

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26253029

研究課題名(和文) 樹状細胞前駆細胞の包括的理解と治療応用技術基盤

研究課題名(英文) Comprehensive understanding of dendritic cell progenitor and its therapeutic application basis

研究代表者

橋木 俊聡 (OHTEKI, Toshiaki)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：50233200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,000,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子E2-2は形質細胞様樹状細胞(pDC)の分化・生存に必須であるが、従来型樹状細胞(cDC)分化には影響しない。本研究では、E2-2レポーターマウスを作製し、共通DC前駆細胞(CDP)中のE2-2高発現分画がpDCにのみ分化することを見出した。これとは対照的に、小腸では、同E2-2高発現CDPが、小腸に豊富に存在するIL-3、IL-5、GM-CSF依存性に、CD103陽性cDCに分化転換した。同CD103陽性cDCは、*ex vivo*においてFoxp3陽性Tregを誘導した。E2-2高発現CDPは可塑性を有し、小腸における免疫寛容の成立に貢献していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Transcription factor E2-2 is essential for the development of plasmacytoid dendritic cells (pDCs) but not conventional DCs (cDCs). In this study, we generated E2-2 reporter mice and demonstrated that an E2-2high fraction among common DC progenitors (CDPs) strictly gave rise to pDCs in the presence of Flt3 ligand *ex vivo* or in the secondary lymphoid organs when transferred *in vivo*. However, in the small intestine, some of these E2-2high progenitors differentiated into cDCs that produced retinoic acid. This transdifferentiation was driven by signaling via the common receptor, a receptor for the cytokines IL-3, IL-5 and GM-CSF, which are abundant in the gut. In the presence of GM-CSF and Flt3 ligand, E2-2high-progenitor-derived cDCs consistently induced Foxp3+ regulatory T cells *ex vivo*. Our findings reveal the commitment and flexibility of E2-2high progenitor differentiation, and imply that pertinent tuning machinery is present in the gut microenvironment.

研究分野：免疫学

キーワード：樹状細胞 E2-2 pDC cDC CDP CD103陽性cDC Treg 免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

1973年、ラルフ・スタインマンによって発見された樹状細胞 (dendritic cell, DC) は、現在では免疫の司令塔として位置付けられ、ウイルス感染などの緊急時における免疫応答の誘導のみならず、定常状態における免疫寛容の維持に重要な役割を担っている (Nature 392, 245 (1998))。DC は、抗原提示能に優れた従来型 DC (conventional DC, cDC) と、病原体や自己の核酸を認識して大量の I 型インターフェロンを産生する形質細胞様 DC (plasmacytoid DC, pDC) に 2 分される (Annu Rev Immunol 23, 275 (2005))。しかしながら DC 分化系譜は不明な点が多く、また、DC の高い疾患治療応用ポテンシャルにも拘らず、DC の稀少性・短命性などにより、奏効しているとは言い難い。これら未解決な問題を克服するため、申請者は、スイスの研究グループとの共同研究として、DC だけを生み出す前駆細胞を初めて同定した (Nat Immunol 8, 1207 (2007))。ところが、この DC 前駆細胞から作られる大部分の DC が cDC であったことから、pDC の源となる DC 前駆細胞の探索を行い、その同定にも成功した (Immunity 38, 943 (2013))。新しい DC 前駆細胞は、過去に報告したものに比べ格段に優れた pDC 産生能力を持ち、pDC の分化および生存に必須の転写因子 E2-2 (Cell 135, 37 (2008)) を高発現していた。2 つの DC 前駆細胞をまとめて common DC progenitor (CDP) と再定義し、さらに M-CSF 受容体 (M-CSFR) の発現の違いから、前者を M-CSFR⁺CDP、新たに同定したものを M-CSFR⁻CDP と定めた (図 1)。1 個の CDP から約 500-1,000 個もの新鮮な DC が生産可能であった。

