

氏名	楢原 清顕
授与した学位	博士
専攻分野の名称	農学
学位授与番号	博甲第3924号
学位授与の日付	平成21年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科 バイオサイエンス専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	ニワトリ胚とヒナにおける B 細胞分化に関する研究
論文審査委員	教授 近藤 康博 教授 奥田 潔 准教授 阿部 浅樹

学位論文内容の要旨

ニワトリ B 細胞は、胚生期に骨髄および脾臓などの造血組織でリンパ幹細胞より分化し、鳥類特有の中枢リンパ器官であるファブリシウス嚢 (BF) へと移行する。B 細胞は BF で遺伝子変換をにより、抗体レパートリーを獲得する。遺伝子変換に成功した B 細胞は、細胞膜表面上に抗原受容体としての膜型 IgM (sIgM) を発現する。B 細胞の sIgM は免疫応答において重要な機能を果たし、主要な B 細胞マーカーとして B 細胞の解析に用いられている。BF で成熟した B 細胞は全身へ末梢化し、脾臓をはじめとする末梢リンパ器官でコロニーを形成する。末梢リンパ器官において、B 細胞は抗原刺激による抗体のクラススイッチを起し、産生する抗体を IgM から IgY もしくは IgA へと切り替える。IgY 抗体は哺乳類 IgG 抗体のホモログであり、鳥類の二次免疫応答における主要な抗体である。母鶏で産生された IgY は卵黄に蓄積され、胚発生の過程で胚へと移行する。本研究では、B 細胞の sIgM 発現に着目し、ニワトリ B 細胞の分化における sIgM の経時的な発現の変化と、胚期から孵化後の時期におけるニワトリの B 細胞分化の様態を sIgM 発現と sIgY 産生に基づいて明らかにすることを目的とした。さらに卵黄由来の移行抗体 (IgY) が B 細胞の分化に与える影響を B 細胞マーカーの変化に着目し追究した。

BF における B 細胞集団の形成は 12 日胚齢から 15 日胚齢の間に形成されることが明らかになった。また、B 細胞集団に占める sIgM 陽性細胞の割合は孵化に向けて上昇し、孵化後の陽性率は 2 日齢から低下することが示された。胚期の B 細胞集団の sIgM 陽性率の上昇は B 細胞の遺伝子変換の成功とそれに伴う sIgM 発現の結果を反映しており、抗体のレパートリー蓄積が行われていると考えられた。一方、孵化後の sIgM 陽性率の低下は、孵化に伴う BF の機能変化に起因する B 細胞の抗体レパートリーの造成活性に伴う sIgM 発現細胞の減少を反映していると考えられた。脾臓における B 細胞集団は孵化に向けて減少するが、孵化後 0 日齢から 2 日齢の間に大きな集団形成が観察され、2 週齢まで経時的な B 細胞集団の増加が観察された。一方、脾臓における sIgM 陽性細胞は 18 日胚齢より観察されたが、実質的な sIgM 陽性集団の形成は 0 日齢より 2 日齢に行われることが示され、脾臓における B 細胞のコロニー形成は孵化直後に行われることが明らかにされた。孵化後の B 細胞の sIgM 陽性率は低下傾向を示し、一方で免疫染色により IgY 産生細胞は孵化後 1 週から 2 週の間に出現することが示された。以上のことから、孵化後の脾臓における sIgM 陽性率の低下は、免疫応答に伴う B 細胞のクラススイッチに起因することが示唆された。一方で、胚期の BF および脾臓において、IgY 産生細胞とは染色様態の異なる細胞が観察された。これらの sIgY 陽性細胞は B 細胞であることが示された。

胚期の BF における B 細胞の sIgY 陽性率は同時期の脾臓における B 細胞の sIgY 陽性率より常に高い値を示した。また、19 日胚齢以降は B 細胞のほとんどが sIgY 陽性を示した。また、孵化後の脾臓の B 細胞においてもほとんどの B 細胞が sIgY 陽性を示した。B 細胞において観察された IgY は血液循環を介した卵黄由来の IgY であり、これらの IgY が B 細胞表面に発現された Fc 受容体 (FcR) に結合したものと考えられた。また、FcR の発現は BF において発現が促進され、sIgM の発現と FcR の発現には正の相関関係があると想定された。さらに孵化後の脾臓においても sIgY 陽性の B 細胞が観察されたことから B 細胞の FcR 発現は BF に存在する未熟 B 細胞から脾臓に存在する成熟 B 細胞にも存在することが示唆された。これらの結果は移行抗体が BF における B 細胞分化に関与していることを示唆している。

論文審査結果の要旨

B細胞は抗体産生などの機能によって動物の生体防御に関与する細胞で、鳥類ではその特有の器官であるファブリシウス嚢 (BF) で分化するとされている。本論文はニワトリの胚期から孵化直後の時期におけるBFでのB細胞分化を中心にして末梢リンパ組織のひとつである脾臓との関連を含めてニワトリのB細胞分化の諸点を明らかにしたものである。まず、本論文ではフローサイトメトリーと免疫組織化学によってBFにおける抗原受容体 (s I g M) 発現細胞の出現は胚期 12 から 15 日におこること、この細胞の脾臓への移行は 18 日胚から始まること、脾臓における IgY へのクラススイッチは 1 から 2 週齢の間に始まることを明らかにしてこの時期のB細胞分化の様態をマーカー発現に基づいて時系列的に明らかにした。一方、胚期のBFや脾臓には卵黄由来の移行抗体 (IgY) によると思われる多数のIgY陽性細胞が認められた。移行抗体は母体から仔への免疫性を付与しているが、胚のBFや脾臓におけるIgY陽性細胞がB細胞分化に関与しているという仮説に基づいて実験を進めた。Bu-1 抗原の発現から、胚期のBF中のIgY陽性細胞はほとんどがB細胞系の細胞であることが示された。B細胞へのIgYの特異的な結合は移行抗体が胚期のBFのB細胞分化になんらかの影響を与えていることを示唆しており、さらにこの結合はB細胞の特殊なFc受容体を介している可能性が示された。後期胚では、IgY陽性細胞は胚の成長に伴って上昇し、さらにBF中のs I g M陽性細胞の割合はIgY陽性細胞の割合に平行して上昇したことから、BFのB細胞ではFcR発現と抗原受容体発現が連動していることが示された。以上の結果は移行抗体由来のIgYがBFのB細胞の分化に関与することを強く示唆している。

以上のように本論文は、B細胞マーカーを用いて胚期のBFや孵化後の脾臓におけるB細胞発達の時期を正確に特定したこと、胚期のBFでは移行抗体由来のIgYがB細胞だけに特異的に付着しており、これはFcRを介しているらしいこと、移行抗体のIgYがBFのB細胞分化に貢献しているらしいこと、などの多くの新知見を含んでおり、その内容は博士の学位 (農学) にふさわしいと考える。