

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590460

研究課題名(和文)免疫応答における末梢組織樹状細胞の機能解析

研究課題名(英文)Analysis of dendritic cell function in immune responses

研究代表者

邊見 弘明(Hemmi, Hiroaki)

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・准教授

研究者番号：20451924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：抗原提示細胞である樹状細胞は、特徴的な機能を示す複数のサブセットからなる。ケモカイン受容体XCR1は、樹状細胞の中でもクロスプレゼンテーション活性の高いサブセットに特異的に発現している。本研究では、ヒト由来ジフテリア毒素受容体と蛍光タンパク質venusとの融合タンパク質をコードする遺伝子をXCR1遺伝子座に挿入した遺伝子組換えマウスを用いて、ジフテリア毒素の投与により一時的にXCR1+樹状細胞を除去できることを確認した。さらに、このマウスを用いて、XCR1+樹状細胞が生体内でのクロスプレゼンテーションや経口投与したタンパク質に対する免疫寛容の誘導に重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Dendritic cells are professional antigen presenting cells and consist of several subsets with specialized functions. A XC chemokine receptor 1 (XCR1) is selectively expressed on a dendritic cell subset showing a high ability to cross-present antigens to naive CD8 T cells. Conditional ablation of these XCR1+ dendritic cells in vivo are achieved by generation of gene modified mice in which the XCR1 gene was replaced with a gene coding for a fusion protein consisting of human diphtheria toxin receptor and fluorescent protein venus. In these mice, XCR1+ dendritic cells were transiently and conditionally ablated when diphtheria toxin was injected. Using this system, we found that cross-presentation as well as oral tolerance was impaired in the absence of XCR1+ dendritic cells in vivo. These results suggest that XCR1+ dendritic cells play important roles in induction of not only immune response but also immune tolerance.

研究分野：免疫学

キーワード：樹状細胞 免疫応答 免疫制御

1. 研究開始当初の背景

皮膚や気道、腸管などは、常に外界と接しており、生体防御の最前線と言える。このような器官において、抗原提示細胞である樹状細胞は、斥候 (sentinel) とも呼ばれるように、末梢組織の抗原を取り込んでリンパ節へと移動し、ナイーブ T 細胞に対して抗原提示を行うことで、抗原特異的な T 細胞の分化・活性化を誘導する (引用文献)。このような樹状細胞は、それぞれに特徴的な機能を示す複数のサブセットから構成されている。特に、CD8 α +樹状細胞は、取り込んだ抗原を CD8 T 細胞に提示するクロスプレゼンテーション活性が高い (なお、この CD8 α +樹状細胞は、末梢組織では CD103+CD11b-樹状細胞として同定される。以下、CD8 α /CD103+樹状細胞とする)。一方、CD8 α -樹状細胞は、CD4 T 細胞を強く活性化すると報告されている。しかしながら、このような各種サブセットの生体内での詳細な機能については、不明な点も多い。

例えば、皮膚の真皮には、真皮樹状細胞 (Langerin+CD103+CD11b-, Langerin-CD103-CD11b+, Langerin-CD103-CD11b-に分類されている) が存在する。それらのうち Langerin+CD11b-樹状細胞が接触性過敏症 (CHS) の発症に重要な働きをしていることが、当該サブセットを特異的に除去できる遺伝子組換えマウスを用いた解析により報告されている (引用文献)。その一方で、Langerin+CD11b-樹状細胞を含めて CD8 α /CD103+樹状細胞が構成的に欠失している転写因子 Batf3 遺伝子欠損マウスでは、CHS が野生型マウスと同様に誘導されるとも報告されており (引用文献) はっきりしない点も多い。また、腸管においては、樹状細胞は、パイエル板などリンパ組織の他に粘膜固有層にも存在して免疫応答を担うとともに、摂取した食物に対する免疫応答の抑制 (経口寛容、oral tolerance) にも関与している。また、CD103+樹状細胞が TGF- β やレチノイン酸産生を通して、制御性 T 細胞 (Treg) の誘導に重要な働きをしている (引用文献)。しかしながら、この CD103+樹状細胞は、さらに CD11b-と CD11b+とに分けることができ、生体内においてどちらの細胞が (あるいは、どちらの細胞とも) Treg の誘導に必須なのか、よくわかっていない。

