

図 2. A ($Rfv-3^{+/+}$) 及び C57BL/10 ($Rfv-3^{-/-}$) マウス系統の交配によるウイルス血症発生の分離と、退交配マウスにおける中和抗体価の分離。

(Kondo, T. et al. *J. Virol.* 69:6735-41, 1995) との異同を明らかにするため、新しく改良型ワクシニアウイルス発現ベクターを作成し、感染防御エピトープが存在すると考えられるMA蛋白質の短い断片を発現する組換えワクシニアウイルスを作成した。これらのミニ遺伝子を発現する組換えワクシニアウイルスで(C57BL/6 × A)F₁マウスを免疫後、フレンドウイルスを接種して感染の成立と発症の経過を観察した。

一方、FV感染後の中和抗体産生を制御する非MHC遺伝子 $Rfv-3$ の作用機序と遺伝子実体を明らかにするため、感受性(中和抗体低産生性) $Rfv-3^{-/-}$ 遺伝子をホモに持つA系統マウスと、抵抗性(中和抗体早期産生性)

$Rfv-3^{+/+}$ 遺伝子をホモに持つC57BL/10 (B10) 系マウスとの間で交配を行い、種々の退交配マウスを作成した。これらのマウスにFVを接種し、継時的に血清を採取して、既に報告した方法 (Robertson, M.N, Miyazawa, M. et al. *J. Virol. Methods* 34:255-271, 1991.) により中和抗体価を測定した。

C. 研究結果

1) MA蛋白質上の感染防御エピトープ解析
MA蛋白質全長を発現する組換えワクシニアウイルスには感染防御能及び白血病死の防止能があり、一部オーバーラップするMA遺伝子小断片を発現する複数の組換えワクシニ

Genetic background	A		(B10 × A)F ₁	(B10 × A) × A	
	<i>Rfv-3^{sls}</i>		<i>Rfv-3^{rls}</i>	<i>Rfv-3^{sls}</i>	<i>Rfv-3^{rls}</i>
	<i>H-2^{a/a}</i>	<i>H-2^{a/b}</i>	<i>H-2^{a/b}</i>	<i>H-2^{a/a}</i>	<i>H-2^{a/a}</i>
PID20	—	IgM	IgM, IgG	—	IgM
PID 40-60	N.D.	IgM, IgG (±)	IgM < IgG	IgM	IgM

表 *Rfv-3* 遺伝子は H2 と相互作用して中和抗体産生の速度を決定する

アウイルス(vK1~vK5)、及び我々が gag 蛋白質リーダーペプチド内に同定した CTL エピトープのみを発現する組換えワクシニアウイルスには、感染防御能がなかった(図1)。特に vK2~vK5 については、これらを同時に組み合わせ免疫を行っても、感染初期の脾腫発症阻止、その後の生存延長効果ともに認められなかった。

2) ウイルス中和抗体産生を制御する非 MHC 遺伝子 *Rfv-3* の同定と機能解析

Rfv-3 遺伝子は、元々 FV 感染 35~60 日後におけるウイルス血症持続の有無によって定義された。図2左に示す通り、A 系統マウスではウイルス血症が持続し、B10 マウスでは早期にウイルス血症が消失する。F₁ マウスではウイルス血症は持続せず、B10 系統の持つ遺伝子が優性である。また、F₁ を A 系統に退交配したマウスでは半数がウイルス血症の持続を示す(Chesebro, B., Miyazawa, M. et al. *Annu. Rev. Immunol.* 8:477-499, 1990)。ウイルス血症持続の有無を決定するのは中和抗体産生の有無であると考えられるが、実際に我々は、FV 接種 15 日後の中和抗体価が *Rfv-3* 遺伝子

型に連鎖して分離することを証明した(図2右)。

Rfv-3 遺伝子の作用機序を解明するため、A 系統及び B10 系統の種々のコンジュニクマウスを用い、FV 接種後のウイルス中和抗体価を経時的に測定した。その結果、

Rfv-3^{sls} でかつ H2^a ハプロタイプをホモに持つマウスであっても、FV 接種後 40 から 60 日が経過すれば中和抗体を産生すること、中和抗体の産生は *Rfv-3'* アリルをひとつ持つか、H2^b ハプロタイプを持つか、いずれかの条件で促進されること、また、これら二つの条件を同時に持つと感染 20 日後には IgG クラスの中和抗体が産生されるようになることが明らかとなった(表)。即ち、*Rfv-3* は H2 と協調して中和抗体産生とそのクラススイッチの速度を制御する遺伝子である。

Rfv-3 遺伝子の染色体マッピングのため、総計 460 匹以上の退交配マウスを用い、STS マーカーによる連鎖解析を行った。その結果、*Rfv-3* 遺伝子座は第 15 染色体テロメア寄り、約 5Mbp の範囲にマップされた(図3)。既にこの領域をカバーするお互いに重複した 96 クロソンの BAC によりコンティグを同定済みで、*Rfv-3^{sls}* の A あるいは BALB/c マウスに BAC を導入したトランスジェニックマウスを作成中である。

興味深いことに、*Rfv-3* 遺伝子座を含む領域とシンテニーのあるヒト第 22 染色体領域には多型性に富むマーカーが存在する。現在、こ

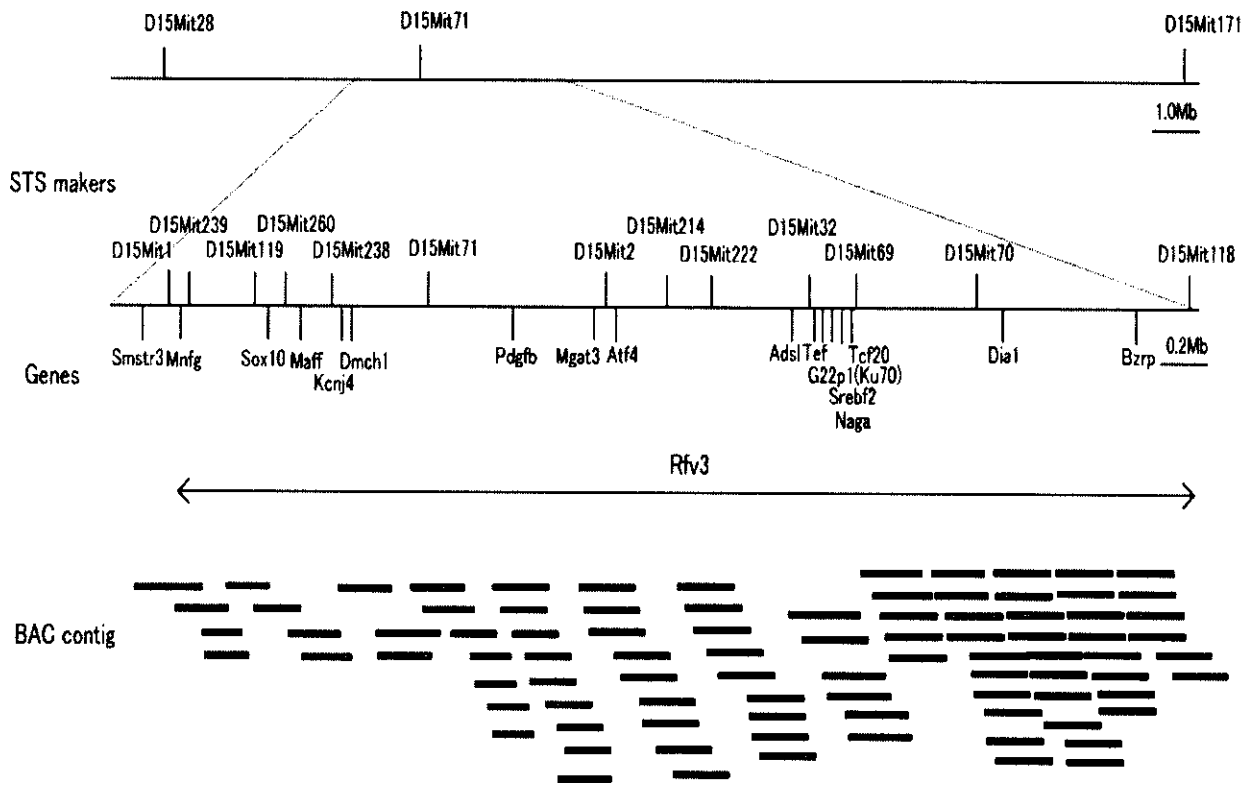


図 3. *Rfv-3*遺伝子座のマッピングとBACコンティグの同定

のヒト染色体マーカーを用いて、HIV exposed seronegativeのヒト集団の遺伝子型に偏りがな
いかを検討中である。

D. 考察

我々は以前から、フレンドウイルスgag遺伝子産物N-末のMA蛋白質内に感染防御に有効な抗原構造があり、複数のCD4陽性Tリンパ球認識エピトープが存在することを示してきた。

MA蛋白質中に存在する感染防御に有効な抗原構造は、いまだにその実体が同定出来ていない。今回、新たに改良型ワクシニアウイルスベクターを作成してミニ遺伝子発現を行った結果、MA蛋白質全長には感染防御能があるが、既に同定したCD4陽性Tリンパ球

認識エピトープを含むMAの小断片単独、あるいはそれらの組み合わせでは感染防御が出来ないことがわかった。以前からHIVのMA蛋白質であるp17に対する抗体がウイルス中和能を示すとの報告があり、合成ペプチドを用いた我々の以前の実験では、MAのアミノ酸残基38-67の範囲に中和抗体産生を誘導するB細胞エピトープが存在する可能性が示唆されている。MA蛋白質全長による免疫では感染初期の脾腫発症が見られず、一種の遮断免疫が誘導されている可能性がある。今後、MA蛋白質上のB細胞エピトープとT細胞エピトープの協調を視野に、最終的に感染防御抗原構造の同定を目指したい。

FV感染後の中和抗体産生を制御する非MHC遺伝子*Rfv-3*を、第15染色体テロメア寄

りの約5Mbpの範囲にマップした。*Rfv-3*はH2と協調して機能し、中和抗体産生とそのクラススイッチの速度を規定していると考えられる。その作用機序から、新たなT細胞・B細胞間相互作用のメカニズムが明らかにされる可能性もあり、*Rfv-3*遺伝子座を含むBACコンティグを利用し、なるべく早期にこの遺伝子の実体を明らかにしたい。

E. 結論

マウスレトロウイルスMA蛋白質内は、その全長を用いて免疫を行うと、感染早期に防御能を発揮する抗原構造を含んでいる。MA蛋白質上に複数同定したCD4陽性Tリンパ球認識エピトープは単独では有効でなく、恐らく複数エピトープで同時に免疫されることが感染防御に重要である。

FV感染個体でH2と協調して中和抗体産生とそのクラススイッチを制御する非MHC遺伝子*Rfv-3*を、第15染色体テロメア寄り5Mbpの範囲にマップした。この遺伝子座を含む領域にシンテニーのあるヒト第22染色体領域には多型性に富むマーカーがあり、今後HIV exposed seronegativeの患者集団でこのマーカーの多型性と抗体産生能の相関を解析することが有意義である可能性がある。

F. 健康危険情報

該当するものなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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**:3152-3163, 2001.

2) Tsuji, S., M. Okamoto, K. Yamada, et al. B cell adaptor containing Src homology 2 domain (BASH) links B cell receptor signaling to the activation of hematopoietic progenitor kinase 1. *J. Exp. Med.* **194**:529-539, 2001.

3) Fukuoka, K., T. Ajiki, T., M. Miyazawa, et al. Changes in the number of gut mucosal T-lymphocytes and macrophages in patients treated by external biliary drainage. *Eur. J. Surg.* **167**:684-688, 2001.

4) Niwa, A., N. Iwanami, H. Uenishi, N. Tabata, H. Yamagishi, and M. Miyazawa. A single-epitope CD4⁺ T-cell vaccine protects mice against fatal retroviral infection by eliciting multiple effector mechanisms and preventing immunosuppression. *Submitted for publication*.

2. 学会発表

1) Miyazawa, M., N. Tabata, and H. Ohtani. Induction of granulomatous arteritis in normal mice by injection of a monoclonal anti-retroviral gp70 autoantibody. **13th International Workshop on Retroviral Pathogenesis** (Lugano, Switzerland). October 26 - 29, 2001.

2) Abe, H., A. Niwa, C. Ishihara, H. Kawabata, Y. Takei, and M. Miyazawa. *Rfv-3* gene and a novel epigenetic factor control the kinetics of neutralizing antibody production at the early stage of Friend virus infection. **13th**

International Workshop on Retroviral Pathogenesis (Lugano, Switzerland). October 26 - 29, 2001.

3) 宮澤 正顯. Overview 動物レトロウイルス: 宿主因子による制御機構. 日本ウイルス学会 第49回学術集会・総会(大阪), 2001年1月18~20日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当するものなし。

研究要旨

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) を肺内で活性化するためには、ヘルパー T 細胞も必要であることを確認した。その結果、ヘルパーエピトープと CTL エピトープのペプチドを同時に投与することがより効果的なペプチドワクチンになると期待される。また、免疫抑制サイトカインである TGFβ を中和して、免疫反応の増強を試みた。

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。我々は、従来より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 (D^b) 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。次に、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た。しかし、両者において感染抑制が見られなかった。今回は、このことを確認すると同時に、免疫抑制サイトカインである TGFβ を中和して、免疫反応の増強を試みた。

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 (50μg/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。

これとは別に、B6 マウスの鼻腔にリポソーム封入 NP366-374 と TGFβ を中和する分泌型 TGFβ レセプターを同時に投与した後、A/Aichi/2/68

を challenge し、肺内でのインフルエンザウイルスの増殖を測定した。

(倫理面への配慮)

