

論文の内容の要旨

論文題目 CD83 による MHC class II 分子の発現制御機構
の解析

指導教員 玉置邦彦教授

東京大学大学院医学系研究科

平成15年4月入学

医学博士課程

外科学専攻

栗野嘉弘

CD83は1992年 Tedderらによりクローニングされた免疫グロブリンスーパーファミリーに属する45キロダルトンの type1 膜糖タンパクで、ヒトでは6番染色体、マウスでは13番染色体上にコードされる。胸腺樹状細胞、皮膚ランゲルハンス細胞、circulating dendritic cells、単球由来樹状細胞、interdigitating reticulum cells といった大半の樹状細胞の細胞表面に CD83は発現しており、樹状細胞の成熟マーカーとして広く用いられている。CD83の T 細胞機能における役割は単純性ヘルペスウイルスを用いた系により示唆されており、単純性ヘルペスウイルスに感染した成熟樹状細胞では CD83の発現が低下し、同時に MLR の系において T 細胞刺激能も低下している。非感染細胞においても、CD83mRNA の核から細胞質への輸送を抑制する事によって T 細胞刺激能が減少する事から、単純性ヘルペスウイルス感染成熟樹状細胞の MLR での T 細胞刺激能低下の原因として、CD83の発現低下の役割が示唆されている。また、実験的自己免疫性脳脊髄炎の系において、可溶性 CD83細胞外ドメインのマウスへの投与がその発症を予防する事も示されている。マウスにおいては胸腺上皮細胞も CD83を発現している。そして、この CD83は CD4陽性 T 細胞の産生に必要である事が示されており、CD83欠損マウスではナイーブ CD4陽性 T 細胞の劇的な減少を認める。さらに、CD83欠損マウスでは、接触性皮膚炎の実験系での反応が低下しており、

また液性免疫の反応も低下しており、CD4陽性 T 細胞の減少が原因のひとつと考えられている。また、CD83欠損マウスの脾臓 B 細胞は、野生型に比べて MHC class II の発現が50%低下している。これが MHC class II 分子転写の減少から起こっているのか、末梢 CD4陽性 T 細胞の減少によって二次的に起こるのかは分かっていなかったが、CD83欠損マウスから培養された骨髄由来樹状細胞が MLR の系において野生型と同程度の T 細胞刺激能を有する事から、CD83の欠損は、まず CD4陽性 T 細胞の産生に影響し、二次的に MHC class II 分子の低下を引き起こすと予想されていた。しかしながら、CD83と MHC class II 分子はともに CD4陽性胸腺細胞と CD4陽性 T 細胞の産生に重要であることから、今回、CD83欠損と MHC class II 分子の発現との間の関係について検討し、CD83欠損マウスの表現型が部分的には MHC class II 分子の欠損から引き起こされるものであるかどうかを評価した。

まず、CD83が MHC class II 分子発現にどの程度影響を与えるかを検索するため、CD83欠損マウスから単離された抗原提示細胞による MHC class II 分子発現をフローサイトメリーにて評価した。CD83欠損マウスからの脾臓 B220陽性 B 細胞は野生型の同腹子からの B 細胞に比べて、細胞表面の MHC class II 分子発現が $50 \pm 2\%$ 低下していた。同様に、CD83欠損マウスからの胸腺上皮細胞、脾臓樹状細胞、マクロファージでは、野生型同腹子からの細胞に比べて、細胞表面の MHC class II 分子発現がそれぞれ $30 \pm 5\%$ 、 $25 \pm 3\%$ 、 $34 \pm 4\%$ 低下していた。それとは対照的に、MHC class I 分子の発現及び細胞質における MHC class II 分子発現は、野生型同腹子と同等であった。同様の結果は野生型同腹子由来の脾臓 B 細胞と CD83欠損マウス由来の脾臓 B 細胞とを LPS や $F(ab')_2$ 抗マウス IgM 抗体で刺激した場合にも得られた。これらの事から、CD83の欠損は、B 細胞やその他の抗原提示細胞における細胞表面 MHC class II 分子発現量に選択的に影響していることが分かった。

