

58. 樹状細胞分化に重要な微小環境の同定と調節機構の解明

小内 伸幸

Key words : 樹状細胞, ニッチ細胞, サイトカイン,
前駆細胞

東京医科歯科大学 難治疾患研究所
生体防御学分野

緒 言

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¹⁾。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²⁾。我々はこの樹状細胞の源となる共通樹状細胞前駆細胞 (common DC progenitor: CDP) を発見した^{3,4)}。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。この CDP から DC への分化は骨髄内で実行されているがその制御に関与する細胞や因子は不明である。骨髄内ニッチ細胞が DC 分化を制御している可能性が考えられるため、CDP を可視化し、骨髄内の局在や各ニッチ細胞との相互関係を検討した。解析の結果、CDP は各ニッチ細胞とは隣接せずに骨髄内に分散していた。またサイトカイン Flt3 リガンドが DC 分化制御に必須であることが報告され、我々もその重要性を明らかにしている^{5,6)}。そこで、骨髄内の Flt3 リガンド産生細胞を検討したところ、ニッチ細胞ではなく、T 細胞、NK 細胞、NK-T 細胞が発現していた。特にメモリー T 細胞が Flt3 リガンド高発現細胞であった。またナイーブ T 細胞は抗原刺激を受けると Flt3 リガンド発現が増加することが確認できた。これらの結果から、リンパ組織内で DC から抗原刺激を受けたナイーブ T 細胞はメモリー T 細胞へと分化し、病原性微生物の排除へと働くが、一部のメモリー T 細胞は骨髄に移動し、Flt3 リガンドを産生して CDP に働き、DC 分化を誘導するというポジティブ・フィードバック機構が示唆された。

方 法

1. 共通樹状細胞前駆細胞 (common DC progenitor: CDP) の骨髄内局在の解析

CDP は CD115⁺CDP と CD115⁻CDP の 2 つから構成されている。前者は c-タイプレクチン Clec9A を発現し、抗 Clec9A 抗体染色により可視化が可能である。後者は形質細胞様 DC (plasmacytoid DC: pDC) 分化に必要な転写因子 E2-2 を高度に発現しており、この CD115⁻CDP 可視化を目的として E2-2 遺伝子発現領域の下流に蛍光タンパク質遺伝子 Kusabiraorange を組み込んだ BAC (bacterial artificial clone) を発現するトランスジェニックマウス (E2-2-KuOr) を作製した。その後、このレポーターマウスの骨髄の凍結サンプルを調製し、河本法によって新鮮骨髄凍結切片を作製して、Clec9A 染色及び各ニッチ細胞を染色する免疫染色 (細網細胞 (PDGFR β ⁺細胞)、骨芽細胞 (Osteocalcin⁺細胞)、血管内皮細胞 (VE-cadherin⁺細胞)) によって CDP 及び各ニッチ細胞の相互関係を検討した。

2. Flt3 リガンド産生細胞の同定

Flt3 リガンドは DC 分化に必須なサイトカインである。このため DC 分化制御機構を解明するために骨髄内 Flt3 リガンド産生細胞を明らかにすることは重要な課題である。この目的のため我々は Flt3 リガンド遺伝子発現制御領域の下流に蛍光タンパク質遺伝子 mCherry を組み込んだ BAC を発現するレポーターマウス (FL-mCherry マウス) を作製した。このマウスの骨髄から各ニッチ細胞 (細網細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞、間葉系幹細胞) や各免疫細胞を調

整しフローサイトメーターにより Flt3 リガンド産生細胞 (レポータータンパク質 mCherry 陽性細胞として検出可能である) を解析した。また、免疫染色によってこれらの結果を検討した。

