

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：34417

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670236

研究課題名(和文)mTORC1シグナル非依存的な新規B細胞分化機構の解明

研究課題名(英文)Characterization of an mTORC1-independent B cell differentiation program

研究代表者

松田 達志 (MATSUDA, Satoshi)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00286444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：mTORC1シグナルに必須のRaptor分子をB細胞特異的に欠失させたマウス(以下、Raptor-BKOマウス)を樹立し解析したところ、骨髄中のIgM陽性細胞が完全に消失しているにもかかわらず、小腸粘膜固有層にIgA陽性細胞が存在し、血中・糞便中の両方でIgAが検出された。これらmTORC1非依存的なIgA産生は、腸内細菌の存在に応答して誘導されており、腸内細菌叢の質的な制御を行っていることが明らかとなった。Raptor-BKOに見られるIgAは、T細胞非依存的に誘導されているにもかかわらず、高頻度体細胞突然変異が生じており、全く新規のB細胞分化制御機構の存在が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Mice with a B cell-specific deletion of Raptor (RaptorB^{-/-} mice), an essential component of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1), had a developmental arrest at the pro-B cell stage in the bone marrow (BM) and consequently failed to produce detectable levels of IgM and IgG. However, RaptorB^{-/-} mice still produced gut-associated IgA required for controlling gut microbiota. Unexpectedly, RaptorB^{-/-} B cells underwent somatic hyper mutation (SHM) in the gene encoding IgA despite the fact that T follicular helper (TFH) cells were absent. Our findings reveal a gut-associated mTORC1-independent differentiation program of IgA⁺ B cells, which plays a crucial role in maintaining intestinal homeostasis.

研究分野：免疫学

キーワード：B細胞分化 mTORC1シグナル 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

B 細胞は抗体産生を介して外界の脅威から生体を守っており、特に莫大な数の腸内細菌や食物由来抗原に曝される腸管においては、腸管への分泌 IgA が重要な役割を担っている。教科書的には、骨髄内で IgM 陽性となった未熟 B 細胞が、末梢で成熟・クラススイッチを起こし、抗体産生細胞に最終分化するものと考えられている。研究代表者はこれまでに class IA PI3K が B 細胞の分化・増殖を制御していることを明らかにしてきた (Suzuki and Matsuda et al., Nat. Immunol. 4: 280 (2003); Matsuda et al., Blood 113: 1037 (2009))。さらにごく最近、PI3K の下流で機能する mTORC1 経路に着目し、mTORC1 シグナルに必須の Raptor 分子を B 細胞系列特異的に欠損させた (以下、Raptor-BKO マウスと記載) ところ、全身で IgM 陽性細胞が消失した。しかし、驚くべきことに、血清中ならびに糞便中に IgA の存在が確認され、腸管粘膜固有層に IgA 産生細胞が存在することが明らかとなった。以上の知見は、従来とは根本的に異なる IgA 産生細胞への分化経路の存在を強く示唆しており、その生理的意義と分化機構の解明を目指す本研究を着想するに至った。

腸管における IgA 産生機構は、ごく最近になって各種樹状細胞の関与が明らかにされるなど、未だに不明な点が多い。一方で、腸内細菌叢と宿主個体の相互作用は、全身性の免疫応答やサイトカインバランスに影響を与えることが明らかとなり、腸内細菌叢の量的・質的バランス調整に関わる IgA 産生経路の理解は喫緊の課題となっている。本研究は、新しく見出された IgA 産生経路の生理的意義・分子基盤の解明を目指すものであり、教科書的な記述に再考を迫る基礎医学的な意義に加え、腸内細菌叢と宿主間の相互作用を理解する上で大きなインパクトを持つものと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者が見出した mTORC1 非依存的な IgA 産生経路に焦点を当て、(i) その生理的意義と (ii) IgA 産生細胞への分化機構の解明を目指す。上述したように、腸管に分泌される IgA は腸内細菌叢の量的・質的な制御に関わることが知られている。そこで (i) へのアプローチとして、Raptor-BKO マウス

と野生型マウス間で腸内細菌叢の量的・質的な比較を行い、Raptor-BKO の産生する IgA が機能的なものか否かを明らかにする。また、腸内細菌叢の異常は腸管粘膜固有層における T 細胞集団の質的な変化を引き起こすことから、腸管粘膜固有層の制御性 T 細胞や Th17 細胞の割合に変化が認められるか否かも併せて評価する。

一方、(ii) に関しては、内在性の B 細胞を欠失した Rag2-KO マウスへの移植実験から、Raptor-BKO マウスの骨髄に存在する CD19⁺IgM⁺細胞が、腸管粘膜固有層に移動後に IgA を産生することが分かっている (未発表)。そこで、Rag2-KO マウスへの移植時に各種阻害剤や中和抗体で処理することで腸管粘膜固有層への移動機構を解明すると共に、in vitro B 細胞分化系を利用して mTORC1 シグナル非依存的 IgA クラススイッチの分子機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 京都大学の本庶教授のグループは、AID の変異マウスを用いた一連の解析を通じて、腸管に分泌される IgA の機能低下により腸内細菌数が増加することを見出している。さらに、理研・RCMI の Fagarasan チームリーダーは、これら IgA の機能低下が腸内細菌叢の質的な変動を引き起こすことも明らかにしている。すなわち、腸管に分泌される IgA が正常に機能しているか否かは、腸内細菌叢の量的・質的な解析を通じて評価可能である。そこで、野生型マウスと Raptor-BKO マウスの糞便を回収し、腸内細菌数の計測ならびに 16S rDNA 法による腸内細菌叢の網羅的定量解析を行うことで、両グループの産生する腸内 IgA に機能的な差異が存在するか否かを明らかにする。また、近年の解析から、腸内細菌叢の変化が腸管粘膜固有層における T 細胞集団のバランスに大きな影響を及ぼすことが示されている。そこで、並行して野生型マウスと Raptor-BKO マウスの腸管粘膜固有層を調べ、制御性 T 細胞や Th17 細胞の比率に変化が生じているかどうかを検証する。

(2) 一般に、腸管への免疫担当細胞の移動・集積には、細胞遊走因子である CCL25 とその受容体である CCR9 を介した細胞の活性化と、インテグリン $\alpha 4 \beta 7$ を介した MAdCAM-1 への結合が重要な役割を果たしている。予備的な解

析から、Raptor-BK0 マウスの骨髄に見られる CD19⁺IgM⁺ 細胞の内、10%程度の細胞が CCR9 を発現していることが分かっている（未発表）。一方、少なくとも骨髄ではこれら細胞に $\alpha 4\beta 7$ の発現は認められない。そこで、Rag2-KO マウスに Raptor-BK0 マウス由来 CD19⁺IgM⁺ 細胞を移植する際に、CCR9 の阻害剤（GSK1605786；GlaxoSmithKline 社）や $\alpha 4\beta 7$ に対する中和抗体（clone DATK32；ATCC）を投与することで、移植後の血中ならびに糞便中 IgA レベルの低下の有無を評価する。なお、GSK1605786 は CCX-282-B もしくは Traficet-EN と呼ばれ、マウス個体において CCR9 依存性の腸管へのリンパ集積を阻害することが示されており、現在クローン病に対する臨床試験が進められている薬剤である。

(3) B細胞のクラススイッチにはT細胞のヘルプが必要であると長く考えられてきたが、近年の解析から、腸管関連リンパ組織に局在する樹状細胞との直接相互作用により IgA へのクラススイッチが誘導されることが明らかとなっている。そこで、Raptor-BK0 に見られる IgA 産生経路が T細胞に依存しているか否か、*in vivo* と *in vitro* の両方の系で検証する。

T細胞に固有の TCR を発現させることで、個体レベルで T細胞の反応性を固定することが可能になる。そこで、OVA 反応性の TCR を有する OT-II トランスジェニックマウスと Raptor-BK0 とを交配させて、全ての T細胞が OVA 反応性 TCR を持つ個体を作成する。マウス個体の体内には OVA は存在しないことから、当該マウスの体内では T細胞は存在するものの、活性化は生じない状況を作り上げることが可能となる。その条件下で IgA 産生の有無を調べることで、Raptor-BK0 による IgA 産生が T細胞の活性化に依存しているか否かを明らかにする。

一方、ごく最近トロント大学の Gommerman 教授のグループが *in vitro* IgA クラススイッチ誘導系を報告しており、本研究でもその系に準拠して Raptor-BK0 由来 CD19⁺IgM⁺ 細胞の IgA 産生細胞への *in vitro* 分化を試みる。具体的には、野生型マウス由来細胞を対照群として、各種の TLR リガンド、抗 CD40 抗体、IL-21 ならびに TGF- β 共存下に腸管粘膜固有層由来細胞との共培養により IgA 陽性細胞へ

の分化を試みる。Raptor-BK0 由来細胞の IgA 分化が認められない場合は、腸管における樹状細胞依存性 IgA クラススイッチ機構をより強く反映させるべく、Tip 樹状細胞によって高産生されるレチノイン酸や BAFF・APRIL といった液性因子、もしくは Tip 樹状細胞そのものの共培養系への添加を試みる。*In vitro* において IgA 産生細胞への分化が観察された場合には、その過程で IgM へのクラススイッチが生じているのか、それとも IgM 産生細胞をスキップした上での IgA 産生細胞への分化が可能かを明確にし、IgM 陽性細胞を起点にした形質細胞分化という教科書的なドグマの検証を行う。

4. 研究成果

(1) Raptor-BK0 マウスの糞便を回収し、16S rDNA 法による腸内細菌叢の網羅的定量解析によって、野生型マウスの腸内細菌叢との比較を行った。すると、若齢マウス同士を比較した場合は腸内細菌叢のパターンに若干の差異が認められたものの、その差は時間経過とともに小さくなり、10週令のマウス間では統計学的に有意な差異は認められなくなった。実際、腸内細菌叢のパターンと密接に関わることが知られる小腸粘膜固有層の制御性 T細胞数・Th17 細胞数は、野生型マウス・Raptor-BK0 間で大きな変化は認められなかった。以上の結果から、Raptor-BK0 マウスの産生する IgA は、腸内細菌叢の質的なコントロールを行うに十分な機能を有していることが強く示唆された。実際、Raptor-BK0 マウスの糞便中の細菌の表面には野生型マウスで観察されるのと同程度の IgA が結合しており、腸腔に分泌される IgA が腸内細菌を認識していることが直接的に証明された。

(2) Raptor-BK0 マウス由来の骨髄を内在性の B細胞を持たない Rag2 欠損マウスに移入することで、IgA 産生を誘導することが可能である。またその際には、小腸粘膜固有層に IgA⁺ 細胞が検出されるようになる。一般に、粘膜固有層への細胞集積にはケモカイン受容体である CCR9 や $\alpha 4\beta 7$ インテグリンを介したシグナルが重要とされている。しかし、骨髄移植に際してこれら分子の阻害剤を添加したところ、IgA 産生レベルの若干の低下は認められたものの、完全には抑制されなかった。一方、あらかじめ抗生物質の投与により腸内

細菌を駆逐した Rag2 欠損マウスに骨髄移植を行ったところ、IgA 産生はほぼ完全に抑制されることが明らかとなった。CCR9 や $\alpha 4\beta 7$ に対する阻害物質の投与プロトコールに不備があった可能性は排除できないものの、以上の結果は、腸内細菌の存在が骨髄由来 proB 細胞の小腸粘膜固有層へのリクルートに大きく関与することを強く示唆している。今後、各種の遺伝子改変マウスを用いて、骨髄と小腸粘膜固有層間の動線を担う分子機構に迫りたい。

(3) OVA 反応性 TCR を発現する OT-II トランスジェニックマウスと Raptor-BKO を交配し、T 細胞が OVA 由来ペプチド以外には反応しない条件下で IgA 産生の有無を調べたところ、コントロールの Raptor-BKO と同程度の IgA が産生されていることが確認された。実際、Raptor-BKO マウスのリンパ節には T 細胞依存性のクラススイッチに必須の濾胞ヘルパー T 細胞 (Tfh 細胞) が全く存在していないことが明らかとなった。以上の結果は、Raptor-BKO マウスに見られる IgA 産生が T 細胞非依存的経路によって担われていることを強く示唆している。一方、*in vitro* 分化系を用いて Raptor-BKO マウス由来 proB 細胞を IgA⁺細胞へと分化させる試みは、残念ながら未だに成功しておらず、今後の検討課題となった。

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 2 件)

Hoshii, T., Kasada, A., Hatakeyama, T., Ohtani, M., Tadokoro, Y., Naka, K., Ikenoue, T., Ikawa, T., Kawamoto, H., Fehling, H.J., Araki, K., Yamamura, K., Matsuda, S., and Hirao, A. Loss of mTOR complex 1 induces developmental blockage in early T-lymphopoiesis and eradicates T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2014) 111: 3805-3810、査読有
DOI: 10.1073/pnas.1320265111
Hoshii, T., Matsuda, S. and Hirao, A. Pleiotropic roles of mTOR complexes in haemato-lymphopoiesis and

leukemogenesis. *J. Biochem.* (2014) 156: 73-83、査読無
DOI: 10.1093/jb/mvu037

[学会発表](計 5 件)

Ohtani, M., Fujii, H., Ohara, O., Koyasu, S., Kubo, M., and Matsuda, S. B-lineage specific loss of mTORC1 signal causes selective production of IgA against commensal bacteria. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会、2014 年 12 月 11 日、京都国際会館(京都府・京都市)

松田 達志、大谷 真志、小安 重夫、久保 允人、平尾 敦

mTORC1 シグナルによる B 細胞分化制御
第 24 回日本サイトメトリー学会学術集会、2014 年 6 月 28 日、関西医科大学(大阪府・枚方市)

Ohtani, M., Fujii, H., Koyasu, S., Kubo, M., and Matsuda, S. mTOR complex 1 is critical for B cell development but not IgA production. 第 42 回日本免疫学会総会・学術集会、2013 年 12 月 11 日、幕張メッセ(千葉県・幕張市)

大谷 真志、渡辺 貴志、星居 孝之、小安 重夫、小原 収、平尾 敦、久保 允人、松田 達志、mTOR complex 1 は IgH μ 発現を介して B 細胞の分化を制御している、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 5 日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

[その他]

ホームページ等

<http://www3.kmu.ac.jp/bioinfo/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 達志 (MATSUDA, Satoshi)
関西医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 00286444

(2) 連携代表者

大谷 真志 (OHTANI, Masashi)
東邦大学・理学部・講師
研究者番号: 20383713