

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19571

研究課題名(和文) 樹状細胞のホメオスターシスに関する新規IL-27シグナル伝達の解明

研究課題名(英文) Analysis of the novel IL-27 signaling pathway involved in homeostasis of dendritic cells

研究代表者

梶田 美穂子 (KAJITA, Mihoko)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任助教

研究者番号：00607442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：申請者はIL-27受容体を構成するWSX-1の欠損マウスにおいて、加齢に伴い二次リンパ組織中の樹状細胞(DC)が減少すること、さらに全身性の自己免疫疾患を発症することを見出している(未発表データ)。本研究期間中には、加齢したWSX-1欠損マウスにおけるDCの減少が、骨髄におけるDC前駆細胞からの分化抑制よること、またIFN- $\gamma$ によって、骨髄のFlt3陽性細胞群が減少すること等を明らかにした。加齢したWSX-1欠損マウスにおいては、血中のIFN- $\gamma$ レベルが上昇することから、そのIFN- $\gamma$ が骨髄のDC前駆細胞に作用し、DCの分化が抑制されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In mice deficient for WSX-1, which is a component of IL-27 receptor, the number of dendritic cells (DCs) substantially decreased in lymphoid tissues and the mice developed systemic autoimmune diseases with age (Kajita et al. unpublished data). In this study, I found that DC development in the bone marrow culture was profoundly suppressed in aged WSX-1-deficient mice compared with young WSX-1-deficient mice. Moreover, IFN- $\gamma$  treatment of bone marrow cells inhibited Flt3-induced DC development. IFN- $\gamma$  treatment also suppressed Flt3 expression on the lineage negative cells in vitro. These data suggest that in aged WSX-1-deficient mice, the reduction of DCs in lymphoid tissues is caused by the aberrant development of DCs.

研究分野：免疫学, 分子腫瘍学

キーワード：dendritic cells WSX-1

## 1. 研究開始当初の背景

樹状細胞 (dendritic cell: DC) は強力な抗原提示細胞であり、全身に分布し、獲得免疫誘導及び免疫寛容維持などの重要な役割を担っている。マウス二次リンパ組織には従来型樹状細胞サブセット (conventional DC: cDC) や強力な I 型インターフェロン産生能を保有する形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid DC: pDC) など機能の異なるサブセットが存在していることが知られている。

WSX-1 は I 型サイトカインレセプターであり、gp130 と共に IL-27 受容体を形成する。WSX-1 を欠損したマウスでは病原体感染時における Th1 型免疫反応の誘導に障害が生じるほか、感染後に炎症性サイトカインの過剰産生が認められるなど、IL-27 の作用と相関する現象が報告されている。一方、IL-27 や WSX-1 によって引き起こされる現象について、加齢に伴う変化について報告した例はない。

申請者は 5 ケ月齢以上の WSX-1 欠損マウスを解析し、リンパ節、腸間膜リンパ節、脾臓などの二次リンパ組織では cDC や pDC が大幅に減少していることを発見した。さらに、リンパ節や脾臓の肥大、CD4+ 及び CD8+T 細胞の活性化、血清中の IFN- $\gamma$  の上昇、血清中の抗 DNA 抗体の上昇など自己免疫疾患を示唆する表現型が認められた。興味深いことに、これらの表現型は若齢の WSX-1 欠損マウス (8 週齢ごろ) では全く見られなかった。つまり、WSX-1 欠損のみで引き起こされるのではなく、加齢に伴う何らかの因子との相互作用か、あるいは加齢に伴って IL-27/WSX-1 シグナルの免疫機構への寄与が変化し、上記のような表現型へ繋がっていることが考えられた。まずは上記の多様な表現型が互いに関わっているのか、またどの表現型が最初に生じるのかを明らかにし、DC の減少や自己免疫疾患の発症の原因を解

明することを目指した。

## 2. 研究の目的

上記の通り、加齢した WSX-1 欠損マウスにおいて二次リンパ組織における DC の減少や自己免疫疾患の発症の原因を解明することを目的とした。これまでの報告により、DC の免疫寛容への寄与や、DC 欠損マウスでは自己免疫疾患が生じることが示されていることから、まずは DC の減少する原因を明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

