

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 加地 友弘

我々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、経口的に摂取した食物抗原などの生体に必須な物質に対しては免疫系の防御反応は起こらず不応答化が誘導され、この現象を経口免疫寛容と呼ぶ。経口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。

これまでに、卵白オвал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、抗原として 20%卵白配合食(卵白食)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。本論文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、プロテオーム解析を用いて明らかにしようと試みた。

第 1 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、抗原未感作マウス CD4 陽性 T 細胞のプロテオームマップの作製を行った。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、固定化 pH 勾配ゲルを用いて 2 次元電気泳動を行ったところ 1300 以上のスポットを確認した。それぞれのスポットは、ゲル内トリプシン消化を行い、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を用いて測定し、データベース検索を行い同定した。現在までに 300 以上のスポットを同定し、抗原未感作 CD4 陽性 T 細胞のプロテオームマップを作製した。

第 2 章では免疫寛容状態の CD4 陽性 T 細胞のプロテオーム解析を行った。OVA23-3 マウスに卵白食を 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・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、この 2 群の脾臓 CD4 陽性 T 細胞の発現タンパク質を 2 次元電気泳動を用いて比較したところ、経口免疫寛容状態の CD4 陽性 T 細胞で、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マフィンガープリント法により同定した。発現量の増加した分子の一つは、システインプロテアーゼである caspase-3 であることが判明し、さらに caspase-3 の標的タンパク質が 3 つ切断されている可能性が示され、caspase-3 の機能亢進が経口免疫寛容状態の CD4 陽性 T 細胞で起こっていることが示唆された。

第 2 章において免疫寛容状態の CD4 陽性 T 細胞において、caspase-3 の働きが示唆されたので、第 3 章ではその働きについて検討した。Caspase-3 はアポトーシスの主要分子だ

が、経口免疫寛容状態の CD4 陽性 T 細胞は、annexin V による染色や DNA の断片化率の測定から非アポトーシス状態であり、さらに内在性の caspase 抑制分子である XIAP の発現を上昇させていることを明らかにした。また caspase-3 の標的であり、TCR シグナル複合体におけるアダプター分子の GADS の発現量が、経口免疫寛容状態の CD4 陽性 T 細胞で減少していたが、ウェスタンブロットにより、GADS が経口免疫寛容状態の CD4 陽性 T 細胞で強く切断されていることを示した。そこで、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で分離し、リン酸化や分子の会合量を検討したところ、TCR と鎖、LAT、SLP-76、PLC- γ 1 のリン酸化・会合量が減少していることが示された。特に SLP-76 の会合は顕著に抑制されていた。従って、経口免疫寛容状態の CD4 陽性 T 細胞では、caspase-3 の働きによって 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。

以上、本論文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を明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。