

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790963

研究課題名(和文) 体液性免疫または細胞性免疫応答の初期誘導と維持におけるケモカインの役割の解析

研究課題名(英文) The roles for chemokines in induction and maintenance of humoral immunity or cell-mediated immunity

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(和文)：野生型マウスにニワトリ卵白アルブミン(OVA)をアジュバントと共に皮下免疫すると、抗原特異的な抗体産生細胞や細胞障害性T細胞(CTL)が誘導される。ケモカインCCL19とCCL21-serの発現を欠損する突然変異マウス(plt)では、野生型マウスに比べて抗体産生能が増強していた。一方、抗原特異的CTLはpltでは誘導が抑制されていた。以上の結果より、ケモカインCCL19とCCL21は抗原特異的T細胞の初期免疫応答と、メモリー細胞誘導の制御に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The roles for chemokines CCL19 and CCL21 in induction of humoral immunity or cell-mediated immunity were investigated using plt mutant mice, which lack expression of CCL19 and CCL21-ser in their lymphoid organs. When the mice were immunized with ovalbumin(OVA) in adjuvant, the amount of anti-OVA IgG in serum was higher in plt mice as compared to BALB/c WT mice. However, the antigen specific CTL induction inhibited in plt mice. These findings indicate that CCL19 and CCL21 induce prompt antibody responses to antigen, and regulate T cell responses in vivo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：ケモカイン・細胞性免疫・体液性免疫

## 1. 研究開始当初の背景

生体の免疫反応で重要な作用の一つは、病原微生物やウイルスによる感染症から身を守ることである。免疫反応の主役を担うリンパ球には、抗体を産生するB細胞と、抗体産生を含めた様々な免疫応答を調節するT細胞がある。抗体は体液中に入った微生物などの異物に結合する。それが標識となり、マクロファージなどの食細胞がより効率よく異物

を排除し感染を防御する(体液性免疫応答)。しかし、細胞内に入り込んだ細胞内寄生性の微生物やウイルスには抗体では効果がない。その場合は細胞障害性T細胞(CTL)が、感染細胞を直接攻撃し感染の拡大を防ぐ(細胞性免疫応答)。このように、両者は役割を分担して生体の防御機構をより完全なものにしている。体液性免疫、細胞性免疫応答ともに、二次リンパ組織におけるナイーブT細胞のプ

ライミングは重要なポイントになる。生体内へ侵入した抗原を取りこんだ樹状細胞と、胸腺で作られたナイーブT細胞はそれぞれ、リンパ流または血流を介してリンパ節内へ入る。この時の細胞遊走に関わっているのが、細胞表面に発現するレセプターCCR7とそのリガンドのケモカインCCL19、CCL21である。ケモカイン-ケモカインレセプターの反応によりリンパ節へホーミングした樹状細胞は、ナイーブT細胞に抗原提示を行ないT細胞のプライミングが成立する。これまで、ケモカインは細胞走化因子としての働きがよく調べられてきた。近年はそれ以外にも免疫反応を制御する働きを持つ事も報告されているが未だ不明の点は多い(J. Immunol. 179:6485-6493, 2007)。我々が見いだしたpltマウスは、ケモカインCCL19とCCL21-ser(SLC-ser)の発現を欠き、樹状細胞やT細胞のリンパ節への遊走と局在に異常が認められる(Blood 91:2886-2895, 1998, J. Exp. Med. 189:451-460, 1999)。しかし、樹状細胞とT細胞はリンパ節辺縁洞や脾臓周辺帯の一部に集積して接触し、免疫応答を惹起でき、特にCD4陽性T細胞の反応は野生型マウスに比べて増強・遷延する(J. Exp. Med. 193:207-217, 2001)。これらの結果もケモカインが単に走化因子として作用するだけではなく、免疫反応をも制御するという説を支持していた。そこで、近年我々が開発した抗原特異的なCD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞が誘導できるリポソームアジュバント(J. Immunol. 177:2324-2330, 2006)を用いて、体液性免疫応答や細胞性免疫応答の誘導や維持におけるケモカインの役割の解析をおこなった。

## 2. 研究の目的

本研究ではニワトリ卵白アルブミン(OVA)または、OVAペプチドを免疫した野生型マウス、ケモカインCCL21-ser(SLC-ser)とCCL19(ELC)の発現を欠損する突然変異マウス(plt mouse: paucity of lymph node T cell mouse)、CCR7ノックアウトマウスでの免疫反応を比較し体液性免疫応答と細胞性免疫応答の初期誘導と維持における、ケモカインCCL19またはCCL21の役割を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 免疫するマウスと抗原・免疫方法：  
BALB/cマウスまたはC57BL/6マウス、CCR7<sup>-/-</sup>マウスに、liposome-OVA、liposome-OVAペプチド(OVA<sub>257-264</sub>:H-2<sup>b</sup>拘束性)、complete Freund's adjuvant-OVA(CFA-OVA)、Alum-OVAを皮下免疫する。なおBALB/c-plt、C57BL/6-pltマウスは、東邦大学医学部実験動物センターで自家繁殖して用いた。アジュ

バントに用いるリポソームの組成は、Distearoyl Phosphatidyl Choline(DSPC):Distearoyl Phosphatidyl Ethanolamine(DSPE):Distearoyl Phosphatidyl Glycerol(DSPG):Cholesterol = 4:3:2:7。本研究では下線部分をオレイン酸(不飽和脂肪酸)に変えた組成のリポソームを準備し、架橋剤グルタルアルデヒドを用いてOVA(ペプチド)抗原と架橋した。

(2) 二次リンパ組織での抗体産生細胞と血清中抗体の検出：

二次リンパ組織へ抗原を輸送した樹状細胞が機能的にナイーブT細胞をプライミングすることにより、B細胞が抗体産生細胞へ分化できているかを調べる。免疫後のマウス二次リンパ組織中の抗OVA抗体産生細胞をELISAPOT法で検出する。また、全身性の反応は、血清中の抗OVA抗体をELISA法で検出し判定する。

(3) 生体内CTL活性の測定：

CTLの誘導にケモカイン-ケモカインレセプターの刺激の有無が影響を及ぼすか調べる。liposome-OVAペプチド免疫後のマウスに、強く蛍光標識してOVAペプチドで抗原パルスしたマウス脾臓細胞と、弱く蛍光標識しただけのマウス脾臓細胞を1:1の割合で混合して静注する。静注後、liposome-OVAペプチド免疫マウスの脾臓を取り出し、フローサイトメーターで脾臓中の蛍光標識細胞を解析する。CTL活性はペプチドパルスした標的細胞の減少で評価する。さらに、機能的なCTLの誘導においてCD4陽性T細胞由来の補助的なシグナルの必要性に関する検討は、同一のリポソーム表面にOVA<sub>257-264</sub>、OVA<sub>323-339</sub>ペプチドを結合させた抗原を用いて免疫をし、CTL活性を調べ判定した。

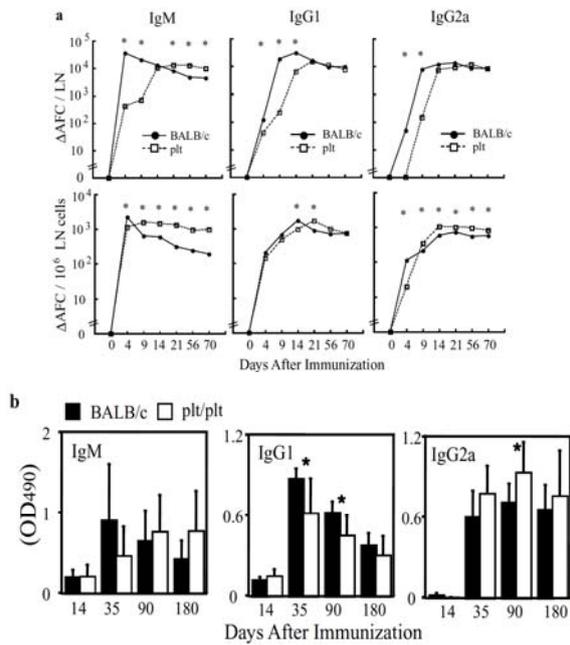
(4) 抗原特異的T細胞の反応性の測定：

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<sup>3</sup>H-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。

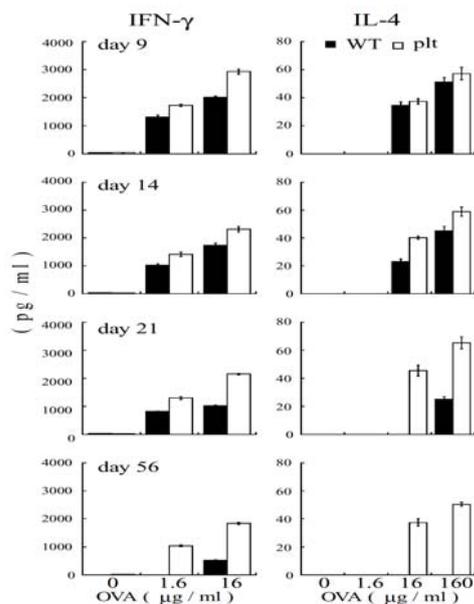
## 4. 研究成果

(1) 抗体産生の誘導にケモカイン-ケモカインレセプターの刺激の有無が影響を及ぼすか調べた。BALB/cマウスにOVAまたはliposome-OVAまたはCFA-OVAを皮下免疫後、

所属リンパ節中のOVAに対する抗体産生細胞をELISPOT法で検出すると、野生型に比べpltではリンパ節あたりの抗OVA抗体産生細胞数が多く検出された(a)。また血清中の抗体価もpltで増強が認められた(b)。



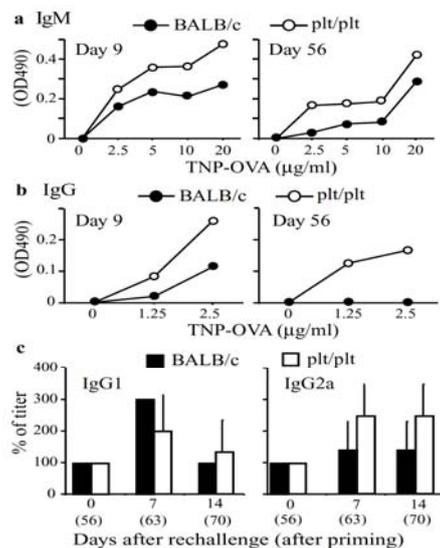
(2) 抗体産生細胞の成熟に必要なサイトカインについてしらべた。IgG2a産生に関与するTh1タイプのサイトカインインターフェロンγ(IFNγ)と、IgG1産生に関与するTh2サイトカインIL-4を測定した。IFNγ、IL-4共に野生型よりもpltで高い産生が認められ、その産生は免疫56日後でも持続していた。



(3) リンパ節中でB細胞が抗体産生細胞に成熟する時には、ヘルパーT細胞からの補助的なシグナルが必要となる。Ex vivoの培養

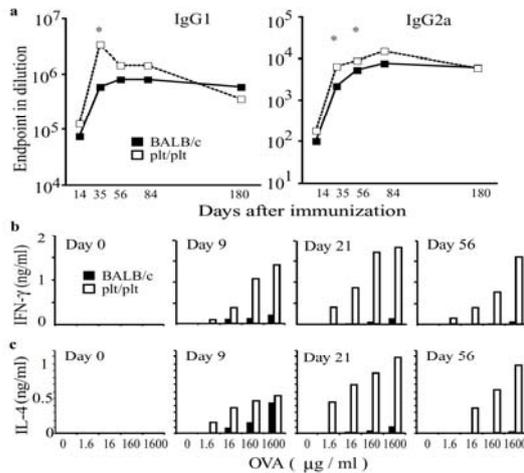
系で抗体産生反応におけるヘルパーT細胞機能を測定した。トリニトロフェニル(TNP)ハプテンを結合させたヒトイムノグロブリン/CFA免疫マウスの脾臓由来のB細胞と、OVA/CFA免疫マウスのリンパ節由来ヘルパーT細胞をそれぞれ分離し、TNP-OVA存在下で共培養し、培養上清中に産生される抗TNP抗体量を測定した。免疫後9日後のplt由来のT細胞を用いた場合、野生型に比べてIgM、IgGともに産生量が増加した。また免疫後56日後のT細胞では、IgM産生は、免疫後9日後と同様にplt由来のT細胞を加えた場合に抗体産生が高く、IgGでは、plt由来のT細胞を加えた場合にのみ抗体産生が検出され、野生型由来のT細胞を加えた場合では抗体産生は検出されなかった。したがって、これらの結果より、pltマウスの由来のヘルパーT細胞は、野生型に比べ、抗体産生反応を増強することが示唆された。(a, b)

次に、二次免疫反応における抗体産生について調べた。マウスにOVA/CFAを免疫し8週後、再度同じOVA抗原を追加免疫した後から、1週目2週目の血清中抗体価を調べた。野生型、plt共に、IgG1は追加免疫後1週で抗体量が増加し2週目は元のレベルまで低下した。一方、IgG2aは、野生型、pltともに、追加免疫1週目に増加し、その増加は2週目も維持された。しかし、増加量はpltの方が野生型に比べ、追加免疫前よりも約2倍に増加した。(c)

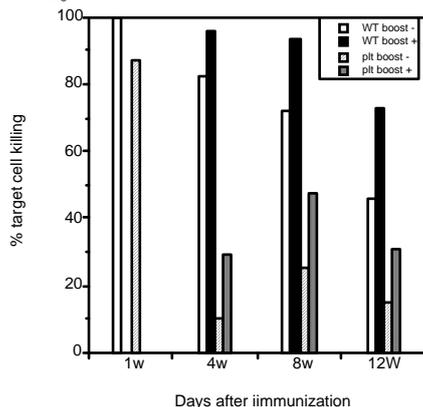


(4) Th2タイプの反応を優位に誘導する、アラムアジュバントを用いて免疫を行ない、血清中抗体価と、所属リンパ節細胞由来のサイトカイン産生を調べた。野生型、plt共にIgG1とIgG2a抗体を産生し、pltでは有意に産生が増加した(a)。リンパ節細胞由来のサ

イトカイン産生は、IFN $\gamma$ 、IL-4 共に plt マウスで増加が認められ、免疫後 56 日後でも持続していた(c)。



(5) CTL の誘導にケモカイン-ケモカインレセプターの刺激の有無が影響を及ぼすかしらべた。マウスに liposome-OVA<sub>323-339</sub> を免疫後 in vivo CTL assay をおこなったところ、野生型に比べ plt では CTL 活性が著しく低下していた。



(6) 以上の結果より、ケモカイン CCL19 と CCL21 は、CFA アジュバント、Alum アジュバントまたは liposome アジュバントを用いた免疫誘導におけるヘルパー T 細胞機能の制御に必要なシグナルをもたらす可能性が示唆された。

## 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 5 件)

- ① Tanaka Y., Taneichi M, Ksai M, Kakiuchi T, Uchida T. Liposome-coupled antigens are internalized by antigen-presenting cells via pinocytosis and cross-presented to CD8 T cells. PLoS One. Vol. 5, issue 12, e15225 (2010) 査読有
- ② Taneichi M, Tanaka Y., Kakiuchi T.

Uchida T. Liposome-coupled peptides induce long-lived memory CD8 T cells without CD4 T cells. PLoS One. Vol. 5, issue 11, e15091 (2010) 査読有

③ Aritomi K, Kuwabara T, Tanaka Y. その他5名、Altered antibody production and helper T cell function in mice lacking chemokines CCL19 and CCL21-Ser. Microbiol Immunol. 54:691-701 (2010) 査読有

④ Kobayashi K, Tanaka Y., Horiguchi S, Yamamoto S, Toshinori N, Sugimoto A, Okamoto Y. The effect of radiotherapy on NKT cells in patients with advanced head and neck cancer. Cancer Immunol Immunother. 59: 1503-1509 (2010) 査読有

⑤ Kuwabara T, Ishikawa F, Yasuda T, Aritomi K, Nakano H, Tanaka Y., Okada Y, Kakiuchi T. CCR7 ligands are required for development of experimental autoimmune encephalomyelitis through generating IL-23-dependent Th17 cells. Journal of Immunology, 183:2513-2521 (2009) 査読有

[学会発表] (計 4 件)

① 田中ゆり子、桑原卓、石川文雄、垣内史堂、Soluble protein antigen efficiently elicits T cell response without any adjuvant in mutant mice lacking expression of CCL19 and CCL21 (plt mice). 第 14 回 国際免疫学会議 (神戸) 平成 22 年 8 月 22 日

② 田中ゆり子、桑原卓、石川文雄、垣内史堂、Soluble protein antigen alone efficiently elicits T cell response in mutant mice lacking expression of CCL19 and CCL21 (plt mice). 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪) 平成 21 年 12 月 3 日

③ 桑原卓、石川文雄、田中ゆり子、垣内史堂、CCR7 ligands up-regulate IL-23 through PI3-kinase and NF- $\kappa$ B pathway in dendritic cells. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪) 平成 21 年 12 月 3 日

④ 石川文雄、桑原卓、田中ゆり子、山下直美、垣内史堂、Acute ethanol inhalation down-regulates IL12 production by dendritic cells and enhances Th2 polarization. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪) 平成 21 年 12 月 2 日

## 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

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし