

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15194

研究課題名(和文) 形質細胞様樹状細胞による経口免疫寛容成立の制御機構の解明

研究課題名(英文) Critical role of plasmacytoid dendritic cells in induction of oral tolerance

研究代表者

高木 秀明 (Takagi, Hideaki)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：10719628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：形質細胞様樹状細胞(pDCs)は多量のI型インターフェロンを産生する免疫細胞であり、現在までにウイルス感染防御免疫応答の惹起や自己免疫疾患の発症に重要な役割を担うことが明らかになりつつある。また、pDCsはT細胞免疫応答において環境依存的に活性化あるいは抑制的に多面的な役割を担っていると推測されている。しかしながら、腸管組織におけるpDCs機能については依然不明であった。そこで本研究ではこれまでに不明であった『腸管での免疫学的恒常性維持における“pDCs機能”の意義』に着目し、腸管免疫組織pDCsの性状特性および経口免疫寛容成立における役割を明らかにすることを目的とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の意義として、これまで未知であった『腸管適応免疫応答の制御機構』に関する“pDC機能”の重要性が解明されることから新たな概念が提唱され、当該分野の発展に積極的に貢献できることが挙げられる。さらに“pDC機能”に関する生物製剤などの分子標的創薬の研究開発が、ヒトpDCの生体内動態に基づいた腸管免疫疾患の病勢診断法とともに革新的な分子標的治療法の確立、ならびに感染症への新規経口粘膜ワクチンの開発を導くことが強く期待される。

研究成果の概要(英文)：Exposure to dietary constituents through the mucosal surface of the gastrointestinal tract generates oral tolerance that prevents deleterious T cell-mediated immunity. While oral tolerance is an active process that involves the emergence of CD4+Foxp3+ regulatory T (Treg) cells in gut-associated lymphoid tissues (GALT) for the suppression of effector T (Teff) cells, how antigen (Ag)-presenting cells (APCs) initiate this process remains unclear. In this study, we sought to determine the role of plasmacytoid dendritic cells (pDCs), known as unconventional type APCs, in the establishment of oral tolerance. In conclusion, we report that gastrointestinal pDC-mediated tolerogenesis through de novo generation of CD4+Foxp3+ iTreg cells impacts the induction of oral tolerance leading to the abortive allergic responses.

研究分野：免疫学

キーワード：形質細胞様樹状細胞 経口免疫寛容 粘膜免疫 制御性T細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

樹状細胞 (DCs) は通常型 DCs (cDCs) と形質細胞様 DCs (pDCs) に大別される複数の亜集団から構成される。DCs は炎症状態では自然免疫と適応免疫を繋ぐ最も強力な抗原提示細胞として様々な抗原特異的エフェクター T 細胞の誘導を介して免疫系を賦活する。一方、定常状態では DCs は T 細胞抗原特異的クローン除去・不応答性の誘導や制御性 T (Treg) 細胞の生成と増幅を介した免疫寛容を誘導し、免疫学的恒常性の維持に重要であると考えられている。しかしながら、生体内での免疫応答における個々の亜集団の役割やその機能を制御する機構についてはいまだ不明な点が多く残されている。

腸管は宿主にとって有益、あるいは有害な外来抗原に恒常的に暴露されており、結果的に腸管免疫システムは病原性微生物に対しては TH1 細胞・TH17 細胞などのエフェクター CD4+T (Teff) 細胞や IgA 産生プラズマ細胞を誘導して防御免疫反応を惹起し、共生微生物や食物抗原に対しては免疫学的恒常性維持のために TGF- $\beta$ /レチノイン酸 (RA) 依存的な CD4+Foxp3+Treg 細胞の誘導を介して経口免疫寛容として知られている不応答性を成立させ、バランスを保っている。また、炎症性腸疾患や食物アレルギーではこのバランスが破綻し、この機序には遺伝的素因や環境要因を背景に免疫細胞の恒常的な活性化が関与する。

pDCs は Toll 様受容体 (TLR)7 と TLR9 のみを高発現し、ウイルス核酸を認識後に多量の I 型インターフェロンを産生することから、抗ウイルス感染防御への主要なメディエーターとして考えられている。また、pDCs は T 細胞適応免疫応答において、環境依存的に活性化あるいは抑制的に多面的な重要な役割を担っていると推測されている。しかしながら、腸管での免疫学的恒常性維持における“pDCs 機能”の意義については依然不明である。従って、腸管免疫システムの制御基盤の理解には、腸管免疫組織 pDCs の性状特性および経口免疫寛容の誘導における役割の解明が不可欠であると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、野生型 (WT) マウスと pDCs 特異的消失 (pDC-ablated) マウスを用いて、腸管免疫組織 pDCs の性状特性および経口免疫寛容成立における役割を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

