

2) Tabata, N, M. Miyazawa, R. Fujisawa, Y. A. Takei, H. Abe and K. Hashimoto. Establishment of monoclonal anti-retroviral gp70 autoantibodies from MRL/lpr lupus mice and induction of glomerular gp70 deposition and pathology by transference into non-autoimmune mice. *J. Virol.* **74**: 4116-4126, 2000.

3) Izuma M., K. Kobayashi, M. Shiina, Y. Ueno, M. Ishii, T. Shimosegawa, T. Toyota, K. Kakimi, and M. Miyazawa. In vitro cytokine production of peripheral blood mononuclear cells in response to HCV core antigen stimulation during interferon- β treatment and its relevance to sCD8 and sCD30. *Hepatology Res.* **18**:218-229, 2000.

4) 宮澤正顕. ウイルスと血管炎. 治療学 **33**: 157-162, 2000.

5) 宮澤正顕. ウイルス感染防御免疫と乳酸菌投与効果. 環境と健康. **3**: 138-154, 2000.

6) 宮澤正顕. 抗gp70自己抗体の病変誘発能と抗原エピトープ特異性の解析. 細胞科学 **11**:63-76, 2000.

7) 宮澤正顕. ウイルス感染と自己免疫病. 臨床リウマチ **12**:85-96, 2000.

8) Iwanami, N., A. Niwa, Y. Yasutomi, N. Tabata, and M. Miyazawa. Role of natural killer cells in resistance against Friend retrovirus-induced leukemia. *J. Virol.* **75**: in press, 2001.

2. 学会発表

1) 丹羽淳子、阿部弘之、宮澤正顕. フレンド白血病レトロウイルス感染マウスの中和抗体産生に影響するnon-MHC遺伝子の解析. 第

23回日本分子生物学会年会(神戸). 2000年12月13日~16日.

2) 岩波礼将、宮澤正顕. フレンドウイルス感染マウスリンパ球の細胞傷害活性. 第30回日本免疫学会総会・学術集会(仙台). 2000年11月14~16日.

3) 阿部弘之、丹羽淳子、宮澤正顕. フレンド白血病レトロウイルスに対する感染抵抗性に関わる宿主遺伝子Rfv-3の染色体マッピング(第2報). 第30回日本免疫学会総会・学術集会(仙台). 2000年11月14~16日.

4) 田端信忠、阿部弘之、松村治雄、藤澤隆一、宮澤正顕. gp70-抗gp70免疫複合体定量法の確立と、精製抗gp70自己抗体静注による糸球体腎炎モデルの解析. 第30回日本免疫学会総会・学術集会(仙台). 2000年11月14~16日.

5) Miyazawa, M., Niwa, A., Iwanami, N., Uenishi, H., and Tabata, N. Multiple effector mechanisms induced by a single-epitope CD4⁺ T-cell vaccine acting against immunosuppressive Friend retrovirus infection. 12th International Workshop on Retroviral Pathogenesis (Annapolis). October 29 - November 1, 2000.

6) Tabata, N., Abe, H., and Miyazawa, M. Induction of glomerulonephritis and granulomatous arteritis in normal mice by injection of purified monoclonal anti-gp70 autoantibodies established from MRL lupus mice. 12th International Workshop on Retroviral Pathogenesis (Annapolis). October 29 - November 1, 2000.

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

抗レトロウイルス粘膜免疫活性に関する研究

主任研究者 竹森 利忠 国立感染症研究所・免疫部長
研究協力者 吉澤いづみ 国立感染症研究所・免疫部協力研究員
緒方 昭典 国立感染症研究所・免疫部研究生
高橋 宜聖 国立感染症研究所・免疫部研究員
横田 恭子 国立感染症研究所・免疫部室長

研究要旨

HIV Gag p24 刺激に対する粘膜記憶細胞の維持、機能、局在について検討する目的で、ネズミ鼻腔を介して鼻腔附属粘膜免疫組織 (nasal-associated lymphoid tissues; NALT) をリコンビナント Gag24 (p24) とコレラトキシン (CT) とで刺激した。この結果、粘膜で活性された Gag24 特異的 CD8⁺T 細胞は記憶細胞として粘膜局所とともに全身性に長期に維持されることが明らかとなった。粘膜非粘膜局所で維持される CD8⁺記憶 CTL が発現する TcRVβ のクラスは多様であり、また各クローンが示す細胞傷害活性にも差が認められた。細胞傷害活性の強弱が TcR の抗原ペプチド/MHC に対する親和性の差によるものか、あるいは他の要因によるものか今後の検討課題である。

A. 研究目的

HIV 主要感染ルートは粘膜であることから、ワクチン開発には、粘膜免疫を有効に賦活するベクター、デリバリー、アジュバント等を考慮することが必要である。一方、粘膜免疫の作動原理、活性化及び記憶の維持要因には不明の点が多く、ワクチンにより活性化された粘膜細胞が有効な記憶細胞へ成熟するか否か、維持される記憶細胞がどこに局在するのか、今後解析すべき事項が多い。これらの問題をアプローチするために本研究ではリコンビナント p24 (p24) で刺激されたネズミをモデルとして、p24 特異的記憶 T 細胞の局在、維持、表現型について解析した。

B. 研究方法

(1) Gag 特異的 T 細胞活性の解析：

BALB/c マウス両側鼻腔内に p24 5μg をコレラトキシン 2μg とともに注入し、注入後、

鼻腔内免疫組織 (nasal-associated lymphoid tissues; NALT), NALT からのリンパ球流入経路である後頸部リンパ節 (posterior cervical lymphnode; PCLN)、及び脾臓より浮遊細胞を調整した。これらに γ 線照射した脾細胞を APC とし、p24 抗原を加えて 5 日間培養した。CTL 活性 p24 に対するキラー活性は、⁵¹Cr で標識した p24 発現 Balb3T3 細胞、あるいは p24 抗原エピトープでパルスした B 細胞株を標的細胞として用い測定した。

(2) 細胞クローンの確立と clonality :

各組織から調整したリンパ球を、抗原提示細胞のソースとして放射線照射した脾細胞とともに、あるいはリコンビナント p24 あるいは Gag 発現 Balb3T3 細胞とともに長期培養し、クローンを確立した。確立したクローンで発現する TcR Vβ クラスを抗 Vβ 抗体による細胞染色で解析後 RT-PCR 法で確認した。また各クローンでの TcR Vβ の CDR3 領域を明ら

かにする目的で V β 及び J β 特異的なプライマーを用いた PCR により増幅されたクローンの塩基配列を決定した。

(3)細胞内染色 (IFN γ 産生の解析)

p24 免疫傷害細胞から濃縮した T 細胞とともに放射線照射 (3000R) A20 及び p24T 細胞組織合成ペプチドとともに 2 時間培養後モネンシン 2mM を添加し 4 時間培養を続けた。培養後、APC 結合 CD8, FITC 結合抗 TcR V β サブクラス検体及び EMA で染色した。染色後、2%ホルマリンで固定した後 0.5%サポニンで処理し洗浄後、PE 結合抗 IFN γ 抗体及び対照群として PE 結合抗ラット Ig で染色し、FACSVantage により解析した。

C.研究結果

リコンビナント p24 (rp24) 3 回投与後、NALT, PCLN, 脾臓及び腸管上皮 (IEL) から調整した細胞群で p24 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の産生が認められ、この活性は PCLN では免疫後約 150 日後まで存続していた (図 1)。

これらの組織に産生される T 細胞の傷害活性と表現型を明らかにするために、各組織由来 T 細胞クローンを確立し解析した。その結果、図 2 に示すように、確立された NALT 由来 T 細胞クローンの内一クローン (V β 10 を使用)を除き全てが V β 1 を発現し、また全ての確立されたクローンは強い細胞傷害活性を示した。一方、PCLN 由来 CTL クローンでは、解析した全てのクローンが TcR V β 15 を発現し、細胞傷害活性は NALT 由来クローンと比較して弱いことが明らかとなった。また脾臓から確立した T 細胞クローンは多様性を示し、V β 1 及び V β 10 を発現するクローンの細胞傷害活性は高く、V β 14, V β 8, 及び V β 4 を発現するクローンの細胞傷害活性は低いことが明らかとなった。

