Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Deregulated c-fos augments cell proliferation of B cells mediated by lipopolysaccharide

高田，壮豊

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
1994-03-31
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲1241
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001241

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

〔25〕

氏名・（本籍）	高田壮豊（たかだもりあつ）　（大阪府）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	博い第871号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付	平成6年3月31日
学位論文題目	Deregulated c-fos augments cell proliferation of B cells mediated by lipopolysaccharide （c－fos　癌遺伝子発現によるB細胞増殖の検討）
審査委員	主査　教授　斎藤洋一 教授　本間守男　教授　尾原秀史

論文内容の要旨

I．緒　言

プロトオンコジーンであるc-fos遺伝子の産物（以下Fosと略）は細胞の核内で他の遺伝子のプロモーター部分のAP-1領域に結合し、その遺伝子発現を制御することが知られている。静止期のリンパ球においてはc-fosの発現は認められないものの、いろいろな刺激によりc-fosの発現誘導がされる。しかし、リンパ球活性化機構におけるFosの役割は知られていなかった。

最近我々は、マウス主要組織適合抗原遺伝子のプロモーターの支配下にあるc-fos遺伝子からFosを恒常的に発現するトランスジェニックマウス（以下H2-c-fosマウスと略）の脾由来B細胞をリポ多糖類（以下LPSと略）とIL-4の存在下で培養することによりIgG1抗体の産生が低濃度LPSでは亢進するが高濃度LPSでは抑制されることを報告した。このことから、恒常的に発現するFosがLPSを介するB細胞の分化増殖を制御することが示唆されていた。

今回インターフェロンα／β（以下IFNと略）で遺伝子誘導制御が可能なMxプロモーター下にFosが発現する新しいc-fosトランスジェニックマウス（以下Mx-c-fosDと略）と前述のH2−c-fosマウスを用いて、この過剰なFosのLPS刺激におけるB細胞分化増殖における役割の解析を試みた。

II．材料および方法

1）　トランスジェニックマウスの作製

C57BL/6マウスにMxプロモーターおよびH-2K^{b}プロモーターの支配下にc-fos遺伝子を組み換えたトランスジェニックマウスを作製した。

2）　DNA合成能の測定

マウス脾臓由来のリンパ球を抗Thy-1抗体と補体で処理したT細胞を除去した。このB細胞（2.5×10^5/ml）をLPSと共に3日から5日培養した。その後1μCi〔^{3}H〕チミジンを添加し6時間培養し、B細胞のチミジンの取り込みを液体シンチレイションカウンターにて測定し

た。

3) ＩｇＭおよびIgG2b抗体産生の測定

Ｂ細胞（5.0x10^5/ml）をＬＰＳと共に７日培養した。培養上清中のIgMおよびIgG2b抗体の濃度をELISA法にて測定した。

4) RNase protection法によるc-fos RNAの測定

ＬＰＳと共に培養したＢ細胞より粗ＲＮＡをグアニジン法により抽出し、その中のc-fos RNA量をRNase protection法により測定した。

Ⅲ. 結　果

FosのＢ細胞増殖における役割を明らかにするために、H2-c-fosマウスおよびMx-c-fosDマウス由来のＢ細胞を種々の濃度のLPSで刺激し、〔^{3}H〕チミジンの取り込みを調べた。H2-c-fosマウスＢ細胞では培養開始後４日および５日で対照マウスと比べ増殖能の増加を認めた。Mx-c-fosDマウスＢ細胞のＤＮＡ合成はH2-c-fosマウスと比べ全てのＬＰＳ濃度において約20倍増加していた。

トランスジェニックマウス由来のＢ細胞のＬＰＳ刺激に対する細胞増殖増強効果がc-fosの量と比例しているかどうかを調べるために、ＬＰＳ（５μg/ml）刺激12時間後のMx-c-fosDマウスＢ細胞のc-fosＲＮＡの発現量とH2-c-fosマウスＢ細胞のc-fosＲＮＡの発現量をRNase protection法により半定量的に比較した。Mx-c-fosDマウスＢ細胞ではＬＰＳ刺激でＩＦＮによる遺伝子誘導時と同程度の非常に強いc-fos RNAの発現が認められた。この時のc-fos RNA量はH2-c-fosマウスＢ細胞に比し５－10倍多かった。ＬＰＳ刺激下のMx-c-fosDマウスＢ細胞のc-fos RNAの発現を経時的にみると、２日まで強いc-fos RNAの発現が持続していたが、対照マウスではc-fos RNAの発現は認められなかった。

次に、c-fos発現による細胞増殖の増加がＢ細胞による免疫グロブリンの産生能に反映されているかを調べた。H2-c-fosマウスおよびMx-c-fosDマウスＢ細胞をＬＰＳ刺激下で７日間培養しELISA法にて上清中のIgMおよびIgG2b濃度を測定した。IgMの産生は対照マウスに比しMx-c-fosDマウスで約３倍に増加していた。また、IgG2b産生も、対照マウスに比しH2-c-fosマウスでは約３倍さらにMx-c-fosDマウスでは約７倍の産生量の増加を認めた。

