

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17108

研究課題名(和文) 難治性口腔粘膜疾患の病態解明における樹状細胞上のAdam10の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of Adam10 on the dendritic cell in the elucidation of a pathology for intractable oral mucosa disease

研究代表者

藤田 康平(FUJITA, KOHEI)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師(非常勤)

研究者番号：80624634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は膜型メタロプロテアーゼADAM10の免疫学的な機構を明らかにすることを目的とした。樹状細胞(DC)特異的にADAM10を欠損させたマウスの解析から、脾臓におけるconventional DC2の分化にADAM10は必須であることが明らかとなった。また、このマウスの解析では末梢血中のFLT3L濃度が低下していた。それらの結果からマウス線維芽細胞特異的にADAM10を欠損させた線維芽細胞の培養の実験を行い、cDC2がFlt3Lの新たな供給源であることを示した。以上よりDCの分化にADAM10を介するFLT3Lの関与が存在する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、獲得免疫の要となる樹状細胞の臓器特異的な一つの分化機構の可能性を示し、FLT3Lの新たな産生細胞の発見、ADAM10による免疫調整機構の発見により、今後の樹状細胞の研究に新たな方向性を見出した。特にcDC2は液性免疫の中心となるCD4⁺T細胞の分化を誘導する細胞であり、局所におけるB細胞の機能や抗体の産生能などへの影響をさらに解析することで免疫疾患への新たなアプローチや炎症制御、ワクチン開発、腫瘍免疫の治療戦略の基盤として役立つこと期待している。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the immunological mechanism of the ADAM10(A disintegrin and metalloproteinase). Analysis of dendritic cell (DC) specific ADAM10 deficient mice suggested that ADAM10 is essential for conventional DC2 differentiation in the spleen. Furthermore, in the analysis of this mouse, the FLT3L concentration in peripheral blood was decreased. From these results, the experiment of culturing fibroblasts in which ADAM10 was specifically deleted in mouse fibroblasts was conducted, and it was shown that cDC2 is a new source of Flt3L. These results suggest that FLT3L may be involved in the differentiation of DC through ADAM10.

研究分野：細胞免疫学

キーワード：ADAM10 シェディング FLT3L 樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

生物の免疫は大きく自然免疫と獲得免疫に分けられ、樹状細胞(DC)は、獲得免疫においてその要となる細胞である。DCは、骨髄由来の血球系の細胞で腫瘍や細菌、ウイルスなどの様々な抗原をT細胞に提示し、獲得免疫を活性化させる。口腔粘膜・皮膚の免疫疾患である扁平苔癬や薬疹などの発症にDCが関与しており、T細胞の分化の異常が関与していると考えられている。近年、DCの一つであるConventional DC(cDC)は、cDC1とcDC2に分類され、cDC1は主としてCD8⁺T細胞、cDC2はCD4⁺T細胞の活性化すること分かっている。これらの樹状細胞は常にターンオーバーすることで恒常性を維持しており、この過程が崩れることで免疫異常を引き起こすと考えられる。したがって、それぞれのcDCの分化の解明は、免疫応答や炎症の制御などを検討する上で重要となる。

細胞分化の恒常性の維持や制御には、細胞間の情報伝達が必要となる。この情報伝達には細胞膜上の膜タンパクがレセプターやリガンドとして機能する。この調整機構の一つとして、A disintegrin and metalloproteinase (ADAM)という膜型プロテアーゼが近年注目されている。ADAMは細胞上の膜タンパクをCleaveすることで機能の発現や活性化を行う。その中でADAM10は、Notchなどのシグナリング分子や細胞接着因子のCadherin、CD44などの基質の活性化に関与することが報告されている。また、ADAM10を欠損したマウスは、胎生9.5日で致死性であることからADAM10が生体にとって重要であることがうかがえる。さらにADAM10と機能が近似するとされるADAM17は、TNF- α を活性化する酵素として報告されており、ADAM10においても同様に免疫機構に影響を与えることを考慮し、ADAM10に注目することとなった。