結 果

1. CDP の骨髄内分布

Clec9A 陽性の CD115⁺CDP 及び E2-2-Kusabiraorange 陽性の CD115⁻CDP の骨髄内の分布及び各ニッチ細胞 (細網細胞 (PDGFR β ⁺細胞), 骨芽細胞 (Osteocalcin⁺細胞), 血管内皮細胞 (VE-cadherin⁺細胞) との位置関係を免疫染色法にて解析した結果, 2つの CDP は細網細胞, 骨芽細胞や血管内皮細胞と隣接しているわけではなく, 骨髄内に一様に分散していた (図1)。この結果は造血幹細胞の分布とは異なり, 当初の我々の予想を覆す結果であった。

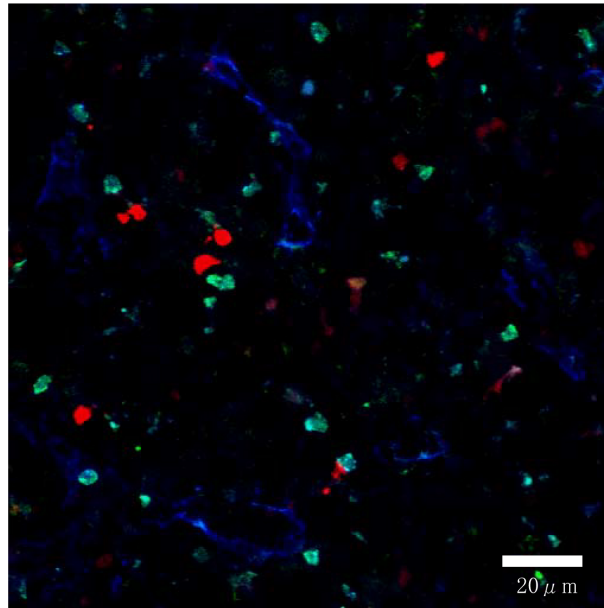


図1. 骨髄内における CDP の分布.

DC 分化に重要な転写因子 E2-2 遺伝子発現調節領域の下流に赤色蛍光タンパク質遺伝子 Kusabiraorange を組み込んだレポーターマウス (E2-2-KuOr) の骨髄サンプルを抗 Clec9A 抗体 (CD115⁺CDP 特異的に発現する) と抗 VE-Cadherin 抗体 (血管内皮細胞に発現: 青色) で染色した結果, Clec9A⁺CD115⁺CDP (緑色) と E2-2-KuOr⁺CD115⁻CDP (赤色) は血管内皮細胞 (青色) とは隣接せずに分散して存在していた。

2. 骨髄内 Flt3 リガンド産生細胞の同定

FL-mCherry レポーターマウスの骨髄から細網細胞, 骨芽細胞を調製し, フローサイトメーターにて FL-mCherry の発現を解析したところ, mCherry の発現はほとんど検出されなかった (図2)。

