

樗木俊聡

国立大学法人 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 主たる共同研究者: 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)

樹状細胞(dendritic cell, DC)を基軸として腸粘膜組織における免疫寛容誘導・維持とその破綻機構の解明を目指して研究を推進した。また、1つの細胞から多くの DC を生み出すことのできる DC 前駆細胞の同定を行った。

二次リンパ組織の DC は従来型 DC (conventional DC, cDC)と形質細胞様 DC (plasmacytoid DC, pDC)に大別される。DCのみを生み出し、他の血液細胞をまったく作らない DC 前駆細胞の同定は、基礎研究ならびに疾患の予防・治療戦略上の興味を同時に包含する重要なテーマである。過去に cDC 分化能に優れた CDP (common DC progenitors)を報告したが、pDC 分化能に優れた DC 前駆細胞は未同定であった。樗木グループは、稲葉グループとの共同研究で、昨年度までに当該細胞の同定に成功していたが、本年度は投稿後に多くの追加実験を行い採択に至った (**Immunity**, in press)¹。この前駆細胞は、pDC の分化に必須の転写因子 E2-2 を高発現していることから、従来の CDP を E2-2^{low} CDP、新たに見出した細胞を E2-2^{high} CDP と再定義した。E2-2^{high} CDP は pDC 分化能に優れてはいるものの、cDC への分化能も残存しているため、厳密に pDC のみに分化する DC 前駆細胞の同定は残された課題である。この課題を解決するため、本年度は E2-2 レポーターマウスを作製し解析を開始した。これと併行してヒト DC 前駆細胞の同定を試みている。現在までに、ヒト臍帯血およびヒト化マウスを用いてマクロファージおよび DC の分化能をもつヒト前駆細胞を同定した(未発表につき詳細は非公開)。一方、腸粘膜組織における DC あるいはマクロファージの前駆細胞として単球に着目し、定常状態・炎症状態の両面から解析を進めた。樗木グループは、Tip-DC (TNF/iNOS producing DC)が腸粘膜における IgA 産生に重要な役割を担うことを報告しているが、腸粘膜に存在する同細胞の前駆細胞が炎症性単球であることを見出している(投稿準備中)。炎症性単球は潰瘍性大腸炎モデルの主な病因細胞の1つでもある。DSS による大腸炎誘導時、同細胞の浸潤が特定の抗生物質感受性の腸内常在菌に依存していることを見出しており、今年度は同抗生物質投与マウスに特定の常在菌群を再定着させる系を新たに構築し解析を進めた。稲葉グループは、炎症性単球に発現する C タイプレクチンの一種である SIGNR3 (CD209)に着目し研究を推進した。CD209 遺伝子は、ヒト炎症性腸疾患関連遺伝子座である 19p13 に存在するが詳細は明らかになっていない。そこで、DSS 誘導性潰瘍性大腸炎モデルを用いて、炎症局所へ誘導される細胞での SIGNR3 の発現およびその経時的変化を調べた。その結果、定常状態に於いても SIGNR3⁺細胞は大腸に存在するが、大腸炎誘導後期(8日目)に同細胞数がピークに達し、それらはマクロファージと DC によって構成されていた。また、これらの細胞は炎症が強い肛門に近い部位に集積することも明らかになった。SIGNR3⁺マクロファージには mannose receptor および F4/80 が発現されていることから、M2 マクロファージであることが予想された。さらに、SIGNR3 欠損マウスでは大腸炎の増悪化も認められた。一方、抑制性 C 型レクチンである DCIR1 の欠損マウスでは大腸炎はむしろ軽減される

傾向にあった。今後は、それらマウスにおける SIGNR3 の発現及び SIGNR3⁺細胞の機能を解析する予定である。

DC の産生するレチノイン酸 (RA) は腸粘膜組織における免疫寛容環境構築に重要である。岩田グループはこれまで、RA 合成酵素 retinal dehydrogenase (RALDH2) の活性レベルを個々の DC で捉えることに初めて成功し、腸関連リンパ系組織のレチノイン酸 (RA) 産生性 DC を同定した。また、同 DC における RALDH2 発現誘導機構の詳細を解明し、RA だけでなく RXR アゴニスト刺激によって T 細胞への小腸帰巢受容体の発現誘導や Foxp3⁺iTreg 誘導効率が上昇すること、対照的に Th17 分化は抑制されることなどを明らかにしてきた。今年度は、樗木グループとの共同研究として、ビタミン A 欠乏マウスで経口免疫寛容誘導を試みたところ、興味深いことに、特定抗原に対する免疫寛容は誘導されず、逆に免疫反応が亢進することを見出した。これらのマウス腸間膜リンパ節 (MLN) DC は炎症性サイトカインを産生していた。同 MLN DC は Th17 細胞ならびに IL-13 産生性の炎症性 Th2 細胞を効率よく誘導し、それら T 細胞は炎症組織または皮膚への帰巢受容体を発現していた。さらに同炎症性 Th2 細胞は抗原特異的かつ多量の血中 IgG1 さらには IgE 抗体を誘導した (論文投稿中)。これらの結果から、小腸からのビタミン A の吸収が MLN-DC の機能に重要な影響を及ぼすことが示唆され、ビタミン A の摂取とともに脂質吸収に関わる胆汁の分泌なども、MLN-DC の正常な機能に重要なことが推測された。粘膜に起因する炎症性疾患の治療に新たな方法原理を提供できる可能性がある。門脇グループは、昨年度までに、ヒト末梢血を用いて RA 産生性 DC を同定した。即ち、ミエロイド DC (mDC) のうち CD1c⁺ mDC サブセットのみが、GM-CSF および 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 (VD3) の刺激を受けることによって RALDH2 を高発現し、RA 依存性にナイーブ T 細胞上に粘膜帰巢性分子を誘導し、さらに Th2 細胞への分化を促進することを見出した。今年度は、樗木・稲葉グループと連携して、さらにヒト MLN DC の RA 産生能を検討した。その結果、GM-CSF と VD3 の刺激により、CD103⁺ DC ではなく CD103⁻ DC が RA 産生能を獲得することが明らかになった。以上より、ヒト MLN DC も末梢血 DC と同様に、GM-CSF と VD3 の刺激により RA 産生能を獲得するが、マウスと異なり CD103 という RA 産生性 DC のマーカーがヒトでは当てはまらないこと、ヒト DC においてのみ VD3 による RA 産生が誘導されることが明らかになった (以上、論文投稿中)。さらに、GM-CSF と VD3 の刺激によってヒト末梢血 CD1c⁺ mDC に発現が誘導される遺伝子を SAGE 法にて網羅的に解析した結果、複数の遺伝子の発現亢進が認められた。これらの分子が、CD1c⁺ mDC 内の VDR 以降のシグナル経路で機能し、RALDH2 の発現を誘導していると考え解析を進めている。

以上より、今年度も概ね順調に研究を遂行できた。来年度は最終年度に当たることから、分担者との連携を図りつつより一層の成果を目指したい。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Onai N, Kurabayashi K, Hosoi-Amaiike M, Toyama-Sorimachi N, Matsushima K, Inaba, K, and Ohteki T. A clonogenic progenitor with prominent plasmacytoid dendritic cell developmental potential. **Immunity**, accepted (2013)
2. Sato T, Ikeda M, Yotsumoto S, Shimada Y, Higuchi T, Kobayashi H, Fukuda T, Ohashi T, Suda T, and Ohteki T. Novel interferon-based pre-transplantation conditioning in the treatment of a congenital metabolic disorder. **Blood**, in press (Published online before print February 14, 2013), (DOI: 10.1182/blood-2012-07-443713)
3. Ichikawa A, Kuba K, Morita M, Chiba S, Tezuka H, Hara H, Sasaki T, Ohteki T, Ranieri VM, dos Santos C C, Kawaoka Y, Akira S, Luster AD, Lu B, Penninger JM, Uhlig S, Slutsky AS, and Imai Y. CXCL10-CXCR3 enhances the development of neutrophil-mediated fulminant lung injury of viral and non-viral origin. **Am J Respir Crit Care Med** 187, 65-77 (2013) (DOI:10.1164/rccm.201203-0508OC.)
4. Haruyuki Fujita, Toshio Kitawaki, Takayuki Sato, Takahiro Maeda, Shimeru Kamihira, Akifumi Takaori-Kondo and Norimitsu Kadowaki, “The tyrosine kinase inhibitor dasatinib suppresses cytokine production by plasmacytoid dendritic cells by targeting endosomal transport of CpG DNA”, **Eur J Immunol**, 43, 93-103 (2013) (DOI: 10.1002/eji.201242699)