

第二章 パイエル板樹状細胞の誘導する T 細胞応答

序

マウスより樹立されたヘルパー T 細胞株が産生するサイトカインの違いから二つの異なる細胞集団に分類できることを Mossman らが見出し、現在ではこれら Th1 と Th2 細胞によって多くの免疫反応が制御されていることが明らかとなってきた (5)。Th1 細胞は T 細胞の増殖を制御するサイトカイン IL-2 や炎症反応を制御する IFN- γ 、リンホトキシン (TNF)- β などのサイトカインを産生する。これに対し、Th2 細胞は B 細胞による抗体産生制御に対するサイトカイン IL-4、IL-5、IL-10、IL-13 など産生する。この二つの細胞集団は産生するサイトカインの違いを反映して、免疫応答において異なる機能を有し、相互のバランスにより感染防御や免疫性疾患における免疫応答を制御している (65)。

胸腺で成熟型 CD4⁺ T 細胞へと分化した細胞は、末梢の免疫系組織へ移行する。成熟型 CD4⁺ T 細胞は抗原刺激に伴って IL-2 を産生することはできるが、ヘルパー T 細胞のように免疫応答を制御するようなサイトカインを産生することはできない。この T 細胞は、未感作 T 細胞 (naïve T 細胞) あるいは Th1/Th2 の前駆細胞となる Th0 細胞と呼ばれ、この細胞が機能を有するサイトカイン産生する能力を獲得するためには、ある特定のサイトカイン環境下で外来からの抗原刺激を受けることによって増殖・分化する必要がある。最近のリコンビナントサイトカインやノックアウトマウスを用いた解析から、未感作 T 細胞が Th1 あるいは Th2 細胞のいずれ

れかへ分化するためには、IL-12 あるいは IL-4 いずれかのサイトカインが決定因子となることがわかってきている(66)。

Th1/Th2 分化の方向を決定づける因子として、サイトカイン環境の他に、抗原の構造(67)と濃度(68, 69)、抗原提示細胞の種類(70)、副刺激因子(71, 72)などが言われており、抗原提示細胞、中でも樹状細胞が T 細胞によるサイトカイン産生応答において重要な役割を担っていることが容易に想像できよう。パイエル板において末梢とは異なるサイトカイン産生応答が起こることが知られている。経口抗原に対して、IL-4、IL-5、IL-10 などの Th2 型サイトカイン、Th3 型サイトカインである TGF- β 、また IL-6 が誘導されることが知られているが、これらは IgA 産生応答に重要なサイトカインである。それに加えて、ある種の病原性微生物の侵入に対しては Th1 型サイトカインである IFN- γ が誘導されることも知られている。これらのサイトカイン産生応答にパイエル板の樹状細胞が重要な役割を示していると考え、本章では、パイエル板樹状細胞により誘導される T 細胞応答について、未感作 T 細胞を用いて解析することを目的とした。さらに、樹状細胞を細胞群ごとにみると、CD11b⁺ 樹状細胞は Th2 応答を、CD8 α ⁺ 樹状細胞は Th1 応答をそれぞれ誘導すると言われており、パイエル板樹状細胞群についてもそれぞれ誘導する T 細胞サイトカイン産生応答を解析した。

生体内の T 細胞は多様な抗原に対応するため多様な特異性を持つポリクローナルな集団であり、特定の抗原に特異的な T 細胞が占める割合はごく小さいため、抗原未感作 T 細胞の免疫応答を解析するのは困難であったが、近年の遺伝子

工学の進歩によりこの問題も解決された。実験動物に対する遺伝子導入技術が確立され、単一の抗原特異性を持つ T 細胞のみを有する TCR トランスジェニックマウス (TCR tg マウス) の作成が可能となったからである。7-3-7 TCR tg マウスはオバルブミン (OVA) 特異的 T 細胞の TCR を導入した tg マウスであり、OVA323-339 残基特異的な TCR を発現している T 細胞の頻度が高いため、このマウスを用いることにより OVA 特異的な未感作 T 細胞の調製が容易となる。T 細胞増殖応答の誘導および T 細胞によるサイトカイン産生応答の誘導の解析には主にこのマウスから調製した T 細胞を用いた。

本章では、パイエル板特異的 T 細胞応答の誘導における樹状細胞の機能を解析することを目的とした。そこでまず、パイエル板樹状細胞の T 細胞増殖応答の誘導能について解析した。次に、7-3-7 TCR tg マウス未感作 T 細胞によるサイトカイン産生応答誘導能および T 細胞の分化誘導能についても解析した。そして、T 細胞サイトカイン産生パターンの決定づけに重要であるパイエル板樹状細胞のサイトカイン産生能について解析するとともに、第一章で明らかとなった副刺激因子の発現についても合わせて考察した。

材料および方法

動物

BALB/c マウスおよび C3H/HeN マウスは日本クレア（東京）より購入した。オバルブミン (OVA)₃₂₃₋₃₃₉ 特異的 I-A^d 拘束性 T 細胞クローン 7-3-7 の TCR α 鎖、 β 鎖両方の遺伝子を導入した tg マウス (7-3-7 TCR tg マウス) (73)は、東海大学医学部免疫学教室の垣生園子博士、佐藤健人博士らによって樹立され、その子孫を供与された。7-3-7 TCR 導入遺伝子陽性で、BALB/c マウスとの交配を重ね遺伝的背景が BALB/c マウスとほぼ同一とみなされるマウス同士を交配させ、導入遺伝子ホモ接合体を作成した。実験には、導入遺伝子ホモ接合体と BALB/c マウスを交配させた仔を用いるか、標準的な方法により尾組織より抽出した DNA、あるいは、末梢血細胞より簡易的な方法により抽出した DNA を用いた PCR による検定法により選定したものを用いた。PCR に用いた導入遺伝子特異的プライマーは、導入遺伝子において、 β 鎖をコードする部およびそのプロモーター部にわたって増幅されるように設計されており、その配列は ACT GTC CTC GCT GAT TCT GC および TCC ATC CTC ATG GAA GTT CC である。マウスは滅菌水と γ 線 10 kGy 滅菌飼料 CE-2（日本クレア）により維持した。なお、実験には、BALB/c、tg マウスともに雌マウスを使用した。

培地

第一章に記載したのものを用いた。また、培養には特に記載

がない場合は 5%FCS を添加した培地を用いた。

樹状細胞とその細胞群の調製

パイエル板および脾臓樹状細胞とその細胞群の調製は第一章、材料と方法「FACS Vantage を用いた樹状細胞とその細胞群の分離」に記載した方法と同様に行った。

T 細胞増殖応答

1) 混合リンパ球反応 (Mixed lymphocyte reaction: MLR)

CD4⁺ T 細胞の分離は C3H/HeN マウスより無菌的に脾臓を摘出し、すりつぶして RPMI を用いて洗浄し RPMI に浮遊した細胞懸濁液を得た後、マイクロビーズ結合抗 CD4 抗体 (Miltenyi Biotech) および MACS LS⁺ 分離カラムを用いて分離した。1X10⁵ の CD4⁺ T 細胞と様々な濃度のパイエル板および脾臓樹状細胞を 96 ウェル丸底プレート (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) で 5% CO₂ インキュベータ中で 60 時間培養した。最後の 20 時間はウェル当たり 0.5 μCi の ³H-チミジン (ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA) の存在下培養した。チミジンを取り込んだ細胞はセルハーベスタでガラスファイバーフィルタ上に回収し、取り込まれた ³H 量をシンチレーションカウンタにより測定した。

2) 抗原特異的 T 細胞増殖応答

1) と同様に 7-3-7 TCR tg マウスより CD4⁺ T 細胞を調製した。1X10⁵ の CD4⁺ T 細胞と 1X10⁴ のパイエル板および脾臓樹状細胞をそれぞれ混合し、様々な濃度の OVA 存在下で

96 ウェル丸底プレートを用いて培養し、1)と同様に、増殖を測定した。

抗原特異的 T 細胞のサイトカイン産生応答

7-3-7 TCR tg マウスより、抗原特異的未感作 T 細胞として CD4⁺/CD62L^{high} 細胞を調製した。まず、第一章材料と方法「パイエル板および脾臓細胞の調製」に記載された方法と同様にコラゲナーゼ溶液を用いて脾臓細胞を調製した。4X10⁷個あたり、100倍希釈した FITC 標識抗マウス CD4 mAb H129.19 (BD PharMingen) を 1 ml 添加し、15 分間、4°C で静置した。MACS 緩衝液で洗浄後、Multisort 抗 FITC マイクロビーズを 1X10⁷個あたり 2 μl 加え、15 分間、4°C で静置した。MACS 緩衝液で洗浄後、MACS LS⁺ 分離カラムに細胞懸濁液を添加し、CD4 陽性細胞を選択的に回収した。その細胞懸濁液に Multisort release reagent を 20 μl 加え、10 分間、4°C で静置し、マイクロビーズを切断した。さらに洗浄後、細胞 1X10⁷個あたり Multisort stop reagent を 30 μl とマイクロビーズ結合抗マウス CD62L 抗体を 2 μl 加え、15 分間、4°C で静置した。同様に洗浄後、MACS LS⁺ 分離カラムを用いて、CD4⁺/CD62L^{high} 細胞を選択的に回収した。CD4⁺/CD62L^{high} 細胞の純度はフローサイトメトリーにより検定した結果、96%以上であった。1X10⁴ のパイエル板および脾臓樹状細胞と 1X10⁵ の CD4⁺/CD62L^{high} 細胞を 1 mg/ml の OVA 存在下で 96 ウェル丸底プレートを用いて培養した。抗 IL-12 mAb (BD PharMingen) または rIL-12 (Genzyme, Cambridge, MA) の効果を検討する場合はそれぞれ、10 μg/ml、

5 ng/ml になるように添加した。48 時間後に培養上清を回収し、上清中のサイトカイン産生量をサンドイッチ ELISA により定量した。

T 細胞分化誘導能

サイトカイン産生応答と同様に細胞を調製した。1X10⁴ のパイエル板および脾臓樹状細胞と 1X10⁵ の CD4⁺/CD62L^{high} 細胞を 100 μg/ml の OVA 存在下で 96 ウェル丸底プレートを用いて培養し、3 日後に細胞を 24 ウェル平底プレート (Costar, Cambridge, MA) に移し、さらに 4 日間培養して細胞を増殖させた。細胞を回収して洗浄した後、細胞を再び 96 ウェル平底プレートに 1 ウェル当たり 1X10⁵ ずつ 3000-rad の放射線照射した 9X10⁵ の BALB/c マウス脾臓細胞と共に 100 μg/ml または 1 mg/ml の OVA 存在下で培養した。48 後に培養上清を回収し、上清中のサイトカイン産生量をサンドイッチ ELISA により定量した。

樹状細胞のサイトカイン産生能

パイエル板および脾臓樹状細胞を調製し、様々な方法で刺激して 96 ウェル丸底プレートを用いて培養した。抗 CD40 抗体による刺激は、あらかじめ細胞に 50 μg/ml の抗マウス CD40 mAb (BD PharMingen) を添加し結合させた後、抗 CD40 mAb を架橋するために 5 μg/ml の抗ハムスター IgM mAb 存在下で 96 ウェル丸底プレートを用いて培養した。また、50 ng/ml ホルボール 12-ミリステート 13-アセテート (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) + 250 ng/ml カルシ

ウムイオノフォア A23187、20 $\mu\text{g/ml}$ の LPS (DIFCO, Detroit, USA) を添加して培養した。48 培養上清を回収し、上清中のサイトカイン産生量をサンドイッチ ELISA により定量した。

また、各サイトカイン mRNA の発現量の測定に用いるサンプルを調製する場合は、刺激をして 24 時間培養した細胞と刺激しない細胞を RNA easy kit (Qiagen, Hilden, Germany) 付属の RLT バッファーに 30 μl の 2-メルカプトエタノールを添加した溶液に懸濁し、RNA 抽出するまでの間は -80°C で保存した。RNA の抽出は RNA easy kit を用い、付属のプロトコールに基づき全 RNA の抽出を行った。30 μl の滅菌水に溶解した全 RNA を以下に述べる逆転写反応の鋳型として用いた。逆転写反応は鋳型 RNA 10 μl に 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の oligo-dT (Life Technologies, Gaithersburg, MD) 1 μl を加え、 70°C で 10 分間静置した。氷上に静置した後、5 倍濃度緩衝液 [250 mM Tris-HCl (pH 8.3)、375 mM KCl、15 mM MgCl_2]、10 mM dNTP mix (Life Technologies) 0.1 M DTT、20 U Rnase インヒビター (Promega, Madison, WI, U.S.A) を加え、 42°C で 5 分間静置した。その後、逆転写酵素 Super Script II Rnase H (Life Technologies) を 100 U となるように加え、 42°C で 50 分間静置した。その後 70°C で 15 分間静置し、酵素を失活させた。

ELISA によるサイトカインの定量

捕捉抗体を 0.5 $\mu\text{g/ml}$ となるように 0.1 M Na_2HPO_4 , pH9.0 で希釈し、96 ウェルプレート (NUNC, Roskilde, Denmark) に吸着させた。1% BSA/PBS でブロッキング後、適切に希

釈した培養上清あるいは標準溶液を加え、その後ビオチン標識した検出抗体、ストレプトアビジン結合アルカリフォスファターゼ、続いて 4-ニトロフェニルリン酸ナトリウムを加えて発色させ、マイクロプレートリーダー Model 450 を用いて 405 nm の吸光値を測定した。なお各ステップは PBS/Tween で洗浄した。用いた捕捉 mAb は、IL-2: JES6-1A2、IL-4: BVD4-1D11、IL-5: TRFK5、IL-6: MP5-20F3、IL-12(p40/p70): C15.6、IL-12(p70): 9A5、IFN- γ : R4-6A2、検出 mAb は、IL-2: JES6-5H4、IL-4: BVD4-24G2、IL-5: TRFK4、IL-6: MP5-32C11、IL-12 (p40/p70): C17.8、IFN- γ : XMG1.2 (全て BD PharMingen) を用いた。標準溶液は、IL-2: 7-3-7 TCR tg マウスの脾臓細胞を OVA 刺激した培養上清を限外濾過により濃縮した溶液を Genzyme (Cambridge, MA) の IL-2 ELISA キットの標準溶液により濃度を決定したもの、IL-4: マウス Th2 クローン D10.G4.1 をアロ抗原で刺激した培養上清を同様に濃縮した溶液を Endogen (Boston, MA) の IL-4 キットの標準溶液により濃度を決定したもの、IL-5 および IL-6: PharMingen より購入、IFN- γ : マウス CD8 クローン 13G2 を抗原刺激した培養上清を同様に濃縮した溶液を Genzyme の IFN- γ ELISA キットの標準溶液により濃度を決定したものをそれぞれ用いた。IL-10 の測定には OptEIA™ set (BD PharMingen) を使用した。

定量 PCR

定量 PCR は Light Cycler™ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を用いて行った。全ての PCR は 95°C

で 1 分間静置した後、以下に示す温度変化を 40 サイクル繰り返すことにより行われた。また用いたプライマー、及びハイブリダイゼーションプローブの塩基配列を以下に示す。

GAPDH (95°C; 0 秒、56°C; 15 秒、72°C; 13 秒)

5'-TGA ACG GGA AGC TCA CTG G-3'

(GAPDH センスプライマー)

5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'

(GAPDH アンチセンスプライマー)

5'-CTG AGG ACC AGG TTG TTG TCT CCT GCG A-FITC-3'

(GAPDH 3' FITC 標識プローブ)

5'-LC Red 640-TTC AAC AGC AAC TCC CAC TCT TCC ACC
-リン酸-3'

(GAPDH 3' リン酸化、5' LC Red640 標識プローブ)

IL-10 (95°C; 0 秒、55°C; 10 秒、72°C; 9 秒)

5'-CCC AGA AAT CAA GGA GCA TTT G-3'

(IL-10 センスプライマー)

5'-CAT GTA TGC TTC TAT GCA GTT G-3'

(IL-10 アンチセンスプライマー)

5'-CTG TGA AAA TAA GAG CAA GGC AG-FITC-3'

(IL-10 3' FITC 標識プローブ)

5'-LC Red 640-GGA GCA GGT GAA GAG TGA TTT TAA -リ
ン酸-3'

(IL-10 3' リン酸化、5' LC Red640 標識プローブ)

IL-12p35 (95°C; 0 秒、55°C; 10 秒、72°C; 7 秒)

5'-CAA GAA CGA GAG TTG CCT GG-3'

(IL-12P35 センスプライマー)

5'-TGT GAT TCT GAA GTG CTG CG-3'

(IL-12P35 アンチセンスプライマー)

5'-TCT TTG ATG ATG ACC CTG TGC C-FITC-3'

(IL-12P35 3' FITC 標識プローブ)

5'-LC Red 640-TGG TAG CAT CTA TGA GGA CTT GAA G-
リン酸-3'

(IL-12P35 3' リン酸化、5' LC Red640 標識プローブ)

統計処理

Student の t 検定により行った。

結果

パイエル板樹状細胞は脾臓樹状細胞と比較して T 細胞増殖応答誘導能が高い

CD4⁺ T 細胞は自己の MHC クラス II 分子と自己抗原由来ペプチドの複合体に対しては応答せず寛容なのに対して、異系統のマウスの MHC クラス II 分子を認識して強い増殖応答を示すことが知られている。パイエル板樹状細胞の T 細胞増殖誘導能を脾臓樹状細胞と比較するため、BALB/c マウスより調製したパイエル板樹状細胞および脾臓樹状細胞を抗原提示細胞として、C3H/HeN マウスから調製した脾臓 CD4⁺ T 細胞を刺激し、³H の取り込みを指標として細胞増殖を測定した。その結果、パイエル板樹状細胞の方が脾臓樹状細胞と比較してより強い T 細胞増殖応答誘導能を有していることが明らかとなった (Fig. 2-1)。さらに OVA 特異的 CD4⁺ T 細胞を 7-3-7 TCR tg マウスより調製し、パイエル板または脾臓樹状細胞と共に OVA を添加して培養し、同様に細胞増殖を測定した場合もパイエル板樹状細胞の方が脾臓樹状細胞と比較して強い T 細胞増殖誘導能を有していることが示された (Fig. 2-2)。

パイエル板樹状細胞は脾臓樹状細胞とは異なり、未感作 T 細胞による IFN- γ 、IL-6 の産生を誘導する

次に、パイエル板樹状細胞による tg マウス由来の脾臓未感作 CD4⁺ T 細胞のサイトカイン産生誘導能を解析した。Fig. 2-3 に示すように、7-3-7 TCR tg マウスより調製した脾臓未感作 CD4⁺ T 細胞を OVA 存在下で樹状細胞を抗原提示細胞

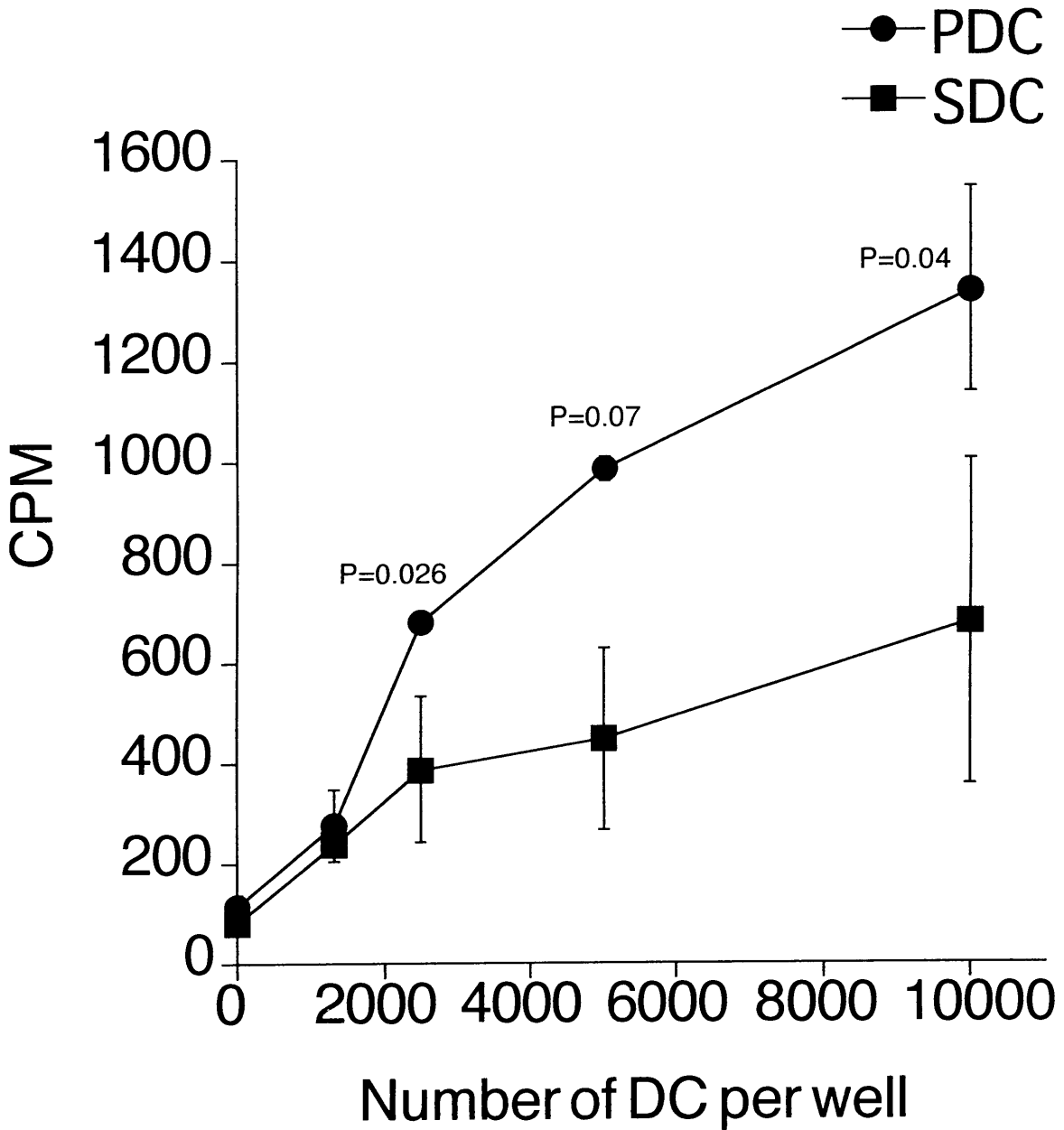


Fig. 2-1. DCs from Peyer's patches are more potent stimulators of allogeneic T cell proliferation than are those from spleen. Mixed lymphocyte reaction was carried out with varying numbers of purified BALB/c DCs (H-2^d) and 10⁵ T cells from C3H/HeN (H-2^k) mice per well in 96-well microtiter plates (round bottom). Proliferation was measured by [³H] thymidine uptake during the last 20 h of a 60 h culture. Results are represented as the mean cpm of triplicate cultures on the y-axis, with the number of DCs per well on the x-axis.

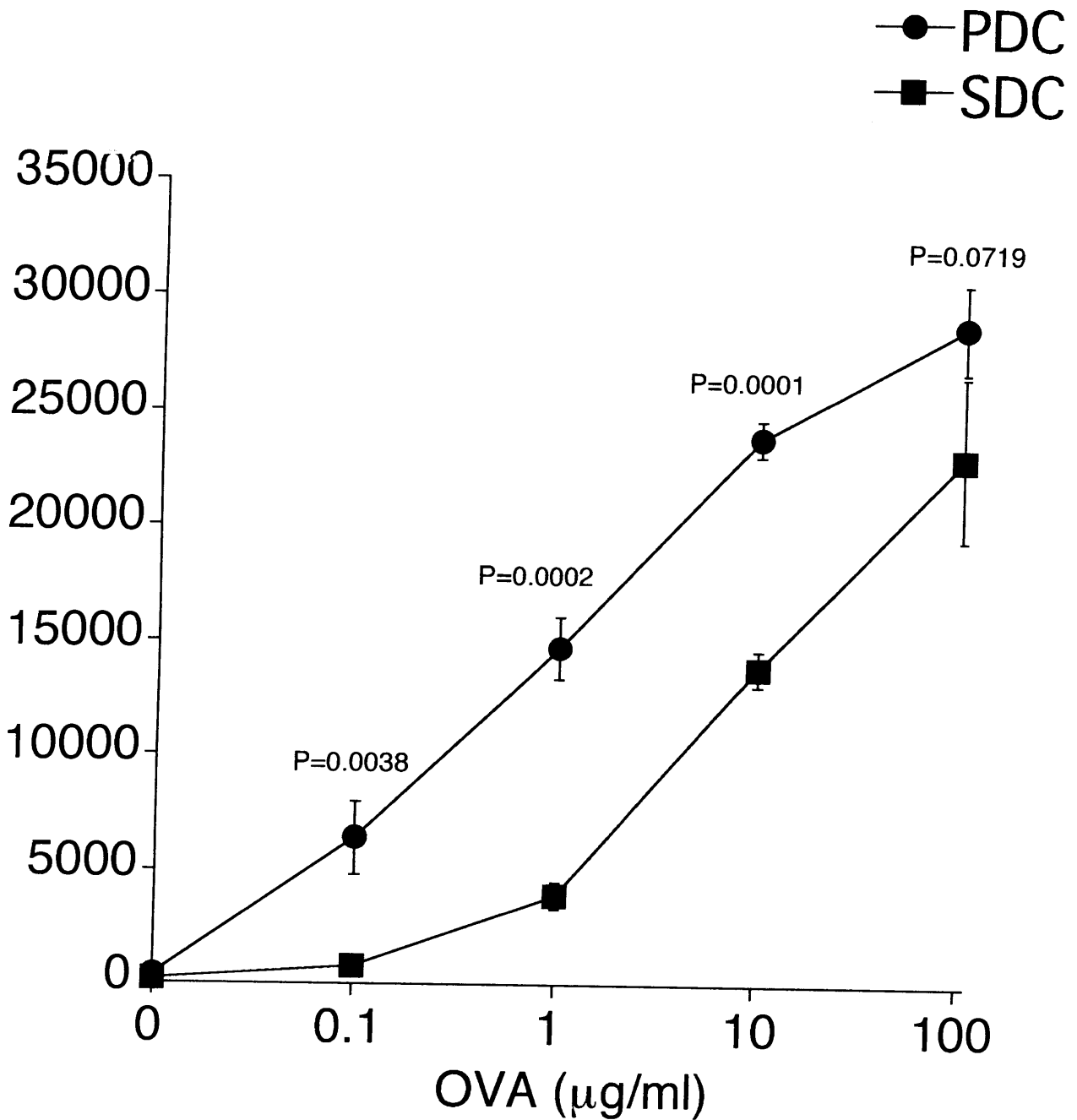


Fig. 2-2. DCs from Peyer's patches are more potent stimulators of transgenic T cell proliferation than are those from spleen. CD4⁺ MACS-purified OVA TCR transgenic T cells from SP (1X10⁵ per well) were cultured with purified BALB/c DCs (1X10⁴ per well) in presence of varying concentrations of OVA in 96-well microtiter plates (round bottom). Proliferation was measured by [³H] thymidine uptake during the last 20 h of a 60 h culture. Results are represented as the mean cpm of triplicate cultures on the y-axis, with the number of DCs per well on the x-axis.

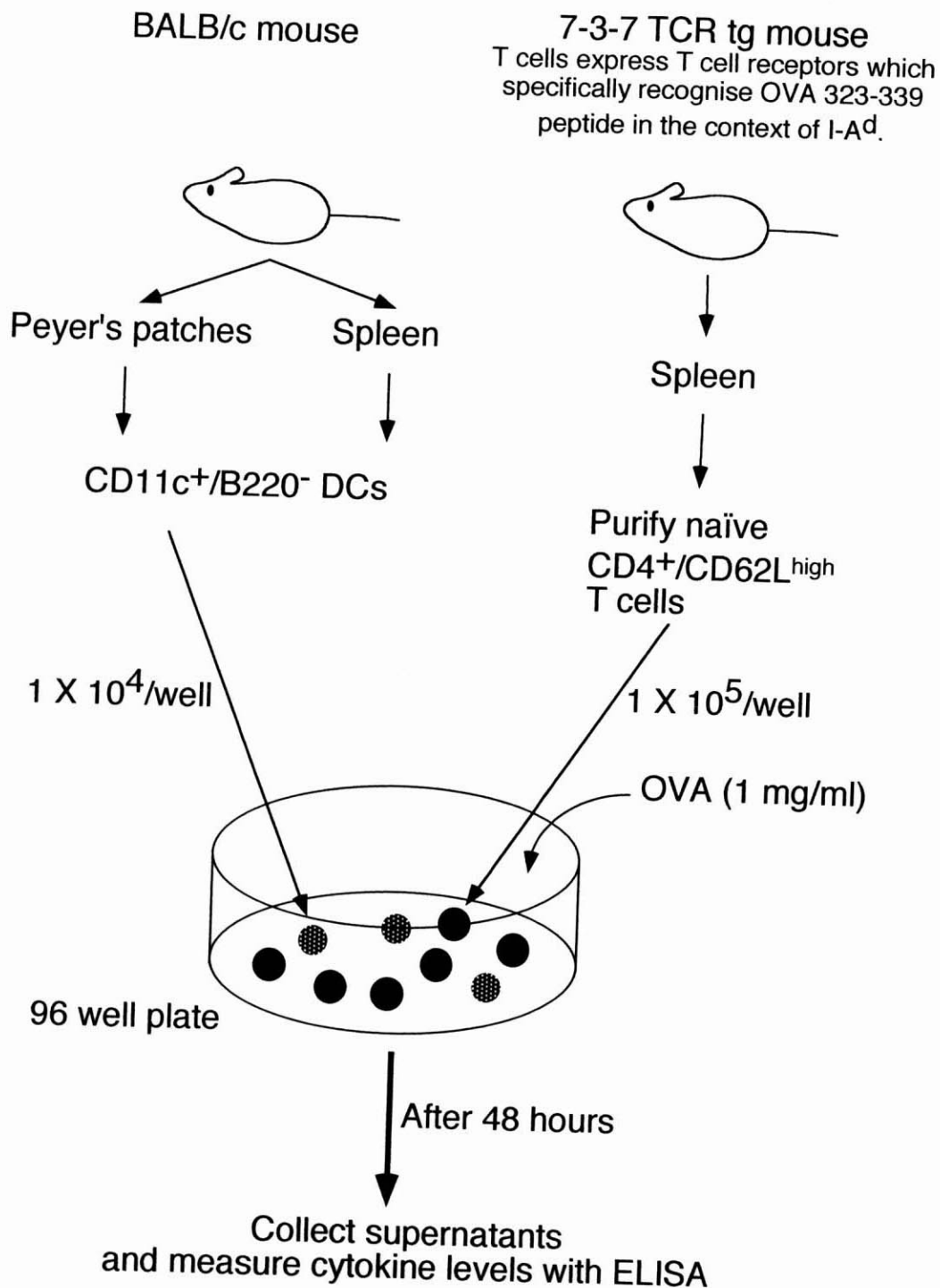


Fig. 2-3. The scheme for primary response of transgenic CD4⁺ T cells cultured with DCs from PP or SP.

として用いて培養した結果、パイエル板樹状細胞を用いた場合は脾臓樹状細胞と比較して高い IFN- γ 、IL-6 の産生誘導が認められた (Fig. 2-4)。IL-4、IL-5、IL-10 に関してはいずれの樹状細胞を抗原提示細胞として用いた場合も検出限界以下であった。また、データは示していないが、パイエル板および脾臓 B 細胞を抗原提示細胞とした場合は全てのサイトカイン産生は認められなかった。

パイエル板樹状細胞は Th1 および Th2 細胞両方の分化誘導を誘導する

続いて、パイエル板樹状細胞による tg マウス由来の脾臓未感作 CD4⁺ T 細胞の分化誘導能を解析した。Fig. 2-5 に示すように、tg マウスより調製した脾臓未感作 CD4⁺ T 細胞を OVA 存在下で樹状細胞を抗原提示細胞として用いて培養し、その 1 週間後に同抗原を用いて再刺激をして培養し、誘導されるサイトカイン産生パターンについて解析した。その結果、Fig. 2-6 に示されるように脾臓樹状細胞は Th1 サイトカインである IFN- γ の誘導能は低く、Th2 サイトカインである IL-4, 5, 10 および IL-6 の産生誘導能が高かった。それに対し、パイエル板樹状細胞は Th1 サイトカイン、Th2 サイトカイン両方の産生誘導能が高かった。またパイエル板樹状細胞の方が脾臓樹状細胞と比較して IFN- γ 、IL-6 の産生誘導能が高かった。

パイエル板樹状細胞と脾臓樹状細胞の IL-12 産生能に差はない

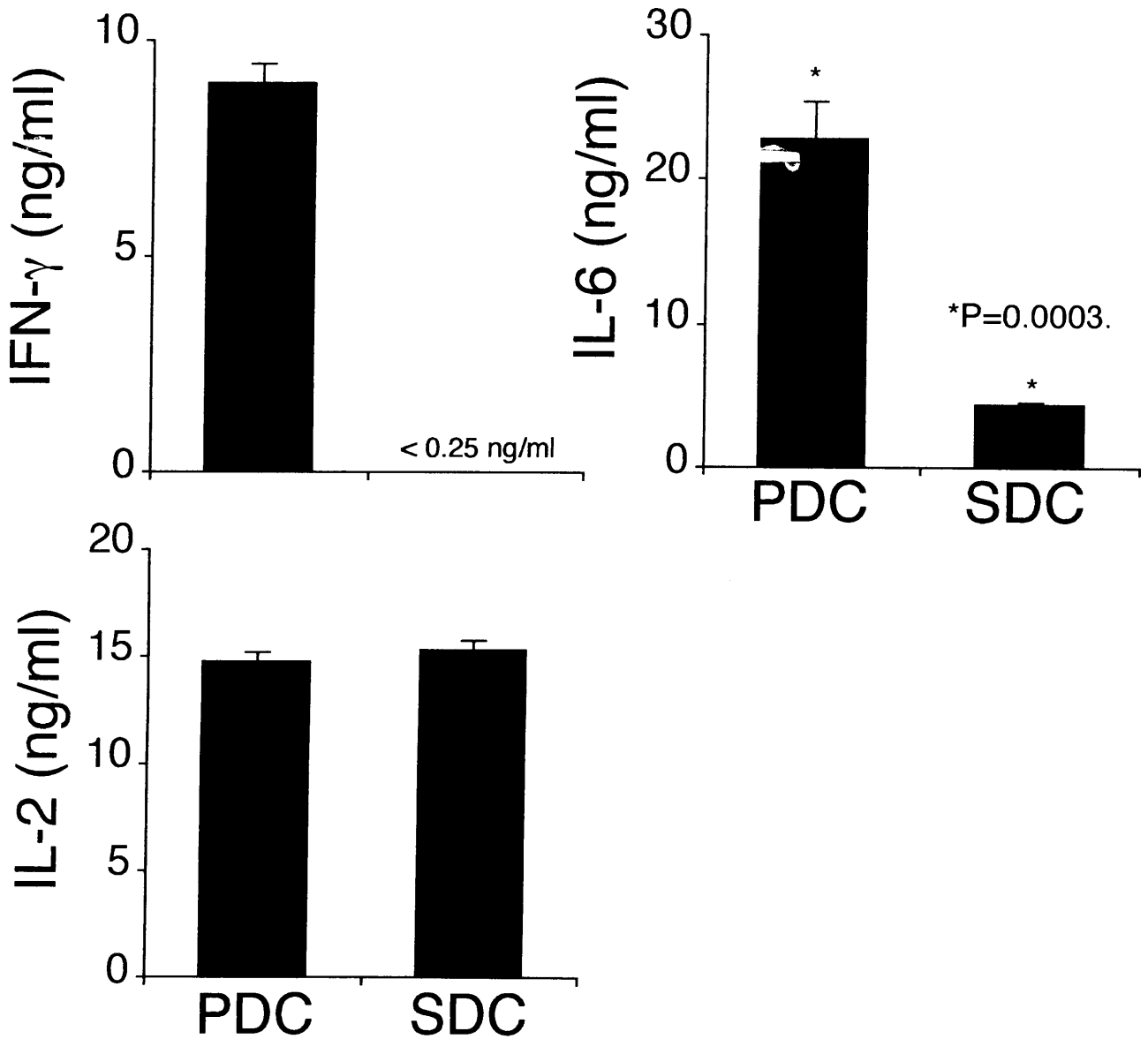


Fig. 2-4. Cytokine productions induced by the antigen presentation of sorted DC from PP and SP during primary culture. Naïve CD4⁺/CD62L^{high} MACS-purified OVA TCR transgenic T cells from SP (1×10^5 per well) were coincubated with DCs (1×10^4 per well) from PP or SP for 48 h in the presence of OVA (1 mg/ml). Supernatants were harvested and cytokine levels were measured by ELISA. Data is representative of two separate experiments producing similar results.

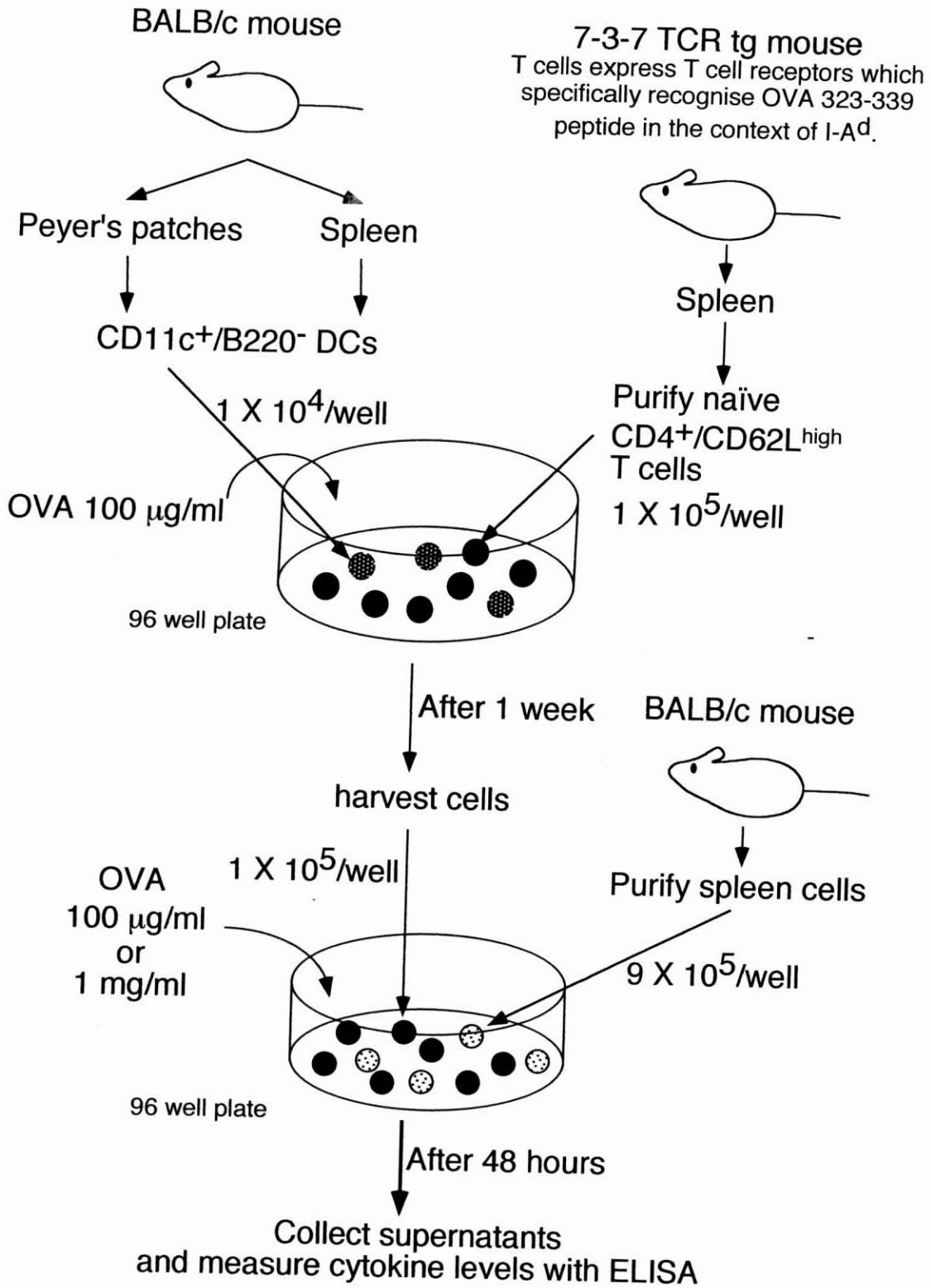


Fig. 2-5. The scheme for secondary response of transgenic CD4⁺ T cells cultured with DCs from PP or SP.

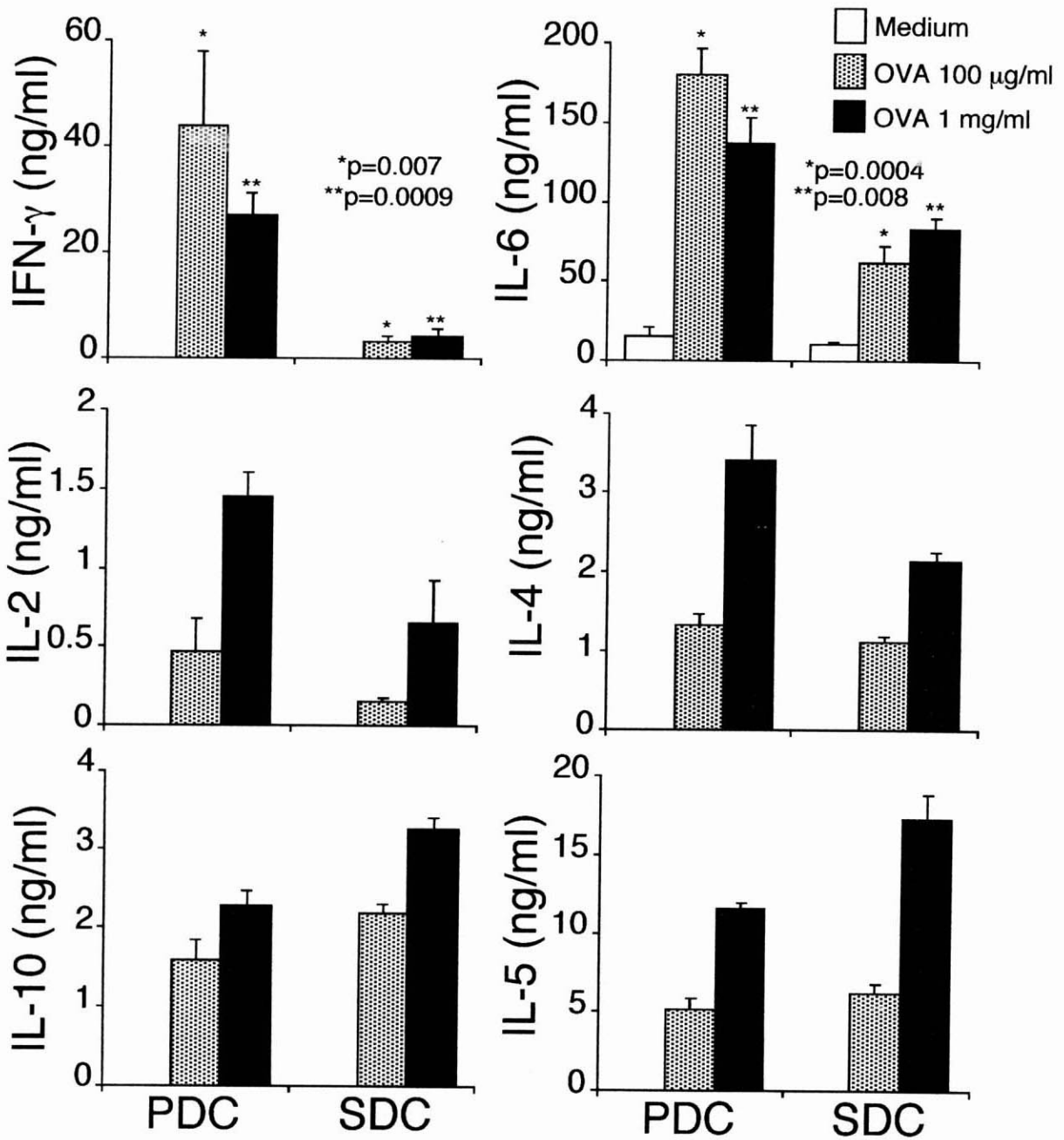


Fig. 2-6. Cytokine productions by TCR transgenic T cells during secondary stimulation. Naïve CD4⁺/CD62L^{high} MACS-purified OVA TCR transgenic T cells from SP (1X10⁵ per well) were coincubated with DCs (1X10⁴ per well) from PP or SP for 3 d in the presence of OVA (100 μg/ml). After 3 d, cells were transferred to 24-well plates and allowed to expand for 4 d in fresh medium without additional antigens. T cells were then washed and 1X10⁵ cells were coincubated with 9X10⁵ X-ray irradiated spleen cells and OVA (100 μg/ml or 1 mg/ml) on 96-well plates. Supernatants were harvested and cytokine levels were measured by ELISA at 48 h. Data is representative of three separate experiments producing similar results.

