

樹状細胞クロストークによる新規免疫賦活機構の解明*

桑 島 精 一

秋田大学医学部病理病態医学講座生体防御学分野

(平成 20 年 4 月 30 日掲載決定)

Clarification of immunostimulating mechanism by dendritic cell crosstalk

Seiichi Kuwajima

*Division of Immunology, Department of Pathology and Immunology,
Akita University School of Medicine, Akita 010-8543, Japan*

I. はじめに

CpG モチーフ配列を含む DNA (以下 CpG) による免疫系活性化誘導能についての報告は、1984 年の BCG 由来の DNA 断片が抗腫瘍活性を有することを報告したものに遡る¹⁾。この配列の特徴はウイルスや細菌などの微生物には認められるが脊椎動物においてはほとんど認められない。そして哺乳類は、DNA から蛋白質への翻訳とは無関係に CpG 配列そのものを微生物の侵略と認識して、微生物を排除するための数々の免疫・炎症反応を発動する。これらを応用した CpG DNA の細菌感染症、ウイルス感染症、あるいは癌に対する治療効果が報告されている²⁻⁴⁾。われわれは感染モデルマウスを用いて CpG 配列を含む DNA (以下 CpG) による免疫賦活機序を検討した。その結果 CpG 刺激により生産される IL-12 は、IL-15 依存的に誘導される cDC と pDC のクロストークが必須であることが明らかになった⁵⁾。ここでは、その詳細な役割を紹介する。

II. CpG について

CpG は細菌や DNA ウィルスに特徴的にみられる配列である。これらはシトシン(C)のメチル化率が5%程度と極端に低く、これとは対照的に、脊椎動物では CpG 配列はほとんど認められず、稀に認められてもメチル化されておりアジュバント活性は低い。CpG の名は、グアニン (G) とシトシン (C) がパリンδροーム (回文) 配列をとることに由来する。CpG は、DC やマクロファージさらには B 細胞の細胞内に発現している Toll 様受容体 (TLR) 9 に結合することで、それら細胞の活性化を誘導する。生理的な状態では、TLR9 は細胞質の小胞内に存在し、細胞外からエンドサイトーシスによって取り込まれた CpG と結合する⁶⁻⁸⁾。その後、アダプター蛋白 MyD88 が TLR9 にリクルートされ、TRAF6/TAK1 を介して MAP キナーゼ経路および IKK-I κ B 経路を活性化することによって AP-1 と NF- κ B の核内移行が促進され、炎症性サイトカインを含むさまざまな遺伝子発現を誘導する⁶⁻⁸⁾。それら一連の反応が DC で起これば DC の機能が著しく亢進する²⁻⁴⁾。例えば、抗原の消化・分解および抗原提示能や副刺激分子の発現が上昇し、炎症性サイトカイン特に IL-12 の生産を介した Th1 細胞誘導が著しく促進される。

III. IL-15 について

IL-15 は 14~15 kDa の糖タンパク質であり、IL-2 などと同様 4 つの α -helix をもつサイトカインファ

Correspondence: Seiichi Kuwajima, Ph.D.
Division of Immunology, Department of Pathology
and Immunology, Akita University School of Medicine,
1-1-1 Hondo, Akita 010-8543, Japan
Tel: 81-18-884-6091
Fax: 81-18-884-6444
E-mail: kwjm@med.akita-u.ac.jp
*第 18 回秋田医学会学術奨励賞

(18)

樹状細胞クロストークによる新規免疫賦活機構の解明

ミリーに属する⁹⁾。IL-15 遺伝子は、ヒトの場合第 4 染色体 p31 に、マウスでは第 8 染色体中央に位置し、9 個のエクソンと 8 個のイントロンから構成されている¹⁰⁾。IL-15 mRNA はさまざまな臓器や組織での発現が認められている。細胞レベルではモノサイト、マクロファージ、DC、上皮細胞や繊維芽細胞などでは発現しているが、対照的に、T 細胞や B 細胞などのリンパ球では発現が認められていない。また IL-15 の発現分泌過程は多段階に調節される。IL-15 遺伝子のプロモーター領域の解析により、GCF、NF- κ B、IRF-E、

