

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860337

研究課題名(和文) CD4陽性通常型樹状細胞による自己免疫疾患の制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis on the mechanism of immune regulation by CD4+ conventional dendritic cells in the development of autoimmune diseases

研究代表者

深谷 知宏 (FUKAYA, Tomohiro)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：20624323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：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。また、DCIR2欠損マウスではTLR介在性炎症反応が亢進していた。さらに、自己免疫病態モデルにおいてDCIR2欠損マウスではWTマウスと比較して免疫病態の増悪化が認められた。以上の結果から、DCIR2はCD4+cDCsの活性化を抑制し、自己免疫病態を制御することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Dcir2^{-/-} CD4⁺ cDCs showed a higher secretion of proinflammatory cytokines and an enhanced T-cell priming after stimulation with TLR ligands than wild-type (WT) CD4⁺ cDCs. Furthermore, Dcir2^{-/-} mice exhibit a hyperinflammatory response associated with the excessive production of cytokines. On antigenic immunization, Dcir2^{-/-} mice showed a more enhanced autoimmune pathogenesis than WT mice. Thus, our findings suggest that DCIR2 provides an inhibitory signal for the fine-tuning of the function of CD4⁺ cDCs to maintain immune homeostasis and prevent autoimmune diseases.

研究分野：免疫学

キーワード：樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

樹状細胞 (DCs) は機能的に通常型樹状細胞 (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、自然免疫と適応免疫を繋ぐ最も重要な抗原提示細胞と考えられている。CD4⁺cDCs は cDCs の主要なサブセットであるが、免疫応答における役割とその機能を制御する機構についてはいまだ不明である。申請者は先に DCs サブセットの遺伝子発現網羅的解析により、CD4⁺cDCs の特異的発現機能分子候補として 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。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⁺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。

2. 研究の目的

本研究課題では、CD4⁺cDCs の DCIR2 を介した機能調節に基づく免疫応答制御機構を明らかにし、その自己免疫病態の形成における役割を解明する。

自己免疫疾患の発症・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、自己免疫疾患での CD4⁺cDCs の性状と動態及び機能を解析することにより、発症・増悪機構の解明が期待される。

このために、申請者らは CD4⁺cDCs の新規特異的機能分子である DCIR2 の機能解析を目的として、DCIR2 欠損マウスを作製した。すなわち、DCIR2 欠損マウスを用いて CD4⁺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 を介する炎症反応、抗原特異的 T 細胞応答、自己免疫病態などの免疫応答の制御を解明する。

3. 研究の方法

研究方法は以下の通りである。

(1) DCIR2 欠損 cDCs の機能解析

wild-type (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⁺cDCs について以下の機能の比較検討を行った。また、CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞が卵白アルブミン (OVA) 特異的 TCR を有するトランスジェニックマウスである OT-II マウス、OT-I マウス、Foxp3^{EGFP}OT-II マウスも用いた。

細胞表面分子発現

細胞表面分子 (MHC 分子、共刺激分子、CD11c 等) の発現を FACS 解析にて測定した。

サイトカイン産生能と細胞内シグナル伝達

各種 Toll-like receptor (TLR) リガンド (LPS、CpG、polyI:C 等) 刺激によるサイトカイン産生を経時的に ELISA 法にて測定した。また、細胞内シグナル伝達分子 (ERK、p38、SAPK/JNK、NF- κ B、IKK- γ) の活性化を解析した。

T 細胞活性化能

OVA を抗原とした共培養による OT-II.CD4⁺T 細胞、OT-I.CD8⁺T 細胞の増殖能 ([³H]-thymidine 取り込み能) を計測した。

T 細胞分化誘導能

OVA を抗原とした共培養による OT-II.CD4⁺Foxp3^{EGFP}-T 細胞からの IFN- γ 産生 T_H1 細胞、IL-17 産生 T_H17 細胞、Foxp3^{EGFP}+T_{reg} 細胞の生成を FACS 解析にて測定した。

(2) 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、投与後経時的に血清中サイトカイン産生を ELISA 法にて測定するとともに炎症性致死率を計測した。

(3) 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 欠損マウスに抗原を免疫し、以下の抗原特異的 T 細胞免疫応答の比較検討を行った。

エフェクター CD4⁺T 細胞誘導

各マウスへ OVA と TLR リガンドを免疫し、免疫後 14 日目に脾臓 CD4⁺T 細胞を調整した。さらに、OVA を抗原とした WT cDCs との共培養による CD4⁺T 細胞の増殖能を計測し、その IFN- γ 産生量を ELISA 法により測定するとともに FACS 解析にて IFN- γ 産生 T_H1 細胞の生成を計測した。

