様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成２４年　５月１５日現在

機関番号：１４５０１
研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2009～2011
課題番号：２１５９０８１１
研究課題名（和文）　IgG-Fc 受容体を介した免疫複合体の細胞内輸送システムと免疫制御機構の解明
研究課題名（英文）　Elucidation of the cellular transport system of immune-complex via the IgG-Fc receptor and its immune regulation mechanism
研究代表者
吉田　優（YOSHIDA　MASARU）
神戸大学・医学研究科・准教授
研究者番号：００４１９４７５

研究成果の概要（和文）：
本研究では、粘膜下に存在する抗原提示細胞が発現するFcγRやFcRnが抗原・IgG複合体の取り込みから抗原提示機能にどのように関わっているのかを検討した。その結果、抗原・IgG複合体は樹上細胞表面でFcγRを介して取り込まれ、エンドソームで離散、FcRnと結合すること、また、FcRn を欠損させることにより抗原提示能が低下する可能性を見出すことができた。これらの研究により、病原微生物に対する宿主の応答機構や粘膜免疫応答に対して、FcRnによるIgG、抗原・IgG複合体輸送、粘膜下の抗原提示細胞に発現するFcγRが大きく関わっている可能性を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：
In this study, I examined how FcγR and FcRn expressing on antigen presenting cells existing in the mucous membrane were concerned with the antigen presenting functions from the uptake of the antigen-IgG complex. As a result, the antigen-IgG complex was taken through FcγR in cell surface, and then was disintegrated in endosome, followed by being combined with FcRn. In addition, this study revealed the possibility that the antigen presenting ability was decreased by a loss of the FcRn functions. Therefore, the transport of IgG and the antigen-IgG complex, and FcγR expressing on antigen presenting cells existing in the mucous membrane may be associated with responsive mechanisms and mucous membrane immunoresponse of the host against the pathogenic microbes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総　計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学
キーワード：FcRn・IgG・胞内輸送システム・免疫・病原微生物

１．研究開始当初の背景

本研究では、FcRn の抗原提示機能における役割、ならびに、FcRn の双方向性 IgG 輸送におけるクラスリンアダプター蛋白 AP1B と低

分子G蛋白rab8の役割を検討した。

①分泌型IgAやIgGなどの免疫グロブリンは粘膜面から感染する病原性微生物に対する生体防御に役立っている。分泌液中には、多量のIgAやIgGが存在しており、polymeric immunoglobulin 受容体 (pIgR；IgAの輸送) やNeonatal Fc receptor for IgG (FcRn；IgGの輸送)によりこれらの免疫グロブリンは腸管内に輸送される。この pIgR を介した IgA の分泌機構とIgAの役割についてはよく研究されているが、上皮を超えたIgGの分泌機構、ならびに、その抗原提示細胞における役割についてはまだよく知られていない。IgG-Fc受容体として、上皮を介して IgG や抗原・IgG 複合体を輸送するFcRn、また、抗原提示細胞に発現する Fcγ受容体(FcγR)がある。FcRnは、げっ歯類新生児期の小腸腸管上皮に発現し、母体から新生児にIgGを輸送する受容体分子として同定された。FcRnはMHCクラスI関連分子で、糖鎖がついたheavy chainとβ2-microglobulin(β2m)より構成されている (Simister NE et al. Nature, 337,184-7, 1989)。IgAの受容体であるpIgRの単方向性の輸送 (basal to apical) と異なりFcRnは双方向性にIgGを輸送すること、ヒト、および、げっ歯類の腸管上皮細胞だけでなく肝臓・肺・血管内皮細胞などに終生発現することが知られている。これまで申請者は細胞モデルを用いて、FcRn の成熟にはβ2m が必要であること、IgG を双方向性に輸送すること (J Biol Chem. 277, 28038, 2002)、個体モデルを用いて FcRn が管腔側へ IgG を輸送するだけでなく、IgG・免疫複合体を管腔側から粘膜下に存在する樹状細胞に輸送し，CD4陽性T細胞を活性化することを明らかにしてきた(Immunity 20,769-83,2004)。さらに、マウス病原性大腸菌モデルであるCitrobacter rodentium を用いて，細菌特異的 IgG 抗体が上皮細胞に発現する FcRn 依存的に腸管内へ分泌され、また、細菌特異的にCD4陽性T細胞を活性化して、感染を制御することを明らかにした(Yoshida M et al. J Clin Invest. 116, 2142 – 2151, 2006).そこで本研究では、FcRnの抗原提示機能における役割ならびにFcRnの双方向性 IgG 輸送におけるクラスリンアダプター蛋白 AP1B と低分子G蛋白rab8の役割を検討した。

