

図3 母乳細胞による GM-CSF の産生

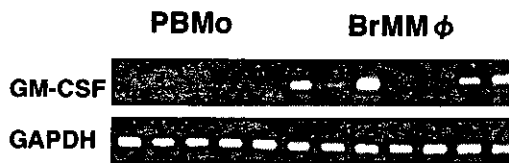


図4 母乳細胞による GM-CSF の遺伝子レベルでの発現

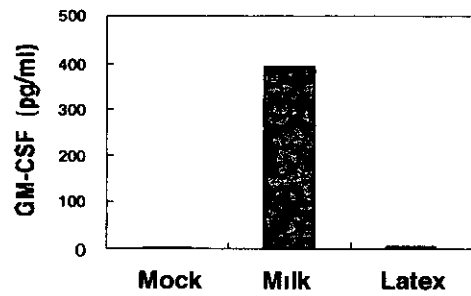


図5 母乳処理による末梢血単核球における GM-CSF の産生誘導

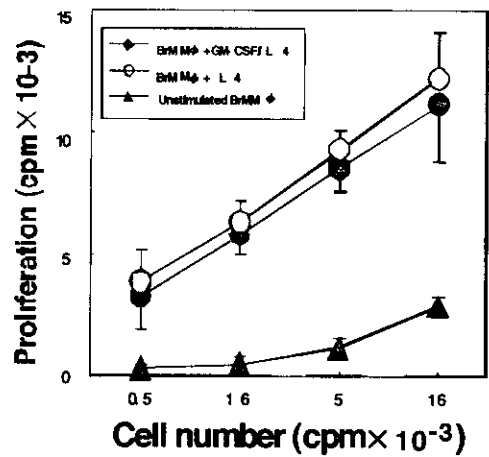


図7 IL-4 誘導樹状細胞での MLR 刺激能

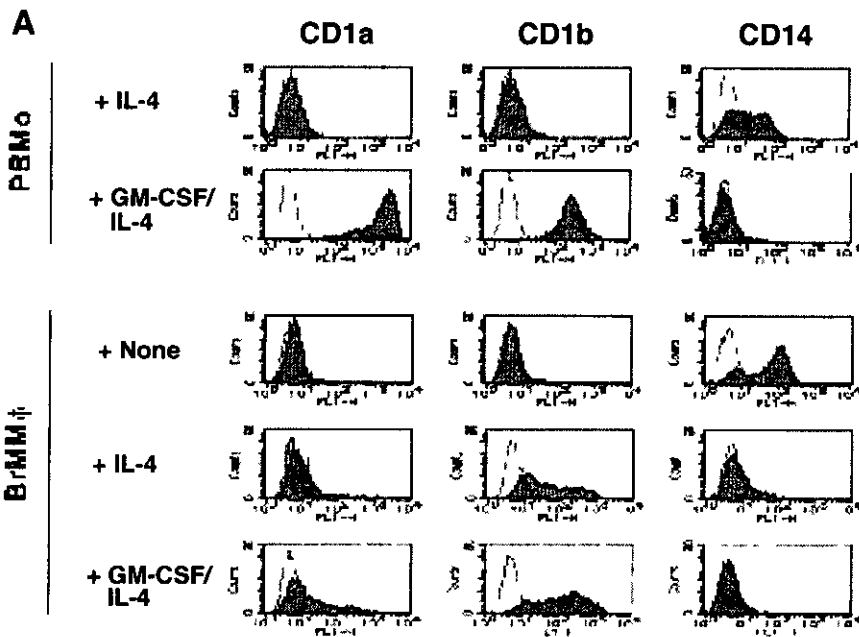


図6 IL-4 単独添加による母乳中マクロファージの樹状細胞への分化

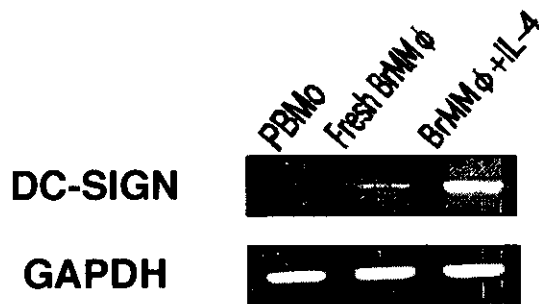


図8 乳汁中マクロファージにおける DC-SIGN 遺伝子の発現

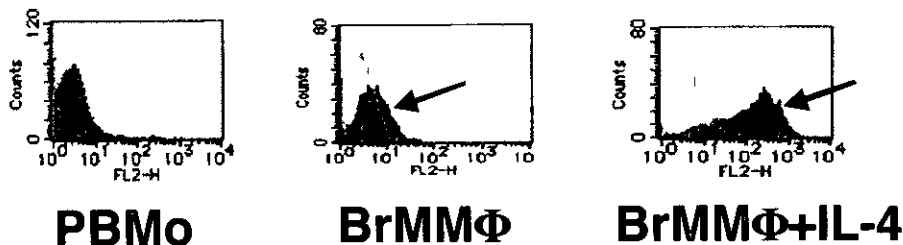


図9 乳汁中マクロファージにおける DC-SIGN 発現の IL-4 添加による増強

#### D 考察

一般にヒト末梢血中に存在する単球群は、血管外を遊走し組織中に侵入することによりマクロファージとなる。これら組織マクロファージは局所における感染防御を担っており、体内に侵入した種々の病原体を監視しその制御にあたる。しかしながら、どのような組織特異的な刺激や環境が、それらの機能分化に影響を与えるかに関しては不明な点が多い。事実ヒトにおいてこうした組織中のマクロファージを採取することは極めて困難であるため、これまで組織マクロファージの細胞分化に関する報告はほとんど認められていない。本研究では、これら組織マクロファージを大量に含有する媒体と想定されるヒト母乳に着目し、その特性および樹状細胞への分化能を検討した。

その結果、乳汁中のマクロファージは既に樹状細胞への初期分化段階にあり、単独で分化因子の一つである GM-CSF を産生していることを見つけた。また、乳汁を直接に末梢血単核球に作用させることにより、それらの細胞から GM-CSF が産生されたことから、乳腺組織を介して乳汁中に侵入した単核球が、乳汁中の成分刺激により樹状細胞への分化能を有した組織マクロファージへと分化した可能性が示唆された。実際、この乳汁中のマクロファージは IL-4 の単独添加により Allo MLR 誘導能を有した機能的樹

状細胞へと分化することが確認され、形態上も樹状細胞へ酷似した形への変化が認められた。

そこで、この樹状細胞が HIV の捕捉伝播因子である DC-SIGN を発現しているかを調べたところ、IL-4 添加をしていない Fresh な乳汁中マクロファージ上にも DC-SIGN が軽度発現しており、その発現が IL-4 の添加により増強することが観察された。

以上から、乳汁中のマクロファージは HIV を捕捉し、新生児へ伝播感染させる可能性ならびに、この伝播能は乳腺炎や他の感染に伴い局所での IL-4 産生が誘発された場合に増強される可能性が示唆された。現在、実際に乳汁中マクロファージによって HIV ウイルス粒子が運ばれ、新生児の T 細胞へと感染が伝達されるかを、臍帯血中のリンパ球などを用いて検討中である。

#### E. 結論

以上、本研究によりヒト母乳中のマクロファージは既に HIV の捕捉伝播因子である DC-SIGN を軽度発現しているとともに、自ら GM-CSF を産生し、IL-4 単独の添加のみで樹状細胞に分化することが判明した。また、こうした分化は DC-SIGN の発現増強を伴い、HIV の母乳を介した垂直感染において重要な役割を担うことが推測された。

## F. 論文発表

1) Hamada, H, Hiroi, T, Nishiyama, Y, Takahashi, H, Masunaga, Y, Hachimura, S, Kaminogawa, S, Takahashi-Iwanaga, H, Iwanaga, T, Kiyono, H, Yamamoto, H, Ishikawa, H (2002) Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine

*J Immunol.*, 168, 57-64

2) Nishiyama, Y, Hamada, H, Noonaka, S, Yamamoto, H, Nanno, M, Katayama, Y, Takahashi, H, Ishikawa, H (2002) Homeostatic regulation of intestinal villous epithelia by B lymphocytes

*J. Immunol*, 168, 2626-2633

3) Yokosuka, T, Takase, K, Suzuki, M, Nakagawa, Y, Taki, S, Takahashi, H, Fujisawa, T, Arase, H, Saito, T (2002) Predominant role of T cell receptor (TCR)- $\alpha$  chain in forming preimmune TCR repertoire revealed by clonal TCR reconstitution system

*J Exp Med*, 195, 991-1001

4) Enose, Y, Ui, M, Miyake, A, Suzuki, H, Uesaka, H, Kuwata, T, Kunisawa, J, Kiyono, H, Takahashi, H, Miura, T, Hayami, M (2002) Protection by intranasal immunization of a nef-deleted, nonpathogenic SHIV against intravaginal challenge with a heterologous pathogenic SHIV

*Virology*, 298, 306-316

5) Li, Q, Nagahara, N, Takahashi, H, Takeda, K, Okumura, K, Minami, M (2002) Organophosphorus pesticides markedly inhibit the activities of natural killer,

cytotoxic T lymphocyte and lymphokine-activated killer a proposed inhibiting mechanism via granzyme inhibition

*Toxicology*, 172, 181-190

6) Takahashi, M, Osono, E, Nakagawa, Y, Wang, J, Berzofsky, J A, Margulies, D H, and Takahashi, H (2002) Rapid induction of apoptosis in CD8<sup>+</sup> HIV-1 envelope-specific murine CTLs by short exposure to antigenic peptide

*J Immunol*, 169, 6588-6593

7) Takahashi, H (2002) Antigen presentation in vaccine development  
*Comp. Immunol Microbiol & Infect Dis.*, (in press)

8) Narazaki, H, Watari, E, Shimizu, M, Owaki, A, Das, H, Fukunaga, Y, Takahashi, H, Sugita, M (2002) Perforin-dependent killing of tumor cells by V $\alpha$ 1V $\beta$ 1-bearing T cells  
*Immuno. Lett.*, (in press)

9) Sakaue, G, Hiroi, T, Nakagawa, Y, Someya, K, Iwatani, K, Sawa, Y, Takahashi, H, Honda, M, Kunisawa, J, Kiyono, H (2002) HIV Mucosal Vaccine Nasal Immunization with gp160-Encapsulated Hemagglutinating Virus of Japan-Liposome Induces Antigen-Specific CTLs and Neutralizing Antibody Responses

*J. Immunol*, 170 (in press)

10) Ichikawa, M, Sugita, M, Takahashi, M, Satomi, M, Toshiyuki, T, Araki, T, Takahashi, H (2002) Breast milk macrophages spontaneously produce GM-CSF and differentiate into dendritic cells in the presence of exogenous IL-4 alone  
*Immunology*, 108 (in press)

11) Takaku, S, Nakagawa, Y, Shimizu, M, Norose, Y, Maruyama, I, Wakita, T, Takano, T, Kohara, M, Takahashi, H (2002) Induction of hepatic injury by hepatitis C virus-specific CD8+ murine cytotoxic T lymphocytes in transgenic mice expressing the viral structural genes *BBRC*, 301 (in press)

12) 高橋秀実 感染症における免疫とワクチン 細胞性免疫の重要性 *臨床と微生物*, 29(2) 191-194, 2002

13) 高橋秀実 臨床研究の進歩 免疫病態と感染抵抗性の実体について *日本臨床*, 60(4) 717-723, 2002

14) 高橋秀実 基本免疫と獲得免疫 *J Nippon Med Sch*, 69(5) 410-414, 2002

15) 高橋秀実 エイズウイルスに対する感染防御免疫 炎症と免疫, 11 (印刷中)

## G 学会発表

1) 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)

2) 山西慎吾、花輪智子、田口晴彦、大崎敬子、山本友子、高橋秀実、神谷茂 *Listeria monocytogenes* における DnaK の病原因子発現への関与 第75回日本細菌学会総会 2002年4月4-6日(横浜)

3) 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38回日本肝臓学会総会 2002年6月13-14日(大阪)

4) 高久俊、清水真澄、中川洋子、脇田隆宇、小原道法、高橋秀実 C型肝炎ウイルス transgenic mice を用いた HCV 特異的細胞障害性T細胞の誘導と解析 第50回日本ウイルス学会総会 2002年10月16-18日(札幌)

5) 高橋秀実、大藪英一、渡理英二、渡辺恵理、高橋めぐみ 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 第50回日本ウイルス学会総会 2002年10月16-18日(札幌)

6) 高橋秀実 免疫システムの新たな実体 基本免疫と獲得免疫 第5回日本臨床腸内微生物学会総会 2002年11月9日(東京)

7) 高橋秀実 病と闘う体内の免疫システム 日本ホリスティック医学シンポジウム2002 2002年11月24日(東京)

8) SHINYA Eiji, KAWASHIMA Tetsuo, TAKEUCHI Junko, OWAKI Atusko, SHIMIZU Masumi, HIDAKA Chizuno, SUGITA Masahiko, TAKAHASHI Hidemi Nef down-regulates CD1 surface expression Another mechanism for immune evasion by HIV-1 第16回日本エイズ学会総会 2002年11月28日-30日(名古屋)

9) 里見操緒、市川雅男、杉田昌彦、新谷英滋、竹下俊行、高橋秀実 ヒト母乳中マクロファージの IL-4 による分化と HIV 運搬の可能性 第16回日本エイズ学会総会 2002年11月28日-30日(名古屋)

10) 高橋秀実 HIV 免疫応答とワクチン開発に関する最近の話題 第16回日本エイズ学会総会 2002年11月28日-30日(名古屋)

11) HIROI Takachika, SAKAUE Gaku, NAKAGAWA Yohko, SOMEYA Kenji, IWATANI Kohichi, SAWA Yoshiki, TAKAHASHI Hidemi, HONDA Mitsuo, KUNISAWA Jun, KIYONO Hiroshi HIV mucosal vaccine Nasal immunization with gp160 encapsulated HVJ-liposome induces antigen-specific CTL and neutralizing antibody responses 第32回日本免疫学会総会 2002年12月4日-6日(東京)

12) 柳原剛、野呂瀬嘉彦、松岡良彰、茂呂周、楢崎秀彦、若林あや子、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2報) 第32回日本免疫学会総会 2002年12月4日-6日(東京)

13) 熊谷善博、大脇敦子、高橋秀実 抗体超可変部を用いたエピトープライブラリの構築と感染防御への利用 第32回日本免疫学会総会

2002年12月4日-6日(東京)

14) 市川雅男、杉田昌彦、高橋めぐみ、新谷英滋、里見操緒、竹下俊行、高橋秀実 IL-4 によるヒト母乳中マクロファージの樹状細胞への分化

第32回日本免疫学会総会

2002年12月4日-6日(東京)

15) KAWASHIMA Tetsuo, NOROSE Yoshihiko, NARAZAKI Hidehiko, ENOMOTO Yutaka, WATARI Eiji, TAKAHASHI Hidemi, SUGITA Masahiko CD1 dependent T-cell recognition of BCG-infected dendritic cells

第32回日本免疫学会総会

2002年12月4日-6日(東京)

16) 金栄厚、中川洋子、杉山弘高、渡理英二、竹下俊行、高橋秀実 胎児期蛋白(AFP)発現細胞を傷害するIL-13産生CD4陽性 $\alpha\beta$ 型T細胞

第32回日本免疫学会総会

2002年12月4日-6日(東京)

17) 石井律子、清水真澄、大脇敦子、渡辺恵理、野呂瀬嘉彦、高橋秀実 腫瘍表面より抽出した抗原による樹状細胞を介した腫瘍特異的CTLの誘導

第32回日本免疫学会総会

2002年12月4日-6日(東京)

18) Takahashi, H. DC-SIGN expression on breast milk macrophages Implication for HIV-1 transmission Japan-US Cooperative Medical Science Program The 15th Joint Scientific Meeting of AIDS

March 5-7, 2003 (Okinawa, Japan)

## 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

SIV ウイルス由来抗原を取り込んだ樹状細胞 (DC) をサルに投与すると、CTL を活性化して SIV の増殖を抑制できることが最近報告された。HIV に対する DC 療法確立のための基礎研究として、我々は DC の活性化を増強する方法について検討を行った。その結果、従来の mature DC に比べてより多くの IL-12p40 を分泌する mature DC を誘導する方法を発見した。さらに、immature DC から T 細胞を活性化する DC と不活化する DC の両方が誘導できることが判明した。

#### A 研究目的

HIV 感染の予防および治療には、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感染をモデルとして、インフルエンザウイルス由来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<sup>b</sup>) 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 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 DC の機能について詳細に検討し、より効果的に T 細胞の活性化を行う DC の誘導を試みた。

#### B 研究方法

1) マウスの lineage negative 骨髄細胞を GM-CSF で 6 日培養後、LPS で刺激する。その後、時間を追って細胞表面の分子を蛍光標識抗体で staining して解析した。また、抗 CD40 抗体を加えて培養して、細胞表面の分子の発現の変化を検討した。

2) LPS または抗 CD40 抗体刺激の 48 時間後の

DC を CD86 分子の発現により sorting 後、そのサイトカイン産生を RNase protection assay 及び real-time quantitative PCR で測定した。

3) それぞれの刺激後の DC と抗原および T cell clone を共培養して、T 細胞反応を  $H^3$ -thymidine の取り込みで測定した。

## C 研究結果

in vitro において LPS 刺激により活性化したマウス骨髄由来 DC の一部が、速い経過で mature phenotype (CD86<sup>high</sup>) から別の phenotype (CD86<sup>low</sup>) へ移行するのを発見した (論文作製中)。この phenotype へ移行した DC は抗原提示できず、T 細胞を anergy 状態にすることが判明した。この anergy phenotype DC (expired DC と命名) は分泌されるサイトカインの種類 (IL-10、TNF $\alpha$ ) および表面分子の発現 (MHC class I、TLR4) が immature phenotype DC と異なっていた。また、他の TLR を介する signal および danger signal を出すと考えられる壊死細胞によっても同様な anergy phenotype を示す DC の誘導が認められた。興味深いことに、抗 CD40 抗体により anergy phenotype への移行が阻止され、LPS で誘導した mature phenotype DC (M1DC) とは分泌されるサイトカインの種類が異なる別の mature phenotype DC (M2DC) へ移行することが判明した (図)。実際 in vivo の実験より、LPS により活性化された mature phenotype はリンパ節へ移行し、そこで活性化ヘルパー T 細胞 (CD40L 陽性) に出会い CD40 を介して anergy phenotype への移行が阻止され、M2DC へ移行することが判明した。

LPS の刺激を受けないでも、抗 CD40 抗体による

単独刺激でも M2DC に移行した。興味深いことに、LPS→抗 CD40 抗体で誘導した M2DC は抗 CD40 抗体単独で誘導した M2DC より IL-12p40 の発現は強かった。従って、LPS→抗 CD40 抗体で誘導した M2DC の方がより強い CTL 活性化能を有している可能性が強い。この M2DC を使用すれば、より効果的な DC 療法が行えると考えられる。

## D 考察

LPS→抗 CD40 抗体で誘導した M2DC が抗 CD40 抗体単独で誘導した M2DC (従来の mature DC に相当する) より CTL を効果的に活性化するかどうかの in vitro の実験と、腫瘍をモデル系としての in vivo の実験を現在行っている。効果が判明すれば、感染症を防げるかどうかを検討する予定である。

一般的に、トレランスを誘導する樹状細胞は immature phenotype DC ということになっている。しかし、immature phenotype DC を生体に投与しても生体内で mature phenotype DC になる可能性があり、トレランス誘導に適さない。これに対して、我々の発見したトレランスを誘導する expired DC は、一度 mature phenotype を経たもので、これ以上 phenotype の変化を起こさず安定なため、トレランスを誘導するための生体への投与には適していると考えられる。

## E 結論

骨髄由来の樹状細胞から CTL を活性化できる DC と抑制する DC を新たに同定した。これらの細胞のさらなる基礎的解析と臨床応用を続ける予定である。

## F 研究発表

### 1 論文発表

- 1 Kontani K, Taguchi O, Ozaki Y, Hanaoka J, Tezuka N, Sawai S, Inoue S, Fujino S, Maeda T, Itoh Y, Ogasawara K, Sato H, Ohkubo I, & Kudo T Novel vaccination protocol consisting of injecting MUC1 DNA and non-primed dendritic cells at the same region greatly enhanced MUC1-specific anti-tumor immunity in a murine model *Cancer Gene Therapy* 9, 330-337, 2002
- 2 Ninomiya A, Ogasawara K, Kajino K, Takada A, & Kida H Intranasal administration of a synthetic peptide vaccine encapsulated in liposome together with an anti-CD40 antibody induces protective immunity influenza A virus in mice *Vaccine* 20, 3123-3129, 2002

### 2 学会発表

- 1 Itoh Y, Ishida H, Ogasawara K, German RN Differential TCR signaling induced by agonist ligand in polarized Th1 and Th2 cells with identical antigen receptors KEYSTONE SYMPOSIA (Colorado)
- 2 Itoh Y, Fujimoto N, Ishida H, Ogasawara K The role of antigen presenting cells and partial agonists in Th1 and Th2 differentiation Kyoto T Cell Conference The 3rd International Workshop (Kyoto)
- 3 Kajino K, Yamamoto Y, Takada H, Itoh Y,

Ogasawara K 可溶性 TGF- $\beta$  受容体を用いた腫瘍抗原特異的 TIL の誘導 第6回基盤的癌免疫研究会 (久留米)

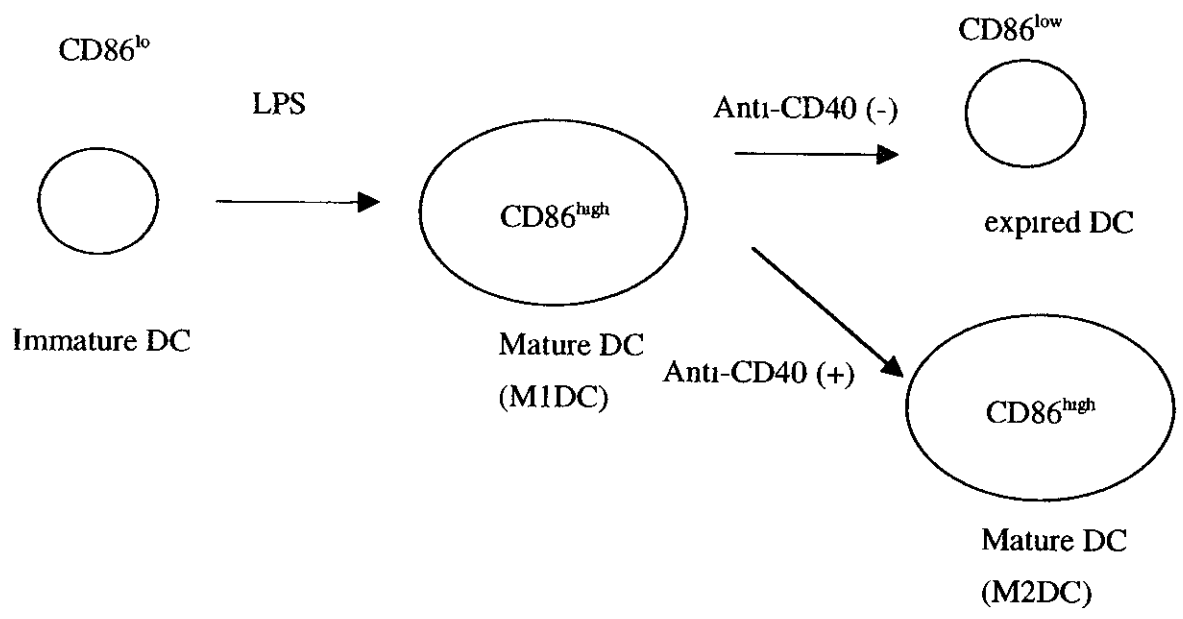
- 4 Kajino K, Ogasawara K コンピューターデザイン環状ペプチドによるウィルス特異的抗体産生誘導の試み 第50回日本ウィルス学会学術集会 (ワークシヨップ) (札幌)
- 5 Nakamura I, Banba H, Kajino Y, Kajino K Ogasawara K Myeloid Dendritic cell の各種刺激による成熟化の異差について 第32回日本免疫学会総会 (東京)
- 6 Makino J, Itoh Y, Matsumoto S, Andoh A, Fujiyama Y, Ogasawara K クローン病モデル SAMP1/Yit のリンパ球表面マーカーの検討 32回日本免疫学会総会 (東京)
- 7 Yamamoto Y, Takada H, Kajino K, Itoh Y, Ogasawara K 可溶性 TGF- $\beta$  レセプターと OVA ペプチド封入リポソームの投与による腫瘍拒絶反応の解析 第32回日本免疫学会総会 (東京)
- 8 Fujimoto N, Itoh Y, Ogasawara K CD40 crosslinking により IL-12 を産生する樹状細胞分画の解析 第32回日本免疫学会総会 (東京)

## G 知的財産権の出願・登録状況

### 特許出願

異なる成熟過程を経る骨髄樹状細胞 (出願番号 2003-8807) 平成15年1月16日提出





## HIV エイスワクチンのモルモットを用いた実用化研究

分担研究者 本多三男 国立感染症研究所 エイズ研究センター 第一研究グループ長

研究要旨 BCG 東京株をベクターに用いた Gag ワクチンの実用化のためにヒト投与許容量の免疫により BCG の評価動物として用いられているモルモットを使って解析するとこれまで用いられた経皮、経口投与により十分な細胞性免疫を誘導することができた。

### 協力研究者

仲宗根正、松尾和浩、浜野隆一、染谷健  
川原守、海津雅彦、滝澤万里、泉泰之、古野直人、堀端重男、兼清優、浜武牧子、田中陽子、山本直樹（国立感染症研究所 エイズ研究センター）

### A 研究目的

既にサルを用いた研究で rBCG をプライミングすることがプライムブーストの系のレシメンで防御免疫を誘導することに有用であることが明らかにされている。今回臨床応用の実用化研究のために経口及び経皮接種を行い、従来の免疫方法によって十分な免疫誘導が可能であるかを検討する。さらにその免疫の持続についても検討する。

### B 研究方法

1 結核ワクチンとしての BCG の評価にはモルモットを用いた免疫誘導能の解析が行われている。従ってそれらの経験と方法を用いてモルモットを用いた BCG の経皮 0.1mg 投与、経口 80mg 投

与によりまず遅延型皮膚反応を条浦井の方法によって解析した。

2 それらのモルモットのサンプルを用いてモルモット特異的な IFN $\gamma$  のメソセーシレベルの解析法を確立し、ワクチン動物の解析を行った。

3 これらの免疫反応の解析を行うにあたってモルモットにおけるリンパ系細胞のフローサイトメーターを用いた同定法を検討し免疫動物のモニターを行った。

(倫理面への配慮)

所内に設置された動物実験委員会の承認を得て行われた。

### C 研究結果

HIV 候補ワクチンの評価にはサルによる評価が重要であるかその過程で小動物による解析が前提となる。さらにヒトにおける臨床試行においては免疫誘導能、特に細胞性免疫誘導能が重要な因子として捉えられる。今年度はモルモットを用いて以下の成果を得た。

1 評価動物としてのモルモットのリン

厚生労働化学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

バ系細胞のフローサイトメーターを用いた同定法の確立

- 2 サルにおけるプライムブースト系のコンセプトが成立しているのでモルモットを用いてその投与量、ルートを検討し rBCG-HIV gag 0.1mg 皮内投与か 80mg 経口投与と同様に細胞性免疫を誘導することを明らかにした。
- 3 モルモットの Th1, Th2 サイトカインの定量法の確立と BCG 免疫評価動物としてのモルモットのリンパ系細胞のフローサイトメーターを用いた同定法の確立の応用
- 4 皮内及び粘膜免疫による免疫誘導の特異性の解析と長期免疫持続の検討

D 考察

rBCG-HIV gag 及び rDIs-HIV gag を用いた防御免疫のコンセプトが確立されているのでモルモットを用いた実用化のための研究を行った。その結果 gag を組込んだリコンビナントワクチンでは 0.1mg の皮内投与及び 80mg の経口投与が有効な免疫誘導できることを明らかにした。

F 結論

モルモットはモデル動物として長期にわたり使用されており特に BCG などのワクチンの評価やアレルギーの解析のモデル動物としての意義が明らかにされつつある。そのポイントはマウス、ラットなどの他の齧歯類動物と比較して病原体の重要な抗原となる糖脂質の抗原提示がヒトと類似していることがあげられる。さ

らに細胞性免疫がヒトに近いことである。さらに HIV ワクチンの評価における最終的なサル評価モデルが確立されていないことから免疫誘導能の解析の重要な因子になっている。これらの点を考慮してモデル動物として優れているモルモットを使って候補ワクチンの免疫誘導の解析、ワクチンの実用化の検討を行い、投与法を明らかにした。

F 健康危険情報

特になし。

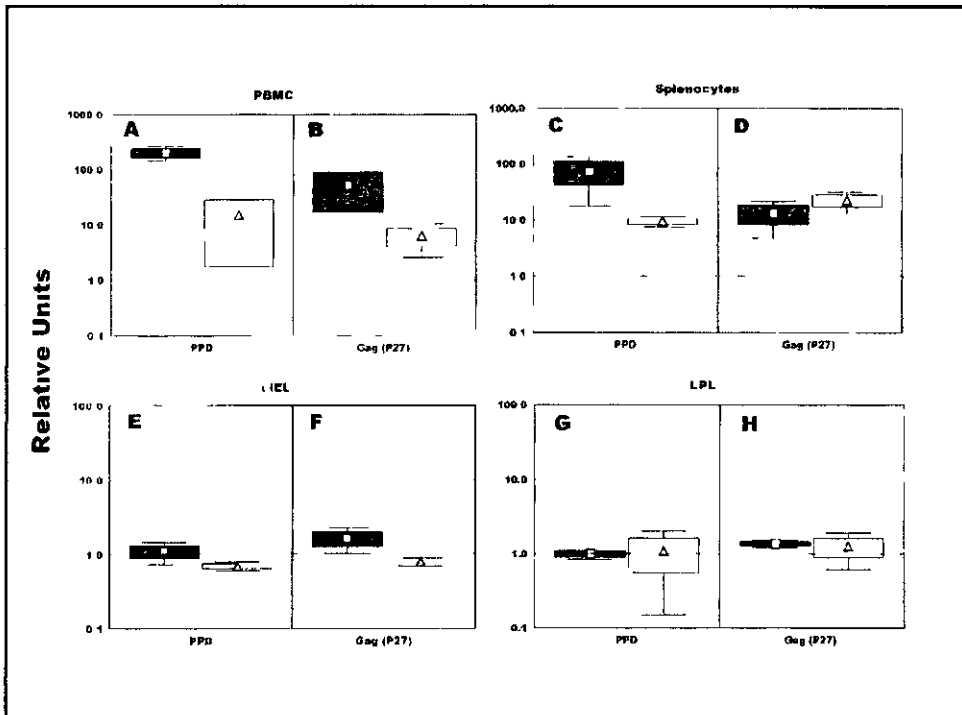
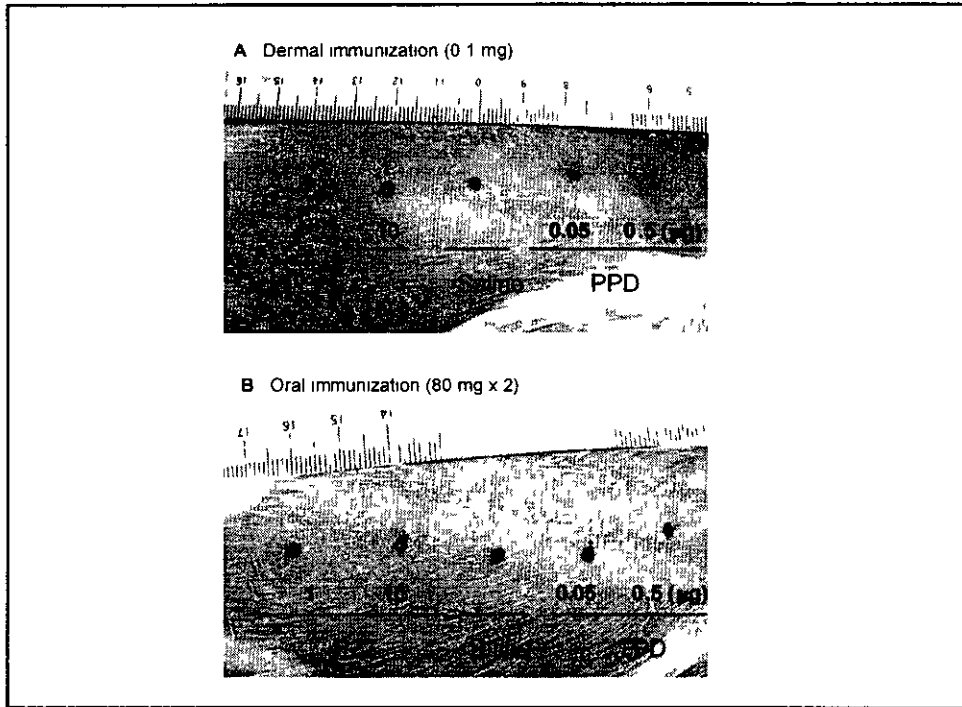
G 研究発表

1 論文発表

- 1) Hiroi T, Goto H, Someya K, Yanagita M, Honda M, Yamanaka N, Kiyono H **HIV mucosal vaccine nasal immunization with rBCG-V3J1 induces a long term V3J1 peptide-specific neutralizing immunity in Th1- and Th2-deficient conditions** (J Immunol 2001 167 5862-5867)
- 2) Kawahara M, Matsuo K, Nakasone T, Hiroi T, Kiyono H, Matsumoto S, Yamada T, Yamamoto N, and Honda M **Combined intrarectal/intradermal inoculation of recombinant Mycobacterium bacillus calmette-guerin (BCG) induces enhanced immune responses against the inserted HIV-1 V3 antigen** (Vaccine 2002 Dec13,21(3-4) 158-66)
- 3) Kawahara M, Nakasone T, and Honda,

厚生労働化学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

- M **Dynamics of Gamma Infection, Interleukin-12 (IL-12), IL-10, and Transforming Growth Factor  $\beta$  mRNA Expression in Primary *Mycobacterium bovis* BCG Infection in Guinea Pigs Measured by a Real-Time Fluorogenic Reverse Transcription-PCR Assay** (Infect Immun 2002 Dec,70(12) 6614-20)
- 4) Kawahara M, Hashimoto A, Toida I and Honda M **Oral recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) expressing HIV-1 antigen as a freeze-dried vaccine induces a long-term HIV-specific mucosal and systemic immunity** (Clinical Immunology 2002 105(3) 326-331)
- 5) Takizawa M, Chiba J, Haga S, Asano T, Yamamoto N and Honda M **Fractionation of guinea pig leukocyte by flow cytometry using a novel MIL4/SSC parameter** (Cytometry Research Vol 12-2 2002)
- 2 学会発表
- 1) 滝澤万里、芳賀伸治、千葉丈、浅野敏彦、本多三男 フローサイトメーターによるモルモットの新しい MIL4-CT7+白血球分画の同定 第12回日本サイトメトリー学会 (8/2-3, 2002, 愛知医科大学)
- H 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
- 1) 特許取得 無し
- 2) 実用新案登録 無し
- 3) その他 無し



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<sup>+</sup>ヘルパーT細胞を中心とした液性免疫活性化法の開発に必要な作用機構の解析と安全性の評価を細胞レベルでおこなう方法の構築を目的として、抗原提示細胞株の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<sup>+</sup>)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<sup>+</sup>)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<sup>+</sup>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開発やCD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞の機能をコントロールする生理活性物質の検索などが必要になる。それらのプロセスにおいて、ワクチンや生理活性物質の作用機構の解析と安全性評価は欠くことのできないものである。この研究は、ワクチン開発や生理活性物質の検索のプロセスにおいて必要な作用機構の解析と安全性評価のための方法を構築することを目的として、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の解析、特に

MHC クラスII分子と抗原ペプチドとの複合体形成とその細胞内輸送機構に関する分子メカニズムの解析の解析をおこなうものである。

B 研究方法

目的を達成するために以下に記す3つの方法で研究をおこなった。

- 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 (DsRedあるいはGFP) 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分子+

抗原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。

### 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。

この結果に関しては、平成13年度の報告書にまとめてあるので参照されたい。

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。

精製ヘクター1 $\mu$ gを $1 \times 10^5$ 個の皮質部胸腺上皮細胞株、髄質部胸腺上皮細胞株およびJ774 1細胞にそれぞれ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) 共焦点レーザー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。

H2-DM $\beta$ 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皮質部胸腺上皮細胞株、髄質部胸腺上皮細胞株およびJ774 1細胞に関する結果を図1に示す。

皮質部胸腺上皮細胞株、髄質部胸腺上皮細胞株およびJ774 1細胞いずれの場合も、また、皮質部および髄質部上皮細胞にIFN- $\gamma$ を培地に投与してクラスII分子を発現させた場合でも、J774 1細胞にLPSを投与して細胞を活性化

した場合でも、赤色の蛍光を発する小胞が細胞質内に点在した。

結果は示していないが、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ところから、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。また、酸性条件下で緑色の蛍光を発色する染料 (Lysosensor<sup>TM</sup>) 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。さらに、カテプシン-B、-D、-L、-Sがこれら小胞に存在し、蛍光基質をプロセスする活性を示した。一方、H2-DM $\beta$ 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2および図3に示すように、IFN- $\gamma$ を培地に投与してクラスII分子を発現した皮質部および髄質部上皮細胞内のDsRed陽性細胞内小胞には、MHC class II分子 (class II)、インヴァリアント鎖 (Ii chain)、さらにCD80分子 (CD80) がそれぞれ存在した。J774 1細胞にLPSを投与した場合でも、そうでない場合でも、DsRed陽性細胞内小胞にclass II、Ii chain、さらにCD80がそれぞれ存在した。これらの蛍光免疫染色の結果から、キメラタンパク質の存在する (DsRed陽性の) lysosome様細胞内小胞には、MHC class II 拘束性抗原提示に関与する分子

群が存在することが明らかとなった。

皮質部および髄質部上皮細胞内および J774 1細胞のDsRed陽性細胞内小胞には、細胞の外から取り込まれた可溶性抗原 (OVA) が輸送された。J774 1細胞が蛍光基質 (BODIPY) でラベルしたOVA (DQ-OVA 酸性の細胞内小胞に取り込まれ、OVAがプロテアーゼにより消化されると緑色の蛍光を発する。)を細胞内へ取り込む様子と細胞内におけるその輸送の様子を図4に示す。J774 1細胞に取り込まれたDQ-OVAは、endosome様のcompartmentsに移動した後に、DsRed陽性のlysosome様細胞内小胞に輸送される。このように、取り込まれた抗原についてもDsRed陽性細胞内小胞に輸送されることが明らかとなった。

以上の共焦点レーザー顕微鏡による観察から、皮質部上皮細胞内、髄質部上皮細胞内およびJ774 1細胞内に存在するDsRed陽性のlysosome様細胞内小胞には、MHCクラスII拘束性抗原提示に関与する分子群が存在し、さらに、細胞内に取り込まれる抗原もこれらの細胞内小胞に輸送されることがわかった。

次に、これらのDsRed陽性lysosome様細胞内小胞を皮質部上皮細胞内、髄質部上皮細胞内およびJ774 1細胞内からそれぞれ分離し、そのキメラタンパク質、class IIヘテロダイマー、Ii chainの存在をSDS-PAGE およびウェスタンブロット法で調べた。図5に示すように、細胞を0.25M sucrose溶液中で破壊し、1000gで10分の遠心を行い、核分画を除いた上清にウサギ抗DsRed抗体を結合した磁気ビーズを加える。DsRed陽性細胞内小胞はその磁気ビーズを結合する。4000ガウス程度の永久磁石で

DsRed陽性細胞内小胞が結合した磁気ビーズを分離、PBSで洗浄した後にSDSサンプル緩衝液に溶解し、SDS-PAGEついでウェスタンブロットをおこなった。

図6に示すように、IFN- $\gamma$ やLPS刺激のあるなしにかかわらず、すべての細胞の場合において、H2-DM $\beta$ 鎖とDsRedキメラタンパク質のバンド (53 kDa) が認められた。また、class IIヘテロダイマー+ペプチド複合体は、胸腺上皮細胞の場合はIFN- $\gamma$ した場合、J774 1細胞の場合はLPS刺激のない場合に認められた

(この場合、SDS-PAGEのサンプルは煮沸しないでゲルにロードした)。Ii chainは、胸腺上皮細胞の場合はIFN- $\gamma$ した場合、J774 1細胞の場合はLPS刺激のあるなしにかかわらず41 kDaと31kDaの2つの異性体とその分解産物(最も多いのが10 kDa程度の分解産物)が認められた。図7に示したように、クラスII拘束性の抗原提示に関与するプロテアーゼであるカテプシン-B、-D、-Lもこの小胞分画に認められた。以上のことから、DsRed陽性細胞内小胞は、ウサギ抗DsRed抗体結合磁気ビーズを用いて分離でき、そこにはclass IIをはしめMHCクラスII拘束性抗原提示に関与する分子群が存在する。さらに、可溶性プロテアーゼの存在も認められることから、分離した小胞は、膜断片などではなく完全な小胞であると考えられる。

#### D 考察

H2-DM $\beta$ 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ヘクターを、皮質部胸腺上皮細胞株、髄質部胸腺上皮細胞株およびマクロファーン



様細胞J774 1にそれぞれ導入し、このタンパク質を恒常的に発現する細胞株をそれぞれ得ることができた。

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移行シグナルは、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、内在性のH2-DMα鎖とヘテロダイマーを形成した後にこのlysosome様細胞内小胞に輸送されると考えられる。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。

DsRed陽性lysosome様細胞内小胞には、class II、Ii chain、CD80などの抗原提示に係る分子や抗原 (OVA) が存在し、さらに、分離した小胞を用いたウェスタンブロットにおいては、class IIヘテロダイマー+ペプチド複合体が認められることから、DsRed陽性細胞内小胞は、class IIヘテロダイマー +ペプチド複合体の形成の場であると考えられる。

今後は、DsRed陽性lysosome様細胞内小胞の細胞内局在とその動態を共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察し、その局在や動態の変化と同調させてこの小胞を分離し、生化学的な解析をおこなうことによって、class IIヘテロダイマー +ペプチド複合体の形成・輸送に関する分子機構の解析とそれらが免疫学的な刺激によってどのように調節されるのかを明らかにしてゆきたい。

## 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。共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いた観察では、キメラタンパク質はlysosome様の細胞内小胞に局在し、これらの細胞内小胞にはclass IIをはじめ、MHC class II拘束性抗原提示に関与する分子群の存在とこれら小胞への可溶性抗原 (OVA) の輸送が認められた。また、分離小胞をウェスタンブロット法で解析したところ、class IIヘテロダイマー +ペプチド複合体の存在がみとめられた。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、class IIヘテロダイマー +ペプチド複合体形成の場であると考えられた。

## F 研究発表

### 論文発表

- ① M Toda, M Kasai, H Hosokawa, N Nakano, Y Taniguchi, S Inouye, S Kaminogawa, T Takemori, and M Sakaguchi DNA vaccine using invariant chain gene for delivery of CD4+ T cell epitope peptide derived from Japanese cedar pollen allergen inhibits allergen-specific IgE response  
Eur J Immunol 32, 1631-1639, 2002

### 学会発表

- ① Kasai, M Study on the molecular mechanism of MHC class II restricted antigen-presenting process in thymic epithelial

cell lines

なし。

Kyoto T Cell Conference, The 3ed International  
Workshop (12<sup>th</sup> Annual Meeting) 2002 年 4 月

② 笠井道之、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 3 2 回 日本免疫学会総会・学術集会、  
2002 年 12 月

③ 田中ゆり子、笠井道之、内藤誠之助、種  
市麻衣子、加藤博史、内田哲也 マクロファ  
ージにおけるリポソーム結合抗原の細胞内動  
態 第 3 2 回 日本免疫学会総会 学術集会  
2002 年 12 月

④ 池田通、黒山浩之、笠井道之、宇津山正  
典、広川勝いく SH 領域を欠く ZAP-70、  
truncated ZAP kinase (TZK) の構造と機能  
第 3 2 回 日本免疫学会総会・学術集会  
2002 年 12 月

#### 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

## 研究成果の刊行に関する一覧表

IV 研究成果の刊行に関する一覧表  
書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
牧野 正彦	ハンセン病— Hansen's Disease, Leprosy	小早川隆敏	新版 感染症マニュアル			2002	176-179
神奈木真理	後天性免疫不全症	谷口 克 宮坂 昌之	標準免疫学 第2版	医学書院	東京	2002	421-426
ハレンチナ・オスタペンコ、 宮澤正顕	温熱治療による宿主免疫能の活性化	上田 公介 中井 吉英	シリーズ21世紀の健康と医生物学4 からだをなおす	昭和堂	京都	2003	25-47