筑波大学

博士（医学）学位論文

B 系統細胞における DNAM-1 の発現と機能

２０２０

筑波大学

永山（長谷川）　裕子

目次

1　序論 3

1-1　B 細胞と分化

1-2　Plasmablast/plasma 細胞のホーミングとケモカイン

1-3　DNAM-1 の T 細胞、NK 細胞における機能

1-4　B 細胞と DNAM-1 に関する知見

1-5　DNAM-1 とリガンドを共有する分子

1-6　多発性骨髄腫

1-7　白血球と血小板の結合

2　目的 9

3　材料および実験方法 10

3-1　マウス

3-2　抗体と試薬

3-3　ヒト B 系統サブセットにおける DNAM-1 の発現解析

3-3-1　イメージングフローサイトメーターによる血小板結合細胞の解析

3-3-2　フローサイトメーターによる DNAM-1 の発現解析

3-4　マウス B 系統サブセットにおける DNAM-1 の発現解析

3-5　多発性骨髄腫患者サンプルを用いた解析

3-5-1　フローサイトメーターによる DNAM-1 の発現解析

3-5-2　免疫組織化学染色による DNAM-1 の発現解析

3-6　B 細胞の増殖

3-7　Plasmablast/plasma 細胞、クラススイッチした memory B 細胞の移動

３-８　サイトカイン及び抗体産生解析

３-９　統計解析

３-１０倫理

４　結果 17

４-１　血小板の B 系統細胞への結合

４-２　B 系統細胞における DNAM-1 発現

４-３　多発性骨髄腫と DNAM-1 の関連

４-４　ヒト末梢血 B 系統細胞上の DNAM-1 の機能

４-４-１ B 系統細胞の増殖

４-４-２ Plasmablast/plasma 細胞、クラススイッチした memory B 細胞の移動

４-４-３ B 系統細胞のサイトカイン及び抗体産生

５　考察 25

６　結語 28

７　略語表 29

８　謝辞 31

９　出典 32

１０　参考文献 33

１１　図 44

1　序論

1-1　B 細胞と分化

リンパ球は T 細胞、B 細胞、NK 細胞に大別され、その中で B 細胞は抗体産生を担う細胞であると認識されている。骨髄において血液幹細胞から Pro-B 細胞、Pre-B 細胞を経て分化した naïve B 細胞は二次リンパ組織の濾胞に移動する[1,2]。二次リンパ組織において naïve B 細胞は細胞表面に発現する B 細胞レセプターと外来抗原が結合すると活性化し、さらに濾胞 T 細胞由来の CD40 の共刺激により増殖する[1,2]。増殖した細胞の一部は速やかに分化し、memory 細胞（胚中心非依存性 memory 細胞）や短寿命の plasma 細胞へと分化する[1-4]。また、増殖した他の B 細胞は濾胞 T 細胞と共に胚中心を形成する。暗領域と明領域で構成される胚中心において、B 細胞は暗領域で著しく増殖し、その際に IgV 領域の体細胞突然変異が起こり、結果として親和性が高い B 細胞が出現する[3,4]。その後胚中心の明領域に移動した B 細胞は濾胞樹状細胞や濾胞 T 細胞との相互作用によって選択され、最終的に長寿命 plasma 細胞や胚中心依存的な memory 細胞へと分化する[3,4]。

1-2　Plasmablast/plasma 細胞のホーミングとケモカイン

plasmablast や plasma 細胞は細胞表面に CXCR4 を発現し、骨髄の間質細胞が多く発現する CXCR4 のリガンドである CXCL12 に反応して骨髄へと移動する（ホーミング）[5,6]。これは、CXCR4 欠損マウスの胎児肝造血細胞を放射線照射した正常マウスに移植したキメラマウスを NP-CGG で免疫すると，誘導された plasma 細胞が血液中には増加するが、骨髄での plasma 細胞の蓄積が認められなかったことにより明らかになった[6]。末梢血中の plasmablast や plasma 細胞は CXCR4 の他に CXCR6（リガンド:CXCL16）、CCR10（リガンド:CCL28）、CCR3（リガンド : CCL28）を発現しており、骨髄はこれらのリガンドの発現が高いことが報告されている[7]。

一方で、CXCL12 は plasmablast や plasma 細胞の移動に関与するだけでなく、B 細胞前駆体の骨髄での分化や保持に重要な役割を持つことが報告されている[5,6]。

1-3　DNAM-1 の T 細胞、NK 細胞における機能

白血球接着分子である DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1、CD226)はイムノグロブリンスーパーファミリーの I 型膜貫通蛋白である。ヒトとマウスにおいて NK 細胞、$CD8^+$T 細胞、$CD4^+$T 細胞、単球、血小板の大多数に定常的に発現することが報告された[8,9]。ポリオウイルスレセプター（PVR）である CD155 とネクチン-2（CD112、ポリオウイルスレセプター関連ファミリー2）は

DNAM-1 のリガンドであることが報告されている[10,11]。これらのリガンドは多くの組織の造血系細胞、上皮細胞、内皮細胞に広く発現しており、特定の癌ではその発現が上昇することが知られている[12-20]。NK 細胞、$CD8^+$T 細胞上の DNAM-1 と標的細胞上のリガンドの相互作用が細胞誘導性の細胞毒性や IFN-γ等のサイトカイン産生を促進する[8,10,21]。DNAM-1 はまた NK 細胞や CD8+T 細胞による腫瘍の排除や白血球機能関連抗原-1（LFA-1）と関連した naïve CD4+T 細胞から Th1 細胞への増殖・分化に関与することが報告されている[15,21,22]。

1-4　B 細胞と DNAM-1 に関する知見

ヒト及びマウスにおいて一部の B 系統細胞に DNAM-1 が発現していることが報告されている[8,23-25]。しかしながら、B 系統細胞における発現パターンや DNAM-1 の機能についてはいまだ不明である。過去には Epstein-Barr (EB)ウイルスの感染が初代培養の B 細胞上の DNAM-1 発現を増加させることが報告されている[23]。この EB ウイルスを感染させた in vitro の実験系において DNAM-1 の機能を明らかにするための実験が行われたが、増殖、生存、凝集、活性化内皮細胞への接着において DNAM-1 の明らかな関与はなかった[23]。また、CD40L/IL-21 の刺激が in vitro で誘導された plasmablast 上の DNAM-1 発現を増加させるという報告はあるものの、その詳細は不明である[24]。さらに、

DNAM-1 の細胞質領域の 307 残基の突然変異が様々な自己免疫疾患の病態と関連することが報告されている[25]が、一方で、健常人と多発性硬化症の患者を比較した際に B 細胞上の DNAM-1 発現には変化が見られなかったとも報告されている[26]。

1-5　DNAM-1 とリガンドを共有する分子

CD155 は TIGIT (T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains)あるいは CD96 のリガンドにもなることが知られている[27,28]。TIGIT は NK 細胞. NKT 細胞、CD8+T 細胞、regulatory T 細胞、memory CD4+ T 細胞に発現する[29]。一方で CD96 はヒトで NK 細胞、CD8+T 細胞、CD4+T 細胞に発現する[30]。TIGIT はその ITIM モチーフを介して直接的に NK の細胞障害活性を抑制する[29]。CD96 は CD155 を発現する標的細胞への NK 細胞の接着を促進することで活性化した NK 細胞の細胞障害活性を刺激する[28]。しかしながら、CD96 は NK 細胞のサイトカイン反応を抑制的に調節することも報告されている[31]。本論文ではヒト B 細胞上の DNAM-1 のみならず、DNAM-1 とリガンドを共有する TIGIT や CD96 の発現をあわせて解析した。

1-6　多発性骨髄腫

多発性骨髄腫は非ホジキン型リンパ腫に次ぐ 2 番目に多い血液腫瘍であり、近年プロテアソーム阻害薬、免疫調節剤、抗体医薬等の新薬の承認により劇的に治療法が進歩しているが、5 年生存率は 50%以下である[32, 33]。多発性骨髄腫は腫瘍化した長寿命 plasma 細胞が主に骨髄内で増殖し、単クローン性に免疫グロブリン（M 蛋白）を産生することを特徴とし、貧血、感染、腎機能障害、骨破壊の症状が認められる[32]。多発性骨髄腫患者の腫瘍化した plasma 細胞上には DNAM-1 のリガンドである CD155 や CD112 が発現しており、in vitro、in vivo モデルにおいて NK 細胞及び $CD8^+$T 細胞上の DNAM-1 が多発性骨髄腫の病態において重要な役割を持つことが報告されている[34-36]。また、多発性骨髄腫の治療に用いられるアルキル化剤のメルファラン、プロテアソーム阻害薬であるボルテゾミブの使用により多発性骨髄腫細胞上の DNAM-1 のリガンドの発現が上昇することが明らかとなった[37, 38]。上記報告のように多発性骨髄腫における腫瘍化した plasma 細胞上の DNAM-1 のリガンド発現については既に明らかになっているが、腫瘍化した plasma 細胞上の DNAM-1 の発現についてはいまだ不明である。