次に新しく細胞表面に出現した MHC class II 分子の発現量を測定するため、野生型同腹子、CD83欠損マウスおよび MHC class II^{+/-}マウス由来の B 細胞をまず無標識抗 MHC class II 抗体で処理し、この時点で細胞表面に存在していた MHC class II 分子を抗 MHC class II 抗体で飽和させ、これ以後新たには抗 MHC class II 抗体が反応できない様にしてから、37°Cで90分間培養し、最後に PE 結合抗 MHC class II 抗体で染色した。培養後に染色された蛍光量は新しく細胞表面へ出現した MHC class II の量を反映している。無処理の場合の蛍光量(細胞表面 MHC class II 全体)と比べた時の処理した場合の蛍光量(新しく出現した細胞表面 MHC class II)の割合を計算すると、新しく出現した細胞表面 MHC class II 分子は野生型同腹子、もしくは MHC class II^{+/-}マウス由来の B 細胞では40-41%程度であったのに対して、CD83欠損マウス由来の B 細胞では62%であった。MHC class II^{+/-}マウス由来の B 細胞における新しく出現した細胞表面 MHC class II 分子の割合が、野生型同腹子での割合と同等であったため、CD83欠損マウスからの B 細胞で新しく出現した細胞表面 MHC class II 分子の割合が増大しているのは細胞表面 MHC class II 分子の発現量が低下しているためではないと考えられた。同様に細胞表面の B220と MHC class I 分子の internalization の割合を測定したが、野生型同腹子と CD83欠損マウスとの間で差は認められなかった。これらの事から、CD83が存在しないと、細胞表面の MHC class II 分子は選択的に

turnover が亢進している事が示唆された。

MHC class II 分子の細胞表面への発現の低下が、MHC class II 分子の構造の変化によって起きているのかどうかを評価するため、野生型同腹子と CD83欠損マウスとの脾細胞を、I-A^b 上の異なるエピトープを認識する抗 I-A^b 抗体で染色したが、CD83欠損マウスにおける発現量低下に変化はなく、また MHC class II ヘテロダイマーの SDS-PAGE による電気泳動での泳動速度の変化も認められなかった。

CD83欠損マウスの T 細胞 development に MHC class II 分子の減少が影響を与えるかどうかを検討するため、CD83欠損 MHC class II^{+/-}マウスを作成し、胸腺及び末梢における CD4 陽性細胞数の変化を検討した。胸腺においては CD83 単独欠損マウスとの間に有意な差を認めなかったが、末梢 CD4 陽性 T 細胞数は有意に減少していた。これらの事から、CD83欠損マウスにおいては、胸腺から T 細胞が出て行き末梢に分布するにあたり、適切な MHC class II 分子の発現量が必要とされると考えられた。

次に、CD83欠損マウス由来の B 細胞による MHC class II 分子 turnover の亢進が、細胞自体に備わった内在性の性質を原因としているのか、それとも、B 細胞以外の外的な影響を原因としているのかを検討した。まず、野生型同腹子由来 B 細胞と CD83欠損マウス由来 B 細胞とを共培養してもそれぞれの MHC class II 分子発現に変化を認めなかった。また、野生型同腹仔由来 B 細胞と CD83欠損マウス由来 B 細胞とをそれぞれ CD83欠損マウスと野生型同腹仔とに移入したが、それぞれの細胞の MHC class II 分子発現がレシピエントの発現量に変化することはなかった。これらの事より、CD83欠損マウス由来 B 細胞の MHC class II turnover の亢進は個々の細胞自体に備わっている内在性の因子によるものである事が示唆された。

最後に LPS 刺激もしくは F(ab')₂ 抗 IgM 抗体刺激を行った後のシグナル伝達を検討するため、[Ca²⁺]_i の変化や NFκB の活性化、ERK の活性化を検討したが、野生型由来 B 細胞と CD83欠損マウス由来 B 細胞との間に違いを認めなかった。このため、MHC class II 分子発現の減少はシグナル伝達の障害が原因ではないと考えられた。

これらの事より、CD83欠損抗原提示細胞においては MHC class II 分子の細胞表面における特異的な発現低下があり、これは外的な因子やシグナル伝達、明らかな MHC class II 分子の構造上の変化によるものではなく、MHC class II 分子の細胞表面での turnover 亢進によると考えられた。CD83欠損 MHC class II^{+/-}マウスにおける positive selection の障害の程度が CD83欠損マウスにおける障害の程度と同程度であったこと等から、CD83欠損マウスにおける positive selection の障害は turnover 亢進による MHC class II 分子発現低下とはまた別の機序で起きていると考えられたが、末梢の免疫系においては CD83欠損 MHC class II^{+/-}マウスにおける CD4 陽性 T 細胞数が CD83欠損マウスにおけるそれと比較してさらなる減少を示しており、CD83の MHC class II turnover を介する制御の重要性が示唆される。このような制御機構は近年の報告にある CD83による自己免疫疾患の治療可能性などを鑑みるに大変興味深いと思われる。