細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 誘導

各マウスへ OVA と TLR リガンドを免疫した。免疫後 6 日目に脾臓 CD8⁺T 細胞を調整し、MHC クラス I-OVA ペプチドテトラマー結合および IFN- γ 産生 CTL の生成を FACS 解析にて測定した。

(4) DCIR2 欠損マウスの自己免疫病態の解析

WT マウス、DCIR2 欠損マウスでの自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) について以下の比較検討を行った。EAE は各マウスへ 0 日目に MOG ペプチドと CFA の emulsion を皮下免疫、0 日目と 2 日目に Pertussis toxin を腹腔内投与し、病態を発症させた。また、免疫後 15 日目に脾臓やリンパ節の CD4⁺T 細胞を調整した。

① 病態評価 (発症率・臨床症状)

免疫後 10 日目より免疫病態の発症率と病態スコアを計測した。

免疫学的性状解析

免疫組織 (脾臓、リンパ節) での CD4⁺T 細胞サブセット (T_H1 細胞・T_H17 細胞・Foxp3⁺T_{reg}

細胞) やその他の免疫細胞の存在比率・細胞数を FACS 解析にて比較検討した。

T 細胞活性化能

MOG ペプチドを抗原とした WT cDCs との共培養による CD4⁺T 細胞の増殖能を計測し、その IFN- と IL-17 の産生量を ELISA 法により測定するとともに FACS 解析にて IFN- 産生 T_H1 細胞と IL-17 産生 T_H17 細胞の生成を計測した。

4. 研究成果

得られた研究成果は以下の通りである。

(1) DCIR2 欠損 cDCs の機能解析

WT CD4⁺cDCs と比較して、DCIR2 欠損 CD4⁺cDCs では各種 TLR リガンド刺激によるサイトカイン産生の亢進、細胞内シグナル伝達の増強が認められた。また、WT CD4⁺cDCs と比較して、DCIR2 欠損 CD4⁺cDCs では抗原特異的 T 細胞活性化能には差異は認められなかった。一方、TLR リガンドの刺激により活性化させた状態では、WT CD4⁺cDCs と比較して DCIR2 欠損 CD4⁺cDCs では T 細胞活性化能及びナイーブ T 細胞からの IFN- 産生 T_H1 細胞、IL-17 産生 T_H17 細胞の抗原特異的分化誘導能が増強していた。

(2) 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 リガンド投与での血清サイトカイン産生が著しく増強していた。さらに、DCIR2 欠損マウスでは WT マウスと比較して炎症性致死率の増加が認められた。

(3) 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 CD4⁺T 細胞の増殖能の亢進、IFN- 産生 T_H1 細胞の生成の増強、MHC クラス II-OVA ペプチドテトラマー結合、IFN- 産生 CTL の生成の増強が認められた。

(4) DCIR2 欠損マウスの自己免疫病態の解析

WT マウスと比較して、DCIR2 欠損マウスでは EAE 病態の増悪化が認められた。また、WT マウスの CD4⁺T 細胞と比較して、DCIR2 欠損マウスの CD4⁺T 細胞では MOGp 特異的 T 細胞増殖反応の増強、サイトカイン産生能の亢進が認められた。

以上の結果から、DCIR2 は CD4⁺cDCs の TLR リガンド刺激による活性化を抑制する特異的発現機能分子であることが明らかとなった。さらに、CD4⁺cDCs は DCIR2 の制御下において自己抗原特異的 T 細胞応答を抑制し、自

己免疫病態を制御することが明らかとなった。

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 4 件)

1. Arimura, K., Takagi, H., Uto, T., Fukaya, T., Nakamura, T., Chojookhuu, N., Hishikawa, Y., Yamashita, Y., and Sato, K.
Crucial role of plasmacytoid dendritic cells in the development of acute colitis through the regulation of intestinal inflammation.
Mucosal Immunol., 査読有, in press, 2017.
doi:10.1038/mi.2016.96
2. Nakamura, T., Fukaya, T., Uto, T., Takagi, H., Arimura, K., Tono, T., and Sato, K.
Selective depletion of basophils ameliorates immunoglobulin E-mediated anaphylaxis.
Biochem. Biophys. Rep., 査読有, 9:29-35, 2017.
doi:10.1016/j.bbrep.2016.11.001
3. 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.
doi:10.1038/ncomms11273
4. Takagi, H., Arimura, K., Uto, T., Fukaya, T., Nakamura, T., Chojookhuu, N., Hishikawa, Y., and Sato, K.
Plasmacytoid dendritic cells orchestrate TLR7-mediated innate and adaptive immunity for the initiation of autoimmune inflammation.
Sci. Rep., 査読有, 6:24477, 2016.
doi:10.1038/srep24477

[学会発表](計 14 件)

