

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390091

研究課題名(和文) Fca/mRによる濾胞樹状細胞の活性化調節機構

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of FDC activation via Fca/mR

研究代表者

本多 伸一郎 (HONDA, Shinichiro)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：60360640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円、(間接経費) 4,560,000円

研究成果の概要(和文)：従来FDCはその抗原を細胞表面に長期間保持することによってB細胞へ抗原を提示し、胚中心形成を促すと考えられてきた。我々はFDC特異的マーカーであるFDC-M2を用いてマウスのリンパ組織からFDCを単離する方法を確立したが、単離FDCを用いた解析からFDCが抗原を保持するのみならず、Fca/mRを介して抗原を細胞内に取り込むことを見いだした。一方、抗原の細胞内取り込みに伴ってFDC細胞表面上においては抗原量の減少が認められた。よってFca/mRはFDCによる抗原の細胞内取り込みを介してFDC細胞表面上の抗原量を調節し、B細胞の活性化、ひいては胚中心形成を制御していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Follicular dendritic cells (FDCs) capture and retain antigen for long period to activate cognate B cells, leading to germinal center formation. We established a novel method for FDCs isolation from lymphoid organs of naive mice. Surprisingly, analysis with this method showed that FDCs internalized capturing antigen via Fca/mR. As a result of this internalization, antigen amount on FDCs cells surface was decreased. These results suggested that Fca/mR regulates antigen amount on FDCs cell surface, leading to the regulation of B cells activation and germinal center formation.

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：濾胞樹状細胞 IgM Fc受容体

1. 研究開始当初の背景

(1) リンパ組織に到達した抗原は濾胞内に存在する濾胞樹状細胞 (Follicular dendritic cells, FDC) 上に集積する。FDC は抗原を提示するのみならず、サイトカイン・ケモカイン産生や膜分子からの共刺激を行う結果、抗原特異的 B 細胞の増殖を惹起して胚中心を形成する。胚中心は B 細胞の抗原親和性成熟や記憶 B 細胞の樹立にも重要であることから FDC は抗体産生応答を制御するキープレイヤーであるといえる (Vinuesa et al., *Immunol. Rev.* 2010)。

(2) 免疫細胞は抗体の Fc 部分に対する受容体である Fc 受容体を発現しているが、Fc 受容体は抗体との結合の結果、免疫細胞を活性化して免疫応答を惹起する一方で Fc γ RIIb のように免疫細胞の活性化を調節する分子も存在することが明らかにされてきた (Nimmerjahn et al., *Immunol. Rev.* 2010)。IgM は自然抗体の大部分を占め、また抗原に対して最初に産生される抗体でもあるため初期段階から免疫応答に関与する抗体であることが知られている (Binder et al., *Springer Semin Immunol.* 2005)。我々のグループは世界に先駆けて IgM に対する Fc 受容体、Fc α / μ R (CD351) を同定して解析を行ってきた。樹立した Fc α / μ R 特異抗体 (Cho et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006) を用いた免疫組織染色によって Fc α / μ R が胚中心を形成する FDC 上に発現し (Honda et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009)、特に胚中心形成が強く認められるパイエル板 FDC に Fc α / μ R が高発現していることを見いだした。また、我々が作製した Fc α / μ R 欠損マウスでは投与された T 細胞非依存性 (TI) 抗原の FDC による捕捉が亢進し、TI 抗原に対しては通常形成されないとされる胚中心

形成が認められ、抗体産生応答が増強していた。すなわち Fc α / μ R は FDC の抗原捕捉を調節し、胚中心形成を抑制していることが示されている (Honda et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009)。

2. 研究の目的

我々は上記の知見から胚中心形成に関わる FDC に Fc α / μ R が高発現し、抗原捕捉を始めとした FDC の活性化を調節しているという仮説を立てた。本研究は FDC 単離法を確立し、この仮説を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 新しい FDC 単離法の確立

FDC に関する詳細な解析を行うためには細胞単離が必須であるが、これまでに報告されている単離方法は放射線照射や抗原投与が必要である点で定常状態の FDC の機能を評価できない点に問題があった。そこで、我々は FDC をナイーブマウスから単離する新たな手法の確立を目指した

