

「アレルギー疾患・自己免疫疾患などの発症機構と治療技術」  
平成 20 年度採択研究代表者

樗木 俊聡

秋田大学医学部・教授

## 樹状細胞制御に基づく粘膜免疫疾患の克服

### 1. 研究実施の概要

生体は、「過剰な免疫反応」をコントロールすることでアレルギーや自己免疫疾患の発症を防ぎ、免疫学的恒常性を維持している。外来抗原や常在菌の刺激を受ける粘膜組織のみならず末梢リンパ組織においても「過剰な免疫反応」を制御する環境が構築されているが、その誘導機構の詳細は明らかになっていない。樗木グループは、TGF- $\beta$ に着目して検討し、腸管関連リンパ組織 (GALT) では、TGF- $\beta$  ファミリーの中で TGF- $\beta$ 1 の発現が優位であり、GALT の TGF- $\beta$ 1 発現レベルは他の末梢リンパ組織に比べ亢進していること、さらに GALT における TGF- $\beta$ 1 発現誘導機構の一端を明らかにした。岩田グループは、レチノイン酸 (RA) に着目して検討し、個々の細胞レベルで RA 生産酵素の活性を検定する方法を確立し、GALT において RA 生産能を持つ樹状細胞 (DC) サブセットを同定した。さらに、DC に RA 生産酵素を発現誘導する GALT 微小環境要因を明らかにした。稲葉グループは、末梢リンパ組織 DC サブセットによる Treg 誘導能の違いが TGF- $\beta$  産生能の違いに起因することを明らかにした。門脇グループは、ヒト DC サブセットの成熟や機能を修飾し得る阻害薬を同定した。

### 2. 研究実施内容 (文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

(樗木グループ)

粘膜組織は、常時外来抗原、食物抗原および常在菌の刺激を受けているにも拘らず、それらに対して容易に免疫反応を起こさないような環境 (免疫寛容・抑制) が構築されているが、その誘導機構の詳細は明らかではない。TGF- $\beta$  は、Treg を含む調節 T 細胞群の誘導に重要であり、TGF- $\beta$  シグナルが期待できないマウスではさまざまな炎症性自己免疫疾患が誘導されることから、免疫寛容の成立に欠かせないサイトカインである。今年度の研究では、粘膜組織には TGF- $\beta$  が豊富な環境が構築されているのか、またその誘導機構はどのようなものかを探索することを目的とした。

まず、GALT として腸間膜リンパ節 (MLN) およびパイエル板 (PP) から免疫細胞を調整し、TGF- $\beta$  の発現レベルを検討した。TGF- $\beta$  ファミリーは、TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 3

に分類されるが、TGF-β1 が他のファミリーを圧倒しており、また TGF-β1 の発現レベルは、通常の末梢リンパ組織に比べて GALT で有意に亢進していた。これらの結果は、GALT で TGF-β1 豊富な環境が構築されていることを示していた。次に、GALT における TGF-β 環境構築原理を明らかにする目的で、さまざまな遺伝子改変マウスを用いて、GALT における TGF-β 発現レベル、Treg・Th17 などの調節性 T 細胞群、さらには IgA 生産能を指標に検討を行った。現在までに、それら指標の亢進あるいは低下を示す複数種類の遺伝子改変マウスを見いだしており、今後解析を進める予定である。

(岩田グループ)

RA は、リンパ球に小腸組織へのホーミング特異性をインプリントするだけでなく、免疫寛容や免疫制御に関与する誘導型 Foxp3<sup>+</sup>Treg の分化を促進し、炎症誘導性 Th17 細胞の分化誘導を抑制する。本研究では、RA 生産性 DC サブセットの性質および DC に RA 生産能を誘導する小腸組織の微小環境因子を明らかにすることを旨とした。