そこでわれわれはADAM10を介するDCの機能や分化に注目し研究を開始した。

2. 研究の目的

口腔粘膜・皮膚の免疫疾患である扁平苔癬や薬疹などの発症には細胞性免疫が深く関与しており、その上位にはDCによる抗原の認識が関与していると考えられている。口腔粘膜・皮膚の免疫疾患の病態の初期では、DCによる抗原提示が必須である。今回われわれはDCの機能や分化に注目した。

ADAM10をノックアウトしたマウスは致死性であることから、本研究ではDC特異的にADAM10条件付きノックアウト(cK0)マウスを製作した。cDC2におけるNotchシグナリングの関与は既に報告されているがDC上でのADAM10がどのように分化機構に関与するかはまだ解明されておらず、ADAM10による樹状細胞の分化と機能の調整機構のより一層の理解のため解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

Adam10遺伝子のcK0マウスとCre-LoxPシステムを利用しDC特異的なマーカーとしてCD11cを使用し、CD11c-Creマウスと掛け合わせADAM10^{DC}マウスを製作し、このマウスを中心に機能解析を行った。同様の方法で既存の報告と比較するためADAM17^{DC}マウスも製作した。また、Notchシグナルの機能解析では、ADAM10^{MX1}マウスを使用した。また、in vitroの実験系ではマウス胎生線維芽細胞(mEF)を使用し、ADAM10とFLT3Lの遺伝子を発現させる実験系を計画した。

4. 研究成果

(1) Adam10^{DC}マウスでは、cDC2が著明に減少

ADAM10^{DC}マウスのDC上での機能を解析すると脾臓特異的にCD11b⁺Esam⁺のDCであるcDC2の著明に減少し、それを補うかのようにCD11b⁺Esam⁻DCが増加することを確認した(図1)。この結果に注目し解析を進めた。なお、この結果はDC特異的な変化でB細胞やT細胞に大きな影響を与えなかった。ADAM10などの膜型プロテアーゼは、発現する細胞自身の分子をcleaveする様式が一般的とされる。この分化様式を解析するためにADAM10^{DC}のマウスの骨髄を野生型マウスに移入した。このマウスでもcDC2の分化異常を認め、分化異常の原因が骨髄由来の細胞であることを確認した。さらに野生型マウスとADAM10^{DC}のマウスの骨髄を同一のレシピエントに移入した。このマウスでもADAM10^{DC}マウス由来のcDC2に分化異常を認めた。これらの結果からcDC2はCell-autonomousなADAM10に依存することが分かった。cDC1およびcDC2の各分化段階をFACSを用いて解析した結果、脾臓におけるcDC2の前駆体であるpre-cDC2の増加を認めた。したがって、前駆細胞が脾臓まで移動した後に、cDC2への分化が停止していることを示唆していると考えられる。さらにcDC2に関連する各転写因子をRNAシーケンスを用いて解析した結果、Pre-cDC2においてDCへの分化を決定付けるId2やIrf4、GATA2など系統決定転写因子の発現低下を認め、cDC2への分化が損なわれる一つの原因であることが考えられた。

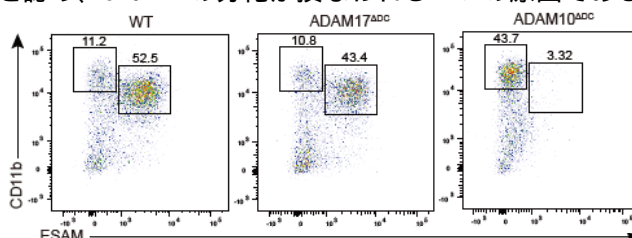


図1
ADAM10^{DC}マウスの脾臓におけるcDC2のFACS解析

また、相補的に増加したと考えられる CD11b⁺Esam⁻DC については、免疫関連の遺伝子解析を Nanostring や細胞学的な解析を FACS を用いて行った結果、単球由来の DC である可能性が高くなった。

(2) cDC2 の分化と維持に ADAM10 が必要

分化した cDC2 の維持に ADAM10 が関与することを示すため ADAM10^{MX1} マウスを製作した。このマウスは、Poly I:C を投与することで、ウイルス免疫を活性化させ、I 型 IFN 反応性の細胞から ADAM10 を欠失させることができるマウスである。このマウスに Poly I:C を投与 24 時間後に cDC2 の FACS にて解析を行ったところ、cDC2 の減少を認め、分化後も DC 上の ADAM10 に依存することを示唆された。さらにこのマウスに notch シグナルを回復させた結果、十分に cDC2 を回復することができなかつた(図 2)。したがって、cDC2 の分化と維持には ADAM10 は必要であり、その分化機構には Notch 以外の別経路が存在する可能性が示された。

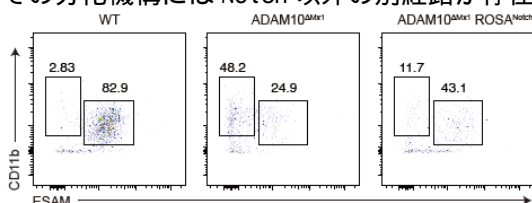


図 2
左から野生型マウス(WT)、ADAM10^{MX1} マウス、notch を回復させたマウスそれぞれの脾臓 cDC2 解析

(3) cDC2 は FLT3L の新たな供給源である

ADAM10^{DC} マウス脾臓の cDC2 上で DC 分化に関与するサイトカイン FLT3L のリガンドである FLT3 の上昇を認め、ADAM10 による ADAM10 が FLT3L の活性化に関与し、脾臓において、FLT3 のリガンドである FLT3L が枯渇している可能性が考えた。さらに ADAM10^{DC} マウスの末梢血中の FLT3L も野生型に比較し減少していた。また、FLT3L の主な供給源とされる T 細胞の分化異常を示す Rag2KO の末梢血でも同様に FLT3L の濃度が低下していた(図 3)。さらに Sort した cDC1 と cDC2 をそれぞれ培養し、上清の FLT3L 濃度を比較すると cDC2 の培養上清中で cDC1 の培養上清よりも高い濃度の FLT3L を検出された。また、RT-PCR においても cDC2 に FLT3L の発現が高いことから cDC2 は、FLT3L の供給源の一つであると考えられた。

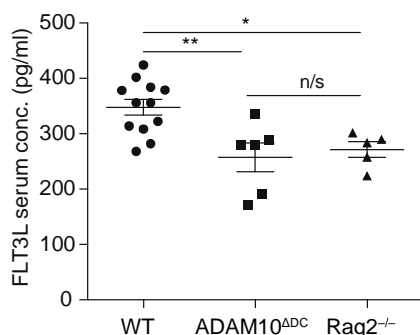


図 3
野生型マウス(WT)、ADAM10^{DC} マウス、Rag2KO マウスの末梢血中の FLT3L 濃度

(4) 細胞上の FLT3L は ADAM10 の基質となる

In vitro の実験にて細胞上の FLT3L が ADAM10 の基質となることを示すためマウス胎生線維芽細胞(mEF)を用いた実験系を製作した。FLT3L とアルカリフォスファターゼ(AP)をベクターを用いて発現させ、培養上清中の AP を検出した結果、培養上清中の AP は ADAM10 を KO した mEF の培養上清上で減少し、そこに ADAM10 を強制発現させることにより、培養上清中の AP の濃度は回復した。これにより、FLT3L は ADAM10 の基質であることが証明された。

