

病態・疾患に連動するサイトカインの新規解析法による迅速な病態把握の試み

岡本能弘

**Development of the Method for Analysis of the Cytokine
Balance Shift Associated with Diseases**

Yoshihiro OKAMOTO

Faculty of Pharmacy, Meijo University, 150 Yagotoyama, Tempaku-ku, Nagoya 468-8503, Japan

(Received December 3, 2004)

A dual-color enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay enabled us to analyze three types of cytokine-secreting cells simultaneously. T helper (Th) cells can be subdivided into at least two distinct functional subsets based on their cytokine secretion profiles. The first type of clones (Th1) produces interleukin-2 (IL-2) and interferon- γ (IFN- γ), but not IL-4 or IL-5. The second type of clones (Th2) produces IL-4 and IL-5, but not IL-2 or IFN- γ . Furthermore, the presence of the third type (Th0) of cell, which is a precursor of Th1 or Th2 cells, has been demonstrated to produce both Th1- and Th2-type cytokines. The dual-color ELISPOT assay was developed to differentiate these three subtypes of Th cells in an identical well. In the system, the red spots corresponding to IL-2-secreting cells (Th1) were developed with horseradish peroxidase and aminoethylcarbazole/H₂O₂. The light-blue spots corresponding to IL-4-secreting cells (Th2) were developed with alkaline phosphatase and Vector blue (chromogenic substrate for alkaline phosphatase). The mixed-colored (indigo) spots corresponding to both types of cytokine-secreting cells (Th0-cells) were developed with both chromogenic substrates. With this system, we could detect the IL-2- and/or IL-4-secreting cells simultaneously in a murine spleen cell or human peripheral mononuclear cell preparation.

Key words—dual-color enzyme-linked immunospot assay; interleukin-2; interleukin-4; cytokine balance; murine spleen cells; human peripheral mononuclear cells

1. はじめに

サイトカインは主に免疫システムの制御に中心的な働きを担う生体内情報伝達物質の総称である。¹⁾ サイトカインは様々な種類の細胞により産生されるが、その中でもヘルパー T(Th) リンパ球は免疫系の特異的反応を司っていることから、サイトカイン産生細胞として極めて重要な細胞である。1986年に T. Mosmann²⁾ らは産生するサイトカインの種類によってヘルパー T リンパ球が 2 種類の亜集団、すなわち、主に細胞性免疫機構を活性化するサイトカインであるインターロイキン (IL)-2 やインターフェロン (IFN)- γ を分泌する Th1 細胞と、主に体

液性免疫機構を活性化する IL-4, IL-5, IL-10 などを産生する Th2 細胞に分類できることを見出した。その後、さらに Th1, Th2 細胞の前駆細胞であり、両方のタイプのサイトカイン類を分泌する Th0 細胞が存在することも報告されている。^{3,4)} 近年、これら亜集団のうち、どの亜集団がより活性化するか、言い換えれば、どのヘルパー T 細胞亜集団がより数を増やし、その集団に属するサイトカインをより多く産生しているか、すなわちサイトカインバランスによって感染防御免疫、^{5,6)} 自己免疫⁷⁻⁹⁾ などの生体の免疫反応の性質が決まると考えられるに至った。さらに、両亜集団のサイトカインバランスの不均衡が様々な疾患の原因になると考えられるようになった¹⁰⁾ (Fig. 1)。例えば、サイトカインバランスが Th1 型に偏向する疾患として、各種自己免疫疾患¹¹⁻¹³⁾ や移植片対宿主病 (graft versus host disease)¹⁴⁾ があり、逆に、Th2 型に偏向する疾患としてはアレルギー性疾患、¹⁵⁾ ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus, HIV) 感染¹⁶⁾ など

名城大学薬学部 (〒468-8503 名古屋市天白区八事山 150)

Present address: Faculty of Pharmaceutical Science, Chiba Institute of Science, 3 Shiomi-cho, Choshi, Chiba 288-0025, Japan

e-mail: yokamoto@cis.ac.jp

本総説は、平成 16 年度日本薬学会東海支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

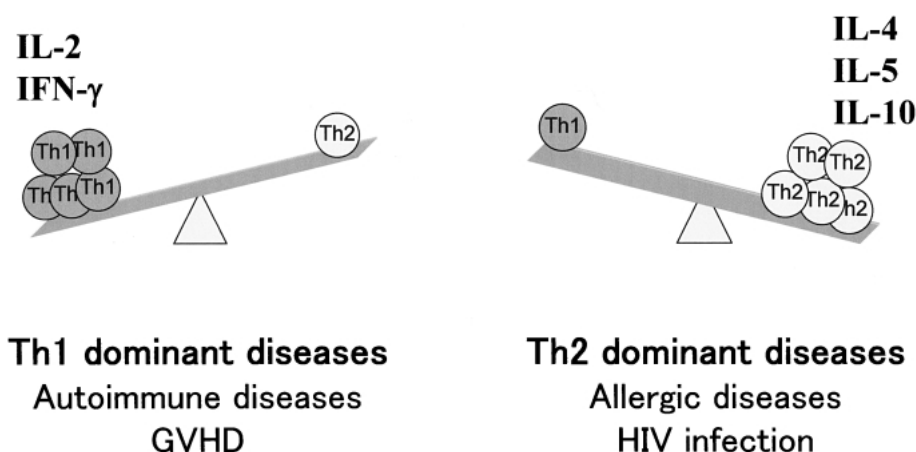


Fig. 1. Cytokine Balance in Diseases

The outcomes of several diseases including infectious, allergic, and autoimmune disorders have been linked to the balance between Th1 and Th2 cytokine production by Th cell-subsets. Th: T helper cells, GVHD: graft versus host diseases.

の感染症が知られている。

2. サイトカインバランスの新規解析法 (Dual Color ELISPOT 法) の開発

サイトカイン類はホルモン類と異なり、サイトカイン自らが産生された局所での機能が生理的に重要である。したがって、サイトカインと病態の関係を解析する際、ただ単に血液中や、リンパ球培養液中のサイトカイン量を測定するのではなく、その分泌を司る細胞数を計測する方法がより有用な情報をもたらすと考えられる。筆者らは複数種のマウスサイトカイン分泌細胞数を同時分別定量を可能とする Dual Color Enzyme-linked Immunospot (ELISPOT) 法 (通称: Stardust Assay, 解析の際、サイトカイン産生細胞の存在を示す痕跡像 (スポット) が Stardust のように見えることに基づき、筆者らが命名した。) を考案した。^{17,18)}

ELISPOT 法とはサイトカイン、あるいはイムノグロブリン分泌細胞を単細胞レベルで検出定量可能な方法である。この方法は最初に Sedgwick ら¹⁹⁾ が特異的抗体産生細胞を検出するために開発して以来、筆者らを含む多くの研究グループにより、改良と修飾がなされてきた^{18,20-23)}。

筆者らの確立した Dual Color ELISPOT 法は従来の ELISPOT 法を発展応用し、Th1 型サイトカイン分泌細胞、Th2 型サイトカイン分泌細胞、さらに両方の型のサイトカインを分泌する細胞である Th0 細胞の同時分別計数を可能とする方法である。本法の測定原理は Fig. 2 に示すように、IL-2 分泌細胞

(Th1 細胞) と IL-4 分泌細胞 (Th2 細胞) の存在を 2 種類の発色システムを用いて、同時に分別検出することに基づく。すなわち、Th1 細胞上 (周辺) に存在する分泌された直後の IL-2 は、Aminoethyl-carbazol (AEC)/H₂O₂ を発色基質としたペルオキシダーゼにより赤色のスポットとして、Th2 細胞に分泌された IL-4 は Vector blue (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) を発色基質としたアルカリホスファターゼにより青色のスポットとして染め分ける。さらに、IL-2、IL-4 両方のサイトカインを分泌する細胞 (Th0 細胞) は赤と青の混合色 (紫) のスポットとして検出することができる (Fig. 3)。筆者らは、上記システムの様々な測定条件 (使用する抗体の種類、量、発色基質等) について検討し、最適測定条件を確立した¹⁸⁾。そして、本法が従来の ELISPOT 法 (Single Color ELISPOT 法) と同等の精度で IL-2 分泌細胞と IL-4 分泌細胞を同時分別定量できることが確認できた。

本法は、サイトカインバランスを (1) 細胞単位で、(2) 包括的に (3 種類のヘルパー T 細胞亜集団を同時に)、(3) フローサイトメーターなどの高価な測定機器の使用、あるいは、細胞のクローニング等の煩雑な実験操作なしに、簡便に、かつ、(4) 高感度に (通常の ELISA 法では単細胞由来の極微量なサイトカインを検出することは不可能であるが、ELISPOT 法では細胞周囲に高濃度のサイトカインがあるので解析可能である) 解析が可能である。Table 1 には各種の細胞レベルのサイトカインバランス解析方法

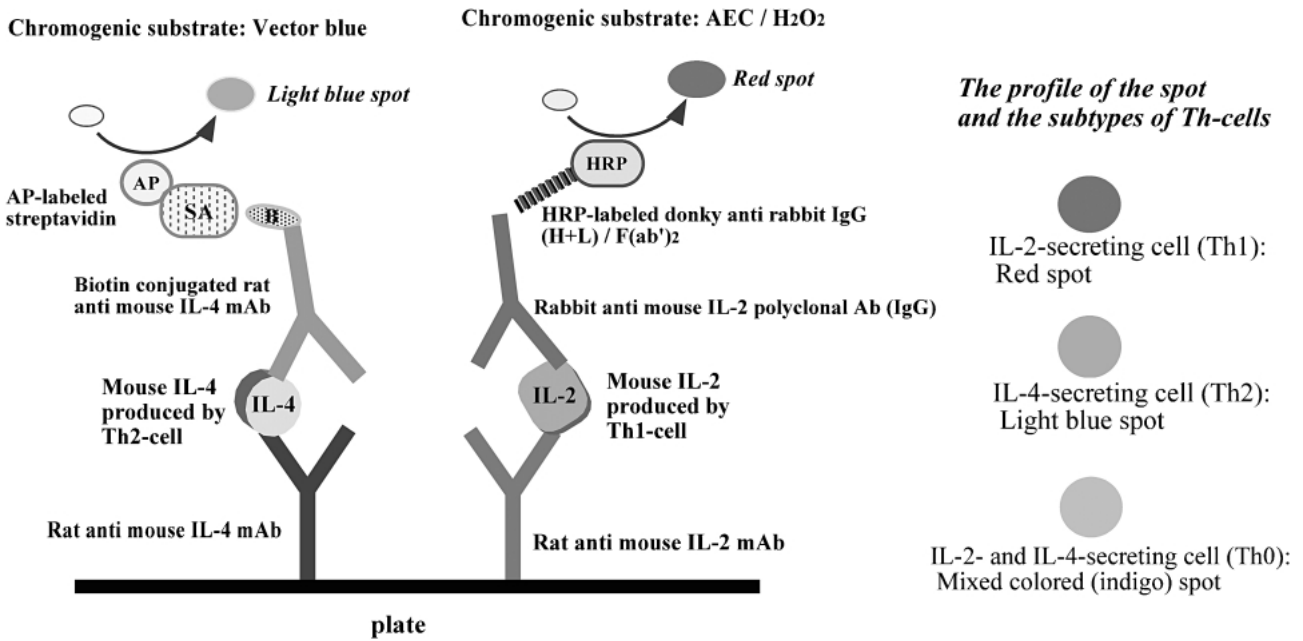


Fig. 2. The Schematic Representation of a Dual Color Detection (Stardust Assay)

mAb: monoclonal antibody, AP: alkaline phosphatase, HRP: horseradish peroxidase, SA: streptavidin, B: biotin. Rat anti mouse IL-2 mAb was obtained from Genzyme (MA, USA), Rat anti mouse IL-4 mAb (clone BVD4-1D11) from Pharmingen (CA, USA), Rabbit anti mouse IL-2 polyclonal antibody from Becton Dickinson (MA, USA), Biotin conjugated rat anti mouse IL-4 monoclonal antibody (clone BVD6-24G2) from Pharmingen, HRP labeled donkey anti rabbit IgG (H+L)/F(ab')₂ from Jackson ImmunoResearch Laboratories (PA, USA), and AP labeled streptavidin from Gibco BRL (PA, USA). Copyright 1998, with permission from Elsevier Science.¹⁸⁾

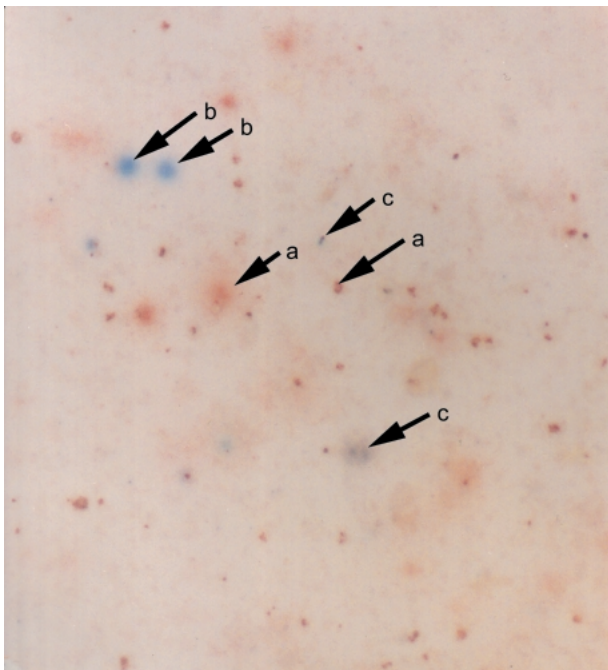


Fig. 3. Typical Profile of the Dual Color ELISPOT Assay

Crude spleen cells of normal BALB/c mice were stimulated with 1 μg/ml Concanavalin A for 18 hours. After the stimulation, the cells were added to wells coated with the mixture of anti-IL-2 and IL-4 antibody, and subsequently spots were developed by the enzyme-substrate system shown in Fig. 1. Red spots corresponding to IL-2-secreting cells are indicated by arrow a, light blue spots corresponding to IL-4-secreting cells are indicated by arrow b, and the indigo spots corresponding to the Th0 type cells are indicated by arrow c (X 40). Copyright 1998, with permission from Elsevier Science.¹⁸⁾

Table 1. The Frequency of IL-2 and IL-4 Secreting Cells in ConA Stimulated Spleen Cells of Several Mouse Strains

	BALB/c	C57BL/6	C3H/He	DBA/2
Number of SFC/10 ⁵ spleen cells				
IL-2	55 (1)	53 (3)	55 (1)	65 (3)
IL-4	156 (11)	244 (5)	249 (8)	111 (6)
IL-2 and IL-4	1 (1)	1 (1)	1 (1)	0 (1)
Ratio				
IL-2/IL-4	0.35	0.22	0.22	0.59

Crude spleen cells obtained from the mice of four different strains were stimulated with 2 μg/ml Con A for 12 hours. The stimulated cells were added to the wells coated with the mixture of anti-IL-2 and anti-IL-4 antibody. Subsequently the frequency of cytokine secreting cells was analysed by a dual color ELISPOT assay. The number of cells secreting IL-2 or IL-4 per 10⁵ spleen cells were determined. The results represent the mean (±S.E.) in 4 assay wells. Copyright 1998, with permission from Elsevier Science.¹⁸⁾

の特徴についてまとめた。

筆者らは、今回確立した Dual Color ELISPOT 法において IL-2 を Th1 型サイトカインのマーカーとして取り上げた。IL-2 だけでなく IFN-γ も Th1 型サイトカインのマーカーとして同様に有用であると考えられる。今後、さらに多種類のサイトカインについて包括的に解析、検討することは重要な課題である。

なお近年, EuroClone 社 (Milano, Italy) から数種のサイトカイン Dual Color ELISPOT アッセイキットが販売され始めている. これらを利用すれば煩雑な条件設定なしに解析を行えるようである.

3. Dual Color ELISPOT 法の応用

Dual Color ELISPOT 法の有用性を示すため以下の2つの動物実験に応用した.

3-1. マウス脾臓細胞のサイトカイン分泌細胞分布の系統差 筆者らは, 4系統 (BALB/c, C57BL/6, C3H/He, DBA/2) の近交系マウス脾臓細胞のサイトカイン分泌細胞の分布を調べた. その結果, Table 2 に示す結果を得た. 4系統の中では, DBA/2 の IL-2 分泌細胞 (Th1) の存在率が高かった. すなわち, BALB/c と DBA/2 マウスは, C57BL/6 や C3H/He 系に比較し, Th1 型細胞が優位に誘導されるということを示している. また, すべての系統で Th0 に相当する細胞数は少数であった. このように本法にてマウスの系統 (遺伝的背景の違い) によるサイトカインバランスの相違を明らかにした.¹⁸⁾

3-2. 関節炎モデルマウスのサイトカインバランス 筆者らは本法を関節リウマチの代表的な病態モデル動物であるコラーゲン関節炎 (Collagen Induced Arthritis, CIA) マウスのサイトカインバランスの解析に応用した. Figure 4 にはコラーゲン関節炎の発症経過, Fig. 5 には CIA マウスリンパ節に含まれるサイトカイン分泌細胞数の経時的な推移を示した. その結果, 関節炎発症前には, Th1 型 (IL-2 分泌細胞) 及び Th0 型細胞が増加し, 発症後

に Th2 型 (IL-4 分泌細胞) が増加するという結果が同時包括的に得られた. この Th1 優位な状況から Th2 優位な状況へのシフトはこれまでに散発的な報告から推定されていた変化であったが, 改めて, 病態の推移に伴う細胞レベルでのサイトカインバランスの変動を実際に証明した初めての報告であ

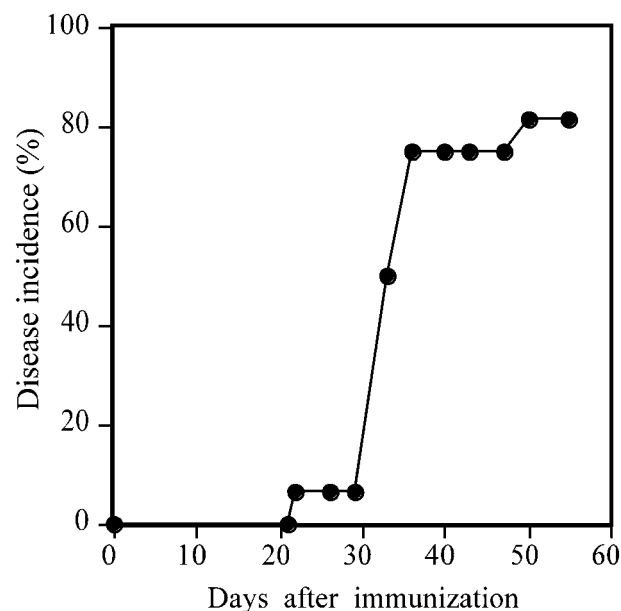


Fig. 4. Incidence and Time Onset of Arthritis in DBA/1 J Mice

Male DBA/1 J mice were injected intradermally in the right footpad with 200 μ g of bovine collagen type II (CII) emulsified in Freund's complete adjuvant, followed on day 21 by an intraperitoneal injection of 200 μ g of CII dissolved in phosphate buffered saline. The clinical onset of collagen induced arthritis (CIA) was estimated by the erythema and edema of paws other than the right foot. Results represent the percent of mice with clinical arthritis in one or more joints. ($n=16$). Copyright 2000, with permission from Mary Ann Liebert, Inc.²⁵⁾

Table 2. Methods for Analysis of Cytokine Balance at Single Cell Level

	Mechanism	Procedure	Cost	Time	Simultaneous detection of multi-kinds of cytokines	Analysis for large number of samples
Dual color ELISPOT assay (Stardust assay)	Application of ELISPOT assay	Simple	Lowest	1-2 days	Possible	Possible
Analysis by T cell cloning	The analysis for the cytokine production of each clone after the T cell cloning	Complicated	Expensive	Long time (a few weeks)	Impossible	Difficult
Assay for intra-cellular cytokines	Analysis by flowcytometer	Simple	Most expensive, requirement of expensive equipment	Short time (several hours)	Possible	Possible

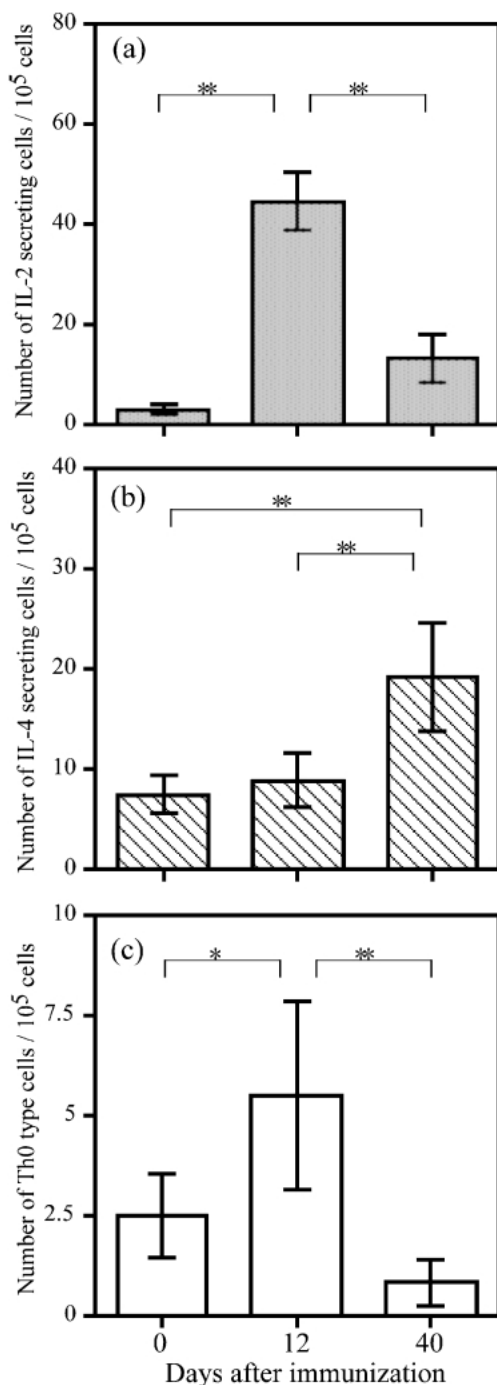


Fig. 5. The Frequency of Th Cells in Lymph Nodes of Mice with Collagen Induced Arthritis (CIA)

Dual color ELISPOT assay was carried out on lymph node cells obtained from mice with CIA at different times after collagen type II (CII)-immunization. Cells were incubated with CII (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in a well coated with a mixture of anti IL-2 antibody and anti IL-4 antibody for 18 hours, and subsequently, spots were developed. (a): The frequency of IL-2-secreting cells (Th1 cell), (b): The frequency of IL-4-secreting cells (Th2 cells), (c): The frequency of cells (Th0) secreting both cytokines. The results are expressed as mean \pm S.E. of six assay wells. Significant differences were determined by Kruskal-Wallis non-parametric one-way analysis of variance and Scheffe's F test. *** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. Copyright 2000, with permission from Mary Ann Liebert, Inc.²⁵⁾

る.^{24,25)}

4. Dual Color ELISPOT 法の臨床応用

筆者らはマウス Dual Color ELISPOT 法と同様に、ヒト Dual Color ELISPOT 法の最適解析条件を確立した。検出原理は Fig. 6 に示す通り、抗サイトカイン抗体をヒトサイトカインに対するものに変更したほかは、マウスのものとほぼ同様である。本法の臨床における有用性を確認するために、若年性関節リウマチ (Juvenile rheumatoid arthritis, JRA) 患者のサイトカインバランスを解析した。²⁶⁾ JRA は 16 歳以下の小児に発症する慢性炎症性疾患であり、特に関節と結合組織に障害をもたらす疾患である。²⁷⁾ その詳細な発症原因は、現在のところ明らかになっていない。筆者らは健常者 5 名、JRA 患者 (Active-Systemic type) 1 名の末梢血中のサイトカイン分泌細胞を解析した。Figure 7 に示したように患者では Th1, Th2 両方のタイプのヘルパー T 細胞数が増大していた。特に、患者 Th2 型細胞の頻度が増加していた。よって、患者の免疫系は異常に活性化し、そのサイトカインバランスが Th2 型優位に偏向していることが考えられた。現在のところ、1 症例のみの解析結果しか得られていないが、ヒト Dual Color ELISPOT 法が臨床応用可能であることを示すことができた。

5. おわりに

筆者らは、細胞レベルでサイトカインバランスを簡便に解析可能とするヒト/マウスサイトカイン Dual Color ELISPOT 法を確立した。そしてさらに本法が動物実験のみならず臨床での病態把握に有用であることを示した。今後、さらに臨床応用を広く進め、サイトカインバランス解析の臨床的意義を解明する予定である。これらの研究成果は免疫関連疾患の診断、治療に直接貢献すると考えられる。

謝辞 本研究に際し、終始ご指導、ご支援を賜りました名城大学薬学部 西田幹夫教授に謹んで感謝致します。また、本研究の実施にあたりご支援、ご協力いただきました名古屋第二赤十字病院 安藤恒三郎博士、後藤芳充博士、あいち小児保健医療センター 上村 治博士に深く感謝致します。

REFERENCES

- 1) Kikuchi K., Uede T., "Ikamen-ekigaku," 5th

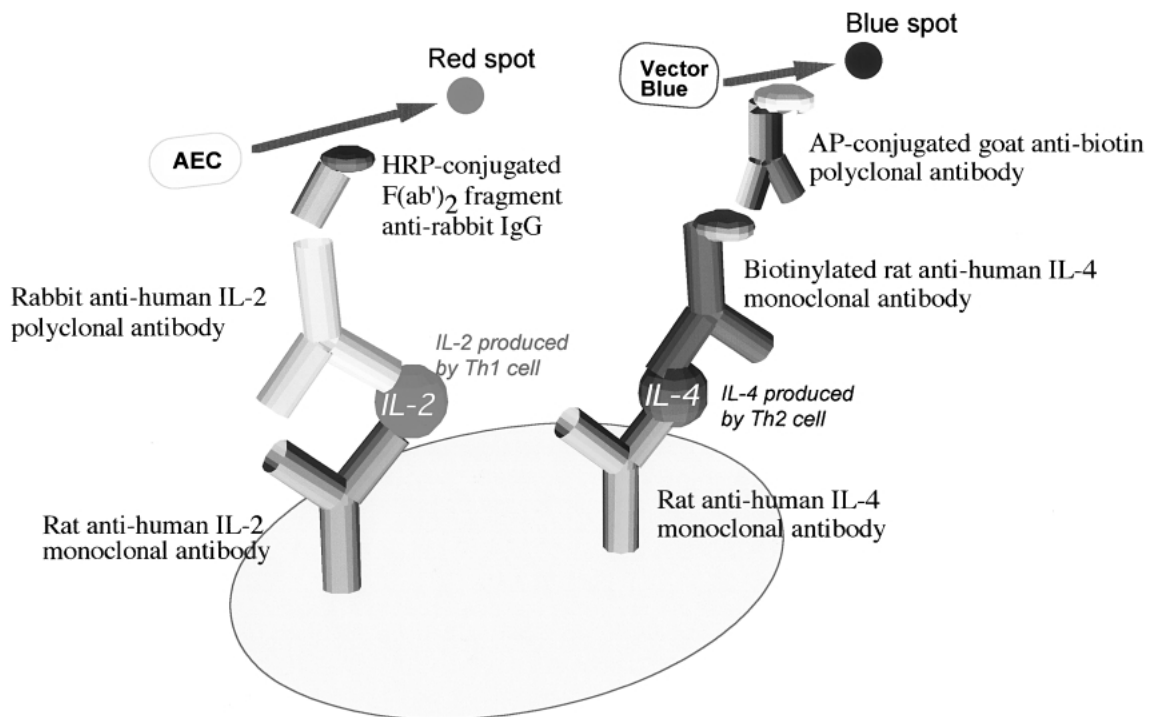


Fig. 6. The Schematic Representation of a Human Dual Color ELISPOT Assay

AP: alkaline phosphatase, HRP: horseradish peroxidase, AEC: 3-amino-9-ethylcalbazole. Rat anti-human IL-2 monoclonal antibody (clone 5344.111) was obtained from Pharmingen (CA, USA), Rat anti-human IL-4 monoclonal antibody (clone 8D4-8) from Pharmingen, Rabbit anti-human IL-2 polyclonal antibody from Endogen (MA, USA), Biotinylated rat anti-human IL-4 monoclonal antibody (clone MP4-25D) from Pharmingen, HRP-conjugated F(ab')₂ fragment anti-rabbit IgG from Jackson ImmunoResearch Laboratories (PA, USA), and AP-conjugated goat anti-biotin polyclonal antibody from Vector Laboratories (CA, USA). Copyright 2003, with permission from Elsevier Science.²⁶⁾

- ed., Nankodo, Tokyo, 2001, pp. 155–180.
- 2) Mosmann T. R., Cherwinski H., Bond M.W., Giedlin M. A., Coffman R. L., *J. Immunol.*, **136**, 2348–2357 (1986).
 - 3) Firestein G. S., Roeder W. D., Laxer J. A., Townsend K. S., Weaver C. T., Hom J. T., Linton J., Torbett B. E., Glasebrook A. L., *J. Immunol.*, **143**, 518–525 (1989).
 - 4) Street N. E., Schumacher J. H., Fong T. A., Bass H., Fiorentino D. F., Leverah J. A., Mosmann T. R., *J. Immunol.*, **144**, 1629–1639 (1990).
 - 5) Clerici M., Hakim F. T., Venzon D. J., Blatt S., Hendrix C. W., Wynn T. A., Shearer G. M., *J. Clin. Invest.*, **91**, 759–765 (1993).
 - 6) Pope M., Chung S. W., Mosmann T., Leibowitz J. L., Gorczynski R. M., Levy G. A., *J. Immunol.*, **156**, 3342–3349 (1996).
 - 7) Murray L. J., Lee R., Martens C., *Eur. J. Immunol.*, **20**, 163–170 (1990).
 - 8) Segal R., Bermas B. L., Dayan M., Kalush F., Shearer G. M., Mozes E., *J. Immunol.*, **158**, 3009–3016 (1997).
 - 9) Shirai A., Conover J., Klinman D. M., *Autoimmunity*, **21**, 107–116 (1995).
 - 10) Abbas A. K., Murphy K. M., Sher A., *Nature*, **383**, 787–793 (1996).
 - 11) Leonard J. P., Waldburger K. E., Goldman S. J., *J. Exp. Med.*, **181**, 381–386 (1995).
 - 12) Neurath M. F., Fuss I., Kelsall B. L., Stuber E., Strober W., *J. Exp. Med.*, **182**, 1281–1290 (1995).
 - 13) Trembleau S., Penna G., Bosi E., Mortara A., Gately M. K., Adorini L., *J. Exp. Med.*, **181**, 817–821 (1995).
 - 14) Carayol G., Bourhis J. H., Guillard M., Bosq J., Pailler C., Castagna L., Vernant J. P., Pico J. L., Hayat M., Chouaib S., Caignard A., *Transplantation*, **63**, 1307–1313 (1997).
 - 15) Durham S. R., Till S. J., *J. Allergy Clin. Immunol.*, **102**, 157–164 (1998).
 - 16) Clerici M., Shearer G. M., *Immunol. Today*, **14**, 107–111 (1993).
 - 17) Okamoto Y., Nishida M., “The Measurement

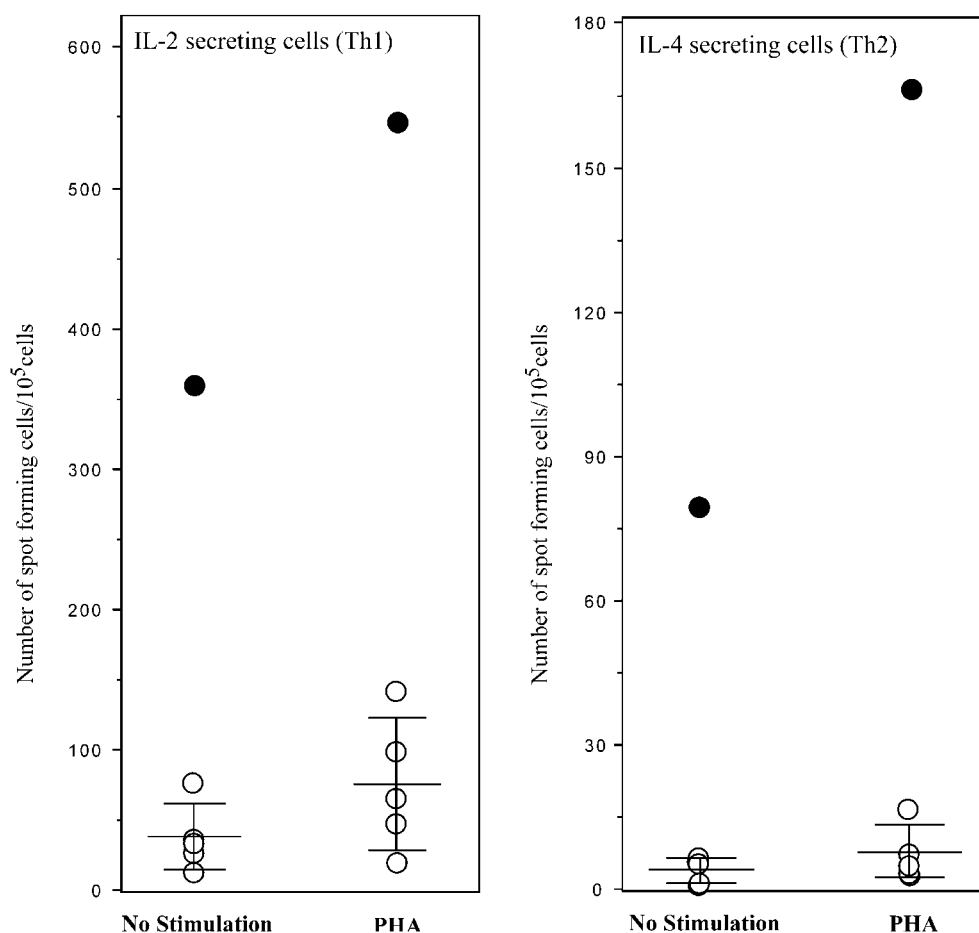


Fig. 7. Frequency of IL-2 and IL-4 Secreting Cells in a Patient with Juvenile Rheumatoid Arthritis (JRA)

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of each healthy volunteer (24 ± 2 years old, range 22-33, 2 males and 3 females) and one patient with JRA (4 years old, male) were prepared. The cells were washed with RPMI 1640 medium. Subsequently the cells were stimulated with $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ phytohemagglutinin (PHA) for 18 hours. Non-stimulated cells were employed as a control. After the stimulation, the cells were applied to the dual color ELISPOT assay. Open circles (○) for healthy individuals, Closed circles (●) for the patient with JRA. Each circle represents the mean values of at least 6 assay wells. Each horizontal bar represents the mean values \pm S.E. of 5 healthy individuals. Copyright 2003, with permission from Elsevier Science.²⁶⁾

- of Interleukins by ELISPOT Assay with Particular Application for Dual Color Analysis (Stardust Assay),” eds. by Luke A. J., O’Neill & Andrew Bowie, Vol. 60, The Humana Press Co., 2001, pp. 29–39.
- 18) Okamoto Y., Abe T., Niwa T., Mizuhashi S., Nishida M., *Immunopharmacology*, **39**, 107–116 (1998).
 - 19) Sedgwick J. D., Czerkinsky C., *J. Immunol. Methods*, **150**, 159–175 (1992).
 - 20) Shirai A., Sierra V., Kelly C. I., Klinman D. M., *Cytokine*, **6**, 329–336 (1994).
 - 21) Herr W., Linn B., Leister N., Wandel E., Meyer zum Buschenfelde K. H., Wolfel T., *J. Immunol. Methods*, **203**, 141–152 (1997).
 - 22) Ronnelid J., Klareskog L., *J. Immunol. Methods*, **200**, 17–26 (1997).
 - 23) Vaquerano J. E., Peng M., Chang J. W., Zhou Y. M., Leong S.P., *Biotechniques*, **25**, 830–834, 836 (1998).
 - 24) Okamoto Y., Nishida M., *Yakugaku Zasshi*, **121**, 131–138 (2001).
 - 25) Okamoto Y., Gotoh Y., Tokui H., Mizuno A., Kobayashi Y., Nishida M., *J. Interferon Cytokine Res.*, **20**, 55–61 (2000).
 - 26) Okamoto Y., Gotoh Y., Shiraishi H., Nishida M., *Int. Immunopharm.*, **4**, 149–156 (2004).
 - 27) Ilowite N.T., *Pediatrics*, **109**, 109–115 (2002).