

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24年 5月 21日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790451

研究課題名（和文）樹状細胞の死細胞認識およびクロスプレゼンテーション機構の解明

研究課題名（英文）Phagocytosis of apoptotic cells and cross-presentation by DC

研究代表者

中山 勝文（NAKAYAMA MASAFUMI）

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：20453582

研究成果の概要（和文）：

本研究で我々はNK細胞がDCと接触した際にDCのMHCクラスIIタンパクを引き抜くことを見出した。この分子メカニズムは不明であるが、trogoctosis（trogo：ギリシャ語で“かじる”という意味に由来）と呼ばれる細胞膜移動に依存すると思われる。このMHCクラスII分子を羽織ったNK細胞はDCのようにT細胞を活性化する可能性が考えられたが、補助刺激分子を発現しないため、T細胞を活性化せずむしろ抑制することが判明した。これらの結果から、免疫応答は trogoctosis によって発生した新たな細胞群によっても制御されている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Natural killer (NK) cells contribute to not only innate but also adaptive immunity by interacting with dendritic cells (DCs) and T cells. All activated human NK cells express HLA-DR and can initiate MHCII-dependent CD4⁺T cell proliferation; however, the expression of MHCII by mouse NK cells and its functional significance are controversial. In this study, we show that NK-DC interactions result in the emergence of MHCII-positive NK cells. Upon *in vitro* or *in vivo* activation, mouse conventional NK cells did not induce MHCII transcripts, but rapidly acquired MHCII protein from DCs. MHCII *H2-AbI*-deficient NK cells turned I-A^b-positive when adoptively transferred into wild type (WT) mice or when cultured with WT splenic DCs. NK acquisition of MHCII was mediated by intercellular membrane transfer called trogoctosis, but not upon DAP10/12 and MHCI-binding NK cell receptor signaling. MHCII-dressed NK cells concurrently acquired costimulatory molecules such as CD80 and CD86 from DCs; however, their expression did not reach functional levels. Therefore, MHCII-dressed NK cells inhibited DC-induced CD4⁺T cell responses rather than activated CD4⁺T cells by competitive antigen presentation. In a mouse model for delayed-type hypersensitivity, adoptive transfer of MHCII-dressed NK cells attenuated the footpad swelling. These results suggest that MHCII-dressed NK cells generated through NK-DC interactions regulate T cell-mediated immune responses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：免疫

キーワード：樹状細胞、NK細胞、MHCクラスII

1. 研究開始当初の背景

NK細胞は癌細胞やウイルス感染細胞を殺傷することにより生体防御の砦として機能することは古くから知られているが、最近、活性化NK細胞はリンパ組織内へ遊走し、DCやT細胞などと相互作用することにより、獲得免疫応答を制御することが分かってきた。また、一部の活性化NK細胞はMHCIIを発現することも報告されていることから、そのNK細胞は抗原提示能を有することが示唆されるが、それについては未だに議論の余地が残されている。

免疫応答は多種多様な免疫細胞群が互いに連携することによって調節されている。最近、免疫細胞同士の細胞接着の際に免疫シナプスを通じて細胞膜が細胞間移動する現象が注目されつつあり、この現象は trogocytosis と名付けられた。本研究では、活性化NK細胞上に発現するMHCIIタンパクは trogocytosis により他の細胞から獲得した可能性について研究を開始した。

2. 研究の目的

活性化NK細胞はDCと相互作用した際にDC上のMHCIIを引き抜くか否について検討し、また、MHCIIを引き抜いたNK細胞の機能について解析した。具体的には卵白アルブミンペプチド323-339/MHCII I-A^b特異的TCRトランスジェニックマウスのCD4⁺T細胞を用いた抗原提示能の有無を検討した。

