

平成 26 年 5 月 3 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591412

研究課題名(和文) 樹状細胞による造血制御

研究課題名(英文) Control of hematopoiesis by dendritic cells

研究代表者

澤田 賢一 (Sawada, Kenichi)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90226069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：樹状細胞は様々なサイトカインを産生することから造血幹細胞の分化制御に関与すると推定されるがその詳細は不明であった。本研究では、樹状細胞を刺激するトール様受容体(TLR)3の刺激によってヒト造血幹・前駆細胞(CD34+細胞)が急速にアポトーシスを起こすことを*in vitro*で証明した。さらに、マウスを用いた*in vivo*実験で、1)TLR9刺激もしくはウイルス感染による血球貪食症候群が惹起される、2)貪食細胞は単球由来樹状細胞でIL-10を産生する、3)産生されたIL-10は血球貪食の過剰な進展を抑制することを示し、血球貪食は過剰な免疫応答を制御する新たな免疫抑制機構であることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Dendritic cells (DC) produce various cytokines which may regulate the differentiation of hematopoietic stem cells (HSCs), however, the details of the relationship between dendritic cells and HSCs remains unclear. In this project, I revealed that the DC-stimulator TLR3 induces the prompt death of HSCs *in vitro*. Using mouse model, I also demonstrated that TLR9 stimulation or viral infection induces hemophagocytic syndrome, and that the phagocytes are monocyte-derived dendritic cells that produce IL-10. The produced IL-10 down-regulated hemophagocytosis, which suggests that hemophagocytosis is a novel immune suppressive mechanism to suppress an excessive immune response.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：造血幹・前駆細胞 CD34+細胞 樹状細胞 TLR IL-10 二本鎖RNA 一本鎖DNA アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

樹状細胞 (dendritic cells, DCs) は、様々なサイトカイン産生を介してリンパ球の制御を行ない免疫系のホメオスタシスを維持するとともに、その破綻は易感染性や過剰反応、自己免疫疾患などの免疫異常を引き起こす。DCs の起源は造血幹細胞でありその発生は炎症刺激後 3 日前後と極めて早期である。さらに DCs は同時に発生する自己造血細胞を盛んに貪食する (Exp Hematol 32: 450, 2004, Blood 107:1366, 2006)。DCs の旺盛なサイトカイン産生能と貪食能を鑑みれば、DCs そのものが造血幹細胞の分化と増殖に関与していることは容易に推定される。しかし、炎症ストレスとしての Toll 様受容体 (Toll-like receptor, TLR) リガンドが造血幹細胞に及ぼす影響や造血幹細胞由来 DCs の分子生物学的性状には不明の点が多い。これまで TLR4 や TLR7/8 リガンドによる造血幹・前駆細胞の単球・マクロファージ系への分化誘導がそれぞれマウスとヒトで報告されているのみである (Immunity 24:801, 2006, J Mol Biol 364:945, 2006)。

2. 研究の目的

本研究ではヒト造血幹細胞由来 DCs が免疫系のみならず造血系をも制御していることを明らかにし、造血における DCs の機能と病態について新たなパラダイムを提唱することを目的とした。本研究により造血幹細胞由来 DCs による病態が明らかになればそれに対する新たな治療法の開発が期待される。

3. 研究の方法

(1) 純化ヒト造血幹細胞 (CD34⁺細胞) に由来する DCs において各分化段階の DCs における TLR 発現パターン、サイトカイン産生能および DC 関連転写因子群の発現レベルを検討した。

(2) 種々の TLR リガンド分子による造血幹細胞由来 DCs の分化・増殖制御機構を解析した。

(3) 自己血球を貪食する DCs の病態生理学的意義を解析するために二次性血球貪食症候群 (hemophagocytic syndrome, HPS) 病態モデルマウスを以下のごとく作製した。

(4) 重篤な炎症反応やウイルス感染によって HPS を誘導する目的で、野生型マウスに高濃度の TLR リガンドや NLR-リガンドを投与あるいはリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV) clone13 (C13) 株を感染させた。その後、貪食細胞と貪食されている細胞の表面抗原や産生物の測定等、詳細な解析を行った。

