

粘膜免疫における Fc $\alpha$ / $\mu$ 受容体の機能解析

2013

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

吉澤 勇一

筑波大学

博士（医学）学位論文

## 图表

## 参 考 论 文

# 目次

1 序論	4
1-1 はじめに	
1-2 自然免疫応答と獲得免疫応答	
1-3 IgA および IgM	
1-4 Fc 受容体 (Fc receptor, FcR)	
1-5 Fc $\alpha$ / $\mu$ 受容体 (Fc $\alpha$ / $\mu$ R, CD351)	
2 目的	13
3 材料および方法	14
3-1 マウス	
3-2 抗体	
3-3 FDC および B 細胞の単離	

3-4 免疫組織染色

3-5 PCR

3-6 FDC による B 細胞の生存亢進機能の解析

3-7 アンピシリン耐性サルモネラ菌の作製

3-8 感染実験

4. 結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 23

4-1-1 小腸において Fcα/μR 遺伝子を高発現する部位の特定

4-1-2 小腸パイエル板において Fcα/μR を発現する細胞の特定

4-1-3 脾臓および小腸パイエル板の B 細胞と FDC における Fcα/μR 遺伝子の発現量

4-1-4 GF マウス小腸パイエル板の FDC における Fcα/μR 遺伝子の発現量

4-1-5 Fcα/μR 遺伝子の発現制御機構における TLR の関与

4-2 サルモネラ感染の抵抗性における Fcα/μR の関与

5.	考察	32
6.	結語	35
7.	略語表	36
8.	謝辞	38
9.	参考文献	39
10.	図表	47

## 1. 序論

### 1-1 はじめに

免疫系には自然免疫と獲得免疫の二つに大別される反応があり、それらが細菌やウイルスなどの病原体から生体を守っている。病原体の侵入に際し、まずマクロファージや好中球、NK 細胞に代表される自然免疫系の細胞が病原体の排除に働いている(Hoffmann et al., 1999; Janeway and Medzhitov, 2002)。その後、T 細胞や B 細胞によって構成される獲得免疫応答が惹起され、生体防御に働いている(Carroll, 1998; Grewal and Flavell, 1998; Romagnani, 1997)。B 細胞は抗体と呼ばれるタンパク質を産生するが、抗体にはいくつかの働きがある。第一に、病原体に対し特異的に結合し、ウイルスや細胞内寄生細菌が細胞表面分子を標的に結合する過程を阻害する。これが中和作用である(Parren and Burton, 2001)。また、細菌毒素の細胞内進入の阻害においても重要な役割を果たす。第二に、抗体は主に貪食細胞による病原体の取り込みを促進することによって細胞外で増殖する細菌を排除する。病原体表面を被覆して貪食作用を亢進させるこの作用はオプソ



ニン化と呼ばれる。病原体に結合した抗体は、抗体の定常部(Fc) に結合する Fc 受容体によって認識される (図 1、2) (Radaev and Sun, 2002)。第三に、病原体を被覆した抗体は、古典経路によって補体系のタンパク質を活性化する(Carroll, 1998)。これにより病原体に結合した補体タンパク質と貪食細胞上の補体受容体との結合を介したオプソニン化が起こる。また活性化補体成分は微生物の細胞に穴を開けて融解させる作用を持つ。このように、B 細胞が産生する抗体によって惹起される生体防御機構は多岐にわたる。したがって、B 細胞が活性化され、分化、成熟の過程を経て抗体を産生するに至るまでの機序を明らかにすることは、病原体から生体を守る機序を明らかにする上で非常に重要な課題であるといえる。

## 1-2 自然免疫応答と獲得免疫応答

自然免疫応答は主にマクロファージや好中球などにより担われているが、これらの細胞は限られた多型性を示す受容体 (Pattern recognition receptor: PRR) によって外来生物を認識する(Akira et al., 2006; Janeway and Medzhitov, 2002)。一方、獲得免疫応答は B 細

胞やT細胞などのリンパ球によって担われているが、これらのリンパ球は、抗原受容体という膜タンパク質により外来抗原を認識する。この抗原受容体は、遺伝子再構成によって多様性を獲得することで様々な抗原を特異的に認識するようになる。細胞表面上に抗原受容体である免疫グロブリンを発現した成熟 B 細胞は、それに対応する抗原と抗原受容体を介して結合することによって細胞内にシグナルが伝達され、活性化されて増殖し、胚中心を形成する。胚中心において B 細胞は抗体産生細胞へと分化するのみならず、産生する抗体のアイソタイプが IgM から IgG などへ変化するクラススイッチも生じる。一方、活性化した B 細胞の一部は記憶 B 細胞として長期間生体内で持続して存在できるようになり、次回の感染に備えられる。このように獲得免疫応答は特異性および免疫記憶といった利点を有しているが、その成立には通常数日かかる。一方、自然免疫応答は外来抗原の侵入に対して非常に迅速な反応を示すことが知られており、それぞれが補いあって有効な生体防御機構を形成している。

### 1-3 IgA および IgM

抗体は抗原に結合する Fab 部分とそれにつながる Fc 部分からなり、Fc 部分の違いによって IgM, IgA, IgG, IgE, IgD の 5 種類のアイソタイプに分類される (図 1)。IgM はいくつかの免疫グロブリンが J 鎖に結合した多量体を形成しており、その多くが五量体であるが、六量体や単量体の IgM も存在している (Pontet and Rousset, 1984; Roberts-Thomson et al., 1984)。IgM は五量体という特異な構造により、抗体の中で最も強力な補体活性化能を示す (Ravetch, 1997; Ravetch and Clynes, 1998)。IgM はナイーブな個体において産生されている自然抗体の大部分を占める抗体であるのみならず、病原体の侵入に対して最初に産生される抗体でもあり、生体防御の初期段階に重要な働きを担っている (Boes et al., 1998b; Ochsenbein et al., 1999)。一方で IgM はその後に産生される高親和性の IgG 産生にも重要である (Boes et al., 1998a; Ehrenstein et al., 1998)。

IgA はマウスにおいてサブクラスが存在しないのに対し、ヒトでは IgA1 および IgA2 の二種類のサブクラスが存在しており、IgA2 は細菌由来のプロテアーゼに耐性があることから腸管により多く存在している。ヒトおよびマウスにおいて IgA は J 鎖により連結され、二量体を形成して粘膜面に分泌される (Kerr, 1990)。マウスでは粘膜面だけでなく、血清中においても多くの IgA が多量体を形成して存在しているが、ヒトの血清中で

は多くが単量体の IgA1 である(Cerutti and Rescigno, 2008)。IgA は各アイソタイプの中で最も多量に産生される抗体であり、粘膜面に分泌される抗体の大部分を占めている。IgA は粘膜局所で中和抗体として機能することにより、細菌やウイルスその他の病原体の上皮細胞への接着、侵入を防ぎ、粘膜免疫の中心的な働きを担っている(Maliszewski et al., 1990; Monteiro, 2010; Monteiro and Van De Winkel, 2003)。さらに腸管管腔側で中和抗体として機能するだけでなく、IgA は小腸パイエル板の M 細胞に選択的に結合し、トランスサイトーシスにより腸管管腔側から腸管関連リンパ組織 (gut-associated lymphoid tissue, GALT) へ移行されている(Mantis et al., 2002; Rey et al., 2004)。しかしながら、その詳細なメカニズムや生理的な意義は明らかとなっていない。

#### 1-4 Fc 受容体 (Fc receptor, FcR)

免疫細胞上や腸管上皮細胞をはじめとする一部の細胞上には抗体の Fc 部分に対する受容体である Fc 受容体が発現しており、抗原複合体を形成した抗体との結合の結果、様々な免疫応答を誘導する(Daeron, 1997; Ravetch and Bolland, 2001; Takai, 2002)。これま

でに複数の Fc 受容体が同定され、その構造や機能の解明がなされてきた。IgG に対する Fc 受容体である Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RIII (CD16) と IgG-抗原複合体との結合は Fc $\gamma$ R を介して細胞内に活性化シグナルを伝達するが、Fc $\gamma$ R 遺伝子欠損マウスを用いた解析から、Fc $\gamma$ RI や Fc $\gamma$ RIII が IgG を介した貪食や細胞障害活性に必須であることが明らかにされている(Daeron, 1997; Ravetch and Bolland, 2001; Takai, 2002)。一方、IgG に対する Fc 受容体の中でも Fc $\gamma$ RIIb と IgG-抗原複合体との結合は細胞内に抑制性のシグナルを伝達することによって免疫応答の調節を行っている(Takai, 2005)。Fc $\gamma$ RIIb 遺伝子欠損マウスでは自己免疫疾患の発症が促進されることから、Fc $\gamma$ RIIb が自己免疫疾患の発症を抑制していることも示されている(Takai, 2002)。IgE に対する Fc 受容体としては Fc $\epsilon$ R I がマスト細胞や好塩基球上に発現して血中の IgE を結合しているが、この IgE に抗原が結合すると Fc $\epsilon$ RI が架橋されて脱顆粒反応が生じ、即時型過敏応答が誘導される(Daeron, 1997; Ravetch and Bolland, 2001)。IgM に対する Fc 受容体としては B 細胞上に発現する Fc $\mu$ R と腸管上皮細胞に発現する pIgR が同定されている。Fc $\mu$ R は IgM によりオプソニン化された抗原の取り込みや病原体に対する抗体産生応答の誘導に働く一方で、自己抗原に対する抗体産生を抑制する働きもある(Kubagawa et al., 2009; Ouchida et al., 2012;

Shima et al., 2010)。pIgR は IgM のみならず IgA を結合可能であり、主に粘膜固有層で結合した IgA を腸管粘膜面へ輸送し、粘膜局所に分泌することに働いている(Kaetzel, 2005)。IgA に対する Fc 受容体として、ヒトにおいては pIgR に加えて Fc $\alpha$ R (CD89) が同定されている。Fc $\alpha$ R はミエロイド系の細胞上に発現が認められ、IgA によりオプソニン化された抗原と Fc $\alpha$ R との会合は貪食や炎症性サイトカイン産生に働く(Maliszewski et al., 1990; Monteiro and Van De Winkel, 2003)。しかしながら、マウスにおいて Fc $\alpha$ R と相同な遺伝子は存在していない。そのため in vivo における IgA Fc 受容体の解析はヒト IgA 受容体のトランスジェニックマウスを用いた解析に限られている。

#### 1-5 Fc $\alpha$ / $\mu$ 受容体 (Fc $\alpha$ / $\mu$ R, CD351)

当研究室はマウス IgM をプローブとした発現クローニング法により、新規 IgM Fc 受容体、Fc $\alpha$ / $\mu$  Receptor (Fc $\alpha$ / $\mu$ R)の同定に成功した(Shibuya et al., 2000)。Fc $\alpha$ / $\mu$ R は pIgR と同様に IgM と IgA の両者に対する Fc 受容体であるが、2009 年に Fc $\mu$ R が同定されるまで免疫系細胞上に発現する IgM Fc 受容体としてはヒトおよびマウスにおいて唯一同定

されていた分子であり、IgM を介した免疫応答に関与していると考えられてきた。一方、免疫系細胞上に発現する IgA Fc 受容体としてはヒトにおいて FcαR が存在するが、マウスにおいては Fcα/μR が唯一同定されている分子である。Fcα/μR 遺伝子はその他の Fc 受容体と同様、ヒトおよびマウスともに 1 番染色体上に存在するが、特に pIgR 遺伝子とは非常に近接した位置に存在することから、両者は近縁な分子であると考えられる (図 3) (Shimizu et al., 2001)。Fcα/μR は細胞外に 1 つの免疫グロブリン様ドメインを有する免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜タンパク質で、423 アミノ酸から構成される細胞外領域と 20 アミノ酸で構成される膜貫通領域、および 60 アミノ酸からなる細胞内領域を有している (図 3)。Fcα/μR は不規則に二量体を形成するが、二量体形成には Fcα/μR の細胞内領域が必要となる (Cho et al., 2010; Takagaki et al., 2013)。Fcα/μR 遺伝子の発現量は各臓器管では小腸に高い発現が認められており (図 4)、各細胞間では B 細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞上に発現が認められるが、特に胚中心の形成に重要な働きをする濾胞樹状細胞 (FDC) 上に強い発現が認められる (Honda et al., 2009; Sakamoto et al., 2001)。B 細胞と FDC の両者における発現は、Fcα/μR が抗原に対する抗体産生応答を始めとする液性免疫応答に関与していることを強く示唆しているが、

Fc $\alpha$ / $\mu$ R 遺伝子欠損マウスを作製して抗原に対する液性免疫応答を検討したところ、このマウスでは通常の野生型マウスではほとんど認められない T 細胞非依存性抗原 (TI 抗原) に対する胚中心の形成が亢進していた(Honda et al., 2009)。すなわち、Fc $\alpha$ / $\mu$ R は TI 抗原に対する液性免疫応答を負に制御していることが明らかにされた。しかしながら、病態における Fc $\alpha$ / $\mu$ R の生理的意義については明らかにされていない。

生理的な意義を明らかにする上で各臓器や細胞における Fc $\alpha$ / $\mu$ R の詳細な発現パターンに関する知見は重要な手掛かりとなるが、細胞レベルでの Fc $\alpha$ / $\mu$ R の発現量の比較検討はこれまで行われておらず、Fc $\alpha$ / $\mu$ R を高発現する細胞の特定やその発現制御機構の解明が望まれる。

さらに、これまでに定量 PCR 法を用いた各臓器における Fc $\alpha$ / $\mu$ R 遺伝子の発現解析から Fc $\alpha$ / $\mu$ R は小腸に高発現することが明らかとなっている。リガンドである IgA は粘膜における感染防御機構において重要な働きを担っているが、Fc 受容体を介した免疫応答については未だ不明である。そのため Fc $\alpha$ / $\mu$ R の腸管粘膜免疫における機能の解析が望まれる。



## 2. 目的

① Fc $\alpha$ / $\mu$ R を高発現する細胞の特定および Fc $\alpha$ / $\mu$ R の発現制御機構を解明する。

② Fc $\alpha$ / $\mu$ R が腸管において高発現することの生理的な意義を明らかにする。

以上、2点を目的として研究を行った。

## 3. 材料および方法

### 3-1 マウス

9~13 週齢の C57BL/6 マウスはクレアジャパン (Clea, Tokyo, Japan) より購入して使用した。本実験で使用した Fc $\alpha$ / $\mu$ R 遺伝子欠損マウスは、当研究室の本多等により作製された BALB/c 遺伝背景の Fc $\alpha$ / $\mu$ R 遺伝子欠損マウスを C57BL/6 マウスと 12 世代以上戻し交配されたものを用いた (Honda et al., 2009)。C57BL/6 遺伝背景の SPF (Specific Pathogen-Free) マウスおよび GF (Germ-Free) マウスは三協ラボサービス株式会社 (Sankyo Labo Service, Ibaraki, Japan) より購入して使用した。TRIF 遺伝子欠損マウスおよび MyD88 遺伝子欠損マウスは株式会社オリエンタルバイオサービス (Oriental Bio Service, Kyoto, Japan) より購入し、筑波大学生命科学動物資源センターにて繁殖したも

のを使用した。いずれのマウスも特定病原体非感染環境下で飼育し、筑波大学生命科学

動物資源センターの規約に従って実験を行った。

### 3-2 抗体

Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識 CD45R/B220、CD21/35 抗体および Biotin 標識

