

Thesis

T細胞特異的c-Mafトランスジェニックマウスにおける B細胞増多メカニズムの解析

臨床医学研究系 内科学

高松 真裕子

【目的】これまでの解析から、T細胞特異的 c-Mafトランスジェニック (Tg) マウスの脾臓では野生型 (WT) マウスに比べB細胞の比率が著増していることが判明している。今回このメカニズムを解析した。

【方法】c-Maf TgマウスでB細胞が増多するメカニズムとして以下の仮説が考えられる。仮説①使用したマウスはT細胞特異的 (CD2プロモーターの支配下) にc-Mafが強制発現するマウスであるが、B細胞にもc-Mafがある程度発現しており、B細胞がc-Mafの影響を受けて増加する (能動的増加)。仮説②c-Maf TgマウスのT細胞が、例えば濾胞性ヘルパー T (Tfh) のような細胞として機能し、B細胞分化を誘導し、その結果としてB細胞が増加する (T細胞による指令)。仮説③c-Maf TgマウスでT細胞が減っていることにより、そのスペースを埋めるためにB細胞が増加する (受動的増加)。これら3つの機序は互いに対立するものではなく、複数の機序が共存している可能性もある。これらの内での機序が関与しているかを明らかにするため、骨髄キメラマウスを利用した競合実験 (competition assay) を行った。またc-MafはTfh細胞の分化に重要であることが報告されているため、ヒツジ赤血球を腹腔内投与したマウスを用いてフローサイトメトリー (FCM) および免疫組織染色を行いTfh細胞や活性化B細胞を解析した。

【結果および考察】competition assayにより能動的増加の可能性は否定的であった。興味深いことに、c-Maf Tg由来のT細胞はWTのT細胞存在下では末梢に存在できず、胸腺の分化段階で消失していることが示された。FCMではTfhマーカーを持っている細胞の比率がc-Maf Tgマウスで有意に増加していたが、活性化B細胞の比率は増加していなかった。このことから、T細胞による指令は否定的であった。competition assayでみられたc-Maf TgマウスでのT細胞分化障害について胸腺細胞の解析を行い、DN4分画においてTCR β 鎖発現の低下を認めた。このことからc-Maf TgのT細胞分化障害は β セレクションの障害である可能性が考えられた。

【結論】T細胞特異的 c-Maf TgマウスのB細胞増多のメカニズムは胸腺におけるT細胞の分化が障害され、末梢のT細胞が減少していることに基づく受動的増加と考えられた。

緒言

【1】ヘルパー T細胞のサブセット

胸腺において分化するリンパ球であるT細胞は、抗体産生細胞であるB細胞と共に、獲得免疫応答において中心的な役割を果たす。胸腺で分化した後に末梢に出るT細胞はCD4分子陽性のヘルパー T (helper T, Th) 細胞とCD8陽性の細胞傷害性 T (cytotoxic T, Tc) 細胞に大別できる。ヘルパー T細胞は、元々はB細胞の抗体産生を「助ける」細胞として命名されたが、外部の

環境に応じていくつかのサブセットに分化することが知られるようになった。古くから知られているのは1986年にMosmannらが報告したTh1細胞とTh2細胞である¹⁾。

Th1細胞はサイトカインの1種インターフェロン (interferon, IFN) - γ を産生することでマクロファージを活性化し、細胞内に寄生するタイプの病原体 (原虫、ウイルスや抗酸菌など) を排除する (細胞性免疫)。Th2細胞はインターロイキン (interleukin, IL) - 4などを産生し、B細胞を活性化 (液性免疫)。これらの2種類のサブセットは共通の前駆細胞から分化するが、お互いに分化を阻害し合う排他的な性質を

持っている。このため、一旦 Th1/Th2 のバランスが崩れるとそれが更に拡大する可能性があり、これが膠原病など自己免疫疾患の原因となりうると考えられてきた。

2000 年代に入って第 3 のエフェクター Th サブセットとして Th17 細胞が提唱された^{2,3)}。これは IL-17 を産生することにより好中球応答を増強するサブセットと考えられており、その分化には IL-6 と TGF- β が、また増殖および活性化に IL-23 が必要であることが報告されている⁴⁾。

一方、リンパ節のリンパ濾胞に存在する CXCR5 陽性の Th 細胞が発見され、濾胞性 Th 細胞 (follicular Th cell, Tfh cell) と呼ばれている^{5,6)}。リンパ濾胞で B 細胞と相互作用することで抗体産生に重要であると考えられている。この Tfh 細胞と Th1/Th2/Th17 細胞の関係は不明な点が多いが、従来抗体産生 (液性免疫) の主役と考えられてきた Th2 細胞が今ではアレルギー応答に重要であり、液性免疫を制御するのは Tfh 細胞であると考えられるようになってきている⁷⁾。

【2】Th 17 細胞のトランスクリプトーム解析

Th1/Th2/Th17 細胞は周囲のサイトカイン環境に応じて分化するため、試験管内 (in vitro) でもその分化を再現することが出来る。すなわち IL-12 と抗 IL-4 抗体の存在下では Th1 細胞、IL-4 と抗 IFN- γ 抗体では Th2 細胞、IL-6 と TGF- β 、抗 IFN- γ 抗体と抗 IL-4 抗体の存在下で Th17 細胞が分化する。これらの細胞を経時的にサンプリングしトランスクリプトーム解析を行い、佐藤らは従来報告されていた Ror γ t⁸⁾ および Ror α ⁹⁾ に加えて、Th17 細胞分化で最も強く誘導された転写因子の 1 つとして c-Maf を見いだした¹⁰⁾。CD2 プロモーターを利用した T 細胞特異的 c-Maf トランスジェニック (Tg) マウスを解析したところ、予想通り IL-17 産生が亢進していたが、意外なことに野生型 Th 細胞はそのほとんどがナイーブ細胞の表面マーカー (CD62L^{high} CD44^{low}) を発現しているのに対して、c-Maf Tg Th 細胞はそのほとんどがエフェクター/メモリー細胞の表面マーカー (CD62L^{low} CD44^{high}) を持つことが明らかとなった。このことからエフェクター/メモリー Th 細胞の分化における c-Maf の重要性が示唆された。

【3】転写因子 c-Maf

Maf はニワトリに腫瘍を引き起こすレトロウイルスの癌遺伝子として日本で同定され¹¹⁾、その腫瘍の名称 (筋腱膜線維肉腫 (musculoaponeurotic fibrosarcoma)) から Maf 遺伝子と命名された。Maf ファミリーは塩基性領域とロイシンジッパー構造 (b-zip 構造) を持つ DNA 結合蛋白質で、2 つのグループに分けられ、転写活性化能の無い小 Maf サブファミリー (MafK, MafF, MafG) と転写活性化領域を保持した大 Maf サブファミリー (c-Maf, MafA, MafB, Nrl) に大別されている。Maf ファミリーは様々な臓器や細胞に

