

博士論文

濾胞樹状細胞が產生する IL-34 による  
胚中心反応の制御に関する研究

2019 年 3 月

小川 紗也香

岡山大学大学院  
自然科学研究科

## 2. 要約

IL-34 は、Colony stimulating factor (CSF)-1とともに CSF-1 receptor (CFS-1R) のリガンドとして作用することが知られている。我々のグループは、胚中心反応の制御に中心的な役割を担う濾胞樹状細胞 (FDC) のマウス細胞株: FL-Y が、IL-34 依存的に胚中心の形成への関与が示唆される新規単球系細胞 FDC-induced monocytic cell (FDMC) の分化を誘導することを発見した。しかし、IL-34 依存的な作用メカニズムを含め、その分化機構は明らかとなっていない。そこで本研究では、FDMC 分化における IL-34 の作用機構の解明を行った。

まず、CRISPER/Cas9 システムを用いて FL-Y の *Il34* 遺伝子を欠失した FL-Y IL-34 ノックアウト (KO) 細胞を作製した。FDMC の分化誘導解析を行った結果、FL-Y IL-34 KO では FDMC 分化の誘導能力が著しく低下していた。さらに、Transwell を用いて、FL-Y と FDMC 前駆細胞の細胞間接触を阻害した条件下において FDMC 分化誘導効率の解析を行ったところ、細胞間接触の阻害により FDMC 分化の誘導効率は著しく低下した。一方で、パラホルムアルデヒド処理により FL-Y のタンパク質分泌を阻害した条件下では、FL-Y の FDMC 分化誘導能力は維持されていた。これらの結果より、FDMC の分化には FL-Y 細胞表面に発現する IL-34 が、FDMC 前駆細胞の発現する CSF-1R へ作用し、シグナル伝達経路を活性化することが必要であると考えられる。実際に、FL-Y 細胞表面における IL-34 の発現はフローサイトメーターを用いて確認することが可能であった。IL-34 の 1 次アミノ酸配列には膜貫通領域が存在せず、IL-34 が細胞表面に発現する報告もない。

そこで、FL-Y における IL-34 の細胞表面への発現制御機構について検討するため、細胞膜画分における IL-34 との結合分子を探査した。その結果、IL-34 結合分子として、分子シャペロンとして知られる 78 kDa glucose-regulated protein (GRP78) を同定した。次に、FDMC 分化および IL-34 の細胞表面発現における GRP78 の機能を詳細に解析するため、FL-Y GRP78 ノックアウト細胞 (FL-Y GRP78<sup>-/-</sup>) を樹立した。FL-Y GRP78<sup>-/-</sup> では、細胞表面の IL-34 発現量は低下し、さらに FDMC の誘導能力も低下していた。この結果より、GRP78 は IL-34 の細胞表面における発現を調節し、FDMC の分化を制御すると考えられる。

最後に、生体内における IL-34 の機能を解析するため、IL-34 KO マウスを用いて免疫後の FDMC 様細胞の存在と抗体応答について解析した。その結果、IL-34 KO マウスでは野生型マウスと比較して FDMC 様細胞 (CD11b<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup>) が減少し、さらに、血清中の抗原特異的 IgG1 抗体値が低下していた。これらの結果より、生体内においても IL-

34 依存的に発生する FDMC 様細胞が存在し、IL-34 が胚中心反応の制御に関与すると考えられる。

### 3. 緒言

Colony stimulating factor-1 receptor (CSF-1R) のシグナル伝達は単球やマクロファージの分化、増殖、生存維持のために重要である<sup>1-4</sup>。現在までに、CSF-1R のリガンドとして Colony stimulating factor-1 (CSF-1) と Interleukin-34 (IL-34) が知られているが、特に CSF-1 からのシグナルが、上記の細胞の分化、増殖、生存の維持に必要であると言われている。CSF-1 が CSF-1R に結合すると、8か所のチロシンのリン酸化が起こり、Src/Pyk2 シグナル伝達経路と PI3K シグナル伝達経路が活性化される<sup>5,6</sup>。実際に、CSF-1<sup>op/op</sup> マウスではマクロファージや破骨細胞が正常に分化せず、歯の欠失や骨格異常が見られる<sup>7</sup>。一方、CSF-1R ノックアウト (KO) マウスは、CSF-1<sup>op/op</sup> マウスよりも重度な表現系を持ち、ランゲルハンス細胞とミクログリアも完全に欠損している<sup>8,9</sup>。

IL-34 は、CSF-1 と同様に CSF-1R に結合し、シグナル伝達を引き起こすサイトカインとして発見された<sup>10</sup>。IL-34 と CSF-1 のアミノ酸配列の相同性は低いが、IL-34 と CSF-1 により活性化される CSF-1R の刺激は類似しているため<sup>11</sup>、同等の作用を持つと考えられていた。実際に、CSF-1<sup>op/op</sup> マウスにおいて、*Csf1* プロモーターの制御下において *Il34* 遺伝子を発現させると、CSF-1<sup>op/op</sup> マウスで認められるマクロファージや破骨細胞の分化異常を救済することができる<sup>3</sup>。しかし、IL-34 KO マウスでは一部のランゲルハンス細胞やミクログリアの分化異常が起きており、IL-34 と CSF-1 の機能的な差異を示す報告もある<sup>12,13</sup>。また、CSF-1R への結合親和性は、CSF-1 よりも IL-34 の方が高いことや<sup>11</sup>、IL-34 と CSF-1 による CSF-1R のリン酸化パターンが異なり<sup>14</sup>、それぞれの刺激により分化した細胞のサイトカイン発現パターンが異なることなどから<sup>14,15</sup>、IL-34 と CSF-1 の機能的な差異が示唆されている。このように、現在では IL-34 と CSF-1 は異なる作用をもつと考えられているが、IL-34 と CSF-1 の CSF-1R へのシグナル伝達がどの様に調節されているのか、その特異性はどの様にして決定されているかなど不明な点が多い。

胚中心 (GC) は、抗原により活性化された B 細胞、濾胞ヘルパーT 細胞 (T<sub>FH</sub>)、濾胞樹状細胞 (FDC) により 2 次リンパ組織内に形成される微小環境である。GC において、B 細胞は急激に増殖する過程で自身の抗体遺伝子に変異を導入することにより抗体分子の多様性を獲得する。その後、多様化した B 細胞集団の中で、抗原に対して高親和性な抗体を産生する B 細胞のみが FDC と T<sub>FH</sub> との相互作用によりクローン選択を受ける

<sup>16-18</sup>。FDC は、胚中心の形成から高親和性抗体を產生する B 細胞の選択までの一連の胚中心反応の進行に必要であるとされているが、その詳細な機能は明らかとなっていない<sup>19-21</sup>。我々のグループは、胚中心反応における FDC の機能解析を行うため、マウス濾胞樹状細胞株 FL-Y を樹立した<sup>22</sup>。FL-Y は、FDC と類似した細胞表面マーカーを発現するのみならず、*in vitro*において GC B 細胞の生存を維持できることから、FDC の機能を再現することが可能な細胞株である<sup>23</sup>。さらに、GC B 細胞の生存促進活性を持つことが報告されている BAFF (B cell activating factor belonging to the TNF family) 遺伝子を導入した FL-Y (FL-YB) では、FL-Y の持つ GC B 細胞の生存維持効果が促進されており<sup>24</sup>、現在、FL-YB が最も FDC の性質を再現することが可能な細胞株である<sup>25</sup>。

近年、FL-Y の機能を解析する過程で、FL-Y が新規な単球系細胞 FDMC (FDC-induced monocytic cell) の分化を誘導することを発見した<sup>26</sup>。FDMC は、脾臓細胞中の c-kit<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup>細胞群を FL-Y 細胞上で約 10 日間培養することにより誘導され、細胞表面分子の発現パターンは既知の細胞とは異なっている。さらに、FDMC の免疫学的機能を解析したところ、*in vitro*において GC 様 B 細胞の分化と増殖を促進した。これらの結果は、FDC により分化誘導される単球系細胞 FDMC の胚中心反応への関与を示唆する。

次に、FL-Y の產生する FDMC 誘導因子を探索するため、FDMC 前駆細胞が CSF-1R を発現していることに注目した。これまでに、CSF-1R には 2 つの異なるリガンド (CSF-1, IL-34) が報告されている。まず、FL-Y における CSF-1 と IL-34 の発現を RNA 干渉により阻害したところ、FL-Y は CSF-1 と IL-34 を共に発現するにも関わらず、IL-34 発現を抑制したときのみ FDMC の分化誘導能力は低下した。また、中和抗体を用いて FL-Y の発現している IL-34 の CSF-1R への結合を阻害した場合でも FDMC の誘導効率が低下した。これらの結果より、FDMC の分化には CSF-1 ではなく IL-34 のみが重要であることが明らかとなったが<sup>26</sup>、これまでに IL-34 の特異的な作用機構については明らかとなっていない。そこで本研究では、FDMC 分化における IL-34 の選択的作用を明らかにするため、FDMC 分化における IL-34 の作用機構を明らかにすることを目的とする。さらに、生体における IL-34 の胚中心反応への役割を解明する。

## 4. 実験材料と方法

### 実験動物

オスの BALB/c マウスは日本チャールズリバーより購入した。マウスは、7-12 週齢で使用した。全てのマウスを使用する実験は、岡山大学動物実験委員会に実験計画書を提出し、承認された後に実施した。IL-34 KO マウスはチューリッヒ大学の Burkhard Becher 教授より提供して頂いた<sup>12</sup>。

### 細胞株

マウス FDC 株 FL-Y は、免疫した BALB/c マウスのリンパ節より単離した初代 FDC を長期培養することにより樹立した<sup>22</sup>。FL-Y は、DMEM と RPMI1640 を 1:1 で混合したものに 10 % のウシ胎児血清と 2 mM グルタミン、1 mM ピルビン酸、100 µg/mL ペニシリノ G、50 µg/mL ストレプトマイシン、50 µM 2-メルカプトエタノールを加えた培地に 5 ng/mL TNF- $\alpha$  を加えて培養した。M-NFS-60 細胞は熊本大学 鈴 伸也 教授に譲渡して顶いた<sup>27</sup>。M-NFS-60 細胞は、10 % ウシ胎児血清を含む RPMI-1640 培地に 100 ng/mL human M-CSF を添加して培養した<sup>28</sup>。

### IL-34 KO FL-Y と GRP78 KO FL-Y の樹立

IL-34 遺伝子をノックアウトするための標的ベクターを作製するため、IL-34 遺伝子のエキソン 3 の 5'側と 3'側の DNA 断片を IL-34-1st-F/IL-34-1st-R と IL-34-2nd-F/IL-34-2nd-R のプライマーペアにより増幅した。PCR には KOD FX neo DNA polymerase (Toyobo) を使用した。それぞれの DNA 断片を pCR-Blunt vector (Invitrogen) にクローニングし、BigDye 1.1 と ABI310 genetic analyzer により遺伝子配列の確認を行なった。5'側と 3'側の DNA 断片は *NotI* と *ClaI* 制限酵素サイトを用いて pBluescript SK (+) vector にサブクローニングした。プラスチサイジン S 耐性(BSR) もしくはピューロマイシン耐性(puro<sup>r</sup>) 遺伝子発現カセットを pLox-BSR もしくは pLox-puro vector から切り出し、5'断片と 3' 断片の間に存在する *BamHI* サイトに組み込んだ<sup>29</sup>。gRNA 発現ベクターには IL-34 遺伝子のエキソン 3 を標的とする 2 つのガイド配列 (T1 と T2) を設計した。2 つの相補的オリゴヌクレオチドをアニーリングし、gRNA 発現ベクター (Addgene) に組んだ。

GRP78 遺伝子をノックアウトするため、GRP78 遺伝子の開始コドンを含むエキソン 2 の 5'側と 3'側の DNA 断片を GRP78-1st-F/GRP78-1st-R と GRP78-2nd-F/GRP78-2nd-R のプライマーペアにより増幅し、IL-34 ノックアウトベクターと同様の方法で GRP78 ノックアウトベクターを構築した。

ターゲティングベクター (1 µg)、gRNA ベクター (1 µg)、Cas9 発現ベクター (1 µg) (Addgene) と X-treamGENE HP DNA transfection reagent (2 µL) (Roche) を 200 µL Opti-MEM (Invitrogen) 中で混合し、その溶液を培養しておいた FL-Y に 24 時間処理をした。安定遺伝子発現細胞は、2 µg/mL ピューロマイシン (Sigma-Aldrich) もしくは 10 µg/mL ブラストサイジン S 塩酸塩 (科研製薬) を含む選択培地で 2-3 週間培養することにより選択した。さらに、限界希釈によりシングルクローニング化し、ゲノム PCR と RT-PCR、ウエスタンプロットにより IL-34 もしくは GRP78 の遺伝子の欠損および発現低下を確認した。ベクター作製および遺伝子組換えの確認に使用したプライマーは **Sup Table 1,2,3** に示す。

#### レトロウイルス遺伝子導入法を用いた IL-34 過剰発現 FL-Y 細胞の樹立

IL-34 cDNA は、**Sup Table 3** に示すプライマーセットを用いて KOD FX neo DNA polymerase (Toyobo) により増幅し、pCR-Blunt へクローニングした (pCR-Blunt-IL-34)。IL-34 に twin-Strep-tag を付加した cDNA 配列をコードする遺伝子を作製するため、two step PCR によりシグナル配列 (1-20 アミノ酸残基) と IL-34 ペプチド配列の間に、twin-Strep-tag を組み込み、pCR-Blunt ベクターにクローニングした (pCR-Blunt-IL-34-Nst)。IL-34 と IL-34-Nst 発現シャトルベクターを構築するため、pCR-Blunt-IL-34、pCR-Blunt-IL-34-Nst から *EcoRI* により IL-34、IL-34-NstDNA 断片を切り出し、pQCXIP ベクター (Clontech) にサブクローニングした。使用したプライマーは **Sup Table 4** に示す。

GP2-293 パッケージング細胞に、シャトルベクターと pVSV-G プラズミドベクター (Clontech) を一過的に遺伝子導入し、レトロウイルスを含む培養上清を回収した。このレトロウイルスを含む培養上清に 4 µg/mL ポリブレン、5 mM HEPES (pH 7.4) を加え、FL-Y に形質導入した。遺伝子導入された FL-Y 細胞を選択するため、FL-Y を 4 µg/mL ピューロマイシンを含む培地で培養した。

#### FDMC の分化誘導

FDMC の分化誘導は以前の報告と同様に行なった<sup>26</sup>。24 well 培養プレートに  $5 \times 10^3$  もしくは  $1 \times 10^4$  cells/mL FL-Y を 1 mL 分注し、一晩培養した。次の日、赤血球と付着性細胞と T 細胞を除去したマウス脾臓細胞  $1 \times 10^6$  cells/mL 1mL を、培地を取り除いた FL-Y 培養プレートに加え、37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。実際には、BALB/c マウスから調整した脾臓細胞から、RBC lysis buffer を用いて赤血球を溶血し、付着細胞を除去した後、Dynabeads Mouse PanT (Thy1.2) (Invitrogen) もしくは CD90.2 (Thy1.2) Magnetic

Particles-DM (BD Biosciences) を用いて T 細胞を除去した。7-12 日間の培養後、トリパンブルーにより死細胞を染色した条件で生細胞を計数し、CD11b<sup>+</sup>cell の割合をフローサイトメーターを用いて測定することにより、FDMC 細胞数を算出した。CSF-1R シグナル伝達阻害条件下での FDMC 分化誘導では、FDMC 誘導開始日に 1 μM GW2580 (Abcam) を加えた。

### フローサイトメーター解析

細胞への標識抗体の非特異的な結合を防ぐため、回収した細胞を normal rat IgG (10 μg/mL) で 30 分間処理したのちに、staining buffer (0.2 % (w/v) BSA と 0.1 % (w/v) NaN<sub>3</sub> を含む PBS) で希釈した PE-labeled anti-CD11b mAb (M1/70; BioLegend) により、4 °C 30 分間染色した。Staining buffer で染色液を 3 回洗浄した後、蛍光標識した細胞を FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) と FlowJo software (Tree Star) により解析した。細胞表面 IL-34 の検出には、FL-Y を 4% ホルムアルデヒドで 10 分間固定したのち、sheep anti-IL-34 抗体 (AF5195; R&D Systems) で 1 時間染色した。Staining buffer で洗浄後、biotinylated anti-sheep IgG (Vector Laboratories) と streptavidin PE-Cy5 (BioLegend) によりそれぞれ 30 分間染色した。使用した抗体は **Sup Table 5** に示す。

### ウエスタンプロット

SDS-PAGE とウエスタンプロットに使用する細胞破碎液は、培養細胞から SDS-PAGE sample buffer を用いて回収した。検出抗体には sheep anti-IL-34 抗体 (AF5195; R&D Systems)、anti-Strep-tag mAb (Strep Mab Classic) (IBA)、rabbit anti-GRP78 Ab (N-20; Santa Cruz Biotechnology, GL-19; Sigma-Aldrich) を使用し、それぞれ rabbit HRP-anti-sheep IgG (Invitrogen)、HRP-anti-mouse IgG1 (Southern Biotechnology Associates)、HRP-anti-rabbit IgG (GE Healthcare) により標識した。最後に、ECL Plus もしくは ECL Pro (PerkinElmer) を用いて化学発光を検出した。また、内部標準として Anti-β-actin Ab (sc-47778; Santa Cruz Biotechnology) を使用した。使用した抗体は **Sup Table 6** に示す。

### 細胞膜画分の抽出とプルダウン分析

FL-Y、FL-Y-IL-34、FL-Y-IL-34-Nst、IL-34 KO FL-Y の細胞膜画分は、プレートで培養した FL-Y を PBS で洗浄し、セルスクレーパーで剥離した後、plasma membrane extraction kit (BioVision) を用いて抽出した。細胞膜画分を精製した後、RIPA buffer (150 mM NaCl, 20 mM HEPES (pH 7.4), 1 % NP-40, 0.1% SDS) により一晩可溶化した。その後、21,880×g

10分 4°Cで遠心し、上清を細胞膜画分とした。プルダウン解析のため、細胞膜画分溶液を10倍量のNP buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl pH 8.0) で希釈し、Strep-Tactinセファロースレジン (IBA) を添加した。NP bufferによる洗浄後、レジンに結合したタンパク質を溶出 buffer (2.5 mM デスチオビオチン (Sigma-Aldrich) 含有 NP buffer) により溶出し、SDS-PAGEとウエスタンプロットにより解析した。

### 質量分析

FL-Y-IL-34-Nst ( $1 \times 10^8$  cells) より精製した細胞膜画分を40 mLのNP bufferに溶解し、40 μLのStrep-Tactinセファロースレジンと4°Cで一晩反応させた。レジンをNP bufferで洗浄後、レジンに結合したタンパク質を20 μLの溶出 bufferで溶出した。溶出サンプルはSDS-PAGEにより分離し、silver staining kit (Invitrogen) を用いて染色した。目的のバンドを切り出し、10 μg/mL sequencing modified trypsin (Promega) を用いて37°Cで一晩ゲル内消化した<sup>30</sup>。断片化されたペプチドを0.1% ギ酸で溶出し、nano reverse phase LC system (島津製作所) を連結したLCMS-IT-TOF装置(島津製作所)によりLC-MS/MS解析した<sup>31</sup>。MS/MSデータはLCMS solutionソフトウェア(島津製作所)を用いて取得し、Mascot Distiller (Matrix Science) を用いて、シグナルテキストファイル(precursor peptide m/z, fragment ion m/z, intensity valuesを含む)に変換した。ファイルの解析には、Mascot (Matrix Science) MS/MS Ion Searchを使用し、SwissProt databaseにより消化産物中に含まれるペプチド配列からタンパク質を同定した。SwissPlot 2017\_05; Taxonomy, all; Enzyme, Trypsin; Variable modifications, carbamidomethyl (C), oxidation (M), propionamide (C); Peptide tolerance ± 0.05 Da; and MS/MS tolerance ± 0.05 Da

### リコンビナントGST-GRP78タンパク質の精製とプルダウン分析

Glutathione-S-transferase (GST)-tagged GRP78は、pGEX-KG-PreSベクター<sup>32</sup>にGST-GRP78配列を組み込んだプラスミドを導入した大腸菌 *E. coli* BL21 Star (DE3) で発現させ、グルタチオンセファロースクロマトグラフィー(GE Healthcare)により精製した。プルダウンに用いたIL-34-Nstは、FL-Y-IL-34-Nst ( $6 \times 10^6$  cells/mL)を200 μL PIPA bufferで溶解し、破碎後1,560×g 5分遠心した上清を使用した。GSTもしくはGST-GRP78タンパク質(40 μg)は、100 μLの細胞破碎液と20 μLグルタチオンセファロースと共に4°Cで一晩反応させた。セファロースを洗浄した後、30 μLのSDS-sample bufferで溶出し、SDS-PAGEとウエスタンプロットにより解析した。

### IL-34 ノックアウトマウスの解析

野生型マウスと IL-34 KO マウスに 50 µg 4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl-conjugated chicken  $\gamma$  globulin (NP-CGG) を 2 mg alum と共に腹腔免疫した。12 日後、脾臓細胞を調製し、FDMC 様細胞をフローサイトメーターにより解析した。T, B 細胞を除去した脾臓細胞に 10 µg/mL rat IgG を 4 °C 15 分間処理したのち、蛍光標識抗体で 4 °C 30 分染色した。抗体は、APC-anti-CD11b, PE-anti-CD115, Pacific blue-anti-B220, FITC-anti-I-A<sup>d</sup>, FITC-anti-CD11c を使用した。FDMC 様細胞は、マウスの脾臓細胞中の B220<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>I-Ad<sup>-</sup>CD11c<sup>-</sup>細胞群の中の CD11b<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup>細胞の割合として示し、FACSAria flow cytometer を用いて解析した結果より算出した。使用した抗体は **Sup Table 6** に示す。

野生型マウスと IL-34 KO マウスの足の裏に 20 µg TNP-KLH を alum 40 µg と共に免疫し、10 日後に膝窩リンパ節を調整し、フローサイトメーターを用いて B220<sup>+</sup>GL7<sup>+</sup>Fas<sup>+</sup> (GC B cell) の細胞数を算出した。

野生型マウスと IL-34 KO マウスに 5 µg NP-CGG を 2 mg alum と共に腹腔免疫し、免疫 12 日後に血清を回収した。血清中に含まれる anti-NP IgM と anti-NP IgG1 抗体価は NP<sub>25</sub>-BSA をコートしたマイクロプレートを用いた ELISA により検出した。クラス特異的抗体の検出には、HRP-conjugated goat anti-mouse IgM (Invitrogen) と HRP-conjugated goat anti-mouse IgG1 (Southern Biotechnology Associates) を使用した。

### FL-Y の產生する IL-34-Nst タンパク質の精製

IL-34-Nst タンパク質を精製するため、FL-Y-IL-34-Nst 培養培地 (20 mL) を Strep-Tactin セファロースレジンと 4 °C で一晩反応させた。その後レジンを洗浄し、溶出 buffer (25 mM デスチオビオチン含有 MEM) を用いて溶出した。溶出サンプルは、SDS-PAGE により分離し、anti-IL34 抗体を用いたウエスタンプロットにより解析した。M-NFS-60 ( $1 \times 10^4$  cells/mL) を recombinant IL-34 (rIL-34; 10 ng/mL) または精製した IL-34-Nst で刺激し、3 日後 M-NFS-60 細胞数を計数した。

### 糖鎖修飾の分解

rIL-34 と精製した IL-34-Nst 5 µL を、10×Glycoprotein Denaturation Buffer 1 µL と共に 10 µL 中で混合し、95 °C 5 分反応させた後、氷上に移した。その後、20.5 µL 中に PNGase (New England Biolabs) 1 µL, 10×G7 Reaction Buffer 2 µL, 10% NP-40 2 µL になるよう添加し、37 °C で 1 時間反応した。

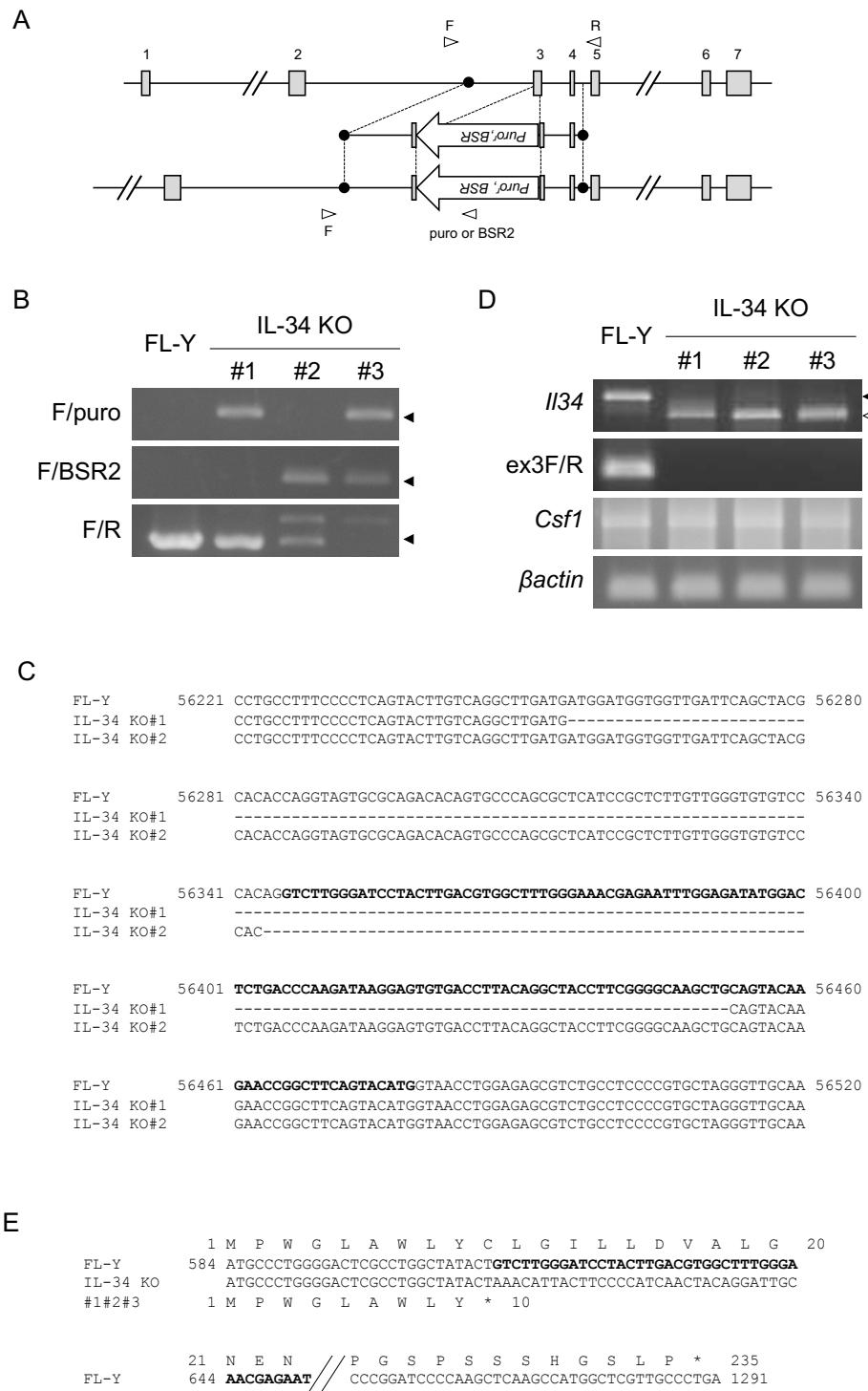
## 5. 結果

### 5-1. IL-34 は FDMC 分化に必須である

FDMC 分化における IL-34 の必要性を詳細に解析するため、CRISPER/Cas9 システムにより IL-34 KO FL-Y を樹立した。guide RNA (gRNA) は、IL-34 KO マウスを作製するために LacZ 遺伝子が挿入されている *Il34* のエキソン 3 を標的として設計した (図. 1A)<sup>33,34</sup>。FL-Y に、gRNA とターゲティングベクターと Cas9 発現ベクターを同時に発現させ薬剤選択した。その後、薬剤耐性クローニングにおいて、エキソン 3 と薬剤選択マーカーの標的相同組み換えが起きていることをゲノム PCR により評価した。その結果、3 つの異なる IL-34 KO FL-Y 細胞 (#1, #2, #3) を樹立した。ゲノム PCR 解析により、IL-34 KO FL-Y における *Il34* 遺伝子への薬剤耐性遺伝子の導入を確認した (図. 1B)。#1 はピューロマイシン耐性遺伝子が、#2 はプラストサイジン S 耐性遺伝子が *Il34* の一方の対立遺伝子に挿入されていた。また、#3 はピューロマイシン耐性遺伝子とプラストサイジン S 耐性遺伝子が *Il34* の両対立遺伝子に挿入されていた。クローン#1 と#2 では、ゲノム PCR 産物 (F/R) 遺伝子配列解析より、もう一方の対立遺伝子の gRNA 結合サイト (エキソン 3) 付近に 197-もしくは 57-bp 欠損が見られ、機能的な IL-34 タンパク質を発現することができない (図. 1C)。IL-34 のタンパク質コード領域に結合するプライマーセット (F/R) を使用した RT-PCR 解析により、全ての IL-34 KO FL-Y クローン (#1, #2, #3) において機能的な *Il34* mRNA の発現は見られなかったが、短い転写産物が見られた (図. 1D)。cDNA から増幅した遺伝子断片の遺伝子配列解析より、#1, #2, #3 で発現する短い *Il34* mRNA は、エキソン 3 がスプライスアウトされており、翻訳された場合も機能的なタンパク質をコードしないと考えられる (図. 1E)。実際に、*Il34* のエキソン 3 に特異的なプライマー (ex3F) を用いて増幅した PCR では、IL-34 KO FL-Y クローン (#1, #2, #3) において増幅産物が検出されなかった。一方で、CSF-1R に対するもう一つのリガンドである *Csf1* mRNA 発現量には変化がなかった (図. 1D)。

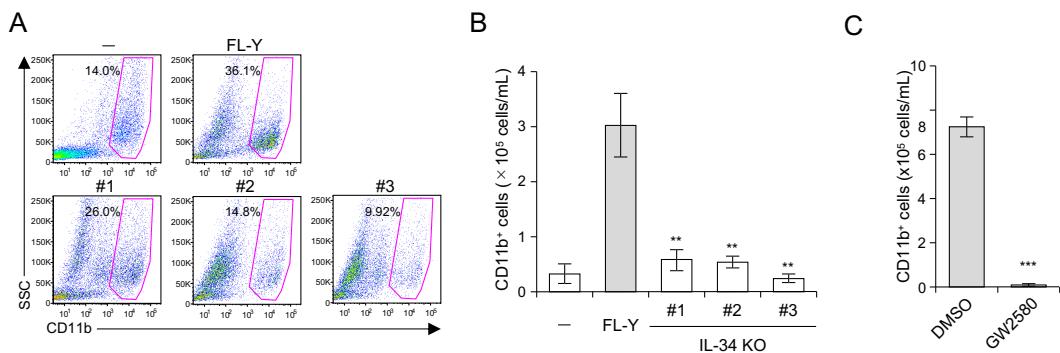
IL-34 KO FL-Y における FDMC の分化誘導能力を解析するため、IL-34 KO FL-Y 細胞上で T 細胞を除去した脾臓細胞を培養した。9 日後、CD11b<sup>+</sup>細胞数を検討したところ、FL-Y と比較して IL-34 KO FL-Y 細胞において CD11b<sup>+</sup>細胞数が大幅に減少していた (図. 2A, B)。さらに、IL-34 のレセプターとして機能すると報告されている受容体型 protein-tirosine phosphatase  $\zeta$  (PTP $\zeta$ ) と syndecan-1 (CD138) の影響を検討するため<sup>35,36</sup>、選択的 ATP 競合型 CSF-1R 阻害剤 (GW2580) を使用し FDMC 分化における IL-34 による CSF-1R シグナル伝達の必要性を評価した<sup>37</sup>。その結果、FDMC 誘導条件下に GW2580 を添加することにより CD11b<sup>+</sup>細胞数は大幅に抑制されていた (図. 2C)<sup>26</sup>。これらの結

結果は、FL-Y の発現する IL-34 による CSF-1R シグナル伝達の活性化が FDMC 分化に重要であり、さらに、IL-34 KO FL-Y は FDMC 分化における IL-34 の作用機構を解析するために有用であることを示す。



### 図. 1 IL-34ノックアウト(KO)FL-Y細胞の樹立

(A) IL-34 KO FL-Y細胞を樹立するための遺伝子標的相同組換えのスキーム。IL34遺伝子のエキソン3をピューロマイシン耐性遺伝子(puro')とプラスチジンS耐性遺伝子(BSR)に置き換えた。白矢印は、予想される標的相同組換えを検出するために用いたプライマーセットを示す。(B) IL-34 KO FL-Y細胞におけるIL34遺伝子座のゲノムPCR解析。IL34 KO遺伝子座は、F/puroもしくはF/BSR2プライマーセットにより検出される。黒矢印は、ゲノムPCRにより増幅されるPCR産物の予想サイズを示す。(C) IL-34 KO FL-Y細胞(#1と#2)から抽出したゲノムDNAのIL34遺伝子を増幅し、DNA配列を決定した。IL-34 KO FL-Y細胞(#1と#2)におけるIL34遺伝子配列をFL-YのDNA配列と比較した。(D) IL-34 KO FL-Yにおいて発現しているIL34 mRNAの解析。FL-YとIL-34 KO FL-Y(#1, #2, #3)により抽出されたmRNAを、RT-PCRにより増幅した。IL34遺伝子のエキソン3特異的なプライマー(ex3F)を用いた。黒矢印は増幅されるPCR産物の予想サイズを示し、白矢印は予想されるものよりも小さいサイズの増幅産物を示す。(E) IL-34 KO FL-Yから抽出された短いIL34 mRNAの塩基配列を示す。



### 図. 2 FDMC分化におけるIL-34の役割

(A) BALB/cマウスの脾臓細胞よりT細胞と付着性細胞を除去した細胞( $1 \times 10^6$  cells)を、FL-YもしくはIL-34 KO FL-Y( $1 \times 10^4$  cells)上で9日間培養した。培養細胞を回収し、抗CD11b抗体で染色した後フローサイトメーターにより解析した。数字は、CD11b<sup>+</sup>細胞の割合を示す。(B) FL-Y上で分化したFDMCの数を、回収細胞数と(A)に示されるCD11b<sup>+</sup>細胞の割合より算出した。(C) BALB/cマウスのT細胞と付着性細胞を除いた脾臓細胞( $1 \times 10^6$  cells)をFL-Y上( $1 \times 10^4$  cells)でGW2580(1 μM)の存在下、非存在下で培養した。CD11b<sup>+</sup>細胞の数は(A)(B)と同様に算出した。グラフには、トリプレリケートの平均値と標準偏差を示した。統計的な有意差は、\*\*FL-Yと比較し  $p < 0.01$ 、\*\*\*DMSOコントロールと比較し  $p < 0.005$ である。

## 5-2. 細胞表面に発現する IL-34 は FDMC 分化に関与する

FL-Y による FDMC 分化誘導過程での IL-34 依存的なメカニズムを解析するため、FL-Y と FDMC 前駆細胞の細胞間接触を阻害する培養条件で FDMC の分化誘導を行なった。その際、FL-Y は Transwell membrane により FDMC 前駆細胞と物理的に隔てられている。その結果、細胞間接触を阻害した条件下において、CD11b<sup>+</sup>細胞の分化は、IL-34 KO FL-Y と同程度まで抑制されていた（図. 3A）。次に、FL-Y と IL-34 KO FL-Y を 0.1 % パラホルムアルデヒド（PFA）処理し、FDMC の分化誘導を行なった。その結果、興味深いことに、PFA 処理した FL-Y においても CD11b<sup>+</sup>細胞が分化した（図. 3B）。生存細胞における PFA 処理は、細胞表面のタンパク質分子を架橋するため、新生タンパク質の細胞外への輸送を阻害することができる<sup>38</sup>。実際に、PFA 処理した FL-Y の培養上清を用いて、CSF-1R のシグナル伝達に依存して増殖をすることが知られている M-NFS-60 細胞培養株を刺激しても、M-NFS-60 の増殖を活性化することができなかった（図. 3C）。これまでに IL-34 は可溶性の分泌タンパク質であると報告されており、FL-Y 細胞からのタンパク質分泌を阻害した条件下においても FDMC が分化誘導されることと矛盾が生じる。FL-Y の分泌する可溶性 IL-34 の FDMC 分化への寄与をより詳細に解析するため、FL-Y による FDMC 分化誘導条件下に、FL-Y-IL-34-Nst の培養上清から精製した分泌型 IL-34 を添加した。しかし、精製した IL-34 を加えた条件においても、CD11b<sup>+</sup> 細胞数の促進は見られなかった（図. 3D）。これらの結果より、FL-Y より産生される分泌型 IL-34 の FDMC 分化への関与は、無いもしくは少ないと考えられる。そのため、FL-Y で発現する異なる形態をもつ IL-34 が FDMC 分化に関与している可能性が高い。

IL-34 の細胞外への分泌を阻害した FL-Y においても FDMC の分化は誘導されたため、FL-Y 細胞表面への IL-34 発現の可能性について解析を行なった。その結果、FL-Y を anti-mouse IL-34 抗体により染色すると、FL-Y 細胞表面での IL-34 の発現が検出され、このシグナル強度は IL-34 KO FL-Y において大幅に減少していた（図. 3E）。これらの結果は、IL-34 の新規な存在様式を示唆する。

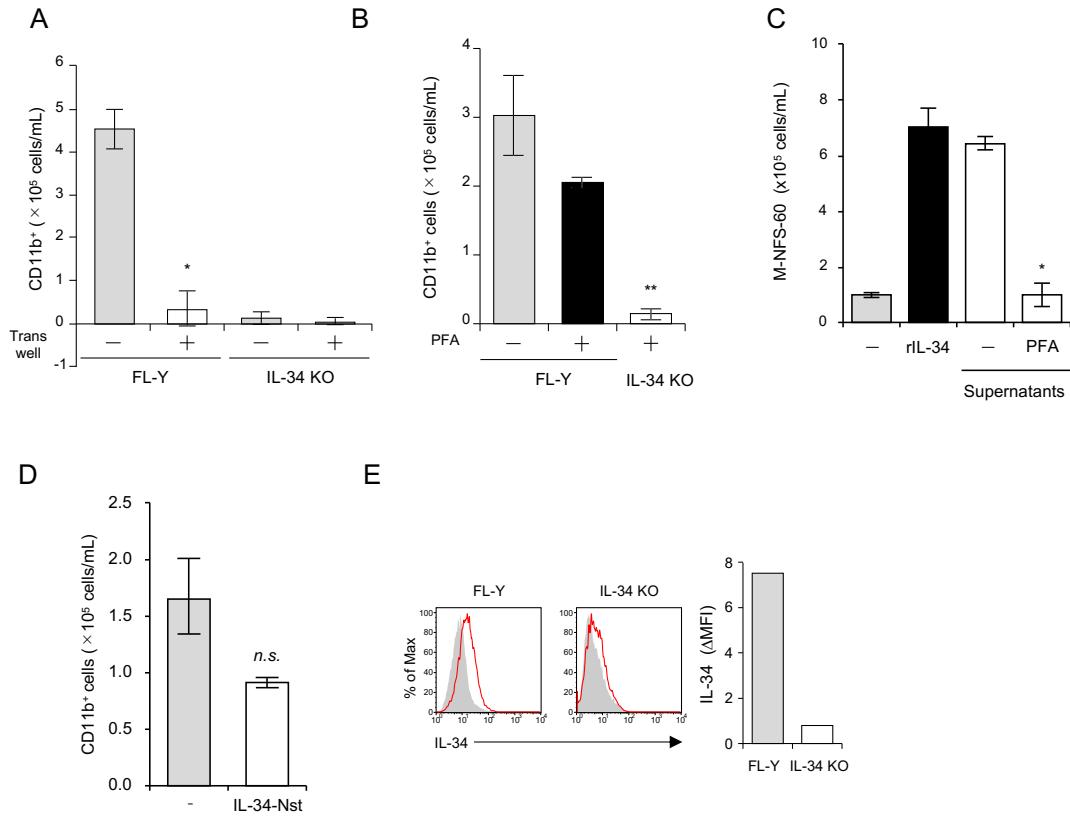


図. 3 FDMC分化には、FL-Y細胞表面に発現するIL-34が関与する

(A) 下層のチャンバーにFL-Y( $1 \times 10^4$  cells)を播種し、 $0.45 \mu\text{m}$ 孔サイズ膜により分けられた上層のチャンバーにおいてT細胞と付着性細胞を除去したBALB/cマウスの脾臓細胞( $1 \times 10^6$  cells)を培養した。9日後、上層のチャンバーにおけるCD11b<sup>+</sup>細胞の数をフローサイトメーターにより算出した。グラフは、トリプリケイドの平均値と標準偏差を示す。統計的な有意差は、\*Transwellを用いないFL-YによるFDMC誘導と比較し $p < 0.05$ である。(B) BALB/cマウスのT細胞と付着性細胞を除いた脾臓細胞( $1 \times 10^6$  cells)を $0.1\%$ のパラホルムアルデヒドで処理したFL-Y( $2 \times 10^5$  cells)上で共培養した。8日後、培養細胞を抗CD11b抗体により染色した後、フローサイトメーターにより解析した。グラフは、トリプリケイドの平均値と標準偏差を示した。統計的な有意差は、\*\*PFA処理していないFL-YによるFDMC誘導と比較し、 $p < 0.01$ である。(C) M-NFS-60( $1 \times 10^4$  cells/mL)を、培養地(-)、rIL-34 (10 ng/mL)を含む培養地(rIL-34)、PFA処理をしていないFL-Y培養上清(Supernatants -)、PFA処理をしたFL-Y培養上清(Supernatants PFA)を用いて培養した。3日後、M-NFS-60細胞数を計数した。グラフは、トリプリケイドの平均値と標準偏差を示す。統計的な有意差は、PFA処理をしていないFL-Y培養上清で培養した条件と比較し $p < 0.05$ である。(D) BALB/cマウスのT細胞と付着性細胞を除去した脾臓細胞( $1 \times 10^6$  cells)を、FL-Y-Nst細胞培養上清から精製したIL-34-Nstを3日おきに添加した条件(IL-34-Nst)と何も加えない条件(-)においてFL-Y上で共培養した。8日後、培養した細胞を抗CD11b抗体で染色後、フローサイトメーターにより解析した。グラフは、トリプリケイドの平均値と標準偏差を示す。統計的な有意差は、何も加えていないものによるFDMC誘導と比較し、n.s. (not significant) である。(E) FL-Y細胞表面のIL-34発現強度はisotype IgG(グレー)もしくは抗IL-34抗体(赤線)により染色後、フローサイトメーターにより解析した(左図)。IL-34細胞表面発現量は、isotypeコントロールMFI値を引いた $\Delta MFI$ 値として示している(右図)。

### 5-3. Strep-tag を付加した IL-34 を発現する FL-Y 細胞の樹立

アミノ酸配列から予測される IL-34 の構造において膜貫通領域が存在せず、可溶性 IL-34 による刺激が単核食食（単球、マクロファージなど）の分化と増殖を引き起こすと報告されている<sup>10</sup>。図. 3E の結果より、フローサイトメーターを用いて FL-Y 細胞表面における IL-34 の発現が検出可能であったが、その発現強度は弱く、細胞表面における IL-34 の発現制御機構を解析することは困難である。そこで、FL-Y 細胞表面への IL-34 発現を調節する因子を同定するため、twin-Strep-tag を付加した IL-34 (IL-34-Nst) を発現する FL-Y を樹立した。twin-Strep-tag は、2 つの Strep-tag ペプチド (WSHPQFEK) が短いリンカー (GGGSGGGSGGSA) により連結されており、anti-Strep-tag モノクローナル抗体と Strep-Tactin セファロースレジンを使用することにより、標的分子の検出と精製が可能とする<sup>39</sup>。今回、twin-Strep-tag 配列は、シグナル配列と IL-34 タンパク質配列の間に挿入した。レトロウイルスを用いた遺伝子導入により、twin-Strep-tag IL-34 遺伝子を FL-Y に形質導入した (FL-Y-IL-34-Nst)。anti-IL-34 抗体と anti-Strep-tag モノクローナル抗体を用いたウエスタンプロットにより、FL-Y と IL-34 KO FL-Y では IL-34-Nst タンパク質が検出されなかつたが、FL-Y-IL-34-Nst では検出された（図. 4A）。FL-Y が発現する細胞内と細胞表面の IL-34 の発現量はとても低いため、anti-IL-34 抗体を用いたウエスタンプロットでは内在性の IL-34 を検出できないと考える（図. 4A）。フローサイトメーターを用いた解析により、FL-Y-IL-34-Nst 細胞表面において、anti-IL-34 抗体と anti-Strep-tag モノクローナル抗体により IL-34-Nst タンパク質が検出され、その IL-34 発現強度は FL-Y と比較して大幅に増加していた（図. 4B）。