3. 研究の方法

3-1) NK-DC 共培養

C57BL/6 マウス脾臓から調製したNK細胞をIL-2 (1000 U/ml)で5日間培養した後、CFSEで(0.5 μM)ラベルした。CFSE-NK細胞とCD11c⁺脾臓DCを1:1の割合で37C共培養した後、NK細胞上のMHCII発現をRT-PCRおよびFACSにより解析した。

3-2) In vitro 抗原提示能の測定

DCからMHCIIを引き抜いたNK細胞が抗原提示能を有するか否かについて卵白アルブミンペプチド/MHC class II I-A^b特異的T細胞受容体をもつOT-IIマウス由来CD4⁺T細胞を用いて評価した。具体的には、MHCII⁺NK細胞、DCあるいはその両細胞とCFSEラベルしたOT-II CD4⁺T細胞を1:10 (APC:T)の割合でova₃₂₃₋₃₃₉ペプチド存在下で3日間培養し、CFSEの蛍光強度の低下を指標にOT-II CD4⁺T細胞の増殖をFACSにより評価した。

3-3) In vivo 抗原提示能の測定

CFSE-ラベルしたOT-II CD4⁺T細胞(3x10⁶/mouse)をB6マウスに静脈内移入し、その翌日にova₃₂₃₋₃₃₉ペプチドをのせたMHCII⁺NK細胞、DCあるいはその両細胞を静脈内移入した。その2日後にマウス脾臓中のOT-II CD4⁺T細胞の増殖をFACSにより評価した。

4. 研究成果

我々は、ウイルス由来核酸を投与したマウス脾臓NK細胞表面上にはMHCII I-A^bが発現誘導されることをFACS解析により見出した。しかしながら、興味深いことにこのNK細胞にmRNAレベルでMHCII I-A^bの発現は認められなかった。この結果から、NK細胞自身がMHCIIを合成するのではなく、他の細胞からそのタンパクを引き抜いている可能性が示唆された。この可能性を検討するために以下の実験を行った。

IL-2で活性化したNK細胞をDCと5日間共培養するとNK細胞がMHCII陽性となった。またMHCII I-A^b遺伝子欠損マウス由来NK細胞をIL-2で活性化させた後、野生型マウスに移入すると、そのNK細胞がMHCII I-A^b陽性になった(図1)。これらの結果は、in vitro および in vivo において活性化NK細胞は他

の免疫細胞から MHCII を引き抜くことを示唆する。この MHCII を獲得した NK 細胞を我々は MHCII-dressed NK 細胞と名付けた。

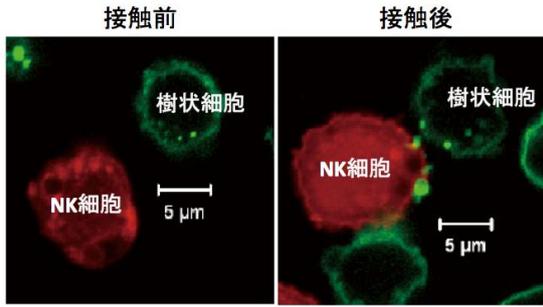


図1. NK細胞(赤)は樹状細胞からMHCクラスII(緑)を引き取る

この MHCII-dressed NK 細胞が抗原提示能を有するか否かについて OT-II CD4⁺ T 細胞を用いて解析した。その結果、in vitro および in vivo 実験ともに MHCII-dressed NK 細胞には抗原提示能が認められなかった。しかしながら、この NK 細胞は DC による抗原提示を抑制することが判明した。また DC をマウス footpad に移入することによる遅延型アレルギーモデルにおいて、MHCII-dressed NK 細胞を移入すると、footpad の浮腫が低減することが判明した (図2)。