高い細胞傷害活性を示す NALT 由来 T 細胞

クローンが V β 1 を発現し、また脾臓由来の V β 1 を発現している 1 クローン CTL が細胞傷害活性が高かったことから、特定の V β 発現に細胞傷害活性が依存する可能性が考慮された。そこで相互の CTL クローンにおける TcR V β 1 の結合領域 (CDR3) を解析した (図 3)。この結果、NALT 由来 TcR V β 1 の結合領域は DB1/J β 1 で構成され V β 1 発現 NALT 由来全クローン間の塩基配列は同一であるが、脾臓由来クローンが発現する TcR V β 1 は DB2/J β 2 と再結合していることが明らかとなった。NALT 由来で確立された全 V β 1 発現クローンが同一の CDR3 領域を有することは、これらのクローンが単一のクローンに由来する可能性を強く示唆する。

更に、TcR V β 15 を発現する NALT が高い細胞傷害活性を示すのに反し、PCLN 及び IEL 由来の TcR V β 15 陽性クローンが低い細胞傷害活性を示すことから、この活性の差が TcR の構造の差に依存する可能性を念頭に置き、各クローンで発現する V β 15 の CDR3 領域の塩基配列を明らかにした。その結果、驚いたことに、各クローンの V β 15 は DB1/J β 1 に再構成し、CDR3 領域の塩基配列は全く同一であった。この結果から、異なった細胞傷害活性を示すクローンがそれぞれ異なった TcR V α 遺伝子を発現する可能性が考えられ、検討中である。

確立された CD8 陽性 CTL クローンで認められた TcR クロノタイプ (clonotype) が、生体内でも同様に認められるか否かを検討する目的で、rp24 を 3 回投与後 6 日目の脾臓及び 6 ヶ月後の脾臓、NALT, PCLN 由来の細胞を調整した。各細胞を p24T 細胞エピトープ合成ペプチドでパルスした A20.2J で再刺激した。刺激後インターフェロンガンマ (IFN γ) を産生する CD8 陽性 T 細胞の V β のクラスを FACS により解析した。結果を図 4 に示す。脾臓で

は、免疫初期に V β 10 を発現する T 細胞クローンが優位で、その他 V β 4, V β 7 細胞群が認められるのに対し、免疫後 6 ヶ月で活性化される CD8 陽性細胞は V β 4, V β 6, V β 7, V β 8 を発現していた。但し、これらの V β を発現する細胞は活性細胞全体の約 50%であり、残りの活性細胞が V β 1 を発現するか否か不明である (V β 1 に対する抗体は商品化されておらず解析は行えなかった)。一方、NALT では、V β 6, V β 8 が優位となり、また V β 4, V β 10 を発現する細胞も認められたが、TcRV β クラス未同定細胞が約 40%あり、この中に V β 1 陽性細胞が含まれるか否か不明である。PCLN 由来クローンでは V β 4, V β 8 が優位であり V β 15 発現細胞の頻度は低かった。

以上、p24 特異的 T 細胞が発現する TcRV β の使用頻度は、NALT 及び PCLN 由来 T 細胞クローンと生体内で活性化され IFN γ T 細胞との完全な一致は今回の解析では認められなかった。これらの差が、記憶 CTL クローンと長期に維持された抗原特異的 IFN γ 産生細胞との機能的あるいは細胞型質の差を反映するか、あるいはクローン確立における抗原による選択の可能性を支持するものか不明である。

D. 考察

本研究において、粘膜を介して産生された CD8 陽性記憶 CTL の維持と活性について検討する目的で、nasal-associated lymphoid tissue (NALT) を介したりコンビナント p24 刺激後の局所及び全身性に産生される CTL の細胞傷害活性、TcR V β の使用頻度について解析した。これらの解析から、免疫局所からリンパ球が流入する PCLN において免疫後長期に渡り記憶 CTL が局在し、再刺激により迅速に傷害活性を発現することが示唆された。確立された細胞クローンのクロナタイプの解析から、恐らく NALT で産生された CTL の一

部は PCLN 及び非粘膜組織である脾臓に移動し、NALT と同様に長期に維持される可能性が示唆された。しかし、現時点ではこれらの多様な性状を示す CTL 記憶細胞が各組織を循環する可能性も否定は出来ない。各組織に局在する記憶細胞のインテグリンファミリー及びケモカイン受容体は発現の解析が必要とされる。

これらの細胞群では、少なくとも確立されたクローンを対象とした解析から、細胞傷害活性の強い群と弱い群に分別される。この異なった活性を決定する因子は不明である。予備実験において、両群における perforin の発現量、T 細胞活性に関わる細胞表面分子の発現は同程度に認められた。CTL クローン内で認められた活性の差が TcR による抗原認識の親和性に関わるかあるいは他の要因によるものかは今後の検討課題の一つである。HIV 感染者において HIV 特異的 CTL が産生されるにもかかわらず、多くの場合、全てが有効な機能を発現していないことが報告されている。異なった TcR V β クラスの発現と試験管内で異なった細胞傷害活性を示す各クローンが、生体内での免疫維持にどのように関与するか明らかにすることは、免疫防御に関与する T 細胞の多様性の獲得を考慮する上で重要と思われる。

E. 結論

ネズミ粘膜免疫組織 NALT をリコンビナント p24 で刺激すると抗原特異的記憶 CTL が産生され、粘膜局所、非粘膜リンパ組織に長期に維持されることが示唆された。これらの細胞は多様な TcR を有し、細胞傷害活性も異なることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Yoshizawa I., Soda, Y., Mizuochi, T., Yasuda,

S., Rizvi, T. A., Mizuochi, T., Takemori, T. and Tsunetsugu-Yokota Y. Enhancement of mucosal Immune response against HIV-1 Gag by DNA immunization. *Vaccine, in press, 2001*

1) Takahashi, Y., Ohta, H., Takemori, T. Fas is required for clonal selection within germinal centers and the subsequent establishment of memory B-cell repertoire.

Immunity, 14, 181-192, 2001

3) Nagaoka, H., Takahashi, Y., Hayashi, R., Nakamura, T., Ishii, K., Matsuda, H., Ogura, K., Shirakata, Y., Karasuyama, H., Sudo, T., Nishikawa, S., Asano, R., Mizuochi, T., Tsubata, T., Sakano, H. and Takemori, T. Ras mediates effector pathways responsible for pre-B cell survival, which is essential for the developmental progression to the late pre-B stage.

J. Exp. Med., 192, 171-181, 2000.

4) Maki, S., Nagata, K., Kitamura, F., Takemori, T. and Karasuyama, H. Ig β signaling regulates locus accessibility for ordered Ig gene rearrangement.

J. Exp. Med., 131, 1333-1340, 2000

5) Tsunetsugu-Yokota, Y., Kato, T., Yasuda, S., Matsuda, Z., Suzuki, Y., Koyanagi, Y., Yamamoto, N., Akagawa, K., Cho, M.W. and Takemori, T. Transcriptional regulation of HIV-1 LTR during antigen-dependent activation of primary T cells by dendritic cells. *J. Leukocyte Biol., 67, 432-440, 2000*

6) Tamura, Y., Sasaki, R., Inoue, S., Kawaguchi, J., Serizawa, N., Toda, M., Takemori, T. and Sakaguchi, N. Identification of a sequential B cell epitope on a major allergen (Cry j1) of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen in mice.

Int. Arch. Allergy & Immunol., 123, 228-235, 2000

7) Toda, M., Sato, H., Takebe, Y., Taniguchi Y., Saito, S., Inouye, S., Takemori, T. and Sakaguchi M. Inhibition of IgE response to Japanese cedar pollen allergen (Cry j 1) in mice by DNA

immunization method.

