

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590894

研究課題名（和文）喘息重症化における真菌認識機構 Dectin-1 経路の役割の解明

研究課題名（英文）The roles of Dectin-1 in the development of severe asthma

研究代表者

廣瀬 晃一 (HIROSE KOICHI)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90400887

研究成果の概要（和文）：近年の研究により Toll like receptor(TLR)のみならず、真菌認識機構である Dectin-1 も CD4 陽性 T 細胞分化を始めとした獲得免疫に関与していることが示された。我々は Dectin-1 特異的リガンドである Curdlan を用いて Dectin-1 経路の CD4 陽性 T 細胞分化に対する働きを検討した。その結果、Curdlan は抗原提示細胞上に発現する Dectin-1 経路を活性化することにより IL-10 産生性 T 細胞分化を誘導することが明らかとなった。さらに、これらの IL-10 産生性 T 細胞は c-Maf を高発現しているが、Th1、Th2、Th17、制御性 T 細胞分化に必須である転写因子 T-bet, GATA3, ROR γ t, FoxP3 は発現していないこと、また STAT6 欠損マウスを用いた実験により Dectin-1 依存的に誘導される IL-10 産生性 T 細胞分化には T 細胞内の STAT6 が必須であることが明らかとなった。以上の結果より Dectin-1 経路は STAT6、c-Maf 依存的に IL-10 産生性 T 細胞分化を誘導することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Recent evidence suggests that signals through not only Toll-like receptors(TLR) but also Dectin-1 contribute to the fine-tuning of acquired immune responses. Here, we examined the effect of Dectin-1 signaling on CD4⁺ T cell differentiation by using a linear form of pure β -glucan, curdlan, as a ligand. We found that curdlan instructed DCs to induce the development of IL-10-producing CD4⁺ T cells without the significant production of IFN- γ , IL-4, or IL-17A. We also found that IL-10-producing CD4⁺ T cells did not express T-bet, GATA3, ROR γ t, or FoxP3, but expressed c-Maf, which has been shown to activate the transcription of IL-10. Moreover, we found that STAT6 but not T-bet expressed in the CD4⁺ T cells is essential for the IL-10 producing T cell differentiation induced by curdlan. Taken together, these results suggest that STAT6 as well as c-Maf plays a critical role for the development of IL-10-producing CD4⁺ T cells in the presence of Dectin-1 activation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・閉塞性肺疾患

キーワード：Dectin-1、IL-10 産生性 CD4 陽性 T 細胞、STAT6、c-Maf

1. 研究開始当初の背景

我々は、喘息の重症化機構を解析し、IL-17 産生性 CD4 陽性 T 細胞 (Th17 細胞) が Th2 細胞依存性アレルギー性気道炎症を増悪させることを明らかにした (Wakashin et al. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2008)。一方近年、真菌由来 β -glucan の認識機構である Dectin-1 経路が Th17 細胞の分化を誘導することが報告された。他方、Th17 細胞依存性実験的脳脊髄炎の発症は Dectin-1 経路の活性化により抑制されることが報告されており、獲得免疫応答における Dectin-1 経路の役割の詳細は依然不明である。

2. 研究の目的

- (1) Dectin-1 経路の CD4 陽性細胞分化における働きを解明する。
- (2) アレルギー性気道炎症における Dectin-1 経路の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) OVA 特異的 TCR を発現する DO11.10 マウス脾臓細胞を用いて CD4 陽性細胞分化における Dectin-1 経路の働きを検討した。
- (2) Dectin-1 経路依存的に誘導される T 細胞分化における抗原提示細胞の働きを検討した。
- (3) Dectin-1 経路依存的に誘導される T 細胞分化における転写因子の働きを検討した。

4. 研究成果

(1) Dectin-1 経路の CD4 陽性 T 細胞分化における働き

卵白アルブミン (OVA) 特異的 TCR を発現する DO11.10 マウスの脾臓細胞を Dectin-1 の特異的リガンド Curdlan の存在下、非存在下で 5 日間培養し Dectin-1 経路の CD4⁺T 細胞分化における働きを細胞内サイトカイン染色法により検討した。興味深いことに Curdlan の存在下でも IFN γ 産生 (Th1) 細胞、IL-4 産生 (Th2) 細胞、IL-17 産生 (Th17) 細胞の割合には明らかな変化は見られなかったが、Curdlan の濃度依存的に IL-10 産生細胞が著明に誘導されることが明らかとなった (図 1)。さらに、Curdlan による IL-10 産生細胞分化における Dectin-1 の働きを明らかにするために、Dectin-1 に対する中和抗体を加え IL-10 産生性 T 細胞分化における働きを検討した。既に Curdlan は Dectin-1 を活性化する β -glucan であることが報告されているが、これらの報告と一致して Dectin-1 中和抗体の存在下では Curdlan による IL-10 産生性 T 細胞分化は完全に抑制された (図 1)。これらの結果から Curdlan は Dectin-1 経路を介して IL-10 産生性 T 細胞の分化を誘導することが明らかとなった。

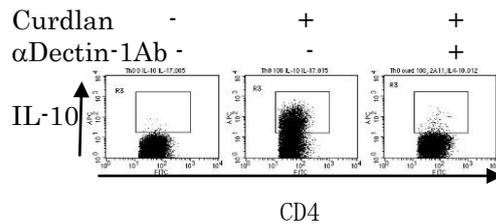


図 1 : Dectin-1 経路の CD4 陽性 T 細胞分化における働き

DO11.10 マウスの脾臓細胞を Curdlan、ならびに抗 Dectin-1 抗体の存在下、非存在下で OVA 刺激した。培養 5 日後に IL-10 産生性 T 細胞分化を細胞内サイトカイン染色法を用いて検討した。

(2) Dectin-1 経路による IL-10 産生性 T 細胞分化における抗原提示細胞の働き

さらに我々は Curdlan が T 細胞に直接的に作用するのか、もしくは抗原提示細胞を介して IL-10 産生性 T 細胞分化に関与するか検討した。DO11.10 マウスの脾臓細胞より MACS により CD4 陽性細胞を純化し Curdlan の存在下、非存在下において抗 CD3 抗体 + 抗 CD28 抗体により刺激し IL-10 産生性 T 細胞分化を検討した。その結果、抗原提示細胞を用いずに CD4 陽性 T 細胞を刺激する際に Curdlan を添加しても IL-10 産生性 T 細胞の分化は誘導されなかった (図 2)。一方、DO11.10 マウスから純化した CD4 陽性細胞を抗原提示細胞の存在下で OVA により刺激する際に Curdlan を添加すると IL-10 産生性 T 細胞の分化が誘導された (図 2)。これらの結果からは Curdlan は抗原提示細胞を介して IL-10 産生性 T 細胞分化に関与すると考えられた。さらに我々は Curdlan の受容体である Dectin-1 の各細胞分画における発現を FACS により検討した。その結果、Dectin-1 は T 細胞には発現していないが、マクロファージと樹状細胞に発現していることが明らかになった。以上の結果から、Curdlan は抗原提示細胞上に発現する Dectin-1 を活性化し、IL-10 産生性 T 細胞の分化を誘導することが明らかになった。

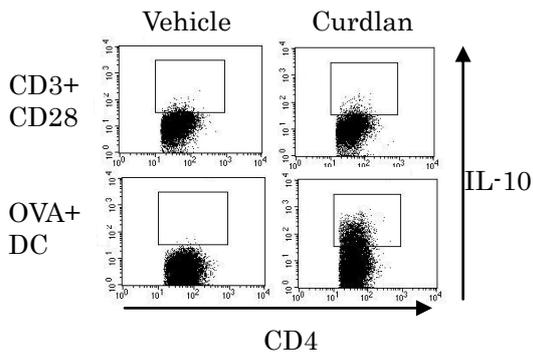


図 2 : Dectin-1 経路により誘導される IL-10 産生性 T 細胞分化における抗原提示細胞の役割

DO11.10 マウス脾臓より CD4 陽性 T 細胞を純化し、Curdlan の存在下および非存在下で、抗 CD3 抗体+抗 CD28 抗体刺激、或は抗原提示細胞+OVA 刺激し、IL-10 産生性 T 細胞の分化を検討した。

(3) Dectin-1 経路により誘導される IL-10 産生性 T 細胞分化における転写因子の働き

次に我々は Dectin-1 経路により誘導される IL-10 産生性 T 細胞が如何なる転写因子を発現しているか検討した。DO11.10 マウスの脾臓細胞を Curdlan の存在下、および非存在下で培養し、CD4 陽性 T 細胞に発現している転写因子を半定量的 RT-PCR 法により比較した。これまでの研究より Th1 細胞分化、Th2 細胞分化、Th17 細胞分化には、それぞれ T-bet、GATA-3、ROR γ t が必須であることが示されているが、Dectin-1 経路により誘導された IL-10 産生性 T 細胞はこれらの転写因子を発現していなかった (図 3)。さらに IL-10 産生細胞のサイトカインプロファイルを細胞内サイトカイン染色法、ELISA 法により検討したところ、Dectin-1 経路により誘導された IL-10 産生性 T 細胞は IFN γ 、IL-4、IL-17 を共発現していないことがわかった (未発表データ)。これらの結果から、Dectin-1 経路により誘導された IL-10 産生性 T 細胞は既存の Th1 細胞、Th2 細胞、Th17 細胞とは異なるサブセットと考えられた。また制御性 T 細胞に特異的な転写因子である FoxP3 も発現していないことより、FoxP3 陽性制御性 T 細胞とも異なるサブセットと考えられた。一方、Dectin-1 経路により誘導された IL-10 産生性 T 細胞は、IL-10 産生への関与が示唆されている c-Maf を高発現していることがわかった (図 3)。さらにレトロウイルスを用いて c-Maf を T 細胞に発現させて、IL-10 産生における働きを検討したところ、c-Maf 発現細胞は非発現細胞に比較して高率に IL-10 を産生することが明らかになった (未発表データ)。以上の結果から、Curdlan

により誘導される IL-10 産生性 T 細胞の分化には T 細胞における c-Maf の発現誘導が重要であることが示唆された。

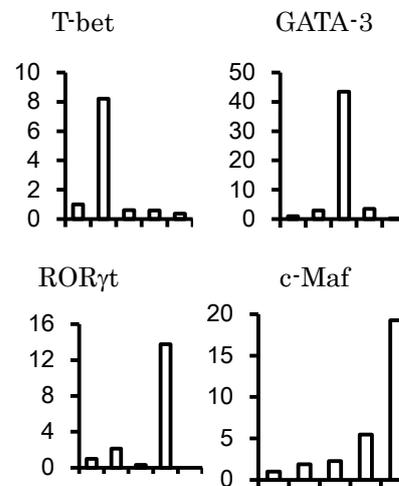


図 3 : Dectin-1 経路により誘導された IL-10 産生性 T 細胞に発現する転写因子

DO11.10 マウスの脾臓細胞を OVA で刺激し各種条件下で培養した。5 日後に T 細胞に発現している転写因子を定量的 RT-PCR 法により評価した。

(左より Th0 条件、Th1 条件、Th2 条件、Th17 条件、Curdlan 存在下)

(4) IL-10 産生性 T 細胞分化における T-bet、STAT6 の働き

Th1 細胞分化、ならびに Th2 細胞分化には、それぞれ T-bet と STAT6 が必須であることが知られている。我々は Dectin-1 経路により誘導される IL-10 産生性 T 細胞分化における T-bet、STAT6 の働きを、それぞれの遺伝子欠損マウスを用いて検討した。

まず DO11.10 マウスを T-bet 欠損マウス (T-bet KO マウス)、STAT6 欠損マウス (STAT6 KO マウス) と交配し、DO11.10/T-bet KO マウス、DO11.10/STAT6 KO マウスを作製した。次にこれらのマウス脾臓細胞を Curdlan 存在下、非存在下で培養し IL-10 産生性 T 細胞分化を細胞内サイトカイン染色法、ELISA 法により検討した。その結果、DO11.10/T-bet KO マウスの脾臓細胞からは Curdlan により野生型と比較して高率に IL-10 産生性 T 細胞が誘導された。また ELISA でも IL-10 産生の亢進が確認された (未発表データ)。以上の結果より T-bet は Curdlan 依存的に誘導される IL-10 産生性 T 細胞分化に抑制的に作用していると考えられた。一方 DO11.10/STAT6 KO マウスの脾臓細胞からは IL-10 産生性 T 細胞分化が完全に抑制された (図 4)。これらの結果から

