

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：14101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06765

研究課題名(和文) IgE産生細胞で特異的な細胞凝集を介した抗体産生増加のメカニズム

研究課題名(英文) The mechanisms about the cell aggregation of IgE-producing cells

研究代表者

國石 菜里(彦坂)(Kuniishi, Mari)

三重大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70804326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、これまでに試験管内で見出してきたI型アレルギー疾患に關与するIgE産生細胞が抗原と抗体、IgG受容体FcγRを介して細胞凝集を引き起こす機構を詳細に解明すること、そして生体内のこういった組織に局在するIgE産生細胞が凝集するかを明らかにすることを目的とした。その結果、IgE産生細胞は様々な組織に局在すること、そして凝集は脾臓のみで観察されることを明らかにした。また、生体内の抗体産生細胞でFcγRIIIの発現が観察され、生体内でのIgE産生細胞の凝集に關与する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IgE産生細胞は他のクラスの抗体産生細胞に比べて、生体内での検出頻度がかなり低く、細胞の局在や抗体産生のメカニズムについて不明な点が多かった。本研究結果は、これまでに報告のあったIgE産生細胞の局在に加え胸腺での局在を明らかにした。血中のIgE抗体の産生はIgE産生細胞によって制御されることから、IgE産生細胞の特徴を示せた点で学術的な意義は大きいと考える。また、現在アレルギー疾患患者が増加しており根本的治療法の開発が急がれており、本研究結果は今後アレルギー治療の基礎的研究を発展させる上で重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：IgE producing cells are related to type I hypersensitivity, but little is known about the specific phenotype of IgE producing cells. we focused on the cell aggregation of IgE-producing cells via antigen-IgE bound FcγRII/FcγRIII. This cell aggregation was observed only in IgE-producing cells by using IgE-producing cell line. Here, we examined where IgE-producing cells aggregated and whether these cells expressed FcγRII/FcγRIII in vivo. We showed that IgE-producing cells are present in spleen, mesenteric lymph node and thymus of antigen/alum-administrated mice, but the cell aggregation was found only in spleen. Furthermore, we found the expression of FcγRIII on antibody producing cells. In this study, we obtained the new finding about the phenotype of IgE producing cells.

研究分野：免疫学

キーワード：IgE

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎や花粉症などのI型アレルギー疾患では、抗原特異的なIgE抗体により惹起される。

抗体産生細胞は脾臓やリンパ節でB細胞から分化した後、骨髄へ移動し長期生存抗体産生細胞として抗体を産生し続けることがIgMやIgG抗体産生細胞から示されてきた。IgE抗体産生細胞に関しても、同様に誘導されるのではないかと考えられてきたが、生体内でかなり頻度が低く他のクラスの抗体産生細胞と同様に骨髄に移動するのか、はたまたIgA抗体産生細胞が粘膜組織に局在するように他の組織で局在するのか、未だIgE抗体産生細胞の性質そのものに関して不明な点が多い。

私は、これまでに抗原とアジュバントAlumを腹腔内投与しIgE産生細胞を誘導したBALB/cマウスで、IgE産生細胞が脾臓で凝集することを見出してきた(hikosaka et al, 2017)。また、これらの現象が抗原-IgE抗体複合体の結合によるIgG受容体FcγRs (FcγRIIもしくはFcγRIII)の活性化によって誘導されることを抗体産生細胞のモデルとして用いたIgE抗体産生細胞株(トリニトロフェニル(TNP)基に特異的な抗体を産生)で示してきた (Fig1, hikosaka et al, 2017)。

IgMやIgGの抗体産生細胞はリポポリサッカライド(LPS)などのtoll-like receptor (TLR)からのシグナルが活性化されることで、抗体産生量を増強させることが報告されている。この報告は生体内の総抗体量は抗体産生細胞の数だけでなく、抗体産生細胞の抗体産生量が制御することを示している。私はIgE産生細胞株を用いて、このFcγRsを介した凝集が抗体産生量を制御するか検討したが、IgE抗体と抗原を添加し凝集を誘導しただけ

は抗体産生量は変わらなかった。しかし、抗原-IgE抗体複合体により凝集させ、そこへLPSを添加したところ、抗体産生量が増強された。LPS単体の刺激では抗体産生量は変わらなかったことから、これらの結果は凝集の活性化とLPSによる刺激、二つのシグナルがIgE産生細胞の抗体産生量を制御したことを示唆している。また生体内では脾臓に局在するIgE産生細胞が凝集することや抗FcγRs抗体を投与することで抗体産生が減少することを明らかにしてきた (hikosaka et al, 2017)。

