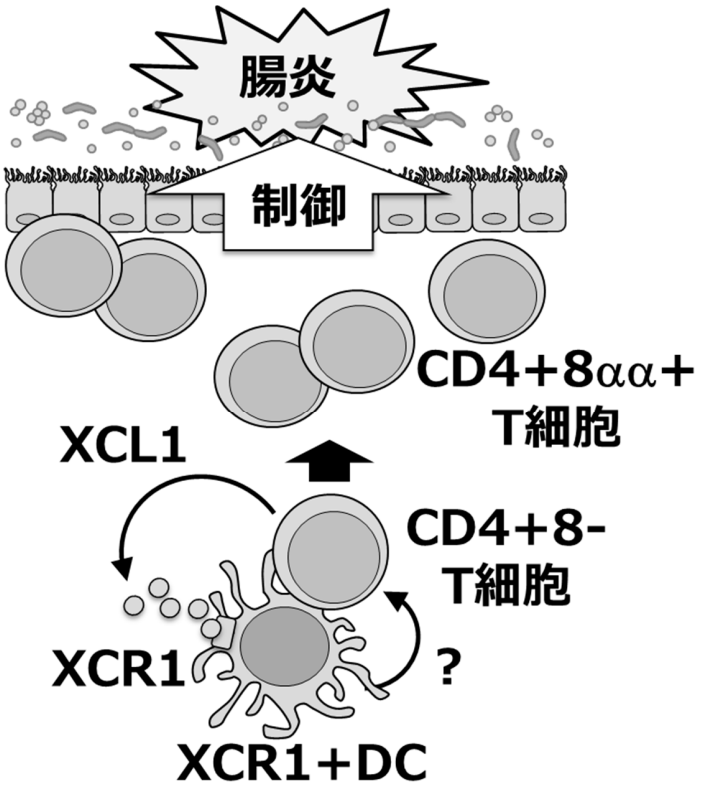
28　樹状細胞サブセットによる病態制御機構の解明	改正　恒康

【目的】ケモカイン受容体 XCR1 を発現する樹状細胞サブセット（XCR1^{+}DC）の新しい機能的意義として、腸管 T 細胞とのクロストークを介して腸管免疫の恒常性を制御していることをこれまでに明らかにしてきた。本研究では、その制御機構のさらなる解明を進めた。

【方法】XCR1^{+}DC を恒常的に欠失するマウス（XCR1-DTA マウス）において、腸管特有の T 細胞サブセットおよびの前駆細胞に関して解析を行った。また、XCR1 以外に、XCR1^{+}DC 優位に発現する機能分子群の欠損マウスの作製を進め、GTP 分解活性を有し、エンドソームやリソソームに局在する Rab7b に関して欠損マウスを解析した。

【結果】XCR1-DTA マウスにおいて、腸管特有のサブセットが著明に減少していたが、その前駆細胞に関しては数も分化能も保たれていた。この結果から、XCR1^{+}DC が恒常的に欠失しても、腸管 T 細胞の前駆細胞は存在し続けること、そして腸管局所における XCR1^{+}DC の重要性が明らかになった。また、Rab7 欠損マウスにおいては、腸管 T 細胞は数としては正常に存在していた。今後、T 細胞や DC における膜タンパクの表現型や様々な免疫アジュバントあるいは病原体に対する腸管免疫応答を解析すると共に、他の候補機能分子の解析を進める。

XCR1 を発現する樹状細胞による腸管免疫制御



28. 樹状細胞サブセットによる病態制御機構の解明

改正　恒康

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

Key words：樹状細胞，遺伝子改変マウス，腸管免疫

緒　言

樹状細胞（DC）は自然免疫担当細胞として炎症応答に関与すると共に抗原提示細胞としてT細胞を中心とした獲得免疫の成立にも関与する。近年、DCが種々のサブセットから構成され、サブセット特有の機能的特性により免疫応答を制御していることが明らかになりつつある［1］。

ケモカイン受容体XCR1を発現するDCサブセット（XCR1$^+$DC）はDCの約5〜10%を占めるにすぎないが、脾臓、リンパ節に加えて、皮膚、腸管など種々の組織に分布し、死細胞を取り込む能力、細胞障害性T細胞（CTL）の分化を誘導する活性（クロスプレゼンテーション活性）が高いという機能的特性を有し、腫瘍やウイルス感染に対する防御的な細胞傷害性免疫応答に重要な役割を果たすことがわかっていた。我々は、XCR1$^+$DCを選択的かつ恒常的に欠失するマウス（XCR1-DTAマウス）を樹立し、そのマウスにおいて腸管T細胞集団の細胞死が亢進し、数が減少していること、そしてデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）による腸炎症状の重篤化がみられることを見出し、腸管内のT細胞集団の生存維持および腸炎病態の制御にXCR1$^+$DCが必須であることを明らかにした（図1）［2］。また、XCR1およびそのリガンドであるXCL1の欠損マウスの解析により、XCR1$^+$DC機能の分子基盤として、腸管T細胞由来のXCL1とXCR1の相互作用が重要であることを示し、ケモカインXCL1を介した、XCR1$^+$DCと腸管T細胞とのクロストークという新たな腸管免疫制御機構を提示した（図1）［2］。本研究では、この知見に基づき、さらにXCR1$^+$DCによる腸管免疫制御機構の解明を進めた。

