

# 研究報告書

## 「形質細胞様樹状細胞による炎症慢性化機構と制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 佐藤 克明

### 1. 研究のねらい

樹状細胞(dendritic cells; DCs)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(conventional DCs; cDCs)と形質細胞様樹状細胞(plasmacytoid DCs; pDCs)に大別されるサブセットから構成され、自然免疫と獲得免疫を繋ぐ最も強力な抗原提示細胞と考えられている。

pDCs は cDCs とは異なり Toll 様受容体 (TLR)のなかでエンドソームに取り込まれた病原体の核酸を認識する TLR7 と TLR9 のみを高発現し、多量の I 型 IFN (interferon)を産生する高度に専門化した抗原提示細胞である。これら TLR リガンド刺激による MyD88 依存的細胞内シグナル伝達では IKK (IkB kinase)- $\alpha$ /IRF (IFN regulatory factor)-7 の活性化が I 型 IFN の産生に必須であり、NF- $\kappa$ B の活性化が炎症性サイトカインの産生に重要であることが報告されている。従って、pDCs はこの特性により病原体感染防御に重要であることが推察されている。また、pDCs は炎症反応により破壊された自己細胞由来の核酸も同様に認識して I 型 IFN や炎症性サイトカインを産生する。全身性エリテマトーデスや尋常性乾癬は I 型 IFN 介在性自己免疫疾患でその病態形成には自己反応性  $T_H1$  細胞・ $T_H17$  細胞や細胞傷害性 T 細胞(CTL)が関与することが知られており、炎症組織に pDCs が選択的に集積していることが報告されている。このことから申請者は pDCs の炎症性自己免疫病態の形成での役割について、pDCs が外来・自己核酸の認識により過度のサイトカインを産生することにより炎症反応を惹起・慢性化させ、同時に自己成分の自己反応性 T 細胞への抗原提示により自己免疫応答の惹起・進行・重症化を導く可能性を考えた。

本提案では、pDCs の特異的発現分子“Siglec-H”の欠損マウスと pDCs 特異的消失マウスを用いて炎症制御の破綻による炎症の慢性化とこれによる自己免疫病態の惹起・進行・重症化に対する pDCs の役割とその分子基盤を解明することを目標とする。

### 2. 研究成果

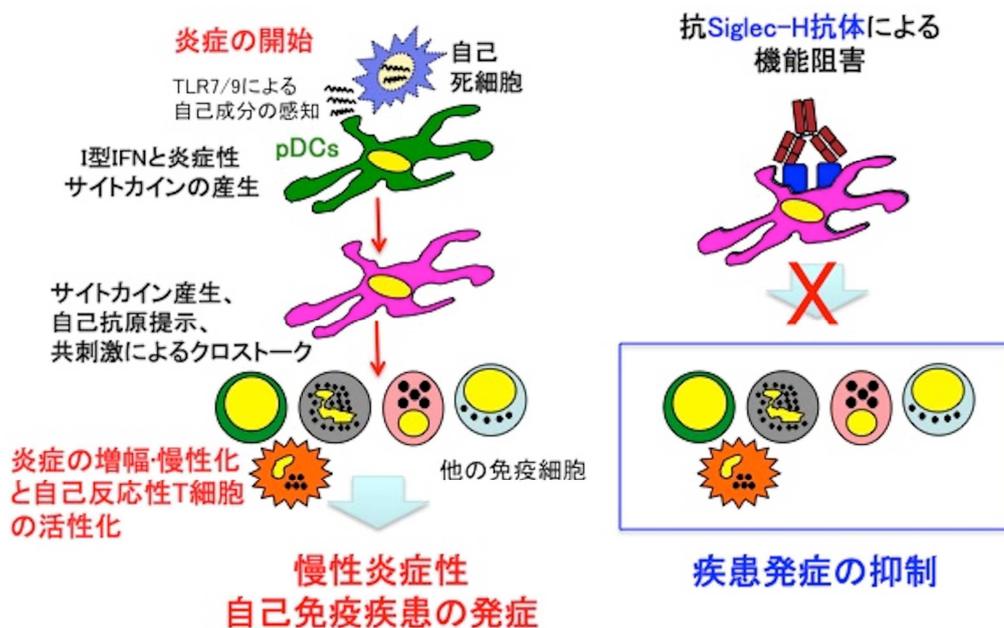
#### (1) 概要

本研究では Siglec-H 欠損マウスと pDCs 特異的消失マウスを用いて、炎症の慢性化とこれによる自己免疫病態の発症・増悪における pDCs の役割とその Siglec-H を介する分子基盤の解明に着眼し、自己免疫疾患の病態を理解することにより pDCs を標的とした分子疾患制御法の確立を試みた。

その結果、pDCs において Siglec-H は TLR7/TLR9-MyD88 依存的な IKK- $\alpha$  や NF- $\kappa$ B の活性化を阻害して I 型 IFN や炎症性サイトカインを抑制する機能抑制性分子であることが判明した。生体内 TLR7/TLR9 依存性炎症反応において pDCs は主要なサイトカイン産生細胞であり、この産生は Siglec-H により制御されることを明らかにした。また、pDCs は TLR7/TLR9 依存性炎症環境において、cDCs の活性化に関与することが示された。一方、pDCs は Siglec-H

の制御下において抗原特異的エフェクターCD4<sup>+</sup>T細胞の誘導とCTLの生成に寄与することを示した。さらに、TLR7リガンド誘発性尋常性乾癬様炎症においてpDCsはI型IFNや炎症性サイトカインの産生を介して病態の発症・増悪に関与し、この免疫病態は抗Siglec-H抗体の投与により緩和することを明らかにした。

以上の結果から、pDCsの慢性炎症性自己免疫病態の形成での役割について、pDCsが自己核酸の認識により過度のサイトカインを産生することにより炎症反応を惹起・慢性化させ、同時に自己成分の自己反応性T細胞への抗原提示により自己免疫応答を誘導して慢性炎症性自己免疫疾患の惹起・進行・重症化を導く機構が推察された(下左)。また、抗Siglec-H抗体によるpDCsの機能阻害に基づいた慢性炎症性自己免疫疾患の制御が可能であることが示唆された(下右)。



## (2) 詳細

### (1) 研究テーマ A

- 1) Siglec-H 欠損の pDCs の TLR7 依存性活性化に及ぼす効果の解明
- 2) pDCs の Siglec-H を介する TLR7 依存性炎症応答制御の解明

#### [研究成果]

1-1) Siglec-H 欠損 pDCs は野生型 (WT) pDCs と比較して、TLR7 リガンドの Imiquimod (IMQ) 刺激後、I 型 IFN と IL-12p40 の産生能の著しい亢進を示した。さらに、WT pDCs への抗 Siglec-H 抗体の処理は IMQ 誘導性の I 型 IFN と IL-12p40 の産生を著しく抑制した。

1-2) WT pDCs では IMQ 刺激後、IKK- $\alpha$  のリン酸化、IKK- $\alpha$  と IRF-7 との結合が認められるとともに I $\kappa$ B のリン酸化とユビキチン化によるその分解を示した。一方、Siglec-H 欠損 pDCs では WT pDCs と比較して、IMQ 刺激による IKK- $\alpha$  のリン酸化、IKK- $\alpha$  と IRF-7 との結合が著しく亢進し、それとともに I $\kappa$ B のリン酸化による NF- $\kappa$ B の活性化もより増強していた。

2) WT マウスでは IMQ/D-GalN の投与により血清中での I 型 IFN、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-12p40 の産生が誘導され、投与後 24 時間以内に炎症性ショックにより全例死亡した。一方、Siglec-H

欠損マウスではこれら血清中サイトカイン産生の著しい亢進が認められ、若干早い死亡が観察された。しかしながら、pDCs 特異的欠損マウスでは I 型 IFN のほぼ完全な産生抑制、炎症生サイトカインについては部分的な産生抑制が認められ、死亡率の低下が示された。

[研究目的の達成状況]

