

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07169

研究課題名(和文)炎症誘導型樹状細胞系サブセットがB細胞の生存を増強する機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism that inflammation-inducible DC subset enhances the survival of B cells

研究代表者

福井 竜太郎 (Fukui, Ryutaro)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：60554508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は独自に樹立した自己免疫疾患モデルマウスで、特殊な細胞が増えていることを発見した。この細胞は、炎症や老化に伴って増加すると考えられたため、各種自己免疫疾患モデルマウスや加齢したマウスの細胞を解析した。その結果、自己免疫性肝炎モデルマウスや、全身性エリトマトーデスモデルマウスでは増加していたのに対し、1型糖尿病モデルマウスでは増加が見られなかった。また、この細胞はTLRと呼ばれる病原体センサーを複数種類発現しているが、1本鎖RNAを認識するTLR7以外は誘導に関与しないことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫系は様々な細胞から構成されており、各々の細胞が協調的に働くことで生体防御システムを構築している。自己免疫疾患やアレルギーなどは免疫細胞の制御が破綻した結果起こる病気であり、原因となる細胞の性質を明らかにすることが重要である。本研究では、これまで着目されていなかった細胞の機能を解析し、誘導される自己免疫疾患や、細胞に発現している分子を特定した。今後は本研究で得られた情報をもとに、当該細胞サブセットが関わる疾患の原因解明や、治療ターゲットの探索などが進められていくと期待される。

研究成果の概要(英文)：We found an inflammation-inducible dendritic subset is increased in an autoimmune disease model mouse. This population also increased in aged mice. We analyzed the immune cells in some autoimmune mouse and aged mice. As result, the subset increased in autoimmune hepatitis model and systemic lupus erythematosus model but not in type 1 diabetes model. These cells express multiple Toll-like receptors (TLRs), however, only TLR7 contributes the induction.

研究分野：免疫学

キーワード：TLR7 単球系細胞 炎症 自己免疫疾患

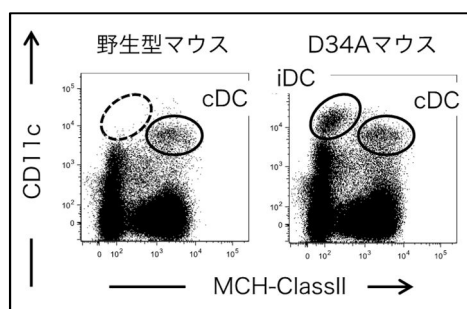
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 核酸認識系 Toll-like receptor (TLR)は、病原体の核酸を認識して免疫応答を惹起する自然免疫系の受容体である。核酸は病原体と宿主との間で高度に保存された構造を持つことから、核酸認識系 TLR は自己由来の核酸をも認識し、非感染性の慢性炎症を引き起こすことが知られている¹。特に、1本鎖RNAやグアノシン誘導体などを認識するTLR7は、様々な自己免疫疾患との関連性が示唆されている。例として、全身性エリテマトーデス (Systemic Lupus Erythematosus, SLE) や乾癬などの要因として、マウスモデルでの研究が進められている²⁻⁵。

(2) 我々は、核酸認識系 TLR の応答に必須の分子 Unc93 homolog B1 (Unc93B1) が TLR7 の過剰な応答を抑制していることを見出した⁶。Unc93B1 は N 末端から 34 番目のアスパラギン酸 (D34)を中心とした部位に、TLR7 と TLR9 の応答バランスを保つ機能がある。このアスパラギン酸をアラニンに置換した D34A 変異体を持つ細胞は、TLR7 と TLR9 の応答バランス制御が破綻して TLR7 の応答が著しく亢進する⁶。さらに、Unc93B1 に D34A 変異を持つマウス (D34A マウス) を樹立したところ、TLR7 依存的に自己免疫性肝炎などの表現型が誘導された^{7,8}。このことから、Unc93B1 による TLR7 の応答制御は生体の恒常性維持に必須であることが示された。

(3) D34A マウスでは、TLR7 依存的にリンパ球系細胞や単球系細胞など各種免疫細胞の活性化が起こる^{7,8}。TLR7 の過剰応答によって特異的に誘導される細胞を探索するため、我々は D34A マウスと野生型マウスの脾臓細胞をフローサイトメーターによって解析した。その結果、CD11c^{hi}/CD16.2^{hi}/CD11b/MHCclassII/SiglecH⁺/Ly6C⁻で規定されるサブセットが、D34A マウスで増加していることが示された (右図)。このサブセットは野生型マウスでは見られないことから、D34A マウスにおける TLR7 依存的な炎症によって誘導されていると仮定し、以下「誘導型樹状細胞 (inducible dendritic cell, iDC)」と記載する。



2. 研究の目的

(1) 炎症に伴って増加する単球系・樹状細胞系サブセットに関しては、様々な報告がある。TLR7 依存的に誘導される細胞として、iDC は「Atypical NK cell」と同一ではないかと考えられたが^{9,10}、マーカーのパターンなどが異なるため iDC は新規サブセットであろうと考えられる。そこで、iDC の性質を予備的に検討したところ、以下の結果が得られた。

- ・リガンドでの刺激を行わない状態でサイトカインを産生する
- ・B 細胞と共培養することで、B 細胞の生存率を向上させる

本研究では、これら iDC の機能に必要なメカニズムの検討を目的とする。

(2) 上述のように、TLR7 が原因と考えられる自己免疫疾患モデルマウスは、多岐にわたり報告されている^{2-5,11-14}。また、iDC は野生型の老齢マウス (約 8 ヶ月齢以上) でも誘導が認められ

るため、老化と炎症との関連性を探る上でも重要であると考えられる¹⁵。本研究では様々な自己免疫疾患モデルマウスや遺伝子改変マウスを用いることで、iDCの誘導に必要な遺伝子や、生体環境の同定を目指す。

3. 研究の方法

(1) 自己免疫疾患モデルマウスを中心として、各種系統のマウスにおける免疫細胞サブセットをフローサイトメーターで解析する。また、iDCが誘導される系統において、細胞表面マーカーやTLRなどの発現を詳細に調べる。

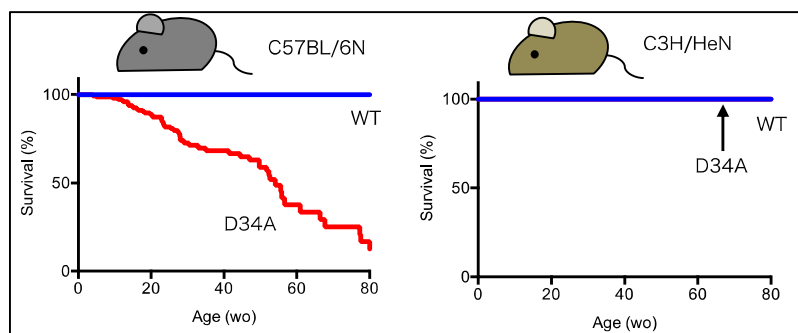
(2) B細胞とiDCとを共培養し、iDCがB細胞の生存効率を増強する因子を探る。その際、iDC以外のサブセットもコントロールとして使用し、この減少がiDC特異的であることを示す。

4. 研究成果

(1) iDCの各種TLRをモノクローナル抗体によって染色し、フローサイトメーターで発現を解析したところ、核酸認識系TLRのうちTLR3, TLR7, TLR9をすべて発現していた。iDC以外の樹状細胞系サブセットでは、核酸認識系TLRの発現パターンは異なっている。例として、plasmacytoid DC (pDC)はTLR7とTLR9を発現し、CD8陽性conventional DC (cDC)はTLR3とTLR9を発現し、CD8陰性/CD4陽性cDCはTLR7とTLR9を発現している。このことから、iDCは他の樹状細胞系サブセットと比較して、様々な内因性の核酸リガンドに応答する可能性のあることが示唆された。

(2) 各種自己免疫疾患モデルマウスの脾臓免疫細胞を解析したところ、D34AマウスやNZBWF1マウスではiDCが誘導されるのに対し、BXS/Yaaマウス、MRL/lprマウス、NOD (Non-obese diabetes)マウスではiDCの誘導が見られなかった。この結果から、iDCが誘導されるためには炎症が必要なだけでなく、マウスの系統依存的な因子が必要であると推測された。

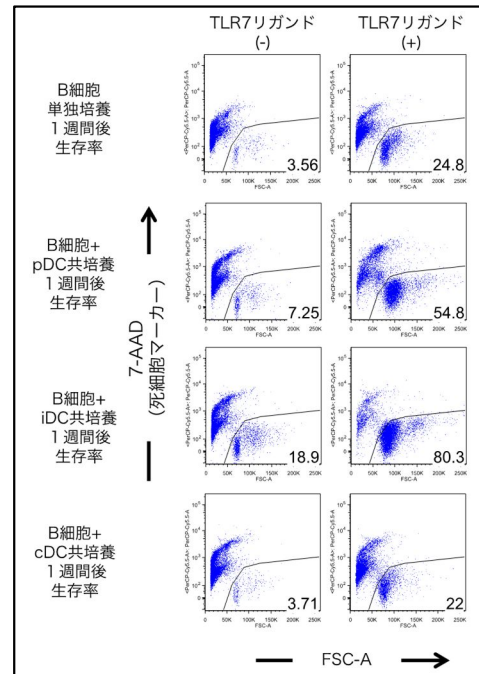
(3) Unc93B1にD34A変異を持つマウスは、どの系統でもTLR7の応答が亢進するが、表現型は系統によって大きく異なる。例として、C57BL/6系統(B6)とC3H/HeN系統(C3H)のD34Aマウスで生存曲線を



