

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790459

研究課題名（和文） 形質細胞様樹状細胞による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 plasmacytoid dendritic cells and its therapeutic application for IgA nephropathy

研究代表者

手塚 裕之 (TEZUKA HIROYUKI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：30375258

研究成果の概要（和文）：申請者は、腸管関連リンパ組織(GALT) に存在する形質細胞様樹状細胞(pDC)が従来型樹状細胞(cDC)よりもIgA生産誘導に優れており、この性質はpDCに優位に発現するサイトカインAPRILやBAFFに依存していること、さらにこの誘導機構には腸内常在菌依存性にGALTストローマ細胞から生産されたI型インターフェロンによる“粘膜型”pDCへのコンディショニングが重要であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： We here showed that plasmacytoid dendritic cells (pDCs) present in the gut-associated lymphoid tissues (GALT) induced substantially higher amounts of IgA production by B cells than conventional dendritic cells (cDCs). The pDC-mediated IgA production was dependent on APRIL and BAFF. Moreover, pDC expression of APRIL and BAFF was dependent on commensal bacteria-dependent type I IFNs production by GALT stromal cells under steady-state conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫

キーワード：IgA, IgA腎症, plasmacytoid DC, Tip-DC, type I IFN

1. 研究開始当初の背景

腸管粘膜は、常時、膨大な数の腸内常在菌に曝されている。また、病原体のほとんどは粘膜を介して感染することが知られている。粘膜面では、これら微生物の刺激依存性に分泌型IgAを生産し、微生物の粘膜上皮細胞への付着・定着や末梢組織への移行を防御している。近年、従来の注射型ワクチンに替わる粘膜ワクチンが注目されており、その最大の魅力は粘膜面に抗原特異的IgA生産を誘導し、感染そのものを防ぐことである。故に、いか

にして粘膜面にIgAを生産させるかが、粘膜ワクチンの実用化の鍵となってくる。一方、IgA生産の破綻はIgA腎症などのIgA関連疾患の発症に繋がることが知られている。しかしながら、IgA生産が粘膜組織で他のリンパ組織よりも効率的に誘導される分子機構や、腸内常在菌がどのようにしてこの誘導機構に関与しているのかなど不明な点が多く、これら機構の解明は粘膜ワクチンやIgA関連疾患の治療法を開発する上で重要である。

IgA生産にはB細胞におけるクラススイッ

チが重要であるが、腸管粘膜にはその誘導部位であるパイエル板や腸間膜リンパ節から構成される腸管関連リンパ組織(GALT)が存在する。IgA クラススイッチは T 細胞依存性経路と非依存性経路に大別され、前者は T 細胞上の CD40 リガンドと TGF- β の刺激により、後者は樹状細胞(DC)の生産する APRIL、BAFF、およびビタミン A の代謝産物であるレチノイン酸の刺激により、ナイーブ B 細胞に IgA クラススイッチが誘導される。このなかで申請者は、TNF α と iNOS を発現する DC(Tip-DC)が常在菌依存性に GALT に誘導され、同細胞から生産される一酸化窒素が B 細胞の TGF- β 受容体や、DC からの APRIL/BAFF の発現誘導を介して、IgA クラススイッチを誘導することを報告した(Nature 2007)。

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ているのか？」という問いに対する答えは得られていない。上述のように、IgA 生産には常在菌刺激依存性に活性化された DC が重要である。DC は従来型 DC(cDC) と形質細胞様 DC(pDC)に大別され、いずれのサブセットも GALT に存在しているが、GALT における pDC の役割はほとんど明らかにされていない。また、GALT DC が IgA クラススイッチを促すという報告は多数あるものの、DC サブセット毎の IgA 生産誘導能に関する報告は皆無である。本研究課題では、T 細胞非依存性 IgA 生産誘導機構における DC サブセットの貢献度について検討をおこない、その分子基盤を解明することを目的とする。本研究成果は IgA 腎症の予防法・治療法の確立や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) 細胞培養実験：野生型マウスおよび I 型インターフェロン受容体欠損(IFNAR1^{-/-})マウスの GALT(腸間膜リンパ節(MLN)とパイエル板)から cDC および pDC を単離し(Tip-DC は含まれない)、それぞれナイーブ B 細胞と 7 日間共培養し、培養上清中に生産された IgA 量を ELISA 法にて測定する。
- (2) IgA クラススイッチに関わる分子の発現：GALT cDC および pDC を単離し、APRIL、BAFF、レチノイン酸合成酵素(ALDH)の遺伝子発現レベルを qPCR 法にて測定する。
- (3) 免疫細胞のフェノタイプ解析：GALT から単核球細胞を調製し、蛍光標識抗体で染色後、フローサイトメーターを用いて解析する。
- (4) 蛍光免疫組織化学染色：GALT の凍結組織切片を作製し、I 型 IFNs、免疫細胞のマーカーである CD45.2、ストローマ細胞のマーカーである ER-TR7 に対する蛍光標識抗体

で染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察する。

- (5) 細胞移入実験：野生型マウスの末梢リンパ節から単離した pDC を、IFNAR1^{-/-}マウスに移入し、2 週間後の血清および糞便中の IgA 量を測定する。

4. 研究成果

- (1) IgA 生産誘導における DC サブセットの貢献度：GALT cDC、pDC、およびその対照として末梢リンパ節(PLN)の pDC をナイーブ B 細胞と共培養したところ、GALT pDC は GALT cDC や PLN pDC よりも効率的に IgA 生産を誘導することが判明した(図 1)。

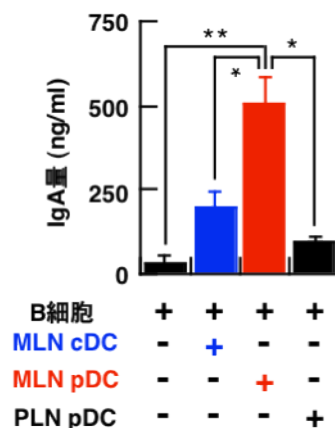


図1. 腸間膜リンパ節(MLN)のpDCはその他のDCサブセットよりも効率的にIgA生産を誘導する。

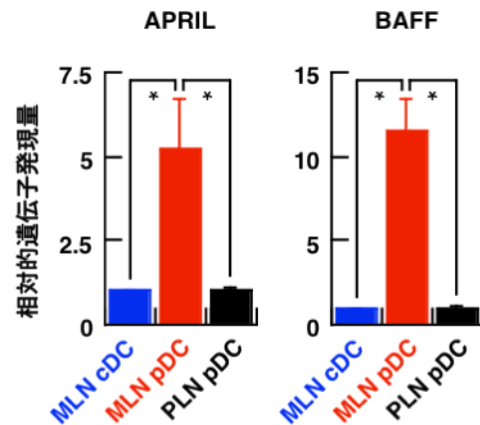


図2. 腸間膜リンパ節(MLN)のpDCにおける優位なAPRILおよびBAFF発現。

また、この結果と相関するように、GALT pDC による APRIL/BAFF 発現はその他の DC サブセットと比較して著しく亢進していた(図 2)。また、上記培養系に、APRIL/BAFF を中和するデコイ受容体 TACI-Ig および BCMA-Ig を添加することで、pDC による

IgA 生産は著しく抑制された。さらに、ALDH の遺伝子発現や酵素活性を調べたところ、同発現や活性は GALT cDC のみに認められた。(2) pDC と B 細胞によるクロストーク機構：pDC と B 細胞間のクロストークを明らかにする目的で、これら細胞間の接触を妨げる Transwell プレートを用いた共培養実験をおこなった。その結果、細胞間接触を阻害することで、GALT pDC による IgA 生産は著しく抑制されたのに対して、cDC による IgA 生産にはほとんど影響しなかった。このことから、pDC による IgA 生産誘導には pDC 上の膜結合型 APRIL/BAFF 依存性であることが推測されたので、同発現について調べた。その結果、膜結合型 APRIL/BAFF 発現は pDC のみに認められた。したがって、pDC による IgA 生産誘導には膜結合型 APRIL/BAFF を介した細胞間接触が重要であることが判明した。

(3) I 型インターフェロンによる pDC コンディショニング：GALT pDC による APRIL/BAFF 発現誘導機構を明らかにする目的で、これら遺伝子発現に重要なサイトカインとして知られている I 型インターフェロン(IFNs)に着目した。野生型マウスと比較して、IFNAR1^{-/-}マウス由来 GALT pDC の APRIL/BAFF 発現レベルは著しく減少していたことから、同発現誘導には I 型 IFN シグナルが重要であることが示唆された(図 3)。

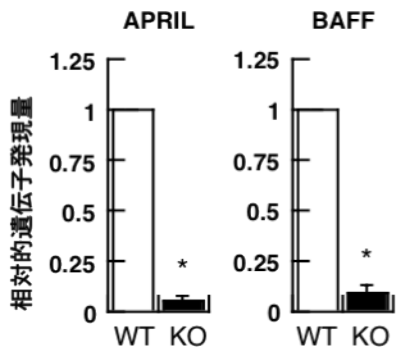


図3. I型IFN受容体欠損マウス(KO)の腸間膜リンパ節のpDCにおけるAPRILおよびBAFF発現レベルは野生型マウス(WT)のpDCと比較して著しく減少している。

興味深いことに、IFNAR1 の発現は、cDC に比べ pDC で有意に高く、DC サブセット間の I 型 IFN 反応性の差異も判明した。また、IFNAR1^{-/-}マウス由来 GALT pDC による IgA 生産は WT pDC と比較して顕著に低下したが、同培養系に APRIL あるいは BAFF を添加することで、IgA 生産の著しい回復が認められた。

これらの結果から予想されるように、

IFNAR1^{-/-}マウスの血清および糞便中の IgA レベルは著しく低下していたが、興味深いことに、IFNAR1^{-/-}マウスに野生型マウスの PLN pDC を移入したところ、同移入細胞の一部は GALT に存在し、同時に IgA レベルの著しい回復が認められた。これらのことから、pDC は GALT で I 型 IFN 依存性にコンディショニングを受けることが示唆された。

(4) I 型 IFN 生産性ストローマ細胞の同定：これらの結果は、定常状態の GALT に I 型 IFN 発現細胞が存在することを示唆していたので、その同定を試みたところ、ストローマ細胞の一部に I 型 IFNs の発現が認められた。興味深いことに、ストローマ細胞による I 型 IFN 発現は無菌マウスや微生物成分を認識する Toll 様受容体のアダプター分子 MyD88^{-/-}Trif^{-/-}マウスの GALT、野生型マウスの PLN ではほとんど認められなかった。

(5) pDC による IgA 生産誘導部位：pDC による IgA 生産誘導部位の特定をおこなったところ、組織切片の解析から、pDC、B 細胞、およびストローマ細胞の三者が接触した像はほとんど認められなかったが、pDC は B 細胞領域内で B 細胞と、B 細胞領域外でストローマ細胞とそれぞれ接触している像が観察された。このことから、GALT に移入した pDC はまずストローマ細胞によりコンディショニングを受け、次いで B 細胞領域に移動し、そこでナイーブ B 細胞に IgA クラススイッチを誘導することが考えられた(図 4)。以上の研究成果は、『Immunity』誌に掲載された。

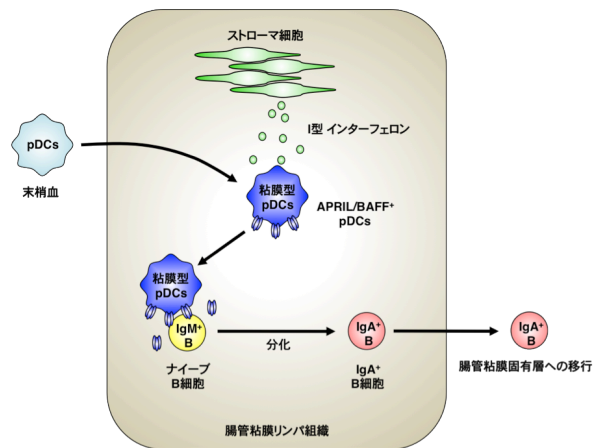


図4. GALTにおけるI型IFNsを介したpDCのコンディショニング

(6) IgA 腎症発症機序における pDC の重要性：IgA 腎症は、同疾病の自然発症モデルである hyper IgA(HIGA)マウスを用いて検討をおこなった。まず、GALT における DC サブセットの頻度を調べたところ、HIGA マウス

スでは pDC の細胞表面マーカーの 1 つである Ly6C 分子を発現していないこと、またその対照(ddY)マウスでは Ly6C 分子の発現のあるものと、ないものが存在するといった、予想外の結果が得られた。さらに、HIGA マウスの血清 IgA レベルは著しく亢進していたにも関わらず、同マウス由来ナイーブ B 細胞を GALT DC との共培養、あるいは APRIL/BAFF、TGF- β + 抗 CD40 抗体、TGF- β +LPS 処理しても、IgA 生産は認められなかった。これらの原因は、マウスの遺伝的背景の違いによるものと考えられた。すなわち、申請者が WT マウスとして使用する C57BL/6 マウスは近交系マウスであるのに対して、HIGA マウスは ddY バックグラウンドのクローズドコロニーマウスである。この理由のために、HIGA マウスにおける免疫学的解析が困難となったものと考えられた。今後は、C57BL/6 マウスに *Staphylococcus aureus* 抗原と不完全フロイントアジュバントを投与することで IgA 腎症を人為的に誘導するモデルを適用し、同疾病の発症機序における GALT pDC の役割を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 8 件)

1. Tezuka, H., Abe, Y., Asano, J., Sato, T., Liu, J., Iwata, M., and Ohteki, T. Prominent role for plasmacytoid dendritic cells in mucosal T cell-independent IgA induction. **Immunity** 34 : 247-257 (2011). 査読有
2. Tezuka, H., and Ohteki, T. A gas governing mucosal immunity. **Vaccine** 28:8039-8040 (2010). 査読有
3. Tezuka, H., and Ohteki, T. Regulation of intestinal homeostasis by dendritic cells. **Immunological Review** 234:247-258 (2010). 査読有
4. Kanazawa, Y., Saito, Y., Supriatna, Y., Tezuka, H., Kotani, T., Murata, Y., Okazawa, H., Ohnishi, H., Kinouchi, Y., Nojima, Y., Ohteki, T., Shimosegawa, T., and Matozaki, T. Role of SIRP α in regulation of mucosal immunity in the intestine. **Genes Cells** 15:1189-1200 (2010). 査読有
5. 榑木俊聡、手塚裕之、T 細胞非依存性 IgA 生産誘導における形質細胞様樹状細胞の

質的優位性、細胞工学、30、376-380、(2011). 査読無

6. 榑木俊聡、手塚裕之、TNF/iNOS 産生 DC と IgA 分泌、*医学のあゆみ*、234、453-457、(2010). 査読無
7. 手塚裕之、安部由紀子、榑木俊聡、粘膜関連リンパ組織における T 細胞非依存性 IgA クラススイッチ誘導機構、*臨床免疫・アレルギー科*、52、422-430、(2009). 査読無
8. 手塚裕之、安部由紀子、榑木俊聡、消化管粘膜における IgA 生産機構、炎症と免疫、17、568-574、(2009). 査読無

[学会発表] (計 2 件)

1. 手塚裕之、腸内細菌と粘膜免疫系との相互作用に関する新知見、第 51 回千葉造血幹細胞移植研究会、2010 年 4 月 17 日、千葉
2. Tezuka, H., Abe, Y., and Ohteki, T. Critical role for type I IFNs in pDC-induced T cell-independent IgA production. 第 39 回 日本免疫学会総会・学術集会、2009 年 12 月 3 日、大阪

[図書] (計 1 件)

手塚裕之、安部由紀子、榑木俊聡、粘膜系樹状細胞 (誘導組織)、清野宏編、*臨床粘膜免疫学*、シナジー、東京、266-274、2010

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/bre/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

手塚 裕之 (TEZUKA HIROYUKI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教
研究者番号 : 30375258

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者