

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 14 年度博士課程進学
氏 名 倉岡 雅征
指導教員名 佐藤 隆一郎

論文題目 パイエル板 CD3⁺IL-2R⁺ 細胞の IgA 産生制御機能に関する研究

腸管は、生体にとって必要な栄養素を吸収する役割を果たしている一方で、病原細菌やウイルスなど有害な抗原を選択的に排除している。腸管を含む粘膜表面積はテニスコート 1.5 面分に相当するといわれ、生体内で最も抗原に暴露されている部位であると言っても過言ではない。腸管では腸管関連リンパ組織 (GALT) が発達し、全身性の免疫応答とは異なる特有の防御機構により抗原の排除を行っている。GALT において防御の主体をなすのが分泌型 IgA 抗体であり、IgA 抗体はパイエル板や腸管膜リンパ節で誘導されると考えられている。パイエル板は小腸に散在するリンパ組織で、上皮細胞層に存在する M 細胞を介して積極的に抗原をパイエル板内へと取り込んでいる。抗原が取り込まれると、パイエル板内に存在する樹状細胞、T 細胞、B 細胞などの相互作用により抗原特異的な抗体産生応答が惹起される。この際、パイエル板では優先的に B 細胞抗体遺伝子座定常領域で $\mu \rightarrow \alpha$ のクラススイッチが起こり、表面 IgA⁺ B 細胞が誘導される。IgA⁺ B 細胞は血流やリンパ管を利用して粘膜固有層に到達し、IgA 抗体を分泌する IgA 形質細胞へと分化、成熟する。分泌された IgA 抗体は、免疫グロブリンの J 鎖や上皮細胞からの分泌片と結合して二量体を形成し、上皮細胞を通過して腸管壁で抗原の排除にあたる。IgA 産生を増強するサイトカインとして TGF- β ($\mu \rightarrow \alpha$ のクラススイッチ)、インターロイキン (IL)-5, IL-6 (IgA⁺ B 細胞の成熟) などが知られているが、これらのサイトカインがどこで、どの細胞群により産生されて作用しているのかは、未解明な部分が多く残されている。

我々は、これまでにパイエル板細胞の IL-5 産生が IL-2 刺激によって誘導され、これが脾臓細胞では認められないことからパイエル板に特有の IL-5 誘導機構であること、またこれは非 T 細胞によるものである可能性が考えられることを報告している。そこで、本研究ではパイエル板における IL-5 産生細胞の同定と表現型の解析、およびこの細胞の IL-5 産生、腸管 IgA 産生における役割について解析することにより、パイエル板での IL-5 産生応答と腸管 IgA 産生誘導機構を明らかにすることを目的とした。

1. パイエル板 CD3⁺IL-2R⁺ 細胞の同定と IL-5 産生応答における役割

まず、パイエル板細胞のうち IL-2 刺激に対して IL-5 を産生する細胞群を同定することを目的として、パイエル板細胞から様々な細胞を分離して IL-5 産生について検討した。その結果、一般に IL-5 の供給源と考えられている CD4⁺ T 細胞では抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体の共刺激により IL-5 産生が誘導されたが、IL-2 刺激では誘導されなかった。また、B 細胞やマクロファージ、樹状細胞などパイエル板を構成する代表的な免疫担当細胞においても IL-5 の産生は認められなかった。一方で、パイエル板非 T・非 B 細胞画分より精製した CD3⁺IL-2R⁺ 細胞は IL-2 刺激に対して IL-5 を産生することが確認された。

次に、CD3⁺IL-2R⁺ 細胞がパイエル板での IL-5 産生にどの程度寄与しているのかについて検討するため、パイエル板細胞よりセルソーターを用いて CD3⁺IL-2R⁺ 細胞を除去し、*in vitro* 培養系における IL-5 産生について評価した。その結果、CD3⁺IL-2R⁺ 細胞を除去した場合にパイエル板細胞の IL-5 産生量が大きく低下した。また、パイエル板 CD4⁺ T 細胞と比較して CD3⁺IL-2R⁺ 細胞では約 2000 倍の IL-5 mRNA の発現が認められたことから、CD3⁺IL-2R⁺ 細胞はパイエル板における主要な IL-5 供給源として考えられた。

2. パイエル板 CD3⁺IL-2R⁺ 細胞の表現型と局在性

これまでに IL-5 を産生する細胞として T 細胞、マスト細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞、好酸球が知られている。これらの細胞は、細胞表面分子の発現様式や形態学的な特徴により分類することが可能である。そこでまず、パイエル板 CD3⁺IL-2R⁺ 細胞がどのような細胞群に属するのかについて検討するため、フローサイトメトリーを用いて CD3⁺IL-2R⁺ 細胞の表面分子の発現を検討した。その結果、CD3⁺IL-2R⁺ 細胞は T 細胞のマーカー分子である T 細胞抗原受容体 (TCR)、NK 細胞のマーカー分子である NK1.1、DX5 を発現していなかった。マスト細胞のマーカー分子である c-kit に関しては、c-kit⁺CD3⁺IL-2R⁺ 細胞と c-kit⁻CD3⁺IL-2R⁺ 細胞のサブポピュレーションが存在したので、それぞれ精製して IL-5 産生を検討したところ、c-kit⁺CD3⁺IL-2R⁺ 細胞の

みが IL-5 を産生した。形態学的には、大部分が核で構成されたリンパ球様の形態を示し、好酸球とは異なることが確認された。また、B220, CD11b, CD11c など B 細胞, マクロファージ, 樹状細胞のマーカー分子の発現も認められなかった。一方で、白血球の共通マーカーである LFA-1 や CD45, 粘膜免疫系に重要な役割を果たす $\beta 7$ インテグリンや IL-7R の発現が確認された。

以上をまとめると、パイエル板 CD3⁺IL-2R⁺ 細胞は骨髄由来のリンパ球様細胞で、代表的な免疫担当細胞や既知の IL-5 産生細胞とは異なる独特な表現型を有する細胞群であることが示された。

続いて、CD3⁺IL-2R⁺ 細胞のパイエル板における存在部位について検討したところ、CD3⁺IL-2R⁺ 細胞はパイエル板の T/B 細胞境界領域および胚中心で確認された。これらの部位は、細胞間相互作用が行われ、IgA⁺ B 細胞が誘導される部位であるので、CD3⁺IL-2R⁺ 細胞がパイエル板における IgA 産生に関与している可能性が考えられた。

3. CD3⁺IL-2R⁺ 細胞の腸管 IgA 産生への関与についての検討

パイエル板 CD3⁺IL-2R⁺ 細胞が IL-5 を高産生すること、IL-5 が代表的な IgA 増強因子であることから、腸管 IgA 産生におけるパイエル板 CD3⁺IL-2R⁺ 細胞の役割について検討した。

コレラトキシン (CT) は粘膜アジュバントとして知られ、通常抗原の単独投与ではその抗原に特異的な抗体産生応答を惹起することが困難であるが、CT と共に投与することにより、より強い抗体産生応答を誘導できる。これを利用して CT と共に卵白アルブミン (OVA) を経口投与して腸管に OVA 特異的 IgA を誘導し、この際の CD3⁺IL-2R⁺ 細胞の活性を対照群 (PBS 投与群) と比較した。その結果、CT+OVA 投与群 (免疫群) においてパイエル板細胞の IL-2 刺激に対する IL-5 産生量が有意に増加していた。これは、1. 対照群と免疫群とでパイエル板細胞中の CD3⁺IL-2R⁺ 細胞の割合は同程度であったこと、2. パイエル板細胞の細胞内 IL-5 を染色した結果、免疫群では対照群と比較して IL-5 陽性 CD3⁺IL-2R⁺ 細胞の割合および細胞あたりの IL-5 産生量が約 2 倍に増加していたこと、から CT+OVA の経口免疫によりパイエル板 CD3⁺IL-2R⁺ 細胞は活性化され、より IL-5 を産生出来るようになったことが示された。すなわち、腸管 IgA 産生を誘導する経口抗原に対してパイエル板 CD3⁺IL-2R⁺ 細胞は応答し活性化されることが示され、腸管 IgA 産生への関与が示唆された。

次に、細胞移入系を用いてパイエル板 CD3⁺IL-2R⁺ 細胞の腸管 IgA 産生におよぼす影響について検討した。野生型マウスより調製した CD3⁺IL-2R⁺ 細胞を野生型マウスに腹腔より移入した場合に、対照群と比較してパイエル板細胞中の B220⁺IgA⁺ 細胞の割合が有意に増加した。一方、腸管膜リンパ節や脾臓では IgA⁺ 細胞の増加は見られず、血中 IgA 濃度および糞中 IgA 含有量も移入群と対照群で同程度であった。これ

らより、CD3⁺IL-2R⁺ 細胞は生体内でパイエル板における IgA⁺ B 細胞の誘導に強く関与していることが示唆された。

そこで、パイエル板 CD3⁺IL-2R⁺ 細胞による IgA 産生誘導機構を解明することを目的として、B 細胞との *in vitro* 共培養系を用いて解析した。リポ多糖 (LPS) 刺激でパイエル板 B 細胞とパイエル板 CD3⁺IL-2R⁺ 細胞を共培養した場合に、パイエル板 B 細胞単独の場合と比較して培養上清中の IgA 濃度が有意に亢進した。この共培養による増強効果は、抗 IL-5 抗体の添加により抑制されたことから、パイエル板 CD3⁺IL-2R⁺ 細胞は IL-5 を産生することにより B 細胞の IgA 産生を亢進することが示された。

以上をまとめると、本研究では新規 IL-5 産生細胞としてパイエル板 CD3⁺IL-2R⁺ 細胞を同定し、パイエル板 CD3⁺IL-2R⁺ 細胞が IL-2 刺激に対して IL-5 を産生すること、パイエル板での主要な IL-5 供給源だと考えられること、既知の IL-5 産生細胞とは異なる表現型を示すことを明らかにした。また、CD3⁺IL-2R⁺ 細胞がパイエル板内で IgA⁺ B 細胞が誘導される胚中心に存在すること、*in vitro* においてパイエル板 B 細胞の IgA 産生を IL-5 依存的に亢進することを示した。さらに、移入系を用いた実験によりパイエル板 CD3⁺IL-2R⁺ 細胞はパイエル板での B220⁺IgA⁺ 細胞の産生に寄与していることが示された。本研究により、パイエル板 CD3⁺IL-2R⁺ 細胞を介した新たな IL-5 産生誘導機構、および新たな腸管 IgA 産生誘導機構が提示され、腸管免疫応答の全貌の解明につながるものと期待される。