

CD8陽性T細胞の生産する免疫調節因子の同定と
その生産に関する研究

栗 袋 裕 二

①

CD8陽性T細胞の生産する免疫調節因子の同定と その生産に関する研究

農芸化学専攻

平成3年度博士課程進学

氏名 薬袋 裕二

指導教官 上野川修一

目次

	ページ
第一章 序論	1
第二章 CD8陽性抑制T細胞クローンが産生する抑制因子の発見	
序	10
材料と方法	12
結果	17
考察	25
第三章 T細胞増殖抑制因子(TGIF)の精製と同定	
序	27
材料と方法	29
結果	35
考察	57
第四章 抑制T細胞の増殖とIL-10の産生	
序	64
材料と方法	68
結果	71
考察	82
第五章 同一クローンからのIL-10とIFN- γ の産生制御	
序	86
材料と方法	88
結果	90
考察	99
第六章 要約	104
参考文献	109
謝辞	114

第一章 序論

生物は絶えず外界からの攻撃、あるいは自己内で発生する異常な細胞によって生命の危機に接している。このような生命への攻撃に対して備わっている免疫系は、毒素の中和、癌化した細胞の破壊、ウイルスや細菌寄生虫等の外来から異物を生体内に侵入するのを防ぐ巧妙な生体防御機構である。特に脊椎動物の免疫系は下等な動物内に存在する免疫系に比べ特異的な認識を行い、異物の排除を行うことができる。無数の抗原にそれぞれ対応する一種類の抗原レセプターを細胞表面に発現しているT、B細胞がリンパ管や血管を通じて生体内を循環して異物の侵入をパトロールするのである(1)。特にT細胞は最初に抗原を認識し、免疫系を司る細胞群を活性化させるという意味で司令塔のような中心的な役割を担っている細胞と考えられている。

ところで細胞はその細胞膜上に様々な糖タンパク質や糖脂質を主体とした表面抗原を発現している。T細胞もその例外ではなく、各種の膜抗原に対してモノクローナル抗体を作成することにより、無秩序であった表面抗原を物質的に同定でき、これらの表面抗原は[Cluster of Differentiation (CD) + 数字]という名称で呼ばれるようになった。最初は表面抗原を認識する抗体を[CD + 数字]で表示したが、現在は表面抗原そのものを示すことが多い。そしてT細胞にも様々なCD抗原が発現されていることが明かとなり、発現しているCD抗原の違いからT細胞群をさらに細かく分類することが可能となった。特にT細胞の機能とCD抗原を対応させることにより、ヘルパー作用を持つT細胞はCD4を発現し、細胞障害性/抑制活性をもつT細胞はCD8を発現していることが知られている(2)。なおT細胞は胸腺内で成熟し、末梢へ移行するが、この末梢血内におけるほとんどのT細胞はCD4かCD8の片方のみを必ず発現している。

そしてこのようなCD4陽性T細胞(CD4⁺T細胞)あるいはCD8陽性T細胞(CD8⁺T細胞)の免疫系に作用する仕組みを解明するために、1)細胞同士の接着に注目。2)液性因子に注

目という2点からアプローチして研究が行われた。まず細胞間の接着に関してであるが、これはT細胞が外来抗原を認識したり標的細胞を認識するためにはなくてはならないものである。T細胞の表面に発現しているT細胞レセプター（TCR）が抗原提示細胞（APC）上に提示されている抗原と主要組織適合抗原複合体（MHC）の複合物を認識し、お互いに結合する（3）。さらにT細胞が発現している接着分子CD4/CD8、CD28、LFA-1、CD2、CD5分子がそれぞれAPC上のMHC、B7、ICAM-1/2、LFA-3、CD72分子と結合することによってその結合を補強し、T細胞を強く活性化することが知られている（4）。

次に液性因子についてであるが、この研究は、*in vitro*における細胞培養が確立しつつある頃に、リンパ球をマイトージェンで刺激するとその培養上清中にT細胞等のある種の細胞を増殖させるのに必要不可欠な成分があることを見いだしたことから始まった（5）。そしてこのような免疫調節物質をリンパ球から産生される生理活性物質という意味でリンホカインと名付けた。またそのような生理活性物質がマクロファージやモノサイトからも産生されていることが判明し、それらの細胞から分泌している物質群をモノカインと呼ぶことにした。その後、細胞増殖を誘導するもの、細胞増殖を阻害するもの、細胞の走化活性を促進させるもの等、様々な生物活性を指標として生理活性物質が単離精製され、それに対する抗体が作られ、そして遺伝子のクローニングが行われた。その結果、リンホカインとモノカインが同じ物質群を指し示したことが判明してきたので、リンホカイン、モノカインを包含して、細胞から産生される生理活性物質という意味でサイトカインと命名された。現在ではサイトカインの性質、定義として以下のような考え方が一般的となっている。

1. 細胞が産生する。
2. タンパク質である（糖鎖結合を含む）。
3. 分子量は約10 kDa～50 kDa。

4. 多様な生理活性を持つ。

- ①免疫の調節
- ②炎症反応誘導
- ③ウイルス感染細胞や腫瘍細胞の障害
- ④細胞の増殖、分化誘導

このようなサイトカインは体内において局所的には高濃度で存在するが、産生細胞からの距離が遠くなるに従い、急激に希釈される。そのため多くのサイトカインは、産生細胞自身に作用する（autocrine）か、すぐ近くの細胞に作用するparacrineメディエーターとして局所的に働いていると考えられている。これは同じように様々な生理活性を有するタンパク質である内分泌ホルモンのように遠隔の標的細胞に作用する（endocrine）活性がないという点で異なる。

これらのサイトカイン遺伝子のクローニングが始まったのは1980年代からであるが、特にここ数年のサイトカインの発見のスピードはすざましいものがある。また作製された組換え体サイトカインを用いてin vitroにおけるサイトカインの性質を検討することにより次々と新たな生物活性が明かとなってきた。表1-1、表1-2に現在までに同定されているサイトカインのなかで特に免疫調節に深く関与しているものを示した（6）。

サイトカインが産生される細胞はリンパ球、マクロファージ、繊維芽細胞、上皮細胞、血管内皮細胞、神経系細胞等ほとんど全ての細胞から産生されていることが明かとなった。そして1種類のサイトカインが数種類の細胞から産生されることの方が一般的であることが知られるようになった。またサイトカインの作用についても、一つのサイトカインが多くの種類の標的細胞に作用し、増殖活性、分化誘導、活性抑制等、標的細胞に対する生理活性は多種多様であることが知られてきた。このように各々のサイトカインは産生、作用の点で重複する部分をかなり有すると同時に、異なるサイトカインが共同に作用して活性を増強させる等、サイトカイン相互作用も保持しているのである。このようなサイトカ

表1-1 各種サイトカインの性状 (1)

サイトカイン	日本語名 / (別称)	分子量 (kDa)	アミノ 酸数	糖鎖
IFN- α	インターフェロン- α	20	166	-
IFN- β	インターフェロン- β	20	166	+
IFN- γ	インターフェロン- γ	20-24	146	+
G-CSF	顆粒球コロニー刺激因子	18-22	174	+
M-CSF	マクロファージコロニー刺激因子	(22or42)x2	149,214	+
GM-CSF	顆粒球マクロファージコロニー刺激因子	22	127	+
TNF- α	腫瘍壊死因子、(カケクチン)	17x3	157	-
TNF- β	リンホトキシン、(LT)	20-25	171	+
TGF- α	トランスフォーミング成長因子 α	5-6	50	-
TGF- β	トランスフォーミング成長因子 β	12.5x2	112	-
PDGF	血小板由来増殖因子	(12-18)x2	110-125	+
IL-1 α	インターロイキン1、 (EP、BAF、LEM、H-1)	17.5	159	-
IL-1 β		17.5	153	-
IL-2	(TCGF、KHF)	15-20	133	+
IL-3	(MCGF、BPA、HCGF、PSF)	14-30	133	+
IL-4	(TCGF-2、MAF、IgE-EF)	15-19	153	+
IL-5	(BCGF-2、EDF、IgA-EF)	23x2	115	+
IL-6	(BSF-2、HGF、TAF、HSF)	21-28	212	+
IL-7	(THCGF、PBGF)	25	154	+
IL-8	(NAP-1)	8-10	72	
IL-9	(P40、TCGF-3、MCGF)	40	126	+
IL-10	(CSIF、B-TCGF)	17-21	160	+
IL-11		23	199	
IL-12	(CLMF、NKSF)	35.40	253,328	+

表1-2 各種サイトカインの性状 (II)

サイトカイン	主な産生細胞の一部	作用の一部
IFN- α	白血球、マクロファージ	ウイルス増殖抑制
IFN- β	線維芽細胞、上皮細胞	細胞増殖抑制
IFN- γ	T細胞、マクロファージ	マクロファージ活性増強 細胞分化誘導
G-CSF	マクロファージ、線維芽細胞	好中球系前駆細胞の増殖分化
M-CSF	マクロファージ、線維芽細胞	骨髄での血小板産生誘導
GM-CSF	T細胞	好中球、好酸球の産生誘導
TNF- α	T細胞、マクロファージ	腫瘍細胞障害活性
TNF- β	T細胞、B細胞	マクロファージの活性化
TGF- α	腫瘍組織、肝細胞	線維芽細胞の増殖
TGF- β	血小板、骨、	リンパ球の増殖抑制
PDGF	血小板、マクロファージ	線維芽細胞の増殖
IL-1 α	マクロファージ、好中球、	T細胞、B細胞の活性化、 IL-2-8の誘導
IL-1 β	線維芽細胞、血管内皮細胞	
IL-2	Th1細胞、NK細胞	T細胞増殖、IFN- γ 、TNF- β の誘導
IL-3	T細胞	B前駆細胞の増殖分化
IL-4	Th2細胞	T細胞増殖、IgE、IgG1産生誘導
IL-5	Th2細胞、肥満細胞	B細胞の増殖分化
IL-6	T細胞、B細胞、線維芽細胞	抗体産生細胞への分化
IL-7	ストローマ細胞	リンパ球の増殖分化
IL-8	マクロファージ、線維芽細胞	好塩基球活性化
IL-9	CD4 ⁺ T細胞	CD4 ⁺ T、肥満細胞の増殖
IL-10	Th2細胞、B細胞、肥満細胞	第三章参照
IL-11	ストローマ細胞、線維芽細胞	B細胞の分化
IL-12	B細胞	IFN- γ 産生誘導

インの性質は、産生細胞と標的細胞がはっきりしているホルモンとは異なるものである。

つまりサイトカインは細胞間相互作用において重要な役割を担い、総合的に大きなサイトカインネットワークを形成しているのである。しかし次々と新しいサイトカインが発見され、多様な生理活性が報告されてきたために、このサイトカインネットワークは複雑に絡み合い過ぎてしまい、全体的な免疫反応として捉えるのが困難な状態に陥ってしまった。

そんな状況のなかで、 $CD4^+$ ヘルパーT細胞が産生するサイトカインの産生パターンに注目したMosmannらは、1986年に、長期培養した $CD4^+$ T細胞クローンが産生するサイトカインのパターンが2種類あり、それぞれをTh1、Th2と定義することを提唱した(7)。その内容は、IL-2、IFN- γ 、TNF- β を産生するヘルパーT細胞(Th)をタイプ1ヘルパーT細胞(Th1)、IL-4、IL-5、IL-6を産生するThをTh2と2つのサブセットに分類するものであった(8)。IL-3、TNFやGM-CSFは両方のタイプから産生されている。この分類は $CD4^+$ 細胞に留まらず、 $CD8^+$ T細胞、肥満細胞にまで適用することができた(表1-3)。 $CD8^+$ T細胞はおもにIFN- γ を産生し、サイトカインパターンはTh1と同じであることが示され、肥満細胞は高親和性IgEレセプターを介する刺激やイオノマイシンによってTh2タイプのサイトカインを分泌することが判明した(9)。

それまでもヘルパーT細胞をいくつかのサブセットに分類する試みはあったが、分泌されるサイトカインの定量に基づいて行われたのは初めてであった。このTh1、Th2という概念の基にサイトカインネットワークを見直してみると、Th2はIgEによって仲介されるアレルギー反応を促進し、Th1はそれを抑制するととらえることが可能になった。またTh1は遅延型反応を促進するというように2つのT細胞群がお互いに免疫反応を制御し合っていると理解されるようになった。

実際の実験においても上記の仮説を裏付ける結果が報告された。

表1-3 マウスサイトカインの産生パターン

サイトカイン	CD4 ⁺ T細胞		CD8 ⁺ T細胞	肥満細胞
	Th1	Th2		
IFN- γ	+	-	+	-
TNF- α	+	+	+	
TNF- β	+	-	+	
IL-2	+	-	+/-	-
IL-3	+	+	+	+
IL-4	-	+	-	+
IL-5	-	+	-	+
IL-6	-	+	-	+
IL-10	-	+	第三章	+

in vitroの実験においてTh 2は効率よくB細胞の抗体産生を誘導した。この理由として、B細胞が免疫グロブリンを産生する抗体産生細胞にまで分化するために必要な刺激としてTh 2とB細胞の接触、それにTh 2から産生されるIL-4とIL-5が必須であるからだと考えられている(10)。またTh 1クローンを皮下に接種すると遅延型過敏症反応(delayed type hypersensitivity reaction: DTH反応)を誘起した。このDTHはT細胞の浸潤とその後のマクロファージと好中球の浸潤と活性化の2段階の反応によって起こる炎症であるが、Th 1は、IFN- γ を産生させてマクロファージを活性化させるので、最終的にDTHの後期に大きく関わっていると考えられている(11)。

このようにT細胞は特異的な抗原を認識するという意味だけではなく、産生するサイトカインの作用を通じて免疫反応や炎症反応を調節する非常に重要な細胞群であることが再確認されたのである。

ところで免疫反応は正常に働いているときは大変生命維持にとって有効であるが、時として過剰に反応してしまい、アレルギーなどの疾患を引き起こしてしまう場合がある。そのような疾患を軽快させるためには免疫抑制機構についての基礎研究が望まれた。

そのため本研究は免疫系で重要な位置を占めるT細胞のなかでもTh 1、Th 2ほど免疫系に対する作用がよく解明されていないCD 8⁺T細胞の作用、特に免疫抑制機構の解明を目的として実験を行った。その実験材料として、当研究室で樹立したCD 8⁺抑制T細胞クローン13G2を用い、その13G2細胞の抑制活性と似た抑制活性が培養上清中に存在することを発見した(第二章)。そして培養上清中の抑制活性物質を同定したところ、当時発見されたばかりのIL-10であることが判明した(第三章)。さらに13G2の増殖とIL-10の産生の関連性について研究を行った(第四章)。そして13G2クローンが産生する免疫抑制活性を持つ2種類のサイトカイン、IL-10とIFN- γ の産生制御について若干の知見を得た(第五章)。今後ますますCD 8⁺T細胞とサイトカイン産生の関係についての情報が蓄積すれば、免

疫抑制機構の解明に大きな光明を見いだすことができると考えられる。

……（以下省略）……

……（以下省略）……

……（以下省略）……

第二章 CD8⁺抑制T細胞クローンが産生する抑制因子の発見

序

CD8陽性T細胞（CD8⁺T細胞）は、ウイルス感染細胞の除去、癌細胞の破壊等の細胞傷害活性を発揮したり、あるいは細胞性免疫を抑制する作用を免疫系に対し引き起こす（12）。つまり一言でいえば、CD8⁺T細胞は細胞増殖を抑制するという機能を持つ細胞群であると考えられる。それではCD8⁺T細胞はどのようなメカニズムで細胞増殖を抑制しているのであろうか。

細胞傷害活性をおもに引き起こすT細胞として、キラーT細胞（細胞傷害性T細胞：CTL）という名前で呼ばれるCD8⁺T細胞群がある。CTLが傷害活性を引き起こすにはまず作用の標的となる細胞と接触する必要がある。ウイルス等に感染した標的細胞がMHCクラスIにウイルス等の内因性抗原の分解ペプチドを提示し、それを抗原特異的なCTLがTCRで認識して接着する。更にCD8分子をはじめとして、CD28、CD45等いくつかのアクセサリー分子が標的細胞との結合を補強する。そして標的細胞の破壊プログラムが始まると考えられている。破壊は標的細胞の核内DNAのフラグメンテーションから始まり、細胞内へのH₂O流入による標的細胞の膨張、そして破裂に終わる。すなわちこの一連の細胞破壊プログラムを引き起こすにはCTLと標的細胞の接着が重要であると考えられている。またCTLから産生されるサイトカインであるTNF- α やTNF- β がその細胞傷害活性を増強させる場合があることが知られている（13）。

一方細胞傷害活性を強く誘導せずに細胞の増殖を抑制するCD8⁺T細胞群があり抑制T細胞と呼ばれている。抑制T細胞については数多くの報告があったが、CTLとの表面抗原の差異が見つかっていないために、現在のところ抑制T細胞とCTLを別のT細胞群としては区別されていない（14）。しかしながらCD8⁺T細胞の免疫系に対する作用を解明する上で抑制T細胞様の活性をもつCD8⁺T細胞の研究を行うのは大変意義のあることであると

思われる。

当研究室では牛乳タンパク質の一つである $\alpha_s 1$ -カゼイン特異的な $CD 4^+$ T細胞クローンの増殖を抑制し、なおかつ細胞傷害活性が極めて弱い $CD 8^+$ 抑制T細胞クローン13G2を樹立している(15)。この13G2は当初 $\alpha_s 1$ -カゼイン+MHCクラスIIに反応して増殖した。 $CD 8^+$ T細胞は一般的にはMHCクラスIに拘束されるが、クラスIIに拘束される $CD 8^+$ T細胞もいくつか報告されており抑制活性をもつことが示唆されている。またプライマリーな系でもクラスII拘束性の $CD 8^+$ T細胞の存在が示唆されている(14)。13G2クローンはその後上記のような抗原特異性を消失した。しかしながら抑制活性は消失せず、抗原特異的なヘルパーT細胞クローンの増殖を抑制している。また増殖抑制の対象となるヘルパーT細胞にはMHC拘束性がなく、抗原特異性もないことが明かとなっている。

一般にT細胞の反応性において、抗原特異性やMHC拘束性がある場合はTCRがその反応性に関与していると考えられる。しかしこれらの拘束性がない場合、その反応性を誘起するのはサイトカインのような液成因子であると推測することもできた。

ところで $CD 8^+$ T細胞が産生するサイトカインはIL-3、GM-CSF、TNF- α 、TNF- β 、IFN- γ が知られており、Th1と全く同じであることが知られている(8)。その中で抑制活性能力を持つサイトカインとして知られているのはIFN- γ 、TNF- α 、TNF- β の3種類である(6)。

本章では13G2細胞によって引き起こされているヘルパーT細胞の抗原特異的な増殖の抑制反応が液成因子によっても誘導できるかを検討するために13G2の培養上清、あるいは $CD 8^+$ T細胞が産生するサイトカインのなかで細胞増殖を抑制する活性が報告されているIFN- γ 、TNF- α 、TNF- β を用いて抑制活性の検討を試みた。

本章ではこの13G2の非特異的な増殖抑制が $CD 8^+$ T細胞が産生するサイトカインによるかを検討した。

材料と方法

1. 動物

マウスは6週令から8週令のメスC57BL/6NCrj (H-2^b)を用い、ラットはオスLewis系を使用した。共に日本チャールズリバーより購入し用いた。

2. 培地

培地の調製は以下の様に行った。高圧蒸気滅菌可能なRPMI 1640 (ニッスイ)を説明書の指示通りに蒸留水に溶解した後に耐圧瓶に入れ高圧滅菌を行った。それに、8%炭酸水素ナトリウム水溶液を2.5%、3%グルタミン水溶液を1%を加え、更に最終的に2-メルカプトエタノール (和光純薬) 5×10^{-5} M、ストレプトマイシン (明治製菓) 100 U/ml、ペニシリン (萬有製薬) 100 μ g/mlとなるように調整したものを培地とした。通常の動物細胞の維持増殖には血清が必要であり、本実験でも培地に10%牛胎児血清 (FCS) を添加したものを完全培地として使用した。

3. サイトカイン

組換え体-ヒト-インターロイキン2 (rhIL-2)は武田薬品工業より供与された。組換え体-ヒト-腫瘍壊死因子 (rhTNF- α)、組換え体-ヒト-リンホトキシン (rhTNF- β) R&Dsystemsから、組換え体-マウス-インターフェロン γ (rmIFN- γ)は東レ研究所から購入した。なおIL-2、TNF- α 、TNF- β のマウスとヒトの相同性は高く、ヒトの組換え体はマウスの細胞に対し、マウスのサイトカインと同様の活性を示すことが知られている。T細胞クローンを維持するには、完全培地の他にT細胞増殖因子 (TCGF) が必須であることが知られている。このTCGFをRosenbergらの方法に準じてラットから作成した(16)。ラットの脾臓細胞をテフロンメッシュを通して得られる細胞懸濁液を 5×10^6 /mlの濃度に調整し、1%FCSと5 μ g/mlのコンカナバリンA (ConA:Sigma)を含む完全培地中で37℃、

湿度100%、5%CO₂の条件下で2日間培養した。そしてこの培養上清に0.15M α -メチルマンノシド (Sigma) を加え1時間かくはんすることで残存するConAを中和した後、遠心し(2000×Gで10分)、0.22 μ mのフィルターで滅菌し、TCGFを得た。なおこのTCGFの活性はその後の研究により、IL-2、IL-4、IL-9等の活性であることが明かとなっている(17-19)。

4. T細胞クローン

当研究室で樹立されたCD8⁺抑制T細胞クローン13G2とCD4⁺ヘルパーT細胞クローン3D20、11D4を使用した。13G2細胞の継代培養にはポリスチレンディッシュ (Falcon) を用いた。13G2は接着性の細胞であるため、以下の方法でディッシュよりはがした。まずディッシュから培養液を取り除き、0.05%トリプシン (Difco) および0.02%EDTA (和光純薬) を含む少量のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS: Na₂HPO₄·12H₂O 26.2g、KH₂PO₄ 5.0g、NaCl 2.34 g/L) で細胞を浸す。そしてすぐにトリプシン溶液を取り除き、溶液のない状態で37℃5分間放置した後培地を加え細胞懸濁液を得た。3~4日毎に2×10⁵個/mlとなるように細胞を調整し、10%TCGFを含む完全培地で培養した。CD4⁺T細胞クローン3D20、11D4は3000-radでX線照射した同系脾臓細胞 (2×10⁶/ml) の存在下、10%TCGF、抗原として100 μ g/mlの α _{s1}-カゼイン (牛乳より精製(20)) を加えた培地で2×10⁵/mlに調整し培養した。そして1週間毎に抗原による反復刺激を行うことにより抗原特異性を維持した。

