

平成 22 年 4 月 19 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390117
 研究課題名（和文）
 食細胞による死細胞貪食に伴う免疫寛容誘導機構
 研究課題名（英文）
 Mechanisms of tolerance induction by apoptotic cell phagocytosis
 研究代表者
 田中 正人 (Tanaka Masato)
 独立行政法人理化学研究所・自然免疫研究チーム・チームリーダー
 研究者番号：00294059

研究成果の概要（和文）：死細胞貪食による死細胞付随抗原に対する免疫寛容誘導機構の解明を行った。経静脈的に投与された死細胞は脾臓辺縁帯に集積し、同部位には局在する辺縁帯マクロファージと CD8 陽性樹状細胞サブセットにより貪食される。これらの細胞による死細胞処理と付随抗原の提示が寛容誘導に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The intravenous injection of apoptotic cells can induce cell associated antigen-specific immunosuppression or tolerance. This mechanism of tolerance induction requires the contributions of two populations of cells in the splenic marginal zone, macrophages that rapidly clear corpse in the blood flow, and CD8⁺, CD103⁺ DCs that selectively phagocytose dead cell and subsequently present dead cell-associated antigen.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2008 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2009 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 ・実験病理学

キーワード：死細胞、貪食、食細胞、マクロファージ、樹状細胞、免疫寛容、辺縁帯

1. 研究開始当初の背景

生体には役目を終え不要となった細胞や、癌細胞やウイルス感染細胞などの有害な細胞に、死を誘導しこれを排除する機構が存在

する。この機構により死を誘導された細胞は、マクロファージや樹状細胞等の食細胞により認識、貪食され除去される。我々はこれまでに食細胞の

よる死細胞貪食の分子機構の解析に取り組んできた。食細胞は生細胞上にはなく、アポトーシスを起こしてはじめて出現する分子を認識して貪食を行う。この貪食に関与する分子として同定した MFG-E8 はアポトーシス細胞上のフォスファチジルセリン (PS) とマクロファージ上のインテグリンの両方に結合することにより、死細胞と食細胞を橋渡しし死細胞貪食を促進することが分かった。MFG-E8 欠損マウスでは、脾臓やリンパ節の胚中心における Tingible Body Macrophage による死細胞貪食に障害がみられるとともに、加齢に伴って抗 DNA 抗体や抗核抗体といった自己抗体の異常産生が見られた。この死細胞貪食障害に伴う自己免疫異常は、複数の欠損マウスあるいは実験系でみられる現象であることから、食細胞による死細胞貪食は自己に対する免疫寛容の維持に重要な役割を担っていると考えられた。

さらに我々は死細胞貪食による免疫寛容誘導現象を応用して、多発性硬化症の動物モデルである EAE の発症を阻止できることを見いだした。マウスにミエリンの構成蛋白である myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) をアジュバントとともに投与すると EAE の発症を誘導できるが、MOG を細胞膜タンパクとして強制発現させた細胞株に *in vitro* でアポトーシスを誘導した後にマウスに経静脈的に投与すると、MOG 抗原特異的 T 細胞の反応性が減弱し、EAE 発症を抑制できることが分かった。この動物モデルは死細胞の貪食に伴う自己に対する免疫寛容維持機構を解析するための優れた実験系であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、死細胞貪食に伴う死細胞付随抗原に対する免疫寛容誘導のメカニズムを明らかにすることを目的とした。我々は上記

のように死細胞投与により、死細胞付随抗原に対して特異的に免疫寛容を誘導できる実験系を確立していたので、この系を用いて生体内において免疫寛容の誘導、維持に関わる死細胞処理細胞の同定し、当該細胞の機能解析を行った。

3. 研究の方法

死細胞貪食による寛容誘導の解析には 上記実験モデルを用いた。脾臓の marginal zone における投与死細胞処理とその意義については、ジフテリア毒素受容体 (DTR) 遺伝子を CD169 遺伝子のプロモーター下に挿入し、DTR を marginal zone のマクロファージのみに選択的に発現させた遺伝子改変マウスを用いた (CD169-DTR マウス)。このマウスではジフテリア毒素 (DT) の投与により、marginal zone に局在する 2 種類のマクロファージの一時的な消失が確認した。本研究では、この CD169-DTR マウスを用いて、死細胞付随抗原に対する免疫寛容誘導機構のメカニズムを解析した。さらに投与死細胞の貪食に関与する食細胞を分取して、マイクロアレイ等の方法により、解析を行った。

4. 研究成果

蛍光色素でラベルした死細胞をマウスに静注すると、脾臓の辺縁帯に集積し、その後速やかに消失する。そこで辺縁帯に局在するマクロファージの消失を誘導できるマウスを作製する目的で、この細胞に特異的にヒトのジフテリア毒素のレセプターを発現するノックインマウスを作製した (CD169-DTR mouse)。このマウスにジフテリア毒素を投与して、marginal zone のマクロファージを選択的に消失させた後、MOG 発現死細胞を投与すると、MOG に対する免疫寛容が誘導できず、EAE の発症を抑制できないことが分かった (図 1)。このことから marginal zone macrophage が死細胞貪食に伴う免疫寛容の誘導に重要な働きをしていることが分かった。marginal zone macrophage 消失状態では、辺縁帯における死細胞

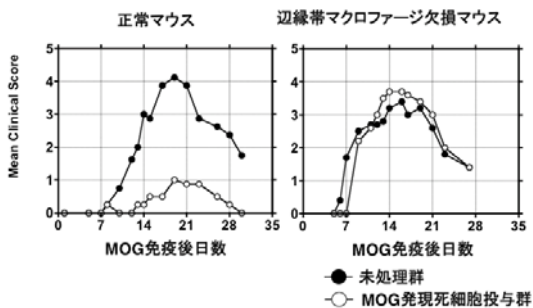


図1: 辺縁帯マクロファージの欠損により死細胞投与による自己免疫抑制は阻害される

のクリアランスは明らかに遅延することが分かった。さらに、野生型マウスでは投与した死細胞は CD8⁺DC に選択的に取り込まれるのに対して、ジフテリア毒素を投与した CD169-DTR マウスでは、CD8⁺DC による取り込みに加えて、通常ではほとんど見られない CD8⁺DC による大量の死細胞の取り込みが観察された。これらの知見より、marginal zone macrophage は、死細胞の迅速な処理と、CD8⁺DC による選択的な死細胞の取り込みと抗原提示を制御している可能性が考えられた。

死細胞貪食による免疫寛容誘導には、食細胞による死細胞貪食とともに、死細胞付随抗原の提示が必要であると考えられる。辺縁帯マクロファージの抗原提示能の有無については、当該細胞の単離ができないため不明であったが、一方、脾臓には強力な抗原提示能を有する樹状細胞が存在することが分かっていた。樹状細胞サブセットの内、CD8 陽性樹状細胞は経静脈的に投与した死細胞をとりこみ、死細胞付随抗原の提示能を有していることが判明していた。しかし、この CD8 陽性樹状細胞は以前より、T 細胞領域のみに存在すると考えられており、辺縁帯に集積する死細胞をどのようにして貪食するのか不明であった。我々はこの謎を解き明かすべく、死細胞を貪食する CD8 陽性樹状細胞の解析を試みた。投与死細胞貪食樹状細胞と非貪食樹

状細胞をそれぞれ単離し、microarray により遺伝子発現を比較したところ、貪食樹状細胞は CD8 とともに CD103 と CD207 を発現する樹状細胞サブセットであることを突き止めた。この細胞群は強力な死細胞貪食能と死細胞付随抗原提示能を有し、抗 CD207 抗体を用いた免疫染色により、T 細胞領域でなく主に辺縁帯に局在していることが示された。さらにこの細胞群は死細胞投与 12 時間後には、T 細胞領域への集積がみられることから、辺縁帯で死細胞を貪食後 T 細胞領域に移動し、死細胞付随抗原の提示を行っていると考えられた。また野生型マウスに LPS あるいは poly IC 等の免疫寛容誘導を阻害する作用を持つ物質を投与すると、この樹状細胞亜集団は一時的に消失することが分かった。さらにマウスに細胞死誘導活性をもつ cytochrome C を投与すると、本樹状細胞亜集団を特異的に消失することが分かった。本樹状細胞亜集団の消失状態では、死細胞投与による寛容誘導が起こらなくなることから、本細胞は死細胞付随抗原に対する寛容誘導に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

これらのことより、経静脈的投与死細胞による寛容誘導には、複数の食細胞が関与していると考えられる (図 2)。マクロファージが死細胞の迅速な処理を担当し、樹状細胞が死細胞付随抗原の提示を担当していると考えられるが、これら食細胞間のネットワークにより協調的に寛容誘導が行われている可能性が示唆された。

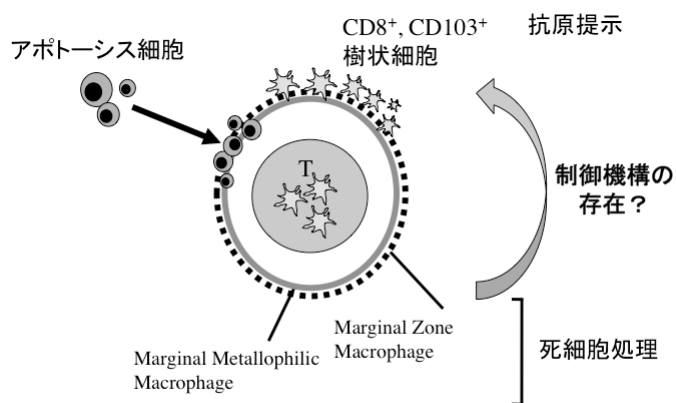


図2: 死細胞付随抗原に対する寛容誘導に関与する細胞群

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 12 件)

- ① Nabeyama, A., Y. Miyake, (12 人中 4 番目) M. Tanaka (12 人中 12 番目), xCT deficiency accelerates chemically induced tumorigenesis, Proc Natl Acad Sci USA, 107:6436-6441, 2010 査読有
- ② Tomura, M., M. Tanaka, Time-lapse observation of cellular function with fluorescent probe reveals novel CTL-target cell interactions. Int Immunol, 21:1145-50, 2009, 査読有
- ③ 三宅靖延, 田中正人, 食細胞による死細胞貪食を介した免疫寛容誘導、医学のあゆみ 230:640-645、2009 年、査読なし
- ④ Qiu, C.H., Y. Miyake, H. Kaise, H. Kitamura, O. Ohara, and M. Tanaka, Novel subset of CD8 α + dendritic cells localized in the marginal zone is responsible for tolerance to cell-associated antigens. J. Immunol, 182:4127-4136, 2009, 査読有
- ⑤ Tanaka, M., Miyake, Y., and Asano, K., Maintenance of self-tolerance by apoptotic cell clearance. Front Biosci 13:6043-6049, 2008, 査読有
- ⑥ 浅野謙一、田中正人、死細胞の貪食異常と自己免疫疾患、実験医学 26:3019-3024、2008 年、査読なし
- ⑦ 三宅靖延、田中正人、細胞に含有される抗原に対する免疫寛容誘導と辺縁帯マクロファージ、臨床免疫・アレルギー科 50:345-349、2008 年、査読なし
- ⑧ Miyake, Y., Asano, K., Tanaka, M., (6 人中 6 番目), Critical role of macrophages in the marginal zone in the suppression of immune responses to apoptotic cell-associated antigens, J Clin Invest. 117:2268-2278, 2007, 査読有
- ⑨ Miyake, Y., Tanaka, M., (6 人中 6 番目), Protective role of macrophages in noninflammatory lung injury caused by selective ablation of alveolar epithelial type II cells, J. Immunol, 178:5001-5009, 2007 査読有
- ⑩ Witas, E., Tanaka, M., (8 人中 5 番目), Bridge over troubled water: milk fat globule epidermal growth factor 8 promotes human monocyte-derived macrophage clearance of non-blebbing phosphatidylserine-positive target cells. Cell Death and Differentiation, 14:1063-1065, 2007 査読有
- ⑪ Tanaka, M., and Miyake, Y., Apoptotic

Cell Clearance and Autoimmune Disorder. Current Medicinal Chemistry, 14:2892-2897, 2007 査読有

- ⑫ Hijikata, A., Tanaka, M., (39 名中 32 番目), Construction of an open-access database that integrates cross-reference information from the transcriptome and proteome of immune cells. Bioinformatics, 23:2934-2941, 2007 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① 田中正人、死細胞貪食による免疫制御機構、第 9 回細胞死研究会、2010 年 1 月 18 日、京都
- ② Masato Tanaka, Strategy of tolerance induction by apoptotic cell clearance, 2009 4th Medical Biotech Forum, August 10, 2009, Dalian, China
- ③ 田中正人、死細胞付随抗原に対する免疫寛容誘導現象を用いた自己免疫疾患の抑制、第 5 回自己免疫疾患研究会、2009 年 7 月 11 日、東京
- ④ Masato Tanaka, Mechanism of tolerance induction to cell-associated antigens by apoptotic cell clearance, Gordon Research Conferences, Apoptotic Cell Recognition & Clearance, June 29, 2009, New London, USA
- ⑤ 田中正人、Apoptotic cell clearance and self-tolerance、第 15 回武田科学振興財団生命科学シンポジウム、2008 年 12 月、東京
- ⑥ 田中正人、死細胞貪食による免疫寛容誘導機構、第 29 回日本炎症・再生医学会、2008 年 7 月 9 日、東京
- ⑦ 田中正人、Mechanisms of tolerance induction to cell-associated antigens、第 37 回日本免疫学会総会・学術集会、2007 年 11 月 20 日、東京
- ⑧ Yasunobu Miyake, Macrophages in the marginal zone regulate selective clearance of dying cells by cd8 α dendritic cells and induction of tolerance to cell-associated antigens, The 20th Naito conference, October 9-12, 2007, Zushi
- ⑨ Masato Tanaka, Tolerance induction by apoptotic cell clearance, RCAI-JSI International Symposium on Immunology 2007: Development and Maintenance of Immune System, July 27, 2007, Yokohama
- ⑩ Masato Tanaka, Mechanisms of tolerance induction to cell-associated antigens, Joint Meeting RIKEN-MPG "Activation and Regulation of the Immune System", April 17, 2007, Germany
- ⑪ Yasunobu Miyake, Regulation of tolerance to cell-associated antigen by macrophages in the marginal zone, Keystone symposia, April 11, 2007, Colorado, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 正人 (Tanaka Masato)

独立行政法人理化学研究所・自然免疫研究チーム・チームリーダー

研究者番号：00294059

(2) 研究分担者

菊地 一博 (Kikuchi Kazuhiro)

独立行政法人理化学研究所・自然免疫研究チーム・研究員

研究者番号：90391929

(3) 連携研究者

三宅 靖延 (Miyake Yasunobu)

独立行政法人理化学研究所・自然免疫研究チーム・研究員

研究者番号：10392143