1. 深谷知宏、宇都倫史、高木秀明、有村慶一、中村雄、小島直也、佐藤克明
Clec4A4 is a regulatory receptor for The Toll-like receptor-mediated activation of dendritic cells
第 45 回日本免疫学会総会、2016 年 12 月 5 日、沖縄コンベンションセンター(沖縄県、宜野湾市)
2. 有村慶一、高木秀明、宇都倫史、深谷知宏、中村雄、佐藤克明
Crucial role of plasmacytoid dendritic cells in the development of acute

- colitis through the regulation of intestinal inflammation
第 45 回日本免疫学会総会、2016 年 12 月 5 日、沖縄コンベンションセンター (沖縄県、宜野湾市)
3. 中村雄、深谷知宏、宇都倫史、高木秀明、有村慶一、佐藤克明
Selective depletion of basophils ameliorates immunoglobulin E-mediated anaphylaxis
第 45 回日本免疫学会総会、2016 年 12 月 5 日、沖縄コンベンションセンター (沖縄県、宜野湾市)
 4. 高木秀明、有村慶一、宇都倫史、深谷知宏、中村雄、佐藤克明
Plasmacytoid dendritic cells orchestrate TLR7-mediated innate and adaptive immunity for the initiation of autoimmune inflammation
第 45 回日本免疫学会総会、2016 年 12 月 5 日、沖縄コンベンションセンター (沖縄県、宜野湾市)
 5. 宇都倫史、深谷知宏、高木秀明、有村慶一、中村雄、小島直也、佐藤克明
Clec4A4 is a regulatory receptor for Dendritic cells that impairs inflammation and T cell immunity
第 45 回日本免疫学会総会、2016 年 12 月 5 日、沖縄コンベンションセンター (沖縄県、宜野湾市)
 6. 深谷知宏、宇都倫史、高木秀明、有村慶一、中村雄、佐藤克明
Pivotal roles of type I interferon and costimulation signals in the development of imiquimod-induced psoriasiform dermatitis in mice
第 44 回日本免疫学会総会、2015 年 11 月 18 日、札幌コンベンションセンター (北海道、札幌市)
 7. 有村慶一、高木秀明、宇都倫史、深谷知宏、中村雄、佐藤克明
Crucial role of plasmacytoid dendritic cells in the development of acute DSS-induced colitis through the regulation of intestinal inflammation
第 44 回日本免疫学会総会、2015 年 11 月 18 日、札幌コンベンションセンター (北海道、札幌市)
 8. 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、2015 年 11 月 18 日、札幌コンベンションセンター (北海道、札幌市)
 9. 高木秀明、有村慶一、宇都倫史、深谷知宏、中村雄、佐藤克明
Critical role of plasmacytoid dendritic cells in the initiation of toll-like receptor 7-mediated autoimmune inflammation
第 44 回日本免疫学会総会、2015 年 11 月 18 日、札幌コンベンションセンター (北海道、札幌市)
 10. 中村雄、深谷知宏、宇都倫史、高木秀明、有村慶一、佐藤克明
Selective depletion of basophils ameliorates passive anaphylaxis
第 44 回日本免疫学会総会、2015 年 11 月 18 日、札幌コンベンションセンター (北海道、札幌市)
 11. 深谷知宏、宇都倫史、高木秀明、有村慶一、佐藤克明
Conditional ablation of CD205⁺ conventional dendritic cells impacts the regulation of antibacterial T cell immunity in vivo
第 43 回日本免疫学会総会、2014 年 12 月 10 日、京都国際会館(京都府、京都市)
 12. 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、2014 年 12 月 10 日、京都国際会館(京都府、京都市)
 13. 高木秀明、有村慶一、宇都倫史、深谷知宏、佐藤克明
Pivotal role of plasmacytoid dendritic cells in the development of imiquimod induced psoriasiform dermatitis in mice
第 43 回日本免疫学会総会、2014 年 12 月 10 日、京都国際会館(京都府、京都市)
 14. 有村慶一、高木秀明、宇都倫史、深谷知宏、佐藤克明
Critical role of plasmacytoid dendritic cells in the development of acute DSS-induced colitis
第 43 回日本免疫学会総会、2014 年 12 月 10 日、京都国際会館(京都府、京都市)
- [図書](計 3 件)
1. 佐藤克明、宇都倫史、深谷知宏、高木秀明
先端医学社
炎症と免疫「樹状細胞サブセットと免疫応答制御」
2017、25(3)、71-77.
 2. Fukaya, T., Takagi, H., Uto, T., Sato, K.
Springer
Methods Mol. Biol. 「Analysis of DC

functions using CD205-DTR knock-in mice」

2016、1423、291-308.

3. 佐藤克明、宇都倫史、深谷知宏、高木秀明
科学評論社
臨床免疫・アレルギー科「樹状細胞サブセットとその機能」
2015、63(6)、563-568.

〔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

深谷 知宏 (FUKAYA, Tomohiro)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：20624323