

<資 料>**日本抗生物質学術協議会・ファイザー感染症研究助成
海外留学研究成果報告****ヒト末梢血単球状の FcγR1 の活性化による自己反応性
T細胞誘導能を持った未熟樹状細胞の分化誘導の研究**

田中志幸

京都大学ウイルス研究所 細胞制御研究分野

留学先：カリフォルニア大学ロサンゼルス校医学部 微生物免疫学部門

免疫系において抗原抗体複合体(IC)は宿主の自然免疫系の活性化とそれに伴う炎症反応の惹起に重要な役割を果たしている。特に、IgG抗原抗体複合体(IgG-IC)が単球状に存在するFcγ受容体(FcγR)に結合して活性化することは自己免疫性疾患やIII型アレルギーなど組織傷害性の炎症性疾患の病態生理に関与している。

我々は固相化されたヒトのIgGを用いて単球状のFcγRを刺激することにより自然免疫系の重要な機能を担う樹状細胞(DC)が分化誘導されうるかを調べた。我々は固相化IgGによる単球刺激はCD1b, CDC86, CD206などを発現する未熟樹状細胞(iDC)の分化を誘導し得た。また、この作用はFcγRI(CD64)を介したGM-CSFの転写誘導に依存していることが分かった。しかしながら、固相化IgGで誘導したiDCはGM-CSFで誘導したiDCに比べて、CD86の発現レベルがより高い一方でMHC class II, CD32, CD206, CD14はより低く、異なる細胞表面マーカーのパターンを示した。さらに、固相化IgG誘導iDCはGM-CSF誘導iDCに比べて自己のリンパ球においても同種のリンパ球においてもリンパ球増殖刺激能が高かった。

これらのことから、抗原抗体複合体によるFcγRIの活性化によって引き起こされる特異的未熟樹状細胞は自己反応性リンパ球刺激を介して抗原抗体複合体に関連した自己免疫疾患の発症機序に関与している可能性が示唆された。

Report of Research Grant: The Japan Antibiotics Research Association·Pfizer Research Fund on Infectious Diseases.

MOTOYUKI TANAKA: Activation of FcγR1 on monocytes triggers differentiation into immature dendritic cells that induce autoreactive T cell responses.

抗原抗体複合体(IC)の形成はリウマチ性関節炎(RA)や全身性エリトマトーデス(SLE)などの自己免疫疾患の病態生理に関わる一連の炎症反応を惹起する^{1~3)}。このICが炎症反応を引き起こすメカニズムの一つはICが免疫グロブリン分子のFc部分の受容体に結合し架橋することである。特にIgGで構成されるICは単球・マクロファージ系の細胞上に発現するFcγ受容体(FcγR)を架橋する⁴⁾。FcγRの架橋はこれらの細胞によるオプソニン化された外来抗原の貪食作用や、抗体依存性細胞傷害活性(ADCC)や様々な種類の炎症性サイトカインやケモカインの産生を引き起こす^{5,6)}。

ヒトではFcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16)と三種の異なるクラスのFcγRが存在することが示されており、発現分布、機能やIgGアイソタイプとの親和性がそれぞれ異なる⁴⁾。CD32とCD16がIgGに対して低い親和性($K_d=10^{-5}$ から 10^{-7})を示すのに対してCD64はIgG高親和性の受容体である($K_d=10^{-8}$)⁴⁾。CD64は単球、マクロファージあるいはインターフェロンγで刺激された顆粒球などミエロイド系の細胞に特異的に発現する。また、CD64の架橋によってTNF-α, IL-6やGM-CSFなどの炎症性サイトカインの産生が引き起こされることが分かっている^{7~9)}。

単球系の細胞は様々な受容体刺激によって活性化されて樹状細胞を含む抗原提示細胞など自然免疫や獲得免疫の調節に関わる細胞群に分化する^{10,11)}。我々は以前、単球状に発現している特定のToll様受容体(TLR)を刺激することによって、単球を強力な抗原提示能を伴ったCD1b陽性樹状細胞(CD1b⁺DC)と貪食能の高いCD209陽性マクロファージの二種類の細胞に急速に分化させる事を示した¹²⁾。CD1b⁺DCはハンセン病においては感染部位に局在し病原体への抵抗性に関わっていることが示されている^{12,13)}。また、*in vitro*でTLR刺激のみならず低用量のGM-CSF

(0.2~10 U/ml)によっても単球からCD1b⁺DCを誘導することができる。GM-CSFとIL-4を併用する一般的な*in vitro*の単球由来DCはCD1bとCD209を両方発現するのに対して組織中や末梢血中のCD1b陽性DCはCD209を発現しないことから、TLR刺激や低用量GM-CSFで誘導されるCD1b⁺DCはより生理的であると考えられる。FcγRが単球状に発現されることと、単球が樹状細胞に分化することに基づいて、我々は単球状のFcγR刺激が樹状細胞への分化を惹起し、その樹状細胞が自己免疫疾患の発症を引き起こすような獲得免疫応答を誘導するのではないかと仮説を立てた。

材料・方法

リガンド・抗体

TLR2/1リガンド(*Mycobacterium tuberculosis* 19kD lipopeptide)は購入した(EMC Microcollections)。結核菌抽出物は文献にあるように超音波破碎したものを¹⁴⁾、Dr. JOHN BELISLE (Colorado State University, Fort Collins, CO)から提供された。GroES蛋白質は国立アレルギー感染症研究所との契約(N01-AI-25469 “Leprosy Research Support”)に基づいてDr. PATRICK BRENNANから提供された。GroESペプチド¹⁵⁾はSynPepを用いて合成した。

固相化ヒトIgG

健康人ドナーのプール血清由来ヒトIgG (Equitech-Bio, Inc, Kerrville, TX)はエンドトキシン無含有のPBS (Invitrogen, Carlsbad, CA)に様々な濃度(0.2~125 μg/ml)で溶解し、プラスチック製培養プレート上に4°Cでovernightインキュベーションしてから使用した。培養開始前にコーティングしたプレートをPBSで2回洗浄した。

単球の分化誘導

インフォームドコンセント (UCLA Institutional Review Board #92-10-591-33) を得られた健康人ドナーから全血を採取し、末梢血単核球 (PBMC) を Ficoll-Hypaque (Ficoll-Paque; Pharmacia Biotech AB) 濃度勾配遠心法で分離した。末梢血単球は PBMC から Percoll (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden) 濃度勾配法で分離した。特に記載のない場合、単球の培養は 37°C でグルタミン (2 mM), ペニシリン (100 U/ml), ストレプトマイシン (100 µg/ml) と 10% 非働化 FCS (OMEGA Scientific, CA) を添加した RPMI1640 培地で行った。単球の刺激は培地のみ、固相化 IgG あるいは非固相化 IgG (0.04~125 µg/ml), rGM-CSF (0.2~10 U/ml), 結核菌由来 19 kD リポペプチド (10 µg/ml) の各存在下で 2 日ないし 3 日間培養した。

末梢血単球中の CD16⁺ と CD64⁺ 分画についての実験では、前述のように単球を分離してから抗 CD16MACS ビーズ (Miltenyi Biotec) を添加して 4°C で 20 分間培養した。磁気カラム通過分画を CD64⁺ 単球とし、磁気カラム吸着分画を CD16⁺ 分画とした。磁気カラム分離操作はそれぞれ 2 回ずつ行った。

FcγR, GM-CSF ブロッキングアッセイ

上述のように分離した単球に 20 µg/ml の 3G8 (抗 CD16 抗体, BioLegend), AT10 (抗 CD32 抗体, AbD Serotec), 10.1 (抗 CD64 抗体, AbD Serotec), 107.3 (マウス IgG1κ アイソタイプコントロール, BD Biosciences), BVD2-23B6 (抗 GM-CSF 抗体, BD Biosciences) あるいは R35-95 (Rat IgG2a アイソタイプコントロール, BD Biosciences) を加え氷上で 20 分間インキュベーションしてから、固相化 IgG コーティングした培養ウェルに移した。

フローサイトメトリー分析

以下の抗体をフローサイトメトリー分析に用いた。BCD1b3.1 (抗 CD1b¹⁶, mIgG1κ), 4A76 (抗 CD1b, Beckman Coulter, mIgG2a), HI149 (抗 CD1a, BD Biosciences), AD5-8E7 (抗 CD1c, Miltenyi Biotec), L243 (抗 HLA-DR, BD Biosciences), MEM-233 (抗 CD80, Caltag Laboratories), 2331 (FUN-1) (抗 CD86, BD Biosciences), HB14 (抗 CD40, Caltag Laboratories), GHI/61 (抗 CD163, BD Biosciences), 19.2 (抗 CD206), DCN46 (抗 CD209, BD Biosciences), Tük4 (抗 CD14, Caltag Laboratories), 3G8 (抗 CD16, Caltag Laboratories), FLI8.26 (抗 CD32, BD Biosciences), 10.1 (抗 CD64, BD Biosciences), M5E2 (抗 CD14, BD Biosciences), HB15e (抗 CD83, BD Biosciences), SCO6 (抗 CDw116, Immunotech) および適切なアイソタイプコントロール (Caltag Laboratories, Sigma-Aldrich, BD Biosciences)。

GM-CSF リアルタイム PCR

単球は培地のみ、固相化 IgG (コーティング溶液中濃度 0.04~25 µg/ml) あるいは 19 kD リポペプチド (10 µg/ml) の存在下で 3 時間刺激し、文献に記載されている方法で RNA を抽出し cDNA を合成した¹⁷⁾。GM-CSF のプライマー配列は以下の通り: forward, 5'-GCCTCACCAAGCTCAAGG-G-3'; reverse, 5'-GGAGGGCAGTGCTGTTTGTAG-3'。PCR 反応には Sybr Green PCR Master Mix (BioRad) を使用した。GM-CSF のサンプルごとの比較定量と標準化は文献に記載された方法で行った¹⁷⁾。

T 細胞アッセイ

リンパ球混合試験 (MLR) では、FcγR 刺激された、あるいは rGM-CSF で誘導された CD1b 陽性細胞を前述の様に準備し、放射線処理した。同種

MLRにはHLA不一致の健常人ドナーから採取したT細胞を使用し自己MLRには単球を採取したのと同人物のT細胞を使用した。T細胞の分離にはRosette Sep T cell enrichment cocktail (Stem Cell Technologies)を用いた。単球に培地のみあるいはT細胞浮遊液を加えた。培養上清中のIFN- γ 濃度をELISA法(BD Biosciences)で測定し、T細胞の増殖を文献に記載された方法で測定した¹⁸⁾。MHC class II拘束性の実験では、単球の分化と放射線照射を前述の様にを行い、分化した樹状細胞を以前我々が報告したGroES蛋白質あるいはGroESペプチド特異的なMHC class II拘束性T細胞と共培養した¹²⁾。

結果

Fc γ Rの活性化は単球の分化を誘発する

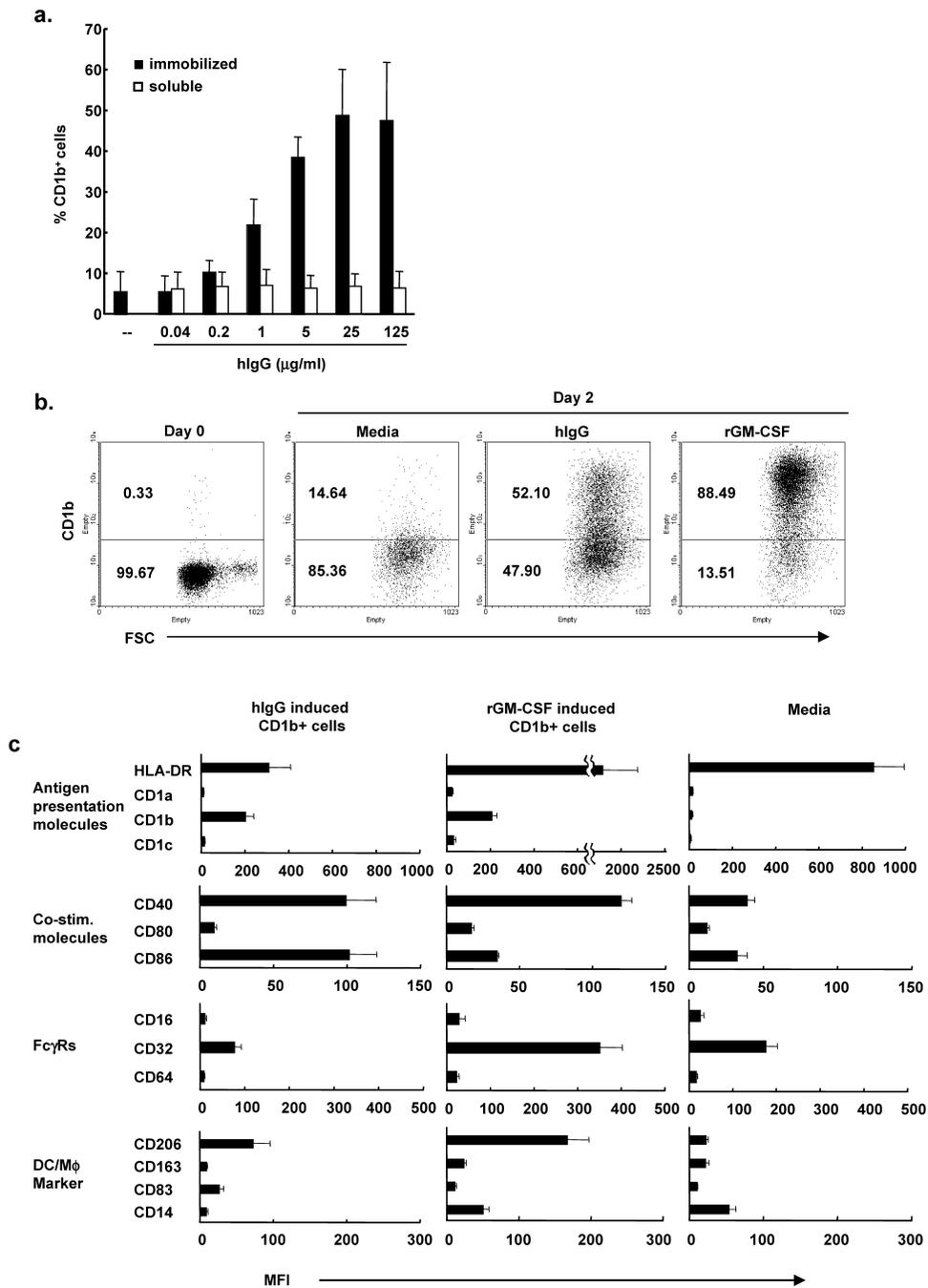
Fc γ Rを介した活性化によって*in vitro*でサイトカインで単球から誘導された樹状細胞の成熟化を抑制することができることは知られていた¹⁹⁾。今回、我々はFc γ R刺激が未分化の末梢血単球に与える直接の影響について研究した。健常人末梢血から分離した単球をプラスチック培養ウェル状に様々な濃度(0.04~125 μ g/ml)で固相化した健常人血清由来のIgG (hIgG)の存在下で培養した。培養2日目に細胞を回収して樹状細胞マーカーであるCD1bの発現レベルをフローサイトメトリーを用いて測定した。その結果、固相化IgGはコーティング時の濃度依存性にCD1bの発現を誘導した(図1a)。一方、固相化せずに培養液に直接加えたIgGは単球状のCD1b発現を誘導しなかった。以前、我々はリコンビナントGM-CSF (rGM-CSF)で二日間刺激したヒト末梢血単球が未熟樹状細胞の形態とCD1b発現を含む表面マーカー発現パターンと機能を備えるようになることを示した^{12,20)}。CD1bの平均輝度(MFI)ではrGM-CSF刺激に及ばないものの、固相化IgGによるCD1b発現比率はrGM-CSF刺激と匹敵した(図1b)。

次に我々は固相化IgG刺激またはrGM-CSF刺激で得られたCD1b陽性細胞の表現型を比較検討した。それぞれの刺激でのCD1b発現レベルが同等となるように、25 μ g/mlでコーティングした固相化IgG刺激した単球と0.2 U/mlのrGM-CSFで刺激した単球を培養2日目に回収して、様々な細胞表面マーカーで染色しフローサイトメトリーで分析した(図1c)。固相化IgG刺激した単球とrGM-CSF刺激した単球は共に、MHC class II, CD40, CD86 (B7.2)の高発現とCD16 (Fc γ RIII), CD64 (Fc γ RI), CD14の発現低下を示し、未熟樹状細胞に似た表現型であった。しかしながら、明確な相違点もあった。CD86の発現レベルは固相化IgG刺激した単球でより高く、一方、MHC class II, CD32 (Fc γ RII), CD206 (マンノース受容体)とCD14はより低かった。これらの結果は固相化IgG刺激で誘導した未熟樹状細胞はrGM-CSFで誘導したものと似ているが異なる細胞であることを示唆していると考えられた。

固相化IgGによる単球のFc γ R刺激はGM-CSFの転写活性を誘導する

GM-CSFがFc γ R活性化による単球のCD1b発現に関与しているかどうか検討するために、まず我々はFc γ Rの活性化によってGM-CSFのmRNAの転写が引き起こされるか調べた。そのために、末梢血単球を固相化IgGで刺激し単球中のGM-CSF mRNA量をリアルタイムPCRで測定した。その結果、固相化IgGは用量依存性にGM-CSF mRNAを誘導し、25 μ g/mlの固相化IgG刺激によるmRNA量は10 μ g/mlのTLR2/1リガンド(19 kDリボペプチド)による刺激に近かった(未刺激単球に比較して50倍 vs 45倍)(図2a)。また、Fc γ R刺激した単球はTNF- α , IL-6, IL-1 β などのほかの炎症性サイトカインも産生したがrGM-CSF刺激した単球では炎症性サイトカインは産生されなかった。

図1. 固相化したヒト IgG による FcγR の活性化は CD1b 陽性未熟樹状細胞の分化を誘導する

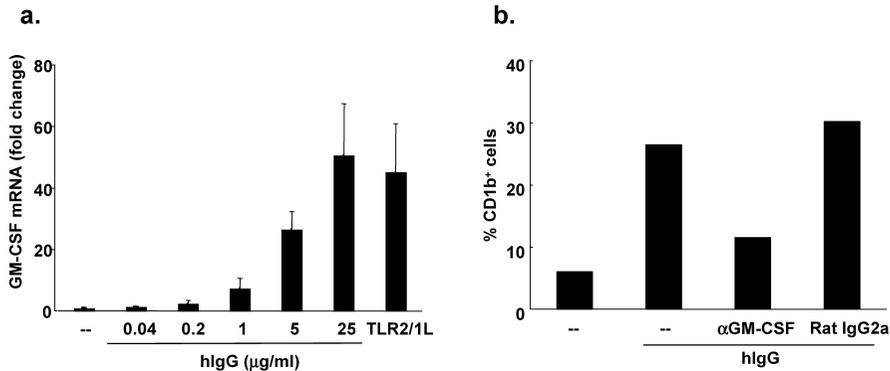


a. 様々な濃度の固相化 IgG, 可溶性ヒト IgG (0.04~125 μg/ml)あるいはリコンビナント GM-CSF (10 U/ml)で単球を刺激し, 培養2日目に CD1b 陽性細胞の百分率をフローサイトメトリーで求めた。データは3回の独立した実験から平均 CD1b 陽性細胞百分率と標準誤差を示した。

b. 固相化 IgG (25 μg/ml), rGM-CSF (10 U/ml)で単球を刺激, あるいは未刺激で2日間培養して, 抗 CD1b 抗体でラベルしフローサイトメトリーで測定した。ドットプロットは3回の独立した実験の一つを示している。

c. 固相化 IgG (25 μg/ml), rGM-CSF (0.2 U/ml)あるいは培地のみで単球を刺激し, 培養2日目に細胞を回収し抗 CD1b 抗体と図に示したマーカーで共染色した。フローサイトメトリー上で CD1b 陽性細胞にゲートをかけ, データを少なくとも3回の独立した実験の平均輝度(MFI)と標準誤差で示した。

図2. 固相化IgGによる単球上のFcγR活性化はGM-CSF転写活性を誘導する



a. 単球を3時間固相化IgG (0.04~25 $\mu\text{g/ml}$)あるいはTLR2/1リガンド(10 $\mu\text{g/ml}$)で刺激した後、細胞を回収してリアルタイムPCRを行った。3回の独立した実験からの未刺激細胞に対するmRNAの増加率の平均値と標準誤差を示した。b. 抗GM-CSF抗体あるいはアイソタイプコントロールの存在下または非存在下に単球を固相化IgG (0.2 $\mu\text{g/ml}$)で刺激した。培養2日目にCD1b陽性細胞の百分率をフローサイトメトリーで求めた。データは2回の独立した実験のうちの1回を示している。

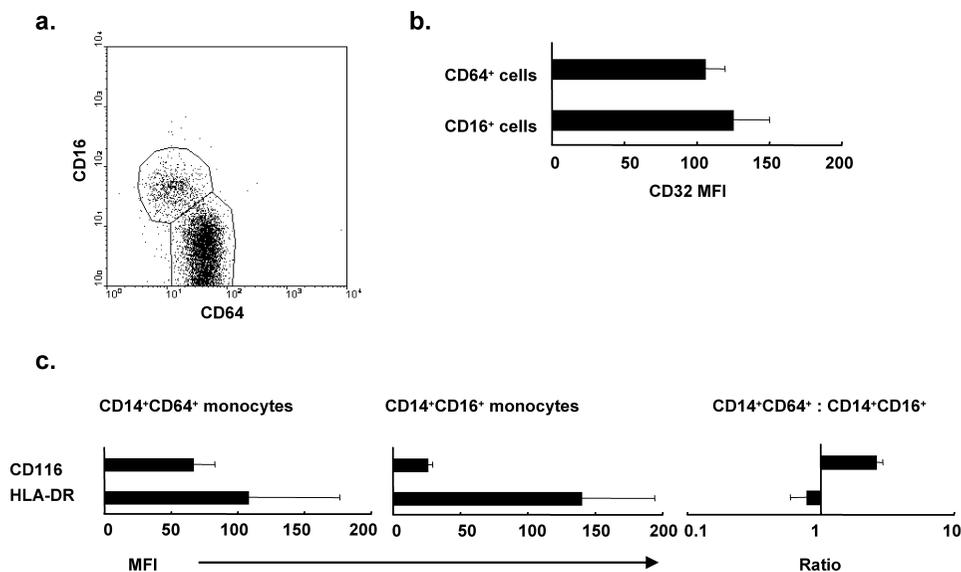
さらに我々は、GM-CSFがFcγR刺激によるCD1b発現誘導に必要なかどうかを明らかにするために、単球を抗GM-CSFブロッキング抗体またはそのアイソタイプコントロールの存在下に固相化IgG刺激を行った。抗GM-CSFモノクローナル抗体によるブロッキングによって固相化IgGによるCD1b発現レベルはアイソタイプコントロールまたは抗体未添加の場合に比べておよそ60%低下した(図2b)。これらのデータは固相化IgGによる単球刺激はGM-CSFの転写を誘導し、十分なCD1b陽性未熟樹状細胞への分化に必要であることを示した。

末梢血単球におけるFcγRの発現の検討

文献上、ヒトの末梢血単球は主に2つの細胞集団、CD14^{dim}CD16⁺CD64⁻の単球とCD14^{bright}CD16⁻CD64⁺の単球から成り立つことが報告されている。これらの細胞集団のうちどちらがCD1b陽性未熟樹状細胞の前駆細胞であるかを調べるために、我々は二種類の単球上のFcγR、

HLA-DR、GM-CSF受容体の発現レベルを比較した。健康人由来末梢血単球をCD14、CD16、CD64と同時にCD32、CD116(GM-CSF受容体 α 鎖)のモノクローナル抗体でラベルして、CD14陽性単球についてフローサイトメトリーで検討した。文献上で報告されていたように、CD14陽性単球は比較的少数のCD16⁺CD64⁻細胞と比較的多数のCD16⁻CD64⁺細胞に分かれていた(図3a)。両方の細胞集団のCD32とHLA-DRの発現レベルはほぼ同等だった(図3b)。興味深いことに、CD16⁻CD64⁺細胞はCD16⁺CD64⁻細胞にくらべて高いレベルのCD116を発現していた(図3c)。また、CD1aとCD1bはどちらの細胞集団にも発現していなかった。MHC class Iと共刺激分子群(CD40、CD80、CD86)は同程度に発現していた。CD16⁻CD64⁺細胞がより高いCD116発現レベルを示したことから、これらのデータはCD16⁻CD64⁺単球がCD1b陽性未熟樹状細胞の前駆細胞である可能性がより高いことを示唆している。

図3. ヒト末梢血単球分画における FcγR の発現



a. ヒト末梢血単球を抗 CD14, 抗 CD16, 抗 CD64 モノクローナル抗体でラベルした。CD14 陽性単球分画における CD16 と CD64 の発現をドットプロットで示した。

b, c. CD14⁺CD16⁺ 分画と CD14⁺CD64⁺ 分画をそれぞれ抗 CD32, 抗 HLA-DR, 抗 CD116 抗体でラベルした。データは 3 回の独立した実験の MFI の平均値と標準誤差を示している。(左側および中央)

固相化 IgG は CD64 を介して CD1b 陽性未熟樹状細胞への分化を惹起する

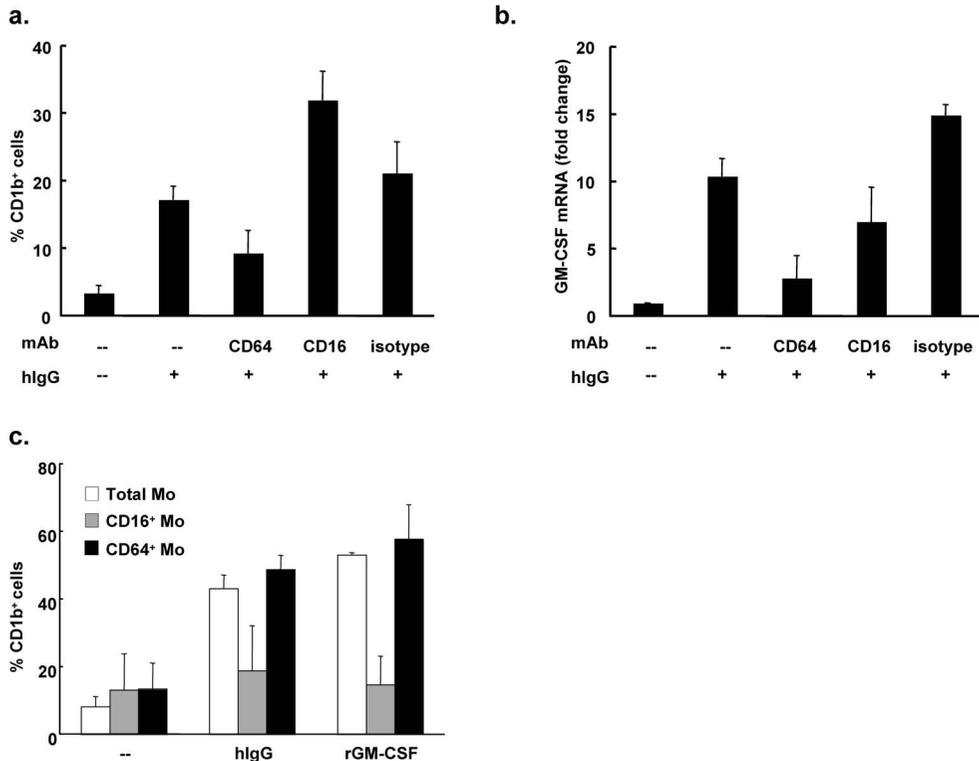
どちらのヒト末梢血単球集団が CD1b 陽性未熟樹状細胞の前駆細胞であるか、より明らかにするために、FcγR と IgG の Fc 部分との結合を阻害するモノクローナル抗体を利用した。まず始めに、CD1b の細胞表面発現レベルへの FcγR ブロッキング抗体の効果調べた。抗 FcγR 抗体あるいはアイソタイプコントロールの存在下または非存在下において単球を固相化 IgG で刺激した。その結果、培養 2 日目の時点で抗 CD64 抗体の存在下で刺激した単球では抗体非存在下に比べて CD1b の発現レベルが 46% 低下していたが、抗 CD16 抗体やアイソタイプコントロールでは発現抑制は認められなかった (図 4a)。

次に CD64 のブロッキングの効果を GM-CSF

mRNA 転写活性においても調べた。前述のように FcγR 刺激と CD64 ブロッキングを行い、培養開始 3 時間後に細胞を回収して GM-CSF mRNA を測定した。その結果、抗 CD64 抗体存在下では 73%、抗 CD16 抗体存在下では 32% の GM-CSF 転写活性抑制が見られたが、アイソタイプコントロールでは見られなかった (図 4b)。抗 CD32 抗体を用いたブロッキングでも GM-CSF 転写活性と CD1b 発現誘導の抑制が観察されたが、その程度は CD64 ブロッキングよりも小さかった。

CD14 陽性単球のうち CD16⁻CD64⁺ 細胞集団が CD1b 発現細胞の前駆細胞かどうか明らかにするために、二つの単球集団を磁気ビーズを用いて分離してから固相化 IgG で刺激した。CD14 陽性単球全体と CD16⁻CD64⁺ 細胞集団は固相化 IgG 刺激と rGM-CSF 刺激の両方において CD1b を発

図4. 固相化IgGで引き起こされるCD1b陽性細胞の分化はCD64依存性である



- a. 図示したブロッキング抗体またはアイソタイプコントロール(10 μ g/ml)の存在下あるいは非存在下に末梢血単球を固相化IgG (0.2 μ g/ml)で刺激した。培養2日目に細胞を抗CD1b抗体で標識し、フローサイトメトリーを行った(n=2)。
- b. 図示したブロッキング抗体またはアイソタイプコントロール(10 μ g/ml)の存在下あるいは非存在下に末梢血単球を固相化IgG (0.2 μ g/ml)で刺激した。培養3時間目に細胞を回収しmRNAを抽出し、GM-CSF mRNAの転写活性をリアルタイムPCRで測定した(n=2)。
- c. 抗CD16抗体標識磁気ビーズを用いて、末梢血単球をCD16陽性とCD16陰性集団に分離した。CD16陽性、CD16陰性集団または未分離の単球を固相化IgG (25 μ g/ml)あるいはリコンビナントGM-CSF (0.2 U/ml)で2日間刺激した。回収した細胞中のCD1b陽性細胞の百分率をフローサイトメトリーで測定した(n=2)。

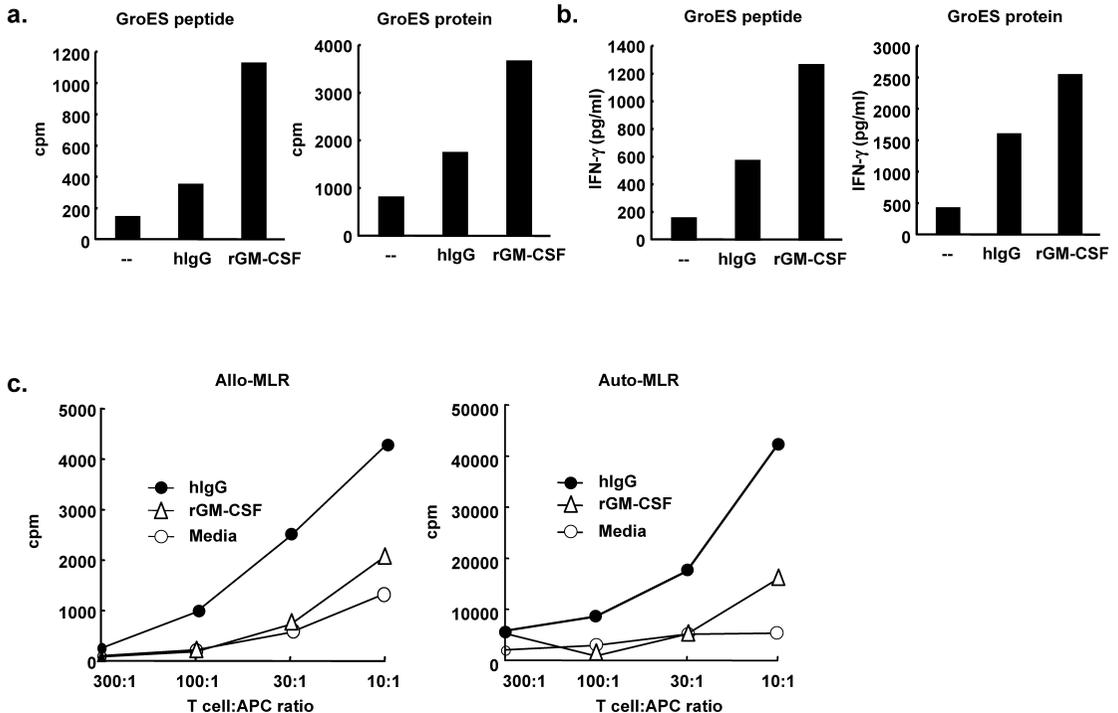
現したが、CD16⁺CD64⁻細胞集団は未刺激細胞と同程度のCD1bしか発現しなかった(図4c)。結論として、固相化IgGはCD16⁻CD64⁺単球上のCD64を介してGM-CSFの産生を誘導し、その結果CD1b陽性未熟樹状細胞への分化を起こすと考えられた。

Fc γ R刺激で分化したCD1b陽性未熟樹状細胞はT細胞を活性化する

Fc γ R刺激とrGM-CSF刺激で得られたCD1b陽

性細胞が両方とも未熟樹状細胞の表現型を示すことから、我々はこれらのCD1b陽性細胞のT細胞活性化能を検討した。Fc γ R活性化とrGM-CSF刺激によって分化した未熟樹状細胞の機能をMycobacterium leprae 10 kDa GroES蛋白由来のペプチドを認識するMHC class II拘束性T細胞クローンである9-14B GroES細胞への抗原提示能を持って比較した。どちらのCD1b陽性未熟樹状細胞もT細胞クローンの増殖とIFN- γ の産生を惹起したが、rGM-CSF刺激による未熟樹状細胞のほうが

図5. FcγR刺激で分化したCD1b陽性未熟樹状細胞はT細胞を活性化する



a. MHCクラスII拘束性についての実験では、単球を前述したように培養液のみ、固相化IgGまたはGM-CSFで刺激して分化誘導した。回収した樹状細胞をMHCクラスII拘束性T細胞株 (1×10^4 個) とGroES蛋白またはGroESペプチドと共培養した後、培養上清のIFN- γ ELISAとT細胞増殖試験を行った。図示したデータは2回の実験の1回を示す。

b. リンパ球混合試験(MLR)では、前述した方法で固相化IgGまたはリコンビナントGM-CSFで分化したCD1b陽性細胞を得た。同種MLRではHLA不適合ドナーから、自己MLRでは単球を得たのと同一のドナーからRosette Sep T cell enrichment cocktail (StemCell Technologies)を用いてT細胞を得た。T細胞：抗原提示細胞の比率は10：1から300：1まで変化させ、IFN- γ をELISA (BD Biosciences)で測定した。T細胞の増殖はトリチウム取り込み試験で測定した。図示したデータは3回の実験のうちの1回を示す。

抗原提示能は優れていた(図5a, 5b)。これに対して、同種リンパ球を用いたリンパ球混合試験(MLR)ではFcγR活性化CD1b未熟樹状細胞はrGM-CSF誘導細胞の2倍から5倍のT細胞増殖能を示した(図5c)。さらに、CD1b陽性未熟樹状細胞の前駆細胞を得た健康ドナーと同一ドナーから採取したリンパ球を用いた自己MLR試験では、やはりFcγR活性化CD1b未熟樹状細胞はrGM-CSF誘導細胞よりも強いT細胞増殖能を示した(図5c)。これらのデータはFcγR活性化で得られ

た未熟樹状細胞はより強い同種/自己T細胞増殖能を持つと言う点でrGM-CSF刺激で得られた未熟樹状細胞と機能的に異なるということを示唆している。

考 察

ICによる自然免疫系の細胞に発現するFc受容体の活性化は疾患において組織傷害性の炎症を引き起こす。この研究で我々は、ヒト末梢血単球に発現しているFcγRを活性化することによって、

単球がCD1b陽性未熟樹状細胞へ分化することを明らかにした。この樹状細胞の分化機序にはCD64 (FcγRI) を介したシグナルとGM-CSFの転写活性上昇が必要であった。前駆細胞となる単球はGM-CSF受容体を高発現するCD16⁻CD64⁺分画であり、固相化IgGによって特異的に活性化され未熟樹状細胞へ分化していることが示唆された。FcγR活性化による未熟樹状細胞とrGM-CSF刺激による未熟樹状細胞では表現型と機能に相違点があり、FcγR活性化樹状細胞はrGM-CSF刺激樹状細胞に比べてより効果的に自己あるいは同種のT細胞増殖を刺激することができた一方で、細菌由来抗原の提示能では劣っていた。

獲得免疫応答を調節する自然免疫応答の能力の発生や調節は樹状細胞の機能によるところが大きい²¹⁾。過去の文献では単独のあるいは複数のサイトカインの組み合わせによる樹状細胞の分化や成熟化に関する研究に焦点を当ててきた¹⁹⁾。免疫複合体に関連した自己免疫疾患や炎症性疾患の発症機序においても樹状細胞は重要な役割を演じている^{22,23)}。しかしながら、FcγRの架橋による活性化と単球への樹状細胞への分化との間の関連や機序についてはまだよく分かっていなかった。また、それに関する研究はサイトカインで誘導された樹状細胞に関するものに限られていた。今回の研究は単球のFcγRの架橋はそれ単独でも未熟樹状細胞への分化を引き起こし、その未熟樹状細胞は自己のT細胞増殖を刺激しうることを明らかにした。我々の得た知見は免疫複合体の存在はそれ自体でも自己免疫病の症状や免疫複合体病を引き起こすのに十分なきっかけになりうることを示唆している。

GM-CSFとIL-4の組み合わせで単球を刺激することにより免疫療法にも有用な強力な単球由来樹状細胞を誘導することができるが、我々はこれまでにGM-CSF単独で単球を刺激することでも未熟樹状細胞を誘導できるモデルを確立した^{12,20)}。

GM-CSF単独で誘導した未熟樹状細胞の形態、細胞表面マーカーの表現型や強い抗原提示能はこれらの細胞が過去に報告された未熟樹状細胞と同様のものであることを示し^{12,24)}、ハンセン病皮膚病変やヒトリンパ組織に分布する未熟受容細胞の細胞表面マーカーの発現パターンと関連性が深いことも示した¹²⁾。今回の研究で、我々はFcγRを活性化された単球がGM-CSF転写活性を増加させ、抗GM-CSF抗体でCD1b陽性樹状細胞の分化を抑制できることを示すことによって、FcγRを活性化された単球がCD1b陽性未熟樹状細胞へ分化するにはGM-CSFが不可欠であることを示した。GM-CSFはそのmRNAや蛋白が炎症組織や自己免疫病患者から検出されることから、自己免疫病の機序に関与していると考えられる²⁵⁾。しかしながら、CD1b発現を誘導する能力を比較するとFcγR活性化とrGM-CSF刺激の間には違いがある。最大限のFcγR活性化(コーティング溶液中のIgG濃度: 25 μg/ml)と同等のCD1b発現レベルを得るのに必要なrGM-CSFは以前の実験で使用されていた量の1/5から1/50量(0.2 U/ml)でしかない。同様に、健常人血清中や滑膜液中に検出されるGM-CSF量はきわめて低いか、検出感度以下である²⁶⁾。慢性関節リウマチ(RA)患者の滑膜液中においてすらGM-CSF濃度は0.2 U/ml(GM-CSF約35 ng/ml相当)よりもずっと低い²⁵⁾。さらに、これら二つの未熟樹状細胞は異なる表現型を示し、重要なことには、FcγR活性化未熟樹状細胞は自己ないし同種T細胞を強力に刺激できる。これらの知見はFcγRで誘導される未熟樹状細胞の分化はGM-CSFに依存してはいるが、別のシグナルやサイトカインがこの特殊な未熟樹状細胞の分化に関わっているに違いないことを示している。

FcγRの自己免疫疾患の病態生理への関与は細胞内ドメインにITAMモチーフを持つCD32aとITIMモチーフを持つCD32bの対による相反的な制御を軸に研究されてきた^{27,28)}。特に、CD32bは

自己免疫疾患への感受性の決定因子と考えられてきた。実際に、ヒトのCD32bをコードする遺伝子 *FCGR2B* の1アミノ酸残基の多型性が慢性関節リウマチの臨床的重傷度と関連することが示されてきている²⁹⁾。これに対して、CD64はCD16やCD32に対してIgGへの親和性が10倍から100倍も強く、最も高い親和性を持つにもかかわらず²³⁾、免疫複合体病や自己免疫疾患に果たす役割はよく分かっていなかった。今回、我々は抗CD64モノクローナル抗体によって分化が阻害されることから、FcγRの中でも主にCD64がCD1b陽性未熟樹状細胞への分化を担っていることをつきとめた。さらに、磁気ビーズ法で分離した未刺激の単球のうちCD16⁺CD14⁺分画ではなくCD64⁺CD14⁺分画がCD1b陽性未熟樹状細胞へ分化したことは、CD64⁺CD14⁺単球がCD1b陽性樹状細胞の前駆細胞であることを示唆している。CD64⁺CD14⁺単球がGM-CSF受容体をより多く発現していることもこの考えを支持している。CD32の発現レベルはCD64に比べてかなり高かったにもかかわらず、CD32のブロッキングの効果は常にCD64に対する効果よりも小さかった。CD64活性化による樹状細胞分化への効果は分化のステージに特異的なものである可能性もある。最近の報告ではGM-CSFとIL-4の組み合わせで刺激中の単球に対してCD64の架橋を行ったところ、CD64架橋無しの場合に比較して樹状細胞の表現型の発現程度が低く、抗原提示細胞としての機能も阻害されていたという¹⁹⁾。

結論として、我々は固相化IgGがCD64の活性化を介してサイトカインの添加が無くても単球から未熟樹状細胞への分化を直接的に引き起こすことを明らかにし、これらの未熟樹状細胞が自己反応性T細胞応答を誘導することを示した。FcγRを活性化された単球のCD1b陽性未熟樹状細胞への分化能は、免疫複合体関連自己免疫疾患あるいは炎症の機序を示すものであるかもしれない。こ

の病態生理学的機序において、自然免疫系は獲得免疫系の二つの側面、すなわち液性免疫反応を細胞性免疫へと転換させることでリンクさせている。この転換は自己反応性IgGによる自己免疫疾患、アレルギーやハプテン複合体反応性IgGによるアレルギー反応、あるいは病原性微生物に対する抗体で引き起こされる感染症などにおいて起り得る。いずれにしても、このメカニズムの鍵としてCD64を特定したことは、患者の罹患率や死亡率を悪化させうるこれらの免疫反応を防止する治療法のターゲットを提供するものである。

謝辞

我々はカリフォルニア大学ロサンゼルス校フローサイトメトリー共同実験室に設備の利用について感謝する。この研究はニューヨークコミュニティトラストのハンセン病および結核研究のためのハイザープログラムと日本抗生物質学術協議会2005年度ファイザー感染症基金の支援を受けた。

参考文献

- 1) LORENZ, H. M.; M. HERRMANN & J. R. KALDEN: The pathogenesis of autoimmune diseases. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 235 Suppl.: 16~26, 2001
- 2) SCHIFFERLI, J. A. & R. P. TAYLOR: Physiological and pathological aspects of circulating immune complexes. *Kidney Int.* 35: 993~1003, 1989
- 3) SCHMIDT, R. E. & J. E. GESSNER: Fc receptors and their interaction with complement in autoimmunity. *Immunol. Lett.* 100: 56~67, 2005
- 4) RAVETCH, J. V. & S. BOLLAND: IgG Fc receptors. *Ann. Rev. Immunol.* 19: 275~290, 2001
- 5) BERGER, S.; H. BALLO & H. J. STUTTE: Immune complex-induced interleukin-6, interleukin-10 and prostaglandin secretion by human monocytes: a network of pro- and anti-inflammatory cytokines dependent on

- the antigen:antibody ratio. *Eur. J. Immunol.* 26: 1297~1301, 1996
- 6) MARSH, C. B.; J. E. GADEK, G. C. KINDT, *et al.*: Monocyte Fc gamma receptor cross-linking induces IL-8 production. *J. Immunol.* 155: 3161~3167, 1995
 - 7) DEBETS, J. M.; J. G. VAN DE WINKEL, J. L. CEUPPENS, *et al.*: Cross-linking of both Fc gamma RI and Fc gamma RII induces secretion of tumor necrosis factor by human monocytes, requiring high affinity Fc-Fc gamma R interactions. Functional activation of Fc gamma RII by treatment with proteases or neuraminidase. *J. Immunol.* 144: 1304~1310, 1990
 - 8) KRUTMANN, J.; R. KIRNBAUER, A. KOCK, *et al.*: Cross-linking Fc receptors on monocytes triggers IL-6 production. Role in anti-CD3-induced T cell activation. *J. Immunol.* 145: 1337~1342, 1990
 - 9) HERRMANN, F.; S. DE VOS, M. BRACH, *et al.*: Secretion of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by human blood monocytes is stimulated by engagement of Fc gamma receptors type I by solid-phase immunoglobulins requiring high-affinity Fc-Fc gamma receptor type I interactions. *Eur. J. Immunol.* 22: 1681~1685, 1992
 - 10) BANCHEREAU, J.; F. BRIERE, C. CAUX, *et al.*: Immunobiology of dendritic cells. *Ann. Rev. Immunol.* 18: 767~811, 2000
 - 11) LANZAVECCHIA, A. & F. SALLUSTO: Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* 106: 263~266, 2001
 - 12) KRUTZIK, S. R.; B. TAN, H. LI, *et al.*: TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat. Med.* 11: 653~660, 2005
 - 13) SIELING, P. A.; D. JULLIEN, M. DAHLEM, *et al.*: CD1 expression by dendritic cells in human leprosy lesions: correlation with effective host immunity. *J. Immunol.* 162: 1851~1858, 1999
 - 14) BECKMAN, E. M.; A. MELIAN, S. M. BEHAR, *et al.*: CD1c restricts responses of mycobacteria-specific T cells. Evidence for antigen presentation by a second member of the human CD1 family. *J. Immunol.* 157: 2795~2803, 1996
 - 15) KIM, J.; A. SETTE, S. RODDA, *et al.*: Determinants of T cell reactivity to the *Mycobacterium leprae* GroES homologue. *J. Immunol.* 159: 335~343, 1997
 - 16) BEHAR, S. M.; S. A. PORCELLI, E. M. BECKMAN, *et al.*: A pathway of costimulation that prevents anergy in CD28- T cells: B7-independent costimulation of CD1-restricted T cells. *J. Exp. Med.* 182: 2007~2018, 1995
 - 17) KRUTZIK, S. R.; M. T. OCHOA, P. A. SIELING, *et al.*: Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat. Med.* 9: 525~532, 2003
 - 18) SIELING, P. A.; D. CHATTERJEE, S. A. PORCELLI, *et al.*: CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science* 269: 227~230, 1995
 - 19) LABORDE, E. A.; S. VANZULLI, M. BEIGIER-BOMPADRE, *et al.*: Immune complexes inhibit differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 179: 673~681, 2007
 - 20) LEE, D. J.; P. A. SIELING, M. T. OCHOA, *et al.*: LILRA2 activation inhibits dendritic cell differentiation and antigen presentation to T cells. *J. Immunol.* 179: 8128~8136, 2007
 - 21) BANCHEREAU, J. & R. M. STEINMAN: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245~252, 1998
 - 22) WENINK, M. H.; W. B. VAN DEN BERG, P. L. VAN RIEL, *et al.*: Fc gamma receptor mediated modulation of dendritic cells as a potential strategy in the battle against rheumatoid arthritis. *Neth. J. Med.* 64: 103~108, 2006
 - 23) NIMMERJAHN, F. & J. V. RAVETCH: Fc gamma receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 34~47, 2008
 - 24) SALLUSTO, F. & A. LANZAVECCHIA: Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating fac-

- tor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 179: 1109~1118, 1994
- 25) BELL, A. L.; M. K. MAGILL, W. R. MCKANE, *et al.*: Measurement of colony stimulating factors in synovial fluid: potential clinical value. *Rheumatol. Int.* 14: 177~182, 1995
- 26) ABDELAAL, M. A.; I. A. HASHIM, T. H. ZAWAWI, *et al.*: Circadian rhythm of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in normal subjects and neutropenic hospitalised patients. *Ir. J. Med. Sci.* 169: 55~57, 2000
- 27) BANKI, Z.; L. KACANI, B. MULLAUER, *et al.*: Cross-linking of CD32 induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells *via* NF-kappa B signaling pathway. *J. Immunol.* 170: 3963~3970, 2003
- 28) SU, K.; H. YANG, X. LI, *et al.*: Expression profile of FcgammaRIIb on leukocytes and its dysregulation in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 178: 3272~3280, 2007
- 29) RADSTAKE, T. R.; B. FRANKE, M. H. WENINK, *et al.*: The functional variant of the inhibitory Fcgamma receptor IIb (CD32B) is associated with the rate of radiologic joint damage and dendritic cell function in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 54: 3828~3837, 2006