

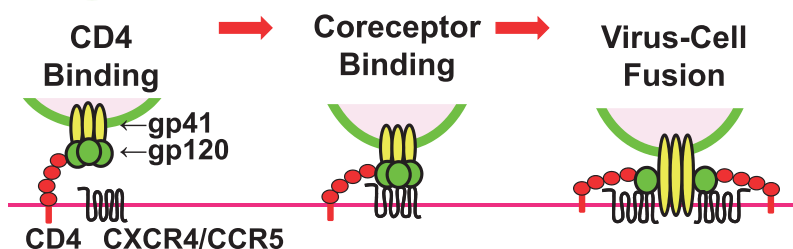
Volume 25, Number 1 April 2015

CYTOMETRY RESEARCH

特集

樹状細胞と免疫制御

Immuno-regulation by dendritic cells



JCS

JAPAN CYTOMETRY SOCIETY

CYTOMETRY RESEARCH

Vol. 25 No. 1

目 次

特 集●樹状細胞と免疫制御

遺伝子改変マウスを用いた樹状細胞サブセットの機能的意義の解明……………	改正 恒康	1
ヒト樹状細胞による免疫制御……………	門脇 則光	7
ペリオスチンによるアレルギー性炎症の増幅……………	有馬 和彦, ほか	13
スタチンの有する抗炎症効果 ～ヒト樹状細胞サブセットを治療ターゲットとした新たな視点からの解析～……	伊藤 量基	19

総 説

フローサイトメトリーを用いたウイルス侵入阻害薬スクリーニング法の樹立……………	松田 幸樹, ほか	25
---	-----------	----

症例報告

免疫グロブリン重鎖別の軽鎖解析がコロナリティー判定に有用であった 悪性リンパ腫の1例……………	棚田 浩子, ほか	29
--	-----------	----

CYTOMETRY RESEARCH

Vol. 25 No. 1

CONTENTS

TOPICS ● Immuno-Regulation by Dendritic Cells

- Clarification of dendritic cell subset functions based on the gene-manipulated mice Tsuneyasu Kaisho 1
- Immune regulation by human dendritic cells Norimitsu Kadowaki 7
- Amplification of allergic inflammation via periostin Kazuhiko Arima 13
- Anti-inflammatory effects of statins
 ~ Novel investigation of the potent activity to human dendritic cell subsets as therapeutic cellular targets ~
..... Tomoki Ito 19

REVIEW

- The establishment of the screening analysis for viral entry inhibitor using flow cytometry. Kouki Matsuda 25

CASE REPORT

- A case of malignant B-cell lymphoma showing abnormal ratio of κ/λ light
 chain detected by flow cytometric analysis Hiroko Tanada 29

遺伝子改変マウスを用いた樹状細胞サブセットの機能的意義の解明

改正 恒康

Clarification of dendritic cell subset functions based on the gene-manipulated mice

Tsuneyasu Kaisho, M.D., Ph.D.

Department of Immunology, Institute of Advanced Medicine, Wakayama Medical University

Abstract

Dendritic cells (DCs) are professional antigen presenting cells involved not only in provoking innate immune responses but also in establishing adaptive immune responses. In order to clarify the critical *in vivo* roles of DCs, generation of gene-manipulated mice for DC ablation is very useful. DCs are heterogeneous and consist of various subsets, including plasmacytoid DCs (pDCs) or conventional DCs (cDCs). These DC subsets show the subset-specific functions. We have recently generated the mutant mice in which CD103⁺CD11b⁻ cDCs can be selectively ablated. The system is based on the selective expression of a chemokine receptor, XCR1, in the DC subset. CD103⁺CD11b⁻ cDCs are known for their high ability to incorporate dying cells and crosspresent the antigens to generate cytotoxic T cells. These functions are critical for protective responses against viral infection or tumors, but additional roles of the DC subset are largely unknown. By using our mutant mice, critical *in vivo* roles of the DC subset have been clarified. Our mutant mice are superior to the mutant mice generated so far in terms of the selectivity of the cell ablation and marking. Therefore, the mice should contribute to the clarification of additional roles of the DC subset. The DC subset is present also in the human. So the knowledge based on the mutant mice can be applicable to the human system.

Key words : Dendritic cells; subset; chemokine receptor; crosspresentation

I. 緒言

樹状細胞 (dendritic cells, DC) は、抗原提示細胞として機能し、自然免疫と獲得免疫の連関に重要な役割を果たす。DC は、1973 年にロックフェラー大学の Ralph M. Steinman と Zanjil A. Cohn によって、マウス脾臓細胞中の、樹状に突起を伸ばす細胞として同定された¹⁾。彼らは、この細胞が、B 細胞やマクロファージとは異なる細胞であり、強力な T 細胞刺激活性を有する抗原提示細胞として機能していることを明らかに

にした。この功績により 2011 年度のノーベル医学生理学賞が Ralph M. Steinman に贈られている。

近年、種々の膜タンパクの発現を指標に、DC の分別解析が進み、DC が単一の細胞集団ではなく、機能的に異なるいくつかのサブセットから構成されることが明らかになりつつある。本稿では、クロスプレゼンテーション機能に特化した DC サブセットを中心に、その機能的意義、およびその機能的意義の解明に有用な遺伝子改変マウスの現状について紹介する。

II. 樹状細胞を欠失するマウスモデル

ある細胞を生体内で欠失させることにより、その細胞の機能的意義に関して重要な情報を得ることができる。このために、その細胞をある時点で一時的に欠

失させるシステム（誘導的欠失システム）、あるいは、生まれつきその細胞を欠失させているシステム（構成的欠失システム）が使われる。

誘導的欠失システムとしては、ヒトのジフテリア毒素受容体（diphtheria toxin receptor, DTR）を発現させるシステムが汎用されている。マウスの DTR は、アミノ酸置換のため、ジフテリアトキシン（DT）に結合できない。そのため、マウスの細胞は DT に耐性であり、ヒト DTR を発現させたマウスにおいては、ヒト DTR を発現する細胞だけが選択的に DT の作用により、死滅する（誘導的欠失システム）。また、DTR のかわりに DTA そのものを発現させた場合には、その細胞は、DT を投与しなくても死滅することになる（構成的欠失システム）。

DC の誘導的欠失システムとしては、まず、樹状細胞に発現する膜タンパク CD11c の遺伝子プロモーターの制御下で DTR を発現させるトランスジェニックマウス（CD11c-DTR マウス）が作成され、種々の免疫応答における DC の機能的意義が明らかになった²⁾。また、構成的欠失システムとしては CD11c-DTA マウスが作成された。このマウスでは、期待に反して、T 細胞に関しては、活性化状態、レパトリ構成などにほとんど影響は認められなかったが、骨髄系細胞の増殖が顕著に認められた²⁾。また、自己免疫疾患様の症状が認められるという報告もあるが、認められないという報告もあり、DC が恒常性維持や疾患制御にどのように関与しているのかについてはよくわかっていない^{2, 3)}。

また、解析が進むにつれて、これらのマウスの問題点も明らかになってきた。一番の問題点は、CD11c が DC 以外にも発現されている点である。たとえば、リンパ球の約 10% に CD11c に基づく発現が認められる⁴⁾。また、非免疫系細胞における DTR の発現のため、DT の頻回投与により CD11c-DTR マウスは死亡してしまう。このために野生型マウスを放射線照射した後に、CD11c-DTR マウスの骨髄細胞を移入したマウス、いわゆる骨髄キメラマウスを作成、解析しなければならない状況も出てくる。Garbi らは、バクテリア人工染色体（bacterial artificial chromosome, BAC）を用いて、CD11c-DOG マウスを作成した。このマウスでは、骨髄キメラの作成が不要となっている⁵⁾。しかし、CD11c-DTR、CD11c-DOG どちらにおいても DC 欠失により、骨髄から好中球が血中に放出されること、そしてそのために感染抵抗性になるということが指摘されている⁶⁾。これまでに、CD11c の発現を基盤とし

た DC 欠失マウスに関して種々の結果が報告されているが、これらの点を十分に留意した上で結果を解釈すべきである。

また、DC が、機能的に異なるいくつかの細胞集団（サブセット）から構成されることを考慮した場合、今後は DC サブセットを選択的に欠失させるマウスモデルが有用になると考えられる。

Ⅲ. クロスプレゼンテーション能の高い DC サブセット

DC は、まず形質細胞様樹状細胞（pDC）と通常型樹状細胞（cDC）に分けられる。cDC はさらにいくつかのサブセットに分けられるが、たとえば、CD103⁺CD11b⁻cDC、CD103⁻CD11b⁺cDC に分けられる。その詳細は他の総説を参照していただきたく、ここでは、細胞傷害性（CD8⁺）T 細胞の分化誘導能が強いことで注目されている CD103⁺CD11b⁻cDC に焦点を絞る。

CD103⁺CD11b⁻cDC は、死細胞を取り込む能力が高く、また、そのようにして取り込んだ細胞由来の抗原を提示して、細胞傷害性 T 細胞の分化を誘導する能力（クロスプレゼンテーション能）が高いことも知られている⁷⁾。この特性は、ウイルス感染や腫瘍に対する防御免疫に威力を発揮する。すなわち、ウイルス感染細胞や腫瘍細胞を取り込むことにより、その細胞に対する細胞傷害性 T 細胞応答を誘導し、抗ウイルス免疫、抗腫瘍免疫に寄与する。クロスプレゼンテーション能は、基本的にすべての DC サブセットにおいて認められるが、特に CD103⁺CD11b⁻cDC において高いこと、そしてその分子基盤として、カルレチクリン、シスタチンなど、MHC クラス I 依存性抗原提示のために必要な分子群の発現が CD103⁺CD11b⁻cDC において高いことが明らかになっている⁸⁾。

CD103⁺CD11b⁻cDC は、病原体センサーとしては、二本鎖 RNA を認識する TLR3、リポ多糖（lipopolysaccharide, LPS）を認識する TLR4、CpG モチーフを持つ一本鎖 DNA を認識する TLR9 を発現している。そして、それらの TLR 刺激により、炎症性サイトカインを産生する。TLR3 は DC サブセットの中では、この CD103⁺CD11b⁻cDC のみに選択的に発現されている。また、TLR4、TLR9 の発現は他の DC サブセットにも認められるが、炎症性サイトカイン産生能は、CD103⁺CD11b⁻cDC が最も強い。つまり、CD103⁺CD11b⁻cDC は、炎症性サイトカイン産生能が強いという機能的特性も持っている。

Ⅳ. ケモカイン受容体 XCR1 遺伝子を用いた DC サブセット欠失マウスモデル

これまでに $CD103^+CD11b^-$ cDC を選択的に欠失する遺伝子変異マウスが報告されている。転写因子 IRF-8 を欠損するマウスでは、 $CD103^+CD11b^-$ cDC と PDC の欠損が認められるが⁹⁾、IRF-8 のアミノ酸変異を自然発生的に持つ BXH2 マウスにおいては、 $CD103^+CD11b^-$ cDC のみの欠失が認められる¹⁰⁾。また、転写因子 BATF-3 (basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 3) は、cDC 優位に発現されているが、その欠損により、 $CD103^+CD11b^-$ cDC の選択的欠失が認められる¹¹⁾。このような遺伝子改変マウスを用いて、ウイルスや細菌の感染、腫瘍に対するクロスプレゼンテーション応答が障害されること、つまり、 $CD103^+CD11b^-$ cDC がクロスプレゼンテーションに重要であることが示された。しかしながら、これらの結果の解釈もやはり慎重になされるべきである。たとえば、IRF-8 は B 細胞やマクロファージにも発現されているし、BATF-3 も $CD103^+CD11b^-$ cDC、 $CD103^-CD11b^+$ cDC の両方に同程度に発現されており (図 1)、遺伝子変異マウスの表現型が $CD103^+CD11b^-$ cDC の欠失だけによるものであるかどうか明確とは言えない。

我々は、この DC サブセットを生体内で選択的に欠失させるシステムを作るために、まず、この DC サブセットにおいて選択的に高発現を示す遺伝子を探した。そして、ケモカイン受容体 XCR1 をコードする遺伝子に着目し^{12, 13)} (図 1)、その遺伝子座に、蛍光タンパク venus、あるいは DTR と venus の融合タンパクをコードする遺伝子をノックインさせたマウス

(XCR1-venus マウス、XCR1-DTRvenus マウス) を作成した¹⁴⁾。これらのマウスでは期待通り、 $CD103^+CD11b^-$ cDC に選択的に venus の発現が認められ、また、XCR1-DTRvenus マウスでは、 $CD103^+CD11b^-$ cDC の選択的誘導的欠失が認められた (図 2, 3)。そして、このマウスを用いた解析により、 $CD103^+CD11b^-$ cDC が、タンパク抗原、死細胞抗原、および細胞内寄生細菌リステリア抗原に対する $CD8^+$ T 細胞応答、すなわちクロスプレゼンテーション能に必須であることが示された¹⁴⁾ (図 4)。このマウスを用いて、今後、 $CD103^+CD11b^-$ cDC の生体内での新たな機能的意義が解明されることが期待される。

この他にも、 $CD103^+CD11b^-$ cDC を欠失させるための遺伝子改変マウスが作成されている。Ruedl らは、 $CD103^+CD11b^-$ cDC 優位に発現するレクチン DC NK lectin group receptor-1 (CLEC9A) 遺伝子に着目し、CLEC9A 遺伝子を含む BAC ヘビ DTR 遺伝子をノックインし、CLEC9A-DTR マウスを作成した¹⁵⁾。CLEC9A-DTR マウスでは、 $CD103^+CD11b^-$ cDC が欠失されるが、CLEC9A を弱く発現する PDC も部分的に欠失していた (図 1, 表 1)。また、佐藤らは、CD205 の遺伝子座へヒト DTR 遺伝子をノックインさせることにより、CD205-DTR マウスを作成した¹⁶⁾。この

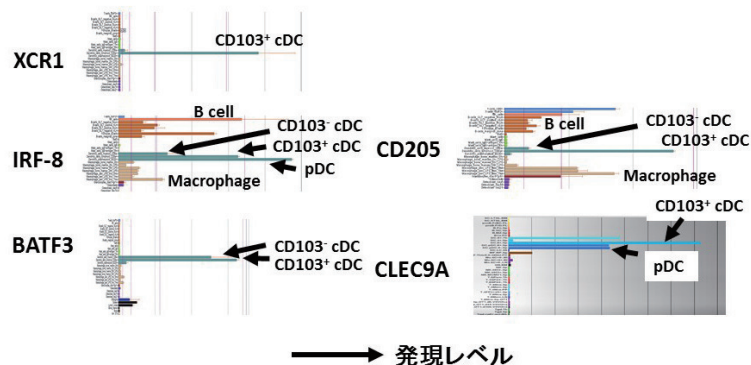


図 1 $CD103^+CD11b^-$ cDC に発現する遺伝子の発現パターン。遺伝子発現プロファイルのデータベースを用いて、発現パターンを検索した。XCR1, IRF-8, BATF3, CD205 の遺伝子に関しては、BioGPS のデータを、CLEC9A の遺伝子に関しては、Immunological Genome Project のデータを使用した。主な発現を示す細胞種を示している。

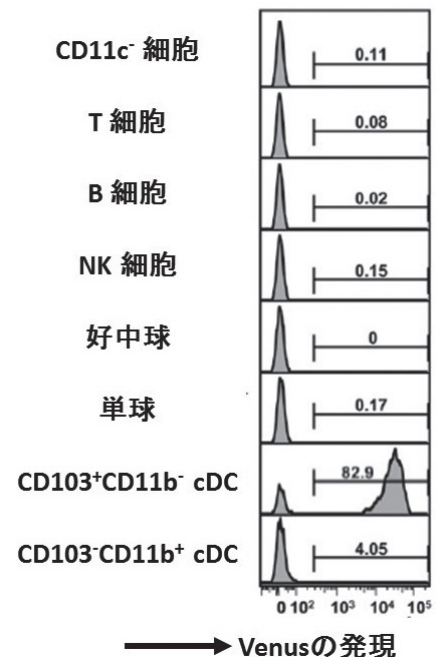


図 2 XCR1-venus マウスにおける venus の発現パターン。数字は陽性細胞のパーセントを示す。

CD205-DTR マウスにおいても $CD103^+CD11b^-$ cDC の欠失が認められたが, CD205 の発現パターンと呼応して, $CD103^-CD11b^+$ cDC の一部にも欠失が認められた (図 1, 表 1)。また, このマウスでは, 非造血系の細胞においても DTR が発現しているために, DT 投与 10 日後にマウスが死んでしまう。そのため, $CD11c$ -DTR マウスと同様に, CD205-DTR マウス由来の骨髄を移植した骨髄キメラマウスを用いた解析が必要になっている。このように, これらのマウスと比較すると, XCR1-DTRvenus マウスの方が, 細胞欠失の選択性が高い。また, CLEC9A-DTR マウスや CD205-DTR マウスにおいては, 蛍光タンパクの発現によって標的細胞を追跡することはできないが, XCR1-DTRvenus マウスでは, venus の発現により, 標的細胞を追跡できるという利点も持ち合わせている (表 1)。

