

# 新規白血病性形質細胞様樹状細胞株 (PMDC05) の 性状解析と樹状細胞分化の検討

渡部 紀宏

新潟大学大学院医歯学総合研究科生体機能調節医学専攻  
機能再建医学講座血液学分野  
(主任：相澤義房教授)

## Characterization of Novel Leukemic Plasmacytoid Dendritic Cell Line (PMDC05) and Analysis of Dendritic Cell Differentiation

Norihiro WATANABE

Division of Hematology,  
Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University  
(Director: Prof. Yoshifusa AIZAWA)

### 要 旨

【目的】 ヒト樹状細胞 (dendritic cells: DC) は、骨髄系樹状細胞 (myeloid DC: mDC) と形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid DC: pDC) の2つのサブセットに大別され、それぞれ、骨髄系またはリンパ系より発生すると考えられている。しかしながら、樹状細胞サブセットの由来についての詳細は明らかとされていない。本研究では、形質細胞様樹状細胞白血病芽球より樹立した細胞株である、PMDC05の特徴を明らかにするとともに、樹状細胞系統におけるpDCからmDCへの形質転換の可能性について検討した。

【方法】 本研究室で樹立したpDCとmDCの両方の性格を有するPMDC05について、細胞表面抗原、遺伝子発現、抗原提示能、サイトカイン産生能について検討し、PMDC05のpDC様分画、mDC様分画について比較するとともに、形質転換についても検討した。

【結果】 PMDC05はBDCA1とCD123の発現様式により、2つの分画に大別された。PMDC05のBDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画は、核の偏在、核周明底の形態を示しており、表面形質としてCD7/CD62Lを発現し、また、TLR7/TLR9/preTα/λ-like 14.1 mRNAを発現していることから、pDC様細胞であることがわかった。この細胞分画は、CpG-Aの刺激によりIFNαを産生した。さらに、BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>細胞は細胞増殖能、高い抗原提示能を有し、CD11b/CD11c/CD45RO陽性、TLR3/TLR8 mRNAを発現し、LPSの刺激によりIL-12p70を産生するBDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>細胞へと形質転換することが示された。

【結論】 本研究におけるデータは、形質細胞様樹状細胞白血病の白血病細胞におけるpDCからmDCへの樹状細胞系統内形質転換の可能性を示しており、これは、正常胸腺内樹状細胞でも

Reprint requests to: Norihiro WATANABE  
Division of Hematology  
Graduate School of Medical and Dental Sciences  
Niigata University  
1-757 Asahimachi-dori Chuo-ku,  
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通1-757  
新潟大学大学院医歯学総合研究科生体機能調節医学  
専攻機能再建医学講座血液学分野 渡部 紀宏

報告されているごとく、正常 DC の分化における pDC から mDC への移行を示唆していると考えられる。

キーワード：白血病性形質細胞様樹状細胞株，形質細胞様樹状細胞，骨髓系樹状細胞，形質転換

## 緒 言

樹状細胞 (dendritic cell: DC) は、抗原を取り込み、それをナイーブ T 細胞に提示することにより免疫反応を開始することから、プロフェッショナルな抗原提示細胞として機能するとされている。ヒト血液樹状細胞は、骨髓系樹状細胞 (myeloid DC: mDC) と形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid DC: pDC) の 2 つに大別される<sup>1)2)</sup>。これら 2 つの DC サブセットに共通の機能は、抗原を T 細胞に提示し、T 細胞を活性化することであるが、表面形質、抗原認識機構、サイトカイン産生様式には多くの差異がある。

mDC は lineage マーカー陰性、CD11b, CD11c, CD13, CD33 のような骨髓系マーカー陽性を示し、血液樹状細胞抗原 (blood dendritic cell antigen: BDCA)-1 陽性によって特徴付けられる<sup>3)4)</sup>。また、mDC は強力な抗原提示能を有し、ウイルス/微生物抗原を認識した際には、ナイーブ T 細胞をインターフェロン (interferon: IFN)- $\gamma$  産生 Th1 細胞へと分化させ、thymic stromal lymphopoietin (TSLP: IL-7 様サイトカイン) を認識した際には、インターロイキン (interleukin: IL)-4/IL-5/IL-13/腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor: TNF)- $\alpha$  産生 Th2 細胞へと分化させる<sup>5)-8)</sup>。一方、pDC は lineage 陰性、mDC に認められるような骨髓系マーカー陰性を示し、CD123 (IL-3 レセプター  $\alpha$  鎖) を高発現している<sup>3)4)</sup>。pDC はウイルス刺激により多量の IFN- $\alpha$  を産生し、これによって mDC の IL-12 産生を促し、結果としてナイーブ T 細胞を Th1 へと分化させる<sup>9)10)</sup>。また、in vitro における survival factor である IL-3 と CD40L の刺激では、IFN  $\alpha$  を産生せず、結果としてナイーブ T 細胞を Th2 へと分化させると考えられている<sup>9)</sup>。以上のように、それぞれの DC サブセットは、刺激の種類により異なる T 細胞誘

導を行ない適切な免疫反応を開始するという、機能における柔軟性を有していると考えられている。

ヒト樹状細胞は、他の血液細胞と同様に造血幹細胞 (hematopoietic stem cell: HSC) より発生する。HSC はまず common myeloid progenitor (CMP) と common lymphoid progenitor (CLP) に分化し、大きく骨髓系とリンパ系に分かれる<sup>11)12)</sup>。mDC は骨髓系マーカー陽性であり、骨髓系細胞である単球に顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor: GM-CSF), IL-4 を加えて培養することにより誘導可能であること<sup>13)</sup>、また、in vivo においても単球が mDC に分化するという報告もあることから<sup>14)</sup>、CMP より発生すると考えられている<sup>15)</sup>。一方、pDC はリンパ系の転写因子である pre-T-cell antigen  $\alpha$  (preT $\alpha$ ),  $\lambda$ -like 14.1, SpiB 等を発現していることから、CLP より発生すると考えられている<sup>16)17)</sup>。HSC における DNA 結合阻害因子 (inhibitor of DNA binding: Id) 2 または Id3 の過剰発現により、T 細胞や B 細胞への分化が阻害されるのと同様に、pDC への分化も阻害されるという報告からも、pDC がリンパ系由来であると考えられる<sup>18)</sup>。しかしながら、マウスモデル実験において pDC が CMP から誘導可能であること、また、Fms-like tyrosine kinase 3 ligand (Flt-3L) の刺激によって、HSC から直接 mDC と pDC が誘導できるという報告も散見されることから、DC サブセットの発生・分化については未だ解明されていない部分が多い<sup>19)-21)</sup>。

本研究室では、pDC leukemia 患者<sup>22)</sup>の白血病細胞より、白血病性形質細胞様樹状細胞株 (PMDC05) の樹立に成功した<sup>23)</sup>。本研究では、このユニークな細胞株である PMDC05 の性状を解析し、これまでの DC の発生・分化に関する知見とは異なる、pDC から mDC への樹状細胞系統

表 1 本研究で使用した蛍光標識モノクローナル抗体

蛍光標識	抗体	製造元
Fluorescein isothiocyanate: FITC	IgG1	BD
	HLA-ABC	BD
	BDC41	MB
	CD62L	BD
Phycoerythrin: PE	IgG1	BD
	CD1a	Im
	CD1d	Ph
	CD2	BD
	CD3	BD
	CD4	BD
	CD7	Im
	CD11a	Im
	CD11b	BD
	CD11c	BD
	CD13	BD
	CD14	BD
	CD16	BD
	CD19	BD
	CD20	BD
	CD33	BD
	CD40	Im
	CD45RA	Im
	CD45RO	Im
	CD54	BD
	CD56	BD
	CD58	BD
	CD80	BD
CD83	Im	
CD86	BD	
HLA-DR	BD	
BDC44	MB	
Cy-Chrome™	CD123	Ph

BD: BD Biosciences, San Jose, CA, USA.

MB: Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany.

Im: Immunotech, Marseille, France. Ph: BD Pharmingen, San Diego, CA, USA

内分化の可能性について報告する。

## 材料と方法

### 使用したサイトカイン, 試薬, 抗体

本研究で用いたサイトカイン, 試薬は以下に示す. 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor: GM-CSF) (キリンビール株式会社医薬カンパニー, 東京), インターロイキン 3 (inter-

leukin 3: IL-3) (キリンビール株式会社医薬カンパニー), リポポリサッカライド (lipopolysaccharide: LPS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), H1N1 インフルエンザウイルス (新潟大学大学院医歯学総合研究科国際感染医学講座公衆衛生学分野, 斎藤玲子講師より供与), CpG-A (ODN2216: Invivogen, San Diego, CA), CpG-B (ODN2006: 北海道システム・サイエンス株式会社, 札幌). また, フローサイトメトリー解析で使用した抗体については, 表 1 に示す.

表2 本研究で使用したPCRプライマー

product	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')	product size (bp)
TLR1	TTGGGCACCCCTACAAAAG	TTTAGGAACGTGGATGAGACC	210
TLR2	GTGCCATTGCTCTTTTAC	CATTGGATGTCAGCACCAGA	316
TLR3	TGGAAGAAAGGGACTTTGAGG	GCAAACAGAGTGCATGGTTC	237
TLR4	TTCTCAACCAAGAACCTGGAC	CAGGGCTAAACTCTGGATGG	198
TLR7	CATGCTCTGCTCTTTCAACC	TGGGGAGATGTCTGGTATGTG	302
TLR8	CTGCTGCAAGTTACGGAATG	CATATTTGCCACCGTTTG	234
TLR9	GAAGGGACCTCGAGTGTGAA	GTGCTGCCATGGAGAAGTG	334
preT $\alpha$	TGGATGCCTTACCTATGG	AGGTCAGGAGCAGGTCAAAC	294
$\lambda$ -like 14.1	TGCAAGTCAGGCCACAAG	GCCAAACACATGCGTCAC	336
SpiB	GGAGGAAGACTTACCGTTGGA	TGCTTGAGGAGAAGTGG	222
ILT7	CCGATGTTCACTTTCCTTCTG	GACTTCTTTTGTGCTGGATTGA	248
MX1	TTCCACCTGAAGAAGGGTTACA	TGATTTTCTAACAGGGGCAGAG	230
GAPDH	ATCATCCCTGCCTCTACTGG	TTCCTCTTGTGCTCTTGCTG	433

### メイ・ギムザ染色による形態観察

対象となる細胞のサイトスピン標本を作製したのち、May-Grünwald's eosin methylene blue solution modified と Giemsa's azur eosin methylene blue solution (Merck kGaA, Darmstadt, Germany) を用いて、プロトコールに従ってメイ・ギムザ染色を行なった。

### フローサイトメトリー解析とセルソーティング

フローサイトメトリー解析は、既報の方法<sup>24)</sup>で行なった。すなわち、対象細胞に $\gamma$ -blocking agentを加え4°C、10分間反応させ、蛍光標識モノクローナル抗体を加え、4°C、20分間反応後、PBSで細胞を洗浄し、FACSscanまたはFACSaria (BD Biosciences, San Jose, CA) を用いて解析した。データはCellQuest software (BD Biosciences) またはFACSdiva software (BD Biosciences) を用いて処理した。末梢血pDCとmDCのソーティングは、正常人ドナー末梢血よりLymphoprep (Axis-Shield Poc AS, Oslo, Norway) を用いた比重遠心法により単核球を分離し、FITC標識抗CD4抗体とPE標識抗BDCA4抗体、または、FITC標識抗BDCA1抗体とPE標識抗CD3/14/19/56抗体を用いて、それぞれpDC (CD4<sup>+</sup>BDCA4<sup>+</sup>) とmDC (BDCA1<sup>+</sup>CD3/14/19/56<sup>-</sup>) を、FACSariaを用いてソーティングした。回収された細胞の純度はすべて99%以上であ

った。

### mRNAの定量解析

mRNAの定量解析はポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction: PCR) により行なった。TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて対象細胞よりtotal RNAを抽出した後、TaKaRa RNA PCR<sup>TM</sup> Kit (AMV) Ver. 3.0 (TAKARA BIO INC, Shiga, Japan) を用いて逆転写反応を行ない、cDNAを合成した。合成されたcDNAを鋳型に、Fast SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用い、StepOne<sup>TM</sup> Real-Time PCR System (Applied Biosystems) により、リアルタイム定量PCRを行なった。使用したプライマーは、表2に示す。GAPDHを内因性コントロールとして用いた。比較定量には、比較Ct法を用いた。計算式は以下に示す。 $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$  ( $\Delta Ct = \text{ターゲット遺伝子 Ct} - \text{内在性コントロール Ct}$ ,  $\Delta\Delta Ct = \text{サンプル}\Delta Ct - \text{キャリアプレートサンプル}\Delta Ct$ )。

### PMDC05への各種刺激

PMDC05の刺激に用いたサイトカイン等の濃度を以下に示す。IL-3 (20 ng/mL), CpG-A/B (3  $\mu$ g/mL), インフルエンザウイルス (1%), GM-CSF (50 ng/mL), LPS (0.5  $\mu$ g/mL)。PMDC05の細胞濃度は $10^6$  cells/mLで刺激した。

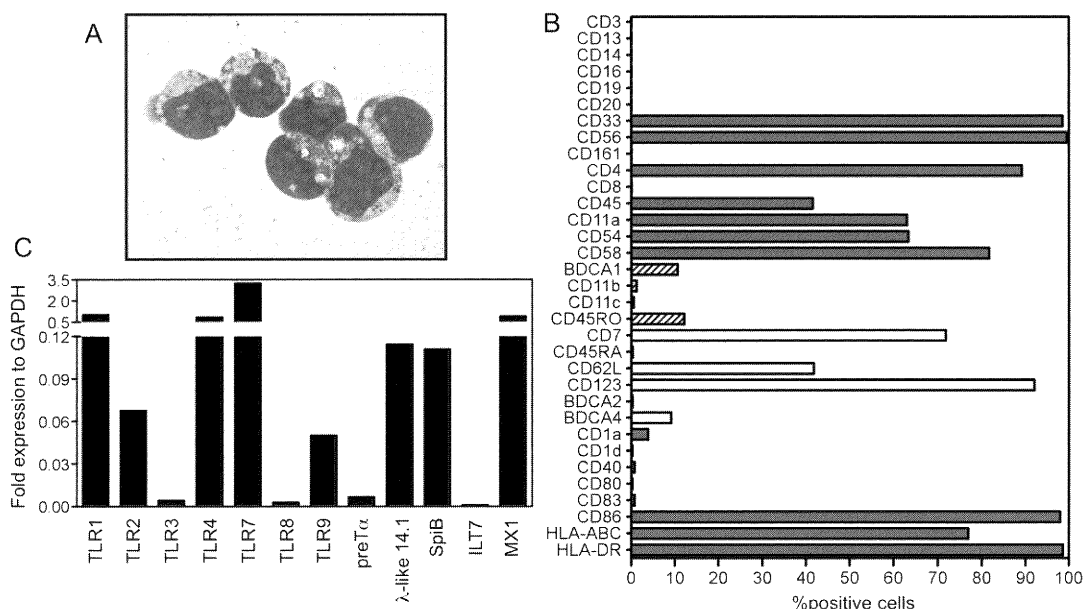


図1 白血病性形質細胞様樹状細胞株 PMDC05 の形態・表面形質・遺伝子発現

A. PMDC05 の形態を May-Giemsa 染色により観察した (× 1,000). B. PMDC05 の表面形質をフローサイトメトリーにより解析した. 図は陽性率を示す. C. PMDC05 の遺伝子発現をリアルタイム PCR によって解析した. 内因性コントロールとして GAPDH を用い, GAPDH に対する発現量を縦軸に示す.

### 抗原提示能の解析

PMDC05 の抗原提示能は, 既報<sup>25)</sup> の同種正常人ドナー単核球を反応細胞とした混合リンパ球培養 (mixed lymphocyte culture: MLC) を行なうことにより評価した. すなわち, 正常人ドナー末梢血より Lymphoprep を用いた比重遠心法により単核球を分離し, 96-well flat-bottom microplates (BD Labware, Franklin Lakes, NJ) に  $10^5$  cells/well となるように播種した. 各種条件下で培養した PMDC05 に  $\gamma$  線照射装置 (PS-3000SB Cs-137, ポニー工業株式会社, 大阪) を用いて 60 Gy の  $\gamma$  線照射を行なった後, 各 well に様々な濃度で加え, 共培養を開始した. 5日後, 各 well に  $^3\text{H}$ -thymidine (Amersham, Buckinghamshire, United Kingdom) を  $0.5 \mu\text{Ci}/\text{mL}$  添加し, 24 時間後, cell harvester (Brandel, Gaithersburg, MD) を用いて

細胞を回収し, responder の  $^3\text{H}$ -thymidine の取り込みを液体シンチレーションカウンター (Beckman, Fullerton, CA) で測定することにより, PMDC05 の抗原提示能を評価した. すべて 3 穴ずつで行なった.

### サイトカインの定量

PMDC05 の産生する  $\text{IFN}\alpha$ ,  $\text{IL-12p70}$  についてはそれぞれ Human Interferon Alpha ELISA kit (PBL Biomedical Laboratories, Piscataway, NJ), Human IL-12 (p70) ELISA kit (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) を用いた, 酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) によって, プロトコールに従って測定した.

