

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08431

研究課題名(和文) 抹消組織樹状細胞サブセットの機能的意義の解明

研究課題名(英文) Analysis of dendritic cell functions in peripheral tissues

研究代表者

邊見 弘明 (Hemmi, Hiroaki)

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・准教授

研究者番号：20451924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：抗原提示細胞である樹状細胞は、機能的な特性を示す複数のサブセットからなる。その中でも、ケモカイン受容体XCR1を発現している樹状細胞(XCR1+樹状細胞)は、取り込んだ抗原を細胞傷害性T細胞に提示するクロスプレゼンテーション能が高い。本研究では、XCR1+樹状細胞誘導欠失マウスや恒常的欠失マウスを用いて、末梢組織、特に腸管における機能的意義の解明を目指した。XCR1+樹状細胞恒常的欠失マウスでは、小腸T細胞の減少が認められ、免疫恒常性の維持に重要であることが示唆された。また、誘導的欠失マウスを用いた実験より、経口投与したタンパク質に対する免疫寛容の誘導に重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Dendritic cells (DCs), professional antigen presenting cells, consist of several subsets with specialized functions. However, it is still largely unclear how DC subsets regulate immunological homeostasis in peripheral tissues. In this study, functions of a DC subset expressing a chemokine receptor, XCR1, were analyzed. This subset has a high ability to cross-present antigens to naive CD8 T cells. In XCR1+ DC constitutively ablated mice, intestinal T cells including intraepithelial lymphocytes were decreased as compared with control mice, while splenic T cells were not affected. In control mice given antigens orally, antigen-specific antibody responses were suppressed (oral tolerance). However, if XCR1+ DC was inducibly and transiently ablated when the antigen was orally administered, antigen-specific antibody responses were not suppressed, suggesting that XCR1+ DC is crucial for induction of oral tolerance. Thus, XCR1+ DC plays important role in the intestine on immune environments.

研究分野：免疫学

キーワード：樹状細胞 免疫応答 免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

皮膚や気道、肺、腸管などは、常に外界と接しており、生体防御の最前線と考えられる。さらに、腸管では、食物として摂取したタンパク質など抗原になり得る物質が多く存在するが、生体にとって有益な物質に対しては免疫応答が起こらないようにしなければならず、免疫機構のコントロールが非常に重要であると考えられる。すなわち、生体にとって有害である微生物などは免疫応答により排除しなければならないが、食物由来物質に対しては逆に免疫応答を抑制する必要がある。食物アレルギーは、この抑制機構の機能不全により引き起こされると考えられている。このような免疫応答を制御に関わる細胞として、樹状細胞が知られている。

抗原提示細胞である樹状細胞は、自然免疫と獲得免疫との橋渡しを行い、適切な免疫応答が誘導されるように免疫機構をコントロールしていると考えられている(引用文献)。樹状細胞は、機能的特性の異なる複数のサブセットに分類できる。一つは、I 型インターフェロン産生細胞としても知られている形質細胞様樹状細胞であり、それ以外の樹状細胞は、通常型樹状細胞と呼ばれ、さらに複数のサブセットに分類できる。その中でも、特にケモカイン受容体 XCR1 を発現している XCR1+樹状細胞サブセットは、取り込んだ抗原を MHC class I 上に提示するクロスプレゼンテーション能力が高いこと、また、サイトカイン産生能が高いことが知られ、抗腫瘍免疫や抗ウイルス免疫に重要な働きをしていることが知られている。これまでに、XCR1+樹状細胞特異的にヒトジフテリア毒素受容体と蛍光タンパク質 venus との融合タンパク質(DTRvenus)を発現させ、ジフテリア毒素を投与することにより誘導的かつ一時的に XCR1+樹状細胞を除去できるマウス(XCR1-DTRvenus)を作成した。このマウスを用いて経口免疫寛容について検討したところ、経口投与したタンパク質に対する T 細胞応答の抑制には、XCR1+樹状細胞が重要であるという予備的知見を得ているが、XCR1+樹状細胞が B 細胞応答の抑制にも重要であるのか、さらには、腸管免疫における機能的意義やそれを担う分子基盤についても、不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、特に XCR1+樹状細胞サブセットの免疫応答や免疫抑制機構に対する機能やそれを担う分子基盤を明らかにすることを目的とした。中でも、経口免疫寛容を含む腸管免疫という末梢組織における免疫機構における機能的意義とその機序の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) XCR1+樹状細胞を恒常的に欠失したマウスは、XCR1 遺伝子座に Cre recombinase

をノックインしたマウスと、全身で発現する ROSA26 遺伝子座に loxP 配列で挟まれた stop codon の下流にジフテリア毒素 A サブユニット(DTA)をコードする遺伝子からなるカセットをノックインしたマウス(引用文献)とを交配し、作成した(XCR1-DTA マウス)。この XCR1-DTA マウスでは、小腸上皮間リンパ球(Intraepithelial lymphocytes, IEL)を含めた腸管 T 細胞が顕著に減少していた(data not shown, 引用文献)。T 細胞の腸管への homing には、ケモカイン受容体 CCR9 や接着因子 $\alpha 4\beta 7$ integrin が重要であることが知られている(引用文献)。そこで、小腸粘膜固有層の CD4 および CD8 T 細胞上の CCR9 や $\alpha 4\beta 7$ integrin の発現を FACS にて検討した。

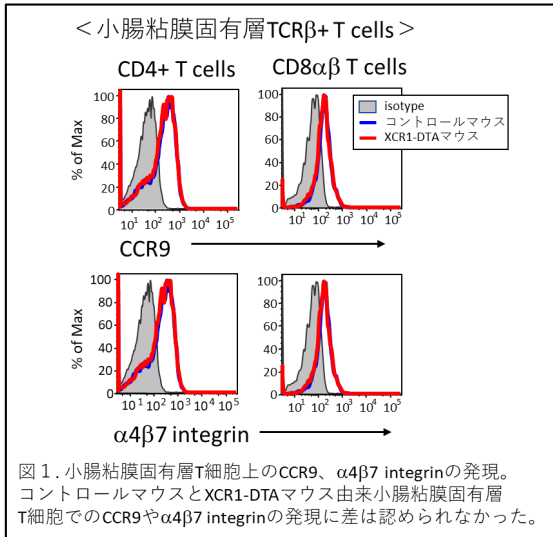
(2) 経口免疫寛容に対して XCR1+樹状細胞がどのように関与しているのかを明らかにするため、マウスに PBS あるいは卵白アルブミン(OVA)を経口投与し、その後 OVA 及び Alum を腹腔内投与して OVA に対する抗体の血中抗体価を ELISA にて測定した。野生型マウスでは、PBS 投与群と比べ OVA 経口投与群における OVA 特異的抗体の抗体価が低下しており、経口免疫寛容が確認される。そこで、XCR1+樹状細胞を特異的かつ一時的に除去できる XCR1-DTR マウスに、OVA の経口投与時(免疫寛容誘導時)にジフテリア毒素を投与して XCR1+樹状細胞を除去しておき、XCR1+樹状細胞の回復後に免疫(OVA + Alum)を行い、その後血中の抗 OVA 抗体の力価を測定した。

(3) 腸管の通常型樹状細胞は、CD103 や CD11b の発現を指標に、CD103+CD11b-(このサブセットが XCR1+樹状細胞)、CD103+CD11b+、CD103-CD11b+の大きく 3 種に分類できる。前述の通り、XCR1+樹状細胞は、腸管 T 細胞の恒常性の維持や経口免疫寛容の誘導に重要な役割を果たしているが、その分子基盤については不明である。そこで、この機能の分子基盤を明らかにするため、マウス小腸粘膜固有層よりこれら 3 種類の樹状細胞サブセットを分取し、DNA マイクロアレイを行って遺伝子発現プロファイル比較し、CD103+CD11b-樹状細胞に特異的に発現している遺伝子を探索した。そして、その結果より、遺伝子の発現パターンや推測される機能などからいくつかの遺伝子を選定し、CRISPR 法にてノックアウトマウスを作成した。

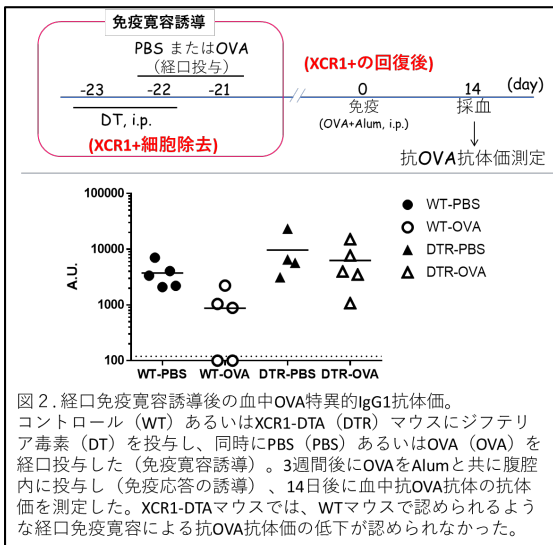
4. 研究成果

(1) コントロールマウスおよび XCR1-DTA マウスの小腸粘膜固有層より細胞を調整し、T 細胞が腸管に homing するために必要な T 細胞上の CCR9 や $\alpha 4\beta 7$ integrin の発現を FACS 解析にて検討した。その結果、コントロールマウスと XCR1-DTA マウスとの間で、T 細胞上の両分子の発現に差は認められなかった(図 1)。このことが

ら、XCR1-DTA マウス腸管での T 細胞の減少は、腸管への homing に必要な分子の発現障害ではなく、細胞分化や増殖・生存など他の因子によることが示唆された。さらに、XCR1-DTA マウス小腸粘膜固有層 T 細胞において、コントロールマウスで認められるような CD62L の発現低下や CD103 の発現上昇が障害されていた。また、その T 細胞の生存についても、低下していることを明らかにしている (data not shown, 引用文献)。

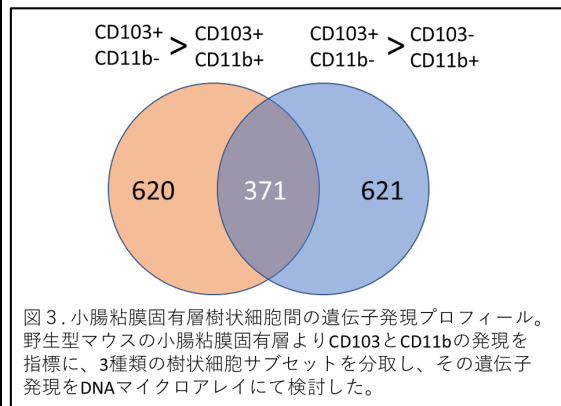


(2) 経口免疫寛容に対する XCR1+樹状細胞の機能について検討するため、マウスに抗原である卵白アルブミン (OVA) を経口にて投与して経口免疫寛容を誘導し、その後、OVA 及び Alum を腹腔内投与し、OVA に対する血中抗体価を ELISA にて検討した。その結果、野生型マウスでは PBS の経口投与群と比較し OVA 経口投与群では OVA 特異的抗体の抗体価が低下した。それに対し、XCR1-DTRvenus マウスでは OVA の経口投与時 (経口免疫寛容誘導時) にジフテリア毒素を投与して XCR1+樹状細胞を除去すると、PBS の経口投与群と比べて血中 OVA 特異的抗体の抗体価の減少、すなわち、経口免疫寛



容が認められなかった (図2)。このことから、T細胞応答だけでなく、B細胞応答に対する経口免疫寛容の誘導に XCR1+樹状細胞が重要な働きをしていることが明らかになった。

(3) XCR1+樹状細胞の機能を担う分子基盤を検討するために、小腸粘膜固有層より CD103+CD11b⁻、CD103+CD11b⁺、CD103-CD11b⁺の3種類の樹状細胞サブセットを分取し、DNAマイクロアレイを行い、遺伝子発現プロファイルを検討した (図3)。これらの内、CD103+CD11b⁻樹状細胞が XCR1+樹状細胞である。遺伝子発現プロファイルと比較した結果、CD103+CD11b⁻樹状細胞 (XCR1+樹状細胞) に特異的に発現している遺伝子として371種同定した。この中から、他の組織・細胞での発現分布や予測される機能より複数の候補遺伝子を選定し、CRISPR法により各遺伝子欠損マウスを作成した。そのうち、一種類の遺伝子について、解析を行うことができたが、腸管 T 細胞の減少など XCR1-DTA マウスで認められる表現型は確認できなかった。このことから、その他の機能遺伝子が XCR1+樹状細胞の機能に関与していることが推察された。



< 引用文献 >

Steinman RM, Decisions about dendritic cells: past, present, and future, Annu Rev Immunol., 30 巻, 2012, 1-22.

Brockschneider D, Pechmann Y, Sonnenberg-Riethmacher E, Riethmacher D. An improved mouse line for Cre-induced cell ablation due to diphtheria toxin A, expressed from the Rosa26 locus. Genesis. 2006 Jul;44(7): 322-327.

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

23; 6: 23505. doi: 10.1038/srep23505.

Agace, W. W. T-cell recruitment to the intestinal mucosa. *Trends Immunol.* 2008 Nov; 29: 514–522.

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)

Ishida Y, Kimura A, Nosaka M, Kuninaka Y, Hemmi H, Sasaki I, Kaisho T, Mukaida N, Kondo T. Essential involvement of the CX3CL1-CX3CR1 axis in bleomycin-induced pulmonary fibrosis via regulation of fibrocyte and M2 macrophage migration. *Sci Rep.* 2017 Dec 4;7(1):16833. doi: 10.1038/s41598-017-17007-8.

Yamazaki S, Odanaka M, Nishioka A, Kasuya S, Shime H, Hemmi H, Imai M, Riethmacher D, Kaisho T, Ohkura N, Sakaguchi S, Morita A. Ultraviolet B-Induced Maturation of CD11b-Type Langerin⁺ Dendritic Cells Controls the Expansion of Foxp3⁺ Regulatory T Cells in the Skin. *J Immunol.* 2018 Jan 1;200(1):119-129. doi: 10.4049/jimmunol.1701056.

Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T. In Vivo Ablation of a Dendritic Cell Subset Expressing the Chemokine Receptor XCR1. *Methods Mol Biol.* 2016;1423:247-53. 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 KJ, Hoshino K, Ginhoux F, Kaisho T. Crucial roles of XCR1-expressing dendritic cells and the XCR1-XCL1 chemokine axis in intestinal immune homeostasis. *Sci Rep.* 2016 Mar 23;6: 23505. doi: 10.1038/srep23505.

Kitano M, Yamazaki C, Takumi A, Ikeno T, Hemmi H, Takahashi N, Shimizu K, Fraser SE, Hoshino K, Kaisho T, Okada T. Imaging of the cross-presenting dendritic cell subsets in the skin-draining lymph node. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Jan 26;113(4):1044-9. doi: 10.1073/pnas.1513607113.

Eickhoff S, Brewitz A, Gerner MY, Klauschen F, Komander K, Hemmi H,

Garbi N, Kaisho T, Germain RN, Kastenmüller W. Robust Anti-viral Immunity Requires Multiple Distinct T Cell-Dendritic Cell Interactions. *Cell.* 2015 Sep 10;162(6):1322-37. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.004.

〔学会発表〕(計 16件)

Sasaki I, Orimo T, Hemmi H, Ozasa T, Fukuda F, Fukuda S, Kaisho T. Roles of arginine and methionine metabolism in cholera toxin-induced adjuvant effects. 第46回日本免疫学会総会・学術集会, 仙台国際センター(宮城県仙台市), 2017年12月12日~14日.

水本有紀, 勝田将裕, 宮澤基樹, 北畑裕司, 宮本篤, 中森幹人, 尾島敏康, 松田健司, 早田啓治, 邊見弘明, 改正恒康, 山上裕機. がん抗原ペプチドの生体内樹状細胞サブセット送達によるワクチン療法の開発. 第30回日本バイオセラピー学会学術集会総会, ホテルグランヴェール岐山(岐阜県岐阜市), 2017年11月30日~12月1日.

Yamazaki S, Nishioka A, Kasuya S, Odanaka M, Hemmi H, Imai M, Riethmacher D, Kaisho T, Ohkura N, Sakaguchi S, Morita A. The critical role of dendritic cell subset in expanding Foxp3⁺ regulatory T cells in the murine skin after ultraviolet B exposure. 15th International Workshop on Langerhans Cells, New York, USA., June 6-8, 2017.

水本有紀, 勝田将裕, 宮澤基樹, 北畑裕司, 宮本篤, 中森幹人, 松田健司, 尾島敏康, 早田啓治, 邊見弘明, 改正恒康, 山上裕機. 樹状細胞サブセットに注目したがんペプチドワクチンの開発. 第38回癌免疫外科研究会, 倉敷アイビースクエア(岡山県倉敷市), 2017年5月25日~26日.

山下友佑, 田村志宣, 岩橋吉史, 佐々木泉, 西川彰則, 金澤伸雄, 邊見弘明, 村田晋一, 改正恒康, 大島孝一, 今留謙一, 吉浦孝一郎, 園木孝志. 治療抵抗性EBウイルス関連血球貪食症候群を発症したX連鎖性知的障害例における新規CCDC22遺伝子変異の同定. 第10回日本免疫不全症研究会, ステーションコンファレンス東京(東京都千代田区), 2017年1月21日.

Ohta T, Hemmi H, Fukuda Y, Sasaki I, Orimo T, Kaisho T. Crosstalk between XCR1-expressing dendritic cells and intestinal T cells keeps intestinal homeostasis through the XCR1-XCL1 chemokine axis. 第45回日本免疫学会総会・学術集会, 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市), 2016年12月5日~7日.

Sasaki I, Fukuda S, Orimo T, Hemmi H, Fukuda Y, Ohta T, Kaisho T. Metabolic basis for cholera toxin-induced IL-1beta production in synergy with lipopolysaccharides. 第45回日本免疫学会総会・学術集会, 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市), 2016年12月5日~7日.

Mizumoto Y, Hemmi H, Katsuda M, Ohta T, Fukuda Y, Miyamoto A, Yamaue H, Kaisho T. Chemokine-directed cancer antigen peptide delivery to the XCR1+ dendritic cell subset. 第45回日本免疫学会総会・学術集会, 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市), 2016年12月5日~7日.

Kanno K, Odanaka M, Imai M, Nishioka A, Nose M, Hemmi H, Kaisho T, Morita A, Sayuri Yamazaki. Does Juzen-Taiho-To have immune-suppressive effect? 第45回日本免疫学会総会・学術集会, 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市), 2016年12月5日~7日.

水本有紀, 勝田将裕, 宮澤基樹, 北畑裕司, 宮本篤, 中森幹人, 松田健司, 尾島敏康, 早田啓治, 北谷純也, 邊見弘明, 改正恒康, 山上裕機. ケモカイン XCL1 を用いたがんペプチドワクチン療法の開発. 第29回日本バイオセラピー学会学術集会, 久留米シティプラザ(福岡県久留米市), 2016年12月1日~2日.

Ohta T, Hemmi H, Kaisho T. Involvement of XCR1-expressing dendritic cells through the XCR1-XCL1 chemokine axis in intestinal immune homeostasis. 16th International Congress of Immunology 2016, Melbourne, Australia, August21-26, 2016.

Ohta T, Hemmi H, Kaisho T. Homeostatic roles of intestinal dendritic cells expressing a chemokine receptor, XCR1, and XCL1-XCR1 chemokine system. The 24th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (MMCB2016), Sola City Conference Center, Chiyoda, Tokyo, June 4-5, 2016.

Mizumoto Y, Hemmi H, Katsuda M, Ohta T, Fukuda Y, Yamaue H, Kaisho T. Effective anti-tumor immunity provoked by chemokine-directed antigen delivering to a DC subset with high CTL-inducing ability. 第44回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市), 2015年11月18日~19日.

Orimo T, Sasaki I, Fukuda S, Hemmi H, Fukuda Y, Kaisho T. Role of the polyamine

pathway in Cholera toxin-induced production of proinflammatory cytokines. 第44回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市), 2015年11月18日~19日.

Yamazaki S, Nishioka A, Kasuya S, Ohkura N, Hemmi H, Kaisho T, Taguchi O, Sakaguchi S, Morita A. Ultraviolet B-expanded thymus-derived Foxp3+ regulatory cells interact with dendritic cells in the skin. 14th International Workshop on Langerhans Cells, Kyoto International Community House, Kyoto, Japan, November 5-8, 2015.

Ohta H, Hemmi H, Kaisho T. Intestinal immune homeostasis is regulated by XCR1-expressing dendritic cells through XCL1-XCR1 axis. 14th International Workshop on Langerhans Cells, Kyoto International Community House, Kyoto, Kyoto, November 5-8, 2015.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

邊見 弘明 (HEMMI, Hiroaki)
和歌山県立医科大学・先端医学研究所・
准教授

研究者番号: 20451924

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者

福田 有里	(FUKUDA, Yuri)
服部 郁子	(HATTORI, Ikuko)
西山 奈央子	(NISHIYAMA, Naoko)