

平成 20 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2007～2008 年  
 課題番号：19590505  
 研究課題名（和文） 制御性樹状細胞の T 細胞機能制御機構における分子作用機序の解明  
 研究課題名（英文） Analysis of the molecular mechanism underlying the T-cell regulatory function of regulatory dendritic cells  
 研究代表者 佐藤 克明 (SATO KATSUAKI)  
 独立行政法人理化学研究所・樹状細胞機能研究チーム・チームリーダー  
 研究者番号：40301147

研究成果の概要：

本研究課題では制御性樹状細胞の T 細胞機能制御機構における CD200 受容体 (CD200R; CD200 receptor) 分子群である CD200R3 の役割について検討を行った。その結果、CD200R3 は制御性樹状細胞の T 細胞アナジー誘導機構と CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性細胞誘導機構に参与する特異的発現機能分子であることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
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：樹状細胞、T 細胞、免疫寛容、制御性樹状細胞、アネルギー T 細胞、  
 制御性 T 細胞、免疫機能分子

## 1. 研究開始当初の背景

申請者は先にヒトとマウスにおいて樹状細胞の *in vitro* 分化誘導法を改変し、MHC 分子の高発現と共刺激分子の欠損を示し、T 細胞活性化能が著しく減弱した制御性樹状細胞の作製に成功した。さらに、マウス制御性樹状細胞を用いた免疫細胞療法は種々のマウス免疫疾患モデルにおいて治療効果を示し、この作用機序には抗原特異的な T 細胞アナジ

ー誘導と CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T 細胞から CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性細胞への分化誘導が関与することを明らかにした。さらに、マウス制御性樹状細胞の T 細胞機能制御における分子作用機序の解明を目的として GeneChip プローブアレイ解析を行い、マウス制御性樹状細胞に特異的に発現する機能膜分子の一つとして CD200 受容体 (CD200R; CD200 receptor) ファミリー分子の CD200R3 を同定した。

## 2. 研究の目的

本研究課題ではCD200R3 がマウス制御性樹状細胞の高発現分子であることから機能分子として想定し、制御性樹状細胞によるT細胞アナジー誘導機構とCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性細胞誘導機構における分子作用機序の解明を目的として、CD2003 の免疫応答における役割を検討した。

## 3. 研究の方法

### 1) CD200R3-IgFc と抗 CD200R3 モノクローナル抗体の作製

#### A. CD200R3-IgFc の作製

マウス制御性樹状細胞よりCD200R3の細胞外領域遺伝子を単離し、IgFc発現ベクターへ導入してCD200R3-IgFc発現ベクターを作製した。さらに、これをヒト培養細胞株に遺伝子導入し、CD200R3-IgFc産生細胞株を取得した。続いて、CD200R3-IgFcは培養上清より精製した。

#### B. CD200R3 発現細胞株の作製

マウス制御性樹状細胞よりCD200R3の全長遺伝子を単離し、レトロウイルス発現ベクターへ導入してCD200R3レトロウイルス発現ベクターを作製した。さらに、これをラット培養細胞株に感染させ、CD200R3発現細胞株を取得した。また、成熟樹状細胞にCD200R3レトロウイルス発現ベクターを感染させ、CD200R3発現成熟樹状細胞を作製した。

#### C. 抗CD200R3モノクローナル抗体の作製

CD200R3 発現細胞株をラットに免疫して脾臓細胞を得た後、脾臓細胞とミエローマ株の細胞融合によりハイブリドーマを取得した。さらに、CD200R3 発現細胞株に対する特異的染色を指標にこれらの培養上清をフローサイトメトリー法にてスクリーニングを行った。続いて、限界希釈法により抗 CD200R3 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマクローンを取得し、培養上清から抗 CD200R3 モノクローナル抗体を精製した。また、成熟樹状細胞、制御性樹状細胞における CD200R3 の発現について抗 CD200R3 モノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリー法にて測定した。

### 2) *in vitro* 機能解析

CD4<sup>+</sup>T細胞はOVAペプチドに特異的なKJ1-26 クロノタイプTCRを有し、かつCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性細胞を欠損する *Rag2* ノックアウト

D011.10TCR-トランスジェニックマウスより調製した (*Rag2*<sup>-/-</sup>KJ1-26<sup>+</sup>T細胞)。抗原提示細胞は成熟樹状細胞、制御性樹状細胞を用いた。

#### A. 抗原提示試験

*Rag2*<sup>-/-</sup>KJ1-26<sup>+</sup>T細胞、OVAペプチド、成熟樹状細胞あるいは制御性樹状細胞の共培養にCD200R3-IgFc、抗CD200R3 モノクローナル抗体を添加した。培養後、T細胞活性化の指標としてT細胞増殖反応 ([<sup>3</sup>H]-TdR取り込み能) を測定した。あるいは、KJ1-26<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性T細胞の誘導をフローサイトメトリー法にて測定した。

### 3) *in vivo* 機能解析

*Rag2*<sup>-/-</sup>KJ1-26<sup>+</sup>T細胞とともにOVAペプチド添加成熟樹状細胞あるいはOVAペプチド添加制御性樹状細胞、CD200R3-IgFc、抗CD200R3モノクローナル抗体をマウスに移入した。移入7日後、*Rag2*<sup>-/-</sup>KJ1-26<sup>+</sup>T細胞を分離精製した。

