

論文の内容の要旨

論文題目 ; "IL-12 responsiveness and expression of IL-12 receptor in human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells."

「ヒト末梢血単球由来樹状細胞におけるインターロイキン 12 への反応性とインターロイキン 12 レセプターの発現」

氏名 ; 長山 人三

緒言

樹状細胞 (以下 DC) は生体の免疫系の一時応答に際して重要な役割を果たす抗原提示細胞である。樹状細胞などの抗原提示細胞から分泌されるインターロイキン-12 (以下 IL-12) は、分子量 40kD と 35kD の二種類のサブユニット二量体 (ヘテロダイマー) からなるサイトカインで、脾臓などの T 細胞や NK 細胞からのインターフェロン γ (以下 IFN- γ) を誘導するサイトカインとして知られている。CD4 陽性 T 細胞の中でも IL-2 や IFN- γ を優位に分泌するいわゆるタイプ 1 ヘルパー T 細胞を誘導するため、Th1 サイトカインといわれ、IL-12 の主な標的細胞は Th1 や NK 細胞と考えられていた。

今回私は、ヒト末梢血単球から顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (以下 GM-CSF) とインターロイキン-4 (以下 IL-4) を用いて *in vitro* で誘導した DC が、IL-12 に対するレセプターを発現していることを発見した。すなわち、IL-12 の強力な産生細胞である DC 自身が IL-12 の作用を受ける可能性が示唆された。そこで下流の刺激伝達系と遺伝子の転写・発現について検討を行った。

方法と結果

IL-12 のレセプターは、IL-6 レセプタースーパーファミリー gp130 と相同性が高い IL-12R β 1 と IL-12R β 2 の二種類のサブユニット二量体 (ヘテロダイマー) が既知の中親和性レセプターとして同定されている。今回の実験では健常人ボランティア末梢血由来 T 細胞、マイトジェン ConA 刺激芽球、単球、単球由来 DC について抗ヒト IL-12R β 1 マウスモノクローナル抗体を用いて、フローサイトメトリーを行い、単球由来 DC の細胞表面に、T 細胞・ConA 芽球同様、IL-12R β 1 分子が発言していることを確認した。ただし単球上には IL-12R β 1 の発現は認められなかった。また、その細胞内のメッセージに関して RT-PCR 法を用いて解析を行い、これらいずれの細胞においても IL-12R β 1 と IL-12R β 2 の mRNA が存在することを明らかにした。

引き続き、このレセプターが機能的発現であれば IL-12 刺激の下流で何らかのサイ

[別紙 1]

トカインの転写が起こるはずであると仮定し、単球由来 DC と IL-12 の機能発現が確立している陽性対照の ConA 芽球において、未刺激及び IL-12 刺激による種々のサイトカイン mRNA の発現に関して RT-PCR 法で検討を行った。その結果、単球由来 DC は IL-12 刺激で ConA 芽球同様、GM-CSF, IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ mRNA の転写が起こることが示された (図 1)。

IFN- γ は従来 IL-12 刺激により脾臓などの T/NK 細胞から主に産生されると考えられていた。リンパ球由来 mRNA の混入を除外するために、抗 CD2 と抗 CD19 のモノクローナル抗体によるネガティブセレクションで純化した DC の培養上清において ELISA 法により IFN- γ の分泌を測定すると、単球由来 DC でも ConA 芽球でも未刺激では IFN- γ 産生は認められなかったが、IL-12 刺激で単球由来 DC に ConA 芽球同等の IFN- γ 分泌が認められた。

次に機能的 IL-12 レセプターからの細胞内シグナルについて、免疫沈降・ウェスタンブロット法を用いて解析を行った。サイトカインレセプターからの刺激伝達系は蛋白リン酸化を介して情報が伝達される。IL-12 刺激した単球由来 DC 抽出液を SDS-PAGE で電気泳動して PVDF 膜にトランスファーし抗リン酸化チロシン抗体を用いて ECL 法にて HRP 標識してリン酸化パターンを検討すると、単球由来 DC では IL-12 の濃度依存性に、リン酸化増強が認められた。また、このリン酸化蛋白パターンは対照 ConA 芽球のリン酸化パターンとは明らかに異なっていた。さらに単球由来 DC において IL-12 刺激による蛋白リン酸化は、抗ヒト IL-12R β 1 マウスモノクローナル抗体の添加によって阻害された。

