

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月22日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790532

研究課題名（和文） 胸腺 Sirp α ⁺樹状細胞による自己免疫寛容の新規誘導メカニズムの解明研究課題名（英文） Thymic Sirp α ⁺ DC subset conducts the novel process of intrathymic immune tolerance

研究代表者

馬場 智久 (BABA TOMOHISA)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：00452095

研究成果の概要（和文）：機能的に正常な免疫システムを維持するうえで、T細胞を中心とした自己の正常免疫組織・細胞による、非自己である病原性微生物やがん細胞の識別過程を理解することが必要不可欠である。本研究では、免疫学的役割が明らかではない胸腺樹状細胞サブセット（Sirp α ⁺樹状細胞）に着目し、詳細な解析を行った。その結果、胸腺内 Sirp α ⁺樹状細胞による、血液中のタンパク抗原を標的とした新規の免疫寛容誘導経路を同定した。また、この経路を介して、分泌性の腫瘍抗原に対して抗腫瘍免疫寛容が誘導されることも明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The discrimination of self or non-self antigens is essential for the maintenance of intact immune system. In this study, we demonstrated that a thymic dendritic cell (DC) subset, Sirp α ⁺ DC is the major conductor of the novel process of intrathymic immune tolerance against blood-borne antigens. Moreover, the secretory tumor-specific antigens can induce the intrathymic anti-tumor immune tolerance through the antigen presentation by thymic Sirp α ⁺ DCs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：胸腺、樹状細胞、制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

胸腺は、T細胞の分化・成熟過程において重要な臓器であることが知られており、中枢自己免疫寛容（central tolerance）の誘導により、選択的に正常なT細胞を分化させることで、全身的な免疫恒常性の維持に重要な役割を担っている。特に、胸腺髄質上皮細胞を中心に発現している Autoimmune regulator (AIRE) 分子による末梢組織由来抗原の胸腺内での異所性発現、ならびに胸腺に常在する樹状細胞による自己抗原のT前駆細胞への提示などが、central tolerance のメカニズムとして報

告されている。特に胸腺樹状細胞は、その効率的な抗原提示能から、T前駆細胞への末梢自己抗原の提示に重要な役割を担っていると考えられている。しかしながら、最近の報告から、胸腺樹状細胞も数種類のサブセットに分類されることが明らかになっており、central tolerance における、それぞれのサブセット特異的な役割については未だ不明な点が多い。

我々は、これまでに免疫学的役割の不明な、胸腺樹状細胞サブセットの一つである Sirp α ⁺樹状細胞に着目し、その分化誘導、胸腺内局在、機能的特徴について詳細な検討を行った。その結果、ケモカインレセプ

ターCCR2のシグナルにより、骨髄から血液を介して動員されたSirpα⁺樹状細胞が、胸腺内において比較的血管が豊富な小葉間領域に局在していることを観察した。また、その特徴的な局在性から、末梢血中に投与したタンパクを効果的に取り込んだ後に、胸腺皮質領域に抗原を運び、T前駆細胞に抗原提示していることを明らかにした。

これらの免疫学的に興味深い機能を勘案して、Sirpα⁺樹状細胞に関する詳細な機能的解析を行い、免疫恒常性の維持、とりわけcentral toleranceにおける役割を解明し、さらには自己免疫疾患や腫瘍性疾患の病態生理への関与についても検討することを目的として、本研究計画を立案するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに我々が着目してきた胸腺Sirpα⁺樹状細胞サブセットのさらなる詳細な機能的解析を行い、生理的な免疫恒常性の維持に関わる役割を同定することを目的とした。さらに、自己免疫疾患や腫瘍性疾患の発症過程で観察される、様々な免疫異常への関与についても検討を加え、それと同時に、血液中の抗原に対する免疫寛容がその病態生理に関与することが予想される、各種疾患に対する予防もしくは治療効果の可能性を検討することを目標として研究を行った。

