

## 「炎症性樹状細胞の分化機序と機能の解明」

徳島大学フォトニクス健康フロンティア研究院免疫ゲノム構造学部門 教授

黒滝 大翼

### 要旨

古典的樹状細胞 (DC) は免疫応答の中核的な抗原提示細胞である。定常状態における DC 分化機構は解析が進んでいるが、炎症や感染時における DC 分化の分子機構や由来については不明な点が多い。本研究では、細胞内寄生病原体感染における DC の分化・状態変化を包括的に解析し、特定の炎症環境下で選択的に誘導される新規の炎症性 DC 亜集団を同定した。単一細胞 RNA-seq 解析および移植実験により、この新規炎症性 DC は特定の DC 亜集団に由来し、炎症刺激に伴って連続的に遷移することが明らかとなった。さらにエピゲノム解析から、新規炎症性 DC 特異的遺伝子群の発現制御領域は、前駆段階ですでにクロマチンが準備状態にあり、炎症刺激によって活性化が進行することが示唆された。この新規炎症性 DC 亜集団は I 型免疫応答の誘導に重要な役割を果たすことが示され、該当亜集団の形成が障害される条件では感染防御能が著しく低下した。本研究は、炎症時における DC の多様性が、亜集団特異的に準備されたエピゲノム状態と炎症環境依存的な転写制御によって規定されることを明らかにし、DC の可塑性を理解する新たな概念を提示するものである。

### 背景・目的

cDC は、自然免疫と獲得免疫の双方に不可欠な抗原提示細胞である(1)。cDC は大きく 2 つの主要な亜集団、cDC1 と cDC2 に分類される(2)。cDC1 および cDC2 はいずれも、骨髄の造血幹細胞 (HSC) から、リンパ球系多能性前駆細胞 (LMPP)、共通ミエロイド前駆細胞 (CMP)、単球 DC 前駆細胞 (MDP)、共通 DC 前駆細胞 (CDP)、pre-cDC など、複数の前駆細胞段階を経て分化することが知られている。

転写因子 IRF8 および BATF3 に依存する cDC1 は、抗ウイルス免疫や抗腫瘍免疫において中心的な役割を担う(3, 4)。これらの細胞は、ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞への抗原提示およびナイーブ CD8<sup>+</sup> T 細胞へのクロスプレゼンテーションを通じて、Th1 応答や細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 応答を誘導する。さらに、トキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*) などの細胞内寄生病原体感染時には、cDC1 は大量の IL-12 を産生し、T 細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞、自然リンパ球 (ILC) などのリンパ系細胞からの IFN- $\gamma$  産生を誘導することで、感染初期の宿主防御に決定的な役割を果たす。一方、cDC2 は、寄生虫や細胞外細菌感染時に、ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞への抗原提示を介して Th2 および Th17 応答を促進する。

cDC2 は高度にヘテロな集団であり、その分化は主として転写因子 IRF4 に依存している(5)。これまでに、Notch2 依存性の ESAM<sup>+</sup> cDC2 と、KLF4 依存性の ESAM<sup>-</sup> cDC2 が詳細に解析されてきた。また、cDC2 は T-bet を発現する cDC2A と、T-bet を発現しない cDC2B にも分類される。多くの場合、ESAM<sup>+</sup> cDC2 は cDC2A に、ESAM<sup>-</sup> cDC2 は cDC2B に対応する(6)。骨髄においては、Siglec-H pre-cDC2A および Siglec-H<sup>-</sup> pre-cDC2B がそれぞれ同定されており、cDC2 亜集団の運命決定がすでに骨髄段階で開始していることを示唆している(7)。さらに、リンパ球系に属する transitional DC (tDC) が

ESAM+ cDC2 へと分化することも報告されている(8)。近年、ヒトおよびマウスの両方において、cDC2 とは系譜的に異なる DC3 と呼ばれる集団の存在が明らかになっている(9)。DC3 は CDP を経由せず、Ly6C+ MDP から分化する一方で、転写プロファイルは T-bet 陰性の cDC2B と類似している。

