

$\alpha 9$  インテグリン陽性脾臓マクロファージサブセットの機能

## 学位論文内容の要旨

【背景と目的】 T細胞の分化とその機能の獲得は、抗原提示細胞の活性化状態および抗原提示を受ける際に存在するサイトカインなどの微少環境に依存している。強力な抗原提示細胞(Antigen Presenting Cell; APC)として知られている樹状細胞(Dendritic Cell; DC)は、T細胞の活性化を促進または抑制することで、免疫応答のバランスを制御していることが現在までに良く知られている。しかし、末梢組織に最も豊富に存在する APC である組織常在マクロファージ(M $\phi$ ) による T細胞反応調節機構に関しては未だ不明な点が多い。

組織常在 M $\phi$  は、その多くが骨髄前駆細胞から派生した末梢血循環単球に由来すると考えられている。一旦組織へと入った単球は、骨、脳、肺、肝臓、脾臓など、異なる微少環境刺激に応じて多様な形質を有する M $\phi$  へと分化する。異なる組織における不均質性(heterogeneity)に加えて、M $\phi$  は同じ組織内においても高度の機能的多様性を有している。最近の研究で、腸管に存在する異なる M $\phi$  サブセットによって、T細胞免疫応答の活性化と寛容が調節されていることが明らかとなっており、M $\phi$  サブセットによる免疫反応の調節機構を理解することは、自己免疫疾患発症のメカニズムを理解する上で非常に重要であると考えられる。末梢免疫組織である脾臓にも解剖学的に異なる部位に赤脾髄 M $\phi$ 、白脾髄 tingible-body M $\phi$ 、辺縁帯 M $\phi$  など多数の M $\phi$  サブセットが存在することが知られている。本研究では、脾臓に存在する M $\phi$  サブセットにより T細胞免疫応答がどのような制御を受けているのかを解明することを目的として研究を行った。

【材料と方法】 C57BL/6 マウスの脾臓細胞から、代表的な M $\phi$  マーカーである F4/80 と Mac-1 を用いたフローサイトメトリー解析(FCM)によって M $\phi$  サブセットを同定した。同定した M $\phi$  の解剖学的な局在の解析するために免疫組織化学的手法を用いて検討を行った。また M $\phi$  の機能を解析するために、ザイモザン食食能、サイトカイン産生能(恒常的産生及び Toll 様受容体(TLR)刺激)を調査した。抗原特異的 T細胞反応を解析するために、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG)ペプチドを特異的に認識する T細胞受容体を発現する 2D2 トランスジェニックマウスを用いて、T細胞増殖誘導能、T細胞分化誘導能の解析を行った。M $\phi$  によるナイーブ T細胞から制御性 T細胞(Treg)への分化誘導能を、Treg 機能に必須の転写因子である Foxp3 の発現を解析することにより評価した。また末梢血、肺胞、小腸、肝臓、腹腔に存在する M $\phi$  における  $\alpha 9$  インテグリンの発現をフローサイトメトリーにより解析した。

【結果】 脾臓細胞に存在するマクロファージは FCM を用いた表面抗原発現解析から大きく 2つのサブセットに分類できることがわかった。1つは典型的な脾臓 M $\phi$  であり、F4/80<sup>int</sup>Mac-1<sup>hi</sup>CCR2 陽性の表現型を示す(conventional M $\phi$ , cM $\phi$ )。一方、今回筆者が同定した M $\phi$  サブセットは F4/80<sup>hi</sup>Mac-1<sup>int</sup> $\alpha 9$  インテグリン陽性の表現型を示す( $\alpha 9$ M $\phi$ )。  $\alpha 9$ M $\phi$  は cM $\phi$  よりも強い食食活性を有し、主に脾臓の赤脾髄に存在することがわかった。これら脾臓 M $\phi$  サブセットの恒常的なサイトカイン産生能を解析した結果、cM $\phi$  は IL-6 と IL-12p40 を発現し、 $\alpha 9$ M $\phi$  は IL-1 $\alpha$ 、IL-12p70 そして TGF- $\beta$  産生した。これらのサイトカインの中でも cM $\phi$  の IL-12p70 と  $\alpha 9$ M $\phi$  の TGF- $\beta$  の発現が高値を示した。さらに TLR 刺激によって、cM $\phi$  はより強い IL-6 と IL-12p40 の発現を示したのに対し、 $\alpha 9$ M $\phi$  は抑制性サイトカインである IL-10 の著明な発現を認めた。興味深いことに、 $\alpha 9$ M $\phi$  による TGF- $\beta$  の発現は TLR 刺激においても変化しなかった。このように、2つの M $\phi$  が異なる

