

氏 名 (本籍)	さ とう たか ゆき 佐 藤 崇 之
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 1 9 5 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 5 年 3 月 2 4 日
学 位 授 与 の 条 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 専 攻	東 北 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科 (博 士 課 程) 医 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Critical role of OX 40-OX 40 ligand interactions in Langerhans cell function (ランゲルハンス細胞の抗原提示機能における OX 40/OX 40 L 系の役割)

(主 査)

論 文 審 査 委 員	教 授 菅 村 和 夫	教 授 佐 々 木 毅
	教 授 高 井 俊 行	

# 論文内容要旨

## 目 的

生体において免疫応答が成立するためには、T細胞が抗原提示細胞（APC）からの抗原提示を受ける必要がある。この機構において、T細胞は細胞表面の抗原受容体を介して、APC上の主要組織適合抗原とペプチド抗原の複合体を認識する。この時、CD28とCD80/CD86間あるいはCD40リガンドとCD40間のような副刺激膜分子間の結合が加わることが抗原特異的免疫反応には必須である。TNF受容体スーパーファミリーに属しているOX40も副刺激膜分子の1つとして知られており、*in vitro*において活性化されたT細胞上に発現する。また関節リウマチの関節腔内T細胞やGVHDにおけるエフェクターT細胞など、*in vivo*での活性化T細胞上にも発現していることが知られている。その機能としてはT細胞の増殖やサイトカインの産生を高める副刺激受容体であることが報告されている。そのリガンドであるOX40リガンド（OX40L）は活性化された樹状細胞やB細胞等のAPC上に発現する。我々はOX40/OX40L系の*in vivo*での機能を解析するためにOX40L遺伝子欠損（KO）マウスを作製し、これまでAPCによる種々の免疫反応の抑制を確認しており、OX40LがAPCの機能発現に重要な役割を担う分子であることを明らかにした。

皮膚表皮内に存在する骨髄由来APCであるランゲルハンス細胞（LC）は皮膚免疫の中心的な役割を担っており、アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎または乾癬などの発症機序に関わると考えられている。LCは抗原を取り込むとリンパ節へ移動し、T細胞へ抗原提示を行う。この時、LCはMHC分子と共にCD80、CD86、CD40、ICAM-1などの副刺激膜分子を発現し、T細胞を活性化させ、エフェクターT細胞へと分化させることが知られている。しかしながら、OX40/OX40L系がLCの抗原提示機能に関わっているかは、まだ明らかにされていない。そこで本研究では、OX40L遺伝子改変マウスにおけるハプテン特異的な接触性皮膚過敏症誘導実験および、これらマウス由来LCのT細胞への抗原提示能を比較し、LCの抗原提示におけるOX40/OX40L系の役割を検討した。

## 方法・結果

まず、LCのOX40L mRNAの発現をRT-PCR法により調べた。その結果、naiveマウスのLCではOX40L mRNAの発現は認められなかったが、ハプテン（FITC）を塗布したマウスのLCではその発現を確認した。従って、LCの抗原提示にOX40Lが関わる可能性が示唆された。次に、C57BL/6（wild），OX40L-KOおよびOX40Lトランスジェニック（Tg）マウスにおけるLC機能を検討するために接触性皮膚過敏症誘導実験を行った。各々のマウス下腹部にハプ

テン (DNFB, TNCB, FITC) を塗布した。6日後, これらのマウス耳介皮膚に同一のハプテンを塗布し, 炎症反応の指標として塗布部耳介の腫脹を測定した。さらに上記のマウスにおけるハプテン特異的 T 細胞の増殖反応とサイトカイン産生を調べるため, 同様の処理をした各々のマウスから所属リンパ節を摘出し, *in vitro* で再びハプテンで刺激し3日間, 37°Cで培養した。T細胞の増殖反応はトリチウム・サイミジン ( $^3\text{H}$ -thymidine) を取り込ませて解析し, サイトカインは培養上清を ELSA により測定した。その結果, OX40L-Tg マウスでは炎症反応が強く増強し, 逆に OX40L-KO マウスでは有意な抑制がみられた。また, 所属リンパ節のハプテン特異的 T 細胞の増殖反応およびサイトカイン産生においても, OX40L-KO/Tg マウスでは増強しており, OX40L-KO マウスでは減弱していた。さらに LC の移動を調べるため, 上記マウスに FITC を感作させ, 24 時間後の所属リンパ節を摘出し, リンパ節内の FITC 陽性 LC の比率をフローサイトメーターにて解析した。その結果, 各々のマウスにおいてリンパ節へ移動した FITC 陽性 LC の割合に, 全く差が認められなかった。最後に, 上記マウス由来 LC の抗原提示機能を比較するために, BALB/c マウス由来 CD4 陽性 T 細胞と C57BL/6 マウス (wild, OX40L-KO および OX40L-Tg) 由来 LC とのアロ抗原に対する混合リンパ球反応法を用いて, CD4 陽性 T 細胞の増殖反応とサイトカイン産生を上記と同じ方法で測定した。その結果, wild および OX40L-KO 由来 LC に比べ, OX40L-Tg 由来 LC は CD4 陽性 T 細胞の増殖と IL-2 産生を著しく促進させた。

これらの結果から, *in vivo* において OX40/OX40L 系は LC の移動には関与しないが, T 細胞への抗原提示に必須に関わることが明らかとなった。

## 審査結果の要旨

生体の免疫応答の成立には、T細胞上のT細胞抗原受容体と抗原提示細胞上のMHC・ペプチド抗原複合体との結合および各々の細胞上に発現する補助刺激膜分子の結合が必須である。OX40はTNFレセプター・ファミリーの1つで、*in vivo*および*in vitro*における活性化T細胞上に発現している。そしてOX40はT細胞の増殖やサイトカインの産生を高める補助刺激受容体として機能することが明らかにされている。一方、OX40リガンド(OX40L)は活性化された樹状細胞やB細胞等の抗原提示細胞上に発現し、抗原提示細胞の機能発現に重要な役割を担う分子であることが示唆されている。本研究の目的は、皮膚の抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞の抗原提示機能におけるOX40-OX40L系の機能的役割を明らかにすることである。

解析の結果、申請者は(1)活性化ランゲルハンス細胞上にOX40Lが発現することを世界で初めて明らかにした。また、(2)OX40L遺伝子欠損マウスおよびOX40L遺伝子導入マウスを用いた解析より、OX40Lがランゲルハンス細胞のCD4<sup>+</sup>T細胞への抗原提示に必須であることを証明した。さらに(3)活性化ランゲルハンス細胞上にOX40が発現することを確認した。このことはOX40からのシグナルによりランゲルハンス細胞の分化および機能発現の亢進に関わる可能性を示すものであり、皮膚免疫における今後の研究に新たな展開を見出す可能性が考えられる。

厳正なる第一次審査および最終審査を経て、本稿は更に加筆修正された。また本稿の基幹研究内容は既にEuropean Journal of Immunology (2002, Vol.32: 3326-3335)にて掲載発表されており、博士号を取得するに値する内容として完成されたものであると判断する。