Immunology, 99, 179-186, 2000

2. 学会発表

[第 30 回日本免疫学会総会、仙台、2000 年]

1) 高須賀直美、竹森利忠 NS インフルエンザウィルスベクターによる呼吸器粘膜免疫の賦活。

2) 福田勝之、吉田尚弘、竹森利忠、古本敬明、古関明彦 消化管付属リンパ組織の形成における forkhead homolog-6 (FKH6) 遺伝子の役割。

3) 近藤英介、中山俊憲、佐藤宏、伊藤俊広、柴田陽一、横山航也、古関明彦、竹森利忠、谷口 克 GFP ノックイン RAG2 ノックアウトマウスにより明らかになったパイエル板リンパ球での TCR 遺伝子再構成。

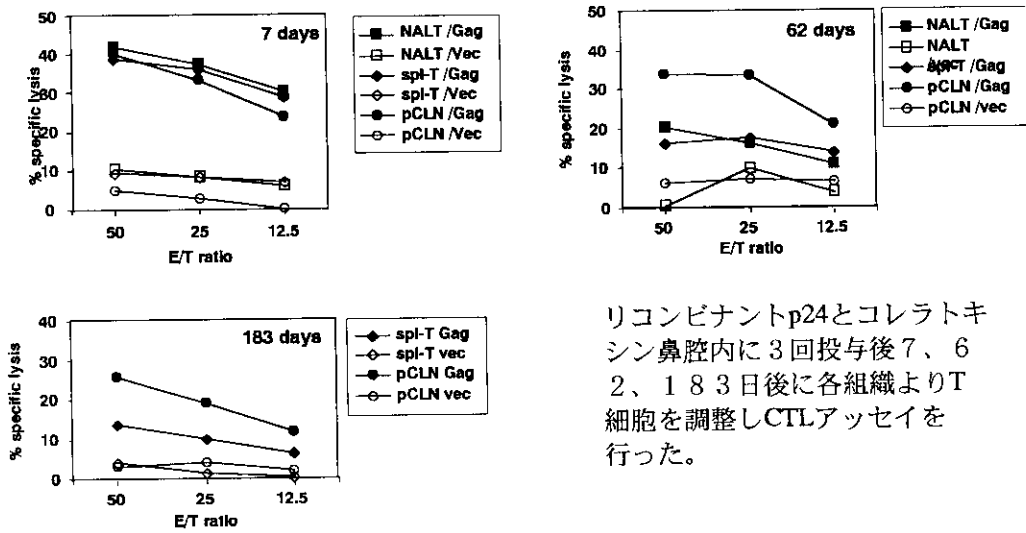
4) 下田美智子、高橋宜聖、浅沼秀樹、田村慎一、東徳洋、菅野長右工門、竹森利忠 粘膜免疫反応における IgA 選択的な高親和性記憶の形成機構。

5) 横田 (恒次) 恭子、橘美紀子、本多三男、竹森利忠 BCG 感作 T 細胞活性に関する解析。

6) 吉澤いづみ、水落利明、竹森利忠、横田恭子 HIV-1 Gag 蛋白に対する粘膜免疫応答。

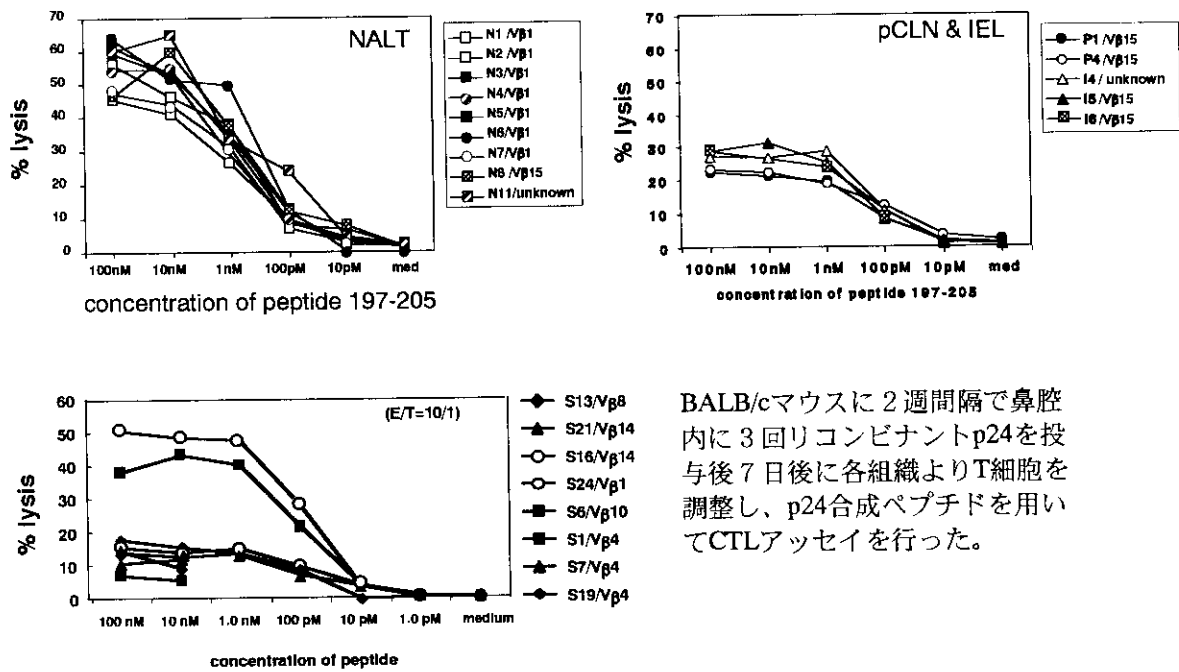
7) 戸田雅子、細川裕之、中野直子、井上栄、竹森利忠、阪口雅弘 スギ花粉アレルゲン特異的 T 細胞を選択的に誘導する DNA ワクチンの開発。

図1 NALT, 脾臓 (spl), 後咽頭リンパ節(PCLN) におけるGag特異的記憶細胞障害T細胞の産生と維持



リコンビナントp24とコレラトキシン鼻腔内に3回投与後7、62、183日後に各組織よりT細胞を調整しCTLアッセイを行った。

図2 NALT, 脾臓 (spl), 後咽頭リンパ節(PCLN)、および腸管内皮細胞(IEL) におけるGag特異的記憶細胞障害T細胞の活性



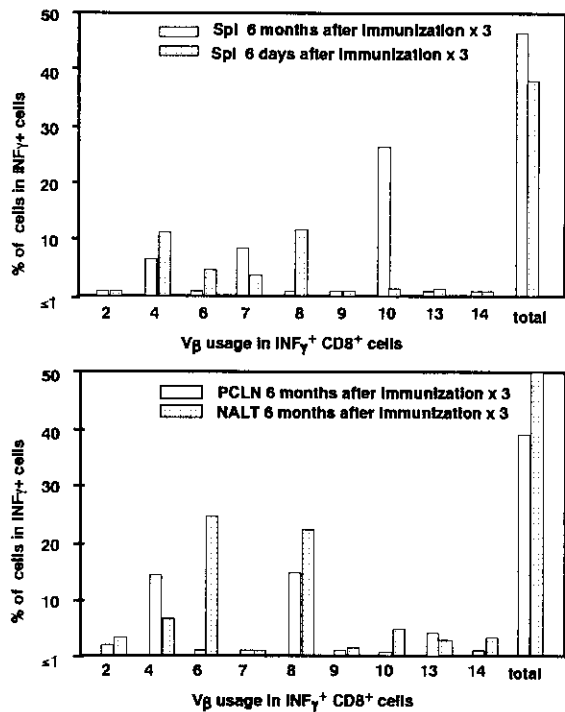
BALB/cマウスに2週間隔で鼻腔内に3回リコンビナントp24を投与後7日後に各組織よりT細胞を調整し、p24合成ペプチドを用いてCTLアッセイを行った。

図3 P24特異的CTL由来T細胞抗原受容体(TCR)ベータ鎖クラスと結合多様性領域(CDR3)の塩基配列

	V β 1		D β		J β	
N1-5	GAGCCAAGA	C	GGGACAGGGGG	AC	TTTCCAACGAAA---	D β 1/ β 1
S24	GAGCCAAGA		GGCTGGGGGG	TAT	AACTATGCTGAG---	D β 2/ β 2.1
	V β 15		D β		J β	
N7	CTGTGGTGC	T	AGGG	ACA	TTTCCAACGAAA---	D β 1/ β 1
PCLN8	CTGTGGTGC	T	AGGG	ACA	TTTCCAACGAAA---	D β 1/ β 1
PCLN9	CTGTGGTGC	T	AGGG	ACA	TTTCCAACGAAA---	D β 1/ β 1
IEL1	CTGTGGTGC	T	AGGG	ACA	TTTCCAACGAAA---	D β 1/ β 1

確立されたNALTクローン(NALT1, 2, 3, 4, 5, 7), 脾臓クローン(S24), PCLNクローン(PCLN8, 9), IELクローン(IEL1)のTCRV β 鎖を特異的プライマーを用い増幅し塩基配列を決定した。

