

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22590441
 研究課題名（和文） CD200R3 陽性内在性制御性樹状細胞による免疫応答制御機構の解明
 研究課題名（英文） Analysis on the mechanism of immune regulation by CD200R3+ Naturally occurring regulatory dendritic cells
 研究代表者
 佐藤 克明 (SATO KATSUAKI)
 独立行政法人理化学研究所・樹状細胞機能研究チーム・チームリーダー
 研究者番号：40301147

研究成果の概要（和文）：

CD200R3 が不活性化した内在性制御性樹状細胞では T 細胞機能制御能が著しく低下した。さらに、免疫病態モデルにおいて CD200R3 陽性内在性制御性樹状細胞特異的欠損遺伝子改変マウス (CD200R3-KI マウス) では野生型マウス (WT マウス) と比較して免疫病態が増悪した。以上の結果から内在性制御性樹状細胞は CD200R3 を介して T 細胞機能を調節することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Deficiency of CD200R3 suppressed the T-cell regulatory function of naturally occurring regulatory dendritic cells. Furthermore, CD200R3+naturally occurring regulatory dendritic cell-deficient mice showed a more enhanced immune pathogenesis than wild-type mice. Therefore, our findings suggest that CD200R3 plays a crucial role in the T-cell regulatory function of naturally occurring regulatory dendritic cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	0	0	0
2009 年度	0	0	0
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学。

キーワード：樹状細胞、T細胞、免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

樹状細胞は樹状突起を有する系統マーカー

一陰性、MHC クラス II 陽性の抗原提示細胞であり、通常型樹状細胞と形質細胞様樹状細胞

に大別される複数のサブセットから構成される (Allergol Int. 2007)。

樹状細胞は炎症状態では自然免疫と獲得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 (Allergol Int. 2007、Mucida et al. Science. 2007)。一方、定常状態では抗原特異的クローン除去・不応答性の誘導や免疫抑制能をもつ種々の制御性T細胞の誘導増幅を介した免疫寛容を誘導する制御細胞として免疫学的恒常性の維持に重要であることが明らかになりつつある (Kretschmer et al. Nat Immunol. 2005、Birnberg et al. Immunity. 2008、Ohnmacht et al. J Exp Med. 2009、Methods Mol Biol. 2009)。

申請者は、免疫疾患に対する樹状細胞を用いた新規免疫細胞療法の開発を目的として、ヒトとマウスにおいて特定の培養条件で強力なT細胞制御機能を有する分化誘導通常型樹状細胞サブセットの作製に成功し、この細胞を制御性樹状細胞と命名した (Blood. 2003)。また、マウス分化誘導型制御性樹状細胞の生体内への投与により抗原不応答T細胞及び制御性T細胞が誘導され、様々な免疫疾患に対して治療効果を示すことを明らかにした (Immunity. 2003、Blood. 2006、Blood. 2007、J Allergy Clin Immunol. 2008)。

これらの申請者の一連の研究を契機に“制御性樹状細胞”の概念が定着し、他の研究グループからも我々の成果を支持する研究報告が複数なされている。しかし、分化誘導型制御性樹状細胞と同様の機能を有する内在性制御性樹状細胞は未だ未同定であり、制御性樹状細胞のT細胞機能制御機構に関する分子機序も不明な点が多い。

申請者は先にマウス分化誘導型制御性樹状細胞に特異的に発現する免疫抑制分子と

してCD200受容体 (CD200R) ファミリー分子のCD200R3を同定した (Blood. 2009)。さらに、生体内のCD200R3陽性細胞が培養系で増幅されたマウス制御性樹状細胞と同様な細胞表現型を有し、また試験管内の解析からT細胞機能制御能を示すことを明らかにした (Blood. 2009)。以上の結果から、新規に同定されたCD200R3陽性細胞が内在性制御性樹状細胞としてCD200R3を介して生体での免疫寛容誘導と疾患制御に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究課題では、CD200R3陽性内在性制御性樹状細胞の生体内での動態とCD200R3を介した免疫寛容誘導機構を明らかにする。

このため、CD200R3陽性内在性制御性樹状細胞を特異的に欠損する遺伝子改変マウスとして、CD200R3の機能を担う exon 2、exon 3、exon 4 を IRES2-ジフテリア毒素 (DT) 受容体遺伝子 (DTR) -EGFP-Cre/Neo Cassette で置換した *Cd200r3.null1*-DTR-EGFP knock-in (KI) マウス (以下、CD200R3-KI マウス) を作製した。CD200R3-KI マウスではCD200R3陽性内在性制御性樹状細胞でCD200R3機能ドメインに代わりDTR-EGFPが発現することからCD200R3は不活性化する。さらに、DTの投与でCD200R3陽性内在性制御性樹状細胞が消失する。すなわち、CD200R3-KIマウスを用いて生体内でのCD200R3の機能を明らかにするとともにCD200R3陽性内在性制御性樹状細胞の免疫応答制御における役割を解明する。

3. 研究の方法

研究方法は以下の通りである。

(1) CD200R3陽性内在性制御性樹状細胞の機能解析

B6.WTマウス (Ly5.2)、B6.CD200R3-KIマウス

ウス (Ly5.2) からの CD200R3 陽性内在性制御性樹状細胞について以下の機能の比較検討を行った (Blood. 2007、Blood. 2009)。また、T 細胞活性化制御能については CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞が ovalbumin (OVA) 特異的 TCR を有するトランスジェニックマウスである B6. OT-II マウス (Ly5.1)、B6. OT-I マウス (Ly5.1) も用いた。

①細胞表面分子発現

細胞表面分子 (MHC 分子、共刺激分子、CD11c 等) の発現を FACS 解析にて測定した。

②サイトカイン産生能

各種 Toll-like receptor (TLR) リガンド刺激 (LPS、CpG、poly I:C 等) によるサイトカイン産生を経時的に ELISA 法にて測定した。

③T 細胞活性化能

OVA ペプチドを抗原とした共培養による B6. OT-II. CD4⁺T 細胞、B6. OT-I. CD8⁺T 細胞の増殖能 (³H]-thymidine 取り込み能) を測定した。

(2)免疫応答の解析

B6. WT マウス (Ly5.2)、B6. CD200R3-KI マウス (Ly5.2) (DT 非投与群、投与群) を用いて以下の比較検討 (Blood. 2006、Blood. 2007、J Allergy Clin Immunol. 2008、Blood. 2009) を行った。

①定常状態での免疫細胞の存在率・分布

胸腺、脾臓、リンパ節中の免疫細胞の存在率を FACS 解析にて測定した。さらに、CD200R3 陽性内在性制御性樹状細胞の上記免疫組織での存在率を FACS 解析にて測定するとともに分布を免疫組織学的に解析した。

②サイトカイン産生能

各種 TLR リガンド (LPS、CpG、poly I:C 等) を投与し、血清中サイトカイン産生を経時的に ELISA 法にて測定した。

③T 細胞分裂能

CFSE を標識した B6. OT-II. CD4⁺T 細胞、B6. OT-I. CD8⁺T 細胞を各マウスへ静脈内移入する。翌日に OVA 単独あるいは OVA と CFA の emulsion を皮下免疫する。免疫後 3 日目に CFSE 標識希釈を指標に T 細胞分裂能を FACS 解析にて測定した。

(3) T 細胞活性化能

各マウスへ OVA と CFA の emulsion を皮下免疫した。免疫後 14 日目に血清と脾臓 CD4⁺T 細胞を調整した。

①血清中 OVA 特異的抗体価を ELISA 法にて測定した。

②OVA を抗原とした脾臓 CD11 陽性樹状細胞との共培養による CD4⁺T 細胞の増殖能を測定した。

(4) .免疫病態での解析

B6. WT マウス (Ly5.2)、B6. CD200R3-KI マウス (Ly5.2) (DT 非投与群、投与群) を用いて自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) モデルでの以下の比較検討を行った。EAE は各マウスへ 0 日目に MOG ペプチドと CFA の emulsion を皮下免疫、0 日目と 2 日目に Pertussis toxin を腹腔内投与し、病態を発症させた。また、免疫後 10 日目に血清と脾臓やリンパ節の CD4⁺T 細胞を調整した。

①・病態評価 (発症率・臨床症状)

②免疫細胞の存在率・分布

②-1 脾臓、リンパ節中の免疫細胞の存在率を FACS 解析にて測定した。

②-2 CD200R3 陽性内在性制御性樹状細胞の上記免疫組織での存在率を FACS 解析にて測定とともに分布を免疫組織学的に解析した。

③ T 細胞活性化能

③-1 MOG ペプチドを抗原とした脾臓 CD11 陽性樹状細胞との共培養による CD4⁺T 細胞の増殖能を測定した。また、CD4⁺T 細胞のサイトカ

イン (IL-17 等) 産生能を ELISA 法と FACS 解析にて測定した。

4. 研究成果

CD200R3 が不活性化した内在性制御性樹状細胞では T 細胞機能制御能が著しく低下した。また、WT マウスと比較して CD200R3-KI マウスでは TLR リガンド投与での血清サイトカイン産生の亢進、抗原特異的 T 細胞免疫応答の増強が認められた。さらに、免疫病態モデルにおいて CD200R3-KI マウスでは WT マウスと比較して免疫病態が増悪し、抗原特異的 T 細胞免疫応答の増強が認められた。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.riken.jp/r-world/research/lab/rcai/cell/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 克明 (SATO KATSUAKI)

独立行政法人理化学研究所・樹状細胞機能研究チーム・チームリーダー

研究者番号：40301147

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し