結核患者における末梢血および肉芽腫組織における 樹状細胞の検討

上 平 和 孝

(内科学第一講座)

Dendritic Cells are Decreased in Blood and Accumulated in Granuloma in Tuberculosis

Kazutaka UEHIRA

要 約

結核に対する免疫は自然免疫と獲得免疫で構成される。我々は、多様な免疫応答を誘導するとされる樹状細胞 (dendritic cells; DC) の動態を、結核患者において解析した。DC は骨髓幹細胞から、異なる分化経路を経て、それぞれの組織、器官に分布する。そして DC は分化経路および属性から、大きくミエロイド系とリンパ球系の2つに分類される。末梢血中には、表面抗原のパターンにより少なくとも3つの亜群が存在することを当教室より報告している [Fraction 1 DC; CD1a⁺/CD11c⁺, Fraction 2 DC; CD1a/CD11c⁺, Fraction 3 DC; CD1a/CD11c⁻]。前2者は、いわゆる myeloid DC であり、fraction 3 は lymphoid DC (plasmacytoid DC) である。

21名の末梢血 DC の解析では、結核患者の末梢血 DC が健常者に比較して有意に減少しており、さらに亜群解析の結果、この減少は Fraction 1 及び Fraction 2 DC の減少に起因することが明らかとなった。21名の結核組織の免疫染色では、fascin⁺, CD11c⁺, HLA-DR⁺ DC が epithelioid cells 周囲のリンパ球領域を中心に多数認められた。また epithelioid cells 周囲リンパ球領域では IFN γ 産生細胞が多数認められ、Th1 偏向を示していることが明かとなった。

Bacillus calmette Guérin (BCG) 存在下あるいは非存在下で、ミエロイド系 DC である Fraction 1 及び Fraction 2 DC (CD11c⁺ DC) とリンパ球系 DC である Fraction 3 DC (CD11c⁻ DC) のそれぞれを autologous naive Th と共培養することにより、DC の Th1 あるいは Th2 への誘導能を検討した結果、CD11c⁺ DC, CD11c⁻ DC はともに BCG 非存在下に比べ BCG を加えた共培養系においてより強く Th1 が誘導された。

これらの結果から、結核の病態において末梢血 DC (主に CD11c⁺ DC) が結核組織に動員され、抗原を取り込んだ後成熟し、所属リンパ節で naive Th を Th1 に誘導していることが示唆された。

目 的

Mycobacterium tuberculosis (M.tb) は結核症の原因菌であり、結核症は現在全世界で年間約 800 万人が発症し、300 万人の死者を出しており、最も多い感染症死亡の原因の1つである¹⁾。結核感染における防御免疫は自然免疫と獲得免疫がある。結核において自然免疫の主役はマクロファージであり、一方獲得免疫はT細胞による抗原特異的な応答である^{2,3)}。これまで結核に対する防御免疫はTh1の誘導が重要であることが報告されている。しかしながら結核患者においてどのようにTh1誘導がなされているかは明らかでない。

樹状細胞 (dendritic cells; DC) は生体に広く分布し、強力な抗原提示細胞 (Antigen-presenting

cells; APC) であり、naive T cells を priming する能力を有しており、Th balance の誘導に重要な役割を担っている。DC は骨髓幹細胞から、異なる分化経路を経て、それぞれの組織、器官に分布する。DCは分化経路および属性から、大きくミエロイド系とリンパ球系の2つに分類される。また、機能的に DC1 および DC2 と分類することが近年提唱されており、DC1 は interleukin (IL)-12 を介して naive Th細胞をTh1細胞に誘導し、DC2はTh2細胞に誘導するとされる⁴⁾。種々のサイトカイン存在下では、ミエロイド系 DC とリンパ球系 DC が有するTh1誘導能あるいはTh2誘導能に影響を与える⁵⁾。さらに各 DC 亜群はその成熟度や抗原により異なる反応を誘導する^{6,7)}。

このように DC には、2 つの細胞系列が存在しそれぞれ異なる機能を有し、免疫システムの中核に位置し、免疫反応において司令塔の役割を担っている。以上の事実から DC は、深く感染症に関与しており、結核免疫においても重要な役割を果たしていることが推測される。しかしながら結核菌抗原の DC に及ぼす *in vitro* での研究報告はあるが⁸⁻¹⁰⁾、*in vivo* における報告はほとんどなく、結核における DC の本質的な役割については不明である。

末梢血中には、表面抗原のパターンにより少なくとも 3 つの亜群が存在することを当教室より報告している [Fraction 1 DC; CD1a⁺/CD11c⁺, Fraction 2 DC; CD1a/CD11c⁺, Fraction 3 DC; CD1a⁻/CD11c⁻]¹¹⁾。Fraction 1 および Fraction 2 DC はミエロイド系 DC で Fraction 3 DC はリンパ球系 DC である。Fraction 3 DC は plasmacytoid DC の precursor であり血中の interferon- α -producing cells (IPC) としても認識されている¹²⁾。これら末梢血 (peripheral blood: PB) DC は未成熟段階にあり、各組織に配置される以前の未熟 DC あるいは DC precursor であると考えられている。健康者では PBDC は steady-state 'sentinel' DC の主な供給源であると考えられている。一方感染症などの緊急時には PBDC は末梢血中から感染組織に 'danger' signals により動員され免疫応答を発動するものと考えられる。我々は primary Sjögren's syndrome において、末梢血から選択的に唾液腺に移動することにより末梢血 Fraction 1 DC が減少していることを報告した。この事実から Sjögren's syndrome の病態生理において DC が本質的に寄与していることが推測される¹³⁾。われわれはこの研究で、初発時の結核患者の末梢血と結核組織 (肉芽腫組織) の DC の解析を試みた結果、Fraction 1 および Fraction 2 DC が末梢血から選択的に結核組織に移動し、組織での Th 1 偏向をひきおこしていることを証明した。

対 象

インフォームドコンセントを得た抗結核療法前 (未治療) の結核患者 42 名 (男性 24 人, 女性 18 人, 年齢: 24 ~ 83 歳, 中央値 53 歳) を対象とした (肺結核: 24 名, 結核性胸膜炎: 4 名, 結核性リンパ節炎: 6 名, 皮下組織結核: 2 名, 肺結核

に結核性胸膜炎あるいは結核性リンパ節炎の合併: 6 名)。このうち末梢血 DC の検討において対象とした患者は、21 人 (男性 14 人, 女性 7 人, 年齢: 24 ~ 83 歳, 中央値 39 歳) である。対照は、年齢・性を一致させた健康人 15 名 (男性 9 人, 女性 6 人, 年齢: 25 ~ 78 歳, 中央値 34 歳) である。結核組織の免疫染色の対象患者は、患者数は 21 人 (男性 10 人, 女性 11 人, 年齢: 29 ~ 70 歳, 中央値 58 歳) である (肺: 9 例, 胸膜: 3 例, リンパ節: 7 例及び皮下組織: 2 例) である。結核の診断は 1990 年 American Lung Association 結核診断基準を満たすものとした。

方 法

1) 末梢血 (peripheral blood; PB) DC の単離・解析

健康者及び患者より得た血液より、単核球分画を比重遠心法にて分離した後、抗 CD3 抗体、抗 CD14 抗体及び抗 CD19 抗体を用いた immunoselection により T 細胞、B 細胞及び単球を除去した。更に磁気ビーズ標識抗 CD4 抗体を用い、positive selection を行い、CD4+CD3-CD14-CD19- の樹状細胞濃縮分画を調整した。この樹状細胞濃縮分画を抗 CD1a 抗体、抗 CD11c 抗体、抗 HLA-DR 抗体、抗成熟分化マーカー (Lineage) 抗体 (抗 CD3, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56 抗体) で染色し、4-color-cell sorter にて解析、純化を行った。DC 数 (/ml) は FCM の total event に対する各々の fraction の比率を末梢血単核球数 (PBMC/ml) に乗じて算出した。

2) 免疫染色

免疫染色は診断のために採取された結核組織を用いて行った。

ホルマリン固定・パラフィン包埋の組織では、以下の一次抗体を用いた。Fascin は内皮細胞や扁平上皮細胞等に発現が認められるが、血液系の細胞では EB virus infected B cells と mature DC に発現が限局していることから、mature DC に特異的な marker と考えられる。よって anti-fascin mAb, anti-CD1a mAb, anti-HLA-DR mAb を用い DC を同定した。T 細胞の同定は anti CD4 mAb, anti CD8 mAb を用いた。凍結標本では、anti-IFN γ mAb, anti-IL-4 mAbs, anti-IL-10 mAbs を使用し、T リンパ球のサイトカイン産生を解析した。

anti-CD11c mAbを用い、DCのCD11cの発現の有無を調べた。さらに anti-IFN α mAb を用い fraction 3 DC の同定した。

- 3) *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette and Guérin (BCG) 刺激下での CD11c⁺ DC (Fraction 1+2 DC) および CD11c⁻ DC (Fraction 3 DC) とナイーブ T 細胞の autologous 共培養

免疫磁気ビーズ法により健康人の末梢血 PBMC から CD4⁺/CD45RA⁺ 細胞をナイーブ T 細胞として得た。Sorting により分離したそれぞれ 1×10^4 個の CD11c⁺ DC および CD11c⁻ DC を BCG (a multiplicity of infection: MOI of 2 to 5) とともに共培養 (37°C で overnight) した。培養後、DC を回収した。さらに CD11c⁺ DC および CD11c⁻ DC はそれぞれ 5×10^4 個のナイーブ T 細胞と autologous 共培養を施行した。7 日目に CD4⁺ T 細胞を細胞内染色法により処理し IFN γ および IL-4 産生細胞の比率を検討した。

4) 統計学的処理

すべての統計学的処理は、Stat-view statistical program (Abacus Concepts) を用い Mann-Whitney U test にて施行した。同順位補正後の p value (tied p value) が 5% 以下のものを有意差ありとした。

結 果

- 1) 総 PBDC および各 Fraction の PBDC の絶対数
結核患者の総 PBDC および各 Fraction の PBDC の絶対数を年齢、性を一致させた健康者のコン

トロールと比較した (図 1)。結核患者では総 PBDC 数が健康者に比較して有意に減少しており (controls: mean 17,132/ml, range 8,313–32,708/ml, 結核患者: mean 9,711/ml, range 2,414–27,819/ml) ($p=0.001$)、さらに亜群解析の結果、この減少は Fraction 1 DC (controls: mean 9,236/ml, range 4,300–18,496/ml, 結核患者: mean 4,106/ml, range 352–10,998/ml) 及び Fraction 2 DC (controls: mean 1,639/ml, range 637–3,264/ml, 結核患者: mean 648/ml, range 52–1,303/ml) の減少に起因することが明らかとなった (Fraction 1 DC: $p<0.0005$ and Fraction 2 DC: $p<0.0001$) (図 1)。Fraction 3 DC は若干の減少を認めたものの統計学的に有意ではなかった (controls: mean 6,258/ml, range 3,061–10,948/ml, 結核患者: mean 4,957/ml, range 1,589–15,527/ml) ($p=0.057$) (図 1)。

2) 結核組織の免疫染色

21 人の結核患者から得られた結核組織の H-E 染色では、乾酪壊死とランゲハンス巨細胞を伴った類上皮肉芽腫とその周囲に単核球が集簇する典型的な結核の組織構造が認められた (図 2A)。

結核組織の免疫染色は、21 名のパラフィン包埋の切片と 4 名の凍結切片 (結核性リンパ節炎) で行なった。成熟 DC に発現する fascin が陽性の細胞が類上皮細胞周囲のリンパ球領域を中心に多数認められた (図 2B)。fascin 陽性細胞は、

図 1 末梢血 DC における細胞数の検討

結核患者では末梢血 DC が 9711/ml と健康者の 17132/ml に比較して有意に減少している。亜群解析の結果、この減少はミエロイド系 DC である Fraction 1 及び Fraction 2 DC の減少に起因している。Fraction 3 DC は若干の減少を認めたが有意な低下ではなかった。

A: H.E.; X40 **B: fascin; X40** **C: HLA-DR; X40** **D: CD11c; X40** **E: CD1a; X40** **F: IFNα; X40**

