

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670185

研究課題名(和文)濾胞樹状細胞の貪食機構を介した液性免疫応答制御機構の解明

研究課題名(英文)The regulation of humoral immune responses mediated by apoptotic cells clearance of follicular dendritic cells

研究代表者

本多 伸一郎 (Honda, Shinichiro)

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：60360640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：濾胞樹状細胞(FDC)はリンパ節の濾胞内に存在し胚中心の形成および液性免疫応答に必須の細胞である。新規FDC単離法を用いた解析の中からFDCは自身が産生するMFG-E8と α Vインテグリンを介してアポトーシス細胞を貪食することを見いだした。さらにFDCによるアポトーシス細胞の貪食に伴ってFDCからのIL-6やCXCL-13の産生が制御されていることが示唆された。FDC特異的 α Vインテグリン欠損マウスを作成して、胚中心形成や液性免疫応答を検討したが、コントロールマウスとの間に有意差は認められず、FDCによるアポトーシス細胞の貪食を介した液性免疫制御機構への関与を明らかにすることはできなかった。

研究成果の概要(英文)：Follicular dendritic cells (FDCs) locate within the follicles of lymphoid tissues and are the critical cells for the germinal center formation and humoral immune responses. By using novel isolation method for FDCs, we observed that FDCs engulf apoptotic cells via interaction between self-producing MFG-E8 and α V integrin. We also observed that IL-6 and CXCL-13 production by FDCs are regulated by the engulfment of apoptotic cells. Although we established mice whose α V integrin expression is specifically ablated on FDCs (FDCs-specific α V integrin null mice), germinal center formation and humoral immune responses seems to be comparable between FDCs-specific α V integrin null mice and control mice.

研究分野：免疫学

キーワード：濾胞樹状細胞 アポトーシス 胚中心形成 液性免疫応答

1. 研究開始当初の背景

濾胞樹状細胞(Follicular dendritic cells, FDC)はリンパ節の濾胞内に存在し、胚中心の形成に必須の細胞である。FDCは様々な病原体センサーを発現し、濾胞内の環境変化を感知して活性化され、胚中心形成を惹起することが報告されたがその活性化制御機構はいまだ不明である。近年、申請者らはFDC単離法を確立し、従来不可能であった細胞単位での解析の中からFDCがアポトーシス細胞を貪食することを見いだした。

2. 研究の目的

アポトーシス細胞の貪食に伴って貪食細胞の活性化は制御されることが知られていることから申請者は胚中心においてFDCの活性化がアポトーシスB細胞の貪食を介して制御されるという仮説を立て、これを検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) FDCによるアポトーシス細胞貪食の in vitro 解析

FDCのアポトーシス細胞貪食機構についてはFDC自身が産生するMFG-E8と α_v インテグリンを介した経路が強く示唆される。一方、アポトーシス細胞の貪食に関わる分子としては、他にもTimファミリーやMer分子等が知られているため、単離後のFDCを用いてこれら既知の分子についても特異抗体を用いたフローサイトメトリー法、固定染色法や定量的PCR法を用いてその発現を検討する。貪食への関与が疑われた場合はFDCとアポトーシス細胞を共培養する際に各分子に対する特異的抗体を添加してその影響を検討する。MFG-E8/ α_v インテグリン経路のみならず、FDCのアポトーシス細胞貪食に関わる分子を同定する。

(2) FDCによるアポトーシス細胞貪食による

FDC活性化制御の in vitro 解析

単離培養後のFDCをアポトーシス細胞と共培養し、胚中心B細胞の活性化に重要な因子であるBaff, CXCL13などのサイトカインやケモカインの産生やB細胞に対する共刺激分子の発現について定量的RT-PCR法や上清を用いたELISA法によって検討し、アポトーシス細胞の貪食がFDCの活性化に及ぼす影響を検討する。また、D89E添加による影響も検討し、FDCの活性化への影響が貪食機構を介したものであることを確認する。

(3) FDCによるアポトーシス細胞貪食の in vivo 解析

抗原免疫後にマウスから脾臓を採取し、DNAの断片化を検出するTUNEL染色と共にFDC-M1等のFDC特異的マーカーによる多重染色を行う。組織染色法およびフローサイトメトリー法を用いてFDCにおけるTUNEL染色性を検討し、胚中心形成過程におけるFDCによるアポトーシス細胞貪食の有無を明らかにする。

(4) FDC特異的 α_v インテグリン欠損マウスの樹立と免疫応答の解析

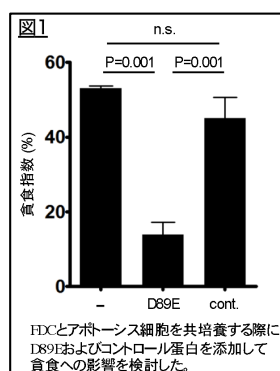
FDCによるMFG-E8/ α_v インテグリン経路を介したアポトーシス細胞の生理的意義を明らかにする目的で、FDC特異的 α_v インテグリン欠損マウスを作製する。まずCD21-Creマウス(ジャクソン研究所より購入予定)と α_v インテグリン^{flox}マウス(マサチューセッツ工科大学、Hynes教授から供与予定)との交配によってCD21発現細胞特異的 α_v インテグリン欠損マウス(CD21- α_v^{flox})を作製する。CD21はFDCのみならずB細胞にも発現しているため、FDCが間質系細胞で放射線抵抗性であることを利用し、CD21- α_v^{flox} マウスへ放射線照射後、野生型マウスの骨髄を移入して、FDC特異的 α_v インテグリン欠損マウス(Str-CD21- α_v^{flox})を樹立する。このStr-CD21- α_v^{flox} マウスをNP

ハプテン付加抗原で免疫後、経時的に脾臓を採取し、免疫組織染色法およびフローサイトメトリー法を用いて胚中心の形成について検討を行う。また NP 価数の異なる蛋白抗原を用いた ELISA 法によって血清中の NP 特異的抗体の産生量や抗体の抗原親和性成熟についても検討を行う。さらに初回免疫から 4~8 週間後に追加免疫を行って抗体産生を検討しメモリー応答についても検討を行う。コントロールマウスと Str-CD21- αv^{flox} マウスを比較検討することにより、FDC によるアポトーシス B 細胞の貪食、排除の消失が胚中心形成、抗体産生、抗原親和性成熟、メモリー B 細胞の樹立等に及ぼす影響を検討する。

4. 研究成果

(1) FDC によるアポトーシス細胞貪食の in vitro 解析

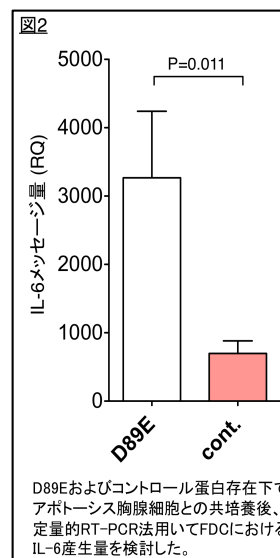
単離 FDC は MFG-E8 を高発現しているものの、Tim ファミリーや Mer 分子等の発現は非常に弱く、MFG-E8/ αv インテグリンを用いた経路が主要な経路と考えられた。そこで FDC とアポトーシス細胞を in vitro で共培養する際に、PS への結合能を保持しつつ αv インテグリンへの結合能を欠失した MFG-E8 の変異体である D89E を添加すると FDC によるアポトーシス細胞貪食がほぼ消失することが確認された。よって FDC によるアポトーシス細胞の貪食は MFG-E8 と αv インテグリンを介した経路が主要なものと考えられた(図 1)。



(2) FDC によるアポトーシス細胞貪食による FDC 活性化制御の in vitro 解析

単離培養後の FDC をアポトーシス細胞と

共培養し、胚中心 B 細胞の活性化に重要な因子である Baff, CXCL13 などのサイトカインやケモカインの産生や B 細胞に対する共刺激分子の発現について定量的 RT-PCR 法を用いて検討した。FDC によるアポトーシス細胞貪食を阻害する D89E の添加によって IL-6 の産生が亢進する一方、CXCL13 の産生は D89E の添加によって低下することが確認された。一方、FDC に高発現する MEG-E8 や Fc α/μ R の発現はほとんど変化がなかった。よって、FDC によるアポトーシス細胞の貪食によって FDC からの IL-6 や CXCL13 の産生が調節される可能性が示された(図 2)。



(3) FDC によるアポトーシス細胞貪食の in vivo 解析

抗原免疫後にマウスから脾臓を採取し、DNA の断片化を検出する TUNEL 染色と共に FDC-M1 等の FDC 特異的マーカーによる多重染色を行ったところ、組織染色法およびフローサイトメトリー法にて FDC の一部 TUNEL 陽性になることを確認した。よって胚中心形成過程において FDC がアポトーシス B 細胞を貪食することが示唆された。

(4) FDC 特異的 αv インテグリン欠損マウスの樹立と免疫応答の解析

インテグリン欠損マウス(CD21- αv^{flox})を作成し、さらにこのマウスへ放射線を照射後、野生型マウスの骨髄を移入して、FDC 特異的 αv インテグリン欠損マウス(Str-CD21- αv^{flox})を樹立した。このマウスの FDC において αv インテグリンの発現がほぼ消失してい

ることを確認した。

この Str-CD21- vflux マウスを蛋白抗原、NP 負荷 CG で免疫して、免疫 1 週、2 週後の抗体産生応答や胚中心形成、および追加免疫に対する抗体産生応答を検討したが、コントロールマウスとの間に有意な差は認められなかった。よって、胚中心形成および液性免疫応答において、FDC によるアポトーシス細胞の貪食を介した制御機構の存在を明らかにすることはできなかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Shibuya A, Honda S. Immune regulation by Fc α / μ receptor (CD351) on marginal zone B cells and follicular dendritic cells. *Immunol Rev*, 268(1):288-295, 2015 査読有 (DOI: 10.1111/imr.12345)
2. Yamashita--Kanemaru Y, Takahashi Y, Wang Y, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Bernhardt G, Shibuya A, Shibuya K. CD155 (PVR/Nect15) Mediates a Costimulatory Signal in CD4+ T Cells and Regulates Allergic Inflammation. *J Immunol*, 194(12):5644-5653, 2015 査読有 (DOI: 10.4049/jimmunol.1401942)
3. Kurita N, Honda S, Shibuya A. Increased serum IgA in Fc α / μ R-deficient mice on the (129 x C57BL/6) F1 genetic background. *Mol Immunol*, 63:367-372, 2015 査読有 (DOI: 10.1016/j.molimm.2014.09.008)
4. Totsuka N, Kim YG, Tahara-Hanaoka S, Nakahashi-Oda C, Honda S, Shibuya K, Shibuya A. Toll-like receptor 4 and MAIR-II/CLM-4/LMIR2 immunoreceptor regulate VLA-4-mediated inflammatory monocyte migration. *Nature Commun*, 5:4710, 2014 査読有 (DOI: 10.1038/ncomms5710)
5. Satake K, Shimizu Y, Sasaki Y, Yanagawa H, Suzuki H, Suzuki Y, Horikoshi S, Honda S, Shibuya K, Shibuya A, Tomino Y. Serum under-O-glycosylated IgA1 level is not correlated with glomerular IgA deposition based upon heterogeneity in the composition of immune complexes in IgA nephropathy. *BMC Nephrology*, 15:89, 2014 査読有 (DOI: 10.1186/1471-2369-15-89)

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Sato K, Honda S, Shibuya K, Shibuya A. Development of a novel method for isolation of follicular dendritic cells. 第 44 回日本免疫学会総会・学術集会 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市) 2015.11.19
2. Nakahashi-Oda C, Udayanga K G S, Nakamura Y, Nakazawa Y, Totsuka N, Miki H, Iino S, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Shibuya K, Shibuya A. Apoptotic epithelial cells control regulatory T cell expansion. International Symposium on Immune Regulation, Oarai Park Hotel, (茨城県東茨城郡大洗町) 2015.10.29
3. Honda S, Sato K, Totsuka N, Fujiyama S, Fujimoto M, Miyake K, Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Shibuya A. Marginal zone B cells exacerbate endotoxic shock via interleukin-6 secretion induced by Fc α / μ R-coupled TLR4 signaling. International Symposium on Immune Regulation, Oarai Park Hotel, (茨城県東茨城郡大洗町) 2015.10.29
4. 戸塚 直也、金 倫基、金丸 和正、新妻 耕太、梅本 英司、永井 恵、田原 聡子、小田 ちぐさ、本多 伸一郎、宮坂 昌之、渋谷 和子、渋谷 彰 TLR4 と免疫受容体 MAIR-II は炎症性単球の感染局所への移入を促進する 第 3 回筑波大学・東京理科大学生命医学研究所合同リトリート 東京理科大学セミナーハウス (千葉県野田市) 2015.3.20
5. Honda S, Sato K, Fujiyama S, Fujimoto M, Miyake K, Shibuya A. Marginal zone B cells exacerbate endotoxin shock by secretion of interleukin-6. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会 国立京都国際会

館（京都府京都市）2014.12.10

6. Totsuka N, Kim YG, Kanemaru K, Niizuma K, Umemoto E, Nagai K, Tahara-Hanaoka S, Nakahashi-Oda C, Honda S, Miyasaka M, Shibuya K, Shibuya A. Toll-like receptor 4 and MAIR-II/CLM-4/LMIR2 immunoreceptor regulate VLA-4-mediated inflammatory monocyte migration. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会 国立京都国際会館（京都府京都市）2014.12.10
7. 本多 伸一郎 からだを守る免疫～病原体や癌との戦い～ 筑波大学公開講座 健康と生命科学 筑波大学 生命領域学際研究センター（茨城県つくば市）2014.8.1

〔その他〕

ホームページ等

<http://immuno-tsukuba.com/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本多 伸一郎 (HONDA, Shinichiro)

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：60360640