Th1 および Th2 細胞の経口トレランス誘導 における IL-4 の役割

吉 野 伸*

Role of IL-4 in the induction of oral tolerance in Th1 and Th2 cells

The effect of a monoclonal antibody against IL-4 (11B11) on oral tolerance was investigated. Oral tolerance was induced by feeding mice with hen egg lysozyme (HEL) before immunization with HEL. 11B11 was ip injected 30 min before oral administration of HEL. The results showed that the oral administration of HEL suppressed immune responses to the antigen including DTH responses, production of both isotypes of IgG 1 and IgG2a antibodies, and proliferation of lymph node cells in a dose-dependent manner. These suppression were associated with a marked reduction of IFN- γ secretion and a partial decrease in IL-4 production by lymphoid cells. The treatment of the tolerant animals with 11B11 significantly blocked the suppression of DTH responses, IgG2a antibody production, and proliferative responses as well as IFN- γ secretion. In contrast, the monoclonal antibody facilitated the suppression of anti-HEL IgG1 antibody production and IL-4 secretion. Thus, oral antigens appear to induce not only Th1 but also Th2 cell tolerance and the neutralizing IL-4 with anti-IL-4 antibodies seems to reverse the suppression of Th1 cell responses, while the antibodies further reduce Th2 cell responses in oral tolerance, indicating the implication of IL-4 in the oral tolerization of Th1 cells.

Rec. 12/11/1996, Acc. 12/24/1996, pp 377~381

*Shin Yoshino**

key words : oral tolerance, IL-4, Th1 cell, Th2 cell

抗原を経口的に投与することによって末梢におけるトレランス(oral tolerance, OT)を誘導できることはよく知られているが、OTは食物抗原に対するアレルギー誘導阻止に重要な役割を果たしていると考えられている¹⁾。また、最近ではOTを利用して、すなわち、自己抗原の経口投与によって自己免疫疾患を治療しようとする試みがなされている²⁾。OTのメカニズムについては、いまだ不明な点が多いが、抗原特異的T細胞の末梢からの消失あるいはアナジの誘導、また制御的T細胞およびその細胞によって産生されるサイトカインによる免疫応答の抑制などが示唆されている。た

えば、小量(1 mg 以下)の抗原の経口投与によってアナジが誘導され、多量(5 mg 以上)の抗原によって抑制的細胞あるいはサイトカインが誘導されると報告されている³⁾。

CD4 陽性ヘルパーT細胞のうちTh1サブセット依存性である遅延型過敏症反応、IgG2a抗体およびIFN- γ 産生は抗原の経口投与によって容易に抑制されるが、一方、IgG1およびIL-4産生に関与するTh2ヘルパーT細胞に対する経口トレランスの誘導は困難である⁴⁾。これらの実験結果およびIL-4などの抑制的サイトカインには遅延型過敏症を抑制する作用⁵⁾があることから、抗原の経口投与によって抗原特異的Th2細胞が特異的に活性化され、この活性化された細胞によって産生される抑制的サイトカインがTh1細胞による免疫反応を抑制している可能性がある。した

* Department of Microbiology, Saga Medical School
佐賀医科大学微生物学教室
Offprint requests to : Shin Yoshino, Department of
Microbiology, Saga Medical School, 5-1-1 Nabeshima, Saga 849, Japan

がって、本研究においては、OT における IL-4 の役割を調べる目的で、抗原を経口投与した動物における Th1 および Th2 細胞依存性の免疫応答に対する抗 IL-4 抗体の効果について検討した。

材料と方法

(1) 感 作

100 μ g の hen egg lysozyme (HEL) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) を 50 μ l の 0.9% NaCl に溶解し、等量の complete Freund's adjuvant (CFA, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) に混和したものを DBA/1J 雄マウス (8-9 週齢) の尾根部皮下に注射した (day 0)。

(2) 抗原の経口投与

0.1, 1, 10 mg の HEL を 0.5 ml の PBS に溶解し、感作前 5 日間 1 日 1 回 (days -5, -4, -3, -2, -1), 経口用ゾンデを用いて投与した。対照として PBS あるいは対照抗原として keyhole limpet hemocyanin (KLH) (Calbiochem Co., La Jolla, CA, USA) を同様に投与した。

