

学位論文

MyD88 欠損マウスにおける自然 IgE 抗体産生メカニズムの解明

2023 年 3 月

天野 峻輔

目次

表紙	1
目次	2
Abbreviations	3
要旨	5
研究背景及び研究目的	6
実験方法	9
結果	16
考察	21
文献	25
図表	36
謝辞	57

Abbreviations

ABX	Antibiotics
AFD	Antigen-free diet
APC	Allophycocyanin
ASC	Antibody secreting cell
BCR	B cell receptor
BHI	Brain heart infusion
BM	Bone marrow
BSA	Bovine serum albumin
BV	Brilliant violet
CCR7	C-C Chemokine receptor 7
CD	Cluster of differentiation
CFA	Complete Freund's adjuvant
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
cDC	conventional DC
CSF1R	Colony stimulating factor 1 receptor
DC	Dendritic cell
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FcεRI	Fc epsilon receptor I
FCM	Flow cytometry
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Foxp3	Forkhead boxprotein P3
GATA3	GATA-binding factor 3
HDM	House dust mite
HRP	Horseradish peroxidase
IAV	Influenza A virus
IgV _H	Immunoglobulin variable heavy chain
IgV _L	Immunoglobulin variable light chain
IL	Interleukin
IL-1RAcP	IL-1 receptor accessory protein
int.	intracellular
IRF4	Interferon regulatory factor 4
i.p.	intraperitoneally

i.t.	intratracheally
i.v.	intravenously
KLH	Keyhole limpet hemocyanin
LLPC	Long-lived PC
LN	Lymph node
LPS	Lipopolysaccharide
LTA	Lipoteichoic acid
MBC	Memory B cell
medLN	mediastinal LN
MOG	Myelin oligodendrocyte glycoprotein
mRNA	messenger ribonucleic acid
MyD88	Myeloid differentiation factor 88
NALT	Nasopharynx-associated lymphoid tissue
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
PBS	Phosphate-buffered saline
PC	Plasma cell
PE	Phycoerythrin
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
SLPC	Short-lived PC
SHM	Somatic hypermutation
Sox4	Sex-determining region Y-box 4
SPF	Specific pathogen free
STAT	Signal transducer and activator of transcription
T-bet	T-box transcription factor
TCR	T cell receptor
Tfh	Follicular helper T cell
Th	T helper
TLR	Toll-like receptor
Treg	Regulatory T cell
TRIF	TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin
16S rDNA	16S ribosomal RNA DNA

要旨

IgE 抗体は、アレルギー反応の一般的な発症因子として知られており、2 型免疫反応が起こる過程で産生される。肥満細胞や好塩基球上の FcεRI に結合した IgE が特定のアレルゲンによって架橋されると、これらの細胞は様々なケミカルメディエーターやサイトカインを産生し、アレルギー応答を惹起する。また、アレルゲン結合を伴わない反応として、単純な IgE の FcεRI への結合は、上記の免疫細胞や非免疫細胞の生存や増殖を促進することが知られている。このことから、血清中に自然に産生される IgE、すなわち自然 IgE は、アレルギー性疾患に対する感受性を高めると考えられている。Toll 様受容体 (TLR) の下流シグナル伝達分子である MyD88 を欠損したマウスでは、血清中の自然 IgE が高値であるが、その機構は不明であった。本研究ではまず、MyD88 欠損マウスでは自然 IgE 量が離乳前後にピークを迎え、その後も高値で維持されること、また、その産生維持はメモリーB 細胞 (MBC) に依存することを明らかにした。また、MyD88 欠損マウスの自然 IgE 抗体は、肺に過剰に存在する常在菌 *Streptococcus azizii* (*S. azizii*) を認識したが、MyD88 へテロ欠損マウスにはそのような IgE を持つ個体はいなかった。加えて、MyD88 欠損マウスに抗生物質を投与すると血清 IgE 値は低下し、その後 *S. azizii* を再感染させると上昇した。すなわち、MyD88 欠損マウスでは肺の常在菌、特に *S. azizii* に対する過剰な IgE 応答が起こっていると考えられた。さらに、MyD88 欠損マウスの脾臓には IgG1⁺MBC が増加しており、この IgG1 も同様に *S. azizii* を認識したことから、*S. azizii* 特異的 IgG1⁺MBC が過剰な IgE 産生に寄与していることが示唆された。MyD88 欠損マウスの肺では Th2 細胞が選択的に増加していたことから、*S. azizii* による IgE 応答は Th2 によって惹起されていると思われ、実際、MyD88 欠損マウスの肺由来細胞を *S. azizii* で刺激・培養すると IL-4 および IL-13 産生が誘導され、この産生応答は CD4⁺ 細胞や CD11c⁺ 細胞を除去すると減少したことから、肺の Th2 細胞は *S. azizii* 抗原に対する反応特異性を有することが示唆された。最後に、中和抗体投与実験により、MyD88 欠損マウスの自然 IgE 産生には、肺の非造血系細胞から過剰発現した CSF1 が関与していることが示された。以上より、TLR-MyD88 シグナルが減弱した環境では、肺において構成変化した常在細菌による異常な Th2 応答と IgE 抗体産生が引き起こされることが示唆された。

研究背景及び研究目的

【研究背景】

1. IgE 性アレルギー応答

IgE 抗体は、マウスやヒトの血液中に流れる 5 種類の抗体アイソタイプの中で最も量が少なく、半減期も 1~2 日と最も短い (1)。IgE 抗体は大まかに 2 つの機能を有している。1 つは、侵入してきた寄生虫の排除や、毒素の中和を担う機能である。もう 1 つは、アナフィラキシーショックや、喘息、アトピー性皮膚炎、食物アレルギー、鼻炎など、様々なアレルギー疾患の発症原因としての機能である。これらの疾患の発症機構として以下のことが広く知られている。家ダニ (HDM) や花粉などのアレルゲンに対する IgE 抗体が産生されたのち、この IgE 抗体が肥満細胞や好塩基球表面上の Fcε 受容体 I (FcεRI) に結合する。アレルゲンは IgE 抗体への結合を介して FcεRI を架橋し、種々のケミカルメディエーターの放出や種々のサイトカインの産生を促すことでアレルギー症状を誘発する (図 1 上段)。また、IgE 抗体は FcεRI に結合するだけで、FcεRI の下流シグナルを活性化し、好塩基球や肥満細胞の生存や成熟 (2-6)、気道平滑筋細胞の増殖を促進する (7, 8) など、アレルゲン非依存的にアレルギーの発症に関与していることが知られている (図 1 下段)。実際に、HDM 誘発型喘息モデルや、経口アナフィラキシーモデル、接触性過敏症モデルなど、いくつかのアレルギー疾患マウスモデルにおいて、アレルゲン非特異的な IgE 抗体の上昇がその後のアレルギー反応を悪化させることが報告されている (4, 9, 10)。また、ヒトにおいても、過剰な血清 IgE 価を有する人は、より大きなアレルギー反応を示すことが報告されている (11-15)。このように、アレルゲン特異的な IgE 抗体産生だけでなく、過剰な IgE 抗体産生自体もアレルギー疾患のリスクファクターであると考えられている。

2. IgE メモリー細胞による恒常的高 IgE 抗体産生応答

恒常的かつ過剰な IgE 抗体産生には、IgG1⁺ MBC と IgE⁺ 長期生存形質細胞 (LLPC) という 2 種類のメモリー細胞が関与していると考えられている (16-19)。これらの細胞は、一般に外部抗原に対する T 細胞依存性の体液性免疫応答において、次のように生じる (図 2)。抗原に感作された B 細胞は、ヘルパー T (Th) 細胞によって活性化され、その一部は、主に Th2 や Tfh 細胞によって産生される IL-4 (20, 21) に応答して、IgG1 あるいは IgE へのクラススイッチを開始する (22, 23)。そして、この活性化 B 細胞は、胚中心 B 細胞や短期生存形質細胞 (SLPC) へと分化する。胚中心 B 細胞は、体細胞超変異 (SHM) や親和性成熟を経て、さらに長期生存形質細胞 (LLPC) や記憶 B 細胞 (MBC) に分化する (24)。IgE⁺ B 細胞の場合、多くは SLPC に優先的に分化し、数日で死滅する (1, 25, 26)。そのため、血清中の IgE 抗体は、他のアイソタイプに比べ非常に低いレベルに保たれている。しかし、最近の研究では、慢性的なアレルゲン曝露が骨髄において IgE⁺ LLPC の形成を促すことが報告され、実際にアレルギー患者の骨髄には IgE⁺ LLPC の増加が確認された (16)。さらに、アレルギーモデルマウスや患者において、IgG1⁺ MBC が二次抗原曝露により IgE 型にスイッチし、IgE⁺ SLPC に分化することが報告されている (17, 18)。このように、アレルギー患者においては、IgE 産生を担う免

疫記憶 (IgE メモリー) の形成とその制御異常が起こり、恒常的な高 IgE 産生に寄与していると考えられている。

3. IgE 抗体産生制御に寄与する因子

IgE 抗体産生の制御機構については、これまでにいくつかのメカニズムが報告されている。1) 自発的 IgE-BCR シグナルは BLNK を介して IgE⁺ SLPC のアポトーシスを誘導することが知られている (1, 25, 26)。したがって、BLNK 欠損マウスでは NP-CGG/alum 免疫により IgE⁺ PC が蓄積し、持続的かつ過剰な IgE 抗体産生が起こる (1)。2) Tfh 細胞由来の IL-21 は抗原に感作された B 細胞に作用し、その STAT3 シグナルを介して IgE クラススイッチングを阻害することが報告されており、STAT3 欠損で生じる過剰 IgE 抗体産生の原因と考えられている (27)。3) 幼少期における正常な腸内常在菌叢の確立は、食物タンパク質特異的な IgE 抗体の産生を抑制することが報告された (4, 10)。これは腸関連リンパ組織における Th2 偏向型 Tfh 細胞の形成や IgE⁺ LLPC の形成を防ぐことに拠る (19)。このように、過去の報告から IgE 抗体産生の制御には、B 細胞自身が持つ機構と B 細胞以外の細胞が寄与する機構があり、複雑に制御されていると考えられる。

さらに、Toll-like receptor (TLR) や IL-1 ファミリーサイトカイン受容体の重要なシグナル伝達分子である Myeloid differentiation factor 88 (MyD88) を欠損したマウスでは、未免疫状態で高濃度の血清 IgE、いわゆる自然 IgE 抗体の産生が認められ (28-30)、MyD88 分子が自然 IgE 産生の負の制御因子であると考えられるが詳細なメカニズムは明らかにされていない。

4. MyD88 分子欠損による免疫応答への影響

マウスにおいて、MyD88 分子の欠損は、少なくとも胸腺・脾臓・リンパ節における B 細胞、T 細胞の分化・維持には影響しないことがわかっており (31)、若干の脳構造変化 (32) 以外は発生に関しても影響がないことが報告されているが (31)、細胞機能に多くの影響を及ぼす。これは MyD88 分子が TLR3 以外の TLR ファミリーや、IL-1、IL-18、IL-33 など多くのサイトカインが属する IL-1 ファミリーサイトカインの下流シグナル分子として働くためである。例えば、TLRs は細菌やウイルスの共通構成成分を認識して様々な生体防御応答を惹起するが、TLR4 の代表的なリガンドである LPS で刺激されたマクロファージは IL-6、TNF- α 、IL-1 β を産生し、炎症反応を誘導する。MyD88 欠損ではこの反応が消失し (33)、またマクロファージの貪食能も減弱することが報告されている (34)。その他、LPS 刺激による B 細胞増殖や (33)、LPS で刺激された骨髄由来 DC による T 細胞増殖能も MyD88 欠損条件下では減弱することがわかっている (35)。IL-1 ファミリーに関しては、MyD88 が IL-1 β 刺激による T 細胞増殖作用や血中 IL-6、TNF- α の産生に必要なこと、IL-18 刺激による NK 細胞の細胞溶解活性が MyD88 欠損条件下では低下すること (31)、T 細胞内の MyD88 が IL-1 β と IL-23 刺激による T 細胞からの IL-17 を産生するために重要であること (36) などが報告されている。免疫細胞以外にも、腸管上皮細胞の MyD88 分子は抗菌ペプチドとして知られる RegIII γ の発現に必須であること (37)、HDM の経鼻投与による炎症反応には、非造血細胞が発現する TLR4 (38) や IL-1R

(39) が重要であることが報告されている。

上記に加え、MyD88 分子は腸内細菌による自然抗体産生誘導にも重要である。まず、MyD88/TRIF 二重欠損マウスを用いた報告 (29) によれば、野生型 C57BL/6 マウスと比べ、血中の IgM 抗体価は変化がないが、IgG2 抗体と IgG3 抗体価が低下し、IgG1 抗体価が高くなることがわかっている。別の報告では、SPF 環境下の野生型 C57BL/6 マウスで、腸内細菌に特異的な自然 IgG、特に IgG2b と IgG3 抗体が産生されることが報告されている (40–42)。この腸内細菌に特異的な自然 IgG 抗体産生応答は、それぞれ MyD88 と TRIF の単独欠損では減少しないが、両分子を欠損することで激減する (40)。最近では腸内細菌だけでなく呼吸器に常在する細菌にも注目されているが (43)、自然抗体産生応答に対する呼吸器常在細菌の寄与は依然として不明である。

このように MyD88 分子は多くの細胞種で機能し、免疫応答の誘導と生体防御に関与している。実際、MyD88 欠損マウスは全身で細菌の排除機能が低下しており、感染性の強い細菌による侵襲が起りやすくなってしまふことが知られている (37, 44–47)。

5. MyD88 分子による IgE 抗体産生制御機構に関する先行研究

MyD88 欠損における IgE 産生誘導のメカニズムについては、これまでにいくつかの報告がなされている。まず、CFA をアジュバントとする KLH (KLH + CFA) 免疫は C57BL/6 マウスに対して TLR4 依存的に Th1 応答を誘導するが、MyD88 欠損マウスでは Th2 応答が優先的に誘導されることが報告された (35)。KLH + CFA 免疫による Th1 応答には、樹状細胞 (DC) の TLR4-MyD88 経路の活性化による IL-12 産生が重要である (35)。IL-12 は Th1 分化の必須分子である T-bet の発現を誘導し、T-bet は、Th2 分化を誘導する GATA3 の発現を抑制する (48)。GATA3 はナイーブ T 細胞にも既に発現していることが知られており (49)、それによって、Th2 分化はデフォルトで誘導されると考えられており、IL-12 のような Th1 誘導物質で刺激された場合に T-bet による GATA3 の抑制を介して Th1 分化に切り替わるという仮説が提唱された (28) (図 3)。しかし、一般に Th1 応答を誘導する、細胞内寄生細菌の可溶性成分を免疫したところ、MyD88 欠損マウスにおいては Th2 応答が惹起された一方で、IL-12 欠損マウスでは Th2 応答が誘導されなかったことから (50)、上記の Th2 デフォルト分化仮説ではなく、能動的に Th2 反応を誘導する機構が存在すると考えられる。これに関して、別の研究では、MyD88 欠損マウスの骨髄由来 DC が LPS 刺激により、TLR4 の下流分子である TRIF の活性化を介して IL-4 を産生することが *in vitro* で示された (35)。一方、*in vivo* では MyD88/TRIF 二重欠損マウスでも依然として過剰な血中 IgE 抗体産生が確認されていることから、TLR4 を介して IL-4 産生が誘導されることは考え難い (29, 30)。このように、MyD88 欠損マウスにおける IgE 産生のメカニズムは未だ分かっていない。

【研究目的】

本研究は、MyD88 分子の欠損により起こる、過剰な自然 IgE 抗体産生メカニズムを解明することを目的とする。これにより、アレルギー治療薬の開発に寄与する基盤知識を構築する。

実験方法

3-1 マウス

C57BL/6NcrSlc (B6) マウスは日本 SLC から購入した。MyD88 欠損マウス (31) は審良静男博士 (大阪大学) から、2D2-TCR トランスジェニックマウス (51) は V. K. Kuchroo 博士 (Harvard Medical School) より提供していただいた。IL-1RAcP 欠損マウスは Jackson Laboratory から購入し (*Il1rap^{tm1Roml}/J*; Stock No. 003284)、10 回バッククロスすることにより C57BL/6 バックグラウンドに近づけた。すべてのマウスは、東京理科大学のマウス施設において、SPF 環境下で維持された。マウスの処置は、TUS 動物愛護使用委員会により承認されたプロトコルの下で行われた。形質細胞または B 細胞を除去するためには、マウスにそれぞれ、20 μ g のボルテゾミブを週 3 回で 3 週間、または 200 μ g の抗マウス CD20 抗体 (AISB12) (BioXCell #BE0302) を 1 週間に 2 回腹腔内注射 (i.p.) した。ヘルパー T 細胞を除去するためには、2 週齢の MyD88 欠損マウスに 50 μ g の抗マウス CD4 抗体 (GK1.5) (BioXCell #BE0003-1) を、またコントロールとして同一アイソタイプの抗体 (LTF-2) (BioXCell #BE0090) を i.p. した。常在菌を除去するためには、2 週齢または 8 週齢のマウスに抗生物質 (ABX) カクテル (1 g/L アンピシリン、0.5 g/L バンコマイシン、1 g/L ネオマイシン、1 g/L メロニダゾール) を含む飲料水を 6 週間飲ませた。細菌感染については、ABX 処理した MyD88 欠損マウスを 1 週間休ませた後、 10^8 cells の *Streptococcus* (*S.*) *azizii* または *S. danieliae* を気管内投与 (i.t.) した。CSF1 を *in vivo* で中和するためには、1 週齢の MyD88 欠損マウスに 50 μ g の抗マウス CSF1 抗体 (5A1) (BioXCell #BE0204) または同一アイソタイプのコントロール抗体 (HRPN) (BioXCell #BE0088) を 4 週齢まで 1 週当たり 2 回 i.p. した。

3-2 細胞の単離と ELISpot アッセイ

脾臓と各リンパ節は切除後、すりガラスを用いてすり潰し、細胞を単離した。肺細胞の採取については、まず PBS で心臓から灌流したのち、肺組織を単離して 0.6 mg/ml collagenase D (Roche) と 0.1 mg/ml DNase I (Roche) を溶解させた RPMI-1640 培地中で、ハサミを用いて細かく組織を裁断した。その後、37°C で 30 分間攪拌して酵素的に消化したのち、フィルターを通して肺細胞を単離した。鼻咽頭関連リンパ組織 (NALT) については、この組織を、口蓋を鉗子で優しく引き剥がしたのち、すり潰して細胞を単離した。採取した唾液腺は、0.6 mg/ml collagenase D、0.1 mg/ml DNase I および 100mM CaCl₂ を溶解させた 5% FCS/RPMI-1640 培地を用いて、肺組織と同様に、酵素的に消化して細胞を単離した。さらに、この細胞から以下のように免疫細胞を単離した (52): 40% Percoll (Cytiva) /RPMI-1640 で唾液腺細胞を懸濁したのち、懸濁液の底部に 75% Percoll /PBS をゆっくりと添加し、2 層にしたのち遠心して免疫細胞を単離した。小腸または大腸からの細胞は以下のように単離した (52): 腸管組織を切除して管腔内の糞便を除去したのち、1 cm 程度に分割、切り開いた。この組織片を EDTA バッファー (5 mM EDTA pH 8.0、10 mM HEPES 1 mM DTT in PBS) 中で 37°C、20 分間攪拌した。その後、組織片を PBS で洗浄した後、0.7 mg/ml collagenase D と 0.2 mg/ml DNase I を溶

解させた 3% FCS/RPMI-1640 培地を用いて、肺組織と同様、酵素的に消化し細胞を単離した。その後、唾液腺と同様、Percoll を用いて免疫細胞を単離した。赤血球は赤血球溶解バッファー (155 mM K_2HPO_4 , 10 mM KH_2PO_4 , 0.1 mM EDTA pH7.4) を用いて溶解した。ELISpot アッセイは、既報のように行った (53)。すなわち、各組織から単離した単一細胞懸濁液から分泌された IgE 抗体を、MultiScreen 96-well filtration plate (Millipore) にコートした 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ラット抗マウス IgE 抗体 (R35-72) (BD Biosciences) で捕捉した。捕捉した IgE 抗体は、3% FCS/RPMI-1640 でブロッキング後、HRP 標識ヤギ抗マウス IgE (Southern Biotech) により検出し、AEC 染色キット (Sigma) により発色させた。スポットは、プレート乾燥後に目視でカウントした。

3-3 フローサイトメトリー

脾臓、リンパ節、肺組織の単一細胞懸濁液から赤血球を除去した後、Fc γ R ブロッキング抗体 (2.4G2) で処理し、FITC、PE、APC、eFluor 660、biotin、PerCP-Cy5.5、PE-Cy7、APC-Cy7、Pacific Blue、BV421、eFluor 450 or BV510 と結合した複数の抗体を組み合わせ、染色をした。表面染色には、c-kit (ACK2)、CD115 (AFS98)、CD11c (N418)、CD138 (281-2)、CD172a (P84)、CD19 (6D5)、CD25 (PC61)、CD38 (clone 90)、CD3 ϵ (145-2C11)、CD4 (GK1.5)、CD45R/B220 (RA3-6B2)、CD62L (MEL-14)、CD98 (RL388)、CD49b (DX5)、GL7 (GL7)、I-A/I-E (M5/114.15.2)、IgD (11-26c.2a)、TCRV α 3.3 (RR3-16)、Ter119 (TER-119)、XCR1 (ZET) (Biolegend)、IgE (RME-1: Biolegend または R35-72: BD Biosciences)、CD44 (IM7) (Biolegend または BD Biosciences)、IgG1 (A85-1) (BD Biosciences)、IgM (II/41) (eBioscience) に対するモノクローナル抗体、または streptavidin (Biolegend) を使用した。細胞内染色には、IFN γ (XMG1.2)、IL-17A (TC11-18H10.1)、IL-4 (11B11) (Biolegend)、IL-13 (eBio13A) (eBioscience) に対するモノクローナル抗体、および同一アイソタイプのコントロール抗体 (RTK2071: BioLegend または eBRG1: eBioscience) を使用した。IgE⁺ または IgG1⁺ MBC の細胞内染色は、既報のように行った (23)。簡潔に、過剰量の Purified anti-mouse IgE (RME-1) で細胞表面上の IgE をブロッキングしたのち、Cytofix/Cytoperm solution と Perm/Wash buffer (BD Biosciences) を用いて、メーカーのプロトコルに従って細胞を固定・透過処理を行ない、細胞内の IgE および細胞表面・細胞内 IgG1 を染色した。細胞内 IgE の染色にはブロッキングに使用したクローンと同じ、RME-1 由来の抗体を使用した。細胞内のサイトカインを染色するために、組織からの単細胞懸濁液を 20 ng/mL PMA、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ionomycin、2 μM monensin で 5 時間、37 °C、5% CO₂ の条件で刺激した。その後、Cytofix/Cytoperm solution と Perm/Wash buffer を用いて細胞を固定・透過処理を行ない、細胞内サイトカインを染色した。IRF4 または Foxp3 の染色は、Foxp3 Staining Buffer Set (eBioscience) を用いてメーカーのプロトコルに従って行った。染色抗体は IRF4-eFluor™ 660 (3E4)、Foxp3-APC (FJK-16s) (eBioscience) を用いた。すべてのサンプルは、FACSCanto II (BD Biosciences) を用いて解析した。データは FlowJo (Tree star) を用いて解析した。