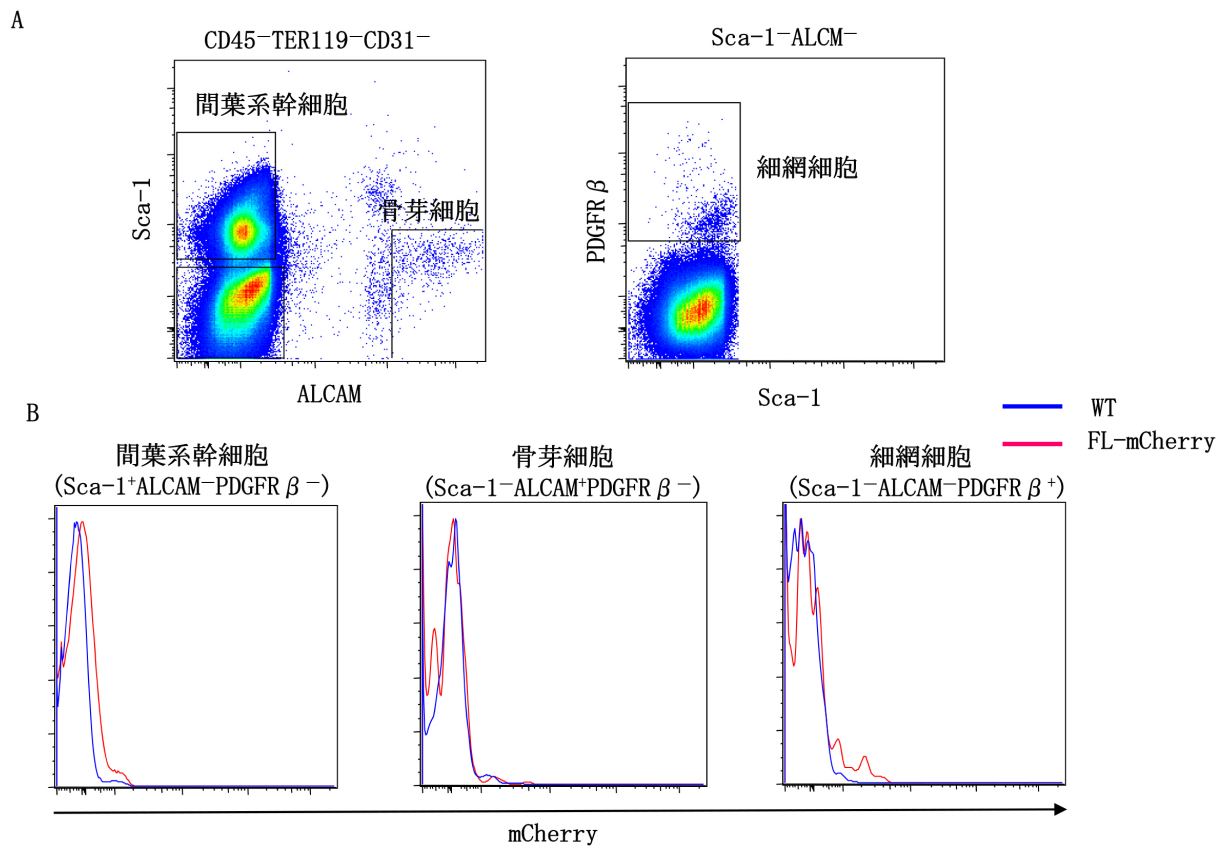


図2. 各ニッチ細胞における Flt3 リガンド (FL)-mCherry の発現.

A) FL-mCherry レポーターマウスの骨髄細胞の CD45⁻TER119⁻CD31⁻ 細胞分画を Sca-1, ALCAM 及び PDGFR β にて染色. 間葉系細胞 (Sca-1⁺ALCAM⁻PDGFR β⁻), 骨芽細胞 (Sca-1⁻ALCAM⁺PDGFR β⁻), 細網細胞 (Sca-1⁻ALCAM⁻PDGFR β⁺). B) 間葉系細胞, 骨芽細胞, 細網細胞における FL-mCherry 発現. これらニッチ細胞では FL-mCherry はほとんど検出されなかった.

従来 Flt3 リガンドは骨髄内のストローマ細胞 (ニッチ細胞を含む) が産生すると考えられていたため, この結果は予想外の結果であった. 次に骨髄内の各免疫細胞における FL-mCherry の発現を解析したところ, T 細胞, NK 細胞, NK-T 細胞にて発現が検出され, 特に CD4⁺及び CD8⁺メモリー T 細胞において発現が高かった (図3).

