

「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

(国立国際医療センター研究所 所長)
(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(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、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 の開発を行うことで、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た。また、自己免疫性甲状腺疾患を対象に、マイクロサテライトマーカーを用いた whole genome scanning を行い、疾患感受性候補遺伝子の同定を行うと共に、リンパ球遊走に不可欠な分子を世界に先駆けて同定した。

2. 研究実施内容

(1) リンパ球遊走に不可欠な分子の同定

免疫細胞は、種々の感染源に迅速に対処すべく生体内を常にパトロールしている。このように構

成細胞が絶えず動き回るといった特徴は、他の生命複雑系においては認められず、免疫系独自に進化したものである。胸腺、骨髄といった1次リンパ組織で分化したT及びBリンパ球は、脾臓、リンパ節、パイエル板といった2次リンパ組織の特定のコンパートメントへ移動することでリンパ濾胞を構築する。リンパ球の移動がケモカインと総称されるタンパク質によって誘導されることは知られているが、リンパ球の運動性を制御する分子機構そのものは不明であった。我々は、マウス胸腺 cDNA ライブラリーにより線虫およびショウジョウバエにおいて細胞運動を制御することが知られている CDM ファミリーに属し、免疫系特異的に発現する遺伝子 DOCK2 を単離し、その生理的機能をノックアウトマウスを作製することで解析した。DOCK2 欠損マウスのリンパ球は種々のケモカイン刺激に対して遊走せず、その結果リンパ濾胞の萎縮、辺縁帯B細胞の消失等さまざまな免疫系の構築異常を呈した。野生型マウスのリンパ球をケモカインで刺激すると Rac の活性化及びアクチンの重合が観察されたが、ノックアウトマウスのリンパ球においてはこれらの反応が消失していた。すなわち、DOCK2 は Rac を活性化し細胞骨格の再構築を促すことでリンパ球の運動性を制御する重要な分子であり、その欠損が免疫系の構築に多大な影響を与えることを明らかとした。

(2) 自己免疫性末梢神経炎を自然発症するマウスの樹立とその発症機序の解析

多くの臓器特異的自己免疫疾患及びそのモデル動物において、その発症がある特定の MHC 対立遺伝子と相関することが知られている。MHC 遺伝子は高度の遺伝的多型を有し、この多型に応じて結合する抗原ペプチドが異なるため、このメカニズムとして、特定の MHC 分子が臓器特異的自己抗原ペプチドと結合し、これに対するT細胞応答が惹起されるために発症するという考え方が一般的である。一方、自己免疫を惹起するT細胞レパートリーは疾患感受性の MHC 分子により京成されているため、T細胞レパートリーの選択そのものが疾患感受性に寄与している可能性も考えられるが、‘免疫応答’と‘T細胞レパートリー形成’という2つの機能を分断して解析することが困難であるため、この可能性につき明確な解答は得られていない。我々は、1種類の MHC クラス II /ペプチド複合体のみを発現する複数系統のトランスジェニックノックアウトマウスのうち、胸腺での発現レベルが最も低い(H3-TKO) マウスにおいて10週齢以後に下肢の運動不全と筋力低下を主徴とする病態が生じることを見出した。組織学的解析より、末梢神経において CD4 陽性 TCR $\alpha\beta$ 陽性T細胞、マクロファージの浸潤と脱髄性変化が観察されたが、中枢神経及び他の臓器は正常であった。しかしながら、non-transgenic littermate や同じMHC クラス II /ペプチド複合体をより高いレベルで発現する B2L-TKO においてはこのような病態は観察されなかった。H3 TKO マウスにおいては、この複合体に対する免疫寛容が不完全であり、H3 TKO の骨髄を放射線照射した B2L TKO マウスに移入することで同様の病態を再現できることより、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負の選択の insufficiency が疾患発症に関与していると考えられた。以上の結果は、MHC 分子により胸腺で形成されるT細胞レパートリーそのものが自己免疫疾患発症を規定する可能性を示すものである。

(3) T細胞の運命を決定する TCR-MHC /ペプチド複合体相互作用の解析

T細胞に相異なる運命を課す TCR-MHC /ペプチド相互作用を分子及び原子レベルで解析する目的で、1つの TCR が正の選択、免疫応答、およびアロ MHC 抗原反応の際に認識する抗原ペ

プチドを同定し、その可溶性 TCR 及び可溶性 MHC/ペプチド複合体の樹立に着手した。

(4) 自己免疫性甲状腺疾患感受性を規定する候補遺伝子の同定

甲状腺特異的な自己免疫疾患である Graves 病(GD)と橋本病(HT)が、どのような遺伝要因をそれぞれ特異的にもち、また共有するかを明らかにし、臨床的・免疫学的に所見の異なるこれら2つの疾患が、同じ甲状腺を舞台として形成される分子機序を解明することを目的として、1)罹患同胞対法による全ゲノムスキャン、2)それによって同定された染色体候補領域を対象とした相関検定による narrowing、3) narrowingされた領域に存在する遺伝子の配列解析、を行い責任遺伝子の同定を試みている。これまでに、自己免疫性甲状腺疾患の罹患同胞対 123 組に対して全ゲノムスキャンを行い、自己免疫性甲状腺疾患全体の疾患感受性遺伝子領域を 5q31-q33 (LOD 値 3.1)に、また HT の疾患感受性遺伝子領域を 8q23-q24 (LOD 値 3.7)に同定した。次に 8q23-q24 を narrowing する目的で、本領域約 21Mb のゲノム情報から 330 個の多型性を有する CA リピートをまず同定し、HT103 症例、対照群 288 例を対象に相関検定を行った。その結果、8q24.2 に P 値 0.00001 を示すマイクロサテライトマーカーを同定し、統計遺伝学的に HT 発症関連領域を約 200kb まで narrowing した。さらに、この領域に gSNPs を約 10kb 間隔で設定し相関検定を行い、P 値 0.00001 を示す SNP を中心として数個の SNP において、HT と対照群の間に有意差が示された。これによって、統計遺伝学的に HT 発症関連領域が数 10kb まで narrowing された。この領域には3つの発現が確認されている遺伝子が位置し、また、遺伝子配列予測プログラムによって遺伝子構造を取る可能性のある配列が5つ存在しており、HT の原因遺伝子を同定するために、これらの配列の塩基配列解析を進めている。

(5) Th1、Th2 への分化制御機構

末梢リンパ系臓器における CD4 陽性 T 細胞の Th1 あるいは Th2 への分化を制御する転写因子はいくつか知られているが、中でも GATA ファミリーに属する GATA-3 は、Th0 から Th2 への分化のみならず、胸腺における T 細胞の分化そのものに必須である。GATA-3 が T 細胞の異なる分化段階において異なる標的遺伝子の転写を活性化する機序を明らかにする目的で、ConA 刺激マウス Th2 細胞核抽出液より、GATA-3 と相互作用し GATA-3 の転写活性化能を仲介する転写共役因子複合体の精製を試みている。GST 融合 GATA-3 と 200mMKCl の塩濃度下で結合するタンパク分子を 0.2%サルコシルにより溶出し、1次元に展開後得られたバンドを質量分析器にて解析することにより、これまでに、約 100KDa のタンパク分子が酵母 cdc48p のホモログである Valosine-containing protein (VCP)であることを明らかにした。VCP は STAT3 シグナル伝達系の活性化に伴い誘導されるタンパク分子であり抗アポトーシス作用を有する。VCP が GATA-3 の転写制御に果たす役割を、現在検討中である。

3. 研究実施体制

免疫制御解析グループ

- ① 笹月 健彦(九州大学生体防御医学研究所・教授、国立国際医療センター研究所・所長)
- ② 免疫応答および自己免疫疾患感受性の遺伝的制御機構の解明

T細胞分化解析グループ

- ① 福井 宣規(九州大学生体防御医学研究所・助教授)
- ② DOCK2 の機能並びにそのシグナル伝達系の解明
T細胞レパートリー選択機構の解明

病因ペプチド解析グループ

- ① 山本 健(九州大学生体防御医学研究所・助教授)
- ② 自己免疫疾患モデルマウスの病因、病態の解明

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Fukui Y, Hashimoto O, Sanui T, Oono T, Koga H, Abe M, Inayoshi A, Noda M, Oike M, Shirai T, Sasazuki T.: Hematopoietic cell-specific CDM family protein DOCK2 is essential for lymphocyte migration. **Nature**, 412: 826–831, 2001
- Oono T, Fukui Y, Masuko S, Hashimoto O, Ueno T, Sanui T, Inayoshi A, Noda M, Sata M, Sasazuki T: Organ-specific autoimmunity in mice whose T cell repertoire is shaped by a single antigenic peptide. **J. Clin. Invest.**, 108: 1589–1596, 2001
- Sakai K, Shirasawa S, Ishikawa N, Ito K, Tamai H, Kuma K, Akamizu T, Tanimura M, Furugaki K, Yamamoto K, Sasazuki T: Identification of susceptibility loci for autoimmune thyroid disease to 5q31–q33 and Hashimoto’s thyroiditis to 8q23–q24 by multipoint affected sib-pair linkage analysis in Japan. **Hum. Mol. Genet.**, 10:1379–1386, 2001

(3) 特許出願

国内1件