動物を処置する場合は、かならずエーテルかネブタールによる麻酔を行い、動物に苦痛を与えないように配慮している。

C. 研究結果

1) MHC class I ノックアウトマウスにおいて、鼻腔にリポソーム封入 NP366-374 ペプチドと抗 CD40 抗体の両方を投与した群と未処置の群の間では、肺でのインフルエンザウイルスの増殖には有意の差が認められなかった。同様に MHC class II ノックアウトマウスでも、未処置群と投与群の間には有意な差が認められなかった。従って、B6 マウスと異なり、これらの KO マウスではリポソーム封入 NP366-374 ペプチドと抗 CD40 抗体の鼻腔投与では効果が見られなかった。

2) B6 マウスに分泌型 TGF β レセプタートリポソーム封入 NP366-374 ペプチドを投与すると肺でのインフルエンザウイルスの増殖が抑制された。

D. 考察

MHC class I ノックアウトマウスで封入ペプチドと抗 CD40 抗体の両方を投与した場合、肺での感染を抑制できなかったことから、少なくとも CTL が感染抑制に関与することは明らかである。しかしながら、MHC class II ノックアウトマウスで感染抑制が見られなかったことから、抗体の関与も否定できない。または、CTL の活性化にヘルパー T 細胞が関与することも考えられる。このことは、今後明らかにする必要があるが、ペプチドは CTL エピトープであることを考えると、後者の可能性

の方が強い。今後は、カセットセオリーにより作製したヘルパーエピトープとこの CTL エピトープを同時に投与し、より強い CTL 活性の誘導を行う予定である。

B6 マウスに分泌型 TGF β レセプタートリポソーム封入 NP366-374 ペプチドを投与すると肺でのインフルエンザウイルスの増殖が抑制された。しかし、マウスの実数がまだ少なく厳密に有意な抑制とは言いがたい。このことに関しては、さらに実験を行う必要がある。また、TGF β を中和することによる免疫反応増強の機構に関しては、詳細な解析が必要と考えられる。

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 細胞からの何らかの補助が必要であると考えられ、ヘルパーエピトープペプチドと CTL エピトープペプチドの同時投与がペプチドワクチンの免疫原性を増強すると期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Iwabuchi, K., Iwabuchi, C., Tone, S., Itoh, D., Tosa, N., Negishi, I., Ogasawara, K., Uede, T., and Onoé, 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* 97, 1765-1775, 2001.
2. 小笠原一誠 ペプチドワクチン *臨床免疫* 36, 650-656, 2001.
3. 小笠原一誠 リンパ球の制御による疾患治療は可能になるか? *臨床病理* 49, 1225-1232, 2001.

2. 学会発表

1. 小笠原一誠 第15回滋賀リウマチ・膠原病臨床談話会 特別講演「免疫反応の人為的制御の試み」(大津)
2. 伊藤 靖、Germain Ronald、小笠原一誠 TCRトランスジェニックマウス由来の Th1 細胞と Th2 細胞の TCR リン酸化の差異 第90回日本病理学会総会 (東京)
3. 小笠原一誠 第44回日本臨床検査医学会 近畿支部総会 特別講演「免疫反応の人為的制御」 (大津)
4. 伊藤 靖、藤本徳毅、石田英晃、小笠原一誠 Th1/Th2 細胞の TCR シグナルと表面マーカーの細胞分裂に伴う変化 第21回滋賀血液・免疫研究会 (草津)
5. 伊藤 靖、石田英晃、藤本徳毅、小笠原一誠 Th1/Th2 細胞の TCR シグナル差異と表面マーカーの関係 Kyoto T Cell Conference 第11回集会 (京都)
6. 高田宏和、伊藤 靖、梶野喜一、小笠原一誠 TGF β R II-Ig の腫瘍関連抗原特異的細胞障害性 T 細胞活性の増強効果の検証 第5回基盤的免疫研究会総会 (津)
7. Ogasawara K, Kajino K, Takikita M, Ishida H, Itoh Y PREVENTION OF INFLUENZA VIRUS INFECTION BY PRIMING OF CTL WITH LIPOSOMAL NP PEPTIDE AND ANTI-CD40 ANTIBODY 11th International Congress of Immunology (STOCKHOLM)
8. Itoh Y, Ishida H, Ronald Germain Ogasawara K AGONIST LIGAND

INDUCES DIFFERENTIAL TCR PHOSPHORYLATION IN POLARIZED TH1 AND TH2 CELLS WITH IDENTICAL ANTIGEN RECEPTORS 11th International Congress of Immunology (STOCKHOLM)

9. 藤本徳毅、伊藤 靖、小笠原一誠 Th1/2 細胞の分化における partial agonist と抗原提示細胞の役割の解析 第31回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪)
10. 高田宏和、伊藤 靖、梶野喜一、石田英晃、瀧北幹子、小笠原一誠 可溶性 TGF- β 受容体を用いた腫瘍拒絶反応の増強 第31回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪)
11. 石田英晃、伊藤 靖、小笠原一誠 SHP-2 ドミナントネガティブマウスを用いた T 細胞反応の解析 第31回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

TGF- β 受容体またはその誘導体と MHC 結合性ペプチドを含む免疫賦活剤 (出願番号 2001-135018) 平成13年5月1日提出

分担研究報告書

HIV 由来浮遊抗原ペプチドによる特異的 CTL のアポトーシス誘導 (II)

分担研究者	高橋 秀実	日本医科大学微生物学免疫学教室	教授
共同研究者	高橋めぐみ	日本医科大学微生物学免疫学教室	助手
共同研究者	中川 洋子	日本医科大学微生物学免疫学教室	助手

研究要旨

ウイルス感染の体内制御においてはそのウイルス特異的 CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞(CTL)が重要な役割を担っているが、初感染時に大量のウイルスに暴露されると、これら CTL が消失あるいは機能不全に陥る場合がある。この現象は clonal exhaustion と呼ばれているがそのメカニズムについて不明な点が多い。報告者らは、これまで HIV 特異的 CTL をエピトープペプチドでパルスすると、著明にキラー活性が低下し Anergy に陥ること、さらに CTL の活性化状態によっては急速にアポトーシスが誘導される場合があることを見いだした。今回は、このエピトープペプチドによって誘導されるアポトーシスのシグナル伝達経路を検討した結果、CTL 上の TCR が自身あるいは隣接する CTL のクラス I 分子に結合したペプチドを認識することにより CD3 ζ chain の強いリン酸化が誘導され、下流の MAP kinase を経由してアポトーシスが誘導される可能性を明らかにした。このアポトーシスは非常に短時間で誘導され、また CTL の Fas ligand や TNF- α receptor の発現が増強されることもないことから従来報告されている Activation Induced Cell Death (AICD)とは異なる細胞死であることが推測された。このようにエピトープペプチドより急激な細胞死が誘導されることは、HIV の破壊産物が生体内において特異的 CTL の機能制御のみならずその数的減少に関与している可能性を示唆しており、その実体を明らかにすることは、CTL の作用強化による HIV 感染に対する新たな治療及び予防戦略の開発に寄与するものと考えられる。