myb、NF-IL-6 などのモチーフが同定されている。特に IRF-E と NF- κ B モチーフが IL-15 の発現に重要なことが明らかにされている。IRF-E に結合する IRF-1 を欠損するマウスでは、IL-15 mRNA の発現が低下している¹¹⁻¹⁵⁾。また HTLV-1 に感染した T 細胞では、HTLV-1 にコードされた tax 蛋白が NF- κ B モチーフに結合することにより IL-15 の遺伝子発現が上昇している^{16,17)}。一方、IL-15 レセプター (IL-15R) は、固有の α 鎖、IL-2 と共通の β 鎖、IL-2/4/7/9/15/21 と共通の γ 鎖からなる⁹⁾。また、IL-15 は慢性関節

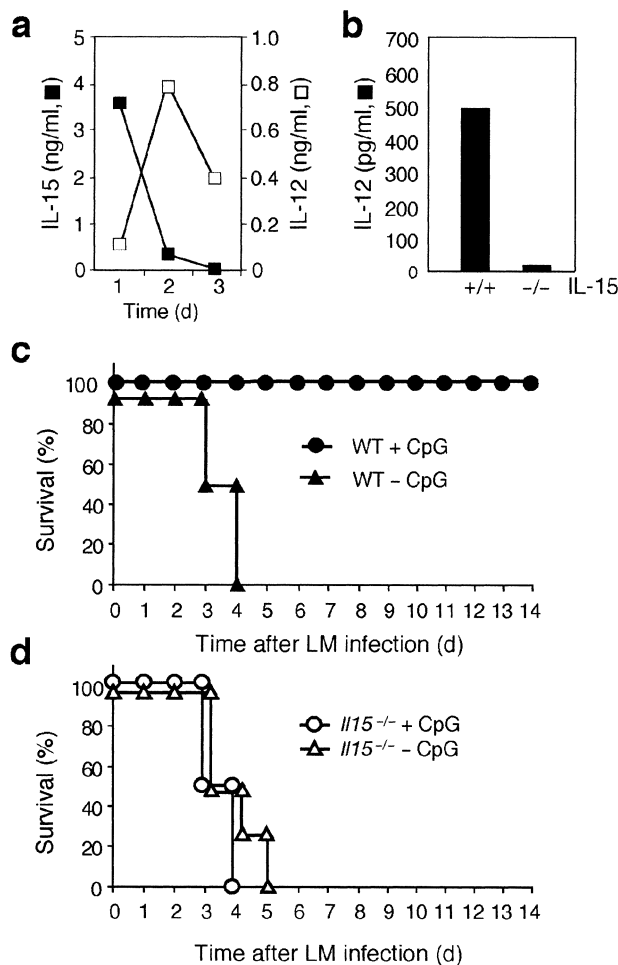


図 1. IL-15^{-/-} マウスでは CpG による免疫賦活が誘導されない

a. CpG (50 μ g) を野生型マウスに投与して血清中の IL-15 および IL-12 p70 を測定した。b. CpG を野生型および IL-15^{-/-} マウスに投与して 48 時間後の血清中の IL-12 p70 レベルを比較した。c. CpG を野生型マウスに投与 3 日後、致死量の LM を感染させて生存率を検討した。コントロールとして CpG 未投与野生型マウスにも同量の LM を感染させた。d. c と同様の実験を IL-15^{-/-} マウスで行った。

リウマチ, 炎症性腸疾患, 多発性硬化症との関連が指摘されている。IL-15は, 自然免疫系を担うNK細胞, NKT細胞, 上皮内TCR $\gamma\delta^+$ 細胞の分化やDCの機能成熟に重要である^{11-15,18}。また獲得免疫系においては, CD8⁺メモリーT細胞の維持に重要であることも明らかにされている¹⁹⁻²¹。

