

「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

東京医科歯科大学
難治疾患研究所 先端分子医学研究部門・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」を制御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常時受ける腸管粘膜や皮膚は「過剰な免疫反応」を制御する環境が構築されているが、当該環境誘導機構の詳細は明らかになっていない。我々は、昨年に引き続き樹状細胞 (DC) の分化・機能を中心に同機構を探求することを目的として研究を行った。樗木グループは、腸管粘膜関連リンパ組織 (GALT) の T 細胞非依存性 IgA 生産誘導における pDC の重要性を見出し、また強力な pDC 分化能を持つ新規 DC 前駆細胞を骨髄中に同定した。岩田グループは、GALT の RA 生産能を持つ DC サブセットを同定し、RA 生産酵素誘導機序を示した。また RXR アゴニストがレチノイン酸と協調し、T 細胞の腸管粘膜帰巣効率を相乗的に上げることを見出した。稲葉グループは、定常状態において単球が体表リンパ節 DC へ分化することを明らかにした。門脇グループは、ヒト単球から DC を誘導する際、GM-CSF に加え TNF- α や IL-15 を加えるとレチノイン酸合成酵素発現レベルが上がることを示した。今後は、GALT DC サブセットの機能解析を推進し、また新たに同定した DC 前駆細胞や単球を含む DC 前駆細胞の定常状態および炎症状態などにおける粘膜 DC サブセットへの分化能と機能を非粘膜組織との比較において検討する。これと併行して、ヒトおよびマウスにおいて免疫細胞の粘膜への帰巣性を高めるための研究を推進する。

§ 2. 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 (東京医科歯科大学、教授)

② 研究項目

・粘膜免疫における寛容構築メカニズムの解明、免疫寛容誘導技術の開発

(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

・レチノイン酸生産性 DC 誘導機構の解明

(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

・免疫担当細胞間の相互作用に関する解析、マクロファージ/樹状細胞の移動と分化の解析、樹状細胞サブセットの機能解析と Treg の誘導、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

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

(樗木グループ)

腸管粘膜関連リンパ組織 (GALT) に存在する多様な DC サブセットは、獲得免疫系細胞群 (Treg、Th17、IgA 生産など) の分化・機能発現を介して寛容誘導・維持に重要な役割を担っていることが明らかになりつつあり (Tezuka H and Ohteki T. *Immunol Rev* **234**, 247-258 (2010))、同機構の詳細を探求することを目的として研究を推進した。その結果、IgA 生産に関して興味深い知見を得た。腸管粘膜関連リンパ組織 (GALT) では IgA が効率よく生産されるが、cDC に比べ pDC は T 細胞非依存性 IgA 誘導能に優れていることが明らかになった。T 細胞非依存性 IgA 誘導には DC の生産する APRIL および BAFF が重要であるが、GALT の pDC は同じ組織由来の cDC や非粘膜リンパ組織の pDC に比較して、APRIL および BAFF の発現レ

ベルが亢進しており、GALT pDC の IgA 生産誘導優位性は同 APRIL・BAFF に依存していることが示唆された。これらの結果は、GALT において pDC が合目的的にコンディショニングされていることを示唆している。これと関連して、自己免疫疾患との関連が示唆されている I 型 IFN シグナルおよび同シグナルを負に制御する転写因子 IRF2 が造血幹細胞の運命決定制御に重要な役割を担うことを明らかにし¹⁾、本知見に基づき時機適切な開発目標の転換、選択を行った。今後、腸粘膜および皮膚における IFN シグナルおよび IRF2 の役割を追求していきたい。

GALT DC サブセットがどのような前駆細胞に由来するかを探求することは、それら DC サブセットだけでなく前駆細胞を用いた寛容の維持および制御戦略に重要である。現在、定常状態における末梢二次リンパ組織の DC サブセットは共通 DC 前駆細胞 (CDP) などから分化すると考えられているが、我々は新たに強力な pDC 分化能を持つ新規 DC 前駆細胞を同定した。CDP との比較において、新規 DC 前駆細胞は pDC 分化能に数倍優れ、pDC 分化や機能発現に重要な転写因子 E2-2 や IRF8 の発現レベルが亢進していた。今後、新規 DC 前駆細胞の詳細な解析を進めると共に、同細胞を含めた DC 前駆細胞の GALT DC サブセットへの分化能や粘膜帰巢性を比較検討する予定である。

(岩田グループ)

小腸組織およびその関連二次リンパ系器官には RA 生産性 DC が存在する。これらの DC が生産する 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⁺ 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。本研究では個々の DC で RA 生産酵素 RALDH の活性レベルを測定する方法を確立し、主要な RALDH アイソフォーム (RALDH2) の発現を DC に誘導する生理的因子として GM-CSF を見出した³⁾。そこで、GALT において定常的に GM-CSF を産生する細胞を同定し、何故、GALT DC 特異的に RALDH2 発現が誘導される分子メカニズムを解明し、さらに in vivo における RA 産生レベルと DC 機能との関係解明を目指した。

特定病原体の感染が無く (SPF)、特別に抗原感作も行っていない (ナイーブ) マウスにおいて、MLN とパイエル板 (PP) の DC だけでなく、小腸粘膜固有層 (LP) の DC も RALDH2 を発現する。LP-DC については、CD11c^{high}CD11b^{low/high}SSC^{low} (side scatter low) CD86⁺MHC class II^{high} 細胞が RALDH2 を発現することを見出した³⁾。また、GM-CSF が DC に RALDH2 を強く発現誘導することを見出し、生理的にも主要な RALDH2 発現誘導因子であることを GM-CSF 受容体欠損マウスを用いて検証し、さらに、GM-CSF 遺伝子欠損マウスにおいても同様に確認した。GM-CSF 産生細胞は、ナイーブ SPF マウスでも MLN および小腸粘膜組織に定常的に存在し、MLN および LP では CD11c⁺F4/80⁺ マクロファージ様細胞であり、LP および粘膜上皮間では T 細胞サブセットであった。しかし、ビタミン A 欠損マウスでは、MLN・マクロファージ様細胞の GM-CSF 発現は著しく減弱しており、GM-CSF 発現における RA の役割が示唆された。そして、GM-CSF による RALDH2 発現誘導には、RAR シグナルが必須であることが判明した。RA は DC 分化の初期過程ではむしろ分化抑制に働くが、成熟過程において RALDH2 発現に関与す

る可能性が示唆された。さらに、ビタミン A 欠損マウスの MLN-DC は RALDH2 をほとんど発現しないばかりでなく、Th17 細胞の分化誘導を著しく促進し、Treg 分化誘導や CCR9 発現誘導の能力は低かった。さらに、DC を用いて T 細胞に小腸特異的ホーミング受容体 CCR9 の発現誘導を解析する過程で、RA による RAR 刺激に加えて RXR 刺激があると著しく CCR9 発現が促進されること、そして抗原を投与する時間の長さも CCR9 発現に著しい影響を与えることを見出した。CCR9 の発現には、転写因子 NFATc2 とレチノイン酸受容体 (RAR)/レチノイド X 受容体 (RXR) ヘテロダイマーが CCR9 遺伝子プロモーター上で複合体を作り、協調的に作用することが必要であった。今後、ビタミン A および RA レベルの低下が免疫寛容構築に及ぼす影響を、DC および獲得免疫系細胞群の機能分化を主な指標として検討し、さらにこれらの機能分化における RAR および RXR シグナルの分子メカニズムを追求して、RA を基盤とした GALT 免疫寛容誘導技術の開発へと繋げる。

(稲葉グループ)

末梢リンパ器官の樹状細胞サブセットは定常状態に於いては common myeloid precursor (CMP) に由来する macrophage-DC precursor (MDP) から common DC precursor (CDP)、pre-cDC を経て分化してくると考えられている。しかし、炎症応答時には Ly6C を強発現する未熟な単球が局所へと移動して、CD11b を発現する樹状細胞やマクロファージへと分化することが知られる。一方、肺においては、Ly6C⁺単球からは CD103⁺CD11b^{lo} が、Ly6C^{low} 単球からは CD103⁻CD11b^{hi} の 2 種の樹状細胞サブセットが分化してくることが報告されている。しかしながら、リンパ系器官に於いてこれら単球が樹状細胞へと分化しているのかどうかについては、これまで詳細な検討はなされていない。

樹状細胞には種々のパターン認識受容体が発現されており、それらが自己と非自己の認識に重要な役割を担うことが明らかであり、我々も C 型レクチンの内 DC-SIGN のホモログについての解析を進めており、そのうちの SIGNR3 を発現する組織器官を RT-PCR により検討したところ、脾臓、リンパ節、胸腺等のリンパ器官に加えて、肺や真皮、末梢血中に存在することが示された。そこで、特異的 mAb を作製して、生体内における発現細胞を検討したところ、体表リンパ節においては、真皮に由来する細胞が分布する interfollicular region に加えて、HEV 周辺にも検出された。これらは CD11c⁺DC と CD11c^{low} の細胞により構成され、前者は MHC class II^{hi} の DC、後者は MHC II^{int} の単球様細胞であった。なお、真皮においても CD11c⁺ と CD11c^{low} の SIGNR3⁺ 細胞が確認されているが、その構成比率は逆転していた。脾臓では、SIGNR3⁺細胞は、T 領域だけでなく、赤脾髄にも分布していたが、これらの一部は CD11c⁺ CD11b⁺ DC であり、多くは CD11c^{lo} MHCII^{int} であった。また、肺でも SIGNR3⁺細胞の多くは CD11c^{lo} CD11b⁺ であり、末梢血単球において SIGNR3 を発現するのは Ly6C^{low}CD11c^{lo} の細胞であり、Ly6C^{hi} の細胞には発現は認められなかった。しかも、これら SIGNR3 の発現によって区別される 2 種の単球は、これまで報告されているように Ly6C^{hi}SIGNR3⁻細胞には CD62L が強発現されていた。これら、SIGNR3⁺細胞がどの末梢血単球に由来するのかを検討するため、まず CD115⁺ CD11b⁺ の

単球を蛍光標識後に正常マウスに移入したところ、リンパ節では2時間後には専ら Ly6C^{hi}の細胞が移動していたが、脾臓では Ly6C の発現強度による差は認められなかった。そこで、CD115⁺ Ly6C^{hi}の骨髄中の単球を精製して、同様の移入実験を行った。その結果血液中や骨髄では1日後でも移入した細胞には Ly6C が高発現されたままであったが、その後 Ly6C 発現の低下と共に SIGNR3 の発現上昇が認められた。これに対して、脾臓では1日後には弱いながら SIGNR3 の発現が認められ、同様に体表リンパ節でも移入細胞が HEV 近傍に分布し、それらの一部に SIGNR3 の発現が検出された。Ly6C^{hi} CD11b^{hi}の骨髄単球の移入でも、同様の結果が得られ、3日後には体表および腸間膜リンパ節や脾臓、肺でも移入細胞の多くが CD11c の発現を徐々に上昇させると共に SIGNR3⁺となった。ところが、CD11c⁺ MHC II^{hi}の DC への有意な分化が認められたのは、体表リンパ節のみであった。

以上の結果より、体表リンパ節中の CD11b⁺DC の中には、DC precursor に由来するものに加えて、単球に由来する細胞が存在していることになる。従って、定常状態に於いて末梢血中の Ly6C^{hi}単球もリンパ器官へと移動して細胞増殖を伴わずに DC へと分化する可能性が示された。単球からの DC への分化制御は組織によって異なる可能性が残る。また、これらの細胞の腸管への移動・分化にくわえて、それらの機能解析も残された課題である。

(門脇グループ)

ヒト寛容誘導性 DC を得るために、ヒト DC に RALDH2 の発現を誘導する因子を同定することを目的とした。GM-CSF+IL-4 による未熟 MoDC の誘導にて RALDH2 mRNA が誘導され、LPS、あるいはプロスタグランジン E2 を含む炎症性因子の成熟刺激によって RALDH2 mRNA の発現はさらに上昇した。また、RALDH 活性の測定を併用した結果、未熟 MoDC 誘導時に IFN- γ と 9-cis-retinoic acid を添加し、LPS にて成熟を誘導することにより、RALDH 活性の強い上昇が見られた。mDC においては、RALDH2 発現レベルが MoDC より全体的に低い傾向にある一方、9-cis-retinoic acid および PPAR γ リガンドである rosiglitazone によって RALDH2 の強力な誘導が見られた。以上の結果より、マウス同様に、GM-CSF, IL-4, 成熟刺激により DC における RALDH2 の発現上昇が見られるとともに、さらに新たな条件にて RALDH 活性の強い誘導が見られた。今後、広汎な検討によって基本条件(サイトカインの種類、培養液の組成、培養日数)を最適化し、その結果を踏まえて、種々の DC サブセットを用いて寛容誘導性 DC を誘導する。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

・論文詳細情報

1. Sato T, Onai N, Yoshihara H, Arai F, Suda T, and Ohteki T. Interferon regulatory factor-2 protects quiescent hematopoietic stem cells from type-I interferon-dependent exhaustion. *Nat Med* 15, 696-700 (2009). doi:10.1038/nm.1973

2. Asano J, Tada H, Onai N, Sato T, Horie Y, Fujimoto Y, Fukase K, Suzuki A, Mak TW, and Ohteki T. Nod-like receptor signaling enhances dendritic cell-mediated cross-priming *in vivo*. *J Immunol* **184**, 736–745 (2010). doi: 10.4049/jimmunol.0900726
3. Yokota A, Takeuchi H, Maeda N, Ohoka Y, Kato C, Song Si-Young, and Iwata M. GM-CSF and IL-4 synergistically trigger dendritic cells to acquire retinoic acid-producing capacity. *Int Immunol* **21(4)**, 361–377 (2009). doi:10.1093/intimm/dxp003