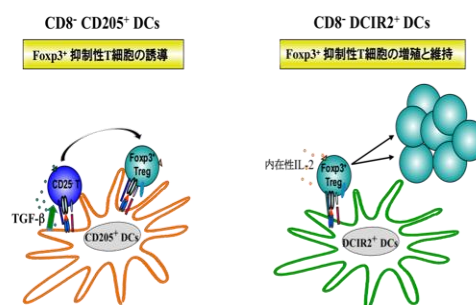
まず、RA 生産性酵素 retinal dehydrogenase (RALDH) の活性を個々の DC で検定する方法を探索した。RALDH を含む aldehyde dehydrogenase (ALDH) の活性に依存して蛍光を発する基質である ALDEFLUOR を取り込ませた DC の蛍光を、flow cytometry で検出する条件を決定し、その蛍光強度を指標として、DC に RALDH 発現を誘導する因子を探索した。その結果、非感染 SPF マウスの MLN および PP の DC には、RA 生産酵素として RALDH2 (ALDH1A2) アイソフォームが検出され、それぞれ約 30%、10% の DC が ALDH 活性陽性であった。また、ALDH 活性陽性の DC は、CD11c<sup>high</sup>CD4<sup>-/low</sup>CD8α<sup>intermediate</sup>CD11b<sup>-/low</sup>F4/80<sup>low/intermediate</sup>CD45RB<sup>low</sup>CD86<sup>high</sup>MHC class II<sup>high</sup>B220<sup>-</sup>CD103<sup>+</sup>細胞であった<sup>1)</sup>。また、GM-CSF、IL-4 と IL-13 が DC に RALDH2 を発現誘導すること、さらに GM-CSF と IL-4 は相乗的に作用することを見いだした。それぞれのサイトカインの受容体欠損マウスの解析から、GM-CSF は生理的にも MLN-DC における RALDH2 発現の誘導に重要な役割を果たすことが示唆された。脾臓 DC (SPL-DC) と Flt3 リガンドによって骨髄細胞から誘導された DC (BM-DC) は RALDH2 をほとんど発現していないが、SPL-DC では GM-CSF および IL-4 と培養することによって、BM-DC の場合はさらに TLR リガンドを組み合わせることで、MLN の RA 生産性 DC サブセットと同等の RALDH2 発現と ALDH 活性を誘導することができた<sup>1)</sup>。

(稲葉グループ)

TGF-β は、ナイーブ T 細胞に作用して Foxp3<sup>+</sup>Treg を誘導するが、粘膜組織を含めたリンパ系組織の DC サブセットの役割の違いについては、明らかではない。本年度は、脾臓における DC サブセット間の Foxp3<sup>+</sup>Treg 能の差異を検討した。

脾臓の DC サブセットは、大きく CD8<sup>+</sup>と CD8<sup>-</sup>のサブセットに分けられるが、それらは同時に C 型レクチン受容体である CD205

樹状細胞サブセットの制御性 T 細胞分化・増殖における作用の違い



(DEC208) および DCIR2 (33D1) の発現においても明瞭に区別される細胞集団を形成する。そこで、抗原特異的な Treg 細胞の誘導能の DC サブセット間の違いを、*in vitro*において調べた。その結果、CD8<sup>+</sup>DC は単独で、ナイーブ T 細胞から Treg を誘導するのに対して、CD8<sup>-</sup>DC は TGF- $\beta$ を添加した場合においてのみ Treg を誘導すること、この作用の違いは、CD8<sup>+</sup>DC の TGF- $\beta$ の産生能に依存することが明らかになった<sup>2)</sup>。さらに、それぞれのサブセットに選択的に抗原を導入すると共に、標識したナイーブ T 細胞あるいは Treg を移入して、*in vivo* でそれら細胞の増殖を指標に検討したところ、CD8<sup>+</sup>DC によって抗原が提示されると、より有効にナイーブ T 細胞から Treg の誘導が認められた。一方、CD8<sup>-</sup>DC によって抗原が提示されると、Treg 細胞の増殖が検出された<sup>2)</sup>。したがって、生体内において、CD8<sup>+</sup>DC は TGF- $\beta$ を産生することによって Treg の誘導に作用するのに対して、CD8<sup>-</sup>DC はむしろ既に生体内に存在している Treg の増殖ならびに維持に関与することが示唆された。