研究方法は以下の通りである。

#### (1) 腸管 pDCs の機能特性解析

WT マウスの免疫組織から分離した pDCs について機能解析を行った。具体的には、脾臓 (Spl)、腸間膜リンパ節 (MLN) から単離した pDCs の細胞表面分子発現、サイトカイン産生能、レチノイン酸産生能、T 細胞活性化能について比較検討した。

#### (2) 腸管での T 細胞免疫応答誘導における pDCs 機能の役割の解明

WT マウス、pDC-ablated マウスにおける腸管免疫組織での T 細胞機能調節能について解析を行った。具体的には、T 細胞サブセット構成、T 細胞分裂能、生体内における抗原特異的 T 細胞分化誘導 (TH1 細胞・TH17 細胞・Foxp3EGFP+Treg 細胞) について比較検討した。

#### (3) 経口免疫寛容における pDCs 機能の役割の解明

WT マウスと pDC-ablated マウスを用いて OVA の 7 日間経口投与後、WT マウスを対照として OVA と CFA の皮内免疫による OVA 特異的免疫応答・OVA 特異的遅延型過敏反応・OVA 特異的全身性アナフィラキシーに対する抑制効果を指標に経口免疫寛容の誘導について解析を行った。具体的には、抗原特異的抗体産生、抗原特異的 T 細胞応答、遅延型過敏反応における経時的な耳介の腫脹と病理組織解析 (H&E 染色; 表皮層肥厚、白血球浸潤)、全身性アナフィラキシーにおける経時的な体温変化について比較検討した。

### 4. 研究成果

得られた研究成果は以下の通りである。

#### (1) 腸管 pDCs の機能特性解析

細胞表面分子の発現について解析を行った結果、MLN pDCs では Spl pDCs と比較して T 細胞の活性化に必要な CD40, 80, 86 などの補助刺激分子の発現が低下していた。また、pDCs による TGF- $\beta$  の産生について解析を行った結果、Spl および MLN pDCs とともに TGF- $\beta$  刺激による TGF- $\beta$  の産生が認められたが、TLR リガンド刺激では認められなかった。さらに、RA 合成酵素である RALDH2 の遺伝子発現およびアルデヒド脱水酵素 (ALDH) 活性について解析を行った結果、MLN pDCs で

は Spl pDCs と比較して RALDH2 の遺伝子発現および ALDH 活性が共に高かった。さらに抗原特異的 FcγR3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Treg 細胞の誘導能について解析を行った結果、MLN pDCs では Spl pDCs に比べて FcγR3<sup>EGFP</sup><sup>+</sup>Treg 細胞の生成が増強していた。

以上の結果から、腸管免疫組織 pDCs は Spl pDCs と比較してより高い免疫抑制性の表現型、ならびに FcγR3<sup>EGFP</sup><sup>+</sup>Treg 細胞の誘導能を示すことが明らかとなった。

#### (2) 腸管での T 細胞免疫応答誘導における pDCs 機能の役割の解明

腸管免疫組織における CD4<sup>+</sup>T 細胞サブセット (TH1 細胞、TH17 細胞、FcγR3<sup>+</sup>Treg 細胞) 分化誘導能について解析を行った結果、Spl pDCs と比較して MLN pDCs では Th1 細胞への誘導が低下し、TH17 細胞および FcγR3<sup>+</sup>Treg 細胞への誘導が増加していた。また、経口抗原投与による腸管免疫組織における抗原特異的 Treg 細胞の誘導について解析を行なった結果、WT マウスと比較して pDC-ablated マウスでは MLN における抗原特異的 FcγR3<sup>+</sup>Treg 細胞の誘導が低下していた。

以上の結果から、生体内において MLN pDCs は Spl pDCs と比較してより高い FcγR3<sup>+</sup>Treg 細胞の誘導能を示すことで、経口摂取抗原に対する腸管免疫組織における抗原特異的 FcγR3<sup>+</sup>Treg 細胞の誘導に関与することが明らかとなった。

#### (3) 経口免疫寛容における pDCs 機能の役割の解明

OVA 経口投与による OVA 特異的抗体産生抑制効果について検討を行った結果、WT マウスと比較して pDC-ablated マウスでは OVA の経口投与による OVA 特異的 IgG1 ならびに IgE 産生抑制効果が低下していた。また、OVA 経口投与による OVA 特異的 T 細胞応答抑制効果について検討を行った結果、WT マウスと比較して pDC-ablated マウスでは OVA の経口投与による OVA 特異的 T 細胞応答抑制効果が低下していた。さらに OVA 経口投与による OVA 特異的遅延型過敏反応ならびに全身性アナフィラキシーに対する抑制効果について検討を行った結果、WT マウスと比較して pDC-ablated マウスでは OVA の経口投与によるアレルギー病態に対する抑制効果が減弱していた。

以上の結果から、pDCs は OVA 特異的 T 細胞応答ならびに OVA 特異的抗体産生の抑制を介して経口摂取抗原に対する経口免疫寛容の誘導に関与することが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kyaw Myat Tin Htwe, Yamaguchi Yuya, Chojjookhuu Narantsog, Yano Koichi, Takagi Hideaki, Takahashi Nobuyasu, Synn Oo Phyu, Sato Katsuaki, Hishikawa Yoshitaka	4. 巻 52
2. 論文標題 The HDAC Inhibitor, SAHA, Combined with Cisplatin Synergistically Induces Apoptosis in Alpha-fetoprotein-producing Hepatoid Adenocarcinoma Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1267/ahc.18044	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 -
1. 著者名 Fukaya Tomohiro, Fukui Takehito, Uto Tomofumi, Takagi Hideaki, Nasu Junta, Miyanaga Noriaki, Arimura Keiichi, Nakamura Takeshi, Koseki Haruhiko, Chojjookhuu Narantsog, Hishikawa Yoshitaka, Sato Katsuaki	4. 巻 9
2. 論文標題 Pivotal Role of IL-22 Binding Protein in the Epithelial Autoregulation of Interleukin-22 Signaling in the Control of Skin Inflammation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1 - 13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2018.01418	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Miyanaga Noriaki, Takagi Hideaki, Uto Tomofumi, Fukaya Tomohiro, Nasu Junta, Fukui Takehito, Nishikawa Yotaro, Sparwasser Tim, Chojjookhuu Narantsog, Hishikawa Yoshitaka, Nakamura Takeshi, Tono Tetsuya, Sato Katsuaki	4. 巻 3
2. 論文標題 Essential role of submandibular lymph node dendritic cells in protective sublingual immunotherapy against murine allergy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-01466-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nasu Junta, Uto Tomofumi, Fukaya Tomohiro, Takagi Hideaki, Fukui Takehito, Miyanaga Noriaki, Nishikawa Yotaro, Yamasaki Sho, Yamashita Yoshihiro, Sato Katsuaki	4. 巻 32
2. 論文標題 Pivotal role of the carbohydrate recognition domain in self-interaction of CLEC4A to elicit the ITIM-mediated inhibitory function in murine conventional dendritic cells in vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 673 ~ 682
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxaa034	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 -

1. 著者名 Fukui Takehito, Fukaya Tomohiro, Uto Tomofumi, Takagi Hideaki, Nasu Junta, Miyanaga Noriaki, Nishikawa Yotaro, Koseki Haruhiko, Choijookhuu Narantsog, Hishikawa Yoshitaka, Yamashita Yoshihiro, Sato Katsuaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Pivotal role of CD103 in the development of psoriasisform dermatitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-65355-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 高木秀明、宮永宣明、宇都倫史、深谷知宏、奈須遵太、福井丈仁、西川陽太郎、佐藤克明
2. 発表標題 Essential role of submandibular lymph node conventional dendritic cells in the protective effect of sublingual immunotherapy on allergic asthma
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高木秀明、宮永宣明、宇都倫史、深谷知宏、奈須遵太、福井丈仁、佐藤克明
2. 発表標題 Crucial role of conventional dendritic cells in the protective effect of sublingual immunotherapy (SLIT) on allergic disorders.
3. 学会等名 第46回日本免疫学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------