3-4 IgE⁺ プラズマ細胞のシングルセルソートと cDNA 合成

脾臓 IgE⁺ PC は、既報の方法 (54) を参考にした独自の方法で単離した。単一細胞懸濁液を 5 mM EDTA /PBS バッファーで処理し、2.4G2 で 4 °C、20 分間ブロッキングした後、各 1 μL のビオチン化抗マウス IgE 抗体 (R35-118) (BD Biosciences) および抗 CD98 抗体 (RL388) (BioLegend) と結合させた抗ビオチンマイクロビーズ (10 μL) (Miltenyi) とともに 4 °C、30 分反応させた。抗 CD98 のみを結合させた抗ビオチンマイクロビーズを陰性対照群として使用した。洗浄後、20% FCS と 0.5% SeaPlaque® Agarose (Cambrex Bio Science) を添加した RPMI1640 培地 50 mL に懸濁し、37 °C、5% CO₂ で 1 時間培養した。細胞を常温で遠心分離し、温めた PBS で洗浄してアガロースを完全に除去した。PC から分泌され、抗 IgE 抗体-マイクロビーズに結合した IgE を、異なるエピトープを認識する抗マウス IgE 抗体 (RME-1) を用いて染色した。IgG1⁻ IgM⁻ DX5⁻ c-kit⁻ B220^{lo/-} CD138⁺ IgE⁺ シングル PC を FACS Aria II (BD Biosciences) を用いてソーティングした。ソートした細胞の cDNA 合成は SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR (Toyobo) を用いて、メーカーのプロトコルにしたがって行った。

3-5 IgV_H または IgV_L 遺伝子のシーケンスとリコンビナント IgE 抗体の作製

V(D)J 配列は、既出論文 (55) に基づいてクローニングを行った。シングル IgE⁺ PC の cDNA を用いて、KOD-FX Neo DNA polymerase (Toyobo)、および IgV_H または IgV_L に対するユニバーサルプライマー (55) と、C_ε 遺伝子の CH1 エキシソンの 5' 末端を標的とした C_ε プライマー (5'-GTCATGCTAGCAGTGCCTTACAGGCTTC-3') を用いて IgV_H と IgV_L 遺伝子を増幅した。精製後、一次増幅産物の配列を解析し (GENEWIZ)、Ig-BLAST および VBASE2 ウェブツールを用いて、遺伝子を同定した。続いて、V 遺伝子特異的なプライマーを作製し、これを用いて、各 IgV_H と IgV_L 遺伝子を二次増幅し、pCAGGS-leader-C_ε、pCAGGS-leader-C_ε または pCAGGS-leader-C_λ ベクターに導入した。これらの pCAGGS ベクターを PEI "Max" (Mw 40,000; Polysciences) を用いて HEK-293T 細胞に導入し、リコンビナント IgE 抗体を産生させた。

3-6 ELISA 法

ELISA は既報 (30) を参考に行った。すなわち、総 IgE 抗体価を測定するためには、2 μg/mL ラット抗マウス IgE 抗体 (R35-72) を 96 ウェルプレート (Thermo Fisher Scientific) にコートし、3% BSA でブロッキング後、捕捉された IgE 抗体をビオチン化抗マウス IgE 抗体 (R35-118) (BD Biosciences) と HRP-streptavidin (Southern Biotech) で検出し、BioFX® TMB super sensitive one (Surmodics) で発色した。細菌特異的な抗体を検出するために、PBS に懸濁した細菌 (2×10⁶ cells /well) をコートし、4°C で一晩放置した。3% BSA/PBS でブロッキング後、細菌に結合した血清またはリコンビナント IgE 抗体を HRP 結合ヤギ抗マウス IgE または IgG1 抗体 (Southern Biotech) で検出した。サイトカインを測定するためには、肺組織から採取した 2×10⁵ 個の細胞を 100 mM Sodium pyruvate、10 mM HEPES pH 7.5、55mM 2-Mercaptoethanol、100 U/mL Penicillin、1 mg/mL Streptomycin を含む 10%

FCS/RPMI-1640 培地中で培養し、 10^6 cells の加熱処理 (85°C、1 時間) した細菌で 4 日間刺激した。培養後、培地中の IL-4 と IL-13 をそれぞれ ELISA MAXTM Deluxe Set Mouse IL-4 (BioLegend) または IL-13 Mouse Uncoated ELISA kit (Invitrogen) を用いて測定した。

3-7 細胞の単離と培養

MBC を単離するため、CD4、CD8 α (53-6.7)、IgD、Ter119 に対する抗体 (BioLegend)、iMag system (BD Biosciences)、MACS system (Miltenyi Biotec) を用いて、ネガティブソーティングにより脾臓細胞から非 B 細胞とナイーブ B 細胞を除去した (53)。その後、IgD⁻ IgM⁻ CD138⁻ GL7⁻ CD38⁺ CD19⁺ B220⁺ クラススイッチ MBC を FACS Aria II を用いてソートし、3T3 細胞に BAFF と CD40L を過剰発現させた 40LB 細胞上で IL-21 とともに 37 °C、5% CO₂ で培養した (56)。培養後 9 日目に培養液を採取した。IgH レパトア解析のため、脾臓、縦隔リンパ節、肺から IgD⁻ IgM⁻ CD138⁻ GL7⁻ CD38⁺ CD19⁺ クラススイッチ MBC、または CD19⁻ CD98⁺ CD138⁺ PC をソーティングした。肺の非造血細胞の分離は、既報 (57, 58) を参考に若干の修正を加えて実施した。簡潔に、心臓から PBS で灌流した後、気管を通して、肺胞内を RPMI-1640 に懸濁した 50 U/mL Dispase II (Roche) 1mL で満たし、その後 100 μ L の 2% SeaPlaque® Agarose を注入して Dispase 溶液を封入した。続いて、取り除いた肺を 2 mL の 50 U/mL Dispase II /RPMI-1640 溶液に浸し、室温で 45 分間攪拌した。次に肺を細々に切断し、1 mg/mL の DNase I を加え、さらに室温で 10 分間攪拌した。消化した肺組織を濾過して単一細胞溶液を回収したのち、iMag system を用いて CD45.2 (clone 104) (BioLegend) と Ter119 に対するビオチン化抗体を用いてリンパ球と赤血球を除去し、非造血系細胞を単離した。

3-8 定量的 PCR 法

RNA 調製、cDNA 合成、定量的リアルタイム PCR は、既報 (56) と同様に行った。各遺伝子の発現量は *Gapdh* の発現量で正規化した。各遺伝子発現を調べるために、以下のプライマーセットを用いた。

Gapdh sense: 5'-GGAGAAACCTGCCAAGTATGA-3'; antisense: 5'-CCCTGTTGCTGTAGCCGTATT-3';

Csf1 sense: 5'-CTTCAGCCACTAGCGAGCAA-3'; antisense: 5'-AGCCCAGCCATGTCTGAAGAA-3';

Csf2 sense: 5'-CATGCCTGTCACGTTGAATGA-3'; antisense: 5'-TGAAATTGCCGTAGACCC-3';

Csf3 sense: 5'-CATGAAGCTAATGGCCCTGC-3'; antisense: 5'-TGACAGTGACCAGGGAACG-3';

Tslp sense: 5'-GGCGACAGCATGGTTCTTCT-3'; antisense: 5'-TTGTAAGTTAGCCATCCGT-3';

Il-4 sense: 5'-CATCGGCATTTTGAACGAGT-3'; antisense: 5'-TCTCTGTGGTGTCTTCGTTG-3';

Il-13 sense: 5'-TCACACAAGACCAGACTCCCC-3'; antisense: 5'-APGCCATGCAATCCTCTGG-3';

Il-25 sense: 5'-GTGACTGGAGCAGTGTCC-3'; antisense: 5'-GTTCCCACGATCATTGC-3'.

3-9 骨髄キメラマウスの作製と細菌感染

各遺伝子型のマウス2~3匹からプールした骨髄細胞を、放射線照射マウス(5.5Gyを3.5時間間隔で2回)にi.v.により移入した(5×10^6 cells /マウス)。移植して8週間後、キメラマウスにABXを2週間投与した後、 10^8 cellsの*S. azizii*をi.t.により投与した。

3-10 細菌の分離、培養および16S rDNAシーケンス解析

腸内細菌はマウスの糞便から以下のように分離した(42):3~5粒の糞便をPBSで懸濁し、2000 rpmで遠心後の上清を回収し、フィルトレーション後にさらに12000 rpmで遠心して糞便細菌をペレット化した。肺細菌については、灌流せずに解剖した肺を小さく切り、無菌状態で21G針と注射器を用いてホモジナイズした後、 $100 \times g$ で5分間遠心分離し、その上清をBrain Heart Infusion (BHI) agar plate (BD Biosciences)とAnaeroPack Kenki (Mitsubishi Gas Chemical)を用いて一晩嫌気培養した。各コロニーをピックアップし、直接KOD-Fx Neo PCR混合液に溶解した。全長16SリボソームRNA DNA (16S rDNA)増幅のために、次のプライマー: universal 8F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; universal 1492R 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' (59) を使用し、次の条件でPCRを行った: 95°C 3分; 95°C 30秒、50°C 30秒、68°C 1分を35サイクル; 68°C 3分。PCR産物をEconoSpin™ (Epoch Life Science)で精製し、次のプライマーでシーケンスした(Genewiz): universal 785F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; universal 906R 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。解析した16S rDNA配列はRDPデータベースにより相同性を検索し、細菌種を同定した。肺における*Streptococcus*属の細菌数は、次の通り行った:1匹のマウスから単離した肺ホモジネートの上清をBHI寒天培地に播種し、嫌気培養した。最大80個のコロニーを任意に採取し、*Streptococcus*属特異的なプライマー(*Streptococcus* Fw 5'-TCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTA-3'; *Streptococcus* Rv 5'-GGACAACGCTCGGACCTAC-3')を用いたPCRにより16S rDNAの配列を同定した。PCRは次の条件で行った:95°C 2分;次に95°C 30秒、68°C 30秒、72°C 1分を35サイクル;72°C 5分。*Streptococcus*属細菌のコロニー数は、以下のように推定した:(PCR陽性コロニー数/被検コロニー数)×BHI寒天培地上の全コロニー数。

3-11 細菌溶液の調製

単離した*Streptococcus azizii*または*Streptococcus danieliae*は、0.5% Yeast Extract (BD Biosciences)培地を含むTodd-Hewitt (THY)液体培地(Sigma-Aldrich)中に25%グリセロールとともに-80°Cで使用時までストックしておいた。マウスへの感染時に、凍結ストックをTHY培地で培養し、無菌状態で37°C、7時間以上培養後、ペレット化しPBSに再懸濁した。菌数はPiCOEXPLORER (Yamato Scientific)を用いて計測した濁度により算出した。

3-12 細胞移入と免疫

CD4⁺ CD25⁻ CD62L⁺ CD44⁻ ナイーブヘルパーT 細胞を 2D2-TCRトランスジェニックマウスの脾臓から FACS Aria III でソートし、*Myd88*^{+/+}または *Myd88*^{-/-}マウスに i.v.により移入し、100 μg の MOG₃₅₋₅₅ ペプチド(MBL Life Science)と加熱処理した *Streptococcus azizii* 4 × 10⁸ cells を i.t.により投与した。

3-13 IgH レパトア解析

cDNA ライブラリーは、後述する各細胞サンプルの溶解液から次の通りに調製した。使用したプライマーは、(表1)に記載した。既報(GSE110711)(60)を改変し、PolyA RNA を、ビオチン-3' WTA-EcoP-dT25 を共役した Dynabeads M-270 streptavidin (Thermo Fisher Scientific)を使用して単離した。続いて cDNA 合成のため、単離したビーズを 10 μL の RT ミックス [1 × First Strand バッファー (Thermo Fisher Scientific)、1 mM dNTP、2.5 mM DTT、1 M ベタイン (Sigma-Aldrich)、9 mM MgCl₂、1 U /μL RNaseIn Plus RNase Inhibitor (Promega, Madison, WI)、10 U/μL Superscript II (Thermo Fisher Scientific)、および 1 μM の trP1-TSO プライマー]に懸濁し、42 °C で 60 分間反応させ、氷上で直ちに冷却した。このビーズを B&W-T バッファー [5 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 M NaCl、1 mM EDTA、および 0.05% Tween-20]で 1 回、Tris-HCl (pH 8.0) で 1 回洗浄した。全 cDNA を増幅するために、cDNA を含むビーズを 25 μL の WTA PCR ミックス [0.4 μM trP1 プライマー、0.4 μM NH2-3' WTA プライマー、および 1 × KAPA Hifi Hotstart ReadyMix]で懸濁した。PCR は次の条件で行った:95 °C 3 分;98 °C 20 秒、65 °C 15 秒、72 °C 5 分を 12 サイクル;72 °C 5 分。WTA PCR 生成物を AmPure XP ビーズ(Beckman-Coulter)、試薬:サンプル = 0.6:1 で精製し、20 μL のヌクレアーゼフリー水で溶出した。

IgH 鎖 cDNA の CDR3 領域を増幅するために、VH-CH1 領域の nested PCR を以下のように行った。精製された WTA PCR 産物を、25 μL の 1st PCR 混合物 [0.4 μM プライマーセット(i5-trP1、mIghE_1st、mIghG1/2b/2c_1st、および mIghG3_1st)、および 1 × KAPA Hifi Hotstart ReadyMix (KAPA Biosystems)]に懸濁し。次の条件で PCR を行った:95 °C 3 分;98 °C 20 秒、65 °C 15 秒、72 °C 30 秒を 10 サイクル;72 °C 2 分。次に、1 μL の 1st PCR 産物を 9 μL の 2nd PCR 混合物 [0.35 μM プライマーセット(illumina i5_2nd、i7-BCx_mIghE、または G1/2b/2c、または G3)、および 1 × KAPA Hifi Hotstart ReadyMix]と混合し、サイクル数が 15 であることを除き、1 回目の同じ条件で PCR を行った。二次増幅産物は Agencort AM Pure XP kit (Beckman Coulter) と 0.7:1 の割合で混合・精製し、12 μ 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)で溶出した。各二次増幅産物を等量で混ぜ、i5_UDI および i7_UDI プライマーで増幅して、次世代シーケンサー用のアダプター配列を付加した。3 回目の PCR 産物は、2 回目の PCR 産物と同様に精製した。アダプター配列を付加した全 PCR 産物をプールし、ProNex size-selective purification system (Promega)を使用して二重サイズ選択を行い、25 μL の 10 mM Tris-HCl (pH 8.5)で溶出した。

上記の通りプールされた CDR3 ライブラリーは、illumina NovaSeq™ 6000 S4 フローセル(Read 1: 167 bp、Read 2: 140 bp)を使用して網羅的にシーケンスした。CD3 配列を含む Read 2 配列に関して、

Cutadapt-3.2 (61) および PRINSEQ-0.20.4 (62) を使用して、シーケンスデータのアダプター配列、および結果の疑われる低品質配列を除去した。続いて、MiXCR-3.0.5 (63) を用いて、シーケンスデータと国際 ImMunoGeneTics (IMGT) 情報システムに登録されているマウス IgH V/D/J 配列の相同性を網羅的に検索し、PCR 産物とシーケンスエラーが起こった配列を区別した。MBC および PC のクローン性を、同じ V セグメント、J セグメント、および CDR3 ヌクレオチド配列を持つものとして定義し、VDJtools を使用して、サンプル間の IgH レパトアの類似性を Morishita-Horn index を計算することで定量化した (64)。計算結果に基づき、既報 (65) で使用された R スクリプトを使用し、R ソフトウェアを用いてヒートマップを作成した。

3-14 統計解析

すべての統計解析は、GraphPad Prism 8 ソフトウェアを用いて行った。2 群間の比較は Welch's t-test、paired t-test、Mann-Whitney test で行なった。また、多群比較は次のうち最適な検定方法で行なった: multiple t-test (Holm-Sidak's multiple comparisons test)、one-way ANOVA & Dunnett's test、Kruskal-Wallis test & Dunn's multiple comparisons test mixed-effects analysis & Dunnett's test。いずれのデータにおいても有意差は下記の通りに判定した。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns, not significant ($p > 0.05$).

結果

4-1 MyD88 欠損マウスにおける自然 IgE 抗体および IgE⁺PC の特性評価

まず、MyD88 欠損マウスの自然 IgE 抗体と IgE⁺ PC の特性を調べた。Myd88^{-/-}マウスの血清中の自然 IgE 抗体価は、Myd88^{+/+}や Myd88^{+/-}マウスと比較して、2 週齢から上昇を始め、4 週齢で優位に高値となり、少なくとも 12 週間齢まで持続した(図 4A)。一方で、TLR 以外に MyD88 を介してシグナル伝達を行う受容体として、IL-1 ファミリー受容体も知られるが、IL-1RAcP の欠損では、MyD88 欠損で見られた IgE 抗体産生増強は起こらなかった(図 4B)。すなわち、TLR-MyD88 経路が自然 IgE 抗体産生の抑制に重要であることが示唆された。また、IgE 抗体分泌細胞(ASC)数を測定したところ、MyD88 欠損により脾臓で増加し、縦隔リンパ節や骨髄でも程度は小さいが、有意に増加していた(図 4C、4D)。次に、自然 IgE 抗体に導入された SHM の解析を試みた。まず、SHM 解析に必要な IgE⁺ PC の単離を目指し、表面上に IgE-BCR を発現する脾臓 IgE⁺ PC の割合を調べたところ、表面に発現している細胞は極少数であり(図 4E)、表面 IgE 染色のみによるソーティング方法では IgE⁺ PC をほとんど単離できないと判断された。そこで、先行研究(54)の方法を応用し、脾臓 IgE⁺ PC 全体をソーティングできる新たな戦略を確立した(図 4F-H)。既報(66)で報告されているように、IgE 型を含む脾臓 PC は表面に CD98 を高発現していた(図 4F、4G)ため、脾臓 PC を抗 CD98 抗体と抗 IgE 抗体を結合させたビーズで標識したのち、ソフトアガー培養液中で抗体を分泌させた(図 4H)。これにより、IgE⁺ PC が IgE 抗体を産生した際、抗 CD98 抗体を介して PC 細胞表面に標識された抗 IgE 抗体が、分泌された IgE 抗体を捕捉する。この捕捉された IgE 抗体を別のエピトープを認識する抗 IgE 抗体で検出することにより(図 4H)、培養液中で IgE 抗体を分泌した PC を検出することに成功した(図 4I)。この細胞をシングルセルソートしたのち、偽陽性の細胞がソート時に混入する可能性を考慮し、C ϵ 遺伝子の CH1 エキソンの 5'末端を標的とした、C ϵ プライマーを用いて V(D)J 遺伝子をクローニングした。V(D)J 遺伝子が増幅された IgE⁺ PC のうち、64~68%のクローンで IgV_Hまたは IgV_L 配列に SHM が導入されていた(図 4J-L)。以上より、MyD88 欠損マウスでは、B 細胞は何らかの環境抗原に応答し、SHM の誘導と IgE⁺ PC への分化を起こしていると考えられた。

4-2 MyD88 欠損マウスにおける IgE⁺ PC とその IgE 抗体の解析

Myd88^{-/-}マウスにおける恒常的な高 IgE 抗体産生が IgE メモリーに拠ることを検証するために、PC を除去するために用いられるボルテゾミブ(67)、または MBC を含む B 細胞を除去するために用いられる抗 CD20 抗体(68)をそれぞれ Myd88^{-/-}マウスに投与し、その後、継時的に血清 IgE 抗体価を測定した。ボルテゾミブは 3 回/1 週間を 3 週間、抗 CD20 抗体は 1 週間の間で 2 回投与した。その結果、ボルテゾミブ投与により IgE 抗体価は一過性に低下したが、投与開始から 5 週間後には、投与前と同程度に回復した(図 5A)。過去の報告では、IgE⁺ LLPC の形成には長期的に抗原に感作される必要があり、4 週間の継続的な抗原暴露では形成されないことが示されている(16)。これを踏まえ、本結果ではボルテゾミブの投与終了後、速やかに IgE 抗体価が回復したことから、定常状態の

MyD88 欠損マウスでは、IgE⁺ LLPC ではなく、IgE⁺ SLPC が自然 IgE 抗体産生を維持していると考えられた。一方、抗 CD20 抗体投与群では、IgE 抗体価は投与開始 3 週間後から 9 週間後にかけて継続的に低下した(図 5B)。抗 CD20 抗体投与群について、血中 B 細胞数を測定したところ、投与開始 1 週間後で完全に除去され、5 週間後から回復を始め、13 週間後で投与前と同程度に回復した。(図 5C)。上記の結果より、MyD88 欠損マウスでは、ナイーブ B 細胞または MBC が感作されるたびに IgE⁺ SLPC に分化することで IgE 抗体が絶えず供給されていると考えられた。続いて MBC の寄与を調べるため、まず MyD88 欠損マウスで MBC が増加しているかを検証した。その結果、*Myd88*^{-/-}マウスと比べ、成体および乳児いずれにおいても *Myd88*^{-/-}マウスの脾臓では、IgE 型や IgG2b 型、IgG2c 型ではなく IgG1 型の MBC が増加していた(図 5D-F)。次に、IgH レパトア解析により、IgG1⁺MBC と IgE⁺PC の VDJ 配列の類似性を検証したところ、脾臓あるいは縦隔リンパ節由来の IgE⁺PC の VDJ 配列は、同じ臓器由来の IgG1⁺または IgG2⁺MBC の配列との類似性が高く、マウス個体 1 および個体 2 でその傾向は特に強かった(図 5F)。また、本結果では、微量ながら IgE⁺MBC が検出されたが、この細胞に関しては、個体 2 でのみ脾臓 IgE⁺MBC と脾臓 IgE⁺PC で強い類似性が見られるに留まった(図 5F)。これらの結果から、MyD88 欠損マウスにおいて高い IgE 抗体価が維持されている原因は、IgE⁺ LLPC ではなく、IgG1⁺MBC に起因することが示唆された。