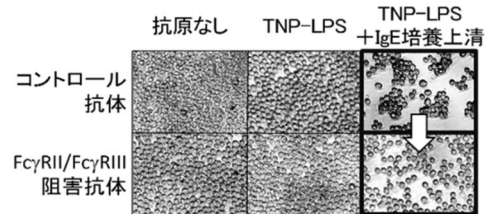
この凝集を抑制した抗FcγRs抗体(clone:2.4G2)は、IgG受容体FcγRsのFcγRIIとFcγRIIIの共通エピトープを認識する抗体である。これらの受容体はそれぞれ抑制型受容体と活性化型受容体で、抗体産生細胞ではこのうち抑制型受容体を発現するといわれてきた。この受容体が抗体産生細胞で活性化するとアポトーシスが誘導されIgMやIgGなどの抗体産生が負に制御される。しかし、私が観察したFcγRを介したIgE産生細胞の凝集は相反して抗体産生を増加させた。さらに、IgE産生ハイブリドーマでは、遺伝子レベルでFcγRIIとFcγRIIIを両方発現していた。面白いことに、IgMやIgG1、IgAをそれぞれ産生する細胞株では、IgE産生細胞株のような細胞凝集は誘導されなかった。さらにこれまでに、生体内のIgE産生細胞がIgMやIgG抗体産生細胞のようにFcγRIIを介して抗体産生を制御するか詳細に分かっていないことから、本課題ではIgE産生細胞の凝集の機構をより詳細に解析すること、そしてIgE産生細胞が生体内のこういった組織で局在し、凝集するのか検証した。

## 2. 研究の目的

そこで本研究課題では、以下の点について研究を進めた。

- (1) IgE産生細胞の凝集におけるメカニズムの解明のため、抗体産生細胞におけるFcγRsの発現解析
- (2) 生体内の様々な組織でのIgE産生細胞の局在と凝集の有無の検証

Fig.1 IgE産生細胞株は抗原とIgE複合体、FcγRII/FcγRIIIを介して凝集した



IgE産生細胞株は、抗原無、TNP-LPS単体、TNP-LPS+IgEを含む培養上清の3条件で培養した。下段には、FcγRII/FcγRIIIの阻害抗体を加えた。

### 3. 研究の方法

#### (1) IgE 産生細胞の凝集におけるメカニズムの解明のため、抗体産生細胞における FcγRs の発現解析

IgE 産生細胞を誘導するために、BALB/c マウスに抗原とアジュバント Alum を腹腔内投与した。その後、脾臓細胞中の抗体産生細胞を抗体産生細胞マーカー等を用いて特定し、フローサイトメトリーにて FcγRs の発現を解析した。また、細胞凝集実験で使用した IgE 産生細胞株でも同様に FcγRs を発現しているか解析した。

#### (2) 生体内の様々な組織での IgE 産生細胞の局在と凝集の有無の検証

(1) と同様に IgE 産生細胞を誘導したマウスから脾臓やリンパ節など様々な組織を回収し、どの組織に IgE 産生細胞が局在するか、各組織切片を作成し抗 IgE 抗体にて染色した。さらに、その切片を用いて IgE 産生細胞が凝集するか検討した。

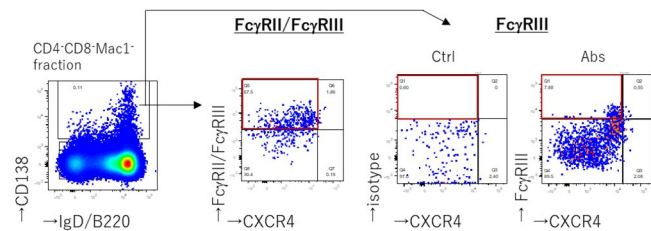
### 4. 研究成果

#### (1) IgE 産生細胞の凝集におけるメカニズムの解明のため、抗体産生細胞における FcγRs の発現解析

##### 脾臓の抗体産生細胞の発現解析

抗原とアジュバントで免疫したマウスの脾臓では、IgE 産生細胞が  $10^6$  におよそ 10 個程度の頻度で検出されることが ELISPOT アッセイの結果からこれまでに分かっている。そこで、これらの免疫したマウスの脾臓と免疫していないマウスの脾臓を用いて、フローサイトメトリーで FcγRII と FcγRIII の共通エピートプを認識する抗体 (clone:2.4G2) と FcγRIII を特異的に認識するとの報告がある抗体を使い、どちらの FcγR を発現するか検証した。1 年目に、プラズマ細胞マーカー CD138 と FcγRIII のみで解析したときには陽性細胞が検出できなかったが、再度他のマーカー (CXCR4 や B220 等) を組み合わせ抗体産生細胞を細かく解析したところ、CD138 陽性で CXCR4 陰性 B220/IgD 陽性の区画にて FcγRIII 陽性細胞を検出した (Fig.2)。抗体産生細胞は B 細胞から分化が進むにつれて、CXCR4 を発現し、IgD/B220 の発現が低下することが報告されている。これらの FcγRIII を発現する細胞は B 細胞から抗体産生細胞へと分化する途中の細胞かもしれない。IgE 産生細胞はかなり頻度が低く、現在 IgE 産生細胞をフローサイトメトリーで検出する系を構築しており、今後、どの抗体クラスの細胞が FcγRIII を発現するのか引き続き解析する予定である。

Fig2. 免疫後のマウスの脾臓における抗体産生細胞の FcγRIII の発現解析



##### IgE 抗体産生細胞株での発現解析

凝集実験で用いた IgE 産生細胞株では、mRNA レベルで FcγRII と FcγRIII を発現することを示してきた。同じようにフローサイトメトリーで解析を行ったところ、FcγRII/FcγRIII を認識する抗体では検出できたものの、FcγRIII を認識する抗体ではほとんど陽性細胞を検出できなかつ

た。遺伝子レベルでは検出できていることから、検出限界以下であった可能性がある。この結果は、これまで抗体産生細胞は Fc $\gamma$ RIII を発現しないとされてきたが、B 細胞から抗体産生細胞に分化する段階で発現する可能性がある。今後、この結果が偽陽性ではなく本当に生体内の抗体産生細胞で発現するのか、また他の骨髄などの他の組織の抗体産生細胞では発現するのかなど、詳細な解析が必要である。また、この Fc $\gamma$ RIII が凝集に関わるのか、阻害抗体を用いて機能アッセイを行うつもりである。

## (2) 生体内の様々な組織での IgE 産生細胞の局在と凝集の有無の検証

抗体産生細胞は一般的に脾臓やリンパ節で作られ、骨髄に最終分化したプラズマ細胞が移動すると考えられてきたが、他の組織でも抗体産生細胞は検出されることから、IgE 産生細胞がこういった組織に局在するか解析した。抗 IgE 抗体を使い様々な組織を染色したところ、肝臓や唾液腺などでは IgE 産生細胞は検出されなかったが、脾臓や腸間膜リンパ節、胸腺において IgE 陽性細胞を検出した。免疫したマウスの骨髄で抗原特異的な IgE 産生細胞の存在を ELISPOT アッセイにて確認していたが、切片での検出が難しく残念ながらどこに局在するのか特定には至っていない。免疫したマウスの腸間膜リンパ節や胸腺で IgE 産生細胞が ELISPOT アッセイで検出できたことから、これらの切片で観察された IgE 陽性細胞は恐らく IgE 抗体産生細胞であると考えられる。胸腺は T 細胞の分化の場として知られる一方で B 細胞が局在することが知られているが、免疫後 IgE 産生細胞が胸腺に局在するかほとんどわかっていなかったことから、非常に面白い結果である。このマウスの胸腺内では、リンパ節や脾臓のようにリンパ構造ができていなかったことから、胸腺内で B 細胞が IgE 産生細胞へ分化したというよりも脾臓等で発生した IgE 抗体産生細胞が胸腺に移動し局在したのではないかと現在考えている。これらの IgE 産生細胞が脾臓のように凝集するのか検討したが、残念ながら IgE 産生細胞は点在して局在していた。この結果から凝集は恐らく B 細胞から分化して早い段階で観察されるような現象なのではないかと考えている。

## 今後の展望

本課題では、IgE 産生細胞株から見出した IgE 産生細胞の凝集が生体内のこういった組織で観察されるか検討するために、抗原とアジュバント Alum を腹腔内投与し IgE 産生細胞を誘導したモデルを使用してきた。アレルギーモデルマウスには、皮下投与や経口投与によって IgE 産生細胞を誘導するモデルも存在することから、IgE 産生細胞株で見出した細胞凝集がこういった生体内の IgE 産生細胞の現象を模倣しているのか、他のモデルも用いて今後より精査していく必要がある。本課題では、残念ながら細胞凝集のメカニズムの同定に至らなかったものの、副次的な結果として抗体産生細胞の性質について新たな知見を得られた。これらの研究を通じて、I 型アレルギー疾患で原因となる IgE 抗体を分泌する IgE 産生細胞がどのように抗体産生を制御するのか細胞凝集という現象を介して明らかにしたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Mari Hikosaka-Kuniishi, Toshiyuki Yamane, Hidetoshi Yamazaki
2. 発表標題 Involvement of follicular dendritic cells in each LNs with IgA production
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 國石（彦坂）茉里，磯野加奈，山崎英俊
2. 発表標題 粘膜免疫に関与するリンパ節支持細胞 follicular dendritic cellの検出の試み
3. 学会等名 第47回 三重歯科・口腔外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshiyuki Yamane, Mari Hikosaka-Kuniishi, Hidetoshi Yamazaki
2. 発表標題 Multiple cell populations generate macrophage progenitors in the early yolk sac
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Doris Narki Tetteh, Mari Hikosaka-Kuniishi, Toshiyuki Yamane, Hidetoshi Yamazaki
2. 発表標題 The role of Neural crest-derived cells in thymic regeneration
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mari Hikosaka, Toshiyuki Yamane, Hidetoshi Yamazaki
2. 発表標題 An attempt to detect follicular dendritic cells in ectopic lymphoid tissues
3. 学会等名 the 47th annual meeting of the japanese society for immunology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshiyuki Yamane, Mari Hikosaka, Hidetoshi Yamazaki
2. 発表標題 Yolk sac progenitors for tissue-resident macrophages
3. 学会等名 the 47th annual meeting of the japanese society for immunology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hidetoshi Yamazaki, Tsunokuma Naoki, Mari Hikosaka, Toshiyuki Yamane
2. 発表標題 Depletion of neural crest-derived cells leads to reduction of plasama noradrenalin and alters T lymphopoiesis
3. 学会等名 the 47th annual meeting of the japanese society for immunology
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考