

パイエル板樹状細胞の免疫応答特性に関する研究
Studies on the immune response of Peyer's patch dendritic cells

佐藤あゆ子

目次

| | |
|---------------------------|-----|
| 略号一覧 | 1 |
| 緒言 | 3 |
| 第一章 樹状細胞分離方法および細胞表面分子発現解析 | |
| 序 | 32 |
| 材料および方法 | 34 |
| 結果 | 40 |
| 考察 | 60 |
| 第二章 パイエル板樹状細胞の誘導する T 細胞応答 | |
| 序 | 65 |
| 材料および方法 | 68 |
| 結果 | 76 |
| 考察 | 90 |
| 第三章 パイエル板樹状細胞の IL-6 産生 | |
| 序 | 101 |
| 材料および方法 | 103 |
| 結果 | 107 |
| 考察 | 118 |
| 総合討論 | 124 |
| 要約 | 128 |
| 参考文献 | 135 |
| 謝辞 | 150 |

略号一覧

ABS: absorbance, 吸光値

APC: antigen presenting cell, 抗原提示細胞

BSA: bovine serum albumin, ウシ血清アルブミン

CMIS: common mucosal immune system, 循環帰巢経路

cpm: counts per minute,

放射能量測定単位、一分間あたりのカウント

CTL: cytotoxic T lymphocyte, 細胞傷害性 T 細胞

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid, エチレンジアミン四酢酸

DC: dendritic cell, 樹状細胞

FAE: follicle-associated epithelium, 円柱上皮細胞

FCS: fetal calf serum, ウシ胎児血清

h: human, ヒト

HBSS: Hanks' balanced salt solution, ハンクス液

HEPES: N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid,

N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸

HEV: high endothelial venule, 高内皮性細静脈

IFN: interferon, インターフェロン

IFR: interfollicular region, 濾胞間

Ig: immunoglobulin, 免疫グロブリン

IL: interleukin, インターロイキン

L: ligand, リガンド

LT: lymphotoxin, リンホトキシン

LP: lamina propria, 粘膜固有層

LPS: lipopolysaccharide, リポ多糖

m: mouse, マウス

mAb: monoclonal antibody, モノクローナル抗体

MACS: magnetic cell sorting and separation of biomolecules,
磁気細胞分離システム

MHC: major histocompatibility antigen complex,
主要組織適合抗原複合体

MLR: mixed lymphocyte reaction, 混合リンパ球反応

OVA: ovalbumin, 卵白アルブミン、オバルブミン

PBS: phosphate-buffered saline, リン酸緩衝生理食塩水

PCR: polymerase chain reaction, ポリメラーゼ連鎖反応

PMA: phorbol 12-myristate 13 acetate,
ホルボール 12- ミリステート 13- アセテート

PP: Peyer's patch, パイエル板

r: recombinant, 組み換え体

R: receptor, レセプター、受容体

SED: subepithelial dome, 円蓋部

SP: spleen, 脾臓

TCR: T-cell receptor, T細胞抗原レセプター

tg: transgenic, トランスジェニック

TGF: transforming growth factor, 形質転換成長因子

TNF: tumor necrosis factor, 腫瘍壊死因子

緒言

腸管粘膜は生命維持に必要な栄養分吸収の場であると同時に、常におびただしい数の微生物やウイルスなどの異物に曝されている。そのため腸管粘膜には他の免疫系とは異なる独特な免疫系が存在し、それらを見分ける機構が備わっている。パイエル板は、腸管特有の免疫応答を誘導する最も主要なリンパ器官である。一方、樹状細胞は抗原特異的免疫応答を開始できる唯一の抗原提示細胞であり、免疫グロブリン A の産生や経口免疫寛容などの腸管特異的免疫応答の誘導組織であるパイエル板においても、司令塔としての役割を担っている重要な細胞である。

したがって、パイエル板樹状細胞の特性を解析することは、腸管特異的な免疫応答の誘導機構を解明する上で非常に重要である。さらにその機能を調節することにより、腸管免疫応答のみならず全身免疫応答も調節することが可能と考えられることから、経口ワクチンの開発など応用分野においても重要である。以下にこの樹状細胞をはじめ、腸管免疫系、特にパイエル板の機能などについての現在の研究状況と本研究の目的について述べる。

樹状細胞

樹状細胞という名称は、1973年に Steinman が脾臓の付着性細胞を検討している過程でその形態から命名したものである(1)。発見されて十数年は、ごく一部を除いて世界中の人々は関心さえ示さない完全に無視された細胞であった。そ

の大きな理由は研究に必要な十分な細胞を得ることが困難だったからである。ところが、1990年代の初め *in vitro* での前駆細胞からの誘導法が確立してから、その性状、機能に関する詳細な検討が行われるようになって多くの新しい知見が明らかにされ、免疫応答における樹状細胞の重要性が認識されるようになった。現在は一般に未感作 T 細胞、未感作 B 細胞を活性化しうる強い抗原提示能を持つ細胞であり、抗原特異的免疫応答の開始において重要な役割を示す細胞であることが明らかとなっている。

(抗原提示とは)

抗原特異的免疫応答の誘導は、侵入した抗原が抗原提示細胞 (antigen presenting cell; APC) により細胞内に取り込まれることで開始される。その後、取り込まれたタンパク質は抗原提示細胞内でカテプシンなどの酵素により消化を受ける。消化により 10 アミノ酸残基程度のペプチドとなったものは主要組織適合抗原複合体 (major histocompatibility antigen complex; MHC) 分子と複合体を形成し、抗原提示細胞の細胞表面上に提示される。T 細胞は T 細胞抗原レセプター (T cell receptor; TCR) を介しそれらを認識することで活性化を受ける (Fig. Preface-1)。T 細胞は可溶性の抗原をそのまま認識することができず、抗原提示細胞によって提示された MHC 分子と抗原ペプチドの複合体を認識するのである。このように、樹状細胞をはじめとする抗原提示細胞は抗原特異的免疫応答において T 細胞を活性化するために非常に重要な役割を果たしている。

