

博士(医学) 鈴木 勇 三

### 論文題目

Mouse CD11b<sup>high</sup> lung dendritic cells have more potent capability to induce IgA than CD103<sup>+</sup> lung dendritic cells *in vitro*

(マウス肺 CD11b<sup>high</sup> 樹状細胞は CD103<sup>+</sup> 樹状細胞と比較して優れた IgA 誘導能を有する)

### 論文の内容の要旨

#### [ はじめに ]

樹状細胞 (DC) は生体内で最も強い抗原提示能を有し、生体防御の最前線である粘膜免疫で重要な役割を担っている。粘膜免疫において DC が T 細胞を活性化させることはよく知られているが、B 細胞と DC の関わりは十分明らかになっていない。粘膜免疫における B 細胞の最も重要な働きは、粘膜面の主要な免疫グロブリンである IgA 産生を誘導することである。IgA は粘膜上皮から粘膜表面へ絶えず分泌され、病原体の付着阻止、毒素の中和、病原体のリンパ組織への輸送を行い、粘膜免疫の液性防御機構の中心を担っている。DC は naïve B 細胞の class switch recombination (CSR) に必須である activation-induced cytidine deaminase (AID) を誘導することにより、naïve B 細胞を IgA 分泌形質細胞へ分化させることが知られている。IgA CSR には T 細胞依存経路と T 細胞非依存経路があり、T 細胞依存経路ではまず DC が naïve T 細胞に抗原提示を行い、T 細胞を活性化させ、次いで活性化された T 細胞は CD40 を介して naïve B 細胞を分化させ IgA CSR を誘導する。一方、T 細胞非依存経路では、DC が a proliferation-inducing ligand (APRIL) や B cell-activating factor (BAFF)、retinoic acid (RA) を介して直接 naïve B 細胞を分化させ IgA CSR を誘導する。我々は以前に、肺において肺樹状細胞 (CD11c<sup>+</sup> LDC) が、最も優れた IgA 誘導能を有する抗原提示細胞であることを報告した (Am J Respir Cell Mol Biol 2008)。しかし、近年 CD11c<sup>+</sup> LDC はさら CD103<sup>+</sup> LDC と CD11b<sup>high</sup> LDC という 2 つのサブタイプに大別されることが明らかとなり、最近我々は、この 2 つのサブタイプの LDC が異なる CD4<sup>+</sup> T 細胞反応を誘導することを報告した (Am J Respir Cell Mol Biol in press)。しかし、この 2 つのサブタイプの LDC の IgA 誘導能に違いがあるかどうかは明らかになっていない。そこで今回、この 2 つのサブタイプの LDC の IgA 誘導能を T 細胞依存経路 (LPS+CD40L 刺激) と T 細胞非依存経路 (LPS 刺激) にわけて検討した。

#### [ 材料ならびに方法 ]

実験には 10 週齢の BALB/c マウスを使用した。まずマウス肺より酵素処理と magnetic cell sorting (MACS) を用いて CD11c<sup>+</sup>細胞を分離した。さらに FACSAria flow cytometer により CD11c<sup>+</sup> MHC class II<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup>細胞 (CD103<sup>+</sup> LDC) と CD11c<sup>+</sup> MHC class II<sup>+</sup> CD103<sup>-</sup> CD11b<sup>high</sup>細胞 (CD11b<sup>high</sup> LDC) を単離した。次いでマウス脾より MACS を用いて naïve IgD<sup>+</sup> B 細胞を単離した。単離した各 LDC と naïve B 細胞を LPS+CD40L あるいは LPS で刺激して共培養したのち、上清中の免疫グロブリンとサイトカインを ELISA 法と cytometric beads array

により測定した。また共培養した naïve B 細胞に対する AID 誘導能の違いも real-time quantitative PCR 法で調べた。さらに各 LDC のみを LPS+CD40L あるいは LPS で刺激し、各 LDC のサイトカイン産生能を cytometric beads array で測定した。トール様受容体 (TLRs) および BAFF、APRIL、RA 誘導体 (RALDH1) の発現を real-time quantitative PCR 法、western blot 法により測定した。

#### [ 結果 ]

TLR1、TLR2、TLR5 の発現は CD11b<sup>high</sup> LDC が有意に高く、TLR3 は CD103<sup>+</sup> LDC の発現が有意に高かった。一方、LPS の受容体である TLR4、および TLR9 の発現は各 LDC で有意差を認めなかった。CD11b<sup>high</sup> LDC は、T 細胞依存経路および T 細胞非依存経路ともに、CD103<sup>+</sup> LDC と比較して強い IgA 誘導能を示した。naïve B 細胞に対する AID 誘導能も、両経路とも CD11b<sup>high</sup> LDC が CD103<sup>+</sup> LDC と比較して優れていた。IgA 分泌形質細胞の分化と増殖に重要な TGF-β、IL-6、IL-10 について検討したところ、TGF-β は各共培養上清で違いは見られなかったが、IL-6 と IL-10 は CD11b<sup>high</sup> LDC の共培養上清で有意に高値であった。さらに、LDC 自身のサイトカイン産生能も、LPS+CD40L あるいは LPS 刺激下で、TGF-β に違いは認めなかったが、IL-6 と IL-10 の産生能は CD11b<sup>high</sup> LDC が優れていた。しかも、CD11b<sup>high</sup> LDC の T 細胞依存性 IgA 誘導能は IL-6 および IL-10 依存性であった。一方、T 細胞非依存性 IgA 誘導能には、IL-6 および IL-10 依存性は認められなかった。また、T 細胞非依存性 IgA CSR に重要な APRIL、BAFF、RALDH1 の発現も、CD11b<sup>high</sup> LDC と CD103<sup>+</sup> LDC で差は見られなかった。

#### [ 考察 ]

今回の結果から、T 細胞依存性および T 細胞非依存性の両経路で、CD11b<sup>high</sup> LDC と CD103<sup>+</sup> LDC が IgA CSR を誘導することが明らかとなった。さらに、CD11b<sup>high</sup> LDC は、CD103<sup>+</sup> LDC と比較して AID の発現が高く、IgA 誘導能も優れていた。CD11c<sup>+</sup> LDC は肺で最も強い IgA CSR を誘導する抗原提示細胞であるが、( Am J Respir Cell Mol Biol 2008、J Exp Med 2009 )、今回の結果から、その中で CD11b<sup>high</sup> LDC が肺における主要な IgA 誘導抗原提示細胞であることが示された。

IgA CSR には TGF-β、IL-6、IL-10 が重要である ( Nat Rev Immunol 2008 )。今回の検討では、CD11b<sup>high</sup> LDC 共培養上清では、CD103<sup>+</sup> LDC 共培養上清と比較して、IL-6 と IL-10 の濃度が有意に高値であり、LDC 自身のこれらサイトカインの産生能も CD11b<sup>high</sup> LDC が優れていた。T 細胞依存性 IgA 誘導においては、IL-6 や IL-10 の抗体添加によって両 LDC の IgA 誘導能に差がなくなったことから、IL-6 と IL-10 産生能の違いが IgA 誘導能の差に関係している可能性が示唆された。一方、T 細胞非依存性 IgA 誘導においては、IL-6 と IL-10 依存性は認められず、また、BAFF や、APRIL、RALDH1 の発現に両 LDC に違いは認められなかった。したがって、両 LDC の T 細胞非依存 IgA 誘導能の違いに関する機序は不明であり、今後の課題と考えられた。

#### [ 結論 ]

CD11b<sup>high</sup> LDC は CD103<sup>+</sup> LDC と比較して優れた IgA 誘導能を有する。

### 論文審査の結果の要旨

樹状細胞 (DC) は粘膜免疫において、T 細胞のみならず B 細胞も分化させ、粘膜面の液性防御機構の中心を担う IgA 産生を誘導している。IgA 産生のためには、IgA への class switch recombination (CSR) が起こらなければならず、T 細胞依存経路と T 細胞非依存経路が知られている。近年、肺 DC (LDC) は CD103<sup>+</sup> LDC と CD11b<sup>high</sup> LDC という 2 つのサブタイプに大別されることが明らかとなった。そこで両 LDC の IgA 誘導能を研究した。

10 週齢 BALB/c マウス肺より CD103<sup>+</sup> LDC と CD11b<sup>high</sup> LDC を単離し、脾より naïve IgD<sup>+</sup> B 細胞を単離した。各 LDC と naïve B 細胞を LPS+CD40L (T 細胞依存経路) あるいは LPS (T 細胞非依存経路) で刺激した。

CD103<sup>+</sup> LDC と比較し、CD11b<sup>high</sup> LDC は、T 細胞依存経路および T 細胞非依存経路ともに、強い IgA 誘導能を示した。naïve B 細胞の class switch に関わる activation-induced cytidine deaminase (AID) 誘導能も、両経路とも CD11b<sup>high</sup> LDC が優れていた。次に、IgA 分泌形質細胞の分化と増殖に重要な TGF- $\beta$ 、IL-6、IL-10 について検討した。TGF- $\beta$  は両 LDC で差は見られなかったが、IL-6 と IL-10 は CD11b<sup>high</sup> LDC の共培養上清中で有意に高値であり、IgA 産生を促進させることが示された。

今回の結果から、T 細胞依存性および T 細胞非依存性の両経路で、CD11b<sup>high</sup> LDC が肺における主要な IgA 誘導抗原提示細胞であることが示された。肺での IgA 産生に関する DC のサブセットを明らかにした点を審査員一同高く評価した。

以上により、本論文は博士 (医学) の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 戸倉 新樹  
副査 大西 一功 副査 小川 法良