

就任講演

Bリンパ球の分化と増殖

村 口 篤

富山医科薬科大学細菌学・免疫学教室

私が阪大医学部の大学院に入学した1970年代後半の免疫学のミステリーの1つは、免疫系が、外来からのあらゆる抗原に対応できる多様性をいかにして獲得するかという問題であった。すなわち、無限と思われる外来抗原にびたりとフィットする抗原レセプター（もちろん当時は Ig が唯一の抗原レセプター）が、どのような仕組みで作られるかということであった。

我々の研究チームは、まずこの研究課題に取り組むことになった。そこで、Bリンパ球が抗原に刺激された後、T細胞のヘルプで細胞増殖が誘導され、クローンの拡大がおきること、この増殖している細胞がT細胞のヘルプで最終的に抗体産生細胞に分化するという仮説を立て、これを分子レベルで証明し行くことに決めた。

まず、Bリンパ球の活性化・増殖についての研究について述べる。多くの試行錯誤の実験を重ねた結果、少しトリッキーな方法を用いてBリンパ球の増殖系を確立することに成功した。それは、低濃度の抗 μ 抗体刺激とT細胞の可溶性因子により、ほとんどのB細胞が増殖すること、しかもこの増殖は簡単にアッセイできるというものである。

そこで、このT細胞由来可溶性因子（BCGFと命名）の同定をしようではないかと考えた。まず、大量にものをつくるという目的でT-Tハイブリドマの作製に果敢に挑戦した。その結果、標準BCGFに比べて非常に高い活性を上清に分泌するハイブリドマ（2B11）を得ることが出来、これを用いてBCGFの精製に取りかかった。精製が進み、N末端のアミノ酸のいくつかを決定するところまで行ったが、この分野は競争が激しく、結局遺伝子クローニングに成功したのは、蛋白の精製に多大の労力を費やした我々ではなく、遺伝子の方からアプローチを

行った分子生物学のグループであった。

クローニングされた IL-4 の cDNA は 153 のアミノ酸をコードし、糖鎖結合部位を 2 個持ち、24 個のシグナル配列があり、概その分子量は 20Kd である。ノザンプロット法による解析の結果、主にヘルパー T リンパ球が IL-4 を産生することが判明した。また、recombinant IL-4 を用いた研究より、B 細胞のみならず肥満細胞の増殖を誘導すること、B 細胞のクラス II 抗原や Fc ϵ 受容体を誘導することが明らかになった。さらに、最近の研究報告では、IL-4 で刺激したマウス脾細胞に 5'S μ と 3'S γ をもつ circular DNA が誘発されることが明らかになった。このことは、遺伝子のレベルで、IL-4 が IgH の C 領域上流にある S 領域間の結合を誘導し、その介在配列が欠失したためにこのような DNA が検出されたと解釈されている。

このように、仕事を開始して7年後に、B細胞の活性化に関与する因子の単離同定がなされ、またその物質はB細胞の増殖とIgクラススイッチに関与することが明らかになった。

次の研究課題は、B細胞の分化因子である。我々は、すでに1978年に、マイトゲン（SAC）で刺激したB細胞に、レクチンで刺激したT細胞の可溶性因子を加えると、B細胞が抗体産生細胞に分化することを見出し、この物質をBCDFと呼んでいた。ATLで腫瘍化したTリンパ球腫瘍細胞（NaI）がBCDFを産生していることを見だし、この細胞の大量培養を行い、約100 ℓ の培養液から種々のカラムを用いて、ほぼ均一になるまで精製した。精製蛋白よりN末端のアミノ酸配列を決定、合成プローブを作製し、Tリンパ球より作ったcDNAライブラリーより、BCDFをコードする遺伝子をクローニングすることに成功した。

遺伝子の染色体構造は5つのエクソンからなり、コード領域は212個のアミノ酸をコードし、分子量は概そ21Kdであると推測される。染色体構造および塩基配列がG-CSFに類似していることから、BCDFとG-CSFはおそらく共通の祖先遺伝子をもつのではないかと思われた。BCDFはクローニングされ分子構造が決定されたので、以後IL-6と呼ばれる。ノザンプロットの解析結果から、IL-6は予想に反して、Tリンパ球以外の多くの細胞、マクロファージや内皮細胞、さらに脳にあるグリア細胞や星状細胞などが産生することが明らかになった。

IL-6のもう1つの話題は、IL-6と腎炎のかかわり合いである。泌尿器からきた学生がいて一緒に行った研究であるが、MPGNという病気(病理組織学的に糸球体のメサンギウム細胞増殖を特徴とする腎炎)があり、彼はメサンギウム(M)細胞の増殖にIL-6が関与しているに違いないと思った。彼は実験を行い、IL-6がラットM細胞を誘導すること、一方M細胞はIL-6を産生分泌することをみごとに実験的に証明した。これらの結果は、IL-6がM細胞のautocrine増殖因子であり、その発現異常がMPGNの発症に起因する可能性を示す貴重な研究結果である。

