



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。



氏名・(本籍)	高 田 壮 豊 (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 ($2.5 \times 10^5/\text{ml}$) を LPS と共に 3 日から 5 日培養した。その後 $1 \mu\text{Ci}$ [^3H] 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ー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 (5.0×10^5 /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、 $[^3\text{H}]$ 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 ($5 \mu\text{g}/\text{ml}$) 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-fos RNA 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L P S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 L P S 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 L P S では亢進するが高濃度 L P S 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 L P S 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 I F N 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 L P S 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 L P S で刺激し、 $[^3\text{H}]$ 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 L P S 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 L P S 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、L P S ($5\mu\text{g/ml}$) 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 L P S 刺激で I F N 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。L P S 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 L P S 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。

本研究はリンパ球活性化機構における Fos の役割について、I F N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。