



# IL-12 promotes the accessory cell function of epidermal Langerhans cells

末本, 保雄

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1998-11-11

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2280

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002280>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	<sup>すえ</sup> 末 <sup>もと</sup> 本 <sup>やす</sup> 保 <sup>お</sup> 雄（岡山県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	博ろ第1659号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与の日付	平成10年11月11日
学位論文題目	IL-12 promotes the accessory cell function of epidermal Langerhans cells (IL-12は表皮ランゲルハンス細胞のアクセサリ機能を高める)
審査委員	主査 教授 市橋 正光 教授 堀田 博 教授 熊谷 俊一

## 論文内容の要旨

## [序文]

皮膚の免疫反応は、様々な細胞と免疫調節因子（神経ペプチドやサイトカイン）によって制御されている。大部分のサイトカイン（interleukin, interferon, tumor necrosis factor, colony stimulating factor 及び growth factor）は、生理的もしくは病的状態で皮膚において検出される。例えば炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , 及び GM-CSF は、ランゲルハンス細胞を強力な抗原提示細胞へと成熟させることが報告されている。また contact hypersensitivity（以下 CHS と略す）において、表皮ランゲルハンス細胞が抗原提示細胞として、Th1 細胞がエフェクター細胞として働いている。CHS 反応の感作及び誘発において、ケラチノサイトやランゲルハンス細胞より生産される IL-12が重要な役割を果たしている。一方紫外線照射により表皮細胞から産生される IL-10は、CHS 反応の感作及び誘発を抑制することが知られている。

IFN- $\gamma$  は、T 細胞が関与する免疫反応において中心的な役割を果たしている。IL-12及び IL-18は、強く IFN- $\gamma$  産生を誘導することが知られている。Stoll らは、ハプテン刺激したマウスケラチノサイトから IL-18mRNA 及び機能的タンパク質が産生されることを報告している。しかし皮膚の免疫反応に関与するサイトカインが、表皮細胞のアクセサリ機能に及ぼす影響については十分には解明されていない。

本研究では表皮細胞のアクセサリ機能に対する各種サイトカインの作用を調べたところ、IL-12に表皮細胞のアクセサリ機能を高める作用が認められ、さらに IL-12の作用メカニズムの解析も試みた。

## [方法]

BALB/c マウスの耳を、トリプシン及び DNase 処理して表皮細胞を回収した。表皮細胞は、調整日の翌日より37℃で48時間、各種サイトカインで処理した。サイトカイン処理した表皮細胞は、よく洗浄し、マイトマイシン C 処理した後、C3 H/HeN マウスの脾臓由来 T 細胞（ナイロンウールカラムにより精製）と共培養した（アロジェニック mixed epidermal cell-lymphocyte reaction, 以下 MECLR

と略す)。

各種サイトカインで前処理した表皮細胞のアクセサリ機能は、MECLR系を用い、T細胞増殖、IFN- $\gamma$ 産生及びIL-4産生(開始72時間後の培養上清中)に対する影響を調べた。

#### [結果]

#### 1. 表皮細胞のアクセサリ機能に対する各種サイトカインの作用

IL-12 1-100ng/mlで前処理した表皮細胞は、MECLRにおいてIL-12の用量依存的にIFN- $\gamma$ 産生を増大させた。IFN- $\gamma$ 100ng/mlで前処理した表皮細胞も、MECLRにおいてIFN- $\gamma$ 産生を約3倍増大させた。しかしいずれの場合においても、T細胞増殖は影響を受けずIL-4産生も認められなかった。一方表皮細胞を、IL-18, GM-CSF, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10, GM-CSF+IL-1 $\beta$ , 及びGM-CSF+IL-1 $\beta$ +TNF- $\alpha$ +IL-4で前処理した場合は、MECLRにおけるT細胞増殖、IFN- $\gamma$ 産生及びIL-4産生に影響を与えなかった。

#### 2. 表皮細胞に対するIL-12の作用におけるIFN- $\gamma$ の関与

IL-12及びIFN- $\gamma$ が表皮細胞のアクセサリ機能を亢進させたという我々の結果と、IL-12はIFN- $\gamma$ 産生を介するとの報告から、表皮細胞に対するIL-12の作用がIFN- $\gamma$ 産生を介するものかどうかを調べた。

IL-12で処理した表皮細胞の培養上清中にIFN- $\gamma$ は検出できなかった。そこで、表皮細胞にIL-12 100ng/mlと抗IFN- $\gamma$ 抗体を加え48時間培養した後に、MECLRを行った。表皮細胞をIL-12+抗IFN- $\gamma$ で前処理するとMECLRにおけるIFN- $\gamma$ 産生は、IL-12単独処理と比べて約16%減少した。従ってIL-12の作用は、大部分がIFN- $\gamma$ 産生を介さないことが分かった。