CD54 抗体、allophycocyanin (APC) 標識 streptavidin は Pharmingen (Pharmingen, San

Diego, USA) から購入した。Biotin 標識 FDC-M2 抗体は Immuno Kontact (Immuno

Kontakt, Abingdon, UK) から購入した。Phycoerythrin (PE) 標識 CD45.2 抗体は

Biolegend (Biolegend, San Diego, USA) から購入した。

### 3-3 FDC および B 細胞の単離

マウスより採取した脾臓および小腸のパイエル板をメスにて細切し、33.3 mg/ml Collagenase D (Roche, Indianapolis, USA) および 2500 U/ml DNase I (Sigma, St.Louis, USA) を含有した 2% 牛胎児血清 (FBS) 添加 DMEM 培地にて 37 度、30 分処理した。ピペッティングにより十分に組織をばらし、細胞を回収した。回収したパイエル板由来の細胞は、Biotin 標識抗 FDC-M2 抗体で染色した後、APC 標識 streptavidin および PE 標識 CD45.2 抗体、FITC 標識 CD45R/B220 抗体にて染色した。FACSAria (Becton Dickinson, San Diego, USA) にて、CD45.2 陰性 FDC-M2 陽性細胞を FDC として、CD45.2 陽性 CD45R/B220 陽性細胞を B 細胞として単離した。回収した脾臓由来の細胞は Biotin 標識抗 CD54 抗体で染色した後、APC 標識 streptavidin および PE 標識 CD45.2 抗体、FITC 標識 CD45R/B220 抗体にて染色した。FACSAria にて CD45.2 陰性 CD54 陽性細胞を FDC として、CD45.2 陽性 CD45R/B220 陽性細胞を B 細胞として単離した。

### 3-4 免疫組織染色

マウスからパイエル板を採取し、OTC-Compound (SAKURA Finetek, Tokyo, Japan) にて包埋し、 $-80^{\circ}\text{C}$ にて凍結した。包埋した組織をマイクロトーム (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) にて  $5\ \mu\text{m}$  厚に薄切し、スライドガラスにはりつけた。組織の固定を 100% 無水アセトンにより行った後、10% FBS/PBS を添加し、室温、暗所にて 1 時間ブロッキングした。その後、1 次抗体を添加して室温、暗所にて 1 時間静置し、PBS にて洗浄後、2 次抗体を添加して室温、暗所にて 30 分間静置した。サンプルは VECTAHIELD (Vector Laboratories, California, USA) を用いて封入し、蛍光顕微鏡 (Keyence, Osaka, Japan) を用いて観察した。

### 3-5 PCR

単離した細胞および組織から ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を用いて mRNA を抽出し、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem, Foster City, USA) を用いて逆転写した。転写産物の定量には Plantium SYBR Green (Invitrogen, Carlsbad, USA) を用い、ABI7500 (Applied Biosystems, Foster City, USA) を用いて解析した。PCR 解析は以下の配列のプライマーの組み合わせで行った。*Fcamr* (variant 1, 2) (5'-CCCAGCCTGAGAACGAGATG-3', 5'-AGAGATGGCTCCTGAACTGAG-3')、*Mfge8* (5'-ATATGGGTTTCATGGGCTTG-3', 5'-GAGGCTGTAAGCCACCTTGA-3')、*Actb* (5'-GGCTGTATTCCCCTCCATCD-3', 5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3')

*Fcα/μR* 遺伝子および *MFG-E8* 遺伝子の発現量は *B-actin* 遺伝子の発現量で標準化した。

統計学的解析は one way ANOVA-test ならびに Tukey's multiple comparison-test を用いて、

または unpaired t-test を用いて行い、 $P < 0.05$  を有意差ありと判定した。

FDC 上の TLR の発現は以下の配列のプライマーを用いた PCR 解析により行った。

*Tlr1* (5'-AAGAACTCAGGCGAGCAGAG-3', 5'-GTCCTTGGGCACTCTGGTAA-3')、*Tlr2* (5'-GCGGACTGTTTCCTTCTGAC-3', 5'-CCAAAGAGCTCGTAGCATCC-3')、*Tlr3* (5'-GATACAGGGATTGCACCCATA-3', 5'-TCCCCCAAAGGAGTACATTAGA-3')、*Tlr4*

(5'-GGACTCTGATCATGGCACTG-3', 5'-CTGATCCATGCATTGGTAGGT-3')、 *Tlr5*  
(5'-CTCTCCAGACGCCTCATCTC-3', 5'-TGGCATATGTTCCAAGCGTA-3')、 *Tlr6*  
(5'-CGTCAGTGCTGGAAATAGAGC-3', 5'-CCACGATGGGTTTTCTGTCT-3')、 *Tlr7*  
(5'-GATCCTGGCCTATCTCTGACTC-3', 5'-CGTGTCCACATCGAAAACAC-3')、 *Tlr8*  
(5'-CAAACGTTTTACCTTCCTTTGTCT-3', 5'-ATGGAAGATGGCACTGGTTC-3')、 *Tlr9*  
(5'-GAGAATCCTCCATCTCCCAAC-3', 5'-CCAGAGTCTCAGCCAGCAC-3')

### 3-6 FDCによるB細胞の生存亢進機能の解析

脾臓から FDC (CD45 陰性 ICAM 陽性細胞分画) および Double Negative (CD45 陰性 ICAM 陰性細胞分画) を、パイエル板から FDC (CD45 陰性 FDC-M2 陽性細胞分画) および Double Negative (CD45 陰性 FDC-M2 陰性細胞分画) を単離した。384 well plate に単離した細胞を  $3 \times 10^4$  cells/well となるように播種し、2ME 入りの DMEM (10%FCS) にて 5 日間培養した。抗 CD45R/B220 Magnetic Particles (BD, Franklin Lakes, USA) を用いて B220 陽性 B 細胞を脾臓から分離し、 $2 \times 10^5$  cells/well となるように単離した細胞と共

培養した。共培養後 3 日後の細胞を回収し、Guava ViaCount 試薬 (Millipore, Billerica, USA) を用いて生細胞数を計数し、FITC 標識 CD45R/B220 抗体により染色して well 中の B 細胞の割合を測定した。生細胞数の計数と B 細胞の割合の測定は Guava Easy Cyte (Millipore, Billerica, USA) を用いて行った。

### 3-7 アンピシリン耐性サルモネラ菌の作製

グリセロールストックから削ったサルモネラ菌 ( $\chi$ 3306 株) を LB Broth に懸濁し、栄研スピッツにて 37 度 200rpm で一晩巡回培養した。培養したサルモネラ懸濁液を LB Broth にて 1000 倍希釈し、三角フラスコにて 37 度 200rpm で OD405 = 0.6 ~ 0.7 になるまで巡回培養した。 $2 \times 10^8$  個のサルモネラ菌を 40  $\mu$ l の 10% グリセロールに懸濁し、2  $\mu$ l のアンピシリン耐性遺伝子を含むベクター (千葉大学大学院薬学研究院微生物薬品化学研究室の山本友子先生からいただいた) を加え、氷上で 5 分静置した。Gene Pulser (Bio-Rad, Hercules, USA) を用い、エレクトロポレーション法にてアンピシリン耐性遺伝



子をトランスフェクトした。作製したアンピシリン耐性サルモネラ菌をサルモネラ-Ampとして本実験で使用した。

### 3-8 感染実験

#### 3-8-1 サルモネラ-Amp の保存

LB Agar プレートから回収したサルモネラ-Amp のコロニーを LB Broth に懸濁し、栄研スピッツにて 37 度 200rpm で一晩旋回培養した。等量のサルモネラ-Amp 懸濁液と LB Broth にて希釈された 80%グリセロールを混合し、-80 度に保存した。

#### 3-8-2 サルモネラ菌の投与

グリセロールストックから削ったサルモネラ-Amp を LB Broth に懸濁し、栄研スピッツで 37 度 200rpm で一晩旋回培養した。培養したサルモネラ-Amp 懸濁液を LB Broth にて 1000 倍希釈し、三角フラスコにて 37 度 200rpm で OD405 = 0.6 ~ 0.7 になるまで旋回培養した。回収したサルモネラ-Amp 懸濁液を高速遠心機 (TOMY SEIKO, Tokyo, Japan) にて 4 度 9250g で 30 分遠心した。ペレットを PBS に懸濁し、200  $\mu$ l/mouse にて

経口投与した。

### 3-8-3 生存率および体重減少率の検討

野性型および Fc $\alpha$ / $\mu$ R 欠損マウスにサルモネラ-Amp を経口投与し、2 週間にわたり生存率および体重減少率を比較した。体重は一日おきに計測した。統計学的解析は Log-rank (Mantel-Cox) Test を用いて行い、 $P < 0.05$  を有意差ありと判定した。

### 3-8-4 菌量の測定

野性型および Fc $\alpha$ / $\mu$ R 欠損マウスにサルモネラ-Amp を経口投与し、1 日および 5 日後にパイエル板、腸管膜リンパ節、脾臓、肝臓を回収した。回収した臓器をホモジェナイザー PT1200E (KINEMATICA AG, Bohemia, USA) を用いて粉碎し、PBS に懸濁した。アンピシリン入りの LB Agar プレートに播種し、24 時間後にコロニーを計数した。統計学的解析は unpaired t-test を用いて行い、 $P < 0.05$  を有意差ありと判定した。

## 4. 結果

### 4-1-1 小腸において Fc $\alpha$ / $\mu$ R 遺伝子を高発現する部位の特定

小腸の中で Fc $\alpha$ / $\mu$ R を発現している主要な部位を明らかにするために、小腸全長 (bulk)、パイエル板 (PP) および小腸全長からパイエル板を除いたサンプル ( $\Delta$ PP) を用意し、Fc $\alpha$ / $\mu$ R 遺伝子の発現量を定量 PCR 法にて測定したところ、bulk および  $\Delta$ PP のサンプルに比べて PP において Fc $\alpha$ / $\mu$ R 遺伝子の発現が有意に高いことが明らかとなった(図5)。このことから小腸における Fc $\alpha$ / $\mu$ R の主な発現場所はパイエル板であることが示唆された。

### 4-1-2 小腸パイエル板において Fc $\alpha$ / $\mu$ R を発現する細胞の特定

小腸パイエル板における Fc $\alpha$ / $\mu$ R 発現細胞を特定するために、免疫蛍光染色法によ

る組織学的な解析を試みた。Fc $\alpha$ / $\mu$ R 欠損および野生型マウスのパイエル板の切片を抗 Fc $\alpha$ / $\mu$ R 抗体で染色したところ、Fc $\alpha$ / $\mu$ R 欠損マウスにおいて染色されず、野生型マウスにおいて染色が確認されたことから Fc $\alpha$ / $\mu$ R 特異的な染色が認められた(図 6)。また Fc $\alpha$ / $\mu$ R の発現は、パイエル板においては FDC のマーカーである CD21/35(補体受容体)の発現と共局在したことから (図 6)、Fc $\alpha$ / $\mu$ R がパイエル板の FDC に強発現することが確認された。

#### 4-1-3 脾臓および小腸パイエル板の B 細胞と FDC における Fc $\alpha$ / $\mu$ R 遺伝子の発現量

パイエル板の FDC に認められた Fc $\alpha$ / $\mu$ R の発現量を調べるためには Fc $\alpha$ / $\mu$ R を発現する細胞の単離が不可欠であるが、FDC は各リンパ組織にごく少数しか存在せず、また単離が非常に困難であった。そこで脾臓からの FDC の単離方法をもとに(Usui et al., 2012)、パイエル板から FDC を単離する方法の確立を試みた。FDC に特異的なマーカーである FDC-M2 の認識抗原は活性化補体成分 C4 であることが同定されている(Taylor et al., 2002)。FDC は間質系由来の細胞であることから、マウスから採取したパ

パイエル板を酵素カクテルにより細分化し、造血系細胞のマーカーである CD45 陰性分画における FDC-M2 陽性細胞をフローサイトメトリーにて解析したところ、CD45 陰性 FDC-M2 陽性細胞の検出、単離に成功した (図 7)。MFG-E8 はアポトーシス細胞の貪食に関わる分子であり、もともと FDC-M1 として、FDC-M2 とならぶ FDC の特異マーカーとして同定された分子である (Allen and Cyster, 2008; Camacho et al., 1998)。

小腸パイエル板における CD45 陰性 FDC-M2 陽性細胞が FDC であることを確認するために、単離した細胞における MFG-E8 遺伝子の発現量を定量 PCR 法により調べたところ、パイエル板中の B 細胞においては MFG-E8 遺伝子の発現はほとんど認められないのに対し、CD45 陰性 FDC-M2 陽性細胞において MFG-E8 遺伝子の発現が有意に高いことが認められた (図 8)。また CD45 陰性 FDC-M2 陽性細胞は脾臓から単離した FDC と同程度の B 細胞の生存亢進機能を示すことが明らかとなった (図 9)。これらの結果から、CD45 陰性 FDC-M2 陽性細胞が FDC であることが強く示唆された。

小腸パイエル板の FDC における Fc $\alpha$ / $\mu$ R 遺伝子の発現量を定量 PCR 法により、これまで発現の確認されている脾臓の B 細胞および FDC、小腸パイエル板の B 細胞と比較したところ、小腸パイエル板の FDC では小腸パイエル板の B 細胞に比べておよ

そ 200 倍の Fc $\alpha$ / $\mu$ R 遺伝子の発現が認められた (図 1 0)。また小腸パイエル板の FDC における Fc $\alpha$ / $\mu$ R 遺伝子の発現量は脾臓の FDC と比べて、およそ 10 倍の発現量が認められた (図 1 0)。さらに、脾臓の B 細胞に比べてパイエル板の B 細胞において、脾臓の FDC に比べてパイエル板の FDC において、それぞれ Fc $\alpha$ / $\mu$ R 遺伝子の発現量が有意に高いことが明らかとなった (図 1 0)。このことから Fc $\alpha$ / $\mu$ R 遺伝子の発現量はパイエル板の FDC および B 細胞において亢進している可能性が示唆された。

#### 4-1-4 GF マウス小腸パイエル板の FDC における Fc $\alpha$ / $\mu$ R 遺伝子の発現量

ナイーブマウスにおける脾臓およびパイエル板の環境は大きく異なり、小腸パイエル板において FDC は常に腸内細菌叢による刺激を受けていることが推察される。小腸の FDC における Fc $\alpha$ / $\mu$ R 遺伝子の高い発現における、腸内細菌叢の影響を調べるために、GF マウスのパイエル板から FDC の単離を試みた。GF マウスのパイエル板は菌体成分による暴露を受けていないため、SPF マウスに比べ未発達であることが予測されたが、GF マウスにおけるパイエル板の数や大きさは SPF マウスと比べてほとん

ど違いがなかった。しかしながら、SPF マウスに比べて GF マウスのパイエル板における CD45 陰性、FDC-M2 陽性細胞の割合は減少していた (図 1 1)。GF マウスパイエル板から単離した CD45 陰性 FDC-M2 陽性細胞が FDC であることを確認するために、単離した細胞における MFG-E8 遺伝子の発現量を定量 PCR 法により調べたところ、パイエル板の B 細胞においては MFG-E8 遺伝子の発現はほとんど認められないのに対し、CD45 陰性 FDC-M2 陽性細胞において MFG-E8 遺伝子の高い発現が認められた (図 1 2)。この結果から GF マウスの小腸パイエル板から単離した CD45 陰性 FDC-M2 陽性細胞が FDC であることが確認された。GF マウスおよび野生型マウスのパイエル板から単離した FDC における Fc $\alpha$ / $\mu$ R 遺伝子の発現量を定量 PCR 法により調べたところ、GF マウスにおいて Fc $\alpha$ / $\mu$ R 遺伝子発現量が低下していた (図 1 3)。このことから Fc $\alpha$ / $\mu$ R 遺伝子の発現は腸内の細菌やウイルスによって亢進されることが示唆された。

