

図 4 HLA class II 分子を介した MAPK の活性化

DR からの刺激は Erk を活性化し、その結果、炎症性モノカインが産生される。p38 の活性化は DR/DQ/DP いずれからの刺激でも起こり、抑制剤の結果から炎症性モノカイン、抗炎症性モノカインいずれの産生にも関与している。ただし、MAPK カスケードを修飾する他の要素は図示していない。

により観察された。抗 DR 抗体または DR 拘束性 T 細胞による刺激は IL-1 β などの炎症性モノカインの産生をより強く誘導したが、抗 DQ/DP 抗体や DQ/DP 拘束性 T 細胞は IL-10 などの抗炎症性モノカインの産生をより強く誘導した。ランダムペプチドに反応し拘束分子の異なる T 細胞クローンの Th1/Th2 型はこれらに対応する結果を示した。DR, DQ/DP 分子は MAPK family を介してそれぞれ異なるシグナルを単球へ伝達し、*in vivo* T 細胞応答に影響を与えていると結論した(図 4)。

生理的には、抗原提示の際に HLA からのシグナルによって抗原提示細胞側の応答が修飾されること、そして DR/DQ/DP の種類によってそのパターンが異なることを意味する。生体内では特定の抗原が多量に存在し、オリゴクローナルな T 細胞応答が起こる微小環境下において使われる抗原提示分子の種類が免疫応答のパターンを支配する可能性があるということを意味している。これはペプチドワクチンをデザインする際にも重要な概念となる可能性を秘めている。

アジュバントとともに用いる場合

アレルギー治療にとって真に有益なのはアレルギーによる減感作なのか、それとも吸入ステロイド製剤なのか、という議論が絶えない。2003 年バンクーバーで開催された国際アレルギー学会ではこのディベートが企画された。形成されたコンセ

ンサスをまとめるとつぎのようになる。

① 成人のアレルギー患者でひとつのアレルゲンだけに反応する人はまれである。したがって、特定の抗原による減感作はあまり意味がない。

② しかし、小児では異なり、発症初期の患者の多くは common allergen のひとつにしか反応しない。

③ このような小児に正しい減感作を行った場合、それをやらなかった患者に比べてアレルギーマーチ(さまざまな抗原に対して鼻炎、喘息など、さまざまな症状が加齢とともに現れてくること)の進行が有意に抑えられる。

この議論において、③はとくに重要である。つまり小児期における抗原特異的な減感作の成功はその後のアレルギー性疾患の拡大を阻止できるのである。しかし、初期から免疫応答を正しい方向に正確に向けた免疫療法をデザインしなければ、むしろ病気を悪化させることにもなりかねない。小児の気管支喘息では Th2 応答がおもな病因となっていることから考えても、Th2 応答を確実に減弱させる治療法の開発が不可欠である。この視点から注目を浴びているのがアジュバントである。近年、CpG をはじめとする Th1 アジュバントの研究が急速に進んでいる。もうひとつの重要な側面は“粗アレルゲン”のなかに Th2 アジュバントが含まれている例がみつかったという点である。Yazdanbakhsh ら²¹⁾は、住血吸虫由来の phosphatidylserine が樹状細胞(DC)を直接刺激し、その

結果, T細胞応答がTh2寄りに傾くことを示した。すなわち, 寄生虫は抗原特異的な免疫応答を誘導する以前に抗原提示細胞の応答を抗原非特異的に動かすことによってTh2アジュバント活性を発揮できるがゆえに“アレルギー”なのである。これはTLR2を受容体の一部として利用しているようである。

おわりに

以上述べてきたように, ひと口に抗原ペプチド療法といっても, その理論や応用はさまざまな側面と可能性をもっている。今後は減感作用のエキスからTh2アジュバントを除く努力も必要になるであろう。ヒトにおけるトランスレーショナルな研究の進展が期待される。

文献

- 1) Stern, L. J. et al. : *Nature*, 368 : 215, 1994.
- 2) La Salle, J. M. et al. : *J. Exp. Med.*, 176 : 177-186, 1992.
- 3) Matsushita, S. et al. : *J. Exp. Med.*, 180 : 873-883, 1994.
- 4) Matsuoka, T. et al. : *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 112 : 365-370, 1997.

- 5) Matsushita, S. et al. : *J. Immunol.*, 158 : 5685-5691, 1997.
- 6) Matsuoka, T. et al. : *J. Immunol.*, 157 : 4837-4843, 1996.
- 7) 松下 祥 : *Mol. Med.*, 32 : 624-629, 1995.
- 8) Yokomizo, H. et al. : *Hum. Immunol.*, 52 : 22-32, 1997.
- 9) Hemmer, B. et al. : *J. Exp. Med.*, 185 : 1651, 1997.
- 10) Tanaka, Y. et al. : *J. Immunol.*, 162 : 7155-7161, 1999.
- 11) 松下 祥 : MHC・ペプチド複合体と抗原提示。標準免疫学(宮坂昌之, 谷口 克編), 医学書院, 2002, pp, 133-145.
- 12) Chen, Y-Z. et al. : *Hum. Immunol.*, 54 : 30-39, 1997.
- 13) 松下 祥 : 組織培養工学, 27 : 4-7, 2001.
- 14) Matsushita, S. et al. : *Eur. J. Immunol.*, 31 : 2395-2402, 2001.
- 15) 中島敏博, 松下 祥 : 組織培養工学, 27 : 29-33, 2001.
- 16) Matsushita, S. and Matsuoka, T. : *Eur. J. Immunol.*, 29 : 431-436, 1999.
- 17) Matsushita, S. et al. : *Immunol. Lett.*, 55 : 150-154, 1997.
- 18) Karin, N. et al. : *J. Immunol.*, 160 : 5188-5194, 1998.
- 19) Tabata, H. et al. : *J. Biol. Chem.*, 275 : 34998-35005, 2000.
- 20) Matsuoka, T. et al. : *J. Immunol.*, 166 : 2202-2208, 2001.
- 21) van der Kleij, D. and Yazdanbakhsh, M. : *Eur. J. Immunol.*, 33 : 2953-2963. 2003.

* * *

HLAと疾病

5

Immune regulation mediated by HLA

HLAによる免疫応答の制御

松下 祥

Matsushita Sho / 埼玉医科大学免疫学教授

はじめに

T細胞はB細胞と異なり、抗原分子を直接認識することはなく、プロテアーゼによって分解されたオリゴペプチド抗原とMHC(主要組織適合抗原複合体; ヒトではHLA)分子の結合によって形成された複合体と結合することによって抗原を認識する。HLAはその分子の先端部分に溝状の構造を有しており、そのなかに抗原ペプチド断片が収容される。ホットドッグに例えると、ちょうどHLAがパンで、ペプチドがソーセージのような構造になっている¹⁾。

HLAはその構造から、クラスIとクラスIIに分類される。細胞内は、

- ① 核膜孔を通じて交通する核内と細胞質
- ② エンドソームを通じて細胞外と交通する小胞区画

の2つに大きく分けることができる。感染性微生物への適切な反応を行うた

めにT細胞は2つの区画、すなわち細胞質内と小胞区画の両方の外来異物の存在を認識するばかりでなく、双方を区別することができる。クラスI分子は細胞質内のペプチドを細胞表面へ輸送し、このクラスI・ペプチド複合体はCD8陽性T細胞により認識される。クラスII分子は、小胞区画内のペプチドを細胞表面へ輸送し、このクラスII・ペプチド複合体はCD4陽性T細胞により認識される(図1)。

生理的状态ではMHCの抗原結合溝は、莫大な種類の自己由来のペプチド断片によって満たされている。この自己ペプチド+MHCの複合体は胸線や末梢におけるT細胞の正の選択と負の選択に関与している。すなわち、自己のHLA分子に結合した自己の蛋白由来のペプチドに対しては免疫寛容(immunological tolerance)が成立しており、病的な状態でない限り、これに反

応するT細胞は存在しないか不活性化されている。外来蛋白由来のペプチドは自己ペプチドに混じって抗原結合溝に侵入し、結合ペプチドのレパートリーの一部を占めるようになるのである。

Human Leukocyte Antigen

クラスII MHCによる抗原提示

クラスII分子はMHCのクラスII領域によってコードされる α 鎖と β 鎖のヘテロ二量体である。HLA-DR, DQ, DPがこれに相当する。抗原提示能のある細胞(B細胞, マクロファージ, 樹状細胞, 内皮細胞, ミクログリアなど), 精子などに発現している。ヒトやほとんどのげっ歯類では活性化T細胞にも発現するがマウスの活性化T細胞には発現しない。自己免疫病では標的臓器(甲状腺の濾胞細胞, 膵臓の β 細胞など)にも発現していることが多い。細胞

HLAと疾病

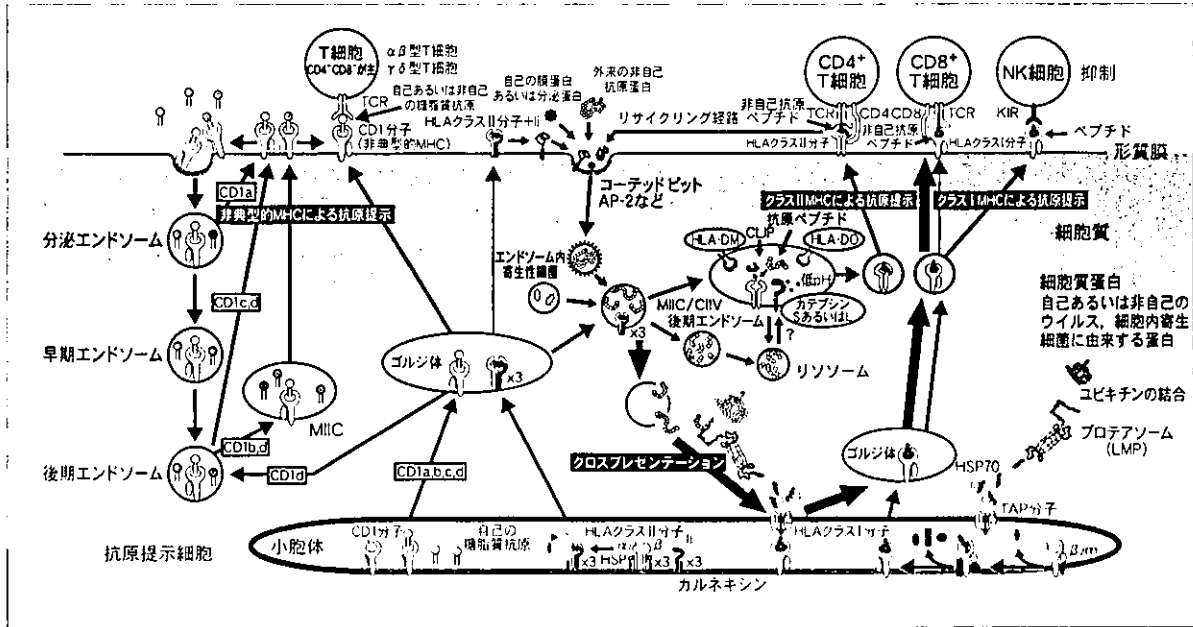


図1 主要組織適合抗原による抗原提示

膜から遠い側の $\alpha 1$ と $\beta 1$ ドメインが溝状の構造を形成して、このなかに 9~30 数 mer のペプチド(多くは 15 mer 前後)を収容する。

ここで重要な点は、MHC の多型性は溝の内部に集中しているということである。すなわち、異なる型の MHC 分子は溝の物理化学的性質(電荷の位置、疎水性、表面のかたちなど)が異なっている(図 2)。このために異なる型の MHC は異なる抗原ペプチドを結合して T 細胞に提示するのである。これによって、「T 細胞に抗原提示されやすいペプチドの種類」に個体差が生じる。これは古くから免疫応答遺伝子現象として知られてきた。実際、HLA の個体差に起因する免疫応答性の個体差が病気の感受性を決定する例が知られている。

当然、この原理はクラス II のみならず、クラス I にも通用する。

図 1 に示すように、APC は細胞外液中により抗原を取り込み、エンドソームに封じ込める。B 細胞においては細胞表面の免疫グロブリン分子が抗原を捕え、これが細胞内のエンドソームに取り込まれる。マクロファージにおいてはマンノースレセプター、シアル酸をもつリガンドに結合するスカベンジャーレセプター、CD14 や補体レセプターの CR3(CD11b/CD18) や CR4(CD11c/CD18) を介して細菌などを捕らえ食食する。エンドソームにおいてこれらの抗原は、カテプシン B、D および E をはじめとする蛋白分解酵素によりペプチドへと分解され、MIIC(MHC class II compartments) や CIIV(class

II vesicles) と呼ばれる別の細胞内コンパートメントへ運ばれる。MIIC はエンドソーム系の後期の特殊な小胞性分画である。

クラス II 分子の生合成の経路も小胞体内に輸送されることから始まるため、小胞体内へと入ってくるペプチドや細胞自身が新たに産生したペプチドがクラス II 分子に結合するのを防がなければならない。インバリエント鎖(Ii 鎖)がこの役割を担っており、クラス II 分子の抗原ペプチド収容溝は Ii 鎖でマスクされている。Ii 鎖は三量体を形成し、それぞれのサブユニットは 1 個のクラス II 分子と結合している。Ii 鎖の第 81~104 アミノ酸残基にまたがる CLIP(class II associated Ii chain peptide)配列の特に第 87~101 残基がク

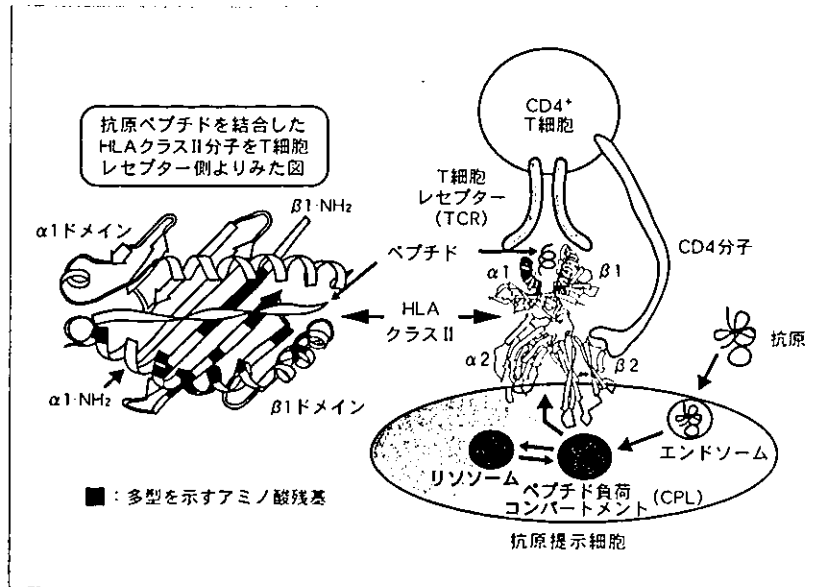


図2 HLA クラスII分子による CD4 T 細胞への抗原ペプチドの提示

ラスIIのペプチド収容溝を覆っている。クラスIIとIi鎖の複合体はMIICに移動したのち、カテプシンSにより分解され、CLIPを除いてクラスIIから離れる。HLA-DM分子はCLIPの解離と抗原ペプチドの結合を促進する。MIICは形態的に多層性小胞と多小胞体に分類される。前者ではIi鎖は切断されていないが、後者ではCLIPのみがクラスIIと結合して残っている。

クラスII分子様の構造をもつDO分子は、胸腺皮質上皮細胞とB細胞にのみ発現している。この機能は完全に解明されたわけではないが、細胞内ではDM分子と会合しており、DM分子がCLIPを抗原ペプチドに置換する反応をpH依存性かつクラスII、DMおよびDO分子の量的比率に依存して、促進したり抑制したりすることにより、抗原提示の調節に関与しているらしい。

細胞表面に発現したクラスIIはリサイクリング経路により再びエンドソーム系に取り込まれ再利用される。これにはクラスIIβ鎖の細胞内ドメインのロイシンが関与している。リサイクリングクラスIIはCLIPでマスクされておらず、pHの高い初期エンドソームでもペプチドを結合できるため、初期エンドソームに存在する分解されやすい蛋白由来のペプチドを結合して細胞表面に提示する。抗原のなかには主にこのリサイクリングクラスIIを介してT細胞に提示されるものがあることが知られている。

Human Leukocyte Antigen

クラスI HLAによる抗原提示

クラスI分子はβ2ミクログロブリンとMHCのクラスI領域によってコー

ドされるα鎖からなるヘテロ二量体である。α鎖の違いによってHLA-A, B, C, E, F, Gが区別される。分子の先端部分にα1, α2ドメインからなる溝状の構造を形成し、このなかに8ないし11アミノ酸残基からなるペプチド(多くは9残基からなるペプチド=9mer)を収容する。HLA-A, B, Cはほとんどすべての有核細胞と血小板に発現している。これに対しHLA-E, F, Gは、限られた組織、細胞に発現している。たとえば、HLA-Eは休止期T細胞、皮膚などに、HLA-F抗原は休止期T細胞、胎児肝などに、HLA-G抗原は胎盤トロホプラストに主に発現している。

細胞にウイルスやある種の細胞内寄生性細菌などが感染すると、その遺伝子は宿主細胞のなかで転写および翻訳され、微生物由来の蛋白が産生されて

HLAと疾病

細胞質中に放出される。また、腫瘍細胞ではこれらの細胞にユニークな蛋白、あるいは正常な細胞では少量しか産生されない蛋白が大量に産生される場合がある。このような蛋白の多くは細胞質内でプロセッシングを受けてペプチドへと分解される。すなわち、細胞質内で過剰に産生されたか、あるいは変性した蛋白にはユビキチンが複数結合し、プロテアソーム(proteasome)あるいはLMP (large multifunctional protease) と呼ばれる蛋白分解酵素の複合体は、主にユビキチン化された蛋白を特異的に認識して、これをエネルギー(ATP)依存性にペプチドへと分解する。ペプチドは小胞体(ER)内に輸送されたあとにすべての有核細胞が発現するクラス I 分子に結合して細胞の表面に発現する(図 1)。

CD8⁺細胞傷害性 T 細胞は、自己のクラス I 分子に結合した非自己抗原ペプチドを識別して活性化される。この際に CD8 分子はクラス I 分子の $\alpha 3$ ドメイン上の第 222~229 アミノ酸残基が形成するループに結合することにより標的細胞と T 細胞とのあいだの細胞間接着を増強するとともに、細胞質部分を介して Lck チロキシンキナーゼを活性化することにより T 細胞の活性化を促進する。

ナチュラルキラー(NK)細胞のレセプターに結合することにより NK 細胞の細胞障害活性を抑制することも、クラス I 分子の重要な機能のひとつである。

Human Leukocyte Antigen

抗原特異的免疫応答性の遺伝子支配

前述のように、HLA の多型(個体差)は収容溝内部のアミノ酸残基に集中しているため、異なる HLA 分子は異なる種類のペプチドと結合して免疫応答を開始させる²⁾。すなわち、ダニアレルギーであるのにスギ花粉アレルギーではない人がいる一方、その反対の反応性を示す人もいたといった現象は、主に HLA の個体差による(免疫応答遺伝子: immune response gene; Ir-gene)。この仕組みに関しては、抗原ペプチドを収容する HLA 分子の溝の部分の多型が大ききほど種全体としては多様な抗原に幅広く免疫応答することができ、自然選択に対して有利であったためであると推定される。つまり、HLA の型次第では、うまく攻撃できる非自己とできない非自己(微生物など)があるということになる。実際、人口が激減するような感染症の大流行が起ると、特定の HLA をもつヒトのみが生存し得たことを示唆する観察もある。特定の免疫関連疾患では特定の HLA 型が多いことが知られており、これも同じ理由によると考えられている。アレルギーに対する応答性と特定の HLA 対立遺伝子との相関はそのよい例であり、*Amb a 5* や *Amb t 5* に対する高応答性と DR2 の相関などはよく知られている。

Human Leukocyte Antigen

HLAは免疫応答の「質」を支配できるか?

