

## 学位論文題名

マウス B7-1 分子の選択的スプライシング産物の  
同定とその T 細胞活性化における役割に関する研究

## 学位論文内容の要旨

## 【序論】

T細胞の活性化反応は、抗原提示細胞上の主要組織適合抗原複合体(MHC)上に提示された抗原ペプチドを、抗原受容体(TCR)を介して認識することにより開始される。しかし、T細胞が最適な反応を示すためには、TCRを介する主シグナルのみでは不十分であり、抗原提示細胞から伝達される抗原非特異的な第2シグナル(costimulatory signal)を必要とすることが明らかとなっている。さらに、TCRを介する主シグナルでのみ刺激されたT細胞は活性化しないだけでなく、それ以後もはや正常な刺激に反応できない不応答状態(anergy)に陥ることから、T細胞活性化における第2シグナルの役割は大きい。

第2シグナルは、主にT細胞上のCD28と抗原提示細胞上のB7-1、B7-2との結合により伝達されていることが明らかとなっている。また、活性化T細胞上にはCD28と相同性があり、リガンドを共有するCTLA-4が発現される。現在、CD28、CTLA-4はそれぞれT細胞を正および負に調節することが遺伝子欠損マウスの解析から明らかにされている。一方、B7-1とB7-2分子の役割は、1)B7-2分子はB7-1分子と比較して、相対的に活性化B細胞上で早期より発現され、樹状細胞等に強く発現されることなどから、B7-2分子が免疫反応の開始に、B7-1分子は免疫反応の維持に主に作用する、2)B7-1分子に刺激されたヘルパーT細胞はTh1細胞に、B7-2分子に刺激されたヘルパーT細胞はTh2に分化する、といった相違が見い出されている。

本研究では、マウスB7-1分子の選択的スプライシング産物を同定し、新たなCD28/CTLA-4リガンドの存在を明らかとした。したがって、CD28/CTLA-4を介するT細胞調節機構は、3種の異なるリガンドにより複雑に調節されていることが予想される。そこでB7-1分子の選択的スプライシング産物のin vivoにおける発現動態および機能を検討し、その生理的役割について考察した。

## 【本論】

## 1. マウスB7-1分子における選択的スプライシング産物(MB7-2)の同定

B7-1分子は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する分子で、細胞外に2つの免疫グロブリン様ドメイン(N末端よりIgVおよびIgC様ドメイン)を有する。マウス脾細胞におけるB7-1mRNAの発現動態をRT-PCR法により解析した。PCRにはB7-1の翻訳領域を完全に含むようなプライマーを用いた。B7-1mRNAはLPS存在下、6時間でその発現が誘導された。その際、LPSにより発現が誘導され、B7-1mRNAよりサイズの小さい特異的なバンドが得られた。このバンドは、塩基配列の解析からB7-1mRNAの一部を欠失したものであること

が明らかとなった。マウスB7-1遺伝子は、ゲノム構造の解析から5つのエクソンより構成されていることが明らかとなっている。先のバンドはB7-1遺伝子のエクソン3に相当する部分が完全に欠失していることから、B7-1の選択的スプライシング(MB7-2と命名)によるものであることが明らかとなった。エクソン3はIgCドメインをコードすることから、細胞表面上のMB7-2分子はB7-1分子のIgVドメインのみを有する分子であると考えられた。

## 2. MB7-2mRNAのin vivoにおける発現および動態

MB7-2分子はB7-1分子のIgCドメインを欠失した構造を有するため、モノクローナル抗体による識別が困難である。そこでB7-1mRNAとMB7-2mRNAを同時にかつ定量的に評価できる、RNase protection assay(RPA)法による解析を試みた。RPA法により胸腺、脾臓、リンパ節の免疫系組織において、特異的にB7-1mRNAの発現が認められるとともに、MB7-2mRNAの発現が認められた。マウスをOVA/CFA懸濁液で免疫し、脾臓における各mRNAの発現を解析した。その結果、いずれのmRNAも投与後2日をピークとするような一過性の発現誘導が認められた。したがって、MB7-2分子はin vivoにおいて、B7-1分子同様その発現が厳密に制御されていることが示唆された。

## 3. MB7-2分子の機能

MB7-2分子の機能を解析するため、B7-1およびMB7-2遺伝子導入CHO細胞を作製した。得られた細胞には、抗マウスB7-1mAb(1G10)を用いたFACS解析によりそれぞれB7-1およびMB7-2分子が同程度発現していると考えられた。CD28およびCTLA-4に対する親和性を比較検討するため、CD28IgおよびCTLA-4Ig可溶性融合蛋白を用いてFACS解析を行った。MB7-2分子はB7-1分子と比較して、CTLA-4に対しては弱いものの、CD28に対してはほぼ同等の親和性を保持していることが明らかとなった。このことからB7-1とCD28/CTLA-4の相互作用において、IgVドメインが両者に対する結合部位であり、IgCドメインはCTLA-4に対する親和性の増強に必要であることが示唆された。ドメイン構造を欠失した選択的スプライシング産物の解析により蛋白間相互作用におけるドメインの役割が明らかにされるとともに、MB7-2分子がCD28/CTLA-4リガンドとして機能し得ることが示唆された。

MB7-2分子のT細胞に対する活性を検討するため、マウスのリンパ節より精製したT細胞を用いて、B7-1、MB7-2、B7-2導入CHO細胞の増殖に与える影響について検討した。T細胞をサブオプティマルな濃度のPMA/ionomycin存在下で各CHO導入細胞と共培養し、T細胞の増殖能を解析した。B7-1、B7-2-CHO細胞がT細胞に活発な増殖を誘導したのに対し、MB7-2-CHO細胞はT細胞の増殖をまったく誘導できなかった。一方、活性化T細胞を各CHO導入細胞と共培養すると、B7-1、B7-2-CHO細胞と比較すると弱いものの、MB7-2-CHO細胞にもT細胞の増殖を維持する活性が認められた。すなわち、MB7-2分子はB7-1、B7-2分子と異なりT細胞に対する作用がT細胞の活性化状態に依存することが明らかとなった。したがって、T細胞を中心とする生体の免疫応答を次の3段階に分けて考えた場合、

- 1) 抗原認識によるT細胞の活性化
- 2) 持続的なT細胞の活性化による外来抗原の除去
- 3) 外来抗原除去後のT細胞反応の終息

B7-1およびB7-2分子がT細胞の活性化段階から作用し得るのに対し、MB7-2は活性化T細胞反応の維持にのみ特異的に作用すると考えられる。

## 【結論】

1. マウスB7-1分子のIgCドメインを完全に欠失するような選択的スプライシング産(MB7-2)の存在を同定した。
2. MB7-2はin vivoにおいてB7-1と同様その発現が厳密に制御されていることが示唆された。
3. MB7-2はIgCドメインを欠失しているにもかかわらず、CD28に対する親和性を保持していることが明らかとなった。一方、CTLA-4に対する親和性はB7-1と比較して低下しており、受容体に対して特徴的な結合能を示すことが明らかとなった。B7-1分子のIgVドメインは、CD28/CTLA-4の結合部位であり、IgCドメインはCTLA-4との親和性の増強に作用することが示唆された。
4. MB7-2のT細胞に対する第2シグナル活性は、T細胞の活性化状態に依存することが明らかとなった。すなわち、MB7-2は静止期T細胞の増殖を誘導せず、活性化T細胞の増殖のみを維持した。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 小 野 江 和 則

副 査 教 授 吉 木 敬

### 学位論文題名

## マウス B 7-1 分子の選択的スプライシング産物の 同定とその T 細胞活性化における役割に関する研究

T細胞の活性化は、TCRを介する主シグナルのみでは不十分であり、抗原提示細胞から伝達される抗原非特異的な第2シグナル(costimulatory signal)を必要とすることが近年明らかとされている。T細胞上のCD28/CTLA-4と抗原提示細胞上のB7-1/B7-2は、第2シグナルを伝達する分子としてその重要性が明らかにされている。

申請者は、マウス脾細胞におけるB7-1mRNAの発現を解析する過程で、エクソン3を欠失するような選択的スプライシング産物(MB7-2と命名)の存在を同定した。RNase Protection Assayにより、MB7-2mRNAはB7-1mRNAとともに、in vivoにおいて胸腺、脾臓、リンパ節等の免疫系組織において特異的に発現していることが明らかとなった。脾臓における各mRNAの発現は、免疫感作によりいずれも投与後2日をピークとするような一過性の発現誘導を示した。したがって、MB7-2はin vivoにおいて、B7-1同様その発現が厳密に制御されていることを明らかとした。さらに、MB7-2遺伝子導入CHO細胞を用いてCD28/CTLA-4に対する結合能を検討し、MB7-2はB7-1と比較して、CTLA-4に対しては弱いものの、CD28に対してはほぼ同等の親和性を保持していることを示した。したがって、MB7-2はCD28/CTLA-4の第3のリガンドとして機能することが示唆された。一方、MB7-2(B7-1バリエント)のT細胞に対する増殖誘導能は、B7-1/B7-2と異なり、T細胞の活性化状態に依存し、活性化T細胞にのみ特異的に作用した。B7-1とB7-2は発現動態の違いから、生体内において、B7-2が免疫反応の開始に、B7-1は免疫反応の増幅に作用することが示唆されている。一方、MB7-2(B7-1バリエント)は活性化T細胞の増殖維持に特異的に作用すると考えられた。

公開発表は約15名の出席者の前で行われた。質疑応答ではまず、吉木教授より、① MB7-2が病態等の特殊な条件下において選択的に発現する場合が存在するか、②抗原提示細胞上におけるB7-1とMB7-2分子の存在様式およびその解析に利用可能な特異抗体の作製について質問があった。申請者は、①これまでに自己免疫疾患モデルマウスであるlprマウスにおいて検討したが、明らかな発現の違いが見い出されなかったこと、②細胞膜上のB7-1とMB7-2分子の存在様式を解析するには、単個細胞上の分子を検出できる特異抗体の利用が必須であること、またその作製には欠失による連結部位を認識する抗体を獲得する必要があることを回答した。次に、小野江教授より、①B7-1とMB7-2分子が

異なる細胞上に発現している可能性について、またその検索のひとつとして各種細胞株における両分子の発現について、②MB7-2分子が活性化T細胞に特異的に作用したことに関して、活性化T細胞の詳細な実験条件について、③MB7-2がCD28/CTLA-4に特徴的な結合能を示したことに関して、ドメインを欠失することによる立体構造への影響について質問があった。申請者は、①B7-1およびMB7-2分子が同時に、あるいは別々に発現する可能性について触れるとともに、これまでに解析したいくつかの細胞株では、いずれも両者が発現していたこと、②活性化T細胞が抗CD3抗体による刺激により72hr前処置を受けたこと、③これまでの文献を引用し、置換、欠失等の変異が全体の立体構造に与える影響の可能性について回答した。会場からは第2内科小林講師より、①抗原提示細胞の種類の違いによるB7-1、MB7-2分子の発現について、②細胞膜上Ig、CD40を介した刺激等、LPS以外の刺激によるB細胞でのMB7-2の発現動態について質問があった。申請者は、①現在まだ未検討であること、②ConAを用いた脾細胞の刺激においてはLPSと同様な結果であったことを回答した。最後に上出教授より、①MB7-2の活性化T細胞に対する作用がCTLA-4Igでほぼ完全に抑制されたにも関わらず、抗CD28(Fab)抗体で部分的であったこと、②MB7-2が静止期T細胞に作用を示さなかったのではなく、アナジの誘導を抑制している可能性について質問があった。申請者は、①CTLA-4の関与および用いた抗CD28(Fab)抗体の濃度の問題を答えたが、MB7-2がB7-1と比較してCTLA-4に対して結合能が低下していることから、CTLA-4を介するアポトーシス誘導能が低下している可能性があることをアドバイスされた。また、②に関しては、MB7-2のアナジ抑制能に関しても今後検討する予定であることを回答した。本研究は、T細胞の新たな活性化調節機構の一部を解明したものであり、今後さらに解析を進めることにより、T細胞機能の人為的制御に道を開くものと期待される。申請者は全般的に概ね妥当な回答を行い、審査委員は本研究の斬新性、実験法や結果の解釈の妥当性、関連領域の知識、さらに研究者としての申請者の資質について審議し、いずれの点においても高く評価されるとの結論に達した。

以上より、審査員一同は、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。