



## C-fos overexpression in splenic b cells augments development of marginal zone b cells

山下, 公大

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2005-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3365

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003365>

※ 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。



【 91 】

氏 名・(本 籍) 山下 公大 ( 兵庫県 )  
博士の専攻分野の名称 博士 (医学)  
学 位 記 番 号 博い第1644号  
学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当  
学位授与の 日 付 平成17年3月25日

【 学位論文題目 】

c-fos Overexpression in Splenic B Cells Augments  
Development of Marginal Zone B Cells  
(脾臓B細胞におけるc-fosの過剰発現は辺縁体  
B細胞の分化を促進する)

審 査 委 員

主 査 教 授 熊谷 俊一  
教 授 片岡 徹  
教 授 千原 和夫

B細胞は感染早期から免疫反応に寄与するが、この早期反応が成熟B細胞の大部分を占める濾胞B細胞(以下FO-B)ではなく、辺縁帯B細胞(以下MZ-B)によって担われていることが明らかになってきた。すなわち、MZ-Bは、リポ多糖(以下LPS)などに反応し細菌抗原に対する抗体を産生することにより、一次防御反応において重要な役割を果たしている細胞群である。しかし、その機能や分化段階において未だ不明な点が多い。一方、H2-c-fos トランスジェニック(以下H2-c-fos)マウス由来脾臓B細胞はLPSに対して高反応性を示すことがわかっている。そこで、H2-c-fosマウスの脾臓B細胞中のMZ-Bを解析することにより、c-fosのMZ-Bにおける分化や機能における役割を明らかにすることを試みた。

8-10週のH2-c-fosマウスの脾臓B細胞をフローサイトメトリーを用いて解析した。MZ-B(CD21陽性、CD23陰性)の割合及び絶対数はH2-c-fos由来が野生型に比べて2倍以上の増加を示した。一方、FO-B(CD21弱陽性CD23陽性)は絶対数に大きな違いはなかった。組織学的解析ではH2-c-fosマウスにおいて、明らかな構造異常は認めなかった。次にLPS刺激におけるMZ-Bの増殖能及び抗体産生能を解析した。増殖能の評価はチミジン取り込み試験を行った。刺激後H2-c-fos MZ-Bは野生型に比べて増殖能が高かった。7日間培養した後の培養上清のIgMとIgG3をELISA法で測定した。H2-c-fos MZ-Bと野生型のIgM産生は同程度だったが、H2-c-fos MZ-BのIgG3産生は著しく阻害されていた。以上の結果より、H2-c-fosマウスでは、MZ-B内のc-fosの過剰発現により、増殖能の亢進及びIgG3クラススイッチ阻害が誘導されることを明らかにした。

次に、c-fos過剰発現によるMZ-B系統分化への影響を解析した。新生未成熟B細

胞は移行期1型B細胞(以下T1-B IgM強陽性、IgD陰性、CD21陰性、CD23陰性)として同定されたが、骨髓を出てから脾臓に到達し、移行期2型B細胞(以下T2-B IgM強陽性、IgD陽性、CD21陽性、CD23陽性)へと分化する。これらのT2-BはMZ-B前駆細胞(以下MZP-B IgM強陽性、IgD陽性、CD21強陽性、CD23陽性)を含んでおりMZ-B(IgM強陽性、IgD陰性、CD21陽性、CD23陰性)に分化する。この各分化段階でH2-c-fosマウスの脾臓MZ-B系統細胞を評価した。H2-c-fos T2-Bが、野生型よりやや多く、それに含まれるMZP-Bにおいては2倍以上の増加を認めた。しかしながら、MZP-Bを除いたT2-B及びT1-Bの絶対数及び割合はほとんど変わらなかった。以上の結果より、c-fosの過剰発現はT1-BからT2-Bの中のMZP-Bへの分化段階で機能していることが示唆された。

