

に提示され、それを認識する自己反応性T細胞が誘導され、Th1タイプのサイトカインを介して自己免疫反応を引き起こしていると考えられる。

一方、臓器非特異的自己抗原としては、Ro/SS-A52kD蛋白のDEREQLRILG (AA203-212)、TCRBV6S7のWAEILRIGRVおよびHSP10/60のWVNMLRRGIがT細胞エピトープとして働いていることを明らかにしてきた。このうち、Ro/SS-A52kDとHSP10/60はIL-2を産生しTh-1タイプのサイトカインパターンを呈することから、これらが自己免疫反応を誘導するautoaggressive epitopeとして機能している可能性が推察される。TCRBV6S7は、IL-4を産生しTh2タイプのサイトカインを産生することから、自己免疫反応を抑制する調節性T細胞エピトープとして働いている可能性が指摘されている。臓器非特異的自己抗原が臓器特異的炎症を引き起こす発症機序としては、まだ明らかにはされていないが、ウイルスあるいは細菌による先行感染が唾液腺臓器に選択的に生じた結果、どの細胞にも存在しているRo/SS-A52kDなどの細胞内蛋白が破壊された細胞より流出し、マクロファージやB細胞などの抗原提示細胞上にHLAとともに提示され、それを認識する自己反応性T細胞を活性化するためと推察される。

いままでの研究成果により、SSの唾液腺におけるいくつかの自己抗原を明らかにすることができたが、SSを特異的に制御するためには、SSに特異的でかつ患者共通の新しい自己抗原を明らかにする必要がある、現在、最新の戦略としてTCRトランスフェクタントを用いた解析を進めている。

また、すでに判明している α -アミラーゼのT細胞エピトープのアナログペプチドを選別することにより、実際にワクチネーションによるSSの特異的制御を可能にしたいと考えている。

文献

1. Sumida T, Matsumoto I, Maeda T, and Nishioka K. T cell receptor in Sjögren's syndrome. *Br. J. Rheumatol.* 36:1965-1970, 1997.
2. Sumida T, Matsumoto I, Murata H, et al. T cell receptor of Fas-sensitive T cells in labial salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *J. Immunol.* 158:1020-1025, 1997.
3. Sumida T, Namekawa T, Maeda T, and Nishioka K. New T-cell epitope of Ro/SS-A 52kDa in labial salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. *Lancet* 348:1667, 1996.
4. Sumida T, Kato T, Hasunuma T, Maeda T, Nishioka K, and Matsumoto I. Regulatory T cell epitope recognized by T cells from labial salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 40:2271-2273, 1997.
5. Matsumura, R., Umemiya, Kagami, M., et al. Glandular and extraglandular expression of Fas-Fas ligand and apoptosis in patients with Sjögren's syndrome. *Clin. Exp. Rheumatol.* 16: 561-568, 1998.
6. Sumida, T. Sjögren's syndrome. *Int. Med.* (in press).
7. Saitoh, I., Haruta, K., Shimura, M., et al. IL-10 transgenic mice as a model for Sjögren's syndrome. *J. Immunol.* (in press).
8. Matsumoto I, Maeda T, Takemoto Y, et al. α -amylase function as salivary glands-specific self T cell epitopes in patients with Sjögren's syndrome. submitted.

課題名 シクロスポリン依存性再生不良性貧血の病態に關与するT細胞クローンの単離に關する研究

氏名 中尾真二、曾 維華、王 紅波、中条 達也、松田 保

所属施設 金沢大学医学部附属病院第三内科

シクロスポリン依存性の再生不良性貧血（再不貧）では、T細胞レセプターβ鎖のCDR3領域について類似のアミノ酸配列（DLTXGP）を持つBV15陽性T細胞が病勢に一致して増殖している。このT細胞の特徴を明らかにするため、患者の骨髓からこのCDR3モチーフを持つT細胞クローンの単離を試みた。骨髓単核細胞をスーパー抗原で刺激後ソーティングしたのち、限界希釈法を用いてBV15陽性T細胞クローンを単離し、SSCP法でスクリーニングすることによりDLTSGPモチーフを持つT細胞クローン（ZN1）を得た。ZN1はCD4陽性AV24陽性であり、自己の骨髓単核細胞や、11-merからなるrandom peptide libraryのうち、6番目のアミノ酸をプロリンに固定したサブファミリーに対して比較的強い増殖反応を示した。したがってZN1は、自己の抗原提示細胞を介して何らかの抗原を認識することにより再不貧の病態に關与していることが示唆された。

