

平成 21 年 6 月 9 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790695

研究課題名 (和文) Th1/Th2 細胞分化におけるケモカイン CCL21、CCL19 の役割の解析

研究課題名 (英文) CCL21/CCL19 chemokines play a role in cell differentiation of Th1/Th2 cells

研究代表者

田中 ゆり子 (TANAKA YURIKO)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：40396685

研究成果の概要：本研究では、ケモカイン CCL21-ser と CCL19 の発現を欠く突然変異マウス (plt) を用いて、ヘルパー T 細胞の分化誘導における CCL19、CCL21 の関与を検討した。Th1 タイプの反応を優位に誘導するアジュバントを用いた免疫でも、抗原の種類によっては、plt マウスで Th1 タイプの反応が抑制されることが示唆された。また、plt マウスでは IL-17 の産生低下も認められ、CCL19、CCL21 は Th1、Th2、Th17 などのヘルパー T 細胞の分化誘導に重要な役割を担っていることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー・感染症内科学

キーワード：免疫学・ケモカイン・Th1・Th2

1. 研究開始当初の背景

病原微生物やアレルゲンなどの抗原が生体内に侵入すると皮膚や組織内にある抗原提示細胞が局所で抗原を取り込み、二次リンパ組織へと移動し、ナイーブ T 細胞に抗原を提示して抗原特異的な T 細胞の反応を惹起する。この時誘導されるヘルパー T 細胞は、主に IL-2、IFN- γ を産生する Th1 タイプと、主に IL-4、IL-5、IL-6、IL-13 を産生する Th2 タイプのサブセットに分類される。Th1 細胞は細胞性免疫を誘導し、細胞内感染病原体の排除に重要であるのに対し、Th2 細胞は体液性免疫を誘導し細胞外感染病原体の排除などの免疫反応を担うことが知られている。Th1 細胞と Th2 細胞は互いにバランスを取り

ながら生体防御において中心的な役割を担っているが、自己免疫疾患やアレルギーなどでは、Th1/Th2 バランスの偏りが認められており、これらの発症や病態形成に少なからず関与していることが推測されている。

末梢の二次リンパ組織における Th1、Th2 タイプの免疫応答の誘導機構の研究は、これまで数多く行なわれているが未だに不明の点が多い。近年、末梢のリンパ節で樹状細胞などの抗原提示細胞が、ナイーブな T 細胞に抗原提示をする際、ケモカイン CCL21 が存在すると、Th1 タイプの T 細胞に分化するという報告があり、抗原-T 細胞レセプターからの主なシグナルと、ケモカイン-ケモカインレセプターからの補助的なシグナルも Th1/Th2

細胞分化への重要な因子である可能性が示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究ではケモカイン CCL21-ser (SLC-ser) と CCL19 の発現を欠損する突然変異マウス (plt mouse : paucity of lymph node T cell mouse) と野生型マウスに免疫する免疫抗原の違いによる、所属リンパ節での T 細胞免疫応答の変化についてそのメカニズムを解析し、Th1 細胞と Th2 細胞の分化誘導における、ケモカイン CCL21、CCL19 の関与を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウスと免疫方法 : BALB/c または C57BL/6 バックグラウンドの plt マウスと、各々の野生型マウスの皮下に、ニワトリ卵白アルブミン (OVA)、OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチド、ニワトリ卵白リゾチーム (HEL)、HEL₇₄₋₉₆ ペプチド、ミエリンオリゴデンドロサイトグリコプロテイン (MOG₃₅₋₅₅) ペプチド、ミエリンベースックプロテイン (MBP₁₋₁₁) ペプチド、アセチルコリン受容体 (ACR₁₄₆₋₁₆₂) ペプチド、プロテオリピッドプロテイン (PLP₁₇₈₋₁₉₁) ペプチドを完全フロイントアジュバント (CFA) と共に免疫した。

(2) 抗原特異的 T 細胞の反応性の測定 : 免疫後、マウスの所属リンパ節又は脾臓を採取し、それぞれの細胞浮遊液を調整後、試験管内で同一抗原を用いて再刺激を行なった。抗原に反応する抗原特異的 T 細胞の増殖は³H-チミジンの取り込みにより、また培養上清中の IL-2、IFN-g、IL-4、IL-10 などのサイトカイン量は ELISA 法で調べた。リアルタイム RT-PCR 法を用いたサイトカインの mRNA の定量を行ない転写レベルでの解析を行なった。Th1 細胞、Th2 細胞の同定は、CD4 陽性、CD8 陽性細胞を各抗体で染色した後、抗 IFN-g 抗体と抗 IL-4 抗体を用いて、細胞内サイトカイン染色を行ない、フローサイトメーターで解析した。

