

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 Identification of CD8 α ⁺CD11c⁻ lineage phenotype-negative cells
in the spleen as committed precursor of CD8 α ⁺ dendritic cells

和訳 マウス脾臓 CD8 α ⁺CD11c⁻Lin⁻細胞の CD8 α ⁺樹状細胞のコミット
した前駆体としての同定

氏 名 王 泳

I. 背景

樹状細胞 (Dendritic cell; DC) は、プロフェッショナルな抗原提示細胞であり、免疫系の調節において非常に重要な細胞である。また、DC にはいくつかのサブセットが存在し、それぞれのサブセットは表面抗原の特徴や機能のみならず、リンパ臓器における局在においても異なっていることが明らかとなっている。CD8 α ⁺ DC は動脈周囲リンパ球鞘 (PALS) の T 細胞領域に局在し、一方で CD8 α ⁻ DC は辺縁帯に存在する。機能の点では、CD8 α ⁺ DC は CD8 α ⁻ DC と異なり、Th 1 タイプの免疫応答に重要なサイトカインである、IFN- γ や IL-12 を大量に産生する特徴がある。また最近、CD8 α ⁺ DC は *in vivo* において、*cross-priming* により細胞傷害性 T 細胞を誘導することが明らかとなった。

これまでの報告において、いくつかの造血系前駆細胞のポピュレーションが CD8 α ⁺ DC へと分化しうることが示されている。胸腺由来の CD4^{low} リンパ球系前駆細胞が、*in vivo* において CD8 α ⁺ DC へと分化しうることが証明された。また、共通ミエロイド系前駆細胞及び共通リンパ球系前駆細胞のいずれの細胞からも、CD8 α ⁺ DC が分化するとの報告も成されている。これらの結果は、異なる造血系前駆細胞が、何らかの共通の分化様式を経て、CD8 α ⁺ DC へと分化する可能性を示唆している。しかしながら、CD8 α ⁺ DC への分化を選択的に誘導する、*in vivo* あるいは *in vitro* の実験系が確立されていないことから、本細胞の発生機構については不明な点が多い。

本研究では、in vivo における CD8 α ⁺ DC の発生機構を明らかにするために、放射線照射した近郊系マウスに脾臓由来 CD8 α ⁺CD11c⁻lineage phenotype(Lin)⁻ 細胞を移入するシステムを用いて、同細胞の CD8 α ⁺ DC 前駆細胞としての可能性を検討した。

II. 材料及び方法

1. CD8 α ⁺CD11c⁻Lin⁻ 細胞の単離及び移植

脾臓から調整した単核球より、CD8 α マイクロビーズを用いて CD8 α ⁺ 細胞を濃縮した後、セルソーターにより CD8 α ⁺CD11c⁻Lin⁻ 細胞を単離した。Ly5.2B6 マウス由来の CD8 α ⁺CD11c⁻Lin⁻ 細胞 (3.5 × 10⁵) を、致死量の放射線を照射した Ly5.1B6 マウスの尾静脈内に移入した。

2. DC の単離及び FACS 解析

脾臓、胸腺及びリンパ節を collagenase D により消化し、単核球を Lymphoprep を用いた比重勾配法により分離した。この単核球を CD11c マイクロビーズと反応させた後、CD11c⁺ 細胞を MACS カラムを用いて濃縮した。種々の細胞表面抗原に対する抗体を用い、2-color または 3-color の蛍光染色を行い、FACS にて解析を行った。

3. 免疫組織染色

脾臓の連続組織切片を、Biotin 標識抗 Ly5.2 抗体と反応後、streptavidin-peroxidase とインキュベートした。その後、抗マウス CD11c、DEC-205 または CD8 α と反応させ、さらに、alkaline-phosphatase 標識ヤギ抗ハムスターIgG またはヤギ抗ラット IgG 抗体とインキュベートした。