２．研究の目的

申請者は世界に先駆けて FcRn による分泌液中への IgG の輸送、ならびに、抗原・IgG 免疫複合体の取り込み機構を明らかにし、また、取り込まれた抗原が粘膜関連リンパ組織で抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞を抗原特異的IgG依存的に活性化し、C. rodentium感染症を制御することを明らかにしてきた。このIgG を介した制御機構には、IgG のサブクラスならびに粘膜下に存在する抗原提示細胞が発現する Fcγ受容体が関与していると考えられている．Fcγ受容体には、刺激性シグナルをもった FcγRI、FcγRIIA、FcγRIII、FcγRⅣ、ならびに、抑制性シグナルを持つFcγRIIBがあり、これらの受容体が抗原・IgG複合体を取り込む際に、抗原提示細胞を刺激または抑制し、下流の免疫応答を制御していることが示唆される。そこで、刺激性の Fcγ受容体の下流のシグナル伝達分子であるFcγRγ鎖欠損マウス、ならびに、抑制性のFcγRIIB 欠損マウスを用いて、C.rodentium感染症における抗原提示細胞に発現する Fcγ受容体の意義を検討した。FcγRγ鎖欠損マウスは樹状細胞に刺激性シグナルが伝わらず、腸管内外に存在する細菌に結合したIgG複合体の貪食能の低下、細菌性抗原・IgGの複合体の取り込みならびに抗原提示を効率よく行うことができないため、C. rodentium 感染症に対して感受性が高く、反対に FcγRIIB 欠損マウスは感受性が低いことを明らかにした（Infect Immun 2008 Apr;76(4):1728-37.)。

これまで Fc 受容体を介した免疫複合体の取り込みは樹状細胞の成熟を誘導し、CD4 陽性T 細胞に効率よい抗原提示が行われることが知られている。FcγR により取り込まれた抗原・IgG複合体が、エンドソームでFcRnと会合することで，抗原提示を制御している可能性がある。そこで、活性型 Fc 受容体を介して取り込まれた免疫複合体が抗原提示される経路に FcRn がどのように関わっているのかを検討した (目的 1)。目的 2 では、FcRnにおける双方向性の IgG 輸送の分子機序を、クラスリンアダプター複合体で上皮細胞特異的に発現するAP1B、ならびに、低分子G蛋白であるrab8を中心にMDCKモデルと遺伝子改変マウスモデル(rab8、AP1B 欠損マウス)を用いて検討する。AP1B は apical からbasolateral方向への、またrab8はFcRnによる basolateral から apical 方向への IgG輸送に関わっていると予想している。本研究により、IgG が粘膜から侵入してくる病原体に如何なる場所でどのような受容体を用いて，生体防御に関わっているのかが明らかになるものと期待される。以上のように、本研究では、病原微生物に対する宿主の応答機構や粘膜免疫応答をFcRnによるIgG、抗原・IgG複合体輸送，粘膜下の抗原提示細胞に発現するFcγRを中心に解明し，感染症や粘膜免疫応答におけるIgGの役割を包括的に検討することを目的としており、独創性が高いと考えられる。