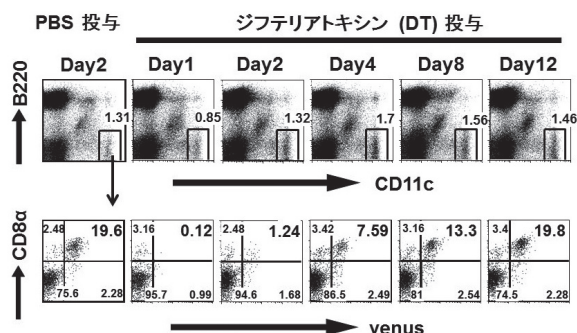


図 3 XCR1-DTRvenus マウスにおける DT 投与後の venus 発現細胞の欠失。

DT (マウス体重 1g あたり 25ng) あるいは PBS 投与後, XCR1-DTRvenus マウスから脾臓細胞を回収し, FACS 解析を行った。cDC ($CD11c^+B220^-$ 細胞) をさらに $CD8\alpha$, venus の発現にしたがって展開している。Dot plot 中の数字は, 該当領域のパーセントを示す。Venus 発現細胞が DT 投与 1 日後に減少し, その後 4-12 日かけて徐々に回復していくのが観察されている。

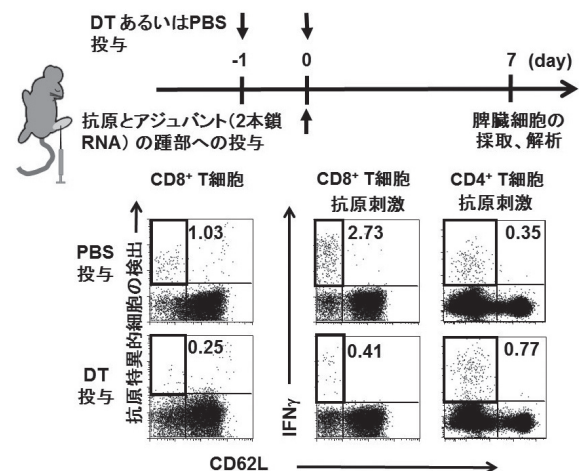


図 4 XCR1-DTR マウスを用いたクロスプレゼンテーションの解析。

XCR1-DTRvenus マウスに DT (マウス体重 1g あたり 25ng) あるいは PBS 投与を, 1 日間隔で 2 回投与した。2 回目の DT 投与時に, マウス踵部皮下に, 抗原として卵白アルブミン $100\mu g$ と免疫アジュバントとして 2 本鎖 RNA (polyinosinic-polycytidylic acid) $20\mu g$ を投与した。その 7 日後に脾臓細胞を回収し, 抗原特異的細胞をテトラマー染色により検出した。また, in vitro で抗原刺激したのち, 細胞内染色により, IFN- γ の発現を解析した。Dot plot 中の数字は, 該当領域のパーセントを示す。DT 投与マウスにおいては $CD8^+$ T 細胞応答が低下している一方, $CD4^+$ T 細胞応答はむしろ亢進している。

V. XCR1 の機能

ケモカインは, N 末端に存在するシステインの数や位置により, 4 つのサブファミリー (CC, CXC, CX3C, XC) に分類される。XC サブファミリーは, N 末端のシステインが 1 個しかないケモカインのサブファミリーであり, そのメンバーには, マウスでは XCL1, ヒトでは, XCL1, XCL2 が含まれる。ただし, ヒト XCL1, ヒト XCL2 は, 遺伝子座が近接していること, アミノ酸構造が 98% 類似 (アミノ酸 114 個中

表 1 $CD103^+CD11b^-$ cDC 欠失マウスの比較

	DT による欠失	蛍光タンパク発現による追跡
XCR1-DTRvenus マウス	ほぼ $CD103^+CD11b^-$ cDC に特異的	可能
CLEC9A-DTR マウス	$CD103^+CD11b^-$ cDC 一部の pDC	不可能
CD205-DTR マウス	$CD103^+CD11b^-$ cDC 一部の $CD103^-CD11b^+$ cDC 非免疫系の細胞	不可能

112 個が同じ) していることから、重複遺伝子と考えられている。XCR1 は、この XC ケモカインの受容体である。

XCL1 は、NK 細胞や活性化 CD8⁺ T 細胞から主に産生される^{12, 13)}。これまでに XCL1 遺伝子欠損マウスを用いて、CD8⁺ T 細胞のメモリー応答や制御性 T 細胞の生成に障害が認められることが報告されている^{12, 17)}。

VI. ヒトにおける XCR1 および XCR1 発現樹状細胞

ヒト末梢血には、DC として、pDC と骨髄由来樹状細胞 (mDC) が含まれる。mDC はさらに、BDCA3 の発現にしたがって、BDCA3⁺ DC と BDCA3⁻ DC に分けられる。DC の約 10% を占める BDCA3⁺ DC では、TLR3 遺伝子に加えて、XCR1 遺伝子も選択的な高発現が認められる^{13, 18)}。また、この BDCA3⁺ DC は、クロスプレゼンテーション能が高いことも報告されている¹⁹⁾。このことから、BDCA3⁺ DC が、CD103⁺CD11b⁻ cDC のヒトホモログであり、XCR1 はそのマーカーとして有用であると考えられている。また、XCL1 が NK 細胞と活性化 CD8⁺ T 細胞において産生量が高いというパターンも、ヒトにおいてもマウスと同様に認められた^{13, 18)}。このように、XCL1、XCR1 は、マウス、ヒトに共通した機構に関与するケモカインシステムであり、CD103⁺CD11b⁻ cDC、BDCA3⁺ DC は、マウス、ヒトに共通の機構で機能していると考えられる。しかしながら、XCL1、XCR1、および BDCA3⁺ DC に関して、ヒトにおける生理的意義、病理的意義はまだほとんどわかっていない。

VII. 今後の展望

これまで、CD103⁺CD11b⁻ cDC は、クロスプレゼンテーション能が高いことから、ウイルス感染や腫瘍に対する防御免疫に重要であることがわかっている。しかし、病態形成にどのような役割を果たしているのかに関してはほとんど知られていない。最近、Unanue らは、インスリン依存性糖尿病モデルマウスにおいて、脾臓のランゲルハンス島にマクロファージと共に CD103⁺CD11b⁻ cDC の浸潤が認められ、それが加齢とともに増加すること、そして、BATF3 欠損により、糖尿病が発症しなくなることを明らかにした²⁰⁾。このことから、CD103⁺CD11b⁻ cDC がインスリン依存性糖尿病の発症に必須であることが示唆されている。今後、CD103⁺CD11b⁻ cDC を欠失させる遺伝子改変マウスを

用いて、CD103⁺CD11b⁻ cDC の新たな生理的意義、病理的意義が明らかになり、その知識を基盤に、ヒト疾患における役割が明らかになっていくことが期待される。

文 献

1. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137:1142-62, 1973.
2. Bar-On L, Jung S. Defining dendritic cells by conditional and constitutive cell ablation. *Immunol Rev* 234:76-89, 2010.
3. Ohnmacht C, Pullner A, King SB et al. Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *J Exp Med* 206:549-59, 2009.
4. Sathaliyawala T, O'Gorman WE, Greter M et al. Mammalian target of rapamycin controls dendritic cell development downstream of Flt3 ligand signaling. *Immunity* 33:597-606, 2010.
5. Hochweller K, Striegler J, Hammerling GJ, Garbi N. A novel CD11c.DTR transgenic mouse for depletion of dendritic cells reveals their requirement for homeostatic proliferation of natural killer cells. *Eur J Immunol* 38:2776-83, 2008.
6. Tittel AP, Heuser C, Ohliger C et al. Functionally relevant neutrophilia in CD11c diphtheria toxin receptor transgenic mice. *Nat Methods* 9:385-90, 2012.
7. Shortman K, Heath WR. The CD8⁺ dendritic cell subset. *Immunol Rev* 234:18-31, 2010.
8. Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF et al. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* 315:107-11, 2007.
9. Tsujimura H, Tamura T, Ozato K. Cutting edge: IFN consensus sequence binding protein/IFN regulatory factor 8 drives the development of type I IFN-producing plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 170:1131-5, 2003.
10. Tailor P, Tamura T, Morse HC, 3rd, Ozato K. The BXH2 mutation in IRF8 differentially impairs dendritic cell subset development in the mouse. *Blood* 111:1942-5, 2008.

11. Hildner K, Edelson BT, Purtha WE et al. Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 322:1097-100, 2008.
12. Dorner BG, Dorner MB, Zhou X et al. Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8+ T cells. *Immunity* 31:823-33, 2009.
13. Yamazaki C, Miyamoto R, Hoshino K et al. Conservation of a chemokine system, XCR1 and its ligand, XCL1, between human and mice. *Biochem Biophys Res Commun* 397:756-61, 2010.
14. Yamazaki C, Sugiyama M, Ohta T et al. Critical roles of a dendritic cell subset expressing a chemokine receptor, XCR1. *J Immunol* 190:6071-82, 2013.
15. Piva L, Tetlak P, Claser C, Karjalainen K, Renia L, Ruedl C. Cutting edge: Clec9A+ dendritic cells mediate the development of experimental cerebral malaria. *J Immunol* 189:1128-32, 2012.
16. Fukaya T, Murakami R, Takagi H et al. Conditional ablation of CD205+ conventional dendritic cells impacts the regulation of T-cell immunity and homeostasis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:11288-93, 2012.
17. Lei Y, Ripen AM, Ishimaru N et al. Aire-dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development. *J Exp Med* 208:383-94, 2011.
18. Crozat K, Guiton R, Contreras V et al. The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha+ dendritic cells. *J Exp Med* 207:1283-92, 2010.
19. Bachem A, Guttler S, Hartung E et al. Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *J Exp Med* 207:1273-81, 2010.
20. Ferris ST, Carrero JA, Mohan JF, Calderon B, Murphy KM, Unanue ER. A minor subset of batf3-dependent antigen-presenting cells in islets of langerhans is essential for the development of autoimmune diabetes. *Immunity* 41:657-69, 2014.

ヒト樹状細胞による免疫制御

門脇 則光

Immune regulation by human dendritic cells

Norimitsu Kadowaki, M.D., Ph.D.

Department of Hematology and Oncology, Graduate School of Medicine, Kyoto University

Abstract

Human dendritic cell (DC) subsets are composed of CD141⁺ myeloid DCs (mDCs), CD1c⁺ mDCs, and plasmacytoid DCs (pDCs). These DC subsets have different functions, and reagents that differentially regulate functions of the subsets may represent novel therapies for immune disorders.

A proteasome inhibitor for multiple myeloma, bortezomib, suppresses the survival and immunostimulatory function of pDCs by targeting two critical points, intracellular trafficking of nucleic acid-sensing Toll-like receptors and endoplasmic reticulum homeostasis.

A tyrosine kinase inhibitor for chronic myeloid leukemia with multiple targets, dasatinib, suppresses IFN- α production by pDCs stimulated with CpG DNA without reducing viability. This suppression is likely due to the abrogation of endosomal retention of CpG DNA, which is critical for the large amount of IFN- α production by pDCs.

It has been reported that pDCs cause inflammatory disorders such as lupus and psoriasis. Thus, these studies illustrate that vesicular trafficking characteristic of pDCs may constitute a target to develop novel therapies for inflammatory disorders.

1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ (VD₃) is an important immunomodulatory vitamin. VD₃ induces CD1c⁺ mDCs to produce a vitamin A derivative, retinoic acid (RA). Furthermore, the CD1c⁺ mDCs induce naïve CD4⁺ T cells to differentiate into gut-homing Th2 cells in an RA-dependent manner. The “vitamin D – CD1c⁺ mDC – RA” axis may constitute an important immune component for maintaining tissue homeostasis in humans.

Long-lasting efforts to clarify the mechanisms by which DCs perform immunoregulatory functions and to apply the accumulating knowledge to developing novel therapies will continue to be an exciting field in immunology.

Key words : dendritic cells; plasmacytoid dendritic cells; bortezomib; dasatinib; retinoic acid

I. 樹状細胞とは

1973年に樹状細胞(dendritic cells; DC)を初めて報告し、その後もDCの研究を牽引してきたRalph Steinman博士が2011年のノーベル生理学・医学賞を受賞された。このことから、DCがわれわれの体にとって重要であり、免疫関連疾患の新しい治療を開発するための鍵を握っていることが窺われる。

抗原特異的な免疫反応を誘導するためには、抗原

提示細胞 (antigen-presenting cells ; APC) が主要組織適合抗原複合体 (major histocompatibility complex ; MHC) 分子上に抗原由来のペプチドを提示し、抗原特異的な T 細胞を刺激する必要がある。そのような APC には、B 細胞、マクロファージ、DC の 3 種類があるが、この中で DC だけが、まだ抗原に出会っていないナイーブな T 細胞を強力に活性化する能力をもつ。しかも DC は、受ける刺激の違いによって、Th1, Th2, Th17 といった異なるタイプのヘルパー T 細胞反応を誘導することから、免疫反応の強さだけでなく、方向性も決定づける。さらに重要なことに、DC は環境要因に応じてトレランスも誘導する。

このように、DC は基本的にあらゆる種類の抗原特異的な免疫反応をコントロールする免疫系の中心的な細胞である。したがって、この細胞の機能を制御する方法を見いだすことが、多くの免疫疾患の新たな治療につながると考えられる。

II. 樹状細胞サブセット

DC は、成熟すると樹状突起 (dendrite) をもつという形態的特徴を共有するが、単一の細胞ではなく、機能の異なる複数のサブセットからなる¹⁾。ヒトの DC は、大きく骨髄系 DC (myeloid DC ; mDC) と形質細胞様 DC (plasmacytoid DC ; pDC) に分けられ、mDC

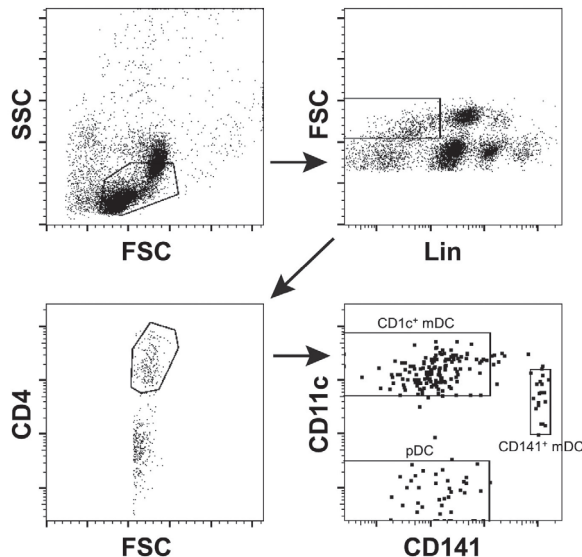


図1 フローサイトメトリーによるヒト末梢血樹状細胞(DC)サブセットの同定

リンパ球と単球の中間の前方散乱光を持ち、lineage marker 陰性 (Lin⁻)、CD4 陽性の分画にゲートをかけると、CD141⁺ mDC、CD1c⁺ mDC、pDC の 3 つの DC サブセットが分別できる。FSC : 前方散乱光, SSC : 側方散乱光