(2) Fc α / μ R 発現変化の定量的解析

ハプテン化抗原とアジュバントを用いてマウスを免疫後、経時的に脾臓を採取して FDC を単離し、Fc α / μ R 遺伝子発現量について定量的 RT-PCR 法を用いて検討した。

(3) FDC における抗原局在の検討

蛍光標識された抗原をマウスに投与後 FDC を単離した。抗原由来の蛍光を指標に FDC における抗原の局在を共焦点顕微鏡を用いて検討した。

(4) FDC による抗原捕捉の検討

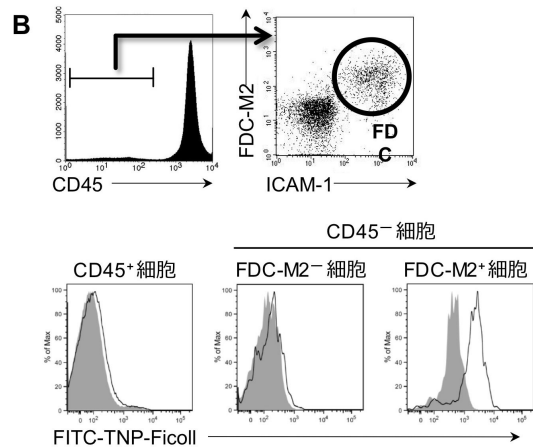
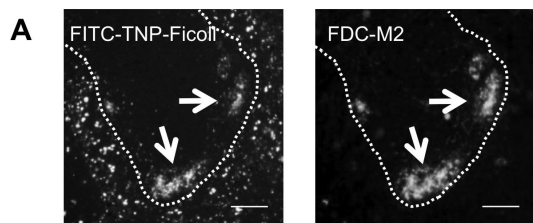
ハプテン化抗原を野生型マウスおよび Fc α / μ R 欠損マウスに投与後 FDC を単離し、細胞膜透過処理の後に抗ハプテン抗体を用

いて染色を行ってフローサイトメトリー法を用いて解析した。細胞膜透過処理の有無により細胞表面上、および細胞内の抗原量について定量を行った。

4. 研究成果

(1) 新しいFDC単離法の確立

メスにて細切したマウス脾臓をcollagenaseとDNaseの酵素カクテルにて処理して間質系細胞を含む細胞懸濁液を調整し、血球細胞マーカーであるCD45およびFDC特異的マーカーであるFDC-M2による染色を行った。フローサイトメーターを用いた解析により、血球系マーカーCD45陰性分画中にFDCマーカーFDC-M2陽性の細胞分画を見いだすことに成功した。この細胞分画はCD21/35やFDC-M1、ICAM-1といったFDCに特徴的な分子を発現し、培養後は樹状突起を伸ばした三次元の網目状の構造を形成した。さらに、この細胞分画はBAFFの産生を介してB細胞の増殖を促進させた。蛍光標識抗原をマウスに投与し、FDCに捕捉された抗原の動態を解析したところ、抗原投与24時間後の脾臓において抗原はFDCに特異的に集積していたが(図A)、フローサイトメトリー法による解析においても抗原由来の蛍光は単離FDCにおいてのみ認められた(図B)。



上記の様にFDCの単離法を確立し、フローサイトメトリー法や定量的RT-PCR法などを用いた詳細で定量的な解析への基盤を得ることに成功した。

(2) Fcα/μR発現変化の定量的解析

抗原免疫後のマウス脾臓からFDCを単離し、定量的RT-PCR法を用いてFcα/μRの発現量を経時的に検討したところ、免疫2週間後においてその発現量が免疫前の状態から約2倍に亢進していることが明らかとなった。これまでの免疫組織染色法を用いた解析においても脾臓FDCにおけるFcα/μRの発現は胚中心形成時に増強していることが示唆されており、この結果に矛盾しないと考えられた。一方、FDC特異的マーカーとして知られるFDC-M1(MFG-E8)遺伝子については免疫前後においてその発現変化は認められなかった。

(3) FDCにおける抗原局在の検討

蛍光標識された抗原をマウスに投与後FDCを単離して共焦点顕微鏡を用いて観察を行ったところ、抗原由来の蛍光は驚くべきことに細胞表面のみならず、細胞内にも認められた。すなわち、FDCが抗原を捕捉するのみならず、その一部を細胞内に取り込むという、これまで未知であった新機構を見出すことに成功した。

(4) FDC における抗原捕捉の検討

ハプテン化抗原を投与した野生型マウスから単離した FDC を細胞膜透過処理の前後で抗ハプテン抗体を用いて染色を行い、フローサイトメトリー法で解析したところ、蛍光は細胞膜透過処理前のみならず、処理後においても検出された。すなわち FDC 細胞表面のみならず、細胞内にも存在しているハプテン化抗原がフローサイトメトリー法で検出可能だった。同様の解析を野生型マウスおよび $Fc\alpha/\mu R$ 欠損マウスにハプテン化抗原を投与し、上記の解析を行ったところ、細胞膜透過処理前の $Fc\alpha/\mu R$ 欠損 FDC 上の蛍光強度は野生型 FDC と比較して減少し、一方で細胞膜透過処理後の $Fc\alpha/\mu R$ 欠損 FDC 内の蛍光強度は野生型 FDC と比較して増加していた。よって野生型マウスにおいては FDC に捕捉された抗原の一部が $Fc\alpha/\mu R$ によって細胞内に取り込まれる結果、細胞表面上の抗原量が減少していると考えられた。この結果は $Fc\alpha/\mu R$ が FDC による抗原の細胞内取り込みに関与し、B 細胞へ提示される FDC 細胞表面上の抗原量を制御していることを示している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計8件)

Yoshizawa Y, Honda S, Shibuya A. Involvement of $Fc\alpha/\mu R$ (CD351) in autoantibody production. *Mol Immunol*, 57(2):216-219, 2013 査読有
DOI: 10.1016/j.molimm.2013.10.002

Takagaki K, Satoh K, Honda S, Shibuya A. Molecular characterization of the dimer formation of $Fc\alpha/\mu$ receptor (CD351). *Mol Immunol*, 56(1-2):23-27, 2013 査読有
DOI: 10.1016/j.molimm.2013.04.003

Arai S, Maehara N, Iwamura Y, Honda S, Nakashima K, Kai T, Ogishi M, Morita K, Kurokawa J, Mori M, Motoi Y, Miyake K, Matsuhashi N, Yamamura K, Ohara O, Shibuya A, Wakeland E K, Li Q-Z, Miyazaki

T. Obesity-associated autoantibody production requires AIM to retain the immunoglobulin M immune complex on follicular dendritic cells. *Cell Reports*, 3:1-12, 2013 査読有
DOI:10.1016/j.celrep.2013.03.006

Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Shoji M, Okoshi Y, Nakano-Yokomizo T, Ohkohchi N, Yasui T, Kikutani H, Honda S, Shibuya K, Nagata S, Shibuya A. Apoptotic cells suppress mast cell inflammatory responses via the CD300a immunoreceptor. *J Exp Med*, 209(8):1493-1503, 2012 査読有
DOI:10.1084/jem.20120096

Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Shibuya K, Shibuya A. Identification of phosphatidylserine as a ligand for the CD300a immunoreceptor. *Biochem Biophys Res Comm*, 417(1):646-650, 2012 査読有
DOI:10.1016/j.bbrc.2011.12.025

Usui K, Honda S, Yoshizawa Y, Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Shibuya A. Isolation and characterization of naïve follicular dendritic cells. *Mol Immunol*, 50(3):172-176, 2012 査読有
DOI: 10.1016/j.molimm.2011.11.010

Nakano-Yokomizo T, Tahara-Hanaoka S, Nakahashi-Oda C, Nabekura T, Nadia K. Tchao, Kadosaki M, Totsuka N, Kurita N, Nakamagoe K, Tamaoka A, Takai T, Yasui T, Kikutani H, Honda S, Shibuya K, Lewis L. Lanier, Shibuya A. The immunoreceptor adapter protein DAP12 suppresses B lymphocyte-driven adaptive immune responses. *J Exp Med*, 208(8):1661-1671, 2011 査読有
DOI: 10.1084/jem.20101623

