原 著

接触性過敏症におけるT細胞と抗原提示細胞の相互反応 におけるCD80/CD86とCTLA-4の機能

塗 谷 達 東 み ゆ き* 榎 本 昭 二

抄録：接触性過敏症の抗原感作時のT細胞と抗原提示細胞間相互反応におけるCD80/CD86分子の発現およびそのリガンドであるCD28及びCTLA-4の抗原特異的T細胞活性化に与える役割について接触性過敏症モデルを用いて検討した。感作時の抗CD86抗体投与によって耳介腫脹の著しい抑制が認められたが、抗CD80抗体投与では明らかな変化は認められなかった。組織染色では感作後の表皮から真皮に移動したLC上にCD86の発現が認められたが、CD80の発現は認められなかった。また、CD28と相反する抑制シグナルを伝達すると考えられているCTLA-4に対する抗体を投与したところ耳介の腫脹の亢進が観察された。以上の結果から、皮膚での抗原感作反応には、LC上のCD86がリンパ節内のナイーブT細胞との相互反応に重要な役割を果たしていること、またCD28だけでなくCTLA-4の機能も関与していることが明らかとなった。

キーワード：接触性過敏症, CD80, CD86, CD28, CTLA-4

緒 言

抗原特異的なT細胞の活性化／不活化の制御にCD28に代表される共刺激シグナル分子の働きが重要であることが明らかになってきた¹⁾。CD28のリガンドであるCD80およびCD86分子の発現がいくつかの自己免疫疾患において報告されており^{2,3)}、免疫異常とこれらの分子との関連が示唆されている。炎症性皮膚疾患であるアレルギー性接触性皮膚炎や扁平苔癬において、正常皮膚においては認められないCD80の発現がランゲルハンス細胞 (Langerhans cell, LC)、真皮樹状細胞やマクロファージにおいて報告されている⁴⁾。CD80およびCD86分子の発現は抗原提示細胞の抗原提示能力と強い相関があることが予想されるが、実際の皮膚および粘膜そして領域リンパ節において展開される、LCによる抗原獲得、それに引き続くT細胞の抗原認識、そしてT細胞の抗原特異的活性化に至る細胞相互反応におけるCD28とCD80およびCD86の経時的な役割相互分担については明らかでない。また、最近ではCD28のホモログであるCTLA-4分子がCD28とは正反対の抑制シグナルを入れている可能性が明らかになり⁵⁾ 共通のリガンドであるCD80とCD86がT細胞上のCD28およびCTLA-4を

介してどの様に関与しているのか興味を持たれるところである。本研究ではハプテン誘導マウス接触性皮膚炎モデルを用いて、LC、領域リンパ節樹状細胞、T細胞間におけるCD28, CTLA-4, CD80およびCD86の4つの分子の機能的役割について検討した。

研究方法

1. モノクローナル抗体

抗マウスI-A抗体産生ハイブリドーマM5/114.15.2はAmerican Type Culture Collection (ATCC) より購入し、培養上清として使用した。抗マウスCD80 (RM80) およびCD86 (PO3) 抗体産生ハイブリドーマの樹立および抗体精製については既報告^{6,7)} に準じた。抗マウスCTLA-4抗体 (UC10.4F10.11) は、PharMingen社より購入した。

2. ハプテン誘導接触性皮膚炎モデルと抗体投与

7-8週令雌BALB/cマウス (静岡実験動物) の腹部を剃毛後、0.5%DNFB (dinitrofluorobenzene, Sigma) -アセトン/オリーブオイル (4:1) 溶液 25 μ lを腹部皮膚に2日連続で塗布し感作した。3日後0.2%DNFB溶液20 μ lを耳介の表裏両面に塗布 (チャレンジ) し、接触性過敏症 (contact hypersensitivity, CH) を発症させた。CHの評価は、各耳介について2回、チャレンジ直前とチャレンジ後で合計4回、耳介腫脹をdial thickness gauge (Peacock, Ozaki, Tokyo, Japan) を用い測定し、そ

東京医科歯科大学歯学部第二口腔外科学教室 (主任: 榎本昭二教授)

* 国立小児病院小児医療研究センター免疫研究室 (主任: 香坂隆夫)

[受付: 4月2日, 1997, 受理: 5月20日, 1997]

の差で表した。陰性対照としては感作時に溶媒のみを塗布し、DNFBチャレンジを行ったマウスを用いた。

一回の実験は4-6匹のマウスを一群とし、最低3回以上実験を繰り返した。抗体投与効果を調べる実験では、2回の感作時の2時間前にPBSで希釈した各々の抗体を250 μ gづつ腹腔内投与した。抗体投与の対照群としては等容量のPBSを投与した群を用いた。

3. 免疫組織染色

耳介および所属リンパ節組織を外科的に切除し、直ちに

O.C.T. コンパウンド (Tissue-tek) に包埋し、使用まで -70°C に保存した。凍結標本はクリオスタットにて厚さ3-4 μm の連続切片とし、冷アセトン固定した。免疫組織染色では、正常ウサギ血清にてブロッッキング後、一次抗体として上記の抗MHC class II, 抗CD80, あるいは抗CD86抗体と反応させた後、2次抗体としてビオチン化ウサギ抗ラットIg (Vector) を用いた。抗原の同定はアビジン-ビオチン化ペルオキシダーゼ複合体 (Vectastain ABC, Vector) とDAB (3,3'-diaminobenzidine) 基質溶液に

Fig. 1 The kinetics of development of CH reaction induced by DNFB application.

Fig. 2 Administration of anti-CD80 and/or CD86mAb in the induction phase of CH reaction.

Data represent the mean changes in ear thickness+SEM. Student's t-test was performed to determine the statistical significance of ear swelling responses.

* denotes values significantly different from those of PBS-treated group. ($p < 0.005$)

Fig. 3 Expression of MHC class II, CD80 and CD86 in the CH reactive site.

Immunohistochemical detection of MHC class II(a), CD80 (b) and CD86 (c) in the ear sections from mice 24 h after DNFB application. Cryostat sections were stained with either anti-MHC class II, anti-CD80 or anti-CD86 mAb as described in Methods.

よる発色で行った。カウンター染色はメチルグリーンを使用した。

研究結果

1. 抗原感作時における抗CD80およびCD86抗体の投与効果

未感作マウス群においてはチャレンジ後の耳介腫脹はほとんど認められなかったのに対し、感作マウスにおいては耳介の腫脹は12時間後から認められ、24時間後をピークにその後減少することが観察された (Fig. 1)。そこで、以下の実験では、チャレンジ後24時間後の耳介腫脹を測定す

ることとした。

感作時における抗体投与では、抗CD86抗体は効果的に耳介の腫脹を抑制し、この現象は個体差なくほとんどのマウスにおいて認められた (Fig. 2)。これに対し、抗CD80抗体投与では平均すると抑制効果をほとんど認めなかった。しかしながら、個体別にみると、抑制効果の認められたもの、逆に腫脹の増強が認められたものなど様々であった。抗CD80および抗CD86抗体の併用投与ではさらなる抑制は認められなかった。

2. 皮膚におけるCD80およびCD86の発現

感作時における投与で抗CD86抗体のみが効果を示す理由を検討するために、初期感作前後の皮膚におけるCD80およびCD86の発現を免疫組織化学染色にて検討した。便宜上、腹部皮膚ではなく耳介皮膚に初回ハプテン感作を行い、塗布前と24時間後の耳介皮膚を用いた。感作前皮膚組織では、表皮および真皮にMHC class II 陽性のLC様の細胞が認められたが、CD80およびCD86陽性細胞はほとんど認めることができなかった。一方、初期感作後24時間の耳介皮膚組織では、MHC class II 陽性細胞の明らかな増加が認められた (Fig. 3 a)。感作後のCD86染色では陽性細胞が多く出現しており、特に強陽性の細胞が表皮にはなく真皮上層に認められ、これらは形態からみても表皮から真皮に遊走してきたLCと思われた (Fig. 3 c)。CD80の明らかな発現は、感作後においても認められなかった (Fig. 3 b)。以上の結果から、CH反応の感作時における抗CD86抗体投与の顕著な抑制効果は感作後のLCにおけるCD86の明らかに優位な発現に帰因することが示唆された。

3. 所属リンパ節におけるCD80およびCD86の発現

抗原を採取したLCは、速やかに所属リンパ節に移動することが知られており、LCはリンパ節において主にT細胞と相互反応を行うと考えられるので、次に領域リンパ節におけるCD80およびCD86の発現を検討した。未感作マウスのリンパ節では傍皮質領域であるT細胞領域に一致して、CD86陽性細胞の発現が認められたが、CD80陽性細胞は僅かであった (Fig. 4 a,b)。感作マウスリンパ節では、CD80およびCD86共に陽性細胞の増加が認められ、これらの細胞は形態学的にも樹状細胞と思われた (Fig. 4 c,d)。以上の結果から、リンパ節内のナイーブT細胞は遊走してきたCD86陽性のLCによって抗原提示を受け活性化され、その結果サイトカイン等を産生し、リンパ節内樹状細胞上のCD80あるいはCD86分子の発現を促進するものと考えられた。

4. 抗原感作時における抗CTLA-4抗体投与結果

Fig. 4 Expression of CD80 and CD86 in the T cell areas of draining lymph nodes.

Draining lymph nodes from unsensitized (a and b) or sensitized (c and d) mice were stained with anti-CD80 (a and c) or anti-CD86 (b and d) mAb.

Fig. 5 Administration of anti-CTLA-4 mAb in the induction phase of CH reaction.

CTLA-4を介した抑制シグナルが抗原感作時におけるL CとT細胞の相互反応に関わっている可能性を調べるために、感作時における抗CTLA-4抗体投与効果について検討した。抗CTLA-4抗体投与は非抗体投与対照群と比べて明

らかに耳介腫脹を増強させた (Fig. 5)。この結果から、抗原感作時におけるT細胞と抗原提示細胞との相互反応にCD28のみならずCTLA-4分子も関与していることがin vivoにおいて示された。

考 察

抗原特異的なT細胞の活性化にCD28を介するシグナルがT細胞と抗原提示細胞との相互反応において重要な役割を果たしていることが多くのin vitro およびin vivo の実験から明らかにされてきた⁸⁻¹⁰⁾。しかしながら、CD28を介するこの制御機構はCD28がCD80とCD86の2つのリガンドを持つことと、さらにこの2つのリガンドを共通するCTLA-4という正反対の機能を持つ分子の存在により複雑化されている。

ハプテン誘導マウス接触性過敏症反応は、ハプテン感作時の誘導相とチャレンジ時の効果発現相の2つの反応相からなる。前者は、経皮的に塗布されたハプテンが表皮蛋白に結合し、抗原として表皮抗原提示細胞であるLCに取り込まれ、表皮から真皮、輸入リンパ管を経たLCが領域リンパ節内のナイーブT細胞に初回の抗原提示を行う反応からなる。後者は抗原採得したLCがすでに同抗原において感作されているメモリーT細胞を領域リンパ節内で活性化し、皮膚局所にT細胞を動員し炎症反応が惹起される相である。今回我々は、抗原感作時の誘導相におけるLCとT細胞の相互反応に関わるCD80およびCD86分子の関与、さらにはCTLA-4による抑制シグナルの影響について検討した。

CD80およびCD86は一般的には樹状細胞、マクロファージ、活性化B細胞などの抗原提示細胞に発現が認められるが¹¹⁾、正常状態ではICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) などの他の接着分子と異なり、時間的および局所的にかなり発現は制約を受けている。本研究においても、過去の報告と同様⁴⁾、CD80およびCD86発現は正常皮膚ではほとんど認められなかった。感作後の真皮上層のLCにおいてCD86のみの発現が強く認められたことと、抗CD86抗体投与のみが有意にCH反応を抑制した結果は、CD86のLCにおける選択的発現が機能に直接関与しているものと考えられる¹²⁾。B細胞においてもIgなどによる抗原特異的な刺激においてはCD80ではなくCD86が経時的にも量的にも優位に増強されることが報告されていることから¹³⁾、LCにおいても抗原特異的な刺激ではCD86のみの発現が増強される可能性が示された。また、CD86強陽性のLCは表皮には殆ど認められず真皮上層に認められた事実は、抗原を採取して表皮から真皮に遊走してきたLCがCD86を発現を獲得した事実を示唆していて興味深い。

CTLA-4がCD28とは逆にT細胞活性化に対し抑制シグナルを入れている事実を示唆する報告が近年相次いでなされているが^{3, 14, 15)}、in vivo の反応において実際にCTLA-

4の関与を証明しているものは少ない。我々は、感作時における抗CTLA-4抗体投与が明らかにCH反応を増悪させることを示し、LCとT細胞間相互作用における初回反応におけるCTLA-4の関与を始めて明らかにした。抗CTLA-4抗体は抗体結合そのものがシグナル伝達に関与する可能性もあることから、結合阻害抗体としてはF(ab)フラグメントにして用いることが望ましいが、当検討では未処理抗体を用いた。Perrinらは、我々と同じ抗体を脱髄疾患モデルであるEAE (experimental allergic encephalomyelitis) に抗原刺激の2日後のプライミング時あるいは病態発症後に投与し、共に病態の悪化を認め、かつ病態発症に関連しているIL-2, TNF- α , IFN- γ のサイトカイン産生増強を報告している¹⁶⁾。現時点では抗CTLA-4抗体によるシグナル伝達の可能性を完全に拭いさることはできないが、我々もCH反応の増悪は抗体投与により抑制シグナルを阻害した結果と理解したい。CTLA-4のT細胞における発現は、一過性で発現量も少ないが、CD28と比べCD80やCD86と高い親和力を持つため^{17, 18)}、発現量が少なくてもリガンドとの結合が可能になると考えられる。今回の我々のモデルにおいては、CD86の優位な発現がLC上に同程度の発現が所属リンパ節樹状細胞上に認められているが、CTLA-4によるシグナルが実際にどの細胞上のあるいはCD80とCD86のどちらの分子の結合を介して伝達されたのかについてはさらなる検討が必要と考えられる。いずれにせよ、皮膚における抗原感作に引き続くT細胞と抗原提示細胞の相互反応にCD28分子だけでなく、CTLA-4分子も関与していることが本研究において明らかになった。

正常皮膚粘膜免疫反応に見られる抗原特異的T細胞と抗原提示細胞上のCD28/CTLA-4/CD80/CD86の4分子の発現とその相互反応が、免疫の関与が考えられる皮膚粘膜疾患においてどのように修飾されているかを検討していくことが今後の課題と考えられる。

結 論

1. 感作時における抗CD86抗体の投与は、効果的に耳介の腫脹を抑制した。

2. 感作後の皮膚において表皮から真皮に遊走してきたと思われるLCにCD86の優位の発現誘導が認められた。

3. 未感作マウスのリンパ節ではCD86のみがわずかに発現されていたが、感作後CD80およびCD86を共に発現している細胞の増加が認められた。

4. 感作時の抗CTLA-4抗体の投与によって耳介の腫脹は増強した。

文 献

- 1) Allison J P: CD28-B7 interactions in T-cell activation. *Curr Opin Immunol* 6: 414-419, 1994.
- 2) Windhagen A, Newcombe J, Dangoud F et al: Expression of costimulatory molecule B7-1 (CD80), B7-2 (CD 86) and interleukin 12 cytokine in multiple sclerosis lesions. *J Exp Med* 182: 1985-1996, 1995.
- 3) Ransheim E A and Kipps T J: Elevated expression of CD80 (B7/BB1) and other accessory molecules on synovial fluid mononuclear cell subsets in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 37: 1637-1646, 1994.
- 4) Simon J, Dietrich A, Mielke V et al: Expression of the B7/BB1 antigen and its ligand CD28 in T-cell-mediated skin diseases. *J Invest Derm* 103: 539-543, 1994.
- 5) Walunas T L, Lenschow D J, Baller C Y et al: CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1: 405-413, 1994.
- 6) Nakajima A, Azuma M, Kodera S et al: Preferential dependence of autoantibody production in murine lupus on CD86 costimulatory molecule. *Eur J Immunol* 25: 3060-3069, 1995.
- 7) Nuriya S, Yagita H, Okumura K et al: The differential role of CD86 and CD80 co-stimulatory molecules in the induction and the effector phases of contact hypersensitivity. *Int Immunol* 8: 917-926, 1996.
- 8) 塗谷 達, 東 みゆき: CD28/B7ファミリー. *現代医療* 28: 2609-2614, 1996.
- 9) Baliga P, Chavin, K D, Qin, L et al.: CTLA-4 Ig prolongs allograft survival while suppressing cell-mediated immunity. *Transplantation* 68: 1082-1090, 1994.
- 10) Saito K, Yagita H, Hashimoto H et al: Effect of CD80 and CD86 blockade and anti-interleukin-12 treatment on mouse acute graft-versus-host disease. *Eur J Immunol* 26: 3098-3106, 1996.
- 11) Azuma M, Ito D, Yagita H et al: B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* 366: 76-79, 1993.
- 12) Inaba K, Witmer-Pack M, Inaba N. et al: The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: Abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J Exp Med* 180: 1849-1860, 1994.
- 13) Morokata T, Kato T, Igarashi O et al: Mechanism of enhanced antigen presentation by B cells activated with anti-m plus interferon- γ : role of B7-2 in the activation of naive and memory CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol* 25: 1992-1998, 1992.
- 14) Waterhouse P, Penninger J M, Timms E et al: Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl α -4. *Science* 270: 985-988, 1995.
- 15) Krummel M F and Allison J P: CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* 182: 459-465, 1995.
- 16) Perrin P J, Maldonado J H, Davis T A et al: CTLA-4 blockade enhances clinical disease and cytokine production during experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 157: 1333-1336, 1996.
- 17) Linsley P S, Bradshaw J, Greene J et al: Intercellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity* 4: 535-543, 1996.
- 18) Linsley P S: Distinct roles for CD28 and cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 receptors during T cell activation? *J Exp Med* 182: 289-292, 1995.

別刷請求先: 塗谷 達 〒113 東京都文京区湯島1-5-45
東京医科歯科大学歯学部第二口腔外科

Functional Role of CD80/86 and CTLA-4 in Interaction between T Cells and Antigen Presenting Cells on Contact Hypersensitivity

Satoru NURIYA, Miyuki AZUMA* and Shoji ENOMOTO

*Second Department of Oral and Maxillofacial
Surgery, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and
Dental University (Chief: Prof. Shoji ENOMOTO)*

**Department of Immunology, National Children's
Medical Research Center (Chief: Takao KOUSAKA)*

J. Jpn. Oral Muc. Membr., 3 : 37~43, 1997

Abstract : The functional expression of CD80 and CD86 and their ligands, CD28, and CTLA-4 in the interaction between T-cells and dermal antigen-presenting cells was investigated by using a hapteninduced murine contact hypersensitivity model. Administration of anti-CD86 monoclonal antibody (mAb), but not anti-CD80 mAb, at the time of sensitization efficiently inhibited ear swelling. Immunohistochemical staining revealed that the migrated LC in the dermis express CD86 but not CD80. Further administration of mAb against CTLA-4, which is supposed to transduce a negative signal to T-cells, resulted in enlargement of ear swelling. These data suggested that CD86 on migrated Lc may play an important role for the interaction with naive T-cells in the regional lymph nodes and CTLA-4 may also contribute to this reaction.

Key words : contact hypersensitivity, CD80, CD86, CD28, CTLA-4

Reprint requests to Satoru NURIYA, Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan.

[Received April 2, 1997: Accepted May 20, 1997]