ケモカイン受容体 XCR1 は、これら樹状細胞サブセットの内、CD8 α /CD103+樹状細胞に特異的に発現している。XCR1 のリガンドである XCL1 は、ナチュラルキラー細胞や活性化 CD8 T 細胞から産生され、XCR1+樹状細胞に対して走化性を誘導する。この XCR1 遺伝子座にヒトジフテリア毒素受容体と蛍光タンパク質 Venus との融合蛋白質 (DTRvenus) をコードする遺伝子をノックインした XCR1-DTRvenus マウスを作成し、解析してきた。このマウスでは、ジフテリア毒素の投与により、XCR1+細胞が特異的に除

去できることが期待される。

2. 研究の目的

本研究計画では、樹状細胞サブセット、特に、XCR1+樹状細胞について、その生理的機能を検討することを目的とした。さらに、樹状細胞の持つ免疫制御の観点から、経口免疫寛容における XCR1+樹状細胞の役割の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) ジフテリア毒素 (DT) の投与により DTR 発現細胞が除去出来ることを期待し、XCR1-DTRvenus マウスに DT を投与し、翌日~8 日後に各種リンパ組織を回収し、XCR1+樹状細胞について FACS を用いて解析した。また、同様に、抹消組織 (皮膚や肺、肝臓、小腸など) についても、DT 投与後 24 時間後に各組織より血球系細胞を調整し、FACS を用いて XCR1+樹状細胞の有無について解析した。

(2) 抗原特異的免疫応答を検討するために以下の実験を行った。モデル抗原として卵白アルブミン (OVA) をアジュバントである二本鎖 RNA と共に免疫し、一週間後に脾臓細胞を回収して、OVA タンパク質あるいは OVA 由来ペプチド存在下で培養して、抗原 (OVA) 特異的 T 細胞応答を、インターフェロン γ 産生を指標に検討した。この時、XCR1+樹状細胞の関与を検討するために、免疫前日に DT を投与して XCR1+樹状細胞の除去を行い、その影響を検討した。

(3) 経口免疫寛容を検討するために、抗原である OVA を経口にて投与し、その後、OVA 及び二本鎖 RNA にて免疫を行い、OVA 特異的 T 細胞の分化・活性化について検討した。その際、XCR1+樹状細胞の関与を検討するために、あらかじめ経口投与時 (免疫寛容誘導時) に DT を投与して XCR1+樹状細胞を除去しておき、XCR1+樹状細胞が回復後に免疫を行い、その後の OVA 特異的 T 細胞の分化・活性化を評価した。

4. 研究成果

(1) マウス個体からの XCR1+樹状細胞の除去

XCR1-DTRvenus マウスへ DT を投与し、リンパ組織 (脾臓や皮膚所属リンパ節など) 中の CD8 α /CD103+樹状細胞 (XCR1+樹状細胞) の変化について、FACS を用いて解析した。その結果、DT 投与後、1~2 日程、効率的に XCR1+樹状細胞が除去されていた。その後、4 日目頃から回復を始め、8 日にはほぼ投与前のレベルにまで回復することが観察された (図 1)。このように、XCR1-DTRvenus マウスに DT を投与することで、効率良く、且つ、一時的に XCR1+樹状細胞が除去出来ることが確認された。さらに、末梢組織中での XCR1+樹状細胞サブセットについて FACS を用いて検討したところ、

肺や肝臓、小腸粘膜固有層からの XCR1+樹状細胞 (CD103+CD11b-) が、リンパ組織と同様に除去されていた (図 2)。

このように、XCR1-DTRvenus マウスに DT を投与することにより、リンパ組織のみならず、各種組織からも XCR1+樹状細胞を除去出来ることが確認された。

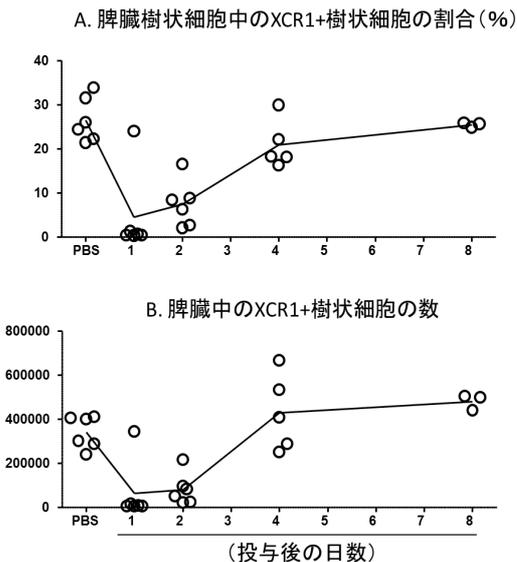


図 1. XCR1-DTRvenus マウスへの DT 投与による XCR1+ 樹状細胞の変化。XCR1-DTRvenus マウスに DT を投与し、その後の脾臓 XCR1+ 樹状細胞の変化を FACS にて検討した。

