

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461465

研究課題名(和文) 形質細胞様樹状細胞に選択的に発現している膜受容体チロシンキナーゼの機能解析

研究課題名(英文) Analysis of functions of a receptor tyrosine kinase selectively expressed in plasmacytoid dendritic cells.

研究代表者

星野 克明 (Hoshino, Katsuaki)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：50324843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウス形質細胞様樹状細胞において、エフリン受容体チロシンキナーゼが選択的に発現している事を、特異的モノクローナル抗体を用いて明らかにした。本抗体処理は、形質細胞様樹状細胞のToll様受容体を刺激によるサイトカイン産生に、影響しないことを明らかにした。また、*in vitro*で骨髄由来樹状細胞を分化誘導する時に、本抗体処理が、形質細胞様樹状細胞の分化を制御しない事を明らかにした。マウス形質細胞様樹状細胞におけるエフリン受容体チロシンキナーゼの機能的意義を明らかにするため、ノックアウトマウス系統を樹立した。形質細胞様樹状細胞の機能解析を今後実施する。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated that an Ephrin receptor tyrosine kinase is selectively expressed in mouse plasmacytoid dendritic cells (pDCs) by use of a specific monoclonal antibody. When we incubate pDCs *in vitro* in the presence or absence of this monoclonal antibody, then stimulate with Toll-like receptor 7 (TLR7) or TLR9 ligands, we have found that pDC produce comparable levels of cytokines including interferon- $\alpha$ . We have also found that pDCs normally developed in Flt3 ligand-induced bone marrow derived dendritic cells cultured in the presence of this monoclonal antibody. In order to analyze the function of the Ephrin receptor tyrosine kinase in mouse plasmacytoid dendritic cells, we have established two lines of knockout mouse. We are planning to analyze the phenotype of pDCs in these knockout mice.

研究分野：免疫学

キーワード：形質細胞様樹状細胞 型インターフェロン 全身性エリテマトーデス

### 1. 研究開始当初の背景

樹状細胞は、体内の存在部位や細胞表面に発現するマーカー分子の違いにより、複数の亜集団に分ける事ができる。その中で、形質細胞様樹状細胞(plasmacytoid dendritic cell, pDC)と呼ぶ一亜集団は、核酸を認識するセンサーの Toll 様受容体 7 (TLR7)と TLR9 を発現しており、ウイルスなど微生物の核酸、あるいは宿主の核酸により活性化されると、極めて多量の Ⅱ型インターフェロン(IFN)を産生する特徴がある。pDC が産生する多量のⅡ型 IFN は、ある種のウイルス感染時には生体防御反応として機能する。しかし、その一方で、全身性エリテマトーデス(SLE)や尋常性乾癬など自己免疫疾患の病態形成にも関与している。自己免疫疾患の場合は、患者由来の核酸(1本鎖 RNA や 2本鎖 DNA)とタンパク質(抗核酸抗体や抗菌ペプチド)から成る複合体が、pDC を活性化して多量の Ⅱ型 IFN 産生を誘導している。そして、産生されたⅡ型 IFN は、免疫細胞の活性化(例えば、B細胞による抗核酸抗体を含む自己抗体の産生亢進など)を引き起こし、再び pDC の活性化が起きてしまうと考えられる。つまり、自己免疫疾患では、pDC による Ⅱ型 IFN 産生が契機となり、病態の悪循環化サイクルが廻ってしまうと考えられる。故に、pDC の Ⅱ型 IFN 産生を抑えることは、この悪循環サイクルを止めることに繋がると考えられる。pDC を標的とした自己免疫疾患の治療も可能と考えている。

本申請者は、pDC の機能調節による自己免疫疾患の制御を目指して、pDC の Ⅱ型 IFN 産生誘導メカニズムを明らかにしてきた。まず、セリンスレオニンキナーゼの I B キナーゼ が、Ⅱ型 IFN 産生に必須である事を明らかにしている(Hoshino et al. Nature 2006)。さらに、複数のマウス樹状細胞亜集団の遺伝子発現を DNA マイクロアレイにより比較解析し、pDC 選択的に発現する遺伝子群を明らかにした(Saito, Hoshino et al. J Tokyo Med Univ 2006)。その中で、Ets ファミリー転写因子 Spi-B が Ⅱ型 IFN 遺伝子の転写活性化に関与することを明らかにした(Sasaki, Hoshino et al. Blood 2012)。これら以外にも、様々なシグナル伝達分子・転写因子が、多くの研究者により明らかにされている。これら分子の機能を阻害する薬剤は、Ⅱ型 IFN 産生を抑える治療薬の候補と考えられるが、薬剤が標的とする分子は pDC 以外の細胞でも機能しているため、pDC に対する選択性がない。治療薬として使うためには pDC を標的とすることが必要と考える。

そこで、本申請者は pDC に発現する膜タンパク質を標的とする事を着想し、マウス pDC に選択的に発現する遺伝子群データベースから膜タンパク質をコードし、かつ、ヒト pDC にも選択的に発現する遺伝子を検索し、エフリン受容体チロシンキナーゼを見出した。マウスとヒトの pDC は、Ⅱ型 IFN

産生などの機能は同等であり、さらに、細胞内シグナル伝達分子も同等に機能している。その一方で、pDC 特異的な膜タンパク質は、マウスとヒトで違いがある。マウスでは Siglec-H と Bst2 (CD317, PDCA-1)が、ヒトでは ILT7 (CD85g)、BDCA-2 (CD303, CLEC4C)と BDCA-4 (CD304, Neuropilin-1)がそれぞれ報告されており、これら分子を標的とする市販の抗体が、フローサイトメトリーなどで pDC を識別するために用いられている。マウスとヒトの pDC に共通して発現する膜タンパク質は報告されておらず、上記の種特異的な膜タンパク質を研究対象とした場合、マウス分子を対象とした実験から得た知見を、直接ヒトに適用できず、逆も同様で、ヒト分子の機能解明もマウスでは検討できない状況である。故に、マウスとヒトで種を越えて保存されている pDC の分子を研究対象とすることは、ヒトの疾患治療を目指した基礎研究をマウスモデルで行えるため、意義があると考えた。

### 2. 研究の目的

SLE などの自己免疫疾患では、自己の核酸成分により活性化された pDC が、Ⅱ型 IFN を多量に産生している。この Ⅱ型 IFN が、自己免疫疾患の病態を悪化させる一因となっている。pDC の Ⅱ型 IFN 産生を調節する分子メカニズムを明らかにする事は、Ⅱ型 IFN 産生の抑制を目的とした、疾患の新しい治療手段を開発するために必須であると考えた。

本研究では、pDC に選択的に発現している膜タンパク質のエフリン受容体チロシンキナーゼに着目し、Ⅱ型 IFN 産生における機能的意義について明らかにする事を目的とした。さらに、エフリン受容体チロシンキナーゼに結合するモノクローナル抗体を作製し、その抗体を用いて、pDC 自身の除去、あるいは pDC の機能調節の可能性を検討して、Ⅱ型 IFN 産生を低下させる治療手段の可能性を探ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1)エフリン受容体チロシンキナーゼに結合するモノクローナル抗体が、マウスあるいはヒト pDC の機能を制御する事ができるか調べる。

(2)マウスエフリン受容体チロシンキナーゼの遺伝子座に、ジフテリア毒素受容体(ヒト HB-EGF)に GFP 遺伝子を連結させたハイブリッド遺伝子をノックインする方針で、遺伝子改変マウス(HB-EGF-GFP ノックインマウス)系統を樹立する。ホモ変異マウスを遺伝子欠損マウスとして扱い、pDC におけるエフリン受容体チロシンキナーゼの機能を解析する。また、ヘテロ変異マウスについて、ジフテリア毒素を腹腔内投与し、pDC の除去が可能か

評価する。

(3) プリスタン(2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン)合成物を、マウス腹腔内に投与することで、マウスに実験的 SLE を誘導する。特に、HB-EGF-GFP ノックインマウスのヘテロ変異マウスを用いて病態モデルを作製し、ジフテリア毒素投与による病態の変化を調べることで、pDC の除去が病態の改善に有効か評価する。

(4) 抗ヒトエフリン受容体チロシンキナーゼモノクローナル抗体を用いて、pDC の除去あるいは pDC の機能調節が可能か調べるために、ヒトエフリン受容体チロシンキナーゼノックインマウス系統を用いて評価する。このノックインマウスは、マウスエフリン受容体チロシンキナーゼの遺伝子座に、ヒトエフリン受容体チロシンキナーゼ遺伝子 cDNA をノックインする方針で系統を樹立する。

#### 4. 研究成果

抗マウスエフリン受容体チロシンキナーゼモノクローナル抗体 (rat IgG2B, R&D systems, MAB639) を購入し、樹状細胞に対する染色特異性を調べた。C57BL/6N マウスから骨髓細胞を採取し、Flt-3 ligand を含む培地で培養することにより、骨髓由来樹状細胞を分化誘導した。この細胞集団には pDC が 1~2 割含まれている。この骨髓由来樹状細胞を抗体染色後に、フローサイトメトリー解析した結果、モノクローナル抗体はマウス pDC に結合する事が明らかとなり、マウス pDC におけるエフリン受容体チロシンキナーゼの選択的な発現がタンパク質レベルでも確認された。

細胞培養実験に添加できるモノクローナル抗体が市販されていないため、独自に作成すべく、抗原タンパク質を調整した。抗原は、ヒトエフリン受容体の細胞外領域とヒト IgG の Fc 領域を連結した融合タンパク質とすることにした。組換えタンパク質を調整するために、融合タンパク質の cDNA を発現プラスミドベクターにクローニングした。HEK293T 細胞にプラスミドを導入し、培養上清に分泌されるレコンビナントタンパク質を精製した。

その後、細胞培養実験に使用できる抗ヒトエフリン受容体チロシンキナーゼモノクローナル抗体を、複数クローン入手する事ができたので、マウスモノクローナル抗体作成を中断した。まず、入手した抗体について、結合の特異性を解析した。Flt-3 ligand の存在下で誘導したマウス骨髓由来樹状細胞を抗体染色後に、フローサイトメトリー解析した結果、抗ヒト抗体が、マウス pDC に結合する事が明らかとなった。使用した抗ヒト抗体は、ヒトとマウスのエフリン受容体チロシンキナーゼに共通する構造に結合していると考

えられる。次に、C56BL/6N マウスの免疫組織(脾臓、骨髓)、および肝臓に存在する pDC について、同抗体で染色を行い、フローサイトメトリー解析した。その結果、すべての pDC がエフリン受容体チロシンキナーゼを発現している事が明らかとなった。さらに、マウス脾臓 pDC の 1 細胞当たりの抗体結合数を測定した結果、約 1 万個の抗体が結合する事が明らかとなった。続いて、pDC 以外の免疫細胞についても、抗体の結合特異性を調べた。C56BL/6N マウス脾臓に含まれる T 細胞、B 細胞、NK 細胞、マクロファージ、通常樹状細胞 (conventional DC) には、抗ヒトエフリン受容体チロシンキナーゼ抗体が結合せず、pDC だけに抗体が結合する事が明らかとなった。pDC に対する結合の特異性が高い結果を得た。

抗ヒトエフリン受容体チロシンキナーゼモノクローナル抗体によって、pDC のサイトカイン産生が影響を受けるか検討した。Flt-3 ligand の存在下で調整した骨髓由来樹状細胞とモノクローナル抗体を *in vitro* でプレインキュベーション後に、TLR7 リガンド (R848, あるいは Poly U と Lipofectamine 2000 の複合体) で刺激を行い、24 時間後に培養上清中の IFN- $\gamma$ 、および炎症性サイトカイン (IL-12p40) 濃度を ELISA 法で測定した。また、TLR9 リガンドとして (CpG DNA D19, あるいは ODN1668) でも刺激を行い、産生されるサイトカイン濃度を測定した。その結果、培養系にモノクローナル抗体を添加しても、これらサイトカイン産生に変化が見られない結果を得た。

抗ヒトエフリン受容体モノクローナル抗体に細胞傷害性物質を標識し、*in vitro* での pDC のサイトカイン産生が、標識抗体によって影響を受けるか検討した。標識抗体と骨髓由来樹状細胞をプレインキュベーション後に、TLR7 リガンド、あるいは TLR9 リガンドで刺激を行ったが、培養上清中に産生される IFN- $\gamma$  および IL-12p40 濃度に変化は見られず、細胞傷害性物質の効果は確認されなかった。

*In vitro* で骨髓由来樹状細胞を分化誘導する時に、Flt-3 ligand を含む培地にモノクローナル抗体を添加した場合でも、骨髓由来樹状細胞中に pDC が確認できた。*In vitro* の系では、モノクローナル抗体は pDC 分化に影響しないと考えられた。細胞傷害性物質を標識したモノクローナル抗体を用いる評価については、今後の課題である。

また、細胞傷害性物質を標識したモノクローナル抗体、あるいは非標識の抗体をマウス個体に投与し、造血幹細胞からの pDC 分化について、今後検討する予定である。

マウスエフリン受容体チロシンキナーゼ遺伝子座に、ヒト HB-EGF-GFP ハイブリッド遺伝子を導入する方針で、ノックインマウス系統を作成する計画であった。組換え ES 細胞クローンを既に得ていたが、ES 細胞が生殖細胞系列に寄与しなかったため、計画のノッ

クイン Maus 系統を得る事ができなかった。それ故に、エフリン受容体チロシンキナーゼの pDC における機能を明らかにするため、Crispr/cas9 システムを用いて遺伝子欠損 Maus 系統を作成している。エフリン受容体遺伝子のゲノム DNA 配列 (exon 1) に 20 塩基対の標的配列を設定し、この 20 塩基対 DNA を挿入したプラスミド (pX330, Addgene #42230) を構築した。続いて、そのプラスミドを Maus 受精卵にマイクロインジェクションすることで、遺伝子破壊 Maus 系統を得ている。標的配列を 2 種類設定し、標的 1 については 1 塩基挿入の変異、また標的 2 については 8 塩基欠失の変異が得られている。これら変異により、ORF にフレームシフト変異が生じるため、ノックアウト Maus を作成することができた。pDC の機能解析を今後実施する予定である。