4-3 MyD88 欠損マウスでは乳児期において常在菌依存的な IgE 産生が誘導される

自然 IgE 抗体産生を促す抗原を同定するために、環境中に存在すると思われる抗原、すなわち、腸内細菌叢やその構成成分(LPS やホスホリルコリン)、自己抗原として知られる DNA やインスリン、ヒストンタンパク質に対する血清 IgE 抗体への結合性を検証した。その結果、いずれの抗原も、ネガティブコントロールであるハプテン特異的モノクローナル IgE (SPE-7)と比較して、MyD88 欠損マウスの血清 IgE が強く結合する抗原はなかった(図 6A)。また近年、無菌マウスや抗生物質投与マウスでは、固形食に含まれるグルテンタンパク質に特異的な IgE 抗体が産生されることがわかっており (19)、これは、腸内細菌の消失により Treg 細胞の MyD88 が活性化できなくなることが原因であることが報告されている (69)。これらの先行研究と同様、MyD88 欠損マウスの血清には、グルテンタンパク質を認識する IgE 抗体が含まれていた(図 6B)。一方で *Myd88*^{-/-}マウスに食物由来タンパク抗原を含まない餌を与えたところ、グルテン特異的 IgE は *Myd88*^{-/-}マウスと同程度まで減少したが(図 6C)、血清中の総 IgE 価は減少しなかった(図 6D)。これより、自然 IgE 抗体の産生には他の未知抗原が寄与していると考えられた。MyD88 欠損マウスでは、血清 IgE 抗体価が 2 週齢頃から増加し始めるので(図 4A)、特定の抗原に対する一次免疫反応も同じ時期に起こっていると考えられる。そこで、3 週齢時の IgE⁺ASC の局在を調べたところ、MyD88 欠損マウスでは脾臓に加えて、肺、縦隔リンパ節や唾液腺などの呼吸器周辺の組織に集積していることが分かった(図 6E、6F)。さらに、生後 2 週から 8 週までの抗生物質投与により、*Myd88*^{-/-}マウスでは、C57BL/6 マウスを用いた既報 (4) と同様、血清 IgE 抗体価は上昇する一方で、*Myd88*^{-/-}マウスでは、亢進していた血清 IgE 抗体価が *Myd88*^{-/-}マウスと同レベルまで低下した(図 6G)。これらのデータから、*Myd88*^{-/-}マウスの IgE 抗体産生を促進する抗原は、腸管ではなく呼吸器の共生細菌であることが示唆された。

4-4 *Streptococcus azizii* は、MyD88 欠損マウスの自然 IgE 抗体産生の主要な刺激因子である

MyD88 分子の欠損は腸内細菌叢の異常を引き起こすことが報告されており (70)、呼吸器組織、特に肺においても細菌叢の異常が生じている可能性がある。そこで、肺の細菌を BHI 寒天培地上で培養し、任意に選択した各12コロニーについて、16S rDNA 塩基配列を解析し、細菌種を同定した。分離された細菌の多様性は低かったが、*Myd88*^{-/-}マウスでは、別ケージで飼育した *Myd88*^{+/+}マウスでは見られない *Streptococcus* 属細菌、*Streptococcus azizii* (*S. azizii*) と *Streptococcus danieliae* (*S. danieliae*) が検出された (図 7A)。さらに、*Streptococcus* 属の 16S rDNA 特異的コロニー-PCR 増幅により、*Myd88*^{-/-}マウスおよび、その同腹である *Myd88*^{+/+}マウスでは、別ケージで飼育した野生型マウスよりも多くの *Streptococcus* 属細菌が検出された (図 7B)。これらの細菌が抗原として自然 IgE 抗体産生を誘導するかどうかを調べるために、MyD88 欠損マウスのリコンビナント IgE、または血清 IgE 抗体のこれらの細菌に対する結合性を検証した。その結果、IgE⁺ PC 由来の IgE cDNA 配列を用いて作製したリコンビナント IgE 抗体クローン (図 4J) 16 種中 6 クローン、および MyD88 欠損マウス由来の血清 IgE 抗体が *S. azizii* に結合したが (図 7C、7D)、*S. danieliae* には 2 クローンしか結合せず、MyD88 欠損マウス由来の血清 IgE 抗体はほぼ認識しなかった (図 7C、7E)。この MyD88 欠損マウスにおける *S. azizii* 特異的 IgE 抗体の産生は ABX の投与により減少することが確認された (図 7F)。加えて、MyD88 欠損マウスにおいて、肺から単離した *Streptococcus* 属コロニー数 (図 7G) や *S. azizii* 特異的 IgE 抗体価 (図 7H) は総 IgE 抗体価と強い正の相関があることがわかった。さらに、これらの細菌が生体内で IgE 応答を誘導する抗原として働くかどうかを検証するため、MyD88 欠損マウスに抗生物質を投与して常在菌を除去したのち、*S. azizii* または *S. danieliae* を経気道感染させた。その結果、*Myd88*^{+/+}マウスではいずれの種に感染しても血清 IgE 抗体価は上昇しなかったが、*Myd88*^{-/-}マウスでは *S. azizii* 感染で有意に上昇し、*S. danieliae* では上昇しなかった (図 7I、7J)。さらに、脾臓由来のクラススイッチした MBC を培養し、その培養上清中に分泌された *S. azizii* に特異的な抗体量を測定したところ、*Myd88*^{+/+}マウスからは *S. azizii* 特異的 IgG1 抗体はほぼ検出されなかった一方で、*Myd88*^{-/-}マウス由来から多くの *S. azizii* 特異的 IgG1 抗体が検出された (図 7K 左)。また、*S. azizii* 特異的 IgG2b 抗体は両群で同程度、*S. azizii* 特異的 IgG2c 抗体は *Myd88*^{+/+}マウス由来から検出された一方で、*Myd88*^{-/-}マウス由来からはほぼ検出されなかった (図 7K 中、7K 右)。これらの結果から、MyD88 分子の欠損は肺に *dysbiosis* を引き起こし、異常生着した *Streptococcus* 属の細菌、特に *S. azizii* が IgG1⁺MBC の形成、およびそのリコール応答を起こすことで、恒常的に IgE 抗体を産生させることが示唆された。

4-5 MyD88 欠損マウスの肺では、*S. azizii* 特異的な Th2 細胞が誘導される

MyD88 欠損マウスに由来するリコンビナント IgE 抗体の大部分に SHM が導入されていたことから、MyD88 欠損マウスでは T 細胞依存性の一次反応が起こっていると考えられた。一般に IgE 抗体産

生は Th2 応答により誘導されることから、本研究においても Th2 細胞の寄与を調べるため、マウスの肺から単離した細胞を *S. azizii* の死菌体存在下で培養した。その結果、*Myd88*^{+/-}マウスと比較して、*Myd88*^{-/-}マウスの肺の細胞からは IL-4 と IL-13 が顕著に分泌されたが、*S. danieliae* 刺激では分泌されなかった(図 8A)。縦隔リンパ節由来の細胞でも同様の傾向はあったが、有意な差は見られなかった(図 8B)。*S. azizii* 刺激による IL-4、IL-13 産生は、肺の細胞から CD11c⁺または CD4⁺細胞を除去すると減少したことから(図 8C)、樹状細胞による抗原提示とそれに続く CD4⁺T 細胞の活性化が、これらのサイトカインの産生をもたらしたと考えられた。さらに、3 週齢の *Myd88*^{-/-}マウスの肺では、*Myd88*^{+/-}マウスよりも多くの CD4⁺T 細胞が定常状態で活性化していた(図 8D)。この活性化 CD4⁺T 細胞のうち、Th2 細胞の割合、および実数は、*Myd88*^{+/-}マウスと比較して *Myd88*^{-/-}マウスで増加していたが、Th1 や Treg 細胞に変化は見られず、Th17 細胞は両マウス共にほぼ存在しなかった(図 8E-H)。さらに、2 週齢の *Myd88*^{-/-}マウスから CD4⁺細胞を除去すると、その 2 週後の血清 IgE 抗体が消失し、さらにその 2 週後に回復した(図 8H)。以上の結果より、*MyD88* 欠損マウスの肺では、*S. azizii* に特異的な Th2 細胞が過剰に形成され、自然 IgE 抗体産生に寄与していることが示唆された。また、この肺 Th2 細胞の過剰形成は Treg 細胞の欠如に起因するものではないと考えられた。

4-6 MyD88 欠損マウスにおいて、Th2 分化には肺組織が重要である

MyD88 欠損マウスにおける肺の Th2 細胞の異常増加は、肺環境で何らかの Th2 分化メカニズムが働いていることを示唆した。この可能性を検証するため、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG)ペプチドに特異的な TCR を発現する 2D2-KI CD4⁺T 細胞を、抗生物質で処理した *Myd88*^{-/-}マウスに移入した。その後、加熱処理した *S. azizii* をアジュバントとして MOG ペプチドで経気道免疫した。免疫 9 日後、肺中のドナー由来 T 細胞をフローサイトメリーによって解析した(図 9A)。その結果、活性化ドナー 2D2-KI CD4⁺T 細胞(Vα3.2 クロノタイプ陽性)の中で、*Myd88*^{+/-}マウスに比べ、*Myd88*^{-/-}マウスの肺で IL-4 を産生する細胞の割合が高かった(図 9B、9C)。以上から *Myd88*^{-/-}マウスの肺には何らかの Th2 分化促進因子があることが示唆された。続いて、いかなる細胞種が Th2 分化を促進しているかを明らかにするために、骨髄キメラマウスを作成した。骨髄由来造血系細胞にのみ *MyD88* が発現し、放射線耐性細胞には *MyD88* が発現しないキメラマウス、またはその逆の条件のキメラマウスを作成し、抗生物質で処理したのち *S. azizii* を経気道感染して IgE 抗体産生を検証した(図 9D)。その結果、造血系細胞ではなく、放射線耐性細胞でのみ *MyD88* 分子を欠損したキメラマウスで、異常な IgE 産生が確認された(図 9E)。続いて、移入した骨髄由来細胞の、肺での置換率を確認するため、CD45.2 発現 C57BL/6 マウスに、放射線照射後、CD45.1 発現 C57BL/6 マウス由来の骨髄細胞を移植し、8 週間後の肺細胞を解析した(図 9F)。その結果、全体として、造血系細胞は約 93%が移植した CD45.1⁺ 骨髄細胞に置換されていた(図 9G)。細胞別に調べると、B 細胞は約 99%、ミエロイド系の細胞は約 96~99%、T 細胞は約 74~82 %が CD45.1⁺ 骨髄細胞に置換されていた(図 9G)。以上の結果より、図 9E の結果では *Myd88*^{-/-}マウスをレシピエントにしたキメラマウスでは、残存したレシピエント由来の *S. azizii* 特異的 Th2 細胞が IgE 抗体産生に影響している可能性は否定できない。しかし、*MyD88* を欠損した骨髄由来造血系細胞を移入したキメラマウスでは IgE 抗体

産生が増強されなかったことから(図 9E)、少なくとも MyD88 を欠損した非造血系細胞が自然 IgE 抗体産生に寄与していると考えられた。

4-7 MyD88 欠損マウスでは、CSF1 が過剰な自然 IgE 産生を担っている

近年の研究により、呼吸器上皮細胞がアレルゲンに反応して種々のサイトカインを産生し、喘息の発症に寄与していることがわかってきた (71)。したがって、MyD88 欠損マウスでも肺上皮細胞が、IgE 応答を惹起するサイトカインを産生する可能性が考えられた。これを検証するため、肺の非造血系細胞(CD45⁻)を単離し、その細胞群におけるサイトカイン発現を mRNA レベルで解析することにした。従来肺細胞の単離の際に用いられている Collagenase D では、CD45⁻細胞、すなわち非造血系細胞が 10%程度しか単離できないことが判明したため(図 10A 左)、先行研究 (57, 58) を参考に、Dispase II を用いて非造血系細胞を単離した。その結果、CD45⁻細胞を約 50%まで増やすことに成功した(図 10A 中)。また、この CD45⁻細胞の中には Ep-CAM⁺細胞(上皮細胞)、CD31⁺細胞(血管内皮細胞)、CD140a⁺細胞(線維芽細胞)が含まれ、多種の非造血系細胞を単離されていることが分かった(図 10A 中)。この結果から、Dispase II を用いて単離した肺細胞から、さらに CD45⁻細胞を精製し(図 10A 右)、その mRNA 発現を qPCR 法で解析した。予想に反し、Th2 応答を誘導すると知られている、上皮細胞由来サイトカインである IL-25 や TSLP、典型的な Th2 サイトカインである IL-4 や IL-13 の発現は、MyD88 欠損細胞で増加していなかった。一方で、CSF1 の発現レベルが MyD88 欠損細胞で著しく増加していた(図 10B)。さらに MyD88 欠損マウスに CSF1 中和抗体を投与することで、血清 IgE 抗体価が有意に減少した(図 10C)。これらの結果より、MyD88 欠損マウスにおいて、肺非造血系細胞から過剰産生された CSF1 が自然 IgE 抗体の産生に寄与していることが示唆された。

近年の研究で、エアロアレルゲン感作時に、気道上皮細胞から分泌された CSF1 が、conventional DC (cDC)、特に cDC2 を刺激し、IgE 産生に寄与することが報告された (72)。そこで、3週齢の *Myd88*^{+/-}および *Myd88*^{-/-}マウスの肺の cDC における CSF1 受容体(CSF1R/CD115)の発現を調べたところ、*Myd88*^{-/-}マウスでは CSF1R を高発現する cDC2 の割合と実数が増加しており、cDC1 では変化が見られなかった(図 10D-F)。同時に、本研究で用いた cDC2 の分画でも、cDC2 のマーカーである IRF4 の発現が cDC1 よりも高いことが確認できた(図 10G)。一方、従属リンパ節では、両マウスで CSF1R 発現 cDC2 の割合が高かったが、*Myd88*^{+/-}および *Myd88*^{-/-}マウス間で差は見られなかった(図 10H, 10I)。DC のマーカーとして CD11c が広く使用されるが、肺では alveolar macrophage も同様に CD11c を発現するため、上記の結果は肺胞マクロファージの漏れ込みを除外できていない可能性がある。そこで同じく肺胞マクロファージのマーカーである Siglec-F と、マクロファージ・単球のマーカーである CD64・Ly-6C 陰性の肺 cDC2 を調べると(図 10J)、図 10D-F の結果と同様、CSF1R の発現が *Myd88*^{-/-}マウスで高いことが確認できた(図 10K)。以上をまとめると、MyD88 欠損マウスにおいて、肺における CSF1 過剰産生が肺 cDC2 を特異的に刺激し、Th2 応答および IgE 抗体誘導に寄与していることが示唆された。

考察

本研究では、MyD88 欠損マウスにおける自然 IgE 抗体の異常産生原因とそのメカニズムを解明した (図 11)。MyD88 欠損マウスの肺では *S. azizii* が異常生着し、非造血系細胞の MyD88 欠損により過剰な Th2 反応と IgE 産生を誘導していることが分かった。これまでの報告では、MyD88 は TLR4、IL-33、IL-1 α 、IL-1 β の下流シグナル分子として肺の 2 型免疫反応の誘導に重要であることが示されている (39, 73–75)。一方、MyD88 欠損マウスでは血清 IgE が過剰産生することがわかっており (4, 28)、MyD88 分子には自然 IgE 抗体産生を抑制する役割があると思われるが、そのメカニズムは未解明であった。本研究で行なった骨髄キメラの解析から、非造血系細胞における MyD88 欠損が IgE 抗体異常分泌に必須であり、これには非造血系細胞による CSF1 の過剰発現と肺の CSF1R 発現 cDC2 の増加が原因であることが示唆された。

MyD88 欠損マウスでは血清 IgE 抗体価は 4 週齢でピークに達し、12 週齢まで高度に維持されていた。半減期が短いにもかかわらず IgE 濃度が維持されるには、IgE の継続的な産生が必要である。MyD88 欠損マウスでは PC を除去するボルテゾミブではなく、MBC を除去する抗 CD20 抗体の投与で持続的に IgE 抗体価が減少したこと、また血清 IgE 抗体と同様、IgG1⁺ MBC が *S. azizii* に対する特異性を有していたこと、さらに IgH レパトア解析の結果より、脾臓および縦隔リンパ節の IgG1/G2⁺ MBC の CDR3 領域の塩基配列は、同組織由来の IgE⁺ PC の CDR3 領域の配列と強い相関があることから、MyD88 欠損マウスでは、LLPC ではなく、IgG1⁺ MBC が *S. azizii* もしくは *S. azizii* の抗原を分子模倣した何らかの抗原によって継続的に活性化され、IgE⁺ SLPC に分化していると考えられた。

また、Myd88^{-/-}マウスおよび同腹の Myd88^{+/-}マウスの肺には、4 週齢から *Streptococcus* 属の細菌が生着しており、特に正常 B6 マウスと対照的に Myd88^{-/-}マウスの肺からのみ *S. azizii* と *S. danieliae* が単離された。*S. azizii* は α 溶血性レンサ球菌の一種で、もともと髄膜脳炎を起こした離乳期の B6 マウスの髄膜から分離された。さらに離乳期およびその母親マウスの口腔からも分離されたことから、*S. azizii* は母親から仔マウスに伝播すると考えられている (76)。*S. azizii* は日和見病原体であり、無症状マウスからも単離されていることから (76)、特定条件下でマウスの肺に異常生着する可能性が考えられる。Myd88^{-/-}マウスとその同腹の Myd88^{+/-}マウスの肺に *Streptococcus* 属の細菌が確認され、正常な B6 マウスでは確認されなかったことから、MyD88 がこれらの細菌の肺からの排除に寄与していることが示唆された。これを支持するように、MyD88 欠損患者は呼吸器系細菌感染症に罹患する傾向にあることが報告されている (77)。MyD88 を介した肺の細菌制御機構については、肺炎球菌の排除に LysM⁺ CD11c⁺ 肺胞マクロファージや肺上皮細胞での MyD88 発現が必要であることが報告されている (78)。また、3 週齢の正常 B6 マウスでは好酸球が肺胞管腔内に一時的に浸潤していたが、MyD88 欠損マウスでは確認されなかった (データ未掲載)。好酸球の抗菌活性は、*in vitro* および *in vivo* 両方で確認されている (79, 80)。すなわち、MyD88 欠損マウスでは抗菌活性を有する好酸球が肺胞管腔内に浸潤できず、細菌叢のコントロールがうまく行われていない可能性がある。

以上のことから、肺胞マクロファージ、肺胞好酸球、肺上皮細胞における MyD88 シグナルは、乳児期の肺の *dysbiosis* を防ぐために重要な役割を担っている可能性がある。

本研究では MyD88 欠損マウスの肺非造血細胞において CSF1 が過剰に発現していること、CSF1 が MyD88 欠損マウスの自然 IgE 抗体産生に寄与していることを明らかにした。しかしながら、CSF1 を過剰発現している具体的な細胞種は未だ特定できていない。肺組織は、上皮細胞、内皮細胞、間葉系細胞など複数の非造血系細胞から構成されている (81)。先行研究では、マウスの肺から単離した線維芽細胞の培養上清中に CSF1 が産生されることや (82)、気道上皮細胞がアレルゲン曝露により CSF1 を産生すること (72) が示されている。したがって、MyD88 欠損マウスでも肺線維芽細胞や気道上皮細胞が CSF1 産生源であることが考えられる。

また本研究から、肺非造血系細胞に発現する MyD88 分子は、CSF1 の発現調節を担っていることが示唆された。IL-1RAcP 欠損マウスでは自然 IgE 抗体産生が亢進していなかったことから、CSF1 の制御には IL-1R-MyD88 経路ではなく、TLRs-MyD88 経路が重要であると考えられる。しかしながら、どの TLR 分子が寄与するかは依然として不明である。先行研究から、TLR 分子は肺の非造血系細胞にも発現すると考えられる。例えば、放射線耐性の細胞のみで TLR4 分子を欠損した骨髄キメラマウスでは、肺における免疫応答が減弱する (73)。また、ヒト由来の気道上皮細胞株ではほとんどの TLR 分子が発現することが報告されている (83–85)。一般に、上皮細胞は外的環境からの病原体に直接接触する細胞である。最近の研究では、16S rRNA の *in-situ* ハイブリダイゼーションにより、常在菌は細気管支や終末細気管支に多く存在し、肺胞内には存在しないことが報告されており (86)、気道上皮細胞は特に常在細菌に対する刺激を受けていると考えられる。上皮細胞以外にも、ヒト由来肺線維芽細胞株 (87) やマウス由来肺線維芽細胞 (88) は TLR2/3/4/9 アゴニストに反応することが知られている。このように、非造血系細胞も TLR 刺激を受けて機能を発揮すると考えられ、TLR-MyD88 経路による CSF1 発現制御機構を明らかにするためには、種々の肺非造血系細胞による影響を考える必要がある。

本研究では、MyD88 を欠損すると、「肺における *Streptococcus* 属細菌の増殖」と「肺非造血系細胞における CSF1 の過剰発現」という2つの現象が発生することがわかった。しかしながら、上記2つの現象に因果関係があるものか、それとも、これらが独立して起こっているものかは未だ不明である。下記の先行研究からはその両方の可能性が示唆される (図 12) : CSF1 は未刺激でマウス肺線維芽細胞 (82) や腎メサンギウム細胞 (89) から産生されることが知られており、この自発的な産生は forskolin やプロスタグランジン E₂ (PGE₂) などの細胞内 cAMP 濃度を上昇させる刺激を加えることで抑制されることが報告された (89)。また、PGE₂ の合成に必要な cyclooxygenase-2 (COX-2) の発現は、TLR2/4 や MyD88 により誘導される (90–92)。肺組織においては、気道上皮細胞が COX-2 を発現し PGE₂ を産生すること (93) や、マウス肺線維芽細胞が TLR2/3/4 刺激を受けて PGE₂ を産生すること (88) が報告されている。以上から、MyD88 欠損状態では非造血系細胞が TLR 刺激を受けられないために PGE₂