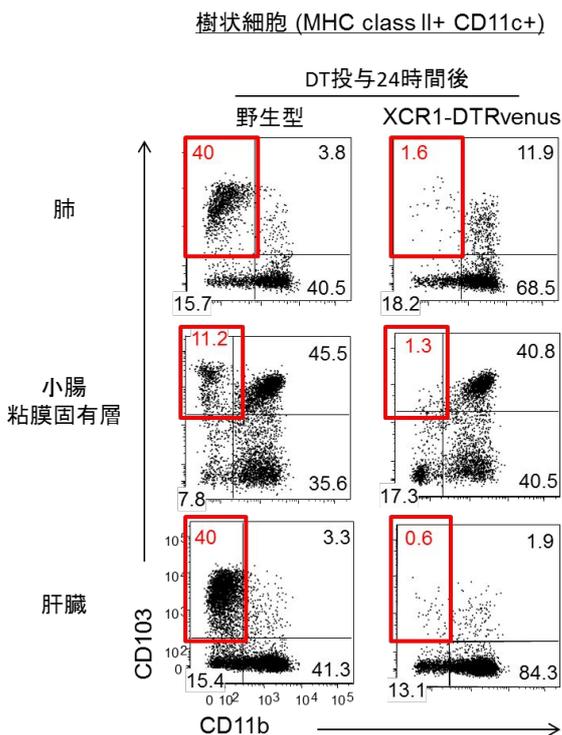


図 2. 各種組織からの CD103+CD11b- 樹状細胞の除去。野生型あるいは XCR1-DTRvenus マウスへ DT を投与し、24 時間後の各組織中

の樹状細胞を検討した。赤枠が、XCR1 を発現している樹状細胞サブセット。

(2) T 細胞免疫応答への XCR1+樹状細胞の関与について

XCR1+樹状細胞の T 細胞免疫応答への関与を検討するために、免疫応答誘導時に XCR1-DTRvenus マウスに DT を投与して XCR1+樹状細胞を除去した後に、OVA (抗原) をアジュバント (二本鎖 RNA) と共に免疫した。免疫一週間後に、脾臓細胞を回収し、OVA タンパク質または OVA ペプチドにて再刺激を行い、IFN γ 産生を指標に抗原特異的 T 細胞について検討した (図 3)。その結果、CD4 T 細胞については、抗原特異的 T 細胞の発生が PBS 投与群と同様に認められ、XCR1+樹状細胞除去の影響が認められなかった。しかしながら、CD8 T 細胞については、DT 投与群において抗原特異的 CD8 T 細胞が有意に減少していた (図 3)。さらに、細胞内寄生細菌に対する免疫応答を検討したところ、XCR1+樹状細胞を除去したマウスでは、CD8 T 細胞に対する免疫応答の減弱が認められた (引用文献)。これらのことから、XCR1+樹状細胞は、個体レベルにおいて、CD8 T 細胞へのクロスプレゼンテーションに必須であることが示された。これらの結果は、論文として報告した (引用文献)。

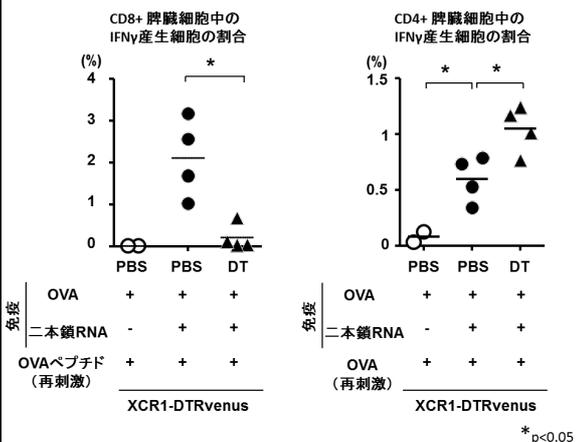


図 3. XCR1+樹状細胞の除去後の T 細胞免疫応答。XCR1-DTRvenus マウスに PBS あるいは DT を投与した後に OVA を免疫し、一週間後に OVA 特異的 T 細胞の誘導について OVA 刺激による IFN γ 産生を指標に検討した。

