

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590576

研究課題名(和文) マウス及ヒト新規樹状細胞前駆細胞の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification of mouse and human DC progenitor

研究代表者

小内 伸幸 (Onai, Nobuyuki)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・講師

研究者番号：50323605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：樹状細胞(dendritic cell: DC)は強力な抗原提示能力を持ち、病原性微生物に対する免疫反応を指導させる重要な細胞である。二次リンパ組織内では従来型DC(cDC)と形質細胞様DC(pDC)に大別される。我々はDCサブセットのみに分化する共通DC前駆細胞(CDP)を発見した。この本研究では新規DC前駆細胞を発見した。DC前駆細胞はpDC分化と維持に必須な転写因子E2-2を高度に発現し、優れたpDCへの分化能を示した。さらにCDPが多能性前駆細胞から直接分化してくることを明らかにした。これらの結果は、免疫学において新規のDC分化経路図を示す学術的に重要な研究成果である。

研究成果の概要(英文)：Dendritic cells (DCs) are professional antigen and induce immune response. In the second lymphoid organ, DCs are subdivided into two sunsets: conventional DCs (cDCs) and plasmacytoid DCs (pDCs). Previously, we identified DC-restricted progenitors, CDPs based on the cytokine receptors expressions. The CDPs gave rise to many cDCs but poor pDC developmental potential. In this study, we identified new DC progenitor with prominent pDC development potential. The new DC progenitor highly expressed E2-2, which is essential transcription factor for pDC development. The new DC progenitors gave rise to only DC sunsets but no other lineages. Based on these data, we proposed the CDPs are comprised of two progenitors: CD115+ and CD115- CDPs. Furthermore, we found that lympho-primed multipotent progenitors (LMPPs) directly give rise to both CD115+ and CD115- CDPs in vivo. These results revised load map of DC development and shed new light on the immunology and hematopoiesis.

研究分野：免疫学

キーワード：樹状細胞 前駆細胞 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は自己増殖能と多分化能を持ち、一生に渡って造血を維持する。一方で多くの造血幹細胞は定常状態では活動休止状態である。骨髄には、このような幹細胞性を維持する微小環境、ニッチ細胞が存在する。ニッチ細胞による造血幹細胞の機能制御に関する知見は多く蓄積しているが、他の血液前駆細胞への役割に関しては不明である。樹状細胞 (dendritic cell: DC) は生体内に侵入してきた病原性微生物を素早く察知し、これらを排除するために免疫反応を始動・制御する重要な細胞である。マウス二次リンパ節には従来型 DC (conventional DCs: cDCs) と形質細胞様 DC (plasmacytoid DCs: pDCs) に 2 つのサブセットに大別される。我々はこの DC サブセットの源となる共通 DC 前駆細胞 (common DC progenitor: CDP) を発見した。また、CDP は DC 分化に重要なサイトカイン受容体である Flt3 と M-CSF 受容体 (CD115) を発現しており、Flt3+CD115+であった。この CDP は常に DC へと分化し、免疫システムの恒常性維持に貢献している。しかし、CD115+ CDP は優れた cDCs への分化能を有していたが、pDC への分化能は僅かであった。このため CDP 以外の pDC の前駆細胞の存在が示唆されていた。

遺伝子改変マウスを用いた解析から、各 DC サブセットに重要な転写因子は同定されていたが、CDP から各 DC サブセットへの分化決定メカニズムや転写因子誘導メカニズムに関しては多くのことが不明であった。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、マウス骨髄細胞を再度、詳細に解析して、pDC の分化起源となりうる新規の DC 前駆細胞を第一の目的とした。

また、遺伝子改変マウスや siRNA を用い

た解析から、各 DC 分化に関与する転写因子の発現誘導に関与するサイトカインを同定し、各 DC サブセットへの細胞運命決定機構を明らかにする。

3. 研究の方法

1) マウス骨髄細胞の CDP を含まない細胞分画を、pDC 分化能を指標にして新規 DC 前駆細胞の候補細胞を絞り込む

2) *in vitro* colony forming assay を用いて各ミエロイド系細胞、あるいは B 細胞への分化能を検討する。

3) 純化した DC 前駆細胞を *in vitro* において Flt3 リガンドを加えて各 DC サブセットへの分化能を検討する。

4) 純化した DC 前駆細胞を X 線照射したマウスあるいは 4 週齢の未処理野生型マウスに移植し、各臓器における DC サブセットへの分化能を検討する。

5) CDP に作用して各 DC サブセットへの分化決定に関与すると予想されるサイトカインで刺激し、分化能を検討する。その後、各 DC サブセット分化決定に関与する転写因子の発現を定量的 PCR にて検討する。

4. 研究成果

1) 新規 DC 前駆細胞は従来の CDP とは異なり、Flt3+CD115-細胞であった。

2) Flt3+CD115-前駆細胞を純化し、*in vitro* において各系列細胞や DC サブセットへの分化能を検討した。この結果、Flt3+CD115-前駆細胞はミエロイド、エリスロイド、B 細胞系のコロニーは全く形成せず、DC サブセットのみに分化した。また驚くべきことに、従来の CDP と比較して約 6~7 倍優れた pDC への分化能を示した。

3) Flt3+CD115-前駆細胞を致死量の X 線を照射したマウス、あるいは 4 週齢のマウスに移植し、各臓器における分化してきた細胞を解析した結果、DC サブセットのみに分

化した。さらに *in vitro* の分化能と相関するように *in vivo* においても従来の CDP と比較して約 5 倍の優れた pDC への分化能を示した。

4) 定量的 PCR 方法によって DC 分化系譜関連遺伝子の発現を検討したところ、Flt3⁺CD115⁻前駆細胞は pDC 分化制御に必要な転写遺伝子 E2-2 を高度に発現していた。

5) これらの結果から従来の CDP を CD115⁺ CDP、今回新たに発見した Flt3⁺CD115⁻前駆細胞を CD115⁻ CDP とし、2 つの前駆細胞をまとめて CDP と提案した。

6) これら 2 つの CDP の分化起源なる前駆細胞を検討した結果、Lympho-primed multipotent progenitors (LMPP) から直接 CDP が *in vivo* において分化してくることを明らかにし、新しい DC 分化経路図を提案した。

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 6 件)

1. Williams, M.*, Ginhoux, F.*, Jakubzick, C.*, Naik, S.H.*, Onai, N.*, Schraml, B.U.*, Segura, E.*, Tussiwand, R.*, and Yona, S.*

Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny.

Nat. Rev. Immunol. 14, 571-578, (2014)

2. Onai N and Ohteki T.* Bipotent or Oligopotent? A macrophage and DC progenitor revisited. *Immunity* 41, 5-7, (2014)

3. Ohyagi H., Onai N., Sato T., Yotsumoto Y., Liu J., Akiba H., Yagita H., Atarashi K., Honda K., Roers A., Müller W., Kurabayashi K., Hosoi-Amai M., Takahashi N., Hirokawa M., Matsushima K., Sawada K., & Ohteki T.* Monocyte-derived dendritic cells perform hemophagocytosis to fine-tune excessive immune responses. *Immunity* 39,

584-598, (2013)

4. Onai N., Kurabayashi K., Hosoi-Amai M., Toyama-Sorimachi N., Matsushima K., Inaba K., & Ohteki T.* A clonogenic progenitor with prominent plasmacytoid dendritic cell developmental potential. *Immunity* 38, 943-957, (2013)

5. Guo YM., Ishii K., Hirokawa M., Tagawa H., Ohyagi H., Michishita Y., Ubukawa K., Yamashita J., Ohteki T., Onai N., Kawakami K., Xiao W., & Sawada K.* CpG-ODN 2006 and human parvovirus B19 genome consensus sequences selectively inhibit growth and development of erythroid progenitor cells. *Blood* 115, 4569-4579, (2010)

6. Asano J., Tada H., Onai N., Sato T., Fujimoto Y., Fukase K., Suzuki A., Mak TW, & Ohteki T.* Nucleotide oligomerization binding domain-like receptor signaling enhances dendritic cell-mediated cross-priming *in vivo*. *J. Immunol.* 184, 726-745, (2010)

[学会発表](計 11 件)

招待講演

1. Onai N. Identification of a new dendritic cell progenitor with prominent plasmacytoid dendritic cell developmental potential. The 9th International Symposium of the Institute Network, 2014, Osaka

2. Onai N. Plasmacytoid dendritic cell development. The 22nd International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages, 2014, Kobe

3. Onai N., Ohyagi H., Sawada K., & Ohteki T. Monocyte derived dendritic cells perform hemophagocytosis to fine-tune excessive immune responses. The 20th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophage, 2012, Tokyo

シンポジウム

1. 小内伸幸：単球由来樹状細胞樹状細胞による血球貪食と免疫制御 第9回 先端血液学セミナー，東京，6月7日，2014，東京

2. 小内伸幸：第22回 東京免疫フォーラム，血球貪食を行う単球由来樹状細胞による免疫制御，3月15日 2013，東京

3. 小内伸幸：マウス血球貪食症候群の病態発症機構の解明と新規治療方法の開発。

第3回 難治疾患共同研究拠点シンポジウム 7月31日 2012，東京
ワークショップ

1. Onai N, Toyama-Sorimachi N, Matsushima K, Inaba K, and Ohteki T.: Identification of M-CSFR⁻ dendritic cell progenitors with potential: Revised road map for dendritic cell development. 42th Annual meeting of the Japanese Society for Immunology, December 11th ~ 13th 2013, Makuhari

2. Onai N, Ohyagi H, Sato T, Yotsumoto S, Kurabayashi K, Sawada K, and Ohteki T: Monocyte derived dendritic cells perform hemophagocytosis to fine-tune excessive immune responses during chronic virus infection. 41th Annual meeting of the Japanese Society for Immunology, December 5th ~ 7th 2012, Kobe

3. Onai N, Ohyagi H, and Ohteki T: 単球由来樹状細胞による新規免疫制御機構。第22回 Kyoto T Cell Conference 学術集会，7月6日～7日 2012，京都

4. Onai N, Ohyagi H, Sato T, Yotsumoto S, Sawada K, and Ohteki T: Inflammatory monocyte-derived dendritic cells produce IL-10 dependent on hemophagocytosis and suppress excessive immune response during inflammation and virus infection. 40th Annual meeting of the Japanese Society for Immunology, November 27th ~ 29th 2011, Makuhari

5. Onai N, Ohyagi H, and Ohteki T: 樹状細胞による血球貪食は過剰な免疫応答を制御する。第21回 Kyoto T Cell Conference 学術集会，6月10日～11日 2011，京都

〔図書〕(計 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：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/bre/index.htm>

↓

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小内 伸幸 (ONAI Nobuyuki)

東京医科歯科大学難治疾患研究所生体防御学分野・講師

研究者番号：50323605

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：