３．研究の方法

病原性大腸菌感染症は不適切に処理された牛肉などの経口摂取により引き起こされ，乳幼児や高齢者では重症にいたる消化管感染症である(Sao Paulo Med. J. 118,21-9, 2000)。これらはAttaching and effacing (A/E) 付着により消化管上皮細胞に接着することにより腸管上皮細胞に炎症を引き起こすことが知られている(Cell. 91,511-20, 1997)。C. rodentium は病原性大腸菌類似菌で、A/E付着によりマウスの腸上皮細胞に接着し消化管上皮細胞に炎症を誘導することから、ヒト病原性大腸菌感染症のマウスモデルとしてよく研究されている。その後、CD4陽性T細胞、ならびに、B細胞がその感染除去に重要であること(Infect Immun 71,5077-86, 2003)、IgA欠損，2量体IgA欠損、分泌型IgA欠損、ならびに、IgM欠損マウスにおいても菌体除去可能であること、さらに抗C.rodentium IgG抗体投与は、便中の菌量ならびに致死率を軽減させることなどが明らかにされている (J Immunol. 172,433-41,2004, Infect Immun 72,3315-24, 2004)。これらより、CD4陽性T細胞によって刺激をうけたB細胞が形質細胞に分化し、産生されたIgGが感染防御に対して有効であることが示唆されている。
これまでに申請者は、作成した腸管上皮細胞特異的FcRn過剰発現マウス、ならびに、FcRn欠損マウスを用いて感染実験を行い、FcRnがIgGを分泌、また、細菌抗原・IgG複合体を輸送してCD4陽性T細胞を活性化することで、C.rodentium感染症を制御していることを明らかにした。FcRnにより分泌されたIgGが粘膜内外で細菌性抗原と免疫複合体を形成し、粘膜下に存在するマクロファージや抗原提示細胞の発現するFcγRを介して下流の免疫応答を制御すると考えられる．Fcγ受容体には、刺激性シグナルをもったFcγRI、FcγRⅢA、ならびに、抑制性シグナルを持つFcγRⅡBがあり、これらの受容体が抗原・IgG複合体を取り込む際に、抗原提示細胞を刺激または抑制し、下流の免疫応答が制御されると考えられる。本研究では、粘膜下に存在する抗原提示細胞が発現するFcγR、FcRnが抗原・IgG複合体の取り込みから抗原提示機能にどのように関わっているのかを検討した。

① FcRnの抗原提示機能における役割

これまでに樹状細胞が活性型Fcγ受容体を介して抗原･IgG複合体が取り込まれると、成熟を誘導し、CD4陽性T細胞に効率よい抗原提示が行われること、また、抑制性Fcγ受容体はその作用を抑制することが知られている。興味深いことにこれら樹状細胞の表面に発現するFcγRはpH7.4で抗原・IgG複合体と結合し、エンドサイトーシスによってとりこまれること、また、酸性化が強いearly endosomeではpHが6.0以下であり、ここでは抗原・IgG複合体とFcγRは離散し、FcRnと抗原・IgG複合体が結合することを予備実験で確認している。そこで、FcRnがこの樹状細胞内への抗原・IgG複合体の取り込みと細胞内輸送、抗原提示細胞の分化、成熟、CD4陽性T細胞への抗原提示能がどのように異なるかを検討する。

方法；活性型、ならびに、抑制型FcγRとFcRnの2重欠損マウス、ならびに、それぞれの欠損マウスの骨髄細胞から樹状細胞を分化させた。FITCラベルしたOVAと抗OVA IgG抗体を用いて、その抗原の運命を共焦点顕微鏡で観察した。また抗原パルス後、表面マーカーであるClass II抗原、ならびに、CD86の発現、また、TLR刺激によるIL-12、IL-10の産生量を検討し、樹状細胞の分化・成熟、ならびに、機能を解析する。また、抗原をパルス後、OVA特異的CD4陽性T細胞を移入したマウスの足底部に免疫し、72時間後、所属リンパ節よりリンパ球を精製し、抗原特異的サイトカイン産生能(IFN-γ，IL-4)を測定した。

