

制御性樹状細胞による CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺制御性
T 細胞の誘導を介した皮膚慢性移植片対宿主病に
対する防御効果

藤田 成晴

目次

I. 要旨	1
II. 略号	2
III. 序論	4
(1) 同種異系骨髄移植と移植片対宿主病	
(2) 免疫寛容と制御性 T 細胞	
(3) 樹状細胞	
(3-1) 樹状細胞による免疫活性化	
(3-2) 樹状細胞の抗原処理と抗原提示の特性	
(3-3) 樹状細胞の組織分布	
(3-4) 樹状細胞の機能的分類	
(3-5) ヒト樹状細胞のサブセットと機能	
(3-6) マウス樹状細胞のサブセットと機能	
(3-7) 樹状細胞による免疫寛容の誘導	
IV. 目的	11
V. 材料と方法	12
(1) マウス	
(2) 樹状細胞の調製	
(3) フローサイトメトリー法	
(4) CD4 ⁺ T 細胞及びそのサブセットの分離	
(5) CD4 ⁺ T 細胞の <i>in vitro</i> プライミング	
(6) 抗原提示試験	
(7) 慢性移植片対宿主病モデル及び評価	
(8) <i>In vivo</i> における CD4 ⁺ CD25 ⁻ Foxp3 ⁻ T 細胞から CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ 制御性 T 細胞の誘導	
(9) 制御性 T 細胞の機能解析	
(10) 統計学的解析	

VI. 結果	17
(1) 制御性樹状細胞による同種異系細胞培養における CD4 ⁺ CD25 ⁻ Foxp3 ⁻ T 細胞から CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ 制御性 T 細胞の誘導	
(2) 制御性樹状細胞による同種異系骨髄移植での慢性移植片対宿主病に対する防御効果	
(3) 制御性樹状細胞の慢性移植片対宿主病の防御効果における in vivo で誘導された同種異系反応性 CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ 制御性 T 細胞の関与	
(4) 制御性樹状細胞による CD4 ⁺ CD25 ⁻ Foxp3 ⁻ T 細胞から CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ 制御性 T 細胞の抗原特異的な誘導	
VII. 考察	22
VIII. 結語	25
IX. 図表	26
X. 参考文献	40
XI. 謝辞	44

I. 要旨

慢性移植片対宿主病(chronic graft-versus-host disease; cGVHD)は同種異系骨髄移植(allogeneic bone marrow transplantation; alloBMT)における罹患・死亡の主要な原因となっているが、有効な治療戦略は未だ確立されていない。本研究では、マウス骨髄由来樹状細胞(dendritic cells; DCs)を改変してこれまでに知られている免疫寛容誘導性樹状細胞よりも強力な免疫制御能をもつ制御性樹状細胞(regulatory DCs; DC_{regs})を作製し、マウス主要組織適合抗原複合体一致・マイナー組織適合抗原不一致 alloBMT 実験モデルにおける cGVHD に対する DC_{regs} の治療効果について検討を行った。

alloBMT 後のレシピエントマウスへのレシピエントタイプ活性化成熟樹状細胞(mature DCs; mDCs)の投与では皮膚 cGVHD が増悪したが、レシピエントタイプ DC_{regs} の投与では免疫抑制剤ラパマイシンよりも皮膚 cGVHD に対する著明な防御効果が認められた。さらに、レシピエントマウスの解析によりレシピエントタイプ DC_{regs} の cGVHD 防御効果にはドナーマウス由来の同種異系反応性 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 細胞から CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺制御性 T(regulatory T; T_R)細胞への末梢誘導が関与していることが示唆された。

以上の結果から、alloBMT での cGVHD に対する DC_{regs} を用いた免疫細胞療法は CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R 細胞による免疫寛容の誘導を介した有用な治療戦略として期待された。

II. 略号

aGVHD; acute graft-versus-host disease; 急性移植片対宿主病
alloBMT; allogeneic bone marrow transplantation; 同種異系骨髄移植
APCs; antigen-presenting cell; 抗原提示細胞
 β_2m ; β_2 microglobulin; β_2 ミクログロブリン
CCL; CC chemokine ligand; CC ケモカインリガンド
CCR; CC chemokine receptor; CC ケモカイン受容体
CD; cluster of differentiation; 分化抗原群
cDCs; conventional dendritic cells; 通常型樹状細胞
cGVHD; chronic graft-versus-host disease; 慢性移植片対宿主病
CpG; cytosine-phosphate-guanine; シトシン-リン酸-グアニン
CTL; cytotoxic T lymphocyte; 細胞傷害性 T 細胞
DC_{regs}; regulatory dendritic cells; 制御性樹状細胞
DCs; dendritic cells; 樹状細胞
ELISA; enzyme-linked immunosorbent assay; 酵素免疫測定法
FACS; fluorescence-activated cell sorting; 蛍光励起細胞分取法
FKBP; FK506 binding protein; FK506 結合蛋白
Foxp3; forkhead box p3; フォークヘッドボックス p3 転写因子
GM-CSF; granulocyte macrophage-colony-stimulating factor; 顆粒球マクロ
ファージコロニー刺激因子
GVHD; graft-versus-host disease; 移植片対宿主病
HLA; human leukocyte antigen; ヒト白血球抗原
iDCs; immature dendritic cells; 未熟樹状細胞
IFN; interferon; インターフェロン
Ig; immunoglobulin; 免疫グロブリン
Ii; invariant chain; インバリアント鎖
IL; interleukin; インターロイキン
intDCs; interstitial DCs; 間質樹状細胞
IPCs; interferon-producing cells; インターフェロン産生細胞
iT_R; inducible regulatory T; 誘導性制御性 T
LCs; Langerhans cells; ランゲルハンス細胞
LPS; lipopolysaccharide; リポポリ多糖

LT; leukotriene; ロイコトリエン
mAb; monoclonal antibody; モノクローナル抗体
MACS; magnetic cell sorting; 磁気細胞分離法
MII C; MHC class II compartment; MHC クラス II コンパートメント
mDCs; mature dendritic cells; 成熟樹状細胞
MHC; major histocompatibility complex; 主要組織適合抗原複合体
miHAg; minor histocompatibility antigen; マイナー組織適合抗原
mTOR; mammalian target of rapamycin; 哺乳類ラパマイシン標的蛋白
nT_R; naturally occurring regulatory T; 内在性制御性 T
ODN; oligodeoxynucleotide; オリゴデオキシヌクレオチド
OVA; ovalbumin; 卵白アルブミン
pDCs; plasmacytoid DCs; 形質細胞様樹状細胞
PRR; pattern-recognition receptor; パターン認識受容体
Rag2; recombination activating gene 2; 再構成活性化遺伝子 2
RAPA; rapamycin (sirolimus); ラパマイシン (シロリムス)
SPF; specific pathogen free; 特定病原体不在
TAP; transporter associated with antigen processing; 抗原処理関連トランスポーター
TBI; total body irradiation; 全身放射線照射
TCR; T cell receptor; T 細胞受容体
TGF; transforming growth factor; 形質転換成長因子
T_H1; T helper type 1; 1 型ヘルパー T
T_H2; T helper type 2; 2 型ヘルパー T
T_H3; T helper type 3; 3 型ヘルパー T
T_H17; T helper type 17; 17 型ヘルパー T
TLR; toll-like receptor; toll 様受容体
T_R; regulatory T; 制御性 T
Tr1; T regulatory type 1; 1 型制御性 T

Ⅲ. 序論

(1) 同種異系骨髄移植と移植片対宿主病

同種異系骨髄移植(allogeneic bone marrow transplantation; alloBMT)は白血病や遺伝性疾患の有効な治療法であるが、その予後の改善のためには適合ドナーの迅速な同定や日和見感染及び移植片対宿主病(graft-versus-host disease; GVHD)の防止が不可欠である¹⁻³。GVHDはドナー骨髄移植片中の同種異系反応性T細胞の活性化がその主たる原因であり、GVHDを軽減するための治療戦略に関してはこれまで主に免疫抑制剤や骨髄移植片からのドナーT細胞の体外式除去法の開発に力が注がれてきた¹⁻³。これらの治療戦略はGVHDを軽減することが報告されているものの、相反して移植片拒絶・重度免疫抑制・致死性感染症の発症率の増加や重篤な副作用が認められる¹⁻³。

GVHDは急性及び慢性の型に分けられ、これらは発症及び病態において機序が異なるものと考えられている³⁻⁵。急性GVHD(acute GVHD; aGVHD)及び慢性GVHD(chronic GVHD; cGVHD)は慣例的には発症時期から診断され、cGVHDは移植後100日以降に発症するものとされる³⁻⁵。しかしながら、cGVHDでは明確な臨床病理学的特徴が認められるため、発症時期に関わらずこれらの症状に基づいて診断されることも多い³⁻⁵。aGVHDでは典型的には皮膚・消化管・肝臓の3大主要標的臓器・組織に同種異系反応性T細胞による上皮細胞障害が引き起こされ、皮膚潮紅・紅皮症、下痢・下血、胆汁鬱滞によるビリルビン上昇等の症状が認められ、全身の重症度は各臓器の重症度を総合してgrade I-IVに分類される⁶。grade III以上の重症aGVHDは我が国ではヒト白血球抗原(human leukocyte antigen; HLA)適合同胞間移植では約8%、HLA適合非血縁者移植では約13%に発症がみられると報告されている⁷。これに対し、cGVHDではaGVHDに引き続いて発症するprogressive型、aGVHDが改善した後に発症するquiescent型、aGVHDに罹患することなくcGVHDのみを発症するde novo型の発症形態がみられ、同種異系反応性T細胞に加えて自己反応性T細胞の出現が主体となり、上皮細胞障害の他に線維芽細胞の増加とコラーゲンの増生が引き起こされ、皮膚硬化、消化管や唾液腺や涙腺等の外分泌腺障害、筋膜炎、胆管硬化による肝疾患、肺の閉塞性細気管支炎等の自己免疫疾患様の症状が特徴的に認められる³⁻⁵。cGVHDの重症度は従来皮膚と肝臓の障害の程度を中心に限局型と広汎型に分類されてきたが、各臓器別の障害程度のスコア化に基づいた新たな分類も提唱されており³、我が国ではHLA適合同胞間移植では約41%、HLA適合非血縁者移植では約

44%に発症がみられると報告されている⁷。

また、ヒト GVHD の病態の解明のためこれまでに種々のマウスモデルが報告されている。主要組織適合抗原複合体(major histocompatibility complex; MHC) 不一致マウス alloBMT における aGVHD モデルでは、脊柱後弯症、体重減少、皮膚・消化管・肝臓の炎症病理所見がみられて死に至るが、これらのマウスモデルを用いて APCs やドナー由来 T 細胞によるレシピエント組織の障害機序、サイトカインの関与、ドナー由来制御性 T(regulatory T; T_R) 細胞の役割等が検討されてきた^{4,5}。一方で、cGVHD の有効な治療法の開発はヒト cGVHD に類似したマウス cGVHD モデルが限られていることもあり aGVHD と比較して非常に遅れているのが現状である。Schlomchik らはマウスにおいて、BALB/c マウス(H-2^d)をレシピエントとし、MHC は一致しているがマイナー組織適合抗原(minor histocompatibility antigen; miHAg)が不一致である B10.D2 マウス(H-2^d)をドナーとした allo BMT における cGVHD モデルを確立した^{4,5}。このマウス cGVHD モデルでは、MHC 不一致マウス allo BMT における aGVHD モデルと比較して移植後 21 日目前後と遅発性に発症がみられ、その症状にはヒト cGVHD と共通する多くの特徴が認められた。すなわち、コラーゲン沈着による皮膚線維化、苔癬様上皮浸潤、毛包脱落、皮下脂肪消失、皮膚単核球浸潤が顕著な症状として認められ、肝障害については肝内外胆管の単核球浸潤とそれに続く胆管壁の線維性肥厚と硬化が認められた^{4,5}。さらに、肺線維症及び唾液腺・涙腺の破壊も認められ、現在までにおいてヒト de novo 型 cGVHD に最も病態が類似するマウスモデルとしてその詳細な免疫学的解析が行われている^{4,5}。また、これらのマウス alloBMT モデルにおいて、aGVHD ではドナー由来の CD8⁺T 細胞と残存するレシピエント抗原提示細胞(antigen-presenting cells; APCs)が必要とされるのに対して、cGVHD ではドナー由来 APCs もしくはレシピエント APCs がドナー由来 CD4⁺T 細胞を介して重要な役割を担っていることが示唆されている^{4,5}。

(2)免疫寛容と制御性 T 細胞

自己・非自己に対する免疫応答の種類は末梢ナイーブ CD4⁺T 細胞から分化誘導されるエフェクター T 細胞によって決定されている。エフェクター T 細胞は IFN- γ 等を産生する 1 型ヘルパー T(T helper type 1; T_H1)細胞、インターロイキン-4(interleukin-4; IL-4)、IL-5、IL-10、IL-13 等を産生する 2 型ヘルパー T(T helper type 2; T_H2)細胞、IL-17 等を産生する 17 型ヘルパー T(T helper

type 17; T_H17) 細胞等に分類され、それぞれ細胞性免疫、液性免疫、自己免疫疾患・炎症応答の誘導に重要な役割を担っている⁸(図 1)。

一方でこれらの免疫応答は様々なフィードバック機構によって制御され、免疫学的恒常性が維持されており、これらの破綻は自己免疫疾患等の免疫疾患を引き起こすと考えられている。免疫学的恒常性の維持には免疫寛容が重要な役割を担っており、その機序は中枢性免疫寛容(central tolerance)と末梢性免疫寛容(peripheral tolerance)に分けられる^{9,10}。中枢性寛容には胸腺での負の選択(negative selection)による自己反応性 T 細胞のクローン除去(clonal deletion)が関与する^{9,10}。一方、末梢性免疫寛容にはクローン除去や不活性化(アナジー; anergy)とともに、 T_R 細胞を介した能動的抑制が関わっている^{8,10}。 T_R 細胞は免疫抑制能をもち、胸腺において分化誘導される内在性 T_R (naturally occurring T_R ; nT_R)細胞と、種々の刺激で末梢ナイーブ $CD4^+$ T 細胞から分化誘導される誘導性 T_R (inducible T_R ; iT_R)細胞に分けられる¹¹。すなわち、胸腺由来 $CD4^+CD25^+Foxp3^+nT_R$ 細胞は末梢 $CD4^+$ T 細胞の 5~10%を占め、その生成には胸腺の上皮細胞や樹状細胞等の APCs に発現する MHC クラス II 分子への高親和性と $CD80 \cdot CD86$ と $CD28$ 等の分子間での共刺激が重要であると考えられている¹¹(図 1)。一方で環境条件によって $CD4^+$ ナイーブ T 細胞から誘導される T_R 細胞としては、T 細胞受容体(T cell receptor; TCR)- $CD3$ 複合体を介する刺激と IL-10・活性化ビタミン D_3 ・デキサメタゾン(dexamethasone)・ $CD46$ リガンド結合等の刺激によって誘導される IL-10 産生 1 型制御性 T(T regulatory type 1; $Tr1$)細胞や、経口抗原投与によって粘膜組織で誘導される形質転換成長因子- β (transforming growth factor- β ; $TGF-\beta$)産生 3 型ヘルパー T(T helper type 3; T_H3)細胞等が知られており、これらはともに Foxp3 が陰性である¹¹。さらに TCR- $CD3$ 複合体を介する刺激と $TGF-\beta$ の刺激によって $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ ナイーブ T 細胞から $CD4^+CD25^+Foxp3^+iT_R$ 細胞が誘導されることが知られている¹¹(図 1)。

(3) 樹状細胞

生体における最も強力な APCs である樹状細胞(dendritic cells; DCs)は樹状突起を有する形態をもち(図 2)、 $CD3 \cdot CD14 \cdot CD16 \cdot CD19$ 等の系統(lineage)表面マーカー分子が陰性で MHC クラス II 分子が陽性の白血球であり、造血幹細胞より骨髓球系もしくはリンパ球系分化経路を経て、成熟段階の異なる多様なサブセットとして末梢組織やリンパ組織にごく低い分布細胞密度(単核球の 1~

2%)で広く存在している^{12,13}。

(3-1) 樹状細胞による免疫活性化

未熟樹状細胞 (immature DCs; iDCs) は病原性微生物等の外来抗原が侵襲した炎症組織へ移行し、マンノース受容体や toll 様受容体 (toll-like receptor; TLR) 等の種々のパターン認識受容体 (pattern-recognition receptors; PRRs) を介してこれらを感じ取り細胞内に取り込んで抗原処理を行い、微小炎症環境下で MHC 分子と CD40 や CD80・CD86 等の共刺激分子や共刺激分子リガンドの発現増加を伴って成熟樹状細胞 (mature DCs; mDCs) へと成熟する^{12,13}。さらに、mDCs は二次リンパ組織に移行し、MHC 分子-抗原ペプチド複合体をナイーブ T 細胞の TCR-CD3 複合体に提示して抗原刺激を与えると同時に CD28 と CD80・CD86 等の共刺激分子と共刺激分子リガンド間での結合による共刺激を与え、エフェクター T 細胞を分化誘導する^{12,13} (図 3)。

