

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 4 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24307

研究課題名(和文)脂質環境応答により制御される形質細胞様樹状細胞の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of plasmacytoid dendritic cells regulated by lipid environmental responses

研究代表者

小林 周平(Kobayashi, Shuhei)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90851345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、形質細胞様樹状細胞(pDC)がFABP5を発現することを見出した。FABP5欠損によって脾臓やリンパ節中のpDC分布に異常は認められなかった。さらに、pDCが選択的に発現するToll様受容体7(TLR7)およびTLR9は定常状態で同程度であったが、リガンド刺激により、FABP5欠損pDCは炎症関連遺伝子の過剰な発現が認められた。一方、免疫抑制性関連の遺伝子発現は有意な差が認められず、FABP5がpDCの炎症バランスの制御を担う可能性が示唆された。また、炎症関連遺伝子の発現上昇が、転写因子IRF7の発現、NF- $\kappa$ Bの構成要素であるp65のリン酸化の亢進が原因であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

pDCは炎症促進および抑制の機能を有する免疫応答の中核を担う自然免疫細胞であり、様々な炎症性疾患の制御へ関与する。本研究から、pDCにおけるFABP5を介した脂質恒常性の維持が炎症制御に重要であることが明らかとなった。免疫細胞における脂質代謝変化の重要性が注目される中で、pDCにおける脂質代謝変化の影響を明らかにした報告はなく、pDCを介した免疫恒常性維持の理解や分子基盤の構築へ向けて大きな前進となった。今後、pDC内のFABP5による脂質恒常性が周辺細胞へどのような影響を及ぼすのか、細胞連関の観点から明らかにすると共に、in vivo実験から炎症性疾患の病態制御との関連性をより強固に示す。

研究成果の概要(英文)：We found that plasmacytoid dendritic cells (pDCs) express FABP5. FABP5 deficiency did not affect the distribution of pDCs in the spleen or lymph nodes. Furthermore, Toll-like receptor 7 (TLR7) and TLR9, which selectively express pDCs, were comparably expressed at steady state, but upon ligand stimulation, FABP5-deficient pDCs showed overexpression of inflammation-related genes. On the other hand, there was no significant difference in immunosuppression-related gene expression, suggesting that FABP5 may play a role in regulating the inflammatory balance of pDCs. They also found that increased expression of inflammation-related genes was caused by increased expression of the transcription factor IRF7 and increased phosphorylation of p 65, a component of NF- $\kappa$ B.

研究分野：免疫学

キーワード：FABP pDC Immune response

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脂質は、エネルギー基質として重要な栄養素である。近年、脂質の重要な構成要素である長鎖脂肪酸の摂取量変化による炎症性疾患の寛解や増悪が報告され、脂質栄養環境による免疫細胞の制御に大きな注目が集まっている。

形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid DC; pDC)は炎症促進性および抑制性の機能を有する、免疫応答の中樞を担う自然免疫細胞であり、様々な炎症性疾患の制御への関与が報告される。pDCの活性化を誘導するサイトカイン(タンパク質性液性因子)の重要性は明らかになりつつあるが、炎症疾患病態と密接にかかわっている脂質の細胞内外環境変化に対して、pDCがいかなる応答をするのか、については不明であり、どのような分子メカニズムにより免疫機能制御に影響するかは未だ謎に包まれている。

### 2. 研究の目的

pDCの(1)分化、(2)免疫機能、に影響を及ぼすのか、さらには、(3)どのような分子メカニズムで病態形成と関連づくのかを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

野生型および FABP5 欠損マウスを用いて、以下の項目を比較検討する。

(1)脂質栄養が pDC の分化誘導へ及ぼす影響

各マウスから脾臓およびリンパ節を回収し、フローサイトメトリーにより pDC の分布を検討した。また、大腿骨から採取した骨髓細胞を Flt3 リガンド添加培地で培養して pDC を分化誘導し、分化効率を検討した。