A. 研究目的

再生不良性貧血の中でも、寛解の維持にシクロスポリンが必要なシクロスポリン依存性の再生不良性貧血患者では、類似のCDR3モチーフ（DLTXGP）を持つCD4陽性BV15陽性T細胞が、異なる患者の骨髓中で優勢に増殖していることをわれわれは明らかにしてきた¹⁾。今回はこのようなT細胞の機能を調べるため、限界希釈法を用いて共通のCDR3モチーフを持つT細胞クローンを患者の骨髓から単離し、*in vitro*での増殖能と特異性を評価した。

B. 研究方法

骨髓でのBV15陽性T細胞の優位な増殖が証明されているシクロスポリン依存性再生不良性貧血患者の骨髓単核細胞をStaphylococcus enterotoxin B（SEB）の存在下で2週間培養後、BV3、BV12、BV14、BV17の各陽性細胞をソーティングにより取り除き、残りの細胞から限界希釈法を用いてBV15陽性T細胞クローンを単離した。これらのT細胞クローンからRNAを抽出後cDNAを合成し、BV15 cDNAを増幅した。増幅産物を一本鎖に変性後、DLTSGPモチーフを持つプラスミドのcDNAとともに非変性ゲルを用

いて電気泳動し、コントロールと同じsingle strand conformation polymorphism（SSCP）を示すクローンを同定した。得られたクローンはHerpesvirus saimiriで不死化させた。T細胞クローンの特異性は³H-thymidineの取込みを用いて測定した。患者および患者とHLA-DRB1*1501のハプロタイプを共有する健常人の末梢血単核細胞から付着細胞を採取し、GM-CSFとIL-4の存在下で1週間培養したのち、TNFを加えてさらに3日間培養することにより樹状細胞を誘導した。11-merのペプチドの6番目のアミノ酸を固定した20組の合成ペプチドのmixtureを末梢血単核細胞または樹状細胞に加え、T細胞クローンの各ペプチドファミリーに対する反応性を検討した²⁾。

C. 研究結果

一回目の限界希釈法で得られたT細胞クローンのうち、コントロールのDLTSGP cDNAと同じSSCPを示したのは20個中2個（23と24）のみであった（図1）。このうち1個のクローンをSEBで刺激後Herpesvirus saimiriを含む培養液とともに培養したところ、このT細胞クローンはインターロイキン2のみで3か月以上の維持が可能となった。

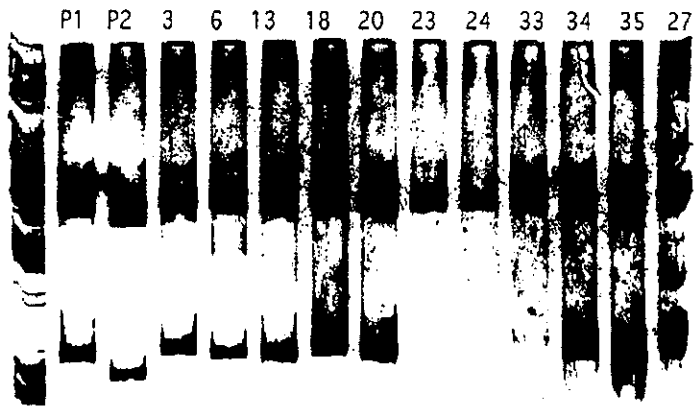


図1 SSCPによるT細胞クローンの一次スクリーニング

P1, DLTS GPのcDNAを含むプラスミド
P2, DLTS GPを持たないcDNAクローン
3~27, 限界希釈法により得られた
BV15陽性T細胞クローン

クローン23と24のみがP1と同じ泳動
度を示した.

その後再度限界希釈を行ったところ、得られた20個のクローンのうち19個はDLTS GPを持っていた(図2)。このT細胞クローンZN1はCD4陽性でAV24を発現していた。自己の骨髓細胞に対する増殖反応性を調べたところ、ZN1はCD34陽性細胞に対しては増殖反応を示さず、むしろCD34陰性分画の細胞に対して選択的な増殖反応を示した。N末端

から6番目のアミノ酸が一種類に固定された11-merからなる random peptide mixtureをEBウイルス感染B細胞または末梢血単核細胞から誘導した樹状細胞にパルスし、ZN1の反応性をみたところ、ZN1は、この部位がプロリンに固定されたペプチドのmixtureに対して比較的強い増殖反応を示した(図3)。

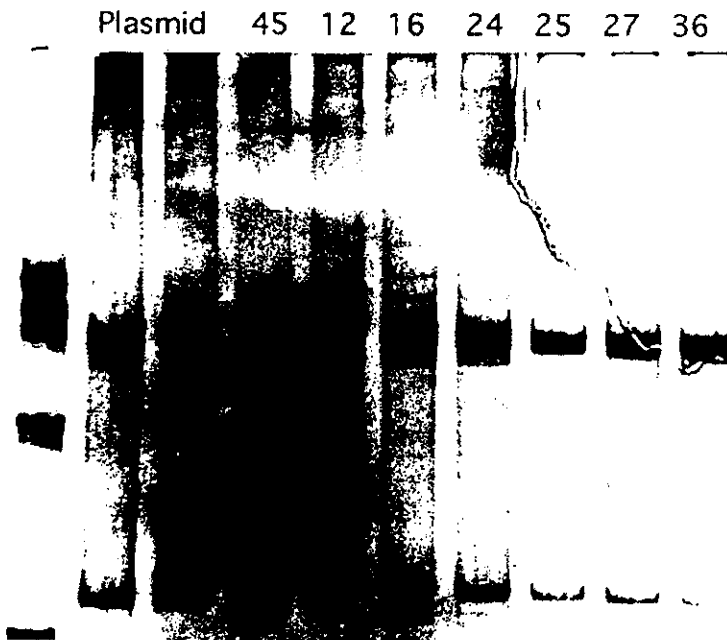


図2 SSCPによるT細胞クローンの二次スクリーニング

Plasmid, DLTS GPのcDNAを含むプラスミド

12~45, 図1のクローン23の限界希釈により得られたT細胞クローン

クローン45を除いたすべてのクローンがコントロールと同じ泳動パターンを示した.

