

平成21年 5月20日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790187
 研究課題名（和文） 樹状細胞の抗原提示によるナチュラルキラーT細胞を介したT細胞応答の制御
 研究課題名（英文） Repetitive injection of bone marrow-derived dendritic cells pulsed with α -galactosylceramide and peptide induce CD4 T cell tolerance
 研究代表者
 伊豫田 智典（IYODA TOMONORI）
 京都大学・大学院生命科学研究科・助教
 研究者番号：60359784

研究成果の概要：

α -ガラクトシルセラミド（ α -GC）とペプチド抗原を提示させた樹状細胞（DC）を1日おきに3回投与することでペプチド抗原特異的な免疫応答を抑制することが出来た。これはDCの頻回投与によりナチュラルキラーT細胞（NK T細胞）のインターロイキン10（IL-10）産生が誘導され、CD4陽性T細胞のIL-10産生や腫瘍壊死因子 β 1の発現が上昇するためだと考えられる。また、DCによる免疫寛容の誘導にはNK T細胞とCD4陽性T細胞が同じDCにより抗原提示を受けることが必要であった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：樹状細胞、ナチュラルキラーT細胞、免疫寛容、IL-10、EAE

1. 研究開始当初の背景

α -ガラクトシルセラミド（ α -galactosyl ceramide、 α -GC）はヒトやマウスのインバリエントナチュラルキラーT細胞（invariant natural killer T cell、iNK T細胞）の合成リガンドであり、iNK T細胞の細胞傷害活性やサイトカイン産生を誘導することが出来る。 α -GCで刺激されたiNK T細胞は大量のIFN- γ を産生することやIL-12産生誘導によりNK細胞の活性化を起こすことなどから、当初は免疫賦活効果を期待され、抗

腫瘍免疫への活用が研究されてきた。しかし、iNK T細胞はリガンド刺激により同時にIL-4も産生し、頻回投与により糖尿病モデルマウスにおける自己免疫疾患を予防することから、投与経路、投与量や頻度によっては免疫寛容を誘導すると考えられている。

iNK T細胞は主要組織適合抗原（major histocompatibility complex、MHC）クラスI様分子であるCD1dに結合して提示された α -GCを認識する。CD1dは多くの細胞に発現が認められるが、特に樹状細胞（dendriti

c cell、DC) やB細胞に強く発現しており、これらの細胞は生体内で α -GCをiNKT細胞に提示することができる。とりわけ強力な抗原提示細胞であるDCは、iNKT細胞への α -GC提示することにより、自らも活性化されてTh1サイトカインであるIL-12を産生することにより、抗腫瘍免疫を誘導することが示されている。一方、DCは免疫応答を賦活化するだけでなく、未成熟な分化段階やIL-10、TGF- β などの抗炎症性サイトカイン存在下で成熟した場合には、免疫応答を負にも制御しうることが知られるようになっている。これら抗原提示細胞によるT細胞の分化誘導の過程にはT細胞受容体からの刺激(シグナル1)、B7分子ファミリーやCD40などの補助刺激分子(シグナル2)の発現程度やサイトカイン・ケモカインなどの環境因子(シグナル3)が関与していることも明らかである。さらに近年の研究より、実験的自己免疫性脳炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)の発症にはIL-17を産生する新しいタイプのThタイプであるTh17が関与することが報告されており、Th17への分化にはIL-23、IL-1、IL-6、TNF- α やTGF- β などのサイトカイン刺激が関与することが報告されている。

申請者はこれまでの研究で、5 μ gの可溶性 α -GCをマウスに9日間隔で2回投与すると、血清中のIL-10量が増加し、添加した抗原の卵白アルブミン(ovalbumin, OVA)に対するCD4T細胞応答が2回免疫により低下することを確認している。また、骨髄より顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子(granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)により誘導したDC(BM-DC)に α -GCを負荷しマウスに投与すると、投与回数が増加するに連れ、血清中のIFN- γ やIL-2産生量が減少し、IL-10やIL-4の産生が認められるようになった。このことからBM-DCに α -GCと抗原を負荷して投与することにより、特異的な免疫寛容が誘導できることが予想された。そこで、CD4T細胞依存的であり、多発性硬化症のマウスモデルであるEAEを用いて、 α -GCとミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパクペプチド(myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG)を負荷したBM-DC投与による発症抑制効果を検討したところ、投与回数に相関して発症の頻度や症状の軽減が認められた。この結果から、BM-DCとiNKT細胞およびMOG特異的CD4T細胞が相互に作用を及ぼすことがEAEの発症抑制に関わっていると考えられる。

