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

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

— Mechanisms of immunoregulation 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　**熊谷　善博**
Yoshihiro Kumagai

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

1. はじめに

このシリーズで紹介する免疫工学とは、免疫系の機能分子、担当細胞、個体を遺伝子工学、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で免疫機構の解明を試みたり、疾病の治療アイデアを提供する学問を指している。今回は下記の4回のシリーズのうち、第2回目として、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について紹介する。

〈免疫工学による免疫システム分子機構の解析シリーズ〉

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[1)]

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抗体　―タンパク質工学によるワクチンの創製―

T細胞上のT細胞レセプター（TCR）分子が、共刺激分子の共役下で、抗原提示細胞上の主要組織適合性抗原複合体クラスIあるいはクラスⅡ分子と共に提示された抗原ペプチドと反応すると、多くのT細胞は活性化される。活性化シグナルにより惹起される応答は単純ではなく、活性化条件により、クローン拡大（clonal expansion）、クローン欠失（clonal deletion）、エフェクター細胞機能の獲得、メモリー細胞機能の獲得（厳密には、セントラルメモリー細胞とエフェクターメモリー細胞機能の獲得）などが観察される（図1）[2),3)]。

このT細胞活性化と個々のT細胞クローンの運命は、暴露される抗原量によって大きく異なることが知られている[3)]。

我々は、シリーズⅠで紹介した、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T細胞レセプター$\alpha\beta$鎖トランスジェニックマウス（OVA23-3マウス）を用いて、ナイーブCD4陽性T細胞が抗原の暴露条件によって、活性化プロフィールの質的量的な違いについて精査した[4)-6)]。解析内容は、活性化に伴う、早期活性化細胞表面分子の動的変化、サイトカイン産生、転写因子の発現やB細胞応答への影響等について、抗原暴露条件による差異を定量的に検討したものである。

2. ナイーブCD4陽性T細胞の初期活性化マーカー発現への暴露抗原濃度の影響

OVA23-3マウスのナイーブCD4陽性T細胞は、活性化前は、$CD62L^{high}$ $CD4^+$の表現型を示す。しかし、脾臓抗原提示細胞の存在下で、異なった抗原濃度で12時間刺激を与え、初期活性化マーカーであるCD69、CD25の発現量、ならびにTCRのダウンレギュレイションを比較した結果、初期活性化マーカー発現は抗原投与量とともに増大し500nMでプラトーに達し、一方TCR発現は50nM以上で急速に低下することが判明した（図2）。

3. 投与抗原量により、ナイーブCD4陽性T細胞の増殖とサイトカイン産生の抗原濃度の影響

脾臓抗原提示細胞の存在下で、異なった抗原濃度で12時間刺激を与え、細胞増殖とIL-4産生、ならびに、IFN-γの産生量を比較した（図3）。その結果、細胞増殖は抗原濃度依存的に上昇し、500nM前後でプラトーに達した。IL-4産生は、抗原濃度依存性が高く、50nMが至適濃度で、高濃度及び低濃度では産生が誘導されないか、減少した。IFN-γは、50nM以上の刺激でしか産生は誘導されず、高濃度の抗原ペプチドで産生が上昇した（図3）。この結果は、細胞性免疫を増強する傾向を持つTh1（IFN-γ産生）と抗体産生やクラススッチングを増強するTh2（IL-4生産）のバランスが、抗原暴露濃度に依存して形成されることを意味している。

