

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790464

研究課題名（和文） 胸腺 Sirp⁺樹状細胞の機能的特徴と自己免疫寛容における役割の解明研究課題名（英文） Research of biological function and distinctive role of Sirp⁺ dendritic cells in central tolerance

研究代表者

馬場 智久 (BABA TOMOHISA)

金沢大学・がん研究所・助教

研究者番号：00452095

研究成果の概要（和文）：本研究では、Sirp⁺胸腺樹状細胞 (tDC) サブセットの分化誘導、胸腺内局在、機能的特徴について解析を行なった結果、Sirp⁺tDC は、ケモカインレセプターである CCR2 を介したシグナルにより、胸腺内への動員、局在性が制御されており、胸腺皮質領域や傍血管領域 (PVR) に散在性に分布していることを明らかにした。さらにその特徴的な局在性から、血液中のタンパクを選択的に取り込み、未熟 T 前駆細胞に対して、抗原を提示することで、制御性 T 細胞への分化を誘導することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the mechanism of differentiation, intrathymic localization, and distinctive function of Sirp⁺tDCs in central tolerance. Our observation revealed that Sirp⁺tDCs were disseminated in the thymic cortical area, with some of them uniquely localized inside PVRs. Moreover, Sirp⁺tDC subset can selectively capture blood-borne antigens under the multi-step guidance of CCR2-mediated signals. Furthermore, they can present blood-borne antigens to the majority of immature thymocytes to induce antigen-specific Treg generation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010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：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、免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

胸腺は、T細胞分化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 tDC 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 tDC 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、tDC 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

サブセットの特徴的な役割については未だ不明な点が多い。

研究代表者が所属する研究グループでは、腫瘍性疾患、炎症性疾患を対象として、腫瘍細胞の転移、免疫細胞の浸潤に関わるケモカインレセプターの役割についてそれぞれの遺伝子欠損マウスを用いて解析を進めてきた。そこで、我々は、他の免疫細胞と同様に、各 DC サブセットの胸腺内への動員においても、これらのケモカインレセプターが重要な役割を担っている可能性を考え、各種ケモカインレセプター欠損マウスを用いて、tDC ポピュレーションを比較検討した。その結果、CCR2 欠損マウスにおいて、tDC サブセットのうち、Sirp^{hi}tDC が特異的に減少していることを見出した。

これらの予備的観察から、CCR2 欠損マウスと野生型(WT)マウスを比較することで、Sirp^{hi}tDC の胸腺内局在、機能的特徴を明らかにすることができると着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、機能的に不明な tDC サブセットである Sirp^{hi}tDC に着目し、central tolerance の誘導における、未知な経路を発見し、自己免疫疾患や腫瘍性疾患の発症過程で観察される、様々な免疫異常の病態生理をより深く理解し、臨床応用することを最終目標とした。具体的には、本 DC サブセットの分化誘導メカニズム、胸腺内局在、central tolerance における特徴的役割の解明を目指すと同時に、得られた知見から、各種自己免疫疾患に対する予防もしくは治療効果、腫瘍抗原に対する免疫寛容誘導への関与についても検討することを目的として、研究計画を立案した。

3. 研究の方法

我々は、以上の研究目的を達成するため、以下の方法で解析を遂行した。

A) Sirp^{hi}tDC の分化誘導メカニズム、機能的特徴、central tolerance における役割の解明

- ① CCR2 欠損マウス胸腺における本 DC サブセットの減少の原因を調べるため、胸腺組織における CCR2 ligand (MCP-1, 2, 3, 5) の発現パターンを、RT-PCR、免疫組織学的に観察した。
- ② 蛍光免疫多重染色を行ない、本 DC サブセットの胸腺内局在を観察した。さらには、①の結果から得られた CCR2 ligand

の発現との共局在性を検討した。

- ③ WT、CCR2 欠損マウスに対して蛍光標識 ovalbumin(OVA)を静脈内投与し、OVA の取り込み能をフローサイトメトリー解析により比較検討した。

- ④ OVA 抗原特異的 T 細胞レセプター遺伝子導入 (D011.10) マウスと、D011.10 マウスと CCR2 欠損マウスとの交配によって作製した D011.10/CCR2 重複遺伝子改変マウスに対して、OVA タンパクを静脈内投与し、本 DC サブセットによる血中抗原の取り込み、T 前駆細胞への抗原提示による central tolerance の誘導メカニズムを検討した。

B) 自己免疫疾患に対する予防・治療効果の検討

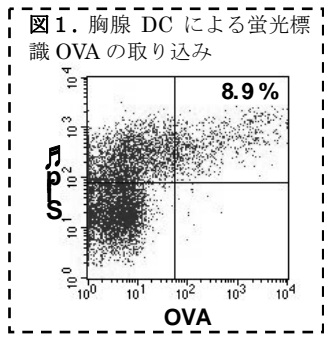
Aの研究計画から、確立した静脈内抗原投与による効果的な免疫寛容の誘導法を用いて、特異抗原によって誘導される過剰免疫反応の一つである、マウス遅延型過敏反応モデルに対する、臨床的評価、病理組織学的評価の改善を指標として、予防・治療効果の可能性を検討した。

C) 腫瘍抗原に対する免疫寛容誘導メカニズムにおける Sirp^{hi}tDC の関与と腫瘍性疾患増悪との関連性の検討

- ① OVA と green fluorescent protein (GFP) の融合タンパク (OVA-GFP) をマウス由来腫瘍細胞株である EL-4 細胞株に遺伝子導入した安定発現細胞株を樹立した。
- ② OVA-GFP を遺伝子導入した EL-4 細胞株を、D011.10 マウスに皮下接種し、腫瘍の増大速度を測定すると同時に、Sirp^{hi}tDC による OVA-GFP の取り込み、さらには D011.10 T 前駆細胞に対する抗原提示を観察した。

4. 研究成果

WT マウスの胸腺組織を解析したところ、CCR2 ligand のうち、MCP-2 が恒常的に PVR 内に発現しており、CCR2 を発現している Sirp^{hi}tDC と共局在していることを観察した。また、胸腺組織において、PVR は血液胸腺関門を形成している重要な組織構造であることが知られていることから、血液中に含まれる末梢タンパクとの関連性を考え、蛍光標識した OVA タンパクを静脈内投与し、Sirp^{hi}tDC による取り込みを観察した。その結果、図 1 で示したように、静脈内投与し

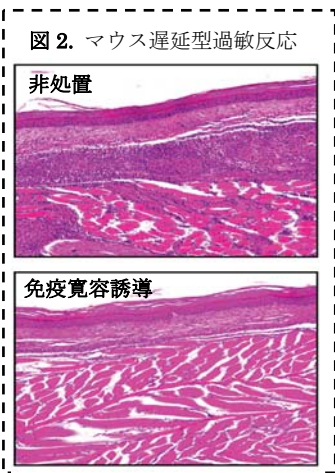


た OVA タンパクが、Sirp⁺tDC 特異的に取り込まれることを観察した。また、組織学的観察から、Sirp⁺tDC は PVR 内で血中 OVA タンパクを取り込み、その後、胸腺皮質領域に運び込むことがわかった。

これらの結果は、Journal of Immunology に報告し(発表論文 2)、従来から知られている AIRE 分子による末梢組織由来抗原を標的とした central tolerance とは異なる経路として世界的に注目されている。

さらに、我々は D011.10 マウスを用いた解析から、OVA タンパクを取り込んだ Sirp⁺tDC は胸腺皮質領域に分布している未熟 T 前駆細胞に抗原を提示し、制御性 T 細胞への分化を誘導することを明らかにした。これらの現象は、Sirp⁺tDC の部分的欠損を呈する CCR2 欠損マウスでは減弱することから、本 tDC サブセットによる作用であることが確認された。

Central tolerance システムにおける、本 tDC 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、図2で示したよ



うに、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、現在論文作成中であり、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。

一方、腫瘍抗原に対する免疫寛容については、本研究で作成した OVA-GFP を遺伝子導入した EL-4 細胞株を D011.10 マウスに皮下接種したが、血中への OVA-GFP の十分な漏出は認められなかった。同様に、胸腺における抗原特異的な免疫寛容の誘導も観察されなかった。今後、OVA-GFP の発現ベクターに分泌タンパク遺伝子由来のシグナル配列を挿入

することによって、腫瘍増殖中の血中 OVA-GFP 量を増加させるなどのさらなる検討が必要と考えられる。

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 9 件)

1. Fujii H, Baba T, Ishida Y, Kondo T, Yamagishi M, Kawano M, Mukaida N. Ablation of the Ccr2 gene exacerbates polyarthritis in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice. *Arthritis Rheum.* 63:96-106, 2011. 査読有
2. Kostadinova FI, Baba T, Ishida Y, Kondo T, Popivanova BK, Mukaida N. Crucial involvement of the CX3CR1-CX3CL1 axis in dextran sulfate sodium-mediated acute colitis in mice. *J Leukoc Biol.* 88:133-43, 2010. 査読有
3. Baba T, Nakamoto Y, Mukaida N. Crucial contribution of thymic Sirp⁺ conventional dendritic cells to central tolerance against blood-borne antigens in a CCR2-dependent manner. *J Immunol.* 183:3053-63, 2009. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

1. Baba T, Mukaida N. Thymic Sirp⁺ conventional dendritic cells orchestrate central tolerance against blood-borne antigens. 14th International Congress of Immunology 2010年 8月23日~27日 神戸国際会議場 (兵庫)
2. Baba T, Mukaida N. Establishment of central tolerance against blood-borne antigens by thymic Sirp⁺ conventional dendritic cells. 97th Annual Meeting of American Association of Immunologists 2010年 5月7日~11日 Baltimore Convention Center (USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 智久 (BABA TOMOHISA)
金沢大学・がん研究所・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