次に、IL-34-Nst の生物学的活性を評価するため、FL-Y-IL-34-Nst 培養上清中の IL-34-Nst を Strep-Tactin セファロースレジンにより精製し、M-NFS-60 細胞の活性化能力を評価した（図. 4C）。その結果、FL-Y-IL-34-Nst 培養上清より精製した IL-34-Nst タンパク質は、添加量依存的に M-NFS-60 細胞の増殖を促進したことから、CSF-1R シグナル伝達を活性化する能力を有すると考えられる（図. 4D）。さらに、可溶性 IL-34-Nst タンパク質は、一般的に使用されている rIL-34 タンパク質と同等の糖鎖修飾を受けていた（図. 5A, B）。次に、FL-Y-IL-34-Nst における FDMC の分化誘導促進効果を検討するため、PFA 処理条件下において FDMC の分化誘導を行なった。図. 4E に示す様に、FL-Y-IL-34-Nst の FDMC 分化の誘導能力は FL-Y よりも増強されており、細胞表面に発現する IL-34 発現量が FDMC 分化誘導効率と相関することを示唆する。

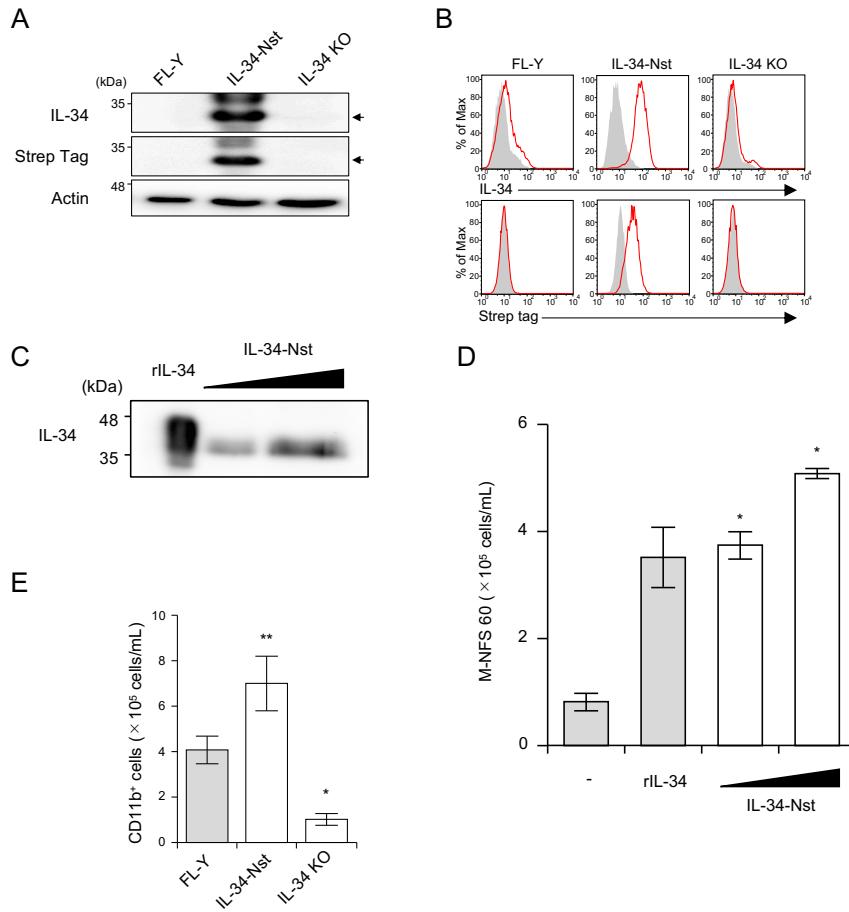


図. 4 Strep-tagを付加したIL-34を発現するFL-Y細胞の樹立

(A) FL-Y、FL-Y-IL-34-Nst(IL-34-Nst)、IL-34 KO FL-Y(IL-34 KO)から抽出した全細胞破碎液におけるIL-34量を、抗IL-34抗体と抗Strep-tag抗体、抗β-Actin抗体を用いたウエスタンプロットにより解析した。β-Actinは内部標準として使用した。右側に示す矢印は、IL-34-Nstタンパク質の位置を示す。(B) FL-Yを抗IL-34抗体もしくは抗Strep-tag抗体により染色後、フローサイトメーターにより解析した(赤線)。ネガティブコントロールにはisotypeコントロール抗体を使用し、グレーで示した。(C) FL-Y-IL-34-Nstの培養上清(20 mL)から、IL-34-Nstタンパク質をStrep-Tactinセファロースレジンを用いて精製した。培養上清をStrep-Tactinレジンと一晩反応させたのち、NP bufferで洗浄した。レジンに結合したIL-34-Nstは、溶出buffer(25 mMデスチオビオチンを含むMEM)で溶出した。精製サンプルをSDS-PAGEで分離し、抗IL-34抗体によるウエスタンプロットにより検出した。(D) M-NFS-60( $1 \times 10^4$  cells/mL)を、培養培地(-)、rIL-34(10 ng/mL)を含む培養培地、精製したIL-34-Nstを含む培養培地を用いて培養した。3日後、M-NFS-60細胞数を計数した。グラフは、トリプリケートの平均値と標準偏差を示す。統計的な有意差は、培地で培養した条件と比較し $p < 0.05$ である。(E) BALB/cマウスT細胞と付着性細胞を除去した脾臓細胞( $1 \times 10^6$  cells)を、0.1 % パラホルムアルdehyd処理したFL-Y、FL-Y-IL-34-Nst(IL-34-Nst)、IL-34 KO FL-Y(IL-34 KO)( $2 \times 10^5$  cells)上で共培養した。8日後、培養した細胞を抗CD11b抗体で染色後、フローサイトメーターにより解析した。グラフは、トリプリケートの平均値と標準偏差を示す。統計的な有意差は、FL-YによるFDMC誘導と比較し、\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ である。

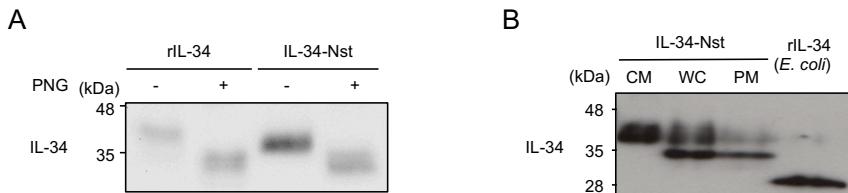


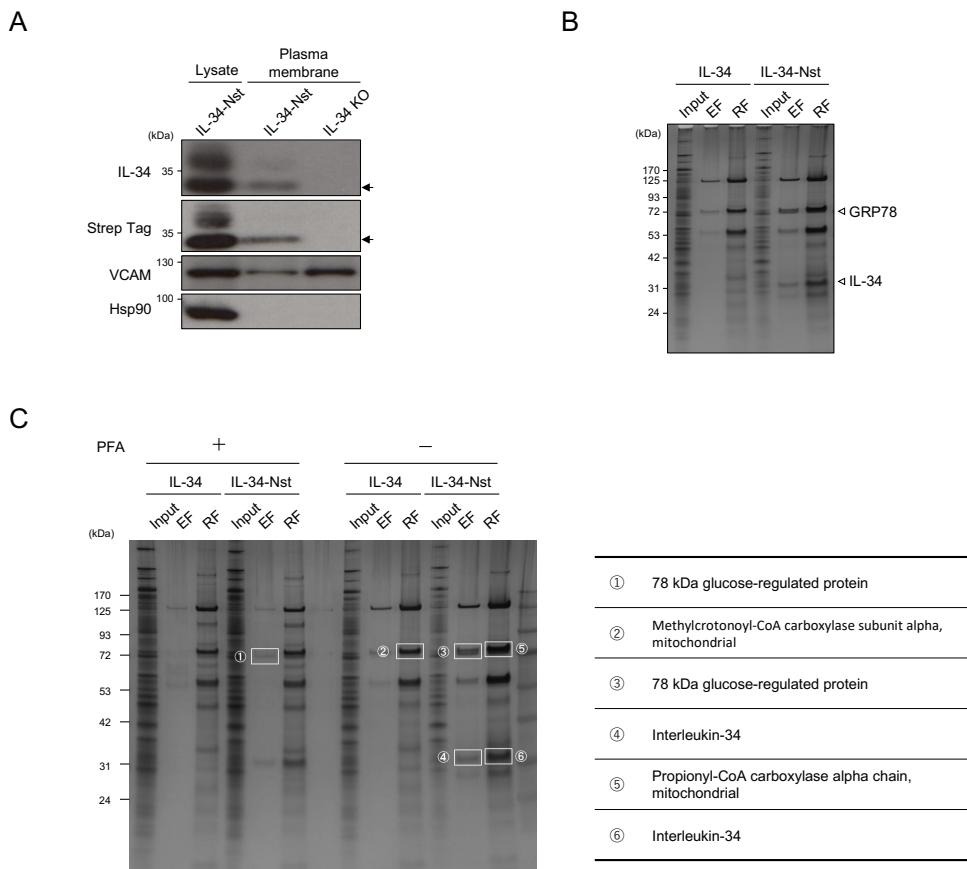
図. 5 FL-Y細胞表面に発現するIL-34は、分泌型とは異なる糖鎖修飾を受けている。

(A) rIL-34と精製したIL-34-Nstを、PNGaseで未処理 (-) もしくは処理 (+) したサンプルを調製した。このサンプルをSDS-PAGEにより分離し、抗IL-34抗体を用いたウエスタンプロットにより検出した。(B) IL-34-Nstタンパク質をFL-Y-Nstの培養上清(CM)、全細胞破碎液(WC)、細胞膜画分(PM)から調製した。また、大腸菌を用いて発現させたIL-34を調製した。それぞれのサンプルをSDS-PAGEにより分離し、抗IL-34抗体を用いてウエスタンプロットにより検出した。

#### 5-4. FL-Y 細胞膜画分における IL-34 結合分子として GRP78 を同定

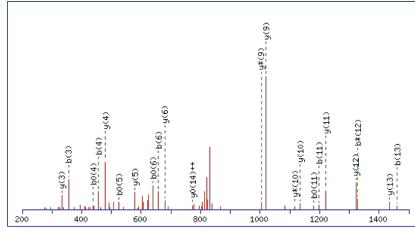
FL-Y 細胞表面への IL-34 の発現制御機構を解析するため、FL-Y-IL-34-Nst の細胞膜画分を精製し、ウエスタンプロットにより IL-34-Nst の検出を行った。フローサイトメーターによる解析結果と同様に、IL-34-Nst タンパク質は、FL-Y-IL-34-Nst の細胞膜画分において検出されたが、IL-34 KO FL-Y では検出されなかった(図. 6A)。また、細胞破碎液では複数の分子量の IL-34 を検出したが、FL-Y 細胞膜画分の IL-34-Nst タンパク質の分子量は約 35 kDa であった(図. 6A)。次に、FL-Y-IL-34-Nst から精製した細胞膜画分における IL-34 結合分子の探索を行なった。まず、IL-34-Nst とその結合分子を含む細胞膜画分を Strep-Tactin セファロースレジンと反応させた。レジンに結合した分子を、デスチオビオチンを含む溶出 buffer を用いて Strep-tag と競合させることにより溶出し、SDS-PAGE sample buffer を加えて調製した。FL-Y-IL-34-Nst 細胞膜画分中に存在する IL-34-Nst 結合候補分子は、LC-MS/MS 解析により同定した(図. 6B)。Strep-tag を付加していない IL-34 を発現する FL-Y-IL-34 では検出されず、FL-Y-IL-34-Nst サンプルのみでいくつかの分子を検出した。約 35 kDa のタンパク質は、IL-34 と同定できたためプルダウンの実験が有効であると考えられる。この実験条件において、FL-Y-IL-34-Nst においてのみ検出される分子の中で、約 75 kDa のバンドに含まれる、78 kDa glucose regulated protein (GRP78) に着目した(図. 6B-D, 表 1)。GRP78 は、Binding immunoglobulin protein (Bip) や Heat shock protein family A member 5 (HSPA5) とも呼ばれ、主に小胞体内においてタンパク質の折りたたみや unfolded protein response に関わるシャペロンタンパク質であることが知られている<sup>40</sup>。次に、実際にプルダウン解析より、FL-Y-IL-34-Nst から精製した細胞膜画分における IL-34-Nst と GRP78 との結合を評価したところ、

Control セファロースでは共沈せず、Strep-Tactin セファロースレジンでは共沈した（図. 7A）。さらに、GRP78 と IL-34 の Strep-Tactin セファロースレジンへの非特異的な結合の可能性を排除するため、FL-Y-IL-34 より調製した細胞膜画分を使用した（図. 7B）。また、IL-34 と GRP78 と相互作用をより確実なものとするため、大腸菌で発現させたリコンビナント GST-GRP78 をグルタチオンセファロースにより精製し、FL-Y-IL-34-Nst 細胞破碎液と反応させ、グルタチオンセファロースを用いてプルダウンした。その結果、全ての実験系において GRP78 と IL-34 の結合を証明することができた（図. 7C）。細胞表面において IL-34 と GRP78 が結合する報告は無く、新規な相互作用の形態であると考えられる。

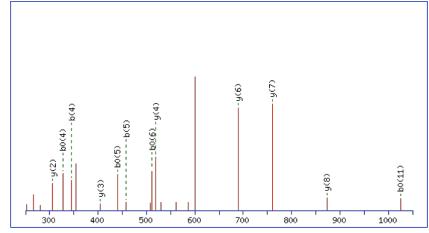


D

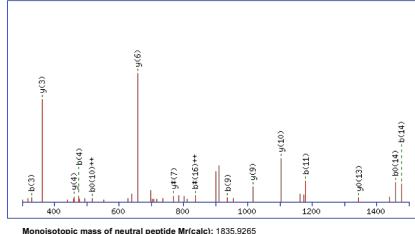
GRP78: 83 NQLTSNPENTVFDAK 97



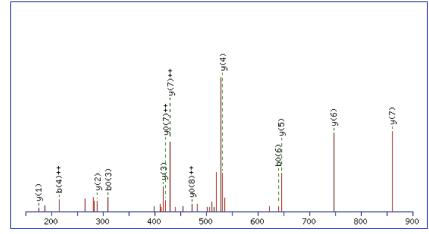
GRP78: 187 DAGTIAGLNVMR 198



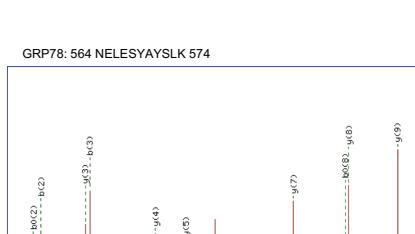
GRP78: 449 SQFISTASDNQPTVTIK 465



GRP78: 525 ITTNDQRN 533



GRP78: 564 NELEYASYSL 574



**図. 6 FL-Y細胞膜画分におけるIL-34結合分子としてのGRP78の同定**

(A) FL-Y-IL-34-Nst (IL-34-Nst) とIL-34 KO FL-Y (IL-34 KO) より調製した細胞膜画分に含まれるIL-34 Nstタンパク質を抗IL-34抗体と抗Strep-tag抗体を用いたウエスタンプロットにより解析した。VCAMは内部標準として使用した。矢印はIL-34-Nstのバンド位置を示す。(B) FL-Y細胞膜画分におけるIL-34とIL-34結合分子の検出。FL-Y-IL-34 (IL-34) とFL-Y-IL-34-Nst (IL-34-Nst) 細胞膜画分をStrep-Tactinセファロースレジンによりプルダウンし、2.5 mM デスチオビオチンを含む溶出bufferにより溶出した。細胞膜画分 (Input)、デスチオビオチンによる溶出画分 (EF)、レジンに残った画分 (RF)をSDS-PAGEにより分離し、銀染色により可視化した。(C) (B)のサンプルを用いて質量分析を行い、①-⑥のタンパク質を同定した。(D) 同定されたペプチドのイオンスコアが50以上である、全てGRP78ペプチドを示している。

表 1. LC-MS/MS解析により同定されたGRP78ペプチドのアミノ酸配列

アミノ酸残基	ペプチド配列	Ions score
83-97	NQLTSNPENTVFDAK	74
83-98	NQLTSNPENTVFDAKR	16
125-139	TKPYIQVDIGGGQTK	10
140-153	TFAPEEISAMVLTK	28
187-198	DAGTIAGLNVMR	51
346-353	VLEDSLK	16
355-368	SDIDEIVLVGGSTR	39
449-465	SQIFSTASDNQPTVTIK	50
525-533	ITITNDQNR	60
534-541	LTPEEIER	37
564-574	NELESYAYSLK	71
623-634	ELEEIVQPIISK	36

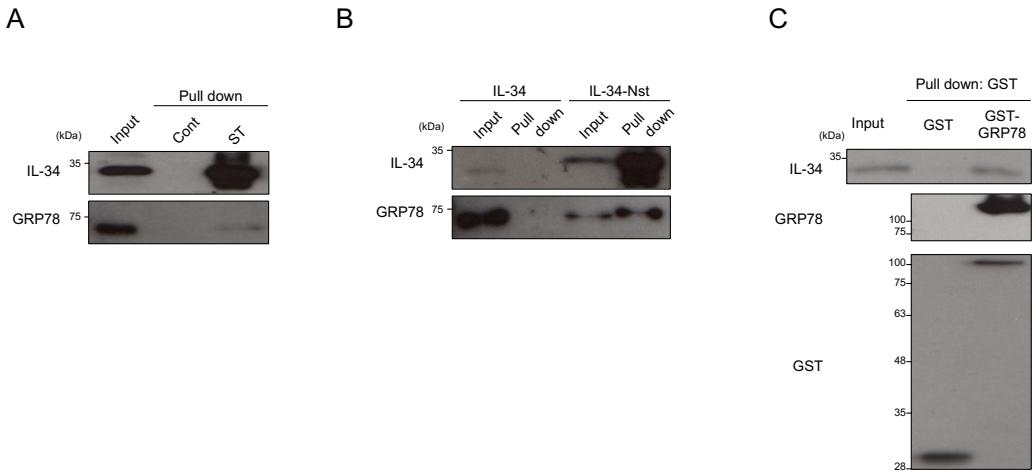


図. 7 FL-Y細胞膜画分に存在するIL-34はGRP78と結合する

(A) FL-Y細胞膜画分において、IL-34-NstはGRP78と結合する。FL-Y-IL-34-Nstの細胞膜画分をコントロール(Cont)もしくはStrep-Tactin(ST)セファロースレジンと混合し、セファロースへの結合分子をSDS-PAGEサンプルbufferにより溶出した。この溶出サンプルを抗GRP78抗体を用いたウエスタンプロットにより解析した。(B) FL-Y-IL-34(IL-34)とFL-Y-IL-34-Nst(IL-34-Nst)の細胞膜画分をStrep-Tactinセファロースと反応させ、セファロースへの結合分子をSDS-PAGEサンプルbufferで溶出し、抗GRP78抗体を用いたウエスタンプロットにより解析した。(C) リコンビナントGSTもしくはGST-GRP78をFL-Y-IL-34-Nstの全細胞破碎液と混合し、グルタチオンセファロースと反応させた。セファロースへの結合分子を溶出し、SDS-PAGEとウエスタンプロットにより解析した。

### 5-5. GRP78 は、細胞表面への IL-34 発現と FDMC 分化を制御する

まず、FL-Y 細胞表面への IL-34 発現における GRP78 の役割を決定するため、CRISPR/Cas9 システムを用いて GRP78 ヘテロノックアウト FL-Y (GRP78<sup>+/−</sup> FL-Y) を樹立した。*Grp78* 遺伝子のターゲティングベクターは、*Grp78* の転写開始コドンを含むエキソン 2 に対して設計した (図. 8A)。FL-Y にターゲティングベクターと *Grp78* のエキソン 2 に特異的な gRNA ベクター、Cas9 発現ベクターを同時に遺伝子導入し、2 つの独立した GRP78<sup>+/−</sup> FL-Y 細胞 (#1, #2) を樹立した (図. 8B)。RT-PCR 解析により、GRP78<sup>+/−</sup> FL-Y クローン (#1, #2) における *Grp78* mRNA 発現は、FL-Y と比較して 29-86 % にまで低下していた (図. 8C)。さらに、GRP78<sup>+/−</sup> FL-Y クローン (#1, #2) における GRP78 タンパク質発現量は、FL-Y と比較しておよそ 50 % まで減少していた (図. 8D)。次に、GRP78<sup>+/−</sup> FL-Y 細胞 (#1, #2) における IL-34 の細胞表面発現量をフローサイトメーターを用いて解析したところ、どちらの GRP78<sup>+/−</sup> FL-Y 細胞 (#1, #2) においても、FL-Y と比較し IL-34 の細胞表面発現量がおよそ 20 % まで減少していた (図. 8E)。この *Grp78*

遺伝子の欠損による IL-34 細胞表面発現量の低下は、IL-34 を過剰発現させた FL-Y-IL-34-Nst 細胞でも認められた（図. 9A-D）。さらに、GRP78 の発現低下による FL-Y の FDMC 誘導能力を解析するため、PFA 処理した  $\text{GRP78}^{+/-}$  FL-Y 上で T 細胞を除去した脾臓細胞群を 12 日間培養し、FDMC の分化誘導能力を評価した。その結果、 $\text{CD11b}^+$ 細胞数は、 $\text{GRP78}^{+/-}$  FL-Y において FL-Y の半分程度に減少した（図. 8F）。これらの結果は、GRP78 が細胞表面における IL-34 の発現制御を介して、FDMC 分化に関与することを示している。

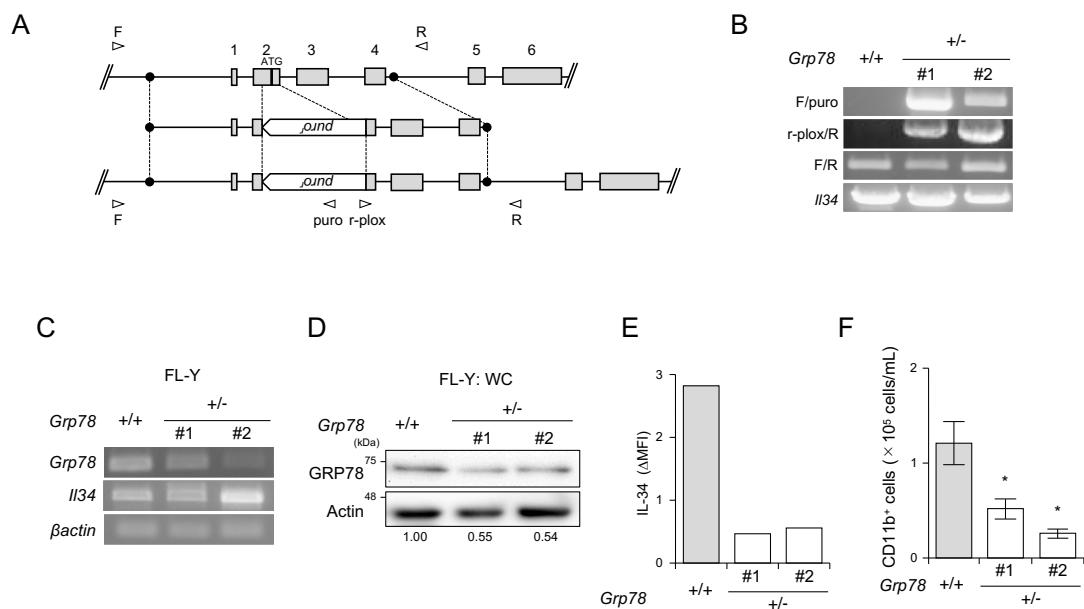
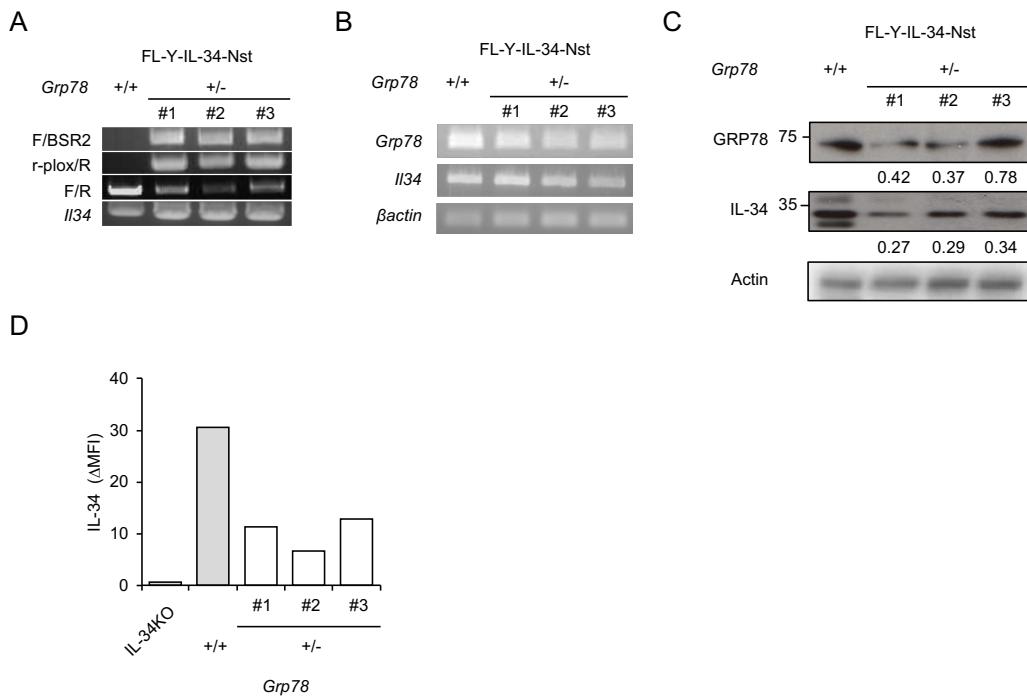


図. 8 GRP78ヘテロ欠損FL-YではFDMC誘導能力が低下する。

(A) GRP78ヘテロ欠損FL-Yを樹立するための遺伝子標的組換えの概略。白矢印は、予想される標的相同組換えを検出するために用いたプライマーセットを示す。(B) FL-Y (+/+)、GRP78ヘテロ欠損 (+/-) FL-YのゲノムPCR解析。ヘテロGRP78 FL-Y (#1, #2)から抽出したゲノムDNAをPCRにより増幅した。 $\text{Grp78}$ 遺伝子座における標的相同組換えは、2種類のプライマーセット(F/puroとr-plox/R)を用いて確認した。(C) GRP78ヘテロ欠損FL-Y (#1, #2)における $\text{Grp78}$  mRNA発現量をRT-PCRにより解析した。全RNAは野生型、GRP78ヘテロ欠損FL-Y (#1, #2)から単離した。(D) FL-YとGRP78ヘテロ欠損FL-Y (#1, #2)のGRP78発現をウエスタンプロットにより解析した。全細胞破碎液は、FL-YとGRP78ヘテロ欠損FL-Y (#1, #2)より調製した。(E) GRP78ヘテロ欠損FL-Yでの細胞表面IL-34の発現を、図. 3Eと同様に、抗IL-34抗体による染色後、フローサイトメーターにより解析した。(F) GRP78ヘテロ欠損FL-YのFDMC分化誘導能力。BALB/cマウスのT細胞と付着性細胞を除去した脾臓細胞( $1 \times 10^6$  cells)をFL-YもしくはヘテロGRP78 (+/-) FL-Y (#1, #2) ( $1 \times 10^4$  cells)上で12日間培養した。培養した細胞を回収し、 $\text{CD11b}^+$ 細胞を染色後、フローサイトメーターにより解析した。グラフには、トリプリケートの平均値と標準偏差を示した。統計的な有意差は、FL-Y (+/+) と比較し、\* $p < 0.05$ である。



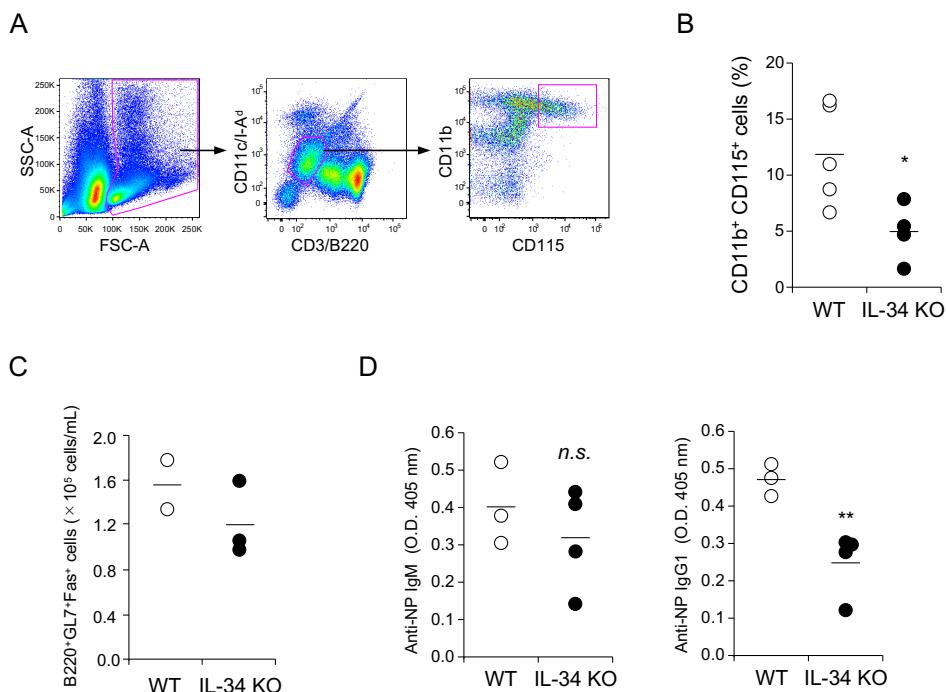
**図. 9 GRP78ヘテロ欠損IL-34過剰発現 FL-Yにおいても、細胞表面のIL-34発現量は低下する**  
**(A)** GRP78ヘテロ欠損 (+/-) FL-Y-IL-34-Nstの樹立。プライマーは図. 8Aに示したものを使用した。  
**(B)** GRP78 (+/-) FL-Y-IL-34-Nstでの $Grp78$ と $Il34$  mRNA発現をRT-PCRにより解析した。  
**(C)** GRP78 (+/-) FL-Y-IL-34-NstにおけるGRP78発現。全細胞破碎液をSDS-PAGEにより分離し、ウエスタンプロットにより解析した。  
**(D)** GRP78 (+/-) FL-Y-IL-34-Nstの細胞表面におけるIL-34の発現を抗IL-34抗体による染色後、フローサイトメーターを用いて解析した。細胞表面に発現するIL-34は図. 3Eに示すように、 $\Delta$ MFIとして表示した。

### 5-6. IL-34 ノックアウトマウスにおいて抗体応答は抑制される

生体内において IL-34 依存的に分化する单球細胞の存在を確認するため、免疫した IL-34 KO マウスから調整した脾臓細胞を *in vitro* で誘導される FDMC の細胞表面マーカーに基づき、フローサイトメーターを用いて解析した。実際には、脾臓細胞中の B220<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup> I-Ad<sup>-</sup>CD11c<sup>-</sup>細胞群をゲートし、さらにゲートした細胞集団中の CD11b<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup>細胞の割合を求めた（図. 10A）。その結果、CD11b<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup>細胞が WT マウスではおよそ 9.4 % 存在するのに対し、IL-34 KO マウスでは約 5.0 % に減少していた（図. 10B）。この結果より、生体内においても、IL-34 依存的に分化する FDMC と類似の細胞表面マーカーを発現する細胞群が存在しており、生体内での FDMC の存在が示唆された。

さらに、IL-34 による免疫調節機構を明らかにするため、免疫した WT と IL-34 KO マウスのリンパ節中の胚中心 B 細胞の割合と、血清中の抗原特異的 IgM と IgG1 抗体値を ELISA により測定した。その結果、WT マウスと比較して IL-34 KO マウスではリンパ節中の胚中心 B 細胞 ( $B220^+GL7^+Fas^+$ cells) が減少する傾向があった（図. 10C）。さらに、IL-34 KO マウスにおいて、抗原特異的な IgM 抗体値は野生型マウスとほぼ同等であったが、抗原特異的な IgG1 抗体値は低下していた（図. 10D）。

これらのことより、生体内にも IL-34 依存的に分化する单球細胞が存在し、IL-34 依存的な機構により適応免疫応答が制御されている可能性がある。



**図. 10 IL-34 KOマウスにおいて胚中心反応は抑制される**  
**(A, B)** 免疫後のIL-34 KO マウスの脾臓組織中のFDMC様細胞数は減少する。WTとIL-34 KOマウスに50 µgの4-ヒドロキシ-3-ニトロフェニルアセチルを付加したチキンγグロブリン(NP-CGG)を2 mgのアラムと共に、腹腔免疫した。12日後、免疫したマウスの脾臓細胞を調製し、FDMC様細胞の解析を行なった。**(A)** T細胞とB細胞を除去した脾臓細胞を蛍光標識した抗体により染色した。FDMC様細胞の割合は、 $B220^-CD31^-Ad^-CD11c^-$ 中の $CD11b^+CD115^+$ 細胞の割合として算出した。**(B)** それぞれのマウスの脾臓組織中の $B220^-CD31^-Ad^-CD11c^-$ 中の $CD11b^+CD115^+$ 細胞の割合を、個体別に表示した。統計的な有意差は、WTマウスと比較し、\* $p<0.05$ である。**(C)** WTとIL-34 KO マウスの足裏にTNP-KLHを免疫し、10日後に膝窩リンパ節を摘出しGC B細胞数を見積もった。**(D)** IL-34 KOマウスにおける抗原特異的な抗体応答について解析した。WT(○)とIL-34 KO(●)マウスに5 µgのNP-CGGを2 mgアラムと共に腹腔免疫し、12日後に採血を行なった。血清中の抗NP IgM抗体値と抗NP IgG1抗体値をELISAにより解析した。統計的な有意差は、WTマウスと比較し、\*\* $p<0.01$ である。統計上の有意差が認められない場合は、n.s. (not significant)と示した。

## 6. 考察

本研究では、培養上清中において検出される分泌型 IL-34 は CSF-1R 刺激活性を持つにも関わらず FL-Y に依存して発生する新規単球系細胞 (FDMC) の分化を誘導することはできず、FL-Y の産生する細胞膜型 IL-34 のみが FDMC の分化に関与していることを明らかにした。IL-34 は 1 次構造に膜貫通ドメインを有していないことから、分泌型の分子であると考えられてきた。しかし、フローサイトメーターを用いた解析より、FL-Yにおいて細胞表面にも IL-34 が発現しており、IL-34 KO FL-Y ではその発現が消失していた (図. 3E, 4B)。さらに、IL-34-Nst レトロウイルス発現ベクターを用いた IL-34 タンパク質の過剰発現は、FL-Y における細胞表面 IL-34 の発現を増強するだけでなく、FDMC 分化も促進した。このことより、FL-Y 細胞表面に発現する IL-34 がその発現量依存的に単球細胞の分化を誘導していることを明らかにした。

さらに、IL-34 の細胞表面発現が GRP78 により制御されていることを初めて明らかにした。GRP78 はヒートショックタンパク質 70 ファミリーの 1 つであり、主に小胞体 (ER) 内に存在し、タンパク質の折りたたみやタンパク質の凝集阻害、小胞体ストレス応答を調節する、最も豊富に存在する分子シャペロンである。GRP78 は主に ER 内腔で見られるが、それ以外に、核やミトコンドリア、細胞質を含む様々な細胞内オルガネラに存在する報告もある<sup>41-43</sup>。さらに、GRP78 は、白血病リンパ球、リンパ種、前立腺がん・乳がん・卵巣がん・脳腫瘍由来のがん細胞を含むいくつかの細胞株や<sup>44-46</sup>、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞や造血幹細胞などの正常細胞において<sup>47,48</sup>、細胞表面にも存在することが報告されている。また、この GRP78 の細胞表面発現量は、ER ストレス条件下や低酸素条件下において促進される<sup>49,50</sup>。これまでに、細胞表面 GRP78 は特定のタンパク質と結合し、様々なリガンドに対するレセプターとして機能することが報告されている。また、細胞表面に発現する GRP78 に GRP78 リガンドや抗 GRP78 抗体を結合させると、細胞内においてタンパク質や DNA 合成を引き起こす NF-κB シグナル伝達や、PI3K/Akt によるシグナル伝達の活性化が起こるため、シグナル伝達分子として機能する報告もある。例えば、細胞表面の GRP78 は、活性化した α2 マクログロブリンの受容体として機能し、細胞増殖や前立腺がんの転移の原因となる細胞内シグナルを活性化する<sup>51-53</sup>。悪性奇形種由来の成長因子 1 として知られている CRIPT は、GRP78 と細胞表面で複合体を形成し、transforming growth factor β (TGF-β) シグナル伝達を阻害することで細胞増殖を促進する<sup>54</sup>。また、細胞表面における GRP78 の高発現は、がんの増殖と転移、化学療法に対する抵抗性に関与するとも言われている。さらに、GRP78 はある種のウイルスの受容体として機能し、細胞内へのウイルスの侵入においても重要な役割があること

も示されている<sup>55,56</sup>。このように、近年、GRP78 の作用は、分子シャペロンとしての役割のみならず、多岐に渡ることが明らかになりつつある。そのため、今回の研究で明らかにした IL-34 と GRP78 との細胞表面での結合の理解は、FDMC の分化誘導シグナル伝達の解明のみならず、GRP78 の新規な機能を理解するために重要であると考える。

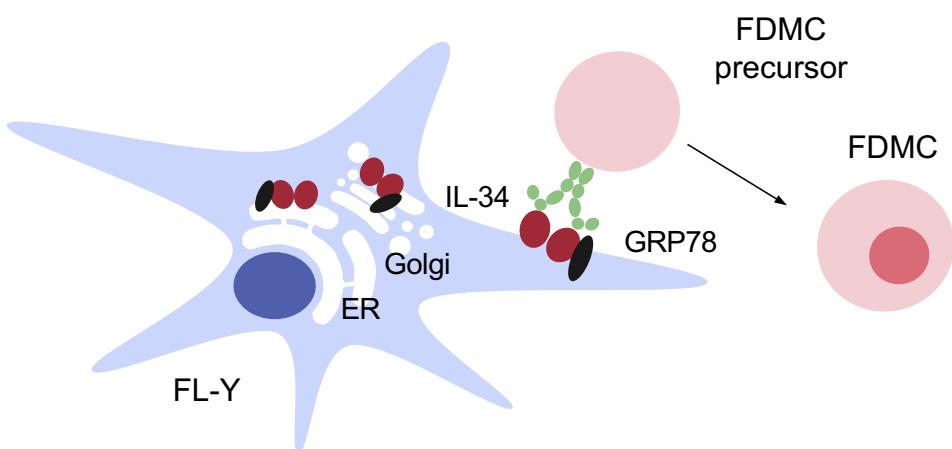
現在までに、GRP78 は TGF-β/LAP と結合することにより、その細胞表面発現を調節することが報告されている。特に、GRP78 と複合体を形成している TGF-β は、高い糖鎖付加を受けた furin-processed latent 型であり、細胞内の TGF-β や分泌型の TGF-β とは異なっている<sup>48</sup>。したがって、GRP78 により制御されている細胞表面 IL-34 は、本来の構造や糖鎖付加パターンとは異なる可能性が考えられる。実際に、細胞表面に発現する IL-34 は分子量がおよそ 35 kDa であり、分泌型の IL-34（細胞表面 IL-34 よりも分子量が大きい）や大腸菌で発現させたリコンビナント IL-34（細胞表面 IL-34 よりも分子量が小さい）のどちらとも異なっている（図. 5B）。

本研究において、マウス FDC 細胞株である FL-Y の細胞膜画分において GRP78 が存在し（図. 7A, B）、IL-34 の細胞表面における発現制御に重要な役割を果たしていることを明らかとした。FL-Y に発現する GRP78 は、細胞膜表面に IL-34 を提示するための結合分子として機能する可能性や、レセプターとして機能する可能性があるが、詳細な制御機構は明らかとなっていない。しかし、この FL-Y 細胞表面に発現する GRP78 と複合体を形成する IL-34 が FDMC 前駆細胞の CSF-1R にパラクライン型のシグナル伝達を引き起こす、もしくは FL-Y 自身にオートクライン型のシグナルを引き起こし FDMC の分化を異なる経路で誘導する可能性があると考えられる。このことは、CSF-1R 阻害剤（GW2580）を加えた条件下において、FDMC の分化誘導が阻害されたことからも明らかである。

当研究室での以前の研究より、FL-Y における *Il34* の mRNA のレベルは TNF-α と抗 LTβR 抗体による刺激や、FDMC 分化誘導時において増加することを明らかにしている<sup>26</sup>。これらの結果より、FDC の活性化条件において IL-34 発現が誘導されていると考えられる。TNFR と LTβR シグナルは 2 次リンパ組織の発達や FDC 分化、胚中心反応、抗体の親和性成熟を含む適応免疫に必要であるため、FDC が産生する IL-34 が、生体内における抗体応答を制御していると考えられる<sup>57-60</sup>。このことは、免疫した IL-34 KO マウスにおいて胚中心でのクラススイッチ組み換え頻度が減少した結果により生じたと考えられ、血清中の抗原特異的 IgG1 抗体値の低下からも示唆される（図. 10D）。他のいくつかの研究グループにより、生体内における IL-34 の発現量と、関節リウマチ<sup>61,62</sup> や全身性エリテマトーデス（SLE）<sup>63</sup>、シェーグレン症候群<sup>64</sup> のような自己免疫疾患の

重症度との関連性が報告されている。例えば、関節リウマチの患者において、主に滑膜の線維芽細胞から產生される IL-34 の滑膜や血清での発現量が重症度と比例する<sup>61,62</sup>。また、血清中の IL-34 濃度は、抗 dsDNA 抗体価と SLE の重症度とも相関がある。特に、血清中の IL-34 濃度は SLE の治療後に大幅に減少することから<sup>63</sup>、IL-34 は自己免疫疾患の診断マーカーとしてだけでなく、SLE の治療標的となるとしても有用であると考えられる。したがって、自己免疫疾患の発症と重症化機構を明らかにするためには、炎症時に產生される分泌型 IL-34 の役割を解明するとともに、細胞表面 IL-34 の発現制御メカニズムやその選択性的作用を解明することは重要であると考えられる。

本研究では、細胞表面に発現している IL-34 により活性化される CSF-1R シグナル伝達が、新規な単球細胞 FDMC の分化に必要であることを明らかにした。しかし、FDMC の分化における細胞表面に発現する IL-34 の詳細な作用機構は解明できていない。そのため、今後は、細胞表面に発現している IL-34 の特異的機能を明らかにする必要がある。しかしながら、現在までに報告のない GRP78 依存的な IL-34 の細胞表面における発現制御メカニズムは、単球細胞分化の制御メカニズムに関する新たな知見となるであろう(図. 11)。



**図. 11 GRP78によるIL-34の細胞表面発現制御は単球細胞の分化を調節する**  
FDCにおいて、GRP78はIL-34と結合することにより、細胞表面におけるIL-34の発現を制御している。またそれに伴って、IL-34依存的に分化する単球細胞 (FDMC) の分化を調節している。

## Supplemental Tables

Supplemental Table 1. IL-34 KO FL-Y細胞の樹立に使用したプライマー

IL-34 KO ベクター	
IL-34-3'-F	TGCGGCCGCCAGTGCTGTAGGTGATC
IL-34-3'-R	AGTAGGATCCAAGACCTGTGGACACACC
IL-34-5'-F	CTGCAGTACAGGATCCGGCTTCAGTACATG
IL-34-5'-R	AGCAATCGATTAGTTGATGGGAAGTAATG

IL-34 gRNA ベクター	
IL-34-guide2 (sense)	AACACCGGCTTGGAAACGAGAATTGT
IL-34-guide2 (antisense)	TAAAACAATTCTCGTTCCCAAAGCCGG
IL-34-guide3 (sense)	AACACCGACCTTACAGGCTACCTCGGT
IL-34-guide3 (antisense)	TAAAACCGAAGGTAGCCTGTAAGGTCGG
IL-34-guide4 (sense)	AACACCGCGAGAGCTCGGTACCTGTGT
IL-34-guide4 (antisense)	TAAAACACAGGTACCGAAGCTCTCGCGG

Targeting check for IL-34 KO allele	
IL-34-F	CCAAGATGCTATGACCTGGCTAGGTGATGAGTG
IL-34-R	CGAAGCTCTCGCTCACTCACGTGAGCCTTC
Puro	CAGCGCCCGACCGAAAGGAGCGCACGACC
BSR2	GTGATGATGAGGCTACTGCTGACTCTAACATTCTACTCCTCC
r-plox	TCGAGGATCTGGCTAGCCCTGATCAATAAC

Supplemental Table 2. GRP78+/- FL-Y細胞の樹立に使用したプライマー

GRP78 KO ベクター	
GRP78-5'-F	GAATTCCATCTCATGGTGGAAAGTGCTCG
GRP78-5'-R	GGATCCAGCAGTCAGGCAGGAGTCTTAG
GRP78-3'-F	GGATCCGGCGCGTTGCTGCTGCTG
GRP78-3'-R	GCGGCCGCTAAACACTCAACACTG

GRP78 gRNA ベクター	
GRP78-guide 1 (sense)	AACACCGGAGCGACTGGTCCTCAGCGCGT
GRP78-guide 1 (antisense)	TAAAACGCGCTGAGGACCAGTCGCTCCGG

Targeting check for GRP78 KO allele	
GRP78-F	TATCAGCCCTATTCCAAGAGTCGAATAGGGTGGTG
GRP78-R	GTGAGATGGCTGGCAGGTAAGGGC

Supplemental Table 3. mRNA発現の検出に使用したプライマー

<i>iil34</i> mRNA	
F	GACACACTTCTGGGGACAGTGCCTC
ex3F	GAGATATGGACTCTGACCCAAGATAAGGAGTGTG
R	GCTCAGGGCAACGAGCCATGGCTTG
<i>csf1</i> mRNA	
F	GCCGGGAATTGCGCTGCCACCATGAC
R	CATAGAATTCTTCTATACTGGCAGTCCACCTGTCTG
<i>grp78</i> mRNA	
F	CTCGAGGGAGGAGGAGGACAAGAAGG
R	GGATCCCTACAACCTCATTTTCTGATGTATC
<i>βactin</i> mRNA	
F	AGTGTGACGTTGACATCCGTA
R	GCCAGAGCAGTAATCTCCTTCT

Supplemental Table 4. IL-34過剰発現FL-Y細胞の樹立に使用したプライマー

IL-34 発現 ベクター	
mIL-34-F-Kozak-EcoRI	GGGGATTCACTGCGCCACCATGCCCTG
IL-34-R2-BgIII	CCAGATCTACTAGGGCAACGAGCC
IL-34-Nst 発現 ベクター	
IL-34-Strep-1st	CGCAGTCGAGAAAGGTGGAGGTTCCGGAGGTGGATCGGGAGG TTCGGCCTGGAGCCACCCGCAAGTCGAAAAAACGAGAATTG
IL-34-Strep-2nd	GGAATTCACTGCGCCACCATGCCCTGGGACTCGCCTGGCTAT ACTG TCTTGGGATCCTACTTGACGTGGCTTGGATGGAGCCACCCGC AGTCGAG
IL-34-R2-BgIII	CCAGATCTACTAGGGCAACGAGCC

Supplemental Table 5. フローサイトメーター使用抗体

抗体	メーカー	IDENTIFIER
normal Rat IgG	Southern Biotechnology Associates	
sheep anti-IL-34	R&D Systems	AF5195
biotinylated anti-sheep IgG	Vector Laboratories	
PE/Cy5 streptavidin	BioLegend	
Sheep IgG Isotype Control	Southern Biotechnology Associates	
Strep Mab Classic (anti-Strep-tag mAb)	IBA	
FITC rat anti-mouse IgG1	BD Biosciences	A85-1
PE-labeled anti-CD11b mAb	BioLegend	M1/70
Pacific Blue anti-mouse CD3e	BioLegend	145-2c11
Pacific Blue anti-mouse/human CD45R/B220	BioLegend	RA3-6B2
FITC anti-mouse I-Ad	BioLegend	39-10-8
FITC anti-mouse CD11c	BD Biosciences	N418
APC anti-mouse CD11b	BioLegend	M1/70
PE anti-mouse CD115 (CSF-1R)	BioLegend	AFS98

Supplemental Table 6. ウエスタンプロット使用抗体

抗体	メーカー	IDENTIFIER
Anti-β-actin Ab (C4)	Santa Cruz Biotechnology	sc-47778
Goat Anti-mouse IgG1-HRP	Southern Biotechnology Associates	
sheep anti-IL-34	R&D Systems	AF5195
rabbit HRP-anti-sheep IgG	Invitrogen	
Strep Mab Classic (anti-Strep-tag mAb)	IBA	
Goat Anti-mouse IgG1-HRP	Southern Biotechnology Associates	
rabbit anti-GRP78 Ab	Santa Cruz Biotechnology	N-20
rabbit anti-GRP78 Ab	Sigma-Aldrich	GL-19
HRP-anti-rabbit IgG	GE Healthcare	
Biotin anti-mouseCD106	BioLegend	429 (MVCAM.A)
Streptavidin Horseradish peroxidase (HRP) conjugate	Invitrogen	
HSP90α/β (F-8)	Santa Cruz Biotechnology	sc-13119
Goat Anti-mouse IgG2a Human ads-HRP	Southern Biotechnology Associates	

## 7. 参考文献

1. Hume, D. A. Macrophages as APC and the Dendritic Cell Myth. *J. Immunol.* **181**, 5829–5835 (2008).
2. Hamilton, J. A. & Achuthan, A. Colony stimulating factors and myeloid cell biology in health and disease. *Trends Immunol.* **34**, 81–89 (2013).
3. Wei, S. *et al.* Functional overlap but differential expression of CSF-1 and IL-34 in their CSF-1 receptor-mediated regulation of myeloid cells. *J. Leukoc. Biol.* **88**, 495–505 (2010).
4. Garceau, V. *et al.* Pivotal Advance: Avian colony-stimulating factor 1 (CSF-1), interleukin-34 (IL-34), and CSF-1 receptor genes and gene products. *J. Leukoc. Biol.* **87**, 753–764 (2010).
5. Yu, W. *et al.* CSF-1 receptor structure/function in MacCsf1r<sup>-/-</sup> macrophages: regulation of proliferation, differentiation, and morphology. *J. Leukoc. Biol.* **84**, 852–863 (2008).
6. Knowlton, M. L. *et al.* Profiling Y561-dependent and -independent substrates of CSF-1R in epithelial cells. *PLoS One* **5**, (2010).
7. Witmer-Pack, M. D. *et al.* Identification of macrophages and dendritic cells in the osteopetrosic (op/op) mouse. *J. Cell Sci.* **104**, 1021 LP-1029 (1993).
8. Dai, X. M. *et al.* Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood* **99**, 111–120 (2002).
9. Ginhoux, F. *et al.* Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat. Immunol.* **7**, 265–273 (2006).
10. Lin, H. *et al.* Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science* **320**, 807–811 (2008).
11. Ma, X. *et al.* Structural basis for the dual recognition of helical cytokines IL-34 and CSF-1 by CSF-1R. *Structure* **20**, 676–687 (2012).
12. Greter, M. *et al.* Stroma-Derived Interleukin-34 Controls the Development and Maintenance of Langerhans Cells and the Maintenance of Microglia. *Immunity* **37**, 1050–1060 (2012).
13. Wang, Y. *et al.* IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat. Immunol.* **13**, 753–760 (2012).
14. Chihara, T. *et al.* IL-34 and M-CSF share the receptor Fms but are not identical in biological activity and signal activation. *Cell Death Differ.* **17**, 1917–1927 (2010).
15. Boulakirba, S. *et al.* IL-34 and CSF-1 display an equivalent macrophage differentiation ability but a different polarization potential. *Sci. Rep.* **8**, 1–11 (2018).
16. Vinuesa, C. G., Sanz, I. & Cook, M. C. Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 845–857 (2009).
17. Liu, M. & Schatz, D. G. Balancing AID and DNA repair during somatic hypermutation. *Trends Immunol.* **30**, 173–181 (2009).
18. Rajewsky, K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* **381**, 751–758 (1996).
19. Park, C. S. & Choi, Y. S. How do follicular dendritic cells interact intimately with B cells in the germinal centre? *Immunology* **114**, 2–10 (2005).
20. Kosco-Vilbois, M. H. Are follicular dendritic cells really good for nothing? *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 764–769 (2003).
21. Allen, C. D. C. & Cyster, J. G. Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: phenotype and function. *Semin Immunol* **20**, 14–25 (2008).
22. Nishikawa, Y. *et al.* Establishment of Lymphotoxin  $\beta$  Receptor Signaling-Dependent Cell Lines with Follicular Dendritic Cell Phenotypes from Mouse Lymph Nodes. *J. Immunol.* **177**, 5240–5214 (2006).
23. Aungier, S. R., Ohmori, H., Clinton, M. & Mabbott, N. A. MicroRNA-100-5p indirectly modulates the expression of *Il6*, *Ptgs1/2* and *Tlr4* mRNA in the mouse follicular dendritic cell-like cell line, FL-Y. *Immunology* **144**, 34–44 (2014).
24. Magari, M. *et al.* IL-21-Dependent B Cell Death Driven by Prostaglandin E<sub>2</sub>, a Product

- Secreted from Follicular Dendritic Cells. *J. Immunol.* **187**, 4210–4218 (2011).
25. Zhang, T. T. *et al.* Germinal center B cell development has distinctly regulated stages completed by disengagement from T cell help. *Elife* **6**, 1–20 (2017).
26. Yamane, F. *et al.* CSF-1 receptor-mediated differentiation of a new type of monocytic cell with B cell-stimulating activity: its selective dependence on IL-34. *J. Leukoc. Biol.* **95**, 19–31 (2014).
27. Nakoinz, I., Lee, M.-T., Weaver, J. F. & Ralph, P. Differentiation of the IL-3-dependent NFS-60 cell line and adaption to growth in macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunol.* **145**, 860–864 (1990).
28. Chihara, T. *et al.* HIV-1 Proteins Preferentially Activate Anti-Inflammatory M2-Type Macrophages. *J. Immunol.* **188**, 3620–3627 (2012).
29. Arakawa, H., Lodygin, D. & Buerstedde, J. M. Mutants IoxP vectors for selectable marker recycle and conditional knock-outs. *BMC Biotechnol.* **1**, (2001).
30. Hatano, N. & Hamada, T. Proteome Analysis of Pitcher Fluid of the Carnivorous Plant Nepenthes alata. *J. Proteome Res.* **7**, 809–816 (2008).
31. Tokumitsu, H., Hatano, N., Fujimoto, T., Yurimoto, S. & Kobayashi, R. Generation of Autonomous Activity of Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinase β by Autophosphorylation. *Biochemistry* **50**, 8193–8201 (2011).
32. Tokumitsu, H., Muramatsu, M., Ikura, M. & Kobayashi, R. Differential Regulatory Mechanism of Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Isoforms. *Biochemistry* **40**, 13925–13932 (2001).
33. Baghdadi, M. *et al.* Chemotherapy-induced IL34 enhances immunosuppression by tumor-associated macrophages and mediates survival of chemoresistant lung cancer cells. *Cancer Res.* **76**, 6030–6042 (2016).
34. Geissmann, F. *et al.* Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* **327**, 656–661 (2010).
35. Nandi, S. *et al.* Receptor-type protein-tyrosine phosphatase ζ is a functional receptor for interleukin-34. *J. Biol. Chem.* **288**, 21972–21986 (2013).
36. Segaliny, A. I. *et al.* Syndecan-1 regulates the biological activities of interleukin-34. *Biochim. Biophys. Acta* **1853**, 1010–1021 (2015).
37. Conway, J. G. *et al.* Inhibition of colony-stimulating-factor-1 signaling in vivo with the orally bioavailable cFMS kinase inhibitor GW2580. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 16078–16083 (2005).
38. Zhang, M. *et al.* Splenic stroma drives mature dendritic cells to differentiate into regulatory dendritic cells. *Nat. Immunol.* **5**, 1124–1133 (2004).
39. Skerra, A. & Schmidt, T. G. M. Use of the Strep-tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods Enzymol.* **326**, 271–304 (2000).
40. Kaufman, R. J. Stress signaling from the lumen to the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.* **13**, 1211–1233 (1999).
41. Ni, M., Zhou, H., Wey, S., Baumeister, P. & Lee, A. S. Regulation of PERK signaling and leukemic cell survival by a novel cytosolic isoform of the UPR regulator GRP78/BiP. *PLoS One* **4**, (2009).
42. Reddy, R. K. *et al.* Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors. *J. Biol. Chem.* **278**, 20915–20924 (2003).
43. Sun, F. C. *et al.* Localization of GRP78 to mitochondria under the unfolded protein response. *Biochem. J.* **396**, 31–39 (2006).
44. Miao, Y. R. *et al.* Inhibition of established micrometastases by targeted drug delivery via cell surface-associated GRP78. *Clin. Cancer Res.* **19**, 2107–2116 (2013).
45. Gonzalez-Gronow, M., Selim, M. A., Papalas, J. & Pizzo, S. V. GRP78: A Multifunctional Receptor on the Cell Surface. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 2299–2306 (2009).
46. Sarkis, S. *et al.* Cell surface expression of the stress response chaperone GRP78 enables tumor targeting by circulating ligands. *Cancer Cell* **6**, 275–284 (2004).

47. Miharada, K. *et al.* Cripto regulates hematopoietic stem cells as a hypoxic-niche-related factor through cell surface receptor GRP78. *Cell Stem Cell* **9**, 330–344 (2011).
48. Oida, T. & Weiner, H. L. Overexpression of TGF- $\beta_1$  Gene Induces Cell Surface Localized Glucose-Regulated Protein 78-Associated Latency-Associated Peptide/TGF- $\beta$ . *J. Immunol.* **185**, 3529–3535 (2010).
49. Tsai, Y.-L. *et al.* Endoplasmic reticulum stress activates SRC, relocating chaperones to the cell surface where GRP78/CD109 blocks TGF- $\beta$  signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, 4245–4254 (2018).
50. Zhang, Y., Liu, R., Ni, M., Gill, P. & Lee, A. S. Cell surface relocalization of the endoplasmic reticulum chaperone and unfolded protein response regulator GRP78/BiP. *J. Biol. Chem.* **285**, 15065–15075 (2010).
51. Misra, U. K., Deedwania, R. & Pizzo, S. V. Binding of activated  $\alpha_2$ -macroglobulin to its cell surface receptor GRP78 in 1-LN prostate cancer cells regulates PAK-2-dependent activation of LIMK. *J. Biol. Chem.* **280**, 26278–26286 (2005).
52. Misra, U. K., Deedwania, R. & Pizzo, S. V. Activation and cross-talk between Akt, NF- $\kappa$ B, and unfolded protein response signaling in 1-LN prostate cancer cells consequent to ligation of cell surface-associated GRP78. *J. Biol. Chem.* **281**, 13694–13707 (2006).
53. Misra, U. K., Gonzalez-Gronow, M., Gawdi, G., Wang, F. & Pizzo, S. V. A novel receptor function for the heat shock protein Grp78: Silencing of Grp78 gene expression attenuates  $\alpha_2$ M\*-induced signalling. *Cell. Signal.* **16**, 929–938 (2004).
54. Shani, G. *et al.* GRP78 and Cripto Form a Complex at the Cell Surface and Collaborate To Inhibit Transforming Growth Factor  $\beta$  Signaling and Enhance Cell Growth. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 666–677 (2008).
55. Nain, M. *et al.* GRP78 Is an Important Host Factor for Japanese Encephalitis Virus Entry and Replication in Mammalian Cells. *J. Virol.* **91**, 1–21 (2017).
56. Triantafilou, K., Fradelizi, D., Wilson, K. & Triantafilou, M. GRP78, a coreceptor for coxsackievirus A9, interacts with major histocompatibility complex class I molecules which mediate virus internalization. *J. Virol.* **76**, 633–643 (2002).
57. Endres, B. R. *et al.* Mature Follicular Dendritic Cell Networks Depend on Expression of Lymphotoxin  $\beta$  Receptor by Radioresistant Stromal Cells and of Lymphotoxin  $\beta$  and Tumor Necrosis Factor by B Cells. *J. Exp. Med.* **189**, 159–167 (1999).
58. Pasparakis, B. M., Alexopoulou, L., Episkopou, V. & Kollias, G. Immune and Inflammatory Responses in TNF $\alpha$ -deficient Mice: A Critical Requirement for TNF $\alpha$  in the Formation of Primary B Cell Follicles, Follicular Dendritic Cell Networks and Germinal Centers, and in the Maturation of the Humoral Immune Response. *J. Exp. Med.* **184**, 1397–1411 (1996).
59. Mackay, F. & Browning, J. L. Turning off follicular dendritic cells. *Nature* **395**, 26–27 (1998).
60. Futterer, A., Mink, K., Luz, A., Kosco-Vilbois, M. H. & Pfeffer, K. The Lymphotoxin  $\beta$  Receptor Controls Organogenesis and Affinity Maturation in Peripheral Lymphoid Tissues. *Immunity* **9**, 59–70 (1998).
61. Hwang, S. J. *et al.* Interleukin-34 produced by human fibroblast-like synovial cells in rheumatoid arthritis supports osteoclastogenesis. *Arthritis Res. Ther.* **14**, 1–10 (2012).
62. Zhou, R. P. *et al.* Functions of interleukin-34 and its emerging association with rheumatoid arthritis. *Immunology* **149**, 362–373 (2016).
63. Wang, H., Cao, J. & Lai, X. Serum interleukin-34 levels are elevated in patients with systemic lupus erythematosus. *Molecules* **22**, 1–8 (2017).
64. Ciccia, F. *et al.* IL-34 is overexpressed in the inflamed salivary glands of patients with Sjögren's syndrome and is associated with the local expansion of pro-inflammatory CD14 $^{bright}$ CD16 $^+$  monocytes. *Rheumatol. (United Kingdom)* **52**, 1009–1017 (2013).

## 8. 発表論文

Sayaka Ogawa, Yukiko Matsuoka, Miho Takada, Kazue Matsui, Fumihiro Yamane, Eri Kubota, Shiori Yasuhara, Kentaro Hieda, Naoki Kanayama, Naoya Hatano, Hiroshi Tokumitsu, Masaki Magari,  
Interleukin 34 (IL-34) cell-surface localization regulated by the molecular chaperone 78-kDa glucose-regulated protein facilitates the differentiation of monocytic cells.  
*Journal of Biological Chemistry* 294, 2386-2396 (2019)

## 9. 謝辞

はじめに、本研究を遂行するにあたり、本論文の主査のみならず、研究面での温かいご指導と日頃の研究室での活動を支えてくださった岡山大学大学院 ヘルスシステム統合科学研究科 細胞機能設計学研究室 徳光 浩 教授に深く御礼申し上げます。また、本論文の副査としてご指導いただきました、岡山大学大学院 ヘルスシステム統合科学研究科 生体分子工学研究室 大槻 高史 教授ならびに、岡山大学大学院 ヘルスシステム統合科学研究科 1分子生物化学研究室 井出 徹 教授には本論文の完遂にあたり、ご協力していただきましたことを深く感謝いたします。そして、研究面のみならず研究以外のご支援ご指導を受け賜りました岡山大学大学院 ヘルスシステム統合科学研究科 細胞機能設計学研究室 金山 直樹 准教授、6年間もの長い期間 温かいご指導をしていただきいたのみならず、日頃の生活や進路の相談にも快く応じてくださった 岡山大学大学院 ヘルスシステム統合科学研究科 細胞機能設計学研究室 曲 正樹 助教に心より感謝いたします。また、質量分析の解析に快く応じてくださった 岡山大学大学院 ヘルスシステム統合科学研究科 細胞機能設計学研究室 波多野 直哉 先生、本論文の遂行ならびに実験面での支援をしていただいた 平田 裕子 技術職員、朝倉 真実 技術職員に感謝申し上げます。

異なる研究チームにも関わらず、丁寧にご指導していただきたのみならず、進路の相談に応じてくださった 川口 祐加 博士、藤原 侑哉 博士、たくさんのご協力とご支援を承りました細胞機能設計学研究室の皆様にも深謝いたします。

最後に、長きに渡り学生生活の支援と本研究の完遂に協力していただきました両親ならびに家族の皆様に感謝いたします。

## 目次

### 1. 序論

- 1-1. 抗体の構造とその機能
- 1-2. 抗体遺伝子の再構成と骨髄における B 細胞の分化
- 1-3. 胚中心において誘導される抗原特異的抗体の機能向上
- 1-4. 濾胞樹状細胞 (FDC) の胚中心反応における役割
- 1-5. 新規単球系細胞 (FDMC) の分化とその機能
- 1-6. 単球・マクロファージ分化における IL-34 と CSF-1 の役割と機能的な差異
- 1-7. 研究目的
- 1-8. 参考文献

### 2. 要約

### 3. 緒言

### 4. 実験材料と方法

### 5. 結果

- 5-1. IL-34 は FDMC 分化に必須である
- 5-2. 細胞表面に発現する IL-34 は FDMC 分化に関与する
- 5-3. Strep-tag を付加した IL-34 を発現する FL-Y 細胞の樹立
- 5-4. FL-Y 細胞膜画分における IL-34 結合分子として GRP78 を同定
- 5-5. GRP78 は、細胞表面への IL-34 発現と FDMC 分化を制御する
- 5-6. IL-34 ノックアウトマウスにおいて抗体応答は抑制される

### 6. 考察

### 7. 参考文献

### 8. 発表論文

### 9. 謝辞

## 1. 序論

生体内に病原体（抗原）が侵入すると、抗原を排除するための免疫応答が誘導される。この免疫応答には様々な細胞群による複雑な相互作用が関わることが知られており、自然免疫系と適応（獲得）免疫系と呼ばれる2つの免疫システムに大別される<sup>1-4</sup>。

抗原が侵入すると、感染組織において即時にマクロファージや好中球、さらには樹状細胞が活性化し、初期の抗原排除を担う自然免疫系が誘導される。この自然免疫系は、下等生物から高等生物まで共通にもつ免疫システムであり、ウイルスや細菌などの非自己の物質の構造（パターン）を認識し、病原体を貪食するなどして抗原の排除を行う。そのため、広範囲の病原体を認識することができ、短期間の間に抗原を排除することが可能である。また、ナチュラルキラー（NK）細胞も自然免疫系を担う細胞であり、がん細胞やウイルスに感染した有害な細胞を素早く認識し、アポトーシスを誘導することによりそれらを排除する。

一方、自然免疫が進行すると同時に、二次リンパ組織への抗原の輸送を引き金とし、適応免疫系が活性化される。適応免疫系は、自然免疫系とは異なり脊椎動物で見られる抗原特異的な反応であり、抗原特異的B細胞とT細胞が中心的な役割を担う。適応免疫系における抗原排除には、B細胞より産生される抗体が重要な役割を担うことが知られており、抗体の抗原への結合が、効率的な抗原排除のプロセスを誘引する。また、適応免疫系の特筆すべき特長として、一度認識した抗原を記憶することにより、再度侵入した同一抗原に対して素早く抗体を產生し、効率的に抗原排除を行うことが挙げられる（免疫記憶）<sup>5</sup>。しかし、適応免疫系の活性化には多段階の反応が必要なため、自然免疫系と比較してその効果を発揮するために長い時間を必要とする。このように、生体内では、2つの異なる免疫反応機構を巧妙に使い分けることで効果的な病原体の排除を行っている。しかし、免疫システムの活性化には多種類の細胞間の相互作用による複雑なプロセスが必要であるため、自然免疫系と適応免疫系のクロストークも含めその全容は明らかになっていない。

適応免疫系において重要な役割を担う抗体分子は、効率的な抗原の排除を行うために時間と共に抗原への結合親和性を向上させることができることが知られている（抗体の親和性成熟）<sup>5</sup>。この抗体の親和性成熟は、免疫に伴い2次リンパ組織に形成される胚中心と呼ばれる微小環境において、活性化した抗原特異的抗体を產生するB細胞が様々な細胞からの制御を受けることにより達成される<sup>5-10</sup>。中でも、胚中心特異的に存在する濾胞樹状細胞（FDC）は、胚中心の形成から高親和性抗体細胞や記憶細胞の分化制御に中心的役割を担うとされている<sup>11-17</sup>。

