

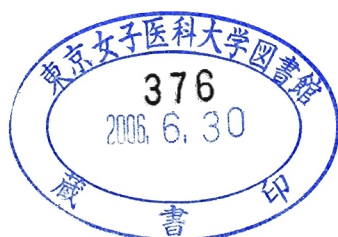
IL-2、IL-4 および ICOS による 2 型ヘルパーT 細胞分化

誘導機構の解析

16590412

平成 16 年度～17 年度科学研究費補助金

基盤研究 (C) 研究成果報告書



平成 18 年 4 月

研究代表者 八木 淳二
東京女子医科大学 医学部 講師



〈はしがき〉

平成 16 年度～17 年度にわたり、科学研究費補助金基盤研究(C)の交付を受け、上記研究課題について研究を遂行することが出来ました。新しい T 細胞補助刺激受容体 ICOS の機能発現のための細胞内シグナル伝達および IL-2、IL-4 および ICOS からなる 2 型ヘルパー T 細胞分化経路を進める分子機構について以下の研究成果を得ました。

研究組織

研究代表者：八木 淳二（東京女子医科大学 医学部 講師）

研究分担者：内山 竹彦（東京女子医科大学 医学部 教授）

研究分担者：今西 健一（東京女子医科大学 医学部 助教授）

研究分担者：有村 裕（東京女子医科大学 医学部 助手）

交付決定額（配分額）

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 16 年度	1,500,000	0	1,500,000
平成 17 年度	1,500,000	0	1,500,000
総 計	3,000,000	0	3,000,000

研究発表

(1) 学会誌等

1. 八木淳二. CD27/B7 関連分子群による免疫制御と免疫療法の試み. 外科と代謝・栄養. 34 (4): 69-81. (2004 年 8 月)
2. Fukada, K., Koyanagi, M., Arimura, Y., Ogiuchi, H., Uchiyama, T., Yagi, J. CD28 is required for induction and maintenance of immunological memory in toxin-reactive CD4⁺ T cells in vivo. Cellular Immunology 238 (2): 103-112. (2005 年 12 月)

(2) 口頭発表

1. Yagi, J., Arimura, Y., Dianzani, U., Uchiyama, T. An immunological pathway linking IL-4 to ICOS in Th2 development. 12th International Congress of Immunology. (2004 年 7 月)
2. 小林里実、扇内博子、川島眞、内山竹彦、八木淳二. 尋常性乾癬患者の T 細胞における inducible co-stimulator (ICOS) 発現. 第 19 回日本乾癬学会学術大会. (2004 年 9 月)
3. 小林里実、崎山博子、有村裕、川島眞、扇内秀樹、内山竹彦、八木淳二. 尋常性乾癬患者における ICOS の発現と機能解析. 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会. (2004 年 12 月)
4. 有村裕、内山竹彦、八木淳二. T 細胞における ICOS のシグナル伝達様式の解析. 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会. (2004 年 12 月)
5. 小林里実、扇内博子、川島眞、内山竹彦、八木淳二. 尋常性乾癬皮疹部における inducible co-stimulator (ICOS) とそのレガンドの発現. 第 20 回日本乾癬

学会学術大会. (2005 年 9 月)

6. 小林里実、崎山博子、有村裕、川島眞、扇内秀樹、内山竹彦、八木淳二. 尋常性乾癬および掌蹠膿疱症における ICOS とそのレガンドの発現. 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会. (2005 年 12 月)
7. 有村裕、八木淳二、小安重夫、江崎太一、内山竹彦. PI3K p85 KO マウスにおける T-B 細胞間の相互作用の異常. 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会. (2005 年 12 月)

(3) 出版物

1. 八木淳二. 共(補助)刺激分子(co-stimulatory molecules). In 免疫学ハンドブック. 免疫学ハンドブック編集委員会編. オーム社. p. 245-258. (2005 年 10 月)

研究成果

IL-2、IL-4 および ICOS からなる 2 型ヘルパー T 細胞 (Th2 細胞) 分化経路において、マウスの T 細胞を用いて ICOS 分子からのシグナルが Th2 分化を進めることが明らかになっている。したがって、ICOS 補助刺激のシグナル伝達を解析することが上記の Th2 分化経路の分子機構の理解のため必要となる。CD28 分子の細胞内領域には、YxxM、YxNx、PxxP モチーフが存在し、多数のシグナル伝達分子が会合し多様なシグナルが伝達される。一方、ICOS 分子の細胞内領域には、YxxM のみが存在するが両者の機能は、質的ないし強弱の差は認めつつも、同様に多様であることが知られている。本研究では、まずこの疑問を解決し、ICOS 補助刺激の機能発現

を誘導するシグナル伝達経路の解明を目指した。その結果、以下に記載するまとまった知見を得た。

- (1) 抗 ICOS 抗体は、抗 CD3 抗体の非存在下で単独刺激しても様々な細胞内シグナルが入ることが観察された。一方、抗 CD28 抗体の単独刺激ではシグナルが入らず、TCR/CD3 からのシグナルが必要であった。レトロウイルスを用いて ICOS と CD28 を B 細胞株 WEHI-231 に導入しても同じ効果が観察された。
- (2) 抗 ICOS 刺激では、約 38kDa の分子のチロシンリン酸化が認められ、この分子は、免疫沈降の結果からアダプター分子 LAT であることが示唆された。抗 CD3 抗体存在下でそのリン酸化レベルは増強した。
- (3) ショ糖密度勾配遠心の結果から、ICOS と CD28 はともに細胞膜のラフト画分の外に局在していたが、ICOS、CD28 と LAT との距離および位置関係に明確な差は認められなかった。MBCD を用いて細胞膜のラフト画分を壊しても ICOS による LAT のリン酸化に影響は見られなかった。

以上の結果から、ICOS は、LAT を介して幅広いシグナルを送り、多様な機能を発揮している可能性が示唆された。

次に、IL-2、IL-4 と ICOS を結ぶ Th2 分化経路について、BALB/c ナイーブ CD4⁺ T 細胞は、C57BL/6 細胞と比較し、この経路が効率良く進み、Th2 分化が促進される点に着目し、BALB/c と B6 の違いについて解析することで、この経路の制御機構を明らかにすることを目指した。その結果、以下に記載するまとまった知見を得た。

- (1) BALB/c ナイーブ CD4⁺ T 細胞が抗 CD3 および抗 CD28 抗体による *in vitro* 一次刺激で産生する IL-4 量は、B6 と比較し 10 倍以上高い。抗体による中和か

らこの IL-4 産生は、IL-2 による制御を受けることを認めた。

(2) ナイーブ CD4⁺ T 細胞 in vitro 一次刺激において、充分量の抗マウス IL-2 抗体で内因性 IL-2 を中和し、同量のヒト IL-2 を添加して IL-2 の IL-4 産生誘導、Th2 分化誘導、活性化 CD4⁺ T 細胞の ICOS 表現誘導について比較すると、BALB/c 細胞は、B6 と比較し IL-2 の効果が著明に強いことを見出した。

(3) ナイーブ CD4⁺ T 細胞に一次刺激を加え、活性化させた後休ませ、IL-2 を添加し IL-2 レセプター下流のシグナル伝達分子をウエスタンブロットにて解析したところ、BALB/c 細胞において、B6 と比較し、チロシンリン酸化 STAT5 が高発現であった。同様にして IL-4 を添加すると、BALB/c 細胞は、B6 と比較し、チロシンリン酸化 STAT6 は、同程度であったが、チロシンリン酸化 STAT5 は高発現であった。

(4) BALB/c バックグラウンドの STAT5^{-/-}マウスナイーブ CD4⁺ T 細胞一次刺激で産生する IL-4 は、B6 と比較しさらに少量であり、Th1 に偏向した。また、B6 ナイーブ CD4⁺ T 細胞一次刺激時にレトロウイルス感染によって活性型 STAT5A ないし活性型 STAT5B を強制発現させると、Th2 への偏向を促進した。

以上の結果から、ナイーブ CD4⁺ T 細胞の STAT5 活性化のレベルが遺伝的背景に制御されており、それによって、IL-2、IL-4 および ICOS からなる Th2 分化経路の進行の程度を調節することでマウス系統間の Th 分化の方向性に影響を与えることが示唆された。STAT5 の活性化は、ナイーブ CD4⁺ T 細胞の IL-4 産生を促すことは示されたが、今後の課題として、STAT5 から ICOS 発現を誘導する pathway の存在を明らかにしていきたい。