

原

著

## シクロスポリン A による樹状細胞の IL-12 分泌誘導作用

阿 部 崇

新潟大学大学院医歯学総合研究科

血液学分野

(主任：相澤義房教授)

### Cyclosporin A Induces IL-12 Production in Human Monocyte Derived Dendritic Cells via p38MAPK Phosphorylation

Takashi ABE

*Division of Hematology, Niigata University Graduate School of**Medicine and Dental Science, Niigata, Japan**(Director: Prof. Yoshifusa AIZAWA)*

#### Abstract

IL-12 secretion from dendritic cells (DCs) is essential for Th1 development and cytotoxic T cell (CTL) activation. A recent study showed that inhibition of CD40 ligand (CD40L)-induced IL-12 secretion was associated with calcium signaling. However, the precise inhibitory mechanism remains unclear. In order to clarify this mechanism, we examined the effect of a calcineurin (calcium-calmodulin dependent serine/threonine phosphatase) inhibitor, cyclosporin A (CyA) on phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) which is a kind of serine/threonine kinase and essential for IL-12 production on CD40 signaling cascades in human monocyte-derived immature DCs.

We demonstrated that CyA could induce p38 MAPK phosphorylation and IL-12 production, and that CyA-induced p38 MAPK phosphorylation was cancelled by A23187. These results suggest that CyA enhances p38MAPK phosphorylation by inhibiting calcineurin phosphatase activity.

CyA has been used as an immunosuppressive agent, which inhibits T cell proliferation. However, concerning these pharmacological actions, it is likely that this drug enhances Th1

Reprint requests to: Takashi ABE  
Division of Hematology  
Niigata University Graduate School of  
Medicine and Dental Science  
1-754 Asahimachi-dori,  
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市旭町通り 1-754  
新潟大学大学院医歯学総合研究科生体機能調節医学  
専攻血液学分野（第一内科）

阿 部 崇

development and cytotoxic T cell (CTL) activation.

**Key words:** Dendritic Cells, CD40 Signal, IL-12, Cyclosporin A, calcineurin

## 緒 言

樹状細胞は、細胞性免疫や腫瘍免疫の確立において中心的役割を担う細胞である。樹状細胞がリンパ節内で抗原を T 細胞に提示すると、T 細胞表面の CD40 リガンド (CD40L) の発現が亢進し、樹状細胞表面の CD40 と結合することにより、さらに樹状細胞上の CD40 の発現が亢進する<sup>1)</sup>。この CD40-CD40L の結合増強は、種々のシグナル伝達を介して樹状細胞における NF- $\kappa$ B の持続的な核内移行、成熟、生存維持を惹起し、更に IL-12 の分泌を促す<sup>2)-4)</sup>。分泌された IL-12 は Th1 や細胞障害性 T 細胞 (CTL) を誘導し<sup>5)</sup>、Th1 のインターフェロン  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) 分泌を促進することが知られている<sup>6)</sup>。

樹状細胞の CD40 シグナルには、p38MAP キナーゼを介する経路と NF- $\kappa$ B を介する経路の 2 つがあると報告されている。前者は IL-12 分泌に関与し<sup>7)</sup>、後者は Akt のリン酸化を介して NF- $\kappa$ B の持続的な核内移行に関与し、樹状細胞の成熟・生存を可能にする<sup>8)</sup>。

IL-12 は免疫反応において促進的に作用するため、厳格な制御機構の存在が推測されている。この点に関して、Faries らは、Calcium ionophore A23187 による細胞内カルシウム濃度上昇が、樹状細胞の IL-12 分泌を抑制すると報告しており<sup>9)</sup>、CD40 シグナルが細胞内カルシウムによって制御される可能性を示唆している。しかし、その詳細な機序については未だ不明のままである。

今回我々はカルシニューリン (カルシウム-カルモジュリン依存性セリン/スレオニン脱リン酸化酵素) 阻害薬であるサイクロスポリン A (CyA)、と Ca ionophore である A23187 を用いて、ヒト単球由来樹状細胞における CD40 シグナルと細胞内 Ca の関与について検討したので報告する。

## 材料と方法

ヒト単球由来樹状細胞の調整：ヒト単核球を比重遠心法で末梢血から分離し、これに抗 CD56, 抗 CD16, 抗 CD19, 抗 CD3 抗体を添加し、磁気ビーズ法により NK, B, T 細胞を除去し、単球を分離した。これに macrophage-serum-free medium (SFM) (Life Technologies, Grand Island, NY), GM-CSF (KIRIN, Japan) 50ng/ml, recombinant human IL-4 (Osteogenetics, Germany) 5ng/ml を添加し、37℃で2日間培養して樹状細胞に分化誘導した。

フローサイトメトリー：誘導した樹状細胞を Beckton Dickinson 製モノクローナル抗体の CD1a-FITC, CD40-FITC, HLA-DR-FITC, CD80-PE, CD86-PE, CD83-PE, CD14-PE で染色し、フローサイトメーターで解析した。

樹状細胞および単核球の刺激：細胞内シグナル伝達の検討のために、①樹状細胞を培養液のみで処理、② CD40L 500ng/ml 3 時間刺激、③ 1 $\mu$ M CyA 30 分処理、④ 1 $\mu$ M CyA 30 分処理後 200ng/ml A23187 (Calbiochem) 10 分添加、⑤ 200ng/ml A23187 (Calbiochem) 10 分処理、の 5 つの群に分け、各々 37℃で incubate した。これに氷温の 2 倍濃度 lysis buffer (20mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 50mM NaF, 5mM NaPPi, 5mM EDTA2Na, 1 $\mu$ M DTT, protease inhibitor cocktail (Sigma P8340), 100 $\mu$ M ortho-vanadate) を加えて反応を停止した。

樹状細胞による IL-12 の産生刺激は、37℃で①培養液のみ、② CD40L 500ng/ml 24 時間刺激、③ CyA 1 $\mu$ M 3 時間処理で行った。

免疫沈降とウェスタンブロッティング：樹状細胞の lysate を氷温で 1 時間おき、anti-p38 MAPK (H-147) antibody (SC-7149, Santa Cruz, Inc) および 'Catch and Release' immunoprecipitation system (#17-319, Upstate, Lake Placid, NY) を用いて免疫沈降した後、等量の Laemmli sample

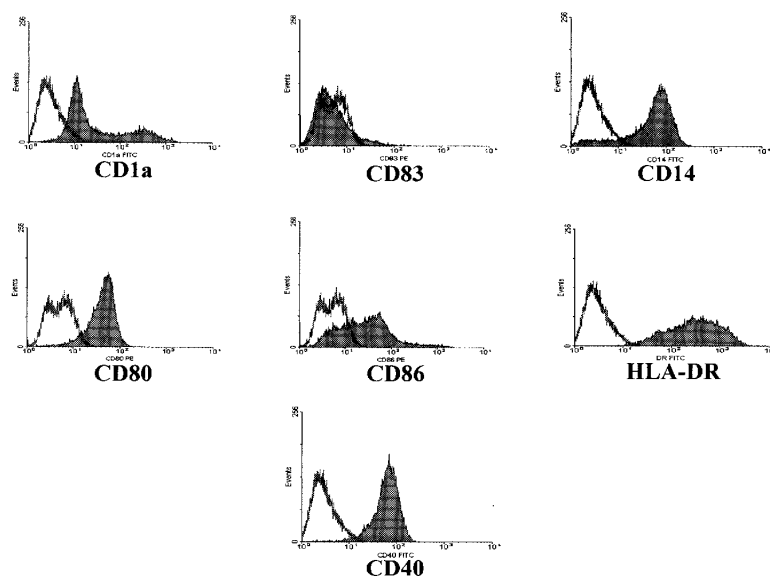


図1 誘導したヒト単球由来樹状細胞の表面マーカー  
単球を GM-CSF (50ng/ml) および IL-4 (5ng/ml) を添加した Macrophage-SFM で 48 時間培養した後、フローサイトメーターで表面マーカーを検討した。

buffer を添加し 95 °C 5 分間加熱後 -80 °C で凍結保存した。蛋白濃度は Bradford 法で定量した。

蛋白は 7.5 % SDS-PAGE ゲルを用いた電気泳動で分離し、polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA) に転写し、anti-phosph-p38 MAPK (pTGPY) anti-body (V1211, Promega) または anti-p38 MAPK antibody (SC-7149, Santa Cruz, Inc.) で標識し、horseradish peroxidase (HRP) を結合させた二次抗体と incubate した後、chemiluminescence system (Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL) で発色させた。

サイトカイン ELISA : 樹状細胞の細胞上清中の IL-12 は IL-12 p70 ELISA kit (American Research Products) を用いて測定した。

統計・解析 : ELISA のデータは平均±標準誤差で表記し、Student の t 検定で有意差を検討した ( $p < 0.05$ )。

## 結 果

フローサイトメトリー : 誘導した樹状細胞は、

CD1a, CD83 が弱陽性、CD14, CD40, CD80, CD86 が中等度陽性で、HLA-DR は強度に発現しており、未熟なヒト単球由来樹状細胞として典型的な表面形質であった (図1)。

p38MAP キナーゼリン酸化に対するカルシウムシグナルの影響 : p38MAP キナーゼは CD40L 刺激後 3 時間で認められた (図 2.2 列目)。また、CyA 30 分処理も同様にリン酸化を引き起こし、これは A23187 処理の追加でキャンセルされた (図 2.3 列目, 4 列目)。

CD40L, CyA 処理による IL-12 産生誘導 : 樹状細胞の CyA 1  $\mu$ M 処理は、CD40L 500ng/ml と同等の IL-12 産生を誘導した (図 3)。

## 考 察

単球を GM-CSF, IL-4, 血清を含む培養液で 7 日間前後培養すると樹状細胞に誘導できるとされている<sup>10)</sup>。一方、O'Sullivan らによれば、無血清で 2 日間のみ培養の方が、NF $\kappa$ B の核内移行が少なく、CD40L 刺激後のシグナル伝達解析に有用であったと報告している<sup>3)8)</sup>。また、無血清の

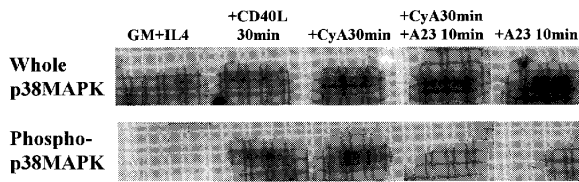


図2 ヒト単球由来樹状細胞の p38MAP キナーゼのリン酸化：CD40L 刺激と A23187 または CyA 処理との比較

上段：全 p38MAP キナーゼ

下段：リン酸化 p38MAP キナーゼ

左より 1 列目：未刺激の樹状細胞

2 列目：CD40L 500ng/ml 3 時間刺激

3 列目：CyA 1 $\mu$ M 30 分処理

4 列目：CyA 1 $\mu$ M 30 分処理後

A23187 200ng/ml 10 分添加

5 列目：A23187 200ng/ml 10 分処理

樹状細胞は上記の刺激後、Lysis buffer で反応を停止し、anti-p38 MAPK monoclonal antibody による免疫沈降、SDS-PAGE による分離、PVDF への転写後、anti-phosph-p38 MAPK antibody および anti-p38 MAPK monoclonal antibody で標識し、horseradish peroxidase (HRP) を結合させた二次抗体と incubate した後、chemiluminescence system (Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL) で発色させた。

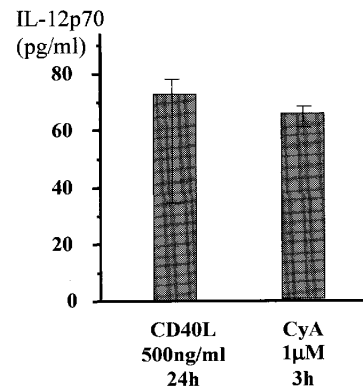


図3 ヒト単球由来樹状細胞の CD40L および CyA による IL-12 分泌

樹状細胞を CD40L 500ng/ml 添加後 24 時間または CyA 1 $\mu$ M 添加後 3 時間培養し、細胞上清中の IL-12 を ELISA で測定した。(平均 $\pm$ 標準誤差 n = 3)

方が、血清中に存在するサイトカインによる予期せぬシグナルを回避できると考えられることから、今回の検討では無血清、2 日間培養で得られた未熟な樹状細胞を用いることとした。

過去の報告では、可溶性 CD40L は IL-12 分泌誘導能が弱く、可溶性 CD40L に加え、TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$  も添加した方が多量の IL-12 分泌を誘導できるとされている<sup>3)9)</sup>。しかし、今回は CD40L によるシグナル伝達の検討が目的であるため、TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$  を併用せずに、可溶性 CD40L 単独で検討することにした。Mackey らは、樹状細胞の p38MAP キナーゼが、遺伝子導入により CD40L を過剰発現させた細胞で刺激されると、速やかにリン酸化すると報告している<sup>7)</sup>。我々の検討では、このリン酸化が、可溶性 CD40L 刺激のみならず、CyA 処理でも認められた。また、リン酸

化 p38MAP キナーゼによって惹起される IL-12 産生も CyA 処理した樹状細胞で認められた。また、CyA による p38MAP キナーゼのリン酸化は、A23187 添加によりキャンセルされた。以上より、CyA が p38MAP キナーゼ（セリン/スレオニンキナーゼ）のリン酸化を引き起こす機序として、カルシニューリン（カルシウム-カルモジュリン依存性セリン/スレオニン脱リン酸化酵素）の抑制が考えられた。

p38MAP キナーゼリン酸化に対する CyA の影響は様々な細胞で報告されている。血管内皮細胞、心筋細胞、好塩基球、T 細胞では抑制的に作用する<sup>11)–14)</sup>とされているが、一方で K562 細胞の赤芽球分化には CyA による p38MAP キナーゼのリン酸化が関与しているとも報告されている<sup>15)</sup>。しかし、我々が調べた限りでは、樹状細胞で CyA が p38MAP キナーゼのリン酸化を促進するという報告は見あたらない。

今まで CyA は T 細胞の増殖を抑制すると考えられ、臨床的には移植後の免疫抑制剤として用いられることが多い。しかし、今回の検討では CyA による樹状細胞の IL-12 分泌促進を認めたこと

から, CyA が Th1 分化と細胞障害性 T 細胞の誘導に促進的に作用する可能性が示唆された。

## 結 語

CyA はカルシニューリンの抑制を介して p38MAP キナーゼリン酸化を促進し, その結果ヒト単球由来樹状細胞の IL-12 分泌を引き起こす可能性が示唆された。よって CyA は必ずしも Th1 分化と細胞障害性 T 細胞の誘導を抑制しておらず, 樹状細胞を介した免疫反応に大きな影響を及ぼしていると考えられた。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を賜りました新潟大学大学院医歯学総合研究科(生体機能調節医学専攻)循環器学分野相澤義房教授, ならびに御指導, 御教示頂きました新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター再生移植医療部門布施一郎助教授, 新潟大学医学部保健学科高橋益廣教授, 成田美和子助教授に謝意を表します。

## 参 考 文 献

- 1) Van Kooten C and Banchereau J: CD40 - CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 67: 2 - 17, 2000.
- 2) Banchereau J, Briere F and Caux C: Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18: 767 - 811, 2000.
- 3) O'Sullivan BJ and Thomas R: CD40 ligation conditions dendritic cell antigen - presenting function through sustained activation of NF- $\kappa$ B. *J Immunol* 168: 5491 - 5498, 2002.
- 4) Ouaz F, Arron J and Zhen Y: Dendritic cell development and survival require distinct NF- $\kappa$ B subunits. *Immunity* 16: 257 - 270, 2002.
- 5) Cella M, Scheidegger D and Palmer-Lehmann K: Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin - 12 and enhances T cell stimulatory capacity: T - T help via APC activation. *J Exp Med* 184: 747 - 752, 1996.
- 6) Mehrotra PT, Wu D and Crim JA: Effects of IL-12 on the generation of cytotoxic activity in human CD8+ T lymphocytes. *J Immunol* 151: 2444 - 2452, 1993.
- 7) Mackey MF, Wang Z and Eichelberg K: Distinct contributions of different CD40 TRAF binding sites to CD154 - induced dendritic cell maturation and IL - 12 secretion. *Eur J Immunol* 33: 779 - 789, 2003.
- 8) O'Sullivan BJ and Thomas R: CD40 and dendritic cell function. *Crit Rev Immunol* 23: 83 - 107, 2003.
- 9) Faries MB, Bedrosian I and Xu S: Calcium signaling inhibits interleukin - 12 production and activates CD83+ dendritic cells that induce Th2 cell development. *Blood* 98: 2489 - 2497, 2001.
- 10) Kiertcher SM and Roth MD: Human CD14+ leukocytes acquire the phenotype and function of antigen presenting dendritic cells when cultures in GM - CSF and IL - 4. *J Leukoc Biol* 59: 208 - 218, 1996.
- 11) Rafiee P, Johnson CP and Li MS: Cyclosporine A enhances leukocyte binding by human intestinal microvascular endothelial cells through inhibition of p38 MAPK and iNOS. *J Biol Chem* 277: 35605 - 35615, 2002.
- 12) Lim HW, New L and Han J: Calcineurin enhances MAPK phosphatase - 1 expression and p38 MAPK inactivation in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 276: 15913 - 15919, 2001.
- 13) Plath KES, Grabbe J and Gibbs BF: Calcineurin antagonists differentially affect mediator secretion, p38 mitogen - activated protein kinase and extracellular signal - regulated kinases from immunologically activated human basophils. *Clin Exp Allergy* 33: 342 - 350, 2003.
- 14) Matsuda S and Koyasu S: Regulation of MAPK signaling pathways through immunophilin - ligand complex. *Curr Top Med Chem* 3: 1358 - 1367, 2003.
- 15) Sawafuji K, Miyakita Y and Kizaki M: Cyclosporin A induces erythroid differentiation of K562 cells through p38 MAPK and ERK pathways. *Am J Hematol* 72: 67 - 69, 2003.

(平成17年2月3日受付)