

## 60. 腸管免疫の恒常性維持における樹状細胞の役割の解明

改正 恒康

Key words : 樹状細胞, リンパ節, 遺伝子改変マウス,  
腸管免疫

\*大阪大学  
免疫学フロンティア研究センター  
免疫機能統御学 寄附研究部門

### 緒言

樹状細胞 (DC) は, 自然免疫と獲得免疫を連関させ, 抗原提示細胞として免疫応答に重要な役割を果たす. DC は不均一な細胞集団であり, 機能的特性の異なる種々のサブセットから構成されている. これらのサブセットの, 生体内での動態, 機能的意義を明らかにすることは, ワクチン開発, 免疫疾患の制御において非常に重要である.

マウスの脾臓では, DC は, CD8 $\alpha$ , CD103, CD11b の発現から, 大きく CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> DC および CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>CD103<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> DC の2つのサブセットに分けられる (ここでは以後, それぞれ CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> DC, CD103<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> DC と呼ぶ). CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> DC は, 死細胞を取り込み, 細胞傷害性 T 細胞 (CD8T 細胞) の分化を誘導する能力 (クロスプレゼンテーション能力) が強く, ウイルスや腫瘍に対する防御免疫に関与している<sup>1)</sup>. CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> DC の生体内における動態, 機能的意義を明らかにする目的で, この DC サブセットに特異的に発現しているケモカイン受容体 XCR1 に着目し<sup>2,3)</sup>, XCR1 の遺伝子座に, 蛍光タンパク venus, およびジフテリアトキシン受容体 (DTR) と venus との融合タンパク (DTRvenus) をコードする遺伝子をノックインしたマウス (各々 XCR1-venus マウス, XCR1-DTRvenus マウス) を作製した<sup>4)</sup>. これらのマウスでは, CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> DC に選択的に venus の発現が認められた. また, XCR1-DTRvenus マウスにおいて, DT の投与により, venus 陽性細胞すなわち CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> DC (XCR1<sup>+</sup> DC) を一過性に除去することができた. そして, この系を用いて, XCR1<sup>+</sup> DC が, 可溶性抗原や死細胞由来抗原に対する CD8T 細胞応答に必須であること, また, NKT 細胞による抗腫瘍 CD8T 細胞の誘導にも関与していること, すなわち *in vivo* 免疫応答における XCR1<sup>+</sup> DC の機能的意義を明らかにした<sup>4,5)</sup>.

今回, XCR1-venus マウス, および, 新たに作製した XCR1<sup>+</sup> DC 欠失マウスを用いて, XCR1<sup>+</sup> DC の生体内での動態, および腸管免疫における機能的意義について解析を行った.

### 方法および結果

#### 1. XCR1<sup>+</sup> DC のリンパ節内での分布, 動態

XCR1-venus マウス単径リンパ節の凍結切片を作製し, 抗 GFP 抗体, 抗 CD11c 抗体, 抗 CD11b 抗体による染色を行った (図 1 A). 抗 GFP 抗体によって検出される venus 陽性細胞は, 主に T 細胞領域の深部に認められた. B 細胞領域や髄質では, venus 陽性細胞は少なかったが, CD11b<sup>+</sup> DC が豊富に認められた.

次に, 免疫応答に伴う, 抗原特異的な T 細胞との相互関係の解析を行った. このために, まず, XCR1-venus マウスに, Vybrant Did 標識した抗原特異的な CD8T 細胞 (OT-I トランスジェニックマウス由来の T 細胞) と tdTomato 標識した抗原特異的な CD4T 細胞 (OT-II トランスジェニックマウス由来の T 細胞) を静注したのち, 抗原 (卵白アルブミン, ovalbumine (OVA)) と免疫アジュバント (二本鎖 RNA, poly(I:C)) を皮下免疫した. 非免疫, あるいは免疫後 1 日目の所属リンパ節の凍結切片を作製し, venus 陽性細胞, OT-I T 細胞, OT-II T 細胞の局在を解析した (図 1 B,C). 非免疫マウスのリンパ節では, 3 種類の細胞はほぼ均等に分布していたが, 免疫後 1 日目のリンパ節では, venus 陽性細胞と OT-I T 細胞が共局在していたが, OT-II T 細胞は, venus 陽性細胞とは異なる領域に局在していた.