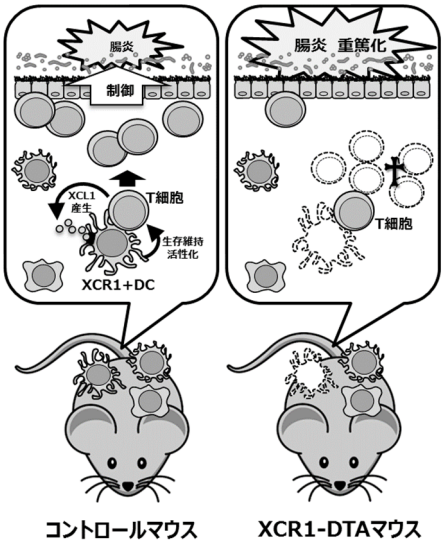


図1. XCR1-DTAマウスの表現型
XCR1$^+$DCの欠失により、腸管T細胞の減少、腸炎症状の重篤化が認められる。

方　法

1. XCR1-DTA マウスにおける T 細胞の解析

XCR1-DTA マウスにおいては、腸管粘膜固有層、腸管上皮の T 細胞が著明に減少していたが、特に、CD4 と CD8αα を共に発現する、腸管特有の T 細胞サブセット（$CD4^+CD8\alpha\alpha^+$T 細胞）の減少が著明であった（図 2A）。$CD4^+CD8\alpha\alpha^+$T 細胞は、$CD4^+CD8^-$T 細胞に由来すると考えられているので、この分化過程に $XCR1^+$DC が関与するかどうかを検討した。

まず、脾臓から $CD4^+CD8^-CD62L^+$T 細胞を調整し、抗 CD3/28 抗体で刺激したのち、RAG2 欠損マウス（B 細胞、T 細胞を欠失するマウス）に静注し、4 週間後小腸の腸管上皮 T 細胞を解析した。また、胸腺内の $CD4^-CD8^-NK1.1^-CD5^+TCR\beta^+$細胞集団の中には、腸管上皮 T 細胞の前駆細胞（IELp）が含まれる［3］。XCR1-DTA マウスから IELp を調整し、RAG2 欠損マウスへ静注し、6 週間後小腸の腸管上皮 T 細胞を解析した。

さらに、コントロールマウスと XCR1-DTA マウスの腸管粘膜固有層の $CD4^+CD8^-$T 細胞の遺伝子発現プロフィールを Nanostring 解析により比較した。

2. $XCR1^+$DC の XCR1 以外の機能分子の解析

XCR1-DTA マウス、XCR1 欠損マウス、XCL1 欠損マウス、いずれにおいても腸管 T 細胞は減少していたが、XCR1-DTA マウスに比較して、XCR1 欠損マウス、XCL1 欠損マウスにおける腸管 T 細胞減少の程度は軽度であった。このことから、$XCR1^+$DC 由来の XCR1 以外の機能分子の関与が示唆された。腸管の DC は、CD103、CD11b の発現から 3 種類のサブセット（$CD103^+CD11b^-$、$CD103^+CD11b^+$、$CD103^-CD11b^+$）に分けられ、$XCR1^+$DC は $CD103^+CD11b^-$DC に相当する。そこで、これら DC サブセットの遺伝子発現を DNA マイクロアレイにより解析し、まず $XCR1^+$DC に 6 倍以上優位に発現する遺伝子 501 個を選別した。この中から、これまでに機能的意義がよくわかっておらず、DC あるいは腸管免疫で機能する可能性が高い遺伝子、特に 4 種類の遺伝子に着目し、CRISPR 法により、ホモ変異マウスを得るための Founder マウスを樹立した。このうち、Rab7b 欠損マウスについて、ホモ変異マウスを得て、腸管 T 細胞の解析を行った。

結　果

1. XCR1-DTA における T 細胞の解析

コントロールマウス由来の脾臓 $CD4^+CD8^-CD62L^+$T 細胞を移入されたマウスでは、4 週間後腸管上皮内で $CD4^+CD8\alpha\alpha^+$T 細胞が検出された（図 2B）。XCR1-DTA マウス由来の脾臓 $CD4^+CD8^-CD62L^+$T 細胞を移入されたマウスにおいても、ほぼ同様の割合で、腸管上皮内にて $CD4^+CD8\alpha\alpha^+$T 細胞が検出された（図 2B）。また、コントロールマウス、XCR1-DTA どちらの胸腺においても、IELp はほぼ同程度に検出された（Not shown）。さらに、XCR1-DTA マウス由来の IELp を RAG2 欠損マウスに移入したところ、腸管上皮内に $CD4^+CD8\alpha\alpha^+$T 細胞が検出された（図 2C）。

また、$CD4^+CD8^-$T 細胞から $CD4^+CD8\alpha\alpha^+$T 細胞への分化の際には転写因子 Runx3 の遺伝子発現が上昇することが報告されている［4, 5］。XCR1-DTA マウス由来の腸管粘膜固有層の $CD4^+CD8^-$T 細胞において、コントロールマウス由来のそれに比べて、Runx3 の発現低下が認められた（Not shown）。

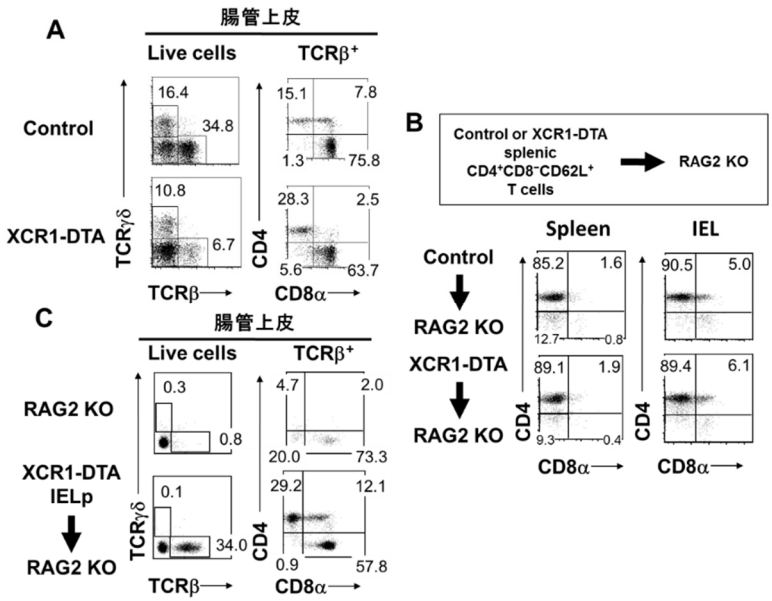


図 2. XCR1-DTA マウスにおける腸管 $CD4^+CD8\alpha\alpha^+$T 細胞分化能の解析

A）腸管上皮 T 細胞の解析。 B）コントロールあるいは XCR1-DTA マウス由来の脾臓 $CD4^+CD8^-CD62L^+$T 細胞の分化能の解析。 C）XCR1-DTA マウス由来の胸腺 IELp の分化能の解析。

2. $XCR1^+DC$ の XCR1 以外の機能分子の解析

Rab7b は、Rab ファミリーに属する、GTP 分解活性を有する細胞質内タンパク質であり、エンドソームやリソソームで、リポ多糖（LPS）の受容体 TLR4 などのタンパクの分解や輸送に関与することが報告されている［6］。Rab7b 欠損マウスを解析したところ、脾臓、リンパ節ばかりでなく、腸管粘膜固有層、腸管上皮共に T 細胞は正常に存在していた（図 3）。

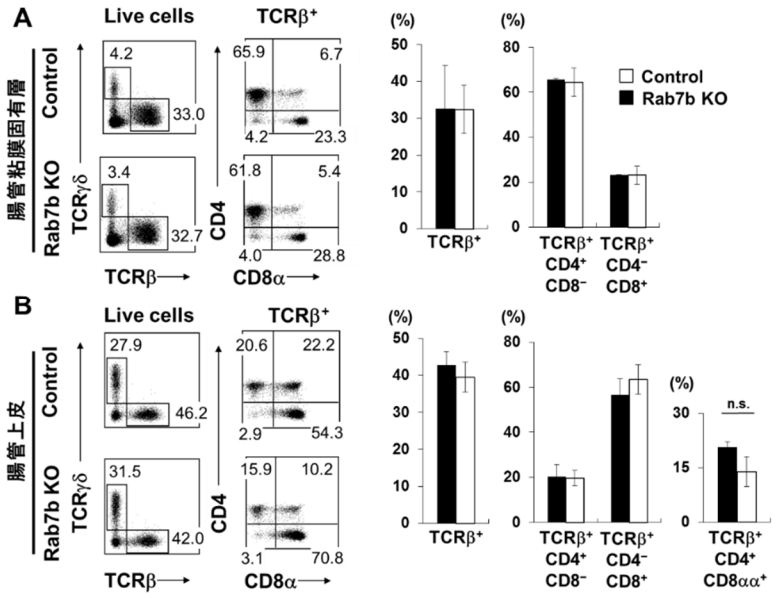


図 3. RAb7b 欠損マウスにおける腸管 T 細胞の解析

A）腸管粘膜固有層 B）腸管上皮

考　察

XCR1$^+$DCが恒常的に欠失した場合に、腸管のT細胞は粘膜固有層、腸管上皮共に減少していたが、腸管特有に存在するT細胞セブセットCD4$^+$CD8αα$^+$T細胞は特に著明に減少していた。また、放射線照射したXCR1-DTAマウスにコントロールマウス由来の骨髄細胞を移入した骨髄キメラマウスではCD4$^+$CD8αα$^+$T細胞が出現したこと、そして、放射線照射したコントロールマウスにXCR1-DTAマウス由来の骨髄細胞を移入した骨髄キメラマウスではCD4$^+$CD8αα$^+$T細胞が著明に減少していたこと（Not shown）から、CD4$^+$CD8αα$^+$T細胞を誘導し、XCR1を発現する細胞は骨髄由来の細胞（DC）であり、実質系の細胞ではないことが示された。また、CD4$^+$CD8αα$^+$T細胞の前駆細胞と考えられる、脾臓CD4$^+$CD8$^-$T細胞や胸腺内の腸管上皮T細胞前駆細胞は、XCR1-DTAマウスにおいて、数もCD4$^+$CD8αα$^+$T細胞への分化能も正常であったことから、XCR1$^+$DCが恒常的に欠失していてもCD4$^+$CD8αα$^+$T細胞へ分化するT細胞は正常に存在し続けることが明らかになった。また、遺伝子発現解析から、XCR1$^+$DCは、腸管粘膜固有層局所で、T細胞の分化誘導プログラムを制御していることが示唆された。

このXCR1$^+$DCの機能に関与するXCR1以外の機能分子として、Rab7b欠損マウスを作製、解析したが、腸管T細胞は正常に存在した。今後、種々の免疫応答、特に腸管免疫を活性化する免疫アジュバントに対する応答が正常かどうか、さらに検索を進める。また、XCR1$^+$DC優位に発現するその他の機能分子の役割についても検討する。また、腸管特有の因子として、腸内細菌叢およびその代謝産物も重要と考えられ、今後この観点からのアプローチも重要である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、和歌山県立医科大学生体調節機構研究部の邊見弘明、佐々木泉、大田友和、折茂貴是、小笹俊哉、福田有里である。

文　献

1) Durai V, Murphy KM. Functions of Murine Dendritic Cells. Immunity. 2016 Oct 18;45(4):719-736. doi: 10.1016/j.immuni.2016.10.010. PMID: 27760337.
2) Ohta T, Sugiyama M, Hemmi H, Yamazaki C, Okura S, Sasaki I, Fukuda Y, Orimo T, Ishii KJ, Hoshino K, Ginhoux F, Kaisho T. Crucial roles of XCR1-expressing dendritic cells and the XCR1-XCL1 chemokine axis in intestinal immune homeostasis. Sci Rep. 2016 Mar 23;6:23505. doi: 10.1038/srep23505. PMID: 27005831.
3) Gangadharan D, Lambolez F, Attinger A, Wang-Zhu Y, Sullivan BA, Cheroutre H. Identification of pre- and postselection TCRαβ$^+$ intraepithelial lymphocyte precursors in the thymus. Immunity. 2006 Oct;25(4):631-41. doi: 0.1016/j.immuni. 2006.08.018. PMID: 17045820.
4) Mucida D, Husain MM, Muroi S, van Wijk F, Shinnakasu R, Naoe Y, Reis BS, Huang Y, Lambolez F, Docherty M, Attinger A, Shui JW, Kim G, Lena CJ, Sakaguchi S, Miyamoto C, Wang P, Atarashi K, Park Y, Nakayama T, Honda K, Ellmeier W, Kronenberg M, Taniuchi I, Cheroutre H. Transcriptional reprogramming of mature CD4$^+$ helper T cells generates distinct MHC class II-restricted cytotoxic T lymphocytes. Nat Immunol. 2013 Mar;14(3):281-9. doi: 10.1038/ni.2523. PMID: 23334788.
5) Reis BS, Rogoz A, Costa-Pinto FA, Taniuchi I, Mucida D. Mutual expression of the transcription factors Runx3 and ThPOK regulates intestinal CD4$^+$ T cell immunity. Nat Immunol. 2013 Mar;14(3):271-80. doi: 10.1038/ni.2518. PMID: 23334789.
6) Wang Y, Chen T, Han C, He D, Liu H, An H, Cai Z, Cao X. Lysosome-associated small Rab GTPase Rab7b negatively regulates TLR4 signaling in macrophages by promoting lysosomal degradation of TLR4. Blood. 2007 Aug 1;110(3):962-71. PMID: 17395780.