図2 結核組織の H-E 染色と免疫染色 A: H-E 染色, B: fascin, C: HLA-DR, D: CD11c, E: CD1a, F: IFN α , G: CD4, H: CD8, I: IFN γ , J: IL-4, K: IL-10. 結核組織に典型的な Langhans' giant cells が認められる. fascin 陽性細胞を類上皮細胞周囲のリンパ球領域を中心に多数認める. B との連続切片で同じ場所に HLA-DR 陽性細胞が存在する. fascin 陽性細胞, HLA-DR 陽性細胞はともに樹状突起を有している. CD11c の染色では, 類上皮細胞周囲リンパ球領域に CD11c 陽性細胞の存在が確認され, fascin 陽性細胞, HLA-DR 陽性細胞と同様に樹状突起を持ち, また同じ頻度で認められる. B と C との連続切片での CD1a 染色の結果, fascin および HLA-DR 陽性細胞は CD1a が陰性である. IFN α の染色では, 低頻度ながら類上皮細胞周囲リンパ球領域において浸潤を認める. 類上皮細胞周囲のリンパ球領域では CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞が多数認められる. サイトカインの免疫染色では CD4 陽性, CD8 陽性 T リンパ球の多くは IFN γ を産生しているが, IL-4 と IL-10 産生細胞は少数である.

図2 (つづき)

連続切片にてHLA-DRが陽性であった(図2C).
これら fascin 陽性細胞が EBV 感染 B 細胞では
ないことを証明するためにEBNA-2とLMP-1に

対する抗体で染色したが陽性細胞は認めなかつ
た (data not shown). fascin 陽性細胞と CD11c
陽性細胞は相対的に発現頻度が同程度であった

図 3 CD11c⁺ DC によるナイーブ細胞の Th1 偏向

CD11c陽性DC, CD11c陰性DCはともにBCG非存在下に比べBCGを加えた共培養系においてより強くTh1が誘導された。

ことから fascin 陽性 /HLA-DR 陽性細胞の多くは, CD11c 陽性であることが判明した (図 2D)。これら fascin 陽性細胞, HLA-DR 陽性細胞, CD11c 陽性細胞は全て樹状突起を有していた (図 2B, C, D)。しかし, fascin 陽性 /HLA-DR 陽性細胞は, 連続切片での染色で CD1a が陰性であった (図 2E)。

また少数ではあるが類上皮細胞周囲リンパ球領域において IFN α 陽性細胞が認められ, Fraction 3 DC の存在が確認された (図 2F)。

一方類上皮細胞周囲リンパ球領域ではCD4あるいはCD8陽性細胞が多数認められた (図 2G, H)。これらリンパ球の多くは IFN γ 産生細胞で (図 2I), IL-4 あるいは IL-10 陽性細胞は少数であった (図 2J, K)。

3) CD11c⁺ DC による naive T cells の Th1 偏向

BCG 存在下あるいは非存在下で, ミエロイド系 DC である CD11c⁺ DC とリンパ球系 DC である CD11c⁻ DC のそれぞれを autologous naive Th と共培養することにより, DC の Th1 あるいは

Th2 の誘導能を検討した。

その結果, CD11c⁺ DC, CD11c⁻ DC はともに BCG 非存在下に比べ BCG を加えた共培養系においてより強く Th1 を誘導した (図 3)。

考 察

今回我々は, 結核では循環血中の DC 総数が減少していること, その減少が Fraction 1+2 DC (= ミエロイド系 DC) の減少に起因していることを示した。結核組織の中に fascin⁺/HLA-DR⁺/CD1a⁺/CD11c⁺ 細胞が存在することも示した。また IPC も低頻度ながら類上皮細胞周囲リンパ球領域において浸潤していた。これらの所見より結核組織には末梢血から DC 亜群が積極的に動員されていることが明かとなった。したがって fascin 陽性 DC は, 大部分が末梢血中の ミエロイド系 DC である Fraction 1 および Fraction 2 DC 由来であることが判明した。結核組織に浸潤している DC が Fraction 1 DC の marker である CD1a を発現していないのは, Fraction 1 DC の末梢血から組織への移動に伴う成熟によるものと考えられた。実際 CD1a は DC の成熟とともに down-regulation することが知られている^{14,15)}。類上皮細胞周囲リンパ球領域では IFN γ 産生 T 細胞が多数認められ, 結核局所での Th1 偏向のみではなく Tc1 偏向も確認された。

