

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590490

研究課題名（和文） 全ての樹状細胞サブセットに共通の新規前駆細胞の同定・純化

研究課題名（英文） Identification and isolation of a new common progenitor for dendritic cell subsets

研究代表者

小内 伸幸（ONAI NOBUYUKI）

秋田大学・医学部・講師

研究者番号：50323605

研究成果の概要：樹状細胞は全身に分布し、異なる機能を持つ様々なサブセットが存在する。しかし、その分化起源は長い間不明であった。研究代表者はマウス骨髄から、樹状細胞サブセットのみに分化する共通樹状細胞前駆細胞を同定・純化した。この結果により、異なる樹状細胞サブセットが同一の前駆細胞から由来することが証明された。この発見は血液細胞分化経路図に樹状細胞分化経路を新たに追加することが出来た大変重要な研究成果である。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：細胞、免疫学、樹状細胞、血液前駆細胞、サイトカイン、細胞分化・増殖

1. 研究開始当初の背景

(1) 全ての樹状細胞サブセットに共通の新規前駆細胞の同定・純化

樹状細胞(dendritic cell: DC)は強力な抗原提示能を有し、末梢組織にて抗原を取り込み二次リンパ組織へ移動した後、獲得免疫応答を惹起させ、さらに免疫寛容をも制御する非常に重要な免疫担当細胞である。DCは、ほぼ全身の組織に存在し、その表現型、分布、成熟状態及び機能の違いにより様々なサブセットが存在する。マウス脾臓及びリンパ節では、

CD11c^{lo}B220⁺PDCA-1⁺の形質細胞様樹状細胞(plasmacytoid DC: pDC)と CD11c⁺B220⁻PDCA-1⁻の古典的樹状細胞(conventional DC; cDC)サブセットが存在する。一方、ヒト末梢血中には、CD11c⁻CD123⁺の pDC 及び CD11c⁺CD123^{lo}の cDCが存在する。これら DCの前駆細胞とその分化過程に関しては、単一の前駆細胞が様々な樹状細胞サブセットへ分化するモデルと、異なる複数の前駆細胞が DCサブセットへと分化するモデルが提唱されていた。しかし、その後の研究から Flt3 陽性前

駆細胞分画に、pDC 及び cDC 分化能が保存されていることが明らかとなった。

現在までに DC やマクロファージに分化する前駆細胞を単離したという論文が幾つか報告されている。2002年には、マウス骨髄、末梢血中から、pDC、CD8 α ⁺cDC、CD8 α ⁻cDC さらにマクロファージへと分化する CD11c⁺CD31⁺Ly6C⁺細胞群が同定された (*Eur. J. Immunol.* 31:3403-3412 (2002))。またマウス末梢血中に DC 前駆細胞 (CD11c⁺MHC class II) が同定され、この細胞をマウスへ移植すると pDC と古典的樹状細胞群へ分化するという報告ある (*Nature* 415: 1043-1047 (2002))。しかしながら、この細胞群には多くの NK 細胞が混入していることが判明し、実際に血中に前駆細胞が存在するかどうかは明らかになっていない。また、ケモカイン受容体 CX₃CR1-GFP ノックインマウスの骨髄から、様々なマクロファージ及び cDC に共通の前駆細胞 (lin⁻c-kit⁺CX₃CR1⁺) が同定されたが (*Science* 311: 83-87 (2006))、この前駆細胞は pDC や顆粒球への分化能は持っていなかった。また、マウス脾臓から cDC サブセットである CD8 α ⁺cDC と CD8 α ⁻cDC 前駆細胞 (CD11c^{int}CD45RA^{lo}CD43^{int}SIRP- α ^{int}MHC class II) が同定されている。

しかしながら、本研究開始当時は、たった 1 つの前駆細胞が pDC 及び cDC のみへと分化することを証明した報告はない。そこで本研究では、マウス骨髄から pDC と cDC サブセットのみに分化する前駆細胞の純化と同定を目標とする。

(2) Flt3 リガンドと GM-CSF のダブルノックアウトマウスの作製とその表現型の解析

Flt3 リガンドは *in vitro* において pDC と cDC を骨髄細胞から分化誘導可能な唯一のサイトカインである。また、Flt3 リガンドノックアウトマウスあるいは Flt3 ノックアウトマウスでは、DC サブセットの数が野生型と比較して 1/10~1/15 に数が減少していることが報告されている。一方、GM-CSF は古くからマウス骨髄あるいはヒト単球から cDC を分化させるサイトカインとして広く利用されているが、GM-CSF ノックアウトマウス及び GM-CSF 受容体 α 鎖ノックアウトマウスでは僅かに DC サブセットの数が減少しているだけであった。そこで、本研究では定常状態の DC 分化に必要なサイトカインを同定するため、Flt3 リガンドと GM-CSF のダブルノックアウトマウスを作製し、その表現型を解析する。

