

## 論文内容の要旨

論文題目 The role of inflammatory cytokines as regulators of the immune system  
(免疫応答調節因子としての炎症性サイトカインの機能解析)

氏名 南部 あや

### 【緒言】

サイトカインとは、細胞から放出されて造血系、内分泌系、神経系、免疫系など、さまざまな細胞間での主要な情報交換を担う、多種多様なタンパク質性のホルモンの総称である。サイトカインを炎症制御の観点から大別すると、IL-1、IL-6、IL-16 といった炎症性サイトカイン、transforming factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )、IL-10、IL-1Ra などの抗炎症性サイトカインのグループに分けられる。近年、これらのサイトカインの中で、炎症の制御だけでなく、免疫機構を調節するような性格を持つものも報告されてきている。申請者は、自己免疫疾患や感染症を制御する免疫機構に関心を持ち、これらの疾患に重要な役割を果たすことが知られている炎症性サイトカインである IL-1 と IL-16 が、炎症性サイトカインとしてだけでなく、T 細胞に対する免疫調節サイトカインとしての機能を持つことに着目して解析を行った。

### 遅延型過敏症反応における IL-1 の機能解析

#### 【背景と目的】

IL-1 は炎症の惹起や免疫系の活性化を通して外来抗原からの生体防御に重要な役割を持つサイトカインである。IL-1 には IL-1 $\alpha$  と IL-1 $\beta$  が存在し、同一のレセプター IL-1RI

に結合してほぼ同様な生理活性を示す。一方、IL-1 の作用を阻害する分子として IL-1RI に結合しても生理活性を示さない IL-1 レセプターアンタゴニスト(IL-1Ra)や、IL-1 $\alpha$ / $\beta$  が結合してもシグナルを伝達しない IL-1RII が生体内に存在する。

IL-1 は炎症性免疫応答の一つである DTH 反応の発症に深く関わりとされる。DTH はアレルゲン特異的な CD4<sup>+</sup> T 細胞の活性化と炎症局所への浸潤を介して誘導される。このとき、IL-1 はリンパ球活性化因子としてアレルゲン特異的な CD4<sup>+</sup> T 細胞の活性化に関わるのか、または炎症性サイトカインとして局所への細胞浸潤を伴う炎症の惹起に関与するのか不明であり、また、IL-1 $\alpha$ と IL-1 $\beta$ の個々の機能分担についても明らかになっていない。本研究では第一章において DTH の発症機構における IL-1 の役割を IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-1 $\alpha$ / $\beta$ 、IL-1Ra 及び IL-1RI 遺伝子欠損マウス(KO)を用いて明らかにすることを試みた。

### 【実験方法】

アレルゲンとしてメチル化 BSA (mBSA) を完全フロイントアジュバント (CFA) とともに野生型マウス (WT) と KO に腹腔内免疫した。一週間後に一方の足蹠に mBSA を投与して DTH 反応を誘導し、もう一方にはコントロールとして PBS を投与した。24 時間後足蹠の厚さをノギスで測定して DTH 反応を評価し、その局所への浸潤細胞の病理像はヘマトキシリン/エオジン染色で観察した。免疫細胞の活性化への関与を評価するために、mBSA 特異的なリンパ節細胞の増殖応答を<sup>3</sup>H]-チミジンの取り込み量を指標に測定し、同時に、培養上清中のサイトカイン産生量を ELISA 法で定量した。また、mBSA 感作マウスの血中の mBSA 特異的な抗体価を ELISA 法で定量した。抗原感作した WT、KO からリンパ節由来 CD4<sup>+</sup>T 細胞を調製し、未感作の WT に移入して (WT の T 細胞→WT、KO の T 細胞→WT) DTH 反応を誘導することによって抗原特異的な T 細胞の活性化における IL-1 の必要性を評価した。また、炎症局所での IL-1 の要求性を評価するために、抗原感作した WT の CD4<sup>+</sup>T 細胞を WT、KO に移入して (WT の T 細胞→WT、WT の T 細胞→KO) DTH 反応を誘導した。

### 【結果と考察】

IL-1 $\alpha$ / $\beta$  及び IL-1RI KO では、足蹠の腫れは有意に抑制され、IL-1Ra KO では有意に腫れが亢進した。病理像からは足蹠への T 細胞やマクロファージといった炎症性細胞の浸潤が IL-1 $\alpha$ / $\beta$  及び IL-1RI KO では減少、IL-1Ra KO では増加していた。また、IL-1 $\alpha$ / $\beta$  及び IL-1RI KO のリンパ節細胞の増殖能は WT に比べて低下し、IL-1Ra KO では増強していた。培養上清中のインターフェロン $\gamma$  産生量も増殖能と同様の傾向を示した。血中の抗原特異的な抗体価も WT に対し IL-1 $\alpha$ / $\beta$  及び IL-1RI KO では有意に低く、IL-1Ra KO マウスでは有意に高かった。細胞移入実験の結果は、WT の T 細胞→WT に

比べ、IL-1 $\alpha$ / $\beta$  KO の T 細胞 $\rightarrow$ WT では DTH 反応が有意に抑制され、逆に IL-1Ra KO の T 細胞 $\rightarrow$ WT は亢進した。また、WT の T 細胞 $\rightarrow$ WT と WT の T 細胞 $\rightarrow$ IL-1 $\alpha$ / $\beta$  KO の間に差は見られなかったのに対し、WT の T 細胞 $\rightarrow$ IL-1RI KO では抑制され、WT の T 細胞 $\rightarrow$ IL-1Ra KO では亢進した。以上の結果から、IL-1 はアレルゲン感作時のアレルゲン特異的な T 細胞の活性化に必須であり、IL-1Ra はその作用を調節することで DTH 反応を抑制することが示された。一方、アレルゲンの再感作による炎症誘導期では、再活性化した記憶 T 細胞から供給される IL-1 が抗原提示細胞に作用することによって、T 細胞自身の増殖に必要であることがわかった。

また、IL-1 $\alpha$  では足蹠の腫れは WT と同程度であったのに対し、IL-1 $\beta$  KO では抑制された。これらの結果から、DTH 反応には IL-1 $\alpha$  ではなく IL-1 $\beta$  が深く関わることを明らかとなった。さらに、IL-1 と TNF を同時に欠損させたマウスを用いた実験から、DTH 反応における TNF の産生は IL-1 に強く依存することが示された。

以上の結果から、IL-1 は炎症性サイトカインとして局所での炎症の亢進への関与だけでなく、アレルゲン感作時のアレルゲン特異的な T 細胞及び B 細胞の活性化に必須なリンパ球活性化因子としての役割を持ち、通常 IL-1Ra はその作用を調節することによって DTH に対し抑制的に働くことが明らかになった。

### T 細胞の活性化における IL-16 の機能解析

#### **【背景と目的】**

IL-16 はリンパ球の活性化と抑制作用の二面性を有するサイトカインであり、CD4<sup>+</sup>T 細胞に対する遊走活性を持つ因子である。生体内では HIV の感染及び複製や関節炎には抑制的に働く一方で、DTH や慢性炎症性大腸炎(IBD)、気道過敏症(AHR)の発症には増悪化に作用することが示唆されるなど、様々な疾患に関与することがわかってきているが、その多くの作用機序が未知である。そこで、IL-16 KO を作製し、IL-16 が果たす役割を明らかにすることを試みた。

#### **【実験方法】**

IL-16 の細胞外に分泌される部分の両端に loxP 配列を挿入し、Cre による組換え反応によって、IL-16 を欠損させるようなターゲティングベクターを作成した。このベクターにより相同組換えをおこした ES 細胞に対し、Cre 発現アデノウイルスを感染させ、loxP 配列の組換えに成功したクローンを得た。また、この ES 細胞由来の IL-16KO を作製し、C57BL/6J もしくは BALB/cA 背景へ 8 代戻し交配し、解析に使用した。

T 細胞の活性化における IL-16 の機能を評価するため、WT、IL-16KO からそれぞれ MACS カラムにより分離した T 細胞を抗 CD3 抗体のみ、もしくはマウス IL-16 共存下

にて 48 時間培養後、増殖応答を<sup>3</sup>H]-チミジンの取り込み量を指標に測定した。また、抗 CD3 抗体による活性化誘導細胞死(Activation induced cell death; AICD)における IL-16 欠損の影響を評価するため、WT、IL-16KO それぞれの T 細胞を抗 CD3 抗体で刺激後、0、24、48 時間後に AnnexinV/PI によりその細胞死を評価した。

IL-16 のリンパ球発生・分化における機能を解析するため、WT、IL-16KO から採取した脾臓細胞中の各リンパ球存在比を FACS にて評価した。

### 【結果と考察】

IL-16 の T 細胞に対する機能に関して、活性化と抑制に関与するという、相反する報告がなされているが、本研究では T 細胞に対する IL-16 の機能を明らかにすべく、IL-16KO を作製し、解析した。IL-16KO はメンデル比に従って正常に生まれ、野生型に比べて外見上特筆すべき表現型を示さなかった。

IL-16KO の T 細胞の抗 CD3 抗体による増殖活性は、亢進していたが、抗 CD3 抗体刺激と同時に IL-16 を培養上清に添加することによって WT と同程度まで増殖が回復した。また、このときの AICD は WT と IL-16KO で同程度であり、IL-16 欠損による過剰な細胞増殖は AICD の抑制によるものではないことが示された。

さらに、WT と IL-16KO では T 細胞中の CD4、CD8 陽性細胞の比率や、記憶・未感作 T 細胞の比率にも違いはみられなかった。よって、IL-16 の欠損は T 細胞の発生・分化に影響を与えないと同時に、抗 CD3 抗体刺激に伴う過増殖は T 細胞の発生・分化の異常によるものではないということも明らかになった。

これらの結果から、IL-16 は T 細胞の増殖を抑制する活性を持つことが明らかとなったが、その一方で、その詳細なメカニズムは不明であり、今後のさらなる解析が必要である。

### 【結語】

本研究は、炎症を誘導するサイトカインの免疫機構を制御する調節因子としての一面を明らかにすることを目的に行った。その結果、IL-1 は炎症局所への炎症細胞の誘導と活性化以外に、T 細胞の免疫成立とその二次増殖において重要な調節因子として機能することが明らかとなり、また IL-16 は炎症局所への細胞遊走のほかに T 細胞の活性化を制御していることがわかった。本研究では、免疫機構調節因子としての機能の一部を明らかにしたが、これらサイトカインの機能発現は時空間的に複雑に制御されており、今後もさらに多くの機能を発見・解析し、この複雑な機構を詳細に理解することによって、新しい治療標的を得ることができ、治療に役立つことが期待される。