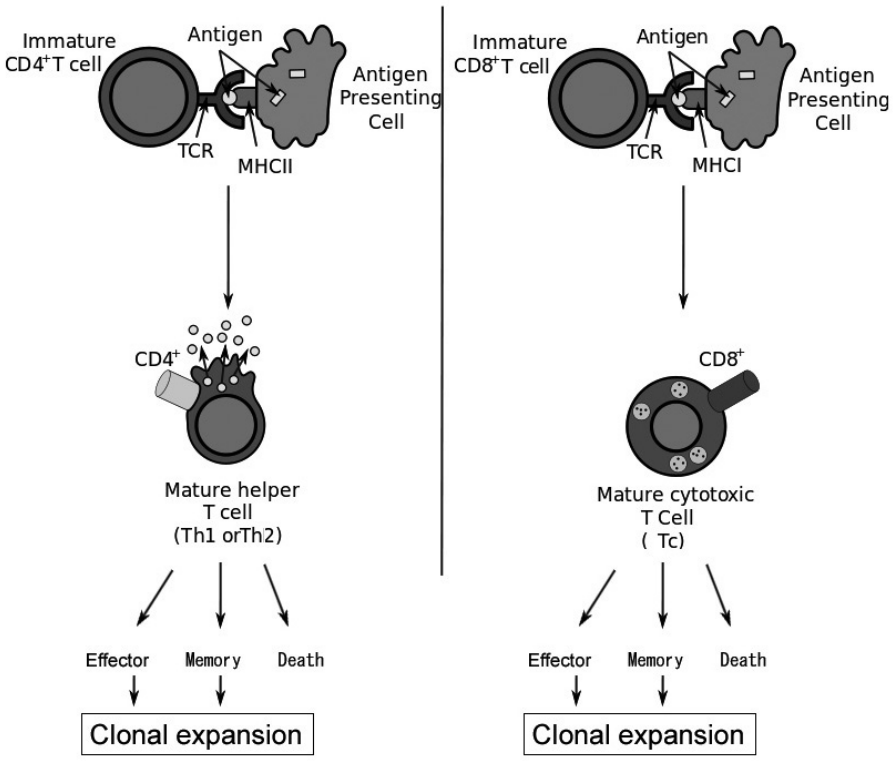


図1 T細胞と抗原提示細胞（Antigen Presenting cell）との相互作用によるT細胞活性化とT細胞クローンの運命
T細胞上のT細胞レセプター分子（TCR）が、共刺激分子の共役下で、抗原提示細胞上の主要組織適合性抗原複合体クラスIあるいはクラスII分子と共に提示された抗原ペプチドと反応すると、T細胞は活性化され、活性化条件により、クローン拡大（clonal expansion）、クローン欠失（clonal deletion=Death）、エフェクター細胞機能の獲得、メモリー細胞機能の獲得（厳密には、セントラルメモリー細胞とエフェクターメモリー細胞機能の獲得）に至る。

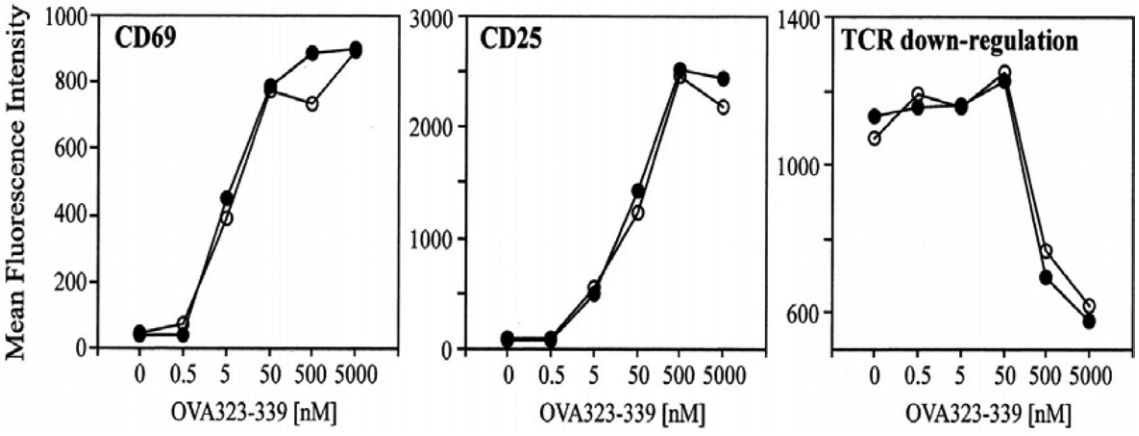


図2 ナイーブCD4陽性T細胞の初期活性化マーカー発現への暴露抗原濃度の影響
ナイーブCD4陽性T細胞を様々な濃度のOVA323-339（=ISQAVHAAHAEINEAGR）ペプチドと脾臓抗原提示細胞の存在下で、12時間刺激を与えた。白丸（○）はOVA23-3マウスで、黒丸（●）はOVA23-3マウスとRAG2–/-マウスの交配マウスF1マウスのデータを示す。両マウスともに、初期活性化マーカー（CD69、CD25）発現は抗原投与量とともに増大し500nMでプラトーに達することが判明し、一方TCR発現は50nM以上で急速に低下した。

