

## 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<sup>+</sup> myeloid DCs (mDCs), CD1c<sup>+</sup> 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- $\alpha$  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- $\alpha$  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 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (VD<sub>3</sub>) is an important immunomodulatory vitamin. VD<sub>3</sub> induces CD1c<sup>+</sup> mDCs to produce a vitamin A derivative, retinoic acid (RA). Furthermore, the CD1c<sup>+</sup> mDCs induce naïve CD4<sup>+</sup> T cells to differentiate into gut-homing Th2 cells in an RA-dependent manner. The “vitamin D – CD1c<sup>+</sup> 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) をもつという形態の特徴を共有するが、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<sup>1)</sup>。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

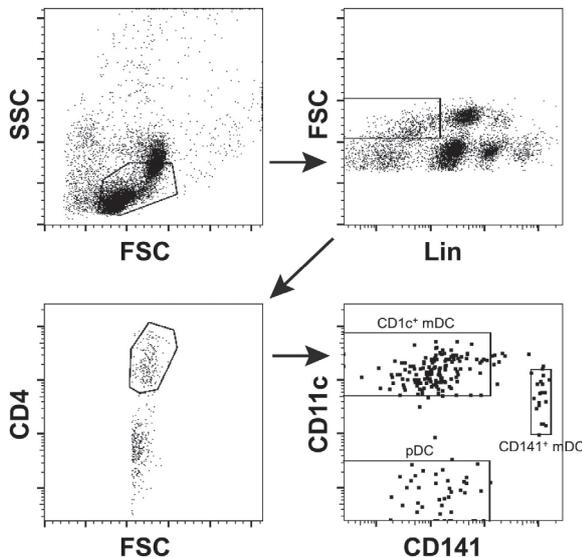


図1 フローサイトメトリーによるヒト末梢血樹状細胞(DC)サブセットの同定

リンパ球と単球の中間の前方散乱光を持ち、lineage marker 陰性 (Lin<sup>-</sup>)、CD4 陽性の分画にゲートをかけると、CD141<sup>+</sup> mDC、CD1c<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> mDC と CD1c<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> T 細胞を刺激する能力が高い<sup>2)</sup>。これに対し、CD1c<sup>+</sup> 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) - $\alpha$  を産生するという際だった特徴を持つ<sup>3)</sup>。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<sup>4)</sup>、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<sup>5)</sup>。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<sup>6)</sup>。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- $\alpha$  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- $\alpha$  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- $\alpha$  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<sup>7)</sup>。したがって、pDC の IFN- $\alpha$  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- $\alpha$  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<sup>8)</sup> と pDC<sup>9)</sup> 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<sup>10)</sup>。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<sup>11)</sup>。

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- $\alpha$  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- $\alpha$  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)<sup>12)</sup>。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<sup>11)</sup>。

#### 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<sup>13)</sup> 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- $\alpha$  の産生を強力に抑制することを見いだした<sup>14)</sup>。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- $\alpha$  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<sup>15)</sup>。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- $\alpha$  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

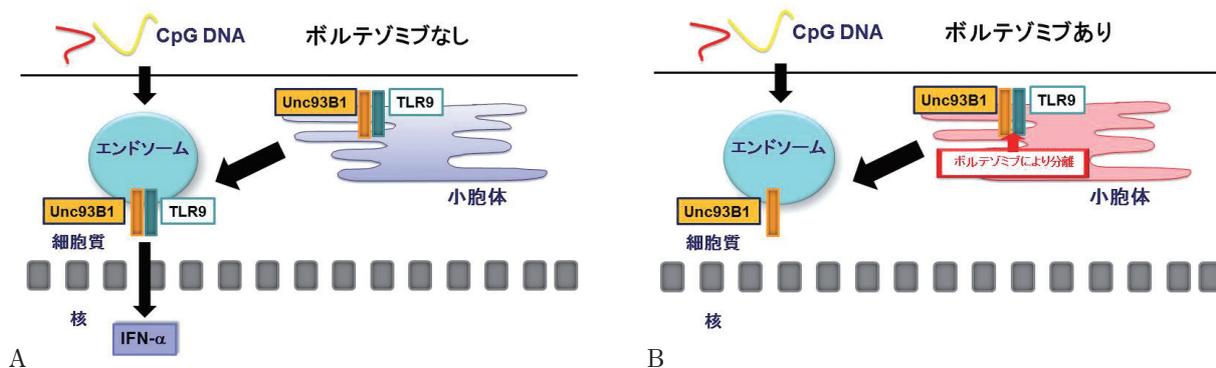


図 2 ボルテゾミブは TLR9 と Unc93B1 の小胞体からエンドソームへの協調的な移動を阻害する  
 定常状態では TLR9 は小胞体に存在するが、pDC が CpG DNA の刺激を受けると、TLR9 は小胞体膜分子 Unc93B1 とともにエンドソームに移動し、CpG DNA を認識して下流のシグナルを伝達し、IFN- $\alpha$  の産生を誘導する (A)。ところが、ボルテゾミブの存在下では、Unc93B1 の小胞体からエンドソームへの移動は阻害されないが、TLR9 の移動が阻害される。すなわち、Unc93B1 と TLR9 が分離してしまう (B)。これにより、ボルテゾ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

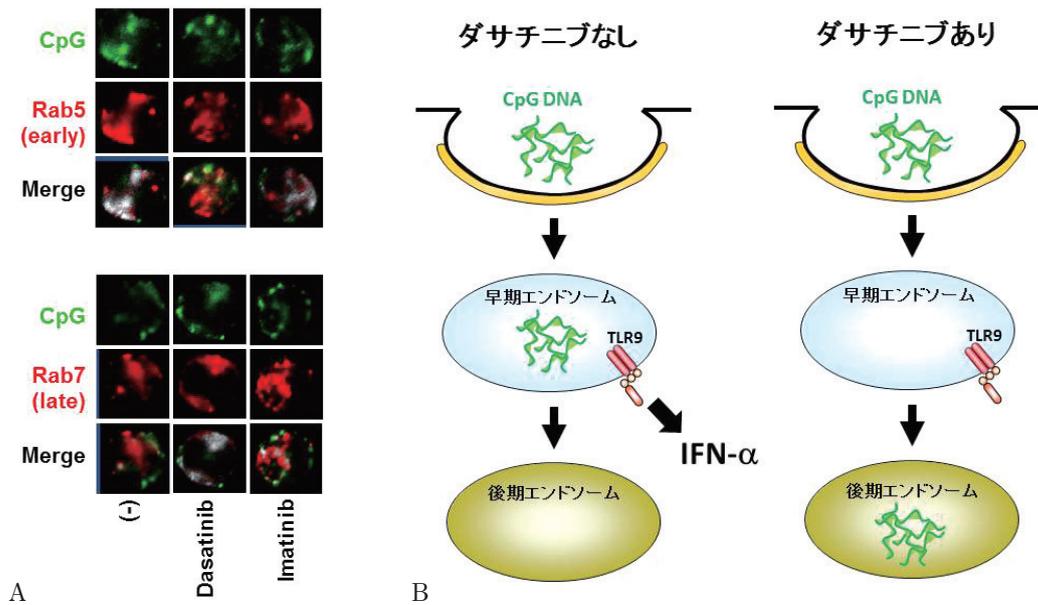


図3 ダサチニブはCpG DNAの早期エンドソームへの滞留を阻害する

(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、これらが重なる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。

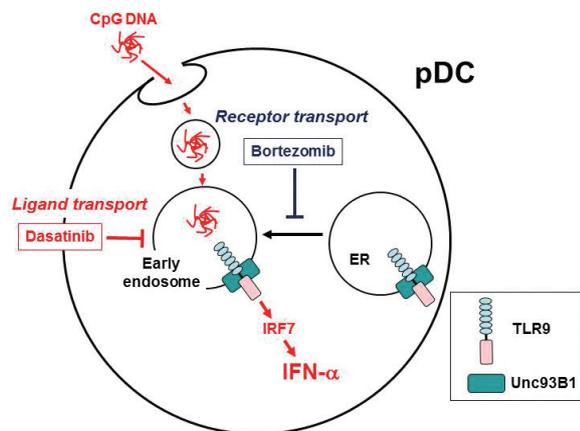


図4 小胞機能を標的としたpDCの機能制御

「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- $\alpha$ 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- $\alpha$ 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- $\alpha$ 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<sup>16)</sup>、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

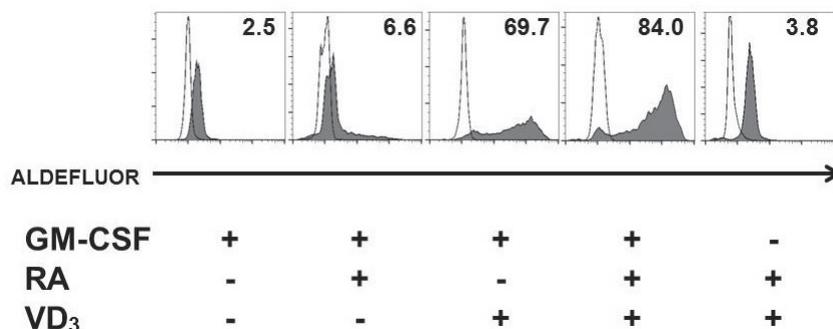


図5 GM-CSF + VD<sub>3</sub> 刺激が CD1c<sup>+</sup> mDC に RA 高産生能を誘導する

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<sup>®</sup> 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<sup>17)</sup>。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<sup>18)</sup>。

前述のように、ヒト DC には、大きく CD1c<sup>+</sup> mDC, CD141<sup>+</sup> mDC, pDC という 3 つのサブセットがあるが、この中で、CD1c<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> mDC のみが、GM-CSF の存在下で活性化ビタミン D<sub>3</sub> (VD<sub>3</sub>) 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 VD<sub>3</sub> 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、VD<sub>3</sub> 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、VD<sub>3</sub> 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<sup>+</sup> T 細胞の Th2 細胞への分化を誘導した。

ヒト CD1c<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> mDC がヒトの RA 高産生 DC であり、CD1c<sup>+</sup> mDC, ビタミン A, ビタミン D という 3

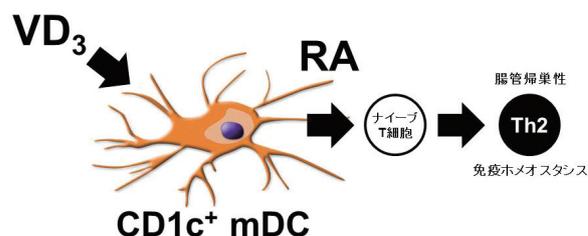


図6 「ビタミン D → CD1c<sup>+</sup> mDC → レチノイン酸」系による腸管免疫ホメオスタシス維持のモデル

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<sup>19)</sup>、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<sup>20)</sup>、「ビタミン D → CD1c<sup>+</sup> 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. *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.