サイトカイン産生能を示したことから、次に筆者はMφによる抗原特異的T細胞反応を解析した。2つのMφは同等のMHC及び補助シグナル分子の発現を呈するが、cMφは強い抗原特異的T細胞増殖とヘルパーT細胞への分化を誘導した。一方、α9Mφは弱いT細胞反応しか示さず、他のAPCによって誘導されるT細胞増殖反応を抑制した。この抑制機構の一部にはTGF-βが関与していることがわかった。さらに、α9Mφは、cMφとは異なり、恒常的に発現するTGF-βによりナイーブT細胞をFoxp3陽性Tregへと分化誘導できることがわかった。このように脾臓α9Mφが独特な機能を有することがわかったため、次に筆者は、他の組織に存在するMφサブセットにおけるα9インテグリンの発現を検討した。その結果、末梢血単球、肺胞Mφ及び肝臓Mφではα9インテグリンの発現を認めなかったが、小腸Mφと腹腔Mφはα9インテグリンを発現することがわかった。

**【考察】** cMφはMCP-1の重要な受容体であるCCR2を発現しており、CCR2を介した炎症性細胞の動員は病原性微生物に対する防御に必須であると考えられている。cMφは、過去の報告と一致して、恒常的あるいはTLR刺激に伴いIL-12p40とIL-6を分泌し、さらには強い抗原特異的CD4陽性T細胞増殖とヘルパーT細胞への分化を誘導した。これらの結果は、cMφが病原性微生物の除去において重要な役割を担っていることを示すものである。対照的に、α9MφはTGF-βを産生することで、T細胞反応を抑制し、Tregを誘導する。このように免疫を活性化あるいは抑制する2種類のMφが存在することによって、脾臓における免疫バランスを協調的に制御しているものと考えられる。

肺や腸管などの微少環境には外来抗原が多く存在するため、過度な免疫反応を誘導しないために種々の免疫抑制機構が働いている。しかしながら免疫寛容は気道や腸管だけに限らず、他の末梢組織においても誘導される必要がある。例えば脾臓においては、老化および損傷を受けた多数の赤血球およびタンパク質の凝集などによって血中に生じた微粒子は、赤脾髄に存在するMφにより貪食、除去されることは良く知られている。このような自己由来の抗原に対しては免疫寛容が誘導される必要性がある。加えて、脾臓における免疫反応は通常、白脾髄のT細胞領域で起こるが、組織障害を免れるために、その他の領域における過度な免疫反応に対しては抑制機構が作用していると考えられる。今回筆者は、抑制性の機能を有するα9Mφが赤脾髄に主に存在し、T細胞反応を抑制し、末梢の免疫寛容に重要な役割のあるTregを誘導することを見いだした。これらの結果より、脾臓における免疫応答の恒常性維持において、赤脾髄に存在するα9Mφが重要な役割を担っている可能性が示された。

腹腔常在Mφや小腸粘膜固有層のMφはT細胞反応を抑制的に制御することが知られている。筆者は小腸と腹腔に常在するMφにおいても、α9インテグリンの発現を見出した。α9Mφを含むこれら抑制性Mφが共通してα9インテグリンを発現することから、このインテグリンがT細胞反応における抑制効果に何らかの役割を有している可能性が考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 西 村 孝 司