図4 P24特異的に活性されインターフェロンガンマ(INF γ)産生CD8陽性T細胞が発現するTCRV β のクラス



BALB/cマウスに2週間隔で3回鼻腔を介しリコンビナントp24とコレラトキシンを投与した。投与後6日の脾臓、および6ヶ月後の脾臓、NALT, PCLNよりT細胞を調整し抗原で刺激したのちINF γ を産生するCD8陽性細胞に発現するTCRV β のサブクラスをFACSにより同定した。

HIV 感染予防に関する研究

分担研究テーマ：HIV に対するペプチドワクチン作製のための基礎研究

所 属 滋賀医科大学病理学第二講座
分担研究者 小笠原 一誠

研究要旨

樹状細胞 (DC) を刺激してインフルエンザウイルス NP 由来ペプチドを認識する細胞障害性 T 細胞 (CTL) を活性化し、マウス肺内でインフルエンザウイルスの感染を抑制することに、我々は成功している。今回は、肺内での感染抑制機序を種々のノックアウトマウスを使用して解析した。その結果、ヘルパー T 細胞も肺内での CTL の活性化には必要である可能性が示唆された。

A. 研究目的

HIV 感染の予防には、中和抗体だけでなく CTL の活性化が極めて重要と考えられている。従来より我々は、インフルエンザウイルスに対するペプチドを使用して CTL の活性化を行ってきた。この CTL の活性化機序を詳細に検討すれば、HIV 感染抑制に応用できると考えている。マウス MHC クラス I 分子 (Db) と結合することが判明しているインフルエンザウイルスの NP 由来ペプチド NP366-374

(ASNENMETM) を multi-lamellar liposome に封入した。このリポソーム封入ペプチドと一緒に抗 CD40 抗体を混合し、B6 マウスの鼻腔内に投与した。抗 CD40 抗体は DC を活性化して、MHC 分子や CD80、CD86 分子などの発現を増強する。その結果、活性化 DC は効率良く CTL に抗原ペプチドを提示し、CTL を活性化で

きる。実際、リポソーム封入 NP366-374 と抗 CD40 抗体の両方を投与した場合にのみ、肺内でのインフルエンザウイルス感染を抑制することができた。

今回はさらに肺内での感染抑制機序を詳細に検討した。MHC class I ノックアウトマウスと MHC class II ノックアウトマウスの鼻腔内にリポソーム封入 NP366-374 と抗 CD40 抗体の両方を投与し、感染抑制に関与する免疫担当細胞について解析した。

B. 研究方法

H3 サブタイプインフルエンザウイルスの NP 由来ペプチド NP366-374 をリポソーム

(phosphatidylserine : phosphatidylcholine =3 : 7) に入れて、抗 CD40 抗体 (50 μ g/mouse) と共に MHC class I ノックアウトマウスまたは

MHC class II ノックアウトマウスの鼻腔に投与した。その後、H3 サブタイプインフルエンザウイルスである A/Aichi/2/68 をこれらのマウス鼻腔より challenge し、肺内でのインフルエンザウイルスの感染抑制を検討した。肺内でのインフルエンザウイルスの活性は、MDCK 細胞を使用して測定した。

C. 研究結果

1) MHC class I ノックアウトマウスまたは MHC class II ノックアウトマウスの皮下にリボソーム封入ペプチド (OVA257-264) と抗 CD40 抗体の両方を投与した後に、脾細胞の CTL 活性を検討した。MHC class I ノックアウトマウスでは CTL を活性化できず、OVA 遺伝子導入 EL4 細胞 (EG7) を傷害できなかったが、MHC class II ノックアウトマウスでは CTL を活性化し、EG7 を傷害できた (図 1)。使用したペプチドは NP366-374 とは異なるが基本的に同じで、皮下に投与した場合には MHC class I ノックアウトマウスではインフルエンザ感染細胞を傷害する CTL を脾臓には見出せないと考えられる。

2) MHC class I ノックアウトマウスまたは MHC class II ノックアウトマウスの鼻腔にリボソーム封入 NP366-374 ペプチドと抗 CD40 抗体の両方を投与した。その後、インフルエンザ A/Aichi/2/68 を鼻腔より感染させた。リボソーム封入 NP366-374 ペプチドと抗 CD40 抗体の両方を投与した MHC class I ノックアウトマウスでは、未処置の MHC class I ノックアウトマウスと比べて、肺でのインフルエンザウイルスの増殖は約 1/500 となった。一方、リボソーム封入 NP366-374 ペプチドと抗 CD40 抗体の両方を投

与した MHC class II ノックアウトマウスでは、未処置の MHC class II ノックアウトマウスと比べて、肺でのインフルエンザ増殖は 10 倍弱程度抑制されただけだった (図 2)。この結果は、1) の結果と反対になり、MHC class II ノックアウトマウスの肺では CTL が弱くしか活性化されない可能性が示された。

3) この差の原因を解析するために、肺内での CD11c 陽性樹状細胞の数を免疫組織化学的手法で数えたところ、MHC class I ノックアウトマウスと MHC class II ノックアウトマウス間では差がなかった。従って、現時点では抗原提示細胞よりは、T 細胞に原因があると推定される。

D. 考察

MHC class I ノックアウトマウスの皮下にリボソーム封入ペプチドと抗 CD40 抗体の両方を投与した場合、CTL を活性化できなかった。このことは、MHC class I ノックアウトマウスでは CTL の数が減少しているため、全体として CTL の傷害性が低下していると解釈できる。一方、MHC class II ノックアウトマウスで CTL を活性化できたことは、我々の方法による CTL の活性化にはヘルパー T 細胞は関与せず、DC による抗原提示が重要であることが確認された。ところが、鼻腔より投与した場合には、肺内でのインフルエンザウイルス感染抑制は MHC class I ノックアウトマウスで見られ、MHC class II ノックアウトマウスでは弱くしか見られなかった。また、肺内の DC の数には差がなかった。MHC class I ノックアウトマウスでも CTL は存在するので、免疫の仕方により活性化も可能になるとの報告があり、肺内では我々の方法により CTL が活性化されると考えら

れる。一方、MHC class II ノックアウトマウスには CTL が存在するが感染抑制が弱かった理由としては、ヘルパー T 細胞からの補助が DC からの抗原提示以外にも肺内での CTL 活性化には重要ではないかと考えられる。この点に関しては、今後解析する予定である。通常のリンパ節で起る CTL の活性化と肺内での CTL の活性化には多少の差異があり、粘膜での免疫反応は特殊であると考えられる。従って、粘膜免疫を活性化するには、粘膜での免疫反応のさらなる解析とそれに伴った工夫が必要になると考えられる。

E. 結論

肺内での CTL の活性化には、活性 DC からの抗原提示以外にも、ヘルパー T 細胞からの液性因子等の補助が必要である可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ito, D., Ogasawara, K., Iwabuchi, K., Inuyama, Y., and Onoe, K.: Induction of CTL responses by simultaneous administration of liposomal peptide vaccine with anti-CD40 and anti-CTLA-4 mAb. *J. Immunol.* 164, 1230-1235, 2000.
2. Namba, K., Ogasawara, K., Kitaichi, N., Morohashi, T., Sasamoto, Y., Kotake, S., Matsuda, H., Iwabuchi, K., Iwabuchi, C., Ohno, S. and Onoe, K.: Amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) by pretreatment with a

pathogenic peptide in liposome and anti-CD40 ligand mAb. *J. Immunol.* 165, 2962-2969, 2000.

3. Kitaichi, N., Ogasawara, K., Iwabuchi, K., Nishihira, J., Namba, K., Onoe, K., Konishi, J., Kotake, S., Matsuda, H. and Onoe, K. Different influence of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in signal transduction pathway of various T cell subsets. *Immunobiol.* 201, 356-367, 2000.

4. Ato, M., Iwabuchi, K., Matsuki, N., Mukaida, N., Iwabuchi, C., Takahashi, A., Takayanagi, T., Dondog, E., Hatakeyama, S., Ishikura, H., Kato, M., Negishi, I., Nishihori, H., Ogasawara, K., Matsushima, K. and Onoe, K. Delayed clearance of zymosan-induced granuloma and depressed phagocytosis of macrophages with concomitant up-regulated kinase activities of src-family in a human monocyte chemoattractant protein-1 transgenic mouse. *Immunobiol.* 201, 432-449, 2000.

5. Kitaichi, N., Matsuda, A., Kotake, S., Namba, K., Tagawa, Y., Sasamoto, Y., Ogasawara, K., Iwabuchi, K., Onoe, K., Matsuda, H., and Nishihira, J.: Inhibition of experimental autoimmune uveoretinitis with anti-macrophage migration inhibitory factor antibodies. *Current Eye Research* 20, 109-114, 2000.

6. Ito, D., Ogasawara, K., Matsushima, K., Morohashi, T., Namba, K., Matsuki, N., Kitaichi, N., Inuyama, Y., Hosokawa, M., Nakayama, E., Iwabuchi, K., and Onoe, K.: Effective priming of cytotoxic T lymphocyte precursors by subcutaneous administration of peptide antigens in liposomes accompanied with anti-CD40 and anti-CTLA-4 antibodies.

Immunobiol. 201, 527-540, 2000.

7. Morohashi, T., Ogasawara, K., Kitaichi, N., Iwabuchi, K. and Onoe, K. : Abrogation of negative selection by GVHR induced by minor histocompatibility antigens or H-2D antigen alone. Immunobiol. (in press)

8. Morohashi, T., Ogasawara, K., Kitaichi, N., Iwabuchi, K., and Onoe, K. : Significant MLR but not CTL responses against recipient antigens generated in T cells from bone marrow chimeras recovered from GVHD. Bone Marrow Transplant. 26, 1069-1076, 2000.

9. Iwabuchi, K., Iwabuchi, C., Tone, S., Itoh, D., Tosa, N., Negishi, I., Ogasawara, K., Uede, T., and Onoe, K. : Defective development of NK1.1⁺ T cell antigen receptor (TCR) $\alpha\beta$ ⁺ cells in zeta-associated protein (ZAP) null mice with an accumulation of NK1.1⁺CD3⁻NK-like cells in the thymus. Blood (in press).

10. 小笠原 一誠 : MHC クラス II と抗原提示 (齊藤隆、竹森利忠編) Bio Science 新用語ライ

ブラリー免疫第2版、羊土社、84-85、2000.

2. 学会発表

1. 小笠原一誠, 福岡順也, 梶野喜一, NP ペプチド特異的CTLによるインフルエンザウイルス感染の抑制 第89回日本病理学会総会 (於 大阪)

2. Yasushi Itoh, Ronald N. Germain, and Kazumasa Ogasawara : Differential TCR Signaling by Differentiated Th1 and Th2 Cells with Identical Receptors The IXth International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2000 (Kyoto)

3. 伊藤靖, 小笠原一誠, Ronald N. Germain : 同一の T 細胞抗原レセプターを持つ Th1 細胞と Th2 細胞の TCR シグナルの差異 : 第 19 回滋賀血液・免疫研究会 (於 大津)

4. 小笠原一誠: 免疫は疾患を制御できるか?: 第 16 回滋賀血液疾患研究会 (於 草津)

5. Construction of effective peptide antigen 2000 JAPAN-US MEDICAL COOPERATION PROGRAM WORKSHOP ON VACCINE (Tokyo)

6. 伊藤 靖、石田英晃、GERMAIN Ronald、小笠原一誠: 同一の T 細胞抗原レセプターを持つ Th1 細胞と Th2 細胞の TCR リン酸化の差異 : 第 30 回日本免疫学会総会 (於 仙台)

7. 梶野喜一、瀧北幹子、福岡順也、伊藤 靖、小野江和則(北大・遺制研・免疫応答)、小笠原一誠 : リポソーム封入 NP366-374 ペプチド+抗 CD40 抗体の鼻腔投与によるインフルエンザウイ

ルスの感染抑制：第 30 回日本免疫学会総会（於 仙台）

8. 瀧北幹子、福岡順也、梶野喜一、石田英晃、伊藤 靖、小笠原一誠：リボソーム封入 NP366-374 ペプチド+抗 CD40 抗体の鼻腔投与によるマウス肺での CTL の活性化：第 30 回日本免疫学会総会（於 仙台）

9. 小笠原一誠：特別講演；免疫反応の人為的制御の試み：第 74 回近畿血液学地方会（於 大津）

CTL activation in class I and class II deficient mice

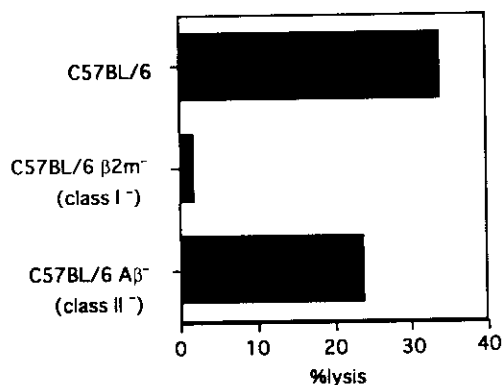
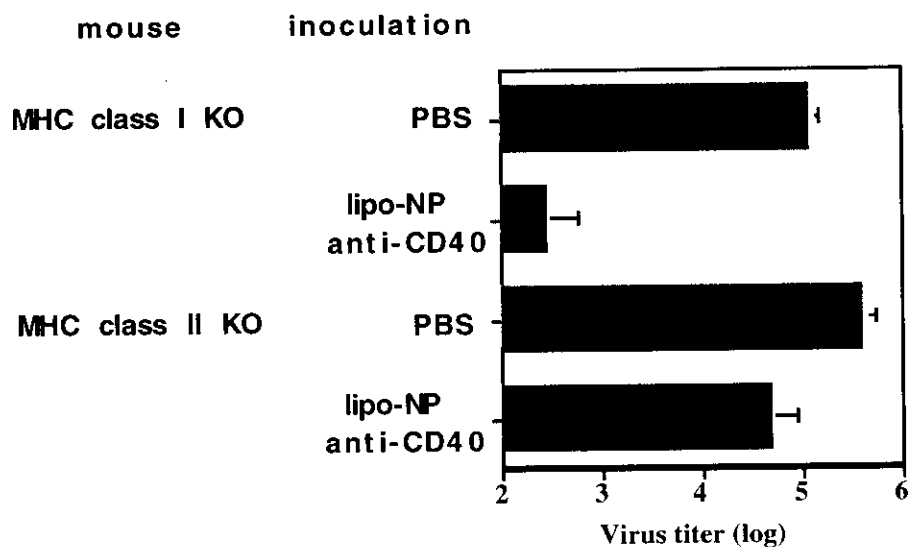


図 1

図 2

Prevention of influenza infection in class I and class II deficient mice



細胞性免疫誘導型エイズワクチンに関する研究

分担研究者 水落 次男（東海大学工学部 教授）

共同研究者 小島 直也（東海大学工学部 助教授）

共同研究者 中田 宗宏（東海大学工学部 助教授）

研究要旨：封入抗原に特異的な DTH や CTL を誘導できる人工糖脂質(M5-DPPE)被覆リボソームのエイズワクチンとしての効果を、モデル抗原としてマウスエイズ(MAIDS)ウイルスの gagP12 領域にコードされるペプチドを封入したりリボソームでマウスを免疫した後、MAIDS ウイルスを大量投与することで調べた結果、M5-DPPE 被覆リボソームで免疫したマウス群は対照マウス群と比べ約 1.6 倍の延命効果が認められ、M5-DPPE 被覆リボソームを用いたペプチドワクチンに MAIDS の発症抑制効果があることが示された。さらにサルを用いて、M5-DPPE 被覆リボソームの安全性を確認した。そこで、人工糖脂質をアジュバントとする DNA ワクチンの開発を試みた。その結果、M5-DPPE と正電価をもつコレステロール誘導体である DC-コレステロールを用いて作製したりリボソームが DNA を効率よく保持でき、抗原提示細胞であるマウス腹腔マクロファージに効率よく遺伝子を移入・発現できることが示された。また、DC-コレステロールの含量をコントロールすることで遺伝子の移入・発現効率を上げることができるとも示された。これらの結果から、この人工糖脂質がペプチドワクチンや DNA ワクチンに用いることのできるヒトに対して安全で実用的なアジュバントとして大変有望であると云える。

A. 研究目的

最近、エイズウイルス(HIV)の感染防御や HIV 感染者の病態制御において細胞性免疫を誘導するようなワクチンの開発の重要性が指摘されている。また HIV のタンパク質あるいはその部分ペプチドはアジュバントとともに投与しないと細胞性免疫を誘導できないことも知られている。しかし、効果的な細胞性免疫誘導能をもち、ヒトに対して毒性が少なく安全なアジュバントは現在見あたらない。その一方、病原体由来のタンパク質からなる不活性化、成分ワクチンは潜在的に不純物の混入の危険性を有しているため、抗原の純度を高めるなどの解決されるべき課題がある。近年 DNA を直接個体に接種すると免疫

が誘導されることが見いだされ、DNA ワクチンの感染症への応用が期待されている。しかし DNA のみを個体に接種する方法では免疫誘導能が著しく低いため、DNA を大量に個体に接種する必要があり、DNA ワクチン用の免疫誘導アジュバントの開発が社会的急務となっている。

我々は、オリゴマンノースを導入した人工糖脂質(M5-DPPE)で被覆したりリボソームがそのリボソーム中に封入されたタンパク質抗原またはペプチド抗原に特異的な DTH や MHC-Class I 拘束性 CTL を強く誘導するアジュバント活性を持っていることを示してきた。そこで本研究では、M5-DPPE をアジュバントとして用いたワクチンが実際の疾患の発症を抑制できるかを検討する

とともに、人工糖脂質の DNA ワクチン用アジュバントとしての利用の可能性について検討した。

B. 研究方法

1. 人工糖脂質の作製

マンノペンタオース (M5) とジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE) を還元アミノ化反応で化学的に結合させ M5-DPPE を合成した。合成した M5-DPPE は HPLC を用い精製した。

2. マウスエイズ抗原ペプチドを封入した糖鎖被覆リポソームの作製

マウスエイズ (MAIDS) ウイルスの gagP12 領域にコードされる 25-mer ペプチド (P12-25; NGGPLIDLITENLPNLPPLSKGPVK) とその部分ペプチドを合成し、抗原とした。抗原ペプチド封入リポソームは、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) とコレステロールを用いて脂質フィルムを作製し、次いでボルテックスミキサーを用いてペプチド抗原を封入したマルチメラリポソームを作製した。さらにこのリポソームの表面に M5-DPPE を組み込み、糖鎖被覆リポソームを作製した。

3. M5-DPPE 被覆リポソームによる MAIDS 発症抑制の解析

作製した抗原ペプチド封入糖鎖被覆リポソームをペプチドワクチンとして用いて、C57BL/6 マウスに 3 μ g の抗原ペプチドを含むワクチンで一回皮下免疫をした。一週間後に MAIDS ウイルス (IP-BM5 MuLV) を致死量投与して経過観察を行った。なお、この実験は、国立感染症研究所の水落利明先生の協力を得て行った。

4. 陽性荷電コレステロール誘導体を含む糖鎖被覆リポソームの作製

DPPC と陽性荷電コレステロール誘導体、Cholesteryl N-(dimethylaminoethyl) carbamate (DC-Chol)、を用いてロータリーエバポレーターで減圧乾固することで脂質フィル

ムを作製した。M5-DPPE をリポソームに組み込むために、M5-DPPE を加え、再度ロータリーエバポレーターを用いて減圧乾固させた。次に、PBS を加え、37°C に保温しながら激しく攪拌することにより、リポソームを作製した。さらに超音波でリポソームの粒径を小さく整えた。

5. リポソームの DNA 保持能力の検討

DC-Chol の全コレステロール (コレステロール + DC-Chol) に対するモル比を 0%、6.25%、12.5%、25%、50%、100% と変化させたリポソームを上記に従い調製した。調製したリポソームの DPPC 濃度を 2 mg/ml に調整したのち、リポソーム 100 μ l と 1 mg/ml サケ精子 DNA を 100 μ l を混合し、30 分間静置後、100,000 x g、30 分間遠心し、沈殿を回収した。沈殿に 1% SDS を含む PBS 200 μ l を加え、3 分間煮沸後、10,000 rpm、30 分間で遠心し上清を回収した。その後、上清の 260 nm における吸収を測定して DNA の結合量とした。

6. マウス腹腔マクロファージの調製

マウスから、冷 PBS を用い常法に従いマウス腹腔よりマクロファージを含む細胞を回収した。1,000rpm、4°C、10 分間遠心を行ない上清を除き、RPMI1640 培地 (10% FCS 添加) に懸濁させ、細胞数を算定した。1 x 10⁶/ml になるよう細胞濃度を調節し、96-well プレートの well に 1 x 10⁵ 個の細胞を播き、4 時間培養した。その後、浮遊細胞を除去し、接着細胞をマクロファージとして DNA のトランスフェクションに用いた。

7. pCMV- β -Gal の細胞へのトランスフェクション

リポフェクトアミンと pCMV- β -Gal (0.5 μ g/ μ l) を混合し 30 分間室温に放置して複合体をつくり、マウスメラノーマ B16 細胞 (5 x 10⁴)、マウス 3T3 繊維芽細胞 (1 x 10⁵)、及びマウス腹腔マクロファージ (1 x 10⁵) それぞれにプロトコールに従いトランスフェクトした。48 時間後、

2%パラホルムアルデヒドで10分間室温に放置して細胞を固定し、1 mg/ml X-Gal で細胞を染色した。DC-Chol を含むリポソームを用いる場合は、リポソーム (DPPCとして10 nmol 相当) と pCMV- β -Gal 0.5 μ g とを混合しリポソーム-DNA 複合体をつくり、培養液中に加えた。48 時間培養後、細胞を2%パラホルムアルデヒドでマクロファージを固定した後、X-Gal で細胞を染色した。

C. 研究結果

1. M5-DPPE 被覆リポソームによる MAIDS 発症抑制の解析

マウスエイズ(MAIDS)ウイルスの gagP12 領域にコードされるペプチドを抗原として封入したリポソームの表面を M5-DPPE で被覆し、これをペプチドワクチンとして用いて C57BL/6 マウスに一回だけ皮下免疫をした。一週間後に MAIDS ウイルスを腹腔内に大量投与して経過観察を行い、人工糖脂質アジュバントの MAIDS 発症抑制効果を調べた。その結果、ペプチドのみを接種したマウスや非免疫マウスはすべて140日前後で MAIDS を発症して死亡した。一方、抗原ペプチドを封入した糖鎖被覆リポソームワクチンで免疫したマウスでは、対照マウスと比較して80日間(対照マウスの1.6倍)の延命が認められた。しかし、このマウス群も最終的にはすべて死亡した。これらの事実は、糖鎖被覆リポソームを用いてペプチド免疫すると、一週間後に行う MAIDS ウイルスの大量投与で感染は成立してしまうが、その後の MAIDS の発症は抑制できたことを意味している。

2. 陽性荷電コレステロール誘導体を含む糖鎖被覆リポソームの DNA ワクチン用アジュバントとしての利用可能性の検討

我々はこれまでに、タンパク質抗原を封入したリポソームに M5-DPPE を組み込んで作製した M5-DPPE 被覆リポソームが、抗原特異的な強い

細胞性免疫を誘導するアジュバント活性を示すことを明らかにしている。さらに本研究で M5-DPPE 被覆リポソームを用いたペプチドワクチンが、実際に MAIDS の発症を抑制できることを示した。そこでタンパク質やペプチドの代わりに DNA を封入したリポソームを作製し、DNA ワクチン製剤の作製を試みたが、コレステロール (Chol) と DPPC から構成される通常のリポソームには DNA が封入・保持されないことが判明した。そこで我々は、負電価をもつ DNA をリポソームに保持させるため、正電価を有するコレステロール誘導体である DC-コレステロール (DC-Chol) と DPPC を用いた M5-DPPE 被覆リポソームの作製を試みた。作製したリポソームの構成成分を TLC で分析したところ、DC-Chol を用いてリポソームを作製しても、M5-DPPE がリポソームに組み込まれていることが確認できた。さらにこの DC-Chol と M5-DPPE を有するリポソームが、マンノースを認識するコンカナバリン A により特異的に凝集反応を示すことから、リポソーム中に組み込まれた M5-DPPE の糖鎖部分はリポソーム表面に露出していることが確認できた。