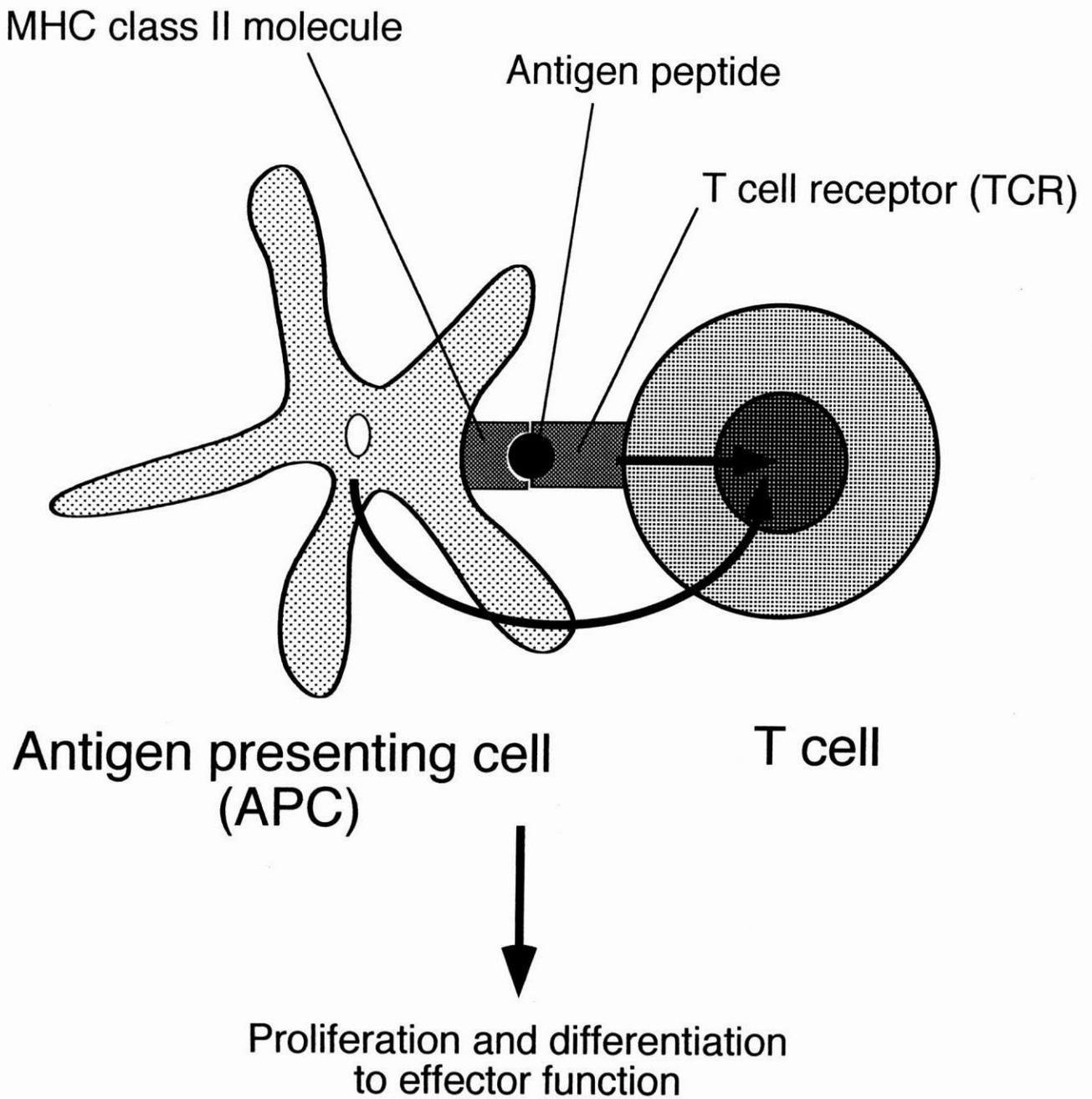


Fig. Preface-1. Antigen presentation. Antigen: receptor binding and co-stimulation of T cell by APC.

樹状細胞の他にもマクロファージ、B細胞などの抗原提示能を持つ細胞がある。かつてはマクロファージが抗原提示細胞としてよく研究されていた。マクロファージが抗原提示能を持つことは確かであるが、抗原未感作 T 細胞に提示することにより免疫応答開始できるという意味での「真の」抗原提示細胞はマクロファージではなく樹状細胞である、ということが二十年前から Inaba と Steinman によって指摘されてきた(2)。最近の研究によって、樹状細胞は未感作 T 細胞を活性化することのできる唯一の抗原提示細胞であること、他の抗原提示細胞と比較して強力な抗原提示能を持つこと、樹状細胞が抗原を T 細胞に対して効率よく提示する分子機構が明らかになりつつある(3)。

(生体内分布と移動)

哺乳動物において、樹状細胞は種々の組織や器官に広く分布していることが知られている。リンパ系器官では、脾臓、胸腺、パイエル板、腸管膜リンパ節など、また輸入リンパ管にも認められる。非リンパ系器官では、皮膚の表皮内、子宮脛腔部や鞘の上皮細胞層、気道上皮、肝臓の門脈三分枝や胆管周縁部、心臓脈管壁、腸管粘膜固有層、口腔粘膜固有層、臓側胸膜など上皮組織に多く分布する。一方、皮膚の真皮組織や肺の柔組織、心臓結合織、骨格筋中などにも認められる。

輸入リンパ管を結搾した場合、所属リンパ管から樹状細胞が消失することから樹状細胞はリンパ管を経てリンパ器官へと供給されていると考えられる。樹状細胞は絶えず補給されることにより一定の値が保たれている。一方、輸出リンパ

液中には樹状細胞の存在が認められないことから、リンパ器官に到達した樹状細胞はそこで死ぬと予想される。

(個体発生)

マウスやラットでの個体発生に伴う樹状細胞の出現は骨髓造血が開始された直後から、生体内各所に順次認められている。ヒトでも、骨髓造血が始まる胎生期 12 週齢になると皮膚を含む多くの非リンパ系組織や胸腺、脾臓、リンパ節の原基に樹状細胞が確認されている。マウスでは、胎生 14 日で胸腺に、18 日で小腸基底膜固有層に、20 日にはパイエル板に出現していることが報告されている。脾臓における数の増加は緩やかで、生体レベルに達するのに生後 2-3 週間を要する。

(骨髓系樹状細胞とリンパ球系樹状細胞)

樹状細胞はその異なる表現系および分布域により少なくとも二つの細胞集団に分類できる。マウスの脾臓 T 細胞領域には胸腺樹状細胞と同様 $CD11b^-/CD8\alpha^+$ 樹状細胞が存在し、白脾髄周縁部や赤脾髄には $CD11b^+/CD8\alpha^-$ 樹状細胞が存在する (Fig. Preface-2)。これらの樹状細胞は起源が異なっており、T 細胞と同じ胸腺前駆細胞に由来し $CD11b^-/CD8\alpha^+$ の表現系を持つ樹状細胞をリンパ球系樹状細胞、マクロファージと同じ前駆細胞に由来し $CD11b^+/CD8\alpha^-$ の表現系を持つ樹状細胞を骨髓系樹状細胞として区別している (4)。この二つの細胞集団は機能的にも異なることが明らかになりつつある。ヘルパー T 細胞と呼ばれる $CD4^+$ T 細胞が分化してエ

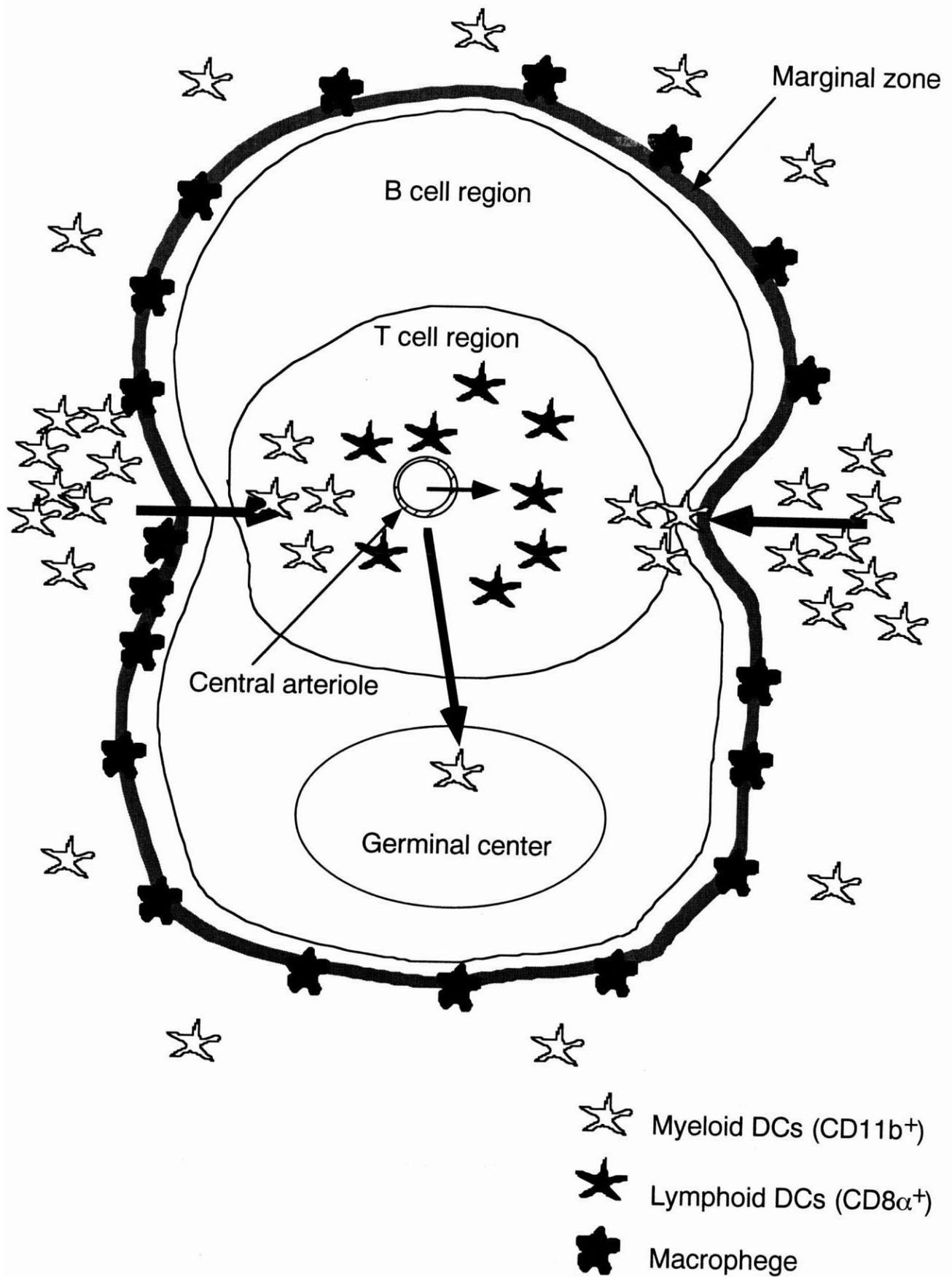


Fig. Preface-2. Transverse section of white pulp of spleen.

フェクター機能を持つようになった細胞は産生するサイトカインの違いから、Th1 と Th2 と呼ばれる二つの異なる細胞集団に分類することができ、異なる免疫応答を制御している (5) (Fig. Preface-3)。

Th1 細胞は主に細胞性免疫反応による細胞内寄生性微生物に対する感染防御を、Th2 細胞は体液性免疫反応により細胞外寄生性微生物に対する感染防御に関与している。この二つの細胞集団はお互いが産生するサイトカインによって相互のバランスを平衡に保つことにより、過剰な反応が起こらないように相互に制御しあっている。また、抗原提示細胞により産生されるサイトカインも Th1/Th2 バランスに影響をおよぼすと考えられており、実際、 $CD11b^-/CD8\alpha^+$ 樹状細胞は IL-12 産生能が高く、インターフェロン (IFN)- γ を産生する Th1 細胞を誘導すると言われている (Fig. Preface-4)。また、ウイルス感染細胞、ガン細胞などは $CD11b^-/CD8\alpha^+$ 樹状細胞に取り込まれプロセッシングを受けた後、ペプチド・MHC クラス I 分子複合体として $CD8^+$ T 細胞に、ペプチド・MHC クラス II 分子複合体として $CD4^+$ T 細胞に同時に抗原情報が提示される。これは、クロスプライミングと呼ばれるウイルス感染細胞、ガン細胞などに対する T 細胞応答の開始に必須の過程である。また、アポトーシスで死滅した自己の細胞なども取り込み、ペプチド・MHC クラス II 分子複合体として $CD4^+$ T 細胞に提示し、免疫寛容の誘導を行っていると考えられている。一方、 $CD11b^+/CD8\alpha^-$ 樹状細胞は IL-12 産生能が低く、インターロイキン (IL)-4, IL-5, IL-10 などのサイトカインを産生する Th2 細胞を誘導し、クロスプライミン

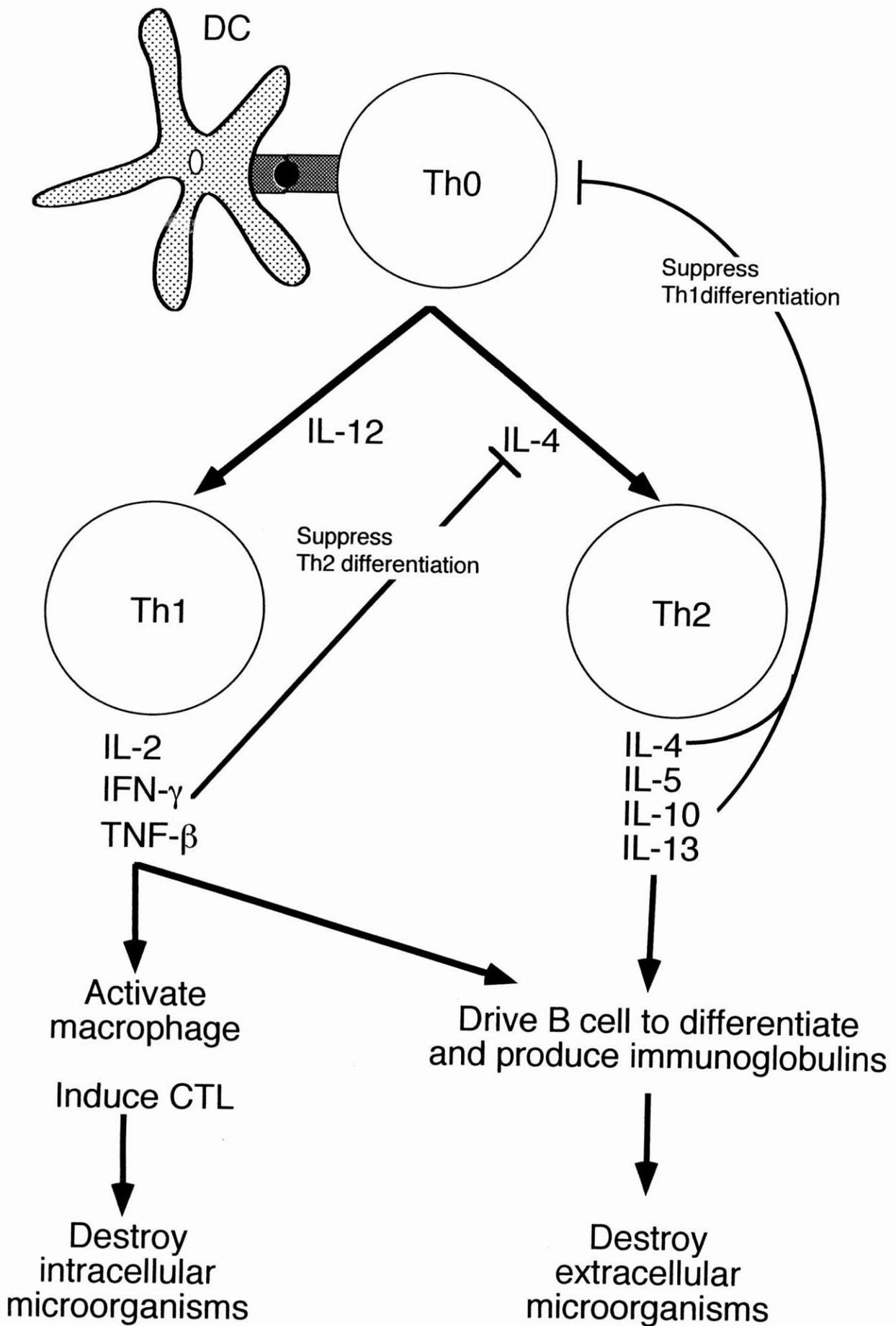
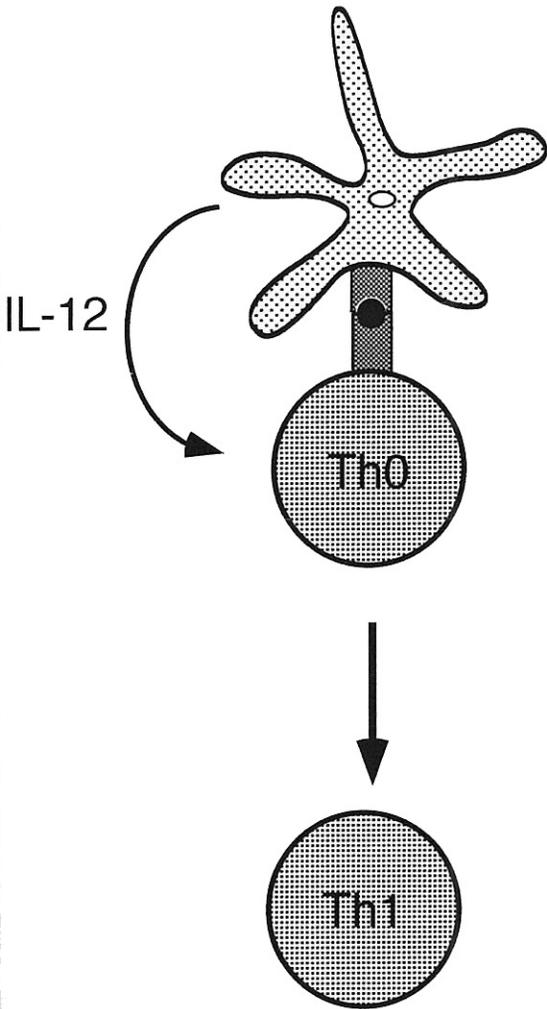


Fig. Preface-3. Differentiation of CD4⁺ T cells.

