



## Deficient Th1-type immune responses via impaired CD28 signaling in ultraviolet B-induced systemic immunosuppression and the restorative effect of IL-12

安藤, 理

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2000-07-12

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2426

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002426>

※ 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)	あん どう 安 藤 理	(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1742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12年7月12日	
学位論文題目	Deficient Th1-type immune responses via impaired CD28 signaling in ultraviolet B-induced systemic immunosuppression and the restorative effect of IL-12 (紫外線B誘導全身性免疫抑制におけるCD28シグナル低下による 不完全Th1タイプ免疫反応と、IL-12の回復効果)	
審査委員	主査 教授 市橋正光 教授 熊谷俊一 教授 堀田博	

### 論文内容の要旨

#### (序文)

紫外線B照射の生物学的影響に関しては、変異誘導や発ガンの要因としての研究に始まり、免疫抑制の誘導作用についての研究も盛んに行なわれている。紫外線B照射は、Th1タイプの免疫反応、例えば接触過敏反応や遅延型過敏反応のような細胞が関与する免疫反応を顕著に抑制し、また、抗原特異的な免疫寛容をも誘導する。紫外線B照射による免疫抑制は、全身性と局所性の2種の分類されており、これらの現象は同様であるが誘導のメカニズムは異なっていることが知られている。局所性免疫抑制では、最初に *cis*-ウロカニン酸やTNF- $\alpha$ が抗原提示細胞に影響を与えるようであるが、全身性免疫抑制ではIL-10の産生が重要であると報告されており、TGF- $\beta$ の関与についての報告もある。これらの因子は、抗原提示細胞上の共刺激分子でありT細胞上のCD28のリガンドであるB7.1(CD80)やB7.2(CD86)の発現変化を含む抗原提示能に影響を与える。その結果、Th2タイプ免疫反応は惹起されるがTh1タイプの免疫反応が減弱すると考えられている。更に、紫外線誘導の免疫抑制には、サプレッサーT細胞の関与も報告されている。しかし、全身性の免疫抑制のメカニズムについては、いまだ不明な点も多い。

一方、Th1特異的免疫反応を誘導し、Th2細胞の分化を阻害する活性を持ち、樹状細胞から産生されて接触過敏反応を誘導する因子としても知られているIL-12は、動物実験において、紫外線B誘導の全身性の遅延型及び接触過敏反応の抑制を回復させ、局所性免疫抑制に対してはその予防や免疫寛容を解除するとの報告がある。しかしながら、IL-12による回復効果のメカニズムについては、とりわけ全身性免疫抑制の系において、まだ明らかになっていない点も多い。また、我々は既に、IL-12が表皮Langerhans細胞のアクセサリー機能を亢進することを報告している。そこで、紫外線Bにより誘導される全身性免疫抑制のメカニズムと、その減弱したTh1タイプの免疫反応をIL-12が如何なるメカニズムにより回復させるかについて調べた。

#### (方法)

遺伝的に紫外線抵抗性であるBALB/cマウス背部を除毛後、15kJ/m<sup>2</sup>の紫外線Bを背部にのみ照射

することにより全身性の免疫抑制を誘導した。免疫抑制の評価は、ハプテン（ジニトロフルオロベンゼン）の腹部塗布による感作（照射5日後）、同一ハプテンの耳介塗布による惹起（照射12日後）により誘導される接触過敏反応を指標とした。対照群は、紫外線B照射のみを省略したものとした。紫外線B照射マウスおよび対照マウスの接触過敏反応を評価した翌日、脾臓のT細胞を調製して実験に供した。

抗原提示細胞は、正常マウスまたは場合により、紫外線B照射マウスの耳介より調製した表皮細胞を3日間培養後、ハプテン（ジニトロベンゼンスルフォン酸）を結合させたものとした。表皮細胞のみをIL-12で処理する場合には、表皮細胞の3日間培養の内、後半の2日間をIL-12(100ng/ml)で処理した。

T細胞のハプテン結合抗原提示細胞での刺激実験は、4日間の共培養を行い、同時に0, 0.1, 1, 10ng/mlのIL-12もしくは、場合により抗IL-10抗体、抗TGF- $\beta$ 抗体又は対照抗体を添加した。

固相化抗CD3抗体単独及び、抗CD28抗体共刺激又は、IL-12共刺激によるT細胞の活性化も検討した。

これら培養上清中のサイトカイン量は、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10およびTNF- $\alpha$ についてはELISA法により、TGF- $\beta$ はbio-assayにより定量した。