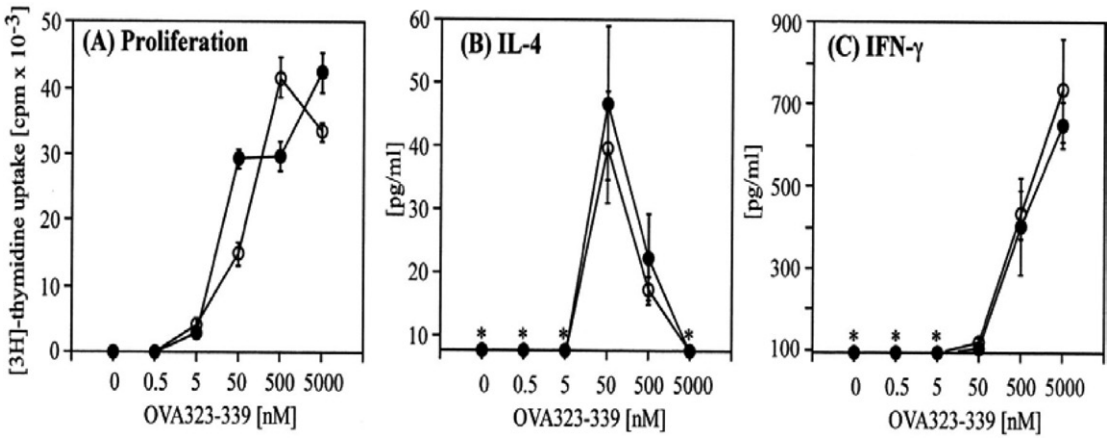


図3 抗原濃度に依存したナイーブCD4陽性T細胞の増殖とサイトカイン産生
ナイーブCD4陽性T細胞に、様々な濃度のOVA323-339(=ISQAVHAAHAEINEAGR)ペプチドと脾臓抗原提示細胞の存在下で刺激を与えた。白丸(○)はOVA23-3マウスで黒丸(●)はOVA23-3マウスとRAG2--/-マウスの交配マウスF1マウスのデータを示す。ナイーブCD4陽性T細胞の増殖とサイトカインの産生は抗原濃度に依存する。(A)は刺激後48－72時間の^{3}Hの取り込み、(B)は72時間後のIL-4産生、ならびに、(C)は72時間後のIFN-γの産生を示す。