(3-2) 樹状細胞の抗原処理と抗原提示の特性

抗原処理と抗原提示における DCs の特徴として、クロスプレゼンテーションの機序が存在する。すなわち、MHC クラス I 分子を発現する全ての細胞では癌やウイルスの遺伝子産物は内在性抗原として MHC クラス I 依存性経路を経て CD8⁺T 細胞に対して抗原提示されるのに対し、MHC クラス II 分子を発現する DCs・B 細胞・マクロファージなどのプロフェッショナルな APCs では捕食された外来性抗原は MHC クラス II 依存性経路を経て CD4⁺T 細胞に対して抗原提示される。これらのプロフェッショナルな APCs の中で DCs のみは捕食した外来性抗原を MHC クラス I 依存性経路を経て CD8⁺T 細胞に対して抗原提示することが可能であり、クロスプレゼンテーションとよばれ極めて注目されている¹⁴ (図 4)。このように、DCs は最も強力な T 細胞活性化能を有し自然免疫系と獲得免疫系を繋ぐ重要な免疫細胞として認識されている^{12,13}。

(3-3) 樹状細胞の組織分布

DCs の生体組織分布としては、末梢組織では皮膚において表皮のランゲルハンス細胞 (Langerhans cells; LCs) や真皮の真皮樹状細胞 (dermal DCs) が認められ、肺・肝臓・脾臓・腎臓・心臓・消化管等の組織中において間質樹状細胞 (interstitial DCs; intDCs) が認められる。これらは MHC 分子と共刺激分子の

発現が低いことから iDCs であると考えられている¹³。一方、リンパ組織ではリンパ節において抗原提示を介して抗原高親和性 B 細胞の選択に関わる濾胞樹状細胞 (follicular DCs) や、MHC 分子と共刺激分子の発現が比較的高く T 細胞活性化能を有する胚中心樹状細胞 (germinal center DCs) や、炎症性末梢組織にて抗原を捕食した LCs・真皮樹状細胞・intDCs が mDCs となってリンパ管を經由して所属二次リンパ節の T 細胞領域へと移動した相互連結性嵌入細胞 (interdigitating DCs) が認められ、胸腺において T 細胞の負の選択に関与しているとされる胸腺樹状細胞 (thymic DCs) が認められる¹³。さらに、循環系では末梢血の末梢血樹状細胞 (peripheral blood DCs) が存在し、輸入リンパ液のヴェール細胞 (veiled cells) が存在する¹³。

(3-4) 樹状細胞の機能的分類

これらの DCs は系統的には現在では 2 つのグループに大別されている。すなわち、もとより樹状突起を発現した形態を有する通常型樹状細胞 (conventional DCs; cDCs) と、形質細胞様の球状の形態を有し活性化後に初めて樹状突起を発現する形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid DCs; pDCs) に分けられ、前者は極めて高い抗原提示機能と T 細胞活性化能を示すのに対して、後者はインターフェロン- α/β (interferon- α/β ; IFN- α/β) を多量に産生する¹³。

(3-5) ヒト樹状細胞のサブセットと機能

ヒト末梢血においては、cDCs としては LCs の前駆細胞である $CD4^+CD1a^+CD11c^{high}CD45RO^+$ 骨髓球系サブセットと intDCs の前駆細胞である $CD4^+CD1a^-CD11c^{low}CD45RO^+$ 骨髓球系サブセットが認められ、これらは微小炎症環境の影響により T_H1 免疫応答や T_H2 免疫応答を誘導すると考えられている¹³ (図 5)。一方、pDCs としては $CD4^+CD11c^-CD45RA^+$ リンパ球系サブセットが認められ、ウイルス刺激等により多量の IFN- α/β を産生し、 T_H1 免疫応答や T_H2 免疫応答のみならず免疫寛容を誘導することが示唆されている¹³ (図 5)。

(3-6) マウス樹状細胞のサブセットと機能

マウスリンパ組織では 5 種類の cDCs と pDCs が認められる。脾臓では T 細胞領域に $CD4^-CD8^{\alpha high}CD205^+CD11b^-$ リンパ球系サブセットが分布しており T_H1 免疫応答を誘導することに加えて可溶性抗原の MHC クラス I 分子を介したクロスプ

レゼンテーションにより細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte; CTL) を活性化すると考えられており、また、辺縁帯に $CD4^+CD8\alpha^-CD205^-CD11b^+$ 骨髄球系サブセットと $CD4^-CD8\alpha^-CD205^-CD11b^+$ 骨髄球系サブセットが分布しており T_H2 免疫応答を誘導すると考えられている¹³ (図 5)。また、リンパ節の T 細胞領域ではこれらに加えてさらに末梢の cDCs が移入した 2 種類の相互連結性嵌入細胞が認められ、Langerin 陽性の成熟 LCs である $CD4^-CD8\alpha^{low}CD205^+CD11b^+$ 骨髄球系サブセットが皮膚からの輸入リンパ管に存在し、成熟 intDCs である $CD4^-CD8\alpha^-CD205^+CD11b^+$ 骨髄球系サブセットが全てのリンパ節に存在し、これらは微小炎症環境要因により T_H1 免疫応答や T_H2 免疫応答を誘導すると考えられている¹³ (図 5)。一方、マウス pDCs は $CD11b^-B220^+Gr-1^+$ リンパ球系サブセットとして同定され、脾臓やリンパ組織全般に存在するとともに骨髄、末梢血、パイエル板でも認められる。マウス pDCs はウイルス刺激等による活性化により IFN- α/β 産生能を示すが、cDCs と比較して T 細胞活性化能がほとんど認められないことから APCs としての機能よりも IFN- α/β の産生を介した抗ウイルス応答に重要であると考えられている¹³ (図 5)。このように樹状細胞は成熟度や細胞系統多様性によるサブセット多様性 (subset heterogeneity) や機能可塑性 (functional plasticity) を反映して様々な免疫応答を誘導すると考えられている。

(3-7) 樹状細胞による免疫寛容の誘導

さらに、現在までの研究報告から従来 mDCs へ至る分化段階としてのみ捉えられてきた iDCs が in vivo の非炎症環境下において末梢性免疫寛容の誘導に関わっていることが示唆されている^{9,10,15,16}。すなわち、炎症環境下においてネクローシス死細胞を貪食した iDCs は mDCs に分化し、T 細胞にこれを抗原提示して免疫応答を惹起するが、非炎症環境下においてアポトーシス死細胞を貪食した iDCs は成熟をおこさずに T 細胞に抗原提示を行い、これらのクローン除去やアナジーを介して免疫寛容を誘導することが示されている¹⁶。また、IL-10 や活性化ビタミン D_3 等の様々な免疫抑制分子で処理した iDC は免疫寛容誘導性樹状細胞 (tolerogenic DCs) として、アナジー T 細胞や IL-10 産生 $Tr1$ 細胞の誘導、 $CD4^+CD25^+Foxp3^+nT_R$ 細胞の増幅を行うことが報告されている¹⁷⁻¹⁹。しかしながら、DC サブセットによる $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ ナイーブ T 細胞から $CD4^+CD25^+Foxp3^+T_R$ 細胞の誘導に関しては未だ不明である¹¹。また、これらの iDCs や tolerogenic DCs

は末梢性免疫寛容の誘導の機序により自己免疫疾患・拒絶反応・アレルギー性疾患・GVHD 等の免疫疾患への臨床応用の可能性も期待されるが、免疫疾患患者に投与するとその生体内において炎症環境下で機能的成熟を行って T 細胞制御機能が消失し、逆に免疫応答を増強して病態を悪化させる可能性が問題点として懸念される¹⁰。

IV. 目的

佐藤らはヒトとマウスにおいて、免疫疾患の治療への応用を目的として樹状細胞の改変を試み、炎症環境下においても従来の tolerogenic DCs よりも強力な T 細胞制御機能 (アナジー T 細胞・Tr1 細胞・CD4⁺CD25⁺T_R 細胞誘導能等) を示す制御性樹状細胞 (regulatory DCs; DC_{regs}) を開発した²⁰⁻²³。マウスにおいて DC_{regs} を用いた免疫細胞療法は alloBMT での aGVHD、アレルギー性喘息、敗血症に対して治療効果を示し、さらにその作用機序として DC_{regs} による CD4⁺T 細胞における抗原特異的なアナジーの誘導、Tr1 細胞・CD4⁺CD25⁺T_R 細胞の誘導が関与することを明らかにした²⁰⁻²³。

本研究では、alloBMT 後長期に亘って時に患者の生命を脅かす重篤な合併症として問題となり、ステロイドや免疫抑制剤等による治療にても改善が困難である cGVHD に対する新規免疫細胞療法の開発を目的として、マウス MHC 一致・マイナー組織適合抗原不一致 allo BMT における cGVHD モデルを用いて、これに対する DC_{regs} の制御効果について検討を行った。

V. 材料と方法

(1) マウス

BALB/c マウス(H-2^d)は Charles River Laboratories (Raleigh, NC) より購入した。B10.D2 マウス(H-2^d)は The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) より購入した。卵白アルブミン (ovalbumin; OVA) 特異的 TCR (KJ1-26 clonotype) を有する *Rag2*^{+/+}D011.10 BALB/c トランスジェニックマウス及び *Rag2*^{-/-}D011.10 BALB/c トランスジェニックマウス²⁴ については理化学研究所 横浜研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター シグナル・ネットワーク研究チーム 久保允人チームリーダーより供与頂いた。全てのマウスは 5-8 週齢で特定病原体不在 (specific pathogen free; SPF) 条件下で飼育され、理化学研究所 横浜研究所 動物実験審査委員会の動物実験実施規定に従って実験に用いた。

(2) 樹状細胞の調製

DCs の調製については既出文献に記載したものを一部改変した²⁰⁻²³。すなわち、mDC は BALB/c マウス大腿骨及び脛骨より得られた骨髓細胞をマウス顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte macrophage-colony-stimulating factor; GM-CSF, 20ng/mL; Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) 存在下で滅菌シャーレ (BIO-BIK, Osaka, Japan) にて 8 日間培養して非接着細胞を回収し、続いてリポポリ多糖 (lipopolysaccharide; LPS, 1 μ g/mL; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) で 24 時間刺激を行って調製した。DC_{regs} は同様に BALB/c マウスより得られた骨髓細胞をマウス GM-CSF (20ng/mL)、マウス IL-10 (20ng/mL; Wako Pure Chemical Industries)、ヒト TGF- β 1 (20ng/mL; Wako Pure Chemical Industries) 存在下で 8 日間培養し、続いて LPS (1 μ g/mL) で 24 時間刺激を行って調製した。さらに、ビオチン化抗 CD40、CD80、CD86 抗体及び IMag Streptavidin Particles Plus-DM (BD Biosciences, San Jose, CA) を用いて CD40⁺CD80⁺CD86⁺細胞 (調製された全細胞の約 20%程度) を除去した。一部の実験では、mDC または DC_{regs} に OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチド (10 μ M) を 4 時間添加して、OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチド添加 mDC または OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチド添加 DC_{regs} (図 12, 13 ではそれぞれ「OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptide/mDCs」または「OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptide/DC_{regs}」と記す) を作製した。

pDCs は脾細胞から抗 mPDCA-1 MicroBeads 及び AutoMACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて精製した。一部の実験では、DCs (5 \times 10⁵)

を未刺激のままとするか、あるいは CpG オリゴデオキシヌクレオチド (oligodeoxynucleotide; ODN, 0.1 μ M; Hokkaido System Science, Sapporo, Japan) で 24 時間刺激を行い、培養上清を回収して酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) キット (BioSource International, Camarillo, CA) を用いて IL-12p40、IL-10、IFN- α の産生量を測定した。

(3) フローサイトメトリー法

細胞を以下の蛍光色素標識抗体を用いて蛍光染色した。CD4、CD8 α 、CD11b、CD11c、CD40、CD45RB、CD54、CD80、CD86、H-2 K^d、I-A/I-E、33D1、B220、Gr-1、アイソタイプ一致コントロール (BD Biosciences)、Foxp3 (eBioscience, San Diego, CA)、CD25、mPDCA-1 (Miltenyi Biotec)、CD205 (SeroTec, Raleigh, NC)、KJ1-26 (Caltag Laboratories, Burlingame, CA)。また、T 細胞の細胞内サイトカイン産生解析については、Golgi Block (BD Biosciences) の存在下で固相化抗 CD3 抗体及び可溶性抗 CD28 抗体 (いずれも 10 μ g/mL; BD Biosciences) で 5 時間刺激を行い、Cytotfix/Cytoperm キット及び抗サイトカイン抗体 (IL-2、IL-4、IL-10、IFN- γ) (BD Biosciences) を用いて染色した²¹。蛍光染色は FACSCalibur フローサイトメーター及び CELLQuest (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA) を用いて解析した。

(4) CD4⁺T 細胞及びそのサブセットの分離

CD4⁺T 細胞は B10. D2 マウスの脾臓細胞より、マウス CD4⁺T Lymphocyte Enrichment Set-DM (BD Biosciences) を用いてネガティブセレクション法により分離した。続いて CD4⁺T 細胞をマウス CD4⁺CD25⁺Regulatory T cell Isolation キット及び autoMACS (Miltenyi Biotec)、あるいは蛍光色素標識抗体 (CD4、CD25) と FACSVantage (BD Immunocytometry Systems) を用いて CD4⁺CD25⁻T 細胞と CD4⁺CD25⁺T 細胞に高純度 (>98%) で分離した。同様に *Rag2*^{+/+}D011.10 BALB/c マウスや *Rag2*^{-/-}D011.10 BALB/c マウスより *Rag2*^{+/+}KJ1-26⁺T 細胞や *Rag2*^{-/-}KJ1-26⁺T 細胞を調製し、さらに CD25⁻T 細胞と CD25⁺T 細胞に分離した。

(5) CD4⁺T 細胞の in vitro プライミング

B10. D2 マウス由来 CD4⁺CD25⁻T 細胞 (5×10^6) を放射線照射 (Cs¹³⁷ 線源, 15Gy; Gammacell 40 Exactor; MDS Nordion, Ottawa, Ontario, Canada) した BALB/c

マウス由来 mDCs または DC_{regs} (5×10^5) と 6 ウェル平底プレート (BD Biosciences) にて 7 日間培養した。また、CD4⁺CD25⁻T 細胞 (1×10^6) を抗 IL-10 阻害抗体 ($10 \mu\text{g/mL}$; JES5-2A5 クローン; BD Bioscience)、抗 TGF- β 阻害抗体 ($10 \mu\text{g/mL}$; 1D11 クローン; BD Bioscience) あるいは非免疫ラットコントロール免疫グロブリン G (immunoglobulin G; IgG, $10 \mu\text{g/mL}$) の存在下あるいは非存在下で DC_{regs} (1×10^5) と 24 ウェル平底プレート (BD Biosciences) にて 7 日間共培養した。もしくは 24 ウェル Transwell cell culture chambers (Millicell; Millipore, Billerica, MA) にて 7 日間分離非接触培養した。培養後、CD4⁺T 細胞はビオチン化抗 I-A/I-E 抗体 (BD Bioscience) と IMag Streptavidin Particles Plus-DM にてネガティブセレクション法にて分離した (蛍光励起細胞分取法 (fluorescence-activated cell sorting; FACS) 解析による I-A/I-E⁺DCs の含有率は 0.1%未満)。

(6) 抗原提示試験

B10. D2 マウスあるいは移植レシピエントマウスより得られた CD4⁺CD25⁻T 細胞 (2×10^5) を放射線照射した BALB/c マウス由来 mDCs または DC_{regs} (2×10^4) と 96 ウェル平底プレート (BD Biosciences) にて 3 日間培養した。同様に *Rag2*^{-/-}KJ1-26⁺T 細胞 (5×10^4) を放射線照射した OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチド添加あるいは無添加の mDC または DC_{regs} (5×10^3) と 3 日間培養した。また、「(8) In vivo における CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺T 細胞から CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺制御性 T 細胞の誘導」の項に記述した養子移入 (adoptive transfer) を受けたマウスより得られた *Rag2*^{-/-}KJ1-26⁺T 細胞 (1×10^5) を OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチド ($1 \mu\text{M}$) の存在下で放射線照射同系脾細胞 (1×10^5) と培養した。さらに、マウス IL-2 (10^3U/mL ; Wako Pure Chemical Industries) または抗 CD3 抗体及び抗 CD28 抗体 (各々 $10 \mu\text{g/mL}$) の存在下でも培養を行った。培養 3 日目の最終 18 時間に [³H]チミジン (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) を添加し、その取り込みを指標として T 細胞増殖能を測定した。

(7) 慢性移植片対宿主病モデル及び評価

cGVHD の誘発及び評価は既出文献に従い、一部改変を加えて行った^{4,5}。すなわち、レシピエント BALB/c マウス (10 尾/1 群) に致死量 (8Gy) の全身放射線照射 (total body irradiation; TBI) を単回で行った。TBI の 3 時間後に全てのレシピエントマウスへ B10. D2 由来 T 細胞除去骨髓細胞 (1×10^7 /マウス 1 尾) 及び

CD4⁺CD25⁻T 細胞 (2×10^6 /マウス 1 尾) を静脈内移植した (未処置群)。続いて実験群では移植後 2、9、16 日目あるいは 18、25、32 日目に移植レシピエントマウスへ BALB/c マウス由来 mDCs または DC_{regs} (2×10^6) を静脈内投与した。もしくはラパマイシン (rapamycin; RAPA, 1.5mg/kg; Sigma-Aldrich) をカルボキシメチルセルロース (Sigma-Aldrich) に懸濁し移植日から 16 日間連日腹腔内投与した。in vivo 阻害実験では、抗 CD25 阻害抗体 ($250 \mu\text{g}$ /マウス 1 尾; PC61 クローン)、あるいはコントロール Ig ($250 \mu\text{g}$ /マウス 1 尾) を移植日及び移植後 3、6、9、12、15 日目にレシピエントマウスへ腹腔内投与した。養子移入実験では、B10.D2 マウスあるいは移植レシピエントマウスより得られた CD4⁺CD25⁺T 細胞 (2×10^6 /マウス 1 尾) を B10.D2 由来 T 細胞除去骨髄細胞及び CD4⁺CD25⁻T 細胞とともに TBI を行ったレシピエント BALB/c マウスへ静脈内移入した。移植レシピエントマウスは移植日から移植後記載された日数まで (図 9 に記載)、皮膚 cGVHD の発症率及び重症度並びに運動性低下、下痢、体重減少の評価のために経時的にモニタリングした。皮膚 cGVHD のスコアリングは以下とした。「0 ; 健常外観、1 ; 皮膚脱毛病変面積 1cm^2 未満、2 ; 皮膚脱毛病変面積 $1\text{cm}^2 \sim 2\text{cm}^2$ 、3 ; 皮膚脱毛病変面積 2cm^2 超。」発症率は臨床症状を呈したマウスの百分率で表した。また、移植レシピエントマウスより移植後 30 日目に脾臓と血清を採取した。血清中の TNF- α 、IL-12p40、IFN- γ 、IL-4 の産生量は ELISA キット (BioSource) にて測定した。

(8) *In vivo* における CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 細胞から CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺制御性 T 細胞の誘導

Rag2^{-/-}KJ1-26⁺T 細胞 (1×10^7 /マウス 1 尾) を単独で、あるいは OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチド添加 mDCs または DC_{regs} (2×10^6 /マウス 1 尾) とともに BALB/c マウスへ移入した。移植後 2、4、6、8、10 日目にレシピエントマウスより CD4⁺T 細胞を分離し、フローサイトメトリー法にて KJ1-26⁺T 細胞の CD25 及び Foxp3 の発現を解析した。また、移入後 8 日目に *Rag2*^{-/-}KJ1-26⁺T 細胞、*Rag2*^{-/-}KJ1-26⁺CD25⁻T 細胞、*Rag2*^{-/-}KJ1-26⁺CD25⁺T 細胞を分離して実験に使用した。

(9) 制御性 T 細胞の機能解析

B10.D2 マウス由来 CD4⁺CD25⁻T 細胞 (5×10^4) を B10.D2 マウスあるいは移植レシピエントマウスより得られた CD4⁺CD25⁺T 細胞 ($6.25 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$) とともに放射

線照射した BALB/c マウス由来 mDCs (5×10^3) と 96 ウェル丸底プレート (BD Biosciences) にて培養した。同様に、 $Rag2^{-/-}$ KJ1-26⁺T 細胞 (5×10^4) を、 $Rag2^{-/-}$ D011.10 BALB/c マウスより得られた $Rag2^{-/-}$ KJ1-26⁺CD25⁺T 細胞や $Rag2^{-/-}$ KJ1-26⁺CD25⁺T 細胞 (5×10^4) または移入レシピエントマウスより得られた $Rag2^{-/-}$ KJ1-26⁺CD25⁺T 細胞や $Rag2^{-/-}$ KJ1-26⁺CD25⁺T 細胞 (5×10^4) とともに、抗 CD3 抗体 ($10 \mu\text{g/mL}$) または OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチド ($1 \mu\text{M}$) の存在下で放射線照射同系脾細胞 (5×10^4) と培養した。さらに、「(6) 抗原提示試験」の項に記述した方法で T 細胞増殖能を測定した。

(10) 統計学的解析

データは平均値 (±標準偏差) で示した。データの統計学的有意差の解析は Student の paired t 検定にて行った。また、発症率分析における有意差の評価は Mantel-Cox の log-rank 検定にて行った (時間区間 $[t_{i-1}, t_i]$ において、 A 群 (処置群), B 群 (対照群) 各々の t_{i-1} での健常個体数 n_{Ai}, n_{Bi} 及び t_i までに新たに生じた観察発症個体数 o_{Ai}, o_{Bi} に関して、両群の発症率に差がないとする帰無仮説の下で超幾何分布 $H(n_{Ai} + n_{Bi}, o_{Ai} + o_{Bi}, n_{Ai})$ より求められる A 群の期待発症個体数 $e_{Ai} = n_{Ai}(o_{Ai} + o_{Bi}) / (n_{Ai} + n_{Bi})$ 及び分散 $v_{Ai} = n_{Ai}n_{Bi}(o_{Ai} + o_{Bi}) \{ (n_{Ai} + n_{Bi}) - (o_{Ai} + o_{Bi}) \} / \{ (n_{Ai} + n_{Bi})^2 (n_{Ai} + n_{Bi} - 1) \}$ をもとに検定統計量 $Z = \{ \sum_i (o_{Ai} - e_{Ai}) \} / \sqrt{ \sum_i v_{Ai} }$ を算出し、これが近似的に標準正規分布 $N(0, 1)$ に従うことを利用)。* P 値が 0.01 未満のものを有意と判定した。

VI. 結果

(1) 制御性樹状細胞による同種異系細胞培養における CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺T 細胞から CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺制御性 T 細胞の誘導

mDCs は CD11c、CD40、CD80、CD86、MHC 分子の高発現を示したが(図 6A, C)、DC_{regs} は MHC 分子の比較的高発現と、CD11c、CD40、CD80、CD86 の著しい低発現を示した(図 6B, C)。さらに DC_{regs} は mDCs よりも CD45RB の発現が高く、CD11b、CD54、CD205 の発現が低下していた(図 6A-C)。mDCs 及び DC_{regs} では、CD4、CD8 α 、33D1 や、pDCs の表面分子マーカーである Gr-1、B220、mPDCA-1 の発現は殆どあるいは全く認められなかった²⁵(図 6A-C)。一方、DC_{regs} は mDCs 及び pDCs と比較して IL-10 の強い産生が認められ、IL-12p40 の産生が減弱していた(図 6D)。pDCs は強力に IFN- α を産生したが、mDCs 及び DC_{regs} では IFN- α の産生は認められなかった(図 6D)。これらの結果より DC_{regs} は cDCs や pDCs とは異なる骨髓球系サブセットであることが示唆された。

Foxp3 (forkhead box p3) 転写因子は正常マウスにおいて末梢 CD4⁺T 細胞の 5-10% を占め、CD25 を恒常的に高発現している CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺nT_R 細胞の分化と機能において枢要であり^{8,11,24}、これまでに DC_{regs} 及び他の tolerogenic DCs が in vivo 及び in vitro にて CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R 細胞を選択的に増幅することが報告されている^{15,17,20,21}。DC_{regs} による CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺T 細胞から CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R 細胞の誘導効果を明らかにするために、CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺T 細胞を同種異系 DCs と培養し、得られた細胞の解析を行った。DC_{regs} は mDCs と比較して、同種異系 CD4⁺CD25⁺T 細胞の活性化能が著しく低下していることが認められた(図 7A)。mDCs は CD4⁺CD25⁺T 細胞を顕著に誘導したが、Foxp3 陽性細胞はほとんど認められなかった(図 7B, C)。一方、DC_{regs} も CD4⁺CD25⁺T 細胞を誘導したが、それらの大部分は Foxp3 を発現していた(図 7B, C)。さらに、DC_{regs} によって誘導された CD4⁺CD25⁺T 細胞は、CD4⁺CD25⁺T 細胞の mDCs による同種異系反応に対して正常マウス由来 CD4⁺CD25⁺nT_R 細胞よりも強力な抑制効果を示したのに対して、mDCs によって誘導された CD4⁺CD25⁺T 細胞は同種異系反応を増強した(図 7D)。また、抗 IL-10 阻害抗体、抗 TGF- β 阻害抗体は DC_{regs} による CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺T 細胞から CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R 細胞の誘導に対して全く影響が認められなかったが、一方で CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺T 細胞と DC_{regs} を分離非接触培養すると CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R 細胞の誘導が著しく減弱した(図 7E)。以上の結果から DC_{regs} は同種異系細胞培養において CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺T 細胞から CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R 細胞を選択的に誘導することが

示唆された。

(2) 制御性樹状細胞による同種異系骨髄移植での慢性移植片対宿主病に対する防御効果

B10. D2 マウスと BALB/c マウスは MHC 一致 (H-2^d)・miHA_g 不一致の移植抗原系である。TBI を行った BALB/c マウスへ B10. D2 マウス由来 T 細胞除去骨髄細胞及び CD4⁺CD25⁻T 細胞を移植すると、コラーゲン沈着・毛包脱落・皮下脂肪消失・皮膚単核球浸潤によって発症する皮膚線維症等を含め、ヒト cGVHD と類似した臨床症状が認められる^{4,5}。レシピエントマウスでは TBI 施行後 5 日目までに脾臓細胞の約 98%が消失するが⁴、alloBMT 施行後 5 日目から脾臓に CD4⁺T 細胞が観察されるようになることから²⁰、TBI を行った alloBMT レシピエントでみられる CD4⁺T 細胞の大部分はドナー由来のものである。

alloBMT における cGVHD に対する DCs の効果を明らかにするため、レシピエントマウスへ移植後 2、9、16 日目にレシピエントタイプ DCs を投与し、皮膚 cGVHD の重症度及び発症率をモニタリングした (図 8)。ほぼ全ての未処置レシピエントマウスは移植後 45 日目までに脱毛を伴う皮膚病変、運動性低下、下痢、体重減少の臨床症状を呈した (図 9)。レシピエントタイプ mDCs の投与では皮膚 cGVHD の発症率及び重症度の顕著な増悪が認められた ($P < 0.01$, 図 9A, B)。また、免疫抑制剤 RAPA の投与では皮膚 cGVHD の発症率及び重症度に関して殆ど効果が認められなかった (図 9A, B)。一方、レシピエントタイプ DC_{regs} の投与では皮膚 cGVHD の発症率及び重症度が著しく抑制され ($P < 0.01$, 図 9A, B)、さらにこれらの防御効果が観察されたマウスでは 120 日を超える期間に亘って皮膚 cGVHD の症状が殆ど認められなかった。

また、レシピエントマウスの血清中 TNF- α 、IL-12p40、IFN- γ 、IL-4 の産生について検討した (図 10)。レシピエントタイプ mDCs 投与群では未処置レシピエントマウスと比較して、血清中の TNF- α 、IL-12p40、IFN- γ 産生の著明な増強とともに IL-4 産生の抑制が認められたが、この機序には IL-12 産生を介して誘導された T_H1 細胞の関与も示唆された。一方、レシピエントタイプ DC_{regs} 投与群では血清中のこれらの炎症性サイトカインの産生が著明に抑制されたが、RAPA 投与群では全く抑制効果が認められなかった。

さらに、DC_{regs} の皮膚 cGVHD に対する治療効果を明らかにするために、移植後 18、25、32 日目に移植レシピエントマウスへレシピエントタイプ DC_{regs} を投与し、

皮膚 cGVHD の発症率及び重症度をモニタリングした(図 9C, D)。その結果、レシピエントタイプの DC_{regs} の投与は cGVHD 発症後においてもその重症度を抑制し発症率を減少させた。

(3) 制御性樹状細胞の慢性移植片対宿主病の防御効果における in vivo で誘導された同種異系反応性 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺制御性 T 細胞の関与

DC_{regs} の cGVHD 制御効果の作用機序を明らかにするために、移植レシピエントマウスより分離したドナー由来 CD4⁺T 細胞の解析を行った。レシピエントタイプ mDCs 投与群より得られたドナー由来 CD4⁺T 細胞は未処置群より得られたドナー由来 CD4⁺T 細胞よりもレシピエントタイプ mDCs に対してより強力な同種異系反応を示した(図 11A)。一方、レシピエントタイプ DC_{regs} 投与群より得られたドナー由来 CD4⁺T 細胞はレシピエントタイプ mDCs に対して低同種異系反応を示し、この低反応性は IL-2 の添加あるいは抗 CD3 抗体及び抗 CD28 抗体によるポリクローナルな刺激によって部分的に回復した(図 11A)。以上の結果から、レシピエントタイプ DC_{regs} は同種異系反応性 CD4⁺T 細胞に対し抗原特異的アナジを誘導することが示唆された。

また、移植レシピエントマウスにおけるドナー由来 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R 細胞の誘導についてフローサイトメトリー法にて検討した。正常マウスと比較して、未処置群及びレシピエントタイプ mDCs 投与群では CD4⁺CD25⁺T 細胞数の増加と CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R 細胞数の減少が認められた(図 11B, C)。一方、レシピエントタイプ DC_{regs} 投与群では、正常マウスと比較して CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R 細胞の顕著な増加が認められた(図 11B, C)。さらに、レシピエントタイプ DC_{regs} 投与群より得られた CD4⁺CD25⁺T 細胞は正常マウス由来 CD4⁺CD25⁺nT_R 細胞と比較して CD4⁺CD25⁺T 細胞の同種異系反応に対するより強力な抑制効果を示したのに対して、未処置群及びレシピエントタイプ mDCs 投与群より得られた CD4⁺CD25⁺T 細胞は同種異系反応を増強した(図 11D)。また、レシピエントタイプ DC_{regs} 投与群より得られた CD4⁺CD25⁺T 細胞は正常マウス由来 CD4⁺CD25⁺nT_R 細胞と同様に²⁴、IL-2、IL-4、IL-10、IFN- γ の産生能が全く認められなかった(図 11E)。以上の結果からレシピエントマウスにおいてレシピエントタイプ DC_{regs} はドナー由来同種異系反応性 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R 細胞を増幅することが示された。

DC_{regs} の cGVHD 制御効果における CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R 細胞の関与を明らかにするために、抗 CD25 阻害抗体を用いた in vivo 阻害実験を行った。未処置群への抗

CD25 阻害抗体の投与による CD4⁺CD25⁺T 細胞の除去では皮膚 cGVHD の発症率及び重症度は僅かに増悪した (図 9E, F)。一方、レシピエントタイプ DC_{regs} 処置群への抗 CD25 阻害抗体の投与による CD4⁺CD25⁺T 細胞の除去ではレシピエントタイプ DC_{regs} の皮膚 cGVHD に対する防御効果が著しく阻害された ($P < 0.01$, 図 9E, F)。さらに、レシピエントタイプ DC_{regs} 処置群より得られた CD4⁺CD25⁺T 細胞の養子移入では、正常マウス由来 CD4⁺CD25⁺nT_R 細胞の養子移入よりも強力に皮膚 cGVHD の発症率及び重症度を抑制したが、未処置群より得られた CD4⁺CD25⁺T 細胞の養子移入では皮膚 cGVHD の病態が悪化した ($P < 0.01$, 図 9G, H)。以上の結果から、DC_{regs} の皮膚 cGVHD の防御効果にはドナー由来同種異系反応性 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R 細胞が関与することが示唆された。

(4) 制御性樹状細胞による CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺T 細胞から CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺制御性 T 細胞の抗原特異的な誘導

これまでの報告では tolerogenic DCs は CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺nT_R 細胞の増幅や IL-10 産生 Tr1 細胞の誘導を介して免疫反応抑制効果を示すことが知られているが^{17-19, 26, 27}、CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺T 細胞から CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R 細胞への抗原特異的転換における DC サブセットの役割については不明である。レシピエントタイプ DC_{regs} によるドナー由来同種異系反応性 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R 細胞誘導機構の解明を目的として、OVA 特異的 T 細胞受容体 (KJ1-26 clone type) 発現 T 細胞を有しかつ CD25⁺Foxp3⁺nT_R 細胞を欠損する *Rag2*^{-/-}/DO11.10 BALB/c マウス²⁴ を用いて検討を行った。OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチド添加 mDCs は *Rag2*^{-/-}/KJ1-26⁺T 細胞に対する強力な抗原特異的活性化能を示したが、OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチド添加 DC_{regs} はその抗原特異的活性化能が著しく減弱していた (図 12A)。

DC_{regs} による CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺T 細胞から CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R 細胞への抗原特異的誘導効果を明らかにするために、*Rag2*^{-/-}/KJ1-26⁺T 細胞を単独で、あるいは OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチド添加 mDCs または OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチド添加 DC_{regs} とともに BALB/c マウスに移入し (それぞれ「OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチド添加 mDCs 移入群」または「OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチド添加 DC_{regs} 移入群」と記す)、移入後の *Rag2*^{-/-}/KJ1-26⁺T 細胞を解析した。OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチド添加 mDCs 移入群より得られた *Rag2*^{-/-}/KJ1-26⁺T 細胞では *Rag2*^{-/-}/KJ1-26⁺T 細胞単独移入群から得られた *Rag2*^{-/-}/KJ1-26⁺T 細胞と比較して、抗原特異的増殖反応が増強していた (図 12B)。一方、OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチド添加 DC_{regs} 移入群より得られた *Rag2*^{-/-}/KJ1-26⁺T 細胞では抗原特異的増殖反応の著しい減弱