以上により本研究の結果以下の新規性を報告した。

脾臓の cDC2 の分化と維持は cell autonomous な ADAM10 に依存する。

cDC2 は FLT3L を産生し、ADAM10 を欠損することで膜型 FLT3L を滞留した。

FLT3L は ADAM10^{DC}cDC2 を回復させるのに必要十分であった。

FLT3L は ADAM10 の新規基質であることを示した。

したがって、cDC2 は ADAM10 を介して膜型 FLT3L をクリープし、cDC2 の cell-autonomous な分化と維持を行うことを示した。

今後の課題としては、他の免疫細胞への影響や cDC2 により活性化される CD4⁺T 細胞により賦活化される液性免疫への影響を検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 小澤夏生, 藤田康平, 佐藤英和	4. 巻 1
2. 論文標題 三黄瀉心湯が有効であった脳梗塞既往のある再発性アフタの1症例	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本歯科東洋医学会誌	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 藤田 康平, 佐藤 英和, 加藤 伸, 西須 大徳, 池浦 一裕, 小高 利絵, 角田 博之, 森 毅彦, 山上 淳, 天谷 雅行, 中川 種昭, 角田 和之	4. 巻 23巻1号
2. 論文標題 腫瘍随伴性天疱瘡6例の口腔症状に関する臨床的検討	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本口腔内科学会	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujita K, Chakarov S, Kobayashi T, Sakamoto K, Voisin B, Duan K, Nakagawa T, Horiuchi K, Amagai M, Ginhoux F, Nagao K.	4. 巻 116(29)
2. 論文標題 Cell-autonomous FLT3L shedding via ADAM10 mediates conventional dendritic cell development in mouse spleen.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	6. 最初と最後の頁 14714-14723
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 池浦一裕、工藤葉子、藤田康平、佐藤英和、加藤伸、加藤淳、森毅彦、中川種昭、角田和之
2. 発表標題 同種造血幹細胞移植患者における唾液分泌量と唾液緩衝能に関する臨床的検討
3. 学会等名 がん口腔支持療法学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金生茉莉、藤田康平、加藤 伸、池浦一裕、中川種昭、角田和之
2. 発表標題 Laugier-Hunziker-Baran症候群の1例
3. 学会等名 日本口腔内科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kohei Fujita, Shin Kato, Kazuhiro Ikeura, Yoko Kudo, Taneaki Nakagawa , Kazuyuki Tsunoda
2. 発表標題 Clinical characterization of oral symptoms in paraneoplastic pemphigus patients
3. 学会等名 International Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小沼寛明、角田和之、潮田裕梨、加藤伸、藤田康平、池浦一裕、石井秀太郎、清水博之、森川暁、中川種昭
2. 発表標題 汎血球減少症の多数歯抜歯において周術期管理を実施した一例
3. 学会等名 日本有病者歯科医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田 諒, 藤田 康平, 加藤 伸, 小高 利絵, 池浦 一裕, 潮田 裕梨, 金生 茉莉, 工藤 葉子, 小池 将人, 佐藤 英和, 大内 健嗣, 高橋 勇人, 中川 種昭, 角田 和之
2. 発表標題 マイコプラズマの関連するStevens-Johnson症候群が強く疑われた一例
3. 学会等名 口腔内科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 舟山 一成, 角田 和之, 筋生田 整治, 相馬 智也, 西須 大徳, 藤田 康平, 潮田 裕梨, 森 毅彦, 河名 裕正, 中川 種昭
2. 発表標題 同種造血幹細胞移植後に舌扁平上皮癌を生じた1例
3. 学会等名 日本口腔科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小澤 夏生, 永井 哲夫, 角田 博之, 角田 和之, 佐藤 英和, 藤田 康平, 池浦 一裕, 海住 直樹, 中川 種昭
2. 発表標題 流延に真武湯が有用であった1例
3. 学会等名 日本東洋医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小澤 夏生, 藤田 康平, 佐藤 英和, 加藤 伸, 角田 和之, 角田 博之, 永井 哲夫, 中川 種昭
2. 発表標題 精神心理的側面を留意した再発性アフタの漢方治療
3. 学会等名 日本歯科心身医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森川 暁, 藤田 康平, 池浦 一裕, 潮田 裕梨, 佐藤 英和, 加藤 伸, 加藤 淳, 森 毅彦, 角田 和之, 中川 種昭
2. 発表標題 広汎型侵襲性歯周炎に対して造血幹細胞移植術前に抗菌歯周治療を実施した1例
3. 学会等名 がん口腔支持療法学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kohei Fujita, Jun Yamagami, Masayuki Amagai, Kazuyuki Tsunoda, Taneaki Nakagawa
2. 発表標題 Clinical Characterization of Oral Symptoms in 6 Paraneoplastic Pemphigus Patients
3. 学会等名 The Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----