

国立国際医療センター研究所 所長

笹月 健彦

「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行った。

未熟胸腺細胞に“生”と“死”という相反する運命を課す分子機構は免疫学の最大の疑問であった。特に、正の選択における自己抗原ペプチドの関与に関しては多くの仮説が提唱されてきた。しかしながら、MHC には数千の自己抗原ペプチドが結合しているため、分子レベルでの解析は困難であった。この問題を克服するために、我々は、1種類の抗原ペプチドのみを結合した MHC を発現する遺伝子改変マウスを作製することで、1) 同じ MHC/自己抗原ペプチド複合体が胸腺での発現量に応じて正の選択のリガンドにも負の選択のリガンドにもなり得ること、及び2) 正の選択においても特異的な TCR-ペプチド相互作用が関与し得るが、その際3) TCR と直接相互作用を持つアミノ酸残基の側鎖の大きさや荷電の有無が、選択される T細胞レパトリーの多様性に影響することを明らかにすると共に、4) この複合体の胸腺での発現量が著しく低い場合負の選択が不完全なため、全身性の自己反応性が惹起され、その結果臓器特異的自己免疫疾患が起こることを示した。

一方、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う特徴は、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。それ故、TCR-MHC/ペプチド複合体相互作用を免疫系フレームワーク決定の‘ソフトウェア’とすれば、リンパ球遊走は、

免疫系構築のための‘ハードウェア’と位置づけることができる。これまでに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たが、リンパ球の運動性を制御する分子機構は不明であった。我々は細胞骨格を制御することが知られている CDM ファミリーに属し、且つリンパ球特異的に発現する分子として DOCK2 を同定し、ノックアウトマウスを作製することでこの分子がリンパ球遊走に不可欠であることを明らかにした。

前述したように、多くの自己免疫疾患やそのモデル動物において、その疾患感受性が MHC に連鎖した遺伝形質として規定されている。しかしながら、自己免疫疾患は多因子疾患であり、MHC 以外のさまざまな遺伝要因が疾患感受性を制御していると考えられる。自己免疫疾患感受性を規定する非 MHC 遺伝子を同定する目的で、甲状腺を標的とした自己免疫疾患である Graves 病と橋本病を対象に、罹患同胞対法による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、また橋本病の疾患感受性遺伝子領域を 8q23-q24 (LOD 値 3.7) に同定すること出来た。

このように免疫系のフレームワークを決定する分子機構の解明から、自己免疫疾患感受性を規定する非 MHC 遺伝子領域の同定に至る極めて多岐にわたる研究テーマで多くの新しい知見を得ることができた。またこれ以外にも 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 及びマルチバレント可溶性 TCR の開発など、未知抗原ペプチドの同定や抗原特異的免疫制御法の開発にむけその基礎となる研究成果を修めることが出来、今後のさらなる展開が期待できる。

## 2. 研究構想

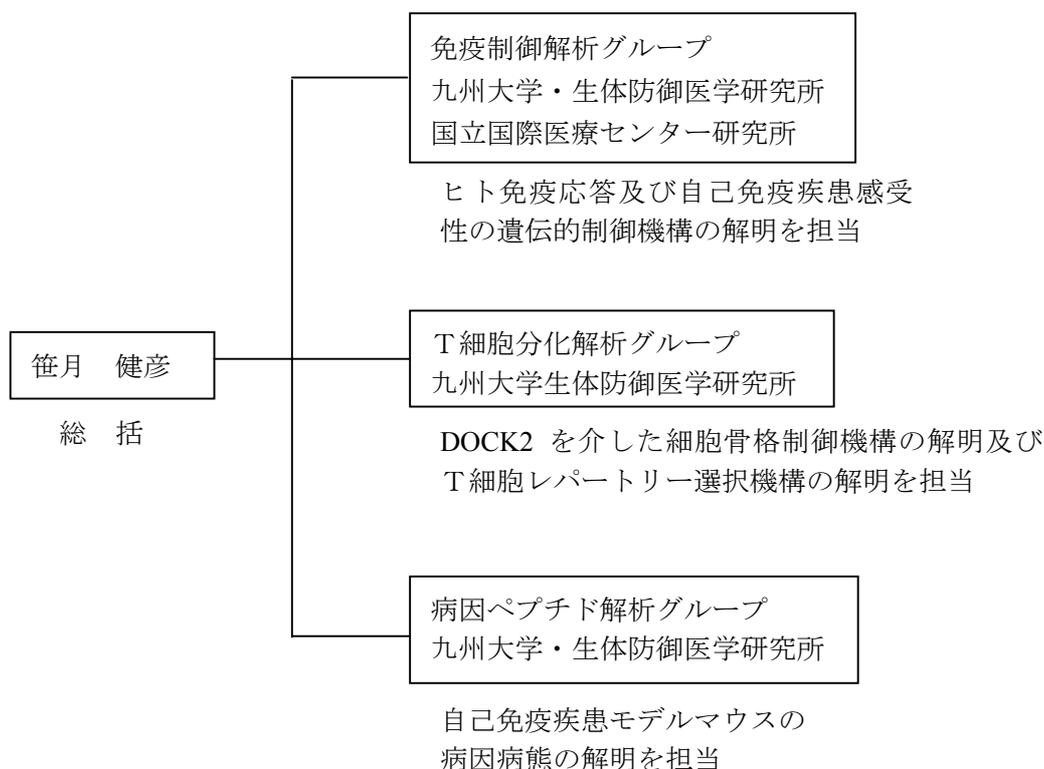
主要組織適合抗原 (MHC) は、自己あるいは外来由来の抗原ペプチドと結合して細胞表面に発現し、その複合体を T 細胞受容体 (TCR) が認識することで、胸腺及び末梢における T 細胞の多様な運命が決定される。この分子基盤を明らかにすべく、単一 MHC/ペプチド複合体を発現するトランスジェニックノックアウトマウスを用いて、TCR-MHC/ペプチド相互作用に関する多くの新しい知見を報告した。この TCR-MHC/ペプチド複合体相互作用は、免疫シナプスに代表されるように極めて‘動的’なものであり、細胞骨格の再構築により巧妙に制御されていることが近年注目されている。このような中でリンパ球の細胞骨格を制御する分子として DOCK2 を同定したことは幸いであった。今後、DOCK2 を介したシグナル伝達の解明は、リンパ球細胞高次機能の制御機構を明らかにする上でも急務であると考えられる。また、自己免疫性甲状腺感受性を規定する非 MHC 遺伝子領域を同定し、現在候補遺伝子の検索を進めているが、その成果は今後、病態の理解にも新しい診断法や治療法の開発にも極めて重要な意味を持つと考えられる。

本研究は、3つのサブグループによって進められた。免疫制御グループ (代表：笹月健

彦) では主にヒト免疫応答制御機構の解明と自己免疫甲状腺疾患の感受性遺伝子の同定を試み、T細胞分化解析グループ(代表:福井宣規)では単一 MHC/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を用いた研究全般と DOCK2 の単離及び機能解析を行った。また病因ペプチド解析グループ(代表:上川路信博/山本健)では MHC ペプチドライブラリーの構築やその応用について検討した。

### 3. 研究実施体制

#### (1) 体制



### 4. 研究期間中の主な活動

#### (1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
1998年 3月25、26日	MHC・Peptide・TCR Workshop '98	九州大学生体防 御医学研究所	20人	MHC 多重遺伝子族の進化から TCR・MHC・ペプチド相互作用における最新の知見を討議した。

## 5. 主な研究成果

(1) 論文発表 (国内 0 件、海外 14 件)

1. 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
2. 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  $\beta$  chain. **J. Exp. Med.**, 188:897-907, 1998
3. 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
4. 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
5. Tana T, Kamikawaji N, Savoie, C.J., Sudo, T., Kinoshita, Y., Sasazuki, T.: A HLA binding motif-aided peptide epitope library: A novel library design for the screening of HLA-DR4-restricted antigenic peptides recognized by CD4<sup>+</sup> T cells. **J. Human Genet.**, 43:14-21, 1998
6. Sano T, Yamamoto K, Fukui Y, Sasazuki T: Spontaneous clustering of Thy-1 antigens on CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> thymocytes lacking TCR engagement by MHC/peptide complexes. **Eur. J. Immunol** 29:403-412, 1999
7. Nishimura H, Washizu J, Naiki Y, Hara T, Fukui Y, Sasazuki T, Yoshikai Y: MHC class II-dependent NK1.1<sup>+</sup> $\gamma\delta$  T cells are induced in mice by Salmonella infection. **J. Immunol.**, 162:1573-1581, 1999
8. Savoie CJ, Kamikawaji N, Sasazuki T.: The peptide binding motif of HLA-A\*0217. **Immunogenetics**, 49:567-570, 1999
9. Kawamura K, Yamamura T, Yokoyama K, Chui DH, Fukui Y, Sasazuki T, Inoko H, David CD, Tabira T.: HLA-DR2-restricted responses to proteolipid protein 95-116 peptide cause autoimmune encephalitis in transgenic mice. **J. Clin. Invest.**, 105:977-984, 2000
10. 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
11. Wataya M, Sano T, Kamikawaji N, Tana T, Yamamoto K, Sasazuki T.: Comparative analysis of HLA restriction and cytokine production of hepatitis B surface antigen-specific T cells from low-and high-antibody responders in vaccinated humans. **J. Human Genet.**, 46:197-206, 2001
12. 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
13. 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

14. 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

(2) 特許出願（国内 3 件、海外 2 件）

①国内

1. 発明者：笹月健彦、白澤専二

発明名称：新規の増殖因子タンパク質および該タンパク質をコードする遺伝子

出願番号：特願平 11-335682

出願日：平成 11 年 11 月 26 日

2. 発明者：福井宣規、笹月健彦

発明名称：T 細胞受容体の可溶性多量体及びその用途

出願番号：特願 2000-026006

出願日：平成 12 年 2 月 3 日

3. 発明者：福井宣規、笹月健彦

発明名称：リンパ球遊走制御機能欠失モデル非ヒト動物

出願番号：特願 2002-000707

出願日：平成 14 年 1 月 7 日

②海外

1. 発明者：福井宣規、笹月健彦

発明名称：T 細胞受容体の可溶性多量体及びその用途

国際出願番号：PCT/JP00/08183

国際出願日：平成 12 年 11 月 21 日

2. 発明者：福井宣規、笹月健彦

発明名称：リンパ球遊走制御機能欠失モデル非ヒト動物

国際出願番号：PCT/JP02/08372

国際出願日：平成 14 年 8 月 20 日

予定指定国：米国、カナダ、オーストラリア

(3) 新聞報道等

①新聞報道

日経産業新聞、8 月 23 日 2001 年

日刊工業新聞、8 月 23 日 2001 年

日経新聞（夕刊）、8 月 23 日 2001 年

日本工業新聞、8月23日2001年

西日本新聞、8月23日2001年

②受賞

笹月健彦

平成11年度 日本医師会医学賞

平成13年度 武田医学賞

平成14年度 紫綬褒章

③その他

(5) その他特記事項

なし