DC-Chol を含むリポソームがどの程度の DNA 保持能力を持っているかを検討するため、DC-Chol と Chol の合計モル数を一定にし、全コレステロール量に対する DC-Chol の含有率を 0~100%と変化させたリポソームを作製した。これらのリポソームとモデル DNA を混合して、遠心後、リポソーム-DNA 複合体を沈殿として回収し、沈殿中の DNA を定量することで、リポソームの DNA の保持能力を調べた。その結果、DC-Chol が全コレステロールの 25%以上を占めているリポソームでは、DNA を保持することができ、DC-Chol の含有率が上昇するに従い DNA の保持量が増加した。

つぎに DC-Chol と M5-DPPE を含むリポソームを用いて、リポソームに保持された DNA を抗原

提示細胞へ移入・発現（トランスフェクション）させることが可能かどうかを、モデル DNA として pCMV- β -Gal を、抗原提示細胞としてマウス腹腔マクロファージを用いて検討した。また対照として市販の遺伝子導入試薬であるリポフェクトアミンを用いた。リポフェクトアミンを用いて pCMV- β -Gal をマウス腹腔マクロファージ、マウス B16 メラノーマ細胞、マウス 3T3 繊維芽細胞にトランスフェクトし、 β -ガラクトシダーゼの発現を X-Gal による細胞染色で検討したところ、B16 細胞や 3T3 細胞には β -ガラクトシダーゼ遺伝子が移入されタンパク質が発現していること示されたが、マウス腹腔マクロファージではその発現は観察されなかった。

一方、DC-Chol と M5-DPPE を含むリポソームを用いてマウス腹腔マクロファージに pCMV- β -Gal をトランスフェクションした場合、X-Gal による細胞染色で陽性を示すマクロファージが多数認められ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子がマウス腹腔マクロファージに移入されタンパク質として効率よく発現していること示された。しかし M5-DPPE を組み込んでいないリポソームを用いた場合には、マクロファージでの β -ガラクトシダーゼの発現は観察できなかった。さらに、リポソーム中の DC-Chol の含有率が pCMV- β -Gal のマクロファージへのトランスフェクション効率に及ぼす影響を、DC-Chol の全コレステロール (Chol + DC-Chol) に対する含有率が異なるリポソームを用いて検討した。その結果、DC-Chol の全コレステロールに対する含有率が 25% のリポソームを用いて β -ガラクトシダーゼ遺伝子をトランスフェクションした場合、最も高い β -ガラクトシダーゼの発現効率を示した。

D. 考察

本研究では第一に、我々が開発し且つ強い細胞性免疫誘導能をもつ人工糖脂質アジュバント

のペプチドワクチンとしての有効性を確認することを目的とした。その結果、MAIDS ウイルスの抗原ペプチドを M5-DPPE 被覆リポソームに封入して作製したペプチドワクチンが、実際に MAIDS ウイルスを大量に投与されたマウスの MAIDS 発症を抑制し、感染マウスを MAIDS による死亡から延命できることを明らかにした。また、抗原ペプチドを封入した糖鎖被覆リポソームを接種したマウスの皮膚局所には膿瘍や顕著な炎症もまったく認められなかった。さらに、サルを用いて M5-DPPE 被覆リポソームの安全性についても検証し、サルでも膿瘍や顕著な炎症がまったく認められないことを確認した。これらの知見は人工糖脂質がヒトに対して安全で実用的なアジュバントとして大変有望であることを意味している。

本研究ではさらに、この人工糖脂質と正電価をもつコレステロール誘導体である DC-Chol を用いて作製したリポソームが DNA を効率よく保持できることを明らかにし、さらにこのようなリポソームが、抗原提示細胞であるマウス腹腔マクロファージに効率よく遺伝子に移入・発現できることも明らかにした。しかもリポソーム中の DC-Chol の含量をコントロールすることで遺伝子の移入・発現の効率を上げることができ、また細胞毒性を低減させることができることが明らかになった。従来から DNA の細胞内移入・発現には毒性の高いリポフェクトアミンなどが研究用として用いられているが、これら既存の遺伝子移入試薬では抗原提示細胞であるマクロファージには遺伝子に移入できないことが、本研究でも確認された。そのため、我々が本研究で開発した人工糖脂質被覆リポソームは、ヒトに対して使用可能な DNA ワクチン用アジュバントとしても有望であるだけでなく、遺伝子治療用のベクターとしての可能性も秘めていると云えよう。

E. 結論

本研究では、ヒトの生体内に広く存在する糖タンパク質糖鎖の一部と脂質を用いて作製した人工糖脂質を用いて、実際に MAIDS 発症を抑制できる有効なペプチドワクチンを構築することに成功した。またこの物質がマウスおよびサルに対して毒性を示さないことも明らかとなった。さらにこの人工糖脂質と陽性荷電コレステロール誘導体を含むリポソームが抗原提示細胞であるマウス腹腔マクロファージに効率よく遺伝子に移入・発現できることも明らかになった。そのため、HIV などに対して有効でヒトに対して使用可能なペプチドワクチン用アジュバントとして大変有望であるだけでなく、DNA ワクチン用アジュバントとしても有望である。

F. 研究発表

1. 研究発表

- 1) Nagaoka, H., Takahashi, Y., Hayashi, R., Nakamura, T., Ishii, K., Matsuda, J., Ogura, A., Shirakata, Y., Karasuyama, H., Sudo, T., Nishikawa, S., Tsubata, T., Mizuochi, T., Asano, T., Sakano, H., and Takemori, T.: Ras mediates effector pathways responsible for pre-B cell survival, which is essential for the developmental progression to the late pre-B cell stage. *J. Exp. Med.*, 192: 171-181, 2000.
- 2) Hosoya, N., Takahashi, T., Wada, M., Endo, T., Nakamura, T., Sakashita, H., Kimura, K., Ohnishi, K., Nakamura, Y., Mizuochi, T., and Iwamoto, A.: Genotyping of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* isolates in Japan based on nucleotide sequence variations in internal transcribed spacer regions of rRNA genes. *Microbiol. Immunol.*, 44: 591-596, 2000.
- 3) Matsumoto, A., Shikata, K., Takeuchi, K., Kojima, N., Mizuochi, T.: Autoantibody activity in IgG rheumatoid factor increases with decreasing levels of galactosylation and sialylation, *J. Biochem.* 128: 621-628, 2000.
- 4) Matsumoto, A., Kojima, N., Takeuchi, F., and Mizuochi, T.: Kinetic analysis of interaction of different types of rheumatoid factors toward immobilized IgG by surface plasmon resonance. *J. Biochem.*, 128: 1009-1016, 2000.
- 5) 水落次男: エイズ, 「基礎生化学実験法 第5巻 脂質・糖質・複合糖質」, 日本生化学会編, pp. 270-273, 東京化学同人, 2000.
- 6) Shimizu, Y., Nakata, M., Matsunuma, J., Mizuochi, T.: Simultaneous quantification of components of neoglycolipid-coated liposomes using high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *J. Chromatogr. B*, in press, 2001.
- 7) Yoshizawa, I., Soda, Y., Mizuochi, T., Yasuda, S., Rizvi, T. A., Mizuochi, T., Takemori, T., and Yokota-Tsunetsugu, Y.: Enhancement of mucosal immune response against HIV-1 gag by DNA immunization, *Vaccine*, in press, 2001.
- 8) Mizuochi, T., Pastore, Y., Shikata, K., Fulpius T., Nakata, M., Fossati, L., Reininger, L., Matsushita, M., Fujita, T., and Izui, S., The level of galactosylation determines the pathogenicity of murine IgG3 monoclonal autoantibodies, *Blood*, in press, 2001.
- 9) Kenjo, A., Takahashi, M., Matsushita, M., Endo, Y., Nakata, M., Mizuochi, T., and Fujita, T., Cloning and characterization of novel ficolins from the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*, *J. Biol. Chem.* in press, 2001.

