

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293117

研究課題名(和文) CD4陽性通常型樹状細胞のDCIR2による機能制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the role of DCIR2 in the function of CD4+conventional dendritic cells

研究代表者

佐藤 克明 (Sato, Katsuaki)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：40301147

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではDCIR2がCD4+cDCsの活性化を制御することで炎症反応とT細胞免疫応答を抑制することを明らかにした。DCIR2欠損マウスではWTマウスと比較して、CD4+cDCsのTLR介在性サイトカイン産生能とT細胞活性化能が増強していた。DCIR2欠損マウスではWTマウスと比較してTLR介在性炎症反応が亢進していた。また、DCIR2欠損マウスではWTマウスと比較して抗原刺激後のT細胞免疫応答と自己免疫病態の進展が亢進していた。以上の結果から、DCIR2はCD4+cDCsの活性化を抑制し、炎症反応、抗原特異的T細胞応答、免疫病を制御することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Here, we show that DCIR2 is a regulatory receptor for the activation of CD4+cDCs that impairs inflammation and T-cell immunity. Dcir2<sup>-/-</sup>-CD4+cDCs show enhanced cytokine production and T-cell priming following TLR-mediated activation. Furthermore, Dcir2<sup>-/-</sup> mice exhibit TLR-mediated hyperinflammation. Upon antigenic immunization, Dcir2<sup>-/-</sup> mice show not only augmented T-cell responses but also progressive autoimmune pathogenesis. Thus, our findings highlight roles of Clec4A4 in regulation of the function of CD4+cDCs for control of the magnitude and quality of immune response.

研究分野：免疫学

キーワード：樹状細胞 自然免疫 適応免疫 T細胞 機能抑制分子

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(cDCs)と形質細胞様樹状細胞(pDCs)に大別される複数のサブセットから構成される(Allergol Int.・2007)。さらに、cDCsはCD4とCD8αの発現の有無により主要なサブセットであるCD4<sup>+</sup>cDCsとCD8α<sup>+</sup>cDCsやCD4<sup>+</sup>CD8α<sup>-</sup>cDCsは分けられる。

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(T<sub>reg</sub>)細胞の生成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と考えられている(Birnberg et al. Immunity・2008; Ohnmacht et al. J Exp Med.・2009; Methods Mol Biol.・2009)。しかしながら、生体内での免疫応答における個々のサブセットの役割やその機能を制御する機構についてはいまだ明らかにされていない。

申請者はこれまでに生体内でのDCsサブセットによる免疫応答制御機構の解明を目視して、遺伝子改変マウスの作製と解析を主体として研究を進めてきた。現在までの得られた主な知見として、pDCsの特異的発現分子としてDNAマイクロアレイ解析により同定した“Siglec-H”とpDCsそれ自身を標的としたSiglec-H欠損マウスとpDC欠失マウスの作製と解析により、pDCsがウイルス感染による炎症反応の惹起に関与するのみならずI型インターフェロン(IFN)産生と細胞傷害性T細胞(CTL)生成を介した宿主からのウイルスの排除に必須であることを世界で初めて明らかにし、pDCsの機能がSiglec-Hにより制御されることも見出した(Immunity・2011)。さらに、CD8α<sup>+</sup>CD205<sup>+</sup>cDC欠失マウスを作製して、CD8α<sup>+</sup>CD205<sup>+</sup>cDCsがT細胞免疫応答の制御とT細胞恒常性維持において重要な役割を担うことも明らかにした(Proc. Natl. Acad. Sci. USA・2012)。これら一連の研究成果は樹状細胞研究での重要な位置づけとして評価されている(Liu et al. Immunity・2011)。

申請者は先にCD4<sup>+</sup>cDCsの機能制御機構の解明を目的として、DNAマイクロアレイ解析によりその新規特異的発現分子として、Cタイプレクチンレセプターファミリーに属するClec4a4を同定した(未発表データ・2006)。現在のところClec4a4のリガンドと機能は不明であるが、細胞内ドメインにITIM(immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif)様配列(ITYAEV)を有することから細胞内シグナル伝達を介して

CD4<sup>+</sup>cDCsの機能を制御することが示唆された。一方、他の研究グループからClec4a4はDC特異的抗体クローン33D1により認識され、DCIR(dendritic cell immunoreceptor)2として報告されている(Dudziak et al. Science・2007)。

2. 研究の目的

本研究課題では、CD4<sup>+</sup>cDCsのDCIR2を介する機能制御機構を明らかにするとともにその免疫応答における役割を解明する。

申請者は現在までにDCIR2のITIM様配列(ITYAEV)をコードする領域を含むエクソン1~2を標的としたDCIR2欠損マウスを作製した(図1A)。DCIR2欠損マウスにおいてCD4<sup>+</sup>cDCsではDCIR2の特異的発現欠損が認められる(図1B、図1C)。すなわち、DCIR2欠損マウスを用いてCD4<sup>+</sup>cDCsのDCIR2による機能制御とその分子基盤を明らかにするとともに生体内でのDCIR2を介する免疫学的恒常性の維持、炎症反応、抗原特異的T細胞応答、微生物(細菌・ウイルス)感染免疫応答、自己免疫病態などの免疫応答の制御を解明する。