#### 4-1-5 Fc $\alpha$ / $\mu$ R 遺伝子の発現制御機構における TLR の関与

LPS や dsRNA など、細菌やウイルス由来の成分には様々な TLR リガンドが含まれている。細菌やウイルスに対する免疫応答は TLR が中心的な役割を担っている。腸管での FDC 上にはこれまでに TLR4 の発現が確認されており、LPS により FDC 上の TLR4 を刺激することで FcγR などの膜分子の発現が亢進することが知られている(El Shikh et al., 2007)。そこで Fcα/μR 遺伝子の発現制御が TLR を介して行われている可能性があると考えた。TLR リガンドと TLR の会合は、下流の TRIF または Myd88 を介してシグナルを伝える。そこで FDC 上の Fcα/μR 遺伝子の発現上昇機構に及ぼす TLR の関与を明らかにするために、TRIF または MyD88 遺伝子欠損マウスのパイエル板における Fcα/μR 遺伝子の発現を調べたところ、TRIF または MyD88 遺伝子欠損による Fcα/μR 遺伝子の発現量の変化は認められなかった (図 1 4)。またパイエル板 FDC 上の Fcα/μR 遺伝子の発現量は MyD88 欠損マウスおよび野生型マウス間では差が認められなかった (図 1 5)。しかしながら、TRIF 遺伝子欠損マウスパイエル板由来の FDC における Fcα/μR 遺伝子の発現量は野生型マウス由来の FDC に比べて有意に低下していた (図 1 5)。このことから MyD88 非依存的、TRIF 依存的な TLR シグナル経路により、FDC 上の Fcα/μR 遺伝子の発現が亢進されることが示唆された。TLR



ファミリーの中で TRIF 経路を使用する受容体には TLR4 以外に TLR3 が知られている。これまで FDC 上に発現の認められている TLR4 に加え (El Shikh et al., 2007; Garin et al., 2010)、今回新たに脾臓の FDC が TLR1/2/3/5/6/7/8/9 遺伝子を、パイエル板の FDC が TLR1/2/3/5/7/8/9 遺伝子を発現することを明らかにしており (図 1 6)、これらの結果から、FDC 上の Fc $\alpha$ / $\mu$ R 遺伝子の発現量は TLR3 または TLR4 刺激により亢進される可能性が考えられた。

#### 4-2 サルモネラ感染の抵抗性における Fc $\alpha$ / $\mu$ R の関与

サルモネラ菌は主に小腸のパイエル板から侵入するが、B 細胞によるサルモネラ菌の取り込みはサルモネラ感染防御機構において重要な役割を担うことが明らかにされている (Barr et al., 2010; Nanton et al., 2012)。Fc $\alpha$ / $\mu$ R は小腸パイエル板の B 細胞に高発現しており (図 1 0)、B 細胞上の Fc $\alpha$ / $\mu$ R は免疫複合体を形成した抗原の取り込みに働くことから (Shibuya et al., 2000)、B 細胞上の Fc $\alpha$ / $\mu$ R を介して IgA に被覆されたサルモネラ菌を B 細胞が取り込むことにより、サルモネラ感染に対する宿主の抵抗

性が亢進されることが示唆された。そこでサルモネラ感染防御機構における Fcα/μR の機能を明らかにするために、アンピシリン耐性サルモネラ菌 ( $4 \times 10^8$ ) を投与し、2 週間にわたり体重の変化と生存率を調べたところ、野生型および Fcα/μR 欠損マウスともに 4 日以降全てのマウスにおいて体重の減少が認められ、11 日までに全てのマウスが死亡した。しかしながら、Fcα/μR 欠損マウスにおける生存率の亢進は認められなかった (図 1 7)。またアンピシリン耐性サルモネラ菌 ( $4 \times 10^5$ ) を投与した系では、Fcα/μR 欠損および野生型マウスともに 85% が 2 週間以上生き残り、両者の生存率や体重変化に有意な差は認められなかった (図 1 7)。サルモネラ菌経口投与から 1 日および 5 日後の全身各臓器における菌体数についても比較検討したところ、投与 1 日後ではほぼすべてのマウスのパイエル板からサルモネラ菌が検出されたが、野生型および Fcα/μR 欠損マウス間で菌数に差は認められなかった (図 1 8)。投与 5 日後のパイエル板からも一部のマウスから菌体が検出されたが、野生型および Fcα/μR 欠損マウス間で菌体数に有意な差は認められなかった (図 1 8)。同様に全身に播種した菌体数を調べたところ、腸管膜リンパ節では投与 1 日後から一部のマウスでサルモネラ菌が検出されたが、野生型および Fcα/μR 欠損マウス間で菌体数に差は認められ

なかった (図 1 8)。投与 5 日後では腸管膜リンパ節、脾臓、肝臓において野生型および  $Fc\alpha/\mu R$  欠損マウスともにほぼ全てのマウスからサルモネラ菌が検出されたが、両者の間で各臓器における菌数に差は認められなかった (図 1 8)。これらの結果から、細菌感染時の腸管免疫応答における  $Fc\alpha/\mu R$  の関与を見出すことはできなかった。

## 5. 考察

本研究により  $Fc\alpha/\mu R$  遺伝子の発現量はパイエル板の FDC および B 細胞上に高い発現が認められ、FDC 上の  $Fc\alpha/\mu R$  遺伝子の発現は TLR3 または MyD88 非依存的な TLR4 シグナルにより制御されることが示唆された。TLR3 および TLR4 の生理的リガンドは、それぞれウイルス由来の dsRNA および細菌由来の LPS であり、それらは TI 抗原に分類することができる。 $Fc\alpha/\mu R$  欠損マウスは TI 抗原に対する抗体産生応答をはじめとした液性免疫応答の亢進が認められる(Honda et al., 2009)。一方で、腸内細菌への応答の結果、産生される自然抗体 IgA は T 細胞非依存的に産生されることが報告されている(Macpherson et al., 2000)。このことから  $Fc\alpha/\mu R$  は腸管におけるウイルス由来の dsRNA や細菌由来の LPS に反応する IgA 抗体産生の抑制に働くことが示唆された。

FDC 上の  $Fc\alpha/\mu R$  を介した TLR リガンドに対する IgA 抗体産生の抑制機構には、以下のモデルが考えられる。IgA は腸管管腔側で中和抗体として機能するだけでなく、小腸パイエル板の M 細胞に選択的に結合し、トランスサイトシスにより腸管管腔側から腸管関連リンパ組織へ移行することが知られており(Mantis et al., 2002; Rey et al.,

2004)、生体がもともと有している IgA 抗体は LPS などの菌体由来の抗原を認識しているため (Wijburg et al., 2006)、それらの抗原は IgA と免疫複合体を形成した状態でパイエル板内に存在していることが考えられる。B 細胞上の Fc $\alpha$ / $\mu$ R は免疫複合体の取り込みに働くことが明らかにされており (Shibuya et al., 2000)、FDC 上の Fc $\alpha$ / $\mu$ R においても、免疫複合体の取り込みに関与していることが示唆される。一方、FDC 上の TLR4 と LPS の会合は FDC の活性化を促し、胚中心形成や抗体の親和性成熟において中心的な役割を担うことが明らかにされている (Garin et al., 2010)。すなわち、Fc $\alpha$ / $\mu$ R を介した LPS-IgA 免疫複合体の取り込みにより LPS が排除されることは、FDC 上の LPS と TLR4 の会合の機会を減らすことで FDC の活性化を抑制することにつながり、ひいては LPS に対する IgA 抗体産生の抑制に働くことが考えられる。

本実験からサルモネラ感染の抵抗性に対する Fc $\alpha$ / $\mu$ R の関与を見出すことはできなかった。B 細胞上 Fc $\alpha$ / $\mu$ R は免疫複合体の取り込みに働くが (Shibuya et al., 2000)、B 細胞によるサルモネラ菌の取り込みがサルモネラ感染防御に働くことから (Mastroeni et al., 2000; Nanton et al., 2012; Ugrinovic et al., 2003)、B 細胞上の Fc $\alpha$ / $\mu$ R がサルモネラ菌 IgA 免疫複合体の取り込みを促進することで宿主のサルモネラ感染防御能を亢進させるこ

とが考えられる。その一方で、FDC 上の病原体の保持は病原体の感染拡大に働くことから(McCulloch et al., 2011)、Fc $\alpha$ / $\mu$ R によるサルモネラ菌の保持はサルモネラ菌の感染拡大を助長している可能性が考えられる。そのため B 細胞または FDC 選択的 Fc $\alpha$ / $\mu$ R 欠損マウスを作製し、サルモネラ菌を感染させることで、サルモネラ感染における Fc $\alpha$ / $\mu$ R の機能を明らかにできると考えられる。

Fc $\alpha$ / $\mu$ R の同定から 10 年を越えたが、未だにその生理的、病理的重要性について明らかにできていない。Fc $\alpha$ / $\mu$ R が特にパイエル板 FDC に高発現し、その発現が TRIF 経路によって制御されている事実は、この機能解析にとって大きな進展である。更なる解析により Fc $\alpha$ / $\mu$ R の腸管免疫における重要性を明らかにする事が今後の重要な課題である。

## 6. 結語

- $Fc\alpha/\mu R$  は小腸パイエル板に存在する FDC および B 細胞において高い発現がみとめられた。
- FDC 上の  $Fc\alpha/\mu R$  遺伝子の発現量は腸内の細菌やウイルス由来の刺激により亢進または維持されており、その制御機構に TRIF 経路の関与が明らかとなった。
- サルモネラ感染後のマウスの生存率や体重減少率、パイエル板で捕捉されたサルモネラ菌の数や全身臓器へ播種したサルモネラ菌の数には、野生型マウスおよび  $Fc\alpha/\mu R$  遺伝子欠損マウス間で差は認められなかった。

## 7. 略語表

BCR: B cells receptor

CD: cluster of differentiation

dsRNA: double strand RNA

FACS: fluorescence-activated cell sorter

FcR: Fc receptor

Fc $\alpha$ R: Fc alpha receptor

Fc $\alpha$ / $\mu$ R: Fc alpha/mu receptor

Fc $\epsilon$ R: Fc epsilon receptor

Fc $\gamma$ R: Fc gamma receptor

FDC: follicular dendritic cell



Ig: Immunoglobulin

pIgR: polymeric Ig receptor

S.typhimurium: Salmonella typhimurium

## 8. 謝辞

本研究の遂行ならびに本論文の執筆に際し、多大なるご指導を賜りました筑波大学大学院人間総合科学研究科免疫学研究室の澁谷彰教授、本多伸一郎准教授に謹んで感謝申し上げます。また日頃の実験に際し、積極的な御助言を賜りました澁谷和子准教授、田原聡子助教、小田ちぐさ助教、金倫基助教をはじめ、免疫学研究室の皆さまに謹んで感謝申し上げます。

## 9. 参考文献

Akira S., Uematsu S. and Takeuchi O., 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.

Allen C. D. and Cyster J. G., 2008. Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: phenotype and function. *Seminars in immunology* 20, 14-25.

Barr T. A., Brown S., Mastroeni P. and Gray D., 2010. TLR and B cell receptor signals to B cells differentially program primary and memory Th1 responses to *Salmonella enterica*. *J Immunol* 185, 2783-9.

Boes M., Esau C., Fischer M. B., Schmidt T., Carroll M. and Chen J., 1998a. Enhanced B-1 cell development, but impaired IgG antibody responses in mice deficient in secreted IgM. *J Immunol* 160, 4776-87.

Boes M., Prodeus A. P., Schmidt T., Carroll M. C. and Chen J., 1998b. A critical role of natural immunoglobulin M in immediate defense against systemic bacterial infection. *The Journal of experimental medicine* 188, 2381-6.

Camacho S. A., Kosco-Vilbois M. H. and Berek C., 1998. The dynamic structure of the germinal center. *Immunology today* 19, 511-4.

- Carroll M. C., 1998. The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annual review of immunology* 16, 545-68.
- Cerutti A. and Rescigno M., 2008. The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity* 28, 740-50.
- Cho Y., Honda S., Yoshizawa Y., Takagaki K., Usui K. and Shibuya A., 2010. Requirement of the cytoplasmic portion for dimer formation of Fc $\alpha$ /micro receptor expressed on cell surface. *Molecular immunology* 47, 878-82.
- Daeron M., 1997. Fc receptor biology. *Annual review of immunology* 15, 203-34.
- Ehrenstein M. R., O'Keefe T. L., Davies S. L. and Neuberger M. S., 1998. Targeted gene disruption reveals a role for natural secretory IgM in the maturation of the primary immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 10089-93.
- El Shikh M. E., El Sayed R. M., Wu Y., Szakal A. K. and Tew J. G., 2007. TLR4 on follicular dendritic cells: an activation pathway that promotes accessory activity. *J Immunol* 179, 4444-50.
- Garin A., Meyer-Hermann M., Contie M., Figge M. T., Buatois V., Gunzer M., Toellner K. M., Elson G. and Kosco-Vilbois M. H., 2010. Toll-like receptor 4 signaling by follicular dendritic cells is pivotal for germinal center onset and affinity maturation. *Immunity* 33,

84-95.

Grewal I. S. and Flavell R. A., 1998. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annual review of immunology* 16, 111-35.

Hoffmann J. A., Kafatos F. C., Janeway C. A. and Ezekowitz R. A., 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313-8.

Honda S., Kurita N., Miyamoto A., Cho Y., Usui K., Takeshita K., Takahashi S., Yasui T., Kikutani H., Kinoshita T., Fujita T., Tahara-Hanaoka S., Shibuya K. and Shibuya A., 2009. Enhanced humoral immune responses against T-independent antigens in Fc alpha/muR-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 11230-5.

Janeway C. A., Jr. and Medzhitov R., 2002. Innate immune recognition. *Annual review of immunology* 20, 197-216.

Kaetzel C. S., 2005. The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces. *Immunological reviews* 206, 83-99.

Kerr M. A., 1990. The structure and function of human IgA. *The Biochemical journal* 271, 285-96.

Kubagawa H., Oka S., Kubagawa Y., Torii I., Takayama E., Kang D. W., Gartland G. L., Bertoli L. F., Mori H., Takatsu H., Kitamura T., Ohno H. and Wang J. Y., 2009. Identity of the elusive IgM Fc receptor (FcmuR) in humans. *The Journal of experimental medicine* 206,

2779-93.

Macpherson A. J., Gatto D., Sainsbury E., Harriman G. R., Hengartner H. and Zinkernagel R.

M., 2000. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* 288, 2222-6.

Maliszewski C. R., March C. J., Schoenborn M. A., Gimpel S. and Shen L., 1990. Expression

cloning of a human Fc receptor for IgA. *The Journal of experimental medicine* 172, 1665-72.

Mantis N. J., Cheung M. C., Chintalacharuvu K. R., Rey J., Corthesy B. and Neutra M. R., 2002.

Selective adherence of IgA to murine Peyer's patch M cells: evidence for a novel IgA receptor. *J Immunol* 169, 1844-51.

Mastroeni P., Simmons C., Fowler R., Hormaeche C. E. and Dougan G., 2000. Igh-6(-/-)

(B-cell-deficient) mice fail to mount solid acquired resistance to oral challenge with virulent *Salmonella enterica* serovar typhimurium and show impaired Th1 T-cell responses to *Salmonella* antigens. *Infection and immunity* 68, 46-53.

McCulloch L., Brown K. L., Bradford B. M., Hopkins J., Bailey M., Rajewsky K., Manson J. C.

and Mabbott N. A., 2011. Follicular dendritic cell-specific prion protein (PrP) expression alone is sufficient to sustain prion infection in the spleen. *PLoS pathogens* 7, e1002402.

- Monteiro R. C., 2010. Role of IgA and IgA fc receptors in inflammation. *Journal of clinical immunology* 30, 1-9.
- Monteiro R. C. and Van De Winkel J. G., 2003. IgA Fc receptors. *Annual review of immunology* 21, 177-204.
- Nanton M. R., Way S. S., Shlomchik M. J. and McSorley S. J., 2012. Cutting edge: B cells are essential for protective immunity against *Salmonella* independent of antibody secretion. *J Immunol* 189, 5503-7.
- Ochsenbein A. F., Fehr T., Lutz C., Suter M., Brombacher F., Hengartner H. and Zinkernagel R. M., 1999. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* 286, 2156-9.
- Ouchida R., Mori H., Hase K., Takatsu H., Kurosaki T., Tokuhisa T., Ohno H. and Wang J. Y., 2012. Critical role of the IgM Fc receptor in IgM homeostasis, B-cell survival, and humoral immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, E2699-706.
- Parren P. W. and Burton D. R., 2001. The antiviral activity of antibodies in vitro and in vivo. *Advances in immunology* 77, 195-262.
- Pontet F. and Rousselet F., 1984. Monoclonal 7S IgM: a rapid screening technique. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 141, 85-91.

Radaev S. and Sun P., 2002. Recognition of immunoglobulins by Fc $\gamma$  receptors.

Molecular immunology 38, 1073-83.

Ravetch J. V., 1997. Fc receptors. Current opinion in immunology 9, 121-5.

Ravetch J. V. and Bolland S., 2001. IgG Fc receptors. Annual review of immunology 19,

275-90.

Ravetch J. V. and Clynes R. A., 1998. Divergent roles for Fc receptors and complement in vivo.

Annual review of immunology 16, 421-32.

Rey J., Garin N., Spertini F. and Corthesy B., 2004. Targeting of secretory IgA to Peyer's patch

dendritic and T cells after transport by intestinal M cells. J Immunol 172, 3026-33.

Roberts-Thomson P. J., Jones D. N., Koh L. Y., Neoh S. H., Thomas M. and Bradley J., 1984.

Low molecular weight IgM in B cell lymphoproliferative disorders. Australian and New

Zealand journal of medicine 14, 121-5.

Romagnani S., 1997. The Th1/Th2 paradigm. Immunology today 18, 263-6.

Sakamoto N., Shibuya K., Shimizu Y., Yotsumoto K., Miyabayashi T., Sakano S., Tsuji T.,

Nakayama E., Nakauchi H. and Shibuya A., 2001. A novel Fc receptor for IgA and IgM

is expressed on both hematopoietic and non-hematopoietic tissues. Eur J Immunol 31,

1310-6.

Shibuya A., Sakamoto N., Shimizu Y., Shibuya K., Osawa M., Hiroyama T., Eyre H. J.,



- Sutherland G. R., Endo Y., Fujita T., Miyabayashi T., Sakano S., Tsuji T., Nakayama E., Phillips J. H., Lanier L. L. and Nakauchi H., 2000. Fc alpha/mu receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes. *Nat Immunol* 1, 441-6.
- Shima H., Takatsu H., Fukuda S., Ohmae M., Hase K., Kubagawa H., Wang J. Y. and Ohno H., 2010. Identification of TOSO/FAIM3 as an Fc receptor for IgM. *International immunology* 22, 149-56.
- Shimizu Y., Honda S., Yotsumoto K., Tahara-Hanaoka S., Eyre H. J., Sutherland G. R., Endo Y., Shibuya K., Koyama A., Nakauchi H. and Shibuya A., 2001. Fc(alpha)/mu receptor is a single gene-family member closely related to polymeric immunoglobulin receptor encoded on Chromosome 1. *Immunogenetics* 53, 709-11.
- Takagaki K., Satoh K., Honda S. and Shibuya A., 2013. Molecular characterization of the dimer formation of Fc alpha/mu receptor (CD351). *Molecular immunology* 56, 23-7.
- Takai T., 2002. Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nature reviews. Immunology* 2, 580-92.
- Takai T., 2005. Fc receptors and their role in immune regulation and autoimmunity. *Journal of clinical immunology* 25, 1-18.
- Taylor P. R., Pickering M. C., Kosco-Vilbois M. H., Walport M. J., Botto M., Gordon S. and Martinez-Pomares L., 2002. The follicular dendritic cell restricted epitope, FDC-M2, is complement C4; localization of immune complexes in mouse tissues. *European journal*

of immunology 32, 1888-96.

Ugrinovic S., Menager N., Goh N. and Mastroeni P., 2003. Characterization and development of T-Cell immune responses in B-cell-deficient (Igh-6(-/-)) mice with Salmonella enterica serovar Typhimurium infection. Infection and immunity 71, 6808-19.

Usui K., Honda S., Yoshizawa Y., Nakahashi-Oda C., Tahara-Hanaoka S., Shibuya K. and Shibuya A., 2012. Isolation and characterization of naive follicular dendritic cells. Molecular immunology 50, 172-6.

Wijburg O. L., Uren T. K., Simpfendorfer K., Johansen F. E., Brandtzaeg P. and Strugnell R. A., 2006. Innate secretory antibodies protect against natural Salmonella typhimurium infection. The Journal of experimental medicine 203, 21-6.

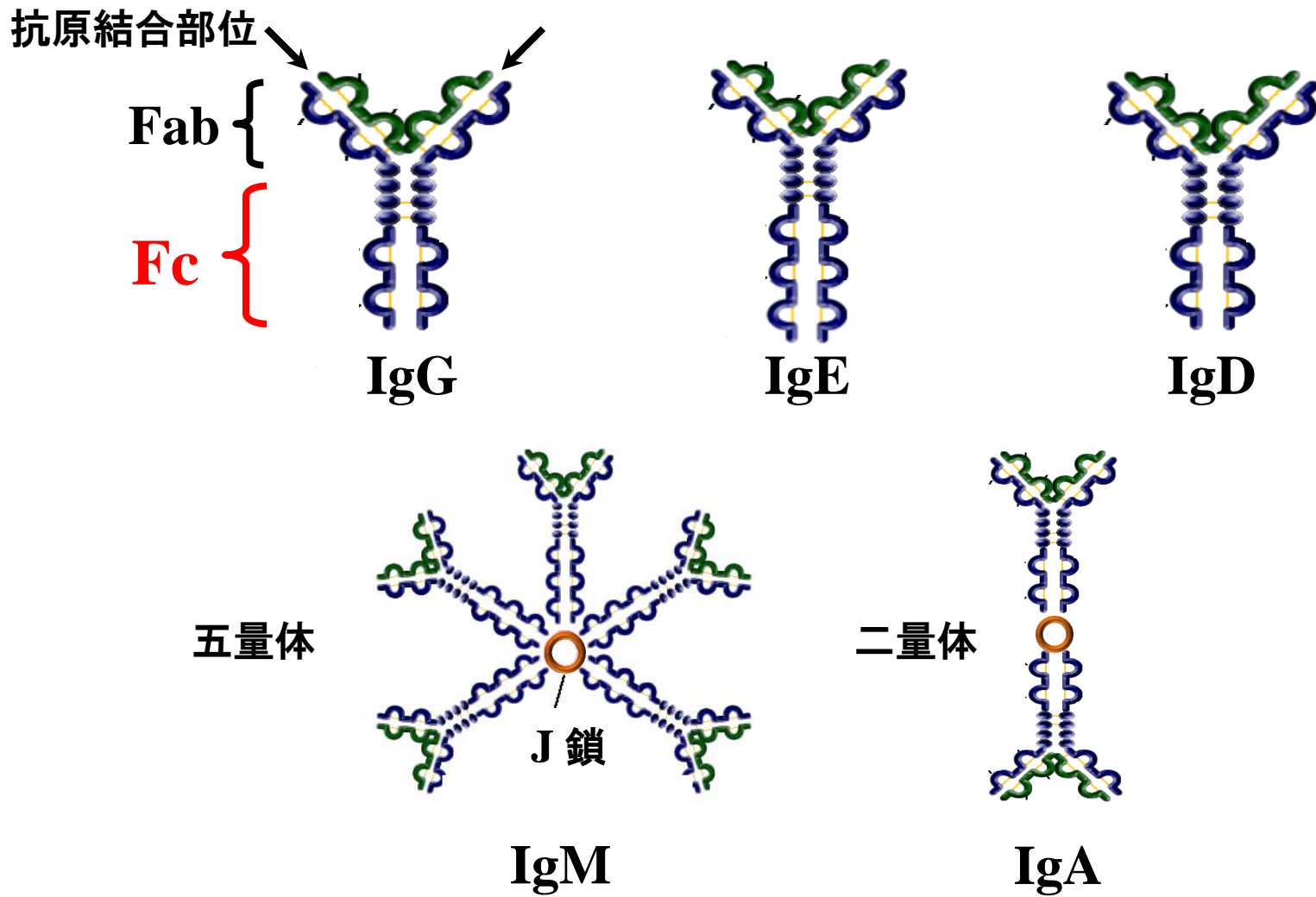


図1. 抗体の種類と構造

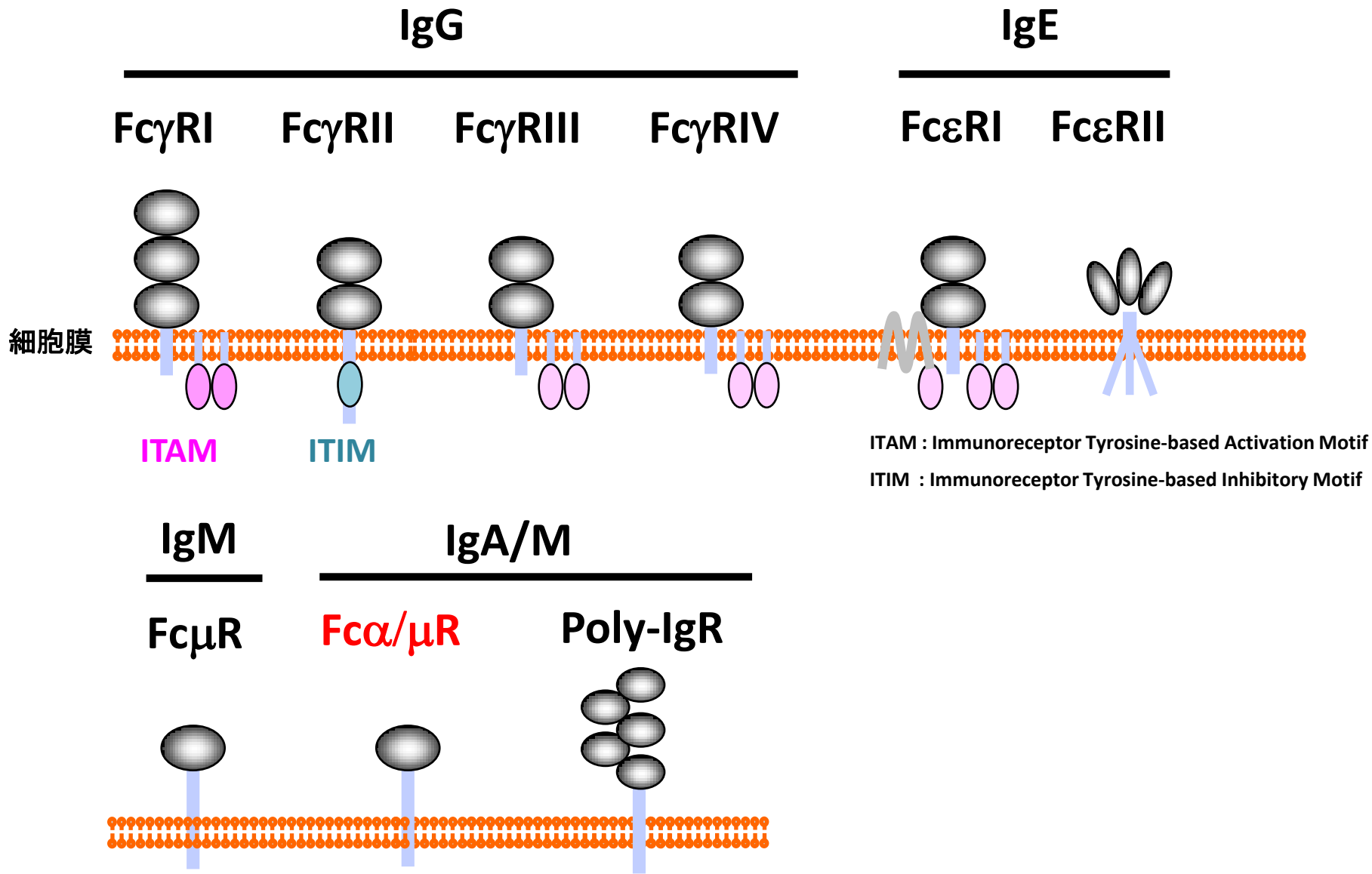
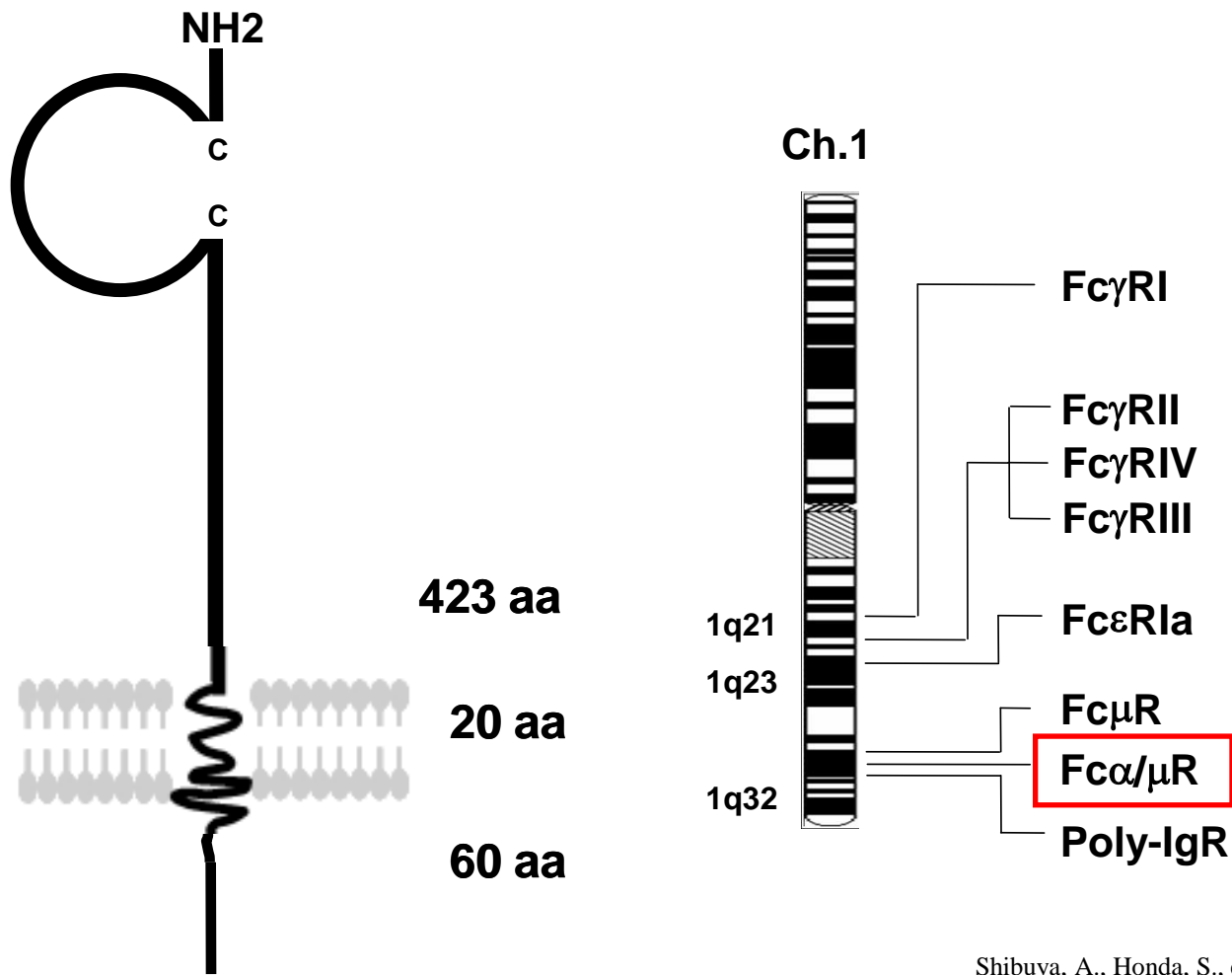
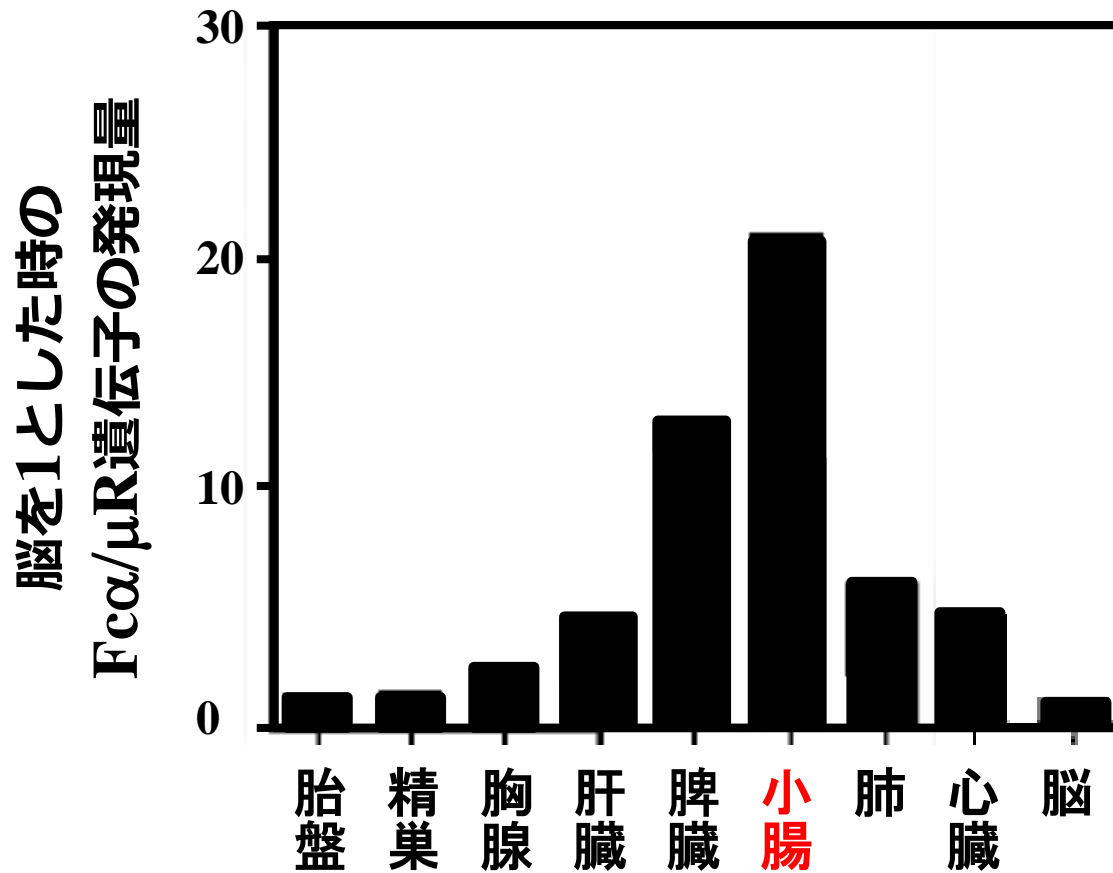


図2. マウスにおいて同定されているFc受容体



Shibuya, A., Honda, S., et al. 2006

図3. Fcα/μ受容体 (Fcα/μR) の構造と遺伝子座  
 細胞外に一つの免疫グロブリン様ドメインを有する免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜たんぱく質。右図はヒトの1番染色体を示す。



Sakamoto et al., Eur. J. Immunol. (2001)

図4. 各臓器におけるFcα/μRの発現量

各臓器におけるFcα/μR遺伝子発現量を定量PCR法により調べた。Fcα/μR遺伝子の発現量は脳での発現量を1としたときの相対値で表した。

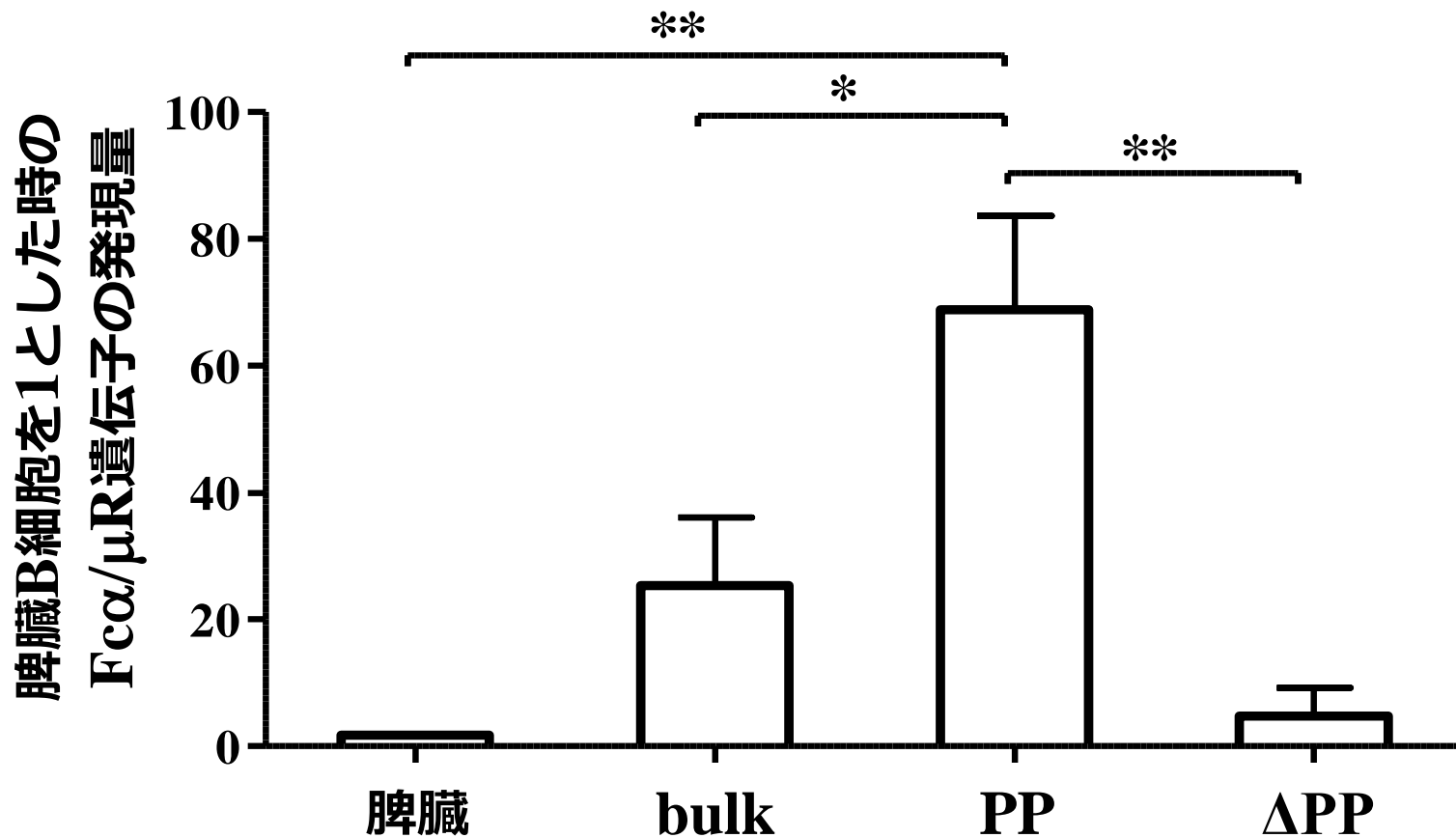
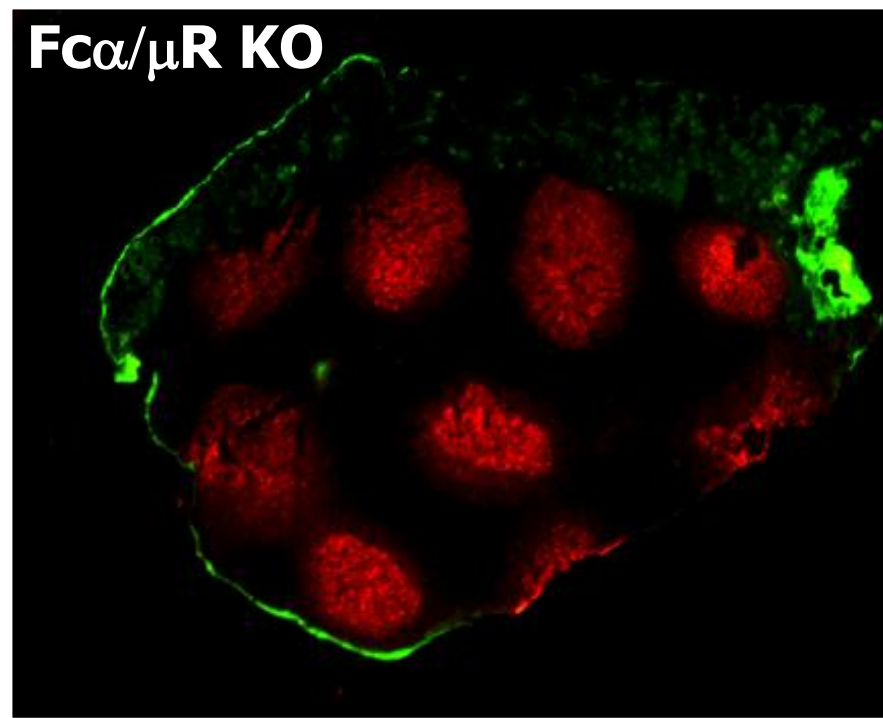
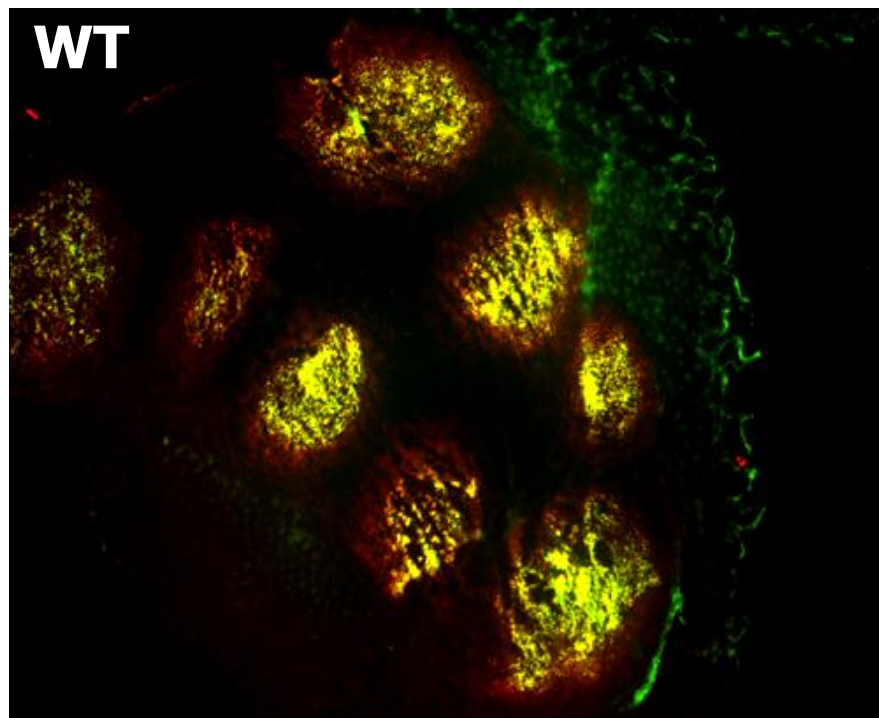


図5. 小腸においてFcα/μRを高発現する部位の特定  
 小腸全長 (bulk)、パイエル板 (PP) および小腸全長からパイエル板を除いた部位 (ΔPP) における Fcα/μR遺伝子の発現を定量PCR法により調べた。Fcα/μR遺伝子の発現量は脾臓B細胞での発現量を1としたときの相対値で表した。(n=3) \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001.



**Fcα/μR**  
**CD21/35**

図6. 小腸パイエル板におけるFcα/μR発現細胞の特定  
免疫蛍光染色法により、小腸パイエル板の組織切片を抗Fcα/μR抗体および抗CD21/35抗体を用いて染色し蛍光顕微鏡にて観察した。Fcα/μRの染色を緑で、CD21/35の染色を赤で示した。



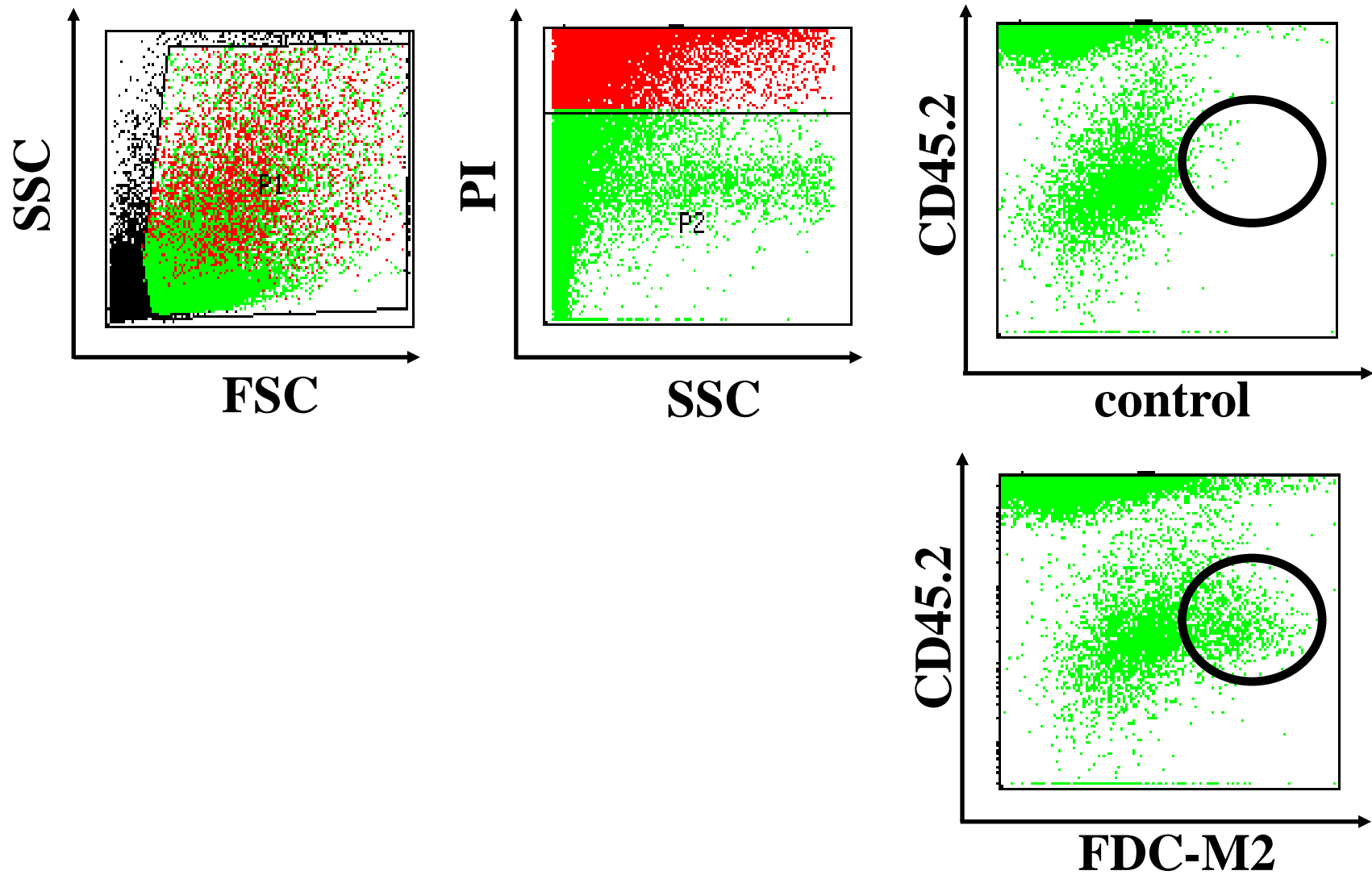


図7. 小腸パイエル板からの**FDC**の単離

酵素カクテルにより細分化されたパイエル板の細胞を抗**CD45.2**抗体および**FDC-M2**抗体により染色し、フローサイトメトリーにより解析した。

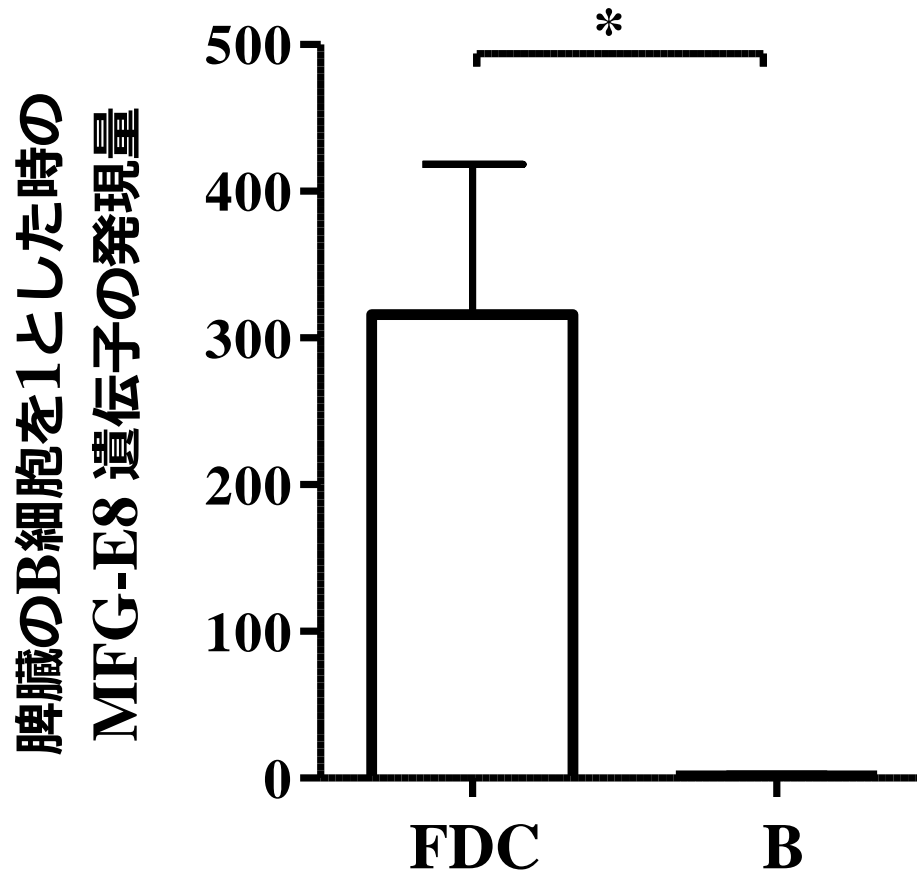


図8. パイエル板から単離した細胞におけるFDCマーカーの発現  
 小腸パイエル板から単離したCD45.2陰性FDC-M2陽性細胞におけるMFG-E8遺伝子の発現量を定量PCR法により調べた。MFG-E8遺伝子の発現量は脾臓のB細胞での発現を1としたときの相対値で表した。(n=3) \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001.

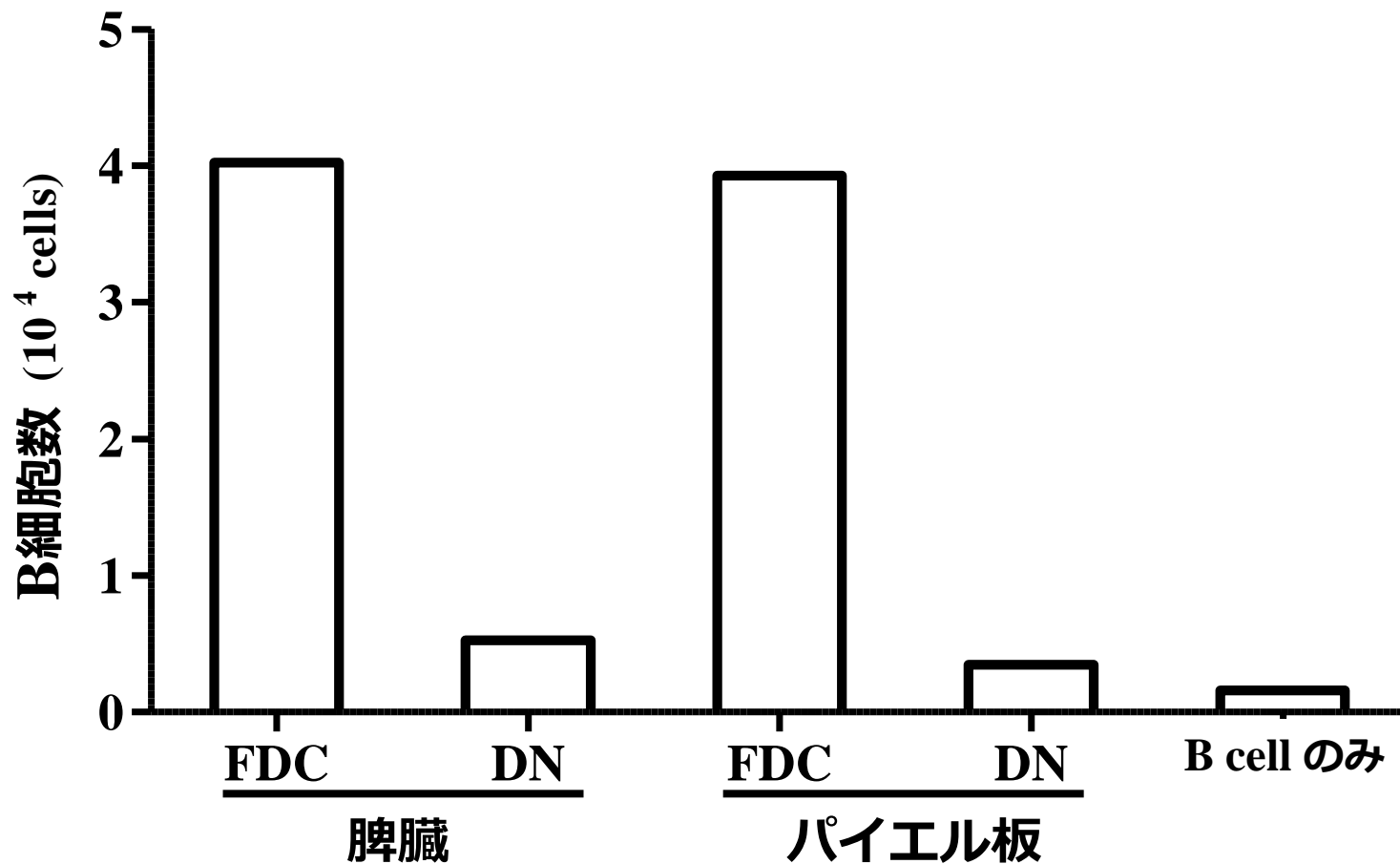


図9. パイエル板から単離したFDCによるB細胞の生存亢進作用の確認  
 脾臓およびパイエル板から単離した細胞とB細胞を共培養してから3日後のB220陽性B細胞の生存数をフローサイトメーターを用いて計数した。脾臓から単離したCD45陰性ICAM陽性細胞分画を脾臓のFDC、CD45陰性ICAM陰性細胞分画を脾臓のDNと表記した。パイエル板から単離したCD45陰性FDC-M2陽性細胞分画をパイエル板のFDC、CD45陰性FDC-M2陰性細胞分画をパイエル板のDNと表記した。

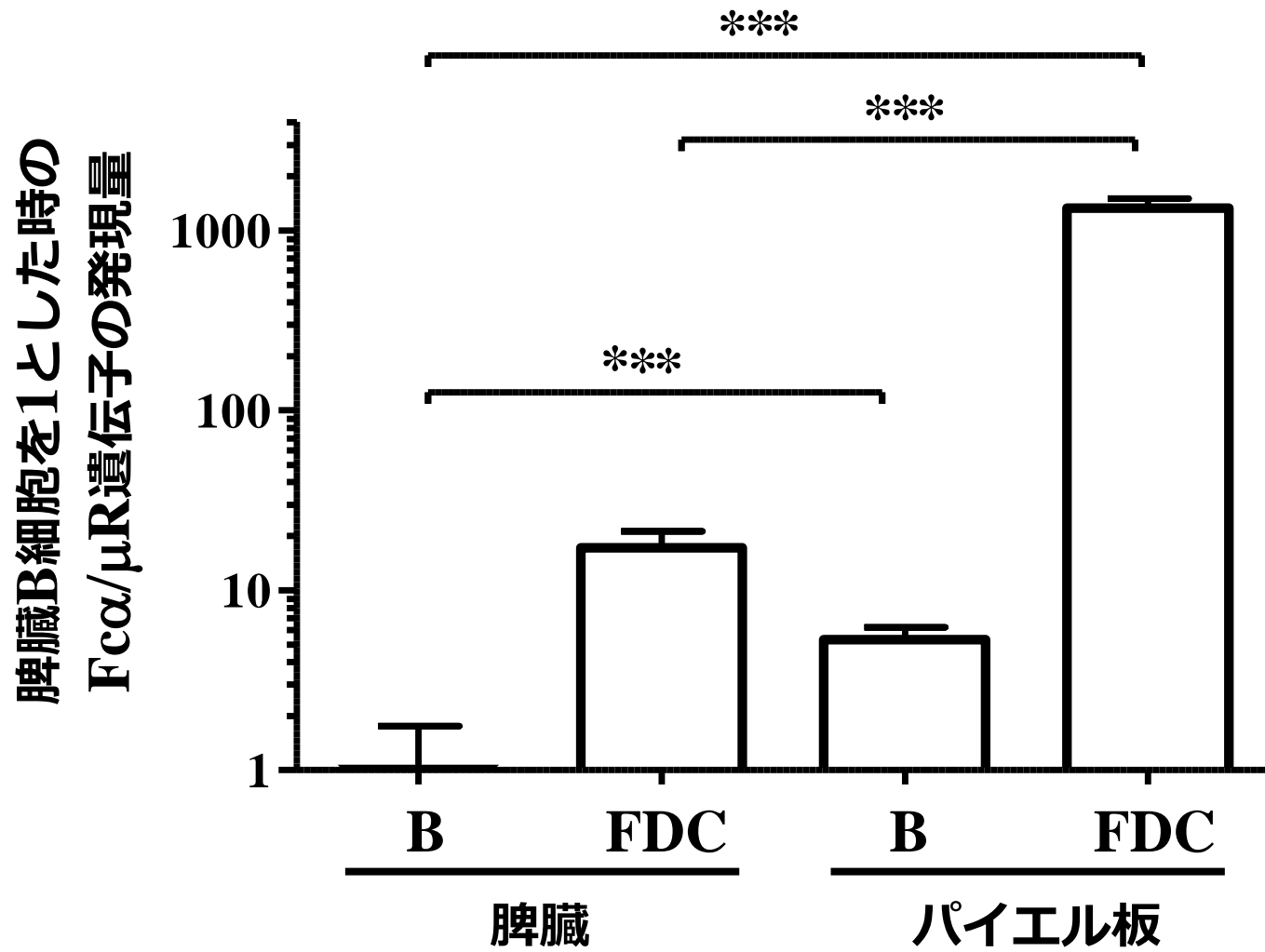


図10. 脾臓およびパイエル板のB細胞とFDCにおけるFcα/μRの発現量  
 フローサイトメーターにより脾臓およびパイエル板から単離したB細胞とFDCにおけるFcα/μR遺伝子の発現量を定量PCR法により調べた。Fcα/μR遺伝子の発現量は脾臓B細胞での発現量を1としたときの相対値で表した。縦軸に対数軸を使用した。(n=3) \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001.

# PI 陰性分画

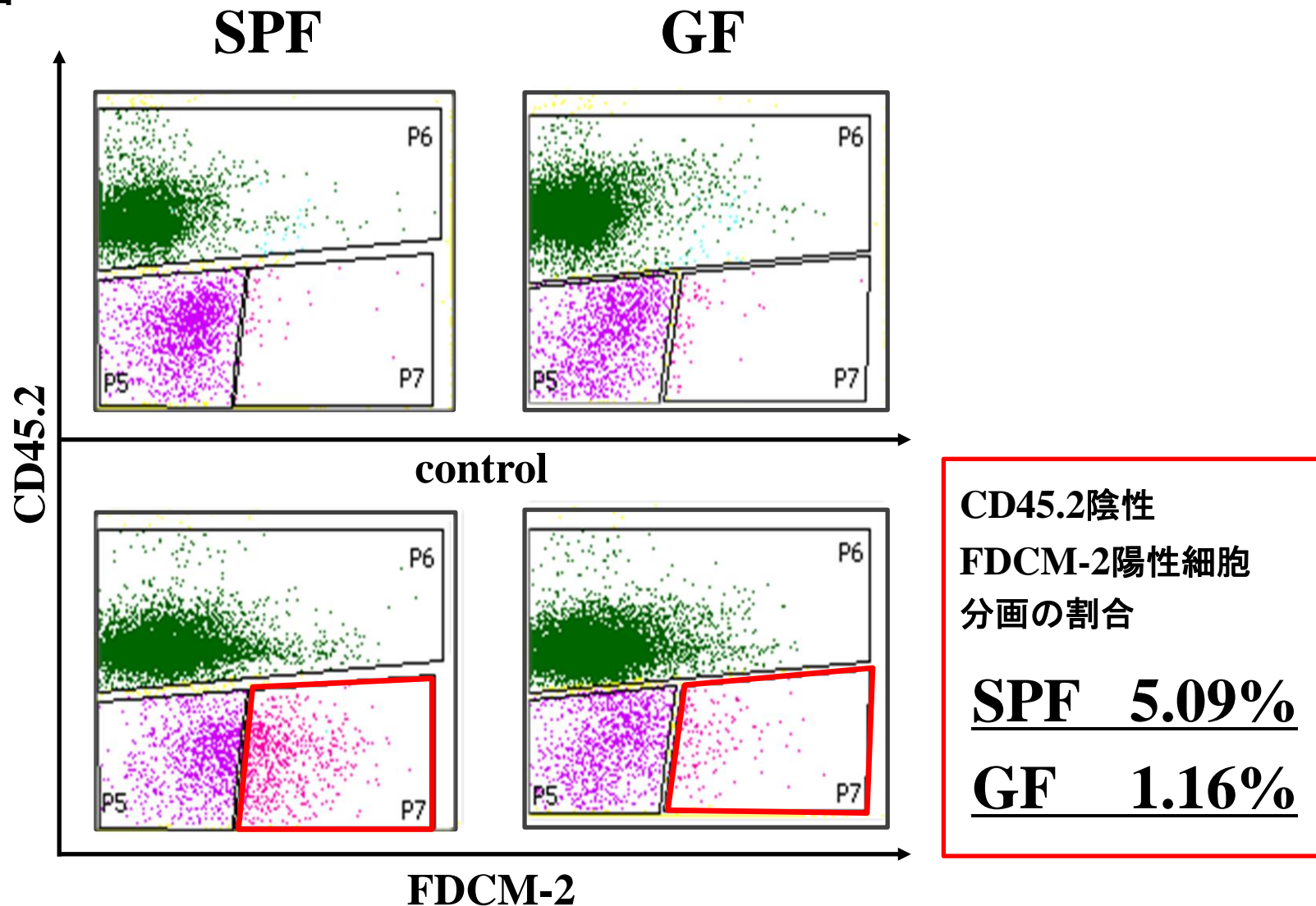


図 1 1. 無菌マウスのパイエル板におけるFDCの割合  
特定病原体除去 (SPF) および無菌 (GF) マウスのパイエル板を酵素カクテルにより細分化した。  
細分化した細胞を抗CD45.2抗体およびFDC-M2抗体により染色し、フローサイトメトリーにより解析した。

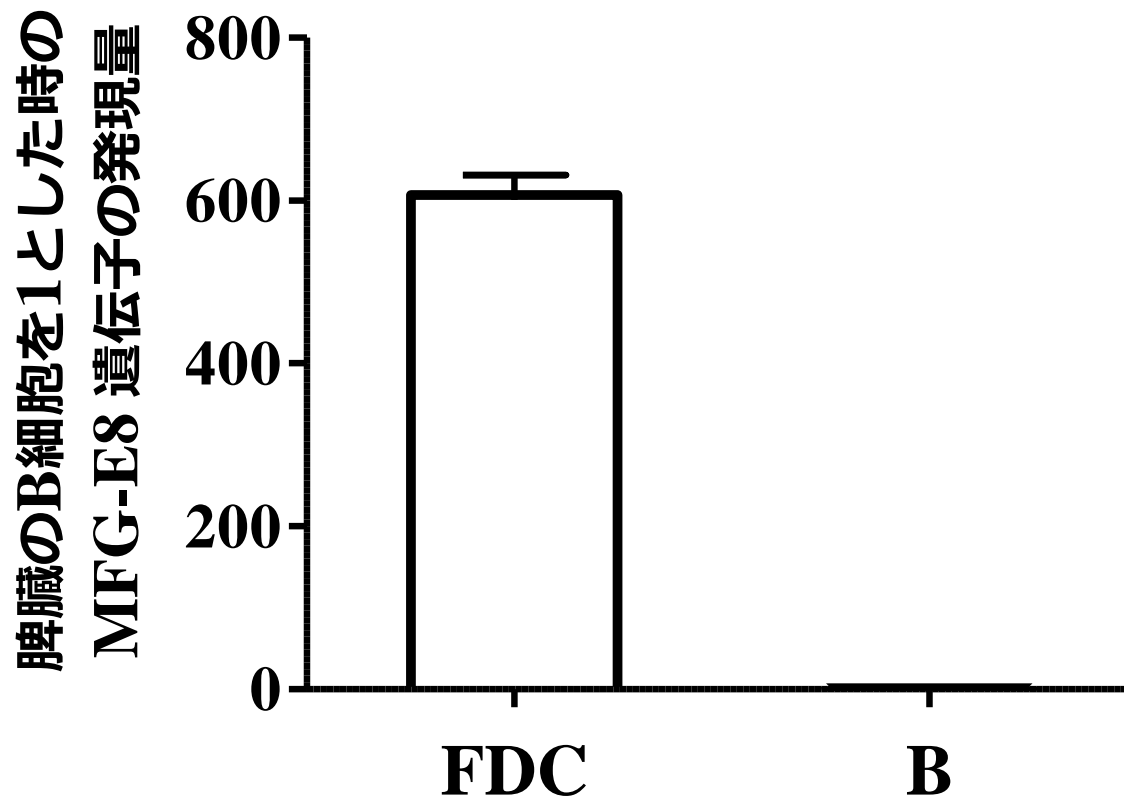


図1 2. GFマウスのパイエル板から単離した細胞におけるFDCマーカーの発現  
無菌マウスの小腸パイエル板から単離したCD45.2陰性FDC-M2陽性細胞におけるMFG-E8遺伝子の発現量を定量PCR法により調べた。MFG-E8遺伝子の発現量は脾臓のB細胞での発現を1としたときの相対値で表した。(n=1)

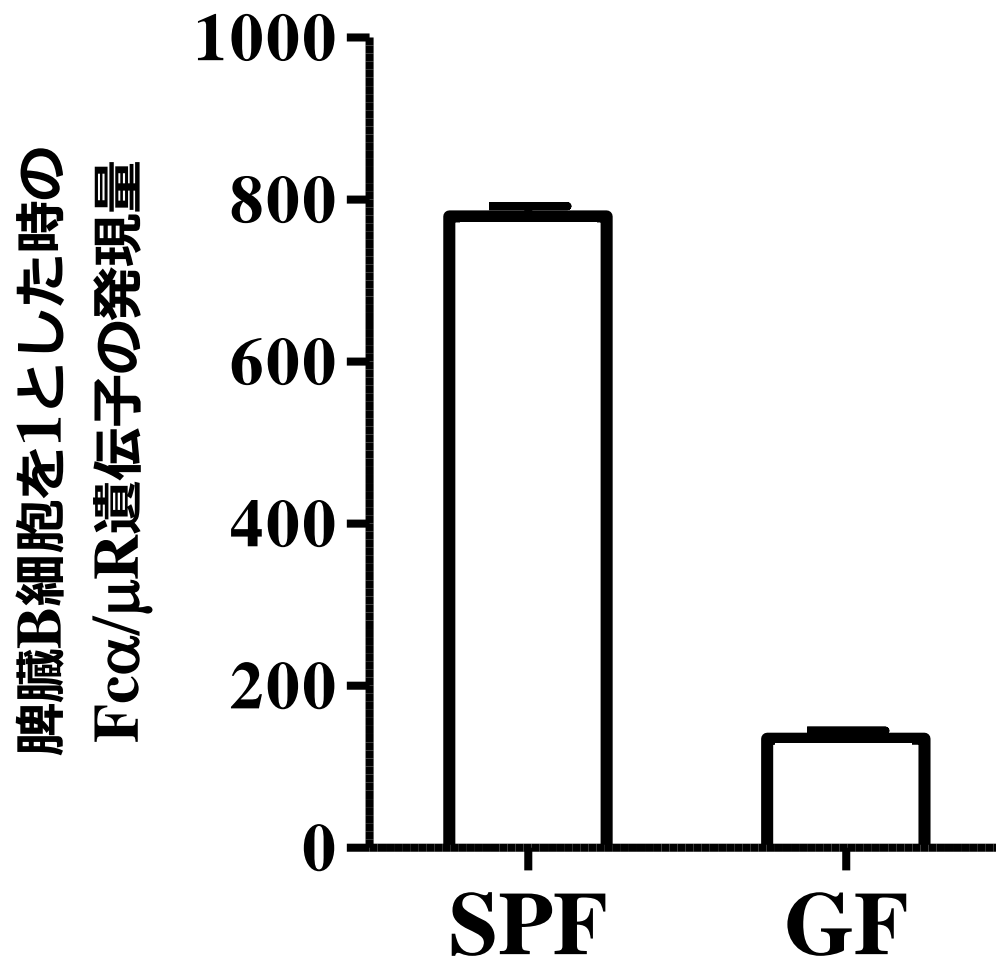


図1 3. GFマウスパイエル板のFDCにおけるFca/mRの発現  
フローサイトメーターによりパイエル板から単離したFDCにおけるFca/μR遺伝子の発現量を定量PCR法により調べた。Fca/μR遺伝子の発現量は脾臓B細胞での発現量を1としたときの相対値で表した。(n=1)

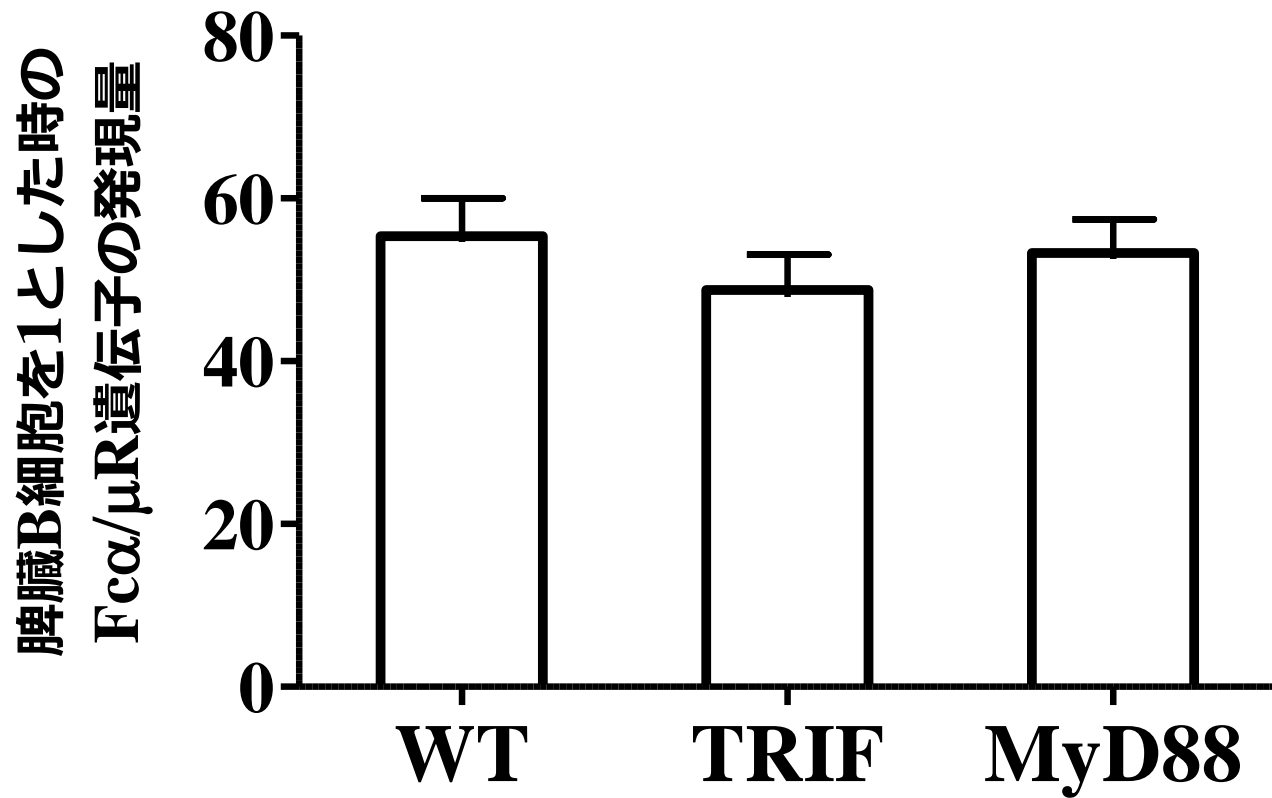


図1 4. **TRIF** または**MyD88** 遺伝子欠損マウスパイエル板における**Fcα/μR**の発現量  
**TRIF** または**MyD88** 遺伝子欠損マウスパイエル板における**Fcα/μR**遺伝子の発現量を定量PCR法により調べた。**Fcα/μR**遺伝子の発現量は脾臓**B**細胞での発現量を1としたときの相対値で表した。(n=3) \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001.



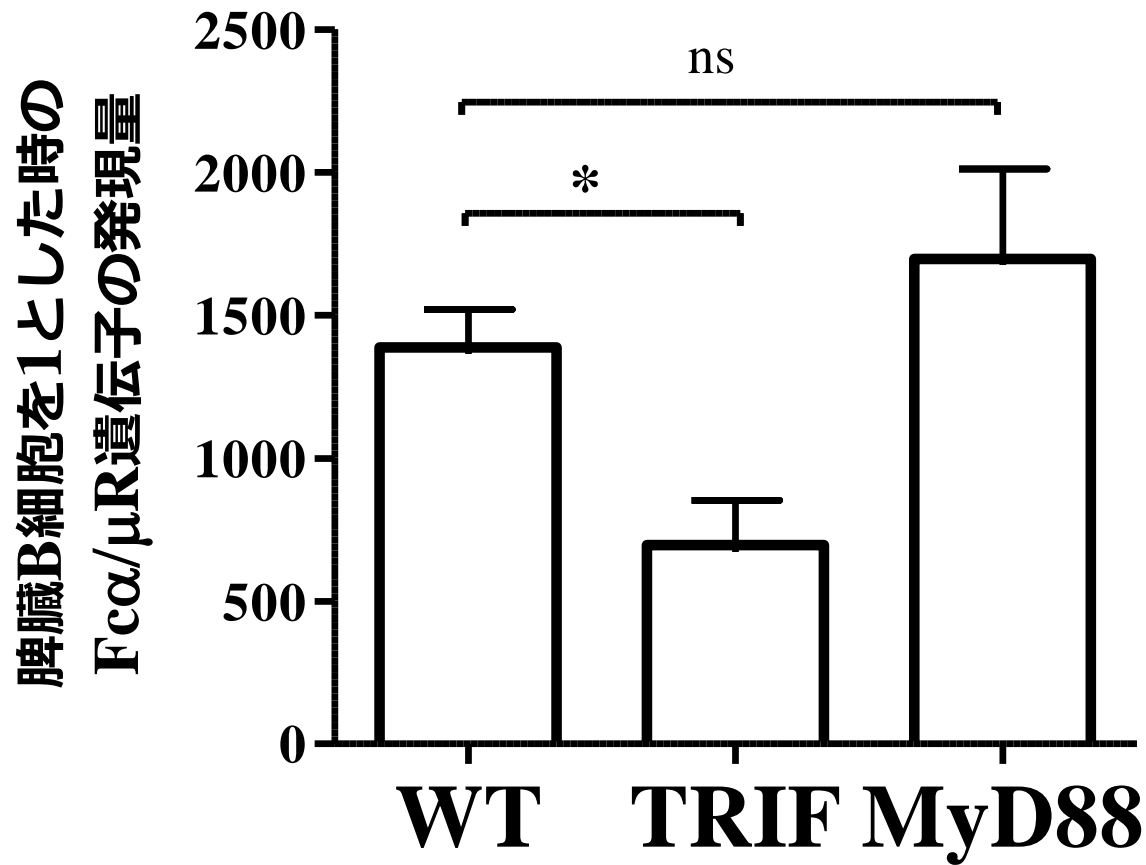


図15. TRIF またはMyD88 遺伝子欠損マウス脾臓のFDCにおけるFcα/μRの発現量  
TRIF またはMyD88 遺伝子欠損マウス脾臓から単離したFDCにおけるFcα/μR遺伝子の  
発現量を定量PCR法により調べた。Fcα/μRの発現量は脾臓B細胞での発現量を1としたときの  
相対値で表した。(n=3) \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001.

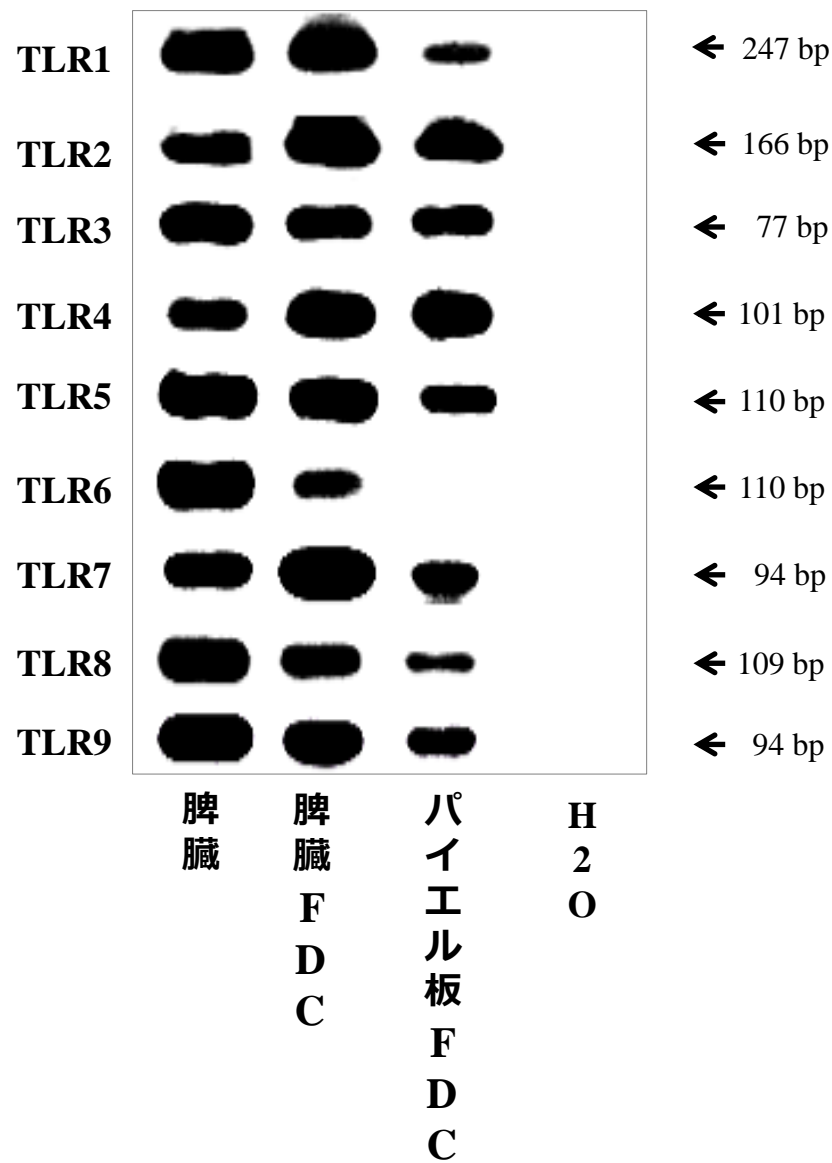
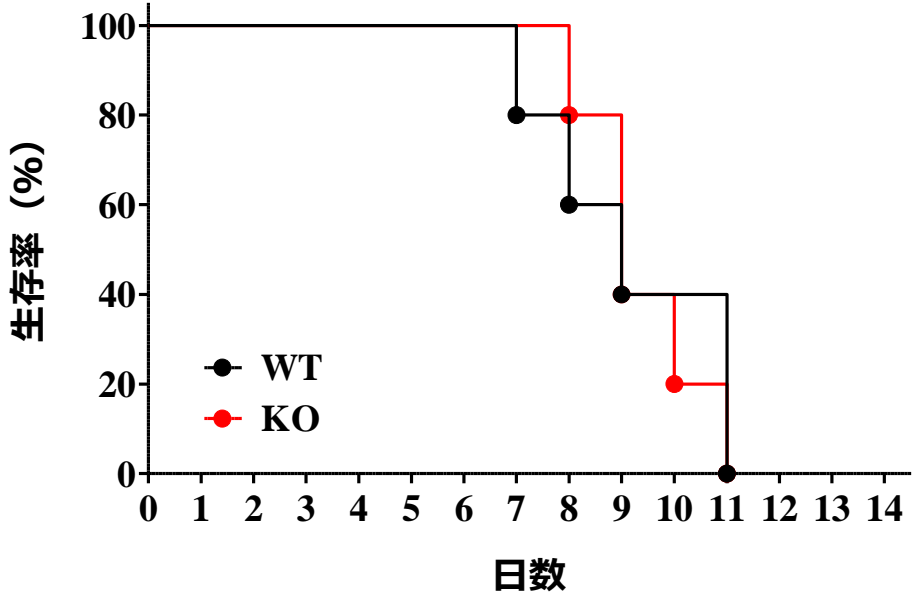


図16. 脾臓およびパイエル板のFDCにおけるTLRの発現  
 フローサイトメーターにより脾臓およびパイエル板から単離したFDCにおける各種TLR遺伝子の発現をPCR法により調べた。

**4x10<sup>8</sup> cells/mouse 経口投与の系**



**4x10<sup>5</sup> cells/mouse 経口投与の系**

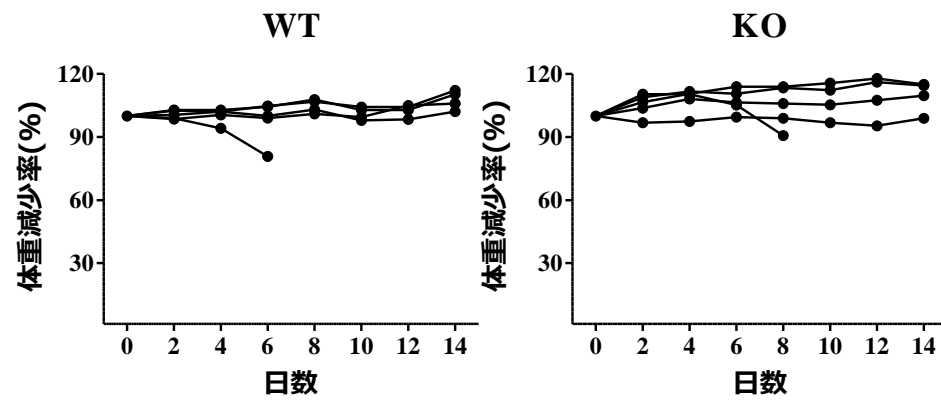
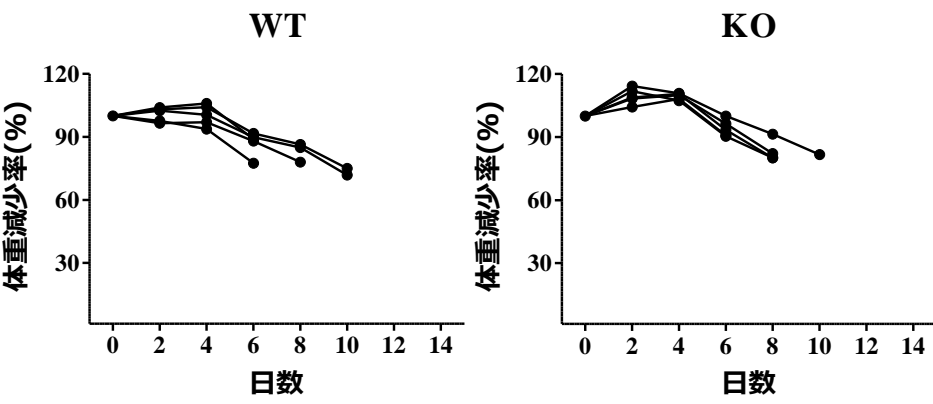
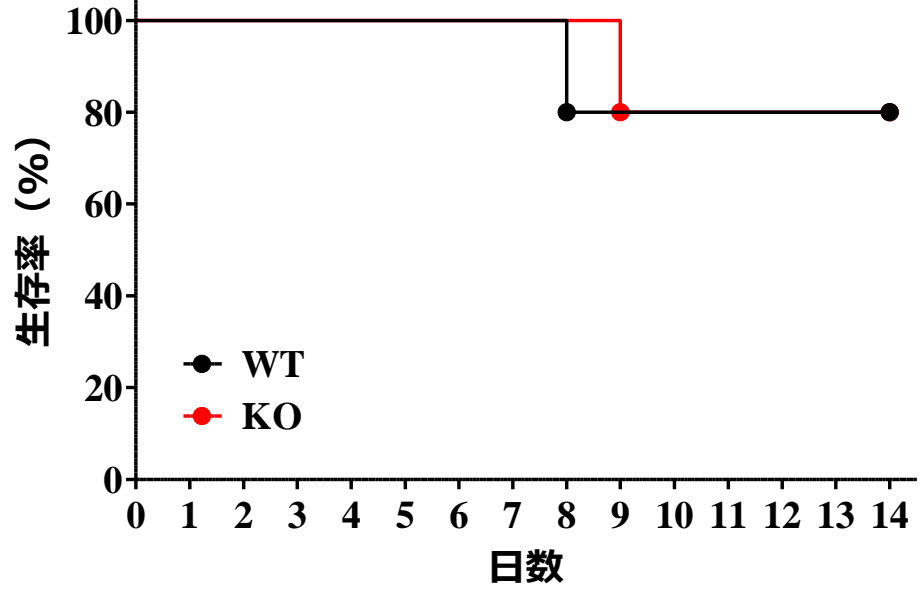


図 1 7. サルモネラ感染防御機構におけるFcα/μRの関与 - 1  
 Fcα/μR欠損および野生型マウスに、4x10<sup>8</sup>または4x10<sup>5</sup>個のサルモネラ菌を200 ml/mouseで経口投与し、2週間にわたり生存率と体重減少率を調べた。(WT n=5、KO n=5) \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001.

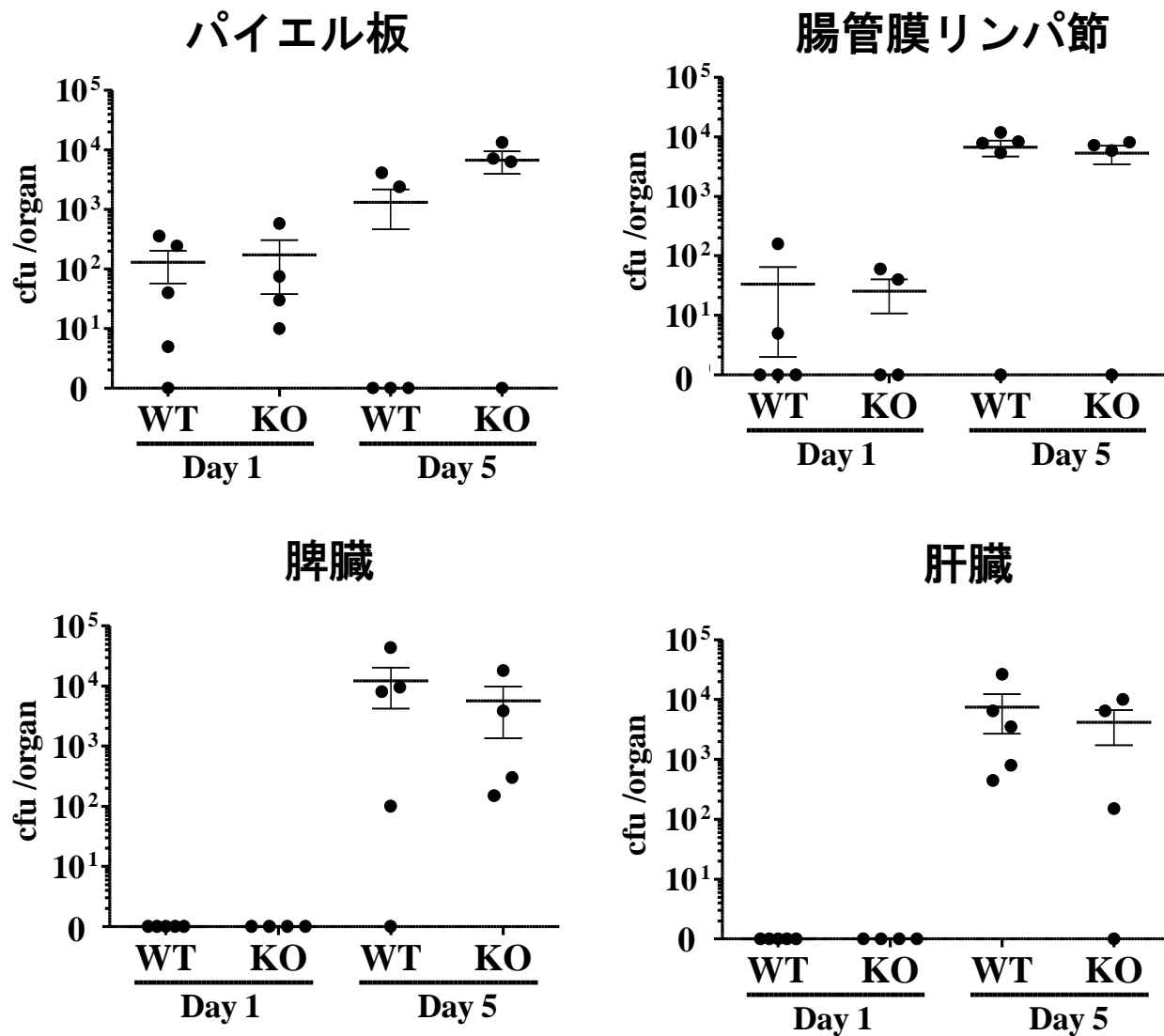


図 1 8. サルモネラ感染防御機構におけるFca/ $\mu$ Rの関与 - 2

Fca/ $\mu$ R欠損および野生型マウスに、 $4 \times 10^5$ 個のサルモネラ菌を200 ml/mouseで経口投与し、1日および5日後に各種臓器を回収した。回収した臓器をホモジェナイズし、LBampプレートに播種してから24時間後の菌数を数えた。(WT n=5、KO n=4) \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001.