2. 学会発表 省略

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

抗原提示と T 細胞活性化に関する研究

(分担) 研究者 水落 利明 細菌・血液製剤部室長
共同研究者 笠井 道之 細菌・血液製剤部主任研究官

研究要旨

CD4⁺ヘルパー T 細胞中心とした液性免疫活性化法の開発、ならびにそれを細胞レベルで評価する方法の確立を目的として、胸腺上皮細胞の MHC class II 拘束性抗原提示の分子メカニズムに関する研究をおこなった。

A. 研究目的

生体の免疫反応には、抗原提示細胞が MHC クラス I+ 抗原ペプチド複合体を CD8 陽性 (CD8⁺) キラー T 細胞に提示することではじまる細胞性免疫と MHC クラス II+ 抗原ペプチド複合体を CD4 陽性 (CD4⁺) ヘルパー T 細胞に提示することではじまる液性免疫とがある。特に、感染予防や治癒後の再感染防止などを考えた場合、液性免疫の能力を高めることは必要である。そのためには、液性免疫系の中核となる CD4⁺ヘルパー T 細胞の機能を効率良く活性化するワクチンなどの抗原感作のシステムを設計し、それを評価する方法の確立が必要になる。

本研究は、未だに不明な点の多い MHC クラス II 拘束性抗原提示の分子メカニズムを解明し、CD4⁺ヘルパー T 細胞中心とした液性免疫の活性化方法の開発、ならびにそれを細胞レベルで評価する方法の確立を目的としたものである

B. 研究方法

目的を達成するために以下に記す 4 つの方

法で研究を行う。

- (1) 抗原提示能力の異なる 2 種類の胸腺上皮細胞から MHC クラス II+ ペプチド複合体の形成・輸送をになう細胞内小胞を分離し、MHC クラス II+ペプチド複合体の形成・輸送の分子メカニズムの解析する。
- (2) H2-DM (または H2-M) 分子と GFP あるいは RFP との融合タンパク質を発現するベクターを作製し、それを胸腺上皮細胞やマクロファージ、B 細胞などの抗原提示細胞へ導入・発現させる。
- (3) 共焦点レーザー顕微鏡観察による GFP 又は RFP 融合タンパク質の細胞内局在の観察及び抗 GFP 又は抗 RFP 抗体結合磁気ビーズを用いた細胞分画による細胞内小胞の分離とその性質を解析する。
- (4) GFP 又は RFP 融合タンパク質を発現する抗原提示細胞を用いて、液性免疫を活性化する抗原、アジュバント、サイトカイン、ワクチン等を検索・評価するシステムを確立する。

C. 研究結果

本年度は、(1)を主体に研究をすすめた。

B6 マウス胸腺皮質部および髄質部より上皮細胞株を樹立した。皮質部上皮細胞 (cTEC) および髄質部上皮細胞 (mTEC) は、共に IFN- γ の刺激により MHC クラス II 拘束性抗原提示に必要なクラス II 複合体および DM 分子 (ヒトでは HLA-DM、マウスでは H2-M または H2-DM) を発現する。しかし、mTEC は、可溶性抗原 (OVA, および β -galactosidase) をクラス II 分子拘束性の抗原特異的ヘルパー T 細胞に提示する能力を持つが、cTEC は、そのような抗原提示能力を持たないことをすでに見出ししている。これまで、このような両者 TEC のクラス II 複合体に拘束性抗原提示能力の違いがあるのは、両者の抗原提示に関与する細胞内小胞の微少環境の違いによることを示す結果を得てきたが、本年度は、両者 TEC から MHC クラス II + ペプチド複合体 (クラス II 複合体) が形成される細胞内小胞内を単離する方法を開発し、両者の細胞内小胞内における MHC クラス II インバリエント鎖 (Ii 鎖) のプロセシング環境が異なることを示す結果を得た。

両者 TEC から抗クラス II 抗体を結合したカラムを用いてクラス II 複合体を精製した。非還元下 SDS-PAGE において、mTEC のクラス II 複合体は cTEC のクラス II 複合体に比べて大きい泳動度を示した (Fig. 1)。両者のクラス II 複合体に結合しているペプチドを酸溶出した後、MALDI-MS で解析したところ、Ii 鎖に由来する CLIP が mTEC の場合、cTEC の場合よりも C 末側に 5-6 残基長いことが

わかった (Fig. 2)。非還元下 SDS-PAGE において、mTEC のクラス II 複合体が cTEC のクラス II 複合体に比べて大きい泳動度を示す理由は、このような C 末側の長さの違いによるものと考えられた。

非還元下 SDS-PAGE における mTEC のクラス II 複合体と cTEC のクラス II 複合体との泳動度の違いは、DM 分子の細胞質領域を認識する抗体をコートした磁気ビーズを用いて単離した DM 陽性の細胞内小胞 (Fig. 3) に存在するクラス II 複合体においても、精製したクラス II 複合体の場合と同様に認められた。このことは、両者 TEC の DM 陽性の細胞内小胞内で、C 末側の長さの異なるペプチドと結合したクラス II 複合体が形成されることを示唆している (Fig. 4)。

磁気ビーズを用いて単離した DM 陽性の細胞内小胞には、クラス II 複合体の他に 41kDa および 31kDa の Ii 鎖とその分解物である約 10kDa の Ii 鎖の分解物が認められた。さらに、システインプロテアーゼ阻害剤であるロイペプチンの存在下で両者 TEC を培養した後に磁気ビーズを用いて単離した DM 陽性の細胞内小胞では、10kDa の Ii 鎖の分解物の増加が認められた (Fig. 5)。従って、DM 陽性の細胞内小胞内が、Ii 鎖がプロセシングされる場であると考えられた。

この磁気ビーズを用いて単離した DM 陽性の細胞内小胞には、各種の活性化プロテアーゼの存在が確認された。このことは、抗体をコートした磁気ビーズを用いることにより、完全な小胞が単離されることを示している。さらに、小胞輸送に関わるタンパク質および

加水分解酵素の解析から、この細胞内小胞はエンドソームとライソソームとの混合物であると考えられた(Fig.5)。

D. 考察

DM分子の細胞質領域を認識する抗体をコートした磁気ビーズを用いて mTEC および cTEC から DM 陽性の細胞内小胞を単離する方法を開発した。DM 陽性の細胞内小胞には各種の活性型プロテアーゼの存在が認められ、完全な小胞であることを示していた。また、細胞内小胞に対するマーカープロテインの検索から、この小胞はエンドソームとライソソームとの混合物と考えられた。

この DM 陽性の細胞内小胞分画から Ii 鎖とその分解物およびクラス II 複合体が検出されることから、この小胞が Ii 鎖のプロセッシングとクラス II 複合体の形成がおこなわれる場であることを示していた。この分画に検出されるクラス II 複合体においても、非還元下 SDS-PAGE における泳動度には、両者 TEC の間に違いがみられた。このことは、両者 TEC 内の DM 陽性細胞内小胞内の Ii 鎖の C 末側プロセッシングに関わるプロテアーゼの種類および活性化環境がお互いに異なることを示している。

mTEC のクラス II 複合体と cTEC のクラス II 複合体との間にみられる機能（抗原提示能）と構造（非還元下 SDS-PAGE における泳動度）の違いは、クラス II 複合体の形成がおこなわれる DM 陽性の細胞内小胞内の微小環境が、両者 TEC の間で異なることに起因していると考えられた。現在、DM 陽性の細胞内小胞内で、クラス II 複合体の形成に関与

するプロテアーゼをはじめ、クラス II 複合体を中心とするラフト形成とその輸送にどのようなタンパク質が関与しているのかについて研究を進めている。

E. 結論

細胞内からクラス II 複合体が形成される DM 陽性の細胞内小胞を単離する方法を開発し、クラス II 複合体の機能的性質および構造的性質は、クラス II 複合体の形成がおこなわれる細胞内小胞の微小環境に影響されることを示唆する結果を得た。

この方法は、今後の CD4⁺ヘルパー T 細胞中心とした液性免疫の活性化方法の開発、ならびにその方法を細胞レベルで評価するためには有用である。

F. 研究発表

(1) 論文発表

- ① Munoz, D., E. Kominami, and T. Mizuochi: Generation of both MHC class I- and class II-restricted antigenic peptides from exogenously added ovalbumin in murine phagosomes. *FEBS Lett.* 478:178-182, 2000
- ② Odaka, C. and T. Mizuochi: Angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril prevents activation-induced apoptosis by interfering with T cell activation signals. *Clin. Exp. Immunol.* 121:515-522, 2000.
- ③ Suriki, H., K. Suzuki, Y. Baba, K. Hasegawa, R. Narusawa, Y. Okada, T. Mizuochi, H. Kawachi, F. Shimizu, and H. Asakura: Analysis of cytokine production in the colon of nude mice with experimental colitis induced by transfer of immunocompetent cells from mice infected with a