2. 研究の目的

既述のように、2 種類の CDP (M-CSFR⁺CDP、M-CSFR⁻CDP) の同定に成功した。しかしながら、cDC あるいは pDC だけを生み出す完全にコミットした CDP は未同定であり、これを同定することは、DC 分化系譜上での段階で各 DC サブセットへの運命決定が起こるのかという基礎研究としての重要性だけでなく、cDC あるいは pDC だけを生み出す CDP の使い分けを可能にする応用技術開発の点からも重要であった。そこで、cDC、pDC 分化に重要な転写因子のレポーターマウスを作製し、それら転写因子を高発現する CDP 分画を単離・精製して DC 分化能を検討することにより、cDC あるいは pDC だけを生み出す CDP の同定を目指した。2 つ目は、CDP の骨髄内ニッチの実体解明、すなわち CDP に分化するために、さらには CDP が cDC や pDC へ分化の方向性を決定するために、どのような間葉系細胞と共局在さらには相互作用しているのか明らかにすることを目的とした。3 つ目は、ストレス環境下における DC 前駆細胞の可塑性を明らかにすることを目的とした。一度分化の方向性が cDC あるいは pDC にコミットした CDP

が“生理的炎症の場”として知られる腸粘膜組織においてどのような分化様式を示すのか、DC 分化の可塑性という観点から評価した。4 つ目は、マウス CDP を標的とした治療基盤技術の確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス

C57BL/6 マウス (Clea)、B6.SJL 及び OTII マウス (Taconic)、CD11c-DTR マウス (Jackson)、 $\beta c^{-/-}$ マウス (熊本大学西中村先生より供与)、E2-2/IRF8 レポーターマウス (筑波大学で受託作製) を各種実験に用いた。すべての動物実験は、東京医科歯科大学実験動物委員会及び遺伝子組換え生物等実験安全委員会の承認を得て実施した。

(2) DC 除去可能な骨髄キメラマウスの作製

B6.SJL x CD11c-DTR (CD45.1⁺CD45.2⁻) マウス由来の骨髄細胞を致死量放射線照射 B6.SJL マウスに移植した。8 週間後、DT (8ng/g body weight) を投与して DC を除去後、さらに CDP 亜集団を移入して in vivo における分化能を解析した。

(3) フローサイトメーター解析

CDP 亜集団は FACS Aria III で単離精製した。CDP 亜集団、同細胞由来の DC、間葉系細胞、T 細胞の解析は、各種蛍光色素ラベル抗体で細胞を染色後、FACSCant II で行った。

(4) ALDH 活性及び Treg 分化誘導解析

調節性 T 細胞 (Treg) 分化に重要な Aldehyde dehydrogenase (ALDH) 活性は、ALDEFUOR 染色キットを用いて行った。染色特異性は ALDH インヒビター DEAB で確認した。CDP から誘導された DC と OT II T 細胞を、Ovalbumin (OVA) ペプチド、TGF β 、IL-2 と共に 5 日間培養し、Foxp3 の発現を FACSCant II で解析した。

(5) 統計学的解析

データは全て有意差検定を行い、 $P < 0.05$ を“有意差あり”と評価した。

4. 研究成果

(1) E2-2 レポーターマウスの作製

E2-2 プロモーター下流に Kusabiraorange (KuOr) 蛍光色素を組み込んだ BAC Tg マウスを作製した。同マウス骨髄および末梢における各種血液前駆細胞、血液細胞の構成は正常であった。

(2) pDC 分化に運命決定した CDP の同定

E2-2 レポーターマウスから、E2-2^{high}CDP、E2-2^{int}CDP、E2-2^{low}CDP を単離して、ex vivo で Flt3L と共培養し DC 分化能を検討した。その結果、E2-2^{high}CDP は pDC のみに、E2-2^{low}CDP は大部分 cDC に、各々分化した。また、E2-2^{int}CDP はその中間の分化能を示した。さらに、DC 除去可能な骨髄キメラマウス

を用いて *in vivo* における同前駆細胞の分化能を検討した。その結果、脾臓において *ex vivo* と同様の分化能を確認した。また、CDP 以外にも、LMPP の中に E2-2 を高発現する亜集団を見出し、分化能を同様に検討したところ、やはり pDC のみへの分化能を有していた。