A.研究目的

HIV の体内制御において HIV 特異的 CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞(CTL)が重要な役割を演ずることが明らかとなってきた。一方、ウイルス初期感染に伴い体内で増殖した CTL は、HIV 感染細胞の排除による感染性ウイルス粒子の消失に応じ、通常速やかにその数を減じていく。これまで報告者らは、HIV-V3 ペプチドを CTL に直接パルスすることにより、一時的にキラー活性が抑制され一種の麻痺状態が誘導されることをマウスモデルを用いて見出し、キラー活性の抑制に関わるシグナル伝達や機能分子の発現について検討してきた。また CTL の活性化状態によっては、エピトープペプチドの直接曝露により、これら CTL が急激にアポトーシスに陥ることを見出し、ウイルスの破壊産物が生体内での CTL 機能のみならず、数の減少にも関与している可能性を発見した。そこで本研究では、こうしたウイルス産物による CTL の破壊機序を探り、CTL を温存させ機能回復をはかるための方策を見出すことを目的とした。

B.研究方法

HIV-1 (IIIB 株)env 蛋白 gp160 を 特異的に

認識する CTL Line (LINE-IIIB cells)を標的細胞 (gp160 gene transfected BALB/c 3T3 細胞) の存在、非存在下で培養・活性化した後、最小認識ペプチドであるペプチド I-10 (minimal immunodominant epitope; RGPGRFVTI)で短時間再刺激し、アポトーシス誘導の有無を調べた。アポトーシス誘導は、処理細胞より断片化された DNA の抽出を行い、アガロース電気泳動法を用いて確認した。さらに CTL をペプチドで再刺激する 1 時間前に種々の阻害剤で処理し、アポトーシス誘導に対する影響を検討した。また、CTL の TCR を介したアポトーシスに関わる CD3 ζ chain リン酸化の程度を western blot 法により解析した。

C.研究結果

図 1 に示すように、直接 peptide I-10 で刺激した resting の CTL においては全くアポトーシス誘導が認められなかったのに対し、予め標的細胞で刺激・活性化された CTL は、peptide I-10 の再刺激により短時間でアポトーシスに陥ることが観察された。また HIV-1 MN 株に対して特異的に誘導された活性化 CTL においても同様の細胞死が認められたことから、こうしたアポト

ーシスは、一般に起こりうる現象であることが示された。

次にこのアポトーシスは、TCR、クラス I MHC 分子の双方あるいは片方だけの刺激で誘導されるのかどうかを明らかにするため、クラス I MHC (D^d)-tetramer I-10 で活性化 CTL を再刺激した場合の影響を検討した。その結果図 2 に示すように、D^d tetramer I-10 による再刺激でもアポトーシスが誘導されることが明かとなり、TCR を介した刺激がアポトーシス誘導に必須であることが判明した。次に TCR を介するシグナル伝達が行われていることを確認するため、western blot 法により TCR-CD3 ζ chain のチロシンリン酸化の程度を検討した。その結果図 3 に示すように peptide I-10 の再刺激により CD3 ζ chain に強いリン酸化が誘導されていることが確認された。

このアポトーシスは caspase 3 inhibitor によって抑制されるものの抗 Fas ligand 抗体及び抗 TNF- α 抗体では抑制されなかった (図 4) ことから、Fas お呼び TNF- α は本アポトーシス誘導には関与していないことが示唆された。

前回の報告で、CTL を Peptide I-10 で再刺激する前に Cyclosporin A で処理するとアポトーシスの誘導が抑制されるが、それは Cyclosporin A の標的分子である calcinurin を介するアポトーシスではないことを示した。この Cyclosporin A が MAP kinase の一部の経路を阻害することが最新に明らかにされたことに基づき、MAP kinase family のうち ERK 経路の阻害剤である U0126 と p38 経路の阻害剤である SB203580 の本アポトーシス誘導における影響を検討した。その結果、図 5 に示すように、予め CTL を U0126 で処理しておくことと顕著にアポトーシスの誘導が抑制されたため、TCR からの刺激が ERK 経路を介してアポトーシスの実行分子に伝えられることが明らかになった。

D. 考察

前回の報告で Peptide I-10 の各アミノ酸うち MHC クラス I との相互作用に必須であるアルギニン、フェニルアラニン、及び TCR との相互作用に重要であるバリンを置換すると顕著にアポトーシスの誘導が抑制されることを示し、クラス I 分子及び TCR からのシグナル伝達がアポトーシスの誘導に関与していることを明らかにした。今回 D^d tetramer I-10 による再刺激でもアポトーシスが誘導されることが判明し、TCR を介したシグナル伝達がアポトーシス誘導により必須であることが証明された。また TCR を介す

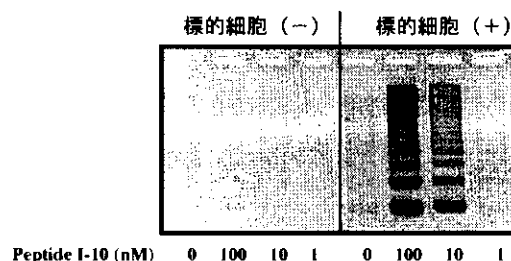


図1 peptide I-10の再刺激によるアポトーシス誘導

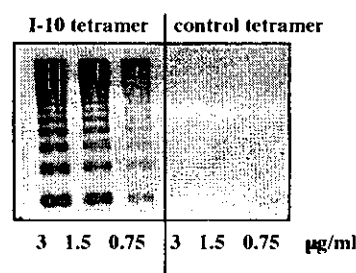


図2 D^d tetramer I-10によるアポトーシスの誘導

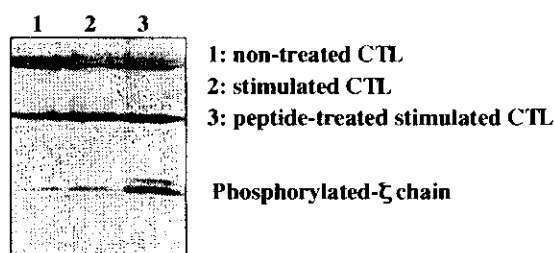


図3 peptide I-10の再刺激による CD3 ζ chain のチロシンリン酸化の誘導

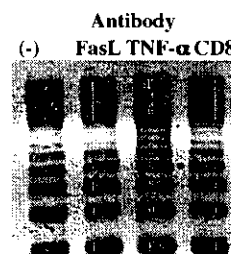


図4 アポトーシス誘導における各抗体の影響

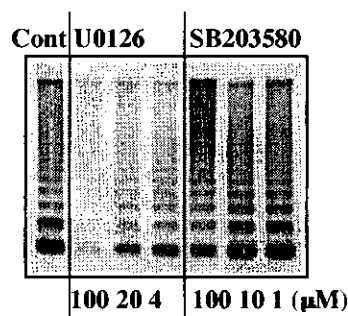


図5 アポトーシス誘導における MAP kinase inhibitor の影響

るシグナル伝達が誘導されていることは、Peptide I-10 の再刺激により TCR-CD3 ζ chain に強いチロシンリン酸化が認められることから確認できた。