次にパイエル板および脾臓樹状細胞に様々な方法で刺激し、培養上清中の IL-12 p40 および p70 の濃度を ELISA により測定した結果、抗 CD40 抗体により刺激した場合、パイエル板樹状細胞と脾臓樹状細胞両方に IL-12 p40 産生が認められたが、差は認められなかった (Fig. 2-7)。

パイエル板 CD11b⁺ 樹状細胞が IFN- γ 産生を誘導する

続いて、CD11b⁺ および CD8 α ⁺ 樹状細胞をそれぞれ分離し、Fig. 2-3 と同様な方法でパイエル板および脾臓樹状細胞の各細胞群によるサイトカイン産生誘導能を解析した。その結果、Fig. 2-8 に示すように、パイエル板 CD11b⁺ 樹状細胞を抗原提示細胞とした場合は脾臓樹状細胞とは異なり、高い IL-2、IL-6、IFN- γ 産生誘導が認められ、IL-4 の産生は認められなかったのに対して、パイエル板 CD8 α ⁺ 樹状細胞を用いた場合には IFN- γ 産生は誘導されず、IL-4 の産生が誘導された。脾臓樹状細胞の場合はパイエル板樹状細胞のような細胞群間の明確なサイトカイン産生パターンの違いは認められなかった。同様な実験において抗 IL-12 抗体を添加して培養したところ、添加しない場合と比較して IL-2、IL-4、IL-6 はその産生量にほとんど変化が見られなかったのに対して、IFN- γ に関してはほぼ完全にブロックされた (Fig. 2-9)。リコンビナント IL-12 (rIL-12) を添加して培養したところ、IL-2、IL-6 はその産生量にほとんど変化が見られなかったが、IFN- γ は増加し、IL-4 は減少した。

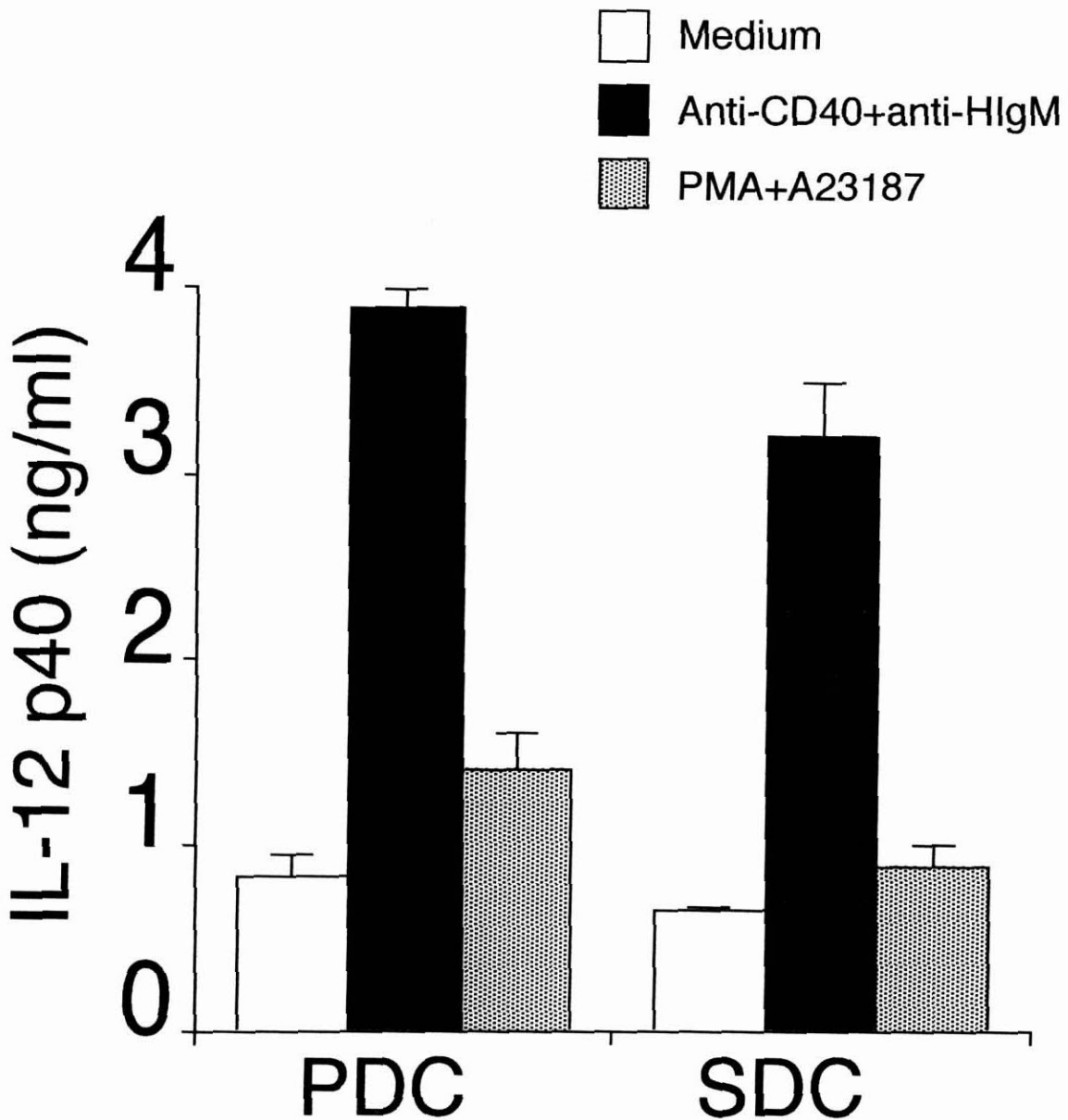


Figure 2-7. IL-12 p40 productions by sorted PP DCs after stimulation. Sorted DCs (5×10^4 per well) from BALB/c mice were incubated in the presence of stimulators. Cells were preincubated with hamster anti-mouse CD40 mAb ($50 \mu\text{g/ml}$) and then incubated with anti-hamster IgM ($5 \mu\text{g/ml}$) to crosslink anti-CD40 mAb, or incubated with PMA (50 ng/ml)+A23187 (250 ng/ml). Supernatants were harvested and cytokine levels were measured by ELISA at 48 h. Data is representative of five separate experiments producing similar results.

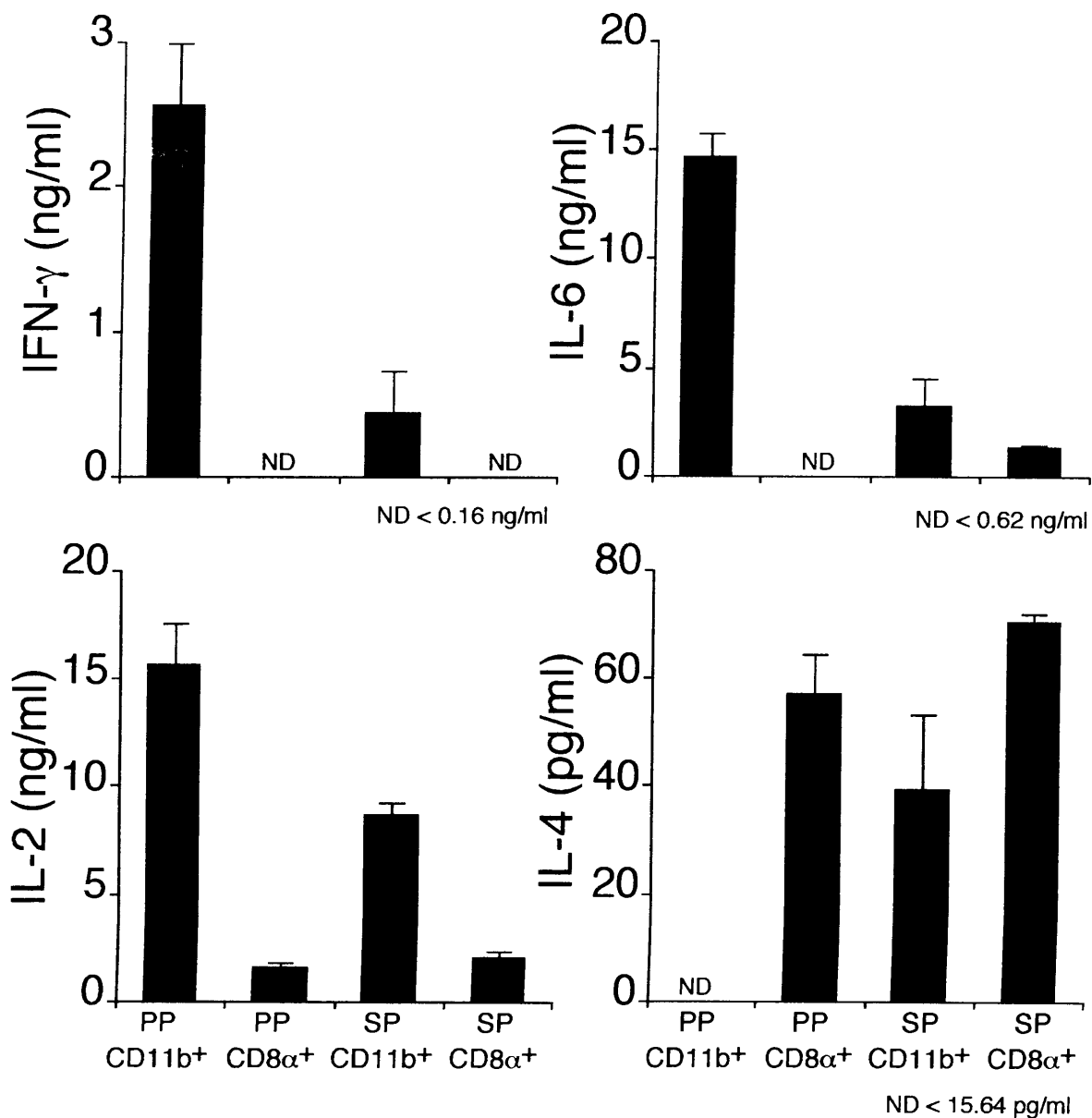


Fig. 2-8. Cytokine productions induced by the antigen presentation of sorted DC populations from PP and SP during primary culture. Naïve CD4⁺/CD62L^{high} MACS-purified OVA TCR transgenic T cells from SP (1X10⁵ per well) were coincubated with DC populations (1X10⁴ per well) from PP or SP for 48 h in the presence of OVA (1 mg/ml). Supernatants were harvested and cytokine levels were measured by ELISA at 48 h. Data is representative of two separate experiments producing similar results.

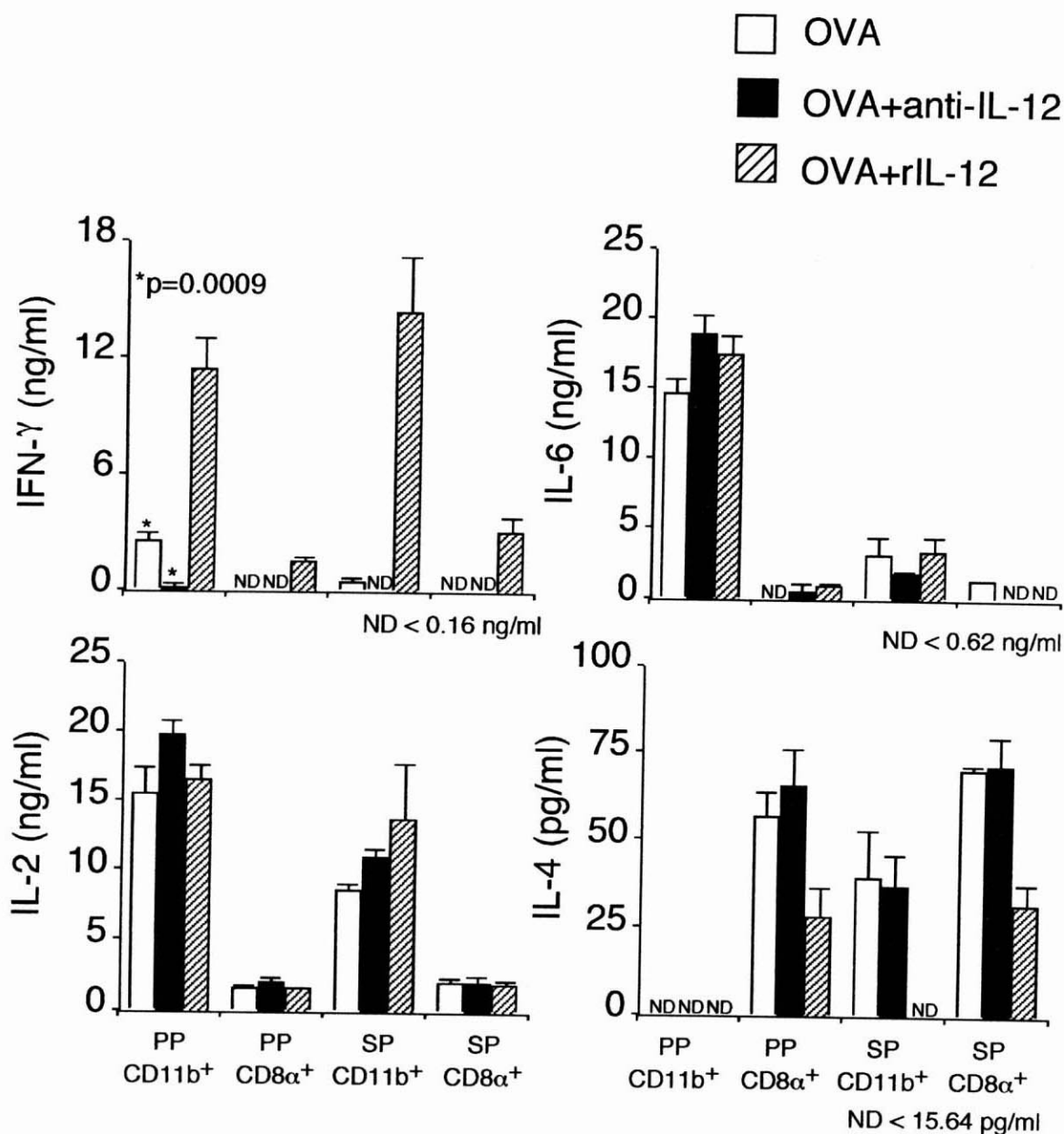


Fig.2-9. Cytokine productions induced by the antigen presentation of sorted DC populations from PP and SP during primary culture. Naive CD4⁺/CD62L^{high} MACS-purified OVA TCR transgenic T cells from SP (1X10⁵ per well) were coincubated with DCs (1X10⁴ per well) from PP or SP for 48 h in the presence of OVA (1 mg/ml) and anti-IL-12 mAb (10 μg/ml) or rIL-12 (5 ng/ml). Supernatants were harvested and cytokine levels were measured by ELISA. Data is representative of two separate experiments producing similar results.

パイエル板 CD11b⁺ 樹状細胞は IFN- γ 産生を誘導するサイトカイン IL-12 の p70 ヘテロダイマーを産生していない

パイエル板 CD11b⁺ 樹状細胞は IFN- γ 産生を誘導し、それが抗 IL-12 抗体によりブロックされることが明らかとなったので、各樹状細胞群の IL-12 産生能を ELISA により測定した。その結果、現在までの報告の通り、脾臓 CD8 α ⁺ 樹状細胞に IL-12 p40 の産生が認められ CD11b⁺ 細胞は産生が少ないことが示された (Fig. 2-10)。それに対して、パイエル板樹状細胞では CD11b⁺ 細胞、CD8 α ⁺ 細胞ともに同程度の産生が認められた。この場合も抗 CD40 抗体で刺激した場合に高い産生が認められた。一方、IL-12 p70 に関しては、脾臓 CD8 α ⁺ 樹状細胞を抗 CD40 抗体で刺激した場合にわずかに産生が認められ、脾臓 CD11b⁺ 樹状細胞では認められなかった。そして、パイエル板 CD8 α ⁺ 樹状細胞は脾臓 CD8 α ⁺ 樹状細胞と比較してより高い IL-12 p70 産生能を示した。パイエル板 CD11b⁺ 樹状細胞はその高い IFN- γ 誘導能より、高い IL-12 p70 産生能を示すことが予想されたが ELISA で測定した結果は検出限界以下であった。また、Light Cycler を用いた定量 PCR を用いて、IL-12 p35 および Th1 細胞への分化を抑制するサイトカインである IL-10 の mRNA の発現について解析したが、全細胞群においてどちらのサイトカインを測定した場合も全て検出以下となった。

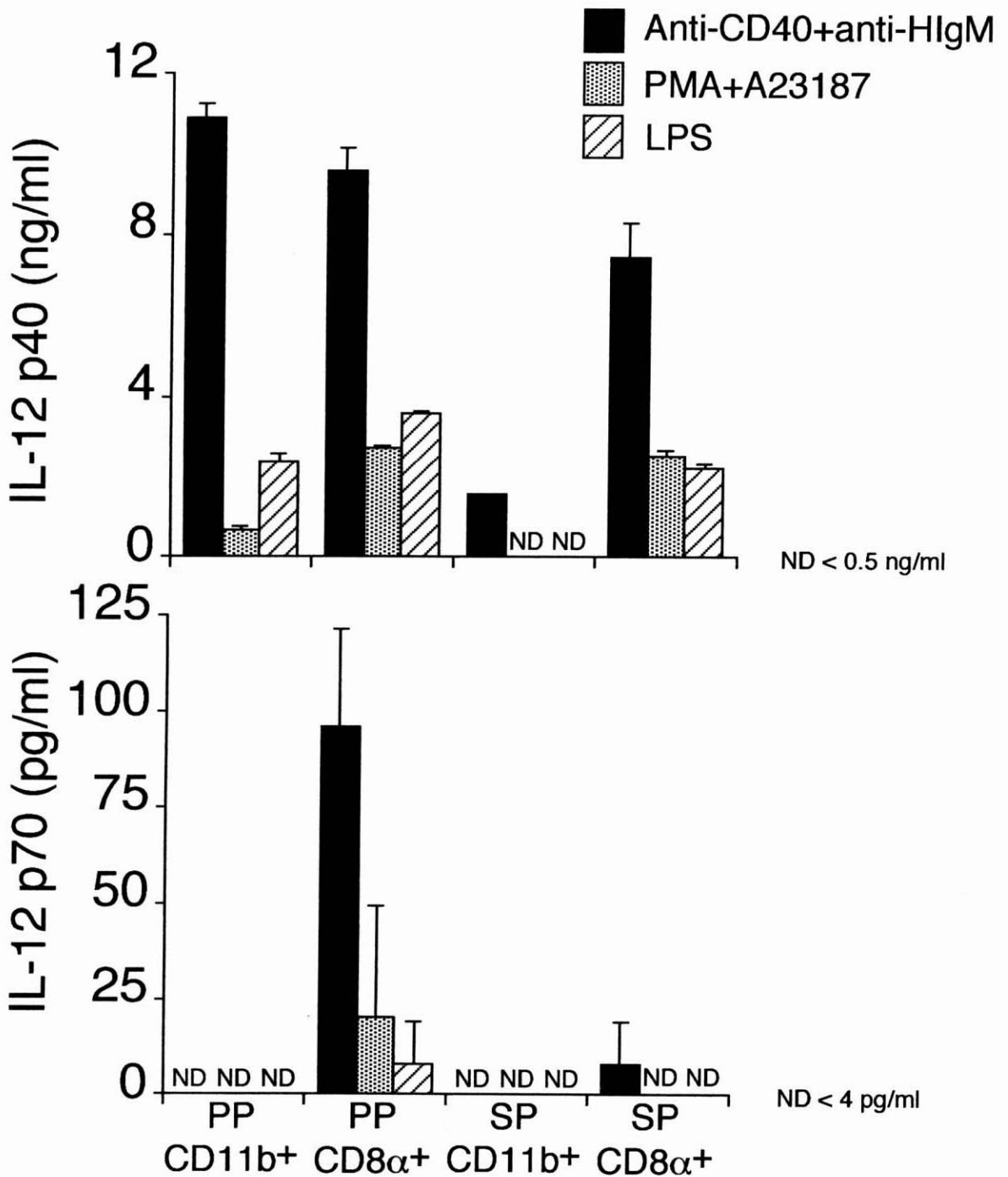


Fig. 2-10. IL-12 productions by sorted PP DC subpopulations after stimulation. Sorted DC subpopulations (2×10^4 per well), CD11b⁺ DCs or CD8α⁺ DCs from BALB/c mice were incubated in the presence of simulators. Cells were preincubated with hamster anti-mouse CD40 mAb (50 μg/ml) and then incubated with anti-hamster IgM (5 μg/ml) to crosslink anti-CD40 mAb, incubated with PMA (50 ng/ml)+A23187 (250 ng/ml), or incubated with LPS (20 μg/ml). Supernatants were harvested and cytokine levels were measured by ELISA at 48 h.

考察

まず、パイエル板および脾臓樹状細胞の初期 T 細胞応答誘導能における違いがあるかどうかについて、異なる MHC 分子を持つ T 細胞を用いて解析した。自然界では個体ごとに異なる MHC 分子を持っているが、実験マウスは全ての個体が同一の MHC を持つような系統が作成されている。これを純系マウスと言う。同じ MHC 分子を持つ同系のマウスの血球を混合するだけでは細胞増殖は見られないが、MHC が異なる抗原提示細胞と CD4⁺ T 細胞を混合して培養すると CD4⁺ T 細胞は抗原提示細胞上に発現している自己と異なる MHC クラス II 分子を認識して TCR を介して刺激を受け増殖する。BALB/c マウスより調製した樹状細胞と C3H/HeN マウスから調製した CD4⁺ T 細胞を混合して培養した結果、パイエル板樹状細胞の方が脾臓樹状細胞と比較して高い T 細胞増殖応答誘導能があることが示された。したがって、パイエル板樹状細胞は高い初期 T 細胞応答誘導能を持つことが示されたので、続いて BALB/c マウスと同様な遺伝的バックグラウンドを持つ、すなわち同じ MHC 分子を発現している 7-3-7 TCR tg マウスより CD4⁺ T 細胞を調製し、OVA 存在下で培養した。その結果、同様にパイエル板樹状細胞の方が、脾臓樹状細胞比較して高い抗原特異的 T 細胞増殖応答誘導能があることが示された。これらの結果は、第一章で示されたように、パイエル板樹状細胞の方が脾臓より MHC クラス II 分子の発現が高いことから、細胞当たりの TCR を介した T 細胞に入るシグナルが強くなるため、このような結果にな

ったと考えられる。また、パイエル板樹状細胞の方が CD86、CD40 などの発現が高く、より成熟していることも示されたが、これらの分子を介した副刺激により伝達されるシグナルもパイエル板の方が強いため強い増殖応答を示したと考えられる。

次に、パイエル板および脾臓樹状細胞を抗原提示細胞とした時に誘導される 7-3-7 TCR tg マウスから調製した CD4⁺T 細胞のサイトカイン産生応答について検討した。その結果、パイエル板樹状細胞を抗原提示細胞として用いた時は脾臓樹状細胞と比較して高い IFN- γ 、IL-6 産生が認められた。未感作 T 細胞を活性化し免疫応答を開始させることができるのは樹状細胞だけであると言われているが、本研究においても B 細胞を抗原提示細胞として未感作 T 細胞を刺激してもサイトカイン産生は認められず、そのことを裏付ける結果となった。続いて T 細胞分化誘導能についても検討したところ、脾臓樹状細胞とは異なり、Th1 サイトカイン、Th2 サイトカインともに誘導能が高く、IFN- γ 、IL-6 産生に関しては脾臓より高いという結果になった。パイエル板樹状細胞を抗原提示細胞として用いた場合に高い IL-6 産生が認められたことに関しては、第三章で述べる。本章では、パイエル板樹状細胞による IFN- γ 産生誘導に関してさらに検討した。

IFN- γ を産生するのは主に T 細胞、NK 細胞、マクロファージであると言われてきたが、近年、Ohteki らにより樹状細胞も IL-12 存在下で IFN- γ を産生することが明らかとなった(74)。パイエル板の各樹状細胞群を抗 CD40 抗体で刺激し、ELISA により IFN- γ 濃度を測定したが、検出限界以下であ

った。したがって、Fig. 2-4, 8, 9 で示された IFN- γ 産生はほとんどが T 細胞によって産生されたものであり、パイエル板樹状細胞による抗原提示により、未感作 T 細胞が IFN- γ 産生能を獲得すると考えられる。

その機構の一つとして IFN- γ 産生を誘導するサイトカインである IL-12 の産生能の違いが考えられた。樹状細胞により産生される IL-12 と CD40-CD40 リガンドの相互作用は Th1 応答の誘導に重要であると考えられている (75, 76)。また、樹状細胞による IL-12 産生の誘導機構の一つとして CD40-CD40 リガンドや MHC クラス II-TCR を介する刺激、またはその両方が必要との報告がされている (77-79)。そこで、パイエル板および脾臓樹状細胞をそれぞれ単独で、また、CD40-CD40 リガンドの相互作用を想定して抗 CD40 抗体を用いるなど様々な方法で刺激して培養し、培養上清中の IL-12 p40 の濃度を ELISA により測定した。その結果、両樹状細胞ともに抗 CD40 抗体で刺激した場合に同程度の IL-12 p40 の産生が認められた。PMA およびカルシウムイオノフォアで刺激した場合は刺激しない場合と同程度の産生しか認められなかった。脾臓樹状細胞もパイエル板と同程度の IL-12 p40 を産生しているのにも関わらず、IFN- γ 産生誘導能は低かった。また、IL-12 には二つのサブユニットが存在し、p40 と p35 が結合したヘテロダイマー-p70 のみが生理活性を示す。また、p40 同士が結合したホモダイマーは競合阻害を示すことも知られている。そこで ELISA により IL-12 p70 の培養上清中の濃度を調べたところ、パイエル板および脾臓樹状細胞共に検出限界以下であった。Light Cycler を用いた

定量 RT-PCR により IL-12 p35 の mRNA の発現も調べたが、これについても検出限界以下であった。

以上によりパイエル板全樹状細胞の解析では、パイエル板樹状細胞による IFN- γ 産生誘導機構について明らかにならなかったため CD11b⁺ 樹状細胞、CD8 α ⁺ 樹状細胞をそれぞれ分離し、同様に 7-3-7 TCR tg マウスから調製した CD4⁺ T 細胞のサイトカイン産生応答について検討した。その結果、パイエル板 CD11b⁺ 樹状細胞は IFN- γ 産生誘導が高く、IL-4 はあまり産生しない Th1 応答を誘導し、CD8 α ⁺ 樹状細胞は IL-4 産生誘導が高く、IFN- γ はあまり産生しない Th2 型応答を誘導した。Fig. 2-8 には代表的なデータを示したが、ここに示した結果では、パイエル板 CD8 α ⁺ 樹状細胞が誘導する IFN- γ 産生および CD11b⁺ 樹状細胞が誘導する IL-4 産生は ELISA の検出限界以下であったが実験によってはわずかに検出されることもあった。

また、最近 Iwasaki らにより、同様なパイエル板樹状細胞群による tg マウスの未感作 T 細胞の分化誘導能の実験において、パイエル板 CD11b⁺ 樹状細胞は IFN- γ 産生を誘導するだけでなく、パイエル板 CD8 α ⁺ 樹状細胞や脾臓樹状細胞群と比較して Th2 サイトカインである IL-4、IL-10 産生を強く誘導するという本研究とは異なる結果も報告されている (58)。さらにパイエル板 CD11b⁺ 樹状細胞は IL-12 産生能が CD8 α ⁺ 樹状細胞と比較して低いのに加え IL-10 産生能が高く、IL-10 を産生することによって IL-4、IL-10 産生誘導を促進していると述べている。そこで IL-10 の発現について IL-12 p35 と同様に Light Cycler を用いた定量 RT-PCR によ

り IL-10 の mRNA の発現レベルを測定したが、検出限界以下であった。このようにパイエル板 CD11b⁺ 樹状細胞による IL-12 および IL-10 産生能の違いが、サイトカイン産生パターンの違いが生じる一因であると考えられる。Iwasaki らが樹状細胞の調製に用いたマウスは本研究で用いたマウスと同じ BALB/c マウスであるが、このように異なるサイトカイン産生能を有する原因は、腸内細菌叢の違いが大きいと推測される。パイエル板において、CD11b⁺ 樹状細胞はパイエル板内に抗原を積極的に取り込んでいる M 細胞の直下に位置する SED に、CD8 α ⁺ 樹状細胞は SED からは離れた場所に位置する T 細胞領域である IFR に局在することが報告されている。したがって、CD11b⁺ 樹状細胞は CD8 α ⁺ 樹状細胞と比べて腸内細菌に接触する頻度が高く、その刺激を受けやすいことが考えられ、同系統のマウスでもその腸内細菌叢の違いにより異なるサイトカイン産生能ならびに T 細胞サイトカイン産生誘導能をもつ可能性は高い。

Fig. 2-8 と同様な条件でさらに抗 IL-12 抗体を添加して培養した。抗 IL-12 抗体を添加することにより、添加しない場合と比較してパイエル板 CD11b⁺ 細胞による IFN- γ 産生誘導はほぼ完全に抑制され、rIL-12 を添加して培養した場合は増強した。これらの結果から、パイエル板樹状細胞のうち、CD11b⁺ 細胞の IL-12 の産生能は他の樹状細胞群と比較して高く、IFN- γ 産生を誘導していることが予想された。

そこでパイエル板および脾臓の樹状細胞群を様々な方法で刺激したところ、抗 CD40 抗体を用いて刺激した時の IL-12 p40 産生はパイエル板の両細胞群でほとんど差が認められな

かった。さらに IL-12 p70 を測定したところ予想に反して、パイエル板 CD8 α ⁺ 樹状細胞は産生が認められたのに対して、CD11b⁺ 樹状細胞には認められなかった。これらの結果から、パイエル板 CD11b⁺ 樹状細胞による IFN- γ 産生誘導は IL-12 以外のサイトカインまたは細胞表面分子を介するものであると示唆された。

近年 IL-12 p40 と結合しヘテロダイマーを形成する分子として p19 という新しいタンパク質が同定され、このヘテロダイマーは IL-23 と名付けられた(80)。IL-23 はヒトおよびマウスの活性化樹状細胞に発現し、IFN- γ 産生を誘導する。Fig. 2-9 の実験で、抗 IL-12 抗体により IFN- γ 産生が抑制されていたが、本実験で用いられた抗 IL-12 抗体は p40 分子を認識して結合するので、IL-12 のみならず IL-23 も抑制してしまうことが考えられ、IFN- γ 産生誘導は IL-23 による効果である可能性が考えられた。

樹状細胞が誘導する T 細胞応答には前述したように樹状細胞上に発現している副刺激因子が大きく関与している。最も重要な副刺激因子に B7 ファミリーがある。特に B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86) に関してはよく研究されており、それぞれ Th1 応答、Th2 応答を誘導することが知られている(71, 81, 82)。第一章で示したように、パイエル板樹状細胞と脾臓樹状細胞の B7-1 の発現に差はなく、B7-2 についてはパイエル板の方が高かったのにもかかわらず、パイエル板樹状細胞は IFN- γ 産生を誘導した。B7-2 により誘導される Th2 型サイトカイン応答を抑制し、IFN- γ 産生誘導が促進されていると考えられる。それに加え、B7-1、B7-2 分子の Th1、Th2

分化誘導における異なる機能についてはたくさんの報告があるもののその分子レベルでの誘導機構については全く不明であり、これらの分子が必ずしも Th1、Th2 応答を誘導するのではない、という可能性もあると考えられる。さらに 2001 年、新しい B7 ファミリーのメンバーである B7-DC という樹状細胞特異的に発現が認められる分子が同定された(83)。この副刺激分子は B7-1 分子より強い T 細胞増殖促進能を有する。また、未感作 T 細胞による IFN- γ 産生を強く誘導する能力を保持していることが Ig 融合タンパク質を用いた実験により示され、樹状細胞による Th1 応答誘導における重要なメディエーターであることが示唆された。したがって、パイエル板 CD11b⁺ 細胞は他の細胞群と比較して B7-DC の発現が高く、IFN- γ 産生誘導に関与している可能性があると考えられる。

第二章においては、パイエル板樹状細胞は脾臓樹状細胞と比較して成熟度が高く、より強力な T 細胞活性化能を有していることが示された。さらに、パイエル板 CD11b⁺ 樹状細胞を抗原提示細胞とした場合は IFN- γ 産生応答が、パイエル板 CD8 α ⁺ 樹状細胞を用いた場合には IL-4 の産生応答の誘導能がそれぞれ高く、細胞群により明確な違いがあることが示され、脾臓とは異なる T 細胞サイトカイン産生誘導能を有することも明らかとなった。

パイエル板樹状細胞群はそれぞれ異なる T 細胞分化を誘導し、互いに抑制することによって Th1 応答と Th2 応答のバランスを保っていると考えられる。一方、樹状細胞に Th1/Th2 バランスを保つフィードバック機構があることも知

られている(84)。ヒト単球由来の樹状細胞 (DC1) は Th1 応答を誘導し、ヒト末梢血由来樹状細胞 (DC2) は Th2 応答を誘導する。そして Th2 サイトカインである IL-4 は DC1 の成熟と DC2 の前駆細胞のアポトーシスを誘導するが、それは CD40L からのシグナルと IFN- γ により抑制される。

パイエル板においてある種の病原微生物感染により IFN- γ が産生され、生体防御に対応していることはすでに述べた。ウイルスなどの細胞内感染に対しては、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が誘導されこれを排除している。樹状細胞にはそれ自体がウイルスに感染していなくてもウイルス感染細胞を取り込み、MHC クラス II 分子だけでなく MHC クラス I 分子でも同時にウイルス抗原を提示し、CD4⁺ T 細胞と CD8⁺ T 細胞を同時に活性化できるというクロスプライミング機構を持つことが近年あきらかとなった(85-87)。IFN- γ は CTL の誘導において MHC クラス I 分子による抗原提示を促進するとの報告もあり(88, 89)、パイエル板 CD11b⁺ 樹状細胞がクロスプライミングや IFN- γ 産生により効率よくウイルス感染に対する免疫応答を誘導している可能性は十分あると考えられる。

一方、緒言でも述べたように、パイエル板樹状細胞の細胞群の局在が明らかになっている(55, 57)。CD11b⁺ 樹状細胞は抗原をパイエル板内に取り込む M 細胞の直下に位置するドーム領域、SED に存在することが報告されている。すなわち、M 細胞を介してパイエル板に取り込まれた抗原は、CD11b⁺ 樹状細胞に貪食されると考えられる。また、微生物由来の刺激により CD11b⁺ 樹状細胞のケモカインレセプタ

— CCR7 の発現が上がるとの報告もある(57)。T 細胞に富んだ領域である IFR 内に存在する HEV の血管内皮細胞は CCR7 のリガンドである MIP-3 β や SLC を分泌している。本章で示された結果と既往の細胞移動に関する研究を合わせて考察することによって、パイエル板の内部に局在する二つの樹状細胞群がそれぞれ異なる T 細胞サイトカイン産生応答を誘導する機構を推測することができる (Fig. 2-11)。すなわち、

- (1) ある種の病原微生物が侵入すると CD11b⁺ 樹状細胞に貪食される。
- (2) SED で CD4⁺ T 細胞に抗原提示され、速やかに IFN- γ 産生応答が誘導される。
- (3) 一部の CD11b⁺ 樹状細胞は微生物の侵入により成熟すると CCR7 の発現が増強されて T 細胞領域である IFR に移動し、そこでも CD4⁺ T 細胞による IFN- γ 産生応答を誘導される。
- (4) 一方、クロスプライミングと同様な機構で CD11b⁺ 樹状細胞から CD8 α ⁺ 樹状細胞に抗原が渡される。
- (5) 抗原を取り込んだ CD8 α ⁺ 樹状細胞は CD4⁺ T 細胞に抗原提示を行い、IL-4 が誘導されることにより Th2 応答が惹起されて抗体産生応答や経口免疫寛容が誘導されると考えられる。

また、パイエル板の CD11b⁻/CD8 α ⁻ 樹状細胞は、SED、IFR の他に M 細胞ポケットにも存在することが知られているが、どのようにケモカインによる制御を受け、パイエル板内を

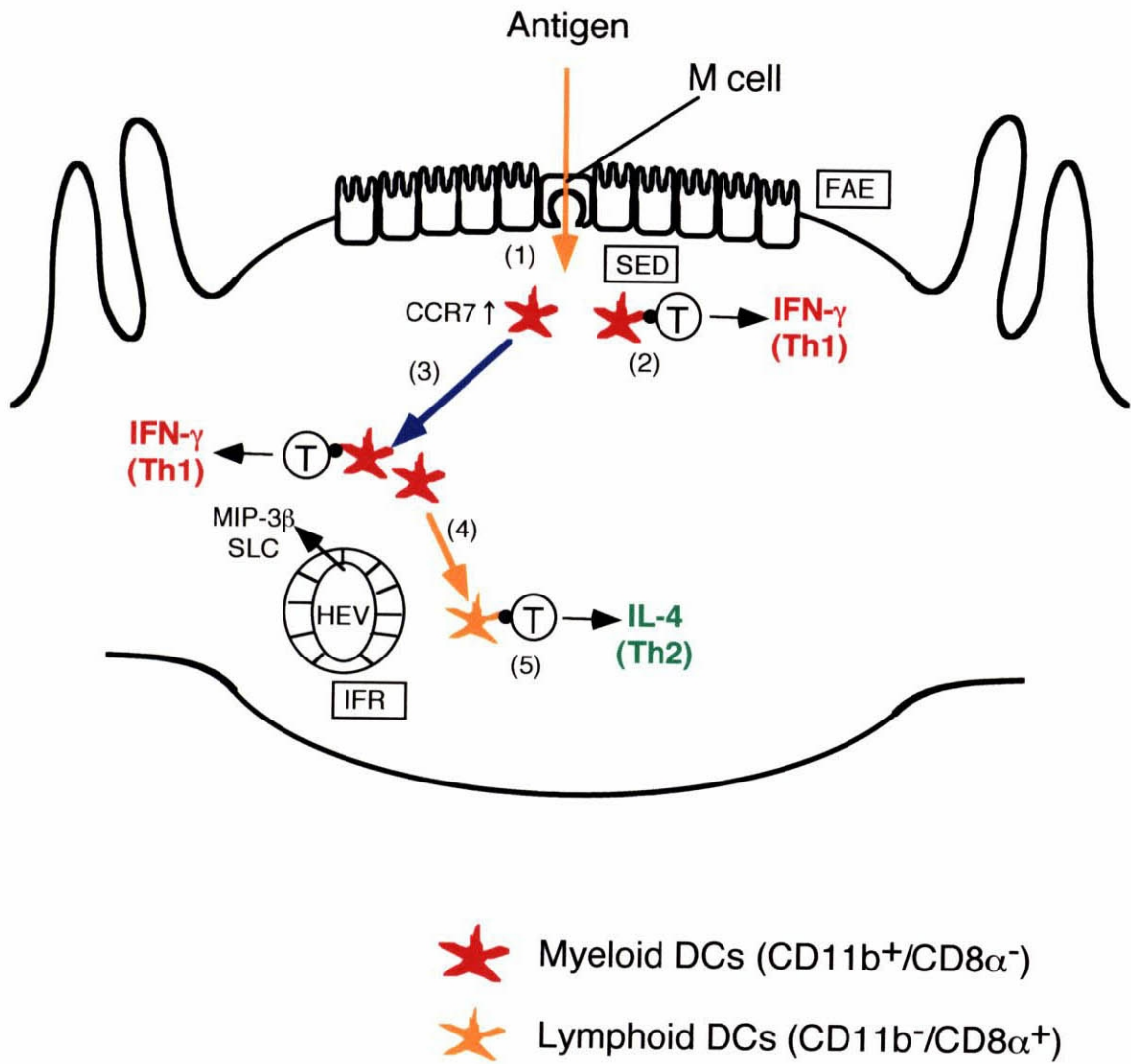


Fig. 2-11. Proposed mechanism of DC recruitment to the distinct regions of the PP and induction of Th1 or Th2 response.

移動するのかは不明である。パイエル板の異なる3つの樹状細胞群がどのように抗原の種類や量などを見分け、それに適する成熟と移動を伴って効率よくT細胞応答を誘導するのかということなど未解明な部分は多く残されており、大変興味深い今後の課題となるであろう。

第三章 パイエル板樹状細胞の IL-6 産生

序

IL-6 は様々な細胞により分泌され、IL-1 と同様に多様な細胞に作用し、標的となる細胞により効力が異なる。免疫系、造血系、急性期反応など生体防御反応に深く関与し、さらに神経系にも作用が認められる因子である。免疫系では B 細胞への影響がよく研究されており、B 細胞の抗体産生細胞への成熟を促すことが知られており、ノックアウトマウスを用いた研究などにより、特に、IgA への効果が強いことが示されている(37)。

IgA 産生誘導機構には、CMIS を介する機構とそうでない機構が存在することが示唆されている(90)。CMIS における腸管粘膜誘導組織であるパイエル板においては B-2 細胞で占められており、B-1 細胞はほとんど存在しない。それに対して、実効組織である小腸粘膜固有層では、B-2 細胞と B-1 細胞が同程度存在することが明らかとなっている。したがって、B-2 細胞は CMIS 依存型 IgA 誘導機構に、B-1 細胞は CMIS 独立型 IgA 誘導機構にそれぞれ関与していると言えよう。そして、IL-6 は B-2 細胞に、IL-5 は B-1 細胞にそれぞれ作用していると言われている。したがって、パイエル板において誘導される IgA 産生誘導機構には IL-6 の役割は非常に重要であると考えられる。

一方、パイエル板の樹状細胞が IgA 産生応答に関与していることも示されている。しかしながら、どのような機構でパイエル板樹状細胞が IgA 産生応答を誘導するのかについては

報告がなく不明である。

そこで本章では、パイエル板樹状細胞に着目してその分泌応答について検討し、パイエル板樹状細胞も IL-6 を産生していることを明らかにした。また、パイエル板樹状細胞による IgA 産生誘導能について脾臓樹状細胞と比較し、その際の IL-6 の効果について検討した。さらに、パイエル板樹状細胞のどの細胞群が IL-6 を分泌するのか解析し、生体内でどのように IgA 産生応答が誘導されるのかについて考察した。

材料および方法

動物

BALB/c マウスは日本クレア（東京）より購入した。OVA₃₂₃₋₃₃₉ 特異的 I-A^d 拘束性 T 細胞ハイブリドーマ DO11.10 の TCR α 鎖、 β 鎖両方の遺伝子を導入した tg マウス(91)は、D. Y. Loh（日本ロシュ、神奈川）らによって樹立され、その子孫を中山俊憲博士（千葉大学大学院医学研究科免疫細胞医学）を通じ供与された。DO11.10 TCR 導入遺伝子陽性マウスは、尾組織より標準的な方法により抽出した DNA を用いた導入遺伝子特異的プライマーによる PCR での検定法、あるいは、末梢血細胞を用いた抗クロノタイプ mAb KJ1-26(92)でのフローサイトメトリーによる検定法により選定したものをを用いた。なお、用いたプライマーの配列は CAG GAG GGA TCC AGT GCC AGC および TGG CTC TAC AGT GAG TTT GGT である。KJ1-26 は P.Marrack 博士 (National Jewish Center for Immunology and Respiratory Medicine, Denver, CO) よりハイブリドーマを供与され、検定にはその培養上清、または、PE 標識抗 KJ1-26 mAb (Caltag) を用いた。マウスは滅菌水と γ 線 10 kGy 滅菌飼料 CE-2（日本クレア）により維持した。なお、実験には、BALB/c、tg マウスともに雌マウスを使用した。

培地

第一章に記載したものをを用いた。また、培養には特に記載がない場合は 5%FCS を添加した培地を用いた。

パイエル板および脾臓細胞の調製

第一章に記載された方法と同様に行った。

樹状細胞とその細胞群の調製

パイエル板および脾臓樹状細胞とその細胞群の調製は第一章、材料と方法「FACS Vantage を用いた樹状細胞とその細胞群の分離」に記載した方法と同様に行った。

樹状細胞の IL-6 産生能の解析

第二章材料と方法「樹状細胞のサイトカイン産生能」および「ELISA によるサイトカインの定量」に記載した方法で行った。

定量 PCR

定量 PCR は Light Cycler™ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)を用いて行った。全ての PCR は 95°C で 1 分間静置した後、以下に示す温度変化を 40 サイクル繰り返すことにより行われた。また用いた IL-6 のプライマー、及びハイブリダイゼーションプローブの塩基配列を以下に示す。GAPDH については第二章に記載したものを使用した。なお、IL-6 mRNA の発現量の比較は IL-6 の測定値を内部標準遺伝子である GAPDH の測定値で割った値を用いて比較した。

IL-6 (95°C; 0 秒、56°C; 15 秒、72°C; 13 秒)

5'-TGG AGT CAC AGA AGG AGT GGC TAA G-3'

(IL-6 センスプライマー)

5'-TCT GAC CAC AGT GAG GAA TGT CAA C-3'

(IL-6 アンチセンスプライマー)

5'-AAG TCA CTT TGA GAT CTA CTC GGC-FITC-3'

(IL-6 3' FITC 標識プローブ)

5'-LC Red 640-AAC CTA GTG CGT TAT GCC TAA GC-リン
酸-3'

(IL-6 3' リン酸化、5' LC Red 640 標識プローブ)

抗体産生応答の誘導

CD4⁺/CD62L^{high} 細胞の調製は、第二章材料と方法「抗原特異的 T 細胞のサイトカイン産生応答」に記載された方法と同様に DO11.10 TCR tg マウスより調製した。IgD⁺ B 細胞の調製は第一章「パイエル板および脾臓細胞の調製」に記載された方法と同様に、まず BALB/c マウスより脾臓細胞を調製した後、 4×10^7 個あたり、100 倍希釈したビオチン化抗マウス IgD mAb (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, USA) を 1 ml 添加し、15 分間、4°C で静置した。MACS 緩衝液で洗浄後、ストレプトアビジンマイクロビーズを 1×10^7 個あたり 2 μ l 加え、15 分間、4°C で静置した。MACS 緩衝液で洗浄後、MACS LS⁺ 分離カラムに細胞懸濁液を添加し、IgD 陽性細胞を選択的に回収した。調製した細胞の純度はフローサイトメトリーにより検定した結果、96%以上が IgD⁺ /B220⁺ であった。 5×10^3 のパイエル板または脾臓樹状細胞、 2×10^5 の CD4⁺/CD62L^{high} 細胞、 2.5×10^5 の

IgD⁺ 細胞を 100 µg/ml の OVA 存在下で 96 ウェル平底プレートを用いて培養した。1 週間後に培養上清を回収し、上清中の抗体産生量をサンドイッチ ELISA により定量した。

ELISA による抗体の定量

捕捉抗体を IgG および IgM は 2 µg/ml、IgA は 1 µg/ml、となるように 0.1 M Na₂HPO₄, pH9.0 で希釈し、96 ウェルプレート (NUNC) に吸着させた。1% BSA/PBS でブロッキング後、適切に希釈した培養上清あるいは標準溶液を加え、その後アルカリフォスファターゼ結合アイソタイプ特異的検出抗体、続いて 4-ニトロフェニルリン酸ナトリウムを加えて発色させ、マイクロプレートリーダー Model 450 を用いて 405 nm の吸光値を測定した。なお各ステップは PBS/Tween で洗浄した。用いた捕捉 mAb は、IgG、IgG1、IgG2a: 抗マウス IgG (Fab specific) (Sigma)、IgA: 抗マウス IgA (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA)、IgM: 抗マウス IgM (Cappel, Durham, NC)、検出抗体は、抗 IgG (H+L)、IgG1、IgG2a、IgA、IgM (全て Zymed) を用いた。標準溶液は、Zymed より購入したものを使用した。

統計処理

Student の t 検定により行った。

結果

パイエル板樹状細胞は高い IL-6 産生能を有する

第二章 Fig. 2-4 において、パイエル板樹状細胞と 7-3-7 TCR tg マウス由来の脾臓未感作 CD4⁺ T 細胞を OVA 存在下で培養すると高い IL-6 の産生が認められた。その IL-6 がパイエル板樹状細胞の作用により T 細胞が分泌しているものなのか、それとも樹状細胞自体が分泌しているものなのかを調べるため、パイエル板および脾臓樹状細胞をそれぞれ単独でさまざまな方法により刺激して培養し、培養上清中の IL-6 濃度を測定した。その結果、Fig. 3-1 に示すように、抗 CD40 抗体、PMA およびカルシウムイオノファー A23187、LPS を用いた刺激いずれの場合においても、パイエル板および脾臓樹状細胞ともにコントロールと比較して高い IL-6 産生が認められた。Fig. 2-4 において、T 細胞のみならず、樹状細胞も IL-6 を産生していたことが示唆された。そして、どの刺激をした場合もパイエル板樹状細胞の方が、脾臓樹状細胞と比較して IL-6 を多量に産生することが明らかとなった。

さらにパイエル板および脾臓樹状細胞における IL-6 mRNA の発現について解析した。パイエル板および脾臓樹状細胞を調製し、Fig. 3-1 と同様な刺激をして 24 時間培養し、細胞を回収して mRNA を抽出後、逆転写酵素を用いて cDNA を作成し、Light Cycler を用いた定量 PCR により定量した。Table 3-1 に示した値は IL-6 の測定値を内部標準遺伝子の GAPDH の測定値で割ったものである。ここでは 2 回の実験結果を示したが、パイエル板樹状細胞の方が脾臓細胞と比較して、抗 CD40 抗体、PMA およびカルシウムイオノフォア

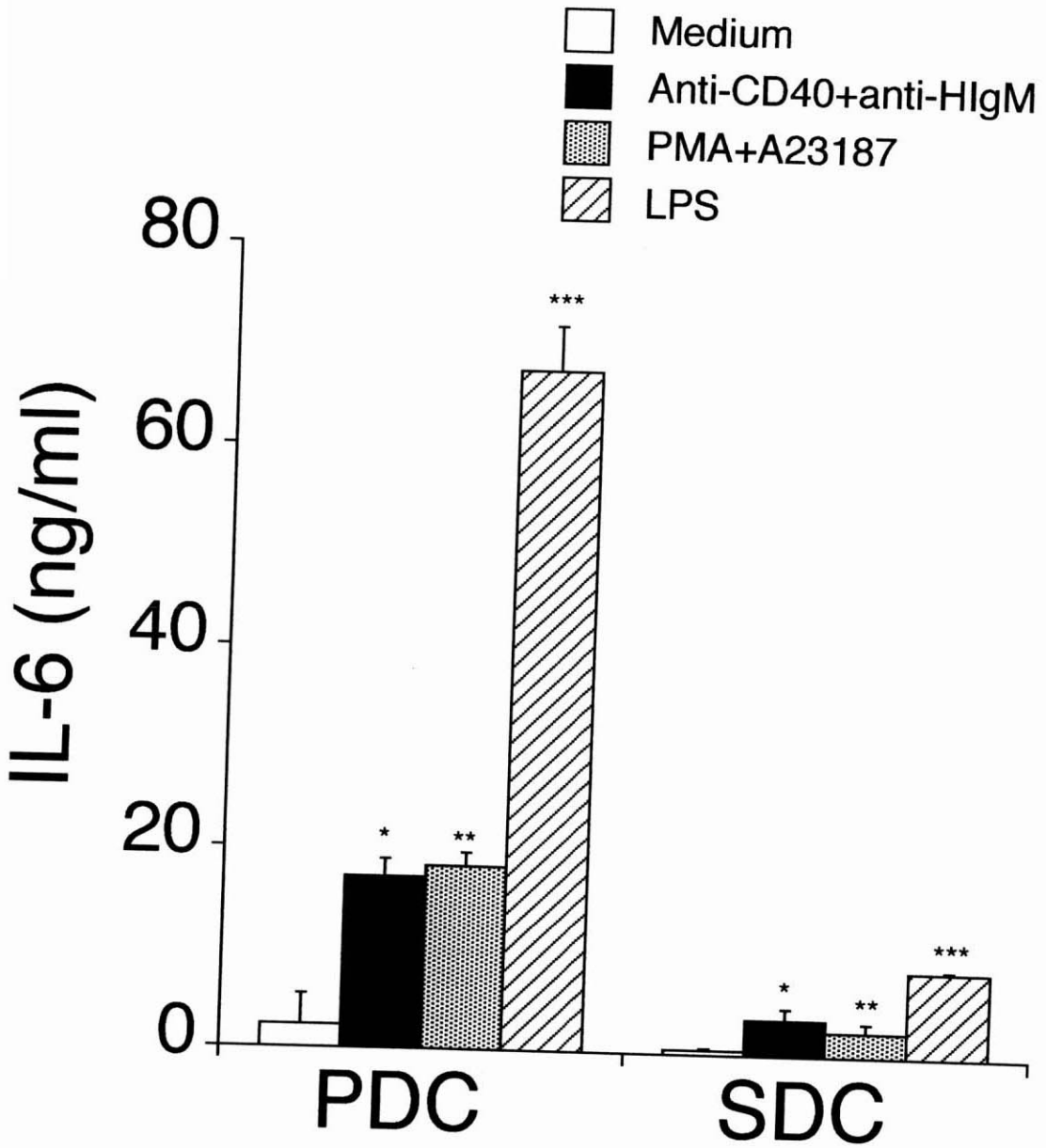


Figure 3-1. IL-6 productions by sorted PP DCs after stimulation. Sorted DCs (5×10^4 per well) from BALB/c mice were incubated in the presence of stimulators. Cells were preincubated with hamster anti-mouse CD40 mAb ($50 \mu\text{g/ml}$) and then incubated with anti-hamster IgM ($5 \mu\text{g/ml}$) to crosslink anti-CD40 mAb, incubated with PMA (50 ng/ml) + A23187 (250 ng/ml), or incubated with LPS ($20 \mu\text{g/ml}$). Supernatants were harvested and cytokine levels were measured by ELISA at 48 h. Data is representative of five separate experiments producing similar results. *, **, and *** are $p=0.013$, $p=0.005$, $p=0.003$, respectively.

Table 3-1. Expression of IL-6 by sorted DCs after stimulation. Sorted DCs (Exp. 1: 5×10^4 per well, Exp. 2: 1×10^4 per well) from BALB/c mice were incubated 20 h in the presence of stimulators. Cells were stimulated as described in figure 3-1. cDNA samples prepared from these cells were analyzed by quantitative RT-PCR for expression of IL-6 and a control marker, GAPDH. Expression levels of IL-6 by PP DCs and SP DCs are presented as the ratios of IL-6 total RNA level to GAPDH total RNA level derived from the same cDNA sample.

Exp. 1

	PDC	SDC
Medium (control)	2.1	2.5
Anti-CD40 + anti-HIlgM	9.4	4.9
PMA + A23187	8.4	2.7

Exp. 2

	PDC	SDC
Medium (control)	3.5	6.5
Anti-CD40 + anti-HIlgM	6.6	2.8
PMA + A23187	10.8	4.1

による刺激どちらの場合でも IL-6 mRNA の発現量が 2-3 倍高くなることが明らかとなった。

調製直後の未刺激な樹状細胞についても同様な mRNA の発現を解析した。その結果、未刺激な状態でパイエル板樹状細胞の方が脾臓樹状細胞と比較して、IL-6 mRNA の発現量が 3.5-6 倍高いことが示された (Table 3-2)。

パイエル板樹状細胞は IgA 産生誘導能を有する

ここまでの実験で、パイエル板樹状細胞は脾臓樹状細胞と比較して IL-6 の産生能が高いことが培養上清中の IL-6 タンパクの発現や mRNA の発現解析により明らかとなった。パイエル板樹状細胞が IgA 産生細胞の分化成熟を促進すると言われていたサイトカインである IL-6 を発現していることとパイエル板樹状細胞が IgA 産生応答の誘導に関与していることを示唆する既往の研究により、パイエル板樹状細胞が IL-6 を分泌することにより IgA 産生を促進していることが考えられたため、パイエル板樹状細胞の誘導する抗体産生応答について解析した。Fig. 3-2 に示すように、BALB/c マウス脾臓より調製した IgD⁺ B 細胞と TCR tg マウス脾臓より調製した未感作 CD4⁺ T 細胞を OVA を添加して樹状細胞存在下または非存在下で培養した。その結果、パイエル板樹状細胞を抗原提示細胞として用いた場合高い IgA 産生の誘導が認められた (Fig. 3-3)。Fig. 3-3 に示したのは代表的なデータであり、脾臓樹状細胞を抗原提示細胞とした場合は IgA の産生量が検出限界以下であったが、実験によってはわずかに産生が認められることもあった。パイエル板樹状細胞を抗原

Table 3-2. Expression of IL-6 by freshly isolated DCs. cDNA samples prepared from freshly isolated PP and SP DCs (Exp. 1:5X10⁴ per well, Exp. 2:1X10⁴ per well) from BALB/c mice were analyzed by quantitative RT-PCR for expression of IL-6 and a control marker, GAPDH. Expression levels of IL-6 by PP DCs and SP DCs are presented as the ratios of IL-6 total RNA level to GAPDH total RNA level derived from the same cDNA sample.

	PDC	SDC
Exp. 1	10.7	1.8
Exp. 2	2.1	0.6

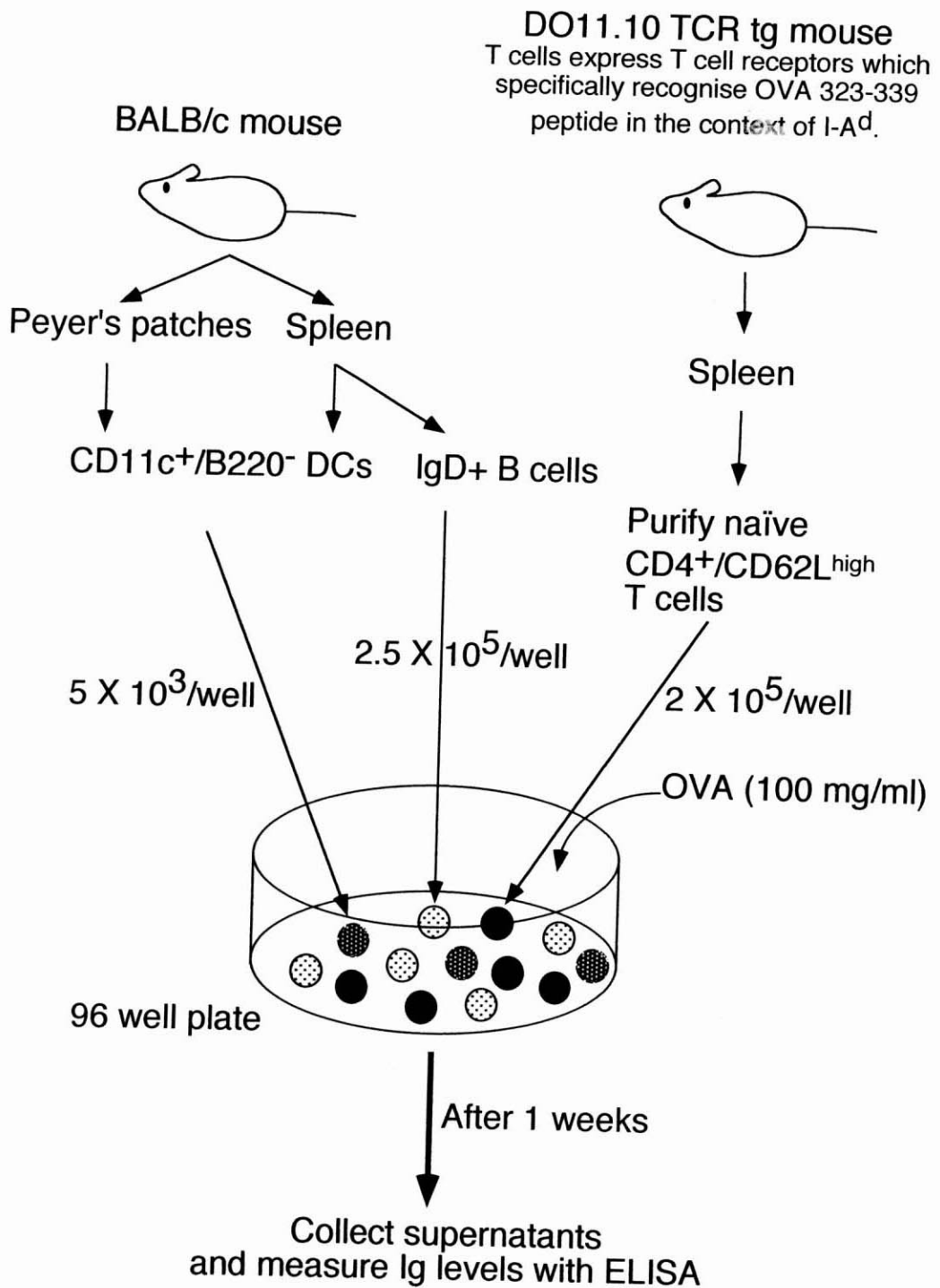


Fig. 3-2. The scheme for induction of Ig production.

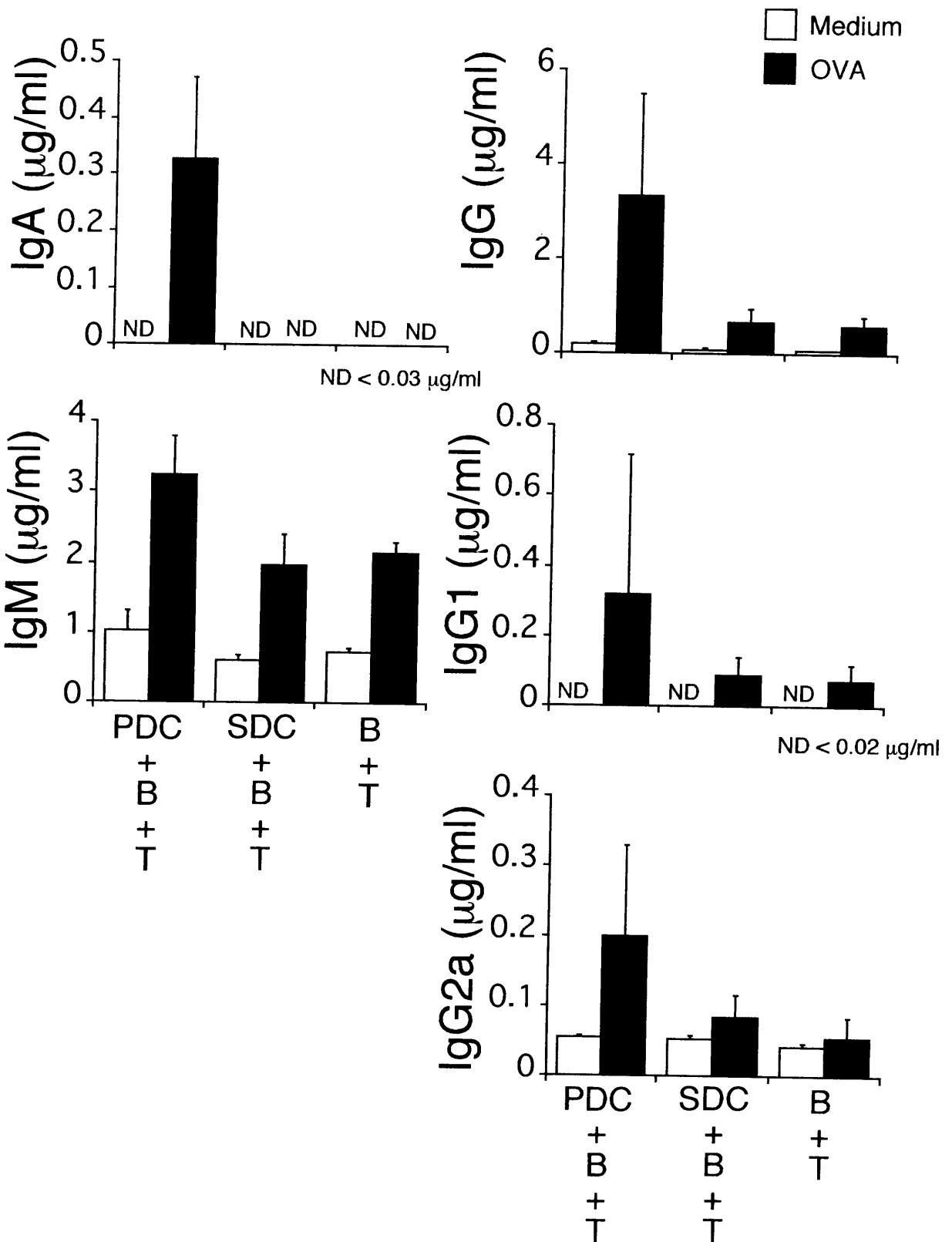


Figure 3-3. Antibody productions induced by the antigen presentation of sorted DC from PP and SP. Naïve CD4⁺/CD62L⁺ MACS-purified OVA TCR transgenic T cells from SP (2×10^5 per well) and naïve IgD⁺ MACS-purified B cells from SP of BALB/c mice (2.5×10^5 per well) were cocultured with DCs (5×10^3 per well) from PP or SP in the presence of 100 $\mu\text{g/ml}$ OVA for a week. Supernatants were harvested and antibody levels were measured by ELISA.

提示細胞とした場合は脾臓の場合と比較して有意に IgA 産生が高いことが示された。また、培養に樹状細胞を加えない場合は、他のクラスの抗体は産生されるのに対して、IgA の産生はほとんど認められなかった。

パイエル板樹状細胞の誘導する IgA 産生応答に IL-6 は重要な役割を担っている

そこで次に、パイエル板樹状細胞が誘導する IgA 産生における IL-6 の効果を検討するために、抗 IL-6 抗体を用いた IL-6 抑制実験を行った (Fig. 3-4)。その結果、抗 IL-6 抗体を添加した場合、IgA 産生は約 40%に抑制された。また、IgA 産生前駆細胞にクラススイッチを促進するサイトカインである TGF- β を添加したところ、IgA 産生は促進され、さらに抗 IL-6 抗体を添加した場合はその約 10%に抑制された。

パイエル板 CD11b⁺ 細胞が IL-6 を高産生する

最後に、パイエル板樹状細胞のうち、どの細胞群が IL-6 を産生しているのかについて検討した。樹状細胞を CD11b⁺ 細胞と CD11b⁻ 細胞に分離し検討したところ、Fig. 3-5 (A) に示されるように、CD11b⁺ 細胞が IL-6 を高産生していることが示された。同様に CD8 α ⁺ 細胞と CD8 α ⁻ 細胞に分離し検討したところ、Fig. 3-5 (B) に示されるように、CD8 α ⁻ 細胞が IL-6 を高産生していることが示された。そこで、パイエル板、脾臓ともに CD11b⁺ 細胞と CD8 α ⁺ 細胞をそれぞれ分離したところ、パイエル板 CD11b⁺ 細胞のみが IL-6 を高産生していることが明らかとなった (Fig. 3-6)。

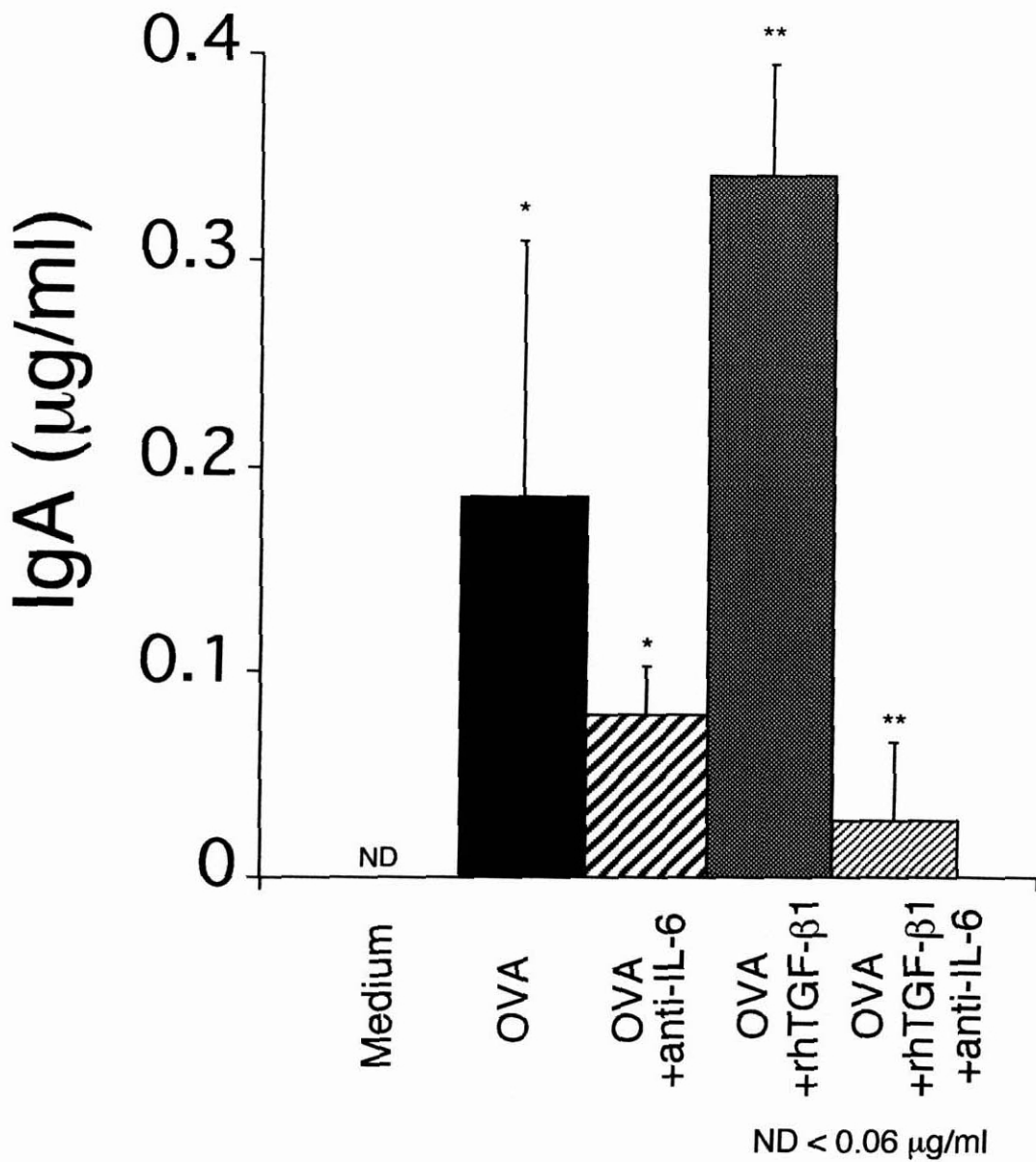


Figure 3-4. Antibody productions induced by the antigen presentation of sorted PP DCs. Naïve CD4⁺/CD62L⁺ MACS-purified OVA TCR transgenic T cells from SP (2×10^5 per well) and naïve IgD⁺ MACS-purified B cells from SP of BALB/c mice (2.5×10^5 per well) were coincubated with PP DCs (5×10^3 per well) in the presence of 100 µg/ml OVA for a week. Supernatants were harvested and antibody levels were measured by ELISA. * and ** are $P=0.38$ and $P=0.01$, respectively.

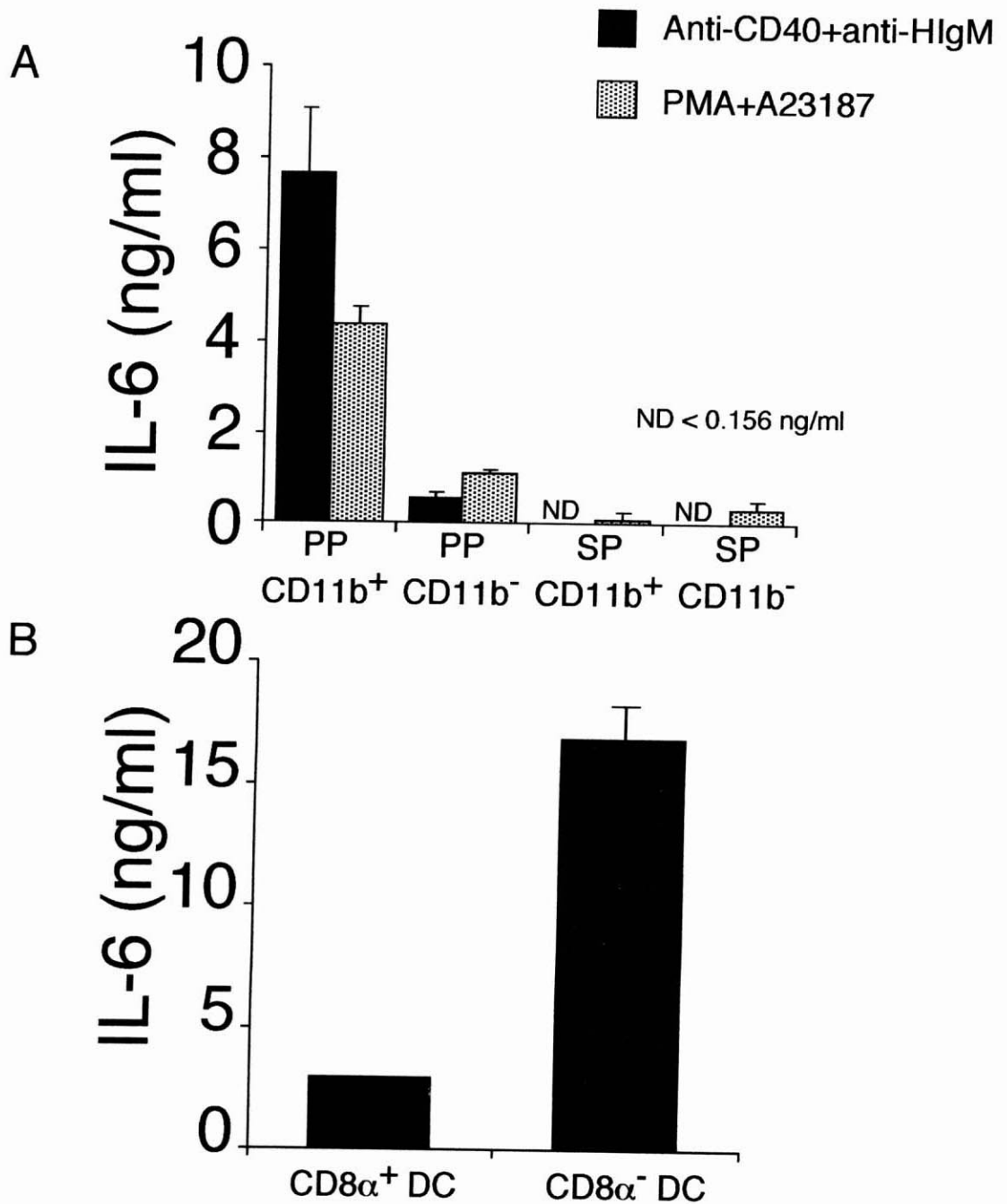


Fig. 3-5. IL-6 productions by sorted PP DC subpopulations after stimulation. Sorted DC subpopulations (2×10^4 per well), (A) CD11b⁺ DCs or CD11b⁻ DCs (B) CD8α⁺ or CD8α⁻ DCs from BALB/c mice were incubated in the presence of stimulators. Cells were preincubated with hamster anti-mouse CD40 mAb (50 μg/ml) and then incubated with anti-hamster IgM (5 μg/ml) to crosslink anti-CD40 mAb, incubated with PMA (50 ng/ml) +A23187 (250 ng/ml), or incubated with LPS (20 μg/ml). Supernatants were harvested and cytokine levels were measured by ELISA at 48 h.

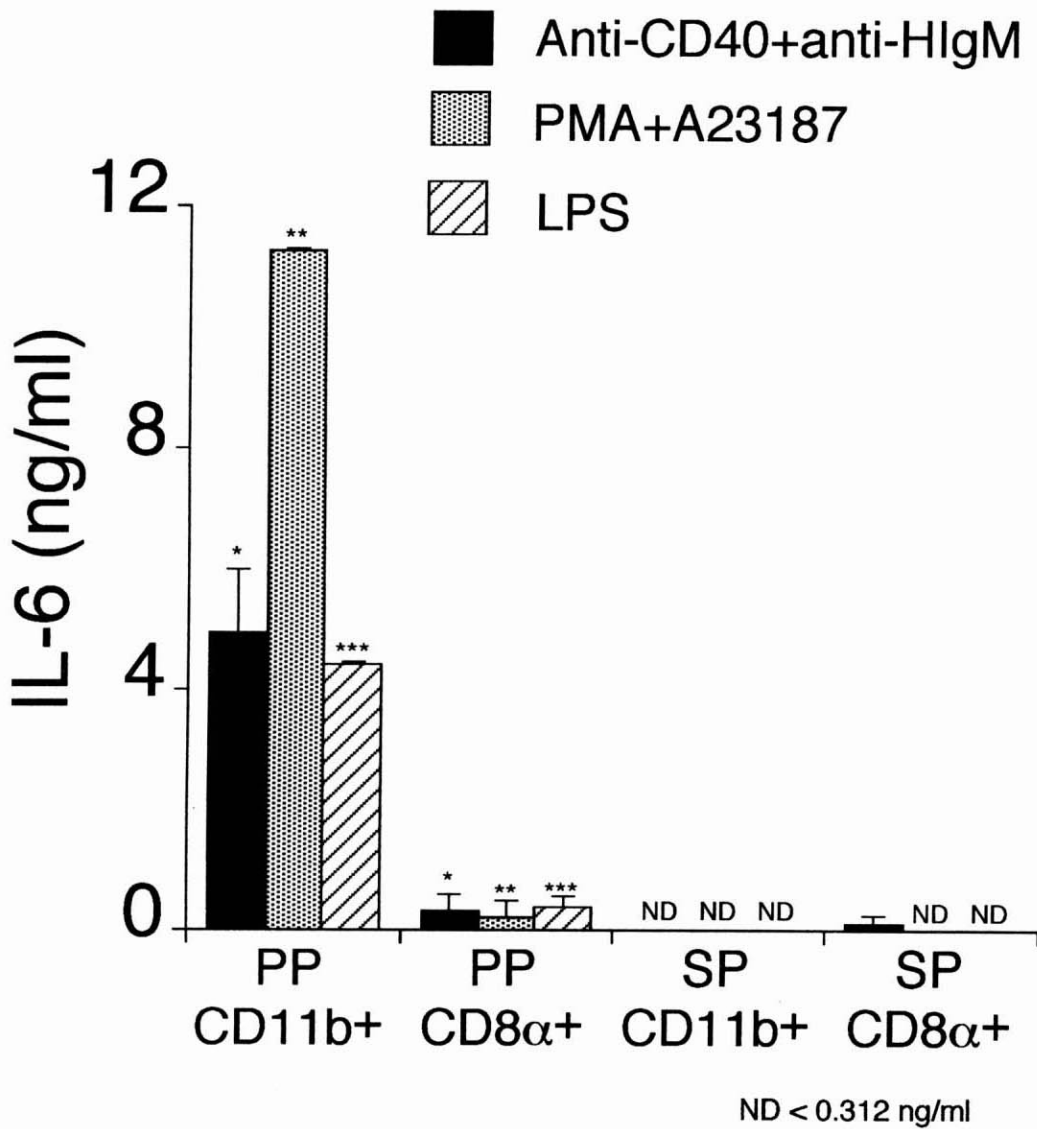


Fig. 3-6. IL-6 productions by sorted PP DC subpopulations after stimulation. Sorted DC subpopulations (2×10^4 per well), CD11b⁺ DCs or CD8 α ⁺ DCs from BALB/c mice were incubated in the presence of simulators. Cells were preincubated with hamster anti-mouse CD40 mAb (50 μ g/ml) and then incubated with anti-hamster IgM (5 μ g/ml) to crosslink anti-CD40 mAb, incubated with PMA (50 ng/ml) +A23187 (250 ng/ml), or incubated with LPS (20 μ g/ml). Supernatants were harvested and cytokine levels were measured by ELISA at 48 h. *, ** and *** are $P=0.026$, $P=0.0003$ and $P=0.0009$, respectively.

考察

IL-6 は IgA 産生細胞が分化・成熟するのを促進するサイトカインである。樹状細胞が IL-6 を産生することはすでに報告されていたが(93)、本研究で初めてパイエル板樹状細胞による IL-6 産生について検討を行った。樹状細胞を *in vitro* で様々な刺激をして培養し、IL-6 産生能について解析したところ、パイエル板樹状細胞において脾臓樹状細胞と比較して非常に高い IL-6 産生が認められた。IL-12 産生とは異なり、抗 CD40 抗体による刺激のみならず、PMA およびカルシウムイオノフォアや LPS により刺激した場合も IL-6 の産生が認められた。このことは mRNA の発現レベルでも確認された。調製直後の未刺激樹状細胞についても IL-6 mRNA の発現を解析したところ、パイエル板樹状細胞の方が脾臓樹状細胞と比較して 3.5-6 倍高いことが明らかとなった。IL-6 の発現は概して活性化により誘導されることから、パイエル板樹状細胞は生体内ですでに活性化されていると考えられる。パイエル板樹状細胞は腸管に存在するおびただしい量の抗原に常にさらされているためこのような結果になったのであろう。

IL-6 の発現は IL-1、TNF などのいくつかのサイトカインによっても誘導されることが知られている(94-97)。細胞内での制御について不明な点はあるが、PKA 経路の関与(96-100)、A23187 により誘導されることにより NFAT の関与(96, 101)、PMA によって誘導されることにより MAPK、AP-1 の関与(96)が考えられている。また、実際にプロモーター部位に結合する分子もいくつか同定されている。IL-1 誘導因子(100)、NFIL6(102)、NF- κ B(94, 102)、IRF(94)それぞれの IL-1-

responsive element への結合、転写因子 Sp1 の CCACC 繰り返し領域への結合(102)などにより発現が誘導されることも明らかとなっている。樹状細胞における IL-6 発現機構に関する研究例はなく、実際にパイエル板樹状細胞が生体内でどのような制御を受けているかは不明であるものの、これらの転写因子の発現が脾臓樹状細胞とは異なることが考えられる。

次に、パイエル板樹状細胞の IgA 産生誘導能の解析を行った。脾臓由来の IgD⁺ B 細胞と未感作 CD4⁺ T 細胞をそれぞれ精製し、樹状細胞存在下または非存在下で OVA を添加して培養した。IgD⁺ B 細胞は検定により 96%以上が IgD⁺/B220⁺ であることが確認されており、ほとんどが未感作 B-2 細胞であると考えられる。その結果、樹状細胞非存在下では IgA の産生が他のクラスの抗体と比較して著しく低く、樹状細胞存在下では IgA の産生が見られたことから、IgA の産生誘導には樹状細胞が重要であることが、高純度に精製された樹状細胞を用いた実験系では本研究で初めて示された。さらに、パイエル板樹状細胞を用いた場合は脾臓樹状細胞を用いた場合と比較して IgA 産生レベルが高いことが示された。そして、B 細胞が IgA 産生前駆細胞にクラススイッチを促進するサイトカインである TGF- β を添加すると IgA 産生量は増加し、さらに抗 IL-6 抗体を添加した場合は著しく減少した。これらの結果から、パイエル板樹状細胞は IL-6 産生することにより、IgA 産生応答に重要な役割を担っていることが示された。

Fig. 3-3、3-4 に示されたようにパイエル板樹状細胞を抗原提示細胞として用いた場合、TGF- β の添加なしに IgA 産

生は誘導された。T 細胞またはパイエル板樹状細胞(62)のどちらかが TGF- β を産生している可能性もある。TGF- β ノックアウトマウスを用いた研究で、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)という報告もあり、TGF- β 以外の IgA クラススイッチを誘導する何らかの機構が働いている可能性も考えられる。最近まで樹状細胞は T 細胞を介して B 細胞を活性化していると考えられてきた。しかし、B 細胞に対しても直接作用することが明らかになってきた(103)。例えば、ヒト扁桃より単離された樹状細胞は CD40 を介して活性化された未感作 B 細胞の増殖を促すとともに IgM 抗体を産生させることが報告された。また、ヒト臍帯血より誘導した樹状細胞は B 細胞と細胞クラスターを形成することや、B 細胞の増殖が誘導されることが確認されており、増殖には樹状細胞由来の因子が作用していることも示唆されている。さらに、ヒト臍帯血より誘導した樹状細胞と CD40 活性化 B 細胞の培養に IL-10 や TGF- β 1 を添加することにより IgA の産生が誘導増強されることも報告されている(104)。これらのことから、パイエル板樹状細胞が何らかの分子を介して IgA クラススイッチに関与していることも考えられる。

続いてパイエル板から CD11b⁺ 樹状細胞および CD8 α ⁺ 樹状細胞を分離し、抗 CD40 抗体を用いて刺激して培養した結果、パイエル板 CD11b⁺ 樹状細胞が CD8 α ⁺ 樹状細胞と比較して IL-6 を高産生していることが示され、CD11b⁺ 樹状細胞が IgA 産生応答に重要であることが示唆された。

本研究によりパイエル板 CD11b⁺ 樹状細胞が非常に高い

IL-6 産生能を持つことが初めて明らかにされた。そして、パイエル板樹状細胞は IgA 産生応答の誘導に関与しており、特に IL-6 を産生することにより IgA 産生を促進していることが示唆された。

これらの結果から、次に述べるようなパイエル板樹状細胞による IgA 産生応答誘導機構への関与が考察された (Fig. 3-7)。すなわち、

- (1) パイエル板の M 細胞を介して抗原がパイエル板内に取り込まれると、その抗原は速やかに M 細胞直下の SED に局在する CD11b⁺ 樹状細胞に取り込まれる。
- (2) それに伴い CD11b⁺ 樹状細胞は成熟し CCR7 の発現が増強され T 細胞領域である IFR に移動する。
- (3) クロスプライミング機構により CD11b⁺ 樹状細胞から CD8 α ⁺ 樹状細胞に抗原が渡される。
- (4) 抗原を取り込んだ CD8 α ⁺ 樹状細胞は CD4⁺ T 細胞に抗原提示を行い、IL-4 が誘導され Th2 応答が惹起される。
- (5) B 細胞は T 細胞と CD40-CD40L の会合や IL-4 などを通じ、相互作用することで活性化を受け、B 細胞領域に移動する。
- (6) 活性化された B 細胞は TGF- β の作用によりクラススイッチを誘導されると共に、樹状細胞も何らかの因子を介してそれを促進する。
- (7) IgA 産生前駆細胞は、IL-5 や樹状細胞により産生される IL-6 によって IgA 産生細胞の分化・成熟刺激を受ける。

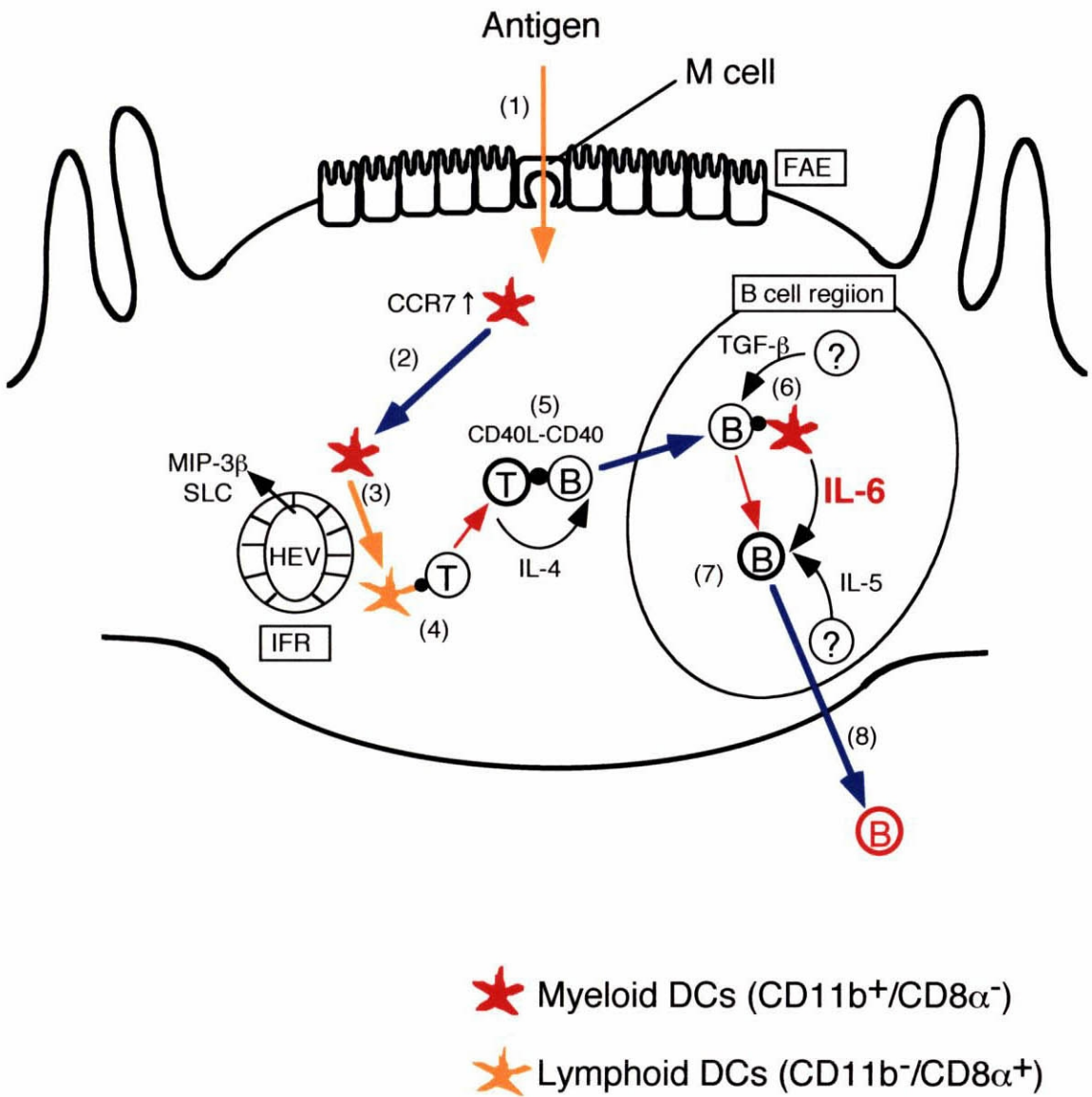


Fig. 3-7. Proposed mechanism of DC recruitment to the distinct regions of the PP and induction of IgA response.

(8) 分化・成熟刺激を受けた IgA 産生前駆細胞は、パイエル板からホーミングして IgA 産生実効組織に移動する過程で IgA 産生細胞に分化・成熟する。

このようにどのような機構でパイエル板において IgA 産生応答が誘導されるのかということに関していくつかの因子は解明されつつあるものの、TGF- β 以外のクラススイッチに必要な因子やパイエル板内での、またはパイエル板外への細胞の移動機構などについて未解明な部分は数多く残されており、今後解明されていくことが期待される。しかしながら、本研究により、パイエル板 CD11b⁺ 樹状細胞により IgA 産生誘導を促進するサイトカインである IL-6 が多量に産生されるということが初めて示され、IgA 産生誘導機構の一端を解明することができたと考える。

総合討論

(経口ワクチンへの応用)

タンパク質抗原を経口投与することにより、抗体産生応答を含む全身性免疫が抑制される一方で、腸管において抗原特異的免疫グロブリン A (IgA) 抗体の産生が亢進されることが知られている。この現象は、細菌・ウイルスの抗原を経口的に投与することにより、腸管粘膜においてその抗原に対する IgA 抗体を誘導し、細菌・ウイルスの体内への侵入を防ぐ経口ワクチンの開発へ応用することができると期待されている。これまで、腸管における IgA 産生機構の解明は、まず B 細胞が注目され *in vitro* での研究を中心に IgA 産生を亢進するような因子の検索が行われ、IL-6、IL-5、TGF- β などが同定された。次にそのサイトカインを発現する細胞として T 細胞が注目され、*in vivo* において感作した T 細胞により産生されるサイトカインについて主に研究が行われ、パイエル板 T 細胞が影響を与えることが示唆された。以上に加えて、IgA 産生応答誘導には腸管リンパ器官に存在する抗原提示細胞による抗原提示が影響を与えている可能性があり、実際にパイエル板樹状細胞が IgA 産生を亢進させることが報告されていた。しかしながら、その誘導機構については報告がなく不明であった。そこで、タンパク質抗原の経口摂取により誘導される免疫応答の主要な誘導部位として考えられているパイエル板の樹状細胞に着目し、その IgA 産生誘導機構についてサイトカイン、特に IL-6 の分泌機構を中心とした検討を行った。そして本研究で初めて、パイエル板樹状細胞が高い IL-

6 産生能を有しており、IgA 産生応答に関与していることが明らかとなった。

(樹状細胞によるパイエル板特有のサイトカイン産生応答の誘導)

一方で、パイエル板では末梢とは異なるサイトカイン産生応答が誘導されると言われているが、その独自性は樹状細胞に起因するものであると考え、パイエル板樹状細胞が誘導するサイトカイン産生応答について解析した。パイエル板において T 細胞によるサイトカイン産生応答が末梢とは異なることが報告されてきたものの、それらは感作後の応答を観察したものが主であった。本研究で tg マウスを用いることにより腸管免疫応答の主要なイニシエーターであると考えられるパイエル板樹状細胞が誘導する未感作 CD4⁺ T 細胞のサイトカイン産生応答について解析することができた。その結果、パイエル板 CD11b⁺ 樹状細胞により Th1 型サイトカインである IFN- γ 産生応答が、CD8 α ⁺ 樹状細胞により Th2 型サイトカインである IL-4 産生応答が誘導されることが明らかとなり、それぞれ、病原微生物への免疫応答、抗体産生応答や免疫寛容の誘導に関与していることが示唆された。

(細胞療法への応用)

近年、樹状細胞の臨床応用として、樹状細胞を用いた細胞療法が脚光を浴びている。ヒトの腫瘍抗原特異的な細胞障害性 T 細胞 (CTL; cytotoxic T lymphocyte) を in vitro で誘導し増殖させた後、患者の体内に戻すという免疫療法に加え、

T 細胞の初期免疫応答を開始させる抗原提示細胞が樹状細胞であることが明らかにされたことにより、樹状細胞を用いたガンワクチン細胞療法の開発が盛んに行われるようになった。CD8 α ⁺ 樹状細胞は、ガン細胞を取り込み MHC クラス I、MHC クラス II を介して CD4⁺ T 細胞および CD8⁺ T 細胞両方に同時に抗原提示する、クロスプライミングと呼ばれる抗原提示機構によりガン細胞特異的な CTL の誘導を開始する。すると、CD4⁺ T 細胞は活性化され、CD8⁺ T 細胞のエフェクター細胞への分化に関与する。第二章において、パイエル板 CD11b⁺ 樹状細胞によって Th1 型サイトカインである IFN- γ 産生が誘導され、また第三章において、IL-6 が多量に産生されることが明らかになった。これらは、CTL の誘導に関与する非常に重要なサイトカインであり、パイエル板におけるウイルスなどの細胞内感染やガン細胞などに対しては CD8 α ⁺ 樹状細胞だけでなく、CD11b⁺ 樹状細胞によっても効率よく排除機構が誘導されていると考えられる。

(これからの課題)

本研究においては、従来の前駆細胞からの分化誘導法により増殖分化させた樹状細胞の研究ではなく、パイエル板という器官特有の樹状細胞を高純度に分離することによってその機能を解析することができた。その結果、パイエル板樹状細胞はその誘導する免疫応答が脾臓とは明らかに異なっていることが示された。それらが実際に生体内でどのような機構で IgA 産生応答に関与しているのかということや、病原微生物やウイルス、ガン細胞などを排除する応答を誘導するのかと

ということについて、樹状細胞のパイエル板内における移動も含めて未解明な部分が多く残されている。

また、樹状細胞は分化した後にそれぞれ器官に移動しそこで器官特有の成熟を受けると考えられる。樹状細胞の器官特有な機能の獲得においてはサイトカイン環境や細胞相互作用などが影響を与えていると考えるが、その機構についても不明である。しかし、経口ワクチンや樹状細胞移入による細胞医療に応用する際には重要であり、今後解明されるべき課題である。

免疫応答の部位特異的制御の解明、特に IgA 産生誘導機構、サイトカイン産生誘導機構を解明することは、基礎的研究として意義を持つのはもちろんのこと、経口ワクチンの開発やガンやウイルス感染に対する細胞療法に応用する際、安全にかつ効率的に適用させるために必要であると考えられる。本研究はその一端を解明することにより、これらの応用技術の開発に貢献するものであると考えられる。

要約

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。この粘膜は呼吸、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。腸管粘膜は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も多量に取り込んでいる。それらを識別し、必要なものは取り込み、生体にとって害となるものは排除するという腸管粘膜組織の免疫組織としての特性が明らかになるとともに、全身免疫系とは異なる独特な免疫機構を有しているということが明確となった。

腸管粘膜の免疫機構の中で重要な役割を果たしているのが免疫グロブリン A (IgA) であり、腸管粘膜に侵入する細菌に対して感染阻止に働く。IgA 産生応答をはじめとする腸管特異的免疫応答の誘導には小腸に存在するリンパ組織であるパイエル板がその役割の一端を担っていると考えられており、パイエル板に存在する免疫担当細胞の解析はその機構を解明する上で非常に重要である。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抗原が積極的に取り込まれると、樹状細胞などの抗原提示細胞によって CD4⁺ T 細胞に提示され、免疫応答の誘導が開始される。パイエル板のドーム領域には CD4⁺ T 細胞を活性化するのに必要な MHC class II を発現する樹状細胞、マクロファージ、B 細胞などの抗

原提示細胞が存在している。また、胚中心には高い割合で IgA 産生前駆 B 細胞が認められ、その周辺には CD4⁺ T 細胞の多く存在する T 細胞領域がある。このようにパイエル板には IgA 抗体産生に必要な免疫担当細胞が含まれており、腸管における IgA 抗体誘導において重要な役割を担っていることが示唆されている。

一方、樹状細胞は、未感作 CD4⁺ T 細胞を活性化しうる唯一の抗原提示細胞であると言われている。したがってパイエル板樹状細胞の機能を調べることは、IgA 産生応答をはじめとする腸管特異的免疫応答の誘導機構の解明において重要である。実際、パイエル板樹状細胞は脾臓樹状細胞と比較して IgA 産生誘導能が高いことが、*in vitro* の実験により示されている。また、IgA など抗体の産生にはサイトカインの介助が重要である。IgA 産生は、まず、B 細胞が形質転換成長因子 (TGF)- β および CD40 からの刺激を受け、その後、インターロイキン (IL) -5 あるいは IL-6 の効果により IgA 産生細胞に分化することにより誘導される。しかしながら、これらのサイトカイン分泌誘導機構をはじめとするパイエル板樹状細胞による免疫応答誘導機構についてほとんど明らかとなっておらず、どのような機構でパイエル板樹状細胞が IgA 産生応答など腸管特異的な免疫応答の誘導に関与しているのか不明であった。

本研究では、パイエル板樹状細胞に焦点を当て、その独自性を調べるために、パイエル板樹状細胞の細胞表面分子の発現、T 細胞応答誘導能について代表的な末梢リンパ組織である脾臓と比較した。また、パイエル板樹状細胞のサイトカイ

ン産生能、特に IgA 産生細胞の成熟に重要なサイトカインである IL-6 について解析を行った。

第一章 樹状細胞分離方法確立および細胞表面分子発現解析

組織の免疫細胞における樹状細胞の頻度は 1%前後と非常に低いため、最近まで組織特有の樹状細胞は分離することが困難であることから詳細な機能の解析は進んでいなかった。しかし、本研究において従来用いられてきた分離方法を再検討した結果、MACS 分離カラムおよびセルソーターを用いて分離することにより、樹状細胞を 97-100%の高純度で分離することに成功した。また、樹状細胞には骨髄系樹状細胞である CD11b⁺ 樹状細胞とリンパ球系樹状細胞である CD8α⁺ 樹状細胞というそれぞれ異なる分化経路を持つ樹状細胞群が知られているが、同様の方法でそれぞれについても分離することができた。

続いて、パイエル板樹状細胞と脾臓樹状細胞の細胞表面分子の発現をフローサイトメトリーを用いて解析した。その結果、パイエル板樹状細胞は脾臓樹状細胞と比較して MHC class II, CD86, CD40 分子の発現が高いこと、また、樹状細胞の成熟マーカーである DEC-205 を高発現している細胞の割合が高いことが明らかとなった。この結果から、パイエル板樹状細胞が脾臓樹状細胞より成熟の度合いが高いことが示唆された。

第二章 パイエル板樹状細胞の誘導する T細胞応答

まず、パイエル板樹状細胞により誘導される抗原特異的

CD4⁺ T 細胞の増殖応答を脾臓樹状細胞と比較した。CD4⁺ T 細胞はオバルブミン (OVA) 特異的 T 細胞の T 細胞抗原レセプター (TCR) を導入したトランスジェニック (tg) マウス (7-3-7 TCR tg マウス) の脾臓細胞から調製した。この tg マウスは OVA323-339 残基特異的な TCR を発現している T 細胞の頻度が高いため、このマウスを用いることにより OVA 特異的な未感作 T 細胞の調製が容易となる。この CD4⁺ T 細胞をパイエル板および脾臓樹状細胞を抗原提示細胞として OVA で刺激した。その結果、パイエル板樹状細胞の場合は、脾臓樹状細胞より強い T 細胞増殖応答を示し、第一章で示されたように MHC class II の発現が高く抗原提示能が高いためこのような結果になったと考えられた。

ある種の細菌感染によって、パイエル板においてインターフェロン (IFN)- γ の産生が誘導され、病原細菌の排除機構の誘導に働くことが知られている。そこで次に、パイエル板樹状細胞による tg マウス由来の脾臓未感作 CD4⁺ T 細胞のサイトカイン産生誘導能を解析した結果、脾臓樹状細胞と比較して、高い IFN- γ , IL-2, IL-6 産生誘導が認められ、IL-4 産生誘導は認められなかった。さらに脾臓の CD11b⁺ 樹状細胞および CD8 α ⁺ 樹状細胞を分離し同様な実験を行った結果、両細胞群の間で IFN- γ および IL-4 の産生誘導能に差は認められなかった。一方、パイエル板 CD11b⁺ 樹状細胞を抗原提示細胞とした場合は脾臓樹状細胞とは異なり、高い IL-2, IL-6, IFN- γ 産生誘導が認められ、IL-4 の産生は認められなかったのに対して、パイエル板 CD8 α ⁺ 樹状細胞を用いた場合には IFN- γ 産生は誘導されず、IL-4 の産生が誘導された。

ここでさらに、パイエル板および脾臓の各樹状細胞群を抗 CD40 抗体を用いて刺激して培養し、IFN- γ 産生誘導に関与するサイトカインである IL-12 p40 の産生量を調べたところ、パイエル板各樹状細胞群による産生量に差は認められなかった。また、第一章においてパイエル板樹状細胞は脾臓樹状細胞より IL-4 産生誘導を増強すると言われている CD86 の発現が高いことが示されたが、パイエル板樹状細胞は IL-4 の産生を誘導せず、IFN- γ 産生を誘導した。

したがって、パイエル板 CD11b⁺ 樹状細胞を抗原提示細胞とした場合、IFN- γ 産生応答、パイエル板 CD8 α ⁺ 樹状細胞を用いた場合には IL-4 の産生応答の誘導がそれぞれ認められ、パイエル板樹状細胞には細胞群により明確な T 細胞応答誘導能の違いがあることが明らかになった。そして、パイエル板 CD11b⁺ 樹状細胞を抗原提示細胞とした場合に IFN- γ 産生が誘導され、その誘導には IL-12 以外のサイトカインまたは CD86 以外の副刺激因子が関与していることが示唆された。

第三章 パイエル板樹状細胞の IL-6 産生

一方、第二章でパイエル板樹状細胞と 7-3-7 TCR tg マウス由来の脾臓未感作 CD4⁺ T 細胞を OVA 存在下で培養すると高い IL-6 の産生が認められたが、その IL-6 がパイエル板樹状細胞の作用により T 細胞が分泌しているものなのか、それとも樹状細胞自体が分泌しているものなのかを調べるため、樹状細胞のみを抗 CD40 抗体を用いて刺激して培養し、IL-6 産生量を調べたところ、パイエル板樹状細胞は脾臓樹状細胞と

比較して IL-6 を高産生していることが明らかとなった。このことは mRNA の発現レベルでも確認されており、IL-6 遺伝子発現に関与する転写因子がパイエル板樹状細胞の方がより強く活性化されていることが推察された。

次に、パイエル板樹状細胞の IgA 産生誘導能の解析を行った。脾臓由来の IgD⁺ B 細胞と未感作 CD4⁺ T 細胞をそれぞれ精製し、樹状細胞存在下または非存在下で OVA を添加して培養した。その結果、樹状細胞非存在下では IgA の産生が他のクラスの抗体と比較して著しく低く、樹状細胞存在下では IgA の産生が見られたことから、IgA の産生誘導には樹状細胞が重要であることが、高純度に精製された樹状細胞を用いた実験系では初めて示された。さらに、パイエル板樹状細胞を用いた場合は脾臓樹状細胞を用いた場合と比較して IgA 産生量が高いことが示された。そして、B 細胞が IgA 産生前駆細胞にクラススイッチするのに必要なサイトカインである TGF- β を添加すると IgA 産生量は増加し、さらに抗 IL-6 抗体を添加した場合は著しく減少した。この結果から、パイエル板樹状細胞は IL-6 産生することにより、IgA 産生応答に重要な役割を担っていることが示された。

続いてパイエル板から CD11b⁺ 樹状細胞および CD8 α ⁺ 樹状細胞を分離し、抗 CD40 抗体を用いて刺激して培養した結果、パイエル板 CD11b⁺ 樹状細胞が CD8 α ⁺ 樹状細胞と比較して IL-6 を高産生していることが示され、CD11b⁺ 樹状細胞が IgA 産生応答に重要であることが示唆された。

以上より、パイエル板樹状細胞は脾臓樹状細胞と比較して

高い T 細胞活性化能を有し、全身免疫系の主要な器官である脾臓の樹状細胞とは異なるサイトカイン産生応答を誘導することが示された。また、パイエル板樹状細胞は 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 の産生能が高いことが本研究により初めて示され、IL-6 を介して IgA 産生応答において重要な役割を有していることが示された。得られた結果は、パイエル板特有のサイトカイン分泌応答機構および腸管特異的免疫応答の一つである IgA 産生応答誘導機構の解明における重要な知見である。

文献

1. Steinman, R. M., and Z. A. Cohn. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137:1142.
2. Inaba, K., K. Nakano, and S. Muramatsu. 1981. Cellular synergy in the manifestation of accessory cell activity for in vitro antibody response. *J Immunol* 127:452.
3. Banchereau, J., and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245.
4. Borkowski, T. A., J. J. Letterio, A. G. Farr, and M. C. Udey. 1996. A role for endogenous transforming growth factor beta 1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming growth factor beta 1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 184:2417.
5. Mosmann, T. R. 1992. T lymphocyte subsets, cytokines, and effector functions. *Ann N Y Acad Sci* 664:89.
6. Pulendran, B., J. Banchereau, E. Maraskovsky, and C. Maliszewski. 2001. Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. *Trends Immunol* 22:41.
7. De Smedt, T., B. Pajak, E. Muraille, L. Lespagnard, E. Heinen, P. De Baetselier, J. Urbain, O. Leo, and M. Moser. 1996. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J Exp Med* 184:1413.
8. Sousa, C. R., S. Hieny, T. Scharon-Kersten, D. Jankovic, H. Charest, R. N. Germain, and A. Sher. 1997. In vivo microbial

stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med* 186:1819.

9. Anjuere, F., P. Martin, I. Ferrero, M. L. Fraga, G. M. del Hoyo, N. Wright, and C. Ardavin. 1999. Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, Peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse. *Blood* 93:590.

10. Manz, M. G., D. Traver, K. Akashi, M. Merad, T. Miyamoto, E. G. Engleman, and I. L. Weissman. 2001. Dendritic cell development from common myeloid progenitors. *Ann N Y Acad Sci* 938:167.

11. McGhee, J. R., J. Mestecky, C. O. Elson, and H. Kiyono. 1989. Regulation of IgA synthesis and immune response by T cells and interleukins. *J Clin Immunol* 9:175.

12. Mestecky, J. 1987. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J Clin Immunol* 7:265.

13. Russell, M. W., G. Hajishengallis, N. K. Childers, and S. M. Michalek. 1999. Secretory immunity in defense against cariogenic mutans streptococci. *Caries Res* 33:4.

14. Hotomi, M., T. Saito, and N. Yamanaka. 1998. Specific mucosal immunity and enhanced nasopharyngeal clearance of nontypeable *Haemophilus influenzae* after intranasal immunization with outer membrane protein P6 and cholera toxin. *Vaccine* 16:1950.

15. Katz, J. M., X. Lu, S. A. Young, and J. C. Galphin. 1997. Adjuvant activity of the heat-labile enterotoxin from enterotoxigenic *Escherichia coli* for oral administration of inactivated influenza virus

vaccine. *J Infect Dis* 175:352.

16. Mestecky, J., and J. R. McGhee. 1987. Immunoglobulin A (IgA): molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. *Adv Immunol* 40:153.

17. Strobel, S., and A. M. Mowat. 1998. Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. *Immunol Today* 19:173.

18. Griebel, P. J., and W. R. Hein. 1996. Expanding the role of Peyer's patches in B-cell ontogeny. *Immunol Today* 17:30.

19. Rescigno, M., M. Urbano, B. Valzasina, M. Francolini, G. Rotta, R. Bonasio, F. Granucci, J. P. Kraehenbuhl, and P. Ricciardi-Castagnoli. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2:361.

20. Chen, Y., J. Inobe, R. Marks, P. Gonnella, V. K. Kuchroo, and H. L. Weiner. 1995. Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature* 376:177.

21. Melamed, D., and A. Friedman. 1993. Direct evidence for anergy in T lymphocytes tolerized by oral administration of ovalbumin. *Eur J Immunol* 23:935.

22. Whitacre, C. C., I. E. Gienapp, C. G. Orosz, and D. M. Bitar. 1991. Oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. III. Evidence for clonal anergy. *J Immunol* 147:2155.

23. Chen, Y., V. K. Kuchroo, J. Inobe, D. A. Hafler, and H. L. Weiner. 1994. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265:1237.

24. al-Sabbagh, A., A. Miller, L. M. Santos, and H. L. Weiner. 1994.

- Antigen-driven tissue-specific suppression following oral tolerance: orally administered myelin basic protein suppresses proteolipid protein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in the SJL mouse. *Eur J Immunol* 24:2104.
25. Miller, A., O. Lider, and H. L. Weiner. 1991. Antigen-driven bystander suppression after oral administration of antigens. *J Exp Med* 174:791.
26. Santos, L. M., A. al-Sabbagh, A. Londono, and H. L. Weiner. 1994. Oral tolerance to myelin basic protein induces regulatory TGF-beta-secreting T cells in Peyer's patches of SJL mice. *Cell Immunol* 157:439.
27. Fujihashi, K., T. Dohi, P. D. Rennert, M. Yamamoto, T. Koga, H. Kiyono, and J. R. McGhee. 2001. Peyer's patches are required for oral tolerance to proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3310.
28. Spahn, T. W., A. Fontana, A. M. Faria, A. J. Slavin, H. P. Eugster, X. Zhang, P. A. Koni, N. H. Ruddle, R. A. Flavell, P. D. Rennert, and H. L. Weiner. 2001. Induction of oral tolerance to cellular immune responses in the absence of Peyer's patches. *Eur J Immunol* 31:1278.
29. Daynes, R. A., B. A. Araneo, T. A. Dowell, K. Huang, and D. Dudley. 1990. Regulation of murine lymphokine production in vivo. III. The lymphoid tissue microenvironment exerts regulatory influences over T helper cell function. *J Exp Med* 171:979.
30. Everest, P., J. Allen, A. Papakonstantinou, P. Mastroeni, M. Roberts, and G. Dougan. 1997. Salmonella typhimurium infections in mice deficient in interleukin-4 production: role of IL-4 in

infection-associated pathology. *J Immunol* 159:1820.

31. George, A. 1996. Generation of gamma interferon responses in murine Peyer's patches following oral immunization. *Infect Immun* 64:4606.

32. Hess, J., C. Ladel, D. Miko, and S. H. Kaufmann. 1996. *Salmonella typhimurium aroA-* infection in gene-targeted immunodeficient mice: major role of CD4+ TCR-alpha beta cells and IFN-gamma in bacterial clearance independent of intracellular location. *J Immunol* 156:3321.

33. Karem, K. L., S. Kanangat, and B. T. Rouse. 1996. Cytokine expression in the gut associated lymphoid tissue after oral administration of attenuated *Salmonella* vaccine strains. *Vaccine* 14:1495.

34. Liesenfeld, O., J. C. Kosek, and Y. Suzuki. 1997. Gamma interferon induces Fas-dependent apoptosis of Peyer's patch T cells in mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 65:4682.

35. Bao, S., K. W. Beagley, M. P. France, J. Shen, and A. J. Husband. 2000. Interferon-gamma plays a critical role in intestinal immunity against *Salmonella typhimurium* infection. *Immunology* 99:464.

36. Beagley, K. W., J. H. Eldridge, H. Kiyono, M. P. Everson, W. J. Koopman, T. Honjo, and J. R. McGhee. 1988. Recombinant murine IL-5 induces high rate IgA synthesis in cycling IgA-positive Peyer's patch B cells. *J Immunol* 141:2035.

37. Beagley, K. W., J. H. Eldridge, F. Lee, H. Kiyono, M. P.

- Everson, W. J. Koopman, T. Hirano, T. Kishimoto, and J. R. McGhee. 1989. Interleukins and IgA synthesis. Human and murine interleukin 6 induce high rate IgA secretion in IgA-committed B cells. *J Exp Med* 169:2133.
38. Kawanishi, H., L. E. Saltzman, and W. Strober. 1982. Characteristics and regulatory function of murine con A-induced, cloned T cells obtained from Peyer's patches and spleen: mechanisms regulating isotype-specific immunoglobulin production by Peyer's patch B cells. *J Immunol* 129:475.
39. Richman, L. K., A. S. Graeff, R. Yarchoan, and W. Strober. 1981. Simultaneous induction of antigen-specific IgA helper T cells and IgG suppressor T cells in the murine Peyer's patch after protein feeding. *J Immunol* 126:2079.
40. Kiyono, H., L. M. Mosteller, J. H. Eldridge, S. M. Michalek, and J. R. McGhee. 1983. IgA responses in xid mice: oral antigen primes Peyer's patch cells for in vitro immune responses and secretory antibody production. *J Immunol* 131:2616.
41. Murray, P. D., D. T. McKenzie, S. L. Swain, and M. F. Kagnoff. 1987. Interleukin 5 and interleukin 4 produced by Peyer's patch T cells selectively enhance immunoglobulin A expression. *J Immunol* 139:2669.
42. Sonoda, E., R. Matsumoto, Y. Hitoshi, T. Ishii, M. Sugimoto, S. Araki, A. Tominaga, N. Yamaguchi, and K. Takatsu. 1989. Transforming growth factor beta induces IgA production and acts additively with interleukin 5 for IgA production. *J Exp Med* 170:1415.
43. Coffman, R. L., D. A. Leberman, and B. Shrader. 1989.

Transforming growth factor beta specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes. *J Exp Med* 170:1039.

44. Harriman, G. R., D. Y. Kunitomo, J. F. Elliott, V. Paetkau, and W. Strober. 1988. The role of IL-5 in IgA B cell differentiation. *J Immunol* 140:3033.

45. Schoenbeck, S., D. T. McKenzie, and M. F. Kagnoff. 1989. Interleukin 5 is a differentiation factor for IgA B cells. *Eur J Immunol* 19:965.

46. Lebman, D. A., and R. L. Coffman. 1988. The effects of IL-4 and IL-5 on the IgA response by murine Peyer's patch B cell subpopulations. *J Immunol* 141:2050.

47. Kunitomo, D. Y., R. P. Nordan, and W. Strober. 1989. IL-6 is a potent cofactor of IL-1 in IgM synthesis and of IL-5 in IgA synthesis. *J Immunol* 143:2230.

48. Kipps, T. J. 1989. The CD5 B cell. *Adv Immunol* 47:117.

49. Kopf, M., F. Brombacher, P. D. Hodgkin, A. J. Ramsay, E. A. Milbourne, W. J. Dai, K. S. Ovington, C. A. Behm, G. Kohler, I. G. Young, and K. I. Matthaei. 1996. IL-5-deficient mice have a developmental defect in CD5⁺ B-1 cells and lack eosinophilia but have normal antibody and cytotoxic T cell responses. *Immunity* 4:15.

50. Ramsay, A. J., A. J. Husband, I. A. Ramshaw, S. Bao, K. I. Matthaei, G. Kohler, and M. Kopf. 1994. The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses in vivo. *Science* 264:561.

51. van Ginkel, F. W., S. M. Wahl, J. F. Kearney, M. N. Kweon, K. Fujihashi, P. D. Burrows, H. Kiyono, and J. R. McGhee. 1999. Partial

- IgA-deficiency with increased Th2-type cytokines in TGF-beta 1 knockout mice. *J Immunol* 163:1951.
52. Hiroi, T., M. Yanagita, N. Ohta, G. Sakaue, and H. Kiyono. 2000. IL-15 and IL-15 receptor selectively regulate differentiation of common mucosal immune system-independent B-1 cells for IgA responses. *J Immunol* 165:4329.
53. Fagarasan, S., K. Kinoshita, M. Muramatsu, K. Ikuta, and T. Honjo. 2001. In situ class switching and differentiation to IgA-producing cells in the gut lamina propria. *Nature* 413:639.
54. Yamamoto, M., P. Rennert, J. R. McGhee, M. N. Kweon, S. Yamamoto, T. Dohi, S. Otake, H. Bluethmann, K. Fujihashi, and H. Kiyono. 2000. Alternate mucosal immune system: organized Peyer's patches are not required for IgA responses in the gastrointestinal tract. *J Immunol* 164:5184.
55. Kelsall, B. L., and W. Strober. 1996. Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch. *J Exp Med* 183:237.
56. Ruedl, C., and S. Hubele. 1997. Maturation of Peyer's patch dendritic cells in vitro upon stimulation via cytokines or CD40 triggering. *Eur J Immunol* 27:1325.
57. Iwasaki, A., and B. L. Kelsall. 2000. Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine. *J Exp Med* 191:1381.
58. Iwasaki, A., and B. L. Kelsall. 2001. Unique functions of

- CD11b+, CD8 alpha+, and double-negative Peyer's patch dendritic cells. *J Immunol* 166:4884.
59. Spalding, D. M., S. I. Williamson, W. J. Koopman, and J. R. McGhee. 1984. Preferential induction of polyclonal IgA secretion by murine Peyer's patch dendritic cell-T cell mixtures. *J Exp Med* 160:941.
60. Spalding, D. M., and J. A. Griffin. 1986. Different pathways of differentiation of pre-B cell lines are induced by dendritic cells and T cells from different lymphoid tissues. *Cell* 44:507.
61. George, A., and J. J. Cebra. 1991. Responses of single germinal-center B cells in T-cell-dependent microculture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:11.
62. Iwasaki, A., and B. L. Kelsall. 1999. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp Med* 190:229.
63. Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, and R. M. Steinman. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 176:1693.
64. Shortman, K. 2000. Burnet oration: dendritic cells: multiple subtypes, multiple origins, multiple functions. *Immunol Cell Biol* 78:161.
65. Mosmann, T. R., and S. Sad. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 17:138.

66. O'Garra, A. 1998. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 8:275.
67. Ise, W., M. Totsuka, R. Takato, S. Hachimura, T. Sato, A. Ametani, Y. Kumagai, S. Habu, and S. Kaminogawa. 2000. Primary response of naive CD4(+) T cells to amino acid-substituted analogs of an antigenic peptide can show distinct activation patterns: Th1- and Th2-type cytokine secretion, and helper activity for antibody production without apparent cytokine secretion. *FEBS Lett* 465:28.
68. Constant, S., C. Pfeiffer, A. Woodard, T. Pasqualini, and K. Bottomly. 1995. Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4+ T cells. *J Exp Med* 182:1591.
69. Hosken, N. A., K. Shibuya, A. W. Heath, K. M. Murphy, and A. O'Garra. 1995. The effect of antigen dose on CD4+ T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model. *J Exp Med* 182:1579.
70. Aloisi, F., F. Ria, S. Columba-Cabezas, H. Hess, G. Penna, and L. Adorini. 1999. Relative efficiency of microglia, astrocytes, dendritic cells and B cells in naive CD4+ T cell priming and Th1/Th2 cell restimulation. *Eur J Immunol* 29:2705.
71. Kuchroo, V. K., M. P. Das, J. A. Brown, A. M. Ranger, S. S. Zamvil, R. A. Sobel, H. L. Weiner, N. Nabavi, and L. H. Glimcher. 1995. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 80:707.
72. Thompson, C. B. 1995. Distinct roles for the costimulatory ligands B7-1 and B7-2 in T helper cell differentiation? *Cell* 81:979.

73. Sato, T., T. Sasahara, Y. Nakamura, T. Osaki, T. Hasegawa, T. Tadakuma, Y. Arata, Y. Kumagai, M. Katsuki, and S. Habu. 1994. Naive T cells can mediate delayed-type hypersensitivity response in T cell receptor transgenic mice. *Eur J Immunol* 24:1512.
74. Ohteki, T., T. Fukao, K. Suzue, C. Maki, M. Ito, M. Nakamura, and S. Koyasu. 1999. Interleukin 12-dependent interferon gamma production by CD8alpha+ lymphoid dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* 189:1981.
75. Macatonia, S. E., N. A. Hosken, M. Litton, P. Vieira, C. S. Hsieh, J. A. Culpepper, M. Wysocka, G. Trinchieri, K. M. Murphy, and A. O'Garra. 1995. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* 154:5071.
76. Maldonado-Lopez, R., T. De Smedt, B. Pajak, C. Heirman, K. Thielemans, O. Leo, J. Urbain, C. R. Maliszewski, and M. Moser. 1999. Role of CD8alpha+ and CD8alpha- dendritic cells in the induction of primary immune responses in vivo. *J Leukoc Biol* 66:242.
77. Cella, M., D. Scheidegger, K. Palmer-Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia, and G. Alber. 1996. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 184:747.
78. Koch, F., U. Stanzl, P. Jennewein, K. Janke, C. Heufler, E. Kampgen, N. Romani, and G. Schuler. 1996. High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J Exp*

Med 184:741.

79. Kato, T., H. Yamane, and H. Nariuchi. 1997. Differential effects of LPS and CD40 ligand stimulations on the induction of IL-12 production by dendritic cells and macrophages. *Cell Immunol 181:59.*
80. Oppmann, B., R. Lesley, B. Blom, J. C. Timans, Y. Xu, B. Hunte, F. Vega, N. Yu, J. Wang, K. Singh, F. Zonin, E. Vaisberg, T. Churakova, M. Liu, D. Gorman, J. Wagner, S. Zurawski, Y. Liu, J. S. Abrams, K. W. Moore, D. Rennick, R. de Waal-Malefyt, C. Hannum, J. F. Bazan, and R. A. Kastelein. 2000. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity 13:715.*
81. Lenschow, D. J., S. C. Ho, H. Sattar, L. Rhee, G. Gray, N. Nabavi, K. C. Herold, and J. A. Bluestone. 1995. Differential effects of anti-B7-1 and anti-B7-2 monoclonal antibody treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *Journal of Experimental Medicine 181:1145.*
82. Miller, S. D., C. L. Vanderlugt, D. J. Lenschow, J. G. Pope, N. J. Karandikar, M. C. Dal Canto, and J. A. Bluestone. 1995. Blockade of CD28/B7-1 interaction prevents epitope spreading and clinical relapses of murine EAE. *Immunity 3:739.*
83. Tseng, S. Y., M. Otsuji, K. Gorski, X. Huang, J. E. Slansky, S. I. Pai, A. Shalabi, T. Shin, D. M. Pardoll, and H. Tsuchiya. 2001. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *Journal of Experimental Medicine 193:839.*
84. Rissoan, M. C., V. Soumelis, N. Kadowaki, G. Grouard, F. Briere, R. de Waal Malefyt, and Y. J. Liu. 1999. Reciprocal control of

T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283:1183.

85. Inaba, K., S. Turley, F. Yamaide, T. Iyoda, K. Mahnke, M. Inaba, M. Pack, M. Subklewe, B. Sauter, D. Sheff, M. Albert, N. Bhardwaj, I. Mellman, and R. M. Steinman. 1998. Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J Exp Med* 188:2163.

86. Inaba, K., M. Pack, M. Inaba, H. Sakuta, F. Isdell, and R. M. Steinman. 1997. High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *J Exp Med* 186:665.

87. Steinman, R. M., and K. Inaba. 1999. Myeloid dendritic cells. *J Leukoc Biol* 66:205.

88. Fruh, K., and Y. Yang. 1999. Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon gamma. *Curr Opin Immunol* 11:76.

89. Tanaka, K., and M. Kasahara. 1998. The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28. *Immunol Rev* 163:161.

90. Hiroi, T., M. Yanagita, H. Iijima, K. Iwatani, T. Yoshida, K. Takatsu, and H. Kiyono. 1999. Deficiency of IL-5 receptor alpha-chain selectively influences the development of the common mucosal immune system independent IgA-producing B-1 cell in mucosa-associated tissues. *J Immunol* 162:821.

91. Murphy, K. M., A. B. Heimberger, and D. Y. Loh. 1990. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCRlo

thymocytes in vivo. *Science* 250:1720.

92. Haskins, K., R. Kubo, J. White, M. Pigeon, J. Kappler, and P. Marrack. 1983. The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells. I. Isolation with a monoclonal antibody. *J Exp Med* 157:1149.

93. Henderson, R. A., S. C. Watkins, and J. L. Flynn. 1997. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 159:635.

94. Faggioli, L., M. Merola, J. Hiscott, A. Furia, R. Monese, M. Tovey, and M. Palmieri. 1997. Molecular mechanisms regulating induction of interleukin-6 gene transcription by interferon-gamma. *Eur J Immunol* 27:3022.

95. Elias, J. A., and V. Lentz. 1990. IL-1 and tumor necrosis factor synergistically stimulate fibroblast IL-6 production and stabilize IL-6 messenger RNA. *J Immunol* 145:161.

96. Ray, A., S. B. Tatter, L. T. May, and P. B. Sehgal. 1988. Activation of the human "beta 2-interferon/hepatocyte-stimulating factor/interleukin 6" promoter by cytokines, viruses, and second messenger agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:6701.

97. Zhang, Y. H., J. X. Lin, and J. Vilcek. 1990. Interleukin-6 induction by tumor necrosis factor and interleukin-1 in human fibroblasts involves activation of a nuclear factor binding to a kappa B-like sequence. *Mol Cell Biol* 10:3818.

98. Zhang, Y. H., J. X. Lin, Y. K. Yip, and J. Vilcek. 1988. Enhancement of cAMP levels and of protein kinase activity by tumor necrosis factor and interleukin 1 in human fibroblasts: role in the

- induction of interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:6802.
99. Zhang, Y., J. X. Lin, and J. Vilcek. 1988. Synthesis of interleukin 6 (interferon-beta 2/B cell stimulatory factor 2) in human fibroblasts is triggered by an increase in intracellular cyclic AMP. *J Biol Chem* 263:6177.
100. Isshiki, H., S. Akira, O. Tanabe, T. Nakajima, T. Shimamoto, T. Hirano, and T. Kishimoto. 1990. Constitutive and interleukin-1 (IL-1)-inducible factors interact with the IL-1-responsive element in the IL-6 gene. *Mol Cell Biol* 10:2757.
101. Sehgal, P. B., Z. Walther, and I. Tamm. 1987. Rapid enhancement of beta 2-interferon/B-cell differentiation factor BSF-2 gene expression in human fibroblasts by diacylglycerols and the calcium ionophore A23187. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:3663.
102. Kang, S. H., D. A. Brown, I. Kitajima, X. Xu, O. Heidenreich, S. Gryaznov, and M. Nerenberg. 1996. Binding and functional effects of transcriptional factor Sp1 on the murine interleukin-6 promoter. *J Biol Chem* 271:7330.
103. Liu, Y. J., and C. Arpin. 1997. Germinal center development. *Immunol Rev* 156:111.
104. Fayette, J., B. Dubois, S. Vandenabeele, J. M. Bridon, B. Vanbervliet, I. Durand, J. Banchereau, C. Caux, and F. Briere. 1997. Human dendritic cells skew isotype switching of CD40-activated naive B cells towards IgA1 and IgA2. *J Exp Med* 185:1909.

謝辞

本研究を進めるにあたり、研究の場を与えてくださり、研究者として必要な考え方、姿勢、発表方法などについて、時には厳しく、時には優しく終始懇切丁寧にご指導を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻食品生化学研究室・上野川修一教授に心より感謝いたします。

研究計画、実験手法、論文作成まで、全ての面においていたるところで熱心に指導していただきました東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻食品生化学研究室・八村敏志助教授に心より感謝いたします。

研究計画、実験データの解釈において様々な貴重な助言をいただき、論文作成においても指導していただきました東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻食シグナル・生体統御系間相互作用（明治乳業）寄付講座・戸塚護助教授に感謝いたします。

実験手法、実験データの解釈において様々な貴重な助言をいただきました東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻食シグナル・生体統御系間相互作用（明治乳業）寄付講座・山田潔助手に感謝いたします。

研究計画、実験手法、実験データの解釈について常に的確な助言をいただきました東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻食品生化学研究室・伊勢渉助手に感謝いたします。

樹状細胞の分離方法の検討をする際に貴重なご助言を賜り、また共同実験も行わせていただきました Yale 大学医学部公衆衛生学・疫学研究室・岩崎明子助教授に心より深く感謝の意を表します。

本研究に不可欠であった 7-3-7 TCR tg マウスを供与していただき

ました東海大学医学部免疫学教室の垣生園子博士ならびに佐藤健人博士ならびに日本医科大学微生物免疫学教室熊谷美恵博士に感謝いたします。

DO11.10 TCR tg マウスをはじめ、様々なモノクローナル抗体、ハイブリドーマなどを快く供与していただいた千葉大学大学院医学系研究科免疫細胞医学教室中山俊憲教授に感謝いたします。

Light Cycler™ の使用を快く許可してくださいました東京大学大学院農学国際専攻国際情報農学研究室・小柳津広志教授に感謝いたします。

FACSsort の使用を許可してくださいました東京大学生産工学センターの職員の方々に感謝いたします。

X 線照射装置の使用を快く許可してくださいました東京大学大学院医学系研究科免疫学研究室の方々に感謝いたします。

大学院を受験する際に、親切に研究室や受験勉強のことについてご助言くださいました、伊勢雅子博士と天野麻穂博士に感謝いたします。

貴重な時間を割いてデータの解釈方法などについてディスカッションしてくださいました、東京農工大学農学部応用生物科学科生物機能化学講座食品化学研究室・好田正助手に感謝いたします。

研究に行き詰まった時には励ましてくださり、また日々の楽しい会話で和ませてくださいました、浅井和美博士に感謝いたします。

共同で研究に携わり貴重なデータを提供して頂いただけでなく、TCR tg マウスの飼育、検定にもご協力いただいた修士課程の遠田悦子氏に深く感謝いたします。

同じ研究グループであり、日頃から貴重な時間をディスカッションに割いてくれ、また、TCR tg マウスの飼育、検定にもご協力いた

だいた修士課程の倉岡雅征氏に感謝いたします。

本研究の準備段階から、実験計画、実験操作、論文作成までの全てにおいて始終丁寧にきめ細やかなご指導をしてくださり、研究の楽しさ、また時にはつらさについて昼夜を問わず議論してくださいました、ジョージア医科大学・橋口昌章博士に深く感謝いたします。

3年間の研究生活においてたくさんの素晴らしい仲間との出会いがあり、私にとってかけがえのない財産となりました。この研究室で時間を共有した方々に感謝の意を表します。

そしていつもそばにいて私を励まし支えてくれる虎谷輝正氏に感謝の気持ちを贈ります。

最後に、子供の頃から好きな道を進むわがままな私を常に励まし暖かく見守ってくださいました両親に深く感謝いたします。

2002年2月