

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790312

研究課題名（和文）抗原提示細胞による死細胞貪食に伴う免疫寛容誘導機構の解析

研究課題名（英文）Tolerance induction of apoptotic cell-associated antigens by antigen presenting cells.

研究代表者

三宅 靖延（MIYAKE YASUNOBU）

九州大学・生体防御医学研究所・分子免疫学分野・助教

研究者番号：10392143

研究成果の概要（和文）：樹上細胞による死細胞の貪食除去は自己免疫寛容の維持に重要な役割を果たしている。脾臓においては、CD8 α +樹上細胞がその任務を担っていると考えられてきた。しかしながら、CD8 α +樹上細胞は主に T 細胞領域に局在し、それがどうやって辺縁帯に集積した死細胞を貪食するのかが不明であった。本研究において我々は、死細胞を貪食して、そこに含まれる抗原に対して免疫寛容を誘導する CD8 α +樹上細胞サブポレーションを同定した。脾臓の CD8 α +樹上細胞の中で特に CD103+, CD207+サブセットは主に辺縁帯に存在して、血中由来の死細胞を貪食した。死細胞貪食後、この樹上細胞サブセットは T 細胞領域に移動して、死細胞抗原を T 細胞にクロスプレゼンテーションした。TLR を刺激することによりこれらの DC サブセットは消滅し、その結果、CD8 α +樹上細胞による死細胞貪食およびそれに伴う、死細胞抗原の提示が起こらなくなった。サイトクローム C 投与により、これらの樹上細胞サブセットを一過的に欠損させると、死細胞抗原に対する免疫寛誘導が起こらなくなった。以上の結果より、脾臓においては CD8 α +樹上細胞の中でも特に CD103+, CD207+サブセットが死細胞貪食およびそれに伴う免疫寛容誘導を担っていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Apoptotic cell clearance by dendritic cells (DCs) plays a crucial role in the maintenance of self-tolerance. In spleen, CD8 α + DCs are thought to be responsible for this phenomenon by phagocytosing circulating apoptotic cells. However, as CD8 α + DCs are believed to be predominantly localized in the T cell zone, it remains unclear how these DCs phagocytose blood-borne apoptotic cells accumulated in the marginal zone (MZ). In this study, we identified a subpopulation of CD8 α + DCs responsible for tolerance induction to cell-associated Ags. Among splenic CD8 α + DCs, the CD103+, CD207+ subset was preferentially localized in the MZ and dominantly phagocytosed blood-borne apoptotic cells. After phagocytosis of apoptotic cells, this DC subset migrated into the T cell zone for cross-presentation of cell-associated Ags. Stimulation of TLRs induced the disappearance of this DC subset. Consequently, CD8 α + DCs neither phagocytosed injected apoptotic cells nor presented cell-associated Ags in mice treated with TLR ligands. Transient ablation of this DC subset by cytochrome c injection resulted in a failure of tolerance induction to cell-associated Ags, indicating that this DC subset is essential for tolerance induction by apoptotic cell clearance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 死細胞貪食による免疫寛容誘導

生体において免疫細胞は、自己と非自己を認識して非自己を排除する一方、自己に対しては反応しない免疫寛容状態となっている。この免疫寛容の構築維持には中枢および末梢での免疫寛容誘導機構が関与している。自己反応性のT細胞は胸腺において負の選択によりほとんど除去されるが(中枢免疫寛容)、この選別は完全でないために一部の自己反応性T細胞は末梢に放出されてしまう。末梢において抗原提示細胞はこれらの自己反応性細胞に免疫寛容を誘導することにより、自己反応性を抑制している(末梢免疫寛容)。末梢免疫寛容機構のひとつとして、抗原提示細胞の死細胞貪食による免疫寛容誘導という現象が知られている。生体においては組織の新陳代謝などにより常に細胞死が起きている。抗原提示細胞はこれら自己の死細胞を取り込み、その抗原をT細胞に提示することにより、自己抗原に対する免疫寛容を誘導している。しかしながら、この死細胞貪食による免疫寛容誘導機構の詳細は明らかになっていない。

(2) 死細胞投与による自己免疫疾患の抑制

我々は、死細胞貪食による免疫寛容の誘導現象を応用して、自己免疫疾患の動物モデルである experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) の発症を抑制できることを見いだしている (Miyake Y. et al. J. Clin. Invest. 2007; 117: 2268-2278)。マウスにミエリンの構成成分である myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) をアジュバントとともに免疫するとEAEの発症を誘導できるが、

MOGを強制発現させた死細胞を経静脈的に前投与しておくことにより、MOG特異的免疫寛容を誘導し、EAEの発症を抑制できることが分かった(図1)。我々は現在この実験系を用いて、死細胞貪食による免疫寛容誘導のメカニズムについて解析を進めており、既にこの免疫寛容誘導には死細胞表面に露出するフォスファチジルセリン依存的な死細胞貪食が必須であることを突き止めている。