H2-c-fosマウスのc-fos過剰発現によるMZ-B細胞の増多が、B細胞自身によるものか否かを確認するために、H2-c-fos(Ly5.2)及び野生型(Ly5.1)の骨髓より造血幹細胞分画を採取し、放射線照射したLy5.1コンジェニックマウスに共移入骨髄キメラマウスを作成した。移入後8週でMZP-B及びMZ-Bの割合はH2-c-fos(Ly5.2)で多かった。逆に、放射線照射したH2-c-fosマウスに共移入を行っても、移入したH2-c-fos由来のMZ-Bの細胞数が増加していた。さらに、脾臓内での分化増強であることを確認するためにT1-Bを採取し、リンパ球のないRAG2ノックアウトマウスに移入し経時にMZ-B及びFO-Bへの分化した細胞を評価した。移入後7日目まではほとんど違いはなかったが、移入後10日目でH2-c-fosマウス由来のT1-Bを移入した側でMZ-Bの数の増加を確認した。この結果は、MZ-Bの増多が、B細胞自身におけるc-fosの過剰発現による効果であることを支持すると同時に、脾臓内T1-B以降で、MZ-Bの分化の程

度が決定されていることが示唆された。

すことを明らかにした。

次に、脾臓の末梢B細胞の各分画のc-fos過剰発現による生体内細胞増殖の効果を調べるために7日間のブロモデオキシウリジン(以下 BrdU)取り込み試験を行った。

BrdUを含む水をマウスに摂取させ BrdU標識された細胞を摂取させ、開始後、第2日目と第7日目で解析した。BrdU陽性細胞の割合には大きな違いはなかったが、この5日間で入れ替わった細胞数では H2-c-fosマウスにおいて MZP-B 及び MZ-B の絶対数が亢進していた。この結果は、増殖能の亢進ではなく、一定期間における分化してきた細胞数が増加していることを示し、c-fos過剰発現により MZ-B 細胞系統特異的に分化の程度が促進することが示唆された。

これらの分子機構として、分化に関するシグナルでは TNF ファミリー B 細胞活性化因子や Notch2 シグナルが重要であるが、これらのシグナル以上は認められなかった。一方で、過剰な B 細胞受容体信号が、MZ-B 細胞の分化を抑制するという報告がある。B 細胞受容体の最も強い反応性をもつ T2-B 細胞を採取し、B 細胞受容体刺激を行い、その反応性を調べた。ここでは、H2-c-fos T2-B はほとんど増殖能を持たなかった。このことから、c-fos過剰発現による B 細胞受容体シグナルの修飾が MZ-B 細胞の分化の増強に関与している可能性が示唆された。

上記の結果から、1)脾臓 B 細胞における c-fos の過剰発現は生体内で MZ-B 細胞の特異的な增多を誘導すること。2) この MZ-B は、LPS に対し増殖能が亢進しているが、クラススイッチの異常から IgG3 産生が阻害されていること。3) H2-c-fos T2-B における B 細胞受容体への反応性が抑制されていること。などが明らかとなった。

以上より、脾臓 B 細胞における c-fos は、MZ-B 細胞への分化に重要な役割を果た

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第1636号	氏名	山下公大
論文題目	<p><i>c-fos</i> Overexpression in Splenic B Cells Augments Development of Marginal Zone B Cells</p> <p>脾臓B細胞における<i>c-fos</i>の過剰発現は辺縁体B細胞の分化を促進する</p>		
審査委員	主査	熊谷俊一	
	副査	千原和夫	
	副査	片岡徹	
審査終了日	平成17年 2月 2日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

B細胞は感染早期から免疫反応に寄与するが、この反応が成熟B細胞の大部分を占める濾胞B細胞(以下FO-B)ではなく、辺縁帯B細胞(以下MZ-B)が、主な担い手で、細菌性リポ多糖(以下LPS)を含む血管由来の抗原に対する一次防御反応における重要な役割を果たしている。しかし、その機能や分化段階において未だ不明な点が多い。一方、H2-c-fosトランジェニック(以下H2-c-fos)マウス由来脾臓B細胞はLPSに対して高反応性を示すことがわかっている。そこで、脾臓B細胞中のMZ-Bを解析することにより、*c-fos*のB細胞における分化や機能における役割を明らかにすることを試みた。

