

令和 6 年 3 月 3 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07614

研究課題名(和文) 腸管樹状細胞によるTGF- β 依存性クラススイッチ誘導機構の解明研究課題名(英文) Regulation of TGF- β -dependent class switching by intestinal dendritic cells

研究代表者

手塚 裕之 (Tezuka, Hiroyuki)

藤田医科大学・研究推進本部 オープンファシリティセンター・講師

研究者番号：30375258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：腸管粘膜に豊富に存在するTGF- β はIgAとIgG2bへのアイソタイプクラススイッチに必須であるが、パイエル板ではIgA、盲腸リンパ節ではIgG2bへのクラススイッチが優位に誘導され、部位ごとにTGF- β 依存性クラススイッチの方向性が異なることを見出した。またこの結果と相関するように、IgA生産誘導に特化した樹状細胞サブセットはパイエル板で優位であり、同サブセットの分化誘導を促す因子Xの生産量もパイエル板で高いことが判明した。ゆえに、同クラススイッチの方向性の違いは、樹状細胞の分化誘導を制御する微小環境に依存する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、腸管関連リンパ組織(GALT)の部位特異的な微小環境がB細胞の運命を決定する上で重要な役割があること、さらに同環境の構築は同所に存在する樹状細胞の機能に依存している可能性を示した。病原体の感染に対して、粘膜面では抗原特異的IgA、血中では特異的IgGを誘導する「粘膜ワクチン」が待望されている。本成果は、樹状細胞の人為的制御に基づく粘膜ワクチンの開発に資する可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：TGF- β , an abundant cytokine in the intestinal mucosa, is essential for isotype class-switching (CSR) into IgA and IgG2b in B cells. We found that IgA and IgG2b CSR are predominantly induced in the Peyer's patches and cecum patches, respectively. Consistent with this result, dendritic cell (DC) subsets that induce IgA-producing B cells were predominantly found in the Peyer's patches, where factor(s) X that induce the DC subsets were constitutively produced at high levels under steady-state conditions. Therefore, these findings suggest that the generation of DCs that differentially regulate TGF- β -dependent CSR in the intestine is dependent on their microenvironment.

研究分野：免疫学

キーワード：樹状細胞 TGF- β クラススイッチ 腸管関連リンパ組織 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

腸管粘膜に豊富に存在するトランフォーミング増殖因子(TGF)- β は、IgA および IgG2b へのアイソタイプクラススイッチに必須のサイトカインであるが、同所では IgA+B 細胞が優位に誘導されることが知られている。しかしながら、「なぜ腸管では、TGF- β シグナルを受容した B 細胞に IgA に偏向したクラススイッチが誘導されるのか」という疑問に対する十分な回答は、現在も得られていない。このなかで申請者は、腸管における IgA クラススイッチには腸管関連リンパ組織(GALT)の樹状細胞が重要な役割を演じていることを報告してきた(*Nature* 2007, **448**:929-933; *Immunity* 2011, **34**:247-257)。また申請者による予備的な検討から、盲腸リンパ節では IgA+B 細胞よりも IgG2b+B 細胞の頻度の方が高いことを見出している。このことは、TGF- β 依存性クラススイッチの方向性が GALT によって異なることを示している。

2. 研究の目的

申請者は、上述の疑問を解明する上で GALT の微小環境が重要であると推測した。本研究課題では、GALT に固有の微小環境構築に重要とされる樹状細胞に着目し、同所における TGF- β 依存性クラススイッチの方向性を決定する要因(細胞あるいは因子)を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス

BALB/c および *Foxn1*^{-/-}BALB/c マウスは日本クレアから購入した。*Rag2*^{-/-}BALB/c マウスは岡田誠治博士(熊本大学)より分与された。すべての動物実験は、藤田医科大学の動物実験委員会の審査・承認を経て遂行した。実験に当たっては、同大学動物実験指針を遵守した。

(2) 単核球細胞のフェノタイプ解析および単離

GALT(パイエル板および盲腸リンパ節)由来単核球細胞を表面分子抗原(B220、CD3 ϵ 、CD4、CD11c、CD19、CD25、CD103、IgA、IgG1、IgG2b、MHC class II、Siglec H、II 型 TGF- β 受容体など)および細胞内分子(Foxp3、TGF- β など)に特異的な蛍光標識抗体で染色し、フローサイトメトリー(Gallios および CytoFLEX)を用いて解析した。また、制御性 T 細胞および樹状細胞は、セルソーター(MoFlo Astrios および FACS Aria III)を用いて単離した。

