科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年 5月 28日現在

機関番号：12601

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2011

課題番号：19059004

研究課題名（和文） 自己免疫応答に関わる細胞動態

研究課題名（英文） Cellular dynamics in autoimmune responses

研究代表者

松島 綱治 (MATSUSHIMA KOUJI)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50222427

研究成果の概要（和文）：本研究では、末梢性免疫寛容を担う細胞群の生体内動態とその制御機序・免疫学的意義の解明を目的とした。その結果、1) nTreg のリンパ節遊走が領域ごとに CCR7 と CXCR4 によって制御されること、2) MDSC が単球と好中球からなり、CCR2 がそのバランスを制御していること、3) リンパ節内の抗体産生細胞ニッチサイズが B 細胞依存的に誘導されるリモデリングによって制御されている可能性を明らかにするとともに、4) DOCK2 を介した免疫細胞の遊走・活性化のメカニズムの一端を解明した。

研究成果の概要（英文）：In this project, we aimed to clarify the trafficking of immune cells that are responsible for peripheral immune tolerance. We also addressed the mechanisms and immunological significance of such cellular trafficking. Following results were obtained through this project: 1) CCR7 and CXCR4 regulate the migration of nTreg into lymph node paracortex and medulla, respectively, 2) MDSC are composed of monocytic cells and neutrophils, and balance between these cell types are critically regulated by a chemokine receptor CCR2, 3) niche size of antibody-producing cells in lymph nodes are likely regulated by B-cell mediated remodeling of the niche, 4) novel mechanisms controlling DOCK2-mediated migration and activation of leukocytes were elucidated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	28,800,000	0	28,800,000
2008年度	28,800,000	0	28,800,000
2009年度	28,800,000	0	28,800,000
2010年度	19,719,734	0	19,719,734
2011年度	19,978,935	0	19,978,935
総計	126,098,669	0	126,098,669

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：免疫寛容、細胞動態、ケモカイン、シグナル、樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

1987年の研究代表者らによるケモカインのプロトタイプ IL-8 の発見は、白血球サブセットの特異的組織浸潤を説明する分子基

盤を与えた仕事である。近年、ケモカインと細胞接着因子群でもって、免疫反応時のみならず生理的条件下でのリンパ組織形成などにおけるダイナミックな免疫担当細胞の移

動機序が解明されつつある。

免疫学的自己の末梢組織での認識は、基本的には自己組織抗原を取り込んだ組織樹状細胞の所属リンパ節への移動により介在され、抗原特異的免疫寛容が誘導・維持されているものと理解される。研究開始当時、リンパ組織における末梢性免疫寛容の厳密な介在細胞とそれらによる制御の分子機序については不明なところが多かった。その中でとりわけ重要視されていたのは自然発生型制御性 T 細胞 (naturally-occurring Treg, nTreg) であるが、その生体内動態制御機序は不明であった。また、炎症時に誘導される誘導型制御性 T 細胞 (induced Treg, iTreg) や NKT 細胞、ミエロイド系抑制性細胞 (myeloid-derived suppressor cell, MDSC) といった細胞群についても、末梢組織における分化・機能制御と炎症・免疫応答時におけるケモカインや細胞接着因子による細胞動態制御、細胞間相互作用、生体内クロストークについても未解明の部分が多かった。さらに、これら免疫応答を負に制御する免疫細胞群と獲得免疫系の相互作用の場である所属リンパ節の構造・環境が、炎症・免疫応答時においてどのように変化し、応答や細胞動態の制御に関わるのかも不明な点が多く残されたままであった。

研究分担者は、免疫系特異的に発現する CDM ファミリー分子として DOCK2 を同定し、この分子がリンパ球や好中球の遊走に不可欠な Rac 活性化分子であり、その欠損により、モデル動物において自己免疫疾患の発症を完全にブロックできることを実証した。それ故、DOCK2 は自己免疫応答を制御する上で格好の分子標的になると考えられるが、そのためには各種受容体刺激から Rac 活性化に至る DOCK2 シグナルネットワークの詳細な解析が不可欠である。

