

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24659219

研究課題名（和文）樹状細胞による新たな過剰免疫応答抑制機構

研究課題名（英文）New DC-mediated machinery to fine-tune excessive immune responses

研究代表者

榑木 俊聡 (OHTEKI TOSHIAKI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：50233200

研究成果の概要（和文）：従来、激しい炎症の指標として位置づけられていた「血球貪食現象」が、過剰な免疫応答を抑制する免疫寛容機構の1つであることを見出した。重篤なウイルス感染系を用いてマウス血球貪食モデルを構築し解析した結果、激しい炎症誘導時に骨髄から末梢に赤芽球様細胞が動員され、アポトーシスを起こして単球由来樹状細胞に貪食された。重要なことに、同樹状細胞はIL-10を産生し過剰な免疫応答を抑制して組織傷害を低下させ、個体の生存を保証していた。

研究成果の概要（英文）：Hemophagocytosis is conventionally viewed as an indicator of severe inflammation. We established a murine model for hemophagocytosis. Using this model, we newly found that DC-mediated hemophagocytosis is the machinery to fine-tune excessive immune responses and assure host survival under severe infectious and inflammatory conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：血球貪食、免疫寛容、DC、IL-10、過剰免疫応答

1. 研究開始当初の背景

免疫反応は“両刃の剣”であり、感染微生物を攻撃・排除すると同時に宿主組織を傷害する。例えば、ウイルス特異的細胞傷害性T細胞(CTL)、サイトカイン、ケミカルメディエーターなどは組織傷害の原因になることが知られている。重篤な感染症ほど激しい免疫反応が誘導され、それ故、組織傷害を回避するためのより厳密な制御機構が求められる。これに関連して、調節性T細胞(Treg)やマクロファージによるアポトーシス細胞の貪食が、定常状態における免疫学的恒常性維持に重要なことが明らかになっている

(*Cell* 133, 775-787 (2008); *Cell* 140, 619-630 (2010))。しかしながら、免疫反応起動時における過剰免疫反応制御メカニズムは、その重

要性が明らかであるにも拘らず殆ど明らかになっていない。

血球貪食症候群は、重篤な微生物感染などに続発し、発熱、脾腫、血球減少などに加え「血球貪食」を特徴とする疾患である(*Autoimmune Review* 3, 69-75 (2003))。疾患名の由来にもなっている「血球貪食」は激しい炎症状態の指標とされ、サイトカインストームによって活性化されたマクロファージが血球を貪食しているとされるが、その誘導機構や真の生物学的意義は明らかではなかった。

2. 研究の目的

宿主の生存を保証するためには、重篤な感染症ほど宿主防御と宿主傷害のバランスが最

適化されなければならないが調整機構の詳細は不明である。申請者は、当該調節機構を同定する手がかりとして「血球貪食」現象に着目し、高濃度のTLRリガンド投与や重篤なウイルス感染系を用いて「血球貪食」モデルを樹立した。本研究では、樹状細胞による「血球貪食」誘導および「血球貪食」の生物学的意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス

C57BL/6 (WT, Clea), B6.*Cx3cr1*^{GFP/+} (Jackson), B6.*Ccr2*^{-/-} (Jackson), B6.*Ccl2*^{-/-} (Rollins BJ博士より分与), B6.*Ifnar1*^{-/-} (B&K Universal), B6.*Il10*^{Venus} (本田賢也博士より分与), B6.*Cd11c-Cre* (Jackson), B6.*Il10*^{fl/fl} (Roer A博士より分与)マウスを使用した。B6.*Cd11c-Cre Il10*^{fl/fl} マウスは、B6.*Cd11c-Cre*とB6.*Il10*^{fl/fl}の交配により作製した。すべての動物実験は、東京医科歯科大学の組換えDNA実験安全委員会および動物実験委員会の審査・承認を経て遂行した。

(2) 試薬の*in vivo*投与

LPS, poly I:C, R848, CpG (ODN1668), iE-DAP, MDPは、100ないし200 µgを静脈内投与 (i.v.) した。

(3) ウイルス感染

リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス Armstrong 株 (LCMV Arm, Pamela Ohashi 博士より分与)、Clone13 株 (LCMV C13, 赤塚俊隆博士より分与) は、各々 2×10^6 pfu を i.v.により感染させた。

(4) 血球貪食の抑制

ホスファチジルセリン (PS) 受容体である Tim-1, Tim-4, α_v , β_3 に対するブロッキング抗体 (八木田秀雄博士より分与) 各々 500 µg を、CpG 投与あるいは LCMV C13 感染後 60 分および 120 分に i.v.投与した。

(5) フローサイトメーター

CD3 ϵ , CD11b, CD11c, TER119, CD19, CD40, CD80, CD86, NK1.1, MHC class II, α_v , β_3 , PD-1, F4/80, Ly6c を含む様々な分子に対する抗体で染色後、Moflo ないしは Aria セルソーターを用いてソーティングを行い、FACSCantoII で解析した。

(6) CTL検出およびウイルス力価測定

LCMV C13感染後9日目に脾臓細胞を回収して解析に供した。LCMV特異的CTLの検出には、CD3 ϵ , CD8 に対する蛍光抗体、PE-H-2D^b-LCMV gp33-41 テトラマー (MBL) を用いた。ウイルス力価は、LCMV C13を含む血清をMC57G細胞と共に48時間培養後、同

細胞を固定、細胞内のLCMV C13を特異抗体とペルオキシダーゼを用いて発色、ブランク数をカウントして算出した。

(7) 統計処理

Student's t-testを行い、 $P < 0.05$ を有意水準5%において有意であると判定した。

4. 研究成果

(1) LCMV C13による血球貪食の誘導

LCMV C13はLCMV Armを親株とする2アミノ酸変異株であり、宿主標的細胞への親和性および標的細胞に感染後の複製効率が著しく高い。その結果、重篤なウイルス感染症を引き起こす。LCMV C13 2×10^6 pfu を WT マウスに i.v.すると、骨髄および末梢血では24時間、脾臓では72時間をピークとして血球貪食が観察された。また、LCMV Arm との比較において、LCMV C13による血球貪食誘導効率は有意に高かった。主な被貪食細胞は赤芽球であり、少数ではあるが顆粒球も含まれていた。一方、貪食細胞は単球由来のDCであった。そのメカニズムを解析したところ、感染後、主として赤芽球にアポトーシスが誘導されホスファチジルセリン (PS) が露出、単球由来DC上にはTim-1, Tim-4, インテグリン α_v , β_3 などのPS受容体が発現し、その結果、血球貪食に至る過程が判明した。

(2) I型インターフェロンは血球貪食の誘導に必要な不可欠である

I型インターフェロン (IFN) はウイルス感染に伴い誘導され、免疫細胞以外にもさまざまな細胞に作用して、宿主に抗ウイルス状態を構築する。このI型IFN受容体を欠損するマウスを用いて(1)と同様の実験を行ったところ、血球貪食の誘導が著しく低下していた。その原因を追求したところ、赤芽球のアポトーシスならびに単球由来DC上のPS受容体の発現誘導がI型IFN依存性であることが明らかになった。

(3) 血球貪食に関わる可能性のあるPS受容体分子群の解析

LCMV C13 2×10^6 pfu 感染後、*in vivo*で誘導される血球貪食現象は、Tim-1, Tim-4, α_v , β_3 に対するブロッキング抗体を同時に投与することによって有意に抑制された。さらに、単球由来DCに誘導される可能性のあるPS受容体分子群の発現を解析した。その結果、PSと α_v , β_3 の結合を介在するアダプター蛋白 *Mfge8*は、qPCRにより単球由来DCに発現が認められたものの、*Bai1*, *Stab2*, *Tyro3*, *Axl*, *Mertk*, *Gas6*などの発現は軽微であった。また、*Stabilin-2*, *Tyro-3*, *Axl*, *MerTK*の発現も特異抗体により検討したが有意な誘導は観られなかった。

(4) 血球貪食は過剰な免疫応答による組織傷害を防ぎ個体の生存を保証する
血球貪食の生理的意義を明らかにすることは重要である。興味深いことに、LCMV C13感染後、血球貪食依存性に免疫抑制性サイトカインIL-10が単球由来DCから産生された。同IL-10の産生はTimには依存せず、MFG-E8/インテグリンを介するシグナルに依存していた。重要なことに、Timおよびインテグリンに対する抗体を投与して血球貪食をブロックするとIL-10が産生されなくなった。その結果、LCMV C13特異的CTLが過剰に活性化して体内からウイルスがより効率よく排除されたものの、CTL依存性の肝障害が亢進して個体の約60%が死亡した。同様の実験を、*Cd11c-Cre/Il10^{fl/fl}*マウスを用いて行った。このマウスでは、血球貪食を行った単球由来DCがIL-10を産生できない。予想通り、LCMV C13感染後、同ウイルス特異的CTL活性および肝傷害の亢進により過半数のマウスが死亡した。

これら一連の実験を通じて得られた結果は、重篤なウイルス感染の際に誘導される血球貪食が過剰な免疫応答を適度に抑制するための免疫寛容機構であり、それによって組織傷害を最小限に食い止め個体の生存を保証していることが示された。今後、重篤な感染症や激しい炎症性疾患において効率よく血球貪食を誘導する技術の開発が新たな治療法へ繋がる可能性が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- ① 小内伸幸, 大八木秀明, 澤田賢一, 樗木俊聡 樹状細胞による新しい免疫寛容誘導の仕組み. 医薬ジャーナル 49, 95-100 (2013).

[学会発表] (計5件)

- ① 樗木俊聡 Dendritic cells hemophagocytose to fine-tune immune responses. 第22回日本樹状細胞研究会, 2012年6月15日, 福島
- ② Ohteki T. Monocyte-derived dendritic cells perform hemophagocytosis to fine-tune excessive immune responses. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2012.9.14, Awaji
- ③ Ohteki T. Role for monocyte-derived dendritic cells in fine-tuning excessive immune responses. The 12th International Symposium on Dendritic Cells, 2012.10.9, Daegu, Korea
- ④ Onai N, Ohyagi H, Sato T, Yotsumoto S, Kurabayashi K, Hosoi-Amaike M, Sawada K, and Ohteki T. Monocyte-derived dendritic cells perform hemophagocytosis to control

excessive immune response. The 12th International Symposium on Dendritic Cells, 2012.10.9, Daegu, Korea

- ⑤ Onai N, Ohyagi H, Sato T, Yotsumoto S, Kurabayashi K, Sawada K, and Ohteki T. Monocyte-derived dendritic cells perform hemophagocytosis to fine-tune excessive immune responses during chronic virus infection. 2012 Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2012.12.7, Kobe

[図書] (計1件)

- ① 樗木俊聡 医学書 標準免疫学 第3版 2013. p219-p225.

[その他]

アウトリーチ活動

本研究に関する市民向け公開講座を以下の通り行った。

樗木俊聡 「からだを守るしくみ”免疫”から学ぶ処世術」 四大学連合文化講演会 (東京) 2012.10.12.

報道関係情報

前述のアウトリーチ活動が11月16日付け日本経済新聞朝刊に掲載された。

ホームページ等

東京医科歯科大学難治疾患研究所生体防御学分野 HP

<http://www.tmd.ac.jp/mri/bre/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

樗木 俊聡 (OHTEKI TOSHIAKI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授
研究者番号: 50233200