

## 第29回 シスメックス血液学セミナー／質疑応答

## 1. 樹状細胞の基礎免疫学と免疫療法への応用

門脇 則光

【司会・浅野】複雑さが増し理解するのが難しくなってきたDCについて、その機能、サブセットの考え方、さらにはDC療法の将来にわたっての展望も大変分かり易くお話いただき、ありがとうございました。それでは早速ですが東京会場からの質問をお受けしたいと思います。リンパ節の一次濾胞中心のDCは、その後形成されたと思われる二次濾胞中心のmDCと異なる由来なのかどうか、その由来はどのようにして調べるのかというものです。よろしくお願いします。

【門脇】一般的に、静止B細胞が集まっている一次濾胞に抗原刺激が入ると、胚中心B細胞が活性化し、中心芽球ができて二次濾胞が形成されます。基本的にDCは、濾胞ではなくT細胞領域に存在します。そこでT細胞を刺激して、そのT細胞が濾胞でのB細胞の反応を誘導すると考えられます。一方、濾胞内にもDCが存在することが報告されていますが、このDCの機能は明らかではありません。濾胞内のT細胞を刺激することによってB細胞反応を増強するか、あるいは直接B細胞を活性化する可能性が指摘されています。ご質問の、一次濾胞のDCと二次濾胞のDCが異なる由来かどうかについては明確な証拠はありませんが、おそらく由来は同じと思われます。

なお、講演の中でも触れましたが、濾胞内にはfollicular dendritic cell (FDC)と呼ばれる、B細胞に抗原を提示する細胞があり、この細胞は間質細胞由来と考えられており、DCとは別物です。

【司会】質問された方、よろしいでしょうか。どうもありがとうございました。東京会場からもう一つ質問があるようです。骨髓球系DCと白血病の患者由来のDCに違いがあるのでしょうか。また、免疫療法に関してはいかがでしょうかという質問です。これは東京会場にご出席の香港の先生からのご質問です。

【門脇】AMLやALLの患者さんの白血病細胞を培養

するとDCに分化し、白血病特異的なCTLを誘導することが報告されていますが、正常の単球を培養して得られるDCとの機能の比較は厳密には行われていません。このようなDCを用いると、既知の抗原以外にもさまざまな腫瘍抗原を提示するDCになるので、免疫療法に役立ちそうですが、すべての患者さんからうまくDCが誘導できるわけではないこと、実際問題として、繰り返し投与するのに十分な数の白血病細胞をあらかじめ確保することが容易ではないことから、実用化は進んでいません。

【司会】ありがとうございました。他の会場からはまだ質問が出ていないようなので私のほうから一つ質問してよろしいでしょうか。中枢性の免疫寛容のお話に関連して胸腺のDCについて少し教えてください。胸腺はトレランスの誘導の場所ということで末梢性のものとは異なった何か形態的な特徴や機能上の違いを示唆する受容体の存在があるのでしょうか。

【門脇】マウスの脾臓と胸腺のDCの表面マーカーを比べると、基本的に違いはないようです。また、胸腺の髄質のDCがネガティブ・セレクションを誘導するということが、クラスIIのノックアウトマウスを使用して示されています。

ヒトの胸腺にも、他のリンパ組織と同様にmDCやpDCが存在することが報告されており、*in vitro*での形態、phenotypeや機能において、他のリンパ組織のDCと基本的に違いはないようです。最近、ヒトの胸腺髄質にあるハッサル小体がTSLPというサイトカインを産生し、それが胸腺のmDCを活性化して、このDCが、胸腺でCD4陽性、CD25陽性のregulatory T cellを誘導することが「Nature」に報告されています。regulatory T cellが胸腺でどのようにしてできるかは分からなかったのが、重要な発見だと思います。

このように、胸腺のDCが、ひとつにはネガティ

ブ・セレクションでT細胞を除去していることと、もう一つはT regを誘導する形で、トレランスを誘導していることが報告されています。

**【司会】** ありがとうございます。それでは他の会場にもアクセスしてみましょう。神戸会場の内山先生、いかがでしょうか。

**【神戸会場・内山】** それでは、二つ質問させてください。

一つは、現在分かっているDCサブセットで、サブセットに関してはもう同定されつくしたと考えていいのでしょうか。それとも、まだこれからも新しいDCサブセットが見つかるかと予想されるのでしょうか。

