

# 血球貪食を行う単球由来樹状細胞は過剰な免疫応答を制御する\*

大八木 秀 明

秋田大学大学院医学系研究科 血液・腎臓・膠原病内科学分野

(平成 26 年 4 月 22 日掲載決定)

## Monocyte-derived dendritic cells perform hemophagocytosis to fine-tune excessive immune responses

Hideaki Ohyagi

*Department of Hematology, Nephrology and Rheumatology, Akita University Graduate School of Medicine*

**Key words :** monocyte-derived dendritic cells, hemophagocytic syndrome, interleukin-10, Toll-like receptor

### はじめに

病原性微生物が生体内に侵入すると、樹状細胞 (dendritic cell : DC) はパターン認識レセプター (Pattern-Recognition Receptors : PRRs) を介して、病原微生物の構成成分 (Pathogen-Associated Molecular Patterns : PAMPs, 病原体関連分子パターン) を認識し、炎症性サイトカインを産生して自然免疫を活性化させる。また、病原性微生物由来の抗原を T 細胞に提示して獲得免疫を発動させる。活性化された獲得免疫系は、抗原特異的に病原体を排除するとともに免疫記憶を誘導して再感染に備える<sup>1,3)</sup>。一方、ウイルス特異的細胞傷害性 T 細胞 (Cytotoxic T Lymphocyte) や、それに伴って産生される炎症性サイトカインやケミカルメディエーター、メタロプロテアーゼなどの生理活性物質は感性防御に働くと同時に、自らの組織を傷害する場合がある<sup>4,6)</sup>。それ故、免疫応答には、病原体排除と組織障害抑制のバランスを調節する仕組みが必

要になる。一般的に、重篤な感染症ほど激しい免疫応答が誘導されるため、当該バランス調節システムの重要度が増すことが予想されるが、その詳細は不明であった。

ヒト血球貪食症候群 (hemophagocytic syndrome : HPS) は先天的な遺伝子異常によって発症する一次性と、ウイルス・細菌感染、悪性腫瘍、膠原病などの疾患に伴って発症する二次性に分類される疾患である。HPS は重篤な炎症反応とサイトカインストーム (IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , M-CSF など) によるマクロファージ、T 細胞の活性化を伴う過剰な免疫反応が原因と考えられている<sup>7)</sup>。臨床検査所見としては発熱、肝脾腫、血球減少、肝機能障害、高フェリチン血症、高トリグリセリド血症、低フィブリノーゲン血症、播種性血管内凝固症候群などをきたす。筆者らは、HPS における血球貪食のメカニズムとその免疫学的な意義を明らかにするために、マウス血球貪食症候群モデルを樹立し、このシステムを用いて、貪食細胞と被貪食細胞の性状や貪食メカニズムの詳細な解析を行い、血球貪食現象がこのバランス調節システムの一翼を担う可能性を見出した。

### 血球貪食現象の誘導

マウスに重篤な炎症反応を惹起し、血球貪食を誘導することを目的として、代表的な PAMPs である種々

Correspondence : Hideaki Ohyagi, M.D., Ph.D.

Department of Hematology, Nephrology and Rheumatology, Akita University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Hondo, Akita 010-8543, Japan

Tel : 81-18-884-6116

Fax : 81-18-836-2613

E-mail : brighttrees @ infoseek.jp

\*平成 26 年 2 月 10 日秋田医学会学術奨励賞受賞記念講演

(18)