5. IL-2の吸収

ポリクローナルな抗IL-2抗体をカップリングしたゲル (武田薬品工業より供与) (21) を培養上清に10~20%添加し、氷上で1時間反応させた。次に溶液部分を0.22 μ mのフィルターで滅菌濾過して抑制活性測定用の試料とした。なおこの操作によって

200 U/ml以下のIL-2は完全に吸収されることは、IL-2依存性T細胞クローンCTL-2（東京工業大学細胞工学講座馬替純二博士より供与）（22）を使用した実験によって確かめられた（結果省略）。

6. 免疫抑制活性の測定

13G2の培養上清の免疫抑制活性はタイプ1ヘルパーT細胞クローンの抗原による増殖能に対する抑制活性を指標とした。測定に用いるタイプ1ヘルパーT細胞として3D20を用いた。すなわち20 μ lの抑制活性を測定する試料を、 2×10^4 個の3D20細胞、 2×10^5 個の同系脾臓細胞、20 μ gの α _s1-カゼインと共に合計200 μ lにし、96ウェルプレート（Falcon）で4日間インキュベートした。培養終了20時間前に37 kBqの³H標識チミジン（³H-チミジン：New England Nuclear）を含む培地を10 μ l添加し、3D20のDNA内に取り込まれた³Hの量を液体シンチレーションカウンターで測定した。各々の実験は3連で行い、その平均値および標準偏差を結果として表示した。

7. 抑制因子の化学的物理的性質

抑制因子の化学的性質を検討するために、次の処理を行った。

- 1) 56℃30分で加熱処理をした。
- 2) 0.1 Mジチオスレイトール（DTT：和光純薬）を加え、1時間37℃で反応させた。
- 3) pH 4.5、6.0、10.0、11.5の緩衝液に24時間透析した。緩衝液の組成は結果の表に表示した。またそれらの試薬はすべて和光純薬から購入した。また大まかな分子量の見当をつけるために限外濾過を行った。分子量1万以下をカットするバケット（ミリポア、CAT.No PTGCOLCM2）を取り付けた限外濾過装置ペリコンラボカセットに13G2の培養上清を通し、分子量1万以下の画分と1万以上の画分を得た。これらの試料は全てPBSで透析を行った。

8. サイトカインの測定

I F N- γ の生物活性の測定は抗ウイルス活性を指標とした(理化学研究所動物システム研究室主任高月昭博士のご協力による)。試料を段階希釈し、96 ウエルプレートに50 μ l ずつ添加した。そこに 4×10^5 /ml のL 9 2 9細胞を50 μ l ずつ添加し、24時間培養した。プレート内の培養液を吸い取った後、あらかじめL 9 2 9細胞に対する感染価(T C I D : Tissue Culture Infected Dose)を求めたV S V (水疱性口内炎ウイルス)を血清の含まれない培地に懸濁し、それを50 μ l (T C I D₅₀量の10倍量) ずつ添加して24時間培養した。その後に染色用に125 μ g/ml のneutral red (Sigma)を含んだ培養液を50 μ l 添加し、90分培養した後にプレート内の培養液を捨ててP B Sで洗浄する。細胞内にとりこまれた染色液を抽出するために0.1 M N a H₂ P O₄ · 2 H₂O : E t O H = 1 : 1の混合液を100 μ l ずつ添加し550 nmの吸光値を測定し、コントロール試料と比較することでユニット数を算出した。

T N F- α / β の生物活性はL 9 2 9細胞に対する傷害活性を用いて求めた。まず 1.6×10^6 /ml のL 9 2 9細胞にT N Fに対する感受性を約100倍高める2 μ g/ml のアクチノマイシンD (Sigma)を加えた懸濁液50 μ l を96 ウエルプレートに添加し、更にそこに段階希釈した試料を50 μ l ずつ添加して24時間培養を行った。次に上清を捨てP B Sで洗浄したのちに、0.2%のクリスタルバイオレット/E t O H溶液を50 μ l 添加し、生細胞を染色した。15分後に水で洗浄後、メタノールを100 μ l ずつ添加した後に550 nmの吸光値を測定し、コントロールと比較することでユニット数を算出した。

またm R N Aの発現の測定には感度がよいポリメラーゼチェーンリアクション(P C R)法を用いた。植え継ぎ後9時間後の13 G 2細胞(1×10^7 個)よりグアニジンイソシアネート法により全R N Aを抽出した。KrugとBergerの方法(23)に従い、オリゴ(d T) 12-18をプライマーとして、AMV逆転写酵素(B-Mannheim)を使用してR N A 1 μ g から一本鎖c D N Aを合成した。次に20分

の1を用いてサイクル数30回(94°C 1min, 54°C 2min, 72°C 3min)の条件でPCRを行った。各物質のプライマーは以下の通りである(24)。

IFN- γ

sense: 5'-AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAG-3' (841-865)

antisense: 5'-GTCACAGTTTTCAGCTGTATAGGG-3' (1084'-1061')

TNF- α

sense: 5'-GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTGC-3' (820-843)

antisense: 5'-ACATTCGAGGCTCCAGTGAATTCGG-3'(1127'-1102')

TNF- β

sense: 5'-TGGCTGGGAACAGGGGAAGGTTGAC-3' (2822-2846)

antisense: 5'-CGTGCTTTCTTCTAGAACCCCTTG-3' (3038'-3014')

このPCR産物を5%アクリルアミドゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した後に紫外線による発色を観察した。

結果

1. 免疫抑制因子の検出

久恒らが樹立した $CD8^+$ 抑制T細胞クローン13G2はヘルパーT細胞クローンの抗原特異的な増殖をほぼ完全に抑制することが観察されている(15)。そしてこの13G2の抑制効果には抗原特異性もMHC拘束性もないことが示されていた。抑制T細胞の免疫抑制機構は詳細には明かとなっていないが、抑制T細胞が産生する液性因子に起因するという複数の報告がある(25, 26)。そこで13G2細胞の培養上清中にヘルパーT細胞の抗原特異的な増殖を抑制する活性があるのかどうかを検討した。

$CD8^+$ 抑制T細胞クローン13G2と $CD4^+$ ヘルパーT細胞クローン3D20、11D4の3種類のT細胞を、24ウェルプレートでTCGFの代わりに $rhlL-2$ (50 U/ml)の存在下各々 5×10^5 /mlの濃度で4日間培養した。TCGFの代わりに $rhlL-2$ を使用したのは、TCGFの中に含まれる様々な免疫調節物質の影響をできるだけ排除するためである。その結果得られた培養上清を0.22 μm のフィルターで濾過した後、その濾過された上清の抑制活性について調べた。添加する上清の量は、その容量の10分の1から2倍ずつ希釈して2560分の1までとし、図2-1はその際の3D20の 3H -チミジンの取り込みを示したものである。図中のN.C. (Negative control) は3D20を抗原刺激しなかった場合の、またP.C. (Positive control) は抗原刺激を行った場合に3D20細胞に取り込まれた 3H -チミジンの値を表している。13G2の上清を加えると、その添加した上清量の濃度依存的に3D20の抗原特異的な増殖反応が抑制されることが認められた。それに対して、13G2と同じ条件で培養した3D20、11D4の4日後の培養上清中には全く増殖抑制活性はなかった。なおこれらの培養上清中には添加した $IL-2$ が残存しているために見かけ上抑制活性が観察されないという可能性も考えられた。そこで各々の培養上清から $IL-2$ を吸収した後に、抑制活性を測定した(図2-2)。しかしその場合

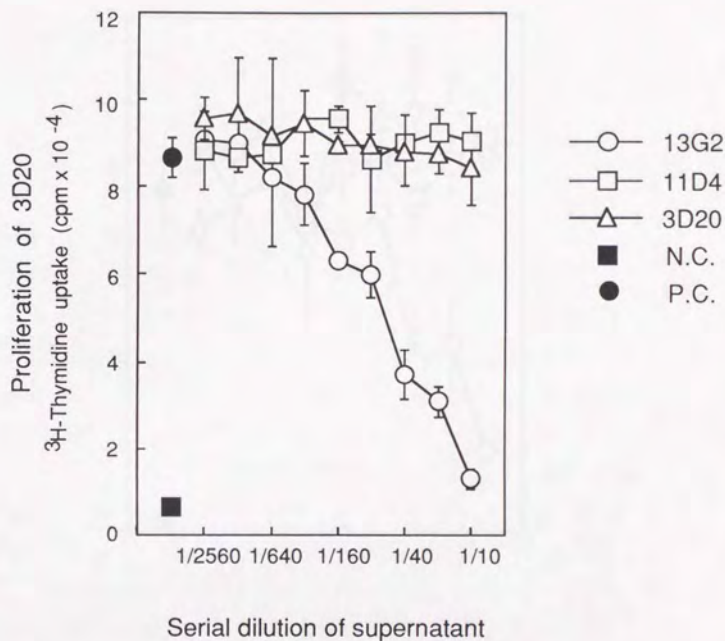


図2-1 13G2の培養上清による免疫抑制作用

13G2、3D20、11D4の培養上清を希釈系列をつけて3D20の抗原刺激の系に添加した。N.C.は抗原刺激をしない場合を示し、P.C.は試料を添加せずに抗原刺激をした場合を示す。

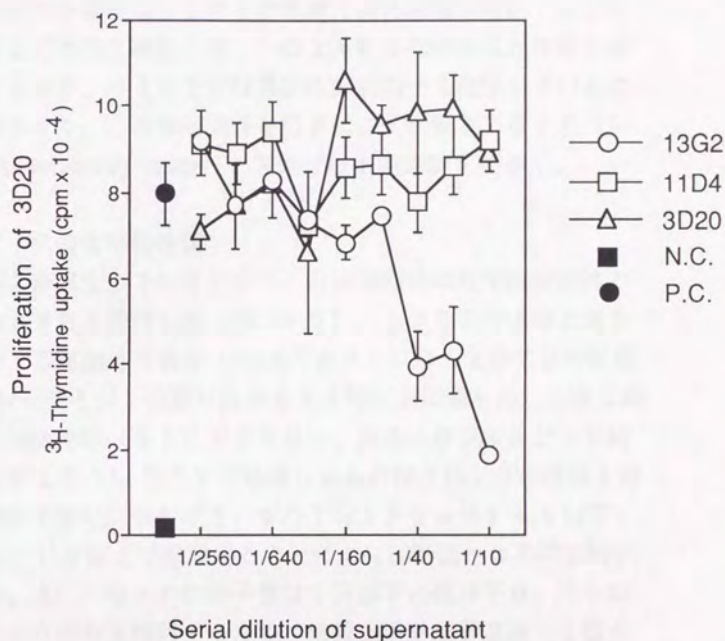


図 2-2 IL-2 吸収後の培養上清による免疫抑制作用

13G2、3D20、11D4の培養上清を抗IL-2抗体で処理した試料を希釈系列をつけて3D20の抗原刺激の系に添加した。N.C.は抗原刺激をしない場合を示し、P.C.は試料を添加せずに抗原刺激をした場合を示す。

でも3D20と11D4の培養上清中にはT細胞の抗原特異的な増殖を抑制する活性は見いだせなかった。

ヘルパーT細胞クローン3D20の $\alpha_s 1$ -カゼイン特異的な増殖を抑制する活性は13G2の培養上清の濃度依存的であったこと、そして他のT細胞クローンの上清には抑制活性が存在しなかったことから、13G2が特異的に抑制因子を産生していることが示唆された。この抑制活性を引き起こす物質をTGIF (T cell growth inhibitory factor) と名付け以下の実験を進めた。

2. TGIFの化学的性質

13G2が産生しているTGIFの抑制活性の化学的安定性と分子量の大きさを検討した(図2-3)。13G2の培養上清を無処理で10%加えた場合(noneのカラム)は、3D20の抗原による³H-チミジンの取り込みを80%以上抑制した。しかし培養上清の加熱処理(56℃で30分)、あるいはジスルフィド結合を還元する0.1M DTTで処理したものは3D20の増殖を抑制する活性を完全に失わせた。またTGIFをpHを4.5以下、あるいは11.5以上で処理することにより抑制活性は不可逆的に失活した。次にTGIFの分子量は1万以下の低分子か、それ以上の高分子なのかを検討するため、培養上清を限界濾過で2画分に分離してその抑制活性を測定した。図に示したように抑制活性は分子量1万以上の画分に存在することが明かとなった。以上の結果よりTGIFは加熱や還元により失活し、安定なpH領域は4.5以上11.5未満であり、その分子量は1万以上であることが示されたが、これらのことから総合的に推測するとTGIFはタンパク質である可能性が考えられた。

3. 培養上清中のサイトカインの活性

T細胞が産生しているタンパク質で免疫系の細胞増殖を制御する活性を持つ物質はサイトカインと呼ばれている。T細胞から産生されるサイトカインは各種あるが、その種類はT細胞のサブセットによってほぼ決定している(29)。CD8⁺のT細胞から産生

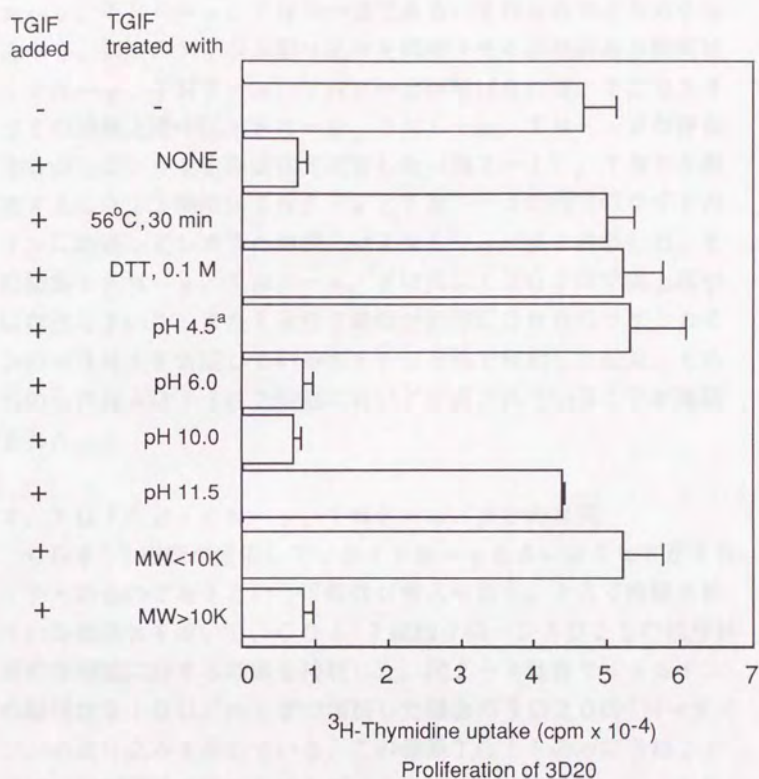


図 2-3 TGIF の化学的性質

なお、TGIF は以下の緩衝液で透析された。

pH 4.5, 0.1 M sodium citrate
 pH 6.0, 0.1 M sodium phosphate
 pH 10.0, 0.1 M glycine-HCl
 pH 11.5, 0.1 M Na₂HPO₄-NaOH

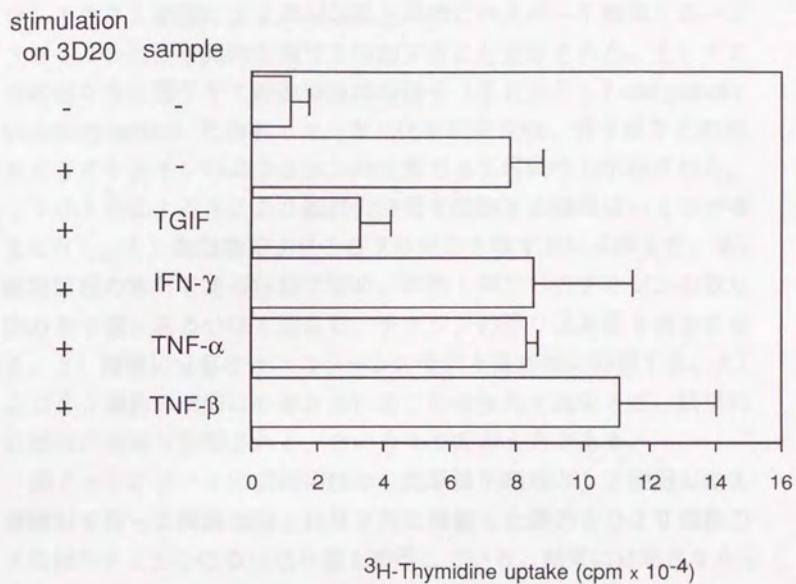
されるサイトカインはIL-2、IL-3、GM-CSF、IFN- γ 、TNF- α 、TNF- β である。それらのサイトカインの中で、細胞のチミジン取り込みを抑制させる活性のある物質はIFN- γ 、TNF- α 、TNF- β が挙げられる。そこで13G2の培養上清中にIFN- γ 、TNF- α 、TNF- β が存在するかないかを生物活性で測定した(表2-1)。TNFを測定するL929細胞はTNF- α とTNF- β の両方のサイトカインに応答してしまうため表にはTNF- α/β と表示した。その結果IFN- γ 、TNF- α/β は共に13G2の培養上清中に存在していた。また13G2細胞が実際にこれらのサイトカインのmRNAを合成しているかをPCR法で解析した結果、それらのmRNAは13G2細胞において合成されていることが確認された。

4. TGIFとIFN- γ 、TNF- α/β との異同

CD8⁺T細胞が産生しているIFN- γ あるいはTNFがTGIFそのものであるという可能性が考えられた。そこで市販されている組換え体を用いて、CD4⁺T細胞クローン3D20の抗原特異的な増殖に対する効果を検討した。図2-4は各サイトカインの組換え体を10U/mlずつ添加した場合の3D20の³H-チミジンの取り込みを示している。この結果TGIFのみに3D20の増殖抑制活性が認められたが、IFN- γ 、TNF- α 、TNF- β には抑制活性を検出することはできなかった。この3種類のサイトカインについては1000U/mlにまで濃度を上げて実験を行ったが、有意な抑制活性は観察されなかった。以上のことからTGIFはIFN- γ 、TNF- α 、TNF- β とは異なることが明かとなった。すなわちTGIFは、この時点でCD8⁺T細胞から産生されると報告があったサイトカインとは異なる物質であることが示唆された。

表 2-1 13G2 細胞からの抑制性サイトカインの発現

	IFN- γ	TNF- α/β
PCR	+	+/+
activity (U/ml)	316 \pm 64	40 \pm 16



Proliferation of 3D20

図 2-4 3D20細胞の抗原特異的な増殖に対する各サイトカインの抑制活性

考察

本章において、 $CD8^+$ 抑制T細胞クローン13G2の培養上清は、13G2細胞による抑制効果と同様にヘルパーT細胞クローン3D20の抗原特異的な増殖を抑制することが示された。そしてこの抑制を担う因子をT細胞増殖抑制因子(TCGF: T cell growth inhibitory factor)と命名した。また化学的安定性、分子量などの点からサイトカインのようなタンパク質である可能性も示唆された。

TGIFによる3D20細胞の増殖を抑制する機構はいくつか考えられた。1) 細胞毒により3D20細胞を殺すという考え方。2) 細胞周期の移行をある状態で留め、細胞1個当りのチミジンの取り込みを0回、あるいは1回にし、チミジンの取り込み量を減少させる。3) 増殖に必要なオンコジンの発現を直接的に抑制する。4) 3D20細胞の増殖に必要な液性因子の産生量を減少させ、結果的に細胞の増殖が抑制される、という4つの考え方である。

図2-1、2-2の抑制活性は、抗原提示細胞として使用したX線照射を行った脾臓細胞と抗原を共に培養した際の3D20細胞の4日後のチミジンの取り込み量を表示している。結果には示さなかったが、3D20のチミジン取り込み量は培養後2日後までは13G2培養上清の添加の有無に関わらず十分量観察されていたため、TCGFは、1)の細胞毒ではないと推察された。

2)や3)の考え方は直接的に3D20の増殖を抑えることを意味する。このような細胞増殖阻害物質で細胞周期を阻害する物質としては、ヒドロキシウレア(28)やトリコスタチン(29)等の存在が知られているが、それらは分子量が1万以下の物質である。サイトカインでは $IFN-\gamma$ が $IFN-\gamma$ 感受性細胞のG1期からS期への移行を阻止し(30)、 $TNF-\alpha/\beta$ はG2期からM期への移行を阻止し(31)、 $c-myc$ 発現を阻害する(32)という報告がある。しかしそれ以外のサイトカインについては細胞周期の移行を抑えたりする報告はない。 $IFN-\gamma$ のT細胞に対する増殖抑制効果は $Th2$ に対してのみであるので(33)、今回の実験で $IFN-\gamma$ が3D20細胞に対して抑制活性を持たなかったのは3D20

がTh1クローンであることが原因の一つであったと考えられる。またTNF- α / β 産生細胞はTNF- α / β 耐性であることが知られている(34)。本実験で使用した3D20細胞はTh1なのでTNF- α / β を産生していると予想され、そのために3D20はTNF- α / β 耐性細胞であったと推測される。

3D20細胞はTh1に属しており、T細胞増殖因子であるIL-2を産生している。4)の考え方をを用いると、13G2の培養上清が3D20のIL-2産生を抑制していると考えられることができる。IL-2の産生を抑えるような物質としては、免疫抑制剤として臨床でも使われ始めているサイクロスポリンA(35)やFk506(36)という低分子の物質が知られているが、これらの物質は細菌類分泌物として発見されたものである。サイトカインではIFN- γ がIL-4の産生を抑制するという報告があるが、その他にサイトカインの産生を抑制するようなサイトカインの存在は当時は報告がほとんどなかった。

また今までは、CD8⁺T細胞が産生するサイトカインはTh1と同じであると報告されてきた。しかし本実験ではTh1クローンである3D20や11D4の培養上清には、IL-2を吸収しても抑制活性を検出することができず、CD8⁺T細胞である13G2のみにTGF活性があったという点で大変興味深い。そのため、それまでの既説であったCD8⁺T細胞が産生するサイトカインはTh1と同じであるという説を、13G2細胞は覆するような細胞である可能性も示唆された。とにかくこのTGFを同定することが急務であると思われた。

第三章 TGFの精製と同定

序

第二章でCD8⁺T細胞の培養上清のみにタイプ1ヘルパーT細胞クローンである3D20の抗原特異的な増殖を抑制するTGFが存在し、そのTGFはサイトカイン様な物質である可能性が示唆されたことを述べた。これまでも免疫系を抑制する免疫抑制因子がいくつか発見されており、SIRS (37)、GIF (38)、TsF (39) など報告されてきたが、まだそのcDNAはクローニングされていない。また免疫抑制に関与しているとされているCD8⁺T細胞が特異的に産生している免疫抑制物質をサイトカインとして同定した報告もなかった。そのためTGFを同定することは、CD8⁺T細胞が引き起こす免疫抑制機構を研究する上で大変意味のあることと考えられた。

このような生理活性物質を同定するためには、できるだけ夾雑物を取り除きTGFの比活性を高めた後に、他のサイトカインの活性と詳細に比較する必要がある。第2章での実験で、CD8⁺T細胞が産生するという報告のあった抑制性サイトカインではTGFによる抑制活性が説明できなかったので、本章の実験では、CD8⁺T細胞以外から産生されているという報告のある免疫抑制活性をもつサイトカインを抑制活性の比較に使用することにした。

現在知られている抑制活性を持つサイトカインは第2章で紹介した他にTGF- β がある。このTGF- β には5種類のアイソフォームが存在し、どれも2本のポリペプチドがS-S結合した分子量25,000のサイトカインである(40)。正常な組織では血小板などから産生されるが、多くの癌細胞からも産生されていることが知られている。そしてほとんどの細胞がTGF- β レセプターを持ち、TGF- β はそれらの細胞に対して増殖抑制作用を起こす。また、TGF- β は細胞から産生されるときには非活性型で分泌されるという特徴を持っている。つまり非活性型のTGF- β はその活性を抑制する分子LAP (latency associated peptide)とLTBP (latent

TGF- β binding protein)が結合した分子量約30万の複合体として分泌され、その後活性型に変化することが知られている(41)。

TGIFの精製中にTh1からのIFN- γ 産生を抑制するCSIF (cytokine synthesis inhibitory factor) という物質がTh2から産生されていることが報告された(42)。CSIFの増殖抑制に関する知見はなかったが、T細胞に対する抑制活性をもつという意味でTGIFとの異同の検討に使用することにした。その後の研究でCSIFは多彩な生理活性を有することが明らかとなり、IL-10と改名された。

本章ではTGIFを同定することを目的として精製したTGIFと、TGF- β 、IL-10との異同について述べる。

材料と方法

1. 動物

マウスの脾臓細胞を得るために6週令から8週令のメスC57BL/6NCrjを用いた(日本チャールズリバー)。またモノクローナル抗体を大量に得るために、ヌードマウス(BALB/c nu/nu)を日本チャールズリバーより購入した。ヌードマウスにはT細胞が存在しないため、種および系統の異なるハイブリドーマ細胞を移入してもそれに対する拒絶反応が起こらないために効率良くモノクローナル抗体が得られることが知られている。

2. サイトカイン

組換え体-ヒトインターロイキン2 (rhIL-2)は武田薬品工業より供与された。組換え体-ヒトトランスフォーミンググロースファクター β 1 (rhTGF- β 1)は宝酒造より、組換え体-マウスインターフェロン γ (rmIFN- γ)は東レ研究所から購入した。マウスインターロイキン10を組み込んだpcDSR α IL-10発現ベクターはK. W. Moore博士(DNAX研究所)より供与された。以下にrmIL-10の発現方法を述べる。

まずCOS7細胞を $1 \times 10^5 / 2 \text{ ml}$ (6 cm径ディッシュを使用)で24時間前培養した。使用した培地は10%のNu-SerumTMV (コスモバイオ)を添加したイスコフMDM培地(コスモバイオ)を用いた。そこに100 ngのIL-10ベクター、クロロキン200 μM 、DEAEデキストランを1 mg添加して4時間培養を行った。次に培養上清を取り除き、10% DMSOを含むRPMI 1640培地で2分間インキュベート後、RPMI 1640 (FCS 10%)培地で培養し3日後に培養上清を採取してrIL-10として用いた。

3. 抗体の調整

抗マウスIL-10抗体SXC-1 (Rat, IgM)を産生するハイブリドーマはJ. Abrams博士(DNAX研究所)から

頂いた。マウスT細胞レセプターからのシグナルを細胞内に伝達するのに重要であると考えられている表面抗原CD3 (43) に対する抗体145-2C11 (ハムスター) (44) を産生するハイブリドーマは多田富雄教授 (東京大学医学部免疫学教室) より供与された。それらのハイブリドーマ 5×10^6 個をヌードマウスに腹腔注射し、マウスが死ぬ間際に (約1カ月後) 腹水を採取した。その腹水に飽和硫酸アンモニウム溶液 (アンモニア溶液を添加してpH7に調整) を終濃度50%になるように添加し、得られた沈澱物をPBSを用いて透析したものを抗体溶液とした。

4. 細胞

抑制T細胞クローン13G2、ヘルパーT細胞クローン3D20の維持は第二章第4項に準じた。ただし培養上清を精製する際に、より不純物を少なくするために、13G2細胞についてはTCGF 10%を添加する代わりに、50U/mlのrhlL-2を使用した。IL-2依存性CD8⁺細胞クローンCTL-2、IL-2依存性CD4⁺T細胞クローンHT-2は10U/ml IL-2存在下の完全培地で維持した。肥満細胞クローンMC/9 (American Type Culture Collection: (ATCC) より購入) は5%TCGFを添加することで維持した。

5. TGIFの抑制強度の定義

試料の抑制活性測定法は第二章第5項に準じた。但し、3D20細胞を増殖させる方法として、APC+抗原刺激の他にIL-2刺激、抗CD3抗体刺激も使用した。IL-2はT細胞増殖因子としてT細胞を増殖させることが知られていた。また10 μ g/mlの抗CD3抗体を50 μ lプレートに添加し、2時間後に抗体溶液を洗い流すことにより、抗CD3抗体が結合したプレートができる。このプレートでT細胞を培養するとAPC非存在下で抗原で刺激したのと変わらない刺激がT細胞に入ることが知られていた (45)。この刺激方法は固相化抗CD3抗体刺激と呼ばれている。

TGIFを精製するためにはその抑制活性を数量的に表示するこ

とが要求される。そこでTh1クローン3D20の抗原特異的な増殖に対する抑制の強さを指標としてTGIF活性を2通りの方法で定義した。一つは%抑制表示を用いた。これは他のサイトカインと抑制活性を比較する場合に使用した。表示値は以下の式で計算した値を表した。

$$\text{抑制活性 (\%)} = 100 \times (a - c) / (b - c)$$

a = 試料共存下で3D20が抗原刺激によって取り込んだ³HーチミジンのCPM

b = 試料非共存下で3D20が抗原刺激によって取り込んだ³HーチミジンのCPM

c = 3D20が抗原刺激を得ずに取り込んだ³HーチミジンのCPM

もう一つの抑制強度としてTGIFをユニット表示する方法を用いた。3D20細胞をAPC+抗原で刺激したときに50%の抑制活性を示すとき、アッセイボリュームである200 μlの培養懸濁液内に1 unit/mlのTGIFが含まれていると定義した。

6. TGIFの調整

a) 13G2の大量培養

13G2細胞を10 cm径ポリスチレンディッシュで増やし、武田薬品工業の協力で50 U/mlを含む8 Lの完全培地を入れた細胞培養機器 (Cell Factory 40: Nunc) を用い大量培養を行った。

b) 培養上清の濃縮

第二章の結果からTGIFは分子量1万以上であることが明らかになっている。そこで1万以上の分子量画分を濃縮するために10 kDaをカットオフするカートリッジ (HIP10-20: Amicon) を用いて限外濾過を行い、TGIFを含む培養上清を濃縮した。

c) 陰イオン交換樹脂カラムによるTGIFの精製

限外濾過によって濃縮された13G2の培養上清を20 mMトリ

スー塩酸緩衝液（pH 8.0に調整）で2日間透析した。次に内径1.6 cmのカラムに高さ30 cmになるまでQAE-Toyopearl 550c（東ソー）に充填することによって完成した陰イオン交換樹脂カラムで以下の方法でTGIFを分画した。まず透析緩衝液で平衡化したカラムに、濃縮された13G2の培養上清を添加し、NaCl 0-0.5 Mの濃度勾配で30 ml/時間の流速で溶出した。溶出液は7.5 mlずつ採取しPBSで透析し、各画分毎にTGIF活性を測定した。またステップ（c）から（g）におけるタンパク質量の値は、280 nmの吸光値1.0が1.0 mg/mlのタンパク質を示すと仮定して表示した。

d) 陰イオン交換樹脂カラム高速液体クロマトグラフィーによるTGIFの精製

ステップ（c）でTGIFの活性が高い画分を限外濾過（分子量1万カット）で濃縮し、20 mMトリスー塩酸緩衝液（pH 8.0）で透析した後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）用陰イオン交換樹脂カラム（TSKgel DEAE-5PW、0.75×7.5cm：東ソー）に添加した。NaClの濃度勾配は0-0.2 Mとし、溶出流速は3 ml/分、採取するフラクションボリュームは6 mlとした。PBS透析後TGIF活性を測定した。

e) ヒドロキシアパタイトカラムHPLCによるTGIFの精製

ステップ（d）でTGIFの活性が高い画分を限外濾過（分子量1万カット）で濃縮し、10 mMリン酸緩衝液（pH 6.8）で透析した後、HPLC用ヒドロキシアパタイトカラム（TSKgel HA-1000、0.75×7.5cm：東ソー）に添加した。リン酸緩衝液の濃度は10-500 mMの勾配とし、0.8 ml/分で溶出し、0.8 ml毎に分取した。PBS透析後TGIF活性を測定した。

f) 陽イオン交換樹脂カラムHPLCによるTGIFの精製

ステップ（e）でTGIFの活性が高かった画分をpH 6.0の10 mMリン酸緩衝液で透析後HPLC用陽イオン交換樹脂カラム

(Synchropak S300、 0.21×25 cm、Synchrom) に添加した。NaCl の濃度勾配は $0 - 0.2$ M とし、 0.4 ml / 分の流速で溶出させ、 0.8 ml 毎に分画した。PBS 透析後 TGI F 活性を測定した。

g) ゲル濾過 HPLC による TGI F の精製

ステップ (f) で TGI F 活性が高かった画分を HPLC 用ゲル濾過カラム (TSKgel G20000SWXL、 0.78×30 cm : 東ソー) に添加した。溶出緩衝液は 0.05% の 3-[(3- α -cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane-sulfonate (Pierce Chemical Co.) を含んだ PBS を使用し、 0.5 ml ずつを 1 画分として集め、TGI F 活性の測定を行った。分子量マーカーとして Standard Proteins (Bio-Rad) を使用した。

7. イムノブロッティング

TGI F を精製する上で行ったゲル濾過後の試料を、Laemmli の方法 (46) に従い 15% ポリアクリルアミドゲルに添加し、電気泳動を行った。分子量マーカーとしてはビオチン化 SDS-PAGE スタンダード (Bio-Rad) を用いた。次に 150 V で 2 時間電気泳動した物質をゲルからニトロセルロース膜に転写させた。転写されたニトロセルロース膜は一晩 4°C の条件で抗 IL-10 抗体 SXC-1 溶液でインキュベートした後、結合しなかった抗体を洗い流した。そしてアルカリホスファターゼ結合抗ラット IgM (Organon Corporation-Cappel Products) 溶液とニトロセルロース膜を 1 時間室温で反応させ、分子量マーカーのためにアビジン化アルカリホスファターゼ溶液内で反応させた。最後にアルカリホスファターゼ染色キット (Bio-Rad) で染色した。

8. PCR 法

培地のみ、 50 U / ml の IL-2、または $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ の ConA + $2 \times 10^6 / \text{ml}$ の X 線照射を行った脾臓細胞を添加してから 24 時間経過した 13G2 細胞から RNA を抽出した。また HT-2 細胞、CTL L-2 細胞はそれぞれ IL-10 産生の陽性

対照、陰性対照として使用した (42)。I L-10、 β アクチンのプライマーは以下の通りである。なおPCRの手順は第二章第7項に準じた。

I L-10

sense: 5'-TCAAACAAAGGACCAGCTGGACAACATACTG-3' (240-270)

antisense: 5'-CTGTCTAGGTCCTGGAGTCCAGCAGACTCAA-3' (660'-630')

β アクチン

sense: 5'-GAGAAGAGCTATGAGCTGCCT-3' (631-651)

antisense: 5'-TTCTGCATCCTGTCAGCAATG-3' (866-846)

結果

第二章でCD8⁺抑制T細胞クローン13G2の培養上清にTh1クローン3D20の抗原特異的な増殖を抑制するTGIFが存在し、その物質はCD8⁺T細胞が一般的に産生している物質とは異なるものである可能性が示唆された。そこでTGIFを同定することにしたが、TGIFを同定するためにはできるだけTGIF以外の物質を排除しなければならない。そのためにTGIFの精製を試みることにした。

1. 13G2の培養条件の検討

TGIFを精製する上で重要なのは多くの培養上清を得る方法である。そこでまず13G2細胞をより効率良く増殖させる植え継ぎ法を求めた。

13G2細胞を第二章の方法で植え継ぎ、細胞数の推移を調べた。但し、TCGFの代わりに50U/mlのrhlL-2を使用し、最初の細胞数は 1×10^5 /mlに調整して合計5mlを6ウェルプレート(Falcon)で培養した。その結果、表3-1に示すような細胞数の変化を見せた。2日後に約4倍の細胞数となり、3日後には最初の細胞数の7倍となった。これは13G2が分裂するには約1日間強の時間が必要であることを意味している。3日から5日後にかけて13G2細胞が増えない理由は2つ考えられた。まず13G2細胞は接着性の細胞であり、顕微鏡観察から推測すると3日-5日後の状態はコンフルエントであると考えられた。コンフルエントになると2'-5'オリゴA合成酵素が細胞内に誘導され、DNA合成が抑制される場合があることが報告されている(47,48)。そのために細胞数が増えなかった可能性があった。もう一つは添加したrhlL-2を消費し尽くしてしまったために増殖能を失った可能性が考えられた。そこで13G2の培養上清中にIL-2が残存している期間を求めた。IL-2の有無の測定にはCTL L-2細胞の増殖を指標とした(図3-1)。0日後の値は50U/mlのIL-2によるCTL L-2の増殖を示している。3日後の13

表 3-1 13G2 の細胞数の変化

Day	Cell Number
1	7×10^5
2	2.0×10^6
3	3.6×10^6
4	3.5×10^6
5	3.5×10^6
6	2.0×10^6
7	5×10^5

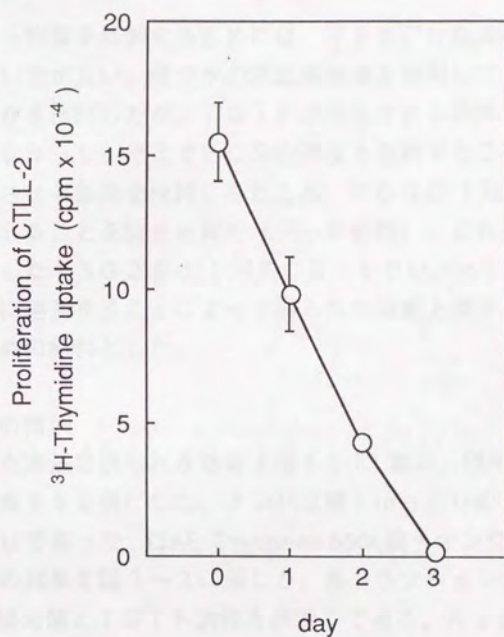


図 3-1 13G2の培養上清中に残存するIL-2

G2培養上清はCTL-2を増殖させなかった。このことは3日後にはIL-2が完全に消失したことを示している。以上の結果は、13G2細胞が7倍に増えるのにはIL-2が50U/ml必要であることを示していると考えた。その条件を踏まえて13G2の大量培養を行った。

培養上清から物質を精製するためには、できるだけ血清のような不純物は少ない方がよい。幾つかの無血清培地を使用してTGIFが産生されるかを検討したが、TGIFが産生される培地を見出すことはできなかった。そこでFCSの濃度を希釈することにより不純物を減少させる条件を検討したところ、FCS0.1%でもTGIFが産生されることを突き止めた(データ省略)。これらのことから大量培養した13G2を0.1%FCS、50U/ml IL-2の存在下で更に培養することによって得られた培養上清をTGIFを精製するための材料とした。

2. TGIFの精製

先項で述べた方法で得られる培養上清を56L集め、限外濾過でタンパク質濃度を50倍にした。タンパク質1mg当りのTGIFの活性は56Uであった。QAE-Toyopearl 550c陰イオン交換クロマトグラフィーの結果を図3-2に示した。各フラクションの280nmにおける吸光値とTGIF活性を表示してある。NaCl濃度が0.2M以上でタンパク質の主ピーク(280nmの吸光値)が現れたが、TGIF活性の主ピーク(フラクションナンバー70~78)はその前に現れたためタンパク質当りの比活性は4.5倍に上昇した。次にDEAE-5WP陰イオン交換HPLCを行った(図3-3)。タンパク質の主ピークは素通り画分とNaCl溶出画分に1個ずつ見られたが、TGIFの活性ピークはNaCl溶出画分におけるタンパク質ピークとほぼ重なった。そのため精製度は良くなく、QAEクロマトグラフィーの試料の比活性を2倍弱濃縮しただけに留まった。ヒドロキシアパタイトHPLCの分画と各フラクションのTGIF活性の結果は図3-4に示した。緩衝液内のリン酸ナトリウム濃度が0.1M以上になると弱いTGIF活性が観察されるが

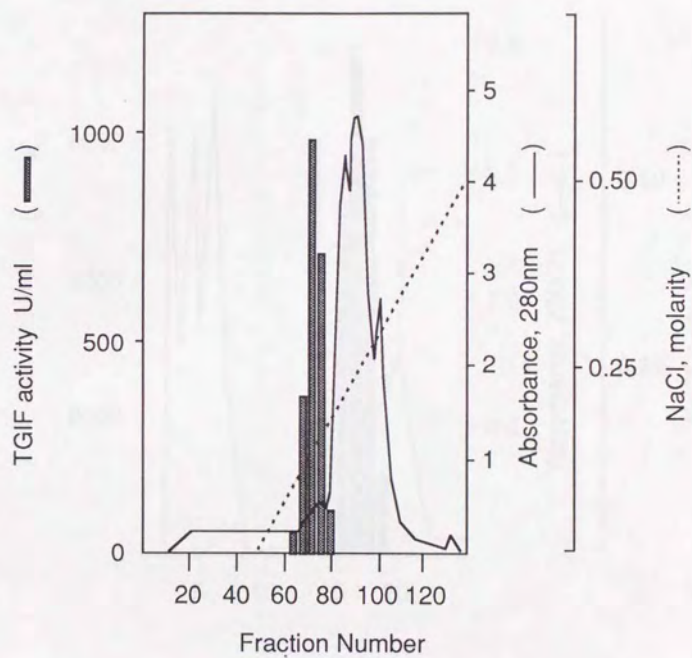


図3-2 QAE陰イオン交換クロマトグラフィー

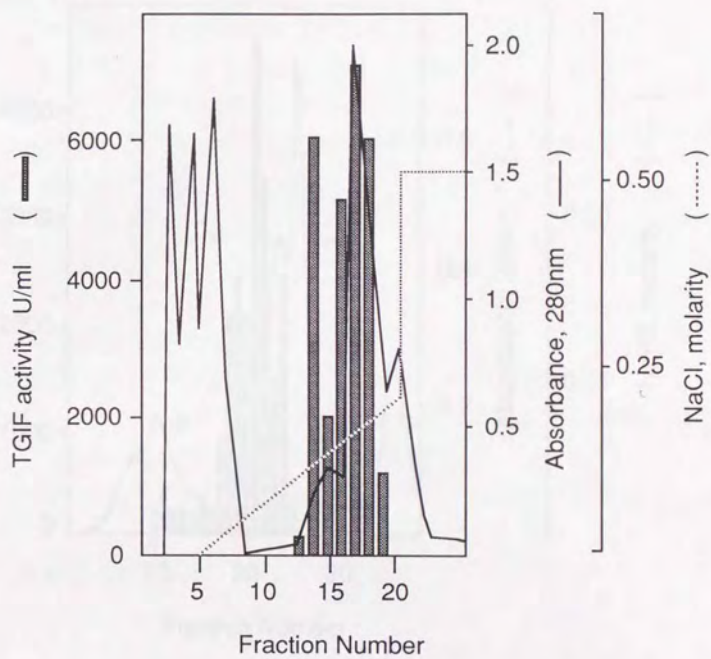


図 3-3 陰イオン交換HPLC

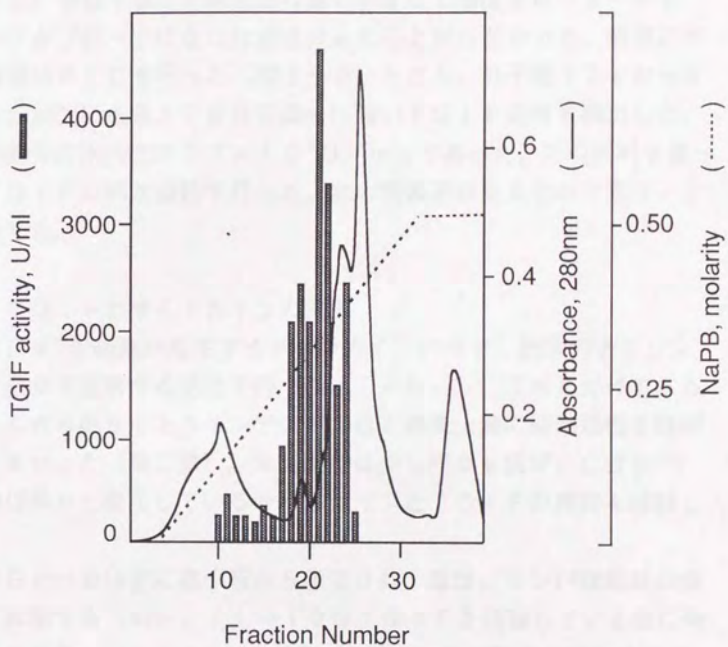


図3-4 ヒドロキシアパタイトHPLC

0.2 M以上になるまで大量のTGIFは溶出しなかった。次のクロマトグラフィーに添加する試料はリン酸ナトリウム0.2 M以上の画分とした（フラクションナンバー21～22）。比活性はその前のDEAE処理に比べ30倍に上昇した。陽イオン交換HPLC（図3-5）ではTGIFが溶出し易いNaCl濃度がはっきりせず、ピークがブロードになり比活性はあまり上がらなかった。最後にゲル濾過HPLCを行った（図3-6）ところ、分子量17 kから44 kの範囲にある17番目の画分に強いTGIF活性を検出した。この画分の比活性は $3.7 \times 10^6 \text{ U/mg}$ であった。この試料を使ってTGIFの同定実験を行った。なお精製過程をまとめて表3-2に示した。

3. TGIFとサイトカインの異同

CD8⁺T細胞が産生するサイトカインの中で、細胞のチミジン取り込みを阻害する活性を持つのはIFN- γ 、TNFだけであるが、これらのサイトカインでは13G2培養上清の抑制活性を説明できなかった（第二章）。本実験では少し視点を広げ、CD8⁺T細胞以外から産生しているサイトカインとTGIFの異同を検討した。

TGF- β は主に血小板から産生され、血球、リンパ球細胞の増殖を抑制する（49）。IL-10はTGIFを精製している頃に発見された新しいサイトカインでCD4⁺Th2細胞から産生されている。抑制作用として報告されたのはTh1からのIFN- γ 産生の抑制であり、増殖を抑制する報告は皆無であったが念のため実験の対象とした。

3D20細胞を抗原（Ag）＋抗原提示細胞（APC）、IL-2、固相化抗CD3抗体の3種類の方法で増殖させた。それぞれの増殖法に対して、精製したTGIF、IL-10、TGF- β の抑制効果を検討した（表3-3）。TGIFとは異なる物質の代表としてIFN- γ の結果も表に掲載した。TGF- β （市販表示で最終濃度が10 U/mlとなるように添加）は3D20の3種類の刺激方法に対する増殖応答を全て有意に抑えた。IL-10は3

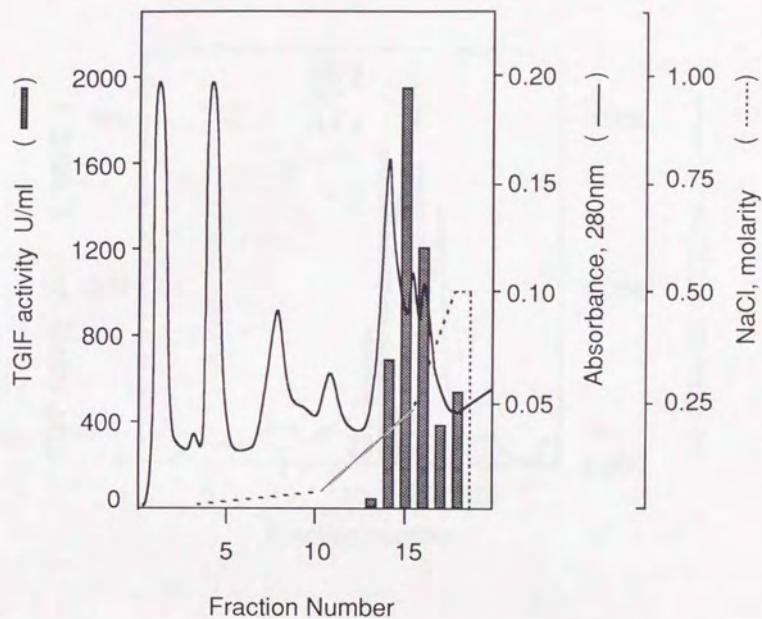


図 3-5 陽イオン交換HPLC

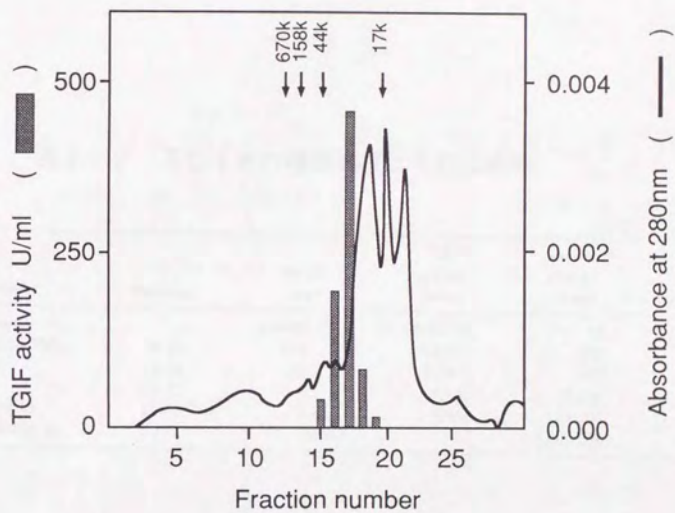


図3-6 ゲル濾過HPLC

表 3-2 TGIF の精製過程とその比活性

<i>Purification step</i>	<i>Fractions</i>	<i>Protein (mg)</i>	<i>TGIF activity (units)</i>	<i>Specific activity (U/mg)</i>	<i>Degree of purification</i>
Starting material		10,000	560,000	56	1
QAE-Toyopearl 550c	70-78	240	60,000	250	4.5
DEAE-5WP	15-18	55	27,000	490	8.8
HA-1000	21-22	0.5	7,500	15,000	270
Synchrompak S300	15-16	0.14	3,000	21,000	380
TSKgel G2000SW _{XL}	17	0.0002	740	3,700,000	66,000

表 3-3 サイトカインの 3D20 細胞に対する抑制効果

Cytokine added	^3H -Thymidine uptake by 3D20 cells (cpm $\times 10^{-3}$)		
	APC + Ag	IL-2	Anti-CD3
-	22 \pm 4 (0) ^{c)}	103 \pm 4 (0)	14 \pm 3 (0)
IFN- γ	23 \pm 4 (-4)	N. D.	N. D.
TGF- β a)	8 \pm 2 (64)	73 \pm 4 (28)	6 \pm 0 (64)
IL-10 b)	6 \pm 1 (73)	113 \pm 2 (-3)	16 \pm 2 (-12)
TGIF	8 \pm 0 (64)	109 \pm 2 (-6)	15 \pm 1 (-5)

a) TGF- β is produced platelets mainly.

b) IL-10 was cloned during the purification of TGIF, and Th2 cells mainly produce this cytokine.

c) Mean \pm SD (percentage suppression).

D20をAg+APCで刺激したときの増殖を抑制したが、IL-2、固相化抗CD3抗体で刺激された場合の増殖は抑制しなかった。なおIL-10はCOS7で発現したのでユニット数が定まっていない。そこで便宜上TGIFと同様に3D20の抗原特異的な増殖を50%抑制する量を1U/mlと定義した。この定義で計算し最終濃度が10U/mlとなるように添加したときのIL-10の結果を表3-4に示している。最後にTGIFであるが、増殖を阻害するのはAPC+Ag刺激の場合だけで、IL-2、固相化抗CD3抗体で刺激された場合の3D20の増殖は抑制しなかった。これはIL-10と同じ抑制作用である。以上の結果から3D20細胞に対する抑制効果をまとめると、TGIFとTGF- β は異なる抑制作用を起こすことが明かとなったが、TGIFとIL-10は同じ抑制作用を行うことが示された。このことからTGIFはIL-10様の活性を持つことが示唆された。

3. 抗IL-10抗体を用いた中和実験

3D20に対する抑制効果がTGIFとIL-10の両因子において大変似通っていたため、TGIFとIL-10の関連性を更に検討することにした。そこで抗IL-10抗体(SXC-1)によってTGIFの抑制活性が阻害されるかどうかの実験を行った。3D20細胞をAPC+Agで刺激し、そこに精製したTGIFとIL-10をそれぞれ最終濃度が8U/mlとなるように添加し、更に10 μ g/mlの抗IL-10抗体を加え、その結果を表3-4に示した。IL-10の抑制活性は抗体の存在により失われ、3D20の増殖はIL-10が無い状態にまで復活した。またTGIFによる抑制効果も抗IL-10抗体によって完全に中和されることが明かとなった。つまりTGIFによって引き起こされた抑制活性はIL-10で説明できることが示唆された。

IL-10の活性にTh1の抗原特異的な増殖を抑制する活性があることはこの実験で初めて示されたのであるが、IL-10の活性は抑制活性の他に、免疫系細胞を活性化する作用が報告されている。そこでIL-10がIL-4の存在化で肥満細胞の増殖を促進

表 3-4 T G I F 活性に対する抗 I L - 1 0 抗体の影響

Cytokine added	Anti-IL-10	^3H -Thymidine uptake by 3D20 cells (cpm)
-	-	27145 \pm 589 (0) ^{a)}
IL-10	-	6339 \pm 409 (85)
IL-10	+	27661 \pm 3611 (-2)
TGIF	-	5622 \pm 45 (88)
TGIF	+	27485 \pm 1561 (-1)

a) Mean \pm SD (percentage suppression).

することに注目し、TGIFにそのような促進活性があるかを検討した。図3-7に示すとおり精製したTGIFは250U/mlのIL-4存在下において肥満細胞クローンMC/9の増殖を有意に促進させた。そしてその効果は抗IL-10抗体の添加により阻害された。

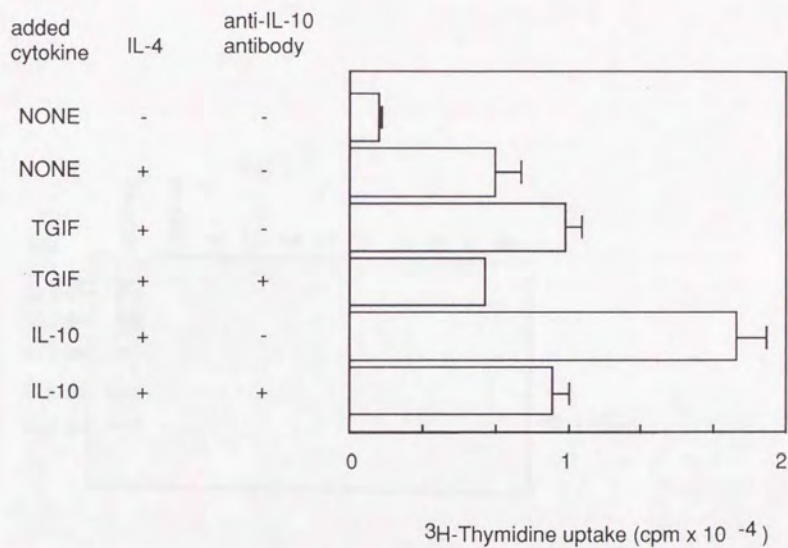
以上の結果からIL-10が備えている抑制的作用あるいは促進的作用と同じ効果を、TGIFは誘起させる能力を持つ物質であることが示唆された。

4. IL-10の検出

TGIFの生物活性が抗IL-10抗体で中和されたことは次のように考えることができる。1) TGIFがIL-10と同一物質である。2) TGIFによってアッセイ系に存在する細胞から2次的にIL-10が産生され、その結果見かけ上IL-10と同様な生物活性を示す。もし1)であったならば抗IL-10抗体でTGIFを物質的に検出することができるが、2)が正しければ抗IL-10抗体でTGIFを物質的に検出させることはできない。この2つの可能性をはっきりさせるために、抗IL-10抗体でイムノブロットングを行うことにした。

TGIFを精製する上での最終ステップであるゲル濾過HPLCで得られた各画分をSDS-PAGEし、抗IL-10抗体でイムノブロットングを行った(図3-8)。その結果一番TGIF活性の高かった17番目の画分に1本のバンドが検出された。そして分子量マーカと比較して、このバンドは約17kDaの位置にあると推測できた。IL-10の分子量は糖鎖部分を除いたタンパク質のみで17kDaである(42)。抗IL-10抗体によって染色された画分と最もTGIF活性が高かった画分が一致したこと、そして抗IL-10抗体で検出された物質の分子量がIL-10と同じ17kDaであったことは最初の1)の推論が正しいことを意味している。よってTGIFはIL-10であると考えられた。

IL-10を生物活性レベル、タンパク質レベルで検出したので、次にmRNAレベルで検出することを試みた。方法はノーザンブロッ



Proliferation of mast cell

図 3-7 各サイトカインの肥満細胞に対する増殖促進作用

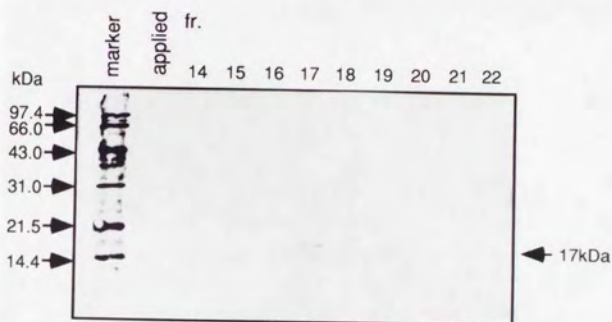


図 3-8 イムノブロッティングによる IL-10 の検出

ティングよりはるかに感度の良いPCR法で行った(図3-9)。その結果、IL-10を産生するHT-2細胞は421bpの部分にIL-10のプライマーにより増幅されたフラグメントが検出された。一方IL-10を産生しないCTL-2細胞(CD8⁺T細胞)には421bpの部分にはバンドが検出されなかった。すなわちIL-10のプライマーを使用して行ったPCRで421bpのフラグメントが増幅されたということは、IL-10のmRNAを産生していると考えてよいことを示している。そこで13G2細胞を調べたところ、IL-2あるいはConA+APCの共存下で24時間培養した13G2細胞には421bpの部分にバンドが観察された。このことから13G2細胞はIL-10のmRNAを合成していることが示された。

5. 13G2培養上清の抑制活性とIL-10の関連

培養上清から抑制活性を指標としてT細胞増殖抑制因子(TGIF)を精製し、その結果精製TGIFを得たが、これはIL-10であることが明かとなった。それでは13G2細胞の培養上清の抑制活性はIL-10で説明できるのだろうか。それについて検討するため培養上清に対する抗IL-10抗体の中和実験を行った。3D20をAPC+Agで刺激する際に、抗IL-10抗体の共存下あるいは非共存下において、13G2の培養上清とIL-10をそれぞれ8U/mlから順次2倍希釈したものを加えて3D20のチミジン取り込みを観察した(図3-10)。その結果13G2培養上清は抗IL-10抗体を添加することにより完全にその抑制活性が中和されることが示された。

以上から13G2培養上清のT細胞抗原特異的増殖阻害活性はIL-10による作用であったことが明かとなった。

6. 13G2細胞の抑制活性とIL-10の関連

そもそも13G2の培養上清にTGIF(IL-10)が存在することを発見すきっかけとなったのは、13G2細胞がヘルパーT細胞クローンの抗原特異的な増殖を阻害するという報告である。

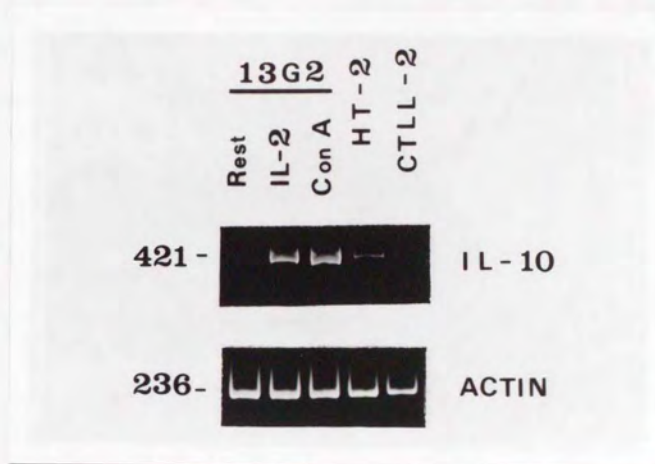


図 3-9 13G2細胞によるIL-10 mRNAの発現

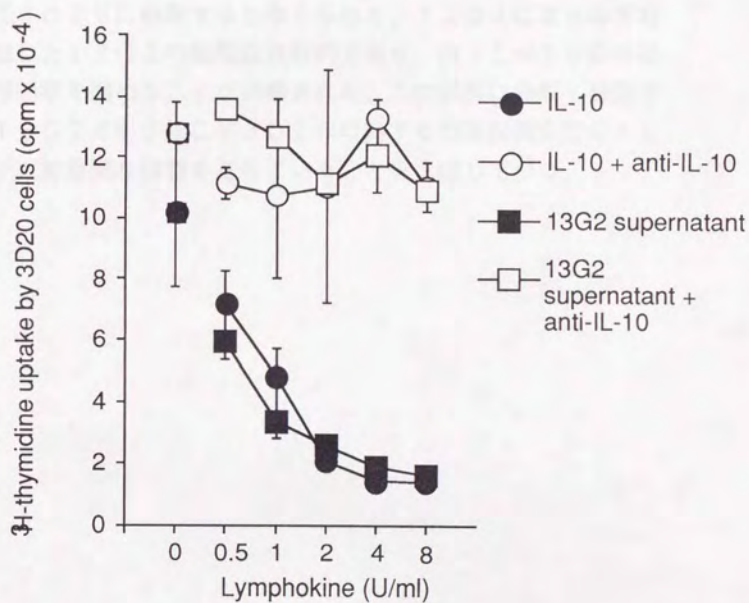


図 3-10 13G2 培養上清の抑制活性に対する抗 IL-10 抗体の影響

T細胞クローンの抗原特異的な増殖を阻害するという報告である。それでは13G2細胞による抑制活性にIL-10はどの程度関与しているのだろうか。そこで3D20をAPC+Agで刺激する培養系(TGIF活性を測定する系と同じ)に13G2細胞を添加し、4日後のチミジン取り込みを図3-11に示した。13G2細胞は3D20の抗原である α_s1 -カゼインには反応しないことが分かっているので、このときに測定される抗原特異的なチミジンの取り込みは全て3D20に由来すると考えられる。13G2による増殖抑制は添加した13G2の細胞数依存的であり、抗IL-10抗体はその抑制効果を弱めることが観察された。この結果は抑制T細胞クローン13G2が引き起こす3D20に対する増殖抑制活性にIL-10が大変重要な役割を占めていることを示唆している。

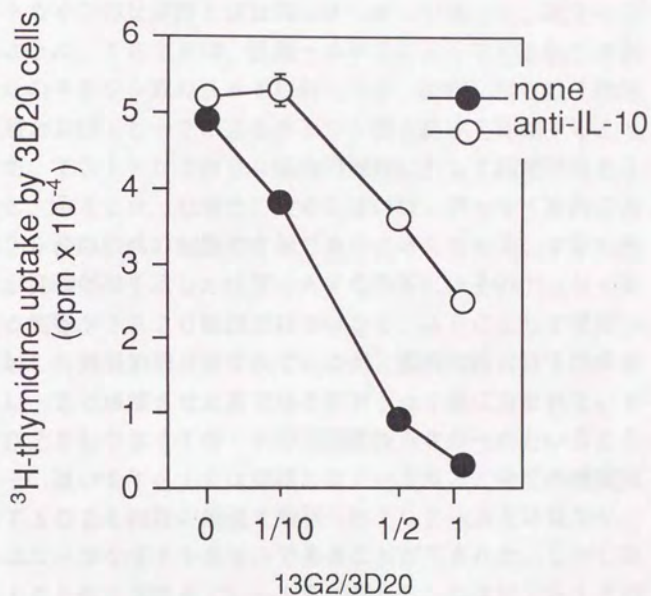


図3-11 13G2細胞の抑制効果に対する
抗IL-10抗体の作用

考察

本実験でCD8⁺抑制T細胞から産生されるTh1細胞の増殖を抑制するTGIFを66、000倍にまで比活性を濃縮することに成功した。精製したTGIFの比活性は3.7 U/ngであり、一般的なサイトカインの比活性とほぼ同じオーダーであった。表3-3で示したように、TGIFは、抗原+APCによって引き起こされる3D20のチミジン取り込みを抑制したが、固相化抗CD3抗体による増殖およびIL-2によるチミジン取り込みを抑制することはなかった。TGIFが3D20細胞の増殖に対して抑制効果を示した場合と、示さなかった場合の大きな違いは、アッセイ系内における3D20細胞以外の細胞の有無であると考えられる。すなわちTGIFが抑制効果を示した抗原+APCの系にはそのアッセイ系に存在する細胞が3D20細胞だけではなく、APCとして使用したX線照射した脾臓細胞が含まれているが、固相化抗CD3抗体あるいはIL-2で増殖させた系ではそのアッセイ系に含まれている細胞は3D20しかなくTGIFの抑制活性もなかったということである。その違いをTGIFは認識したという点で、全ての増殖方法に関して3D20細胞の増殖を抑制したTGIF- β とは異なり、たいへんユニークなサイトカインであることが示された。しかしながらTGIFと同じ活性をIL-10が示した。つまりTGIFの活性をIL-10が代用できることが判明したのである。

ここでTGIFとIL-10の異同の詳細な検討が必要になった。まずTGIFまたはIL-10によって誘導される生物活性が同じであるか否かが一つの問題となり、次に両者が物質的に同一かどうか解決すべき問題となった。

まず生物活性の異同を検討した。そこでTGIFのTh1細胞における抗原特異的な増殖を抑制する活性を抗IL-10抗体で阻害できるかを検討した。この抗IL-10抗体(SXC-1)はIFN- γ の産生抑制(50)、胸腺T細胞の増殖促進(51)、B細胞クラス2抗原発現の促進(52)等様々なIL-10による生物活性を阻害する中和活性を持っている。表3-4のように抗IL-10抗

体はTGIFの抑制活性を中和したので、IL-10とTGIFは大変似た物質を通じて抑制活性を引き起こしていることが示唆された。しかしIL-10とホモロジーの高いEBV産生タンパク質であるBCRF1はIL-10と同様にTh1のIFN- γ 産生を抑えるが、IL-10の免疫促進活性である肥満細胞の増殖促進作用などは持たないことが知られている(53)。これはIL-10の活性部位が抑制活性と促進活性で異なるからなのか、あるいはBCRF1を認識するレセプターとIL-10を認識するレセプターが異なり、抑制効果を示す細胞にはIL-10RもBCRF1Rも発現しているが、促進活性を示す細胞にはIL-10Rしか発現していないという可能性もある。どちらにしてもIL-10とTGIFが抑制活性の面で一致した生理活性を示しただけでは両者が同一な生理活性を誘導する物質であるとは断定できなかった。そこでIL-10の促進作用をTGIFが示すかを検討したところ図3-7のようにTGIFは有意に肥満細胞の増殖を増強した。このときのTGIFの促進活性はrIL-10と比較して弱かったが、これは夾雑物の影響と考えられた。この肥満細胞増殖促進作用は抗IL-10抗体で阻害された。以上2つの生物活性にたいする抗体中和実験により、TGIFはIL-10と同じ抑制活性と促進活性を誘導する物質であると考えることができた。

残る問題はTGIFとIL-10が同様な生物活性を誘導する理由が、TGIFとIL-10が同一の物質だからなのか、あるいはTGIFが細胞に働きかけ、2次的にIL-10が産生された結果見かけ上TGIFがIL-10様の生物活性を示すのか、の2通りのうちどちらによるものなのかということである。今回行った実験系では抑制活性を調べる際にはTh1細胞クローン3D20とX線照射した脾臓細胞が存在し、促進活性を検討した系では肥満細胞クローンMC/9を使っている。IL-10はTh1細胞からは産生されていないため、3D20にTGIFが作用して、IL-10を分泌させるという可能性は薄かったが、脾臓細胞にはIL-10を産生しうるTh2細胞や、マクロファージが含まれているのでTGIFによってIL-10が産生される可能性はあった。また肥満

細胞株であるMC/9はIL-10を産生するという報告があり(42)、TGIFによる二次的なIL-10産生でオートクライン増殖した可能性も否定できなかった。TGIFの活性がIL-10の二次的な産生によるという可能性を否定する一番よい方法は、精製したTGIF内にIL-10を物質的に検出することであると考えられた。その結果図3-8のようにTGIF活性の一番高かった画分に抗IL-10で認識できたバンドが存在し、なおかつその分子量がIL-10と同じ17kDaであったのでTGIFはIL-10と同一であると結論づけることができた。

IL-10は糖タンパク質で、糖成分が結合していない時の分子量は17kDa、糖が結合することにより、19kDa、21kDaとなる(42)。今回精製したTGIFには17kDaのバンドしか検出できなかったが、その他の分子量のIL-10は精製途中で除かれてしまったと考えられる。ゲル濾過でのTGIF活性が現れたピークは17kDaより大きく、約2倍の34kDa付近であると推量できた。これはIL-10が生物活性を示す場合にはIL-10がダイマーを形成している可能性を示唆していると思われた。サイトカインでダイマーを形成していることが判明しているのはIFN- γ (54)、TGFB (40)、であり、トライマー構造をしているサイトカインとしてTNF- α (55)が知られているが、今後IL-10レセプターの研究、IL-10の構造研究が進むにつれてその是非については解明されると期待される。

TGIFはIL-10であったが、13G2培養上清の抑制活性はすべてIL-10の作用で説明できるのであろうか。図3-10で示したように抗IL-10抗体で完全に抑制効果がブロックされたので13G2培養上清の抑制活性はIL-10によるものであることが明かとなった。それでは13G2細胞による増殖抑制はIL-10によるのであろうか。図3-11は添加した13G2の細胞数が3D20の10分の1の場合、その抑制効果を完全に抗IL-10抗体で阻害されることを示している。このことから13G2細胞による抑制作用にもIL-10が大きな役割を担っていることが推察される。細胞数を同数にしたときは、抗IL-10抗体で完

全に抑制効果をブロックすることはできなかったが、これは13G2の細胞数が多かったために産生されるIL-10の量も多く、抗体での完全な中和が不可能になったためと考えられる。

以上の事からCD8⁺抑制T細胞クローンである13G2を研究材料とすることで、CD8⁺T細胞の免疫抑制作用の一端をIL-10が司っているということが示された。ところで図3-9でIL-10を産生していなかったCTL-2（マウスC57BL/6由来IL-2依存性CTL）はCD8⁺T細胞であるが、このようにCD8⁺T細胞でもIL-10を作らないT細胞も存在する。その後の研究でCTLはIL-10を産生せず、抑制T細胞のみIL-10を産生するという報告も発表されている（56）。当研究室ではIL-10が抑制T細胞のみならず、自己応答性のCD8⁺T細胞、キラー活性を持つCD8⁺T細胞からも産生していることを明らかにしており、今後CD8⁺T細胞の免疫応答を研究する上でIL-10はますます重要な研究課題となると思われる。

最後にIL-10についての知見をまとめてみた（57）。

Th1が産生するサイトカインはDTHを誘起し、Th2が産生するサイトカインは抗体産生を誘導しやすいということが実験的に証明されていた（58）。またDTHと抗体産生が相互に排他的な免疫反応であることは経験的に知られていた。そこでTh1とTh2がお互いに制御し合っているのではないかと考えられ、この際特定のサイトカインが関与しているものと推察された。そしてTh1が産生するIFN- γ はTh2の増殖を抑制することが明かとなり、Th2が産生しTh1の活性を抑制するCSIF（IL-10）が、1990年にK. W. Mooreらによってクローニングされたのである。

マウスのIL-10は、分泌前は178個のアミノ酸からなるポリペプチドであるが、N末の18個の疎水性シグナル配列が切断されて160残基からなる分泌型IL-10になる。このペプチドは2つのN-結合糖鎖部位と5つのシステイン残基を含み、4つの α -ヘリックスからなる構造をしていると考えられる。そして糖鎖の結合型の違いにより、17から21kDaの分子量をとるサイトカ

インであることが判明した。その後マウスのcDNAをプローブとしてヒトIL-10がクローニングされ、アミノ酸レベルで73%、DNAレベルで81%の相同性を持つことが示された。また相同性の高い物質を検索したところEBウイルス(EBV)にコードされていたBCRF-1 (EBV-encoded BamHI fragment C rightward reading frame) がアミノ酸およびDNAレベルで70%のホモロジーを持ち、その組換え体がCSIF活性をもつことが明かとなった。なおマウスIL-10とは異なり、ヒトIL-10とBCRF-1に存在するN-結合糖鎖部位は1つで、システイン残基は4つであった。

マウスIL-10の生物活性の特徴は免疫抑制活性と促進活性の2面性を兼ね備えていることである。表3-5にその主な活性をまとめて表示した。このような活性を保持するIL-10はTh1の他に、腹腔に存在する $Ly1^+$ B細胞、マクロファージ、肥満細胞、ケラチノサイト(59)などの多種類の細胞から産生されている。

IL-10の抑制作用はマクロファージに直接的に働き、そのサイトカイン産生をはじめ一連のマクロファージの活性化を抑制し、その結果として間接的にTh1のサイトカイン産生を抑制していると考えられている。しかし、1) IL-10によって抑制されるマクロファージ産生サイトカインであるIL-1、IL-6、TNF- α を添加しても、Th1に対する抑制効果は変化ない。2) 抗原提示に関与するクラス2分子のマクロファージからの発現に対してもIL-10は抑制作用を示さない。3) 細胞内のプロセッシングを必要とせずにマクロファージに抗原提示されるStaphylococcus Enterotoxin Bのようなスーパー抗原に対するTh1の活性化は抑制する。これらの結果から未だにTh1に対する抑制メカニズムは明かではないのだが、現在はTh1の活性化に必要なCo-stimulatory分子の発現を抑制してTh1の活性化を抑制しているのではないかと考えられている。その分子としては、T細胞のCD28やCTLA-4と結合するB7分子が候補に挙がっているが詳細はまだ判明していない(60, 61)。

IL-10の生理活性の促進活性はT細胞に対する抑制活性とは

表 3-5 マウス IL-10 の生物活性

1. 抑制活性

- a) Th1 からの IFN- γ などのサイトカイン産生をタンパク質レベルおよび mRNA レベルで抑制する (50)。しかしこの抑制活性はマクロファージ抗原提示細胞として存在しているときのみ観察され、以下の条件での Th1 からのサイトカイン産生は抑制しない。

ア、マクロファージ非共存化で抗 CD3 抗体刺激、ConA 刺激したとき。

イ、抗原提示細胞として B 細胞を使用したとき (62)。

なお、IL-10 は Th2 からの IL-4、IL-5 などのサイトカイン産生に対しては抑制作用を示さない (50)。

- b) LPS 刺激によるマクロファージからの IL-1、IL-6、TNF- α の産生をタンパク質レベル、mRNA レベルで抑制する (63)。
- c) 活性化したマクロファージからの酸化窒素産生を抑制する。

2. 促進活性

- a) IL-2、IL-4 共存下で胸腺細胞の増殖を促進させる (64)。
- b) IL-2 と ConA 共存下で胸腺、脾臓細胞からの CTL 分化を促進させる (65)。
- c) B 細胞の生存率を高め、クラス 2 抗原の発現を増強させる (52)。
- d) 肥満細胞の生存率を高め、IL-3 または IL-4 の存在下で増殖を促進させる (53)。

異なり、標的細胞に直接的に働きかけていると考えられている。ただTh1細胞に対する抑制効果を有しているBCRF-1はB細胞のクラス2抗原発現促進、肥満細胞の増殖補助作用などの促進効果を保持しないことが知られている。

このようにIL-10は発見されてからまだ3年しか経っていないが、様々な報告が発表されてきている。とにかくIFN- γ やTG β のように免疫を抑制する作用を持つサイトカインであるので、生体内の免疫制御を考える上で極めて重要な物質であると思われる。

第四章 抑制T細胞の増殖とIL-10の産生

序

IL-10がCD8⁺抑制T細胞から産生され、体内での免疫反応の制御に大きく寄与している可能性があることが第4章で示された。しかしIL-10はサイトカインの一種であり、体内においては産生細胞から遠い部位でIL-10が急激に希釈されてしまうためにautocrine、あるいはparacrineメディエーター的な活躍しかできないと推測される。つまりIL-10の生物活性効果が期待できるのはIL-10産生細胞のそばにある細胞だけである。免疫の抑制を免疫抑制活性も持つIL-10の効果に期待する場合、例えば過剰なマクロファージの活性化によって激しくなった炎症反応の鎮静化をIL-10に期待するには、IL-10産生細胞の増加とIL-10産生量の増加が起こらなければならないと思われる。しかしながら逆にサイトカインが必要以上に産生されると様々な疾患を引き起こしてしまう。例えばマクロファージからも産生されているIL-6が大量に生産されるとポリクローナルなB細胞の活性化が誘導され、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス等の自己免疫疾患を引き起こすと考えられている(66)。そのため、体内での免疫抑制反応を調べる上でIL-10産生細胞の増殖とIL-10の産生量制御について研究することが必要であると考えられた。その実験モデルとしてCD8⁺抑制T細胞クローン13G2の増殖とそのIL-10産生について研究することにした。また体内で起こりそうな刺激方法であるTCRを介する刺激とIL-2受容体(IL-2R)を介する刺激法を用いて実験を行うことにした。以下に予想される細胞内シグナル伝達を記述する。

まずTCRを介した刺激についてであるが、これはTCRが多様な抗原を特異的に認識することから始まる。このTCR分子は α 鎖 β 鎖あるいは γ 鎖 δ 鎖のヘテロダイマーであり、イムノグロブリンスーパーファミリーに属す分子であるが、免疫グロブリンとは異なり細胞外へ分泌されずにT細胞の表面に存在している(67)。そし

て抗原認識方法は、免疫グロブリンのように抗原と直接結合するのではなく、マクロファージ、デントリティック細胞、B細胞などのAPCによって分解されたペプチドがAPC表面上のMHCに結合したものを認識する。そしてMHC/抗原複合体をTCRで認識することにより、T細胞は増殖、サイトカインの産生、サイトカイン受容体の発現等一連のT細胞の活性化を起こすのである(68)。TCRは5つの分子からなるCD3分子($\gamma\delta\epsilon\zeta\eta$)あるいは($\gamma\delta\epsilon\zeta\eta$)と非共有結合で会合してTCR/CD3複合体を形成している(69)。

TCR/CD3複合体を介するシグナル経路は主に2つあるとされている。一つはフォスホリパーゼC- γ (PLC- γ)を介したPI代謝の系でPKCの活性化と細胞内 Ca^{2+} 上昇を起こす経路である。このPLC- γ の活性化にはG蛋白の関与が考えられていたが現在ではチロシンキナーゼ(PTK)によってPLC- γ が活性化するという説が主流である(70)。もう一つの経路はPTKがCD3の ζ 鎖のチロシン残基をリン酸化することによって引き起こされる経路である。このPTKはCD4分子あるいはCD8分子にアソシエイトするP56lck、またTCRにアソシエイトするP59fynであることが明かとなっている。

この一連の活性化の間には以下のような変化が起こっていると考えられている。まずタンパク質のチロシン化が起こり、その後にホスファチジルイノシトール(PI)からPIキナーゼによってホスファチジルイノシトール4-リン酸(PI4-P:PIP)、更にPI4-Pキナーゼによってホスファチジルイノシトール4、5-二リン酸(PIP4、5P2:PIP2)に変化し、その次に活性化したPLC- γ によってジアシルグリセロール(DAG)とイノシトール1、4、5-三リン酸(IP3)に加水分解される。DAGはセリン/トレオニンキナーゼであるPKCを活性化する。PKCの活性化に伴い細胞質内に存在するIkBがリン酸化されNF- κ Bと解離する。そしてNF- κ Bは核内に移行してNF- κ B認識塩基配列に転写調節因子として結合するのである。IP3はIP3レセプターを介して細胞内の Ca^{2+} 貯蔵部位である小胞体から

Ca^{2+} を細胞質内に放出させる。それとは別に細胞膜の膜電位依存性 Ca^{2+} チャンネル、あるいはレセプター依存性 Ca^{2+} チャンネルを介して細胞外からの Ca^{2+} 流入が引き起こされる。このようにして引き起こされた細胞内の Ca^{2+} の上昇はカルモジュリンと協同してホスファターゼであるカルシニューリンを活性化し、細胞質内に存在しているNF- κ Bを脱リン酸化する(71)。それによってNF- κ Bは核へ移行し(72)、最終的にDNAに結合することでT細胞を活性化するのではないかと考えられている。

次にIL-2Rからの刺激についてであるが、これはIL-2とIL-2Rの会合によって始まる。このIL-2Rは α 、 β 、 γ の3つの分子の様々な組合せで形成されている。IL-2と α 鎖(Tac抗原)のみとの結合は低親和性で増殖シグナル伝達能は持たない(73)。 β 鎖のみ、あるいは β 鎖と γ 鎖の組合せでは中親和性をもつ。そして $\alpha\beta\gamma$ 鎖の会合で100倍もの高親和性の活性を持つのである。その高親和性のIL-2RにIL-2が会合することによって、IL-2のインターナリゼーションや増殖シグナルの細胞内への伝達が起きる。現在 β 鎖を中心に細胞内シグナル伝達の研究が進められている。 β 鎖は細胞内ドメインにチロシンキナーゼ活性を持たず、特定のアミノ酸配列を持つサイトカインレセプターに属す構造をしている。C末側に存在する酸性アミノ酸に富む領域(A領域)を介しsrc型チロシンキナーゼが活性化される。そしてMAPキナーゼカスケードが活性化し核内プロトオンコジーンであるc-fos、c-jun遺伝子の発現を誘導することによりT細胞をG1期からS期に移行させると考えられている(74)。またセリン残基に富む領域(S領域：サイトカインレセプターファミリー間で保存されている)がMAPキナーゼ経路とは別経路で最終的に増殖に必須であるc-mycの発現を誘導し、S期からG2/M期への移行を司っているのではないかと考えられている。

ところでサイトカインの産生はmRNAの転写効率、安定性、翻訳効率、合成されたタンパク質の分泌等多くの段階で制御されている。そしてIL-10がその作用を示すためには最終的に細胞外へ分泌されなければならないのだが、一般に分泌タンパク質は調節性

分泌経路か非調節性分泌経路の片方を經由して分泌される。分泌タンパク質は全て膜結合リボゾームで合成され、合成と同時に粗面小胞体の内腔に取り込まれ、移行型小胞体に輸送される。そしてトランスゴルジ網様体 (TGN) に到達する (75)。ここで二つの経路に分かれる。調節性分泌経路はこのTGNで約10倍から200倍にまで濃縮されて分泌顆粒となり貯蔵される。そして分泌刺激を受けることによってエキソサイトーシスで細胞外へ分泌される。この経路による分泌性タンパク質としてインシュリンが挙げられる (76)。一方非調節性分泌経路はTGNで濃縮されることなく分泌小胞に包まれ、次々と細胞外へ分泌される。このようなタンパク質としては形質細胞から分泌されるIgGがある。

このようにT細胞特異的な刺激は様々なシグナルを細胞内に伝達しT細胞の増殖あるいはサイトカインの産生という反応を起こす。またサイトカインの産生に関しても数多くの段階で調節を受け、最後の調節段階の分泌経路でも2経路の選択が行われているのである。そこで本研究ではIL-10産生細胞の増殖とIL-10産生の関連性を調べるためにCD8⁺抑制T細胞クローン13G2をT細胞特異的的刺激方法で刺激し、その増殖能とIL-10産生能を検討した。

材料と方法

1. T細胞

抑制T細胞クローン13G2を使用した。培養方法は第三章第4項に準じた。

2. 抗体

a) 抗体の調整

抗CD3抗体を使用。抗マウスIL-10抗体SXC-1 (Rat, IgM)、JES5-2A5 (Rat, IgG1)を産生するハイブリドーマはJ. Abrams博士(DNA X研究所)の許可を得てATCCより購入した。それらのハイブリドーマからの抗体の精製は第三章第3項に準じたが、精製度を高めるために硫酸沈澱した後にFPLC (Pharmacia)で精製を行った。JES5-2A5の精製にはprotein G Superrose HR 10/2を用い0.1Mのリン酸緩衝液(pH 7.0)でカラムに結合させ0.1Mのグリシン緩衝液で溶出させた。SXC-1はMONO Qを用い、10mMトリス緩衝液をベースにNaCl 0-500mMの濃度勾配で溶出させた。

b) 抗体のビオチン化

SXC-1を20mg/mlの濃度で炭酸水素ナトリウム緩衝液(pH 8.5)に溶解し、400 μ gのNHS-LC-biotin (Pierce)を添加して4時間氷上で振とうさせた。その後PBSで透析し、未反応のビオチンを除き、それを抗体溶液とした。

3. 13G2細胞の刺激方法

10 μ g/mlの抗CD3抗体PBS溶液を用いて抗体を固相化した。固相化の方法は第三章に準じた。固相化後に200 μ lの13G2細胞懸濁液(5 \times 10⁵/ml)を添加して培養を開始した。それとは別にrhlL-2 (武田薬品工業より供与)も13G2細胞の刺激に使用した。

4. 細胞周期の測定

まず13G2細胞 1×10^6 個を1mlの冷却したPBSに懸濁した。そこに冷95%エタノール（和光純薬）を3倍量になるまでかくはんしながら徐々に滴下し、エタノールの最終濃度を70%とすることで細胞を固定した。細胞固定液を遠心後PBS1mlに懸濁する。これに、最終濃度が $40 \mu\text{g/ml}$ 、 $50 \mu\text{g/ml}$ となるようにリボヌクレアーゼA（Sigma）とヨードプロピディウム（Sigma）を添加して室温で30分放置した。これを試料としてフローサイトメトリー（EPICS:Coulter）を使用してDNA量を測定した。励起波長は488nmで行った。

5. IL-10の測定

$5 \times 10^5/\text{ml}$ の13G2細胞懸濁液200 μl を96ウェルプレート（Falcon）に添加して培養した。経時的变化の実験以外では24時間後の培養上清を採取し、それぞれ0.22 μm のフィルターで濾過したものをIL-10測定用の試料とした。IL-10の測定は2種類の抗IL-10抗体を用いたサンドイッチ酵素免疫測定法（ELISA）で行った。以下にその手順を示す。なおPBSは0.02%のアジ化ナトリウムを防腐剤として含有しているものを使用した。

- ア) 抗IL-10抗体（2A5）のPBS溶液（ $1 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ ）50 μl を96ウェルプレート（MAXSORP、Nunc）にコーティングして一晩4℃保存。
- イ) 0.05%Tween20入りのPBS溶液（PBS-Tween20）で4回洗浄後、3%BSA/PBS溶液を100 μl 添加してブロッキングし、室温で2時間放置。
- ウ) 再び洗浄した後、試料を50 μl 添加し、一晩4℃放置。洗浄後、ビオチン化した抗IL-10抗体（SXC-1）のPBS-Tween20溶液（ $0.5 \sim 2 \mu\text{g/ml}$ ）を50 μl 添加し室温で3時間放置。

エ) 洗浄後、アビジン結合アルカリフォスファターゼ (Z y m e d) を P B S - T w e e n で適当濃度にしてから $50 \mu\text{l}$ 添加し、室温で1時間放置。

オ) 洗浄後、基質溶液を添加した。基質は p - ニトロフェニルリン酸 (和光純薬) を使用し、 405 nm の吸光値を測定した。

6. 13G2細胞の増殖測定

13G2細胞刺激後24時間毎の増殖を、培養終了直前20時間における ^3H -チミジンの取り込み量で測定した。

7. タンパク質合成の阻害、DNA合成の阻害法

13G2細胞を 5×10^5 個/ ml に調整し、48ウェルプレート (Costar) に $630 \mu\text{l}$ ずつ分注した。そこに培地で適当濃度に希釈したタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド (和光純薬)、またはDNA合成阻害剤ヒドロキシウレア (和光純薬) を $70 \mu\text{l}$ ずつ添加して2時間前培養した。この前培養した細胞懸濁液を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の抗CD3抗体で固相化した96ウェルプレートに $200 \mu\text{l}$ ずつ添加して培養を行った。24時間後に培養上清を採取し、IL-10測定用の試料とした。

結果

1. 細胞周期の解析

13G2細胞の増殖、あるいはIL-10の産生について研究するためには細胞をいつも一定した状態にして実験を行わなければならない。そこで実験に使用する全ての13G2細胞をDNA合成期(S期)前の状態であるG1期あるいはG0期に調整することにした。そのために50 U/mlのrIL-2で植え継いだ後の13G2細胞の細胞周期を解析した。細胞周期の測定は、M期G2期の状態にある細胞のDNA量がG1期G0期の状態にあるDNA量の2倍あることを利用し、その結果を図4-1に示した。このグラフは横軸に細胞一つ当りのDNA量を表し、縦軸に細胞数を表している。IL-2添加一日後の細胞は約40%がS+M+G2期の状態となっていた。しかし6日後の細胞でS+M+G2期の状態にあるものはなく、全ての13G2細胞がG0/G1期に同調していることが明らかとなった。この細胞周期解析により、50 U/mlのIL-2で植え継ぎ後6日経過した13G2細胞を以下の実験で使用することにした。

2. IL-10の産生とその経時的変化

サイトカインはストローマ細胞からIL-7が恒常的に産生される(77)ように産生細胞から恒常的に分泌される場合と、T細胞からのIL-2産生のように刺激を受けたときのみ分泌される場合の2通りが知られている。13G2細胞からのIL-10産生についてどうなのか検討したところ、13G2に何も刺激を与えないとIL-10は分泌されることが明らかとなった(図4-2)。図4-2には7時間後までしか示していないが、5日後まで観察しても培養上清中にIL-10は検出されなかった(データ省略)。次に13G2細胞を生理的に活性化したときのIL-10分泌を調べた。T細胞の主な生理的活性化経路は表面抗原(特にT細胞レセプター/CD3複合体)を介した経路と、サイトカインレセプター(特にIL-2レセプター)を介した経路の2つがあると考えられている。

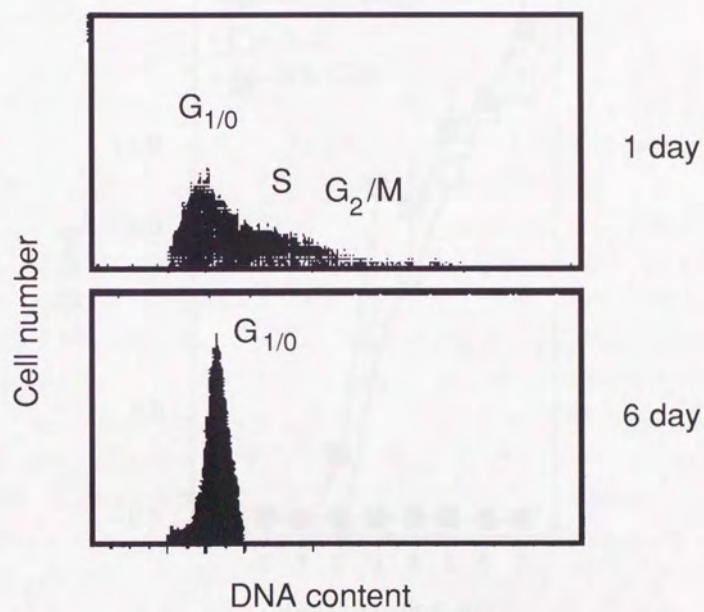


図 4-1 13G2 細胞の細胞周期の解析

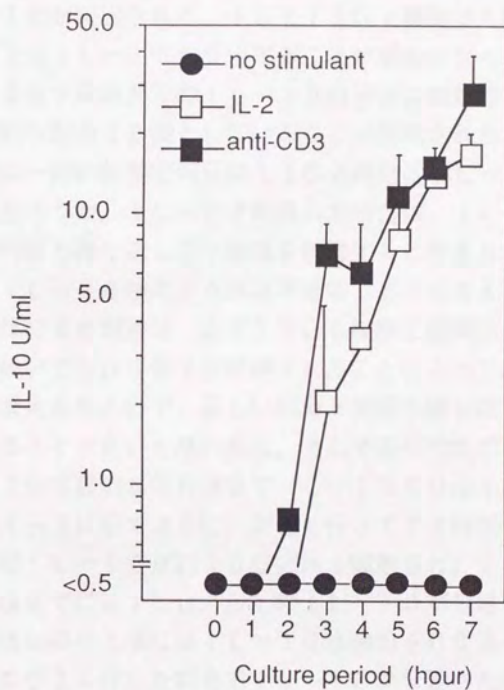


図4-2 13G2細胞からのIL-10分泌の経時的変化

そこでT細胞レセプター(TCR)/CD3複合体から刺激を与える方法として固相化抗CD3抗体を、IL-2レセプター(IL-2R)から刺激を与える方法としてIL-2を用い、13G2を刺激した。その結果を図に示したが、抗CD3抗体刺激あるいはIL-2刺激を行うと刺激3時間後から培養上清中に1U/ml以上のIL-10が検出された。そして13G2細胞は6時間で10U/ml以上のIL-10を分泌することが明かとなった。以上の結果より13G2細胞からのIL-10の分泌は恒常的ではなく、T細胞特異的な刺激を必要としていることが示唆された。

それでは一回の刺激で何日間13G2細胞はIL-10を分泌し続けるのだろうか。IL-2で刺激した場合は、IL-2が消費されるまで何回も繰り返してT細胞を刺激すると考えられるので、この実験にIL-2を使用するのは不適切であると考えた。固相化抗CD3抗体による刺激は、まず13G2細胞と固相化された抗体が接触し、続いてCD3分子が架橋されることによって刺激が細胞内に入ると考えられるので、新しい刺激が何回も繰り返して細胞内に伝達されることはないと思われた。そこで固相化抗CD3抗体を用いて、13G2細胞が何日後までIL-10を分泌するのかを検討した。図4-3に示すように、刺激を行って24時間後までの培養上清中にはIL-10が約70U/ml観察され、24時間後から48時間後までには15U/mlのIL-10が分泌されていた。48時間後以降の上清にはIL-10は検出されなかった。以上の結果からCD3を介した刺激でIL-10が分泌されるのは刺激後3時間から48時間の間であることが示唆された。

それではIL-10を産生させる刺激はIL-10の分泌のみを誘導しているのだろうか。それともIL-10の合成も誘導しているのだろうか。そのためタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドを添加することにより、培養上清に分泌されるIL-10量が阻害されるか否かを調べた。刺激方法は前の実験と同じく固相化抗CD3抗体刺激を使用し、24時間後の上清中のIL-10量を図4-4に示した。またシクロヘキシミドが過剰に存在するとタンパク質の合成を阻害するだけでなく、非特異的に細胞に損傷を引き

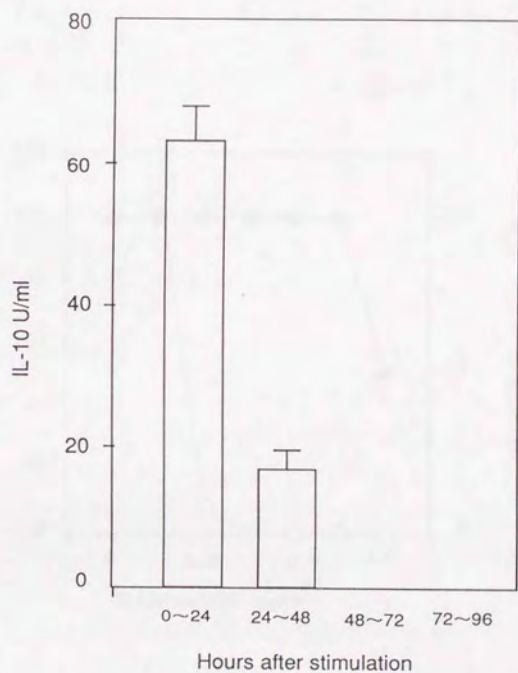


図 4-3 13G2 刺激後の IL-10 分泌能力の経時的変化

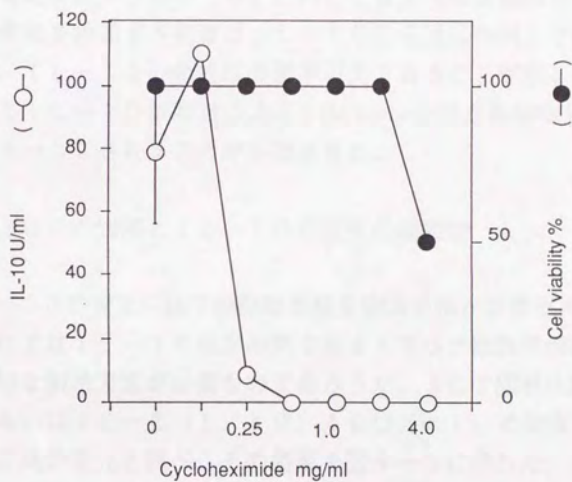


図 4-4 IL-10 産生に対するタンパク質合成阻害剤の影響

起こすと考えられるので、図には細胞生存数の百分率も表示した。その結果 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下のシクロヘキシミドでは 13G2 に対して非特異的な毒性を示さないことが観察された。次に IL-10 産生についてだが、もし IL-10 があらかじめトランスゴルジ網様体のような組織に蓄えられていて、刺激が IL-10 の分泌に作用しているのであれば、シクロヘキシミドが存在の有無に関わらず IL-10 は同量分泌されるはずである。ところが $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上のシクロヘキシミドが存在した場合、培養上清中に IL-10 を検出することはできなかった。このことは 13G2 細胞からの IL-10 産生を誘導する刺激は IL-10 の分泌に作用しているのではなく、IL-10 の合成に必要不可欠であることが示している。すなわち IL-10 は刺激によって de novo 合成され細胞外にエキソサイトーシスされることが示唆された。

3. 13G2 の増殖と IL-10 の産生の関連性

IL-10 の産生には T 細胞特異的な刺激方法が必要不可欠であった。それでは IL-10 産生細胞である 13G2 細胞の増殖も T 細胞特異的な刺激方法が必要なのであろうか。そこで固相化抗 CD3 抗体あるいは IL-2 (1, 10, 40 U/ml) で刺激し DNA 合成の経時的変化を調べ、その結果を図 4-5 に示した。当然の結果だが無刺激の場合は細胞内に取り込まれる ^3H -チミジンは 500 cpm 以下であり、増殖していないと考えられた。固相化抗 CD3 抗体で刺激したときの増殖のピークは 2 日目に観察され、その時に取り込まれた ^3H -チミジンは約 1×10^4 cpm であった。1 U/ml の IL-2 で刺激した場合も増殖のピークは 2 日目で、取り込まれた ^3H -チミジンの量は固相化抗 CD3 抗体の場合と同じく約 1×10^4 cpm であった。40 U/ml の IL-2 を添加したときは増殖のピークは 3 日目に現れ、そのときに取り込まれた ^3H -チミジンは約 2×10^5 cpm で、これは固相化抗 CD3 抗体刺激の場合の 20 倍であった。

以上の結果から 13G2 細胞の増殖にも T 細胞特異的な刺激が必

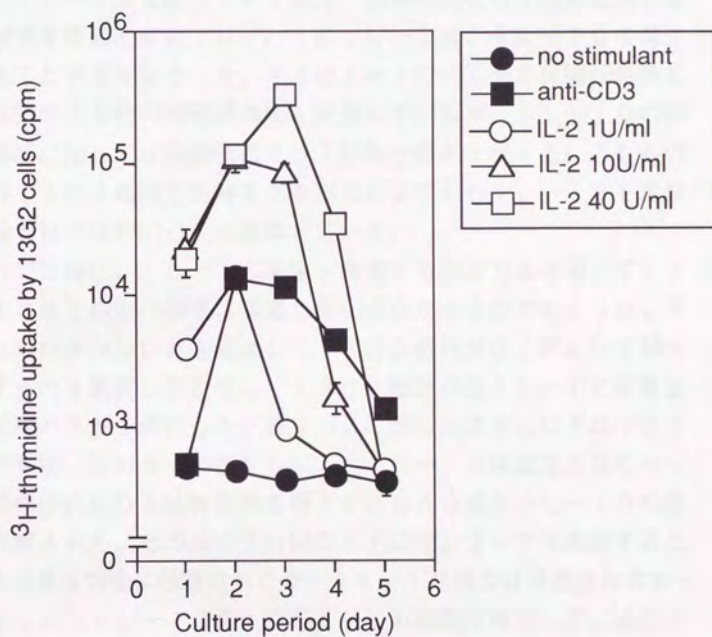


図 4 - 5 13G2細胞の増殖の経時的変化

要不可欠であることが明かとなった。それでは増殖活性を強く誘導する刺激方法は産生させる IL-10 の量も多いのであろうか。そこで増殖を調べた刺激方法で 13G2 を刺激し、IL-10 の産生量を調べた (表 4-1)。固相化抗 CD3 抗体は 58~90 U/ml の IL-10 を産生させていた。固相化抗 CD3 抗体と同じ強さの増殖を誘起させた 1 U/ml の IL-2 は、IL-10 を産生させることができなかった。40 U/ml の IL-2 は固相化抗 CD3 抗体の 20 倍の増殖誘導能を保持しているが、IL-10 の産生誘導能に関しては固相化抗 CD3 抗体と差がなかった。これらのことは 13G2 細胞を増殖させる刺激が必ずしも IL-10 を産生させるわけではないことを意味している。

それでは逆に、IL-10 産生を誘導する刺激方法を用いても IL-10 産生細胞の増殖は誘導しない場合があるのであろうか。そこでヒドロキシウレアを添加して 13G2 細胞が G1 期から S 期へ移行するのを阻害したときに、13G2 細胞から IL-10 が産生されるかどうかを検討した。表 4-2 に示したようにヒドロキシウレアの有無に関わらず刺激をしないと IL-10 は産生されなかった。固相化抗 CD3 抗体刺激を行うと DNA 合成と IL-10 の産生が観察された。その系に 2 mM のヒドロキシウレアを添加すると DNA 合成は完全に阻害されたが、IL-10 産生は阻害されなかった。すなわち IL-10 産生が起こっても細胞が増殖しない場合があることを意味している。

これらの結果から IL-10 を産生させる刺激と IL-10 産生細胞である 13G2 の増殖を誘導させる刺激はパラレルではないことが推察された。

表 4 - 1 2 4 時間後の I L - 1 0 産生量

Stimulant	IL-10 (U/ml)
-	< 0.5
Anti-CD3	74 ± 16
IL-2 1 U/ml	< 0.5
IL-2 10 U/ml	55 ± 12
IL-2 40 U/ml	49 ± 10

表 4-2 IL-10 産生に対する DNA 合成阻害剤の影響

Stimulant	Hydroxyurea	^3H -thymidine uptake (cpm)	IL-10 (U/ml)
-	-	735 \pm 440	<0.5
-	+	1078 \pm 386	<0.5
Anti-CD3	-	4525 \pm 578	64 \pm 25
Anti-CD3	+	784 \pm 159	77 \pm 6

考察

本実験ではTCR/CD3からの刺激方法としてよく使用されている抗CD3抗体を固相化する方法とリンホカインレセプターからの刺激方法としてのIL-2による刺激法をT細胞特異的刺激として用いた。図4-2に示したように13G2細胞をG0/G1期の状態にすると、IL-10を分泌させるには上記に述べたT細胞特異的な刺激を必要とすることが明かとなった。このことは13G2細胞が恒常的にIL-10を産生するT細胞でないことを示しており、これは抑制T細胞クローン13G2がサイトカインを一過性に発現する一般のT細胞クローンと同じであることを意味している。つまりサイトカイン産生に関しては一般的なT細胞の一つとして13G2細胞を捉えることが可能であると考えられた。

13G2からのIL-10分泌は刺激後約3時間から産生され始めており、マクロファージからのIL-10産生に20時間かかるという報告とは少々異なった(78)。本実験ではG0/G1期に同調させた13G2細胞からIL-2によってIL-10が産生されており、このことは13G2細胞上にIL-2Rが発現していることを意味している。また、CD8⁺T細胞が他の細胞よりも早くIL-10を産生することによってマクロファージから産生される炎症性サイトカインであるIL-1、IL-6、TNF- α の産生を抑制し(79)、炎症の早期鎮静化に一役買っているということも考えられる。IL-10産生を行うCD8⁺T細胞は幾つも発見されているので、このIL-10の早期発現がCD8⁺T細胞に一般的なものであるかどうかは検討の余地があると思われる。既に上述したが、13G2からのIL-10産生は一過性の現象であった。そして図4-3に示すように、少なくともTCRからの刺激ではIL-10産生は刺激後長くとも48時間以内で終了することが明かとなった。この実験はワンヒット刺激によるIL-10産生の結果なので、体内では一つのT細胞クローンが何回も刺激を受け、それに応じて長期間IL-10を産生している可能性も考えられる。またサイトカインの産生は様々な段階で調節されていることが知られているが、

図4-4の実験のようにIL-10の産生に必要な刺激はIL-10の分泌ではなくIL-10タンパク質の合成に必要であることが示唆された。このことはまた、抑制T細胞のIL-10分泌経路が非調節性経路であることを示している。なおIL-10のmRNAレベルでの実験は今回は行わなかったが、最近の知見ではサイトカインの産生におけるmRNAの安定性と分解が重要な意味を持つことが知られている。今後mRNAの安定性を含めた研究がIL-10産生の制御を調べる上では必要となるだろう。

本実験ではIL-10産生細胞の増殖とIL-10産生の関連性についても興味ある知見を得た。図4-5のチミジンの取り込みと表4-1のIL-10産生量を比較するとチミジン取り込みとIL-10産生量の間には関連性があまりないことが示唆される。すなわち、2日後におけるチミジンの取り込み量がほぼ同じであった、抗CD3抗体刺激と1U/mlのIL-2刺激を比較した場合、前者はIL-10を産生させるのに対し、後者はIL-10を産生させなかったのである。また逆にほぼ同じ量のIL-10を産生させる抗CD3抗体と40U/mlのIL-2で刺激した場合を比較した際、前者の2日後におけるチミジン取り込み量は後者の約10分の1であった。この違いはTCR/CD3複合体を介する刺激とIL-2Rを介する刺激との差異から生じるものと考えられる。TCR/CD3からの刺激はチロシキナーゼを経由する部分と、IP代謝によって引き起こされる Ca^{2+} /PKC経路が存在すると言われている。特に Ca^{2+} /PKC経路はアナログによる研究によりIL-2等のサイトカイン産生には必要不可欠な刺激とされていた。一方IL-2からの刺激は細胞の増殖に関するシグナル伝達の研究が主で、独立した2つの経路でG1期からS期への移行の調節、またS期から分裂期であるG2/M期への移行の調節を行っていると考えられている。IL-2によってT細胞から産生されるサイトカインはIFN- γ 、TNFなどいくつか存在しているが(80)、その産生メカニズムについてはTCR/CD3を介した場合との異同を含めてまだ報告が無い。またCD8⁺T細胞から産生されるMAF (Macrophage activating factor) のようにTCRを介した刺激で

は産生されるのに対し、 $IL-2$ によってはその濃度を高くしても産生されないという報告もある(81)。本実験で使用した $CD8^+T$ 細胞は、 $IL-2$ の量の違いによって $IL-10$ の産生がOn、Offされたという点で、 $IL-2$ によるサイトカイン産生に関するシグナル伝達を研究するよい実験材料になると期待される。また今回細胞の増殖の指標としたのがチミジンの取り込みであるが、この反応は細胞周期のS期に起こるものである。真核生物の細胞周期は少なくともG1期からS期への移行、そしてS期からG2/M期への移行の2段階でサイクリン/サイクリン依存性キナーゼ複合体により調節されていることが知られている(82)。 $IL-2$ による刺激の場合はこの2段階の移行が可能になるため細胞数も増加する。しかし、顕微鏡観察を行ってみるとTCR/CD3からの刺激だけでは、細胞は大きくなるのだがどうも分裂が起らず、G2期/M期を移行していないという印象を受けた(データ省略)。この現象がTCR/CD3を介したシグナルの特徴であるのか、あるいはアクセサリー分子同士の結合がなかったからなのかについては議論の余地があるが、今後は細胞周期を詳細に研究した上で、 $IL-10$ 産生と増殖の比較検討が課題であると思われる。

今回はチミジン取り込みと $IL-10$ 産生についての比較であったが、それらをまとめると $IL-2$ 刺激は $13G2$ の増殖に主に大きな役割を持ち、TCR/CD3からの刺激は $IL-10$ の産生に重要であった。そして $IL-10$ の産生はG1期からS期への移行を必要としない(表4-2)ことが示唆されたといえる。特に $IL-2$ の量の違いによって $IL-10$ の産生の有無が変化するという実験結果から推測すると次の様な仮説をたてることができる。すなわち体内における免疫反応の初期段階では $IL-2$ の量が少ないため、 $CD8^+T$ 細胞は増殖するが $IL-10$ は産生しない。そのため結果的に免疫反応の活性化に関与しているのかもしれない。そして排除すべき抗原がなくなるころには免疫反応は最大限に活発化しており、過剰の $IL-2$ 等のサイトカインによって増殖し続ける $Th1$ や活性化したままのマクロファージが存在するが、その局所に存在する高濃度な $IL-2$ によって $CD8^+T$ 細胞から $IL-10$

が産生され、免疫反応を鎮静化すると解釈することもできる。この仮説では抗原特異的なCD8⁺T細胞の役割が全く述べられていないが、抗原に感作することでIL-2Rが発現し、IL-2応答性のCD8⁺T細胞になることで抗原特異的な抑制効果を期待することができる。その抗原認識のときにIL-10も産生されると思われるが、まだCD8⁺の細胞数が少ないために免疫反応を抑制するほどのIL-10は全体として産生されていないのではないだろうか。確かに1つのクローンでのin vitro系における実験結果からin vivoでの反応を予想するのは無謀ではあるが、しかし今後ますますCD8⁺T細胞からのT細胞特異的な刺激によるIL-10産生に関する実験結果が蓄積されれば、免疫抑制反応に対するCD8⁺T細胞とIL-10の関係が明かになっていくものと期待される。

第五章 同一クローンからのIL-10とIFN- γ の産生制御

序

CD8⁺抑制T細胞クローン13G2からIL-10が産生していることは既に明かであるが、そもそもIL-10はある仮説の基に発見されたサイトカインである。その仮説とは、以下のようなものであった。

代表的な免疫反応である遅延型過敏症反応と抗体産生によって起こる液性免疫という現象が相互に排他的であることが古くから知られており(83,84)、それらの反応は各々Th1とTh2が担っていると考えられていた。そのためTh1とTh2はお互いを抑制的に制御する機構が働いていることが予想された。Th1が産生するIFN- γ がTh2の増殖を抑制することは知られていたので、Th1の活性を抑制するTh2が産生する因子の検索が試みられた。その結果Th2をマイトージェンで刺激した培養上清にTh1のIFN- γ 産生を抑制する活性CSIFが見つかり(50)、その後p c D S R α 発現ベクターのCOS細胞へのトランスフェクション系によってCSIFのcDNAがクローニングされ、後にその生物活性の多様性からサイトカインIL-10と命名された(42)のである。すなわちIL-10はTh1の活性を抑制する物質として発見され、現在までマウスにおいてはTh1からIL-10が産生されている報告はない。一方IL-10検索のために、Th1の活性抑制の指標となったIFN- γ はTh1から産生され、Th2から産生されないとされている。

それではサイトカインの発現がTh1とTh2で異なる理由は何であろうか。一般にサイトカインの発現は抗原刺激やマイトージェンによって一斉に誘導されることから、サイトカインの遺伝子上に同時に発現制御される機構の存在が示唆され、5'領域に一定のホモロジーを保持したDNAモチーフ(Conserved Lymphokine Element: CLE)があることが指摘されている(85)。それとは別にTh1、Th2細胞において異なるグループのサイトカインを

産生する機構が考えられる。そのひとつとして産生されるサイトカインのDNA上にTh1サブセットまたはTh2サブセット共通のモチーフが発見されTh1とTh2の産生制御に関わっているのではないかと考えがある(86)。また細胞内のシグナル伝達の違いでTh1とTh2の分離を説明する考え方もある。IL-1による感受性の違い(87)、cAMP濃度を上昇させる薬剤に対する感受性の違いを重要視する説もある(88-90)。またTh2においては刺激後の細胞内のカルシウム濃度の上昇、イノシトールリン脂質の代謝が見られず、PKC経路が使用されていないという報告もある(92)。

ところで本論文ではCD8⁺T細胞クローンに注目して実験を行ってきたが、CD8⁺T細胞はTh1と同じサイトカインパターンで発現するという今までの説とは異なり、CD8⁺T細胞クローン13G2においては本来互いに抑制し合うはずのTh1が産生するIFN- γ とTh2が産生するIL-10を産生することがはっきりした。本章ではこのクローンにおけるIL-10とIFN- γ の産生に必要な細胞内シグナルについて検討した。

方法

1. T細胞

CD8⁺抑制T細胞クローン13G2を使用した。培養方法は第三章第4項に準じた。

2. 抗体

ア) 抗体の調整

抗CD3抗体、抗IL-10抗体(SXC-1、JES5-2A5)を使用した(第四章第2項参照)。抗マウスIFN- γ 抗体XMG1.2(Rat、IgG1)を産生するハイブリドーマはJ. Abrams博士(DNA X研究所)の許可を得てATCCより購入した。抗マウスIFN- γ 抗体R4-6A2(Rat、IgG1)を産生するハイブリドーマもATCCより購入した。抗体の精製は第四章に準じ、FPLCで精製した。XMG1.2の精製はSXC-1と同様に行い、R4-6A2についてはJES5-2A5と同様に行った。

イ) 抗体のビオチン化

抗IL-10抗体SXC-1、抗IFN- γ 抗体XMG1.2を第四章第2項の方法でビオチン化した。

3. IL-10、IFN- γ の測定法

ア) 試料の調整

13G2は 5×10^5 /ml、200 μ lで24時間培養した。そして培養上清を採取し0.22 μ mのフィルターで濾過しサイトカイン測定用の試料とした。なお13G2細胞をT細胞特異的な方法で刺激するために抗CD3抗体、IL-2、ConAを使用した。また化学物質による刺激方法として、細胞内の遊離カルシウムイオン濃度を上昇させるカルシウムイオノフォアA23187(Sigma)、

プロテインキナーゼCを活性化させるPhorbol12-myristate 13-acetate (PMA: Sigma)、細胞内のcAMP濃度を上昇させるN⁶,O²-Dibutyryl adenosine 3',5'-cyclicmonophosphate, Na salt (dbcAMP: 生化学工業)を使用した。

イ) IL-10、IFN- γ の定量

試料中に存在するIL-10、IFN- γ の定量は第四章第5項の手順に基づいてサンドイッチELISAで行った。なおIFN- γ の測定に使用するコーティング用の抗体はR4-6A2、セカンド抗体としてXMG1.2を用いた。

4. 細胞内遊離カルシウムイオン濃度上昇の有無の評価法

$2 \times 10^6 / \text{ml}$ の13G2細胞懸濁液に $20 \mu\text{M}$ となるようにRHOD2-AM (生化学工業)を添加して 37°C で1時間培養した。その後細胞を培地でよく洗い、カルシウム測定用の緩衝液に懸濁した。緩衝液の組成は(NaCl 800mg, KCl 400mg, Na_2HPO_4 47.9mg, Glucose 1000mg/l)とした。細胞外に Ca^{2+} が存在する条件の場合は、その緩衝液に 200 mM の CaCl_2 溶液を 200 分の1添加した。そして分光蛍光光度計を使用し、 555 nm で励起させ、 576 nm の蛍光値を測定した

結果

1. T細胞特異的刺激方法によるIL-10とIFN- γ の産生

13G2細胞は刺激を受けたときのみIL-10を産生する。ところで13G2細胞は第2章で述べたように培養上清中にIFN- γ を放出している。序論で言及したようにIL-10とIFN- γ はお互いに制御し合う作用を持つ。そこでIFN- γ の産生機構について研究するため、IL-10産生の場合と同じようにT細胞特異的刺激方法でIFN- γ が産生されるのかを調べた。図5-1には比較のためIL-10の結果も表示した。その結果IL-10と同様IFN- γ も13G2に刺激を与えないと産生されないことが明かとなった。そしてCD3からの刺激、あるいはIL-2からの刺激を受けることによって13G2細胞からIFN- γ は産生された。今回は刺激方法として生理的方法以外の方法であるマイトージェン刺激(ConA)も用いてサイトカインの産生量を調べてみたところ、IL-10とIFN- γ は共に十分な量を産生することが示された。

2. 細胞内へのCaの流入

一般的に細胞は刺激を受けると細胞内にCa²⁺イオンを取り込むことが知られている。抗CD3抗体、IL-2で刺激した場合の13G2細胞においてCa²⁺流入が起こっているか否かを検討し、細胞質内のCa²⁺イオン濃度が上昇した結果を得た場合は+で表示した(表5-1)。細胞外にCa²⁺イオンが存在している場合は抗CD3抗体、IL-2共にCa²⁺流入を引き起こした。しかし細胞外にCa²⁺イオンがない状態では、IL-2刺激では細胞内のCa²⁺イオン濃度は上昇しなかった。抗CD3抗体刺激でCa²⁺イオン濃度上昇が観察されたが、これは細胞内カルシウムストアーからCa²⁺イオンが放出されたためと考えられる。これらの結果から抗CD3抗体刺激とIL-2刺激とでは刺激伝達経路が異なるが、細胞外にCa²⁺イオン存在する場合は共に細胞内のCa²⁺イオン濃度を上昇させることが明かとなった。またT細胞マイトージェンで

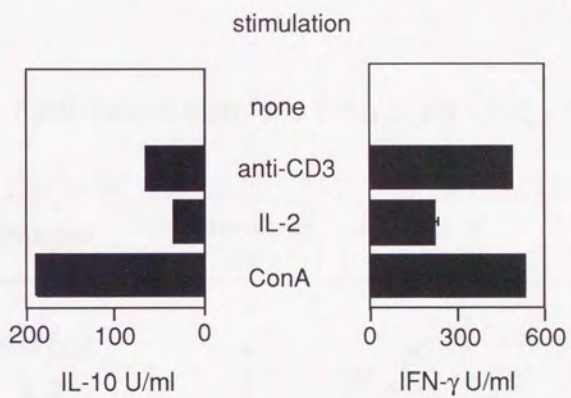


図 5 - 1 T細胞特異的な刺激法によるサイトカインの産生

表 5-1 T細胞特異的な刺激による 13G2 細胞への Ca^{2+} 流入の有無

Stimulant	presence of Ca^{2+}	absence of Ca^{2+}
-	-	-
Anti-CD3	+	+
IL-2	+	-
ConA	+	+

あるConAで刺激した場合は、抗CD3抗体刺激と同じように細胞内へ Ca^{2+} イオンの流入が観測された。

3. カルシウムイオノフォアによるIL-10、IFN- γ の産生
13G2細胞内の Ca^{2+} イオンの上昇がIL-10、IFN- γ の産生を誘導するかどうかをカルシウムイオノフォア(A23187)を用いて検討した。それと共にPKC活性剤であるPMAの相乗効果を調べた(図5-2)。カルシウムイオノフォア $0.25\mu g/ml$ からIL-10が産生されたが、その産生量はConAで刺激した場合の約1/5であった。PMAのみではIL-10は産生されず、カルシウムイオノフォアに対するPMAの相乗効果も観測されなかった。IFN- γ はカルシウムイオノフォア $0.125\mu g/ml$ より産生されることが確認され、 $0.25\mu g/ml$ で最大量となった。そしてその量はConA刺激によって産生される量とほぼ同じであった。PMAの影響はIFN- γ 産生に関しても観測されなかった。ConA刺激によって産生されたサイトカインの量を13G2細胞が最大限に産生できるサイトカインの量と仮定すると、 Ca^{2+} イオン濃度の上昇によるサイトカインの産生誘導はIL-10よりもIFN- γ の産生に大きく寄与しているのではないかと推測された。

4. cAMP濃度上昇によるIL-10、IFN- γ の産生
細胞内シグナルはCa流入やPKC経路の他にPKA経路が存在することが知られている。そこでPKA活性化によるIL-10とIFN- γ の産生を検討した。実験は、13G2細胞からサイトカインを十分量産生させることができない微量のConAを共存させ、PKAの活性化剤であるdbcAMPを1mM添加して行った。その結果を図5-3に示した。ConA $3ng/ml$ から $400ng/ml$ の範囲ではIL-10は殆ど産生されなかったが、dbcAMPを添加すると $40\sim70U/ml$ のIL-10が産生されるようになった。IFN- γ もConAのみの刺激で産生されることはなかった。しかしIL-10とは異なり、dbcAMPを添加してもIFN- γ は産生されなかった。

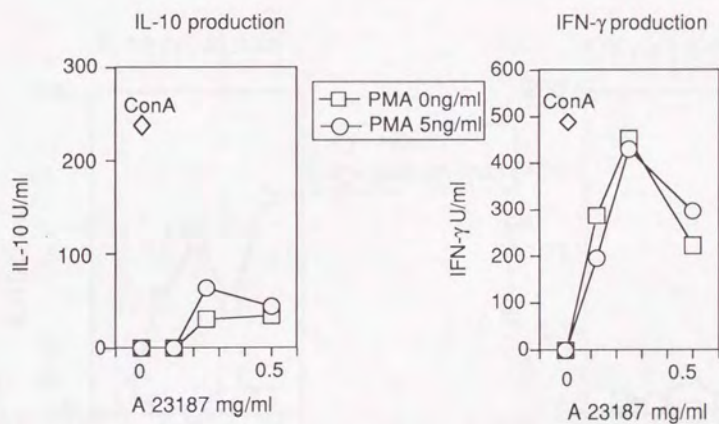


図 5-2 13G2細胞からのサイトカインの産生に対するカルシウムイオノフォアとPKC活性剤の影響

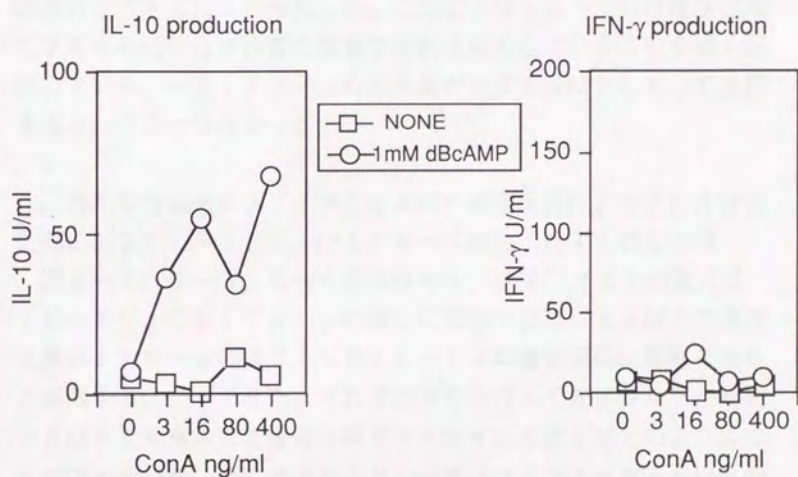


図5-3 サイトカイン産生におけるConAとPKA活性剤の影響

P K A が I L - 1 0 産生を相乗的に促進させている可能性が推察されが、そのことを確かめるために d B c A M P の濃度を順次希釈したときの I L - 1 0 の産生量および I F N - γ の産生量変化を調べた。I L - 1 0 も I F N - γ も殆ど産生させない C o n A 4 0 0 n g / m l の存在下で、0 m M から 1 m M までの濃度の d B c A M P を添加した (図 5 - 4)。I L - 1 0 の産生量は d B c A M P の濃度が上昇するにつれ増加した。このことは I L - 1 0 の産生促進に P K A の活性化が非常に重要な役割を果たしていることを強く示唆している。一方 I F N - γ の産生量が d B c A M P によって上昇するということはなかった。

5. カルシウムイオノフォアと c A M P 濃度上昇による P K A 活性化による I L - 1 0 および I F N - γ 産生に対する相互作用

図 5 - 2、5 - 3、5 - 4 の実験から、C a ²⁺ イオンの流入は I L - 1 0 よりも I F N - γ の産生に重要であり、c A M P の濃度上昇は I F N - γ の産生よりも I L - 1 0 の産生促進に重要であると推測することができた。それではカルシウムイオノフォアと d B c A M P を共存させた場合は両サイトカインの産生はどのようなのであろうか。そこでカルシウムイオノフォアと d B c A M P の相互作用を検討し、その結果を表 5 - 2 に示した。I L - 1 0 はカルシウムイオノフォアのみで刺激で産生されるが、その条件に d B c A M P を添加すると I L - 1 0 の産生量は 2 倍に増加した。一方 I F N - γ の産生量は d B c A M P を添加することによって減少した。このことは 1 3 G 2 細胞における c A M P 濃度の上昇が I L - 1 0 と I F N - γ の産生制御に大きく関わっていることを示している。

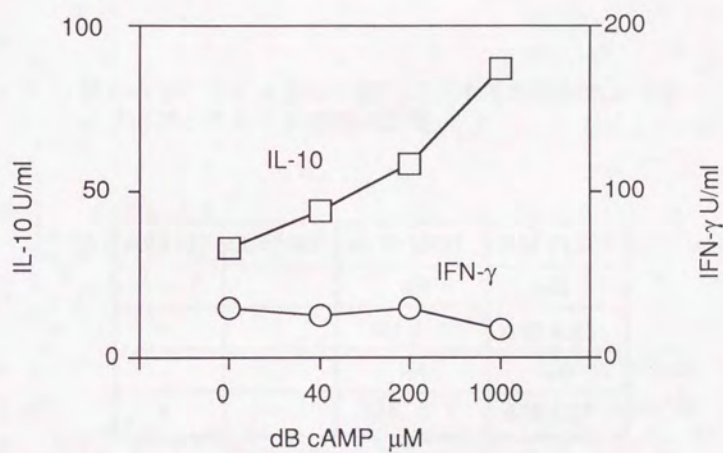


図5-4 0.4 μ g/mlのConA存在下におけるPKA活性剤のサイトカイン産生に対する影響

表5-2 サイトカイン産生に対するカルシウムイオ
ノフォアとPKA活性剤の影響

A23187	dBcAMP	IL-10 U/ml	IFN- γ U/ml
-	-	<6	<6
+	-	58 \pm 13	450 \pm 33
-	+	<6	<6
+	+	126 \pm 7	436 \pm 21

考察

本章ではCD8⁺T細胞クローンにおいてIL-10とIFN- γ がT細胞特異的な刺激方法によって産生されることを示した。両サイトカインは細胞内へのCa²⁺の流入で産生誘導されたが、ConA刺激と比較してみるとその産生量に違いがあることが示唆された。ConAはT細胞のマイトジェンであるので、本章においては、ConA刺激によって産生されるサイトカイン量はそのT細胞が産生できる最大量であると仮定して実験の解釈を行った。すなわちConAは、T細胞クローンが潜在的に産生することができるサイトカインを最大限に産生させることができる刺激剤である、と仮定したのである。図5-2は、IFN- γ の産生量はカルシウムイオノフォア刺激とConA刺激では同じであるので、細胞内へのCa²⁺流入がIFN- γ を産生させるのに必要十分な細胞内シグナル伝達であると捉えることができる。一方IL-10については、ConA刺激と比較してカルシウムイオノフォア刺激の産生量は約5分の1であった。カルシウムイオノフォアが量的に少なかったためにIL-10を十分量産生できなかったという可能性については、高濃度のカルシウムイオノフォアでのIL-10の産生量に変化がなかったという結果から考えなくてよいと思われた。このことは少なくとも13G2細胞においては、IL-10の産生誘導にはIFN- γ とは異なりCa²⁺の流入だけでは不十分であることを意味すると考えられた。

このCa²⁺流入とPKCの活性化はTCRからの刺激によって引き起こされるPLCの活性化を介したPI代謝カスケード経路を代替する。しかしながら、本実験ではPKC活性化による相乗的なIL-10産生増強は起こらなかった。Ca²⁺/PKC経路によってIL-10産生の増強が起こらないという報告はヒトの系で発表されており(93)13G2特有の結果ではなく、IL-10遺伝子自身の特徴と推察することができる。

Ca²⁺/PKC経路以外の細胞内シグナルとしてPKA系が知られているが、これはリンパ球の活性化に対して阻害的に働くことで

知られており、T細胞内の活性化、特に増殖、IL-2の産生においてこのPKAは阻害的に働くとして報告されてきた(94)。しかし最近になって、Th2が産生するIL-4産生は阻害せず、IL-5については逆に産生を促進するという報告も発表されている。13G2細胞に対する実験(表5-2)でも、IL-10産生量はカルシウムイオノフォアだけの刺激よりdBcAMPも添加した場合の方が約2倍増大した。また図5-3、5-4で示した結果からもBt₂cAMPを添加することによりIL-10の産生量が増加していると考えることができる。この実験は、低濃度のConAの存在下においてPKA経路がIL-10産生誘導に対して相乗効果を持つことを示している。低濃度のConAはT細胞に対して、サイトカインを大量に産生させるほどは活性化しないが、弱い活性化は引き起こしていると考えられ、このことは弱い活性化状態のT細胞内でPKAが活性化するとIFN- γ は産生させないがIL-10は産生されることを意味している。つまりIL-10とIFN- γ を両方産生させることができるCD8⁺T細胞は、接着分子などによる結合で弱い刺激を受けているときにPKA経路が活性化されるとIL-10のみを産生し、TCRを介する刺激やIL-2Rを介した強い刺激を受けるとIFN- γ も産生するようになると考えられる。

このように同一クローンでもサイトカインの種類によってその産生に必要なシグナルが異なる実験結果が得られたことは大変興味深い。サイトカインの産生は様々な段階で調節されているが、特に細胞内シグナル伝達と遺伝子発現との関連性は密接であると考えられており、研究が進んでいる。高等生物細胞における遺伝子の転写調節領域は大きく2つに分類される。一つは転写開始点(+1)より20~30bpほど上流に位置するTATAボックスであり、この存在によって正しい位置から転写が開始される(95)。もう一つはTATA配列の上流にあるエンハンサーと呼ばれる領域でここに転写活性因子が結合することで転写活性の増大等の転写調節が行われる(96)。このエンハンサー領域の同定と結合する転写活性因子の研究が急速に進んでいる。Ca²⁺上昇シグナルによってCa²⁺/Ca

ルモジュリンのカスケンドが活性化し、最終的にNF-AT結合因子をIL-2エンハンサー部位であるNF-ATに結合させ、IL-2の産生を増強することが知られている。この Ca^{2+} /カルモジュリン経路はIFN- γ の産生にも関与しており、13G2細胞でもIFN- γ 産生誘導に関して Ca^{2+} の上昇は重要であった。またPKCの標的分子として考えられている転写活性因子として最も有力な候補がNF- κ Bである。現在IL-2、IL-6、GM-CSFなどのサイトカイン遺伝子の5'上流部分にNF- κ B認識塩基配列があることが示されている(97,98)。一方細胞内のcAMP濃度が上昇するとcAMP response element (CRE) と呼ばれるDNAモチーフを持つ一群の遺伝子発現レベルが上昇することが知られている。サイトカイン遺伝子上流にCREが存在するIL-6は、cAMP上昇を引き起こすアゴニストによって線維芽細胞から産生されることが報告されている。IL-10遺伝子にも転写開始部位より約420bp上流にCREが存在していることが知られており、PKA活性化が最終的にそのモチーフに転写活性因子を結合させた結果、本実験のようにIL-10が産生されたと推測することもできる。

次にIL-10とIFN- γ を両方産生する細胞が免疫系にどのような役割を果たすのか考えてみたい。上記したようにPKAの活性化によって産生量の多くなるサイトカインはどれもTh2から産生されるものである。一方Th1から産生されるIL-2などはPKAの活性化によって産生が抑制されることが知られている。このような事実からTh1とTh2のサイトカイン産生パターンの違いを細胞内のシグナル伝達や細胞の応答性の違いに求める考え方が最近現れてきた。その違いとして発表されたものを表5-3にまとめた。

表5-3 Th1とTh2の応答性の違い

	Th 1	Th 2
Con Aによる細胞内へのCa ²⁺ 流入	+	-
Con AによるIP3の代謝	+	-
IL-1に対する応答性	-	+
cAMPの上昇によるサイトカイン産生への影響	↓→	→↑
cAMPの上昇によるc-fosへの影響	↓	→

ところでThはTh1にもTh2にも属さないTh0からTh1とTh2へと分化していくと考えられている。その分化についてはまだよく解明されていないが、分化決定要素には、1) 抗原提示細胞、2) MHCクラス2、3) サイトカイン等の液性因子が考えられており、以下にその例を挙げた。

- 1) B細胞が抗原提示するとTh2になりやすい(99)。
- 2) 同じ抗原(II型コラーゲン)を投与してもTh1を誘導するマウスの系統と、Th2を誘導するマウスの系統がいる(100)。
- 3) IL-4、IL-10でTh2細胞が誘導される(101、102)。
Th1誘導にはIFN- γ 、TGF- β 、IL-12(103、104)が報告されている。

IFN- γ 、IL-10によって分化が決定されるということから推測すると、IFN- γ とIL-10の両方のサイトカインを産生するCD8⁺T細胞が、このCD4⁺T細胞の分化決定を行なっているのではないかと考えられる。そしてCD8⁺T細胞がIL-10とIFN- γ の産生バランスを保つことで生体内のTh1、あるいはTh2の割合を決定すると推察できる。また免疫抑制に関わるIL-10とIFN- γ を産生することによって体内での過剰な免疫反応を巧みに抑制している可能性がある。例えば遅延型過敏症が過剰に反応を起こしたとき、活発化したマクロファージが

ら産生された PGE_2 が近傍に存在している $\text{CD}8^+$ T 細胞内の cAMP を上昇させ、その結果 $\text{CD}8^+$ T 細胞から $\text{IL}-10$ が産生され、マクロファージからの炎症性サイトカインの産生を抑制するのではないかと予想できる。今後はサイトカインネットワークの要として $\text{CD}8^+$ T 細胞をとらえなおし、相反する抑制活性をもつ $\text{IL}-10$ と $\text{IFN}-\gamma$ の産生制御について研究することが求められているのではないだろうか。

以上第二章から第五章までの結果から推察すると、 $\text{CD}8^+$ T 細胞の役割は産生するサイトカインを通じて、お互いに排他的であるといわれている DTH と液性免疫をともに抑制する能力のある細胞であると考えることができた。そして $\text{CD}4^+$ T 細胞の $\text{Th}1$ 、 $\text{Th}2$ への分化を決定づける環境をつくりだすことによって全体の免疫反応を司っている細胞と考えることができた。

高等動物は自己の生命を守るための高次の生体システムである免疫機構を備えている。免疫系を構成している細胞のなかでT細胞は中心的な役割を担い、表面抗原の違いからCD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞と大きく2種類に分類されている。特にCD8⁺T細胞は過剰な免疫反応を抑制することにより生体の恒常性を維持しているのではないかと考えられているが、詳細は明かではない。そこで免疫抑制機構を調べることを目的として、当研究室で樹立されたCD8⁺抑制T細胞クローン13G2が産生する液性因子の同定、及びその産生制御について研究を行った。

1. CD8⁺抑制T細胞クローンが産生する抑制因子の発見

α s1-カゼイン特異的なCD4⁺タイプ1ヘルパーT細胞 (Th1) クローンと抑制T細胞クローン13G2をIL-2の存在下で培養した。両者のうち13G2の培養上清中にTh1クローンの抗原特異的な増殖を抑制する活性があることを見いだした。この抑制活性が1) Th1クローンの上清中には認められなかったこと、2) 13G2の培養上清の濃度依存的であったことから、13G2が特異的に抑制因子を産生していると推定された。そこでこの抑制を引き起こす物質をT細胞増殖抑制因子 (TGIF: T cell growth inhibitory factor) と名付け、その化学的、物理的性質を調べた。その結果56℃30分加熱処理、あるいはジチオスレイトールで還元するとTGIFは失活し、また安定なpH領域は6.0から10.0であり、さらに限外濾過の結果より分子量は1万以上であることが明かとなった。以上のことからTGIFはタンパク質である可能性が高まった。このようにT細胞が産生し、免疫系の細胞増殖を制御するタンパク質はサイトカインと呼ばれているが、CD8⁺T細胞クローンから産生され、なおかつ増殖抑制能を持つIFN- γ 、TNFはTh1の抗原特異的な増殖を抑制しなかった。そのためCD8⁺T細胞が産生するサイトカインとしてはこれらと異なる新規物質であることが示唆された。

2. TGF β の精製と同定

まずTGF β の抑制の強さをunit数で表示するために、抗原特異的な刺激後4日目におけるTh1クローン3D20の³H-チミジンの取り込みを50%抑制する量を1U/mlのTGF β と定義した。そしてTGF β を同定するために以下の方法で精製を行った。13G2をIL-2存在下で大量に培養し、56Jの培養上清を得た。この上清を限外濾過で濃縮した後に、2種類の陰イオン交換カラム(QAE,DEAE)に通し、タンパク質量当りのTGF β 活性濃度を約9倍に高めた。次に、ヒドロキシアパタイトカラム及び陽イオン交換樹脂のカラムを用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を使用し400倍に活性を高め、最後にゲル濾過(HPLC)を行い最終的に6万倍にまで精製することに成功した。

このように精製されたTGF β について、CD8⁺T細胞以外の免疫細胞が産生する抑制能のあるサイトカイン(TGF β 、IL-10)との異同を検討した。そこでTh1クローンを3種類の刺激方法(IL-2、抗原提示細胞+抗原、固相化抗CD3抗体)により増殖させ、それに対する各サイトカインの抑制効果を調べた。増殖の測定法には³H-チミジンの取り込みを用いた。その結果、TGF β は3種類の刺激によるTh1クローンの増殖を全て抑制した。IL-10はTh1クローンの抗原提示細胞+抗原による増殖のみを抑えた。精製したTGF β は抗原提示細胞+抗原による増殖を約60%を抑制したが、IL-2、固相化抗CD3抗体によるTh1クローンの増殖は全く抑制せずIL-10と同様な挙動を示した。以上の結果からTGF β とIL-10が同一物質である可能性が高まったため、抗体による阻害実験を行った。抗IL-10抗体を精製したTGF β と共に添加したところ、Th1クローンの増殖抑制は完全に阻害された。またIL-10はIL-4の存在下において、肥満細胞株の増殖を促進する活性があることが知られているが、精製したTGF β にも同様の活性が観察された。さらにTGF β がIL-10であるということを確認するために、先のTGF β を精製する上での最終ステップであるゲル濾過で得られた各画分

を電気泳動し、抗IL-10抗体によるイムノブロッティング実験を行った。その結果、最もTGIF活性の高かった画分にのみ17 kDaの位置にバンドが現れた。この実験からタンパク質レベルでもTGIFはIL-10であると示された。またPCR法により、13G2細胞が実際にIL-10のmRNAを発現していることを確かめた。以上の結果から、13G2が産生するTGIFはIL-10と同一であると結論できた。

さらに13G2細胞の培養上清の抑制活性が抗IL-10抗体で阻害されること、13G2細胞によるTh1に対する抑制活性も抗IL-10抗体で抑制されることが示された。以上の結果より抑制T細胞の機能において、IL-10が重要な役割を担っていることを初めて明示することができた。

3. 抑制T細胞の増殖とIL-10の産生

体内において免疫を抑制するためには、より多くの抑制T細胞の存在と、IL-10の分泌が重要であると考えられる。そこで抑制T細胞クローン13G2を使用し、増殖とIL-10産生の相関を検討した。まず細胞内のDNA含有量を調べることにより、G0/G1期に同調させる条件を見だし、その条件下の細胞を以下の実験に使用した。13G2をT細胞に特異的な方法である固相化抗CD3抗体、またはIL-2を用いて刺激し細胞の増殖能とIL-10産生能を観察した。IL-10の測定には2種類の抗IL-10抗体を用いたサンドイッチELISAで行った。その結果、刺激のない状態では増殖もIL-10産生も観察されなかったが、T細胞レセプターを介した刺激方法である固相化抗CD3抗体刺激により増殖が認められ、IL-10の産生も約3時間後から観察された。1U/mlのIL-2刺激の場合は増殖能は観察されたがIL-10は産生されず、逆に40U/mlでは固相化抗CD3抗体刺激の場合の約10倍の増殖能が見られたが、IL-10の産生は抗CD3抗体刺激の場合とほぼ同じであった。以上のことから増殖を誘導する刺激方法は必ずしもIL-10の産生を誘導するわけではないことが示された。反対にヒドロキシウレアの存在下で固相化抗CD3

抗体刺激を行うと、増殖は観察されなかったがIL-10は産生された。またシクロヘキシミドを用いた実験により、IL-10は刺激によりde novo合成されることが示唆された。これらの結果から抑制T細胞の増殖とIL-10産生には刺激が必要であるが、増殖能とIL-10産生能はパラレルではないことが示唆された。

4. 同一クローンからのIL-10とIFN- γ の産生制御

IL-10の活性の一つに、Th1細胞からのIFN- γ の産生を抑制することが知られている。またIFN- γ はIL-10を産生するTh2の増殖を抑制する。このようにお互いに抑制制御している両サイトカインであるが、CD8⁺クローン13G2細胞においてはIL-10のみならずIFN- γ も同時に産生されていることがELISAによって明かとなった。同一T細胞クローンからこのような両サイトカインが産生されていること自体興味深いことであるので、その産生機構の細胞内シグナルを検討した。まずカルシウムイオノフォア及びプロテインキナーゼC活性化剤で刺激したところ、コンカナバリンA (ConA) で刺激した場合と比較してIL-10の産生量は約5分の1であったが、IFN- γ は同量産生された。また低濃度のConAの存在下でプロテインキナーゼA活性化剤であるdBcAMPを添加すると、IL-10の産生量は濃度依存的に増加するのに対しIFN- γ の産生能は促進されなかった。以上の結果よりCD8⁺T細胞クローンにおけるIL-10とIFN- γ の産生に必要なシグナルは異なることが示された。従ってCD8⁺T細胞クローンはIL-10とIFN- γ の産生を別々に制御しており、同一クローンでも異なる刺激に応じて異なる抑制機能を発揮する可能性が示唆された。

まとめ

CD8⁺抑制T細胞クローン13G2が産生する液性因子はTh1の抗原特異的な増殖を抑制する。そしてこの液性因子がIL-10であることを活性、タンパク質、RNAレベルで示すことに成功した。このIL-10の産生にはT細胞レセプターまたはIL-2

レセプターからの刺激が必要であるが、細胞増殖に必要な刺激が必要というわけではなかった。またIL-10はIFN- γ とは異なり、プロテインキナーゼAを活性化することによっても産生が促進されることが示された。今後CD8⁺T細胞から産生される抑制活性を持ったサイトカインの産生制御を更に詳細に調べることは、複雑な免疫ネットワークを研究する上で大変意義深いものと考えられる。

参考文献

1. Burnet FM.: The clonal Deletion theory of acquired immunity, (1959) The University Press.
2. Sprent J.: T lymphocytes and the Thymus. In: Fundamental Immunology 2nd ed. (ed. by Paul WE), (1989) pp. 69-93, Raven Press, New York.
3. Clevers H. Alarcon B. Wileman T. Terhorst C.: Annu. Rev. Immunol., (1989) 6. 629.
4. Fraser JD. Straus D. Weiss A.: Immunol. Today, (1993) 14. 357.
5. Morgan DA. Ruscetti FW. Gallo R.: Science, (1976) 193. 1007.
6. Burke F. Naylor MS. Davies B. Balkwill F.: Immunol. Today, (1993) 14. 165.
7. Mosmann TR. Cherwinski H. Bond MW. Giedlin MA. Coffman RL.: J. Immunol., (1986) 136. 2348.
8. Mosmann TR. Coffman RL.: Annu. Rev. Immunol., (1989) 7. 145.
9. Plaut M. Pierce JH. Watson CJ. Hanley-Hyde J. Nordan RP. Paul WE.: Nature, (1989) 339. 64.
10. Julius MH.: Immunol. Rev., (1987) 95.177.
11. Fitch FW. McKisic MD. Lancki DW. Gajewski TF.: Annu. Rev. Immunol., (1993) 11. 29.
12. Springer TA. Davignon D. Ho MK. Kurzinger K. Martz E. Sanchez-Madrid F.: Immunol. Rev., (1982) 68. 171.
13. Beutler B. Cerami A.: Annu. Rev. Biochem., (1988) 57. 505.
14. 久恒辰博: (1993) 東京大学農芸化学博士論文
15. Hisatsune T. Enomoto A. Nishijima K. Minai Y. Asano Y. Tada T. Kaminogawa S.: J. Immunol., (1990) 145. 2421.
16. Rosenberg SA. Spiess PJ. Schwarz S.: J. Immunol., (1978) 121.1946.
17. Watson J. Aarden LA. Lefkovits I.: J. Immunol., (1979) 123. 2928.
18. Yokota T. Otsuka T. Mosmann T. Banchereau J. DeFrance T. Blanchard D. De Vries JE. Lee F. Arai K.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., (1986) 83. 2061.
19. Renauld JC. Houssiau F. Louahed J. Vink A. Van Snick J. Uyttenhove C.: Adv. Immunol., (1993) 54. 79.
20. Zittle CA. Cerbulis J. Pepper L. Della Monica ES.: J. Dairy Sci., (1959) 42. 1897.

21. Moriya N. Kato K. Suzuki N. Yamada T. Nishimura O.: J. Immunoassay, (1987) 8. 131.
22. Gillis S. Ferm MM. Ou W. Smith KA.: J. Immunol., (1978) 120. 2027.
23. Krug MS. Berger SL.: Methods Enzymol., (1987) 152. 316.
24. Murray LJ. Lee R. Martens C.: Eur. J. Immunol., (1990) 20. 163.
25. Yee GK. Levy JG. Kripke ML. Ullrich SE.: Cell. Immunol., (1990) 126. 255.
26. Kitamura K. Nakauchi H. Koyasu S. Yahara I. Okumura K. Tada T.: J. Immunol., (1984) 133. 1371.
27. Fitch FW. McKisic MD. Lancki DW. Gajewski TF.: Annu. Rev. Immunol., (1993) 11. 29.
28. Young CW. Hodos S.: Science, (1964) 146. 1172.
29. Usui T. Yoshida M. Abe K. Osada H. Isono K. Beppu T.: J. Cell Biol., (1991) 115. 1275.
30. Sokawa Y. Watanabe Y. Kawade Y.: Nature, (1977) 268. 236.
31. Darzynkiewicz Z. Williamson B. Carswell EA.: Cancer Res., (1984) 44. 83.
32. Kronke M. Schluter C. Pfizenmaier K.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., (1987) 84. 4693.
33. Gajewski TF. Fitch FW.: (1988) 140. 4193.
34. Niitsu Y. Watanabe N. Neda H.: Cancer Res., (1988) 48. 5407.
35. Shevach EM.: Ann. Rev. Immunol., (1985) 3. 397.
36. Thomson AW.: Immunol. Today, (1989) 10. 6.
37. Blackstock R. Zembala M. Asherson GL.: Cell. immunol., (1991) 136. 435.
38. Steele JK. Domingo R. Gomi H. Ishizaka K.: J. Immunol., (1992) 148. 2834.
39. Blackstock R. Zembala M. Asherson GL.: Cell. immunol., (1991) 136. 435.
40. Derynck R. Jarrett JA. Chen EY. Eaton DH. Bell JR. Assoian RK. Roberts AB. Sporn MB. Goeddel DV.: Nature, (1985) 316.701.
41. Miyazono K. Hewlsin CH.: Latent of TGF- β , Chiba Foundation Symposium 157, (1991) Wiley J. and Sons C.ed. 81
42. Moore KW. Vieira P. Fiorentino DF. Trounstein ML. Khan TA. Mosmann TR.: Science, (1990) 248.1230.
43. Clevers H. Alarcon B. Wileman T. Terhorst C.: Ann. Rev. Immunol., (1988) 6:629-62.

44. Leo O. Foo M. Sachs DH. Samelson LE. Bluestone JA.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, (1987) 84. 1374.
45. Mercep M. Bluestone JA. Noguchi PD. Ashwell JD.: *J. Immunol.*, (1988) 140(1).324.
46. Laemmli UK.: *Nature*, (1970) 227. 680.
47. Stark GR. Dower WJ. Schimke RT. Brown RE. Kerr IM.: *Nature*, (1979) 278. 471.
48. Smekens-Etienne M. Goldstein J. Ooms HA. Dumont JE.: *Eur. J. Biochem.*, (1983) 130. 269.
49. Fontana A. Constan DB. Frei K. Malipiero U. Pfister HW.: *International Archives of Allergy & Immunology*, (1992) 99.1.
50. Fiorentino DF. Bond MW. Mosmann TR.: *J. Exp. Med.*, (1989) 170. 2081.
51. MacNeil IA. Suda T. Moore KW. Mosmann TR. Zlotnik A.: *J. Immunol.*, (1990) 145. 4167.
52. Go NF. Castle BE. Barrett R. Kastelein R. Dang W. Mosmann TR. Moore KW. Howard M.: *J. Exp. Med.*, (1990) 172. 1625.
53. Thompson-Snipes L. Dhar V. Bond MW. Mosmann TR. Moore KW. Rennick DM.: *J. Exp. Med.*, (1991) 173. 507.
54. Farrar MA. Schreiber RD.: *Annu. Rev. of Immunol.*, (1993) 11. 571.
55. Jones EY.: *Crystal structure of TNF. Tumor Necrosis Factors* (ed. by Affarwal BB. and Vilcek J.), (1992) Marcel Dekker, New York. 93.
56. Inoue T. Asano Y. Matsuoka S. Furutani-Seiki M. Aizawa S. Nishimura H. Shirai T. Tada T.: *J. Immunol.*, (1993) 150. 2121.
57. Moore KW. O'Garra A. De Waal MR. Vieira P. Mosmann TR.: *Annu. Rev. Immunol.*, (1993) 11.165.
58. Romagnani S.: *Immunol. Today*, (1992) 13. 379.
59. De Waal MR. Abrams J. Bennett B. Figdor CG. De Vries JE.: *J. Exp. Med.*, (1991) 174. 1209.
60. Linsley PS. Greene JL. Tan P. Bradshaw J. Ledbetter JA. Anasetti C. Damle NK.: *J. Exp. Med.*, (1992) 176. 1595.
61. Linsley PS. Brady W. Grosmaire L. Aruffo A. Damle NK. Ledbetter JA. Institution: *J. Exp. Med.*, (1991) 173. 721.

62. Fiorentino DF. Zlotnik A. Vieira P. Mosmann TR. Howard M. Moore KW.:
O'Garra A. *Journal of Immunology*, (1991) 146. 3444.
63. Fiorentino DF. Zlotnik A. Mosmann TR. Howard M. O'Garra A.: J.
Immunol., (1991) 147. 3815.
64. Suda T. O'Garra A. MacNeil I. Fischer M. Bond MW. Zlotnik A.
Institution: Cell. Immunol., (1990) 129. 228.
65. Chen WF. Zlotnik A.: *J. Immunol.*, (1991) 147. 528.
66. Hirano T. Matsuda T. Turner M. Miyasaka N. Buchan G. Tang B. Sato K.
Shimizu M. Maini R. Feldmann M.: *Eur. J. Immunol.*, (1988) 18. 1797.
67. Davis MM. Bjorkman PJ.: *Nature*, (1988) 334. 395.
68. Gotoh Y. Moriyama K. Matsuda S. Okumura E. Kishimoto T. Kawasaki H.
Suzuki K. Yahara I. Sakai H. Nishida E.: *EMBO J.*, (1991) 10. 2661.
69. Koretzky GA. Picus J. Thomas ML. Weiss A.: *Cell*, (1991) 64. 875.
70. Samelson LE. Phillips AF. Luong ET. Klausner RD.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*,
(1990) 87. 4358.
71. Jain J. McCaffrey PG. Valge-Archer VE. Rao A.: *Nature*, (1992) 356. 801.
72. Liu J. Farmer JD Jr. Lane WS. Friedman J. Weissman I. Schreiber SL.: *Cell*,
(1991) 66. 807.
73. Smith KA.: *Science*, (1988) 240. 1169.
74. Minami Y. Kono T. Yamada K. Kobayashi N. Kawahara A. Perlmutter RM.
Taniguchi T.: *EMBO J.*, (1993) 12. 759.
75. Jekky RB.: *Science*, (1985) 230. 25.
76. Steiner DF. Chikago MD.: *Diabetes*, (1977) 26. 322.
77. Sakata T. Iwagami S. Tsuruta Y. Teraoka H. Tatsumi Y. Kita Y. Nishikawa S. Takai
Y. Fujiwara H.: *J. Leukocyte. Biol.*, (1990) 48. 205.
78. De Waal MR. Abrams J. Bennett B. Figdor CG. De Vries JE.: *J. Exp. Med.*,
(1991) 174. 1209.
79. Ralph P. Nakoins I. Sampson-Johannes A. Fong S. Lowe D. Min HY. Lin
L.: *J. Immunol.*, (1992) 148. 808.
80. Farrar WL. Johnson HM. Farrar JJ.: *J. Immunol.*, (1981) 126. 1120.
81. Harris DT. Kozumbo WJ. Cerutti P. Cerottini J.: *J. Immunol.*, (1987) 138. 600.
82. 柳田充弘編.: 細胞周期の制御とメカニズム, (1992) 実験医学増刊 1026

83. Parish CR.: *Transplant. Rev.*, (1972) 13. 35.
84. Katura Y.: *Immunology*, (1977) 32. 227.
85. Miyatake S. Shlomai J. Arai K. Arai N.: *Mol. Cell. Biol.*, (1991) 11. 5894.
86. Abe E. De Waal Malefyt R. Matsuda I. Arai K. Arai N.: *Proc.Natl. Acad.Sci. U.S.A.*, (1992) 89. 2864.
87. Lichtman AH. Abbas A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, (1988) 85. 9699.
88. Betz M. Fox BS.: *J. Immunol.*, (1991) 146. 108.
89. Novak TJ. Rothenberg EV.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, (1990) 87. 9353.
90. Munoz E. Zubiaga AM. Merrow M. Sauter NP. Huber BT.: *J. Exp. Med.*, (1990) 172. 95.
92. Gajewski TF. Schell SR. Fitch FW.: *J. Immunol.*, (1990) 144. 4110.
93. Yssel H. De Waal MR. Roncarolo MG. Abrams JS. Lahesmaa R. Spits H. de Vries JE.: *J. Immunol.*, (1992) 149. 2378.
94. Rappaport RS. Dodge GR.: *J. Exp. Med.*, (1982) 155. 943.
95. Sawadogo M. Sentenac A.: *Annu. Rev. Biochem.*, (1990) 59. 711.
96. Johnson PF. McKnight SL.: *Annu. Rev. Biochem.*, (1989) 58. 227.
97. Lenardo MJ. Fan CM. Maniatis T. Baltimore D.: *Cell*, (1989) 58. 227.
98. Tsuboi A. Sugimoto K. Yodoi J. Miyatake S. Arai K. Arai N.: *Int. Immunol.*, (1991) 3. 807.
99. Gafewsky TF. Pinna M. Wong T. Fitch FW.: *J. Immunol.*, (1991) 146. 1750.
100. Pfeiffer C. Murray J. Madri J. Bottomly K.: *Immunol. Rev.*, (1991) 123. 65.
101. Gros LG. Ben-Sasson SZ. Seder R. Finkelman FD. Paul WE.: *J. Exp. Med.*, (1990) 172. 921.
102. Tanaka T. Hu-Li J. Seder RA. de St. Groth BF. Paul WE.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, (1993) 90. 5914.
103. Macatonia SE. O'Garra A. Murphy KM. et al.: *Int. Immunol.*, (1993) 5. 371.
104. Hsieh CS. Macatonia SE. Tripp CS. Wolf SF. O'Garra A. Murphy KM.: *Science*, (1993) 260. 496.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始暖かい激励と懇切なる御指導を賜った東京大学農学部農芸化学科畜産物利用学研究室の上野川修一教授に心より深く感謝の意を表します。また研究全般を通じ、いつも思いもつかぬ視点でご指導を頂きました当研究室の飴谷章夫助教授に深く感謝致します。本研究の最初より、毎日親身になって実験のご指導を頂くと同時に暖かく、時には厳しく様々な助言をしてくださいました久恒辰博助手に心から深く感謝致します。また常に鋭いご指摘をして下さいました現群馬大学工学部榎本淳博士に感謝します。本実験の要である細胞の大量培養をはじめ、多大にお世話になった武田薬品工業の志甫理博士に心より感謝致します。

免疫学について御指導頂いた東京大学医学部免疫学教室多田富雄教授ならびに浅野喜博助教授に感謝致します。またサイトカインの発現について多くの貴重な助言を頂いた東京大学医科学研究所分子生物学部門新井賢一教授ならびに横田崇助教授に心から感謝します。サイトカインの測定などの実験法を親切に教えて頂いた東京工業大学生命理工学部細胞工学講座片岡孝夫助手に感謝いたします。

本研究を進めるに当たり、生活一般を含めご協力頂いた当研究室の八村敏志助手、戸塚護助手、そして本研究の当初よりよき相談相手となりいつもお世話になった西島謙一君に感謝いたします。また実験と一緒に行った後藤真生君をはじめとした畜産物利用学研究室の皆様にも心から感謝します。本当にありがとうございました。

1994年3月

薬袋 裕二