Lymphoid dendritic cell

CD11b⁻/CD8α⁺



Myeloid dendritic cell

CD11b⁺/CD8α⁻

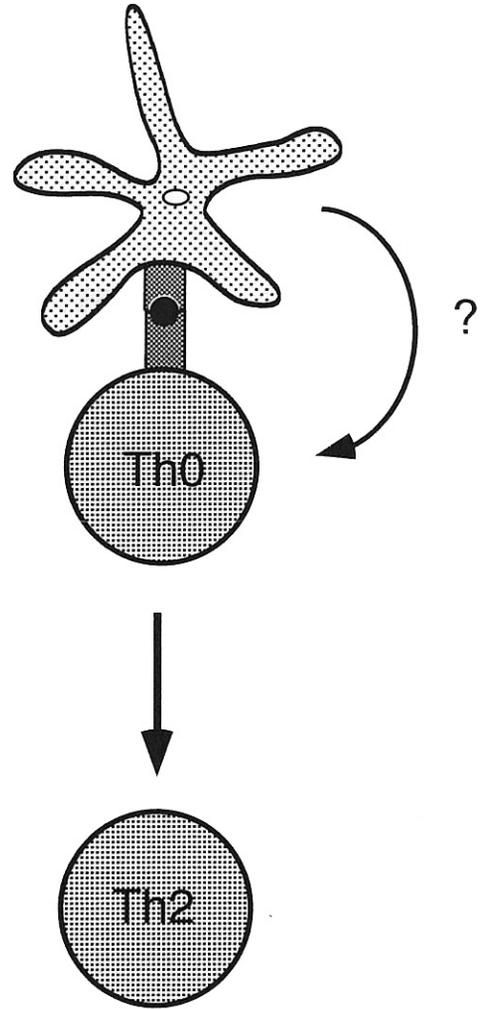


Fig. Preface-4. Regulating T cell immunity.

グ能は有していない(6)。しかし、リポ多糖 (LPS) などによる微生物由来の刺激により $CD11b^+/CD8\alpha^-$ 樹状細胞は速やかに T 細胞領域に移動し、免疫応答の誘導に関与する(7, 8)。

ただし、*in vitro* 培養により誘導された樹状細胞は胸腺前駆細胞を用いた場合においても、 $CD8\alpha$ の発現は認められていない(4)。また、骨髄系樹状細胞であるランゲルハンス細胞も生体内に投与されると T 細胞領域へ移動し、 $CD8\alpha$ を発現するとの報告もあり、 $CD8\alpha$ をマウスリンパ球系樹状細胞の指標とすることに疑問が呈されていることも事実である(9, 10)。

以上のように、樹状細胞の *in vitro* での前駆細胞からの誘導法の確立により、めざましい勢いで樹状細胞について解明され、その重要性が明らかとなった。以下に述べるような生体における最大の免疫システムである腸管免疫系においても重要な役割を担っていると考えられる。

腸管免疫

我々の身体は筒状の構造物あるいはその集合体に例えることができる。その外側面は皮膚に、その内側面は腸管を含む粘膜によって覆われており、粘膜の表面積は皮膚の約 200 倍に達すると言われている。口腔、鼻腔、呼吸器、消化管、生殖器は粘膜という一層のバリアーを介して外界と接しており、呼吸、食餌、排泄、生殖などの重要な生命維持活動において、多様でおびただしい異物をその表面から体内に取り込んでいる。

粘膜免疫システムは、胸腺、骨髄を中心に解明の進んできた全身系・末梢系免疫システムとは異なった誘導・制御機構が備わっていることが明らかになってきた (Fig. Preface-5)。特に、抗体産生において産生される免疫グロブリン (Ig) のアイソタイプが異なっており、粘膜組織を除く末梢では、投与された抗原に対して、IgM 抗体がまず誘導され、つづいて様々なサブクラスを含む IgG 抗体産生が誘導される。それに対して、粘膜組織では、IgA 産生が優位に誘導され(11, 12)、IgM や IgG など他のクラスの抗体の寄与はほとんどない。産生された分泌型 IgA 抗体は、粘膜侵入細菌に対して効果的な感染阻止を示す効果が認められている(13-15)。

この IgA 抗体を中心とした粘膜免疫は全身系の免疫機構とは異なる独特な免疫機構であることがわかっている。それは、循環帰巢経路 (common mucosal immune system: CMIS)(11, 12, 16)と呼ばれる機構を中心に説明されてきた。例えば腸管粘膜においては、まず、IgA 誘導組織であるパイエル板に抗原が取り込まれ、抗原提示されることにより T 細胞および B 細胞が活性化され、それに続いて B 細胞の IgA 産生細胞への分化が誘導される。それらの細胞は CMIS により粘膜固有層 (lamina propria; LP) へとホーミング (homing; 帰巢) する。そこで、消化の影響を受けにくい分泌型 IgA を産生し、それを腸管内に分泌することにより、腸管内の抗原タンパク質を中和すると考えられている (Fig. Preface-6)。

(最大の免疫組織としての腸管粘膜)

粘膜の中でも腸管粘膜は全粘膜面積の 80%以上を占め、

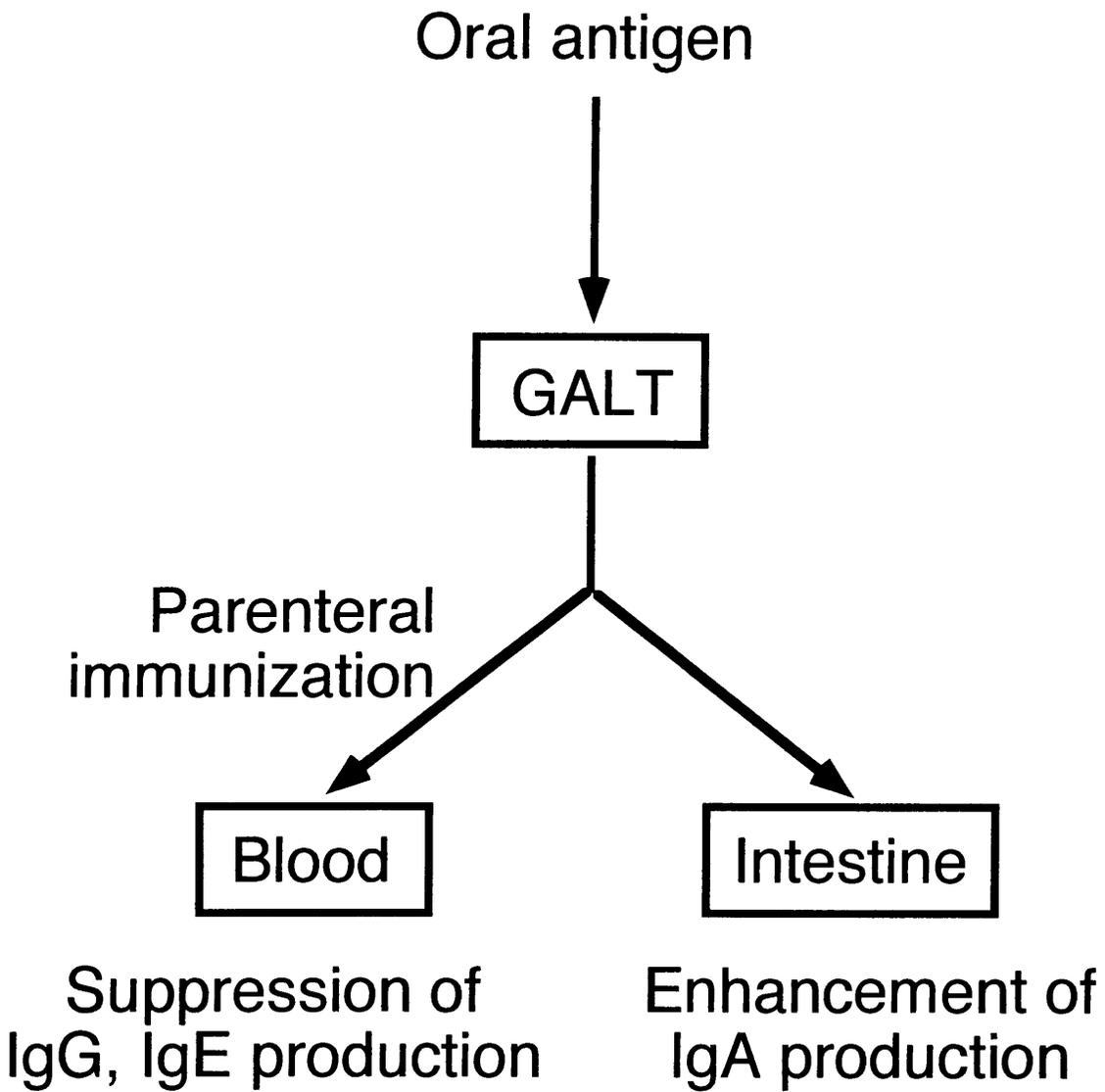


Fig. Preface-5. Oral administration of antigen induces two aspects on antibody production on the periphery.

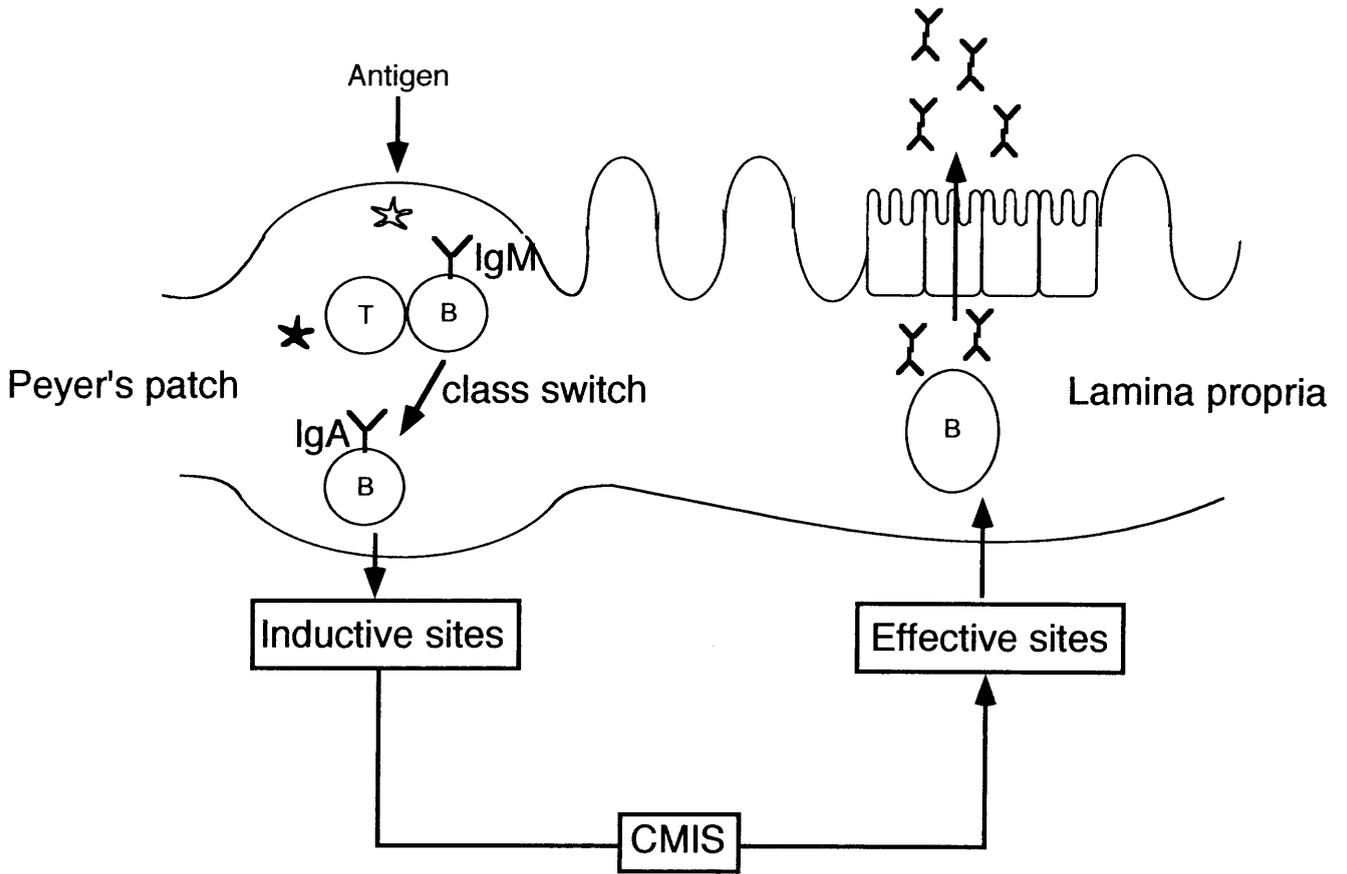


Fig. Preface-6. Common mucosal immune system (the intestine).

摂食という行為を通して、食物などの生命維持に必要なもののみならず生体にとって不都合な病原微生物などにも曝されている。それらを識別し、生体に有用であるものは取り込み、不要、または害となるものは排除する必要があるという点で、皮膚が単に異物の侵入を防ぐバリアーとしての役割をしているのとは異なり、腸管粘膜は生体における最大の免疫組織として重要な役割を担っている。小腸、大腸の表面は厚い粘液層で覆われており、その流動性により病原微生物などの異物の排出を促進している。さらに、その構成主成分はムチンという様々な糖鎖が結合している糖タンパク質であり、その糖鎖群には微生物が粘膜上皮細胞に結合する細胞膜上の糖鎖構造と類似しているものが多くあり、競合的に作用する防御因子として働いている。粘液層にはさらに細菌の膜構造を破壊するリゾチーム、細菌の生命活動に必要な鉄代謝を阻害するラクトフェリン、 H_2O_2 代謝に必要なペルオキシダーゼ、胆汁酸由来の界面活性剤様物質などの抗菌作用を有する非特異的活性物質が多く存在しており、腸管での最前線の感染防御バリアーとしての粘膜免疫機能を果たしている。

このような抗原非特異的な物理的・化学的バリアーの他に分泌型 IgA 誘導および上皮細胞間に高頻度で存在する CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞などによる抗原特異的免疫応答が誘導され多種多様な感染源の侵入に備えている。また、腸管特異的免疫応答として、IgA 産生応答誘導の他に、経口免疫寛容現象が知られている。すなわち、可溶性抗原であるタンパク質を経口的に摂取した場合、その後末梢においてその抗原に対して免疫応答が誘導されないことが知られている(17)。

このように、腸管粘膜組織では、生体にとって不必要なものや危険なものに対しては速やかに排除する機構が働き、有用なものに対しては免疫寛容が誘導されるという非常に巧妙な免疫機構が働いている。

パイエル板の構造

この腸管粘膜における主要なリンパ器官がパイエル板である。パイエル板はリンパ濾胞が多数集合した組織であり、小腸粘膜にマウスでは 6-12 個、ヒトでは 180-240 個存在する(18)。大腸や虫垂には孤立性リンパ濾胞がある。それらは構造的にパイエル板に類似しており、同様の機能を有すると考えられている。

パイエル板は構造的にいくつかの部位により構成されている(Fig. Preface-7)。腸管腔側に存在する M 細胞および円柱上皮細胞 (follicle-associated epithelium; FAE) により覆われ、その下部にある円蓋部 (subepithelial dome; SED) と呼ばれる樹状細胞、マクロファージなどが存在する領域がある。その下方にいくつかの胚中心 (germinal center; GC) を形成する B 細胞に富んだ濾胞域 (follicular area) がある。また、濾胞域と濾胞域の間には濾胞間 (interfollicular region; IFR) が存在し、T 細胞の割合が高い。ここには高内皮性細静脈 (high endothelial venule; HEV) が分布している。その内皮細胞には MAdCAM-1 が発現し、リンパ球の表面レセプターである L-セレクチンや $\alpha 4\beta 7$ インテグリンのリガンドとして機能し、リンパ球のパイエル板への集積に関係している。M 細胞は絨毛の短い特殊な上皮細胞であり、腸管腔内の抗

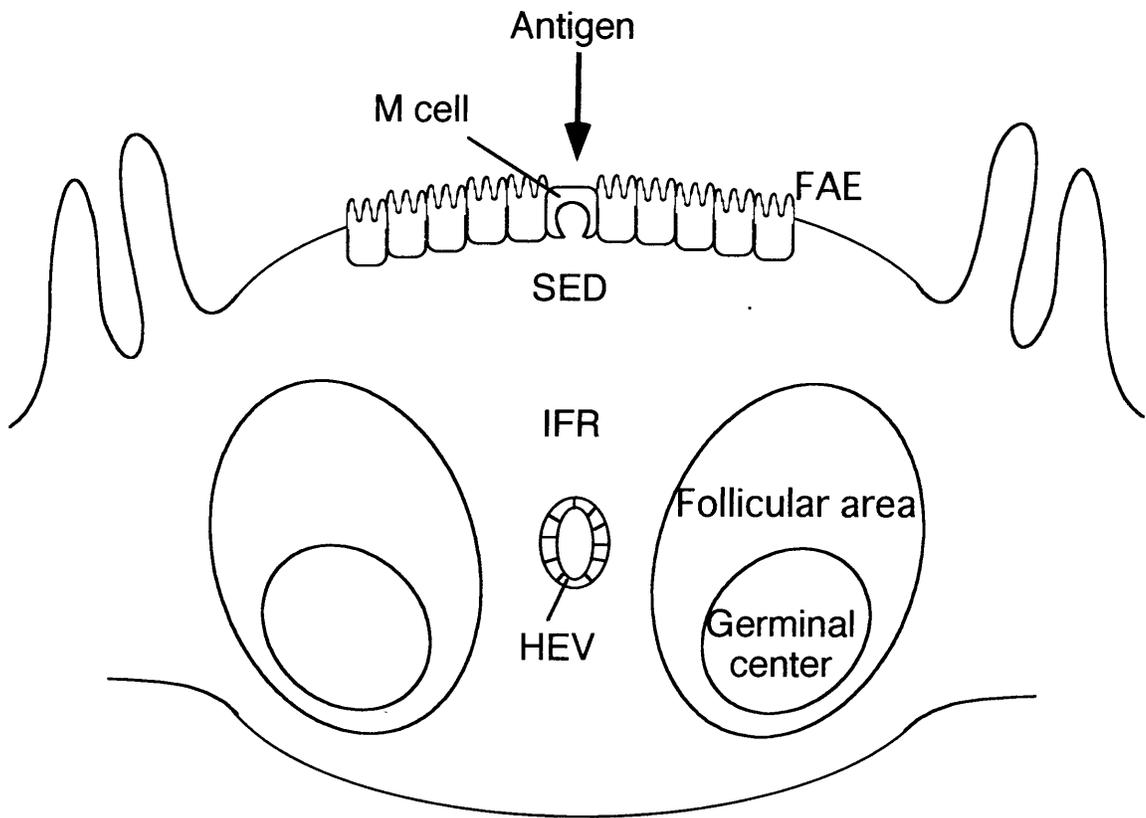


Fig. Preface-7. Structure of a Peyer's patch. FAE; follicle-associated epithelium, SED; subepithelial dome, IFR; interfollicular region, HEV; high endothelial venule.

原はレセプターや貪食作用などによってこの M 細胞に積極的に取り込まれる。M 細胞直下にはポケットと呼ばれる空間があり、B 細胞、T 細胞、マクロファージ、樹状細胞が入り込んでいる。また、M 細胞は細胞内にカテプシン E を有すのに加え、MHC クラス II の発現が認められている。しかしながら、抗原提示に必須であると考えられている抗原処理酵素群等の活性がないため、M 細胞は単に抗原を輸送するだけで、抗原提示細胞としての機能はないとされている。M 細胞に取り込まれた抗原は FAE 直下の SED に分布する樹状細胞などの抗原提示細胞に受け渡され提示されると考えられている。

抗原の腸内への取り込みと樹状細胞

(M 細胞を介した抗原の取り込み)

腸管粘膜は無数の抗原や病原微生物に曝されているが、限られたもののみが体内に侵入することができる。それは、上皮細胞がタイトジャンクションにより結合しており、微生物やその代謝物からのバリアーの役目を果たしているからである。腸管では、病原微生物は通常 M 細胞を介して侵入する。こうして侵入した病原微生物は M 細胞ポケット内やその直下の SED に存在する樹状細胞に直接取り込まれる。

(樹状細胞による抗原の取り込み)

抗原が粘膜固有層に取り込まれるもう一つの機構は樹状細胞が樹状突起を上皮細胞と上皮細胞の間から腸管内腔に送り抗原をとらえて取り込むものである(19)。上皮細胞のバリ

アーを突破した樹状細胞はタイトジャンクションタンパクを発現し、新しいタイトジャンクション様の構造を上皮細胞との間に構築する。この機構が常に働いているのか腸管内腔に存在する病原微生物および多量の非病原微生物に接触した上皮細胞よりシグナルが伝達された場合に誘導されて働くのかは不明である。

パイエル板における経口免疫寛容の誘導

このパイエル板は腸管特異的免疫応答において重要な役割を担うことが知られている。その一つが経口免疫寛容の誘導である。経口免疫寛容と呼ばれる現象のメカニズムとして主に三つの機構が挙げられている。クローン消失（デリーション）(20)、クローン不応答(21, 22)、調節性細胞による制御機構(23-25)である。Weinerらは、マウスに多量の抗原を経口投与することにより、パイエル板において抗原特異的にクローン消失が起きることを報告している(20)。また、抗原を経口投与したマウスのパイエル板において抗原特異的に抑制性のサイトカインである TGF- β を産生する T 細胞が誘導されることも報告されている(26)。さらに、リンホトキシン(LT) β -Ig 融合タンパク質投与によりパイエル板の発生に必要なシグナル伝達を抑制することによりパイエル板を消失させたマウスにタンパク質を経口投与しても寛容状態が誘導されないという報告(27)など、パイエル板がタンパク質に対する経口免疫寛容の誘導部位であることを示す報告が多数存在する。

一方、最近同様なパイエル板欠損マウスを用いた研究に

より、パイエル板が経口免疫寛容の誘導に必須ではないという報告もされており(28)、より詳細な解析が期待される。

パイエル板における細菌感染に対する応答

パイエル板における特異的な免疫応答として、インターロイキン (IL)-4、IL-5、IL-10 などの Th2 サイトカイン産生応答誘導能(29)と Th3 サイトカインである TGF- β 産生応答誘導能(26)、IL-6 産生誘導能(29)が挙げられるが、これらは経口免疫寛容の誘導や後述する IgA 産生応答に重要なサイトカインである。

Th2 および Th3 サイトカインの誘導能に加えて、パイエル板においては病原微生物による感染が起こった場合は、速やかに Th1 応答が誘導されることが知られている。例えば、*Salmonella typhimurium*(30-33)や *Toxoplasma gondii*(34)の腸管への感染により、パイエル板 T 細胞によるインターフェロン (IFN)- γ 産生が認められることが報告されている。IFN- γ ノックアウトマウスでは、*Salmonella typhimurium* の経口投与により、野生型マウスでは認められない敗血症が投与の 2 週間後に認められた(35)。また、野生型マウスでは *Salmonella typhimurium* の経口投与により CD4⁺ 細胞および CD8⁺ 細胞数の増加、MHC クラス II および血管細胞接着分子 VCAM-1 の発現増強が認められたが、IFN- γ ノックアウトマウスでは認められず、*Salmonella* の排除機構が妨げられていることが示された。このことから、IFN- γ 産生は腸管における *Salmonella* 感染に対する免疫応答に重要な役割を果たしていることが示唆された。

パイエル板における IgA 産生応答の誘導

パイエル板の最も重要な機能の一つと考えられているのが IgA 産生応答の誘導である。抗原がパイエル板の表層に存在する M 細胞を介してパイエル板内に積極的に取り込まれ、取り込まれた抗原は樹状細胞などの抗原提示細胞などにより CD4⁺ T 細胞に提示される。このように、粘膜面で免疫担当細胞の活性化を誘導する組織を誘導組織というが、パイエル板は IgA をはじめとする腸管特異的免疫応答の誘導部位であると考えられてきた。

パイエル板内では抗原特異的 CD4⁺ T 細胞や IgA 産生前駆細胞 (sIgA⁺ B 細胞) がクラススイッチにより誘導され、これらの細胞は一度パイエル板の外に出て胸管から血液循環系を介して再び小腸の粘膜固有層に到達するが、その過程で IL-5 や IL-6 などの IgA 誘導サイトカインの刺激を受けて IgA 産生前駆細胞が形質細胞化して IgA を産生分泌するようになる (11, 36, 37)。粘膜固有層などの実際に IgA の産生が起きる組織を実効組織と呼び、誘導組織と実効組織の二段階からなる抗原特異的粘膜免疫応答機構を前述したように循環帰巢経路 (CMIS) と呼んでいる。

パイエル板細胞の IgA 産生応答への関与について多くの報告がある。1983 年、Kawanishi らはパイエル板 T 細胞クローンは IgA⁻ B 細胞を IgA⁺ 細胞へと変換することを示し、これをスイッチ T 細胞としたが、スイッチ T 細胞のみでは IgA 産生を亢進できず、他の因子の必要性が示唆された (38)。1981 年、Richman らは、抗原を経口投与したマウスのパイエル板細胞を調製し、その細胞を他個体に移入し同抗原で免疫し

た場合、脾臓細胞中の IgA 産生細胞の頻度が上昇することを報告した(39)。また、Kiyono らは、抗原を経口投与したマウスより調製したパイエル板 CD4⁺ T 細胞を B 細胞と共培養した場合、IgA 産生細胞が高頻度に誘導されることを報告した(40)。これらの作用機序は液性因子によると予想されていたが、しばらく不明であり、IL-5 などのサイトカインの同定により明らかになった。パイエル板より樹立された自己反応性 T 細胞クローンにより分泌される IL-4、IL-5 が LPS 刺激した脾臓 B 細胞の IgA 産生を亢進することが報告された(41)。

