

博士(医学) 古橋一樹

### 論文題目

Mouse lung CD103<sup>+</sup> and CD11b<sup>high</sup> dendritic cells preferentially induce distinct CD4<sup>+</sup>T cell responses

(マウス肺の CD103<sup>+</sup>樹状細胞と CD11b<sup>high</sup>樹状細胞は選択的に異なった CD4<sup>+</sup>T 細胞反応を誘導する)

### 論文の内容の要旨

#### [はじめに]

樹状細胞 (DC) は、最も強力な抗原提示細胞として免疫反応の中心的な役割を担っている。肺樹状細胞 (LDC) は気道上皮下や肺胞隔壁に存在し、気道に侵入してきた抗原を捉えてリンパ節へ遊走した後、T 細胞へ抗原提示して免疫反応を誘導する。近年、この DC にいくつかのサブタイプがあることが分かってきており、その中でマウスの LDC には、主に CD103<sup>+</sup> DC と CD11b<sup>high</sup> DC という2つのサブタイプがあることが報告された。これらの LDC のサブタイプが誘導する免疫反応には違いがある可能性が考えられているが、CD4<sup>+</sup> T 細胞 (ヘルパー T 細胞: Th 細胞) 反応への誘導能の違いについての報告はほとんどない。そこで今回、この2つの LDC サブタイプにおける Th 細胞反応への誘導能の違いを検討した。

#### [材料ならびに方法]

実験には、8-12 週の BALB/c マウスと ovalbumin (OVA) に特異的に反応する T 細胞受容体を持ったトランスジェニックマウスである DO11.10 マウスを使用した。まず BALB/c マウスから肺を摘出し、酵素処理と magnetic cell sorting を使って CD11c<sup>+</sup>細胞を分離した。更に FACS Aria flow cytometer により CD11c<sup>+</sup> MHC class II<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>細胞 (CD103<sup>+</sup> LDC) と CD11c<sup>+</sup> MHC class II<sup>+</sup> CD103<sup>-</sup> CD11b<sup>high</sup>細胞 (CD11b<sup>high</sup> LDC) を選別し、CD103<sup>+</sup> LDC と CD11b<sup>high</sup> LDC の表面および細胞内分子の違いを検討した。次に DO11.10 マウスから脾臓を摘出し、magnetic cell sorting により naïve CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> T 細胞を単離した。単離した各 LDC と naïve CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> T 細胞を OVA 存在下で共培養した後に、Th 細胞を更に抗 CD3+抗 CD28 抗体結合ビーズで刺激しその属性を検討した。具体的には cytometric bead array で各サイトカイン産生量を、flow cytometer で細胞内サイトカイン染色を行なった。また real-time quantitative PCR を使い、誘導された Th 細胞のケモカインレセプター (CCR) の発現量を調べた。最後に2つの LDC のサイトカイン産生能の違いを調べるため、トール様受容体 (TLR) リガンド存在下で LDC を刺激し、cytometric bead array と ELISA 法で産生された各サイトカイン量の測定を行なった。

#### [結果]

2つの LDC サブタイプの表面および細胞内分子を比較すると、CD207 は CD103<sup>+</sup> LDC でより強く発現し、F4/80 は CD11b<sup>high</sup> LDC のみで発現していた。その他の表面分子の発現に

ついて、2つのサブタイプの間には大きな違いを認めなかった。次に CD103<sup>+</sup> LDC あるいは CD11b<sup>high</sup> LDC と共培養した Th 細胞を、それぞれ再刺激したところ、IL-2、TNF、IFN- $\gamma$ 、IL-17A は CD103<sup>+</sup> LDC で誘導した Th 細胞で、また、IL-4、IL-6、IL-10 は CD11b<sup>high</sup> LDC で誘導した Th 細胞で有意に多く産生された。細胞内サイトカイン染色でも培養上清中のサイトカイン量の結果と同様に、CD103<sup>+</sup> LDC で誘導した Th 細胞では IFN- $\gamma$  と IL-17A の陽性細胞が多く、また CD11b<sup>high</sup> LDC で誘導した Th 細胞では IL-4 と IL-10 の陽性細胞を多く認めた。誘導した Th 細胞の CCR の発現量の比較では、CD103<sup>+</sup> LDC で誘導した Th 細胞では主に Th1 細胞に発現する CXCR3 と CCR5 の mRNA の発現レベルが有意に高く、一方、CD11b<sup>high</sup> LDC で誘導した Th 細胞では Th2 細胞で見られる CXCR4 と CCR4 の発現レベルが有意に上昇していた。各種 TLR リガンドの刺激による LDC の産生サイトカインについては、IL-12p70 は TLR1 と TLR2 のリガンドにより CD103<sup>+</sup> LDC で有意に多く産生され、その一方で IL-10 と MCP-1 はすべての TLR リガンドの刺激によって CD11b<sup>high</sup> LDC で有意に多く産生された。また IL-6 と TNF については、TLR1 と TLR2 あるいは TLR9 を刺激するリガンドにより CD11b<sup>high</sup> LDC で有意に産生された。

