

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 11 年度博士課程入学

氏名 佐藤 あゆ子

指導教官 上野川修一

論文題目 パイエル板樹状細胞の免疫応答特性に関する研究

我々の身体は筒状の構造物あるいはその集合体に例えることができる。その外側面は皮膚に、その内側面は粘膜によって覆われており、粘膜の表面積は皮膚の約 200 倍に達する。この粘膜は呼吸、食餌、排泄、生殖などの重要な生命維持活動において、多様でおびただしい異物をその表面から体内に取り込んでいる。腸管粘膜は食物などの生命維持に必要なもののみならず、生体にとって不都合な病原微生物なども多量に取り込んでいる。それらを識別し、必要なものは取り込み、生体にとって害となるものは排除するという腸管粘膜組織の免疫組織としての特性が明らかになるとともに、全身免疫系とは異なる独特な免疫機構を有しているということが明確となった。

腸管粘膜の免疫機構の中で重要な役割を果たしているのが免疫グロブリン A (IgA) であり、腸管粘膜に侵入する細菌に対して感染阻止に働く。IgA 産生応答を始めとする腸管特異的免疫応答の誘導には小腸に存在するリンパ組織であるパイエル板がその役割の一端を担っていると考えられており、パイエル板に存在する免疫担当細胞の解析はその機構を解明する上で非常に重要である。パイエル板の表層に存在する M 細胞を介してパイエル板内に抗原が積極的に取り込まれると、樹状細胞などの抗原提示細胞によって CD4⁺ T 細胞に提示され、免疫応答の誘導が開始される。パイエル板のドーム領域には CD4⁺ T 細胞を活性化するのに必要な MHC class II を発現する樹状細胞、マクロファージ、B 細胞などの抗原提示細胞が存在している。また、胚中心には高い割合で IgA 産生前駆 B 細胞

が認められ、その周辺には CD4⁺ T 細胞の多く存在する T 細胞領域がある。このようにパイエル板には IgA 抗体産生に必要な免疫担当細胞が含まれており、腸管における IgA 抗体誘導において重要な役割を担っていることが示唆されている。

一方、樹状細胞は、未感作 CD4⁺ T 細胞を活性化しうる唯一の抗原提示細胞であると言われている。したがってパイエル板樹状細胞の機能を調べることは、IgA 産生応答をはじめとする腸管特異的免疫応答の誘導機構の解明において重要である。実際、パイエル板樹状細胞は脾臓樹状細胞と比較して IgA 産生誘導能が高いことが、*in vitro* の実験により示されている。また、IgA など抗体の産生にはサイトカインの介助が重要である。IgA 産生は、まず、B 細胞が形質転換成長因子 (TGF)- β および CD40 からの刺激を受け、その後、インターロイキン (IL) -5 あるいは IL-6 の効果により IgA 産生細胞に分化することにより誘導される。しかしながら、これらのサイトカイン分泌誘導機構を始めとするパイエル板樹状細胞による免疫応答誘導機構についてほとんど明らかとなっておらず、どのような機構でパイエル板樹状細胞が IgA 産生応答など腸管特異的な免疫応答の誘導に関与しているのか不明であった。

本研究では、パイエル板樹状細胞に焦点を当て、その独自性を調べるために、パイエル板樹状細胞の細胞表面分子の発現、T 細胞応答誘導能について代表的な末梢リンパ組織である脾臓と比較した。また、パイエル板樹状細胞のサイトカイン産生能、特に IgA 産生細胞の成熟に重要なサイトカインである IL-6 について解析を行った。

第一章 樹状細胞分離方法確立および細胞表面分子発現解析

組織の免疫細胞における樹状細胞の頻度は 1%前後と非常に低いため、最近まで組織特有の樹状細胞は分離することが困難であることから詳細な機能の解析は進んでいなかった。しかし、本研究において従来用いられてきた分離方法を再検討した結果、MACS 分離カラムおよびセルソーターを用いて分離することにより、樹状細胞を 97-100%の高純度で分離することに成功した。また、樹状細胞には骨髓系樹状細胞である CD11b⁺ 樹状細胞とリンパ球系樹状細胞である CD8 α ⁺ 樹状細胞というそれぞれ異なる分化経路を持つ樹状細胞群が知られているが、同様の方法でそれぞれについても分離することができた。

続いて、パイエル板樹状細胞と脾臓樹状細胞の細胞表面分子の発現をフローサイトメトリーを用いて解析した。その結果、パイエル板樹状細胞は脾臓樹状細胞と比較して MHC class II, CD86, CD40 分子の発現が高いこと、また、樹状細胞の成熟マーカーである DEC-205 を高発現している細胞の割合が高いことが明らかとなった。この結果から、パイエル板樹状細胞が脾臓樹状細胞より成熟の度合いが高いことが示唆された。

第二章 パイエル板樹状細胞の誘導する T 細胞応答

まず、パイエル板樹状細胞により誘導される抗原特異的 CD4⁺ T 細胞の増殖応答を脾臓樹状細胞と比較した。CD4⁺ T 細胞はオバルブミン (OVA) 特異的 T 細胞の T 細胞抗原レセプター (TCR) を導入したトランスジェニック (tg) マウス (7-3-7 TCR tg マウス) の脾臓細胞から調製した。この tg マウスは OVA323-339 残基特異的な TCR を発現している T 細胞の頻度が高いため、このマウスを用いることにより OVA 特異的な未感作 T 細胞の調製が容易となる。この CD4⁺ T 細胞をパイエル板および脾臓樹状細胞を抗原提示細胞として OVA で刺激した。その結果、パイエル板樹状細胞の場合は、脾臓樹状細胞より強い T 細胞増殖応答を示し、第一章で示されたように MHC class II の発現が高く抗原提示能が高いためこのような結果になったと考えられた。

ある種の細菌感染によって、パイエル板においてインターフェロン (IFN)- γ の産生が誘導され、病原細菌の排除機構の誘導に働くことが知られている。そこで次に、パイエル板樹状細胞による tg マウス由来の脾臓未感作 CD4⁺ T 細胞のサイトカイン産生誘導能を解析した結果、脾臓樹状細胞と比較して、高い IFN- γ , IL-2, IL-6 産生誘導が認められ、IL-4 産生誘導は認められなかった。さらに脾臓の CD11b⁺ 樹状細胞および CD8 α ⁺ 樹状細胞を分離し同様な実験を行った結果、両細胞群の間で IFN- γ および IL-4 の産生誘導能に差は認められなかった。一方、パイエル板 CD11b⁺ 樹状細胞を抗原提示細胞とした場合は脾臓樹状細胞とは異なり、高い IL-2, IL-6, IFN- γ 産生誘導が認められ、IL-4 の産生は認められなかったのに対して、パイエル板 CD8 α ⁺ 樹状細胞を用いた場合には IFN- γ 産生は誘導されず、IL-4 の産生が誘導された。ここでさらに、パイエル板および脾臓の各樹状細胞群を抗 CD40 抗体を用いて刺激して培養し、IFN- γ 産生誘導に関与するサイトカインである IL-12 p40 の産生量を調べたところ、パイエル板各樹状細胞群による産生量に差は認められなかった。また、第一章においてパイエル板樹状細胞は脾臓樹状細胞より IL-4 産生誘導を増強すると言われている CD86 の発現が高いことが示されたが、パイエル板樹状細胞は IL-4 の産生を誘導せず、IFN- γ 産生を誘導した。

したがって、パイエル板 CD11b⁺ 樹状細胞を抗原提示細胞とした場合、IFN- γ 産生応答、パイエル板 CD8 α ⁺ 樹状細胞を用いた場合には IL-4 の産生応答の誘導がそれぞれ認められ、パイエル板樹状細胞には細胞群により明確な T 細胞応答誘導能の違いがあることが明らかになった。そして、パイエル板 CD11b⁺ 樹状細胞を抗原提示細胞とした場合に IFN- γ 産生が誘導され、その誘導には IL-12 以外のサイトカインまたは CD86 以外の副刺激因子が関与していることが示唆された。

第三章 パイエル板樹状細胞の IL-6 産生

一方、第二章でパイエル板樹状細胞と 7-3-7 TCR tg マウス由来の脾臓未感作 CD4⁺ T 細胞を OVA 存在下で培養すると高い IL-6 の産生が認められたが、その IL-6 がパイエル板樹状細胞の作用により T 細胞が分泌しているものなのか、それとも樹状細胞自体が分泌しているものなのかを調べるため、樹状細胞のみを抗 CD40 抗体を用いて刺激して培養し、IL-6 産生量を調べたところ、パイエル板樹状細胞は脾臓樹状細胞と比較して IL-6 を高産生していることが明らかとなった。このことは mRNA の発現レベルでも確認されており、IL-6 遺伝子発現に参与する転写因子がパイエル板樹状細胞の方がより強く活性化されていることが推察された。

次に、パイエル板樹状細胞の IgA 産生誘導能の解析を行った。脾臓由来の IgD⁺ B 細胞と未感作 CD4⁺ T 細胞をそれぞれ精製し、樹状細胞存在下または非存在下で OVA を添加して培養した。その結果、樹状細胞非存在下では IgA の産生が他のクラスの抗体と比較して著しく低く、樹状細胞存在下では IgA の産生が見られたことから、IgA の産生誘導には樹状細胞が重要であることが、高純度に精製された樹状細胞を用いた実験系では初めて示された。さらに、パイエル板樹状細胞を用いた場合は脾臓樹状細胞を用いた場合と比較して IgA 産生量が高いことが示された。そして、B 細胞が IgA 産生前駆細胞にクラススイッチするのに必要なサイトカインである TGF- β を添加すると IgA 産生量は増加し、さらに抗 IL-6 抗体を添加した場合は著しく減少した。この結果から、パイエル板樹状細胞は IL-6 産生することにより、IgA 産生応答に重要な役割を担っていることが示された。

続いてパイエル板から CD11b⁺ 樹状細胞および CD8 α ⁺ 樹状細胞を分離し、抗 CD40 抗体を用いて刺激して培養した結果、パイエル板 CD11b⁺ 樹状細胞が CD8 α ⁺ 樹状細胞と比較して IL-6 を高産生していることが示され、CD11b⁺ 樹状細胞が IgA 産生応答に重要であることが示唆された。

以上より、パイエル板樹状細胞は脾臓樹状細胞と比較して高い T 細胞活性化能を有し、全身免疫系の主要な器官である脾臓の樹状細胞とは異なるサイトカイン産生応答を誘導することが示された。また、パイエル板樹状細胞は IgA 産生細胞の分化・成熟において重要なサイトカインである IL-6 の産生能が高いことが本研究により初めて示され、IL-6 を介して IgA 産生応答において重要な役割を有していることが示された。得られた結果は、パイエル板特有のサイトカイン分泌応答機構および腸管特異的免疫応答の一つである IgA 産生応答誘導機構の解明における重要な知見である。