(3) 小腸における E2-2^{high}CDP の分化転換

E2-2^{high}CDP は脾臓では pDC のみに分化したが、同じマウスの小腸を解析したところ、興味深いことに、E2-2^{high}CDP から一部 CD103⁺cDC が分化していることが判明した。この結果は、本来 pDC になるべき E2-2^{high}CDP が、腸の微小環境下で CD103⁺cDC に分化転換したことを示唆していたため、そのメカニズムを追求した。qPCR により、小腸に IL-3, GM-CSF, IL-5 (β c サイトカイン) が高発現していることが明らかになったため、それらサイトカイン存在下で E2-2^{high}CDP を培養した。その結果、全ての β c サイトカインにより cDC への分化転換が促進された。この結果に基づき、 β c サイトカインに対する中和抗体を用いて、あるいは β c^{-/-} E2-2 レポーターマウス由来の E2-2^{high}CDP を移入して、*in vivo* における分化能を検討した。その結果、いずれの系においても、小腸における E2-2^{high}CDP の CD103⁺cDC への分化転換が有意に抑制された。これらの結果から、小腸に高発現している β c サイトカインが E2-2^{high}CDP の CD103⁺cDC への分化転換を促していることが明らかになった。

さらに、当該分化転換の生物学的意義を検討した。E2-2^{high}CDP から分化転換により誘導された CD103⁺cDC に、Treg 分化誘導に重要な ALDH 活性が認められた。そこで同 cDC と OT II T 細胞を、OVA ペプチドと共に 5 日間培養したところ、Foxp3⁺Treg が効率よく誘導された。一方、E2-2^{high}CDP 由来の pDC (ALDH 活性陰性) と OT II T 細胞を同じ条件で培養しても Foxp3⁺Treg は出現しなかった。

これら一連の実験により、1) pDC 分化にコミットした CDP (E2-2^{high}CDP) の同定に成功した；2) E2-2^{high}CDP は可塑性を有しており、免疫寛容がより重要となる小腸では、ALDH 陽性 CD103⁺cDC を供給して Treg を効率よく誘導することによって、免疫寛容の成立維持に貢献していることが示唆された (図 1)。

(4) IRF8 レポーターマウスの解析

IRF8-Venus マウスを作製し、同マウス骨髄中に存在する cDC 前駆細胞 (pre-cDC) を IRF8 発現の有無を指標に分画精製し、各々の分化能を検討したところ、IRF8⁺pre-cDC からは CD8⁺cDC のみが誘導された。一方、CDP 中には IRF8 の発現がほとんど検出されず、DC 分化系譜上、IRF8 の発現は CDP の直下 pre-cDC から始まるということが判明した。

(5) CDP ニッチの同定

E2-2 レポーターマウスを用いて M-CSFR⁺ CDP を可視化、血管内皮細胞を抗 VE-カドへ

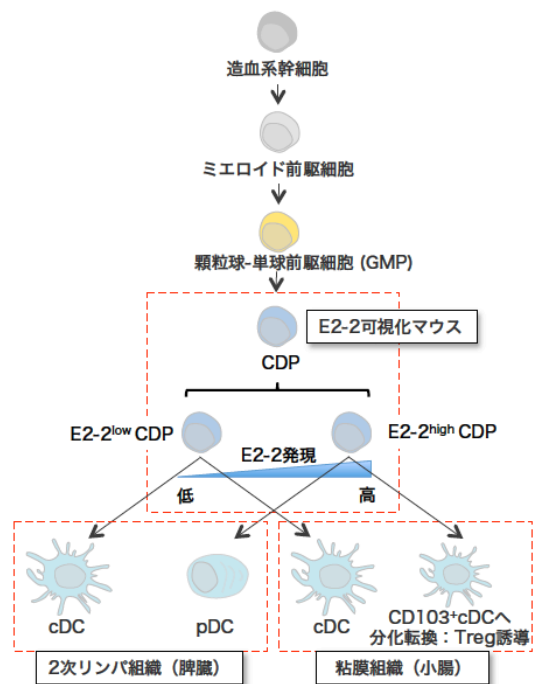


図 1 E2-2^{high}CDP の分化転換と生物学的意義

リン抗体、間葉系細胞の 1 つ CXCL12 abundant reticular (CAR) 細胞を抗 PDGFR β 抗体で染色したところ、CDP が CAR 細胞と共局在することを示唆する興味深い知見を得た。一方、E2-2 レポーターマウスでは M-CSFR⁺ CDP 可視化できないため、IRF8 レポーターマウスも試行したが、(4) で述べたように IRF8 は CDP には発現しておらず、全ての CDP を可視化することは今後の課題である。

(6) その他

抗原提示脳に優れた cDC のみに分化する CDP 分画を同定後、同 CDP を標的として OVA 遺伝子をウイルスベクターで導入し治療技術基盤を構築予定であったが、研究期間内に同定に至らなかったため、今後の課題である。

また、マウス CDP 同定に成功した成果にに基づき、ヒト臍帯血を用いてヒト CDP の同定を試行した。本プロジェクト遂行中、米国 Liu 博士らのグループからヒト CDP 同定の論文が報告された (J Exp Med 212, 385-99 (2015))。このヒト CDP 分画は我々の手でも解析済みであり、ほとんど増殖能を示さない等の所見から、CDP ではなく pDC 自身あるいは pre-pDC 様の細胞であろうと思われた。現在までに、真のヒト CDP は未同定である。これら一連の研究の過程で、偶然にもヒト共通単球前駆細胞 (common monocyte progenitor, cMoP) の同定に成功した。当該プロジェクトは挑戦的萌芽研究で主に推進しており、そちらの報告書を参照頂きたい。

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 19 件)

- ① Kawamura S, Onai N, Miya F, Sato T, Tsunoda T, Kurabayashi K, Yotsumoto S, Kuroda S, Takenaka K, Akashi K and Ohteki T. Identification of a human clonogenic progenitor with strict monocyte differentiation potential: a counterpart of mouse cMoP. *Immunity*. 2017 May 16;46(5):835-848. E4. doi:10.1016/j.immuni.2017.04.019. 査読有
- ② 川村俊輔、樗木俊聡「ヒトにおける共通単球前駆細胞の同定」*ライフサイエンス 新着論文レビュー*(2017) DOI: 10.7875/first.author.2017.048 査読無
- ③ Liu J, Guo YM, Onai N, Ohyagi H, Hirokawa M, Takahashi N, Tagawa H, Ubukawa K, Kobayashi I, Tezuka H, Minamiya Y, Ohteki T and Sawada K. Cytosine-phosphorothionate- guanine oligodeoxynucleotides exacerbates hemophagocytosis by inducing tumor necrosis factor- α production in mice after bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 22, 627-636 (2016). doi:10.1016/j.bbmt.2015.12.018 査読有
- ④ Yokoi T, Yokoi K, Akiyama K, Higuchi T, Shimada Y, Kobayashi H, Sato T, Ohteki T, Otsu M, Nakauchi H, Ida H and Ohashi T. Non-myeloablative preconditioning with ACK2 (anti-c-Kit antibody) is efficient in bone marrow transplantation for murine models of mucopolysaccharidosis type II. *Mol Genet Metab* 119, 232-238 (2016). doi:10.1016/J.ymgme.2016.08.003 査読有
- ⑤ Onai N, Ohteki T. Isolation of dendritic cell progenitor and bone marrow progenitor cells from mouse. *Methods Mol Biol*. 1423, 53-59 (2016) doi : 10.1007/978-1-4939-3606-9_4 査読有
- ⑥ 小内伸幸、樗木俊聡「樹状細胞前駆細胞および樹状細胞サブセットのソーティング」*実験医学 別冊 最強のステップUP シリーズ 新版! フローサイトメトリー*. 羊土社 ISBN-13: 978-4758101967 p229-240, 2016 査読無
- ⑦ 樗木俊聡「マクロファージ・樹状細胞の起源と多様性」*医学のあゆみ* 259 巻 5 号 マクロファージのすべて p347-352(2016) 査読無
- ⑧ Kobayashi H, Kobayashi CI, Nakamura-Ishizu A, Karigane D, Haeno H, Yamamoto KN, Sato T, Ohteki T, Hayakawa Y, Barber GN, Kurokawa M, Suda T, and Takubo

K. Bacterial c-di-GMP affects hematopoietic stem/progenitors and their niches through STING. *Cell Reports* 111, 71-84, 2015 doi : 10.1016 / J. celrep. 2015.02.066 査読有

⑨ Nakanishi Y, Sato T and Ohteki T. Commensal gram-positive bacteria initiate colitis by inducing monocyte/macrophage mobilization *Mucosal Immunol*. 8 152-160 (2015). doi:10.1038/mi.2014.53 査読有

⑩ 樗木俊聡、小内伸幸「制御性血球貪食樹状細胞」*炎症と免疫* 15年11月号 23-6 , 60-64 (2015) ISBN-13: 978 - 4 - 86550-128-5 査読無

⑪ Yokota-Nakatsuma A, Takeuchi H, Ohoka Y, Kato C, Song Si-Y, Hoshino T, Yagita H, Ohteki T, and Iwata M. Retinoic acid prevents mesenteric lymph node dendritic cells from inducing IL-13-producing inflammatory Th2 cells. *Mucosal Immunol*. 2014 Jul;7(4):786-801. 査読有

⑫ Onai N and Ohteki T. Bipotent or oligopotent? A macrophage and DC progenitor revisited. *Immunity* 41, 5-7 (2014). doi:10.1016/J.immuni.2014.07.004 査読有

⑬ 樗木俊聡、小内伸幸「樹状細胞の新しい前駆細胞」*炎症と免疫* 14年1月号 22-1 Basic 自己免疫疾患のオミックス *Clinical 血管炎症*, 41-46 (2014) ISBN-13: 978-4884079512 査読無

⑭ 小内伸幸、樗木俊聡. 「plasmacytoid dendritic cell の分化とその制御」*医学のあゆみ* 250 巻 11 号 関節リウマチ治療薬による有害事象の現状と対策 -レジストリー研究・薬剤疫学研究からの最新知見, 1044-1045 (2014) 査読無

⑮ 樗木俊聡「血球貪食現象の新たな視点」*臨床血液* 55:10, 49(1757)-53(1761) (2014) 査読無

⑯ 上羽悟史、小内伸幸、松島綱治、樗木俊聡「樹状細胞・マクロファージサブセットの起源と生体内移動」*実験医学 増刊 炎症* 32(17), 31-37 (2014). 羊土社 ISBN-13: 978-4758103428 査読無

⑰ 樗木俊聡、小内伸幸. 「樹状細胞の分化経路」*臨床免疫・アレルギー科* 62(6), 569-574 (2014) 査読無

⑱ 大八木秀明、小内伸幸、澤田賢一、樗木俊聡「樹状細胞による免疫寛容誘導の最新情

報：単球に由来する樹状細胞による血球の貪食と新しい免疫寛容誘導の仕組み」Surgery Frontier (21), 3-4, 2014. 査読無

⑬大八木秀明、小内伸幸、澤田賢一、榎木俊聡 「血球貪食症候群の病態解明の進歩：単球に由来する樹状細胞による血球の貪食と新しい免疫寛容誘導の仕組み」血液内科第69巻第2号 279-284, 2014. 査読無

[学会発表] (計 20 件)

①Kawamura S, Onai N and Ohteki T. Identification of human common monocyte progenitors. The 24th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (第24回マイクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム) 2016. 6. 4 御茶ノ水ソラシティ (東京都文京区)

②Nakanishi Y and Ohteki T. Dynamics of clonic macrophages during the development of colitis. The 24th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (第24回マイクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム) 2016. 6. 4 御茶ノ水ソラシティ (東京都文京区)

③Onai N, Asano J, Nakamura R, Kuroda S and Ohteki T. Regulation of pDC development by graded expression of E2-2. The 24th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (第24回マイクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム) 2016. 6. 4 御茶ノ水ソラシティ (東京都文京区)

④Ohteki T. Identification of mononuclear phagocyte progenitors. The 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (第44回日本免疫学会学術集会) 2015. 11. 18 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

⑤Nakanishi Y and Ohteki T. Dynamics of colonic macrophages during the development of colitis. The 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (第44回日本免疫学会学術集会) 2015. 11. 18 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

