

## 論文内容の要旨

応用生命化学専攻  
平成 12 年度博士課程進学  
氏 名 加地 友弘  
指導教官名 上野川 修一

## 論文題目

### 免疫寛容状態にある CD4 陽性 T 細胞のプロテオーム解析

我々の生体は常に外来の抗原に曝されているが、免疫系の防御機構により恒常性が保たれている。しかしながら、自己抗原や食物抗原などの生体に必須な物質に対して、免疫系の防御反応は起こらず不応答化が誘導され、このような現象は免疫寛容として知られる。特に経口的に摂取した抗原に対する不応答状態を経口免疫寛容と呼び、自己免疫疾患やアレルギーなどの免疫系の破綻による病気の治療に応用が模索されているが、現状では詳しい誘導機構などはわかっていない。また、免疫寛容状態では末梢の CD4 陽性 T 細胞が抗原特異的に不応答化しているが、どのような機構で不応答状態が誘導・維持されているのか未だ不明な点が多い。すなわち、免疫寛容状態の CD4 陽性 T 細胞の特性を明らかにすることは、免疫疾患の抑制といった応用的な観点からも非常に重要である。

我々の研究室において、卵白オバルブミン(OVA)特異的な T 細胞レセプター(TCR)を発現するトランスジェニックマウス(OVA23-3 マウス)に長期的に卵白配合食を摂取させることで、全身性免疫系における CD4 陽性 T 細胞が寛容状態になることが明らかとなっている。本研究ではこのようにして誘導された免疫寛容状態の CD4 陽性 T 細胞の細胞特性を、2 次元電気泳動を用いてタンパク質レベルで明らかにしようとした。

#### 第 1 章 抗原未感作マウス CD4 陽性 T 細胞のプロテオームマップの作製

プロテオームとは、細胞や組織に発現しているタンパク質の全体を指し、そ

の解析は主に 2 次元電気泳動を用いて行われる。さらにおのおののスポットの同定には、タンパク質の特異的分解法と質量分析計を利用したペプチドマスフィンガープリント法が主に用いられる。プロテオーム解析はポストゲノム時代の新たな分野として期待されているが、その解析には正確なプロテオームマップのデータベースが必要となってくる。しかしながら、プロテオームマップは特定の細胞種にのみ作製されているのが現状で、マウスの CD4 陽性 T 細胞に対しては全く作製されていない。そこで本章では、抗原未感作な OVA23-3 マウスの脾臓 CD4 陽性 T 細胞が抗原に感作した際に起こる細胞内タンパク質の変化を解析するのを目的とし、抗原未感作な CD4 陽性 T 細胞に対するプロテオームマップを作製した。

まず、MACS 法により 98%以上の純度に精製した脾臓 CD4 陽性 T 細胞を溶解した。この際細胞の状態による個々のタンパク質の発現量を比較しやすいようにするため、細胞全体を直接超音波破碎し、それを試料とした。また、プロテオームマップの再現性を高めるために、1 次元目は市販されている固定化 pH 勾配ゲルを用いて等電点電気泳動を行い、2 次元目は SDS-PAGE を用いて分子量により分離した。等電点電気泳動は pH4.0-7.0 のワイドレンジの固定化 pH 勾配ゲル、pH4.0-5.0、pH4.5-5.5、pH5.0-6.0、pH5.5-6.7 のナローレンジの固定化 pH 勾配ゲルを用いて銀染色で検出したところ、1300 以上のスポットを確認した。それぞれのスポットを切り出し、トリプシン消化により生じたタンパク質特異的なペプチドの分子量を、マトリックス支援レーザー脱離イオン化/飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF MS)を用いて測定した。各タンパク質から生成されるペプチドは特異的なものであることから、測定された分子量を配列が公開されているタンパク質データベース上で検索することでタンパク質を同定した。現在までに 300 以上のスポットを同定し、WEB 上にて公開中である。また、これらのマップが他の TCR トランスジェニックマウスでも利用できるかどうか、別の OVA 特異的 TCR トランスジェニックマウスである DO11.10 TCR トランスジェニックマウスから脾臓 CD4 陽性 T 細胞を調製し、2 次元電気泳動を行ったところ、ほぼ同じ分離パターンが得られ、作製した抗原未感作 CD4 陽性 T 細胞のプロテオームマップの汎用性が示された。

## 第 2 章 免疫寛容状態の CD4 陽性 T 細胞のプロテオーム解析

OVA23-3 マウスに抗原として卵白を 20%含む飼料(卵白食)を 4 週間自由摂取させ、脾臓の CD4 陽性 T 細胞の寛容を誘導した。この寛容状態の CD4 陽性 T 細胞は *in vitro* における抗原提示細胞存在下 OVA 刺激に対して、増殖能・インターロイキン(IL)-2・IL-4・IL-10・インターフェロン- $\gamma$ サイトカイン産生能が、コントロール食を摂取させたマウス由来の抗原未感作な CD4 陽性 T 細胞に比べ、著しく低下していた。

そこで、経口免疫寛容状態の CD4 陽性 T 細胞の特性を明らかにするため、経口免疫寛容状態と抗原未感作な脾臓 CD4 陽性 T 細胞を、2 次元電気泳動を用いて発現タンパク質の比較を行い検討した。その結果、コントロール食摂取群由来の CD4 陽性 T 細胞と比較して、卵白食摂取群由来の CD4 陽性 T 細胞では、有意に発現が上昇しているスポットを 26 個、減少しているスポットを 16 個見出した。そのうち、第 1 章で作製したプロテオームマップなどを利用して、35 スポットをペプチドマスフィンガープリント法により同定した。これら同定したタンパク質の中では、Caspase-3 が大きく免疫寛容状態で誘導されており、そのターゲットとなるアクチン・STE20-like kinase MST1 などのタンパク質の減少も確認された。

次に CD4 陽性 T 細胞を、細胞表面抗原の CD62L と CD44 で分類したところ、抗原未感作な状態ではナイーブ型(抗原未感作型, CD62L<sup>high</sup>CD44<sup>low</sup>)が 90%近く存在するが、卵白食摂取後では 36%近くまで減少し、逆にメモリー型(CD62L<sup>low</sup>CD44<sup>high</sup>)が 60%以上に上昇していた。セルソーターを用いて、コントロール食摂取群由来の CD62L<sup>high</sup>CD44<sup>low</sup> CD4 陽性 T 細胞、卵白食摂取群由来の CD62L<sup>high</sup>CD44<sup>low</sup> および CD62L<sup>low</sup>CD44<sup>high</sup> CD4 陽性 T 細胞を分離して、増殖応答能・サイトカイン産生能を検討したところ、卵白食摂取群由来のナイーブ型・メモリー型いずれの細胞群も抗原刺激に対して低応答性であった。さらに、mRNA を抽出し、発現差のあったタンパク質について、それぞれ定量 RT-PCR を行ったところ、卵白食摂取群由来の細胞群どうしても、mRNA の発現が大きく違うことが、明らかとなった。これらのことより、*in vivo* において免疫寛容状態にある CD4 陽性 T 細胞は、それぞれ性質の異なった低応答性の細胞群から構成されていることが示された。

### 第 3 章 免疫寛容状態の CD4 陽性 T 細胞における Caspase-3 の働き

第 2 章において免疫寛容状態の CD4 陽性 T 細胞において、アスパラギン酸特異的システインプロテアーゼ群の一つである Caspase-3 の働きが示唆された。Caspase-3 は主にプロテアーゼとして基質タンパク質を切断し、細胞のアポトーシスを誘導するのに主要な役割を果たしていることが報告されている。その活性化にはプロセッシングが必要となるが、実際免疫寛容状態の CD4 陽性 T 細胞においてもプロセッシングを受けていることが、ウェスタンブロットにより明らかとなった。そこで免疫寛容状態の CD4 陽性 T 細胞がアポトーシスを起こしているのかどうか、Annexin V 染色によるフローサイトメトリー解析及び DNA の断片化量から検討したところ、コントロール群との差は認められず、非アポトーシス状態であることが明らかとなった。このことから、免疫寛容状態の CD4 陽性 T 細胞では抗アポトーシス分子(抗 Caspase 分子)の活性が上昇していることが示唆され、Caspase-3 の活性を最も阻害する内因性タ

ンパク質である X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)のタンパク量について調べた。その結果、免疫寛容状態の CD4 陽性 T 細胞では、XIAP のタンパク量が優位に増加していることが明らかとなった。従って、免疫寛容状態の CD4 陽性 T 細胞は、生存とアポトーシスの微妙なバランスを、アポトーシスを促進・阻害する分子の発現によって保っていることが示唆された。

次に免疫寛容状態の CD4 陽性 T 細胞の TCR からの細胞内シグナル伝達における Caspase-3 の働きについて検討した。これまで当研究室において経口免疫寛容状態の CD4 陽性 T 細胞において、TCR シグナルの下流では、カルシウム/Nuclear Factor of Activated T cells (NFAT)の経路に障害があることが示されている。2次元電気泳動における結果から、TCR シグナル複合体における重要なアダプター分子である Grb2-related adaptor downstream of Shc (GADS)のタンパク量が免疫寛容状態の CD4 陽性 T 細胞で減少していたこと、さらに GADS が Caspase-3 のターゲットであることから、Caspase-3 により GADS が切断されていることが示唆された。そこでウェスタンブロットにより検討したところ、GADS が免疫寛容状態の CD4 陽性 T 細胞で切断されていることが明らかとなった。そこで、このような Caspase-3 の働きが、免疫寛容状態の CD4 陽性 T 細胞における TCR 刺激時のシグナル複合体形成に与える影響について検討した。まず、GADS を中心とする TCR シグナル複合体を抗 GADS 抗体を用いた免疫沈降法により分離し、抗リン酸化チロシン抗体でウェスタンブロットを行ったところ、免疫寛容状態の CD4 陽性 T 細胞において、TCR  $\zeta$  chain、Linker of activated T cells (LAT)、SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa (SLP-76)、Phospholipase-C $\gamma$ 1 (PLC- $\gamma$ 1)のチロシンリン酸化量の減少が示され、さらに複合体に会合してくる TCR  $\zeta$  chain、zeta-associated protein-70 (ZAP-70)、SLP-76、PLC- $\gamma$ 1 の量も減少していた。従って免疫寛容状態の CD4 陽性 T 細胞では、GADS-SLP-76 を中心とした TCR シグナル複合体の形成が出来ず、下流にシグナルを伝えられないことが示唆された。特に、PLC- $\gamma$ 1 は細胞内カルシウムの放出に重要な役割を果たしており、その活性が免疫寛容状態の CD4 陽性 T 細胞において減少していることは、カルシウム/NFAT 経路の障害の大きな要因となっていると考えられる。

以上、本研究では免疫寛容状態の CD4 陽性 T 細胞について初めてプロテオーム解析から検討した結果、免疫寛容状態の CD4 陽性 T 細胞は非アポトーシス状態を保ったまま Caspase-3 の活性を上昇させ、TCR シグナル複合体を含む様々なタンパク質を切断することで、「免疫寛容」という特別な不応答状態を維持していることが明らかとなった。また、*in vivo* おいて経口免疫寛容状態の CD4 陽性 T 細胞は異なった性質を持つ細胞群から構成されていることも明らかとなった。