従来報告されている TCR を介した T 細胞アポトーシスの主たるパターンである Activation Induced Cell Death (AICD)においては、TCR の刺激により Fas ligand の発現が増強され Fas-Fas ligand の相互作用によりアポトーシスが誘導されると考えられてきた。しかし peptide I-10 で CTL を再刺激しても FACS 及び RT-PCR による解析では Fas ligand の発現増強は認められず、また抗 Fas ligand 抗体によりアポトーシスが抑制されることもなかったため、本システムにおいて Fas を介するアポトーシスが誘導されている可能性は低い。また非常に短時間のうちにアポトーシスが誘導されることから、TCR からより直接的にアポトーシス実行分子を活性化するシグナルが伝達されていることが予想された。

それではこうした TCR からのシグナルは、いかなる経路を経由してアポトーシス実行分子に伝達されるのであろうか？今回の検討で、MAP kinase 経路のうち ERK 経路を阻害するとアポトーシスの誘導が顕著に抑制されることが観察された。これまで p38 経路や JNK 経路を介するアポトーシスの存在がいくつか報告されているが、いずれも MAP kinase の活性化により Fas ligand の発現が誘導されアポトーシスに至ると仮定するものであった。ERK 経路は、他の経路より TCR の下流近くに存在するといわれている。ERK 経路が直接アポトーシス実行分子に繋がっているのか、あるいはその下流に別の経路が存在するのかわかりませんが、Fas の系路を介さずに直接 caspase のようなアポトーシス実行分子に直接シグナルが伝えられている可能性も考えられる。

CTL を直接 peptide I-10 で刺激してもアポトーシスは誘導されないことから、標的細胞を認識した CTL において休止期の CTL とは異なったシグナル伝達ネットワークが形成されているものと推察される。FITC 標識した抗 CD3 抗体で休止期の CTL を染色すると TCR-CD3 複合体 (patch) が細胞の一端に集積する像 (capping) がみられるのに対して、標的細胞で刺激しておいた CTL では、形成された patch が速やかに細胞内に取り込まれる像 (internalization) が観察されることを見だしている (図 6)。このことは、標的細胞で刺激された CTL においては、TCR からの刺激がより速やかに細胞内に伝達される状態にあることを示唆しており、短時間でのア

ポトーシスへのシグナル伝達を説明する手がかりになるものと推測している。

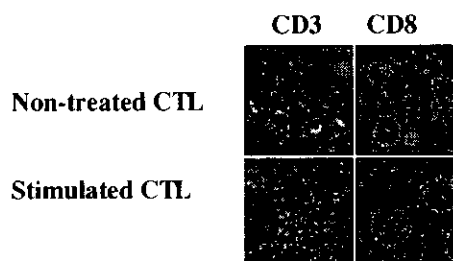


図5 TCR-CD3 複合体の細胞内局在

E. 結論

標的細胞を認識し活性化した CTL は、早い時期にエピトープペプチドに暴露されると急速にアポトーシスに陥るメカニズムの一端を明らかにした。このようにエピトープペプチドより急激な細胞死が誘導されることは、HIV の破壊産物が生体内において特異的 CTL の機能制御のみならずその数的減少に関与している可能性を示唆しており、その実体を明らかにすることは、CTL の作用強化による HIV 感染に対する新たな治療及び予防戦略の開発に寄与するものと考えられる。

F. 論文発表

- 1) Nakajima, Y., Takahashi, M., Norose, Y., Ogawa, R., Takahashi, H. (2001) Induction of apoptosis in mice thymocytes by tetracaine. *Biomedical Res.* 21, 297-303.
- 2) Takahashi, M., Nakagawa, Y., Berzofsky, J.A., Takahashi, H. (2001) Counter-regulation of cytolytic activity and cytokine production in human immunodeficiency virus (HIV)-1-specific murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes by free antigenic peptide. *Int. Immunol.* 13, 43-51, 2001.
- 3) Watari, E., Shinya, E., Kurane, S., Takahashi, H. (2001) Effect of cyclosporin A on cell fusion in monkey kidney cell line persistently infected with measles virus. *Intervirology.* 44, 209-211.
- 4) Machida, K., Kohara, K., Seike, E., Tone, S., Shibasaki, F., Shimizu, M., Takahashi, H., et al. (2001) Inhibition of cytochrome C release in Fas-mediated signaling pathway by hepatitis C viral proteins in transgenic mice liver. *J.Biol. Chem.* 276, 12140-12146.

5) Hirota, K., Nagata, K., Norose, Y., Futagami, S., Nakagawa, Y., Senpuku, H., Kobayashi, M., Takahashi, H. (2001) Identification of an antigenic epitope in *Helicobacter pylori* urease that induces neutralizing antibody production. *Infect. Immun.* 69, 6597-6603.

6) Hamada H., Hiroi T., Nishiyama Y., Takahashi H., et al. (2002) Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *J. Immunol.* 168 (in press).

7) Nishiyama Y., Hamada H., Yamamoto, H., Nanno, M., Takahashi H., Ishikawa, H. (2002) Homeostatic regulation of intestinal villous epithelia by B lymphocytes. *J. Immunol.* (in press).

8) 高橋秀実 : HIV ワクチン開発の展望 : DNA ワクチンによる細胞性免疫賦活. カレントセラピー, 19(2): 73-76, 2001.

9) 高橋めぐみ, 高橋秀実 : グランザイム B のレセプターは mannose6-phosphate/Insulin-like growth factor II receptor である. 臨床免疫, 36(6): 944-948, 2001.

10) 高橋秀実 : HIV 感染症の病態 2) 免疫学的側面から 治療学, 35(2): 123-128, 2001.

11) 高橋秀実 : 樹状細胞による細胞性免疫の賦活 感染・炎症・免疫, 31(1): 20-28, 2001.

12) 高橋秀実 : エイズワクチン開発に向けて J.AIDS Res., 3(2): 115-117, 2001.

13) 高橋秀実 : DNA ワクチンの実体と応用 細胞, 33(9): 352-355, 2001.

14) 高橋秀実 : 樹状細胞を用いた腫瘍制御の可能性 炎症と免疫, 9(3): 287-288, 2001.

15) 中川洋子, 高橋秀実 : 樹状細胞による抗原特異的細胞傷害性T細胞の賦活 炎症と免疫, 9(3): 320-327, 2001.

16) 高橋秀実 : HIV 感染症における粘膜免疫の役割: 樹状細胞と $\gamma\delta$ T細胞の関与 医学のあゆみ, 199(1): 111-114, 2001.

17) 高橋秀実 : HIV と免疫不全: ワクチン戦略の全貌 *Mebio*, 18(11), 42-49, 2001.

G. 学会発表

1) Takahashi, H., Uesaka, H., Fukushima, T., Shimizu, M., Ui, M., Hayami, M.: Induction of CTL specific for SHIV-infected CD4+T cells from SHIV-resistant rhesus monkeys. Japan-US Cooperative Medical Science Program: The 13th Joint Scientific Meeting of AIDS. March 21-23, 2001 (Kumamoto, Japan).

2) Akahata, W., Ido, E., Akiyama, H., Enose, Y., Takahashi, H., Hayami, M.: DNA vaccination of macaques by a full genome plasmid which produces non-infectious virus particles. Japan-US Cooperative Medical Science Program: The 13th Joint Scientific Meeting of AIDS. March 21-23, 2001 (Kumamoto, Japan).

3) Ichikawa, M., Takahashi, M., Takeshita, T., Araki, T., Takahashi, H.: The character and potentiality of macrophages in human breast milk. 11th International Congress of Immunology. July 22-27, 2001 (Stockholm, Sweden).

4) Yanagihara, T., Norose, Y., Matsuoka, Y., Kumagai, Y., Takahashi, H.: Polymeric Ig receptor deficiency in glomerulus is responsible for the IgA nephropathy in DDY mice. 11th International Congress of Immunology. July 22-27, 2001 (Stockholm, Sweden).

5) Kumagai, Y., Kiyoshima, Y., Owaki, A., Takahashi, H.: The processing of epitopes grafted into the immunoglobulin hypervariable regions. 11th International Congress of Immunology. July 22-27, 2001 (Stockholm, Sweden).

6) Sugiyama H., Yanagie, H., Takaku, S., Takahashi, H.: Cytotoxicity of hepatitis C virus nonstructural protein 2. 11th International Congress of Immunology. July 22-27, 2001 (Stockholm, Sweden).

7) Takahashi, H., Takahashi, M., Berzofsky, J., Nakagawa, Y.: Counter-regulation of cytolytic activity and cytokine production in HIV-1-specific murine CD8+ CTL by free epitopic peptide. 11th International Congress of Immunology. July 22-27, 2001 (Stockholm, Sweden).

8) Takeuchi, J., Watari, E., Owaki, A., Takahashi, M., Shinya, E., Kawana, S., Takahashi, H.: The effects of CpG motif on various type of dendritic cells induced from human blood mononuclear cells. 11th International Congress of Immunology. July 22-27, 2001 (Stockholm, Sweden).

9) Shinya, E., Watari, E., Takahashi, H.: Plasmo-lentivirus: A novel non-viral /viral vector.
11th International Congress of Immunology.
July 22-27, 2001 (Stockholm, Sweden).

10) Yokosuka, T., Takase, K., Takahashi, H., Arase, H., Saito, T.: Unexpectedly high flexibility of CDR3b in antigen recognition by cytotoxic T cells from HIV gp160-specific TCR-transgenic mice. 11th International Congress of Immunology.
July 22-27, 2001 (Stockholm, Sweden).

11) Wakabayashi, A., Watari, E., Takahashi, M., Kumagai, Y., Hirokawa, K., Takahashi, H.: Analysis of the mechanisms of oral tolerance mediated in OVA-immunized mice: Detection of antigenic OVA fragments in the sera.
11th International Congress of Immunology.
July 22-27, 2001 (Stockholm, Sweden).

12) Takaku, S., Wakita, Y., Nakagawa, Y., Takano, T., Kohara, M., Takahashi, H.: Induction and analysis of cytotoxic T lymphocytes against hepatitis C virus (HCV) structural antigens using HCV transgenic mice with Cre/Lox-P switching expression system.
11th International Congress of Immunology.
July 22-27, 2001 (Stockholm, Sweden).

13) Takahashi, H., Takahashi, M.: Brief exposure to the epitopic peptide can induce apoptosis for HIV-1-specific CD8+ CTL. Japan-US Cooperative Medical Science Program: The 14th Joint Scientific Meeting of AIDS.
March 19-21, 2002 (Seattle, USA).

14) 高橋秀実: ウイルス感染制御における細胞性免疫の役割: $\alpha\beta$ 型T細胞と $\gamma\delta$ 型T細胞の関与について
第49回日本ウイルス学会総会.
2001年11月18-20日(大阪).

15) 榎瀬良美、三宅在子、宇井雅博、鈴木元、上坂浩実、国澤純、清野宏、高橋秀実、速水正憲: nef 欠損 SIVmac/HIV-1 キメラウイルス (SHIV-dn)の免疫誘導能と粘膜感染防御効果.
第49回日本ウイルス学会総会.
2001年11月18-20日(大阪).

16) 赤畑渉、井戸栄治、秋山尚志、高橋秀実、速水正憲: 非感染性粒子を産生する SHIV 全ゲノムプラスミドを用いた DNA ワクチン.
第49回日本ウイルス学会総会.
2001年11月18-20日(大阪).

17) 栗林秀樹、金子礼志、中川洋子、渡理英二、齋藤隆、熊谷善博、高橋秀実: HIV-P18 特異的 CTL の TCR トランスジェニックマウスを用いた

HIV-P18 組み換えワクチニアウイルスに対する感染防御能の解析
第15回日本エイズ学会総会
2001年11月30日(東京)

18) 宇賀神秀樹、福島達伸、上坂浩実、清水真澄、日高千鶴乃、渡理英二、速水正憲、高橋秀実: SHIV 感染防御能獲得ザルを用いた感染抵抗性の解析: 感染T細胞を特異的に傷害するキラーT細胞の特性
第15回日本エイズ学会総会
2001年11月30日(東京)

19) SHINYA Eiji, OWAKI Atusko, WATANABE Kuhomi, KAWASHIMA Tetsuo, IIZUMI Tasuku, TAKAHASHI Hidemi: Production of multimeric soluble CD4 using C-terminal fragment of C4-binding protein gene
第31回日本免疫学会総会
2001年12月11日-13日(大阪).

20) 高久俊、清水真澄、脇田隆字、中川洋子、石井律子、杉山弘高、高野照夫、小原道法、高橋秀実: C 形肝炎ウイルス(HCV)トランスジェニックマウスにおける HCV 構造蛋白特異的細胞傷害性Tリンパ球の誘導とその解析
第31回日本免疫学会総会
2001年12月11日-13日(大阪).

21) 渡理英二、倉根修二、清水真澄、日高千鶴乃、杉田昌彦、高橋秀実: Mycobacterium(M. tuberculosis)のT細胞活性化蛋白(EAST-6)由来ペプチドに対する人リンパ球反応性の検討
第31回日本免疫学会総会
2001年12月11日-13日(大阪).

22) 大国寿士、渡辺ユキノ、留目優子、櫻田紳策、高橋秀実、斉藤博久: 組み換え型 Streptococcal pyrogenic exotoxin B(rSPE B)の性状に関する研究
第31回日本免疫学会総会
2001年12月11日-13日(大阪).

23) 高橋めぐみ、大園英一、馬淵綾子、高橋秀実: 浮遊ペプチド抗原によるキラーT細胞のアポトーシス誘導(II)
第31回日本免疫学会総会
2001年12月11日-13日(大阪).

24) 熊谷善博、大脇敦子、栗林秀樹、高橋秀実: 免疫グロブリン超可変部へ分子移植した HIV-1 の gp120V3 エピトープのプロセッシングと抗原提示
第31回日本免疫学会総会
2001年12月11日-13日(大阪).

25) 市川雅男、高橋めぐみ、金栄淳、里見操緒、竹下俊行、高橋秀実: 母乳由来マクロファージ

の特徴と樹状細胞への分化
第 31 回日本免疫学会総会
2001 年 12 月 11 日-13 日 (大阪) .

26) 竹下淳子、渡理英二、大脇敦子、新谷英滋、
藤本千明、川名誠司、高橋秀実：ヒト末梢血単
球由来樹状細胞の菌体成分に対する反応
第 31 回日本免疫学会総会
2001 年 12 月 11 日-13 日 (大阪) .

27) 西山康裕、金城安慶、浜田裕公、坂上静香、
栗原さやか、野中聡史、高橋秀実、山岸秀夫、
石川博通： $\gamma\delta$ 型上皮細胞間 T 細胞サブセットに
よる腸管上皮細胞の再生統御
第 31 回日本免疫学会総会
2001 年 12 月 11 日-13 日 (大阪) .

28) 坂上静香、栗原さやか、野中聡史、浜田裕
公、西山康裕、高橋秀実、石川博通；免疫機能
関連遺伝子ミュータントマウスにおける腸管上
皮細胞の増殖
第 31 回日本免疫学会総会
2001 年 12 月 11 日-13 日 (大阪) .

29) 柳原剛、野呂瀬嘉彦、松岡良彰、茂呂周、
楢崎秀彦、村上睦美、熊谷善博、高橋秀実：腎
における poly Ig receptor (pIgR) 発現の低下は
ddY マウスにおける IgA 腎症発症要因の一つで
ある
第 31 回日本免疫学会総会
2001 年 12 月 11 日-13 日 (大阪) .

30) 浜田裕公、廣井隆親、西山康裕、高橋秀実、
八村敏志、上野川修一、清野宏、山元弘、石川
博通：マウス腸管粘膜に分布する孤立リンパ小
節 (第 2 報)
第 31 回日本免疫学会総会
2001 年 12 月 11 日-13 日 (大阪) .

31) 若林あや子、清水真澄、中川洋子、西山康
裕、齊藤善、熊谷善博、高橋秀実：OVA 経口投
与による抗 OVA 抗体産生ならびに OVA 特異的
CTL の誘導
第 31 回日本免疫学会総会
2001 年 12 月 11 日-13 日 (大阪) .

32) 高橋秀実：新たなる腫瘍免疫への期待
第 8 回外科侵襲とサイトカイン研究会
2001 年 12 月 15 日 (東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

HIV-V3 特異的 CTL の T 細胞レセプター遺
伝子を導入発現させたトランスジェニック
マウス (特許申請済)

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 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、マウス由来マクロファージ様細胞株および胸腺上皮細胞株の 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システムの設計と、それを評価するシステムの確立が必要になる。

そこで、本研究は次の2つの目的に沿って研究をおこなう。

- 1) これまでのMHC クラスII拘束性抗原提示の機構と調節の分子メカニズムに関する知識を基に、さらに新たな知見を積み重ね、理解を深める。
- 2) 1) で得られた知見を基に、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

する方法を確立する。

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を解明する。
- 2) H2-DM (H2-M)分子と蛍光タンパク質 (GFPあるいはDsRed) とのキメラ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キメラタンパク質の細胞内局在の観察及び蛍光タンパク質に対する抗体を結合した磁気ビーズを用いた細胞内分画をおこない、細胞内小胞の分離とその性質を解析し、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を解明する。

- 4) キメラタンパク質を発現する抗原提示細胞を用いたワクチン評価系を確立する。

C. 研究結果

本年度は、研究方法で挙げた2)および3)を主体におこない、以下の結果を得た。

- 1) H2-DM 分子と蛍光タンパク質とのキメラタンパク質をコードする遺伝子の作製。

完全長のH2-DMβ鎖をコードするcDNAをCincinnati大学のJohn J. Monaco教授より供与を受けた。NotIおよびHindIIIで全長を切り出した後、5'末端および3'末端のシークエンスを確認した

図1に記すプライマーと反応条件でPCRをおこなった。得られたフラグメントをpEGFPN2ベクターまたはpDsRedN1ベクター(クローンテック社)のSma I siteに組み込んだ。H2-DMβ鎖のストップコドンを含まないため、このベクターにコードされる産物は、H2-DMβ鎖のC末端側に蛍光タンパク質が結合したキメラタンパク質をコードする。

- 2) 抗原提示細胞へのキメラタンパク質をコードする遺伝子のトランスフェクションとその発現。

精製ベクター1μgを 1×10^5 個のJ774.1細胞にトランスフェクションし、48時間後に選択培地に交換した。蛍光を強く発するstable transfectantを得るために、セレクション試薬の濃度を徐々に高めて培養した。最後に、cell sortingを用いて蛍光を強く発するtransfectantを選び出した。

- 3) 共焦点顕微鏡を用いた抗原細胞における

キメラタンパク質の局在と動態の観察。

ここでは、H2-DMβ鎖とDsRed(赤色の蛍光タンパク質)とのキメラタンパク質を発現するJ774.1細胞に関する結果を示す。

図2に示すように、赤色の蛍光を発する小胞は細胞質内に点在した。LPS刺激後、そのような小胞は細胞質内に数多く存在するようになった。これらの細胞内小胞は抗DsRed抗体および抗H2-DM抗体共に陽性であることから、これらの細胞内小胞におけるキメラタンパク質の存在が確認できた(図3)。酸性条件下で緑色の蛍光を発色する染料を取り込ませたところ、キメラタンパク質の存在する小胞においても緑色の蛍光を発色し、その結果としてその小胞は黄色に観察されることから、これら小胞内部は酸性であることがわかった(図3)。さらに、図4に示すように、カテプシン-B、-D、-L、-Sがこれら小胞に存在した。一方、H2-DMβ鎖部分の細胞質領域はYTPLというチロシン残基を基本としたlysosome移行シグナルを持つために、H2-DM分子はTGNから出芽後にlysosome様の細胞内小胞へ輸送されることがわかっている。以上のことから、キメラタンパク質の存在する小胞は、lysosome様の細胞内小胞と考えられた。

図5に示すように、これらの細胞内小胞には、MHC class II分子(class II)、インヴァリアント鎖(Ii鎖)、さらには図6に示すように、CD80分子(B7-1)、CD86(B7-2)がそれぞれ存在した。LPSを投与して細胞を活性化した場合、class IIやIi鎖はこの小胞に存在する程度が高められた。B7-1の場合は、存在程度が高まると同時に、細胞膜への移行が見られ

た。CD86分子 (B7-2) はB7-1とは異なり、細胞内小胞には存在せず細胞膜に存在した。しかし、LPS投与後、その一部はキメラタンパク質の存在する細胞内小胞へ移行した。

これらの細胞内小胞には、細胞の外から取り込まれた可溶性抗原 (OVA) が輸送された (図7)。その取り込みと輸送の程度は、LPS添加で高められた。抗原と抗体との複合体の細胞内への取り込みに関与するFcレセプター (そのサブユニットのCD16/CD32、FcγRIII/RIIを蛍光ラベルした) は細胞膜に発現し、LPS投与後、その一部はキメラタンパク質の存在する細胞内小胞へと移行した (図7)。