Curdlanにより誘導されるIL-10産生性T細胞分化にはSTAT6が必須であると考えられた。

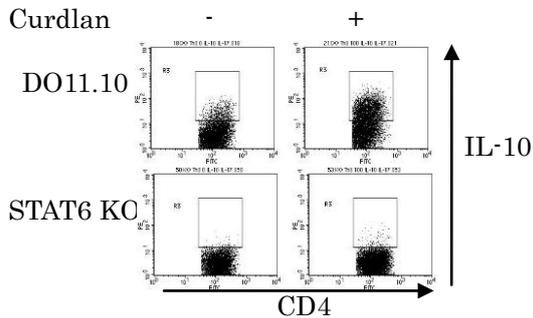


図4：Dectin-1経路依存的IL-10産生性T細胞分化におけるSTAT6の役割

DO11.10マウス、DO11.10/STAT6 KOマウスの脾臓細胞をCurdlanの存在下、非存在下でOVA刺激し、培養5日後に、IL-10産生性T細胞の分化を細胞内サイトカイン染色法により検討した。

(5) T細胞、抗原提示細胞におけるSTAT6の働き

次にどの細胞群に発現するSTAT6がIL-10産生性T細胞の分化に必須であるか検討するために野生型マウスとSTAT6欠損マウスより抗原提示細胞を、DO11.10マウスとDO11.10/STAT6 KOマウスからCD4陽性細胞をそれぞれ単離し、Curdlanの存在下、非存在下におけるIL-10産生細胞分化を比較検討した。

まず、抗原提示細胞に発現するSTAT6が関与するか否か検討するために、DO11.10マウスのCD4陽性T細胞を野生型マウスおよびSTAT6欠損マウスより単離した抗原提示細胞で刺激した。その結果、STAT6欠損マウスから単離した抗原提示細胞も野生型マウスの抗原提示細胞と同等にCurdlanによるIL-10産生性T細胞の分化は誘導することがわかった。一方、DO11.10/STAT6 KOマウスより単離したCD4陽性T細胞を野生型マウスより単離した抗原提示細胞で刺激した際にはCurdlan存在下においてもIL-10産生性T細胞の分化は誘導されなかった(図5)。以上より、T細胞に発現するSTAT6がDectin-1経路依存的に誘導されるIL-10産生性T細胞の分化に必須であることが示された。

以上の結果からDectin-1のリガンドであるCurdlanは抗原提示細胞上に発現するDectin-1経路を活性化することにより、T細胞内のSTAT6、c-Maf依存的にIL-10産生性T細胞分化を誘導することが示された。

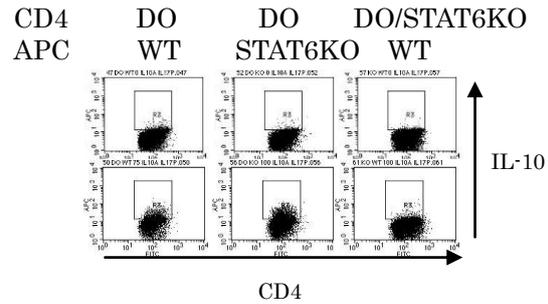


図5：T細胞、および抗原提示細胞におけるSTAT6の役割

野生型マウス、STAT6欠損マウスより抗原提示細胞を、またDO11.10マウス、DO11.10/STAT6 KOマウスよりCD4陽性T細胞を単離し、Curdlanの存在下、非存在下でOVA刺激し、IL-10産生性T細胞の分化を細胞内サイトカイン染色法により検討した。

上段：溶媒コントロール
下段：Curdlan

(6) 考察

本研究により、Dectin-1経路の活性化はSTAT6依存的にIL-10産生性T細胞の分化を誘導することが明らかとなった。現在、Dectin-1刺激により誘導されるIL-10産生性T細胞の機能解析を進めているが、既に本方法により誘導した抗原特異的IL-10産生性T細胞は、in vivoにおいて抑制能をもつことを示唆する予備データを得ている。従ってIL-10産生性T細胞の分化機構の更なる解析により、アレルギー疾患に対する新規治療方法の開発につながると考えられる。

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16件)

① B and T lymphocyte attenuator suppresses IL-21 production from follicular Th cells and subsequent humoral immune responses

Kashiwakuma D, Suto A, Ikeda K, Hirose K, Watanabe N, Nakajima H et al. J Immunol. 2010 185 2730-2736

② Role of Th2 cells in IgG4-related lacrimal gland enlargement

Kanari H, Kagami S, Ikeda k, Hirose K, Watanabe N, Nakajima H et al. Int Arch Allergy Immunol 2010 152 47-53

③ Role of IL-23 and Th17 Cells in Airway Inflammation in Asthma

Nakajima H Hirose K
Immune Netw 2010 10 1-4

④ c-Maf activates the promoter and enhancer of the IL-21 gene, and TGF- β inhibits c-Maf-induced IL-21 production in CD4+ T cells

Hiramatsu Y, Suto A, Ikeda K, Hirose K, Watanabe N, Nakajima H, et al.
J Leukoc Biol 2010 87 703-712

⑤ Protective roles of B and T lymphocyte attenuator in NKT cell-mediated experimental hepatitis

Iwata A, Watanabe N, Ikeda K, Hirose K, Nakajima H et al.
J Immunol. 2010 184 127-133

⑥ Roles of IL-23-Th17 cell axis in allergic airway inflammation

Wakashin H, Hirose K, Iwamoto I, Nakajima H
Int Arch Allergy Immunol. 2009 149 108-112

⑦ Protein geranylgeranylation regulates the balance between Th17 cells and FoxP3+ regulatory T cells

Kagami S, Ikeda K, Hirose K, Watanabe N, Nakajima H et al.
Int Immunol. 2009 21 679-689

⑧ STAT6 inhibits T-bet independent Th1 cell differentiation

Tamachi T, Takatori H, Hirose K, Watanabe N, Nakajima H et al.
Biochem Biophys Res Commun 2009 15 751-755

⑨ IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice

Wakashin H, Hirose K, Watanabe N, Nakajima H et al.
Am J Respir Crit Care Med. 2008 178 1023-1032

⑩ An explanation for the apparent dissociation between clinical remission and continued structural deterioration in rheumatoid arthritis

Brown AK, Ikeda K, Emery P, et al.
Arthritis Rheum 2008 58 2958-2967

⑪ Reduction of fatigue in Sjogren syndrome with rituximab: results of a randomized, double-blind,

placebo-controlled pilot study.

Dass S, Ikeda K, Emery P, et al.
Ann Rheum Dis 2008 67 1541-1544

⑫ Development of autoimmune hepatitis-like disease and production of autoantibodies to nuclear antigens in mice lacking B and T lymphocyte attenuator

Oya Y, Watanabe N, Hirose K, Nakajima H et al.
Arthritis Rheum. 2008 58 2498-2510

⑬ GS143, an I κ B ubiquitination inhibitor, inhibits allergic airway inflammation in mice.

Hirose K, Wakashin H, Ikeda K, Watanabe N, Nakajima H
Biochem Biophys Res Commun 2008 374 507-511

⑭ HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin inhibits proinflammatory cytokine production from murine mast cells.

Kagami S, Kanari H, Ikeda K, Hirose K, Watanabe N, Nakajima H et al.
Int Arch Allergy Immunol 2008 146 61-66

⑮ Development and characterization of IL-21 producing CD4+ T cells

Suto A, Hirose K, Watanabe N, Nakajima H et al.
J Exp Med. 2008 205 1369-1379

⑯ Overlapping and distinct roles of STAT4 and T-bet in the regulation of T cell differentiation and allergic airway inflammation.

Furuta S, Kagami S, Tamachi T, Ikeda K, Hirose K, Watanabe N, Nakajima H, et al.
J Immunol. 2008 181 6656-6662

〔学会発表〕 (計 1 件)

dectin-1 signaling instructs dendritic cells to induce the development of IL-10-producing CD4+ T cells by ICOS- and TGF- β -dependent mechanisms
Kawashima S, Hirose K, Nakajima H, et al
14th International Congress of Immunology
Kobe/ Japan, 2010

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.jp/class/gene/kenkyugyouseki.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣瀬 晃一 (HIROSE KOICHI)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90400887

(2) 研究分担者

渡邊 紀彦 (WATANABE NORIHIKO)
千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20375653

池田 啓 (IKEDA KEI)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：10456014

(3) 連携研究者

中島 裕史 (NAKAJIMA HIROSHI)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：00322024