

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 26 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860223

研究課題名(和文)ロイコトリエンB4受容体BLT1が規定する新規樹状細胞サブセットの機能解析

研究課題名(英文)Elucidation of novel DC subset defined by expression of BLT1

研究代表者

古賀 友紹 (KOGA, TOMOAKI)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30615092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ロイコトリエンB4第一受容体BLT1は、好中球や好酸球に多く発現し、炎症反応に関わる分子として研究が進められて来たが、近年の研究からBLT1が、T細胞等のリンパ球にも発現し、免疫反応にも関わる事が明らかになって来た。しかしながら、免疫応答の司令塔である樹状細胞におけるその役割は不明な点が多い。申請者は、BLT1発現量の異なる新規樹状細胞サブセット(BLT1hi、BLT1lo)を同定し、サイトカイン産生能やT細胞分化誘導能に大きな差がある事を見出した。この成果は、脂質メディエーターおよびその受容体による免疫応答の制御機構を解明する上で重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：Leukotriene B4 (LTB4) is a classical pro-inflammatory lipid mediator for neutrophils. BLT1 is a high-affinity receptor for LTB4 and expressed in inflammatory cells including neutrophils and macrophages. Recently, LTB4-BLT1 axis has been known to be important not only for inflammatory response, but also for immune response. Dendritic cells (DCs) are highly specialized antigen-presenting cells that regulate immune responses by presenting antigen to naive T cells and releasing cytokines. Although there are accumulating evidences on the roles of BLT1 in immune responses, its role in DCs is still elusive. Here we reported that there are two distinct DC subsets defined by different expression levels of BLT1, BLT1hi and BLT1lo DCs. Those DC subsets have different Th1-polarizing and naive T cell-proliferating abilities. These findings provide novel insights into the regulatory mechanisms of how immune response is controlled by lipid mediator and its receptor.

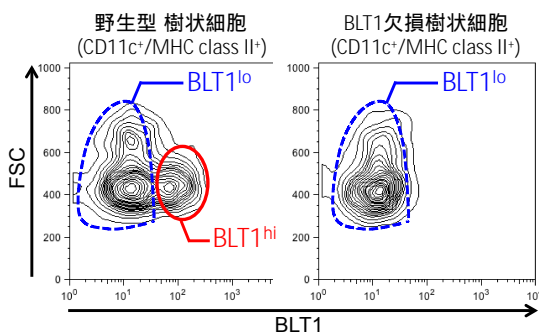
研究分野：脂質免疫学

キーワード：GPCR LTB4 BLT1 樹状細胞 T細胞

1. 研究開始当初の背景

ロイコトリエン(LT)は、プロスタグランディン(PG)と同様にアラキドン酸から生合成される生理活性脂質である。本研究室では、ロイコトリエン B4(LTB4)の高親和性受容体である BLT1 を世界に先駆けて遺伝子同定し(Yokomizo, *Nature* 1997)、その遺伝子欠損マウスの表現型解析を行ってきた。その結果、BLT1 欠損マウスでは、Th1、Th2、Th17 応答の全てが減弱するという興味深い知見を得ている(Toda, *Biochimie* 2010, Terawaki, *J Immunol.* 2005, Kihara, *BBRC.* 2009)。また BLT1 が、リンパ球に発現し免疫反応を制御するという知見が報告され (Tager, *Nat Immunol.* 2003, Goodarzi, *Nat Immunol.* 2003)、LTB4-BLT1 経路の免疫応答における重要な役割が徐々に明らかになってきている。そのような背景にも関わらず、免疫応答の司令塔である樹状細胞(DC)における BLT1 の役割には不明な点が多い。申請者は独自に樹立した抗 BLT1 単クローン抗体を用いて、骨髄由来樹状細胞(BMDC)と脾臓の樹状細胞に、BLT1 発現レベルが異なるサブセット (BLT1^{hi}、BLT1^{lo})が存在することを見いだした(図 1)。

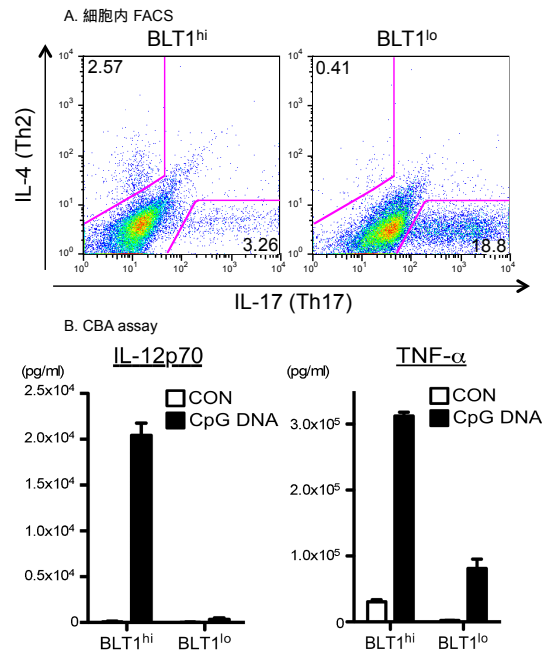
図1 脾臓には、BLT1^{hi}とBLT1^{lo}樹状細胞が存在する



詳細な *in vitro* 解析の結果、両サブセット間には、サイトカインや生理活性脂質産生能に大きな違いがある事がわかり、さらに、OTII Tg マウス由来 CD4 陽性 T 細胞との共培養系において、BLT1^{hi} は naive CD4 陽性 T 細胞を Th1、Th2 細胞へ分化させる能力が強く、一方 BLT1^{lo} は Th17 細胞へ分化させる能力が強

いことを見いだした (図 2)。

図2 BLT1^{hi}とBLT1^{lo}樹状細胞によるT細胞分化誘導能の違い



さらに、BLT1^{lo}がどのようにして Th17 分化誘導を効率よく引き起こすのかを明らかにするために DNA マイクロアレイを用いて解析を行った。その結果、Th17 誘導に重要なサイトカイン(IL-6, TGF- β , IL-23)の発現量は BLT1^{hi} に比べて変わらないかむしろ低いという結果が得られた。これは、BLT1^{lo}による Th17 分化誘導能が、通常の経路とは異なる未知の経路を介する可能性を示している。

2. 研究の目的

本研究では、BLT1 の発現量が規定する新規樹状細胞サブセットによる免疫制御機構の包括的な解析を目標とし、樹状細胞を用いて Th1、Th2、Th17 分化誘導のメカニズム解明を *in vitro* にて行い、また、BLT1 全身ノックアウトマウスと細胞特異的ノックアウトマウスを用いた *in vivo* 機能解析を行う。

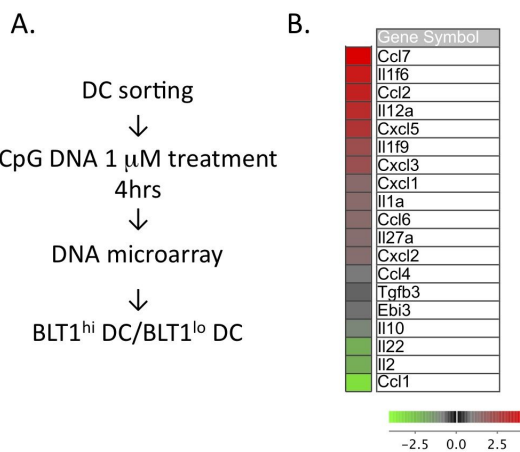
3. 研究の方法

BLT1 は、好中球や好酸球に多く発現し、炎症反応に関わる分子として研究が進められて来たが、近年の研究から BLT1 が、樹状細胞や T 細胞等にも発現し、免疫反応にも関わることが明らかになって来た。申請

者は、BLT1 発現量の異なる新規樹状細胞サブセット(BLT1^{hi}、BLT1^{lo})を同定し、サイトカイン産生能やT細胞分化誘導能に大きな差がある事を見いだしている。本研究では、1)樹状細胞 adoptive transfer の系を用いて疾患モデルを構築し、両サブセットの *in vivo* における機能解析を行う、2)siRNA を用いたノックダウンの系でT細胞分化誘導のメカニズムを解明する、3)2)で明らかにしたメカニズムを樹状細胞 adoptive transfer を用いて *in vivo* において検証する、4)樹状細胞特異的 BLT1 ノックアウトマウスを作製し、樹状細胞の BLT1 が様々な免疫疾患に関与するか検討する。

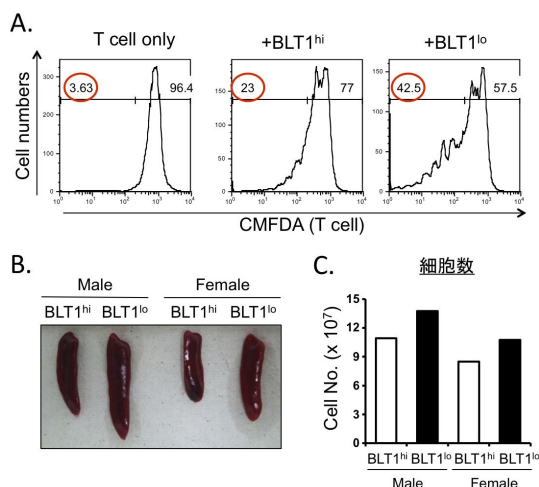
4. 研究成果

DNA マイクロアレイを用いて、BLT1^{hi} と BLT1^{lo} 樹状細胞におけるサイトカイン分泌能とT細胞分化誘導能の違いを生み出す原因遺伝子を調べた。その結果、Th1 分化を誘導することが知られている IL-12a (IL-12p35), IL-1f6 (IL-36 α), IL-1f9 (IL-36 γ)といった遺伝子や Th2 分化を誘導する事が知られる IL-10 遺伝子が BLT1^{hi} 樹状細胞において高く発現していることがわかった(下図)。

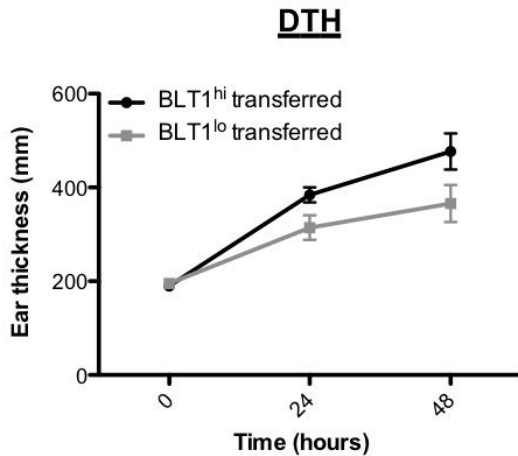


IL-12p35 と IL-10 においてはタンパク質レベルでも BLT1^{hi} 樹状細胞において高い発現を認めた。そこで IL-12 の中和抗体を用いたところ、BLT1^{hi} 樹状細胞による Th1 分化誘導が抑制された。また、BLT1^{hi} 樹状細胞と比

べて、BLT1^{lo} 樹状細胞では IL-2 の分泌能が高いことが明らかとなった。樹状細胞から分泌される IL-2 は、T 細胞が分化・増殖を始めるのに重要な因子である事が知られているため、両サブセットを用いて T 細胞増殖に対する影響を *in vitro* 共培養を用いて検討した結果、BLT1^{lo} 樹状細胞は BLT1^{hi} 樹状細胞に比べて、2 倍ほどの T 細胞増殖誘導能を持つ事がわかった(下図 A)。さらに、*in vivo* における T 細胞増殖応答に対する影響を検討するために、OVA 特異的な TCR を持つ OT-II マウスに OVA 抗原を感作させた BLT1^{hi}、BLT1^{lo} 樹状細胞を移入し、解析した。その結果、*in vitro* の結果と相関して BLT1^{lo} 樹状細胞は T 細胞増殖能が高いことがわかった(下図 B,C)。

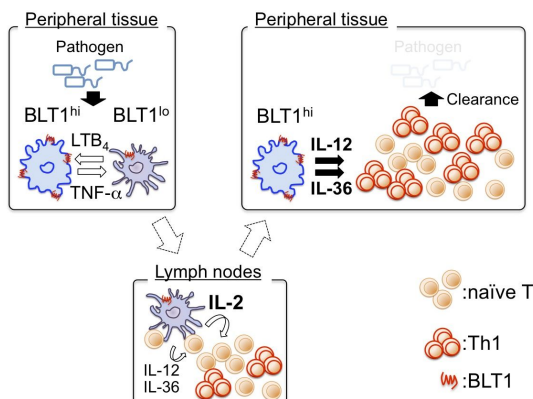


これらの結果から、BLT1 の発現で規定される両樹状細胞サブセットはT細胞の分化と増殖を分担して免疫応答の活性化に関わっていると考えられた。また、樹状細胞 adoptive transfer による接触性皮膚炎(DTH)の系を用いて *in vivo* における両樹状細胞の機能を解析した。その結果、BLT1^{hi} 樹状細胞を移入した方が耳は大きく腫れた。DTH は Th1 優位な疾患モデルのため、BLT1^{hi} 樹状細胞は Th1 疾患を促進することが示唆された(次頁上図)。



また、細胞特異的な BLT1 ノックアウトマウスを作製する為に、KOMP より ES 細胞を入手し、キメラマウスを作製した。これらのマウスはその遺伝型を仔に伝える事が出来た。LacZ およびネオマイシンカセットを切り出すために、CAG-FLPe マウスと交配した結果、切り出しに成功し、目的の BLT1^{flox} マウスを得た。現在、CD11c-Cre、Lys-M-Cre、CD4-Cre マウスと交配し、細胞特異的な BLT1 ノックアウトマウスを作製している。

以上より、本研究では、BLT1 の発現レベルにより規定される新規樹状細胞サブセット (BLT1^{hi}、BLT1^{lo}) がそれぞれ、T 細胞分化と T 細胞増殖を役割分担し、働くことで、免疫応答をコントロールすることを明らかにした(下図)。



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 3 件)

- 1). Fukuda R, Suico MA, Kai Y, Omachi K, Motomura K, Koga T, Komohara Y, Koyama K, Yokota T, Taura M, Shuto T, Kai H*: Podocyte p53 limits the severity of experimental Alport syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology*, in press (ASN.2014111109).
- 2). Liu M, Saeki K, Matsunobu T, Okuno T, Koga T, Sugimoto Y, Yokoyama Y, Nakamizo S, Kabashima K, Narumiya S, Shimizu T, Yokomizo T: 12-hydroxyheptadecatrienoic acid promotes epidermal wound healing by accelerating keratinocyte migration via the BLT2 receptor. *Journal of Experimental Medicine*, 211(6):1063-1078, 2014.
- 3). Komatsu K, Lee J, Miyata M, Lim JH, Jono H, Koga T, Xu H, Yan C, Kai H, Li JD: Suppression of inflammation via PDE4B-JNK2-dependent upregulation of deubiquitinase CYLD. *Nature Communications*, 4:1684, 2013.

[学会発表](計 9 件)

- 1). Koga T, Sasaki F, Saeki K, Ichiki T, Okuno T, Yokomizo T. BLT1 defines dendritic cell subsets with different characteristics in differentiation and proliferation of T cells. 6th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators, 2015/2/10-12, 2015, Tokyo.
- 2). Koga T, Sasaki F, Saeki K, Ichiki T, Okuno T, Yokomizo T. Distinct roles of BLT1^{hi} DCs and BLT1^{lo} DCs in activating T cells. Keystone Symposium, 2015/3/8-13, 2015, Montreal.
- 3). 古賀友紹, 佐々木文之, 佐伯和子, 市木貴子, 奥野利明, 横溝岳彦. ロイコトリエンB4第

一受容体BLT1陽性樹状細胞はTh1分化誘導を促進する. 第87回日本生化学会大会, 2014年10月15-18日, 2014, 京都

- 4). **古賀友紹**, 佐々木文之, 佐伯和子, 市木貴子, 奥野利明, 横溝岳彦. 新規樹状細胞サブセットマーカー分子としてのロイコトリエンB4受容体. 第35回日本炎症・再生学会(シンポジウム), 2014年7月1-4日, 2014, 沖縄
- 5). **古賀友紹**, 佐々木文之, 佐伯和子, 奥野利明, 横溝岳彦. 新規樹状細胞サブセットマーカー分子としてのロイコトリエンB4受容体. 第134回日本薬学会, 2014年3月27-30日, 2014, 熊本
- 6). **古賀友紹**, 佐々木文之, 佐伯和子, 奥野利明, 横溝岳彦. 新規樹状細胞サブセットマーカーとしてのBLT1受容体. 第55回日本脂質生化学会, 2013年6月6-7日, 2013, 松島
- 7). **Koga T.**, Sasaki F., Saeki K., Ichiki T., Okuno T., Yokomizo T. Leukotriene B4 receptor 1 is a potential marker of mouse dendritic cells. The 8th Korea-Japan Conference on Cellular Signaling for Young Scientists, 2013/11/7-8, 2013, Fukuoka
- 8). **Koga T.**, Sasaki F., Saeki K., Ichiki T., Okuno T., Yokomizo T. Role of leukotriene B4 receptor BLT1 in dendritic cells. Faseb SRC: Lysophospholipid and Other Related Mediators-From Bench to Clinic, 2013/8/4-9, 2013, Niseko
- 9). **Koga T.**, Sasaki F., Saeki K., Ichiki T., Okuno T., Yokomizo T. BLT1 defines a DC1 subset that induces Th1 differentiation by releasing IL-12p35. 第42回日本免疫学会, 2013年12月11-13日, 2013, 千葉

{図書}(計 1 件)

古賀友紹, 横溝岳彦.

疾患モデルの作製と利用-脂質代謝異常と関連疾患-

第5章 脂質メディエーター, 第4節 ロイコトリエン. エルアイシー出版.

総ページ数: 413 (187-196), 2015 年発行.

{その他}
ホームページ等

http://plaza.umin.ac.jp/j_bio/Biochem1/Top.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

古賀 友紹 (KOGA, Tomoaki)

順天堂大学大学院・医学研究科・助教

研究者番号: 30615092