はさらに CD141⁺ mDC と CD1c⁺ mDC に分けられる。mDC はその名の通り骨髄系の細胞に起源を持つ。一方、pDC という名称は、活性化前の段階では形質細胞に形態が似ていることに由来する。これらの DC サブセットは末梢血に少数存在し (mDC, pDC とも単核球の 0.1-0.5%)、多重染色によって同定できる (図 1)。CD141⁺ mDC は抗原を取り込んだ後に、その抗原由来のペプチドを MHC クラス I 分子に提示して (これをクロス・プレゼンテーションとよぶ) CD8⁺ T 細胞を刺激する能力が高い²⁾。これに対し、CD1c⁺ mDC に特有の機能は明らかにされていない。一方の pDC は、ウイルスの刺激を受けると大量のインターフェロン (interferon ; IFN) - α を産生するという際だった特徴を持つ³⁾。そして、興味深いことに、mDC と pDC は異なる Toll-like receptor (TLR) を発現して異なる微生物成分を認識し⁴⁾、侵入してきた微生物を排除するのに適したタイプの免疫反応を誘導する。

mDC, pDC 以外に、単球も granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) とインターロイキン (interleukin ; IL) -4 の存在下で in vitro において DC に分化する。マウスの解析から、この単球由来 DC は炎症環境下で DC の一部を形成すると考えられるが、ヒトの体内で単球がどの程度 DC に分化するかわかっていない⁵⁾。また、遺伝子発現プロファイルの比較から、単球由来 DC は mDC, pDC よりもマクロファージに近い⁶⁾。したがって、単球がヒトの in vivo で DC に分化するとしても、mDC, pDC と異なる機能を持つかもしれない。

III. プロテアソーム阻害薬ボルテゾミブによる pDC の抑制

前述のように、pDC はウイルス刺激により大量の IFN- α を産生して、抗ウイルス免疫において重要な役割を果たす。この IFN- α 産生は、pDC がウイルスの持つ DNA, RNA をそれぞれ TLR9, TLR7 を介して認識することにより起こる。一方、pDC は死んだ自己細胞由来の核酸も認識して IFN- α を産生し、全身性エリテマトーデスや尋常性乾癬といった自己免疫性・炎症性疾患の発症や進展に重要な役割を果たす⁷⁾。したがって、pDC の IFN- α 産生を抑制する薬剤は、こうした pDC が関与する疾患の治療薬となる可能性がある。

pDC は発達した小胞体を持ち、形態が形質細胞に似ていることにちなんで命名されている。このような発達した小胞体は、形質細胞においては免疫グロブリン、pDC においては IFN- α の産生を担っている。こう

した高い分泌能を持つ細胞は、小胞体における分泌蛋白の適切な折りたたみが損なわれることによって起こる小胞体ストレスにさらされやすく、それに対処する小胞体ストレス応答 (unfolded protein response : UPR) に生存と機能が大きく依存している。興味深いことに、UPR を司り小胞体ストレスによる細胞死を防ぐ転写因子 XBP1 の欠損マウスでは、形質細胞⁸⁾ と pDC⁹⁾ の形成が阻害されることから、この両細胞の形成には UPR による生存の維持が必要であると考えられる。また、プロテアソーム阻害薬ボルテゾミブが多発性骨髄腫に有効性を発揮する重要なメカニズムとして、異常な蛋白が細胞内に蓄積して小胞体ストレスが高まる事が挙げられている¹⁰⁾。したがって、われわれは、ボルテゾミブが、形質細胞に類似した pDC の活性も抑えるのではないかと考え、検討を行った¹¹⁾。

その結果、ボルテゾミブは pDC のアポトーシスを強く誘導し、この現象は XBP1 活性の抑制と関連することがわかった。また、ボルテゾミブは TLR9 リガンド CpG DNA (非メチル化 CpG モチーフをもつ DNA) の刺激を受けた pDC による IFN- α の産生を強く抑え、この機能抑制は、少なくとも部分的にはアポトーシス非依存性であった。CpG DNA の刺激を受けた pDC が IFN- α を産生するためには、TLR9 が、小胞体膜分子 Unc93B1 とともに小胞体からエンドソームに移動する必要がある (図 2A)¹²⁾。共焦点顕微鏡で検討した結果、ボルテゾミブは Unc93B1 の小胞体からエンドソームへの移動は抑制しないが、TLR9 の移動を抑制することがわかった (Fig.2B)。以上より、ボルテゾミブは、まず TLR9 と Unc93B1 の小胞体からエンドソームへの

協調的な移動を阻害し、次いで UPR を阻害してアポトーシスを誘導することにより、pDC の機能と生存を強く抑制すると考えられる¹¹⁾。

IV. チロシンキナーゼ阻害薬ダサチニブによる pDC の抑制

がんに対する分子標的薬の中には標的分子が広汎な薬剤があり、本来の標的以外による作用 (off-target 効果) を来しうる。慢性骨髄性白血病に対するチロシンキナーゼ阻害薬ダサチニブは、本来の標的である ABL チロシンキナーゼ以外にも、広汎なチロシンキナーゼや一部のセリン・スレオニンキナーゼも阻害する¹³⁾ ことから、免疫細胞にも何らかの影響を及ぼす可能性がある。そこでわれわれはダサチニブを in vitro でヒト末梢血由来 pDC に添加したところ、ウイルス刺激を受けた pDC による IFN- α の産生を強力に抑制することを見いだした¹⁴⁾。一方で、pDC の細胞死は誘導しなかった。したがって、ダサチニブは pDC の生存ではなく機能のみを抑制する。

次いで、その機序を検討した。pDC が大量の IFN- α を産生する重要な理由として、エンドサイトーシスで取り込まれた TLR9 リガンド CpG DNA が、TLR9 の局在部位である早期エンドソームに長時間滞留することが報告されている¹⁵⁾。われわれは共焦点顕微鏡を用いた解析により、ダサチニブが CpG DNA の早期エンドソームへの滞留を阻害することを見いだした (図 3A, B)。これが、ダサチニブによる IFN- α 産生抑制の重要な作用機序と考えられる。

以上述べたように、pDC が TLR リガンドである

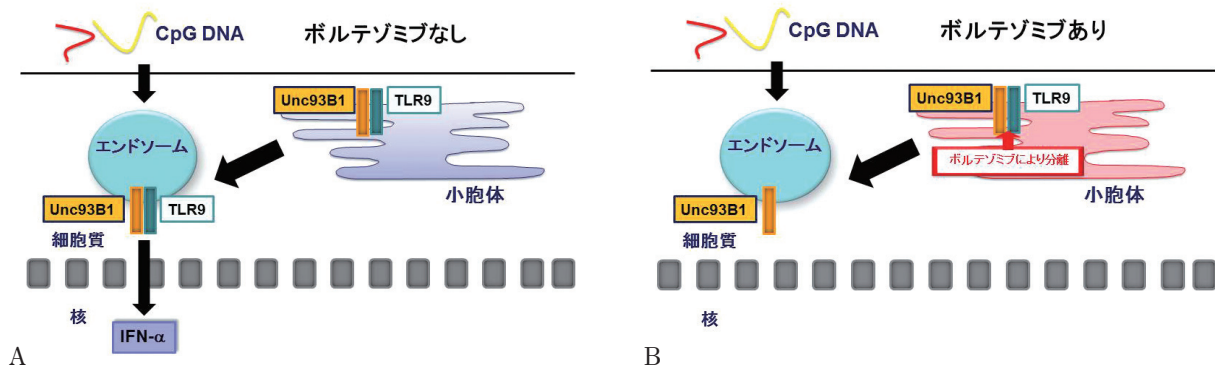


図 2 ボルテゾミブは TLR9 と Unc93B1 の小胞体からエンドソームへの協調的な移動を阻害する
定常状態では TLR9 は小胞体に存在するが、pDC が CpG DNA の刺激を受けると、TLR9 は小胞体膜分子 Unc93B1 とともにエンドソームに移動し、CpG DNA を認識して下流のシグナルを伝達し、IFN- α の産生を誘導する (A)。ところが、ボルテゾミブの存在下では、Unc93B1 の小胞体からエンドソームへの移動は阻害されないが、TLR9 の移動が阻害される。すなわち、Unc93B1 と TLR9 が分離してしまう (B)。これにより、ボルテゾミブの存在下で pDC の IFN- α 産生が抑制されると考えられる。

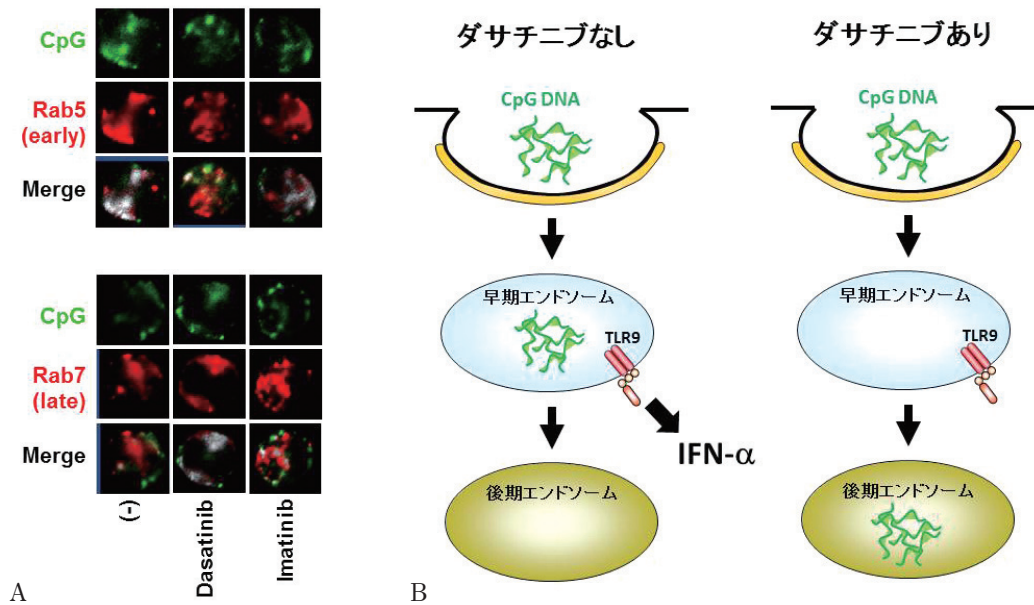


図3 ダサチニブはCpG DNAの早期エンドソームへの滞留を阻害する

(A) 共焦点顕微鏡を用いた pDC の観察。CpG DNA が緑、Rab5, Rab7 (それぞれ早期エンドソーム, 後期エンドソームのマーカー) が赤, これらが重なりと白くなるようにしている。通常は CpG DNA は Rab5 と重なり Rab7 と重ならない (つまり早期エンドソームに滞留する) が, ダサチニブの存在下では CpG DNA の多くが Rab7 と重なる (つまり後期エンドソームに速やかに移動する)。このような CpG DNA の早期エンドソームへの滞留阻害は, 別のチロシンキナーゼ阻害薬イマチニブでは起こらない。(B) (A) でみられた現象を模式図で示している。

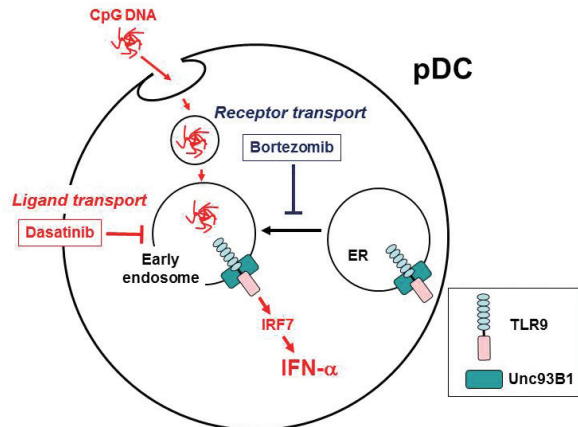


図4 小胞機能を標的とした pDC の機能制御

「核酸認識 TLR の小胞体からエンドソームへの移動」「CpG DNA の早期エンドソームへの滞留」という特異な小胞機能により, pDC は大量の IFN- α 産生という他に類を見ない機能を発揮する。ボルテゾミブは前者 (レセプターである TLR の移動), ダサチニブは後者 (リガンドである CpG DNA の移動) に変調を来すことにより, pDC の IFN- α 産生を阻害する。このように, pDC の特異な小胞機能が炎症性疾患の新たな創薬標的になり得る。

核酸に反応して IFN- α を産生する際には, 「核酸認識 TLR の小胞体からエンドソームへの移動」「CpG DNA の早期エンドソームへの滞留」という特異な小胞機能を発揮する。そして, ボルテゾミブは前者を, ダサチニブは後者を阻害することにより, pDC の活性を抑制する (図 4)。このように, 小胞機能を標的とした DC の機能制御が炎症性疾患の治療薬の開発につながる可能性があり, 新たな創薬コンセプトになる可能性を秘めている。

V. RA 産生ヒト DC サブセットと産生刺激の同定

次にわれわれは mDC の機能を解析した。

ビタミンは健康維持に必須であり, また適切な免疫機能の維持にも重要な役割を果たす。特にビタミン A とビタミン D は重要で¹⁶⁾, ビタミン A の不足はさまざまな免疫異常を来す。また, ビタミン D は骨代謝以外にも多くの作用があり, 免疫系においては過剰な免疫反応を抑制する方向に働く。

近年マウスの研究により, 腸管の CD103 陽性 DC というサブセットがビタミン A の活性型代謝産物である全トランス型レチノイン酸 (all-trans retinoic acid; 以下 RA) を産生し, 腸管免疫寛容に寄与するという

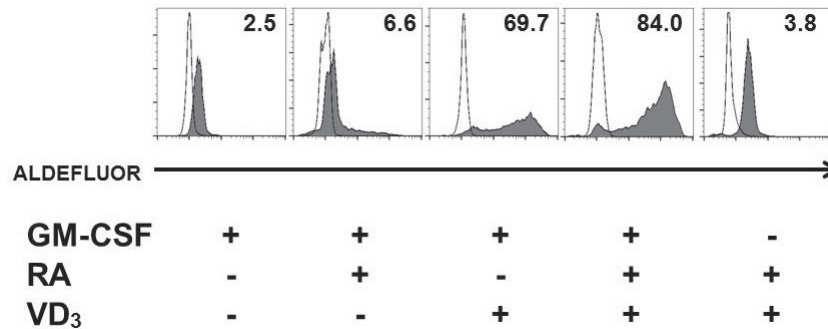


図5 GM-CSF + VD₃ 刺激が CD1c⁺ mDC に RA 高産生能を誘導する

前駆体 retinal から RA を誘導するアルデヒド脱水素酵素により蛍光を発する基質 ALDEFLUOR[®] を用いて RA 産生能を定量。数字は酵素阻害剤を添加したネガティブコントロール（白抜き）との mean fluorescence intensity の比を示す。

モデルが提唱されている¹⁷⁾。しかし、ヒトのどの DC が RA を産生するのか知られていなかった。そこで、これを明らかにすることを試みた¹⁸⁾。

前述のように、ヒト DC には、大きく CD1c⁺ mDC, CD141⁺ mDC, pDC という 3 つのサブセットがあるが、この中で、CD1c⁺ mDC に特有の機能は明らかにされていない。われわれは、異なるヒト末梢血 DC サブセットを、免疫抑制作用が報告されているさまざまな分子で刺激したところ、CD1c⁺ mDC のみが、GM-CSF の存在下で活性化ビタミン D₃ (VD₃) の刺激を受けることにより、RA の高産生能を獲得した (図 5)。

次に、マウスの報告と対比させるために、ヒト腸間膜リンパ節から単離した mDC を CD103 陽性と陰性に分け VD₃ で刺激したところ、マウスと異なり CD103 陰性の mDC が RA を強く産生した。また、VD₃ がマウス DC の RA 産生も誘導するかどうか調べたところ、脾臓および腸間膜リンパ節のどの DC サブセットも、GM-CSF 刺激だけで RA 高産生能を獲得し、VD₃ を加えても増強は見られなかった。以上より、ヒトとマウスでは、RA を高産生する DC サブセットや誘導刺激が異なることがわかった。

RA 産生 DC が RA 依存性にどのような T 細胞反応を誘導するか調べたところ、T 細胞に腸管帰巢性の接着分子 α4β7 インテグリンの発現を誘導し、皮膚帰巢性の接着分子 cutaneous lymphocyte antigen の発現を抑制した。また、ナイーブ CD4⁺ T 細胞の Th2 細胞への分化を誘導した。

ヒト CD1c⁺ mDC は体内に一番多いと考えられる DC サブセットだが、その特有の機能が不明であった。本研究により、CD1c⁺ mDC がヒトの RA 高産生 DC であり、CD1c⁺ mDC、ビタミン A、ビタミン D という 3

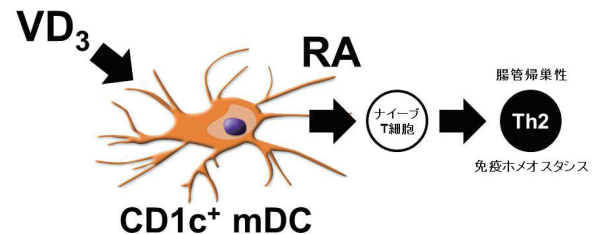


図6 「ビタミン D → CD1c⁺ mDC → レチノイン酸」系による腸管免疫ホメオスタシス維持のモデル

つの重要な免疫コンポーネントが直接つながるという新たな事実が明らかになった (図 6)。ビタミン D がさまざまな自己免疫疾患を抑制することが疫学的に示され¹⁹⁾、また Th2 反応は過剰な免疫反応を抑制する側面があることから²⁰⁾、「ビタミン D → CD1c⁺ mDC → ビタミン A」系は腸管の免疫ホメオスタシスを維持する重要なコンポーネントであることが示唆される。この系がマウスに存在しないことから、in vivo における重要性は今後ヒト化マウスを用いて示してゆく必要がある。

VI. おわりに

以上われわれは、異なる機能をもつ DC サブセットがそれぞれ特有の薬剤や小分子に反応して機能制御を受けることを明らかにした。冒頭で述べたように、DC の機能制御がさまざまな免疫関連疾患の新たな治療開発につながると考えられる。そのための基礎的な知見は、世界中の研究者の集中的な努力により数多く蓄積しており、実際に臨床応用される日も遠くないと期待される。今後も DC 研究の動向から目が離せないであろう。

文 献

1. Guillems M, Henri S, Tamoutounour S, et al. From skin dendritic cells to a simplified classification of human and mouse dendritic cell subsets. *Eur J Immunol* 40: 2089-2094, 2010.
2. Villadangos JA, Shortman K. Found in translation: the human equivalent of mouse CD8+ dendritic cells. *J Exp Med* 207: 1131-1134, 2010.
3. Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, et al. Plasmacytoid Dendritic Cells: Recent Progress and Open Questions. *Annu Rev Immunol* 29: 163-183, 2011.
4. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different Toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 194: 863-870, 2001.
5. Geissmann F, Manz MG, Jung S, et al. Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science* 327: 656-661, 2010.
6. Robbins S, Walzer T, Dembele D, et al. Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biology* 9: R17, 2008.
7. Gilliet M, Cao W, Liu Y-J. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 8: 594-606, 2008.
8. Reimold AM, Iwakoshi NN, Manis J, et al. Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* 412: 300-307, 2001.
9. Iwakoshi NN, Pypaert M, Glimcher LH. The transcription factor XBP-1 is essential for the development and survival of dendritic cells. *J Exp Med* 204: 2267-2275, 2007.
10. Lee A-H, Iwakoshi NN, Anderson KC, et al. Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 9946-9951, 2003.
11. Hirai M, Kadowaki N, Kitawaki T, et al. Bortezomib suppresses function and survival of plasmacytoid dendritic cells by targeting intracellular trafficking of Toll-like receptors and endoplasmic reticulum homeostasis. *Blood* 117: 500-509, 2011.
12. Kim Y-M, Brinkmann MM, Paquet M-E, et al. UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* 452: 234-238, 2008.
13. Bantscheff M, Eberhard D, Abraham Y, et al. Quantitative chemical proteomics reveals mechanisms of action of clinical ABL kinase inhibitors. *Nat Biotechnol* 25: 1035-1044, 2007.
14. Fujita H, Kitawaki T, Sato T, et al. The tyrosine kinase inhibitor dasatinib suppresses cytokine production by plasmacytoid dendritic cells by targeting endosomal transport of CpG DNA. *Eur J Immunol* 43: 93-103, 2013.
15. Honda K, Ohba Y, Yanai H, et al. Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* 434: 1035-1040, 2005.
16. Mora JR, Iwata M, von Andrian UH. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat Rev Immunol* 8: 685-698, 2008.
17. Cassani B, Villablanca EJ, De Calisto J, et al. Vitamin A and immune regulation: Role of retinoic acid in gut-associated dendritic cell education, immune protection and tolerance. *Mol Aspects Med* 33: 63-76, 2012.
18. Sato T, Kitawaki T, Fujita H, et al. Human CD1c+ Myeloid Dendritic Cells Acquire a High Level of Retinoic Acid-Producing Capacity in Response to Vitamin D3. *J Immunol* 191: 3152-3160, 2013.
19. Hewison M. An update on vitamin D and human immunity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 76: 315-325, 2012.
20. Pulendran B, Artis D. New Paradigms in Type 2 Immunity. *Science* 337: 431-435, 2012.

ペリオスチンによるアレルギー性炎症の増幅

有馬 和彦, 白石 裕士, 出原 賢治

Amplification of allergic inflammation via periostin

Kazuhiko Arima, MD, PhD, Hiroshi Shiraishi, PhD, and Kenji Izuhara, MD, PhD

Division of Medical Biochemistry, Department of Biomolecular Sciences, Saga Medical School, Saga, Japan

Abstract

Th2-type immune response is critical for development of allergic inflammation. We have recently identified periostin as one of the inducible genes upon stimulation with IL-13, a representative Th2 cytokine. Periostin is a matricellular protein that binds to both matrix proteins and cells to modulate cellular activation. The expression/production of periostin is indeed augmented in multiple allergic diseases such as atopic dermatitis, allergic rhinitis, and bronchial asthma. Particularly, serum periostin measurement has been proven useful to predict the effectiveness of the molecularly-targeted drugs against IgE as well as IL-13 in the treatment of patients with bronchial asthma. Mechanistically, periostin is produced mainly by fibroblasts, and acts on multiple cell types including epithelial cells, fibroblasts themselves, and eosinophils via integrins. Periostin contributes to the production of thymic stromal lymphopoietin by keratinocytes and interleukin-6 by fibroblasts either directly or indirectly, and chemotaxis of activated eosinophils, thus amplifying the Th2-type immune response. Periostin is a promising novel target of molecular medicine in allergic diseases for both diagnosis and treatment.

Key words : allergic inflammation, fibroblasts, integrin, matricellular protein, periostin

I. 緒 言

国民の約半数が何らかのアレルギー疾患に罹患しているとされる現代、アレルギー性炎症病態の解明および制御が強く望まれている。アレルギー性炎症形成に関わる数多くの分子群の中で“Th2型”サイトカインである interleukin (IL)-13 やその作用を媒介する主要な転写因子 signal transducer and activator of transcription (STAT)6 がアレルギー性炎症形成に重要な役割を果たすことが1998年頃までに明らかになったが、それ

らの下流においてどのような分子の転写制御がアレルギー性炎症に寄与しているのかは不明であった¹⁾。われわれの研究室ではIL-13により発現が増強する遺伝子を検索する過程で、細胞外マトリックスタンパク質の一種ペリオスチンがアレルギー性炎症の増悪化に重要な役割を果たしていることを見出してきた²⁾。本稿ではペリオスチンを介したアレルギー性炎症増悪化機構について解説する。

II. ペリオスチンとは

ペリオスチンは分泌型の細胞接着タンパク質である。当初マウス骨芽細胞株に発現する遺伝子として同定され、そのcDNA配列をもとにヒトホモログがクローニングされた³⁾。その発現は骨膜、心臓弁、胎盤、

歯周靱帯、表皮真皮境界部などに見られ、種々の炎症性疾患や癌組織での発現亢進が知られている。構造的には中央に見られる細胞外接着モジュール FAS1 ドメインの4回繰り返し構造が特徴的でN末側にはN末端の分泌シグナル配列とそれに引き続くシステインに富んだ EMI ドメインがある。C末側には既知のタンパク質ドメインとの相同性はない(図1)。FAS1 ドメインはそもそも昆虫の神経接着分子 Fasciclin I に見出されたものだが、哺乳類においてもペリオスチンの FAS1 ドメインはインテグリン分子 ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$) と結合することが示されている³⁾。

ペリオスチンの機能としてはファイブロネクチンやテネシンCといった他の細胞外マトリックス構成タンパク質と接着することによる組織構築の維持や線維化における役割とともに、細胞表面のインテグリン分子を受容体として細胞に作用し、活性化、成長因子産生、遊走、生存といった細胞機能を制御する役割が報告されてきている(図1)³⁾。後者のように細胞機能を調節するマトリックスタンパク質は近年マトリセルラータンパク質(matricellular protein)と総称されている⁴⁾。

ペリオスチンノックアウトマウスの解析によりペリオスチンは骨梁形成、歯周靱帯形成、および心臓の発生、とりわけ弁形成に重要な役割を果たしていることが明らかになっている^{3, 5)}。

Ⅲ. ペリオスチンのアレルギー性炎症増悪化への関与

i) アレルギー性疾患におけるペリオスチンの発現

われわれの研究室では、気管支喘息発症に重要なサイトカイン IL-13 の気道上皮細胞への作用を解析するた

めにマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った²⁾。その結果強く転写が誘導される遺伝子群の中にペリオスチンが含まれていた。この結果に基づき気管支喘息患者肺におけるペリオスチンの発現を調べたところ肥厚した基底膜に強い発現が認められた⁶⁾。これ以降、アスピリン喘息を併発した鼻茸、好酸球性食道炎、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎といった種々のアレルギー性疾患の病変部においてペリオスチンが高発現していることが報告されてきた^{2, 7-8)}。さらに気管支喘息患者において、血中ペリオスチン高値は Th2 型喘息の良い指標となることが示され⁹⁻¹⁰⁾、抗 IgE 抗体製剤、抗 IL-13 抗体製剤による治療反応性を予測する良いバイオマーカーであることも示された²⁾。また、ペリオスチン高値群は吸入ステロイド治療に対する反応性が悪く、かつ呼吸機能予後不良となることも示されており¹⁰⁻¹¹⁾、今後、新たなアレルギー治療戦略を練る上でペリオスチン測定は重要な位置を占めることが期待されている。

ii) マウスモデルからの知見

ii)-a. アレルギー性皮膚炎モデル

アトピー性皮膚炎患者の病変部組織にペリオスチンが過剰に沈着していることから、われわれの研究室では2型免疫応答(IL-4, IL-13産生)により誘導されたペリオスチンがアレルギー性炎症の病態形成へ機能的に関与しているのか否かを明らかにするためにペリオスチン欠損マウスを用いてダニ抗原塗布によるアトピー性皮膚炎様モデルの解析を行った^{8, 12)}。その結果、野生型マウスで見られるダニ抗原依存的な耳介の肥厚・腫脹、真皮への好酸球を主体とする細胞浸潤、お

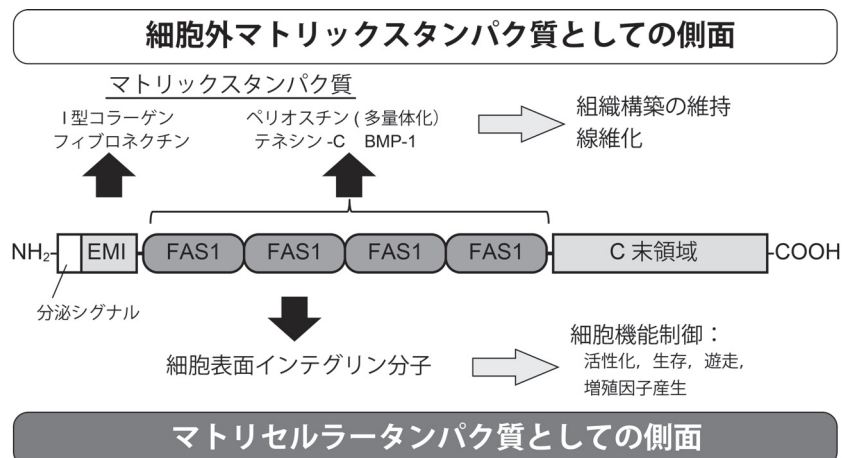


図1 ペリオスチンの構造と機能。本文参照。

よび IL-13 や thymic stromal lymphopoietin (TSLP) 産生といった 2 型免疫応答は減弱しており、ペリオスチンは本皮膚炎モデルの病態形成に機能的に関与していると結論付けられた。

ii)-b. 好酸球性食道炎モデル

好酸球性食道炎は食物を含む物質が抗原となってアレルギー反応が起こり、食道に好酸球が浸潤して慢性炎症を惹起することで臓器としての正常な機能が障害される疾患である。臨床的には胃食道逆流症に類似しており、組織リモデリングのために食道の線維化、狭小化を来す。病因的には 2 型免疫応答の重要性が明らかにされており、動物モデルとして IL-13 の気管内投与やカビ抗原 (*Aspergillus fumigatus*) 抽出物の経鼻投与によって肺とともに食道に好酸球性炎症を誘導するモデルが報告されている¹³⁾。実際に好酸球性食道炎患者の病変部にペリオスチンの沈着が認められることから、Blanchard らはペリオスチンノックアウトマウスを用いてカビ抗原抽出物経鼻投与モデルを作成し、肺および食道への好酸球の浸潤が 7 割近く抑えられたことを報告するとともに、その機序としてペリオスチンが好酸球遊走を促進するという知見を示した (後述)⁷⁾。

ii)-c. 喘息モデル

気管支喘息患者の病変部にペリオスチンが過剰発現していることは示されたが⁶⁾、ペリオスチン分子による喘息病態への機能的関与についてはいまだ明確な議論の一致を見ていない。Kaplan ら¹⁴⁾ と Fahy ら¹⁵⁾ のグループはそれぞれ卵白アルブミンと *Aspergillus fumigatus* 抗原を用いた抗原誘発性気道炎症モデルをペリオスチン欠損マウスにて解析したところ、予想に反していずれも気道過敏性の悪化および血中 IgE 値のさらなる上昇が認められた。これよりペリオスチンはアレルギー性炎症に対し抑制的に作用していると結論付けられた。Fahy らは *in vitro* の実験と併せ、ペリオスチン欠損により TGF- β 1 の活性が低下し、制御性 T 細胞の誘導が低減したため、免疫応答が増強したとするエビデンスを示している。一方、Hershenson らのグループはダニ抗原を用いた気道炎症モデルを解析し、前二者とは逆にペリオスチン欠損により細胞浸潤・粘液産生の軽減とともに気道過敏性が改善することを示している¹⁶⁾。