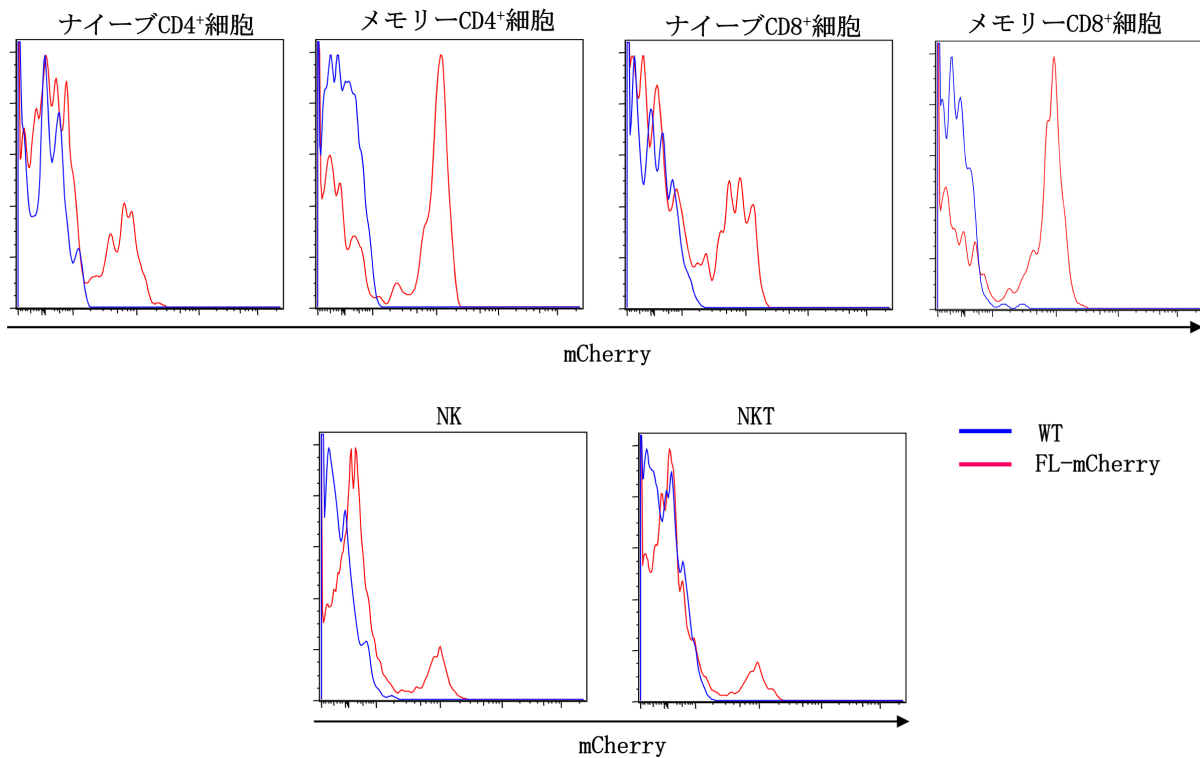


図3. 骨髄内リンパ球における Flt3 リガンド (FL)-mCherry 発現.

FL-mCherry レポーターマウスの骨髄内リンパ球における FL-mCherry 発現量の解析結果. メモリー CD4⁺, CD8⁺T 細胞が最も FL-mCherry の発現が高かった.

また, 骨髄内の T 細胞, NK 細胞, NK-T 細胞にて FL-mCherry の発現は免疫染色法によっても確認された (図4).

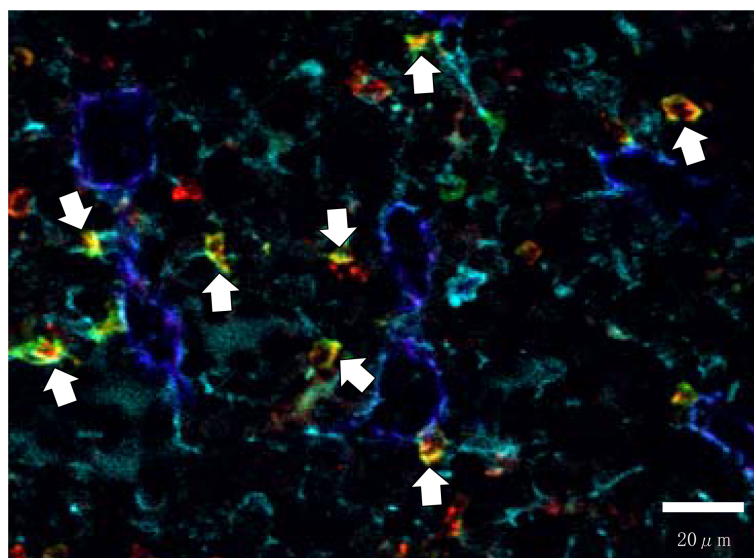


図4. FL-mCherry レポーターマウス骨髄内における mCherry 発現細胞の解析.

