

氏 名 (本 籍) 藤 本 徳 毅 (兵庫県)

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 博 士 第 4 6 3 号

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当

学 位 授 与 年 月 日 平 成 1 6 年 3 月 2 5 日

学 位 論 文 題 目 Quantities of interleukin-12p40 in mature CD8 $\alpha$  negative dendritic cells  
correlate with strength of TCR signal and determine Th cell development  
(成熟型CD8 $\alpha$ 陰性樹状細胞のインターロイキン 12p40 産生量はT細胞レセ  
プターシグナルの強さと相関し、ヘルパーT細胞の分化を決定する)

審 査 委 員 主 査 教 授 瀬 戸 昭

副 査 教 授 松 田 昌 之

副 査 教 授 陣 内 皓 之 祐

## 論文内容要旨

*整理番号	465	(よりがな) 氏 名	ふじもと のりき 藤本 徳毅
学位論文題目	Quantities of interleukin-12p40 in mature CD8 $\alpha$ negative dendritic cells correlate with strength of TCR signal and determine Th cell development (成熟型 CD8 $\alpha$ 陰性樹状細胞のインターロイキン 12p40 産生量は T 細胞レセプターシグナルの強さと相関し、ヘルパー T 細胞の分化を決定する)		
<p>【研究の目的】</p> <p><i>in vitro</i> において、マウスヘルパー T 細胞は高濃度の抗原を認識すると Th1 に、低濃度の抗原を認識すると Th2 に分化することが知られている。脾臓細胞の中で、ナイーブ CD4 T 細胞に抗原提示する細胞としては CD8<math>\alpha</math> 陽性樹状細胞と CD8<math>\alpha</math> 陰性樹状細胞が重要であると言われている。そこで、ヘルパー T 細胞との相互作用によりインターロイキン 12 (IL-12) を産生するマウス脾臓細胞分画を同定し、その産生量がヘルパー T 細胞の分化に及ぼす影響を解析した。</p> <p>【方法】</p> <p>T 細胞レセプタートランスジェニックマウスのナイーブ CD4 T 細胞を、T 細胞を除去した脾臓細胞及び様々な濃度の抗原ペプチドと共に培養した。5 日目にモノクシンの存在下で再刺激して細胞内のインターフェロン<math>\gamma</math> (IFN-<math>\gamma</math>)、IL-4 を染色し、フローサイトメーターで測定してヘルパー T 細胞の分化を解析した。最初の刺激時に IL-12 を産生する脾臓細胞分画を、細胞表面分子染色とモノクシンを用いた細胞内サイトカイン染色をしてフローサイトメーターで測定することにより同定した。また、脾臓細胞の産生する IL-12 を ELISA で測定した。</p> <p>【結果】</p> <p>高濃度の抗原 (10<math>\mu</math>M) で刺激されたナイーブ CD4 T 細胞は 30%以上が IFN-<math>\gamma</math> 産生細胞に分化し、低濃度の抗原 (0.001<math>\mu</math>M) では IFN-<math>\gamma</math> 産生細胞はほとんど認めず、IL-4 産生細胞を数%認めた。この時、抗 IL-12 抗体を投与して IL-12 を中和すると、IFN-<math>\gamma</math> 産生細胞の比率は大幅に減少するが、完全には阻害されなかった。低濃度の抗原 (0.001<math>\mu</math>M) で刺激した際でも、外から IL-12 を投与すれば IFN-<math>\gamma</math> 産生細胞への分化が見られ、IFN-<math>\gamma</math> 産生細胞の比率は投与した IL-12 の濃度依存性であった。この時、IL-12 は 20p/ml 程度と低濃度でも 20%程の IFN-<math>\gamma</math> 産生細胞を認めた。脾臓細胞の IL-12 産生量は、IL-12p40、IL-12p70 共に抗原濃度依存性であり、IL-12p70 は高濃度の抗原 (10<math>\mu</math>M) を用いた際でも 20pg/ml 程度と低濃度であった。また、抗原提示細胞上の CD40 と T 細胞上の CD40L の結合を阻害する抗 CD40L 抗体を投与すると、IL-12p40、p70 産生量は共に著明に減少した。そこで、脾臓細胞と抗原で</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。  
2. ※印の欄には記入しないこと。

刺激された CD4 T 細胞上に発現する CD40L の発現量をフローサイトメーター測定したところ、抗原濃度依存性であり、低濃度の抗原 ( $0.001 \mu\text{M}$ ) では発現量が非常に低かった。次に高濃度の抗原 ( $10 \mu\text{M}$ ) を認識した CD4 T 細胞との相互作用により IL-12 を産生する脾臓細胞分画を細胞内 IL-12p40 を染色して解析した。脾臓細胞のなかで IL-12p40 が陽性なのは、主に CD11c 陽性細胞であった。CD11c 陽性細胞の中では、CD8 $\alpha$  陰性細胞分画は IL-12p40 陽性細胞が増加していたが、CD8 $\alpha$  陽性細胞分画では増加は見られなかった。コラゲナーゼ D を用いた脾臓細胞を用いた実験でも CD8 $\alpha$  陰性細胞分画のみ IL-12p40 陽性細胞比の増加を認めた。また、種々の抗原濃度を用いて同様の実験を施行し、CD86 と IL-12p40 を染色したところ、IL-12p40 が陽性なのは CD11c 陽性細胞の中でも CD86 の発現が高い集団のみで、IL-12p40 染色の平均蛍光強度は抗原濃度依存性であった。

#### 【考察】

ナイーブ CD4 T 細胞は、抗原濃度が高いと Th1 に分化する。この時、脾臓細胞から産生される IL-12 は  $20\text{pg/ml}$  程度と低濃度ではあるが、IL-12 を中和すると Th1 への分化がかなり阻害された。また、低濃度の抗原を認識しても、 $20\text{pg/ml}$  程度の IL-12 が存在すれば十分に Th1 に分化した。このことから、CD4 T 細胞の Th1 への分化には、T 細胞レセプターシグナルと IL-12 が共に重要であると言える。CD4 T 細胞上の CD40L の発現量は抗原濃度依存性であること、脾臓細胞からの IL-12 産生量も抗原濃度に依存しており、その産生は抗 CD40L 抗体で阻害されることから、IL-12 産生量は T 細胞上の CD40L を介した T 細胞レセプターシグナルの強さに制御されていると言える。また、ナイーブ CD4 T 細胞との相互作用により IL-12 を産生する脾臓細胞分画は、主に成熟型 CD8 $\alpha$  陰性樹状細胞であることが判明した。

#### 【結論】

T 細胞レセプターシグナルと脾臓細胞から産生される低濃度の IL-12 が Th1 への分化を主に決定している。抗原濃度が低いと CD40L の発現が低いために Th1 に分化しないが、低濃度でも IL-12 が存在すれば Th1 に分化できる。また、脾臓細胞の中で、CD4 T 細胞との相互作用により IL-12 を産生するのは、主に CD86 の発現が高く CD8 $\alpha$  陰性の樹状細胞である。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	465	氏名	藤本 徳毅
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>ヘルパー T(Th)細胞の分化における樹状細胞と IL-12 の役割については不明な点が多い。本研究は、Th 細胞との相互作用により IL-12 を産生するマウス脾臓細胞分画を同定し、その IL-12 産生量が Th 細胞の Th1 細胞への分化に及ぼす影響を検討したものである。</p> <p>その結果、以下のことを明らかにした。1) T 細胞レセプターシグナルの強さと、脾臓細胞から産生される IL-12 が Th1 細胞への分化を決定する。2) 低濃度の抗原刺激では、Th 細胞の CD40L の発現が十分に誘導されないために Th1 細胞に分化しないが、抗原が低濃度でも IL-12 存在下では Th1 細胞に分化する。3) 脾臓細胞の中で、Th 細胞との相互作用により IL-12 を産生するのは、CD86 を強く発現している CD8<math>\alpha</math> 陰性の樹状細胞である。</p> <p>これらの研究成果は、Th 細胞の分化機構について重要な知見を与えたものであり、博士 (医学) の学位論文に値するものである。</p>			
(平成 16 年 2 月 6 日)			