



Title	The capacity of the natural ligands for CD28 to drive IL-4 expression in naive and antigen-primed CD4+ and CD8+ T cells
Author(s)	辺, 暘
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45465">https://hdl.handle.net/11094/45465</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 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

氏名	辺 陽
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 19288 号
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	The capacity of the natural ligands for CD28 to drive IL-4 expression in naïve and antigen-primed CD4 <sup>+</sup> and CD8 <sup>+</sup> T cells (CD28 分子の天然リガンドでの副刺激によるナイーブ及び抗原感作 CD4、CD8T 細胞の IL-4 産生誘導)
論文審査委員	(主査) 教授 平野 俊史  (副査) 教授 宮坂 昌之 教授 宮崎 純一

### 論文内容の要旨

#### [目的]

T 細胞抗原受容体 (TCR) 刺激時に共存する IL-12 や IL-4 が、ナイーブ CD4 や CD8 陽性 T 細胞の IFN- $\gamma$  産生性 T 細胞 (Th1/Tc1) 或いは IL-4 産生性 T 細胞 (Th2/Tc2) への分化にそれぞれ重要な役割を果たす事はよく知られている。一方、CD28 を介する副刺激が T 細胞の活性化には不可欠であることも衆知の事実であるが、何れのタイプの T 細胞分化がこの副刺激への依存性が高いかについては不明な点が多い。本研究では、CD28 の天然リガンド (B7-Ig キメラ蛋白) 或いは抗 CD28 抗体架橋による副刺激の T 細胞分化に及ぼす影響を解析した。

#### [方法ならびに成績]

1) マウスのナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞を *in vitro* で抗 CD3 抗体 (0.25  $\mu$ g/ml) で TCR 刺激をする際に、抗 CD28 抗体 (5  $\mu$ g) 或は B7.2 (CD86) の細胞外領域と免疫グロブリン (Ig) の Fc 領域を繋いだキメラ蛋白 (B7.2-Ig, 5  $\mu$ g) で副刺激を行い、培養 5 日後に上清中の IFN- $\gamma$  と IL-4 を測定した。IFN- $\gamma$  産生は、抗 CD28 抗体或いは B7.2-Ig の何れの副刺激によっても同程度に増強された。一方、IL-4 産生は B7.2-Ig を用いた場合に著明に誘導され、抗 CD28 抗体刺激では殆ど増強されなかった。B7.2-Ig の IL-4 誘導効果は、OVA (トリ卵白アルブミン) 特異的 TCR トランスジェニックマウスの CD4<sup>+</sup> T 細胞を用いた場合にも認められた。即ち、TCR マウスのナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞を抗原提示細胞存在下に OVA で刺激した場合、IL-4 産生は B7.2-Ig 副刺激によってのみ誘導された。

2) B7.2-Ig は T 細胞表面分子 CTLA-4 に対しても結合性を示す事が知られている。しかし、B7.2-Ig の IL-4 誘導効果が CTLA-4 への作用を介してもたらされる可能性は、ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞を TCR と B7.2-Ig で共刺激して誘導される IL-4 産生が抗 CTLA-4 抗体の Fab モノマーの培養系への添加により何ら阻害されない事から否定された。

3) Th1 及び Th2 分化にそれぞれ関与する転写因子 T-bet と GATA-3 の副刺激による発現誘導を RT-PCR で測定した。ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞を抗 CD3 抗体と B7.2-Ig で共刺激した場合、刺激 3 日後に T-bet 及び GATA-3 mRNA の発現が著明に誘導された。この結果に一致して、B7.2-Ig 副刺激により IFN- $\gamma$  及び IL-4 mRNA の発現が増強することも確かめられた。一方、抗 CD28 抗体副刺激は B7.2-Ig 副刺激と同程度に T-bet 及び IFN- $\gamma$  mRNA を誘導したにも拘わらず、GATA-3 及び IL-4 mRNA はごく僅かしか誘導しなかった。

4) CD28 のもう一つのリガンドである B7.1 (CD80) や CD28 ファミリーに属する ICOS のリガンド ICOSL で刺激した場合、B7.2-Ig 副刺激でみられる IL-4 産生が誘導されるかを検討した。ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞を抗 CD3 抗体と B7.1-Ig で共刺激した場合、IFN- $\gamma$  及び IL-4 産生が著名に誘導されたのに対して、ICOSL-Ig 副刺激では IFN- $\gamma$  産生だけが増強された。以上より、IL-4 産生は CD28/B7 シグナル伝達系により選択的に誘導される事が示された。

5) ナイーブ T 細胞を *in vitro* で抗 CD3 抗体と B7.2-Ig で共刺激した場合、IL-4 産生性 CD8<sup>+</sup> T 細胞が誘導される事が細胞内染色での解析で示された。一方、抗 CD28 抗体副刺激は IFN- $\gamma$  産生性 CD8<sup>+</sup> T 細胞を惹起するにも拘わらず、IL-4 産生細胞を誘導できなかった。尚、ナイーブ CD8<sup>+</sup> T 細胞単独の培養では B7.2-Ig を用いても、IL-4 産生細胞は生成しなかった。

6) B7.2-Ig の抗原感作 CD8<sup>+</sup> T 細胞に及ぼす作用を調べる為に、アロ MHC クラス I 抗原を発現する胸腺腫 EL-4 で BALB/c マウスを免疫した。CD8<sup>+</sup> T 細胞による IL-4 産生を明確にする為に、EL-4 感作後に抗 CD4 抗体の *in vivo* 投与により CD4<sup>+</sup> T 細胞を除去した。この CD4 除去感作脾細胞を *in vitro* で MMC 処理 EL-4 細胞と B7.2-Ig で共刺激した場合、著明な IL-4 産生性 CD8<sup>+</sup> T 細胞の生成及び培養上清中への IL-4 分泌が検出された。しかし、抗 CD28 抗体副刺激は IFN- $\gamma$  を著明に誘導したが、IL-4 発現は僅かであった。一方、EL-4 免疫する前に *in vivo* で CD4<sup>+</sup> T 細胞を除去した場合、CD8<sup>+</sup> T 細胞を *in vitro* で EL-4+B7.2-Ig で再刺激を行っても IL-4 発現は誘導されなかった。以上、B7.2-Ig での副刺激により CD8<sup>+</sup> T 細胞の Tc2 への分化が促進される事、及び TCR 刺激を最初に受ける時に CD4 陽性 T 細胞の共存が必要である事が示された。

[総括]

CD28 の天然リガンド (B7-Ig キメラ蛋白) による副刺激は、抗 CD28 抗体架橋による副刺激とは異なり、ナイーブのみならず抗原感作 CD4<sup>+</sup> や CD8<sup>+</sup> T 細胞の IL-4 産生性 T 細胞 (Th2/Tc2) への分化を促進することが示された。

#### 論文審査の結果の要旨

T 細胞抗原受容体 (TCR) 刺激時に共存する IL-12 や IL-4 が、ナイーブ CD4 や CD8 陽性 T 細胞の IFN- $\gamma$  産生性 T 細胞 (Th1/Tc1) 或いは IL-4 産生性 T 細胞 (Th2/Tc2) への分化に重要な役割を果たす。しかし、CD28 を介する副刺激は T 細胞の活性化には不可欠であるが、いずれのタイプの T 細胞分化に副刺激依存性が高いかについては不明な点が多い。本研究では、CD28 の天然リガンドである B7 分子或いは抗 CD28 抗体での架橋により副刺激を与えた場合の T 細胞分化に及ぼすかを解析した。その結果、CD28 の天然リガンド (B7-Ig キメラ蛋白) による副刺激は、抗 CD28 抗体架橋による副刺激とは異なり、ナイーブ CD4 や CD8 陽性 T 細胞のみならずアロ抗原感作 CD8 陽性 T 細胞の IL-4 産生 T 細胞 (Th2/Tc2) への分化を促進すること、さらに CD8 陽性 T 細胞が Tc2 へ分化するためには、TCR 刺激を最初に受けとる時に CD4 陽性 T 細胞のヘルプが必要である事も明らかにした。以上、B7 刺激による CD28 シグナルを介する IL-4 産生性 T 細胞の分化誘導機構を明らかにした。本研究の結果は学位に値するものと認める。