(3) 経口免疫寛容に対する XCR1+樹状細胞の役割

食物など経口にて取り込んだ抗原に対しては免疫応答が誘導されず、むしろ抑制される (経口寛容)。この経口寛容における XCR1+樹状細胞の役割を検討するために、XCR1-DTRvenus マウスに DT を投与して XCR1+ 樹状細胞を除去した状態で抗原

(OVA) を経口投与し(経口寛容の誘導)その後、除去した XCR1+樹状細胞が回復した後に OVA とアジュバント(二本鎖 RNA) を免疫して、抗原特異的 T 細胞の分化・活性化について検討した。野生型マウス(XCR1+/+)では、OVA を経口投与した場合、その後の抗原特異的 T 細胞の分化・活性化が抑制されていた(図4)。しかし、経口寛容誘導時に XCR1+樹状細胞を欠失させた場合(XCR1-DTRvenus マウス) CD4、CD8 T 細胞ともに、抗原特異的 T 細胞応答の抑制は認められなかった(図4)。さらに、OVA 特異的 T 細胞受容体トランスジェニックマウス(OT-II マウス)より CD4 T 細胞を精製し、それらを DT 投与後の野生型あるいは XCR1-DTRvenus マウスに移入し、OVA の経口投与による Treg の誘導について検討した。その結果、XCR1-DTRvenus マウスでは腸管膜リンパ節での転写因子 Foxp3+ Treg の誘導が、野生型マウスのそれと比べて抑制されていた。このように、XCR1+樹状細胞は、Treg の誘導を介して経口寛容の誘導に重要な働きをしていることが示唆された。

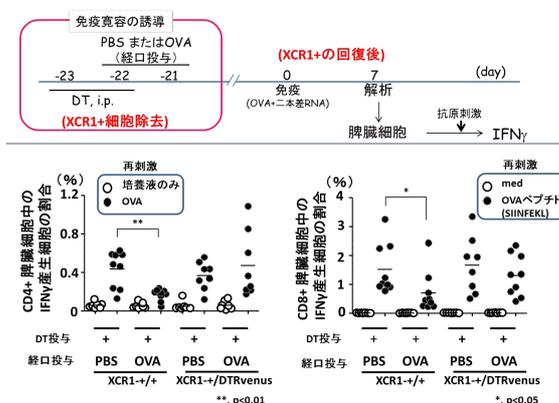


図4. 経口寛容誘導における XCR1+樹状細胞の機能的役割

<引用文献>

Steinman RM, Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol.*、 30 巻、 2012、 1-22

Kaplan DH, Jenison MC, Saeland S, Shlomchik WD, Shlomchik MJ, Epidermal langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity. *Immunity.*、 23 巻、 2005、 611-620

Bobr A, Olvera-Gomez I, Igyarto BZ, Haley KM, Hogquist KA, Kaplan DH, Acute ablation of Langerhans cells enhances skin immune responses. *J Immunol.*、 185 巻、 2010、 4724-4728

Edelson BT, KC W, Juang R, Kohyama M, Benoit LA, Klekotka PA, Moon C, Albring JC, Ise W, Michael DG, Bhattacharya D,

Stappenbeck TS, Holtzman MJ, Sung SS, Murphy TL, Hildner K, Murphy KM, Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha+ conventional dendritic cells. *J Exp Med.*、 207 巻、 2010、 823-836

Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Cárcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, Powrie F, A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med.*、 204 巻、 2007、 1757-1764

Yamazaki C, Sugiyama M, Ohta T, Hemmi H, Hamada E, Sasaki I, Fukuda Y, Yano T, Nobuoka M, Hirashima T, Iizuka A, Sato K, Tanaka T, Hoshino K, Kaisho T, Critical roles of a dendritic cell subset expressing a chemokine receptor, XCR1. *J Immunol.*、 190 巻、 2013、 6071-6082

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 4 件)

Yamazaki S, Nishioka A, Kasuya S, Ohkura N, Hemmi H, Kaisho T, Taguchi O, Sakaguchi S, Morita A. Homeostasis of thymus-derived Foxp3+ regulatory T cells is controlled by ultraviolet B exposure in the skin. *J Immunol.*、 査読有、 193 巻、 2014、 5488-5497

DOI: 10.4049/jimmunol.1400985.