(3) 免疫寛容誘導における辺縁帯マクロファージの役割

従来、死細胞貪食による免疫寛容誘導には樹状細胞が重要であると考えられてきた。しかしながら、経静脈的に投与した死細胞は速やかに脾臓の辺縁帯と呼ばれる領域に集積し、その後消失することから、辺縁帯に局在する辺縁帯マクロファージが死細胞処理に何らかの役割を果たしていることが想定された。そこで、辺縁帯マクロファージ欠損マウスを作製したところ、このマウスでは死細胞投与による免疫寛容誘導が起らず、EAEの発症が抑制されないことが分かった。このことより、死細胞投与による免疫寛容誘導には辺縁帯マクロファージの存在が必須であることが明らかとなった。また、辺縁帯マクロファージ欠損マウスでは脾臓における死細胞の貪食処理に遅延が生じることを見出した。さらに、生理的条件下では死細胞はCD8 α ⁺樹状細胞に選択的に貪食されるが、辺縁帯マクロファージ欠損マウスでは通常死細胞を貪食しないCD8 α ⁻樹状細胞による異常な死細胞貪食が観察されたことから、辺縁帯マクロファージは過剰な死細胞を貪食処理することにより、CD8 α ⁺樹状細胞による選択的な死細胞貪

食を制御している可能性が示唆された。

2. 研究の目的

(1) 死細胞貪食とそれに伴う免疫寛容誘導機構の解明

死細胞貪食による免疫寛容の誘導維持は、生体の恒常性維持に重要な現象であるにも関わらず、その詳しいメカニズムは不明である。我々は既に、死細胞投与により死細胞付随抗原に対して特異的に免疫寛容を誘導できる実験系を確立している。そこで本研究では、この系を用いて死細胞貪食およびそれに伴う免疫寛容誘導に関して、次の二点を中心に解析する。

.死細胞貪食に関与する細胞集団の特定

生理的条件下において、投与した死細胞はCD8 α ⁺樹状細胞により選択的に貪食される。さらに我々は、投与する死細胞数を増やしても、死細胞を貪食するCD8 α ⁺樹状細胞の数には限りがあることを見出しており、CD8 α ⁺樹状細胞の中にも死細胞を貪食できる細胞とできない細胞が存在すると考えている。そこで、この死細胞貪食能をもつ細胞集団を分離して、特異的な細胞表面マーカーを同定する。

.死細胞貪食の分子機構の解明

上述により特定した死細胞貪食細胞に特異的に発現する分子の中から、死細胞貪食に関与する分子を同定する。次に、そのリガンドを死細胞表面分子から決定し、互いの相互作用を解析することにより、死細胞貪食の分子機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) 細胞貪食とそれに伴う免疫寛容誘導機構の解明

.死細胞貪食に関与する細胞集団の特定

蛍光ラベルした死細胞をマウスに投与し、脾臓より抗体結合磁気ビーズを用いたMACSシステムによりCD8 α ⁺樹状細胞を分取し、さらにセルソーターを用いて蛍光強度を指標に死細胞を貪食した細胞と、貪食していない細胞を分離する。それぞれの細胞を様々な細胞表面マーカーに対する抗体で染色してフローサイトメーターで解析することにより、死細胞を貪食した細胞に特異的なマーカーを同定する。

.死細胞貪食の分子機構の解明

上述により分離した、死細胞貪食細胞と非貪食細胞のmRNA発現量をmicroarray法により比較し、死細胞貪食細胞に特異的に発現している分子の中から、死細胞貪食に関与する分子を特定する。比較する細胞はともにCD8 α ⁺樹状細胞であることから、ほとんどのmRNA発現量は同じであり、発現量に違

いがある遺伝子の数は極めて少ないと考えられる。また、死細胞貪食に関与する分子は細胞表面分子である可能性が高いので、細胞表面分子に標的を絞って検討を行う。ここで、死細胞を貪食した細胞のmRNAには死細胞由来のmRNAが混入してしまう可能性が考えられる。その場合は、死細胞の代わりに人工脂質膜のリボソームを用いることによりmRNAの混入を回避する。こうして絞り込んだ候補分子に対する中和抗体を作製してマウスに投与し、死細胞貪食が阻害される分子を死細胞貪食に関与する分子とする。さらには、この分子のノックアウトマウスを作製して死細胞貪食に異常が生じることが検討する。次に、死細胞貪食分子とイムノグロブリンの融合タンパク質を作製して、死細胞表面分子の可溶化液より免疫沈降法により結合分子を分離して、死細胞側のリガンドを決定する。

