

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790353  
 研究課題名 (和文) 粘膜固有層 Tip-DC による IgA 生産誘導機構の解明と IgA 腎症治療への応用  
 研究課題名 (英文) Regulatory mechanism of IgA production by mucosal Tip-DC and its therapeutic application for IgA nephropathy.  
 研究代表者  
 手塚 裕之 (TEZUKA HIROYUKI)  
 秋田大学・医学部・助教  
 研究者番号：30375258

研究成果の概要：本研究では、腸管粘膜組織における IgA 生産誘導機構を明らかにすることを目的とした。腸管粘膜組織には TNF- $\alpha$  と iNOS を構成的に発現する IgA 生産誘導に特化したユニークな樹状細胞が多く存在することが明らかとなった。また、IgA 腎症モデルマウスを用いた解析から、高 IgA 生産の誘導には腸管粘膜組織の形質細胞様樹状細胞が重要な役割を担っている可能性が示唆された。したがって、IgA 生産誘導機構にはこれら DC が重要であり、IgA 腎症治療の標的となる可能性が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：抗体, IgA, IgA 腎症, HIGA マウス, Tip-DC, plasmacytoid DC

## 1. 研究開始当初の背景

IgAは定常状態の生体において大量に生産され、その生産量は免疫グロブリンのなかで最も多い。このことから、粘膜組織ではIgA生産が選択的かつ効率的に誘導されることが推測されているが、その詳細な分子機構は不明である。一方、IgA生産機構の破綻はさまざまな疾病の原因となる。例えば、IgAの過剰な生産によって引き起こされるIgA腎症は、最も高頻度の原発性糸球体腎炎であり、慢性化により腎不全に至る疾病である。研究代表者は、誘導型一酸化窒素合成酵素欠損(iNOS<sup>-/-</sup>)マウスでは血清中のIgA生産レベルが著しく減少していることを見出している。

興味深いことに、IgA腎症患者の腎組織においてiNOS発現が検出されることが報告されている。これらのことから、IgA生産誘導機構にiNOS由来NOが重要であることが想定される。昨今、鳥型あるいは豚型インフルエンザのパンデミックが懸念されており、これら感染症に対して効果的な粘膜ワクチンの開発が進められている。粘膜ワクチンはいかにして抗原特異的IgAを生産させるかが実用化の鍵となっており、そのためには粘膜組織におけるIgA生産誘導機構の解明が求められている。

## 2. 研究の目的

「なぜ粘膜組織ではIgAに偏向した抗体生産が誘導されるのか？」という疑問は未だに解明されていない。本研究では、この疑問を明らかにすることを目的とした。具体的には、低IgA生産系統である*iNOS*<sup>-/-</sup>マウスおよび高IgA生産系統であるIgA腎症自然発症(HIGA)マウスを用いて、個体および細胞レベルでの粘膜組織におけるIgA生産誘導機構の解明を目指した。これらの成果はIgA腎症の予防法・治療法の確立、さらには効果的な粘膜ワクチンの開発に繋がることが期待される。

## 3. 研究の方法

(1) IgA生産誘導に関わる分子の発現：野生型および*iNOS*<sup>-/-</sup>マウスからB細胞および樹状細胞(DC)を単離し、TGF- $\beta$ 受容体、APRIL、BAFFの遺伝子発現レベルをリアルタイムPCR法にて定量する。

(2) 細胞培養実験：ナイーブB細胞をサイトカイン(TGF- $\beta$ +抗CD40抗体、APRIL、BAFF)やDCで7日間刺激し、培養上清中に生産されるIgA量をELISA法にて測定する。

(3) 免疫細胞のフェノタイプ解析：マウスの腸管粘膜組織から単核球細胞を調製し、蛍光標識抗体(抗IgA抗体/抗B220抗体、抗CD11c抗体/抗*iNOS*抗体など)で染色後、フローサイトメーターを用いて解析する。

(4) 免疫組織化学：腸管粘膜組織の凍結組織切片を作製し、上記の蛍光標識抗体で染色することでDCの分布を明らかにする。

(5) 細胞移入実験：野生型マウスの小腸粘膜固有層DCを静脈内注射により*iNOS*<sup>-/-</sup>マウスに移入し、2-3週間後の血清、消化管内容物、および糞便中のIgAレベルを測定する。また、HIGAマウスについても同様の検討を試みる。

## 4. 研究成果

(1) Tip-DCによるIgA生産誘導機構：野生型マウスと比較して誘導型一酸化窒素合成酵素(*iNOS*)欠損マウスでは血清、腸管内容物、および糞便中のIgAレベルが選択的かつ著しく減少していた。また、*iNOS*<sup>-/-</sup>マウスではナイーブB細胞のII型TGF- $\beta$ 受容体(TGF $\beta$ RII)発現や、パイエル板および小腸粘膜固有層のDCによるAPRILおよびBAFF発現が著しく減少しており、これらの発現はNOの刺激により正常レベルにまで回復することが判明した(図1)。

野生型B細胞と比較して*iNOS*<sup>-/-</sup>B細胞ではTGF- $\beta$ +抗CD40抗体の刺激により誘導されるIgA生産が著しく低下しており、また*iNOS*<sup>-/-</sup>B細胞からのIgA生産は野生型パイエル板DCあるいは小腸粘膜固有層DCとの共培養により回復した。

重要なことに、野生型マウスの腸管粘膜組織(パイエル板、腸間膜リンパ節、小腸粘膜固有層)にはTNF- $\alpha$ と*iNOS*を構成的に発現するDC(Tip-DC)が多く存在するのに対し、非粘膜組織である脾臓にはほとんど存在せず、また同細胞は腸内常在菌の刺激により生理的に誘導されることが判明した。さらにTip-DCを含む小腸粘膜固有層DCを*iNOS*<sup>-/-</sup>マウスに移入することにより血清および腸管内容物中のIgA生産レベルが著明に回復することが明らかとなった。この成果は、Nature誌に掲載された。

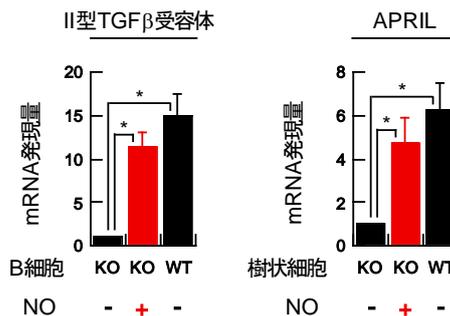


図1. *iNOS*欠損(KO)マウスのII型TGF- $\beta$ 受容体およびAPRIL発現は一酸化窒素(NO)の刺激により野生型(WT)マウスの発現レベルにまで回復する。

(2) IgA腎症発症機序における粘膜樹状細胞の重要性：野生型マウスと比較してIgA腎症自然発症(HIGA)マウスの血清IgAレベルは著しく増加していた。HIGAマウスのパイエル板におけるIgA<sup>+</sup>B細胞数は野生型マウスと同程度であったのに対して、小腸粘膜固有層におけるIgA<sup>+</sup>形質細胞数はHIGAマウスで著しく増加していた。一方、*in vitro*において、HIGAマウスのナイーブB細胞はTGF- $\beta$ +抗CD40抗体、APRILやBAFFの刺激に対してIgAをほとんど生産しなかった。この矛盾は、HIGAマウスにおけるIgA生産性B細胞のサブセットが野生型マウスと異なるためであると考え、現在この可能性について検討中である。

興味深いことに、HIGAマウスでは全身性に従来型DC(cDC)が減少しており、特に腸管粘膜組織のcDCはT細胞非依存性IgA生産誘導に重要なレチノイン酸の合成酵素の活性も著しく低下していた。その一方で、HIGAマウスの腸管粘膜組織では形質細胞様DC(pDC)の割合が増加していた。興味深いことに、野生型マウスの骨髓細胞から誘導したcDCあるいはpDCをナイーブB細胞と共培養したところ、pDCはcDCより

も効果的にIgA生産を誘導することが明らかとなった。また、腸管粘膜組織のpDCがHIGAマウスにおける高IgA生産誘導機構に重要であることを示唆する結果を得ており、今後詳細に解析していく予定である。