② FcRnによるIgGの双方向性輸送におけるクラスリンアダプター蛋白AP1Bと低分子G蛋白rab8の役割

これまで申請者はFcRn発現MDCK細胞を作成し，トランスウェルシステムを用いて双方向性のIgG、IgG・抗原複合体の双方向性輸送を明らかにしている(Yoshida M et al. Immunity 20,769-83,2004)。しかしながら、どのようにFcRnがIgG、ならびに、IgG・抗原複合体の輸送を規定しているのかは明らかでない。これまでに我々は上述のMDCKモデルを用いて、FcRnによる輸送は、IgG単独では管腔側への分泌方向 (apical側) が優位であり、また抗原・IgG複合体では、粘膜下への輸送 (basolateral側) と管腔側が同程度であるであるという結果を予備実験で得ており、これはFcRnがIgGを分泌することで管腔内の抗原を取り込むという仮説を支持するものである。しかしながらFcRnがどのような分子を介して、IgG、ならびに、IgG・抗原複合体の輸送を制御しているのかは明らかでない。トランスゴルジネットワーク・エンドソームを介した小胞輸送においてはAP複合体、SHARE蛋白、ならびに、低分子G蛋白(rab)等がその輸送蛋白質の選別および輸送の方向性を決定する重要な因子であることが知られている。特に上皮細胞におけるbasolateral側への輸送においては、上皮細胞特異的に発現するクラスリンアダプター蛋白であるAP1Bが(J.Biochem. 139：943-948, 2006)、またapical側への輸送では、rab8

(Nature. 2007 Jul 19;448(7151):366-9.) が重要な役割を果たしていることが示唆されている。また、rab8 は AP1B 複合体と相互作用することで、basolateral 側への輸送を阻害する (J Cell Biol. 2003 Oct 27;163(2):339-50.) ことも知られており、これらの蛋白が FcRn による IgG、ならびに、IgG・抗原複合体の輸送を制御している可能性がある。本研究では, IgG の双方向性輸送における分子機序を明らかにする目的で、低分子 G 蛋白である rab8、ならびに、クラスリンアダプター複合体で上皮細胞特異的に発現する AP1B を中心に MDCK モデルと遺伝子改変マウスモデル(rab8、AP1-B 欠損マウス)を用いて検討した。

②-1：FcRn による apical から basolateral 方向への IgG 輸送における AP1B の役割

方法；HA Tag 付き FcRn 発現 MDCK 細胞ならびにコントロール MDCK 細胞をトランスウェル上に撒いた。ウサギ IgG (100 μg/ml) を apical、もしくは、basal リザーバーに投与して IgG の輸送を観察した。AP1B と FcRn の相互作用、ならびに、双方向性の IgG 輸送に関わっているかどうかを AP1B の過剰発現株、または、siRNA、ならびに、ドミナントネガティブコンストラクトを用いた AP1B 欠損株にて検討した。さらに、AP1B 欠損マウスに rabbit IgG を経口、または、静脈投与し、経時的 (投与前、4 時間後) に採血、腸内分泌液、ならびに、腸管上皮組織を採取し、rabbit IgG 特異的 ELISA による血中ならびに腸分泌液中の IgG 濃度の測定と腸管上皮細胞の免疫染色にて IgG の局在を検討した。

②-2：FcRn による basolateral から apical 方向への IgG 輸送における rab8 の役割

上記の AP1B に関する検討と同様な実験を、rab8 に関して実施した。

４．研究成果

生後 1 週目のマウスに rabbit IgG を経口投与し、経時的に小腸組織ならびに血清を採取した。投与された rabbit IgG の小腸組織における局在を抗 rabbit IgG 特異的抗体を用いた免疫染色で､また､血清中の rabbit IgG 濃度を rabbit IgG 特異的 ELISA システムを確立し、検討した。その結果、FcRn 欠損マウス、ならびに、AP1B 欠損マウスでは、どちらも経口投与された rabbit IgG の apical 側から basolateral 側への輸送が有意に阻害されていた。ともに小腸上皮細胞レベルでの輸送障害が免疫染色にて予想される。これら結果より､apical から basolateral 方向の IgG の輸送には、FcRn と AP1B が協調的に働いていることが示唆された。一方、Rab8 についても同様な検討を行ったものの、IgG 輸送へのかかわりを示す実験結果が得られなかった。

次に、粘膜下に存在する抗原提示細胞が発現する FcγR や FcRn が抗原・IgG 複合体の取り込みから抗原提示機能にどのように関わっているのかを検討した。その結果、抗原・IgG 複合体は樹上細胞表面で FcγR を介して取り込まれ、エンドソームで離散、FcRn と結合すること、また、FcRn を欠損させることにより抗原提示能が低下する可能性を見出すことができた。これらの研究により、病原微生物に対する宿主の応答機構や粘膜免疫応答に対して、FcRn による IgG、抗原・IgG 複合体輸送、粘膜下の抗原提示細胞に発現する FcγR が大きく関わっている可能性を示すことができたことから、今後、実際の感染症や粘膜免疫応答における IgG の役割をより詳細に検討していく必要があると考える。

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 6 件)

1. Ben Suleiman Y, Yoshida M, Nishiumi S, Tanaka H, Mimura T, Nobutani K, Yamamoto K, Takenaka M, Aoganghua A, Miki I, Ota H, Takahashi S, Matsui H, Nakamura M, Blumberg RS, Azuma T. Neonatal Fc receptor for IgG (FcRn) expressed in the gastric epithelium regulates bacterial infection in mice. Mucosal Immunol. 2012 Jan;5(1):87-98.

2. Nakata K, Kobayashi K, Ishikawa Y, Yamamoto M, Funada Y, Kotani Y, Blumberg RS, Karasuyama H, Yoshida M, Nishimura Y. The transfer of maternal antigen-specific IgG regulates the development of allergic airway inflammation early in life in an FcRn-dependent manner. Biochem Biophys Res Commun. 2010 Apr 30;395(2):238-43.

3. Yamamoto M, Kobayashi K, Ishikawa Y, Nakata K, Funada Y, Kotani Y, Masuda A, Takai T, Azuma T, Yoshida M, Nishimura Y. The inhibitory effects of intravenous administration of rabbit immunoglobulin G on airway inflammation are dependent upon Fcγ receptor IIb on CD11c(+) dendritic cells in a murine model. Clin Exp

Immunol. 2010 Nov;162(2):315-24.

4. Kuo TT, Baker K, Yoshida M, Qiao SW, Aveson VG, Lencer WI, Blumberg RS. Neonatal Fc receptor: from immunity to therapeutics. J Clin Immunol. 2010 Nov;30(6):777-89.

5. Baker K, Qiao SW, Kuo T, Kobayashi K, Yoshida M, Lencer WI, Blumberg RS. Immune and non-immune functions of the (not so) neonatal Fc receptor, FcRn. Semin Immunopathol. 2009 Jul;31(2):223-36.

6. Kobayashi K, Qiao SW, Yoshida M, Baker K, Lencer WI, Blumberg RS. An FcRn-dependent role for anti-flagellin immunoglobulin G in pathogenesis of colitis in mice. Gastroenterology. 2009 Nov;137(5):1746-56.e1.

〔学会発表〕（計１件）

1. 吉田　優. 消化管免疫機構の制御と破綻. 第54回 日本リウマチ学会総会・学術集. 2010年4月22-24日. 神戸

〔図書〕（計０件）

http://www.med.kobe-u.ac.jp/gi/index.htm

６．研究組織

(1)研究代表者

吉田　優（YOSHIDA　MASARU）
神戸大学・医学研究科・准教授
研究者番号：００４１９４７５