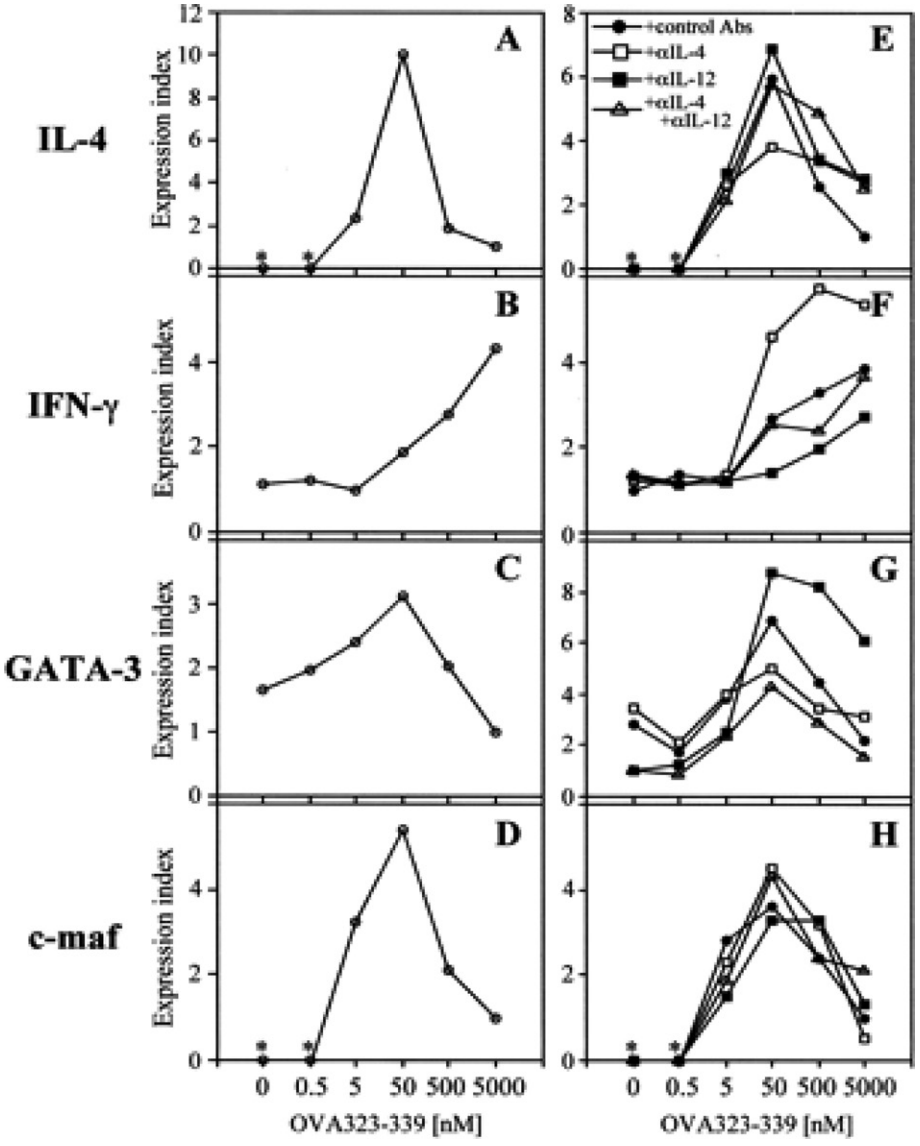


図4 抗原刺激後のサイトカインmRNAや転写因子mRNAの誘導
ナイーブCD4陽性T細胞を様々な濃度のOVA323-339(=ISQAVHAAHAEINEAGR)ペプチドと脾臓抗原提示細胞の存在下で、24時間刺激を与えた。全RNAを抽出後、それぞれのサイトカインあるいは逆転写酵素で作成した転写因子のcDNAを定量(A、B、E、F)あるいは定量的リアルタイムPCR(C、D、G、H)で解析した。E、F、G、Hは、それぞれの発現パターンへのIL-4とIL-12の影響を調べるため、抗IL-4(αIL-4)あるは抗IL-12(αIL-12)抗体存在下でのプロフィールを示している。

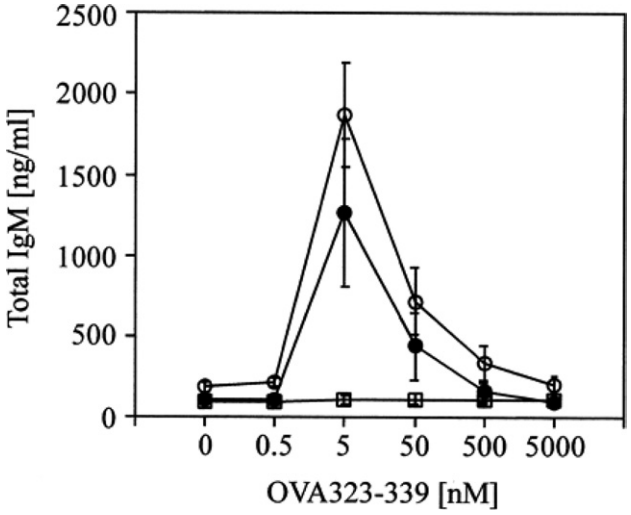


図5 ナイーブCD4陽性T細胞活性化に伴うB細胞のIgM産生形質細胞誘導への影響
ナイーブCD4陽性T細胞を様々な濃度のOVA323-339(=ISQAVHAAHAEINEAGR)ペプチドと脾臓抗原提示細胞の存在下で、刺激を与えた。白丸(○)はOVA23-3マウスで黒丸(●)はOVA23-3マウスとRAG2--/-マウスの交配マウスF1マウスのデータを示す。培養上清を7日後に採取し、総IgM産生量を酵素抗体法により測定した。四角(□)はT細胞非存在下のIgM産生を示す。

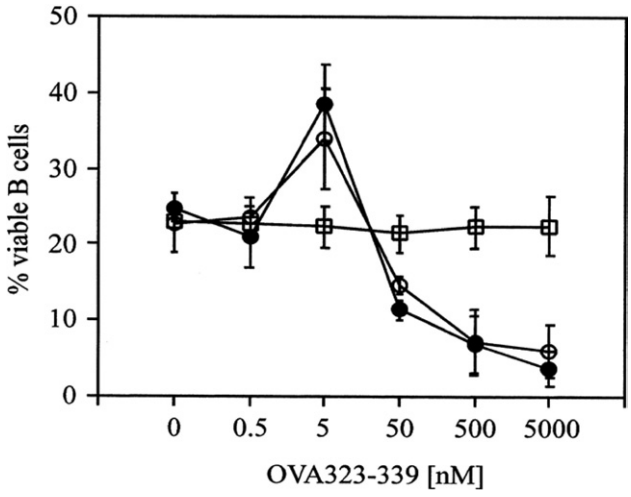


図6 様々な抗原濃度で刺激をうけたナイーブCD4陽性T細胞が、B細胞の細胞死に与える影響
白丸(○)はOVA23-3マウスで黒丸(●)はOVA23-3マウスとRAG2--/-マウスの交配マウスF1マウスのデータを示す。96時間後にB220陽性B細胞を採取し、抗アネキシンV(annnexin V)でアポトーシス誘導細胞の有無を測定した。四角(□)はT細胞非存在下での生細胞率を示す。

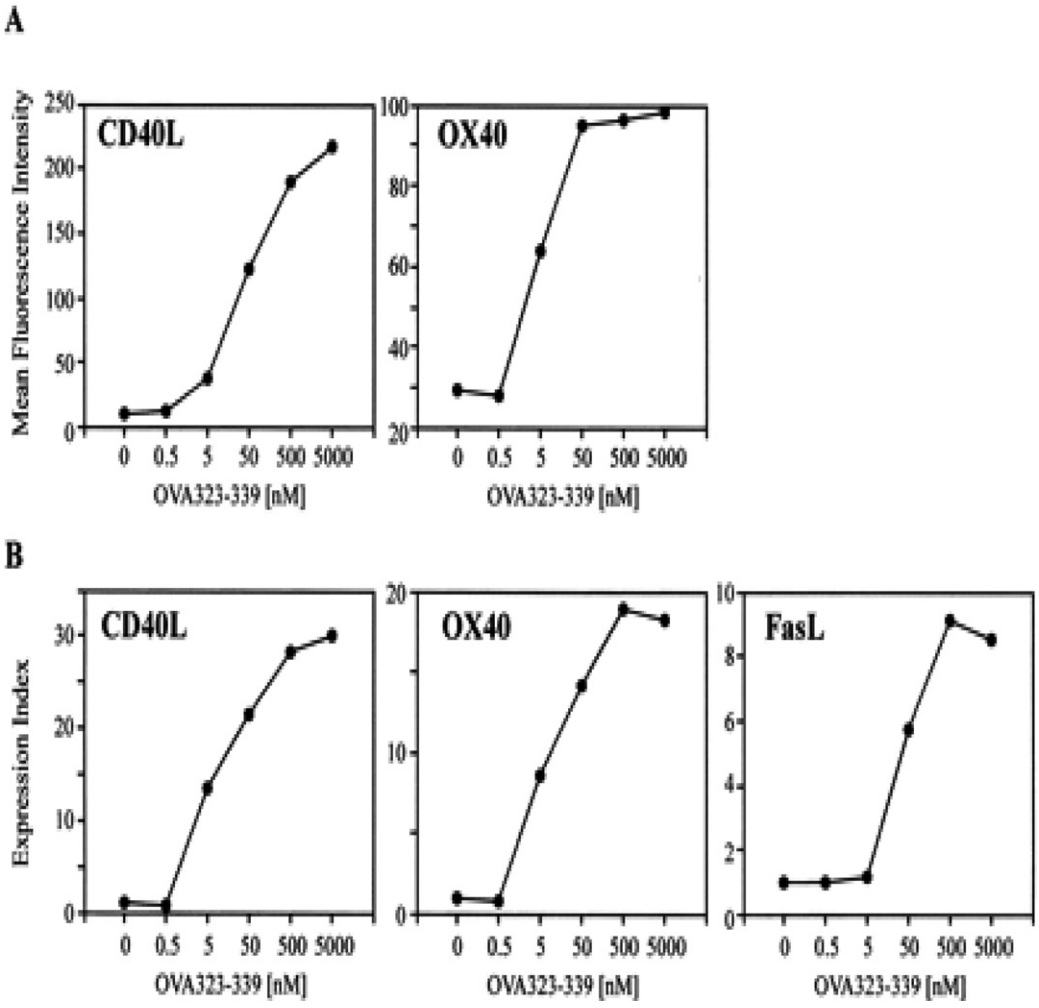


図7 様々な抗原濃度で刺激をうけたナイーブCD4陽性T細胞のおける、FasL、CD40L、ならびに、OX40の発現
ナイーブCD4陽性T細胞に、様々な濃度のOVA323-339(=ISQAVHAAHAEINEAGR)ペプチドと脾臓抗原提示細胞の存在下で、刺激を与えた。CD40Lは24時間後、OX40は48時間後にフローサイトメトリーで解析した(A)。また、細胞を12時間後に回収してCD40LとOX40のmRNAの測定、72時間後にFasLのmRNAを定量的リアルタイムPCRで測定した(B)。

抗原刺激の初期過程での違いを解析するため、OVA 323-339（=ISQAVHAAHAEINEAGR）ペプチド刺激後24時間でのサイトカインmRNAや転写因子mRNAを定量した（図4）。GATA-3やc-mafのようなTh2-特異的転写因子はIL-4産生に伴い転写誘導されることが判明した。IFN-γは濃度依存的に産生が誘導された。サイトカインあるいは転写因子の発現パターンへのIL-4とIL-12の影響を調べるため、抗IL-4（αIL-4）あるは抗IL-12（αIL-12）抗体存在下でのプロフィールを調べた（図4のE、F、G、H）。IFN-γの転写誘導は抗IL-4存在下で上昇し、GATA-3の転写誘導は、抗IL-4存在下で減少することが判明した。それと対照的に、抗IL-12存在下では、IFN-γの転写誘導は減少し、GATA-3の転写誘導は、抗IL-4存在下で上昇した。興味深いことに、c-mafは抗IL-4と抗IL-12の大きな影響を受けなかった。

4. B細胞の抗体産生形質細胞への分化誘導とアポトーシス（apoptosis）の誘導に抗原刺激を受けたナイーブCD4陽性T細胞が与える影響

様々な抗原濃度で刺激をうけたナイーブCD4陽性T細胞は、B細胞活性化に影響を与える。抗体産生形質細胞誘導には、至適抗原濃度が存在し（図5）、また、50nM以上の高濃度のOVA323-339（=ISQAVHAAHAEINEAGR）ペプチド存在下では、アポトーシスが強く誘導され、生細胞が減少していることが分かる（図6）。

5. アポトーシス誘導に伴うFasリガンド（FasL）の発現には、CD40LやOX40[9),10)]より高濃度の抗原ペプチドを要する

アポトーシス誘導に伴うFasリガンド（FasL）の発現には、CD40LやOX40[9),10)]より高濃度の抗原ペプチドを要する（図7）。また、抗体による阻害実験から、IL-4、CD40L、ならびに、OX40を介したシグナルが、抗原刺激をうけたナイーブCD4陽性T細胞が抗体産生におけるヘルパーT細胞機能を発現するために必要であることが推定された（図8）。

6. まとめ

T細胞上のT細胞レセプター分子が、共刺激分子の共役下で、抗原提示細胞上の主要組織適合性抗原複合体クラスIあるいはクラスII分子と共に提示された抗原ペプチドと反応すると、T細胞は活性化されるが、暴露される抗原濃度により、各T細胞クローンの活性化の内容に違いが生じることを証明できた。サイトカイン産生やB細胞の抗体産生細胞への分化への影響の中身が異なることが証明できた。図9にまとめたが、ナイーブ

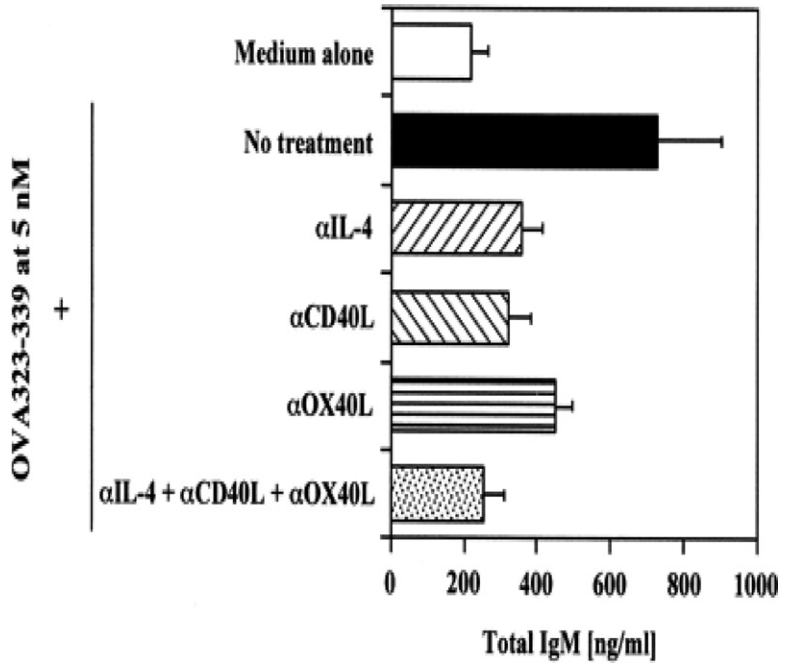


図8 抗IL-4、抗CD40L、ならびに、抗OX40のナイーブCD4陽性T細胞によるB細胞へのIgM産生形質細胞誘導への影響
ナイーブCD4陽性T細胞に、様々な濃度のOVA323-339（=ISQAVHAAHAEINEAGR）ペプチドと脾臓抗原提示細胞の存在下で、刺激を与えた。それぞれの単クローン抗体を5μg/mlの濃度で加え、IgM産生濃度を7日後に測定した。

CD4陽性T細胞初期活性化過程、サイトカイン産生、ヘルパー機能としてのT細胞―B細胞相互作用が、抗原への暴露条件（濃度）により応答が大きく異なることが判明した。様々な予防接種のワクチンの分子デザインと投与条件や方法を考案するための基礎情報の提供に貢献できるものと思われる。また、前回のシリーズⅠ[1)]で紹介した、免疫のパラダイム=自己非自己に対する免疫応答のバランスゲームも抗原濃度依存的に形成されることも推定され、疾病の制御にも重要な情報を提供していると思われる。