2. 研究の目的

そこで、BM-DCが α -GCとタンパク抗原を提示することで誘導できる抗原特異的なT細胞応答の抑制機構を明らかにするために、提示を受けたiNKT細胞やT細胞の応答性の変化に着目して研究を進める予定である。まず、BM-DCがiNKT細胞とT細胞へ抗原を提示することは明らかであるが、iNKT細胞とT細胞への提示を行う場合は各臓器におけるこれらの細胞の分布が異なることから、必ずしも一致するとは限らないので、組織学的な手法を用いて生体内における抗原提示の場を検討する。次に、可溶性 α -GC投与実験からiNKT細胞は頻回投与によりTh2タイプのサイトカインを産生するようになることが報告されていることから、BM-DCの提示により影響を受けたiNKT細胞が再刺激で産生するサイトカインの種類や量を正常個体のiNKT細胞と比較する。また、iNKT細胞の数量変化が免疫応答に及ぼすことから、 α -GC負荷BM-DC投与によるiNKT細胞の増減についても検討する。また、 α -GCを提示するDCは活性化したiNKT細胞から刺激を受け、活性化することが知られていることを考慮し、投与したDCや生体のDCの活性化をMHC分子や共刺激分子の発現量の変化やサイトカイン産生を指標に検討する。EAEの発症にはT細胞のTh17への分化によるとの報告があることを念頭に、 α -GC負荷BM-DC投与によるMOG提示がTh17への分化を抑制するかを他のThサブセットへの分化と合わせて検討する。また、他のEAE発症抑制機構に関わるT細胞の機能変化としてクローン除去、アネルギーや制御性T細胞への分化についても検討する。予備的実験ではマウスを予め免疫してからEAEを誘導したが、より臨床的な意義を追求するために、EAE発症マウスにおける効果も検討する。これらの研究より α -GC負荷BM-DC投与による抗原提示が抑制性T細胞を誘導できた場合は、喘息などの異なるThタイプの応答により引き起こされる自己免疫疾患モデルにおいても応用可能かを検討する。

3. 研究の方法

(1) 使用したマウス

マウスはC57BL/6マウスを日本S.L.C株式会社より購入し、京都大学理学部動物飼育施設にてSPF環境下で飼育したものを使用した。CD1dノックアウト(CD1d KO)マウスおよびJ α 281 KOマウス

スは谷口克（理研免疫・アレルギー科学総合研究センター）先生より供与された。

(2) BM-DCの誘導と抗原負荷
マウス大腿骨と脛骨から調製した骨髓細胞を顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）にて刺激し、未成熟BM-DCを誘導した。CD11c陽性細胞を磁気ビーズ分離システム（MACS）にて精製し、再播種する際に抗原をパルスした（ α -GCは100 ng/ml）、MOGペプチドは2 mg/ml）。2日後に細胞を回収し、PBSで洗浄後、マウスに 1×10^5 個/200 μ lで静脈より投与した。

(3) iNKT細胞の調製
脾臓細胞からB細胞、CD8 T細胞やマクロファージ等を抗体で標識した後にDyna beadsで除去し、残った生細胞から α -GC/CD1d-Ig結合細胞をMACSで分離した。さらに、FACS AdvantageによりiNKT細胞を精製して用いた。

(4) EAE誘導
マウス背側部にフロイント完全アジュバントとMOGペプチドの乳化物を皮下接種し、1日後に百日咳毒素を腹腔投与した。EAEの症状は5段階で評価した。1；尾の麻痺、2；正向反射の不全、及び部分的な後肢麻痺、3；完全な後肢麻痺、4；前後肢麻痺、5；死亡。

4. 研究成果

(1) 生体に α -GC負荷BM-DCを投与したところ、肺、肝臓と脾臓への集積が見られたが、これらの細胞は投与後2時間以降で細胞数が著明に減少することから、DCにより活性化したNKT細胞により除去されていると考えられた。BM-DCによるNKT細胞の活性化は短時間であると推測されたが、血清中には検出可能な量のサイトカインが放出された。また、蛍光標識した α -GC負荷BM-DCを投与したところ、脾臓のCD8+DCに貪食が認められ、CD1d KOマウス骨髓から誘導したBM-DCに α -GCを負荷して投与した場合にも、血清サイトカイン量の増加が検出された。これらの結果より、投与したBM-DCは直接抗原を提示するのに加え、iNKT細胞による傷害を受け、ホストのDCにより抗原が提示される経路も存在すると考えられる。

(2) そして、 α -GC負荷BM-DCを3回投与したマウスと初回投与マウスの血清中のサイトカイン量を経時的に測定したと

ころ、IFN- γ 産生量は投与後3時間という早期には3回投与したマウスの方が多いものの、6時間以降は逆転し、3回投与群では産生量が低下するのに対して、初回投与群は12時間後までIFN- γ 産生量の上昇が認められた。一方、IL-4産生は3回投与群で投与後3時間、初回投与群で6時間でピークとなり、ピーク時の産生量は3回投与群が初回投与群を上回っていた。IL-10は初回投与群では α -GCを負荷していないBM-DCを投与した場合と同程度の産生しか認められないのに対して、3回投与群では3時間をピークとした産生が認められた。このIL-10産生がNKT細胞に由来することをin vitroにおける再刺激実験および α -GC反応性NKT細胞がないJ α 281ノックアウトマウスを用いた実験により確認した。

(3) 次に、 α -GC負荷BM-DC3回投与による生体内DCの機能変化をT細胞刺激能とCD40リガンド刺激に対するサイトカイン産生により検討したところ、 α -GCを負荷していないBM-DCを投与した場合と差は認められなかった。しかし、BM-DCを3回投与したマウスのCD4陽性T細胞をin vitroで抗CD3 ϵ 抗体と抗CD28抗体で刺激したところ、 α -GC負荷DC投与群でIL-10産生量の上昇が認められた。

(4) NKT細胞がMOGペプチドと α -GCをパルスした骨髓由来樹状細胞（MOG+ α -GC/BM-DC）3回投与によるEAE発症抑制に必要であることがJ α 218ノックアウト（KO）マウスを用いた実験より明らかとなった。また、野生型（WT）C57BL/6マウスを免疫する際にMOGペプチドと α -GCを別々のBM-DCにパルスして投与した場合には抑制効果が認められなかった。これらの結果より、NKT細胞とCD4 T細胞が同一のBM-DC上でそれぞれの抗原を認識することが重要であることが明らかとなった。また、投与したBM-DCは肺、肝臓、脾臓に分布するが、脾臓除去マウスではMOG+ α -GC/BM-DC3回投与によるEAE発症抑制誘導されないことから、投与DCとNKT細胞およびT細胞が相互作用するのは脾臓であると考えられる。

(5) MOG+ α -GC/BM-DCを3回投与した場合、MOG/BM-DC免疫群よりもEAE誘導10日目で脾臓、リンパ節、脊髄においてT細胞数の増加が抑制されて

いた。NK T細胞数は脾臓とリンパ節では同程度の増加であったが、脊髄ではMOG + α - GC / BM - DC投与群でより多くのNK T細胞浸潤が認められた。これまでの研究で α - GCパルスBM - DC3回投与はIL - 10産生CD4 T細胞を誘導することが明らかとなっているが、Foxp3陽性の制御性T細胞の数には変化が認められなかった。しかし、CD25弱陽性から陰性CD4 T細胞において膜結合型TGF - β 1の発現上昇が認められた。これらの結果より、MOG + α - GC / BM - DC投与はNK T細胞の活性化を介してIL - 10やTGF - β 1を発現するCD4 T細胞を誘導し、他のエフェクター細胞の増殖や分化を抑制することでEAEの発症を抑制することが示唆された。また、MOG + α - GC / BM - DCを3回投与したマウスより調製したCD4 T細胞を移入したマウスではEAE発症を抑えられなかったことから、抗原を負荷したBM - DCは反応性CD4 T細胞の除去も誘導している可能性は排除できない。

iNK T細胞とTNF- α 刺激BM - DCの相互作用によりIL-10産生CD4 T細胞が誘導されることはすでに示されているが、このときのリガンドは不明である。今回の研究では α - GCでも同様のIL-10産生CD4 T細胞が誘導されることを示し、それにiNK T細胞のIL-10産生が関与することを示した。この結果は α - GCとBM - DCを用いた免疫寛容の誘導への応用が期待されるほか、現在行なわれている α - GCパルスBM - DCのがん治療への応用にも重要な知見となる。

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)

Aoi Son, Hajime Nakamura, Tomonori Iyoda, Kayo Inaba and Junji Yodoi et al.
Dendritic cells derived from TBP-2-deficient mice are defective in inducing T cell responses
Eur. J. Immunol.
vol. 38
p1358-1367
2008
査読・有

[学会発表] (計 3件)

①伊豫田 智典

Induction of anergy of NK T cells in

response to α -galactosylceramide presented by dendritic cells

日本免疫学会総会・学術集会

2007/11/21

東京都

②羽床 明子

Repetitive injection of dendritic cells pulsed with α -galactosylceramide effectively induce tolerance in an antigen-dependent and independent manner

日本免疫学会総会・学術集会

2007/11/21

東京都

③伊豫田 智典

Anergy induction of NK T cells by dendritic cells presenting α -galactosylceramide

The 5th International Symposium on CD1/NK T cells

2009/3/24

神奈川県

[図書] (計 1件)

伊豫田 智典

科学評論社

NK T細胞を介した樹状細胞によるIL-10産生T細胞の誘導

2008年

p32-38

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊豫田 智典 (IYODA TOMONORI)

京都大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号：60359784

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者