細胞表面マーカーは、flow cytometryにより解析した。

#### （結果および考察）

先ず、全身性の免疫抑制をin vitroで解析する系を構築するため、15kJ/m<sup>2</sup>の紫外線B照射したマウスにおける、紫外線非照射部位（ハプテン塗布部位）の抗原提示細胞の機能及び、脾臓T細胞の抗原特異的反応について調べた。15kJ/m<sup>2</sup>の紫外線B照射は、BALB/cマウスの接触過敏反応を約50%抑制した。このマウスにおいて、脾臓T細胞ではIFN- $\gamma$ 産生抑制がハプテン特異的反応として認められたが、非照射部位の抗原提示細胞のB7.1やB7.2の発現及び抗原提示能は減損していなかった。

我々が既に見出している、IL-12が示す表皮Langerhans細胞のアクセサリーオンコモジュール亢進作用により、紫外線照射で抑制されているT細胞のハプテン特異的反応を正常レベルに回復させることができるかについて調べた。表皮の抗原提示細胞をIL-12で予め処理し、ハプテンを結合させた後、紫外線B照射により免疫抑制状態となっているマウスの脾臓T細胞と共に培養したが、減弱したIFN- $\gamma$ 産生は正常マウスのレベルにまでは回復しなかった。IL-4はいずれの場合にも検出されなかった。従って、IL-12による抗原提示能の亢進のみでは、紫外線B照射により減弱したTh1タイプの免疫反応を回復できないことが分かった。用いたT細胞のCD4及びCD8発現の割合と強度は紫外線B照射と非照射のマウスの間で同等であり、これら表面マーカーの変化が原因でTh1タイプ免疫反応の抑制が生じているのではないと考えられた。

そこで更に、紫外線B照射マウスのT細胞を、ハプテン結合抗原提示細胞を用いてin vitroで刺激した際にIFN- $\gamma$ 産生が減弱している原因について解析した。その結果、IL-10とTGF- $\beta$ のいずれも、この抑制反応には関与していないことが分かった。また、TNF- $\alpha$ もこの刺激上清に検出されず、関与していないと考えられた。これらのサイトカインは、紫外線B照射による免疫抑制状態を誘導する際には関与するが、抑制状態になっているマウスのT細胞においてはもはやその抑制反応に関与していないものと考えられた。

一方、T細胞を抗CD3抗体で刺激すると、紫外線B照射マウス群のIFN- $\gamma$ 産生もIL-4産生も共に正常マウス群に比べて減弱しておらず、CD3を介したT細胞の活性化は紫外線B照射マウスにおいて低下していないことが分かった。次に、抗原提示細胞とT細胞との反応にはCD3を介した刺激

に加えて T 細胞上の CD28 と抗原提示細胞上の B7 の結合による共刺激が重要であることから、T 細胞を抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で共刺激した。すると興味深いことに、抗 CD3 抗体単独刺激の場合に比し、紫外線 B 照射マウス由来 T 細胞では IFN- $\gamma$  産生は変化せず IL-4 産生のみが 1.6 倍に增加了。非照射マウス由来 T 細胞では、IFN- $\gamma$  産生は 2 倍、IL-4 産生は 2.3 倍に增加了。紫外線 B 照射マウスから調製した T 細胞の CD28 の発現は、非照射マウスのそれと比して差はなかった。つまり、紫外線 B 照射マウスにおいて、Th1 タイプの免疫反応は誘導されないが Th2 タイプの免疫反応は誘導されるという、T 細胞上の CD28 を介したシグナルに機能低下があることが見出された。従って、紫外線 B 照射マウスの免疫抑制状態には、少なくとも部分的には、CD28 を介したシグナルの低下による Th1 タイプ免疫反応の非誘導のメカニズムが関与していると考えられる。我々は、紫外線 B 照射による抗原提示細胞側の機能変化による Th1 タイプの反応が抑制されるというこれまでの知見に加え、新たに T 細胞上の CD28 シグナルの低下が関与していることを見出した。

次に、紫外線 B 照射マウスにおける免疫抑制を IL-12 がいかに回復させるかについて解析を加えた。T 細胞抗 CD3 抗体で刺激する際に同時に IL-12 处理すると、紫外線 B 照射マウス群と非照射マウス群ともに IL-12 濃度依存的に同様の傾向で IFN- $\gamma$  産生が増加し、そのレベルも同等であった。IL-4 産生は IL-12 による影響を受けなかった。抗 CD3 抗体での刺激下に IL-12 处理した場合の T 細胞の活性化は、紫外線 B 照射マウス群と正常マウス群では、ともに同等であることが分かった。一方、ハプテン結合抗原提示細胞を用いて T 細胞を *in vitro* で刺激した場合、紫外線 B 照射マウスにおける減弱した IFN- $\gamma$  産生は、0.1ng/ml の IL-12 をその刺激中に添加しても正常レベルにまでは回復しなかったが、1ng/ml または 10ng/ml の IL-12 を添加すると完全に正常レベルにまで回復した。従って、ハプテン結合抗原提示細胞を用いた T 細胞の *in vitro* での刺激中に IL-12 が充分量存在すれば、紫外線 B 照射マウスにおける減弱した Th1 タイプの免疫反応が回復することが明らかとなった。また、IL-12 の濃度が不十分な場合、即ち前述した表皮の抗原提示細胞のみを IL-12 で予め処理した場合や刺激中に 0.1ng/ml の IL-12 を添加した場合は、IFN- $\gamma$  産生は増加するものの正常マウスの反応レベルには至らないと考えられる。

#### (結語)

本研究では、紫外線 B 誘導の全身性免疫抑制において、T 細胞の CD28 シグナル低下による不完全な Th1 タイプ免疫反応が認められること、そして IL-12 は、その T 細胞における CD28 シグナル低下を補い Th1 タイプの免疫反応を回復させることを示した。

#### 論文審査の結果の要旨

紫外線 B 照射は、Th1 タイプの免疫反応、例えば接触過敏反応のような細胞が関与する免疫反応を顕著に抑制する。紫外線 B 照射による全身性免疫抑制においては、IL-10 を始めとした種々の因子が抗原提示細胞に影響を与えた結果、Th2 タイプ免疫反応は惹起されるものの Th1 タイプの免疫反応が減弱すると考えられている。しかし、そのメカニズムについては、いまだ不明な点も多い。

一方、IL-12 は、Th1 特異的免疫反応を誘導し、Th2 細胞の分化を阻害することが知られており、動物実験において、紫外線 B 誘導の全身性の遅延型や接触過敏反応の抑制を回復するとの報告がある。しかしながら、その IL-12 による回復効果のメカニズムについては、まだ明らかになっていない点も多い。

本研究では、高照射量の紫外線 B により誘導される全身性免疫抑制のメカニズムと、その免疫抑

制を IL-12が回復させるメカニズムに関する解析を試みた。

先ず、高照射量 (15kJ/m<sup>2</sup>) の紫外線 B により全身性の免疫抑制状態となったマウスにおいては、免疫抑制評価時のハプテン塗布部位である紫外線非照射部位に存在する抗原提示細胞の機能は減損していないこと、および、脾臓の T 細胞の機能低下により Th 1 タイプの免疫反応が抑制されていることを *in vitro* の系で確認した。そして、紫外線 B 照射により免疫抑制状態が成立したマウスの T 細胞においては、CD 3 を介した活性化シグナルは低下していないが、CD28を介したシグナルに機能低下があることを新たに見出した。更に、紫外線 B による免疫抑制の誘導時に関与することが知られている IL-10や TGF-β は、抑制状態となったマウスにおいては、もはやその T 細胞の抑制反応に関与していないことも示した。

次に、紫外線 B 照射マウスの減弱した Th 1 タイプ免疫反応を、IL-12が回復させるメカニズムについて解析を加えた。CD 3 のみの刺激下で IL-12処理した場合、T 細胞の活性化は紫外線 B 照射マウス群と非照射マウスとともに同等であることを示した。一方、T 細胞をハプテン結合抗原提示細胞で刺激する際には、IL-12の抗原提示細胞への作用のみでは抑制された Th 1 タイプ免疫反応を正常レベルにまでは回復できないが、その反応中に充分量の IL-12を添加すると完全に正常レベルにまで回復できることが分かった。

本研究の成果は、紫外線 B 誘導の全身性免疫抑制が T 細胞上の CD28を介したシグナル低下による不完全な Th 1 タイプ免疫反応を伴うこと、そして IL-12は、その T 細胞を抗原提示細胞で刺激する際に充分量存在すると、T 細胞の CD28シグナル低下を補って Th 1 タイプの免疫反応を回復させることを示したことである。

本研究は、紫外線 B による全身性免疫抑制のメカニズム並びに、その免疫抑制を IL-12が回復させるメカニズムを説明できるという点で価値ある集積と認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。