#### [考察]

今回の結果から、マウスの CD103<sup>+</sup> LDC は主に Th1、Th17 反応へ、また CD11b<sup>high</sup> LDC は Th2 反応へ誘導を促す可能性が示唆された。CD103<sup>+</sup> LDC と CD11b<sup>high</sup> LDC を比較すると、共刺激分子を含めた表面分子の発現には大きな差はなかったが、一部の TLR リガンドの刺激で CD103<sup>+</sup> LDC は IL-12p70 を多く産生し、一方、CD11b<sup>high</sup> LDC は IL-6 と IL-10 の産生能が高いことが示された。したがって、CD103<sup>+</sup> LDC の IL-12p70 産生能が高いことがその Th1 誘導能と関連している可能性が示唆された。しかし、Th17 誘導に関わる IL-6、TGF- $\beta$ 、IL-23 の産生は両 LDC で差はなく、CD11b<sup>high</sup> LDC と比べ CD103<sup>+</sup> LDC がより強く Th17 反応を誘導する機序は不明であった。

我々の結果と一致した報告として Raymond らは、Th2 反応に障害を来す CD47 ノックアウトマウスを使い、CD11b<sup>high</sup> LDC が肺における Th2 反応の誘導に不可欠であることを証明している (J Allergy Clin Immunol 2009)。さらに近年、皮膚における Langerin<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>low</sup> or negative 樹状細胞 (CD103<sup>+</sup> DC) が Th1、Th17 反応を主に誘導し、自己免疫疾患の発症と関連する可能性が報告された (J Exp Med 2010)。また、腸間膜リンパ節の CD103<sup>+</sup> DC に関して、腸炎モデルマウスでは Th1、Th17 反応を効率的に誘導するということが示されている (Eur J Immunol 2010)。同じサブタイプの DC であっても組織や環境の違いによって Th 反応の誘導能に違いがある可能性が考えられており、今回、我々の研究は定常状態下であるため、他の条件での検討は今後の課題である。

#### [結論]

定常状態におけるマウスの CD103<sup>+</sup> LDC は Th1、Th17 反応へ誘導を促す一方、CD11b<sup>high</sup> LDC は Th2 反応へ誘導を促す可能性が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

マウスの肺樹状細胞(LDC)には、主に CD103<sup>+</sup> DC と CD11b<sup>high</sup> DC の2つのサブタイプがある。しかし、これらが誘導する CD4<sup>+</sup> helper T 細胞 (Th 細胞) のサブポピュレーションについての報告はほとんどない。申請者らは、この2つの LDC の Th 細胞誘導能の違いを検討した。

BALB/c マウスの肺から CD103<sup>+</sup> LDC と CD11b<sup>high</sup> LDC を単離した。反応細胞として、ovalbumin (OVA) に特異的に反応する T 細胞受容体を持った DO11.10 トランスジェニックマウスの脾臓から、naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞を得た。各 LDC と naïve CD4<sup>+</sup> T 細胞を OVA 存在下で共培養した後、Th 細胞を更に再刺激し、各サイトカインの産生量、細胞内サイトカイン染色、誘導された Th 細胞のケモカインレセプター (CCR) の mRNA 発現量を調べた。結果、共培養により誘導された Th 細胞は T 細胞受容体刺激により、CD103<sup>+</sup> LDC 誘導の場合は IL-2、TNF、IFN- $\gamma$ 、IL-17A を産生し、一方 CD11b<sup>high</sup> LDC 誘導の場合は IL-4、IL-6、IL-10 を産生した。誘導した Th 細胞の CCR においては、Th1 細胞に主に発現する CXCR3 と CCR5 は CD103<sup>+</sup> LDC 誘導 Th 細胞で、一方 Th2 細胞に発現する CXCR4 と CCR4 は CD11b<sup>high</sup> LDC 誘導 Th 細胞で mRNA の発現レベルが有意に上昇していた。一部の TLR リガンドの刺激で CD103<sup>+</sup> LDC は IL-12p70 を多く産生し、一方、CD11b<sup>high</sup> LDC は IL-6 と IL-10 の産生能が高いことが示された。

本研究により、マウスの CD103<sup>+</sup> LDC は主に Th1、Th17 反応へ、また CD11b<sup>high</sup> LDC は Th2 反応へ誘導を促す可能性が示唆された。審査委員会では、肺での DC サブセットの機能を明らかにした点を審査員一同高く評価した。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 戸倉 新樹  
副査 大西 一功 副査 永田 年