2. 研究の目的

末梢における自己抗原認識は、末梢組織における樹状細胞の抗原取り込みと活性化、それに続く所属リンパ節への遊走により介在される。本研究では樹状細胞の末梢組織における分化・性質決定とリンパ節への遊走制御ならびに、リンパ節における寛容誘導の場の形成機序を個体レベルで明らかにする。また、樹状細胞とともに寛容誘導に中心的な役割を果たすと想定される制御性 T 細胞群・MDSC

の動態や、免疫担当細胞間相互作用の支持基盤であるリンパ節の構造変化にも着目し、その免疫学的意義を明らかにする。さらに、自己免疫応答に関わる細胞動態制御シグナルを解明することで、新規自己免疫応答制御法の開発を目指す。

具体的には、

- (1) ケモカインによる Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ nTreg の動態制御の解析
 - (2) MDSC の細胞系列およびケモカインによる動態制御の解析
 - (3) 免疫応答に伴うリンパ節髄質領域構造のリモデリングの詳細と機序の解析
 - (4) 免疫細胞の遊走・分化・活性化を制御するシグナル伝達機構の解析
- を行い、自己免疫応答に関わる細胞動態を制御する細胞・分子機序の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) nTreg の動態制御機序

ケモカイン受容体欠損マウス、中和抗体、低分子アンタゴニストを用いた養子移入実験により、Foxp3⁺ CD4⁺ nTreg の正常状態におけるリンパ節遊走に関与するケモカインを同定する。

(2) MDSC の細胞系列と動態制御

担癌宿主の腫瘍局所および脾臓に誘導される CD11b⁺ Gr-1⁺ MDSC の細胞系譜を同定するとともに、ケモカインによる MDSC 動態制御を解明する。また、同じミエロイド系の細胞である腫瘍浸潤樹状細胞の表現型・機能・生体内動態・細胞系譜についても解析し、MDSC との関連を探る。

(3) リンパ節髄質領域のリモデリング

モデル抗原を各種アジュヴァントとともに免疫、あるいはモデル抗原を発現する病原微生物を感染させた際のリンパ節構造の変化や、リンパ節髄質領域に局在する細胞サブセット、各種遊走因子の発現を明らかにする。また、各種免疫細胞の欠損マウスや除去抗体を用いて、リモデリングに必要な細胞サブセットを同定する。さらに、モデル抗原特異的な B 細胞/抗体産生応答とリモデリングの関係を明らかにする。

(4) 細胞動態を制御するシグナル伝達機構の解明

DOCK2 の機能や構造、細胞内動態制御機構

を包括的な解析を行い、各種受容体から Rac 活性化に至るシグナル伝達経路を解明する。

4. 研究成果

(1) nTreg の動態制御機序

末梢性免疫寛容の維持に中心的な役割を果たす nTreg は、リンパ節では主に傍皮質領域において免疫抑制能を発揮すると考えられる。しかし、その細胞遊走制御機構、とくにリンパ節への移行を制御するメカニズムは解明されていなかった。そこで我々は、各種ケモカイン受容体の欠損マウス・低分子アンタゴニストを用いて、ケモカインによる nTreg の動態制御を解析した。経静脈的に養子移入した野生型 nTreg は、多くが傍皮質領域の高内皮静脈 (HEV) を介してリンパ節内に進入し傍皮質領域に分布したが、一部は髄質領域の HEV より進入し髄質領域に分布した。また、いずれの領域においても DC および Foxp3⁺ T 細胞とクラスターを形成する像を認めた。一方、*Ccr7*^{-/-} nTreg はリンパ節遊走が野生型の約 10%まで低下しており、リンパ節に遊走したごく一部の *Ccr7*^{-/-} nTreg も、主に髄質領域に分布していた。さらに、髄質領域への CCR7 非依存的遊走は CXCR4 アンタゴニストにより著明に抑制されたことから、nTreg のリンパ節遊走には、傍皮質領域の HEV を介した CCR7 依存的経路と、髄質領域の HEV を介した CXCR4 依存的経路が存在することが明らかになった。