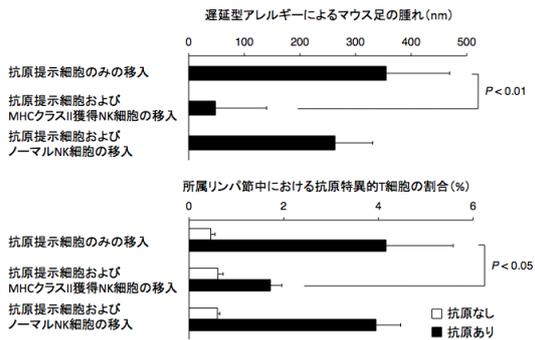


図2. MHCクラスIIを獲得したNK細胞は CD4⁺ T細胞反応を抑制する

これらの結果は、MHCII-dressed NK 細胞が T 細胞の活性化を抑制することを示唆する。この活性化抑制の分子メカニズムについては不明であるが、おそらく MHCII-dressed NK 細胞は CD80/86 といった補助刺激分子が発現していないため、T 細胞がアナジーに陥るのではないかと考えられる (図2)。

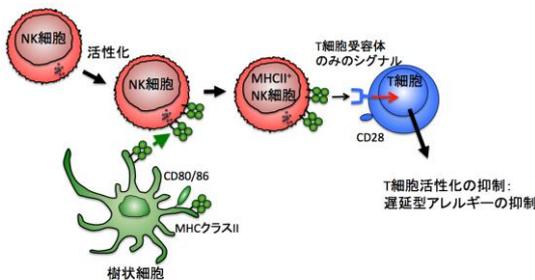


図3. 樹状細胞からMHCクラスIIを獲得したNK細胞はT細胞の活性化を抑制する

本研究により、NK 細胞が DC から MHCII を引き抜くこと、またその結果生じた MHCII-dressed NK 細胞が T 細胞の活性化を抑制することが明らかとなった (図3)。この trogocytosis を介する新たな免疫制御の生理的・病理的役割の今後の解明が期待される。

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3件)

1. Nakayama M, Takeda K, Kawano M, Takai T, Ishii N, Ogasawara K. Natural killer (NK)-dendritic cell interactions generate MHC class II-dressed NK cells that regulate CD4⁺ T cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2011, 108, 18360-18365 (査読有)
2. Kojima Y, Nakayama M, Nishina T, Nakano H, Koyanagi M, Takeda K, Okumura K, Yagita H. Importin β1 protein-mediated nuclear localization of death receptor 5 (DR5) limits DR5/tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced cell death of human tumor cells. J Biol Chem. 2011, 286, 43383-43393 (査読有)
3. Takeda K, Nakayama M, Sakaki M, Hayakawa Y, Imawari M, Ogasawara K, Okumura K, Smyth MJ. IFN-γ production by lung NK cells is critical for the natural resistance to pulmonary metastasis of B16 melanoma in mice. J Leukoc Biol. 2011, 90, 777-785 (査読有)

[学会発表] (計3件)

1. Nakayama M, Takeda K, Kawano M, Takai T, Ishii N, Ogasawara K. Natural killer (NK)-dendritic cell interactions generate MHC class II-dressed NK cells that regulate

CD4+ T cells. 第40回 日本免疫学会総会, 千葉 2011年11月27-29日

2. Kawano M, Kumagai K, Kobayashi H, Nakayama M, Suzuki R, Ogasawara K: Investigation of metal allergy using muse model. 第40回 日本免疫学会総会, 千葉 2011年11月27-29日

3. Kojima Y, Nakayama M, Nishina T, Nakano H, Koyanagi M, Takeda K, Okumura K, Yagita H. Importin β 1 protein-mediated nuclear localization of death receptor 5 (DR5) limits DR5/tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced cell death of human tumor cells. 13th International TNF conference, May 15-18, 2011, Awaji, Japan

[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

<http://www.tohoku.ac.jp/japanese/2011/11>

</press20111104-01.html>

<http://release.nikkei.co.jp/detail.cfm?relID=295892&lindID=5>

<http://news.mynavi.jp/news/2011/11/04/097/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 勝文 (NAKAYAMA MASAFUMI)
東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号: 20453582

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: