

樹状細胞機能研究チーム

Laboratory for Dendritic Cell Immunobiology

チームリーダー 佐藤 克明
SATO, Katsuaki

樹状細胞は分化系列や活性化・成熟段階の異なる多様な細胞集団から構成されており、自然免疫系と獲得免疫系を繋ぐ最も強力な抗原提示細胞として免疫応答を惹起・増強するのみならず、免疫寛容を誘導する制御細胞（制御性樹状細胞）として免疫学的恒常性の維持にも関与している。従って、樹状細胞の多面的な性状解析が免疫システム制御機構の理解に繋がることが期待されるとともにがん・感染症や免疫疾患に対する新しい免疫療法の開発に寄与するものと考えられる。

当研究チームでは、ヒトとマウスの樹状細胞の改変により強力な T 細胞機能制御能を有する制御性樹状細胞を作製し、制御性樹状細胞による免疫応答制御の解明と免疫疾患に対する制御性樹状細胞を用いた新規免疫療法の開発を行っている。今後は制御性樹状細胞による免疫応答制御の分子レベルでの解明とともに自己免疫疾患、アレルギー疾患等の免疫疾患に対する制御性樹状細胞を用いた新規免疫療法の開発を中心に研究を行う。

1. 急性移植片対宿主病と白血病再発に対する TRAIL 遺伝子導入樹状細胞を用いた遺伝子療法の開発（佐藤（克）、佐藤（馨））

TNF (tumor necrosis factor) ファミリーに属する TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) は腫瘍細胞に対しアポトーシスを誘導し、活性化 T 細胞に対しては細胞周期の阻害効果を示すことが知られている。

本研究では、異系抗原反応性 T 細胞の抗原特異的機能制御に基づく急性移植片対宿主病 (GVHD ; graft-versus-host disease) ならびに白血病再発に対する新規遺伝子療法の確立を目的として、ヒトとマウスの TRAIL 発現組換えアデノウイルス (TRAIL-adenovirus ; TRAIL-Ad) を用いて TRAIL 遺伝子導入樹状細胞を作製し、その T 細胞機能制御能とともに、マウス異系骨髄移植における急性 GVHD と白血病再発に対する治療効果について検討を行った。

(1) ヒト TRAIL 導入成熟樹状細胞の T 細胞機能制御の検討

ヒト TRAIL-Ad を感染させた成熟樹状細胞 (ヒト TRAIL 導入成熟樹状細胞) では未感染成熟樹状細胞やコントロール組換えアデノウイルス (control-Ad) 感染成熟樹状細胞と比較して、MHC 分子・共刺激分子 (CD40, CD80, CD86) の発現に差異は認められず、導入 TRAIL の高発現が認められた。TRAILR (TRAIL receptor) である DR (death receptor) 4, DR5, DcR (Decoy receptor) 1, DcR2 の発現解析では、成熟樹状細胞は未熟樹状細胞と比較して、これら TRAILR の発現減弱が認められた。また、CD4⁺T 細胞および Con A 芽球ではこれら TRAILR の発現が認められず、成熟樹状細胞と共培養した異系 CD4⁺T 細胞ではヒト TRAIL 感受性細胞株である Jurkat 細胞株と同様に DR5 の高発現が認められた。一方、機能解析において、ヒト可溶性 TRAIL やヒト TRAIL 導入成熟樹状細胞は CD4⁺T 細胞および Con A 芽球に対して共に顕著な細胞傷害活性を示さなかったが、ヒト TRAIL 導入成熟樹状細胞はヒト可溶性 TRAIL と比較して Jurkat に対するより高い細胞傷害活性を示し、この活性は抗ヒト TRAIL 抗体や抗ヒト DR5 抗体

