

審査の結果の要旨

氏名 宝方達昭

生体防御の観点から重要な役割を担っている免疫系は細胞性免疫と液性免疫の二つに大別される。そのいずれにおいても外来抗原に特異的な T 細胞の活性化およびエフェクター(ヘルパー)機能が不可欠である。どちらの免疫反応が誘導されるかは活性化される T 細胞のヘルパー機能発現の相違による。CD4 陽性ヘルパー T 細胞は、そのサイトカイン産生パターンから主に IFN- γ および IL-2 等を産生する Th1 細胞と IL-4、IL-5 および IL-10 等を産生する Th2 細胞に分類され、Th1 細胞は細胞性免疫を、Th2 細胞は液性免疫の担い手としてヘルパー機能を発揮する。Th1/Th2 細胞の誘導は生体防御機構に重要であるだけでなく、自己免疫疾患およびアレルギー疾患等の発症においても重要であることが知られている。Th1/Th2 細胞の共通の前駆細胞であると考えられているナイーブ T 細胞が抗原刺激を受けて Th1/Th2 細胞へと分化するメカニズムを解明し、Th1/Th2 反応のバランスを調節することは、これらの免疫疾患の発症機序を理解し、新しい治療法を考える上で非常に重要である。本研究は *in vitro* および *in vivo* の検討により、ナイーブ T 細胞から Th1/Th2 細胞の活性化に至る T 細胞の活性化機構と Th1/Th2 型反応の不均衡によって生じるアレルギー性気管支喘息の主症状である肺内好酸球浸潤の病態形成について解析した。

CD4 陽性 T 細胞は活性化の段階によって副刺激の必要性が異なることを明らかにした。すなわち、ナイーブ T 細胞は IL-12 単独では副刺激を与えなかったが、B7-2 からの副刺激と共同して細胞増殖を誘導した。一方、何らかの形で一度活性化したと考えられるメモリー T 細胞は IL-12 および B7-2 それぞれ単独で副刺激を与え、迅速に細胞増殖を誘導したが、B7-2 の副刺激は IL-12 の副刺激を増強しなかった。一方、Th1 細胞に完全に分化した Th1 クローンは B7-2 単独では副刺激を与えなかったが、IL-12 単独で副刺激を与え、B7-2 は IL-12 の作用をさらに増強した。このようにナイーブ T 細胞は Th1 細胞への分化に不可欠な IL-12 に反応するために B7-2 からの副刺激が必要であり、メモリー T 細胞および Th1 クローンの活性化において必ずしも B7-2 からの副刺激は必要でないことを明らかにした。すなわち、ナイーブ T 細胞が活性化し、Th1 細胞へ分化するためには B7-2 および IL-12 からの副刺激の両方が不可欠であることを明らかにした。

実際に抗原提示細胞上で B7-2 が生理的条件下で発現し、機能することを確かめるために、古くから T 細胞の増殖を誘導することが知られている抗 μ 鎖抗体+IFN- γ 活性化 B 細胞を用いて脾臓 T 細胞の増殖反応を検討した。その結果、IFN- γ は抗 μ 鎖抗体活性化 B 細胞上

の B7-2 発現を著しく増強し、T 細胞の増殖を強力に誘導した。中でもナイーブ CD4 陽性 T 細胞は IL-2 産生および細胞増殖反応を強力に誘導し、メモリー T 細胞はナイーブ T 細胞ほど強い増殖反応を誘導しなかった。こうして、ナイーブ T 細胞は Th1 型のサイトカインである IFN- γ と抗原刺激によって活性化した B 細胞上の B7-2 により効果的に活性化し、IL-2 を大量に産生することによって強力な増殖反応を誘導することを明らかにした。一方、メモリー T 細胞は、活性化 B 細胞上の B7-2 を介して CTLA-4 から負の刺激を受け取ることによって IL-2 産生は抑制され、ナイーブ T 細胞ほど強力な増殖反応を誘導しないことを示唆した。

抗原により頻回刺激を受けた結果、ナイーブ T 細胞から分化した Th1 および Th2 クローンを用いて抗 CD3 抗体刺激による反応性の相違を検討した。その結果、Th1 クローンは抗 CD3 抗体刺激により Fyn、ZAP-70 等の protein tyrosine kinase の活性化、PLC- γ 1 の活性化および PIP₂ の分解が誘導された。一方、Th2 クローンではこれらすべての活性化が誘導されなかった。さらに、両クローンは抗 CD3 抗体刺激によって [Ca²⁺]_i 上昇とオシレーションを示したが、Th1 クローンの [Ca²⁺]_i 上昇は herbimycin A 感受性であるのに対し、Th2 クローンの [Ca²⁺]_i 上昇は herbimycin A 非感受性であることを明らかにした。こうして、Th1/Th2 細胞に分化したそれぞれのクローンは、IL-2 および IL-4 産生において全く異なったシグナル伝達経路を使用していることを明らかにした。

Th1/Th2 反応の不均衡によって誘導されるアレルギー性気管支喘息の発症に遺伝的要因が関与するか否かを検討するために、古くから遺伝的に異なる系統として知られる C57BL/6 および DBA/2 マウスを用いて *in vivo* で血中 Ig 産生、Th1/Th2 サイトカイン産生および肺内好酸球浸潤について検討した。その結果、C57BL/6 マウスは DBA/2 マウスに比べて、脾臓でのサイトカイン産生および血中 Ig 産生において Th2 型の反応を示した。さらに、C57BL/6 マウスは肺内で Th2 型のサイトカインを産生し、強力な肺内好酸球浸潤を誘導した。一方、DBA/2 マウスは肺内で Th1 型のサイトカインを産生し、好酸球浸潤を誘導しなかった。こうして遺伝的に異なる二系統のマウスは同環境下で異なった Th1/Th2 反応と好酸球浸潤を誘導することから、遺伝的要因は Th1/Th2 反応とアレルギー性気管支喘息発症に重要な役割をしていることを明らかにした。

遺伝的に Th1 型反応を引き起こしやすいとされる C57BL/6 マウスならびに Th2 型反応を引き起こしやすいとされる BALB/c マウスを用いて、今まで検討されたことのなかった低用量の抗原感作によって両マウスのアレルギー性気管支喘息における反応性を比較した。その結果、C57BL/6 マウスは BALB/c マウスに比べて Th2 型の血中 Ig 産生を誘導し、肺内で Th2 型のサイトカインを産生し、強力な肺内好酸球浸潤を誘導した。一方、BALB/c マウスは Th1 型の血中 Ig 産生を誘導し、肺内で Th1 型のサイトカインを産生し、好酸球浸潤を誘導しなかった。こうして、アレルギー性気管支喘息における肺内好酸球浸潤は遺伝的要因によってのみ決定されるわけではないことを明らかにした。

遺伝的要因以外に感作抗原の用量によって、Th1/Th2 反応および肺内好酸球浸潤は誘導されることが示唆されたため、C57BL/6 マウスおよび BALB/c マウスを用いて幅広い用

量の抗原感作によって Th1/Th2 反応を *in vivo* で比較した。その結果、C57BL/6 マウスは低用量感作において肺内で Th2 型反応を示し、高用量感作では Th1 型反応を示した。逆に、BALB/c マウスは低用量感作において Th1 型反応を示し、高用量感作では Th2 型反応を示した。しかしながら、脾臓での反応は感作抗原の用量に関係なく C57BL/6 マウスでは常に Th1 型、BALB/c マウスでは常に Th2 型反応を示した。すなわち、C57BL/6 マウスと BALB/c マウスの肺内好酸球浸潤に対する反応性の相違は、抗原量に対する Th1/Th2 型サイトカイン産生の相違によって引き起こされることを明らかにした。こうして、遺伝的要因に加え、抗原量によって Th1/Th2 反応は制御されていることを明らかにし、特にアレルギー性気管支喘息の発症を決定づけるのは遺伝的に決められている全身性の反応ではなく、炎症局所である肺内での Th1/Th2 反応の不均衡によって生じることが示唆された。

以上の結果を総括すると、ナイーブ T 細胞は活性化する際に以下の五つの条件によって Th1 あるいは Th2 細胞へと分化することを *in vitro* および *in vivo* 試験によって明らかにした。①活性化する際に共存するサイトカインの種類、②Costimulatory 分子からの刺激の種類、③抗原提示細胞の種類、④遺伝的要因・遺伝的背景、⑤抗原量。さらに、これら五つの条件によって Th1/Th2 型反応の不均衡が生じ、Th2 型反応が優位となった結果、肺内好酸球浸潤は誘導されることを明らかにした。このように、本研究はナイーブ T 細胞から Th1/Th2 細胞の活性化に至る T 細胞の活性化機構と Th1/Th2 型反応の不均衡によって生じるアレルギー性気管支喘息の主症状である肺内好酸球浸潤の病態形成におけるメカニズムの一部を解明した。従って、アレルギー性気管支喘息のメカニズム解明および気管支喘息治療薬の開発に大きく貢献する研究であり、博士(薬学)の授与に値するものと判断した。