

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成13年度博士課程進学
氏名 後藤 貴康
指導教官名 八村 敏志

論文題目 免疫寛容を誘導された CD4 陽性 T 細胞において
特異的に発現する遺伝子に関する研究

我々生物は常に外界と接しているため、外来抗原に常に暴露されている。外来抗原には細菌やウイルスなど我々にとって有害となるものも多い。それら外来抗原から身を守るために我々の体には免疫系と呼ばれる極めて精巧な機構が備わっている。また、食物は我々が生きていくために必要不可欠なものであるが、食物も生体にとって外来抗原であることに変わりはない。しかし、食物のように生体にとって有用な物質には免疫系は排除するという反応を起こさない。また、同様に自己抗原に対しても免疫系の反応は起きない。これらの現象を免疫寛容現象と呼び、免疫寛容が破綻するとアレルギーや自己免疫疾患などの疾病を発症する。

特に経口的に摂取した抗原に対して免疫系が応答しなくなる現象は経口免疫寛容現象と呼ばれている。実験的には、抗原をあらかじめ経口的に投与すると同一の抗原を免疫した際に特異的 T 細胞のインターロイキン 2 (IL-2) 産生や増殖応答が抑制される。経口免疫寛容は生体に生まれながらに備わっている自然な免疫抑制機構であり、その臨床への応用はアレルギーや自己免疫疾患に対する安全かつ有効な治療法として期待される。

経口免疫寛容の機構には、T 細胞の免疫応答が低下する免疫不応答(anergy)、抑制性サイ

トカインを産生する調節性 T 細胞の誘導による抑制(active suppression)、アポトーシスにより抗原特異的 T 細胞が除去される細胞除去(clonal deletion)などが考えられている。このようにこれまでの経口免疫寛容研究は、細胞の応答レベル（サイトカイン産生量、抗体産生量、細胞増殖能）での現象に焦点を当てたものが主流であり、分子レベルでの解析は遅れており、経口免疫寛容の誘導・維持機構は十分に明らかにされていない。本研究は、経口免疫寛容に中心的な役割を果たしていると考えられる CD4 陽性 T 細胞に着目して、経口免疫寛容の分子レベルでの誘導・維持機構の解明、また経口免疫寛容状態 T 細胞のマーカーとなる分子の同定を行うことを目的とし遺伝学的手法を用いて実験を行った。

また、T 細胞は単一の T 細胞レセプター (TCR) を発現しており、体内に侵入してくる膨大な種類の抗原に対応するために、免疫系は莫大な種類の TCR を用意しなくてはならない。その為、経口免疫寛容の解析を通常のマウスを用いて行くと、単一の抗原を認識するリンパ球の頻度が低いため、抗原特異的な応答を解析することが困難であった。本研究では、鶏オバルブミン (OVA) を特異的に認識する TCR を高発現している TCR トランスジェニックマウス (DO11.10) を用いた。この系を用いることにより単一抗原特異的かつ経口免疫寛容状態の T 細胞を高純度で得ることが可能となる。

第一章 Suppression Subtractive Hybridization 法による経口免疫寛容を誘導された CD4 陽性 T 細胞に特異的に発現する遺伝子の検索

組織や細胞由来の 2 種類の RNA 群のうち片方の RNA 群に特異的に発現、もしくは多く含まれる遺伝子を濃縮する方法であるサブトラクション法を用いて経口免疫寛容を誘導された脾臓由来 CD4 陽性 T 細胞に特異的に発現している遺伝子の検索を行った。経口免疫寛容誘導群として、20%の卵白含有飼料を 28 日間自由摂取させた DO11.10 マウスから脾臓由来 CD4 陽性 T 細胞を単離し RNA を精製した。また、コントロール群として解剖 10 日前にアジュバント (CFA) と共に OVA を腹腔免疫した DO11.10 マウスから脾臓由来 CD4 陽性 T 細胞を単離し RNA を精製した。細胞の単離には磁気細胞分離システム (MACS) を用いて OVA 特異的 CD4 陽性 T 細胞のみを精製し、経口免疫寛容を誘導した群はコントロール群に比べて IL-2 産生能、増殖能が低下していた。サブトラクション法は、活性化した CD4 陽性 T 細胞群に対して免疫寛容を誘導された CD4 陽性 T 細胞群に特異的に発現する遺伝子の濃縮 (forward subtracted cDNA とする) と免疫寛容を誘導された CD4 陽性 T 細胞群に対して活性化した CD4 陽性 T 細胞群に特異的に発現する遺伝子の濃縮 (reverse subtracted cDNA とする) を行った。Forward subtracted cDNA を用いてサブトラクション済みライブラリー (subtracted cDNA library) を構築した。

サブトラクション法により免疫寛容を誘導された CD4 陽性 T 細胞群に特異的に発現する

遺伝子を濃縮したが、実際には擬陽性クローンが含まれている。そこで、ディファレンシャルスクリーニングを行い陽性クローンの絞込みを行った。その際、**subtracted cDNA library** より無作為に単離したクローンのインサート部位のみを PCR により増幅してメンブレンにプロットし、プローブとして **forward subtracted cDNA** と **reverse subtracted cDNA** を用いた。3300 クローンのディファレンシャルスクリーニングを行い **forward subtracted cDNA** をプローブとして用いた際に強いシグナルを示すクローンが陽性クローンの候補として 110 クローンに絞り込んだ。110 クローンについて塩基配列を読み、BLAST を用いてホモロジー検索を行った。その後、110 クローン全てに対して定量 PCR を行い免疫寛容に関与すると思われるクローンを 12 クローンに絞った (機能未知遺伝子: 4 クローン)。それらの遺伝子には、LAX (**L**inker for **A**ctivation of **X** cells, X indicates “to be defined”), **culin1**, **Napg** (**N**-ethylmaleimide-sensitive factor **a**ttachment **p**rotein, **g**amma), **HSP40** (**H**eat **s**hock **p**rotein **40**), **Zfx1b** (**Z**inc **f**inger **h**omeobox **p**rotein **1b**), **emerin**, **Zfp36** (**Z**inc **f**inger **p**rotein **36**), **MKP-1** (**M**AP **k**inase **p**hosphatase-**1**)が含まれていた。

第二章 免疫寛容の誘導された CD4 陽性 T 細胞に高発現している遺伝子の発現特性についての解析

最近、**Tob** (**T**ransducer of **E**rbB2), **GRAIL** (**G**ene **r**elated to **a**nergy in **l**ymphocytes) など新たな T 細胞における不応答化関連遺伝子が報告されている。これらの遺伝子は **in vivo** ではなく **in vitro** の不応答化誘導条件で同定されてきた。T 細胞の完全な活性化には TCR からのシグナルの他に補助刺激分子である **CD28** からのシグナルが必要であり、補助刺激の無い状態で TCR (**CD3**) 刺激のみを加えると T 細胞は不応答化状態になることが知られている。上述の **Tob** や **GRAIL** は **in vitro** において、補助刺激の無い状態で TCR 刺激のみを加えることにより誘導された不応答化状態の CD4 陽性 T 細胞で高発現している遺伝子として同定された。また、その他の不応答化関連遺伝子の多くも **in vitro** の誘導系を用いて同定されている。**In vitro** の誘導系には、より均一な細胞を大量に取得可能となるという利点や、不応答化が誘導される過程での遺伝子発現を詳細に検討できる利点がある。その一方で、**in vitro** 実験系で得られた結果が **in vivo** を正確に反映していない可能性も考慮する必要がある。そこで、本研究では第一章で同定した遺伝子が **in vitro** 系で誘導された不応答化 CD4 陽性 T 細胞においても高発現が見られるかについて定量 PCR により解析した。その結果、**in vivo** 誘導系 (経口免疫寛容を誘導された群) においては発現の上昇が見られたが **in vitro** 誘導系では発現上昇が見られないものが 6 遺伝子 (**Napg**, **Zfp36**, **LAX**, 機能未知遺伝子 3 個) あった。誘導方法によるこのような遺伝子発現の違いは、IL-2 産生能の低下・細胞増殖能の低下に見られる不応答化状態の誘導機構にも複数の機構が存在する

可能性や、*in vivo* 不応答化 T 細胞と *in vitro* 不応答化 T 細胞では性質を異にする可能性を示している。

また、*in vitro* 不応答化誘導系で経時的な遺伝子発現変化についても解析した。すなわち、*in vitro* 系での不応答化誘導時間を 6、24、48 時間および 48 時間の刺激後 2 日間の休止期間をとった群を準備し経時的な遺伝子の発現量の変化について解析を行った。その結果、不応答化誘導初期段階 (48 時間以内) で高い発現上昇がみられる遺伝子 3 個 (*Zfx1b*、*emerin*、機能未知遺伝子 1 個)、休止期間後での発現上昇が見られた遺伝子が 3 個 (*culin1*、*Zfp36*、機能未知遺伝子 1 個) あった。この結果から、本研究で同定した遺伝子は、T 細胞の不応答化誘導において初期段階で発現し、不応答化の誘導に関与する遺伝子と、誘導後に高発現し、不応答化の維持に関与する遺伝子に分類される可能性が考えられた。

第三章 免疫寛容状態の T 細胞で高発現している遺伝子の T 細胞活性化抑制能についての解析

第一章、第二章より経口免疫寛容 T 細胞に高発現していることが確認された遺伝子が T 細胞の活性化において抑制能を有するかどうかについて検討した。まず、注目している遺伝子を取得するために完全長 cDNA を PCR を用いて増幅し、塩基配列に変異が無いことの確認を行った。T 細胞の活性抑制能の指標として T 細胞の増殖因子である IL-2 遺伝子の転写抑制能について調べた。すなわち、T 細胞ハイブリドーマ (68-41) に IL-2 のプロモーター領域が挿入されたレポータープラスミドを遺伝子導入し、IL-2 の転写活性についてルシフェラーゼアッセイを行った。現在までに *culin1*、*Napg*、*LAX*、*HSP40* さらに 1 個の機能未知遺伝子の計 5 個の遺伝子について IL-2 転写抑制活性を確認した。*Culin 1* は E3 ubiquitination ligase 活性を有し、前述の *GRAIL* が E3 ubiquitination ligase であることから *culin 1* も T 細胞の低応答化に関与している可能性が高いと考えられる。また、*LAX* は T 細胞の活性化を負に抑制するシグナル分子であるため、免疫寛容誘導への関与が示唆される。さらに *Napg* は、小胞の輸送に関与しており T 細胞の不活性化に必要な何らかのレセプターの細胞表面への発現を制御している可能性が考えられる。これらのことから、本研究で同定した遺伝子が T 細胞の低応答化に関与している可能性が高いと考えられる。

本研究では新規に免疫寛容を誘導された CD4 陽性 T 細胞に高発現し、活性化抑制能を有する遺伝子を同定した。その作用機構についてはさらなる解析が必要であるが、本研究が免疫寛容の誘導・維持機構の解明の手がかりとなることを確信している。