

論文内容の要旨

論文題目

Sphingosine 1-phosphate regulates intestinal B cell trafficking for the subsequent intestinal secretory IgA production

腸管分泌型 IgA の産生におけるスフィンゴシン 1 リン酸介在型腸管 B 細胞の遊走制御メカニズムの解明

氏名

合田 昌史

粘膜組織の主要抗体である IgA は、細菌やウイルスの侵入阻害や毒素に対する中和活性を示すことで、腸管組織での第一線のバリア機構として機能している。IgA は B1 細胞と B2 細胞という二種類の B 細胞サブセットを由来とする。B1 細胞は主に腹腔由来であり、T 細胞非依存的抗原を認識する IgA を産生する。一方、B2 細胞は、主にパイエル板に代表される腸管関連リンパ組織で活性化され、T 細胞依存的抗原を認識する IgA を産生する。この様に、相補的に機能することで IgA を介した腸管の防御・恒常性維持に貢献している B1 細胞と B2 細胞であるが、それぞれの腸管への遊走メカニズムについては多くが未解明である。

最近、脂質メディエーターの一つであるスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) がリンパ球のリンパ節からの移出を制御する分子であることが報告され、その機能解析が精力的に行なわれている。これまでに同定されている 5 種類の S1P 受容体のうち、1 型の S1P 受容体がリンパ球の遊走を制御することが示されている。しかしながら、これまでの S1P に関する免疫研究の多くが、全身系免疫組織におけるものであり、約 400 m² におよぶ広大な腸管粘膜免疫系における S1P の役割に関しては、ほとんど解析されていないのが現状である。特に上述のように腸管 IgA の産生においては、パイエル板を由来とする B2 細胞と、腹腔由来の

B1 細胞が相補的に機能するという特徴的な性質を示すことから、その遊走制御における S1P の役割を解明することは、腸管免疫のユニーク性に立脚した新視点からの脂質メディエーターによる免疫制御機構が明らかになると期待される。そこで本研究においては、腸管 IgA の産生における S1P 介在型腸管 B 細胞の遊走制御メカニズムの解析を行った。

S1Pを介した腹腔B細胞由来腸管IgAの産生機構

本研究においては、S1P を介した細胞遊走制御を検討するために、S1P 受容体の発現抑制を誘導することで S1P シグナルを遮断することが知られている免疫抑制剤 FTY720 を用いた。FTY720 を腹腔内に単回投与した 10 時間後に腹腔細胞を回収し、FACS 法により細胞組成を解析したところ、B1 細胞、B2 細胞共に FTY720 投与による減少が観察された。また腹腔 B 細胞の 1 型 S1P 受容体の発現を定量的 PCR にて検討したところ、FTY720 に対する反応性と相関し、腹腔 B1 細胞及び B2 細胞で高レベルの 1 型 S1P 受容体の発現が確認された。

次に、FTY720 処理マウスにおける腹腔 B 細胞の挙動を解析するために、carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) で蛍光標識した腹腔細胞を、機能的な T、B 両細胞群が欠損している SCID マウスに移入し、その動態を追跡した。腹腔細胞を腹腔経路で移入した SCID マウスに FTY720 を投与すると、CFSE 陽性 B 細胞は腹腔から消失し、腹腔の所属リンパ節である傍胸腺リンパ節に集積していた。一方、静脈経路で移入した場合、FTY720 投与群で CFSE 陽性 B 細胞の骨髄への集積を伴う腹腔への侵入抑制が確認された。以上のことから、FTY720 は腹腔 B 細胞の腹腔から傍胸腺リンパ節への移出促進と血流から腹腔への移入阻害の少なくとも二つの機構により、腹腔 B 細胞の遊走を阻害していることが示唆された。

FTY720 による腹腔 B 細胞の遊走阻害による腸管 IgA の産生変化について検討するため、SCID マウスに腹腔細胞を移入した際に誘導される腸管 IgA の産生について検討した。SCID マウスに腹腔細胞を移入すると、移入二週間後に腸管固有層において IgA 産生細胞が観察され、同時に糞便中への IgA の産生が確認された。一方、FTY720 投与群においては、腸管固有層における IgA 産生細胞数の減少が認められ、それに伴う糞便中 IgA の減少も観察された。また、肺炎双球菌の死菌体を粘膜アジュバントであるコレラトキシン (CT) と共に経口免疫した際に誘導される B1 細胞由来ホスフォリルコリン特異的腸管 IgA の産生も、FTY720 投与群において減少していた。以上の結果より、S1P は腹腔 B 細胞の腸管への遊走を制御することで、腸管 IgA による生体防御において重要な役割を担っていることが明らかとなった。