今回紹介した研究の生データは、大阪大学免疫学フロンティア研究センター 伊勢渉博士の貢献を主としたものであることを最後に付記する。

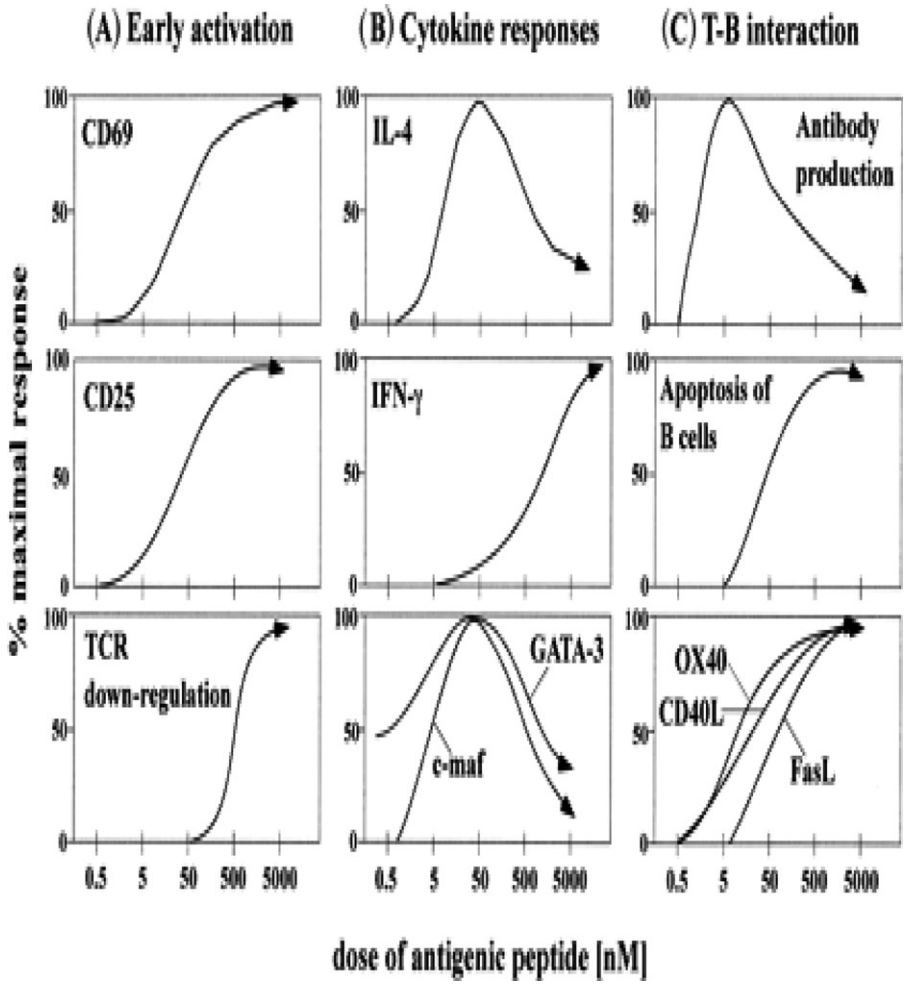


図9 ナイーブCD4陽性T細胞活性化の暴露抗原濃度依存性
初期活性化過程、サイトカイン産生、ヘルパー機能としてのT細胞ーB細胞相互作用に強い抗原濃度依存性が確認される。

参考文献

1）熊谷善博. THE CHEMICAL TIMES. 2014, 232, 8-14.

2）熊谷善博. 蛋白質核酸酵素. 1986, 31（9）, 813-830.

3）Smith-Garvin, J.E.; Koretzky, G.A.; Jordan, M.S. Annu. Rev. Immunol. 2009, 27, 591-619.

4）Sato, T.; Sasahara, T.; Nakamura, Y.; Osaki, T.; Hasegawa, T.; Tadakuma, T.; Arata, Y.; Kumagai, Y.; Katsuki, M.; Habu, S. Eur. J. Immunol. 1994, 24（7）, 1512-1516.

5）Ise, W.; Totsuka, M.; Takato, R.; Hachimura, S.; Sato, T.; Ametani, A.; Kumagai, Y.; Habu, S.; Kaminogawa, S. FEBS Letters. 2000, 465（1）, 28-33.

6）Ise, W.; Totsuka, M.; Sogawa, Y.; Ametani, A.; Hachimura, S.; Sato, T.; Kumagai, Y.; Habu, S.; Kaminogawa, S. J. Immunol. 2002, 168（7）, 3242-3250.

7）Ho, I.C.; Hodge, M.R.; Rooney, J.W.; Glimcher, L.H. Cell. 1996, 85（7）, 973-983.

8）Zheng, W.; Flavell, R.A. Cell. 1997, 89（4）, 587-596.

9）Stüber, E.; Neurath, M.; Calderhead, D.; Fell, H.P.; Strober, W. Immunity. 1995, 2（5）, 507-521.

10）Cleary, A.M.; Fortune, S.M.; Yellin, M.J. ; Chess, L.; Lederman, S. J. Immunol. 1995, 155（7）, 3329-3337.