

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05478

研究課題名(和文) IL-21はパイエル板でIgA親和性を上昇させ、食物アレルギー応答を抑制するか？

研究課題名(英文) Does IL-21 produced in Peyer's patch regulate the affinity of IgA and food allergy?

研究代表者

橋口 昌章 (Hashiguchi, Masaaki)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20372443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：小腸に点在するパイエル板では、IgAへのアイソタイプスイッチの頻度が高く、腸管IgA産生の誘導部位として考えられているが、その機構は不明な点が多い。本研究では、パイエル板B細胞の抗原特異性、IgAの*in vivo*における機能、およびIgA誘導機構について検討した。その結果、パイエル板は、主要な応答抗原であるDNAに対するIgAおよび経口抗原に対するIgA産生の誘導の場であり、IgA産生は、IL-21およびIL-5により亢進することを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管で産生されるIgA抗体については、一部は腸内細菌に結合するなど、特異性などが徐々に明らかにされつつあるが、詳細な解析は行われてきていなかった。本研究の結果は、IgA抗体の特異性を明らかにしたことにより全体像が見え、解析の方向性を定める点で、重要な知見となったと考える。また、IgA抗体産生誘導機構の一部が明らかとなり、今後の解析の上で重要な知見となったと考える。

研究成果の概要(英文)：IgA is at least partly induced in Peyer's patches (PPs), which are secondary lymphoid tissues and scatteredly located in the small intestine (SI). However, the precise mechanisms have not been clarified yet. Establishing hybridomas from naive murine PPs revealed the major specificity against double stranded DNA in IgA. The IgA was induced by the intestinal microbes and in PPs, but was independent of CD4+ T cells. IgA positively regulate intestinal bacteria via an antigen-independent manner. TGF-beta induced IgA secretion from naive B cells, but was not enough for the induction of surface IgA. The additional IL-21 and IL-5 upregulate surface IgA+ B cell frequency. The blocking of IL-21R signaling abrogated GC B cell frequency and IgA+ B cells in PPs. PPs were required for oral antigen-specific IgA in the intestine. These results suggest that PPs are required for anti-dsDNA and anti-diet protein IgAs, and that IL-21 and IL-5 coordinately induce IgA.

研究分野：食品科学

キーワード：IgA パイエル板 IL-21

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腸管を含む粘膜組織では、IgA を特徴とした抗体産生応答が高く、定常状態で全身の免疫組織よりも効率的に抗体産生応答が誘導されている。しかしながら、その抗原特異性、IgA 賛成誘導機構、in vivo での機能については、不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、パイエル板における抗体産生に焦点をあて、その産生機構の解明を目的とした。まず、パイエル板 IgA の抗原特異性をハイブリドーマを樹立することで検討する。また、IL-21 が IgA 産生応答に与える影響について解析を行う。検証のために、GFP 誘導体による IL-21 産生細胞マーキングによる IL-21 産生細胞の追跡と機能解析目的として、IL21 プロモーター制御下で GFP 誘導体を発現するマウスの樹立を試みる。このマウスはホモ化することにより IL21 欠損マウスとしても用いるようにデザインする。同時に、この代替策として、IL-21R の阻害抗体の樹立を試みる。一方、パイエル板 B 細胞の抗原特異性を解析するために、パイエル板由来 IgA 産生ハイブリドーマの樹立を試みる。さらに、IgA アイソタイプスイッチ機構について重要な因子の同定を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ELISA およびフローサイトメトリー

アイソタイプ特異的 ELISA は標準的な方法により測定した。

各アイソタイプ陽性 B 細胞および活性化マーカーは特異的蛍光色素標識抗体を用いてフローサイトメトリーにより測定した。

細胞内サイトカイン産生は、パラホルムアルデヒドを用いて固定したのち、0.1%サポニンを用いて膜透過性を上昇させサイトカイン特異的抗体を用いてフローサイトメトリーにより観察した。

特定の細胞は、フローサイトメトリーを用いたセルソーティングにより分取した。

(2) 細胞および小腸内容物・糞中可溶性分画調製

脾臓細胞は、スライドガラスを用いて単細胞を調製した。パイエル板細胞および脾臓細胞を比較する場合は、コラーゲナーゼを用いて組織より分散し調製した。IgD⁺ 細胞は、ビオチン標識抗体とストレプトアビジン磁気ビーズをもちいて単離した。

小腸内容物および糞中可溶性分画はそれぞれ 0.1 g に対して PBS 1 ml を加え懸濁し、遠心により固形物を除いて調製した。

(3) 定量 RT-PCR

各細胞より標準的な方法で total RNA を調製し、oligo dT を用いて逆転写し、cDNA を得た。それをテンプレートとして、SYBR Green I を用いた定量 PCR を行った。内部標準として Actb もしくは Hprt を用い、実際の発現量は内部標準との比により算出した。

(4) In vivo 処理

除去抗体は 3-4 日に 1 回、全体で 4-5 回、腹腔内に投与することで行った。コントロール抗体は、アイソタイプの合致した抗体を用いた。

抗生剤の投与は、飲み水にアンピシリン、ネオマイシン、バンコマイシン、メトロニダゾール

を溶解させ、自由摂取で2週間投与した。

IgA 抗体の投与は、IgA 抗体を 25 µg/ml になるように飲み水に溶解し、2週間自由摂取させることを行った。

(5) *Ii21-venus* マウスの樹立

Ii21 遺伝子領域を含有する BAC を理研より入手し、これをもとに *Ii21* プロモーター制御下で GFP 誘導体 Venus (東京大医科研宮脇博士より供与) を発現するようデザインされたターゲティングベクターを作製した。これを用いて ES 細胞へトランスフェクションし、G418 にて選択した。得られたコロニーを拡大し、調製した DNA をもちいて PCR を行い適切に組み換えを起こした細胞を選択し、これを ICR マウス胚に移植した。

(6) 阻害抗体の樹立

マウス IL-21R およびマウス IL-5R に対するハイブリドーマは SD ラットを免疫し、標準的な方法で樹立し、腹水化してカプリル酸をもちいて調製した。

4. 研究成果

(1) パイエル板 B 細胞は活性化表現型の割合が高い

まず、パイエル板 B 細胞において、それぞれのアイソタイプを発現するものの割合を確認した。その結果、パイエル板細胞全体において、IgM、IgG1、IgG2c、IgG2b、IgA は、それぞれ、68%、1.3%、0.3%、2.8%、3.9%であった。これは脾臓のそれらが、50%、0.2%、0.2%、1.0%、0.4%であるのと比較すると、アイソタイプスイッチした細胞の割合が高かった。次に、それらの細胞における活性化マーカー等の分子の発現を検討したところ、CD23 および CD62L の発現する細胞の頻度は低く、逆に、CD69、および、胚中心マーカーである GL7 を発現する細胞の頻度は高く、パイエル板においては、アイソタイプスイッチした B 細胞はより活性化状態であることが示唆された。

これらの細胞において、形質細胞への分化およびアイソタイプスイッチに関与する転写因子の発現を検討したところ、概して、パイエル板 B 細胞において脾臓 B 細胞より高い BLIMP-1、XBP-1、AID、および Bcl-6 mRNA の発現が高く、遺伝子発現レベルで活性化度合いが高いことが示唆された。

(2) パイエル板 B 細胞の抗原特異性

次に、パイエル板 B 細胞の抗原応答性について検討した。抗原は BSA、insulin、LPS、ヒト IgG、食餌抽出物、大腸菌、2本鎖 DNA を用いた。その結果、概して、IgA が IgM 以外の他のアイソタイプよりヒト IgG、食餌抽出物、2本鎖 DNA に反応性が高かった。そこで、抗原特異性を検討するため、未処理のマウスから調製したパイエル板細胞をマイクロマと融合させ、B 細胞ハイブリドーマを樹立した。その反応性を確認したところ (図 1)、バルク