- 1) Siglec-H は、pDCs の TLR7-MyD88 依存的な IKK- $\alpha$  と NF- $\kappa$ B の活性化を阻害してサイトカイン産生を抑制することが明らかとなった。また、抗 Siglec-H 抗体は pDCs の機能を阻害するアンタゴニスト抗体であることが判明した。
- 2) 生体内において pDCs は TLR7 リガンド刺激に対する主要なサイトカイン産生細胞であり、この産生は Siglec-H により制御されることが明らかとなった。

(2) 研究テーマ B

- 1) 炎症応答における cDCs と pDCs のクロストークに及ぼす Siglec-H 欠損と pDCs 消失の効果の解明
- 2) 抗原特異的 CD4<sup>+</sup>T 細胞の活性化に及ぼす Siglec-H 欠損と pDCs 消失の効果の解明
- 3) 抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の活性化/CTL の誘導に及ぼす Siglec-H 欠損と pDCs 消失の効果の解明

[研究成果]

1) 生体内での IMQ 誘導性炎症環境において、WT マウスの cDCs と pDCs の MHC クラス II と共刺激分子の発現増強と比較して、Siglec-H 欠損マウスの cDC と pDCs ではさらなる増強を示し、pDCs 特異的欠損マウスの cDCs ではこれら分子の発現の減弱を示した。一方、WT マウスの cDCs と pDCs と比較して、Siglec-H 欠損マウスの cDC と pDCs では CD4<sup>+</sup>T 細胞活性化能のさらなる増強を示し、pDCs 特異的欠損マウスの cDCs では減弱を示した。

2) IMQ 誘導性炎症環境では、WT マウスの抗原特異的 CD4<sup>+</sup>T 細胞の増殖能と IFN- $\gamma$  産生能、および CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>T<sub>H</sub>1 細胞生成能と比較して、Siglec-H 欠損マウスでは増強、pDCs 特異的欠損マウスでは減弱を示した。

3) IMQ 誘導性炎症環境では、WT マウスと比較して Siglec-H 欠損マウスと pDCs 特異的消失マウスで著しい抗原特異的 CTL 誘導の低下が認められた。

[研究目的の達成状況]

- 1) 炎症環境では、cDCs の活性化には pDCs が必要であり、pDCs は cDCs のヘルパー機能を示すことが明らかとなった。
- 2) pDCs は Siglec-H 制御下において活性化後、サイトカイン産生に基づいて抗原特異的エフェクター CD4<sup>+</sup>T 細胞を誘導することが考えられた。
- 3) 生体内において pDCs は抗原クロスプレゼンテーションを介して CD8<sup>+</sup>T 細胞を活性化し、CTL の生成に寄与することが明らかとなった。

### 3. 今後の展開

これまでの研究成果を踏まえ、尋常性乾癬の発症・増悪機構における pDCs の役割のさらなる解明を目指して、Siglec-H 欠損マウスと pDCs 特異的消失マウスを用いたマウス尋常性乾癬様炎症モデルにおいて、免疫病態の形成におけるサイトカイン及び共刺激分子の関与とともに

pDCs と免疫細胞とのクロストークの意義を明らかにする。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

設定した研究目的については上述の通り、ほぼ達成状況にある。研究の進め方については、研究代表者単独で計画され、研究協力者3名(研究補助者名、博士課程大学院生2名)の協力のもと有効な研究実施体制にて円滑に遂行された。研究経費については主として研究課題の遂行に必要な機器類や研究試薬を含む消耗品費に使用されたことから、研究費執行状況は妥当であると考えられる。

本研究課題では慢性炎症性自己免疫病態の形成におけるpDCsの意義とpDC機能阻害に基づいた病態制御を示した。従って、pDCs機能制御に関する新技術の創製は将来的に加齢に伴う慢性自己免疫疾患の創薬開発を可能とし、高齢化社会に必要な先制的医療の基盤技術の創出に大きく資することが期待できる。さらに、結果として慢性自己免疫疾患に関わる医療費、QOLの低下等、その経済的・社会的損失等の諸問題の解決へ積極的に貢献する可能性を有する。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

形質細胞様樹状細胞(pDCs)に特異的に発現する分子であるSiglec-Hを欠損したマウスとpDCsを特異的に消失させたマウスを独自に作製し、pDCsにおいてSiglec-Hが有する、(1) TLR7/TLR9-MyD88依存的なIKK- $\alpha$ とNF- $\kappa$ Bの活性化を介する炎症性サイトカイン(I型インターフェロン)産生の抑制機能、(2)通常型樹状細胞の活性化調節機能や抗原特異的エフェクターCD4+T細胞とCTLの誘導の調節機能を明らかにし発表した。さらに、尋常性乾癬様炎症病態モデルにおいて、pDCsとSiglec-Hの免疫病態の形成における役割の解析を行いつつある。これらの結果は、pDCの関与が疑われる自己免疫疾患に対する新たな治療ターゲットを示唆することができた。本さきがけ研究は国内外において評価され、研究者としての飛躍につながった。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 論文(原著論文)発表

1. Fukaya, T., Murakami, R., Takagi, H., Sato, K., Sato, Y., Otsuka, H., Ohno, M., Hijikata, A., Ohara, O., Hikida, M., Malissen, B., and Sato, K. Conditional ablation of CD205<sup>+</sup> conventional dendritic cells impacts the regulation of T cell immunity and homeostasis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012, 109, 11288-11293.
2. Takagi, H., Fukaya, T., Eizumi, K., Sato, Y., Sato, K., Shibasaki, A., Otsuka, H., Hijikata, A., Watanabe, T., Ohara, O., Kaisho, T., Malissen, B., and Sato, K. Plasmacytoid dendritic cells are crucial for the initiation of inflammation and T cell immunity in vivo. *Immunity*. 2011, 35, 958-971.

(2)特許出願

該当無し。

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な招聘講演

1. 佐藤克明, 樹状細胞による感染防御, 日本農芸化学会 2014 年度大会キリン株式会社ランチオンセミナー<ウイルス感染防御と乳酸菌>, 東京, 2014.
2. 佐藤克明, 樹状細胞による免疫応答制御, 武田薬品工業研究所第 3 回免疫研究者招待セミナー, 藤沢, 2013.
3. Sato, K., Plasmacytoid dendritic cells in innate and adaptive immunity, The 21th International Symposium of Macrophage Molecular and Cellular Biology, Tokyo, Japan, 2013.
4. 佐藤克明, 樹状細胞と免疫療法, 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会シンポジウム, 東京, 2013.
5. 佐藤克明, Plasmacytoid dendritic cells in innate and adaptive immunity, 大阪大学免疫学フロンティア研究センターセミナー, 大阪, 2012.

受賞

1. Katsuaki Sato, RIKEN RCAI The Excellent Paper Award 2011 (March 23, 2012)
2. 佐藤克明, 慶應医学会感謝状(2013 年 3 月 12 日)

著作物

1. 佐藤克明, 樹状細胞と免疫療法. アレルギー科, 63(7):914-919, 2014.
2. 佐藤克明, 形質細胞様樹状細胞による免疫応答の制御, 感染・免疫・炎症, 43(2): 69-71, 2013.
3. 佐藤克明・高木秀明, 形質細胞様樹状細胞による T 細胞の反応の制御, 臨床免疫・アレルギー科, 58(5):503-507, 2012.
4. 佐藤克明, 樹状細胞サブセットによる免疫応答制御, 医学のあゆみ, 243(1):73-77, 2012.
5. 高木秀明・佐藤克明, 形質細胞様樹状細胞の生体での炎症反応と T 細胞の免疫応答における役割, ライフサイエンス統合データベースセンターライフサイエンス新着論文レビュー, <http://first.lifesciencedb.jp/archives/4086>, 2012.

プレスリリース

1. 2011 年 12 月 16 日, 化学工業日報, 9 面
2. 2012 年 1 月 13 日, 科学新聞, 4 面
3. 2012 年 6 月 26 日, 日刊工業新聞, 19 面
4. 2012 年 7 月 11 日, 化学工業日報, 9 面
5. 2014 年 1 月 31 日, 産経新聞, 9 面

その他: