

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 留美
指導教官名 八村 敏志

論文題目

T 細胞受容体を介した抗原刺激の変化が免疫応答に及ぼす影響

免疫系は、外界に存在するおびただしい量の細菌やウイルスといった微生物を排除する生体防御に極めて重要な役割を果たしている。免疫システムは非常に精密であり、無数にもある外来抗原のそれぞれにまさにオーダーメイドと表現するにふさわしい柔軟な対応を示す。また抗原の質だけでなく、抗原の量に応じて異なる質の免疫応答を示している。抗原構造や抗原量の変化は抗原に特異的な免疫応答の制御に深く関与しており、これを解明することは複雑で巧妙な免疫システムの調節機構を探る上で非常に重要である。

免疫応答は免疫担当細胞であるリンパ球によって引き起こされるが、中でも T 細胞が抗原を認識し、活性化されるところから始まる。生体内に抗原が侵入すると、抗原未感作 T 細胞は T 細胞レセプター (TCR) を介して抗原提示細胞の表面に発現した主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 分子と結合した抗原を認識して活性化され、異なる機能を有する二種類の細胞、炎症性細胞 (Th1 細胞) とヘルパー細胞 (Th2 細胞) に分化する。Th1 細胞は主にインターロイキン (IL) -2 やインターフェロン (IFN) - γ を産生し、細胞性免疫応答を司る。一方、Th2 細胞は IL-4 や IL-5 を放出し、B 細胞による抗体産生の補助に重要な役割を果たしている。抗原未感作 CD4⁺ T 細胞が Th1 あるいは Th2 のどちらに分化するかは最初に遭遇する抗原の量や構造により巧みに制御されていることが示唆されているがその機構についてはいまだ不明な点が多く残されている。

本研究では抗原量と抗原構造の変化により抗原未感作な CD4⁺ T 細胞において異なるサイトカイン産生応答が誘導される機構について解析を行うため、卵アレルギーである卵白アル

ブミン (OVA) の 323-339 残基を MHC クラス II 分子である I-A^d 拘束的に認識する TCR を発現するトランスジェニックマウス (OVA23-3 マウス) を利用した。このマウスは OVA 特異的な単一の TCR を発現する T 細胞の割合が非常に高いため、抗原に感作されていない T 細胞の、抗原刺激に対する一次応答を *in vitro* で解析できる優れた実験系である。さらに、TCR シグナルを変化させ、抗原特異的な T 細胞応答を抑制する作用を持つアミノ酸残基置換アナログペプチドを用いて、上記の抗原未感作 CD4⁺ T 細胞のサイトカイン産生応答に対する影響、および OVA23-3 マウスを用いた食品アレルギーの動物モデルに対する抑制効果についての検討を行った。

1. 抗原刺激により誘導される抗原未感作 CD4⁺ T 細胞のサイトカイン発現を制御する TCR シグナル伝達の解析

これまで当研究室において OVA23-3 マウスを用いた実験より、抗原未感作 CD4⁺ T 細胞は抗原濃度や抗原構造に応じて一次応答時に異なる Th1/Th2 型サイトカイン産生パターンを示すことを明らかにしている。すなわち、高濃度の OVA323-339 で刺激することにより Th1 優位な応答が誘導され、低濃度の OVA323-339、また、一アミノ酸残基置換アナログペプチドである A326Q (³²⁶Ala→Gln) で刺激することで Th2 優位な応答が誘導される。本章では抗原未感作 CD4⁺ T 細胞においてこれらの異なる抗原刺激に対してサイトカイン産生応答が変化する機構について検討した。

抗原未感作 CD4⁺ T 細胞のサイトカイン産生制御に関与する TCR シグナル経路について調べるため、CD4⁺ T 細胞を抗原刺激する際に各シグナル経路に特異的な阻害剤を添加し、サイトカイン産生応答を解析した。高濃度の OVA323-339 刺激により誘導される IFN- γ 産生 (Th1 型応答) はサイクロスポリン A (CsA, Ca²⁺経路阻害剤)、カフェイン酸フェネチルエステル (CAPE, NF- κ B 阻害剤)、PD98059 (ERK 阻害剤) の添加により抑制された。一方阻害剤非添加条件では IL-4 産生はほとんど認められないのに対し、PD98059 の添加で IL-4 産生は劇的に増加した。また CsA、CAPE の添加によってもわずかに IL-4 産生は増強された。また、アナログペプチド刺激で誘導される強い IL-4 産生応答 (Th2 型応答) は CAPE および PD98059 の添加で増強されたが、CsA の添加により抑制された。このことから、IFN- γ の産生には Ca²⁺、ERK、NF- κ B いずれの経路も正に働くが、IL-4 産生応答に対しては、ERK 経路は強い抑制機能を有し、NF- κ B 経路も抑制的に働くことが明らかとなった。

次に、Th1 型応答、Th2 型応答を誘導する抗原刺激によって実際に TCR を介して誘導されるシグナル伝達について解析した。Th2 型サイトカイン産生応答はアナログペプチド刺激だけでなく低濃度の OVA323-339 刺激によっても誘導される。このため、高濃度の OVA323-339、低濃度の OVA323-339、アナログペプチドによる刺激に対して誘導されるシグナル伝達について、NFAT (NFAT1, NFAT2)、NF- κ B (p65, p50, c-Rel)、AP-1 (c-fos, c-Jun) の核内発現量、

ならびに ERK のリン酸化の比較を行った。ERK のリン酸化の程度および NFAT、AP-1、NF- κ B のいずれの転写因子の核内発現量も低濃度の OVA323-339 刺激および A236Q 刺激では高濃度の OVA323-339 刺激に比べて弱いものであり、質的な違いは観察されなかった。

TCR シグナルを介して活性化される NF- κ B に対する CAPE の作用点については未だ不明である。IL-4 産生を制御するのは NF- κ B ファミリーのどの分子なのかについて検討するため、CAPE の添加が抗原刺激により誘導される NF- κ B 各分子の核内発現に及ぼす影響について解析した。その結果、CAPE は c-Rel 分子の核内発現を顕著に抑制した。このことより、c-Rel は IL-4 産生に対し抑制的に働くことが示唆された。

以上より、高濃度の OVA323-339 により誘導される TCR シグナルの強い活性化により IFN- γ 産生を正に制御するシグナル経路の活性が増強されると共に ERK や c-Rel といった IL-4 産生応答を負に制御するシグナル経路の活性も増強され、これにより Th1 型優位な応答が誘導されることが明らかとなった。一方、低濃度の OVA323-339 およびアナログペプチドで刺激を行うと、IFN- γ 産生を正に制御しかつ IL-4 産生応答を負に制御するシグナル経路の活性化が弱いために Th2 型応答が優位に誘導される可能性が示唆された。

2. TCR アンタゴニストが抗原未感作 CD4⁺ T 細胞のサイトカイン産生応答に及ぼす影響

TCR アンタゴニストとは、抗原の一アミノ酸残基置換アナログペプチドのうち、TCR シグナル伝達に影響を与え、抗原特異的に T 細胞応答を抑制する性質を持つものである。これまでに、TCR アンタゴニストの抗原未感作 CD4⁺ T 細胞に対する影響は明らかにされていない。そこで本章では、第 1 章で解析した抗原濃度によるサイトカイン産生バランスの変化に対して、TCR アンタゴニストがどのように影響するかについて検討を行った。

OVA323-339 の一アミノ酸残基置換アナログペプチドの中から TCR アンタゴニストを探索した結果、A326V (³²⁶Ala→Val) が抗原特異的な増殖応答を効果的に抑制する TCR アンタゴニストの性質を有することが明らかとなった。次に、OVA23-3 マウス由来抗原未感作 CD4⁺ T 細胞を抗原提示細胞存在下、様々な濃度の OVA323-339 と A326V と共に培養し、一次応答におけるサイトカイン産生と Th1/Th2 細胞への機能分化について検討した。TCR アンタゴニストにより OVA323-339 の濃度依存的に誘導される増殖応答および IFN- γ 産生応答は抑制された。一方、IL-4 産生応答は OVA323-339 0.05 μ M 前後で産生のピークを迎え、それ以上の濃度では産生量が低下する山型の応答を示すが、TCR アンタゴニストの存在は IL-4 産生を抑制せず、むしろ IL-4 の最大産生量が増大し、また産生量のピークを迎えるためにはより高い抗原濃度が必要となった。また、抗原未感作 CD4⁺ T 細胞の Th1/Th2 分化においても同様の現象が観察された。TCR アンタゴニストは免疫応答に対する抑制機能の他に、抗原未感作 CD4⁺ T 細胞の Th1/Th2 サイトカイン産生応答および機能分化に対する制御機能を有することが明らかとなった。また、第 1 章の結果とあわせて考察すると、TCR アンタゴニストは

TCR シグナルを全般的に抑制することにより IL-4 産生応答や Th2 分化を亢進させることが示唆された。

3. TCR アンタゴニストによる in vivo 免疫応答制御についての解析

Th1 型応答と Th2 型応答は互いを制御しながらバランスを保つことで免疫系の恒常性維持に寄与しており、そのバランスの崩壊はアレルギーなどの免疫疾患の原因となる。アレルギー疾患はいまだ根本的な治療法及び効果的な予防法がなく、それらの早急な確立が望まれている。アレルギーの原因となる抗原に特異的な応答を抑制できれば他の免疫系に悪影響を及ぼすことなくアレルギー応答を抑制できると考えられる。

これまでに当研究室において、OVA23-3 マウスに卵白タンパク質を含む飼料を自由摂取させることによって強い IgE 産生応答や小腸組織の形態変化、体重減少といった食品アレルギー反応に特徴的な現象を示すことが明らかとなっている。また、第 2 章で述べた TCR アンタゴニストは、自己免疫疾患の動物モデルにおいて発症抑制などの効果を示すことが報告されている。そこで本研究ではこの食品アレルギーの動物モデルにおける TCR アンタゴニストの抑制効果について解析を行った。すなわち、卵白含有飼料摂取に伴い OVA23-3 マウスに誘導される免疫応答に対する A326V 投与の抑制効果について検討した。OVA23-3 マウスに卵白食を 6 週間摂取させた後、4 週間普通食を与え、再び卵白食を摂取させることで誘導される血中 OVA 特異抗体価および体重の経時的変化について解析を行った。A326V 投与は卵白食摂取開始前と再摂取開始前の二回行った。対照群としては卵白食を摂取させるのみの群と PBS 投与群を設けた。対照群では卵白食再摂取開始後に強い抗 OVA IgE 産生応答が誘導され、また卵白食摂取期間中に体重減少あるいは体重変化の停滞が観察された。一方 A326V 投与群においては、対照群で誘導された抗 OVA IgE 抗体産生の強い応答が誘導されず、また卵白食摂取期間中の体重増加が認められた。このことから、TCR アンタゴニスト活性を持つ抗原アナログの投与は抗原の経口摂取によって誘導される抗原特異的 IgE 産生応答及び体重変化に対して抑制効果を持ちうることを、すなわち食品アレルギー疾患の予防や治療に対する TCR アンタゴニストの有用性が示唆された。

以上、第 1 章では抗原未感作な T 細胞のサイトカイン発現における TCR シグナル伝達経路の役割を明らかにした。第 2 章では TCR アンタゴニストは T 細胞応答を抑制するだけでなく、抗原未感作 T 細胞に作用した場合には Th2 応答を亢進させるサイトカイン産生制御能を有することを初めて見いだした。第 3 章では、TCR アンタゴニストの投与が抗原の経口摂取により誘導される抗原特異的な IgE 産生応答および体重減少に対し抑制効果を有することを示した。本研究から得られた知見は、免疫系の破綻により引き起こされる疾患の誘導機構の解明や免疫疾患の予防法および治療法の確立に光明をもたらすものと思われる。