

博士(医学) 加藤正仁

学位論文題名

NODマウス由来の promiscuous T細胞ハイブリドーマ

学位論文内容の要旨

緒 言

特異的免疫反応のシステムが動き出すには、T細胞がその受容体(TCR)を用い、抗原提示細胞(APC)上の主要組織適合抗原複合体(MHC)分子により提示される抗原を認識しなければならない。この現象を分子レベルで言い替えると、TCR、MHC分子、抗原由来のペプチド断片よりなる3分子複合体形成が、T細胞の反応開始には不可欠である、ということになる。T細胞は胸腺内で正負の選択を経て、自己MHC分子に結合した抗原ペプチドのみを認識し、反応するレパートリーを形成する。このように自己のMHC分子に結合した抗原ペプチドのみに対してT細胞が反応する現象を自己MHC拘束と呼ぶ。

ところが、自己のMHC分子以外の同種(アロ)MHC分子からも抗原提示を受け得るT細胞がいくつか報告されている。この現象を、MHC拘束に対してMHC degeneracyと呼ぶ。通常、単一T細胞クローンが degeneracyを示すMHC分子の種類は、せいぜい2から3種類であるが、本研究で解析したT細胞は、少なくとも5種の異なるMHC分子から抗原提示を受け得た。本研究では、この特異なT細胞クローンの抗原認識様式について詳細に検討を加えた。

材料と方法

NODマウスをハトチトクロームcの43番から58番目のアミノ酸からなる合成ペプチド p43-58のアナログ46R50E54Aにて免疫した。得られたリンパ節T細胞を、T細胞腫瘍BW1100と融合してT細胞ハイブリドーマ（NOEシリーズ）を作製した。APCとしては、種々のマウスの脾細胞、及び変異MHC遺伝子導入線維芽細胞を用いた。T細胞ハイブリドーマの反応は、IL-2の産生量で計測した。また、種々の抗体を用い、ハイブリドーマの表面に発現している機能分子をフローサイトメトリーにて解析した。さらに、monogamousなハイブリドーマとの競合実験を行い、TCRのペプチド-MHC分子複合体に対する親和性を間接的に測定した。

結果

p43-58の46、54番残基は、マウスのMHC分子の一つ、I-A分子と結合する部位（アグレトープ）であること、また50番残基はTCRに結合する部位（エピトープ）であることが判明している。p43-58の50番残基はアスパラギン酸（D）だが、今回この50番残基をグルタミン酸（E）に置換したペプチド群50Eシリーズ（46R50E54A, 50E54A, 46A50E54A）を用いてNODマウスを免疫し、I-A⁺分子と親和性の高いアグレトープモチーフを検索した。NODマウスはI-E分子欠損系なので、T細胞増殖反応は、I-A⁺とペプチドとの結合を直接反映すると考えられる。その結果、46番目をアルギニン（R）、54番目をアラニン（A）に置換したアナログペプチド46R50E54Aが、最も強くI-A⁺分子と結合することが判明した。50Eシリーズに対するT細胞の反応をクローンレベルで解析するため、ハイブリドーマNOEシリーズを樹立したが、この中に広いMHC degeneracyを示す

NOE33-1-2が同定された。しかし、NOE33-1-2の表面抗原の発現パターンには、他のハイブリドーマと特に異なる点は認められなかつた。

*promiscuous*なハイブリドーマNOE33-1-2は、NOD(I-A^{*7})、B10.D2(I-A^d, I-E^d)、B10.PL(I-A^b, I-E^b)、B10.S(I-A^b)、B10.SM(I-A^b, I-E^b)の脾細胞をAPCとした時、これらから抗原提示を受けた。各APC存在下において、NOE33-1-2の反応を惹起する合成ペプチドの刺激性の順位は、各マウスを50Eシリーズのペプチドにて免疫した場合に得られるリンパ節T細胞全体に対するアナログペプチドの刺激性の順位に一致した。つまりNOE33-1-2は、各MHC分子と抗原ペプチドとの結合性の順位と一致する反応性を示すことが判明した。また、各MHCクラスII分子に対する抗体を用いた抑制実験により、NOE33-1-2が主にI-A分子拘束性であることが明らかになった。I-E欠損系のNODマウスの脾細胞をAPCとしたI-A^{*7}拘束性の反応と、B10.D2マウスの脾細胞をAPCとしたI-A^d拘束性の反応では、NOE33-1-2の各ペプチドに対する反応性に差が認められた。I-A^{*7}とI-A^d分子の違いはβ鎖のみに認められる。

