

論文の内容の要旨

論文題目 Roles of B7 and IL-12 in the activation of murine CD4⁺ T cells

和 訳 マウスCD4 陽性 T 細胞活性化における B7 と IL-12 の役割

氏 名 五十嵐 脩

(緒言) T細胞の抗原特異的な活性化には、T細胞上の抗原レセプター (TCR) と抗原提示細胞 (APC) 上の抗原/主要組織適合性抗原複合体 (MHC) との結合のみでは不十分であり、APC 由来の他の分子による副刺激が必要である。B7 分子 (B7-1, B7-2) は T細胞上の CD28/CTLA-4 レセプターを介して T細胞活性化、特に T細胞の増殖因子であるインターロイキン (IL)-2 の産生誘導を増幅する副刺激を与える。IL-12 は APC が産生するサイトカインであり、T細胞、特にナイーブ T細胞のTh1 への分化誘導及び Th1 細胞の活性化、特に IL-2 レセプター α 鎖 (CD25) の発現誘導を伴う IL-2 依存的増殖応答の増強に重要な役割を果たしている。したがって、T細胞活性化において B7 と IL-12 が共同作用し得るのかを調べることは非常に興味深い課題である。

最近の研究によって、CD4⁺T細胞の IL-2 依存的増殖応答における B7 副刺激と IL-12 の相乗効果が証明された。しかし、そのメカニズムは解明されていない。本研究はこのメカニズムの解明を目的としている。

(結果と考察) 第1章では、抗原特異的マウス CD4⁺ Th1 クローンを用いて、CD25 発現における B7-1 副刺激と IL-12 の役割についてを調べた。IL-12 を産生しないことで知られる B細胞を APC として Th1 クローンを抗原刺激した場合、IL-12 の添加によって Th1 クローン上に強い CD25 の発現がみられ、この発現は抗 B7-1 抗体の添加により濃度依存的に抑制された。この結果は、IL-12 による Th1 クローンの CD25 発現に B細胞上の B7-1 分子が関与していることを示唆している。さらに、抗 CD3 抗体を用いて Th1 クローンを刺激した場合、B7-1 遺伝子導入 Chinese hamster ovary 細胞 (B7-1-CHO) と IL-12 両方の存在下でのみ、強い CD25 の発現がみられ、この発現は加えた B7-1-CHO の細胞数に依存していた。さらに、この増強は高濃度の IL-2 (B7-1-CHO によって誘導される量の約 3 倍に相当する量) または抗 IL-2 抗体の添加によってほと

んど影響を受けなかった。B7-1-CHO の単独添加は CD25 の発現増強効果を持たなかった。また、IL-12 の単独添加による CD25 発現増強効果は非常に弱く、さらに、この培養液中に高濃度の IL-2 を添加してもこの効果は若干増強されただけであった。一方、IL-2 の産生は B7-1-CHO の添加によって強く増強され、IL-12 はこの増強に影響を与えなかった。観察された B7-1-CHO による CD25 発現及び IL-2 産生の増強は、抗 B7-1 抗体添加により抑制されることから、CHO 上の B7-1 分子が有効な刺激を与えていることが分かった。これらの結果は、1) B7-1 副刺激は Th1 細胞の IL-2 産生増強だけでなく、IL-12 による CD25 の発現を増強する、2) この B7-1 副刺激による CD25 の発現増強は IL-2 によるものではないことを示している。

次に、IL-12 存在下に B7-1-CHO または CHO で Th1 細胞を刺激する際、培養液に免疫抑制剤 FK506 を加えたところ、両刺激下での IL-2 産生は FK506 により転写レベルで抑制された。一方、両刺激下での CD25 発現は、若干低下したものの依然として B7-1 副刺激による増強効果がみられた。この結果は、B7-1 副刺激による CD25 発現増強が IL-2 産生増強とは無関係であることを強く示しているだけでなく、B7-1 副刺激によって誘導される T 細胞内シグナル伝達経路には FK506 感受性及び抵抗性の少なくとも 2 つの経路が存在することを示している。さらに、同条件で刺激された Th1 細胞の増殖応答においても B7-1 副刺激による増強効果がみられた。この増強効果は過剰量の外因性 IL-2 存在下または外因性 IL-2 と FK506 との共存下においても観察されたことから、B7-1 副刺激による CD25 の発現増強が実際に増殖応答の増強において重要であることが分かった。

B7 副刺激は転写レベル及び mRNA 安定化によって T 細胞の IL-2 産生を増強することが知られているが、B7-1 副刺激による CD25 発現増強は転写レベルでのみ確認された。

以上のことから、B7-1 副刺激は、IL-12R の発現、もしくは、それを介したシグナル伝達経路に影響を与えることによって、IL-12 による T 細胞の CD25 発現を増強する可能性が示唆された。

第 2 章では、T 細胞の IL-12R 発現における B7 副刺激の関与を検討した。ここでは、抗原特異的 CD4⁺ Th1 クローンの外に CD4⁺ ナイーブ及びメモリー T 細胞を用いた。Th1 クローンを脾臓付着性細胞 (SAC) を APC として抗原刺激した場合、強い IL-12 結合能がみられ、この結合能は、抗 B7-2 抗体の単独添加により強く抑制された。抗 B7-1 抗体の単独添加は弱い抑制効果を示しただけであるが、抗 B7-1 抗体と抗 B7-2 抗体を共に添加すると、抗 B7-2 抗体の単独添加よりさらに強い抑制効果を示した。同様に、CTLA-4-Ig (B7 分子に対する T 細胞側レセプターであり、B7 分子に対する親和性が CD28 の数十倍高いことから B7/CD28 結合に対する強力な阻害剤として知られる、CTLA-4 と Ig との融合タンパク) の添加も強い抑制効果を示した。ナイーブ及びメモリー T 細胞を抗 CD3 抗体で刺激し、SAC をアクセサリ細胞として添加した場合にも、抗 B7-2 抗体による強い抑制効果が得られた。これらの結果は、SAC 上の B7 分子、特に B7-2 分子が Th1 細胞の IL-12R 発現増強に役割を果たしていることを示している。また、ここで用いた、SAC は B7-2 分子を強く発現していたが、B7-1 分子の発現はごく僅かであった。

次に、T 細胞を抗 CD3 抗体と B7-2-CHO で刺激する系を用いて IL-12R 発現における B7-2 副刺激の役割を調べた。Th1 及びメモリー T 細胞の IL-12 結合能は、抗 CD3 抗体刺激により濃度依存的に増強されたが、B7-2-CHO の添加はさらに強くこの結合能を増強した。また、競合的 RT-PCR 法を用いた IL-12R サブユニット (IL-12Rβ1 及び β2 鎖) mRNA の発現解析により、IL-12Rβ1 及び β2 mRNA の発現増強が上述の IL-12 結合能の増強と相関していることが分かった。これらの結果は、Th1 及びメモリー T 細胞は TCR 刺激のみで IL-12R を発現するが、B7 副刺激はこの発現を増強する作用を持つことを示している。

一方、ナイーブ T 細胞は、単離直後及び無刺激の状態では IL-12 結合能を持たず、高濃度の抗 CD3 抗体刺激を受けても、極く弱い IL-12 結合能しか示さなかった。この細胞は IL-12R β 1 mRNA のみを発現していたことから、この結合は低親和性であると考えられる。B7-2-CHO 刺激はこの IL-12R β 1 mRNA の発現を増強しただけでなく、IL-12R β 2 mRNA の発現を誘導し、これに一致して、強い IL-12 結合能の誘導（メモリー T 細胞と同程度）が観察された。これらの結果から、ナイーブ T 細胞の IL-12R、特にその β 2 鎖の発現には B7-2 副刺激が必須であることが分かった。

以上のことから、B7-2 副刺激は CD4⁺ T 細胞の IL-12R 発現の誘導または増強において重要な役割を果たしていると考えられる。

（結語） 第 1 章及び 2 章で得られた結果から、T 細胞活性化において、B7 副刺激は、IL-2 産生を誘導するだけでなく、IL-12R の発現誘導を介して IL-12 感受性を高めることによって IL-12 による CD25 発現を増強する。その結果、最大限の IL-2 依存的増殖が誘起されるというメカニズムが考えられる。IL-12 がナイーブおよびメモリー T 細胞の Th1 への分化誘導において重要な役割を果たしていることを考慮に入れると、本研究は、T 細胞-APC 相互作用による Th1 細胞分化のメカニズムを理解するうえで重要な知見を与えている。