2. 研究の目的

本研究では、マウス骨髄から未だに同定されていない、形質細胞様樹状細胞と古典的樹状細胞に共通の新規前駆細胞の同定及び純化を目的とする。樹状細胞分化機構を細胞レ

ベル・分子レベルで明らかにするため、樹状細胞分化に関与するサイトカイン受容体に対する抗体と多重染色方法により、セルソーターを用いて当該細胞の同定が可能である。さらにその細胞群の表現型の解析、生理的さらには炎症反応状態における樹状細胞分化への役割を明らかにする。

個体レベルでは Flt3 リガンドと GM-CSF のダブルノックアウトマウスを作製し、樹状細胞に焦点を絞り、樹状細胞が存在するのか否か、また存在する場合その表現型、機能を解析する。また、樹状細胞関連前駆細胞の数や機能を検討する。さらに免疫反応、炎症反応、自己免疫疾患モデルを用いて樹状細胞及び、これらサイトカインの役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) DC 分化能は骨髄における Flt3 陽性細胞分画に保存されていることが証明されている。

また、Flt3 は短期造血幹細胞、ミエロイド系前駆細胞、リンパ球系前駆細胞に発現している。そこで、DC 分化に関与していると考えられているサイトカイン受容体 (Flt3、M-CSF) を用いて、これら既知の前駆細胞以外で、これらサイトカイン受容体陽性細胞分画を探し出す。その後、セルソーターを用いて該当する細胞群を純化し、*in vitro* おいてその分化能を検討する。

(2) 研究代表者が開発した Flt3 リガンドとマウスストローマ細胞 Ac6 による高感度 DC 分化検出方法を用いて、同定した新規前駆細胞中に pDC と cDC のみに分化するクローンが存在するか検討する。

(3) 致死量及び半致死量の放射線を照射したマウスに純化した新規前駆細胞を移植し、脾臓及び骨髄における分化能を検討する。さらに生後 3~4 週齢の若いマウスに新規前駆細胞を移植し、定常状態における DC サブセットへの分化能を検討する。

(4) Flt3 リガンドノックアウトマウスと GM-CSF ノックアウトマウスを交配し、ダブルノックアウトマウスを作製し、各組織における DC やミエロイド系細胞、リンパ球系細胞の数や機能を検討する。さらに、このマウスを用いて種々の免疫反応を検討する。

4. 研究成果

(1) 研究代表者は、Flt3 と M-CSF 受容体の発現を指標にして、世界で初めて樹状細胞サブセットのみに分化する共通樹状細胞前駆細胞 (common dendritic cell progenitor: CDP) を同定、純化に成功した (*Nature Immunol.* 8: 1207-1216 (2007))。この CDP は *in vitro* colony assay の結果、僅かに M-CSF に反応し、macrophage colony

を形成したが、pre-B 細胞及び赤芽球系コロニー形成能は全くなかった。

さらに、Flt3 リガンドとマウスストローマ細胞 Ac6 の共培養系を用いたクローナルアッセイを行った。この結果、252 個のクローンを調べたところ、この CDP 中には pDC と cDC への分化可能な bipotential なクローンと、pDC あるいは cDC のみに分化可能な uni-potential なクローンが存在した (*Nature Immunol.* 8: 1207-1216 (2007))(図 1)。

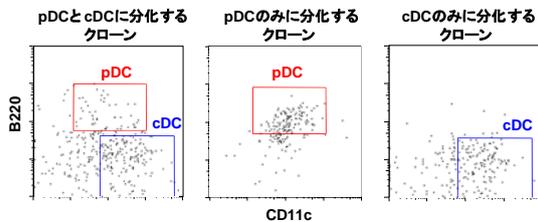


図 1. CDP 中には 3 種類の DC 前駆細胞クローンが存在する

(2) *in vivo* における CDP の分化能を評価するため、致死量あるいは半致死量のマウスに純化した CDP を移植し、7 日目の脾臓、骨髄における CDP 由来の細胞を解析したところ、pDC と 3 種類の全ての cDC サブセット ($CD8\alpha^+CD4^-$, $CD8\alpha^-CD4^+$, $CD8\alpha^-CD4^+$)のみへ分化し、他の系列細胞へは分化しなかった。さらに、定常状態における CDP の分化能を検討するため、生後 3~4 週後の若いマウスに移植したところ、脾臓及びリンパ節において、pDC と cDC のみに分化した (*Nature Immunol.* 8: 1207-1216 (2007))。

(3) CDP の起源を探るため、造血幹細胞、ミエロイド系前駆細胞、リンパ球系前駆細胞を骨髄に直接移植し、4 日後の細胞を調べたところ、造血幹細胞とミエロイド系前駆細胞から明らかに CDP 様の細胞が分化してきた。一方、リンパ球系前駆細胞からは僅かに CDP が検出された。また、最近の他のグループによる研究結果から MDP から CDP が分化してくることが報告されており、図のような DC 分化経路が予想される (図 2)。

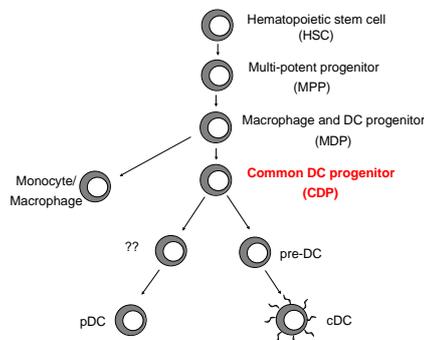


図 2. 定常状態における樹状細胞サブセット分化モデル

(4) Flt3 リガンドと GM-CSF のダブルノックアウトマウスを作製し、その表現型や免疫反応を解析した。従来、Flt3 リガンドノックアウトマウスでは、リンパ組織内の pDC と cDC の数が野生型と比較して著しく低下していた。Flt3 リガンド xGM-CSF のダブルノックアウトマウスでは、さらに DC サブセットの数が低下していた。また骨髄内の DC 関連前駆細胞である MDP や CDP の数やランゲルハンス細胞や真皮内 DC の数、また所属リンパ節内の皮膚由来の DC の数も低下していた。これら DC サブセットの数の減少を支持するように OT-II 細胞を移入後、OVA をマウスに免疫したところ、OVA 特異的な T 細胞増殖も Flt3 リガンド xGM-CSF のダブルノックアウトマウスでは野生型と比較して低下していた。これらの結果は、定常状態の二次リンパ組織内 DC や真皮内 DC のホメオスタシスは Flt3 リガンドと GM-CSF によって維持されていることが示唆された (*Blood in press* (2009))。

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 8 件)

- ① Sato, T., Onai, N., Yoshihara, H., Arai, F., Suda, T., and Ohteki, T., Interferon regulatory factor-2 protects quiescent hematopoietic stem cells from type-I interferon-dependent exhaustion. *Nat. Med.*, (2009) doi: 10.1038, in press, 査読有
- ② Kingston, D., Schmid, M.A., Onai, N., Obata-Onai, A., Baumjohann, D., and Manz, M.G., The concerted action of GM-CSF and Flt3-ligand on *in vivo* DC homeostasis. *Blood*, (2009) in press, 査読有
- ③ Onai, N., and Manz, M.G., The STATs on dendritic cell development. *Immunity*, 28:490-492, (2008), 査読有
- ④ 小内伸幸, 樗木俊聡, 樹状細胞による Th 分化制御、分子細胞治療、7、58-66、(2008) 査読無
- ⑤ 小内伸幸, 小内亜矢, 血液前駆細胞から樹状細胞サブセットへの分化経路、実験医学、26、3149-3157、(2008)、査読無
- ⑥ Onai, N., Obata-Onai, A., Schmid, M.A., Ohteki, T., Jarrossay, D., and Manz, M.G., Identification of clonogenic common Flt3⁺GM-CSFR⁺ plasmacytoid and dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat. Immunol.*, 8, 1207-1216 (2007), 査読有
- ⑦ Onai, N., Obata-Onai, A., Schmid, M. and Manz, M.G., Flt3 in regulation of type-I interferon producing and dendritic cell development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1106,

253-261, (2007), 査読有

- ⑧ 小内伸幸、小内亜矢、樗木俊聡、樹状細胞サブセットの分化経路、生化学、79、1143-1148、(2007)、査読無

[学会発表] (計6件)

- ① Onai, N., The role of hematopoietic cytokine in dendritic cell subsets development. 第38日本免疫学会総会・学術集会、2008年12月1-3日、京都
- ② Onai, N., Regulation of dendritic cell homeostasis. The 10th International Symposium on Dendritic Cells, 2008年10月1-5日、神戸
- ③ Onai, N., Identification of clonogenic common plasmacytoid and dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. 第37回日本免疫学会総会・学術集会 Late breaking symposium, 2007年11月22日、東京
- ④ 小内伸幸、マウス骨髄における樹状細胞前駆細胞の同定、群馬大学・秋田大学連携グローバル COE プログラム「生体調節シグナルの統合的研究」第2回若手ミニシンポジウム、2007年11月3日、秋田
- ⑤ Onai, N., Prospective isolation of clonogenic common plasmacytoid and dendritic progenitors in mouse bone marrow. 第20回内藤コンファレンス「自然免疫の医学・生

物学(III)」, 2007年10月9-12日、神奈川

- ⑥ 小内伸幸、樹状細胞分化における Flt3 シグナル伝達系の役割、第5回北東北血液研究会、2007年5月12日、秋田

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.akita-u.ac.jp/~kisei/Default.html>

受賞

東邦大学理学部生物分子科学科 第13回(平成20年)生物分子科学賞

受賞者: 小内伸幸

研究題目: 樹状細胞分化メカニズムの解明

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小内 伸幸 (ONAI NOBUYUKI)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号: 50323605

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者