

Concanavalin A (Con A) 肝炎マウスにおける 肝樹状細胞の役割

富山（宮路）智香子

新潟大学大学院医歯学総合研究科
国際感染医学講座免疫・医動物学分野
(主任：安保 徹教授)

Role of Liver Dendritic Cells in Concanavalin A (Con A)-induced Hepatitis

Chikako TOMIYAMA - MIYAJI

*Division of Immunology and Medical Zoology,
Department of Infectious Disease Control and International Medicine,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Science
(Director: Prof. Toru ABO)*

要 旨

Concanavalin A (Con A) 投与により誘導される肝傷害は T 細胞依存性であることは古くから知られている。しかし、肝臓には自然免疫を担う NK 細胞や NKT 細胞が他の臓器に比べて最も多く存在し、特異な免疫応答の場であることも明らかとなってきた。Con A 肝炎モデルマウスにおいては、肝傷害のエフェクター細胞としての T 細胞、NKT 細胞、Kupffer 細胞、liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) や好中球の役割、およびその機能亢進が報告されている。しかし、肝樹状細胞 (DC) は肝移植におけるトレランス誘導に重要な役割を果たしていることが明らかとなり注目を浴びているが、Con A 肝炎での動態は不明である。

本研究では、正常マウスの肝臓より効率よく DC 分画を採取する方法を確立すると共に、自己免疫性あるいは劇症肝炎モデルとして使われる Con A 投与マウスの肝 DC の性状と機能について解析した。

その結果、正常の肝臓には I-A⁻CD11c^{low} の plasmacytoid (形質細胞様) DC が優位に存在し、その抗原提示能が低いことが明らかとなった。Con A 肝炎では肝 DC の総数が減少すると共に、I-A⁺CD11c^{high}CD205⁺ の myeloid 系 DC の割合が増加すること、I-A⁻CD11c^{low} DC 中の補助シグナル分子である CD80 と CD86 の発現低下を認めた。ケモカインの mRNA 発現については肝、および脾 DC で CCL17 が増強し、CpG 刺激によるサイトカイン産生能については、MCP-1 の増加、および IL-10 の低下が肝 DC に特徴的であった。これらの解析から、肝傷害における病態形成への肝 DC の役割の一端を明らかにできた。

Key words: Con A-induced hepatitis, Liver DC subsets, Cytokines, Chemokines

Reprint requests to: Chikako TOMIYAMA-MIYAJI
Division of Immunology and Medical Zoology
Department of Infectious Disease Control and
International Medicine Niigata University
Graduate School of Medical and Dental Science
1-757 Asahimachi-dori,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先: 〒951-8510 新潟市旭町通1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科国際感染医学講座
免疫・医動物学分野 富山智香子

緒 言

肝炎ウイルス、薬剤や自己免疫により引き起こされる肝傷害は広範な肝細胞壊死により肝不全をきたす極めて予後不良な疾患である。その病態形成については、T細胞が重要な役割を果たしていることが報告されているが、標的臓器である肝臓内の特異な免疫応答の過剰な亢進もこれら肝傷害に関わっていることが考えられている^{1)~3)}。肝臓は脾臓やリンパ節などの通常のリンパ臓器とは異なり、自然免疫を担うNK細胞やNKT細胞が最も多く存在し、IL-12や他の新規サイトカイン(LECT2)で活性化することにより、Fas ligand(Fas-L)分子やTNF α が発現し、肝細胞を傷害することがモデルマウスで明らかになるなど、特徴的な免疫応答を有する⁴⁾⁵⁾。また、NK細胞、NKT細胞及びT細胞を活性化するKupffer細胞、liver sinusoidal endothelial cells(LSEC)や好中球も病態形成に関与することも報告されている^{3)6)~8)}。肝炎モデルとしては、HBVトランスジェニックマウスへのHBs抗原特異的細胞傷害性T細胞移入、*Propionibacterium acnes*(*P. acnes*)の加熱死菌あるいはgalactosamineとlipopolysaccharide(LPS)の経静脈的投与、T細胞を刺激する植物レクチンConcanavalin A(Con A)の経静脈的投与が知られており、それぞれ肝傷害の機構は異なっている^{9)~12)}。中でも、Con A投与による肝炎は自己免疫性肝炎モデルあるいは劇症肝炎モデルとして知られ、活性化T細胞やNKT細胞の発現するFas-L分子やperforin産生誘導により肝傷害が起こされることが報告されている^{13)~15)}。

このような特異的な免疫応答を示す肝臓に存在する樹状細胞(dendritic cells: DC)は、ウイルス性肝炎でのT細胞活性化によるウイルス排除や肝移植でのトレランス誘導への役割が注目されてきた¹⁶⁾。さらに、近年のDCサブセットやその遊走機構の解明が進むにつれ、*P. acnes*投与による肝肉芽腫形成にDCの産生するサイトカインやケモカインが深くかかわっていることや、未熟な肝DCを移植前投与することにより同種移植片の生

着延長を誘導できるなどの肝DCの特異性が報告されている¹⁷⁾¹⁸⁾。しかし、このように外来抗原の排除に対するDCの動態についての報告は見られるが、Con A肝炎におけるDCの役割は不明な点が多い。

本研究では、正常マウスの肝臓より効率よくDC分画を採取する方法を確立すると共に、自己免疫性あるいは劇症肝炎モデルとして使われるCon A投与マウスの肝DCの性状と機能について解析した。その結果、正常の肝臓にはplasmacytoid(形質細胞様)DCが優位に存在すること、Con A肝炎では肝DCの総数が減少するがDCサブセットには変化が見られないことやケモカインの産生が脾DCとは異なることが明らかとなった。これらの解析から、Con A肝炎の病態形成における肝DCの役割の一端を明らかにできたと思われる。

材料と方法

1. マウス

8~14週令のC57BL/6(B6)マウス(日本チャールズリバー、横浜)を用いた。これらのマウスは新潟大学脳研究所・生命科学リソース研究センター動物資源開発支援研究部門においてspecific pathogen-free環境下で飼育・維持を行った。

2. Con A投与による肝炎の誘導

Con A(Sigma Chemical, St. Louis, MO)はPBSで溶解し、15mg/kgの量を尾静脈より投与した¹²⁾。投与3時間後にマウスをイソフルラン(アボットジャパン、大阪)による麻酔下で屠殺し、肝臓、脾臓および血液を採取したのち実験に用いた。肝障害の指標となる血清中のアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)は、POP・TOOS法による測定キット、トランスアミナーゼC II-テストワコー(和光純薬、大阪)を用いて測定した。

3. 樹状細胞の分離

イソフルラン麻酔下マウスから血液を採取した

後、門脈から 1500 IU/ml dispase II (合同酒精, 東京) 酵素液で灌流し, 肝臓と脾臓を摘出した. 肝臓は剪刀で細切し, dispase II 酵素液中で 37 °C, 15 分間振とう混和した. 5mM HEPES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) と 10 % 非働化ウシ胎仔血清を添加した Eagle's MEM 培養液 (日本製薬, 東京) で洗浄し, 酵素処理済の肝臓細切塊を 200 ゲージステンレスメッシュ上ですりつぶした. 得られた細胞浮遊液を洗浄後, 100 IU/ml のヘパリン (三菱ウェルファーマ, 大阪) を含む 15ml の 30 % percoll 液 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) に再浮遊させ, 室温で 2000rpm (420g), 15 分間遠心分離し単核球 (MNC) を分離した. 得られた MNC をさらに percoll 非連続密度勾配遠心法で 3000rpm (960g), 20 分間室温で遠心後, 低比重部分 (40 % と 50 %) を回収し, DC 分画を得た. 脾臓は, 肝臓と同様に酵素処理後細胞浮遊液を得, 0.2 % NaCl 溶液と 1.6 % NaCl 溶液による低張液処理で赤血球を除去し, percoll 非連続密度勾配遠心法を行い, DC 分画を得た.

いくつかの実験では, 肝および脾 DC 分画から biotin 標識抗 CD11c 抗体 (HL3) と Streptavidin Particles Plus (BD PharMingen, San Diego, CA) を用いた magnetic beads sorting 法で CD11c⁺細胞を採取した. また肝および脾 DC 分画を fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗 I-A^b (AF6-120.1) 抗体および phycoerythrin (PE) 標識抗 CD11c 抗体 (BD PharMingen) で染色し, FACS Vantage (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) を用いて, I-A⁺CD11c^{high} と I-A⁻CD11c^{low} 細胞を採取した.

4. フローサイトメトリーによる解析

肝及び脾 DC 分画の表面抗原の解析は, 定法に従って多重染色を行った¹⁹⁾. 本実験では, FITC 標識の抗 I-A^b, PE 標識の抗 CD11c (BD PharMingen), 及び biotin 標識の抗 CD205 (NLDC-145) (Cedarlane, Canada), 抗 mPDCA-1 (JF05-1C2.4.1) (Miltenyi Biotec GmbH, Germany), 抗 CD80 (16-10A1), 抗 CD86 (GL1), 抗 CD40 (3/23), 抗 CD45R/B220 (RA3-6B2), 抗 Gr-1

(RB6-8C5) 抗体 (BD PharMingen) を使用した. biotin 標識抗体は Streptavidin TRI-color (Caltag Laboratory, San Francisco, CA) を用いて発色させた. 細胞表面への抗体の非特異的結合を防ぐため, 抗 CD16/32 (2.4G2) (BD PharMingen) を用いた. 蛍光染色された細胞はフローサイトメトリー (FACScan), および CellQuest Pro ソフトウェア (Becton-Dickinson) で解析を行った. 死細胞を除外するために propidium iodide (Sigma Chemical) 染色あるいは, 前方散乱光と側方散乱光でのゲーティングを行った.

5. 樹状細胞の抗原提示能の測定

卵白アルブミン (OVA) 抗原に特異的に反応する CD4⁺T 細胞クローンである GG4 (東京大学医科学研究所より分与) を responder, 33Gy 放射線照射した肝, または脾 DC 分画を APC, OVA (Sigma Biochemical) を抗原として定法に従って培養を行った. 培養終了 18 時間前に ³H-thymidine (Amersham Biosciences) 0.5 μ Ci/well 添加し, 細胞を回収後 β 線シンチレーションカウンターにてその放射活性を測定した²⁰⁾.

6. 各種サイトカインの測定

正常および肝炎マウスの肝臓と脾臓より I-A⁺CD11c^{high}, I-A⁻CD11c^{low} 細胞, あるいは CD11c⁺細胞を分離し, 24 時間 CpG ODN (1 μ g/ml) 存在下と非存在下で培養を行い, 培養上清を回収した²¹⁾. 各実験群の培養上清中の IFN α の測定は ELISA kit (PBL Biomedical Laboratories, Piscataway, NJ) を, IL-10, MCP-1, IL-12 (p70), IFN γ , TNF α , IL-6 の測定は CBA assay kit (BD PharMingen) を用いた.

7. RT-PCR 法によるケモカイン, ケモカインレセプターおよび TLR の測定

RNA は正常および肝炎マウスの肝臓と脾臓の CD11c⁺細胞から RNeasy Mini Kits (QIAGEN GmbH, Germany) を用いて抽出した. 抽出した RNA は定法に従って cDNA に逆転写し, 各種 Primer を用いて RT-PCR 法にて増幅を行い,

mRNA発現を解析した²²⁾. PrimerはCCL3, CCL17, CCL22, CCL25, CXCL9, CXCL10, CCR1, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, CXCR3, CXCR4, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, G3PDHを用いた¹⁰⁾²³⁾⁻²⁵⁾.

8. 有意差検定

実験群間の有意差検定はStudent's *t*-test, あるいはone-factor ANOVA testを用い, $p < 0.05$ を有意差有りとした.

結 果

1. 正常マウスにおける肝DCの性状と機能

中性プロテアーゼである dispase 酵素処理と percoll 非連続密度勾配遠心法により分離したDC分画をフローサイトメトリーで解析した. 肝DC分画は脾DC分画に比べてI-A⁻CD11c^{low}細胞が優位を占め, 一方, 脾DC分画ではI-A⁺CD11c^{high}DCが優位であった(図1-A). 肝および脾DC分画におけるI-A⁻CD11c^{low}DCとI-A⁺CD11c^{high}DCの割合およびそれぞれの総数を図1-Bに示した. 肝におけるI-A⁻CD11c^{low}DCの割合は肝では 23.5 ± 4.2 (%), 脾では 6.0 ± 0.9 (%), I-A⁺CD11c^{high}DCについては肝で 7.2 ± 1.8 (%), 脾では 20.3 ± 4.0 (%)であった. 各臓器におけるI-A⁻CD11c^{low}DCの総数は肝 $7.1 \pm 1.8 \times 10^5$ 個, 脾 $10.4 \pm 2.1 \times 10^5$ 個であり, I-A⁺CD11c^{high}DCについては肝 $2.3 \pm 0.8 \times 10^5$ 個, 脾 $29.4 \pm 4.3 \times 10^5$ 個であり, 肝ではI-A⁻CD11c^{low}DCが, 脾ではI-A⁺CD11c^{high}DCが優位であることが明らかとなった. このDC分離法ではF4/80陽性のKupffer細胞の混入は見られなかった(未発表データ). また, 樹状細胞は抗原提示能を有することから, 各臓器のDC分画がOVA抗原を抗原特異的に反応するT細胞クローンに提示できるかを検討した. 脾DC分画は添加する細胞数に比例してT細胞クローンの増殖が見られ, 強い抗原提示能を示したが, 肝DC分画ではその抗原提示能はほとんど認められなかった(図1-C). DCはmyeloid系とplasma-

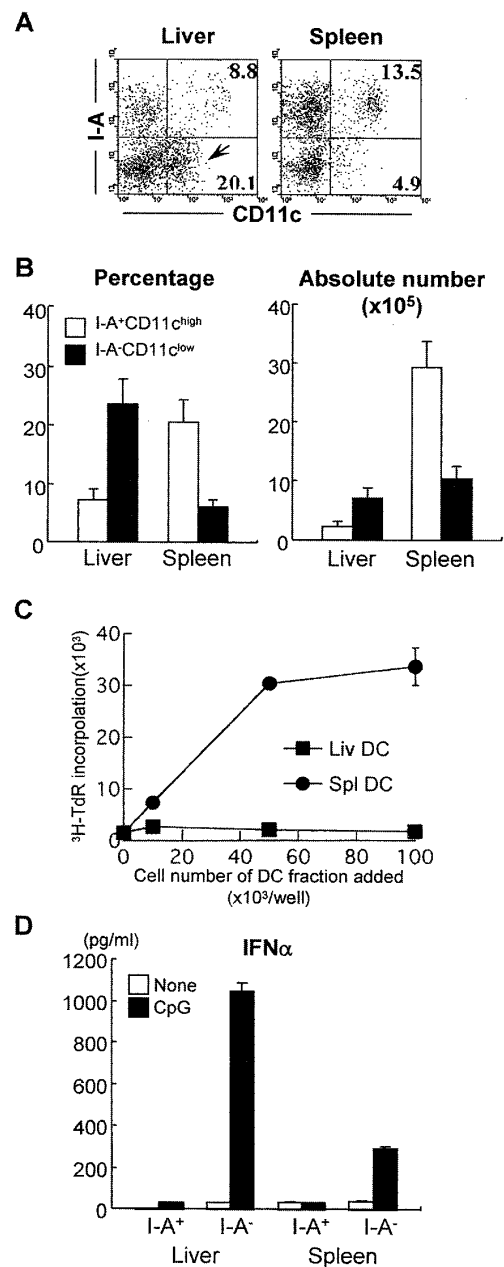


図1 正常マウス肝および脾DCの性状

(A) 肝および脾DCをI-AおよびCD11cで二重染色を行った. 図は代表的なものを示し, 図中の数値は各サブセットの比率を示す. (B) 各DCサブセット (□: I-A⁺CD11c^{high} および ■: I-A⁻CD11c^{low}) の割合と総数を示した ($n = 5$). (C) OVA特異的T細胞クローン増殖反応を用いて肝 (■) および脾 (●) DCの抗原提示能を, 添加するDC数を変化させ検討した ($10^4 \sim 10^5$ /well) ($n = 5$). (D) 各DCサブセット (2.5×10^5 /well) をCpG ODN ($1 \mu\text{g/ml}$) 存在下 (■), 非存在下 (□) において24時間培養を行い, その細胞上清中のIFN α 量を測定した ($n = 3$).

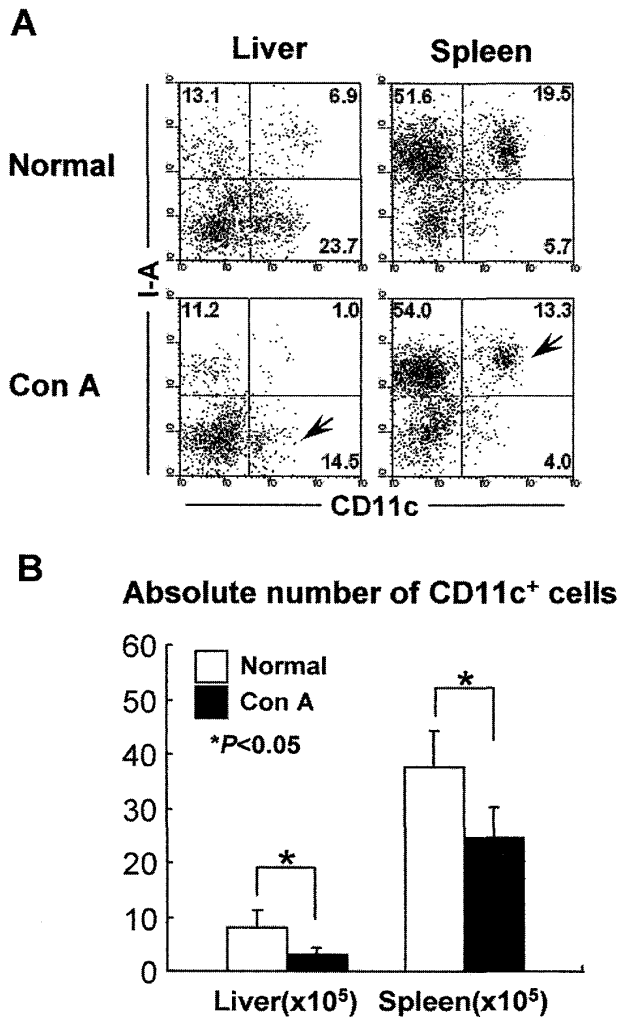


図2 on A 肝炎マウス肝および脾における DC の割合および総数変化

(A) 肝および脾 DC を I-A と CD11c で二重染色を行い、DC サブセットの変化を検討した。図中の数値は各サブセットの比率を示す。Con A 肝炎で肝の I-A⁺CD11c^{low}DC、および脾 I-A⁺CD11c^{high}DC の減少を認めた (矢印)。(B) 正常 (□) および Con A 肝炎 (■) マウス肝と脾 DC (CD11c⁺細胞) の総数変化を示した (n = 5)。Con A 肝炎で肝、脾 DC 共に減少を認めた (*P < 0.05)。

cytoid 系に大別されることが知られており、CD11c と MHC class II 分子 (I-A) の発現の強弱により分けられ、特に plasmacytoid DC は合成 DNA 刺激により IFN α を産生することが分かっている。そこで cell sorting により I-A⁺CD11c

high DC と I-A⁺CD11c^{low}DC を分離し、その IFN α 産生能を検討した。肝 I-A⁺CD11c^{low}DC は強い IFN α 産生を示し、一方、脾 I-A⁺CD11c^{low}DC も弱いながらもその産生が認められた (図 1-D)。

2. Con A 肝炎マウスにおける肝および脾 DC の動態

Con A 投与マウスでは肝障害が誘導され、血清中の ALT が上昇することが報告されている。予備的な検討から、ALT 値は投与後 3 時間から有意に上昇することが明らかとなった (0 時間 19.8IU/L → 3 時間後 62.5IU/L)。そこで投与 3 時間後の肝および脾 DC の動態をフローサイトメトリーで解析した。図 2-A に示すように、肝に多く見られる I-A⁺CD11c^{low}DC と脾の I-A⁺CD11c^{high}DC が減少することが示された。また、CD11c⁺DC の臓器あたりの総数も有意に減少していた (図 2-B)。そこで各臓器の I-A⁺CD11c^{high}DC と I-A⁺CD11c^{low}DC の割合と総数を表 1 に示した。肝障害の見られる肝だけでなく脾においても各 DC サブセットの割合及びその総数が 50 ~ 90 % 減少していた。

変化の見られた I-A⁺CD11c^{high}DC と I-A⁺CD11c^{low}DC の性状を myeloid DC の抗原である CD205 および plasmacytoid DC 抗原である mPDCA-1 の発現を調べた。その結果、I-A⁺CD11c^{high}DC は CD205 抗原陽性であることから myeloid DC、I-A⁺CD11c^{low}DC は mPDCA-1 陽性であることから plasmacytoid DC であると同定できた。Con A 肝炎マウスでは肝と脾の I-A⁺CD11c^{high}DC で CD205 抗原の発現が増強していることが示された (図 3)。

DC サブセットは種々の細胞表面抗原を発現し、その発現型によりさらに細分化される。表 2 に示したように、正常マウスの肝と脾の myeloid 系 DC である I-A⁺CD11c^{high}DC は B220 と Gr-1 抗原の発現が弱く、一方、plasmacytoid DC である I-A⁺CD11c^{low}DC は B220 抗原陽性で Gr-1 抗原は陰性となる。Con A 肝炎マウス DC では、正常マウスと比較してこれらの抗原の発現パター

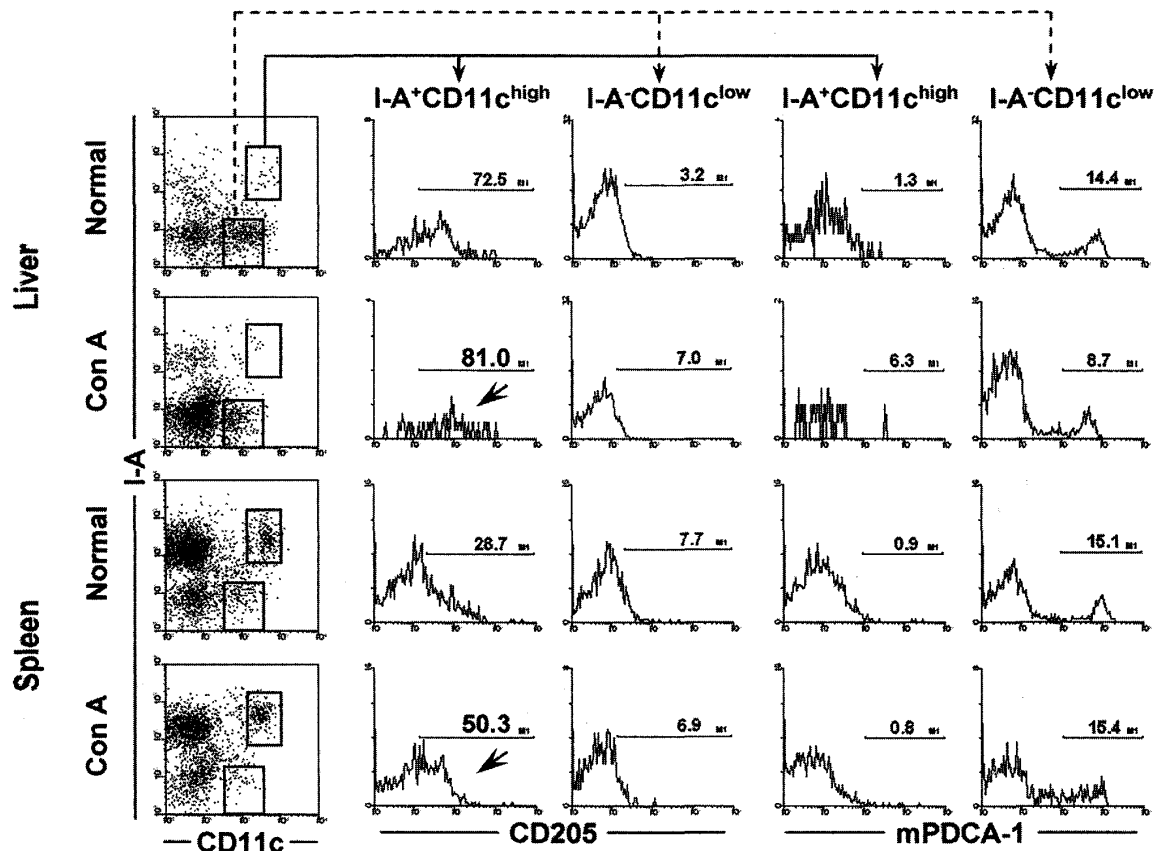


図3 Con A肝炎マウス肝および脾DCにおける myeloid DC 抗原 (CD205) と plasma cytotoid DC 抗原 (mPDCA-1) の変化

肝および脾DCをI-A, CD11c, CD205, あるいはmPDCA-1で三重染色を行った. 図中の数値は各抗原の発現比率を示す. Con A肝炎マウス肝および脾でI-A + CD11c^{high}DCのCD205抗原の発現増強を認めた(矢印).

表1

Organ	Experiment	I-A ⁺ CD11c ^{high}		I-A ⁺ CD11c ^{low}	
		%	Cell No. ($\times 10^5$)	%	Cell No. ($\times 10^5$)
Liver	Normal	7.2 \pm 1.8	2.3 \pm 0.8	23.5 \pm 4.2	7.1 \pm 1.8
	Con A	1.4 \pm 0.8*	0.2 \pm 0.1*	13.7 \pm 0.9*	2.7 \pm 1.1*
Spleen	Normal	20.3 \pm 4.0	29.4 \pm 4.3	6.0 \pm 0.9	10.4 \pm 2.1
	Con A	13.5 \pm 1.0*	16.0 \pm 2.6*	3.5 \pm 0.6	4.2 \pm 0.4*

*P<0.05

表 2

Organ	Experiments	I-A ⁺ CD11c ^{high}		I-A ⁻ CD11c ^{low}	
		B220 ⁺	Gr-1 ⁺	B220 ⁺	Gr-1 ⁺
Liver	Normal	32.0±1.7	23.1±1.6	74.3±6.7	8.4±3.4
	Con A	33.9±0.8	31.7±3.1	88.2±0.6	8.9±0.1
Spleen	Normal	21.5±4.9	7.6±3.6	82.6±3.3	5.7±2.4
	Con A	18.1±3.0	9.8±4.0	82.8±9.7	8.4±0.7

表 3

Organ	Experiments	I-A ⁺ CD11c ^{high}			I-A ⁻ CD11c ^{low}		
		CD80 ⁺	CD86 ⁺	CD40 ⁺	CD80 ⁺	CD86 ⁺	CD40 ⁺
Liver	Normal	93.1±5.0	90.6±2.9	78.1±7.0	45.2±3.5	36.3±2.5	4.6±1.7
	Con A	95.2±2.1	91.4±4.0	89.2±9.2	20.1±4.6*	22.6±7.0*	5.7±1.8
Spleen	Normal	95.5±5.7	79.7±5.4	87.8±6.8	34.4±1.6	33.7±0.5	6.5±0.9
	Con A	96.3±4.2	86.9±14.1	84.8±12.5	35.1±7.1	11.1±4.3*	10.9±0.9

*P<0.05

ンには変化が見られなかった。すなわち、それぞれの DC を特徴付ける抗原の発現変化は認められなかった。

DC は抗原提示能を有し、T 細胞を活性化する補助シグナル分子である CD80, CD86 や CD40 抗原を発現している。この発現量も myeloid DC の I-A⁺CD11c^{high} DC はいずれの抗原も強発現しているが、plasmacytoid DC の I-A⁻CD11c^{low} DC では CD80 と CD86 抗原は中程度であり、CD40 抗原は陰性である。Con A 肝炎マウス DC では、I-A⁺CD11c^{high} 細胞でのこれらの発現量は不変であったが、I-A⁻CD11c^{low} 細胞で CD80 と CD86 抗原の発現量は低下していた (P < 0.05) (表 3)。

3. RT-PCR 法による DC のケモカインおよびケモカインレセプターの発現解析

DC は外来抗原を末梢組織から所属リンパ器官へと運搬する機能を有し、その移動には走化性サイトカインであるケモカインを産生するとともに、自身のケモカインレセプターの発現増強も起こる。Con A 肝炎マウスにおける肝臓のような炎症組織への移動や退避には、ケモカインやケモカインレセプターが密接に関与することから、それらの発現を RT-PCR 法で解析した。ケモカイン産生に関しては、正常肝 CD11c⁺ DC と脾とではその差異が認められ、脾 CD11c⁺ DC では mRNA の発現は認められたが、正常肝 CD11c⁺ DC では解析したすべてのケモカインの mRNA は検出さ

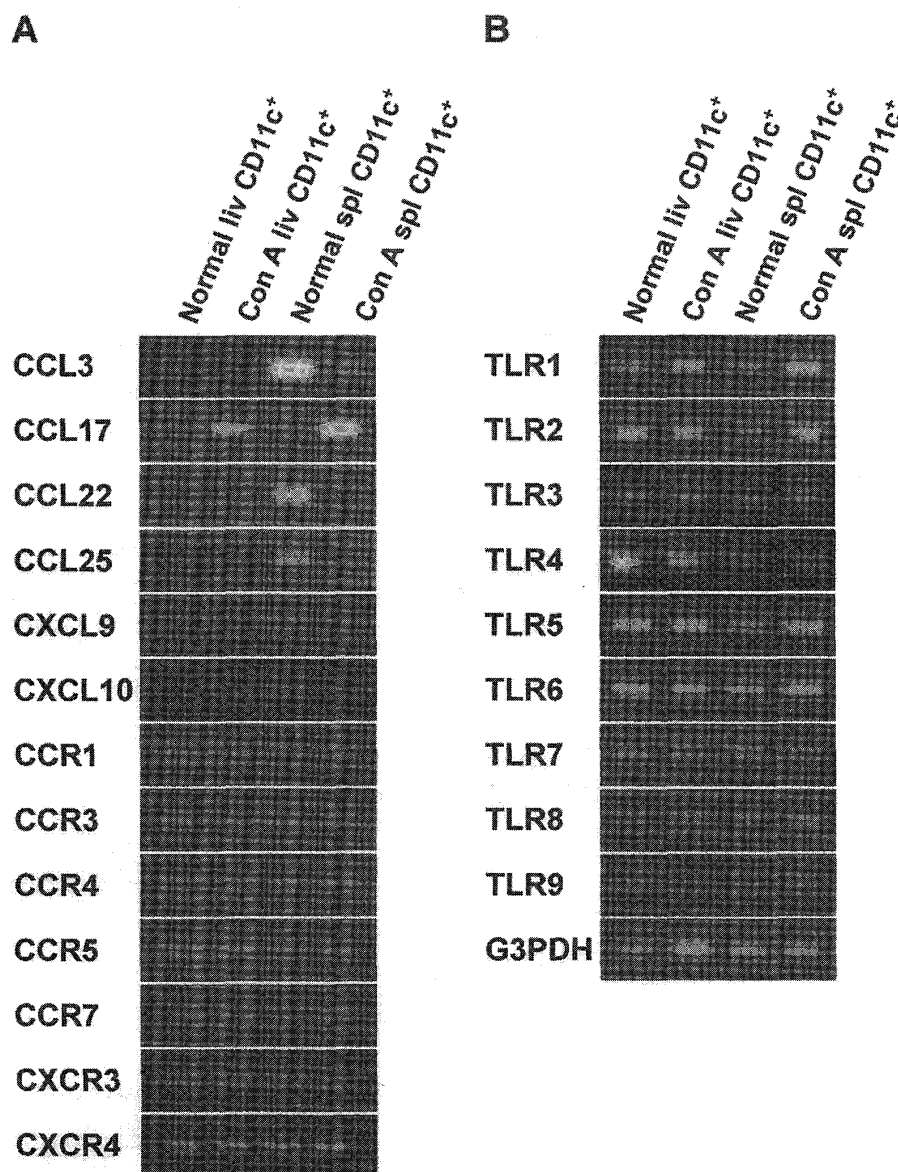


図4 Con A肝炎マウス肝および脾DCにおけるケモカイン、ケモカインレセプター、およびToll様受容体(TLR)のmRNA発現変化

正常およびCon A肝炎マウス肝および脾CD11c+DCの各種ケモカイン、ケモカインレセプター(A)、およびToll様受容体(TLR)(B)のmRNA発現をRT-PCR法にて解析した。

れなかった。肝炎マウス肝および脾CD11c+DCではT細胞や好塩基球の移動に関与するケモカインCCL17の強発現が認められた(図4-A)。一方、ケモカインレセプターの発現に変化は認められず、このことが肝DCサブセットの変化が見られないことと関与するものであろう。

4. DCサブセットにおけるToll様受容体(TLR)発現

DCの重要な役割は外来抗原を取り込み、それをMHCと共に提示してT細胞を活性化することである。しかしこのプロセスは細胞内のシグナル伝達系を直接には活性化しない。近年、外来微生物

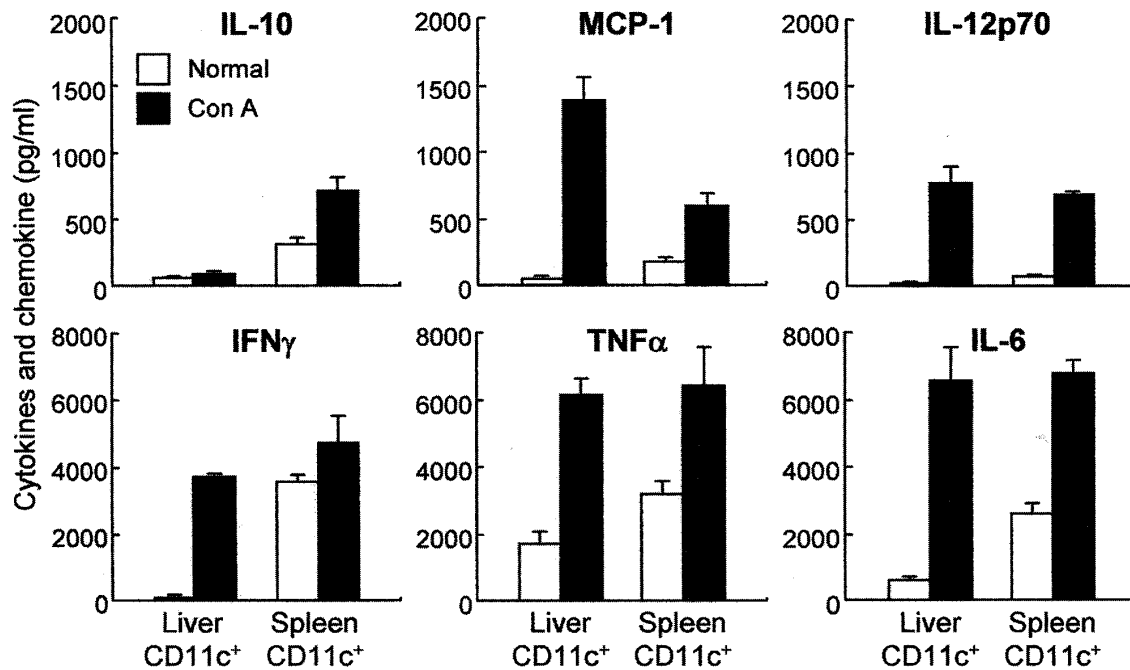


図5 Con A 肝炎マウス肝および脾 DC の各種サイトカイン産生能の解析

正常 (□) および Con A 肝炎 (■) マウス肝および脾 CD11c⁺ DC を CpG ODN (1 μ g/ml) 存在下で 24 時間培養し、その細胞上清中の各種サイトカイン産生量を CBA 法にて測定した (n = 3)。

物抗原を直接認識し、初期生体防御に関与するサイトカイン産生を迅速に誘導する Toll 様受容体 (TLR) が見出され、DC の機能が見直されてきた。そこで、正常及び肝炎マウスの肝と脾 CD11c⁺ DC の TLR 発現を RT-PCR で検討したが、その差異は認められなかった (図 4-B)。

5. DC の炎症性サイトカイン産生量の検討

前述したように、DC は TLR の刺激により各種の炎症性サイトカインを産生することが知られている。そこで肝炎誘導による DC のサイトカイン産生能の変化を調べた。magnetic sorting により分離した CD11c⁺ DC を *in vitro* で TLR9 を介する合成 DNA (CpG ODN) で刺激し、サイトカイン産生能を検討した。正常マウスの肝および脾 DC を比較すると、IL-10、IFN γ 、TNF α と IL-6 産生は myeloid DC が優位な脾 DC が強かった。肝炎マウスではいずれの炎症性サイトカイン産生能が高かったが、肝 DC では脾 DC に比べて

MCP-1 の産生が強く、脾 DC では IL-10 が優位であった。

考 察

肝臓や脾臓からの DC の分離には、collagenase 等の酵素処理後、magnetic beads を用いる方法や metrizamide あるいは牛血清アルブミン (BSA) の密度勾配法が用いられている^{26)–28)}。このような方法で分離した肝 DC は、脾 DC より死細胞率の割合が高く、肝 DC の機能解析に支障をきたすことも報告されている。本研究で用いた肝 DC の分離法は、metrizamide や BSA の密度勾配法に比較して細胞の回収率が高く死細胞の割合も低いものであり、一方、BSA の密度勾配法は脾 DC の回収率が高いことが見出された (未発表データ)。

肝臓には T 細胞への抗原提示能を持つ細胞として Kupffer 細胞、liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) や DC が存在する²⁹⁾³⁰⁾。また、イ

ンフルエンザウイルス抗原特異的な TCR を発現させたトランスジェニックマウスでは肝細胞も抗原提示ができることが報告されている³¹⁾。近年、肝 DC は肝臓の炎症反応や肝移植における免疫寛容の誘導に重要な役割を担うことから、その性状と機能解析が精力的になされてきた²⁹⁾³⁰⁾³²⁾。DC は CD11c⁺ MHC class II^{low}CD86^{low} の未熟 DC と CD11c⁺ MHC class II⁺CD86^{high} の成熟 DC に大別されるが、未熟 DC は CD8 α ⁻CD11b⁺ の myeloid 系と CD8 α ⁺CD11b⁻ の lymphoid 系に分類されている³²⁾。さらに、明らかな樹状突起を有しない plasmacytoid DC の存在も報告されてきた³³⁾。著者の正常肝 DC の解析結果はこれらの報告を裏付けるものであるが、B220 や補助シグナル分子である CD80 や CD86 発現の差異も認められている(表 2, 表 3)。本研究で用いた DC 分離法では、I-A⁺CD11c^{high} DC が myeloid 系であり I-A⁻CD11c^{low} DC が plasmacytoid に属することが、Giemsa 染色による形態学的観察や plasmacytoid DC の特徴である IFN α 産生能の解析および myeloid DC の抗原である CD205 や plasmacytoid DC 抗原の mPDCA-1 発現解析から明らかとなった(未発表データ, 図 1, 図 3)。Lian ZX ら³³⁾が述べているように、肝 DC の分離法により得られる DC 分画の違いが見られることは、本研究の結果からも認められた。また、Abe M らは分離直後の肝 DC は未熟型のため抗原提示能が低い、GM-CSF 存在下で培養することにより強い抗原提示能を誘導できることを報告している³⁴⁾。

Con A 肝炎においては、活性化 T 細胞や NKT 細胞の発現する Fas-L 分子や perforin 産生により肝傷害が起こされることが報告されている^{13)–15)}。一方、この T 細胞や NKT 細胞の活性化には抗原提示能を有する肝マクロファージの Kupffer 細胞の関与は報告されているが、DC の役割についてはほとんど報告が見られていない。Schümann, J. らは liposome-encapsulated dichloromethylene-bisphosphonate (Cl₂MBP) 投与により Kupffer 細胞を特異的に除去することにより Con A 肝炎の発症が抑制されることを明らかにしている⁷⁾。Con A はマンノースレセプターを介して種々の細

胞に結合することが知られており、マクロファージの MHC にも結合する⁸⁾³⁵⁾。著者らのビオチン標識 Con A を用いた予備的な検討では、Con A の結合は T 細胞や NKT 細胞と同様に DC にも見られることから、DC への直接的な関与が十分に考えられる。

Con A 肝炎マウスでは、肝および脾 DC の総数が有意に低下し、特定の DC サブセットの減少は認められていない。しかし、I-A⁺CD11c^{high} DC では CD205 の発現が強くなるが、補助シグナル分子である CD80, CD86 や CD40 の発現には変化が見られていない。一方、I-A⁻CD11c^{low} DC では CD80 と CD86 発現の有意な低下が認められていることから、Con A 投与は肝 I-A⁻CD11c^{low} DC への影響が強いことが示された。このような補助シグナル分子の発現抑制の機構は不明であるが、活性化リンパ球からの抑制性サイトカインや Con A の DC への直接的な結合による可能性も考えられる。

肝臓における DC の役割は、T 細胞や NKT 細胞への抗原提示能だけでなく、外来抗原に対する監視機能を有する³⁶⁾。すなわち、骨髄から DC 前駆細胞が常に供給され、感染や炎症時には抗原を取り込み肝臓から所属リンパ節へと速やかに移動する。この移動には、DC の発現するケモカインレセプター (chemokine receptor:CR) や Kupffer 細胞などが産生するケモカインが重要な役割を果たすことになる¹⁶⁾。Yoneyama H らは、*P. acnes* 投与により誘導される肝肉芽腫モデルを用いこれらの現象を詳細に解析した¹⁷⁾。肝 DC サブセットにおける CR の発現については Abe M ら³⁷⁾による報告があるが、各サブセット間の大きな差異は認められていなく、著者らの結果も同様であった。Con A 肝炎における DC の CR やそれに反応するケモカインについての報告は見られないが、CCR5 欠損マウスでは強い肝細胞壊死と炎症性細胞の侵入が見られマウスは死に至る³⁸⁾。このモデルマウスでは、CCR5 欠損が CCL5 の過剰産生を誘導し、炎症性細胞の肝臓への流入と炎症性サイトカイン産生が原因と考えられている。本研究の結果からは、Con A 肝炎マウスの肝と脾 DC の

CR 発現に差は見られていないが、T 細胞の移動を促進するケモカインである CCL17 の発現が強く認められた。CCL17 は CCL22 と共に未熟 DC から産生され、抗原非依存性 T 細胞の移動に関与することが報告されており³⁹⁾、Con A 肝炎の病態形成が T 細胞依存性であることとの関連が考えられた。DC のサイトカイン産生能の解析では、Con A による DC の活性化に起因すると考えられる IL-12 や IFN γ および炎症性サイトカインである TNF α や IL-6 産生は肝と脾 DC での差異は認められなかったが、ケモカインの monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) 産生は肝 DC が顕著であった。Fas-FasL 相互作用は細胞のアポトーシスを誘導する機構の一つであるが、炎症性サイトカインの IL-1 や TNF α 及びケモカインの IL-8 や MCP-1 の産生を誘導することが明らかになってきた⁴⁰⁾。また、DC は Fas を発現しているにもかかわらず、Fas-FasL によるアポトーシスに抵抗性を示すことが報告されている。従って、Con A 肝炎における炎症の場である肝臓では Fas-FasL による肝細胞のアポトーシスは起きるが、DC のアポトーシスは弱く逆に MCP-1 産生能が誘導されるものと考えられた。IL-10 産生に関して Abe M らは Con A 肝炎における肝 DC は抑制性サイトカイン IL-10 の産生が低下していることを報告し、このことが炎症の増強に関与すると報告している⁴¹⁾。著者らの結果においても、脾 DC では IL-10 産生が亢進するが、肝 DC ではその産生は低いことが示された。

本研究では、Con A 投与により惹起される肝炎モデルを用い病態形成や免疫応答に重要な役割を果たす肝 DC の動態を脾 DC と比較検討した。その結果、肝 DC サブセットの変動、補助シグナル分子の発現低下やケモカイン・サイトカインの産生能亢進など、病態形成や免疫応答を担う肝 DC の役割の一端を明らかにすることができた。

謝 辞

御指導いただきました新潟大学大学院医歯学総合研究科免疫・医動物学分野、安保徹教授、関川弘雄助教授、琉球大学遺伝子実験センター感染免疫制御分野、渡部久

実教授に深謝いたします。また、研究を支えて頂きました免疫・医動物学分野の皆様にも併せて感謝いたします。

尚、本研究の一部は第 35 回日本免疫学会総会（2004 年、横浜）にて発表した。

文 献

- 1) Abo T, Kawamura T and Watanabe H: Physiological responses of extrathymic T cells in the liver. *Immunol Rev* 174: 135 - 149, 2000.
- 2) Minagawa M, Oya H, Yamamoto S, Shimizu T, Bannai M, Kawamura H, Hatakeyama K and Abo T: Intensive expansion of natural killer T cells in the early phase of hepatocyte regeneration after partial hepatectomy in mice and its association with sympathetic nerve activation. *Hepatology* 31: 907 - 915, 2000.
- 3) Knolle PA and Gerken G: Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev* 174: 21 - 34, 2000.
- 4) Saito T, Okumura A, Watanabe H, Asano M, Ishida-Okawara A, Sakagami J, Sudo K, Hatano-Yokoe Y, Bezbradica JS, Joyce S, Abo T, Iwakura Y, Suzuki K and Yamagoe S: Increase in hepatic NKT cells in leukocyte cell-derived chemotaxin 2-deficient mice contributes to severe concanavalin A-induced hepatitis. *J Immunol* 173: 579 - 585, 2004.
- 5) Abe T, Kawamura H, Kawabe S, Watanabe H, Gejyo F and Abo T: Liver injury due to sequential activation of natural killer cells and natural killer T cells by carrageenan. *J Hepatol* 36: 614 - 623, 2002.
- 6) Hatada S, Ohta T, Shiratsuchi Y, Hatano M and Kobayashi Y: A novel accessory role of neutrophils in concanavalin A-induced hepatitis. *Cell Immunol* 233: 23 - 29, 2005.
- 7) Schumann J, Wolf D, Pahl A, Brune K, Papadopoulos T, Rooijen N and Tiegs G: Importance of Kupffer cells for T-cell-dependent liver injury in mice. *Am J Pathol* 157: 1671 - 1683, 2000.
- 8) Bonder CS, Ajuebor MN, Zbytniuk LD, Kubes P

- and Swain MG: Essential role for neutrophil recruitment to the liver in Concanavalin A-induced hepatitis. *J Immunol* 172: 45 - 53, 2004.
- 9) Ando K, Moriyama T, Guidotti LG, Wirth S, Schreiber RD, Schlicht HJ, Huang SN and Chisari FV: Mechanisms of class I restricted immunopathology. A transgenic mouse model of fluminate hepatitis. *J Exp Med* 178: 1541 - 1554, 1993.
 - 10) Yoneyama H, Narumi S, Zhang Y, Murai M, Baggiolini M, Lanzavecchia A, Ichida T, Asakura H and Matsushima K: Pivotal role of dendritic cell-derived CXCL10 in the retention of T helper cell 1 lymphocytes in secondary lymph nodes. *J Exp Med* 195: 1257 - 1266, 2002.
 - 11) Galanos C, Freudenberg MA and Reutter W: Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 11: 5939 - 5943, 1979.
 - 12) Tiegs G, Hentschel J and Wendel A: A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J Clin Invest* 90: 196 - 203, 1992.
 - 13) Takeda K, Hayakawa Y, Kaer LV, Matsuda H, Yagita H and Okumura K: Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 5498 - 5503, 2000.
 - 14) Tagawa Y, Kakuta S and Iwakura Y: Involvement of Fas/Fas ligand system-mediated apoptosis in the development of concanavalin A-induced hepatitis. *Eur J Immunol* 28: 4105 - 4113, 1998.
 - 15) Kaneko Y, Harada M, Kawano T, Yamashita M, Shibata Y, Gejyo F, Nakayama T, and Taniguchi M: Augmentation of V α 14 NKT cell-mediated cytotoxicity by interleukin 4 in an autocrine mechanism resulting in the development of concanavalin A-induced hepatitis. *J Exp Med* 191: 105 - 114, 2000.
 - 16) Crispe IN: Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev Immunol* 3: 51 - 62, 2003.
 - 17) Yoneyama H, Matsuno K, Zhang YZ, Murai M, Itakura M, Ishikawa S, Hasegawa G, Naito M, Asakura H and Matsushima K: Regulation by chemokines of circulating dendritic cell precursors, and the formation of portal tract-associated lymphoid tissue, in a granulomatous liver disease. *J Exp Med* 193: 35 - 49, 2001.
 - 18) O'Connell PJ, Li W, Wang Z, Specht SM, Logar AJ and Thomson AW: Immature and mature CD8 α ⁺ dendritic cells prolong the survival of vascularized heart allografts. *J Immunol* 168: 143 - 154, 2002.
 - 19) Watanabe H, Miyaji C, Kawachi Y, Iiai T, Ohtsuka K, Iwanaga T, Takahashi-Iwanaga H and Abo T: Relationships between intermediate TCR cells and NK1.1⁺ T cells in various immune organs: NK1.1⁺ T cells are present within a population of intermediate TCR cells. *J Immunol* 155: 2972 - 2983, 1995.
 - 20) Miyaji C, Watanabe H, Minagawa M, Toma H, Kawamura T, Nohara Y, Nozaki H, Sato Y and Abo T: Numerical and functional characteristics of lymphocyte subsets in centenarians. *J Clin Immunol* 17: 420 - 429, 1997.
 - 21) Miyagi K, Kawakami K, Kinjo Y, Uezu K, Kinjo T, Nakamura K and Saito A: CpG oligodeoxynucleotides promote the host protective response against infection with *Cryptococcus neoformans* through induction of interferon- γ production by CD4⁺ T cells. *Clin Exp Immunol* 140: 220 - 229, 2005.
 - 22) Tsukada C, Yokoyama H, Miyaji C, Ishimoto Y, Kawamura H and Abo T: Immunopotential of intraepithelial lymphocytes in the intestine by oral administrations of β -glucan. *Cell Immunol* 221: 1 - 5, 2003.
 - 23) Ogata M, Zhang Y, Wang Y, Itakura M, Zhang YY, Harada A, Hashimoto S and Matsushima K: Chemotactic response toward chemokines and its regulation by transforming growth factor- β 1 of murine bone marrow hematopoietic progenitor cell-derived different subset of dendritic cells. *Blood* 93: 3225 - 3232, 1999.
 - 24) Edwards AD, Diebold SS, Slack EM, Tomizawa H, Hemmi H, Kaisho T, Akira S and Reis e Sousa C: Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 α ⁺ DC correlates with unresponsiveness to imidazo-

- quinolines. *Eur J Immunol* 33: 827 - 833, 2003.
- 25) Sato S, Nomura F, Kawai T, Takeuchi O, Muhlradt PF, Takeda K and Akira S: Synergy and cross - tolerance between toll - like receptor (TLR) 2 - and TLR4 - mediated signaling pathways. *J Immunol* 165: 7096 - 7101, 2000.
 - 26) O'Connell PJ, Morelli AE, Logar AJ and Thomson AW: Phenotypic and functional characterization of mouse hepatic CD8 α ⁺ lymphoid - related dendritic cells. *J Immunol* 165: 795 - 803, 2000.
 - 27) Iyoda T, Shimoyama S, Liu K, Omatsu Y, Akiyama Y, Maeda Y, Takahara K, Steinman RM and Inaba K: The CD8⁺ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J Exp Med* 195: 1289 - 1302, 2002.
 - 28) Ohteki T, Fukao T, Suzue K, Maki C, Ito M, Nakamura M and Koyasu S: Interleukin 12 - dependent interferon gamma production by CD8 α ⁺ lymphoid dendritic cells. *J Exp Med* 189: 1981 - 1986, 1999.
 - 29) Doherty DG and O'Farrelly C: Dendritic cells: regulators of hepatic immunity or tolerance? *J Hepatol* 34: 156 - 160, 2001.
 - 30) Knolle PA and Gerken G: Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev* 174: 21 - 34, 2000.
 - 31) Bertolino P, Trescol - Biemont MC and Rabourdin - Combe C: Hepatocytes induce functional activation of naïve CD8⁺ T lymphocytes but fail to promote survival. *Eur J Immunol* 28: 221 - 236, 1998.
 - 32) Lau AH and Thomson AW: Dendritic cells and immune regulation in the liver. *Gut* 52: 307 - 314, 2003.
 - 33) Lian ZX, Okada T, He XS, Kita H, Liu YJ, Ansari AA, Kikuchi K, Ikehara S and Gershwin ME: Heterogeneity of dendritic cells in the mouse liver: Identification and characterization of four distinct populations. *J Immunol* 170: 2323 - 2330, 2003.
 - 34) Abe M, Akbar SMF, Horiike N and Onji M: Induction of cytokine production and proliferation of memory lymphocytes by murine liver dendritic cell progenitors: role of these progenitors as immunogenic resident antigen - presenting cells in the liver. *J Hepatol* 34: 61 - 67, 2001.
 - 35) Keren Z and Berke G: Selective binding of concanavalin A to target cell major histocompatibility antigens is required to induce no specific conjugation and lysis by cytolytic T lymphocytes in lectin - dependent cytotoxicity. *Cell Immunol* 89: 458 - 477, 1984.
 - 36) Matsuno K and Ezaki T: Dendritic cell dynamics in the liver and hepatic lymph. *Int Rev Cytol* 197: 83 - 136, 2000.
 - 37) Abe M, Zahorchak AF, Colvin BL and Thomson AW: Migratory responses murine hepatic myeloid, lymphoid - related, and plasmacytoid dendritic cells to CC chemokines. *Transplantation* 78: 762 - 765, 2004.
 - 38) Moreno C, Gustot T, Nicaise C, Quertinmont E, Nagy N, Parmantier M, Moine OL, Deviere J and Louis H: CCR5 deficiency exacerbates T - cell - mediated hepatitis in mice. *Hepatol* 42: 854 - 862, 2005.
 - 39) Real E, Kaiser A, Raposo, G, Amara A, Nardin A, Trautmann A and Donnadieu E: Immature dendritic cells (DCs) use chemokines and intercellular adhesion molecule (ICAM) - 1, but not DC - specific ICAM - 3 - grabbing nonintegrin, to stimulate CD4⁺ T cells in the absence of exogenous antigen. *J Immunol* 173: 50 - 60, 2004.
 - 40) Guo Z, Zhang M, Tang H and Cao X: Fas signal links innate and adaptive immunity by promoting dendritic - cell secretion of CC and CXC chemokines. *Blood* 106: 2033 - 2041, 2005.
 - 41) Abe M, Akbar SMF, Hasebe A, Horiike N and Onji M: Glycyrrhizin enhances interleukin - 10 production by liver dendritic cells in mice with hepatitis. *J Gastroenterol* 38: 962 - 967, 2003.

(平成 18 年 2 月 6 日受付)