

樗木 俊聡

東京医科歯科大学難治疾患研究所・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、昨年度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 の質的優位性を報告し、併せて、昨年度同定した強力な pDC 分化能を持つ新規 DC 前駆細胞の解析、本年度見出した炎症時の「過剰な免疫反応」を制御する新規免疫寛容機構の解析などを推進した。α4β7/CCR9 は T・B 細胞の GALT への帰巢性を担う分子であるが、岩田グループは、レチノイン酸 (RA) による CCR9 転写誘導に NFATc2 が重要なこと、RAR/RXR の共刺激シグナルが制御性 T 細胞の α4β7/CCR9 発現促進に有効なこと、RA 分解酵素として CYP26B1 が重要なことなどを報告した。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 へ分化することを報告した。門脇グループは、ヒト mDC に強力な RALDH 活性を誘導する方法を見出した。今後、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 GALT DC サブセットへの分化能を検討する。これと併行して、ヒトおよびマウスにおいて免疫寛容誘導能を持つ T・B 細胞や DC 前駆細胞の粘膜帰巢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」グループ

- ① 研究分担グループ長: 樗木 俊聡 (東京医科歯科大学難治疾患研究所、教授) (研究代表者)
- ② 研究項目
  - ・ 粘膜および末梢免疫寛容環境構築における DC サブセットの役割分担
  - ・ ヒトおよびマウスにおける DC 前駆細胞の解析
  - ・ DC 前駆細胞の粘膜 DC サブセット供給能

(2)「岩田」グループ研究分担グループ長:岩田 誠 (徳島文理大学香川薬学部、教授)(主たる共同研究者)

① 研究項目レチノイドシグナルによる制御性 T 細胞の粘膜移入誘導法の開発

- ・ RA 生産性 DC 誘導機構の解明
- ・ RA 分解メカニズムの解明
- ・ ビタミン A レベルが経口免疫寛容誘導に及ぼす影響

(3)「稲葉」グループ

① 研究分担グループ長:稲葉 カヨ (京都大学大学院生命科学研究科、教授)(主たる共同研究者)

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・DC の移動と分化の解析
- ・ DC サブセットの機能解析と Treg の誘導

(4)「門脇」グループ

① 研究分担グループ長:門脇 則光 (京都大学大学院医学研究科、准教授)(主たる共同研究者)

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)

昨年度に引き続き DC および DC 前駆細胞の粘膜組織免疫寛容構築メカニズムの解明を目指して研究を推進した。昨年度までに、腸管粘膜関連リンパ組織(GALT)に存在する pDC は、cDC に比べ T 細胞非依存性 IgA 誘導能に優れており、この性質が pDC に優位に発現する APRIL および BAFF に依存していることを示した。今年度は、その分子基盤として、腸内常在菌依存性に GALT ストローマ細胞から I 型 IFNs が生産され、同 I 型 IFNs が pDC に作用して APRIL および BAFF が誘導されることを明らかにした。I 型 IFNs 受容体が、pDC に発現しているのとは対照的に cDC にはほとんど発現していないことも見出し、これが I 型 IFNs による pDC 選択的コンディショニングの一因であることが示唆された<sup>1)</sup>。さらに岩田グループとの共同研究において、cDC に比べ、pDC のレチノイン酸合成酵素(RALDH1A2)の発現レベルが著しく低いこと、因って pDC がレチノイン酸(RA)依存性に IgA 生産誘導を担う、あるいはリンパ球に腸粘膜帰巢性を

付与する可能性が極めて低いことを示した<sup>1)</sup>。また、昨年度に引き続き、新規 pDC 前駆細胞の解析を行った結果、*ex vivo* の Flt3 リガンドを用いた結果同様、*in vivo* においても強力な pDC 分化誘導能が確認された(未発表)。既に報告されている DC 前駆細胞との関係における分化系譜や GALT DC サブセットへの分化供給能をさらに追求したい。さらに、ユニークな免疫寛容誘導機構を明らかにしつつある。重篤な炎症状態においてしばしば“血球貪食現象”が観察されるが、その免疫学的意義は明らかではない。樗木グループは、新たに血球貪食モデルを樹立し、貪食細胞が単球由来の DC であること、血球貪食依存性に生体内の IL-10 や TGF- $\beta$  レベルを亢進させて、CTL による自己組織障害を伴う「過剰な免疫反応」を抑制し個体死を回避していることを突き止めた(未発表)。“血球貪食現象”を新たな免疫寛容機構と捉え全貌を明らかにしたい。

(岩田グループ)

レチノイドシグナルを利用した腸管粘膜炎症の制御を目指して研究を推進した。レチノイドシグナルは RA 合成系と CYP26 ファミリー酵素を含む RA 分解系のバランスによって制御される。GALT の活性化/メモリー T 細胞において CYP26B1 の発現を見出した<sup>2)</sup>。この発現は RA に依存すると思われる。RA はナイーブ T 細胞の活性化の際に作用して、CYP26B1 発現を誘導し、RA による小腸帰巢性受容体 CCR9 の発現を負に調節していることを見出した。しかし、制御性 T 細胞(Treg)および Th17 の誘導に関与する TGF- $\beta$  や、Th1 誘導に関与する IL-12 は CYP26B1 発現に抑制的に作用し、Th2 誘導に関与する IL-4 あるいは炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  は促進的に作用した。T 細胞機能分化の方向によって、CYP26B1 の影響が異なると思われた。昨年度までに、T 細胞において、CCR9 遺伝子プロモーター上での転写因子 NFATc2 と RA 受容体(RAR)/レチノイド X 受容体(RXR)ヘテロダイマーの複合体形成が RA による CCR9 発現誘導に必要であり<sup>3)</sup>、さらに、RA による RAR 刺激に加えて RXR からの共刺激が CCR9 発現を著しく促進することを見出した。今年度は、これに基づき、naturally-occurring Treg に、Foxp3 発現を維持したまま、腸帰巢性受容体  $\alpha 4\beta 7$  と CCR9 の発現を高率に誘導することに成功した<sup>4)</sup>。また、昨年度までに、DC における RA 合成酵素 RALDH2 の発現誘導では、GM-CSF が主役を演じ、RA 自体が補助的役割を果たすことなどを示したが、今年度は、RALDH2 発現誘導には、初期にタンパク質キナーゼの活性化と新たなタンパク質の生合成が必須であること、さらにエピジェネティックな制御が関与する可能性を見出した(未発表)。また、ビタミン A 欠損マウスでは、経口免疫寛容が成立し難いこと、腸間膜リンパ節の cDC が種々の好炎症性 T 細胞を誘導する高い能力を持つことを見出した(未発表)。今後、この cDC の中に役割の異なるサブセットが存在する可能性を追求するとともに、RALDH2 発現と制御の分子基盤を解明して、腸粘膜炎症の制御と免疫寛容の機構を明らかにしたい。

(稲葉グループ)

末梢リンパ器官の DC サブセットは定常状態に於いては common myeloid precursor (CMP) に由来する MDP から CDP、pre-cDC を経て分化してくると考えられている。一方、炎症状態に於

いては Ly6C を強発現する単球が局所へと移動して DC やマクロファージへと分化することが知られる。昨年度に引き続き、定常状態のリンパ系器官に於いて単球が DC へと分化しているのかどうかを明らかにすることを目的として研究を推進し、以下の知見を報告した<sup>5)</sup>。

DC に発現する C 型レクチンである SIGNR3 に対する特異的モノクローナル抗体を作製して、生体内における SIGNR3 発現細胞を検討したところ、体表リンパ節では、真皮に由来する DC と単球様細胞であった。これら SIGNR3<sup>+</sup>細胞がどの末梢血単球に由来するのかを検討するため、末梢血および骨髄の単球を蛍光標識して移入実験を行ったところ、移入後間もなく Ly6C<sup>hi</sup> 単球がリンパ節に検出され、その後、Ly6C 発現の低下と共に SIGNR3 の発現が上昇し、3 日後以降には移入細胞の多くが CD11c の発現を徐々に上昇させると共に SIGNR3<sup>+</sup>となり、CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>hi</sup> の DC への有意な分化も認められた。以上の結果より、定常状態の体表リンパ節中の DC 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が示唆された。

(門脇グループ)

引き続き粘膜免疫を制御するヒト DC を *in vitro* において創出することを目的として研究を推進した。昨年度までの検討で、単球由来 DC に 9-cis retinoic acid と IFN- $\gamma$  を添加すると、ある程度の RALDH 活性が誘導されるものの、この DC でナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞を刺激しても有意な Foxp3 の発現誘導能は見られなかった。これは、同 DC における RALDH 活性が機能的差異を生じるほど強くないためと考え、培養条件を再検討した。ヒト DC として末梢血 mDC、単球由来 DC、CD34 陽性細胞由来 DC、pDC の4種類を用いた。その結果、特定の DC サブセットが特定の培養条件下のみで強い RALDH 活性を獲得することがわかった。この DC サブセットや培養条件はマウス DC と異なる点が多いことから、ヒトとマウスにおいて、DC が RA 産生能を獲得する環境に差異があることが示唆される。

## §4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ●論文詳細情報

1. Takeuchi H, Yokota A, Ohoka Y, Kagechika H, Kato C, Song S-Y, and Iwata M. Efficient induction of CCR9 on T cells requires co-activation of retinoic acid receptors and retinoid X receptors (RXR): Exaggerated T cell homing to the intestine by RXR activation with organotins. **J Immunol** **185**, 5289-5299 (2010). doi: 10.4049/jimmunol.1000101
2. Nagaoka K, Takahara K, Minamino K, Takeda T, Yoshida Y, and Inaba K. Expression of the C-type lectin, SIGNR3, on subsets of dendritic cells, macrophages and monocytes using a new monoclonal antibody. **J Leukoc Biol** **88**, 913-924 (2010). doi: 10.1189/jlb.0510251

3. Takeuchi H, Yokota A, Ohoka Y, and Iwata M. CYP26B1 regulates retinoic acid-dependent signals in T cells and its expression is inhibited by transforming growth factor- $\beta$ . **PLoS ONE** **6**, 1-8 (2011). doi: 10.1371/journal.pone.0016089
4. Hirai M, Kadowaki N, Kitawaki Y, Fujita H, Takaori-Kondo A, Fukui R, Miyake K, Maeda T, Kamihira S, Miyachi Y, and Uchiyama T. Bortezomib suppresses function and survival of plasmacytoid dendritic cells by targeting intracellular trafficking of Toll-like receptors and endoplasmic reticulum homeostasis. **Blood** **117**, 500-509 (2011). doi: 10.1182/blood-2010-05-284737
5. Ohoka Y, Yokota A, Takeuchi H, Maeda N, and Iwata M. Retinoic acid-induced CCR9 expression requires transient TCR stimulation and cooperativity between NFATc2 and the retinoic acid receptor/retinoid X receptor complex. **J Immunol** **186**, 733-744 (2011). doi: 10.4049/jimmunol.1000913
6. Tezuka H, Abe Y, Asano J, Sato T, Liu J, Iwata M, and Ohteki T. Prominent role of plasmacytoid dendritic cells in mucosal T cell-independent IgA induction. **Immunity** **34**, 247-257 (2011). doi: 10.1016/j.immuni.2011.02.002