Dendritic cells perform hemophagocytosis to excessive immune responses

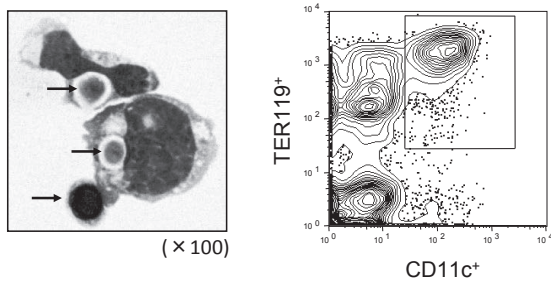


図1. TLR9 リガンド CpG 投与による血球貪食の誘導。

野生型マウスへ高濃度の TLR9 リガンド CpG を投与 (200  $\mu$ g) し誘導した血球貪食。

左: 貪食細胞の Diff-Quick 染色, 矢印は赤芽球系細胞。

右: フローサイトメーターによる検出, 貪食細胞は単球由来樹状細胞あり, 細胞表面上に CD11c を発現し, TER119 を発現する赤芽球系細胞を貪食していた。

TLR: Toll Like Receptor.  
(文献 8 より)

の TLR (Toll Like Receptor) リガンドを高濃度 (100 ~ 200  $\mu$ g) で野生型マウスに投与したところ血球貪食現象が誘導された。特に TLR 9 リガンドである CpG-ODN 投与時に効率よく血球貪食が誘導された。血球貪食細胞は、骨髄、脾臓、末梢血などに検出された。また、組織染色だけではなく、フローサイトメーターでも CD11c<sup>+</sup>TER119<sup>+</sup>細胞として検出可能であった(図 1)<sup>8)</sup>。詳細な解析により、血球を貪食する CD11c<sup>+</sup>細胞は単球由来の樹状細胞 (Monocyte-derived Dendritic Cell: Mo-DC) であり、貪食される細胞は TER119<sup>+</sup>有核赤血球系細胞が優位であったが、成熟赤血球も混在していることがわかった (以下、両者まとめて赤血球系細胞)。

骨髄から末梢組織への単球の動員はケモカイン受容体 CCR2 (C-C chemokine receptor type 2) に依存することが知られている<sup>9)</sup>。我々は単球に CCR2 が発現していること、CpG-ODN 投与時に CCR2 リガンドである CCL2, 7, 12 が上昇することを確認した。さらに CCR2 遺伝子欠損マウスに CpG-ODN 投与すると、骨髄内での血球貪食の頻度は野生型マウスと同等であったが、末梢血における血球貪食の割合が CCL2 及び CCR2 遺伝子欠損マウスにおいて有意に低下していた。よって、単球由来 Mo-DC の骨髄から末梢への動員には CCR2 が重要な役割を担っていることが示唆さ

れた。

### 血球貪食誘導機序

生体内では非常に多くの細胞がアポトーシスを起こし、貪食細胞によって除去され恒常性が維持されている。このアポトーシス細胞の除去システムが破綻するマウスは自己免疫疾患を発症することが知られている。アポトーシス細胞は“find me シグナル”と“eat me シグナル”を発することによって貪食細胞に効率良く貪食され、除去される<sup>10,11)</sup>。find me シグナルの代表的なものはアポトーシス細胞が細胞遊走因子として放出する細胞外 ATP (Adenosine Triphosphate) や UTP (Uridine Triphosphate) であり、それを認識する受容体として貪食細胞上の P<sub>2</sub>Y<sub>2</sub> 受容体が知られている。また、アポトーシス細胞は細胞膜の内膜側にある phosphatidylserine (PS) を“eat me シグナル”として細胞膜の外膜側に露出し、一方で、貪食細胞は PS 受容体である Tim1, 3, 4 や MFG-E8-integrin  $\alpha$ V $\beta$ 3 を介して認識する。我々は TLR リガンドやウイルス感染系を用いて誘導した血球貪食現象も例外ではないことを見出している。CpG 誘導性の血球貪食症候群モデルマウスにおいて、血中 ATP 濃度の上昇と Mo-DC 上の P<sub>2</sub>Y<sub>2</sub> 発現を認め、ATP 加水分解酵素アピラーゼや P<sub>2</sub>Y<sub>2</sub> の結合阻害剤スラミンを投与することで血球貪食が阻害された。この結果は、アポトーシスを起こした赤血球系細胞が Mo-DC の遊走因子として ATP を放出し、Mo-DC は P<sub>2</sub>Y<sub>2</sub> を介して動員されていること示唆していた。また、アポトーシスを起こした赤血球系細胞が PS を細胞膜の外側に露出し、Mo-DC が PS 受容体 Tim1, 4,  $\alpha$ V $\beta$ 3 を発現していた。さらに、これら PS 受容体に対する中和抗体を投与すると血球貪食が有意に抑制された。

### ウイルス感染時の血球貪食

ヒトにおいて血球貪食が観察されるのは、EB (Epstein-Barr) ウイルス、サイトメガロウイルス、HIV (Human Immunodeficiency Virus) などに感染した場合で、いずれも慢性感染症である<sup>12-14)</sup>。そこで、野生型マウスに慢性感染を誘導することが知られているリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (Lymphocytic Choriomeningitis Virus: LCMV) Clone 13 株 (C13)<sup>15,16)</sup> を用いて血球貪食の誘導を試みた。C13 は、急性感染

を誘導する親株である Armstrong 株 (Arm) の変異株であり, Arm との比較において, DC を含む標的細胞への感染効率ならびに感染後の複製効率が飛躍的に亢進することが報告されている. ある意味では, 高濃度の TLR リガンド投与系に準じていると言えるかもしれない. Arm との比較において, C13 感染マウスでは血球貪食誘導の優位な上昇が観察された.

### 血球貪食現象の新たな生物学的意義

これまで, *in vitro* の実験結果から, 炎症性刺激を受けた貪食細胞がアポトーシス細胞を貪食すると抑制性サイトカイン IL (Interleukin)-10 や TGF (Transforming Growth Factor)- $\beta$  を産生し, 炎症性サイトカインの産生を抑制することが示唆されている<sup>17)</sup>. また, マウスへの C13 の感染では DC から IL-10 が産生され, C13 特異的な細胞傷害性 T 細胞に作用して, 同細胞の機能低下を誘導し, この結果慢性感染につながるということが報告されている. しかしながら, IL-10 産生機構のメカニズムは不明である<sup>18)</sup>.

そこで, C13 の感染によって誘導される血球貪食の免疫学的意義について検討した. Mo-DC 上に発現する PS 受容体に対するブロッキング抗体を *in vivo* に投与し血球貪食を抑制すると, 血中の IL-10 産生が低下した. また, IL-10 産生細胞を同定するため IL-10<sup>venus</sup> レポーターマウス<sup>19)</sup> に C13 を感染させ解析したところ, 血球を貪食している Mo-DC が主な IL-10 産生細胞であった. さらに C13 感染 12 時間後の骨髄から Mo-DC とアポトーシスを起こした赤血球系細胞を純化し, これらを共培養して *ex vivo* 血球貪食モデルを構築したところ, 血球貪食に伴い Mo-DC から IL-10 が産生されることを見出した. この *ex vivo* 血球貪食モデルに PS 受容体に対するブロッキング抗体を加えると, 血球貪食および IL-10 の産生が抑制された. これら結果から, Mo-DC は血球貪食依存性に IL-10 を産生していることが証明された.

さらに, 血球貪食現象の生物学的意義を明らかにするため, 血球貪食を行っている Mo-DC が IL-10 を産生できないマウス (*Cd11c-Cre/Il10<sup>fl/fl</sup>* [CKO] マウス)<sup>20)</sup> およびコントロールマウスに C13 を感染させて解析した. 予想通り, 血清中 IL-10 レベルが有意に低下していたことがわかった. この結果により, 血球貪食を行っている Mo-DC が *in vivo* における主な IL-10 産生細胞であると考えられた (図 2)<sup>8)</sup>. 重要なことに, 同

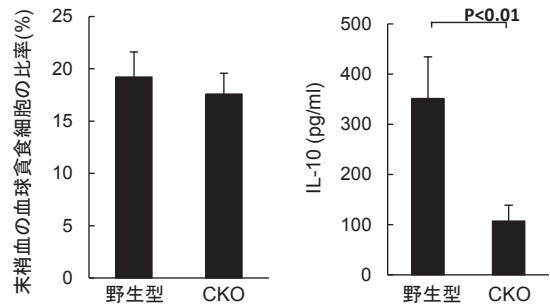


図 2. Mo-DC は主要な IL-10 産生細胞である. LCMV C13 株を *Cd11c-Cre/Il10<sup>fl/fl</sup>* (CKO) マウスに感染させると, 血球貪食の頻度 (左) は野生型マウスと同程度であるが, IL-10 産生 (右) は有意に低下していた.

Mo-DCs: Monocyte-derived Dendritic Cell.

IL: Interleukin. (文献 8 より)

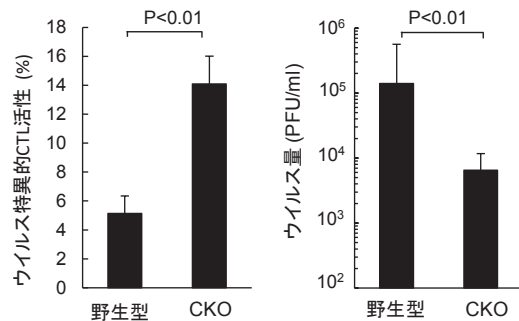


図 3. 血球貪食の生理的意義.

LCMV C13 株を *Cd11c-Cre/Il10<sup>fl/fl</sup>* (CKO) マウスに感染させると, 野生型マウスとの比較において, C13 特異的 CTL (左) が上昇し, 血中の C13 ウイルス量 (右) が有意に低下した.

LCMV: Lymphocytic Choriomeningitis Virus.

C13: Clone 13 株. PFU: Plaque Forming Unit.

(文献 8 より)

マウスにおいて C13 特異的 CTL 活性の増加ならびに C13 の排除が亢進したが (図 3)<sup>8)</sup>, 同時に CTL 依存性肝障害が重症化して半数以上のマウスが死亡した (図 4)<sup>8)</sup>. これらの結果から, 血球貪食現象は IL-10 の産生を介して過剰な免疫応答を抑制しており, 特に重篤な感染症において, 個体の生存を保障する免疫寛容システムとして重要であると考えられた (図 5)<sup>8)</sup>.

(20)

Dendritic cells perform hemophagocytosis to excessive immune responses

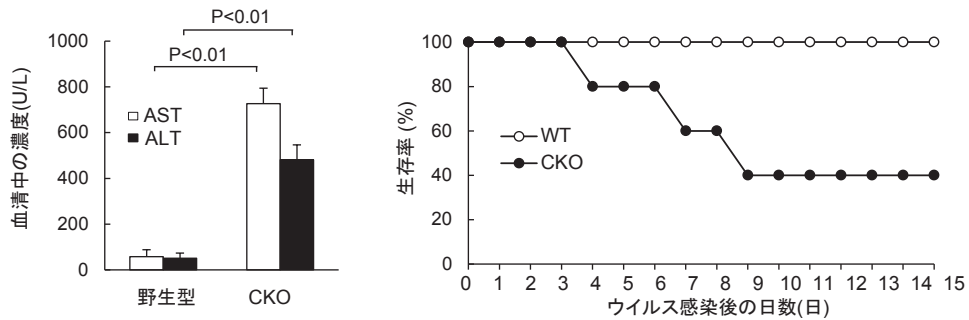


図4. 血球貪食の生理的意義.

LCMV C13 を *Cd11c-Cre/Il10<sup>fl/fl</sup>* (CKO) マウスに感染させると、野生型マウス (WT) との比較において肝障害 (左) が重篤化し、生存率 (右) が低下した.