分布しており、その役割は多様である。

大 Maf サブファミリーの一つである c-Maf は Th2 細胞特異的に発現される転写因子として報告された¹²⁾。その後 c-Maf 欠損 (knockout, KO) マウスの解析で、IL-4 以外の Th2 型サイトカイン産生には影響を与えないことが示された¹³⁾が、最近 Th2 細胞以外の T 細胞やマクロファージへの関与が明らかになってきている¹⁴⁻¹⁶⁾。c-Maf は生存に必須であり、c-Maf KO マウスは出生前後に死亡する¹⁷⁾。また、c-Maf は水晶体分化や骨芽細胞分化にも必須である¹⁷⁻¹⁹⁾。また先述のように c-Maf Tg マウスの Th 細胞のほとんどがエフェクターメモリー細胞の表面抗原を持つことから、リンパ球の分化における c-Maf の重要性が示唆される。

【4】c-Maf Tg マウス脾細胞における B 細胞増多

今回の c-Maf Tg マウスの解析の過程で、興味深いことに脾細胞中の B 細胞が著増していることが見いだされた。本研究の目的はその B 細胞増多のメカニズムを明らかにすることである。

B 細胞が増多する原因として、我々は以下の 3 つのメカニズムを考えた。

- ① 使用したマウスは CD2 プロモーターを利用した T 細胞特異的に c-Maf が強制発現するマウスであるが、B 細胞にも c-Maf が逸脱して発現しており、B 細胞が c-Maf の影響を受けて増加する (能動的増加)。
- ② c-Maf Tg マウスの T 細胞が、例えば Tfh のような細胞として機能し、B 細胞分化を誘導し、その結果として B 細胞が増加する (T 細胞による指令)。
- ③ c-Maf Tg マウスで T 細胞の数が減っていることにより、空いたスペースを埋めるために B 細胞が増加する (受動的増加)。

ただし、これら 3 つの機序は互いに対立するものではなく、従って複数の機序が共存している可能性もある。

これらの内でどの機序が関与しているかを明らかにするため、骨髄キメラマウスを利用した競合実験を計画した。この実験には congenic marker である Ly5.1 (CD45.1), Ly5.2 (CD45.2) を利用した。すなわち c-Maf Tg マウス (あるいは同腹の WT マウス) 由来の血液細胞は Ly5.2 陽性であり、Ly5.1 マウスは Ly5.1 陽性の血液細胞を持つマウスであるため、両者は特異抗体により区別が出来る。具体的には、Ly5.2 陽性の c-Maf Tg マウス (あるいは同腹の WT マウス) の骨髄血と、Ly5.1 陽性のマウスの骨髄血を 1:1 で混合し、X 線照射後の Rag-2 欠損マウス (recombinase activating gene 2 の欠損により、末梢 T/B 細胞を欠損する) に移入するものである。このキメラマウスの末梢に出現する T 細胞や B 細胞は donor マウスの造血幹細胞由来ということになる。それぞれの仮説で考えられる結果は以下の様である (Fig. 1)。

仮説①の場合は B 細胞に発現した c-Maf によって

内訳ではc-Maf Tgマウス由来のLy5.2陽性細胞の占める割合は低いはずである.

【マウス】

C57BL/ 6 マウス (B6 マウス) は CLEA Japan (Tokyo, Japan) または Charles River Laboratories Japan, INC. (Yokohama, Japan) より購入した. B6 バックグラウンドの c-Maf Tg マウスは筑波大学大学院人間総合科学研究科 解剖学・発生学研究室高橋智教授より供与を受けた²⁰⁾. Rag2 KO マウスは Taconic (NY, U.S.A.) より, B6. Ly5.1 コンジェニック マウスは Sankyo Labo Service Corporation, INC. (Tokyo, Japan) より購入. 実験動物の使用については, 当施設内の

仮説③の場合は、WTマウス由来のT細胞により、T細胞の不足は起こらないはずであるからリンパ球全体でのB細胞の増多は起こらない。さらにT細胞中の

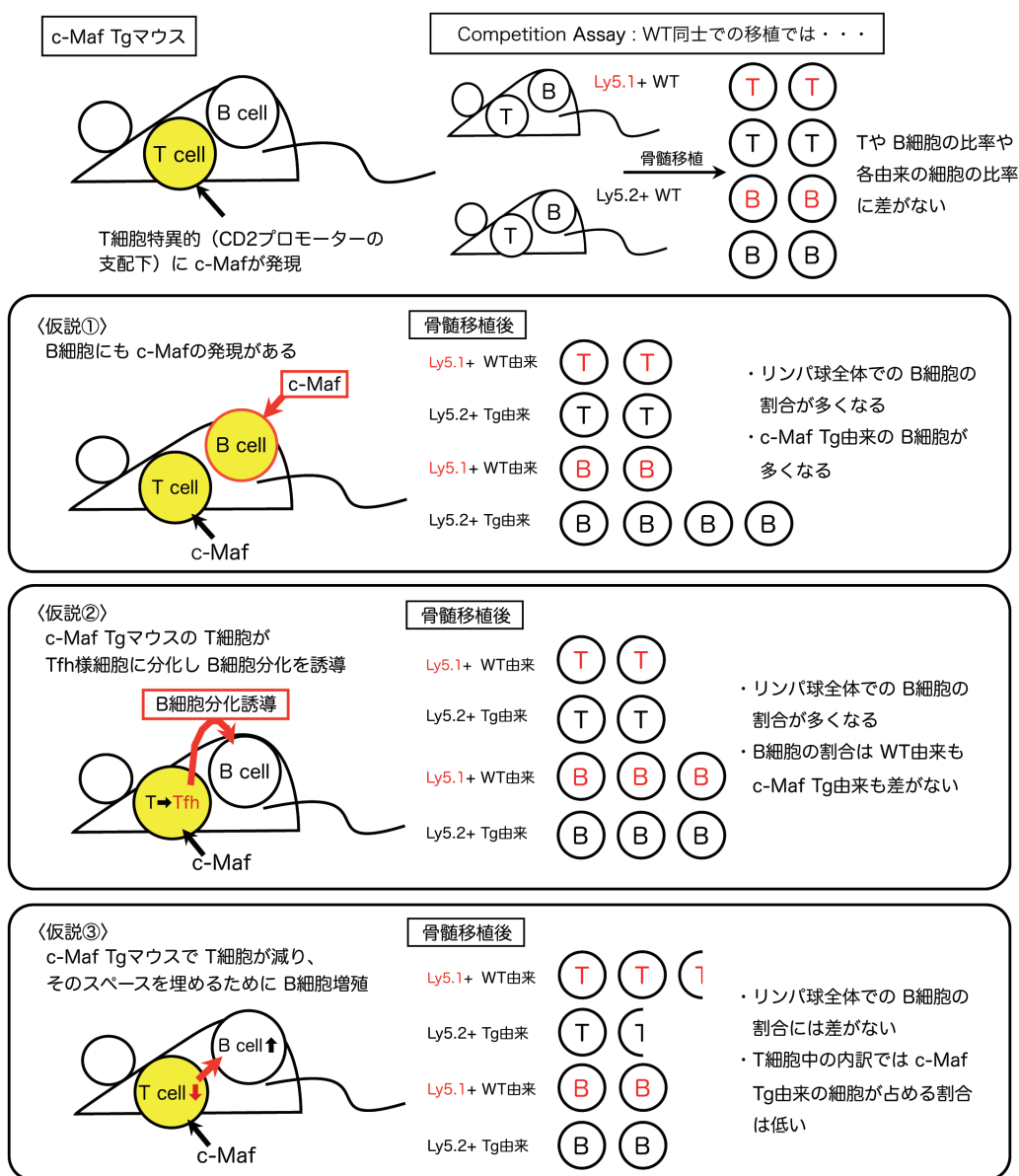


Fig. 1. c-Maf TgマウスでB細胞が増加するメカニズムの仮説.