FL-mCherry レポーターマウス骨髄内の FL-mCherry (赤色) Thy1.2⁺細胞 (緑色, T 細胞, NK 細胞, NK-T 細胞を含む), 血管内皮細胞 (青色), 細網細胞 (水色) の解析結果. FL-mCherry は Thy1.2⁺細胞で発現していた (黄色, 矢印).

考 察

骨髄内ニッチ細胞は造血幹細胞と相互作用し、サイトカインやケモカイン、細胞接着因子を発現して造血幹細胞の機能を維持している。このためこれらニッチ細胞は他の血液前駆細胞の分化制御にも関与していることが予想されていた。本研究で共通 DC 前駆細胞 (CDP) とニッチ細胞との相互関係を検討した結果、CDP は各ニッチ細胞とは隣接していなかった。ニッチ細胞が DC の分化制御に関与するかどうかは未だに不明であるが、少なくとも直接相互作用して DC 分化を制御している可能性はない。また、DC 分化に不可欠なサイトカイン Flt3 リガンド (FL) 産生細胞を可視化可能なレポーターマウスを作製し、骨髄内 FL 産生細胞を検討した結果、驚くべきことにメモリー CD4⁺、CD8⁺ T 細胞が主な産生細胞であった。ナイーブ T 細胞を抗原刺激すると、FL の産生量が増加することも見出した。また骨髄内に存在する T 細胞はほとんどが活性化したメモリータイプである。これらの結果から、CDP から分化した DC は末梢のリンパ節内でナイーブ T 細胞に抗原を提示し、活性化させ免疫反応を始動させる。抗原刺激を受けたナイーブ T 細胞はメモリー T 細胞へと分化する。この分化したメモリー T 細胞は骨髄へと移行し FL を産生して DC 分化誘導に関与するモデルが示唆された。今後は、この T 細胞による DC 分化制御の重要性及び免疫学的な意義を検討する必要がある。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東京医科歯科大学難治疾患研究所生体防御学分野の橋木俊聡である。本稿を終えるにあたり、本研究を御支援頂きました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Nagasawa, T., Omatsu, Y. & Sugiyama, T. : Control of hematopoietic stem cells by the bone marrow stromal niche: the role of reticular cells. *Trends Immunol.*, **32** : 315-320, 2011.
- 2) Banchereau, J. & Steinman, R. M. : Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, **392** : 245-252, 1998.
- 3) Onai, N., Obata-Onai, A., Schmid, M. A., Ohteki, T., Jarrossay, D. & Manz, M. G. : Identification of clonogenic common Flt3⁺M-CSFR⁺ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat. Immunol.*, **8** : 1207-1216, 2007.
- 4) Onai, N., Kurabayashi, K., Hosoi-Amaiike, 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) McKenna, H. J., Stocking, K. L., Miller, R. E., Brasel, K., De Smedt, T., Maraskovsky, E., Maliszewski, C. R., Lynch, D. H., Smith, J., Pulendran, B., Roux, E. R., Teepe, M., Lyman, S. D. & Peschon, J. J. : Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood*, **95** : 3489-3497, 2000.
- 6) Onai, N., Obata-Onai, A., Tussiwand, R., Lanzavecchia, A. & Manz, M. G. : Activation of the Flt3 signal transduction cascade rescues and enhances type I interferon-producing and dendritic cell development. *J. Exp. Med.*, **203** : 227-238, 2006.