

「生体防御のメカニズム」
平成9年度採択研究代表者

笹月 健彦

(九州大学生体防御医学研究所 教授)

「免疫系のフレームワーク決定及び免疫制御の分子機構」

1. 研究実施の概要

免疫システムは多様な感染源との相互作用を通して進化してきた生体にとって必須の防御機構である。このため、T細胞受容体 (TCR) は理論上 10^{15} 乗を越す高度の多様性を獲得し得るが、実際には TCR は胸腺において自己の主要組織適合抗原 (MHC) およびそれと結合した自己ペプチドを同時に認識することによって、この多様性の中から(1)自己 MHC による拘束性の獲得 (正の選択)、および(2)自己反応性 TCR の除去 (負の選択)、という二大選択を受け、免疫システムのフレームワークが決定されている。

一方胸腺におけるこの二大選択を経て生き延びた T細胞は、末梢において自己の MHC と結合した細菌やウィルス由来のペプチドを認識して、量的にも質的にも様々な免疫応答を惹起し、感染防御あるいは逆に自己免疫疾患発症など、生体にとっては正負の両面の機能を有する。

本研究は、①胸腺における正および負の選択機構、②末梢における MHC 多重遺伝子族による免疫応答の制御機構、をそれぞれ分子レベルで解明し、その理解に立脚して、抗原特異的免疫制御法を確立し、感染症、自己免疫疾患、アレルギー、GvH 病、癌など現代医学が抱える難治性疾患の真の治療法、予防法の確立に資することを目的としている。

これまで、種々の遺伝子改変マウスを樹立し、胸腺において“自己”と“非自己”がいかんにして識別され、その破綻がいかんにして自己免疫に向かうかに関して、新しい知見を得た。また、MHC 結合ペプチドライブラリーや、マルチバレント可溶性 MHC およびマルチバレント可溶性 TCR の開発を通じて、未知抗原ペプチドの同定や抗原特異性免疫制御法の確立に向けた研究を進めている。

2. 研究実施内容

(1) T細胞レパートリー形成における TCR-MHC-ペプチド相互作用

I-Ab/E アルファ 52-68 ペプチド複合体上で分化した CD4+CD8-胸腺細胞を単離し、その TCR ベータレパートリーを'immunoscope'と'sequencing'を用いて解

析することで、単一 MHC/ペプチド複合体により少なくとも 10^5 の多様性をもつ TCR レパートリーが形成されることを示した。一方、I-Ab/E アルファペプチド複合体と無関係な TCR ベータ鎖の存在下で、この複合体上で分化した TCR アルファ鎖を'アンカー PCR'と'sequencing'を用いて解析することで、その V アルファ usage 及び CDR3 のアミノ酸組成が極めて限られていることを明らかにし、正の選択において特異的 TCR-ペプチド相互作用が関与し得ることを証明した。次に、生理的条件下での正の選択における TCR-MHC-ペプチド相互作用をより詳細に解析することを目的に、まず選択に関与するペプチドの TCR コンタクト部位のアミノ酸残基が分化の効率と選択される TCR レパートリーに及ぼす影響を検討した。E アルファアナログペプチドを用いた実験より、57 位(Q)、58 位(G)、60 位(L)、62 位(N)のアミノ酸残基が TCR コンタクト部位であることを明らかにし、うちいくつかをリジンに置換したトランスジェニックノックアウトマウスを数系統樹立した。現在これらのマウスにおける CD4+T 細胞の分化、その TCR の構造及び異なる単一 MHC/ペプチド複合体を発現したトランスジェニックノックアウトマウスを組み合わせることで、T 細胞レパートリー形成の免疫応答性およびその質に及ぼす影響等解析を進めている。

(2) 自己免疫疾患モデルマウスの樹立

胸腺において極めて低いレベルで I-Ab/E アルファ 52-68 ペプチド複合体を単一 MHC/ペプチド複合体として発現する H3TKO において、CD4+TCR アルファベータ+T 細胞及びマクロファージの浸潤と脱髄性変化によって特徴づけられる末梢神経炎を自然発症することを見出した。検索した全ての末梢神経においては、その局在や機能にかかわらず、細胞浸潤を認めたが、中枢神経系も含めて他の臓器は正常であった。一方、I-Ab/E アルファ 52-68 複合体をより高いレベルで発現する B2L や non-transgenic littermate である TKO ではこのような末梢神経炎は観察されなかった。H3 の骨髄細胞を放射線照射した B2L に移入すると、同様の所見を呈することより、この末梢神経炎は、自己免疫に起因するものと考えられた。現在、臓器特異的自己免疫疾患は、臓器特異的自己抗原ペプチドをある特定の MHC クラス II 分子が CD4+T 細胞に提示することで惹起されるというモデルが一般的である。しかしながら、H3TKO において唯一の MHC 分子である I-Ab 分子は E アルファ 52-68 ペプチドで占有されており、他の自己および外来抗原ペプチドはもはや結合しない。それ故、臓器特異的自己免疫疾患の発症に、臓器特異的ペプチドに対する CD4+T 細胞の免疫応答は必須ではないことを示している。現在、その発症機序を分子レベルで理解すべく解析を行っている。

(3) '分化'と'死'を制御する新規遺伝子の単離と解析

T細胞レパートリーの形成は、TCR-MHC-ペプチド相互作用によるT細胞の'分化'と'死'の結果である。この観点より、分化あるいは死を制御する遺伝子の同定はT細胞レパートリー形成の分子レベルでの理解において必須である。我々は、胸腺 cDNA のサブトラクティブライブラリーを用いて、造血細胞に特異的に発現し、その構造上アダプター分子として機能すると考えられる新規遺伝子 P4F9 を単離した。現在ノックアウトマウスの作製も含め、P4F9 の *in vitro* および *in vivo* での機能解析を進めている。

(4) MHC 結合ペプチドライブラリー、マルチバレント可溶性 MHC/ペプチド複合体及びマルチバレント可溶性 TCR の開発

未知抗原ペプチドの同定や、抗原特異的免疫制御への応用を目的に、MHC 結合ペプチドライブラリー、マルチバレント可溶性 MHC/ペプチド複合体及びマルチバレント可溶性 TCR の開発を、無細胞系での分子間相互作用の解析、モデルシステムでの抗原ペプチドの同定、自然発症自己免疫疾患モデルマウスへの応用も含めて解析を行っている。

(5) HBs 抗原に対する免疫応答における遺伝的制御機構の解明

HLA は高度の多型性に富む多重遺伝子族という特徴を有するが、その特徴に基づく免疫制御機構には不明な部分が多い。我々は、ヒト集団にB型肝炎ウイルス表面抗原 (HBsAg) をワクチン接種すると、その 5~10%は数回のワクチン接種にもかかわらず抗体産生低応答者であること、その低応答者は特定の HLA タイプを有すること、そして抗体産生低応答にもかかわらず、HBsAg 特異的な T細胞増殖反応が高応答者のそれと同程度に観察されることなどを報告しており、その機序を明らかにすることが HLA による免疫制御機構の解明につながると考えている。HBsAg 特異的 T細胞クローンを複数の抗体産生高応答者より樹立し、そのサイトカイン産生パターンを検討すると、ほとんど総てが Th2 タイプ CD4T 細胞であり、抗体価高値と一致する結果であった。一方、低応答者において HBsAg 特異的に増殖する T細胞クローンは個体によって異なり、Th1 タイプの CD4T 細胞が主であるもの、Th0 タイプ CD4T 細胞が主であるもの、また CD4 および CD8T 細胞の両者を有するものなど一様ではなかった。すべての T細胞の解析は終了していないが、このような低応答者における T細胞応答の多様性が HLA 型に基づいて如何に制御されているかを検討することがヒトにおける HLA による免疫制御への理解を可能にすると考えられる。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

○Savoie CJ, Kamikawaji N, Sasazuki T: The peptide binding motif of HLA-

- A*0217. Immunogenetics, in press, 1999
- Sano T, Yamamoto K, Fukui Y, Sasazuki T: Spontaneous clustering of Thy-1 antigens on CD4+ CD8+ thymocytes lacking TCR engagement by MHC/peptide complexes. *Eur. J. Immunol.*, 29:403-412, 1999
 - Nishimura H, Washizu J, Naiki Y, Hara T, Fukui Y, Sasazuki T, Yoshikai Y: MHC class II-dependent NK1.1+gd T cells are induced in mice by Salmonella infection. *J. Immunol.*, 162:1573-1581, 1999
 - Fukui Y, Hashimoto O, Inayoshi A, Gytoku T, Sano T, Koga T, Gushima T, Sasazuki T: Highly restricted T cell repertoire shaped by a single major histocompatibility complex-peptide ligand in the presence of a single rearranged T cell receptor b chain. *J. Exp. Med.*, 188:897-907, 1998
 - Gapin L, Fukui Y, Kanellopoulos J, Sano T, Casrouge A, Malier V, Beaudoin E, Gautheret D, Claverie JM, Sasazuki T, Kourilsky P: Quantitative analysis of the T-cell repertoire by a single peptide/MHC complex. *J. Exp. Med.*, 187: 1871-1883, 1998
 - Gytoku T, Fukui Y, Sasazuki T: An endogenously processed self peptide and the corresponding exogenous peptide bound to the same MHC class II molecule could be distinct ligands for TCR with different kinetic stability. *Eur. J. Immunol.*, 28:4050-4061, 1998
 - Ono T, Zambenedetti MR, Yamasaki K, Kawano Y, Kamikawaji N, Ito H, Sakurai M, Nishimura Y, Kira J, Kanazawa I, Sasazuki T: Molecular analysis of HLA class I (HLA-A and -B) and HLA class II (HLA-DRB1) genes in Japanese patients with multiple sclerosis (Western type and Asian type). *Tissue Antigens*, 52:539-542, 1998