動物実験委員会の承認(承認番号904号)を得た。

【細胞】

脾細胞はマウスより脾臓を摘出し、その脾臓をワイヤーメッシュ(線径0.1 mm, 100 m/s)上ですりつぶし通過させることにより細胞浮遊液を得た。1200 rpm, 4分間遠心し上清を除き、ペレットに溶血バッファー(BD bioscience, CA, U.S.A.)を加えて懸濁し、赤血球を溶血した。PBSを添加し1200 rpm, 4分間遠心し上清を除くことを2回洗い洗浄した細胞を解析に用いた。

胸腺細胞は脾細胞と同様に調整したが、溶血処理はしていない。

骨髓細胞は、マウス的大腿骨を摘出し、その大腿骨の骨髓腔に23 G注射針付きのシリンジを用いて洗い出すことで細胞浮遊液として単離し、その細胞浮遊液を1200 rpm, 4分間遠心し上清を除き、PBSで2回洗浄した。

【抗体・試薬】

FITC 標識ラット抗マウスCD4モノクローナル抗体, PE 標識ラット抗マウスCD44モノクローナル抗体, PE-Cy7 標識ラット抗マウスCXCR5モノクローナル抗体, APC 標識ラット抗マウスCD62Lモノクローナル抗体, APC-Cy7 標識ラット抗マウスCD4モノクローナル抗体, FITC 標識ラット抗マウスGL7モノクローナル抗体, PE 標識ラット抗マウスB220モノクローナル抗体, PE-Cy7 標識アルメニアンハムスター抗マウスFASモノクローナル抗体, APC 標識マウス抗マウスCD45.1モノクローナル抗体, APC-Cy7 標識ラット抗マウスCD8モノクローナル抗体, FITC 標識ラット抗マウスCD8モノクローナル抗体およびPE-Cy7 標識ラット抗マウスCD25モノクローナル抗体はBD Pharmingen (CA, U.S.A.) より購入した。Alexa Fluor 488 標識ラット抗IgDモノクローナル抗体, FITC 標識ハムスター抗ICOSモノクローナル抗体およびFITC 標識ハムスター抗マウスLineageモノクローナル抗体カクテルはBioLegend (CA, U.S.A.) から購入。PNA Alexa Fluor 594はInvitrogen (CA, U.S.A.) から購入。

【フローサイトメトリー (FCM)】

細胞を20分間各種抗体で染色した後、PBSで2回洗浄した。死細胞は7-amino-actinomycin D (7AAD) (BD Pharmingen) により染色した。BD FACSCanto II フローサイトメーター (BD Japan, Tokyo, Japan) を使用して解析した。

【ELISA】

マウスの血清を用い、以下の製品のプロトコールに従って行った。Mouse IgG, IgA, IgM ELISA Quantitation Set (Bethyl Laboratories, TX, U.S.A.) を用いてIgG, IgA, IgMを測定した。

【骨髓キメラマウスの作成】

X線(7 Gy)照射したC57BL/6. Rag2 KOマウス(8-12

週齢)に、WTおよびc-Maf Tgマウスより調製した骨髓細胞(2×10^6 cells/mouse)を尾静脈より静注し、骨髓キメラマウスを作製した。骨髓移植8週後以降にその脾細胞および胸腺細胞を解析した。

【ヒツジ赤血球 (SRBCs) 免疫】

マウス腹腔内に 2×10^9 個のSRBCs (Saitama Experimental Animals Supply Co., Ltd., Saitama, Japan) を投与し8日後に脾細胞を単離し解析に用いた²¹⁾。

【免疫蛍光組織染色】

マウスより脾臓を摘出し、Tissue-Tek® O.C.T. Compound (Sakura Finetek Japan Co., Ltd., Tokyo, Japan) で包埋後、液体窒素で凍結し凍結ブロックを作成した。この凍結ブロックをクリオスタットLeica CM 1900 (Leica, Wetzlar, Germany) を用いて10 μ mの厚さに薄切し、切片をMASコートスライドガラス (Matsunami Glass Ind., Ltd., Osaka, Japan) に貼付け、室温で1時間以上風乾した。乾燥後室温でアセトン固定をした後、1% BSAにて30分間ブロッキングを行った。PBSで洗浄後、抗体を室温で30分間反応させた。反応後PBSで洗浄し、SlowFade® Gold Antifade Reagent (Invitrogen) にて封入した。

結 果

【1】c-Maf TgマウスとWTマウスの脾臓におけるT/B細胞の比率と、絶対数

マウスの1個体当たりの脾細胞数は図のようにWTマウスに比べてc-Maf Tgマウスでは有意差はなかった (Fig. 2A)。その内訳はWTマウスに比べてc-Maf TgマウスではCD4, CD8 T細胞は割合が減少し、B細胞が増加しており (Fig. 2B), それぞれ有意差があった (Fig. 2C)。マウスの血清中の免疫グロブリンIgG, A, MをELISAで測定したところ、平均値ではc-Maf Tgマウスの方で増加しているようにみえたが、個体差によるばらつきが大きく有意差は出なかった (Fig. 2D)。

【2】骨髓キメラマウスの解析結果

標識マーカーのみが異なるWTマウス同士の移入群では、脾細胞中のB細胞の割合は平均 $63 \pm 7\%$ 程度であり、通常のWT単独でのB細胞の割合と差がなく、予測通りの結果であった。また、各細胞におけるLy5.1陽性細胞とLy5.2陽性細胞の割合も予測通り有意差なく1:1程度に存在していた(コントロール実験; 図は省略)。

c-Maf Tgマウスのdonor細胞を混ぜた群では、脾細胞中におけるB細胞の割合には有意差がなく、B細胞の割合はコントロールと変わらない結果であった (Fig. 3A, B)。各細胞の内訳では、B細胞はc-Maf Tgマウス由来のLy5.2陽性細胞はWTマウス由来のLy5.1細胞とほぼ同数で有意差は見られなかった。また意外なことにT細胞にはc-Maf Tgマウス由来のLy5.2陽性細胞がほとんど存在しなかった (Fig. 3C, D)。

以上より、脾細胞中のB細胞が増えていないことから、仮説①は否定された。②も否定的と考えられたが、T細胞はWT細胞共存下ではc-Maf Tgの細胞はほとんど存在していないことから仮説②の検証はこの実験系ではできない可能性が示唆された。

【3】脾細胞におけるTfh細胞の解析

リンパ濾胞を刺激するためにSRBCsを投与し、その前後で脾細胞の表面マーカーの発現をFCMで解析した。Tfh細胞にあたるICOS^{high} CXCR5^{high}のポピュレーションはSRBCs投与によってWTでは約2%から約4%に増加し、それに対し、c-Maf Tgマウス

では約14%から約40%に増加していた(Fig. 4A)。このことからc-Maf TgマウスではTfh細胞のポピュレーションが増加していることが示唆された。次にTfh細胞によって分化誘導される活性化B細胞のポピュレーションもFCMにより解析した。WTマウスとc-Maf TgマウスそれぞれSRBCs投与による活性化B細胞の増加はみられたが、その増加率はWTマウスとc-Maf Tgマウスで有意な差はみられなかった(Fig. 4B)。これはB細胞増多のメカニズムとして仮説②は考えにくいことを示唆する。

