

Title	CCR7 Is Critically Important for Migration of Dendritic Cells in Intestinal Lamina Propria to Mesenteric Lymph Nodes
Author(s)	寒川, 延子
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46363
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	寒川 延子
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 19917 号
学位授与年月日	平成 18 年 2 月 20 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	CCR7 Is Critically Important for Migration of Dendritic Cells in Intestinal Lamina Propria to Mesenteric Lymph Nodes (CCR7 は腸管粘膜固有層に存在する樹状細胞の腸間膜リンパ節への遊走に重要である)
論文審査委員	(主査) 教授 宮坂 昌之 (副査) 教授 菊谷 仁 教授 平野 俊夫

論文内容の要旨

〔 目 的 〕

樹状細胞は末梢組織で取り込んだ抗原をリンパ節に輸送し、T 細胞に抗原を提示し抗原特異的な免疫反応の誘導や自己寛容の維持に重要な役割を果たす。小腸組織では、樹状細胞はパイエル板や粘膜固有層に存在し、腸管の恒常性維持に寄与すると推測されているがその実験的証明はされていない。本研究では、小腸粘膜固有層から樹状細胞を単離し、その機能的解析を進めることで樹状細胞の新しい機能とトラフィッキングの機構を明らかにしようとした。

〔 方 法 〕

(1) 小腸粘膜固有層からの樹状細胞の分離同定

マウス小腸組織より予めパイエル板を除き、EDTA 処理により上皮細胞除去後、collagenase D と Dnase I で酵素処理を行い、さらに Accudenz を用いて low-density 細胞を回収した。表面発現分子に対する抗体で染色し、細胞のフェノタイプを FACS にて解析した。

(2) 小腸粘膜固有層樹状細胞の CCL21 に対する運動能

粘膜固有層樹状細胞のケモカインレセプターの発現を mRNA レベル、蛋白質レベルで検討した。更にそのケモカインレセプターが機能的であるかどうかをトランスウェルと time-lapse video monitoring system (EZ-TAXIScan) を用いて検討した。

(3) 小腸粘膜固有層樹状細胞の抗原取込み能

CFSE ラベルした小腸上皮細胞にアポトーシスを誘導させ、その後に粘膜固有層樹状細胞のそれぞれのサブセットと共培養し、細胞内に含まれる CFSE ラベル物質を FACS と顕微鏡観察にて確認した。抗原提示能力については、浸透圧ショックにより小腸上皮細胞に抗原 (OVA) を取り込ませ (IEC-OVA)、その後数時間でアポトーシスを誘導させ、樹状細胞にアポトーシスを起こした IEC-OVA を取り込ませた後、粘膜固有層樹状細胞をサブセット毎に分離し、CFSE ラベルした DO11.10 T 細胞 (OVA 反応性 T 細胞受容体発現 T 細胞) と 6 日間共培養し、T 細胞の分化を CFSE の希釈度をもとに FACS にて解析した。

〔 成 績 〕

(1) 小腸粘膜固有層には少なくとも2つの樹状細胞サブセット、 $CD11c^{high}CD11b^{low}CD8\alpha^{+}$ (R1)、 $CD11c^{high}CD11b^{high}CD8\alpha^{-}$ (R2) が存在し、R1、R2 サブセット共に、樹状突起はもたないが不規則な偽足をもち、クロマチンの濃度は低く、細胞質は灰色がかかった水色であった。CD80、CD40 や MHC class II の発現は、パイエル板由来樹状細胞や腸間膜リンパ節由来樹状細胞に比べ低い、CD86 の発現はパイエル板由来樹状細胞とほぼ同程度であった。

(2) R1、R2 サブセット共に CCR7 mRNA の発現は非常に高く、また、免疫組織染色により CD11c 陽性細胞における蛋白質レベルでの CCR7 発現が確認された。トランスウェルを用いた実験では、R1、R2 両サブセットはともに、CCR7 のリガンドの一つである CCL21 に対して、濃度依存的に遊走した。更に、time-lapse video monitoring system でも、粘膜固有層樹状細胞は経時的に CCL21 の濃度勾配に沿って一方向性に遊走し、R1、R2 サブセット共に、脾臓や骨髄由来の樹状細胞に比べ4~5倍強く CCL21 に反応し、その動きは百日咳毒素により阻害された。また、 αL 、 $\beta 7$ インテグリンの発現をもとに樹状細胞のフェノタイプを検討したところ、腸管膜リンパ節には粘膜固有層樹状細胞のフェノタイプをもつ細胞とパイエル板樹状細胞のフェノタイプを持つ細胞の両方のサブセットが存在し、CCR7 ノックアウトマウスの腸間膜リンパ節では、粘膜固有層由来樹状細胞集団のみが著減し、CCL19、CCL21 の発現を欠損する *pltp* マウスの腸管膜リンパ節ではこの集団のみが半減していた。

(3) R1、R2 サブセット共にアポトーシスした上皮細胞を取り込み、R1 は R2 に比べて強い取り込みを示した。抗原提示能力については、アポトーシス上皮細胞を介して OVA を取り込んだ粘膜固有層樹状細胞は R1、R2 共に、80% 以上の DO11.10 T 細胞を増殖させたが、脾臓由来の樹状細胞 $CD11b^{-}$ サブセットでは 70% 程度、 $CD11b^{+}$ サブセットでは 50% 程度の T 細胞の増殖しか誘導しなかった。一方、OVA 無しにアポトーシス上皮細胞のみを取り込んだ樹状細胞は、脾臓由来、粘膜固有層由来樹状細胞と同様に、T 細胞増殖はほとんど誘導しなかった。また、アポトーシス上皮細胞を介して OVA を取り込んだ粘膜固有層樹状細胞で DO11.10 T 細胞を刺激すると、IL-4、IL-10 の産生が誘導され、これは脾臓由来樹状細胞を抗原提示細胞とした場合に比べて、明らかに高かった。

〔 総 括 〕

- (1) 粘膜固有層には少なくとも2つの樹状細胞サブセットが存在し、それらの成熟度は比較的低いことが示唆された。
- (2) 粘膜固有層樹状細胞は炎症刺激がない場合にも CCL21 に対しては強い遊走能を持つことが示された。
- (3) 粘膜固有層由来樹状細胞は腸間膜リンパ節へ CCR7 依存的に移動し、パイエル板由来樹状細胞は CCR7 非依存的に移動することが示唆された。
- (4) 粘膜固有層樹状細胞は、脾臓由来のものよりもアポトーシスした上皮細胞をよく取り込み、上皮細胞に介する抗原を T 細胞に提示して IL-4、IL-10 を産生する T 細胞を誘導するユニークな機能をもった樹状細胞であることが示唆された。

以上の結果から、腸管粘膜固有層には免疫調節機能を持つ樹状細胞が存在し、これらの細胞は CCR7 依存的に腸間膜リンパ節に遊走し、このリンパ節に免疫調節機能を付与する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

粘膜免疫系において、抗原はパイエル板に存在する M 細胞を介して取り込まれるが、その他にも、小腸粘膜固有層に存在する樹状細胞 (LP-DC) を介しても取り込まれる。抗原を取り込んだ LP-DC は腸間膜リンパ節に移動し免疫反応を誘導するが、LP-DC の腸間膜リンパ節への移住のメカニズムは不明である。本研究により、マウス小腸粘膜固有層には少なくとも二つの樹状細胞サブセットが存在し、これらの樹状細胞はフェノタイプにおいても機能においても非常にユニークであることが明らかになった。LP-DC は CCR7 を発現し、そのリガンドである CCL21 に対して強いケモタキシスを示す。更に、CCR7 ノックアウトマウスの解析から、LP-DC は CCR7 依存的に移動することが示

唆された。LP-DC の二つのサブセットは共に、上皮細胞に介合した抗原を T 細胞に提示し IL-10、IL-4 を産生させた。以上の結果から、腸管粘膜固有層には免疫調節機能をもつ樹状細胞が存在し、これらの細胞は CCR7 依存的に腸間膜リンパ節に移動して、免疫調節に関わる可能性が示唆された。本研究は学位に値するものと認める。