$Fc\alpha/\mu$ を介した免疫制御 本多伸一郎、渋谷彰 臨床免疫・アレルギー科 55(5):552-558, 2011

<http://www.kahyo.com/item/M201105-555>

[学会発表](計11件)

Totsuka N, Kim YG, Tahara-Hanaoka S, Nakahashi-Oda C, Honda S, Shibuya K, Shibuya A. Involvement of CD300a in the pathogenesis of DSS-induced colitis. 第42回日本免疫学会総会・学術集会 幕張メッセ(千葉)2013.12.13

Honda S, Yoshizawa Y, Sato K, Fujimoto M, Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Shibuya A. $Fc\alpha/\mu R$ (CD351) regulates inflammatory responses of marginal zone B cells against experimental septic shock. 第42回日本免疫学会総会・学術集会 幕張メッセ(千葉)2013.12.12

Arai S, Honda S, Shibuya A, Li Q-Z, Miyazaki T. Obesity-associated autoantibody

production requires AIM to retain IgM immune complex on follicular dendritic cells. 第 42 回日本免疫学会総会・学術集会 幕張メッセ (千葉) 2013.12.11

Honda S, Satoh K, Matsuoka Y, Matsushita T, Fujimoto M, Shibuya A. Fcα/μR (CD351) regulates inflammatory responses of marginal zone B cells against experimental septic shock. 15th International Congress of Immunology. Mico Milano Congressi, Milan, Italy 2013.8.23

Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Yasui T, Kikutani H, Honda S, Shibuya K, Nagata S, Shibuya A. Apoptotic cells suppress mast cell inflammatory responses via the CD300a immunoreceptor. 第 41 回日本免疫学会国際シンポジウム 神戸国際会議場(兵庫) (41th International Symposium of Japanese Society of immunology, Kobe.)2012.12.6

Sato K, Usui K, Honda S, Yoshizawa Y, Shibuya A. Follicular dendritic cells (FDC) internalized IgM-coated antigen via Fc receptor for IgA/IgM (Fcα/μR; CD351). 第 41 回日本免疫学会 神戸国際会議場 (兵庫) 2012.12.5

戸塚直也、田原聡子、永井恵、小田 (中橋) ちぐさ、人見香織、栗田尚樹、本多伸一郎、渋谷和子、渋谷彰 MAIR-II(CD300d) on Ly-6C^{high} inflammatory monocytes plays a crucial role in inflammatory responses in a murine sepsis model. 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会 幕張メッセ (千葉) 2011.11.29

臼井健太、本多伸一郎、吉澤勇一、田原聡子、渋谷和子、渋谷彰 ナイーブマウス脾臓からの FDC の単離 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会 幕張メッセ (千葉) 2011.11.29

高垣香菜、本多伸一郎、臼井健太、吉澤勇一、渋谷和子、田原聡子、渋谷彰 Iga/IgM 受容体、Fcα/μ 受容体の二量体形成の解析 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会 幕張メッセ (千葉) 2011.11.29

山下由美、Wang Yhan、吉岡文、鍋倉宰、田原聡子、本多伸一郎、渋谷彰、渋谷和子 The role of CD155, a novel co-stimulatory molecule in CD4⁺ T cell, in contact dermatitis. 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会 幕張メッセ (千葉) 2011.11.27

本多伸一郎 濾胞状樹状細胞上の IgA 受容体を介した粘膜免疫応答制御機構の解析 平成 23 年度第 1 回班会議 京都大学医学部芝蘭会館 (京都) 2011.7.19

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tulips.tsukuba.ac.jp/dspace/simple-search?query=%E6%9C%AC%E5%A4%9A+%E4%BC%B8%E4%B8%80%E9%83%8E> (つくばリポジトリ)

<http://trios.tsukuba.ac.jp/researcher/0000001684>

(TRIOS)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本多 伸一郎 (HONDA, SHINICHIRO)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号 : 60360640

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし