

論文内容の要旨

応用生命化学 専攻
平成 17 年度博士課程 進学
氏名 梅田幸子
指導教員名 佐藤隆一郎

論文題目 小腸 CD3⁺IL-2R⁺細胞の IgA 産生制御機構に関する研究

はじめに

生体は多種多様な微生物や抗原などの侵入の危険に曝され、それに対する防御機構を確立してきた。その機構の一つに腸管における IgA 産生が挙げられる。IgA は腸管で、成人体重 1 kg あたり 66 mg/day も産生され、細菌やウイルスなどに結合し有害な毒素を中和したり、これらの生体内への侵入を防いだりする機能がある。小腸パイエル板 (PP) は他のリンパ節とは異なり、IgA⁺B 細胞が高頻度に生成されている。それではなぜ、小腸では IgA 産生が亢進しているのかという疑問が生じる。これについて IgA 産生を促進する液性因子に関しては研究が進んだが、どの細胞群がそれら因子を供給しているのかについて不明な点が多く残っている。

これまでの研究により、抗原未感作 B 細胞が IgA⁺B 細胞へとクラススイッチを起こすには TGF- β や APRIL、BAFF といったサイトカインが作用し、さらに IgA 分泌には IL-5 や IL-6 が重要な役割を果たすことが報告されている。そこで本研究室では、小腸 IgA 産生の誘導部位である PP において IL-5 産生細胞を探索したところ、PP CD3⁺IL-2R⁺細胞が IL-2 刺激に应答する主要な新規 IL-5 産生細胞であり、IL-5 依存的に IgA 分泌を促進することを報告してきた。本研究においては未だ不明な点が多い腸管 IgA 産生システムの中で、PP CD3⁺IL-2R⁺細胞の果たす特徴的な役割について示すことを目的とした。特に、PP CD3⁺IL-2R⁺細胞が腸内細菌およびウイルス感染刺激を受けて活性化し IL-5 依存的に B 細胞の IgA 抗体産生を促進させると共に、自身もダイナミックに移動する可能性について解析した。

PP CD3⁺IL-2R⁺細胞の TLR 発現と TLR リガンド刺激及びウイルス感染に対する応答性

PP CD3⁺IL-2R⁺細胞が腸管微生物刺激に応答する可能性を模索した。すなわち近年菌体やウイルスの構成成分を認識するレセプターとして報告されている Toll-like receptors (TLRs) に着目し、その発現を RT-PCR 法を用いて定量した。解析の結果、PP CD3⁺IL-2R⁺細胞は TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9 を発現し、特にウイルス成分を認識する TLR3、TLR7、TLR8 の発現が CD4⁺T 細胞と樹状細胞に比べ顕著に高いことが明らかとなった。発現の確認できた TLR の各リガンドで本細胞を刺激した結果、lipoteichoic acid (TLR2)、lipopolysaccharide (TLR4)、R848 (TLR7/8)、CpG DNA (TLR9) 刺激により IL-5 mRNA 発現が上昇した。特に TLR3 のリガンドである二本鎖 RNA (poly I:C) 刺激により IL-5 mRNA 発現が強く誘導された。二本鎖 RNA はウイルスに特有の構造である。そこで H1N1 型のインフルエンザウイルスである PR8 を PP CD3⁺IL-2R⁺細胞に感染させたところ IL-5 mRNA 発現が急上昇した。これらの結果から PP CD3⁺IL-2R⁺細胞は腸内細菌やウイルスの初期感染を認識する可能性が示された。

PP CD3⁺IL-2R⁺細胞は poly I:C 刺激を受けると IL-5 依存的に B 細胞の IgA 産生を促進する

二本鎖 RNA 構造のモデルである poly I:C が IL-5 mRNA 発現を強く誘導したことから、poly I:C 刺激による PP CD3⁺IL-2R⁺細胞の応答性を解析した。解析の結果、PP CD3⁺IL-2R⁺細胞は poly I:C 刺激を受けると IL-5 mRNA を高発現するとともに、IL-5 を分泌することも示された。そこで、poly I:C で刺激した PP CD3⁺IL-2R⁺細胞の IgA 産生促進効果について *in vitro* の系で解析した。PP 由来の B220⁺B 細胞と PP CD3⁺IL-2R⁺細胞を poly I:C 刺激下で培養し、分泌 IgA 量を測定した。この時、IL-5 中和抗体の効果も調べた。その結果、PP CD3⁺IL-2R⁺細胞は poly I:C 刺激を受けると IL-5 依存的に B 細胞の IgA 産生を促進することが示された。一方、脾臓 (SPL) CD3⁺IL-2R⁺細胞は IgA 産生促進効果を示さなかった。

以上の結果を踏まえ、poly I:C 刺激した PP CD3⁺IL-2R⁺細胞をマウス腹腔に移入し、糞中 IgA 量を測定した。また PP、SPL、腸間膜リンパ節 (MLN)、粘膜固有層 (LP) 中の IgA⁺細胞の割合を FACS で解析した。その結果、コントロール群に比べて poly I:C 刺激した PP CD3⁺IL-2R⁺細胞移入群では糞中 IgA 量と、PP および LP 中の IgA⁺細胞の割合が有意に上昇した。以上の結果から poly I:C 刺激した PP CD3⁺IL-2R⁺細胞が IgA 抗体産生を促進することが *in vivo* でも示された。

PP CD3⁺IL-2R⁺細胞は poly I:C 刺激を受けると粘膜固有層へと移動する

Poly I:C 刺激した PP CD3⁺IL-2R⁺細胞を移入したレシピエントマウスの PP、LP 中 IgA⁺B 細胞の割合が増加したが、SPL、MLN ではコントロール群に比べて有意な増加は認められなかった。この結果は poly I:C で刺激した PP CD3⁺IL-2R⁺細胞が腸管特異的に移動し、IgA 産生を促進したことを示唆する。そこで、poly I:C 刺激によって PP CD3⁺IL-2R⁺細胞が獲得する移動能について、リンパ球の移動に重要な役割を果たすケモカインレセプター発現について解析した。その結果、PP CD3⁺IL-2R⁺細胞は腸管および LP への移動に重要な役割を果たす CCR9 を poly I:C 刺激の後に高発現する事が確認された。さらに、LP 由来の CD3⁺IL-2R⁺細胞が CCR9 を強く発現することから、PP CD3⁺IL-2R⁺細胞は poly I:C 刺激を受けた後、CCR9 を発現し LP へと移動する可能性が示唆された。そこで、CD45.2 を発現するマウス由来の PP CD3⁺IL-2R⁺細胞を poly I:C 刺激後、CD45.1 を発現するマウス腹腔に移入し、CD45.2⁺移入細胞の移動先臓器を解析した。その結果、poly I:C 刺激した PP CD3⁺IL-2R⁺細胞は LP で多く検出された。一方、無刺激の PP CD3⁺IL-2R⁺細胞は PP で多く検出された。以上の結果から PP CD3⁺IL-2R⁺細胞はウイルス成分 (poly I:C) を認識して CCR9 を発現し、LP へと移動することが示された。

腸内共生細菌による刺激も MyD88 シグナル依存的に PP CD3⁺IL-2R⁺細胞を活性化させ IgA 産生を促進する

PP CD3⁺IL-2R⁺細胞は TLR3、TLR7/8 のほかに菌体成分を認識する TLR1、TLR2、TLR4、TLR6、TLR9 を発現し、これらリガンド刺激に応じて IL-5 mRNA を発現した。そこで PP CD3⁺IL-2R⁺細胞が腸内共生細菌刺激により活性化し、IgA 産生を促進する可能性を検討した。

これまで腸内が完全に無菌のマウス (GF マウス) において腸管 IgA 量の低下が報告されている。そこで、GF マウスから PP CD3⁺IL-2R⁺細胞を精製し、IL-5 mRNA 発現を定量した。その結果、SPF 環境下で飼育したマウスに比べて IL-5 mRNA 発現が低下していた。また GF マウスの PP CD3⁺IL-2R⁺細胞と抗原未感作 B 細胞を共培養した結果、IgA 産生促進効果は SPF マウスに比べて低下しており、この低下は LPS 刺激により回復した。以上の結果から GF マウスの腸管 IgA 量の低下は PP CD3⁺IL-2R⁺細胞が腸内細菌刺激を受けていないことに起因することが示された。

TLR1、TLR2、TLR4、TLR6、TLR9 は TLR3 と異なり刺激を認識すると細胞内アダプター分子である MyD88 を介してシグナルを下流へと伝達する。そこで PP CD3⁺IL-2R⁺細胞の IgA 産生促進効果における MyD88 シグナルの寄与を解析した。まず、MyD88 KO マウスの PP CD3⁺IL-2R⁺細胞を解析したところ、野生型マウスに比べて IL-5 mRNA 発現が低下していた。次に、MyD88 KO マウスの PP CD3⁺IL-2R⁺細胞を抗原未感作 B 細胞と共培養した結果、IgA

産生促進能の低下が示された。以上の結果から、PP CD3⁺IL-2R⁺細胞は腸内細菌刺激にも応じて B 細胞の IgA 抗体産生を促進し、この機能は MyD88 シグナルに依存することが示された。

総括・まとめ

本研究によって PP CD3⁺IL-2R⁺細胞は TLR family の中でもウイルス成分を認識する TLR3、TLR7/8 を強く発現し、poly I:C 刺激によって IL-5 依存的に B 細胞の IgA 産生を促進することが示された。また、H1N1 型のインフルエンザウイルス感染により IL-5 mRNA を高産生したことから、初期のウイルス感染を認識する可能性が考えられた。さらに細菌を認識する TLR も発現し腸内細菌刺激に応じて IL-5 mRNA 発現を上昇させた。以上の結果から、PP CD3⁺IL-2R⁺細胞は腸内細菌に刺激され IgA 産生を促進すると共に、ウイルス侵入時には素早く強く活性化され、さらに IgA 産生を促進しウイルス毒素を中和したり生体内への侵入を防ぐ可能性が考えられる。

本研究により腸管 IgA 産生機構における PP CD3⁺IL-2R⁺細胞の特徴的役割を示した。本研究結果は、PP CD3⁺IL-2R⁺細胞をターゲットとした食品成分等の探索研究やワクチン開発への有益な基礎知見となることが期待される。