比較すると、C3H系統のD34AマウスはB6系統に比べて顕著に死亡率が低い(右上図)。こうした表現型の系統差とiDCとの誘導に関連性があるかを検討するため、各系統D34Aマウスの細胞をフローサイトメーターで解析した。その結果、表現型の弱いC3H系統のD34Aマウスでも、脾臓においてiDCが認められた。ただし、iDCの数はB6系統と比較して非常に少ない。また、B6系統のD34Aマウスでは末梢血にiDCが存在するのにに対し、C3H系統では末梢血にiDCが見られなかった。この結果から、iDCはTLR7の応答亢進によって脾臓で誘導され、血行性に各種臓器へ浸潤する可能性が示された。また、末梢血に移行するためには、系統依存的な因子が必要であると予想された。

(4) iDC が誘導される条件を検討するために、各種遺伝子ノックアウトマウスの細胞を解析した。D34A マウスとの二重変異マウスでは、D34A 変異による炎症がノイズになることから、老齢の遺伝子ノックアウトマウスを解析した。その結果、TLR7 ノックアウトマウスや B 細胞欠損マウス (*Ighm*^{-/-}) では加齢に伴う iDC の誘導が見られなかった。一方、TLR3 ノックアウトマウスや TLR9 ノックアウトマウスでは、野生型マウスと同様に iDC の誘導が認められた。このことから、iDC の誘導は TLR7 が関わると同時に、B 細胞が必要な可能性が示唆された。

(5) iDC, pDC, cDC をそれぞれ単離し、B 細胞と 1 週間共培養して B 細胞の生存率を測定した (右図)。このうち cDC との共培養では B 細胞の生存増強が見られなかった。一方、pDC との共培養では iDC ほど顕著ではないものの、B 細胞の生存効率を増強する効果が見られた。なお、B cell は I 型インターフェロンシグナルによって TLR7 の発現が維持され、活性化や生存などに影響を受けることが報告されている^{16,17}。従来、I 型インターフェロンのリソースは pDC や単球系細胞が主体であると考えられてきたが、iDC も同様の役割を果たしている可能性が示唆された。今後は、iDC による B 細胞の活性化機構が他の細胞サブセットと異なる点を検討していくことが必要である。



< 引用文献 >

1. Miyake, K. *et al.* Mechanisms controlling nucleic acid-sensing Toll-like receptors. *International Immunology* **30**, 43–51 (2018).
2. Lande, R. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* **449**, nature06116 (2007).
3. Ganguly, D. *et al.* Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J Exp Medicine* **206**, 1983–1994 (2009).
4. Pisitkun, P. *et al.* Autoreactive B Cell Responses to RNA-Related Antigens Due to *TLR7* Gene Duplication. *Science* **312**, 1669–1672 (2006).
5. Santiago-Raber, M.-L. *et al.* Evidence that Yaa-induced loss of marginal zone B cells is a result of dendritic cell-mediated enhanced activation. *Journal of Autoimmunity* **34**, 349–355 (2010).
6. Fukui, R. *et al.* Unc93B1 biases Toll-like receptor responses to nucleic acid in dendritic cells toward DNA- but against RNA-sensing. *The Journal of Experimental Medicine* **206**, 1339–1350 (2009).

7. Fukui, R., Kanno, A. & Miyake, K. Type I IFN Contributes to the Phenotype of Unc93b1D34A/D34A Mice by Regulating TLR7 Expression in B Cells and Dendritic Cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **196**, 416–27 (2016).
8. Fukui, R. *et al.* Unc93B1 Restricts Systemic Lethal Inflammation by Orchestrating Toll-like Receptor 7 and 9 Trafficking. *Immunity* **35**, 69–81 (2011).
9. Voynova, E. N., Skinner, J. & Bolland, S. Expansion of an Atypical NK Cell Subset in Mouse Models of Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Immunology* **194**, 1503–1513 (2015).
10. Voynova, E., Qi, C.-F., Scott, B. & Bolland, S. Cutting Edge: Induction of Inflammatory Disease by Adoptive Transfer of an Atypical NK Cell Subset. *The Journal of Immunology* **195**, 806–809 (2015).
11. Huang, J. *et al.* Toll-like receptor 7 deficiency suppresses type 1 diabetes development by modulating B-cell differentiation and function. *Cell Mol Immunol* 1–11 (2021) doi:10.1038/s41423-020-00590-8.
12. Deane, J. A. *et al.* Control of Toll-like Receptor 7 Expression Is Essential to Restrict Autoimmunity and Dendritic Cell Proliferation. *Immunity* **27**, 801–810 (2007).
13. Buechler, M. B., Akilesh, H. M. & Hamerman, J. A. Cutting Edge: Direct Sensing of TLR7 Ligands and Type I IFN by the Common Myeloid Progenitor Promotes mTOR/PI3K-Dependent Emergency Myelopoiesis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **197**, 2577–82 (2016).
14. Yang, Q. *et al.* TLR7 promotes Th1 polarization in immune thrombocytopenia. *Thrombosis Research* **128**, 237–242 (2011).
15. Franceschi, C. & Campisi, J. Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases. *The Journals of Gerontology: Series A* **69**, S4–S9 (2014).
16. Bekeredjian-Ding, I. B. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells control TLR7 sensitivity of naive B cells via type I IFN. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **174**, 4043–50 (2005).
17. Green, N. M. *et al.* Murine B Cell Response to TLR7 Ligands Depends on an IFN- Feedback Loop. *The Journal of Immunology* **183**, 1569–1576 (2009).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7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 Fukui Ryutaro, Yamamoto Chikako, Matsumoto Fumi, Onji Masahiro, Shibata Takuma, Murakami Yusuke, Kanno Atsuo, Hayashi Takuto, Tanimura Natsuko, Yoshida Nobuaki, Miyake Kensuke	4. 巻 9
2. 論文標題 Cleavage of Toll-Like Receptor 9 Ectodomain Is Required for In Vivo Responses to Single Strand DNA	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1491-1491
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2018.01491	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 Fukui Ryutaro, Murakami Yusuke, Miyake Kensuke	4. 巻 38
2. 論文標題 New application of anti-TLR monoclonal antibodies: detection, inhibition and protection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	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） 10.1186/s41232-018-0068-7	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 Miyake Kensuke, Shibata Takuma, Ohto Umeharu, Shimizu Toshiyuki, Saitoh Shin-Ichiroh, Fukui Ryutaro, Murakami Yusuke	4. 巻 30
2. 論文標題 Mechanisms controlling nucleic acid-sensing Toll-like receptors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 43~51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxy016	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 Furusho Katsuhiro, Shibata Takuma, Sato Ryota, Fukui Ryutaro, Motoi Yuji, Zhang Yun, Saitoh Shin-ichiroh, Ichinohe Takeshi, Moriyama Masafumi, Nakamura Seiji, Miyake Kensuke	4. 巻 31
2. 論文標題 Cytidine deaminase enables Toll-like receptor 8 activation by cytidine or its analogs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 167~173
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxy075	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 Sato Ryota, Kato Akihisa, Chimura Takahiko, Saitoh Shin-Ichiroh, Shibata Takuma, Murakami Yusuke, Fukui Ryutarō, Liu Kaiwen, Zhang Yun, Arii Jun, Sun-Wada Ge-Hong, Wada Yoh, Ikenoue Tsuneo, Barber Glen N., Manabe Toshiya, Kawaguchi Yasushi, Miyake Kensuke	4. 巻 19
2. 論文標題 Combating herpesvirus encephalitis by potentiating a TLR3/mTORC2 axis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 1071 ~ 1082
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-018-0203-2	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 Miyake Kensuke, Saitoh Shin ichiroh, Sato Ryota, Shibata Takuma, Fukui Ryutarō, Murakami Yusuke	4. 巻 106
2. 論文標題 Endolysosomal compartments as platforms for orchestrating innate immune and metabolic sensors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Leukocyte Biology	6. 最初と最後の頁 853 ~ 862
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/JLB.MR0119-020R	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 Sato Ryota, Reuter Tatjana, Hiranuma Ryosuke, Shibata Takuma, Fukui Ryutarō, Motoi Yuji, Murakami Yusuke, Tsukamoto Hiroki, Yamazaki Satoshi, Liu Kaiwen, Saitoh Shin-Ichiroh, Latz Eicke, Miyake Kensuke	4. 巻 32
2. 論文標題 The impact of cell maturation and tissue microenvironments on the expression of endosomal Toll-like receptors in monocytes and macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 785 ~ 798
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxaa055	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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 福井 竜太郎
2. 発表標題 マウスToll-like receptor 7阻害抗体は炎症性疾患モデルマウスの症状を緩和する
3. 学会等名 第40回日本炎症・再生医学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 FUKUI Ryutaro, KANNO Atsuo, MOTOI Yuji, MURAKAMI Yusuke, MIYAKE Kensuke
2. 発表標題 Toll-like receptor 7 is a factor of type 1 diabetes in NOD mice
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関