(3) 樹状細胞の抗原提示機能解析 : 免疫後、抗原が免疫局所から所属リンパ節へ運ばれて行く効率を測定した。蛍光標識した抗原をマウスに免疫後、所属リンパ節や脾臓に存在する蛍光標識抗原を取り込んだ樹状細胞を、樹状細胞表面抗原に特異的な抗体を用いてフローサイトメーターや蛍光顕微鏡で検出した。

(4) T 細胞、樹状細胞の生体内での局在の検討 : T 細胞、樹状細胞が生体内でどこに局在し、どこで相互に作用し合うのかを調べるために、免疫後にリンパ節、脾臓などの各組

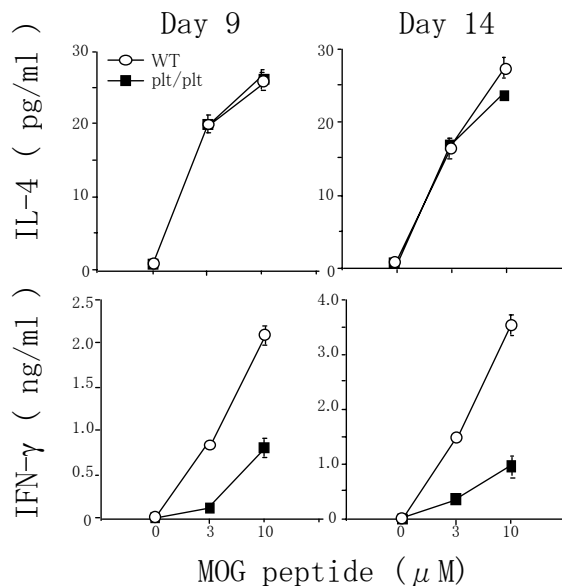
織を採取し、凍結切片を作成して蛍光抗体で多重染色した。染色した組織は共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察し、抗原刺激前後での移動の変化を検討した。

(5) 実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) 発症の検討 : C57BL/6 マウスの皮下に MOG₃₅₋₅₅ を CFA アジュバントと共に免疫し、免疫 0 日目、免疫後 2 日目に、pertussis toxin を静脈注射した。EAE の発症の程度は、0-5 段階の症状のスコアに従って分類した。

4. 研究成果

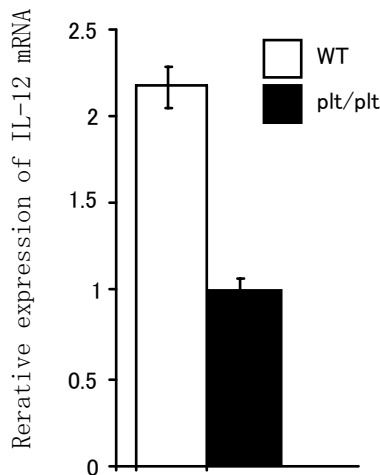
(1) C57BL/6 マウスに、MOG₃₅₋₅₅、OVA、OVA₃₂₃₋₃₃₉、HEL₇₄₋₉₆、MBP₁₋₁₁、ACR₁₄₆₋₁₆₂、PLP₁₇₈₋₁₉₁ を CFA アジュバントと共に皮下免疫し、免疫後 9 日目に所属リンパ節細胞を採取し in vitro で再度抗原刺激を行なった。その培養上清中の IFN-g 量を調べたところ、MOG ペプチドまたは MBP ペプチド免疫時に plt マウスでの IFN-g 産生が抑制されていた。

(2) MOG ペプチドを免疫したときの反応について、より詳しく解析をするため、(1) と同様の免疫をして、免疫後 9 日目、14 日目に in vitro でリンパ節細胞を抗原刺激し、サイトカイン産生を調べた。IFN-g 産生は免疫後 14 日目でも plt マウスでは抑制していた。しかし、IL-4 産生は野生型と plt マウスでの差は認められなかった。野生型マウスに CFA アジュバントで抗原を免疫すると、細胞性免疫が誘導され、IFN-g を産生する Th1 細胞が優位に誘導されと考えられているが、plt マウスでは、CFA をアジュバントに用いた免疫でも、用いる抗原によっては Th1 タイプのサイトカイン産生が抑制され、IL-4 つまり、Th2 タイプのサイトカイン産生が優位になるという興味深い結果が得られた。

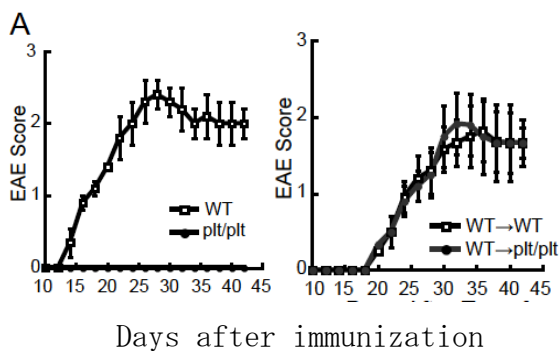


(3) マウスの皮下に免疫した抗原の動態について調べた。野生型、plt マウス共に、皮下に免疫した抗原は、所属リンパ節で CD11c 陽性、CD11b 陽性細胞に取り込まれ、その細胞内では、抗原が分解されていることが示唆された。また、plt マウスの所属リンパ節では、野生型に比べて CD11c 陽性、CD11b 陽性、Gr1 陽性細胞の頻度が高かった。

(4) IFN-g を産生する Th1 細胞を誘導するサイトカイン IL-12 の mRNA 発現について調べた。MOG ペプチドを免疫したマウスの所属リンパ節細胞での IL-12 mRNA の発現は、野生型に比べて plt マウスで優位に低下していた。また IL-12 産生も、同様に plt マウスでは低下していた。



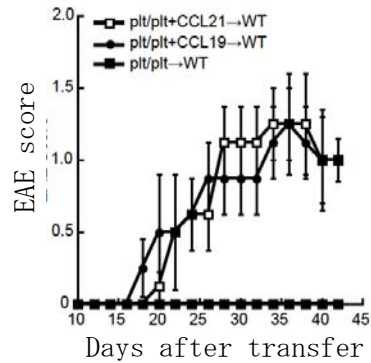
(5) MOG ペプチドは、Th1 タイプの反応によって発症する、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を発症させる抗原として実験に用いられている。C57BL/6 マウスに MOG ペプチド/CFA を皮下免疫し、pertussis toxin を静脈注射すると、野生型では EAE が発症したが、plt マウスでは全く発症しなかった。ところが、EAE を発症した野生型の T 細胞を plt マウスに移入すると野生型と同様に発症した。



(6) plt マウスで EAE が発症しないのは、ケモカイン CCL21、CCL19 の欠損によるもの

であるのかを検討した。

plt マウスに MOG ペプチドを、EAE を発症させる条件で免疫し、免疫後 9 日目に所属リンパ節細胞を取り出し、in vitro で CCL21 又は CCL19 存在下で抗原刺激した。抗原刺激後の細胞を野生型マウスに再度移入すると、このマウスは EAE を発症した。



(7) EAE を発症した野生型マウスの T 細胞機能についてさらに検討した。EAE を発症した野生型マウスの T 細胞は、サイトカイン IL-17 を産生していた。しかし、EAE を発症しない plt マウスでは、IL-17 産生は認められなかった。この plt マウスのリンパ節細胞を in vitro で、CCL21 存在下で培養すると、IL-17 や、その産生細胞である Th17 の誘導と維持に必要なサイトカイン IL-23 を産生した。したがって、CCL21、CCL19 は Th1、Th2、Th17 などのヘルパー T 細胞の分化誘導においても重要な役割を話していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Horiguchi S, Tanaka Y, Uchida T, Chazono H, Ookawa T, Sakurai D, Okamoto Y. Seasonal changes in antigen-specific T-helper clone sizes in patients with Japanese cedar pollonosis: a 2-year study. Clin Exp Allergy 38:405-412. (2008) 査読有

[学会発表] (計 7 件)

① 田中ゆり子、石川文雄、桑原卓、垣内史堂 CCL19/CCL21 chemokines play a role in initiating immune response in the draining lymph node. 第 38 回 日本免疫学会総会・学術集会 2008, 12 京都

② 石川文雄、桑原卓、田中ゆり子、岡田弥生、垣内史堂 気道過敏症マウスへのエタノール吸入の影響 第 38 回 日本免疫学会総会・学術集会 2008, 12 京都

- ③ 桑原卓、石川文雄、田中ゆり子、岡田弥生、垣内史堂 実験的自己免疫性脳脊髄炎におけるケモカインCCL19 とCCL21 の役割 第38回 日本免疫学会総会・学術集会 2008, 12 京都
- ④ 種市麻衣子、田中ゆり子、垣内史堂、内田哲也 リポソーム結合CTLエпитープペプチドはCD4 陽性ヘルパーT細胞に非依存的にCD8 陽性メモリーT細胞を誘導・維持する 第38回 日本免疫学会総会・学術集会 2008, 12 京都
- ⑤ 田中ゆり子、種市麻衣子、笠井道之、垣内史堂、内田哲也 不飽和脂肪酸からなるリポソームの表面に結合した抗原により誘導されるクロスプレゼンテーションの機序 第37回 日本免疫学会総会・学術集会 2007, 12 東京
- ⑥ 種市麻衣子、田中ゆり子、垣内史堂、内田哲也 リンパ節指向型ペプチドはリポソーム結合抗原に対する免疫応答を顕著に増強する 第37回 日本免疫学会総会・学術集会 2007, 12 東京
- ⑦ 石川文雄、桑原卓、田中ゆり子、岡田弥生、垣内史堂 気道過敏症マウスへのエタノール吸入の影響 第37回 日本免疫学会総会・学術集会 2007, 12 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 ゆり子 (TANAKA YURIKO)
東邦大学・医学部・助教
研究者番号：40396685

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし