

## 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：16201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590444

研究課題名（和文）形質細胞様樹状細胞特異的遺伝子改変マウスによる樹状細胞の動態制御機構の解明

研究課題名（英文）Studies on dynamics of plasmacytoid dendritic cells by gene-targeting technology.

研究代表者

星野 克明（HOSHINO KATSUAKI）

香川大学・医学部・教授

研究者番号：50324843

研究成果の概要（和文）：

我々は形質細胞様樹状細胞に優位に発現する Siglech 遺伝子座に、蛍光タンパク質遺伝子あるいは cre レコンビナーゼ遺伝子を挿入することで生理的条件下の細胞標識を行い、本細胞の生体内での動態解析を試みた。樹立した遺伝子改変マウス系統の蛍光タンパク質発現および cre レコンビナーゼ発現は、形質細胞様樹状細胞に限定されず、他の樹状細胞サブセットにも見られた。故に、この方法による形質細胞様樹状細胞の特異的な標識は不可能であることが示めされた。形質細胞様樹状細胞を標識するためには、他の遺伝子座を対象とすべきである。

研究成果の概要（英文）：

In order to track plasmacytoid dendritic cells (pDCs) in vivo, we generated Siglech-fluorescent protein and Siglech-cre recombinase knock-in mice, in which genes for a fluorescent protein and a cre recombinase were knocked into the gene locus of a Siglech expressed highly in pDC. In Siglech-fluorescent protein knock-in mice, fluorescent-positive cells were detected not only in the majority of pDC, but also in a small population of CD8+ dendritic cells in spleen and Peyer's patches. We observed all of the blood cells analyzed were tdRFP-positive in Siglech-cre: Rosa-loxP-STOP-loxP-tdRFP mice, which carry cre-expressing tdRFP-positive cells. These data suggest that we cannot label and track pDCs in vivo by use of these knock-in mice. I propose that we choose other genes highly and specifically expressed in pDCs, and generate new knock-in mouse line to label pDCs in vivo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：形質細胞様樹状細胞、I型インターフェロン

## 1. 研究開始当初の背景

形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid

dendritic cell、pDC) と呼ばれる樹状細胞サブセットは、核酸を認識する病原体センサ

一の TLR7 と TLR9 を発現しており、核酸刺激により IFN- $\alpha$  や IFN- $\beta$  を含む大量の I 型 IFN を産生する特性を持つ。この pDC による I 型 IFN 産生は、ウイルス感染に対して防御的に作用するばかりでなく、全身性エリテマトーデス (SLE) 等のある種の自己免疫疾患の病態形成にも重要な役割を果たしていることが明らかにされている。pDC の特性を制御する分子機構、および、pDC の生体内での活性化、動態の制御機構を解明することは、これらの疾患の制御にとって非常に重要であるが、不明の部分が多い。

pDC の特性である TLR7/9 のシグナルによる I 型 IFN 産生誘導に機能する分子として、転写因子 interferon regulatory factor-7 (IRF-7) が同定されており、我々は、セリンスレオニンキナーゼの I $\kappa$ B キナーゼ  $\alpha$  (IKK $\alpha$ ) が IRF-7 活性化に必須であることを明らかにしている (Hoshino et al. Nature 2006)。さらに、pDC に高発現している Ets ファミリー転写因子 Spi-B が、IRF-7 と協調して I 型 IFN 遺伝子プロモーターを活性化すること、また pDC の成熟分化にも関与することを見出している。我々は、pDC に特異的かつ高発現する遺伝子について遺伝子欠損マウス作成する事で、pDC の活性化機構を明らかにできると考えた。また、同様の手法により遺伝子ターゲティングを行い、pDC のみを蛍光タンパク質でマーキングし、pDC の動きを追跡する事も可能と考えた。

## 2. 研究の目的

我々は、マウス pDC 優位に発現する膜タンパク質 SiglecH の遺伝子座に蛍光タンパク質 Kikume Green-Red (KikGR) をコードする遺伝子を挿入した遺伝子改変マウス (SiglecH-KikGR マウス) 系統を樹立した。蛍光タンパク質 KikGR は緑色蛍光を発するが、435nm 近紫外光の短時間照射により赤色蛍光を発するように蛍光色が不可逆的に変化する特性がある。