(2)脂質栄養により変化する pDC の免疫機能の獲得制御

脾臓からセルソーターで分取した pDC における免疫関連分子の発現を定量的 RT-PCR およびフローサイトメトリーにより比較検討した。

(3)脂質栄養により制御される pDC と病態発症の関連

pDC が発症の主軸となる乾癬モデルを実施し、脂質環境変化を受けた pDC が病態発症とどのような関連を示すか評価した。

### 4. 研究成果

(1)脂質栄養が pDC の分化誘導へ及ぼす影響

pDC に高発現する FABP5 が、生体における pDC の分布に影響を及ぼすかを評価するために、フローサイトメトリーによる検討を行った。脾臓、リンパ節から細胞を単離して pDC (Siglec-H<sup>+</sup>PDCA-1<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>CD11b<sup>int</sup>) を染色した結果、野生型および FABP5 欠損マウスの間で有意な差は認められず、正常に分布することが明らかとなった。一方で、Flt3 リガンド添加による骨髓前駆細胞からの pDC の分化誘導実験では、誘導初期においては FABP5 欠損マウス由来の細胞における pDC への分化効率が高かった一方で、誘導後期には野生型と比較して、FABP5 欠損マウス由来の細胞の分化効率の低下が認められた (図 1)。In vivo における分布と異なる結果が得られたが、これは pDC における脂質環境変化のみならず、FABP5 欠損による周辺の脂質環境変化が影響していることが推察された。

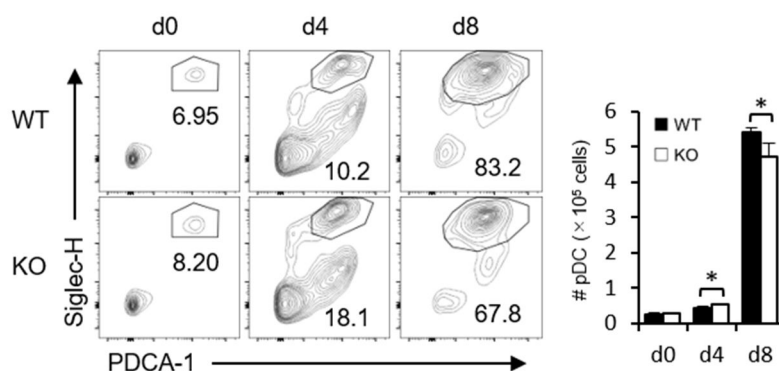


図 1: FABP5 欠損マウス由来の骨髓細胞は、*in vitro* で pDC 分化誘導に異常をきたす。

(2)脂質栄養により変化する pDC の免疫機能の獲得制御

pDC がエンドソーム上に選択的に発現し、pDC の活性化に必要である Toll-like receptor 7 (TLR7) および TLR9 の発現を評価するため、セルソーターで脾臓から単離した pDC (Siglec-H<sup>+</sup>PDCA-1<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>CD11b<sup>int</sup>) を用いて定量的 RT-PCR を行った。定常状態における TLR7 と TLR9 の発現レベルは、野生型および FABP5 欠損 pDC 間で有意な差は認められなかった (図 2A)。しかしながら、TLR7 および TLR9 のリガンドである R848、CpG-DNA の刺激に対して、FABP5 欠損 pDC では IL-6 や I 型インターフェロン (IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ ) などの炎症関連遺伝子の発現亢進が認められた (図 2B)。また、免疫抑制性の IL-10 や TGF- $\beta$  などの遺伝子発現については有意な差が認められなかった。さらに、pDC の重要な因子の一つであるインドールアミン-2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO1) の発現が有意に減弱することが明らかとなった (図 2C)。炎症関連遺伝子の発現の亢進は、転写因子 IRF7 の発現および NF- $\kappa$ B のサブユニットである p65 のリン酸化の亢進が原因であることを明らかにした (図 2D、E)。

一方で、定常状態において共刺激分子である CD40、CD80、CD86 および OX40 分子の発現の差は 2 群間では認められなかった。また、フラックスアナライザーによるミトコンドリアの機能評価を行ったところ、FABP5 欠損 pDC において基礎呼吸能が減弱している可能性を見出した。これらのことから、FABP5 によるミトコンドリアの脂肪酸酸化を介した pDC の機能制御メカニズムが存在する可能性を示唆した。

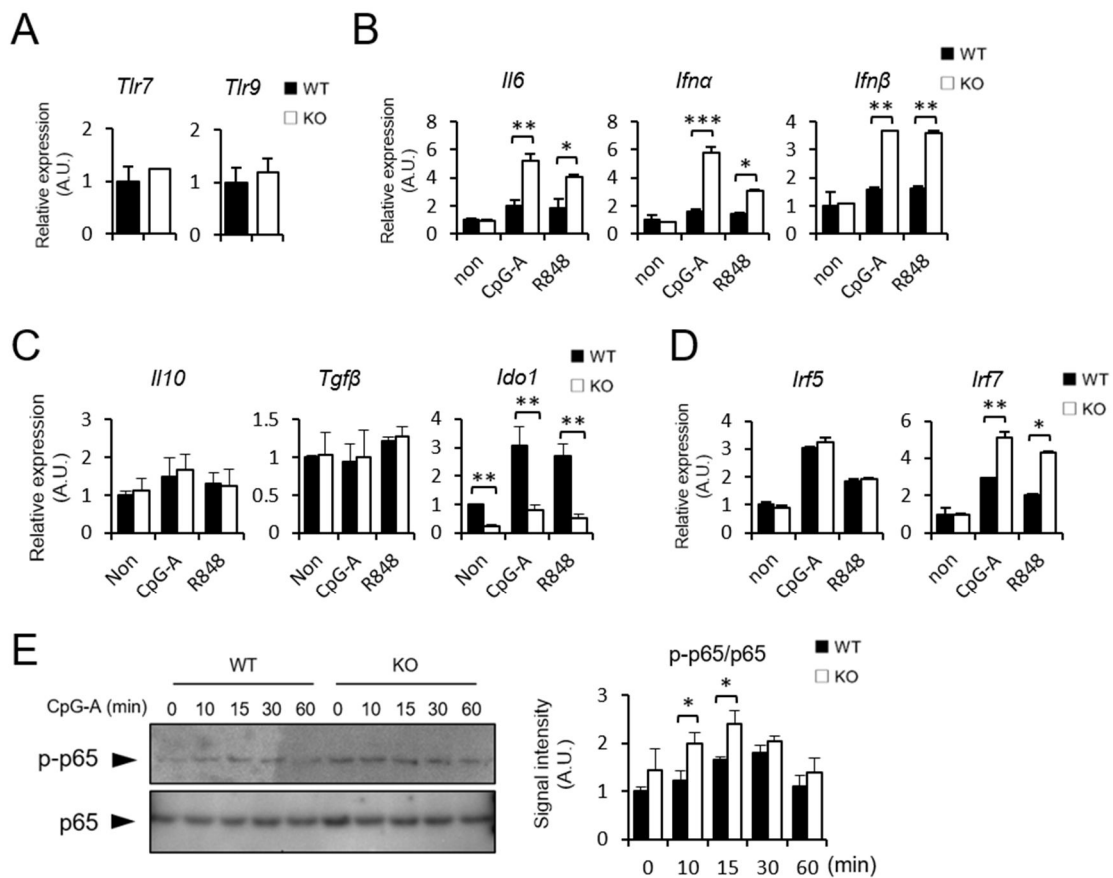


図 2A: FABP5 欠損 pDC は、野生型 pDC と比較して、同程度の *Tlr7* および *Tlr9* の発現を示す。リガンド刺激後、B: *Il6*、*Ifnα*、*Ifnβ* (炎症関連)、C: *Il10*、*Tgfβ*、*Ido1* (炎症抑制)、D: *Irf5*、*Irf7* (転写因子)、E: p-p65 シグナルが亢進、もしくは抑制される。

### (3) 脂質栄養により制御される pDC と病態発症の関連

5% Imiquimod クリームを 8 日間、野生型および FABP5 欠損マウスの皮膚組織に塗布して pDC 依存性である乾癬を誘導し、炎症による皮膚の肥厚を測定した。その結果、予想とは異なり、野生型と FABP5 欠損マウス間で有意な差は認められなかった。近年、乾癬の増悪を担う Th17 細胞の誘導を FABP5 が促進しているという報告がなされたことから、FABP5 欠損 pDC の炎症亢進を介した Th17 細胞の誘導と、T 細胞における FABP5 欠損による Th17 細胞の誘導減弱による、病態の誘導相殺が推測された。現在、新たな疾患モデルの利用について検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kobayashi Shuhei, Phung Hai The, Tayama Shunichi, Kagawa Yoshiteru, Miyazaki Hirofumi, Yamamoto Yui, Maruyama Takashi, Ishii Naoto, Owada Yuji	4. 巻 288
2. 論文標題 Fatty acid binding protein 3 regulates differentiation of IgM producing plasma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 1130 ~ 1141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.15460	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林周平、香川慶輝、宮崎啓史、大和田祐二
2. 発表標題 接触性過敏症におけるFABP3の関与機構
3. 学会等名 第125回日本解剖学会学術総会全国学術集会（誌上開催）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------