

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19585

研究課題名(和文)GVHDにおける樹状細胞サブセットの機能的意義の解明とその応用

研究課題名(英文)Functions of dendritic cell subsets in graft versus host diseases

研究代表者

福田 有里(Fukuda, Yuri)

和歌山県立医科大学・医学部・特別研究員

研究者番号：40770847

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):細胞傷害性T細胞の活性化に重要な樹状細胞サブセット(XCR1+DC)に焦点をあて、移植片対宿主病(GVHD)におけるXCR1+DCの役割の解明を試みた。まずGVHDを誘導する実験系を樹立した。そして、コントロールマウス、XCR1+DCを恒常的に欠失するマウス(XCR1-DTAマウス)を用いてGVHDの解析を行い、ドナー由来のXCR1+DCがGVHDの病態に関与していることを見出した。

研究成果の概要(英文): I have investigated whether or how pathogenesis of graft versus host diseases (GVHD) depends on a dendritic cell subset, XCR1+DC, which is known to be involved in activation of cytotoxic T cells. First, I established the analyzing system for GVHD. Then by utilizing control or XCR1-DTA mice, in which XCR1+DCs are constitutively ablated, I have found that donor-derived XCR1+DCs are involved in pathogenesis of GVHD.

研究分野：免疫学

キーワード：樹状細胞 サブセット 遺伝子改変マウス 移植片対宿主病 抗体

1. 研究開始当初の背景

血液系の悪性腫瘍や再生不良性貧血の治療として、化学療法に加えて、造血幹細胞や骨髄細胞など造血細胞の移植が行われている。造血細胞移植は、放射線照射による腫瘍細胞の除去ばかりでなく、移植片（ドナー）由来の免疫担当細胞による腫瘍細胞への攻撃（移植片対腫瘍効果）も見込まれ、非常に有効な治療手段となっている。しかしながら、ドナー由来のT細胞により、宿主（レシピエント）の組織が傷害を受け、腸炎、皮膚炎など、いわゆる移植片対宿主病Graft versus host disease (GVHD)が生じ、時に重篤な状態に陥ることがこの治療の障壁となっている。ドナーのT細胞除去、あるいは、免疫抑制剤の投与などはGVHDに対して一定の効果がみられているものの、未だ十分な対応策は確立されていない。GVHDを制御することが可能になれば、血液系の悪性腫瘍や再生不良性貧血の予後が飛躍的に改善される。

T細胞の活性化には、樹状細胞による抗原提示が必須である。GVHDの病態にも、レシピエント由来あるいはドナー由来の樹状細胞によるドナー由来T細胞への抗原提示、それに引き続くT細胞の活性化が重要な役割を果たす。近年、樹状細胞は、機能的特性の異なる種々のサブセットから構成され、サブセットによる機能的分担がなされていることがわかってきた。ケモカイン受容体XCR1を発現する樹状細胞サブセット（XCR1+DC）は、死細胞を取り込む能力、細胞傷害性T細胞分化の誘導能が強く、微生物感染や腫瘍に対する防御免疫に関与することがわかってきており、XCR1+DCが細胞傷害性T細胞の活性化を介してGVHDの病態に関与している可能性が高い。しかしながら、GVHDにおける、レシピエントあるいはドナー由来のXCR1+DCの機能的意義に関してはほとんどわかっていない。

また、XCR1の発現はヒトにおいても、マウスと同様の機能を持つ樹状細胞サブセッ

トに発現されていることが指摘されているが、ヒトXCR1+DCに関する解析は進んでいない。

2. 研究の目的

本申請者の属する研究室では、XCR1の遺伝子座に様々な遺伝子をノックインすることにより、venusなどの蛍光タンパクがXCR1+DCに発現するXCR1+DC標識マウス（XCR1-venusマウス）、venusとジフテリア毒素受容体（DTR）の融合タンパク（DTRvenus）がXCR1+DCに発現するXCR1+DC誘導型欠失マウス（XCR1-DTRvenusマウス）、creレコンビナーゼがXCR1+DCに発現するXCR1-creマウスなどを作成している。

本研究では、XCR1+DCを恒常的に欠失するマウスを用いて、GVHDにおけるXCR1+DCの機能的意義を明らかにする。

また、ヒトXCR1の解析には、抗ヒトXCR1モノクローナル抗体が必要になる。これまでに、抗ヒトXCR1モノクローナル抗体を産生するマウスハイブリドーマを3種類樹立しているが、本研究では、ヒトXCR1+DC解析のツールとして、そのハイブリドーマから人工抗体を作成する。

3. 研究の方法

R26:lacZbpAfloxDTAマウスにおいては、ROSA26遺伝子の遺伝子座に、ジフテリア毒素Aサブユニット（DTA）遺伝子が挿入されている。しかし、loxPで挟まれた転写終始配列（LSL）が開始コドンの直前に位置しているため、通常DTA遺伝子は発現されず、cre

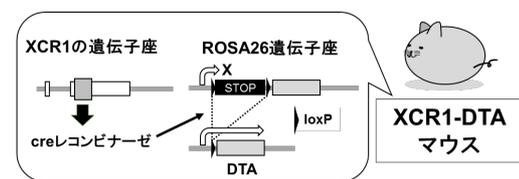


図1 .XCR1+DC欠失マウス作成の模式図

レコンビナーゼが発現する細胞でのみ、LSLが除去され、DTAが発現し、その細胞が死滅する。この R26:lacZbpAfloxDTA マウスと XCR1-cre マウスを交配することにより、XCR1+DC を恒常的に欠失する XCR1-DTA マウスを作成する(図1)。

次に GVHD モデルを確立した。ドナーとしては、野生型マウス(コントロールマウス)あるいは XCR1-DTA マウス(遺伝的背景はいずれも C57BL/6)を使用した。レシピエントとしては、B6C3F1 (遺伝的背景は C57BL/6 と C3H の F1 世代)を使用した。ドナーから骨髄細胞と脾細胞を調製し、放射線照射したレシピエントへ静注し、その生存率を判定した。

抗ヒト XCR1 抗体に関しては、ハイブリドーマから免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の可変領域をコードする遺伝子を PCR により増幅し、それぞれマウス免疫グロブリン $\gamma 2a$ 鎖(変異により Fc 受容体との結合活性を欠失させている)および κ 鎖の定常領域をコードする遺伝子と融合させる。得られた遺伝子をヒト胎児腎臓細胞株 293 細胞へトランスフェクション(導入)し、培養上清から免疫グロブリンを回収し、その活性を検定する。

4. 研究成果

XCR1+DC は CD8 α あるいは CD103 陽性、CD11b 陰性の集団にほぼ相当する。XCR1-DTA マウスの脾臓、腸間膜リンパ節、皮膚リンパ節、腸管粘膜固有層などにおいて CD8 α あるいは CD103 陽性、CD11b 陰性の樹

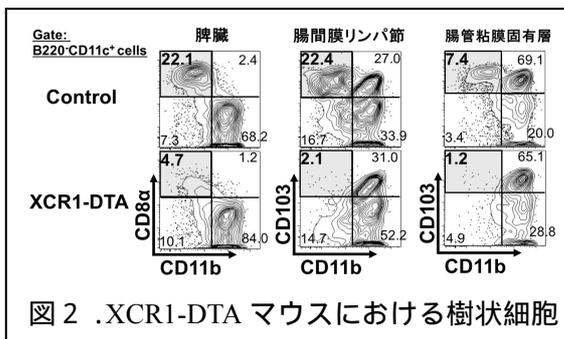


図2 .XCR1-DTA マウスにおける樹状細胞

状細胞すなわち XCR1+DC が恒常的に欠失していた(図2)。

GVHD モデルの解析では、コントロールマウスの骨髄細胞、脾細胞を移入した場合には、40 日以内に約 80%のマウスが死亡した。しかし、XCR1-DTA マウスの骨髄細胞、脾細胞を移入した場合には、60 日後でも全マウスが生存し、80 日後でも約 90%のマウスが生存した。(図3)

3 種類の抗ヒト XCR1 抗体の可変領域をサブクローニングし、抗ヒト XCR1 に対する結

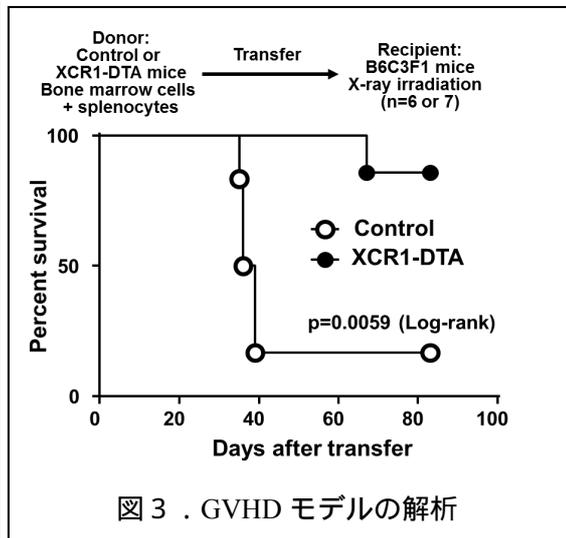


図3 . GVHD モデルの解析

合活性を保持した人工抗体を作成することができた。

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 1 件)

1. T. Ohta, M. Sugiyama, H. Hemmi, C. Yamazaki, S. Okura, I. Sasaki, Y. Fukuda, T. Orimo, K. J. Ishii, K. Hoshino, F. Ginhoux, T. Kaisho. 2016. Crucial roles of XCR1-expressing dendritic cells and the XCR1-XCL1 chemokine axis in intestinal immune homeostasis. *Sci. Rep.* Mar 23;6:23505. doi: 10.1038/srep23505.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. T. Ohta, H. Hemmi, Y. Fukuda, I. Sasaki, T. Orimo, T. Kaisho. Crosstalk between XCR1-expressing dendritic cells and intestinal T cells keeps

intestinal homeostasis through the XCR1-XCL1 chemokine axis. 第46回日本免疫学会 2016.12.5-7, 沖縄 宜野湾 沖縄コンベンションセンター

2. I. Sasaki, S. Fukuda, T. Orimo, H. Hemmi, Y. Fukuda, T. Ohta, T. Kaisho. Metabolic basis for cholera toxin-induced IL-1beta production in synergy with lipopolysaccharides. 第46回日本免疫学会 2016.12.5-7, 沖縄 宜野湾 沖縄コンベンションセンター
3. A. Kimura, Y. Ishida, M. Nosaka, Y. Kuninaka, I. Sasaki, Y. Fukuda, T. Kaisho, T. Kondo. Spi-B plays a protective role in pressure overload-induced heart failure through attenuation of cardiac inflammation. 第46回日本免疫学会 2016.12.5-7, 沖縄 宜野湾 沖縄コンベンションセンター
4. Y. Mizumoto, H. Hemmi, M. Katsuda, M. Sugiyama, T. Ohta, Y. Fukuda, A. Miyamoto, H. Yamaue T. Kaisho. Chemokine-directed cancer antigen peptide delivery to the XCR1+ dendritic cell subset. 第46回日本免疫学会 2016.12.5-7, 沖縄 宜野湾 沖縄コンベンションセンター
5. A. Taruya, A. Kimura, M. Nosaka, Y. Ishida, Y. Kuninaka, I. Sasaki, Y. Fukuda, T. Kaisho, T. Kondo. The absence of Spi-B exaggerates acute aortic dissection in mice. 第46回日本免疫学会 2016.12.5-7, 沖縄 宜野湾 沖縄コンベンションセンター
6. 木村章彦、福田有里、加藤喬、佐々木泉、改正恒康、近藤稔和。Spi-Bは圧負荷による心不全の病態形成において炎症と線維化を抑制して保護的に機能する。第38回日本炎症・再生医学会 2017.7.18-19 大阪 大阪市 大阪国際会議場
7. K. Negoro, M. Tane, M. Morinaka, Y. Fukuda, I. Sasaki, T. Kaisho. An Ets family member, Ets2 is required for Cholera toxin-induced arginase-1 gene expression. 第46回日本免疫学会 2017.12.12-14, 宮城 仙台市 仙台国際センター
8. I. Sasaki, T. Orimo, H. Hemmi, T. Ozasa, Y. Fukuda, S. Fukuda, T. Kaisho. Roles of arginine and

methionine metabolism in cholera toxin-induced adjuvant effects. 第46回日本免疫学会 2017.12.12-14, 宮城 仙台市 仙台国際センター

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕なし

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

福田 有里 (FUKUDA Yuri)

和歌山県立医科大学 先端医学研究所

生体調節機構研究部 特別研究員

研究者番号 : 40770847