抗 SiglecH 抗体による刺激で *in vitro* の pDC 機能は抑制されるが、SiglecH の *in vivo* における機能的意義は不明であった。本研究では、まず SiglecH-KikGR ホモ変異マウス、つまり SiglecH 欠損マウスを用いて、SiglecH の生体内での機能的意義を明らかにする。また、SiglecH-KikGR ヘテロ変異マウスにおいて、皮膚などの局所に近紫外光を照射すると、照射部位に局在した pDC だけが赤色 pDC になり、その色を指標に他のリンパ組織で追跡することが可能になる。このマウスを用いて、生理的状態や種々の病的状態での pDC の動態を解明する。さらに、SiglecH 遺伝子座に cre レコンビナーゼ遺伝子を挿入したマウスを作成し、pDC 特異的遺伝子欠損システムを作

成する。

## 3. 研究の方法

(1) SiglecH-KikGR マウスについて、蛍光タンパク質を発現する細胞を詳細に解析する。

(2) SiglecH-KikGR マウスのヘテロ変異マウスを用い、皮膚あるいはリンパ節局所に近紫外光照射を行った後、他のリンパ節、骨髄、脾臓における赤色変換した pDC の有無や割合を調べ、pDC の動態を調べる。生理的状態だけではなく、種々のウイルス (インフルエンザウイルス、水疱性口内炎ウイルス) 感染時にも検討を行う。

(3) SiglecH-KikGR マウスのホモ変異マウスは遺伝子欠損マウスであるため、pDC における SiglecH の機能的意義について、野生型あるいは、SiglecH-KikGR ヘテロ変異マウスを対照として比較解析を行う。

(4) SiglecH-KikGR マウスと同様の方法で、ゲノム上に cre レコンビナーゼ遺伝子を挿入し、pDC 特異的な遺伝子改変マウスシステム (SiglecH-cre マウス) 系統を樹立する。

① ROSA-loxP-STOP-loxP-tdRFP ノックインマウスでは、cre レコンビナーゼが発現する細胞でのみ赤色蛍光が検出される (Luche et al. Eur J Immunol. 2007)。このマウスと SiglecH-cre マウスを交配し、pDC 特異的に赤色マーキングが可能となるか検討する。

③ 樹状細胞サブセット間の比較では pDC に高発現しているが、他の細胞や組織にも発現する数種類の遺伝子について、条件付き遺伝子ターゲティングマウス系統を作成している。SiglecH-cre マウスとの交配を行うことで、pDC 特異的遺伝子欠損マウスを作成し、pDC の機能について解析を行う。

## 4. 研究成果

樹状細胞サブセットについて遺伝子発現を比較した結果、膜タンパク質の SiglecH が、他の樹状細胞に比べて、pDC に約 50 倍高発現している事を確認した。pDC 特異的な遺伝子改変マウスを作るため、SiglecH 遺伝子座に蛍光タンパク質 KikGR 遺伝子を挿入した SiglecH-KikGR マウス系統を樹立した。SiglecH-KikGR マウスから得た各種細胞について、KikGR 発現をフローサイトメトリーにより確認した結果、脾臓、骨髄、パイエル板の pDC すべてが KikGR を発現していることが明らかとなった。しかしながら、脾臓およびパイエル板において、pDC 以外の樹状細胞である CD8 陽性樹状細胞 (CD8+DC) の一部にも KikGR 発現が見られた。また、SiglecH-KikGR

マウスの骨髄細胞を Flt3 ligand 存在下で培養して得られる樹状細胞でも、KikGR 発現がすべての pDC のみならず、脾臓の CD8+DC に相当する CD24 陽性樹状細胞 (CD24+DC) の一部に見られた。SiglecH-KikGR ヘテロ変異マウスの骨髄細胞を培養して得た KikGR 陽性 CD24+DC の SiglecH 発現をフローサイトメトリーで検討したが陰性であった。同時に、この KikGR 陽性 CD24+DC は、pDC 特異的な膜タンパク質である CCR9 および Ly49Q 発現も陰性であった。KikGR 発現が、pDC だけではなく CD8+DC および CD24+DC の一部に見られる理由は不明である。KikGR 陽性の CD8+DC および CD24+DC は、pDC の前駆細胞、あるいは pDC から分化した細胞であるかもしれないが検討していない。故に、SiglecH-KikGR マウスでは、pDC のみを KikGR 標識できない事が明らかとなった。

SiglecH-KikGR ホモ変異マウスの pDC は、対照の野生型 pDC と同様に発生し、分化した。ホモ変異マウスの脾臓 pDC は、ex vivo で CpG DNA 刺激による I 型 IFN 産生が亢進していたが、炎症性サイトカイン産生は野生型と変わらなかった。一方、1 本鎖 RNA 刺激による I 型 IFN 産生と炎症性サイトカイン産生は、野生型と同様に見られた。SiglecH 欠損マウスを用いた pDC の機能解析は、他のグループにより報告された (Takagi et al. *Immunity* 2011) ので、進めていない。

pDC 特異的遺伝子欠損システムを作成するために、SiglecH-cre マウスシステムを樹立した。cre レコンビナーゼ発現が pDC 特異的であるか確認するために、ROSA-LoxP-STOP-LoxP-tdRFP ノックインマウスと交配し、仔マウスについて解析を行った。その結果、解析した血球細胞すべてに赤色蛍光が検出されたため、pDC 特異的な赤色蛍光は観察されなかった。個体発生の過程、あるいは造血幹細胞から血球細胞への分化過程において、cre 発現が誘導されると考えている。よって、SiglecH-cre マウスは、pDC 特異的に遺伝子欠損を行うために不適切と結論した。

対策として、新たにタモキシフェン誘導性 cre レコンビナーゼ (cre レコンビナーゼ-改変型ヒトエストロゲン受容体融合タンパク質、creERT2) 遺伝子をノックインした遺伝子改変マウス (SiglecH-creERT2 マウス) システムを樹立した。タモキシフェン投与による cre レコンビナーゼ活性の発現特異性を確認するために、ROSA-LoxP-STOP-LoxP-tdRFP ノックインマウスと交配している。仔マウスについて、タモキシフェン投与に依存した pDC の赤色蛍光タンパク質発現を解析する予定である。

種々の樹状細胞サブセットについて遺伝子発現を比較すると、pDC 優位に発現する遺伝子群があり、SiglecH と同様に CCR9 も pDC

優位に発現している。pDC を蛍光タンパク質でマーキングするために、CCR9 遺伝子についても KikGR 遺伝子ノックインマウスシステムを樹立した。得られたマウスシステムでは、KikGR 発現が脾臓 pDC で強く検出された。しかし、CD8+DC の一部と、CD4 陽性樹状細胞の一部にも KikGR 発現が検出されたので、この方法でも pDC のみをマーキングできないと結論した。

## 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 9 件)

原著論文

- ① Okuma, A., Hoshino, K., Ohba, T., Fukushi, S., Aiba, S., Akira, S., Ono, M., Kaisho, T., and Muta, T., Enhanced Apoptosis by Disruption of the STAT3-IkappaB-zeta Signaling Pathway in Epithelial Cells Induces Sjogren's Syndrome-like Autoimmune Disease. *Immunity* 38: 450-460, (2013). 査読有  
10.1016/j.immuni.2012.11.016
- ② Sasaki, I., Hoshino, K., Sugiyama, T., Yamazaki, C., Yano, T., Iizuka, A., Hemmi, H., Tanaka, T., Saito, M., Sugiyama, M., Fukuda, Y., Ohta, T., Sato, K., Ainai, A., Suzuki, T., Hasegawa, H., Toyama-Sorimachi, N., Kohara, H., Nagasawa, T., and Kaisho, T., Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development. *Blood* 120: 4733-4743, (2012). 査読有  
10.1182/blood-2012-06-436527
- ③ Kanaya, T., Hase, K., Takahashi, D., Fukuda, S., Hoshino, K., Sasaki, I., Hemmi, H., Knoop, K. A., Kumar, N., Sato, M., Katsuno, T., Yokosuka, O., Toyooka, K., Nakai, K., Sakamoto, A., Kitahara, Y., Jinnohara, T., McSorley, S. J., Kaisho, T., Williams, I. R., and Ohno, H., The Ets transcription factor Spi-B is essential for the differentiation of intestinal microfold cells. *Nat Immunol* 13: 729-736, (2012). 査読有  
10.1038/ni.2352
- ④ Yamazaki, C., Miyamoto, R., Hoshino, K., Fukuda, Y., Sasaki, I., Saito, M., Ishiguchi, H., Yano, T., Sugiyama, T., Hemmi, H., Tanaka, T., Hamada, E., Hirashima, T., Amakawa, R., Fukuhara, S., Nomura, S., Ito, T., and Kaisho, T., Conservation of a chemokine system, XCR1 and its ligand, XCL1, between

