

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16608

研究課題名(和文) Follicular dendritic cellによるIgE産生制御機構の解明

研究課題名(英文) the regulation of IgE production by follicular dendritic cells

研究代表者

國石 菜里(Kuniishi, Mari)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・助教

研究者番号：70804326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、リンパ節に存在する非造血系細胞Follicular dendritic cell(FDC)の、IgE抗体をはじめとする抗体産生に与える影響を解明することを目的とし、実験を行った。その結果、FDCを効率的に単離する方法、そしてB細胞との共培養実験にて、FDCの機能評価を行う手法を確立した。さらに、IgEではなくIgA抗体ではあるが、リンパ節ごとのFDCはIgA抗体の産生を促進することを明らかにした。また、環境が整えば、粘膜組織以外のFDCもIgA抗体産生を促進できる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FDCは免疫細胞や他の非造血系細胞に比べて単離が難しく、他の細胞の影響を考慮することなく、B細胞への直接的な影響についてはほとんど分かっていない。本研究結果は、FDCの機能を解析できる系を確立したことにより、FDCの抗体産生に与える機能の解析が可能になった点で、学術的意義は大きいと考える。また、現在免疫反応は、非造血系細胞が作り出す環境が血液細胞の機能を促進する上で重要なことが分かってきている。本研究は、様々な疾患で誘導される免疫反応がどのように非造血系細胞によって制御されるかその基礎的研究となり、社会的意義も大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed experiments to examine the effects of follicular dendritic cells (FDCs) in lymph nodes on the production of IgE antibodies and other antibodies. As a result, we established a method to isolate FDCs efficiently and to evaluate the function of FDCs in co-culture with B cells. Furthermore, we found that FDCs in each lymph node promote the production of IgA antibodies, although not IgE antibodies. We suggest that FDCs of mucosal tissues as well as FDCs of non-mucosal tissues might promote IgA antibody production if the environment is favorable.

研究分野：免疫

キーワード：FDC Antibody

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アレルギー性鼻炎などの I 型アレルギー疾患は、IgE 抗体が主体となる疾患である (Shamji, M. H. et al., Allergy, 2021)。アレルゲンが粘膜組織より生体内へ侵入すると、リンパ節内で B 細胞が IL-4 などの Th2 サイトカインによって IgE 抗体産生細胞が誘導され、分泌された IgE 抗体がアレルギー反応を惹起する。

Follicular dendritic cell (FDC) は、非造血系細胞で B 細胞の活性化が誘導されるリンパ節の胚中心に局在し、BAFF や CXCL13 などを産生し B 細胞の生存や活性化をサポートすることが知られている。一方で、IgE 抗体受容体を介して IgE 抗体の産生を負に制御することも報告されてきた。最近の報告では、様々なリンパ組織で FDC の発現分子や機能が異なることがわかってきているものの、IgE など抗体産生において、各リンパ組織の FDC が一様に制御されるかどうかについては未だ不明な点が多い。その理由の一つとして、FDC の回収、培養が難しいという点が挙げられる。FDC は、B 細胞などの血液細胞、他の非造血系細胞とは異なり、物理的・化学的な刺激に弱い。またリンパ組織における細胞集団の頻度が低いため、これまでの研究では、FDC を単離するために、マウスの様々なリンパ節をまとめて回収し、FDC を単離することが多かった。そのため、リンパ節ごとの FDC の機能の違いについてはほとんどわかっていないことが現状である。また、FDC で発現するマーカーはこれまでに報告されているが、特異的な転写因子やマーカーなどについては未だ分かっていないことが多く、他の細胞も一緒に欠損させたマウスで実験されることが多い。

そこで、本研究では、各リンパ組織の FDC が一様に IgE 抗体産生を制御しうるか明らかにするための実験系の確立として、各リンパ組織の FDC を回収すること、そして B 細胞とともに共培養することによって、FDC の機能評価を行うことを目的とした。それにより、IgE 抗体など抗体産生に与える影響を非造血系細胞の観点からの解明を目指す。