#### 3. 表皮細胞のMHC class II, CD80及びCD86分子の発現に対するIL-12の作用

抗原提示細胞の機能は、MHC class II及びcostimulatory分子の発現に依存すると報告されていることから、IL-12 100ng/mlで処理した表皮細胞のMHC class II, CD80及びCD86分子の発現をFACSにより調べた。

IL-12処理した表皮細胞において、MHC class II, CD80及びCD86分子を発現している細胞の割合と、これら分子の発現強度は、無処理細胞のそれとほぼ同じであった。一方この時のIL-12で前処理した表皮細胞は、MECLRにおいてIFN- $\gamma$ 産生を増大させていた。

#### 4. MECLRにおいてIFN- $\gamma$ 産生を亢進させるメディエーターの解析

IL-12で前処理した表皮細胞を含むMECLRにおけるIFN- $\gamma$ 産生亢進に、IFN- $\gamma$ 産生を誘導するIL-12及びIL-18が関与しているかどうかを調べるために、MECLR系へ抗IL-12抗体もしくはIL-18抗体を加えた。

抗IL-12もしくは抗IL-18の添加によって、亢進しているIFN- $\gamma$ 産生はそれぞれ約90%と約16%制御された。この時抗体添加によってT細胞増殖及びIL-4産生は影響を受けなかった。従ってMECLRにおいて亢進しているIFN- $\gamma$ 産生は、大部分が内因性のIL-12によるものであり、内因性のIL-18も一部関与していることが分かった。

#### 5. IL-12の作用発現におけるランゲルハンス細胞の関与

マウスMECLRにおいてT細胞増殖を指標にした場合、ランゲルハンス細胞がステイミューレーター細胞として働くことが報告されている。IL-12が表皮細胞中のどの細胞に作用するかを調べるために、表皮細胞を抗MHC class II抗体+補体で処理した後、IL-12と培養してMECLRを行った。

その結果、ランゲルハンス細胞の割合は11.2%から0.2%に減少し、MECLRにおけるIFN- $\gamma$ 産生亢進はほとんど認められなくなった。従ってIL-12の作用発現においてランゲルハンス細胞が必要

であることが分かった。

#### [考察]

我々は IL-12 がランゲルハンス細胞のアクセサリー機能を高め、その結果として MECLR において T 細胞増殖には影響を与えないが、IFN- $\gamma$  産生を増大させることを示した。IL-12 は、T 細胞や NK 細胞に作用し IFN- $\gamma$  産生を誘導することがよく知られている。しかし表皮細胞中に混入する可能性のあるこれらの細胞が、MECLR において IFN- $\gamma$  産生を増大させることは、IL-12 の作用が IFN- $\gamma$  非依存性であること及び表皮細胞のみでは IFN- $\gamma$  産生が認められないことから考えにくい。

Goodman らは、IFN- $\gamma$  で処理したケラチノサイトをアクセサリー細胞として用いた場合、プロフェッショナルな抗原提示細胞を用いた時に比べて T 細胞からの IFN- $\gamma$  産生のみが抑制されることを報告しており、IL-12 がケラチノサイトに作用する可能性は低い。さらに IL-12 で処理する前に表皮細胞からランゲルハンス細胞を除くと、MECLR における IFN- $\gamma$  産生亢進は認められなくなり、IL-12 は表皮細胞中のランゲルハンス細胞のアクセサリー機能を高めると考えられる。

IL-12 で処理した表皮細胞において、MHC class II、CD80 及び CD86 分子の発現に明確な変化は認められなかった。IL-12 で前処理した表皮細胞を含む MECLR における IFN- $\gamma$  産生亢進は、MECLR 系への抗 IL-12 抗体の添加により大きく制御されており、MECLR 時に内因性の IL-12 産生が起きていると考えられる。活性化された T 細胞は、CD40 と CD40 リガンドの相互作用により抗原提示細胞から IL-12 を産生させることが報告されている。試験的に IL-12 で前処理した表皮細胞を含む MECLR 系へ抗 CD40 リガンド抗体を加えたが、IFN- $\gamma$  産生は制御されなかった。