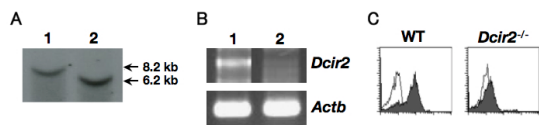


図1 DCIR2欠損マウスの作製とDCIR2の発現の欠損

A. 野生型(WT)マウス(lane 1)、DCIR2欠損マウス(lane 2)のゲノムDNA-PCR解析。WT-allele、DCIR2欠損-alleleではそれぞれ8.2 Kb、6.2 Kbのバンドが検出される。

B. CD4<sup>+</sup>cDCsにおけるRT-PCR解析。WT CD4<sup>+</sup>cDCs(lane 1)ではDCIR2のPCR産物(700 bp)の発現が認められるが、DCIR2欠損CD4<sup>+</sup>cDCs(lane 2)ではその発現は認められない。

C. CD4<sup>+</sup>cDCsにおけるFACS解析。WT CD4<sup>+</sup>cDCsではDCIR2の発現が認められるが、DCIR2欠損CD4<sup>+</sup>cDCsではその発現は認められない。

本研究課題の特色・独創的な点は、DCIR2欠損マウスを用いてCD4<sup>+</sup>cDCsの免疫応答における生理学的な役割及びその制御機構の分子基盤を初めて証明することが挙げられる。

予想される結果では、WT CD4<sup>+</sup>cDCsと比較してDCIR2欠損CD4<sup>+</sup>cDCsでは活性化後にMHC分子と共刺激分子の発現がより亢進してT細胞活性化能が増強するとともに、活性化シグナル伝達分子の機能亢進によるサイトカイン産生能の増強が予想される。さらに、WTマウスと比較して、DCIR2欠損マウスでは炎症反応、抗原特異的T細胞応答、微生物(細菌・ウイルス)感染免疫応答免疫、病態病態が

亢進することが考えられる。

本研究課題の意義として、これまで不明であった CD4<sup>+</sup>cDCs の免疫調節機能とその分子基盤が明らかとなり、DCs による免疫応答制御に関わる新たな概念が確立される。

自己免疫疾患、アレルギー疾患などの免疫疾患の発症・増悪における免疫異常には DCs の量的・質的動態変化が関与していることが強く示唆されている。従って、これらの疾患での CD4<sup>+</sup>cDCs の性状と動態及び機能を解析することにより、発症・増悪機構の解明や新しい治療法の開発に展開し、特にその応用面について CD4<sup>+</sup>cDCs を標的とした分子創薬の開発が期待される。

### 3. 研究の方法

本研究計画・方法の概要は以下の通りである。

#### 1. CD4<sup>+</sup>cDCs の機能に対する DCIR2 による制御機構の解明

WT マウス、DCIR2 欠損マウスからの CD4<sup>+</sup>cDCs について細胞表面分子発現、サイトカイン産生能、細胞内シグナル伝達、T 細胞活性化能などの性状差異を比較検討した。

#### 2. 生体内での免疫応答における DCIR2 の役割の解明

定常状態および炎症状態において WT マウス、DCIR2 欠損マウスでの免疫細胞の構成、サイトカイン産生、抗原特異的 T 細胞応答、微生物（細菌・ウイルス）感染免疫応答、自己免疫病態を比較検討した。

##### 1) DCIR2 欠損 cDCs の機能解析

WT マウス、DCIR2 欠損マウスの免疫組織（脾臓・リンパ節）から分離した CD4<sup>+</sup>cDCs について、細胞表面分子発現、サイトカイン産生能、細胞内シグナル伝達、T 細胞活性化能、T 細胞分化誘導能等の機能の比較検討を行った。

##### 2) 定常状態での DCIR2 欠損マウスの免疫学的性状解析

WT マウス、DCIR2 欠損マウスにおける免疫組織（脾臓、リンパ節、腸管）での CD4<sup>+</sup>T 細胞サブセット（T<sub>H</sub>1 細胞・T<sub>H</sub>17 細胞・Foxp3<sup>+</sup>T<sub>reg</sub> 細胞）やその他の免疫細胞の存在比率・細胞数を比較検討した。

##### 3) 炎症反応での DCIR2 欠損マウスの機能解析

WT マウス、DCIR2 欠損マウスに TLR リガンドを投与し、サイトカイン産生能と急性炎症致死、cDCs 活性化能等の炎症反応の比較検討を行った。

##### 4) DCIR2 欠損マウスの抗原特異的 T 細胞免疫応答の解析

WT マウス、DCIR2 欠損マウスに抗原の免疫あるいは微生物を感染させ、T 細胞分裂能、T 細胞活性化能、誘導性制御性 T 細胞生成能等の抗原特異的 T 細胞免疫応答の比較検討を行った。

##### 5) 微生物感染免疫応答の解析

WT マウス、DCIR2 欠損マウスに LM-OVA や HSV-OVA を感染させ、サイトカイン産生能と感染致死、CTL 誘導能等の感染免疫応答の比較検討を行った。