4. 研究成果

(1) 死細胞貪食に関与する細胞集団の特定

脾臓において、死細胞はCD8 α ⁺樹状細胞により貪食処理される。我々は、投与する死細胞の数を増やしてもCD8 α ⁺樹状細胞のうちたかだか半分しか死細胞を貪食できないことを見出した。このことからCD8 α ⁺樹状細胞の中にも死細胞を貪食できる細胞と、貪食できない細胞とが存在するものと考えた。そこで、死細胞投与マウスよりCD8 α ⁺樹状細胞を分取し、さらに死細胞を貪食した細胞と、貪食していない細胞を分離し、それぞれのmRNA発現量をmicroarray法により比較した。その結果、死細胞貪食細胞にはCD103およびCD207が高発現していることが分かった。フローサイトメーターによる解析により、CD8 α ⁺樹状細胞のうち約半分がCD103およびCD207を発現しており、このCD8 α ⁺、CD103⁺、CD207⁺樹状細胞が選択的に死細胞を貪食していることを明らかにした。また、マウスに尾静脈よりcytochrome Cを投与することにより、in vivoにおいてこのCD8 α ⁺、CD103⁺、CD207⁺樹状細胞が選択的に欠損することを見出した。CD8 α ⁺、CD103⁺、CD207⁺樹状細胞を欠損させたマウスでは、死細胞貪食が起こらず、それに伴う免疫寛容誘導も起こらないことが明らかとなった。これまでは死細胞貪食およびそれに伴う免疫寛容誘導はCD8 α ⁺樹状細胞が行っていると考えられてきたが、今回の我々の結果より、CD8 α ⁺樹状細胞の中でも特にCD103⁺、CD207⁺の細胞がこれらの役割を行っていることが明らかとなった。

(2) 死細胞貪食後のCD8 α ⁺、CD103⁺、

CD207⁺樹状細胞の局在変化

脾臓組織切片に対する免疫組織染色による解析の結果、CD8 α^+ 、CD103 $^+$ 、CD207 $^+$ 樹状細胞は通常状態においては主に辺縁帯と呼ばれる領域に局在し、そこで死細胞を貪食することを見いだした。また死細胞を貪食したCD8 α^+ 、CD103 $^+$ 、CD207 $^+$ 樹状細胞はCCR7の発現が上昇し、T細胞領域に移動することを明らかにした。さらにT細胞領域に移動したCD8 α^+ 、CD103 $^+$ 、CD207 $^+$ 樹状細胞はその後速やかに辺縁帯へと戻ることを見いだした。これまで、死細胞が集積する辺縁帯とT細胞領域は離れているため、死細胞抗原がどうやってT細胞領域へ運ばれるのかは不明であったが、我々の解析によりCD8 α^+ 、CD103 $^+$ 、CD207 $^+$ 樹状細胞が辺縁帯において死細胞抗原を補食してCCR7依存歴にT細胞領域に運んでいることが明らかとなった。

(3) CD8 α^+ 、CD103 $^+$ 、CD207 $^+$ 樹状細胞による死細胞貪食機構の解析

CD8 α^+ 、CD103 $^+$ 、CD207 $^+$ 樹状細胞による死細胞貪食に関与する分子を特定するために、CD8 α^+ 、CD103 $^+$ 、CD207 $^+$ 樹状細胞をハムスターに免疫して、CD8 α^+ 、CD103 $^+$ 、CD207 $^+$ 樹状細胞表面を認識するモノクローナル抗体を作製した。この抗体の中から死細胞貪食を阻害する抗体をスクリーニングし、数クローンに活性を見出し、その抗体の認識分子がTim3であることを明らかにした。これによりCD8 α^+ 、CD103 $^+$ 、CD207 $^+$ 樹状細胞はTim3を介して死細胞を貪食していることが明らかとなった。

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5件)

1. Nabeyama A, Kurita A, Asano K, Miyake Y, Yasuda T, Miura I, Nishitai G, Arakawa S, Shimizu S, Wakana S, Yoshida H, Tanaka M. xCT deficiency accelerates chemically induced tumorigenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 107, 6436-6441 (2010) 査読有
2. Qiu, CH*, Miyake, Y*, Kaise, H., Kitamura, H., Ohara, O., and Tanaka, M. Novel subset of CD8 $^+$ dendritic cells localized in the marginal zone is responsible for tolerance to cell-associated antigens. **J. Immunol.** 182, 4127-4136 (2009), *equal contribution. 査読有

3. Miyake, Y., and Tanaka, M. 食細胞による死細胞貪食を介した免疫寛容誘導 **医学のあゆみ** 230(9): 640-645 (2009) 査読無

4. Miyake, Y., and Tanaka, M. 細胞に含有される抗原に対する免疫寛容誘導と辺縁帯マクロファージ **臨床免疫・アレルギー科** 50(3): 345-349 (2008) 査読無

5. Tanaka, M., Miyake, Y., and Asano, K. Maintenance of self-tolerance by apoptotic cell clearance. **Front. Biosci.** 13, 6043-6049 (2008) 査読無

[学会発表](計1件)

三宅靖延, 死細胞付随抗原に対する免疫寛容誘導現象を用いた自己免疫疾患の抑制
第五回自己免疫疾患研究会, 東京都千代田区霞が関ビル 35F、(2009)

[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

三宅 靖延 (MIYAKE YASUNOBU)
九州大学・生体防御医学研究所・分子免疫
学分野・助教
研究者番号：10392143

(2)研究分担者
無し ()

研究者番号：

(3)連携研究者
無し ()

研究者番号：