In vitroでのIL-6の生物学的活性は実際にin vivoでの活性を反映しているのであろうか? この疑問に答えるために、トランスジェニック(Tg)マウスの作製を行った。E μ のエンハンサーにヒトgenomic IL-6を連結したconstructを構築し、マウス受精卵に打ち込み、Tgマウスを作った。その結果、いくつかの興味あるデータが得られた。まず、血清中Ig(IgG)レベルが対照群マウスのそれに比し約100倍の高値であることである。次に、Tgマウスのほとんどに蛋白尿がみられるということである。

組織学的には2つの重要な所見が見られた。まず、骨髄におけるプラズマ細胞の異常増殖である。サザンプロット解析の結果、これらの細胞はポリクロナルであることが証明された。次に、腎臓においては、糸球体のM細胞の著しい増殖が見られ、MPGNが発症していることが確認された。

このように、in vitroのみならず個体レベルでも、IL-6は、抗体産生の調節、M細胞増殖の調節をしていることが明らかになったわけである。さらに、

世界の多くの研究者によりIL-6の実に多彩な生物学活性が証明された。たとえば、肝細胞における急性期蛋白の合成や神経細胞の分化誘導能等である。

このようなIL-6のきわめて多彩な生物学的活性は、研究をスタートした10年前に我々が想像できなかったことである(これが研究らしさとも考えられる)。それから5年になるが、さらにIL-6の研究が進み、IL-6レセプターの構造や、IL-6遺伝子の発現調節機構が明らかになりつつある。このように、BCDF/IL-6はリンパ球の分化因子として研究が始まったにも拘らず、いまではさらにブロードな分野での細胞増殖分化因子として研究が深められている。

さて、最近私が取り込んでいる研究テーマは、リンパ球の発生機構である。血液幹細胞からリンパ球へのコミットについては、ほとんど謎に包まれている。現時点では、リンパ球へのコミットとは、IgやTCR遺伝子の再構成がおきることであると解釈されよう。我々の極めて素朴な疑問は、リンパ球幹細胞がどのようなシグナルで再構成(VDJ)を開始するのであろうかということである。

まず、in vitroでの実験系を確立するために、極めて未熟細胞があると思われる若い胎児の肝細胞からリンパ球系細胞を単離し、EBVで形質転換を行い、いくつかの細胞株を得た。遺伝子解析の結果、ほとんどの細胞株のIg遺伝子はgerm line(再構成していない)であることが解った。

このように、目的とするlymphoid progenitor細胞株が得られたので、2つの問いかけをした。それは、(1)再構成が起きる前にIgH鎖の染色体構造変化が起きるか? (2)この段階でrecombinase activityを持つか? というものである。実験を行い、(1)についてはJHとC μ の間にあるエンハンサー部位に一致して、DNase 1に対する高感受性部位が存在することが証明した。このことは、再構成前にすでにクロマチン構造が変化し、その部位に酵素が接近しやすくなる機構が存在することを示すものである。組み換え酵素については、recombinase substrateを用いた実験で、IgH鎖の再構成まえにすでに細胞はrecombinase activityをもつことが証明された。

最近(1990年)、組み換え酵素活性をもつ遺伝子がクローニングされた。そこで、この遺伝子を用いて、我々のlymphoid progenitorにRAGの発現がある

かを検討した。ノザン解析の結果、クローンの3つに RAG の発現が認められた。このことは、前述の実験結果、すなわち、lymphoid progenitor の段階ですでに組み組え活性が発現していることを裏付ける結果となった。

次に RAG を発現していないクローンを用いて、何かの刺激で RAG が誘導されないかと種々の実験を行った。その結果、IL-2/IL-7 などのサイトカインにより RAG が誘導された。現在、この系を用いて RAG の発現を誘導する物質を同定しようとしている。また、レセプターからのシグナルが何かという問いかけに対して実験を行い、この細胞株を Forskolin (adenyl cyclase activator) や db-cAMP で刺激すると RAG が発現することを見だし、シグナルの second messenger は cAMP であることを示した。

現在、リンパ球の発生機構 (lymphopoiesis) につ

いては研究が始まったばかりである。紹介したように、我々は、RAG の系を用いてリンパ球のコミットを行う分子のクローニングを目指している。おそらく、10年後いや5年後には、どのようなシグナルでリンパ球のコミットがおきるかが分子レベルで明らかになると思う。そのことにより、SCID などの免疫不全症の病態がわかり、その疾患の治療が可能になるし、また CD4 陽性 T 細胞のみが減少する AIDS、現在世界中で猛威を奮っている恐ろしい病気、AIDS の治療への道が開ける可能性もある。

「免疫学は、免疫のしくみを知り、それを用いて病気をなおす学問である」という故山村雄一先生のお言葉を胸に、若い力をここに結集し、免疫学の研究を展開する所存である。最後に本日の講演内容は大阪大学細胞工学センターおよび佐賀医大時代の多くの勤勉で優秀な研究者の研究成果をまとめたものであり、ここに深謝する。