

論文の内容の要旨

論文題目 接触過敏反応における B 細胞制御分子 CD22 の役割

指導教員 玉置 邦彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 年入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 中島 広子

接触過敏反応(CHS)は、主に抗原特異的 effector T 細胞を介した皮膚免疫反応で、感作相と惹起相に分かれる。マウス CHS の感作相は、感作抗原の腹部などへの塗布で成立する。惹起相は、抗原を感作が成立したマウスの感作時以外の皮膚に再塗布することで引き起こされ、24 から 48 時間後に最も強い耳介腫脹を呈する。CHS は様々な疾患での T cell-mediated reaction のプロトタイプと考えられている。

これまで、免疫反応を抑制する B 細胞の存在が明らかになってきており、自己免疫性脳脊髄炎(EAE)、炎症性腸疾患、コラーゲン誘導関節炎などで B 細胞の欠損・機能障害による症状の増悪が報告されている。これらの疾患では、B 細胞が抗体ではなく、特定の B 細胞サブセットの産生する IL-10 を介して抑制的に作用する可能性が考えられている。近年、CHS でも抑制作用を持つ B 細胞サブセットの存在を示唆する報告が散見される。B 細胞特異的な細胞表面分子 CD19 を欠損するマウスでは CHS が増悪し、脾臓 marginal zone B 細胞 (MZ B 細

胞)がこれを抑制するという報告がある。また、脾臓で IL-10 を産生し CHS を抑制する CD5⁺CD1d^{hi} B 細胞の存在も報告されている。とはいえ、抑制性 B 細胞についてはまだ不明な点も多い。

CD22 は B 細胞特異的に発現する 130-140kDa の膜表面タンパクで、B 細胞抗原受容体 (BCR) の抑制性共受容体である。α2-6 シアル化多糖類をリガンドとする。BCR に抗原が結合すると、BCR の近傍に位置する CD22 は速やかにリン酸化され、チロシンフォスファターゼがリクルートされる足場となり、BCR シグナルを収束させる。

CD22 欠損マウスでは MZ B 細胞数が著しく減少する。分化時の BCR シグナルが変化したため、または CD22 がないと MZ B 細胞が脾臓への遊走、保持ができないためと推測されている。また、CD22 欠損マウスでは骨髄中の再循環 B 細胞が著しく減少する。骨髄の類洞内皮細胞にシアル酸リガンドが多く発現しており、これによる遊走、保持が障害されるためと言われている。

B細胞には、B-1細胞とB-2細胞がある。後者がいわゆる通常のB細胞で、前者はB220^{lo}, IgM^{hi}, IgD⁺, CD9⁺, CD32⁺, CD23^{lo}という特徴的な表現型を有し、CD11bを弱く発現する一群である。B-1細胞にはCD5陽性のB-1a細胞とCD5陰性のB-1b細胞がある。CD22欠損マウスではこのB-1細胞が増加する。B-1細胞は自然抗体(主にIgM)の産生に関わるが、CD22欠損マウスで血清IgMが上昇することはこれに合致する。さらに、CD22欠損マウスでは加齢に伴い自己抗体が産生される。

このような CD22 欠損マウスで、CHS からの回復が野生型より遅延することが判明した。CHS で抑制性に働くとされる脾臓 CD5⁺CD1d^{hi} B 細胞とリンパ節 CD4⁺CD25⁺regulatory T 細胞は、野生型と CD22 欠損マウスで差がなかった。

感作した野生型または CD22 欠損マウスの鼠径リンパ節の全細胞、T 細胞、B 細胞を、それぞれ未感作の野生型または CD22 欠損マウスに移入し、翌日 recipient マウスを惹起した。すると、recipient が CD22 欠損マウスの場合には回復が遅延した。T 細胞のみを単離して移入した場合には、全細胞を移入した場合とほぼ同等の CHS が誘導され、B 細胞単独を未感作マウスに移入しても誘導されなかった。

感作されたリンパ節 T 細胞があれば donor の CD22 の有無によらず惹起できるが、recipient マウスの CD22 発現が CHS の正常な収束に必要なことが示された。

腹腔内、リンパ節、脾臓の T 細胞と B 細胞についての adoptive cell transfer と、血清の transfer を行った。未感作もしくは感作した野生型 donor から感作 5 日後の CD22 欠損マウスに移入し、翌日惹起した。いずれも CHS は PBS を静注した場合と同等に惹起されたが、腹腔内 B 細胞を移入した CD22 欠損マウスのみが早く収束した。一方、未感作もしくは感作した CD22 欠損マウスを donor、感作 5 日後の野生型マウスを recipient として同様の adoptive cell transfer を行い惹起したところ、いずれも CHS は control とほぼ同等に惹起され回復した。従って、野生型腹腔内 B 細胞には CD22 欠損マウスで遷延する CHS を収束させる作用があることがわかった。また、CD22 欠損腹腔内 B 細胞は、野生型マウスの CHS を増悪させることはないことも示された。