BCG 存在下あるいは非存在下で, 末梢血 CD11c⁺ DC と末梢血 CD11c⁻ DC のそれぞれを自己の naive Th 細胞と共培養した *in vitro* の実験から, 結核感染においてはミエロイド系 DC とリンパ球系 DC はともに, Th1 への偏向性を示すことが明らかとなった。

以上の結果より, 我々は結核感染における以下の 'DC trafficking model' を提唱している。

すなわち結核感染では danger signal によって末梢血の DC が組織へ動員される。その大部分がミエロイド系 DC であるが, わずかながらリンパ球系 DC も浸潤し, IFN α を産生する。感染局所で DC は, 結核菌の刺激により成熟活性化され所属リンパ節に移動し, さらにナイーブ T 細胞を Th1 と Tc1 にシフトし, そのリンパ球が tubercle に戻り結核免疫を誘導すると考えられた。

この model から, 結核感染において DC は結核免疫を導く重要な細胞であることが示唆される。

文 献

- 1) Kochi, A.: The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. *Tubercle*, 72: 1-6, 1991.
- 2) Kaufmann, S. H. and Ladel, C. H.: Role of T cell subsets in immunity against intracellular bacteria: experimental infections of knock-out mice with *Listeria monocytogenes* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Immunobiology*, 191: 509-519, 1994.
- 3) Stenger, S., Mazzaccaro, R. J., Uyemura, K., Cho, S., Barnes, P. F., Rosat, J. P., Sette, A., Brenner, M. B., Porcelli, S. A., Bloom, B. R. and Modlin, R. L.: Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. *Science*, 276: 1684-1687, 1997.
- 4) Rissoan, M. C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal Malefyt, R. and Liu, Y. J.: Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science*, 283: 1183-1186, 1999.
- 5) Ito, T., Amakawa, R., Inaba, M., Ikehara, S., Inaba, K. and Fukuhara, S.: Differential regulation of human blood dendritic cell subsets by IFNs. *J Immunol*, 166: 2961-2969, 2001.
- 6) Cella, M., Facchetti, F., Lanzavecchia, A. and Colonna, M.: Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat Immunol*, 1: 305-310, 2000.
- 7) Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A. and Sallusto, F.: Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol*, 1: 311-316, 2000.
- 8) Henderson, R. A., Watkins, S. C. and Flynn, J. L.: Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*, 159: 635-643, 1997.
- 9) Demangel, C., Bean, A. G., Martin, E., Feng, C. G., Kamath, A. T. and Britton, W. J.: Protection against aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection using *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guérin-infected dendritic cells. *Eur J Immunol*, 29: 1972-1979, 1999.
- 10) Fortsch, D., Rollinghoff, M. and Stenger, S.: IL-10 converts human dendritic cells into macrophage-like cells with increased antibacterial activity against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*, 165: 978-987, 2000.
- 11) Ito, T., Inaba, M., Inaba, K., Toki, J., Sogo, S., Iguchi, T., Adachi, Y., Yamaguchi, K., Amakawa, R., Valladeau, J., Saeland, S., Fukuhara, S. and Ikehara, S.: A CD1a⁺/CD11c⁺ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells. *J Immunol*, 163: 1409-1419, 1999.
- 12) Siegal, F. P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P. A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S. and Liu,

- Y. J.: The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*, 284: 1835–1837, 1999.
- 13) Ozaki, Y., Amakawa, R., Ito, T., Iwai, H., Tajima, K., Uehira, K., Kagawa, H., Uemura, Y., Yamashita, T. and Fukuhara, S.: Alteration of peripheral blood dendritic cells in patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 44: 419–431, 2001.
- 14) Schuler, G. and Steinman, R. M.: Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med*, 161: 526–546, 1985.
- 15) Stenger, S., Niazi, K. R. and Modlin, R. L.: Down-regulation of CD1 on antigen-presenting cells by infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*, 161: 3582–3588, 1998.