4. 研究成果

(1) 二本鎖 RNA によるヒト造血幹・前駆細胞 (CD34⁺細胞) のアポトーシス誘導パターン認識受容体 (pattern recognition

receptors, PRRs) には、TLR、retinoic acid inducible gene-1 (RIG-I) 様受容体 (RLRs)、nucleotide binding oligomerization domain (NOD) 様受容体 (NLRs) 及び細胞質 DNA 受容体等が含まれる。PRRs はさまざまな病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) を特異的に認識し、I 型インターフェロン (interferon, IFNs)、炎症性サイトカイン等の産生を誘導することによって、病原体や感染された細胞を除去する。最近、ヒト CD34⁺造血幹・前駆細胞にも、TLRs 及び NLRs の発現が確認されつつある。それらのリガンドの刺激による CD34⁺細胞の活性化、サイトカイン産生、細胞周期進行、骨髄系や単球系への分化誘導が報告されている。TLR3 の代表的リガンドである二本鎖 RNA (dsRNA) である poly I:C について検討した。その結果、poly I:C は、濃度依存性に CD34⁺細胞の増殖を抑制した。抑制はすべての血球系列の前駆細胞で認められた (図 1A)。Poly I:C による抑制は極めて早期であり、培養開始後 30 分間の poly I:C 暴露で CD34⁺細胞の増殖が抑制された。培養開始 24 時間以降の添加では抑制効果を認めなかった。

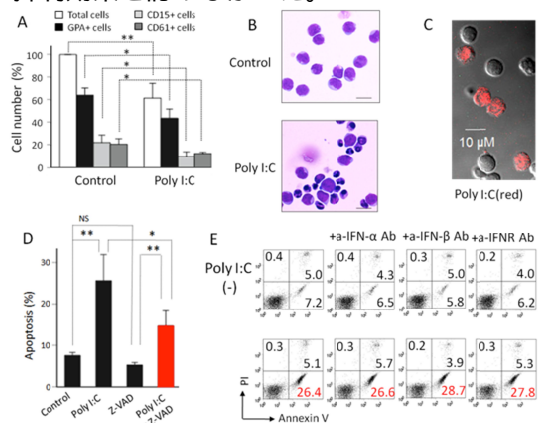


図1 Poly I:CによるCD34⁺細胞の抑制

CD34⁺細胞は、poly I:C 存在下で、その約 40% が 4 時間以内にアポトーシス様形態を示し、Annexin V 陽性となった (図 1B)。このアポトーシス誘導作用は TLR リガンドの中で poly I:C に特異的であり、TLR4, TLR7/8, TLR9 に対するそれぞれのリガンドではアポトーシス誘導作用を認めなかった。

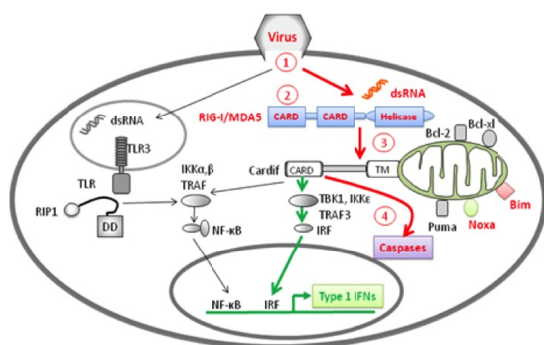
Poly I:C は CD34⁺細胞に迅速に取り込まれた。オートファゴソームとライソソームの融合を阻害する bafilomycin によってアポトーシスがほぼ完全に抑制されたことから、poly I:C はオートファゴソームとライソソームを介して CD34⁺細胞に取り込まれると考えられた (図 1C)。

Poly I:C による TLR3、RIG-I と MDA-5 の mRNA 発現上昇を認めた。RIG-I /MDA-5 を介してシグナルを伝達する poly I:C/LMW/Lyovec は CD34⁺細胞のアポトーシスを誘導した。TLR3 を介してシグナルを伝達する poly A:U は CD34⁺細胞のアポトーシスを誘導しなかった。従って、poly I:C は

RIG-I/MDA-5 経路を介して CD34⁺細胞のアポトーシスを誘導すると推定された。広域スペクトルカスパーゼ阻害剤である Z-VAD-fmk がアポトーシスの一部を抑制したため、カスパーゼ経路の関与が示唆された (図 1D)。