S1Pを介した腹腔B細胞の遊走制御におけるNFκB inducing kinaseの役割

NFκB inducing kinase (NIK) の変異マウスである *aly* マウスは、腹腔 B 細胞の遊走、ならびに腸管の IgA 産生に機能的欠損があることから、NIK を介したシグナルが腹腔 B 細胞を由来とする腸管 IgA の産生に重要であることが示唆されている。しかしながら、現在までのところ、その詳細なメカニズムは不明である。本研究の対象である S1P 受容体は G 蛋白共役型の受容体であるが、NIK が G 蛋白共役型受容体を介したシグナルにも関与していることが示唆されていることから、S1P を介した腹腔 B 細胞の遊走制御に NIK が関与していることが考えられた。その仮説を検証するために、FTY720 を *aly* マウスに腹腔内投与し、その反応性を検討したところ、FTY720 の単回投与では腹腔 B 細胞の消失が観察されなかった。しかしながら、FTY720 の複数回投与により *aly* マウスでも腹腔 B 細胞の消失が認められたことから、*aly* マウスは FTY720 に対して反応性は有しているものの、野生型マウスに比べ感受性が著しく低いことが示された。

そのメカニズムについて検討したところ、*aly* マウス由来腹腔 B 細胞は S1P 受容体を正常に発現し、*in vitro* において S1P に対する走化性を示した。また SCID マウスに移入した際には FTY720 への正常な反応性が観察された。一方、野生型マウス由来腹腔 B 細胞を *aly* マウスに移入した際には、FTY720 への反応性が消失していたが、野生型マウス由来のストローマ細胞を移入することにより反応性が回復することから、S1P を介した腹腔 B 細胞の遊走制御にはストローマ細胞における NIK 依存的シグナルが必須であることが示された。

パイエル板由来B細胞におけるS1P介在性遊走制御機構と腸管IgA産生

活性化や分化に伴う S1P 受容体の発現変化が報告されている T 細胞に対し、B 細胞においては活性化や分化と S1P 受容体の発現との関連に関しては不明である。これは定常状態の全身系リンパ節では、B 細胞の活性化や分化がほとんど観察されず、実験的に解析が困難であることが一因として挙げられる。一方、パイエル板はその他のリンパ組織とは異なり、腸内抗原による恒常的な刺激により定常状態においても IgA B 細胞への分化が高頻度で起こっている。そこで、パイエル板は B 細胞の分化と S1P を介した遊走制御との関連、ならびに腸管 IgA 産生への関与を調べる上で、有用な組織であると考えられる。

パイエル板においては、IgM⁺IgA⁻B220⁺細胞が IgM⁺IgA⁺B220⁺細胞を経て IgM⁻IgA⁺B220⁺細胞に分化し、その後さらに IgM⁻IgA⁺B220⁻細胞へと分化すると考えられている。パイエル板における B 細胞分化と S1P 依存性を検討する目的で、各分化段階の B 細胞をパイエル板より単離し、1 型 S1P 受容体の発現を定量的 PCR により解析した。その結果、IgM⁺IgA⁻B220⁺細胞は 1 型 S1P 受容体を高レベルで発現していたが、IgM⁺IgA⁺B220⁺細胞 (形質芽細胞) へと分化すると、その発現が約 1/40 に低下した。この 1 型 S1P 受容体の低発現は IgM⁻IgA⁺B220⁺細胞

においても維持されていたが、IgM⁻IgA⁺B220⁻細胞へと分化するのに伴い発現レベルが腸管固有層の IgM⁻IgA⁺B220⁻細胞と同程度にまで回復した。

FTY720 で処理し S1P を介したシグナルを遮断したマウスにおける B 細胞の遊走を検討したところ、1 型 S1P 受容体を高レベルで発現する IgM⁻IgA⁺B220⁻細胞（形質芽細胞）がパイエル板に集積し、逆にその遊走先である腸管固有層では減少していた。また共焦点レーザー顕微鏡を用いた検討から、IgA⁺形質芽細胞は主にパイエル板基底部のリンパ管周辺に集積することが確認された。これらの結果から、FTY720 は 1 型 S1P 受容体を発現する IgA⁺形質芽細胞のパイエル板基底部からの移出を選択的に阻害することで、同細胞のパイエル板から腸管固有層への移行を抑制していることが示された。

次に、パイエル板を介した抗原特異的 IgA の産生誘導における S1P の関与を検討する目的で、ニワトリ卵白アルブミン（OVA）を CT と共に経口免疫し、腸管 IgA の産生を検討した。その結果、FTY720 処理群では OVA 特異的 IgA 産生細胞のパイエル板への集積と腸管固有層での減少が観察された。また同マウスにおいては、糞便中の OVA 特異的 IgA の産生が減少していた。以上のことから、抗原特異的腸管 IgA の産生には、S1P を介した IgA⁺形質芽細胞のパイエル板基底部からの移出が必須であることが判明した。

まとめ

本研究においては、腸管 IgA の主要供給細胞である腹腔及びパイエル板由来の B 細胞に焦点を当て、腸管への遊走における S1P シグナルの役割を解明した。腹腔由来 B 細胞とパイエル板由来 B 細胞は異なる遊走経路を介して腸管固有層へと到達することから、独自の遊走関連分子の関与が予期されたが、S1P は両経路において中核的な役割を担っていることが判明した。本研究を通じ S1P を介した腸管 IgA 産生制御機構を明らかとし、腸管 IgA 産生の多様な経路における脂質メディエーターを介した重要な制御機構の一端が解明された。