

リンホカインによるCD8陽性T細胞の
活性調節機構に関する研究

西 島 謙 一

①

リンホカインによるCD8陽性T細胞の
活性調節機構に関する研究

西島 謙一

目次

第1章 緒言	1-19
第2章 α_s -カゼイン特異的CD8陽性T細胞クローンの樹立	20-45
第3章 IL-10によるCD8陽性T細胞増殖の調節	46-91
第1節 IL-10による増殖の自律的制御	47-68
第2節 IL-10の増殖抑制機構の解析	69-91
第4章 IL-10によるインターフェロン γ 産生の自立的抑制調節	92-105
第5章 IL-4によるインターフェロン γ の産生調節	106-123
第6章 経口免疫寛容誘導下におけるCD8陽性T細胞の性質	124-133
第7章 総合討論	134-140
第8章 要約	141-147
引用文献	148-154
論文目録	155
謝辞	156

第1章 緒言

ほ乳類の免疫系は自然には存在しない物質も含め全ての物質を自己と非自己に分類して認識する。自己と判断された抗原に対しては免疫応答を起こさず、一方非自己と判断した物質に対しては様々な方法によって排除しようとする。この自己非自己の識別は合理的に柔軟性を持ってなされることが知られており(図 1-1)、例えば腸管より吸収したタンパクは完全に分解されないまま体内に入った場合非自己由来の物質であっても排除されない。これは経口免疫寛容と呼ばれ生体が栄養素を効率よく利用するために重要な仕組みである(1-6)。また多くの人は杉の花粉が多量に舞う季節であってもアレルギーを起こさずに過ごしている。アレルギーは免疫応答の過剰反応であることを考えれば、健常人においてはアレルギーを防ぐための何らかの仕組みが備わっているものと考えられる。

免疫系が自己に対する不応答性を獲得する方法は3つの機構が知られている(7-13)。第一にある抗原を認識するT細胞を完全に除いてしまう方法。産生された抗体による液性免疫においても炎症を中心とする細胞性免疫においてもT細胞の活性化がまず起こる必要があることを考えれば、この方法のもっとも確実な方法であるといえる。胸腺における自己抗原に応答する未熟T細胞の除去は主にこの仕組みによってなされている。第二にT細胞は存在してもその応答性を失っている場合見かけ上そのT細胞はいないのと同じ状態となる。これは不応答説と呼ばれ特に末梢において起こる免疫寛容の主原因とされる。第三に他の細胞によってT細胞の活性が抑制される場合である。抑制T細胞、調節T細胞と呼ばれる抑制専門のT細胞がいるという初期の仮説は現在は疑問視されているが、多くのT細胞は他のT細胞に対する能動的抑制活性を持つという考え方は現在広く受け入れられている。基本的には免疫系はこれらの機構を組み合わせで応答しな

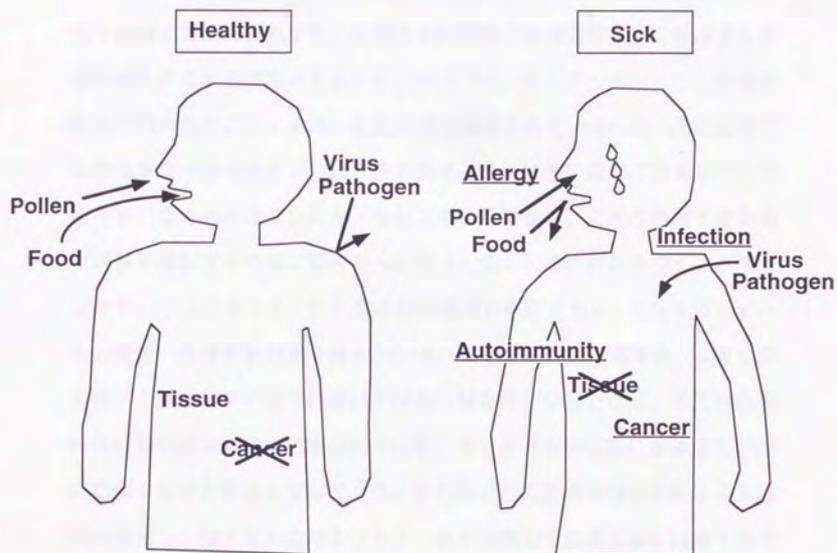


図1-1. 免疫学的自己・非自己の認識

免疫系は自己由来であってもガン等を排除する仕組みを持っている。逆に非自己由来であっても食物などは積極的に吸収できるように合理的な仕組みを持つ。この調節が乱れるとアレルギーや感染症等を引き起こすことになる。

い方が生体に有利である物質に対する免疫応答を抑えているのである。

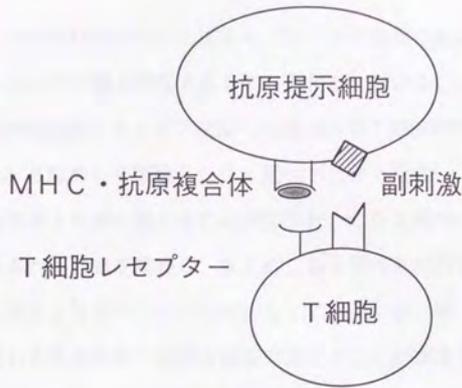
この3種の仕組みの内最初のを除いた二つは潜在的に抗原特異的なT細胞が体内に存在するため何らかの原因で免疫寛容状態を維持する要因が破られると免疫応答を起こすことになる。そのきっかけとしては感染症など他の抗原に対する強い免疫応答が示唆されている(14)。自己抗原に対する寛容が破られると自己免疫疾患を、食品抗原に対しては食品アレルギーを、また様々なアレルギーを起こすことになる。これらの強すぎる免疫応答を抑制するために現在もっともよく使われるのはステロイドホルモンやサイクロスポリン・FK 506等の免疫抑制剤である。これらはいずれも大変強い免疫抑制効果を持ち(15-16)、症状を劇的に改善する。しかしステロイドホルモンの投与においては常に依存症が問題となり、微生物由来の免疫抑制剤は全ての免疫応答を抑制してしまうために逆に感染症をいかに防御するかが問題となってくる。これに対して免疫の持つ柔軟性を人為的に利用し、様々な細胞のネットワークを利用して免疫応答を調節する方法は副作用なく様々な疾患の予防・治療を可能とすることが期待される。またこのようなアプローチは、近年の医学の進歩によって急速に注目を浴びている臓器移植における拒絶反応の抑制、また逆に免疫不全症の改善等につながりうるものである。

そのためには、成熟した免疫細胞による末梢の複雑精緻な免疫応答の調節機構を理解することが重要である。本研究では、T細胞の働きを免疫の鍵として位置づけ、その活性調節機構の一端を明らかにすることを目的とした。

T細胞の活性化はT細胞レセプターを介して行われる抗原認識に始まる。末梢に存在するほとんどのT細胞のT細胞レセプターは α 鎖 β 鎖と呼

ばれる2種類の異なるタンパク質から構成されている。1つのT細胞が持つT細胞レセプターはただ1種類であり、これがそのT細胞の抗原特異性と主要組織適合抗原複合体 (Major Histocompatibility Complex, MHC) 拘束性を決定することになる。T細胞がT細胞レセプターを介して抗原を認識するときには抗原と直接相互作用することはできず、抗原提示細胞と呼ばれる他の細胞表面にあるMHC分子と結合した形で抗原の分解物を認識する。この抗原認識と、その他の副刺激と総称される抗原提示細胞からのシグナル (Costimulation) によってT細胞が活性化されるのである(17、図1-2)。

MHC分子は大きく分けてクラスIとクラスIIの2種類が存在し、その分布及び提示するペプチドの種類が異なっていることが知られている(18、図1-2)。クラスIは赤血球などごく少数の例外的な細胞を除いた体内の全ての細胞上に存在する。一方クラスII分子はマクロファージ、B細胞等の免疫系の限られた細胞のみが発現している。この違いはそれぞれの分子の免疫応答における役割を反映するものと考えられている。クラスI分子は細胞質内で生成する内在性ペプチドを提示する。通常の状態においては自己抗原のみが提示されており免疫応答は起こらない。しかし一度ウイルスが細胞に感染するとその細胞はウイルスタンパクをクラスI分子上に提示する。これを認識して、炎症反応、細胞傷害活性等によりウイルス感染細胞をウイルスごと破壊してしまう。また、変異した原癌遺伝子を提示するガン細胞を破壊することによって腫瘍を未然に防ぐ作用もあるとされる。これらは体内の全ての細胞に関わることであるため、クラスI分子は全ての細胞に発現している。一方、クラスII分子はエンドサイトーシスによって取り込まれ内在性ペプチドとは異なった経路に乗った可溶性の外來抗原を、免疫担当細胞が提示するために用いられる。これらの免疫系の



MHC分子	提示する抗原		刺激するT細胞	
	内在性 (ウイルス)	外来性 (可溶性蛋白)	CD4	CD8
クラスI	+++	+	—	+++
クラスII	+	+++	+++	+

図1-2. T細胞のサブセット

T細胞はMHC・抗原複合体および副刺激によって活性化される。CD8陽性T細胞は主にクラスIに提示されたウイルスやガン等の内在性抗原を認識するが、外来性可溶性抗原を認識するものの存在が知られている。

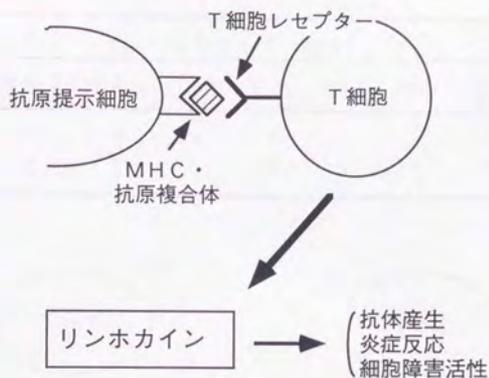
細胞同士が相互作用することによって互いを活性化しあい、炎症反応や抗体産生によって外敵を排除するものと考えられている。

細胞表面抗原によって2種類に分類されるT細胞のサブセットCD4陽性(CD8陰性)T細胞とCD8陽性(CD4陰性)T細胞は認識するMHC分子がそれぞれ異なることが知られ、CD4陽性T細胞はクラスII上に提示された抗原を認識し、多くのCD8陽性T細胞はMHCクラスI分子上に提示されたペプチドを抗原として認識する(図1-2)。これによりそれぞれの免疫応答の役割分担が存在することが想定されてきた。CD4陽性T細胞は外来性の可溶性抗原を認識しその排除に参画し、CD8陽性T細胞は主にウイルス抗原や腫瘍抗原などを認識し、生体をこれらから守る役割を果たすものと考えられてきた。しかしながら最近の研究によると、外来性の可溶性抗原をクラスI分子上に提示する特殊な抗原提示細胞群が末梢に存在することが明らかとなり(19-20)、この区別には例外もあることが示された。また、外来性可溶性抗原に対する免疫応答の調節にCD8陽性T細胞が関与していることは古くから示されており、これを裏付ける報告として、クラスI拘束性に外来抗原を認識するCD8陽性T細胞の存在がプライマリー培養系において、またT細胞クローンの樹立によって示されている(21-25)。また、少数ながらクラスII拘束的に外来抗原を認識するCD8陽性T細胞クローンの存在も報告されている。これらの抗原特異的なCD8陽性T細胞の存在は、これまで内在性抗原に限られて想定されてきたCD8陽性T細胞の役割がさらに大きなものであることを示唆するとともに、外来抗原に対する免疫応答の調節を考える上でCD8陽性T細胞の存在を無視できないことを示している。しかしながら、これらの細胞の性質は解析がよく進んでいるCD4陽性T細胞に比べ、まだほとんどなされていないのが現状である。そこで本論文ではT細胞のうちCD8陽

性T細胞、特に外来抗原を認識するものの機能解析を試みた。

それでは免疫応答調節を担うT細胞の機能は何であろうか。本研究ではT細胞の産生するリンホカインをその鍵物質であると位置づけた(図1-3)。T細胞クローンを使って得られた情報をもとにしてMosmannらはCD4陽性のヘルパーT細胞をそのリンホカインの産生パターンによって分類することを提唱した(26)。彼の説によると、マウスのT細胞クローンのほとんどはIL-2、インターフェロン γ を産生しIL-4,IL-6を産生しないタイプ1ヘルパーT細胞(Th1)とIL-4,IL-6を産生しIL-2,インターフェロン γ を産生しないタイプ2ヘルパーT細胞(Th2)に分類され、体内においても異なる作用を司っているというのである(図1-4)。この分類法はそれまでの表面抗原による分類ではなく、産生するリンホカインによって分類するという点で新しいものであった。その後、必ずしもこの分類に当てはまらないT細胞クローンが存在することも明らかになった(27)が、現在の考え方は広く受け入れられている。その後Th1が体内において遅延型過敏症などの免疫応答を引き起こし(28)、Th2は抗体産生を引き起こすこと(29)が明らかとなった。さらにこれら2種の免疫応答は一方が強いときには他方は起こらないことが見いだされ(26)、Th1とTh2は互いに抑制し合っていることが示唆された。これらの性質の違いは膜表面に発現される機能分子の差異よりはむしろ産生するリンホカインの違いによることが示唆されており(30)、T細胞の免疫調節機能をその産生するリンホカインの活性として理解することが広く行われるようになった。

当研究室の久恒らによってマウスのリンパ節から樹立された抑制T細胞クローン13G2はCD8陽性T細胞について同様の仮説を提供した(31)。13G2はCD4陽性T細胞クローンの抗原特異的な増殖応答を強く抑制する機能を有するが、この抑制活性が抗IL-10抗体によって中和されること



リンホカインの特徴

1. 多機能性
2. 複雑なネットワークを介して作用
 (様々な細胞が同じリンホカインを産生
 様々な細胞がレセプターを持つ)

図1-3. リンホカインがT細胞機能を担う

活性化されたT細胞はリンホカインを産生することによって抗体産生や炎症反応を誘導したり、場合によっては細胞障害活性を示す。このリンホカインは多機能性であり、どのような状況下で産生されたのかを考える必要がある。逆に、何がいつ何を対象としてあるリンホカインを産生したかを明らかにすれば、その役割が明らかにできると考えられる。

タイプ	リンホカイン産生							
	IFN- γ	TNF- α	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-10
Th1	+	+	+	+	-	-	-	-
Th2	-	+	-	+	+	+	+	+

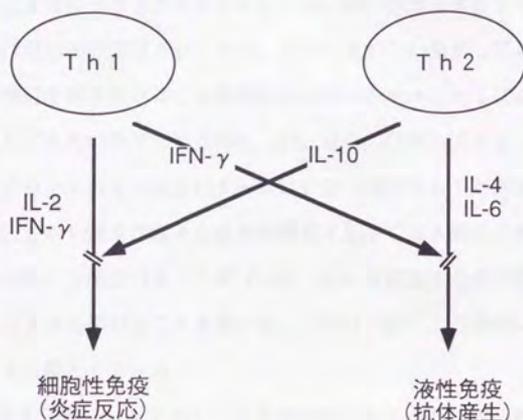


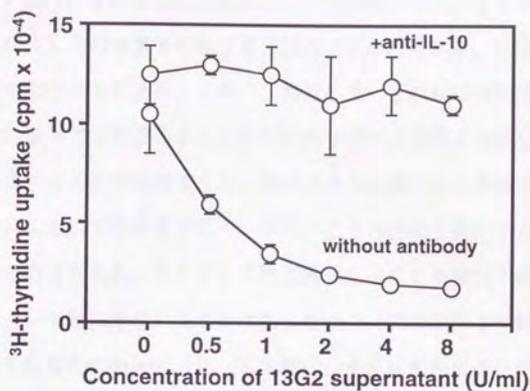
図1-4. リンホカイン産生パターンによるCD4陽性T細胞の分類

CD4陽性T細胞はリンホカイン産生パターンの違いによって分類することが現在広く受け入れられている。Th1は産生するIL-2やインターフェロン γ によって炎症などの細胞性免疫を誘導し、Th2はIL-4やIL-6等によって抗体産生を引き起こす。

それと同時に、Th1はインターフェロン γ によって、Th2はIL-10によって、互いに相手の免疫応答を抑制する。実際、細胞性免疫と液性免疫は、どちらかが強く起こっているとき、他方は低く抑えられていることが知られている。このネットワークに外来抗原特異的CD8陽性T細胞がどう関わってくるかが本研究の課題である。

が観察されたのである(32,33)。これにより Mosmann らがCD4陽性のヘルパーT細胞クローンの分類法として導入し、機能を理解する基礎としてリンホカインの産生パターンをとらえたように、CD8陽性T細胞においてもその産生するリンホカインが重要である可能性が示された(図1-5)。既に述べたように、それまではCD8陽性T細胞の役割は主に細胞傷害活性によるものであると考えられたため、標的細胞を破壊するための細胞間相互作用のみが注目されてきた。リンホカインに着目してCD8陽性T細胞の機能を探る試みはごく最近になるまで Mosmann らによって細々と続けられてきたのみであった(34、35)。彼らの研究によると、CD8陽性T細胞のリンホカイン産生パターンはCD4陽性Th1と類似したものであった。しかし我々は様々な抗原特異性を示すCD8陽性T細胞クローンのリンホカイン産生パターンがIL-10、IL-6を産生する点でCD4陽性Th1とは大きく異なることを見いだしており(36)、この点はさらに詳細な解析を必要としている。

さて一般にリンホカインは多機能性であることが知られている。異なった細胞に対してはあるリンホカインが免疫反応を促進する向きにも抑制する向きにも働きうる。また同一の細胞においても成熟度や活性化の状況、また共存する因子の影響で異なった作用をすることもある。この多機能性はただ単にある細胞がどのリンホカインを産生するかを解析するだけではその機能を推し量ることは不可能であることを示している。どのような組み合わせでリンホカインが産生されるのか、またその産生される状況がどのようなものであるのかを考慮することが重要である。逆に、これらのことを理解することにより、産生されるリンホカインの役割及びそのリンホカインを産生する細胞の機能・応用上の有用性が明らかとなってゆくものと期待される(図1-3)。



Hisatsune *et al.* Lymphokine and Cytokine Research. 11:87 (1992).

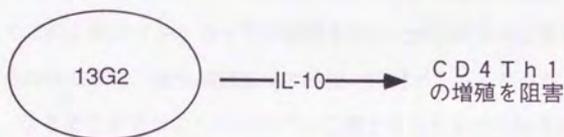


図1-5. CD8陽性T細胞クローン13G2はIL-10を産生することによってCD4Th1の増殖を抑制する

これまで、CD8陽性T細胞の機能は細胞間相互作用による細胞障害活性を中心に考えられてきたが、当研究室において示されたようにリンホカインも重要な作用を担っている。CD8陽性T細胞がいかなる刺激によってどのような種類のリンホカインを産生するかが重要な問題である。

T細胞の性質を解析する上で、一つの有力な手段としてT細胞クローンを樹立しその性質を解析する方法(37)があげられる。クローナルな細胞集団を扱うことにより、クローン相互の違いを詳細に検討できること及び初代培養系では検出することが不可能な微弱な応答を増幅した形で解析できることが大きな特徴である。現状のようにほとんど解析がなされていない時点においてはまずクローンをを用いてその特徴を検討することが肝要であると考えられた。そこでまず抗原特異的なCD8陽性T細胞クローンをカゼインを経口投与したマウスとしないマウスの2群より樹立し、その基礎的な性質の解明を行った(第2章)。その結果樹立された全てのクローンにおいてインターフェロン γ とIL-10の産生が認められた。この二種のリンホカインは既に香山によって様々なCD8陽性T細胞クローンから産生されることが示されている(36)。そこでCD8陽性T細胞の機能を探る上でこの二種のリンホカインに着目することが手がかりになると考え、以下その標的細胞、産生調節機構を詳細に検討することとした。

ここでこの2つのリンホカインに関するこれまでの知見をまとめてみたい(図1-6)。

IL-10はTh2が産生し、Th1によるリンホカイン産生(ことにインターフェロン γ 産生)を抑制する因子として発見された(38)。N末の18残基の分泌シグナルに続く160残基のタンパク質で、1次配列から予想される分子量は18.7KDa、pIは8.1である。糖鎖が結合しうる部分を2カ所持っており、ここに糖鎖が結合することによって見かけ上の分子量はかなり幅を持って観察される。実際IL-10の最初の報告ではゲル濾過の結果からT細胞の培養上清中に含まれるIL-10の分子量は27-50KDaと記述している(39)。すでに大腸菌で発現させて得られた組替え体IL-10にも同様の活性があることが報告されており、IL-10の活性には糖鎖部分は関与していな

IL-10

産生細胞

- ・ T細胞 (CD4⁺ Th2, CD8)、B細胞、マクロファージ

生物活性

- T細胞に対して
 - ・ CD4⁺ Th1の増殖・リンホカイン産生を阻害
 - ・ 細胞障害性T細胞を誘導
 - ・ 過剰量のIL-2とともにT細胞増殖促進
- B細胞に対して
 - ・ 増殖を誘導
 - ・ 細胞死を抑制
- マクロファージに対して
 - ・ サイトカイン産生を抑制
 - ・ T細胞刺激能を抑制
- マスト細胞に対して
 - ・ IL-3、IL4による増殖を促進

インターフェロン γ

産生細胞

- ・ T細胞 (CD4⁺ Th1, CD8)、B細胞、ナチュラルキラー

生物活性

- T細胞に対して
 - ・ CD4⁺ Th2の増殖を阻害
- B細胞に対して
 - ・ IgE産生を抑制
 - ・ クラスIIの発現量低下
- マクロファージに対して
 - ・ サイトカイン産生を促進
 - ・ 細胞接着因子の発現量増大

図1-6. IL-10とインターフェロン γ

いことが明かとなっている。IL-10 は抗原提示細胞に対して作用を及ぼし、間接的に Th1 に対する抑制効果を発揮する(40-41)。IL-10 はマクロファージを不活化し、その T 細胞刺激能、炎症反応に関わる酸化窒素類の産生量を減少させる。ヒトの系においてはクラス II 分子の発現量を減少させることも報告されている(42)。また抑制活性ばかりでなく、その後次々と新しい生物活性が報告されている。まず T 細胞に対しては、飽和量の IL-2、IL-4 と共働効果を示して未熟 T 細胞にも成熟 T 細胞に対しても細胞増殖因子として働くことが示された(43)。また細胞傷害性 T 細胞の前駆細胞に対して、IL-2 と共働効果を示して、細胞傷害活性を誘導する分化誘導因子としての報告もある(44)。またある種の条件下では、T 細胞の生存を促進する活性も持つ(45)。また IL-10 は肥満細胞に対しても活性があり、IL-3、IL-4 による細胞増殖を促進することが知られている(46)。さらに B 細胞に対する活性も知られ、休止期の B 細胞の MHC クラス II 分子の表現量を増加させる。また *in vitro* における B 細胞の生存率を上げ(47)、増殖を促進する活性も報告されている(48)。一方、このような新しい活性の報告と時期を同じくして、様々な細胞が IL-10 を産生することが明らかとなってきた。Th 2 のみならず、B 細胞(49)、マクロファージ(50)も IL-10 を産生することが相次いで報告され、IL-10 が免疫応答の様々な局面で重要な役割を果たしていることが推測された。

一方、インターフェロン γ はもともと抗ウイルス作用のある物質として発見された(51)。143残基のアミノ酸からなり、分子量は2カ所の糖鎖結合部位の状態を反映して34-50 kDであることが報告されている。その後リステリア (*Listeria*) やリューシマニア (*Leishmania*) 等の細胞内病原体に対する免疫応答を担う中心的リンホカインであることが明らかとされた。その活性は主にマクロファージを活性化することによってな

れると考えられている。まず細胞傷害活性を担う活性酸素や一酸化窒素、TNF- α の産生を促進する(52)。また、マクロファージ細胞表面の高親和性Fc γ レセプターの発現量を増大させ、抗体依存性細胞傷害活性を強める(53)。さらに補体成分の合成を促進することによって補体依存性の液性免疫を増強する(54)。またマクロファージのT細胞活性化能を強めることも知られており、抗原提示能を増し(55-56)、MHC分子の発現量を増大させる(57)ことが報告されている。また、T細胞とマクロファージの相互作用を担う接着分子であるICAM-1の発現量を増すと報告もある(58-60)。一方ある種の免疫応答を抑制する活性も知られている。Th2細胞に直接作用してその増殖を抑制し(61-62)、またin vivo 及びin vitroの実験系において代表的なTh2による免疫応答であるとされるIgEの産生を強く阻害する(63-66)。またIL-4によって誘導されるB細胞のMHCクラスII分子の発現量増強効果を阻害することも知られている(67)。産生細胞としてはCD4陽性T細胞のうちTh1に属する細胞(68-69)及びCD8陽性T細胞(34)、また近年の研究から自然免疫に関与するナチュラルキラー細胞が報告されている(70)。

このように、この二つのリンホカインはCD4陽性T細胞による免疫調節のネットワークにおいては相互抑制における中心的な役割を担うものと考えられている。即ちTh1の産生するインターフェロン γ はTh2の応答を抑制し、逆にTh2はその産生するIL-10によってTh1の応答を抑制する(図1-4)。筆者はこの両者を同時に産生する性質がCD8陽性T細胞の大きな特徴であり、その特異な役割を示唆するものであると考えている(図1-7)。そこでまずCD8陽性T細胞の機能分子としてのIL-10に注目した。まず、CD8陽性T細胞に対するIL-10の影響を検討し、さらに自己の産生するIL-10による新たなタイプの増殖調節機構を発見した

Type	IFN- γ		IL-10	
	Secretion	Susceptibility	Secretion	Susceptibility
CD4 ⁺ Th1	+	-	-	+
CD4 ⁺ Th2	-	+	++	-
CD8 ⁺	+	-	+	第3章

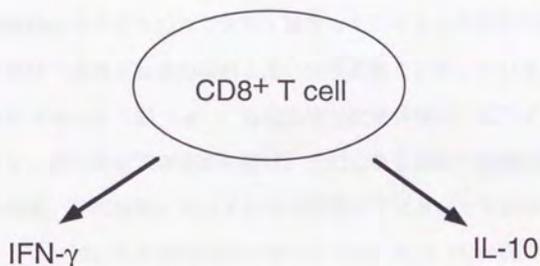


図1-7. CD8陽性T細胞はIL-10及びIFN- γ を産生する。

IL-10とインターフェロン γ はCD4陽性T細胞の2つのサブセット (Th1とTh2) が相互に相手を抑制するものとして機能すると考えられてきた。これに対してこの両方を産生するCD8陽性T細胞がいかなる機能を持っているのかを明らかとする必要がある。

(第3章)。また、CD4陽性T細胞を実験系として用いることにより、IL-10がT細胞増殖を抑制する際には抗原提示細胞を不活化することを示した。次に、IL-10による自己調節機構がリンホカイン産生調節においても機能していることを明らかとした(第4章)。さらに、IL-4によるインターフェロン γ 産生の増強効果を明らかとし、自己調節されるCD8陽性T細胞のインターフェロン γ 産生が、Th2のフィードバック調節に関わりうることを示唆した(第5章)。これらの結果はCD8陽性T細胞のリンホカイン産生がCD4陽性T細胞のものとはその組み合わせ、標的細胞、調節機構のそれぞれの点で大きく異なっていることを示すものであり、CD8陽性T細胞が独自の役割を担い免疫応答を制御していることを支持するものであった(図1-8)。免疫応答が抗原特異的に低下する現象の一例として、経口免疫寛容状態を選び、そのCD8陽性T細胞の性質を調べた。その結果、初代培養においては検出限界以下であったリンホカイン産生パターンは、強い免疫抑制活性を有するTGF- β (72-74)が経口免疫寛容由来のCD8陽性T細胞の特徴として観察され(第6章)、免疫応答の抑制に関わることが示唆された。

