

論 文 要 旨

Interferon- α and interleukin-12 are induced, respectively, by double-stranded DNA and single-stranded RNA in human myeloid dendritic cells

(二本鎖 DNA と一本鎖 RNA により Interferon- α と interleukin-12 がそれぞれ、ヒトミエロイド系樹状細胞から産生される)

関西医科大学内科学第一講座
(指導：野村 昌作教授)

片芝 雄一

【はじめに】

ウイルス感染や自己免疫疾患発症過程で生体内では各種の一重鎖、二重鎖の核酸(dsDNA、ssRNA など)が生じる。これらに対し、樹状細胞(DC)サブセットは自然免疫の中で各々が、異なる反応をし、異なるサイトカインを産生する事によって多種にわたる外敵や自己組織に反応し、免疫応答を惹起していると考えられる。

実際に自己免疫疾患では自己 DNA の放出を DC サブセットの一つである plasmacytoid DC が検知し、I 型 IFN の異常産生亢進が認められ、この現象が病態発症とその進展に寄与しているとされる。しかしながらヒトミエロイド系 DC を用いて各種の核酸に対するサイトカイン産生を一元的に比較検討した報告は未だ存在しない。そこで一重鎖および二重鎖核酸(dsDNA、ssRNA)を用いて、ヒトミエロイド系 DC サブセットの反応をサイトカイン産生の側面から比較検討した。

【研究方法】

1. 健康人ドナーの末梢血からマグネティックビーズ法およびセルソーターを用いてミエロイド系 DC、単球を単離する。単離した単球は GM-CSF、IL-4 を添加し単球由来 DC : monoDC を作成し、2つのミエロイド系樹状細胞(末梢血 MDC、単球由来 monoDC)を同一ドナーより調整する。
2. 細胞内受容体へ移送するため、transfection 試薬(LyoVec, Lipofectamine, DOTAP, Protamine)を核酸(dsDNA, ssRNA)に加え室温で 30 分反応させ、その後 DC に添加し 24 時間培養する。
3. 蛍光抗体でラベルした核酸を用い、confocal microscopy 及び、FACS で細胞内移行とその局在を確認する。またエンドゾーム内での酸性化阻害剤 (TLR 刺激阻害薬)であるクロロキンを添加しサイトカイン産生を検証し受容体の局在を検討する。
4. 培養中の細胞、上清を回収し細胞内免疫染色や ELISA 法でサイトカイン(IFN- α , IL-12)の産生を確認し、FACS による成熟能の観察(CD86)を行う。

【結果】

1. moDC 内へ核酸の取り込み

dsDNA 単独では monoDC 内への取り込みは認められず protamine 以外の transfectant の添加で取り込みを認め、特に DOTAP、lipofectamine で強く認められた。また confocal microscopy によって、ssRNA は endosome に存在する LAMP-1 と同一部位へ、dsDNA は他部位への取り込みが確認された。

2. moDC の成熟度

dsDNA、ssRNA は transfectant 無しでは成熟 marker である CD86 を誘導しなかった。LyoVec、lipofectamine 存在下では、dsDNA、ssRNA はいずれも、CD86 の発現が増強した。Protamine に関しては ssRNA にのみ CD86 の誘導を認めた。

3. moDC からのサイトカイン産生

dsDNA、ssRNA とともに単独ではサイトカインの産生は認められないが、transfectant (protamine 以外) の添加により dsDNA 刺激で IFN- α の産生が認められた。ssRNA ではすべての transfectant で IL-12 の産生が認められた。

4. 末梢血ミエロイド系 DC からのサイトカイン産生

末梢血 MDC でも、moDC と同様の dsDNA、ssRNA に対するサイトカイン産生反応が認められるか検定したところ、あらかじめ transfectant が付加された dsDNA から IFN- α が、ssRNA から IL-12 が産生されることを確認した。

5. TLR 関連反応かどうかの検定

TLR による活性の阻害剤であるクロロキンを添加しサイトカインの産生量を比較した。CpG-DNA (TLR9 リガンド) による pDC からの IFN- α の産生や、ssRNA (TLR7/8 リガンド) による moDC からの IL-12 の産生はクロロキンの濃度依存性に低下を認めたが、dsDNA による moDC からの IFN- α の産生は低下しなかった。この結果より dsDNA による moDC からの IFN- α の産生は TLR-independent である可能性が示唆された。

【考察】

核酸を介する自然免疫応答には、ウイルスや細菌の侵入により生じる核酸により免疫応答を誘導する場合と、自己の細胞死の時に放出される内因性の核酸により全身性エリテマトーデスや乾癬などの自己免疫疾患の病因に関与しているという、2つの側面がある。

糸球体内皮細胞や線維芽細胞では dsDNA が 1 型 IFN の産生にかかわっているという報告は散見されるが、詳細はほとんど知られていない。

本研究はヒトミエロイド系 DC における 1 型 IFN の産生に dsDNA が強く関わっていることを示唆した。

また樹状細胞療法で用いられる moDC を用いて検討することは、実臨床に即した実験系であり、今後の免疫療法の開発において transfectant の選別などにおいても、重要な基礎的なデータとなりうると考えられる。