が認められ、この低反応性は IL-2 の添加あるいは抗 CD3 抗体及び抗 CD28 抗体によるポリクローナルな刺激によって部分的に回復した(図 12B)。これらの結果から抗原ペプチド添加 DC_{regs} は in vivo で抗原特異的アナジ-CD4⁺T 細胞をクローンレベルで誘導することが示唆された。

一方、フローサイトメトリー法による解析にて、*Rag2*^{+/+}D011.10 BALB/c マウス由来 *Rag2*^{+/+}KJ1-26⁺T 細胞の約 5%で CD25⁺・Foxp3⁺ 両陽性細胞が認められ、*Rag2*^{-/-}D011.10 BALB/c マウス由来 *Rag2*^{-/-}KJ1-26⁺T 細胞では CD25⁺・Foxp3⁺ 両陽性細胞は認められなかった²⁴(図 12C)。同様に、*Rag2*^{-/-}KJ1-26⁺T 細胞単独移入群から得られた移入後 8 日目の *Rag2*^{-/-}KJ1-26⁺T 細胞では CD25⁺・Foxp3⁺ 両陽性細胞は認められなかった。OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチド添加 mDCs 移入群より得られた *Rag2*^{-/-}KJ1-26⁺T 細胞における CD25⁺ 陽性細胞は移入後 4 日目までは増加してそれ以降は減少したが、CD25⁺・Foxp3⁺ 両陽性細胞はほとんど認められなかった(図 12C, D-左)。一方、OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチド添加 DC_{regs} 移入群より得られた *Rag2*^{-/-}KJ1-26⁺T 細胞では経時的に CD25⁺・Foxp3⁺ 両陽性細胞の著しい増加が認められた(図 12C, D-右)。

さらに、OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチド添加 DC_{regs} 移入群より得られた *Rag2*^{-/-}KJ1-26⁺CD25⁻T 細胞及び *Rag2*^{-/-}KJ1-26⁺CD25⁺T 細胞の機能について検討した。*Rag2*^{+/+}D011.10 BALB/c マウス由来 *Rag2*^{+/+}KJ1-26⁺CD25⁻T 細胞は抗 CD3 抗体刺激(図 13A)及び抗原刺激(図 13B)に対して増殖反応を示したが、OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチド添加 DC_{regs} 移入群より得られた *Rag2*^{-/-}KJ1-26⁺CD25⁻T 細胞はこれらの刺激に対して低反応であった(図 13A, B)。一方、*Rag2*^{+/+}D011.10 BALB/c マウス由来 *Rag2*^{+/+}KJ1-26⁺CD25⁺T 細胞及び OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチド添加 DC_{regs} 移入群より得られた *Rag2*^{-/-}KJ1-26⁺CD25⁺T 細胞は抗 CD3 抗体刺激及び抗原刺激に対して低反応を示すとともに、*Rag2*^{-/-}KJ1-26⁺T 細胞の増殖反応に対して制御能を示した(図 13A, B)。以上の結果から DC_{regs} は CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺T 細胞から CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_r 細胞を抗原特異的に誘導することが示された。

VII. 考察

alloBMTにおいてcGVHDは重篤な合併症であるが³⁻⁷、その病態制御には不明な点が多く残されている。本研究ではDC_{regs}がドナー由来同種異系反応性CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻T細胞からのCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R細胞の誘導を介してマウスMHC一致・miHAg不一致alloBMTモデルにおける皮膚cGVHDに対して治療効果を示すことを明らかにした。

これまでにin vitroにおけるDCsの同種異系CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺nT_R細胞増幅効果やTGF-β1依存性CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R細胞誘導効果が既出論文にて報告されている^{28,29}。本研究では同種異系mDCsにはCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R細胞誘導効果は認められず、活性化CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻T細胞誘導効果を有することが示された。さらに、レシピエントタイプmDCsはレシピエントマウスにおいてドナー由来CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻T細胞を顕著に誘導し、cGVHDの発症率及び重症度を増悪させた。以上の結果からレシピエントタイプmDCsは炎症条件下でドナー由来CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻T細胞から同種異系反応性活性化CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻T細胞を選択的に誘導し、皮膚cGVHDの病態の悪化を引き起こすものと考えられた。

皮膚cGVHDはその発症と進行においてaGVHDとは異なる臨床病理的特徴が認められ、その効果的な治療法は確立されていない^{4,5}。RAPAはタクロリムス(tacrolimus)と同様のマクロライド系の免疫抑制剤であり、FK506結合蛋白(FK506 binding protein; FKBP)と結合し、シクロスポリン(cyclosporin)やタクロリムスによるカルシニューリン(calcineurin)の阻害を介したIL-2の産生抑制の機序とは異なり、哺乳類RAPA標的蛋白(mammalian target of RAPA; mTOR)の阻害を介してIL-2のシグナル伝達を抑制して免疫抑制作用を示す³⁰。RAPAはマウスalloBMT後aGVHDモデルにおいて防御効果が報告されているものの³¹、本研究ではRAPAの皮膚cGVHDに対する防御効果は認められなかった。これまでの研究でiDCsが種々のマウス免疫疾患モデルにおいて予防効果をもつことが報告されている¹⁷。しかしながら、iDCsの治療応用はこれらが炎症条件下で成熟してしまう可能性があるため慢性炎症を伴う免疫疾患には不相当であると推察されている¹⁰。一方、レシピエントタイプDC_{regs}は皮膚cGVHDに対する著しい治療効果を示した。以上の結果から、レシピエントタイプDC_{regs}を用いた免疫細胞療法でのcGVHDに対する臨床応用の可能性が示唆された。

マウスにおいてCD4⁺CD25⁺nT_R細胞はaGVHDに対する防御効果を示すことが報告されているが³²、cGVHDの病態におけるCD4⁺CD25⁺nT_R細胞の役割については不明

である。本研究では、レシピエントマウスへの抗 CD25 阻害抗体の投与によって CD25 を恒常的に高発現している CD4⁺CD25⁺T_R 細胞を除去すると皮膚 cGVHD が僅かに増悪し、正常マウス由来 CD4⁺CD25⁺nT_R 細胞をレシピエントマウスへ投与すると皮膚 cGVHD の病態がやや改善される傾向が認められた。これらの結果から、TBI 施行後の残存レシピエント CD4⁺CD25⁺nT_R 細胞⁴ 及びドナー骨髄移植片に含まれる CD4⁺CD25⁺nT_R 細胞が cGVHD の病態を制御している可能性が示唆された。

DC_{regs} と CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺T 細胞の同種異系細胞培養では CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R 細胞が誘導され、これは正常マウス由来 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺nT_R 細胞よりも強力な制御能を示した。さらに、この誘導効果は抗 IL-10 阻害抗体及び抗 TGF-β 阻害抗体により阻害されず、その分離非接触培養により阻害された。以上の結果から、DC_{regs} は細胞接触依存性かつ IL-10 及び TGF-β 非依存性に CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺T 細胞から同種異系抗原特異的 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R 細胞を誘導することが考えられた。

レシピエントタイプ DC_{regs} はレシピエントマウスにおいて、同種異系反応性 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R 細胞の産生を増強した。また、レシピエントマウスへの抗 CD25 阻害抗体の投与によって CD25 を恒常的に高発現している CD4⁺CD25⁺T_R 細胞を除去すると、レシピエントタイプ DC_{regs} の皮膚 cGVHD に対する防御効果が阻害された。さらに、レシピエントタイプ DC_{regs} 投与群より得られた CD4⁺CD25⁺T 細胞は、皮膚 cGVHD の病態に対して正常マウス由来 CD4⁺CD25⁺nT_R 細胞よりも強力な防御効果を示した。これらの結果から、レシピエントタイプ DC_{regs} の皮膚 cGVHD の病態における防御効果には、ドナー由来同種異系反応性 CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺T 細胞から CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R 細胞への誘導が関与することが考えられた。

これまでの研究では、CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺T 細胞から CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R 細胞への抗原特異的誘導における DC サブセットの関与については直接的に解明されていない^{11, 15, 17-19}。DC_{regs} による CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R 細胞の胸腺外末梢誘導を明らかにするために、*Rag2*^{-/-}D011.10 BALB/c マウス由来の *Rag2*^{-/-}KJ1-26⁺T 細胞を用いた移入実験を行った。*Rag2*^{+/+}D011.10 BALB/c マウス由来の *Rag2*^{+/+}KJ1-26⁺T 細胞は D011.10 トランスジーンによって、MHC クラス II 分子 (H-2^d) により提示された非自己抗原 OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチドを特異的に認識する KJ1-26 clonotype の TCR α・β 鎖を発現しているが、内在性 TCR α 鎖が遺伝子再構成された非 clonotype TCR も同時に発現しているため胸腺分化時に CD25⁺Foxp3⁺nT_R 細胞が誘導される^{33, 34}。ここでさらに *Rag2* (recombination activating gene 2) 遺伝子をノックアウトした *Rag2*^{-/-}D011.10 BALB/c マウス由来の *Rag2*^{-/-}KJ1-26⁺T 細胞では、TCR の遺伝子再

構成が不能となるため全てが OVA 特異的な KJ1-26 clonotype の TCR のみを発現したナイーブ T 細胞となっており、かつ CD25⁺Foxp3⁺nT_R 細胞を欠損している^{33,34}。本研究における *Rag2*^{-/-}KJ1-26⁺T 細胞を用いた移入実験モデルの結果により、OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチド添加 DC_{regs} が CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻T 細胞から CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R 細胞を抗原特異的に直接誘導しうるということが明確に示された。以上の結果から、レシピエントタイプ DC_{regs} はドナー由来ナイーブ CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻T 細胞から同種異系反応性 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R 細胞を抗原特異的に誘導して、同種異系反応性活性化 CD4⁺T 細胞を制御することにより皮膚 cGVHD に対して防御効果を示すことが考えられた(図 14)。

VIII. 結語

マウス MHC 一致・マイナー組織適合抗原不一致 allo BMT 後 cGVHD モデルにて、DC_{regs} は CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R 細胞の胸腺外末梢誘導による能動的抑制の機序を介して顕著な治療効果を発揮した。本研究で報告した知見は、将来的なヒト cGVHD に対する DC_{regs} を用いた新規免疫細胞療法の可能性も示唆するものである。また一方で、我々はマウス DC_{regs} による T 細胞機能制御に関わる候補分子を同定し、その作用機序の解明も進めている。DC_{regs} による免疫抑制機構に関わる機能分子の特定と分子生物学的機序の解明は、DCs による T_R 細胞を介した末梢免疫寛容誘導の更なる洞察を導き、種々の免疫疾患の新規分子療法の可能性をも切り拓くものとして期待される。

IX. 図表

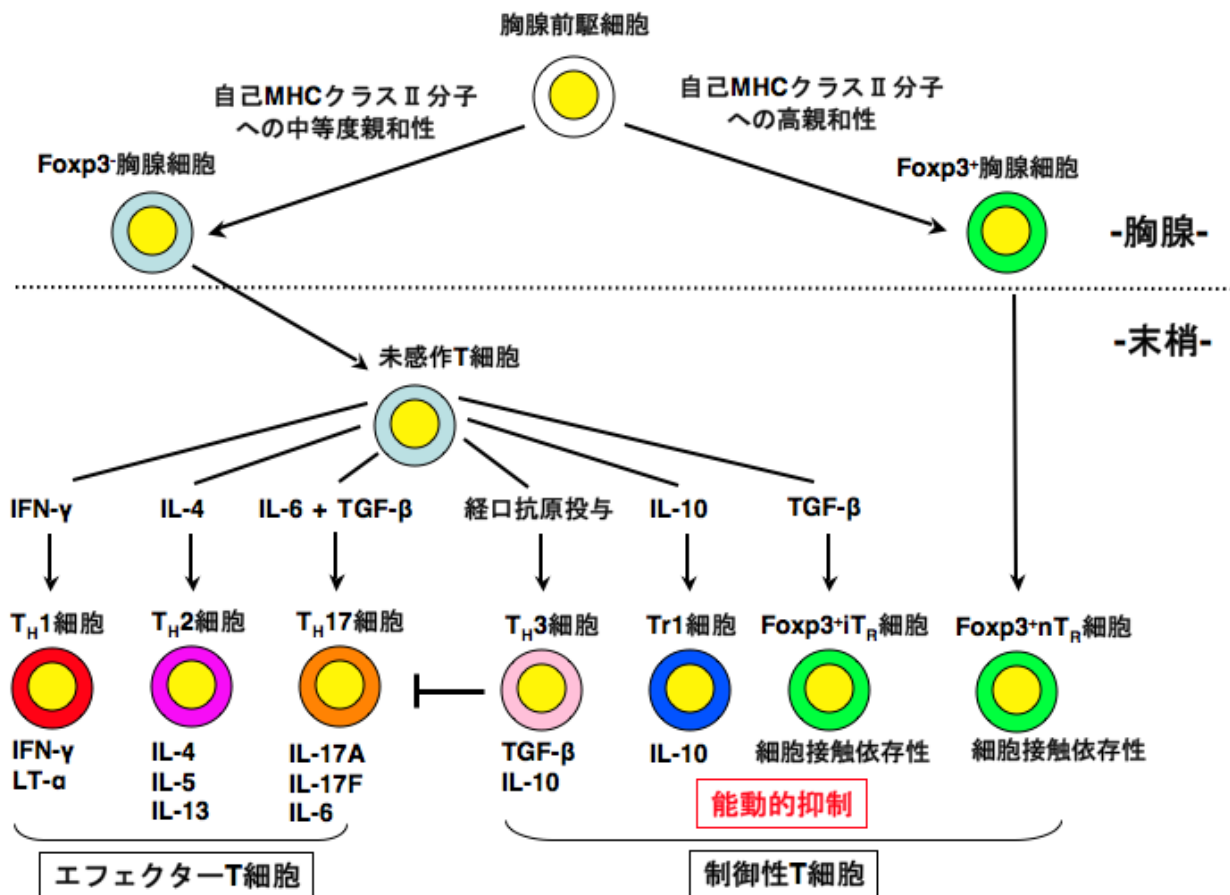


図1 T細胞による免疫学的恒常性の維持

免疫学的恒常性の維持には免疫寛容が重要な役割を担っており、中枢性免疫寛容では胸腺内の幼若T細胞のうち自己のMHC分子に対して極めて高い親和性を示す細胞がクローン除去(clonal deletion)によって負の選択(negative selection)を受ける^{9,10}。一方、排除しきれなかった自己反応性T細胞は、末梢性免疫寛容によるクローン除去や不活性化(アナジー; anergy)とともに、一連の制御性T細胞の誘導により抑制される^{8,10}。自己のMHC分子に対して比較的高い親和性をもちながら胸腺における負の選択を逃れた細胞は、Foxp3の発現を獲得してFoxp3⁺胸腺細胞となり、末梢に移行して自然発生型のCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺nT_R細胞となる。一方、自己のMHC分子に対して中等度の親和性をもつ細胞は正の選択(positive selection)によって残されてFoxp3⁻胸腺細胞となり、末梢ナイーブT細胞となって一部はT_H1細胞、T_H2細胞、T_H17細胞等のエフェクターT細胞へと分化誘導される⁸。また末梢ナイーブT細胞の一部は制御性T細胞に分化誘導される。すなわち、経口抗原投与でT_H3細胞が誘導され、IL-10環境下でTr1細胞が誘導され、TGF- β の刺激でFoxp3⁻からFoxp3⁺に転換した適合型のCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺iT_R細胞が誘導される¹¹。これらの一連の制御性T細胞が自己反応性T細胞や過剰に活性化したエフェクターT細胞を抑制することで免疫学的恒常性が維持されている。