によりほぼ完全に阻害された。また、ヒト可溶性 TRAIL は成熟樹状細胞により活性化された異系 CD4⁺T 細胞に対して弱い増殖抑制効果を示したが、ヒト TRAIL 導入成熟樹状細胞はアポトーシスの誘導に基づく著しい増殖抑制効果を示し、この効果は抗ヒト TRAIL 抗体や抗ヒト DR5 抗体によりほぼ完全に阻害された。以上の結果から、ヒト TRAIL 導入樹状細胞は異系反応性により DR5 の特異的発現が誘導された CD4⁺T 細胞に対してアポトーシスの誘導に基づく T 細胞機能制御能を示すことが明らかとなった。

(2) マウス TRAIL 導入成熟樹状細胞を用いた遺伝子療法
ヒト TRAIL 導入成熟樹状細胞と同様にマウス TRAIL 導入成熟樹状細胞はマウス DR5 の高発現を示す L929 細胞株と P815 白血病株に対する顕著な細胞傷害活性を示し、この効果は抗マウス TRAIL 抗体によりほぼ完全に阻害された。また、マウス TRAIL 導入成熟樹状細胞は異系反応性により DR5 の発現誘導が認められた CD4⁺T 細胞に対してアポトーシスの誘導に基づく著しい増殖抑制効果を示し、これらの効果は抗マウス TRAIL 抗体によりほぼ完全に阻害された。

マウス異系骨髄移植での急性 GVHD モデルを用いて、マウス TRAIL 導入成熟樹状細胞の治療効果について検討を行った。その結果、異系骨髄細胞と脾細胞の移植を施行されたレシピエントマウスでは、急性 GVHD の発症により全例死亡したが、移植後にマウス TRAIL 導入成熟樹状細胞を投与することにより顕著な延命効果が認められた。また、これら延命効果が認められたレシピエントマウスでは、ドナー由来 CD4⁺T 細胞のレシピエント成熟樹状細胞に対する反応性の低下、ドナー由来 CD8⁺T 細胞のレシピエントタイプ標的細胞に対する細胞傷害活性の低下、炎症性サイトカイン産生の低下が認められた。

さらに、マウス白血病再発モデルを用いてマウス TRAIL 導入成熟樹状細胞の治療効果について検討を行った。その結果、P815 白血病株を移植したレシピエントマウスでは白血病により全例死亡した。一方、異系骨髄細胞を移植した白血病再発レシピエントマウスでは異系骨髄 T 細胞の移植

片対白血病 (GVL ; graft-versus-leukemia) 効果に基づく弱い延命効果が認められたが、これらにマウス TRAIL 導入成熟樹状細胞を投与することにより顕著な延命効果が認められた。

以上の結果から、マウス TRAIL 導入成熟樹状細胞はドナー由来異系反応性 CD4⁺T 細胞と白血病細胞に対して選択的なアポトーシスを介した細胞傷害活性を示すことにより、異系骨髄移植での急性 GVHD と白血病再発に対して治療効果を示すことが明らかとなった。

2. 敗血症に対する制御性樹状細胞を用いた免疫細胞療法 (佐藤 (克), 佐藤 (馨), 佐藤 (由), 竹内)

近年、免疫学的恒常性維持機構での免疫寛容の誘導における未熟樹状細胞ならびに特定の免疫寛容誘導性樹状細胞 (tolerogenic 樹状細胞) サブセットの関与が明らかになりつつある。一方、細菌感染等による宿主炎症反応の誘導機構については詳細な知見が得られているが、その制御機構についてはいまだ不明な点が多く残されている。

敗血症を代表とした感染に起因する全身性炎症反応症候群に対する治療法については、外科的インターベンション、抗生物質投与、ステロイド製剤投与、体外循環によるエンドトキシン除去 (PMX 治療) が用いられているが、副作用とともに奏効性が大きな問題となっており、新規治療法の確立が望まれている。一方、現在までに、動物実験モデルにおいて、敗血症の原因物質となる菌体成分 (リポ多糖 [LPS ; lipopolysaccharide] 等) に対する抗体、免疫細胞の菌体成分受容体に対する抗体および拮抗分子、免疫細胞内シグナル伝達活性化阻害分子、炎症性メディエーターに対する抗体および拮抗分子、抗炎症性サイトカイン、アポトーシス阻害剤、lysophosphatidylcholine 等を用いた敗血症に対する前臨床研究がなされ、予防・治療効果が認められており、さらに、抗 LPS 抗体、抗 TNF (tumor necrosis factor) - α 抗体、IL (interleukin) -1 レセプター拮抗分子、IL-10 について臨床試験がなされたが、有効な効果は認められていない。

本研究では、敗血症に対する新規免疫細胞療法の確立を目的として、マウス実験的敗血症モデルにおいて制御性樹状細胞を用いた免疫細胞療法の予防・治療効果を検討した。

正常樹状細胞と制御性樹状細胞では LPS レセプターである TLR (Toll-like receptor) 4-MD2 複合体のほぼ同等の発現レベルが認められた。正常樹状細胞では LPS 誘導性の炎症性サイトカインの著しい産生が認められたが、制御性樹状細胞では LPS 誘導性の炎症性サイトカインの産生が認められず、IL-10 の顕著な産生を示した。正常樹状細胞は LPS 活性化マクロファージの炎症性サイトカイン産生に対して弱い抑制効果を示したが、制御性樹状細胞はこれを著しく抑制した。

さらに、この抑制効果は抗 IL-10 抗体により著しく阻害されるとともに、IL-10 遺伝子欠損 (IL-10KO) マウスより作製された制御性樹状細胞では抑制効果の著しい減弱が認められた。また、D-ガラクトサミン感作マウスにおいて、正常樹状細胞の投与では LPS 投与によるマウス血清中の炎症性サイトカイン産生に対して弱い抑制効果が示されたが、制御性樹状細胞の投与では、炎症性サイトカイン産生が著しく抑制され、かつ IL-10 産生が増強された。一方、実験

的エンドトキシン血症モデル、実験的細菌性腹膜炎致死モデルおよび盲腸結紮穿孔による致死モデルにおいて、正常樹状細胞の発症後の投与では有意な延命効果は認められなかったが、制御性樹状細胞の発症後の投与により顕著な延命効果が認められた。さらに、盲腸結紮穿孔による致死モデルにおける制御性樹状細胞の延命効果は抗 IL-10 抗体の投与により阻害されるとともに、IL-10KO マウスより作製された制御性樹状細胞では延命効果の著しい減弱が認められた。

以上の結果から、制御性樹状細胞を用いた免疫細胞療法は敗血症に対して治療効果を示すことが明らかとなり、その作用機序の 1 つとして、菌体成分による活性化マクロファージに対する制御性樹状細胞の IL-10 を介した抑制効果が示された。さらに、本研究より制御性樹状細胞を例とした tolerogenic 樹状細胞が生体の炎症反応における制御性細胞として作用することが示唆された。

1. TRAIL-transduced dendritic cells protect mice from acute graft-versus-host disease and leukemia relapse

TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) preferentially induces apoptotic cell death in a wide variety of transformed cells whereas it induces no apoptosis but inhibits activation of Ag-specific T cells via blockade of cell cycle progression. Although accumulating results suggest that TRAIL is involved in the maintenance of immunological homeostasis under steady state conditions as well as in the initiation and progression of immunopathologies, the potential regulatory effect of TRAIL on immune responses and its therapeutic potential in immunological diseases remain unclear. We report here the potential usefulness of TRAIL-transduced DCs for the treatment of lethal acute graft-versus-host disease (GVHD) and leukemia relapse. DCs genetically modified to express TRAIL showed potent cytotoxicity against both alloreactive T cells and leukemic cells through the induction of apoptosis. In addition, the treatment of the recipients of allogeneic BM transplantation (BMT) bearing leukemia with genetically modified DCs expressing TRAIL was effective for the protection against acute GVHD and leukemia relapse. Thus, gene transfer of TRAIL to DCs is a novel modality for the treatment of acute GVHD and leukemia relapse by selective targeting the pathogenic T cells and leukemic cells.

2. Regulatory dendritic cells act as regulators of acute lethal systemic inflammatory response

Dendritic cells (DCs) are a crucial link between innate and adaptive immunity. Accumulating results suggest that several DC subsets are involved in the maintenance of peripheral T-cell tolerance as well as the regulation of the evoked T-cell response. However, the regulation of host inflammatory response remains unknown. Here we report that regulatory DCs (DC_{reg}), which are potent tolerogenic DCs, control the systemic inflammatory response. Unlike normal DCs, which produced proinflammatory cytokines in response to bacterial lipopolysaccharide (LPS), DC_{reg} did not produce proinflammatory cytokines and instead preferentially produced interleukin (IL)-10. In addition, DC_{reg} suppressed not only LPS-induced production of proinflammatory cytokines in macrophages, but also reduced their serum levels in mice with experimental en-

dotoxemia. Furthermore, DC_{reg} protected mice against the lethality induced by experimental endotoxemia and bacterial peritonitis. The inhibitory effect of DC_{reg} against inflammatory responses both in vivo and in vitro involved the production of IL-10. Thus, a subset of tolerogenic DCs act as potential regulators of the host inflammatory response, and they might have preventive and therapeutic potential for the treatment of systemic as well as local inflammatory diseases.

Staff

Laboratory Head

Dr. Katsuaki SATO

Technical Staff

Ms. Kaori SATO

Ms. Yumiko SATO

Mr. Akio TAKEUCHI

Assistant

Ms. Mai YAMAMOTO

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(総 説)

佐藤克明: “ヒト樹状細胞”, *Biotherapy* **18**, 467–477 (2004).

佐藤克明, 松山隆美: “樹状細胞を用いた膠原病治療の可能性”, *Mol. Med.* **41**, 210–216 (2004).

佐藤克明, 松山隆美: “制御性樹状細胞による GVHD 抑制”, *炎症と免疫* **12**, 273–279 (2004).

佐藤克明, 松山隆美: “制御性樹状細胞による急性 GVHD 制

御”, *実験医学* **22**, 682–688 (2004).

佐藤克明, 松山隆美: “樹状細胞による免疫応答の制御”, *臨床免疫* **41**, 61–68 (2004).

佐藤克明: “樹状細胞サブセットの多様性”, *臨床免疫* **41**, 649–655 (2004).

佐藤克明: “制御性樹状細胞を用いた免疫細胞療法”, *臨床免疫* **42**, 241–244 (2004).

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国内会議)

佐藤克明: “制御性樹状細胞を用いた免疫療法”, 第 13 回東京免疫フォーラム, (東京大学医科学研究所 感染・免疫大部門免疫調節分野), 東京, 5 月 (2004).

佐藤克明: “TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) 遺伝子導入 regulatory 樹状細胞を用いた関節リウマチに対する新規細胞・遺伝子治療法の開発”, 神澤医学研究振興財団第 6 回講演会, 東京, 6 月 (2004).

佐藤克明: “制御性樹状細胞を用いた免疫療法”, 第 15 回日本樹状細胞研究会, (関西医科大学), 京都, 7 月 (2004).

佐藤克明: “樹状細胞機能研究と弊社製品の IMag の使用例について”, 藤沢薬品工業株式会社医療関連事業部学術研修, 東京, 10 月 (2004).

佐藤克明: 第 11 回移植免疫制御 21, (バイエル薬品株式会社), 東京, 11 月 (2004).

佐藤克明, 山下直秀, 八木田秀雄, 河崎寛, 森本幾夫, 馬場昌範, 松山隆美: “TRAIL 遺伝子導入樹状細胞を用いた急性移植片対宿主病と白血病再発に対する免疫療法”, 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌, 12 月 (2004).

佐藤克明: “GVHD に対する制御性樹状細胞を用いた免疫細胞療法”, 第 27 回日本造血細胞移植学会総会シンポジウム 2 「GVHD; 基礎研究から臨床応用の時代へ」, 岡山, 12 月 (2004).