副 査 准教授 岩 淵 和 也

学 位 論 文 題 名

## $\alpha 9$ インテグリン陽性脾臓マクロファージサブセットの機能

抗原提示細胞による T 細胞反応の制御は、生体内における免疫の活性化と寛容のバランスを維持する上で重要である。このバランスの制御機構は樹状細胞においては詳しく解析が進められてきたが、末梢組織に最も豊富に存在する抗原提示細胞であるマクロファージ(以下 M $\phi$ )に関しては未だ明らかにされていない部分が多い。本学位論文では、末梢免疫組織の一つである脾臓に常在する M $\phi$  に着目し、異なる M $\phi$  サブセットによって末梢における T 細胞免疫反応を制御する機構が存在することを、詳細な免疫学的解析を行うことにより証明しようと試みた。脾臓 M $\phi$  サブセットを同定するために、フローサイトメトリーによる解析を行った結果、脾臓中には M $\phi$  マーカーを発現する二種類の細胞集団が存在することがわかった。これら二種類の細胞集団はまめ型の核と細胞質内に多数の小胞を有し、酵母由来粒子であるザイモザンに対し著明な食食反応を認めたことから、形態学的及び機能的に M $\phi$  であると同定した。一方の M $\phi$  は、脾臓中に含まれる主要な M $\phi$  細胞集団であり、過去の典型的な M $\phi$  と一致して IL-6 や IL-12p40 を恒常的に産生した(典型的 M $\phi$ 、以下 cM $\phi$ )。もう一方の M $\phi$  は、接着分子である  $\alpha 9$  インテグリンを発現し( $\alpha 9$  インテグリン陽性 M $\phi$ 、以下  $\alpha 9$ M $\phi$ )、恒常的あるいは Toll 様受容体刺激に反応して抑制性のサイトカインである TGF- $\beta$  や IL-10 を産生した。両 M $\phi$  サブセットの CD4 陽性 T 細胞への抗原提示反応を検討した結果、両 M $\phi$  サブセットは同程度の主要組織適合性抗原複合体 (MHC) 分子と補助シグナル分子の発現を有することがわかったが、cM $\phi$  が CD4 陽性 T 細胞の増殖と Th1 及び Th2 エフェクター T 細胞への分化を強く誘導したのに対し、 $\alpha 9$ M $\phi$  は CD4 陽性 T 細胞の増殖を抑制し、恒常的に発現する TGF- $\beta$  によって CD4 陽性 T 細胞を Foxp3 陽性抑制性 T 細胞へと分化誘導できることがわかった。申請者は、このような抑制性機能を持ち  $\alpha 9$  インテグリンを発現する M $\phi$  と免疫反応を促進するのに特化した M $\phi$  が腹腔や腸管を含む様々な組織に存在することにより、M $\phi$  サブセットが末梢における T 細胞免疫反応を協調的に制御するというモデルを提唱した。

以上の発表に対し、副査の西村教授より  $\alpha 9$ M $\phi$  と他の臓器に存在する  $\alpha 9$  インテグリン陽性 M $\phi$  との表現型の差異、 $\alpha 9$ M $\phi$  が脾臓に存在する意義そして炎症及び感染における  $\alpha 9$ M $\phi$  の役割についての質問があった。申請者は、過去の報告を引用し、他の組織に存在する  $\alpha 9$  インテグリン陽性 M $\phi$  が  $\alpha 9$ M $\phi$  と同様の機能を有する可能性、 $\alpha 9$ M $\phi$  が赤脾髄に存在することによって過剰な炎症や自己抗原に対して寛容を誘導するために脾臓の赤脾髄に存在する可能性を示し、申請者が行った研究から自己免疫モデルマウスである MRL/lpr マウスにおいて  $\alpha 9$  インテグリンの発現が失われていることが明らかになったことから、このような自己免疫が引き起こされるマウスにおいて抑制性 M $\phi$  の機能的変質などが現れる可能性をその解答として述べた。次いで、副査の岩淵准教授より  $\alpha 9$ M $\phi$  の T 細胞反応抑制機構、赤脾髄において  $\alpha 9$  インテグリンを発現する意義、 $\alpha 9$ M $\phi$  が TGF- $\beta$  や IL-1 $\alpha$  などのサイトカインを産生する機構についての質問があった。これらの質問に対し申請者は、自身の研究結果や

過去の報告から、抑制効果における iNOS 及び IL-10 の役割や、赤脾髄に発現する VCAM-1 と  $\alpha 9$  インテグリンとの相互作用の役割、老化した赤血球の食食による抑制性サイトカイン産生の可能性などをその解答として述べた。次いで、主査の上出教授から脾臓に存在する 2 つのマクロファージサブセットの分化の相違を与える分子機構に関する質問があった。申請者は過去の報告を引用し、Spi-C という転写因子欠損マウスにおいて脾臓  $\alpha 9$ M $\phi$  と同一見られる細胞集団が失われること、この遺伝子が  $\alpha 9$ M $\phi$  の機能発現に重要である可能性などをその回答として述べた。

この学位論文は、組織常在性 M $\phi$  サブセットによる免疫反応制御機構を詳細に解析した数少ない研究の一つであり、基礎免疫学の分野で高く評価される。M $\phi$  による末梢免疫寛容誘導への関与を解明することは生体内の免疫恒常性維持の上で意義があり、本論文でその機構の一端を明らかにしたことは特筆に値する。今後の M $\phi$  及び末梢免疫寛容誘導機構研究などの分野において新たな方向性を示すことが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。