炎症や感染の状況下では、定常状態とは異なる表現型および機能を示す炎症性 DC が出現する。マウスでは、肺炎ウイルスやインフルエンザ A ウイルス感染、あるいはダニ誘導性喘息モデルにおいて、MAR1 抗原を発現する炎症性 cDC2 が誘導されることが報告されている(10)。MAR1+炎症性 cDC2 は、TLR 刺激と I 型 IFN シグナルの組み合わせによって誘導され、CD4+および CD8+ T 細胞の双方をプライミングする能力を有する。MAR1+炎症性 cDC2 の産生自体には IRF4 や IRF8 は必須ではないが、IRF8 は成熟に関連する限られた遺伝子群の発現制御に関与することが示されている。単一細胞 RNA シーケンス解析により、炎症条件下ではさらに多様な cDC2 亜集団が出現することが明らかとなり、MAR1+炎症性 cDC2 以外にも機能的に異なる炎症性 cDC 集団が存在する可能性が示唆されている。しかし、炎症性 DC の多様性を規定する分子機構は未だ十分に理解されていない。また、炎症性 DC が特定の DC 亜集団に由来するのか、あるいは環境シグナルによって亜集団特異的な分化プログラムが上書きされることで形成されるのかについても、議論が続いている(11)。

本研究では、炎症時における DC の分化や活性化状態を理解するために、様々な微生物由来成分およびサイトカインの投与、さらには感染症モデルの解析を行った (Kikuchi et al 論文投稿中)。その結果、細胞内寄生病原体トキソプラズマ感染や BCG ワクチン投与によって特徴的に分化誘導される炎症性 cDC 亜集団を新たに同定した。本研究課題では、これら炎症性 cDC の分化制御メカニズムを解明するとともに、炎症性 cDC が感染症、自己免疫疾患、炎症性疾患において果たす免疫学的役割を明らかにすることを目的とする。

## 方法

### 実験動物および飼育条件

本研究では、C57BL/6 背景の野生型マウス、OT-I 及び OT-II マウス、Ly5.1 マウス、転写因子遺伝子欠損マウスを用いた。マウスは SPF 環境下、温度 24±1°C、湿度 50±5%、12 時間明暗サイクルで飼育した。結核感染実験には C3HeB/FeJ マウスを用い、国立感染症研究所の SPF 動物施設にて飼育・交配を行った。すべての動物実験は日本学術会議のガイドラインに従い、熊本大学および国立感染症研究所の承認を受けた実験計画に基づいて実施した。

### ゲノム編集マウスの作製

受精卵に Cas9、tracrRNA、合成 crRNA、および ssODN をエレクトロポレーションにより導入し、ゲノム編集マウスを作製した。遺伝子改変はサンガーシーケンスにより確認した。

### 感染モデル

*Toxoplasma gondii* (ME49 株) は腹腔内投与、*Mycobacterium bovis* BCG は静脈内投与、*Mycobacterium tuberculosis* (Erdman 株) は気管内投与により感染させた。感染後、所定の時点でマウスを解析を行った。サイトカイン投与実験では、組換えマウスサイトカインを 1—7 日間連日腹腔内投与した。TLR リガンドは 3 日間連日腹腔内投与した。

### 細胞調製およびフローサイトメトリー

脾臓、リンパ節、骨髄から細胞懸濁液を調製し、赤血球溶解後に生細胞数を測定した。細胞表面および細胞内染色を行い、BD FACSymphony により解析した。データ解析には FlowJo を用いた。

### DC および T 細胞の分離

磁気ビーズにより lineage 陽性細胞を除去後、FACSAria により各 DC 亜集団を高純度で分取した。OT-I CD8<sup>+</sup> および OT-II CD4<sup>+</sup> T 細胞はナイーブ T 細胞分離キットおよび FACSA により精製した。

### 機能解析

抗原提示能は、CFSE 標識した OT-I/OT-II T 細胞との共培養により評価した。T 細胞分化誘導実験では Th0、Th1、Th2、Th17 条件下で培養し、サイトカイン産生を解析した。DC 移植実験では、Ly5.1 コンジェニックマウスを用いた in vivo トラッキングを行った。

### 分子生物学的解析

RT-qPCR、ELISA により遺伝子発現およびサイトカイン量を定量した。RNA-seq、scRNA-seq、ATAC-seq、CUT&Tag、CUT&RUN、ChIP-seq、Micro-C を用いて、転写、ヒストン修飾、転写因子結合、クロマチン状態、三次元ゲノム構造を包括的に解析した。

### データ解析

RNA-seq は Salmon と edgeR、ATAC-seq および ChIP-seq 系解析は HOMER、scRNA-seq は CellRanger、Seurat、Monocle3、scVelo を用いた。Micro-C データからはトポロジカル関連ドメイン、核内コンパートメント、ループ構造を同定・定量した。

### データ登録

本研究の次世代シーケンスデータは DNA Data Bank of Japan に登録した。

## 結果

### 1. 細胞内寄生性病原体感染で誘導される新規炎症性樹状細胞亜集団の同定

細胞内寄生微生物感染では、cDC1 が IL-12 を作り、リンパ球系細胞がそれに応答して IFN- $\gamma$  を分泌する「I 型免疫応答」が成立する。本研究では、この I 型免疫応答環境下で出現する炎症性 DC の多様性を解析した。トキソプラズマ感染では従来型の MAR1<sup>+</sup>炎症性 cDC2 が増加したが、同時に特徴的なマーカーを発現する新規炎症性 DC 亜集団が顕著に増えることを見出した。この亜集団は結核菌など他の細胞内寄生性微生物でも誘導された。誘導要因を検討すると、感染時の I 型サイトカイン環境を人工的に形成すると脾臓・リンパ節で当該炎症性 DC 亜集団が出現した。一方、TLR 刺激のみでは従来型は増えるが新規亜集団は十分に誘導されず、TLR 受容体刺激だけでなく、体内での十分な I 型サイトカイン環境が鍵と結論づけられた。

## 2. 新規炎症性 DC 亜集団の機能

抗原特異的 T 細胞との共培養では、従来型と新規亜集団はいずれも定常状態より強い T 細胞増殖を誘導したが、CD8 応答は従来型 MAR1+炎症性 cDC2 が強く、CD4 応答は新規亜集団が強い傾向があった。新規亜集団は CD4+ T 細胞を Th1 や Th17 へより効率よく誘導し、Th2 への優位性は示さなかった。

## 3. 新規炎症性 DC 亜集団の起源

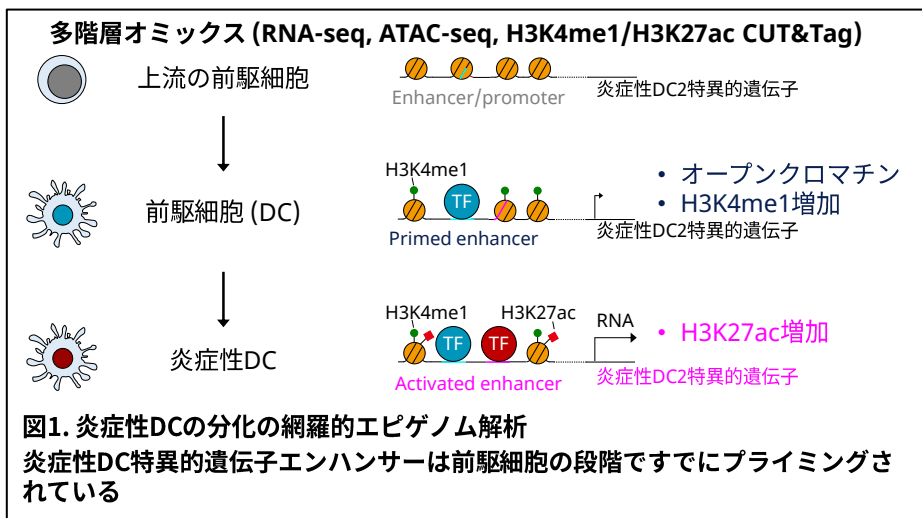
網羅的遺伝子発現解析では、新規亜集団は従来型と異なる遺伝子群を発現し、免疫活性化や T 細胞応答に関連する経路が強かった。また単球系のシグネチャーは優位ではなく、cDC1 に近い転写状態が示唆された。DC 移植実験では、I 型サイトカイン環境下において特定の DC 亜集団から当該炎症性 DC が誘導された。

## 4. 単一細胞 RNA-seq 解析

I 型サイトカイン環境形成後の複数時点で単一細胞 RNA-seq 解析を行うと、定常状態 DC 亜集団群、従来型炎症性細胞、新規炎症性 DC 亜集団などが区別された。新規炎症性 DC 亜集団は炎症早期から出現し、起源候補の定常状態 DC 亜集団近傍に位置した。軌跡推定と RNA velocity は、特定の定常状態 DC 亜集団から新規亜集団へ連続的に移行することを支持した。

## 5. エピゲノム解析

ATAC-seq と H3K27ac の CUT&Tag 解析から、新規炎症性 DC 亜集団で高発現する遺伝子群の発現制御領域は、定常状態の DC 前駆細胞段階ですでに chromatin accessibility が高い一方、活性化の程度は低かった。炎症下で新規亜集団へ移行すると、chromatin accessibility 増加と活性化が生じ、発現が強く誘導された。すなわち chromatin priming → 活性化の二段階モデルが支持された (図 1)。三次元ゲノム構造の比較では明瞭な差は検出されなかった。



## 6. 転写制御と生体意義

新規亜集団特異的遺伝子群には、I 型サイトカイン環境で作動する転写因子制御カスケードの関与が示唆され、候補転写因子欠損や制御領域欠失により、新規炎症性 DC 亜集団の誘導が選択的に抑制された。興味深いことに、既知の DC 分化過程で利用されるエンハンサー領域とは独立に、炎症環境下では近位プロモーター領域を介した転写誘導が重要であり、この制御は定常状態の免疫細胞分化には必須ではない一方、当該炎症性 DC の遺伝

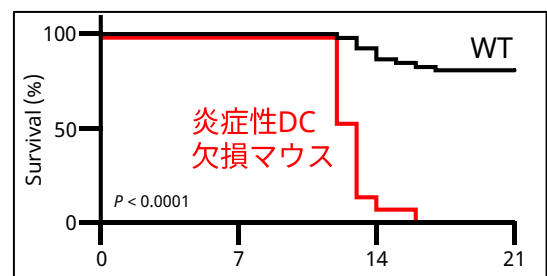


図2. 炎症性DC亜集団の機能

炎症性DC亜集団を特異的に欠損するマウスはトキソプラズマ感染に対して脆弱である

子発現には必須であった。さらに、当該炎症性 DC 亜集団の特異的欠失により、トキソプラズマに対する感染防御は著しく低下し、T 細胞における IFN- $\gamma$  産生が低下した (図 2)。さらに、*in vitro* で作製した新規炎症性 DC 亜集団の移入によりトキソプラズマ感染における生存率が有意に改善し、この経路が宿主防御に実質的に寄与することが示された。

## 考察

本研究では、炎症環境下で出現する新規の炎症性 DC 亜集団を同定した。この集団は、炎症時に形成される特定のサイトカイン環境に応答して、既存の DC 亜集団から主に誘導されることが明らかとなった。特筆すべき点は、この新規炎症性 DC 亜集団に特異的な遺伝子群の制御領域が、前駆細胞段階においてすでにエピゲノム的に準備された状態にあり、炎症刺激を契機としてクロマチン活性化が進行することで、特徴的な転写プログラムが強力に誘導される点である。これは、DC 亜集団が炎症シグナルに応答して新たな機能状態へと移行する可塑性を持ち、その移行可能性が亜集団特異的なクロマチン状態によって事前に規定されていることを示している。さらに本研究は、炎症時に誘導される主要転写制御因子の発現が、定常状態とは異なる制御様式によって駆動されることを明らかにした。既知の分化過程で利用される遠位制御領域とは独立に、炎症環境下では近位制御領域を介した転写誘導が重要であり、この制御は定常状態の免疫細胞分化には必須ではない一方、炎症誘導性の遺伝子発現には不可欠であった。興味深いことに、この転写制御因子は炎症下で複数の免疫細胞において誘導されるものの、転写および機能的な影響は主として新規炎症性 DC 亜集団に限定されていた。これは、転写因子の誘導そのものよりも、細胞種特異的なクロマチン環境や協調的転写制御ネットワークが、機能的帰結を決定している可能性を示唆する。今後、ヒト免疫系における対応集団の存在や、慢性炎症・自己免疫疾患における病態的意義が明らかになれば、DC の状態制御を標的とした新たな免疫介入戦略の開発につながることを期待される。

## 共同研究者

田村智彦	横浜市立大学医学部免疫学教室
阿戸学	国立健康危機管理研究機構国立感染症研究所ハンセン病研究センター
永宗喜三郎	国立健康危機管理研究機構国立感染症研究所寄生動物部
荒木喜美	熊本大学生命科学研究部附属健康長寿代謝制御研究センター
Keiko Ozato	米国国立衛生研究所

## 引用論文

1. Steinman RM. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:1-22.
2. Guillems M, Ginhoux F, Jakubzick C, et al. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(8):571-8.
3. Nishiyama A, Tamura T. Cis- and trans-regulation of Irf8 enhancers during dendritic cell development. *Exp Hematol.* 2025;150:104858.
4. Yamasaki T, Nishiyama A, Kurogi N, et al. Physical and functional interaction among Irf8

enhancers during dendritic cell differentiation. *Cell Rep.* 2024;43(4):114107.

5. Backer RA, Probst HC, Clausen BE. Classical DC2 subsets and monocyte-derived DC: Delineating the developmental and functional relationship. *Eur J Immunol.* 2023;53(3):e2149548.
6. Brown CC, Gudjonson H, Pritykin Y, et al. Transcriptional Basis of Mouse and Human Dendritic Cell Heterogeneity. *Cell.* 2019;179(4):846-63.e24.
7. Zhu Y, Cai P, Li Z, et al. Transcription factors TCF4 and KLF4 respectively control the development of the DC2A and DC2B lineages. *Nat Immunol.* 2025;26(8):1275-86.
8. Idoyaga J, Ni H, Maqueda-Alfaro RA. Bridging pDCs and cDCs: The Identity of Transitional Dendritic Cells. *Immunol Rev.* 2025;336(1):e70070.
9. Liu Z, Wang H, Li Z, et al. Dendritic cell type 3 arises from Ly6C(+) monocyte-dendritic cell progenitors. *Immunity.* 2023;56(8):1761-77.e6.
10. Bosteels C, Neyt K, Vanheerswynghe M, et al. Inflammatory Type 2 cDCs Acquire Features of cDC1s and Macrophages to Orchestrate Immunity to Respiratory Virus Infection. *Immunity.* 2020;52(6):1039-56.e9.
11. León B. Type 2 conventional dendritic cell functional heterogeneity: ontogenically committed or environmentally plastic? *Trends Immunol.* 2025;46(2):104-20.

#### 助成研究に関連した発表論文

1. Saeki K, Pan R, Lee E, Kurotaki D, Ozato K. IRF8 defines the epigenetic landscape in postnatal microglia, thereby directing their transcriptome programs. *Nat Immunol.* 2024 Oct;25(10):1928-1942
2. Yamasaki T, Nishiyama A, Kurogi N, Nishimura K, Nishida S, Kurotaki D, Ban T, Ramilowski JA, Ozato K, Toyoda A, Tamura T. Physical and functional interaction among *Irf8* enhancers during dendritic cell differentiation. *Cell Rep.* 2024 Apr 23;43(4):114107.