A. *Rag2*<sup>-/-</sup>KJ1-26<sup>+</sup>T細胞、OVAペプチド、成熟樹状細胞の共培養後、T細胞増殖反応 ([<sup>3</sup>H]-TdR取り込み能) を測定した。

B. フローサイトメトリー法にてKJ1-26<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性T細胞の誘導を測定した。

## 4. 研究成果

得られた研究結果は以下の通りである。

- 1) *in vitro*においてCD200R3-IgFcはCD4<sup>+</sup>T細胞活性化阻害効果を示した。
- 2) 制御性樹状細胞ではCD200R3の発現は認められるが、成熟樹状細胞では認められなかった。
- 3) *in vitro*において制御性樹状細胞のT細胞活性化阻害効果は抗CD200R3モノクローナル抗体により部分的に阻害された。
- 4) *in vitro*においてCD200R3の遺伝子導入により成熟樹状細胞のT細胞活性化能は阻害された。
- 5) *in vitro*において制御性樹状細胞によるKJ1-26<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T細胞からのKJ1-26<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性T細胞の誘導は抗CD200R3モノクローナル抗体により部分的に阻害された。
- 6) *in vivo*においてCD200R3-IgFcはCD4<sup>+</sup>T細胞活性化阻害効果を示した。
- 7) *in vivo*において制御性樹状細胞のT細胞活性化阻害効果は抗CD200R3モノクローナル抗体により部分的に阻害された。
- 8) *in vivo*において制御性樹状細胞によるKJ1-26<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T細胞からのKJ1-26<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性T細胞の誘導は抗CD200R3モノクローナル抗体により部分的に阻害された。

以上の結果から、CD200R3 は制御性樹状細胞の T 細胞アナジー誘導機構と CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性細胞誘導機構に関与する特異的発現機能分子であることが明らかとなった。

#### 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)

1. Sato, K., Eizumi, K., Fukaya, T., Fujita, S., Sato, Y., Takagi, H., Yamamoto, M., Yamashita, N., Hijikata, A., Kitamura, H., Ohara, O., Yamasaki, S., Saito, T., and Sato, K.  
Naturally occurring regulatory dendritic cells regulate murine cutaneous chronic graft-versus-host disease.  
Blood, 査読有, 113(19), 4780-4789, 2009.
2. Fujita, S., Yamashita, N., Ishii, Y., Sato, Y., Sato, K., Eizumi, K., Fukaya, T., Nozawa, R., Takamoto, Y., Yamashita, N., Taniguchi, M. and Sato, K.  
Regulatory dendritic cells protect against allergic airway inflammation in a murine athmatic model, Regulatory dendritic cells protect against allergic airway inflammation in a murine athmatic model.,  
J. Allergy Clin. Immunol., 査読有, 121(1), 2008, 95-104.
3. Fujita, S., Sato, Y., Sato, K., Eizumi, K., Fukaya, T., Kubo, M., Yamashita, N. and Sato, K.  
Regulatory dendritic cells protect against cutaneous chronic graft-versus-host disease mediated through CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells.  
Blood, 査読有, 110(10), 3793-3803, 2007.
4. Sato, K. and Fujita, S.  
Dendritic cells-Nature and classification.  
Allergol. Int., 査読有, 56(3), 183-191, 2007.

[学会発表] (計 4 件)

1. 江泉香里、佐藤馨、深谷知宏、藤田成晴、高木秀明、山下直秀、土方敦司、北村浩、小原收、山崎晶、齊藤隆、佐藤克明  
Crucial role of CD200R3 in the induction of peripheral tolerance by regulatory

dendritic cells

第 38 回日本免疫学会総会、2008 年 12 月 2 日、京都

2. 佐藤馨、江泉香里、深谷知宏、藤田成晴、高木秀明、山下直秀、佐藤克明  
Naturally occurring regulatory dendritic cells induce regulatory T cell-mediated peripheral tolerance  
第 38 回日本免疫学会総会、2008 年 12 月 2 日、京都
2. 藤田成晴、山下直秀、山下直美、佐藤克明

Impact of immunostimulatory and regulatory DCs on T cell-polarization in the control of T<sub>H</sub>2-mediated allergic immunity

第 18 回日本樹状細胞研究会、2007 年 5 月 25 日、兵庫

4. 藤田成晴、佐藤馨、山下直秀、佐藤克明  
Regulatory dendritic cells induce antigen-specific extrathymic peripheral generation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>regulatory T cells  
第 37 回日本免疫学会、2007 年 11 月 21 日、東京

[図書] (計 5 件)

1. 佐藤克明  
アークメディア  
肝胆膵「樹状細胞の抗原提示・T 細胞との相互作用」  
2009、58(2)、175-183.
2. 佐藤克明  
Respiration Research Foundation  
呼吸「気管支喘息の樹状細胞を用いた免疫細胞療法」  
2008、27(10)、953-957.
3. 佐藤克明  
羊土社  
実験医学「制御性樹状細胞を介する免疫応答コントロール」  
2008、26(20)、89-95.
4. 佐藤克明  
科学評論社  
臨床免疫・アレルギー科「制御性 T 細胞誘導樹状細胞」  
2008、50(1)、25-31.
5. 佐藤克明、藤田成晴  
科学評論社  
臨床免疫・アレルギー科「樹状細胞による IgE 産生調節」  
2007、48(3)、223-229.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 克明 (SATO KATSUAKI)

独立行政法人理化学研究所・樹状細胞機能研究チーム・チームリーダー

研究者番号：40301147