

樹状細胞分化を決定する骨髄微小環境におけるサイトカイン及び転写因子ネットワーク機構の解明

Analysis of cytokine and transcription factor signal transduction network in the bone marrow niche which regulating dendritic cell development

(日本免疫学会推薦)

代表研究者	金沢医科大学	小内 伸幸	Kanazawa Medical University	Nobuyuki ONAI
協同研究者	東京医科歯科大学	四元 聡志	Tokyo Medical and Dental University	Satoshi Yotsumoto
	東京医科歯科大学	川村 俊輔	Tokyo Medical and Dental University	Syunsuke KAWAMURA

Regulation of dendritic cell (DC) development from common dendritic cell progenitors (CDPs) in the bone marrow (BM) has not yet been clarified. Flt3-ligand is a non-redundant cytokine for DC development. In this study, we have generated Flt3-ligand reporter mice to detect the cells that produce this protein and identify the BM microenvironments that regulate DC development in the BM. In addition, we have confirmed the contribution of BM niche cells to DC development. However, it seems that niche cells do not contribute to DC development since all niche cells do not produce the Flt3-ligand, as confirmed by using the Flt3-ligand reporter mice. Surprisingly, we identified that both memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells are high producers of the Flt3-ligand in the BM. In addition, we found that T cell receptor ligation on naïve CD4⁺ and CD8⁺ T cells enhances Flt3-ligand production from these cells. It has been well known that naïve T cells receive the antigen presentation property from DCs and differentiate into memory T cells. Based on these results, we propose following positive feed-back model: naïve T cells, which receive the antigen presentation property from DCs, activate and differentiate into memory T cells. These memory T cells are recruited in the peripheral tissue and eliminate pathogens. On the other hand, some memory T cells migrate into the BM, produce the Flt3-ligand, stimulate CDPs, and induce DC development in the BM.

研究目的

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⁾。ニッチ細胞は細網細胞、血管内皮細胞、間葉系幹細胞、骨芽細胞などから構成され、サイトカイン、ケモカイン、細胞接着分子を産生し造血幹細胞の幹細胞性や機能を維

持している。この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、異物由来の物質を取り込み、T細胞へ抗原を提示することで免疫反応を始動させる重要な免疫担当細胞である²⁾。DCは核酸成分に反応して大量のI型イン

ターフェロンを産生する形質細胞様 DC(plasmacytoid DC: pDC) と通常型 DC(conventional DC: cDC)に大別される。申請者は、DC 分化に必須なサイトカイン受容体 Flt3 と CD115(macrophage colony stimulating factor receptor: M-CSFR)の発現を指標にしてマウス骨髄から世界に先駆けてこの DC サブセットのみに分化する 2 種類の共通 DC 前駆細胞 (common DC progenitor: CDP)、CD115⁺CDP と CD115⁻CDP を発見した^{3,4)}。この CDP から DC サブセットへの分化は骨髄内で決定されているが、この細胞運命決定分子機構や CDP の骨髄内動態は不明である。そこで本研究では、DC 分化に必須な転写因子のレポーターマウスを用いたり、CDP に特異的に発現する細胞表面マーカーに対する抗体を用いて CDP を可視化

研究経過

研究代表者は世界に先駆けて 2 つの樹状細胞前駆細胞を同定した。1 つ CD115⁺CDP でもう一つは CD115⁻CDP である。前者は Clec9A を発現し、cDC の主な分化起源である。後者は転写因子 E2-2 を発現し、pDC の主な分化起源である。本研究では樹状細胞前駆細胞である CDP の骨髄内動態を明らかにするために pDC 分化に必須転写因子 E2-2 の遺伝子発現領域を含む BAC (bacterial artificial clone) の下流に赤色の蛍光タンパク質遺伝子 Kusabiraorange (KuOr) を組み込んだ BAC クローンをを用いて E2-2-KuOr トランスジェニックマウスを作製した。この E2-2-KuOr トランスジェニックマウスは発達上、行動上の問題もなく、各造血幹細胞、前駆細胞、免疫細胞の数には問題は無かった。さらに CDP に特異的に発現する Clec9A に対する抗体を用いると CDP が可視化可能である。また骨髄内ニッチ細胞である細網細胞 (CAR 細胞) は PDGFR β を発現し、血管内皮細胞は V-cadherin、骨芽細胞は Osteocalcin を発現している。これらの分子に対する抗体を用いることで各ニッチ細胞を免疫染色方法で検出可能である。そこで、E2-2-KuOr マウスの骨髄切片を作製し、蛍光免疫染色方法に

し、骨髄内動態を明らかにする。さらに DC 前駆細胞と相互作用するニッチ細胞を同定し、DC 分化におけるニッチ細胞の生理学的意義を明らかにする。また、サイトカイン Flt3 リガンドは DC 分化に必須なサイトカインである⁵⁾。このため、骨髄内で Flt3 リガンドを大量に産生する細胞が、骨髄内で DC 分化を制御するニッチ細胞として機能しているという仮説の元、Flt3 リガンドを可視化可能なレポーターマウスを作製した。本研究では、CDP と Flt3 リガンド産生細胞を可視化可能なレポーターマウスを用いて、骨髄内の DC 分化をコントロールするニッチ細胞を同定し、さらにニッチ細胞由来の DC 分化を制御する分子とその下流の転写因子ネットワーク制御機構を明らかにすることを目的とした。

て CDP の骨髄内動態を検討したところ、特定の細網細胞 (CAR 細胞) や血管内皮細胞、破骨細胞に隣接している訳ではなく、骨髄内に一様に分散して存在していた。

骨髄内において CDP から DC への分化を制御するニッチ細胞は、同細胞分化に必須サイトカインである Flt3 リガンドを大量に産生する細胞こそが骨髄内で DC 分化を制御していると想定し、Flt3 リガンドの遺伝子発現-mCherry レポーターを作製した。この Flt3 リガンド-mCherry の骨髄からコラゲナーゼ処理を行い、細胞懸濁液を調整し、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 ⁺) における mCherry の発現を検討した。しかし、驚くべきことに、各ニッチ細胞において Flt3 リガンド-mCherry 発現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。そこで、骨髄内の各免疫細胞における Flt3 リガンド-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。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。さらにナイーブ CD4⁺及び CD8⁺T 細胞を抗原刺激を模倣すべく、T 細胞受容体を刺激し、mRNA を調整して定量的 PCR 方法によって Flt3 リガンド mRNA 発現量を検討したところ、mRNA が増強していることを確認した。さらに抗原刺激を行った培養上清中の Flt3 リガンド量を ELISA 方法にて検討したところ、タンパク質レベルでも増加していることを確認した。

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考えられていた。本研究で 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。ニッチ細胞が何らかの分化誘導因子を産生し、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低いことが示唆された。また、DC 分化に不可欠なサイトカイン Flt3 リガンド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 Flt3 リガンド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、Flt3 リガンド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 細胞に病原性微生物由来の抗原を提示し、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 細胞は当然、病原性微生物を排除するために、抹消の感染部位に移行する。一方で、一部のメモリーT 細胞は骨髄

へと移行し Flt3 リガンドを産生して DC 分化誘導に関与するモデルが示唆された。また我々はこのメモリーT 細胞が末梢組織への移行に重要なケモカイン受容体 CCR7 を発現し、さらに骨髄へのホーミングに重要なケモカイン受容体 CXCR4 を発現していることを確認している(未発表データ)。また、我々は Flt3 リガンド以外にも造血サイトカインであるトロンボポエチンと M-CSF が Flt3 リガンドと協調して、DC 分化に必須な転写因子 Irf8 と E2-2 の発現を誘導し、DC 分化を増強することを見出している。今後は骨髄内におけるトロンボポエチンと M-CSF 産生細胞を同定することが重要である。さらに、このリンパ節内で抗原刺激を受けたメモリー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。

研究の発表

口頭発表

1. Nobuyuki Onai and Toshiaki Ohteki. Identification of Flt3-ligand producing cells by generating Flt3-ligand mCherry reporter mouse. 5th Annual Meeting of the international Cytokine and Interferon Society. Kanazawa Japan, 29th Oct-1st Nov. 2017
2. Nobuyuki Onai and Toshiaki Ohteki. Regulation of pDC development by graded expression of E2-2. The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. Sendai, Japan, 12nd-14th Dec, 2017
3. Nobuyuki Onai, Junpei Asano, Shoko Kuroda, and Toshiaki Ohteki. Regulation of pDC development by graded expression of E2-2. 第 27 回 日本樹状細胞研究会. 東京. 6 月 30 日 2017 年
4. Nobuyuki Onai, Junpei Asano, Shoko Kuroda, Rumiko Kurosaki-Nakamura, and Toshiaki Ohteki. Regulation of pDC development by graded expression of E2-2. The 24th International Symposium on Molecular Cell

Biology of Macrophage. Tokyo June 4th~5th.
2016

誌上発表

1. Onai N, Asano J, Kurosaki R, Kuroda S, Ohteki T. Flexible fate commitment of E2-2^{high} common DC progenitors implies tuning in tissue microenvironments. *Int. Immunol.* 29: 443-456, 2017
2. Kawamura S, Onai N, Kurabayashi K, Sato T, Miya F, Tsunoda, T, Yotsumoto S, Kuroda S, Takenaka K, Akashi K, Ohteki T. Identification of a human clonogenic progenitor with strict monocyte differentiation potential - a counterpart of mouse cMoPs. *Immunity* 45: 835-848, 2017

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.*, 32:315-20, 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^{hi}M-CSFR⁺ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat. Immunol.* 8, 1207-1216, 2007
- 4) Onai, N., Kurabayashi, K., Hosoi-Amaike, 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