

論文内容の要旨

論文題目 抗原特異的な T 細胞免疫応答に伴う、抗原特異性の異なる T 細胞活性化の解析

指導教官 山本 一彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏 名 澁谷 美穂子

<背景>

自己免疫疾患は自己の成分を抗原とする免疫反応が病態に関与している疾患群であり、その病像は全身症状と特定の臓器障害が組み合わさって形成される。臓器障害は様々な免疫細胞の浸潤により惹起されると考えられているが、なかでも T 細胞と関節リウマチ(Rheumatoid Arthritis; RA)との関連を示唆する報告が多数存在する。しかし従来の T 細胞集団を解析する方法では、単一細胞レベルでの遺伝情報はもとより、T 細胞上でペアとなっている T 細胞レセプター(T Cell Receptor; TCR)の α 鎖と β 鎖の組み合わせの同定も困難であった。個々の T 細胞の抗原特異性や機能がわかれば、RA の病態解明にさらに近づくことができる、当時から期待されていた。

当研究室の藤尾らは、T 細胞をシングルセルソーティングによって回収し、同定した TCR を用いて免疫応答の解析を行う手法を開発した。彼らはこの手法を用いて RA の動物モデルである II 型コラーゲン(Type II Collagen; CII)誘発性関節炎 (Collagen Induced Arthritis; CIA) の関節炎局所に集積している CD4 陽性 T 細胞を解析した。すると、マウス関節炎局所においては抗原である CII に特異性を示さないが、所属リンパ節及び炎症局所で何らかの刺激を受けた T 細胞が存在した。T 細胞の活性化を誘導する機序の一つとして知られている bystander activation は「ある抗原 X に特異的な T 細胞の活性化が、別の抗原 Y に対する免疫応答に伴って生ずる現象」である。ウイルス感染症やヘルペス角膜炎などの動物モデルや試験管内の検討で bystander activation は TCR シグナルではなくサイトカインに依存していることが報告されている。以上よ

り、CIA の炎症局所における CII に特異的でない活性化した CD4 陽性 T 細胞の集積の機序の一つとして bystander activation の関与が考えられた。

<目的>

本研究は CII 免疫時のリンパ節で bystander activation が生じているのかについて検討し、抗原特異的な T 細胞免疫応答に伴う抗原特異性の異なる T 細胞の活性化様式を明らかにすることを目的とした。

<方法>

CII で 2 回免疫を行った C57BL/6(B6)マウスの鼠径リンパ節より T 細胞をシングルセルソーティングによって回収し、単一細胞解析を行った。一実験あたり単一細胞として約 70 個の細胞と、バルク群を回収した。単一細胞由来の cDNA を合成し、PCR により TCR α 鎖、 β 鎖の配列を同定した。また Foxp3 とサイトカイン (IL-17A、IL-17F、IL-10、IL-4、IFN- γ) 遺伝子の発現につき、すべての単一細胞で PCR による検討を行った。約 50 種類存在するマウスの J α 鎖遺伝子配列をもとに、すべての T 細胞の J α 鎖による分類を行った。C251 と C171 クローンの TCR をレトロウイルスベクターを用いて、B6 マウスの CD4 陽性 T 細胞に遺伝子導入した。C251 及び C171 導入細胞の CII 特異性と CII 特異的 T 細胞存在下での増殖反応について検討した。

2 種類の TCR トランスジェニックマウスの CD4 陽性 T 細胞の共培養系の解析を行った。一組は E α ペプチド(MHC クラス II の I-E 由来、E α 52-68)と E α ペプチドに特異的な TE α T 細胞、もう一組は OVA ペプチド (ニワトリオボアルブミン由来、OVA323-339)と OVA ペプチドに特異的な OT-II T 細胞である。この二組の T 細胞を種々の量の抗原と抗原提示細胞と共に培養し解析した。

<結果>

合計 322 個の T 細胞を回収し、このうち 194 個(60.2%)の TCR α 鎖の配列を同定した。バルク群の細胞は 336 コロニーの TCR α 鎖の配列を同定した。ソーティングした全ての単一細胞及び、バルク群中の TCR α 鎖の配列を約 50 種類存在する J α 鎖を指標に分類すると、約 82%の J α 鎖が使用されていた。単一細胞のみを J α 鎖で分類すると、高頻度に使用が認められた J α 鎖は 9 つあった。次に免疫惹起抗原である CII 添加時と、OVA 添加時または抗原非添加時での J α 鎖の使用頻度を検討すると、CII 存在下で特異的に使用頻度が高い J α 鎖の出現が認められた。

単一細胞から同定した TCR α 鎖のアミノ酸配列が同一である細胞集団(クローン)が全部で 17 個確認された。TCR を再構築するにあたり 4 つ以上の単一細胞が認められ、さらに Foxp3 と IL-17A 及び IL-17F の発現が高頻度であった 2 つのクローン(C251 と C171)を選択した。C251 と C171 クローンの TCR α 鎖と β 鎖を細胞表面に発現させた T 細胞を作成し、惹起抗原存在下での増殖反応を解析すると、C251 及び C171 導入細胞ともに CII に対する明らかな増殖反

応を示さなかった。一方で CII 特異的 T 細胞を含む CII で免疫した B6 マウスのリンパ節の CD4 陽性 T 細胞存在下に C251 導入細胞を抗原、抗原提示細胞と共に培養すると、C251 導入細胞は明らかに分裂した。

以上の結果から CII 免疫後のリンパ節内に、それ自身は CII への特異性をもたないが CII 存在下で分裂する T 細胞が存在する可能性が示された。また C251TCR を再構築した CD4 陽性 T 細胞は活性化した CII 特異的 T 細胞の存在下で分裂が促進された。これらの結果は CII 免疫後のマウスリンパ節で bystander activation による CD4 陽性 T 細胞活性化を生じており、それには活性化した CII 特異的 T 細胞の存在及び活性化する CII 特異的でない T 細胞自体の抗原認識が関与している可能性を示唆していた。

抗原特異性の判明している OT-II と TEa の 2 種類の TCR トランスジェニックマウスの CD4 陽性 T 細胞を使った実験系を用いて、この可能性についてより詳細な解析を試みた。OT-II を大量の OVA ペプチドに反応して十分に増殖する Responder、TEa をごく少量の E α ペプチドに反応する Associator とし、この二組の T 細胞を種々の量の抗原と抗原提示細胞と共培養し解析した。Associator の E α ペプチドが少量しか存在しない条件下で、Responder の OVA ペプチドが十分量存在すると、Associator である TEa の分裂が亢進した。

T 細胞活性化に関与する刺激として、抗原特異的な刺激と抗原非特異的な刺激(サイトカイン等)の大きく二つが挙げられ、bystander activation ではサイトカイン等の影響が大きいと考えられている。そこで MHC クラス II (I-Ab)と E α ペプチドの複合体に結合する抗体(Y-Ae)を用いて TEa への抗原提示を阻害すると、TEa の分裂は著明に抑制された。これらの結果により、抗原 X (OVA ペプチド) が大量に存在しその X に特異的な CD4 陽性 T 細胞(OT-II) が十分に増殖する条件下で、ごく少量しか存在しない抗原 Y (E α ペプチド)に特異的な CD4 陽性 T 細胞(TEa) の増殖反応が誘導されることが示された。またその増強反応には Y 抗原特異性が重要であることが示唆された。

OVA に特異的な OT-II が十分に増殖し、少量の E α ペプチドが存在する条件下で分裂した TEa と通常の抗原刺激で分裂した TEa の発現遺伝子を検討したところ、両者は明らかに異なっていた。このことは両者の活性化メカニズムが異なっていることを示唆していると考えられた。

<考察>

本研究では単一 T 細胞の遺伝情報解析により、CII 存在下の培養で増殖する特定の表現型の T 細胞の TCR を同定した。同定した TCR の解析により抗原特異的な T 細胞免疫応答に伴う抗原特異性の異なる T 細胞活性化のメカニズムの存在が示唆された。抗原特異性の判明している 2 種類の CD4 陽性 T 細胞を用いて詳細に解析すると、抗原 X が大量に存在し X に特異的な T 細胞が十分に増殖する条件下で、ごく少量しか存在しない抗原 Y に依存して Y 特異的な T 細胞が活性化する現象が観察された。この結果から抗原 X の存在下での CD4 陽性 T 細胞の活性化には、従来指摘されている抗原 X に特異的な T 細胞の活性

化や bystander activation と呼ばれる抗原非特異的な T 細胞の活性化以外の、X 以外の抗原 Y による刺激に依存性が高い活性化様式が存在する可能性が示唆された。Bystander activation は特異的な TCR 刺激に依存しない T 細胞の活性化であるという定義もあり、今回の研究で確認された活性化様式を bystander activation に含めることは妥当でない可能性も考えられた。そこで今後この活性化様式を「拡張抗原提示」という現象として解析を進めることを検討している。このような現象は自己免疫病態の細胞レベルでの基盤となっている可能性があると考えられる。

< 結論 >

マウスの所属リンパ節に存在する単一 T 細胞の解析により、抗原特異的な T 細胞の免疫応答に伴って抗原特異性の異なる T 細胞が活性化するメカニズムが存在する可能性を示した。また抗原特異性の判明している 2 種類の T 細胞を用いた実験系においても、抗原 X の存在下での CD4 陽性 T 細胞の活性化には、X 以外の抗原 Y による刺激に依存性が高い活性化様式が存在する可能性を示した。従来試験管内で T 細胞をある抗原の存在下で培養した際に、分裂又はサイトカインを産生する T 細胞は抗原特異的であるとみなされている。今回の研究結果は抗原存在下で分裂する T 細胞には、培養した抗原に特異的でないが何らかの抗原認識を介して活性化した T 細胞が含まれている可能性を示唆している。