## 1-1. 抗体の構造とその機能

抗体は、生体外から侵入してきた細菌などの病原体（抗原）を抗原結合部位により識別し、抗原に対し特異的に結合する。その後、抗原に結合した多価の抗体を指標とし、主に、以下に記述する3つの経路が協調的に作用することにより体内から病原体を排除する<sup>1-4</sup>。

### ① 中和

抗体が細菌等の産生する毒素に結合した場合、細菌毒素と抗体の免疫複合体を形成することにより、宿主細胞の発現する細胞毒素受容体への細菌毒素の結合を阻害し、細胞毒性を不活性化する（中和）（図. 1左）。その後、細菌毒素はマクロファージ細胞表面に発現する抗体の定常部（Fc）を認識する Fc $\gamma$ レセプター（Fc $\gamma$ R）を介して取り込まれ、エンドソーム内においてリソソームに存在するタンパク質分解酵素により分解される（貪食）。

### ② オプソニン化

抗体が、病原体表面に多数結合することで抗原抗体複合体を形成し、マクロファージ等の貪食細胞による貪食効率を高める（オプソニン化）。抗原抗体複合体で形成される多価のFc領域を指標とし、Fc $\gamma$ Rを介して効率的にマクロファージにより貪食され、その後エンドソーム内で分解される（図. 1中央）。

### ③ 補体活性化

病原体に結合した多価の抗体は、補体カスケードを活性化する。補体カスケードの反応により、補体のもつ膜侵襲能力が活性化され、直接病原体を溶菌することにより、細菌を傷害する（図. 1右）。また補体は、抗原・抗体と共に免疫複合体を形成することにより、補体受容体を介して Fc $\gamma$ R と協調的に貪食細胞による病原体の取り込みを促進する。

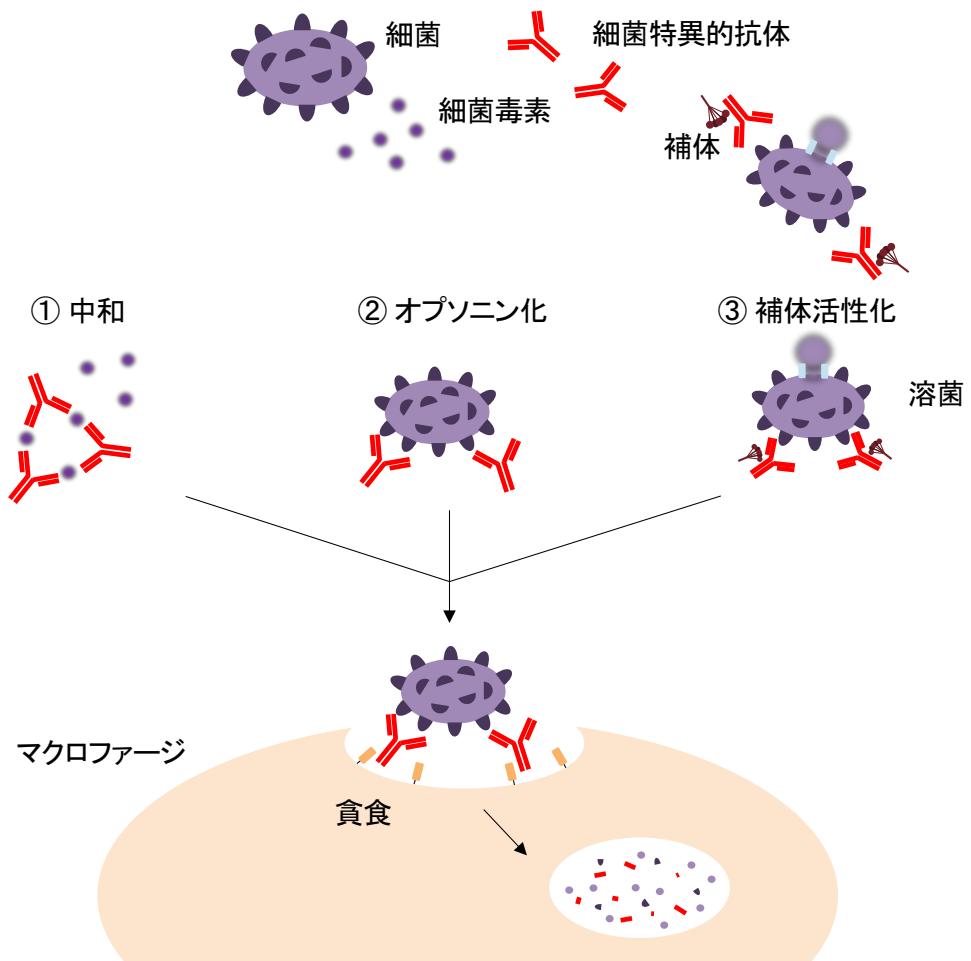


図. 1 抗体による病原体(細菌)の排除メカニズム

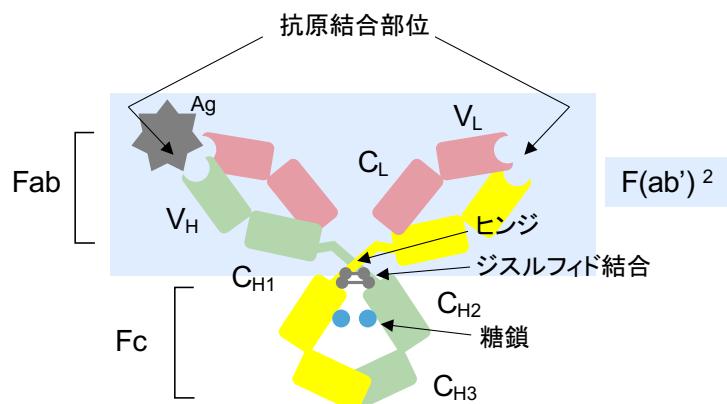
抗体は、主に3つの経路により細菌に対する生体防御を担う。

- ① 細菌由来の毒素に結合し、その作用を不活性化する(中和作用)。
- ② 細菌と直接結合することにより、マクロファージなどの貪食細胞による貪食を促進する(オプソニン化)。
- ③ 細菌の細胞表面において、補体成分を活性化することにより溶菌する(補体活性化)。

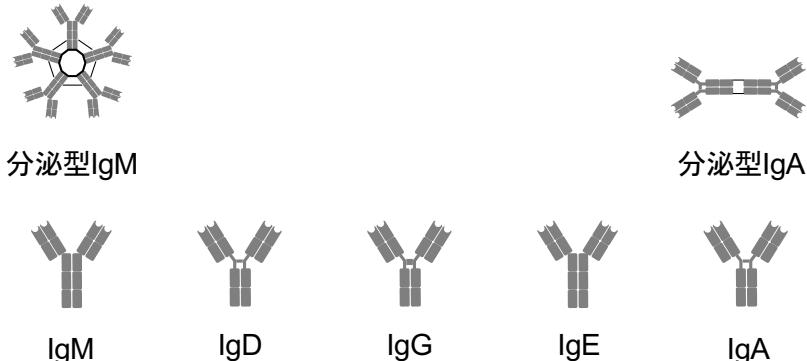
抗体は、重鎖（H鎖: Heavy chain）と軽鎖（L鎖: Light chain）と呼ばれる2種類のポリペプチド鎖がそれぞれ2つ結合したヘテロ4量体から構成されるY字型構造をしたタンパク質であり、共に機能的に異なる可変部と定常部から構成されている（図. 2A）。重鎖定常部はC<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub>, C<sub>H3</sub>ドメイン、軽鎖定常部はC<sub>L</sub>ドメインから構成され、抗体のエフェクター機能を発揮するために重要な領域である。一方、重鎖および軽鎖可変部は、それぞれV<sub>H</sub>, V<sub>L</sub>ドメインからなり、実際に抗原を認識する領域である。抗原結合部位である可変部のアミノ酸配列は抗体分子ごとに異なっており、これにより抗体の抗原特異性が決定される。また、C<sub>H1</sub>とC<sub>H2</sub>ドメインの間のヒンジ領域は、重鎖間でのジスルフィド結合を形成し2箇所の抗原結合部位を連結することによる抗体の多価性の獲得と共に、抗体分子の可動性に重要である（図. 2A）<sup>18-23</sup>。

また抗体は、重鎖定常部の違いにより5つクラス（IgM, IgD, IgG, IgE, IgA）に大別される。このクラスの違いはエフェクター機能の違いを生じ、誘発する免疫システムを決定する。IgM抗体は5量体を形成するためアビディティーが高く、単量体では低い結合能力しか持たない抗原に対しても結合することができるため、感染初期の免疫応答に重要な役割をもつ。IgD抗体は、抗体分子の中では唯一分泌されず、抗体産生細胞であるB細胞の細胞表面に発現している。これまでに、IgDのB細胞の分化への関与が報告されているが、免疫応答における役割は明らかとなっていない。IgG抗体は、適応免疫応答時に最も血清中に分泌される抗体であり、抗体応答の主要なクラスである。また、IgG抗体は、IgM抗体よりも抗原に対し高い親和性を有し、2次免疫応答においても活躍する。IgE抗体は、寄生虫に対する免疫応答に重要な役割を持つ一方で、花粉症やアトピー性皮膚炎に代表されるアレルギーの発症に関与する主要なクラスの抗体である。IgA抗体は2量体を形成しており、主に腸管関連リンパ節組織や粘膜関連リンパ組織において分泌され、腸管内や粘液中での細菌や毒素の中和を担う（図. 2B）。

A



B



分子量 (kDa)	970	184	146-165	188	160
血清値 (mg/mL)	1.5	0.04	0.5-9	0.00003	2.1
分泌部位	血清	なし	血清	上皮下	腸管粘膜 リンパ組織

## 図.2 抗体の構造と抗体のクラス

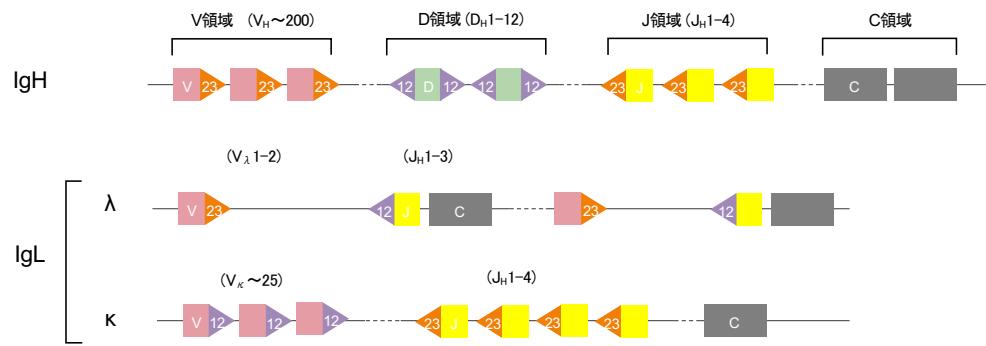
(A) 抗体は、重鎖と軽鎖から構成されるヘテロ4量体タンパク質であり、抗原結合部位により抗原を認識する。また、重鎖と軽鎖ともに、可変部と定常部から構成される。(B) 抗体には、重鎖定常部の違いにより5つのクラス(IgM, IgD, IgG, IgE, IgA)が存在する。IgMは5量体を、IgAは2量体を形成する。また、分泌型抗体のクラスの違いによりその機能が異なる。

## 1-2. 抗体遺伝子の再構成と骨髄における B 細胞の分化

B 細胞は 1 種類の抗体を産生するが、その抗原特異性は抗体可変部遺伝子の遺伝子組み換え (V(D)J 遺伝子再編成) によって決定される。抗体可変部遺伝子は、重鎖においては、それぞれ異なる配列を持ち多数の遺伝子断片からなる V 遺伝子断片群、D 遺伝子断片群、J 遺伝子断片群、軽鎖では、V 遺伝子断片群、J 遺伝子断片群から構成されている (図. 3A)。B 細胞は、重鎖では VDJ 断片を、軽鎖では VJ 断片をそれぞれ一つずつ組み合わせる V(D)J 遺伝子再編成により、抗体可変部をコードする遺伝子を完成させる<sup>19,23,24</sup>。V(D)J 遺伝子再編成は、遺伝子断片の両端に存在する組み換えシグナル配列 (RSS) の Recombination activating gene (RAG)-1, RAG-2 による認識・切断を開始とし、遺伝子断片同士が連結されることにより達成される<sup>18,20,25</sup>。また、この V(D)J 遺伝子組み換えにおける遺伝子断片の選択はランダムであるため、選択される断片の違いにより抗体の多様性が生じ、様々な抗原特異性を有する B 細胞集団が形成される (図. 3B)<sup>18-23</sup>。

B 細胞は、骨髄内において造血幹細胞から分化するが、V(D)J 遺伝子再編成はその初期段階において起こる。まず、造血幹細胞から分化した早期プロ B 細胞において重鎖遺伝子の D-J 再編成が起こり、続いて後期プロ B 細胞において V-DJ 再編成が起こる。重鎖遺伝子の VDJ 再構成の結果、機能的な重鎖を発現できる B 細胞のみが選択され、プレ B 細胞へと分化する。プレ B 細胞において軽鎖可変部遺伝子の V-J 再編成が起こり、機能的な IgM 抗体を細胞表面に発現できる B 細胞のみが未熟 B 細胞へと分化する。未熟 B 細胞において、細胞表面に発現する抗体の抗原特異性に基づき自己抗原に反応する B 細胞が除去され、非自己抗原に応答できる B 細胞のみが脾臓に移行し、細胞表面に IgD を発現する成熟 B 細胞へと分化する。その後、全身の血管とリンパ管内を循環し、病原体の侵入に備える (図. 4)。

A



B

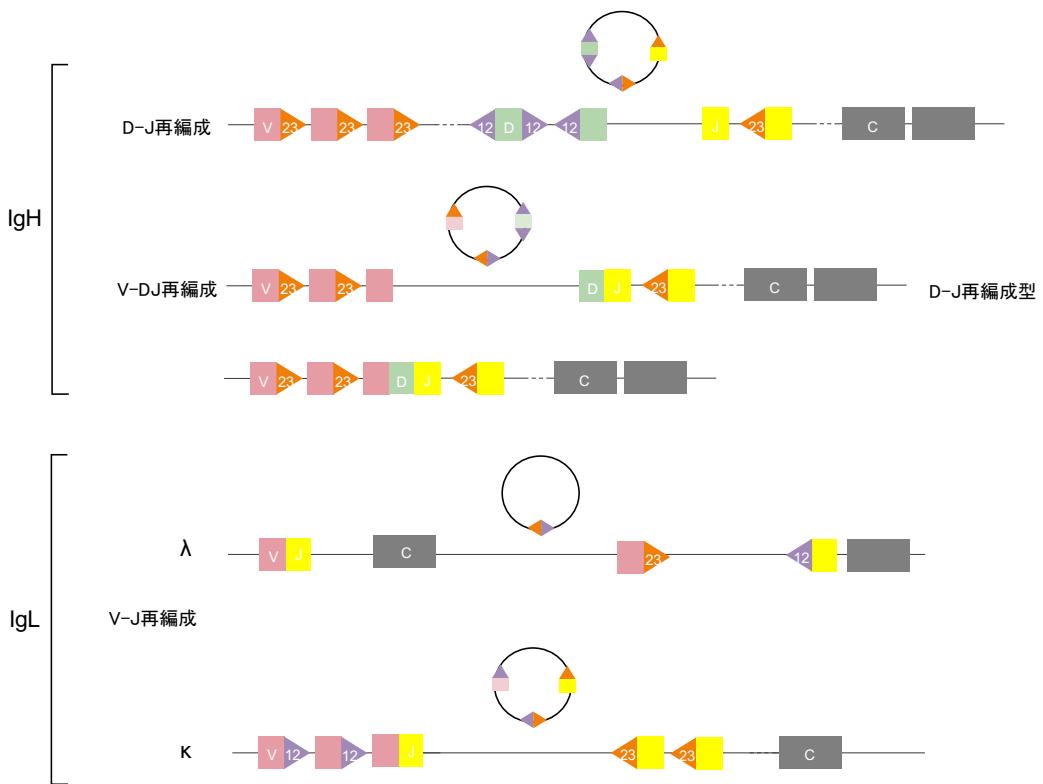


図. 3 抗体遺伝子再構成による抗体の多様化  
抗体の多様性は、抗体可変部遺伝子の重鎖 (IgH) でのVDJ、軽鎖 (IgL) でのVJ遺伝子のランダムな遺伝子組換えにより生じる。 (A) 生殖細胞型 (B) VDJ再編成型

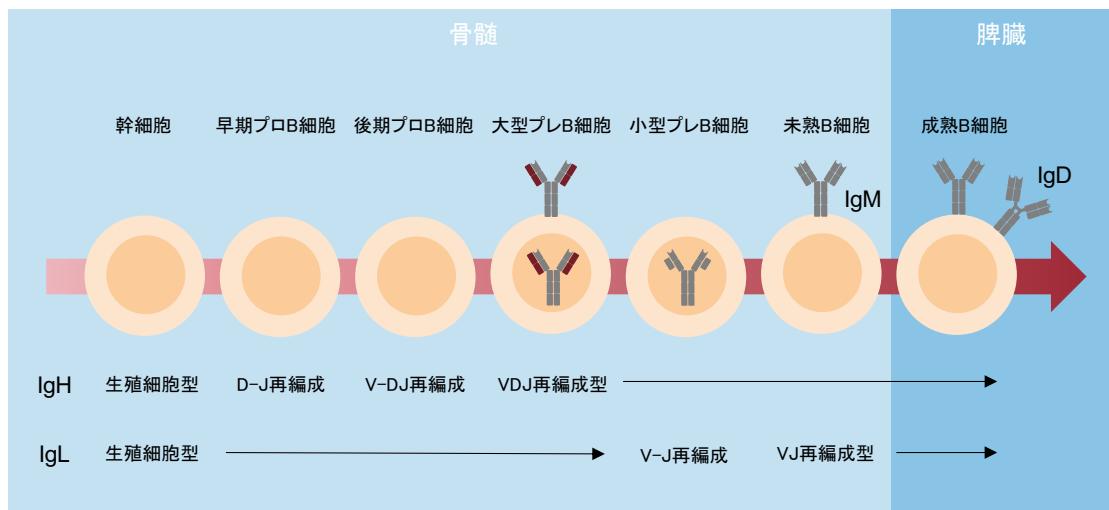


図. 4 B細胞の分化機構と抗体遺伝子の組み換え

骨髓内でのB細胞分化過程において、重鎖ではVDJ再編成、軽鎖ではVJ再編成が段階的に起きる。これらの遺伝子再編成の結果、機能的な抗体を発現することができるB細胞のみが、細胞表面にIgMを発現する未熟B細胞へと分化する。

### 1-3. 胚中心において誘導される抗原特異的抗体の機能向上

生体内に抗原が侵入すると、感染局所において自然免疫系が活性化されると共に、抗原を取り込んだ組織局在性の樹状細胞（DC）が2次リンパ組織へ遊走する。2次リンパ組織において、遊走した樹状細胞はT細胞に抗原を提示し、適応免疫系を機能させるために抗原特異的T細胞抗原受容体を発現するT細胞を活性化する<sup>26,27</sup>。抗原特異的なB細胞レセプター（BCR）を発現するB細胞は、T細胞領域において抗原による刺激を受けた後に、樹状細胞により活性化されたT細胞からの補助刺激を受け取ることにより髓索に1次反応巣を形成する。1次反応巣を形成した大部分のB細胞は短命の抗体産生細胞へと分化しIgMクラスの抗体を産生する<sup>28</sup>。一方、活性化した一部のB細胞は、B細胞領域へと移行し、濾胞樹状細胞（FDC）との相互作用により胚中心（GC）と呼ばれる微小環境を形成する。胚中心において、活性化したB細胞はまず急速に増殖し、暗領域を形成する（セントロプラスト）<sup>28,29</sup>。セントロプラストでは、抗体遺伝子可変部遺伝子座に体細胞高頻度突然変異（SHM）や遺伝子変換が、抗体定常部遺伝子にはクラススイッチ組み換え（CSR）が誘導されることにより抗体の多様化が誘発される<sup>7,9,30,31</sup>。その後、抗体分子を多様化したB細胞集団はFDCの近傍で明領域を形成するセントロサイトへと分化し、FDCや濾胞ヘルパーT（T<sub>FH</sub>）細胞との相互作用により、抗原に対して高親和性抗体を産生するB細胞のみが正のクローニング選択を受け、抗体を産生

する形質細胞（PC）や2次免疫応答で活躍する記憶細胞へと分化する<sup>32-34</sup>。胚中心において分化した形質細胞は、輸出リンパ管から骨髄へと移行し、高親和性抗体を産生する。產生された高親和性抗体は、抗原に結合することにより様々な免疫システムを誘導し、効率的な抗原の排除に寄与する（図. 5）。

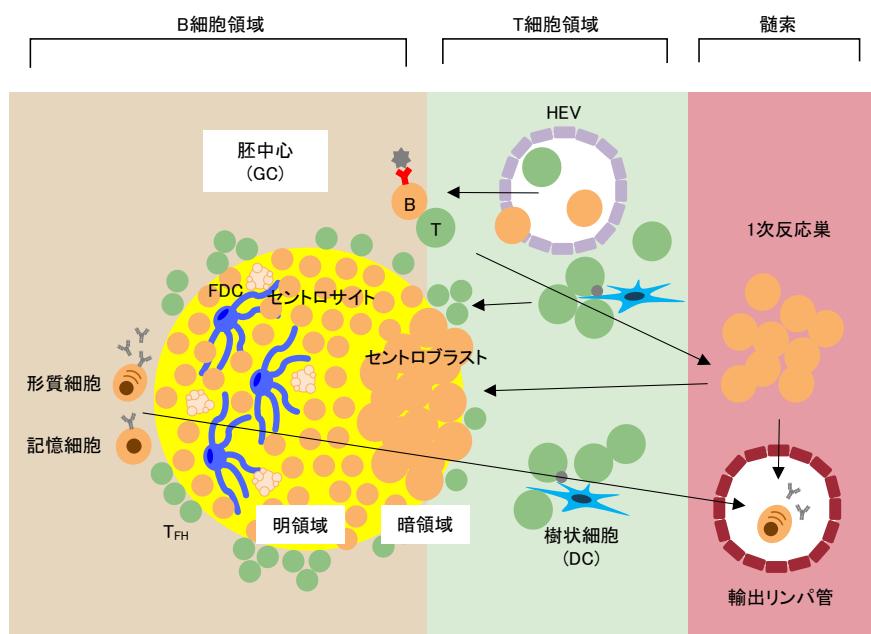


図. 5 胚中心の形成メカニズムと構造

胚中心は、主に抗原により活性化されたB細胞、T細胞と濾胞樹状細胞により形成される。胚中心では抗体の親和性成熟が起こり、抗原に対し高親和性な抗体を産生する形質細胞と記憶細胞が產生される。

#### 1-4. 濾胞樹状細胞（FDC）の胚中心反応における役割

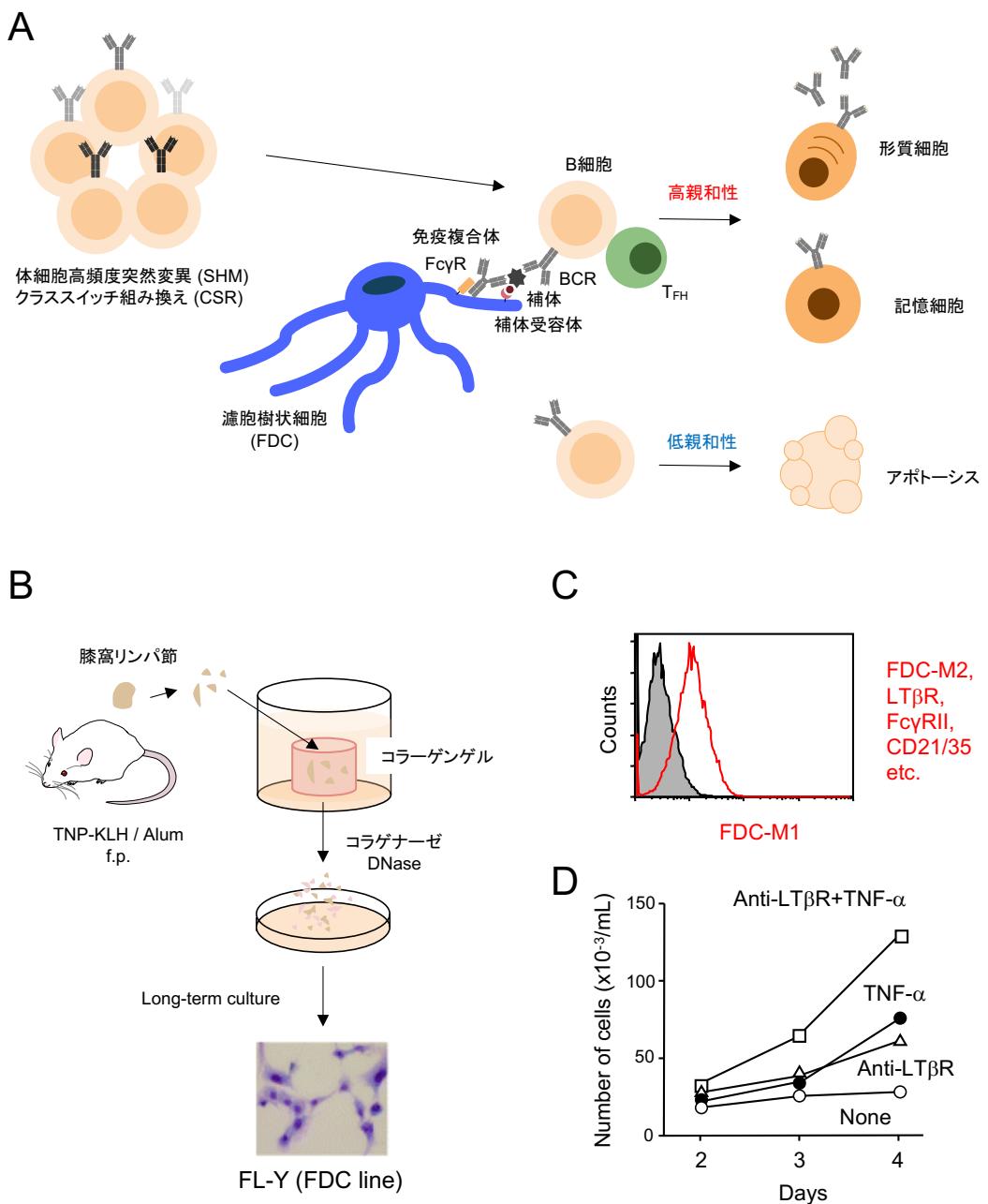
B 細胞領域における胚中心の形成には、B 細胞と FDC との相互作用が必要である。これは、FDC の分化に必要な Lymphotoxin (LT) や Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) およびそれらの受容体を欠損したマウスにおいて、免疫に伴い脾臓中に胚中心が形成されないという報告からも明らかである。

FDC は、2 次リンパ組織に存在する放射線耐性をもつ間葉系の細胞集団として発見された<sup>35-47</sup>。FDC は、胚中心内の明領域において、Fc $\gamma$ レセプターと補体レセプターを介して細胞表面に抗原・抗体・補体からなる免疫複合体を提示しており、抗原に対し高親和性抗体を産生する B 細胞のクローニング選択に重要な役割を担う<sup>11-16,37-39</sup>。高親和性抗体を産生する B 細胞は、BCR を介して FDC に提示された抗原に優先的に結合し、FDC からの B cell activating factor belonging TNF family (BAFF) などの生存シグナルを受け取ると共に抗原を取り込む<sup>48</sup>。さらに、抗原を取り込んだ B 細胞は、胚中心内に存在する T<sub>FH</sub> 細胞に抗原を提示し、T<sub>FH</sub> 細胞からの生存シグナルを受け取ることによりクローニング選択されると考えられている。その後、選択された B 細胞は抗体を産生する形質細胞や抗原を記憶する記憶細胞へと分化する<sup>49-53</sup>。一方、生存シグナルを受け取ることができない B 細胞は、アポトーシスにより除去される (図. 6A)<sup>12,54</sup>。このように、FDC は胚中心形成から高親和性抗体産生 B 細胞の分化までの一連の胚中心反応の制御に重要な細胞であると考えられている。しかし、胚中心形成に必要な FDC からの刺激因子や、高親和性抗体産生 B 細胞の選択機構などを含め、その詳細は明らかとなっていない。

当研究室では、胚中心での FDC の機能を解析するため、免疫したマウスから摘出したリンパ節とコラーゲンゲル培養法を用いて primary FDC を単離する手法を確立した。さらに、primary FDC を FDC の分化増殖に必要な TNF- $\alpha$  存在下で長期培養することにより、安定に増殖可能な FDC 細胞株 FL-Y を樹立した (図. 6B)<sup>55</sup>。この FL-Y は、FDC の特徴的な細胞表面マーカー (FDC-M1, FDC-M2, Fc $\gamma$ レセプター、補体レセプターなど) を発現し (図. 6C)、LT $\beta$  レセプターの刺激と TNF- $\alpha$  に応答して増殖するなどこれまでに報告されている FDC の特長を有している (図. 6D)。さらに、免疫したマウスのリンパ節より調整したリンパ球を FL-Y 上で培養すると胚中心 B 細胞の分化・増殖を促進するなど FDC 特有の機能を保持しており、FL-Y の利用により胚中心反応を再現することが可能である<sup>56</sup>。

これまでに FL-Y を利用して胚中心 B 細胞のクローニング選択機構を解析したところ、FDC から産生されるプロスタグラジン E<sub>2</sub> が T<sub>FH</sub> 細胞から産生される IL-21 と協調的に作用し、T 細胞からの生存シグナルを受け取ることができない (低親和性) 胚中心 B 細

胞に積極的にアポトーシスを誘導する機構（負の選択機構）の存在を明らかにした<sup>57</sup>。これらの機構は、効率的に高親和性抗体産生 B 細胞を選択するために重要な機構であると考えられる。さらに、FL-Y を利用し、胚中心 B 細胞分化における T 細胞の重要性を検討したところ、一過的な T 細胞からの補助刺激が胚中心 B 細胞への分化とその増殖に重要であることを明らかにした<sup>55</sup>。このように、FL-Y はこれまでに解析が困難であった FDC による胚中心反応の制御機構を解明するために有用なツールである。



**図. 6 濾胞樹状細胞の機能と濾胞樹状細胞株の樹立**  
**(A)**濾胞樹状細胞(FDC)は、細胞表面上に発現するFc<sub>γ</sub>Rと補体受容体を介して、抗原・抗体・補体から構成される免疫複合体を提示し、抗原に対し高親和性のBCRを発現する胚中心B細胞を選択する。選択されたB細胞が、形質細胞や記憶細胞へと分化する。一方、高親和性抗体を産生しないB細胞はアポトーシスにより排除される。**(B)**コラーゲンゲルを用いた培養により、免疫したマウスの膝窩リンパ節からFDC株FL-Yを樹立した。**(C)** FL-Yは、FDCに特徴的な細胞表面マーカーを発現している。**(D)** FL-Yは、LT<sub>β</sub>Rの刺激により増殖が促進される。

## 1-5. 新規単球系細胞 (FDMC) の分化とその機能

FL-Y の機能を解析する過程において、FL-Y が新規な単球系細胞 (FDC-induced monocytic cell (FDMC)) の分化を誘導することを発見した<sup>58</sup>。FDC が単球系細胞の分化に関与する報告はなく、FDC の新規な機能の発見である。FDMC は、マウスの脾臓細胞から T 細胞と B 細胞を除去した細胞を FL-Y 上で 8-12 日間培養すると発生する (図. 7A)。FDMC の発現する細胞表面分子の発現パターンは、これまでに報告されている細胞群とは異なる (図. 7B)<sup>59</sup>。先行研究より、FDMC は、脾臓細胞中に存在する CSF-1R<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>細胞から分化することが明らかとなっている。さらに、FL-Y の產生する FDMC の分化誘導因子を探索するため、Colony stimulating factor (CSF)-1 receptor のリガンドである IL-34 と CSF-1 の発現を RNA 干渉により阻害したところ、IL-34 の発現を阻害した時のみ FDMC の分化は抑制された。さらに、FDMC の分化誘導条件下において IL-34 と CSF-1 に対する中和抗体を添加しところ、RNA 干渉による結果と同様に IL-34 に対する中和抗体を添加した条件下のみで、FDMC の分化は抑制されていた。これらの結果より、FDMC の分化には、FL-Y の產生する IL-34 が必要であることが明らかとなっている<sup>58</sup>。

また、FDMC の生理機能を解析するため、*in vitro* において抗 CD40 抗体で刺激した B 細胞を FDMC と共に培養した。その結果、FDMC の刺激により胚中心様 B 細胞の増殖が促進された (図. 7C)。さらに、実際に免疫したマウスの脾臓中において、*in vitro* で分化誘導した FDCM と類似の表現系および B 細胞活性化能力をもつ単球系細胞 (FDMC 様細胞) が増加していた (図. 7D)。これらの結果は、免疫に伴い FDC により分化誘導された FDMC が、胚中心 B 細胞の分化を制御している可能性を示唆する。

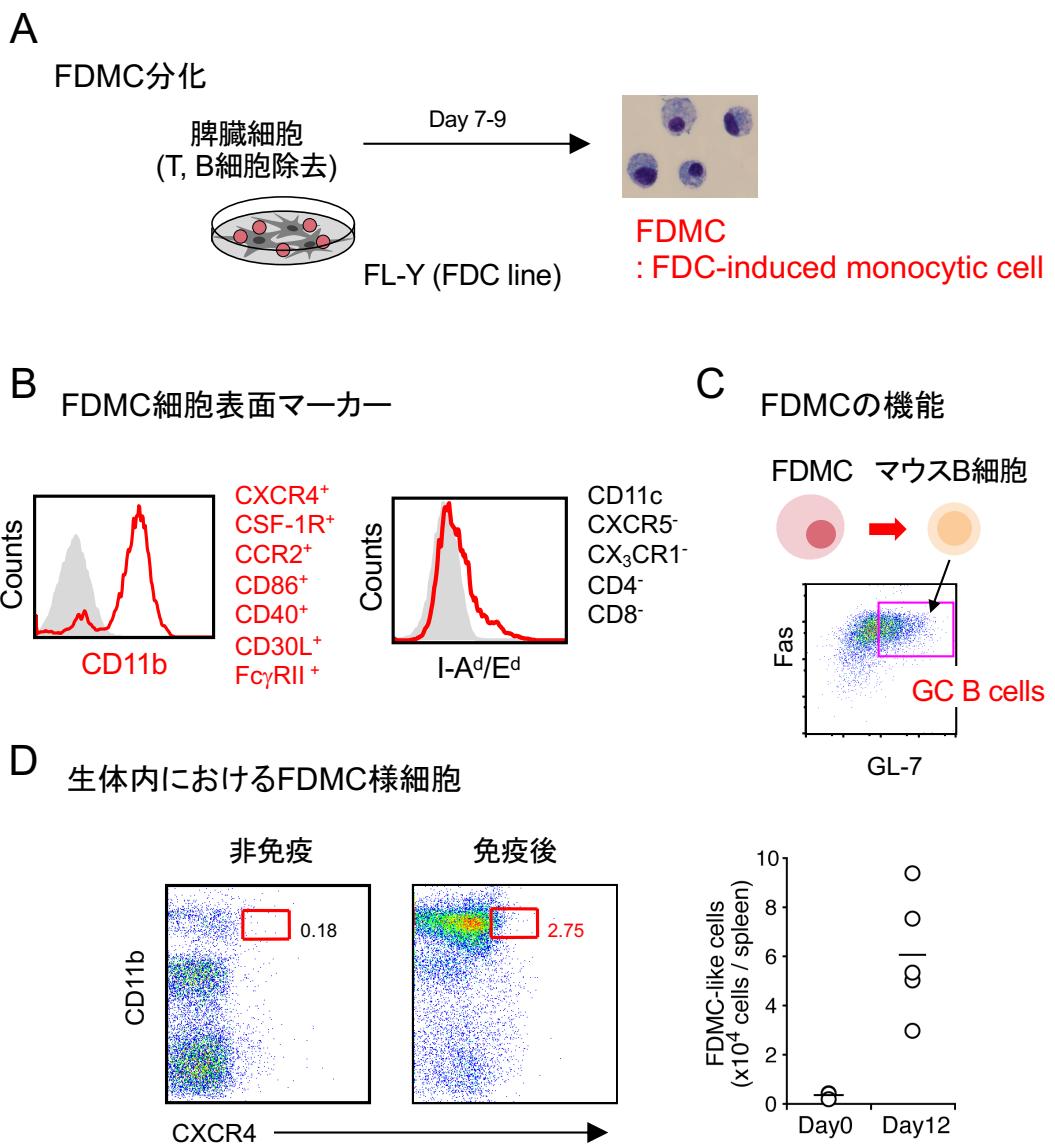


図. 7 新規単球系細胞(FDMC)の分化機構とその機能

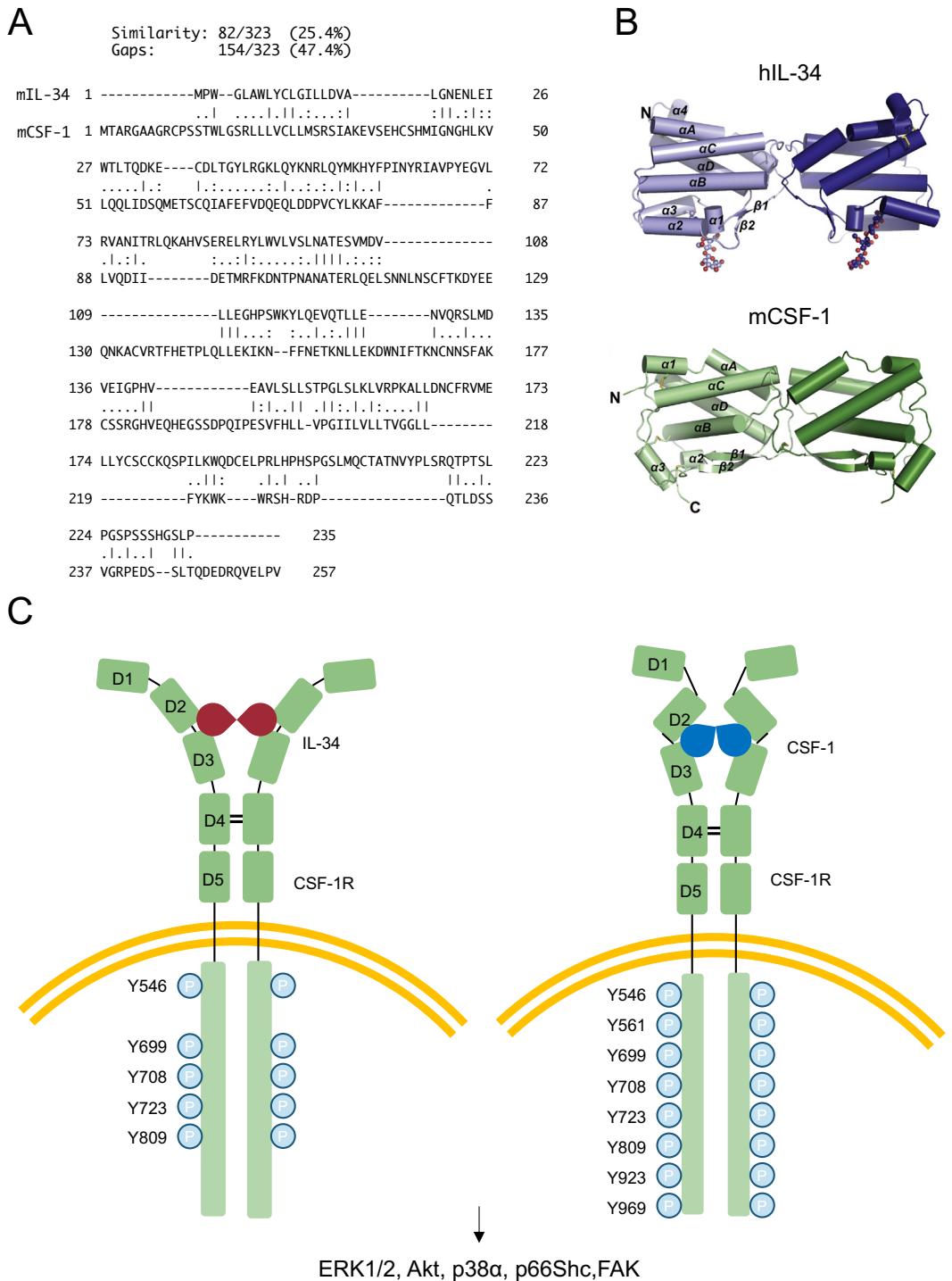
(A) FDC株FL-Yは、新規単球細胞FDMCの分化を誘導する。(B) FDMCは、今までに報告されている細胞群と異なる細胞表面マーカーを発現している。(C) FDMCは、胚中心B細胞の分化と増殖を促進する。(D) 免疫に伴い、生体内においてもFDMC様細胞が増加する。

## 1-6. 単球・マクロファージ分化における IL-34 と CSF-1 の役割と機能的な差異

CSF-1R は、レセプター型チロシンキナーゼであり、主に単球やマクロファージの分化に重要な役割を担う<sup>60,61</sup>。現在までに、CSF-1R に結合し、それらを刺激するリガンドとして、CSF-1 と IL-34 が報告されている<sup>62,63</sup>。マウスにおける CSF-1 と IL-34 のアミノ酸配列の相同性は 25.4% と低いが、そのタンパク質の構造が類似しており、この構造が CSF-1R への結合性に重要であると考えられている（図. 8A, B）<sup>64-67</sup>。一方で、CSF-1 と IL-34 との違いは、発現する細胞種や時期のみで、CSF-1R に対してほぼ同等の作用を及ぼすとされているが、はっきりとは分かっていない。実際に、CSF-1 と IL-34 の CSF-1R への結合予測モデルから、CSF-1 と IL-34 では CSF-1R への結合部位が異なっており、リガンドの結合によって誘導される CSF-1R 細胞内領域のチロシンリン酸化パターンも違うため、そのシグナル伝達は異なると考えられている（図. 8C）<sup>62,63,68,69</sup>。さらに、IL-34 と CSF-1 により刺激したマクロファージのサイトカイン発現パターンが異なり、炎症性マクロファージと抑制性マクロファージの分化制御に関わるとの報告もある<sup>70,71</sup>。

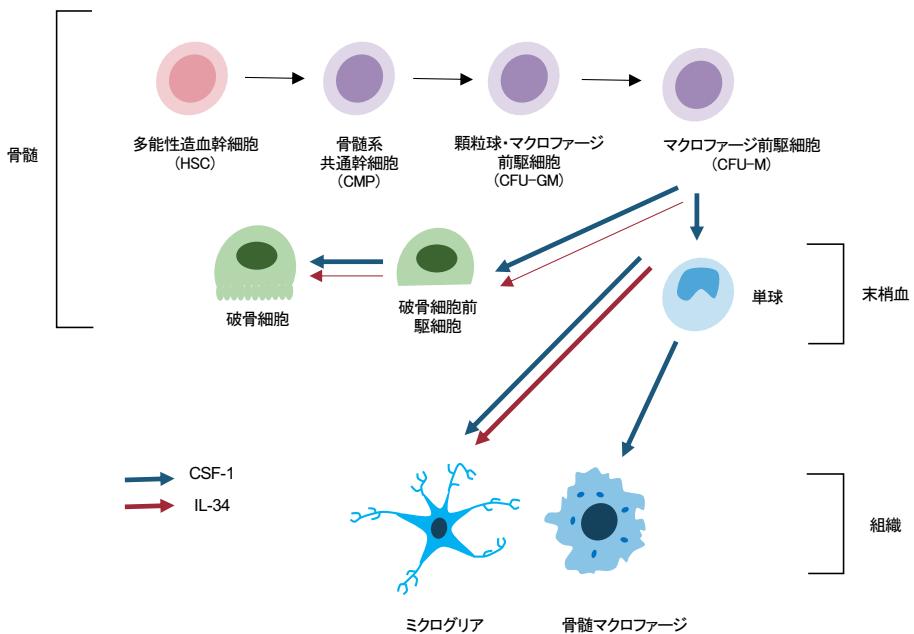
これまでの報告によると、CSF-1 ノックアウト ( $CSF-1^{op/op}$ ) マウスでは、大理石骨病の表現系を示すと共にマクロファージや破骨細胞の分化異常が見られる<sup>72,73</sup>。CSF-1R ノックアウトマウスでは、 $CSF-1^{op/op}$  マウスの表現系に加え、ミクログリアやランゲルハンス細胞も完全に消失するなど、より重篤な症状を示す<sup>74,75</sup>。一方、IL-34 ノックアウトマウスの表現系はより緩やかであり、大理石骨病様の症状は呈さないが、ミクログリアとランゲルハンス細胞の消失が認められる<sup>76,77</sup>。そのため、IL-34 は単球や組織マクロファージの分化に必須ではなく、ミクログリアとランゲルハンス細胞の分化に寄与すると考えられる（図. 9A）<sup>78-80</sup>。しかし、 $CSF-1^{op/op}$  マウスの表現系は、IL-34 の発現により回復することも報告されており、生体内における CSF-1 と IL-34 の機能差異については議論の予知がある（図. 9B）<sup>76,77,81,82</sup>。

近年、IL-34 が一部のがん細胞で高発現し、がん組織に抑制性マクロファージを誘導することにより、がん細胞の免疫システムからの回避の一端を担うことが報告された<sup>83,84</sup>。また、リウマチ患者では血中に IL-34 の高発現が認められるなど、IL-34 の自己免疫疾患への関与を示唆する報告もある<sup>85-89</sup>。しかし、生体内における IL-34 の詳細な作用メカニズムやその免疫学的機能を含めその全容は明らかとなっていない<sup>90,91</sup>。



**図. 8 IL-34とCSF-1によるCSF-1Rシグナル伝達機構の活性化**  
CSF-1Rリガンドとして、アミノ酸配列の相同性は低いが構造の類似する2種類のリガンド(IL-34とCSF-1)が報告されている。IL-34とCSF-1によるCSF-1Rシグナル伝達の活性化において、細胞内ドメインのリン酸化部位が異なる。

A



B

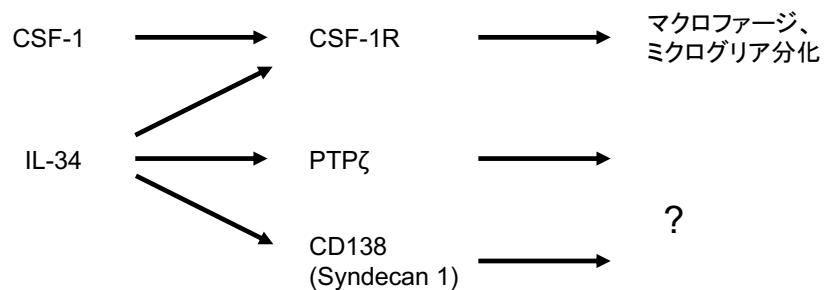


図. 9 単球・マクロファージ分化におけるIL-34とCSF-1の機能

CSF-1とIL-34は、単球・マクロファージ系の細胞分化に重要である。しかし、受容体が異なるなど、生理機能が完全には一致しない。

## 1-7. 研究目的

先行研究から、FDC より産生される IL-34 が、B 細胞活性化能力を有する单球系細胞の分化を刺激することにより、適応免疫系に必要な環境である胚中心の形成に関与する可能性がある。しかし、IL-34 が CSF-1 と異なる作用を示すメカニズムや、生体内の免疫組織において発現される IL-34 の单球系細胞分化への役割や胚中心 B 細胞分化への寄与は不明である<sup>92</sup>。そこで、本研究では、FDC が発現する IL-34 の特殊性を明らかにすることにより、FDMC 分化誘導機構を解明することを目的とした。さらに、生体内での適応免疫応答における IL-34 の重要性を明らかにするため、IL-34 の胚中心反応における役割を解明することを目指した（図. 10）。

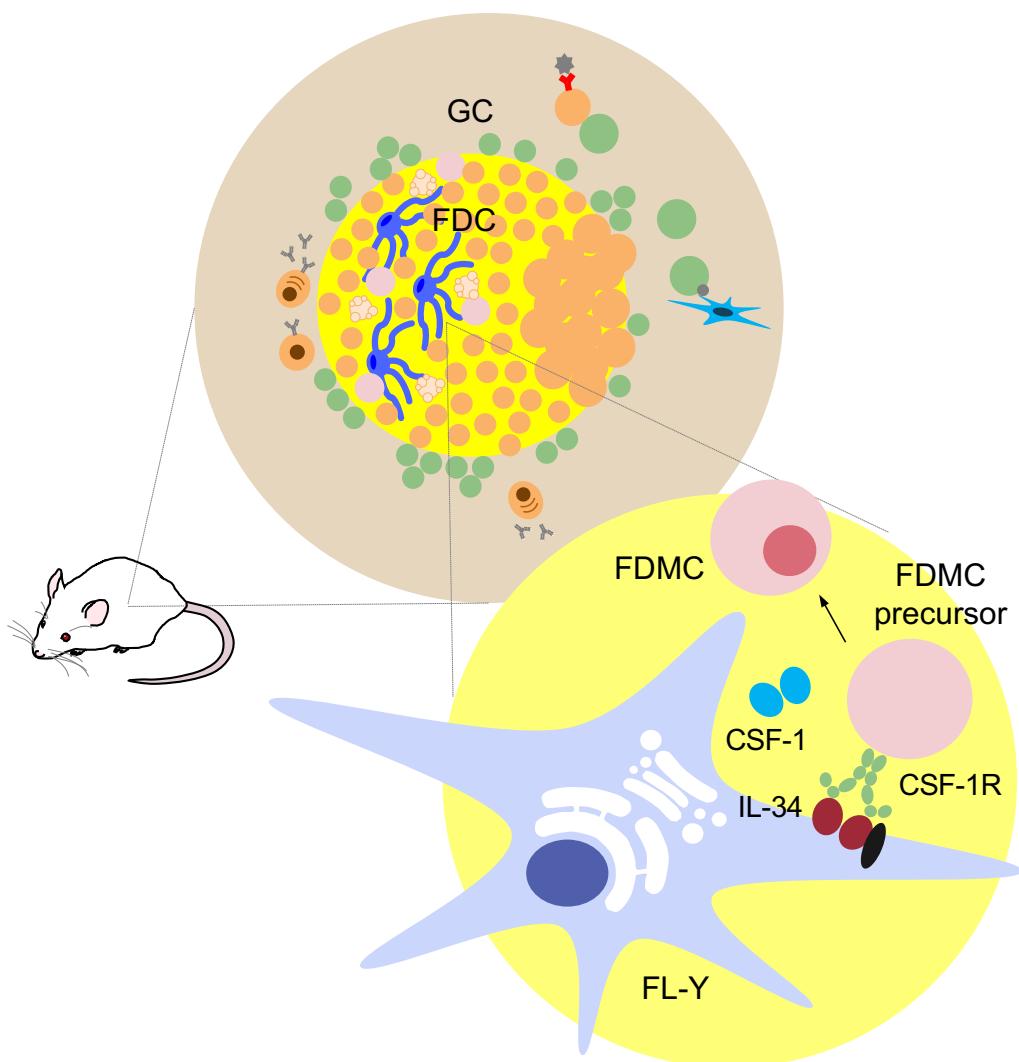


図. 10 FDCの产生するIL-34の胚中心反応への関与  
FDCより産生されるIL-34は、胚中心反応への関与が示唆される新規单球細胞 (FDMC) の分化を誘導する。

## 1-8. 参考文献

1. Janeway, C. A. & Medzhitov, R. INNATE IMMUNE RECOGNITION. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197–216 (2002).
2. Medzhitov., R., Paula, P.-H. & Janeway Jr, C. A. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394–397 (1997).
3. Zinkernagel, R. M. ON NATURAL AND ARTIFICIAL VACCINATIONS. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 515–546 (2003).
4. Takeda, K. & Akira, S. Toll-Like Receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 335–376 (2003).
5. Tarlinton, D. M. & Kenneth, S. G. C. Dissecting affinity maturation: a model explaining selection of antibody-forming cells and memory B cells in the germinal centre. *Immunol. Today* **21**, 436–441 (2000).
6. Berek, C., Berger, A. & Apel, M. Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell* **67**, 1121–1129 (1991).
7. Camacho, S. A., Kosco-vilbois, M. H. & Berek, C. The dynamic structure of the germinal center. *Immunol. Today* **19**, 511–514 (1998).
8. Honjo, T., Kinoshita, K. & Muramatsu, M. MOLECULAR MECHANISM OF CLASS SWITCH RECOMBINATION : Linkage with Somatic Hypermutation. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 165–196 (2002).
9. Kelsoe, G. Life and death in germinal centers (Redux). *Immunity* **4**, 107–111 (1996).
10. Jacob, J., Kelsoe, G., Rajewsky, K. & Weiss, U. Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centers. *Nature* **354**, 389–392 (1991).
11. Jacob, J. & Kelsoe, G. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl) acetyl. II. A common clonal origin for periarteriolar lymphoid sheath-associated foci and germinal centers. *J. Exp. Med.* **176**, 679–687 (1992).
12. Tew, J. G., Wu, J., Fakher, M., Szakal, A. K. & Qin, D. Follicular dendritic cells: beyond the necessity of T-cell help. *Trends Immunol.* **22**, 361–367 (2001).
13. Takahashi, Y., Ohta, H. & Takemori, T. Fas is required for clonal selection in germinal centers and the subsequent establishment of the memory B cell repertoire. *Immunity* **14**, 181–192 (2001).
14. Smith, K. G. C. *et al.* bcl-2 Transgene Expression Inhibits Apoptosis in the Germinal Center and Reveals Differences in the Selection of Memory B Cells and Bone Marrow Antibody-Forming Cells. *J. Exp. Med.* **191**, 475–484 (2000).
15. Takahashi, Y. *et al.* Relaxed negative selection in germinal centers and impaired affinity maturation in bcl-x<sub>L</sub> transgenic mice. *J. Exp. Med.* **190**, 399–409 (1999).
16. Cyster, J. G. *et al.* Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol. Rev.* **176**, 181–193 (2000).
17. Garside, P. *et al.* Visualization of Specific B and T Lymphocyte Interactions in the Lymph Node. *Science* **281**, 96–99 (1998).
18. Oettinger, M. A., Schatz, D. G., Gorka, C. & Baltimore, D. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* **248**, 1517 LP-1523 (1990).
19. Osmond, D. G., Rolink, A. & Melchers, F. Murine B lymphopoiesis: Towards a unified model. *Immunol. Today* **19**, 65–68 (1998).
20. Tonegawa, S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* **302**, 575–581 (1983).
21. Muramatsu, M. *et al.* Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* **102**, 553–563 (2000).
22. Sawchuk, B. D. J. *et al.* V(D)J Recombination: Modulation of RAG1 and RAG2 Cleavage Activity on 12/23 Substrates by Whole Cell Extract and DNA-bending Proteins. *J. Exp. Med.* **185**, 2025–2032 (1997).
23. Van Gent, D. C., Ramsden, D. A. & Gellert, M. The RAG1 and RAG2 proteins establish the 12/23 rule in V(D)J recombination. *Cell* **85**, 107–113 (1996).
24. Sawchuk, D. J. *et al.* V(D)J recombination: modulation of RAG1 and RAG2 cleavage activity on 12/23 substrates by whole cell extract and DNA-bending proteins. *J. Exp.*

- Med.* **185**, 2025–2032 (1997).
25. Schatz, D. G., Oettinger, M. A. & Baltimore, D. The V(D)J Recombination Activating Gene, RAG-1. *Cell* **59**, 1035–1048 (1989).
  26. Banchereau, J. & Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245–252 (1998).
  27. Gunzer, M. *et al.* Antigen presentation in extracellular matrix: Interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential. *Immunity* **13**, 323–332 (2000).
  28. Ian C.M. MacLennan *et al.* Extrafollicular Antibody Responses. *Immunol. Rev.* **194**, 8–18 (2003).
  29. Durie, F. H., Foy, T. M., Masters, S. R., Laman, J. D. & Noelle, R. J. The role of CD40 in the regulation of humoral and cell-mediated immunity. *Immunol. Today* **15**, 406–411 (1994).
  30. McHeyzer-Williams, L. J. & McHeyzer-Williams, M. G. Antigen-Specific Memory B Cell Development. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 487–513 (2005).
  31. Rajewsky, K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* **381**, 751–758 (1996).
  32. Neuberger, M. S. & Milstein, C. Somatic hypermutation. *Curr. Opin. Immunol.* **7**, 248–254 (1995).
  33. Wabl, M., Cascalho, M. & Steinberg, C. Hypermutation in antibody affinity maturation. *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 186–189 (1999).
  34. Wagner, S. D. & Neuberger, M. S. Somatic Hypermutation of Immunoglobulin Genes. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 441–457 (1996).
  35. Matsumoto, M. *et al.* Affinity maturation without germinal centres in lymphotoxin- $\alpha$ -deficient mice. *Nature* **382**, 462–466 (1996).
  36. Fu, Y. X. *et al.* Lymphotoxin- $\alpha$  (LT $\alpha$ ) Supports Development of Splenic Follicular Structure That Is Required for IgG Responses. *J. Exp. Med.* **185**, 2111–2120 (1997).
  37. Fu, Y. X., Huang, G., Matsumoto, M., Molina, H. & Chaplin, D. D. Independent signals regulate development of primary and secondary follicle structure in spleen and mesenteric lymph node. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 5739–5743 (1997).
  38. Banks, T. A. *et al.* Lymphotoxin- $\alpha$ -deficient mice. Effects on secondary lymphoid organ development and humoral immune responsiveness. *J. Immunol.* **155**, 1685–1693 (1995).
  39. Togni, P. De *et al.* Abnormal Development of Peripheral Organs in Mice Deficient in Lymphotoxin. *Science* **264**, 703–707 (1994).
  40. Engwerda, C. R. *et al.* Distinct Roles for Lymphotoxin- $\alpha$  and Tumor Necrosis Factor in the Control of Leishmania donovani Infection. *Am. J. Pathol.* **165**, 2123–2133 (2004).
  41. Fu, Y. X., Huang, G., Wang, Y. & Chaplin, D. D. B lymphocytes induce the formation of follicular dendritic cell clusters in a lymphotoxin alpha-dependent fashion. *J. Exp. Med.* **187**, 1009–1018 (1998).
  42. Koni, P. A. *et al.* Distinct Roles in Lymphoid Organogenesis for Lymphotoxins  $\alpha$  and  $\beta$  Revealed in Lymphotoxin  $\beta$ -Deficient Mice. *Immunity* **6**, 491–500 (1997).
  43. Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Episkopou, V. & Kollias, G. Immune and inflammatory responses in TNF $\alpha$ -deficient mice: a critical requirement for TNF $\alpha$  in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J. Exp. Med.* **184**, 1397–411 (1996).
  44. Matsumoto, M. *et al.* Role of Lymphotoxin and the Type I TNF Receptor in the Formation of Germinal Centers. *Adv. Sci.* **271**, 1289–1291 (1996).
  45. Fütterer, A., Mink, K., Luz, A., Kosco-Vilbois, M. H. & Pfeffer, K. The Lymphotoxin  $\beta$  Receptor Controls Organogenesis and Affinity Maturation in Peripheral Lymphoid Tissues. *Immunity* **9**, 59–70 (1998).
  46. Miyawaki, S. *et al.* A new mutation, *aly*, that induces a generalized lack of lymph nodes accompanied by immunodeficiency in mice. *Eur. J. Immunol.* **24**, 429–434 (1994).
  47. Yamada, T. *et al.* Abnormal Immune Function of Hemopoietic Cells from

- Alymphoplasia (aly) Mice, a Natural Strain with Mutant NF-  $\kappa$ B-Inducing Kinase. *J. Immunol.* **165**, 804–812 (2000).
48. Park, C. S. & Choi, Y. S. How do follicular dendritic cells interact intimately with B cells in the germinal centre? *Immunology* **114**, 2–10 (2005).
  49. McHeyzer-Williams, L. J., Cool, M. & McHeyzer-Williams, M. G. Antigen-specific B cell memory: expression and replenishment of a novel B220- memory B cell compartment. *J. Exp. Med.* **191**, 1149–1165 (2000).
  50. Slifka, M. K. & Ahmedt, R. Long-lived plasma cells: a mechanism for maintaining persistent antibody production. *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 252–258 (1998).
  51. Sze, D. M.-Y., Toellner, K.-M., de Vinuesa, C. G., Taylor, D. R. & MacLennan, I. C. M. Intrinsic Constraint on Plasmablast Growth and Extrinsic Limits of Plasma Cell Survival. *J. Exp. Med.* **192**, 813–821 (2000).
  52. Smith, K. G. C., Light, A., Nossal, G. J. V. & Tarlinton, D. M. The extent of affinity maturation differs between the memory and antibody-forming cell compartments in the primary immune response. *EMBO J.* **16**, 2996–3006 (1997).
  53. Manz, R. A., Thiel, A. & Radbruch, A. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* **388**, 133–134 (1997).
  54. Fischer, M. B. *et al.* Dependence of Germinal Center B Cells on Expression of CD21 / CD35 for Survival. *Science* **280**, 582–585 (1998).
  55. Nishikawa, Y. *et al.* Establishment of Lymphotoxin  $\beta$  Receptor Signaling-Dependent Cell Lines with Follicular Dendritic Cell Phenotypes from Mouse Lymph Nodes. *J. Immunol.* **177**, 5240–5214 (2006).
  56. Zhang, T. T. *et al.* Germinal center B cell development has distinctly regulated stages completed by disengagement from T cell help. *Elife* **6**, 1–20 (2017).
  57. Magari, M. *et al.* IL-21-Dependent B Cell Death Driven by Prostaglandin E<sub>2</sub>, a Product Secreted from Follicular Dendritic Cells. *J. Immunol.* **187**, 4210–4218 (2011).
  58. Yamane, F. *et al.* CSF-1 receptor-mediated differentiation of a new type of monocytic cell with B cell-stimulating activity: its selective dependence on IL-34. *J. Leukoc. Biol.* **95**, 19–31 (2014).
  59. Bronte, V. *et al.* Identification of a CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8<sup>+</sup> T cells. *Blood* **96**, 3838–3846 (2000).
  60. Terry, R. L. & Miller, S. D. Molecular control of monocyte development. *Cell. Immunol.* **291**, 16–21 (2014).
  61. Pixley, F. J. & Stanley, E. R. CSF-1 regulation of the wandering macrophage: Complexity in action. *Trends Cell Biol.* **14**, 628–638 (2004).
  62. Droin, N. & Solary, E. Editorial: CSF1R, CSF-1, and IL-34, a ‘menage a trois’ conserved across vertebrates. *J. Leukoc. Biol.* **87**, 745–747 (2010).
  63. Heymann, D. Interleukin-34: An enigmatic cytokine. *IBMS Bonekey* **7**, 406–413 (2010).
  64. Lin, H. *et al.* Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science* **320**, 807–811 (2008).
  65. Ségaliny, A. I. *et al.* IL-34 and M-CSF form a novel heteromeric cytokine and regulate the M-CSF receptor activation and localization. *Cytokine* **76**, 170–181 (2015).
  66. Garceau, V. *et al.* Pivotal Advance: Avian colony-stimulating factor 1 (CSF-1), interleukin-34 (IL-34), and CSF-1 receptor genes and gene products. *J. Leukoc. Biol.* **87**, 753–764 (2010).
  67. Ma, X. *et al.* Structural basis for the dual recognition of helical cytokines IL-34 and CSF-1 by CSF-1R. *Structure* **20**, 676–687 (2012).
  68. Felix, J. *et al.* Human IL-34 and CSF-1 establish structurally similar extracellular assemblies with their common hematopoietic receptor. *Structure* **21**, 528–539 (2013).
  69. Zelante, T. & Ricciardi-Castagnoli, P. The yin-yang nature of CSF1R-binding cytokines. *Nat. Immunol.* **13**, 717–719 (2012).
  70. Chihara, T. *et al.* IL-34 and M-CSF share the receptor Fms but are not identical in biological activity and signal activation. *Cell Death Differ.* **17**, 1917–1927 (2010).
  71. Sanchez-Niño, M. D., Sanz, A. B. & Ortiz, A. Chronicity following ischaemia-

- reperfusion injury depends on tubular-macrophage crosstalk involving two tubular cell-derived CSF-1R activators: CSF-1 and IL-34. *Nephrol. Dial. Transplant.* **31**, 1409–1416 (2016).
72. Wei, S. *et al.* Functional overlap but differential expression of CSF-1 and IL-34 in their CSF-1 receptor-mediated regulation of myeloid cells. *J. Leukoc. Biol.* **88**, 495–505 (2010).
  73. Witmer-Pack, M. D. *et al.* Identification of macrophages and dendritic cells in the osteopetrosic (*op/op*) mouse. *J. Cell Sci.* **104**, 1021–1029 (1993).
  74. Ginhoux, F. *et al.* Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat. Immunol.* **7**, 265–273 (2006).
  75. Dai, X. M. *et al.* Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood* **99**, 111–120 (2002).
  76. Wang, Y. *et al.* IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat. Immunol.* **13**, 753–760 (2012).
  77. Greter, M. *et al.* Stroma-Derived Interleukin-34 Controls the Development and Maintenance of Langerhans Cells and the Maintenance of Microglia. *Immunity* **37**, 1050–1060 (2012).
  78. Wang, Y. & Colonna, M. Interleukin-34, a cytokine crucial for the differentiation and maintenance of tissue resident macrophages and Langerhans cells. *Eur. J. Immunol.* **44**, 1575–1581 (2014).
  79. Geissmann, F. *et al.* Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* **327**, 656–661 (2010).
  80. Rietkötter, E. *et al.* Anti-CSF-1 treatment is effective to prevent carcinoma invasion induced by monocyte-derived cells but scarcely by microglia. *Oncotarget* **6**, 15482–15493 (2015).
  81. Nandi, S. *et al.* The CSF-1 receptor ligands IL-34 and CSF-1 exhibit distinct developmental brain expression patterns and regulate neural progenitor cell maintenance and maturation. *Dev. Biol.* **367**, 100–113 (2012).
  82. Nakamichi, Y. *et al.* Spleen serves as a reservoir of osteoclast precursors through vitamin D-induced IL-34 expression in osteopetrosic *op/op* mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 10006–10011 (2012).
  83. Franzè, E. *et al.* Interleukin-34 sustains pro-tumorigenic signals in colon cancer tissue. *Oncotarget* **9**, 3432–3445 (2018).
  84. Baghdadi, M. *et al.* Chemotherapy-induced IL34 enhances immunosuppression by tumor-associated macrophages and mediates survival of chemoresistant lung cancer cells. *Cancer Res.* **76**, 6030–6042 (2016).
  85. Zhang, F. *et al.* Interleukin-34 in rheumatoid arthritis: Potential role in clinical therapy. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 7809–7815 (2015).
  86. Chang, E. J. *et al.* IL-34 is associated with obesity, chronic inflammation, and insulin resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99**, 1263–1271 (2014).
  87. Hwang, S. J. *et al.* Interleukin-34 produced by human fibroblast-like synovial cells in rheumatoid arthritis supports osteoclastogenesis. *Arthritis Res. Ther.* **14**, 1–10 (2012).
  88. Wang, B. *et al.* IL-34 upregulated Th17 production through increased IL-6 expression by rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Mediators Inflamm.* **2017**, (2017).
  89. Chang, S. H. *et al.* Baseline serum interleukin-34 levels independently predict radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* **35**, 71–79 (2015).
  90. Nakamichi, Y., Udagawa, N. & Takahashi, N. IL-34 and CSF-1: Similarities and differences. *J. Bone Miner. Metab.* **31**, 486–495 (2013).
  91. Baghdadi, M. *et al.* Interleukin-34, a comprehensive review. *J. Leukoc. Biol.* **104**, 931–951 (2018).
  92. Baek, J. H. *et al.* IL-34 mediates acute kidney injury and worsens subsequent chronic kidney disease. *J. Clin. Invest.* **125**, 3198–3214 (2015).