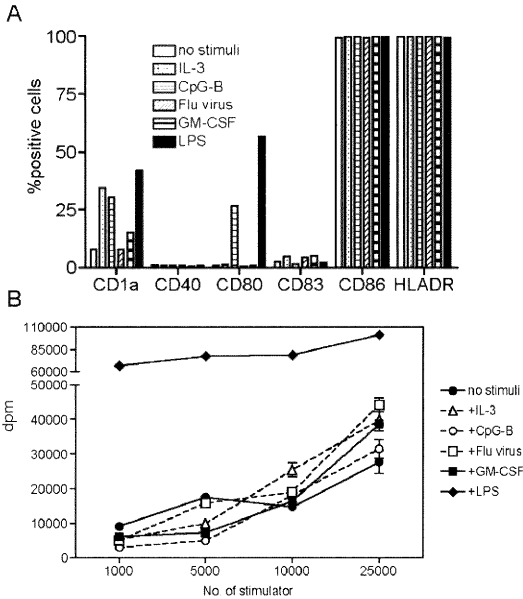


図2 PMDC05の抗原提示能解析

A. PMDC05をIL-3, CpG-B, Flu virus, GM-CSF, LPSで3日間刺激し, 抗原提示分子の発現率の変化を, フローサイトメトリーにより解析した. B. 刺激されたPMDC05の同種末梢血単核球に対する抗原提示能を, <sup>3</sup>H-thymidineを用いたMLCを行なうことによって評価した. すべて3穴ずつ行なった.

### 結果

#### PMDC05の表面形質, 遺伝子発現解析

PMDC05以外に形質細胞様樹状細胞株としての報告はこれまでに2報のみであり<sup>26)27)</sup>, 非常にまれな細胞株である. 今回PMDC05の形態と表面形質について詳しい解析を行なった. メイギムザ所見より, 多くの細胞が核の偏在, 核周明庭を示し, 典型的な形質細胞様形態を有していた(図1A). 表面形質は, lineage陰性, HLA-DR陽性, 正常pDCに認められるCD4, CD123, CD62L, CD7陽性を示した. また, 正常mDCの特徴であるBDCA1やCD45ROの発現も軽度認められた(図1B). 抗原提示に関わる分子としては, 抗原提

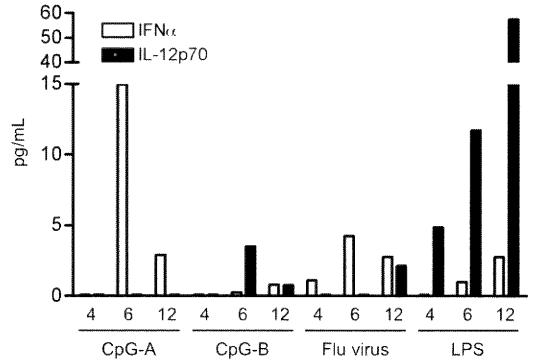


図3 PMDC05のIFNα, IL-12p70の産生能  
PMDC05をCpG-A, CpG-B, Flu virus, LPSで4-12時間刺激し, 上清中に産生されるIFNα, IL-12p70をELISA法によって測定した.

示分子であるCD86, 接着分子であるCD54, CD58が高発現を示した. 正常pDCの特徴として, ウイルスや微生物を認識するtoll様受容体(toll-like receptor: TLR)のうち, TLR7/9を高発現し<sup>28)29)</sup>, さらに, リンパ系転写産物を発現していることが挙げられる<sup>16)17)30)</sup>. そこで, PMDC05におけるこれらの遺伝子発現の有無を, リアルタイム定量PCRによって解析した. 図1Cに示すように, PMDC05はTLR7 mRNAを強く発現しており, また, リンパ系転写産物であるpre Tα, λ-like 14.1, SpiB, ILT7, MX1 mRNAの発現も確認された. さらに, mDCに優位に発現しているとされる<sup>29)</sup>, TLR3/8の発現も認められた.

#### PMDC05の機能解析

次に, PMDC05の機能解析を行なった. PMDC05は抗原提示分子や接着分子を発現していることより(図1B), PMDC05が抗原提示能を有する可能性が考えられ, 各種刺激がPMDC05の抗原提示分子に与える影響をフローサイトメトリーによって解析した. PMDC05をIL-3(正常pDCのin vitroにおけるsurvival factor)で刺激することにより, CD1aの発現が軽度ではあるが増強し, CpG-B(TLR9のリガンド)の刺激によ

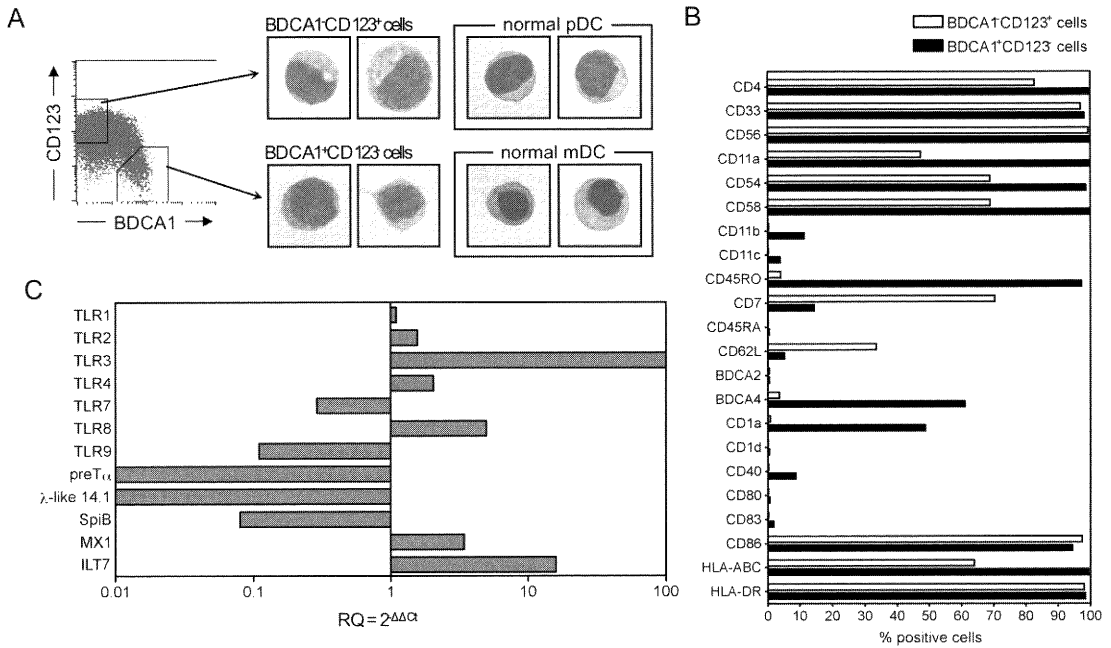


図4 PMDC05のBDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画とBDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画の形態・表面形質・遺伝子発現

A. PMDC05はBDCA1とCD123の発現に基づき、BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画とBDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画の2つの分画に分けられた。それぞれの分画をFACS Ariaを用いてソーティングし、May-Giemsa染色によって形態を観察した(x1,000)。また、それぞれの形態を、正常pDCまたはmDCと比較した。B. PMDC05をFITC標識抗BDCA1抗体、CyChr標識抗CD123抗体、PE標識各種モノクローナル抗体で染色し、フローサイトメトリーによりその発現を解析した。BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画(□)とBDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画(■)をゲートし、それぞれの分画の表面形質を解析した。図は陽性率を示す。C. PMDC05のBDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画とBDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画をFACS Ariaを用いてソーティングし、それぞれの分画の遺伝子発現量をリアルタイムPCRによって比較した。GAPDHを内在性コントロール、BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画をキャリブレーターサンプルとして用いた。定量値(RQ = 2<sup>-ΔΔCt</sup>)が1より大きいものは、BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画における発現量が多く、定量値が1より小さいものは、BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画における発現量が多いことを示す。

ってCD1a, CD80が中等度増強した。さらに、LPS (TLR4のリガンド)で刺激することによって、CD1a, CD80の強い発現増強が認められた(図2A)。インフルエンザウイルス(TLR7のリガンド)、GM-CSFの刺激では、抗原提示分子にほとんど変化は認められなかった。これらを刺激細胞とし、同種正常ヒト単核球とのMLCを行なったところ、PMDC05は、無刺激においても強い抗原提示能を示し、さらにそれは、IL-3、インフル