このように気道炎症におけるペリオスチンの役割は用いる抗原や投与プロトコルによって異なっているよ

うに見える。このことはヒトの喘息患者が均一な集団でないことと通じるものがあり、完全解明に向けては今後の研究の蓄積を待たねばならない。一つの方向性としては、皮膚炎モデルによる解析から、ペリオスチンは炎症の増悪化・慢性化に関与していることが示されているので、気道炎症の解析においても慢性化モデルでの検討が必要であろう。

iii) *In vitro* 解析からの知見

ペリオスチンの主な産生細胞は線維芽細胞と考えられる⁶⁾。ではペリオスチンはどのような細胞に作用することで機能を発揮しているのだろうか？これまでに上皮細胞、線維芽細胞、好酸球が主要な標的細胞として解析されてきた。

iii)-a. ケラチノサイト

アトピー性皮膚炎においてはケラチノサイトの分化異常を伴った過増殖が認められる。しかしながら前述のようにペリオスチン欠損マウスを用いたダニ抗原塗布によるアトピー性皮膚炎様モデルでは皮膚・ケラチノサイトの肥厚を認めなかった。このことから真皮内の線維芽細胞が産生したペリオスチンがケラチノサイトに直接作用している可能性について解析した⁸⁾。その結果、組換えペリオスチンタンパク質を固相化したシャーレでマウス初代ケラチノサイトを培養すると NF- κ B p65 の活性化 (核移行) と TSLP の産生が認められ、これは NF- κ B 阻害剤により抑制できたことから、ペリオスチンはケラチノサイトに直接作用して NF- κ B 経路を活性化し、TSLP 産生を誘導することが分かった。TSLP はアトピー性皮膚炎患者の表皮に発現して樹状細胞の活性化を通じた 2 型免疫応答の誘導を惹起することが知られており¹⁷⁾、線維芽細胞と表皮細胞のクロストークがアトピー性皮膚炎におけるアレルギー性炎症の増幅に関与していることが示された。

iii)-b. 線維芽細胞

定常状態の成人皮膚におけるペリオスチンの発現は真皮―表皮境界部の真皮側と毛包の一部に限局している。しかしながらアトピー性皮膚炎患者の病変皮膚組織においては真皮内に広くペリオスチンの発現が見られる⁸⁾。このペリオスチン発現の程度は臨床像とよく相関し、重症例ほどペリオスチンの沈着が著明である。この知見から、線維芽細胞が産生したペリオスチンは線維芽細胞自身に作用することで細胞機能を調節しているのではないかと考えた。実際、線維芽細胞を

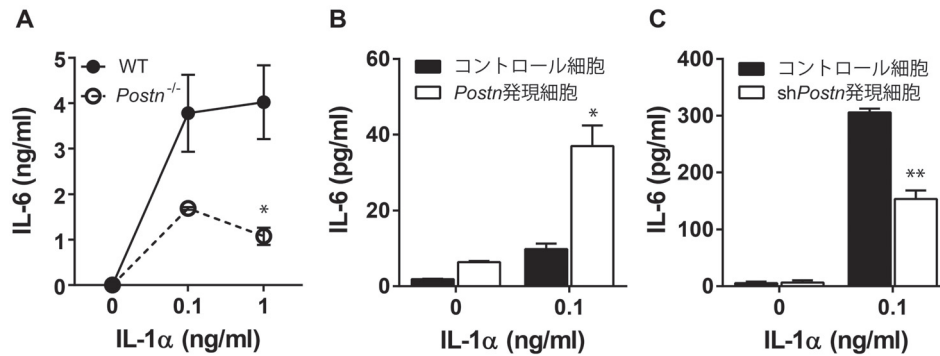


図2 線維芽細胞におけるペリオスチンの作用。(A) マウス胎児線維芽細胞を用いた解析。野生型 (WT) に比しペリオスチン欠損型 (*Postn*^{-/-}) は IL-1 α による IL-6 産生能が低い。(B, C) マウス線維芽細胞株 NIH3T3 細胞を用いた解析。(B) ペリオスチン過剰発現細胞はコントロール細胞に比し IL-6 産生能が増強している。(C) ペリオスチンを RNA 干渉にてノックダウンした細胞はコントロールノックダウン細胞に比し IL-6 産生能が減弱している。* p <0.05, ** p <0.01。文献 18 を参照。

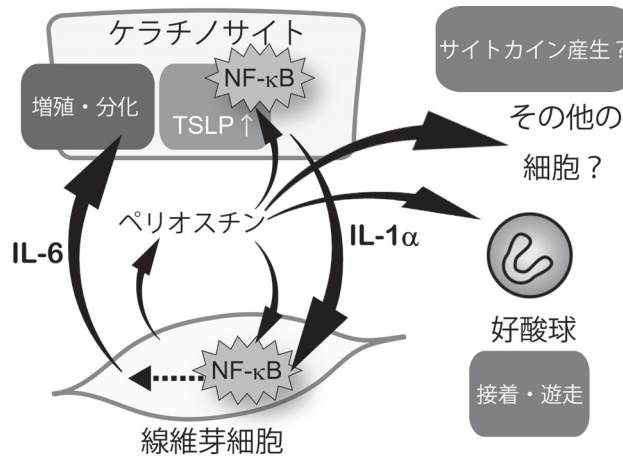


図3 ペリオスチンを介したアレルギー炎症増幅。本文参照。文献 18 より改変して引用。

IL-1 ファミリーサイトカインで刺激すると炎症性サイトカイン IL-6 が産生されるが、ペリオスチン欠損線維芽細胞においてはこの IL-6 産生が減弱していた (図 2A)。ペリオスチン欠損細胞では IL-1 α 刺激による NF- κ B の活性化が減弱していたことから、ペリオスチンは IL-1 α による NF- κ B 活性化を増強もしくは維持する作用を有していると考えられる。実際、線維芽細胞株にペリオスチン遺伝子を過剰発現させると IL-1 α による IL-6 産生は増強し、ペリオスチン遺伝子の発現を RNA 干渉により低減させると IL-6 産生も低下した (図 2B, C) ¹⁸⁾。IL-1 ファミリーのうち、IL-1 α や IL-33 は損傷を受けた上皮細胞より分泌されることが知られている。とりわけ IL-33 は近年、アレルギーとの関連が指摘されている。また一方で IL-6 はケラチノサイトの主要な増殖因子として作用することも知られている。これらのことからペリオスチンは線維芽細胞と

表皮細胞とのクロストークを媒介し、表皮の増殖を制御している可能性が示唆された (図 3) ¹⁸⁾。

iii)-c. 好酸球

好酸球浸潤はアレルギー疾患において代表的な組織所見である。好酸球は 7 種のインテグリン分子を発現していることが知られており、一つまたは複数のインテグリンが vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 や intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 といった細胞表面接着分子、およびラミニン、フィブリノゲン/フィブリン、ビトロネクチンといった細胞外マトリックスタンパク質に対する接着・遊走を媒介していることが知られている。ごく最近、IL-5 存在下で好酸球がペリオスチンと接着することが報告された ¹⁹⁾。IL-5 は好酸球に作用してインテグリン $\alpha_M\beta_2$ を発現させ、これを介して好酸球とペリオスチンが結合することが示され

ている。さらに培養液中に添加したペリオスチンはIL-5で刺激した好酸球のフィブロネクチンに対する接着を増強させることも示された^{7, 19)}。後者の機序としては、ペリオスチンとフィブロネクチンとの直接結合による可能性とペリオスチンがインテグリン $\alpha_M\beta_2$ を介して好酸球の機能を制御している可能性の二つが考えられる。すなわちアトピー性皮膚炎や気管支喘息などアレルギー疾患の病変部に沈着しているペリオスチンは局所で好酸球の遊走や貯留の際のリガンドとして作用しているが、さらにマトリセルラータンパク質として好酸球の細胞機能を調整している可能性もある。

以上、ペリオスチンの標的細胞として代表的な三つの細胞を取り上げた。実際のところ生体ではどの細胞がペリオスチンの主要な標的なのか、またここにあげていない他の細胞種に対する作用はいかなるものかといった点は今後解明していく必要があるが、*in vivo*で見出されたペリオスチンによるアレルギー性炎症増幅機構の機序の一端は確実に明らかになってきていると言えよう (図3)。

IV. 細胞外マトリックス研究における サイトメトリー利用

細胞外マトリックス構成タンパク質研究におけるサイトメトリー手法の利用は限定的である。その理由として挙げられるのは、①細胞外マトリックスを産生・分泌する主要な細胞が線維芽細胞であるため血球細胞とは異なり生体からの採取にハードルがあること、②一口に線維芽細胞といっても形態的・機能的に不均一な集団であり、血球細胞のような細胞系譜特異的分化抗原による明瞭な分類ができていないこと、であろう。実際、定常状態において表皮・真皮境界や毛包周囲部に限局して発現しているペリオスチンを産生する細胞は未だに決定されていない。さらにアレルギー性炎症に伴って病変組織に産生されるペリオスチンの産生細胞も同定されていない。これらの課題はペリオスチンプロモーターの下流で標識タンパク質を発現させることでペリオスチン産生細胞を網羅的に同定する遺伝学的細胞系譜解析を利用するといった手法で解決できると期待される²⁰⁾。アレルギー性炎症を増悪化させることができれば新たな選択的アレルギー疾患治療戦略となり得るであろう。

V. 結 語

ペリオスチンがアレルギー性炎症の病変部で過剰に発現していること、および遺伝子欠損マウスにおける結果からペリオスチンがアレルギー性炎症病態形成に関与していることは明らかになってきた。しかしペリオスチンが標的細胞に対しどのような作用をいかなる分子機序によって果たしているのかはまだ十分に解明されていない。今後は従来サイトメトリーによるアプローチが困難であった非免疫細胞と免疫系とのペリオスチンを介したクロストーク機構を遺伝学的細胞系譜解析といった新たな手法を取り入れることにより明らかにしていきたい。こういった取り組みを通じて慢性化した治療抵抗性アレルギー症例に対して効果的な診断・治療法が提供できるようにこの分野の研究が一層活性化していくことを期待する。

謝 辞

本稿をまとめるにあたって、出原研究室のメンバーおよび多数の学内外の共同研究者に協力いただいたことに謝意を表したい。ペリオスチン欠損マウスはDr. Simon J. Conway (Indiana University, USA) より譲渡いただいた。

文 献

1. Wills-Karp M: Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Immunol Rev* 202: 175-190, 2004
2. Izuhara K, Arima K, Ohta S, et al.: Periostin in allergic inflammation. *Allergol Int* 63: 143-151, 2014
3. Kudo A: Periostin in fibrillogenesis for tissue regeneration: periostin actions inside and outside the cell. *Cell Mol Life Sci* 68: 3201-3207, 2011
4. Bornstein P, Sage EH: Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Current Opin Cell Biol* 14: 608-616, 2002
5. Rios H, Koushik SV, Wang H, et al.: periostin null mice exhibit dwarfism, incisor enamel defects, and an early-onset periodontal disease-like phenotype. *Mol Cell Biol* 25: 11131-11144, 2005
6. Takayama G, Arima K, Kanaji T, et al.: Periostin: a novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals. *J Allergy Clin Immunol* 118: 98-104, 2006
7. Blanchard C, Mingler MK, McBride M, et al.: Periostin facilitates eosinophil tissue infiltration in allergic lung and esophageal responses. *Mucosal Immunol* 1: 289-

- 296, 2008
8. Masuoka M, Shiraishi H, Ohta S, et al. : Periostin promotes chronic allergic inflammation in response to Th2 cytokines. *J Clin Invest* 122: 2590-2600, 2012
9. Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, et al. : T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 180: 388-395, 2009
10. Kanemitsu Y, Matsumoto H, Izuhara K, et al. : Increased periostin associates with greater airflow limitation in patients receiving inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol* 132: 305-312 e303, 2013
11. Nagasaki T, Matsumoto H, Kanemitsu Y, et al. : Integrating longitudinal information on pulmonary function and inflammation using asthma phenotypes. *J Allergy Clin Immunol* 133: 1474-1477, 1477 e1471-1472, 2014
12. Shiraishi H, Masuoka M, Ohta S, et al. : Periostin contributes to the pathogenesis of atopic dermatitis by inducing TSLP production from keratinocytes. *Allergol Int* 61: 563-572, 2012
13. Mishra A, Hogan SP, Brandt EB, et al. : An etiological role for aeroallergens and eosinophils in experimental esophagitis. *J Clin Invest* 107: 83-90, 2001
14. Sehra S, Yao W, Nguyen ET, et al. : Periostin regulates goblet cell metaplasia in a model of allergic airway inflammation. *J Immunol* 186: 4959-4966, 2011
15. Gordon ED, Sidhu SS, Wang ZE, et al. : A protective role for periostin and TGF- β in IgE-mediated allergy and airway hyperresponsiveness. *Clin Exp Allergy* 42: 144-155, 2012
16. Bentley JK, Chen Q, Hong JY, et al. : Periostin is required for maximal airways inflammation and hyperresponsiveness in mice. *J Allergy Clin Immunol* 134: 1433-1442, 2014
17. Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, et al. : Human epithelial cells trigger dendritic cell-mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* 3: 673-680, 2002
18. Taniguchi K, Arima K, Masuoka M, et al. : Periostin controls keratinocyte proliferation and differentiation by interacting with the paracrine IL-1 α /IL-6 loop. *J Invest Dermatol* 134: 1295-1304, 2014
19. Johansson MW, Annis DS, Mosher DF: $\alpha_M\beta_2$ integrin-mediated adhesion and motility of IL-5-stimulated eosinophils on periostin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 48: 503-510, 2013
20. Lindsley A, Snider P, Zhou H, et al. : Identification and characterization of a novel Schwann and outflow tract endocardial cushion lineage-restricted periostin enhancer. *Dev Biol* 307: 340-355, 2007

特 集

スタチンの有する抗炎症効果 ～ヒト樹状細胞サブセットを治療ターゲットとした新たな視点からの解析～

伊藤 量基

Anti-inflammatory effects of statins ～ Novel investigation of the potent activity to human dendritic cell subsets as therapeutic cellular targets ～

Tomoki Ito

First Department of Internal Medicine, Kansai Medical University

Abstract

Dendritic cells (DCs) are the master cells in activating immune responses through enhancing innate immunity by cytokine production and initiating acquired immunity by priming naïve CD4+ T cells. However, DCs play not only a central role in antimicrobial immune response in host defense but also a pathogenic role in the development of the several inflammatory disorders such as allergy and autoimmune diseases. In allergy, epithelial cell-derived thymic stromal lymphopoietin stimulates myeloid DC subset to express OX40L and CCL17 that induce and maintain Th2 cell responses. In systemic lupus erythematosus (SLE), aberrant continuous type I IFN production by plasmacytoid DCs causes vicious spiral of pathogenic autoimmune responses. Thus, myeloid DC and plasmacytoid DC subsets represent key cellular pathogenic cells in allergy and SLE, respectively. Accordingly, control of the dysregulated myeloid DC functions and pDC-derived type I IFNs provides an alternative treatment strategy for allergy and SLE. We focus on specific roles of statins in controlling the myeloid DCs-dependent Th2 pathway and plasmacytoid DC-dependent IFN pathway and state their therapeutic potentials for allergy and SLE.