3. 研究の方法

我々は、以上の研究目的を達成するために、以下の方法で解析を遂行した。

(1) Sirpα⁺樹状細胞による血中抗原の取り込み過程の詳細な観察

蛍光標識した高分子デキストラン (2000 kDa) を静脈内投与し、蛍光免疫多重染色を行ない、Sirpα⁺樹状細胞による胸腺内での取り込み過程を時間経過的に観察した。

(2) Sirpα⁺樹状細胞による胸腺内Treg分化、negative selection誘導メカニズムの解明

Ovalbumin(OVA)抗原特異的T細胞レセプター遺伝子導入(D011.10)マウスに、OVAタンパク・熱処理した凝集OVAタンパクを静脈内投与し、T前駆細胞に対する抗原提示能、さらには制御性T細胞(Treg)分化とアポトーシスによるnegative selectionの誘導能を検討した。

① D011.10⁺T前駆細胞に対する抗原提示をGlucocorticoid-Induced TNF Receptor (GITR)【TCRを介した抗原刺激で特異的に誘導されることが報告されている(J. Immunol. 2008; 181:5405-5413)】の発現上昇を指標に、免疫組織学的、フローサイトメトリー解析により観察した。

② GITRの発現誘導が観察されたT前駆細胞に対して、Tregのマスター遺伝子であるFoxp3の発現を指標にTregの分化誘導を、フローサイトメトリー解析により検討した。

③ アポトーシスの誘導を指標にnegative selectionの誘導を、フローサイトメトリー解析により検討した。

(3) 腫瘍性疾患、自己免疫疾患との病態生理学的関連と免疫療法への応用の検討

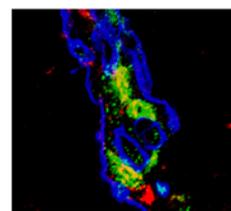
① 分泌タンパク遺伝子由来のシグナル配列を挿入したOVA(sOVA)・野生型OVAをマウス由来大腸癌細胞株(Co126)に遺伝子導入し、安定発現細胞株(Co126-sOVA・Co126-OVA)を作製した。作製した細胞株をD011.10マウスに皮下接種し、血中へのOVAタンパクの漏出、D011.10⁺T前駆細胞に対するcentral toleranceの誘導を、ELISA法、フローサイトメトリー解析により検討した。

② 静脈内抗原投与による効果的な免疫寛容の誘導法を用いて、特異抗原によって誘導される過剰免疫反応の一つである、マウス遅延型過敏反応モデルに対する、臨床的評価、病理組織学的評価の改善を指標として、予防・治療効果の可能性を検討した。

4. 研究成果

マウスの尾静脈内に蛍光標識した高分子デキストランを投与した結果、時間経過とともに、Sirpα⁺樹状細胞が主に局在している胸腺小葉間領域に選択的に漏出することを観察した。その後、毛細血管から小葉間領域に漏出したデキストランは、Sirpα⁺樹状細胞によって効果的に取り込

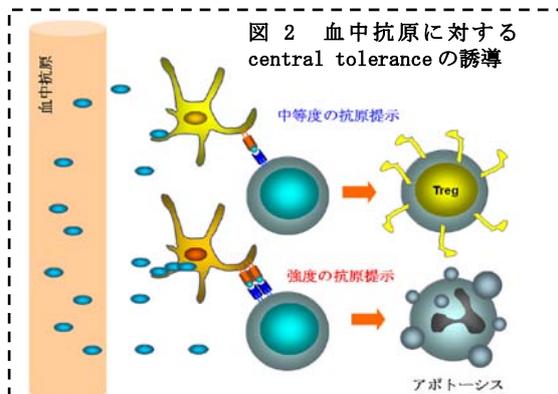
図1. Sirpα⁺樹状細胞による血中抗原の取り込み



デキストラン/
コラーゲンIV/Sirpα

まれ (図 1)、胸腺皮質領域に運ばれることを明らかにした。

OVA タンパクを尾静脈投与した後、D011.10⁺T 前駆細胞における GITR の発現上昇を指標とした観察から、抗原タンパクを取り込んだ Sirp α ⁺樹状細胞は胸腺皮質領域において T 前駆細胞に抗原提示し、その結果、Foxp3⁺ Treg の分化を誘導することがわかった。一方で、免疫原性が高いことが知られている凝集 OVA タンパクを尾静脈投与した場合には、同様に Sirp α ⁺樹状細胞によって取り込まれた後、より強力に T 前駆細胞に抗原提示することで、Treg の分化誘導ではなく、negative selection によるアポトーシスの誘導が観察された。すなわち、図 2 で示したように、Sirp α ⁺樹状細胞による抗原提示の強さによって central tolerance の誘導経路が決定されることを明らかにした。