### ① 骨髄細胞培養系を用いた DC 分化の解析

まず、二次リンパ組織における DC の減少が、DC の分化抑制によるものなのかを検討した。若齢 WSX-1 欠損マウスと加齢 WSX-1 欠損マウスから骨髄細胞を調整し、30 ng/ml Flt3 ligand 存在下で 8 日間培養して DC への分化を誘導した。その後 FACS にて cDC や pDC への分化度合いを調べた。また、Flt3 ligand と共に IL-27 を添加することにより IL-27 が直接 DC の分化に影響を与える可能性について解析した。さらに血中の IFN- $\gamma$  上昇が DC 分化に与える影響についても検討した。

### ② DC 分化抑制の分子機構の解析

IFN- $\gamma$  によって DC 分化が抑制される分子機構について、骨髄における分化マーカー陰性細胞群における Flt3 発現への影響を解析した。まず、野生型マウスから骨髄細胞を調整し、ウシ胎児血清存在下で 20 ng/ml IFN- $\gamma$  を添加し 24 時間培養した。その後分化マーカー陰性細胞群における Flt3 発現を比較した。STAT1 欠損マウス由来の骨髄細胞についても、同様の実験を行った。

### ③ 細胞特異的 WSX-1 欠損マウスの作製

T 細胞特異的 WSX-1 欠損マウス (Lck-cre : WSX-1<sup>fllox/fllox</sup>) や DC 特異的 WSX-1 欠損マウ

ス (CD11c-cre : WSX-1<sup>flox/flox</sup>) を作製した。

#### 4. 研究成果

##### ①骨髄細胞培養系を用いた DC 分化の解析

加齢した WSX-1 欠損マウスにおける二次リンパ組織での DC の減少が、DC の分化異常によるものかを調べるため、若齢 WSX-1 欠損マウスと加齢 WSX-1 欠損マウスから骨髄細胞を調整し、Flt3 ligand 存在下で DC への分化を誘導した。コントロールとして、野生型の若齢マウスと加齢マウスについても同様の実験を行った。その結果、野生型マウスについてはマウスの月齢による DC 分化の程度に変化はなかったが、WSX-1 欠損マウスでは、加齢マウスにおいて pDC や cDC への分化が著しく抑制されていた (図 1)。また、若齢 WSX-1 欠損マウスでは DC 分化に影響がなかったことから、この条件下では、

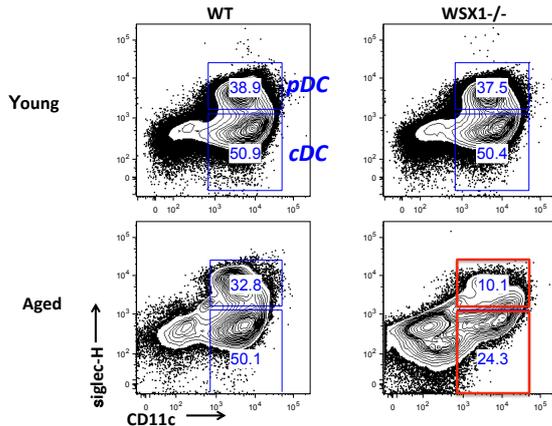


図 1 WSX-1 欠損による DC 分化への影響

WSX-1 の欠損のみでは DC 分化に影響を与えないことがわかった。

また、IL-27 シグナルが DC 分化に直接影響を与える可能性について、野生型マウスの骨髄を用いた同様の実験系に IL-27 を添加して DC 分化への影響を調べた。その結果、IL-27 の添加により DC 分化の度合いに顕著な変化はみられなかった。若齢 WSX-1 欠損マウスでは骨髄細胞の DC 分化に影響がなかったことと合わせて考えると、IL-27-WSX-1 シグナルが直接 DC 分化に影響を与えるので

はなく、なんらかの加齢シグナルが重要であることが考えられた。

さらに、加齢した WSX-1 欠損マウスでは血中の IFN- $\gamma$ 濃度が上昇していることから、IFN- $\gamma$ が DC の分化を抑制する可能性について検討した。上記の実験と同様に野生型の骨髄細胞を調整し、Flt3 ligand と共に IFN- $\gamma$  を添加して DC への分化を誘導した。その結果、IFN- $\gamma$ を添加した DC の分化が著しく抑制されていた (図 2)。