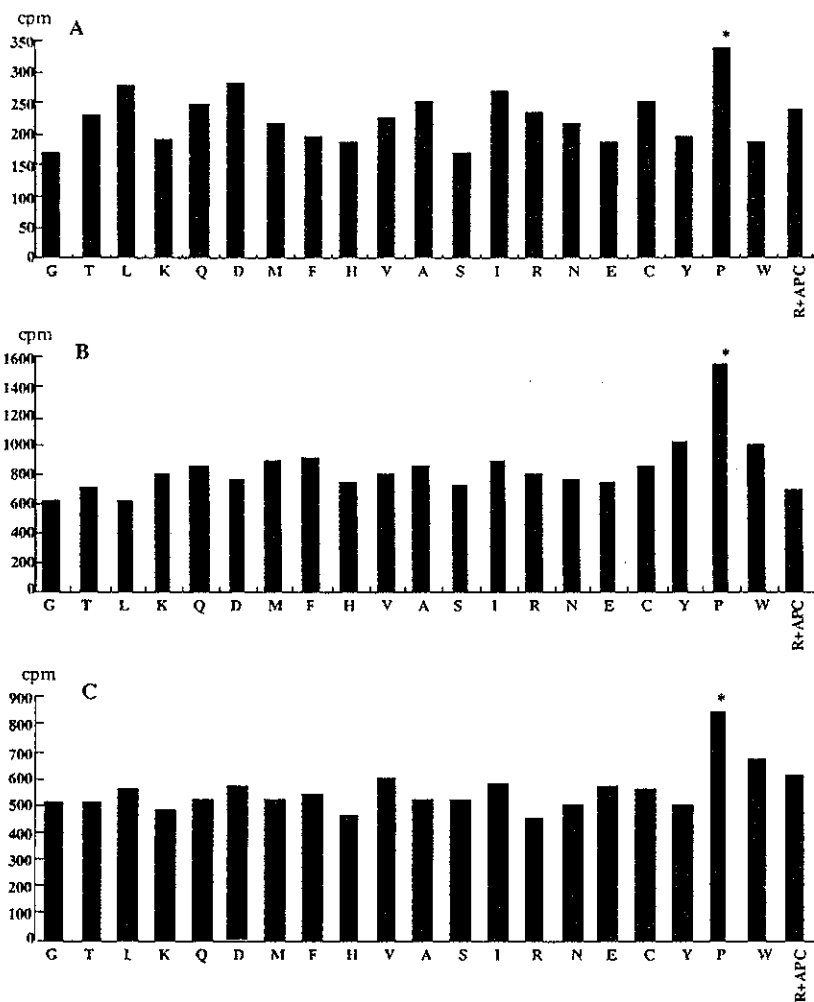


図3 第6番目のアミノ酸を固定した 11mer の combinatorial peptide library に対する ZN1 の増殖反応

図は、A (患者と HLA-DRB1*1501 を共有する健康人ドナー由来の樹状細胞)、B、C (患者由来の EB ウイルス感染 lymphoblastoid cell line) のそれぞれを抗原提示細胞に用いた場合の ³H-thymidine uptake を示している。ZN1 は、position 6 をプロリンに固定したペプチドファミリーに対して比較的強い増殖反応を示した。

D. 考察

T細胞レセプターβ鎖のcDNAの検討により、骨髓中の優勢な増殖が示唆されたT細胞クローンは、限界希釈法とSSCPにより、機能を持つT細胞クローンとして実際に単離できることが示された。このCD4陽性BV15陽性AV24陽性T細胞クローンは、抗原提示細胞を介して何らかの抗原を認識することにより、再生不良性貧血の病態に関与していると考えられる。ペプチドライブラリーのスクリーニングを進めていくことによって、このT細胞クローンの標的ペプチドが明らかになれば、再生不良性貧血を引き起こす何らかの病原体を同定できる可能性がある。

E. 文献

1. Zeng W, Nakao S, Takamatsu H, et al. Characterization of T-cell repertoire in the bone marrow

of immune-mediated aplastic anemia: evidence for the involvement of antigen-driven T cell response in cyclosporine-dependent aplastic anemia. Blood, in press.

2. Hemmer B, Fleckenstein BT, Vergelli M, et al. Identification of high potency microbial and self ligands for a human autoreactive class II-restricted T cell clone. J Exp Med 185: 1651-1659, 1997.

要 約

脳炎惹起性 T 細胞クローン 4b.14a の TCR アルファ鎖 CDR3 領域に相当するペプチドは、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を増悪させる (Yamamura et al. J. Neurosci. Res. 45:706-713, 1996)。我々は今回、同ペプチドによる自己免疫疾患増悪機構を探った。まず、同ペプチド特異的 T 細胞の細胞移入により感作 EAE および T 細胞移入による EAE が増悪することを示し、EAE の増悪に TCR 特異的調節性 T 細胞の関与することを明確にした。さらに、同ペプチド特異的 T 細胞ハイブリドーマをプローブに用いた SSCP 解析により、ナイーブな SJL/J マウスの CD25 陽性分画において、CDR3 ペプチド特異的 T 細胞が clonal expansion を起こしていることを示した。このような in vivo で活性化・増殖している TCR-CDR3 ペプチド特異的 T 細胞クローンは、自己免疫病における免疫学的制御の標的となりうる。

目 的

EAE は難治性自己免疫疾患多発性硬化症 (multiple sclerosis; MS) の動物モデルで、これまで自己免疫病の発症、調節、人為的制御等に関する研究に大きく貢献してきた。EAE は Th1 サイトカインを産生する CD4 陽性 T 細胞により誘導され、脳炎惹起性 T 細胞の認識するペプチド配列がこれまで数多く同定されている。我々は以前、SJL/J マウス由来で MBP89-101 ペプチドに反応する脳炎惹起性 T 細胞の TCR 配列を解析し、TCR アルファ鎖 CDR3 領域に特定のモチーフが頻繁に現れることを報告した^{1,2)}。またこの保存された CDR3 領域をカバーするペプチド (CDR3 ペプチド) を投与すると EAE が増悪することを示した^{1,3)}。しかし、ペプチド投与により MBP89-101 による EAE のみならず、まったく配列の異なる PLP136-150 ペプチドによる EAE も増悪すること、NOD マウスの糖尿病も増悪することなどから³⁾、厳密な idio type 特異的な免疫調節の可能性は否定された。本研究では、CDR3 ペプチドによる自己免疫調節機構を探り、調節性 T 細胞の in vivo における存在様態を明らかにすることを企図した。SSCP 法を導入することにより、TCR 特異的調節機構に関する新知見が得られたので報告する。

方 法

1. MBP 特異的脳炎惹起性 T 細胞クローン 4b.14a³⁾ の TCR アルファ鎖 CDR3 ペプチド (CDR3 ペプチド; 配列 LYFCAARSNYQL) は既報のごとく合成した^{1,3)}。CDR3 ペプチドと完全フロイント・アジュバントで emulsion を作製し、SJL/J マウスを免疫し、10 日後に所属リンパ節細胞を調精した。この細胞を CDR3 ペプチドで 4 日間刺激し得られた培養細胞を、CDR3 特異的 T 細胞として利用した。CDR3 特異的 T 細胞、または同様にして得られた卵白アルブミン(OVA)特異的 T 細胞を、EAE 誘導操作 (PLP136-150 による感作、または PLP136-150 特異的 T 細胞移入) を施した SJL/J マウスに移入し、臨床経過を観察した。
2. CDR3 ペプチド特異的 T 細胞ハイブリドーマ (hybridoma) 4 クローンは、同ペプチドで免疫した SJL/J マウスから型どおりに樹立した。
3. CDR3 ペプチドの各残基をアラニンで置換したアナログ・ペプチドを合成し、細胞増殖阻害アッセイによって hybridoma の活性化に重要な残基を同定した。
4. naive な SJL/J マウス脾細胞の CD4 陽性 IL-2 レセプターアルファ鎖 (CD25) 陽性分画を磁気分離装置により分離し、RT-PCR-SSCP 法により集積クローンの TCR ベータ鎖クロノタイプを描出した。Hybridoma も平行して解析し、TCR

特異的調節性T細胞がマウス生体内で活性化/増殖しているかどうかを検討した。

結 果

1) 感作 EAE と受け身 EAE のいずれの実験系においても、CDR3 ペプチド特異的 T 細胞を移入されたマウスは、細胞を移入されないマウス、OVA 特異的 T 細胞を移入されたマウスに比較して、強い臨床症状（ピーク時の臨床スコアの上昇、および罹病期間の延長）を示した。2) 樹立された hybridoma は MHC クラス II 拘束性に CDR3 ペプチドを認識し、IL-2 と IL-4 を産生した。3) SSCP 法の解析により、これらはすべて同一の TCR ベータ鎖 CDR3 配列 (V β 14*) を保有していることが示唆された。4) いずれの hybridoma も、その活性化には CDR3 ペプチドの二番目の Y 残基 (Y²)、C⁴、A⁵、A⁶、N⁹、Y¹⁰ が必須であり、hybridoma の発現する TCR が均一であることを支持した。5) 脾臓から分離した CD4⁺CD25⁺細胞は、10 数個の優勢クローン (SSCP clonotype) を含んでいた。その中の V β 14* clonotype の一つは、hybridoma の発現する clonotype と一致した。