ヒトエフリン受容体チロシンキナーゼ遺伝子ノックイン Maus 系統も作成する予定であったが、ヒト抗体が Maus エフリン受容体チロシンキナーゼにも結合する事が明らかとなったため、ノックイン Maus 作成を中止した。

BALB/c および C57BL/6N Maus 腹腔内にプリスタン合成物を投与し、Maus SLE 病態モデルを誘導した。経時的に血中の抗核抗体レベルを測定した結果、すべての BALB/c Maus で 16 週目における抗核抗体レベルの上昇が確認された。一方、C57BL/6N Maus では、16 週目で抗核抗体レベルの上昇が確認できた個体は 20%にとどまった。エフリン受容体チロシンキナーゼノックアウト Maus を用い、Maus SLE 病態モデルにおけるエフリン受容体チロシンキナーゼの機能を解析する予定である。

## 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 6 件)

原著論文

Hemmi, H., Hoshino, K., and Kaisho, T., In Vivo Ablation of a Dendritic Cell Subset Expressing the Chemokine Receptor XCR1. *Methods Mol Biol* 1423, 247-253, (2016). 査読有.

DOI: 10.1007/978-1-4939-3606-9\_17

Ohta, T., Sugiyama, M., Hemmi, H., Yamazaki, C., Okura, S., Sasaki, I., Fukuda, Y., Orimo, T., Ishii, K. J., Hoshino, K., Ginhoux, F., and Kaisho, T., Crucial roles of XCR1-expressing dendritic cells and the XCR1-XCL1 chemokine axis in intestinal immune homeostasis. *Sci Rep* 6, 23505, (2016). 査読有.

DOI: 10.1038/srep23505

Kitano, M., Yamazaki, C., Takumi, A., Ikeno,

T., Hemmi, H., Takahashi, N., Shimizu, K., Fraser, S. E., Hoshino, K., Kaisho, T., and Okada, T., Imaging of the cross-presenting dendritic cell subsets in the skin-draining lymph node. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 1044-1049, (2016). 査読有.

DOI: 10.1073/pnas.1513607113

Daniels, N. J., Hyde, E., Ghosh, S., Seo, K., Price, K. M., Hoshino, K., Kaisho, T., Okada, T., and Ronchese, F., Antigen-specific cytotoxic T lymphocytes target airway CD103(+) and CD11b(+) dendritic cells to suppress allergic inflammation. *Mucosal Immunol* 9, 229-239, (2016). 査読有.

DOI: 10.1038/mi.2015.55

Akiyama, N., Shinzawa, M., Miyauchi, M., Yanai, H., Tateishi, R., Shimo, Y., Ohshima, D., Matsuo, K., Sasaki, I., Hoshino, K., Wu, G., Yagi, S., Inoue, J., Kaisho, T., and Akiyama, T., Limitation of immune tolerance-inducing thymic epithelial cell development by Spi-B-mediated negative feedback regulation. *J Exp Med* 211, 2425-2438, (2014). 査読有.

DOI: 10.1084/jem.20141207

Liu, T., Yamaguchi, Y., Shirasaki, Y., Shikada, K., Yamagishi, M., Hoshino, K., Kaisho, T., Takemoto, K., Suzuki, T., Kuranaga, E., Ohara, O., and Miura, M., Single-Cell Imaging of Caspase-1 Dynamics Reveals an All-or-None Inflammasome Signaling Response. *Cell Rep* 8, 974-982, (2014). 査読有.

DOI: 10.1016/j.celrep.2014.07.012

[学会発表](計 4 件)

星野克明、自然免疫受容体による樹状細胞活性化メカニズムの解析、2017 肝免疫フォーラム、2017 年 2 月 4 日、芝パークホテル(東京都・港区)

財賀大行、結核菌感染における初期免疫応答、第 14 回四国免疫フォーラム、2015 年 6 月 20 日、愛媛大学医学部(愛媛県・東温市)

Tomokazu Ohta, XCL1 and XCR1 are involved in intestinal immune homeostasis by dendritic cells. 第 43 回日本免疫学会学術集会、2014 年 12 月 10-12 日、京都国際会議場(京都府・京都市)

星野克明、自然免疫受容体による樹状細胞活性化メカニズムの解析、第 66 回日本皮膚科学会西部支部学術大会、2014 年 11 月 8-9 日、アルファあなぶきホール(香川県・高松市)

[その他]

ホームページ

<http://www.med.kagawa-u.ac.jp/~immunol/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

星野 克明(HOSHINO KATSUAKI)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：50324843