The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	CCR5発現増強によって惹起されるLFA-1を介したT細胞接着におけるIL－12の役割
Author(s)	向井, 隆雄
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44012
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【18】

氏　　名	向井隆雄（むかい たかお）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　１７７３６　号
学位授与年月日	平成 15 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学　位　論　文　名	**CCR5 発現増強によって惹起される LFA-1 を介した T 細胞接着における IL-12 の役割**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　古郷　幹彦 （副査） 教　授　由良　義明　　教　授　村上　伸也　　助教授　川端　重忠

論　文　内　容　の　要　旨

【背景および目的】

IL-12 は生体内において炎症などの刺激により Mφ、単球、リンパ球、線維芽細胞から分泌されるサイトカインであり、細胞障害活性の増強、増殖応答の惹起、IFN-γ の産生誘導、Th1 細胞の分化、および抗腫瘍作用など多様な生物活性を示す。マウス腫瘍系の特定のモデルにおいては、IL-12 の全身投与が腫瘍局所に多数の T 細胞浸潤を誘導し、腫瘍を完全に退縮することが証明されている。

一般に局所への T 細胞の浸潤は、T 細胞上のインテグリンと局所血管内皮上のインテグリンの接着を介して起こる。しかし、T 細胞上のインテグリンが実際に接着能を示すにはケモカインレセプターからのシグナルによって活性化される必要がある。昨年、活性化 T 細胞を IL-12 で刺激すると、T 細胞上にケモカインレセプターCCR5 が誘導されることが明らかになった。以上のことから、①活性化 T 細胞は IL-12 刺激によって CCR5 を発現する、②CCR5 が腫瘍局所で産生されるケモカイン刺激を受けてインテグリンが活性化される、③活性化されたインテグリンは接着能を獲得し、T 細胞は血管内皮細胞と強固に接着するという 3 段階のメカニズムが考えられる。そこで本研究では IL-12 応答性 Th1 クローン 2D6 細胞を用いて、IL-12 と CCR5 発現誘導の関係について、また CCR5 発現がいかに接着分子の機能に影響を及ぼすかについて検討した。

【材料と方法】

細胞として IL-12 あるいは IL-2 によってのみ維持可能な Th1 クローン 2D6 細胞を用いた。mRNA 発現の検出には RNase protection assay を用いた。細胞表面蛋白の発現の検出は FACScalibur を用いて解析した。細胞内の Ca^{2+} 動態は Fura-2-AM で標識して測定した。

【結果および考察】

(1)2D6 細胞は IL-12 だけでも（以下 $2D6^{IL\text{-}12}$）、また IL-2 だけでも（以下 $2D6^{IL\text{-}2}$）継代維持可能であった。

(2)$2D6^{IL\text{-}12}$ は培養中に細胞凝集を示し、この細胞凝集は抗 ICAM-1 抗体によって阻害された。これより $2D6^{IL\text{-}12}$ の細胞凝集は LFA-1-ICAM-1 相互作用を介することが示された。

(3)それに対し $2D6^{IL\text{-}2}$ は培養中に全く細胞凝集を示さなかった。$2D6^{IL\text{-}2}$ に接着分子が発現していないからであろうという予想に反して、$2D6^{IL\text{-}2}$ は $2D6^{IL\text{-}12}$ と同等の LFA-1/ICAM-1 を発現していた。

(4)なぜ同等の接着分子を発現している $2D6^{IL\text{-}12}$ と $2D6^{IL\text{-}2}$ に接着能の差が生じるのかを検討するため、接着分子を活性化するとされるケモカインレセプターの発現を比較した。$2D6^{IL\text{-}12}$ では強い CCR5 mRNA 発現が見られたのに対し、$2D6^{IL\text{-}2}$ では全く見られなかった。

(5)CCR5 以外に Th1 に発現するとされる CXCR3、また CCR5 と共通のリガンドをもつ CCR1 に関して $2D6^{IL\text{-}12}$、$2D6^{IL\text{-}2}$ とも mRNA 発現は認められなかった。CCR5 のリガンドケモカインについて RANTES mRNA 発現は $2D6^{IL\text{-}12}$、$2D6^{IL\text{-}2}$ ともわずかに認めたものの、MIP-1α/β mRNA は発現しなかった。

(6)ケモカインと抗ケモカイン抗体を用いた FACS 解析により、$2D6^{IL\text{-}12}$ 細胞表面上に CCR5 が発現していることが示された。

(7)同様に抗 CCR5 ポリクローナルあるいはモノクローナル抗体を用いた FACS 解析でも $2D6^{IL\text{-}12}$ 細胞表面上に CCR5 発現を認めた。また $2D6^{IL\text{-}2}$ 細胞表面上には CCR5 発現を認めないことが確認された。

(8)$2D6^{IL\text{-}12}$ をリガンドケモカインで刺激することによって Ca^{2+} の細胞内流入が見られた。このことより $2D6^{IL\text{-}12}$ に発現している CCR5 は機能的なものであることが示された。

(9)IL-12 と同様の生物活性をもつ IL-18 で $2D6^{IL\text{-}12}$ を刺激しても CCR5 mRNA 発現を誘導しなかったが、IL-12 刺激よりも著しく強い RANTES mRNA 発現が誘導された。

(10)IL-2、IL-12、IL-18 を組み合わせて $2D6^{IL\text{-}12}$ を刺激したところ、IL-2 は IL-12 による CCR5 mRNA 発現を抑制したが、IL-18 は抑制しなかった。

(11)$2D6^{IL\text{-}12}$ の培養中に IL-18 を加えると細胞凝集は著しく促進され、また抗 CCR5 抗体を加えると細胞凝集は阻害された。

以上の結果より、Th1 クローン 2D6 細胞において、細胞凝集能すなわち接着能の獲得には IL-12 刺激により発現誘導される機能的な CCR5 が重要であることが示された。このことより IL-12 による腫瘍退縮において、T 細胞が局所へ浸潤する過程において T 細胞上の CCR5 が重要な役割を担うことが示唆された。

論文審査の結果の要旨

インターロイキン 12（IL-12）の抗腫瘍効果において、IL-12 は腫瘍抗原によって活性化された T 細胞に働きかけて T 細胞を血管内より腫瘍局所へ浸潤させる。これにはさまざまな要因が関与するが、T 細胞が血管内から局所に浸潤するためには T 細胞が血管内皮細胞と強固に接着する必要があり、本研究では IL-12 が T 細胞に接着能を獲得させるメカニズムについて Th1 クローン 2D6 細胞を用いて検討したものである。

その結果、IL-12 刺激が活性化 Th1 T 細胞表面上に機能的なケモカインレセプターCCR5 の発現増強を誘導していることが明らかになった。またこの CCR5 がリガンドケモカインからの刺激を受けると T 細胞上の接着分子 LFA-1 が活性化され、その結果 T 細胞は接着機能を獲得するということが示された。

現在、IL-12 は臨床で応用され始めており、本研究は IL-12 が惹起する T リンパ球の血管外遊走のメカニズムの一端を明らかにしただけでなく、ヒトに対する抗癌剤としての作用機序をも示す重要な知見を示すものであり、博士（歯学）の学位授与に値するものであることを認める。