8-10週の脾臓B細胞のMZ-Bの割合及び絶対数はH2-c-fos由来が野生型に比べて2倍以上の増加を示した。一方、FO-Bは大きな違いはなかった。組織学的解析ではH2-c-fosマウスにおいて明らかな構造異常は認めなかった。LPS刺激における増殖能及び抗体産生能を解析した。刺激後H2-c-fos MZ-Bは野生型に比べて増殖能が高かった。新生未成熟B細胞は移行期1型B細胞(以下T1-B)として同定されたが、骨髄を出てから脾臓に到達し、移行期2型B細胞(以下T2-B)へと分化する。これらのT2-BはMZ-B前駆細胞(以下M2P)を含んでいる。さらに、これらは、MZ-Bに分化する。この分類でH2-c-fosマウスの脾臓MZ-B系統細胞を評価した。H2-c-fos T2-Bが、野生型よりやや多くそれに含まれるM2Pにおいては2倍以上の増加を認めた。一方、M2Pを除いたT2-B及び、T1-Bの絶対数及び割合はほとんど変わらなかった。以上の結果より、H2-c-fosマウス脾臓MZ-B細胞系統は特異的に増加していることがわかった。これらの結果から、*c-fos*の過剰発現はT1-BからT2-Bの中のM2Pへの分化段階で機能していることが示唆された。

H2-c-fosマウスの*c-fos*過剰発現によるMZ-B細胞の増多が、B細胞自身によるものか否かを確認するために、H2-c-fos(Ly5.2)及び野生型(Ly5.1)の骨髄より造血幹細胞分画を採取し、放射線照射したLy5.1コンジェニックマウスとLy5.2 H2-c-fosマウスに共移入骨髄キメラマウスを作成した。移入後8週でM2P及びMZ-Bの割合はH2-c-fos由来で多かつた。放射線照射H2-c-fosマウスに共移入を行っても、同様の結果であった。

さらに、脾臓内での分化増強であることを確認するためにT1-Bを採取し、リンパ球のないRAG2ノックアウトマウスに移入し経時にMZ-B及びFO-Bへの分化した細胞を評価した。移入後7日目まではほとんど違いはなかったが、移入後10日目でH2-c-fosマウスのT1-B

を移入した側で MZ-B 数の増加を確認した。MZ-B の增多が *c-fos* の B 細胞自身における効果であることを支持すると同時に、脾臓内 T1-B 以降で、MZ-B の分化の程度を決定していることが示唆された。

脾臓の末梢 B 細胞の各分画の *c-fos* の効果を調べるために、7 日間のプロモデオキシウリジン(以下 BrdU) 取り込み試験を行った。BrdU を含む水をマウスに摂取させ BrdU 標識された細胞を摂取させ、開始後、第 2 日目と第 7 日目で解析した。BrdU 陽性細胞の割合には大きな違いはなかったが、この 5 日間で入れ替わった細胞数では MZP-B 及び MZ-B の絶対数が、H2-*c-fos* マウスにおいて亢進していた。これは増殖能の亢進ではなく、分化した細胞数の亢進を示すと考えられた。

これらの分子機構として、分化に関するシグナルでは TNF ファミリー B 細胞活性化因子や Notch2 シグナルが重要であるが、これらで説明しうる結果は得られなかった。一方で、過剰な B 細胞受容体信号が、MZ-B 細胞の分化を抑制するという報告がある。B 細胞受容体の最も強い反応性をもつ T2-B 細胞を採取し、B 細胞受容体刺激を行い、その反応性を調べた。ここでは、H2-*c-fos* T2-B はほとんど増殖能を持たなかった。*c-fos* 過剰発現による B 細胞受容体シグナルの修飾が MZ-B 細胞の分化の増強に関与している可能性が示唆された。

本研究は、辺縁帯 B 細胞の分化に焦点をあて *c-fos* 遺伝子の影響を *in vivo* で検討したものであり、*c-fos* 遺伝子の強発現が、生体内で B 細胞内で機能し辺縁帯 B 細胞系統を促進していることを明らかにした最新の知見を得たものとして価値ある業績であると認める。

よって本研究者は、博士(医学)の学位をえる資格があると認める。