

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 IFN- α による CD154 分子の発現調節と IFN- γ の産生誘導における役割について

指導教官 山本 一彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士過程

内科学専攻

氏名 渋谷 英樹

IFN- α は、強力な抗ウイルス作用及び、T 細胞や NK 細胞の細胞障害作用の亢進といった様々な免疫調節作用を有する多遺伝子ファミリーに属している。IFN- α はマクロファージ、樹状細胞、そして線維芽細胞などから産生され、特にウイルス感染症時にその産生が著明に亢進し、その様々な免疫調節機能から判断すると、innate immunity と acquired immunity との間の重要な橋渡しとしての役割を演じていることが示唆される。IL-12 と同様、IFN- α もまた STAT4 を活性化させ、ヒトにおいて直接 IFN- γ の産生を誘導することが示されている。

一方 CD40 ligand(CD154)は、TNF(腫瘍壊死因子)スーパーファミリーに属する、33-kDa の分子量を有するタンパク質であり、主として活性化 CD4 陽性 T 細胞に発現する。CD154 とその受容体である CD40 との間の相互作用は様々な免疫反応の調節-例えば T 細胞依存性の B 細胞の活性化、増殖、分化の誘導などに極めて重要な役割を果たす。さらに CD154 は自己免疫疾患の発症に極めて重要な役割を示すことが分かってきている。

これまでの研究で、IL-12 がヒト T 細胞において CD154 の発現を増強することが示されている。それ故、IL-12 によるヒトにおける IFN- γ の産生誘導は、CD154 分子の発現増強と関連性がある可能性が示唆された。しかしながら、ヒト T 細胞において、IL-12 による CD154 発現の増強がどのような機序によって起こっているのか解明されていなかったこともあり、CD154 の発現増強が IFN- γ の産生誘導から引き起こされる結果によるものなのか、あるいは単なる偶然による

ものなのか未だ解明されてはいない。IL-12 が CD154 の発現を増強し、かつ IFN- γ の産生を誘導することが示されている故、IFN- α もヒト T 細胞において CD154 の発現に影響を与える可能性が十分考えられた。実際これまでの研究により、IFN- α が全身性エリテマトーデス(SLE)のような自己免疫疾患の発症の原因となっており、また SLE の発症に CD154 の発現異常が深く関与している可能性があるということが示されている。従って、IFN- α が CD154 の発現を増強する可能性も十分考えられるわけである。しかしながら、これまでヒト T 細胞における CD154 発現に対する IFN- α の影響について調べられた研究は存在しなかった。

そこで、我々は活性化されたヒト CD4 陽性 T 細胞における CD154 の発現に対する IFN- α の影響を調べた。特に注目したのは、IFN- α が CD154 の発現に及ぼす影響のみならず、CD154 の発現と IFN- γ の産生誘導との間に関連性があるのか否かということであった。健康人から得られた高純度の(>96%) CD4 陽性 T 細胞を、IFN- α 、IL-12 の存在、非存在下に固相化抗 CD3 抗体にて刺激した。まず我々は、活性化された CD4 陽性 T 細胞における CD154 の発現に対する IFN- α の影響をタンパクレベルで調べた。IFN- α は固相化抗 CD3 抗体にて活性化された CD4 陽性 T 細胞において、IL-12 の存在、非存在に関係なく刺激 24 時間後の CD154 分子タンパクの発現を抑制するが、刺激 120 時間後の CD154 タンパクの発現を、IFN- α の濃度 1×10^2 IU/ml から 1×10^5 IU/ml の間において濃度依存的に増強した。注目すべきことに、IFN- α は CD154 の発現増強に最大の効果を示した濃度の IL-12 (10 ng/ml) の存在下においてすら、固相化抗 CD3 抗体にて 120 時間刺激された CD4 陽性 T 細胞における CD154 の発現をさらに増強した。すなわち、IFN- α は IL-12 の存在、非存在に無関係にヒト CD4 陽性 T 細胞における CD154 の発現に対し、細胞の活性化状態に依存して二相性の影響を与えるということを示した。IFN- α が CD154 の発現を増強する機序は、IL-12 のそれとは異なると考えられた。

次に固相化抗 CD3 抗体にて活性化された CD4 陽性 T 細胞における CD154 mRNA の発現に対する IFN- α の影響を、半定量 RT-PCR 及びリアルタイム定量 PCR を行うことで調べた。IFN- α は刺激 24 時間後において、IL-12 の存在、非存在に関係なく CD154 mRNA 発現を有意に抑制するが、刺激 72 時間後においては IL-12 の存在下においてすら、活性化された CD4 陽性 T 細胞における CD154 mRNA の発現を有意に増強しており、その効果は刺激 120 時間後においても認められた。つまり、IFN- α は固相化抗 CD3 抗体にて刺激された CD4 陽性 T 細胞の活性化状態に依存して、CD154 mRNA の発現に対しても二相性の影響を与えた。ここでも、IFN- α と IL-12 はヒト CD4 陽性 T 細胞における CD154 の発現を異なる機序によって増強する可能性を強く示唆した。それでもなお、IFN- α は機能的 IL-12 受容体の発現及び高親和性 IL-12 結合の誘導にきわめて重要である IL-12R β 2 サブユニットの mRNA の発現を、固相化抗 CD3 抗体にて刺激された CD4 陽性 T 細胞において刺激 24 時間後から 120 時間後に至るまで有意に増強したため、IFN- α が IL-12 の作用に依存した機序により CD4 陽性 T 細胞における CD154 の発現を増強する可能性が残された。しかしながら、刺激 120 時

間後に至るまで CD4 陽性 T 細胞の培養上清中には IL-12 の存在は認められなかった。その上、抗 IL-12 中和抗体は IL-12 による CD154 タンパク発現の増強を完全に抑制したが、IFN- α を介した CD154 タンパク発現の増強には何ら影響を与えなかった。したがって、IFN- α はそれ自身の CD4 陽性 T 細胞に対する直接の作用を通じて CD154 の発現を増強するということを裏付けることになった。

次に、固相化抗 CD3 抗体にて刺激された CD4 陽性 T 細胞における IFN- γ の発現に対する IFN- α の影響について調べた。IFN- α は固相化抗 CD3 抗体にて刺激された CD4 陽性 T 細胞における IFN- γ の発現をタンパク、mRNA レベル共に刺激 24 時間後から 120 時間後に至るまで全く増強しなかった。一方、IL-12 は有意に IFN- γ タンパク及び mRNA の発現を増強した。注目すべきことに、IFN- α は外因性 IL-12 の非存在下においても CD154 の発現を増強したが、IFN- γ タンパク及び mRNA の発現は外因性 IL-12 の存在下においてのみ有意に増強した。すなわち、固相化抗 CD3 抗体にて刺激を受けた CD4 陽性 T 細胞における IFN- α による IFN- γ 産生の増強には IL-12 の存在を必要としており、一方 IFN- α による CD154 発現の増強には IL-12 の存在を必要としないことを示した。つまり、IFN- α は固相化抗 CD3 抗体により活性化された CD4 陽性 T 細胞において CD154 の発現を IFN- γ の産生誘導とは全く無関係に増強する可能性があり、かつ IFN- γ の産生誘導のためには IL-12 の存在が必要であるということを示唆した。

上記、IFN- α や IL-12 による固相化抗 CD3 抗体により刺激された CD4 陽性 T 細胞における CD154 mRNA 発現の増強が、CD154 mRNA の安定性を増強することによるものかどうかについて調べるために、CD4 陽性 T 細胞を IFN- α 、IL-12 の存在、非存在下に 48 時間及び 96 時間、固相化抗 CD3 抗体にて刺激した後、転写阻害剤 actinomycin D(10 μ g/ml)を添加し、種々の時間の経過後に細胞を回収し、半定量 RT-PCR を行った。その結果、IFN- α 、IL-12 共に固相化抗 CD3 抗体にて刺激された CD4 陽性 T 細胞における CD154 mRNA の分解速度に対し有意な影響を与えず、IFN- α 及び IL-12 は活性化された CD4 陽性 T 細胞において CD154 mRNA の安定性には影響を及ぼさないことを示した。そこで、IFN- α 及び IL-12 による CD154 mRNA の発現増強が転写の活性化によるものであるか否かを調べるために、ヒト白血病系 T 細胞株 Jurkat 細胞にヒト CD154 プロモーター領域を含むルシフェラーゼベクターをトランスフェクションし、IFN- α 、IL-12 の存在、非存在下に培養を行い、その後ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、IL-12 のみならず IFN- α も CD154 プロモーター領域をトランスフェクトされた Jurkat 細胞において、ルシフェラーゼ活性を有意に増強した。注目すべきことに、IFN- α は IL-12 の存在下においてもルシフェラーゼ活性を有意に増強した。すなわち、IFN- α と IL-12 は CD154 mRNA の転写活性を増強することにより、固相化抗 CD3 抗体にて活性化された CD4 陽性 T 細胞における CD154 mRNA の発現を増強することを強く示唆した。

最後に、ヒト CD4 陽性 T 細胞に対し固相化抗 CD3 抗体のみならず可溶化抗 CD28 抗体を添加することで、T 細胞上に存在する CD28 分子を介しての刺激をも加えることにより、T 細胞に対し最大限の刺激を加えた状態で CD154 及び

IFN- γ の発現に対する IFN- α の影響を調べた。CD28 副刺激による CD154 タンパク発現の増強は、刺激 24 時間後には有意ではなかったが、刺激 72 時間後以降においては著明であった。注目すべきことに、CD28 副刺激の存在下においても固相化抗 CD3 抗体のみによる刺激の場合と同様、IFN- α は刺激 120 時間後において CD154 タンパクの発現を有意に増強した。一方、CD28 副刺激による CD154 mRNA 発現の増強は、刺激 24 時間後の時点において既に認められ、120 時間後に至るまでその増強は続いた。注目すべきことに、IFN- α は最大限の CD28 副刺激の存在下においてすら刺激 72 時間及び 120 時間後における CD154 mRNA の発現をさらに増強した。一方においては、IFN- α は CD28 副刺激の存在下においても刺激 24 時間後の CD154 mRNA の発現を抑制した。すなわち、IFN- α は CD28 副刺激とは異なった機序により CD154 の発現を増強することを示唆した。他方 CD28 副刺激は、固相化抗 CD3 抗体にて活性化された CD4 陽性 T 細胞における IFN- γ の発現をタンパク、mRNA 共に有意に増強した。注目すべきことに、IFN- α は IL-12 が存在しない状態においては、CD28 副刺激が存在しているも固相化抗 CD3 抗体により活性化された CD4 陽性 T 細胞における IFN- γ タンパク及び mRNA の発現に対し、刺激 24 時間後から 120 時間後に至るまでなんら影響を与えなかった。つまり、IFN- γ の産生を最適に誘導するためには、CD28 副刺激が存在しているも IL-12 の存在が必須であることを示した。

まとめると、IFN- α は固相化抗 CD3 抗体にて刺激された CD4 陽性 T 細胞の初期活性化段階において CD154 の発現を抑制するが、その後の活性化段階において IL-12 や CD28 副刺激とは異なった機序により、CD154 mRNA の転写を増強することにより CD154 の発現を増強することを示した。さらに、IFN- α は IL-12 の存在なくしては固相化抗 CD3 抗体にて刺激された CD4 陽性 T 細胞における IFN- γ の発現には影響を及ぼさず、IFN- α は IFN- γ の産生誘導とは全く無関係に活性化されたヒト CD4 陽性 T 細胞における CD154 の発現を増強することを明らかにした。