(3) 抗 IL-4 抗体の投与

マウス IL-4 に対するラット IgG1 モノクローナル抗体 (11B11) 産生細胞株⁹⁾は佐賀医科大学免疫学教室から提供された。11B11 の精製のため、まず本細胞株を SCID マウス (佐賀医科大学実験動物施設) に腹腔内注射し、得られた腹水を硫酸アンモニウム処理した。つぎに得られた沈殿物を protein G Sepharose 4FF カラム (Pharmacia Biotech, 東京) を用いて精製し、PBS に溶解した。種々の用量の 11B11 を各 HEL 経口投与前 30 分に腹腔内注射した。対照として、PBS あるいは精製した正常ラット IgG を同様に注射した。

(4) T 細胞増殖反応

感作後 14 日に、鼠径部リンパ節を除去し、 5×10^6 /ml のリンパ節細胞浮遊液を調製した。培養液としては、1% 同系マウス血清を添加した RPMI1640 を使い、0.1 ml の細胞浮遊液および 0.1 ml の HEL 溶液 (50 μ g/ml) の混合液を 96 穴マイクロプレートにて 3 日間培養した。0.5 μ Ci の 3 H-thymidine を加え、さらに 16 時間培養後、細胞に取り込まれた放射性活性を液体シンチレーション

図 1 Effect of 11B11 on proliferative responses to HEL in orally tolerized mice

HEL was orally administered on days -5, -4, -3, -2 and -1 before immunization with HEL. PBS and KLH were given as feeding controls. To test the effect of 11B11 on oral tolerance, PBS (stippled bar) and 11B11 (hatched bar) were ip injected 30 min before each oral administration of HEL. Proliferative responses to HEL in mice were tested on day 14 as described in Materials and Methods. Values are expressed as mean $\pm$ SEM of quadruplicate cultures of cells pooled from 4 mice.

カウンターを用いて測定した。

(5) 遅延型過敏症反応 (DTH)

感作後 12 日に 10 μ g HEL を 50 μ l の PBS に溶解し、動物の footpad 皮下に注射した。24 時間後、footpad の厚みを 0.01 mm の目盛をもつ回転式厚み計 (オザキ製作所, 東京) によって測定した。

(6) 抗体測定

感作後 21 日に血清を得、56°C, 30 分間加熱した。抗 HEL IgG1 および IgG2a 抗体は ELISA 法によって測定した。アルカリリンフォスファターゼでラベルしたラット抗マウス IgG1 および IgG2 抗体は Pharmingen 社から購入した。結果は OD₄₀₅ で示した。

(7) サイトカインの測定

鼠径部リンパ節細胞浮遊液を上記の方法によって調製し、48 時間培養した。培養上澄を遠心分離し、上澄中の IL-4 および IFN- γ を sandwich ELISA 法によって測定した。標準試薬 IL-4 および IFN- γ , 一次抗体である抗 IL-4 および IFN- γ 抗体, 二次抗体であるビオチン化した抗 IL-4 および抗 IFN- γ 抗体はすべて Pharmingen 社から

図 2 Effect of 11B11 on DTH responses to HEL in orally tolerized mice
HEL was orally administered on days -5, -4, -3, -2 and -1 before immunization. PBS and KLH were given as feeding controls. To test the effect of 11B11 on oral tolerance, PBS(stippled bar) and 11B11(hatched bar) were ip injected 30 min before each oral administration of HEL. Footpad DTH responses to HEL were tested on day 12 as described in Materials and Methods. Values are expressed as mean $\pm$ SEM of six mice. 11B11 treatment compared with PBS treatment(student's t test, * $p < 0.05$).

購入した。結果は pg/ml で示した。

結果

(1) HEL 経口投与によるリンパ節細胞増殖反応抑制における 11B11 の効果

0.1, 1, および 10 mgHEL の経口投与によって同抗原に対するリンパ節細胞の増殖反応は用量依存的に抑制された(図 1)。一方, 10 mg KLH の投与によってはリンパ節細胞の増殖は影響を受けなかった。動物を抗 IL-4 モノクローナル抗体である 11B11 で処理することによって, 本経口トレランス誘導の阻止が観察された。HEL の経口投与を受けなかった免疫のみの動物(PBS 投与群)においては, リンパ節細胞増殖反応に対する 11B11 の有為な効果はみられなかった。

(2) HEL 経口投与による DTH 抑制における 11B11 の効果

図 2 に示されているように, HEL に対する DTH は本抗原の経口投与によって用量依存的に抑制された。この Th1 細胞依存性の免疫応答抑制は, 11B11 によってブロックされた。PBS の経口

図 3 Effect of 11B11 on the production of IgG1 and IgG2a antibodies to HEL in orally tolerized mice

HEL was orally administered on days -5, -4, -3, -2 and -1 before immunization. PBS and KLH were given as feeding controls. To test the effect of 11B11 on oral tolerance, PBS(stippled bar) and 11B11(hatched bar) were ip injected 30 min before each oral administration of HEL. Serum samples were collected on day 21 after immunization and individually assayed for anti-HEL IgG1 and IgG2a antibodies by ELISA as described in Materials and Methods. Values are expressed as mean $\pm$ SEM of five mice. 11B11 treatment compared with PBS treatment(student's t test, * $p < 0.05$).

投与動物における DTH に対する 11B11 の効果はみられなかった。

(3) HEL 経口投与による抗 HEL IgG1 および IgG2a 抗体産生抑制における 11B11 の効果

1 および 10 mg の HEL の経口投与によって, 抗 HEL IgG1 および IgG2a 抗体産生はともに有意に抑制されたが, その抑制の程度は IgG1 よりも IgG2a 産生においてより顕著であった(図 3)。11B11 処理によって, IgG2a 産生抑制はブロックされたが, 一方, IgG1 産生抑制は本モノクローナル抗体によってさらに促進された。PBS 経口投与群における抗 HEL IgG1 および IgG2a 抗体産生は 11B11 によって影響を受けなかった。

表 1 Effect of 11B11 on the secretion of IL-4 and IFN- γ in orally tolerized mice

Group	IL-4 (pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)
PBS/PBS	240 $\pm$ 18	8680 $\pm$ 582
HEL/PBS	183 $\pm$ 13	660 $\pm$ 42
HEL/0.01 mg anti-IL4	149 $\pm$ 12	726 $\pm$ 55
HEL/0.1 mg anti-IL4	82 $\pm$ 6	2192 $\pm$ 186
HEL/1 mg anti-IL4	27 $\pm$ 1	4629 $\pm$ 140
HEL/1 mg rat IgG	176 $\pm$ 16	710 $\pm$ 68

The indicated doses of 11B11 were ip injected into mice fed 10 mg of HEL on days -5, -4, -3, -2 and -1 before immunization with HEL. IL-4 and IFN- γ secreted by cells of lymph nodes removed on day 14 were measured by sandwich ELISA as described in Materials and Methods. Values are shown as mean $\pm$ SEM of quadruplicate samples from supernatants of cells pooled from 4 mice.

(4) HEL 経口投与による IL-4 および IFN- γ 産生抑制における 11B11 の効果

HEL の経口投与によって、IL-4 産生は 24%と部分的に抑制されたが、IFN- γ 産生の抑制は 92%と顕著であった(表 1). 0.01, 0.1 および 1 mg の 11B11 の投与によって、IFN- γ 産生の抑制は 47%(1 mg 11B11 の場合)までは小さくなったが、一方、IL-4 産生抑制はさらに 89%まで促進した。HEL 経口投与による両サイトカイン産生抑制は正常ラット IgG 処理によっては影響されなかった。

考 察

本研究によって少なくともつぎの二点についての新しい知見が得られた。

(1) 1 mg および 10 mg の HEL を免疫前 1 日 1 回 5 日間にわたって経口投与することによって、Th1 細胞依存性である HEL に対する DTH, IgG2a 抗体および IFN- γ 産生は著明に抑制され、また、Th1 細胞の場合ほど顕著ではないが、Th2 細胞依存性である IgG1 および IL-4 産生も本抗原の経口投与によって有意に抑制される。すなわち、抗原の経口投与によって、Th1 および Th2 の両ヘルパー T 細胞の機能が抑制される。

これまで Th1 細胞の経口トレランス誘導は容易であるが、Th2 細胞の場合、その誘導は困難で

あると報告されてきた⁴⁾。これは筆者らが実験に用いたマウス (DBA/1J) が経口トレランスの誘導に対し感受性が高いためではないかと思われる。したがって、経口トレランス誘導には遺伝的素因が重要であると考えられる。

(2) 抗 IL-4 抗体である 11B11 を経口トレランスマウスの腹腔内に投与することによって、HEL に対する DTH, IgG2a 抗体および IFN- γ 産生抑制はブロックされる。一方、本経口抗原に対する IgG1 および IL-4 産生抑制は促進される。したがって、IL-4 は Th1 細胞の経口トレランスの誘導に重要な役割を果たしている。

得られた筆者らの知見は、これまで Friedman および Weiner によって得られた結果と異なる。彼らは多量 (5 mg 以上) の抗原の経口投与によって誘導されるトレランスにはアナジーが関与しており、IL-4 などを産生する制御的 T 細胞の役割はみられなかったと報告した³⁾。しかし彼らの実験系では、多量の抗原が投与された動物において Th1 細胞のみのトレランスが誘導されており、Th2 細胞のトレランスは観察されなかった。また、IL-4 産生は亢進していた。筆者らの実験系においては、Th1 のみならず Th2 細胞もトレランスの状態になっており、また、IL-4 産生は抑制されていた。このように、筆者らの実験系と彼らの系とは経口トレランス誘導のメカニズムに違いがあり、これは用いたマウスの系統の違いによると思われる。

以上から、多量の抗原の経口投与によって誘導されるトレランスには、アナジー、または制御的 T 細胞、あるいはその両方が関与し、どちらのメカニズムが主に関与するかは、用いる実験系によると結論するのが妥当のように考える。

一方、彼らは小量 (1 mg) の抗原を経口的に投与することによって誘導されるトレランスには制御的 T 細胞が関与していることを見出したが、これは筆者らの実験結果と同じであった。しかし、彼らは小量の経口投与によって IL-4 産生は増加していたと報告し、一方、筆者らの実験系では IL-4 産生は減少していた。

どのようなメカニズムで Th1 細胞のトレラン

スは 11B11 によってブロックされ, Th2 細胞のトレランスは促進されるのかは明らかではないが, 現時点ではつぎのように考える.すでに述べたように, HEL の経口投与によって IL-4 の産生は抑制されたが, その抑制率は 24% であり, まだ十分な量の IL-4 が存在していた.一方, IFN- γ 産生の抑制率は 92% であり, このサイトカイン産生はほとんど抑制された.したがって, トレランス誘導後も比較的多量存在する IL-4 が HEL に対する DTH および IgG2a 抗体産生を抑制した可能性がある.なぜなら, IL-4 はこれら Th1 細胞依存性の免疫応答を抑制することができるからである⁵⁾. 11B11 の投与によって IL-4 産生抑制は 89% まで促進され, 逆に IFN- γ 産生抑制は 47% にまで減少した. IFN- γ が Th1 細胞応答の誘導に強く関与する⁷⁾ことを考慮すると, 11B11 処理後にみられる IL-4 産生の減少および IFN- γ 産生の増加が, この Th1 細胞応答抑制のブロックにつながったと考えることができる.

本論文の要旨は第 17 回日本炎症学会(平成 8 年 7 月, 東京)において発表した.

文 献

- 1) Mowat A Mcl : Oral tolerance and regulation of immunity to dietary antigens. In Handbook of Mucosal Immunology. (ed. Ogra PL, Mestecky J, Lann ME, Strober W, McGhee JR, Bienesstock J), Academic Press, San Diego, p. 185-201, 1993.
- 2) Weiner HL, Friedman A, Miller A, Khoury SJ, Al-Sabbagh A, Santos L : Oral tolerance : Immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. Ann. Rev. Immunol. 12 : 809-837, 1994.
- 3) Friedman A, Weiner HL : Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 : 6688-6692, 1994.
- 4) Melamed D, Friedman A : In vivo tolerization of Th1 lymphocytes following a single feeding with ovalbumin : anergy in the absence of suppression. Eur. J. Immunol. 24 : 1974-1981, 1994.
- 5) Powrie F, Menon S, Coffman RL : Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity in vivo. Eur. J. Immunol. 23 : 3043-3049, 1993.
- 6) Ohara J, WE Paul WE : Production of a monoclonal antibody to and molecular characterization of B-cell stimulatory factor-1. Nature 315 : 333-336, 1985.
- 7) Finkelman FD, Katona IM, Mosmann TR, Coffman RL : IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune response. J. Immunol. 140 : 1022-1029, 1988.