\*現所属: 和歌山県立医科大学 先端医学研究所 生体調節機構研究部

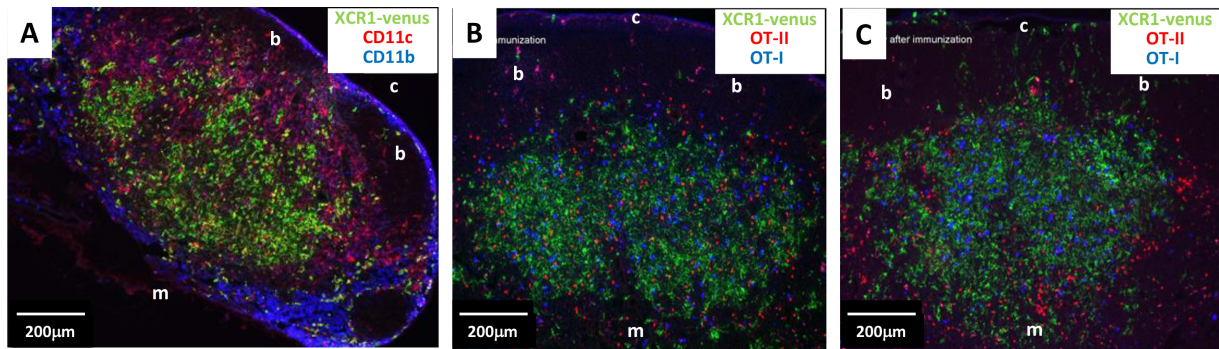


図1. リンパ節における XCR1<sup>+</sup> DC の局在.

A) 非免疫 XCR1-venus マウスの単径リンパ節において、DC サブセットの局在を解析した. B, C) XCR1<sup>+</sup> DC と抗原特異的 CD4, CD8T 細胞との共局在を解析した. XCR1-venus マウスに、Vybrant Did 標識した抗原特異的 CD8T 細胞 (OT-I トランスジェニックマウス由来の T 細胞) と tdTomato 標識した抗原特異的 CD4T 細胞 (OT-II トランスジェニックマウス由来の T 細胞) を移入したのち、抗原 (卵白アルブミン, ovalbumine (OVA)) と免疫アジュバント (二本鎖 RNA, poly(I:C)) を皮下免疫した. 免疫前 (B), あるいは免疫後 1 日目 (C) の所属リンパ節において、venus 陽性細胞, OT-I<sup>+</sup> 細胞, OT-II<sup>+</sup> 細胞の局在を解析した. Venus の発現は、抗 GFP 抗体により検出している. 図の中で b, c, m はそれぞれ B 細胞濾胞, 皮質側, 髄質側を示している.

## 2. XCR1<sup>+</sup> DC 欠失マウスの解析

XCR1<sup>+</sup> DC を恒常的に欠失させるために、ジフテリア毒素 A サブユニット (DTA) を XCR1<sup>+</sup> DC に発現させるようにデザインした遺伝子改変マウス (XCR1-DTA マウス) を作製した. このマウスにおいて、DC サブセットの FACS 解析を行ったところ、脾臓、皮膚リンパ節、腸間膜リンパ節ばかりでなく、腸管粘膜固有層においても、CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> DC の選択的恒常的な欠失が認められた (図 2).

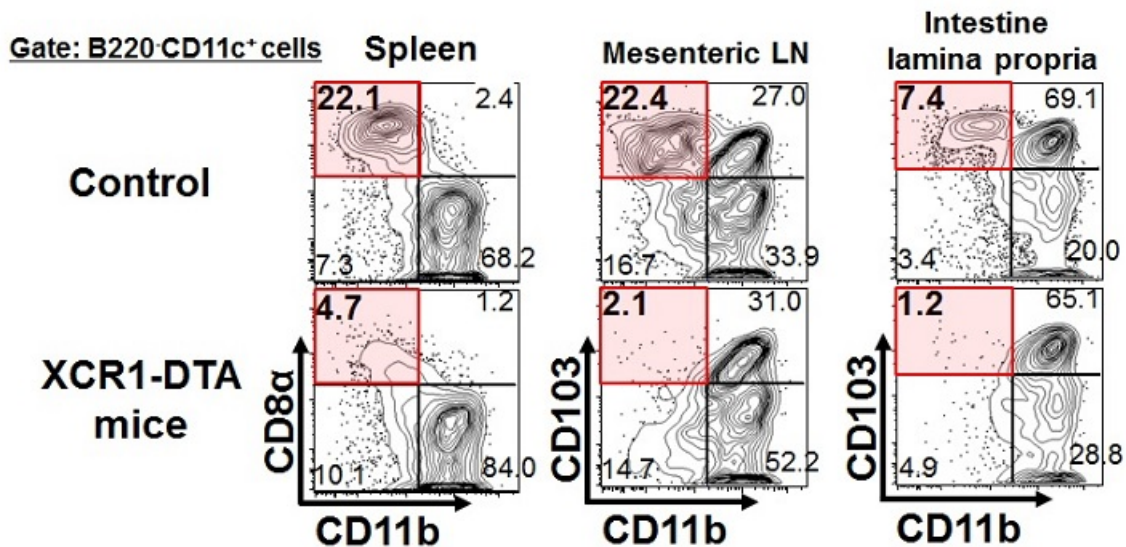


図2. XCR1-DTA マウスにおける DC サブセットの解析.

脾臓、腸間膜リンパ節、腸管粘膜固有層の DC (B220<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>の細胞集団) を、さらに、CD8 $\alpha$  / CD103, CD11b の発現に従い、解析した.

次に、T細胞の解析を行った。脾臓、腸間膜リンパ節において、CD4T細胞、CD8T細胞の数、比率はほぼ正常であったが、腸管粘膜固有層においては、CD4T細胞、CD8T細胞の減少が認められた(図3 A)。腸管では、上皮細胞間にT細胞が存在する。このT細胞には、T細胞受容体 $\gamma$ 鎖、 $\delta$ 鎖を持つT細胞( $\gamma\delta$ T細胞)や、CD8 $\alpha$ 鎖ホモ二量体を持つCD8 $\alpha\alpha$ T細胞など腸管上皮特有のT細胞サブセットが含まれる。XCR1-DTAマウスの腸管上皮では、これらすべてのT細胞サブセットが減少していた(図3 B)。また、XCR1-DTAマウスの腸管粘膜固有層にて残存するT細胞においては、腸管T細胞マーカであるCD103の発現が低下し、活性化により発現が低下するCD62Lの発現は増加していた(データ示していない)。

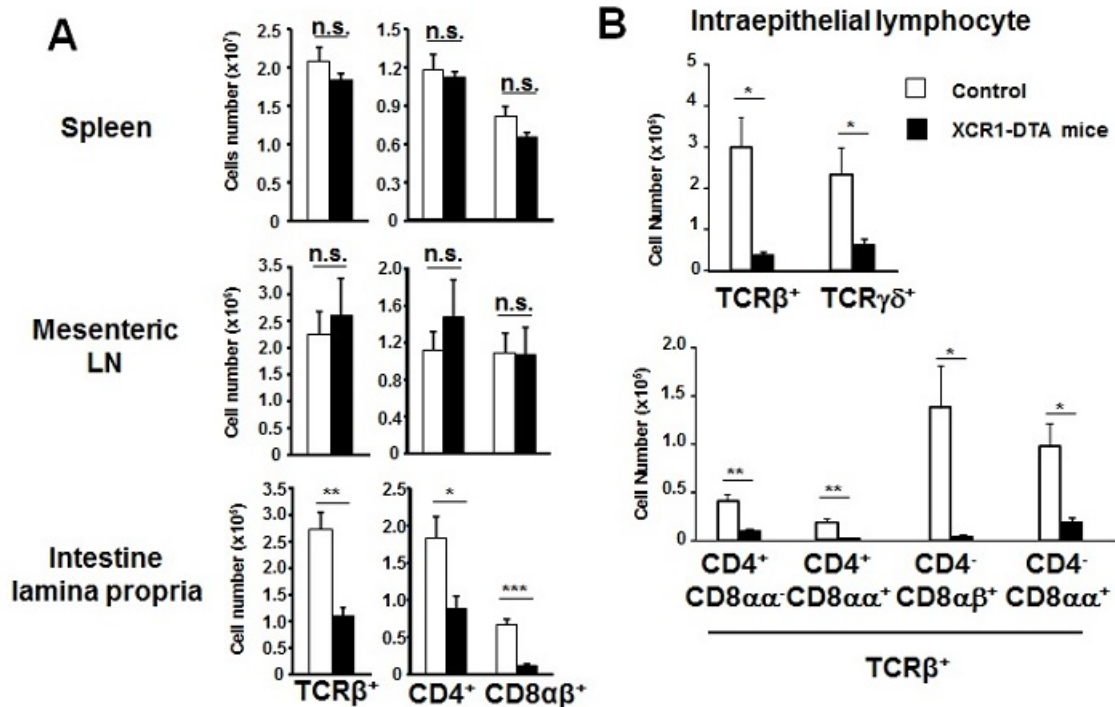


図3. XCR1-DTA マウスにおける T 細胞の解析。

脾臓、腸間膜リンパ節、腸管粘膜固有層 (A)、腸管上皮リンパ球 (B) における T 細胞数を FACS により解析した。n.s.=not significant, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, Student's t test.

## 考 察

リンパ節内で、CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> DC(XCR1<sup>+</sup> DC)は、CD103<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> DC とは異なった領域に分布していた。また、免疫応答の際には、主に CD8T 細胞と共局在し、細胞傷害性 T 細胞応答に主に関与していることが示唆された。また、CD4T 細胞は、CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> DC(XCR1<sup>+</sup> DC)とは異なった領域に主に局在していたことから、別の DC サブセット、おそらく CD103<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> DC と主に相互作用していると考えられた。以上のように、免疫組織学的手法により、DC サブセットの機能的分業が示された。

また、XCR1<sup>+</sup> DC を恒常的に欠失するマウスの解析から、腸管 T 細胞集団の維持に、XCR1<sup>+</sup> DC が必須であることが明らかになった。そして、T 細胞の表現型の解析から、XCR1<sup>+</sup> DC は、腸管 T 細胞の活性化、分化に関与していることが示唆された。これまで、DC は、T 細胞応答に関与していることは指摘されてきたが、定常状態で T 細胞集団の維持に関与しているかどうかについてはわかっていなかった。すなわち、腸管内において、DC 全体のわずか 5% を占めるに過ぎない XCR1<sup>+</sup> DC が、腸管免疫制御に必須の役割を果たしているという知見は非常に興味深い。XCR1<sup>+</sup> DC による T 細胞制御に関与する機能分子として、XCR1 自身が重要であるという予備的知見も得られつつあり、今後その機構の解明が期待される。

## 共同研究者

XCR1-venus マウスの画像解析に関して、理研統合生命医科学研究センター組織動態研究チームの岡田峰陽先生、北野正寛先生（南カリフォルニア大学 Scott Fraser's Lab へ留学）、また、XCR1<sup>+</sup>DC 欠失マウスの解析に関して、大学院生大田友和君に、心より感謝の意を表します。本稿を終えるにあたり、本研究にご支援を賜り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) Shortman, K. & Heath, W. R. : The CD8<sup>+</sup> dendritic cell subset. *Immunol. Rev.*, **234** : 18-31, 2010.
- 2) Dorner, B. G., Dorner, M. B., Zhou, X., Opitz, C., Mora, A., Guttler, S., Hutloff, A., Mages, H. W., Ranke, K., Schaefer, M., Jack, R. S., Henn, V. & Kroczeck, R. A. : Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8<sup>+</sup> T cells. *Immunity*, **31** : 823-833, 2009.
- 3) Yamazaki, C., Miyamoto, R., Hoshino, K., Fukuda, Y., Sasaki, I., Saito, M., Ishiguchi, H., Yano, T., Sugiyama, T., Hemmi, H., Tanaka, T., Hamada, E., Hirashima, T., Amakawa, R., Fukuhara, S., Nomura, S., Ito, T. & Kaisho, T. : Conservation of a chemokine system, XCR1 and its ligand, XCL1, between human and mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **397** : 756-761, 2010.
- 4) Yamazaki, C., Sugiyama, M., Ohta, T., Hemmi, H., Hamada, E., Sasaki, I., Fukuda, Y., Yano, T., Nobuoka, M., Hirashima, T., Iizuka, A., Sato, K., Tanaka, T., Hoshino, K. & Kaisho, T. : Critical roles of a dendritic cell subset expressing a chemokine receptor, XCR1. *J. Immunol.*, **190** : 6071-6082, 2013.
- 5) Shimizu, K., Asakura, M., Shinga, J., Sato, Y., Kitahara, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Schoenberger, S. P., Ezaki, T. & Fujii, S. : Invariant NKT cells induce plasmacytoid dendritic cell (DC) cross-talk with conventional DCs for efficient memory CD8<sup>+</sup> T cell induction. *J. Immunol.*, **190** : 5609-5619, 2013.