

論文内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 10 年度博士課程進学
氏名 浅井 和美
指導教官名 上野川 修一

論文題目

経口免疫寛容における T 細胞内情報伝達機構の解明

免疫系とは、我々の生体に侵入し害を与える外来抗原を排除する生体防御機構で、あらゆる物質に対応可能だが、自己抗原および生体にとってエネルギー源となる経口摂取された食物抗原を排除するような免疫応答は誘導されない。この現象は自己免疫寛容および経口免疫寛容と呼ばれている。これら免疫寛容の誘導には CD4 T 細胞が重要な役割を演じていることが知られており、特に、経口免疫寛容状態での末梢 CD4 T 細胞には、抗原特異的な低応答（不応答）性が誘導されることが知られているが、その分子メカニズムについては不明な点が多い。近年、この経口免疫寛容が、自己免疫疾患やアレルギーの治療などに応用され、成果を挙げている事実をみても、経口免疫寛容の分子機構を解明することは非常に重要である。

この機構を解析するために、通常のマウスを用いた場合は、単一抗原を認識するリンパ球の頻度が低いために、抗原特異的な T 細胞応答を分子レベルで観察することは困難である。そこで我々は、抗原特異的 T 細胞の頻度が高い、卵白アルブミン（OVA）に特異的な T 細胞抗原レセプター（TCR）を発現するトランスジェニックマウス（OVA23-3 Tg マウス）を用い、抗原の経口摂取により誘導される T 細胞の特性について、細胞分子生物学的立場から細胞内シグナル伝達系に着目して解析を行った。

1・経口免疫寛容の誘導と低応答性 T 細胞の特性

OVA23-3 TCR-Tg マウスに OVA を 8%含む卵白食を 28 日間自由摂取させ、その脾臓細胞から MACS 法により CD4 T細胞を単離してその解析を行った。はじめに、その細胞の大きさをフローサイトメトリーを用いて観察した結果、コントロール群より卵白食群の CD4 T細胞の方がやや肥大していた。さらに、T細胞表面分子の発現も調べた結果、抗原の経口摂取により誘導される CD4 T細胞では、未感作型マーカー分子 CD62L、CD45RB の発現量が低下していることから *in vivo* において抗原感作され、活性化型マーカー分子 CD69、CD25、CD44 の発現量が高いことから *in vivo* において活性化されていることが示された。そこで、特異的抗原である OVA ペプチドに対する *in vitro* での細胞応答を検討した。コントロール群に対し卵白食群で、その特異的抗原である OVA の刺激に対して、 $[^3\text{H}]$ -チミジンの取り込み、IL-2 サイトカイン産生量の低下及び活性化 T細胞表面マーカー CD40L 分子の発現能の低下が見られ、CD4 T細胞が低応答化し、経口免疫寛容が誘導されていることが確認された。

TCR からの T細胞シグナル伝達経路には、大きく分けて Ca/CN 系と Ras/MAPK 系があることが知られているが、経口免疫寛容状態にある脾臓 CD4 T細胞におけるシグナル伝達についての知見は乏しい。そこで、それぞれの経路を活性化する薬剤、イオノマイシンと PMA を用いて細胞内シグナル伝達経路の検討を試みた。結果、細胞増殖応答、IL-2 サイトカイン産生量、CD40L 分子の発現能の全ての応答において、経口免疫寛容状態における CD4 T細胞の方がこれらの薬剤刺激に対して強く応答していることが明らかになった。故に、先の OVA ペプチドを用いた TCR 刺激と細胞内シグナル伝達経路を直接刺激する薬剤刺激ではその細胞応答が異なることから、この経口免疫寛容状態の CD4 T細胞では、TCR からの刺激を下流に伝えることができなくなっている可能性、つまり TCR 近傍に障害があることが示唆された。

2・経口免疫寛容状態の低応答性 T 細胞の TCR シグナル伝達系

T細胞は、抗原提示細胞 (APC) によって提示された抗原を TCR が認識することによって活性化される。TCR が CD4/CD8 とともに抗原-MHC 複合体を認識すると、チロシンキナーゼにより TCR- ζ chain がリン酸化される。そこに ZAP-70 が結合しリン酸化されてキナーゼ活性を持ち、LAT などの分子をリン酸化して、MAPK の活性化 (Ras/MAPK 系) や細胞内 Ca 濃度の上昇 (Ca/CN

系) を介してシグナルが伝わり、T 細胞は活性化される。そこで、経口免疫寛容状態における CD4 T 細胞の分子メカニズムを明らかにするために、主にウエスタンブロット法を用いて、細胞内シグナル伝達分子の解析を行った。

はじめに、抗 TCR 抗体と抗 CD4 抗体で TCR を刺激して誘導される細胞内カルシウム濃度上昇を検討した。結果は、経口免疫寛容状態における低応答性 CD4 T 細胞では、細胞内カルシウム濃度上昇が減少しており、さらに、TCR 刺激によって誘導されて細胞内カルシウム濃度の上昇に続いて起こる転写因子である NF-AT 分子の核への移行も起こっていないことが示された。そこで、TCR からの刺激を Ca/CN 系に伝える T 細胞シグナル伝達物質である PLC γ -1 の活性化を、リン酸化を指標にして解析した結果、タンパク質量には変化が見られなかったが、低応答性 CD4 T 細胞においてリン酸化が著しく低下していることが明らかになり、以上の解析から、Ca/CN 系に障害があることが確認された。

そこで、さらに上流の TCR 近傍のシグナル伝達分子の解析を行った。PLC γ -1 の上流の LAT、ZAP-70、TCR- ζ の活性化を、リン酸化を指標に解析した結果、それぞれタンパク質量には変化が見られなかったが、低応答性 CD4 T 細胞において各分子のリン酸化が減弱していた。また、低応答性 CD4 T 細胞での TCR- ζ に会合する分子を調べたところ、ZAP-70、LAT の会合が確認されたが、そのリン酸化は低下していた。これらの結果から、TCR 近傍、特に TCR- ζ の活性化低下によって、その下流のシグナル伝達経路に障害が起きていることが示され、先の推測が裏付けられた。また、TCR- ζ の活性低下が Ca/CN 系には障害をもたらすが、Ras/MAPK 系には影響を及ぼさない可能性が示唆された。

不応答 (低応答) 性を示す T 細胞は一般的にアナジーと称され、T 細胞クローンを用いた *in vitro* の実験系で、副刺激 (CD28 分子) を欠落した抗原刺激によって誘導され、IL-2 サイトカイン産生が低下し、細胞増殖が起こらない状態を示すことが知られている。このようなクラシカルなアナジー T 細胞内シグナル伝達では Ras/MAPK 系に障害があるという報告が多くされている。先に述べたように、本研究で得られる経口免疫寛容状態の低応答性 CD4 T 細胞は、このアナジーに非常に似た現象を示す。そこで、Ras/MAPK 系の解析を行ったところ、ERK/MAPK と SAPK/MAPK とともに TCR 刺激によって誘導されるその活性化は変わらない、もしくは活性化が維持されており、経口免疫寛容状態の低応答性 CD4 T 細胞は、クラシカルなアナジーとは異なる機構によって低応答化していることが示唆された。

3・経口免疫寛容状態の低応答性 T 細胞の IL-2 シグナル伝達系

クラシカルなアナジー T 細胞は、IL-2 の付加によりその不応答性が回復することも知られている。そこで、経口免疫寛容状態における低応答性 T 細胞の IL-2 に対する応答性を調べた結果、IL-2 の付加によりこの低応答性は回復せず、通常のアナジーとは異なることが示された。

IL-2 は、細胞表面の受容体とそれに結合する JAK 型チロシンキナーゼにより STAT5 などの転写因子を活性化し (JAK-STAT 系)、細胞応答に作用する。近年、STAT5 の下流に存在し、STAT5 の負のフィードバック調節因子である CIS1 の存在が知られるようになってきた。そこで、経口免疫寛容状態における低応答性 CD4 T 細胞の IL-2 サイトカインシグナル経路の解析を行った。その結果、STAT5 のリン酸化は低応答性 CD4 T 細胞でやや高く、活性化されていることが示された。これは、先に示したように、低応答性 CD4 T 細胞では CD25 (IL-2 受容体) 分子の発現能が高くなっているためと考えられた。また、CIS1 の発現量もコントロールと差が無く、IL-2 の下流にある JAK-STAT 系には障害が認められなかった。

しかし、IL-2 の付加によって細胞増殖せず、低応答性が回復しないことから、IL-2 によって誘導される別のシグナル経路の影響が考えられた。そこで、細胞増殖応答の抑制因子である p27^{Kip1} 分子の関与を検討した。p27^{Kip1} は、IL-2 刺激によってその発現が低下し、その結果、細胞増殖応答が起こると考えられている。ウエスタンブロット解析の結果、コントロールでは刺激後 p27^{Kip1} の発現が低下したのに対し、低応答性 CD4 T 細胞では刺激後も p27^{Kip1} の発現低下が見られず、このために IL-2 刺激によって低応答性が回復しないことが明らかになった。

以上、抗原の経口摂取によって誘導される経口免疫寛容状態の低応答性 CD4 T 細胞における細胞内情報伝達系の解析を行った結果、TCR シグナル伝達系では TCR- ζ の活性低下によって引き起こされる Ca/CN 系の障害が起きており、IL-2 シグナル伝達系では p27^{Kip1} の蓄積による細胞増殖応答の抑制が起きていることが明らかになった。また、この経口免疫寛容状態の低応答性 CD4 T 細胞には、MAPK 系に障害が無く、また IL-2 の添加によってその低応答性が回復しないことから、これまでに報告のあるクラシカルなアナジー T 細胞とは異なる機構によって、制御されていることが明らかになった。