##### 6) 免疫病態の解析

WT マウス、DCIR2 欠損マウスでの自己免疫性脳脊髄炎（EAE）について病態評価（発症率・臨床症状）、免疫学的性状解析、T 細胞活性化能等の比較検討を行った。

### 4. 研究成果

#### 1) DCIR2 欠損 cDCs の機能解析

TLR リガンド刺激後、WT マウスの CD4<sup>+</sup>cDCs と比較して、DCIR2 欠損マウスの CD4<sup>+</sup>cDCs では細胞表面分子発現、サイトカイン産生能、細胞内シグナル伝達、T 細胞活性化能、T 細胞分化誘導能等の機能増強が認められた。

#### 2) 定常状態での DCIR2 欠損マウスの免疫学的性状解析

WT マウスと比較して、DCIR2 欠損マウスでは免疫組織での CD4<sup>+</sup>T 細胞サブセットやその他の免疫細胞の存在比率・細胞数に差は認められなかった。

#### 3) 炎症反応での DCIR2 欠損マウスの機能解析

WT マウスと比較して、DCIR2 欠損マウスでは TLR リガンド投与後、サイトカイン産生能の亢進、急性炎症致死の増加、cDCs 活性化能の増強が認められた。

#### 4) DCIR2 欠損マウスの抗原特異的 T 細胞免疫応答の解析

WT マウスと比較して、DCIR2 欠損マウスでは抗原免疫後や微生物感染後、T 細胞分裂能や T 細胞活性化能の亢進が認められたが、誘導性制御性 T 細胞生成能には差は認められなかった。

#### 5) 微生物感染免疫応答の解析

WT マウスと比較して、DCIR2 欠損マウスでは抗原免疫後や微生物感染後、サイトカイン産生能の亢進、感染致死の低下、CTL 誘導能の増強が認められた。

## 6) 免疫病態の解析

WT マウスと比較して、DCIR2 欠損マウスでは EAE の病態増悪、自己抗体産生の亢進、自己反応性 T 細胞応答の増強が認められた。

以上の結果から、DCIR2 は CD4<sup>+</sup>cDCs の活性化を抑制し、炎症反応、抗原特異的 T 細胞応答、感染免疫応答、免疫病態を制御することが明らかとなった。

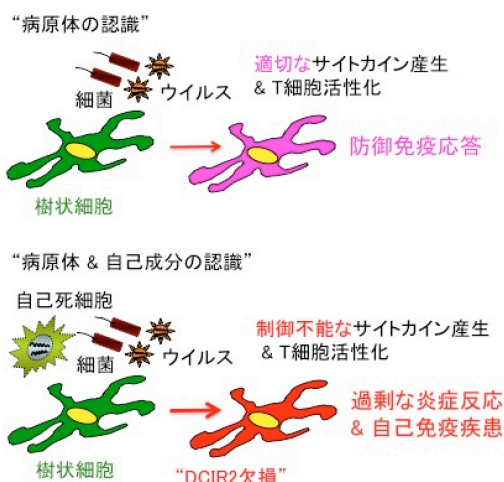


図2 DCIR2 による樹状細胞の活性化と免疫応答の制御

DCIR2 の制御下では、樹状細胞は細菌やウイルスなどの病原体（抗原）を認識後、適切なサイトカイン産生と T 細胞活性化により防御免疫応答を惹起する。一方、Clec4A4 の欠損下では、樹状細胞は病原体成分や自己死細胞からの自己成分を認識後、制御不能なサイトカイン産生と T 細胞活性化により過剰な炎症反応や自己免疫疾患を導く。

## 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. Uto, T., Fukaya, T., Takagi, H., Arimura, K., Nakamura, T., Kojima, N., Malissen, B., and Sato, K. Clec4A4 is a regulatory receptor for dendritic cells that impairs inflammation and T-cell immunity. *Nat. Commun.*, 査読有, 7: 11273, 2016.
2. 佐藤克明. 樹状細胞サブセットと機能. *アレルギー*, 査読無, 65(1):11-16, 2016.
3. 佐藤克明・宇都倫史・深谷知宏・高木秀明.

樹状細胞サブセットとその機能. *臨床免疫・アレルギー科*, 査読無, 63(6):563-568, 2015.

[学会発表] (計 2 件)

1. 宇都倫史、深谷知宏、高木秀明、有村慶一、中村雄、佐藤克明、「DCIR2 is a regulatory receptor for the activation of conventional dendritic cells that impairs inflammation and T-cell immunity in vivo」、第 44 回日本免疫学会総会、北海道・札幌市、2015 年 11 月 20 日
2. 宇都倫史、深谷知宏、高木秀明、有村慶一、佐藤克明、「DCIR2 is an inhibitory receptor for the TLR-mediated activation of conventional dendritic cells that regulates inflammation and T cell immunity in vivo」、第 43 回日本免疫学会総会、京都国際会館（京都府・京都市）、2014 年 12 月 10 日

[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.med.miyazaki-u.ac.jp/meneki/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
佐藤 克明 (SATO, Katsuaki)  
宮崎大学・医学部・教授  
研究者番号：40301147

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：