

「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(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、胸腺における正および負の選択機構、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、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、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、新規遺伝子を単離しノックアウトマウスの作製よりこの遺伝子が免疫系の構築において重要な役割を演ずることを明らかにした。

### 2. 研究実施内容

- (1) T細胞レパ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<sup>b</sup>/E $\alpha$ 52-68複合体を単一MHCクラス / 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<sup>b</sup>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TCR $\beta$ 鎖を発現させることでその $\alpha$ 鎖が高度に制限されることを見出した。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を明らかにする目的で、E $\alpha$ 52-68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<sup>b</sup>分子との単一MHCクラス / 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<sup>+</sup>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。

また、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た。

## (2) 多発性硬化症 (MS) モデルマウスの樹立

HLA-DR2ハプロタイプを有する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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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。

## (3) 新規遺伝子の単離とその解析

新規遺伝子をマウス胸腺cDNAライブラリーより単離し、ノックアウトマウスを用いた解析より、この遺伝子産物が免疫系の構築に重要な役割を演じることを明らかにした。

#### (4) HBs抗原特異的免疫応答制御機構の解析

健常人の5-10%がHBsAgワクチンに対して抗体産生低応答者である。我々は、これまでに、特定のHLAタイプがこの低応答と相関すること、そして低応答であるにもかかわらず、その約半数においてHBsAgに対するT細胞増殖反応が認められることを証明しており、この低応答のメカニズムは単にHBsAgに特異的なT細胞の欠如では説明できない。一方、我々は抗体産生に対するHLAの寄与が50%であることを示しており、HLA以外の他の因子の関与を示唆している。HBsAgワクチンに対する免疫応答に個体差が生じる機序をT細胞レベルでの抗体産生制御に焦点をあて、抗体高応答者および低応答者それぞれ3人よりHBsAg特異的なT細胞クローンを146クローン樹立した。高応答者より得られたT細胞クローンは、CD4陽性TCR $\alpha\beta$ 型のT細胞であり、77%がHBsAgに対しIL-4優位の産生パターンで増殖反応を示すTh2タイプのT細胞であったが、低応答者に関しては、CD4陽性TCR $\alpha\beta$ 型で $\gamma$ -IFN優位のサイトカイン産生パターンを示すTh1タイプのT細胞クローンを主に有する個体、CD4陽性TCR $\alpha\beta$ 型でTh0タイプのT細胞クローンを主に有する個体、また、HBsAg特異的に増殖を示すCD8陽性TCR $\alpha\beta$ 型T細胞クローンとCD4陽性T細胞クローンの両者を有する個体が認められた。これは、ヒト集団における免疫応答の個体差が、機能的に異なるCD4T細胞サブセットの活性化に基づくことを示した初めての例である。HBsAgに対する免疫応答に関し、このようなTh1/Th2バランスの差が生じる機序の一つとして、抗体高応答者と低応答者におけるT細胞クローンの拘束分子の差異が考えられたが、現段階では、解析対象数が不十分であり、特定のHLAとの相関は明確ではない。今後、対象者を増やして再検討することにより拘束分子とTh1/Th2バランスの関連が明らかにされるであろう。

また、Th1/Th2バランス形成に関与することが知られている分子群(T-bet, NFAT, c-Maf, GATA-3)やこれら転写因子と相互作用する分子の多型性なども視野に入れ、これまでにGATA-3と結合する分子を数種精製し、その同定と機能解析を行っている。

#### (5) 病因ペプチドの解析と人為的免疫制御法に関する研究

NODマウスにおける自己免疫性糖尿病の発症は、このマウスに特徴的なMHCクラス(I-A<sup>g7</sup>)によって提示された自己ペプチドを認識する自己反応性T細胞によって引き起こされる。本研究では、I-Ag7に結合するペプチドのアンカーモチーフを決定し、これらの情報をもとにアンカー部位を固定したペプチドライブラリーを用いて脾臓反応性T細胞クローンの認識するペプチドのモチーフ配列を同定を行い、さらに、これらの結果から得られたペプチドによる糖尿病発症制御を試みた。その結果、2種のT細胞クローンが非常に類似した配列のペプチドに

反応し、また、NODの脾細胞も類似の配列に強く反応することを明らかにした。2種類のT細胞クローンおよびNOD脾細胞が共通して反応するモチーフをもとに合成した単一配列からなるH2Piペプチドに対するマウス脾細胞の反応性を調べたところ、BALB/cやC57BL/6の脾細胞は反応しないが、若齢の雌NOD脾細胞では弱く、10週齢以上の雌NOD脾細胞は強く反応し、H2Piペプチドへの反応性と自己免疫が関連していた。また、生後4週目に、H2Piペプチドを皮下に免疫したNODマウスは、シンクロホスファミド誘発の糖尿病発症を抑制した。以上より、H2PiペプチドはI-A<sup>g7</sup>拘束的に提示され、膵島反応性T細胞が認識するペプチドエピトープの一つである可能性が示唆された。(大阪大学菊谷教授との共同研究)

### 3. 主な研究成果の発表(論文発表)

Fukui Y, Oono T, Cabaniols JP, Nakao K, Hirokawa K, Inayoshi A, Sanui T, Kanellopoulos J, Iwata E, Noda M, Katsuki M, Kourilsky P, Sasazuki T. : Diversity of T cell repertoire shaped by a single peptide ligand is critically affected by its amino acid residue at a T cell receptor-contact. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97 : 13760-13765, 2000

Kawamura K, Yamamura T, Yokoyama K, Chui DH, Fukui Y, Sasazuki T, Inoko H, David CD, Tabira T. : Induction of autoimmune encephalitis by proteolipid protein 95-116-specific T cells from HLA-DR2 (DRB1\*1502) transgenic mice. J. Clin. Invest., 105 : 977-984, 2000

Toh H, Kamikawaji N, Tana T, Muta S, Sasazuki T, Kuhara S. : Magnitude of structural changes of the T-cell receptor binding regions determine the strength of T-cell antagonism : molecular dynamics simulations of HLA-DR4 (DRB1\*0405) complexed with analogue peptide. Protein Engineering, 13 : 423-429, 2000

Toh H, Savoie CJ, Kamikawaji N, Muta S, Sasazuki T, Kuhara S. : Changes at the floor of the peptide-binding groove induce a strong preference for proline at position 3 of the bound peptide : molecular dynamics simulations of HLA-A\*0217. Biopolymers, 54 : 318-327, 2000

Hamaguchi K, Kimura A, Seki N, Higuchi T, Yasunaga S, Takahashi M, Sasazuki T, Kusuda Y, Okeda T, Itoh K, Sakata T. : Analysis of tumor necrosis factor- $\alpha$  promoter polymorphism in type 1 diabetes : HLA-Band - DRB1 alleles are primarily associated with the disease in Japanese. Tissue Antigens, 55 : 10-16, 2000