T 細胞や NK 細胞における IL-12 の細胞内情報伝達系において、レセプターと会合するリン酸化蛋白として、チロシンリン酸化酵素の Jak2, Tyk2 と転写因子 Stat3, Stat4 が知られている。なかでも Stat4 は既知のレベルでは他のリガンドが知られておらず、IL-12 特異的に情報伝達と転写開始を行うことが知られている。単球由来 DC 細胞抽出物を、抗ヒト IL-12R β 1 マウスモノクローナル抗体を用いて免疫沈降を行い、各種リン酸化蛋白に対する抗体でブロッティングを行い、IL-12R β 1 と直接会合する分子を検討した。その結果、IL-12R β 1 のバンドに一致して、抗 Jak2 抗体、抗 Tyk2 抗体、抗 Stat3 抗体、及び抗 Stat4 抗体の標識が認められ、これら分子が IL-12R β 1 と直接会合していることが示された (図 2)。

次にこれらチロシンリン酸化酵素や転写因子が IL-12 刺激にてリン酸化されるかどうかを検討した。IL-12 刺激、及び未刺激 DC 由来細胞抽出物を抗 Jak2 \cdot Tyk2 \cdot Stat3 \cdot Stat4 抗体を用いて免疫沈降後、SDS-PAGE にて泳動を行い PVDF 膜にトランスファー後、抗リン酸化抗体および抗 Jak2 \cdot Tyk2 \cdot Stat3 \cdot Stat4 抗体でブロッティングを行った。その結果、未刺激ではこれら分子のリン酸化は認められなかったが、IL-12 刺激によりこれら分子のリン酸化が確認された。

また IFN- γ の産生刺激に関しては、チロシンリン酸化以外に、RAF/MAP キナーゼの関与が指摘されているが、代表的な RAF/MAP キナーゼである p38^{mapk} について検討を行い、IL-12 刺激により p38^{mapk} のリン酸化をウェスタンブロット法で確認した。また p38^{mapk} の基質として知られる ATF-2 が IL-12 刺激後 p38^{mapk} によってリン酸化されることを *in vitro* キナーゼアッセイにて証明した。

[別紙1]

考察

ヒト末梢血単球由来 DC を用いて以下の点が明らかになった。

1. FACS 解析によると DC は IL-12R β 1 を発現している。
2. RT-PCR で DC は IL-12R β 1 と IL-12R β 2 の mRNA を発現している。
3. IL-12 刺激の下流の転写として、RT-PCR で GM-CSF, IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ , 及び IL-12p40 の mRNA が検出された。ただし、IL-12p35 は検出されなかった (図 1)。
4. IFN- γ については ELISA でも蛋白レベルでの産生が確認された。
5. IL-12 刺激により DC の細胞内チロシンリン酸化が濃度依存性に惹起され、その際のリン酸化蛋白バンドは対照の ConA 芽球とはパターンが異なり、抗 IL-12R β 1 抗体で阻害された。
6. IL-12R β 1 と会合する蛋白として Jak2, Tyk2, Stat3, Stat4 が明らかになった。また IL-12R 刺激でこれらチロシンリン酸化酵素・転写因子のリン酸化が惹起された (図 2)。
7. IFN- γ 産生の際に活性化されるとされる p38^{mapk} も IL-12 刺激でリン酸化され酵素活性も *in vitro* で確認された。

以上の結果より DC が機能的 IL-12 レセプターを発現していることが示された。

項目 1, 2 の IL-12R β 1 転写・発現に関して、T 細胞、ConA 芽球、DC では IL-12R β 1 mRNA 発現と IL-12R β 1 の細胞表面発現とが相関していたのに対し、単球では mRNA の発現が見られたのに細胞表面 IL-12R β 1 の発現が欠損していた理由としては、転写以降の機序が関与していると考えられる。

項目 3 の IL-12 産生に関して、Grohmann らはマウスの系で IL-12 刺激により、IL-12 が産生されることから IL-12 の autocrine loop を想定しているが、私の実験では IL-12 の p40 サブユニットは mRNA が確認されたが、IL-12p35 サブユニット mRNA は検出されなかった。Ling らは IL-12p40 サブユニットの二量体 (ホモダイマー) は、機能的 IL-12 ヘテロダイマーに対してレセプターを競合阻害することを報告している。これら結果から、DC において IL-12 刺激は IL-12p40 ホモダイマー産生刺激を介して自己抑制的に働くのではないかと推論した。

また項目 3, 4 の IFN- γ 産生に関して、IFN- γ が樹状細胞から分泌されることは、マウスでは知られていたが、ヒトの系で示されたのは世界で始めてである。すなわち、従来 DC から産生される IL-12 によって脾臓などの T 細胞・NK 細胞から IFN- γ が分泌されると考えられていたが、ヒト単球由来 DC にも IFN- γ 産生能があった。

結語

以上の実験からヒト末梢血単球由来 DC が機能的 IL-12 レセプターを発現し、IL-12 刺激によりさまざまな生理活性を示すことが証明された。

また 免疫系における DC の役割について、ヒト由来 DC で初めて IL-12 刺激によって①Th1 サイトカインでそれ自身抗腫瘍・抗ウイルス活性をもつ IFN- γ の産生や、②自己抑制的に働く IL-12p40 ホモダイマーの産生、などの新たな知見が得られた。

図 1 .

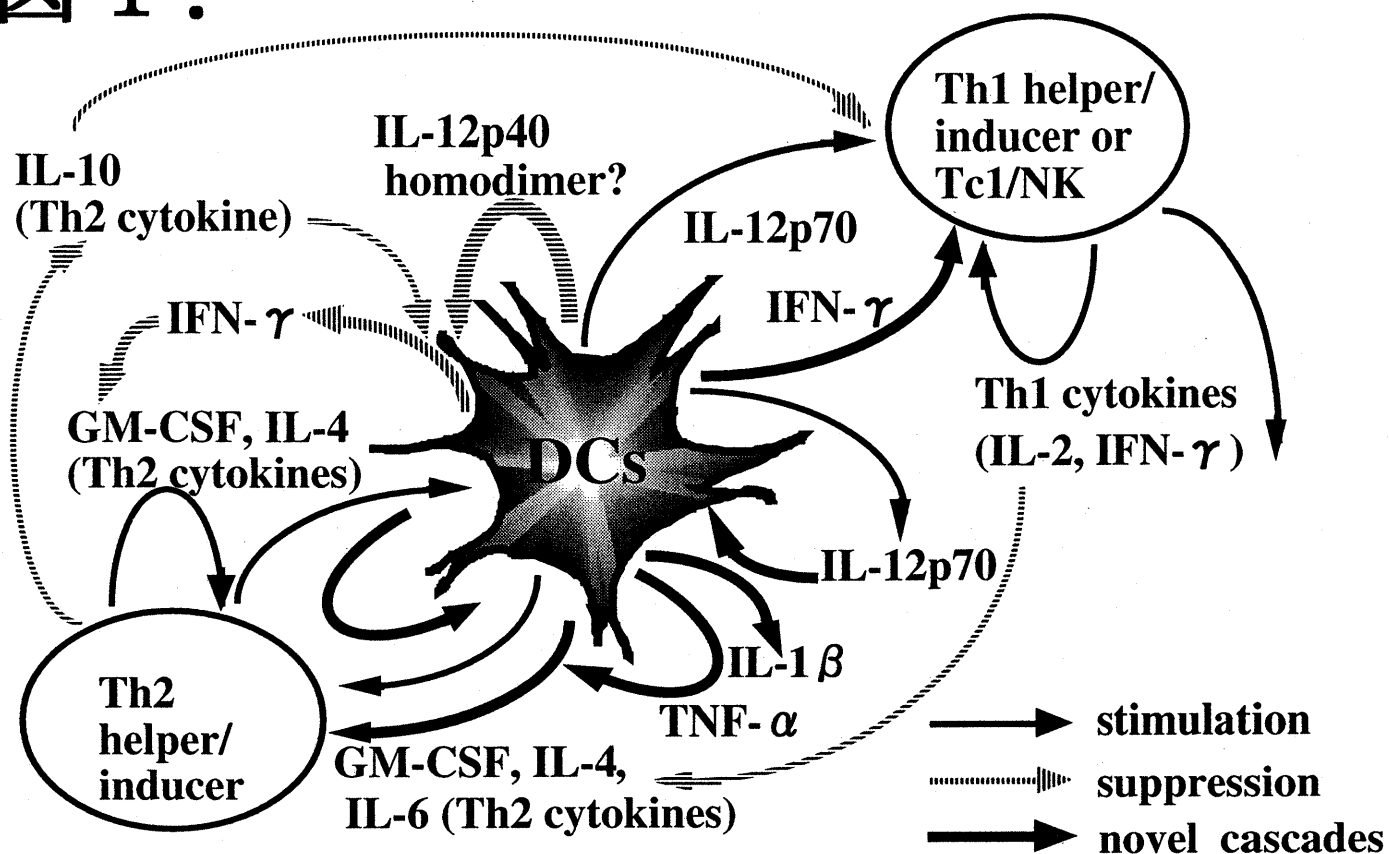


図 2 .