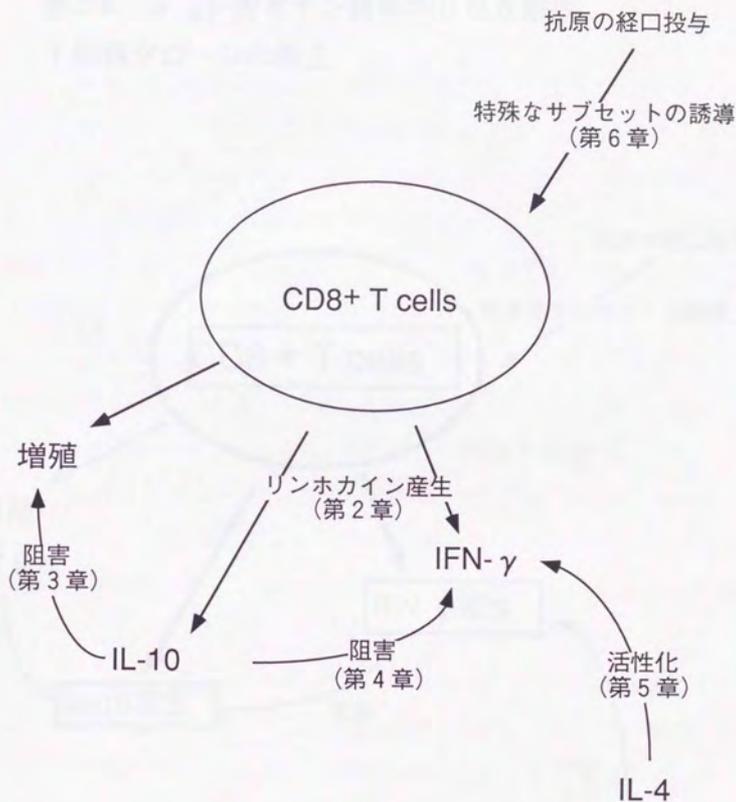
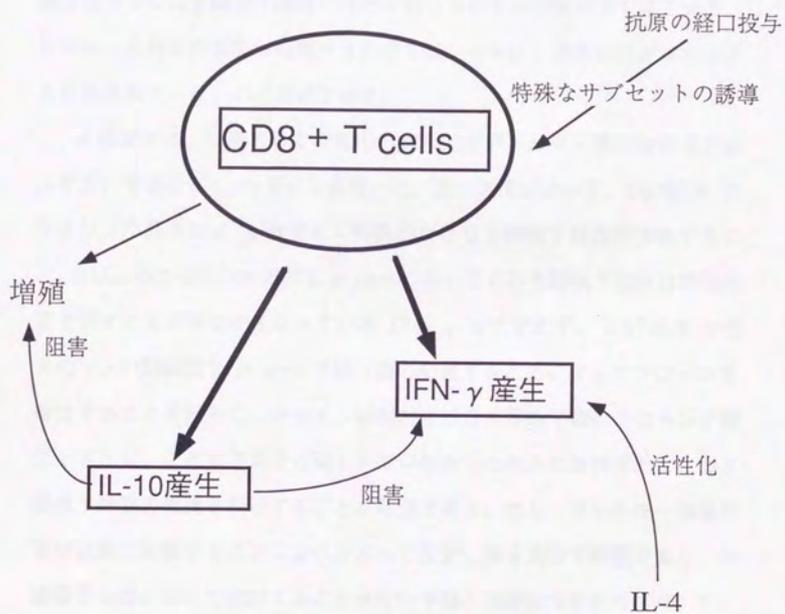


図1-8. 本論文の構成

第2章 α s1-カゼイン特異的CD8陽性
T細胞クローンの樹立



序

多くのCD8陽性T細胞は内在性抗原をクラスI拘束的に認識する。しかし緒言でも述べたように、最近の研究によると、外来抗原に応答するCD8陽性T細胞も少なからず存在することから、外来抗原の免疫応答調節におけるCD8陽性T細胞の役割を明らかにする必要がでてきている。しかし、これらの細胞は頻度がきわめて低いために、その研究がまだほとんどなされていないのが現状である。

本研究では、抗原として牛乳中の代表的なアレルギー原因物質（アレルゲン）である α_{S1} -カゼインを用いた。既に久恒によって、C57BL/6マウスリンパ節中に α_{S1} -カゼイン特異的なCD8陽性T細胞が存在すること、及びこのカゼイン特異的な*in vitro*においてCD8陽性T細胞は増殖応答を示すことが明らかとなっている(74)。そこでまず、C57BL/6マウスのリンパ節細胞を*in vitro*で繰り返し刺激することによってクローンを樹立することを試みた。カゼイン特異的なCD8陽性T細胞クローンが樹立できれば、これまであまり知られていなかった外来抗原特異的なCD8陽性T細胞の性質を解析することが可能である。また、アレルギーは免疫系が過剰に応答することによりかえって生体に害を及ぼす現象であり、免疫系を必要に応じて抑制することがその予防・治療につながる(75)が、CD8陽性T細胞は潜在的に抑制活性を持ちうる細胞であると報告されているため(例えば、経口免疫寛容誘導マウスのCD8陽性T細胞を他のマウスに移入することによって免疫寛容状態を移築することができる(76))、その免疫調節活性を解析することは、副作用のない食品アレルギー治療法開発へ向けて有用な情報をもたらしうることが期待された。

本研究では、免疫応答が低く抑えられている状況として、経口免疫寛容状態に着目した。既に序論でもふれたように、経口投与した抗原に対しては、T細胞応答・抗体産生応答ともに低い免疫反応しか誘導されない（経口免疫寛容）。経口投与した抗原に対する免疫応答を低く抑える仕組みの一つに、CD8陽性T細胞による抑制が示唆されている。経口免疫寛容が誘導されれば食品アレルギーは防げることから、経口免疫寛容誘導・非誘導時の α_{S1} -カゼイン特異的なCD8陽性T細胞の性質を比較・解析することはアレルギー治療のための有用な情報をもたらすものと期待された。そこで本章において、 α_{S1} -カゼイン特異的なCD8陽性T細胞クローンを樹立し、その性質を解析した。その結果、多くの性質は細胞の元となるマウスに経口免疫寛容を誘導しても変化しないことが示唆された。本章ではこの不変の性質について述べる。経口免疫寛容誘導マウスより樹立したクローンのみに認められた性質については第6章において考察する。

材料及び方法

マウス

6-12 週齢の C57BL/6(B6)および C3H/HeN(C3H)の雌マウスを日本チャールズリバー株式会社から購入した。免疫応答を司るMHCハプロタイプはB6がH-2^b、C3HがH-2^kである。MHC領域が異なるコンジュニックマウスである4R、bm1、bm3マウスは東京大学医学部免疫学教室多田富雄博士、浅野善博博士より供与された。4RのMHC領域はK^kA^kE^bD^bである。bm1、bm3はともにK^bA^bE^bD^bであるが、K^b分子に突然変異を持つ(77)。なお、この4つの領域の内KとDがクラスI、AとEがクラスII領域である。また、E^bは遺伝子に欠損があり実際には発現されないため、C57BL/6においてはクラスII分子はA^bのみである。

抗原

ウシ α_{s1} -カゼイン (バリエーションB、199残基)は牛乳からZittleらの方法(78)に従って調製し、さらにDEAE-Sephacelを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製した(79)。清水らの方法に従い、炭酸緩衝液中(pH8.5)で37°C 2時間1%(w/v)トリプシンで分解することによりトリプシン分解フラグメントを得た(80)。以後 α_{s1} -カゼインのトリプシン分解物として混合物のまま抗原として使用した。HPLCを用いた解析により分解物中に切れ残ったタンパクが存在しないことが確認された(データ省略)。

α_{s1} -カゼインの全領域を含む20残基の長さの20種類の部分ペプチ

ドペプチドシンセサイザー430Aによって合成し、HPLCによって精製した後実験に供した(81-82)。本章で用いるのはこのうち136-155残基に相当するものである。 α_{S1} -カゼインの142-149残基に相当するペプチドも同様に調製した。

リンホカイン

精製ヒト組換え体IL-2は武田薬品株式会社より供与された。ラット脾臓細胞をコンカナバリンA(Sigma)で刺激して2日間培養した培養上清を、 α メチルマンノシドで中和した後T細胞増殖因子として使用した(83)。こうして調製されたT細胞増殖因子は様々なリンホカインの混合物であると考えられる。

モノクローナル抗体

抗CD3抗体145-2C11(84)、抗CD8抗体83-12-5(85)、53-6-72(86)、抗CD4抗体GK1.5(87)、抗T細胞レセプター β 鎖抗体H57-597(88)、抗K^b抗体28-13-3(89)、抗D^b抗体28-14-8(90)、抗A^b抗体M5/114(90)は東京大学医学部免疫学教室多田富雄博士、浅野善博博士より供与された。これらのモノクローナル抗体はヌードマウスの腹水又はハイブリドーマの培養上清よりプロテインAを用いたアフィニティカラム(MAPS2キット、バイオラッド)により精製して用いた。

抗IL-10抗体SXC-1(91)は、DNAX研究所 Dr. K. Moore より供与された。抗IL-10抗体2A5(92)、抗インターフェロン γ 抗体XMG1.2(93)はDNAX研究所 Dr. J.S. Abrams より供与された。抗インターフェロン γ 抗体R4-6A2(94)はATCC (American Type Culture Collection) より購入した。これらの抗体はヌードマウスの腹水から50%飽和硫酸アンモ

ニウム溶液によって粗精製し、さらに必要に応じてFPLCを用いて高度に精製した。また、ビオチン化したSXC-1及びXMG1, 2をELISAにおける検出抗体として使用した。

T細胞クローン

当研究室で樹立されたCD4陽性T細胞クローン3D20(95)を用いた。3D20はA^b上の α_{S1} -カゼインの136-155領域を認識するTh1クローンである。

抗原の経口投与

タンパク源としてカゼインのみを含む飼料を調製しカゼイン食としてマウスに自由摂取させた。これに対して、対照群のマウスはカゼインを含まない市販の飼料(MF、オリエンタル酵母)を与えた。緒言において述べたように、抗原の経口摂取により経口免疫寛容と呼ばれる免疫の低応答状態が誘導できる。2週間の自由摂取によって、カゼイン食を投与した群のマウスはカゼイン特異的なT細胞増殖応答能、抗体産生応答能を失うことがすでに示されている(2-5)。

マウスの免疫

常法に従い、抗原である α_{S1} -カゼインをフロイントの完全アジュバント(Complete Freund's Adjuvant, CFA(H37Ra, Difco))とともにエマルジョン状にした後、200 μ gを後足のフットパッド、尾の付け根に免疫した。1週間後リンパ節細胞を回収、使用した。

CD8陽性T細胞の分離

リンパ節細胞を抗CD 8抗体8 3-1 2-5を結合させたマグネチックビーズを用いて純度よくCD 8陽性T細胞を分離した。フローサイトメーターを用いた解析によりCD 8陽性細胞の割合は98%以上、混在するCD 4陽性細胞の割合は0.5%以下であることが確認された(74)。

CD 8陽性T細胞クローンの樹立

得られたリンパ節細胞を3 GyのX線を照射した同系マウスの脾臓細胞(抗原提示細胞として使用)と抗原(1 μ Mのトリブシン分解 α_{S1} -カゼインを添加)により、反復刺激した。培養はRPMI1640培地に 5×10^5 Mの2-メルカプトエタノール、100U/mlペニシリン、100 μ g/mlストレプトマイシンおよび10%ウシ胎児血清(FCS)を加えた培地で、5%CO₂添加空气中37°Cで行った(以後特に断わらない限り培養はこの条件で行った)。この際T細胞の増殖を保つためにIL-2(50U/ml)またはT細胞増殖因子(5-10%)を培地中に加えた。増殖してきた細胞を限界希釈法によりクローン化し、抗原特異性をT細胞増殖試験及びインターフェロン γ 産生によって検討した。

フローサイトメーターによる細胞表面抗原の解析

常法に従い、フローサイトメーターを用いた間接法によって細胞表面抗原の発現量を測定した。細胞(およそ 10^6 個)を一次抗体と4°C 30分インキュベートし、細胞を洗浄後FITC標識した二次抗体によって染色した。解析時には、前方散乱光及び側方散乱光によって生細胞のみを解析した。これにより、前回の刺激時に加えた抗原提示細胞の残骸を除いた形での解析が可能であった。

T細胞増殖の測定

2×10^4 /well の T細胞クローンを特に断らない限り 2×10^5 /well の抗原提示細胞とともに 96well マイクロタイタープレート中で 4日間培養した。培養終了 16時間前に $0.5 \mu\text{Ci/well}$ のトリチウムラベルしたチミジンを加え、細胞増殖をそのチミジン取り込み量で測定した。実験は 3連で行い、その平均値を標準偏差とともに表記した。

リンホカイン産生量の測定

各 T細胞クローンを各々刺激した培養上清を培養開始 22時間後に回収しその上清中のリンホカイン産生量を酵素免疫測定法 (Enzyme-linked immuno sorbent assay, E L I S A) によって測定した。T細胞の培養は以下の条件で行った。インターフェロン γ 測定時には T細胞の刺激は 96well プレート内で増殖アッセイの条件を用いた。他のリンホカイン測定用のサンプルは 10^6 の T細胞クローンを 48well プレート 1ml の培地中で 2×10^6 の抗原提示細胞と抗原によって刺激して調製した。

IL-10 とインターフェロン γ については Abram らによって報告された方法(92)に従い測定した。IL-10 の E L I S A においては、プレート (N U N C) を 2 A 5 によりコーティングし、2次抗体としてビオチン化した S X C-1 を用いた。またインターフェロン γ の測定においては 6 A 2 をコートし、ビオチン化 X M G 1.2 で検出した。また、T G F- β の量は T G F- β_1 E L I S A キット (Promega) を用いた。

また IL-2 の産生量は IL-2 依存性の T細胞株である HT-2、CTLL-2 の増殖応答を指標にして測定した。 1×10^4 /well の細胞をサンプルと共に 24時間培養し、 $0.5 \mu\text{Ci/well}$ のトリチウムラベルチミジンを加えさらに 6時間培養した後のチミジン取り込み量を測定した。IL-4 は IL-4 ELISA kit

(Endogen)を用いて測定した。

結果

1. 1990年代前半の経済成長

図表1に示した通り、1990年代前半には、実質GDPは年平均約4.5%のペースで増加した。これは、1990年代前半の平均的な成長率である。また、この期間には、インフレ率が低水準に安定した。これは、中央銀行の政策によるものである。また、この期間には、失業率が低水準に安定した。これは、労働市場の需給バランスによるものである。

この期間の成長は、主に内需の拡大によるものである。これは、政府の財政政策によるものである。また、この期間には、インフレ率が低水準に安定した。これは、中央銀行の政策によるものである。また、この期間には、失業率が低水準に安定した。これは、労働市場の需給バランスによるものである。

2. 1990年代後半の経済成長

図表2に示した通り、1990年代後半には、実質GDPは年平均約2.5%のペースで増加した。これは、1990年代後半の平均的な成長率である。また、この期間には、インフレ率が低水準に安定した。これは、中央銀行の政策によるものである。また、この期間には、失業率が低水準に安定した。これは、労働市場の需給バランスによるものである。

結果

CD 8 陽性 T 細胞クローンの樹立

図 2-1 に示したスキームに従い、マウスを二群に分け、カゼイン食摂取・非摂取群より T 細胞クローンの樹立を試みた。ウシ α_{S1} -カゼインを免疫したマウスのリンパ節細胞からマグネチックビーズを用いて CD 8 陽性 T 細胞を純度よく分離し、in vitro で繰り返し刺激することによってライン化細胞を得、限界希釈法によってクローン化細胞を得た。

経口免疫寛容を誘導したマウスから 6 B 1、5 F 1 の 2 個のクローンを、コントロール群のマウスから U c、U d を得た。まず表面抗原の発現パターンを蛍光免疫測定法によって解析した。図 2-2 に示すように 6 B 1、5 F 1 とともに $\alpha\beta$ 型 T 細胞レセプターを持つ CD 8 陽性 CD 4 陰性の T 細胞クローンであることが確認された。いずれのクローンもクラス I MHC 分子である K^b 、 D^b を強く発現していること、また通常マウス T 細胞では発現していないクラス II MHC 分子を発現していないことも明らかとなった。また、U c、U d について同様の解析を行ったところ、同様な表現型を有していることが示された（データ省略）。

得られたクローンの MHC 拘束性およびエпитープ

得られたクローンの MHC 拘束性を検討した。表 2-1 に示すように、樹立された CD 8 陽性 T 細胞クローンのインターフェロン γ 産生は、抗クラス II 抗体によって阻害されなかった。一方コントロールとして用いたクラス II 拘束性の CD 4 陽性 T 細胞クローン 3 D 2 0 のインターフェロン γ 産生は完全に阻害された。このことから樹立された CD 8 陽性 T 細胞クロー

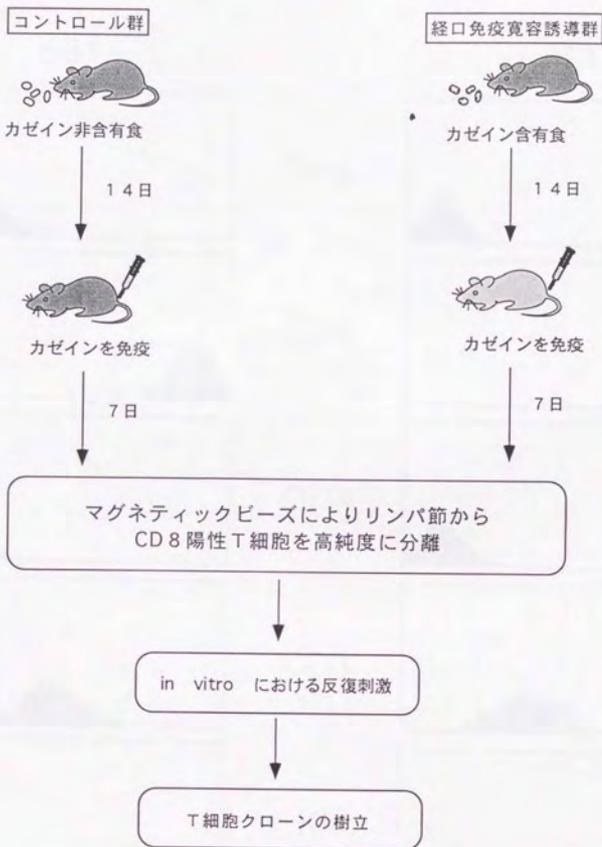


図2-1. CD8陽性T細胞クローンの樹立方法

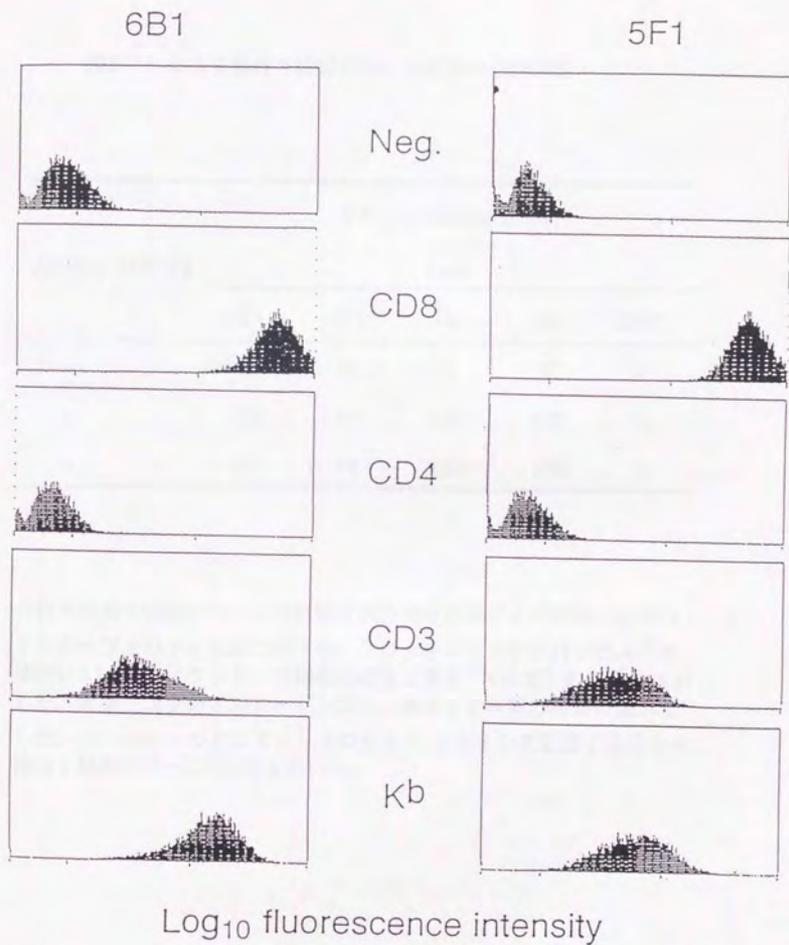


図2-2. 樹立されたCD8陽性T細胞クローンの表面抗原の解析

表2-1 CD8陽性T細胞クローンのMHC拘束性

Antigen	M5/114	IFN- γ produciton (U/ml)				
		from				
		6B1	5F1	Uc	Ud	3D20
-	-	12	16	8	12	4
+	-	52	40	124	132	12
+	+	52	44	132	136	4

それぞれのT細胞クローンを抗原と抗原提示細胞により刺激した際のインターフェロン γ 産生に対する、ブロッキング活性を持つ抗A^b抗体M5/114（ハイブリドーマ細胞の培養上清を5%添加）の影響を検討した。培養上清中のインターフェロン γ 量を22時間の培養の後測定した。コントロールとしてA^b上の α s1-カゼインを認識するCD4陽性T細胞クローン3D20を用いた。

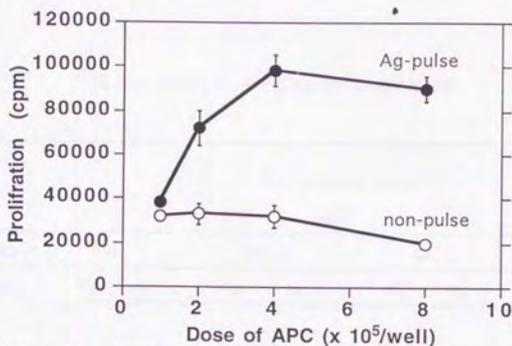
ーンはいずれもクラス I 分子に拘束されて抗原を認識していることが示された。

T 細胞クローンにおいてはその反応性がただ一つであり、他の T 細胞の持つアロ反応により目的の抗原特異的応答がマスクされないため、コンジェニックマウスを用いて MHC 拘束性を決定することが可能である。そこで樹立された T 細胞クローンがどのクラス I 分子によって抗原を認識しているかをさらに詳しく検討するために B10 系のコンジェニックマウスを抗原提示細胞として用いた。

実験に先立ち、刺激条件の検討を行った。すでに示したように、いずれの T 細胞クローンにおいても、 $K^b D^b$ のクラス I 分子を発現しており、T 細胞と抗原提示細胞の混合系に直接抗原ペプチドを加えたのでは、誘起された応答が T 細胞上の抗原-MHC 複合体によるものか、加えた抗原提示細胞上のものによるのか判断できない。実際 6 B 1 のインターフェロン γ 産生は抗原提示細胞を加えることなく抗原のみによって誘導可能であった（データ省略）。そこで抗原をあらかじめ抗原提示細胞にパルスした状態での応答を検出することを試みた。図 2-3 に示すように、抗原をパルスした抗原提示細胞によって増殖応答インターフェロン γ 産生ともに誘導されることが明らかとなった。インターフェロン γ 誘導には、増殖アッセイに比べより多くの抗原提示細胞を必要とした。以下の実験は 8×10^5 /well の抗原提示細胞で刺激し、インターフェロン γ を測定することにより行った。

表 2-2 に示すように、抗原提示細胞として C57BL/6 由来の脾臓細胞を用いたときはいずれの細胞においても有意なインターフェロン γ 産生が認められた。一方、C 3 H, 4 R を用いたときはインターフェロン γ は全く産生されなかった。このことから、得られた 4 種の CD 8 陽性 T 細胞クローンはいずれも K^b 分子に拘束されて抗原を認識していることが明らかと

(A) Proliferation



(B) IFN- γ production

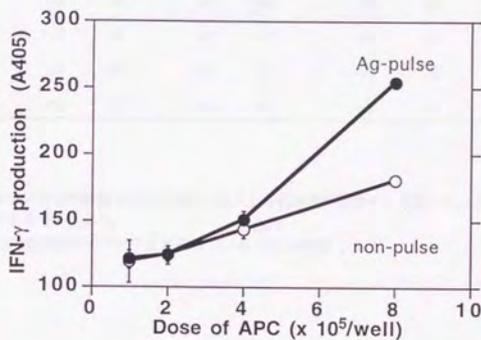


図2-3. 抗原を提示させた抗原提示細胞によるT細胞活性化条件の検討

抗原提示細胞を抗原 ($1\mu\text{M}$ トリプシン分解 $\alpha\text{s}1$ -カゼイン) とともに60分間培養し、遊離の抗原を洗浄した後、X線照射し、抗原パルス抗原提示細胞として用いた。6B1と混合培養し、6B1の(A)増殖及び(B)インターフェロン γ 産生を測定した。

表2-2 コンジェニックマウスに対する応答性の検討.

APC		IFN- γ production (U/ml)							
Strain	MHC	from							
		6B1		5F1		Uc		Ud	
	KAED	-Ag	+Ag	-Ag	+Ag	-Ag	-Ag	+Ag	-Ag
B6	bbbb	<8	64	<8	24	<8	40	<8	72
4R	kkbb	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8
bm1	b*bbb	<8	36	<8	<8	<8	<8	<8	<8
bm3	b*bbb	<8	140	<8	60	<8	<8	<8	<8
C3H	kkkk	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8

それぞれのマウス由来の脾臓細胞を抗原をバルスして抗原提示細胞として用いた。2 2 時間後のインターフェロ γ 産生量を測定した。

*, bm1とbm3は変異型のK^b分子を発現している(本文参照)。

なった。

次に抗原認識部位の極限化を試みた。すでに当研究室の久恒らによって初代培養系のCD8陽性T細胞においては、互いに重複して α_{S1} -カゼインの全領域を含む20種類の合成ペプチドのうち136-155残基の領域が唯一の認識部位として同定されている。そこでまずペプチド136-155がこれらのT細胞クローンを刺激しうるかどうかを検討した。その結果表2-3に示すように、トリプシン分解物よりもやや弱いながら、いずれのクローンにおいても有意なインターフェロン γ 産生が認められ、この領域に抗原決定基が含まれていることが示された。

Falkらによると、実際にクラスIに提示される内在性ペプチドは8残基の長さであるという(96)。そこでさらにエピトープの極限化を試みた。すでに報告されている K^b 結合性のペプチドはモチーフとして(X-X-Tyr-X-X-Phe/Tyr-X-X-Leu/Met)を持つとの報告がある。 α_{S1} -カゼインの136-155領域においては142-149 (Leu-Ala-Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu)がこの条件を完全に満たすことから、このペプチドのT細胞刺激能を検討した。表2-3に示すように、この短い8残基のペプチドは非常に強いT細胞刺激能を有していることが明らかとなった。これらの結果から、樹立された4種のクローンはいずれも K^b 分子に拘束されて、 α_{S1} -カゼインの142-149残基を認識することが明らかとなった。

これらのクローンの抗原特異性をさらに細かく解析するために、b m 1、b m 3マウスに対する応答性を検討した。これらのマウスはいずれも K^b 分子が抗原に結合する部位にそれぞれ3残基(アミノ酸152、155、156残基目)、2残基(77、89残基目)の点突然変異を持つことが知られている(77)。表2-2に示すようにいずれのクローンにおいてもトリプシン分解 α_{S1} -カゼインの非存在下では有意なインターフェロン γ

表2-3. 樹立されたCD8陽性T細胞クローンのエピトープ特異性

Antigen	IFN- γ production (U/ml)			
	from			
	6B1	5F1	Uc	Ud
none	<8	<8	<8	<8
t-CN	76	76	260	56
136-155	36	40	176	28
142-149	68	56	228	48

それぞれのT細胞クローンを抗原提示細胞の存在下、 $1\mu\text{M}$ の $\alpha\text{s}1$ -カゼインのトリプシン分解物(t-CN)、2種類の合成ペプチドによって刺激し、24時間後のインターフェロン γ 産生を測定した。

産生が認められずこれらのクローンはこの変異K^bに対してアロ応答性を持たないことが示された。抗原の存在下においてもUc、Udはいずれの変異K^bに対してもインターフェロン γ 産生をしなかった。一方6B1、5F1のインターフェロン γ 産生はbm3を抗原提示細胞として用いたときは本来の抗原提示細胞であるC57BL/6マウスを抗原提示細胞源として用いたときよりも強いことが認められた。また6B1のみがbm1を抗原提示細胞として α_{s1} -カゼインを認識することが観察された。これらのことから樹立された4種のクローンはいずれもK^b分子上の α_{s1} -カゼインペプチド142-149を認識するもののその抗原認識は微妙に異なることが示された。

CD8陽性T細胞クローンのリンホカイン産生パターン

次に樹立されたCD8陽性T細胞クローンのリンホカイン産生パターンを調べた。まずインターフェロン γ の産生量を検討した。いずれのクローンも多量のインターフェロン γ を産生することが認められ、その産生量はインターフェロン γ 産生細胞として知られるCD4陽性Th1クローンに匹敵するものであった(表2-4)。次にIL-10の産生量を測定した。表2-4に示すように5F1のみ多量のIL-10の産生が観察された。一方、他の3種のクローンは少量のIL-10を産生することが明らかとなった。いずれのリンホカインも抗原の非存在下では全く認められなかった。IL-2依存性の細胞株を用いてこれらの細胞の培養上清中のIL-2量を測定したところ検出限界以下であった。またIL-4は検出限界以下であった。