そこで、I-A^d分子のβ鎖のβシート部分をI-A^b分子の同部分と置換した、ミュータントMHC遺伝子導入線維芽細胞をAPCとして用いると、NOE33-1-2は用いた全てのペプチド抗原に対する反応性を失った。これに対して、他の*monogamous*なT細胞ハイブリドーマ(DE及びBDシリーズ)では、ミュータントMHC分子発現APCの存在下でも通常の反応性を示した。従って、NOE33-1-2の無反応性に対して、ミュータントMHC分子とペプチド抗原の結合不全の可能性は否定された。次に、NOE33-1-2のTCRとMHC+ペプチ

ド抗原との親和性を、間接的に検討した。NOE33-1-2またはDEシリーズのハイブリドーマ、ペプチド抗原、APCからなる培養系に、不活化したNOE33-1-2またはDEシリーズのハイブリドーマを加え、それぞれの反応の阻害実験を行った。その結果、NOE33-1-2のTCRのペプチド抗原-MHC分子複合体に対する親和性は、DEシリーズのTCRよりむしろ高いことが示唆され、*promiscuous*なTCRは、各MHC分子の一部の共通な立体構造を認識していると考えられた。

考 察

現在、著者の同定した非常に高度な*promiscuity*を示すT細胞の生理的意義については不明である。NODマウス以外では類似の細胞は発見されていないので、このようなT細胞はNODマウスに固有のものである可能性もある。NODマウスにおける糖尿病の発症には、複数の遺伝子が関与していることが判明しているが、いずれにせよ自己免疫による脾β細胞の破壊が直接の発症原因となっている場合には、異論のないところである。従って、NODマウスのみに認められる*promiscuous*なT細胞は、自己免疫疾患の病態に何らかの役割を果たしていると推定される。実際、I-A⁺分子のβ鎖由来のペプチドが、同系のNODマウスに対し*immunogenic*であることが報告されている。このような自己成分反応性T細胞が残存することから、NODマウスの*negative selection*には、何らかの欠陥があると考えられる。胸腺内の*negative selection*と*positive selection*は、胸腺上皮、胸腺マクロファージ、そして樹状細胞上に発現されているMHC分子によって影響されることが判明している。NODマウス固有のI-A⁺分子の存在下でのT細胞の選択過程（*negative*

selection、positive selection) に、他の MHC マウスでは認められないような何らかの異常が生じ、今回示したような幅広い degeneracy を示す T 細胞が、胸腺内で產生されたとも考えられる。そして、この I-A degeneracy が、自己蛋白由来ペプチドと I-A⁺複合体に対する交叉性に結びつき、結果として自己膜 β 細胞抗原反応性、そして自己免疫疾患発症へと帰結するのではないか、というシナリオを考えている。この点に関しては、今後のさらなる解析が必要と考えられる。

学位論文審査の要旨

主　查　教　授　小野江　和　則
副　查　教　授　上　出　利　光
副　查　教　授　柿　沼　光　明

学　位　論　文　題　名

NOD マウス由来の promiscuous T 細胞ハイブリドーマ

特異的免疫反応のシステムが動きだすには、T細胞がその受容体(TCR)を用い、抗原提示細胞(APC)上の主要組織適合抗原複合体(MHC)分子より提示される抗原を認識しなければならない。T細胞が自己MHC分子に結合した抗原ペプチドのみを認識し、反応する現象を自己MHC拘束と呼ぶ。一方自己のMHC分子以外の同種(アロ)MHC分子からも、抗原提示を受けるT細胞が知られている。この現象をMHC degeneracyと呼ぶ。本研究では、少なくとも5種の異なるMHC分子から抗原提示を受ける、promiscuous T細胞クローニングを樹立した。そして、この特異なT細胞クローニングの抗原認識様式について、詳細に検討を加えた。

ハトチトクロームcの43から58番残基よりなるp43-58の46、54番残基は、マウスのMHC分子の一つ、I-A分子と結合する部位(アグレトープ)であり、また50番残基はTCRに結合する部位(エピトープ)であることが判明している。今回、p43-58の50番残基をグルタミン酸(E)に置換したペプチド群50Eシリーズ(46R50E54A, 50E54A, 46A50E54A)を用いてNODマウスを免疫し、I-A^{e7}分子と親和性の高いアグレトープモチーフを検索した。その結果、46番目をアルギニン(R)、54番目をアラニン(A)に置換したアナログペプチド46R50E54Aが、最も強くI-A^{e7}分子と結合することが判明した。次に50Eシリーズに対するT細胞の反応をクローニングレベルで解析するため、ハイブリドーマNOEシリーズを樹立した。この中に、広いMHC degeneracyを示すNOE33-1-2が同定された。しかし、NOE33-1-2の表面抗原の発現パターンには、他のハイブリドーマと特に異なる点は認められなかった。

promiscuousなハイブリドーマNOE33-1-2は、NOD(I-A^{e7}), B10.D2(I-A^a, I-E^a), B10.PL(I-A^a, I-E^a), B10.S(I-A^s), B10.SM(I-A^v, I-E^v)の脾細胞をAPCとした時、これらから50Eシリーズの合成ペプチド抗原提示を受けた。それぞれのAPC存在下において、NOE33-1-2の反応を惹起する各合成ペプチドの刺激性の順位は、各MHC分子と抗原ペプチドとの結合性の順位と一致した。また、各MHCクラスII分子に対する抗体を用いた抑制実験により、NOE33-1-2が主にI-A分子拘束性であることが明らかになった。

NOD マウスの脾細胞をAPC としたI-A^{e7} 拘束性の反応と、B10.D2マウスの脾細胞をAPC としたI-A^d拘束性の反応では、NOE33-1-2 の各ペプチド抗原に対する反応性に差が認められた。I-A^{e7} とI-A^d分子は α 鎖は共通で、その違いは β 鎖のみに認められる。そこで、I-A^d分子の β 鎖の β シート部分をI-A^e分子の同部分と置換した、ミュータントMHC 遺伝子導入線維芽細胞をAPC として用い、NOE33-1-2 を各ペプチドで刺激した。NOE33-1-2 は用いた全てのペプチド抗原に対する反応性を失った。しかし、コントロールに用いた他のmonogamousなDEまたはBDシリーズのT細胞ハイブリドーマでは、このミュータントMHC 分子発現APC の存在下でも、I-A^d発現APC と同様の反応性を示した。これらの結果より、ミュータントMHC 分子とペプチド抗原の結合には問題がないと考えられた。

次に、NOE33-1-2 またはDEシリーズのハイブリドーマ、ペプチド抗原、APC からなる培養系に、不活化したNOE33-1-2、またはDEシリーズのハイブリドーマを加え、それぞれの反応の阻害実験を行った。その結果、NOE33-1-2 のTCR とペプチド抗原-MHC 分子複合体との親和性は、DEシリーズのTCR よりむしろ高いことが示唆された。したがって、NOE33-1-2 は5種のMHC 分子とペプチド抗原によって形成される複合体間で共通な立体構造を高親和性に認識すること、この構造はMHCの抗原結合溝の底面の変異によって影響されることが示唆された。今まで、申請者の同定した非常に高度な promiscuity を示すT細胞は、NOD マウス以外では発見されていない。したがって、このpromiscuous なT細胞は、NOD マウスに認められる自己免疫疾患の病態に、何らかの役割を果していると推定された。

口頭発表に際し、上出教授よりハイブリドーマの親株に存在する種々の膜表面分子、および細胞内シグナル伝達系に働く分子の影響について質問されたが、申請者は大旨妥当な解答を成し得た。また、上出、柿沼両教授には個別に審査をいただき、合格と判定された。

以上、自己免疫を発症するNOD マウスのみに存在する、稀なpromiscuity を示すT細胞クローニングの樹立と、その抗原認識機構の詳細な解析は、自己免疫を誘導するT細胞クローニングの产生機構の解明につながるもので、博士（医学）の授与に相当すると判定した。