

樹状細胞の分化・増殖における  
細胞内アダプター分子 Lnk/SH2B3 を介した新規制御機構

岩崎 由希子

## 目次

目次	1
略語一覧	2
第一章 序論	6
第二章 材料と方法	11
第三章 結果	
第一節 <i>Ink</i> 欠損マウスリンパ組織内樹状細胞の変化	22
1. リンパ組織における樹状細胞数	
2. 生体内での樹状細胞の移動能	
3. 樹状細胞におけるアポトーシス抑制分子 <b>Bcl-2</b> の発現	
第二節 <i>Ink</i> 欠損が樹状細胞の免疫学的応答に与える影響	25
1. 抗原提示能について	
2. サイトカイン産生能について	
第三節 <i>Ink</i> 欠損マウスにおける樹状細胞増加のメカニズム	28
1. 樹状細胞前駆細胞における <i>Ink</i> 欠損の影響	
2. <i>Ink</i> 欠損樹状細胞のサイトカイン応答性	
第四章 考察	31
第五章 結語と今後の展開	35
謝辞	37
参考文献	38
図	

## 略語一覽

7AAD	7-amino-actinomycin D
AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog
APC	allo-phycoyanin
APRIL	a proliferation-inducing ligand
APS	adaptor molecule containing PH and SH2 domains
Bad	Bcl-2-antagonist of cell death domain
BAFF	B cell activating factor
Bax	Bcl-2 associated x
BCR	B cell receptor
Bcl-2	B cell lymphoma-2
Bid	BH3 interacting domain death agonist
bmDC	bone marrow-resident dendritic cell
BMDC	bone marrow-derived dendritic cell
BSA	bovine serum albumin
CCL	CC type chemokine ligand
CCR	CC type chemokine receptor
CD	cluster of differentiation
cDC	conventional dendritic cell
cDNA	complementary DNA
CDP	common dendritic cell precursor
CFSE	5-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
CLP	common lymphoid progenitor
CMP	common myeloid progenitor
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
Cy7	cyanine 7
DC	dendritic cell
DEC	dendritic and epithelial cells
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay

EPO	erythropoietin
EpoR	erythropoietin receptor
ERK	extracellular-signal-regulated kinase
FACS	fluorescence-activated cell sorter
F-actin	filamentous actin
Fas	FS-7-associated surface antigen
FcεR I	Fcε receptor I
FCS	fetal calf serum
FITC	fluoscein isothiocyanate
Flk-2	fetal liver kinase-2
Flt3L	Fms-related tyrosine kinase 3 ligand
GALT-DC	gut-associated lymphoid tissue dendritic cell
GAPDH	glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase
GM-CSF	granulocyte/macrophage colony-stimulating factor
HLA	human leukocyte antigen
HRP	horseradish peroxidase
HSC	hematopoietic stem cell
IFN-α	interferon-alpha
IFN-γ	interferon-gamma
IgA	immunogloblin A
IL	interleukin
JAK	janus kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
kDa	kilo Dalton
L	ligand
Lin	lineage
LPS	lipopolysaccharide
MACS	magnetic cell sorting
MAPK	mitogen activated protein kinase
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MDP	macrophage dendritic cell progenitor

2-ME	2-mercaptoethanol
MgK	megakaryocytes
MHC	major histocompatibility complex
NK	natural killer
OVA	ovalbumin
OT-I	ovalbumin-specific, MHC class I-restricted $\alpha\beta$ T cell receptor transgenic
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pDC	plasmacytoid dendritic cell
PE	phycoerythrin
PerCP	Peridinin chlorophyll protein
PH	pleckstrin homology
PTPN2	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2
Rac	ras-related C3 botulinum toxin substrate
Ras	rat sarcoma viral oncogene homolog
RNA	ribonucleic acid
RT	reverse transcription
SCF	stem cell factor
SDS	sodium dodecyl sulfate
SH2	src-homology 2
Shc	src homology 2 domain-containing transforming protein C
SHP	SH2 –containing protein tyrosine phosphatase
SNP	single nucleotide polymorphism
STAT	signal transducers and activators of transcription
TAP	transporter associated with antigen processing
TCR	T cell receptor
TBS	Tris-buffered saline
TGF- $\beta$	transforming growth factor, beta

T <sub>H</sub>	T helper
TLR	toll-like receptor
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor-alpha
TRAIL	TNF related apoptosis inducing ligand
TPO	thrombopoietin
Tris	tris(hydroxymethyl) aminomethane
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1

## 樹状細胞

樹状細胞は、1973年、Ralph M. Steinman と Zanjil A. Cohn によりマウスの末梢リンパ節臓器で同定され、その多様な樹枝状の形態から dendritic cell (樹状細胞) と名付けられた(1)。樹状細胞は、抗原の取り込みとナイーブ T 細胞への抗原提示を行うという点で共通した働きを持つものの、極めて多様性に富む集団であり、生体内での存在部位、移動経路、表面マーカーの発現パターン、成熟段階、詳細な免疫学的機能、感染や炎症に伴う分化過程等により複数のサブセットに分類されている(図 1)(1,2)。大きくは、conventional DC (cDC; 古典的樹状細胞) と plasmacytoid DC (pDC; 形質細胞様樹状細胞) に分類され、cDC は更に、リンパの流れに乗って全身を循環し、抗原を捕捉してリンパ節に移動する能力を持つ DC と、分化してリンパ組織に留まったままの DC とに分けられる。移動能を持つ DC は、移動先のリンパ節にて T 細胞へ抗原提示を行う。その代表的な例が表皮の Langerhans 細胞や、気道上皮の DC、心臓・肝臓等の実質臓器の interstitial DC であり、腸管粘膜組織に存在する GALT-DC (gut-associated lymphoid tissue DC) は retinoic acid (RA) を産生することで、腸管膜リンパ節において T 細胞、B 細胞に腸管粘膜指向性をもたらす CCR9 やインテグリン  $\alpha 4\beta 7$  の発現を誘導し、腸管粘膜免疫にとって重要な働きをしている。一方で、移動能を持たず、リンパ組織に留まっている樹状細胞はその組織の中のみで抗原提示細胞として機能している。脾臓や胸腺に存在する大部分の樹状細胞がこの様な樹状細胞であり、マウスにおいては、 $CD4^+CD8\alpha^-cDCs$ ,  $CD4^-CD8\alpha^+cDCs$ ,  $CD4^-CD8\alpha^-cDCs$  に更に分類され、各々特徴的な機能を果たしている(3)。pDC は、形質細胞様樹状細胞という名前からも分かるように、分化過程で転写因子である SPI-B を発現するなど、B 細胞と似た特徴を持つ樹状細胞で、典型的な樹状突起を持たず、生体内を循環し、ウイルス感染時に多量の I 型インターフェロンを産生し、樹状突起を持った細胞形態へと変化する(1,2)。また、炎症が生じた際には単球(monocyte)からも樹状細胞が分化してくることが知られており、近年、*Listeria* 感染により脾臓に誘導される TipDC (TNF- $\alpha$ /inducible nitric oxide synthase (iNOS) producing DC)(4)が消化管関連粘膜リンパ組織内にも存在し、B 細胞の IgA へのクラススイッチを促進する作用を持つことが明らかにされた(5)。

この様に極めて多面的な作用を持つ樹状細胞は、自然免疫と獲得免疫の橋渡しをする存

在として、また、T 細胞に自己抗原に対する免疫寛容を誘導する存在 (tolerogenic DCs)(6)(7)として、生体内の免疫系のバランス調節において中心的な役割を果たしている。

### 樹状細胞の恒常性維持

定常状態において樹状細胞は、pDCsとcDCsの2つに大きく分類される。リンパ組織内での樹状細胞の半減期は、cDCで2~3日、pDCでそれよりもやや短い1.5日程度と考えられ、その恒常性は、骨髄細胞から分化し血流を介して供給される樹状細胞前駆細胞と、分化後の樹状細胞の分裂、そしてアポトーシスとのバランスにより維持されているものと考えられる(8)。

近年まで、樹状細胞前駆細胞の骨髄における分化・増殖が主にその恒常性維持に寄与しているものと考えられていたことから、前駆細胞の同定に関する研究が精力的になされてきた(図2)。造血幹細胞からの血球分化のごく初期の段階で、リンパ球系に分化する common lymphoid progenitor (CLP)と骨髄球系に分化する common myeloid progenitor (CMP) とに分かれ、cDCs, pDCs 共にどちらの系列からも分化し得るが、主として CMP を介して分化してくるものと考えられている(9)。それら前駆細胞の分化・増殖は M-CSF(10)、GM-CSF(11)、Flt3L(別名 flk-2 ligand)(12)(13)といったサイトカインによって制御されていることが明らかになってきているものの、樹状細胞に分化の方向性が決定づけられた前駆細胞の同定に関しては、樹状細胞が多くのサブセットに分かれることもあり、依然非常に議論の盛んな分野である。当初、Fogg等によりリンパ組織のマクロファージ及び樹状細胞の前駆細胞として報告された macrophage DC progenitor (MDP)は、分化抗原陰性 (Lin<sup>-</sup>)CX3CR1<sup>+</sup>c-Kit/CD117<sup>lo</sup> の骨髄細胞として報告されたが(14)、後に、Lin<sup>-</sup>M-CSFR/CD115<sup>+</sup>の表現型がMDPを定義する上で十分であり、Onai等によって報告された Lin<sup>-</sup>IL-7Rα/CD127<sup>c</sup>-Kit<sup>int</sup>Flt3/CD135<sup>+</sup>M-CSFR<sup>+</sup>の common DC precursor (CDP)(15)を包含する細胞集団であることが示された(16)。また、脾臓においては、より直接的な樹状細胞前駆細胞が CD11c<sup>int</sup>B220/CD45RA<sup>lo</sup>CD43<sup>int</sup>SIRP-α<sup>int</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>の表現型を示す pre-cDCs として同定されており(17)、骨髄における樹状細胞前駆細胞から分化したものと思われる。

この様な前駆細胞の供給は、末梢での樹状細胞の恒常性維持において重要であると考えられる一方、最近になり、分化した樹状細胞の末梢での増殖も重要であることが明らかになりつつある。これまでも、lymphotoxin-β receptor を介したシグナルが脾臓における CD8α<sup>+</sup>cDCs の増殖に必要であることが示されてきたが(18)、Flt3 欠損マウスにおいて骨髄

中の MDP や脾臓 pre-cDC の数が大きく変化しないのに対し、脾臓 cDC の数が減少していることが分かり、Flt3 が末梢での cDC の細胞分裂・増殖に重要であることが明らかとなった(16)。(pDC については Flt3 欠損による増殖への影響は認められず、異なる機構が pDC の分裂・増殖を制御しているものと思われる。)

樹状細胞の寿命の制御に関しては、アポトーシス抑制分子である Bcl-2 の関与が知られている(19)(20)。抗原取り込みにより活性化し成熟した樹状細胞では Bcl-2 の発現が低下し、Bcl-2 を欠損した樹状細胞では LPS、CpG といった TLR 刺激により顕著に寿命が短くなることが示されており、Bcl-2 が抗原を捕捉した免疫原性のある樹状細胞の生体内での存在期間を制約しているものと考えられる。また、Bcl-2 欠損マウスでは、脾臓やリンパ節といったリンパ組織における樹状細胞数の減少が認められることから、Bcl-2 がこうした組織における樹状細胞の恒常性の維持にも関与していることが示唆されている。

樹状細胞は、生体における免疫系において、中心的な働きをする存在であり、各組織における恒常性の維持は上述の様に様々な側面から極めて精巧になされているものと考えられる。

#### アダプター蛋白質 Lnk とそのファミリー蛋白質群

細胞内アダプター蛋白質群は、細胞内において各種サイトカインシグナルの増幅・抑制やシグナル伝達系間のクロストークを担うといった重要な働きを果たしていることが知られている。Lnk は、SH2-B adaptor protein 3 (Sh2b3)とも呼ばれ、SH2-B (別名 PSM; pro-rich, PH and SH2 domain containing putative signaling mediator)や APS (adaptor molecule containing PH and SH2 domains)とアダプター蛋白質ファミリーを形成している。構造は、系統的にショウジョウバエから保存されており、N 末端からプロリンに富んだ領域、PH 及び SH2ドメインとチロシンリン酸化部位を持つ分子量 68kDa の蛋白質である(図 3. A)(21)(22)。Lnk は、脾臓、リンパ節、骨髄などリンパ系組織で比較的強く発現し、特に B 細胞や造血前駆細胞で強く発現している(22)。APS は脳、脾臓、筋肉、骨髄等で発現しており、脾臓 T 細胞では発現が見られず、B 細胞には発現が認められる(23)。また、SH2-B は免疫系を含む様々な組織に広く発現している(24)。Lnk 欠損マウスでは、B 細胞の過剰産生が見られ、Lnk が c-Kit 依存性シグナルを抑制し B 細胞前駆細胞の増殖・分化を制御していることが明らかとなった(図 3. B)(25)。また、Lnk 欠損マウスでは造血幹細胞を含む Lin<sup>c-Kit</sup>+Sca-1<sup>+</sup>分画が増加し、競合的骨髄再構築法を用いた評価により造血能亢進も認めこれらの一部は c-Kit 依存性シグナルの亢進に因ることが示され(26)、加えて、

造血幹細胞の自己複製も *Lnk* が抑制しており、これは TPO シグナルの抑制によることも示された(27)。 *lnk*トランスジェニックマウスではリンパ球前駆細胞の増殖抑制や B 細胞並びに T 細胞の減少が観察され、 *Lnk* がリンパ球系の細胞の産生制御および恒常性維持に重要な分子であることが明らかとなっている(28)。また、Tong 等により、 *lnk* 欠損マウスにおいて赤芽球前駆細胞が増加し、骨髄抑制を起こす薬剤により誘発される貧血からの回復も早いことが示され、 *Lnk* が EpoR からのシグナルも負に制御していることが明らかにされた(29)。更に、 *lnk* 欠損マウスでは血小板増多を認め、巨核球前駆細胞の TPO 依存性増殖・成熟が亢進することが示された(30)(31)。この様に、 *Lnk* は c-Kit, c-Mpl, EpoR からのシグナルを抑制的に制御していることが明らかとされてきたが、最近、 *Lnk* が細胞骨格制御にも関与している可能性が示唆されている。 *lnk* 欠損巨核球を、インテグリン $\alpha 4\beta 1$  及びインテグリン $\alpha 4\beta 7$  のリガンドである細胞外基質 VCAM-1 上で培養すると、TPO シグナル伝達経路上 STAT5 のリン酸化の阻害、p38, ERK1/2 のリン酸化の亢進といった変化を認めると共に、基質上に広がった細胞の辺縁部からばかりでなく、中央部からも血小板の産生を認め、形態上においても野生型との違いが示された(32)。このことから、 *Lnk* はサイトカインシグナル伝達と細胞骨格双方の制御に関わっているものと考えられる。

また、 *Lnk* ファミリーに属する APS は、その欠損マウスやトランスジェニックマウスの解析から、マスト細胞の Fc $\epsilon$ R I 依存性脱顆粒や、BCR の crosslinking による F-actin の集積を制御する機能を有していることが示され(23)(33)、SH2-B については成長ホルモンレセプターを介したアクチン骨格再構築や細胞の運動性制御への関与が報告されている(34)(35)。 *Lnk* ファミリーアダプター蛋白質群には、共通してサイトカインシグナルと細胞骨格を繋ぐ作用があるものと考えられる。

## 本研究の目的

樹状細胞は、高い移動能と形態学的な多様性を持った細胞集団である。典型的な抗原提示細胞としての働きは、抗原の取り込みとリンパ節へのホーミングであり(36)、様々な刺激に応じて樹状突起を伸ばし、ラメリポディアと呼ばれる形態を呈することが知られている(37)(38)。これらの樹状細胞の特性より、その分化や機能において種々のサイトカイン環境からのシグナル伝達を介した制御のみならず、細胞接着などを介した細胞骨格制御が関わっているものと考えられる。近年、免疫細胞療法など、臨床面での多面的な応用の可能性からも注目を集める樹状細胞であるが、これまで樹状細胞における *Lnk* の発現の有無やその機能については検討されてこなかった。 *Lnk* の作用機構として、サイトカインシグナルと細胞

骨格制御との関わりが造血幹細胞、pre-B 細胞、巨核球などで示されてきていることを踏まえると、Lnk が樹状細胞においてもそれらの制御の一端を担うことが十分に予想され、樹状細胞の免疫学的な機能の制御においても関与している可能性が考えられる。本研究では、Lnk タンパクの樹状細胞における発現を確認の後、その働きを明らかにする為 *lnk* 欠損マウスの脾臓、末梢リンパ節、胸腺、骨髄といったリンパ組織における樹状細胞の数やサブセット、並びに *lnk* 欠損により樹状細胞の抗原提示などの免疫学的機能、サイトカイン (GM-CSF, Flt3L) 反応性に及ぶ影響につき解析を行った。

## 【材料】

## 1. マウス

野生型として用いた C57/BL6J マウスは日本エスエルシー株式会社または日本クレア株式会社より購入した。*lnk* 欠損マウスは国立国際医療センター研究所動物実験施設及び東京大学医科学研究所動物センターで所内規定に従って飼育し、実験に供した。

## 2. 試薬

使用した試薬、キット類と購入先を以下に示す。

Recombinant Murine GM-CSF (PeproTech)

Recombinant Human Flt3-Ligand (PeproTech)

FITC isomer I (FITC) (Sigma)

Cholera Toxin (Azyde free, List Biological Laboratories, Inc)

Cytometric Bead Array Flex Set System (for mouse IL-6, BD Biosciences)

BD™ CBA Mouse Soluble Protein Master Buffer Kit (BD Biosciences)

Mouse Interferon Alpha ELISA Kit (PBL Biomedical Laboratories)

Ex Taq DNA polymerase (TAKARA Bio)

RNeasy Kit (QIAGEN)

SuperScript III First-Strand Synthesis System for reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR) (Invitrogen)

Electroblot Buffer Kit (Owl Separation Systems, Inc)

Lumigen™ PS-3 detection reagents (化学発光検出キット, Amersham Biosciences)

Obalbumin (OVA) (FractionV, LPS containing, Sigma)

Obalbumin (OVA) (Cristallized, LPS free, SEIKAGAKU CORPORATION)

Optiprep (Iodioxanol 60w/v % Solution, AXIS SHIELD PoC AS)

Bovine serum albumin (BSA) (Sigma)

7-amino-actinomycin D (7AAD) (Sigma)

その他特に指定のない試薬類は和光純薬株式会社またはナカライテスクの特級試薬もしくはは生化学用を用いた。

### 3. Buffer 組成

使用したバッファーを以下に示す。

#### Staining buffer

2% FCS、0.05%アジ化ナトリウムを含有する FACS Flow 液 (BD Biosciences)

#### Lysis buffer

150mM Nacl, 50mM Tris-Hcl, 10mM sodium fluoride, 2% Triton-X-100, 1mM sodium vanadate, 1X Protenase Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics GmbH)

#### ACK buffer

150 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA

#### Fixation buffer

BD Phosflow Fix Buffer I (BD Biosciences)

#### Permeabilizing buffer

Saponin containing BD Phosflow Perm/Wash Buufer I (BD Biosciences)

その他特に指定のない Buffer、培地等の組成は Molecular Cloning (Sambrook et al., 1989)に準拠した。

### 4. 抗体

染色に用いた抗体を以下に示す。括弧内はクローン名。

#### FITC 標識:

抗マウス B220 抗体(anti-CD45R, RA3-6B2)

抗マウス CD3e 抗体(145-2C11)

抗マウス CD4 抗体(RM4-5)

抗マウス CD8 $\alpha$ 抗体(53-6.7)

抗マウス CD11b 抗体(anti-Mac-1, M1/70)

抗マウス CD11c 抗体(HL3)

抗マウス CD19 抗体(1D3)

抗マウス Gr-1 抗体(RB6-8C5)

抗マウス I-A/I-E 抗体(anti-MHC-II, M5/114.15.2)  
抗マウス IL-7R $\alpha$ 抗体(anti-CD127, A7R34)  
抗マウス NK1.1 抗体(PK136)  
抗マウス Sca-1 抗体 (anti-Ly-6A/E, D7)  
抗マウス TER119 抗体(TER119)

PE 標識:

抗マウス B220 抗体(anti-CD45R, RA3-6B2)  
抗マウス CD3 $\epsilon$ 抗体(145-2C11)  
抗マウス CD11c 抗体(HL3)  
抗マウス CD19 抗体(1D3)  
抗マウス CD40 抗体(1C10)  
抗マウス CD43 抗体(S7)  
抗マウス CD86 抗体(GL1)  
抗マウス CD11b 抗体(anti-Mac-1, M1/70)  
抗マウス Flt3 抗体(anti-CD135, A2F10.1)  
抗マウス Gr-1 抗体 (RB6-8C5)  
抗マウス H-2K<sup>b</sup> 抗体(anti-MHC-I, AF6-88.5)  
抗マウス I-A<sup>b</sup> 抗体(anti-MHC-II, AF6-120.1)  
抗マウス IL-7R $\alpha$ 抗体(anti-CD127, A7R34)  
抗マウス NK1.1 抗体(PK136)  
抗マウス Sca-1 抗体(anti-Ly-6A/E, D7)  
抗マウス Bcl-2 抗体(3F11)  
抗マウス IgG1 抗体(isotype control, American Hamster IgG1, A19-3)  
抗マウス TER119 抗体(TER119)

ビオチン化:

抗マウス CD16/32(anti-Fc $\gamma$  III/II receptor, 2.4G2)  
抗マウス CD19 抗体(1D3)  
抗マウス NK1.1 抗体(PK136)  
抗マウス MCSF-R 抗体(anti-CD115, AFS98)  
抗マウス TER119 抗体(TER119)

APC 標識:

- 抗マウス CCR9 抗体(242503)
- 抗マウス CD3ε抗体(145-2C11)
- 抗マウス CD8α抗体(53-6.7)
- 抗マウス CD11c 抗体(HL3)
- 抗マウス CD34 抗体(RAM34)
- 抗マウス c-Kit 抗体(2B8)
- 抗マウス SIRP-α抗体(anti-CD172a, P84)

APC-Cy7 標識:

- 抗マウス B220 抗体(anti-CD45R, RA3-6B2)

Streptavidin-PerCP

Streptavidin-PE-Cy7

以上、抗 CCR9 抗体 (R&D Systems より購入) を除く全ての抗体は BD Biosciences または eBioscience から購入した。また、CMP 及び GMP のソーティング時を除く全ての染色の前に、抗マウス CD16/CD32 抗体 (anti-Fcγ III/II Receptor, 2.4G2) を用いて非特異的な抗体のブロッキングを行い、死細胞の染色には 7AAD (Sigma) を用いた。

磁気マイクロビーズによる分離精製に用いたシステム・抗体を以下に示す。

BD™ IMag CD8 T lymphocyte enrichment system (BD Biosciences)

BD™ IMag Mouse Hematopoietic Stem Cell Enrichment cocktail

(BD Biosciences)

MACS® system (Miltenyi Biotec)

抗マウス CD11c マイクロビーズ

Streptavidin マイクロビーズ

抗 Biotin マイクロビーズ

抗 APC マイクロビーズ

ウェスタンブロッティングに用いた抗体を以下に示す。

抗マウス Lnk 抗体については、我々が以前に作成したものをを用いた(22)。

以下の抗体については、全て Cell Signalling Technology より購入した。

抗 STAT5 抗体

抗リン酸化 STAT5 抗体(Tyr694)

抗 ERK1/2 抗体

抗リン酸化 ERK1/2 抗体(Thr202/Tyr204)

抗リン酸化 JAK2 抗体(Tyr1007/1008)

2 次抗体は、eBioscience より購入した。

抗ラビット IgG-horseradish peroxidase (HRP)抗体

Streptavidin- horseradish peroxidase (HRP)抗体

## 【方法】

### 1. 骨髄由来樹状細胞の培養

*in vitro* での骨髄細胞からの樹状細胞の誘導には標準的な方法を用いた(39)(40)。マウス大腿骨及び脛骨より骨髄細胞を、培養液を入れた注射筒に注射針をつけ、フラッシュアウトし、ACK 処理にて赤血球の除去後、網目サイズ 70 $\mu$ M のセルストレーナーを通し、細胞浮遊液を得た。1X10<sup>6</sup>cells/ml の濃度にて、RPMI 培地(10% FCS、50 $\mu$ M 2-ME、1% 非必須アミノ酸(Gibco 社)、50IU/ml ペニシリン、50IU/ml ストレプトマイシン含有)を用い、10ng/ml recombinant mouse GM-CSF または、100ng/ml recombinant human FLT3L を添加し、培養した。GM-CSF による培養の際には、培養液は培養開始より 2 日目及び 4 日目の時点で、全ての培養液を取り除き、GM-CSF を添加した新たな培養液を加えた。Flt3L による培養の際には、培養液の交換は行わなかった。いずれの場合においても、培養開始後 6 日目ないしは 7 日目の時点で回収し、実験に用いた。

ソーティングした GMP からの樹状細胞の誘導については(ソーティング方法については 6. RT-PCR の項を参照)、200 $\mu$ l/well の GM-CSF(10ng/ml)を含む RPMI 培地を入れた 96 穴マイクロプレートに、FACSAria™ を用いて 50cells/well にて GMP をまいた。培養開始後 10 日目以降、各 well 内で増殖している細胞を、150 $\mu$ l/well で培養上清を捨てた上に 50 $\mu$ l/well ずつ抗体溶液(FITC 標識抗 CD11c 抗体及び PE 標識抗 CD11b 抗体)を加えて染色し、FACS にて解析した。分化してきた細胞は、CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>の樹状細胞と CD11c<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>のマクロファージに二分された。

### 2. リンパ組織からの樹状細胞の調整

脾臓より樹状細胞を分離する際には、400U/ml の Collagenase D を含む HANKS(Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>含有)を入れた注射筒に注射針をつけ溶液を組織内からフラッシュしながら脾臓を細かく割いた後、上澄みの細胞浮遊液を回収し、培養皿に残った脾臓の破片に 100U/ml の Collagenase D を含む HANKS(Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>含有)を加え 37°C 30 分間インキュベートした。インキュベート後の細胞浮遊液と、先に回収した細胞浮遊液とを合わせて 70 $\mu$ M セルストレーナーにてフィルトレーションし脾細胞を得た。更に純度高く樹状細胞を得るためには、30%BSA in PBS に脾細胞を浮遊させ、1XPBS を重層の後、2200rpm、30 分間遠心し、中間層の細胞浮遊液を抽出し、そこから抗 CD11c マイクロビーズを用いて MACS により樹状細胞をポジティブセレクションした。この操作により 95%以上の純度で樹

状細胞を分離することが可能であった。

リンパ節及び胸腺に含まれる樹状細胞を調べる際には、各々の組織を 100U/ml Collagenase D にて 37°C 30 分間インキュベートし、細胞浮遊液を得た。本研究においては、そこからの樹状細胞分離操作は行わず、樹状細胞マーカーである抗 CD11c 抗体を用いて染色し、FACS により解析を行った。

### 3. 免疫沈降及びウェスタンブロッティング

分離された脾臓樹状細胞あるいは骨髄由来樹状細胞を lysis buffer にて処理し、全細胞溶解液もしくは抗マウス Lnk 抗体で免疫沈降した溶液を 7.5%SDS-PAGE にて展開し、フッ化ポリビニリデン(PVDF)メンブレン(MILIPORE)にトランスファーを行った。5% non-fat milk (雪印) を含有する 0.1% Tween20/TBS pH 7.6 中でブロッキングを行った後、抗マウス Lnk-C 抗体の至適濃度でウェスタンブロッティングを行った。骨髄樹状細胞における GM-CSF シグナル伝達系の解析には、培養後の骨髄由来樹状細胞を抗 CD11c マイクロビーズと反応させ、MACS により精製し、一晚サイトカインを加えずにインキュベートの後、GM-CSF にて刺激を行った。全細胞溶解液を 5~20%の gradient SDS-PAGE にて展開し、上述の様にトランスファーとブロッキングを行い、至適濃度の JAK2, STAT5, ERK1/2 に対する抗体にてウェスタンブロッティングを行った。

### 4. 免疫組織化学的染色

野生型及び *lnk* 欠損マウスより摘出された脾臓を 4% carboxymethyl cellulose 内に埋没させ、ドライアイスにて冷却した N-ヘキサン内で凍結させた。凍結組織より Cryostat(LEICA)にて薄切標本を作製し、アセトンにて固定、風乾したのち染色に用いた(41)。樹状細胞の染色には、PE 標識抗 CD11c 抗体を、T 細胞の染色には、FITC 標識抗 CD3ε抗体を用いた。撮影には、Olympus FV-500 の蛍光顕微鏡を使用した。

### 5. 細胞表面マーカー染色及び細胞内 Bcl-2 染色

脾臓・リンパ節・胸腺内での樹状細胞数の計算及びサブセットの解析、骨髄・脾臓における樹状細胞前駆細胞の解析、また、精製後の樹状細胞の純度や成熟度の確認には、各種細胞表面マーカーを用いて染色し、FACSCaliber™ないしは FACSCantoII™にて解析を行った。各染色において、必要とされる蛍光色素の数(最大 4 カラー)が許す限り 7AAD を用い、陰性の生細胞にゲートをかけて解析した。

細胞質内 Bcl-2 の染色には、脾細胞を予め、樹状細胞解析用に抗 I-A/I-E 抗体(FITC) 及び抗 CD11c 抗体(APC)、T 細胞解析用に抗 CD8 抗体(FITC)及び抗 CD3ε抗体 (APC) にて 30 分間染色を行い、Fix I buffer にて 37°C、10 分間インキュベートして固定後、Perm/Wash buffer 内(サポニン含有)にて 1200rpm、5 分間遠心し、Fcγ III/II Rceptor ブロッキング抗体を氷上、15 分間反応させた。そこに、抗 Bcl-2 抗体乃至は抗アイソタイプ 抗体(いずれも PE 標識)を加え、氷上、30 分間染色を行った。Perm/Wash buffer にて 1 回洗浄の後、FACSCantoII™にて解析を行った(19)。

## 6. RT-PCR

マウス骨髄細胞を Mouse Hematopoietic Stem Cell Enrichment cocktail (ビオチン 化抗 B220, CD3ε, Gr-1, CD11b, TER119 抗体カクテル) とインキュベートし、 Streptavidin マイクロビーズを用いて IMag システムにて造血幹細胞(HSC)を濃縮した。続 いて各表面マーカーに対する蛍光抗体を用いて染色した。抗 c-Kit 抗体(APC)陽性、抗 Lineage マーカー (CD3ε, TER119, B220, CD19, NK1.1, CD11c, I-Ab, Gr-1, CD11b) 抗体 (PE)陰性、抗 Sca-1 抗体(PE)陰性、抗 IL-7Rα抗体(PE)陰性の細胞集団を、抗 CD16/32 抗体(Biotin)、抗 CD34 抗体(APC)の発現パターンにて展開し、CMP と GMP の分画を同定後、FACSAria™ を用いてソーティングした。Biotin 化抗体に関しては、 Streptavidin-PerCP 抗体にて検出した。

得られた細胞より総 RNA を、RNeasy キットを用いて抽出し、鋳型となる cDNA を Superscript™III First-Strand Synthesis System for RT-PCR を用いて合成の後、段 階希釈した cDNA を鋳型として PCR を行った。PCR サイクルは、94°C1 分、64°C2 分、 72°C2 分を 1 サイクルとし、36 サイクル行った。PCR 産物は 0.8%アガロースゲルにて展開 し、エチジウムブロマイドにて染色した。ハウスキーピング遺伝子としては GAPDH 遺伝子を用いた。

用いたプライマーセットは以下の通り

Lnk 遺伝子:

Forward primer: 5'-GGGCTACCAGTGACACCAAT-3'

Reverse primer: 5'-TCACAAGCTGCTCCACATTC-3'

GAPDH 遺伝子:

Forward primer: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'

Reverse primer: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

## 7. ELISA

骨髓より Flt3L にて誘導した培養 7 日目の pDC を抗 B220 抗体(Biotin)と反応させ、Streptavidin マイクロビーズを用いて MACS により精製後、 $1 \times 10^5$  cells/ml で 96 穴マイクロプレートにまき、TLR9 リガンドである CpG-A で 24 時間刺激を行った。上清を Mouse Interferon Alpha ELISA Kit 付属の、抗 IFN- $\alpha$ 抗体が固相化された 96 穴マイクロプレート上に 100 $\mu$ l/well で入れ、室温にて 1 時間反応の後上清を捨て 1 回洗浄し、ビオチン化抗 IFN- $\alpha$ 抗体 100 $\mu$ l/well を加え、24 時間反応させた。3 回洗浄の後 Streptavidin-HRP 抗体を 100 $\mu$ l/well にて加え、室温にて 1 時間反応の後、プレートを 4 回洗浄した。基質である TMB solution を 100 $\mu$ l/well にて添加し、遮光し 15 分間室温にてインキュベート後、Stop solution を 100 $\mu$ l/well で加えよくタッピングした後、マイクロプレートリーダーにて波長 450nm の吸光度を測定した。産生量については、最初に用意しておいた標準溶液の吸光度を用いて検量線を引き、計算した。尚、合成された CpG オリゴヌクレオチドは CpG-A, ggTGCATCGATGCAGggggG (ODN D19, Hokkaido System Science)で、大文字は、リン酸ジエステル結合を骨格に持つ塩基、小文字はその結合の酸素原子一つが硫黄原子に置換された骨格を持つ塩基である(42)。

## 8. FACS を用いたサイトカイン(IL-6)の測定

GM-CSF(10ng/ml)にて誘導した骨髓由来樹状細胞を培養 7 日目に回収し、抗 CD11c マイクロビーズを用いて MACS により精製した後、 $2 \times 10^6$  cells/ml にて 12 穴プレートにコレラ毒素(1mg/ml)と GM-CSF(10ng/ml)を添加し 24 時間培養した(43)。Mouse CBA Flex Set for IL-6 Kit 内の、IL-6 に対する Capture Beads 50 $\mu$ l と培養上清ないしは調整した IL-6 標準溶液 50 $\mu$ l とを混合し、遮光し室温にて 1 時間インキュベーションした。そこに PE 標識の Detection Antibody 50 $\mu$ l を添加し、遮光し室温にて更に 1 時間インキュベーションした。Wash buffer にて 1 回洗浄後、Beads の吸引に注意しながら上清を捨て、各サンプルを Wash buffer に再混濁した。その後、キット内の Setup Beads を用いて FACSCantoII™の機器設定を行い、サンプルを流してデータを採取した。そのデータを、FCAP Array software(BD Biosciences)にて解析し、各サンプル中に含まれる IL-6 量を測定した。

## 9. 細胞増殖アッセイ

抗 CD11c マイクロビーズを用いて MACS にて精製された培養 6 日目の骨髓由来樹状

細胞( $1 \times 10^5$  cells/well)を 96well の通常の細胞培養用のマイクロプレートないしは、96well の非付着性の細胞培養マイクロプレート(商品名: HydroCell, CellSeed 社製)に  $100 \mu\text{l/well}$  でまき、GM-CSF の濃度を、0, 0.04, 0.2,  $1 \text{ ng/ml}$  で振って、刺激を行った。48 時間の刺激の内、最後の 16 時間を $^3\text{H}$ チミジン  $0.2 \mu\text{Ci}$  にてパルスし、取り込まれた $^3\text{H}$ チミジンの量を測定し細胞増殖能を評価した。尚、HydroCell とは、ナノ表面設計技術を応用し、超親水性ポリマーを器材表面に固定した培養皿である(企業提供の情報による)。

## 10. 炎症誘導性および内因性皮膚樹状細胞の移動能の評価

アバチンにて麻酔下の野生型及び *Ink* 欠損マウスの胸部の皮膚をバリカンにて剃り、セロテープにて細かい毛も取った上で、接触皮膚炎の系に用いる場合にはアセトンとフタル酸ジブチルを 1:1 の容量で混和した溶液に 0.5%となるように FITC を溶解したもの  $400 \mu\text{l}$  を(44)、内因性の皮膚樹状細胞の移動を見る系に用いる場合にはアセトンとオリーブオイルを 4:1 の容量で混和した溶液に 0.5%となるように FITC を溶解したもの  $500 \mu\text{l}$  を皮膚に塗布した(45)。コントロールとしては、FITC を溶解しない溶液を塗布したマウスを用いた。48 時間後、マウスより脾臓、胸腺、腋下リンパ節を摘出し、FACS を用いた解析により、各組織に移動してきた FITC<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup>の樹状細胞数を算出した。

## 11. 骨髄由来樹状細胞のクロスプレゼンテーション能の評価

GM-CSF にて誘導した骨髄由来樹状細胞の抗原提示能を抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の分裂回数を用いて評価した。OT-I トランスジェニックマウスの脾臓より、CD8 T lymphocyte enrichment set を用いて I Mag によりナイーブ CD8<sup>+</sup> T 細胞を精製した。続いて RPMI1640 培地に  $1 \times 10^7$  cells/ml となるように混濁し、 $5 \mu\text{M}$  CFSE で室温 15 分間インキュベートして標識した。標識後の T 細胞は  $5 \times 10^5$  cells/well の濃度にて  $5 \times 10^4$  cells/well の骨髄由来樹状細胞と共に、LPS 含有ないし非含有の OVA( $1 \text{ mg/ml}$ )を添加し、通常の樹状細胞培養用の培地にて 48 穴プレート上で 3 日間培養した。回収後、7AAD と抗 CD8 抗体 (PE) で染色し、FACS にて生細胞にゲーティングをかけた上で CD8<sup>+</sup> T 細胞の分裂回数を CFSE の輝度にて評価した。

## 12. 密度勾配遠心法を用いた脾臓 pre-cDC の同定

Collagenase D 処理した脾臓より得た脾細胞を、15%Optiprep ( $1.084 \text{ g/cm}^3$ ) $\cdot 4 \text{ ml}$  に混濁し、15%Optiprep ( $1.084 \text{ g/cm}^3$ ) $\cdot 4 \text{ ml}$  の上に重層した上に 13%Optiprep + 5%FCS

(1.076g/cm<sup>3</sup>)・4mlを重層し、更に1mlのFCSを重層し、1700g、10分間遠心した。バンドとして検出される密度1.076g/cm<sup>3</sup>以上1.084g/cm<sup>3</sup>以下の中間層の細胞から、MACSによりCD3ε, CD19, NK1.1, TER119陰性の細胞をネガティブセレクションし、各種細胞表面マーカーにて染色を行い CD11c<sup>int</sup>B220/CD45RA<sup>lo</sup>CD43<sup>int</sup>SIRP-α<sup>int</sup>の表現型を示す脾臓 pre-cDCをFACSにて同定した(17)。

第一節 *lnk* 欠損マウスリンパ組織内樹状細胞の変化

## 1. リンパ組織における樹状細胞数

まず初めに、脾臓より樹状細胞を分離精製し、*Lnk* 蛋白の発現をウェスタンブロットティングにて確認した(図 4. A 左)。この際、野生型マウスより精製した樹状細胞の純度は 95%以上であった。骨髄より GM-CSF にて誘導した骨髄由来樹状細胞においても *Lnk* 蛋白の発現を認め、また、LPS にて刺激し樹状細胞の成熟を促した場合でも、*Lnk* 蛋白の発現量に明らかな差を認めなかった(図 4. A 右)。脾細胞全体に含まれる樹状細胞の比率は、野生型、*lnk* 欠損マウス共に 3%弱程度であり明らかな差を認めなかったが(図 4. B 左)、その比率より絶対数を算出したところ、*lnk* 欠損マウスでは脾臓樹状細胞が増加していることが明らかとなった(図 4. C 左)。同様に、腋下リンパ節、胸腺の各々に存在する樹状細胞の数を検討したところ、いずれにおいてもその存在比率に明らかな差はないものの、絶対数に換算すると *lnk* 欠損マウスで野生型と比較して有意な増加が認められた(図 4. B, C 中央、右)。また、骨髄においては、成熟 B 細胞のニッチとしての機能が報告された bone marrow-resident DC(46)が、*lnk* 欠損マウスで、骨髄細胞における存在比率、絶対数共に増加していることがわかった(図 5)。脾臓、腋下リンパ節、胸腺、骨髄共に *lnk* 欠損マウスで 1.5 倍～2 倍の細胞数の増加を認めており、これまでの研究により、*lnk* 欠損マウスの腫大した脾臓において、その細胞数の増加は主に比較的未熟な B 細胞の増加によりもたらされており、CD4<sup>+</sup>T 細胞や CD8<sup>+</sup>T 細胞の数には大きな変化がないこと、また、骨髄においては、Pro-B 細胞、Pre-B 細胞、未熟 B 細胞の増加が認められる一方、成熟 B 細胞は減少していることが明らかになっている(25)。今回脾臓 B 細胞に加えて、新たに樹状細胞の増加が示されたことから、その脾臓内での分布に偏りが無いかを調べるため、樹状細胞マーカーである CD11c を用いて免疫組織化学的染色を行った。CD11c<sup>+</sup>樹状細胞は、野生型で T 細胞領域周囲の辺縁帯付近に分布しており、*lnk* 欠損による分布領域の変化や異常な集積部位などは認めなかった(図 6. A)。次に、脾臓樹状細胞において、成熟度マーカー(I-A<sup>b</sup>/MHC-II)と共刺激分子(CD40, CD86/B7.2)の発現及び CD8 $\alpha$ の発現の有無で分類されるサブセットの存在比

に関して検討した。定常状態における脾臓樹状細胞は殆どが未熟な樹状細胞であり、CD86 の発現において *Ink* 欠損マウスで上昇傾向を認めたものの、CD40 や I-A<sup>b</sup> の発現も含めて有意差を認めなかった(図 6. B)。また、脾臓においては CD8 $\alpha$ 陰性樹状細胞が CD8 $\alpha$ 陽性樹状細胞の 2~3 倍程度であると知られているが、本研究では CD8 $\alpha$ 陰性の樹状細胞の存在比が若干高い結果が得られた。しかしながら、野生型と *Ink* 欠損マウスの間で、大きな変化は認めなかった(図 6. B)。これらの結果より、*Ink* 欠損マウスリンパ組織内における樹状細胞は、サブセットや分布領域に大きな偏りを示すことなく、総数が増加していることがわかった。

## 2. 生体内での樹状細胞の移動能

リンパ組織内における樹状細胞の増加に、末梢からの樹状細胞の移動能亢進が関わっている可能性を考え、FITC を用いた接触皮膚炎の系を用いて検討した(44)。炎症性の刺激をもたらすフタル酸ジブチルと共にアセトンに溶解した FITC を皮膚に塗布することにより、活性化した皮膚の樹状細胞は FITC 分子を MHC-II 上に提示し、所属リンパ節へと移動する。図 7A に示した様に、胸部に塗布した FITC を取り込んだ樹状細胞の、所属リンパ節である腋下リンパ節への移動をフローサイトメトリーにて解析し、移動してきた樹状細胞の数を評価したところ、*Ink* 欠損マウスで総樹状細胞に占める FITC 陽性樹状細胞の割合は若干低下していたが、絶対数で明らかな増加は認めなかった。また、定常状態においても、皮膚の樹状細胞が末梢抗原を提示しながら体内を循環し、脾臓や胸腺に移動していることが示されており、これらは免疫寛容の誘導に関与しているものと考えられている(45)。この様な内因性の樹状細胞の移動を調べる為に、フタル酸ジブチルを用いず、アセトンとオリーブオイルの混合溶液に FITC を溶解し胸部皮膚に塗布したところ、*Ink* 欠損マウスにおいて、胸腺への移動には大きな差を認めなかったが、脾臓への移動の亢進が認められた(図 7. B)。以上より、樹状細胞のリンパ組織への移動能は炎症下、非炎症下共に *Ink* 欠損による著明な亢進を認めないが、脾臓においては樹状細胞のホーミングを促す何らかの変化が生じている可能性も考えられる。胸腺へのホーミングにはインテグリン $\alpha 4$  の重要性が示されているが(45)、脾臓では示されておらず、別の接着に関わる分子やケモカインの関与が示唆される。各組織へ移動後の樹状細胞におけるケモカインレセプターやインテグリン等の接着分子の発現について、更に詳細な解析が必要と考えられる。

### 3. 樹状細胞におけるアポトーシス抑制分子 Bcl-2 の発現

*Ink* 欠損マウスの脾臓における樹状細胞の増加が、アポトーシスの遷延によりもたらされているか否かを検討するため、アポトーシス抑制分子であり、樹状細胞の寿命を規定する分子としても報告されている、Bcl-2 の発現についてフローサイトメトリーによる評価を行った。樹状細胞における Bcl-2 の発現は MHC-II の発現が低い未熟なものほど高く、成熟、すなわち、MHC-II の発現が高くなるにつれて低くなることが報告されている。本研究においても、野生型マウスで同様の現象が確認され、また、各々の成熟状態において、*Ink* 欠損脾臓樹状細胞での Bcl-2 の発現上昇は認めなかった(図 8、上二段)。一方で、内部コントロールとして使用した脾臓 T 細胞においては、CD8 陽性 T 細胞で *Ink* 欠損による Bcl-2 の僅かな発現増加を示唆する結果が得られた(図 8、下二段)。細胞のアポトーシスを決定する経路には、TNF、FasL、TRAIL などにより死受容体を介したシグナル伝達が起こりカスパーゼ 8 の活性化に繋がる経路と、遺伝子障害や遺伝プログラムによりミトコンドリアからのチトクローム C の放出や Bcl-2 の解離が起こりカスパーゼ 9 の活性化に繋がる経路が存在する。前者は細胞外からのシグナル、即ち他の細胞により提示されたアポトーシスシグナルに応答する経路であり、後者は細胞内からのシグナル、即ち発生過程などで遺伝プログラムに基づき計画的な細胞死をもたらす経路と考えられている。しかしながら、各々の経路は完全に独立しているわけではなく、また、Bcl-2 ファミリー分子にも、Bcl-2, Bcl-xL などアポトーシス抑制性に働くものや、Bax, Bad, Bid などアポトーシス促進性に働くものなど、多様な種類の分子が報告されており、アポトーシスは細胞内外の様々な因子が絡み合い、コントロールされているものと考えられる。本研究において、少なくともアポトーシス抑制分子である Bcl-2 の発現は、野生型と *Ink* 欠損脾臓樹状細胞で変化がないことが示され、*Ink* 欠損マウスでの樹状細胞増加におけるアポトーシス遷延の積極的な関与は否定的であったものの、*Ink* が樹状細胞において、様々なアポトーシスに関わる経路・分子に作用しているかどうかについては、今後の詳細な検討が必要であると思われる。

## 第二節 *lnk* 欠損が樹状細胞の免疫学的応答に与える影響

### 1. 抗原提示能について

樹状細胞は生体内で主要な抗原提示細胞として機能している。抗原提示の方法には、MHC-Iを介した提示とMHC-IIを介した提示の二種類が存在する。基本的に、MHC-I分子は、細胞質内タンパク由来のペプチドを提示する。細胞質内タンパクはプロテアソームというタンパク質分解酵素の複合体で 8-10 個のアミノ酸からなるペプチドに分解され、TAP トランスポーターによって粗面小胞体に運ばれ、そこで合成された MHC-I 分子に結合し、最終的に細胞表面に MHC-I 分子とともに提示される。MHC-II 分子は、エンドサイトーシスやファゴサイトーシスで取り込んだタンパク質由来のペプチドと、エンドゾームという細胞小器官内で結合した後、細胞表面に発現する。例外的に、樹状細胞はエンドサイトーシスやファゴサイトーシスで取り込んだタンパクを細胞質内に移し、元来の細胞質内タンパクと同じ経路を使って提示することが出来る。これはクロスプレゼンテーションと呼ばれている。これまでの研究により、*lnk* が細胞骨格制御に関与している可能性が示唆されていることから、抗原提示の中でも、より細胞骨格の制御が重要と思われるクロスプレゼンテーションについて、骨髄由来樹状細胞を用いて *lnk* 欠損による影響を検討した。外来抗原として OVA を用い OT-I TCR トランスジェニックマウス(OVA 特異的な TCR を持つマウス)より分離した CD8<sup>+</sup> T 細胞に対する抗原提示能を、CFSE の輝度を指標にして T 細胞の分裂回数を比較することで評価した。図 9 に示す様に、LPS 含有 OVA を用いて樹状細胞の成熟を促した場合においても、LPS 非含有 OVA を用いた場合においても、樹状細胞により抗原提示を受けた CD8<sup>+</sup>T 細胞の分裂回数、即ち、*lnk* 欠損骨髄由来樹状細胞の抗原提示能は野生型と同等であった。尚、骨髄由来樹状細胞表面上の MHC-I の発現量(抗 H-2K<sup>b</sup> 抗体を用いた染色による)にも *lnk* 欠損による変化がないことをフローサイトメリーにて確認した。マウス生体内において、CD8<sup>+</sup>DEC205<sup>+</sup>樹状細胞がクロスプレゼンテーションを行うサブセットととして知られているが(3)、図 6. B に示した様に、脾臓樹状細胞中の CD8<sup>+</sup>樹状細胞の存在比に偏りはなく、このことから、*lnk* 欠損マウスにおいて、クロスプレゼンテーションを含めた抗原提示能に大きな差はないものと思われる。

## 2. サイトカイン産生能について

樹状細胞がナイーブ T 細胞に抗原を提示し、 $T_H1$ ,  $T_H2$ , regulatory T 細胞といった T 細胞の分化の方向性を決定づけていく際には、抗原である PAMPs (pathogen-associated molecular patterns)の種類に対応した TLR からのシグナルに応じて産生される各種サイトカインのバランスが重要な働きを果たしている(47)。また、最近、ハウスダスト抗原や、粘膜上でアジュバント効果を持つコレラ毒素で樹状細胞を刺激すると、細胞表面上に c-Kit とそのリガンドである SCF の発現が亢進し、c-Kit を介したシグナルにより IL-6 の産生が誘導されることが示された。IL-6 の産生は  $T_H1$  型サイトカインである IFN- $\gamma$  の産生を抑え、IL-13 や IL-17 といったサイトカインを誘導することで  $T_H2$  や  $T_H17$  型の反応を促進していることが示されている(43)。

これまでに、Lnk は B 細胞分化や造血幹細胞分化において、c-Kit シグナルを抑制的に制御していることが示されてきており(25) (26)、樹状細胞においても c-Kit 依存性に生じるサイトカイン産生に変化が生じている可能性が考えられたことから、骨髄由来樹状細胞をコレラ毒素で刺激し、IL-6 の産生を測定したところ、図 10 に示す様に、IL-6 の産生に *lnk* 欠損による亢進などの変化は認められなかった。この時、刺激後の樹状細胞上の c-Kit の発現には野生型と *lnk* 欠損で差はなかった(data not shown)。このことから、Lnk による細胞内シグナル伝達制御は、その細胞の種類に依存する部分が多いことが考えられた。但し、野生型において IL-6 の産生が既にプラトーに達している為に、*lnk* 欠損による c-Kit シグナルの抑制解除の効果が IL-6 の産生量増加として表れていない可能性も否定は出来ない。

pDC は、その分化経路については未だ議論の多い細胞ではあるが、樹状突起を持たず、形質細胞様の特徴的な形態を持ち、分化過程での転写因子の発現からは、B 細胞と類似していることが指摘されてきた(2)。これまでに Lnk は B 細胞分化における制御に関与していることが示されてきていることから、Lnk が pDC で特徴的な働きをしている可能性が考えられた。更に、pDC はウイルス感染に伴い大量の I 型インターフェロンを産生し、NK 細胞、B 細胞、T 細胞、cDC の機能を促進するという働きを持ち(48)、その免疫学的重要性も高い樹状細胞である。そこで、骨髄より Flt3L を用いて pDC を誘導しインターフェロン $\alpha$  の産生を検討した。TLR9 リガンドである double-stranded DNA ウイルスのモチーフである CpG-A オリゴヌクレオチドを用いて骨髄由来 pDCs を刺激したところ、*lnk* 欠損骨髄由来 pDC は野生型と同程度のインターフェロン $\alpha$  を産生した(図 11)。

樹状細胞からの各種サイトカイン産生は、様々な機構により、特徴的な分子・経路を

介して制御されているものと考えられる。その全てについて *Ink* 欠損による影響を検討してはいないため、今後の詳細な解析の必要性が残されてはいるものの、現段階では *Ink* 欠損が樹状細胞からのサイトカイン産生に及ぼす影響は認められていない。

### 第三節 *Ink* 欠損マウスにおける樹状細胞増加のメカニズム

#### 1. 樹状細胞前駆細胞における *Ink* 欠損の影響

分化を遂げた樹状細胞の生体内におけるリンパ組織への移動能にも、その寿命にも、*Ink* 欠損による明らかな亢進を認める傾向がないにも関わらず、*Ink* 欠損マウスで樹状細胞の増加を認めることから、その増加が分化段階で生じているかについて検討を行った。骨髄における造血初期の段階で、樹状細胞は主に CMP から GMP (granulocyte-macrophage progenitor) を介して分化してくると考えられていることから、まず初めに Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>-</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>c</sup>-Kit<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD16/32<sup>lo</sup> の表面マーカー発現を示す CMP ならびに Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>-</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>c</sup>-Kit<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD16/32<sup>high</sup> である GMP について、その存在比率をフローサイトメトリーにて解析し細胞数を算出したところ、*Ink* 欠損マウスの骨髄において、CMP で明らかな増加を認めた(図 12. A)。*Ink* の発現は、GMP の方が CMP に比べて高いにも関わらず(図 12. B)、その *Ink* 欠損による増加の度合いは、GMP で減弱していた(図 12. A)。CMP における増加については、*Ink* 欠損マウスで造血幹細胞が野生型に比べて 15 倍以上も増加していることが反映されているものと考えられる(49)。また、GMP を 50cells/well にて 96 穴マイクロプレートにソーティングの後、GM-CSF(10ng/ml)で培養し、培養開始後 10 日目以降各ウェル内で増殖している細胞集団を CD11c 及び CD11b の発現に関して解析したところ、*Ink* 欠損細胞において、総細胞数の増加を認めたものの、得られた CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>細胞と CD11c<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>細胞との発現割合に野生型との明らかな変化は見出されず、GMP の時点での樹状細胞へのコミットメントに *Ink* 欠損による大きな偏りがないことがわかった(data not shown)。

次に、近年報告された、GMP の中でもより樹状細胞分化に運命が決定づけられた集団であり、実験的にも cDC と pDC の両者の前駆細胞であることが示された Lin<sup>-</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>c</sup>-Kit<sup>int</sup>Flt3<sup>+</sup>M-CSFR<sup>+</sup>である CDP の数について検討したところ、*Ink* 欠損マウスで増加傾向が認められた(図 13)。これらの結果から、*Ink* 欠損マウスの骨髄では樹状細胞前駆細胞が増加傾向にあることが示された。一方、脾臓内に存在する CD11c<sup>int</sup>B220<sup>lo</sup>CD43<sup>int</sup>SIRP- $\alpha$ <sup>int</sup> の表現型を示すより直接的な樹状細胞前駆細胞である pre-cDCs の数については、*Ink* 欠損マウスで増加傾向は認められなかった(図 14)。これについては、*Ink* 欠損マウスにおいて、pre-cDC 以降の樹状細胞への最終的な分化速度が亢進し、pre-cDC の段階では、野生型との数の差が認められにくくなっている

のではないかと考えている。

## 2. *lnk* 欠損樹状細胞のサイトカイン応答性

GM-CSF と Flt3L は骨髄細胞を培養し、樹状細胞を誘導する際に頻繁に用いられるサイトカインである。両サイトカインに対して、骨髄由来樹状細胞の増殖曲線を得たところ、図 15. A に示す様に、*lnk* 欠損骨髄細胞からは、どちらのサイトカインによる培養においても、より多くの樹状細胞が得られ、特に、培養細胞中 60~70% が樹状細胞となる培養 6、7 日目以降で *lnk* 欠損による差が明らかとなることが示された。このことから、分化後の樹状細胞のサイトカイン応答性が亢進している可能性を考え、GM-CSF に対する骨髄由来樹状細胞の反応性増殖をチミジンの取り込みを測定することにより評価したところ、*lnk* 欠損骨髄由来樹状細胞での増殖亢進が明らかとなった(図 15. B 上)。

次に、その増殖亢進の機構を詳細に調べるため、GM-CSF レセプター下流のシグナル伝達物質について検討することとした。GM-CSF レセプターは $\alpha$ 及び $\beta$ サブユニットから構成され、 $\beta$ サブユニットは IL-3 や IL-5 のレセプターと共有されていることから common $\beta$ サブユニット( $\beta c$ )とも呼ばれ、そのリン酸化は、GM-CSF の全ての生物学的機能において必須なシグナル伝達物質である JAK2 のリン酸化を引き起こす。その他、Shc, SHP-2, MAPK cascades, Vav, c-Cbl, STAT1,3,5 等、様々な分子が活性化されることが知られている(50)。骨髄由来樹状細胞を GM-CSF 濃度と時間経過を振って刺激し、得られた細胞溶解液を用い、これらシグナル伝達物質のリン酸化につきウェスタンブロッティングにて解析したところ、JAK2, STAT5, ERK1/2 のチロシンリン酸化が *lnk* 欠損骨髄由来樹状細胞で亢進していることが明らかとなった(図 15. C 左)。

更に、骨髄由来樹状細胞が、GM-CSF で刺激時に培養皿に堅固に接着していること、及び *lnk* によるサイトカインシグナル制御には細胞骨格の制御が関与していることが巨核球で示唆されていることを踏まえ(32)、樹状細胞における *lnk* 欠損の影響が、接着と関与しているか否かを検討した。骨髄由来樹状細胞を非付着性の培養皿(商品名: HydroCell)にのせ、同様に GM-CSF による増殖をチミジンの取り込みにより評価したところ、*lnk* 欠損による増殖亢進は殆ど認められなくなった(図 15. B 下)。一方でこの条件下では、野生型で JAK2, STAT5, ERK1/2 のリン酸化が減弱するのに対して、*lnk* 欠損による JAK2, STAT5, ERK1/2 のリン酸化亢進は同様に、寧ろ更に亢進する傾向が、認められた(図 15. C 右)。これらの結果から、*lnk* は樹状細胞において、GM-CSF や Flt3L といったサイトカインシグナルに対し抑制的に作用していることが示され、更に

GM-CSFシグナル制御に関しては、接着を介したシグナルが *Lnk* の抑制性制御を抑える方向に働いていることが示唆された(図 16. B)。また、非付着性の条件下で、*lnk* 欠損により GM-CSFR を介したシグナル伝達に関わる JAK2, STAT5, ERK1/2 のリン酸化亢進が維持されているにも関わらず、増殖は認められなかったことから、樹状細胞の増殖にはサイトカインシグナルに加えて接着により誘導されるシグナルが必須であることがわかった。この接着を介したシグナルは細胞骨格系を制御するシグナルであると思われるが、詳細な機構及び *Lnk* の関与の有無に関しては現段階では明らかでない(図 16. B)。

リンパ組織における樹状細胞の恒常性は、血中からの樹状細胞前駆細胞の流入速度と、樹状細胞の分裂回数、及び細胞死のバランスに依存している。本研究により、*Lnk* は樹状細胞に発現しており、*lnk* 欠損マウスの脾臓、末梢リンパ節、胸腺、骨髄といったリンパ組織では樹状細胞が増加していることが明らかとなった。樹状細胞には多くのサブセットが存在するが、大別すると pDC と cDC に二分され、マウスにおいて cDC は更に CD8 $\alpha$  の発現の有無により分類される。野生型マウスの脾臓では、CD8 $\alpha$  陰性の樹状細胞が約 70% を占め、白脾臓周辺部や赤脾臓に分布している。*lnk* 欠損マウスにおいて、脾臓内で増加している樹状細胞の成熟度及び CD8 $\alpha$  発現の割合、また組織学的分布に野生型との明らかな差を認めず、これらのバランスは保たれつつ総数が増加していることが示された。生体内を循環する樹状細胞の、これらリンパ組織への移動能亢進が、樹状細胞数の増加に寄与している可能性を考え、皮膚樹状細胞のリンパ組織への移動につき、接触皮膚炎のモデル系における活性化された樹状細胞の所属リンパ節への移動を検討したところ、*lnk* 欠損による移動能の亢進は認められなかった。一方で、活性化を受けない状況では、内因性に脾臓へ移動する樹状細胞の数が増加していた。*lnk* 欠損マウスの脾臓は野生型の凡そ二倍ほどに腫大している為、皮膚から移動してきた樹状細胞が多く捕捉されやすくなっている可能性も考えられるが、脾臓への末梢からの樹状細胞の移動に関わる接着因子やケモカインなどが、*lnk* 欠損により影響を受けている可能性も否定できない。尚、現在のところ、末梢の樹状細胞が脾臓へ内因性に移動する機構については明らかにされていない。また、樹状細胞の寿命に関しては、脾臓樹状細胞においてアポトーシス抑制分子である Bcl-2 の発現に *lnk* 欠損による影響を認めておらず、樹状細胞のアポトーシスの遷延により数の増加が生じている可能性を積極的に支持する結果は得られていない。

樹状細胞の前駆細胞については、未だ議論の多い分野であるが、樹状細胞以外の前駆細胞を含みつつも樹状細胞前駆細胞の殆どが包含されると考えられる GMP や、より樹状細胞特異的前駆細胞と考えられる CDP について *lnk* 欠損による影響を検討したところ、いずれにおいても増加傾向を認めた。また、骨髄由来樹状細胞の誘導において、GM-CSF、Flt3L いずれを用いた場合においても *lnk* 欠損骨髄由来樹状細胞の数が増加していた。リンパ組織では、GM-CSF は炎症反応時に単球からの樹状細胞分化を誘導する上で重要であり、Flt3L は定常状態における樹状細胞のプールサイズを維持する上で重要であると考

えられているが(16)、近年同定された、骨髄における樹状細胞前駆細胞と考えられる MDP は GM-CSF の刺激により cDC を産生すること(14)、また、CDP は Flt3L の刺激により cDC と pDC の両者を産生することが報告されており(15)、生体内では、GM-CSF、Flt3L のいずれも、樹状細胞の分化、末梢での増殖の過程において重要な働きをしているものと考えられる。故に、*lnk* 欠損マウスリンパ組織における樹状細胞の増加は、樹状細胞前駆細胞からの分化並びに分化後の増殖の過程を通じて、関与するサイトカインシグナルの亢進によりもたらされているものと考えられる(図 16. A)。

これまでの研究により、*Lnk* は B 細胞前駆細胞・造血幹細胞における *c-Kit* シグナル伝達系の活性化、巨核球における TPO 依存性シグナル下流にある ERK1/2 の活性化や、マスト細胞系の MC9 細胞における *Kit* リガンドの活性化等を特異的に抑制することが示されてきた。また、Tong 等は *Lnk* が EPO による赤血球産生を、JAK2, STAT5, AKT, ERK1/2 の活性化を抑制的に制御することで阻害していることを報告した(29)。更に最近、*Lnk* が初期マスト細胞において、*Kit* リガンドシグナルの p38 MAPK、Rac/JNK パスウェイを抑制的に制御することでその SCF 応答性の移動を抑制していることも示された(51)。本研究において、*lnk* 欠損樹状細胞では GM-CSF シグナル伝達における JAK2, STAT5, ERK1/2 のリン酸化が亢進していることが示され、*Lnk* が樹状細胞においてこれらの活性化を抑制的に制御していることが明らかとなった。更に、樹状細胞を非付着性条件におくことにより、野生型では JAK2, STAT5, ERK1/2 のリン酸化が減弱するのに対し、*lnk* 欠損ではこれらのリン酸化が更に亢進する傾向にあることが分かり、接着を介したシグナルが *Lnk* による GM-CSF シグナルの抑制性制御を負に制御しているものと考えられる。またこの時、*lnk* 欠損樹状細胞における GM-CSF シグナル反応性の増殖亢進は減弱することが明らかとなり、増殖が起こるには、サイトカインシグナル以外に接着部位からのシグナルが必要であることがわかった。これまでに、造血幹細胞の VCAM-1 上での運動性が *Lnk* 依存性に調節されていることや、巨核球における TPO シグナルの VCAM-1 上での活性化が *Lnk* により阻害されることが示されてきており、本研究においても、樹状細胞での *Lnk* による GM-CSF シグナルの抑制性制御に足場からのシグナルが関与していることが示唆され、*Lnk* は足場となる細胞外基質からの細胞骨格制御に関わるシグナルと、サイトカインシグナル伝達とのクロストークにおいて重要な働きをしているものと思われる(図 16. B)。また、造血幹細胞や B 細胞分化において、*Lnk* が *c-Kit* 依存性のシグナルを抑制的に制御していることが示されている一方で、本研究でコレラ毒素刺激による *c-Kit* 依存性の樹状細胞からの IL-6 産生には *Lnk* の関与は否定的であった。従って *Lnk* の作用はその発現している細胞の種類によって異なる

っていることが予想される。今までに、*lnk*欠損造血幹細胞におけるTPOシグナル下流でのJAK2の活性化は野生型と変わらないこと、また、GM-CSFRとcommon  $\beta$ サブユニットを共有するIL-3Rを介してマスト細胞系のMC9細胞に伝わるシグナル伝達にも*lnk*欠損による変化を認めないことが報告されている。一方で、*lnk*欠損赤芽球におけるEPOシグナル下流でのJAK2の活性化が報告されており、本研究においても、*lnk*欠損樹状細胞ではGM-CSFシグナル下流でJAK2のリン酸化亢進が生じることが明らかとなった。このことから、*Lnk*が細胞種に依存した作用を持つことが示唆される。サイトカインシグナル伝達の大枠は、その受容体の重合に伴うJAKの活性化と、続く転写因子STAT及びRas-MAPK経路の活性化であり、JAKによりチロシンリン酸化を受けたSTATは二量体を形成し核へと移行し、遺伝子発現を制御する。*Lnk*が如何にして細胞骨格の制御とサイトカインシグナル制御を結びつけているか、細胞種特異的な作用をもたらしているかを理解するためには、今後、更なる分子機構の解明が必要である。

樹状細胞は生体内のあらゆる組織に分布し、外来抗原の取り込みにより活性化し、更にその活性化を受けた外来抗原の種類に応じてT細胞を活性化し、多様な免疫応答を誘導する。のみならず、自己抗原反応性のT細胞に対してはその活性化を抑制することで自己に対する免疫寛容を誘導する働きを持ち、免疫応答の中心的な存在として機能している。私は、*Lnk*の細胞骨格系に対する作用の可能性を考慮し、より抗原処理に細胞質内での動態制御が重要と思われるクロスプレゼンテーションによる抗原提示能について、*lnk*欠損骨髓由来樹状細胞を用いて検討したところ、*lnk*欠損による有意な変化は認められなかった。また、抗原を取り込み活性化した樹状細胞の所属リンパ節への移動能に関しても、本研究で接触皮膚炎の実験系を用いた解析からは、*lnk*欠損による影響を認めなかった。今まで生体内での樹状細胞の移動には、接着分子であるインテグリンの働きが重要であると考えられてきたが、最近、全てのインテグリンヘテロダイマーをノックアウトした樹状細胞の皮膚からリンパ節への移動が正常に起こることが示され、更には2光子顕微鏡を用いたリンパ節内での樹状細胞の動態観察から、リンパ節内における樹状細胞の移動もインテグリン非依存性に起こり得る事が明らかとなった(52)。活性化した樹状細胞のリンパ節への移動は、細胞表面上に発現されるCCR7とCCL19及びCCL21との結合により誘導されると考えられており(36)、こうしたケモカインレセプターの樹状細胞における発現について、*lnk*欠損による変化の有無を今後検討する必要があると考えられる。これまでに、*Lnk*によるc-KitやTPOシグナルの抑制性制御機構において、pre-B細胞とストローマ細胞との相互作用、造血幹細胞と造血微小環境との接着、インテグリンシグナルを介した巨核球からの血小板産生制御とい

った、接着を介した機構が関与していることが示されてきており、本研究により、樹状細胞においては、*Lnk* による GM-CSF シグナルの抑制性制御を負に制御する方向に、接着部位からのシグナルが関与していることが示唆されている。従って、樹状細胞の組織への浸潤や、樹状細胞同士或いは B 細胞や T 細胞との間での細胞同士の接着によるシグナル伝達など、より接着による制御が重要な現象について、*lnk* 欠損による影響を検討していく必要があると考えられる。

樹状細胞は免疫応答を正にも負にも制御できる細胞という点で、免疫応答の中心に存在する細胞である。従って、慢性感染症の治療や、癌の免疫療法などのように、抗原特異的な免疫応答を強力に誘導したい場合においても、反対に、自己免疫疾患やアレルギー疾患の治療、或いは、臓器移植における拒絶反応の防止といった、抗原特異的免疫応答を抑制したい場合においても、人為的に樹状細胞の機能を制御することが出来れば強力な免疫制御療法を実現しうる、極めて臨床的に魅力的な細胞である。本研究により、*Lnk* による樹状細胞分化・増殖における新たな抑制性制御機構が明らかとなった。近年、I 型糖尿病や吸収不良症候群である Celiac sprue 病の患者の 1 塩基遺伝子多型性(SNPs)解析の結果、共に 12 番染色体長腕、*LNK/SH2B3* の exon3 領域で PH ドメインにアミノ酸置換を伴う変化が生じており、I 型糖尿病でオッズ比 1.33 (95%信頼区間:1.26-1.42)、Celiac sprue 病でオッズ比 1.19 (95%信頼区間:1.10-1.30) の相対危険度が示された(53)(54)。I 型糖尿病は膵ランゲルハンス島β細胞に対する自己免疫反応の結果生じる病態と考えられおり、白人で HLA-DR3,DR4、日本人で HLA-DR4,DR9 との関連が知られている。Celiac sprue 病は小麦、ライ麦、大麦に含まれるタンパクに対する T 細胞依存性の免疫応答が原因と考えられており、白人女性に多く、HLA-DQ2,DQ8 と関連し、小腸粘膜の炎症とそれに起因する小腸絨毛の萎縮による吸収障害が起こる。両者には、共通の遺伝子多型性が *LNK/SH2B3* 以外にも *PTPN2* や *CTLA4* など報告されており、何らかの共通の機構が各々の疾患発症に働いているものと考えられている(55)。ヒトでは、*LNK* の発現が単球や樹状細胞で強く認められるといったデータもあり (Genomics Institute of the Novartis Research Foundation の公開データベースによる)、PH ドメインに変異を持つ *Lnk* が、細胞膜への結合に変化をきたし、N 末端を介した多量体形成が阻害され、*Lnk* によるサイトカインシグナルの抑制性制御が減弱することにより、これらの疾患に関わる抗原を提示している樹状細胞の増殖を促している可能性も考えられる。また、最近、CCR9 を発現する pDC は、未熟な状態にあると同時に、免疫寛容を誘導する働きを持っていることが報告された(56)。CCR9 は、GALT-DC により合成されたレチノイン酸の作用で腸間膜リンパ節の T 細胞や B 細胞がインテグリン  $\alpha 4\beta 7$  と共に発現し腸管粘膜へのホーミング能を獲得する点で注目されている、CCL25 ケモカインのレセプター分子である。この CCR9 陽性 pDC について検討したところ、*lnk* 欠損マウスの末梢リンパ節で存在割合が上昇し、絶対数にして野生型の凡そ

10 倍近い増加を認めた。尚、腸間膜リンパ節でも同様の傾向を認めたが、末梢リンパ節での増加がより顕著であることがわかった(図 17)。このことから、Lnk による樹状細胞分化・増殖の抑制性制御は、tolerogenic DC の分化・増殖過程でより強く作用している可能性が示唆され、前述の自己免疫疾患における Lnk の SNPs の報告と併せて、樹状細胞における Lnk の働きと自己免疫疾患との関連性は、重要な検討課題であると考えられる。

今後、樹状細胞の免疫学的な機能における Lnk の働きについて詳細な解析を加えていくことで、免疫制御療法における効率的、乃至は、効果的な樹状細胞の誘導など、新たな臨床面での発展に繋がることが期待される。また、樹状細胞における Lnk によるサイトカインシグナルの抑制性制御機構に、細胞骨格の制御が関わっていることが示唆されていることから、その更なる分子機構の解明は、樹状細胞にとどまらず、より普遍的な、サイトカインと細胞接着とのクロストークシグナルによる細胞機能制御の分子機構の解明に貢献するものであると考えられる。

## 謝辞

本稿を終えるにあたり、大学院の四年間を基礎研究に従事することを御快諾戴き、終始温かい御指導を賜りました東京大学医学部附属病院アレルギー・リウマチ内科教授 山本一彦 博士に深謝申し上げます。本研究の機会を与えてくださり、終始親身な御指導、御鞭撻を賜りました旧東京大学医科学研究所感染・免疫部門免疫調節分野教授 高津 聖志 博士(現富山県薬事研究所所長)、並びに日々の実験内容や手技・研究の方向性等きめ細かな御指導を賜りました国立国際医療センター研究所地域保健医療研究部部長 高木 智 博士に厚く御礼申し上げます。

本研究をまとめるにあたり、貴重な御助言を賜りました旧東京大学医科学研究所感染・免疫部門免疫調節分野の皆様へ御礼申し上げます。

日々変わらず陰に陽に支えていただいております私の家族に心より感謝いたします。

最後になりますが、本研究は全ての皆様の惜しみない御協力のもと成し得た成果であり、改めて皆様に深く感謝申し上げます。

## 参考文献

1. Steinman, R. M. and Z. A. Cohn. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 137: 1142-1162.
2. Shortman, K. and S. H. Naik. 2007. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 19-30.
3. Dudziak, D., A. O. Kamphorst, G. F. Heidkamp, V. R. Buchholz, C. Trumfheller, S. Yamazaki, C. Cheong, K. Liu, H. W. Lee, C. G. Park, R. M. Steinman, and M. C. Nussenzweig. 2007. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* 315: 107-111.
4. Serbina, N. V., T. P. Salazar-Mather, C. A. Biron, W. A. Kuziel, and E. G. Pamer. 2003. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* 19: 59-70.
5. Tezuka, H., Y. Abe, M. Iwata, H. Takeuchi, H. Ishikawa, M. Matsushita, T. Shiohara, S. Akira, and T. Ohteki. 2007. Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. *Nature* 448: 929-933.
6. Steinman, R. M., D. Hawiger, and M. C. Nussenzweig. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 685-711.
7. Probst, H. C., K. McCoy, T. Okazaki, T. Honjo, and M. van den Broek. 2005. Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat. Immunol.* 6: 280-286.
8. Liu, K., C. Waskow, X. Liu, K. Yao, J. Hoh, and M. Nussenzweig. 2007. Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice. *Nat. Immunol.* 8: 578-583.

9. Chicha, L., D. Jarrossay, and M. G. Manz. 2004. Clonal type I interferon-producing and dendritic cell precursors are contained in both human lymphoid and myeloid progenitor populations. *J. Exp. Med.* 200: 1519-1524.
10. MacDonald, K. P., V. Rowe, H. M. Bofinger, R. Thomas, T. Sasmono, D. A. Hume, and G. R. Hill. 2005. The colony-stimulating factor 1 receptor is expressed on dendritic cells during differentiation and regulates their expansion. *J. Immunol.* 175: 1399-1405.
11. Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, and R. M. Steinman. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 176: 1693-1702.
12. McKenna, H. J., K. L. Stocking, R. E. Miller, K. Brasel, T. De Smedt, E. Maraskovsky, C. R. Maliszewski, D. H. Lynch, J. Smith, B. Pulendran, E. R. Roux, M. Teepe, S. D. Lyman, and J. J. Peschon. 2000. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 95: 3489-3497.
13. Brasel, K., T. De Smedt, J. L. Smith, and C. R. Maliszewski. 2000. Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures. *Blood* 96: 3029-3039.
14. Fogg, D. K., C. Sibon, C. Miled, S. Jung, P. Aucouturier, D. R. Littman, A. Cumano, and F. Geissmann. 2006. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 311: 83-87.
15. Onai, N., A. Obata-Onai, M. A. Schmid, T. Ohteki, D. Jarrossay, and M. G. Manz. 2007. Identification of clonogenic common Flt3<sup>+</sup>M-CSFR<sup>+</sup> plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat. Immunol.* 8: 1207-1216.

16. Waskow, C., K. Liu, G. Darrasse-Jeze, P. Guermonprez, F. Ginhoux, M. Merad, T. Shengelia, K. Yao, and M. Nussenzweig. 2008. The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nat. Immunol.* 9: 676-683.
17. Naik, S. H., D. Metcalf, A. van Nieuwenhuijze, I. Wicks, L. Wu, M. O'Keeffe, and K. Shortman. 2006. Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat. Immunol.* 7: 663-671.
18. Kabashima, K., T. A. Banks, K. M. Ansel, T. T. Lu, C. F. Ware, and J. G. Cyster. 2005. Intrinsic lymphotoxin-beta receptor requirement for homeostasis of lymphoid tissue dendritic cells. *Immunity* 22: 439-450.
19. Nopora, A. and T. Brocker. 2002. Bcl-2 controls dendritic cell longevity in vivo. *J. Immunol.* 169: 3006-3014.
20. Hou, W. S. and L. Van Parijs. 2004. A Bcl-2-dependent molecular timer regulates the lifespan and immunogenicity of dendritic cells. *Nat. Immunol.* 5: 583-589.
21. Huang, X., Y. Li, K. Tanaka, K. G. Moore, and J. I. Hayashi. 1995. Cloning and characterization of Lnk, a signal transduction protein that links T-cell receptor activation signal to phospholipase C gamma 1, Grb2, and phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92: 11618-11622.
22. Takaki, S., J. D. Watts, K. A. Forbush, N. T. Nguyen, J. Hayashi, J. Alberola-Ila, R. Aebersold, and R. M. Perlmutter. 1997. Characterization of Lnk. An adaptor protein expressed in lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 272: 14562-14570.
23. Iseki, M., S. Takaki, and K. Takatsu. 2000. Molecular cloning of the mouse APS as a member of the Lnk family adaptor proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272: 45-54.
24. Ohtsuka, S., S. Takaki, M. Iseki, K. Miyoshi, N. Nakagata, Y. Kataoka, N.

- Yoshida, K. Takatsu, and A. Yoshimura. 2002. SH2-B is required for both male and female reproduction. *Mol. Cell. Biol.* 22: 3066-3077.
25. Takaki, S., K. Sauer, B. M. Iritani, S. Chien, Y. Ebihara, K. Tsuji, K. Takatsu, and R. M. Perlmutter. 2000. Control of B cell production by the adaptor protein lnk. Definition Of a conserved family of signal-modulating proteins. *Immunity* 13: 599-609.
26. Takaki, S., H. Morita, Y. Tezuka, and K. Takatsu. 2002. Enhanced hematopoiesis by hematopoietic progenitor cells lacking intracellular adaptor protein, Lnk. *J. Exp. Med.* 195: 151-160.
27. Seita, J., H. Ema, J. Oeohara, S. Yamazaki, Y. Tadokoro, A. Yamasaki, K. Eto, S. Takaki, K. Takatsu, and H. Nakauchi. 2007. Lnk negatively regulates self-renewal of hematopoietic stem cells by modifying thrombopoietin-mediated signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 2349-2354.
28. Takaki, S., Y. Tezuka, K. Sauer, C. Kubo, S. M. Kwon, E. Armstead, K. Nakao, M. Katsuki, R. M. Perlmutter, and K. Takatsu. 2003. Impaired lymphopoiesis and altered B cell subpopulations in mice overexpressing Lnk adaptor protein. *J. Immunol.* 170: 703-710.
29. Tong, W., J. Zhang, and H. F. Lodish. 2005. Lnk inhibits erythropoiesis and Epo-dependent JAK2 activation and downstream signaling pathways. *Blood* 105: 4604-4612.
30. Velazquez, L., A. M. Cheng, H. E. Fleming, C. Furlonger, S. Vesely, A. Bernstein, C. J. Paige, and T. Pawson. 2002. Cytokine signaling and hematopoietic homeostasis are disrupted in Lnk-deficient mice. *J. Exp. Med.* 195: 1599-1611.
31. Tong, W. and H. F. Lodish. 2004. Lnk inhibits Tpo-mpl signaling and Tpo-mediated megakaryocytopoiesis. *J. Exp. Med.* 200: 569-580.

32. Takizawa, H., K. Eto, A. Yoshikawa, H. Nakauchi, K. Takatsu, and S. Takaki. 2008. Growth and maturation of megakaryocytes is regulated by Lnk/Sh2b3 adaptor protein through crosstalk between cytokine- and integrin-mediated signals. *Exp. Hematol.* *36*: 897-906.
33. Kubo-Akashi, C., M. Iseki, S. M. Kwon, H. Takizawa, K. Takatsu, and S. Takaki. 2004. Roles of a conserved family of adaptor proteins, Lnk, SH2-B, and APS, for mast cell development, growth, and functions: APS-deficiency causes augmented degranulation and reduced actin assembly. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *315*: 356-362.
34. Herrington, J., M. Diakonova, L. Rui, D. R. Gunter, and C. Carter-Su. 2000. SH2-B is required for growth hormone-induced actin reorganization. *J. Biol. Chem.* *275*: 13126-13133.
35. Diakonova, M., D. R. Gunter, J. Herrington, and C. Carter-Su. 2002. SH2-Bbeta is a Rac-binding protein that regulates cell motility. *J. Biol. Chem.* *277*: 10669-10677.
36. Randolph, G. J., V. Angeli, and M. A. Swartz. 2005. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat. Rev. Immunol.* *5*: 617-628.
37. Salter, R. D., R. J. Tuma-Warrino, P. Q. Hu, and S. C. Watkins. 2004. Rapid and extensive membrane reorganization by dendritic cells following exposure to bacteria revealed by high-resolution imaging. *J. Leukoc. Biol.* *75*: 240-243.
38. Watkins, S. C. and R. D. Salter. 2005. Functional connectivity between immune cells mediated by tunneling nanotubules. *Immunity* *23*: 309-318.
39. Boonstra, A., R. Rajsbaum, M. Holman, R. Marques, C. Asselin-Paturel, J. P. Pereira, E. E. Bates, S. Akira, P. Vieira, Y. J. Liu, G. Trinchieri, and A. O'Garra. 2006. Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals. *J. Immunol.* *177*: 7551-7558.