すでに図4に示したように、キメラタンパク質存在の細胞内小胞にはカテプシン-B、-D、-L、-Sが存在するが、LPS投与後、これら小胞に存在する程度が高められた。培養細胞にカテプシン特異的な蛍光基質を投与し、細胞から発する蛍光を観察することにより細胞内小胞のカテプシン活性を調べた (図8)。カテプシン-B、-Lに対する基質 (Z-Phe-Arg-MCA、Carbobenzoxy-L-Phenylalanyl-L-Arginine-4-methyl-Coumaryl-7-amide) を反応させた場合、キメラタンパク質の存在する細胞内小胞では顕著な反応が見られなかった。LPS投与後でも、一部のキメラタンパク質の存在する細胞内小胞内で反応が見られただけにすぎなかった。一方、カテプシン-Sに対する基質 (Z-Val-Val-Arg-MCA、Carbobenzoxy-L-Valanyl-L-Valanyl-L-Arginine-4-methyl-Coumaryl-7-amide) を反応させた場合、キメラタンパク質の存在する細胞内小胞内で反応が見られ、

LPS投与した場合、反応するその反応程度が高くなると同時に反応を示すキメラタンパク質存在の細胞内小胞の数も増加した。

D. 考察

H2-DMβ鎖のC末端側に蛍光タンパク質 (DsRed) を結合したキメラタンパク質を発現するベクターを、マクロファージ様細胞 J774.1に導入し、このタンパク質を恒常的に発現する細胞株を得ることができた。

このキメラタンパク質は、内部が酸性で、プロテアーゼを内包するlysosome様の細胞内小胞に局在していた。このことは、H2-DMβ鎖部分の細胞質領域はYTPLというチロシン残基を基本としたlysosome移行シグナルが、蛍光タンパク質をC末端側に結合してもほとんど影響を受けないことを示している。また、このキメラタンパク質は、LPSの投与でlysosome様の細胞内小胞に局在する程度が高められることから、このタンパク質単独であるいは会合してlysosome様の細胞内小胞に輸送される場合と、内在性のH2-DMα鎖とダイマーを形成した後に輸送される場合の2つの輸送形態が考えられる。

今回は、蛍光タンパク質がDsRedの場合だけを報告したが、蛍光タンパク質をEGFPにした場合でも同様な結果が得られた。胸腺上皮細胞にこれらのキメラタンパク質を発現させた場合でも、キメラタンパク質はlysosome様の細胞内小胞に局在した。IFN-γを投与でclass II分子を発現させた場合には、その程度が高められた。

このキメラタンパク質存在のlysosome様の細胞内小胞には、class II、Ii鎖、B7-1など

の抗原提示に係る分子や抗原 (OVA) やその取り込みに係るレセプター (CD16/32) が存在し、LPSの投与でそれらの分子群の存在程度に動的な変化が見られた。このような変化は、LPS投与のような外からの刺激によって、抗原提示に関係する分子の細胞内輸送機構やそれを調節する機構が変化するために生じたと考えられる。また、この細胞内小胞で検出されるカテプシンは、図4に示したように、カテプシン-B、-Dよりもむしろカテプシン-L、-Sのほうがその程度が高かった。図8に示したようにプロテアーゼ活性でも、この小胞においてはカテプシン-B、-Lよりもカテプシン-Sの方が強い活性を示した。このようにカテプシン-Sは、この細胞内小胞における主要なカテプシンの1つであると考えられる。このように、キメラタンパク質存在のlysosome様の細胞内小胞には、抗原提示に係る分子や抗原分子に加えて、カテプシン-Sのように抗原提示において重要な役割 (Ii鎖由来のCLIP生成に参与する) を果たすプロテアーゼも優位に存在し活性化されていることを考えると、このキメラタンパク質存在の細胞内小胞は、MHC クラスII+ペプチド複合体の形成の場であると推察される。

今後は、キメラタンパク質存在の細胞内小胞を単離し、class IIの抗原ペプチド獲得がこの小胞内で実際に起こっているのかを確認すると同時に、この小胞の生化学的解析をおこない、MHC クラスII+ペプチド複合体の形成・輸送の機構とその調節に関する分子メカニズムと明らかにしていきたい。

E. 結論

マクロファージ様細胞J774.1にH2-DMβ鎖と蛍光タンパク質とのキメラタンパク質をコードする遺伝子を導入し、キメラタンパク質を発現する細胞株を得た。キメラタンパク質はlysosome様の細胞内小胞に局在した。これらの細胞内小胞にはclass II、Ii鎖およびB7-1が存在し、これら小胞への可溶性抗原 (OVA) や抗原と結合するレセプターが輸送されることが確認された。以上のことから、キメラタンパク質の存在する細胞内小胞は、MHC class II拘束性抗原提示プロセスの場であると考えられた。LPSで細胞を活性化すると、これらの細胞内小胞に存在する抗原提示に係る分子群や抗原分子に、細胞内輸送機構やその調節機構の変化に基づく動的な変化が見られた。

F. 研究発表

論文発表

- ① Ikeda, T., M.Kasai, M.Utsuyama, and K.Hirokawa: Dtermination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kB ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology* 142:1419-1426, 2000.

学会発表

- ① 笠井道之、水落利明、池田 通：マウス胸腺上皮細胞株H2-DM陽性compartmentの生化学的性質

The 11th Kyoto T Cell Conference, 2001年

- ② 笠井道之、水落利明、池田 通：マウス胸腺上皮細胞株におけるH2-DM陽性細胞内小胞の解析

第31回日本免疫学会総会・学術集会、2001

年

G. 知的所有権の取得状況

特許取得

なし。

実用新案登録

なし。

その他

なし。

Procedure

1. Full length H2-DMβ2鎖 in pRc/CMV vectorを増幅する。
2. H2-DMβ2鎖の5'-側および3'-側の塩基配列を確認する。
3. 下記プライマーおよびKOD plus (TOYOBO)を用いて以下の条件でPCRをする。

Mb2COD5: 5'-ATGGCTGCACTCTGGCTGCTGCTGCTGGT-3'

Mb2COD3NS: 5'-ATGCCGTCCTTCTGGGTAGGTGGATCC-3'

for cloning into pEGFPN2

Mb2COD3NSN1: 5'-GATGCCGTCCTTCTGGGTAGGTGGATCC-3'

for cloning into pDsRedN1

95°C 2min. x 1 cycle

(95°C 20sec. 60°C 30sec. 72°C 1min.) x 30 cycles with Stratagene Robo Cycler

4. フラグメントをpEGFPN2, pDsRedN1, pECFPN1のSma I siteに組み込む。
H2-DMβ2鎖のstop codonを含まないので、このvectorにコードされる産物は、H2-DMβ2鎖のC末端側に蛍光タンパク質が結合したキメラタンパク質を形成する。

5. Transient transfection

精製vector 1μgを1 x 10⁵-10⁶個の細胞にtransfectionする。

6. Stable transfection

48-72時間後にselective mediumに交換し、培養する。

蛍光を強く発するstable transfectantを得るために、selective reagentの濃度を徐々に高める。最後は、cell sortingにより蛍光を強く発するtransfectantを得る。

Figure 1