Key words : type I IFN, Systemic lupus erythematosus, OX40 ligand, allergy, CCL17

I. はじめに

一般に免疫応答は樹状細胞 (Dendritic cell : DC) によって制御されているが, DC は大きく 2 つのサブセットがあり, それぞれに異なる機能を持ち, 様々な炎症性免疫疾患の病態発症・進展に重要な働きをする。

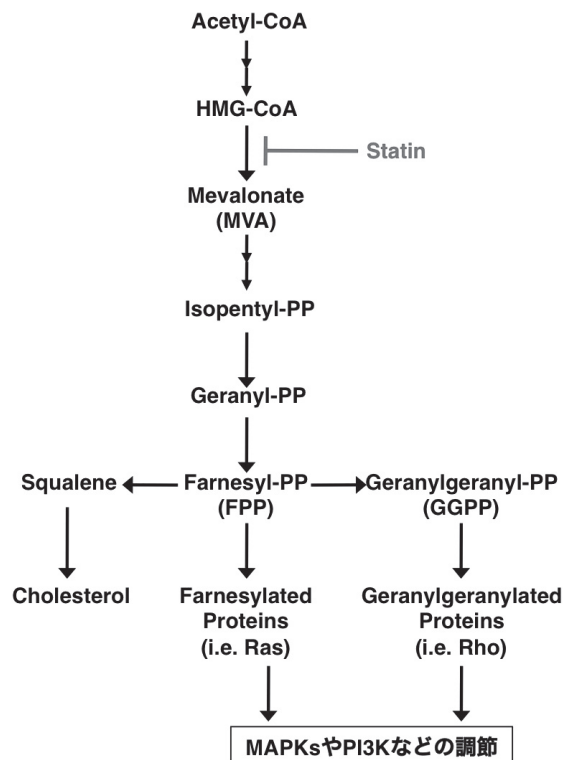
自己免疫疾患は, 本来抑制されるはずの自己成分に対する免疫応答に基づく疾患である。全身性エリテマ

トーデス (SLE) においては, DC サブセットの一つ, 形質細胞様 DC (plasmacytoid DC : pDC) が自己核酸に応答して, 持続的な異常 I 型 IFN 産生することが, 病態形成に関与している。一方, アレルギーは Th2 サイトカインの産生, IgE 産生性 B 細胞の誘導, 好酸球や肥満細胞の活性化という一連の免疫カスケードにより惹起される。そのトリガーとして, 上皮由来の胸腺間質リンパ球増殖因子 (TSLP) によって活性化したミエロイド系 DC (myeloid DC : mDC) が OX40 リガンド (OX40L) と CCL17 を発現し, エフェクター Th2 細胞誘導ならびにその増殖維持に寄与することによりアレルギー性炎症が惹起・増悪する。

高脂血症治療薬として広く使用されている HMG-CoA 還元酵素阻害剤（スタチン）は、近年、血清 CRP や冠動脈疾患に関する炎症性マーカーをも抑制することが示され、種々の炎症性疾患や免疫疾患に対する治療効果が注目されている。このスタチンが持つ抗炎症・免疫抑制作用を、この DC サブセットの持つそれぞれ独自のサイトカイン・表面分子発現の側面から解析することは、自己免疫疾患やアレルギーに対する新たな治療戦略に繋がる可能性がある。我々は、スタチン系薬剤が、核酸認識によるヒト pDC 由来 IFN α の産生を阻害し、また TSLP 刺激時における mDC 機能の抑制することを見出している。このスタチンの持つ、DC 機能阻害活性は SLE をはじめとする全身性自己免疫性疾患や各種アレルギーに対する新たな治療戦略に寄与すると考えられる。

II. スタチン

高脂血症治療薬として世界的に広く使用されている HMG-CoA 還元酵素阻害剤（スタチン）は、近年、脂質低下作用の他に、血清 CRP や IL-6、可溶性 ICAM-1 など冠動脈疾患に関する炎症性マーカーを抑制することが示され、種々の炎症性疾患に対する治療効果が注目されている。



近年のスタチン系薬物を使用した大規模臨床試験によると、虚血性心疾患の発症を予防することは周知の事実であるが、この効果は必ずしもコレステロール低下作用だけに基づくものではないことが最近の研究成果から明らかになっている。歴史的には、1995年に、スタチン系薬物を用いて治療された心臓移植レシピエントでは、重篤な急性拒絶反応の発症率が低下することが報告された¹⁾。その機序として、CTL や NK 活性を低下させる効能に基づく事も示されている。その後、にわかにスタチン系薬物の多面的作用が注目され、幾つかの詳細な実験により、スタチンの持つ抗炎症および免疫抑制効果に関する研究成果が蓄積されつつある。スタチンは IL-12 のシグナルに関わる STAT4 の核内への移行を阻害し、Th1 細胞への分化を直接抑制し、ヒト多発性硬化症患者の末梢血単核球に対して *in vitro* での増殖を抑制する^{2, 3)}。 *In vivo* では、リウマチ病態モデルマウスにおいて、スタチン投与が滑膜びらん、炎症細胞の滑膜への浸潤を抑制し、一方、ヒトにおける臨床試験では、前述の心臓移植後に拒絶反応を減少させるのみならず、高脂血症患者でスタチン投与により CRP の低下することや、関節リウマチ患者における炎症反応の低下と腫脹関節数の減少が認められている。

スタチンの作用はコレステロール合成経路において、HMG-CoA からメバロン酸への反応を触媒する HMG-CoA 還元酵素を選択的に阻害することによって、その下流の合成系を遮断しコレステロール生成を抑制することにある（図 1）。しかしながら、このスタチン

図 1 コレステロール代謝経路とスタチンの作用点図

コレステロールは細胞膜を構成している脂質二重層の成分の 1 つであり、肝細胞がその主な生成場所であるが、他に様々な細胞においてもこのカスケードは存在している。スタチンは HMG-CoA からメバロン酸への代謝を阻害することによりコレステロールの合成を抑制する。逆にメバロン酸の投与によりこの系におけるスタチンの薬理作用は相殺される。

メバロン酸以下の経路には、イソプレノイドと呼ばれる中間代謝産物ファルネシルピロリン酸（FPP）やゲラニルゲラニルピロリン酸（GGPP）があり、これらイソプレノイドが低分子量 GTP 結合タンパク質である Ras や Rho 蛋白合成を誘導する。FPP が分岐点となって、スクワレンを経由してコレステロール合成を誘導する経路と、FPP がファルネシル化することで Ras 蛋白合成を誘導する系、さらに GGPP を介して、ゲラニルゲラニル化蛋白である Rho 蛋白生成に寄与する系がある。また、Rho の下流のメディエーターは Rho kinase（ROCK）である。これら Ras や Rho が、細胞の分化・増殖や骨格の形成、サイトカインやケモカインの産生など多面的な効果を制御する。それゆえ、スタチンの持つ様々な細胞に対する多面的効果は、これら Ras や Rho 蛋白合成を抑制することに起因すると考えられている。

ンによって阻害されるコレステロール合成経路への分岐には、FPP（ファルネシルピロリン酸）や GGPP（ゲラニルゲラニルピロリン酸）があるため、これらの合成をも阻害する結果、その下流で生成される small GTPase である Ras や Rho 蛋白合成をも阻害することとなる（図 1）。これら Ras/Rho 蛋白は、細胞の分化・増殖の制御や骨格の形成に重要であることが知られており、スタチンの持つ抗炎症効果を含めた多面的作用は、実はこの Ras/Rho 蛋白活性を抑制することに起因すると考えられている。実際に、Rho 蛋白の作用を直接阻害する Rho kinase 阻害剤を用いると、スタチンと同様に関節リウマチ由来滑膜細胞にアポトーシスを誘導する。Ras/Rho 蛋白は、細胞内シグナルとして p38 や ERK などの MAP キナーゼや PI3 キナーゼが活性調節を受けることから考えると、これらの細胞内キナーゼ活性を阻害することがスタチンの持つ抗炎症作用に重要と考えられる。

Ⅲ. ヒト樹状細胞サブセット

生体内では、未熟な DC が、上皮などの非リンパ組織に侵入した細菌やウイルスなどの異物を認識して取り込み、輸入リンパ管から所属リンパ組織に移動し、ナイーブ T 細胞を活性化し T 細胞免疫応答を惹起する。さらに炎症局所においてはメモリー Th 細胞を活性化することもできる。DC は造血幹細胞由来であり、基本的に大きくミエロイド系とリンパ球系の 2 つに大別される（図 2）。ミエロイド系 DC にはランゲルハンス細胞が含まれる。この DC は病原微生物などの刺激に対して、toll 様受容体（TLR）を介して認識し、豊富な IL-12 を産生し、強い Th1 誘導能を持つ⁴⁾。一方で上皮由来のサイトカイン、胸腺間質リンパ球増殖因子（thymic stromal lymphopoietin : TSLP）刺激により、OX40L を発現するために Th2 誘導能を持つようになり、アレルギー性疾患の病態に寄与することも判明している。一方、リンパ球系と考えられている pDC は、各種ウイルスに応答して、大量の I 型 IFN を産生する⁵⁾ことから、血中 I 型 IFN 産生細胞としても認識されている⁶⁾。しかしながら、ミエロイド系 DC とは異なり、IL-12 産生能が無いが、非常に低いことが報告されている⁷⁾。また、pDC の産生する 1 型 IFN が全身性エリテマトーデスや尋常性乾癬などの自己免疫病態の発症・進展に関与している（図 2）。

このように DC は、免疫機構における中核としての役割を果たすのみならず、様々な疾患病態の悪因にもなる。

現在までにスタチン系薬物と DC 機能とを関連付けた報告はごく限られている。このようなスタチンの持つ抗炎症・免疫抑制作用が各病態局面において樹状細胞サブセットを制御することが判明すれば、臓器移植領域での応用のみならず、今後、アレルギーや自己免疫性疾患など難治性炎症性疾患への応用が期待出来る。

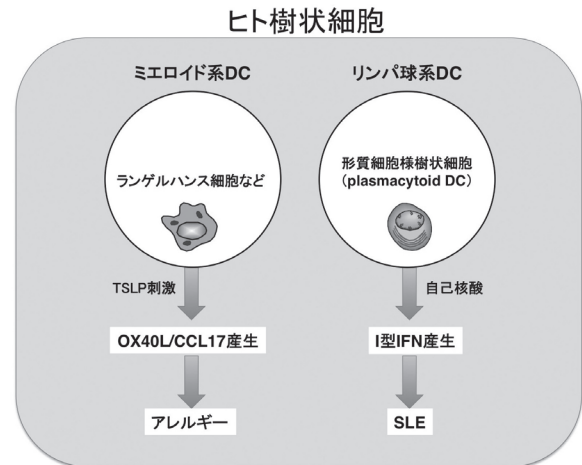


図2 ヒト樹状細胞サブセット

ミエロイド系 DC としては、ランゲルハンス細胞、末梢血 CD11c+DC、単球由来 DC などがある。一方、pDC はリンパ球系の属性を持つと考えられている。ミエロイド系 DC は刺激に対して、非常に豊富な IL-12 を産生する。しかし、TSLP による刺激の場合は、IL-12 産生は認められず、代わりに特徴的に OX40L と Th2 ケモカインである CCL17 を産生する。この機序によって、Th2 細胞誘導ならびにメモリー Th2 細胞浸潤とその増殖を促進する。その結果、アレルギー反応を惹起すると考えられる。一方の pDC は、ウイルスなど微生物由来の RNA や DNA を認識し、大量の I 型 IFN を産生する。しかし、時に自己核酸を認識してしまうと、その結果、自己免疫応答を惹起する一因となる。このように mDC と pDC はアレルギーや自己免疫疾患の病態形成に重要な役割を果たす。

Ⅳ. ミエロイド系 DC とアレルギー

生体は病原微生物の侵入に対して適切な免疫応答を惹起することにより、病原微生物の排除を行う。この免疫防御機構では、寄生虫感染やアレルゲン被曝の際に、Th2 細胞が抗原特異的な IgE 産生性形質細胞の誘導、それらに引き続く肥満細胞の活性化、好酸球・好塩基球刺激、気道過敏性亢進と粘液産生という一連の免疫カスケードを惹起し、アレルギー病態に貢献する。このアレルギー関連 Th2 細胞誘導機構を起動・制御するのが DC、特にランゲルハンス細胞など上皮に存在するミエロイド系 DC である（図 3）。この mDC から惹起される Th2 細胞誘導とそれに引き続くアレルギーカスケードがアトピー性皮膚炎や気管支喘息など

を誘発・増悪に深く関係するも判明している。

TSLP は近年同定されたアレルギー性炎症誘導サイトカインで、表皮などの上皮細胞が主に産生し、また mDC がそのレセプターを発現することで応答し、成熟活性化する⁸⁾。この活性化に際しては、TLR を介して活性化した場合とは異なり、IL-12、IL-23 など Th1- タイプ誘導型サイトカインや、TNF- α 、IL-6 などの炎症サイトカインを産生せず、代わりに Th2-attracting ケモカインである TARC (CCL17) を産生する^{9,10)}。さらにこの活性化 DC は OX40L を発現する⁹⁾。この OX40L を作動分子として CD4 陽性ナイーブ T 細胞を強力に増殖させ、IL-4、IL-5、IL-13、TNF- α を産生し、IL-10 非産生型の炎症性 Th2 細胞へと分化させる⁹⁾。また、CCL17 産生によって浸潤してきたメモリー Th2 細胞に対しても OX40L によって、その細胞増殖を引き起こし、アレルギー性炎症の維持に寄与する¹¹⁾。実際に、TSLP はアトピー性皮膚炎や喘息における上皮組織に高発現し、表皮に存在するミエロイド系

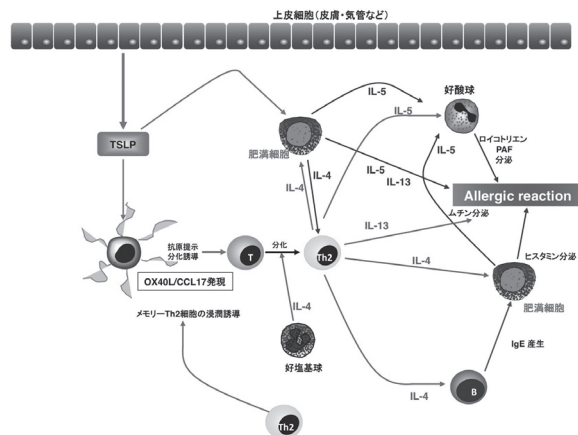


図3 ミエロイド系 DC を基点とするアレルギー性炎症カスケード

何らかの外部からの刺激（たとえばアレルゲンや薬剤被曝、あるいは寄生虫などの微生物感染）によって、皮膚や肺胞上皮組織から TSLP が産生される。肥満細胞や好塩基球も TSLP を産生することができる。この TSLP により刺激を受けた局所に存在するミエロイド系 DC は成熟・活性化し特異的に OX40L を発現する。同時に、所属リンパ節への遊走が促され、抗原特異的な CD4 陽性ナイーブ T 細胞を刺激増殖させ、炎症性 Th2 細胞 (IL-4+IL-5+IL-13+TNF- α +IL-10-産生細胞) への分化を誘導する。この炎症性 Th2 細胞を介して、B 細胞からの IgE 産生促進、肥満細胞・好塩基球の集積・活性化などの免疫カスケードが誘導されて、アレルギー性炎症病態が発症する。

一方慢性期においては、DC から Th2 ケモカイン CCL17(TARC) を産生させることにより、メモリー Th2 細胞を呼び寄せ、OX40L によってメモリー Th2 細胞を増殖させ、炎症局所浸潤とアレルギー性炎症の維持に寄与する。

DC であるランゲルハンス細胞の活性化・遊走に関与するのみならず、同部皮下組織には、ヒトにおけるメモリー Th2 細胞と mDC が多数浸潤しており¹¹⁾、マウスでも、同様にアトピー性皮膚炎や喘息のアレルギー性炎症発症に重要な役割を果たしていることも示されている^{12, 13)}。また TSLP は、上皮細胞のみならず、肥満細胞や好塩基球からも産生されることが示されており、複雑な液性因子・細胞機構によりアレルギー性炎症は構築されているものと推測される。いずれにせよ、ミエロイド系 DC はアレルギー性炎症疾患の発症機序の中心に潜在している細胞と言える。この点に注目し、OX40L/CCL17 とその産生細胞としてのミエロイド系 DC を標的として、その抑制を誘導できる何らかの薬剤があるならば、それはすなわち、アレルギーにおける新たな治療の開発に繋がるといえる。

我々の検証の結果、*in vitro* における培養によって TSLP 存在下の mDC が発現する OX40L と CCL17 がスタチンの添加によって著明に抑制されることが判明した（投稿中）。この効果から、アレルギーカスケードの一つのトリガーポイントを抑制する能力を、スタチンが有すると考えられる（図5）。実際にいくつかの論文でスタチンによるアレルギー抑制効果を示唆する報告があり^{14, 15)}、その免疫学的裏付けとなるデータといえよう。

V. pDC と自己免疫疾患

自己免疫疾患、特に SLE や尋常性乾癬の病態形成には I 型 IFN の関与が強く示唆されている。SLE 患者血清 IFN α レベルの上昇が報告され¹⁶⁾、その血清レベルが、皮膚病変やリンパ球減少、低補体価血症などの疾患活動性と相関する。IFN α 導入マウスでも抗 DNA 抗体の出現が確認されることから、I 型 IFN の産生亢進が、SLE における病態発症ならびに進展の一つの基点であることは間違いない。そして血中 I 型 IFN 産生細胞である pDC が、自己免疫疾患病態を引き起こす元凶の細胞と推察されている。実際に、SLE 患者の末梢血中から、pDC が数的に減少し、かたや SLE や尋常性乾癬の皮膚病変では、活性化 pDC の異常浸潤が認められる^{17, 18)}。また、この SLE 患者血清で培養すると健康人末梢血単球が速やかに成熟抗原提示細胞へ分化すること、さらに、その分化誘導因子は血清 I 型 IFN であることも証明されている¹⁹⁾。この pDC が引き起こす SLE 病態は、pDC が、本来反応してはならない自己核酸-自己抗体複合体 (DNA- 抗 DNA 抗体免疫複合体など) を認識・応答することにより、I 型

IFN を持続産生することに基づくと考えられている。

トリガーとしてのウイルス感染や核酸を認識した pDC は大量の I 型 IFN を産生し、末梢血単球をミエロイド系 DC へ分化させる。この誘導ミエロイド系 DC が遊離した自己の死細胞由来のヌクレオソームを貪食し、自己反応性の CD4 陽性 T 細胞へ抗原提示し、さらには自己抗体産生の B 細胞や形質細胞を誘導する一方で、自己反応性 CD8 陽性 T 細胞をも分化させることにより組織障害を惹起し、死細胞由来のヌクレオソームのさらなる遊離を促す。その結果、DC による自己成分/自己核酸の認識・抗原提示を助長する。この病態悪循環の中心に pDC と I 型 IFN が潜在するといえる (図 4)。また、pDC の産生する I 型 IFN はこれら自己反応性 T 細胞や B 細胞を直接活性化する能力も有する。そして、自己の遊離した核酸は自己抗体と免疫複合体を形成し、pDC のエンドゾーム内にある TLR7/9 に認識され、さらに持続的な病的 I 型 IFN が産生される。このような病的な悪循環が形成されることにより SLE の病像が形成されると考えられている (図 4)。

すなわち、自己免疫疾患、特に SLE において、液性因子としての I 型 IFN と、その産生細胞としての

pDC が、分子レベル、細胞レベルとして、治療戦略におけるターゲットとなりうると考えられる。

我々の検証により、スタチンは、TLR9 刺激による末梢血由来および pDC 由来の IFN α 産生を濃度依存的に抑制する能力を有していることが判明している²⁰⁾。この効果はメバロン酸の同時添加で解除されることより、スタチンが示す IFN α 抑制作用は HMG-CoA 還元酵素阻害作用に基づくものと推測される。スタチンの持つ IFN α 抑制作用はメバロン酸生成阻害によって、その下流のイソプレノイド (GGPP) を経た Rho-ROCK 経路の活性阻害に起因することも判明している。このようにスタチンによって、IFN に起因する異常自己免疫応答が抑制出来る可能性が示唆される (図 5)。

VI. 終わりに

本稿で概説したように、アレルギーや自己免疫疾患の病態形成に DC サブセットが深く関与している。現在までのところ、アレルギーや SLE には根治する治療法はなく、終生にわたるステロイド療法などの非特異的な免疫抑制療法が主流である。今後樹状細胞をターゲットとした治療効果が、様々な炎症性疾患に対

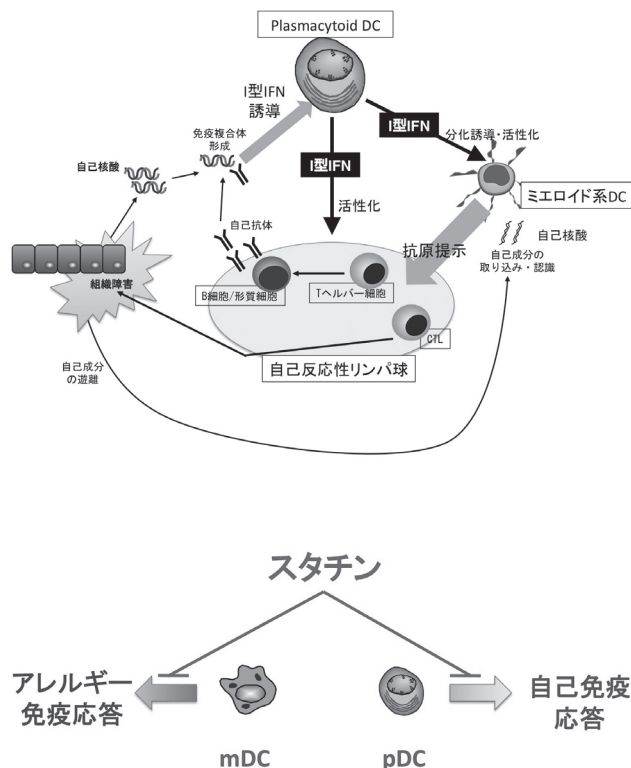


図 4 SLE 病態における、I 型 IFN と pDC を中心とする病的悪循環

トリガーとしてのウイルス感染や核酸を認識した pDC は大量の I 型 IFN を産生し、末梢血単球をミエロイド系 DC へ速やかに分化させる。自己の死細胞由来の自己成分を貪食した抗原提示細胞は自己反応性 CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、自己抗体産生の B 細胞・形質細胞を分化誘導し、組織障害・アポトーシスを促し、自己成分や自己核酸の遊離を惹起し、これらを捕食した抗原提示細胞は、さらなる自己成分の抗原提示を行い、自己免疫応答が増強する。pDC 由来の I 型 IFN はこれら自己反応性 T 細胞や B 細胞を直接活性化し、この自己免疫応答が過剰に持続される。そして自己反応性の B・形質細胞から産生された自己抗体は、障害組織から遊離した自己核酸と免疫複合体を形成し、pDC のエンドゾーム内にある TLR7/9 に認識され、さらに I 型 IFN 産生は繰り返される。このような悪循環が形成されることにより SLE などの病像が形成・持続されることとなる。

図 5 アレルギーと SLE における樹状細胞をターゲットとした治療戦略

mDC と pDC が産生する物質や機能を抑制するそれぞれ薬剤があるならば、アレルギーや SLE における新たな治療に繋がる。

する治療へと拡大するであろう。少なくとも本稿で概説したようにアレルギーやSLEなどに対する治療戦略としても重要と考えられ、その一つの治療薬剤の候補がスタチンである。今後新たな薬剤も出現し、治療に貢献する可能性が期待される。

文 献

1. Kobashigawa JA, Katznelson S, Laks H, et al.:Effect of pravastatin on outcomes after cardiac transplantation. *N Engl J Med* 333: 621-627, 1995
2. Youssef S, Stuve O, Patarroyo JC, et al.:The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. *Nature* 420: 78-84, 2002
3. Vollmer T, Key L, Durkalski V, et al.:Oral simvastatin treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet* 363: 1607-1608, 2004
4. Ito T, Amakawa R, Kaisho T, et al.:Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J Exp Med* 195: 1507-1512, 2002
5. Liu YJ:IPC: Professional Type 1 Interferon-Producing Cells and Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors. *Annu Rev Immunol* 23: 275-306, 2005
6. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, et al.:The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284: 1835-1837, 1999
7. Ito T, Kanzler H, Duramad O, et al.:Specialization, kinetics, and repertoire of type 1 interferon responses by human plasmacytoid predendritic cells. *Blood* 107: 2423-2431, 2006
8. Reche PA, Soumelis V, Gorman DM, et al.:Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. *J Immunol* 167: 336-343, 2001
9. Ito T, Wang YH, Duramad O, et al.:TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med* 202: 1213-1223, 2005
10. Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, et al.: Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* 3: 673-680, 2002
11. Wang YH, Ito T, Homey B, et al.:Maintenance and polarization of human TH2 central memory T cells by thymic stromal lymphopoietin-activated dendritic cells. *Immunity* 24: 827-838, 2006
12. Yoo J, Omori M, Gyarmati D, et al.:Spontaneous atopic dermatitis in mice expressing an inducible thymic stromal lymphopoietin transgene specifically in the skin. *J Exp Med* 202: 541-549, 2005
13. Zhou B, Comeau MR, Smedt TD, et al.:Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice. *Nat Immunol* 6: 1047-1053, 2005
14. Tse SM, Li L, Butler MG, et al.:Statin exposure is associated with decreased asthma-related emergency department visits and oral corticosteroid use. *Am J Respir Crit Care Med* 188: 1076-1082, 2013
15. Yuan C, Zhou L, Cheng J, et al.:Statins as potential therapeutic drug for asthma? *Respir Res* 13: 108, 2012
16. Vallin H, Perers A, Alm GV, et al.:Anti-double-stranded DNA antibodies and immunostimulatory plasmid DNA in combination mimic the endogenous IFN-alpha inducer in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 163: 6306-6313, 1999
17. Farkas L, Beiske K, Lund-Johansen F, et al.: Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon- alpha/ beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. *Am J Pathol* 159: 237-243, 2001
18. Nestle FO, Conrad C, Tun-Kyi A, et al.:Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J Exp Med* 202: 135-143, 2005
19. Blanco P, Palucka AK, Gill M, et al.:Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. *Science* 294: 1540-1543, 2001
20. Amuro H, Ito T, Miyamoto R, et al.:Statins, inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, function as inhibitors of cellular and molecular components involved in type I interferon production. *Arthritis Rheum* 62: 2073-2085

フローサイトメトリーを用いた ウイルス侵入阻害薬スクリーニング法の樹立

松田 幸樹, 岡田 誠治

The establishment of the screening analysis for viral entry inhibitor using flow cytometry.

Kouki Matsuda, Seiji Okada

Center for AIDS Research, Kumamoto University

Abstract

The combination anti-retroviral therapy (cART) was introduced into the treatment of AIDS, the mortality due to the AIDS markedly decreased, and the convalescence of the patient was improved drastically. Although, the membrane fusion of host's T cells and HIV-1 is an essential step of early infection of HIV-1, there is low number of drugs targeting this step and it will be hope to develop new HIV-1 entry inhibitors. Moreover, it was reported that decreasing of cell membrane fluidity suppresses HIV-1 entry and cell-cell fusion. Here, we focused on the viral entry as initial step of HIV-1 infection and evaluated to establish the novel screening analysis using flow cytometry. Firstly, we screened the reagents modified cell membrane fluidity using fluorescent depolarization methods. Next, we performed cell-cell fusion inhibition assay. In this model, Tetinducible HIV-1 envelope protein (Env) expressing T cell and Target T cell were labeled with green and red fluorescent dyes, respectively and cells were co-cultured. Then, fused cells are taken on yellow color due to merge green and red color with fluorescent microscopy and can detect as double positive cells by flow cytometric analysis. We identified Cepharanthine and GUT-70 as novel viral entry/fusion inhibitors targeting host cell membrane and the availability of our screening analysis was confirmed. Our study suggests the possibility of rapidly screening for viral entry inhibitors using flow cytometry. The rapidly screening of anti-viral reagents is possible to reduce the time to apply for clinical use.

Key words : HIV-1 entry; Cell-cell fusion; Cell membrane fluidity

I. はじめに

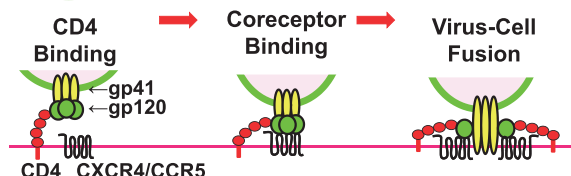
HIV-1 感染症は多剤併用療法 (cART) が導入されて以降, 先進諸国では AIDS による死亡率が顕著に低下し, 患者の予後は飛躍的に改善された¹⁾. HIV-1 (ヒト免疫不全ウイルス 1 型) は宿主細胞膜上に発現している受容体 CD4, CXCR4, CCR5 を用いて細胞内に侵

入した後, ウイルス自身が持つ様々な酵素を用いて細胞内で増殖を開始する。宿主細胞と HIV-1 の膜融合は, HIV-1 侵入において最も重要な過程のひとつであり, このウイルス侵入過程を制御することができれば, その後のウイルス複製に至るまでのイベントを止めることが可能である。また, 最近ではフリーのウイルスによる感染よりも, HIV-1 感染細胞から感染細胞への “cell-to-cell interaction” を介した感染が重要であることが判明している²⁾。しかし, この過程を標的とした薬剤は未だ少なく, さらなるウイルス侵入阻害薬の開発が期待されている。また, 細胞膜流動性制御が HIV-1

侵入及び細胞融合を抑制することが報告されている³⁾。そこで、HIV-1 感染の最初のステップであるウイルス侵入過程に着目し、フローサイトメトリーを用いた新たなウイルス侵入阻害薬スクリーニング法の樹立を試みた。

II. HIV-1 感染機構と細胞膜流動性

レトロウイルスである HIV-1 は、単独での自己増殖能を持たず、宿主細胞に寄生して、細胞の様々な増殖機構を利用しながら自己複製を行う。HIV-1 は宿主細胞膜に発現している CD4 と CXCR4 または CCR5 を利用して細胞内に侵入することが特徴的である。まず、細胞と HIV-1 が会すると、gp120 と宿主細胞の CD4 が結合する。次いで、gp120 とケモカインレセプターである CXCR4/CCR5 が結合する。これにより、gp120 から gp41 が開放され、それまで gp120 内に隠れていた gp41 の疎水性領域が露出し、その領域が宿主細胞膜に直接挿入される。三量体である gp41 は、膜内在性タンパク質として、一時的に宿主細胞の二重膜を貫通して結合し、そして自発的に配列を変化させ、六つのらせん状の束となる。これらの束が放出するエネルギーは、HIV-1 外膜と宿主細胞膜を引き寄せあうことに使われ、膜融合に必要な活性化エネルギーを超える。そして、ウイルスの膜と細胞膜を融合（膜融合）させることで細胞への侵入を成し遂げる（図 1）。宿主細胞の細胞膜はリン脂質二重膜から構成されている。リン酸基は親水性の頭部と 2 本の疎水性の脂肪酸を尾部に有する構造を取っており、頭部を細胞の外側に、尾部を内側にして二層を作って並んでいる。細胞はフリップフラップ運動により恒常的にリン酸基を動かす



1. ウイルスと宿主細胞が出会うと、gp120(HIV-1)と CD4(宿主細胞)が結合する
2. gp120はケモカイン受容体CXCR4/CCR5と結合する
3. 感染のトリガーとなり、HIV-1は細胞内に侵入する

図 1 HIV-1 と宿主細胞の膜融合

ており、細胞内外からの物質の取り込みやシグナル伝達等、様々な生命活動維持のために働く。細胞膜上にはスフィンゴ脂質とコレステロールに富んだ脂質ラフトが存在しており⁴⁾、細胞膜の中で筏のように浮かんでいる。脂質ラフトは、HIV-1 感染に必須である CD4, CXCR4, CCR5 等の様々な膜タンパクを乗せて機能しているため（図 2）、HIV-1 感染とも密接に関わっている⁵⁾。細胞膜の流動性が上昇すると、脂質ラフトが細胞膜上のある特定の部位に局在（クラスター形成）することが報告されており⁶⁾、我々はこれまでに HIV-1 感染症治療の標的として膜の流動性に着目し、薬剤のスクリーニングを行ってきた。

III. 細胞膜流動性の測定

これまでに日本脳炎ウイルス⁷⁾やインフルエンザウイルス⁸⁾が宿主細胞に感染する際に宿主細胞の膜流動性を増加させ PI3K 経路の活性化を促し、細胞内侵入を活性化させることが報告されている。HIV-1 感染においても、細胞膜流動性の制御、すなわち細胞膜の安定化がウイルスの感染性を抑制することが報告されている³⁾。そこで我々は細胞膜流動性を制御する薬剤のスクリーニングとして蛍光偏光解消法を用いた細胞膜流動性の測定を行った⁹⁾。まず、T 細胞株(MOLT4)を DPH (1, 6-diphenyl-1, 3, 5-hexatriene) で染色後、薬剤を添加し、添加後 10 分間の細胞膜流動性の変化を F4500 (HITACHI, Japan) 分光蛍光光度計を用いて測定した。偏光度の測定は、励起波長 357 nm / 蛍光波長 432 nm を用いた。膜流動性の測定には、まず G 値（補正係数）を測定する。励起側偏光子 90°, 蛍光側偏光子 90°の時のスペクトル ($i_{//}$) と、励起側偏光子 90°, 蛍光側偏光子 0°の時のスペクトル ($i_{\perp}$) を測定し、

$$G = i_{\perp} / i_{//}$$

の値を 3 回測定してその平均値を G 値とする。次に P 値（蛍光偏光度）を測定する。励起側偏光子 0°, 蛍光

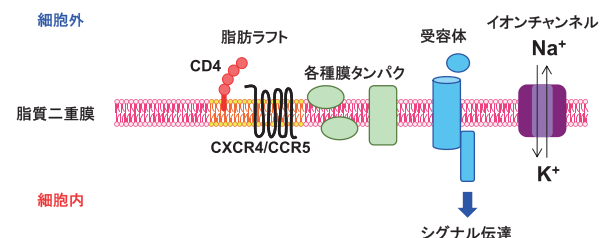


図 2 細胞膜の構造と脂質ラフト

側偏光子 0° の時のスペクトル ($I \parallel (\lambda)$) と、励起側偏光子 0° 、蛍光側偏光子 90° の時のスペクトル ($I \perp (\lambda)$) を測定し、

$$P = I \parallel (\lambda) - G \cdot I \perp (\lambda) / I \parallel (\lambda) + G \cdot I \perp (\lambda)$$

の値を P 値とする。P 値が小さいほど膜流動性が高いことを示し、大きいほど膜流動性が低下していることを示す。我々はこの手法を用いて細胞膜流動性を低下させ、細胞膜を安定化させる薬剤として Cepharanthine (CEP) 及び GUT-70 を同定し (図 3)、以下の実験に用いたので、これについて述べることにする。

IV. Cell-cell fusion inhibition assay

HIV-1 感染症研究において、感染初期のイベントであるウイルス侵入過程が重要であるが、感染細胞と非感染細胞の細胞融合 (Cell fusion) は特に免疫系の崩壊及びウイルスの増殖と密接に関わっている。HIV-1 はレトロウイルス科に属しており、P3 レベルの実験室でないと取り扱うことができない。そのため、国内における実験施設は限られており、取扱者への感染の危険性もある。そこで我々はテトラサイクリン誘導的に (Tet-Off) HIV-1 エンベロープタンパク (Env) を発現した T 細胞株 (Jurkat_{HXBc2} Jurkat_{522F/Y})¹⁰⁾ と対照となる T 細胞株 (MOLT4) を蛍光色素で染色後、共培養すると細胞融合が起こるといふ in vitro モデル (図 4A) を用いて薬剤の細胞融合抑制効果を評価した。

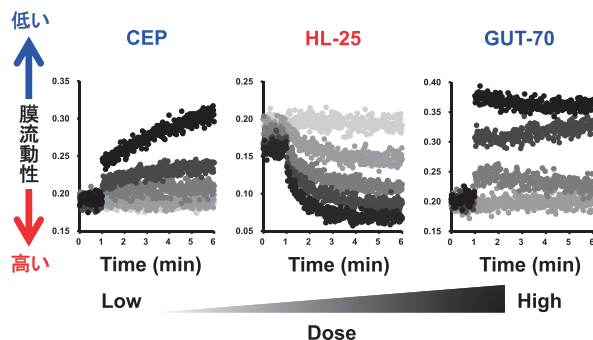


図 3 細胞膜流動性の測定

誘導性 Env 発現 T 細胞と標的細胞は PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kit, PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit (Sigma Aldrich) を用いて各々染色した。融合した細胞は赤と緑がマージして黄色を呈し、経時的な細胞融合を蛍光顕微鏡で観察することが出来る (図 4B)。また、融合した細胞は FL1 及び FL2 ダブルポジ

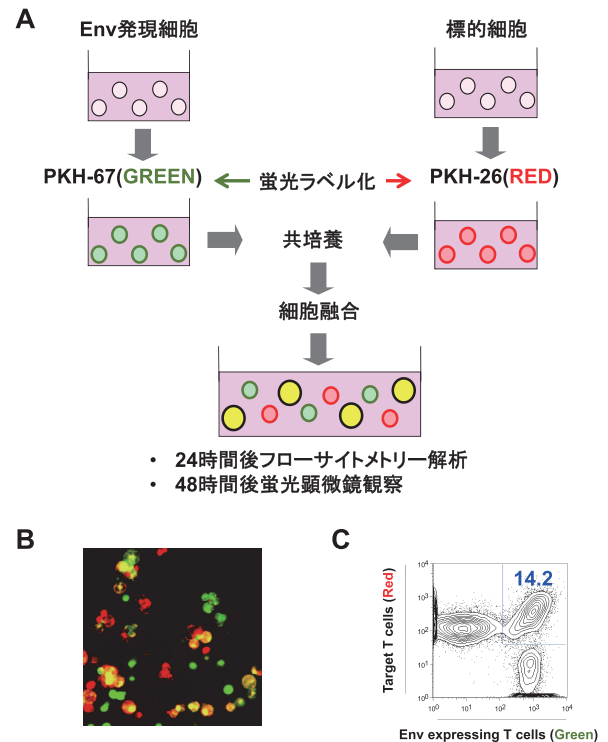


図 4 Cell-cell fusion inhibition assay

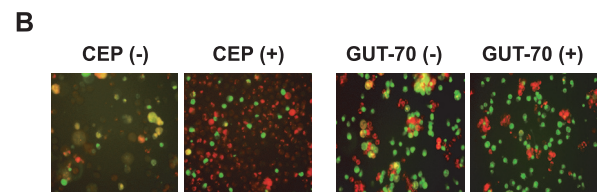
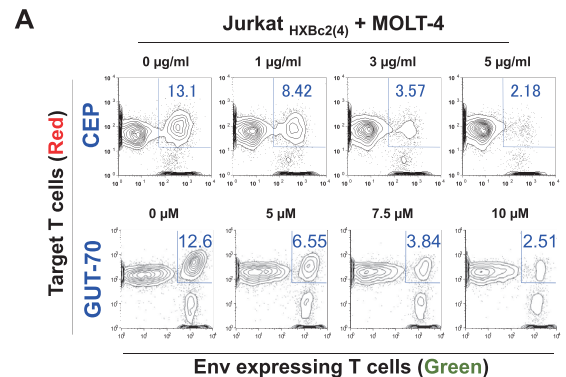


図 5 参考文献 10, 11 から改編

タイプの分画に現れるため、フローサイトメトリー解析にて定量することが出来る (図 4C)。さらに、この実験は生ウイルスではなくウイルス由来タンパクを用いるため、P2 レベルの実験室での取り扱いが可能である。この細胞融合を標的とした新規ウイルス侵入阻害薬として、CEP¹¹⁾ 及び GUT-70¹²⁾ が同定された (図 5)。

V. おわりに

フローサイトメトリーにより、ウイルス侵入阻害薬の迅速なスクリーニングが可能であることを示し、本スクリーニング系によりいくつかの薬剤の有用性が確認された。薬剤の迅速なスクリーニングは、その後の臨床応用に至るまでの時間を短縮することが可能であり、さらなる薬剤の発見が期待される。最近ではローダー等により一度に多くのサンプル解析が可能なフローサイトメトリーが増えており、フローサイトメトリーを用いた薬剤スクリーニング系は、非常に有用なツールとなることが期待される。本総説は第 24 回日本サイトメトリー学会学術集会 (野村昌作会長, 大阪) 一般演題「免疫疾患」(座長: 松田達志先生) で発表された内容等をまとめたものである。

文 献

1. Palella FJ, Jr., Delaney KM, Moorman AC, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med*. 338 (13) : 853-860, 1998.
2. G.B. Melikyan. HIV entry: a game of hide-and-fuse? *Curr Opin Virol*. 4:1-7, 2014.
3. Harada S, Yusa K, Monde K, et al. Influence of membrane fluidity on human immunodeficiency virus type 1 entry. *Biochem Biophys Res Commun*. 329 (2) : 480-486, 2005.
4. Harder T, Scheiffele P, Verkade P, et al. Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol*. 141 (4) : 929-942, 1998.
5. Popik W, Alce TM, Au WC. Human immunodeficiency virus type 1 uses lipid raft-colocalized CD4 and chemokine receptors for productive entry into CD4(+) T cells. *J Virol*. 76 (10) : 4709-4722, 2002.
6. Komizu Y, Nakata S, Goto K, et al. Clustering of Lipid Rafts in Plasma Membranes by Hybrid Liposomes for Leukemia Cells along with Apoptosis. *Chemistry letters*. 39 (12) : 1291-1293, 2010.
7. Das S, Chakraborty S, Basu A. Critical role of lipid rafts in virus entry and activation of phosphoinositide 3' kinase/Akt signaling during early stages of Japanese encephalitis virus infection in neural stem/progenitor cells. *J Neurochem*. 115 (2) : 537-549, 2010.
8. Fujioka Y, Tsuda M, Hattori T, et al. The Ras-PI3K signaling pathway is involved in clathrin-independent endocytosis and the internalization of influenza viruses. *PLoS One*. 6 (1) : e16324, 2011.
9. Towata T, Komizu Y, Suzu S, et al. Highly selective fusion and accumulation of hybrid liposomes into primary effusion lymphoma cells along with induction of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 393 (3) : 445-448, 2010.
10. Cao J, Park IW, Cooper A, et al. Molecular determinants of acute single-cell lysis by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 70 (3) : 1340-1354, 1996.
11. Matsuda K, Hattori S, Komizu Y, et al. Cepharanthine inhibited HIV-1 cell-cell transmission and cell-free infection via modification of cell membrane fluidity. *Bioorg Med Chem Lett*. 24 (9) : 2115-2117, 2014.
12. Matsuda K, Hattori S, Kariya R, et al. Inhibition of HIV-1 entry by the tricyclic coumarin GUT-70 through the modification of membrane fluidity. *Biochem Biophys Res Commun*. 457 (3) : 288-294, 2014.

症例報告

免疫グロブリン重鎖別の軽鎖解析がクロナリティー判定に有用であった 悪性リンパ腫の1例

棚田 浩子, 池本 敏行, 田中 秀磨, 牧 亜矢子, 岡田 仁克

A case of malignant B-cell lymphoma showing abnormal ratio of κ/λ light chain detected by flow cytometric analysis

Hiroko Tanada, Toshiyuki Ikemoto, Hidema Tanaka, Ayako Maki, Yoshikatsu Okada

Osaka Medical College Hospital, Central Clinical Laboratory

Key words : κ/λ ratio, surface immunoglobulin, malignant lymphoma

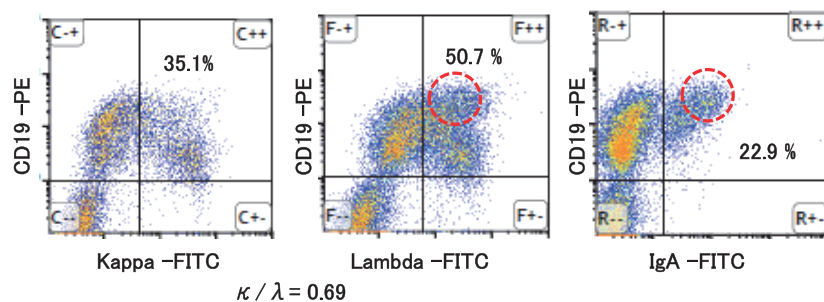
症例：80歳男性，主訴：右耳下腺腫脹。エコー検査で右耳下腺，右甲状腺に腫瘍性病変を認め悪性リンパ腫疑いで紹介入院となった。入院時検査所見：ALT 44IU/L，ALB 3.6g/gL，WBC 4850 / μ L，Mono 9% 以外は特に異常を認めず。病理組織診断：Extranodal marginal zone B-cell lymphoma，染色体分析：46 X Y，IGH 遺伝子再構成あり。免疫グロブリンの解析方法：3 color 法はCD45-PC5/CD19-PE/smIg-FITC，5 color 法は CD45-AAF750/CD19-PC5.5/CD5-APC or CD10-APC / κ -FITC / λ -PE，免疫グロブリン重鎖別軽鎖解析法は CD45-AAF750/CD19-PC5.5/Ig heavy chain-FITC/ κ -APC or λ -PE の組み合わせで行い，解析はすべて CD45gating で行った。結果：3color 法のサイトグラムでは IgA，L- λ の腫瘍細胞の存在が推測されたが κ/λ 比は 0.69 であった（図 a）。5 color 法では CD19⁺CD5⁻，CD19⁺CD10⁻，CD19⁺CD10⁺ 細胞における κ/λ 比は，それぞれ 0.66，0.58，0.84 であった（図 b）。免疫グロブリン

重鎖別軽鎖解析法における κ/λ 比は，それぞれ IgM 0.85，IgD1.14，IgG 0.84，IgA 0.07 であり，IgA の軽鎖に明らかな偏りを認めた（図 c）。考察：一般的に κ/λ 比が 0.5 以下または 3.0 以上で軽鎖に偏りありと判断される^{1, 2)}。本症例では表面免疫グロブリン重鎖別の軽鎖解析がクロナリティーの判定に有効であった。本解析法は，正常 B 細胞が多数混在する悪性リンパ腫の診断や，その骨髓浸潤解析に有用である。

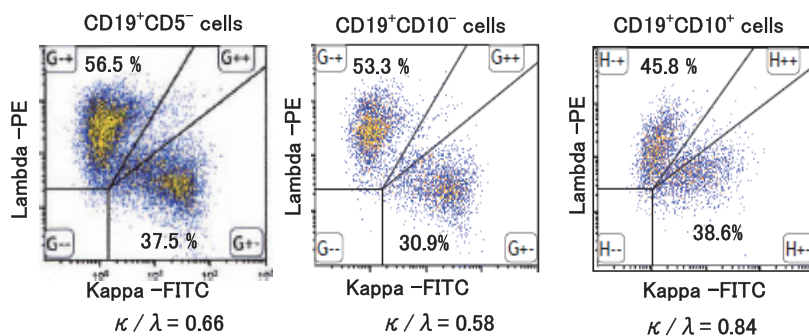
文 献

1. 川野千鶴，室井一男，和泉透，ほか：骨髓に浸潤した B 細胞性リンパ腫細胞の Flow cytometry を用いた検出，癌の臨床 43：1471-1476，1997
2. 室井一男，川野千鶴，和泉透，ほか：リンパ節における B 細胞サブセットの解析—非モノクローナル B 細胞における κ/λ 比—，Biotherapy13：395-397，1999

(a) 3 color法



(b) 5 color法



(c) 免疫グロブリン重鎖別軽鎖解析法

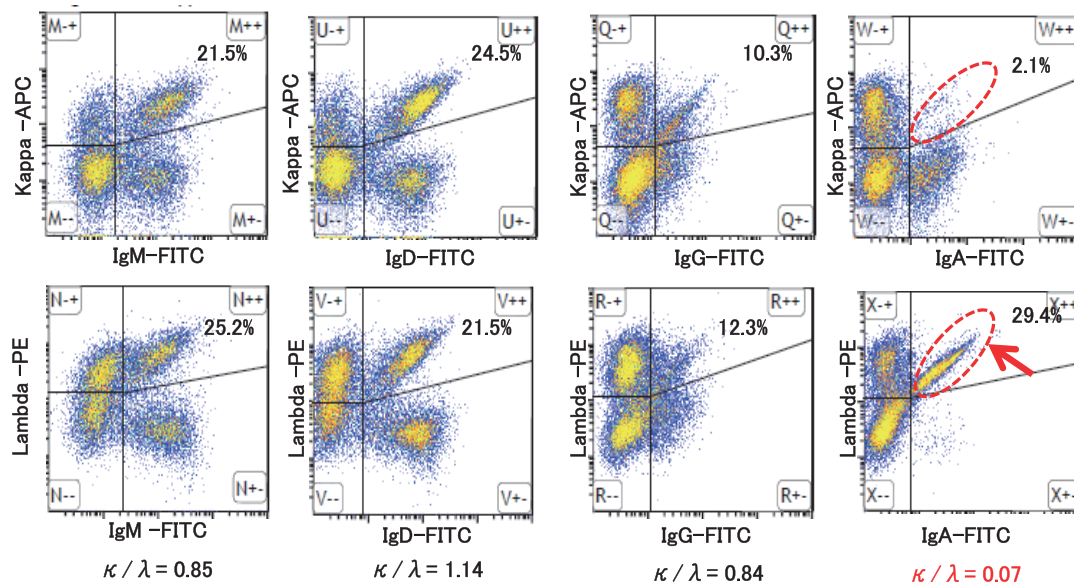


図 免疫グロブリン軽鎖偏りの解析

図 (a) 3color 法では CD19 強発現 IgA-Lambda 鎖の細胞集団の存在が考えられる (赤破線部)。