Zhao H, Aoshi T, Kawai S, Mori Y, Konishi A, Ozkan M, Fujita Y, Haseda Y, Shimizu M, Kohyama M, Kobiyama K, Eto K, Nabekura J, Horii T, Ishino T, Yuda M, Hemmi H, Kaisho T, Akira S, Kinoshita M, Tohyama K, Yoshioka Y, Ishii KJ, Coban C. Olfactory plays a key role in spatiotemporal pathogenesis of cerebral malaria. *Cell Host Microbe.*、 査読有、 15 巻、 2014、 551-563

DOI: 10.1016/j.chom.2014.04.008.

Yamazaki C, Sugiyama M, Ohta T, Hemmi H, Hamada E, Sasaki I, Fukuda Y, Yano T, Nobuoka M, Hirashima T, Iizuka A, Sato K, Tanaka T, Hoshino K, Kaisho T. Critical roles of a dendritic cell subset expressing a chemokine receptor, XCR1. *J Immunol.*、 査読有、 190 巻、 2013、 6071-6082

DOI: 10.4049/jimmunol.1202798.

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, Aina A, Suzuki T, Hasegawa H, Toyama-Sorimachi N, Kohara H, Nagasawa T, Kaisho T. Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development. *Blood*. 査読有、120 巻、2012、4733-4743
DOI: 10.1182/blood-2012-06-436527.

〔学会発表〕(計 8 件)

Sasaki I, Fukuda S, Orimo T, Hemmi H, Kaisho T. Roles of Arginase I in Cholera toxin-induced production of proinflammatory cytokines. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会. 2014 年 12 月 10 日 ~ 12 日. 京都国際会館 (京都府京都市).

Ohta T, Okura S, Hemmi H, Sugiyama M, Sasaki I, Yamazaki C, Hoshino K, Kaisho T. XCL1-and XCR1 are involved in intestinal immune homeostasis by dendritic cells. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会. 2014 年 12 月 10 日 ~ 12 日. 京都国際会館 (京都府京都市).

Yamazaki S, Nishioka A, Ohkura N, Hemmi H, Kaisho T, Taguchi O, Sakaguchi S, Morita A. Homeostasis of thymus-derived Foxp3+ regulatory T cells is controlled by ultraviolet B exposure in the skin. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会. 2014 年 12 月 10 日 ~ 12 日. 京都国際会館 (京都府京都市).

Hemmi H, Sugiyama M, Ohta T, Sasaki I, Yamazaki C, Tanaka T, Hoshino K, Kaisho T. Function of XCR1-expressing dendritic cells in oral tolerance. 第 42 回日本免疫学会総会・学術集会. 2013 年 12 月 11 日 ~ 13 日. 幕張メッセ (千葉県千葉市).

Ohta T, Hemmi H, Yamazaki C, Sugiyama M, Sasaki I, Hoshino K, Kaisho T. A novel mechanism to regulate the intestinal intraepithelial T lymphocytes by XCR1-expressing dendritic cells. 第 42 回日本免疫学会総会・学術集会. 2013 年 12 月 11 日 ~ 13 日. 幕張メッセ (千葉県千葉市).

Sugiyama M, Hemmi H, Yamazaki C, Ohta T, Sasaki I, Hoshino K, Kaisho T. Analysis of in vivo function of XC chemokine receptor-expressing dendritic cells. 第 41 回日本免疫学会総会・学術集会. 2012 年 12 月 5 日 ~ 7 日. 神戸国際会議場・神戸国際展示場・神戸ポートピアホテル (兵庫県神戸市).

Sasaki I, Hoshino K, Hemmi H, Sugiyama M, Yamaguchi T, Kaisho T. Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell development in bone marrow. 第 41 回日本免疫学会総会・学術集会. 2012 年 12 月 5 日 ~ 7 日. 神戸国際会議場・神戸国際展示場・神戸ポートピアホテル (兵庫県神戸市).

Hemmi H, Yamazaki C, Sugiyama M, Ohta T, Sasaki I, Hoshino K, Kaisho T. Ablation of a dendritic cell subset expressing XC chemokine receptor 1 in vivo. The 12th International Symposium on Dendritic Cells. 2012 年 10 月 7 日 ~ 11 日. 大邱 (韓国).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

邊見 弘明 (HEMMI, Hiroaki)
和歌山県立医科大学・先端医学研究所・
准教授
研究者番号 : 20451924

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

福田 有里 (FUKUDA, Yuri)
田中 有理子 (TANAKA, Yuriko)