

免疫工学による免疫システム分子機構の解析

Analysis of molecular mechanisms in the immune system by immunoengineering

I. T細胞抗原レセプター遺伝子トランスジェニックマウスを用いたアレルギー発症機構の解析

— Mechanism of allergy induction analyzed by using T cell antigen receptor gene transgenic mice —

日本医科大学 医学部 医学科 微生物学・免疫学 准教授 熊谷 善博

Yoshihiro Kumagai (Associate Professor)

Department of Microbiology and Immunology, Nippon Medical School and Graduate School of Medicine

1. はじめに

免疫工学とは、免疫系の機能分子、担当細胞、個体に対し、遺伝子工学、細胞工学、タンパク質工学、発生工学などの、いわゆる生命に手を加える手法により、免疫機構の解析や解明を試みたり、疾病の治療アイデアを提供する学問である。

ここでは、4回のシリーズに分けて、筆者らが過去20年程継続してきた研究の中から、免疫工学を有効に免疫機構の解明や調節に利用した、以下の4トピックスについて紹介する。

- I. T細胞抗原レセプター遺伝子トランスジェニックマウスを用いたアレルギー発症機構の解析
- II. T細胞抗原レセプター遺伝子トランスジェニックマウスを用いた免疫調節機構の解析
- III. タンパク質工学と細胞工学を有効に利用した抗体の作製
- IV. エピトープ移植抗体 —タンパク質工学によるワクチンの創製—

2. 免疫のパラダイム

免疫系は、自然免疫系 (innate immunity) と獲得免疫系 (acquired immunity) により構成されるが、免疫記憶や異物排除におけるエフェクター機構においては、T細胞が中枢的な役割を担っている。T細胞は、抗体の産生の調節(増幅と抑制)、炎症細胞の局所への動員、効果細胞としての機能等、獲得免疫の大局的な反応のほとんどに関わっている。

免疫のパラダイムを図1に示したが、異物に対する反応の強弱、反応対象の異物の属性によって免疫応答の内容が大きく異なっている。免疫は、スーパーシステムともいえる精緻な細胞相互作用と介在分子によるネットワークを形成しているが、システム自体のパラダイム(ここでは「大きな枠組み」という意味で用いる)は、動的なバランスによって維持されている。

免疫のパラダイム
Paradigm of Immune System

	抗自己	抗非自己
高	自己免疫病	アレルギー
	移植片拒否反応	
低	ガン	感染症

図1 免疫のパラダイムと疾病

本来、免疫応答は、個体に侵入するあらゆる異物(非自己)に対して反応し、その際異物を、自分の体内の成分(自己)との対比により識別し見分けるように仕組みられている(組織適合性抗原複合体拘束)。免疫細胞を過度に活性化し続けると、アレルギー反応や自己成分を標的とした自己免疫病による過度な炎症が惹起され、

対照的に、免疫応答が不十分だと、様々な感染症やガンが高頻度に発生することになる。免疫系細胞が必要な時に必要な程度反応するという状態、つまり適度な免疫応答が異物に対して適度に反応するバランスを保っていることが生体の免疫学的恒常性の維持には必要なのである。

ヒトをはじめとする動物は従属栄養生物で、動植物の成分(肉や野菜)を食物として摂取して、消化器系および消化酵素の働きをかりて吸収されやすい形に分解する。そして、生命維持のために必要な栄養源やビタミンを体内に吸収し、代謝系を駆動することによって生命活動を営んでいる。一方では、なんらかの理由でもともと体の中に存在しなかった物質が侵入したり、もともと体の構成成分と似ていてもその構造の違いが明確な場合には、その排除のためのシステムが作動する。

この生体異物に対する防御反応を総称して免疫反応と呼ばれているが、アレルギーという反応はもともと免疫反応そのものであるが、アレルギーは「過度に」、あるいは「不適切に」進行した免疫反応と理解できる。

3. 免疫反応の本質=自己と非自己の識別

そもそも免疫反応は他の生体反応と異なった特徴を有している。感染性微生物が体に侵入した場合を考えると、外敵である感染性微生物も当然生物であるため、これらが生体物質でできているのは、私たちヒト科の生物と共通である。したがって、微生物が体内に侵入するという具体的な言葉で表現すると、「彼ら微生物の体を作っている生体物質と微生物の生命システムが体内に入ってくる」ということになるわけである。免疫反応とは「微生物を構成する生体物質のように、本来人間(個体)がもっていない物質が体に入ってきたとき、これを排除しようとする反応」である。アレルギー反応の相手も外来の生体物質や環境物質である。我々の体も生体物質でできているが、自分自身の生体物質を排除してしまうと不都合なため、自己の生体物質に対しては、免疫反応は起こらないように仕組みられている。このことはヒトと微生物の関係にとどまらない。ヒトの個体同士にもあてはまる。ヒト個体の中に存在しない非自己の物質を異物と呼ぶが、全く構造の異なる成分も、構造は異なっているが明確な構造の違いが1つでも存在す

れば、免疫系はそれをヒトの成分ではあるが、同種の異物(同種抗原、alloantigen)として識別する。その結果、ヒトはヒトでも、他人はもちろん、親や兄弟の違いも同様に厳密に見分けることができる。これが免疫システムの不可思議ながら、最も重要な機能である。生体にとって、自己の物質と非自己の物質(異物)を区別する「免疫系」は、神経系や内分泌系とは役割は異なるが生存に必須な仕組みなのである。その重要性は、エイズという免疫系の働きの破綻を原因とする後天性免疫不全に罹ると生存できないことから分かる。非自己物質を自己物質と区別し、これを異物と認識して排除するための反応が免疫反応なのである¹⁾。

アレルギーを、免疫反応が「過度に」、あるいは「不適切に」進行した反応と表現したが、さらに、標的を明らかにして表現すると、「自己あるいは非自己に対する過度で不適切な反応」ということになる。標的抗原が自己抗原である場合、自己への反応それ自体が不適切であるのは自明であるため、自己免疫病の病態の多くがアレルギー反応として位置づけられている。よって反応の内容を知ることが、アレルギーの制御や治療に重要であることは言うまでもない。

4. アレルギー反応の特徴=自己あるいは非自己に対する過度で不適切な免疫反応

自己・非自己を厳密に識別する免疫反応は、大別して体液性免疫や細胞性免疫といわれる2種類の反応に分類できる。体液性免疫は、抗体がその抗体のできる原因を作った抗原と結合することにより異物排除に導く反応であり、異物を処理する反応に細胞が直接関与するのが細胞性免疫である。例えば、ウイルスに感染した細胞を排除する場合には、感染細胞の表面にあるウイルス蛋白質を感染細胞の組織適合性抗原とともに認識することができるT細胞が、感染細胞に直接反応して標的細胞を傷害する。この体液性免疫や細胞性免疫が自己あるいは非自己物質に対して過度あるいは不適切に進行した反応がアレルギーである。

体液性免疫や細胞性免疫は、厳密に言えば多様な反応様式から成り立っている。したがって、「自己あるいは非自己に対する、過度で不適切な免疫反応」であるアレルギー反応も必然的に多様な様式を呈することにな

るが、アレルギー反応の結果起こる炎症や組織障害の様式に着目して分類すると4つのタイプに分類できる。それは、クームスとゲル(Coombs & Gell)の分類と呼ばれるものである(図2)^{2), 3)}。

5. 先天的に遅延型(IV)アレルギー反応を有するトランスジェニックマウスの創製⁴⁾

我々は、卵白アルブミンのアミノ酸配列(OVA323-339=ISQAVHAAHAEINEAGR)をマウスクラスII組織適合性抗原複合体をI-A^dとともに認識するIL-2依存性T細胞クローン7-3-7からpoly(A)⁺mRNAを抽出精製し、λg t10cDNAライブラリーを作製した。そのライブラリーからT細胞抗原レセプターβ鎖遺伝子(TCR-β)

とT細胞抗原レセプターα鎖遺伝子(TCR-α)のcDNAクローンを単離した。それぞれの配列を決定し、V領域の発現遺伝子、Vβ5.5-Dβ1-Jβ2.2、VaJa遺伝子、Jβ2ゲノム遺伝子をプローブとして、発現型に遺伝子再構成したTCRゲノム遺伝子を単離した。T細胞抗原レセプター遺伝子の再構成パターンは、図3に示した。

発現型ゲノム遺伝子DNAを3-7-T細胞ゲノムDNAライブラリーから単離し、図4に示した発現型TCRβゲノム遺伝子と発現型TCRαゲノム遺伝子の33.8kbと22.1kbのCosmidコンストラクトを作製し、(BALB/cXDBA)F1受精卵にマイクロインジェクションし、トランスジェニックマウスを作製した。トランスジェニックマウスは、BALB/cマウスと退交配(バッククロス)を繰り返し、BALB/cをバックグラウンドとするトランスジェニックマウスラインを確立した。

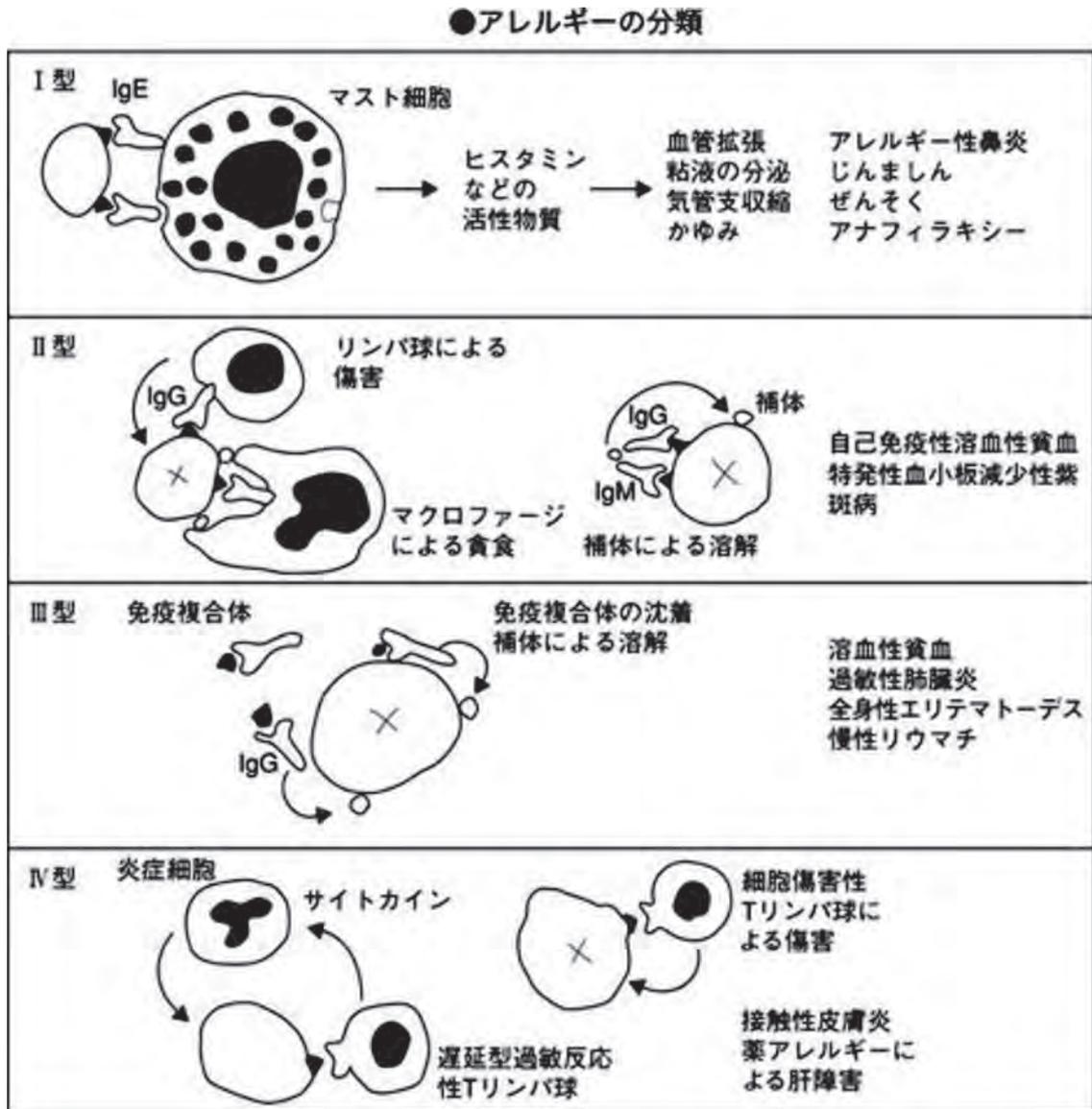


図2 Coombs & Gellの古典的アレルギーの分類

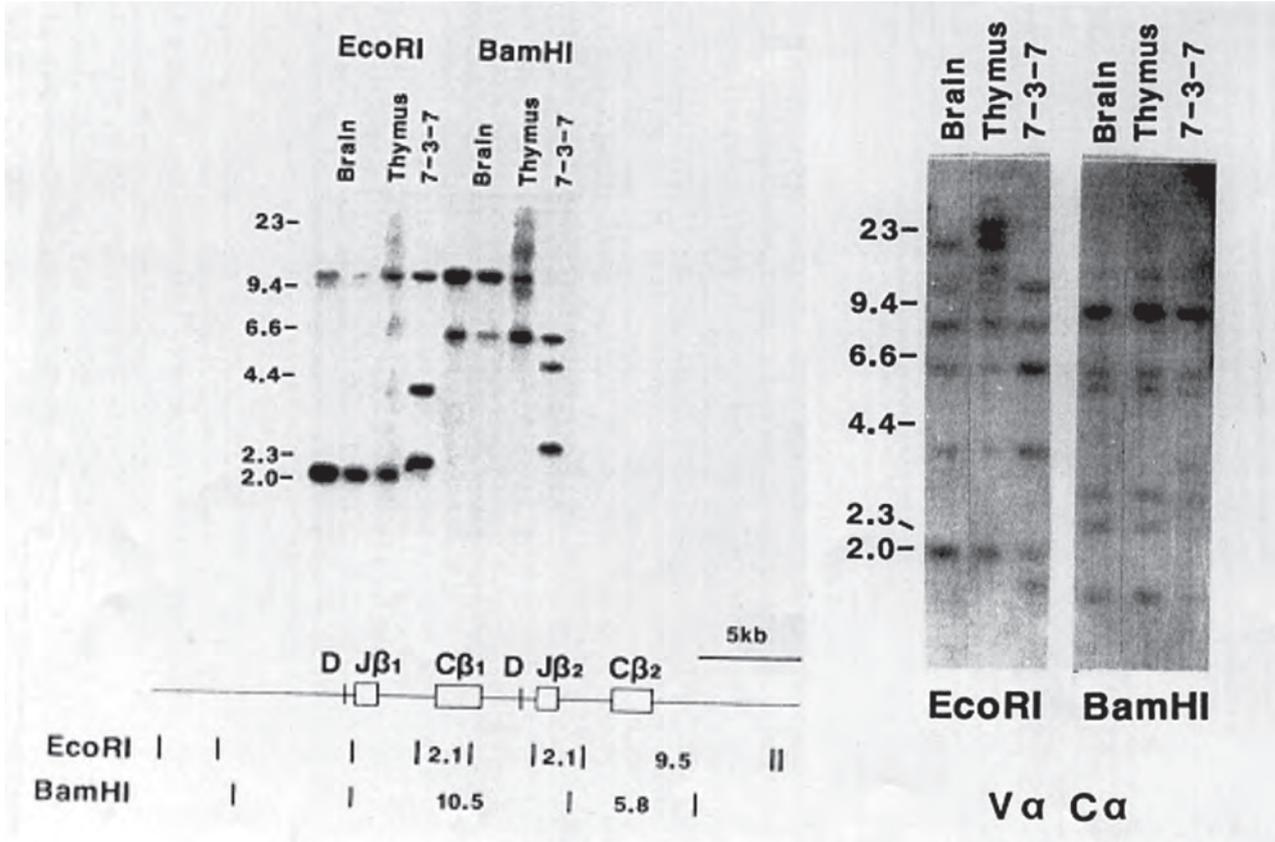


図3 T細胞クローン3-7-3のT細胞抗原レセプター遺伝子再構成パターン
β鎖遺伝子は、対立遺伝子座両方が遺伝子再構成していたが、Vβ15-Dβ1-Jβ2.2の再構成をしている対立遺伝子座が発現型で、他方のVβ5.2-Dβ2-Jβ2.4は非発現型の遺伝子再構成をしていた。Va遺伝子に関しては、遺伝子再構成ゲノム遺伝子フラグメントをそれぞれクローニングし、発現遺伝子再構成地図を作製した。

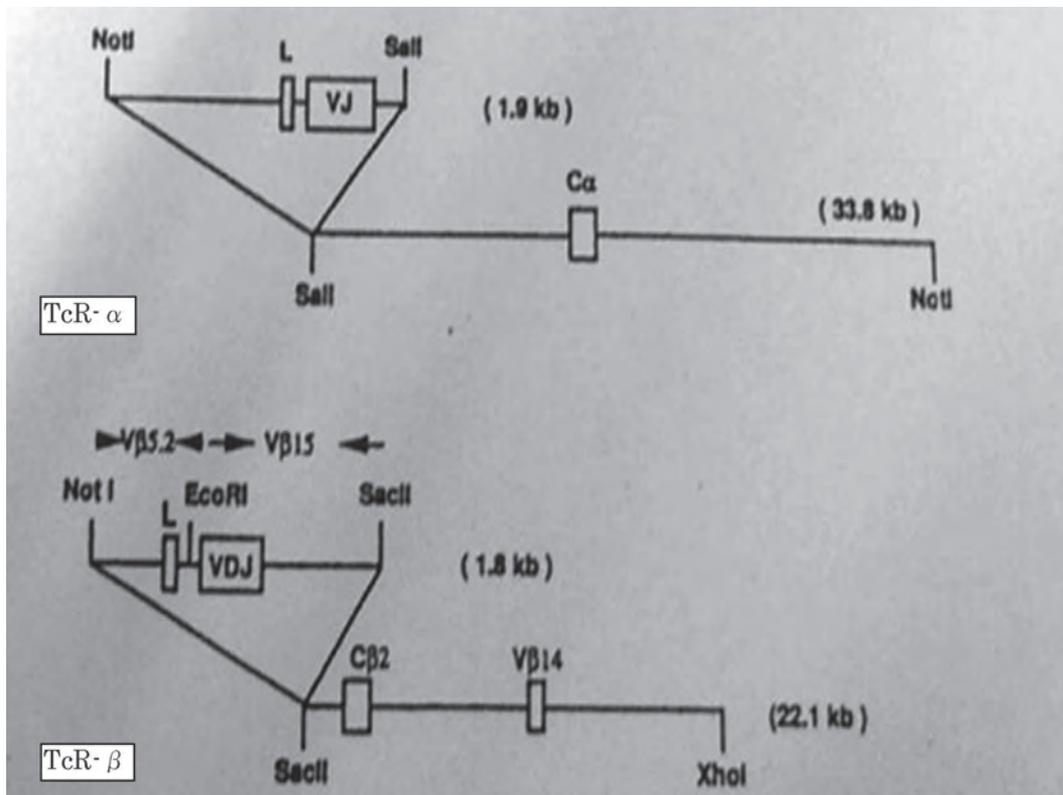


図4 トランスジーン構築
発現型ゲノム遺伝子 DNA を 3-7-T 細胞ゲノム DNA ライブラリーから単離し、図4に示した発現型 TCRβ ゲノム遺伝子と発現型 TCRα ゲノム遺伝子の 33.8kb と 22.1kb の Cosmid コンストラクトを作製した。

トランスジェニックマウスDNAの挿入スクリーニングとフローサイトメトリーによるT細胞表面マーカースクリーニングにより、TCRトランスジーンを発現するCD4陽性T細胞だけが胸腺内選択分化成熟したTCR遺伝子トランスジェニックマウスを確立できた。図5に代表的な系統のリンパ節CD3陽性T細胞のフローサイトメトリーパターンを示した。ほとんどの成熟T細胞がトランスジーンを発現しており、遺伝子再構成装置を欠くRAG2ノックアウトマウスをバックグラウンド遺伝子とした交配ラインでも同様の結果が得られた。

このTCRトランスジェニックマウスの下肢フットパッドで遅延型アレルギー反応試験(図6参照)を行うと、驚いたことに、TCRトランスジェニックマウス自身は、一度も卵白アルブミンに暴露されたことはないにもかかわらず、

強い遅延型アレルギー反応を示した。このことは、未感作のCD4陽性T細胞、つまり、ナイーブヘルパーT細胞が1次細胞免疫応答の過程で遅延型アレルギー反応(DTH:Delayed Type Hypersensitivity)を惹起できることが明らかとなった(図7)。特殊なサイトカインを産生する特殊なT細胞がDTHの惹起効果細胞であるという推定は誤りであることが判明した。

THの過程で産生される炎症性サイトカインをRT-PCRとウェスタンブロットにより解析すると、IL-2、IL-3、Interferon- γ (IFN γ)、GMCSF、MIP-1 α 、MIP-1 β などの産生は検出されたが、IL-4、IL-5の産生は誘導されなかった。ナイーブT細胞は、炎症性サイトカインやケモカインを産生し、DTHを直接誘導できることが初めて証明された。

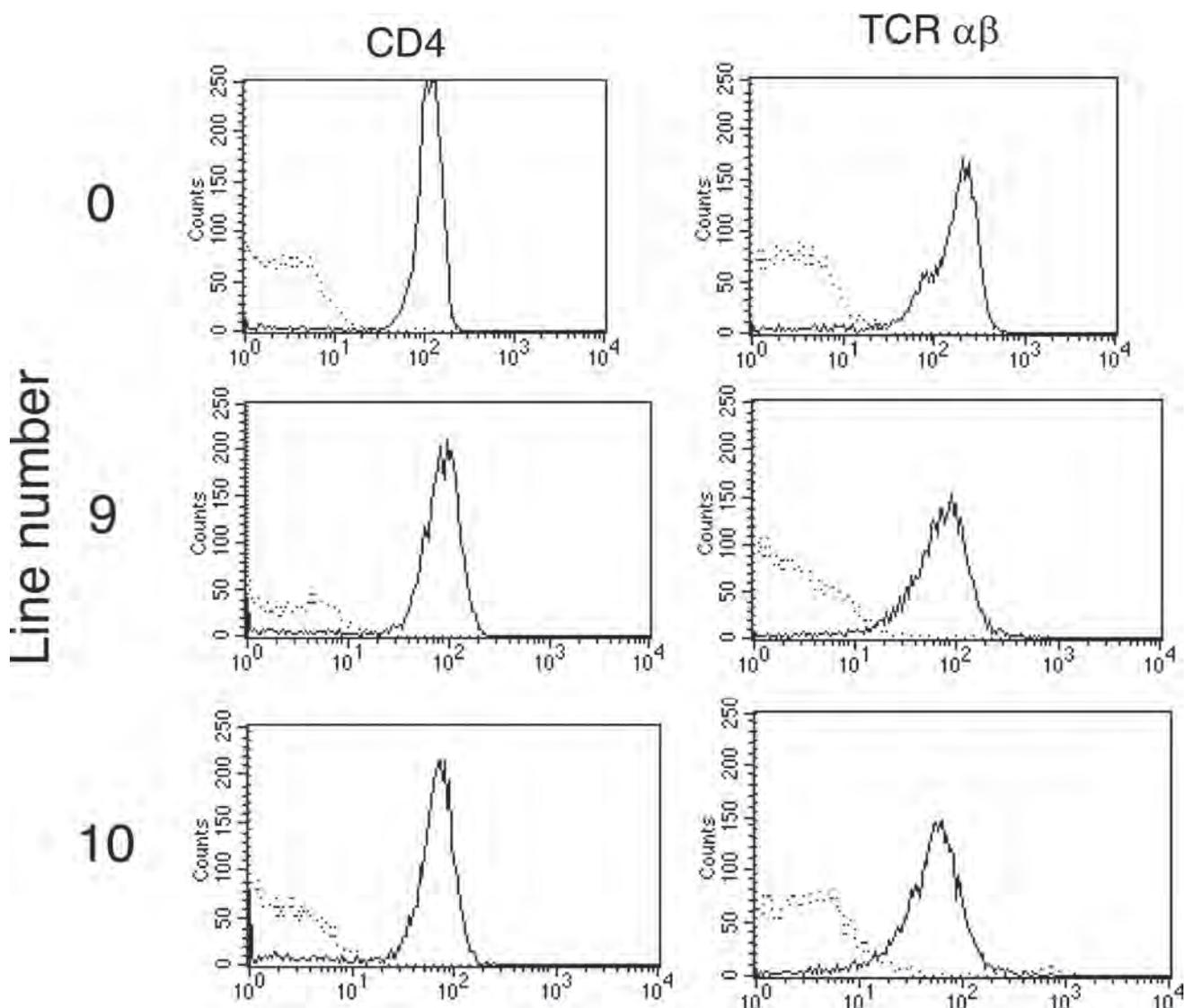


図5 腸間リンパ節CD3陽性Tリンパ球のTCRトランスジェニックマウスにおけるフローサイトメトリーパターン。成熟T細胞ほとんどがTCRトランスジーンを発現し、CD4陽性細胞として成熟しており、遺伝子再構成装置を欠くRAG2ノックアウトマウスをバックグラウンド遺伝子とした交配ラインでも同様であった。

6. TCRトランスジェニックマウスを用いた即時型アレルギーの解析⁵⁾⁻⁹⁾

図2に示した4つの型の非自己に対するアレルギーの中で最も症例が多く重要なのはI型アレルギー(気管支喘息、花粉症、枯草熱、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、蕁麻疹など)である。卵白アルブミンに

特異性を有するTCRのトランスジェニックマウスのCD4陽性T細胞は、I型のアレルギー反応の惹起にどのような関係性を持つのだろうか。

I型アレルギーを起こす卵白アルブミン特異的IgE抗体の産生を、卵白アルブミンの経口投与で試みると、我々のTCRトランスジェニックマウスでは、図8に示した抗体産生パターンを示した。

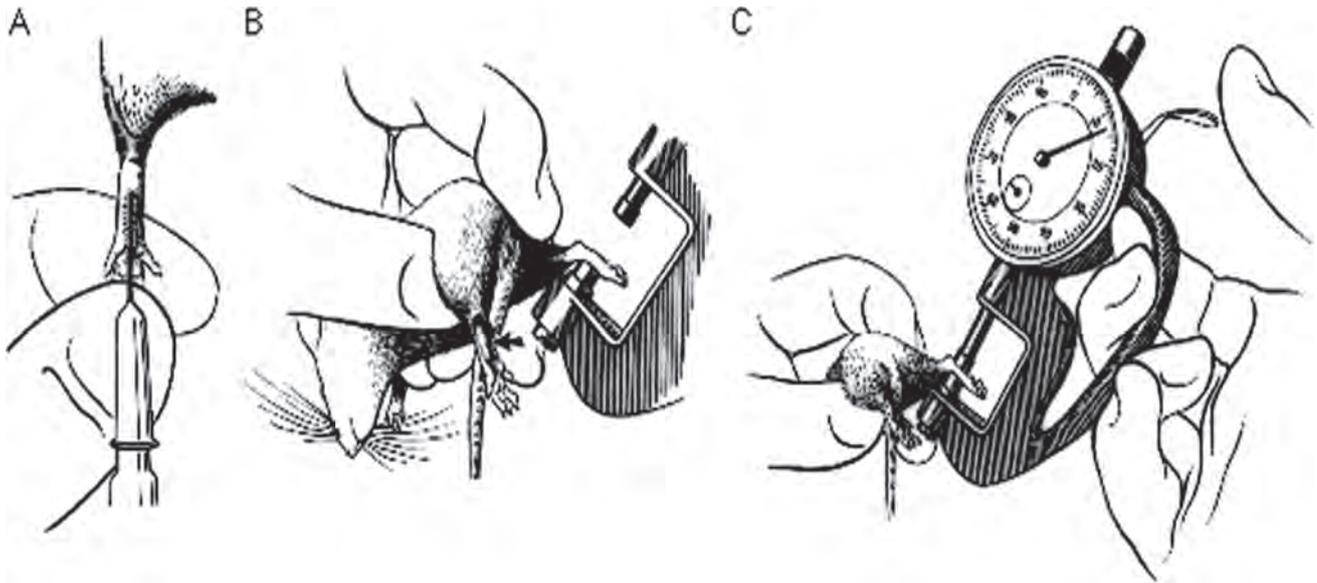


図6 遅延型アレルギー反応試験
マウス下肢フットパッドに一定量の抗原を注入し、48時間後にノギスで注入部フットパッドの腫脹をノギスで測定する。

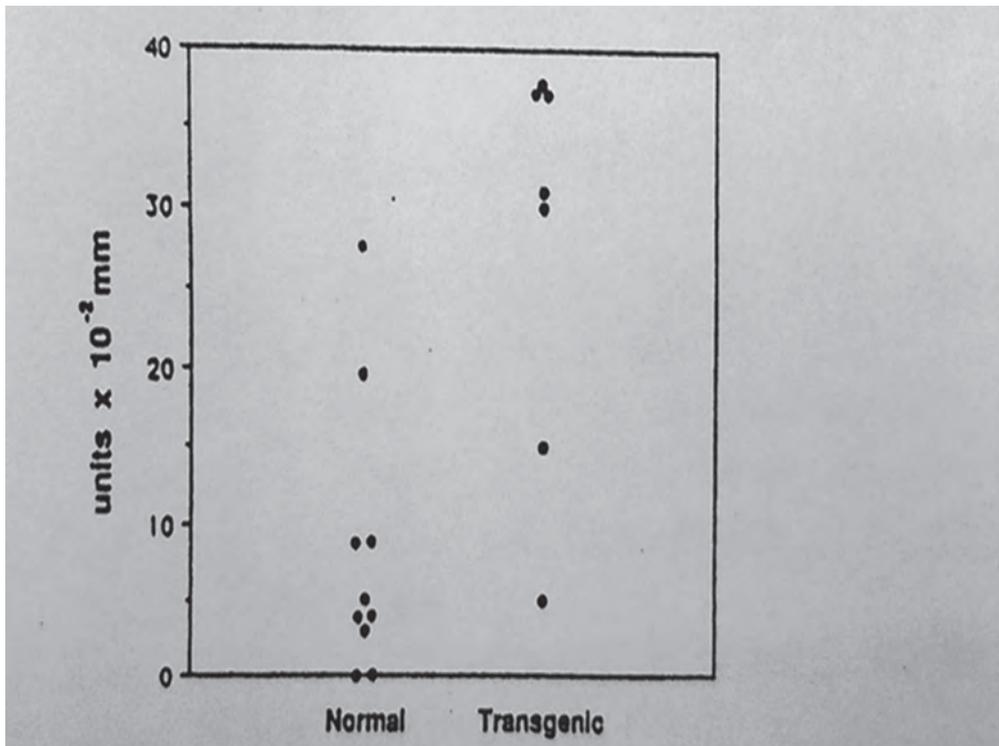


図7 ナイブT細胞によって惹起される遅延型アレルギー反応(DTH)
正常マウスは、フットパッドに卵白アルブミンを注入しても、DTH反応は強く惹起されない(左)が、TCRトランスジェニックマウスでは、ばらつきこそあれ、強いDTHが誘導される。

ヒトI型アレルギーでは、気管支喘息、花粉症、枯草熱、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、蕁麻疹などが誘導されるが、このトランスジェニックマウスを用いて全身性のアナフィラキシーショックが誘導されるか否かを検討した。図9に示されるように、経口抗原投与による卵白アルブミン特異的IgE抗体産生量とアナフィラキシーショックの重篤度は正の相関を持つことが判明した。

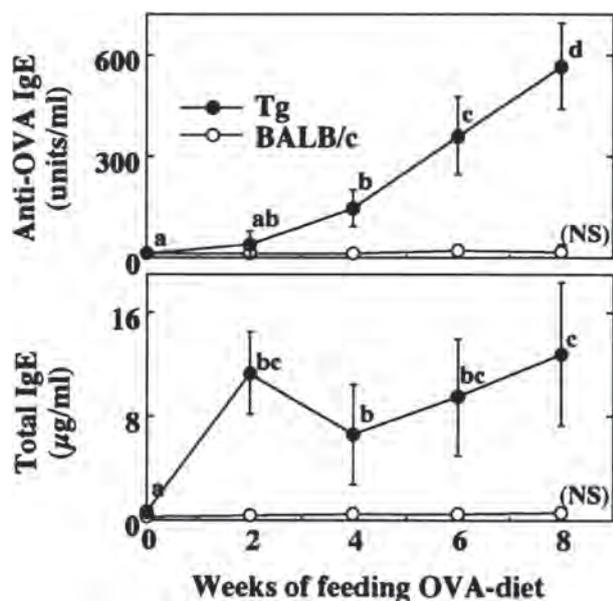


図8 卵白アルブミン(OVA)特異的IgE抗体の経口投与による誘導
OVAを20%含む固形飼料を餌に与え、2週おきに血中IgE抗体価を酵素抗体法で測定した。アラムとともに腹腔過免疫したマウス血清を1000unitとした相対unitで抗体価を示したトランスジェニックマウスで有意にOVA特異抗体の産生が誘導された。

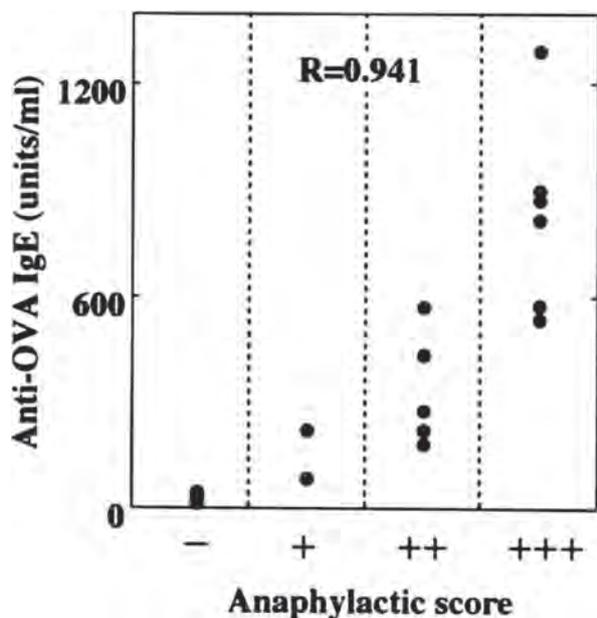


図9 血中卵白アルブミン特異的IgE抗体の産生量とアナフィラキシースコアの相関
1mg/0.1mlの卵白アルブミンを尾静脈から注入後、30分間観察した。
-:無反応、+:動けるが動作が緩慢、++:動けず、うずくまる、+++ :昏倒し痙攣する。

7. おわりに

我々のTCRトランスジェニックを用いた研究により、I型アレルギー(即時型アレルギー)とIV型アレルギー(遅延型アレルギー)は、アレルギー反応として複合的に惹起されることが推定された。最近、アレルギーの反応連鎖が、アレルギー症例の多くで報告されているようになってきた¹⁰⁾が、我々のTCRトランスジェニックマウスを用いた研究が先駆けになっていたら幸いである。

次回は、抗原の侵入量と免疫応答の関係、ワクチンの投与量は何によって規定されるのかといった、免疫学の基本的な問題をTCRトランスジェニックマウスで解析した結果を紹介したい。

参考文献

- 1) 熊谷善博. 蛋白質核酸酵素. 1986. 31. 813-830.
- 2) Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pober, J.S. Cellular and Molecular Immunology. 2nd ed., W.B. Saunders, 1994, 457p.
- 3) 富岡玖雄, 羅智晴 編著. マスト細胞とアレルギー. 医科学出版社, 1993, 224p.
- 4) Sato, T.; Sasahara, T.; Nakamura, Y.; Osaki, T.; Hasegawa, T.; Tadakuma, T.; Arata, Y.; Kumagai, Y.; Katsuki, H.; Habu, S. Eur. J. Immunol. 24, 1994, 1512-1516.
- 5) Shida, K.; Makino, K.; Morishita, A.; Takamizawa, K.; Hachimura, S.; Ametani, A.; Sato, T.; Kumagai, Y.; Habu, S.; Kaminogawa, S. Int. Archive. Allergy and Immunol. 1998, 115, 278-287.
- 6) Ise, W.; Totsuka, M.; Takato, R.; Hachimura, S.; Sato, T.; Ametani, A.; Kumagai, Y.; Habu, S.; Kaminogawa, S. FEBS Letters. 2000, 465, 28-33.
- 7) Shida, K.; Hachimura, S.; Ametani, A.; Ishimori, M.; Ling, M.; Hashiguchi, M.; Ueda, Y.; Sato, T.; Kumagai, Y.; Takamizawa, K.; Habu, S.; Kaminogawa, S. J Allergy Clin. Immunol. 2000, 105, 788-795.
- 8) Ise, W.; Totsuka, M.; Sogawa, Y.; Ametani, A.; Hachimura, S.; Sato, T.; Kumagai, Y.; Habu, S.; Kaminogawa, S. J. Immunol. 2002, 168, 3242-3250.
- 9) Goto, M.; Hachimura, S.; Ametani, A.; Sato, T.; Kumagai, Y.; Habu, S.; Ishikawa, H.; Kaminogawa, S. Biosci Biotechnol Biochem. 2003, 67, 1223-1229.
- 10) Murphy, K. "IgE-mediated allergic reaction have a rapid onset and can lead to chronic responses." Janeway's Immunobiology. 8th ed., Garland Science Press, 2011, 587-589.
- 11) 熊谷善博. Dear Pharmasist. 2013, 16, p3.