産生量が低下し、CSF1 発現が制御されずに過剰産生している可能性が考えられる (図 12 上段①)。一方で、自発的な産生以外にも、CSF1 は IFN γ や TNF α の刺激によって、腎メサンギウム細胞 (89) やメラノーマ細胞株 (94) から産生誘導されることが報告されている。TNF α は TLR 刺激以外に、C-type lectin receptor (CLR) ファミリー分子である Dectin-1/2 や、NOD-like receptor (NLR) ファミリー分子である KOD1/2 刺激によっても産生される (95–98)。本研究の予備的な実験結果では、MyD88 欠損肺細胞を *S.azizii* 死菌体で刺激した際、同時に Syk 阻害剤 (CLR の pan 阻害剤)、もしくは NOD1/2 阻害剤 (NLR の pan 阻害剤) を添加すると IL-6 産生が抑制されるという結果を得ている (データ未掲載)。肺の非造血系細胞が、TNF α 刺激により CSF1 を産生するかは不明であるが、以上から MyD88 欠損マウスでは、*S. azizii* が CLR や NLR を介して肺で TNF α 産生を誘導し、CSF1 の発現誘導を引き起こしている可能性が考えられる (図 12 下段②)。さらに、前述した先行研究では、TNF α 刺激による CSF1 産生増強作用は PGE₂ の共刺激により抑制されることも報告している (89)。すなわち、PGE₂ 量の産生低下と、*S.azizii* 刺激による肺 TNF α の産生増強作用が協働的に働くことで CSF1 の過剰発現をもたらす可能性も考えられ (図 12 ③)、CSF1 の産生制御機構を解明するには上記のような複合的な作用も考慮する必要があると考える。

MyD88 欠損マウスの肺では、CSF1R の発現が、Th2 細胞を誘導する細胞型の一つである cDC2 (99) で選択的に増加していた。CSF1 の DC における機能的役割はほとんど知られていないが、CSF1R 欠損マウスでは肺 cDC2 が減少することが報告されている (100)。また最近の研究で、CSF1 刺激は CSF1R 依存的に DC の IRF4 発現を上昇させることが明らかになり (72)、CSF1 は肺 cDC2 の分化を促進すると考えられる。さらに、CSF1R⁺IRF4⁺cDC2 を除去すると、アレルゲン混合物 (HDM、ブタクサ、アスペルギルス) の鼻腔内免疫による IgE 抗体産生が抑制された (72)。この結果は、CSF1 応答性の cDC2 が IgE 抗体産生を誘導する機能的な細胞であることを明確に示している。肺の CSF1⁺cDC2 の具体的な機能は不明であるが、MyD88 欠損マウスにおいても、この細胞が異常な IgE 抗体産生に重要である可能性がある。

また先行研究では、肺 CSF1R⁺cDC2 は、CSF1 とアレルゲン混合物 (HDM、ブタクサ、アスペルギルス : TLRs リガンドを含む) の両方で刺激すると、その表面の CCR7 発現を上昇させ、縦隔リンパ節へ移行することが示された (72)。一方、本研究における予備的な実験結果では、MyD88 欠損マウスでは MyD88 ヘテロ欠損マウスと比べて、縦隔リンパ節の CSF1R⁺cDC2 は増加しておらず、CCR7 の発現にも変化は見られなかった (データ未掲載)。ヘテロ欠損マウスでは *S. azizii* 特異的な Th2 細胞が形成されていなかったことから、*S. azizii* を取り込み、抗原提示機能を獲得した cDC2 は縦隔リンパ節に移行していないと考えられる。すなわち CCR7 発現に変化がない MyD88 欠損マウスにおいても cDC2 は縦隔リンパ節には移行していないと考えられ、cDC2 における MyD88 シグナルが CCR7 発現と縦隔リンパ節への移動に重要であると考えられる。また、MyD88 欠損マウスでの肺組織における Th2 分化バイアスは、cDC2 が縦隔リンパ節に移行できていないことが原因である可能性がある。

呼吸器へのウイルス感染は、その後の異常な細菌の生着を促進し、呼吸器系での細菌感染

症を悪化させる要因として注目されている (101)。例えば、インフルエンザウイルス (IAV) 感染は、肺胞マクロファージの NF- κ B 活性低下をもたらし、LPS、フラジェリンまたは LTA 等の TLR リガンドによる、TLR シグナルの脱感作および炎症性サイトカイン産生低下を引き起こした (102)。また、IAV 感染により、それに続く肺炎球菌などの感染性細菌の感染が促進されることが示されている (102)。さらに、最近の研究により、Sox4 が TLR ファミリー分子だけでなく MyD88 分子発現の負の調節因子として働くこと、IAV 感染患者の咽頭細胞や IAV 感染ヒト肺上皮細胞株で Sox4 の発現が上昇することが明らかにされ (103)、IAV 感染が気道上皮細胞の MyD88 発現を低下させることが示唆されている。このように、ウイルス感染は、MyD88 欠損マウスと同様の肺の状態を生み出す可能性があり、異常に増加した肺常在菌に反応して自然 IgE 産生を誘発する可能性がある。このシナリオを支持するものとして、幼児期における IAV を含む呼吸器系ウイルス感染が、鼻咽頭の連鎖球菌の異常生着を促進し、これが後の喘息発症のリスク因子となることが報告されている (104)。この先行研究では言及されていないが、本研究結果から推測すると、これらの患者では異常な細菌の生着が肺の Th2 反応と IgE 産生を刺激し、喘息発症に寄与していることが考えられる。

本研究結果は、古典的な「衛生仮説」を支持するものである。この仮説では、皮膚や腸、呼吸器などの常在細菌叢の構成変化が免疫細胞の状態を乱し、それがアレルギーを含む様々な炎症性疾患を引き起こすと考えられている (105)。実際、マウスを用いた最近の研究では、乳児期の常在菌による刺激が成体となつてからの炎症性疾患の予防に重要であることが示されている (106)。本研究は、乳児期の MyD88 シグナルが肺組織における CSF1 の発現を制御し、最終的に IgE 抗体の産生を制御していることを明らかにした。MyD88 は細菌を認識する TLR の重要な下流シグナル分子であることから、TLR によって認識された何らかの常在菌が肺の CSF1 発現量を制御し、*S. azizii* 等の異常細菌に対する Th2 応答と、それによる IgE 抗体の産生を制御している可能性がある。したがって上記の結果は、長年の「衛生仮説」を説明する基盤知識となると考えられる。

以上、本研究結果および考察から次の仮説を提唱する (図 13)。健常人においては肺上皮細胞における CSF1 の発現が TLR-MyD88 経路によって調節されている。一方で、肺の共生細菌叢の異常や減少、ウイルス感染による TLR シグナルの脱感作によって、TLR-MyD88 経路が機能低下すると過剰な CSF1 産生が起こる。これにより肺 CSF1⁺ cDC2 が活性化・増殖し、異常に増加した別の共生細菌に対する Th2 型免疫応答が誘導され、また、同じ細菌に応答した B 細胞から IgG1⁺ MBC が形成される。この MBC が Th2 細胞とのコグネートな相互作用により長期間持続的に IgE⁺ SLPC へと分化し、恒常的かつ高度な自然 IgE 抗体産生を引き起こされてアレルギー発症のリスクを高める (図 13)。この仮説を証明するためには、CSF1 産生細胞の同定やウイルスと細菌の共感染実験による IgE 抗体産生の有無、MBC による自然 IgE 抗体の産生維持機構の解明等の、より詳細な研究が必要である。

参考文献

1. Haniuda, K., S. Fukao, T. Kodama, H. Hasegawa, and D. Kitamura. 2016. Autonomous membrane IgE signaling prevents IgE-memory formation. *Nat. Immunol.* 17: 1109–1117.
2. Asai, K., J. Kitaura, Y. Kawakami, N. Yamagata, M. Tsai, D. P. Carbone, F.-T. Liu, S. J. Galli, and T. Kawakami. 2001. Regulation of mast cell survival by IgE. *Immunity* 14: 791–800.
3. Kalesnikoff, J., M. Huber, V. Lam, J. E. Damen, J. Zhang, R. P. Siraganian, and G. Krystal. 2001. Monomeric IgE stimulates signaling pathways in mast cells that lead to cytokine production and cell survival. *Immunity* 14: 801–811.
4. Hill, D. A., M. C. Siracusa, M. C. Abt, B. S. Kim, D. Kobuley, M. Kubo, T. Kambayashi, D. F. Larosa, E. D. Renner, J. S. Orange, F. D. Bushman, and D. Artis. 2012. Commensal bacteria-derived signals regulate basophil hematopoiesis and allergic inflammation. *Nat. Med.* 18: 538–546.
5. Kitaura, J., J. Song, M. Tsai, K. Asai, M. Maeda-Yamamoto, A. Mocsai, Y. Kawakami, F.-T. Liu, C. A. Lowell, B. G. Barisas, S. J. Galli, and T. Kawakami. 2003. Evidence that IgE molecules mediate a spectrum of effects on mast cell survival and activation via aggregation of the FcεRI. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 12911–12916.
6. Msallam, R., J. Balla, A. P. S. Rathore, H. Kared, B. Malleret, W. A. A. Saron, Z. Liu, J. W. Hang, C. A. Dutertre, A. Larbi, J. K. Y. Chan, A. L. St. John, and F. Ginhoux. 2020. Fetal mast cells mediate postnatal allergic responses dependent on maternal IgE. *Science (80-.)*. 370: 941–950.
7. Roth, M., J. Zhong, C. Zumkeller, C. T. S'ng, S. Goulet, and M. Tamm. 2013. The role of IgE-receptors in IgE-dependent airway smooth muscle cell remodelling. *PLoS One* 8: e56015.
8. Redhu, N. S., L. Shan, D. Al-Subait, H. L. Ashdown, H. Movassagh, B. Lamkhioued, and A. S. Gounni. 2013. IgE induces proliferation in human airway smooth muscle cells: role of MAPK and STAT3 pathways. *Allergy, Asthma Clin. Immunol.* 9: 41.
9. Bryce, P. J., M. L. Miller, I. Miyajima, M. Tsai, S. J. Galli, and H. C. Oettgen. 2004. Immune sensitization in the skin is enhanced by antigen-independent effects of IgE. *Immunity* 20: 381–392.
10. Cahenzli, J., Y. Köller, M. Wyss, M. B. Geuking, and K. D. McCoy. 2013. Intestinal microbial diversity during early-life colonization shapes long-term IgE levels. *Cell Host Microbe* 14: 559–570.

11. Sears, M. R., B. Burrows, E. M. Flannery, G. P. Herbison, C. J. Hewitt, and M. D. Holdaway. 1991. Relation between airway responsiveness and serum IgE in children with asthma and in apparently normal children. *N. Engl. J. Med.* 325: 1067–1071.
12. Sunyer, J., and A. Muñoz. 1996. Concentrations of methacholine for bronchial responsiveness according to symptoms, smoking and immunoglobulin E in a population-based study in Spain. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153: 1273–1279.
13. Peat, J. K., B. G. Toelle, J. Dermand, R. Berg, W. J. Britton, and A. J. Woolcock. 1996. Serum IgE levels, atopy, and asthma in young adults: results from a longitudinal cohort study. *Allergy* 51: 804–810.
14. Satwani, H., A. Rehman, S. Ashraf, and A. Hassan. 2009. Is serum total IgE levels a good predictor of allergies in children? *J. Pak. Med. Assoc.* 59: 698–702.
15. Vaneckova, J., and J. Bukač. 2016. The severity of atopic dermatitis and the relation to the level of total IgE, onset of atopic dermatitis and family history about atopy. *Food Agric. Immunol.* 27: 734–741.
16. Asrat, S., N. Kaur, X. Liu, L.-H. Ben, D. Kajimura, A. J. Murphy, M. A. Sleeman, A. Limnander, and J. M. Orengo. 2020. Chronic allergen exposure drives accumulation of long-lived IgE plasma cells in the bone marrow, giving rise to serological memory. *Sci. Immunol.* 5: eaav8402.
17. He, J.-S., S. Subramaniam, V. Narang, K. Srinivasan, S. P. Saunders, D. Carbajo, T. Wen-Shan, N. Hidayah Hamadee, J. Lum, A. Lee, J. Chen, M. Poidinger, F. Zolezzi, J. J. Lafaille, and M. A. Curotto de Lafaille. 2017. IgG1 memory B cells keep the memory of IgE responses. *Nat. Commun.* 8: 641.
18. Looney, T. J., J. Y. Lee, K. M. Roskin, R. A. Hoh, J. King, J. Glanville, Y. Liu, T. D. Pham, C. L. Dekker, M. M. Davis, and S. D. Boyd. 2016. Human B-cell isotype switching origins of IgE. *J. Allergy Clin. Immunol.* 137: 579-586.e7.
19. Hong, S.-W., E. O, J. Y. Lee, M. Lee, D. Han, H.-J. Ko, J. Sprent, C. D. Surh, and K. S. Kim. 2019. Food antigens drive spontaneous IgE elevation in the absence of commensal microbiota. *Sci. Adv.* 5: eaaw1507.
20. Snapper, C. M., F. D. Finkelman, and W. E. Paul. 1988. Regulation of IgG1 and IgE production by Interleukin 4. *Immunol. Rev.* 102: 51–75.
21. Bao, K., and R. L. Reinhardt. 2015. The differential expression of IL-4 and IL-13 and its impact on type-2 immunity. *Cytokine* 75: 25–37.

22. Roco, J. A., L. Mesin, S. C. Binder, C. Nefzger, P. Gonzalez-Figueroa, P. F. Canete, J. Ellyard, Q. Shen, P. A. Robert, J. Cappello, H. Vohra, Y. Zhang, C. R. Nowosad, A. Schiepers, L. M. Corcoran, K.-M. Toellner, J. M. Polo, M. Meyer-Hermann, G. D. Victora, and C. G. Vinuesa. 2019. Class-switch recombination occurs infrequently in germinal centers. *Immunity* 51: 337-350.e7.
23. Yang, Z., B. M. Sullivan, and C. D. C. Allen. 2012. Fluorescent in vivo detection reveals that IgE⁺ B cells are restrained by an intrinsic cell fate predisposition. *Immunity* 36: 857–872.
24. Kurosaki, T., K. Kometani, and W. Ise. 2015. Memory B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15: 149–159.
25. Yang, Z., M. J. Robinson, X. Chen, G. A. Smith, J. Taunton, W. Liu, and C. D. C. Allen. 2016. Regulation of B cell fate by chronic activity of the IgE B cell receptor. *Elife* 5: e21238.
26. Newman, R., and P. Tolar. 2021. Chronic calcium signaling in IgE⁺ B cells limits plasma cell differentiation and survival. *Immunity* 54: 2756-2771.e10.
27. Yang, Z., C.-A. M. Wu, S. Targ, and C. D. C. Allen. 2020. IL-21 is a broad negative regulator of IgE class switch recombination in mouse and human B cells. *J. Exp. Med.* 217: e20190472.
28. Schnare, M., G. M. Barton, A. C. Holt, K. Takeda, S. Akira, and R. Medzhitov. 2001. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 2: 947–950.
29. Gavin, A. L., K. Hoebe, B. Duong, T. Ota, C. Martin, B. Beutler, and D. Nemazee. 2006. Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of Toll-like receptor signaling. *Science* (80-.). 314: 1936–1938.
30. Lim, J., E. V. Lin, J. Y. Hong, B. Vaidyanathan, S. A. Erickson, C. Annicelli, and R. Medzhitov. 2022. Induction of natural IgE by glucocorticoids. *J. Exp. Med.* 219: e20220903.
31. Adachi, O., T. Kawai, K. Takeda, M. Matsumoto, H. Tsutsui, M. Sakagami, K. Nakanishi, and S. Akira. 1998. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 9: 143–150.
32. Schroeder, P., M. Rivalan, S. Zaqout, C. Krüger, J. Schüler, M. Long, A. Meisel, Y. Winter, A. M. Kaindl, and S. Lehnardt. 2020. Abnormal brain structure and behavior in MyD88-deficient mice. *Brain. Behav. Immun.* .
33. Kawai, T., O. Adachi, T. Ogawa, K. Takeda, and S. Akira. 1999. Unresponsiveness of MyD88-Deficient Mice to Endotoxin. *Immunity* 11: 115–122.

34. Shen, Y., I. Kawamura, T. Nomura, K. Tsuchiya, H. Hara, S. R. Dewamitta, S. Sakai, H. Qu, S. Daim, T. Yamamoto, and M. Mitsuyama. 2010. Toll-Like Receptor 2- and MyD88-Dependent Phosphatidylinositol 3-Kinase and Rac1 Activation Facilitates the Phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by Murine Macrophages. *Infect. Immun.* 78: 2857–2867.
35. Kaisho, T., K. Hoshino, T. Iwabe, O. Takeuchi, T. Yasui, and S. Akira. 2002. Endotoxin can induce MyD88-deficient dendritic cells to support Th2 cell differentiation. *Int. Immunol.* 14: 695–700.
36. Chang, J., P. R. Burkett, C. M. Borges, V. K. Kuchroo, L. A. Turka, and C.-H. Chang. 2013. MyD88 is essential to sustain mTOR activation necessary to promote T helper 17 cell proliferation by linking IL-1 and IL-23 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110: 2270–5.
37. Vaishnava, S., M. Yamamoto, K. M. Severson, K. A. Ruhn, X. Yu, O. Koren, R. Ley, E. K. Wakeland, and L. V. Hooper. 2011. The antibacterial lectin RegIII γ promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science (80-.).* 334: 255–258.
38. Hammad, H., M. Chieppa, F. Perros, M. A. Willart, R. N. Germain, and B. N. Lambrecht. 2009. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat. Med.* 15: 410–416.
39. Willart, M. A. M., K. Deswarte, P. Pouliot, H. Braun, R. Beyaert, B. N. Lambrecht, and H. Hammad. 2012. Interleukin-1 α controls allergic sensitization to inhaled house dust mite via the epithelial release of GM-CSF and IL-33. *J. Exp. Med.* 209: 1505–1517.
40. Zeng, M. Y., D. Cisalpino, S. Varadarajan, J. Hellman, H. S. Warren, M. Cascalho, N. Inohara, and G. Núñez. 2016. Gut Microbiota-Induced Immunoglobulin G Controls Systemic Infection by Symbiotic Bacteria and Pathogens. *Immunity* 44: 647–658.
41. Koch, M. A., G. L. Reiner, K. A. Lugo, L. S. M. Kreuk, A. G. Stanbery, E. Ansaldo, T. D. Seher, W. B. Ludington, and G. M. Barton. 2016. Maternal IgG and IgA Antibodies Dampen Mucosal T Helper Cell Responses in Early Life. *Cell* 165: 827–841.
42. Fukao, S., K. Haniuda, H. Tamaki, and D. Kitamura. 2021. Protein kinase C δ is essential for the IgG response against T-cell-independent type 2 antigens and commensal bacteria. *Elife* 10: e72116.
43. Wypych, T. P., L. C. Wickramasinghe, and B. J. Marsland. 2019. The influence of the microbiome on respiratory health. *Nat. Immunol.* 20: 1279–1290.
44. Sugawara, I., H. Yamada, S. Mizuno, K. Takeda, and S. Akira. 2003. Mycobacterial Infection in MyD88-Deficient Mice. *Microbiol. Immunol.* 47: 841–847.

45. Naiki, Y., K. S. Michelsen, N. W. J. Schröder ‡, R. Alsabeh, A. Slepchenko, W. Zhang, S. Chen, B. Wei, Y. Bulut, M. H. Wong, E. M. Peterson, and M. Arditì. 2005. MyD88 Is Pivotal for the Early Inflammatory Response and Subsequent Bacterial Clearance and Survival in a Mouse Model of Chlamydia pneumoniae Pneumonia*. *J. Biol. Chem.* 280: 29242–29249.
46. Chen, L., L. Lei, X. Chang, Z. Li, C. Lu, X. Zhang, Y. Wu, I.-T. Yeh, and G. Zhong. 2010. Mice Deficient in MyD88 Develop a Th2-Dominant Response and Severe Pathology in the Upper Genital Tract following Chlamydia muridarum Infection. *J. Immunol.* 184: 2602–2610.
47. Hanke, M. L., A. Angle, and T. Kielian. 2012. MyD88-Dependent Signaling Influences Fibrosis and Alternative Macrophage Activation during Staphylococcus aureus Biofilm Infection. *PLoS One* 7: e42476.
48. Zhu, J., D. Jankovic, A. J. Oler, G. Wei, S. Sharma, G. Hu, L. Guo, R. Yagi, H. Yamane, G. Punkosdy, L. Feigenbaum, K. Zhao, and W. E. Paul. 2012. The transcription factor T-bet is induced by multiple pathways and prevents an endogenous Th2 cell program during Th1 cell responses. *Immunity* 37: 660–673.
49. Zheng, W., and R. A. Flavell. 1997. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89: 587–596.
50. Jankovic, D., M. C. Kullberg, S. Hieny, P. Caspar, C. M. Collazo, and A. Sher. 2002. In the absence of IL-12, CD4+ T Cell responses to intracellular pathogens fail to default to a Th2 pattern and are host protective in an IL-10^{-/-} setting. *Immunity* 16: 429–439.
51. Bettelli, E., M. Pagany, H. L. Weiner, C. Linington, R. A. Sobel, and V. K. Kuchroo. 2003. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J. Exp. Med.* 197: 1073–1081.
52. Wang, X., S. Asami, and D. Kitamura. 2021. A novel cancer immunotherapy using tumor-infiltrating B cells in the APC^{min/+} mouse model. *PLoS One* 16: e0245608.
53. Fukao, S., K. Haniuda, T. Nojima, T. Takai, and D. Kitamura. 2014. gp49B-mediated negative regulation of antibody production by memory and marginal zone B cells. *J. Immunol.* 193: 635–644.
54. Tashiro, Y., A. Murakami, R. Goizuka, T. Shimizu, H. Kishimoto, and T. Azuma. 2015. An asymmetric antibody repertoire is shaped between plasmablasts and plasma cells after secondary immunization with (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl chicken γ -globulin. *Int. Immunol.* 27: 609–620.
55. Tiller, T., C. E. Busse, and H. Wardemann. 2009. Cloning and expression of murine Ig

- genes from single B cells. *J. Immunol. Methods* 350: 183–193.
56. Nojima, T., K. Haniuda, T. Moutai, M. Matsudaira, S. Mizokawa, I. Shiratori, T. Azuma, and D. Kitamura. 2011. In-vitro derived germinal centre B cells differentially generate memory B or plasma cells in vivo. *Nat. Commun.* 2: 465.
57. Chen, Q., and Y. Liu. 2021. Isolation and culture of mouse alveolar type II cells to study type II to type I cell differentiation. *STAR Protoc.* 2: 100241.
58. Sinha, M., and C. Lowell. 2016. Isolation of highly pure primary mouse alveolar epithelial type II cells by flow cytometric cell sorting. *Bio-protocol* 6: e2013.
59. Turner, S., K. M. Pryer, V. P. W. Miao, and J. D. Palmer. 1999. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46: 327–338.
60. Shichino, S., S. Ueha, S. Hashimoto, M. Otsuji, J. Abe, T. Tsukui, S. Deshimaru, T. Nakajima, M. Kosugi-Kanaya, F. H. W. Shand, Y. Inagaki, H. Shimano, and K. Matsushima. 2019. Transcriptome network analysis identifies protective role of the LXR/SREBP-1c axis in murine pulmonary fibrosis. *JCI Insight* 4: e122163.
61. Martin, M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 17: 10–12.
62. Schmieder, R., and R. Edwards. 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27: 863–864.
63. Bolotin, D. A., S. Poslavsky, I. Mitrophanov, M. Shugay, I. Z. Mamedov, E. V Putintseva, and D. M. Chudakov. 2015. MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling. *Nat. Methods* 12: 380–381.
64. Van Valen, D. A., T. Kudo, K. M. Lane, D. N. Macklin, N. T. Quach, M. M. DeFelice, I. Maayan, Y. Tanouchi, E. A. Ashley, and M. W. Covert. 2016. Deep learning automates the quantitative analysis of individual cells in live-cell imaging experiments. *PLOS Comput. Biol.* 12: e1005177.
65. Tsunoda, M., H. Aoki, H. Shimizu, S. Shichino, K. Matsushima, and S. Ueha. 2021. Proportional tumor infiltration of T cells via circulation duplicates the T cell receptor repertoire in a bilateral tumor mouse model. *Front. Immunol.* 12: 1–12.
66. Tellier, J., W. Shi, M. Minnich, Y. Liao, S. Crawford, G. K. Smyth, A. Kallies, M. Busslinger, and S. L. Nutt. 2016. Blimp-1 controls plasma cell function through the regulation of immunoglobulin secretion and the unfolded protein response. *Nat. Immunol.* 17: 323–330.