(IgA 誘導機構)

IgA は以下に述べるような機構で産生誘導される。成熟 B 細胞は BCR として IgM (μ^+) と IgD (δ^+) を細胞表面に発現し、抗原刺激を受けると IgM のみを発現するようになる。さらにこのとき刺激を受けるときの環境により、IgM だけでなく、IgG、IgA、IgE など、どのクラスの抗体を産生するかが決定される。これはアイソタイプスイッチと呼ばれ、抗体定常部の遺伝子が組み換えを起こしそのタイプの抗体が発現するようになる機構であり、サイトカインが重要な因子となっている (Fig. Preface-8)。TGF- β は α^+ へのアイソタイプスイッチを誘導することが知られている(42, 43)。アイソタイプスイッチした IgA⁺ B 細胞は IL-5、IL-6 存在下、抗体産生細胞へ成熟すると言われている(41, 42)。

しかしながら、IL-5、IL-6 の作用については実験系の違いにより多数の報告があり、統一した見解はとれていない。

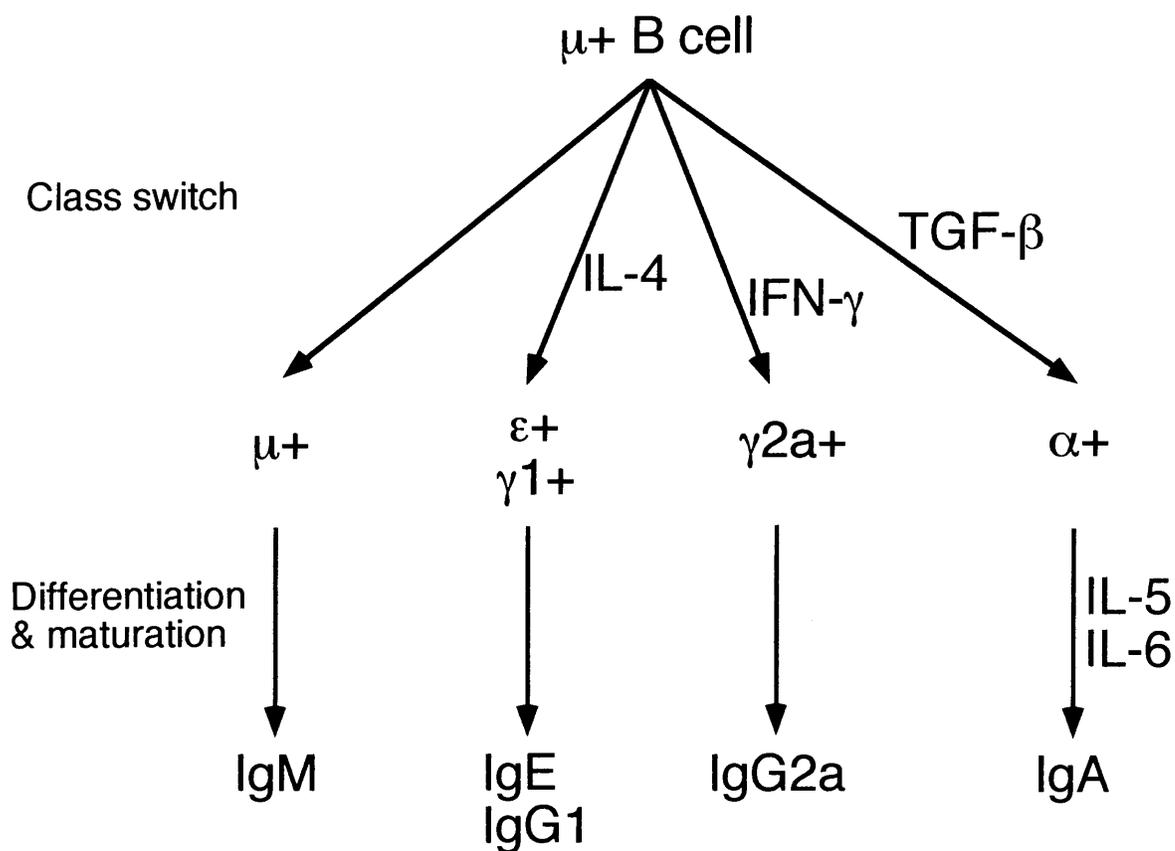


Fig. Preface-8. Antibody isotypes and cytokines.

Herriman ら(44)、Schoenbeck らは LPS 刺激したマウス IgA⁺ B 細胞に IL-5 を加えると IgA 産生が亢進することを報告し(45)、Beagley らは IgA⁺ B 細胞が増殖期であれば、LPS 刺激がなくても IL-5 により IgA 産生が亢進することを報告した(36)。これに対し、Lebman らは IgA⁻ B 細胞でも LPS で刺激すれば IL-5 は作用することを報告している(46)。一方、Kunimoto らは T 細胞非存在下、パイエル板 B 細胞に IL-5 に加えて IL-6 を添加すると IgA 産生が亢進することを報告し(47)、Beagley らはパイエル板 B 細胞を用いた系では、IL-6 は IL-5 より強い効果があることを報告している(37)。

また、最近では、B 細胞には CD5 の発現により、CD5 陽性である B-1 細胞と CD5 陰性の B-2 細胞の二つの細胞群が存在することが知られている(48)。B-2 細胞は T 細胞依存的な機構で抗原特異的な抗体産生に携わっており、通常の B 細胞は B-2 細胞を指している。一方、B-1 細胞は T 細胞非依存的な機構で一般的な菌体構成成分に対する親和性の低い IgA を分泌する。IL-5 ノックアウトマウスでは B-1 細胞の発達が阻害され、低分子に対する IgA 産生が低下していたことから IL-5 は B-1 細胞の発達を誘導し、その IgA 産生の誘導に関与していることが示唆されている(49)。一方、IL-6 ノックアウトマウスでは、粘膜組織における IgM 以外の全てのクラスで抗原特異的な抗体産生の誘導が低下しており、特に IgA で顕著であった(50)。これらより、IL-5 は B-1 細胞、IL-6 は B-2 細胞への作用が強いと考えられている。しかしながら、*in vitro* の系では、互いに B-2 細胞へ作用することが知られており、必須でなくとも、影響を与えていることが考え

られる。

また、TGF- β 1 ノックアウトマウスでは、IgA 産生は各組織で低下は見られるものの劇的な減少ではなかった(51)。IgA 産生が TGF- β 1 以外の TGF により誘導されるものかどうかは明確ではなく、他にも IgA のアイソタイプスイッチを誘導するものが存在する可能性があることが示された。また、IL-15 には、sIgM⁺sIgA⁻ B-1 細胞特異的に sIgA⁺ 細胞へのクラススイッチを促進させる効果があることが示され、IL-15 は B-1 細胞による IgA 産生誘導に関与していることが示唆された(52)。

一方、後述するように、パイエル板樹状細胞の IgA 産生応答誘導への関与が示唆される報告もあり、これらの研究はパイエル板の IgA 産生応答誘導への関与を強く支持するものである。

(パイエル板を介さない IgA 産生誘導)

B-1 細胞はパイエル板にはほとんど存在しないことなどから、B-1 細胞による IgA 産生は CMIS 独立型 IgA 産生応答機構によるものであると考えられる。また、最近 Honjo らによって、B-2 細胞の IgA 産生前駆細胞へのクラススイッチはパイエル板のみならず、実効組織である粘膜固有層でも起こっていることが示された(53)。また、パイエル板欠損マウスにおける糞中 IgA 産生応答は健常マウスと比較して優位に低下するが、完全に抑制されないことも報告されている(54)。このように、IgA を産生する二種類の B 細胞の存在が明らかになるとともに、一方で B-2 細胞については異なる二つの IgA

誘導機構が存在することも明らかになり、パイエル板の機能が不十分な場合にもそれを補う機構が存在することが明らかになった。しかしながら、それぞれに誘導された IgA が機能的にどのように感染防御に関わっているのかということについては不明な点が多く、今後の詳細な解析が期待される。

パイエル板樹状細胞の分布と表現型

上記の腸管特異的免疫応答には樹状細胞が重要な役割を果たすと考えられる。1996年、Kelsallらにより、マウスのパイエル板に2つの異なる樹状細胞の細胞集団が存在することが示された(55)。2つの樹状細胞の細胞集団のうち一つは、腸管腔側に存在するFAEの直下にあるSEDに存在しており、 $CD11c^+/DEC-205^-/M342^-$ の表現型を持つ細胞である。この表現型を持つ細胞は胚中心を除くB細胞濾胞域でも確認されている。もう一つの樹状細胞の細胞集団は濾胞間IFRと呼ばれる濾胞域と濾胞域の間に存在するT細胞に富んだ領域に存在する。これらの樹状細胞は $CD11c^+/DEC-205^+/M342^+$ の表現型を持つ。