I 型-IFN 及び I 型-IFN の中和抗体、I 型-IFN レセプター-中和抗体は CD34⁺細胞の迅速なアポトーシスに影響を与えなかったことから、poly I:C による CD34⁺細胞の迅速なアポトーシス誘導に I-IFN 経路が関与していないと推定された (図 1E)。

下図に示すごとく本研究によって、poly I:C () が RIG-I/MDA-5 経路を介して ()、ヒト CD34⁺造血幹細胞/前駆細胞のアポトーシスを迅速に誘導することを始めて明らかにした。ヒト CD34⁺細胞のアポトーシス誘導には、カスパーゼが関与するアポトーシス経路が関与するが ()、I 型-IFNs が関与しないと考えられた。これらの結果は、RNA ウイルス感染に対して CD34⁺細胞が自己アポトーシスを誘導することで、ウイルス感染細胞を除去する抗ウイルス機能を示唆していると考えられる。一方、RNA ウイルスが CD34⁺細胞のアポトーシスを誘導することで、造血抑制を介する免疫力低下を誘導し、ウイルスの生体侵入戦略の一環としていることも考えられる。この研究は、ウイルス RNA による汎血球減少を特徴とする骨髄不全症候群の病因を考える上で重要な知見を提供するものであると考えられる。(Exp Hematol, 40:330-341, 2012)



(2) 血球貪食を行う単球由来樹状細胞は過剰な免疫応答を制御する

HPS は重篤な炎症反応、微生物感染また様々な疾患でしばしば観察される病態であり、貪食現象は重度の炎症の指標として考えられていたが、その貪食機構や免疫学的な意義は不明であった。本研究では、TLR-リガンド投与あるいは LCMV C13 感染によって、貪食細胞による血球貪食が観察された。TLR-リガンドのうち TLR9 リガンドである CpG-ODN が最も強力に血球貪食を誘導した。この血球貪食は骨髄、末梢血、脾臓など全身で検出された。

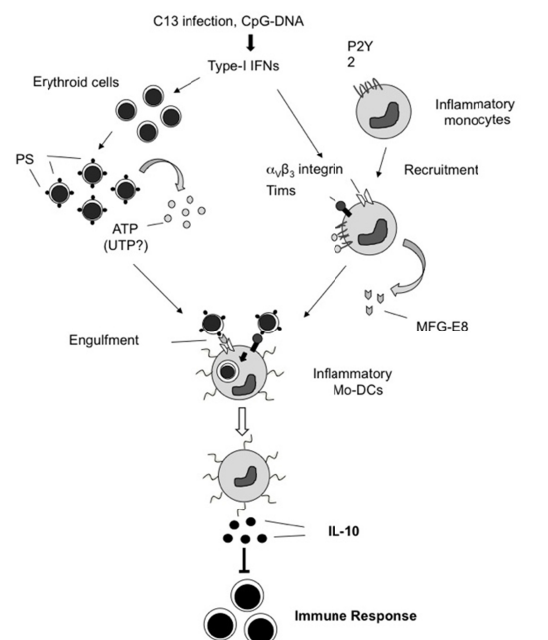
貪食細胞は単球由来樹状細胞 (monocyte derived-dendritic cell : Mo-DC) であり、

貪食されている細胞は主に TER119⁺赤芽球であった。詳細な解析結果から、この血球貪食ではアポトーシスを起こした赤芽球が Mo-DC への遊走因子として ATP を放出し、Mo-DC は P₂Y₂ 受容体を介して赤芽球を発見していた。

Mo-DC が細胞外膜側へフォスファチジルセリン(PS)を露出した赤芽球を PS 受容体 Tim1, 4 とインテグリン $\alpha_v\beta_3$ -MFG-E8 を用いて認識し、貪食していた。この LCMV C13 感染マウスに ATP 加水分解酵素、P₂Y₂ の結合阻害剤や抗 Tim1, 4、 $\alpha_v\beta_3$ 中和抗体を投与すると血球貪食が抑制された。

