

原 著

スーパー抗原ならびに細菌内毒素によるアポトーシスを介した単球の CD80 発現調節作用

高 橋 昌 宏

東北大学大学院歯学研究科口腔機能再建・材料学講座
歯内・歯周療法学分野
(主任; 島内英俊教授)

Regulation of CD80 expression on human monocytes via apoptosis mediated by superantigen and lipopolysaccharide

Masahiro Takahashi

*Tohoku University, Graduate School of Dentistry, Department of Oral Rehabilitation and Materials Science, Division of Periodontics and Endodontics
(Chief : Prof. Hidetoshi Shimauchi)*

Abstract: Staphylococcal enterotoxin B (SEB) rapidly increased the number of apoptotic monocytes, whereas lipopolysaccharide (LPS)-treated monocytes were resistant to the apoptotic action of SEB. This SEB-induced killing was abolished by anti-CD95 (Fas) and anti-CD95 ligand (FasL) monoclonal antibodies (mAb), suggesting a CD95-based pathway of apoptosis. Apoptosis in cultures with SEB was affected by differences in the susceptibility of CD80⁺ and CD80⁻ monocytes to apoptosis. On the other hand, interferon- γ (IFN- γ) production from activated T cells was observed after 9 hr of stimulation with SEB. Addition of IFN- γ to unstimulated cultures induced a marked increase in the number of CD80⁺ monocytes, which was inhibited by LPS through the action of interleukin-10. The numbers of SEB-induced CD80⁺ monocytes were partially decreased by anti-CD119 (IFN- γ receptor α -chain) mAb and by anti-CD95L mAb, an anti-apoptotic agent. These findings show that SEB-induced monocyte apoptosis is closely associated with the enrichment of CD80⁺ monocytes generated before IFN- γ production, followed by up-regulation of CD80⁺ by IFN- γ , and that LPS has negative effects in both cases. These results may help to elucidate the effects and functions of SEB and LPS in the immune system.

Key words: SEB, LPS, monocyte apoptosis, CD80, interferon- γ

緒 言

口腔内には多種、多様な細菌が生息しており、直接あるいは間接に歯周組織に傷害を与えていると考えられている。口腔内細菌に内在する病原因子として注目されているグラム陰性菌由来の内毒素リポ多糖 (lipopolysaccharide; LPS) は歯周組織を構成する細胞に働き、炎症性サイトカイン [インターロイキン

(IL)-1 β , IL-6, IL-8, 腫瘍壊死因子 (TNF- α) 等] を誘導することを示す研究は数多い (総説^{1,2)} 参照)。一方、口腔内にはスーパー抗原を産生する細菌が存在して歯周組織に傷害作用を及ぼす可能性が考えられるが、この方面の研究は数少ない³⁻⁶⁾。

スーパー抗原は T 細胞上の T 細胞レセプターと抗原提示細胞の MHC クラス II 分子を介して、T 細胞を刺激し増殖を誘導する⁷⁻⁹⁾。この際、抗原提示細胞上に

発現する CD80 分子と T 細胞上の CD28 分子との結合を介した T 細胞への補助シグナルの伝達が必要である^{8,9)}。また、スーパー抗原は T 細胞および MHC クラス II 陽性細胞を活性化し、過剰なサイトカインを誘導することが知られている¹⁰⁾。LPS もスーパー抗原と同様に多量のサイトカインを誘導することはよく知られているが¹¹⁾、さらに重要なことはこれらの因子は細胞のプログラム死、すなわち、アポトーシスに深く関わっていることである¹²⁾。アポトーシスとは、主に Fas 抗原を介して特定の細胞のプログラム死を誘導し、それらの細胞の機能を制限することにより、組織あるいは生体の機能の恒常性を維持する現象である¹³⁾。したがって、仮に口腔内で免疫異常が発生してアポトーシスが誘導されないとすると、炎症性サイトカインが細胞より持続的に産生され、結果として歯周組織の慢性的な炎症が起こり、歯周組織の機能が傷害される可能性がある。アポトーシスを受ける細胞は歯肉上皮細胞や歯周粘膜組織に分布する単球やマクロファージなどその細胞の種類を問わない¹⁴⁻¹⁶⁾。しかし、これまでの研究から、同種細胞や組織で同程度の Fas が発現していても、アポトーシスに対する感受性は異なるという結果も報告されており^{14,17)}、アポトーシス・シグナル機構は複雑であり、まだ不明な点が多い。

本研究では、比較的アポトーシスを誘導しやすい末梢血単球に対するスーパー抗原と LPS の作用を検討した結果、スーパー抗原は CD80⁺ 単球に選択的にアポトーシスを誘導することが証明された。その結果、CD80⁺ 単球の割合が選択的に増加し、T 細胞に効率的に補助シグナルを伝えると考えられる。一方、LPS はこれを抑制する結果が得られたので、ここに IFN- γ の CD80 誘導作用と併わせて詳細に解析した成績を報告する。

材料と方法

1. モノクローナル抗体 (mAb), サイトカイン, スーパー抗原

表面抗原解析用には、抗 CD3 mAb (Leu-4), 抗 CD80 mAb (L307.4), アイソタイプ・コントロールとしてのマウス IgG 抗体 (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA), 抗 CD14 mAb (IOM-2; Immunotech, Marseille, France), 抗 CD14 mAb (MY4; Coulter, Hialeah, FL, USA), 抗 CD86 mAb (IT2.2), 抗 CD95 mAb (DX2) (PharMingen, San Diego,

CA), FITC 標識の抗マウス IgG 抗体 (Southern Biotech; Birmingham, AL, USA) をそれぞれ用いた。中和抗体として抗 IL-12 mAb (C8.6), 抗 CD119 (IFN- γ receptor α -chain) mAb (Genzyme, Cambridge, MA, USA), 抗 CD95 mAb (ZB4, Coulter), 抗 CD95 リガンド (L) mAb (NOK2, PharMingen) を購入した。リコンビナント・サイトカインとして IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-10, 腫瘍壊死因子 (TNF- α) は R & D system 社 (Minneapolis, MN, USA) より購入した。staphylococcal enterotoxin B (SEB), LPS (*Escherichia coli* O55: B5 由来), toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) は Sigma 社 (St. Louis, MO, USA) より購入した。SPM-2 (*Streptococcus pyogenes* mitogen-2) は *S. pyogenes* type 12 の培養上清より調製した¹⁸⁾。

2. 細胞の分離と活性化

健常ヒト末梢血より得られたヘパリン加血液をリンホライト-H (Cedarlane Labs, Hornby, Ontario, Canada) に重層して比重遠心分離を行うことにより末梢血単核細胞 (PBMC) を得た。2 \times 10⁶/ml の割合で 96 穴平底プレート (Falcon Becton Dickinson) に播種した。培養は 10% ウシ胎仔血清 (FCS) 添加 RPMI 1640 (日水製薬, 東京) 培地を用いた。刺激にはスーパー抗原や LPS をそれぞれ 1 μ g/ml の濃度にして加え、18 時間培養した。また、抗 IL-12 mAb, 抗 CD95 mAb, 抗 CD95L mAb, 抗 CD119 mAb, コントロール抗体としてのマウス IgG 抗体は、それぞれ 1~10 μ g/ml の濃度で刺激の 1 時間前に加えた。サイトカインの効果を調べるために TNF- α (10 ng/ml), IL-1 β (10 ng/ml), IFN- γ (100 U/ml), IL-4 (10 ng/ml) および IL-10 (10 ng/ml) をそれぞれ添加した。培養細胞はトリプシン-EDTA (37°C, 3 分) で処理後回収した。CD80⁺ 単球の変動は、CD14 陽性細胞について FACS-can (Becton Dickinson) により解析した。

3. 単球のアポトーシス誘導

培養細胞を回収して、単球細胞の標識マーカーとして phycoerythrin (PE) 標識の抗 CD14 mAb (IOM2) で染色後、Ca²⁺ 含有の binding buffer で洗い、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識の annexin V で染色した。また、FITC 標識抗 CD14 mAb (MY4) と propidium iodide (PI) にて染色した。染色後、FACS-can で CD14⁺ 単球の annexin V および PI 陽性率を

測定した。結果は平均値±標準偏差 (SD) で示したが、SD はすべて平均値の 10% 以内であった。

4. サイトカインの測定

IL-1 β , IL-4, IL-10, TNF- α および IFN- γ などのサイトカインの産生を調べるために、PBMC を一定時間培養した。それぞれの上清中のサイトカインを ELISA キット (Endogen, Woburn, MN) により測定した。すべてのサンプルはそれぞれ 3 検体を測定した。なお、検出限界を IFN- γ , IL-1 β , IL-10 および TNF- α は 20 pg/ml, IL-4 は 10 pg/ml に設定した。別に、それぞれのリコンビナント・サイトカインで標準曲線を作成し、この曲線からそれぞれのサイトカイン濃度を算定した。

5. 統計学的分析

A) 図 1 および 7(a) の実験では、適宜 paired *t* テストを実施して、*P* 値が 5% 未満になった場合に統計学的に有意差ありと判定した。

B) 図 2, 4, 5, 6 および 7(b) の実験では、ANOVA の後、Sheffe の多重比較法を実施して、*P* 値が 5% 未満を統計学的に有意差ありと判定した。

結 果

1. スーパー抗原による CD80⁺ 単球の誘導と LPS による抑制

スーパー抗原 (SEB, TSST-1 および SPM-2) 刺激による PBMC 中の CD14 陽性細胞 (2×10^4) のうち、CD80 抗原を発現する細胞の割合を FACSscan で測定した。また、同時にスーパー抗原による CD80 発現に及ぼす LPS の効果を調べた。図 1 に示すように LPS 単独では無刺激と同程度なのに対して、スーパー抗原刺激を行うと、全ての場合において 18 時間後の CD80⁺ 単球の割合が著しく増加した。さらに、LPS をスーパー抗原と同時に加えた場合、CD80⁺ 単球の割合は抑制された。

2. 単球上の CD80 誘導における IFN- γ の効果

単球上の CD80 の発現に対するサイトカインの影響を調べるため、PBMC にリコンビナント・サイトカインをそれぞれ加えて、18 時間培養した。図 2 に示すように IFN- γ を加えた場合のみ、単球に CD80 の顕著な誘導が認められた。さらに SEB 刺激時に抗 CD119

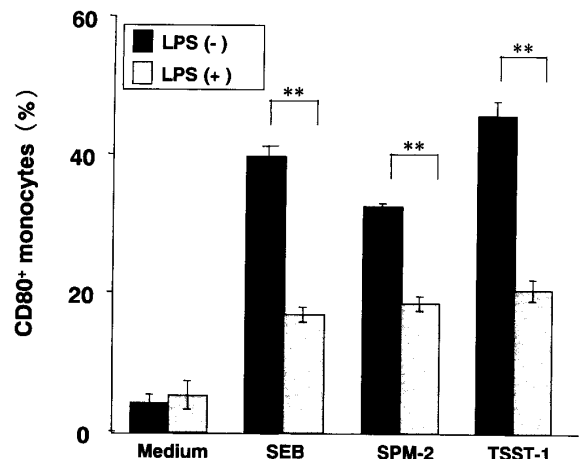


図 1 スーパー抗原刺激による CD80⁺ 単球の誘導と LPS の抑制効果

スーパー抗原 (SEB, TSST-1 および SPM-2) ($1 \mu\text{g/ml}$) で PBMC ($1 \times 10^6/\text{ml}$) を刺激した。また、LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) で同様に刺激した。18 時間後に培養細胞を回収して、抗 CD14 抗体 (FITC) と抗 CD80 抗体 (PE) による二重染色を行った。 2×10^4 個の単球 (CD14 陽性細胞) を解析し、CD80 陽性細胞の割合を FACSscan で解析した。CD80⁺ 単球 (%) は 3 人の donor の平均値±標準偏差 (SD) で示した。

なお、** は $P < 0.01$ を示す。

抗体あるいは抗 IL-12 抗体で前処理すると、CD80 の誘導は抑制された。また、IFN- γ と共に IL-4, IL-10 あるいは LPS を加えると、IFN- γ 添加時における CD80 誘導能が抑制された。このことから、スーパー抗原刺激による CD80 の誘導には IFN- γ が密接に関係していることが示された。

3. SEB 刺激により誘導される CD80⁺ 単球の経時的变化

無刺激の場合と比べ、SEB 刺激では 6 時間まで CD80⁺ 単球の穏やかな増加が観察され、さらに刺激後 6 時間を越えると、CD80⁺ 単球の顕著な増加が認められた (図 3)。

4. SEB および LPS 刺激によるサイトカインの産生

SEB あるいは LPS 刺激で、PBMC 上清中に産生されるサイトカインを ELISA 法で調べた (表 1)。LPS 刺激で、IL-1 β , IL-10 および TNF- α が産生され、SEB 刺激で T 細胞から IFN- γ と IL-4 が産生される

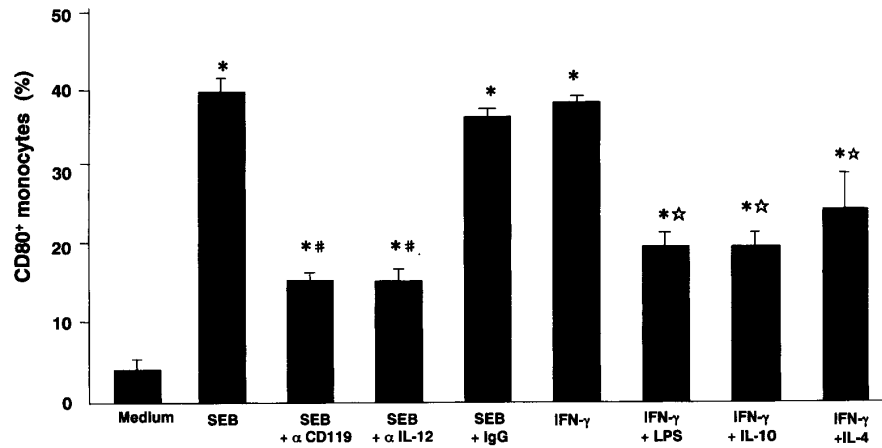


図2 IFN- γ によるCD80⁺単球の誘導

抗CD119抗体(10 μ g/ml)あるいは抗IL-12抗体(10 μ g/ml)で1時間前処理後にSEB(1 μ g/ml)を加えた。また、IFN- γ (100 U/ml)と同時にLPS(1 μ g/ml)、IL-10(10 ng/ml)、あるいはIL-4(10 ng/ml)を加えた。18時間後に抗CD14抗体(FITC)と抗CD80抗体(PE)による二重染色を行い、FACScanで解析した。CD80⁺単球(%)は3人のdonorの平均値 \pm SDで示した。

なお、*は $P < 0.01$ vs medium, #は $P < 0.01$ vs SEB刺激群, ☆は $P < 0.01$ vs IFN- γ 刺激群を示す。

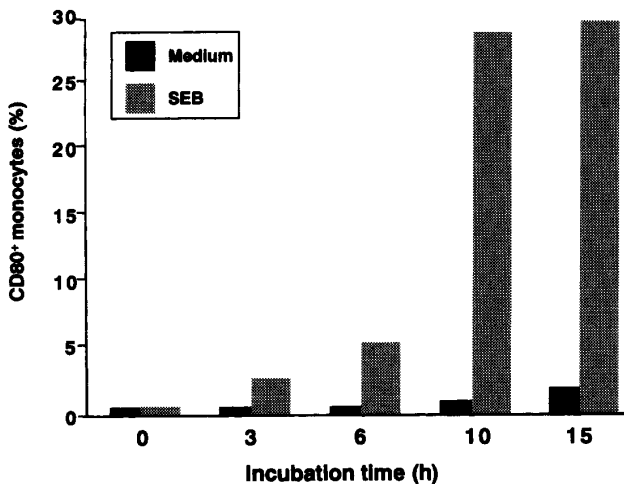


図3 SEB刺激で誘導されるCD80⁺単球の経時的変化

PBMCをSEB(1 μ g/ml)で処理後、3, 6, 10および15時間に細胞を回収して、抗CD14抗体(FITC)と抗CD80抗体(PE)で二重染色を行い、CD80⁺単球の出現率(%)をFACScanにて解析した。図には3人のdonorのうち最も代表的な結果を示した。

ほか、IL-1 β 、IL-10およびTNF- α の産生誘導も観察された。特に、IFN- γ 産生に関しては、SEB刺激後9時間から観察され、それ以前は検出限界以下であった。

5. SEB刺激による単球のアポトーシス誘導

IFN- γ の産生以前に見られるCD80⁺単球の緩やか

な増加が、SEBによる単球のアポトーシスに起因する可能性を調べるために、アポトーシスの初期段階から特異的に結合するannexin V¹⁹⁾を用いて検討した。図4に示すように、SEB刺激で単球のannexin V陽性率が増加した。また、CD95(Fas)、CD95L(FasL)のアンタゴニストとして知られる、抗CD95抗体(ZB4)と抗CD95L抗体(NOK2)で1時間前処理後にSEBを加え、3時間培養した単球のannexin V陽性率を調べた結果、アポトーシスは有意に抑制された。

6. SEB刺激後の単球のPI陽性率

単球のアポトーシス誘導をアポトーシス後期に特異的なPIにより確認した。その結果、PI染色でも、SEBが単球のアポトーシスを誘導することが確かめられた。さらに、annexin Vの場合と同様にLPSの添加により、誘導される単球のPI陽性率は抑制された(図5)。また、IFN- γ には標的細胞のFasの発現を増強し、アポトーシスを誘導することが知られている¹⁷⁾ので、IFN- γ 処理によるPI陽性率を調べたが、単球のアポトーシスにおけるIFN- γ の関与は観察されなかった。

7. サイトカインによる単球のアポトーシス調節

SEBにTNF- α (10 ng/ml)、IL-1 β (10 ng/ml)、IFN- γ (100 U/ml)、IL-10(10 ng/ml)などのリコンビナント・サイトカインを同時に添加して、アポトー

表1 SEB と LPS 刺激によるサイトカイン産生

| Stimulus | Cytokine production (pg/ml) | | | | | | | |
|----------|-----------------------------|-----|--------------|-----------------|------------|---------------|--------------|---------------|
| | IFN- γ | | | | IL-4 | IL-1 β | IL-10 | TNF- α |
| | 3 | 6 | 9 | 18 | 18 | 18 | 9 | 6 |
| — | <20 | <20 | <20 | <20 | <10 | <20 | <20 | <20 |
| LPS | <20 | <20 | <20 | <20 | <10 | 430 \pm 123 | 549 \pm 55 | 422 \pm 56 |
| SEB | <20 | <20 | 164 \pm 29 | 1,155 \pm 136 | 16 \pm 1 | 438 \pm 108 | 171 \pm 11 | 201 \pm 10 |

PBMC を SEB (1 μ g/ml) と LPS (1 μ g/ml) で刺激して、一定の処理時間(3, 6, 9, 15 および 18 時間)後に上清を回収した。上清中のサイトカイン (IFN- γ , IL-4, IL-1 β , IL-10 および TNF- α) を ELISA キットで測定した。なお、本実験では図3と同じ donor の PBMC を用いた結果を示した。

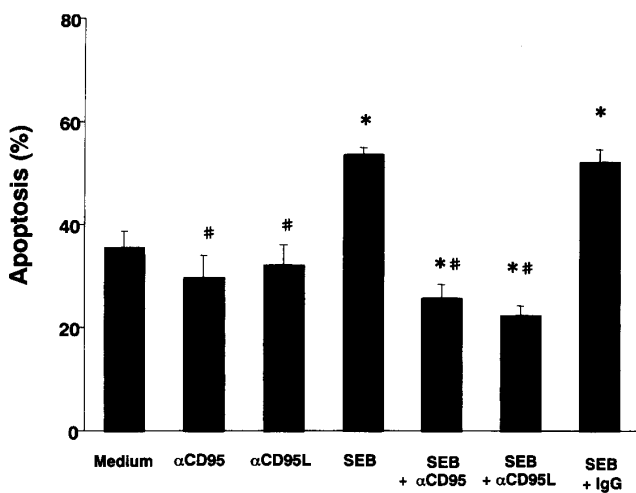


図4 SEB 刺激による単球のアポトーシス誘導
抗 Fas 抗体 (ZB4), 抗 FasL 抗体 (NOK2), コントロールとして抗マウス IgG を、それぞれ 1 μ g/ml 加えて 1 時間処理後、PBMC を SEB (1 μ g/ml) で刺激した。3 時間培養後に抗 CD14 抗体 (PE) と annexin V (FITC) で二重染色した後、アポトーシス陽性単球を FACSscan で解析した。単球中に占めるアポトーシス単球の割合 (%) は 3 人の doner の平均値 \pm SD で示した。
なお、* は $P < 0.01$ vs medium, # は $P < 0.01$ vs SEB 刺激群を示す。

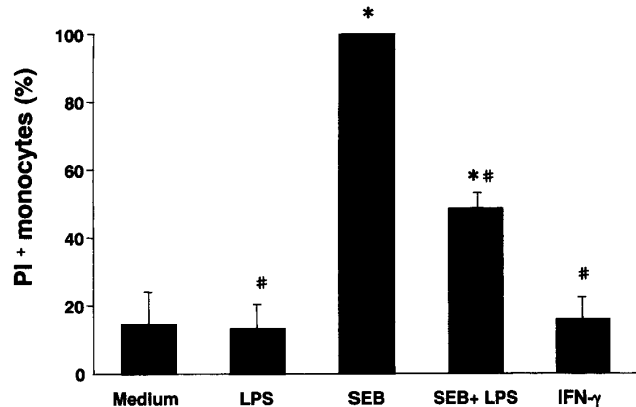


図5 SEB 刺激による PI+ 単球の誘導
PBMC を SEB (1 μ g/ml), LPS (1 μ g/ml), IFN- γ (100 U/ml) あるいは SEB+LPS で刺激し、18 時間後に細胞を回収して抗 CD14 抗体 (FITC) と PI で二重染色を行い、FACSscan で解析した。SEB で誘導される単球の PI 陽性率を 100% として、他の刺激による PI 陽性率を相対的に示した。結果は 3 人の doner の平均値 \pm SD で示した。
なお、* は $P < 0.01$ vs medium, # は $P < 0.01$ vs SEB 刺激群を示す。

シスの変化を 3 時間培養後に FACSscan で調べた。図 6 に示すように、LPS の場合と同様に IL-1 β あるいは、TNF- α を加えると、annexin V 陽性率が減少した。一方、IL-10 および IFN- γ で処理した場合には、このような抑制効果は認められなかった (データは示さず)。このことから、LPS は主に IL-1 β と TNF- α を介して、SEB で誘導される単球のアポトーシスを抑制している可能性が示唆された。

8. アポトーシスを介した CD80+ 単球の選択的増加

SEB 刺激で誘導される CD80+ 単球のアポトーシスに対する感受性を調べた結果、CD80- 単球と比較してアポトーシスに抵抗性を示すことが明らかとなった (図 7(a))。

さらに、1 μ g/ml の抗 FasL 抗体 (NOK2) を加えて選択的アポトーシスを抑制すると、CD80+ 単球の割合は著しく減少していた (図 7(b))。

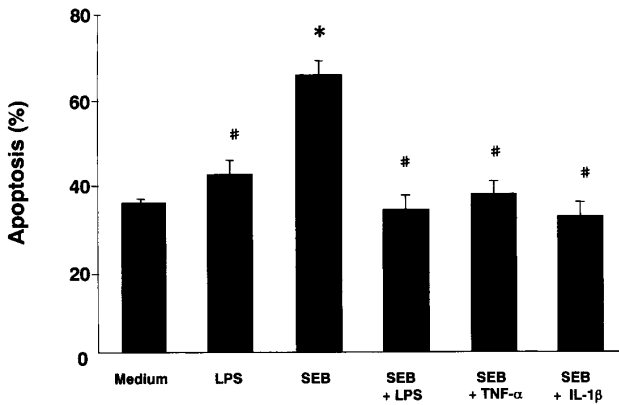


図6 SEB刺激による単球のアポトーシス誘導に及ぼすLPSとサイトカインの効果
SEB (1 μ g/ml) 単独あるいはLPS (1 μ g/ml), TNF- α (10 ng/ml) あるいはIL-1 β (10 ng/ml) をPBMCに加えた。3時間培養後に細胞を回収して、抗CD14抗体(PE)とannexin V (FITC) で二重染色を行いFACScanで解析した。annexin V陽性単球の割合(%)は3人のdonorの平均値 \pm SDで示した。
なお,*は $P < 0.01$ vs medium, #は $P < 0.01$ vs SEB刺激群を示す。

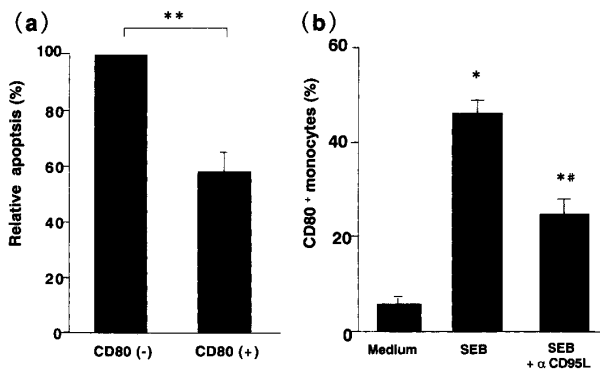


図7 アポトーシスを介したCD80⁺単球の選択的増加
(a) SEB刺激6時間後に細胞を回収して、抗CD80抗体(PE)とannexin V (FITC) で二重染色して単球ゲート内を解析した。CD80⁻単球のannexin V陽性率を100%として示して、CD80⁺単球の陽性率を示した。結果は3人のdonorの平均値 \pm SDで示した。なお,**は $P < 0.01$ を示す。
(b) 抗FasL抗体(NOK2) (1 μ g/ml) を加え、1時間前処理後PBMCをSEB (1 μ g/ml) で刺激した。18時間後に細胞を回収して、抗CD14抗体(FITC)と抗CD80抗体(PE)で二重染色を行いFACScanで解析した。CD80⁺単球の割合(%)は3人のdonorの平均値 \pm SDで示した。なお,*は $P < 0.01$ vs medium, #は $P < 0.01$ vs SEB刺激群を示す。

考 察

単球は通常FasLを発現しており、T細胞のアポトーシスを誘導する役割を担っている^{20,21}。また、単球は構成的にFas receptorも高レベルに発現しており、自身にも自然誘発のアポトーシスが観察される¹²。本研究の結果、単球のアポトーシスはSEB刺激で促進され、さらに、抗Fas抗体(ZB4)や抗FasL抗体(NOK2)を加えることで抑制されることから、SEBはFasの経路を介して単球にアポトーシスを誘導することが示された。さらに、アポトーシスの検出方法としてannexin VとPIを用いて検討したところ、両者は高い相関関係を示したが、annexin Vを用いた場合は、PIよりも高い数値を示す傾向にあった。これは、annexin Vの単球への部分的な非特異的結合、あるいは正常細胞への回復を示唆していると考えられる。今回の実験結果で特徴的なのは、CD80を発現した単球はSEBによるアポトーシスに抵抗性を示したことである。この機構は不明であるが、アポトーシスに対する感受性の違いから選択的にCD80⁺単球の割合が増加するものと考えられる。また、実験成績は示していないが、SEBによるアポトーシス誘導機構の一つとして、SEB処理により可溶性FasLが上清中に放出されて、これが単球上のFas receptorに結合してアポトーシスを誘導する可能性が考えられる。しかし、可溶性FasLは膜結合型と比べ、アポトーシスの誘導能が弱いという報告もあり²²、今後の検討が必要である。さらに、caspase-3インヒビター(DEVD-CHO)はSEB刺激で誘導される単球のアポトーシスを抑制する(データは示さず)ことから、Fas経路のアポトーシス・シグナルとしてのcaspase²³の活性化も示唆される。

近年、LPSや同刺激により産生されるIL-1 β や、TNF- α のような炎症性サイトカインが、単球のアポトーシスを調節するという報告がされている²⁴⁻²⁶。本研究でも、図6に示すように、LPSやIL-1 β , TNF- α は、SEBで誘導される単球のアポトーシスを抑制することが明らかとなった。LPSによるアポトーシス抑制機構としてcaspaseに作用を及ぼしている可能性が示唆されているが²⁶、その細部はまだ明らかでない。

IFN- γ はマクロファージ活性化サイトカインの1つであり、タイプ1ヘルパーT細胞やNK細胞などから産生されることが知られている²⁷。また、単球表面に発現するMHCクラスII, ICAM-1およびCD80の発現を亢進して、T細胞の活性化を促進する作用が知ら

れている²⁸⁻³¹⁾。T 細胞の活性化には抗原刺激などのメインシグナル以外に、CD28/CD80 の相補的な結合を介した補助シグナルが重要といわれる^{30,31)}。さらに、図 2 に示すように、SEB による CD80⁺ 単球の増加は、主に IFN- γ の作用によることが示唆された。また、IFN- γ による CD80 誘導能が LPS 処理で抑制された。この原因として、LPS 処理により単球上の IFN- γ レセプター (α 鎖) の発現が減少するという結果を得ており (データは示さず)、これが LPS による抑制機構の 1 つである可能性が考えられる。

単球上の CD80 の発現は、IL-4 を加えることで抑制され、抗 IL-4 中和抗体を用いると抑制が解除されるとの研究がある³²⁻³⁴⁾。また、IL-4 によって B 細胞上の CD80 の発現が低下するとの報告もある³⁴⁾。過去の報告と同じく、今回の実験においても、図 2 に示したように、IFN- γ 刺激によって単球上に誘導される CD80 は、部分的に IL-4、さらには IL-10 によって抑制されることが明らかとなった³⁵⁻³⁸⁾。しかし、SEB 刺激で産生される IL-4 の量は、18 時間培養でも微量に過ぎない。よって、IFN- γ による CD80 誘導の抑制には、むしろ、LPS 刺激により産生される IL-10 が主に関与していることが考えられる³⁵⁻³⁷⁾。

以上の実験結果から、スーパー抗原および LPS 存在下における T 細胞と単球の相互作用として、以下の仮説が考えられる。SEB 刺激で培養初期から培養上清中に可溶性 FasL が産生される。この FasL は CD80⁻ 単球のアポトーシスを選択的に誘導し、CD80⁺ 単球の割合を増加させる。遅れて産生される IFN- γ により単球の CD80 の発現は二次的に増強され、T 細胞の CD28 との結合を介して T 細胞を活性化する。また、

LPS は単球から IL-1 β 、TNF- α や IL-10 の産生を誘導し、早期に産生された IL-1 β や TNF- α 等はオートクラインに作用することで単球内にシグナルを伝達し、SEB 刺激で誘導される単球のアポトーシスを抑制する。一方、遅れて産生される IL-10 は IFN- γ による単球の CD80 発現を抑制する。したがって、LPS は単球のアポトーシスと CD80 発現の両方に異なるメカニズムの抑制作用を示すが、どちらも CD80⁺ 単球の減少を導き、T 細胞の過剰な活性化を抑制するものと考えられる。しかし、この仮説の細部について、さらに研究が必要である。

本研究で得られたスーパー抗原による T 細胞の過剰な活性化による歯周組織の傷害作用が、有害な菌体成分と考えられきた LPS により抑制される³⁹⁾ という知見は、歯周病の発病と病態の研究に新たな視点を提供して、興味ある研究へと展開する可能性があるものと思われる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に着手する機会を与えて下さいました、本学旧保存学第一講座の堀内 博教授(現名誉教授)、ならびに研究遂行と論文作成にあたり直接ご指導頂いた本研究科口腔微生物学分野の力石秀実講師に心から拝謝いたします。また、本論文の作成にあたって御指導ならびにご校閲を賜りました同分野の高田春比古教授ならびに、歯内・歯周療法学分野の島内英俊教授に厚く御礼申し上げます。さらに、終始様々なお力添えを賜りました本学口腔微生物学分野ならびに歯内・歯周療法学分野の皆様には、厚く感謝の意をあらわします。

内容要旨: スーパー抗原である staphylococcal enterotoxin B (SEB) は単球のアポトーシスを誘導し、内毒素リポ多糖 (LPS) はこれを抑制する。SEB 刺激で誘導される単球のアポトーシスは抗 CD95 (Fas) 抗体、抗 CD95 リガンド (CD95L) 抗体により抑制されることから、SEB は Fas の経路を介したアポトーシスを誘導することが示唆された。また、SEB 刺激による CD80⁺ 単球の増加と関連して、CD80⁻ 単球の方が CD80⁺ 単球よりもアポトーシスに高い感受性を示し、CD80⁺ 単球が選択的に増加することが示された。一方、SEB 刺激で T 細胞からインターフェロン- γ (IFN- γ) が産生される。IFN- γ は単独で CD80 を単球に誘導する。IFN- γ の作用は、抗 CD119 (IFN- γ レセプター α 鎖) 抗体を用いた IFN- γ レセプターのブロックによる CD80⁺ 単球の減少により確かめられた。また、LPS はインターロイキン (IL)-10 の作用を介して CD80 の発現を抑制した。しかしながら、SEB 刺激で誘導される CD80⁺ 単球は IFN- γ が産生される前から緩やかに増加すること、抗 FasL 抗体処理によるアポトーシス抑制によって CD80⁺ 単球が減少することから、この CD80⁺ 単球の増加は、SEB 刺激に対する単球の複合的な反応の結果であることが示唆された。すなわち、SEB 処理により、IFN- γ が産生される以前にすでに単球にアポトーシスのシグナルが伝達され、その感受性の違いから CD80⁺ 単球の選択的な増加が

起こる。遅れて産生される IFN- γ の作用により、さらに二次的な増加が誘導される。一方、LPS はアポトーシスおよび IFN- γ の作用の両方に抑制的に作用し、SEB 刺激で誘導される CD80⁺ 単球の増加を抑制することが示唆された。

文 献

- 1) Takada, H., Mihara, J., Morisaki, I. and Hamada, S.: Production of cytokines by human gingival fibroblasts. Hamada, S., Holt, S.C. and McGhee, J.R. (edit.): Periodontal disease: pathogenesis & host immune response. Quintessence Publishing, Tokyo, 1991, pp. 265-276.
- 2) Wilson, M.: Biological activities of lipopolysaccharide and endotoxin. Shah, H.N. (edit): Biology of the species of *Porphyromonas gingivalis*. CRC Press, 1993, pp. 171-194.
- 3) Matushita, K., Fujimaki, W., Kato, H., Uchiyama, T., Igarashi, H., Ohkuni, H., Nagaoka, S., Kawagoe, M., Kotani, S. and Takada, H.: Immunopathological activities of extracellular products of *Streptococcus mitis*, particularly a superantigenic fraction. Infect. Immun. **63**: 785-793, 1995.
- 4) Matushita, K., Sugiyama, A., Uchiyama, T., Igarashi, H., Ohkuni, H., Nagaoka, S., Kotani, S. and Takada, H.: Induction of lymphocytes cytotoxic to oral epithelial cells by *Streptococcus mitis* superantigen. J. Dent. Res. **75**: 927-934, 1996.
- 5) Zadeh, H.H. and Kreutzer, D.L.: Evidence for involvement of superantigens in human periodontal diseases: skewed expression of T cell receptor variable regions by gingival T cells. Oral Microbiol. Immunol. **11**: 88-95, 1996.
- 6) Leung, K.-P. and Torres, B.A.: *Prevotella intermedia* stimulates expansion of V β -specific CD4⁺ T cells. Infect. Immun. **68**: 5420-5424, 2000.
- 7) Marrack, P. and Kappier, J.: The staphylococcal enterotoxins and their relatives. Science **248**: 705-711, 1990.
- 8) Kappler, J., Kotzin, B., Herron, L., Gelfand, E.W., Bigler, R.D., Boylston, A., Carrel, S., Posnett, D.N., Choi, Y. and Marrack, P.: V β -specific stimulation of human T cells by staphylococcal toxins. Science **244**: 811-814, 1989.
- 9) Mittrücker, H.-W., Shahinian, A., Bouchard, D., Kündig, T.M. and Mak, T.W.: Induction of unresponsiveness and impaired T cell expansion by staphylococcal enterotoxin B in CD28-deficient mice. J. Exp. Med. **183**: 2481-2488, 1996.
- 10) Rink, L., Luhm, J., Koester, M. and Kirchner, H.: Induction of a cytokine network by superantigens with parallel Th1 and Th2 stimulation. J. Interferon Cytokine Res. **16**: 41-47, 1996.
- 11) Morrison, D.C. and Ryan, J.L.: Endotoxins and disease mechanisms. Ann. Rev. Med. **38**: 417-432, 1987.
- 12) Fahy, R.J., Doseff, A.I. and Wewers, M.D.: Spontaneous human monocyte apoptosis utilizes a caspase-3-dependent pathway that is blocked by endotoxin and is independent of caspase-1. J. Immunol. **163**: 1755-1762, 1999.
- 13) Um, H.-D., Orenstein, J.M. and Wahl, S.M.: Fas mediates apoptosis in human monocytes by a reactive oxygen intermediate dependent pathway. J. Immunol. **156**: 3469-3477, 1996.
- 14) Iwai, K., Miyawaki, T., Takizawa, T., Kanno, A., Ohta, K., Yachie, A., Seki, H. and Taniguchi, N.: Differential expression of bcl-2 and susceptibility to anti-Fas-mediated cell death in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and neutrophils. Blood **84**: 1201-1208, 1994.
- 15) Tonetti, M.S., Cortellini, D. and Lang, N.P.: In situ detection of apoptosis at sites of chronic bacterially induced inflammation in human gingiva. Infect. Immun. **66**: 5190-5195, 1998.
- 16) Muro, M., Koseki, T., Akifusa, S., Kato, S., Kowashi, Y., Ohsaki, Y., Yamato, K., Nishijima, M. and Nishihara, T.: Role of CD14 molecules in internalization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by macrophages and subsequent induction of apoptosis. Infect.

- Immun. **65** : 1147-1151, 1997.
- 17) Weller, M., Frei, K., Groscurth, P., Krammer, P.H., Yonekawa, Y. and Fontana, A. : Anti-Fas/APO-1 antibody-mediated apoptosis of cultured human glioma cells. Induction and modulation of sensitivity by cytokines. *J. Clin. Invest.* **94** : 954-964, 1994.
 - 18) Rikiishi, H., Okamoto, S., Sugawara, S., Tamura, K., Liu, Z.-X. and Kumagai, K. : Superantigenicity of helper T-cell mitogen (SPM-2) isolated from culture supernatants of *Streptococcus pyogenes*. *Immunology* **91** : 406-413, 1997.
 - 19) Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P.M., McGahon, A.J., Rader, J.A., von Schie, R.C.A.A., LaFace, D.M. and Green, D.R. : Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* **182** : 1545-1556, 1995.
 - 20) Ashany, D., Song, X., Lacy, E., Nicolic-Zugic, J., Friedman, S.M. and Elkon, K.B. : Th1 CD4⁺ lymphocytes delete activated macrophages through the Fas/APO-1 antigen pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** : 11225-11229, 1995.
 - 21) Wang, J.K.M., Zhu, B., Ju, S.-T, Tschopp, J. and Marshak-Rothstein, A. : CD4⁺ T cells reactivated with superantigen are both more sensitive to FasL-mediated killing and express a higher level of FasL. *Cell, Immunol.* **179** : 153-164, 1997.
 - 22) Oyaizu, N., Kayagaki, N., Yagita, H., Pahwa, S. and Ikawa, Y. : Requirement of cell-cell contact in the induction of Jurkat T cell apoptosis: the membrane-anchored but not soluble form of Fas L can trigger anti-CD3-induced apoptosis in Jurkat T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **238** : 670-675, 1997.
 - 23) Ashkenazi, A. and Dixit, V.M. : Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281** : 1305-1309, 1998.
 - 24) Estaque, J. and Ameisen, J.C. : A role for T-helper type-1 and type-2 cytokines in the regulation of human monocyte apoptosis. *Blood* **90** : 1618-1625, 1997.
 - 25) Mangan, D.F., Welch, G.R. and Wahl, S.M. : Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor- α , and IL-1 β prevent programmed cell death (apoptosis) in human peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* **146** : 1541-1546, 1991.
 - 26) Stoiber, D., Kovarik, P., Cohnen, S., Johnston, J.A., Steinlein, P. and Decker, T. : Lipopolysaccharide induces in macrophages the synthesis of the suppressor of cytokine signaling 3 and suppresses signal transduction in response to the activating factor IFN- γ . *J. Immunol.* **163** : 2640-2647, 1999.
 - 27) Kawakami, K., Koguchi, Y., Qureshi, M.H., Miyazato, A., Yara, S., Kinjo, Y., Iwakura, Y., Takeda, K., Akira, S., Kurimoto, M. and Saito, A. : IL-18 contributes to host resistance against infection with *Cryptococcus neoformans* in mice with defective IL-12 synthesis through induction of IFN- γ production by NK cells. *J. Immunol.* **165** : 941-947, 2000.
 - 28) Matsue, H., Kobayashi, H., Hosokawa, T., Akitaya, T. and Ohkawara, A. : Keratinocytes constitutively express the Fas antigen that mediates apoptosis in IFN- γ -treated cultured keratinocytes. *Arch. Dermatol. Res.* **287** : 315-320, 1995.
 - 29) Fargeas, C.A., Truneh, A., Reddy, M., Hurle, M., Sweet, R. and Sekaly, R.-P. : Identification of residues in the V domain of CD80 (B7-1) implicated in functional interactions with CD28 and CTLA4. *J. Exp. Med.* **182** : 667-675, 1995.
 - 30) Boulougouris, G., McLeod, J.D., Patel, Y.I., Ellwood, C.N., Walker, L.S.K. and Sansom, D.M. : Positive and negative regulation of human T cell activation mediated by the CTLA-4/CD28 ligand CD80. *J. Immunol.* **161** : 3919-3924, 1998.
 - 31) Fleisher, J., Soeth, E., Reiling, N., Grage-Griebenow, E., Flad, H.-D. and Ernst, M. : Differential expression and function of CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) on human peripheral blood monocytes. *Immunology* **89** : 592-598, 1996.
 - 32) Mangan, D.F., Robertson, B. and Wahl, S.M. : IL-4 enhances programmed cell death

- (apoptosis) in stimulated human monocytes. *J. Immunol.* **148**: 1812-1816, 1992.
- 33) Schweitzer, A.N. and Shparpe, A.H.: Mutual regulation between B7-1 (CD80) expressed on T cells and IL-4. *J. Immunol.* **163**: 4819-4825, 1999.
- 34) Stack, R.M., Lenschow, D.J., Gray, G.S., Bluestone, J.A. and Fitch, F.W.: IL-4 treatment of small splenic B cells induces costimulatory molecules B7-1 and B7-2. *J. Immunol.* **152**: 5723-5733, 1994.
- 35) Willems, F., Marchant, A., Delville, J.-P., Gérard, C., Delvaux, A., Velu, T., de Boer, M. and Goldman, M.: Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *Eur. J. Immunol.* **24**: 1007-1009, 1994.
- 36) Donnelly, R.P., Fenton, M.J., Finbloom, D.S. and Gerrard T.L.: Differential regulation of IL-1 production in human monocytes by IFN- γ and IL-4. *J. Immunol.* **145**: 569-575, 1990.
- 37) Ding, L., Linsley, P.S., Huang, L.-Y., Germain, R.N. and Shevach, E.M.: IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J. Immunol.* **151**: 1224-1234, 1993.
- 38) Takeshita, S., Gage, J.R., Kishimoto, T., Vredevoe, D.L. and Martinez-Maza, O.: Differential regulation of IL-6 gene transcription and expression by IL-4 and IL-10 in human monocytic cell lines. *J. Immunol.* **156**: 2591-2598, 1996.
- 39) Kai, K., Rikiishi, H., Sugawara, S., Takahashi, M., Takada, H. and Kumagai, K.: Lipopolysaccharide-dependent down-regulation of CD27 expression on T cells activated with superantigen. *Immunology* **98**: 289-295, 1999.

略語表

FITC; fluorescein isothiocyanate
 PE; phycoerythrin
 SEB; staphylococcal enterotoxin B
 TSST-1; toxic shock syndrome toxin-1
 SPM-2; *Streptococcus pyogenes* mitogen-2
 MHC; major histocompatibility complex
 CD95; Fas
 CD95L; Fas ligand
 PBMC; peripheral blood mononuclear cell
 PI; propidium iodide