

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. 研究実施体制

(1) 樗木グループ

- ① 研究代表者: 樗木 俊聡 (東京医科歯科大学難治疾患研究所、教授)
- 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

- ① 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)
- ② 研究項目
 - ・ レチノイン酸生産性 DC 誘導機構の解明
 - ・ レチノイン酸生産性 DC 誘導法の開発

(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)
- 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)
- 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

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

昨年度に引き続き DC を基軸とした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。これと併行して、DC は寿命が比較的短く、予防・治療戦略上必ずしも理想的ではないため、1つの細胞から多くの DC を生み出すことのできる DC 前駆細胞の同定を目指した。

pDC は定常状態においては免疫寛容誘導に積極的な役割を担うことが明らかになりつつある。樗木グループは、昨年度、pDC が T 細胞を必要としない IgA 産生誘導に優れていることを報告し、また、卓越した pDC 分化能をもつ新規 DC 前駆細胞を同定した。本年度は、同前駆細胞の詳細な解析を進めると共に、DSS 大腸炎モデルを用いて腸炎誘導メカニズムに関する新たな知見を得た。既知の DC 前駆細胞である CDP との比較において、新たに同定した DC 前駆細胞は pDC 分化に必須の転写因子 E2-2 を高発現しており、この重要な知見に基づき、CDP を E2-2^{low}CDP、新規 DC 前駆細胞を E2-2^{high}CDP と再定義した。また、E2-2^{high}CDP 由来の pDC は性状・機能共に通常の pDC と遜色がなく、機能的に正常であることを確認した。pDC は RAG1⁺と RAG1⁻サブセットに二分され、後者は炎症性サイトカインの生産能により優れているが、E2-2^{low}CDP から分化する pDC は大部分が RAG1⁻であり、RAG1⁺pDC の供給源は不明であった。E2-2^{low}CDP との比較において、E2-2^{high}CDP は RAG1⁺pDC と RAG1⁻pDC 両者の供給能に卓越していることを明らかにした。さらに、骨髄における分化系譜上、E2-2^{high}CDP は E2-2^{low}CDP の上流でも下流でもなく、lymphoid-primed MPP から直接分化する可能性を提示した(以上、投稿中)。ヒト DC 前駆細胞の同定を目指した解析も進めており、ヒト化マウス骨髄から Lin⁻Flt3⁺ならびに Lin⁻Flt3⁻細胞を調整し、マイクロアレイ解析を行った。現在、DC 分化能が集約されている Lin⁻Flt3⁺画分に特徴的な分子群を見出し、それらを指標にヒト DC 前駆細胞の絞り込みを行っている。

これらと併行して DSS 誘導性大腸炎モデルを用いて新たな知見を得た。同大腸炎の病態形成には、好中球・単球・好酸球からなる CD11b⁺細胞群が重要な役割を担うが、樗木グループは、特に好中球・単球の浸潤が腸内常在菌依存性であること、また DC 特異的オートファジー不全マウスでは同大腸炎が遷延化することを見出しており、詳細な分子基盤を検討中である。また、腸管粘膜固有層 DC の発現する C 型レクチン SIGNR1 は糖鎖抗原を提示することによって Tr-1 細胞を誘導し、粘膜免疫寛容の成立に寄与していることが報告されている。稲葉グループは、SIGNR1 が *Candida albicans* 表層の mannoprotein を認識して結合し、活性酸素の産生には Dectin-1 と¹、TNF- α の産生においては TLR2 と²、それぞれ協働して働くことが明らかにした。現在、DSS 誘導性大腸炎モデルを用いて C 型レクチンの機能を検討中である。

腸粘膜関連リンパ組織に存在する cDC が産生するレチノイン酸 (RA) は、リンパ球に腸組織帰巢性を付与するだけでなく、iTreg の分化を促進し、Th17 の分化を抑制することで免疫寛容の誘導に寄与している。岩田グループは、独自に開発した RALDH2 活性を個々の DC で測定する方法を用いて RA 産生性 DC を同定し、RALDH2 の発現誘導に生理的 GM-CSF が重要なことを

見出した。また、CCR9 遺伝子プロモーター領域には通常の RA 応答配列 (RARE) の半分の配列が存在しており、ATRA (生理的 RA) の結合した RAR/RXR は、NFATp の助けによって同配列に結合し CCR9 発現を誘導すること、ATRA に加えて RXR アゴニストで刺激すると T 細胞の小腸帰巢性が有意に上昇すること、同処置により nTreg にも効率的に小腸帰巢受容体を誘導できることを示した。さらに、ビタミン A 欠損マウスで経口免疫寛容の誘導を試みると、逆に免疫炎症反応が増悪化することを見出しており、その際、腸間膜リンパ節 (MLN) DC が炎症性サイトカインを産生し、in vitro で Th17 細胞など炎症性エフェクター T 細胞を効率良く分化誘導する知見を得た。また、RALDH2 発現誘導の分子機構について、MAP キナーゼの関与や RALDH2 遺伝子プロモーターの GC-rich 領域と転写因子 SP1、PU.1、RAR/RXR などの寄与を見出しており、詳細を検討中である。RA シグナルレベルの乱れが免疫寛容の破綻や炎症反応の促進に関与している可能性も、IBD モデルマウスやアトピー性皮膚炎モデルマウスを用いて検討中である。IgA 抗体産生の制御における RA シグナルの関与については、樗木グループと共同で明らかにする。

これらマウスで得られた知見に基づき、ヒト DC を用いて RA 産生性 DC の誘導条件について検討した。門脇グループは、樗木・岩田グループと共同で、ヒト末梢血 DC サブセット (mDC, pDC)、単球、さらには臍帯血 CD34⁺細胞由来の DC を、粘膜組織を想定した種々の条件で培養した。その結果、mDC の特定のサブセット (CD1c⁺mDC、マウス CD8 α DC に相当) を GM-CSF および 1 α , 25-dihydroxy vitamin D3 (VD3) の存在下で培養することによって、高い RALDH2 発現を誘導することに成功した。VD3 刺激が内因性 RA を誘導すること、VD3 と同 RA の協調作用と p38MAPK の活性化が RALDH2 発現誘導に重要なことが判明した。この条件下で誘導した RALDH2^{high}mDC は、T 細胞との共培養系において、T 細胞上に粘膜帰巢分子 α 4 β 7 と CCR9 の発現を、さらに T 細胞から Th2 サイトカイン (IL-4, IL-13) の産生を誘導した (以上、投稿準備中)。対照的に、マウス cDC は GM-CSF の単独刺激で十分な RALDH2 の発現誘導が可能であり、VD3 による増強効果は観られなかった。以上により、ヒトにおいては VD3 が DC による RA の産生に重要であり、この DC が T 細胞に粘膜帰巢性と Th2 サイトカイン産生能を誘導することが示された。今後は、臨床検体やヒト化マウスの系を用いて、ヒト GALT DC の解析を始める予定である。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Kazuhiko Takahara, Sumika Tokieda, Koji Nagaoka, Tatsuki Takeda, Yukino Kimura and Kayo Inaba. “C-type lectin SIGNR1 enhances cellular oxidative burst responses against *C. albicans* in cooperation with Dectin-1”, Eur. J. Immunol. vol. 41, No. 5, pp.1435-1444, 2011 (DOI:10.1002/eji.200940188)
2. Kazuhiko Takahara, Sumika Tokieda, Koji Nagaoka and Kayo Inaba, “Efficient capture of *C. albicans* and zymosan by SIGNR1 augments TLR2-dependent TNF- α production”, Int. Immunol. vol. 24, No. 2, pp.89-96, 2012 (DOI: 10.1093/intimm/dxr103)
3. Mitsuhiro Kanamori, Tomonori Iyoda, Maki Ushida, and Kayo Inaba, “Sulfatide inhibits α -galactosyl ceramide presentation by dendritic cells”, Int. Immunol, vol. 24, No. 2, pp.129-36, 2012 (DOI: 10.1093/intimm/dxr108)