

抗 CD3/抗 CD28 活性化リンパ球の培養液は、樹状細胞の分化と成熟を誘導し、アジュバント様活性を有する

● ポイント

CD3 抗体と CD28 抗体^{※1}で活性化した T 細胞の培養液 (Lymphocyte Conditioned Medium, LCM) 中には、樹状細胞 (Dendritic Cell, DC) を分化・成熟させる成分が多く分泌されており、ワクチンの免疫賦活剤 (アジュバント) ^{※2} として機能することが示唆されました。

● 概要

T 細胞から分泌された様々な成分を含む LCM を調製し、その成分の詳細や、体外での免疫細胞に与える効果、体内での免疫機能に与える影響を分析したところ、次のようなことがわかりました。

- (1) LCM には、様々なサイトカインやケモカイン^{※3}が含まれている
- (2) LCM は、単球から未成熟 DC への分化および、未成熟な DC を成熟化させることができる
- (3) LCM はアジュバントとして機能し、ワクチンの免疫応答を増強する

● 研究の背景

免疫細胞の一種である DC は、未熟な状態で体内のあちこちにおいて、異物 (細菌やウイルス、がん細胞など) を見つけると、目印となる抗原を取り込んで成熟化し、免疫システムを活性化することで体を守ります。この成熟化の過程には、T 細胞から分泌される各種サイトカインやケモカインが必要であることが知られています。

本研究では、人為的に活性化した T 細胞から培養液中に分泌される成分の詳細を分析し、体外およびサル¹の体内において、実際に免疫系を活性化する能力を持つかどうか調べました。

● 研究の成果

- (1) LCM には、様々なサイトカインやケモカインが含まれている

Cytokine/chemokine	Quantity (ng/ml)	Cytokine/chemokine	Quantity (ng/ml)
GM-CSF	23	IL15	0
IFN α	0	MCP1	110
IFN β	0	M-CSF	8.69
IFN γ	31	MIP1 α	127.2
IL1 β	0.07	MIP1 β	157.89
IL2	5.9	PGE2	1.54
IL3	1	RANTES	20.64
IL4	0.28	CD40L	1.27
IL6	2.17	SDF1 α	0
IL8	47.97	TGF β	0
IL10	0.66	TNF α	6.43
IL12	0.01		

Table 2. LCM に含まれるサイトカイン/ケモカインの定量結果 (単位: ng/mL) (一部改変)

調製した LCM を分析した結果、様々な成分が含まれていることがわかりました (Table 2)。このうち、GM-CSF、IL-4、IL-3 は DC の成長因子として知られています。また、IL-1β、IL-6、PGE2、TNF-α、IFN-γ は炎症性サイトカインとして知られ、免疫系の働きを亢進します。免疫細胞を誘引する働きを持つケモカインとしては、MCP-1、MIP1、RANTES などが検出されました。

- (2) LCM は、単球から未成熟 DC への分化および、未成熟な DC を成熟化させることができる LCM を添加して単球を培養したところ、LCM を添加しなかった場合 (Figure 1、Control) と比較して細胞表面マーカーである CD14 の低下および、CD40 と CD80 の上昇が確認されました (Figure 1、LCM)。

CD14 は単球に発現する示すマーカー、CD40 と CD80 は DC に発現するマーカーです。CD14 が低下し、CD40/CD80 が上昇していることは、単球から DC に分化していることを示唆します。

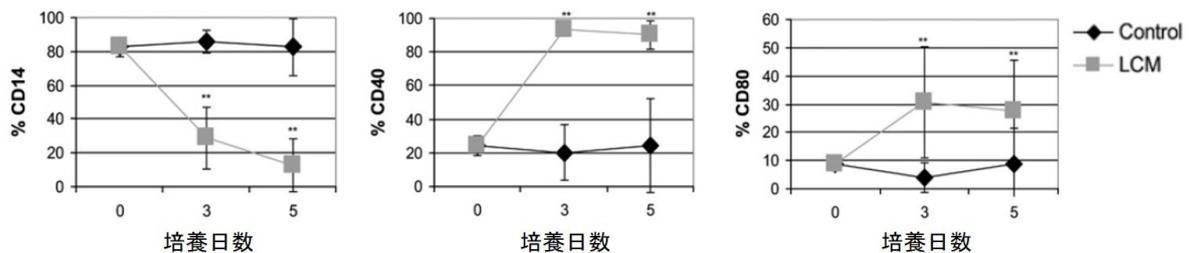


Figure 1. LCM は単球を未成熟 DC に分化させる (一部改変)

次に、単球を一般的な方法で DC に分化させたもの (Figure 2、GM-CSF + IL-4)、LCM のみを添加して培養したもの (同、LCM 添加)、何も添加せずに培養したもの (同、LCM なし)、培養していない単球 (同、Control) を調製し、それぞれの細胞と蛍光物質でラベルした物質を混ぜて 90 分間、静置しました。DC は、周囲の物質を取り込む「貪食」という機能を持っており、この実験では、貪食能を持った細胞の割合を、蛍光測定によって検出することができます。

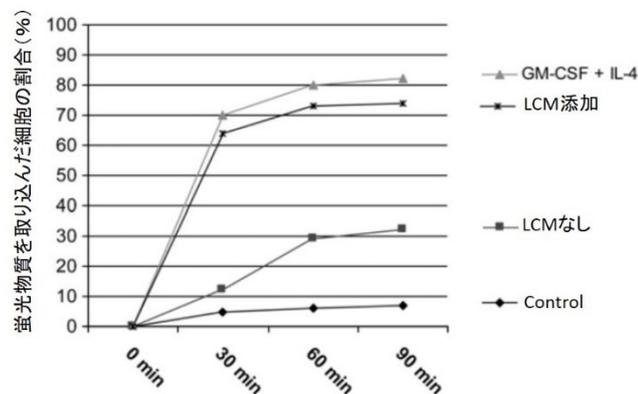


Figure 2. LCM で単球から分化させた未成熟 DC は、貪食能を持つ (一部改変)

これらの実験の結果、LCMは、単球を未成熟 DC へ分化させることができ、また、この DC は、GM-CSF + IL-4 を添加する一般的な手法で分化させた DC と同等レベルの貪食能（抗原取り込み能）を有していることがわかりました。

なお、LCMにも GM-CSF や IL-4 は含まれていますが、その濃度は一般的な手法で使用している濃度より大幅に低く、別の成分が関与していることも示唆されました。

さらに、単球から未成熟 DC に分化させた細胞に対して、LCM 添加のあり・なしの条件で 48 時間の培養を行い、その表面マーカーについて比較したところ、LCM を添加して培養した方が、CD40、CD83、CD80 といった DC の成熟度と関連するマーカーの割合が高くなりました (Table 4)。

この結果は、LCM は、単球から未成熟 DC へ分化させるだけでなく、未成熟 DC から成熟 DC への成熟化も促進するというを示唆します。

Marker	Percent		
	(+) LCM	(-) LCM	P value
CD40	95±3	59±26	0.003
CD83	17±11	5±2	0.014
CD80	56±21	15±6	0.0003
CD86	90±7	86±19	NS

Table 4. LCM は DC を成熟化させる (一部改変)

(3) LCM はアジュバントとして機能し、ワクチンの免疫応答を増強する

最後に、LCM によって免疫細胞の機能が亢進するかどうか確認するため、2 つの実験を行いました。

まず、サイトメガロウイルス (CMV) に既感染のドナーの血液から細胞を抽出し、体外において、濃度の異なる LCM 添加のあり・なしの条件で、CMV 溶出物と共に培養し、血液細胞の免疫応答の度合いを観察しました (Figure 5)。このドナーの免疫細胞は CMV を認識すると、その排除のために IFN- γ を分泌するため、これを測定することで免疫反応の強さを測ることができます。

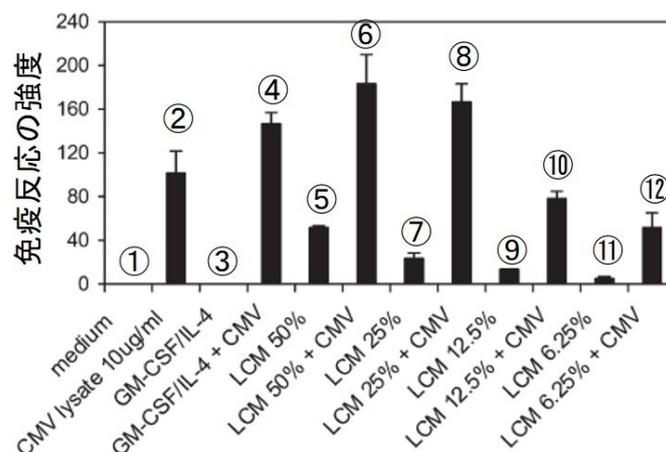


Figure 5. LCM は CMV 溶出物に対する免疫応答を増強する (一部改変)

この実験結果から、以下のことがわかりました。

- ・CMV 溶出物のみでも免疫反応が起こるが (②)、LCM を添加するとその反応がより増強される (⑥)
- ・LCM による免疫応答の増強メカニズムは、LCM の濃度に依存する (⑥⑧⑩⑫)
- ・GM-CSF + IL-4 だけでは免疫応答は発生しないが (③)、CMV への応答時に共存すると、シグナルを増強する (②④)
- ・LCM 単体でも、免疫応答が誘発される (⑤⑦⑨⑪)

次に、LCM のアジュバント機能の有無を確認するため、様々なワクチン（破傷風、ジフテリア、A 型肝炎）と共に LCM をサルに投与し、定期的に血液中の抗体濃度をモニタリングしました (Figure 6)。その結果、ワクチン単体ではほとんど抗体が産生されなかったのに対して、LCM をあわせて投与した場合には、強い抗体産生が確認されました。

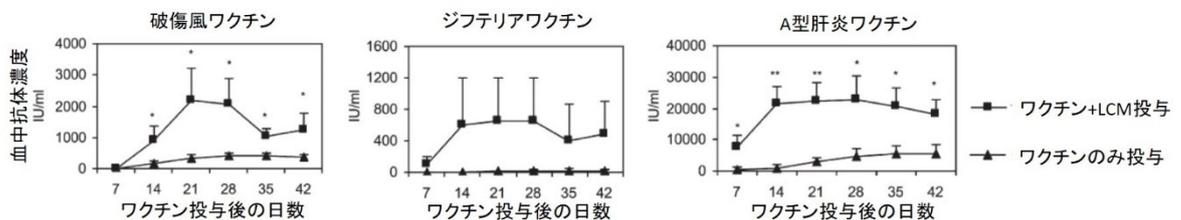


Figure 6. LCM はワクチンによる抗体産生を増強する (一部改変)

以上の結果から、LCM には免疫反応を賦活化するアジュバント様の機能があることが明らかとなりました。

● 今後の展望

本研究により、LCM がワクチンのアジュバントとして使用できる可能性が示唆されたことから、これを利用したワクチン療法の開発を進めていきます。

● 用語説明

(1) CD3 抗体と CD28 抗体

T 細胞の表面上に発現している CD3 と CD28 と呼ばれるタンパク質に結合する抗体です。これらのタンパク質に抗体が結合すると、T 細胞が活性化され、様々な物質を分泌するようになります。本研究では、人為的に T 細胞を活性化するために使用しています。

(2) 免疫賦活剤 (アジュバント)

一般的なワクチンには、対象となる病原体の抗原の他に、その抗原を患者の免疫系に認識させやすくさせるための成分が含まれており、これをアジュバントと呼びます。この成分があることで、ワクチンの効果が増強されます。

(3) サイトカインやケモカイン

サイトカインは、細胞から分泌される生理活性をもつタンパク質の総称で、インターロイキン

作成日：2024年6月3日

(IL) やインターフェロン (IFN) など、色々な種類が知られています。ケモカインは、サイトカインの一種で、特定の場所に免疫細胞を誘引して炎症を引き起こさせる機能を持っています。

● 論文情報

タイトル Products of anti-CD3/anti-CD28 activated lymphocytes induce differentiation and maturation of dendritic cells and have adjuvant-like activity *in vitro* and *in vivo*

著者 Kristina M. Harris, Petra Lenz, Kim G. Hankey, Thomas MacVittie, Ann Farese, Kaori Nakajima, Kenichiro Hasumi, and Dean L. Mann

掲載誌 Clinical Immunology, 2008; 129(1): 58-68.

URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18691939/>

以上