細胞質内に限局して OVA タンパクを発現する Co126-OVA に対して、細胞外に OVA タンパクを分泌する Co126-sOVA を皮下接種した場合、腫瘍の増殖にともなって、胸腺内において、D011.10⁺T 前駆細胞に対して negative selection が誘導された。これらの結果は、PLoS ONE に報告し (発表論文 2)、抗腫瘍免疫寛容の誘導、さらには、腫瘍細胞に対する免疫不応答性に関わる新規メカニズムとして世界的に注目されている。

Central tolerance システムにおける、本樹状細胞サブセットの特徴的な機能を利用し、マウス遅延型過敏反応モデルを用いて臨床応用の可能性を検討した。その結果、胸腺内において、血中に投与した抗原特異的な制御性 T 細胞を分化させ、さらに生じた制御性 T 細胞を末梢に動員することで、同抗原に対する過剰免疫反応を顕著に抑制することに成功した。これらの結果に関して、現在論文投稿中であり、自己免疫疾患に対する、新しい治療概念の確立に寄与することが期待される。

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 7 件)

- ① Katsurada T., Kobayashi W., Tomaru U., Baba T., Furukawa S., Ishizu A., Takeda K., Sakamoto N., Asaka M., Takeda H., Kasahara M.
Decrease of peripheral and intestinal NKG2A-positive T cells in patients with ulcerative colitis.
PLoS One. 7:e44113, 2012. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0044113.
- ② Baba T., Badr Mel S., Tomaru U., Ishizu A., Mukaida N.
Novel process of intrathymic tumor-immune tolerance through CCR2-mediated recruitment of Sirp α ⁺ dendritic cells: a murine model.
PLoS One. 7:e41154. 2012. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0041154.
- ③ Mukaida N., Baba T.
Chemokines in tumor development and progression.
Exp Cell Res. 318:95-102. 2012. 査読有
DOI: 10.1016/j.yexcr.2011.10.012.
- ④ Wang YY., Taniguchi T., Baba T., Li YY., Ishibashi H., Mukaida N.
Identification of a phenanthrene derivative as a potent anticancer drug with Pim kinase inhibitory activity.
Cancer Sci. 103:107-115. 2012. 査読有
DOI:10.1111/j.1349-7006.2011.02117.x.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 馬場智久, 向田直史
Novel process of intrathymic immune tolerance against secretory tumor-specific antigens.
2012年12月5日, 第41回日本免疫学会, 神戸国際会議場 (兵庫県)
- ② 馬場智久, 向田直史
Thymic Sirp alpha⁺ DC subset conducts the novel process of intrathymic tumor-immune tolerance.
2012年9月19日, 第71回日本癌学会, ロイトン札幌 (北海道)
- ③ 馬場智久, 向田直史
Intrathymic perivascular dendritic

cells capturing blood-borne antigens
conduct central tolerance.

2011年6月9日, 第6回研究所ネットワ
ーク国際シンポジウム, 東京医科歯科大
学(東京都)

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称: 慢性骨髄性白血病モデル動物

発明者: 馬場智久, 向田直史

権利者: 金沢大学

種類: 特許権

番号: 特願2013-011556

出願年月日: 2013年1月24日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

[http://www.kanazawa-u.ac.jp/~ganken/bun
siseitai/JapContent.html](http://www.kanazawa-u.ac.jp/~ganken/bun
siseitai/JapContent.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 智久 (BABA TOMOHISA)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号: 00452095

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし