

化学療法の領域 私達の研究：ケモカインによるCTLメモリー誘導・維持の場の形成制御

東京大学大学院医学系研究科分子予防医学 松島綱治、倉知慎、上羽悟史、米山博之

ケモカインは様々な白血球サブセットに対して細胞走化性作用を示すポリペプチド性生理活性物質の総称であり、サイトカインファミリーに属する。ケモカインのプロトタイプ好中球遊走因子、インターロイキン8 (IL 8, CXCL8)と単球走化性・活性化因子 MCAF/MCP-1(CCL2)は、1987から1989年に米国国立がん研究所 National Cancer Institute (NCI), NIH (Frederick, MD, USA)において著者 (KM)ならびに吉村貞三らにより精製、遺伝子クローニングにされた^{1,2}。現在では40に及ぶ大きなファミリーを形成する³。ケモカインは当初、好中球、マクロファージ、好酸球などの炎症反応に関与する細胞の組織浸潤を制御すると予想されたが、今は獲得免疫応答に関わる樹状細胞(dendritic cells, DCs)やT/Bリンパ球サブセット移動・組織浸潤も制御するのみならず、生理的条件下における免疫組織形成に必須の分子群であることも明らかになってきている。ケモカインを抜きにしてもはや、免疫応答のダイナミックな時・空間制御を語るができなくなっている。本稿では、私達のこの間のケモカインによる免疫制御に関する主な仕事を概括する。

1) 抗ウイルス性CTL誘導の場の形成とケモカイン

ウイルス感染制御において細胞傷害性T細胞、cytotoxic T Lymphocytes (CTL)は中心的な役割を有する。私達は、マウスのI型ヘルペスウイルス (herpes simplex virus: HSV-1) 皮膚感染モデルにおいて、血中に新たに動員される2種類のDC前駆体がリンパ節に遊走するまでの生体内動態を解析した。Myeloid (m)DC前駆体は末梢炎症局所にケモカインMIP-1 α /CCL3とその受容体CCR1/5を介して遊走し、SLC/CCL21-CCR7 axisを通して輸入リンパ管経由で所属リンパ節に集積する。一方、plasmacytoid (p)DC前駆体は炎症時の全身リンパ節へ直接、高内皮細静脈 (high endothelial venules ; HEV) 経由でMig/CXCL9-CXCR3 axisを介して遊走することが判った⁴。さらに、炎症局所で産生され血中に放出されるTNF- α が、両DC前駆体を骨髄から血中に誘導する (MIP-1 α /CCL3を介した反応)のみならず、全身リンパ節HEVのCXCL9の発現を誘導することによりpDC前駆体のリンパ節への血行性移動を促すという、局所性と全身性の炎症がリンクしている生体防御の巧みなメカニズムが判明した。

免疫組織学的に感染リンパ節での mDCs と pDCs の分布を検討した。両 DC とも感染 2 日目のリンパ節 T 細胞領域で有意に増加しており、かつ、mDCs と pDCs とが極めてよく接触している像を認めた。リンパ節より分離した mDCs と pDCs を用いて in vitro でクラスター形成試験をセットアップし解析したところ、mDC と pDC のクラスターは、HSV 感染時に有為に増加し、かつ、ケモカイン IP-10/CXCL10、ならびに接着分子 LFA2/CD2 がこのクラスター形成に関与している事が明らかになった。したがって、mDCs と pDCs は、リンパ節遊走後早期に積極的な contact をしていることが示唆された。

