

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 植田祥啓

指導教官名 上野川修一

論文題目

経口免疫寛容におけるアポトーシスの役割

腸管は常に微生物や食物抗原に曝されているため、過剰な免疫応答を誘導してアレルギーや自己免疫疾患を引き起こしかねない。したがって腸管免疫系は生体を調節する上で非常に重要な役割を担っていると考えられる。腸管免疫系は分泌型免疫グロブリンクラス A (IgA) を産生し、抗原の侵入をブロックする。また生体に侵入した抗原に対しては経口免疫寛容を誘導して強い免疫応答から生体を防御していると考えられている。経口免疫寛容は自己抗原やアレルゲンに対しても免疫寛容を誘導できることから臨床的に応用されることが期待されているため、詳細な機構の解析が待たれている。経口免疫寛容の誘導時に免疫抑制性の調節 T 細胞の誘導や T 細胞の不応答化、T 細胞のアポトーシスといった現象が起こることが報告されている。しかし、このような寛容のメカニズムを誘導する抗原提示のしくみや部位はわかっていない。本研究は抗原の経口投与によってアポトーシスが起こることに注目して経口免疫寛容の誘導部位について検討した。さらにアポトーシス異常マウスにおける経口免疫寛容の誘導を評価することをあわせて経口免疫寛容における免疫細胞のアポトーシスの役割を検討することを目的とした。

第 1 章 経口抗原によって誘導される CD4⁺ T 細胞のアポトーシスの起こる部位

経口抗原によってどの部位で CD4⁺ T 細胞のアポトーシスが起るのかを検討するためにオボアルブミン(OVA)特異的 T 細胞レセプター(TCR)遺伝子導入マウス(OVA23-3)に卵白食(OVAを9%含む)を摂取させ免疫器官を摘出し、CD4⁺ T細胞数の変化とCD4⁺ T細胞のアポトーシスを解析した。(TCRトランスジェニックマウスのT細胞は大部分が導入されたTCRを発現するT細胞のため、抗原特異的な応答を解析するのに有用である。)その結果、胸腺を含め腸管免疫系以外の免疫器官でCD4⁺ T細胞のアポトーシスと細胞数の低下が観察された。一方腸管免疫系であるパイエル板はアポトーシスが観察されたものの、細胞数が低下しなかった。また腸間膜リンパ節では顕著なアポトーシスが誘導されず、細胞数の増加が観察された。したがって経口抗原に対して腸管免疫系よりもそれ以外の部位でCD4⁺ T細胞のアポトーシスと細胞数の低下が誘導されることが示された。そこで、卵白食摂取により腸管免疫系と全身免疫系でCD4⁺ T細胞の応答低下が誘導されているかどうかを調べた。卵白食を摂取させたOVA特異的TCRトランスジェニックマウス(卵白食群;寛容群)のCD4⁺ T細胞を腸間膜リンパ節(腸管免疫系)と脾臓(全身免疫系)から回収し、*in vitro*の抗原刺激に対する増殖応答・サイトカイン応答を比較した。卵白食マウス由来の腸間膜リンパ節CD4⁺ T細胞はカゼイン食群(対照群)に比べて増殖応答が低下しなかった(すなわち寛容が誘導されなかった)のに対して脾臓のCD4⁺ T細胞はカゼイン食群に比べて卵白食群の増殖応答が低下した(寛容が誘導された)。また、IL-2応答は低下したものの高抗原量で刺激した場合、IL-5産生が亢進した。以上の結果より腸間膜リンパ節に比べ、脾臓の方がCD4⁺ T細胞の寛容がより強く誘導されていることがわかった。

第2章 腸管免疫系および全身免疫系由来の抗原提示細胞によって誘導されるT細胞応答の相違

免疫器官や組織によって誘導される免疫応答が異なることが知られている。このような免疫応答の違いは免疫器官や組織に存在する抗原提示細胞の違いや環境によると考えられている。第1章の結果から抗原の経口投与によって腸管膜リンパ節ではIL-5産生等を介したIgA産生応答などの腸管独特の免疫応答が、脾臓ではT細胞のアポトーシスを始めとして免疫寛容が部位特異的に誘導される可能性が考えられた。このような応答の変化が臓器による抗原提示の環境によるものであるかどうかを確かめるためにカゼイン食群(対照群)あるいは卵白食群(寛容群)の腸間膜リンパ節・脾臓細胞(T細胞を除く)を抗原提示細胞として未感作CD4⁺ T細胞を抗原とともに培養して誘導したT細胞の応答を解析した。

カゼイン食群・卵白食群であるかに拘わらず腸間膜リンパ節抗原提示細胞で誘導した T 細胞は強い増殖応答とサイトカイン応答、特に IL-5 応答が誘導された。一方でカゼイン食群の脾臓抗原提示細胞で誘導した T 細胞は増殖応答が誘導されたが、腸間膜リンパ節抗原提示細胞とで誘導した T 細胞に比べて低いサイトカイン応答を示した。さらに卵白食群由来の脾臓抗原提示細胞で誘導した T 細胞は顕著に増殖とサイトカイン応答が抑制された。したがって、卵白食群由来の脾臓を抗原提示細胞として培養することによって T 細胞に増殖・サイトカイン応答の低下を誘導できることが明らかとなった。このことから抗原の経口投与により脾臓の抗原提示細胞によって経口免疫寛容が誘導されることが示された。また、腸管膜リンパ節の抗原提示細胞は経口抗原の影響を受けずに脾臓よりも強い免疫応答、特に IgA 産生応答を誘導する IL-5 応答を誘導することが示された。

第 3 章 アポトーシス遺伝子変異マウスと経口免疫寛容の誘導

第 1 章より OVA 特異的 TCR トランスジェニックマウスに抗原を摂取させることによって全身にアポトーシスを誘導したことから、経口免疫寛容において重要な役割を果たしていると考えられた。そこで経口免疫寛容の誘導におけるアポトーシスの役割を明らかにするために、2 種類のアポトーシス遺伝子に異常のあるマウスを用いて経口免疫寛容の誘導に与える影響を観察した。まず活性化 T 細胞または B 細胞にアポトーシスを誘導する Fas 遺伝子に変異のある *lpr* マウスにおいて経口免疫寛容の誘導を検討した。*lpr* マウス・同系正常マウスである C57B6/J マウスにそれぞれカゼイン食(対照群)・卵白食(寛容群)を摂取させ、OVA で腹腔免疫し、血清中の特異的抗体価を測定した。また、*lpr* マウス、C57B6/J マウスにカゼイン食・卵白食を摂取後、OVA を皮下免疫してリンパ節を摘出し、*in vitro* におけるリンパ節細胞の増殖応答の低下を比較した。その結果、*lpr* マウスにおいては抗体応答・リンパ節増殖応答ともに同系正常マウスと同様に対照群と比べ寛容群で経口免疫寛容による応答の低下が観察された。また、OVA 特異的 TCR トランスジェニックマウスの脾臓 T 細胞を抗原刺激し FasL mRNA の発現量をライトサイクラーにより検討したところカゼイン食群、卵白食摂取群と同様に FasL mRNA が発現された。したがって、Fas 遺伝子は経口免疫寛容の誘導に必須ではないことが証明された。次にストレスに対して細胞にアポトーシスと細胞周期の停止を誘導するガン抑制遺伝子である p53 遺伝子欠損(p53KO)マウスにおける経口免疫寛容の誘導を検討した。その結果、このマウスにおいてリンパ節増殖応答の低下は同系正常マウスと同様に誘導されたものの、抗体産生応答の低下が部分的に解除されることが観察された。このことから p53 が経口免疫寛容において T 細胞ではなく B 細胞の寛容の誘導に関係することが考えられた。それを確認す

るため、p53KO マウスと OVA 特異的 TCRトランスジェニックマウスを交配し p53KO-OVA 特異的 T 細胞トランスジェニックマウスを作成し、このマウスに 9%OVA 食を自由摂取させて CD4⁺ T 細胞のアポトーシスを観察した。その結果、p53KO-OVA 特異的 T 細胞トランスジェニックマウスにおいても正常に CD4⁺ T 細胞のアポトーシスが誘導されることがわかった。さらに、p53KO マウスにカゼイン食・卵白食を摂取させ、TNP 結合 OVA で腹腔免疫し、血清中の OVA 特異的抗体価と TNP 特異的抗体価を測定・比較した。その結果、先にも述べたとおり、経口免疫寛容による OVA 特異的抗体価の応答低下に部分的な解除が観察されたが、TNP 特異的抗体価は同系正常マウスと同様に応答の低下が誘導された。TNP 特異的抗体価は OVA 特異的 T 細胞の状態を反映するため、p53KO マウスにおいては正常に T 細胞の免疫寛容が誘導されていることが示された。すなわち、p53KO マウスにおける経口免疫寛容による抗体応答の低下の部分的解除は B 細胞の異常に起因することが示唆された。

まとめ 経口免疫寛容とアポトーシス

TCR トランスジェニックマウスに抗原を摂取させることによって全身に T 細胞のアポトーシスを誘導した。特に胸腺でネガティブセレクションが誘導されたということは、食物特異的な T 細胞を消去するだけでなく、食物タンパク質が末梢の免疫系のレパトアを調節している可能性を示唆していると考えられる。また経口抗原によって全身系の末梢の T 細胞にアポトーシスが誘導されることは経口抗原に対しては免疫応答が炎症反応に至る前に T 細胞を消去してしまう働きがあると予想される。今回アポトーシス異常マウスで T 細胞の寛容に影響がなかったのは、Fas や p53 以外の経路のアポトーシスが働いたためか、アポトーシスが T 細胞の寛容の維持には大きく影響しないと考えられる。抗原提示細胞で誘導された T 細胞の応答低下が *in vitro* においてアポトーシスを介さなかったこともそのことを示唆していると考えられる。また、p53 遺伝子が経口免疫寛容における B 細胞の調節機構に関係している結果が得られたことは本研究が初めてである。したがって、アポトーシスの異常はむしろ B 細胞寛容に強く影響するのかもしれない。さらに本研究によって経口抗原によって全身免疫系と腸管免疫系とは異なる免疫応答が誘導されることが示された。すなわち、全身免疫系では経口免疫寛容が誘導され、腸管免疫系はむしろ経口抗原によって T 細胞応答が活性化され IgA 産生応答を促進されるように調節されていると考えられる。本研究は経口免疫寛容における全身免疫系と腸管免疫系の制御に重要な知見を与えるものと考えられる。