エンザウイルスの刺激によって増強し、特にLPS刺激によって顕著に増強した(図2B)。

正常pDCの最も特徴的な機能は、TLR7/9経由刺激時におけるIFN $\alpha$ の産生である。そこで、PMDC05がIFN $\alpha$ 産生能を有するかどうかを確認する為に、PMDC05をインフルエンザウイルス、CpG-A, CpG-B, LPSで刺激し、上清中に放出されるIFN $\alpha$ を、ELISA法を用いて検出した。同様に、表面形質、遺伝子発現の解析結果から、

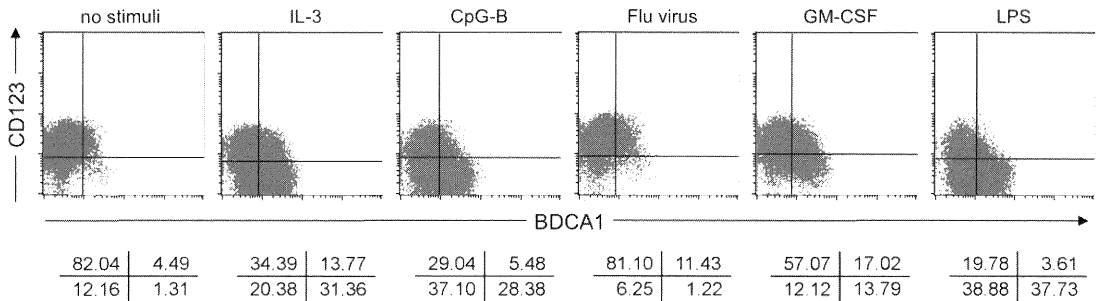


図5 各種刺激によるBDCA1, CD123発現様式の変化

PMDC05をIL-3, CpG-B, Flu virus, GM-CSF, LPSで3日間刺激した後, FITC標識抗BDCA1抗体, CyChr標識抗CD123抗体で染色し, その発現をフローサイトメトリーにより解析した. 下段の数字は, 各分画における細胞の割合を示す.

PMDC05はmDCの特徴も有すると考えられたので, 正常mDCの機能的特徴であるIL-12p70産生についても検討した. その産生量は少ないものの, CpG-A刺激によってIFN $\alpha$ が, LPS刺激によってIL-12p70の産生が確認された(図3).

#### BDCA1とCD123の発現様式に基づく2つの細胞集団

これまでの検討から, PMDC05はpDCとmDC両者の特徴を有することが確認された. そこで, PMDC05におけるCD123(pDCに特徴的な発現)とBDCA1(mDCに特徴的な発現)の発現様式を, マルチカラーフローサイトメトリーによって確認したところ, PMDC05は多くがBDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>を示す一方, 僅かながらBDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>を示す分画も含むことが確認された(図4A). 2つの細胞分画の形態の違いを確認する為, FACSriaを用いて各細胞集団をソーティングし, メイ・ギムザ染色を行なった. 図4Aより, BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>細胞は, 前述のような典型的な形質細胞様形態を示したのと比較すると, BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>細胞は核周明庭等の所見は認められず, 単球/mDC様の形態を示していることが確認された. さらに, 表面形質の違いをフローサイトメトリーにより解析した. lineageマーカー

については, 両分画ともにCD3, CD13, CD14, CD16, CD19, CD20が陰性, CD33, CD56が陽性を示し, 違いは認められなかった. BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画は正常pDCに認められるようなCD7, CD62Lの陽性率がBDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画よりも高く, 一方, CD11b, CD11c, CD45ROのような正常mDCに認められる分子の陽性率は, BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画で高いことが確認された(図4B).

正常pDCとmDCの違いは, 前述のようにTLRの発現様式にも見られる. そこで次に, BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画とBDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画におけるTLR mRNA等の発現量を, リアルタイム定量PCRによって比較した. TLR7, TLR9 mRNAの優位な発現がBDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画において認められ, 一方, TLR3, TLR4, TLR8 mRNAの優位な発現がBDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画において認められた(図4C). TLR3 mRNAはBDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画でのみ発現が認められた. pDCの特徴の一つとされるリンパ系転写産物の発現については, preT $\alpha$ ,  $\lambda$ -like 14.1, SpiB mRNAの優位な発現がBDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画において確認され, このうちpreT $\alpha$ ,  $\lambda$ -like 14.1 mRNAについては, BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画では発現が認められなかった. しかし, MX1, ILT7 mRNAの発現(どちら



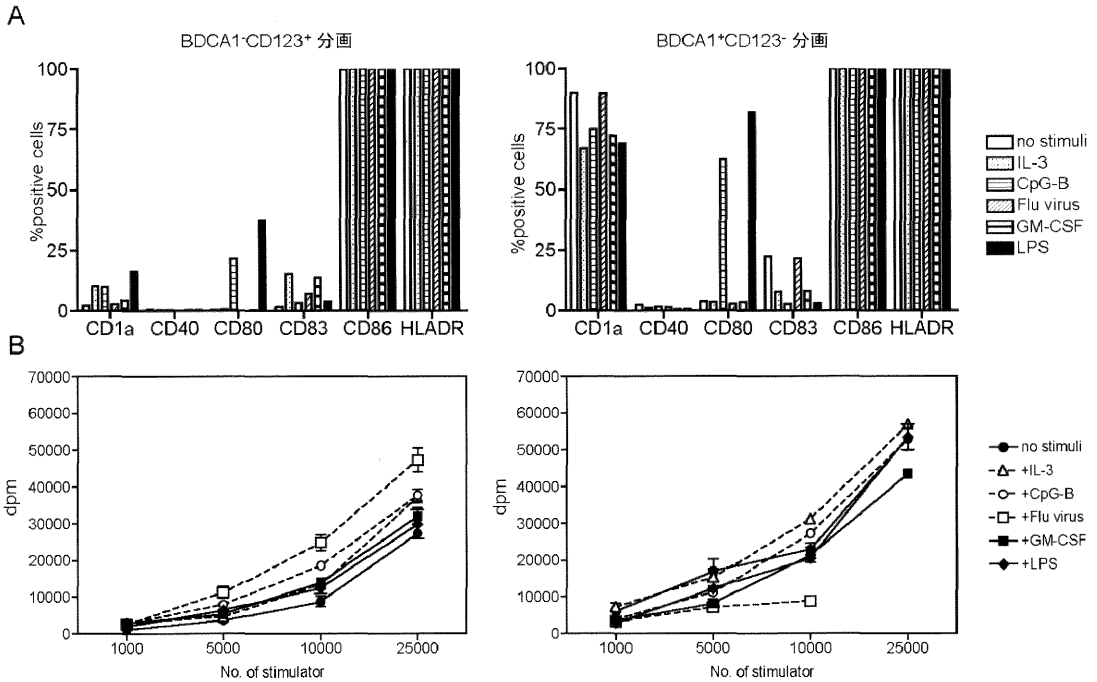


図6 BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画とBDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画の抗原提示能の比較

A. PMDC05 を IL-3, CpG-B, Flu virus, GM-CSF, LPS で3日間刺激した後, FITC 標識抗 BDCA1 抗体, CyChr 標識抗 CD123 抗体, PE 標識各種モノクローナル抗体で染色した後, フローサイトメトリーにより, BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画 (左図) と BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画 (右図) の抗原提示分子の発現を解析した. 図は陽性率を示す. B. PMDC05 を IL-3, CpG-B, Flu virus, GM-CSF, LPS で3日間刺激した後, FITC 標識抗 BDCA1 抗体, CyChr 標識抗 CD123 抗体で染色し, FACS Aria を用いて BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画と BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画をソーティングした. 回収した BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>細胞 (左図) と BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>細胞 (右図) を抗原提示細胞とし, 同種末梢血単核球に対する抗原提示能を <sup>3</sup>H-thymidine を用いた MLC を行なうことによって評価した. すべて3穴ずつ行なった.

も pDC に特徴的な発現) については, BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画において強く発現していた.

**BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画と BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画の抗原提示能**

次に, BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画と BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画の機能比較として, まず, 抗原提示能の検討を行なった. PMDC05 を IL-3, CpG-B, インフルエンザウイルス, GM-CSF, LPS で3日間刺激した後, 抗 BDCA1-FITC 抗体, 抗

CD123-CyChr 抗体と, 各種 PE 標識抗体を用いて染色することにより, BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画と BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画の抗原提示分子の発現を, フローサイトメトリーにより解析した. 各種刺激により, BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画の割合の減少と BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画の割合の増加が確認された (図5). 各種刺激後の BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画の抗原提示分子の発現は, BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画と比較すると, 陽性率, 蛍光強度ともに高く, 特に CD1a の発現についてその違いが顕著であった

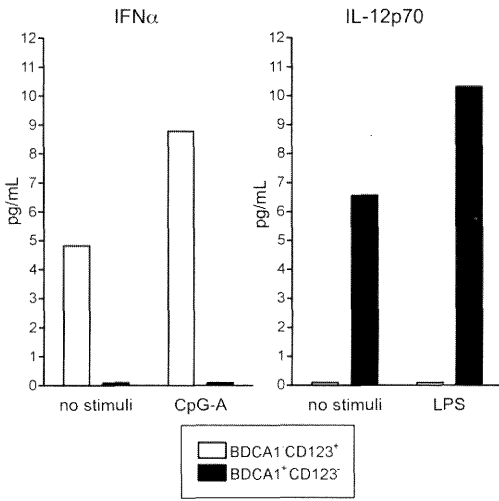


図7 BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画とBDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画のIFN $\alpha$ 、IL-12p70産生能の比較

PMDC05をIL-3で2日間刺激した後、FITC標識抗BDCA1抗体、CyChr標識抗CD123抗体で染色し、FACSARIAを用いてBDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画とBDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画をソーティングした。回収した各分画の細胞をCpG-A(18時間)、LPS(12時間)で刺激し、上清中に産生されるIFN $\alpha$ 、IL-12p70をELISA法によって解析した。

(図6A)。また、CpG-BまたはLPSの刺激によるCD80のupregulationが両分画において確認された。次に、各種刺激後のPMDC05より、FACSARIAを用いてBDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画とBDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画を分離し、両分画の抗原提示能をMLC assayによって比較検討した。BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画の抗原提示能は、BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画のそれと比較すると、強いことが確認されたが、BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画の細胞においては各種刺激による抗原提示能の増強は確認されなかった(図6B, 右図)。一方、BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画の抗原提示能は、BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画のそれよりも弱かったが、IL-3、CpG-B、インフルエンザウイルス等の正常pDCを刺激、活性化させる際に用いられる刺激によって増強した

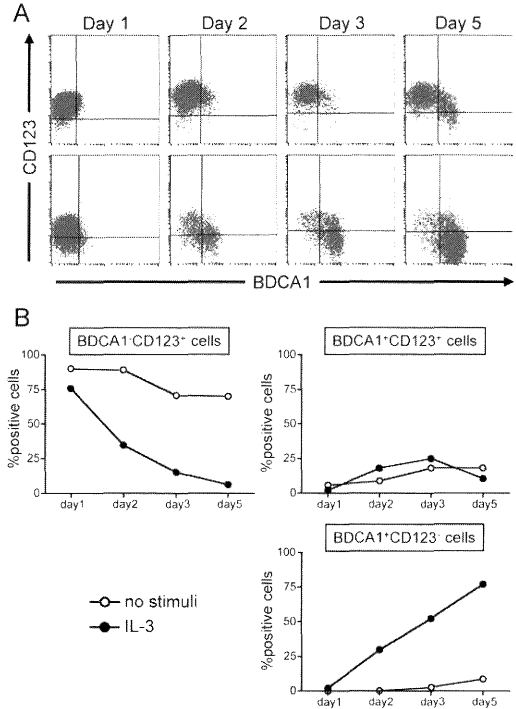


図8 BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画からBDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画への移行とIL-3刺激による移行の促進

PMDC05をFITC標識抗BDCA1抗体、CyChr標識抗CD123抗体で染色し、FACSARIAを用いてBDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画をソーティングした。回収した細胞を、IL-3の刺激の有無で5日間培養し、経時的にBDCA1とCD123の発現様式をフローサイトメトリーにより解析した。図は、BDCA1 $\times$ CD123ドットプロット(A)と、各分画の細胞の割合(B)を示す。

(図6B, 左図)。

**BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画とBDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画のサイトカイン産生能**

PMDC05はCpG-Aの刺激によりIFN $\alpha$ を、LPSの刺激によりIL-12p70を産生することが確認されたので(図3)、次に、各分画におけるサイトカイン産生能を検討した。まず、十分な細胞数

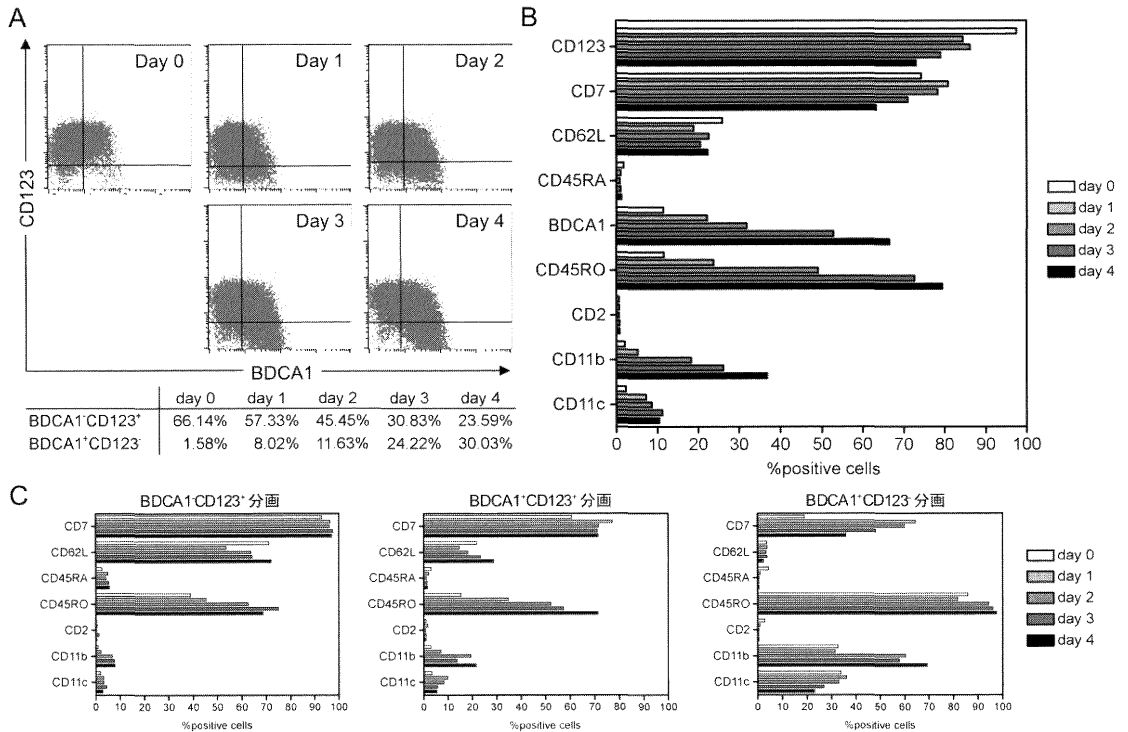


図9 IL-3刺激によるPMDC05のpDC様表面形質からmDC様表面形質への形質転換

PMDC05をIL-3で4日間培養し、経時的に表面形質の変化をフローサイトメトリーにより解析した。A. BDCA1 x CD123 ドットプロット。下段の数字は、BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画とBDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画の割合を示す。B. PMDC05における正常pDCに特徴的なマーカー (CD123, CD7, CD62L, CD45RA) または正常mDCに特徴的なマーカー (BDCA1, CD45RO, CD2, CD11b, CD11c) の発現率。図は陽性率を示す。C. BDCA1とCD123の発現に基づいたPMDC05の各分画における、表面形質の変化。図は陽性率を示す。

を得る為に、PMDC05を、正常pDCのIFN $\alpha$ 産生能に影響を与えないIL-3<sup>9)</sup>で2日間刺激し、その後、FITC標識抗BDCA1抗体、CyChr標識抗CD123抗体を用いて染色し、FACS Ariaを用いてBDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画とBDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画を分離した後、CpG-AまたはLPSで刺激した。BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画をCpG-Aで刺激するとIFN $\alpha$ 産生が、BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画をLPSで刺激するとIL-12p70が産生することが確認された(図7)。

### BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画からBDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画への形質転換

これまでの検討から、PMDC05は無刺激状態においてBDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画とBDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画の大きく2つの分画が存在することが示されており、また、刺激によってそれぞれの分画の割合に変化があることが示された(図5)。この割合の増減が、2つの異なる細胞集団の増殖能の違いであるのか、BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画からBDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画への形質転換であるのかを検討する為に、PMDC05のBDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>

分画と BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画を FACS Aria を用いて分離し、無刺激で培養した。経時的に抗 BDCA1-FITC 抗体、抗 CD123-CyChr 抗体を用いて染色し、フローサイトメトリーによって表面形質の変化を検討したところ、図 8 に示すように、BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画は増殖能を有しながらも、培養 5 日目には、BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画の存在が確認されたことから、BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画は BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画から形質転換を起こしたものであると考えられた。一方、分離した BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画は、その後増殖することなく、アポトーシスを起こした(データ非掲載)。さらに、無刺激状態で確認された形質転換は、IL-3 の刺激によって促進された(図 8)。

### IL-3 刺激 PMDC05 の形質転換に伴う表面形質の変化

次に、IL-3 刺激 PMDC05 における、pDC 様性質を有する BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画から、mDC 様性質を有する BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画への形質転換に伴う表面形質の経時変化を、フローサイトメトリーによって確認した。対象とした抗原は、pDC で陽性、mDC で陰性と報告されている CD123, CD45RA, CD62L, CD7 と、pDC で陰性、mDC で陽性と報告されている BDCA1, CD45RO, CD2, CD11b, CD11c である<sup>4)31)</sup>。まず、CD123 と BDCA1 の発現に着目して解析すると、刺激前の PMDC05 では、BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画、BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画の割合はそれぞれ 66.14%, 1.58% であったが、IL-3 によって刺激することで、BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画の割合が漸減し、対照的に BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画の割合は漸増し、4 日後には 30% にまで増加した(図 9A)。この変化に伴い、PMDC05 の CD123, CD7 の陽性率は減少し、BDCA1, CD11b, CD11c, CD45RO の陽性率が増加した(図 9B)。CD62L, CD45RA, CD2 の陽性率は変化が認められなかった。次に、CD123 と BDCA1 の発現様式によって分けられるそれぞれの分画について、同様の表面形質の変化を検討した。これまで述べてきた BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画、BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画に加えて、その中間体であ

ると考えられる BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>+</sup>分画についても解析した。図 9C に示すように、IL-3 刺激によって CD45RO 陽性細胞と CD11b 陽性細胞の割合が BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画中と BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>+</sup>分画中に増加した。BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画中においては、CD7 陽性細胞の減少と、CD11b 陽性細胞の増加が確認された。無刺激状態(day 0)で CD123 陽性分画中で陽性率の高い CD7 と CD62L, BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画中で陽性率の高い CD45RO と CD11c の陽性率については、IL-3 刺激で変化しなかった。

### 考 察

従来 CD4<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> hematodermic neoplasm (blastic NK lymphoma/leukemia) と呼ばれてきた疾患の中に、pDC の特徴を有する腫瘍細胞からなる白血病/リンパ腫が存在するということが、様々な研究者によって明らかとされ<sup>32)–34)</sup>、近年、WHO-EORTC 分類において、pDC leukemia という疾患概念が提唱された<sup>35)36)</sup>。これまでに、PMDC05 以外に CD4<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> hematodermic neoplasm または pDC leukemia より樹立された pDC 細胞株は 2 例のみである<sup>26)27)</sup>。末梢血ではその割合が少なく、詳細な解析が困難である pDC の性状解析や、上記疾患の病態解析にこれらの pDC 細胞株が有効に用いられている。

本研究室では、pDC leukemia 症例<sup>22)</sup>の白血病細胞から、pDC の性質を有する細胞株、PMDC05 を樹立することに成功した<sup>23)</sup>。正常 pDC または pDC leukemia 腫瘍細胞は、lineage<sup>-</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup>, CD123<sup>+</sup>の他に、特異的表面形質とされる BDCA2<sup>+</sup>, BDCA4<sup>+</sup>によって特徴付けられる<sup>26)</sup>。PMDC05 の表面形質は、lineage<sup>-</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD123<sup>+</sup>を示したが、CD45RA, BDCA2 は陰性、BDCA4 については一部陽性を示した。BDCA2 は正常 pDC を in vitro で培養することによって downregulation するという報告があり<sup>37)</sup>、また、BDCA4 は in vitro における培養によって、pDC 以外の細胞にも発現することが知られている<sup>37)</sup>、新鮮 pDC または新鮮

白血病細胞における有用なマーカーにはなり得るが、培養後においては、pDC 特異的マーカーとは言えないと考えられる。本研究室で経験した pDC leukemia 症例の新鮮白血病細胞は、BDCA2<sup>+</sup>、BDCA4<sup>+</sup>を示していた<sup>22)</sup>が、株化を目指して培養したことによって、BDCA2、BDCA4 抗原の発現に変化があったものと考えられる。一方、正常 pDC または pDC leukemia 症例に関して、CD45RA 抗原が陰性を示すという報告はなく、PMDC05 が CD45RA を発現しないことに関しては、後述する pDC 様細胞から mDC 様細胞への形質転換が関係すると考えられる。正常 pDC の特徴として挙げられる、TLR7/9 mRNA の発現、リンパ系転写因子の preT $\alpha$ ,  $\lambda$ -like 14.1, SpiB, ILT7, MX1 mRNA の発現は、PMDC05 においても確認され、それに加え、mDC の特徴とされる TLR3/8 mRNA の発現も認められた。PMDC05 の機能としては、DC 特有の強力な抗原提示能を有し、IL-3、インフルエンザウイルス、LPS の刺激によって抗原提示能は増強した。IL-3、インフルエンザウイルスは正常 pDC の刺激因子として知られ、また、LPS は mDC の刺激因子として知られている。PMDC05 はこれらの異なる刺激に対して反応することから、pDC、mDC 両者の特徴を併せ持つと考えられた。抗原提示能の他に DC の機能的特徴的としては、特定の刺激において特定のサイトカインを産生し、適切な免疫反応を惹起するという機能における柔軟性を有することである。特に、pDC は TLR7/9 経路刺激によって IFN $\alpha$  を、mDC は TLR4 経路刺激によって IL-12p70 を産生することが知られている。PMDC05 は、CpG-A 刺激によって IFN $\alpha$  を、LPS 刺激によって IL-12p70 を産生することが明らかとなった。以上より、PMDC05 はその表面形質、遺伝子発現、機能の面から、pDC と mDC の両者の性質を兼ね備えている細胞株であると考えられた。

一方、血液 DC サブセットである pDC、mDC は造血幹細胞から発生するが、その後の分化過程については、様々な報告があり、未だ明らかとはなっていない。Zuniga らはウイルス感染モデルマウスを用いた実験において、骨髄 pDC がウイルス

刺激によって mDC に形質転換し得ることを報告している<sup>38)</sup>。また、Schmitt らは、ヒト胸腺 pDC を IL-3 で刺激することで mDC に形質転換することを報告している<sup>39)</sup>。さらに、Flt-3L 処理を受けた正常人ヒト末梢血中の pDC において、CD5<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>を示す pDC サブセットが、pDC から mDC に形質転換する際の中間体であるという報告もあることから<sup>40)</sup>、pDC と mDC の発生・分化における関連性については、非常に興味深いものがある。

PMDC05 は、前述のように pDC と mDC の両方の性質を有する細胞株である。PMDC05 の中で、BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>の表面形質を示す分画は、形質細胞様の形態を示し、CD7<sup>+</sup>、CD62L<sup>+</sup>、CD11b<sup>-</sup>、CD11c<sup>-</sup>の pDC 様の表面形質を有していた。一方、BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画の形態は、単球/mDC 様形態を示し、CD11b<sup>+</sup>、CD11c<sup>+</sup>、CD45RO<sup>+</sup>の mDC 様の表面形質を有していた。また、これら2つの分画における TLR 遺伝子発現の比較検討より、BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画は TLR3<sup>-</sup>、TLR7/9 を優位に発現しており、BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画は TLR3/8 を優位に発現していた。さらに、BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画はリンパ系マーカーである preT $\alpha$ ,  $\lambda$ -like 14.1 mRNA を発現しておらず、SpiB の発現も弱かった。正常 pDC の遺伝子発現様式は TLR3<sup>-</sup>/TLR7<sup>++</sup>/TLR8<sup>-</sup>/TLR9<sup>++</sup>/preT $\alpha$ <sup>+</sup>/ $\lambda$ -like 14.1<sup>+</sup>/SpiB<sup>+</sup>で特徴づけられ、正常 mDC の遺伝子発現様式は TLR3<sup>+</sup>/TLR7<sup>-</sup>/TLR8<sup>+</sup>/preT $\alpha$ <sup>-</sup>/ $\lambda$ -like 14.1<sup>-</sup>/SpiB<sup>-</sup>で特徴づけられることから、BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画は pDC に、BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画は mDC に類似する性質を持つことが示された。しかし、pDC の特徴とされる MX1、ILT7 については、BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画において優位に発現していた。MX1 は、I 型 IFN によって誘導される因子であり、I 型 IFN の産生の指標とされている因子であるので、IFN $\alpha$  産生細胞である pDC のみならず、I 型 IFN によって他の細胞でも誘導されること<sup>41)</sup>、様々な腫瘍細胞株においても発現していることから、MX1 が BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画よりも BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画において優位に発

現していることが、BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画のpDC様性質、またはBDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画のmDC様性質を否定することにはならないと考えられる。また、ILT7の発現に関しては、確かにILT7はpDCで陽性、mDCで陰性を示すとされるが、pDCをIL-3で刺激することによって、その発現はdownregulationすることから<sup>31)</sup>、後述の形質転換と関係があるのかもしれない。さらに、PMDC05は白血病細胞株であることから、正常pDCとは異なる遺伝子発現様式を示す可能性も考えられる。

PMDC05における、これら2つの異なる表現系を持つ分画をさらに特徴付ける為に、その機能について検討した。BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画の抗原提示能は、IL-3、CpG-B、インフルエンザウイルスの刺激によって増強した。一方、BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画の抗原提示能はこれら刺激によって増強することはなかったが、無刺激時の抗原提示能は、BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画のそれよりも強力であった。また、pDCの特徴であるIFN $\alpha$ 産生能、mDCの特徴であるIL-12p70産生能を、これら2つの分画について検討したところ、BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画はCpG-Aの刺激によってIFN $\alpha$ 産生能の増強が、BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画はLPS刺激によってIL-12p70産生能の増強が認められたが、その産生量は軽度であった。BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画におけるIL-12p70産生、BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画におけるIFN $\alpha$ 産生は認められなかった。pDC leukemia症例の白血病細胞は、刺激によってIFN $\alpha$ を産生するとされているが、すべての症例において確認されるわけではなく、その産生量は正常pDCと比較するとごく微量であることから<sup>42)43)</sup>、PMDC05において考慮すべきは、その産生量ではなく、各分画が異なる刺激に対して異なるサイトカインを産生したことであると考えられる。以上、各分画の機能をまとめると、1) BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画は、IL-3、CpG-B、インフルエンザウイルス刺激で増強し得る抗原提示能を有し、CpG-A刺激によってIFN $\alpha$ を産生する。2) BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画は、無刺激で強力な抗原提示能を有し、LPS刺激によってIL-12p70を産生

する。したがって、機能の点からも、BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画はpDCに類似しており、BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画はmDCに類似していると考えられた。

これらの検討から、PMDC05の中には、BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>を示すpDC様細胞と、BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>を示すmDC様細胞が混在している(heterogeneousな状態)と考えられたが、染色体分析の結果から、PMDC05はモノクローナルであることが確認されている<sup>23)</sup>。また、それぞれの分画をsortingして培養することにより、BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画はBDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画より移行していることが確認され、これはすなわち、pDC様細胞がmDC様細胞に形質転換したことを示している。さらに、PMDC05において認められた形質転換には、pDCで陽性かつmDCで陰性を示すCD7、CD62Lのdownregulation、pDCで陰性かつmDCで陽性を示すCD45RO、CD11b、CD11cのupregulationを伴うことが確認された。以上のように、PMDC05はpDC様細胞からmDC様細胞への形質転換を起こしながら増殖する為、一般的に知られているpDCまたはpDC leukemia腫瘍細胞の性質とは若干異なり、CD45RAの陰性化(pDCで陽性、mDCで陰性)が認められたのかもしれない。また、形質転換は各種刺激によって誘発・促進されることから、無刺激状態においても何らかのサイトカイン等を分泌し、それがBDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画におけるILT7 mRNAの優位な発現を招いたのかもしれない。PMDC05を用いた以上の研究結果より、pDCからmDCへの分化の可能性が示唆された。

末梢血中や胸腺中の樹状細胞サブセットは、一般的に未熟樹状細胞と考えられており、抗原刺激によって成熟すると考えられている。胸腺未熟pDCはpreT $\alpha$ や $\lambda$ -like 14.1 mRNA等のリンパ系であることを示す転写因子を発現しているとされているが、成熟pDC、または活性化pDCにおいてはこれらの転写因子の発現が認められず、mDCに認められるCD11c分子が発現するとされている<sup>17)44)45)</sup>。したがって、本研究で確認された、BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画からBDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分

画への形質転換に伴う, preT $\alpha$ ,  $\lambda$ -like 14.1 mRNA の消失と CD11c の発現増強が, pDC 様細胞から mDC 様細胞への形質転換ではなく, immature pDC の成熟による変化であることを否定することは難しい。しかし, 胸腺, 血中, 脾臓, リンパ節中に存在する DC サブセットの表面形質や遺伝子発現が異なると考えられており<sup>16)17)44)46)</sup>, また, 先行研究においては詳細な機能解析が行われていないことに加え, 本研究で認められた, TLR 発現様式, 抗原提示能, サイトカイン産生能の差異を考慮すると, PMDC05 において認められた BDCA1<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>分画から BDCA1<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>分画への移行は, pDC 様細胞から mDC 様細胞への形質転換ととらえるのが妥当であると考えられる。

DC サブセットである mDC と pDC は, 抗原刺激の種類により T 細胞を異なる方向に分化させるという機能における柔軟性を有しており, これによって, 適切な免疫反応を惹起できる。本研究から, DC は機能における柔軟性だけではなく, 刺激により pDC が mDC に形質転換するような, 分化における柔軟性も併せ持つことによって, より最適な免疫反応を誘導している可能性が示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり, 本研究の御指導を賜りました新潟大学大学院医歯学総合研究科・相澤義房教授, 新潟大学大学院保健学研究科・高橋益廣教授, 成田美和子准教授に深謝申し上げます。

## 引用文献

- 1) O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, Swiggard WJ, Betjes M, Bhardwaj N and Steinman RM: Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 82: 487 - 493, 1994.
- 2) Robinson SP, Patterson S, English N, Davies D, Knight SC and Reid CD: Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur J Immunol* 29: 2769 - 2778, 1999.
- 3) Grabbe S, Kampgen E and Schuler G: Dendritic cells: multi - lineal and multi - functional. *Immunol Today* 21: 431 - 433, 2000.
- 4) MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J and Hart DN: Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 100: 4512 - 4520, 2002.
- 5) Pulendran B, Kumar P, Cutler CW, Mohamadzadeh M, Van Dyke T and Banchereau J: Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. *J Immunol* 167: 5067 - 5076, 2001.
- 6) de Jong EC, Vieira PL, Kalinski P, Schuitemaker JH, Tanaka Y, Wierenga EA, Yazdanbakhsh M and Kapsenberg ML: Microbial compounds selectively induce Th1 cell - promoting or Th2 cell - promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell - polarizing signals. *J Immunol* 168: 1704 - 1709, 2002.
- 7) Cella M, Salio M, Sakakibara Y, Langen H, Julkunen I and Lanzavecchia A: Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double - stranded RNA. *J Exp Med* 189: 821 - 829, 1999.
- 8) Reche PA, Soumelis V, Gorman DM, Clifford T, Liu M, Travis M, Zurawski SM, Johnston J, Liu YJ, Spits H, de Waal Malefyt R, Kastelein RA and Bazan JF: Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. *J Immunol* 167: 336 - 343, 2001.
- 9) Ito T, Amakawa R, Inaba M, Hori T, Ota M, Nakamura K, Takebayashi M, Miyaji M, Yoshimura T, Inaba K and Fukuhara S: Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs. *J Immunol* 172: 4253 - 4259, 2004.
- 10) Kadowaki N, Antonenko S, Lau JY and Liu YJ: Natural interferon alpha/beta - producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 192: 219 - 226, 2000.
- 11) Kondo M, Weissman IL and Akashi K: Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91: 661 - 672, 1997.

- 12) Akashi K, Traver D, Miyamoto T and Weissman IL: A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404: 193 - 197, 2000.
- 13) Morse MA, Zhou LJ, Tedder TF, Lyerly HK and Smith C: Generation of dendritic cells in vitro from peripheral blood mononuclear cells with granulocyte - macrophage - colony - stimulating factor, interleukin - 4, and tumor necrosis factor - alpha for use in cancer immunotherapy. *Ann Surg* 226: 6 - 16, 1997.
- 14) Randolph GJ, Inaba K, Robbiani DF, Steinman RM and Muller WA: Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* 11: 753 - 761, 1999.
- 15) Traver D, Akashi K, Manz M, Merad M, Miyamoto T, Engleman EG and Weissman IL: Development of CD8alpha - positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* 290: 2152 - 2154, 2000.
- 16) Res PC, Couwenberg F, Vyth - Dreese FA and Spits H: Expression of pTalpha mRNA in a committed dendritic cell precursor in the human thymus. *Blood* 94: 2647 - 2657, 1999.
- 17) Bendriss - Vermare N, Barthelemy C, Durand I, Bruand C, Dezutter - Dambuyant C, Moulian N, Berrih - Aknin S, Caux C, Trinchieri G and Briere F: Human thymus contains IFN - alpha - producing CD11c (-), myeloid CD11c (+), and mature interdigitating dendritic cells. *J Clin Invest* 107: 835 - 844, 2001.
- 18) Spits H, Couwenberg F, Bakker AQ, Weijer K and Uittenbogaart CH: Id2 and Id3 inhibit development of CD34 (+) stem cells into pre - dendritic cell (pre - DC) 2 but not into pre - DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre - DC2. *J Exp Med* 192: 1775 - 1784, 2000.
- 19) D'Amico A and Wu L: The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. *J Exp Med* 198: 293 - 303, 2003.
- 20) Ishikawa F, Niuro H, Iino T, Yoshida S, Saito N, Onohara S, Miyamoto T, Minagawa H, Fujii S, Shultz LD, Harada M and Akashi K: The developmental program of human dendritic cells is operated independently of conventional myeloid and lymphoid pathways. *Blood* 110: 3591 - 3660, 2007.
- 21) Karsunky H, Merad M, Cozzio A, Weissman IL and Manz MG: Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3 + lymphoid and myeloid - committed progenitors to Flt3 + dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 198: 305 - 313, 2003.
- 22) Narita M, Kuroha T, Watanabe N, Hashimoto S, Tsuchiyama J, Tochiki N, Saitoh A, Satoh N, Furukawa T, Toba K, Fuse I, Aizawa Y and Takahashi M: Plasmacytoid dendritic cell leukemia with potent antigen - presenting ability. *Acta Haematol* 120: 91 - 99, 2008.
- 23) Narita M, Watanabe N, Yamahira A, Hashimoto S, Tochiki N, Saitoh A, Kaji M, Nakamura T, Furukawa T, Toba K, Fuse I, Aizawa Y and Takahashi M: A leukemic plasmacytoid dendritic cell line, PMDC05, with the ability to secrete IFN - alpha by stimulation via Toll - like receptors and present antigens to naive T cells. *Leuk Res* 33: 1224 - 1232, 2009.
- 24) Watanabe N, Narita M, Yokoyama A, Sekiguchi A, Saito A, Tochiki N, Furukawa T, Toba K, Aizawa Y and Takahashi M: Type I IFN - mediated enhancement of anti - leukemic cytotoxicity of gammadelta T cells expanded from peripheral blood cells by stimulation with zoledronate. *Cytotherapy* 8: 118 - 129, 2006.
- 25) Tochiki N, Narita M, Zheng Z, Lu C, Saitoh A, Watanabe N, Satoh N, Furukawa T, Toba K, Fuse I, Aizawa Y and Takahashi M: Induction of recipient cell - specific donor T - cell anergy by UV - C - irradiated recipient immature monocyte - derived dendritic cells. *Bone Marrow Transplant* 41: 1037 - 1045, 2008.
- 26) Chaperot L, Blum A, Manches O, Lui G, Angel J, Molens JP and Plumas J: Virus or TLR agonists induce TRAIL - mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 176: 248 - 255, 2006.



- 27) Maeda T, Murata K, Fukushima T, Sugahara K, Tsuruda K, Anami M, Onimaru Y, Tsukasaki K, Tomonaga M, Moriuchi R, Hasegawa H, Yamada Y and Kamihira S: A novel plasmacytoid dendritic cell line, CAL-1, established from a patient with blastic natural killer cell lymphoma. *Int J Hematol* 81: 148 - 154, 2005.
- 28) Jarrossay D, Napolitani G, Colonna M, Sallusto F and Lanzavecchia A: Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 31: 3388 - 3393, 2001.
- 29) Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F and Liu YJ: Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 194: 863 - 869, 2001.
- 30) Cho M, Ishida K, Chen J, Ohkawa J, Chen W, Namiki S, Kotaki A, Arai N, Arai K and Kamogawa-Schifter Y: SAGE library screening reveals ILT7 as a specific plasmacytoid dendritic cell marker that regulates type I IFN production. *Int Immunol* 20: 155 - 164, 2008.
- 31) Risoan MC, Duhon T, Bridon JM, Bendriss-Vermare N, Peronne C, de Saint Vis B, Briere F and Bates EE: Subtractive hybridization reveals the expression of immunoglobulin-like transcript 7, Eph-B1, granzyme B, and 3 novel transcripts in human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 100: 3295 - 3303, 2002.
- 32) Chaperot L, Bendriss N, Manches O, Gressin R, Maynadie M, Trimoreau F, Orfeuvre H, Corront B, Feuillard J, Sotto JJ, Bensa JC, Briere F, Plumas J and Jacob MC: Identification of a leukemic counterpart of the plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 97: 3210 - 3217, 2001.
- 33) Feuillard J, Jacob MC, Valensi F, Maynadie M, Gressin R, Chaperot L, Arnoulet C, Brignole-Baudouin F, Drenou B, Duchayne E, Falkenrodt A, Garand R, Homolle E, Husson B, Kuhlein E, Le Calvez G, Sainty D, Sotto MF, Trimoreau F and Bene MC: Clinical and biologic features of CD4 (+) CD56 (+) malignancies. *Blood* 99: 1556 - 1563, 2002.
- 34) Petrella T, Comeau MR, Maynadie M, Couillault G, De Muret A, Maliszewski CR, Dalac S, Durlach A and Galibert L: 'Agranular CD4 + CD56 + hematodermic neoplasm' (blastic NK-cell lymphoma) originates from a population of CD56 + precursor cells related to plasmacytoid monocytes. *Am J Surg Pathol* 26: 852 - 862, 2002.
- 35) Slater DN: The new World Health Organization - European Organization for Research and Treatment of Cancer classification for cutaneous lymphomas: a practical marriage of two giants. *Br J Dermatol* 153: 874 - 880, 2005.
- 36) Willemze R, Jaffe ES, Burg G, Cerroni L, Berti E, Swerdlow SH, Ralfkiaer E, Chimenti S, Diaz-Perez JL, Duncan LM, Grange F, Harris NL, Kempf W, Kerl H, Kurrer M, Knobler R, Pimpinelli N, Sander C, Santucci M, Sterry W, Vermeer MH, Wechsler J, Whittaker S and Meijer CJ: WHO - EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood* 105: 3768 - 3785, 2005.
- 37) Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, Buck DW and Schmitz J: BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 165: 6037 - 6046, 2000.
- 38) Zuniga EI, McGavern DB, Pruneda-Paz JL, Teng C and Oldstone MB: Bone marrow plasmacytoid dendritic cells can differentiate into myeloid dendritic cells upon virus infection. *Nat Immunol* 5: 1227 - 1234, 2004.
- 39) Schmitt N, Cumont MC, Nugeyre MT, Hurtrel B, Barre-Sinoussi F, Scott-Algara D and Israel N: Ex vivo characterization of human thymic dendritic cell subsets. *Immunobiology* 212: 167 - 177, 2007.
- 40) Comeau MR, Van der Vuurst de Vries AR, Maliszewski CR and Galibert L: CD123bright plasmacytoid predendritic cells: progenitors undergoing cell fate conversion? *J Immunol* 169: 75 - 83, 2002.
- 41) Farkas L, Beiske K, Lund-Johansen F, Brandtzaeg P and Jahnsen FL: Plasmacytoid

- dendritic cells (natural interferon - alpha/beta - producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. *Am J Pathol* 159: 237 - 243, 2001.
- 42) Chaperot L, Perrot I, Jacob MC, Blanchard D, Salaun V, Deneys V, Lebecque S, Briere F, Bensa JC and Plumas J: Leukemic plasmacytoid dendritic cells share phenotypic and functional features with their normal counterparts. *Eur J Immunol* 34: 418 - 426, 2004.
- 43) Garnache - Ottou F, Chaperot L, Biichle S, Ferrand C, Remy - Martin JP, Deconinck E, de Taily PD, Bulabois B, Poulet J, Kuhlein E, Jacob MC, Salaun V, Arock M, Drenou B, Schillinger F, Seilles E, Tiberghien P, Bensa JC, Plumas J and Saas P: Expression of the myeloid - associated marker CD33 is not an exclusive factor for leukemic plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 105: 1256 - 1264, 2005.
- 44) Fohrer H, Audit IM, Sainz A, Schmitt C, Dezutter - Dambuyant C and Dalloul AH: Analysis of transcription factors in thymic and CD34 + progenitor - derived plasmacytoid and myeloid dendritic cells: evidence for distinct expression profiles. *Exp Hematol* 32: 104 - 112, 2004.
- 45) Briere F, Bendriss - Vermare N, Delale T, Burg S, Corbet C, Risoan MC, Chaperot L, Plumas J, Jacob MC, Trinchieri G and Bates EE: Origin and filiation of human plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol* 63: 1081 - 1093, 2002.
- 46) Shortman K and Naik SH: Steady - state and inflammatory dendritic - cell development. *Nat Rev Immunol* 7: 19 - 30, 2007.

(平成22年1月14日受付)

---