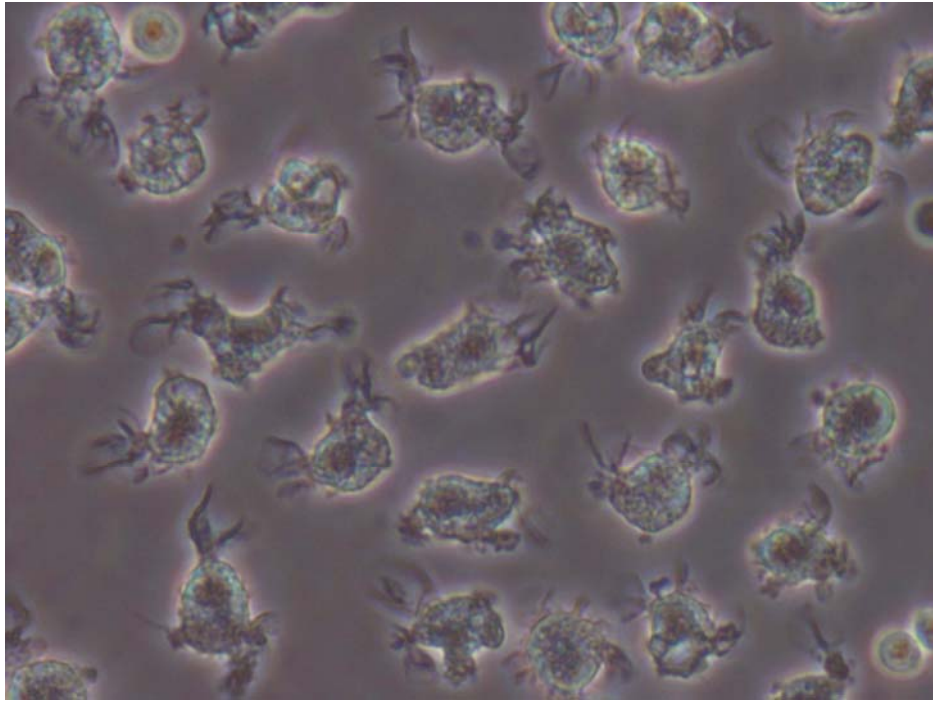


図2 樹状細胞の形態

樹状細胞の光学顕微鏡写真（ヒト末梢血単球由来、×400）。

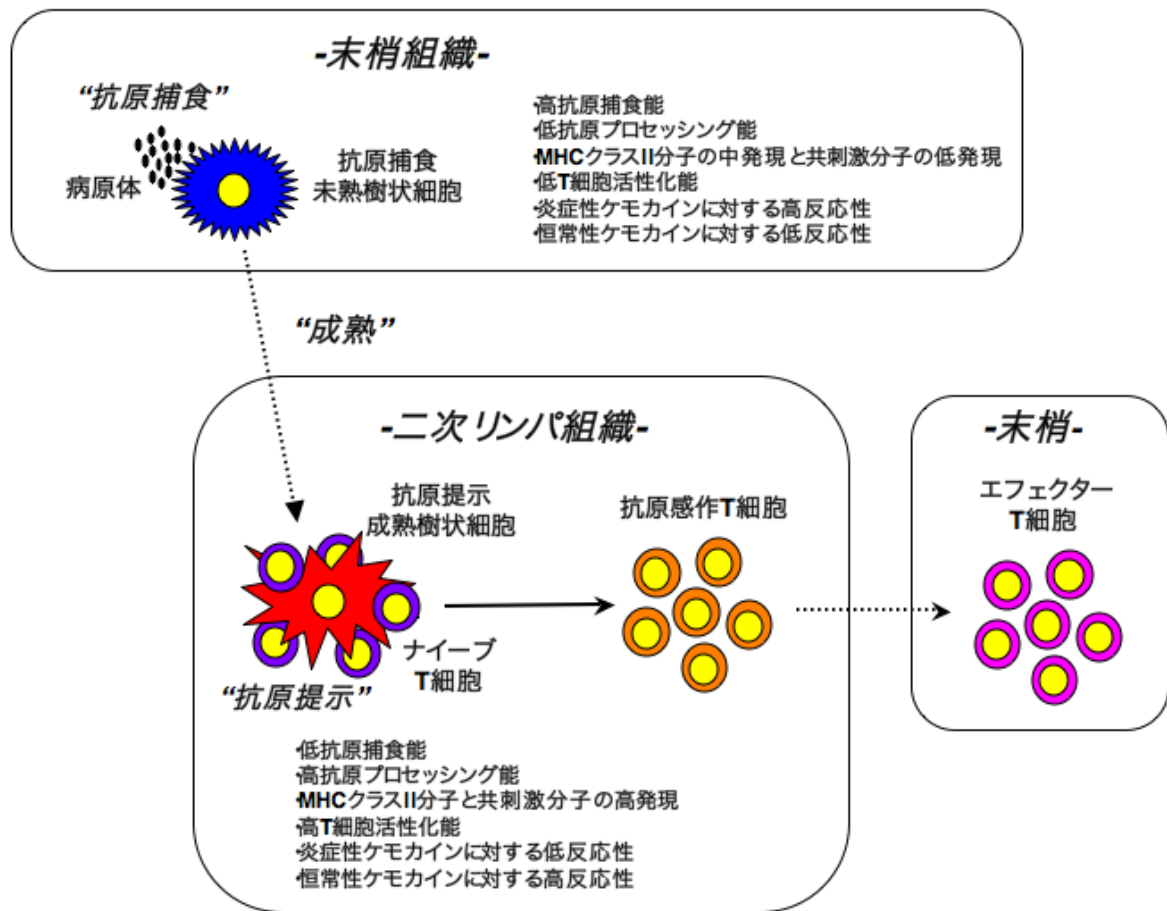


図3 樹状細胞による免疫活性化機構

骨髓中の造血幹細胞から分化したDC前駆細胞(DC precursors)は末梢血管やリンパ管を循環し、iDCsとなって末梢組織に分布する。病原微生物等の末梢組織への侵襲により様々な炎症性サイトカインやCCケモカインリガンド3(CC chemokine ligand 3; CCL3)・CCL5・CCL20等の炎症性ケモカインの産生が誘導されて局所的な炎症反応が惹起される。iDCsは炎症性ケモカインの受容体であるCCケモカイン受容体1(CC chemokine receptor 1; CCR1)・CCR5・CCR6等を恒常的に発現しているため炎症組織へ移行し、これらをマンノース受容体・TLR等のPRRsを介して捕食する。炎症性刺激によって、iDCsでは抗原捕食能の低下と抗原プロセッシング能の増強がみられ、さらにMHC分子とCD40やCD80・CD86等の共刺激分子や共刺激分子リガンドの発現増強を伴ってmDCsへと成熟する。同時にCCR1・CCR5・CCR6の発現低下による炎症性ケモカインへの遊走能の減弱、CCR7の発現誘導によるCCL19・CCL21等の恒常性ケモカインに対する遊走能の獲得が起るため、mDCsは所属二次リンパ組織へ移行し、MHC分子-抗原ペプチド複合体をナイーブT細胞のTCR-CD3複合体に提示して抗原刺激を与え、更にCD28とCD80・CD86等の共刺激分子と共刺激分子リガンド間での結合による共刺激を与えることによってエフェクターT細胞を分化誘導する¹³。

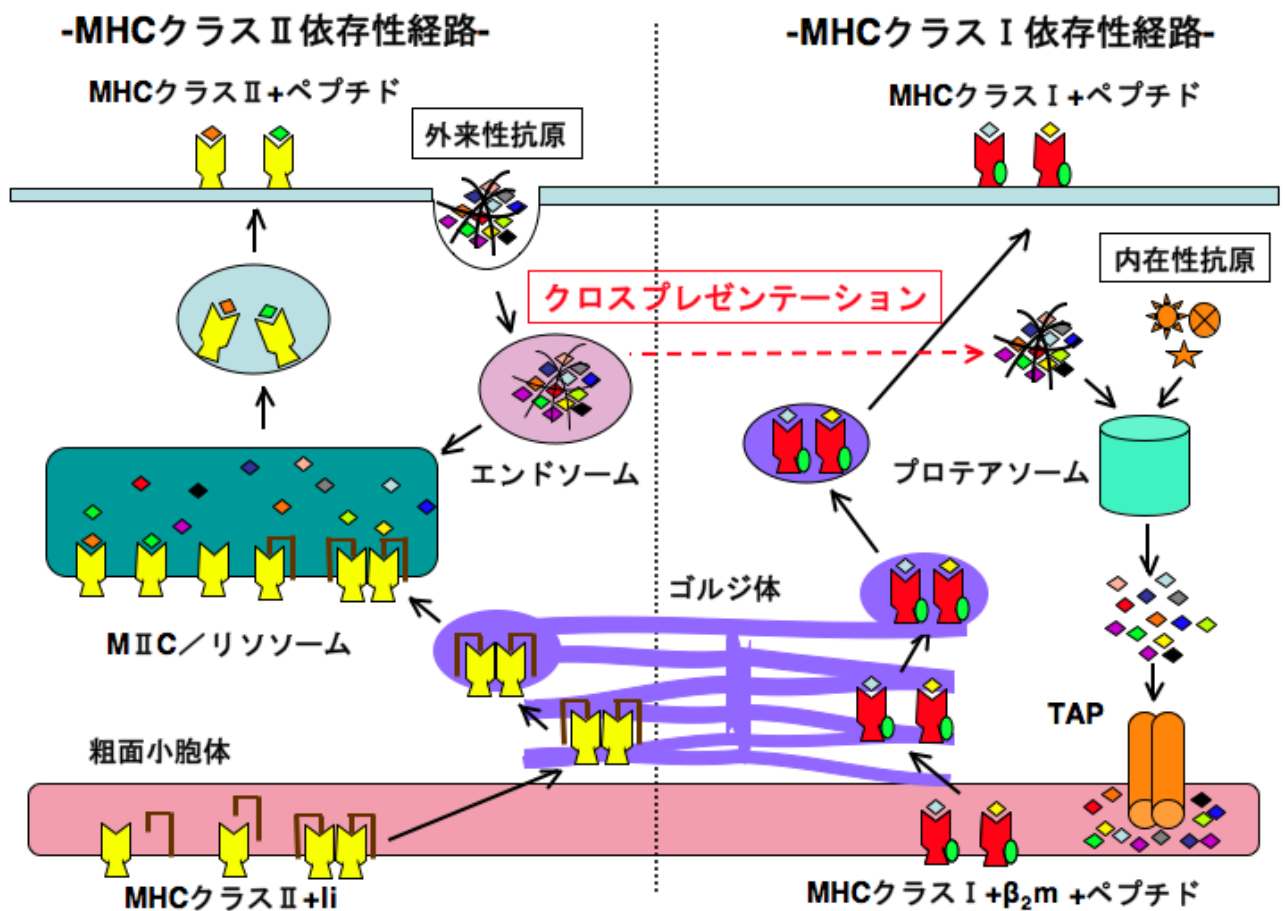


図4 樹状細胞によるクロスプレゼンテーション

MHC クラス I 分子を発現する全ての細胞では癌やウイルスの遺伝子産物等の内在性抗原はプロテアソームでペプチドに分解後、抗原処理関連トランスポーター(transporter associated with antigen processing; TAP)を介して小胞体に輸送され、MHC クラス I- β_2 ミクログロブリン(β_2 microglobulin; β_2m)複合体に結合する。MHC クラス I- β_2m -ペプチド複合体はゴルジ体を経て細胞膜上に発現し CD8⁺T 細胞に対して提示される(MHC クラス I 依存性経路)。MHC クラス II 分子を発現する DCs・B 細胞・マクロファージなどのプロフェッショナルな APCs では捕食された外来性抗原はエンドソームでペプチドに分解され、小胞体で合成された MHC クラス II-インバリアント鎖(invariant chain; Ii)複合体はゴルジ体を経て MHC クラス II コンパートメント(MHC class II compartment; MIIc)に輸送されるが、ここで MHC クラス II からインバリアント鎖が外れて抗原ペプチドと結合し、MHC クラス II-ペプチド複合体は細胞膜上に発現し CD4⁺T 細胞に対して提示される(MHC クラス II 依存性経路)。これらのプロフェッショナルな APCs の中で DCs のみは外来性抗原をエンドソームから直接プロテアソームに移行させるクロスプレゼンテーションによって内在性抗原と同様の MHC クラス I 依存性経路を経て CD8⁺T 細胞に対して抗原提示することが可能である¹⁴。

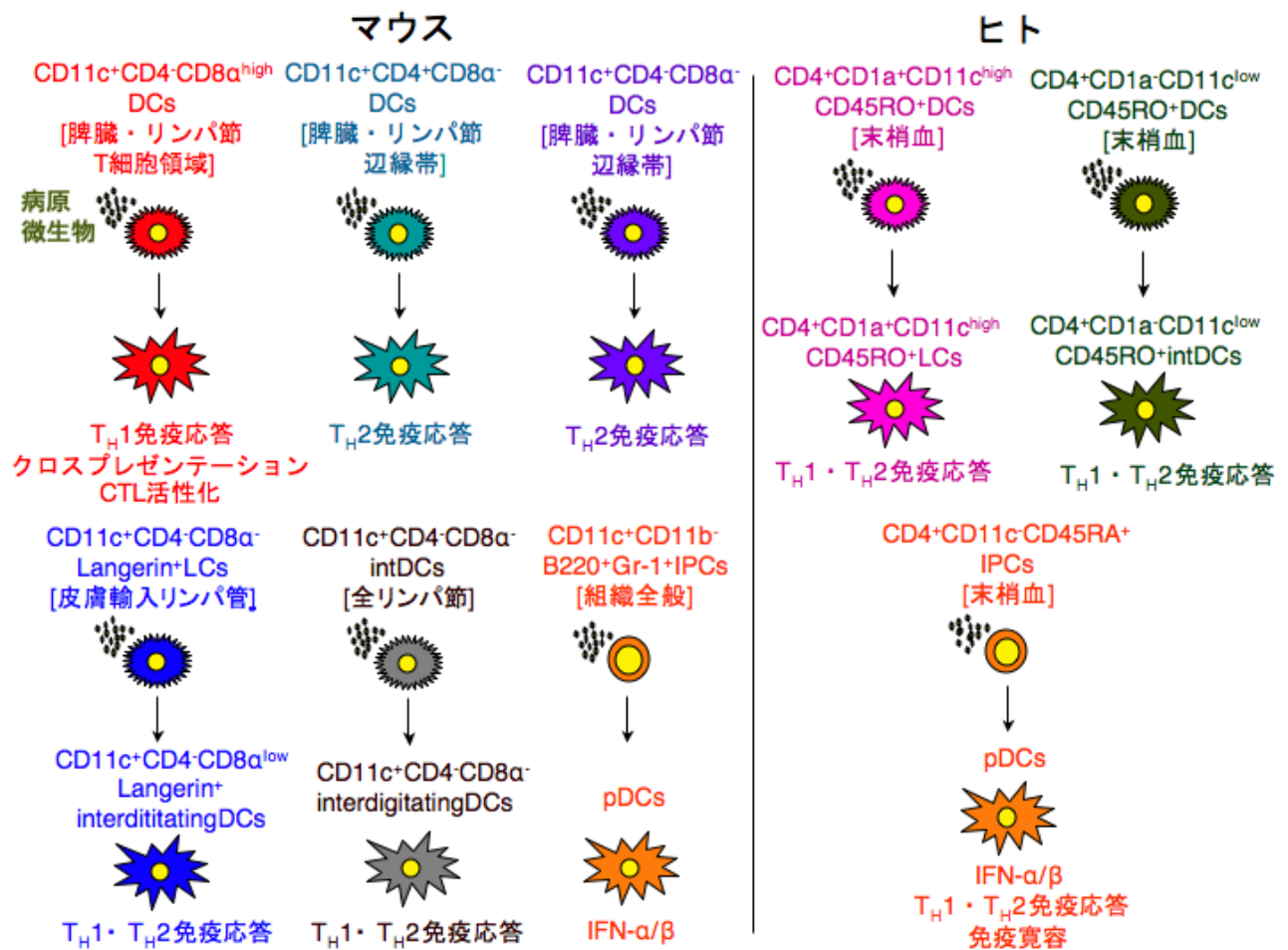


図5 マウス及びヒト樹状細胞サブセットと機能

マウスの樹状細胞は5種類のcDCsと1種類のpDCsの計6種類のサブセットから構成される。脾臓DCsの20%を占めるCD4⁻CD8α^{high}DCsはT細胞領域に存在し、定常状態では死細胞を捕食して細胞関連抗原をプロセッシングしてナイーブCD4⁺T細胞に抗原提示しアナジューを誘導し末梢性免疫寛容に関与する。また活性化状態ではIL-12を多量に産生してT_H1免疫応答を誘導し、可溶性抗原のクロスプレゼンテーションを行ってCTLを活性化する。また脾臓DCsの40%と15%を占めるCD4⁺CD8α⁻DCsとCD4⁻CD8α⁻DCsは定常状態では辺縁帯に存在しているが、活性化に伴いT細胞領域に移行してT_H2免疫応答を誘導する。一方、CD11b⁻B220⁺Gr-1⁺IFN産生細胞(INF-producing cells; IPCs)は形質細胞様の形態をもち脾臓DCsの25%を占め、ウイルス刺激等による活性化によりIFN-α/βを産生するpDCsとして同定されている。さらに、リンパ節ではこれらに加え、2種類のcDCsが認められる。即ち、皮膚からの輸入リンパ管ではLCs由来CD4⁻CD8α^{low}Langerin⁺相互連結性嵌入細胞、全てのリンパ節ではintDCs由来のCD4⁻CD8α⁻相互連結性嵌入細胞が認められる。ヒトの樹状細胞は2種類のcDCsと1種類のpDCsの計3種類のサブセットから構成される。末梢血DCsの60%を占めるCD4⁺CD1a⁺CD11c^{high}CD45RO⁺DCsはLCsに分化し、末梢血DCsの5%を占めるCD4⁺CD1a⁻CD11c^{low}CD45RO⁺DCsはintDCsに分化する。これらは抗原捕食能とともに高いIL-12産生能を示す。さらに、末梢血DCsの35%を占めるCD4⁺CD11c⁻CD45RA⁺IPCsは形質細胞様の形態をもち、ウイルス刺激等による活性化によりIFN-α/βを産生するpDCsとして同定されており、T_H1免疫応答やT_H2免疫応答のみならず免疫寛容を誘導することが示唆されている¹³。

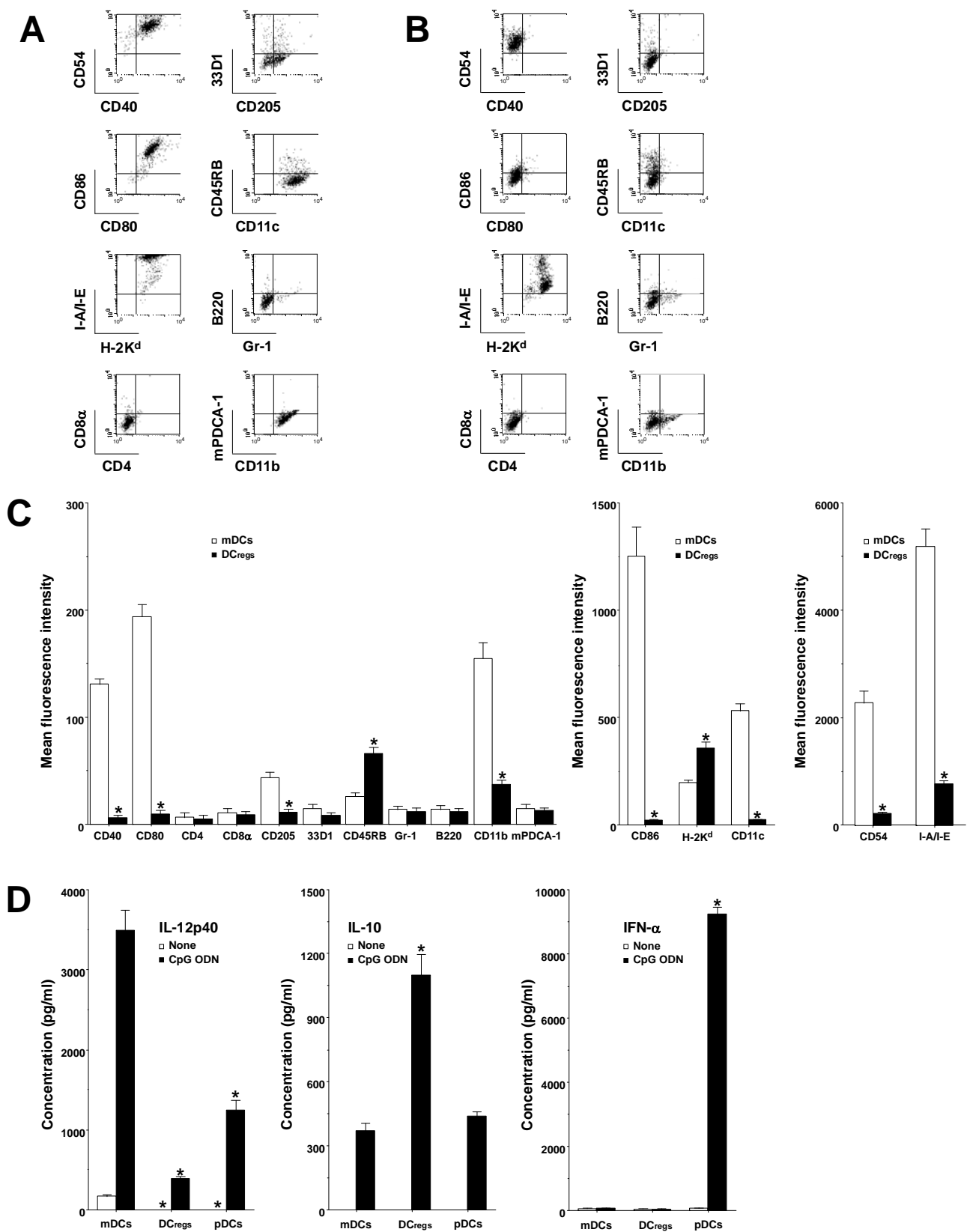


図6 制御性樹状細胞の特性

(A-C) mDCs (A, C) 及び DC_{regs} (B, C) の細胞表面分子の発現をフローサイトメトリー法にて解析し、データをドットプロット (A, B) 及び平均蛍光強度 (C) で示した。**P* < 0.01 ; mDCs と比較。

(D) DCs (5 × 10⁵) を未刺激あるいは CpG ODN (0.1 μM) で 24 時間刺激して、培養上清のサイトカイン産生を測定した。**P* < 0.01 ; mDCs と比較。

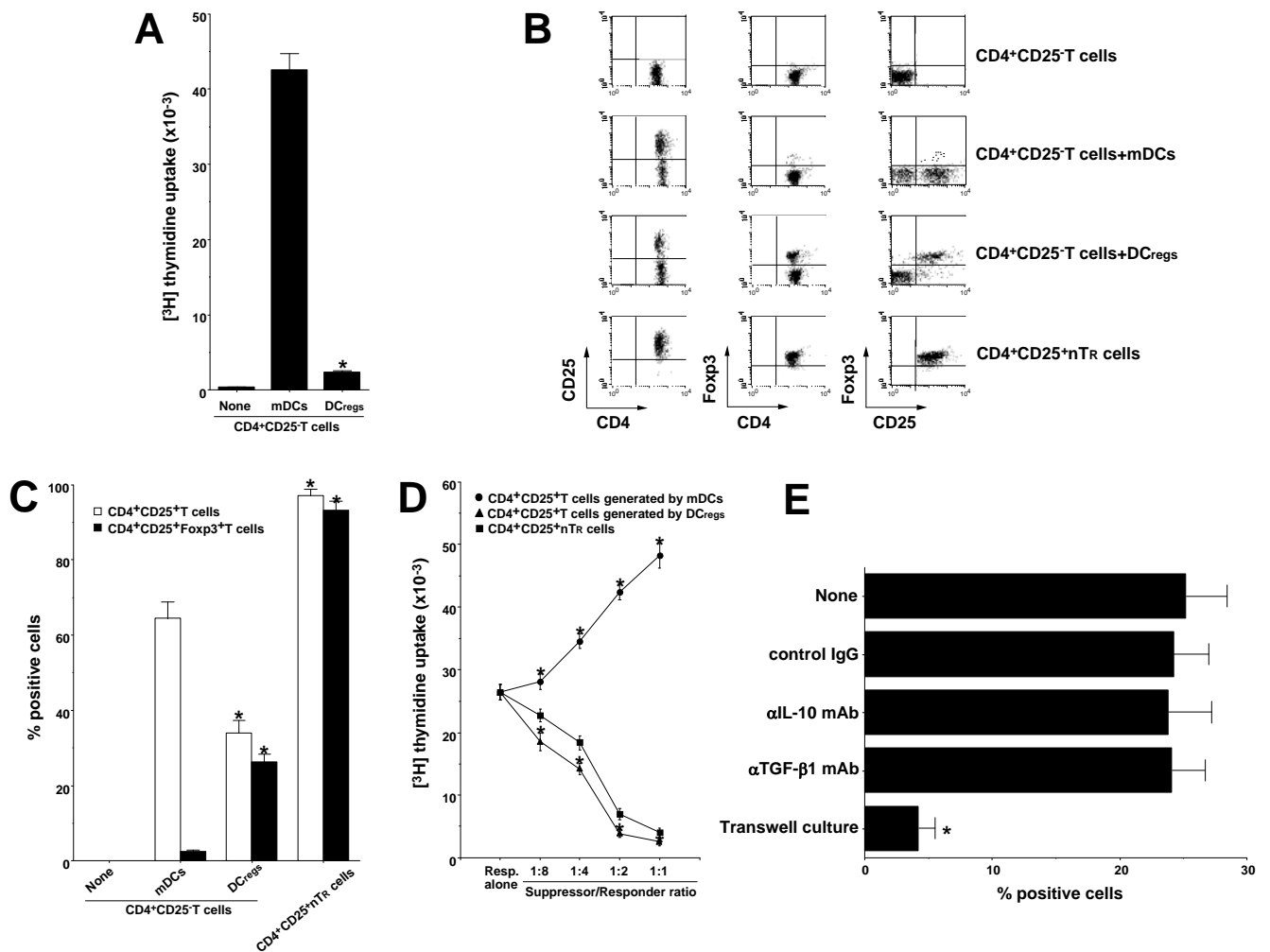


図 7 制御性樹状細胞による *in vitro* での CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 細胞から同種異系反応性 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺制御性 T 細胞の誘導

(A) B10. D2 マウス由来 CD4⁺CD25⁺T 細胞 (2 × 10⁵) を放射線照射した BALB/c マウス由来 DCs (2 × 10⁴) と 3 日間培養して増殖反応を測定した。*P < 0.01 ; mDCs と比較。

(B-D) B10. D2 マウス由来 CD4⁺CD25⁺T 細胞 (5 × 10⁶) を放射線照射した BALB/c マウス由来 DCs (5 × 10⁵) と 7 日間培養して CD4⁺T 細胞を回収した。

(B, C) CD4⁺T 細胞の CD25 及び Foxp3 の発現をフローサイトメトリー法にて解析し、データをドットプロット (B) 及び陽性細胞率 (C) で表した。*P < 0.01 ; 同種異系 mDCs でプライミングされた CD4⁺T 細胞と比較。

(D) B10. D2 マウス由来 CD4⁺CD25⁺T 細胞 (5 × 10⁴) を B10. D2 マウス由来 CD4⁺CD25⁺nTr 細胞あるいはそれぞれの培養より得られた CD4⁺CD25⁺T 細胞 (6.25 × 10³ - 5 × 10⁴) とともに放射線照射した BALB/c マウス由来 mDCs (5 × 10³) と 3 日間培養して増殖反応を測定した。*P < 0.01 ; CD4⁺CD25⁺nTr 細胞と比較。

(E) B10. D2 マウス由来 CD4⁺CD25⁺T 細胞 (1 × 10⁶) を抗 IL-10 阻害抗体 (10 μg/mL)、抗 TGF-β 阻害抗体 (10 μg/mL) またはコントロール Ig (10 μg/mL) の存在下あるいは非存在下で放射線照射した BALB/c マウス由来 DC_{regs} (1 × 10⁵) と 7 日間共培養あるいは分離非接触培養し、CD4⁺T 細胞を回収した。CD4⁺T 細胞の CD25 及び Foxp3 の発現をフローサイトメトリー法にて解析し、データを CD25・Foxp3 陽性細胞率で表した。

*P < 0.01 ; 同種異系 DC_{regs} でプライミングされた CD4⁺T 細胞と比較。

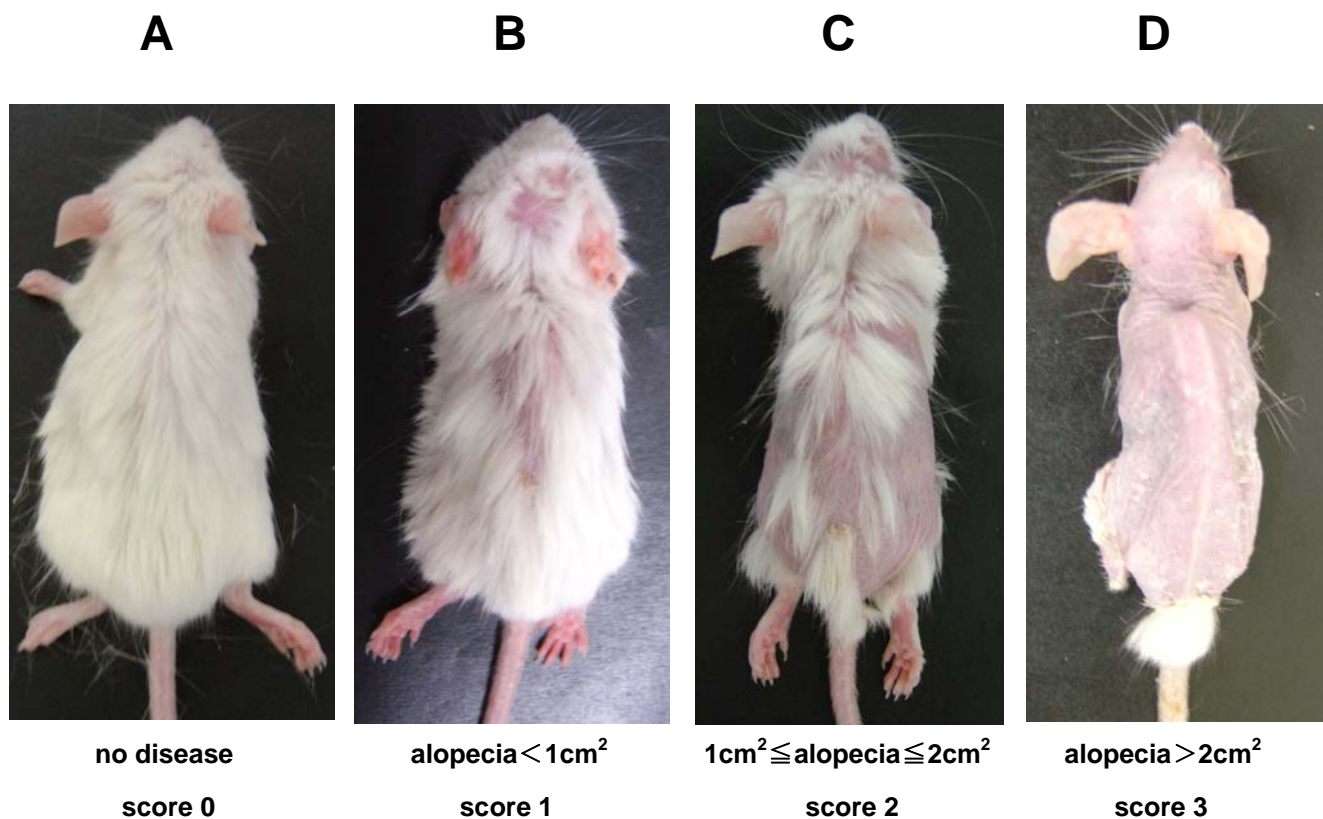


図8 マウス皮膚慢性移植片対宿主病の症状とスコアリング

ドナーB10. D2 マウス由来T細胞除去骨髄細胞 (1×10^6 /マウス1尾) と $CD4^+CD25^-$ T細胞 (2×10^6 /マウス1尾) を TBI (8Gy) 施行後のレシピエント BALB/c マウス (10尾/1群) に移植し、移植後レシピエントマウスの皮膚 cGVHD の症状をモニタリングした。皮膚 cGVHD について、下記のスコアリングを行った。

- (A) 健常外観；スコア 0。
- (B) 皮膚脱毛病変面積 1cm^2 未満；スコア 1。
- (C) 皮膚脱毛病変面積 $1\text{cm}^2 \sim 2\text{cm}^2$ ；スコア 2。
- (D) 皮膚脱毛病変面積 2cm^2 超；スコア 3。

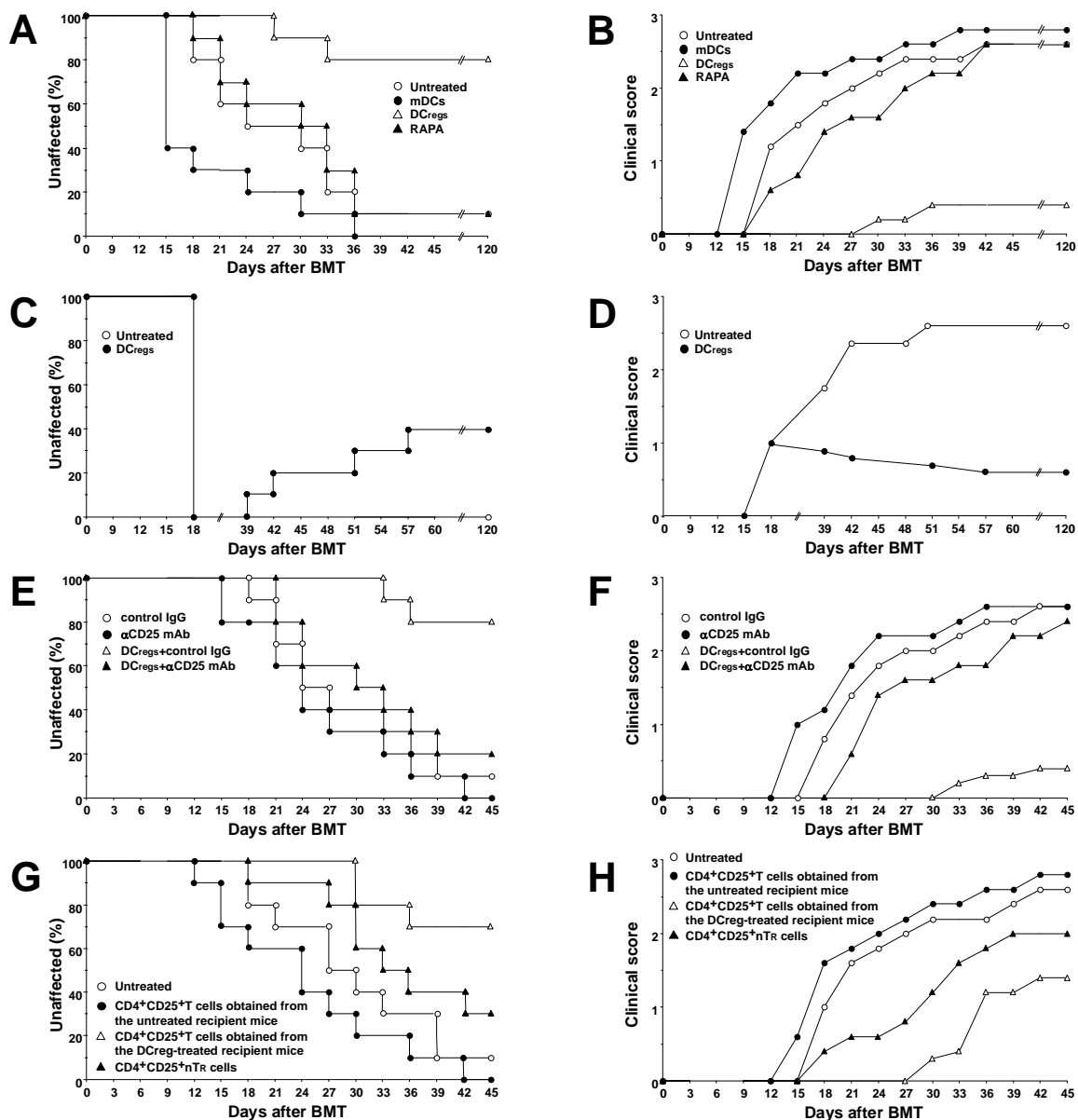


図 9 制御性樹状細胞によるマウス皮膚慢性移植片対宿主病の発症率及び重症度に対する防御効果

(A, B) B10. D2 マウス由来 T 細胞除去骨髄細胞と CD4⁺CD25⁺T 細胞をレシピエント BALB/c マウス(10 尾/1 群)へ移植した(未処置群)。移植後、実験群ではレシピエントタイプ mDCs または DC_{regs}、もしくは RAPA を投与した。皮膚 cGVHD の発症率(A)及び重症度(B)を移植後 120 日間モニタリングした。