40. Hemmi, H., T. Kaisho, K. Takeda, and S. Akira. 2003. The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. *J. Immunol.* *170*: 3059-3064.
41. Katagiri, K., N. Ohnishi, K. Kabashima, T. Iyoda, N. Takeda, Y. Shinkai, K. Inaba, and T. Kinashi. 2004. Crucial functions of the Rap1 effector molecule RAPL in lymphocyte and dendritic cell trafficking. *Nat. Immunol.* *5*: 1045-1051.
42. Honda, K., Y. Ohba, H. Yanai, H. Negishi, T. Mizutani, A. Takaoka, C. Taya, and T. Taniguchi. 2005. Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* *434*: 1035-1040.
43. Krishnamoorthy, N., T. B. Oriss, M. Paglia, M. Fei, M. Yarlagadda, B. Vanhaesebroeck, A. Ray, and P. Ray. 2008. Activation of c-Kit in dendritic cells regulates T helper cell differentiation and allergic asthma. *Nat. Med.* *14*: 565-573.
44. Kripke, M. L., C. G. Munn, A. Jeevan, J. M. Tang, and C. Bucana. 1990. Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. *J. Immunol.* *145*: 2833-2838.
45. Bonasio, R., M. L. Scimone, P. Schaerli, N. Grabie, A. H. Lichtman, and U. H. von Andrian. 2006. Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. *Nat. Immunol.* *7*: 1092-1100.
46. Sapoznikov, A., Y. Pewzner-Jung, V. Kalchenko, R. Krauthgamer, I. Shachar, and S. Jung. 2008. Perivascular clusters of dendritic cells provide critical survival signals to B cells in bone marrow niches. *Nat. Immunol.* *9*: 388-395.
47. Kapsenberg, M. L. 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat. Rev. Immunol.* *3*: 984-993.
48. Liu, Y. J. 2005. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and

- plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 275-306.
49. Ema, H., K. Sudo, J. Seita, A. Matsubara, Y. Morita, M. Osawa, K. Takatsu, S. Takaki, and H. Nakauchi. 2005. Quantification of self-renewal capacity in single hematopoietic stem cells from normal and Lnk-deficient mice. *Dev. Cell.* 8: 907-914.
50. Itoh, T., R. Liu, T. Yokota, K. I. Arai, and S. Watanabe. 1998. Definition of the role of tyrosine residues of the common beta subunit regulating multiple signaling pathways of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor. *Mol. Cell. Biol.* 18: 742-752.
51. Simon, C., E. Dondi, A. Chaix, P. de Sepulveda, T. J. Kubiseski, N. Varin-Blank, and L. Velazquez. 2008. Lnk adaptor protein down-regulates specific Kit-induced signaling pathways in primary mast cells. *Blood*
52. Lammermann, T., B. L. Bader, S. J. Monkley, T. Worbs, R. Wedlich-Soldner, K. Hirsch, M. Keller, R. Forster, D. R. Critchley, R. Fassler, and M. Sixt. 2008. Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature* 453: 51-55.
53. Todd, J. A., N. M. Walker, J. D. Cooper, D. J. Smyth, K. Downes, V. Plagnol, R. Bailey, S. Nejentsev, S. F. Field, F. Payne, C. E. Lowe, J. S. Szeszko, J. P. Hafler, L. Zeitels, J. H. Yang, A. Vella, S. Nutland, H. E. Stevens, H. Schuilenburg, G. Coleman, M. Maisuria, W. Meadows, L. J. Smink, B. Healy, O. S. Burren, A. A. Lam, N. R. Ovington, J. Allen, E. Adlem, H. T. Leung, C. Wallace, J. M. Howson, C. Guja, C. Ionescu-Tirgoviste, Genetics of Type 1 Diabetes in Finland, M. J. Simmonds, J. M. Heward, S. C. Gough, Wellcome Trust Case Control Consortium, D. B. Dunger, L. S. Wicker, and D. G. Clayton. 2007. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat. Genet.* 39: 857-864.
54. Hunt, K. A., A. Zhernakova, G. Turner, G. A. Heap, L. Franke, M. Bruinenberg, J. Romanos, L. C. Dinesen, A. W. Ryan, D. Panesar, R.

- Gwilliam, F. Takeuchi, W. M. McLaren, G. K. Holmes, P. D. Howdle, J. R. Walters, D. S. Sanders, R. J. Playford, G. Trynka, C. J. Mulder, M. L. Mearin, W. H. Verbeek, V. Trimble, F. M. Stevens, C. O'Morain, N. P. Kennedy, D. Kelleher, D. J. Pennington, D. P. Strachan, W. L. McArdle, C. A. Mein, M. C. Wapenaar, P. Deloukas, R. McGinnis, R. McManus, C. Wijmenga, and D. A. van Heel. 2008. Newly identified genetic risk variants for celiac disease related to the immune response. *Nat. Genet.* 40: 395-402.
55. Smyth, D. J., V. Plagnol, N. M. Walker, J. D. Cooper, K. Downes, J. H. Yang, J. M. Howson, H. Stevens, R. McManus, C. Wijmenga, G. A. Heap, P. C. Dubois, D. G. Clayton, K. A. Hunt, D. A. van Heel, and J. A. Todd. 2008. Shared and Distinct Genetic Variants in Type 1 Diabetes and Celiac Disease. *N. Engl. J. Med.* 359: 2767-2777.
56. Hadeiba, H., T. Sato, A. Habtezion, C. Oderup, J. Pan, and E. C. Butcher. 2008. CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nat. Immunol.* 9: 1253-1260.

## **Conventional DCs**

**Migratory DCs:** migrate to the lymphnodes through the lymph  
most DCs in peripheral non-lymphoid organs, such as  
Langerhans cells  
Dermal DCs  
Interstitial DCs  
GALT (gut-associated lymphoid tissue) DCs

**Lymphoid-organ-resident DCs:** do not migrate through the lymph  
CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>DCs  
CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>DCs  
CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>DCs

## **Plasmacytoid DCs: interferon-producing DCs**

round, non dendritic and circulating cells  
producing typeI IFN after viral or microbial infections

## **Inflammatory DCs: appear as a consequence of inflammation or microbial stimuli**

Inflammatory monocytes can produce DCs  
TipDCs: TNF and iNOS-producing DCs

### 図1.樹状細胞のサブセット

樹状細胞には、多くのサブタイプが存在する。conventional DCとplasmacytoid DCに大別され、conventional DCは更に、リンパの流れに乗って全身を循環し、抗原を捕捉してリンパ節に移動する能力を持つDCと分化してリンパ組織に留まったまま、抗原提示細胞として機能しているDCとに分けられる。移動能を持つDCの中には、皮膚のLangerhans細胞や、腸管粘膜組織に存在し、CD103を発現し、VitaminAの代謝産物であるretinalをretinoic acid (RA)に変換する作用をもつGALT-DCが含まれる。plasmacytoid DCはDCの特徴の一つである樹状突起はなく、ウイルス感染に伴い樹状突起を持った形態に変化すると同時に大量のインターフェロン $\alpha$ を産生し、抗ウイルス作用をもたらすDCとして知られる。また、炎症反応時には、単球からも樹状細胞が分化することが知られており、加えて、消化管粘膜関連リンパ組織に存在するTipDCは、常在性細菌の刺激によってTNF $\cdot\alpha$ とiNOSを産生し、iNOSがB細胞のTGF $\cdot\beta$ 受容体発現を誘導すると共に、TipDCのAPRILやBAFF産生を増強することによって、B細胞においてIgAへのクラススイッチを促進し、この仕組みが腸管における恒常的なIgA産生の機構となっていることも報告されている。

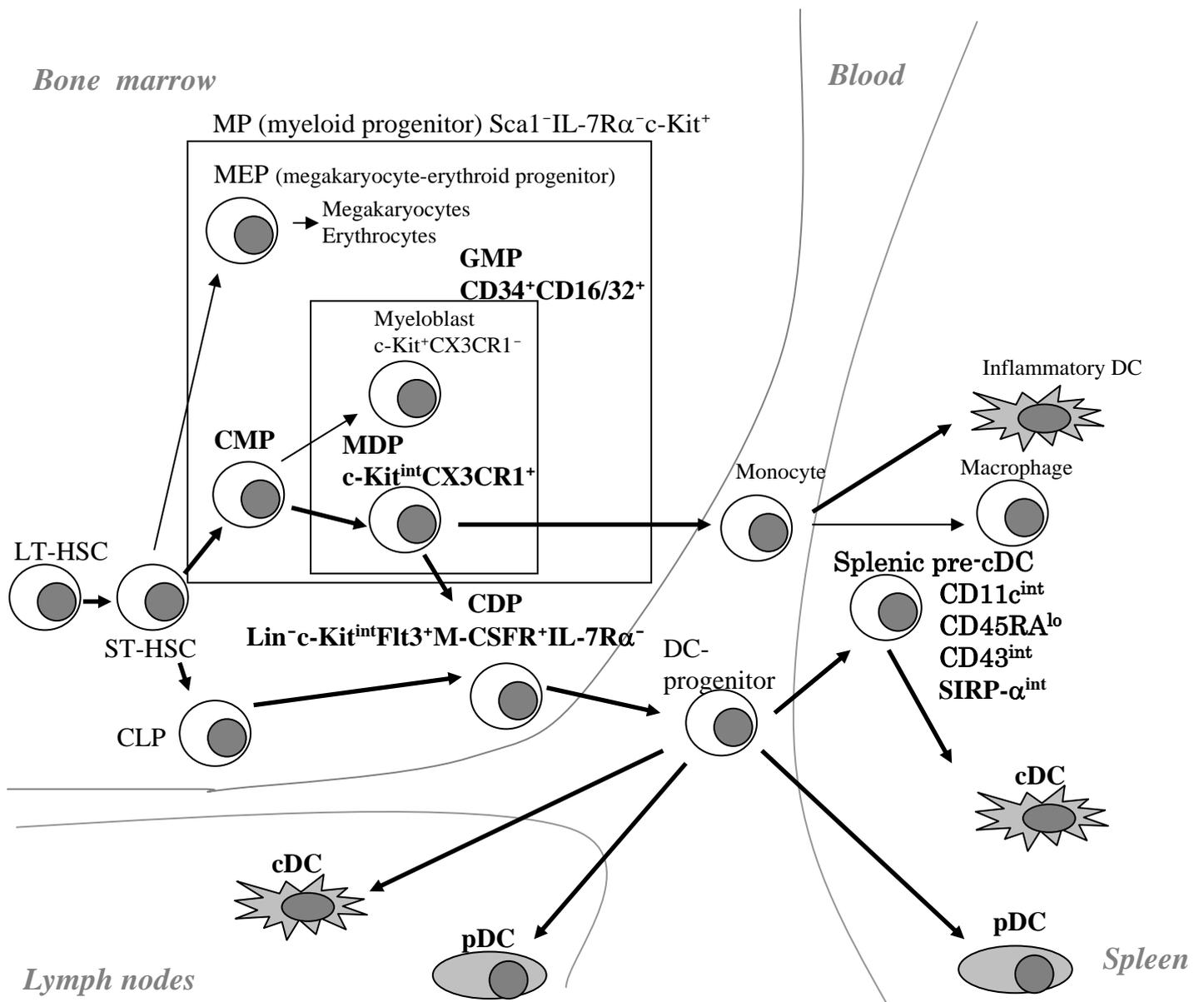
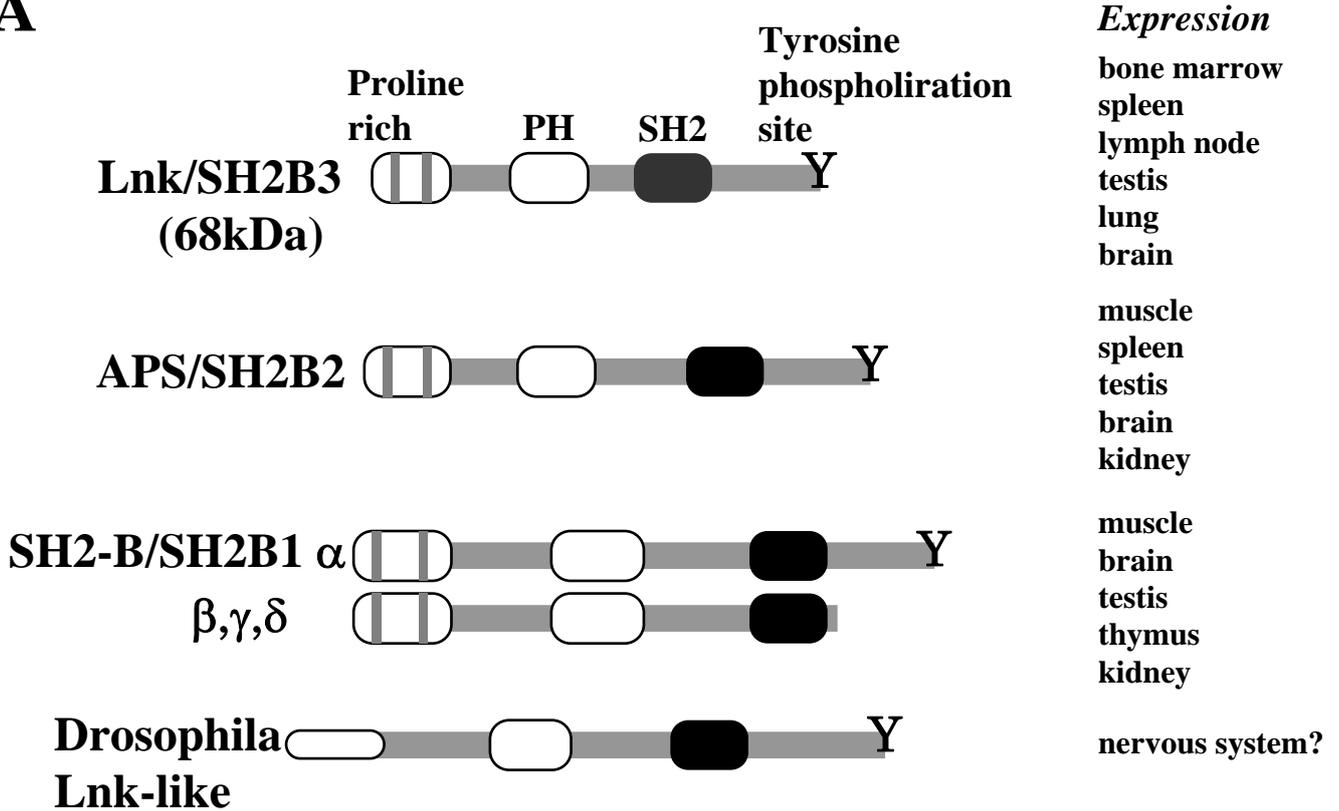


図2.樹状細胞の分化

Fogg等により、分化抗原陰性( $Lin^{-}$ )、 $c-Kit^{low}CX3CR1^{+}$ の骨髄細胞として同定されたMDP (macrophage DC progenitor) は、後に $Lin^{-}M-CSFR^{+}$ の骨髄細胞も同じ性質であることが示された。更に最近、Onai等により、より直接的な樹状細胞前駆細胞として、CDP (common DC precursor)が同定され、これらはMDPに包含されると考えられている。脾臓には、cDCに分化する直前の段階として、pre-cDCと名づけられた細胞があることも明らかとなっている。CDPからは、血中においてDC前駆細胞が分化してくると考えられ、そこからcDC及びpDCが分化してくるものと思われる。

**A**



**B**

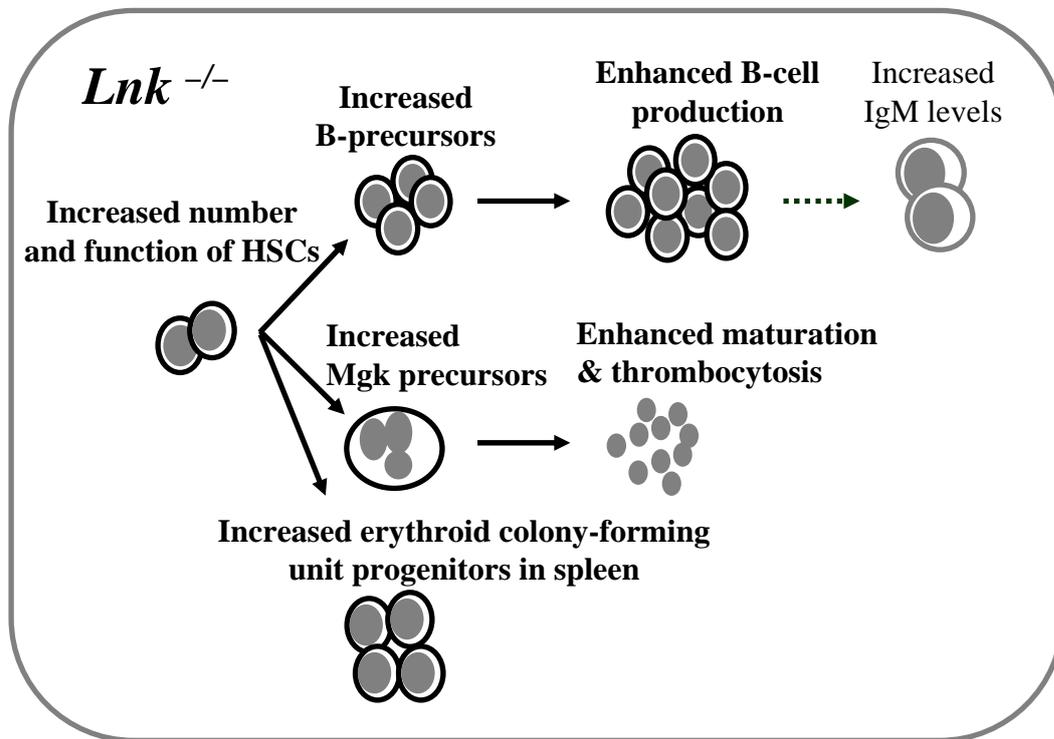


図3.細胞内アダプター分子Lnkに関する知見

A. LnkとそのファミリータンパクであるAPS、SH2-Bの構造及び発現臓器。DrosophilaではN末端の相同性は低い。

B. Lnk欠損マウスでこれまでに報告されたphenotype。MgK: megakaryocytes

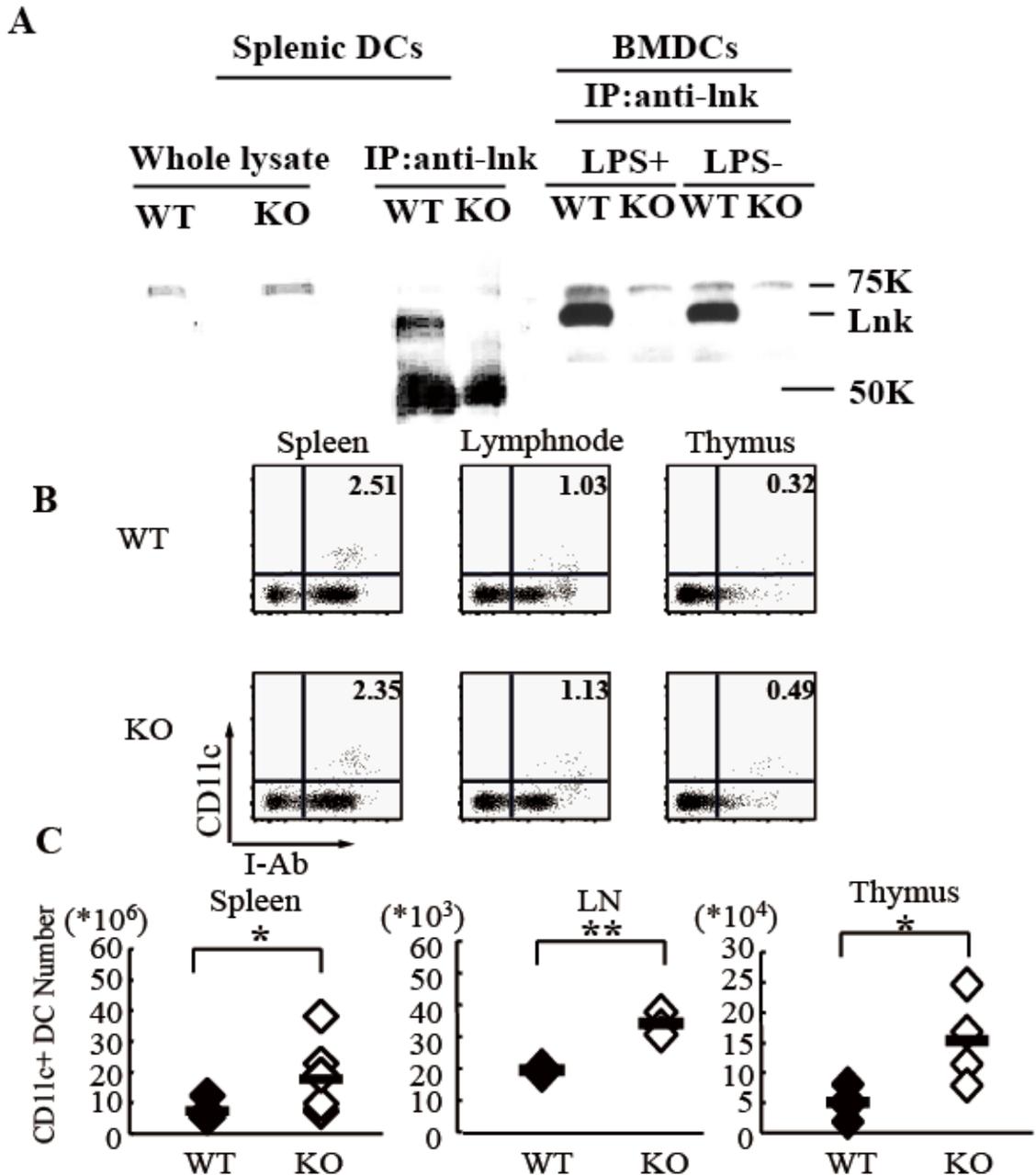


図4.樹状細胞におけるLnkの発現と $lnk$ 欠損による脾臓・末梢リンパ節・胸腺内樹状細胞数への影響

**A.**脾臓樹状細胞及び骨髄由来樹状細胞におけるLnk蛋白の発現を確認した。脾臓樹状細胞では、 $1.5 \times 10^6$  cellsからの細胞溶解液を直接ウェスタンブロッティングにて解析したところ、バンドを認めなかったため、 $5.0 \times 10^6$  cellsからの細胞溶解液を抗マウスLnk抗体で免疫沈降し、抗マウスLnk-C抗体でイムノブロットした。骨髄由来樹状細胞については、 $1 \times 10^7$  cellsからの細胞溶解液を抗マウスLnk抗体で免疫沈降の後、抗マウスLnk-C抗体でイムノブロットした。