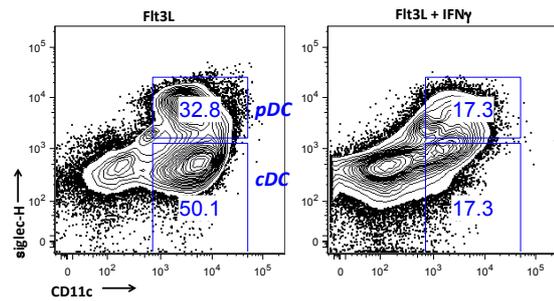


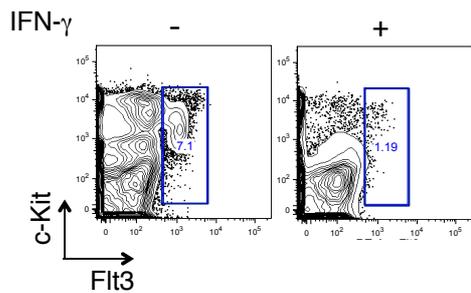
図 2 IFN- $\gamma$ による DC 分化の抑制

以上の結果から、加齢した WSX-1 欠損マウスにおいて二次リンパ組織から DC サブセットが減少している原因として、血中における IFN- $\gamma$ の上昇によって骨髄における DC 分化が抑制されている可能性が示唆された。

##### ②DC 分化抑制の分子機構の解析

加齢した WSX-1 欠損マウスの骨髄における DC 前駆細胞の数を調べると、DC の分化に重要な役割を果たす Flt3 を発現している集団が顕著に減少しており、DC 前駆細胞も著しく減っていた。そこで IFN- $\gamma$ による DC 分化の抑制が、Flt3 発現細胞の減少によるのかを *in vitro* において検証した。その結果、IFN $\gamma$  を添加して 24 時間培養した系では、添加しない系と比べて Flt3 陽性細胞群が著しく減少していた (図 3)。

さらに、IFN- $\gamma$ 受容体のシグナル伝達に必須である STAT1 の欠損マウスでは、IFN- $\gamma$ 添加による Flt3 発現細胞の減少が有意に抑制されており、IFN- $\gamma$ は STAT1 を介したシグナル



骨髓:分化マーカー陰性細胞群

図3 IFN- $\gamma$ による Flt3 陽性細胞群の減少

伝達によって、Flt3 発現細胞の減少に関与していることが示唆された。

### ③細胞特異的 WSX-1 欠損マウスの作製

加齢した WSX-1 欠損マウスでは CD4+ 及び CD8+T 細胞が著しく活性化されており、血中の IFN- $\gamma$ 濃度上昇は、これらの活性化したT細胞由来である可能性を示唆するデータが得られた。そのため、加齢した WSX-1 欠損マウスで見られる DC 減少や自己免疫疾患などの表現型が、T 細胞における WSX-1 シグナルの欠損によるものか調べるため、T 細胞特異的プロモーターの下流で WSX-1 を欠損する Lck-cre:WSX-1<sup>flox/flox</sup> マウスを作製した。さらに、二次リンパ組織における DC の減少が、DC における WSX-1 シグナルの欠損である可能性を考慮し、DC 特異的 WSX-1 欠損マウス (CD11c-cre: WSX-1<sup>flox/flox</sup>)の作製も完了した。これらのマウスの解析により、加齢した WSX-1 欠損マウスにおける DC の減少や自己免疫疾患の発症のメカニズムを明らかにしていく。

### 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 1 件)

① Asano, J., Sato, T., Ichinose, S., Kajita, M., Onai, N., Shimizu, S., Ohteki, T. (2017) Intrinsic Autophagy Is Required for the Maintenance of Intestinal Stem Cells and for Irradiation-Induced Intestinal Regeneration. *Cell Rep*, **20**, 1050–60. 査読有

DOI: 10.1016/j.celrep.2017.07.019.

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶田美穂子 (Kajita, Mihoko)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任助教

研究者番号: 00607442