mDCs は細菌感染のみならず、HSV 感染においても抗原特異的ヘルパー CD4 T 細胞 (Th1) を直接誘導するのに対し、CD8 α^+ DCs はウイルス抗原特異的 CTL のクロスプライミングに関わっている。一方、pDCs は抗ウイルス IFN- α を産生するが、抗原提示細胞 (APC) としての活性は低く、抗ウイルス細胞性免疫誘導における役割や生体内動態はほとんど分かっていなかった。CXCL9 と E セレクチンの共阻害、抗 Ly6G/C 抗体および抗 PDCA-1 抗体投与でリンパ節 DC 亜集団のうち pDCs のみを in vivo レベルで除去する事で、(1) 抗ウイルス CTL 樹立には、in vivo レベルでは pDCs の参画が必須である (2) リンパ節に遊走する pDCs は、ウイルス感染により APC 機能の低下した mDCs、CD8 α^+ DCs と CXCL10 ならびに CD2 を介して cell-contact をし、(3) この cell-contact がリンパ節内 DCs の APC 機能を回復させ、CTL 誘導能力も回復させる (4) このためには、pDCs 上の LFA2/CD2 と CD40L からの signal が重要であり、(5) pDCs はその前駆体が HEV を介して移動する際に、活性化 HEV との相互作用で LFA2/CD2 と CD40L の発現を増強する⁵。

私達の発表後、Ohteki らはマウスにおける細胞内寄生体 Listeria monocytogens に対する CpG 誘導免疫応答においてやはり conventional DCs (cDCs、リンパ節に存在する CD11c⁺ myeloid DCs の総称) と pDCs の相互作用が感染防御に働く IL 12 産生に必須であり、CpG 刺激を受けた cDCs から産生される IL 15 により CD40 が cDCs 表面に発現誘導され、CpG により活性化された pDCs 表面の CD40L により cDCs がフルに活性化され最終的に IL 12 を産生する機序を解明した⁶。また、最近のマウス DCs subset に関する研究ではマウスリンパ節には組織由来の CD11c⁺CD205⁺CD11b⁻CD8 α^- DCs ならびに CD11c⁺CD205⁺CD11b⁻CD8 α^+ DCs のみならず CD11c⁺CD205⁻CD11b⁺CD8 α^- CD4⁻ DCs と CD11c⁺CD205⁻CD11b⁺CD8 α^- CD4⁺ DCs などの多様な myeloid DCs subset と CD11c^{du11+}CD45RA⁺ (B220⁺Gr1⁺PDCA1⁺) plasmacytoid DCs が存在することが判っている⁷。様々な感染モデルでの CTL メモリー誘導におけるそれぞれの DCs subset の役割に関する仕事が発表されているが、W. R. Heath らによるとナイーブ T 細胞の CTL 誘導には CD11c⁺CD205⁺CD11b⁻CD8 α^- DCs ならびに CD11c⁺CD205⁺CD11b⁻CD8 α^+ DCs とも関与するが CD8 α^+ DCs による抗原提示は、組織由来の CD11c⁺CD205⁺CD11b⁻CD8 α^- DCs の

リンパ節での貪食を介する cross-priming によるとされる。一方、DCs のメモリー反応における抗原提示においては、 $CD11c^+CD205^+CD11b^-CD8\alpha^-$ DCs ではなく $CD11c^+CD205^+CD11b^-CD8\alpha^+$ DCs が主に関与する⁸。CTL 誘導における DC subset の役割は複雑で、それぞれの状況においても異なるようである。今後、DC subset 特異的 conditional knock out マウスを用いた詳細な検索が待たれる。

2) CTL メモリー維持とケモカイン：抗ウイルス性 CTL メモリー T 細胞の繰り返す感染における永続的維持機構に対する新しい概念の導入

抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞(memory CTL)は典型的な急性感染応答においてピーク時細胞数の一定数(5-10%程度)が残存し長期にわたって個体内で維持される。この「免疫記憶」は、免疫システムにおける最大の特徴のひとつであり、ワクチンに応用されて感染症との闘いにおいて人類福祉に最大級の貢献を果たしている。Memory CTL は、二次リンパ組織への遊走に大きく関与するホーミング分子 CD62L とケモカイン受容体 CCR7 によって、 $CD62L^{hi}CCR7^{hi}$ の central memory (TCM)と $CD62L^{lo}CCR7^{lo}$ の effector memory (TEM)に分類されることが多い。前者は再刺激時のサイトカイン即応産生性が乏しいが分裂能が高く、後者はその逆でサイトカイン即応産生性が高いが分裂能が低いことから、TCM が長期免疫記憶を二次リンパ組織内で担保し、TEM が末梢組織で即応免疫記憶を担うと位置づけられている。しかし実際には他の活性化・成熟化・遊走分子マーカーおよびサイトカイン産生性の組み合わせから見て memory CTL は非常に多様性に富んでおり、TCM/TEM のみで分類することは、いささか古典的で単純化しすぎていると思われる。

このように複数のサブセットが存在する memory CTL について、私達は「感染応答（抗原）経験回数」という新しい視点から解析を行った。個体生涯レベルでの抗原特異的 CTL の興亡（維持機構）を明らかにするために、CTL のプライマリー応答に着目し、マウス複次感染モデルにおいて同一抗原特異的 CD8T 細胞集団の消長を解析した。同一病原体(抗原)の感染を繰り返す個体環境において、感染のたびに新規誘導されるプライマリー応答が、抗原特異的 CTL 応答全体に量的(抗原特異的 CTL 数)にも質的(クローン多様性)にも大きな役割を果たしていることを明らかにした。なかでも意外であったのは、一番最初に樹立されたメモリー CTL 集団が必ずしも半永久的に免疫応答の多数を占めるわけではないという事実であった。(概念図参照) 後続のより若いメモリー CTL 集団(赤色)がいずれ古いメモリー CTL 集団(青色)を量的に凌駕することが明らかとなった。これはある特定の抗原に対する抗原特異的 CTL に限定しても、抗原特異的 CTL が priming の時期からして異なる様々な集団で構成されていることを示し、一

一般的には抗原特異的 CTL が樹立当初のクローンが永続的に expansion と contraction を繰り返すと受け止められてきた通説を覆すものであり、memory CTL の分類及び維持に新しい概念を導入することができた⁹。また最近、TCR Tg(OT-I)を用いた反復感染モデルを樹立し、若いmemory CTLが TCM 様の、古いmemory CTLが TEM 様の phenotype を示すことを確認している。このことは、CTL が分裂回数依存的に、homing 分子の発現を変化させ、個体内での局在を変えていることを示し、複次感染の結果個体レベルでは異なるmemory CTL サブセットが異なる組織分布をしていて、抗原特異的 CTL の反復応答は両者の総和として捉えることができる。

3) Foxp3⁺CD4⁺制御性 T 細胞の生体内動態とケモカイン

近年、Foxp3⁺CD4⁺制御性 T 細胞 (nTreg) が自己免疫、腫瘍免疫、感染症免疫における T 細胞応答制御に重要な役割を果たす事が明らかになってきた。nTreg による T 細胞応答制御には DCs および通常の T 細胞との細胞間接触が重要であることから、生体内における nTreg の局在、DC サブセットとの相互作用と、これを制御するケモカインシステムの詳細は、T 細胞応答制御の根幹をなすと考えられる。組織染色可能な抗マウス Foxp3 抗体を作成し、正常および担癌マウスにおける nTreg の局在、DC サブセットとのクラスター形成、ケモカインシステムによる動態制御について解析を進めた。

末梢組織由来抗原に対する T 細胞応答は主にリンパ節において誘導される。正常マウスリンパ節において、Foxp3⁺ nTreg は主に傍皮質領域 (T 細胞領域) に局在しており、また自己免疫寛容に重要な役割を果たす CD11b⁻CD8 α ⁺DCs または CD11b⁻CD8 α ⁻DCs と高頻度に接触する像を認めた。ケモカイン受容体欠損マウスおよび低分子アンタゴニストを用いた養子移入実験により、Foxp3⁺ nTreg の血行性リンパ節遊走には、傍皮質領域で生じる CCR7 依存的なルートと、髓質領域で生じる CXCR4 依存的なルートが存在する事を明らかにした。組織由来 DCs は CCR7 を介してリンパ行性にリンパ節傍皮質領域に遊走する事から、CCR7 が DC, nTreg および通常の T 細胞とのクラスター形成を制御し、T 細胞応答制御に重要な役割を果たしていることが示唆された¹⁰。髓質領域で生じる免疫応答の特性と nTreg の存在意義については、さらなる研究が必要である。

nTreg は担癌宿主における免疫抑制にも関与する事が報告されている。マウス腫瘍細胞株 3LL を用いた皮下腫瘍において、腫瘍接種 7 日目より nTreg がびまん性に腫瘍へ浸潤する像を認めた。さらに 14 日目には nTreg と CD11c 陽性細胞および通常の T 細胞がクラスターを形成する像を認め、腫瘍局所においても nTreg を介する免疫抑制の場が形成される事が示唆された。腫瘍浸潤 nTreg ではケモカイン受容体 CXCR3 が高発現しており、CXCR3 欠損マウスにおいて nTreg の

腫瘍浸潤が著明に抑制されることから、本モデルにおける nTreg の腫瘍浸潤には CXCR3 が中心的な役割を果たすこと判った。一方で CXCR3 欠損マウスでは明らかな抗腫瘍免疫の亢進を認めず、この原因として Foxp3⁺ CD4 T 細胞および CD8 T 細胞の腫瘍浸潤も同時に抑制されており、CXCR3 の阻害が腫瘍局所における T 細胞応答のバランスを抗腫瘍エフェクター細胞優位にするには至っていないことが示唆された。ヒト乳癌においては CCR4-CCL22 axis が Treg 特異的な腫瘍浸潤を媒介し、この相互作用を阻害することにより異種移植腫瘍モデルにおいて腫瘍増殖が抑制されることが報告されており¹¹、癌腫によってケモカインを標的とした nTreg 特異的な免疫抑制解除の可能性も示唆されている。

4) もう一つの免疫抑制性細胞、CD11b⁺Gr-1⁺ “Myeloid derived suppressor cells” の担癌宿主内動態とケモカイン

腫瘍が免疫系から逃れ成長する過程には、Treg 以外にも種々の抑制性免疫担当細胞が関与することが近年明らかになってきた。なかでも “Myeloid derived suppressor cells; MDSCs” は、T 細胞に対する強い抑制活性を示し、また腫瘍組織における血管新生および組織再構築にも関与する事が報告されており、治療標的としても注目されている細胞集団である¹²。マウスにおいては CD11b⁺Gr-1⁺ のヘテロな細胞集団として同定されてきたが、フローサイトメトリー、in vivo BrdU 取り込み試験および parabiosis (並体結合) により、マウス皮下腫瘍モデルで誘導される腫瘍浸潤 MDSCs は、主に骨髄由来炎症性マクロファージと好中球から構成される事を明らかにした。これらの細胞は末梢組織での増殖応答は示さず、またマクロファージのターンオーバーは好中球より速いものであった。ケモカイン受容体 CCR2 欠損マウスでは、腫瘍浸潤細胞の構成がマクロファージ優位から好中球優位へと変化し、その一因として腫瘍局所における CXCL2 および G-CSF の過剰産生が示唆された。CXCL2 は腫瘍内において主に好中球により産生されており、オートクラインな CXCL2 産生による好中球の腫瘍浸潤制御と、腫瘍浸潤マクロファージが何らかの機序によりこれを抑制するという、細胞集団間の相互作用が示唆された。また CCR2 欠損マウスでは腫瘍局所において血管新生の抑制を伴わない壊死領域の拡大を認める一方、エフェクター T 細胞の誘導増強および腫瘍増殖の抑制を認めなかった。ケモカインを標的とした MDSCs の動態制御という新規な治療戦略の開発には、MDSCs が生体内において腫瘍病態進行に果たす役割について、今後さらなる検討が必要である¹³。

参考文献

1. Yoshimura T, et al: Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 9233-9237, 1987
2. Matsushima K, et al: Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med* 167: 1883-1893, 1988
3. Viola A, et al: Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 48: 171-197, 2008;
4. Yoneyama H, et al: Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules. *Int Immunol.* 16: 915-928, 2004
5. Yoneyama H, et al: Plasmacytoid DCs help lymph node DCs to induce anti-HSV CTLs. *J Exp Med.* 202: 425-435, 2005
6. Kuwajima S, et al: Interleukin 15-dependent crosstalk between conventional and plasmacytoid dendritic cells is essential for CpG-induced immune activation. *Nat Immunol.* 7: 740-746, 2006
7. Randolph GJ, et al: Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annu Rev Immunol.* 26: 293-316, 2008
8. Belz GT, et al: Minimal activation of memory CD8⁺ T cell by tissue-derived dendritic cells favors the stimulation of naive CD8⁺ T cells. *Nat Immunol.* 8: 1060-1066, 2007
9. Kurachi M, et al. Maintenance of memory CD8⁺ T cell diversity and proliferative potential by a primary response upon re-challenge. *Int Immunol.* 19: 105-115, 2006
10. Ueha S, et al: CCR7 mediates the migration of Foxp3⁺ regulatory T cells to the paracortical areas of peripheral lymph nodes through high endothelial venules. *J Leukoc Biol.* 82: 1230-1238, 2007
11. Curiel TJ, et al: Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 10: 942-949, 2004
12. Marx J. Cancer immunology. Cancer's bulwark against immune attack: MDS cells. *Science* 319: 154-156, 2008
13. Sawanobori Y, et al: Chemokine-mediated rapid turnover of myeloid-derived

suppressor cells in tumor-bearing mice. *Blood*. 111: 5457-5466, 2008

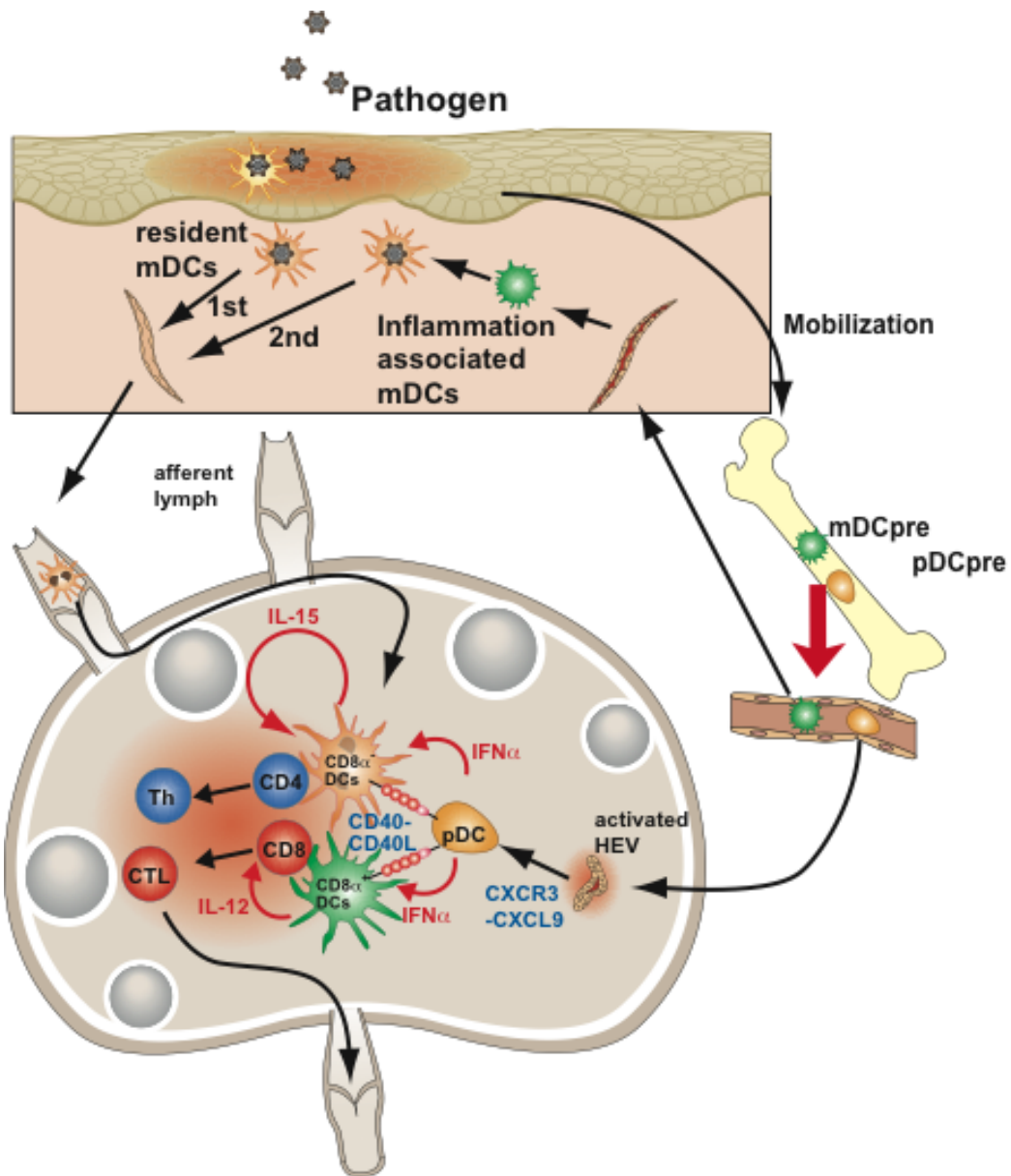


図1：ケモカインによってリンパ節にHEVを通してリクルートされ、T細胞領域に配置されたpDCsは、抗原提示細胞であるDCサブセット (CD8 α ⁺, CD8 α ⁻ DCs) を活性化し、DCとT細胞のネットワーク形成を手助けすることで、抗ウイルスCTL樹立に決定的な役割を演じる。

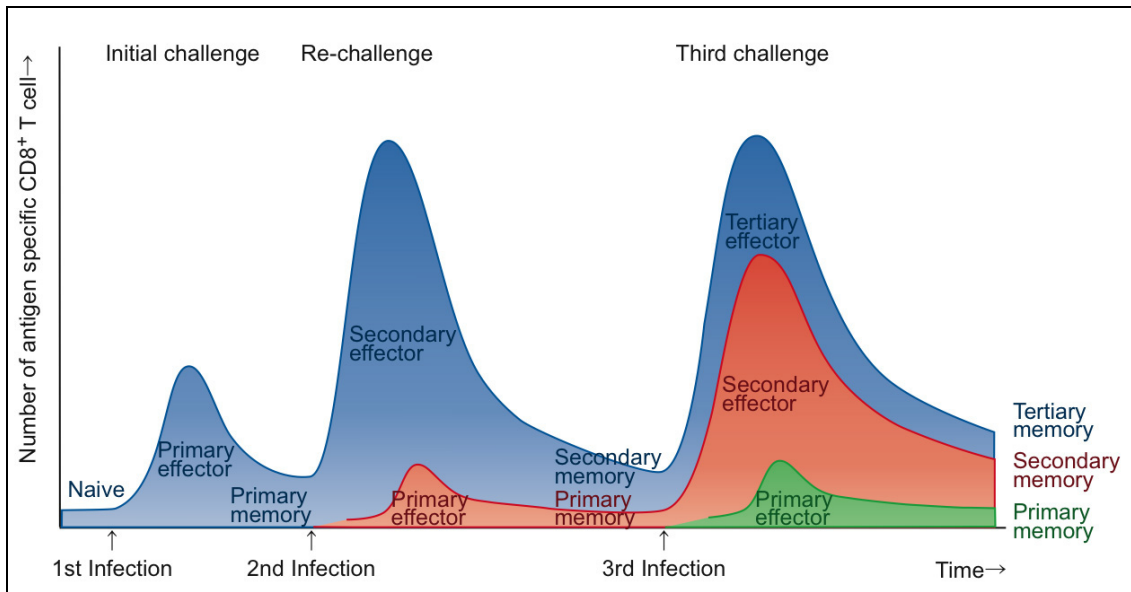


図2：反復感染応答におけるmemory CTL集団の維持機構。一次応答で形成された一次memory CTLは、二次感染時に応答の主体をなす。二次感染時には同時に一次応答により一次memory CTLが形成され、二次感染終了後個体内には二次memory CTLと一次memory CTLが共存している。さらなる感染応答(三次感染)では、直前に形成されたmemory CTLが応答の主体を形成する。memory CTL集団は感染応答ごとに新しいクローンが参画して「若返り」し、細胞集団全体(個体レベル)で分裂応答能が維持される。

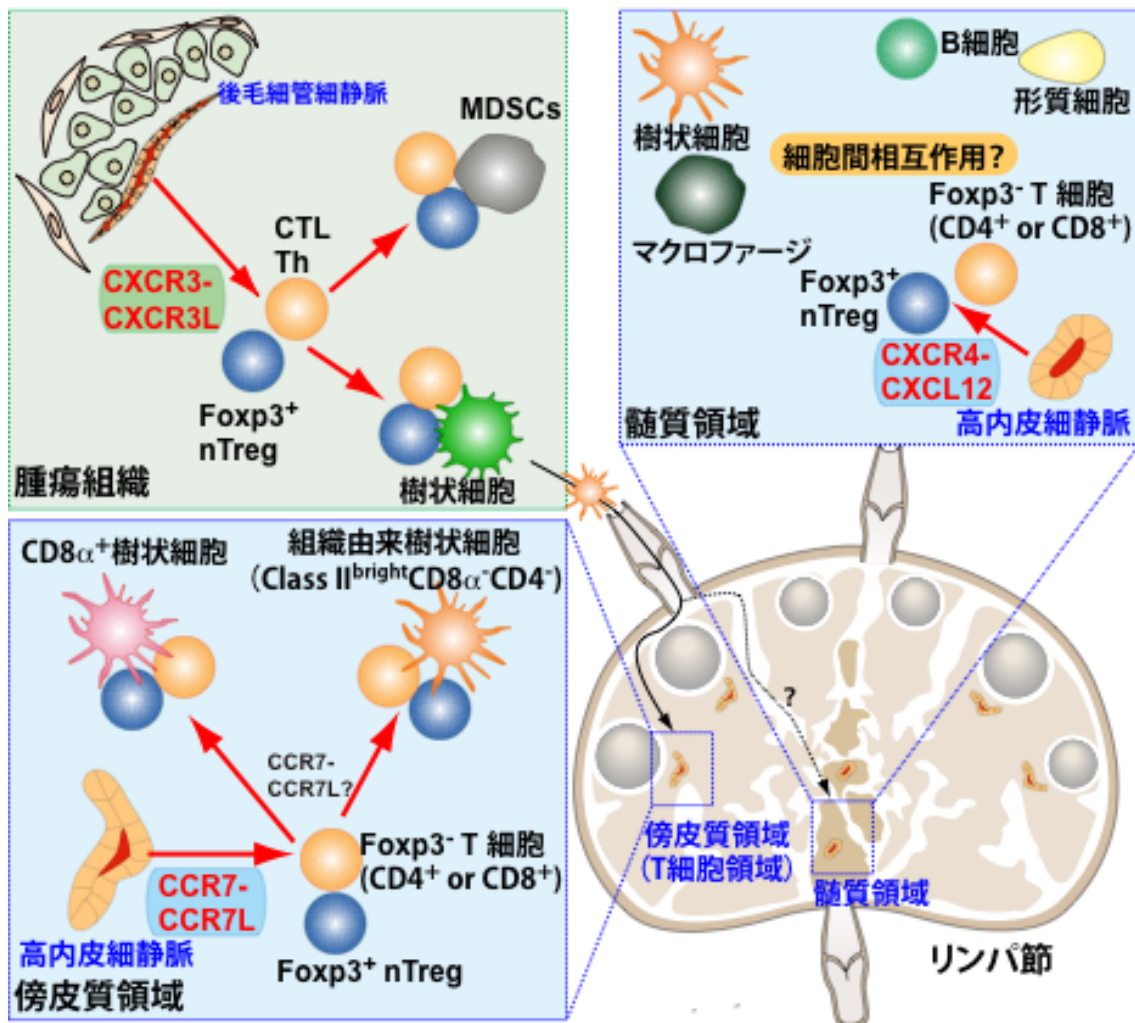


図3:ケモカインシステムによる組織・領域特異的Foxp3⁺nTregの組織浸潤制御。Foxp3⁺nTregは、傍皮質領域で生じるCCR7依存的なルートと髄質領域で生じるCXCR4依存的なルートを介してリンパ節の各領域に血行性に遊走し、それぞれの領域における免疫応答を調節すると考えられる。また腫瘍組織にはCXCR3依存的に浸潤し、CD11c⁺樹状細胞、MDSCs、通常のT細胞等とクラスターを形成する。

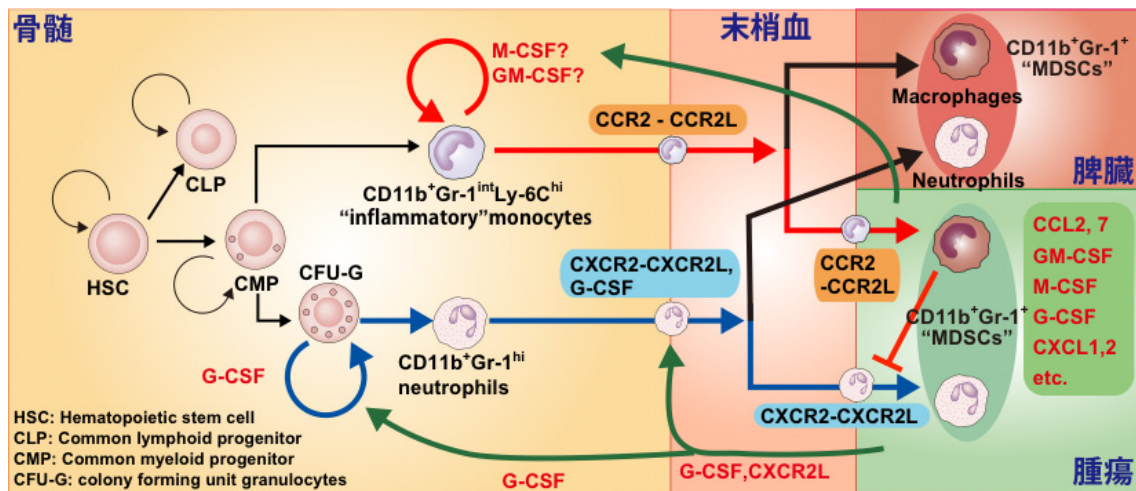


図4：担癌マウスにおける CD11b⁺Gr-1⁺ MDSCs の生体内動態とケモカインシステムによる制御。腫瘍組織浸潤 CD11b⁺Gr-1⁺ “MDSCs” は主に CD11b⁺Gr-1^{int}Ly-6C^{hi} “inflammatory” monocyte 由来 macrophages および neutrophils から構成される。これらの細胞の担癌宿主内動態は、腫瘍局所で産生される増殖因子およびケモカインにより、全身性のダイナミックな制御を受けている。また腫瘍局所では macrophages が neutrophils の浸潤を抑制するという、myeloid系細胞間の相互作用が働いている。