IP: immunoprecipitated

**B.**脾臓、腋下リンパ節、胸腺のフローサイトメリー解析の代表例。脾臓は400U/mlのCollagenase Dで細断し、100U/mlのCollagenase Dで37°C30分間インキュベートし細胞を調整した。腋下リンパ節及び胸腺は100U/mlのCollagenase Dで37°C30分間インキュベートし細胞を調整した。その上で蛍光標識した抗CD11c抗体及び抗I-A<sup>b</sup>抗体にて染色し、フローサイトメリーにて解析した。数値は各ボックス内の細胞、すなわち樹状細胞の比率である。

**C.**脾臓、腋下リンパ節、胸腺内の樹状細胞数。Bの様なフローサイトメリーを用いた解析により得られた比率から算出。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

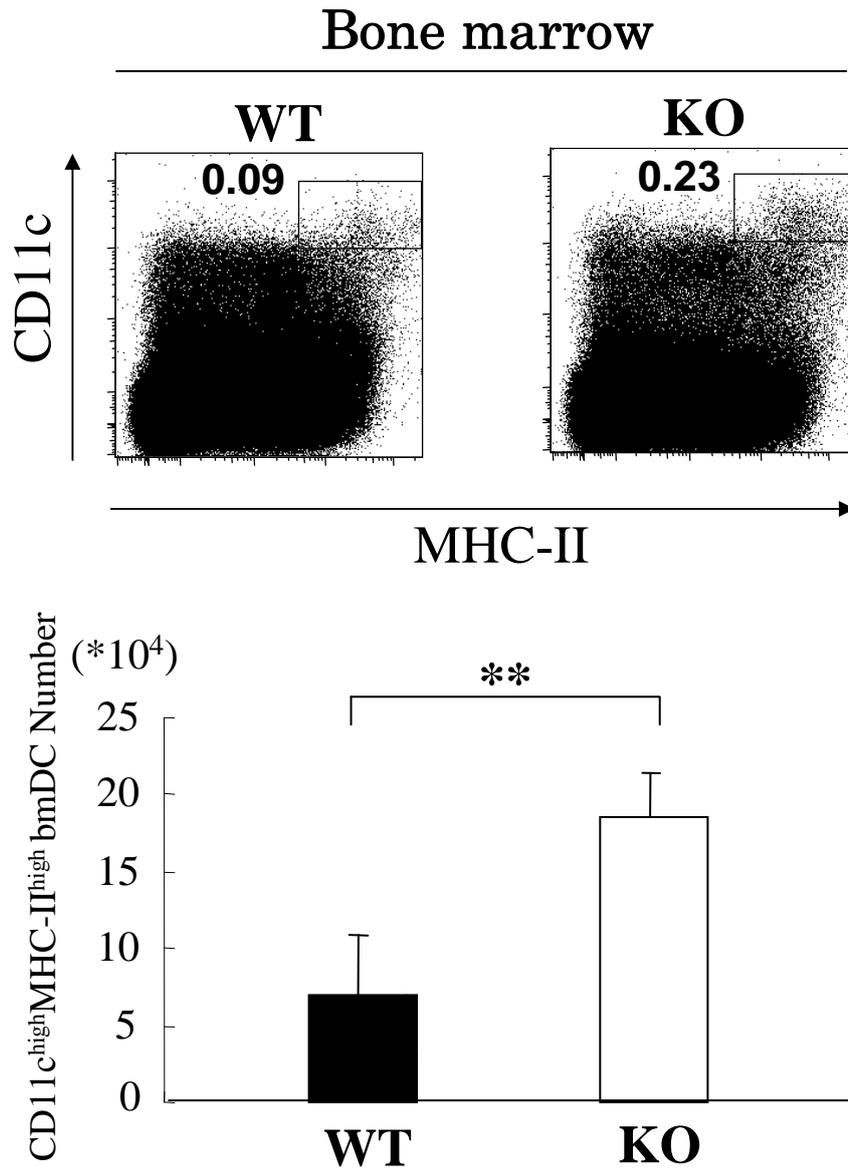


図5.骨髄内樹状細胞数の *lnk*欠損による影響

大腿骨及び脛骨より得た骨髄細胞を、抗CD11c抗体(APC)及び抗MHC-II(I-A/I-E)抗体(PE)にて染色し、フローサイトメトリーにて解析した。数値は各ボックス内の細胞、すなわち骨髄内樹状細胞の比率である。その比率から、骨髄内樹状細胞数を算出した。  
 bmDC: bone marrow-resident DC. n=5, \*\*p<0.01

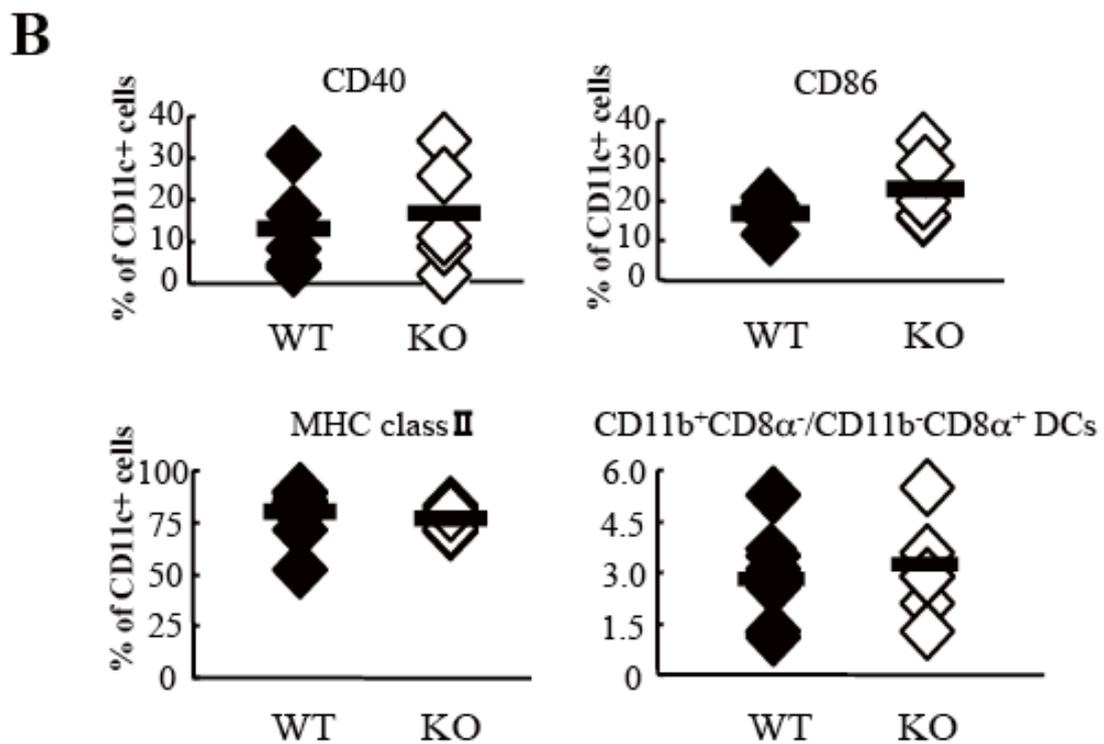
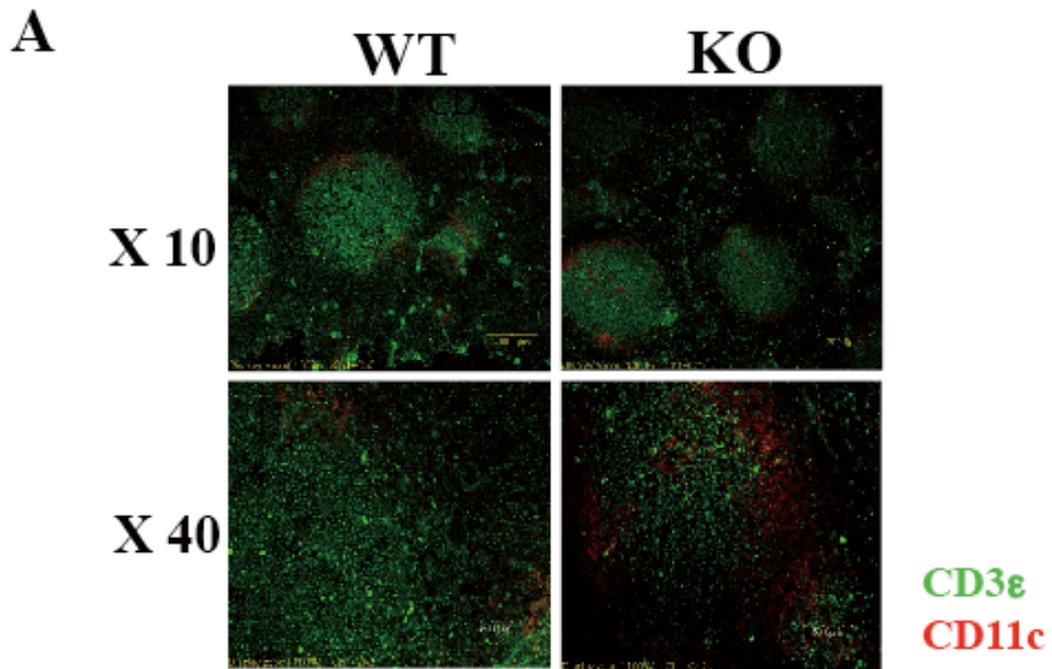


図6.脾臓における樹状細胞の分布とサブポピュレーション

A.脾臓凍結切片の免疫組織学的染色。樹状細胞マーカー:CD11c(赤)、T細胞マーカー:CD3ε(緑)

B.成熟度マーカー(I-A<sup>b</sup>/MHC-II)・共刺激分子(CD40, CD86/B7.2)の発現及びCD11b<sup>+</sup>CD8α<sup>-</sup>/CD11b<sup>-</sup>CD8α<sup>+</sup>樹状細胞サブセットの比率。

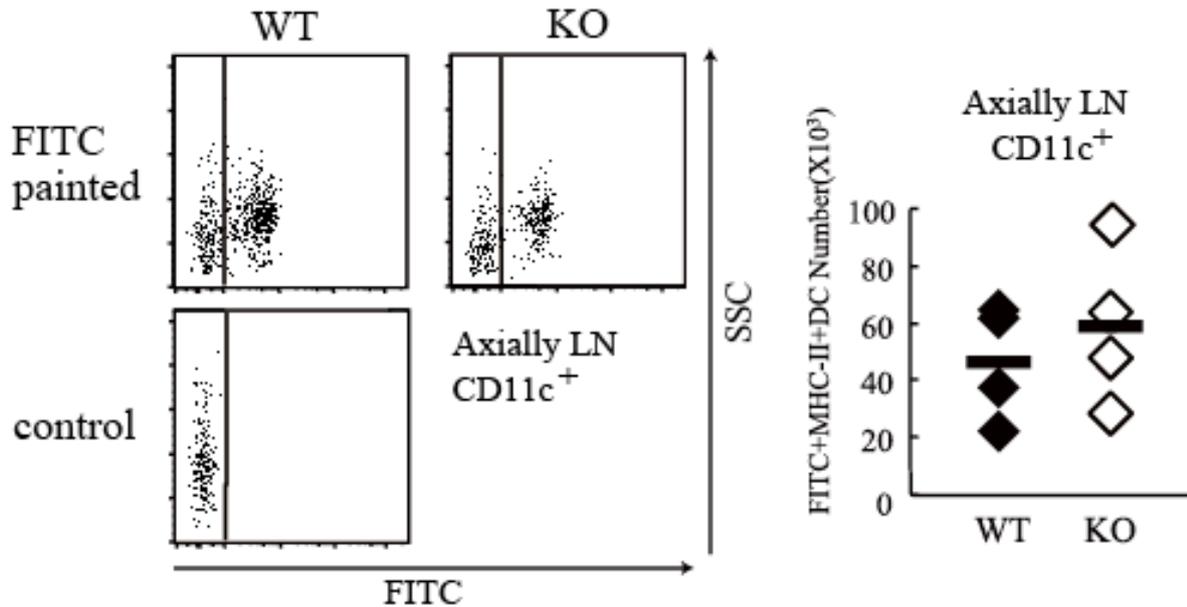
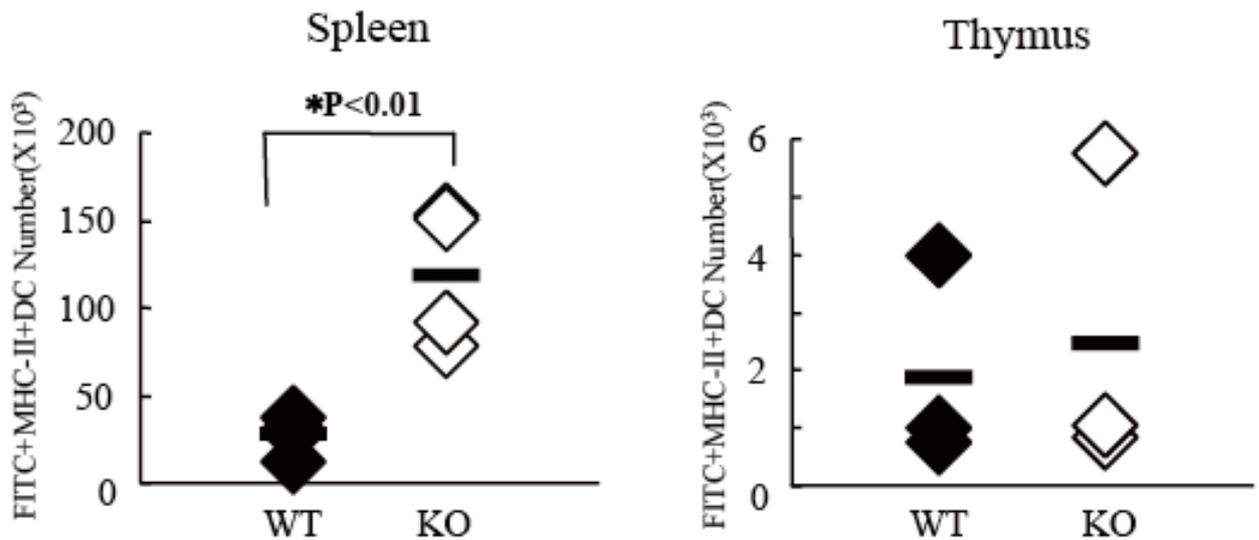
**A****B**

図7.樹状細胞の移動能

皮膚樹状細胞の移動能をFITCを皮膚に塗布することにより評価した。

**A.** 胸部皮膚に、FITCを接触皮膚炎を誘導する際に用いられるフタル酸ジブチルと共に塗布し、44~48時間後腋下リンパ節を摘出しフローサイトメリーにて解析した。FITCを細胞表面に提示していると考えられる樹状細胞は、CD11c<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup>の細胞としてゲートをかけた上で、FITCの輝度が高い集団として検出された。その比率によりリンパ節へと移動した樹状細胞数を計算した。  
**B.** 内因性の皮膚樹状細胞の脾臓・胸腺への移動能の評価。フタル酸ジブチルを使用しない点以外は、Aと同様の方法によりFITCを塗布した。\*p<0.01

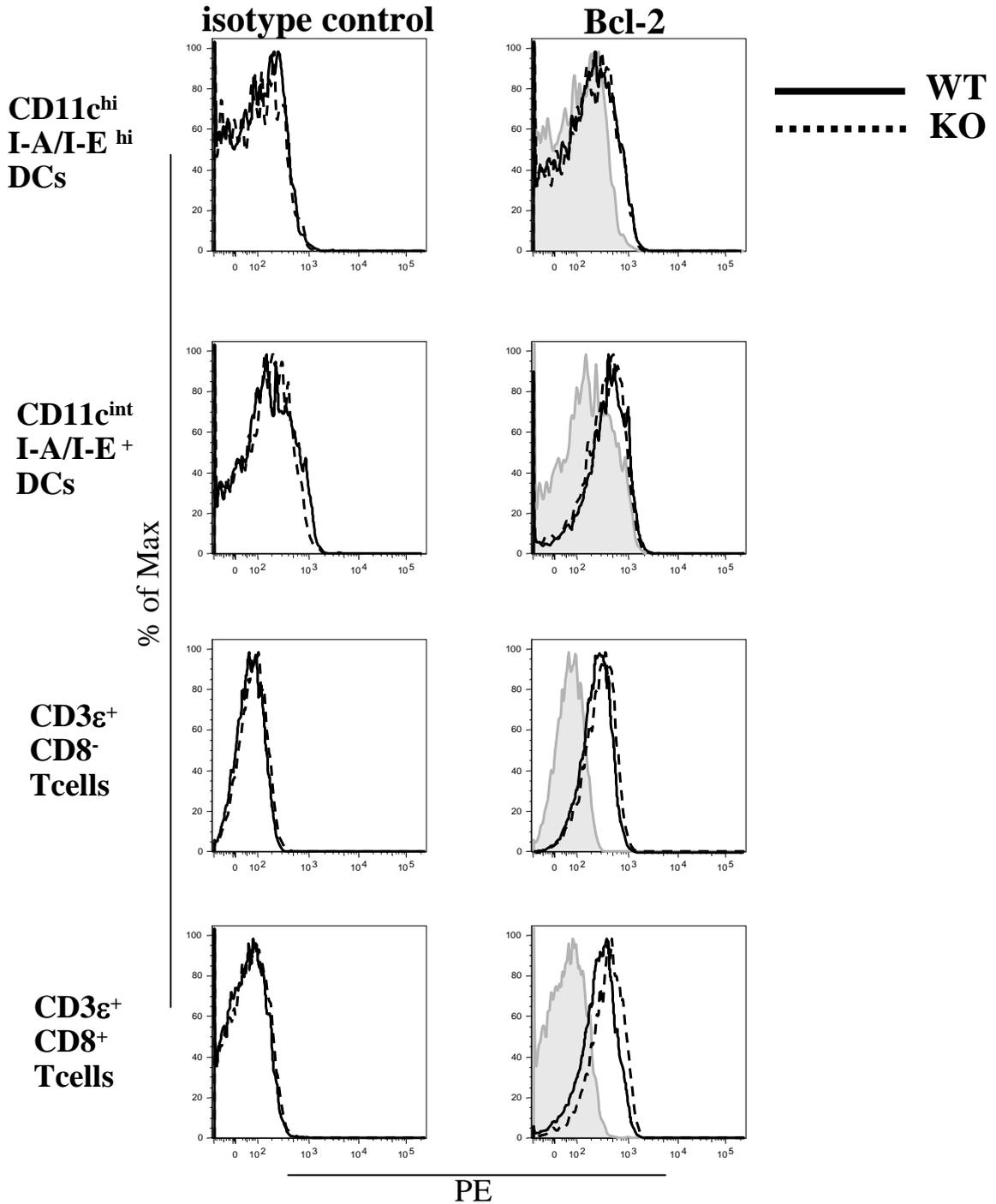


図8.脾臓樹状細胞におけるBcl-2発現

脾細胞を、抗CD11c抗体(APC)及び抗I-A/I-E/MHC-II抗体(FITC)にて染色し、固定後サポニンにて浸透させ抗Bcl-2抗体(PE)乃至はアイソタイプ抗IgG1抗体(PE)にて細胞内染色を行いフローサイトメトリーにて解析した。内部コントロールとしてT細胞におけるBcl-2の発現を、抗CD3ε抗体(APC)及び抗CD8抗体(FITC)を染色に用い、確認した。  
 成熟樹状細胞: CD11c<sup>hi</sup>I-A/I-E<sup>hi</sup>。未熟樹状細胞: CD11c<sup>int</sup>I-A/I-E<sup>+</sup>。  
 黒、実線: 野生型マウス。黒、破線: *Ink*欠損マウス。  
 灰色、塗りつぶし: 各細胞集団における野生型マウスでのアイソタイプコントロールの重ね合わせ。

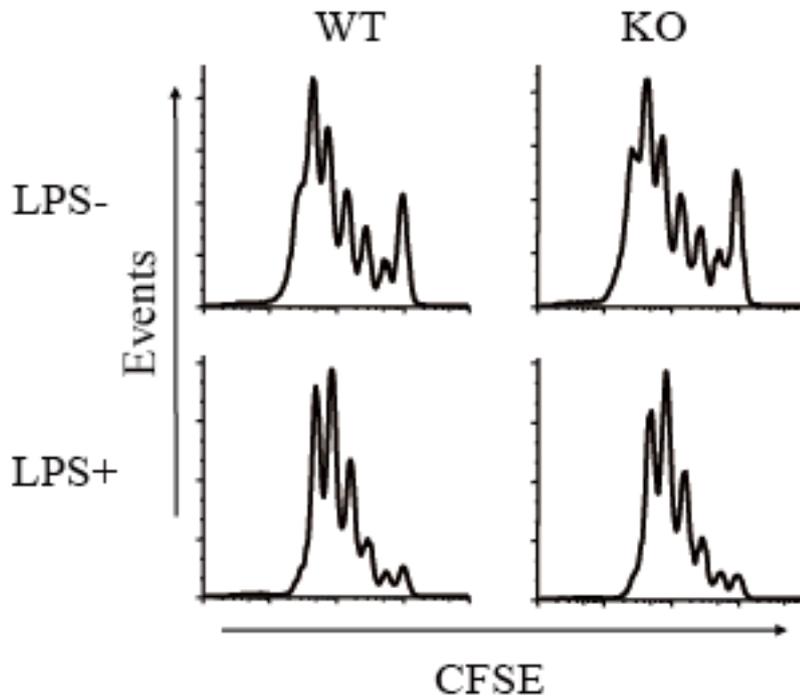
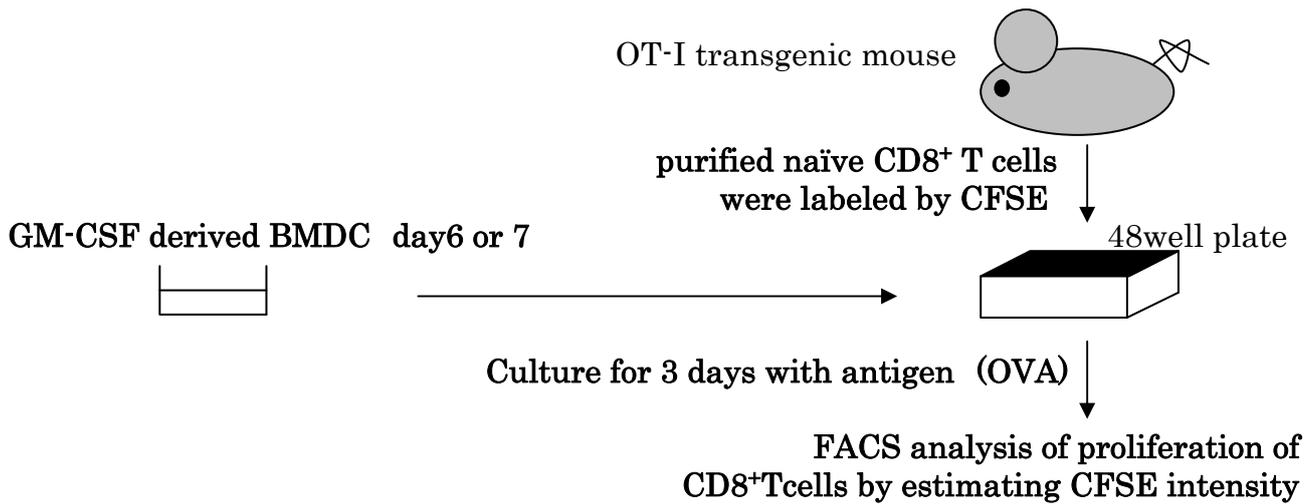


図9. *Ink*欠損骨髄由来樹状細胞の抗原提示能

GM-CSF(10ng/ml)にて誘導した骨髄由来樹状細胞の抗原提示能をT細胞の分裂回数により評価した。上はアッセイの模式図である。培養6日目もしくは7日目の骨髄由来樹状細胞 ( $5 \times 10^4$  cells/well)を、ナイーブT細胞とともに、LPS-ないしはLPS+のOVA(1mg/ml)を加えて48穴プレートで3日間培養した。T細胞は、OT-I TCRトランスジェニックマウスの脾臓より分離精製したCD8<sup>+</sup>T細胞 ( $5 \times 10^5$  cells/well)を5 $\mu$ M CFSEで室温15分インキュベートし染色した上で用いた。培養終了後、CD8<sup>+</sup>T細胞のCFSEの輝度をフローサイトメトリーにて解析し、細胞分裂の回数を評価した。

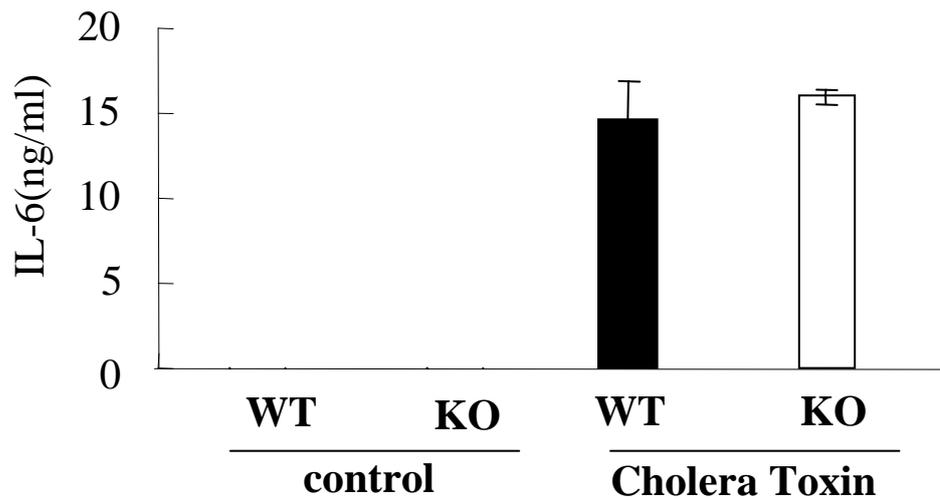


図10. コレラ毒素刺激による骨髄由来樹状細胞からのIL-6の産生

GM-CSF(10ng/ml)にて誘導した骨髄由来樹状細胞を培養7日目に回収し、 $2 \times 10^6$  cells/mlにて12穴プレートにコレラ毒素(1 $\mu$ g/ml)とGM-CSF(10ng/ml)を添加し24時間培養した。培養後の上清をIL-6のCapture抗体をコーティングした蛍光ビーズとIL-6のDetection抗体(PE標識)を用いたサンドイッチ法によるシステムで、フローサイトメトリーによりIL-6の産生を定量化した。

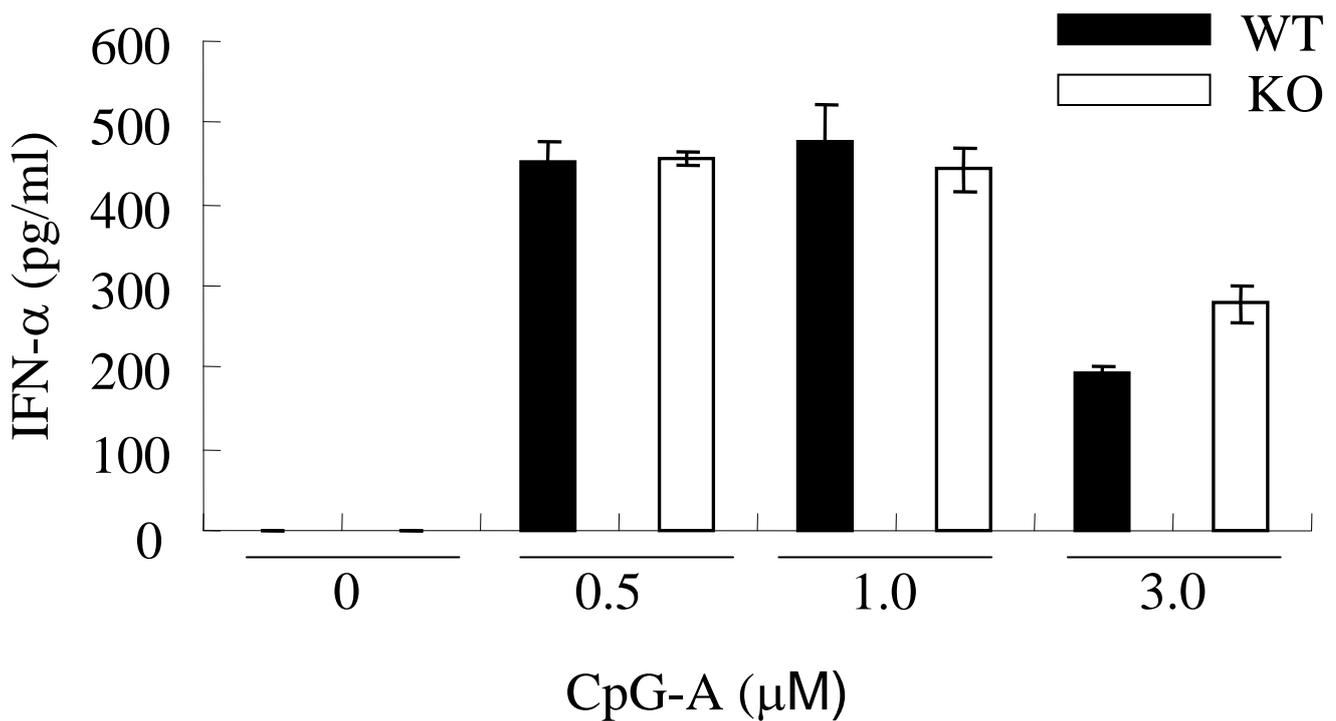


図11. CpG-A刺激による骨髄由来形質細胞様樹状細胞からのインターフェロン $\alpha$ 産生

Flt3L(100ng/ml)にて誘導した骨髄由来樹状細胞を、培養7日目に回収し、抗B220抗体 (Biotin)及びStreptavidinマイクロビーズを用いてMACSによりpDCを精製。

$1 \times 10^5$  cells/wellにて96穴プレートにまき、CpG-Aを各濃度にて添加し24時間培養後、ELISAにより上清中のインターフェロン $\alpha$ を測定した。

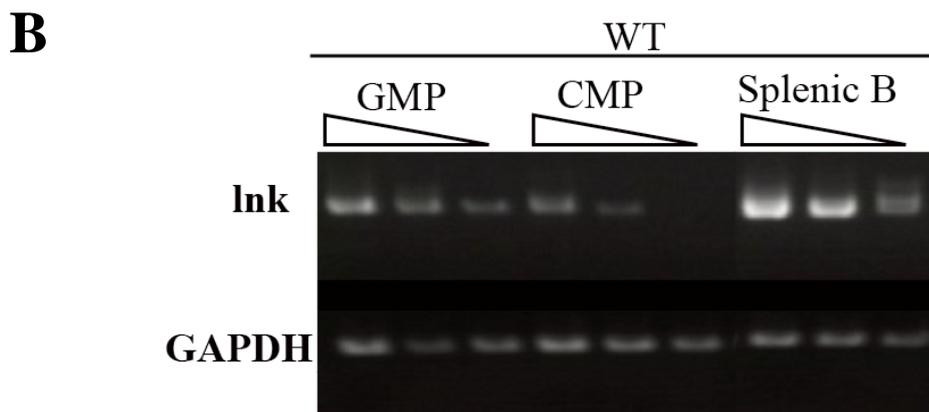
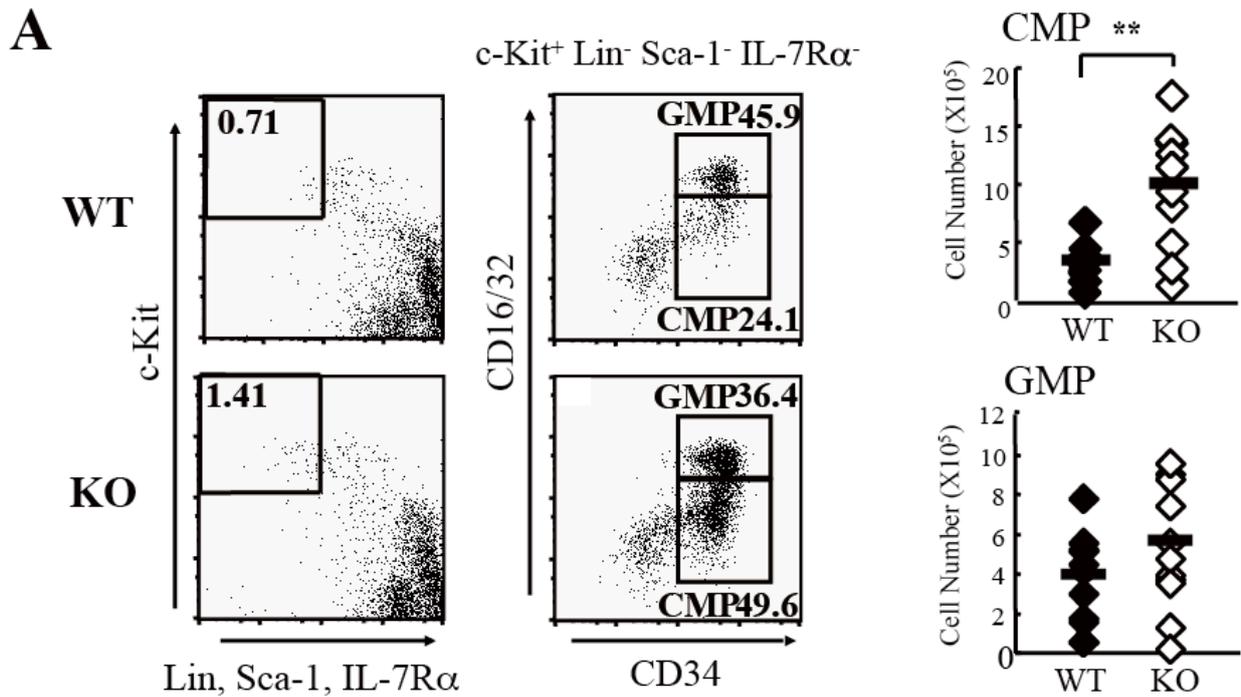


図12. 骨髄におけるCMP及びGMPの数と $lnk$ の発現

**A.** マウス大腿骨・脛骨より骨髄細胞を採取し、各表面マーカーに対する蛍光抗体を用いて染色し、フローサイトメトリーにて解析した。抗c-Kit抗体(APC)陽性、抗Lineageマーカー(CD3ε, TER119, B220, CD19, NK1.1, CD11c, I-A<sup>b</sup>, Gr-1, CD11b)抗体(PE)陰性、抗Sca-1抗体(PE)陰性、抗IL-7Rα抗体(PE)陰性の細胞集団を、抗CD16/32抗体(Biotin)、抗CD34抗体(APC)の発現パターンにて展開し、CMPとGMPの分画を同定した。数字は各分画に含まれる細胞の比率であり、その比率から絶対数を算出した。

Biotin化抗体に関しては、Streptavidin-PerCP抗体にて検出した。\*\* $p < 0.01$

**B.** 野生型マウスの骨髄細胞から、上記蛍光抗体による染色にて同定されたCMPとGMPをソーティングし、cDNAを抽出。段階希釈したcDNAを鋳型とし、 $lnk$ (上段)及び $GAPDH$ (下段)cDNAフラグメントを増幅するように設計されたプライマーを用いてRT-PCRを行い、 $lnk$ 発現を解析した。

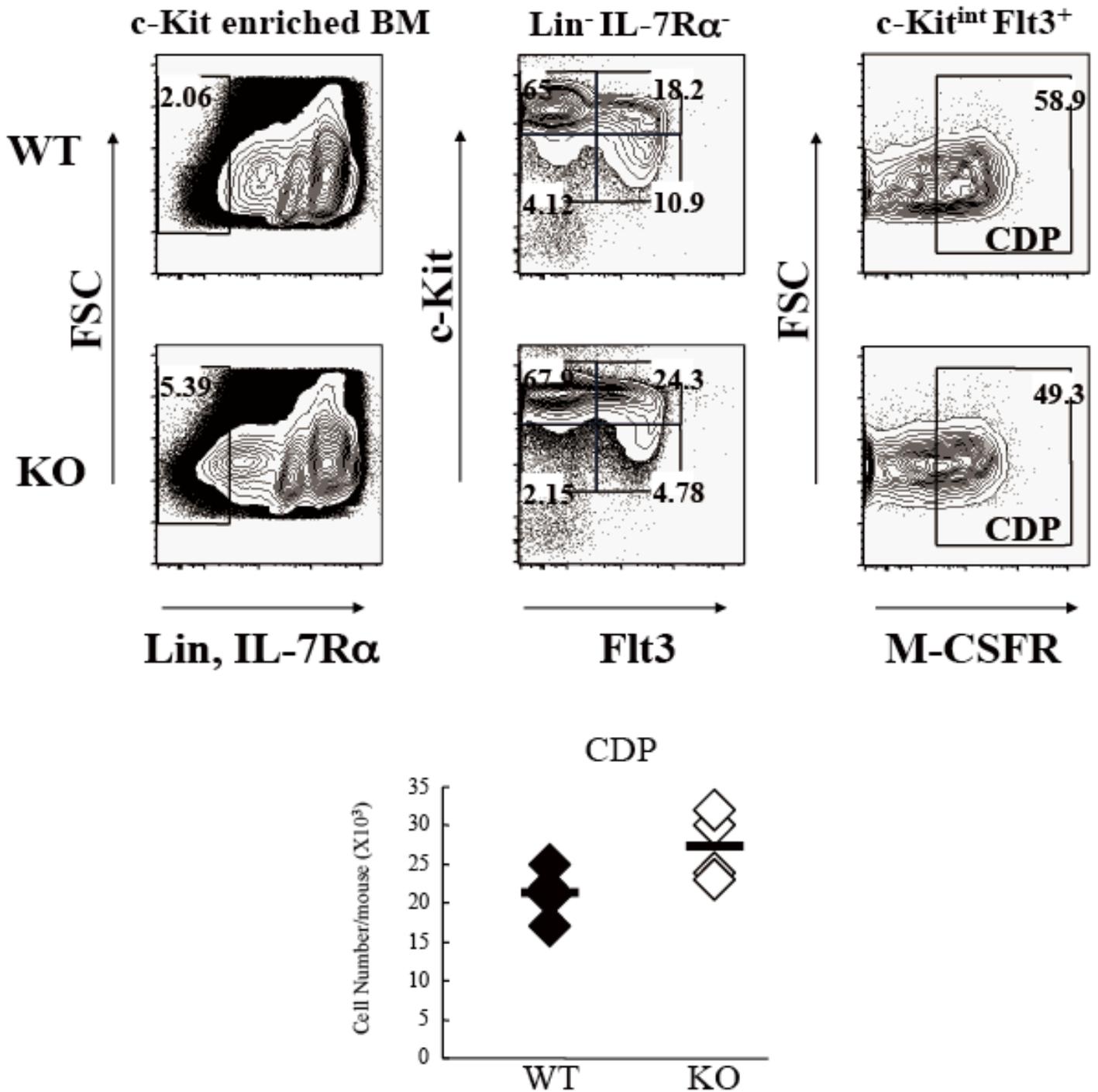


図13. 骨髄におけるCDPの数

マウス大腿骨および脛骨より採取した骨髄細胞を、抗c-Kit抗体(APC)で染色後、抗APCマイクロビーズと反応させ、MACSにてc-Kit陽性細胞を濃縮した。その上で抗Lineageマーカー(CD3ε, CD4, CD8, CD11b, CD19, B220, Gr-1, NK1.1, TER119, IL-7Rα)抗体(FITC)、抗Flt3抗体(PE)、抗M-CSFR抗体(Biotin)及びStreptavidin-PECy7にて染色を行い、Lin<sup>-</sup>IL-7Rα<sup>-</sup>c-Kit<sup>int</sup>Flt3<sup>+</sup>M-CSFR<sup>+</sup>のCDPをフローサイトメトリーにて同定した。得られたCDPの骨髄内存在比よりCDPの絶対数を算出した。数字は各分画内の細胞の存在比率である。

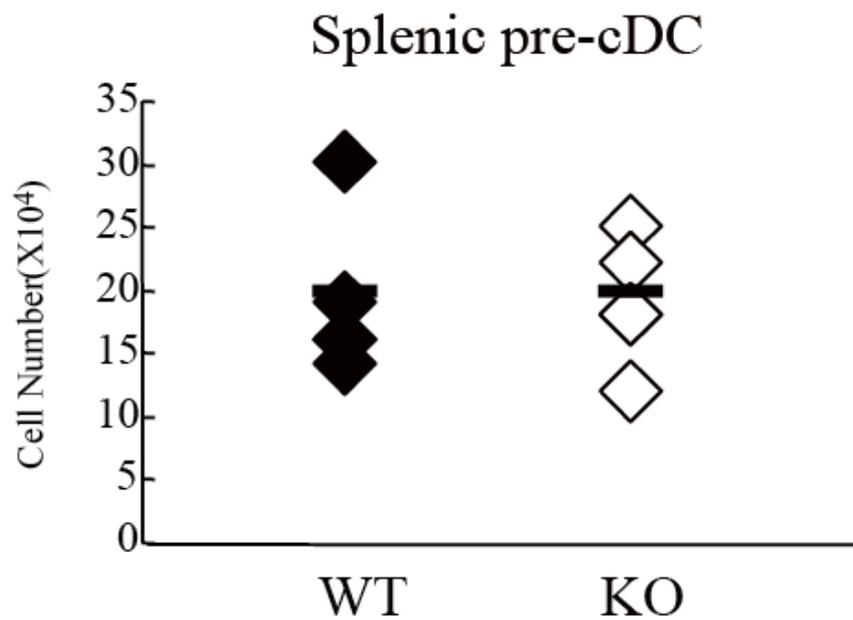
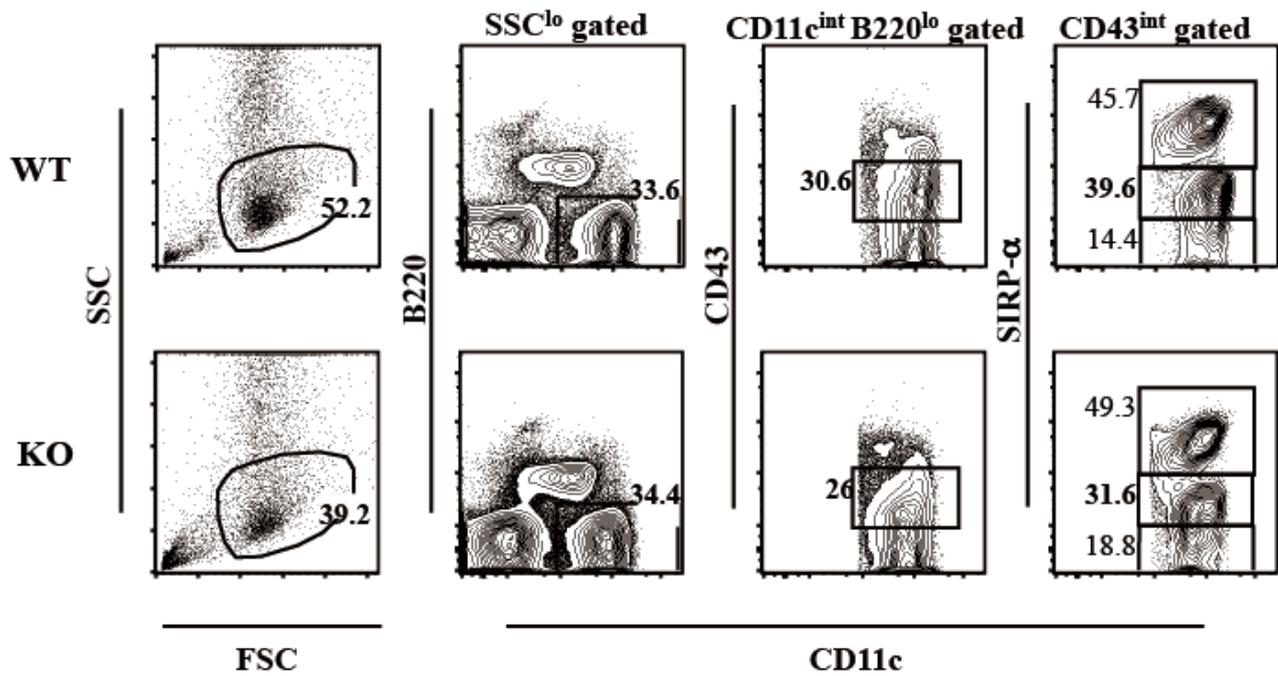


図14. 脾臓内pre-cDCの数

Collagenase D処理にて得られた脾細胞を、密度勾配 (Optiprepにて1.076g/cm<sup>3</sup>と1.084g/cm<sup>3</sup>を作成)遠心法にて1700g、10分間遠心し、中間層を分離した。得られた細胞を抗CD3ε、抗CD19、抗NK1.1、抗TER119抗体(いずれもBiotin化抗体)にて染色し、抗Biotinマイクロビーズと反応させ、MACSにて陽性細胞を除去し、残りの細胞を抗CD11c抗体 (FITC)、抗CD43抗体 (PE)、抗B220抗体 (APC-Cy7)、抗SIRP-α抗体 (APC)にて染色した。フローサイトメトリーにて解析し、CD11c<sup>int</sup>B220<sup>lo</sup>CD43<sup>int</sup>SIRP-α<sup>int</sup>の細胞として同定される脾臓内pre-cDCの数をその存在比より算出した。数字は各分画内に存在する細胞の比率である。

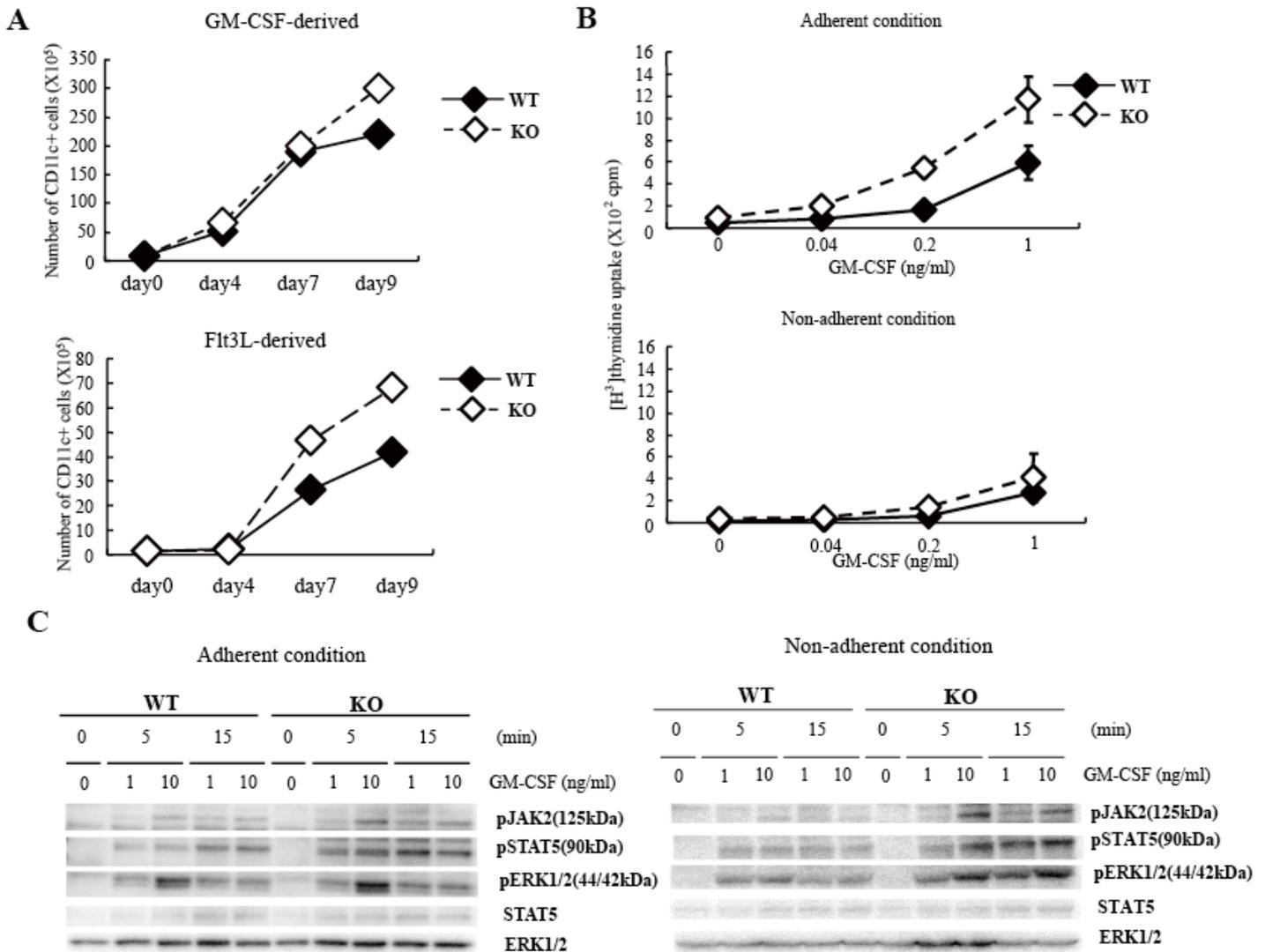


図15. 骨髄由来樹状細胞のサイトカイン反応性

**A.** 骨髄細胞をGM-CSF(10ng/ml)(上)、Flt3L(100ng/ml)(下)で培養し、各日数にて回収。フローサイトメリーにて培養細胞中のCD11c<sup>+</sup>の樹状細胞比率を得、細胞数を算出することで増殖曲線を得た。

**B.** 骨髄由来樹状細胞を培養6日目にて回収し、抗CD11cマイクロビーズと反応させ、MACSにて樹状細胞を精製した。96穴プレートに樹状細胞をまき(1×10<sup>5</sup>cells/well)、GM-CSFに対する反応性増殖をチミジンの取り込みを測定することで評価した。

cpm: counts per minute. 通常の培養皿での培養(上)、非付着性の培養皿での培養(下)。

**C.** B同様に精製した骨髄由来樹状細胞を一晩サイトカインを加えずにおき、GM-CSF(1ng/ml or 10ng/ml)で時間経過を振って(0min.5min.15min.)刺激した。それぞれの細胞溶解液(1.5×10<sup>6</sup>cells/分)に含まれるJAK2, STAT5, ERK1/2のリン酸化をウェスタンブロッティングにて解析した。

通常の培養皿での培養(左)、非付着性の培養皿での培養(右)。

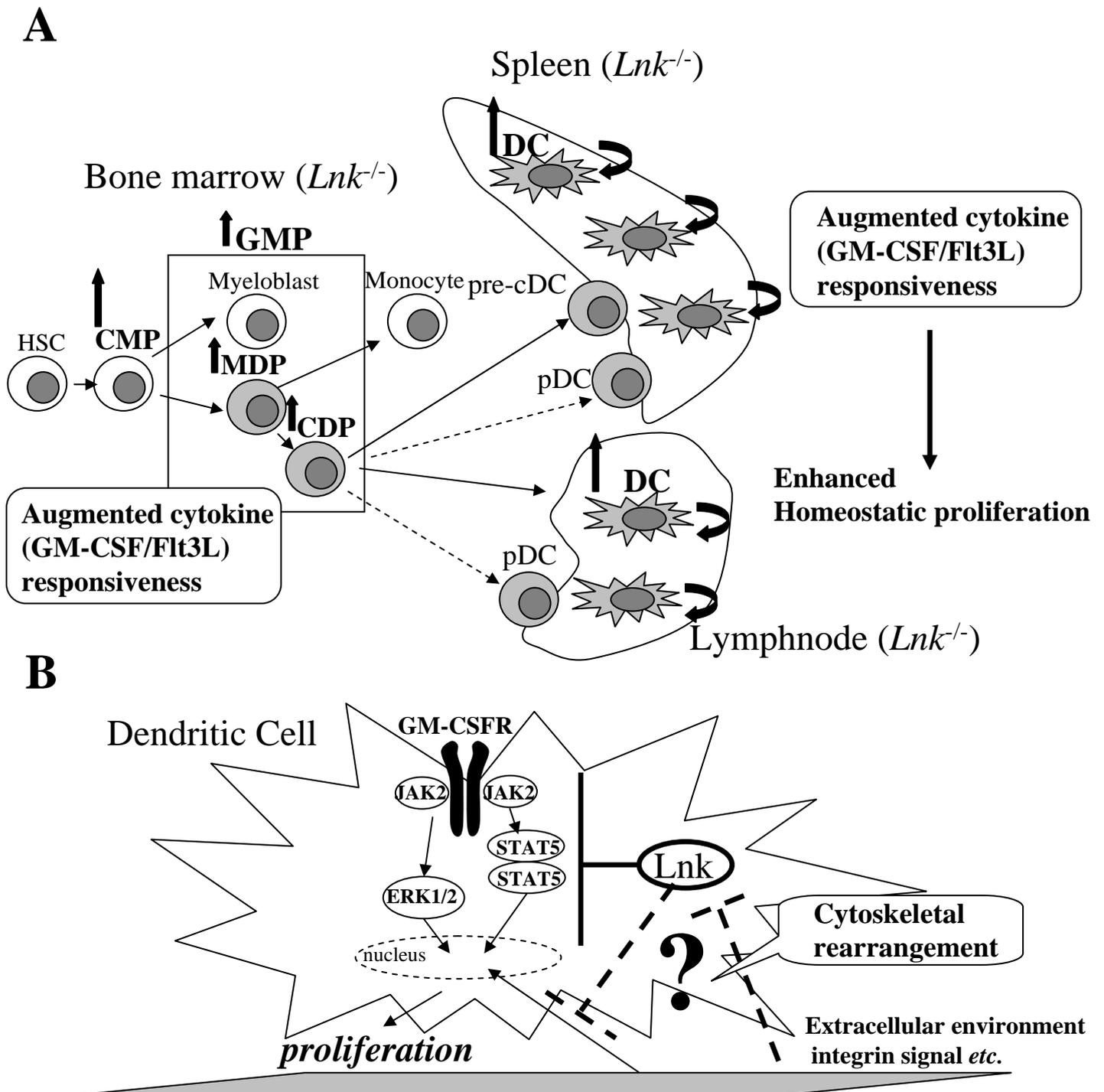


図16. 樹状細胞におけるLnkの働きのモデル図

**A.** 樹状細胞の恒常性維持におけるLnkの働き。 *Lnk*欠損マウスでは樹状細胞前駆細胞の増加傾向及び、分化後の樹状細胞のGM-CSFやFlt3L反応性の増殖亢進を認める。

**B.** 樹状細胞内で、LnkはGM-CSFシグナルを抑制的に制御している。それを更に抑制する方向で、足場からの細胞骨格系を介した制御が働いていると考えられるが、その詳細な機構については不明である。また、樹状細胞の増殖には、サイトカインシグナルに加えて、足場からのシグナルが必須であり、そこにLnkが関与しているか否かについては、現段階では明らかでない。

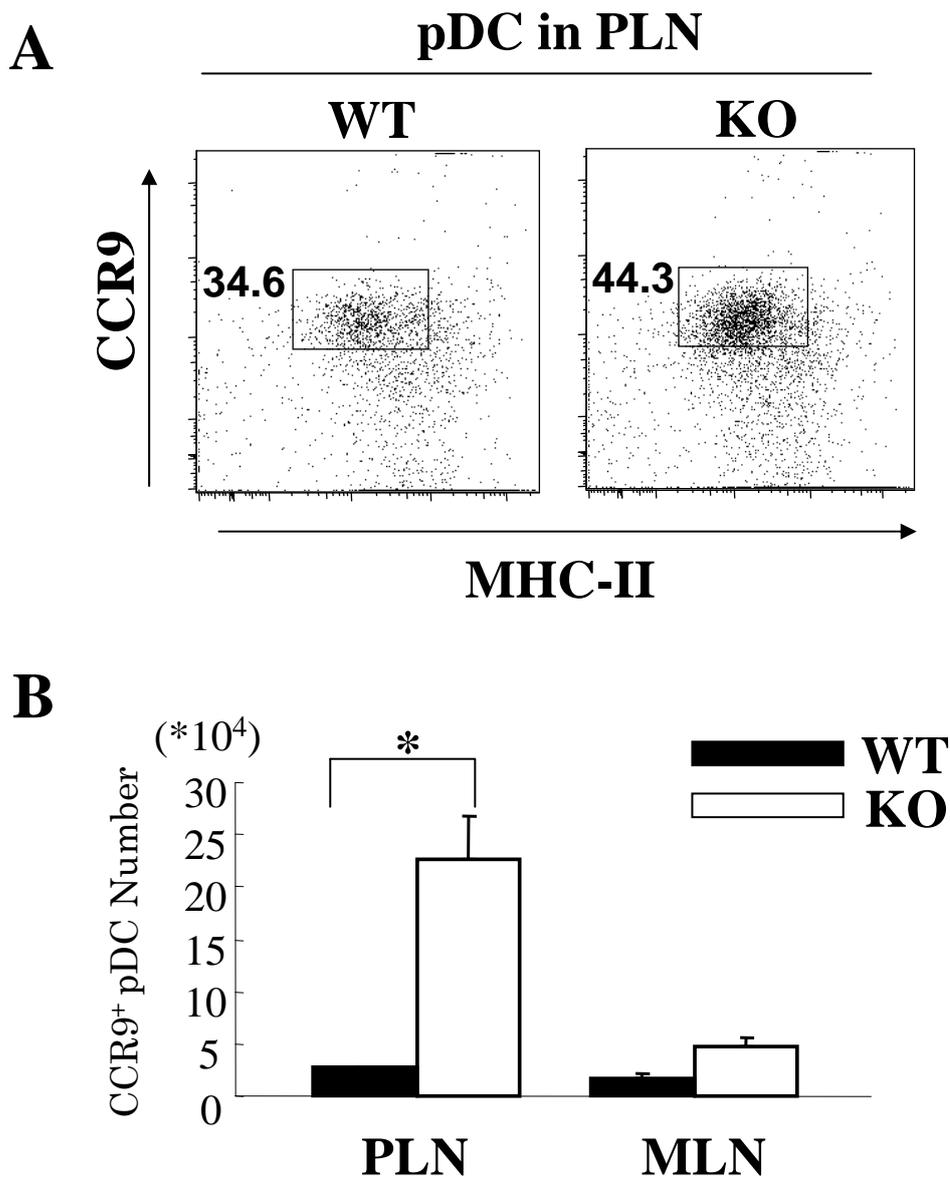


図17. *Ink*欠損マウスリンパ節におけるCCR9陽性pDCの数

**A.** 末梢リンパ節の細胞を、抗MHC-II(I-A/I-E)抗体(FITC)、抗CD11c抗体(PE)、抗B220抗体(Biotin)、抗CCR9抗体1(APC)及びStreptavidin-PerCP抗体にて染色し、フローサイトメトリーにて解析した。CD11c<sup>int</sup>B220<sup>+</sup>のpDCの集団にゲートをかけ、MHC-II<sup>int</sup>CCR9<sup>+</sup>の集団をCCR9陽性pDCとして同定した。数値は各ボックス内の細胞の比率である。

**B.** Aで得られた存在比率から、CCR9陽性pDCの数を算出した。腸管膜リンパ節におけるリンパ球も、同様に解析を行った。PLN: peripheral lymphnode, MLN: mesenteric lymphnode n=3, \*p<0.05