(3) 細胞培養実験

GALT 由来単核球細胞をリポ多糖あるいはサイトカインの存在下あるいは非存在下で 24-72 時間培養した。培養上清中の免疫グロブリン(IgA、IgG1、および IgG2b)量およびサイトカイン(TGF- β)量は ELISA 法により定量した。

(4) 細胞移植実験

野生型マウスの末梢リンパ節から上記方法により単離した制御性 T 細胞を、胸腺依存性 $\alpha\beta$ T 細胞を欠損する *Foxn1*^{-/-}マウスに移植した。移植から 3 週間後の GALT における IgA+B 細胞および IgG2b+B 細胞の頻度を調べた。

4. 研究成果

(1) GALT における TGF- β 依存性クラススイッチ

GALT における IgA+B 細胞および IgG2b+B 細胞の頻度を調べた。予想されたように、パイエル板ではクラススイッチを終えた B 細胞のなかで IgA+B 細胞が優位であった。興味深いことに、盲腸リンパ節では、IgG2b+B 細胞が優位であり、GALT では部位ごとに TGF- β 依存性クラススイッチの方向性が異なることが明らかとなった(図 1, 論文投稿中のため未掲載)。



(2) GALT における TGF- β 環境の重要性

TGF- β 依存性クラススイッチの方向性は、TGF- β の局所濃度に依存する可能性が報告されている (*J.Exp.Med.*, 1993, 177:1031)。まず、GALT 由来単核球細胞から生産される潜在型 TGF- β 量を比較検討したところ、これらのリンパ節間に生産量の違いは認められなかった。この結果から、方向性の違いは B 細胞における TGF- β シグナルの受容能による可能性が考えられた。そこで、GALT 由来 B 細胞の II 型 TGF- β 受容体の発現量を比較したところ、同受容体の発現量も同等であった。

次いで、GALT 樹状細胞における潜在型 TGF- β を活性化型に変換するインテグリン $\alpha\nu\beta 8$ の発現量を調べた。その結果、インテグリンの発現量も同程度であった。

(3) TGF- β 依存性クラススイッチにおける制御性 T 細胞の重要性

制御性 T 細胞は、パイエル板における IgA クラススイッチに重要である。まず、GALT における Treg の頻度を比較検討したところ、これら間に差は認められなかった。野生型 BALB/c マウスの末梢リンパ節由来制御性 T 細胞を、T 細胞を欠損する *Foxn1*^{-/-} BALB/c マウスに移植し、3 週間後の GALT における IgA⁺B 細胞および IgG2b⁺細胞の頻度を調べた。その結果、パイエル板では IgA⁺B 細胞、盲腸リンパ節では IgG2b⁺細胞がそれぞれ優位に出現し、それらは野生型マウスの GALT でみられた頻度にまで回復した。

ここまでの検討から、TGF- β やその主要な生産源である制御性 T 細胞は、TGF- β 依存性クラススイッチの方向性を決定する要因ではないことが明らかとなった。

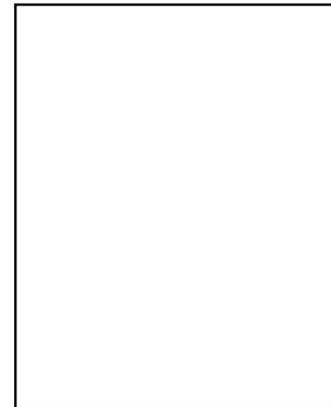


(4) TGF- β 依存性クラススイッチにおける樹状細胞の重要性

樹状細胞は GALT に高頻度で存在することや、B 細胞における IgA クラススイッチを直接誘導することが知られている。GALT の樹状細胞サブセット(従来型樹状細胞 cDC、形質細胞様樹状細胞 pDC)の頻度を比較検討したところ、パイエル板では IgA 生産誘導に特化した樹状細胞サブセットが優位であった。同様に、形質細胞様樹状細胞の頻度もパイエル板で高いことが判明した(図 2, 論文投稿中のため未掲載)。

(5) IgA 生産に特化した樹状細胞サブセットの制御機構

パイエル板では IgA 生産に特化した樹状細胞サブセットが誘導される環境が構築されていることが推測される。そこで、腸管粘膜に固有の因子(サイトカイン、栄養素、腸内細菌成分など)に着目し、IgA 生産誘導に特化した樹状細胞サブセットの誘導に重要な因子の探索を試みた。その結果、因子 X の生産量が盲腸リンパ節よりもパイエル板で高いことが明らかとなった(図 3, 論文投稿中のため未掲載)。重要なことに、盲腸リンパ節の樹状細胞を因子 X で刺激することで、同樹状細胞サブセットが選択的に誘導されることが明らかとなった。



これら一連の実験を通じて得られた結果から、因子 X 誘導性樹状細胞サブセットは TGF- β 依存性クラススイッチの方向性を決定する上で重要な役割を担うことが示された。腸管には IgA よりも IgG2b へのクラススイッチが優位に誘導される GALT も存在しており、この方向性の違いは、同樹状細胞サブセットの存在により説明される。GALT 樹状細胞の人為的制御は、粘膜面で病原体抗原特異的 IgA を、血中で同抗原特異的 IgG を誘導する「粘膜ワクチン」の開発に繋がることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Yamazaki Kyoka, Hoshi Masato, Tezuka Hiroyuki, Morita Nanaka, Hirayama Masaya, Sato Fumiaki, Yoshida Sayaka, Saito Kuniaki	4. 巻 47
2. 論文標題 D-allose enhances the efficacy of hydroxychloroquine against Lewis lung carcinoma cell growth by inducing autophagy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 117
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2022.8328	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sato Daisuke, Hamada Yusuke, Narita Michiko, Mori Tomohisa, Tezuka Hiroyuki, Suda Yukari, Tanaka Kenichi, Yoshida Sara, Tamura Hideki, Yamanaka Akihiro, Senba Emiko, Kuzumaki Naoko, Narita Minoru	4. 巻 15
2. 論文標題 Tumor suppression and improvement in immune systems by specific activation of dopamine D1-receptor-expressing neurons in the nucleus accumbens	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-022-00902-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 柴田侑依、日比谷睦子、手塚裕之	4. 巻 40
2. 論文標題 粘膜関連リンパ組織：粘膜免疫を司るリンパ装置	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 呼吸器内科	6. 最初と最後の頁 615-621
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Taniguchi-Ikeda Mariko, Koyanagi-Aoi Michiyo, Maruyama Tatsuo, Takaori Toru, Hosoya Akiko, Tezuka Hiroyuki, Nagase Shotaro, Ishihara Takuma, Kadoshima Taisuke, Muguruma Keiko, Ishigaki Keiko, Sakurai Hidetoshi, Mizoguchi Akira, Novitch Bennett G., Toda Tatsushi, Watanabe Momoko, Aoi Takashi	4. 巻 24
2. 論文標題 Restoration of the defect in radial glial fiber migration and cortical plate organization in a brain organoid model of Fukuyama muscular dystrophy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103140 ~ 103140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2021.103140	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Hoshi Masato, Kubo Hisako, Ando Tatsuya, Tashita Chieko, Nakamoto Kentaro, Yamamoto Yasuko, Tezuka Hiroyuki, Saito Kuniaki	4. 巻 5
2. 論文標題 3-Hydroxykynurenine regulates lipopolysaccharide-stimulated IL-6 production and protects against endotoxic shock in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ImmunoHorizons	6. 最初と最後の頁 523 ~ 534
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/immunohorizons.2100028	査読の有無 無
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 Setsu Takao, Hamada Yusuke, Oikawa Daisuke, Mori Tomohisa, Ishiujji Yozo, Sato Daisuke, Narita Michiko, Miyazaki Shogo, Furuta Eri, Suda Yukari, Sakai Hiroyasu, Ochiya Takahiro, Tezuka Hiroyuki, Iseki Masako, Inada Eiichi, Yamanaka Akihiro, Kuzumaki Naoko, Narita Minoru	4. 巻 534
2. 論文標題 Direct evidence that the brain reward system is involved in the control of scratching behaviors induced by acute and chronic itch	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 624 ~ 631
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.11.030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tashita Chieko, Hoshi Masato, Hirata Akihiro, Nakamoto Kentaro, Ando Tatsuya, Hattori Takayuki, Yamamoto Yasuko, Tezuka Hiroyuki, Tomita Hiroyuki, Hara Akira, Saito Kuniaki	4. 巻 26
2. 論文標題 Kynurenine plays an immunosuppressive role in 2,4,6-trinitrobenzene sulfate-induced colitis in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 World Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 918 ~ 932
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3748/wjg.v26.i9.918	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 Tezuka Hiroyuki, Ohteki Toshiaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Regulation of IgA production by intestinal dendritic cells and related cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1891
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.01891	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Adachi Takahiro, Yoshikawa Soichiro, Tezuka Hiroyuki, Tsuji Noriko M., Ohteki Toshiaki, Karasuyama Hajime, Kumazawa Toshihiko	4. 巻 38
2. 論文標題 Propolis induces Ca2+ signaling in immune cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience of Microbiota, Food and Health	6. 最初と最後の頁 141 ~ 149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12938/bmfh.19-011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計12件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 窪田悠力、毛利彰宏、國澤和生、長谷川眞也、倉橋仁美、小菅愛加、山本康子、手塚裕之、釘田雅則、長尾静子、齋藤邦明、鍋島俊隆
2. 発表標題 高食塩負荷による高血圧および情動・認知機能障害はPGE2/EP1-タウリン酸化シグナルが関与している
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Aika Kosuge, Kazuo Kunisawa, Hiroyuki Tezuka, Masato Hoshi, Nanaka Morita, Tomoki Kawai, Yasuko Yamamoto, Kuniaki Saito, Toshitaka Nabeshima, Akihiro Mouri
2. 発表標題 Involvement of cerebellum blood-brain barrier disruption in the depression-like behaviors induced by chronic social defeat stress
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 窪田悠力、國澤和生、長谷川眞也、倉橋仁美、手塚裕之、釘田雅則、長尾静子、齋藤邦明、鍋島俊隆、毛利彰宏
2. 発表標題 高食塩負荷による高血圧および情動・認知機能障害におけるPGE2/EP1シグナルの関与
3. 学会等名 第15回日本臨床検査学教育学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 牟田武尊、田中謙一、濱田祐輔、成田道子、佐藤大介、山下健介、手塚裕之、山中章弘、落合孝広、葛巻直子、成田年
2. 発表標題 C線維特異的知覚神経活性化制御による脾臓リンパ球における免疫変容解析
3. 学会等名 第144回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中謙一、濱田祐輔、牟田武尊、渡邊諒、成田道子、佐藤大介、手塚裕之、山中章弘、落合孝広、葛巻直子、成田年
2. 発表標題 悪性黒色腫移植担がんマウスにおける”痛み刺激”負荷による脾臓リンパ球の変化を伴った免疫変容の解析
3. 学会等名 第14回日本緩和医療薬学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 窪田悠力、毛利彰宏、國澤和生、長谷川眞也、倉橋仁美、山本康子、手塚裕之、釘田雅則、長尾静子、齋藤邦明、鍋島俊隆
2. 発表標題 高食塩負荷により惹起される高血圧および行動異常は末梢炎症反応を伴う
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Matsuda Yoshiko、Tezuka Hiroyuki、Imamura Ryoichi、Takahata Shiro
2. 発表標題 New everolimus administration targeting the prevention of the development of antibody-mediated rejection considering the comparison of growth and survival in IgG and IgG memory B cells.
3. 学会等名 The 2020 American Transplant Congress (ATC) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤大介、成田道子、濱田祐輔、手塚裕之、落合孝広、葛巻直子、山中章弘、成田年
2. 発表標題 側坐核中型有棘神経細胞が担う中枢性制御機構の解明
3. 学会等名 日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下健介、近藤貴茂、濱田祐輔、田中謙一、佐藤大介、飯塚麻純、清水遥奈、手塚裕之、山中章弘、葛巻直子、成田年
2. 発表標題 人為的な知覚神経の活性化に伴う末梢免疫細胞の質的变化
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 手塚 裕之
2. 発表標題 腸管樹状細胞によるIgA生産制御機構
3. 学会等名 第28回 内毒素・LPS研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田小莉、濱田祐輔、浅野克倫、成田道子、田村英紀、手塚裕之、山中章弘、葛巻直子、成田年
2. 発表標題 がん病態下における視床下部内活性化細胞の同定と脳-末梢免疫関連の解析
3. 学会等名 第140回 日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤大輔、渡邊萌、手塚裕之、濱田祐輔、成田道子、葛巻直子、山中章弘、成田年
2. 発表標題 鎮痛および脳内報酬発現に關与する脳領域におけるモルヒネ活性化細胞の細胞薬理学的同定と解析
3. 学会等名 第41回 日本疼痛学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

藤田医科大学 研究推進本部 総合医科学研究部門 オープンファシリティーセンター ホームページ
<https://www.fujita-hu.ac.jp/~kyoriken/>

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

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. 本研究に關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
---------	---------