Ⅳ. 考　察

Ｂ細胞をＬＰＳで刺激した時におけるFosの量とＤＮＡ合成能はほぼ相関していた。このことから初期Ｂ細胞増殖におけるFosの役割が細胞増殖を促進させるものであることが明らかにされた。線維芽細胞を血清で刺激する時に、抗Fos抗体やアンチセンスRNAを用いてc-fosの量を低下させることによりそのＤＮＡ合成が低下することから、Fosが活性化線維芽細胞における細胞周期亢進に作用することが知られている。ＬＰＳ刺激下のＢ細胞において、Fosの量に依存してＤＮＡ合成が亢進していたことから、Fosが活性化Ｂ細胞での細胞周期亢進の一因となっていることが示唆された。

抗体産生能を調べてみると、IgMおよびIgG2b産生量はc-fosの発現量と相関していた。培養開始４日目の膜表面IgG2b陽性細胞の割合は対照マウスとMx-c-fosDマウスとでほぼ同程度であったことから、IgG2b産生の増加はＢ細胞からIgG2b産生Ｂ細胞へのクラススイッチの亢進によるものではなく、細胞増殖の増加を反映したものと考えられた。

V. 結　語

c-fos トランスジェニックマウス由来のB細胞を用いてＬＰＳ刺激下の細胞増殖能における Fos の役割を検討し、以下の結論を得た。

1、Fos の量に相関してＤＮＡ合成の亢進を認め、細胞増殖の亢進を認めた。

2、免疫グロブリンの産生量も細胞増殖に相関して亢進を認めた。

以上より、活性化B細胞における Fos の生物学的役割として、細胞周期亢進に寄与することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

マウス主要組織適合抗原遺伝子のプロモーターの支配下にある c-fos 遺伝子から Fos を恒常的に発現するトランスジェニックマウス（以下 H2-c-fos マウスと略）の脾由来B細胞をリポ多糖類（以下ＬＰＳと略）と IL-4 の存在下で培養することにより IgG1 抗体の産生が低濃度ＬＰＳでは亢進するが高濃度ＬＰＳでは抑制されることを認めこのことから、恒常的に発現する Fos がＬＰＳを介するB細胞の分化増殖を制御することが示唆されその一連の研究を行って来たが、申請者はさらにインターフェロンα／β（以下ＩＦＮと略）で遺伝子誘導制御が可能なＭＸプロモーター下に Fos が発現する新しい c-fos トランスジェニックマウス(以下 MX-c-fosD マウスと略)と前述の H2-c-fos マウスを用いて、この過剰な Fos のＬＰＳ刺激におけるB細胞分化増殖における役割の解析を試みた。

すなわち、Fos のB細胞増殖における役割を明らかにするために、H2-c-fos マウスおよび MX-c-fosD マウス由来のB細胞を種々の濃度のＬＰＳで刺激し、〔^{3}H〕チミジンの取り込みを調べた。H2-c-fos マウスB細胞では培養開始後 4 日および 5 日で対照マウスと比べ増殖能の増加を認め、MX-c-fosD マウスB細胞のＤＮＡ合成は H2-c-fos マウスと比べ全てのＬＰＳ濃度において約20倍増加していた。

トランスジェニックマウス由来のB細胞のＬＰＳ刺激に対する細胞増殖増強効果が c-fos の量と比較しているかどうかを調べるために、ＬＰＳ（5μg/ml）刺激12時間後の MX-c-fosD マウスB細胞の c-fos RNA の発現量と H2-c-fos マウスB細胞の c-fosRNA の発現量を RNase protection 法により半定量的に比較した。MX-c-fosD マウスB細胞ではＬＰＳ刺激でＩＦＮによる遺伝子誘導時と同程度の非常に強い c-fosRNA の発現が認められた。この時の c-fosRNA 量は H2-c-fos マウスB細胞に比し 5 ～10倍多かった。ＬＰＳ刺激下の MX-c-fosD マウスB細胞の c-fosRNA の発現を経時的にみると、2 日まで強い c-fosRNA の発現が持続していたが、対照マウスでは c-fosRNA の発現は認められなかった。

次に c-fos 発現による細胞増殖の増加がB細胞による免疫グロブリンの産生能に反映されているかを調べた。H2-c-fos マウスおよび MX-c-fosD マウスB細胞をＬＰＳ刺激下で 7 日間培養し ELISA 法にて上清中の IgM および IgG2b 濃度を測定した。IgM 産生は対照マウスに比し MX-c-fosD マウスで約 3 倍に増加していた。また、IgG2b 産生も、対照マウスに比し H2-c-fos マウスでは約 3 倍さらに MX−c−fosD マウスでは約 7 倍の産生量の増加を認めた。

これらの成績から、

(1) Fos の量に相関してＤＮＡ合成の亢進を認め、細胞増殖の亢進を認めた。

(2) 免疫グロブリンの産生量も細胞増殖に相関して亢進を認めた。

との結果を得た。

すなわち、活性化B細胞におけるFosの生物学的役割として、細胞周期亢進に寄与するとの結論が得られた。

本研究はリシパ球活性化機構におけるFosの役割について、ＩＦＮで遺伝子誘導制御が可能な新しいc-fosトランスジェニックマウスを用いて活性化B細胞におけるFosの生物学的役割に関して重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。

よって本研究者は、博士（医学）学位を得る資格があると認める。