⑥Kawamura S, Onai N and Ohteki T. Identification of cMoP and bona fide GMP in human umbilical cord blood. The 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (第44回日本免疫学会学術集会) 2015. 11. 18 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

⑦榎木俊聡 「免疫の司令塔、樹状細胞の源となる細胞の同定」第22回輸血細胞治療学会シンポジウム 2015. 10. 23 軽井沢プリンスホテル (長野県軽井沢市)

⑧Onai N, Nakamura R and Ohteki. Identification of Flt3-Ligand Producing cells by Generating Flt3-Ligand Mcherry reporter Mouse. 44th International Society for Experimental Hematology (第44回国際実験血液学会) 2015. 9. 17 国立京都国際会館 (京都府京都市)

⑨Kawamura S, Onai N, Takenaka K, Akashi K and Ohteki T. Identification of Common Monocyte Progenitors, Pre-Monocytes, and Granulocyte Monocyte Progenitors in Human Umbilical Cord Blood. 44th International Society for Experimental Hematology (第44回国際実験血液学会) 2015. 9. 17 国立京都国際会館 (京都府京都市)

⑩Ohteki T. Identity and flexibility of common dendritic cell progenitor. 4th European Congress of Immunology, 2015. 9. 9 ウィーン (オーストリア)

⑪榎木俊聡 「免疫の司令塔、樹状細胞は医療に貢献し得るか？」2014年度クリニカルサミット第2回研究会 (フローサイトメーターの発展的応用の可能性) 2015. 2. 3 東京医科歯科大学 (東京都文京区)

⑫榎木俊聡 「免疫の司令塔、樹状細胞を大量に生み出す減細胞の同定」第14回難治性免疫疾患先端治療開発研究会 2014. 12. 5 慶応義塾大学医学部 (東京都新宿区)

⑬Ohteki T. A Novel Source of Dendritic Cells, the Control Tower of the Immune System. 難治疾患研究所40周年記念シンポジウム 2014. 11. 28 東京医科歯科大学 (東京都文京区)

⑭Ohteki T. Dendritic cell and immune regulation. The 2014 Fall Conference of the KAI, 2014. 11. 6 ソウル (韓国)

⑮Ohteki T. Agricultural Biotechnology Symposium, Biomaterials and Immune Modulation Seoul National University, 2014. 11. 5 ソウル (韓国)

⑯榎木俊聡 「血球貪食症の新たな視点」第76回日本血液学会学術集会 2014. 11. 1 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

⑰榎木俊聡 「免疫の司令塔、樹状細胞の源となる細胞の同定」LEGEND Seminar 2014 in 仙台 2014. 10. 14 東北大学 (宮城県仙台市)

⑱Ohteki T. Novel Source of Dendritic Cells, the Control Tower of the Immune System. Novo Nordisk Innovation Summit Tokyo 2014, 2014. 10. 1 東京大学医科学研究所 (東京都港区)

⑲Onai N, Inaba K and Ohteki T. Identification of M-CSFR DC progenitors with prominent pDC developmental potential: Revised load map for dendritic cell development. 13th International Symposium on Dendritic Cells, 2014. 9. 14 トゥールーズ (フランス)

⑳Ohteki T. A novel source of dendritic cells, the control tower of the immune system. The 2nd International Symposium of Research Center for Cellular Homeostasis, 2014. 6. 20 ソウル (韓国)

[図書] (計 2 件)

①小内伸幸、樗木俊聡、大八木秀明、澤田賢一「単球由来樹状細胞による血球貪食と免疫制御」Annual Review 血液 (2015) , 143-148 (2015) 中外医学社 285 ページ 2015/01 ISBN-10: 4498125819 ISBN-13: 978-4498125810

②樗木俊聡「樹状細胞の起源」Annual Review 呼吸器 (2015) , 55-62 (2015) 中外医学社 252 ページ 2015/01 ISBN-10: 4498130138 ISBN-13: 978-4498130135

[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.tmd.ac.jp/mri/bre/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樗木 俊聡 (OHTEKI Toshiaki)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授
研究者番号：50233200

(2) 連携研究者

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