

## クラス II 主要組織適合抗原複合体による抗原提示と自己免疫病発症に関する基礎的研究

- (1) マウス胸腺で提示される自己抗原と抗原特異的 CD25 陽性制御性 T リンパ球の分化の  
関係に関する研究
- (2) 活性化抗原提示細胞による提示抗原の修飾と修飾抗原特異的 T リンパ球の存在に関する  
研究

徳島大学 前川洋一

派遣期間 2002 年 6 月 1 日～2004 年 9 月 30 日

研究機関 Department of Pathology and Immunology, Washington University School of Medicine,  
St. Louis, MO 63110, USA

研究指導者 Prof. Emil R. Unanue

私は、上記派遣期間において Unanue 教授の指導のもと主に 2 つのテーマについて取り組んできた。いずれも、クラス II 主要組織適合抗原複合体による抗原提示に関連する研究であり、(1) は自己免疫病の発症を抑制する機構について、また (2) では自己免疫病の新たな発症機構の可能性についてのものである。

### (1) マウス胸腺で提示される自己抗原と抗原特異的 CD25 陽性制御性 T リンパ球の分化の関係に関する研究

免疫系は体外からの微生物等の侵入や体内でのがん細胞の出現に対してこれらを排除する様に働いている。この際免疫系は自己と非自己を識別し非自己成分にだけ反応する。自己に対する免疫系の反応は自己免疫病を惹起するが、このような自己反応性はいくつかの機構により抑制されている。そのような機構の一つに制御性 T リンパ球があげられる。近年、CD4 陽性 T リンパ球集団の中に存在する CD25 分子を持つ T リンパ球 (CD4+CD25+T リンパ球) が、自己に対する免疫応答を抑制し自己免疫病の発症を回避していることが報告されてきた。この細胞群は CD25 陽性制御性 T リンパ球 (Treg) と呼ばれ通常の T リンパ球と同じように胸腺で分化成熟すると考えられているが、その分化様式はまだ完全には明らかになっていない。自己反応性 T リンパ球の大半は胸腺に存在する自己成分 (自己抗原) に反応して細胞死が誘導され体内から除去されてしまうが、Treg は自己抗原によって分化が誘導されるのではないかと考えられている。今回の派遣研究に際して、私は胸腺における自己抗原の発現量とその自己抗原に特異的な Treg の分化について検討を行った。

脾臓に鶏卵由来リゾチーム蛋白 (HEL) を発現する様遺伝子工学的に作製されたマウス (ILK3) では、HEL を免疫しその後免疫を施した部位の所属リンパ節細胞を取り出し試験管内において再度 HEL にて刺激を行ったところ、野生型マウスで認められる HEL 抗原濃度依存的 CD4 陽性 T リンパ球の増殖反応が観察されなかった。また、このようなマウスでは自己免疫性脾臓破壊による糖尿病も認められなかった。一方、HEL 蛋白を膜型に改変して抗原提示細胞に発現させる

ように作製したマウス (mHEL) でも、同様の実験において ILK3 マウスと同じく HEL による再刺激に対して CD4 陽性 T リンパ球の増殖反応が観察されなかった。ILK3 マウスや mHEL マウスのように遺伝子改変技術により外来蛋白を自己抗原として発現するマウスではその抗原に対して免疫寛容が誘導されているが、それぞれのマウスでは免疫寛容の機構に違いあるか否かについて検討を行った。ILK3 マウスおよび mHEL マウスの胸腺での負の選択 (ネガティブセレクション) による自己抗原特異的な T リンパ球の除去を観察する目的で、HEL 抗原ペプチド特異的な T 細胞抗原受容体 (TCR) をもつ 3A9 マウスと ILK3 および mHEL マウスを交配し胸腺での 3A9T リンパ球の発生を観察した。3A9 x mHEL マウスでは、3A9TCR 陽性細胞は胸腺でほとんど観察されなかった。それに対して 3A9 x ILK3 マウスでは、3A9TCR 陽性細胞の減少が観察されたが 3A9 x mHEL マウスのように完全ではなかった。このことから mHEL マウスでは胸腺でのネガティブセレクションにより HEL 特異的な T リンパ球は生体内から完全に除去されていると考えられるのに対し、ILK3 マウスでは HEL 特異的な T リンパ球のネガティブセレクションは完全ではなく、一部の HEL 特異的な T リンパ球は成熟し抹消のリンパ組織へと移動していくと考えられた。mHEL マウスと ILK3 マウスの胸腺における HEL 特異的な T リンパ球に対するネガティブセレクションの違いは胸腺で提示されている HEL ペプチドの量の違いで説明することができる。つまり、mHEL マウスでは HEL 特異的な T リンパ球に対してネガティブセレクションを誘導するのに十分な抗原ペプチドが提示されていたのに対して、ILK3 マウスでは HEL の発現は脾臓のみであり非常に微量の HEL が血流経路で胸腺に到達するが胸腺での HEL ペプチドの提示量が充分ではないために完全にはネガティブセレクションを誘導できなかったと考えられる。従って ILK3 マウスで認められた HEL に対する免疫応答の低下は胸腺でのネガティブセレクションによる免疫寛容とは別の機構によるものであると考えられた。そこで、HEL 免疫を行ったマウスの免疫所属リンパ節細胞から CD25 陽性細胞を除去した後 HEL にて再刺激を行ったところ、ILK3 マウスでは T リンパ球の増殖反応が認められるようになった。しかし、mHEL マウスの場合には CD25 陽性細胞の除去を行っても T リンパ球の増殖は回復しなかった。また、HEL 免疫 ILK3 マウスでは HEL 特異的な抗体産生も認められた。この結果から、ILK3 マウスでは HEL 特異的な T リンパ球が生体内に存在し免疫によりそのような T リンパ球は感作・活性化を受け、さらに B リンパ球に対して抗体産生を促す様に分化していることが示唆された。しかし、免疫による HEL 特異的な T リンパ球の活性化にも関わらず ILK3 マウスは自己免疫性糖尿病を発症することはないことから、生体内では活性化した自己反応性 T リンパ球が存在するにもかかわらず病気の発症は抑制される機構が存在することが示唆された。さらに HEL 免疫 ILK3 マウスの CD25 陽性細胞中には野生型マウスと比較して HEL 特異的な Treg 活性が認められた。また、このような自己抗原に特異的な Treg の分化は胸腺での自己抗原の提示量に依存することも示唆された。今回の研究で、生体は胸腺での自己抗原の提示量によって、様々なレベルで自己免疫病の発症を

回避していることが明らかとなった。

## （２）活性化抗原提示細胞による提示抗原の修飾と修飾抗原特異的 T リンパ球の存在に関する研究

感染症や外来からの異物の侵入ではまず自然免疫系が発動され異物の除去にあたる。この際、強力な貪食作用を持つマクロファージが微生物由来の成分で活性化され、IL-1 $\beta$ や TNF- $\alpha$ などのサイトカインを産生する。また一酸化窒素（NO）や活性酸素などのフリーラジカルも産生される。ここで、NO はタンパク質を構成するチロシンやトリプトファンなどのアミノ酸を修飾し、ニトロ化チロシン（nTyr）やニトロ化トリプトファン（nTrp）へと変換することが知られていた。Unanue 研究室では以前より感染症などの炎症時にマクロファージなどから産生される NO による抗原修飾と、このような修飾抗原に対する免疫応答について研究を行ってきた。私が Unanue 研究室へ参加当時、NO により修飾された nTyr を特異的に認識する T リンパ球ハイブリドーマが作製されており、T リンパ球（免疫系）は修飾されたペプチドと本来のペプチドとを識別し得ることが明らかになりつつあった。そこで私はこのような修飾ペプチド特異的な T リンパ球ハイブリドーマの種類を増やすとともに、生体内でこのようなペプチドの修飾が免疫系にどのように影響するかについて検討を行った。

HEL 抗原蛋白の中には主に 4 つの異なるポリペプチド部位が T リンパ球を活性化することが知られている。このなかで NO により修飾される可能性があるペプチドとして HEL48-63 と HEL20-35 がある。私は HEL20-35 ペプチドの NO による修飾特異的 T リンパ球ハイブリドーマを作製し解析を行った。このペプチドに対しても修飾特異的な T リンパ球ハイブリドーマが単離され、このハイブリドーマは修飾された nTrp を認識することが明らかとなった。しかし、NO によるトリプトファンの修飾は単一型ではないため、どのような修飾に特異的なかを精査することはできなかった。

次に、生体内において免疫系は修飾抗原と本来の抗原とを識別しているかどうかを検討した。

（１）でも述べた mHEL マウスは膜型 HEL 抗原を抗原提示細胞に発現し胸腺において HEL 特異的 T リンパ球を完全に除去してしまうマウスであるが、このマウスにおいて NO により修飾された HEL に対する T リンパ球が存在するかどうかを検査した。その結果、野生型と比較して頻度は少ないながら mHEL マウスには NO 修飾 HEL 特異的な T リンパ球が存在していた。このことから免疫系は NO により修飾された抗原は本来の抗原とは別の抗原であると識別していることが明らかとなった。このことは、感染症などの炎症の際、NO により自己抗原が修飾されこの修飾抗原特異的な T リンパ球が感作され免疫記憶細胞として生体内に存続した場合、後に別の病原体による感染症が起った時にも、このような NO 修飾特異的な T リンパ球は炎症特異的な T リンパ球として微生物特異的な T リンパ球よりも早期に活動を開始し感染症を最小限にとどめている可能性があることを意味している。しかしこれとは逆に、本来自己の抗原として免疫

寛容状態であったものが感染症などの炎症によって産生誘導された NO により修飾されて新たな抗原性を発揮し免疫系を活性化して自己免疫病を誘導してしまう可能性も示唆された。