67. Neubert, K., S. Meister, K. Moser, F. Weisel, D. Maseda, K. Amann, C. Wiethe, T. H. Winkler, J. R. Kalden, R. A. Manz, and R. E. Voll. 2008. The proteasome inhibitor bortezomib depletes plasma cells and protects mice with lupus-like disease from nephritis. *Nat. Med.* 14: 748–755.
68. DiLillo, D. J., Y. Hamaguchi, Y. Ueda, K. Yang, J. Uchida, K. M. Haas, G. Kelsoe, and T. F. Tedder. 2008. Maintenance of long-lived plasma cells and serological memory despite mature and memory B cell depletion during CD20 immunotherapy in mice. *J. Immunol.* 180: 361–371.
69. Abdel-Gadir, A., E. Stephen-Victor, G. K. Gerber, M. Noval Rivas, S. Wang, H. Harb, L. Wang, N. Li, E. Crestani, S. Spielman, W. Secor, H. Biehl, N. DiBenedetto, X. Dong, D. T. Umetsu, L. Bry, R. Rachid, and T. A. Chatila. 2019. Microbiota therapy acts via a regulatory T cell MyD88/ROR γ t pathway to suppress food allergy. *Nat. Med.* 25: 1164–1174.
70. Vaishnava, S., M. Yamamoto, K. M. Severson, K. A. Ruhn, X. Yu, O. Koren, R. Ley, E. K. Wakeland, and L. V. Hooper. 2011. The antibacterial lectin RegIII γ promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science (80-.)*. 334: 255–258.
71. Hammad, H., and B. N. Lambrecht. 2008. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 193–204.
72. Moon, H.-G., S. Kim, J. J. Jeong, S.-S. Han, N. N. Jarjour, H. Lee, S. L. Abboud-Werner, S. Chung, H. S. Choi, V. Natarajan, S. J. Ackerman, J. W. Christman, and G. Y. Park. 2018. Airway epithelial cell-derived colony stimulating factor-1 promotes allergen sensitization. *Immunity* 49: 275-287.e5.
73. Hammad, H., M. Chieppa, F. Perros, M. A. Willart, R. N. Germain, and B. N. Lambrecht. 2009. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat. Med.* 15: 410–416.
74. Schmitz, J., A. Owyang, E. Oldham, Y. Song, E. Murphy, T. K. McClanahan, G. Zurawski, M. Moshrefi, J. Qin, X. Li, D. M. Gorman, J. F. Bazan, and R. A. Kastelein. 2005. IL-33, an Interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 23: 479–490.
75. Schneider, C., C. Shen, A. A. Gopal, T. Douglas, B. Forestell, K. D. Kauffman, D. Rogers, P. Artusa, Q. Zhang, H. Jing, A. F. Freeman, D. L. Barber, I. L. King, M. Saleh, P. W. Wiseman, H. C. Su, and J. N. Mandl. 2020. Migration-induced cell shattering due to DOCK8 deficiency causes a type 2–biased helper T cell response. *Nat. Immunol.* 21: 1528–1539.

76. Braden, G. C., R. R. Arbona, M. Lepherd, S. Monette, A. Toma, J. G. Fox, F. E. Dewhirst, and N. S. Lipman. 2015. A novel α -hemolytic streptococcus species (*Streptococcus azizii* sp. nov.) associated with meningoenkephalitis in naïve weanling C57BL/6 mice. *Comp. Med.* 65: 186–195.
77. Bernuth, H. von, C. Picard, Z. Jin, R. Pankla, H. Xiao, C.-L. Ku, M. Chrabieh, I. Ben Mustapha, P. Ghandil, Y. Camcioglu, J. Vasconcelos, N. Sirvent, M. Guedes, A. B. Vitor, M. J. Herrero-Mata, J. I. Aróstegui, C. Rodrigo, L. Alsina, E. Ruiz-Ortiz, M. Juan, C. Fortuny, J. Yagüe, J. Antón, M. Pascal, H.-H. Chang, L. Janniere, Y. Rose, B.-Z. Garty, H. Chapel, A. Issekutz, L. Maródi, C. Rodriguez-Gallego, J. Banchereau, L. Abel, X. Li, D. Chaussabel, A. Puel, and J.-L. Casanova. 2008. Pyogenic Bacterial Infections in Humans with MyD88 Deficiency. *Science* (80-.). 321: 691–696.
78. Dudek, M., F. Puttur, C. Arnold-Schrauf, A. A. Köhl, B. Holzmann, B. Henriques-Normark, L. Berod, and T. Sparwasser. 2016. Lung epithelium and myeloid cells cooperate to clear acute pneumococcal infection. *Mucosal Immunol.* 9: 1288–1302.
79. Linch, S. N., A. M. Kelly, E. T. Danielson, R. Pero, J. J. Lee, and J. A. Gold. 2009. Mouse eosinophils possess potent antibacterial properties in vivo. *Infect. Immun.* 77: 4976–4982.
80. Arnold, I. C., M. Artola-Borán, P. Tallón de Lara, A. Kyburz, C. Taube, K. Ottemann, M. van den Broek, S. Yousefi, H.-U. Simon, and A. Müller. 2018. Eosinophils suppress Th1 responses and restrict bacterially induced gastrointestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 215: 2055–2072.
81. Basil, M. C., J. Katzen, A. E. Engler, M. Guo, M. J. Herriges, J. J. Kathiriya, R. Windmueller, A. B. Ysasi, W. J. Zacharias, H. A. Chapman, D. N. Kotton, J. R. Rock, H.-W. Snoeck, G. Vunjak-Novakovic, J. A. Whitsett, and E. E. Morrisey. 2020. The cellular and physiological basis for lung repair and regeneration: past, present, and future. *Cell Stem Cell* 26: 482–502.
82. Yoshida, H., S.-I. Hayashi, T. Kunisada, M. Ogawa, S. Nishikawa, H. Okamura, T. Sudo, L. D. Shultz, and S.-I. Nishikawa. 1990. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 345: 442–444.
83. Greene, C. M., T. P. Carroll, S. G. J. Smith, C. C. Taggart, J. Devaney, S. Griffin, S. J. O’Neill, and N. G. McElvaney. 2005. TLR-induced inflammation in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis airway epithelial cells. *J. Immunol.* 174: 1638–1646.
84. Muir, A., G. Soong, S. Sokol, B. Reddy, M. I. Gomez, A. van Heeckeren, and A. Prince. 2004. Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am. J. Respir.*

Cell Mol. Biol. 30: 777–783.

85. Sha, Q., A. Q. Truong-Tran, J. R. Plitt, L. A. Beck, and R. P. Schleimer. 2004. Activation of airway epithelial cells by Toll-like receptor agonists. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 31: 358–364.

86. Yildiz, S., J. P. Pereira Bonifacio Lopes, M. Bergé, V. González-Ruiz, D. Baud, J. Kloehn, I. Boal-Carvalho, O. P. Schaeren, M. Schotsaert, L. J. Hathaway, S. Rudaz, P. H. Viollier, S. Hapfelmeier, P. Francois, and M. Schmolke. 2020. Respiratory tissue-associated commensal bacteria offer therapeutic potential against pneumococcal colonization. *Elife* 9: e53581.

87. Ju, N., H. Hayashi, M. Shimamura, S. Baba, S. Yoshida, R. Morishita, H. Rakugi, and H. Nakagami. 2022. Prevention of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by a RANKL peptide in mice. *Sci. Rep.* 12: 12474.

88. Wright, W. R., N. S. Kirkby, N. A. Galloway-Phillipps, D. M. Reed, M. J. Paul-Clark, and J. A. Mitchell. 2013. Cyclooxygenase and cytokine regulation in lung fibroblasts activated with viral versus bacterial pathogen associated molecular patterns. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 107: 4–12.

89. Satriano, J. A., K. Hora, Z. Shan, E. R. Stanley, T. Mori, and D. Schlondorff. 1993. Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage colony-stimulating factor-1 by IFN-gamma, tumor necrosis factor-alpha, IgG aggregates, and cAMP in mouse mesangial cells. *J. Immunol.* 150: 1971–1978.

90. Fukata, M., A. Chen, A. Klepper, S. Krishnareddy, A. S. Vamadevan, L. S. Thomas, R. Xu, H. Inoue, M. Arditi, A. J. Dannenberg, and M. T. Abreu. 2006. Cox-2 Is Regulated by Toll-Like Receptor-4 (TLR4) Signaling: Role in Proliferation and Apoptosis in the Intestine. *Gastroenterology* 131: 862–877.

91. Lee, J. Y., K. H. Sohn, S. H. Rhee, and D. Hwang. 2001. Saturated Fatty Acids, but Not Unsaturated Fatty Acids, Induce the Expression of Cyclooxygenase-2 Mediated through Toll-like Receptor 4. *J. Biol. Chem.* 276: 16683–16689.

92. Jimenez, R., E. Belcher, S. Sriskandan, R. Lucas, S. McMaster, I. Vojnovic, T. D. Warner, and J. A. Mitchell. 2005. Role of Toll-like receptors 2 and 4 in the induction of cyclooxygenase-2 in vascular smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102: 4637–4642.

93. Schmidt, L. M., M. G. Belvisi, K. A. Bode, J. Bauer, C. Schmidt, M.-T. Suchy, D. Tsikas, J. Scheuerer, F. Lasitschka, H.-J. Gröne, and A. H. Dalpke. 2011. Bronchial Epithelial Cell-Derived Prostaglandin E2 Dampens the Reactivity of Dendritic Cells. *J. Immunol.* 186: 2095–

2105.

94. Neubert, N. J., M. Schmittnaegel, N. Bordry, S. Nassiri, N. Wald, C. Martignier, L. Tillé, K. Homicsko, W. Damsky, H. Maby-El Hajjami, I. Klaman, E. Danenberg, K. Ioannidou, L. Kandalaft, G. Coukos, S. Hoves, C. H. Ries, S. A. Fuertes Marraco, P. G. Foukas, M. De Palma, and D. E. Speiser. 2018. T cell-induced CSF1 promotes melanoma resistance to PD1 blockade. *Sci. Transl. Med.* 10.
95. LeibundGut-Landmann, S., O. Groß, M. J. Robinson, F. Osorio, E. C. Slack, S. V. Tsoni, E. Schweighoffer, V. Tybulewicz, G. D. Brown, J. Ruland, and C. Reis e Sousa. 2007. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat. Immunol.* 8: 630–638.
96. Yonekawa, A., S. Saijo, Y. Hoshino, Y. Miyake, E. Ishikawa, M. Suzukawa, H. Inoue, M. Tanaka, M. Yoneyama, M. Oh-hora, K. Akashi, and S. Yamasaki. 2014. Dectin-2 Is a Direct Receptor for Mannose-Capped Lipoarabinomannan of Mycobacteria. *Immunity* 41: 402–413.
97. Kim, Y.-G., J.-H. Park, M. H. Shaw, L. Franchi, N. Inohara, and G. Núñez. 2008. The Cytosolic Sensors Nod1 and Nod2 Are Critical for Bacterial Recognition and Host Defense after Exposure to Toll-like Receptor Ligands. *Immunity* 28: 246–257.
98. Park, J.-H., Y.-G. Kim, C. McDonald, T.-D. Kanneganti, M. Hasegawa, M. Body-Malapel, N. Inohara, and G. Núñez. 2007. RICK/RIP2 Mediates Innate Immune Responses Induced through Nod1 and Nod2 but Not TLRs. *J. Immunol.* 178: 2380–2386.
99. Tussiwand, R., B. Everts, G. E. Grajales-Reyes, N. M. Kretzer, A. Iwata, J. Bagaitkar, X. Wu, R. Wong, D. A. Anderson, T. L. Murphy, E. J. Pearce, and K. M. Murphy. 2015. Klf4 expression in conventional dendritic cells is required for T helper 2 cell responses. *Immunity* 42: 916–928.
100. Ginhoux, F., K. Liu, J. Helft, M. Bogunovic, M. Greter, D. Hashimoto, J. Price, N. Yin, J. Bromberg, S. A. Lira, E. R. Stanley, M. Nussenzweig, and M. Merad. 2009. The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *J. Exp. Med.* 206: 3115–3130.
101. Bosch, A. A. T. M., G. Biesbroek, K. Trzcinski, E. A. M. Sanders, and D. Bogaert. 2013. Viral and bacterial interactions in the upper respiratory tract. *PLoS Pathog.* 9: e1003057.
102. Didierlaurent, A., J. Goulding, S. Patel, R. Snelgrove, L. Low, M. Bebien, T. Lawrence, L. S. van Rijt, B. N. Lambrecht, J.-C. Sirard, and T. Hussell. 2008. Sustained desensitization to bacterial Toll-like receptor ligands after resolution of respiratory influenza infection. *J. Exp. Med.* 205: 323–329.
103. Shang, J., Y. Zheng, J. Mo, W. Wang, Z. Luo, Y. Li, X. Chen, Q. Zhang, K. Wu, W. Liu,

and J. Wu. 2021. Sox4 represses host innate immunity to facilitate pathogen infection by hijacking the TLR signaling networks. *Virulence* 12: 704–722.

104. Teo, S. M., D. Mok, K. Pham, M. Kusel, M. Serralha, N. Troy, B. J. Holt, B. J. Hales, M. L. Walker, E. Hollams, Y. A. Bochkov, K. Grindle, S. L. Johnston, J. E. Gern, P. D. Sly, P. G. Holt, K. E. Holt, and M. Inouye. 2015. The infant nasopharyngeal microbiome impacts severity of lower respiratory infection and risk of asthma development. *Cell Host Microbe* 17: 704–715.

105. von Hertzen, L., I. Hanski, and T. Haahtela. 2011. Natural immunity. *EMBO Rep.* 12: 1089–1093.

106. Al Nabhani, Z., S. Dulauroy, R. Marques, C. Cousu, S. Al Bounny, F. Déjardin, T. Sparwasser, M. Bérard, N. Cerf-Bensussan, and G. Eberl. 2019. A weaning reaction to microbiota is required for resistance to immunopathologies in the adult. *Immunity* 50: 1276-1288.e5.

図表

図 1 アレルギー発症における IgE 抗体の役割

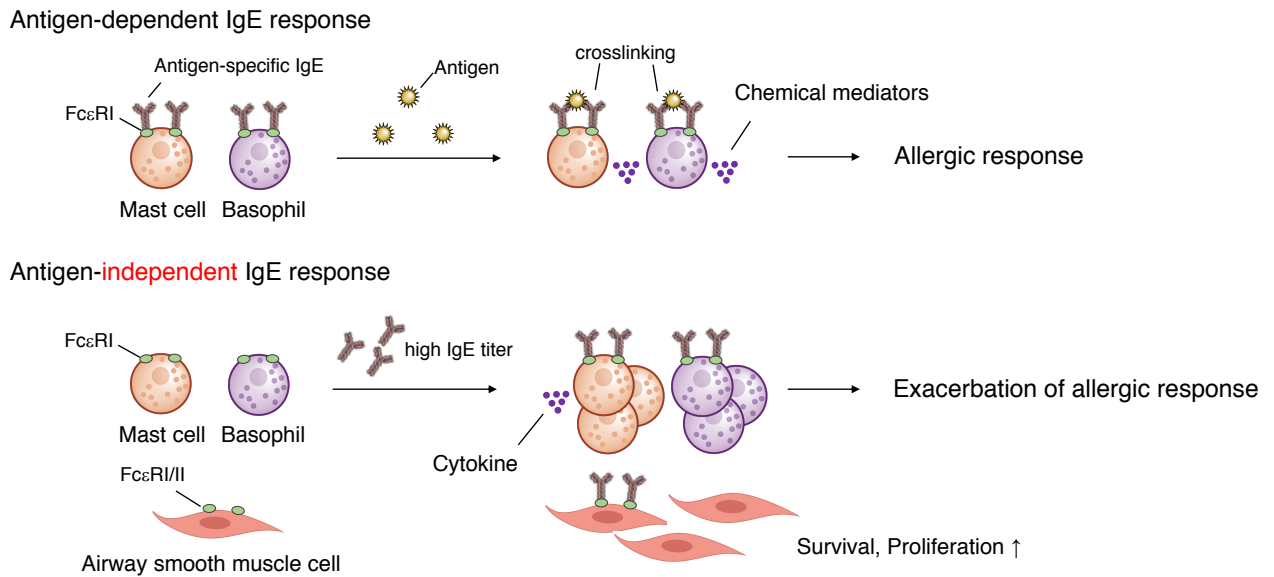


図 2 B 細胞応答とメモリー細胞の形成

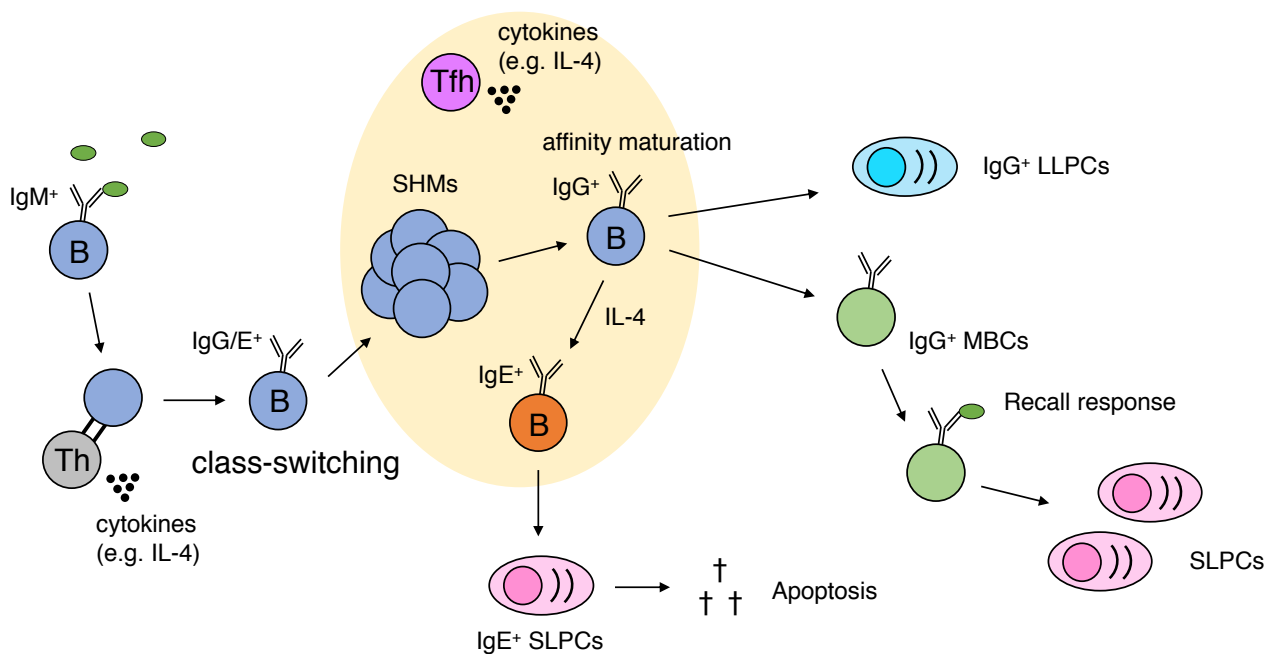
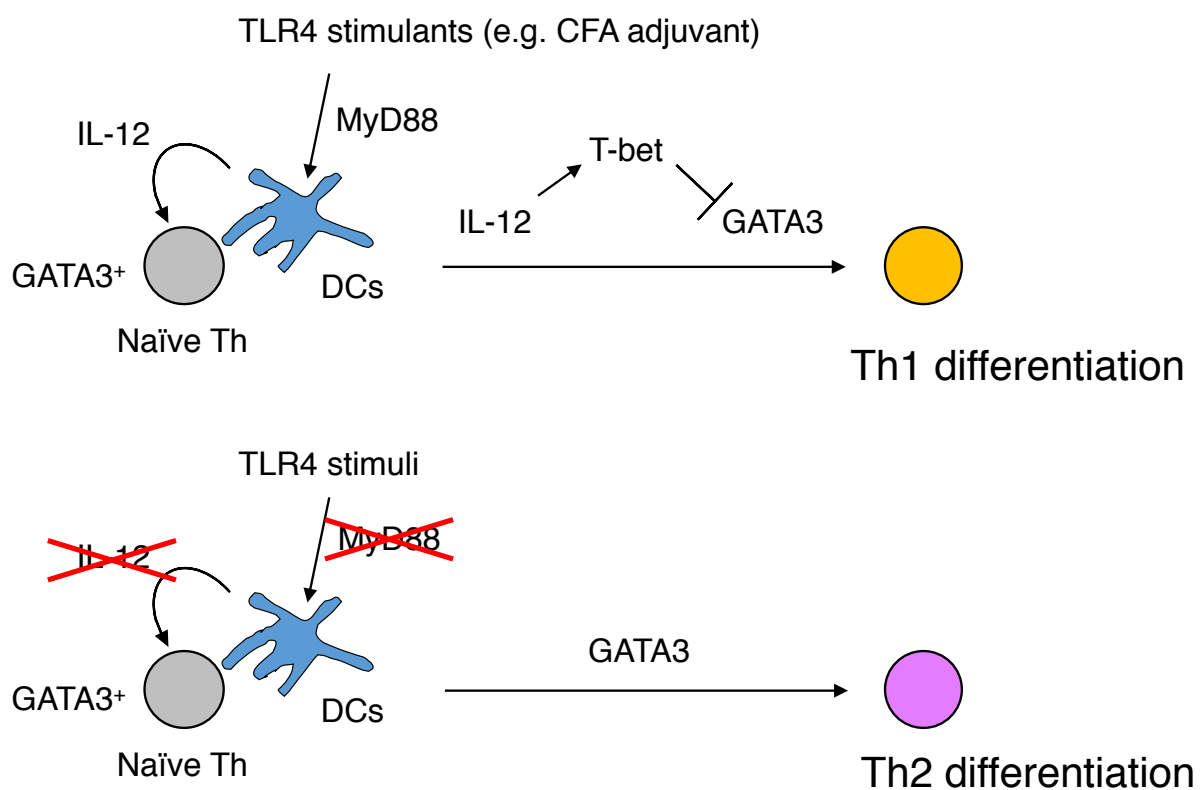
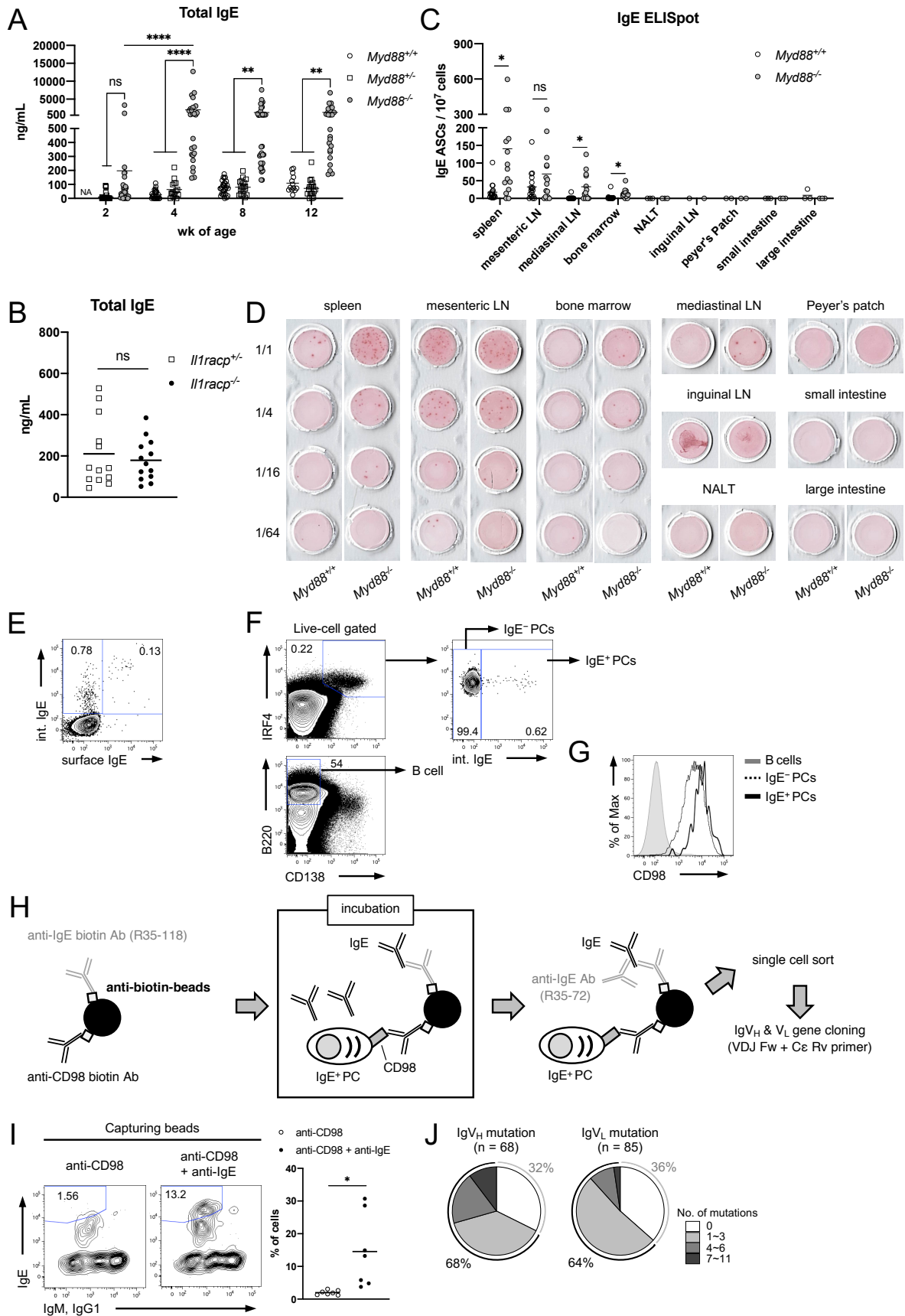