抗 Tim1, 4、 $\alpha_v\beta_3$ 中和抗体投与実験と IL-10^{venus} レポーターマウスを用いた実験結果から Mo-DC が貪食依存的に抑制性サイトカイン IL-10 を産生し、且つ同細胞が主要な IL-10 産生細胞であることが明らかとなった。

Mo-DC による血球貪食を抑制したり、抗 IL-10 中和抗体を投与、あるいは同細胞からの IL-10 産生が期待できない *Cd11c-Cre/IL10^{fl/fl}* マウスに LCMV C13 を感染させたところ、これらのマウスにおいてウイルス特異的 CTL 活性が上昇したが、一方で肝障害マーカー (AST・ALT) が亢進し、組織障害が起こり半数のマウスが 2 週間以内に死亡した。



以上、マウスに HPS を誘導し Mo-DC が赤芽球を貪食するという血球貪食を観察した。この血球貪食は、上図に示すごとく、赤芽球が放出する ATP とそれを認識する Mo-DC 上の P₂Y₂ 受容体 (“ Find me ” シグナル)を介したアポトーシス細胞の発見、さらに赤芽球外膜上の PS と Mo-DC 上の受容体 Tim1,4 と $\alpha_v\beta_3$ -MFG-E8 (“ Eat me ” シグナル)によって実行されていることを示した。また血球貪食によって、主として Mo-DC から IL-10 が産生されることを見出し、Mo-DC による血球貪食は、

重篤な炎症状態やウイルス感染において過剰な免疫応答を制御する新たな免疫抑制機構であることを示唆した。(Immunity, 39: 584-598, 2013)

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4件)

Ito M, Teshima K, Ikeda S, Kitadate A, Watanabe A, Nara M, Yamashita J, Ohshima K, Sawada K, Tagawa H. MicroRNA-150 inhibits tumor invasion and metastasis by targeting the chemokine receptor CCR6, in advanced cutaneous T-cell lymphoma. Blood. 2014 Mar 6;123(10):1499-511.

Ohyagi H, Onai N, Sato T, Yotsumoto S, Liu J, Akiba H, Yagita H, Atarashi K, Honda K, Roers A, Müller W, Kurabayashi K, Hosoi-Amaiike M, Takahashi N, Hirokawa M, Matsushima K, Sawada K, Ohteki T. Monocyte-derived dendritic cells perform hemophagocytosis to fine-tune excessive immune responses. Immunity. 2013 Sep 19;39(3):584-98.

Liu J, Guo YM, Hirokawa M, Iwamoto K, Ubukawa K, Michishita Y, Fujishima N, Tagawa H, Takahashi N, Xiao W, Yamashita J, Ohteki T, Sawada K. A synthetic double-stranded RNA, poly I:C, induces a rapid apoptosis of human CD34(+) cells. Exp Hematol. 2012 Apr;40(4):330-41.

Ubukawa K, Guo YM, Takahashi M, Hirokawa M, Michishita Y, Nara M, Tagawa H, Takahashi N, Komatsuda A, Nunomura W, Takakuwa Y, Sawada K. Enucleation of human erythroblasts involves non-muscle myosin IIB. Blood. 2012 Jan 26;119(4):1036-44.

[学会発表](計2件)

Ubukawa K, Yong-Mei Guo, Hirokawa M, Michishita Y, Nara M, Tagawa H, Takahashi N, Komatsuda A, Nunomura W, Takakuwa Y, Sawada K. Enucleation of human erythroblasts is an actomyosin-dependent process following nuclear polarization. 16th Congress of European Hematology Association, London, 2011, 6.9-12.

Jiajia Liu, Y M Guo, Hirokawa M, Iwamoto K, Yamashita J, Ubukawa K, Michishita Y, Fujishima N, Tagawa H, Takahashi N, Ohteki T, Sawada K. RIG-I and MDA-5 signaling triggers apoptosis of human CD34+ cells in type 1 IFNs independent pathway. 第73回日

本血液学会学術集会, 名古屋, 2011.10.14-16

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤田 賢一 (KENICHI SAWADA)

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 90226069

(2) 連携研究者

樗木 俊聡 (OHTEKI TOSHIAKI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所

先端分子医学研究部門・教授

研究者番号: 50233200