#### (門脇グループ)

免疫抑制性のヒト DC を誘導する手段として、粘膜組織に存在する因子とともに、粘膜 DC の機能を抑制すると考えられる薬剤を添加し、その結果誘導される DC の機能を検討した。薬剤として、ボルテゾミブ (プロテアソーム阻害薬) およびダサチニブ (チロシンキナーゼ阻害薬) を用い、ヒト DC サブセットである mDC および pDC に添加したところ、ボルテゾミブは、核酸リガンドを認識する Toll-like receptor (TLR) の小胞体からエンドソームへの移行を阻害することにより、TLR シグナルによる DC の活性化・成熟を阻害した。ダサチニブも、TLR 刺激による pDC および mDC からの IFN- $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ の産生をそれぞれ強く阻害するとともに、T 細胞に対する共刺激分子の発現を抑制した。今後、免疫抑制性 T 細胞を誘導するかどうかを検討する。

### 3. 研究実施体制

#### (1)「樗木俊聡」グループ

- ① 研究分担グループ長: 樗木 俊聡 (秋田大学、教授)
- ② 研究項目
  - ・ 粘膜組織における TGF- $\beta$ 環境構築メカニズムの解明
  - ・ 疾患治療技術の開発

#### (2)「岩田 誠」グループ

- ① 研究分担グループ長: 岩田 誠 (徳島文理大学、教授)
- ② 研究項目
  - ・ 個々の樹状細胞におけるレチノイン酸生産酵素活性の検定法確立
  - ・ 粘膜組織におけるレチノイン酸生産性樹状細胞サブセットの同定
  - ・ 樹状細胞にレチノイン酸生産酵素を発現誘導する腸組織微小環境因子の同定

(3)「稲葉カヨ」グループ

①研究分担グループ長:稲葉 カヨ(京都大学、教授)

②研究項目

稲葉カヨ:研究総括

伊豫田智典:免疫担当細胞間の相互作用に関する解析

高原和彦:マクロファージ/樹状細胞の移動と分化の解析

南野研人:樹状細胞サブセットの機能解析と Treg の誘導

長岡孝司:マクロファージ/樹状細胞の移動と分化の解析

(4)「門脇則光」グループ

①研究分担グループ長:門脇 則光(京都大学、講師)

②研究項目

- ・ヒト DC による寛容誘導機構の解明、粘膜帰巢および寛容誘導特性を備えたヒト DC 培養技術の確立

#### 4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

1. Yokota A, Takeuchi H, Maeda N, Ohoka Y, Kato C, Song Si-Young, Iwata M. GM-CSF and IL-4 synergistically trigger dendritic cells to acquire retinoic acid-producing capacity. *Int. Immunol.* 2009 Feb 3. [Epub ahead of print](in press)
2. Yamazaki S, Dudziak D, Heidkamp GF, Fiorese C, Bonito AJ, Inaba K, Nussenzweig MC, and Steinman RM. CD8<sup>+</sup> CD205<sup>+</sup> splenic dendritic cells are specialized to induce Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *J. Immunol.* 181(10):6923-6933, 2008.
3. Suzuki R, Oda Y, Utoguchi N, Namai E, Taira Y, Okada N, Kadowaki N, Kodama T, Tachibana K, Maruyama K. A novel strategy utilizing ultrasound for antigen delivery in dendritic cell-based cancer immunotherapy. *J. Control Release* 133: 198-205, 2009.
4. Ueda Y, Marusawa H, Ichinohe T, Kadowaki N, Uchiyama T, Chiba T. Effective treatment for de novo hepatitis B with nucleotide analogue in patients with hematological malignancies. *Am. J. Hematol.* 2009 Feb 27. [Epub ahead of print] (in press)
5. Yamada, J., Hamuro, J., Fukushima, A., Ohteki, T., Terai, K., Iwakura, Y., Yagita, H., and Kinoshita, S., MHC-matched corneal allograft rejection in an IFN-gamma/IL-17-independent manner in C57BL/6 mice. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* 2009 Jan 10. [Epub ahead of print] (in press)

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 0 件)