HamaMed-Repository
浜松医科大学学術機関リポジトリ
浜松医科大学
Hamamatsu University School of Medicine

TCRV β7+ Th2 cells mediate UVB-induced suppression of murine contact photosensitivity by releasing IL-10

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-28 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 八木, 宏明 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1582

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第　３０５号	学位授与年月日	平成１１年　３月　９日
氏　　名	八　木　宏　明		
論文題目	TCRV $\beta 7^{+}$ Th2 cells mediate UVB-induced suppression of murine contact photosensitivity by releasing IL-10 (T 細胞受容体 Vβ7 陽性 Th2 細胞が IL-10 を遊離してマウス接触光過敏症の UVB による抑制を誘導する)		

博士(医学)　八 木 宏 明

論 文 題 目

TCRVβ7⁺Th2 cells mediate UVB−induced suppression of murine contact photosensitivity by releasing IL−10

(T細胞受容体Vβ7陽性Th2細胞がIL−10を遊離してマウス接触光過敏症のUVBによる抑制を誘導する)

論 文 内 容 の 要 旨

〔はじめに〕

遅延型過敏反応は多種の疾患に関与する重要なアレルギー反応である。接触光過敏症（contact photosensitivity；CPS）は遅延型過敏症の一型であり、テトラクロロサリチルアニリド（TCSA）を光ハプテンとすることにより、感作が可能である。このCPSでは、感作部に中波長紫外線（UVB）を前照射することにより感作成立が抑制されるが、これはCD4陽性の光ハプテン特異的抑制性T細胞（Ts）が誘導されるためである。

マウスCD4陽性細胞は、そのサイトカインプロフィールによりインターロイキン−2（IL−2）やインターフェロン−γ（IFN−γ）を産生し遅延型過敏反応を担当するTh1細胞と、IL−4やIL−10を産生しTh1細胞を抑制するTh2細胞の少なくとも2種類に分類され、ゆえに遅延型過敏反応の制御におけるTh2細胞の働きが注目されている。

この研究では抗原刺激を繰り返し行うことによりTsを作製し、その生物学的性格を特にサイトカイン産生の側面から調べ、遅延型過敏症の制御様式ならびに、それに関わる因子の解明を行った。

〔材料ならびに方法〕

動物：8から10週齢の雄BALB/cマウスを使用した。

感作および惹起：マウス腹部剃毛部にTCSAを塗布した後、長波長紫外線（UVA）を照射（TCSA/UVA）し感作する。惹起は耳翼で行い、24時間後の耳の厚さを測定した。

免疫リンパ節細胞：TCSA/UVAにより感作し、3日後にリンパ節細胞を採取した。

TCSAに対するCPS特異的なTsの誘導および抗原刺激：マウス腹部剃毛部にUVBを前照射した後TCSA/UVA感作したマウス脾細胞浮遊液を作成する。これをTsとする。さらにTsを含む脾細胞をリコンビナントIL−4（rIL−4）の存在下にX線照射したTCSA光修飾抗原提示細胞で2週間毎に刺激することにより細胞株B⁺TCLを得る。UVBの前照射を行わずに採取した脾細胞も同様に培養した（B⁻TCL）。

In vivoにおける抑制活性の検討：B⁺TCL、B⁻TCLまたはTsをマウスに経静脈的に投与した後に感作し、惹起反応に対するそれぞれの抑制活性を比較した。

In vitroにおける抑制活性の検討：X線照射B⁺TCLまたはB⁻TCLを免疫リンパ節細胞とともに培養し、リンパ節細胞の増殖を^{3}H−チミジンの取り込みにより測定し、リンパ節細胞の増殖の抑制活性を比較した。

サイトカイン濃度の測定：IL−2とIL−4の濃度はbioassayにより、IL−10濃度はELISA法により測定した。

〔結果〕

表面マーカーの解析：B⁺TCLの99%がCD4陽性であった。T細胞受容体ではB⁺TCLはVβ7（53%）とVβ13（45%）の2種類のポピュレーションから成ることが分かった。

In vivoにおける抗原特異的抑制：B^+TCLをマウスに経静脈的に投与したところ抗原特異的にTCSA接触光過敏症を抑制した。一方UVBの前照射を行わなかったマウスから得たB^-TCLには抑制活性がみられなかった。

In vitroにおける抑制：in vitroにおいてB^+TCLはTCSA/UVA感作マウス免疫リンパ節細胞の増殖を抗原特異的に抑制した。またB^+TCLをVβに対する抗体と補体で処理しVβ7とVβ13のいづれかを除去して調べたところ、Vβ7陽性細胞群のみが抑制活性を有した。

サイトカインプロフィール：B^+TCLは抗原刺激によりIL−4、IL−10を産生したがIL−2は産生せず、またRT−PCRではIL−4、IL−10mRNAの発現が認められたが、IL−2mRNAの発現は認められなかった。またVβ7陽性細胞はVβ13陽性細胞に比し有意に高濃度のIL−10を産生した。

中和抗体による抑制活性の検討：in vitro における抑制活性に関わるサイトカインを調べるために中和抗体を加えて培養したところ、IL−10を中和することにより B^+TCL は抑制活性を失ったが、IL−4の中和では抑制活性は保たれた。

Vβ7陽性細胞によるin vivoにおける抑制：Ts誘導マウス脾細胞をTCRVβ7に対する抗体と補体で処理し Vβ7陽性細胞を除去したものをマウスに投与したところコントロール群に比し有意に抑制活性が低下した。これらマウスのリンパ節を惹起反応時にフローサイトメトリーで解析したところ、感作成立が抑制されたマウスではVβ7陽性細胞が約20％を占め、感作成立群に比し高率であった。

〔考察〕

繰り返し抗原刺激することにより得たB^+TCLは、CD4陽性で、in vivoおよびin vitroにおいて抗原特異的な抑制活性を持つことからTsとしての性格を持っていることが示された。B^+TCLはTh2としての性格を有し、そのin vitroでの抑制活性はIL−10によることがわかった。またVβ7とVβ13の２つのポピュレーションのなかで、Vβ7陽性細胞のみが抑制活性を持ち、より高濃度のIL−10を産生した。またin vivoで抑制が強く認められたマウス群ではそのリンパ節に高比率のVβ7陽性細胞が存在した。

〔結論〕

TCSA接触光過敏症に関わる抗原特異的抑制性T細胞はT細胞受容体にVβ7をもつTh2細胞であり、その抑制活性はIL−10にあり、また遅延型過敏症の抑制には抗原特異的Th2細胞の活性化が関与することが示された。

論文審査の結果の要旨

接触光過敏症は遅延型過敏症の一型であり、テトラクロロサリチルアニリド（TCSA）を光ハプテンとすることにより、感作が可能である。申請者らの研究グループは、感作部に予め中波長紫外線（UVB）を照射することにより、この接触光過敏症を抑制することが可能であることをすでに報告している。さらに、この抑制の機序にはCD4陽性の光ハプテン特異的抑制性T細胞（Ts）が関与することも明らかにしている。そこで、申請者は本研究で、このTsの生物学的性格と接触光過敏症の抑制機序を解明した。

TCSA特異的なTsは、BALB/cマウスの腹部剃毛部にUVBを照射した後、同部にTCSAを塗布し、長波長紫外線（UVA）を照射（TCSA/UVA）することにより誘導した。このマウスの脾細胞浮遊液をTCSA/UVA感作マウスのリンパ節細胞によりIL−4存在下で２週毎に抗原刺激を行うことにより、純化したTs群B^+TCLを得た。

主な結果は以下の通りである。

(1) B^+TCLはCD4陽性細胞であり、主にVβ7とVβ13の２群より成り立っていた。

(2) B^+TCLのうち、Vβ7陽性細胞がin vivoにおける接触光過敏症、およびin vitroにおけるリンパ節細胞の増殖反応を光ハプテン特異的に抑制した。

(3) B^+TCLはIL−4とIL−10を産生し、これらのmRNAを発現することからTh2細胞であることが判明した。

(4) これらのサイトカインのうち、IL−10が in vitro の細胞増殖反応の抑制に関与することが抗体による中和反応で明らかとなった。

以上の結果より、申請者はTCSA接触光過敏症に関与する抗原特異的TsはT細胞受容体にVβ7をもつTh2細胞であり、これが産生するIL−10により抑制活性をあらわすことを示した。

審査委員会では、申請者がTCSA接触光過敏症に対するTsを頻回抗原刺激により純化し、その生物学的特徴、および抑制機序を詳細に解明した点を高く評価した。

以上の研究に対し、審査委員会では以下の質疑を行った。

1）TCSA感作におけるUVAの役割について

2）UVB照射でTsが誘導される機序について

3）UV照射時のストレスはマウスの免疫能に影響しないか

4）TCSA/UVA感作マウスのT細胞は様々なVβを発現するのに、B^+TCLのT細胞受容体は何故Vβ7とVβ13に限定されるのか

5）Vβ13陽性細胞の役割は

6）B^+TCLに発現しているVαは検討したか

7）BALB/c以外の系統のマウスで、TsのVβ発現パターンを検討したか

8）抗 Vβ13抗体と補体で B^+TCL を処理して、Vβ7陽性細胞の比率を高めても抑制効果が増強しないのは何故か

9）B^+TCL による試験管内でのリンパ球増殖性反応の抑制と生体内での接触光過敏症の抑制はどのように関連しているか

10）Ts をマウスに静注し接触光過敏症の抑制を検討した実験で、Vβ7および Vβ13陽性細胞の反応局所（耳）での分布を免疫組織化学的に検討したか

11）CTLL−2を用いたIL−2、およびIL−4のbioassayの特異性について

12）IL−10の抑制活性の機序は

13）IL−10をマウスに直接投与して、接触光過敏症の抑制を検討したか

14）Ts をマウスに静注して、接触光過敏症の抑制を検討した実験で所属リンパ節または脾臓を摘出するとどうなるか

15）この実験系にγ/δT細胞は関与しないか

16）B^+TCLに発現しているVβ7、およびVβ13のN領域は解析したか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者　主査　教授　小　出　幸　夫

副査　教授　山　下　昭　副査　講師　大　橋　弘　幸