1-7　白血球と血小板の結合

血小板の止血や血栓形成における役割についてはよく知られているが、近年血小板がその役割に加えて、広範囲な免疫反応においても重要な役割を持つこ

とが報告された[39-41]。血小板は循環血中や組織中の白血球との直接的な細胞間相互作用、あるいは血小板活性化後にα顆粒から放出されるケモカインである PF4（CXCL4）などの可溶性因子を介して炎症を調節する役割が明らかとなった[39,40]。血小板と白血球の直接的な相互作用における細胞間接着のメカニズムについては、血小板上の P-selectin と好中球上の PSGL-1 の相互作用による好中球の経内皮移動の促進や、血小板上の GPIbα と白血球上の Mac-1 の相互作用による微小血管炎症や血栓形成の促進等が報告されている[39]。一方、B 細胞と血小板においては、末梢血の血小板が B 細胞と CD40-CD40L の相互作用により細胞間接触し、sCD40L と RANTES を介して B 細胞の IgG 産生を促進することが報告されている[42]。B 細胞に無視できない数の血小板が結合していることから、血小板には DNAM-1 が高発現しているため[43]、フローサイトメーターによる解析によりこれまで少数の B 系統細胞で観察されていた DNAM-1 の発現についても、その真偽が問われるようになった。

2　目的

B 系統細胞における DNAM-1（CD226）の発現様式とその機能を示すこと。

3　材料および実験方法

3-1　マウス

8 ~ 12 週齢の C57BL/6 及び BALB/c マウスを日本クレア株式会社より購入して用いた。いずれも Specific Pathogen Free の環境下にて飼育し、筑波大学生命科学動物資源センターの規約に従って実験を行った。

3-2　抗体と試薬

FITC 標識抗ヒト CD138, CD27、PE 標識抗ヒト CD38、IgD、PE-Cy5 標識抗ヒト CD3、抗マウス CD138、ビオチン標識抗ヒト CD56、APC 標識抗マウス IgG1 アイソタイプコントロール、APC-Cy7 標識抗マウス、抗ヒト CD11b、ストレプトアビジン、AF700 標識抗ヒト NKp46、V500 標識抗マウス CD45R/B220 抗体は BD Biosciences（USA）より購入した。V450 標識抗ヒト CD19、FITC 標識抗マウス CD19 は Tonbo Biosciences から購入した。PE-Cy7 標識抗ヒト CD41/61、抗マウス TCRβ、APC 標識抗ヒト CD96、抗マウス IgG2b アイソタイプコントロール、APC-Cy7 標識抗マウス CD41 は Biolegend（USA）から購入した。APC 標識抗ヒト TIGIT 抗体は R&D systems (USA)から購入した。抗ヒト DNAM-1 抗体及び抗マウス DNAM-1 抗体は研究

室で標準的な方法で作製され、Alexa647 及びビオチンでそれぞれ標識した。Propidium iodide（PI）は死細胞を解析から除去するために使用した。

3-3　ヒト B 系統サブセットにおける DNAM-1 の発現解析

3-3-1 イメージングフローサイトメーターによる血小板結合細胞の解析

健常人から末梢血を採取し、Lymphoprep (Stemcell technologies, Canada) のプロトコールに準じて Ficoll 密度勾配により PBMC（peripheral blood mononuclear cell）を分離した。PBMC に FcR blocking reagent (MACS, MiltenyiBiotec, Germany)を加えて Fc 受容体ブロッキングを行った後に、抗ヒト CD41/61 抗体、抗ヒト CD19 抗体、抗ヒト DNAM-1 抗体を用いて染色した。その後 ImagingStream^{X} (Merck Millipore, USA)を用いて解析した。

3-3-2 フローサイトメーターによる DNAM-1 の発現解析

3-3-1 と同様の方法で健常人の末梢血から PBMC を分離し、Fc 受容体をブロッキング後に抗ヒト CD19, CD138, CD27, CD38, IgD, CD3, CD11b, CD56, CD41/61, DNAM-1, TIGIT, CD96 抗体及びアイソタイプコントロール抗体を用いて染色した。また、死細胞除去のために PI で染色を実施後に FACS

Fortessa (BD Biosciences, USA)を用いて解析を実施した。また、解析には FlowJo software (Tree Star)を使用した。

3-4　マウス B 系統サブセットにおける DNAM-1 の発現解析

C57BL/6 及び BALB/c マウスから脾臓を採取し、外科用メスで細切し、ナイロンメッシュを通して単一細胞の懸濁液を得た。調製した単一細胞懸濁液に CD16/32 抗体を加えて Fc ブロッキングを行った後に、抗マウス B220, CD138, DNAM-1, TCRβ, CD11b, CD41, NKp46 抗体及びアイソタイプコントロール抗体を用いて細胞を標識した。また、死細胞除去のために PI で染色を実施後に FACS Fortessa を用いて解析を実施した。また、解析には FlowJo software (Tree Star)を使用した。

3-5　多発性骨髄腫患者サンプルを用いた解析

3-5-1 フローサイトメーターによる DNAM-1 の発現解析

3-3-1 と同様の方法で患者由来の末梢血から PBMC を分離し、Fc 受容体をブロッキング後に抗ヒト CD19, CD138, CD38, DNAM-1 抗体及びアイソタイプコントロール抗体を用いて染色した。また、死細胞除去のために PI で染

色を実施後に FACS Fortessa を用いて解析を実施した。また、解析には FlowJo software (Tree Star)を使用した。

3-5-2 免疫組織化学染色による DNAM-1 の発現解析

多発性骨髄腫患者のパラフィン包埋された骨髄から標本を作製し、CD138 及び CD41 は Envision kit（Dako、USA）、DNAM-1 は CSA kit（Dako）のプロトコールに準じて染色した。1 次抗体に用いた CD138 と CD41 はそれぞれ Abcam（UK）から購入した。抗ヒト DNAM-1 抗体は研究室で標準的な方法で作製された。

3-6　B 細胞の増殖

B 細胞の増殖における DNAM-1 の影響を調べるため、抗ヒト DNAM-1 抗体を 0, 10, 20, 50 μg/mL になるように 96 well flat plate (Falcon)に添加後、1 時間、37℃でインキュベーションした。健常人から採取した血液を用いて、3-3-1 に記載した方法で PBMC を採取後、human CD19 magnetic Microbeads（MACS, Miltenyi Biotec）のプロトコールに準じて $CD19^{+}$B 系統細胞を回収し、CSFE を用いて染色した。3.5×10^{4} cells/well の細胞数で播種し、CpG-

ODN 0.5 μM と 10%FBS を添加した RPMI1640 培地を用いて 37℃で培養した。培養後、4 日後、7 日後の増殖細胞の比率を FACS Fortessa で測定した。

3-7　Plasmablast/plasma 細胞、クラススイッチした memory B 細胞の移動

CXCL12 による Plasmablast/plasma 細胞、クラススイッチした memory B 細胞の移動における DNAM-1 の影響を評価するため、トランスウェルチャンバーを用いて検討した。トランスウェル（pore size: 5 μm, 24 well plate, Corning Costar, USA）のインサートに 0.1%gelatin 溶液を加え、37℃、30 分インキュベートした。PBS で 2 回洗った後、HUVEC（ヒト臍帯静脈内皮細胞、PromoCell, Germany）をインサートに播種し（5×10^4 cells/insert）、内皮細胞増殖培地（PromoCell）を用いて 5%CO_2 でコンフルエントになるまで培養した。健常人から採取した血液を用いて、3-5 に記載した方法で PBMC を採取後 $CD19^+$B 系統細胞を回収した。Plasmablast/plasma 細胞、クラススイッチした memory B 細胞を同定するため $CD19^+$B 系統細胞を抗ヒト CD27、IgD 抗体で染色後に抗ヒト DNAM-1 ブロッキング抗体もしくはアイソタイプコントロール抗体と氷上で 30 分間インキュベートさせた後、0.5%FBS 添加 DMEM 培地を加え、トランスウェルのインサートに添加した（4.5×10^4 cells/insert）。トランスウェルの下層には CXCL12（100 ng/well, PeproTech, USA）を添加した DMEM 培地（0.5%FBS 含有）を加えた。37℃で 5 時間培

養後にトランスウェルの下層に移動した細胞について死細胞除去のためにPIで染色後に全てFACS Fortessaで解析した。

3-8　サイトカイン及び抗体産生解析

健常人から採取した血液を用いて、3-5に記載した方法でPBMCを採取後$CD19^{+}$B系統細胞を回収した。その際の$CD19^{+}$B系統細胞の純度は95%以上であることを確認した。$CD19^{+}$B系統細胞は抗ヒトDNAM-1ブロッキング抗体もしくはアイソタイプコントロール抗体と氷上で30分間インキュベートさせた。このB系統細胞を0.5 μMのCpG-ODN（TLR9 agonist, Type B, InvivoGen, USA）の存在下、非存在下で10%FBS添加RPMI1640培地を用いて37 ℃、10 % CO_2 条件下で5日間培養した（4×10^4 cells/well）。培養上清中のサイトカイン濃度（IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, TNF, IL-12p70）はCBA Human Inflammatory Cytokines Kit（BD Biosciences）のプロトコールに準じてFACS Fortessaにより測定した。

また、培養7日後の培養上清中のIgM、IgG濃度についてELISA（Bethyl Laboratories, USA）を用いて分光光度計で測定した。

3-9　統計解析

統計学的解析は unpaired t-test を用いて行い、ソフトウェアは GraphPad Prism 5（CA, USA）を用いた。

3-10　倫理

本研究は筑波大学附属病院臨床研究倫理審査委員会（H28-060）及び筑波大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

4　結果

4-1　血小板の B 系統細胞への結合

末梢血において、無視できない数の血小板が P-selectin-PSGL-1 や CD40-CD40L の相互作用を介して白血球と結合することが報告されている[39-42]。血小板は DNAM-1 を高発現しているため[43]、フローサイトメトリーで解析する際、DNAM-1^{+}B 細胞の比率が B 細胞に結合した血小板の影響により過大評価される可能性がある。末梢血中で実際に B 細胞が血小板に結合しているかどうかについて調べるため、血小板のマーカーとして知られている CD41/61 に対する抗体を用いて PBMC を染色し、イメージングフローサイトメーターで解析した。その結果、ヒト末梢血の DNAM-1 を発現する CD19^{+}B 系統細胞の中の約 10%が DNAM-1 を発現する血小板に結合していることが明らかとなった（図 1A)。また、イメージングフローサイトメーターの解析は CD41/61^{-}DNAM-1^{+}CD19^{+}B 細胞において CD19 のシグナルと DMAM-1 のシグナルが一致したことを示した（図 1B)。一方で、CD41/61^{+}DNAM-1^{+}CD19^{+}B 細胞においては DNAM-1 のシグナルは CD19 ではなく、CD41/61 のシグナルと一致した（図 1C)。

フローサイトメーターで CD41/61 の染色結果により血小板結合細胞除去前後でのヒト CD19＋B 系統細胞の DNAM-1 の発現比率を比較した。その結

果、血小板結合細胞除去前は CD19+B 細胞系統の DNAM-1 陽性細胞比率は 9.8%であったのに対し、血小板結合細胞除去後は 6.2%と低下傾向を認めたが、有意差はなかった（図 2A,B）。

次に CD27 と IgD を用いて B 系統細胞を各分化段階のサブセットに分け、血小板結合細胞除去前後での DNAM-1 の発現を解析した[44,45]。その結果、$CD27^{-}IgD^{+}$ naïve B 細胞において血小板結合細胞除去による DNAM-1 発現比率の有意な低下が認められた（図 2A）。この結果は、naïve B 細胞が血小板に結合していることを示唆している。一方、$CD27^{+}IgD^{+}$クラススイッチしていない memory 細胞、$CD27^{+}IgD^{-}$ クラススイッチした memory 細胞、$CD27^{high}IgD^{-}$ plasmablasts/ plasma 細胞に関しては血小板結合細胞除去による影響をほとんど認めなかった（図 2A）。

4-2　B 系統細胞における DNAM-1 発現

ヒト末梢血において血小板が結合した細胞を除去した上で CD27 と IgD を用いて B 系統細胞を各分化段階のサブセットに分け、B 系統細胞上の DNAM-1 の発現を解析した[44,45]。その結果、naïve B 細胞、クラススイッチをしていない memory B 細胞では DNAM- 1 の発現をほとんど認めなかった（図 2C）。一方、クラススイッチした memory B 細胞、plasmablast/plasma 細胞では DNAM-1 を発現していることが明らかとなった（図 2C）。さらに、CD138 は

plasma 細胞の典型的なマーカーであることが知られており、ヒト末梢血中の plasmablast と plasma 細胞は CD38 と CD138 の染色結果により区別される [46]。そのため、CD38 と CD138 を用いて plasmablast と plasma 細胞における DNAM-1 の発現を確認したところ、$CD27^{high}IgD^{-}$ plasmablasts/ plasma 細胞における DNAM-1 発現の結果と一致して $CD38^{high}CD138^{-}$plasmablast、$CD38^{high}CD138^{+}$plasma 細胞における DNAM-1 の発現が確認された（図 2D）。DNAM-1 は TIGIT や CD96 とリガンドである CD155 を共有している。そのため B 系統細胞の各サブセット上の DNAM-1 に加えて TIGIT と CD96 の発現を解析したが、全てのサブセットにおいて TIGIT、CD96 の発現は認められなかった。

その一方で、C57BL/6 及び BALB/c マウスの脾臓における B 系統細胞についても同様に血小板結合細胞を除去して DNAM-1 発現について解析した結果、Lin（TCRβ、NKp46、CD11b、CD41）$^{-}CD138^{+}B220^{-}$plasma 細胞において DNAM-1 の発現が確認された（図 3）[47]。一方で $Lin^{-}B220^{+}$B 細胞及び $Lin^{-}CD138^{+}B220^{dull}$ plasmablast では DNAM-1 の発現は認められなかった（図 3）。これらの結果より、ヒト及びマウスにおいて B 系統細胞での中でも plasmablast や plasma 細胞のような分化した細胞において DNAM-1 が発現することが示された。

4-3　多発性骨髄腫と DNAM-1 の関連

多発性骨髄腫は主に骨髄で腫瘍化した plasma 細胞が増殖する疾患である[32, 33]。健常人の末梢血において B 系統細胞の中でも分化した細胞である plasmablast や plasma 細胞に DNAM-1 の発現が認められ、また、human myeloma cell line である PCM6 について抗ヒト DNAM-1 抗体を用いて染色したところ、DNAM-1 の発現が認められたため、多発性骨髄腫患者由来の腫瘍化した plasma 細胞に DNAM-1 が発現するかどうかについて検証した。白血病化した多発性骨髄腫患者 1 例の末梢血を解析したところ、腫瘍化した $CD19^{-}CD38^{high}CD138^{+}$ plasma 細胞は DNAM-1 の発現がほとんど認められなかった（図 4A）[48]。一方で、健常人の結果と一致して、$CD19^{+}CD38^{high}CD138^{+}$ 正常 plasma 細胞や $CD19^{-}CD38^{high}CD138^{-}$ plasmablast には明らかな DNAM-1 の発現が認められた（図 4A）。

また、多発性骨髄腫患者の骨髄のパラフィン包埋ブロックから連続切片の標本を作製し、DNAM-1 の免疫組織化学染色を実施したが、その結果、CD138 の陽性部位と DNAM-1 の陽性部位は一致しなかった（図 4B）。DNAM-1 の染色結果が血小板のマーカーである CD41 の染色結果と類似していたため（図 4C）、多発性骨髄腫患者の骨髄における DNAM-1 陽性部位は血小板由来である可能性が示唆された。

4-4　ヒト末梢血 B 系統細胞上の DNAM-1 の機能

4-4-1　B 細胞の増殖

ヒト末梢血 B 系統細胞上の DNAM-1 の機能を明らかにする目的で、最初に B 系統細胞の増殖に対する DNAM-1 の関与について検証した。抗ヒト DNAM-1 抗体を flat plate に添加し、1 時間インキュベーションした後に末梢血から分離、CFSE で染色した $CD19^{+}$B 系統細胞を CpG-ODN 添加培養液で培養し、4 日後、7 日後に増殖細胞の比率を調べた[49,50]。増殖細胞は CSFE の蛍光強度の減弱から判断した。その結果、4 日後、7 日後のいずれにおいても TLR9 agonist である CpG-ODN の刺激による B 系統細胞の増殖が認められたが、その増殖において DNAM-1 刺激の有無による増殖細胞の比率の変化は認められなかった（図 5)。この結果より、B 系統の細胞の増殖に関して DNAM-1 は関与しないことが示唆された。

4-4-2　Plasmablast/plasma 細胞、クラススイッチした memory B 細胞の移動

骨髄において幹細胞から成熟した B 細胞は二次リンパ組織の濾胞に移動し、最終的に分化した B 系統細胞である plasmablast/plasma 細胞はさらに骨髄に移動（ホーミング）し、長寿命 plasma 細胞となる[5]。発現解析の結果から、DNAM-1 はヒト及びマウスにおいて plasmablast や plasma 細胞のような B

系統細胞での中でも分化した細胞において発現することが示された。また、ヒト骨髄由来の間葉系間質細胞はDNAM-1のリガンドであるCD155やCD112を発現している[51]。これらのことから、plasmablastやplasma細胞上のDNAM-1が二次リンパ組織から骨髄への移動に関与する可能性について検証した。実際にはCXCL12によるplasmablast/plasma細胞の移動におけるDNAM-1の関与についてトランスウェルチャンバーを用いて検討した[52]。トランスウェルのインサートにHUVECを播種し、コンフルエントになるまで培養した。次に、末梢血から分離した$CD19^{+}$B系統細胞を抗DNAM-1中和抗体とインキュベート後にインサートに添加した。トランスウェルの下層にCXCL12の存在下、非存在下の条件で5時間培養し、下層に移動したB細胞について解析した。Plasmablast/plasma細胞はCD27及びIgDの染色結果に基づき評価した[44,45]。インサートに播種したHUVECがDNAM-1のリガンドであるCD155とCD112を発現していることは事前にフローサイトメーターによる発現解析で確認した。CXCL12の添加によりB細胞のトランスウェル下層への移動が誘導されたが、移動したplasmablast/plasma細胞における抗DNAM-1中和抗体処理の影響は認められなかった。また、DNAM-1を発現するクラススイッチしたmemory B細胞もplasmablast/plasma細胞と同様にCXCL12のレセプターであるCXCR4を発現するため[53]、plasmablast/plasma細胞と同時に評価したが、移動したクラススイッチしたmemory B細胞における抗DNAM-1中和抗体処理の明らかな影響も認められ

なかった。以上の結果より、CXCL12 による plasmablast/plasma 細胞、クラススイッチした memory B 細胞の移動に対し DNAM-1 の影響はないことが示唆された（図 6）。

4-4-3　B 系統細胞のサイトカイン及び抗体産生

B 系統細胞の中で Transitional B 細胞、memory B 細胞、plasma 細胞は IL-10 を産生する細胞として知られている[54,55]。また、B 細胞を TLR9 agonist である CpG-ODN 単独、または IL-2、IL-6、IFNα のサイトカインカクテルを添加した培地を用いた培養をした際に、$CD27^{int}CD38^{+}$ plasmablast が IL-10 を産生することが報告されている[56]。そのため、CpG-ODN によって誘導されたヒト memory B 細胞及び plasmablast 上の DNAM-1 が CpG-ODN 刺激後の IL-10 を含む各種サイトカイン産生に与える影響について調べた[57,58]。末梢血から分離した $CD19^{+}$B 細胞を抗 DNAM-1 中和抗体とインキュベート後に CpG-ODN の存在下、非存在下で 5 日間培養し、上清中の IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, TNF, IL-12p70 濃度について測定した。分離した $CD19^{+}$B 細胞を CpG-ODN で刺激をすると DNAM-1 及びリガンドの CD155 の発現が上昇することが見出された（DNAM-1: 図 7A, CD155: data not shown）。また、分離した $CD19^{+}$B 細胞を抗 DNAM-1 中和抗体とインキュベートし、CpG-ODN で刺激した際に IL-10 産生は有意に減少し（図 7B）、IL-10 以外のサイトカインに対

する影響は認められなかった。さらに、末梢血から分離した $CD19^{+}$B 細胞を CpG-ODN の存在下、非存在下で 7 日間培養し、上清中の IgM、IgG 濃度を測定したところ、抗 DNAM-1 中和抗体とインキュベートすることにより IgM、IgG 濃度は有意に減少した（図 7C, D）。これらの結果は $CD19^{+}$B 細胞上の DNAM-1 が CpG-ODN 刺激後の IL-10 及び抗体産生に関与していることを示す。しかしながら、どのように DNAM-1 が IL-10 の産生や B 細胞による抗体産生に関与するかについては現時点では未だ不明である。

5　考察

これまでB系統においてDNAM-1を発現する細胞が少数存在することが報告されていたが、B系統細胞のどのサブセットが発現しているのか不明であった[8,23-25]。さらにB細胞に無視できない数のDNAM-1を高発現する血小板が結合していることが報告された[39-43]ため、本研究では、血小板が結合したB細胞を除去した上でDNAM-1の発現解析をしたところ、ヒトではクラススイッチしたmemory B細胞、plasmablast/plasma細胞にDNAM-1が発現し、マウスではplasma細胞に発現することを示した（図2, 3）。つまり、ヒト及びマウスにおいてB系統細胞での中でもplasmablastやplasma細胞のような分化した細胞においてDNAM-1が発現することを初めて明らかにした。

一方、B細胞を各分化段階のサブセットに分け、血小板結合細胞除去前後でのDNAM-1の発現を解析した結果、naïve B細胞が血小板に結合していることが明らかになった（図2A）。B細胞と血小板についてはCD40-CD40Lを介して細胞間接触後に互いに活性化することが報告されている[42]ことより、B系統細胞の各サブセットの中でnaïve B細胞が血小板と結合していることは上記の*Cognasse*らの報告を支持する結果となったと考えられる。

分離した$CD19^{+}$B細胞をCpG-ODNで刺激をするとDNAM-1及びリガンドのCD155の発現が上昇することが見出された。さらに、CpG-ODN刺激後のIL-10並びに抗体産生の解析より、B系統細胞上のDNAM-1とCD155の結

合を抗 DNAM-1 中和抗体で阻害することにより IL-10、IgM、IgG 産生が有意に減少したことから、CD19^{+}B 細胞上の DNAM-1 が IL-10 及び抗体産生を促進することが示唆された（図 7）。B 系統細胞により産生された IL-10 はオートクラインで memory B 細胞を IgM や IgG 分泌 plasmablast への分化を誘導することや、IgG1 あるいは IgG3 への免疫グロブリンのクラススイッチを誘導させることが報告されている[56, 59-61]。また、B 細胞を CpG-ODN で刺激をした際に、IL-10 の産生細胞は CD27^{int}CD38^{+} plasmablast であることが報告されている[56]。IL-10 は B 細胞の生存や分化を促進する役割を持つことも一方で報告されている。従って、DNAM-1 は B 系統細胞の獲得免疫反応に関与する可能性が示唆された。DNAM-1 による抗体産生促進作用が IL-10 を介する変化かどうかを含めて、どのように DNAM-1 が B 細胞の IL-10 や抗体産生に関与するのか、また、免疫反応における B 系統細胞上の DNAM-1 の機能的な意義については現段階では未だ不明である。これらの点を明らかにするために更なる研究が期待される。

マウスに関しては、B 系統細胞における DNAM-1 の発現解析より、DNAM-1 は plasma 細胞に発現していることを示した（図 3）。EAE モデルにおいて脾臓の CD138^{+} plasma 細胞が B 細胞由来の IL-10 の産生細胞であるとことが報告されている[62]。*Ping* らによる報告とヒトの CpG-ODN 刺激後の IL-10 及び抗体産生の解析結果を考慮すると、マウスについても同様に plasma 細胞か

らの IL-10 及び抗体産生に DNAM-1 が関与している可能性があると考えられる。

また、多発性骨髄腫患者の試料を用いてフローサイトメーターで解析した結果、腫瘍化した plasma 細胞上に DNAM-1 の発現をほとんど認めなかったことを示した（図 4A）。正常 plasma 細胞における DNAM-1 の発現は確認できたため、plasma 細胞における DNAM-1 は CD19 と同様に腫瘍化するとその発現を失うことが明らかとなった。さらに、骨髄の免疫組織化学染色の結果から、多発性骨髄腫患者の骨髄における DNAM-1 の発現は腫瘍化した plasma 細胞ではなく、血小板由来であり、組織像より腫瘍化した plasma 細胞と血小板が直接細胞間接触していることが示唆された（図 4B、C）。これまでに、血小板と腫瘍化した plasma 細胞の相互作用により腫瘍化した plasma 細胞が増殖することが報告されている[63]。一方、血小板上の DNAM-1 に関しては血管内皮細胞との接着に関与することが明らかになっている[43]。腫瘍化した plasma 細胞上には DNAM-1 のリガンドが発現していることが知られている[34-36]ため、血小板上の DNAM-1 の新規機能について今後さらなる研究が期待される。

6　結語

1　ヒト末梢血 B 系統細胞サブセットの中では plasmablast/ plasma 細胞とクラススイッチした memory B 細胞に、マウスでは plasma 細胞に DNAM-1 が発現していることを明らかにした。

2　ヒト B 系統細胞上の DNAM-1 が IL-10 及び抗体産生に関与していることが示唆された。

7　略語表

(アルファベット順)

APC	Allophycocyanin
CFSE	Carboxy fluorescein diacetate succinimidyl ester
DC	Dendritic cell
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FBS	Fetal Bovine Serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GP I bα	Glycoprotein　I b alpha
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IFN-α	Interferon-alpha
IFN-γ	Interferon-gamma
IL-1β	Interleukin-1beta
IL-2	Interleukin-2
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IL-10	Interleukin-10
IL-12p70	Interleukin-12p70
IL-21	Interleukin-21
IgV	Immunoglobulin V

ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibitor motif
NK	Natural killer
PE	Phycoerythrin
PF4	Platelet factor 4
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
RANTES	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RPMI	Roswell park memorial institute
TCR	T cell receptor
TNF	Tumor necrosis factor

8　謝辞

本研究の遂行、並びに本論文の執筆に際し、多大なる御指導、御援助を賜りました筑波大学大学院人間総合科学研究科免疫制御医学学研究室の渋谷彰教授、渋谷和子准教授，本多伸一郎先生，並びに佐藤和貴助教に謹んで感謝申し上げます。

また、本研究に関して討論に参加していただき、貴重な御意見を頂戴いたしました免疫制御医学研究室の皆様に謹んで感謝申し上げます。

9 出典

本学位論文ではCytometry Part B（doi: 10.1002/cyto.b.21859.）に掲載された論文の内容をWiley Periodicals, Inc.の規定に従って再利用している。

10　参考文献

1. Shapiro-Shelef M, Calame Kathryn. Regulation of plasm-cell development. Nat Rev Immunol. 2005;5: 230-242. doi:10.1038/nri1572
2. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM, The generation of antibody-secreting plasma cells. Nat Rev Immunol. 2015;15: 160-171. doi:10.1038/nri3795
3. Suan D, Sundling C, Brink R. Plasma cell and memory B cell differentiation from the germinal center. Current Opinion in Immunology. 2017;45: 97–102. doi:10.1016/j.coi.2017.03.006
4. Shinnakasu R, Kurosaki T. Regulation of memory B and plasma cell differentiation. Current Opinion in Immunology. 2017;45: 126–131. doi:10.1016/j.coi.2017.03.003
5. Kunkel EJ, Butcher EC. Plasma-cell homing. Nat Rev Immunol. 2003;3: 822-829. doi:10.1038/nri1203
6. Hargreaves DC, Hyman PL, Lu TT, Ngo VN, Bidgol A, Suzuki G, et al. A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. J Exp Med. 2001;194: 45-56. doi:10.1084/jem.194.1.45
7. Nakayama T, Hieshima K, Izawa D, Tatsumi Y, Kanamaru A, Yoshie O. Cutting edge: profile of chemokine rexeptor expression on human plasma cells accounts for their efficient recruitment to target tissues. J Immunol. 2003;170: 1136-1140. doi:10.4049/jimmunol.170.3.1136

8. Shibuya A, Campbell D, Hannum C, Yssel H, Franz-Bacon K, MeClanahan T, et al. DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. Immunity. 1996;4: 573-581. doi:10.1016/S1074-7613(00)70060-4
9. Tahara-Hanaoka S, Miyamoto A, Hara A, Honda S, Shibuya K, Shibuya A. Identification and characterization of murine DNAM-1 (CD226) and its poliovirus receptor family ligands. Biochem Biophys Res Commun. 2005;239: 996-1000. doi:10.1016/j.bbrc.2005.02.067
10. Bottino C, Castriconi R, Pende D, Rivera P, Nanni M, Carnemolla B, Cantoni C, et al. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. J Exp Med. 2003;198: 557-567. doi:10.1084/jem.20030788
11. Tahara-Hanaoka S. Functional characterization of DNAM-1 (CD226) interaction with its ligands PVR (CD155) and nectin-2 (PRR-2/CD112). Int Immnol. 2004;16: 533-538. doi:10.1093/intimm/dxh059
12. Aoki J, Koike S, Asou H, Ise I, Suwa H, Tanaka T, et al. Mouse homolog of poliovirus receptor-related gene 2 product, mPRR2, mediates hemophilic cell aggregation. Exp Cell Res. 1997;235: 374-384. doi:10.1006/excr.1997.3685.
13. Maier MK, Seth S, Czeloth N, Qui Q, Ravens I, Kremmer E, et al. The adhesion receptor CD155 determines the magnitude of humoral immune responses against orally ingested antigens. Eur J Immunol. 2007;37: 2214-2225. doi:10.1002/eji.200737072

14. Lopez M, Aoubala M, Jordier F, Isnardon D, Gomez S, Dubreuil P. The human poliovirus receptor related 2 protein is a new hematopoietic/endothelial hemophilic adhesion molecule. Blood. 1998;92: 4602-4611. http://www.bloodjournal.org/content/92/12/4602
15. Tahara-Hanaoka S, Shibuya K., Kai H, Miyamoto A, Morikawa Y, Ohkochi N, et al. Tumor rejection by the poliovirus receptor family ligands of the DNAM-1 (CD226) receptor. Blood. 2006;107: 1491-1496. doi:10.1182/blood-2005-04-1684.
16. EI-Sherbiny YM, Meade JL, Holmes TD, McGonagle D, Mackie SL, Morgan AW, et al. The requirement for DNAM-1, NKG2D, and NKp46 in the natural killer cell-mediated killing of myeloma cells. Cancer Res. 2007;67: 8444-8449. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4230
17. Verhoeven DH, de Hooge AS, Mooiman EC, Santos SJ, tem Dam MM Gelderblom H, et al. NK cells recognize and lyse Ewing sarcoma cells through NKG2D and DNAM-1 receptor dependent pathways. Mol Immunol. 2008; 45: 3917-3925. doi:10.1016/j.molimm.2008.06.016
18. Ravens I, Seth S, Forster R, Bernhardt G. Characterization and identification of Tage4 as the murine orthologue of human poliovirus receptor/CD155. Biochem Biophys Res Commun. 2003;312: 1364-1371. doi:10.1016/j.bbrc.2003.11.067
19. Chadeneau C, LeCabellec M, LeMoullac B, Meflah K, Denis, MG. Over-expression of a novel member of the immunoglobulin superfamily in Min mouse intestinal adenomas. Int J Cancer. 1996;68: 817-821,

doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19961211)68:6<817::AID-IJC21>3.0.CO;2-W

20. Morrison ME, Racaniello VR. Molecular cloning and expression of a murine homolog of the human poliovirus receptor gene. J Virol. 1992; 66: 2807-2813. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC241037/
21. Iguchi-Manaka A, Kai H, Yamashita Y, Shibata K, Tahara-Hanaoka S, Honda S, et al. Accelerated tumor growth in mice deficient in DNAM-1 receptor. J Exp Med. 2008;205: 2959-2964. doi:10.1084/jem.20081611.
22. Shibuya K, Shirakawa J, Kameyama T, Honda S, Tahara-Hanaoka S, Miyamoto A, et al. CD226 (DNAM-1) is involved in lymphocyte function-associated antigen 1 costimulatory signal for naïve T cell differentiation and proliferation. J Exp Med. 2003;198: 1829-1839. doi:10.1084/jem.20030958
23. Grossman L, Chand C, Dai J, Nikitin PA, Jima DD, Dave SS, et al. Epstein-barr virus indices adhesion receptor CD226 (DNAM-1) expression during primar B cell transformation into lymphoblastoid cell lines. mSphere. 2017;2: 1-11. doi:10.1128/mSphere.00305-17
24. Berglund LJ, Avery DT, Ma CS, Moens L, Deenick EK, Bustamante J, et al. IL-21 signaling via STAT3 primes human naïve B cells to respond to IL-2 to enhanve their differentiation into plasmablasts. Blood. 2013;122: 3940-50. doi:10.1182/blood-2013-06-506865
25. Du Y, Tian L, Shen LX, Wang F, Yu LK, Song Y et al. Association of the CD226 single nucleotide polymorphism with systemic lupus

eruthematosus in the Chinese Han Population. Tissue Antigen. 2011;77: 65-67. doi:10.1111/j.1399-0039.2010.01568.x

26. Ayano M, Tsukamoto H, Kohno K, Ueda N, Tanaka A, Mitoma H, et al. Increased CD226 expression on CD8+ T cells is associated with upregulated cytokine production and endothelial cell injury in patients with systemic sclerosis. J Imunol. 2015;195: 892-900. doi:10. 4049/jimmunol.1403046.
27. Yu X, Harden K, Gonzalez LC, Francesco M, Chiang E, Irving B, et al. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. Nat Immunol. 2009;10: 48-57. doi:10.1038/ni.1674.
28. Fuchs A, Cella M, Giurisato E, Shaw AS, Colonna M. Cutting edge: CD96 (tactile) promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD155). J Immunol. 2004;172: 3994-3998. doi:10.4049/jimmunol.172.7.3994
29. Stanietsky N, Simic H, Arapovic J, Toporik A, Levy O, Novik A, et al. The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. Proc Natl Acad Sci. 2009;106: 17853-17863. doi:10.1073/pnas.0903474106
30. Wang PL, O'Farrell C, Clayberger C, Krensky AM. Identification and molecular cloning of tactile. A novel human T cell activation antigen that is a member of the Ig gene superfamily. J Immunol. 1992;148: 2600-2608. http://www.jimmunol.org/content/148/8/2600

31. Chan CJ, Martinet L, Gilfillan S, Souza-Fonseca-Guimaraes F, Chow MT, Town L, et al. The receptor CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions. Nat Immunol. 2014;15: 431-438. doi:10.1038/ni.2850
32. Palumbo A, Anderson K. Multiple myeloma. N Eng J Med. 2011;364: 1046-1060. doi:10.1056/NEJMra1011442
33. Robak P, Drozdz I, Szemraj J, Robak T. Drug resistance in multiple myeloma. Cancer Treat Rev. 2018;70: 199-208. doi:10.1016/j.ctrv.2018.09.001.
34. Guillerey C, Ferrari de Andrade L, Vuckovic S, Miles K, Ngiow SF, Yong MC, et al. Immunosurveillance and therapy of multiple myeloma are CD226 dependent. J Clin Invest. 2015;125: 2904. doi:10.1172/JCI82646
35. Flonda C, Soriani A, Zingoni A, Santoni A, Cippitelli M. NKG2D and DNAM-1 ligands: molecular targets for NK cell-mediated immunotherapeutic intervention in multiple myeloma. Biomed Res Int. 2015;2015: 178698. doi:10.1155/2015/178698
36. El-Sherbiny YM, Meade JL, Holmes TD, McGonagle D, Mackie SL, Morgan AW, et al. The requirement for DNAM-1, NKG2D, and NKp46 in the natural killer cell-mediated killing of myeloma cells. Cancer Res. 2007;67: 8444-8449. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4230
37. Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, Raulet DH. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. Nature. 2005;436: 1186-1190. doi:10.1038/nature03884

38. Soriani A, Zingoni A, Cerboni C, Iannitto ML, Roccoardo MR, Di Gialleonardo V, et al. ATM-ATR-dependent up-regulation of DNAM-1 and NKG2D ligands on multiple myeloma cells by therapeutic agents results in enganced NK-cell susceptibility and is associated with a senescent phenotype. Blood. 2009;113:3503-3511. doi:10.1182/blood-2008-08-173914.
39. Sonmez O, Sonmez M. Role of platelets in immune system and inflammation. Port Biomed J. 2017;2: 311-314. doi:10.1016/j.pbj.2017.05.005
40. Lam FW, Vijavan KV, Rumbaut RE. Platelets and their interactions with other immune cells. Compr Physiol. 2015;5: 1265-1280. doi:10.1002/cphy.cl40074
41. Li N, Ji Q, Hjemdahl P. Platelet-lymphocyte conjugation differs between lymphocyte subpopulations. J Thromb Haemost. 2006;4: 874-881. doi:10.1111/j.1538-7836.2006.01817.x
42. Cognasse, F., Hamzeh-Cognasse, H., Lafarge, S., Chavarin, P., Cogne, M., Richard, Y., Garraud, O., 2007. Human platelets can activate peripheral blood B cells and increase production of immunoglobulins. Exp Hematol. 35, 1376-1387, doi:10.1016/j.exphem.2007.05.021
43. Kojima H, Kanada H, Shimizu S, Kasama E, Shibuya K, Nakauchi H, et al. CD226 mediate platelet and megakaryocytic cell adhesion to vascular endothelial cells. J Biol Chem. 2003;278: 36748-36753. doi:10.1074/jbc.M300702200

44. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the human immunology project. Nat Rev Immunol. 2012;12: 191-200. doi:10.1038/nri3158
45. Avery DT, Ellyard JI, Mackay F, Corcoran LM, Hodgkin PD, Tangye SG. Increased expression of CD27 on activated human memory B cells correlates with their commitment to the plasma cell lineage. J Immunol. 2005;174: 4034-4042. doi:10.4049/jimmunol.174.4.4034
46. Rawstron AC. Immunophenotyping of plasma cells. Curr Protoc Cytom. 2006;36: 6.23.1-6.23.14. doi:10.1002/0471142956.cy0623s36.
47. Barwick BG, Scharer CD, Bally APR, Boss JM. Plasma cell differentiation is coupled to division-dependent DNA hypomethylation and gene regulation. Nat Immunol. 2016;17: 1216-1225. doi:10.1038/ni.3519
48. Kim D, Park CY, Medeiros BC, Weissman IL. CD19-CD45 low/- CD38 high/CD138+ plasma cells enrich for human tumorigenic myeloma cells. Leukemia. 2012;26: 2530-2537. doi:10.1038/leu.2012.140
49. Nakano-Yokomizo T, Tahara-Hanaoka S, Nakanishi-Oda C, Nabekura T, Tchao NK, Kadosaki M, et al. The immunoreceptor adapter protein DAP12 suppresses B lymphocyte-driven adaptive immune responses. J Exp Med. 2011;208: 1661-1671. doi:10.1084/jem.20101623
50. Van Belle K, Herman J, Boon L, Waer M, Sprangers B, Louat T. Comparative in vitro immune stimulation analysis of primary human B

cells and B cell lines. J Immunol Res. 2016:2016: 5281823. doi:10.1155/2016/5281823.

51. Niehage C, Steenblock C, Pursche T, Bornhauser M, Corbeil D, Hoflack B. The cell surface proteome of human mesenchymal stromal cells. PLoS One. 2011;6: e20399. doi: 10.1371/journal.pone.0020399
52. Pak HK, Gil M, Lee Y, Lee H, Lee AN, Roh J, Park CS. Regulator of G protein signaling 1 suppresses CXCL12-mediated migration and AKT activation in RPMI 8226 human plasmacytoma cells and plasmablasts. PLoS One. 2015;10: e0124793. doi:10.1371/journal.pone.0124793
53. D Payne, S Drinkwater, R Baretto, M Duddridge, MJ Browning. Expression of chemokine receptors CXCR4, CXCR5 and CCR7 on B and T lymphocytes from patients with primary antibody deficiency. Clin Exp Immunol. 2009;156: 254-262. doi:10.1111/j.1365-2249.2009.03889.x
54. Daien Cl, Gailhac S, Mura T, Audo R, Combe B, Hahne M, et al. Regulatory B10 cells are decreased in patients with rheumatoid arthritis and are inversely correlated with disease activity. Arthritis Rheumatol. 2014;66: 2037-2046. doi:10.1002/art.38666.
55. Shen P, Roch T, Lampropoulou V, O'Connor RA, Stervbo U, Hilgenberg E, et al. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. Nature. 2014;507: 366-370. Doi:10.1038/nature12979

56. Matsumoto M, Baba A, Yokota T, Nishikawa H, Ohkawa Y, Kayama H, et al. Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. Immunity. 2014;41: 1040-1051. doi:10.1016/j.immuni.2014.10.016
57. Bemasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A., Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. Science. 2002;298: 2199-2202. doi:10.1126/science.1076071
58. Joo H, Coquery C, Xue Y, Gayet I, Dillion SR, Punaro M, et al. Serum from patients with SLE instructs monocytes to promote IgG and IgA plasmablast differentiation. J Exp Med. 2012;209: 1335-1348. doi:10.1084/jem.20111644
59. Heine G, Drozdenko G, Grun JR, Change HD, Radbruch A, Worm M. Autocrine IL-10 promotes human B-cell differentiation into IgM- or IgG-secreting plasmablasts. Eur J Immunol. 2014;44: 1615-1621. doi:10.1002/eji.201343822
60. Malisan F, Briere F, Bridon JM, Harindranath N, Mills FC, Max EE, et al. Interleukin-10 induces immunoglobulin G isotype switch recombination in human CD40-activated naïve B lymphocytes. J Exp Med. 1996;183: 937-947. doi:10.1084/jem.183.3.937
61. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleuklin-10 and the interleukin-10 receptor. Annu Rev Immunol. 2001;19: 683-765. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.683
62. Ping S, Toralf R, Vicky L, Richard AO, Ulrik S, Ellen H, et al. IL-35-producing C cells are critical regulators of immunity during

autoimmune and infectious diseases. Nature. 2014;507: 366-370. doi:10.1038/nature 12979

63. Takagi A, Tsukamoto S, Kawano Y, Moschetta M, Mishima Y, Kokubun K, et al. Platelets/Megakaryocytes are critical regulators of tumor progression in multiple myeloma. Blood. 2015;126: 1793

10　図

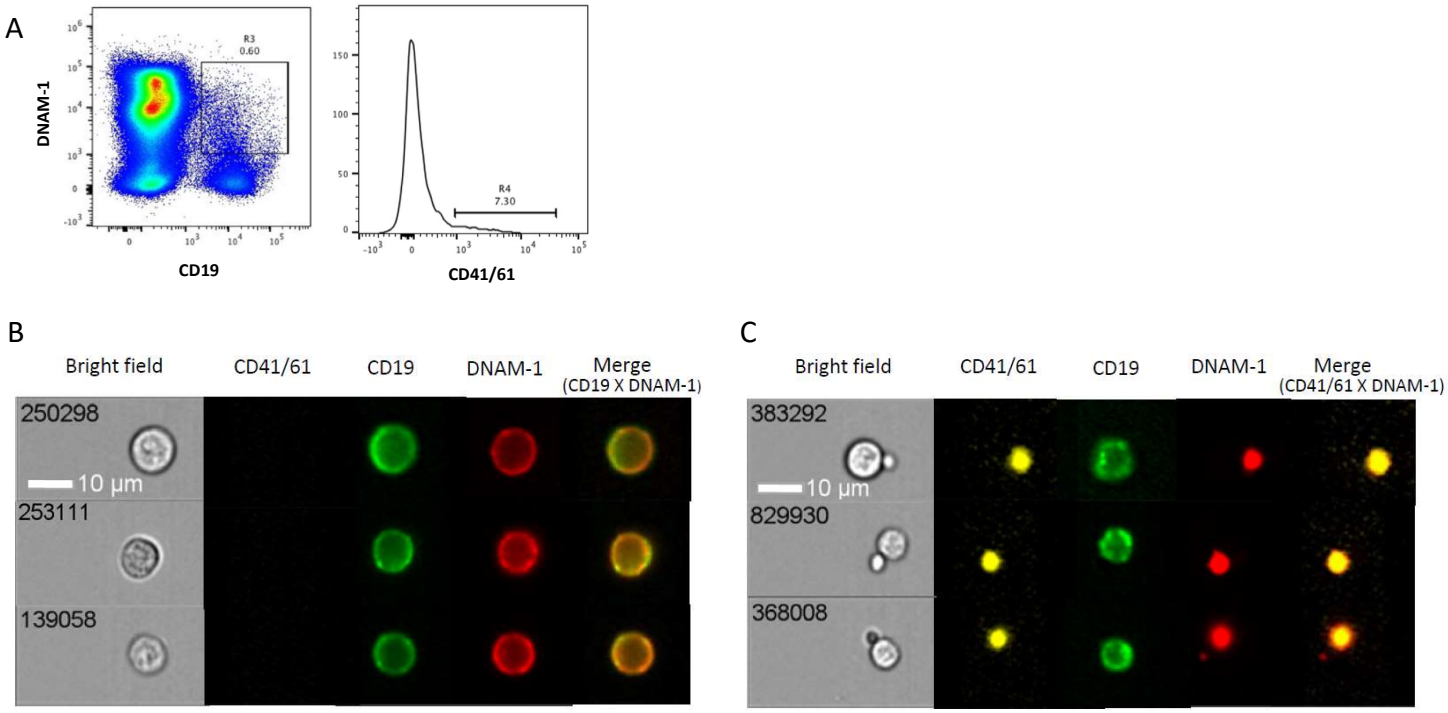

図1 血小板とB系統細胞の結合

A：ヒトのPBMCを抗CD41/61、抗CD19、抗DNAM-1抗体で染色し、イメージングフローサイトメトリーにより解析した。左図はDNAM-1^{+}CD19^{+}細胞のゲーティング様式を示す。数値はゲートに含まれる細胞分画の割合を表す。右図はDNAM-1^{+}CD19^{+}細胞におけるCD41/61^{+}細胞の割合を示した。B-C：イメージングフローサイトメトリーにより撮影した代表的な画像。左から明視野像、CD41/61、CD19、DNAM-1の蛍光像及びMerge像（B：CD19及びDNAM-1、C：CD41/61及びDNAM-1）を示した。

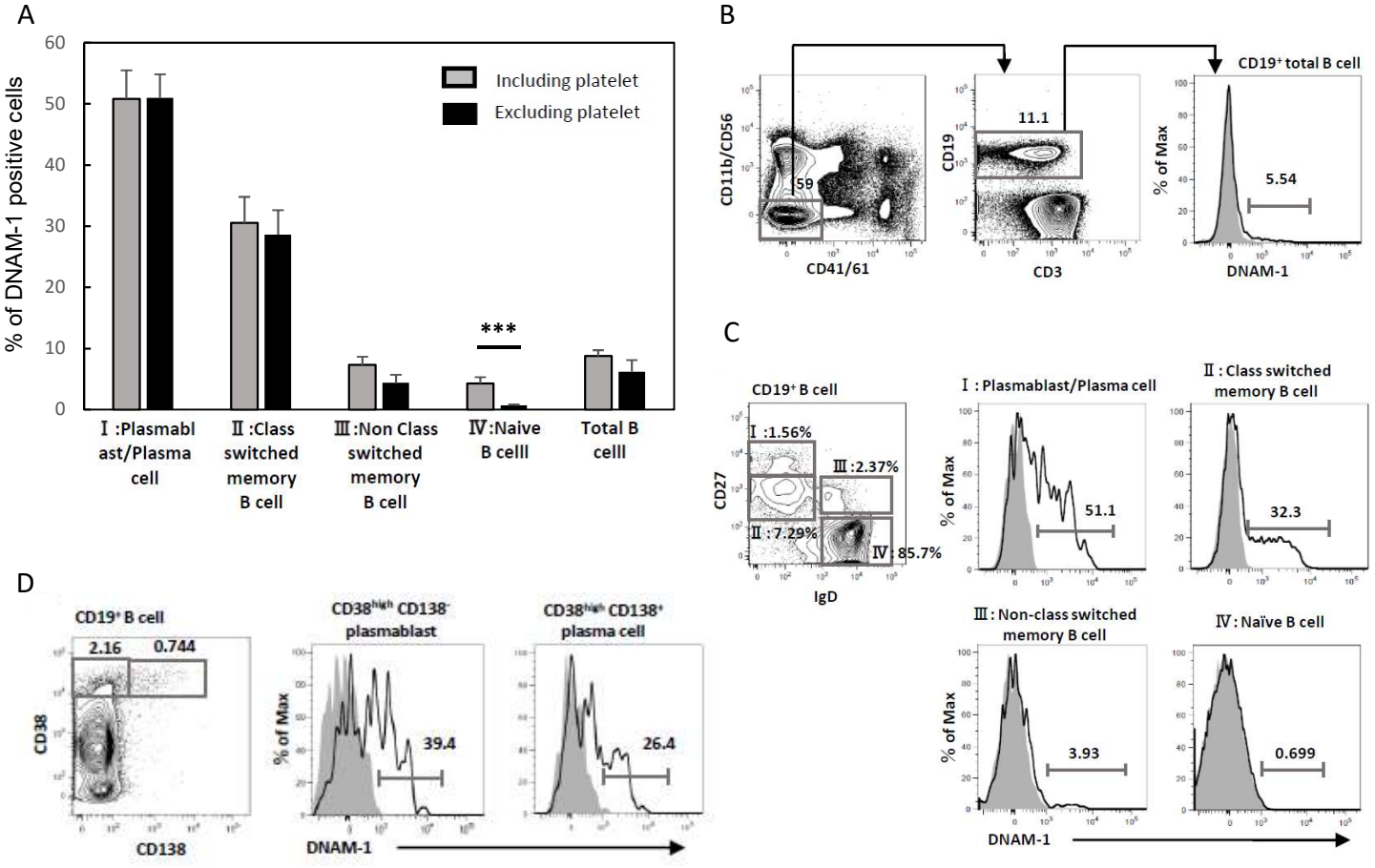

図2　フローサイトメーターによるヒトB系統細胞上のDNAM-1発現解析

A：ヒトのPBMCを各特異抗体で染色し，フローサイトメーターにより解析した。血小板結合B細胞を除去前後のB系統細胞の各サブセットにおけるDNAM-1陽性細胞の比率の平均値（n=5）を棒グラフで示した。エラーバーはSEM。*** P<0.01　B：B系統細胞のゲーティング様式を示した。前方散乱光(FSC-A)と側方散乱光(SSC-A)で展開することでリンパ球を選択し、PI陽性細胞を死細胞として除去した。その後、CD41/61⁻CD11b⁻CD56⁻CD3⁻CD19⁺ B系統細胞上のDNAM-1を示した。 C: CD27とIgDの染色によりB系統細胞を分化段階によりplasmablast/ plasma 細胞(Ⅰ)、クラススイッチしたB細胞(Ⅱ)、クラススイッチしていないmemory B細胞(Ⅲ)、naïve B細胞(Ⅳ)の4種類に分類し、各サブセットにおけるDNAM-1の発現を示した。D:CD38とCD138の染色結果からplasmablastとplasma 細胞を分け、各サブセットにおけるDNAM-1の発現を示した。
ヒストグラムの実線は抗DNAM-1抗体による染色，灰色はアイソタイプコントロール抗体による染色を表す。数値は各ゲートにおける細胞分画の割合を示す。

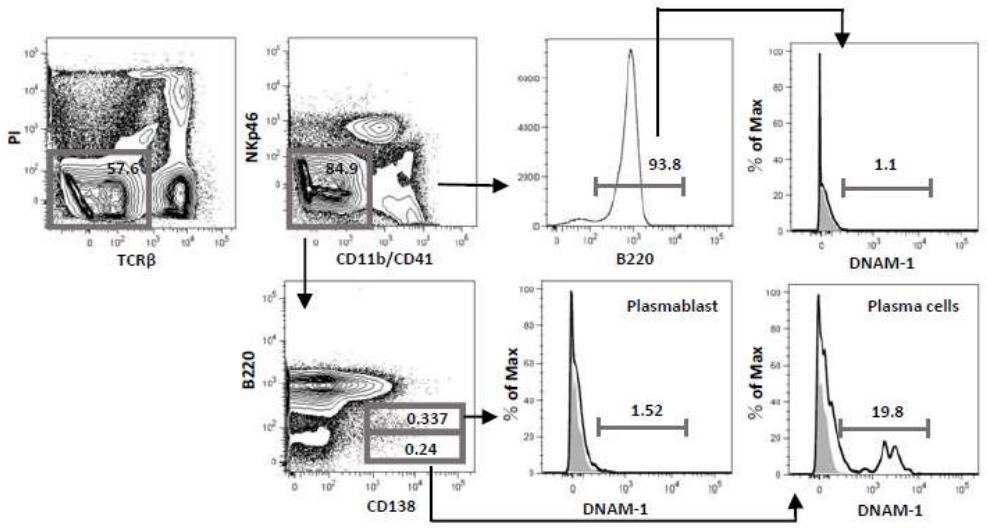

図3　フローサイトメーターによるマウスB系統細胞上のDNAM-1発現解析

C57/BL6マウスの脾臓B系統細胞のゲーティング様式を示した。前方散乱光(FSC-A)と側方散乱光(SSC-A)で展開することでリンパ球を選択し、PI陽性細胞を死細胞として除去した。その後、Lin(CD41^{-}CD11b^{-}NKp46^{-}TCR-β^{-})B220^{+} B系統細胞上のDNAM-1を示した。B220とCD138の染色結果よりB220^{dull}CD138^{+}plasmablastとB220^{-}CD138^{+} plasma細胞を分け、各サブセットにおけるDNAM-1の発現を示した。ヒストグラムの実線は抗DNAM-1抗体による染色，灰色はアイソタイプコントロール抗体による染色を表す。数値は各ゲートにおける細胞分画の割合を示す。

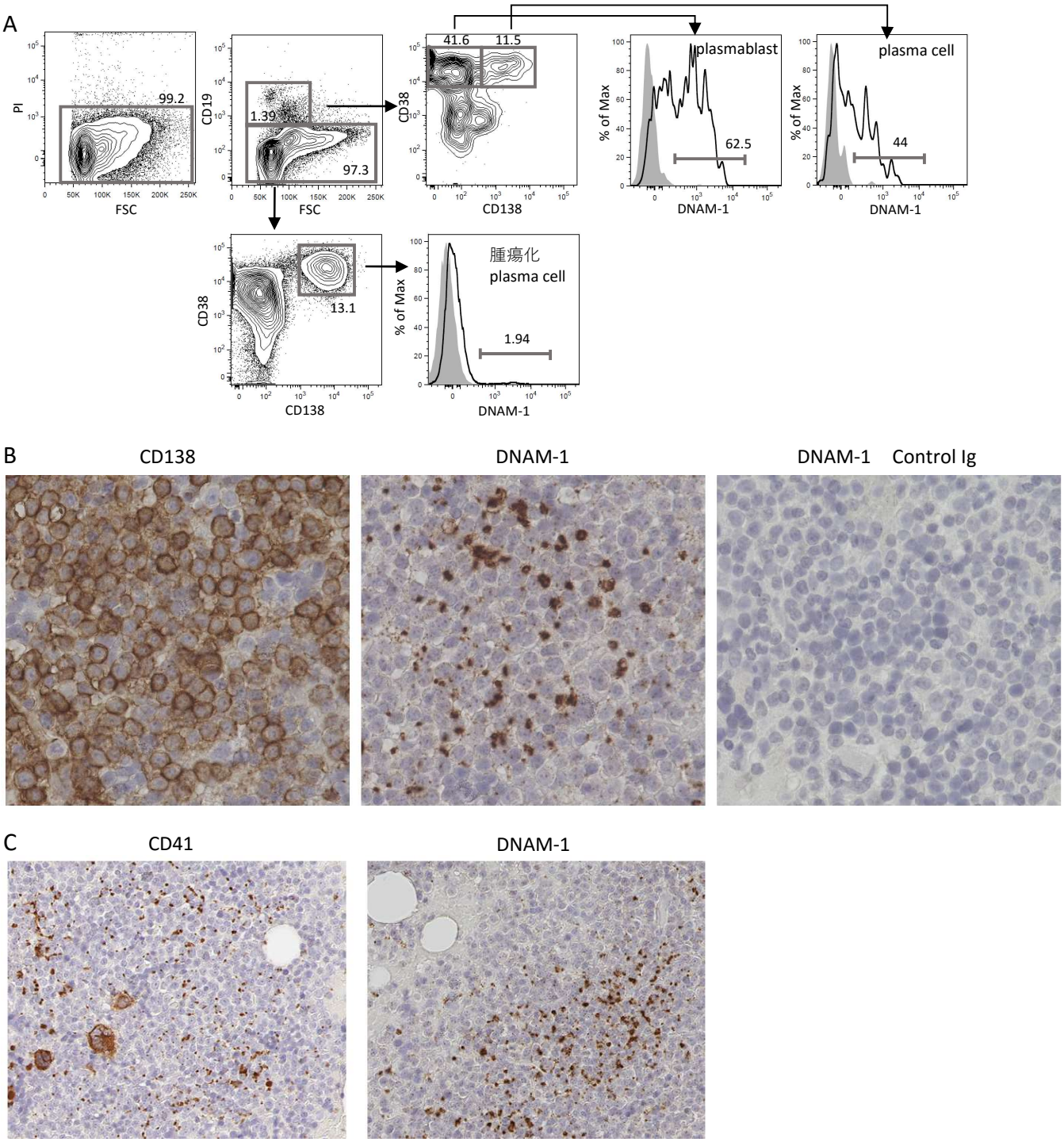

図4　多発性骨髄腫の腫瘍性plasma細胞におけるDNAM-1の発現解析

A：フローサイトメーターによる多発性骨髄腫患者由来の末梢血のゲーティング様式を示した。前方散乱光(FSC-A)と側方散乱光(SSC-A)で展開することでリンパ球を選択し、PI陽性細胞を死細胞として除去した。その後、CD19、CD38、及びCD138の染色結果よりplasmablast、 plasma細胞、腫瘍化plasma細胞を特定し、各サブセットにおけるDNAM-1の発現を示した。ヒストグラムの実線は抗DNAM-1抗体による染色，灰色はアイソタイプコントロール抗体による染色を表す。数値は各ゲートにおける細胞分画の割合を示す。B，C：多発性骨髄腫患者の骨髄を用いた免疫組織化学染色の代表的な組織像を示した（B：左からCD138，DNAM-1，アイソタイプコントロールの組織像，C：左からCD41，DNAM-1の組織像）。Bは骨髄の連続切片を使用，Cは非連続切片を使用した。

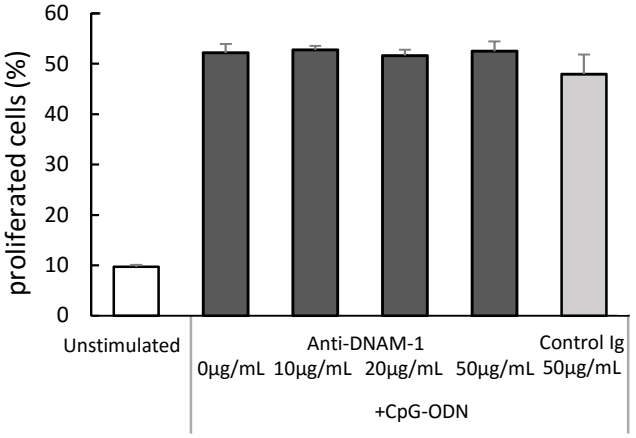

図5　B系統細胞の増殖、抗体産生におけるDNAM-1の関与

事前に抗DNAM-1抗体もしくはアイソタプコントロール抗体をプレートにコーティングし，CFSEで標識したCD19+細胞（ヒト末梢血より分離）を加え、CpG-ODN存在下、非存在下で7日間培養し，CpG-ODNによるB細胞の増殖条件下でDNAM-1を刺激した際の変化について解析した。増殖した細胞についてはCFSEの蛍光強度の減衰を指標としてフローサイトメーターにて解析した。各実験条件下における増殖した細胞の比率（３ウェルの平均値）を棒グラフで示した。エラーバーはSEM。

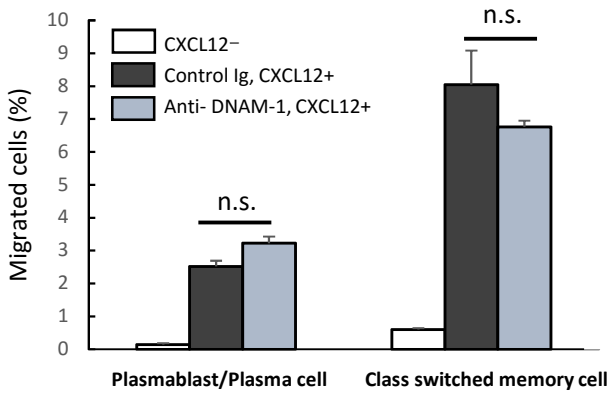

図6　Plasmablast/Plasma細胞，クラススイッチしたmemory B細胞の移動におけるDNAM-1の関与

トランスウェルのインサートにHUVECを播種し，末梢血から分離したB系統細胞を抗DNAM-1中和抗体あるいはコントロール抗体とインキュベート後にインサートに添加した。トランスウェルの下層にCXCL12の存在下，非存在下で5時間培養し，下層に移動した細胞についてフローサイトメーターで解析した。トランスウェルの下層へ移動した細胞をトランスウェルのインサートに添加した細胞で除した比率（3ウェルの平均値）を棒グラフで示した。Plasmablast/Plasma細胞及びクラススイッチしたmemory B細胞はCD27とIgDの染色結果に基づき分類した。エラーバーはSEM。n.s.：not significant.

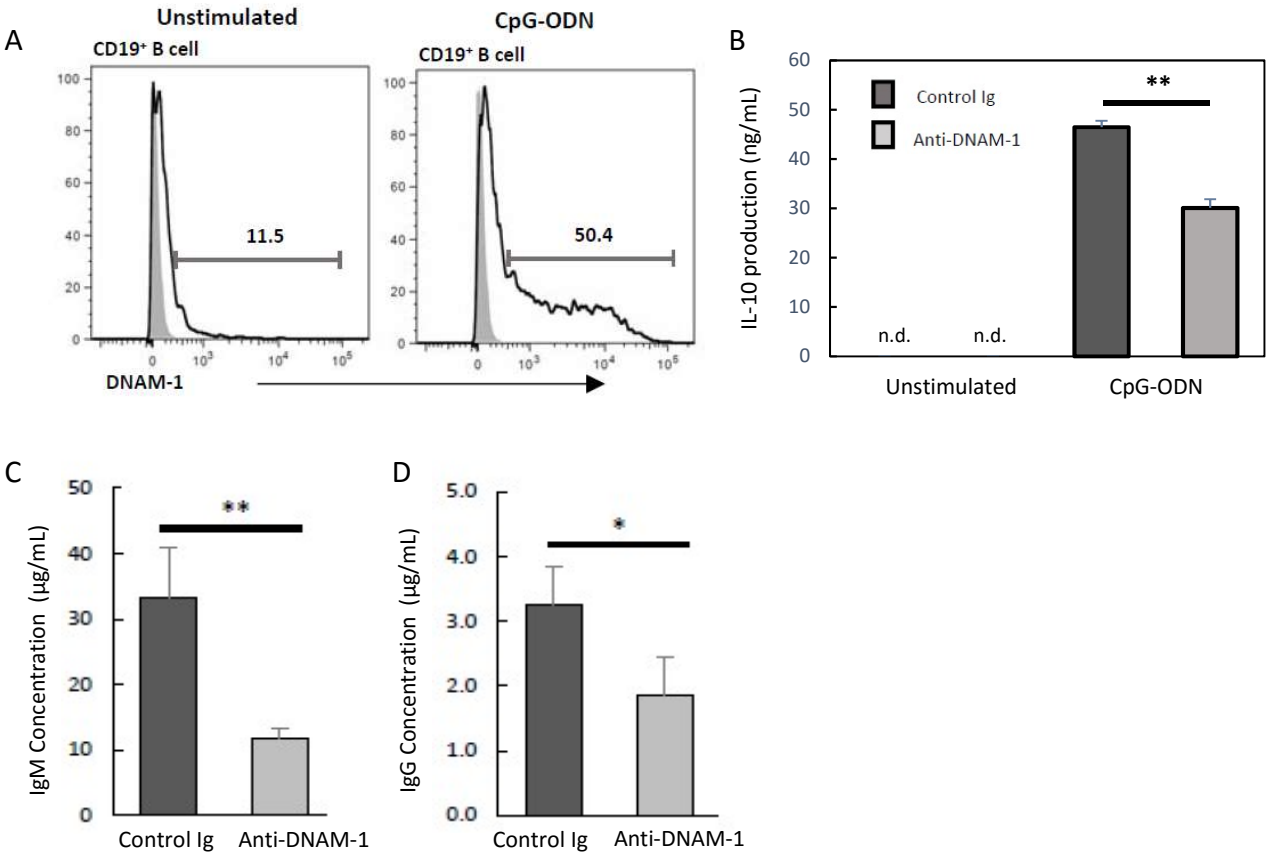

図7　B系統細胞によるIL-10及び抗体産生におけるDNAM-1の関与

A：ヒト末梢血から分離したB系統細胞をCpG-ODN刺激の存在下，非存在下で、5日間培養した際のDNAM-1発現についてフローサイトメーターにより解析した代表的なヒストグラムを示した。ヒストグラムの実線は抗DNAM-1抗体による染色，灰色はアイソタイプコントロール抗体による染色を表す。数値は各ゲートにおける細胞分画の割合を示す。B-D：ヒト末梢血から分離したB系統細胞をコントロール抗体又は抗DNAM-1中和抗体とインキュベートし，その後CpG-ODN存在下，非存在下で5日間（B），又は7日間（C, D）培養した。B：培養上清のIL-10濃度をフローサイトメーターにより測定し，CpG-ODN刺激によるIL-10産生におけるDNAM-1が及ぼす影響について解析した。棒グラフは各条件下における培養上清IL-10濃度の6ウェルの平均値を示した。C-D：培養上清のIgM（n=4）およびIgG（n=3）濃度をELISAにより測定し，CpG-ODN刺激によるIgM, IgG産生におけるDNAM-1が及ぼす影響について解析した。 棒グラフは各条件下における培養上清IL-10濃度の6ウェルの平均値を示した。エラーバーはSEM。n.d. : not detected. ** P<0.01, * P<0.05