二つめは、DC由来の血液腫瘍のお話と、がんではDCの機能が落ちているというお話がありましたが、それ以外の疾患でDCの量的・質的な異常が病態に関係しているものに関して、現在、どの程度報告されているのでしょうか。

**【門脇】** 一つめのDCのサブセットについては、自分でやっている範囲や見ている範囲では、ヒトに全く新たなDCサブセットが出てくる感じは、個人的にはあまりありません。はっきりしたことは分かりませんが、あるとしても、mDC、pDCの亜型のようなものかもしれません。しかし、マウスにおいては最近、IKDCと呼ばれる、NKのマーカーを持っていて、キラー活性を持ったDC、DCとしての働きとNK細胞としての働きを持ったDCが、新しいサブセットとして同定されています。したがって、ヒトにおいてもこういった細胞があるのではないかと探している人がいると思いますので、マウスのIKDCと同様のサブセットが見つかるかもしれません。

二つめの質問に関しては、基本的には、いろいろながん細胞が免疫抑制性のサイトカインを出していると言われていています。IL-10やTGF- $\beta$ 、あるいはVEGFのようなものによって、がん患者のDCの機能は抑えられていると、いろいろながんで報告されています。

それと、がん以外で一つ重要なのは、全身性エリテマトーデス(SLE)において、抗DNA抗体とDNAの免疫複合体がpDCを刺激して、インターフェロン $\alpha$ を出させます。したがって、pDCによ

るインターフェロン $\alpha$ の産生は、SLEの病態形成や進展に非常に重要な役割を果たしていることが報告されています。

それ以外の例を挙げると、皮膚の免疫関連疾患である尋常性乾癬でもpDCが活性化していて、病態形成に役立っています。

また、ウイルスの感染では、人の呼吸器のウイルス感染巣、あるいはマウスのモデルでも、呼吸器の感染巣にpDCが浸潤して、そこでインターフェロン $\alpha$ を出しています。予想されることですが、そのような形でpDCがウイルス感染に重要な役割を果たしていることが*in vivo*の所見でも分かっています。このようにして、腫瘍、免疫疾患、感染において、DCが関わっていることが報告されています。

**【神戸会場・内山】** ありがとうございます。

**【司会】** 内山先生、ありがとうございます。それでは、次は名古屋会場に聞いてみましょう。名古屋会場、いかがでしょうか。

**【名古屋会場】** 血液塗抹標本上で、pDC、mDCの区別をつけることは可能でしょうか。

**【門脇】** 形態的には、可能だと思いますが、普通に塗抹しただけでは、それぞれ末梢血単核球が0.1から0.5%ずつで、まず見つからないと思います。濃縮しなくてはいけないのですが、実験で示す分は、他の細胞を除いて、サイトスピンの標本を染めています。こうすれば、pDCはplasma cell様で、mDCは樹状突起を持っているので、形態的に区別はできるはずです。

**【名古屋会場】** ありがとうございます。

**【司会】** 名古屋会場の方、ありがとうございます。シドニー会場から質問が入っているようです。シドニー会場、お待たせしました。それではよろしくお願いします。

**【シドニー会場】** *in vivo*で、マスト細胞の刺激でDCを活性化し、TH2の反応を惹起するようなものは何でしょうか。

**【門脇】** 講演の中でご紹介したのはヒトの*in vitro*の実験なので、ある程度の限界があるのですが、ここで使ったマスト細胞の刺激方法は、一般的に使われているマスト細胞表面のFC- $\epsilon$ レセプターの

クロス・リンキングです。IgEを加えて、抗IgEを加えるというクロス・リンクです。生理的にはアレルギーがマスト細胞についたときに起こる反応です。そうすると、さまざまなchemical mediatorを出します。そのマスト細胞由来の因子が、この実験ではDCに対する影響を及ぼしています。体の中で同様のことが起こっているかどうかについては、この実験からでは断定できませんが、免疫組織染色で染めてみると、アトピー性皮膚炎の病変でマスト細胞と樹状細胞が共存しているという所見を得ていますので、*in vivo*でも同じような現象が起こっている可能性があると思っております。

**【シドニー会場】** ありがとうございます。次の質問です。*in vitro*で培養したDCを用いた治療で、有害事象は何かあるでしょうか。

**【門脇】** 有害事象といえるほどでもありませんが、投与した部位に軽い炎症反応による発赤は出ます。患者さんによっては、一過性の発熱が起こることも報告されています。使った抗原が正常な細胞にも発現していて、自己免疫反応が起こることが心配されていますが、これまでのところ、メラノーマの抗原を使ったときに、メラノサイトが殺されて白斑ができるという自己免疫反応が報告されていますので、実際にそういう自己免疫反応が起こ

る可能性はあります。ただし、この場合は致命的なものではないので、問題はありませんでした。重要な臓器に対する免疫反応が起こって、臓器障害が起こる可能性はありますが、ヒトではそれ以上のものは報告されていません。一方、マウスにおいては、DC療法のモデルで、使った抗原が心臓の筋肉の細胞にも共有されている場合、心筋炎が起きたという報告があるので、DC療法で非常に効率よく免疫反応が誘導されれば自己免疫疾患が誘発されることは、理論的には考えられると思います。

それともう一つは、DC療法だけではなく、regulatory T cellsの除去や、免疫抑制性シグナルのブロックを併用すると、自己免疫疾患が表に浮かび上がってくる可能性は十分あると思います。そのような臨床試験のときは、非常に注意する必要があります。実際、DC療法ではありませんが、抗原とCTLA-4のブロックを併用した臨床試験では、皮膚炎、腸炎、肝炎、下垂体炎といった自己免疫疾患が報告されています。

**【司会】** シドニー会場、どうもありがとうございました。まだまだご質問があるかとは思いますが、時間となりましたので、このあたりで門脇先生への質問は終了させていただきたいと思っております。門脇先生、ありがとうございました。

## 【後日ご回答をいただいた質問】

**【質問】** HIVがDC（クラスは知りませんが）に付着（吸着）してCD4 T cellに取り込まれるらしい、との話を聞いた記憶があります。この記憶に間違いがなければ、その詳細をご教授ください。またHTLV-1にはHIVのようなことはみられるのでしょうか。

**【回答】** 粘膜のDCがDC-SIGNという分子を発現し、これがHIVのgp120に結合してHIVを吸着し、CD4 T細胞に運ぶことが報告されています（Cell 100:587, 2000）。なお、DC-SIGNは血中のmDC, pDCには発現しておらず、単球由来のDCに発現しています（Blood 100:4512, 2002）。

最近同様の検討がHTLV-Iでなされており、HTLV-I感染で単球由来DCがsyncytiaを形成し、この現象にDC-SIGNが関与していますが、HIVの場合と異なり、HTLV-IのenvelopeがDC-SIGNに直接結合するのではないと報告されています（J Virol 80:4771, 2006）。

**【質問】** DC免疫療法において、アジュバントが重要とのことですが、anti-CTLA-4, PD-1に関する知見はどの程度得られているのでしょうか。

**【回答】** CTLA-4に関しては、マウスの実験でDC療法（あるいはそれに類似の方法）と抗CTLA-4抗体の併用で、抗腫瘍効果が増強したと報告されています（PNAS 95:10067, 1998; J Exp Med 189:1157, 1999）。こうした研究結果を受けて、前立腺がん患者を対象に、Cell Genesys社が開発した免疫療法用細胞「GVAX」（前立腺癌細胞株にGM-CSFを遺伝子導入したもの）と、Medarex社が開発したCTLA-4受容体をターゲットとする完全ヒト化抗体ipilimumab（MDX-010）の併用療法を施すフェーズI臨床試験が行われ、期待できるデータが得られたと今年の米国臨床腫瘍学会で発表されています。前立腺特異抗原（PSA）レベルの低下を含む抗がん効果が6人の患者のうち5人で観察され、5人すべての患者で、米国立がん研究所（NCI）のワーキンググループが設定したクライテリアで「一部応答」と認められました。2人の患者では、95%の

病巣の縮小が見られたとのこと。ただ、PSAに一部応答を示した5人の患者はすべて（おそらく自己免疫反応による）免疫性内分泌欠損症に罹患しており、これはipilimumab療法を受けた患者でかつ報告されたもの（PNAS 100:8372, 2003）と類似の症状とのこと。つまり、CTLA-4のブロックは自己免疫疾患を誘発することがあるため、注意が必要です。

PD-1阻害の免疫療法への応用に関しては、検索した範囲ではAnticancer Res 25:3309, 2005にマウスでの実験がひとつ報告されているだけで、現時点ではあまり進んでいないようです。今後の報告が期待されます。

**【質問】** 樹状細胞のがんの症例というのは有るのでしょうか。

**【回答】** 講演の中でも少し触れましたが、樹状細胞の腫瘍は稀ながら存在し、WHO分類ではhistiocytic and dendritic cell neoplasmsというカテゴリーが設けられています。このうちhistiocytic sarcomaはマクロファージ由来、Langerhans cell histiocytosisはランゲルハンス細胞由来、interdigitating DC sarcoma/tumorはT細胞領域のDC由来と考えられています。また、blastic NK-cell lymphomaの少なくとも一部がplasmacytoid DC由来の腫瘍であることがわかっています（Blood 97:3210, 2001）。

### 【質問】

1) CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>分画の比率、絶対数の変化は、人体にどのような変化を起こすのでしょうか。

リンパ球数の減少や、免疫能低下患者では、健康人に比し、CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>分画の比率および絶対数が減少していますが、そのメカニズム、それが人体へ及ぼす影響など教えてください。また、この分画とDCとの関わりについても教えていただけないでしょうか。

2) 抑制性CD8 T cellのFCM的分画は何があるのでしょうか。

3) CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>分画の臨床的意義について教えてください。(CD8<sup>bright+</sup>CD57<sup>+</sup>分画)

**【回答】**

- 1) CD4 T細胞の大部分はCD28を発現していますが、その細胞分画に関してお尋ねの内容について、検索した範囲で回答は見あたりませんでした。
- 2) CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>のTregがマウスで報告されており(J Clin Invest 115:2904, 2005)、ヒトの胸腺にもCD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>のTregが存在することが報告されています(Blood 102:4107, 2003)、ヒトの末梢血にCD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregが存在するという報告は見あたりませんが、あるとしてもごくわずかと考えられます。
- 3) CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>分画は慢性ウイルス感染症や多発性硬化症の患者で報告されており、何らかの抗原による慢性的な刺激状態を反映すると考えられます。

**【質問】** DC細胞を介する免疫寛容とがんのDC療法についてお尋ねします。

- 1) immature DCが免疫寛容を誘導するならば、TNF  $\alpha$  /IL-1/TLRリガンド/CD40Lなどで成熟化していないsemi-mature DC投与により、腫瘍免疫が、かえって低下してしまい、腫瘍が増悪する危険性がありますか(テキストp15, 表1にある論文は必ずしも全てmature DCを用いていないと思いますが)。
- 2) 腫瘍抗原ペプチドをワクチンとして皮内注射すると腫瘍が増悪することがある、との古い結果は上記と関連があるのでしょうか。また、この結果はどのように評価されますでしょうか。

**【回答】**

- 1) GM-CSFとIL-4だけで誘導したimmature DCを投与するとIL-10を産生する免疫抑制性CD8 T細胞が誘導されることが報告されているので(Blood 100:174, 2002)、成熟が不十分なsemi-mature DC投与により腫瘍が増悪する危険性は理論的にはあります。また、immature DCまたはmature DCにペプチドをパルスしてメラノーマ患者に投与した比較試験では、immature DC投与においてはごく弱い免疫反応しか誘導されませんでした(Int J Cancer 93:243, 2001)。それによってこれらの患者で腫瘍が増悪したかどうか分かりませんが、少な

くとも *in vivo* において mature DCの方が免疫誘導能が高いことが示されています。

- 2) 「腫瘍抗原ペプチドをワクチンとして皮内注射すると腫瘍が増悪することがある」という報告は知りませんので、コメントできません。その場合、自然経過で増悪したのか、ワクチンを投与したから増悪したのかが判別できないのではないのでしょうか。

**【質問】** 現在、当院では、単球から誘導し癌のDC療法を行っていますが、品質管理および研究目的で表面抗原のFCMを行っています。現在解析している抗原はCD14, HLA-DR, (CD80), CD86, CD83です。(費用の関係で4項目に限定しています。)

基本的にはGM-CSF, IL4で分化誘導し、TNF-  $\alpha$  により成熟をかけたmature DCを用いていますが、固体により発現の強弱があるようです。

- 1) この4項目の他に deifferentiation, maturation のよいマーカーを教えてください。
- 2) これらのマーカーの発現量の違いによって、特に maturation のマーカーが低発現である場合、トレランスを誘導することがあるのでしょうか。
- 3) もしトレランスを誘導するとしたら、これを解決する方法として最も簡便な方法はどのようなものなのでしょうか。

**【回答】**

- 1) 基本的にはご提示の4つでいいと思います。追加するとすれば所属リンパ節への遊走に重要なケモカインレセプター CCR7ですが、必須ではありません。なお、TNF-  $\alpha$  単独での成熟ではCCR7の発現はあまり上がらず、プロスタグランジンE2を添加すると上がります。
- 2) あり得ると思います。例えばGM-CSFとIL-4だけで誘導したimmature DCを投与するとIL-10を産生する免疫抑制性CD8 T細胞が誘導されることが報告されていますし(Blood 100:174, 2002)、TNF-  $\alpha$  単独で刺激したDCはsemi-matureといえる状態で、トレランスを誘導しうることが報告されています(Trends Immunol 23:445, 2002)。
- 3) 十分な成熟を誘導することが重要ですが、例えば、よく使われるTNF-  $\alpha$  + IL-1  $\beta$  + IL-6 + プロスタ

グランジン E2 のカクテルを使うとか(この刺激がいかどうかは異論のあるところですが)、あるいは OK-432 のような Toll-like receptor のリガンドを用いるといいかもしれません (Cancer Res 63:4112, 2003)。

**【質問】**

- 1) 重篤な感染症などの場合、スメアでも DC の増加が観察されることがあるのでしょうか。
- 2) 通常、臨床検査技師はスメアで観察された DC を異形細胞として分類しているものと思われませんが、この分類でよろしいのでしょうか。
- 3) DC の研究についてはどのくらいの歴史があるのでしょうか。また、臨床検査へはどのように応用されているのでしょうか。

**【回答】**

- 1) ヒト血液中の mDC, pDC の頻度は非常に低い(いずれも単核球のうち 0.1 - 0.5% 程度)ですし、重篤な感染症やその他の疾患において、末梢血の DC 数が増えるという報告は知る限りなく、むしろ炎症巣に動員されて減少するという報告が多いので、
- 2) DC が観察されたとして、mDC はおそらく樹状突起をもった単球様に、pDC は形質細胞様に見えるはず (Science 284:1835, 1999)。そうだとすればそれと認識できる可能性はありますが、私自身スメアで DC を観察したことがないのでわかりません。よくわからないまま「異形細胞」分類されることがあるかもしれませんが、本来異形細胞ではないので、この分類は不適切と思います。
- 3) DC 研究の歴史は講演の中でも触れましたが、1973 年に Steinman という人が、マウスリンパ組織の付着細胞分画に、突起をもった特異な形態の細胞を同定し、“dendritic cell” と名づけたことから本格的に始まりました。臨床検査への応用はまだほとんど始まっていないと思います。疾患によって、末梢血の DC 数が減ったり、病巣に DC が集積したりしていることが報告されているので、こうした知見が疾患の診断や治療効果の判定に有用であると確立すれば、臨床検査に取り入れられると思います。現時点ではまだその段階ではありません。