(C, D) B10. D2 マウス由来 T 細胞除去骨髄細胞と CD4⁺CD25⁺T 細胞をレシピエント BALB/c マウス(10 尾/1 群)へ移植した(未処置群)。病態発症後、実験群ではレシピエントタイプ DC_{regs} を投与した。皮膚 cGVHD の発症率(C)及び重症度(D)を移植後 120 日間モニタリングした。

(E, F) B10. D2 マウス由来 T 細胞除去骨髄細胞と CD4⁺CD25⁺T 細胞をレシピエント BALB/c マウス(10 尾/1 群)へ移植した。さらに、コントロール Ig または抗 CD25 抗体を単独で、あるいはレシピエントタイプ DC_{regs} とともに投与した。皮膚 cGVHD の発症率(E)及び重症度(F)を移植後 45 日間モニタリングした。

(G, H) B10. D2 マウス由来 CD4⁺CD25⁺nTr 細胞あるいはレシピエントタイプ DC_{regs} 投与群より得られた CD4⁺CD25⁺T 細胞を B10. D2 マウス由来 T 細胞除去骨髄細胞と CD4⁺CD25⁺T 細胞とともにレシピエント BALB/c マウス(10 尾/1 群)へ移入した。皮膚 cGVHD の発症率(G)及び重症度(H)を移植後 45 日間モニタリングした。

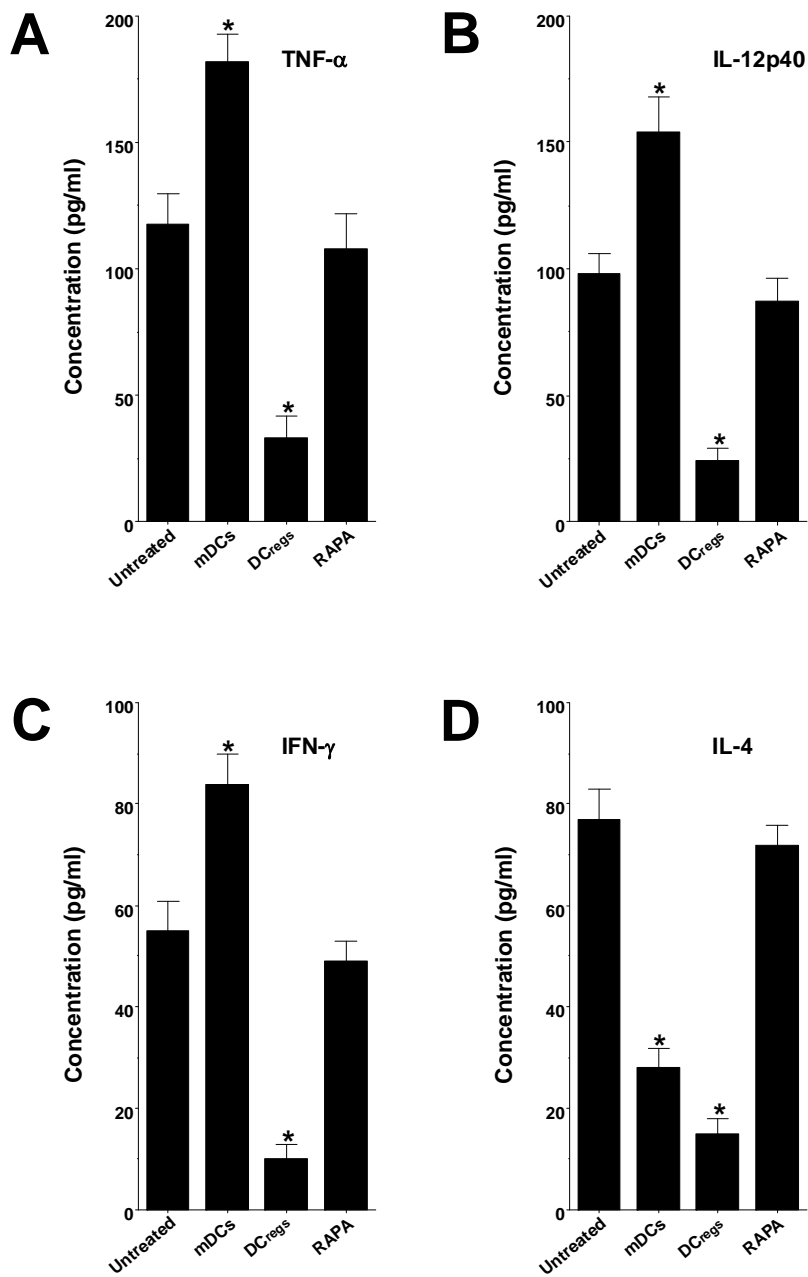


図 10 制御性樹状細胞による移植レシピエントマウスのサイトカイン産生の抑制

図9A, Bに記載した移植レシピエントマウス各群より移植後30日目に血清を回収した。血清中のTNF- α (A)、IL-12p40 (B)、IFN- γ (C)、IL-4 (D)の産生量をELISAにて測定した。* $P < 0.01$; 未処置群と比較。

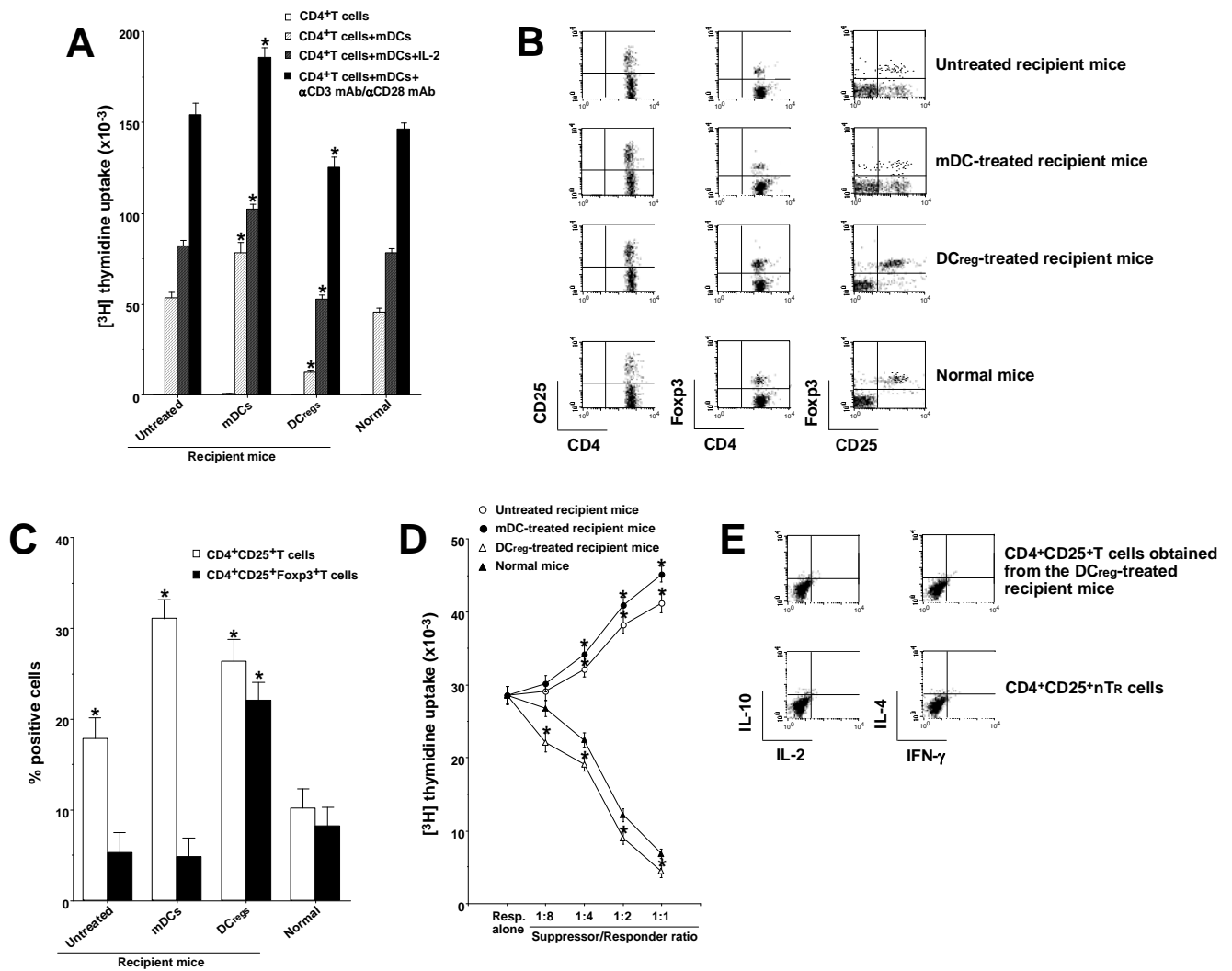


図 11 移植レシピエントマウスにおける制御性樹状細胞によるドナー由来同種異系反応性 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺制御性 T 細胞の誘導

図 9A, B に記載した移植レシピエントマウス各群より移植後 30 日目にドナー由来 CD4⁺T 細胞を回収した。

(A) 移植レシピエントマウス各群より得られた CD4⁺T 細胞 (2×10^5) を IL-2 (10^3 U/mL) または抗 CD3 抗体及び抗 CD28 抗体 (各々 $10 \mu\text{g/mL}$) の存在下あるいは非存在下で放射線照射した BALB/c マウス由来 mDCs (2×10^4) と 3 日間培養して増殖反応を測定した。* $P < 0.01$; 正常 B10. D2 マウスの CD4⁺T 細胞と比較。

(B, C) 移植レシピエントマウス各群より得られた CD4⁺T 細胞の CD25 及び Foxp3 の発現をフローサイトメトリー法にて解析し、データをドットプロット (B) 及び陽性細胞率 (C) で表した。* $P < 0.01$; 正常 B10. D2 マウスの CD4⁺T 細胞と比較。

(D) B10. D2 マウス由来 CD4⁺CD25⁺T 細胞 (5×10^4) を B10. D2 マウス由来 CD4⁺CD25⁺nTr 細胞あるいは移植レシピエントマウス各群より得られた CD4⁺CD25⁺T 細胞 ($6.25 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$) とともに放射線照射した BALB/c マウス由来 mDCs (5×10^3) と 3 日間培養して増殖反応を測定した。* $P < 0.01$; CD4⁺CD25⁺nTr 細胞と比較。

(E) B10. D2 マウス由来 CD4⁺CD25⁺nTr 細胞あるいはレシピエントタイプ DC_{regs} 投与群より得られた CD4⁺CD25⁺T 細胞の IL-2、IL-4、IL-10、IFN- γ の産生をフローサイトメトリー法にて解析し、データをドットプロットで表した。

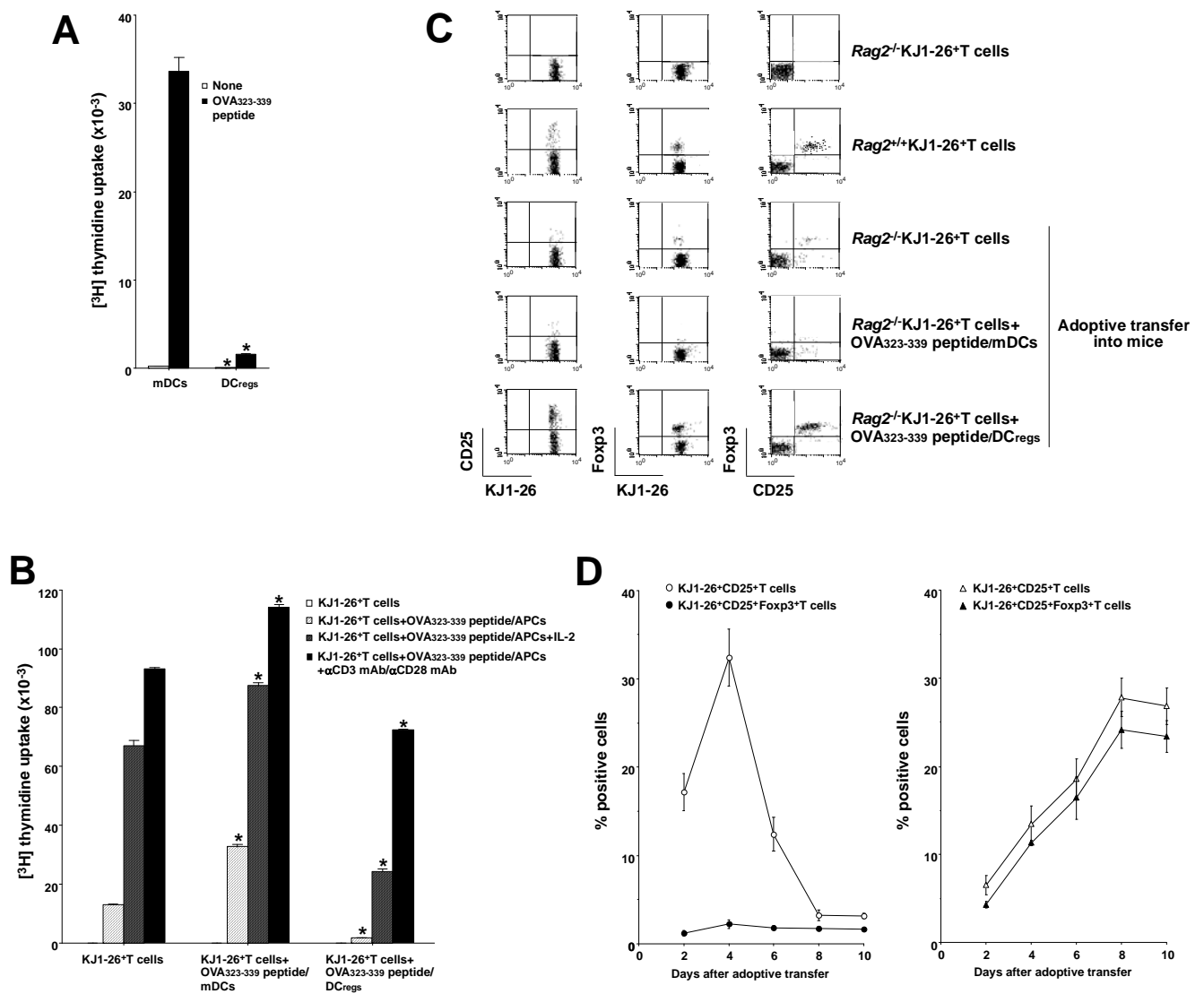


図 12 抗原ペプチド添加制御性樹状細胞による $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T 細胞から $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ 制御性 T 細胞の抗原特異的末梢誘導

(A) $Rag2^{-/-}$ KJ1-26⁺T 細胞 (5×10^4) を放射線照射同系 DCs (5×10^3) と 3 日間培養して増殖反応を測定した。

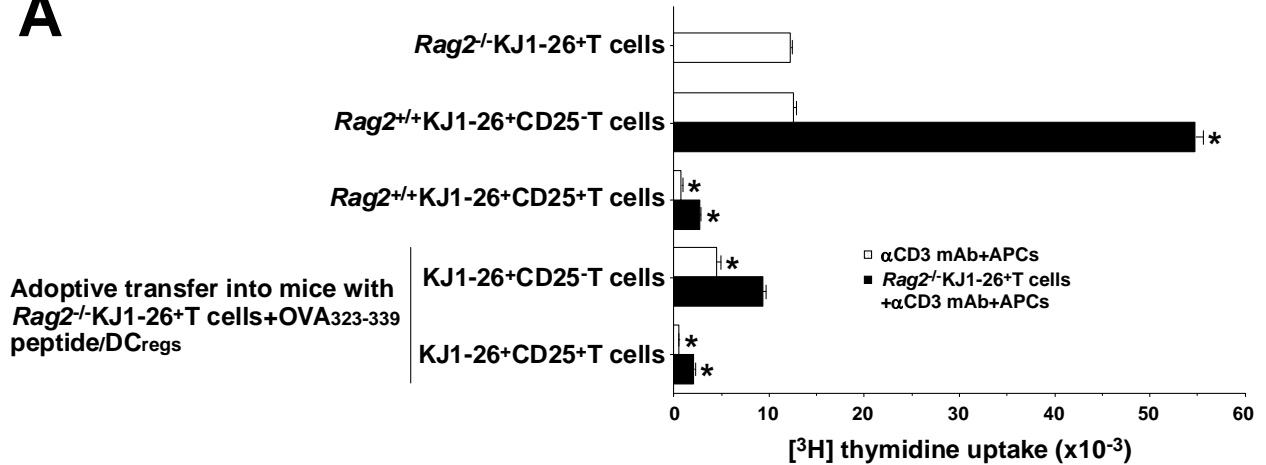
* $P < 0.01$; mDCs と比較。

(B-D) $Rag2^{-/-}$ KJ1-26⁺T 細胞を単独で、あるいは $OVA_{323-339}$ ペプチド添加 mDCs または $OVA_{323-339}$ ペプチド添加 DC_{regs} とともに BALB/c マウスに移入した。移入レシピエントマウスより移入後 8 日目 (B, C) あるいは記載された日数 (D) に $Rag2^{-/-}$ KJ1-26⁺T 細胞を分離した。

(B) 移入レシピエントマウス各群より得られた $Rag2^{-/-}$ KJ1-26⁺T 細胞 (1×10^5) を IL-2 (10^3 U/mL) または抗 CD3 抗体及び抗 CD28 抗体 (各々 10μ g/mL) の存在下あるいは非存在下にて $OVA_{323-339}$ ペプチド (1μ M)、放射線照射同系脾細胞 (1×10^5) と 3 日間培養して増殖反応を測定した。* $P < 0.01$; 単独移入群より得られた $Rag2^{-/-}$ KJ1-26⁺T 細胞と比較。

(C, D) $Rag2^{-/-}$ D011.10 BALB/c マウス由来 $Rag2^{-/-}$ KJ1-26⁺T 細胞、 $Rag2^{+/+}$ D011.10 BALB/c マウス由来 $Rag2^{+/+}$ KJ1-26⁺細胞あるいは移入レシピエントマウス各群より得られた $Rag2^{-/-}$ KJ1-26⁺T 細胞の CD25 及び Foxp3 の発現をフローサイトメトリー法にて解析し、データをドットプロット (C) で表した。また陽性細胞率 (D) を $OVA_{323-339}$ ペプチド添加 mDCs 移入実験群 (D-左) 及び $OVA_{323-339}$ ペプチド添加 DC_{regs} 移入実験群 (D-右) について示した。

A



B

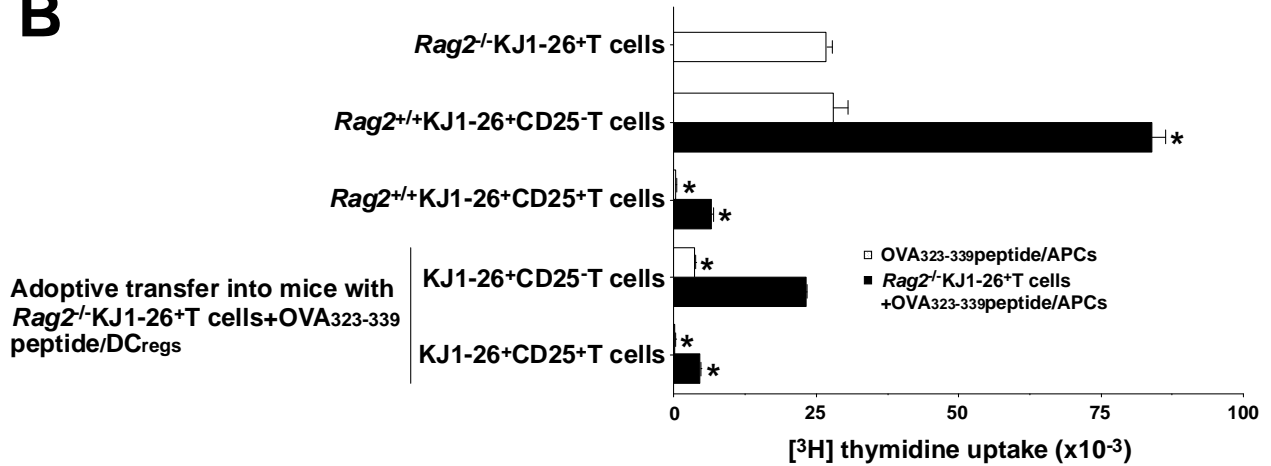


図 13 抗原ペプチド添加制御性樹状細胞により in vivo で誘導された CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 制御性 T 細胞の制御機能

Rag2^{-/-} KJ1-26⁺T 細胞を OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチド添加 DC_{regs} とともに BALB/c マウスに移入した。移入レシピエントマウスより移入後 8 日目に Rag2^{-/-} KJ1-26⁺CD25⁺T 細胞及び Rag2^{-/-} KJ1-26⁺CD25⁺T 細胞を分離した。Rag2^{-/-} DO11.10 BALB/c マウス由来 Rag2^{-/-} KJ1-26⁺T 細胞 (5 × 10⁴)、Rag2^{-/-} DO11.10 BALB/c マウス由来 Rag2^{+/+} KJ1-26⁺CD25⁺T 細胞や Rag2^{+/+} KJ1-26⁺CD25⁺T 細胞 (5 × 10⁴)、移入レシピエントマウスより得られた Rag2^{-/-} KJ1-26⁺CD25⁺T 細胞や Rag2^{-/-} KJ1-26⁺CD25⁺T 細胞 (5 × 10⁴) を抗 CD3 抗体 (10 μg/mL) (A) または OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチド (1 μM) (B) の存在下で放射線照射同系脾細胞 (5 × 10⁴) と 3 日間培養して増殖反応を測定した。あるいは Rag2^{-/-} DO11.10 BALB/c マウス由来 Rag2^{-/-} KJ1-26⁺T 細胞 (5 × 10⁴) を、Rag2^{-/-} DO11.10 BALB/c マウス由来 Rag2^{+/+} KJ1-26⁺CD25⁺T 細胞や Rag2^{+/+} KJ1-26⁺CD25⁺T 細胞 (5 × 10⁴)、移入レシピエントマウスより得られた Rag2^{-/-} KJ1-26⁺CD25⁺T 細胞や Rag2^{-/-} KJ1-26⁺CD25⁺T 細胞 (5 × 10⁴) とともに抗 CD3 抗体 (10 μg/mL) (A) または OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチド (1 μM) (B) の存在下で放射線照射同系脾細胞 (5 × 10⁴) と 3 日間培養し、増殖反応を測定した。*P < 0.01 ; Rag2^{-/-} KJ1-26⁺T 細胞と比較。

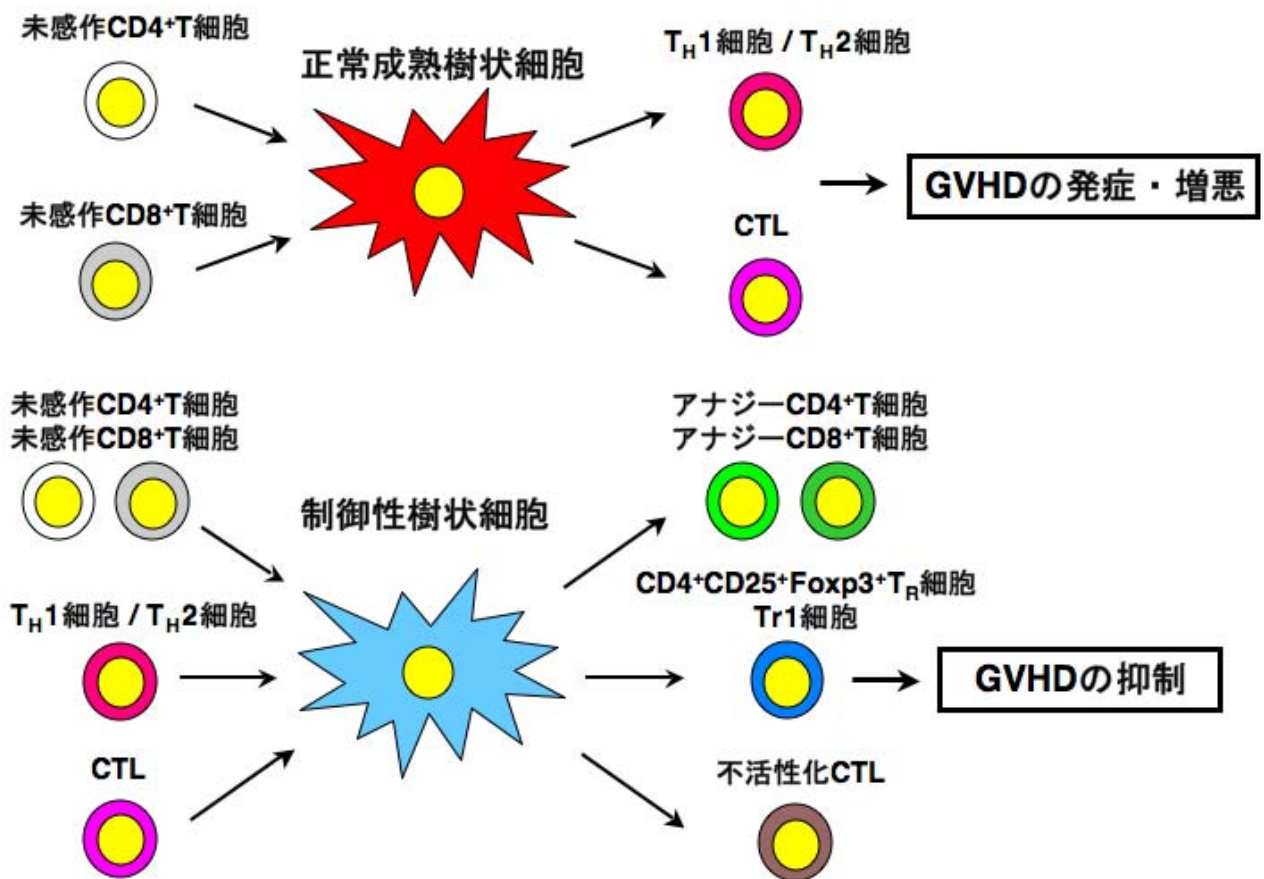


図 14 制御性樹状細胞による移植片対宿主病の制御

同種異系骨髄移植を受けたレシピエントマウスにおいて、炎症刺激により誘導されたレシピエント mDCs や投与されたレシピエントタイプ mDCs は同種異系反応性ドナーT細胞を活性化し、GVHDの発症・増悪を引き起こす。一方、レシピエントタイプ DC_{regs}を投与すると同種異系反応性ドナーCD4⁺T細胞・CD8⁺T細胞に対して抗原特異的アナジーを誘導するとともにドナー由来 Tr1細胞と CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R細胞を誘導してGVHDを抑制する。

X. 参考文献

1. Matte CC, Liu J, Cormier J, Anderson BE, Athanasiadis I, Jain D, McNiff J, Shlomchik WD. Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. *Nat Med.* 2004; 10: 987-992.
2. Shlomchik WD. Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7: 340-352.
3. Baird K, Pavletic SZ. Chronic graft versus host disease. *Curr Opin Hematol.* 2006; 13: 426-435.
4. Anderson BE, McNiff JM, Matte C, Athanasiadis I, Shlomchik WD, Shlomchik MJ. Recipient CD4⁺ T cells that survive irradiation regulate chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 2004; 104: 1565-1573.
5. Anderson BE, McNiff JM, Jain D, Blazar BR, Shlomchik WD, Shlomchik MJ. Distinct roles for donor- and host-derived antigen-presenting cells and costimulatory molecules in murine chronic graft-versus-host disease: requirements depend on target organ. *Blood.* 2005; 105: 2227-2234.
6. 日本造血細胞移植学会. 造血細胞移植ガイドライン-GVHD の診断と治療に関するガイドライン. *JSHCT monograph Vol.1.* 1999.
7. 日本造血細胞移植学会. 全国データ集計事務局平成 16 年度全国調査報告書. 2005.
8. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity.* 2006; 24: 677-688.
9. Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99: 351-358.
10. Roncarolo MG, Levings MK, Traversari C. Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells. *J Exp Med.* 2001; 193: F5-F9.
11. Wing K, Fehervari Z, Sakaguchi S. Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells. *Int Immunol.* 2006; 18: 991-1000.
12. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000;

- 18: 767–811.
13. Sato K, Fujita S. Dendritic cells—nature and classification. *Allergol. Int.* 2007; 56: 183–191.
 14. Villadangos JA, Schnorrer P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7:543–555.
 15. Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, von Boehmer H. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol.* 2005; 6: 1219–1227.
 16. Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med.* 2000; 191: 411–416.
 17. Morelli AE, Thomson AW. Dendritic cells: regulators of alloimmunity and opportunities for tolerance induction. *Immunol Rev.* 2003; 196: 125–146.
 18. Wakkach A, Fournier N, Brun V, Breittmayer JP, Cottrez F, Groux H. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity.* 2003; 18: 605–617.
 19. Chorny A, Gonzalez-Rey E, Fernandez-Martin A, Ganea D, Delgado M. Vasoactive intestinal peptide induces regulatory dendritic cells that prevent acute graft-versus-host disease while maintaining the graft-versus-tumor response. *Blood.* 2006; 107: 3787–3794.
 20. Sato K, Yamashita N, Yamashita N, Baba M, Matsuyama T. Regulatory dendritic cells protect mice from murine acute graft-versus-host disease and leukemia relapse. *Immunity.* 2003; 18: 367–379.
 21. Sato K, Yamashita N, Baba M, Matsuyama T. Modified myeloid dendritic cells act as regulatory dendritic cells to induce anergic and regulatory T cells. *Blood.* 2003; 101: 3581–3589.
 22. Fujita S, Seino K, Sato K, Sato Y, Eizumi K, Yamashita N, Taniguchi M, Sato K. Regulatory dendritic cells act as regulators of acute lethal systemic inflammatory response. *Blood.* 2006; 107: 3656–3664.
 23. Fujita S, Yamashita N, Ishii Y, Sato Y, Sato K, Eizumi K, Fukaya T, Nozawa R, Takamoto Y, Yamashita N, Taniguchi M, Sato K. Regulatory dendritic

- cells protect against allergic airway inflammation in a murine asthmatic model. *J Allergy Clin Immunol*. 2008; 121: 95-104.
24. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003; 299: 1057-1061.
25. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol*. 2004; 5:1219-1226.
26. Stock P, Akbari O, Berry G, Freeman GJ, DeKruyff RH, Umetsu DT. Induction of T helper type 1-like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyper-reactivity. *Nat Immunol*. 2004; 5: 1149-1156.
27. Ochando JC, Homma C, Yang Y, Hidalgo A, Garin A, Tacke F, Angeli V, Li Y, Boros P, Ding Y, Jessberger R, Trinchieri G, Lira SA, Randolph GJ, Bromberg JS. Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol*. 2006; 7: 652-662.
28. Yamazaki S, Patel M, Harper A, Bonito A, Fukuyama H, Pack M, Tarbell KV, Talmor M, Ravetch JV, Inaba K, Steinman RM. Effective expansion of alloantigen-specific Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells by dendritic cells during the mixed leukocyte reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103: 2758-2763.
29. Luo X, Tarbell KV, Yang H, Pothoven K, Bailey SL, Ding R, Steinman RM, Suthanthiran M. Dendritic cells with TGF- β 1 differentiate naïve CD4⁺CD25⁻ T cells into islet-protective Foxp3⁺ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104: 2821-2826.
30. Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, Bruns CJ, Zuelke C, Farkas S, Anthuber M, Jauch KW, Geissler EK. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med*. 2002; 8:128-135.
31. Blazar BR, Taylor PA, Panoskaltsis-Mortari A, Vallera DA. Rapamycin inhibits the generation of graft-versus-host disease- and graft-versus-leukemia-causing T cells by interfering with the production of Th1 or Th1 cytotoxic cytokines. *J Immunol*. 1998; 160: 5355-5365.

32. Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S. Donor-type CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med.* 2002; 196: 389-399.
33. Hayashi RJ, Loh DY, Kanagawa O, Wang F. Differences between responses of naive and activated T cells to anergy induction. *J Immunol.* 1998; 160: 33-38.
34. Saparov A, Kraus LA, Cong Y, Marwill J, Xu XY, Elson CO, Weaver CT. Memory/effector T cells in TCR transgenic mice develop via recognition of enteric antigens by a second, endogenous TCR. *Int Immunol.* 1999; 11: 1253-1263.

XI.謝辞

平成十三年に研修医となり東京大学医科学研究所附属病院に配属して以来、一貫して御指導を賜りました東京大学医科学研究所附属病院 病院長・先端診療部教授 山下直秀先生に深謝申し上げます。

本研究は全て平成十七年大学院進学時に山下直秀教授より共同研究先の研究室として御紹介を賜りました、理化学研究所 横浜研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター 樹状細胞機能研究チームにて行われました。同研究室での共同研究におきまして温かき御助力を賜りました佐藤由美子氏、佐藤馨氏、江泉香里氏、深谷知宏氏、高木秀明氏、山元舞氏に深く感謝申し上げます。

最後に、本研究を含めた私の博士課程の研究の遂行につきまして四年の長きに亘って日々常に情熱と厳しさをもって叱咤激励下さり、公私に亘る多大の御支援を賜りました同研究室チームリーダー 佐藤克明先生に、衷心より深謝申し上げます。