IV. CpGによる免疫賦活誘導とIL-15の重要性

1) CpGによる免疫賦活にはIL-15が必須である

CpGにより誘導される最も知られた免疫賦活作用の1つは, DCからのIL-12生産を著しく亢進させ, これによって強力なTh1反応を誘導することである。CpGの免疫賦活におけるIL-15の重要性を検討すべく, 野生型マウスにCpGを投与して血清中IL-15とIL-12 p70を経時的にELISAで測定した。IL-15の生産はCpG刺激後24時間でピークが認められた。IL-12 p70の生産はCpG刺激後48時間にピークが認められた。興味深いことに, これに対してIL-15^{-/-}マウスではCpG投与48時間後のIL-12 p70の生産が著しく減少していた(図1a, 1b)。またCpGによる免疫賦活効果を評価するために, 致死量の*Listeria monocytogenes* (LM)をCpG投与後に感染させた。

CpGを前投与した野生型マウスは致死量のLM感染に対して非常に強い抵抗性を示し全個体が生存したが, IL-15^{-/-}マウスは短日中に死亡した(図1c, 1d)。これらの結果から, CpG刺激による免疫賦活効果の誘導にはIL-15が必須であることが明らかになった。なお, IL-15^{-/-}マウスのDCにおけるTLR9の発現レベルは正常であった。また, CpGによる免疫賦活とLMの排除にはNK細胞が関与していないことも分かった(未発表データ)。

2) DCから生産されるIL-15の重要性

免疫系におけるIL-15生産細胞は, DC以外にもマクロファージ, モノサイトなど複数存在する。CpG刺激時にどの細胞種からIL-15が生産されるのかを検討した。IL-15の生産源としてのDCの重要性を検討する目的で, 混合骨髄キメラマウスを作製した。混合骨髄キメラマウスは, DTR tgマウス (CD45.2)由来の骨髄細胞とIL-15^{-/-}マウス (CD45.2)由来の骨髄細胞を1:1で混合し, これを放射線照射した宿主(B6.SJLマウス, CD45.1)に移入して作製した(図2a)。DTR tgマウスとはジフテリアトキシンレセプター(DTR)とGFPをコードする遺伝子をCD11cプロモーターの下流に組み込んだトランスジェニックマウ

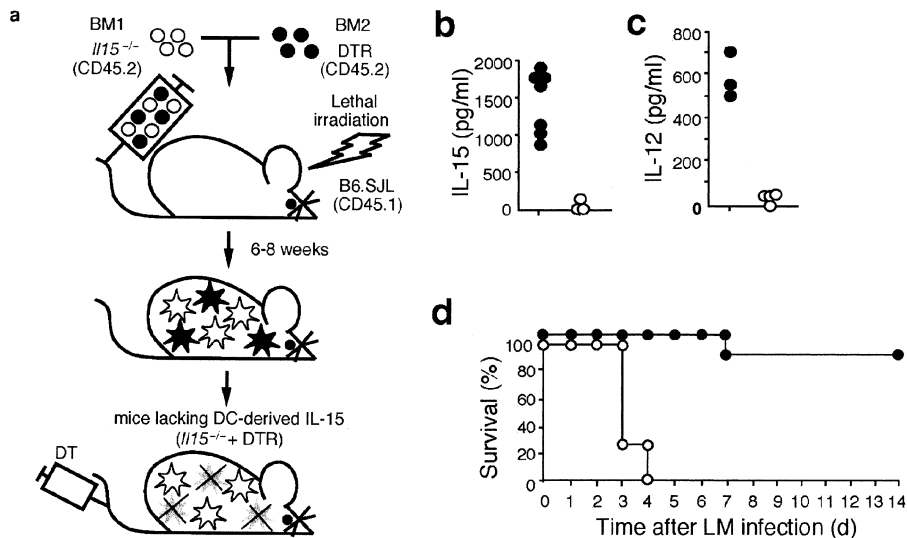


図2. DC由来IL-15の重要性

a. 混合骨髄キメラマウス作製の模式図。b, c. CpG (50 μ g)を混合骨髄キメラマウスに投与して24時間後の血清中のIL-15 (b)ならびに48時間後の血清中のIL-12 p70 (c)レベルを検討した。d. CpGを混合骨髄キメラマウスに投与3日後, 致死量のLMを感染させて生存率を検討した。

(20)

樹状細胞クロストークによる新規免疫賦活機構の解明

スであり、同マウスにジフテリアトキシン (DT) を投与すると一過性に DC が除去されることが報告されている²¹⁾。骨髓細胞移入から約 8 週間後、免疫系細胞 (CD45.2) が再構築されるのを末梢血で確認した後、キメラマウスに DT を投与すると、DTR tg マウス骨髓細胞由来の DC のみが選択的に除去される。その際、IL-15^{-/-} マウス骨髓細胞由来の DC や、DTR tg マウス由来のマクロファージやモノサイトは除去されないため、同キメラマウス (IL-15^{-/-}/DTR マウス) は DC の IL-15 生産を選択的に欠失していることになる。

IL-15^{-/-}/DTR マウスに CpG を投与したところ、IL-15^{-/-} マウスで観察されたのと同様に、IL-15 ならびに IL-12 p70 生産が著しく減少しており、LM 感染に対する感受性を示した (図 2b, 2c, 2d)。以上の結果から、CpG 刺激時における生体内の主たる IL-15 生産細胞は DC であること、DC 由来の IL-15 こそが CpG による免疫賦活に必要であることが明らかになった。

3) DC サブセットとその役割分担

DC は従来型 DC (conventional DC, cDC) と形質

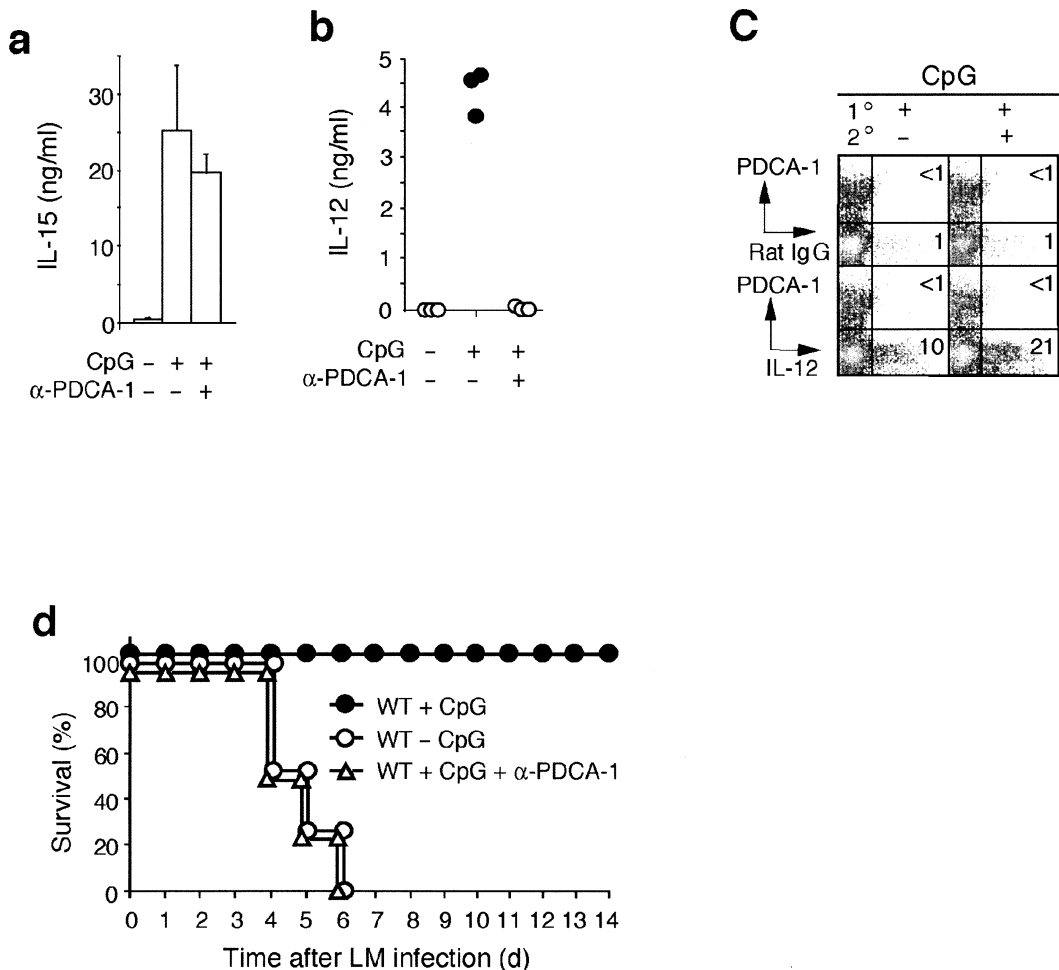


図 3. DC サブセットの役割分担

a, b. コントロール野生型マウスおよび抗 mPDCA-1 抗体により pDC を選択的に除去した野生型マウスに CpG を投与して 24 時間後の血清中の IL-15 (a), 48 時間後の IL-12 p70 (b) レベルを比較検討した。c. CpG 投与 24 時間後に野生型マウスから DC を単離して、CpG による再刺激を行い (2°+) 細胞内 IL-12 を検討した。d. a 同様 pDC を除去した WT マウスに LM を感染させて生存率を検討した。

細胞様 DC (plasmacytoid DC, pDC) に大別される^{22,23}). CpG による免疫賦活誘導におけるそれら DC サブセットの役割を検討する目的で, 抗 mPDCA-1 抗体を野生型マウスに投与して pDC を選択的に除去した後 CpG を投与し, 一連の実験を行った. 興味深いことに, 血清中 IL-15 の生産レベルに変化はみられなかったが (図 3a), その一方で IL-12 p70 の生産は著しく減少していた (図 3b). この実験結果は, cDC が IL-15 の生産源であることを示唆すると同時に, 以下の 2 つの可能性を提示している. 即ち, (1) pDC が主な IL-12 p70 生産細胞である, (2) cDC が主な IL-12p70 の生産細胞であるが, 同細胞は pDC の存在下でのみ IL-12 p70 を生産できる, のどちらかである. そこで CpG を投与した野生型マウスから DC を採取し

て細胞内 IL-12 を解析した. その結果, IL-12 もやはり cDC から生産されていることが判明した (図 3c). さらに pDC を選択的に除去したマウスでは CpG による免疫賦活効果が誘導されず, LM 感染に対して感受性を示した (図 3d). これらの実験結果から, IL-15, IL-12 p70 共に cDC から生産されること, ただし IL-12 p70 の生産には pDC が何らかの形で必要であること (DC サブセット間のクロストークの存在) が明らかになった.

4) cDC と pDC のクロストークによる免疫賦活機構

DC サブセット間クロストーク機構の詳細を明らかにする目的で, CpG 投与 24 時間後に野生型マウスお

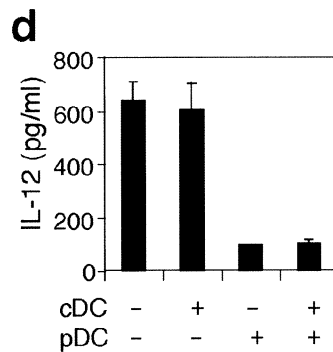
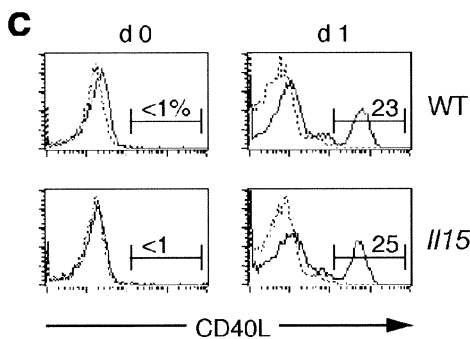
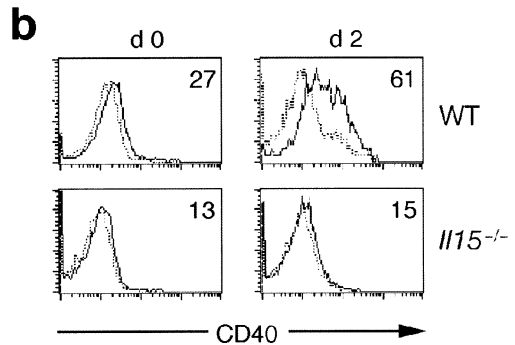
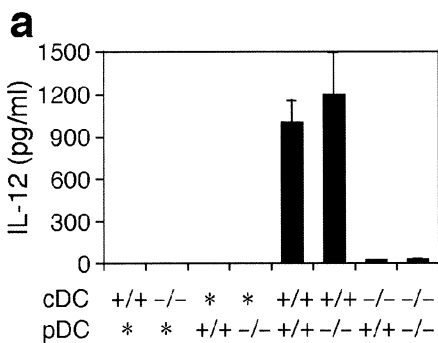


図 4. cDC と pDC による免疫賦活機構

a. CpG 投与 24 時間後に野生型マウス (+/+) および IL-15R $\alpha^{-/-}$ マウス (-/-) から cDC と pDC を単離し, CpG で共培養して 24 時間後の培養上清中の IL-12 p70 を測定した. b, c. CpG 刺激による野生型マウスおよび IL-15 $^{-/-}$ マウスの cDC 上の CD40 (b), pDC 上の CD40L (c) の発現を検討した. d. CpG 投与 24 時間後に野生型マウスから cDC と pDC を単離し, α -CD40L 抗体で処理した後 (+) 24 時間共培養して, 培養上清中の IL-12 p70 を測定した.

よび $IL-15R\alpha^{-/-}$ マウスから cDC と pDC を単離し, 2 μM の CpG を添加して共培養した. 興味深いことに, 野生型 cDC を野生型 pDC あるいは $IL-15R\alpha^{-/-}$ pDC と共培養することによって IL-12 p70 の生産が認められ, それとは対照的に, $IL-15R\alpha^{-/-}$ cDC を野生型 pDC あるいは $IL-15R\alpha^{-/-}$ pDC と共培養しても IL-12 p70 は生産されなかった (図 4a). これらの結果は, cDC 上に $IL-15R\alpha$ 鎖が発現していることの重要性, 即ち cDC から生産された IL-15 が cDC 自身に作用することが同細胞から IL-12 p70 が生産されるための必要条件であることを示している. では IL-15 は cDC に作用した後に cDC にどのような機能変化をもたらすのであろうか. CD40 分子に着目し検討を進めた結果, CpG 刺激により野生型 cDC にみられる CD40 発現レベルの亢進が, $IL-15^{-/-}$ cDC ではほとんど誘導されなかった (図 4b). さらに興味深いことに, CpG 刺激によって野生型 pDC, $IL-15^{-/-}$ pDC 共に CD40L の発現が同程度に認められた (図 4c). これらの結果から, CpG 刺激により cDC から生産された IL-15 が cDC 上に CD40 の発現を誘導し, pDC 上の CD40L と結合することによって CD40-CD40L のクロスリンクが起これば, cDC からの IL-12 p70 の生産を誘導することを予測した. 事実, 共培養の系において pDC 上の CD40L を MR1 (抗 CD40L) 抗体でブロックすると cDC からの IL-12 p70 の生産が抑制された (図 4d). また, $CD40^{-/-}$ マウスおよび $CD40L^{-/-}$ マウスにおいても CpG による IL-12p70 の生産の低下がみられたことから, 個体レベルにおいても上記クロストークが重要であることが強く示唆された (未発表データ).

V. おわりに

今回は CpG を生体内に投与して DC による免疫賦活機構の解析を行った. その結果, CpG によって IL-12 が生産されるためには, IL-15 に依存した DC サブセット間クロストークの存在が必須であることが明らかになった. 混合骨髄キメラマウスならびに DC サブセットの解析結果から, CpG 刺激によって生体内で生産される IL-15 および IL-12p70 の主な生産細胞は cDC であることが示された. IL-15 は pDC の存在なしに生産されたが, IL-12p70 は cDC 上の CD40 と pDC 上の CD40L による DC サブセット間クロストークによって, cDC から生産されていた (図 5). pDC は I 型インターフェロンの主たる生産細胞として広く知られ

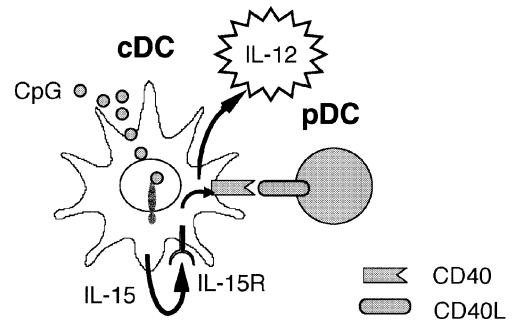


図 5. cDC と pDC による免疫賦活機構の模式図
CpG 刺激により pDC は CD40L を発現する. 一方で CpG 刺激により cDC は IL-15 を生産し cDC 上の IL-15R に作用して CD40 を発現する. cDC と pDC が CD40/CD40L を介して cDC からの IL-12p70 の生産を誘導する.

ているが^{22,23}), 上記 DC サブセット間クロストークには pDC の生産する I 型インターフェロンは必要ではなかった (未発表データ). HSV-1 や HSV-2 は TLR9 を介して免疫系を活性化することが報告されていることから²⁴⁻²⁸), これらの DNA ウィルスが持つ CpG が, ウィルス感染により惹起される免疫反応を誘導していると考えられる. DC サブセット間クロストークの効率的誘導が, ウィルス排除の鍵となることが予測され今後の検討課題としたい.

謝 辞

これまでの研究を支えてくださいました樗木俊聡教授を始めとする生体防御学分野の方々, 実験動物の管理でお世話になっております本学動物実験部門の方々 に感謝の意を表します.

文 献

- 1) Tokunaga, T., Yamamoto, H., Shimada, S. *et al.* (1984) Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J. Natl. Cancer Inst.*, **72**, 955-962.
- 2) Krieg, A.M. (2002) CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu. Rev. Immunol.*, **20**, 709-760.

- 3) Wagner, H. (2002) Interactions between bacterial CpG-DNA and TLR9 bridge innate and adaptive immunity. *Curr. Opin. Microbiol.*, **5**, 62-69.
- 4) Klinman, D.M. (2004) Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat. Rev. Immunol.*, **4**, 249-258.
- 5) Kuwajima, S., Sato, T., Ishida, K., Tada, H., Tezuka, H. and Ohteki, T. (2006) IL-15-dependent cross-talk between cDC and pDC is essential for CpG-induced immune activation. *Nat. Immunol.*, **7**, 740-746.
- 6) Wesche, H., Henzel, W.J., Shillinglaw, W., Li, S. and Cao, Z. (1997) MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity*, **7**, 837-847.
- 7) Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kuruma, T. and Goeddel, D.V. (1996) TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature*, **383**, 443-446.
- 8) Shirakabe, K., Yamaguchi, K., Shibuya, H., Irie, K., Matsuda, S., Moriguchi, T., Gotoh, Y., Matsumoto, K. and Nishida, E. (1997) TAK1 mediates the ceramide signaling to stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.*, **1** **272**, 8141-8144.
- 9) Waldmann, T.A. and Tagaya, Y. (1999) The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu. Rev. Immunol.*, **17**, 19-49.
- 10) Anderson, D.M., Johnson, L., Glaccum, M.B. *et al.* (1995) Chromosomal assignment and genomic structure of IL-15. *Genomics*, **25**, 701-706.
- 11) Ohteki, T., Ho, S., Suzuki, H., Mak, T.W. and Ohashi, P.S. (1997) Role for IL-15/IL-15 receptor β -chain in natural killer 1.1⁺ T cell receptor- $\alpha\beta$ ⁺ cell development. *J. Immunol.*, **159**, 5931-5935.
- 12) Ogasawara, K., Hida, S., Azimi, N., Tagaya, Y., Sato, T., Yokochi-Fukuda, T., Waldmann, T.A., Taniguchi, T. and Taki, S. (1998) Requirement for IRF-1 in the microenvironment supporting development of natural killer cells. *Nature*, **391**, 700-703.
- 13) Ohteki, T., Yoshida, H., Matsuyama, T., Duncan, G.S., Mak, T.W. and Ohashi, P.S. (1998) The transcription factor interferon regulatory factor 1 (IRF-1) is important during the maturation of natural killer 1.1⁺ T cell receptor- $\alpha\beta$ ⁺ (NK1⁺ T) cells, natural killer cells, and intestinal intraepithelial T cells. *J. Exp. Med.*, **187**, 967-972.
- 14) Lodolce, J.P., Boone, D.L., Chai, S., Swain, R.E., Daspoulos, T., Trettin, S. and Ma, A. (1998) IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity*, **9**, 669-676.
- 15) Kennedy, M.K., Glaccum, M., Brown, S.N. *et al.* (2000) Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J. Exp. Med.*, **191**, 771-780.
- 16) Azimi, N., Brown, K., Bamford, R.N., Tagaya, Y., Siebenlist, U. and Waldmann, T.A. (1998) Human T cell lymphotropic virus type I tax protein trans-activates interleukin 15 gene transcription through an NF- κ B site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2452-2457.
- 17) Washizu, J., Nishimura, H., Nakamura, N., Nimura, Y. and Yoshikai, Y. (1998) The NF- κ B binding site is essential for transcriptional activation of the IL-15 gene. *Immunogenetics*, **48**, 1-7.
- 18) Ohteki, T., Suzue, K., Maki, C., Ota, T. and Koyasu, S. (2001) Critical role of IL-15-IL-15R for antigen-presenting cell functions in the innate immune response. *Nat. Immunol.*, **2**, 1138-1143.
- 19) Schluns, K.S., Williams, K., Ma, A., Zheng, X.X. and Lefrançois, L. (2002) Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells. *J. Immunol.*, **168**, 4827-4831.
- 20) Becker, T.C., Wherry, E.J., Boone, D., Murali-Krishna, K., Antia, R., Ma, A. and Ahmed, R. (2002) Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J. Exp. Med.*, **195**, 1541-1548.
- 21) Yajima, T., Nishimura, H., Ishimitsu, R., Watase, T., Busch, D.H., Pamer, E.G., Kuwano,

(24)

樹状細胞クロストークによる新規免疫賦活機構の解明

- H. and Yoshikai, Y. (2002) Overexpression of IL-15 *in vivo* increases antigen-driven memory CD8+ T cells following a microbe exposure. *J. Immunol.*, **168**, 1198-1203.
- 22) Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P. *et al.* (2002) *In vivo* depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity*, **17**, 211-220.
- 23) Colonna, M., Trinchieri, G. and Liu, Y.J. (2004) Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat. Immunol.*, **5**, 1219-1226.
- 24) Barchet, W., Cella, M. and Colonna, M. (2005) Plasmacytoid dendritic cells-virus experts of innate immunity. *Semin. Immunol.*, **17**, 253-261.
- 25) Yoneyama, H., Matsuno, K., Toda, E. *et al.* (2005) Plasmacytoid DCs help lymph node DCs to induce anti-HSV CTLs. *J. Exp. Med.*, **202**, 425-435.
- 26) Krug, A., Luker, G.D., Barchet, W., Leib, D.A., Akira, S. and Colonna, M. (2004) Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood*, **103**, 1433-1437.
- 27) Hochrein, H., Schlatter, B., O'Keeffe, M., Wagner, C., Schmitz, F., Schiemann, M., Bauer, S., Suter, M. and Wagner, H. (2004) Herpes simplex virus type-1 induces IFN- α production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 11416-11421.
- 28) Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R. and Iwasaki, A. (2003) Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.*, **198**, 513-520.