#### 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11件)

- ① Kuroda, S., Nishio, M., Sasaki, T., Horie, Y., Kawahara, K., Sasaki, M., Natsui, M., Matozaki, T., Tezuka, H., Ohteki, T., Förster, I., Mak, T.W., Nakano, T., and Suzuki, A., Effective clearance of intracellular *Leishmania major* in vivo requires Pten in macrophages. *Eur. J. Immunol.* 38, 1331-1340, (2008), 査読有
- ② 手塚裕之、安部由紀子、榑木俊聡、腸管における樹状細胞のトラフィッキングとIgA生産誘導機構、臨床免疫・アレルギー科、49、10-15、(2008)、査読無
- ③ 手塚裕之、安部由紀子、榑木俊聡、IgAクラススイッチを誘導するパイエル板樹状細胞、臨床免疫・アレルギー科、50、216-221、(2008)、査読無
- ④ 手塚裕之、安部由紀子、榑木俊聡、腸管粘膜樹状細胞によるIgAクラススイッチ制御-腸内常在菌の役割、医学のあゆみ、227、326-331、(2008)、査読無
- ⑤ 手塚裕之、安部由紀子、榑木俊聡、腸管でのIgA生産を司るTNF/iNOS生産性樹状細胞とその機能、生体の科学、59、268-274、(2008)、査読無
- ⑥ 手塚裕之、安部由紀子、榑木俊聡、消化管粘膜での免疫応答における樹状細胞の役割-小腸粘膜樹状細胞によるIgAクラススイッチ制御、実験医学、26、3236-3242、(2008)、査読無
- ⑦ 榑木俊聡、安部由紀子、手塚裕之、樹状細胞によるIgA生産誘導機構の新知見、炎症と免疫、16、209-214、(2008)、査読無
- ⑧ 安部由紀子、手塚裕之、榑木俊聡、粘膜樹状細胞によるIgAクラススイッチ誘導機構、感染・炎症・免疫、38、271-274、(2008)、査読無
- ⑨ Tezuka, H., Abe, Y., Iwata, M., Takeuchi, H., Ishikawa, H., Matsushita, M., Shiohara, T., Akira, S., and Ohteki, T., Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. *Nature*, 448, 929-933 (2007), 査読有
- ⑩ 手塚裕之、安部由紀子、榑木俊聡、樹状細胞

によるIgAクラススイッチ誘導機構、臨床免疫・アレルギー科、48、230-235、(2007)、査読無

- ⑪ 手塚裕之、安部由紀子、榑木俊聡、粘膜TiP-DCによるIgA生産誘導機構、臨床免疫・アレルギー科、47、619-624、(2007)、査読無

[学会発表] (計9件)

- ① Tezuka, H., Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. The 4th Stage Surface Barrier Immunology Study Group (SBARIS) 1st Meeting 「Immune Response at Mucosal Surface」, 2009年3月6日、東京
- ② 榑木俊聡、腸管粘膜組織におけるIgA生産調節機構。第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会シンポジウム「血球細胞の分化系譜」、2008年12月9-14日、神戸
- ③ Tezuka, H., Critical role for pDCs in mucosal T cell-independent IgA production. 第38日本免疫学会総会・学術集会、2008年12月1-3日、京都
- ④ Ohteki, T., Regulation of mucosal IgA production by dendritic cells. 第38日本免疫学会総会・学術集会 Symposium 5 Dendritic cell、2008年12月1-3日、京都
- ⑤ Tezuka, H., Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. 第37回日本免疫学会総会・学術集会Late breaking symposium, 2007年11月22日、東京
- ⑥ Tezuka, H., Abe, Y. and Ohteki, T. (2007) Regulation of IgA production by mucosal CCL2<sup>+</sup> dendritic cells. 第37回日本免疫学会総会・学術集会、2007年11月21日、東京
- ⑦ Inaba, M., Interleukin-15 regulates Th17 differentiation in collagen-induced arthritis. 第37回日本免疫学会総会・学術集会、2007年11月21日、東京
- ⑧ 榑木俊聡、IgA生産調節メカニズムの新知見。歯科基礎医学会シンポジウム、2007年8月30日、札幌
- ⑨ 榑木俊聡、TNF/iNOS生産樹状細胞によるIgA生産調節機構、第61回日本細菌学会東北支部総会、2007年8月23-24日、仙台

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.akita-u.ac.jp/~kisei/Default.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

手塚 裕之 (TEZUKA HIROYUKI)  
秋田大学・医学部・助教  
研究者番号：30375258

(2) 研究分担者  
(3) 連携研究者