2. 研究の目的

本研究では、以下の点に関して研究課題を進めた。

- (1) 各リンパ組織の FDC を検出する系の確立
- (2) B 細胞と共培養し、抗体産生や B 細胞の活性化状態を検出することによる、各リンパ組織の FDC の機能の評価

3. 研究の方法

- (1) 各リンパ節における FDC 回収系の確立

BALB/c マウスのリンパ節の切片を作成し、FDC のマーカーとして知られる CD35 や FDC-M1 に対する抗体で FDC が検出できるかどうか検討した。さらに、マウスから FDC を単離するために、まず血液細胞を除去する目的で、前日に放射線照射(10Gy)を行った。その後、マウスより腸間膜リンパ節、顎下リンパ節、鼠径リンパ節をそれぞれ回収し、Collagenase D と DNaseI の酵素で処理を行った。単一細胞にした後、血液細胞マーカーである CD45 と、FDC のマーカーである CD35 などで染色した。細胞の回収は、セルソーターおよび、Magnetic Beads により FDC を単離した。

- (2) B 細胞との共培養実験

単離した FDC は、脾臓の B 細胞とともに、TGF-beta など IgA 誘導因子とともに共培養した。そ

の後、B細胞の活性化状態を評価するために、B220, CD138, GL7, IgA に対する抗体で染色後、フローサイトメトリーにて染色を行った。

4. 研究成果

(1) 各リンパ節における FDC 回収系の確立

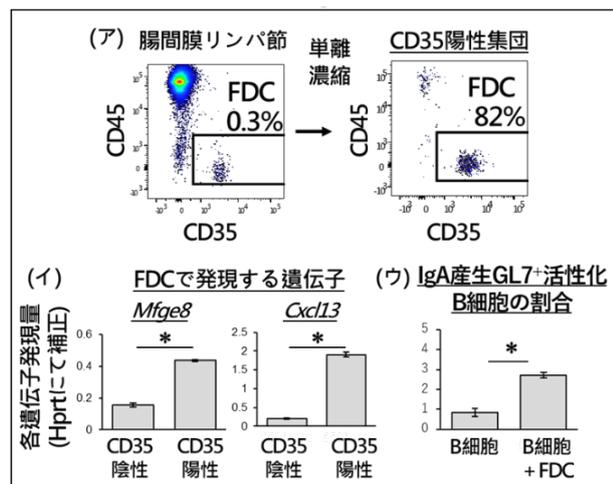
① マウスリンパ節の切片を用いた、FDC の検出

FDC (CD35+CD45⁻細胞) は様々な B 細胞の活性化に寄与することが報告されているものの、リンパ節の約 0.3%しか含まれない稀な細胞集団である。これまでの先行研究では、CD35 や FDC-M1 などの抗体が FDC の単離や特定に使用されてきた。そこで、まず、これらの抗体の中で、どの抗体が各リンパ節で一様に FDC を検出可能か検討した。マウスの腸間膜リンパ節、顎下リンパ節、鼠径リンパ節の切片をそれぞれ作成し、B220 とともに、CD35 や FDC-M1 で染色を行った。CD35 も FDC-M1 もともに、リンパ節の B 細胞領域 (B220 陽性) でのみ検出された。CD35 は非造血系細胞で観察される網状構造で染色されたが、FDC-M1 はほとんどが CD68 陽性の tingle body macrophage と共染色された。この結果から、我々は CD35 の抗体を各リンパ節における FDC を特定するための抗体として用いることにした。

② 次に、CD35 に対する抗体を用いて、

FDC を単離し、培養条件を検討した。血液細胞を除去する目的で行った放射線照射したマウスのリンパ節では、CD35 陽性細胞は、CD45 陰性であり、ほとんどが ICAM1+gp38⁻の非造血系細胞の集団であった (右図-ア)。これらの細胞を、セルソーターで単離することを試みたが、コラーゲンコートをした Dish で培養しても、これらの細胞は接着しなかった。このようにセルソーターでは、FDC と B 細胞の共培養による機能アッセイが難しいことが分かった。そこで、マグネティックビーズに切り替え、放射線照射マウスより CD35 陽性細胞を単離することにした。これらの細胞をコラーゲンコート

FDC単離方法の確立、
およびB細胞の共培養実験によるIgA+GL7⁺細胞の増加



(ア) FDC (CD45⁻CD35⁺細胞) は腸間膜リンパ節の全細胞中、0.3%存在し、抗CD35抗体により単離することでFDCを82%まで濃縮できた。

(イ) CD35陽性集団はFDCに発現する遺伝子を強く発現した

(ウ) B細胞とFDCを5日間、IgA誘導因子と共培養すると、フローサイトメトリーにて、IgA産生GL7⁺活性化B細胞の割合が増加した

した Dish に播種した結果、培養 5 日目にはほとんどの細胞が接着した。FDC はリンパ節あたり 1 万個に 1 個とかなり低い頻度で検出される。しかし、この方法ではおおよそ 80%までエンリッチすることに成功した (右図-ア)。さらに、FDC で発現する *Mfge8* や *Cxcl13* を mRNA レベルで検出でき、FDC であることを確認した (右図-イ)。

(2) B 細胞との共培養実験

当初の目的は、IgE 抗体の産生誘導に、リンパ節ごとの FDC がどのように寄与するかについて検討することであった。しかし、本研究で、アレルギーモデルマウスの作製が思うように上手く進まなかったこともあり、定常状態のマウスでの FDC の機能解析に切り替えて検討した。マウスでは、定常状態に IgE 抗体は微量しか検出されず、実験に用いることが難しいことから、これまで

に報告のあった IgA 抗体の制御機序について、腸間膜リンパ節と顎下リンパ節の FDC の機能の比較検討した。各リンパ節の FDC をそれぞれ脾臓の B 細胞と、IgA 抗体誘導因子とともに共培養したところ、FDC の存在下で、IgA+GL7+細胞が有意に増加した（前ページ-ウ）。また、腸間膜リンパ節、顎下リンパ節どちらの FDC もレチノイン酸の刺激を介して IgA 抗体産生を誘導することが分かった。定常状態のマウスでは、IgA 抗体は腸間膜リンパ節で常時検出されるものの、顎下リンパ節ではほとんど検出されない。このことから、リンパ節ごとの FDC のポテンシャルは同等であるが、FDC の環境がそろえば、FDC は IgA 抗体の制御が可能であることが示唆された。

これらの研究成果は、論文として、Hikosaka-Kuniishi M, et al., Immunol Lett. 2022, 243:53-60. にまとめることができた。