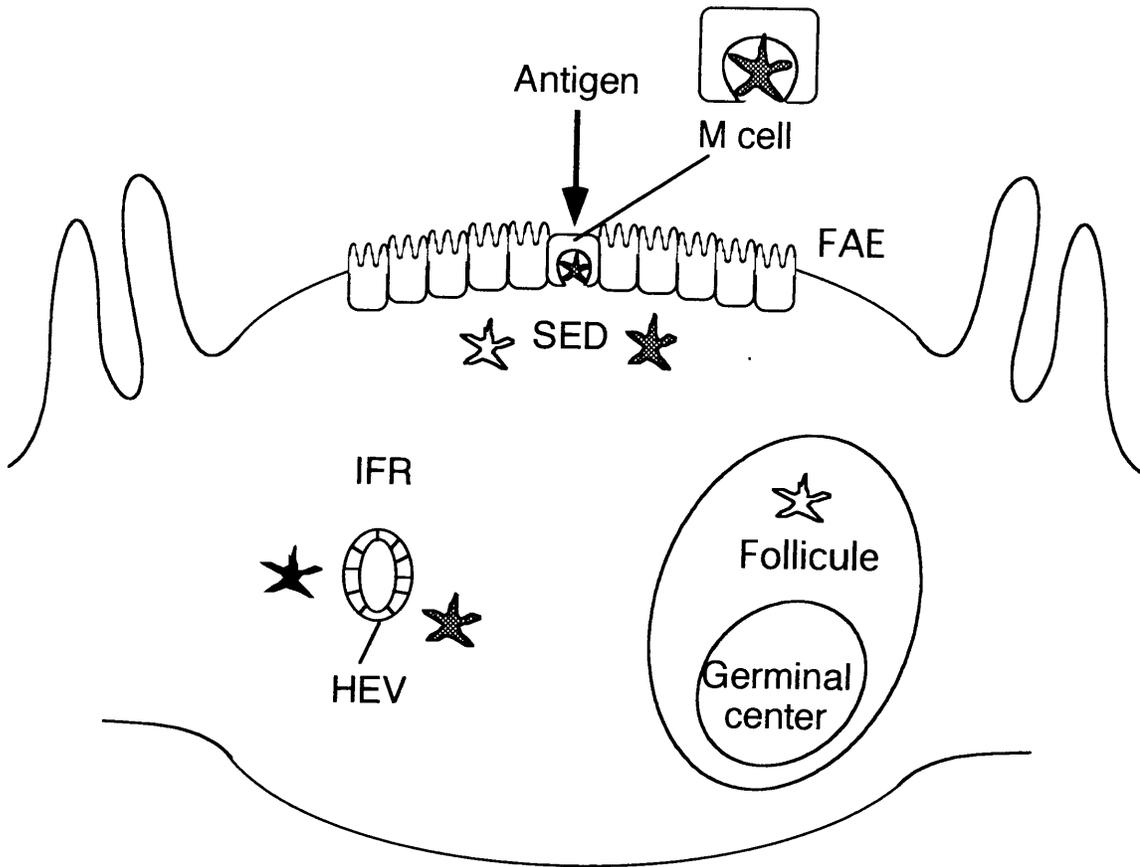
1997年、Rudleらはパイエル板樹状細胞は生体内では未成熟であり、可溶性抗原を効率よく貪食すること、*in vitro*で成熟させると高レベルのMHC class II, CD80, CD86, DEC-205分子を発現し貪食活性を失うことを示した(56)。これらのことからSEDの樹状細胞とIFRの樹状細胞の表現型の違いは移動に伴う機能的成熟の過程で変化が起ころうとと考えられた。すなわち、未成熟なSEDの樹状細胞がM細胞を介してパイエル板に侵入してきた抗原を取り込むとIFR

に移動する。その移動する過程で成熟型に分化すると考えられた。

一方で 2000 年に、Iwasaki と Kelsall はパイエル板の SED に存在する $CD11c^+/DEC-205^-$ の樹状細胞は $CD11b^+$ の骨髄系樹状細胞、IFR に存在する $CD11c^+/DEC-205^+$ は $CD8\alpha^+$ のリンパ球系樹状細胞であり、これらは異なる独立した分化経路を持つ樹状細胞であることを示した (57) (Fig. Preface-9)。その他に、SED と IFR 両方に新しいパイエル板樹状細胞の細胞群として $CD11c^+/CD8\alpha^-/CD11b^-$ (DN: double negative) 細胞が存在することを見いだしたが、機能については不明であった。さらに今年になって、この DN 樹状細胞は、粘膜リンパ組織特有の細胞群であり、パイエル板では FAE 内にも存在することが確認された (58)。これらパイエル板の 3 つの細胞群に *in vitro* で CD40 を介した刺激を与えると DEC-205, MHC class II, CD80, CD86 の発現量は全て同様に増加したが、 $CD8\alpha$ および $CD11b$ の発現量は変化しないことが示され、DN 樹状細胞はミエロイド系樹状細胞およびリンパ球系樹状細胞の未成熟な表現系ではなく、独立した分化経路を持つ細胞群の一つであることが示唆された。

パイエル板樹状細胞の IgA 産生への関与

パイエル板樹状細胞の IgA 産生への関与についても研究がなされてきた。1984 年、Spalding らは、樹状細胞と T 細胞をパイエル板から調製した場合、B 細胞をパイエル板あるいは脾臓のどちらから調製しても、IgA の産生を誘導することを報告し (59)、1986 年、Spalding と Griffin は Pre-B 細胞



- ☆ Myeloid DCs (CD11b⁺/CD8α⁻)
- ★ Lymphoid DCs (CD11b⁻/CD8α⁺)
- ★ Doublenegative DCs (CD11b⁻/CD8α⁻)

Fig. Preface-9. Structure of a Peyer's patch and dendritic cell subsets. FAE; follicle-associated epithelium, SED; subepithelial dome, IFR; interfollicular region, HEV; high endothelial venule.

株を用い、パイエル板由来の樹状細胞は脾臓由来の T 細胞と混合培養しても、IgA 産生を誘導することを報告した(60)。また、George と Cebra はパイエル板の胚中心の B 細胞は T 細胞と混合培養しても、IgA 産生は誘導されないのに対し、パイエル板由来の T 細胞と樹状細胞の両方と混合培養すると、IgA 産生が誘導され、樹状細胞が IgA 産生に強く関与することを明らかにした(61)。このように、IgA 産生の誘導にはパイエル板樹状細胞が関与していることが示唆されているが、どのような機構で誘導しているのかは報告がなく不明であった。その後、パイエル板における IgA 産生応答誘導機構については T 細胞に注目して研究が進められ、樹状細胞の関与についての研究は進んでいなかったが、前述のように 1999 年、Iwasaki らは、調製直後のパイエル板樹状細胞はその脾臓樹状細胞より RT-PCR によって TGF- β の発現が高いことを示した(62)。TGF- β は IgA へのアイソタイプスイッチを誘導する分子として知られており、樹状細胞により分泌された TGF- β が腸管での IgA 産生に関与している可能性もある。しかしながら、TGF- β は上皮系の細胞をはじめ、T 細胞など様々な細胞より分泌されるため、樹状細胞により分泌された TGF- β がどれだけ効力を有しているかは不明である。

以上述べたように、パイエル板樹状細胞が IgA 産生応答をはじめとする腸管特異的免疫応答を制御していることは示されているものの、その機構についてはほとんど明らかになっていない。そこで、本研究では、腸管特異的免疫応答の主要な誘導部位であるパイエル板の機能を解析するために樹状細

胞に焦点を当て、その免疫応答特性について代表的な末梢リンパ組織である脾臓との比較検討を行った。

まず、樹状細胞を高純度に分離する方法を確立し、パイエル板および脾臓樹状細胞の細胞表面分子の発現の違いを比較した（第一章）。次に、パイエル板および脾臓樹状細胞のT細胞増殖応答誘導能、T細胞サイトカイン産生誘導能、サイトカイン産生能について、特にパイエル板にある種の細菌が感染した場合に産生が認められるサイトカインであるIFN- γ に着目して解析した（第二章）。最後に、IgA産生細胞の分化・成熟において重要なサイトカインであるIL-6の産生能について解析し、パイエル板樹状細胞のIgA産生誘導への関与について検討を行った（第三章）。