LCMV: Lymphocytic Choriomeningitis Virus. C13: Clone 13 株. AST: Aspartate Aminotransferase. ALT: Alanine Aminotransferase. (文献 8 より)

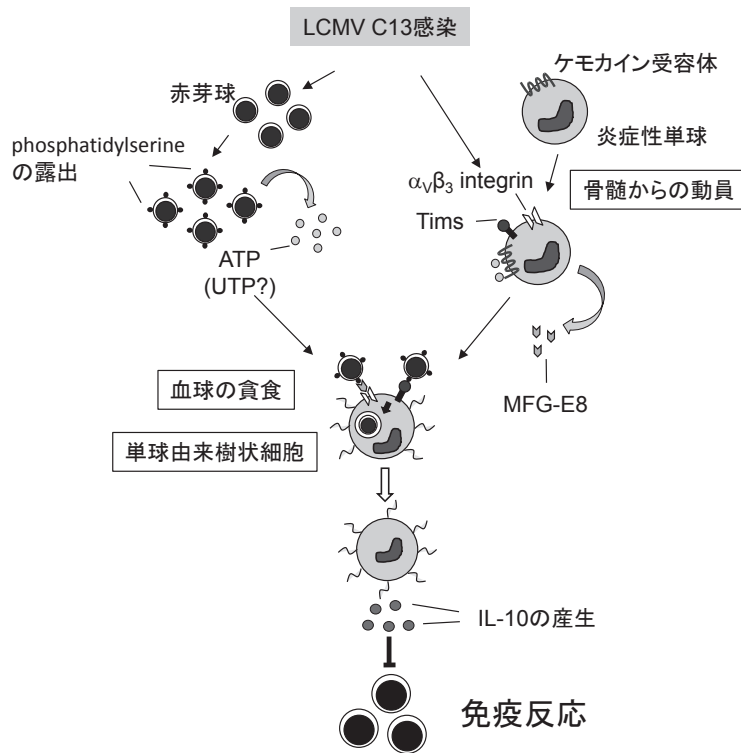


図5. 血球貪食誘導機構のまとめ.

高濃度の TLR リガンドや重篤なウイルス感染により赤血球系細胞の細胞外膜に PS が露出し、Mo-DCs 上の PS 受容体 (Tim1, 4 及び MFG-E-8- $\alpha_v\beta_3$  インテグリン) に認識されて血球貪食が誘導される. その結果、Mo-DCs から抑制性サイトカイン IL-10 が産生され過剰な免疫応答を抑制する.

TLR: Toll Like Receptor. LCMV: Lymphocytic Choriomeningitis Virus. PS: Phosphatidylserine. ATP: Adenosine Triphosphate. UTP: Uridine Triphosphate. Tim: T-cell immunoglobulin-and mucin-domain-containing. MFG-E8: Milk Fat Globule-EFG Factor 8. Mo-DCs: Monocyte-derived Dendritic Cell. IL: Interleukin. (文献 8 より)

## おわりに

HPSは、重篤な炎症反応、微生物の感染、また、さまざまな疾患においてしばしば観察される病態である。二次性HPSにおいて高サイトカイン血症が病態の中心的役割を果たしていることが明らかにされており、高サイトカイン血症の是正のための血漿交換や持続血液濾過の有用性が、臨床の現場からもいくつか報告されている<sup>21-26)</sup>。また、TNF- $\alpha$ やIL-6に対する抗サイトカイン療法の効果も期待される報告があるが<sup>27-29)</sup>、逆にこれらの薬剤による感染症に伴うHPSの発症も報告されている<sup>30)</sup>。本疾患は重度の炎症の指標として考えられていたが、その機構および免疫学的な意義については不明な部分が多く、より詳細な解明が必要とされている。本研究において、おもに赤血球系細胞にアポトーシスが誘導され、Mo-DCがこれらアポトーシス細胞を貪食し、抑制性サイトカインIL-10を産生することが明らかになった。また、これまで、炎症の刺激を受けた貪食細胞がネクローシスを起こした細胞を貪食した場合には炎症性サイトカインを産生し、アポトーシスを起こした細胞を貪食した場合には抑制性サイトカインを産生することが *ex vivo* の実験結果から示されていたが、この研究において、アポトーシスを起こした赤血球系細胞を貪食したMo-DCが抑制性サイトカインであるIL-10を産生することが *in vivo* においてはじめて明らかにされた。

免疫系は外来のさまざまな病原微生物から自己を守るため、また、自己と非自己を特異的に認識するため多様性を獲得し、病原性微生物をより効率よく排除するよう進化してきた。一方で、全身性の重篤なウイルス感染の場合、これらのウイルスをすべて排除しようとすると、CTLにより多くの感染細胞が破壊され、組織の恒常性が保てなくなり、場合によっては死にいたる。そこで、宿主は積極的にCTLの機能を適度に抑制し感染病原体との共存(慢性感染)を選択したのではないだろうか。我々は、C13以外のウイルス、例えば単純ヘルペスウイルス、インフルエンザウイルスPR8、ワクシニアウイルスなどの感染においても、血球の貪食およびIL-10の産生が誘導されることを見出している(未発表)。この研究において発見された新規の免疫制御機構が、炎症状態や病原性微生物の感染において普遍的な機構であるかどうか、今後さらなる解析が必要である。一方で、この発見が慢性感染の成立機構の解明や治療法の開発に貢献できれば幸いであ

る。

## 謝 辞

本研究は、秋田大学大学院医学系研究科血液・腎・膠原病内科学分野、澤田賢一教授(現・学長)のご指導のもと、東京医科歯科大学難治疾患研究所先端分子医学研究部門生体防御学分野との共同研究として小内伸幸先生、橋木俊聡教授にご指導いただき行われました。また両講座の諸先生方および研究室の皆様のご指導、ご協力のもと行われました。心より感謝申し上げます。

## 引用文献

- 1) Medzhitov, R. and Janeway, C.A. Jr. (1997) Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, **91**, 295-298.
- 2) Banchereau, J.J., Briere, F., Caux, C., *et al.* (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.*, **18**, 767-811.
- 3) Cooper, M.D. and Alder, M.N. (2006) The evolution of adaptive immune systems. *Cell*, **124**, 815-822.
- 4) Clark, I.A. (2007) How TNF was recognized as a key mechanism of disease. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **18**, 335-343.
- 5) Lambeth, J.D. (2007) Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. *Free Radic. Biol. Med.*, **43**, 332-347.
- 6) Rouse, B.T. and Sehrawat, S. (2010) Immunity and immunopathology to viruses: what decides the outcome? *Nat. Rev. Immunol.*, **10**, 514-526.
- 7) 河 敬世 (2008) 血球貪食症候群とは. 血液・腫瘍科 **57**, 1-8.
- 8) Ohyagi, H., Onai, N., Ohteki, T., *et al.* (2013) Monocyte-derived Dendritic Cells Perform Hemophagocytosis to Fine-tune Excessive Immune Responses. *Immunity*, **39**, 584-598.
- 9) Boring, L., Gosling, J., Charo, I.F., *et al.* (1997) Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J. Clin. Invest.*, **100**, 2552-2561.
- 10) Nagata, S., Hanayama, R. and Kawane, K. (2010) Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell*,

- 140, 619-630.
- 11) Martin, S.J., Finucane, D.M., Green, D.R., *et al.* (1996) Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity. *J. Biol. Chem.*, **271**, 28753-28756.
  - 12) Larroche, C. and Mouthon, L. (2003) Pathogenesis of hemophagocytic syndrome (HPS). *Autoimmun. Rev.*, **3**, 69-75.
  - 13) Janka, G.E. (2007) Hemophagocytic syndrome. *Blood Rev.*, **21**, 245-253.
  - 14) Maakaroun, N.R., Moanna, A., Albrecht, H., *et al.* (2010) Viral infections associated with haemophagocytic syndrome. *Rev. Med. Virol.*, **20**, 93-105.
  - 15) Sevilla, N., Kunz, S., Lewicki, H., *et al.* (2000) Immunosuppression and resultant viral persistence by specific viral targeting of dendritic cells. *J. Exp. Med.*, **192**, 1249-1260.
  - 16) Matloubian, M., Somasundaram, T., Ahmed, R., *et al.* (1990) Genetic basis of viral persistence: single amino acid change in the viral glycoprotein affects ability of lymphocytic choriomeningitis virus to persist in adult mice. *J. Exp. Med.*, **172**, 1043-1048.
  - 17) Byrne, A. and Reen, D.J. (2002) Lipopolysaccharide induces rapid production of IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils. *J. Immunol.*, **168**, 1968-1977.
  - 18) Brooks, D.G., Trifilo, M.J., Oldstone, M.B., *et al.* (2006) Interleukin-10 determines viral clearance or persistence *in vivo*. *Nat. Med.*, **12**, 1301-1309.
  - 19) Atarashi, K., Tanoue, T., Ohba, Y., *et al.* (2011) Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science*, **331**, 337-341.
  - 20) Roers, A., Siewe, L., Müller, W., *et al.* (2004) T cell-specific inactivation of the interleukin 10 gene in mice results in enhanced T cell responses but normal innate responses to lipopolysaccharide or skin irradiation. *J. Exp. Med.*, **200**, 1289-1297.
  - 21) Tong, H., Ren, Y., Liu, H., *et al.* (2008) Clinical characteristics of T-cell lymphoma associated with hemophagocytic syndrome: Comparison of T-cell lymphoma with and without hemophagocytic syndrome. *Leuk. Lymphoma.*, **49**, 81.
  - 22) Sanada, S., Ookawara, S., Shindo, T., *et al.* (2004) A case report of the effect of plasma exchange on reactive hemophagocytic syndrome associated with toxic shock syndrome. *Ther. Apher. Dial.*, **8**, 503.
  - 23) Coman, T., Dalloz, M.A., Coolen, N., *et al.* (2003) Plasmapheresis for the treatment of acute pancreatitis induced by hemophagocytic syndrome related to hypertriglyceridemia. *J. Clin. Apher.*, **18**, 129.
  - 24) Matsumoto, Y., Naniwa, D., Banno, S., *et al.* (1998) The Efficacy of Therapeutic Plasmapheresis for the Treatment of Fatal Hemophagocytic Syndrome: Two Case Reports. *Ther. Apher.*, **2**, 300.
  - 25) Satomi, A., Nagai, S., Nagai, T., *et al.* (1999) Effect of Plasma Exchange on Refractory Hemophagocytic Syndrome Complicated with Myelodysplastic Syndrome. *Ther. Apher.*, **3**, 317.
  - 26) 柳屋憲充, 高橋直人, 中永士師明ら (2002) 血漿交換と持続血液透析濾過の併用で多剤併用化学療法を施行し得た血球貪食症候群合併びまん性大細胞型B細胞リンパ腫. *臨床血液* **42**, 35.
  - 27) Lackner, H., Urban, C., Sovinz, P., *et al.* (2008) Hemophagocytic lymphohistiocytosis as severe adverse event of antineoplastic treatment in children. *Hematologica.*, **93**, 291.
  - 28) Henzan, T., Nagafuji, K., Tsukamoto, H., *et al.* (2006) Success with infliximab in treating refractory hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Am. J. Hematol.*, **81**, 59.
  - 29) Takaahashi, N., Naniwa, T. and Banno, S. (2008) Successful use of etanercept in the treatment of acute lupus hemophagocytic syndrome. *Mod. Rheumatol.*, **18**, 72.
  - 30) Sandhu, C., Chesney, A., Piliotis, E., *et al.* (2007) Macrophage activation syndrome after etanercept treatment. *J. Rheumatol.*, **34**, 241.