- human and mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 397: 756-761, (2010). 査読有  
10.1016/j.bbrc.2010.06.029
- ⑤ Amuro, H., Ito, T., Miyamoto, R., Sugimoto, H., Torii, Y., Son, Y., Nakamichi, N., Yamazaki, C., Hoshino, K., Kaisho, T., Ozaki, Y., Inaba, M., Amakawa, R., and Fukuhara, S., Statins, inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, function as inhibitors of cellular and molecular components involved in type I interferon production. *Arthritis Rheum*, 62: 2073-2085, (2010). 査読有  
10.1002/art.27478
- ⑥ Miyamoto, R., Ito, T., Nomura, S., Amakawa, R., Amuro, H., Katashiba, Y., Ogata, M., Murakami, N., Shimamoto, K., Yamazaki, C., Hoshino, K., Kaisho, T., and Fukuhara, S., Inhibitor of IkappaB kinase activity, BAY 11-7082, interferes with interferon regulatory factor 7 nuclear translocation and type I interferon production by plasmacytoid dendritic cells. *Arthritis Res Ther*, 12: R87, (2010). 査読有  
10.1186/ar3014
- ⑦ Gotoh, K., Tanaka, Y., Nishikimi, A., Nakamura, R., Yamada, H., Maeda, N., Ishikawa, T., Hoshino, K., Uruno, T., Cao, Q., Higashi, S., Kawaguchi, Y., Enjoji, M., Takayanagi, R., Kaisho, T., Yoshikai, Y., and Fukui, Y., Selective control of type I IFN induction by the Rac activator DOCK2 during TLR-mediated plasmacytoid dendritic cell activation. *J Exp Med*, 207: 721-730, (2010). 査読有  
10.1084/jem.20091776
- ⑧ Hoshino, K., Sasaki, I., Sugiyama, T., Yano, T., Yamazaki, C., Yasui, T., Kikutani, H., and Kaisho, T., Cutting edge: critical role of IkappaB Kinase alpha in TLR7/9-induced type I IFN production by conventional dendritic cells. *J Immunol*, 184: 3341-3345, (2010). 査読有  
10.4049/jimmunol.0901648

総説

- ⑨ 辺見弘明、山崎千尋、星野克明、改正恒康、CD8 陽性樹状細胞サブセットの動的制御機構の解析、*Cytometry Research* 22: 31-35, (2012). 査読無  
<http://ci.nii.ac.jp/naid/10030199789>

[学会発表] (計 17 件)

- ① Izumi Sasaki, Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell development in bone marrow. 第 41 回日本免疫学会学術集会、2012 年 12 月 5-7 日、神戸
- ② Masanaka Sugiyama, Analysis of in vivo function of XC chemokine receptor-expressing dendritic cells. 第 41 回日本免疫学会学術集会、2012 年 12 月 5-7 日、神戸
- ③ Izumi Sasaki, Roles of an Ets family transcription factor, Spi-B, in plasmacytoid dendritic cell development in the bone marrow. International Endotoxin and Innate Immunity Society Meeting 2012、2012 年 10 月 23-26 日、東京
- ④ Masanaka Sugiyama, In vivo roles of XC chemokine receptor 1-expressing dendritic cells. International Endotoxin and Innate Immunity Society Meeting 2012、2012 年 10 月 23-26 日、東京
- ⑤ Hiroaki Hemmi, ABLATION OF A DENDRITIC CELL SUBSET EXPRESSING XC CHEMOKINE RECEPTOR 1 IN VIVO. The 12th International Symposium on Dendritic Cells (DC2012), 2012 年 10 月 7-11 日、Daegu, South Korea
- ⑥ Masanaka Sugiyama, In vivo ablation of XC chemokine receptor 1-expressing dendritic cell subset. The 20th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2012, 2012 年 6 月 15-16 日、東京
- ⑦ 山崎千尋、ケモカイン受容体 Xcr1 発現樹状細胞の in vivo における機能的意義、第 40 回日本免疫学会学術集会、2011 年 11 月 28 日、幕張メッセ (千葉県)
- ⑧ 星野克明、形質細胞様樹状細胞優位に発現する Ets ファミリー転写因子 Spi-B による I 型インターフェロン遺伝子発現制御、新学術領域研究「自然炎症」若手ワークショップ、2011 年 1 月 26-28 日、山形県山形市
- ⑨ Izumi Sasaki, Critical roles of an Ets family member, Spi-B, in pDC maturation. 14th International Congress of Immunology、2010 年 8 月 25 日、神戸
- ⑩ Katsuaki Hoshino, An Ets family member, Spi-B, transactivates type I interferon promoters through the cooperation with IRF-7. 14th International Congress of Immunology、2010 年 8 月 24 日、神戸

[その他]  
ホームページ

[http://www.med.kagawa-u.ac.jp/~immunol/  
index.html](http://www.med.kagawa-u.ac.jp/~immunol/index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

星野 克明 (HOSHINO KATSUAKI)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：50324843