

主論文の要旨

A proliferation-inducing ligand sustains the proliferation of human naïve (CD27⁻) B cells and mediates their differentiation into long-lived plasma cells *in vitro* via transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor and B-cell mature antigen

A proliferation-inducing ligand は transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor と B-cell mature antigen を介してヒト由来ナイーブ B 細胞の長期生存型形質細胞への分化を支える

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻

生物化学講座 分子生物学分野

(指導: 門松 健治 教授)

松田 佳子

(緒言)

長期生存型形質細胞は液性免疫系の維持において重要な役割を果たしている。ヒト由来メモリ - B 細胞は *in vitro* において長期生存型形質細胞への分化が確認されている。一方、ヒト由来ナイ - ブ B 細胞においては形質細胞の特異的マ - カ - である CD138 抗原の発現は確認されているが長期生存型形質細胞への分化は確認されていない。よってマウスモデルにおいて骨髓内形質細胞への分化への効果が報告されている A proliferation - inducing ligand (APRIL) を *in vitro* でヒト由来ナイ - ブ B 細胞培養条件に添加することとした。結果 APRIL は *in vitro* で transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor (TACI) を介してヒト由来ナイ - ブ B 細胞のクラススイッチもしくは B - cell mature antigen (BCMA) を介して形質芽細胞から成熟化形質細胞への分化に重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに *In vitro* におけるヒト由来ナイ - ブ B 細胞から長期生存型形質細胞分化への系は長期生存型形質細胞分化、生存維持における新たな知見をもたらすことが期待できる。

(序論)

APRIL は tumor necrosis factor (TNF) family に属しており、B 細胞の分化増殖や生存に関与している。また APRIL は TACI もしくは BCMA を介して特に B 細胞の分化後期に影響を及ぼす、さらには炎症や自然免疫に関与することが報告されている。実際には APRIL のヒト B 細胞分化への影響、特に形質細胞に対する作用機序については十分には解明されていない。そこで我々は APRIL を *in vitro* ヒト由来ナイ - ブ B 細胞培養系に添加し、効果を確認することとした。結果、ヒト由来ナイ - ブ B 細胞は高い IgG 産生能を有し、DNA 合成能を有しない形質細胞まで分化することが確認できた。

(対象と方法)

健康人 10 人から末梢血 B 細胞を採取し、単核球から negative selection により、分離した B 細胞をさらに CD27⁻ ナイ - ブ B 細胞と CD27⁺ メモリ - B 細胞に分離した。培養条件は IL - 21, CpG - ODN, CD40 ligand, Anti - His を基本条件に加え、さらに APRIL もしくは BAFF を添加した。B cell receptor (BCR) の刺激には抗 IgM 抗体を加えた。ナイ - ブ B 細胞の分化、クラススイッチ、APRIL レセプタ - の発現レベルは FACS にて解析した。またナイ - ブ B 細胞からの IgG、IgM 産生量については ELISA アッセイで測定し、形質細胞の DNA 合成能については BrdU アッセイにて査定した。CD27 陰性 B 細胞にメモリ - B 細胞が含まれていないことの確認には IgHV 領域での体細胞突然変異が存在しないことをもって証明した。

(結果)

BAFF と APRIL のナイ - ブ B 細胞への影響を比較すると BAFF 添加条件では APRIL と異なり、ナイ - ブ B 細胞は成熟化した形質細胞まで分化誘導されなかった。一方、APRIL 添加条件ではナイ - ブ B 細胞は培養 21 日目までに DNA 合成能を喪失し、高い

IgG 産生能を有する形質細胞にまで分化誘導された。さらに APRIL レセプターである TACI、BCMA を中和抗体でブロックした結果、これらのレセプターを介して APRIL はナイーブ B 細胞の長期生存型形質細胞への分化に重要な役割を果たすことが示唆された。

(結論)

ヒト由来メモリ - B 細胞の長期生存型形質細胞への分化は *in vitro* ですでに報告されているがナイーブ B 細胞においては Huggins らが CD138 抗原の発現までは確認しているが長期生存型形質細胞への分化はまだ確認されていない。

末梢血 B 細胞は CD27⁻ ナイーブ B 細胞と CD27⁺ メモリ - B 細胞から構成されるとの報告があるが我々はナイーブ B 細胞を CD27 陰性のみでなく、IGHV 領域における体細胞突然変異の有無においても確認した。さらにナイーブ B 細胞を 28 日間培養し、それらの培養後細胞の IgHV 領域での体細胞突然変異の有無も確認し、変異は認められなかった。よってメモリ - B 細胞でなくナイーブ B 細胞由来の形質細胞が培養 28 日目にも生存維持されていることを確認した。

ついで BAFF と APRIL の *in vitro* でのナイーブ B 細胞への効果を比較検討した。これらのサイトカインのレセプターとして BAFF receptor (BAFF - R)、TACI、BCMA が存在する。TACI と BCMA は両サイトカインに結合し、TACI は胚中心 B 細胞で高発現し、BCMA は形質細胞で発現が上昇する。さらに BCMA ノックアウトマウスでは骨髄内での形質細胞数がワイルドタイプに比べて有意に少ないことから BCMA を介したシグナルが形質細胞の長期生存に関与することが示唆されている。

我々は APRIL 添加条件下でナイーブ B 細胞が *in vitro* で 56 日間生存維持されることを確認した。ナイーブ B 細胞から形質細胞への分化、形質細胞の成熟化については細胞表面での CD138 発現量と IgG 産生能の増加で証明し、さらに mRNA レベルでも形質細胞への分化を確認した。しかし分化誘導された形質細胞が長期生存型形質細胞であることをさらに証明する必要があった。よって培養 21 日目に Ara - C を添加し、DNA 合成能を喪失した形質細胞が培養 56 日目にも生存維持されていることを確認した。また APRIL レセプターの役割を確認するためにこれらのレセプターに対する中和抗体を加えた。BCMA に対する中和抗体を培養 14 日目に加えると培養 25 日目に形質細胞数がコントロール群と比べ有意に減少していた。さらに FACS にて形質芽細胞から形質細胞への分化が抑制されていることが示唆された。一方 TACI に対する中和抗体を培養 14 日目に添加したところ、ナイーブ B 細胞のクラススイッチが抑制された。最後に成熟化形質細胞への APRIL の生存維持効果を確認するためにナイーブ B 細胞を APRIL 添加条件下で 21 日間培養し、抗 APRIL 抗体を追加し 14 日間培養を行った。FACS にて培養後細胞を解析した結果、抗 APRIL 抗体添加群においても非添加群と比べ、形質細胞分画が同様に維持されていた。

(結語)

APRIL は TACI を介してヒト由来ナイーブ B 細胞のクラススイッチに BCMA を介して形

質芽細胞から形質細胞への分化に重要な役割を果たしている。また一旦成熟化形質細胞に分化後は APRIL 非存在下でも生存が維持されることが示唆された。