今後の展望

本課題では、リンパ組織ごとの FDC が異なる IgE 抗体産生の制御を行うかどうかについて検討するために、FDC の回収、B 細胞との共培養実験系を確立してきた。副次的な結果として、IgA 抗体の産生制御に関して、リンパ節ごとの FDC は環境がそろえば IgA 抗体の産生を誘導することができる可能性を、共培養実験の結果より示すことができた。本課題では、残念ながら IgE 抗体の産生機構へのリンパ節ごとの FDC の機能の比較には至らなかったものの、この研究を通じて、今後様々な I 型アレルギー疾患モデルマウスを用いて、FDC が IgE 抗体の制御をリンパ組織ごとに異なる制御をしているかどうかについて明らかにしたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hikosaka Kuniishi Mari, Ishii Naoto, So Takanori	4. 巻 3
2. 論文標題 Role of tumor necrosis factor receptor-associated factor 5 in B- and T-lymphocytes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Exploration of Immunology	6. 最初と最後の頁 40～55
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.37349/ei.2023.00088	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 Hikosaka-Kuniishi Mari, Yamane Toshiyuki, Isono Kana, Tetteh Doris Narki, Yamazaki Hidetoshi	4. 巻 243
2. 論文標題 Isolation of CD35+ follicular dendritic cells and its role in the differentiation from B cells to IgA+GL7+ cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Immunology Letters	6. 最初と最後の頁 53～60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.imlet.2022.02.005	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 Ito Chie, Hikosaka-Kuniishi Mari, Yamazaki Hidetoshi, Yamane Toshiyuki	4. 巻 79
2. 論文標題 Multiple cell populations generate macrophage progenitors in the early yolk sac	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Life Sciences	6. 最初と最後の頁 159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00018-022-04203-7	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 Isono K., Takahashi E., Miyoshi I., Tsuneto M., Hikosaka-Kuniishi M., Yamane T., Yamazaki H.	4. 巻 100
2. 論文標題 Simultaneous Fluorescent Identification of Odontoblasts and Ameloblasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 532-541
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0022034520974576	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11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Mari Hikosaka-Kuniishi, Toshiyuki Yamane, Doris Narki Tetteh, Hidetoshi Yamazaki
2. 発表標題 The role of isolated CD35+ follicular dendritic cells in the differentiation from B cells to IgA+ GL7+ cell
3. 学会等名 The 51st Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Doris Narki Tetteh, Hidetoshi Yamazaki, Mari Hikosaka-Kuniishi
2. 発表標題 Neural crest-derived mesenchymal cells support thymic regeneration after lethal irradiation
3. 学会等名 The 51st Annual Meeting of The Japanese Society for Immunolog
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mari Hikosaka-Kuniishi, Toshiyuki Yamane, Hidetoshi Yamazaki
2. 発表標題 Follicular dendritic cell-mediated enhancement of the differentiation into IgA+GL7+ cells
3. 学会等名 the 50th annual meeting of the japanese society for immunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 國石(彦坂) 茉里、磯野 加奈、山崎 英俊
2. 発表標題 リンパ節ストローマ細胞Follicular dendritic cellによるレチノイン酸を介したIgA抗体制御機序の解明への試み
3. 学会等名 第2回 Winter Dental Meeting in Tsu (ウインターデンタルミーティングin津)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 磯野 加奈、國石(彦坂) 茉里、山崎 英俊
2. 発表標題 エナメル質形成不全マウス (Amelx) 及び象牙質形成不全マウス (DsppGFP/GFP) を用いたエナメル質及び象牙質の構造解析の試み
3. 学会等名 第2回 Winter Dental Meeting in Tsu (ウィンターデンタルミーティングin津)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 國石 (彦坂) 茉里、磯野加奈、山崎英俊
2. 発表標題 リンパ組織支持細胞Follicular dendritic cellによる粘膜免疫に関わるIgA抗体制御機構解明の試み
3. 学会等名 第1回Winter Dental meeting in 津 (第48回三重歯科・口腔外科学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 磯野加奈、國石 (彦坂) 茉里、山崎英俊
2. 発表標題 Amelx欠損及びDspp遺伝子欠損マウスの歯のCT解析
3. 学会等名 第1回Winter Dental meeting in 津 (第48回三重歯科・口腔外科学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mari Hikosaka-Kuniishi, Toshiyuki Yamane, Hidetoshi Yamazaki
2. 発表標題 Involvement of follicular dendritic cells in each LNs with IgAproduction
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshiyuki Yamane, Mari Hikosaka-Kuniishi, Hidetoshi Yamazaki
2. 発表標題 Multiple cell populations generate macrophage progenitors in the early yolk sac
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Doris Narki Tetteh, Mari Hikosaka-Kuniishi, Toshiyuki Yamane, Hidetoshi Yamazaki
2. 発表標題 The role of Neural crest-derived cells in thymic regeneration
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 國石(彦坂)茉里, 磯野加奈, 山崎英俊
2. 発表標題 粘膜免疫に関与するリンパ節支持細胞 follicular dendritic cellの検出の試み
3. 学会等名 第47回 三重歯科・口腔外科学会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------