(2) MDSC ならびに腫瘍浸潤樹状細胞の細胞系列と動態制御

マウス MDSC は CD11b⁺ Gr-1⁺ の免疫表現型で同定されてきたが、この表現型を示す細胞集団は形態等の観点から極めて不均一な集団である。そのため、MDSC を構成する細胞群の実態や、その生体内動態制御機構は不明であった。我々はマウス皮下腫瘍モデルで誘導される腫瘍浸潤 MDSC について、フローサイトメトリー、*in vivo* BrdU 取り込み試験および並体結合実験により、MDSC が主に骨髓由来炎症性マクロファージと好中球から構成されることを明らかにした。いずれの細胞も末梢組織での増殖応答は示さず、またマクロファージは好中球よりも速く入れ替わることがわかった。さらに、ケモカイン受容体 CCR2 を欠損したマウスでは、マクロファージの腫瘍浸潤が著明に抑制されるのに対し、腫瘍局所における CXCL2 および G-CSF の過剰産生を一因とする好中球の過剰集積が認められた。この結果から、CCR2 が腫瘍浸潤マクロファ-

ジ・好中球の動態制御に中心的な役割を果たすことが明らかとなった。

担癌状態では、腫瘍局所だけでなく腫大した脾臓にも多数のミエロイド系細胞が集積しており、MDSC の reservoir となっていることが示唆されているが、脾臓由来ミエロイド系細胞の再循環動態はこれまで不明であった。光変換蛍光タンパク KikGR、細胞周期可視化タンパク Fucci の遺伝子を導入したマウスを用いて脾臓内および腫瘍内のミエロイド系細胞の動態を解析したところ、腫瘍局所へのミエロイド系細胞の供給に対する脾臓由来細胞の寄与は限定的であることが明らかになった。また、脾臓が骨髓で産生されたミエロイド系細胞の短期的プールとなること、腫瘍内でのミエロイド系細胞の入れ替わりは総じて早いことが明らかとなった。一方で、脾臓における髄外造血は極めて少ないこともわかり、これらの結果を統合して担癌宿主におけるミエロイド系細胞の動態を記述する数理モデルを確立した。

また、組織樹状細胞 (腫瘍浸潤樹状細胞) は従来単球に由来すると考えられていたが、単球系細胞が著減する CCR2 欠損マウスの腫瘍局所にも集積することから、組織樹状細胞は単球系細胞と細胞系列が異なることが示唆された。

これらの結果は、担癌状態においてミエロイド系細胞が量・質・タイミングの点でどのような機能を示すのか、という観点から腫瘍免疫を理解する基盤となりうるものと考えている。

(3) リンパ節髄質領域のリモデリングとその機序

リンパ節において形成された抗体産生細胞は髄質領域に集積するが、その機序や意義については未解明であった。我々は自己免疫疾患モデルを含め、様々な応答に伴ってリンパ節髄質領域がリモデリングされることを見出した。髄質領域のリモデリングは B 細胞と lymphotoxin- β 受容体を介したシグナル依存的に誘導されるプロセスであり、急性応答では一過性の現象として応答とともに収束することが明らかになった。リモデリング過程初期には B 細胞に加えて、Foxp3⁺ CD4⁺ T 細胞、樹状細胞、マクロファージなど多様な免疫細胞集団が局在し、特徴的なクラスターを形成していた。一方リモデリング後の髄質実質領域では、抗体産生細胞と B 細胞が、それぞれコラーゲンが密な領域と疎な領域に局在化されるという像に変化した。リモデリング後の髄質実質領域では CCR7 リガンド

の発現が認められるようになるなど遊走制御がリモデリング前後で変化する可能性が示唆された。リモデリングプロセスはT細胞依存性B細胞応答とは独立して誘導される事象であることが明らかになったが、一方で抗体産生応答と強い相関を示したことから、髄質構造のリモデリングがリンパ節における抗体産生細胞ニッチを形成するプロセスである可能性が示唆された。

(4) 細胞動態を制御するシグナル伝達機構の解明

DOCK2-GFP 融合タンパク質を発現するノックインマウスを作製することで、好中球遊走における DOCK2 の細胞内動態が PIP3 とホスファチジン酸という2つのリン脂質によって連続的に制御されていることを見出し、先端端形成に関する新しいモデルを提唱した。また、DOCK2 が形質細胞様樹状細胞の遊走に不可欠な Rac 活性化分子であることを明らかにすると共に、TLR による抗原認識とは独立して DOCK2-Rac シグナル伝達系が作動し、IKK- α の活性化を介して、I 型インターフェロン産生を選択的にコントロールするという、新しい制御機構の存在を明らかにした。さらに、DOCK2-Rac シグナルがヘルパーT細胞の分化にも重要な役割を演じることを実証すると同時に、DOCK2 DHR-2 ドメインと Rac の複合体の構造決定に成功し、この相互作用をブロックできる低分子化合物を同定した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 32 件)

- ① Matsushima K (著者 11 名、11 番目): Chemokine receptor CXCR3 facilitates CD8⁺ T cell differentiation into short-lived effector cells leading to memory degeneration. **J. Exp. Med.** 208(8):1605-1620, 2011 (査読有)
DOI: 10.1084/jem.20102101
- ② Matsushima K (著者 10 名、10 番目): Bone marrow graft-versus-host disease: early destruction of hematopoietic niche following MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. **Blood.** 115(26):5401-5411, 2010 (査読有)
DOI: 10.1182/blood-2008-01-136895
- ③ Fukui Y (著者 17 名、17 番目): Selective control of type I IFN induction by the Rac activator DOCK2 during TLR-mediated

plasmacytoid dendritic cell activation. **J. Exp. Med.** 207: 721-730, 2010 (査読有)

DOI: 10.1084/jem.20091776

- ④ Fukui Y (著者 16 名、16 番目): Sequential regulation of DOCK2 dynamics by two phospholipids during neutrophil chemotaxis. **Science** 324: 384-387, 2009 (査読有)

DOI: 10.1126/science.1170179

- ⑤ Matsushima K (著者 11 名、11 番目): Chemokine-mediated rapid turnover of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. **Blood.** 111(12): 5457-5466, 2008 (査読有)

DOI: 10.1182/blood-2009-11-253559

- ⑥ Fukui Y (著者 13 名、13 番目): T helper type 2 differentiation and intracellular trafficking of the interleukin 4 receptor- α subunit controlled by the Rac activator Dock2. **Nat. Immunol.** 8: 1067-1075, 2007 (査読有)

DOI: 10.1038/ni1506

[学会発表] (計 91 件)

- ① Fukui Y: Immune regulatory functions of DOCK2 in health and disease. ESF-JSPS Frontier Science Conference Series for Young Researchers, 2011 年 3 月 1 日-6 日、Amsterdam、オランダ
- ② Matsushima K: Chemokines as therapeutic targets of inflammatory diseases and cancer. 14th International Congress of Immunology, 2010 年 8 月 27 日、神戸ポートピアホテル、兵庫県

[図書] (計 7 件)

- ① 松島 綱治 (著者 5 名、1 番目)「改訂版 分子予防医学」分子予防環境医学会 編、本の泉社、p5-19、2011

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

- ① 名称: 移植片対腫瘍効果を保存した免疫学的再構築促進剤または感染症予防剤

発明者: 松島綱治、上羽悟史、庄野雄介

権利者: 東京大学

種類: PCT

番号: PCT/JP2009/68805

出願年月日: 平成 21 年 1 月 4 日

国内外の別: 日本、米国、中国、オーストラリア

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松島 綱治 (MATSUSHIMA KOUJI)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：5 0 2 2 2 4 2 7

(2) 研究分担者

福井 宣規 (FUKUI YOSHINORI)
九州大学・生体防御医学研究所・教授
研究者番号：6 0 2 4 3 9 6 1

(3) 連携研究者

橋本 真一 (HASHIMOTO SHINICHI)
金沢大学・医薬保健研究域・特任教授
研究者番号：0 0 3 1 3 0 0 9

倉知 慎 (KURACHI MAKOTO)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：0 0 3 9 6 7 2 2

上羽 悟史 (UEHA SATOSHI)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：0 0 4 4 7 3 8 5