とほぼ同様の結果であ

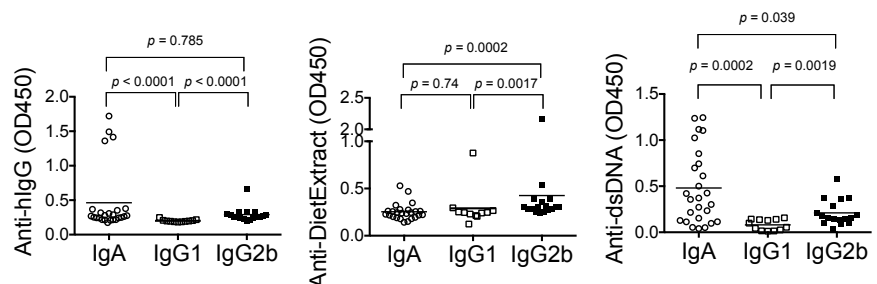


図 1 パイエル板由来 B 細胞ハイブリドーマの反応性

り、IgA⁺ ハイブリドーマでも、2本鎖 DNA に対する応答が高いことが明らかとなった。

(3) 抗 2 本鎖 DNA 抗体はパイエル板で誘導され、その誘導には腸内細菌が必要であるが、CD4⁺ T 細胞は必要でない

次に、この抗 2 本鎖 DNA IgA 抗体がどのように誘導されるのかを検討するため、まず、腸内細菌叢の影響を検討した。その結果、抗生剤入り飲み水を 2 週間与え続けると小腸内抗 2 本鎖 DNA IgA 抗体の量が低下した。このことより、腸内細菌由来の DNA がこの抗体の誘導に必要であることが示唆された。しかしながら、抗 CD4 抗体を投与することにより CD4⁺ 細胞を除去してもその産生量は変わらず、T 細胞非依存的に誘導されることが示唆された。一方で、パイエル板を欠損したマウスでは、抗 DNA 抗体量が低下しており、パイエル板において誘導されることが明らかとなった。

(4) IgA は腸内細菌を制御する

DNA は通常細胞内にあるため、抗 DNA 抗体が小腸内で機能することは考えにくかった。そこで、IgA 自体が抗原非特異的に機能するかどうかを検討した。IgA 抗体を有しない Rag2 欠損マウスに投与した結果、抗原の特異性に関わらず、IgA 抗体を投与した群では、大腸の腸内細菌レベルが優位に上昇した (図 2)。一方、IgA は、mAb により差異はあるものの抗原特異性を介さず腸内細菌に結合した。これらにより、IgA 抗体は腸管内で細菌と結合し、細菌叢を維持していることが示唆された。

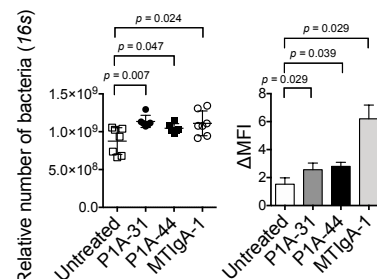


図 2 IgA による腸内細菌叢の制御

(5) IgA 分泌と表面発現の差異

次に、IgA へのアイソタイプスイッチ機構について解析した。これまで、TGF-β が IgA へのアイソタイプスイッチに重要であることは知られているが、レチノイン酸 (RA) などの因子も影響することが明らかとなっている。そこで、IgD⁺ の未感作な B 細胞を LPS 刺激することにより誘導される IgA 分泌、および、細胞表面 IgA 発現における様々な因子の関与を検討した。その結果、IgA の分泌には TGF-β が非常に影響を与え、次に RA も分泌量を大きく増大させた。その他の液性因子は、若干の増強は認められたものの、顕著な効果は認められなかった。一方で、細胞表面の IgA 発現は、TGF-β のみでは不十分で、ここに、RA および April を加えても、弱い効果しか認められなかった。しかしながら、さらに、IL-5 と IL-21 を添加すると、陽性細胞の比率は上昇し、これは IL-21 を添加した場合に顕著であった。分泌は、形質細胞もしくは plasmablast より担われるが、plasmablast は短命であるため、TGF-β だけでは plasmablast への分化がそれ以前の分化までしか進まず、他の因子があると形質細胞への分化が促進されることが可能性として考えられる。

(6) IL-21 と IL-5 による協調的 IgA⁺ 細胞の誘導

次に、IL-21 と IL-5 による IgA⁺ 細胞の増大による機序を検討した。IL-5 は細胞の増殖を亢進し、逆に、IL-21 は増殖を抑制した。IgA⁺ 細胞の絶対数は IL-5 を加えた場合が最も多かったが、IL-5 と IL-21 の両方を加えた場合も多く、IL-21 はアイソタイプスイッチを経験していない細胞の増殖には抑制的に働くが、経験した細胞には促進的に働く可能性が考えられた。

そこで、IL-21 による遺伝子発現について定量 RT-PCR で検討したところ、IL-21 の添加により、アイソタイプスイッチを促進する AID のほか、形質細胞への分化を誘導する BLIMP-1 の発現上昇が認められ、前述の可能性を示唆する結果であった。

(7) IL-21 はパイエル板 Tfh で発現が高い

実際の IL-21 の発現がパイエル板でどの程度高いのか定量 RT-PCR にて検討した。その結果、測定に用いた組織・器官の中で最も高く、また、パイエル板 CD4⁺ 細胞は脾臓 CD4⁺ 細胞より、さらに、パイエル板 PD-1⁺ ICOS⁺ の Tfh は脾臓のそれよりも IL21 値が高かった。

(8) IL-21 と IL-5 は in vivo においても IgA 産生を亢進する

IL-21R からのシグナルの影響を検討した。まず、IL21 プロモーター制御下で GFP 誘導体 Venus を発現するマウスの樹立を試みた。ターゲティングベクターを調製し、これを用いて適切に組み換えを起こした ES 細胞 (B6-6, RIKEN より入手) を得、これを ICR マウス胚に移植したが、キメラマウスは得られなかった。そこで、異なる ES 細胞である BCF1-FF-1 を用いて同様のことを行ったが、キメラマウスは得られなかった。

そこで、抗 IL-21R 抗体を樹立し、それを投与することで IL-21 の in vivo での機能について評価した。その結果、野生型マウスのパイエル板において、IL-21R 抗体投与群で胚中心 B 細胞の割合が低だけでなく、IgA⁺ B 細胞の割合も低下していた (図 3)。さらに、抗原を経口投与かつ IL-21R 抗体投与した TCR トランスジェニックマウスにおいて、小腸内投与抗原特異的 IgA 産生が抑えられ、IL-21 が経口抗原誘導性の IgA 産生に IL-21 が重要であることが示された。また、抗 IL-5 抗体についても同様の手技を行った結果、効果は若干弱いながらも同様の結果が得られ、IL-21 と IL-5 は協調的に IgA⁺ 細胞の誘導に寄与していることが示唆された。

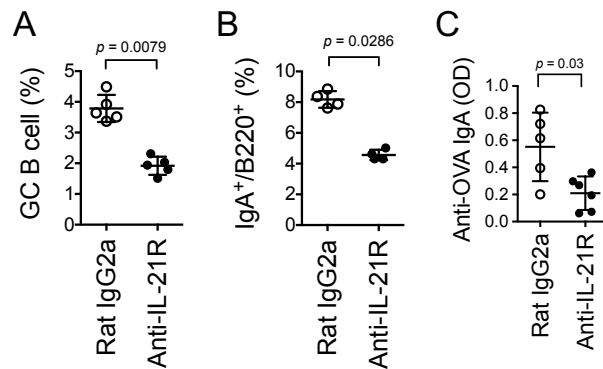


図 3 IL-21 は IgA⁺ 細胞を誘導する
抗 IL-21R 抗体投与による野生型マウスパイエル板 B 細胞の胚中心 B 細胞の割合 (A)、IgA⁺ 細胞の割合 (B)、TCR トランスジェニックマウス糞中経口抗原特異的 IgA 量 (C)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hashiguchi, M., Kashiwakura, Y., Kojima, H., Kanno, Y., Kobata, T.	4. 巻 211
2. 論文標題 Peyer's patches contain abundant isotype-switched B cells with activated phenotypes and are inductive sites for T-independent anti-DNA IgA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Immunol. Lett.	6. 最初と最後の頁 53-59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.imlet.2019.05.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hashiguchi, M., Kashiwakura, Y., Kanno, Y., Kojima, H., Kobata, T.	4. 巻 224
2. 論文標題 IL-21 and IL-5 coordinately induce surface IgA+ cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Immunol. Lett.	6. 最初と最後の頁 21-27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.imlet.2020.05.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hashiguchi, M., Kashiwakura, Y., Kanno, Y., Kojima, H., Kobata, T.
2. 発表標題 RORalpha is crucial for the survival of IgA+ plasma cells but not B220+ IgA+ cells
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hashiguchi, M., Kashiwakura, Y., Kanno, Y., Kojima, H., Kobata, T.
2. 発表標題 IL-21 and CD4+ T cells are required for Peyer's patch germinal center formation but not for intestinal IgA in homeostatic condition
3. 学会等名 第47回日本免疫学会総会・学術集会
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
研究協力者	菅野 由美子 (Kanno Yumiko)		
研究協力者	田作 佑弥 (Tasaku Yumi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------