4. サイトカイン測定

Ly5.1 骨髄細胞を移植して再構築した Ly5.1B6 マウスの CD8 α ⁺ DC、及び Ly5.2 脾臓由来 CD8 α ⁺CD11c⁻Lin⁻ 細胞を Ly5.1B6 マウスに移植して再構築した Ly5.2⁺CD8 α ⁺Ia⁺ DC をそれぞれ脾臓より単離した後、これらの細胞を IL-12 及び IFN- γ 産生が誘導される条件下で培養した。培養上清を回収し、これらのサイトカインについて、ELISA にて定量した。

5. MLR

BALB/c 由来アロ CD4⁺ T 細胞を responder として用いた。比較対象とした骨髄由来成熟 DC は、骨髄中の Lin⁻c-kit⁺造血幹細胞を SCF+GM-CSF+TNF- α 存在下で培養することで得た。ナイーブ Ly5.2 マウス及び再構築マウスの脾臓由来 Ly5.2⁺CD8 α ⁺Ia⁺ DC、及び骨髄由来成熟 DC を MMC 処理し、stimulator として用いた。細胞増殖は、MTT 法により検出した。

6. RT-PCR

目的の細胞から、RNazolB を用いて total RNA を抽出後、First-strand cDNA を合成し、これをテンプレートとして、種々のケモカイン、ケモカインレセプターに対するプライマーを用いて PCR を行った。

III. 結果

1. *in vivo* における $CD8\alpha^+$ DC の前駆細胞を同定するために、 $CD8\alpha^+CD11c^-Lin^-$ 細胞を脾臓より単離した。3-color 蛍光染色より、本細胞は $CD3\epsilon$ 、B220、 $CD11b$ 、Gr-1、NK1.1、Ia、 $CD40$ 、 $CD86$ 、 $CD4$ のいずれの表面抗原も発現していなかったが、 $CD8\beta$ を発現していた。本細胞は非常に数が少なく、C57BL/6 マウスでは、全脾臓細胞の 0.2~0.25% であった。Gimsa 染色の結果、 $CD8\alpha^+CD11c^-Lin^-$ 細胞は、リンパ球系細胞様の丸い形状をしていた。さらに、本細胞集団は、骨髄及び種々のリンパ節においても検出され、全リンパ節細胞の 0.2% 及び骨髄白血球の 0.06% であった。
2. *in vivo* において $CD8\alpha^+CD11c^-Lin^-$ 細胞が $CD8\alpha^+$ DC に分化するか否かを明らかにするために、 5×10^5 個の Ly5.2B6 マウス脾臓由来 $CD8\alpha^+CD11c^-Lin^-$ 細胞を、致死量の放射線照射した Ly5.1B6 マウスの尾静脈内に移入した。ドナー由来 Ly5.2⁺Ia⁺ 細胞は、移植後 7 日目においてすでに脾臓で検出され、移植後 14 日目にピークとなった。これらドナー由来細胞は、中位から高レベルの Ia と共に、DC に特徴的な $CD11c$ 、DEC-205、 $CD40$ 、 $CD86$ 分子を発現していた。驚いたことに、移植後 7-21 日目において、これらのドナー由来細胞のすべてが $CD8\alpha$ を発現しており、機能の点では、これらドナー由来 Ly5.2⁺ $CD8\alpha^+$ Ia⁺ 細胞が、アロ T 細胞の増殖を誘導した。さらに、移入された脾臓由来 $CD8\alpha^+CD11c^-Lin^-$ 細胞は胸腺及びリンパ節にホーミングし、それぞれの臓器において $CD8\alpha^+$ DC へと分化している可能性が示唆された。

次に、*in vivo* において $CD8\alpha^+CD11c^-Lin^-$ 細胞が他の系統の細胞へと分化する可能性について検討した。移植後の各 time point (1,2,3,4 wks) におけるドナー由来 (Ly5.2⁺) 細胞の、 $CD3\epsilon$ 、NK1.1、Gr-1 の発現について解析したが、いずれの lineage marker も検出されなかった。
3. 脾臓におけるドナー由来 DC の局在を解析するために、 $CD8\alpha^+CD11c^-Lin^-$ 細胞を用いて再構築したマウス脾臓の凍結切片を、Ly5.2 及び $CD11c$ 、DEC-205、 $CD8\alpha$ にて染色した。 $CD8\alpha$ の染色は、PALS の T 細胞領域に認められた。また、全てのドナー由来細胞は T 細胞領域に局在し、それらは $CD11c$ 、DEC-205 を発現していた。
4. ドナー由来 DC のサイトカイン産生パターンについて解析するために、Ly5.1 骨髄細胞を移植して再構築した Ly5.1B6 マウスの $CD8\alpha^+$ DC、及び Ly5.2 脾臓由来 $CD8\alpha^+CD11c^-Lin^-$ 細胞を Ly5.1B6 マウスに移植して再構築した Ly5.2⁺ $CD8\alpha^+$ Ia⁺ DC を、それぞれ脾臓より高純度でソートした。これらの細胞を、GM-CSF、IFN- γ 、Pansorbin の存在下で 40 時間培養した後、培養上清中の IL-12p70 量を ELISA により定量した。同様に、これらの細胞を、rmIL-12 の存在下で 48 時間培養した後、培養上清中の IFN- γ 量を ELISA により定量した。その結果、IL-12p70 及び IFN- γ の産生が、ドナータイプ DC の培養上清に高いレベルで認められた。
5. 最後に、ナイーブ Ly5.2 マウス及び再構築マウスの脾臓由来 Ly5.2⁺ $CD8\alpha^+$ Ia⁺ DC、または、ドナー Ly5.2⁺ $CD8\alpha^+CD11c^-Lin^-$ 細胞における、ケモカイン、ケモカインレセプ

ターの発現パターンについて RT-PCR により解析した。再構築マウスの脾臓由来 $Ly5.2^+CD8\alpha^+Ia^+$ DC は、CCR2,CCR5,CCR6,CCR7 及び T 細胞遊走活性を持つ MDC を発現していた。一方、 $Ly5.2^+CD8\alpha^+CD11c^-Lin^-$ 細胞は CCR2,CCR5,CCR7 を発現していたが、CCR6 及び MDC は発現していなかった。

IV. 考察

本研究において、マウス脾臓 $CD8\alpha^+CD11c^-Lin^-$ 細胞の、 $CD8\alpha^+$ 樹状細胞のコミットした前駆細胞としての同定を行った。この前駆細胞は、脾臓に存在し、 $CD8\alpha^+$ DC には分化しうるが、 $CD8\alpha^-$ DC、T 細胞、NK 細胞、あるいはその他のミエロイド系細胞へは分化しなかった。いくつかの証拠から、 $CD8\alpha^+CD11c^-Lin^-$ 細胞が、 $CD8\alpha^+$ DC へと分化しうるコミットした前駆細胞であることが示唆される。第一に、*in vivo* において $CD8\alpha^+CD11c^-Lin^-$ 細胞は $CD8\alpha^-$ DC には分化しないこと。第二に、*in vivo* において $CD8\alpha^+CD11c^-Lin^-$ 細胞は、CD8 T cells、NK 細胞、あるいはその他のミエロイド系細胞へは分化しないこと。第三に、マウスに Flt3L を投与すると $CD8\alpha^+CD11c^-dull$ 細胞の増加が認められ、それに伴い、脾臓 $CD8\alpha^+$ DC の劇的な増加が認められること。これらのことから、 $CD8\alpha^+CD11c^-Lin^-$ 細胞は、*in vivo* において、 $CD8\alpha^+$ DC にコミットした *immediate precursor* であると考えられた。このように、コミットした $CD8\alpha^+$ DC 前駆細胞の同定は、細胞レベルあるいは分子レベルにおいて、異なった造血前駆細胞からの $CD8\alpha^+$ DC の発生を理解するうえで非常に有効であると考えられる。