未感作もしくは感作した野生型マウスから腹腔内の CD5 陽性細胞と CD5 陰性細胞、CD11b 陽性細胞と CD11b 陰性細胞を得て、それぞれ感作した CD22 欠損マウスに移入し、翌日惹起した。CD5 陽性 B 細胞と CD11b 陽性細胞を移入すると早く収束したが、陰性細胞を移入した場合には CHS が遷延した。野生型の腹腔内 CD5 陽性 B 細胞、すなわち腹腔内 B-1a 細胞が CHS への抑制作用を持つ可能性が考えられた。

CD22 欠損マウスでの腹腔内 B-1 細胞の profile を flow cytometry で検討したところ、CD22 欠損マウスでは腹腔内の B-1 細胞、B-1a 細胞、B-1b 細胞のいずれも増加していた。

既報告の B 細胞の抑制性作用は IL-10 を介するものが考えられている。そこで、腹腔内 B 細胞での感作前、惹起 2 日後の IL-10 産生について real-time PCR を用いて検討した。CD22 欠損腹腔内 B 細胞の IL-10 産生は、惹起後野生型と同等に亢進していた。

CD22 欠損マウスではシアル酸リガンドを介した組織への遊走、保持が障害されている可能性が指摘されている。そこで、PKH-26 と calcein-AM を用いた

two-color staining migration assay で、CD22 欠損腹腔内 B 細胞と野生型腹腔内 B 細胞について、惹起後の脾臓やリンパ節への分布について検討した。惹起 5 日後で、野生型マウス由来 B 細胞がより多く脾臓やリンパ節に分布しており、CD22 欠損マウスでは野生型に比べリンパ組織への分布が減少している可能性が示唆された。

CD22 欠損マウスの CHS は、急性期反応は野生型と同等で、回復のみが遷延するのが特徴的であった。急性期の増悪と回復期の遷延の両方がある CD19 欠損マウスを用いて adoptive cell transfer を行った。未感作の野生型マウス、CD22 欠損マウスから腹腔内 B-1a 細胞（CD5 陽性 B 細胞）を得て、感作 5 日後の CD19 欠損マウスに移入し、翌日惹起した。野生型腹腔内 B-1a 細胞は、CD19 欠損マウスにおいても CHS からの回復を促進するが、急性期の増悪は改善しなかった。また、CD22 欠損腹腔内 B-1a 細胞では、この作用がなかった。

本実験では、CD22 欠損マウスでの CHS の遷延は、野生型腹腔内 B-1 細胞、特に B-1a 細胞の移入で回避される。B-1a 細胞が免疫疾患を増悪させる機序として、これまで B-1 細胞の産生する IgM 抗体を介したのも推測されている。しかし、CD22 欠損マウスの CHS は急性期の反応は野生型と同等で、CD22 欠損マウスより血清を移入しても野生型マウスの CHS の増悪はないことから、回復期の遷延が IgM 抗体を介する作用によるとは考えにくい。

CHS で、感作後活性化した腹腔内 B-1 細胞が脾臓や所属リンパ節に遊走するとの報告がある。以前より CD22 欠損マウスでは骨髄中の再循環 B 細胞が減少することから CD22 が B 細胞の遊走、保持に関与する可能性が指摘されていた。本実験では惹起 5 日後に、CD22 欠損 B 細胞が野生型 B 細胞にくらべてリンパ組織に分布する能力が劣る傾向があった。回復期に、リンパ組織に保持される機能、リンパ組織での生存能、もしくは遊走してくる機能が障害されるか、いずれも考えられる。

また、CD22 欠損腹腔内 B 細胞の IL-10 発現は、惹起後野生型と同等に上昇していた。従って、CD22 欠損腹腔内 B-1a 細胞は野生型と同等の IL-10 産生能を有

するが、リンパ組織への分布が障害され、抑制作用を発揮できないと考えられた。

CD19 は CD22 同様 B 細胞特異的な細胞膜表面タンパクで、CD22 と対照的に BCR の促進性共受容体である。CD19 欠損マウスでは急性期より増悪が見られ、その後も遷延する。これと CD22 欠損マウスのパターンを比較すると、急性期の異常な増悪を妨げる機序とは異なる抑制作用が回復期に存在し、それが CD22 欠損マウスでは障害されると考えられた。CD19 欠損マウスを recipient とした adoptive cell transfer で、野生型腹腔内 B-1a 細胞の移入により反応の遷延が回避されたが、急性期反応の増悪は改善しなかった。すなわち、CHS の惹起相はさらに急性期と回復期の 2 相に分けられ、各々で異なる抑制性の機序が働くこと、そして腹腔内 B-1a 細胞はこのうち回復期で抑制作用を発揮することが示唆された。

以上より、CHS は惹起相で急性期と回復期とで異なる抑制性の機序が働くことがわかった。回復期に反応が正常に収束するには CD22 が必要で、CD22 が欠損すると腹腔内 B-1a 細胞のリンパ組織への分布が障害され、回復期での IL-10 などを介した反応の収束が障害されることが示唆された。