考 察

以上の解析から、CDR3 ペプチド特異的で EAE を増悪させる調節性 T 細胞の存在すること、naive なマウスの体内で増殖している CD25 陽性 T 細胞クローンの中に CDR3 ペプチド特異的なクローンの存在することが証明された。TCR ペプチド特異的な T 細胞が健康マウスの体内で既にプライムされた状態で存在することは、これまで間接的に示唆されていた⁹⁾。しかし、SSCP 法を利用することによって、特定の TCR ペプチド特異的 T 細胞が体内で増殖していることが確実に証明できた。今後、調節性細胞の体内動態の研究に、SSCP 法は有力な方法論となると思われる。

これまで TCR ペプチド特異的な調節性 T 細胞は、主に生体に好ましくない自己免疫応答を抑制し、免疫系のホメオスタシスの維持に積極的な役目を果たしているものと考えられてきた。しかし、我々の結果から、免疫系は自己免疫病の発症を促進する能力を持つ危険な TCR 特異的クローンも保持していると言わざるをえない。ヒト自己免疫疾患との関わりにおいては、このような危険な TCR 特異的クローンがヒトでも存在するかどうか、ペプチド・リガンドによってその機能を制

御できるかどうか、などについて大変興味を持たれる。自己免疫疾患の新しい治療法の開発にまで発展する可能性があり、その流れの中で、現在 CDR3 特異的 T 細胞の機能を変質させる変換ペプチド・リガンドを同定しようとしている。なお、CDR3 ペプチドの刺激によって疾患増悪を誘導するこの T 細胞クローンが、生体内では同ペプチド以外の natural ligand に反応して疾患抑制的に働いている可能性は除外できない。我々の報告した、MS 患者の末梢血 CD25 陽性分画では SSCP クロノタイプが減少傾向にあるという観察⁹⁾を考慮にいれば、数残基のみ異なる他の CDR3 ペプチドが真のリガンドである可能性は、充分検討の予知がある。

I.R. Cohen は免疫系レパトアを説明する新しい概念として immunological homunculus^{6,7)}、または homuncular network なる概念を提唱している。これは neurological homunculus に対応するアイデアで、免疫系の対応できる抗原ペプチドには著しいヒエラルキーのあることを表現している。この概念に当てはまれば、我々の検討している CDR3 ペプチド特異的 T 細胞は immunological homunculus の中に組み込まれている重要なコンポーネントとすることができよう。

結 論

健康なマウスの体内で活性化・増殖している T 細胞クローンの種類はごく限られている。今回の解析結果は、その中に TCR CDR3 ペプチドに反応する重要な調節性 T 細胞クローンが含まれていることを明らかにした。今後このようなクローンをペプチドによる治療的介入の標的とできる可能性があり、さらに研究を進めていく必要がある。

文 献

1. Yamamura T, Kondo T, Sakanaka S et al. Analysis of T cell antigen receptors of myelin basic protein specific T cells in SJL/J mice demonstrates an α chain CDR3 motif associated with encephalitogenic T cells. *Int Immunol* 6: 947-954, 1994.
2. 山村 隆. 脳炎惹起性 T 細胞の TCR CDR3 モチーフとその由来. *臨床免疫* 27:1463-1469, 1995.
3. Yamamura T, Geng T-C, Kozovska MF,

Yokoyama K, Cohen IR and Tabira T. An α -chain TCR CDR3 peptide can enhance EAE induced by myelin basic protein or proteolipid protein. *J Neurosci Res* 45:706-713, 1996.

4. Offner H, Hashim GA, and Vandenbark AA. T cell receptor peptide therapy triggers autoregulation of experimental encephalomyelitis. *Science* 251: 430-432, 1991.

5. Illes, Z., T. Kondo, K. Yokoyama, T. Ohashi, T. Tabira, and T. Yamamura. Identification of autoimmune T cells among in vivo expanded CD25⁺ T cells in multiple sclerosis. *J Immunol* 162:1811-1817, 1999.

6. Cohen IR. Kadishman's tree, Escher's angels, and the immunological homunculus. in *Autoimmunity; Physiology and Disease*. Wiley-Liss, Inc., 7, 1994.

7. Cohen IR. The cognitive paradigm and the immunological homunculus. *Immunol. Today* 13:490-494, 1992.