図3 先行研究から提唱される、MyD88欠損によるIgE抗体産生メカニズム

By default Th2 differentiation hypothesis



4



K

				<-----FR1-IMGT-----><-----CDR1-IM	
	Query_1	77		Q V Q L Q Q S G T E L A R P G A S V K L S C K A S G Y T F T	166
V 97.3%	(286/294)	IGHV1-81*01	1	CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCACTGAGCTGGCGAGGCTGGGGCTCAGTGAAGCTGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTCACA	90
			T.....AG.....	90
V 91.2%	(268/294)	IGHV1-85*01	1	Q V Q L Q Q S G A E L A R P G A S V K L S C K A S G Y T F T	90
V 89.8%	(264/294)	IGHV1-77*01	1T.....AC.....T..A.....T.....	90
			C.....A.....AG.....T..A.....A.A.....T	90
				GT-----><-----FR2-IMGT-----><-----CDR2-IMGT-----><-----	
	Query_1	167		S Y G I S W V K Q R T G Q G L E W I G E I F P R N S N T Y Y	256
V 97.3%	(286/294)	IGHV1-81*01	91	AGCTATGGTATAAGCTGGTGAAGCAGAGAAGCTGGACAGGCGCTTGAATGGATTGGAGAGATTTTCTAGAAATAGTAATACTACTACTAC	180
			G.....G.....	180
				S Y G I S W V K Q R T G Q G L E W I G E I Y P R S G N T Y Y	180
V 91.2%	(268/294)	IGHV1-85*01	91C.A.....A.....GC.....A.....G.....TG.....A.....G.G.....A.G.....	180
V 89.8%	(264/294)	IGHV1-77*01	91	GA...CTA...A.....GC.....G.....A.....GG...G...G.G...G.....	180
				-----FR3-IMGT-----	
	Query_1	257		N E K F K G K A T L T A D K S S S T A Y M E L R S L T S E D	346
V 97.3%	(286/294)	IGHV1-81*01	181	AATGAGAAGTTCAGGGCAAGGCCACTGACTGCAGACAAATCTCCAGCACAGCGTACATGGAGCTCCGACGCTGCATCTGAGGAC	270
			T.....T.....C.....	270
V 91.2%	(268/294)	IGHV1-85*01	181	N E K F K G K A T L T A D K S S S T A Y M E L R S L T S E D	270
V 89.8%	(264/294)	IGHV1-77*01	181C.....C.....A.....	270
				-----><-----CDR3-IMGT-----><-----FR4-IMGT-----><-----	
	Query_1	347		S A V Y F C A R K D G Y Y V G Y Y A M D Y W G Q G T S V T V	436
V 97.3%	(286/294)	IGHV1-81*01	271	TCTGCGGTCTATTTCTGTGCACGAAAAGATGGTACTACGTGGGTACTATGCTATGGACTACTGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTC	294
			A.....	294
				S A V Y F C A R	294
V 91.2%	(268/294)	IGHV1-85*01	271A.....	294
V 89.8%	(264/294)	IGHV1-77*01	271A.....	294
D 100.0%	(12/12)	IGHD2-3*01	6	17
D 90.9%	(10/11)	IGHD2-1*01	7A.....	17
D 90.9%	(10/11)	IGHD2-10*01	7A.....	17
J 100.0%	(52/52)	IGHJ4*01	3	47
J 87.5%	(35/40)	IGHJ2*02	9C.....C.....TC.....A...	41
J 85.0%	(34/40)	IGHJ2*01	9C.....C.....A.TC.....A...	41
				----->	
				S S	
J 100.0%	(52/52)	IGHJ4*01	437	TCCTCAG 443	
J 87.5%	(35/40)	IGHJ2*02	48 54	
J 85.0%	(34/40)	IGHJ2*01	42 48	

L

				<-----FR1-IMGT-----><-----CDR1-IM	
	Query_1	80		D I L L T Q S P A I L S V S P G E R V S L S C R A S Q S I G	169
V 98.6%	(281/285)	IGKV5-48*01	1	GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGCCATCTCTGTGTGACCCAGGAGAAAGAGTCACTCTCTCTGCGAGCCAGTCAGACATTTGGC	90
			T.....	90
V 85.6%	(243/284)	IGKV5-45*01	1	D I L L T Q S P A I L S V S P G E R V S F S C R A S Q S I G	90
V 85.2%	(242/284)	IGKV5-43*01	1	..T.TG...A.....C.....C.....T.....T.....A.T...A...	90
				..T.TG...A.....C.....C.....T.....T.....C.A.T...A...	90
				GT-----><-----FR2-IMGT-----><-----CDR2-IM-----><-----	
	Query_1	170		T T I H W Y Q Q R T N G S P R L L I K Y A S E S L S G I P S	259
V 98.6%	(281/285)	IGKV5-48*01	91	ACAACCATACACTGGTATCAGCAAAGAACAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTCTGAGTCTCTCTCTGGATCCCTTCC	180
			G.....A.....	180
				T S I H W Y Q Q R T N G S P R L L I K Y A S E S I S G I P S	180
V 85.6%	(243/284)	IGKV5-45*01	91	.ACTA.C.....A...A.T...C...AG.....C.....CC...CA.....C...	180
V 85.2%	(242/284)	IGKV5-43*01	91	.AC.A.C.....A...A.T...C...AG.....C.....CC...CA.....C...	180
				-----FR3-IMGT-----	
	Query_1	260		R F S G S G S G T D F T L S I N S V E S E D V A D Y Y C Q Q	349
V 98.6%	(281/285)	IGKV5-48*01	181	AGGTTTAGTGCCAGTGGATCAGGACAGATTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGAGTCTGAAGATGTTGAGATATTAATCTGTCAACAA	270
			A.....	270
				R F S G S G S G T D F T L S I N S V E S E D I A D Y Y C Q Q	270
V 85.6%	(243/284)	IGKV5-45*01	181C.....C.....T.....A.....T...G.ATG...T.....G	270
V 85.2%	(242/284)	IGKV5-43*01	181C.....C.....T.....A.....T...G.ATG...T.....G	270
				---CDR3-IMGT-----><-----FR4-IMGT-----><-----	
	Query_1	350		S N S W P Y T F G G G T K L E I	399
V 98.6%	(281/285)	IGKV5-48*01	271	AGTAATAGCTGGCCATACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAA	285
				285
				S N S W P	284
V 85.6%	(243/284)	IGKV5-45*01	271C.....	284
V 85.2%	(242/284)	IGKV5-43*01	271C.....	284
J 100.0%	(35/35)	IGKJ2*01	3	37
J 93.8%	(30/32)	IGKJ2*03	6TC.....	37
J 93.1%	(27/29)	IGKJ2*02	6TC.....	34

(A-J: Amano et. al., 2023, *The Journal of Immunology* より引用)

図4 MyD88 欠損マウスにおける自然 IgE および IgE⁺PC の特性評価

(A) 未免疫の *Myd88*^{+/+}, *Myd88*^{+/-} および *Myd88*^{-/-} マウスの週齢ごと(横軸)の総血清 IgE 濃度。
Myd88^{+/+}, *Myd88*^{+/-}, *Myd88*^{-/-}: n = 0, 34, 30 (2 wk); n = 29, 16, 25 (4 wk); n = 27, 21, 32 (8 wk); n = 13, 20,

26 (12 wk) NA = not assessed

(B) 未免疫の 8 週齢 *Il1racp*^{+/+}、*Il1racp*^{+/-} および *Il1racp*^{-/-} マウス (8 週齢) の総血清 IgE 濃度 (*Il1racp*^{+/+} n = 13、*Il1racp*^{-/-} n = 13)。

(C, D) 未免疫の *Myd88*^{+/+} または *Myd88*^{-/-} マウス (8 週齢) の各臓器 (横軸) の IgE⁺ ASC の数を ELISpot アッセイで評価した。代表的なデータ (D) と全データのまとめをグラフ (C) で示した。
Myd88^{+/+}, *Myd88*^{-/-}: n = 18, 15 (spleen, mesenteric LN); n = 16, 13 (mediastinal LN); n = 17, 14 (bone marrow); n = 3, 3 (NALT); n = 1, 1 (inguinal LN); n = 2, 2 (Peyer's patch); n = 3, 3 (small or large intestine)

(E) 代表的な FCM 解析結果。*Myd88*^{-/-} マウスにおける脾臓 IgE⁺ PC (IRF4⁺ CD138⁺ DX5⁻ c-kit⁻) の表面および細胞内 IgE 発現を調べた。

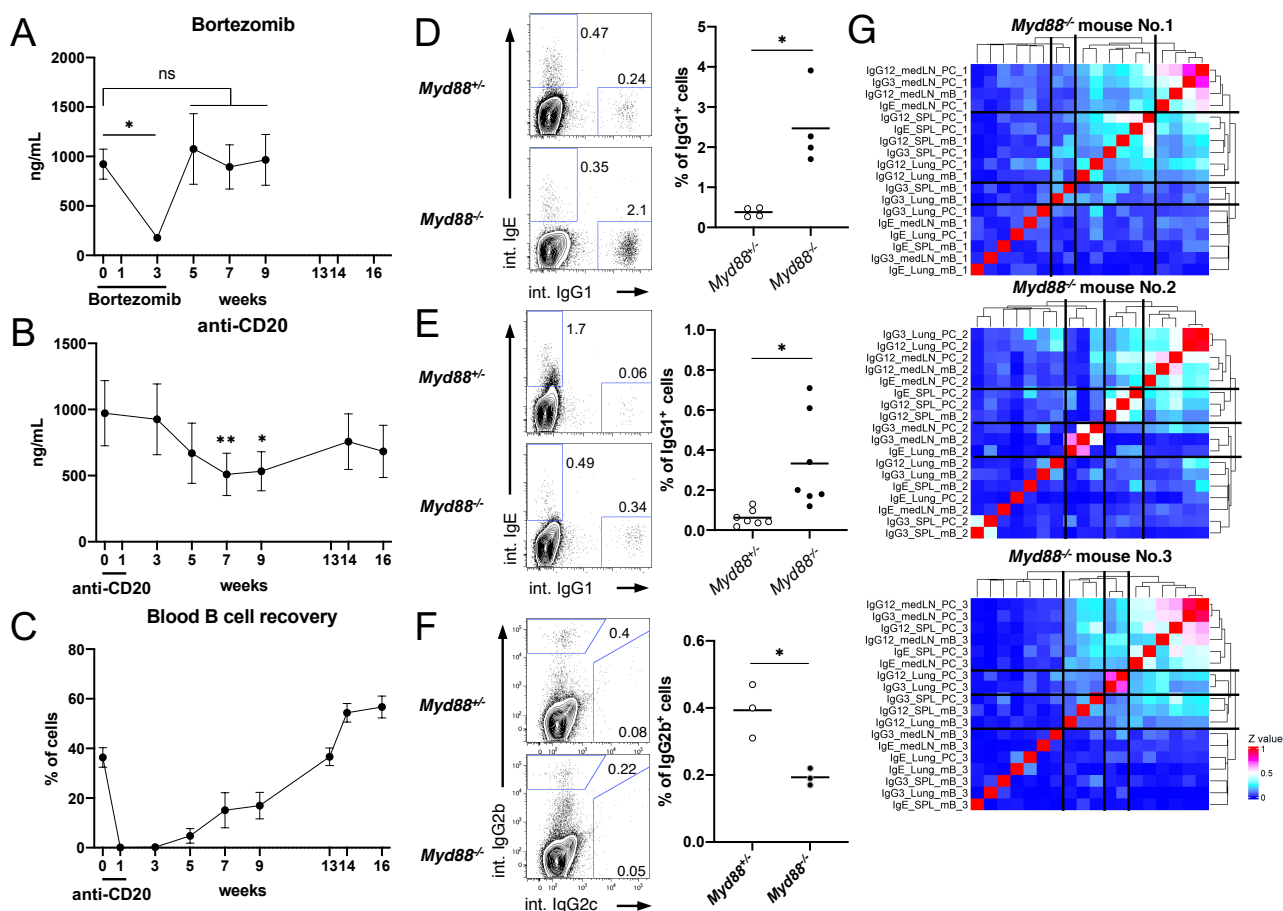
(F, G) 代表的な FCM 解析結果。B 細胞、IgE⁻ PC、IgE⁺ PC のゲーティングストラテジー (F) とそれらの細胞における CD98 発現をヒストグラム (G) で示した。

(H, I) *Myd88*^{-/-} マウスから単離・調製した脾臓細胞中の IgE⁺ PC 表面標識方法と FCM 解析結果。培養液中で IgE⁺ PC から分泌された IgE 抗体を抗 IgE 抗体 (R35-118) および抗 CD98 抗体の共役マイクロビーズによって捕捉し、これをさらに異なるエピトープを認識する抗 IgE 抗体 (RME-1) によって染色した (H)。培養脾臓細胞中の IgE⁺ PC (IgM/G1⁻ IgE⁺ DX5⁻ c-kit⁻ CD138⁺) の割合を FCM 解析した (I)。陰性対照群として抗 CD98 抗体のみ共役したマイクロビーズを用いた細胞を使用した。

(J-L) (I) でシングルセルソートした *Myd88*^{-/-} マウス由来 IgE⁺ PC の IgV_H (左パネル) または IgV_L (右パネル) 遺伝子に導入された SHM の割合 (J) と、クローニングした代表的な IgV_H (K) または IgV_L (L) 遺伝子の、BLASTtools での相同性検索結果を示した。(解析したクローン数 = 68, 85)。

グラフ (A-D, I, J) は 2~5 回独立して行った実験結果をまとめた全データを示した。*p < 0.05、**p < 0.01、***p < 0.0001、ns = 有意差なし。

図 5



(Amano et. al., 2023, *The Journal of Immunology* より引用)

図 5 MyD88 欠損マウスにおける IgE⁺ PC とその IgE 抗体の解析

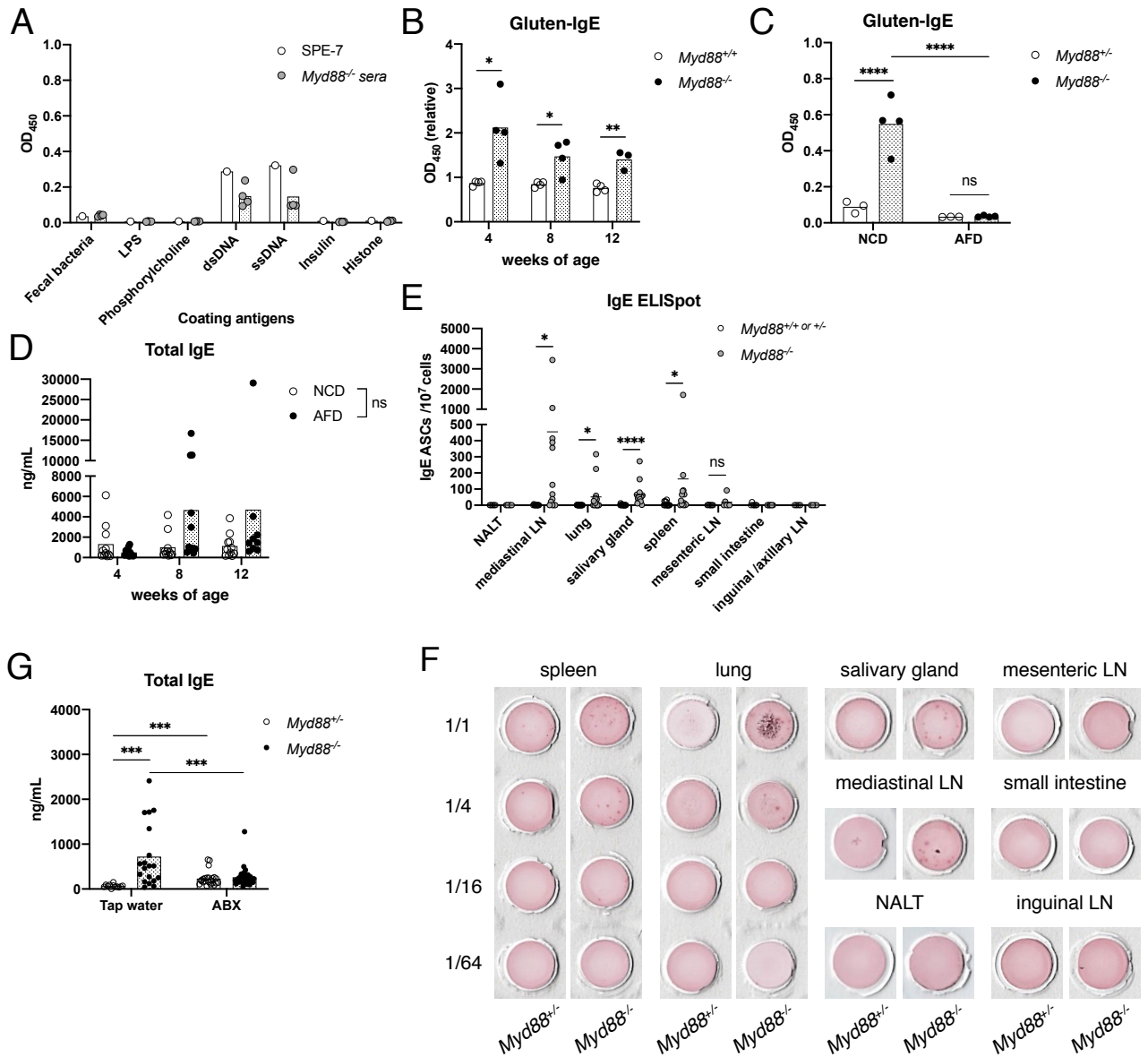
(A-C) 8 週齢の *Myd88*^{-/-} マウスにボルテゾミブを週 3 回、3 週間 (n = 14) (A)、または 1 週間に 2 回、抗 CD20 抗体を腹腔内注射した (B、C)。投与前 (横軸: 0 weeks)、および投与後の各時点 (横軸) で血清を採取し、総血清 IgE 濃度 (A、B) と血中 B 細胞の割合 (C)。エラーバーでは SEM を示した。 (B) n = 19 (0–9 wks)、n = 12 (14, 16 wks) (C) n = 12

(D-F) 未免疫の *Myd88*^{+/-} または *Myd88*^{-/-} マウス (D: 7 週齢 n = 4; E: 3 週齢 n = 7) の脾臓 MBC (B220⁺ CD38⁺ CD138⁻ IgD⁻ IgM⁻) の IgG1、IgG2b、IgG2c または IgE を細胞内染色し、FCM 解析した。MBC 中の IgG1⁺ 細胞の割合 (D、E)、または IgG2b⁺ 細胞をグラフにまとめた。

(G) 細胞間の IgH レパトアの類似性を示したヒートマップ。10~12 週齢の未免疫 *Myd88*^{-/-} マウスの脾臓、肺、縦隔リンパ節から、それぞれクラススイッチした MBC (IgD⁻ IgM⁻ CD138⁻ GL7⁺ CD38⁺ CD19⁺) または PC (CD19⁻ CD98⁺ CD138⁺) をソートした (縦軸)。その cDNA から IgH 配列のライブラリーを調整後、NovaSeq™ 6000 シーケンサー (illumina) で網羅的に配列を解析し、MiXCR を用いて CDR3 配列を同定し、細胞間の CDR3 配列の類似性を MorishitaHorn index を算出することで定量した。その類似性に

に基づき、サンプルをクラスターごとに縦横に同順で並べ、ヒートマップを作成した。クラスターは黒線で分画してヒートマップ中に表記した。IgG12: IgG1 および IgG2、mB: MBC、SPL: spleen。グラフは 2~3 回独立して行った実験結果をまとめた全データ (A-E)、1 回行なった実験結果 (F) を示した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、ns = 有意差なし。

図 6



(Amano et. al., 2023, *The Journal of Immunology* より引用)

図 6 MyD88 欠損マウスでは乳児期において常在菌依存的な IgE 産生が誘導される

(A) 8 週齢の *Myd88*^{-/-} マウス (n = 4) 由来の血清 IgE 抗体の、各抗原 (横軸) に対する結合性を ELISA で検証した。コントロールとして抗ジニトロフェニル IgE モノクローナル抗体 (SPE-7) を使用した。

(B) 未免疫の *Myd88*^{+/+} または *Myd88*^{-/-} マウス (n = 4) から、各週齢時 (横軸) に血清を採取し、グルテンタンパク質に対する血清 IgE 抗体の結合性を ELISA で検証した。

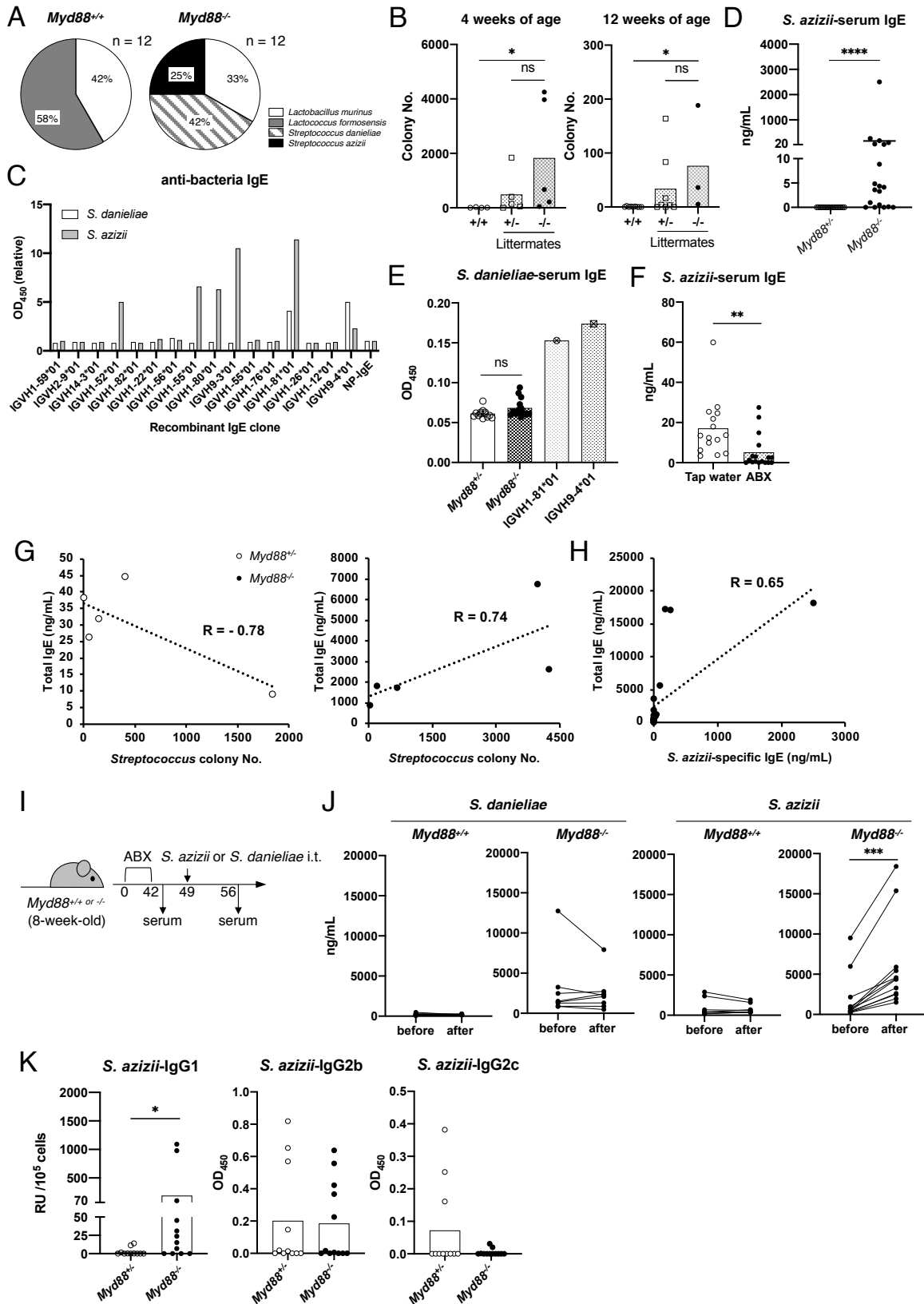
(C, D) 未免疫の *Myd88*^{+/+} または *Myd88*^{-/-} マウスに、通常の固形食 (NCD)、またはタンパク抗原フリーの食餌 (AFD) を 2 週齢から 6 週間与え、8 週齢時のグルテンタンパク質特異的な血清 IgE (C)、または 4、

8、12 週齢時の総血清 IgE 抗体価 (D) を測定し、SPE-7 に対する相対値で示した。(C) *Myd88*^{+/-} n = 3、*Myd88*^{-/-} n = 4 (D) NCD n = 11、AFD n = 11

(E, F) 未免疫の *Myd88*^{+/-} または *Myd88*^{-/-} マウス (3 週齢) における各臓器 (横軸) の IgE⁺ ASC の数を ELISpot アッセイで調べた。*Myd88*^{+/+ or +/-}, *Myd88*^{-/-}: n = 5, 5 (NALT); n = 10, 13 (mediastinal LN); n = 14, 14 (lung, salivary gland, spleen); n = 6, 6 (mesenteric LN, small intestine); n = 4, 4 (inguinal/axillary LN)

(G) 未免疫の *Myd88*^{+/-} または *Myd88*^{-/-} マウスに、ABX カクテル (アンピシリン、バンコマイシン、ネオマイシン、メロニダゾール) またはただの飲料水を 2 週齢から 6 週間で与え、8 週齢時の総血清 IgE 濃度を測定した (水道水: *Myd88*^{+/-} n = 12, *Myd88*^{-/-} n = 19; ABX: *Myd88*^{+/-} n = 23, *Myd88*^{-/-} n = 31)。

グラフは 2 回の実験結果のうち 1 回の結果 (B, C)、または、2~4 回独立して行った実験結果をまとめた全データ (D-G) を示した。*p < 0.05、**p < 0.01、***p < 0.001、****p < 0.0001



(A-F, I, J: Amano et. al., 2023, *The Journal of Immunology* より引用)

図 7 *Streptococcus azizii* は、MyD88 欠損マウスにおける自然 IgE 抗体産生の主要な刺激因子である

(A, B, G) 単離培養した肺嫌気性細菌の 16S rDNA 解析結果(A)と *Streptococcus* 属細菌の割合(B)。マウス肺ホモジネートの上清を BHI 寒天培地に播種し、嫌氣的に 37°Cで 24 時間培養した。ランダムに選択した細菌コロニーの 16S rDNA を、完全長増幅用のユニバーサルプライマー(A)、*Streptococcus* 属細菌特異的なプライマー(B)で PCR 増幅した。(A) 21 週齢の *Myd88*^{+/+}、または *Myd88*^{-/-}マウスの肺から単離培養した細菌(各 3 匹からのサンプルをプール)の構成割合(n = 12)を円グラフで示した。(B) PCR 結果をもとに、BHI 寒天培地中の *Streptococcus* 属の細菌コロニーの数をマウスごと(4 週齢:左パネル; 12 週齢:右パネル)に算出した(4 週齢:*Myd88*^{+/+} n = 4、*Myd88*^{+/-} n = 5、*Myd88*^{-/-} n = 5、12 週齢:*Myd88*^{+/+} n = 9、*Myd88*^{+/-} n = 8、*Myd88*^{-/-} n = 3)。詳細な計算方法については、実験方法に記載した。(G) 4 週齢時の *Myd88*^{+/+}(上段)、または *Myd88*^{-/-}マウス(下段)における、*Streptococcus* 属の細菌コロニーの数と総 IgE 抗体価の相関を示した。R = 相関係数。

(C) *Myd88*^{-/-}マウス(図 1J)由来のリコンビナント IgE の *Streptococcus (S.) azizii* または *S. danieliae* への結合を ELISA で測定した。ニトロフェニル(NP)特異的 IgE モノクローナル抗体(NP-IgE)を陰性対照群として使用した。

(D, E, H) 未免疫 *Myd88*^{+/+}または *Myd88*^{-/-}マウス(3 週齢)の血清中の(D) *S. azizii*、または(E) *S. danieliae* 特異的 IgE 抗体価。(H) *Myd88*^{-/-}マウス(3 週齢)の総 IgE 抗体価と *S. azizii* 特異的 IgE 抗体価の相関を示した。R = 相関係数。(D) *Myd88*^{+/+}, *Myd88*^{-/-}: n = 19, 19 (E) n = 13, 14

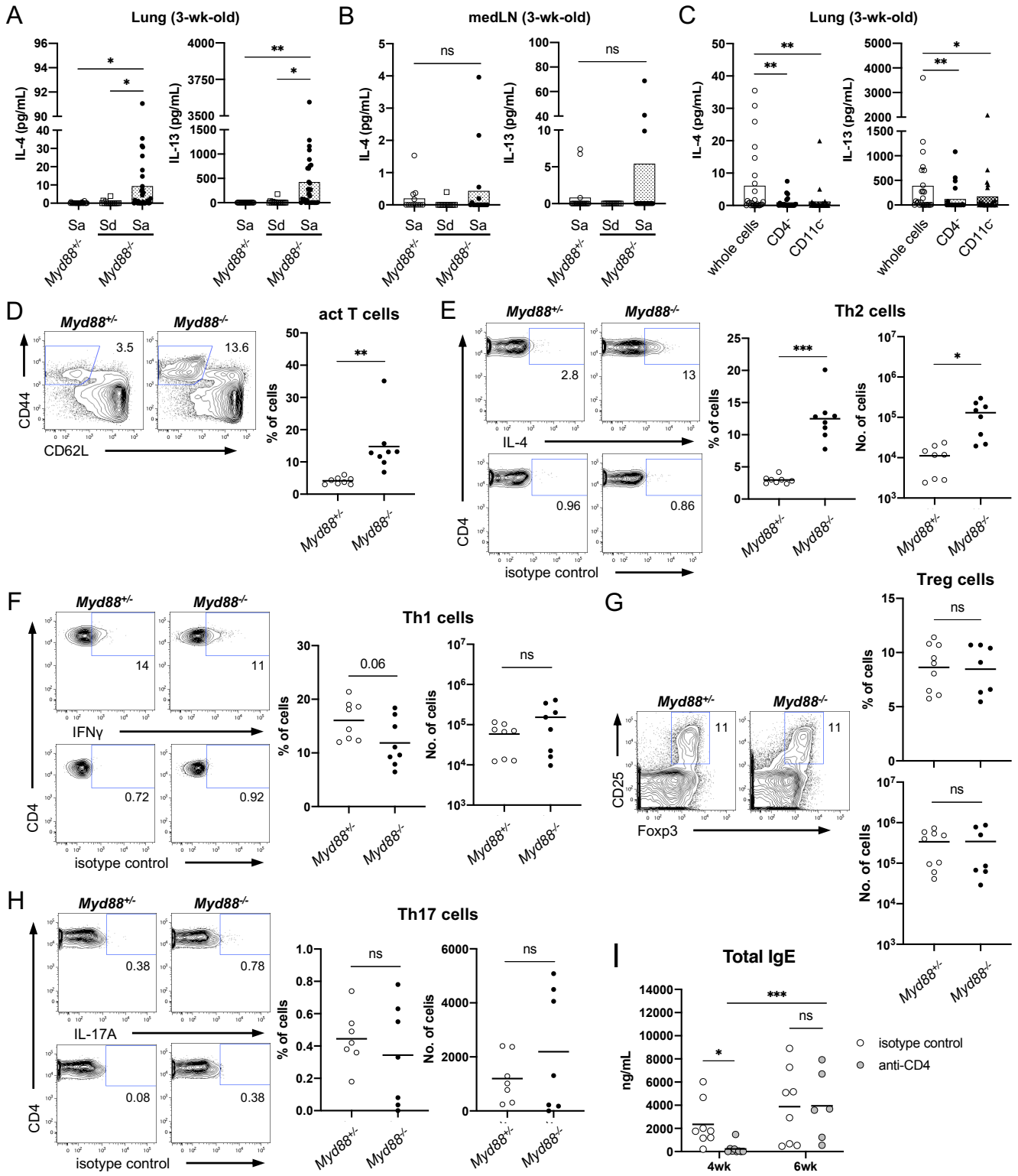
(F) 図 6G で通常飲水、または ABX を投与した *Myd88*^{-/-}マウスにおける、*S. azizii* 特異的血清 IgE 抗体価を ELISA で測定した。(Tap water, n = 15、ABX, n = 17)

(I, J) 生きた *S. azizii* または *S. danieliae* (10⁸ cells)を、図 6G のように 6 週間 ABX で処理した *Myd88*^{+/+}または *Myd88*^{-/-}マウスに気管内感染した(I)。感染前と感染 1 週間後の総血清 IgE 濃度を ELISA で測定した(J) (n = 8、*S. azizii* を経気道投与した *Myd88*^{-/-}: n = 12)。

(K) クラススイッチ MBC における *S. azizii* 特異的 IgG1、IgG2b、IgG2c 抗体の定量結果。B220⁺ CD38⁺ CD138⁻ IgD⁻ IgM⁻ 細胞を *Myd88*^{+/+}または *Myd88*^{-/-}マウスの脾細胞からソートし、40LB フィーダー細胞上、IL-21 存在下で 9 日間培養した。培養上清中の *S. azizii* 結合 IgG1、IgG2b、IgG2c 抗体の濃度を ELISA で測定した(*Myd88*^{+/+} n = 11、*Myd88*^{-/-} n = 12)。

グラフ(B, D-H, J, K)は 2~5 回独立して行なった実験結果をまとめた全データを示した。*p < 0.05、***p < 0.001、****p < 0.0001、ns = 有意差なし。

8



(Amano et. al., 2023, *The Journal of Immunology* より引用)

図 8 MyD88 欠損マウスの肺では、*S. azizii* 特異的な Th2 細胞が誘導された

(A, B) 加熱処理した *S. azizii* (Sa) または *S. danieliae* (Sd) (10^6 cells) を 5 日間刺激後の *Myd88*^{+/+} または *Myd88*^{-/-} マウスの肺細胞 (A) または縦隔リンパ節細胞 (B) の培養上清中の IL-4 または IL-13 濃度を ELISA で測定した。*Myd88*^{+/+} Sa, *Myd88*^{-/-} Sd, *Myd88*^{-/-} Sa: n = 22, 16, 31 (A)、n = 12, 16, 13 (B)

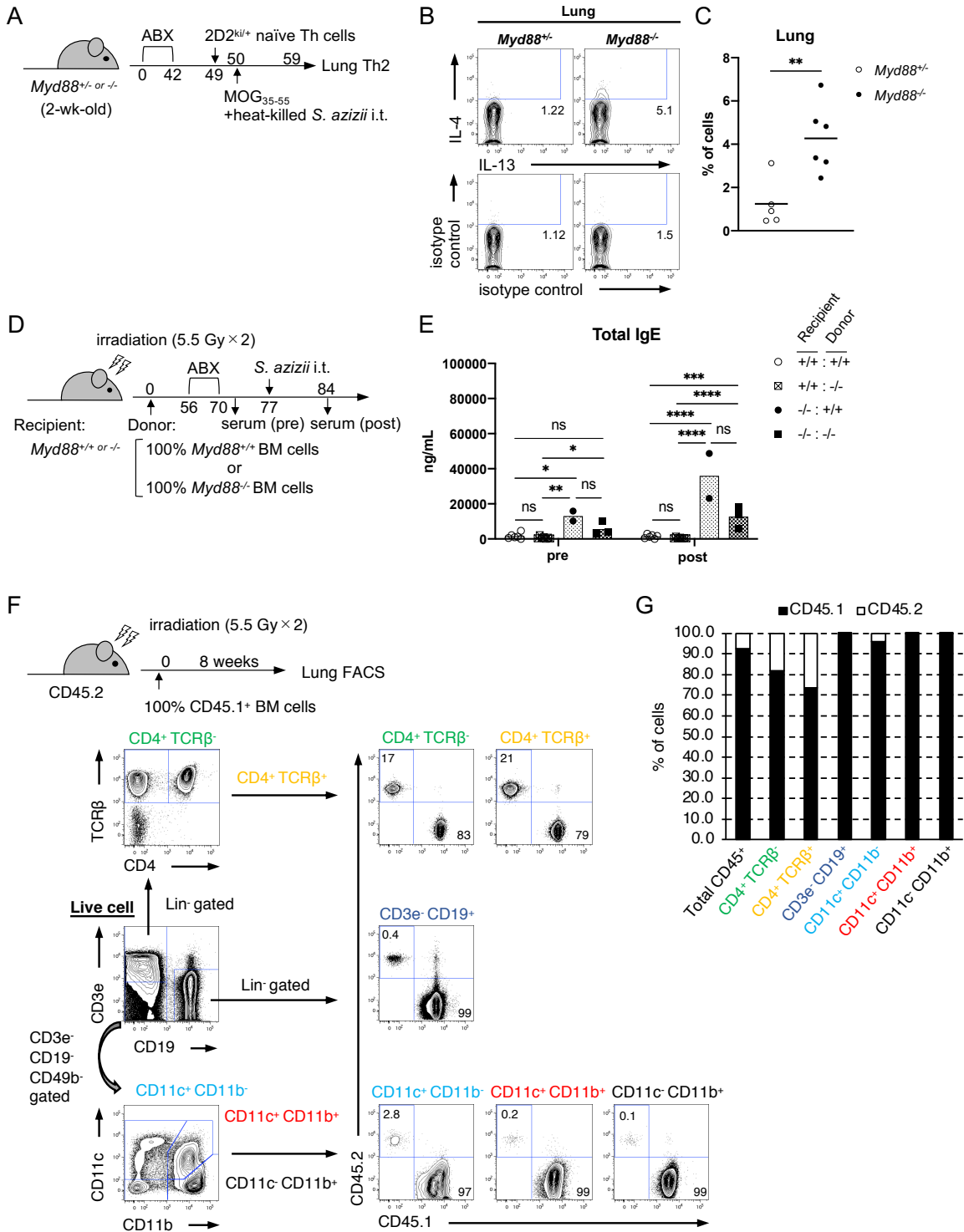
(C) *Myd88*^{-/-} マウス由来の全肺細胞、または CD4⁺ 細胞または CD11c⁺ 細胞を除去した細胞を加熱処理した *S. azizii* (10^6 cells) で 5 日間刺激した後の培養上清中の IL-4 または IL-13 の濃度 (whole lung, CD11c⁻ n = 25, CD4⁻ n = 21)。

(D-H) 3 週齢の未免疫 *Myd88*^{+/+} または *Myd88*^{-/-} マウスの肺における CD4⁺ T 細胞 (CD3e⁺ CD4⁺) (n = 8) 中の活性化 Th 細胞 (CD62L⁻ CD44⁺) の頻度 (D)、および活性化 Th 細胞中の IL-4⁺ Th2 細胞 (n = 8) (E)、IFN γ ⁺ Th1 細胞 (n = 8) (F)、IL-17A⁺ Th17 細胞の割合と実数 (n = 7) (H)、または CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 細胞の割合を FCM 解析した (*Myd88*^{+/+}: n = 9; *Myd88*^{-/-}: n = 7) (G)。

(I) 2 週齢の *Myd88*^{-/-} マウス (n = 9) に抗 CD4 またはアイソタイプコントロール抗体を腹腔内注射し、その 2 または 4 週間後の血清中の総 IgE 濃度。Isotype control: n = 8; anti-CD4: n = 9 (4 wk), n = 6 (6 wk)

グラフ (A -I) は 2~3 回独立して行った実験結果をまとめた全データを示した。*p < 0.05、**p < 0.01、***p < 0.001、ns = 有意差なし。

9



(A-F: Amano et. al., 2023, *The Journal of Immunology* より引用)

図9 MyD88 欠損マウスにおいて、Th2 分化には肺組織が重要である

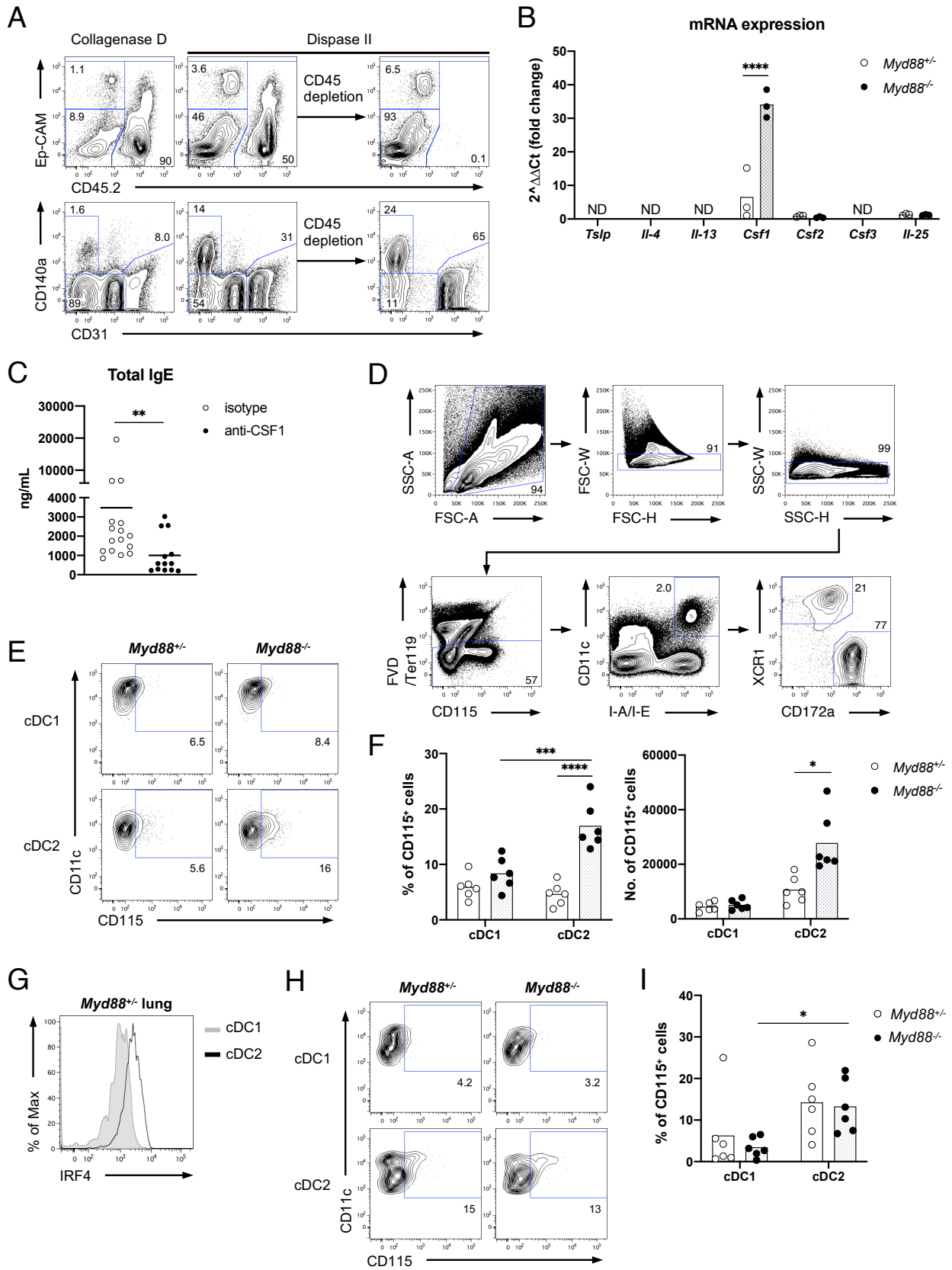
(A-C) Th2 分化解析の実験スキーム(A)と FCM 解析結果(B, C)。(A)2 週齢の *Myd88*^{+/+}または *Myd88*^{-/-}同腹マウスを図 3G のように 6 週間 ABX で処理し、さらにその 1 週間後に 2D2-TCRトランスジェニックマウス由来の 3×10^6 個のナイーブ CD4⁺T 細胞を静脈内投与して移植した。その 1 日後、MOG₃₅₋₅₅ ペプチド(100 μg)と加熱処理した *S. azizii*(4×10^8 cells)の混合物による免疫を行い、9 日後に肺のドナー由来 T 細胞(CD4⁺ TCRVα3.2⁺)を解析した。(B, C)肺のドナー由来 Th 細胞(CD4⁺ TCRVα3.2⁺ CD62L⁻ CD44⁺)における IL-4⁺ Th2 細胞の割合を示した(*Myd88*^{+/+} n = 5、*Myd88*^{-/-} n = 6)。

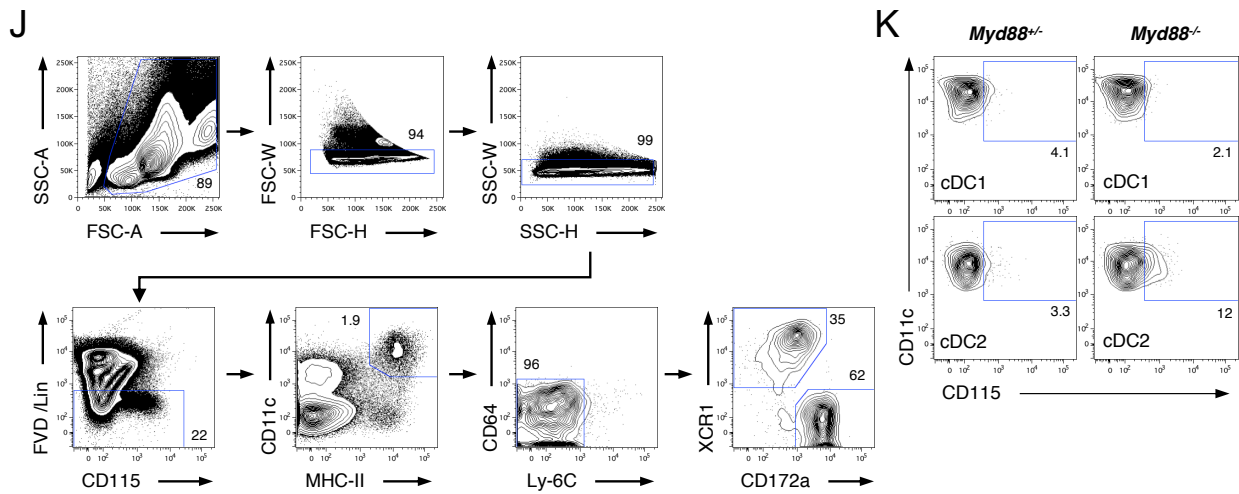
(D, E) BM キメラマウスを用いた実験スキームと総 IgE 抗体価への影響。*Myd88*^{+/+}または *Myd88*^{-/-}レシピエントマウスを放射線照射(3.5 時間間隔で 5.5 Gy 2 回)し、 5×10^6 個の *Myd88*^{+/+}または *Myd88*^{-/-} BM 細胞を、レシピエントマウスに移植した。移植して 8 週間後のキメラマウスを ABX で 2 週間処理し、生きた *S. azizii*(10^8 cells)を経気道感染させた(D)。*S. azizii* 感染前(pre)と感染後(post)の総血清 IgE 濃度を測定した(n = 2~7)。

(F, G) (F)BM キメラマウスを用いた実験スキームと各リンパ球の置換率の確認。CD45.2 C57BL/6 レシピエントマウス(n = 4)を放射線照射(3.5 時間間隔で 5.5 Gy 2 回)し、 5×10^6 個の CD45.1⁺ BM 細胞を移植した。移植して 8 週間後のキメラマウスの肺における、CD45⁺細胞、CD8 T 細胞(Lin⁻ CD19⁻ CD3e⁺ CD4⁺ TCRβ⁺)、CD4 T 細胞(Lin⁻ CD19⁻ CD3e⁺ CD4⁺ TCRβ⁺)、B 細胞(Lin⁻ CD19⁺ CD3e⁻)、CD19⁻ CD3e⁻ CD49b⁻ ミエロイド細胞(CD11c⁺ CD11b⁻, CD11c⁺ CD11b⁺ or CD11c⁻ CD11b⁺)の CD45.1 と CD45.2 発現細胞の割合を FCM 解析し、(G)棒グラフ(4 匹の平均値)にまとめた。Lin: CD11c, CD11b, CD49b。

グラフは 2 回独立して行なった実験結果をまとめた全データ(C)、2 回の実験結果のうち 1 回の結果(E)、1 回行なった実験結果(G)を示した。*p < 0.05、**p < 0.01、***p < 0.001、****p < 0.0001、ns = 有意差なし。

10





(B, C, E-H: Amano et. al., 2023, *The Journal of Immunology* より引用)

図 10 MyD88 欠損マウスでは、CSF1 が過剰な自然 IgE 産生を担っている

(A, B) 3 週齢の *Myd88*^{+/+} または *Myd88*^{-/-} 同腹マウス (n = 3) 由来の肺 CD45⁻ 細胞の RT-PCR 解析結果。(A) Collagenase D (左) または Dispase I (中) で処理した肺の生細胞、さらに Dispase I で処理した肺細胞から CD45⁺ 細胞を除去した生 (右) における、(上) CD45⁺、Ep-CAM⁺、(下) CD31⁺、CD140a⁺ 細胞の割合を示した。(B) (A) の CD45⁻ 細胞におけるサイトカイン発現を qPCR で検証した。*Myd88*^{+/+} マウス 3 匹中の 1 匹を基準として、 $\Delta\Delta Ct$ の相対値を縦軸に示した。

(C) *Myd88*^{-/-} マウスに生後 7 日から、抗 CSF1 (n = 13) またはアインタイプコントロール (n = 16) 抗体を週 2 回で 3 週間腹腔内投与し、4 週齢時の総血清 IgE 濃度を ELISA で測定した。

(D-I) 3 週齢の *Myd88*^{+/+} または *Myd88*^{-/-} マウスの肺 (D-F) または縦隔リンパ節 (G, H) における cDC1 (CD11c⁺ MHC-II⁺ XCR1⁺ CD172a⁻) または cDC2 (CD11c⁺ MHC-II⁺ XCR1⁻ CD172a⁺) 中の CD115 発現細胞の割合と実数、または (I) 肺 cDC1 および cDC2 の IRF4 発現を FCM 解析した (n = 6)。肺および縦隔リンパ節中の cDC1 または cDC2 の Gating strategy を代表的な *Myd88*^{+/+} マウスの肺サンプル (D) を用いて示した。

(J, K) 3 週齢の *Myd88*^{+/+} または *Myd88*^{-/-} マウスの肺 cDC1 (Lin⁻ CD64⁻ Ly-6C⁻ CD11c⁺ MHC-II⁺ XCR1⁺ CD172a⁻) または cDC2 (Lin⁻ CD64⁻ Ly-6C⁻ CD11c⁺ MHC-II⁺ XCR1⁻ CD172a⁺) における (J)、CD115 発現細胞の割合を FCM 解析した (K)。Lin: B220, CD3e, NK1.1, Ly-6G, Siglec-F, Ter-119。

グラフは 2 回の実験結果のうち 1 回の結果 (B)、または 2 回の独立して行った実験結果をまとめた全データ (C, E, I) を示した。*p < 0.05、**p < 0.01、***p < 0.001、****p < 0.0001、ns = 有意差なし。

図 11

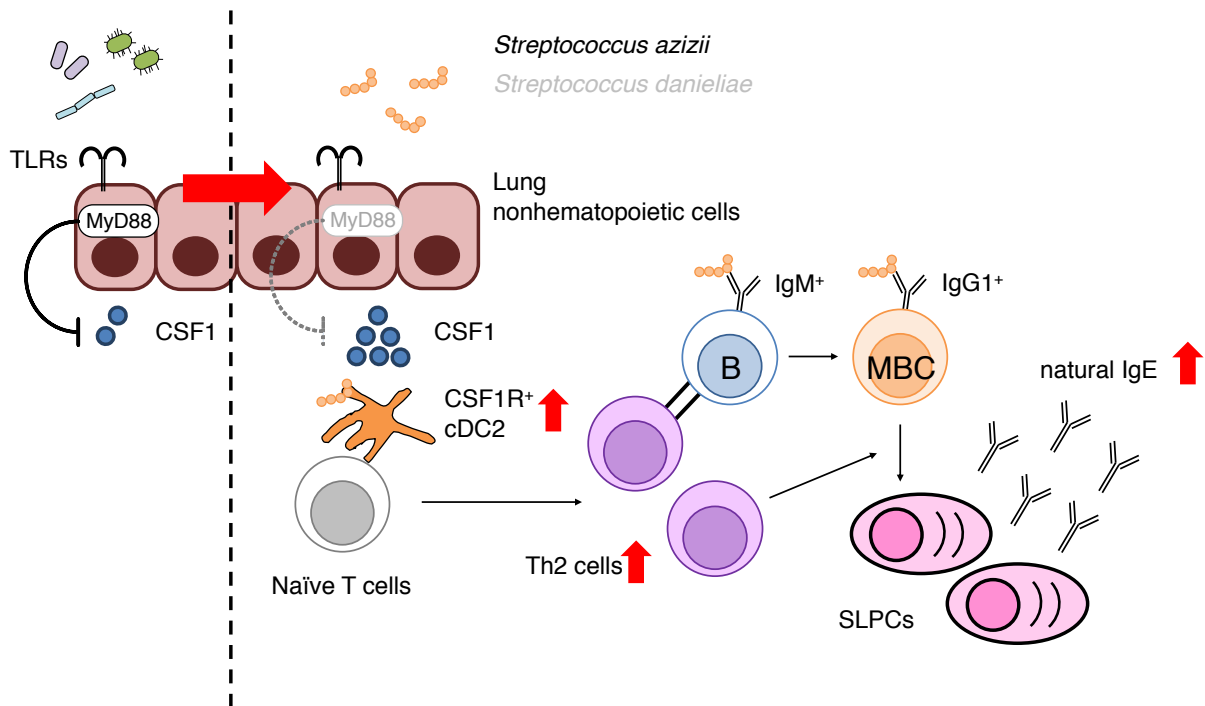


図 11 本研究結果のまとめ

本研究から、MyD88 欠損環境下では肺で *Streptococcus* 属細菌、特に *Streptococcus azizii* (*S. azizii*) と *Streptococcus danieliae* (*S. danieliae*) が異常生着すること、また、肺非造血系細胞で CSF1 が過剰発現することが分かった。さらに、肺では CSF1R⁺cDC2 と *S. azizii* 特異的 Th2 細胞が増加していたことから、過剰な CSF1 産生により増加した CSF1R⁺cDC2 が、*S. azizii* に対する Th2 応答を誘導していると考えられた。さらに、この Th2 応答により *S. azizii* 特異的な IgG1⁺ メモリーB 細胞 (MBC) が形成され、この MBC がリコール応答を起こして IgE⁺ short-lived plasma cells (SLPCs) を絶えず供給し、高い自然 IgE 抗体産生がもたらされていると考えられた。IL1-RAcP 欠損マウスでは過剰な IgE 抗体産生応答が起こらないことから、MyD88 欠損マウスにおける上記の応答は TLR-MyD88 経路により制御されていると考えられた。

図 12

①

(Prostaglandins Other Lipid Mediat., 2013; J. Immunol. 2011)

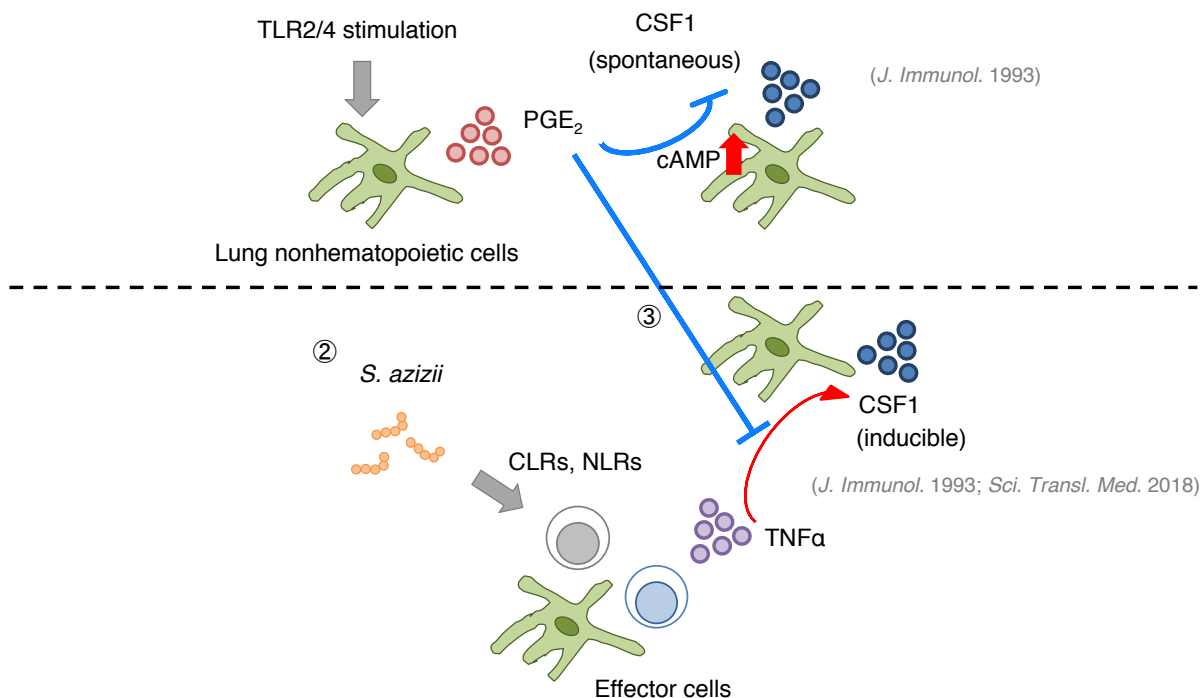


図 12 CSF1 発現制御における TLR-MyD88 経路の関与に関する仮説

先行研究から 3 つの可能性が示唆される：① MyD88 分子が発現している状態では、肺線維芽細胞や気道上皮細胞などの非造血系細胞が TLR2/4 刺激を受けて PGE₂ を産生している。この PGE₂ がオートクリン・パラクリン的に作用することで、細胞内の cAMP 濃度を上昇させ、自発的な CSF1 産生を制御している。一方、MyD88 欠損状態では非造血系細胞からの PGE₂ 産生量が低下することで、CSF1 の過剰発現が起こっている可能性が考えられる。② MyD88 欠損状態では、CLR や NLR を介した *S.azizii* からの刺激を受けて、エフェクター細胞（免疫細胞、非免疫細胞を含む）から TNF α の産生が誘導される。続いて産生された TNF α の刺激を受けて肺非造血系細胞が CSF1 を産生することが考えられる。③ さらに、TNF α 刺激による CSF1 産生増強作用は PGE₂ 刺激で競合的に抑制されるという報告から、MyD88 欠損状態では PGE₂ の産生低下と TNF α による CSF1 産生誘導の両方の作用が働き、CSF1 の過剰発現をもたらしている可能性が考えられる。

図 13

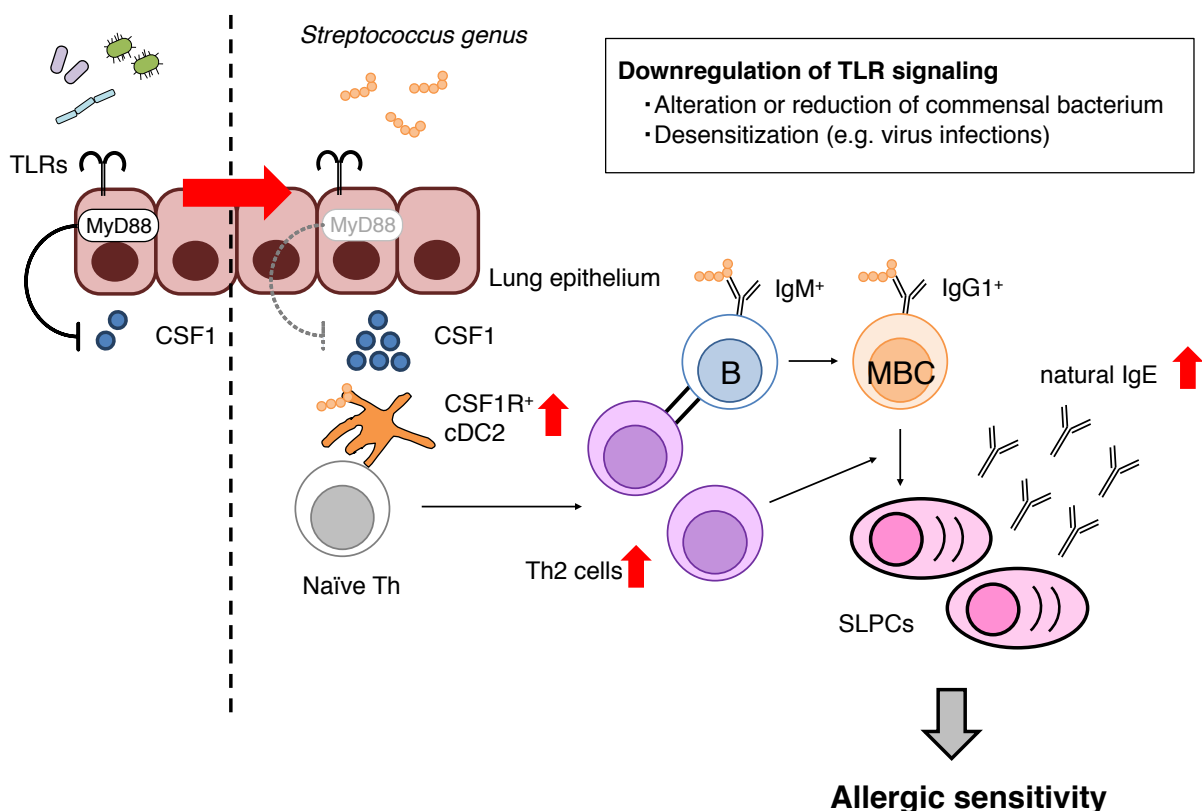


図 13 本研究結果および考察より提唱する仮説

健常人においては肺上皮細胞における CSF1 の発現が TLR-MyD88 経路によって調節されている。一方で、肺の共生細菌叢の異常や減少、ウイルス感染による TLR シグナルの脱感作によって、上皮細胞の TLR-MyD88 経路が機能低下すると過剰な CSF1 産生が起こる。これにより肺 CSF1R⁺ cDC2 が増殖し、*Streptococcus* 属細菌などの異常に増加した細菌に対する Th2 型免疫応答が誘導され、また、同じ細菌に応答した B 細胞から IgG1⁺ MBC が形成される。この MBC が Th2 細胞とリコール応答を起こし、長期間持続的に IgE⁺ SLPC へと分化することにより、恒常的かつ高度な自然 IgE 抗体産生が引き起こされ、アレルギー発症のリスクを高める。

謝辞

本研究は東京理科大学 生命医科学研究所 分子生物学研究部門で行われました。

本研究を進めるにあたり、熱心なご指導、ご鞭撻を賜りました北村大介教授に深く感謝いたします。研究時より多くのご指導、ご助言を賜りました生命医科学研究所 羽生田圭博士 羽生田紗央里博士、共同研究に参画いただき、多くのご助言を賜りました生命医科学研究所 上羽悟史准教授 博士課程 青木寛泰さんに厚く御礼申し上げます。

また、本研究において多くのご指導、ご助言、ご協力を賜りました、北村研究室の皆様、その他の生命医科学研究所の諸先生方に深く感謝いたします。