アロジェニック MECLR に比べてシンジェニック MECLR は、その反応性が低いと報告されていることから、我々はアロジェニック MECLR を採用した。一方成熟したランゲルハンス細胞は、アロジェニック T 細胞のみならず自己 T 細胞も活性化できると報告されていることから、IL-12 で前処理した表皮細胞のシンジェニック T 細胞に対する反応性も調べた。IL-12 で前処理した表皮細胞は、シンジェニック MECLR においても IFN- $\gamma$  産生を増大させたが、そのレベルはアロジェニックの場合よりも低いものであった（シンジェニック及びアロジェニック MECLR における IFN- $\gamma$  産生は、それぞれ 12.2 IU/ml と 53.3 IU/ml）。

IL-12 は、CHS やアトピー性皮膚炎のような炎症性疾患において産生されることが報告されている。また IL-12 は、CHS 反応を指標にした場合、紫外線による免疫抑制及びハプテン特異的トレランスを改善することが報告されている。CHS において Th 1 細胞がエフェクター細胞として働いているが、Th 1 細胞誘導のメカニズムは解明されていない。さらに紫外線照射された個体では、ランゲルハンス細胞が T 細胞を活性化できなくなると考えられている。IL-12 で前処理した表皮細胞がシンジェニック及びアロジェニック T 細胞を活性化したことは、Th 1 細胞の誘導及び免疫抑制からの回復のメカニズムを解明できるかもしれない。すなわち、何らかの刺激によって産生された IL-12 が、ランゲルハンス細胞（紫外線により機能の低下した場合も含む）に働きアクセサリー機能を高める；活性化されたランゲルハンス細胞は、所属リンパ節において T 細胞に働き IFN- $\gamma$  産生を誘導する；産生された IFN- $\gamma$  は、Th 1 細胞を誘導する。

#### [結論]

IL-12 は表皮ランゲルハンス細胞のアクセサリー機能を高め、その結果として MECLR において、内因性の IL-12 産生を介して T 細胞からの IFN- $\gamma$  産生を増大させた。

## 論文審査の結果の要旨

### [目的]

Contact hypersensitivity (以下 CHS と略す) 反応の感作及び誘発において、ケラチノサイト及びランゲルハンス細胞より生産される IL-12が重要な役割を果たしている。IL-12は、T細胞及びNK細胞に作用し IFN- $\gamma$  産生を誘導することがよく知られているが、表皮細胞のアクセサリ機能に対する作用は、調べられていない。本研究では IL-12に表皮細胞のアクセサリ機能を高める作用を見出し、さらに IL-12の作用メカニズムの解析も試みた。

### [方法及び結果]

(1) IL-12 1~100ng/ml で前処置した表皮細胞は、アロジェニック mixed epidermal cell-lymphocyte reaction (以下 MECLR と略す) において IL-12の用量依存的に IFN- $\gamma$  産生を増大させた。この時 T細胞増殖は影響を受けず、IL-4 産生も認められなかった。

(2) 表皮細胞を IL-12+抗 IFN- $\gamma$  抗体で前処理すると、MECLR における IFN- $\gamma$  産生は、IL-12単独処理と比べて約16%減少した。

(3) IL-12処理した表皮細胞において、MHC class II, CD80及び CD86分子を発現している細胞の割合と、これら分子の発現強度は、無処理細胞のそれとほぼ同じであった。

(4) MECLR 系へ抗 IL-12抗体もしくは抗 IL-18抗体を加えると、亢進している IFN- $\gamma$  産生はそれぞれ約90%と約16%制御された。この時抗体添加によって、T細胞増殖及び IL-4 産生は影響を受けなかった。

(5) 表皮細胞を抗 MHC class II 抗体+補体で処理した後、IL-12と培養して MECLR を行ったところ、ランゲルハンス細胞の割合は11.2%から0.2%に減少し、MECLR における IFN- $\gamma$  産生亢進はほとんど認められなくなった。

(6) IL-12で前処理した表皮細胞は、シンジェニック MECLR においても IFN- $\gamma$  産生を増大させたが、そのレベルはアロジェニックの場合よりも低いものであった。

### [考察]

以上の結果より IL-12は、表皮ランゲルハンス細胞のアクセサリ機能を高め、その結果として MECLR において、内因性の IL-12産生を介して T細胞からの IFN- $\gamma$  産生を増大させることが示唆された。

一方、紫外線照射された個体では、ランゲルハンス細胞が T細胞を活性化できなくなると考えられている。

また、IL-12は CHS 反応を指標にした場合、紫外線による免疫抑制及びハプテン特異的トレランスを改善することが報告されている。

本研究結果は、IL-12で前処理した表皮細胞が T細胞を活性化することを示しており、IL-12が Th1 細胞の誘導及び免疫抑制からの回復に関与していることを強く示唆している。