表2-4. リンホカイン産生パターンの解析

Lymphokine	Lymphokine production (U/ml)			
	from			
	6B1	5F1	Uc	Ud
IFN- γ	770 (310-1600)	180 (50-250)	270 (180-360)	460 (400-490)
IL-10	11 (4-24)	104 (40-260)	25 (4-40)	4 (2-5)
IL-2	<0.5 (<0.5 [*])	<0.5 (<0.5 [*])	<0.5 (<0.5 [*])	<0.5 (<0.5 [*])

T細胞クローンを1mlの培地中4 8wellプレートで抗原提示細胞と抗原（1 μ Mの α s 1-カゼイントリブシン分解物）によって刺激し、24時間後に培養上清を回収しそれぞれのリンホカイン量を測定した。値は2-7回の実験結果の平均値を、カッコ中の数値はその値の範囲を示す。

^{*}, 全ての実験において検出限界以下であった。

考察

本章において外来抗原である α_{S1} -カゼイン特異的なCD8陽性T細胞クローンを樹立することに成功した。経口免疫寛容を誘導したマウスから抗原特異的CD8陽性T細胞クローンを樹立したのは本研究が初めての報告である。その性質の多くは経口免疫寛容を誘導しなかったコントロールマウス由来のクローンと類似するものであった。本章においてはCD8陽性T細胞クローンに共通と考えられるこれらの性質について考察する。一方、経口免疫寛容誘導マウス由来のクローンに特徴的な性質も認められたが、これについては第6章において考察する。

CD8陽性T細胞クローンの抗原認識：クラスI上の同一のペプチドを認識するがそれぞれの抗原認識は微妙に異なっていた

樹立されたCD8陽性T細胞クローンはいずれもクラスI拘束性であった。このことから、外来抗原特異的CD8陽性T細胞の多くはクラスI上に提示されたペプチドを認識するものであると推察された。このことは、すでに当研究室において久恒が初代培養系で明らかにした結果(25,74)と矛盾しない。少数報告のあるクラスII拘束のCD8陽性T細胞は、本来クラスIを認識するT細胞が偶然類似した構造をとった別のペプチドとクラスIIとの複合体を認識した結果であるとされており(97)、頻度が低いということを支持する。また、すでに久恒が報告しているように(74)、これらのクラスII拘束性のクローンの抗原認識はクローンを継代しているうちに消失する性質であるため、長期間のクローニング期間の後樹立されたクローンにおいては抗原特異性のない株と判断された可能性も考えられた。

抗原の認識部位（エピトープ）は初代培養系において明らかとなった唯一の部位である α_{s1} -カゼインの136-155部位に存在することが示された。さらに、 K^b に結合するペプチドの共通配列から予測されたペプチド142-149がいずれのT細胞においても強いインターフェロン γ 産生を誘導することが示された。このことはFalkらが提唱した K^b の結合モチーフの概念が実際のCD8陽性T細胞のエピトープを予測する上で有用であることを示す一例となる。実際、 α_{s1} -カゼインにおいてはクラスIの結合モチーフはこの領域にしか現れない。また、実験に用いた2種類の合成ペプチドのうち、9残基のペプチドは20残基のものよりT細胞刺激能が非常に強いことが認められた。このことは、本来クラスIに提示されるペプチドは9残基であること、またMHCクラスIの立体構造上結合するペプチドは両端の閉じた溝に埋め込まれるような構造であることから推測された通りである。余分な領域はペプチドがクラスIと結合する際の障壁となるものと考えられる。このことは、CD8陽性T細胞を効率よく刺激するためには、そのエピトープを正確に予測することが重要であることを示唆するものである。将来CD8陽性T細胞を誘導するワクチンの開発等を効率よく行うためにヒトのMHC分子についてのさらなる情報の蓄積が必要であらう。

認識される抗原としてアミノ酸9残基にまで限局化したが、抗原認識はそれぞれのクローンにより微妙に異なることが、変異型 K^b 分子を持つコンジェニックマウに対する応答性の違いから明らかとなった。ペプチドがどの K^b 変異分子にも結合可能であることが6B1の反応性から結論された。しかしUc、Udはいずれの抗原提示細胞に対しても応答性を示さず、また5F1もbm1を抗原提示細胞とした時有意な応答を示さなかった。この点は性質の異なるクローンを別個に制御することを旨とする上で重

要である。MHC分子を変異させることによってMHC・抗原の複合体の構造を変え、実際の免疫応答を調節することは不可能である。しかし構造変化はMHC側の変化であってもペプチド側の変化であっても同様な効果を与えることが知られており(98)、抗原認識の違いを抗原アナログを用いることによって積極的に利用することが可能である。つまり、T細胞を刺激するペプチドに点変異を加えることにより、あるクローンは活性化し他のクローンは反応しないというペプチドが作成できる。これにより、例えば、6B1を活性化し5F1を活性化しないペプチドは、以下に示すようにIL-10の産生は低くインターフェロン γ 産生を強く引き起こすことが予想される。

リンホカイン産生：CD8陽性T細胞クローンはインターフェロン γ とIL-10を産生する

本章で樹立されたいずれのクローンも多量のインターフェロン γ を産生することが認められた。IL-4の産生は観察されず、最近になってMosmannらが提唱しはじめたCD8陽性T細胞の二つのサブセット(35)のうちTc1と呼ばれるタイプに属するものであると考えられた。CD4陽性T細胞クローンと同様のこの分類においては、インターフェロン γ を産生しIL-4を産生しないものをTc1、その逆にIL-4を産生しインターフェロン γ を産生しないものをTc2と分類している。彼らはIL-10など他のリンホカインを含めてCD4陽性T細胞クローンの場合と同様の分類が可能であり、またTc1、Tc2それぞれへの分化の際にそれぞれインターフェロン γ 、IL-4が重要であると報告している。これらの点はCD4陽性Th1、Th2の分類とよく一致するものであり、CD8陽性T細胞のサブセットをCD4陽性T細胞と類似した性質を持つものとして定

義している (35)。しかし、我々は、このような Tc1 に属すると考えられる T 細胞クローンが Th2 と類似した性質を合わせ持つものであることを見いだしている。現在 Tc2 に相当するクローンを有していないためその比較を行うことはできないが、少なくとも CD4 陽性 T 細胞クローンの特質とはかけ離れた性質を持つ細胞群の存在を確信している。具体的には、IL-10 の産生が認められるのは Tc2 のみと報告されているが以下に示すように我々はある程度の IL-10 はほとんどの Tc1 タイプの CD8 陽性 T 細胞クローンから産生されるものと考えている。また本研究の 5 章において論じるが、IL-4 によってインターフェロン γ 産生が増加するという事実もこれまでの定説とは異なっている。これらの差異の原因はクローン樹立の際の刺激条件や、T 細胞の抗原特異性等の具体的な実験条件を詳細に比較検討していくことにより今後明らかにしてゆかねばならない。

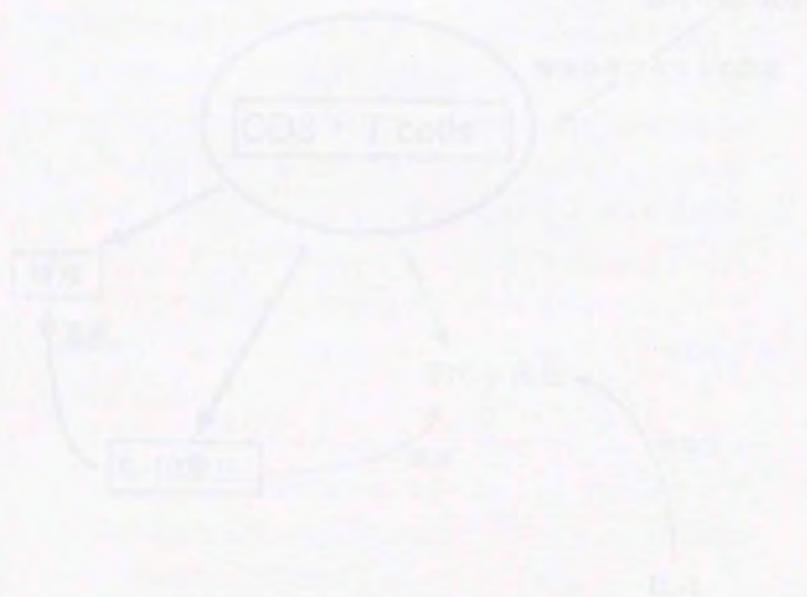
まず抗原の経口投与に関わりなく CD8 陽性 T 細胞がインターフェロン γ を産生することの意義について検討してみたい。既に加藤が明らかにしているように、初代培養においても CD8 陽性 T 細胞は経口免疫寛容誘導の有無に関わらず多量のインターフェロン γ を産生することが示されている。これに対して CD4 陽性 T 細胞のインターフェロン γ 産生は経口免疫寛容誘導によりほぼ完全に消失することから、安定したインターフェロン γ 産生は CD8 陽性 T 細胞の一つの特徴であると考えられた。インターフェロン γ はウイルスに対する防御や炎症反応において重要な働きをすることが知られている (51)。そのため多くの CD8 陽性 T 細胞が認識する抗原が内在性の抗原であることを考えると、生体にとってこれらの応答を抑制しないことは生体防御において合理的である。これにより、例えば病原ウイルスが食品抗原を模倣して免疫応答を逃れるという戦略を阻止することが可能であろう。また後に 5 章で考察するように CD8 陽性 T 細胞が

産生するインターフェロン γ はTh2免疫応答の行き過ぎを防ぐ役割が推察される。Th2による免疫応答はIL-4による正のフィードバック制御によって増幅され続けることが知られ(26)、数少ないTh2に対する負のフィードバック機構の必要性を示唆するものと考えられた。

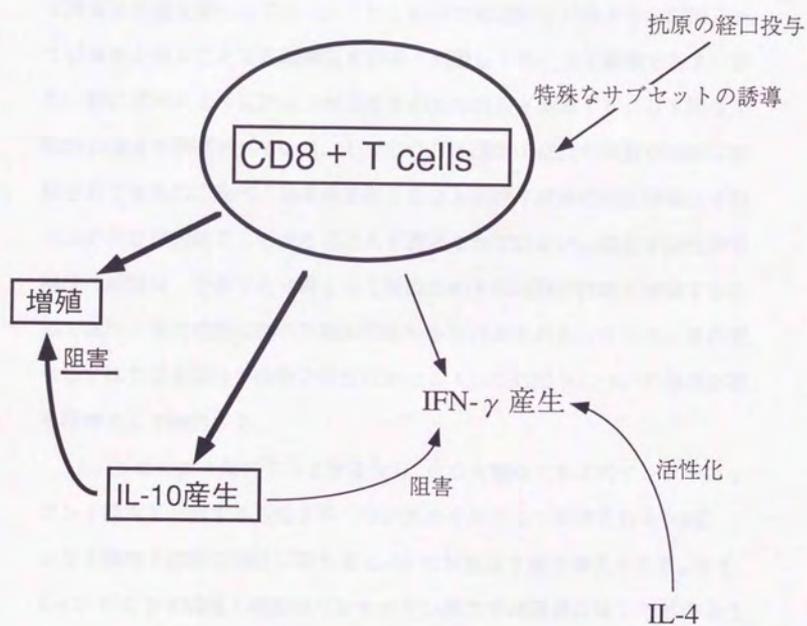
次に、IL-10の産生について考えてみたい。すでに当研究室の香山が示したように、多くのCD8陽性T細胞クローンは量に多寡はあるものいづれもIL-10を産生する(36)。我々はある程度のIL-10産生はTc1タイプのCD8陽性T細胞クローンの基本的特徴であると考えている。多量にIL-10を産生する5F1のようなT細胞はおそらくIL-10の持つ強い免疫抑制活性によって免疫応答を抑制的に制御する役割を持つものと推測される。実際我々もすでに報告しているように、IL-10を多量に産生するCD8陽性T細胞クローンの免疫抑制活性はIL-10によって担われる例がある(32)。一方、他の3種のT細胞クローン6B1、Uc、Udの産生量はいずれも少なく、この点においては我々の考える典型的なCD8陽性T細胞クローンである。しかし産生されるリンホカイン量が少ないことが直ちに生物学的重要性の欠如を意味するわけではない。リンホカインは環境中に放出されて濃度依存的に作用するばかりでなく、接触している細胞に直接分泌し言わばぶつけることによってその効果が現れることがある(99)からである。また他の可能性として、産生する少量のIL-10はもっとも近傍の細胞(つまり自分自身)の活性を調節するためのものであることが考えられる。後者の可能性については3章及び4章で検討する。

本章において経口免疫寛容を誘導したマウス及びコントロールのマウスより α_{SI} -カゼイン特異的CD8陽性T細胞クローンの樹立に成功し、その基本的特質を明らかとした。得られたクローンはいずれもIL-10、インタ

ーフェロン γ を産生した。これらの性質はCD8陽性T細胞クローンの基本的な性質であるものと推測され、以後この2つのリンホカインに注目して研究を進めた。



第3章 IL-10によるCD8陽性T細胞増殖応答の調節



第1節 IL-10による増殖の自律的制御

序

CD8陽性T細胞はウィルスやガンなどに対する免疫系の制御において重要な役割を果たしており、これらの細胞の活性がどのように調節されているかを知ることが細胞機能を制御・利用してゆく上で重要である。また、既に述べたようにアレルゲンなどの外来抗原を認識するCD8陽性T細胞の働きも示唆されている。しかしCD4陽性T細胞の性質が詳細に解析されてきたのに比べ、抗原特異的なCD8陽性T細胞の調節機構はクローンの樹立が困難なことからほとんど調べられていない。新たな活性調節機構の解明は、今までとは異なった局面でのその細胞の役割を示唆するものであり、その細胞活性の利用の可能性を広げるものとなりうる。そこで、本章ではCD8陽性T細胞の調節におけるIL-10の関与について増殖応答を指標として検討する。

IL-10はCD4陽性Th2が産生し、CD4陽性Th1のインターフェロニン γ 産生を抑制する活性を持つリンホカインとして同定された(38)。CD8陽性T細胞の活性に関わるIL-10の役割は2通り考えられる。まず、IL-10がCD8陽性T細胞のリンホカイン産生や増殖等に対してどのような効果を持つかという点である。序論でも述べたようにIL-10はきわめて多様な生物活性を持ち、同じT細胞であっても刺激条件や分化状態によって異なった応答性があり得る。本研究に用いたCD8陽性T細胞クローンとCD4陽性Th1は以下の点において似た特性を持つ。まずIL-4を産生せず、インターフェロニン γ を産生する。また抗原提示細胞としてマクロフ

ァージによって効率よく活性化される。さらに、副刺激の種類として IL-1 以外のものを必要とする（副刺激の詳細については本章第 2 節で考察する）。これらはいずれも Th 2 とは異なる、Th 1 と類似した性質である。このことから、IL-10 の免疫抑制作用に対する感受性においても Th 1 と似た挙動を示すことが考えられた。

既に述べたように（2 章、36）CD 8 陽性 T 細胞クローンは IL-10 を産生する。CD 8 陽性 T 細胞は何のために IL-10 を産生するのであろうか。当研究室の久恒らによって明らかにされたように、IL-10 高産生性の CD 8 陽性 T 細胞クローンの免疫抑制活性は IL-10 によって担われることがある（32）。本研究に用いた CD 8 陽性 T 細胞クローンの IL-10 産生はこのとき用いられた T 細胞クローンよりも少なく、その役割はまた異なったものである可能性が考えられた。そこで本章においてはまず第 1 節において CD 8 陽性 T 細胞クローンの抗原特異的増殖に対する外来及び内在性 IL-10 の抑制活性を検討し、次に第 2 節において IL-10 の増殖抑制機構の解明を試みた。

材料及び方法

抗原・抗体

細胞の刺激に用いた抗原及びリンホカイン測定用の抗体は第2章に述べた。このうち抗IL-10抗体SXC-1、2A5はIL-10の生物活性を中和することが知られている。抗IL-4抗体11B11 (100)はハイブリドーマの培養上清から精製したものを使用した。

リンホカイン

マウス組換え体IL-10は、cDNAをCOS7細胞に遺伝子導入して得られた培養上清を用いた(38)。コントロールとしてCOS7に空の発現ベクターを遺伝子導入した培養上清をmockとして使用した。これらはいずれもDNAX研究所Dr. K. Mooreより供与された。

T細胞クローン

2章で樹立したクローンの内、IL-2の添加なしで有意な増殖応答を示す6B1を用いた。このほかに当研究室で久恒によって樹立された自己応答性のクローン4B4、D2 (101)を用いた。CD8陽性T細胞クローンは従来IL-2の添加なしでは増殖しないと考えられ、IL-2非存在下での増殖はこれらのクローンの特質と考えられた。いずれも検出可能なIL-2、IL-4を産生せず、インターフェロン γ 及びIL-10を産生することが既に示されている。CD4陽性T細胞クローンとして、アロ応答性のTh1クローン#16 (102, 東京大学医科学研究所成内秀夫教授より恵与)、コンアルブミン特異的Th2クローンD10.G4.1 (103, American Type Culture

Collection, ATCC より購入) を用いた。

T細胞増殖試験

第2章に記述したようにT細胞を抗原提示細胞と適当な抗原とともに96well マイクロプレートにて4日間培養し、細胞増殖を最後の16時間のトリチウムラベルしたチミジンの取り込み量として測定した。

結果

IL-10 は CD 8 陽性 T 細胞クローンの増殖を抑制する。

まず IL-10 が CD 8 陽性 T 細胞クローンの増殖を抑制するかどうかを検討した。表 3-1 に示すようにいずれの細胞株においても培養開始時に加えた IL-10 (20U/ml) は抗原特異的な増殖を強く抑制することが観察された。次にその増殖抑制効果の IL-10 に対する濃度依存性を検討した (図 3-1)。その結果 CD 8 陽性 T 細胞クローン 4 B 4 の増殖に対する抑制の強さはすでに我々が報告した Th 1 細胞に対する抑制とほぼ同様の非常に強いものであった (32、図 1-5)。このことから IL-10 はインターフェロン γ を産生し IL-4 を産生しない CD 8 陽性 T 細胞クローンの増殖を抑制することが示された。次に IL-10 による T 細胞増殖抑制効果を時間を追って調べた。その結果、図 3-2 に示すように IL-10 を培養開始時に加えた場合、増殖抑制は有意なチミジン取り込みが認められる初期から観察された。

抗 IL-10 抗体による増殖の促進効果

既に香山が明らかにしているように (36)、本研究に用いた CD 8 陽性 T 細胞クローンは、抗原刺激に対して IL-10 を産生する。また、本章で明らかにしたように、その増殖は IL-10 を加えることによって抑制されることから、これらの CD 8 陽性 T 細胞クローンは IL-10 を産生することによってみずからの増殖を抑制していることが考えられた。この可能性を検証するために、産生される IL-10 の活性を抗 IL-10 抗体によって中和することを試みた。まず予備実験として、抗 IL-10 抗体の至適濃度を決定した。アッセイ中の培養上清中の IL-10 の濃度はいずれも 5U/ml 以下であったの

表3-1. CD8陽性T細胞クローンの増殖に対するIL-10の抑制活性の検討

Responding Cells Name	Thymidine Uptake (cpm x 10 ⁻³) Cells were Cultured		%Suppression
	without IL-10	with IL-10	
4B4	9.3±2.1	0.6±0.1	97
D2	15.1±0.9	0.5±0.0	99
6B1	5.2±0.6	0.8±0.2	94

抗原提示細胞によって誘導される増殖に対するIL-10の抑制効果を第3章に準じて検討した。

なお、刺激なしでのチミジン取り込み量は以下の通りであった。

4B4: 0.3±0.0, D2: 0.3±0.1, 6B1: 0.5±0.2

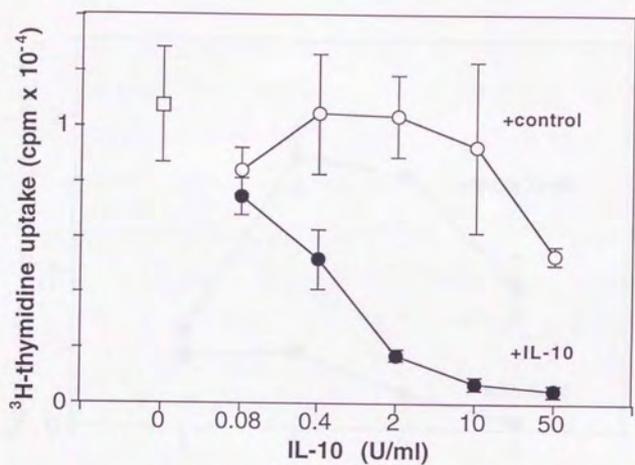


図3-1. CD8陽性T細胞クローンの増殖抑制におけるIL-10の濃度依存性

CD8陽性T細胞クローン4B4を抗原提示細胞によって刺激し、その増殖応答に対する培養開始時に添加した様々な濃度のIL-10の抑制効果を検討した。

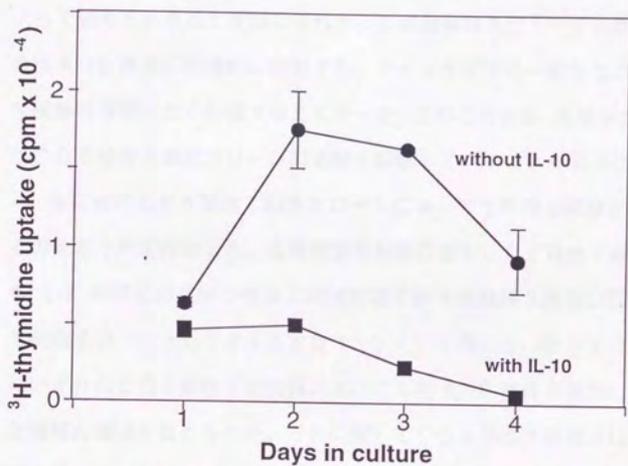


図3-2. IL-10によるCD8陽性T細胞クローンの増殖抑制の経時変化
 抗原提示細胞によって誘導される4B4の増殖に対して培養開始時に加えたIL-10の効果を時間を追って観察した。表示された期間細胞を培養し、最後の16時間のチミジンの取り込み量を測定した。

で、5U/mlのIL-10を中和するのに必要な抗体濃度を決定した。図3-3に示すようにSXC-1は5 μ g/ml、2A5は1 μ g/mlで5U/mlのIL-10を中和するのに十分であることが示された。そこでこれらの抗IL-10抗体を4B4、6B1の増殖を測定するアッセイに加えた。図3-4に示すように、CD8陽性T細胞クローンの抗原特異的増殖が抗IL-10抗体の存在によって強められることが認められた。この効果はエピトープの異なる2種の抗IL-10抗体に特異的に観察され、アイソタイプの一一致したコントロール抗体は増殖に全く影響を与えなかった。このことから、産生されたIL-10がCD8陽性T細胞クローンの増殖を抑制していることが明かとなった。

次に他のCD8陽性T細胞クローンにおいても同様な現象が観察されるのかどうかを検討した。当研究室で利用可能なCD8陽性T細胞株のうちIL-2非添加の条件で有意な増殖応答を示す細胞株3株及びCD4陽性T細胞クローンとして#16とD10.G4.1を用いた。表3-2に示すようにいずれのCD8陽性T細胞株においても抗IL-10抗体の添加により有意な増殖の増強が認められた。これに対してCD4陽性T細胞クローンの増殖はTh1(#16)、Th2(D10.G4.1)ともに抗IL-10の影響を受けなかった。このことから抗IL-10抗体による増殖促進効果はCD8陽性T細胞に特異的であることが示唆された。

次に抗IL-10抗体によるT細胞増殖増強効果を時間を追って調べた(図3-5)。抗IL-10抗体を培養開始時に加え、T細胞を図に表示された時間培養し、最後の16時間のチミジン取り込み量を測定した。その結果、培養開始3日目以降に強く現われる抗IL-10抗体による増殖の増強活性は、抗IL-10抗体は培養開始時から存在するにもかかわらず培養開始から1、2日目には全く観察されないことが明らかとなった。一方、CD4陽性T細胞クローンの増殖はTh1、Th2ともに培養全期間を通して抗IL-10抗

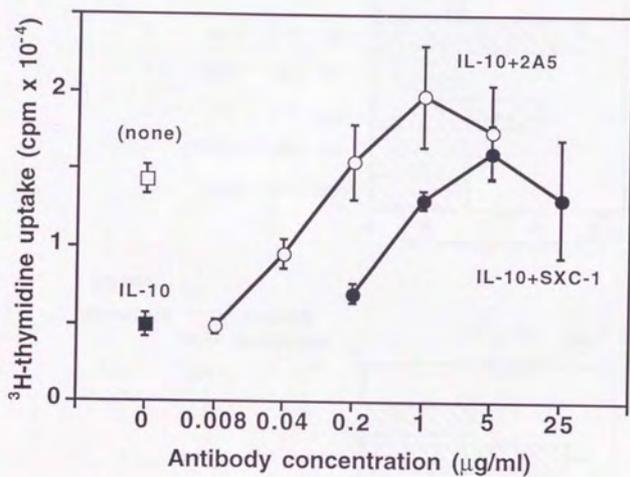
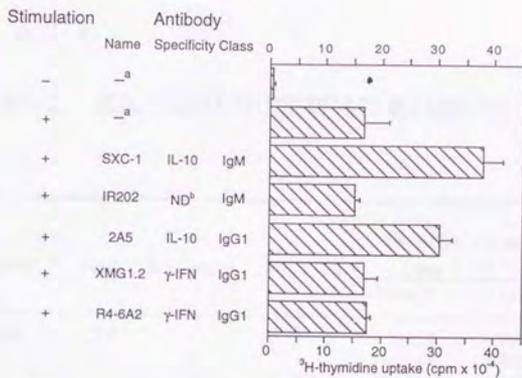


図3-3. 抗IL-10抗体の中和活性の検討

16の増殖に対する5 U/mlのIL-10の抑制効果を中和する抗IL-10抗体の濃度を検討した。

(A) 4B4



(B) 6B1

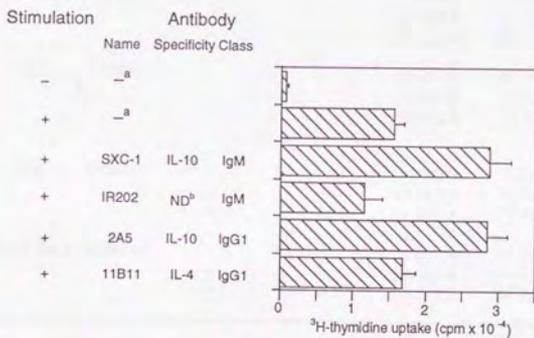


図3-4. 抗IL-10抗体のCD8陽性T細胞増殖に及ぼす影響の検討

それぞれの抗体を培養開始時に加え、(A) 4B4、(B) 6B1の細胞増殖に対する影響を検討した。
a. 抗体を加えないときの増殖応答
b. 特異性は不明

表3-2. 抗IL-10抗体の増殖増強効果の選択性

Name	Type	Stimulation	Anti-IL-10	Thymidine uptake (cpm x 10 ⁻³)	
				Expt. 1	Expt. 2
4B4	CD8	-	-	1.0±0.8	0.3±0.0
		+	-	13.2±1.2	9.2±2.0
		+	+	<u>38.1±4.9</u>	<u>21.1±1.3</u>
D2	CD8	-	-	0.4±0.1	0.2±0.0
		+	-	10.1±0.9	15.1±0.9
		+	+	<u>15.6±1.9</u>	<u>24.6±2.0</u>
6B1	CD8	-	-	0.5±0.2	0.6±0.0
		+	-	4.0±0.3	2.2±0.3
		+	+	<u>9.4±1.1</u>	<u>4.6±0.8</u>
#16	CD4Th1	-	-	1.1±0.3	0.2±0.1
		+	-	42.9±0.3	16.3±0.0
		+	+	43.2±0.4	13.7±0.6
D10.G4.1	CD4Th2	-	-	2.3±0.3	1.1±0.5
		+	-	85.2±2.9	39.1±3.9
		+	+	86.3±1.2	36.3±1.6

培養開始時に加えたSXC-1 (5 μg/ml) の影響を検討した。抗体の添加によって増加した応答に下線を付した。

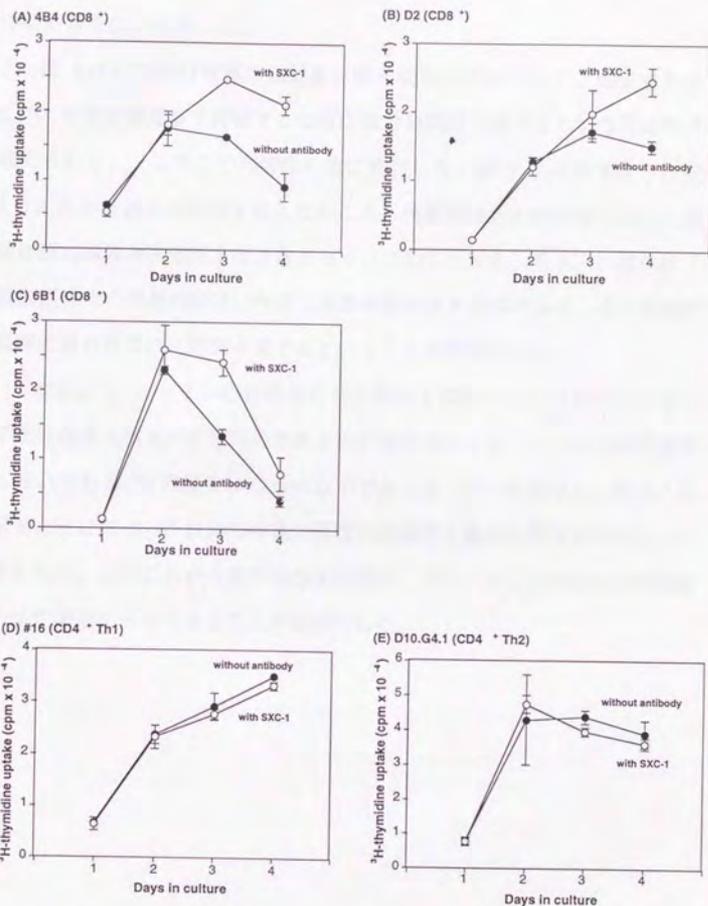


図3-5. 抗IL-10抗体の増殖促進活性のカイネティクス

各T細胞クローンを培養し、培養開始時に加えた抗IL-10抗体の影響を時間を追って検討した。表示された期間細胞を培養し、最後の16時間のチミジン取り込み量を測定した。

体の影響を受けなかった。

抗 IL-10 抗体の増殖増強効果が遅く現れる理由として、産生された IL-10 が有効濃度まで蓄積するために数日の時間を要するという可能性が考えられた。そこでこの可能性を次に検討した。図 3-6 に示すように抗 IL-10 抗体を加える時期を変えたところ、培養開始 24 時間後に加えた抗体は既に増殖増強効果を有さなかった。このことから、抗 IL-10 抗体は T 細胞活性化の初期の段階に作用し増殖増強効果を発揮するが、その効果が実際に現われるのに時間を要することが示唆された。

次に α_{s1} -カゼイン特異的な CD8 陽性 T 細胞クローン 6 B 1 を用いて抗原濃度と抗 IL-10 抗体の効果との相関を検討した。いずれの抗原濃度においても IL-10 の産生は 5U/ml 以下であった（データ省略）。図 3-7 に示すように抗 IL-10 抗体の存在は至適抗原濃度を微妙に変化させることが示された。このことから自律的増殖制御は、クローンごとの至適抗原濃度の決定因子の一つであることが推察された。

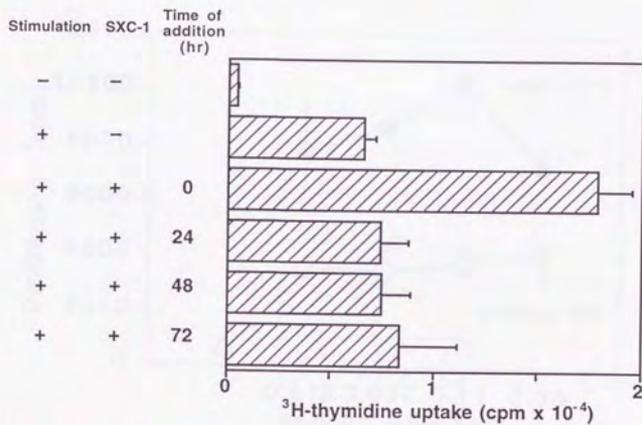


図3-6. 抗IL-10抗体の増殖増強効果に及ぼす添加時期の影響

4 B 4 の抗原提示細胞による増殖に、培養開始後表示された時間に抗IL-10抗体を加えその影響を検討した。細胞は4日間培養し、最後の16時間のチミジン取り込み量を測定した。

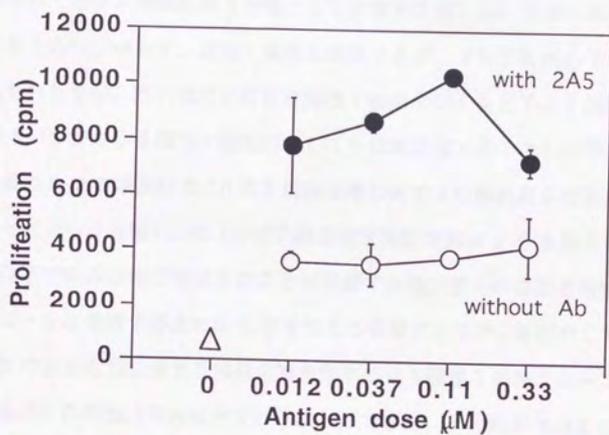


図3-7. 抗原濃度がIL-10の増殖増強効果に及ぼす影響

6 B 1 を抗原提示細胞と抗原で刺激し抗IL-10抗体 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 2 A 5) の増殖増強効果を検討した。

考察

IL-10 は CD 8 陽性 T 細胞クローンの増殖を抑制する

IL-10 の免疫抑制効果は T 細胞のタイプによって異なることが既に報告されており、増殖応答を指標として本章第 2 節において述べるように、Th 1 のリンホカイン産生・増殖を抑制するが、Th 2 に対しては抑制効果をもたない。既に述べた CD 8 陽性 T 細胞クローンと Th 1 の類似性から、IL-10 が CD 8 陽性 T 細胞に対しても抑制効果を示すことが予想された。多量の IL-2 の添加は IL-10 の T 細胞増殖に対する抑制効果を打ち消すことから（データ省略）、IL-10 の T 細胞増殖抑制効果は IL-2 を加えない実験条件下でのみ正確に測定することが可能である。多くの CD 8 陽性 T 細胞クローンは増殖するために IL-2 を加える必要があるが、本研究においては IL-2 の添加なしに有意な増殖応答を示す CD 8 陽性 T 細胞クローンを用いて IL-10 の抑制効果の解析を行うことができた。その結果 IL-10 は CD 4 陽性 Th 1 クローンのみでなく、インターフェロン γ を産生し IL-4 を産生しない CD 8 陽性 T 細胞クローンの増殖をも抑制することが明らかとなった。

CD 8 陽性 T 細胞は IL-10 を産生することによって自らの増殖を抑制する

次に抗 IL-10 抗体を用いた実験によって、応答細胞が産生する IL-10 の影響について検討した。その結果、CD 8 陽性 T 細胞クローンが IL-10 を産生し、自らの増殖を抑制していることが示された。Bejarano らはヒトの混合リンパ球反応が、抗 IL-10 抗体によって高められたことを報告して

いる(104)が、残念ながら彼らの研究においては IL-10 産生細胞と増殖応答を示す細胞とを正確に同定していない。あるクローンが IL-10 を産生し、その結果みずからの増殖を抑制しうることがクローンレベルで明かとなったのは本研究が初めてである。T細胞増殖において、オートクラインに作用し増殖を維持するリンホカインは、IL-2、IL-4 においてよく知られているが、IL-10 ははじめて発見されたT細胞増殖の自己抑制性リンホカインである(図 3-8)。`自己抑制`という言葉は、T細胞の産生したリンホカインが直接T細胞に作用して増殖を抑制することを想起させるが、本研究においてはT細胞の産生した IL-10 が最終的にその産生細胞自身の増殖を抑制したという意味でこの言葉を用いることとする。IL-10 は初めて発見されたT細胞増殖の自己抑制活性を持つリンホカインとなる。また、CD 4 陽性T細胞クローンでは抗 IL-10 抗体の効果は認められなかったことから、IL-10 の自己抑制性リンホカインとしての新たな役割はCD 8 陽性T細胞に特異的な現象であるものと考えられた。抗 IL-10 抗体の増殖促進効果は劇的なものではないが、ここで増殖応答のあるクローンとして用いたクローンはいずれも IL-10 の産生量があまり多くないことから、さらに多量の IL-10 を産生するクローンにおいてはこの現象はより重要性を持つものと推測された。

この内因性 IL-10 の効果は増殖応答の後期に観察された。培養開始 24 時間後に加えた抗 IL-10 抗体は全く増殖応答に影響を及ぼさなかったことから、この時間的遅れは活性を発揮するのに十分な量の IL-10 を蓄積するための時間を反映しているものではないことが示された。そのためT細胞活性化初期における IL-10 の効果が時間を経て現れたものと考えられた。第 2 節で示すように、IL-10 による Th 1 のリンホカイン産生抑制においては、IL-10 の標的機能はT細胞活性化に要する副刺激であることが示唆

CD8陽性T細胞
(IL-10を産生する
(IL-10により増殖阻害を受ける

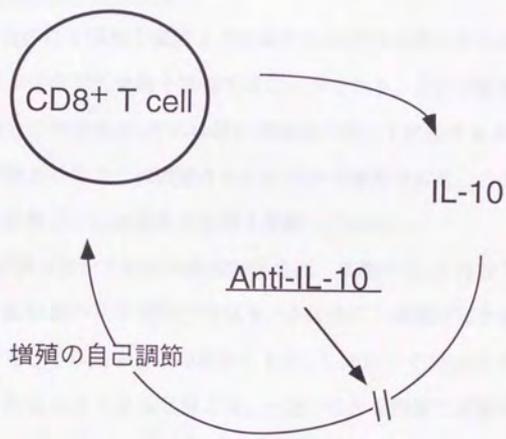


図3-8. CD8陽性T細胞の産生するIL-10の役割
CD8陽性T細胞はIL-10を産生し、同時にその増殖はIL-10感受性であった。CD8陽性T細胞はIL-10を産生し、自らの増殖を調節していることが明らかとなった。

されている。CD 8 陽性 T 細胞の増殖抑制においても同様に抗原提示細胞を介した間接作用であるものと考えられ、IL-10 の増殖抑制効果の遅延性はこの標的となる副刺激の性質によるものと推察された。これにより CD 8 陽性 T 細胞による免疫応答が行き過ぎるのを防ぎ適度な強さに保つものと考えられた。

増殖の自己抑制の持つ意義

IL-10 と CD 8 陽性 T 細胞との性質から本研究で明らかになった増殖の自己調節の生物学的意義を推測することができる。この増殖抑制が常に同程度起こるのであれば、それは単に増殖能の低い T 細胞であるに過ぎず、この自己抑制がどのように調節されているかが重要である。この点に関して、IL-2 の影響及び抗原濃度の効果を考察してみたい。

IL-10 が持つ強い T 細胞増殖抑制活性は、多量の IL-2 存在下では認められない。飽和量の IL-2 存在下では IL-10 は逆に T 細胞増殖を増強するコファクターとして作用するとの報告もある。したがって、IL-10 の生物活性を決定するのは IL-2 であると言える。一方、CD 8 陽性 T 細胞の多くは増殖するために、主に CD 4 陽性 T 細胞から供給される IL-2 を必要とする。IL-2 非存在下でのみ観察される増殖抑制は、CD 4 陽性 T 細胞による免疫応答に無関係に CD 8 陽性 T 細胞が活性化され過ぎるのを防ぐ安全装置として働く可能性があげられる。IL-2 を多量に産生する様な激しい免疫応答に際してはすばやく増殖する能力を保ちながら、通常は自らの増殖を低く抑えておくシステムは、CD 8 陽性 T 細胞の役割が過度の免疫応答を抑制することであると考えると合理的である。また、CD 8 陽性 T 細胞は強い細胞障害活性を持つことから、通常は生体自身を守るために一定数を超えないような仕組みが備わっていると考えられる。一方 IL-2 の不在

は、実験上CD8陽性T細胞の応答がCD4T細胞の応答がない状況では観察しにくい理由の一つであると考えられた。

抗原濃度を振った実験からは抗IL-10の存在下では6B1の増殖がより低い抗原濃度でもっとも強くなることが認められた。このことはIL-10による増殖の自己抑制の強さによって、あるクローンの至適抗原濃度が影響を受けることを示すものである。Allenらは抗原ペプチドを部分置換することによって、あるCD4陽性T細胞クローンの複数のT細胞応答の内特定のを独立に制御可能であることを報告している(105-106)。同様な現象がCD8陽性T細胞のIL-10の産生についてもあてはまれば、類似したペプチドが至適抗原濃度を大きく異にすることが予想される。類似した抗原を的確に区別しなければならない免疫系の新たな調節機構と考えられるかもしれない。

さらに増殖における不応答状態の可能性についてふれたい。実験によっては4日目のチミジン取り込みがバックグラウンドと同じにしか見られない増殖応答が、抗IL-10抗体によって復活することが観察された。通常T細胞の不応答状態は増殖能の欠如として定義され、場合によっては細胞傷害活性やリンホカイン産生などの他の応答は残ることが知られている(104,106-107)。多量のIL-10を産生するクローンによってはこのようなメカニズムで不応答状態を維持する可能性もある。T細胞をIL-10高産生性に分化させる刺激はこのような意味でのCD8T細胞の寛容源として機能する可能性を示唆するものと考えられた。

本研究でマウスCD8陽性T細胞クローンについて明らかとなったことは、ヒトにおいてはさらに大きな一般性を持つ可能性がある。ヒトCD4陽性T細胞クローンは、マウス同様IL-2、IL-4、インターフェロン γ 産

生パターンによってTh1、Th2に分類されるが、IL-10はどちらのサブセットでも産生される。そしてそのどちらの増殖もIL-10による抑制を受けることが報告されている(108)。このことはIL-10による自己制御、またその一形態としての不応答状態の維持機構がヒトにおいてはさらに様々な抗原、T細胞サブセットに対して当てはまる可能性を提示する。この点は推察の域をでないが、マウスCD8陽性T細胞クローンは興味深いモデル系として有用であると考えられる。

第2節 IL-10の増殖抑制機構の解析

序

前節において IL-10 は CD 8 陽性 T 細胞の増殖を自己抑制的に調節することを明らかとした。また、当研究室において初めて明らかにされたように IL-10 は CD 8 陽性 T 細胞クローン 1 3 G 2 が CD 4 陽性 T 細胞クローン 3 D 2 0 の増殖を抑制する際に重要な役割を果たす (32,33)。このことから IL-10 は CD 8 陽性 T 細胞においてその機能・活性調節を考える上で欠かせないものであると考えられた。

IL-10 は Th 2 が産生し Th 1 のインターフェロン γ 産生を抑制するリンホカインとして本研究遂行とほぼ同じ頃に同定された (38)。しかし当時 IL-10 の抑制機構については全く明らかとなっておらず、またそれまでに数多くの研究から存在が示唆されていた可溶性免疫抑制因子の抑制機構についてもほとんど知られていなかった。さらに、CD 4 陽性 Th 1 による免疫応答は主に炎症反応であることが知られ、リウマチなどの慢性病の治療においてその活性抑制は重要であると考えられた。そこで本節では IL-10 の T 細胞増殖抑制機構を明らかにすることを目的とした。CD 8 陽性 T 細胞においては T 細胞増殖を誘導するための刺激が同時に IL-10 の産生を引き起こすため、抑制機構の解析は困難であると考えられた。そこで IL-10 非産生性の CD 4 陽性 Th 1 を用いて解析を行った。以下に示すように、IL-10 は T 細胞に直接働きかけるのではなく、抗原提示細胞を介して間接的に作用することが示された。このことから、本節で明らかになった増殖抑制機構は CD 8 陽性 T 細胞についても当てはまる普遍性を有しているものと考えられた。

材料及び方法

抗原

カサ貝のヘモシアニン (keyhole limpet hemocyanin, K L H) は Calbiochem Behring から、コンアルブミンは WAKO から購入した。

T細胞クローン

本章においては様々な抗原特異性、リンホカイン産性パターンを有する CD 4 陽性 T 細胞クローンを用いた。T h 1 クローンとして、 α_{SI} -カゼイン特異的クローン 3 D 2 0、1 1 D 4 (95, 当研究室において久恒により樹立)、アロ応答性クローン # 1 6 (第 1 節に記載)、K L H 特異的クローン 2 8-4、9-1 6 (109, 東京大学医学部多田富雄教授より恵与)、また、T h 2 クローンとして自己応答性クローン 4 G 4 (101, 当研究室において樹立)、M S S B (109, 東京大学医学部多田富雄教授より恵与)、K L H 特異的クローン 8-5 (109, 東京大学医学部多田富雄教授より恵与)、コンアルブミン特異的クローン D10.G4.1 (第 1 節に記載) を用いた。これらの細胞は 7 日に一度 5% T C G F の存在下抗原提示細胞と抗原によって刺激することによって継代した。本章で用いたこれらのクローンの性質を表 3-3 にまとめた。

T細胞増殖試験

T 細胞増殖は前節に準じて測定した。また、T 細胞を抗原提示細胞非存在下刺激する方法として固相化抗体による刺激を用いた(110)。抗 T 細胞レセプター抗体の溶液 (特に記述がない場合は 20 μ g/ml のものを用い

表3-3. 本章で用いたCD4陽性T細胞クローンの特性

Name	Type	Specificity		Origin	Ref.
		MHC	Antigen		
3D20	Th1	A ^b	α_{S1} -casein	B6	95
11D4	Th1	A ^b	α_{S1} -casein	B6	95
#16	Th1	A ^b	(alloreactive)	C3H	102
28-4	Th1	A ^k	KLH	F1	109
9-16	Th1	E ^k	KLH	F1	109
D10.G4.1	Th2	A ^k	Conalbumin	AKR/J	103
4G4	Th2	A ^b	(autoreactive)	B6	101
8-5	Th2	A ^b	KLH	F1	109
MSSB	Th2	A ^k	(autoreactive)	C3H	109

た) をプレートに 50 μ l まぎ、37°C で 2 時間インキュベートし、結合しなかった抗体を洗い落とした後、T 細胞を加え培養を行った。

増殖抑制の強さを以下の式で計算した。

$$\% \text{suppression} = \frac{(\text{IL-10 存在下の正味のチミジン取り込み量})}{(\text{IL-10 非存在下の正味のチミジン取り込み量})} \times 100$$

ただし、それぞれの取り込み量からバックグラウンドを差し引いたものを正味のチミジン取り込み量とした。

抗原提示細胞の前処理

脾臓細胞 1×10^7 を 6well プレート中で様々な物質と共に 15 時間培養した後、全ての細胞をトリプシン-EDTA 溶液によってプレートからはがして回収し、2 回洗浄し、3Gy の X 線照射後抗原提示細胞として用いた。脾臓細胞は 1 晩の培養によって抗原をプロセッシングする能力を失いタンパク質抗原は提示できなくなるため、プロセッシングの不要な 20 残基のペプチドフラグメント (α_{s1} -カゼイン 136-155) を抗原として使用した。

結果

IL-10 の増殖抑制効果の選択性

まず最初に IL-10 の効果を様々な細胞株に対して検討した。表 3-4 に示すように T h 1 に属する T 細胞クローンの抗原特異的増殖に対して IL-10 は強い抑制効果を示した。一方 T h 2 に属するクローンに対しては全く抑制効果は観察されなかった。このことからマウス IL-10 はマウス T h 1 細胞の増殖を選択的に抑制する活性を持つことが明らかとなった。次に IL-10 の抑制効果の濃度依存性を検討した。図 3-9 に示したように、2U/ml の IL-10 の添加によって T h 1 クローン # 16 の増殖応答はおよそ 50% 抑制された。一方 T h 2 に属する D10.G4.1 の増殖は 50U/ml の IL-10 存在下でも影響は受けなかった。次に増殖のカイネティクスについて検討を加えた。図 3-10 に示すように抗原刺激による強いチミジン取り込みが観察され始める培養開始 2 日後から IL-10 の抑制効果ははっきりと観察され、その抑制効果は培養開始 3-4 日目に特に強く現れた。一方、D10.G4.1 の増殖は全培養期間を通じて加えた IL-10 の影響を受けなかった。

<IL-10 による T h 1 の増殖抑制機構の解析>

IL-10 は T 細胞活性化の初期に作用する

次に IL-10 の T h 1 細胞増殖抑制効果の作用機構の検討を行った。まず、IL-10 が T 細胞活性化のどの時期に作用しているのかを検討した。その結果培養開始後 24 時間後に加えた IL-10 は全くその抑制作用を見せないことが示された (データ省略)。このことから、IL-10 は T 細胞活性化の初期に作用することが必要であることが示された。

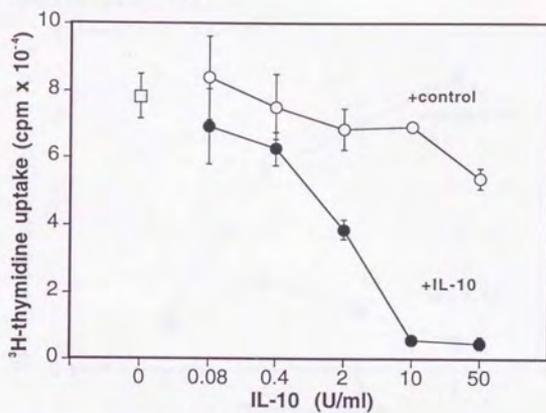
表3-4. CD4陽性T細胞クローンの増殖に対するIL-10の抑制活性の検討

Responding Cells		Thymidine Uptake (cpm x 10 ⁻³)		%Suppression
Name	Type	Cells were Cultured without IL-10	with IL-10	
3D20	Th1	55.7±8.8	5.1±0.8	83
11D4	Th1	24.5±3.9	0.5±0.0	102
#16	Th1	13.5±2.4	2.4±0.3	83
28-4	Th1	23.1±3.5	3.2±0.1	106
9-16	Th1	8.1±1.9	1.1±0.3	86
D10.G4.1	Th2	36.2±0.4	40.0±2.8	-10
4G4	Th2	6.0±0.1	6.8±0.2	-13
8-5	Th2	5.8±1.4	4.6±1.8	23
MSSB	Th2	51.9±6.7	56.5±9.9	-8

刺激なしでのチミジン取り込み量は以下の通りであった。

3D20: 0.5±0.1, 11D4: 0.8±0.1, #16: 0.2±0.1, 28-4: 5.8±3.3, 9-16: 0.5±0.2,
D10.G4.1: 6.3±0.8, 4G4: 0.7±0.1, 8-5: 0.5±0.2, MSSB: 15.2±2.1

(A) #16 (CD4⁺ Th1)



(B) D10.G4.1 (CD4⁺ Th2)

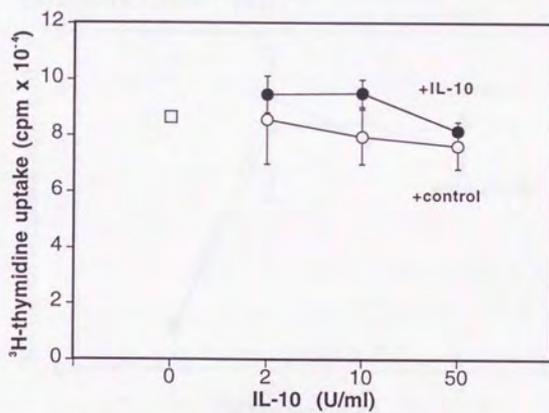


図3-9. IL-10の増殖抑制効果の濃度依存性の検討

それぞれのT細胞クローンを抗原提示細胞の存在下適当な抗原で刺激した。COS細胞に発現させたIL-10を培養開始時に濃度を変えて加えた。IL-10を遺伝子導入しなかったCOS細胞の培養上清をコントロールとして加えた。

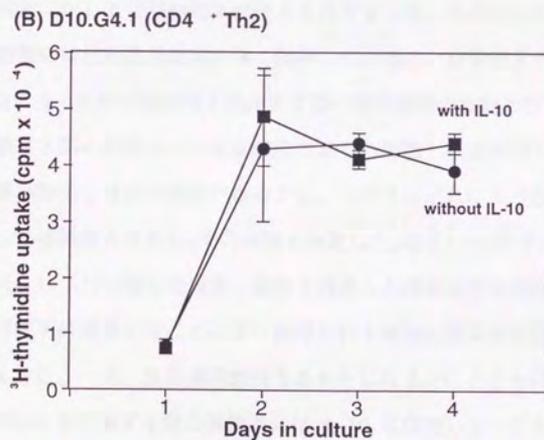
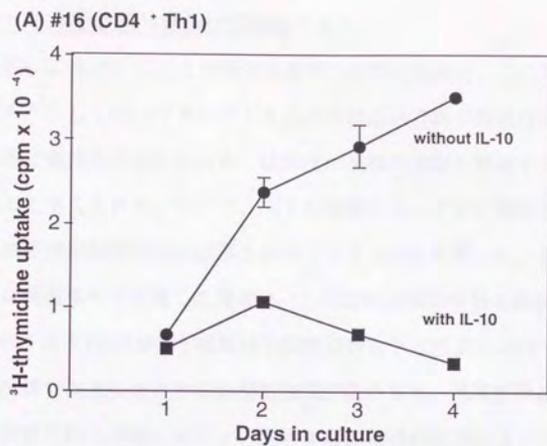


図3-10. IL-10がT細胞増殖応答のカイネティクスに及ぼす影響

T細胞クローンを抗原刺激により培養した。IL-10を培養開始時に加え、表示された時間細胞を培養し最後の16時間のチミジン取り込み量を測定した。

IL-10 の標的細胞は抗原提示細胞である

さらに IL-10 による増殖抑制機構の解明を試みた。ここまで CD4 陽性 Th1 として用いてきた #16 はアロ反応性であり抗原提示細胞を加えるのみで活性化が始まるため、抗原提示細胞の役割を解析する上で不向きであると考えられた。そこで、以下の実験においては T 細胞クローンの刺激に抗原提示細胞の他に抗原を必要とする 3D20 を用いた。まず 3D20 を様々な刺激条件で刺激した際の IL-10 の抑制効果の有無を検討した。表 3-5 に示すように 3D20 を抗原提示細胞の存在下抗原または抗 T 細胞レセプター抗体で刺激したときのみ抑制効果が認められ、抗原提示細胞非存在下での固相化抗 T 細胞レセプター抗体または IL-2 の刺激によって引き起こされる増殖に対しては抑制効果が認められなかった。このことから IL-10 の抑制効果には抗原提示細胞が深く関与していることが示唆された。

次に IL-10 が抑制効果を発揮する際の標的細胞の検討を行った。3D20 を刺激する際の実験系には応答細胞である T 細胞と刺激細胞である X 線照射脾臓細胞の 2 種類の細胞が存在する。このそれぞれに IL-10 を加えて前培養した後両者を混合し、その増殖を測定した。図 3-11 に示すように 3D20 を IL-10 により処理した場合、細胞を洗浄した後未処理抗原提示細胞と抗原の存在下共培養することにより誘導される増殖応答は未処理の場合と同等であった。一方、抗原提示細胞をあらかじめ IL-10 とともに前培養すると、3D20 を刺激する際の実験系には IL-10 は存在しないにも関わらず、3D20 の増殖が有意に低くなることが観察された。これらのことから IL-10 が CD4 陽性 Th1 細胞株の増殖を抑制する際の標的細胞は抗原提示細胞であることが示された。

IL-10 が抗原提示細胞を介して抑制作用を示す場合その作用機構とし

表3-5. IL-10の増殖抑制効果の刺激特異性の検討

Stimuli	IL-10	Thymidine uptake (cpm x 10 ⁻³)	%suppression
None	-	0.5±0.4	
	+	0.6±0.3	
APC+Ag	-	76.2±1.0	
	+	10.0±1.1	89
APC+anti-TcR	-	29.5±4.0	
	+	2.4±0.5	99
Immobilized anti-TcR	-	7.3±0.4	
	+	7.2±0.3	2
IL-2	-	47.8±3.1	
	+	50.8±1.4	-6

3D20を抗原提示細胞と抗原、抗原提示細胞と抗T細胞レセプター抗体溶液、固相化した抗T細胞レセプター抗体、IL-2によって刺激して誘導した増殖に対して、培養開始時に加えたIL-10の抑制効果を検討した。

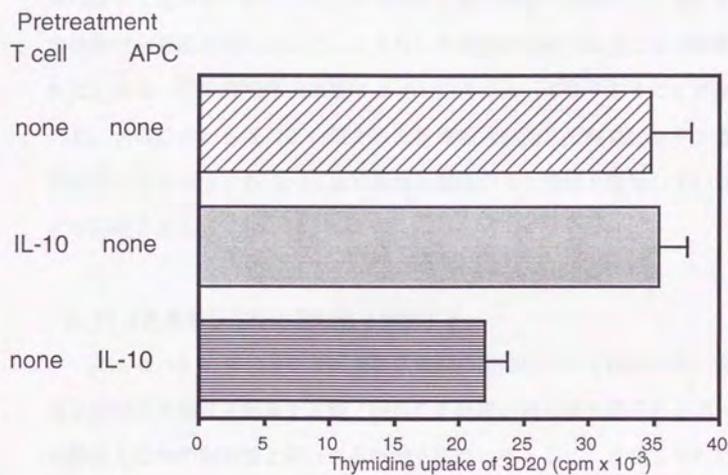


図3-11. IL-10の増殖抑制効果の標的細胞

T細胞クローン3D20または抗原提示細胞をIL-10とともに前培養したものをIL-10処理細胞として用いた。コントロールの細胞はIL-10の非存在下同条件下で培養し、これらを組み合わせてT細胞の増殖応答を測定した。抗原として20残基の合成ペプチド136-155を用いた。

て次の2つの可能性が想定される。まず IL-10 が抗原提示細胞の持つ機能を阻害する可能性、次に IL-10 が抗原提示細胞に作用して何らかの抑制機能を誘導する可能性である。このうち後者の可能性を次に検討した。図 3-12 に示すように IL-10 で処理された抗原提示細胞は未処理の抗原提示細胞によって誘導される 3D20 の増殖応答を全く抑制しなかった。逆に多量の抗原提示細胞を加えることによりむしろ増殖が強められることが観察された。また、この増殖増強効果は IL-10 処理によって低下することが示された。このことから IL-10 処理された抗原提示細胞は抑制活性を有するのではないことが示され、IL-10 は抗原提示細胞のもつ機能を阻害していることが示唆された。

IL-10 は抗原提示細胞の副刺激を抑制する

次に IL-10 の標的となる抗原提示細胞の機能について検討した。抗原提示細胞は T 細胞を刺激する際、MHC と抗原の複合体を提示するが、この際さらに他の副刺激と呼ばれる刺激も同時に与えることが報告されている。そこで IL-10 が副刺激を抑制しているのかどうかを次に検討した。実験系として Unanue らが副刺激を測定する系として報告している系(111)を採用した。その概略を図 3-13 に示す。T 細胞は固相化した抗 T 細胞レセプター抗体によって MHC 抗原複合体を模倣した刺激を受ける。同時に抗原提示細胞を加えることによってそれ以外の刺激を与えるというものである。副刺激の特徴として、表に示すようにこの際の抗原提示細胞は MHC が一致している必要がなく、また抗原提示細胞単独では 3D20 の増殖を誘導することができないことが確認された。この系に IL-10 を加えた。図 3-14 に示すようにいずれの抗体濃度においても、固相化抗 T 細胞レセプター抗体のみによるごく弱い増殖に対して IL-10 は全く抑制効果を示さないこ

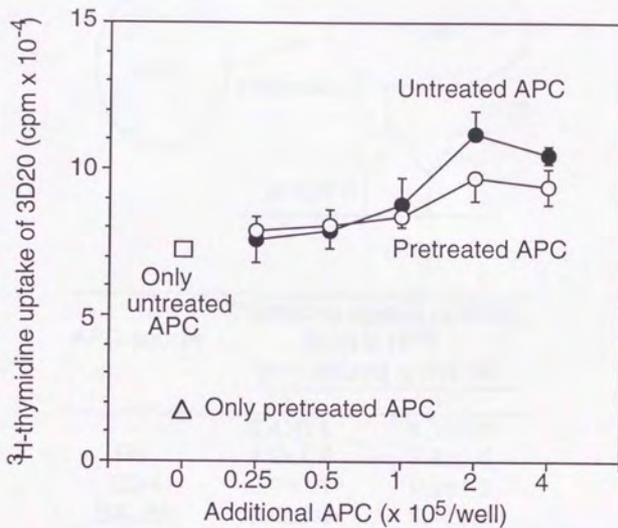
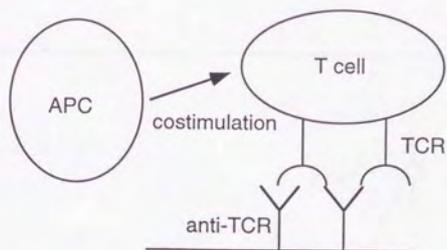


図3-12. IL-10処理抗原提示細胞の細胞増殖抑制能の検討

IL-10処理抗原提示細胞の数を変えて、未処理抗原提示細胞によって誘導される増殖応答に加え、その効果を検討した。



APC source	Thymidine uptake of 3D20 (cpm x 10 ⁻³)	
	Immobilized anti-TCR	
	-	+
-	0.4±0.1	1.1±0.1
B6	1.2±1.2	7.2±0.6
C3H	0.7±0.1	9.3±1.5
BALB/c	0.6±0.0	8.4±0.1

図3-13. 抗原提示細胞の副刺激伝達能

上図に示した仕組みによって抗原提示細胞の持つ副刺激伝達能を測定した。下表のようにMHCに関わりなく増殖応答を増強する。

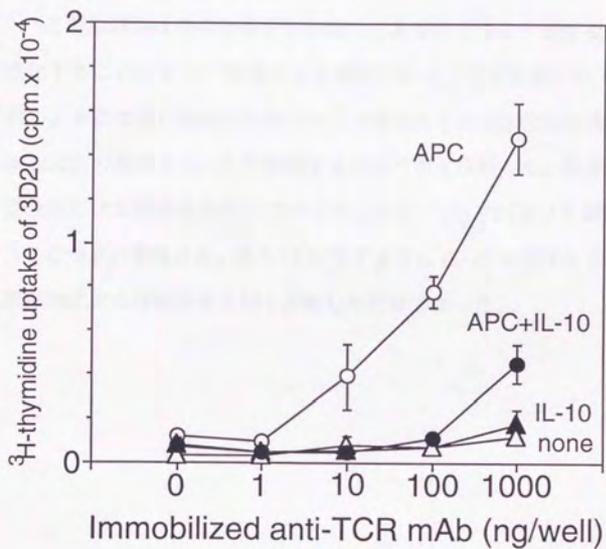


図3-14. IL-10の副刺激抑制活性の検討

3 D20細胞を固相化抗T細胞レセプター抗体によって刺激した。副刺激のある条件としては抗原提示細胞を加えた。培養開始時に添加したIL-10の増殖抑制効果を検討した。

とが確認された。一方ここに抗原提示細胞を加えた場合その増殖は相乗効果によって強められ、この増殖は IL-10 の添加によって強く抑制されることが示された。これらのことから IL-10 は抗原提示細胞の副刺激を抑制する活性を持つことが示された。

この副刺激は常に抗原提示細胞上にあるのではなく抗原提示細胞を活性化することによって誘導される機能であることが報告されている(112-113)。そこで次に副刺激をあらかじめ発現させた活性化抗原提示細胞による 3D20 の増殖を IL-10 が抑制するかどうかを検討した。抗原提示細胞の活性化には大腸菌由来のリポポリサッカロイド(LPS)及び T細胞増殖因子(TCGF)を用いた。図 3-15 に示すように IL-10 は活性化された抗原提示細胞による増殖応答を弱く抑制したのみであった。

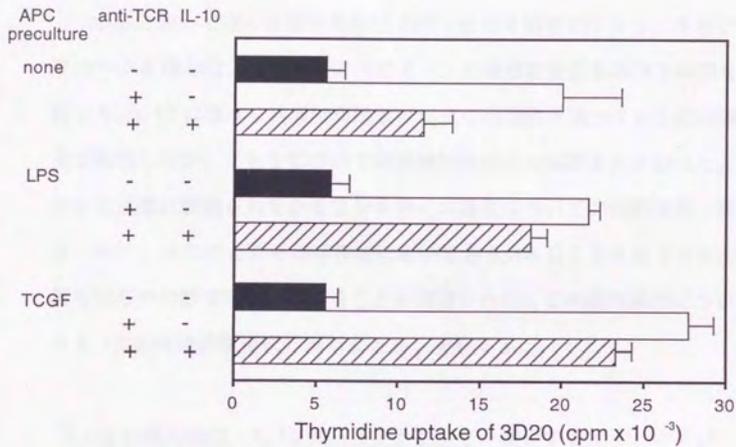


図3-15. 活性化した抗原提示細胞によって誘導される増殖に対するIL-10の効果

脾臓細胞をあらかじめLPS、TCGFとともに前培養し、抗原提示細胞として用いた。

考察

IL-10による増殖抑制効果の選択性：IL-10はTh1の増殖のみを抑制する

本節において様々な抗原特異性を持つCD4陽性のTh1、Th2のクローンを種々用いることによってIL-10の増殖抑制効果の及ぶ範囲を検討した。IL-10は様々な抗原特異性及びMHC拘束性を持つTh1の増殖を全て抑制したが、Th2については増殖抑制効果は観察されなかった。このことは既に報告されているリンホカイン産生についての選択性と一致する(39)。このことから増殖抑制においてもIL-10はTh1とTh2の差異を何らかの形で識別していることが確認された。この識別機構についてはIL-10の増殖抑制機構の解析とともに考察する。

IL-10の標的細胞：IL-10は抗原提示細胞を不活化する

本研究において、IL-10による免疫抑制機構についても興味深い情報を得ることが出来た。

まずT細胞クローンを様々な方法で刺激したときのIL-10の抑制効果の比較からIL-10がTh1の増殖抑制効果を発揮するのはT細胞を抗原提示細胞の存在下刺激したときのみであることが示され、その抑制活性と抗原提示細胞との関連が示唆された。T細胞の培養開始24時間後に加えたIL-10は抑制効果を持たないという実験結果はIL-10の抑制活性はT細胞の活性化初期に関わることを示唆し、このことも抗原提示細胞の関与という仮説と矛盾しない。さらに、抗原提示細胞またはT細胞をIL-10で前処理する実験から、IL-10は抗原提示細胞に作用してその抑制効果を現してい

ることが明らかに示された。しかし、このことは IL-10 がそれ以外の効果を持たないということの意味するものではない。T細胞と抗原提示細胞が相互作用をするとき、または活性化を受けた後初めてT細胞が IL-10 の抑制効果を直接受けることが出来るようになるなどの可能性が残されている。T細胞サブセットによる選択性を最も簡単に説明できる仮説はT細胞サブセットによって IL-10 レセプターの表現量が異なりこれによって感受性に差がでるといものである。しかし抗原提示細胞に対する明白な効果が確認できたため以後抗原提示細胞に対する IL-10 の効果を検討した。

IL-10 の抑制効果が抗原提示細胞と密接に関わっているということは2つの可能性が考えられた。まず IL-10 が抗原提示細胞として用いている脾臓細胞の抑制活性を新たに誘導する可能性である。これには IL-10 が抗原提示細胞によって活性型に変換されるという可能性を含んで考えることができる。一方の可能性としては、抗原提示細胞がT細胞活性化において本来果たすべき役割を IL-10 が阻害するというものである。この点を検討するために、IL-10 とともに前培養した抗原提示細胞がT細胞増殖の抑制活性を有しているかどうかを検討した。その結果、IL-10 処理細胞はT細胞の増殖を起こす能力は弱いものの、未処理細胞によって起こされるT細胞増殖に対して抑制活性を持たないことが明らかとなった。このことから IL-10 は抗原提示細胞の持つ何らかの機能を阻害することによってT細胞増殖を抑制していることが示された。IL-2 により誘導される増殖は抗原提示細胞の存在下であっても IL-10 により抑制されないことも（データ省略）、抗原提示細胞によって IL-10 が刺激非特異的な抑制活性を得るのではないことを支持するものである。

IL-10 の標的分子：IL-10 は副刺激を阻害する

次に IL-10 が阻害する抗原提示細胞の機能の同定を試みた。図 3-13 に示したように T 細胞活性化における抗原提示細胞と T 細胞の相互作用においては 2 種類が考えられる。まず T 細胞レセプターを介して MHC・抗原複合体の情報を読みとる必要がある。これによって抗原特異的な T 細胞が活性化されることになる。次に、副刺激と総称される刺激がある(114-118)。T 細胞側のレセプターとしては CD 28、CTLA-4、IL-1 レセプター等が知られ、一方リガンドは抗原提示細胞の細胞表面にあって作用するものとして CD 80 (B7)、B7-2、J11d が、可溶性タンパクとして IL-12、IL-1 が報告されている。この他に接着分子として知られる LFA-1 等を含めて考えることもある。このように副刺激には未知のものも含めて様々なレセプター・リガンドのセットがあり得る。その定義は、T 細胞レセプター刺激の非存在下においては T 細胞増殖を誘導できないが T 細胞レセプターの刺激とともに与えられることによって T 細胞を強く活性化する刺激であること、及び抗原提示細胞側の MHC に関わりのない分子であることである。William らによって報告された実験系(111)は図 3-13 で確認したように、この条件を満たす抗原提示細胞の機能を測定可能なものである。この系を用いて IL-10 の抑制効果を検討したところ、抗 T 細胞レセプター抗体のみによる弱い増殖は IL-10 によって全く抑制されなかったのに対し、抗原提示細胞存在下での強い増殖は IL-10 によって抑制されることが観察された。このことから、IL-10 は抗原提示細胞の副刺激を阻害することによって Th 1 の増殖を抑制することが示された。ある種の副刺激は MHC・抗原複合体を提示する同一の細胞によらなければ伝えられないとの報告(114)もあり、この実験系で全ての副刺激を測定することは不可能である。しかし、この抗原提示細胞の機能は抗 J11d 抗体、抗 LFA-1 抗体、抗 CD 45 抗体、抗 MAC-1 抗体により阻害されたことから(データ省略)、様々なリガン

ドの効果を同時に測定可能な実験系と考えられ、これらのうちのいずれかが IL-10 の標的分子である可能性がある。

IL-10 の抑制作用が抗原提示細胞の副刺激の阻害によるということは、T 細胞サブセットによって必要とする副刺激が異なることから、その選択性を説明する実験結果であると考えられる。副刺激として最初に発見された IL-1 は T h 2 の増殖を強く促進するが、T h 1 には何の影響も持たない(119)。一方 T h 1 の IL-2 レセプターを発現させる活性が知られる IL-12 は、T h 1 に選択的に作用するとの報告がある(117)。IL-10 はおそらく T h 1 に特異的な副刺激を抑制するものと考えられる。この仮説はその後の Ding ら(120)、D'Andrea ら(121)の報告によって証明されている。Ding らは IL-10 が抗原提示細胞であるマクロファージの B 7 分子の発現量を選択的に減少させることによって、また D'Andrea らは IL-12 の産生抑制によって説明可能であると報告している。細かい実験条件の違いによる違いはあるものの IL-10 の抑制活性と副刺激の関連は確実であると考えられる。

抗原提示細胞が副刺激を伝える能力は抗原提示細胞が常に持っている機能ではないことが報告されている。IL-10 は副刺激を担う分子の誘導を阻害するのか、その機能分子の働きそのものを阻害するのかを検討した。抗原提示細胞をあらかじめ LPS やリンホカインの混合物と共に培養した後、抗原提示細胞として用いると、この時の増殖を IL-10 はごく弱くしか抑制しないことが観察された。この事は抗原提示細胞が副刺激の誘導過程を阻害することによって IL-10 がその抑制作用を及ぼしていることを示唆するものである。実際の T 細胞との相互作用においては、抗原提示細胞の副刺激を担う分子の誘導は以下のような経緯をたどって起こるものと考えられる。MHC・抗原複合体を認識した T 細胞は様々なリンホカインを産生し、産生されたリンホカインは逆に抗原提示細胞を活性化し副刺激能を誘導す

る。この副刺激能によってT細胞は更に活性化され強い増殖を起こすようになる。IL-10はこの抗原提示細胞の副刺激誘導過程を抑制するものと考えられる。

以上の結果から、IL-10の免疫抑制機構について図3-16のようなモデルを提唱した。脾臓の抗原提示細胞は通常副刺激を伝達する能力を持たないが、T細胞との接触やLPSによって副刺激伝達能を獲得する。IL-10はこの過程を阻害することによりTh1の増殖を抑制するものと考えられる。また、CD8陽性T細胞の活性化においてもB7等の副刺激が必要であるとの報告もあり、この抑制機構はCD8陽性T細胞増殖抑制においても成り立つものであると考えられた。

本研究遂行時において、分子として同定された免疫抑制性リンホカインは少なく、その作用機構は未知であった。本研究において、免疫系を選択的に抑制する標的として抗原提示細胞が有望であることが示唆された。既に抗原提示細胞の機能を標的とした薬剤のスクリーニングも行われており、今後さらにT細胞応答を調節する細胞として注目されてゆくものと考えられる。また、単に強い免疫抑制活性を持つばかりでなく、その抑制活性に選択性があったことは、IL-10が免疫応答調節において重要な役割を果たしていることを示唆しており、CD8陽性T細胞の特徴としてIL-10の産生を位置づけることが出来る。

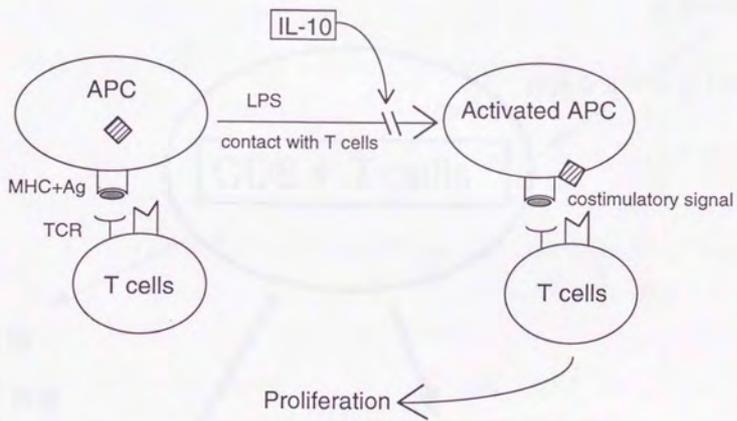
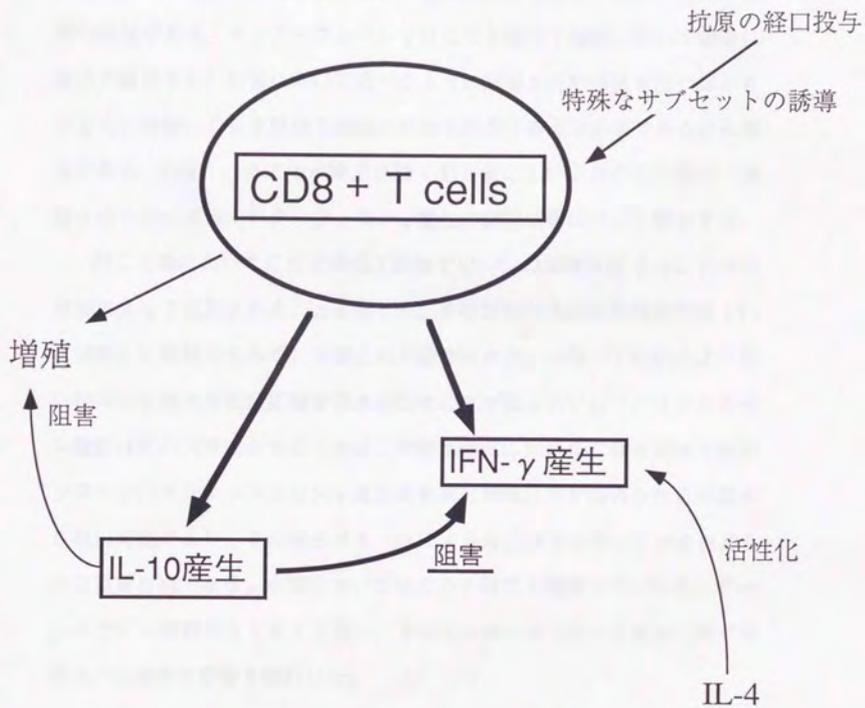


図3-16. IL-10による増殖抑制機構のモデル

抗原提示細胞はT細胞との接触によって活性化される。T細胞増殖の至適化にはこの過程が必須である。IL-10はこの抗原提示細胞の活性化過程を阻害する。

第4章 IL-10によるインターフェロン γ 産生の自律的抑制制御



序

T細胞機能の多くは産生するリンホカインによるとされ、その産生調節機構がいかなるものであるかは、免疫応答調節を正しく理解する上で必須の情報である。インターフェロン γ はCD8陽性T細胞において顕著に産生が認められ、緒言において述べたように重要な生物活性を持つばかりでなく、実際にCD8陽性T細胞が生体を防御する上で必須であるとの報告がある(122)。そこで本章及び続く第5章においてはCD8陽性T細胞クローンによるインターフェロン γ 産生の調節機構について解析する。

既に3章においてCD8陽性T細胞クローンの増殖が抗IL-10抗体の添加によって増強されることを示した。その増強効果は培養開始初期(1-2日後)には認められず、後期にのみ観察された。一般にT細胞はより早い時期にも様々な免疫応答を引き起こすことが知られており、リンホカイン産生はその代表的なものである。実際本研究に用いたCD8陽性T細胞クローンのインターフェロン γ 産生は有為な増殖応答が認められる以前から検出可能であり、その産生がIL-10による自己調節を受けているかどうかは重要な点である。本章においてはCD8陽性T細胞クローンとして α_{SI} -カゼイン特異的な6B1を用い、そのインターフェロン γ 産生に対する抗IL-10抗体の影響を検討した。

材料及び方法

T細胞クローン

2章で樹立した α_{s1} -カゼイン特異的CD8陽性T細胞クローンのうち前章で用いた6B1を使用した。

リンホカイン

組み換え体IL-4はゼンザイムより購入した。IL-2及び抗体類はこれまでの章で述べた通りである。

インターフェロン γ 産生の測定

96wellプレート中で6B1 2×10^4 /wellを 2×10^5 /wellの抗原提示細胞とともに $1 \mu\text{M}$ のトリプシン分解 α_{s1} -カゼインによって刺激した。22時間後培養上清 $50 \mu\text{l}$ をとり2章で示したように酵素免疫測定法により、インターフェロン γ 産生量を測定した。

結果

IL-10によるCD8陽性T細胞のインターフェロン γ 産生抑制

まずCD8陽性T細胞クローンからのインターフェロン γ 産生に対するIL-10の効果について検討した。6B1は抗原提示細胞の存在下抗原であるトリプシン分解 α_{s1} -カゼインによって26U/mlのインターフェロン γ を産生した。ここに10U/mlのIL-10を加えることによって、その産生は15U/mlに抑制されることが認められた。抗原非存在下でのインターフェロン γ 産生量は検出限界以下であった。(8U/ml以下)このことから、マウスIL-10はCD8陽性T細胞クローンのインターフェロン γ 産生を抑制しうることが示された。

IL-10によるインターフェロン γ 産生の自己調節

抗IL-10抗体の影響を検討した。図4-1に示すようにエピトープの異なる2種の抗IL-10抗体はいずれも有意に6B1のインターフェロン γ 産生を増強することが観察された。これに対して、アイソタイプの一一致するコントロール抗体は全く影響を及ぼさなかった。このことから、6B1はIL-10を産生することにより自らのインターフェロン γ 産生を抑制的に調節していることが示された。一方、CD4陽性Th1クローン3D20の抗原特異的なインターフェロン γ 産生は抗IL-10抗体の添加によっても影響を受けなかった(データ省略)。

次に抗IL-10抗体のインターフェロン γ 産生増強効果の経時変化を調べた。培養開始後異なった時点において培養上清を回収しその中に含まれるインターフェロン γ の量を測定した。図4-2に示すようにインターフェ

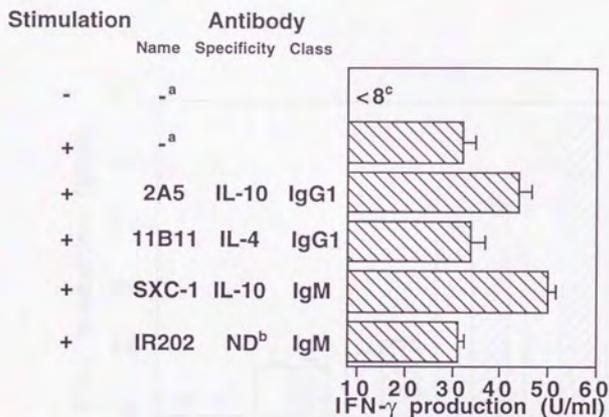


図4-1. 抗IL-10抗体が6 B 1のインターフェロン γ 産生に及ぼす影響

6 B 1を96wellプレート中抗原提示細胞と抗原で刺激した。各抗体を培養開始時に加え、22時間後のインターフェロン γ 産生に及ぼす影響を検討した。

- a. 抗体無添加
- b. 特異性不明
- c. 検出限界以下

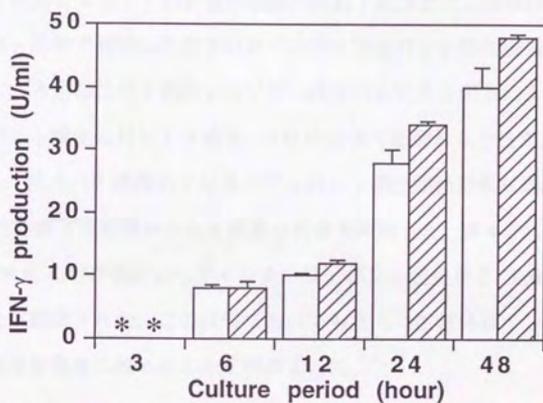


図4-2. 抗IL-10抗体の6B1のインターフェロン γ 生に及ぼす影響の経時的変化

抗IL-10抗体 ($1 \mu\text{g/ml}$ の2A5)が6B1のインターフェロン γ 産生に及ぼす影響を経時的に検討した。

*、検出限界以下

ロン γ 産生は培養開始後6時間から認められた。これに対して、抗 IL-10 抗体の増強効果は培養開始後12時間から観察された。

内因性の IL-10 による抑制効果をさらに調べるために、細胞を様々な方法により刺激し、抗 IL-10 抗体の効果を検討した。表 4-1 に示すように抗 IL-10 抗体は 6 B 1 を抗原提示細胞の存在下抗原または固相化抗 T 細胞レセプター抗体で刺激したときのみインターフェロン γ 産生増強効果を発揮した。一方固相化抗 T 細胞レセプター抗体のみによる刺激によるインターフェロン γ 産生に対しては抗 IL-10 抗体は全く影響しなかった。

次に、抗 IL-10 抗体のインターフェロン γ 産生増強効果が過剰の IL-2 や IL-4 の存在下でも認められる現象なのかを検討した。表 4-2 に示すように、IL-2 や IL-4 の存在によってインターフェロン γ 産生は 2-3 倍に強められることが観察された。この状態においても抗 IL-10 抗体はインターフェロン γ 産生を有意に強めることが観察された。

表4-1. 抗IL-10抗体によるインターフェロン γ
産生増強効果の刺激選択性

		γ -IFN production (U/ml)			
		Cells were stimulated with			
2A5	none	coat-TCR alone	coat-TCR plus APC	antigen plus APC	IL-2
-	<8	60 \pm 6	96 \pm 12	32 \pm 4	<8
+	<8	64 \pm 8	124 \pm 4	44 \pm 4	<8

6 B 1 をIL-2 (20U/ml)、抗原提示細胞の存在下または非存在下にて固相化抗T細胞レセプター抗体、抗原と抗原提示細胞によって刺激し、そのインターフェロン γ 産生に及ぼす抗IL-10抗体 (1 μ g/ml 2 A 5) の影響を検討した。

表4-2. 抗IL-10抗体によるインターフェロン γ 産生
増強作用に対するIL-2及びIL-4の影響

2A5	γ -IFN production (U/ml)		
	Cells were cultured with		
	none	IL-2	IL-4
-	40 \pm 10	64 \pm 4	72 \pm 12
+	64 \pm 4	152 \pm 4	168 \pm 8

6B1を抗原提示細胞と抗原にて刺激し、2 μ g/mlの2A5のインターフェロン γ 産生に及ぼす影響を検討した。20U/mlのIL-2またはIL-4を培養開始時に加え、その影響を観察した。抗原の非存在下におけるインターフェロン γ 産生量は8U/ml以下であった。

考察

CD 8 陽性 T 細胞クローンのインターフェロン γ 産生は IL-10 による弱い抑制を受ける

IL-10 による 6 B 1 のインターフェロン γ 産生に対する抑制効果は、増殖抑制に比べかなり弱いことが観察された。報告されている CD 4 陽性 T 細胞クローンのインターフェロン γ 産生に対する抑制効果 (39) に比べてもこの活性は弱い。これはおそらくそれぞれの反応が抗原提示細胞として加えた脾臓細胞の副刺激に依存する度合いによるものと考えられた。CD 4 陽性 T 細胞クローンにおいてはクラス II 陽性のマクロファージが抗原認識において必須であり、IL-10 のマクロファージに対する強い抑制効果が直接現れる。これに対して、CD 8 陽性 T 細胞が抗原を認識するクラス I 分子は全ての細胞に発現していることが知られており、6 B 1 においても自らの拘束分子である K^b を非常に強く発現している。インターフェロン γ 産生に必要な抗原認識は T 細胞クローン相互によってもなされ、加えた脾臓細胞由来の副刺激を必ずしも必要としないものと考えられる。実際、固相化抗 T 細胞レセプター抗体のみの刺激によって強いインターフェロン γ 産生が認められている。(ここに脾臓細胞を加えた際のインターフェロン γ 産生量の上乗せ分が内在・外来の IL-10 の標的となるものと考えられた。) 一方、これらの T 細胞クローンの増殖応答においては、抗原を認識するのみでなくさらに副刺激シグナルが必須であると考えられた。この抗原提示細胞ごとにマクロファージに対する依存性の違いが IL-10 に対する感受性を決定する因子であると考えられる。

CD 8 陽性 T 細胞は IL-10 を産生することによって自らのリンホカイン産生を抑制する

本章において内因性の IL-10 が CD 8 陽性 T 細胞クローンのインターフェロン γ 産生に及ぼす効果を検討し、CD 8 陽性 T 細胞クローンが IL-10 を産生することによって自らのインターフェロン γ 産生を抑制的に制御していることを明らかとした。これによりマウス IL-10 のインターフェロン γ 産生における自己調節作用という新たな役割が示された。また、IL-10 は T 細胞が自ら産生したリンホカインの作用によって自分の他のリンホカイン産生を抑制するという活性を持つと報告された最初のリンホカインとなる (図 4-3)。一般にマウスの CD 4 陽性 T 細胞においては、IL-10 とインターフェロン γ は Th 2 と Th 1 という相互に抑制しあう異なるサブセットから産生されることが知られている。この点においてここで報告した現象は CD 4 陽性 T 細胞群には見られない CD 8 陽性 T 細胞に特異的な現象であることが考えられた。この他に IL-10 とインターフェロン γ を同時に産生する T 細胞株として末梢においては非常に少ないサブセットである CD 4 陽性 CD 8 陽性のいくつかのクローンの報告がある(123)。このクローンにおいてはインターフェロン γ 産生の調節機構については解析がなされていないが、IL-10 の作用機構から推測して、同様なメカニズムが存在する可能性は高いと思われる。

内因性 IL-10 の作用機構については外来性 IL-10 と同様の機構であることを示唆する結果であった。まず抗 IL-10 抗体のインターフェロン γ 産生の増強効果は T 細胞を抗原提示細胞存在下で刺激したときのみ認められたこと、また固相化抗 T 細胞レセプター抗体による刺激において副刺激が IL-10 の標的であることを支持する結果が得られたことである。しかし以下に述べるようにその詳細はさらに検討の余地が残っている。

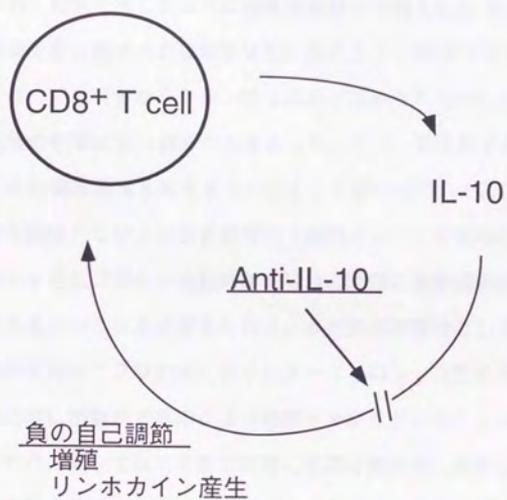


図4-3. CD8陽性T細胞の産生するIL-10の役割

CD8陽性T細胞はIL-10を産生することによって、自らの増殖及びインターフェロン γ 産生を負に自己調節していることが明らかとなった。この調節は例えば抗原の至適濃度を決定する一要因となっていることが示唆された。

前章及び本章で述べたように、抗 IL-10 抗体は CD 8 陽性 T 細胞の増殖とインターフェロン γ 産生をともに強めることが明らかとなった。しかしその効果は異なった時期に観察された。インターフェロン γ 産生の増強効果は有意な増殖応答が認められる前である培養開始 12 時間後から認められた。一方、前章で示したように培養開始時から加えた抗 IL-10 抗体が増殖増強効果を示し始めるのは培養後期に当たる 3-4 日目であり、それ以前の時点においては有意なチミジン取り込みが認められるのにも関わらず抗 IL-10 抗体の影響は全く認められなかった。この一見矛盾する結果はおそらく IL-10 の抑制機構を考えることによって解かれていくことになる。まず第一の可能性として、CD 8 陽性の T 細胞クローンの増殖応答とインターフェロン γ 産生は異なった副刺激を独自の時期に抗原提示細胞から受ける必要があるということが考えられる。また別の可能性として、単独の副刺激分子の欠如が 12 時間後にはインターフェロン γ 産生を低下させる一方、増殖応答に影響が与えるのはより時間がかかるということも考えられる。これらの点に関しては T 細胞の刺激に必要な副刺激に関する更なる知識の集積が必要であろう。IL-10 の標的となる副刺激分子として B7/BB1 や IL-12 が報告されている (120,121)。その後発見された副刺激分子である B7-2 や J11d (118,124)、さらには未知の機能分子がそれぞれのサブセットの T 細胞刺激の際にどのように関与しているのか、また IL-10 の活性との相関はあるのかなどが明らかになってゆくにつれ複雑な免疫応答調節機構の理解が進んでゆくものと期待される。

CD 8 陽性 T 細胞の産生する IL-10 の役割

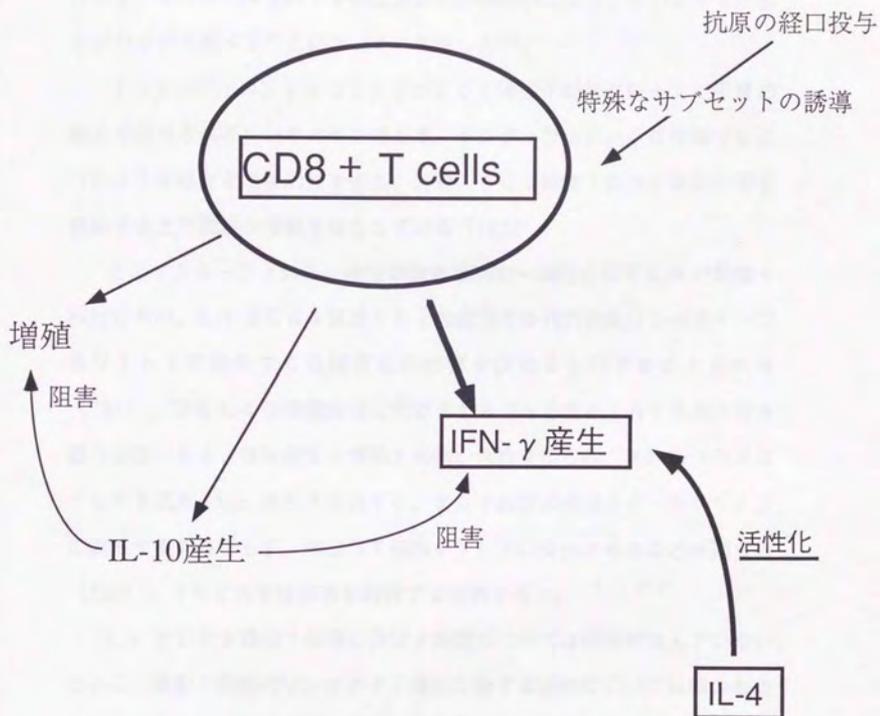
ここで CD 8 陽性 T 細胞が産生する IL-10 の生物学的役割について考察してみたい。IL-10 に対する感受性の差を考慮すると、そのインターフェロ

ン γ 産生に対する抑制活性の第一の標的はCD4陽性のTh1タイプの細胞群であることが推測される。この点に関してはすでに当研究室において樹立された免疫抑制活性を有するCD8陽性T細胞クローン13G2の抑制効果はIL-10によるものであることを報告している(32)。CD8陽性T細胞のあるものは体内においてIL-10の活性を通してCD4陽性Th1を抑制する働きをしていることが推測される。次に、CD8陽性T細胞の増殖の制御があげられる。インターフェロン γ 産生の調節は、よりIL-10の産生量が多いものにおいて有効である可能性が考えられる。しかし、生体における実際の免疫応答調節においてはあるリンホカインの局所濃度が重要であること、また産生されたリンホカインは血流によって循環、拡散して作用するよりも局所においてしか機能しないことを考えると、産生されたリンホカインの産生細胞自身に対する影響は無視できないものであることが考えられる。

本章で述べたインターフェロン γ 産生のIL-10による自己抑制は過剰量のIL-2、IL-4の存在下でも認められた。このことはIL-10のインターフェロン γ 産生抑制効果及び自己制御がCD4陽性T細胞由来のリンホカインとは独立に行われうることを示し、CD8陽性T細胞の強い自律性を示唆するものと考えられる。

一方、IL-2、IL-4はインターフェロン γ 産生を有意に増加させることが示された。T細胞からのインターフェロン γ 産生を増強する活性を持つものとしては、IL-2、過酸化水素、ロイコトリエンB4、C4、D4等活性化されたT細胞、マクロファージ由来の産物が知られている(125-130)。IL-4がインターフェロン γ 産生を増強するという報告はこれまでにない。次章ではこの点を検討する。

第5章 IL-4によるインターフェロン γ の産生調節



序

本研究においてCD8陽性T細胞独自の増殖・リンホカイン産生調節機構について記述してきた。本章ではこうして産生されるリンホカインの役割を、インターフェロン γ の産生が他の細胞群によってどのような調節を受けるかを調べることによって、考察したい。

インターフェロン γ はほとんどのCD8陽性T細胞クローンで多量の産生が認められるリンホカインである。インターフェロン γ は序論でも述べたような様々な生物活性をもち、実際にCD8陽性T細胞が免疫応答を調節する上で重要な役割をはたしている(122)。

このインターフェロン γ 産生の調節機構の一側面としてIL-4の影響を検討したい。IL-4はCD4陽性Th2の産生する代表的なリンホカインでありTh2の媒介する免疫反応の性質を決めるものであるとされる(131)。即ちIL-4は液性免疫に代表されるTh2型とされる免疫応答を担う活性がある。抗体産生を増強する強い活性が知られ、抗体のクラススイッチを進め、IgE産生を促進する。またT細胞の増殖をオトクラインに維持するのみならず、未感作T細胞をTh2に分化させることが知られ(132)、Th2の免疫応答を維持する役割を担う。

IL-4がCD8陽性T細胞に及ぼす影響については研究が進んでいない。ことに、成熟T細胞のリンホカイン産生に対する活性については何の報告もない。しかし、Th2が活性化されている状況下でのCD8陽性T細胞の役割を考察するためには、IL-4によるCD8陽性T細胞のリンホカイン産生調節及び未熟T細胞の分化・成熟に対する効果を明らかにする必要がある。そこで本章ではCD8陽性T細胞のIL-4応答性を解析し、その役割をインターフェロン γ の持つ抑制活性に着目して考察した。

材料及び方法

T細胞クローン

2章で樹立した α_{S1} -カゼイン特異的CD8陽性T細胞クローン4種を用いた。またインターフェロン γ を産生するCD4陽性T細胞クローンとしてTh1クローンである3D20を用いた。増殖応答及びリンホカイン産生応答の測定法はこれまでの章に述べた方法に準じた。

抗原及び試薬

抗IL-4レセプター抗体はGenzymeより購入した。他の試薬については既に述べた各種試薬を用いた。

初代培養系における免疫応答の測定

Sederらによって報告された実験法に準じた(133)。マウスのリンパ節細胞を調製し、抗CD8抗体を結合させたマグネチックビーズによりCD8陽性T細胞画分を分離した。IL-2の存在下、固相化した抗CD3抗体によって刺激し、36時間後のインターフェロン γ 産生を測定した。2次刺激の観察においては、7日間培養後の細胞を回収し再び抗CD3抗体で刺激した。この際の細胞の生存率はトリパンブルーによる計数によって95%以上であることが確認された。再刺激36時間後に培養上清を回収し、インターフェロン γ の産生量を測定した。増殖応答は細胞を72時間培養し最後の16時間のトリチウム標識したチミジンの取り込み量として評価した。

結果

CD 8 陽性 T 細胞クローンの IL-4 応答性

まず最初に CD 8 陽性 T 細胞クローンが IL-4 レセプターを発現しているかどうかをフローサイトメーターによって検討した。図 5-1 に示すように、いずれのクローンも無刺激状態において IL-4 レセプターを弱く発現していることが示された。

次にこれらの細胞が IL-4 に応答するかを増殖を測定することによって検討した。表 5-1 に示したように 4 種のクローンのうち 3 種は抗原の刺激なしで IL-4 により増殖応答を示した。固相化抗 T 細胞レセプター抗体の刺激及び抗原刺激存在化では全てのクローンが IL-4 によって増殖を強められることが観察された。この結果から IL-4 が繰り返し刺激を受けている T 細胞クローンに対して作用するということが示された。CD 4 陽性 Th 1 細胞株 3 D 2 0 の増殖も IL-4 によって強められることが示された。

IL-4 の CD 8 陽性 T 細胞クローンのインターフェロン γ 産生に対する増強効果

次に IL-4 のインターフェロン γ 産生に対する効果を検討した。6 B 1 を 96well プレート中で刺激し 2 4 時間後の培養上清中のインターフェロン γ 量を測定した。図 5-2 (A) に示すように、IL-4 はその濃度依存的に 6 B 1 細胞のインターフェロン γ 産生を強めることが認められた。その増強効果はプラトーに達した時約 2.5 倍であった。6 B 1 を刺激しないときには IL-4 を高濃度で加えても全くインターフェロン γ は産生されなかった。

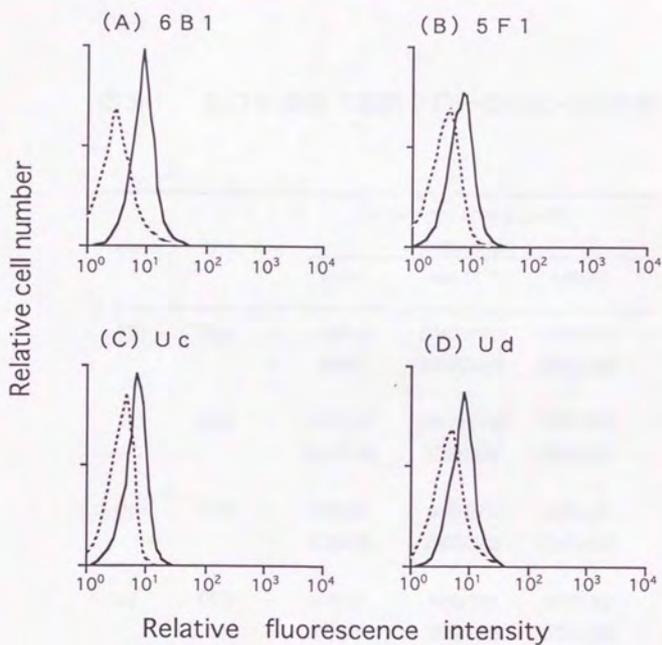


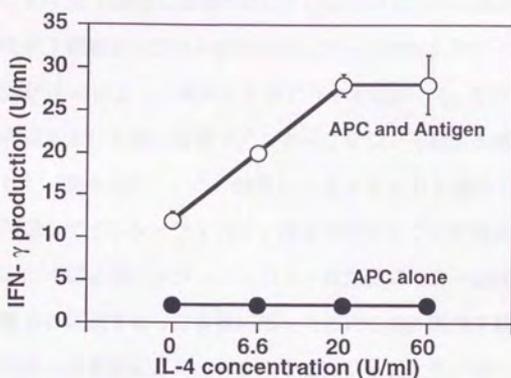
図5-1. CD8陽性T細胞クローンのIL-4レセプター発現
 間接蛍光抗体法によりそれぞれのT細胞クローンのIL-4レセプ
 ターの発現量を測定した。

表5-1. CD8陽性T細胞クローンのIL-4応答性

Clone	Type	IL-4	³ H-thymidine uptake (cpm)		
			stimulated with		
			none	anti-TCR	Antigen
6B1	CD8	-	120±11	5040±1010	2093±117
		+	<u>945±7</u>	<u>28090±105</u>	<u>9826±124</u>
5F1	CD8	-	841±440	4617±1418	1753±165
		+	<u>3439±768</u>	<u>7788±192</u>	<u>3068±455</u>
Uc	CD8	-	277±27	949±375	293±95
		+	<u>1198±76</u>	<u>2663±146</u>	<u>2069±840</u>
Ud	CD8	-	200±31	876±195	338±150
		+	267±58	<u>1855±185</u>	<u>1231±199</u>
3D20	CD4(Th1)	-	1127±293	964±122	39828±2447
		+	892±334	<u>2143±202</u>	<u>53836±376</u>

各T細胞クローンは固相化抗T細胞レセプター抗体または抗原と抗原提示細胞によって刺激し、その際加えたIL-4 (20U/ml) の増殖に及ぼす影響を検討した。IL-4の添加によって増加した増殖応答に下線を付した。

(A) Antigenic stimulation



(B) Immobilized anti-TCR stimulation

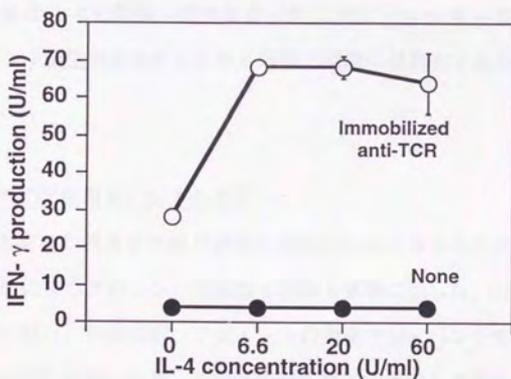


図5-2. IL-4が6B1のインターフェロン γ 産生に及ぼす影響

6B1を(A)抗原提示細胞と抗原、(B)固相化抗T細胞レセプター抗体によって刺激した。培養開始時に加えたIL-4が及ぼすインターフェロン γ 産生に対する影響を検討した。

次に IL-4 が T 細胞に直接作用しているのかどうかを検討した。6 B 1 を固相化抗 T 細胞レセプター抗体のみによって刺激しそのインターフェロン γ 産生が IL-4 によって増加するかどうかを検討した。その結果 IL-4 は抗原刺激の場合よりも低い濃度でインターフェロン γ 産生を増強することが認められた (図 5-2(B))。この結果から IL-4 は CD 8 陽性 T 細胞クローンに直接作用してインターフェロン γ 産生を強めることが示された。

次に IL-4 によるインターフェロン γ 産生量増加の一般性について検討した。表 5-2 に示すように実験に用いたどの CD 8 陽性 T 細胞クローンにおいても IL-4 の添加によりインターフェロン γ 産生量が増すことが認められた。これに対して CD 4 陽性 T 細胞クローン 3 D 2 0 のインターフェロン γ 産生は IL-4 の影響を受けなかった。このことから IL-4 によるインターフェロン γ 産生増強効果は CD 8 陽性 T 細胞に特異的であることが示唆された。

IL-4 の初代培養系に対する効果

さらにこの現象が未感作状態の細胞にも当てはまるのかどうかを検討するためにマウスのリンパ節細胞を調製し実験に供した。C57BL/6 マウスを 3 群に分け、非免疫群、フロイントの完全アジュバントをフットパッド及び尾底部に免疫した群、百日咳毒素を腹腔に免疫した群それぞれから CD 8 陽性 T 細胞画分を分離した。この細胞を固相化した抗 CD 3 抗体によって刺激し、そのインターフェロン γ 産生を測定したところ、IL-4 の有無に関わらず有為なインターフェロン γ 産生は認められなかった (10U/ml 以下)。そこで細胞を 7 日間培養した後、再度刺激し、そのインターフェロン γ 産生を測定した。表 5-3 に示すように、7 日間の培養中 IL-4 を加えた細胞においていずれの免疫方法を用いたマウス由来細胞においても、強い

表5-2. CD8陽性T細胞クローンのインターフェロン γ 産生に
対するIL-4の影響

Clone	Antigen	IL-4	IFN- γ production (U/ml)	
			Exp. 1	Exp. 2
6B1	-	-	16 \pm 1	<8
		+	12 \pm 1	<8
	+	-	160 \pm 13	100 \pm 15
		+	<u>272\pm8</u>	<u>184\pm2</u>
5F1	-	-	12 \pm 1	<8
		+	<8	<8
	+	-	56 \pm 2	24 \pm 1
		+	<u>72\pm3</u>	<u>52\pm5</u>
Uc	-	-	16 \pm 2	12 \pm 0
		+	12 \pm 1	12 \pm 0
	+	-	128 \pm 11	120 \pm 2
		+	<u>200\pm4</u>	<u>192\pm11</u>
Ud	-	-	16 \pm 1	20 \pm 2
		+	12 \pm 0	12 \pm 1
	+	-	68 \pm 4	152 \pm 10
		+	<u>96\pm5</u>	<u>800\pm37</u>
3D20	-	-	<8	12 \pm 0
		+	<8	<8
	+	-	36 \pm 0	32 \pm 1
		+	36 \pm 1	32 \pm 1

各T細胞クローンを1 μ Mの抗原と抗原提示細胞によって刺激した、
20 U/mlのIL-4を培養開始時に加えた。培養上清を培養開始22時間後に
回収し、インターフェロン γ 産生量を測定した。IL-4によって増大したイ
ンターフェロン γ 産生に下線を付した。

表5-3. IL-4によるCD8陽性T細胞の分化・成熟誘導

<i>in vivo</i> priming	Responding CD8 ⁺ T cells			IFN- γ production (U/ml)	
	<i>in vitro</i> stimulation			stimulated with	
	anti-CD3	IL-2	IL-4	none	anti-CD3
none	+	+	-	<10	<10
	+	+	+	<10	195 \pm 5
CFA	+	+	-	<10	23 \pm 2
	+	+	+	<10	225 \pm 11
BP	+	+	-	<10	<10
	+	+	+	<10	176 \pm 10

抗体を結合させたマグネティックビーズによって分離したCD8陽性T細胞を、50U/mlのIL-2存在下固相化した抗CD3抗体によって刺激し、7日間培養した。細胞を回収し、再度の固相化抗CD3抗体刺激によって産生されるインターフェロン γ の量を測定した。初回刺激時に加えたIL-4が、*in vitro*での二回目の刺激時のインターフェロン γ 産生に及ぼす効果を検討した。

インターフェロン γ 産生が観察された。これに対して、7日間の培養時にIL-2のみしか加えなかった細胞においては完全アジュバント免疫群において弱いインターフェロン γ 産生が認められたのみで、全般にほとんどインターフェロン γ 産生が観察されなかった。

そこでIL-4の有無に関わらずインターフェロン γ 産生を観察できた完全アジュバント免疫群について、再刺激時のIL-4の効果を検討した。表5-4に示すように、初回刺激時にIL-2のみを加えた細胞のインターフェロン γ 産生は、再刺激時にIL-4を加えることにより強められることが観察された。この結果からIL-4によるインターフェロン γ 産生増加作用は繰り返し刺激を受け続けたクローン化T細胞のみでなく、より生体に近い状態でのCD8陽性T細胞群に広く当てはまるものであることが示唆された。

一方、初回刺激時にIL-4を加えて培養した細胞のインターフェロン γ 産性はIL-4により増強されなかった。同時に測定した増殖応答は有意に促進されることが観察され、インターフェロン γ の産生と増殖応答は独立に制御されることが明らかとなった。

表5-4. 二次刺激時にIL-4がインターフェロン γ 産生に及ぼす影響

Responding CD8 ⁺ T cells				Stimulation		IFN- γ (U/ml)	Proliferation (cpm)
in vivo stimulation	in vitro stimulation			anti-CD3	IL-4		
	anti-CD3	IL-2	IL-4				
CFA	+	+	-	+	-	119 \pm 5	15838 \pm 5953
				+	+	377 \pm 5	104135 \pm 23824
	+	+	+	+	-	640 \pm 49	137484 \pm 3907
				+	+	600 \pm 19	334110 \pm 21732

CD8陽性T細胞は表5-3で述べたように分離・培養した。再刺激時に加えたIL-4がインターフェロン γ 産生を増強するかどうかを検討した。

考察

本章においてIL-4に対するCD8陽性T細胞の応答性を検討し、T細胞クローン及びリンパ節細胞の2代目培養系においてIL-4はインターフェロン γ 産生を強める活性があることを示した。これはIL-4がT細胞のインターフェロン γ 産生を増強することを示した初めての結果である。一方、CD4陽性T細胞クローンにおいてはこの効果は認められなかったことから、IL-4の持つインターフェロン γ 産生促進活性はCD8陽性T細胞に特異的なものであることが示唆された。初代培養系においては今回用いた実験条件ではいずれの免疫方法で調製したCD8陽性T細胞においても有意なインターフェロン γ 産生が認められなかった。しかし、さらに少量のインターフェロン γ が産生され、クローンで示されたものと同じ仕組みによって調節を受けている可能性は残っている。また逆に、CD8陽性T細胞が細胞傷害活性を示すためには *in vitro* での刺激と培養を必要とするという現象と同様に、インターフェロン γ 産生においても *in vitro* での刺激が必要であることを意味するのかもしれない。この点は定量的PCR法等さらに感度の良い方法を用いることで明らかとなるであろう。

IL-4はCD8陽性T細胞のインターフェロン γ 産生を促進する

まず最初にIL-4のインターフェロン γ 産生に対する効果と増殖に対する効果がどのような関係にあるかについて考察する必要がある。まずインターフェロン γ の産生量増大は増殖によりT細胞数が増したためではないと考えられる。インターフェロン γ の産生量を測定するための培養上清は培養開始24時間後に採取しているが、既に3章で示したようにこの時点

においては6B1の有意味なチミジン取り込みは起こっていない。T細胞クローンは1週間以上の間隔をあけて抗原刺激をしており刺激前は細胞周期はG1にそろっていると考えられるため、24時間の時点での細胞数の増加はあり得ない。さらに増殖とインターフェロン γ 産生はこれらのCD8陽性T細胞クローンにおいて独立に制御しうることが本研究において示されている。即ちT細胞レセプターを介した刺激はインターフェロン γ 産生に必須であるが、増殖応答はIL-4のみによっても誘導しうることがある。これらの結果から、IL-4はインターフェロン γ 産生を増強する活性を持つということが示された。

IL-4のインターフェロン γ 産生促進効果はCD8陽性T細胞のさらに細かいサブセットによって異なっている

IL-4によるインターフェロン γ 産生増強効果にはCD8陽性T細胞のさらに細かいサブセットが関与している可能性が示唆された。リンパ節細胞の再刺激時におけるIL-4のインターフェロン γ 産生増強効果は、初回刺激時にIL-4を加えるか否かによって、全く異なることが観察された。IL-4を初回刺激時に加えることにより培養分化させたCD8陽性T細胞のインターフェロン γ 産生はIL-4によって全く影響を受けなかった。一方、IL-4の非存在下で培養した細胞のインターフェロン γ 産生はIL-4により強く増強されることが示された。前者はインターフェロン γ の他にIL-10、IL-4を産生し、後者はどちらも産生しない細胞である(香山、未発表データ)。リンホカイン産生パターンの違いによって区別されるCD8陽性T細胞の中のさらに細かいサブセットによってIL-4がインターフェロン γ 産生に及ぼす影響が異なることを示す結果である。本研究に用いたCD8陽性T細胞クローンは少量のIL-10を産生することを除き、後者と近い性質を有す

る。これはそれぞれのクローンがCFAとともに抗原を免疫したリンパ節細胞からIL-4の非存在下で樹立されてきた経緯と矛盾しない。

Fongらによって報告され(34)、また当研究室においても確認されたことである(36)が、多くのCD8陽性T細胞クローンはTh1と類似したリンホカイン産生パターンを持つ(Tc1型と呼ぶことが提唱されている)。しかし、少数ながらIL-4を産生するクローン(Tc2)の樹立が報告されている(35, 134)。本研究で用いたT細胞クローンはいずれもIL-4を産生しないTc1型に近いもので、IL-4産生性のTc2型CD8陽性T細胞の性質は本研究では調べるができなかった。本章においてサブセット間の違いによるIL-4の効果に違いのあることが示唆されたことから、IL-4産生性のCD8陽性T細胞に対するIL-4の効果、またリンホカイン産生調節機構についてさらに新たな現象が発見される可能性がある。この点は今後の研究課題として残された。

IL-4はCD8陽性T細胞にインターフェロン γ 産生能を誘導する

また、IL-4はCD8陽性T細胞からのインターフェロン γ 産生を増加させるもう一つの経路を持つことが示された。IL-4存在下で抗CD3抗体によって刺激培養することによってリンパ節細胞はIL-4を強く産生する細胞に分化することが示された。これに対してSadらはアロ抗原によって刺激する際のIL-4の存在はCD8陽性T細胞をインターフェロン γ を産生しない細胞へと分化させることを報告している(35)。本研究との差異は刺激条件の違いであると考えられる。実際、刺激条件の違いがCD8陽性T細胞のIL-4応答性に影響を与えることがCroftらによって報告されている(134)。彼らによると、T細胞レセプタートランスジェニックマウスにおいてCD8陽性T細胞をIL-4の存在下*in vitro*で特異的抗原で刺激すること

によりインターフェロン γ 産生能を失う一方、アロ刺激の際に存在するIL-4はインターフェロン γ 産生能に影響を及ぼさない。一般にアロ刺激は異系マウスのMHC上に提示された抗原ペプチドを認識する交差反応性であり、特異的抗原刺激との質的相違はないと考えられているため、この差を理解するためにはさらに細かい条件の検討が今後なされる必要がある。しかしながら筆者はある種の条件下においてはIL-4は未熟なCD8陽性T細胞をインターフェロン γ を産生する細胞へと分化させる働きがあるものとする。

IL-4によるインターフェロン γ 産生促進の意義：CD4陽性Th2による免疫応答抑制における役割

次にIL-4によってインターフェロン γ の産生量が増加するという現象の生物学的意味をTh2による免疫応答のフィードバック調節の観点から考察してみたい。インターフェロン γ はTh2クローンの増殖を抑制すること及び、典型的なTh2タイプの免疫応答であるIgE産生を強く抑制する活性があること(61-66)から、体内においてTh2タイプの免疫応答を抑制的に制御する上で中心的役割を果たしていると考えられている。インターフェロン γ の産生細胞としてはCD4陽性Th1とCD8陽性T細胞があげられる。この2群の細胞によるインターフェロン γ 産生の調節機構について考察するとTh2由来のリンホカインにたいする応答性が以下の2点において大きく異なることが指摘できる。まず第1点として、本章によりCD8陽性T細胞由来のインターフェロン γ はIL-4によって産生量が増す一方、Th1由来のインターフェロン γ はIL-4によって強められないことが示唆された。次に、第4章において示したようにTh2由来の抑制性リンホカインとして知られるIL-10に対する感受性がCD8陽性T細胞

胞においてはCD4Th1よりもかなり弱いことがあげられる。これらの点を鑑みて、すでに活性化されたCD8陽性T細胞はTh2による免疫応答が強く起きすぎないように適当なところで抑えるフィードバック調節に関与していることが想定された(図5-3)。インターフェロン γ はクラスIによる抗原提示を強めることが知られており、この活性もCD8陽性T細胞群のフィードバック阻害における役割をさらに助ける方向に作用するものと考えられた。さらに、IL-4及びIL-10が未熟な末梢CD8陽性T細胞のインターフェロン γ 産生性T細胞への分化を促進することから、CD4陽性Th1とは異なったCD8陽性T細胞群の役割が推察された。

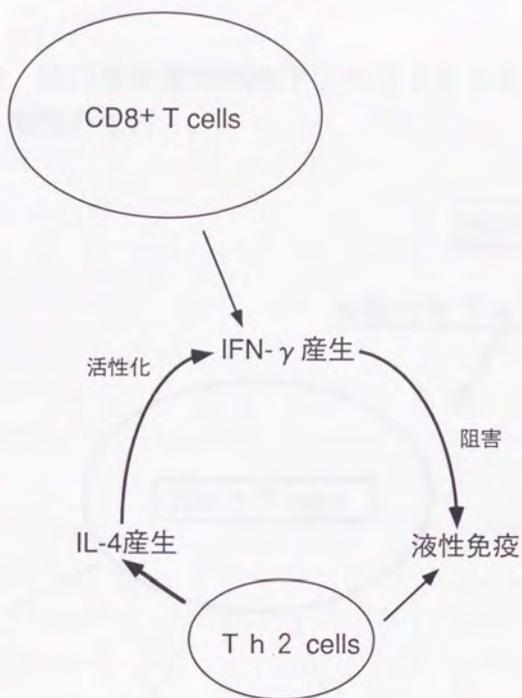
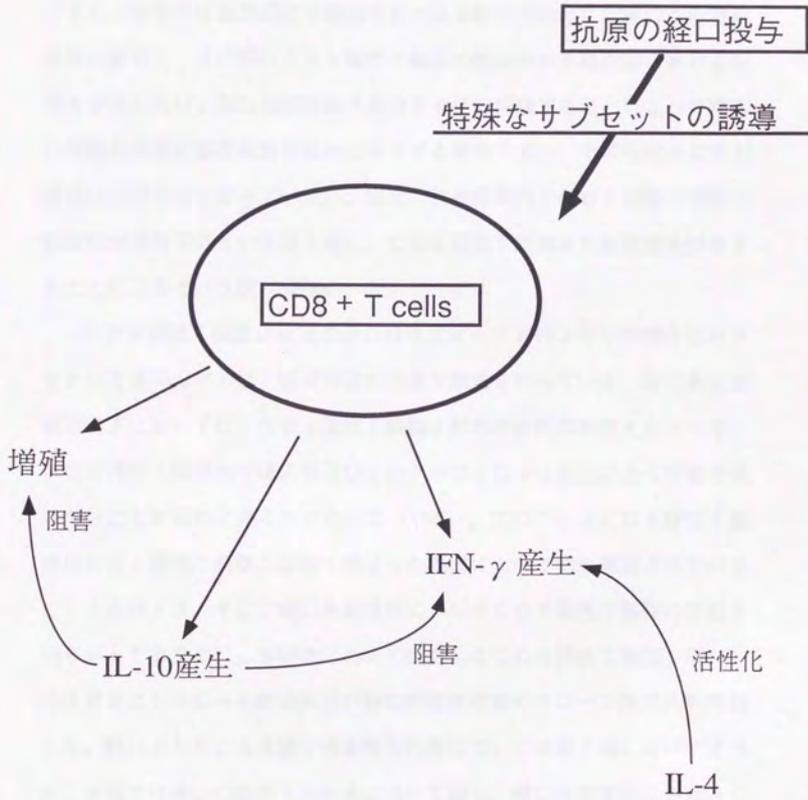


図5-3. IL-4によるインターフェロン γ 産生増強効果の意義

インターフェロン γ はTh2型の免疫応答に対する強い阻害活性が知られている。そのため、Th2の産物であるIL-4によってインターフェロン γ 産生が増強されればそれ以上の液性免疫の継続を抑えることになると考えられる。Th2は不応答性にならないことが報告されており、CD8陽性T細胞によるこのようなフィードバック調節は適度な免疫調節に重要な役割を果たしている可能性がある。

第6章 経口免疫寛容誘導下におけるCD8陽性T細胞の性質



序

これまでCD 8 陽性T細胞の役割を、免疫抑制作用と関連付けて考えてきた。本章では免疫応答が抑制されている時の代表として経口免疫寛容状態に着目し、その際のCD 8 陽性T細胞の解析から免疫調節における役割を考察したい。経口免疫寛容は蛋白質を経口摂取することによって幅広い種類の免疫応答が抗原特異的に低下する現象であり、その仕組みはまだ完全には明らかとなっていない。現在、抗原特異的なCD 4 陽性T細胞の応答性が消失するという説と共に、CD 8 陽性T細胞が免疫応答を抑制することによるという説が根強い。

CD 8 陽性T細胞が抗原の経口投与によってどのような影響を受けるかという点については、当研究室の加藤が解析を行っている。経口免疫寛容誘導下においては、CD 4 陽性T細胞は抗原特異的応答能を失う一方、CD 8 陽性T細胞の増殖応答及びインターフェロン γ 産生は全く影響を受けないことが初めて明らかとなった(135)。このことはCD 8 陽性T細胞はCD 4 陽性T細胞とは全く異なった機構によって活性調節されていることを意味する。そこで経口免疫寛容におけるCD 8 陽性T細胞の役割を明らかとするために、本研究において樹立したCD 8 陽性T細胞クローンの性質をコントロール群由来及び経口摂取群由来のクローン間で比較検討した。既にどちらにも共通な基本的な性質については第2章において述べた。本章では違いの認められた点について記し、経口免疫寛容におけるCD 8 陽性T細胞の役割について考察した。

材料及び方法

抗体

T細胞の持つ抗原特異性は主にT細胞レセプターが用いるV α 鎖とV β 鎖の組み合わせによって決定される。このうち各々のV β 鎖に特異的な抗T細胞レセプター抗体は種々作成されており、T細胞のレパートリーを解析するための有用な道具として広く用いられている。本章で用いた抗V β 2抗体B 20.6(136)、抗V β 3抗体K J 25(137)、抗V β 11抗体R R 3-15(138)は北海道大学伊藤博士より供与された。これらは培養上清のまま実験に用いた。

TGF- β 産生量の解析

培養上清中のTGF- β 量はプロメガ社のELISAキットを用いて測定した。

結果

T細胞レセプターの解析

T細胞のクローンごとに異なり、その抗原特異性を決定するT細胞レセプターをV β 特異的抗体を用いて解析した。その結果6B1がV β 2を、5F1がV β 2を、Uc及びUdがV β 3を発現していることが示された(図6-1)。

TGF- β の産生

経口免疫寛容において免疫応答を低下させる上で特に重要であるとの報告のあるTGF- β を測定した。表6-1に示すように、経口免疫寛容マウス由来のT細胞クローン6B1、5F1は抗原刺激によりTGF- β を産生する一方、コントロールマウス由来のT細胞クローンUc、Udは検出限界以下であった。

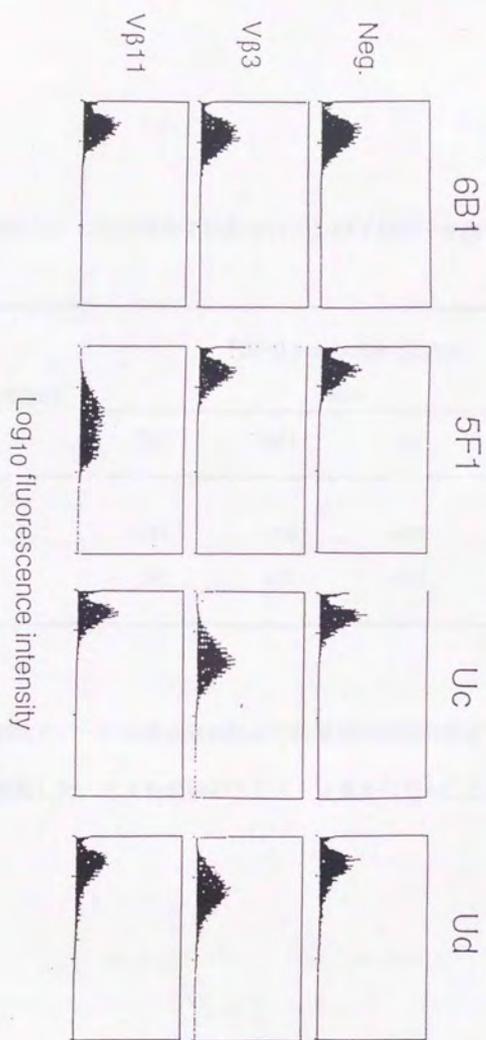


図6-1. CD8陽性T細胞クローンのT細胞レセプターの解析

なお6B1はVβ2を発現していることが同様な解析で明らかとなった。

表6-1. CD8陽性T細胞クローンのTGF- β 産生能の解析

Antigen	TGF- β produciton (pg/ml)			
	from			
	6B1	5F1	Uc	Ud
-	<16	<16	<16	<16
+	64	49	<16	<16

T細胞クローンを無血清培地中で抗原提示細胞の存在下抗原によって刺激した。24時間後のTGF- β 量をELISAにより測定した。

考察

リンホカイン産生：経口免疫寛容誘導マウス由来CD8陽性T細胞クローンはTGF- β を産生する

樹立されたT細胞クローンはその元となるマウスの状態によって異なった性質を持つものが得られた。すなわち経口免疫寛容を誘導したマウスから樹立したクローンはTGF- β の産生が共通した性質として認められた。また、第2章で述べたように、IL-10を多量に産生するクローンは経口免疫寛容誘導マウスからのみ得られた(図6-2)。まずこれらの違いが持つ生物学的な意義について考察してみたい。

TGF- β は強い免疫抑制活性を持つことが知られている。*in vitro*においてTGF- β がTh1、Th2の応答をともに抑えること、及びTGF- β 1を遺伝子破壊したマウスは出生直後に強い自己免疫反応によって死んでしまうことが報告されている(71-73)。また、経口免疫寛容においてはWeinerらのグループがTGF- β の関与を報告している。まずラットのモデルにおいては、抗原の経口投与によって抗原特異的なCD8陽性T細胞が誘導され、その産生するTGF- β によって免疫応答を抑制することが示されている(139-141)。また、マウスにおいては、経口免疫寛容を誘導したマウス由来のCD4陽性T細胞クローンの特徴として抗原特異的なTGF- β 産生があげられることを報告している(142)。本研究はマウスにおいてもTGF- β 産生性のCD8陽性T細胞が誘導されることを初めて示唆した結果といえる。

次に、IL-10についてふれてみたい。既に述べたように、IL-10もまた強い免疫応答阻害活性を持つことが知られ(39)、多量にIL-10を産生す

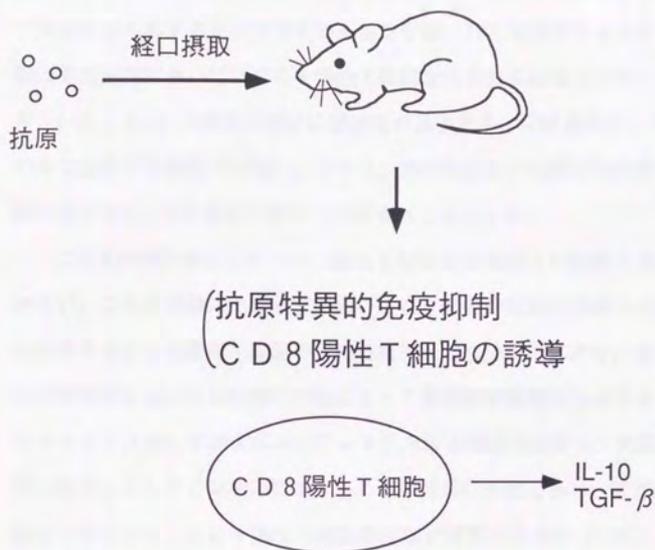


図6-2. 抗原の経口投与の影響

抗原を経口投与することによって全身の免疫応答は抗原特異的に低下する一方、CD8陽性T細胞の反応性は低下せず（文献135）、かえって特殊な性質を持つT細胞サブセットが誘導されることが示唆された。

るクローン5F1が経口免疫寛容誘導マウスより樹立されたことは、すでに述べたTGF- β 産生とならびCD8陽性T細胞が経口免疫寛容において抑制作用を有するという古くからある仮説(76)を支持するものである。経口免疫寛容においてはCD4陽性T細胞全ての免疫応答が抑制される一方(1-6)、IL-10の抑制作用には選択性があるため、抑制活性としてIL-10のみでは全てを説明できない。しかし、本研究において経口免疫寛容誘導時におけるIL-10の産生が初めて示唆されたといえる。

これらの抑制性リンホカイン産生と経口免疫寛容との相関を検討してみたい。これまで経口免疫寛容においては、多量の抗原を摂取した場合には応答するCD4陽性T細胞の反応性自体がおちることにより、また少量の抗原摂取においては能動的抑制によって免疫寛容状態がもたらされるとされてきた(143)。本研究においてはマウスは2週間のカゼイン食摂取期間中に約2gのカゼインを摂取する。これは非常に多量であり、実際加藤が報告したように、CD4陽性T細胞の応答が消失しており(135)、免疫寛容状態を維持する抑制活性は不要である。しかし、CD8陽性T細胞の抑制作用が役割を果たす局面として2つの可能性をあげたい。まずCD4の応答性を失わせる過程にCD8陽性T細胞が関わっている可能性があげられる。最近、IL-10がCD4陽性T細胞の不応答状態を誘導することが報告されたこと(144)はこの仮説を支持する結果であろう。次に、一種のフェールセーフ機構として働くことが考えられる。微生物感染により免疫寛容が破られるとの報告があり(14)、それまで休止状態だったCD4陽性T細胞が何らかの理由で活性化されたときCD8陽性T細胞の持つ抑制活性が顕在化することが想像される。

CD8陽性T細胞クローンの抗原認識

これら性質の異なるT細胞の由来を考えてみたい。T細胞レセプターを検討した結果から経口寛容誘導マウスより樹立された樹立されたクローンはコントロールマウスより樹立されたものとは異なるクローンであることが明らかとなった。このことは、経口免疫寛容の誘導過程において特殊なT細胞が選択され、活性化されることを示唆する。これは腸管より吸収された抗原が最初にT細胞に認識される際に脾臓などの末梢系でなされる抗原提示とは異なることによるものであると考えられた。2章に結果を示したように、コンジェニックマウスを用いた実験から、bm1を抗原提示細胞として用いた際のインターフェロン γ 産生は経口寛容誘導マウス由来のクローンに共通してC57BL/6を用いた時より強い一方、コントロールマウス由来のクローンは全く応答しなかった。腸管あるいは肝臓における抗原提示はこのような性質を持つペプチドMHC複合体によってなされ、これによりTGF- β 産生性のT細胞が選択された可能性がある。この場合クラスIIで知られるように腸管においては特殊な立体構造を持ったMHCクラスI分子が存在する可能性、また提示されるペプチドが抗原提示の起こる部位によって微妙に異なる可能性が考えられる。腸管の抗原提示細胞によって抗原提示を受けたT細胞は抑制活性を持つようになるとの報告(145)はこの仮説と一致するものである。

CD8陽性T細胞のCD4陽性T細胞とは異なる活性調節機構が存在することが経口免疫寛容状態の免疫応答の解析によって確認された。今後さらに様々な局面におけるCD8陽性T細胞の役割が明らかとなってゆくであろう。

第7章 総合討論

本研究においてはCD 8 陽性T細胞の特質をそのリンホカイン産生能と位置づけ、その産生調節機構及び生物活性を解析してきた。CD 8 陽性T細胞に共通する性質としてIL-10 及びインターフェロン γ の産生を観察した。緒言でも述べたように、この2種のリンホカインが同一の細胞から産生されることはCD 4 陽性T細胞には認められない点であり、この意義を考察してみたい。

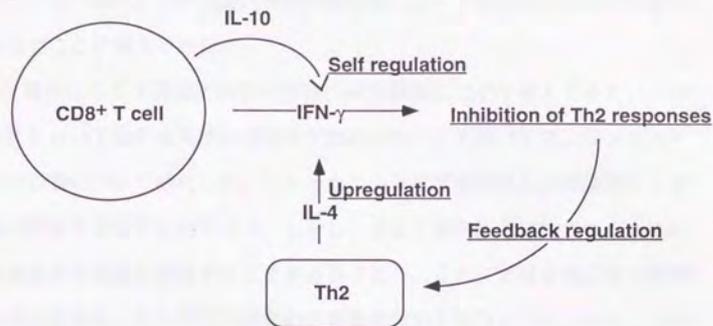
IL-10 とインターフェロン γ はCD 4 陽性T細胞の2つのサブセットが相互に抑制しあう際に重要な役割を担っているものと考えられている。これらを同時に産生することはCD 8 陽性T細胞がCD 4 陽性T細胞の2種のサブセットとは異なる独自の役割を持ちうることを示唆する。CD 8 陽性T細胞を免疫を抑制する機能を持つT細胞としてとらえるのが一つの見方である。CD 8 陽性T細胞クローンはヘルパータイプのリンホカインであるIL-2 やIL-4 を産生しないことがこの仮説の根拠の一つになっている。IL-2 やIL-4 を生産せず消費するばかりのT細胞はこれらのリンホカインが他の細胞に働きかけて免疫応答を誘導することを抑制しうる。また、IL-10 は過剰量のIL-2、IL-4 の存在下ではT細胞増殖を促進する活性を持つため、IL-10 を介してTh 1 応答を抑制する上でこれらのリンホカインの不在は重要な要素である可能性がある。さらに本論文ではふれなかったが、樹立されたクローンはいずれも強い細胞傷害活性を有し、マクロファージ等を除去することによって免疫応答を終息に向けることも考えられる。インターフェロン γ 産生のIL-4による増強効果がTh 2 に対するフィードバック調節に働きうるという仮説もこの延長上にある。

また他の見方として、本研究で示したようにIL-10 はCD 8 陽性T細胞が自己調節を行うために少量産生していることが考えられる。抗原の経

口投与による免疫応答の変化を初代培養系で調べた実験から外来抗原特異的CD8陽性T細胞はCD4陽性T細胞が反応性を失った状態においてもその反応性を維持することが示されている(135)。通常CD8陽性T細胞はCD4陽性T細胞が産生する様々なリンホカイン(活性化を促進するIL-2やIL-4、また阻害するIL-10)によってその活性を調節されるとされているが、抗原特異的なCD4陽性T細胞が不応答状態にあるときCD8陽性T細胞自身による調節が重要となってくることが予想される。IL-10によって産生が自己調節されるインターフェロン γ の生物活性は、CD4陽性T細胞が応答しない状態を考える場合Th2に対する抑制効果よりもマクロファージの活性化等の炎症反応誘導が重要なものとなってくる。

筆者はこの中間の立場をとりたい。多くのCD8陽性T細胞クローンにおいては多量のインターフェロン γ 産生に対しIL-10の産生は典型的なTh2の十分の一以下である。この少量のIL-10はまず自身に影響を与え自己調節に用いられ、まず細胞数を、そして次にインターフェロン γ 産生を制御するものと考えられる。そしてこのインターフェロン γ が外来抗原を認識するCD8陽性T細胞がCD4陽性Th2応答を抑制する際に用いられる(図7-1(A))。その根拠としてあげられるのは、まずインターフェロン γ が有するTh2に対する強い抑制活性と、本研究で明らかにされた産生調節の二つの大きな特徴、即ちIL-4による増強及びIL-10に対する抵抗性である。一般にTh1は抗原に対する不応答状態に陥りやすいが、Th2は能動的抑制による活性調節が中心であるとされており、CD8陽性T細胞が重要な役割を果たしている可能性がある。一方、少数のIL-10高産生性のCD8陽性T細胞においては、その顕著な性質としてIL-10を介した免疫抑制活性が認められる。この細胞においてはIL-10は他の細胞に対する活性を主にとらえるべきものであろう(図7-1(B))。また経口免疫

(A) IL-10低産生性CD8陽性T細胞



(B) IL-10高産生性CD8陽性T細胞

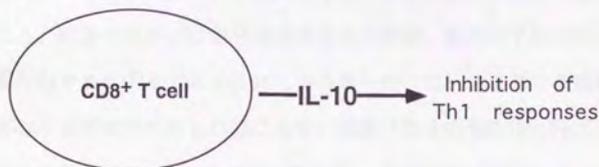


図7-1. CD8陽性T細胞の産生するリンホカインの役割(モデル)

(A) IL-10低産生性細胞においてはインターフェロン γ を介してTh2による免疫応答のフィードバック調節に関わる。IL-10はこのインターフェロン γ 産生を調節するために産生する。

(B) IL-10高産生性のCD8陽性T細胞は、IL-10の持つ強いTh1抑制活性によって炎症などの免疫応答の調節に関わる。

この他に抗原の経口投与によって誘導されるTGF- β 産生細胞はこれにより免疫応答を負に制御することが考えられる。本論文ではIL-4非産生性のCD8陽性T細胞のみ解析したが、この他にIL-4産生性の細胞群が存在する。

寛容マウス由来のクローンにおいて観察されたように、TGF- β 産生性のクローンは TGF- β の持つ強い免疫抑制活性によって潜在的に免疫抑制活性を持つことが考えられた。

最後にCD8陽性T細胞の今後の研究課題について考えてみたい。本研究においては外来抗原特異的なT細胞クローンを用いて主にリンホカインの影響について検討した。リンホカインは抗原特異性とは無関係にT細胞に影響を及ぼすものである。しかし、あるT細胞が活性化されるためには特異的な抗原を認識することが必要であり、これにより免疫応答の特異性が決定され、またそのT細胞のその後の役割や運命が決定される。この点については本研究で残された今後の課題である。この抗原認識についての研究はクローンを用いる利点をもっともよく現れる分野であると考えられる。抗原ペプチドに部分置換を与えた場合、各々のクローンが独立に制御可能であるのみでなく(146)、ある単一のクローンにおける複数の細胞応答のうち特定のものしか起こらない現象(部分的活性化と呼ばれる)が起こることが知られ(105-106、図7-2)、免疫応答の抗原による調節を考える上で中心的課題となっている。本研究で樹立されたCD8陽性T細胞クローンは抗原認識が各々異なっていることから、外来抗原特異的なCD8陽性T細胞の抗原認識の多様性を明らかとする上で有用な材料となるであろう。

また、近年CD8陽性T細胞もTc1、Tc2と分類することが提唱され、それぞれの細胞が分化成熟した後の活性調節機構のみでなく、互いに影響を及ぼしあい分化する過程の解析に関心が集まっている。現在得られているIL-4産生性のTc2タイプのクローンはヒトでライ病患者由来のもの(147)、マウスで高濃度のIL-4とともにT細胞を刺激して樹立したものの(35)が報告されている。IL-12やインターフェロン γ 等のリンホカイン、

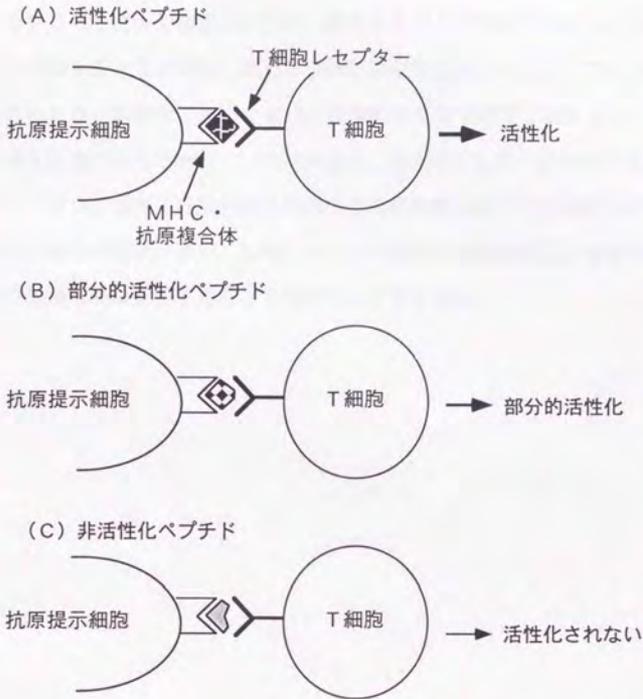


図7-2. アナログペプチドを用いたT細胞応答の調節

T細胞を強く刺激する抗原ペプチドによりT細胞は様々な応答を同時に引き起こす(A)。これに対し抗原認識ペプチドと異なったペプチドによってはT細胞は活性化されない(C)。この中間の場合、MHC・抗原複合体は(A)と似た構造をとり、T細胞の部分的活性化が引き起こされる(B)。このとき複数のT細胞応答の内、あるものは起こり他のものは起こらない。目的にあったT細胞応答のみを選択的に誘導することができるになれば、免疫応答全体を調節することができる。

またCD80等の副刺激等が分化に関与することが報告されはじめており、その詳細な条件及び誘導に関わる細胞群等が今後明らかになってゆくものと思われる。本研究で用いたIL-10産生性のCD8陽性T細胞クローンの正確な位置づけもなされていくであろう。またそうした一連の成果をふまえて、CD8陽性T細胞も含めた形での外来抗原に対する免疫応答調節機構の仕組みが解明がされ、末梢における不適切な免疫応答による様々な障害の改善につながってゆくことを期待してやまない。

第8章 要約

[はじめに]

免疫系はすべての物質を自己非自己に分けて認識している。この認識は非常に合目的に柔軟性を持ってなされることが知られており、これにより例えば非自己である食品成分等に対する免疫応答は通常の場合抑えられている。この調節がうまく行かない場合アレルギーや自己免疫病などを発症することになる。そこで本研究においては、免疫応答を調節するための基礎的知見を得ることを目的とし、外来抗原特異的なCD8陽性T細胞に着目した。CD8陽性T細胞は通常癌抗原やウィルス等の内在性抗原に対する免疫応答を司るが、外来抗原を認識する細胞も存在しており近年その役割が注目を浴びている。しかしその性質、活性調節機構等はまだまだ未解明の点が多い。そこで、牛乳中の代表的アレルゲンである α_{S1} -カゼインに対するCD8陽性T細胞クローンを樹立し、リンホカイン産生及び増殖調節機構の解析を行い、CD4陽性T細胞群とは異なるCD8陽性T細胞群独自の役割解明をめざした。

[α_{S1} -カゼイン特異的CD8陽性T細胞クローンの樹立]

近年患者数の増加や乳幼児における深刻性が問題となっている食品アレルギーは、通常は有効に機能する食品由来ペプチドに対する免疫応答を抑制する仕組み（経口免疫寛容）が働かないことが原因である。CD8陽性T細胞は経口免疫寛容において免疫応答を抑制することが示唆されてきた細胞群であるが、頻度の低さが障害となりこれまで解析がなされてこなかった。そこで、経口免疫寛容を誘導したマウス及びコントロールのマウスからCD8陽性T細胞クローンを樹立した。各グループ2種ずつ得られたクローンは多くの点で共通の性質を有していた。まず、いずれもクラス

I 分子の一種 K^b 分子に拘束され、 α_{S1} -カゼインの 142-149 領域を認識した。また、リンホカイン産生パターンを解析した結果、いずれもインターフェロン γ 及び IL-10 を産生することが示された。そこで経口免疫寛容誘導時における CD 8 陽性 T 細胞の役割については後に考察することとし、まず外来抗原特異的な CD 8 陽性 T 細胞の性質を明らかにするために、この 2 つのリンホカインに着目した。

[IL-10 による CD 8 陽性 T 細胞応答の調節：IL-10 による増殖の自律的制御]

まず CD 8 陽性 T 細胞の増殖に対する IL-10 の効果を検討した。その結果、CD 8 陽性 T 細胞クローンの増殖応答は IL-10 によって強く抑制されることが認められた。その抑制効果は既に報告のある CD 4 陽性 T h 1 に対する抑制作用と同等の強さであった。次に CD 8 陽性 T 細胞クローンが産生する IL-10 がこれらの細胞自身に与える影響を IL-10 に対する中和抗体を用いて解析した。その結果、いずれの細胞も IL-10 を産生することによって自らの増殖を培養後期において抑制していることが明らかとなった。この IL-10 による増殖自己抑制効果は CD 4 陽性 T 細胞クローンにおいては観察されず、CD 8 陽性 T 細胞に特異的な現象であることが示唆された。培養開始 2 4 時間後に加えた抗 IL-10 抗体は内在性 IL-10 の効果を中和せず、内在性 IL-10 の標的となる分子の特異的な性質が推測された。また、抗 IL-10 抗体の有無によって至適抗原濃度が変化することが認められ、この自己調節が至適抗原濃度を決定する一因であることが示唆された。

[IL-10 の増殖抑制機構の解析]

IL-10 による T 細胞増殖抑制機構を CD 4 陽性 T 細胞を用いて解析し

た。まず様々な抗原特異性を持つCD4陽性T細胞クローンの増殖に対するIL-10の効果を検討したところ、Th1クローンの増殖を強く抑制したのに対し、液性免疫を誘導するCD4陽性Th2クローンの増殖応答は全く抑制しなかった。このことからIL-10によるT細胞増殖抑制には選択性が存在することが明らかとなった。次にIL-10の増殖抑制機構について解析した。IL-10とともに抗原提示細胞を前培養することによってその後の増殖が有意に低下することが示され、IL-10はまず抗原提示細胞に作用して間接的にT細胞増殖を抑制しうることが示された。さらに、この抗原提示細胞に対する効果は、抗原提示細胞の機能を阻害することによるものであることが示唆された。抗原提示細胞がT細胞の活性化において果たす役割として抗原刺激及びその他の副刺激と呼ばれる二つの機能が知られるが、このうち副刺激を抑制することによってIL-10が作用していることが示された。IL-10はこの機構によってCD8陽性T細胞の増殖をも抑制しているものと考えられた。

[IL-10によるインターフェロン γ 産生の自律的抑制調節]

既に述べたように内在性IL-10による増殖抑制は培養開始3-4日後に始めて認められた。一般にT細胞の持つ機能の多くは産生されるリンホカインの活性によるものが多く、またリンホカインは刺激後数時間から産生される。そこで内在性IL-10がリンホカイン産生をも抑制しているかどうかをインターフェロン γ の産生量を測定することによって検討した。まず外から添加したIL-10がCD8陽性T細胞クローンのインターフェロン γ 産生を抑制するかどうかを検討した。その結果、IL-10によってインターフェロン γ 産生が有意に低下することが示された。次に培養開始時に抗IL-10抗体を加えたところ、インターフェロン γ 産生が増加することが認め

られた。この効果は有意な増殖応答が認められる以前の培養開始 12 時間後から認められた。刺激特異性を調べた実験より、この際の IL-10 の抑制機構に抗原提示細胞が関与していることが示唆された。また、過剰の IL-2、IL-4 によりインターフェロン γ 産生量が増加することが認められたが、抗 IL-10 抗体による増強効果は IL-2、IL-4 の存在下においても認められた。

[IL-4 によるインターフェロン γ の産生調節]

CD 8 陽性 T 細胞のインターフェロン γ 産生は IL-4 の添加によって増加することが示唆されたが、これまで CD 4 陽性 T 細胞に関する研究から、IL-4 はむしろインターフェロン γ の産生を抑制すると考えられてきた。そこでこの点が CD 8 陽性 T 細胞の特徴であると考えさらに検討した。まず IL-4 レセプターの発現を調べたところ、CD 8 陽性 T 細胞クローンはいずれも無刺激時においても IL-4 レセプターを発現していることが明らかとなった。次に IL-4 のインターフェロン γ 産生に対する効果を検討した。その結果、IL-4 は T 細胞に直接作用することにより、CD 8 陽性 T 細胞クローンのインターフェロン γ 産生を促進することが示された。一方 CD 4 陽性 T 細胞クローンのインターフェロン γ 産生は IL-4 の影響を受けなかった。さらに、IL-4 は未分化の細胞をインターフェロン γ 産生性の細胞に成熟させること、新たに分化したこれらの細胞のインターフェロン γ 産生をも増加させることが示された。これらの結果から IL-4 が CD 8 陽性 T 細胞のインターフェロン γ 産生を強めうることが示された。インターフェロン γ は IL-4 を産生する Th 2 の機能を抑制する強い活性があることから、CD 8 陽性 T 細胞の産生するインターフェロン γ は Th 2 のフィードバック調節に関わることが推測された。

[経口免疫寛容誘導下におけるCD8陽性T細胞の性質]

免疫応答が低下した状態の一例として、経口免疫状態に着目した。経口免疫寛容誘導下におけるCD8陽性T細胞の役割を検討するために、樹立されたクローンの性質を二群間で詳細に比較した。まず、T細胞レセプターを検討したところ、これらは異なったT細胞レセプターを有していることが明らかとなった。この違いを反映して、それぞれのクローンは変異型リガンドに対する応答性が異なっており、ある種の変異型リガンドは経口免疫寛容誘導マウス由来のクローンのみを強く活性化することが観察された。このことから、経口免疫寛容の誘導により、特異的なT細胞レパートリーが選択的に活性化されている可能性が示唆された。また、TGF- β の産生量を測定したところ、経口免疫寛容誘導マウス由来のクローンの特徴として高いTGF- β 産生が認められた。TGF- β は強い免疫抑制活性を持つことから、経口免疫寛容誘導下のCD8陽性T細胞は通常の状態のCD8陽性T細胞に比べ強い免疫抑制活性を有する可能性が示唆された。

[おわりに]

本研究によって外来抗原特異的なCD8陽性T細胞独自の活性調節機構が明らかとなった。リンホカインは多機能性であるため産生される状況・調節機構が重要であり、逆にこれらのことから産生細胞の役割を推測することができる。多くのCD8陽性T細胞クローンは少量のIL-10を産生することによって自らの増殖とインターフェロン γ 産生を調節していることが示唆された。こうして調節されるインターフェロン γ の活性がCD8陽性T細胞の重要な役割を担うものと考えられる。筆者はCD8陽性T細胞がインターフェロン γ を産生することによりTh2による免疫応答のフィードバック調節を行う役割を持ち、インターフェロン γ 産生を自己調

節するために IL-10 を少量産生するというモデルを提唱したい。インターフェロン γ は CD 8 陽性 T 細胞より多量に産生され、また Th 2 に対する抑制活性を持つ。さらに本研究で示したように、CD 8 陽性 T 細胞のインターフェロン γ 産生は Th 2 の生産物である IL-4 により増強され、また他の Th 2 産物である IL-10 の抑制作用を CD 4 陽性 Th 1 に比べ受けづらいからである。また、これとは別に少数の IL-10 高産生性の CD 8 陽性 T 細胞及び経口免疫寛容誘導下での TGF- β 産生性 CD 8 陽性 T 細胞も、外来抗原に対する免疫応答を抑制する活性を持つものとする。これら CD 8 陽性 T 細胞をも視野に入れた外来抗原に対する免疫応答調節機構の解明により将来のアレルギー等の疾患治療への応用を期待したい。

引用文献

1. Weiner HL, Friedman A, Miller A, Khoury SJ, Al-Sabbagh A, Santos L, Sayegh M, Nussenblatt RB, Trantham DE and Hafler DA. (1994) *Annu. Rev. Immunol.* 12: 809.
2. Enomoto A, Konishi M, Hachimura S and Kaminogawa S. (1993) *Clinical Immunol. Immunopathol.* 66: 136.
3. Kim S-M, Enomoto A, Hachimura S, Yamauchi K and Kaminogawa S (1993) *Int. Arch. Allergy Immunol.* 101: 260.
4. Hachimura S, Fujikawa Y, Enomoto A, Kim S-M, Ametani A and Kaminogawa S. (1994) *Int. Immunol.* 6: 1791.
5. Hirahara K, Hisatsune T, Nishijima K, Kato H, Shiho O. and Kaminogawa S. (1995) *J. Immunol.* 154: 6238.
6. Melamed D. and Freidman A. (1993) *Eur. J. Immunol.* 23: 935.
7. Smith CA, Williams GT, Kingston R, Jenkinson EJ and Owen JJT. (1989) *Nature* 337:181.
8. Webb S, Morris C and Sprent J. (1990) *Cell* 63:1249.
9. Jones LA, Chin LT, Longo DL and Kruisbeek AM. (1990) *Science* 250:1726.
10. Schwartz RH. (1990) *Science* 248:1349.
11. Markman J, Lo D, Nagi A, Palmiter RD, Brinster RL and Heber-Katz E. (1988) *Nature* 336:476.
12. Gershon RK and Kondo K. (1971) *Immunology* 21:903
13. Nakauchi H, Ohno I, Kim M, Okumura K and Tada T. (1984) *J. Immunol.* 132:88.
14. Roeckman M, Urban JF and Shevach EM. (1992) *Nature* 359: 79.
15. Thomson AW. (1989) *Immunol. Today* 10:6.
16. Orosz CG, Fidelus RK, Roopeniar DC, Widmer MB, Ferguson RM and Bach FH. (1982) *J. Immunol.* 129:1865.
17. Ullman KS, Northrop JP, Verweij CL and Crabtree GR. (1990) *Annu. Rev. Immunol.* 8:421.
18. Carbone FR and Bevan MJ. (1989) in *Fundamental Immunology* 2nd Paul WE ed. Raven Press, New York p. 541.
19. Rock KL, Rothstein L, Gamble S and Fleischacker C. (1993) *J. Immunol.* 150: 438.
20. Kovacsovics-Bankowski M and Rock KL. (1995) *Science* 267: 243.
21. Jensen PE, Pierce CW and Kapp JA. (1984) *J. Exp. Med.* 160: 1012.

22. Krzych U, Fowler AV and Sercarz EE. (1985) *J. Exp. Med.* 162: 311.
23. McMenamin C and Holt PG. (1993) *J. Exp. Med.* 178: 889.
24. Lipford GB, Hoffman M., Wagner H and Hegg K. (1993) *J. Immunol.* 150: 1212.
25. Hisatsune T, Nishijima K, Kohyama M, Kato H. and Kaminogawa S. (1995) *J. Immunol.* 154: 88.
26. Mosmann TR and Coffman RL. (1989) *Annu. Rev. Immunol.* 7:145
27. Gajewski TF, Schell SR and Fitch FW. (1990) *J. Immunol.* 144:4110.
28. Cher DJ and Mosmann TR. (1987) *J. Immunol.* 138:3688.
29. Kim J, Woods A, Becker-Dunn E and Bottomly K. (1985) *J. Exp. Med.* 162:188.
30. Hodgkin PD, Yamashita LC, Seymour B, Coffman R and Kehry MR. (1991) *J. Immunol.* 147:3696.
31. Hisatsune T, Enomoto A, Nishijima K, Minai Y, Asano Y, Tada T and Kaminogawa S. (1990) *J. Immunol.* 145: 2421.
32. Hisatsune T, Minai Y, Nishijima K, Enomoto A, Moore KW, Yokota T, Arai K and Kaminogawa S. (1992) *Lymphokine Cytokine Res.* 11: 87.
33. 葉袋裕二 (1994) 東京大学農学部博士論文
34. Fong TAT and Mosmann TR. (1990) *J. Immunol.* 144: 1744.
35. Sad S, Marcotte R and Mosmann TR. (1995) *Immunity*2:271.
36. 香山雅子 (1994) 東京大学農学部修士論文
37. Kimoto M and Fathman CG. (1980) *J. Exp. Med.* 152:759.
38. Moore KW, Vieira P, Fiorentino DF, Trounstein ML, Khan TA and Mosmann TR. (1990) *Science* 248:1230.
39. Fiorentino DF, Bond MW and Mosmann TR. (1989) *J. Exp. Med.* 170:2081.
40. Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW and O'Garra A. (1991) *J. Immunol.* 146:3444.
41. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo M, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H and de Vries JE. (1991) *J. Exp. Med.* 174: 915.
42. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M and O'Garra A. (1991) *J. Immunol.* 147:3815.
43. MacNeil IA, Suda T, Moore KW, Mosmann TR and Zlotnik A. (1990) *J. Immunol.* 145:4167.
44. Chen W-F and Zlotnik A. (1991) *J. Immunol.* 147:528.

45. Taga K, Cherney B and Tosato G. (1993) *Int. Immunol.* 5:1599.
46. Thompson-Snipes LA, Dahr V, Bond MW, Mosmann TR, Moore KW and Rennick DM. (1991) *J. Exp. Med.* 173:507.
47. Go NF, Castle BE, Barrett R, Kastelein R, Dang W, Mosmann TR, Moore KW and Howard M. (1990) *J. Exp. Med.* 172:1625.
48. Rousset F, Garacia E, Defrance T, Peronne C, Vezzio N, Hsu D-H, Kastelein R, Moore KW and Banchereau J. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1890.
49. O'Garra A, Stapleton G, Dhar V, Pearce M, Schumacher J, Rugo H, Barbis D, Stall A, Cupp J, Moore KW, Vieira P, Mosmann TR, Whitmore A, Arnold L, Haughton G and Howard M. (1990) *Int. Immunol.* 2:821.
50. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG and de Vries JE. (1991) *J. Exp. Med.* 174: 1209.
51. Farrar MA and Schreiber RD. (1993) *Annu. Rev. Immunol.* 11:571.
52. Ding AH, Nathan CF and Stuehr DJ. (1988) *J. Immunol.* 141:2407.
53. Erde DV, Collins JE, Shen L, Graziano RF and Fanger MW. (1990) *Mol. Immunol.* 27:57.
54. Strunk RC, Cole FS, Perlmutter DH and Cohen HR. (1985) *J. Biol. Chem.* 260:15280.
55. Johnson KP and Panitch HS. (1988) *Trans. Am. Clin. Clim. Assoc.* 100:171.
56. Allen PM and Unanue ER. (1987) *Adv. Exp. Med. Biol.* 225:147.
57. King DP and Jones PP. (1983) *J. Immunol.* 131: 315.
58. Pober JS, Gimbrone MA Jr, Lapierre LA, Mendrick DL, Fiers W, Rothlein R and Springer TA. (1986) *J. Immunol.* 137:1893.
59. Mantovani A and Dejana E. (1989) *Immunol. Today* 10:370.
60. Frohman EM, Frohman TC, Dustin ML, Vayuvegula B, Choi B, Gupta A, van den Noort S and Gupta S. (1989) *J. Neuroimmunol.* 23:117.
61. Gajewski TF, Schell SR, Nau G and Fitch FW. (1989) *Immunol. Rev.* 111:79.
62. Gajewski TF and Fitch FW. (1988) *J. Immunol.* 140:4245.
63. Coffman RL and Carty J. (1986) *J. Immunol.* 136:949.
64. Snapper CM and Paul WE. (1987) *Science* 236: 944.
65. Pene J, Rousset F, Briere F, Chretien I, Bonnefoy J-Y, Spits H, Yokota T, Arai N, Arai K and Banchereau J. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6880.

66. Finkelman FD, Katona IM, Mosmann TR and Coffman RL. (1988) *J. Immunol.* 140:1022.
67. Finkelman FD, Holmes J, Katona IM, Urban JF Jr, Beckmann MP, Park LS, Schooley KA, Coffman RL, Mosmann TR and Paul WE. (1990) *Annu. Rev. Immunol.* 8:303.
68. Street NE, Schumacheer JH, Fong TAT, Bass H, Fiorentino DF, Leverah JA and Mosmann TR. (1990) *J. Immunol.* 144:1629.
69. Gajewski TF, Joyce J and Fitch FW. (1989) *J. Immunol.* 143:15.
70. Handa K, Suzuki R, Matsui H, Shimizu Y and Kumagai K. (1983) *J. Immunol.* 130:988.
71. Wrann M, Bonder S, deMartin R, Siepl, et al (1987) *EMBO J.* 6:1633.
72. Fontana A, Frei K, Bodmer S, Hofer E, Schreier MH, Palladino MA Jr and Zinkernagel RM. (1989) *J. Immunol.* 143:3230.
73. Schull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, Anrunziata N and Doetschman T. (1992) *Nature* 359: 693.
74. 久恒辰博 (1993) 東京大学農学部博士論文
75. 上野川修一 (1992) 食品アレルギー(講談社ブルーバックス)
76. Richman LK, Graeff AS, Yarchoan R and Strober W. (1981) *J. Immunol.* 126: 2079.
77. Nathenson SG, Geliebter J, Phaffenbach GM and Zeff RA. (1986) *Annu. Rev. Immunol.* 4: 471.
78. Zittle CA, Cerbulis J, Pepper L and DellaMonica ES. (1959) *J. Daily Sci.* 42: 1897.
79. Ametani A, Kaminogawa S, Shimizu M and Yamauchi K. (1987) *J. Biochem.* 102:421.
80. Shimizu M, Ametani A, Kaminogawa S and Yamauchi K. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 869: 259.
81. Enomoto A, Shon D-H, Aoki Y, Yamauchi K and Kaminogawa S. (1990) *Mol. Immunol.* 27:581.
82. Shon D-H, Enomoto A, Yamauchi K and Kaminogawa S. (1991) *Eur. J. Immunol.* 21: 1475.
83. Resenberg SA, Spiess PJ and Shwartz S. (1978) *J. Immunol.* 121:1946.
84. Leo O, Michele M, Sachs DH, Samelson LE and Bluestone J A (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 1374.
85. Leo O, Foo M, Segal D., Shevach E and Bluestone JA. (1987) *J.*

- Immunol. 139: 1214.
86. Ledbetter JA and Herzenberg LA. (1979) *Immunol Rev.* 47:63.
 87. Dialynas DP, Wilde DB, Marrack P, Pierres A, Wall KA, Havran W, Otten G, Loken MR, Pierres M, Kappler L and Fitch FW. (1983) *Immunol. Rev.* 74: 29.
 88. Kubo RT, Born W, Kappler JW, Marrack P and Pigeon M. (1989) *J. Immunol.* 142: 2736.
 89. Ozato K and Sachs D. (1981) *J. Immunol.* 126:317.
 90. Bhattacharya A, Dorf ME and Springer TA. (1981) *J. Immunol.* 127: 2488.
 91. Mosmann TR, Schumacher JH, Fiorentino DF, Leverah J, Moore KW and Bond MW. (1990) *J. Immunol.* 145: 2938.
 92. Abrams JS, Roncarolo M-G, Yssel H, Andersson U, Gleich GJ and Silver JE. (1992) *Immunol. Rev.* 127: 5.
 93. Cherwinski HM, Schumacher JH, Brown KD and Mosmann TR. (1987) *J. Exp. Med.* 166: 1229.
 94. Spitalny GL and Havell EA. (1984) *J. Exp. Med.* 159: 1560.
 95. Hisatsune T, Ametani A, Nishijima K, Enomoto A and Kaminogawa S. (1992) *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 1616.
 96. Falk K, Rotzchke O, Stevanovic S, Jung G and Rammensee H-G. (1991) *Nature* 351: 290.
 97. Suzuki H, Eshima K, Takagaki Y, Hanaoka S, Katsuki M, Yokoyama M, Hasegawa T, Yamazaki S and Shinohara N. (1994) *J. Immunol.* 153:4496.
 98. Racioppi L, Ronchese F, Matis LA and Germain RN. (1993) *J. Exp. Med.* 177:1047.
 99. Kupfer H, Monks CRF and Kupfer A. (1994) *J. Exp. Med.* 179: 1507.
 100. Ohara J and Paul WE. (1985) *Nature* 315:33.
 101. Hisatsune T, Nishijima K, Minai Y, Kohyama M and Kaminogawa S. (1994) *Cell. Immunol.* 154: 181.
 102. Kato T, Inoue T, Yamamoto K, Tamura T and Nariuchi H. (1992) *Cell. Immunol.* 142:79.
 103. Kaye J, Porcelli S, Tite J, Jones G and Janeway CA Jr. (1983) *J. Exp. Med.* 158:836.
 104. Bejarano M-T, de Waal Malefyt R, Abrams JS, Bigler M, Bacchetta R, de Vries JE and Roncarolo M-G. (1992) *Int. Immunol.* 4:1389.
 105. Evavold BD and Allen PM. (1991) *Science* 252:1308.
 106. Evavold BD, Sloan-Lancaste J, Hsu BL and Allen PM. (1993) *J.*

- Immunol. 150:3131.
107. Otten GR and Germain RN. (1991) *Science* 251:1228.
 108. Prete GD, Carli MD, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R and Romagnani S. (1993) *J. Immunol.* 150:353.
 109. Nakayama T, Kubo RT, Kubo M, Fujisawa I, Kishimoto H, Asano Y and Tada T. (1988) *Eur J. Immunol.* 18:761.
 110. Mercep M, Bluestone JA, Noguchi PD and Ashwell JD. (1988) *J. Immunol.* 140:324.
 111. Williams IR and Unanue ER. (1990) *J. Immunol.* 145:80.
 112. Aiello FB, Longo DL, Overton R, Takacs L and Durum SK. (1990) *J. Immunol.* 144:2572.
 113. Lu Y and Janeway CA Jr. (1990) *Int. Immunol.* 3:323.
 114. Weaver CT and Unanue ER. (1990) *Immunol. Today* 11: 49.
 115. Makgoba MW, Sanders ME and Shaw S. (1989) *Immunol. Today* 10:417.
 116. June CH, Ledbetter JA, Linsley PS and Thompson CB. (1990) *Immunol. Today* 11:211.
 117. Yanagida T, Kato T, Igarashi O, Inoue T and Nariuchi H. (1994) *J. Immunol.* 152:4919.
 118. Liu Y, Jones B, Aruffo A, Sullivan KM, Linsley PS and Janeway CA Jr. (1992) *J. Exp. Med.* 175: 437.
 119. Greenbaum LA, Horowitz JB, Woods A, Pasqualini T, Reich EP and Bottomly K. (1988) *J. Immunol.* 145:2421.
 120. Ding L, Linsley PS, Huang LY, Germain RL and Shevach EM. (1993) *J. Immunol.* 151:1224.
 121. D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M and Trinchieri G. (1993) *J. Exp. Med.* 178:1041.
 122. Schofield L, Villaquiran J, Ferreira A, Schellekens H, Nussenzweig R and Nussenzweig V. (1987) *Nature* 330:664.
 123. Nanda NK, Sercarz EE, Hsu D-H and Kronenberg M. (1994) *Int. Immunol.* 6: 731
 124. Azuma M, Ito D, Yagita H, Okumura K, Phillips JH, Lanier LL and Somoza C. (1993) *Nature* 366:76.
 125. Kasahara T, Hooks JJ, Dougherty SF and Oppenheim JJ. (1983) *J. Immunol.* 130:1784.
 126. Vilcek J, Henrisken-DeSrefano D, Siegel D, Klion A, Robb RJ and Le J. (1985) *J. Immunol.* 135:1851.
 127. Farrar WL, Birchenall-Sparks MC and Young HB. (1986) *J.*

- Immunol. 137:3836.
128. Munakata T, Semba U, Shibuya Y, Kuwano K, Akagi M and Arai S. (1985) *J. Immunol.* 134:2449.
129. Johnson HM and Torres BA. (1984) *J. Immunol.* 132:413.
130. Johnson HM, Russell JK and Torres BA. (1986) *J. Immunol.* 137:3053.
131. Kishimoto T and Hirano T. (1989) in *Fundamental Immunology* 2nd Paul WE ed. Raven Press, New York p. 385.
132. Swain SL, Weinberg AD, English M and Huston G. (1990) *J. Immunol.* 145:3796.
133. Seder R., Boulay J-L, Finkelman F, Barbier S, Ben-Sasson SZ, Gros GL and Paul WE. (1992) *J. Immunol.* 148:1652.
134. Croft M, Carter L, Swain SL and Dutton RW. (1994) *J. Exp. Med.* 180: 1715.
135. 加藤宏子 (1996) 東京大学大学院農学生命科学研究科修士論文
136. Gregorie C, Rebai N, Schweisguth F, Necker A, Mazza G, Auphan N, Millward A, Schmitt-Verhulst A-M and Malissen B. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8077.
137. Pullen AM, Marrack P and Kappler JW. (1988) *Nature* 335: 796.
138. Bill J, Kanagawa O, Woodland DL and Palmer E. (1989) *J. Exp. Med.* 169: 1405.
139. Lider O, Santos LMB, Lee CSY, Higgins PJ and Weiner HL. (1989) *J. Immunol.* 142: 748.
140. Miller A, Lider O and Weiner HL. (1991) *J. Exp. Med.* 174: 791.
141. Miller A, Lider O, Roberts AB, Sporn MB and Weiner HL. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 421.
142. Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA and Weiner HL. (1994) *Science* 265: 1237.
143. Gregerson DS, Obritsch WF and Donoso LA. (1993) *J. Immunol.* 151: 5751.
144. Enk AH, Angeloni VL, Udey MC and Katz SI. (1993) *J. Immunol.* 151: 2390.
145. Bland PW and Warren LG. (1986) *Immunology* 58: 9.
146. Jameson SC, Carbone FR and Bevan MJ. (1993) *J. Exp. Med.* 177:1541.
147. Salgame P, Abrams JS, Clayberger C, Goldstein H, Convit J, Modlin RL and Bloom BR. (1991) *Science* 254: 279.

論文目録

1. Ken-ichi Nishijima, Tatsuhiro Hisatsune, Yuji Minai, Masako Kohyama and Shuichi Kaminogawa, "Anti-IL-10 antibody enhances the proliferation of CD8⁺ T cell clones: autoregulatory role of murine IL-10 in CD8⁺ T cells", *Cellular Immunol.*, 154, 193-201. (1994)
2. Ken-ichi Nishijima, Tatsuhiro Hisatsune, Hiroko Kato, Osamu Shiho and Shuichi Kaminogawa, "Anti-IL-10 antibodies enhanced the production of IFN-g of an a_S1-casein-specific CD8⁺ T cell clone", *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 2274-2276. (1995)
3. Ken-ichi Nishijima, Masako Kohyama, Tatsuhiro Hisatsune, Hiroko Kato, Mashiro Takehi and Shuichi Kaminogawa, "IL-4 enhanced the production of IFN-γ of CD8⁺ T cells", submitted.
4. Ken-ichi Nishijima, Masako Kohyama, Hiroko Kato, Tatsuhiro Hisatsune, Satoshi Hachimura, Masahiro Takehi and Shuichi Kaminogawa, "Oral administration of antigen does not influence the proliferation of responsive CD8⁺ T cells, but induces distinct cell population", submitted.

謝辞

本研究は東京大学農学部農芸化学科畜産物利用学研究室（現東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻食品生化学研究室）で行われたものであり、研究の開始から終始暖かくまた適切なご指導を賜りました上野川修一教授に深くお礼申し上げます。研究室配属当初より、研究の細かい点にいたるまで懇切にご指導いただきました久恒辰博助手に心から感謝いたします。また、とらわれない視点から様々なご助言を頂きました飴谷章夫助教授にあつくお礼申し上げます。

専門家の立場より免疫学について様々なご指導を賜り、また貴重な試薬をご恵与いただきました東京大学医学部免疫学教室多田富雄前教授（現東京理科大学教授）、浅野善博前助教授（現愛媛大学教授）、及び研究室の皆様へ深く感謝いたします。

T細胞クローンをご恵与いただいた東京大学医科学研究所成内秀雄教授、抗T細胞レセプター抗体をご供与いただいた北海道大学伊藤靖博士にあつくお礼申し上げます。

研究生活全般にわたりお世話になりました畜産物利用学研究室の皆様へ感謝いたします。特に、終始激励くださいました薬袋裕二博士、八村敏志助手、戸塚護助手、また、貴重な時間を割いて実験をしてくださった加藤宏子氏、香山雅子氏、寛雅博氏に深く感謝いたします。

本論文をまとめるにあたり、名古屋大学工学部生物機能工学科遠伝子工学講座の皆様にご迷惑をおかけいたしました。特に、飯島信司教授、及び上平正道助教授、三宅克英助手にあつくお礼申し上げます。ありがとうございました。

1996年10月

西島 謙一

西島 謙一