また脾臓の組織で凍結切片を作成し、B細胞の指標

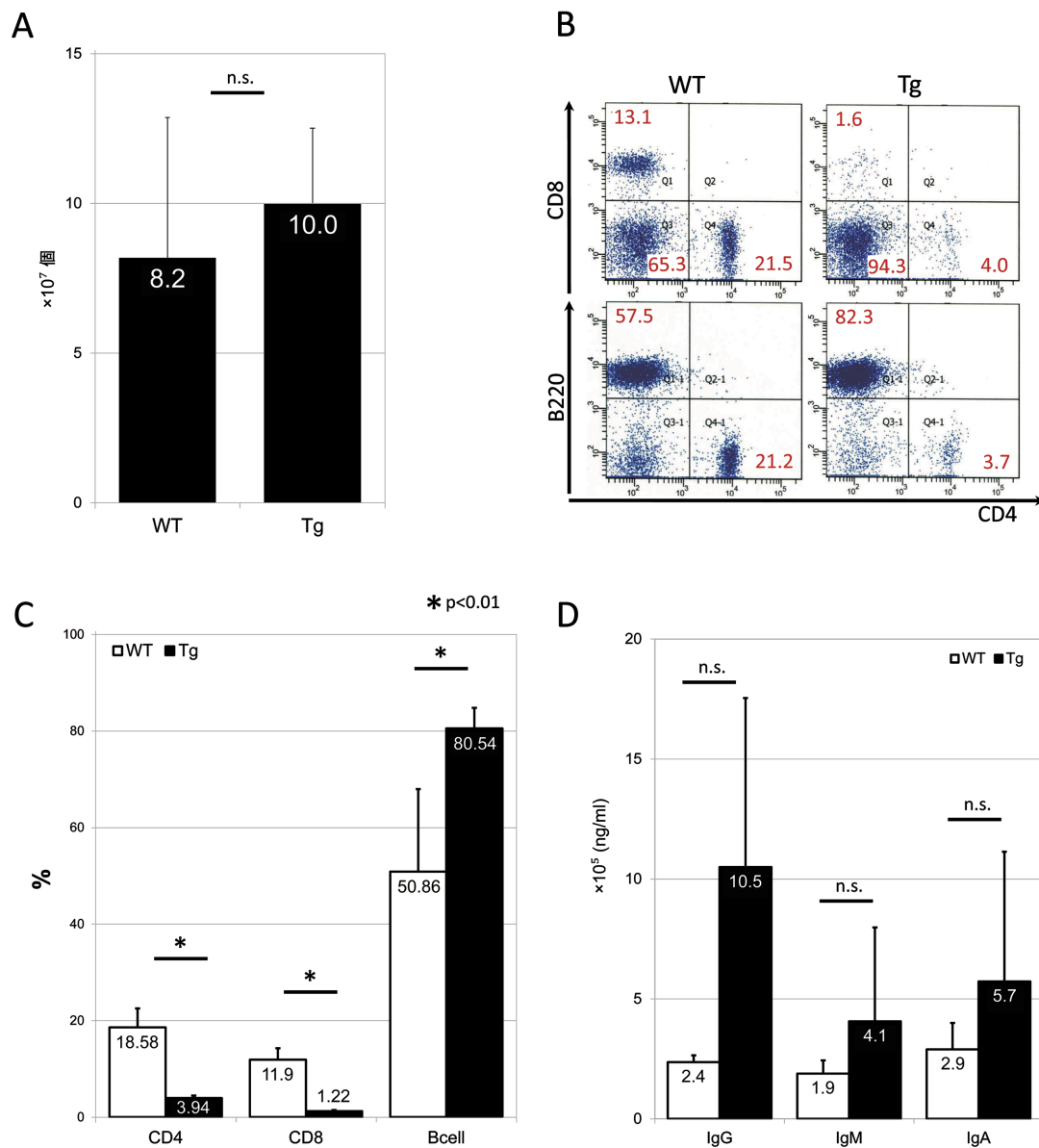


Fig. 2. コントロール (WT) マウスと c-Maf トランスジェニック (Tg) マウスの解析。A: 脾細胞数 (N = 4)。各マウスの脾臓から脾細胞を単離し、チュルク液で染色しセルカウントした。B: 脾臓におけるTおよびB細胞の比率。各マウスの脾臓からそれぞれ脾細胞を単離しFCMで解析した。データは独立した3回の実験の典型例を示す。C: Fig. 2Bの独立した5回の実験の平均±標準偏差を示す。D: 血清のグロブリン量 (N = 4)。各マウスの血清をELISAで測定した。

となるIgDおよび濾胞の胚中心が染まるPNAで染色し解析を行った。

刺激前はWTマウスとc-Maf Tgマウスで大きな差は見られなかったが、SRBC刺激後ではWTマウスと比べてc-Maf Tgマウスのほうが胚中心特異的にPNAが染色される印象であったが、濾胞構造自体には有意な差は見られなかった (Fig. 4C)。

【4】c-Mafの胸腺細胞の解析

骨髄移植細胞競合実験でc-Maf Tgマウスのdonor

細胞を混ぜた群ではT細胞でのc-Maf Tgマウス由来のLy5.2陽性細胞がほとんど存在しないことからWTマウス由来の細胞が存在するとTgマウス由来のT細胞は分化できないことが考えられた。そこで骨髄キメラマウスではなく、c-Maf TgマウスとWTマウスの胸腺細胞をCD4とCD8で染色しFCMを行うとc-Maf TgマウスではWTマウスに比べCD4陰性およびCD8陰性のダブルネガティブ (DN) 細胞の比率が著増していた (Fig. 5A)。よって胸腺細胞分化の段階で何らかの障害

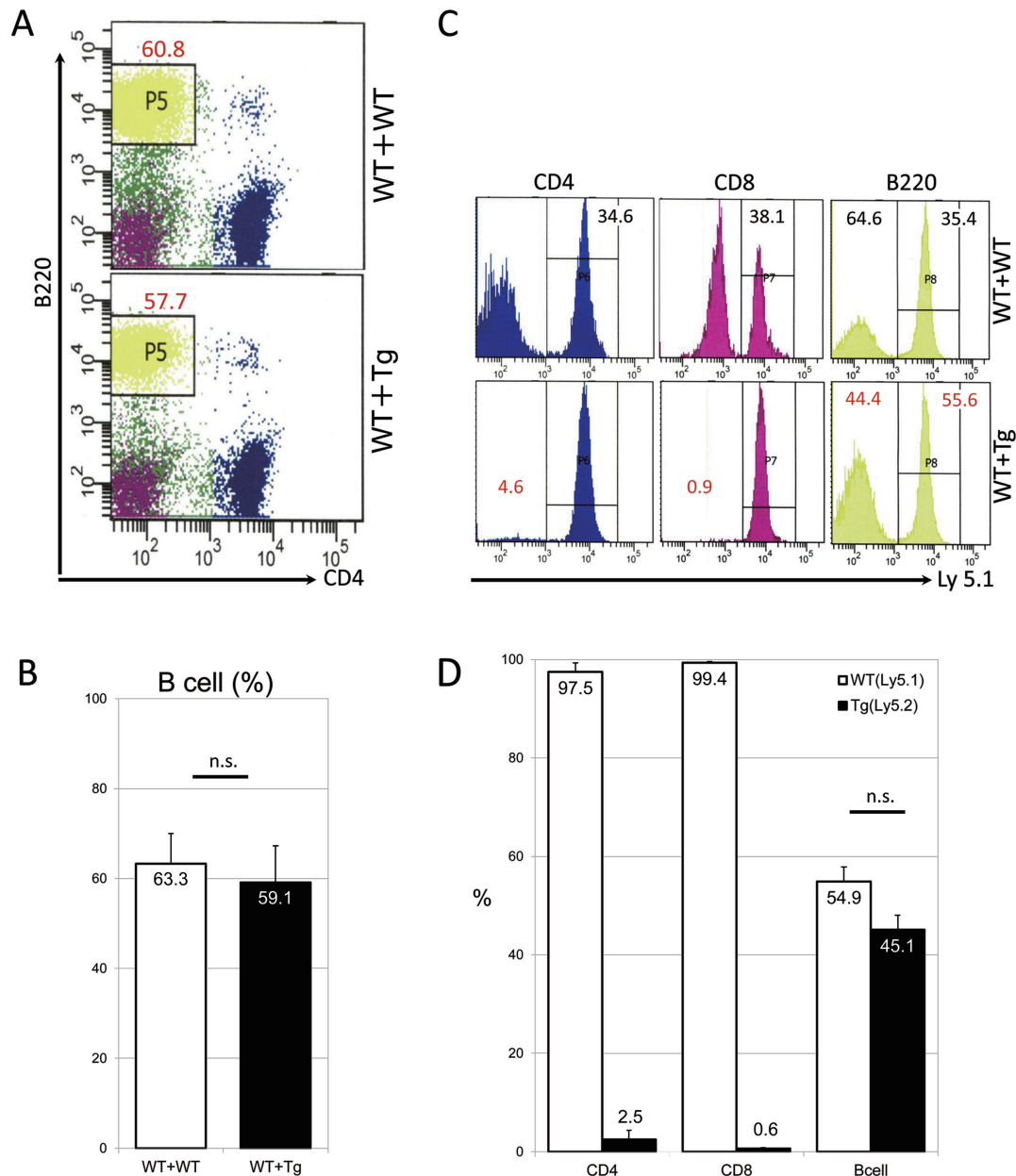


Fig. 3. 骨髄キメラマウスの結果. A, B : 骨髄キメラマウスのB細胞の比率. A : CD45.1 (Ly5.1) 陽性 WTマウスとCD45.2 (Ly5.2) 陽性 WTマウス (WT + WT) およびLy5.1陽性 WTマウスとLy5.2陽性 c-Maf Tgマウス (WT + Tg) の骨髄細胞を1 : 1の割合で混合し, Rag2 KOマウスに移植. 移植後4週以降のRag2 KOマウスの脾細胞を単離し, FCMで解析した. データは独立した3回の実験の典型例を示す. B : Fig. 3Aの 独立した3回の実験の平均±標準偏差を示す. C : 骨髄キメラマウスのCD4 T細胞, CD8 T細胞, B細胞におけるLy5.1の比率. Fig. 3Aと同じ脾細胞をFCMで解析. データは独立した3回の実験の典型例を示す. D : Fig. 3Cの 独立した3回の実験の平均 ± 標準偏差を示す.

があることが考えられ、胸腺細胞を更に詳細に解析する事でT細胞分化が停止する段階を探る事とした。

このDN細胞分化をc-Maf Tgマウスの胸腺細胞で確認した。lineage negativeかつCD4およびCD8陰性細胞にgateをかけて、CD25とCD44で展開した (Fig. 5B)。WTマウスではDN3は10数%程度でDN4は60-70%程度であり、ほとんどDN4が占めていた。c-Maf TgマウスではDN3が50%程度と多くDN4は30-40%程度とWTと比較して少なく、このDN3からDN4の段階で障害があることが示唆された。

そこでWTマウスとc-Maf TgマウスでのDN細胞表面のTCR β 発現をみると、c-Maf Tgマウスでは発現が低下していた (Fig. 5C)。さらにDN3とDN4の各ポピュレーションでのTCR β の発現をみた (Fig. 5D)。DN3

の段階でTCR β 鎖の再構成に成功した細胞がDN4へと増殖するため、WTではDN4の段階でTCR β 鎖の発現がみられる。これに対し、c-Maf Tgマウスの細胞では発現が低下していた。この結果より c-Maf TgマウスのT細胞分化は胸腺での β セクションが障害されていることが示唆された。

これは仮説③のT細胞が減っていることにより、そのスペースを埋めるためにB細胞が増加しているという説に矛盾しない結果である。

考 察

今回我々はc-Maf Tgマウスに見られたB細胞増多の解析を行った。B細胞増多のメカニズムには能動的増加、T細胞による指令、受動的増加の3つが

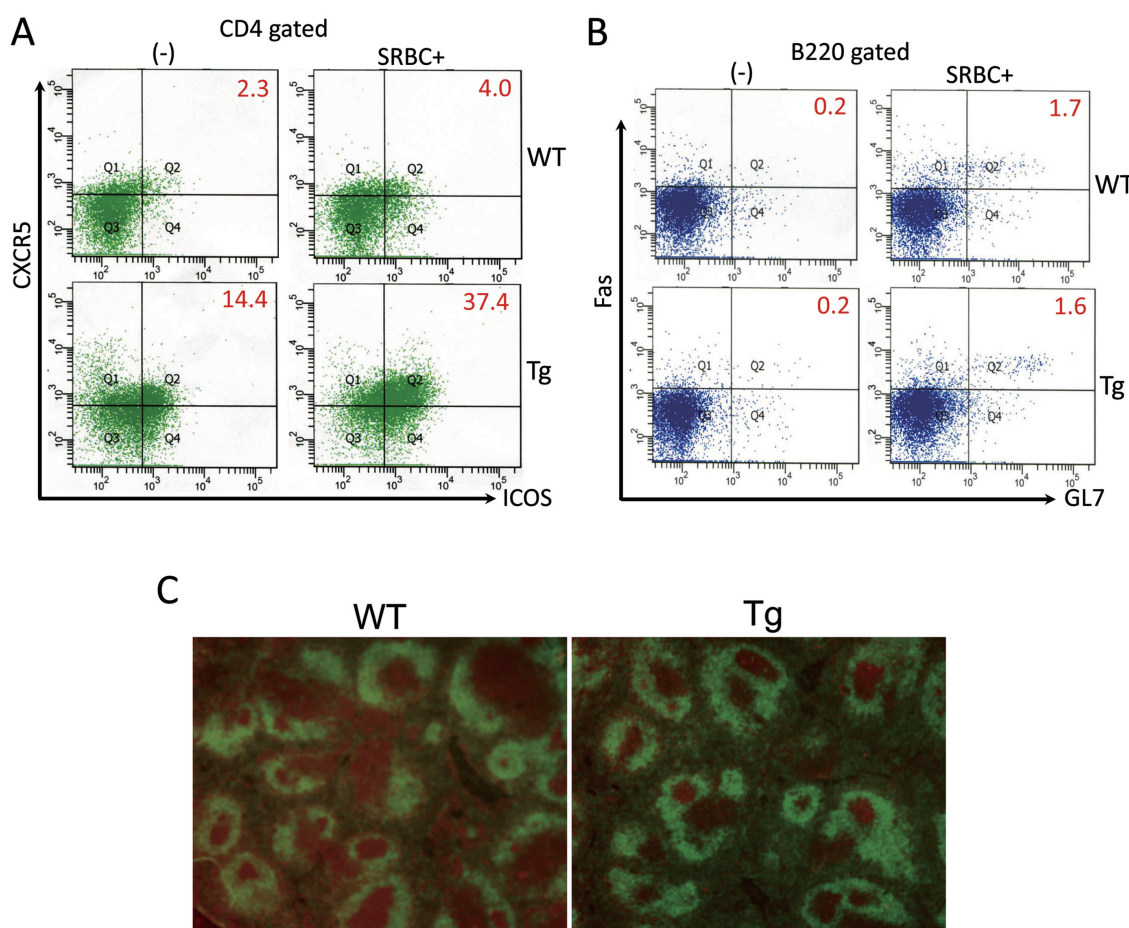


Fig. 4. SRBCs 投与による濾胞刺激における WT マウスと c-Maf Tg マウスの比較. A: 脾細胞中の Tfh 細胞の比率. 各マウスの脾細胞を単離し、FCM で解析. CD4 陽性 T 細胞中の CXCR^{high} ICOS^{high} である Tfh 細胞の比率を示す. 刺激なしと SRBCs 投与後の比較. データは独立した 3 回の実験の典型例を示す. B: 脾細胞中の活性化 B 細胞の比率. Fig. 4A と同じ細胞を FCM で解析. B220 陽性 B 細胞中の Fas^{high} GL7^{high} である活性化 B 細胞の比率を示す. 刺激なしと SRBCs 投与後の比較. データは独立した 3 回の実験の典型例を示す. C: SRBCs 投与による濾胞形成の評価. 各マウスの脾臓より凍結切片を作成. 抗 IgD 抗体と PNA で染色し、免疫蛍光染色を行った. IgD は緑色に、PNA は赤色に染色される. 倍率 40 倍.

考えられ、これらは互いに共存しうるものであった。これらの内でのどの機序が関与しているかを明らかにするため、骨髓キメラマウスを利用した競合実験を行った。競合実験では脾細胞中のB細胞は増加せず、その内訳も差がないことから、能動的増加は否定された。またこの競合実験で意外なことにT細胞にはc-Maf Tgマウス由来の細胞がほとんど存在せず、T細胞

による指令の検証はこの実験系ではできない可能性が示唆された。

c-Maf 欠損マウスではIL-21の産生が低下し、Tfh細胞の分化が抑制されることが報告されている²²⁾。Tfh細胞の分化が抑制されることで自己反応性B細胞が活性化され自己免疫疾患が発症すると報告されている^{5, 6)}。また、Tfh細胞はIL-21を産生することに

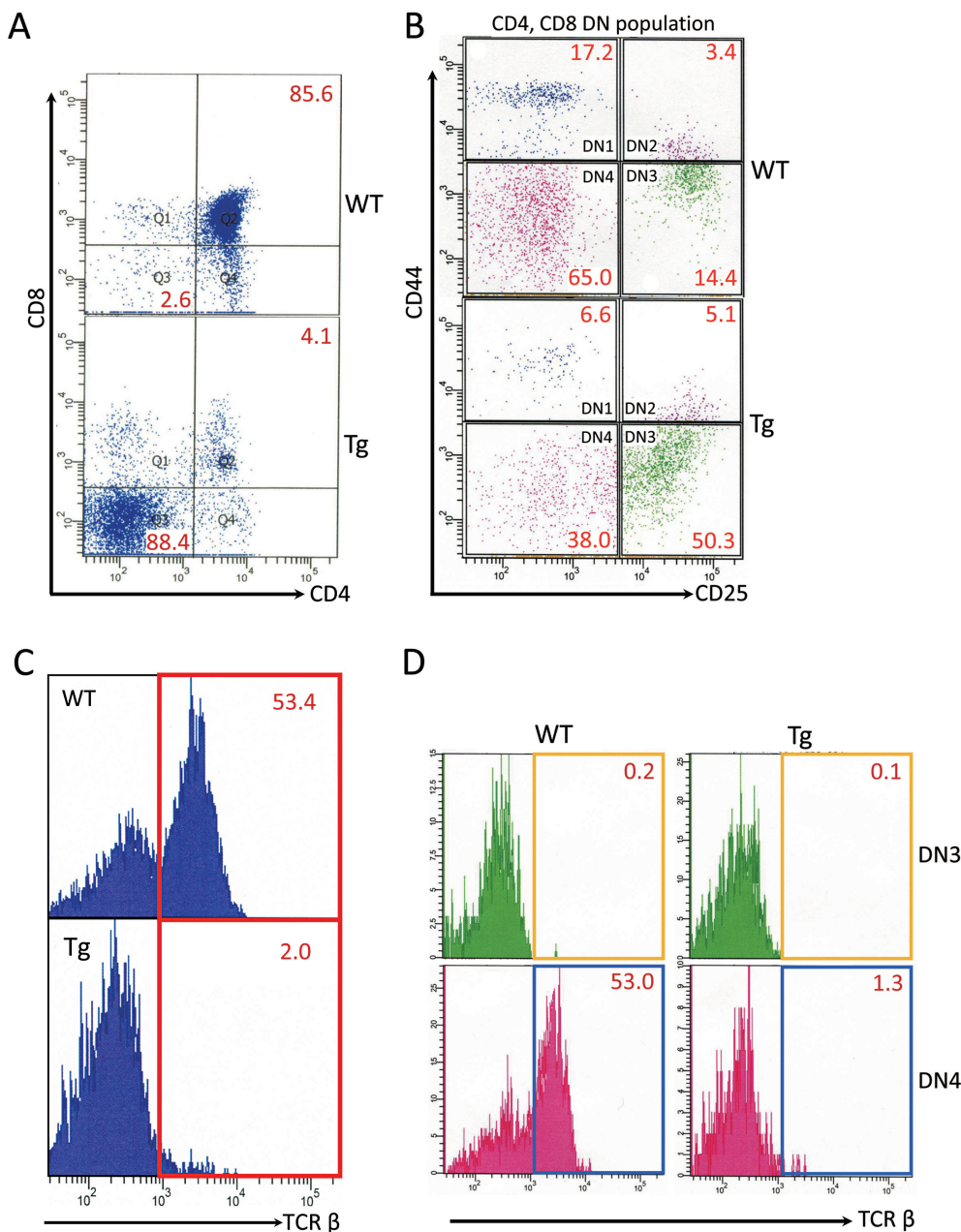


Fig. 5. WTマウスと c-Maf Tgマウスの胸腺細胞の比較. **A**: CD4および CD8 陰性のダブルネガティブ (DN) 細胞の比率. 各マウスの胸腺から単離した胸腺細胞を FCM で解析した. データは独立した3回の実験の典型例を示す. **B**: 胸腺 CD4 陰性細胞の分化. 各マウスの胸腺細胞を FCM で解析. lineage negative かつ CD4, CD8 陰性細胞で解析した. データは独立した3回の実験の典型例を示す. **C**: 胸腺細胞の TCR β 発現の比率. 各マウスの胸腺細胞を単離し, FCM で解析し CD4 陰性 T 細胞中の TCR β の発現を示す. データは独立した3回の実験の典型例を示す. **D**: DN3 および DN4 細胞での TCR β 発現の比率. Fig. 5B で DN3 および DN4 に該当する細胞を FCM で解析し, その TCR β 発現を示す. データは独立した3回の実験の典型例を示す.

より抗体産生を制御することが報告されている²³⁾。また、レトロウイルスを用いて c-Maf を発現させた CD4 陽性 T 細胞の解析で、c-Maf は IL-4 – STAT6 経路非依存的に IL-21 の産生を誘導し、IL-21 受容体欠損マウスでも c-Maf による IL-21 産生誘導が見られたと報告されている²⁴⁾。さらに興味深いことに、共刺激受容体である inducible costimulator (ICOS) からのシグナルが c-Maf を誘導し、Th17 細胞と Tfh 細胞の分化を促進するという報告がある²²⁾。以上のことから Tfh 機能における c-Maf の役割は重要であり、c-Maf Tg マウスにおいて、増加した Tfh 細胞が B 細胞増殖を誘導している可能性 (T 細胞による指令説) を考えた。

この検証のために SRBCs による免疫有無での FCM により、T および B 細胞の表面マーカーを解析した。c-Maf Tg マウスで Tfh 細胞は刺激により有意に増加したが、活性化 B 細胞の増加には影響が見られなかった。また免疫組織学的検討でも、WT マウスと c-Maf Tg マウスの間でリンパ濾胞の構造に大きな違いは認めなかった。以上の結果から、B 細胞増殖のメカニズムとして T 細胞による指令は否定的であった。

骨髓キメラマウスを利用した競合実験で c-Maf Tg マウスの donor 細胞混合群では c-Maf Tg マウス由来の T 細胞がほとんど存在しないことから T 細胞分化障害の存在が考えられた。c-Maf Tg マウスの胸腺細胞には DN 細胞が多いことから、DN 細胞での分化障害が疑われたが、競合実験での胸腺細胞には recipient マウスである Rag2 KO マウス由来の細胞 (Ly5.2 陽性) も存在し、Tg (あるいはコントロールの) 細胞と区別がつかないことから、骨髓キメラマウスではなく未処置の c-Maf Tg マウスおよびコントロールの WT マウスを用いて胸腺の解析を行った。

c-Maf Tg マウスの T 細胞分化障害についていくつか報告がある。Peng S²⁵⁾ は c-Maf Tg における CD4 陽性細胞減少のメカニズムとして、Bcl-2 がダウンレギュレートしており、そのため末梢の CD4 細胞の生存が制限されると主張している。また、同じグループが CD8 陽性細胞減少のメカニズムとして、c-Maf Tg マウスでは Caspase 6 がアップレギュレートされ、そのため末梢の CD8 細胞の Caspase 依存性のアポトーシスが誘導されると報告している²⁶⁾。すなわち、CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞の減少のメカニズムはそれぞれ異なることを提唱している。我々の今回の実験結果はそれらのメカニズムを否定するものではないが、一次リンパ組織 (胸腺) における T 細胞分化に障害があることを見いだしたものである。我々の用いた T 細胞特異的 c-Maf Tg マウスは、CD2 のプロモーターを利用しており、T 細胞分化の最も初期から c-Maf が発現する。この特徴のために胸腺における分化異常が明らかになったと考えられる。また、実際、今回の c-Maf Tg マウスを樹立した Takahashi らは、c-Maf を

高発現する Tg マウスではリンパ腫を発生することを報告しているが、そのような c-Maf 高発現性の Tg マウスの胸腺細胞は DN の段階で分化が止まっていることを報告している²⁰⁾。我々が今回供与を受けたマウスはリンパ腫を好発しない、c-Maf 低発現性の Tg マウスの系統である。

T 細胞は胸腺内で DN 細胞からいったん CD4 および CD8 陽性のダブルポジティブ (DP) 細胞に分化しその後セレクションをうけて CD4 または CD8 シングルポジティブ (SP) 細胞に分化する。胸腺では DN 細胞の段階でさらに 4 段階の分化が行われている。この DN 細胞は表面マーカーの CD25 と CD44 の発現によって DN1 から DN4 へと分化が進む (DN1: CD44⁺CD25⁻ ⇌ DN2: CD44⁺CD25⁺ ⇌ DN3: CD44⁻CD25⁺ ⇌ DN4: CD44⁻CD25⁻)²⁷⁾。DN1 から DN2 の段階では旺盛な増殖をし、DN3 ではいったん増殖は停止し、ここで TCR β 鎖の遺伝子再構成が起こる。この TCR β 鎖の再構成に成功すると、β 鎖は α 鎖が完成するまで pre-TCR α 鎖 (pTα) と二量体 (β / pTα) を形成し、pre-TCR (pTCR) を形成する。そしてこの pTCR は β 鎖の完成を細胞に知らせる。この完成が成功すれば DN4 となる (β セレクション)。DN4 では再び旺盛な細胞増殖が起こり、その後 DP 段階へと進み、増殖は停止し α 鎖の遺伝子再構成が誘導される (Fig. 6)。

本実験によって c-Maf Tg マウスでは DN3 が多く DN4 が少ないことから、DN3 から DN4 への分化の段階に障害があることが示唆され、その機序としては β セレクションの障害によるものであることが示唆された。実際に DN4 のポピュレーションにおいて細胞表面における TCR β 鎖の発現が低下していた。

pTCR 下流のシグナル伝達物質には CD3 γ / ε, Lck, Syk/ZAP-70, LAT, SLP-76 がありこれらを欠損させたマウスでは pTCR シグナルが遮断され、DN3 で分化が停止することが知られている²⁸⁾。今回明らかとなった c-Maf Tg マウスでの β セレクション障害の原因は pTCR の発現の障害であると考えられる。pTCR の細胞表面への発現には TCR β および pTα が共に必要である。pTα に対する抗体が入手できなかったために確認はしていないが、β 鎖と同様に細胞表面の pTα 発現は低いことが予想される。転写因子 c-Maf が TCR β および pTα の発現のいずれを制御しているかは明らかでないが、元々正の転写因子と考えられてきた c-Maf は最近負の転写因子の要素があることが報告されている^{29, 30)}。c-Maf Tg マウスの胸腺は痕跡状であり DN 分画の生化学的な解析は困難であるが、β セレクション障害のメカニズムは今後の重要な検討課題である。いずれにしろ、転写因子 c-Maf の発現レベルが精妙に調節されていることが正常の T 細胞分化に必須であることが今回明らかとなった。

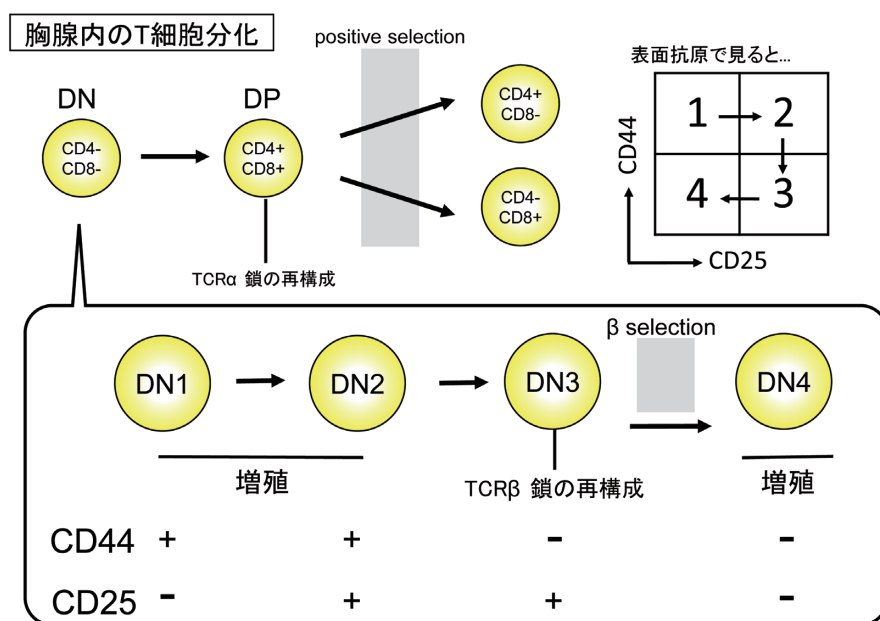


Fig. 6. 胸腺でのT細胞分化の模式図(文献2を参考に作成).

結 論

T細胞特異的(CD2プロモーターの支配下)c-Maf TgマウスにおけるB細胞増多のメカニズムは胸腺におけるT細胞の分化が障害され,末梢のT細胞が減少していることに基づく受動的増加と考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり,本論文のご指導,ご高閣を賜りました埼玉医科大学リウマチ膠原病科教授の三村俊英先生と同講師の佐藤浩二郎先生に感謝いたします。

引用文献

- 1) Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348-57.
- 2) Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005;6:1123-32.
- 3) Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005;6:1133-41.
- 4) Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;441:235-8.
- 5) Vinuesa CG, Tangye SG, Moser B, Mackay CR. Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2005;5:853-65.
- 6) King C, Tangye SG, Mackay CR. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annu Rev Immunol* 2008;26:741-66.
- 7) Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 2009;361:888-98.
- 8) Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006;126:1121-33.
- 9) Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y, et al. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* 2008;28:29-39.
- 10) Sato K, Miyoshi F, Yokota K, Araki Y, Asanuma Y,

- Akiyama Y, et al. Marked induction of c-Maf protein during Th17 cell differentiation and its implication in memory Th cell development. *J Biol Chem* 2011;286:14963-71.
- 11) Nishizawa M, Kataoka K, Goto N, Fujiwara KT, Kawai S. v-maf, a viral oncogene that encodes a "leucine zipper" motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:7711-5.
 - 12) Ho IC, Lo D, Glimcher LH. c-maf promotes T helper cell type 2 (Th2) and attenuates Th1 differentiation by both interleukin 4-dependent and -independent mechanisms. *J Exp Med* 1998;188:1859-66.
 - 13) Kim JI, Ho IC, Grusby MJ, Glimcher LH. The transcription factor c-Maf controls the production of interleukin-4 but not other Th2 cytokines. *Immunity* 1999;10:745-51.
 - 14) Sarrazin S, Mossadegh-Keller N, Fukao T, Aziz A, Mourcin F, Vanhille L, et al. MafB restricts M-CSF-dependent myeloid commitment divisions of hematopoietic stem cells. *Cell* 2009;138:300-13.
 - 15) Cao S, Liu J, Chesi M, Bergsagel PL, Ho IC, Donnelly RP, et al. Differential regulation of IL-12 and IL-10 gene expression in macrophages by the basic leucine zipper transcription factor c-Maf fibrosarcoma. *J Immunol* 2002;169:5715-25.
 - 16) Moriguchi T, Hamada M, Morito N, Terunuma T, Hasegawa K, Zhang C, et al. MafB is essential for renal development and F4/80 expression in macrophages. *Mol Cell Biol* 2006;26:5715-27.
 - 17) Kawauchi S, Takahashi S, Nakajima O, Ogino H, Morita M, Nishizawa M, et al. Regulation of lens fiber cell differentiation by transcription factor c-Maf. *J Biol Chem* 1999;274:19254-60.
 - 18) Takeuchi T, Kudo T, Ogata K, Hamada M, Nakamura M, Kito K, et al. Neither MafA/L-Maf nor MafB is essential for lens development in mice. *Genes Cells* 2009;14:941-7.
 - 19) Nishikawa K, Nakashima T, Takeda S, Isogai M, Hamada M, Kimura A, et al. Maf promotes osteoblast differentiation in mice by mediating the age-related switch in mesenchymal cell differentiation. *J Clin Invest* 2010;120:3455-65.
 - 20) Morito N, Yoh K, Fujioka Y, Nakano T, Shimohata H, Hashimoto Y, et al. Overexpression of c-Maf contributes to T-cell lymphoma in both mice and human. *Cancer Res* 2006;66:812-9.
 - 21) Linterman MA, Beaton L, Yu D, Ramiscal RR, Srivastava M, Hogan JJ, et al. IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J Exp Med* 2010;207:353-63.
 - 22) Bauquet AT, Jin H, Paterson AM, Mitsdoerffer M, Ho IC, Sharpe AH, et al. The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nat Immunol* 2009;10:167-75.
 - 23) Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, Yang XO, Kang HS, Ma L, et al. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* 2008;29:138-49.
 - 24) Hiramatsu Y, Suto A, Kashiwakuma D, Kanari H, Kagami S, Ikeda K, et al. c-Maf activates the promoter and enhancer of the IL-21 gene, and TGF-beta inhibits c-Maf-induced IL-21 production in CD4+ T cells. *J Leukoc Biol* 2010;87:703-12.
 - 25) Peng S, Lalani S, Leavenworth JW, Ho IC, Pauza ME. c-Maf interacts with c-Myb to down-regulate Bcl-2 expression and increase apoptosis in peripheral CD4 cells. *Eur J Immunol* 2007;37:2868-80.
 - 26) Peng S, Wu H, Mo YY, Watabe K, Pauza ME. c-Maf increases apoptosis in peripheral CD8 cells by transactivating Caspase 6. *Immunology* 2009;127:267-78.
 - 27) Godfrey DI, Kennedy J, Suda T, Zlotnik A. A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol* 1993;150:4244-52.
 - 28) Kruisbeek AM, Haks MC, Carleton M, Michie AM, Zuniga-Pflucker JC, Wiest DL. Branching out to gain control: how the pre-TCR is linked to multiple functions. *Immunol Today* 2000;21:637-44.
 - 29) Rutz S, Noubade R, Eidenschenk C, Ota N, Zeng W, Zheng Y, et al. Transcription factor c-Maf mediates the TGF-beta-dependent suppression of IL-22 production in T(H)17 cells. *Nat Immunol* 2011;12:1238-45.
 - 30) Ciofani M, Madar A, Galan C, Sellars M, Mace K, Pauli F, et al. A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell* 2012;151:289-303.