

氏名	西川 裕美子		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	工学		
学位授与番号	博甲第3272号		
学位授与の日付	平成18年 9月30日		
学位授与の要件	自然科学研究科生体機能科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	Establishment and functional characterization of mouse cell lines with follicular dendritic cell phenotypes (マウス濾胞樹状細胞様細胞株の樹立と機能解析)		
論文審査委員	教授 大森 齋	教授 中西一弘	教授 酒井 裕

学位論文内容の要旨

生体において高親和性抗体を獲得するための応答は、抗原感作後、感作部位近傍のリンパ組織に形成される胚中心で誘導される。胚中心内では、特異的抗原と遭遇し、さらに抗原特異的なT細胞と相互作用して活性化したB細胞が活発に増殖しており、増殖にともない抗体遺伝子座における体細胞突然変異が誘導される。体細胞突然変異により、高い親和性を獲得したB細胞は濾胞樹状細胞(FDC)上の抗原-抗体免疫複合体との結合性により選択され、高親和性抗体産生細胞や記憶細胞に分化すると考えられてきた。この一連の親和性成熟過程において特に高親和性抗体産生細胞がFDC上の免疫複合体に対する結合性により選択されるという仮説に対し、免疫複合体を形成できないマウスで親和性成熟が起こるとする報告がなされた。

胚中心における親和性成熟の実際の応答を詳細に解析するためには、*in vitro*でFDC、B細胞、T細胞が共存し、胚中心応答を再現できる培養系の確立が必須であると考えられるが、FDCはリンパ組織中にごく少数しか存在しない上に、B細胞と強く会合しており、純粋に単離することが非常に難しい。これまでにヒト由来FDC株が報告されているが、いくつかのFDCの表面マーカーの発現が低下しており、リンパ節内での性質をそのまま維持しているとは言えない。また、マウス由来のFDC株は樹立されていない。

そこで、本研究では、マウスリンパ節由来のFDC株を樹立し、このFDC株と特定の抗原に対する親和性が均一なマウス由来のB細胞と抗原特異的なT細胞株を共培養することで*in vitro*で胚中心反応を解析できる培養系を確立することを目的とし、以下の実験を進めた。

<①リンパ組織細胞を用いた*in vitro*での胚中心反応を模倣した培養系の確立> リンパ球活性化に伴い発達したFDCを効率的に取得するため、リンパ組織環境を模倣したコラーゲンゲルを用いる3次元培養について検討した。免疫したマウスのリンパ節断片をコラーゲンゲルに封入して培養後、ゲルを溶解して細胞を回収し、再び液体培養を行った結果、樹状突起が発達し、リンパ球と強く接着した付着系細胞の増殖を確認した。

<②collagen gel 培養によるFDC lineの確立> ①の細胞の性質を調べるため、細胞染色や、gene chipによるRNA発現解析を行った結果、付着系細胞は、FDCに特有な表面マーカーを発現し、FDCをenrichした画分で報告された遺伝子を発現していた。このため、この細胞をprimary-FDC-like line (pFL) とし、pFLから、増殖能の高いFL-Yを単離することに成功した。

<③FDC上でのQMマウスB細胞の分化と選択機構の解析> VHTをノックインし、特定の抗原に対して特異的なB細胞が30%程度存在するマウスから得たリンパ節B細胞を、抗原特異的なTh2クローンやpFLと共培養したところ、付着細胞に接着したB細胞が従来の培養系と比較して、はるかに高い増殖能と生存率を示した。このB細胞は胚中心細胞マーカーを強く発現していた。この付着性細胞はB細胞の生存あるいは増殖を支持する、FDC様の細胞であり、この細胞を用いた培養系が胚中心応答の解析に有効であると考えられる。

論文審査結果の要旨

生体内での高親和性抗体の生成（親和性成熟）は、B細胞における高頻度突然変異と高親和性を獲得したB細胞クローンの選択によって行われる。親和性成熟過程では、高親和性抗体産生B細胞が濾胞樹状細胞（FDC）上の免疫複合体に対する結合性により選択されると考えられているが、詳細な機構は不明である。これは、FDCを十分な数、高純度で採取することが困難なこと、FDCの培養条件が確立されていないことに起因する。

そこで、本研究では、マウスリンパ節由来のFDC株を樹立し、このFDC株上でマウスB細胞を培養し、*in vitro*で胚中心反応を解析できる培養系を確立することを目的として以下の実験を行った。

1) リンパ球活性化に伴い発達したFDCを効率的に取得するため、リンパ組織環境を模倣したコラーゲンゲルを用いる3次元培養について検討した。免疫したマウスのリンパ節断片をコラーゲンゲルに封入して培養後、ゲルを溶解して細胞を回収し、繰り返し刺激培養を行った結果、樹状突起が発達し、Bリンパ球と強く接着した付着系細胞が増殖してくるを見いだした。

2) DNA microarray、flow cytometryなどによる解析の結果、この付着系細胞は、これまで報告されたFDCに特長的な表面マーカーを発現していることを確認した。この細胞をpFLと名付け、さらにpFLから、増殖能の高いより安定な細胞株FL-Yを単離することに成功した。FL-Y細胞はLTやTNF依存性に増殖するというFDCとして期待される性質を備えていた。

3) リンパ節B細胞とTh2クローンをpFL、FL-Y存在下で培養したところ、B細胞の増殖と生存は飛躍的に促進された。このB細胞は胚中心細胞マーカーを強く発現していた。

以上のように、本申請者はマウスリンパ組織から継続的に培養可能なFDC機能を保持した細胞株を樹立することに世界で初めて成功した。これを用いて、従来*in vitro*での解析が困難であった胚中心反応の機構について重要な知見が得られることが期待でき、学術的意義は極めて大きい。したがって本研究は博士(工学)の学位に十分値するものと判定される。