「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}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⑴自己MHCによる拘束性の獲得（正の選択）、および⑵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イ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、③先鋭的な免疫応答制御法を確立することで、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と共に、生物学的見地から、④免疫系の構築とその恒常性維持の分子機構を解明することを目的に研究を進めている。

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"がいかにして識別され、その破綻がいか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の開発を行い、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成果を修めると共に、免疫系の構築およびその恒常性維持に重要な役割を演じると考えられる新規遺伝子を単離し、ノックアウトマウスの作製等を通じて現在その機能解析を進めている。

２．研究実施内容

⑴　Ｔ細胞レパートリー形成におけるTCR-MHC／ペプチド複合体相互作用

胸腺内分化過程で、Ｔ細胞はTCR-MHC／ペプチド複合体相互作用の結果、正と負の選択を受け、免疫応答に寄与するＴ細胞レパートリーが決定される。我々は、これまでにI-A^b/Eα52－68複合体を単一MHCクラスII／ペプチド複合体を発現するトランスジェニック－ノックアウトマウス（Tg-KO）において野生型I-A^b分子を発現したマウスのそれとほぼ同程度の多様性をもつＴ細胞レパートリーが形成される一方、この複合体と無関係な特異性を有するTCRβ鎖を発現させることでそのα鎖が高度に制限されることを見い出した。この知見は、正の選択においても特異的TCR- ペプチド相互作用が関与し得ることを示す決定的な証拠を提供するものである。本年度は、選択に関わる抗原ペプチドの構造がＴ細胞レパートリー形成に及ぼす影響は明らかする目的で、Eα52－68のTCRコンタクト部位にあたるアミノ酸残基を置換したアナログペプチドをI-A^b分子との単一MHCクラスII／ペプチド複合体として発現する複数系統のTg-KOを樹立し、そのCD4$^+$Ｔ細胞分化及びTCRの構造を詳細に解析することで、TCRコンタクト部位のアミノ酸残基の側鎖の大きさや荷電の有無によって、正の選択における抗原ペプチドの関与の程度が異なり、結果として多様性や特異性を異にするＴ細胞レパートリーが形成されることを明らかにした。

⑵　臓器特異的自己免疫疾患モデルマウスの樹立とその解析

単一MHCクラスII／ペプチド複合体を胸腺において極めて低いレベルで発現する１系統のマウスにおいて、CD4$^+$TCRαβＴ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。リンパ節CD4$^+$Ｔ細胞の移入実験、骨髄キメラを用いた解析、単クローン抗体のin vivo投与あるいはin vitroでのＴ細胞の機能解析等より、この末梢神経炎は、骨髄由来細胞上のMHCクラスII／ペプチド複合体の低発現に起因する不完全な負の選択の結果生じる自己免疫病であると考えられた。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分子が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。しかしながら今回の知見は、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Ｔ細胞応答は必須ではなく、むしろＴ細胞レパートリー形成に起因する全身性の自己反応性が関与している可能性があることを示している。

一方、HLA-DR2ハプロタイプを有する多発性硬化症（MS）患者において認められるproteolipid protein （PLP）由来のペプチド（PLP 95-116）反応性CD4$^+$Ｔ細胞のMS発症における役割を明らかにするために、HLA-DR2トランスジェニックマウスを用いた解析を行った（国立精神神経センター田平武部長らとの共同研

究)。このマウスにPLP95－116を免疫することで樹立したPLP95－116特異的HLA-DR2拘束性CD4^{+}Ｔ細胞株のうち１種類は、HLA-DR2トランスジェニックRAG2欠損マウスに移入することで疾患を惹起した。以上の結果は、HLA-DR2を有するMS患者において、このHLAに拘束されたPLP反応性CD4陽性Ｔ細胞が疾患発症に関与していることを明らかにしたのみならず、このマウスが今後MS研究の新しい材料として極めて有用であることを示している。

⑶　高親和性可溶TCRの樹立とその応用

免疫応答は、TCRがそのリガンドであるMHCに結合した抗原ペプチドを認識することで惹起される。それ故、TCR-MHC／ペプチド複合体相互作用を標的として抗原特異的に免疫応答を制御することが理論上可能であるが、この相互作用は極めて低親和性であり、特に解離速度（オフレイト）が速いため、その実現を困難なものとしている。この点を克服するため、特定のMHC／ペプチド複合体に対して高親和性を有する可溶性TCRの開発を行った。BIAcoreを用いた解析にて、このTCRは、それが認識するMHC／ペプチド複合体に対して、極めて延長したオフレイトを示し、その親和性は約300倍上昇していた。また、この可溶性TCRをマグネティックビーズと組み合わせることで、リガンドとなるMHC／ペプチド複合体を発現した細胞を容易に単離することができた。それ故、この方法論を用いて今後抗原特異的に免疫応答を制御することが可能になると期待される。

⑷　Motif aided peptide library （MAPL）法を用いた未知抗原ペプチドの同定とその応用

I-A^{b}/Eα52－68複合体を単一MHCペプチド複合体として発現するTg-KOのリンパ節CD4^{+}Ｔ細胞から野生型I-A^{b}分子に対する反応性を指標に樹立したＴ細胞ハイブリドーマのいくつかは、I-A^{d}分子に対しても反応性を示す。そこで、選択に関わる自己抗原ペプチドと免疫応答における抗原ペプチドの構造を比較すると共に、免疫応答とアロMHC抗原認識におけるTCR-MHC／ペプチド複合体相互作用の異同を明らかにする目的で、これらのＴ細胞ハイブリドーマが、I-A^{b}あるいはI-A^{d}の存在下で認識する抗原ペプチドを、それぞれのMHCに結合するペプチドのモチーフを基に、合成ペプチドライブラリーを作製する方法（MAPL法）にて同定した。また、同様の方法論を用いて、Ｉ型糖尿病のモデルマウスであるNODから樹立したCD4^{+}Ｔ細胞株が認識する抗原ペプチドモチーフの同定を行った（大阪大学・菊谷　仁教授との共同研究)。

⑸　新規遺伝子の単離とその機能解析

免疫系の構築及びその恒常性維持において重要な機能を演ずると推測される新規遺伝子HCHを単離した。現在、HCHを介するシグナル伝達系を解明すると共にその機能の全貌を明らかにすべくノックアウトマウスを用いた解析を進めてい

る。

⑹　Th1、Th2免疫応答バランスを制御する転写共役因子の解析

末梢リンパ系臓器において抗原刺激を受けたCD4Ｔ細胞はTh1あるいはTh2 CD4Ｔ細胞へと分化し、それぞれに特異的なサイトカインを産生して、細胞性あるいは液生免疫応答を誘導する。この分化に関与する転写因子はいくつか知られているが、これらと相互作用し、転写を制御するタンパク複合体を精製した。この複合体はヒストニアセチル化酵素および非特異的にDNAと結合する４種のタンパク質を含んでいた。現在転写制御に関する機能とサブユニットの同定を進めている。

３．主な研究成果の発表（論文発表）

○Nishimura H, Washizu J, Naiki Y, Hara T, Fukui Y, Sasazuki T, Yoshikai Y:MHC class II-dependent NK1.1^{+}γδ T cells are induced in mice by Salmonella infection. J. Immunol., 162:1573-1581, 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

○Savoie CJ, Kamikawaji N, Sasazuki T.: The peptide binding motif of HLA-A*0217. Immunogenetics, 49:567-570, 1999