われわれは、ヒト T 細胞クローンの

解析から、DRB1 拘束性のクローンは Th1 寄りのフェノタイプを示し、DQ、DP 拘束性のクローンは Th2 寄りのフェノタイプを示す傾向にあることを観察していた。そこで、われわれは抗原ペプチドが DR/DQ/DP のどの分子によって提示されるかによっても Th1/Th2 への分化が左右されるのではないかという作業仮説のもと研究を進め、以下の結論を得た

① HLA-ペプチド-TCR 相互作用が起ると、TCR のみならず HLA からシグナルが伝達されて抗原提示細胞が活性化される。その際、DR を介したシグナル伝達は MAPK family の Erk/p38 の活性化を介して炎症性モノカインである IL-1 β や TNF α の産生をより強く誘導し、逆に、DQ/DP を介したシグナル伝達は p38 のみの活性化を介して抗炎症性モノカインである IL-10 の産生をより強く誘導する傾向がある

② ランダムペプチド、ダニ粗抗原および PPD 特異的なヒト T 細胞株を樹立し、DR 拘束性、DQ 拘束性、DP 拘束性の T 細胞株のリンホカイン産生パターンを調べたところ、完全に区別することはできないが、DR 拘束性 T 細胞は Th1 寄り、DQ/DP 拘束性 T 細胞は Th2 寄りのフェノタイプを示す傾向があった。すなわち、PBMC レベルでの polyclonal な反応にも同様な傾向があることが確認された。クラス II HLA 分子に ITAM モチーフは存在しないので、会合している分子を介して刺激が入っていると考える

のが妥当であろう。実は, transmembrane domain から cytoplasmic domain にかけてのアミノ酸配列には HLA-DR, DQ, DP ごとに特徴がある。DR, DQ, DP は異なる分子と会合(あるいは異なる親和性で会合)することによって, 抗原提示細胞内に異なる刺激をいれているのかもしれない。もしそうであるならば, HLA の多様性 (DR, DQ, DP といった) は結合ペプチドの多様性を増やしているだけでなく, 一分子が活性化できる免疫応答の多様性を増やしているということが出来る。これこそが, MHC が多重遺伝子族として進化した合目的性であるのかもしれない³⁾。

Human Leukocyte Antigen

免疫遺伝学と分子予防医学

われわれは, 遺伝要因, 環境要因ともに比較的単純な疾患をモデルとしてとりあげ, その相互作用のメカニズムを解析してきた。その一例としてわれ

われが解析したインスリン自己免疫症候群 (insulin autoimmune syndrome ; IAS) を紹介する。IAS は, インスリンに対する自己免疫現象であり, 低血糖発作を主徴とする。患者の 90 % 以上が HLA-DRB1*0406 陽性であること (健康人では 5%), 患者の半数はメルカゾール[®] (チアマゾール) などの還元剤投与中に発症することが特徴である。そこで, HLA-DR4 分子を大量に精製して結合している自己ペプチドを溶出し, その構造モチーフを決定したところ, FxxLxQ のようなモチーフを有するペプチドが HLA-DRB1*0406 分子と高親和性に結合することが明らかとなった。このモチーフに完全にフィットする配列がインスリン α 鎖中に存在し (図 3), 実際, その合成ペプチドは HLA-DRB1*0406 と高親和性に結合した。

興味深いことに, インスリン分子中に存在する 3 カ所の S-S 結合のために, このペプチドは生理的条件下では直鎖ペプチドとしては存在し得ない。

つまり免疫学的には非自己である。しかし, メルカゾール[®]投与などの環境要因で強制的に還元されると, はじめて HLA-DRB1*0406 分子と結合し, 抗原提示されて自己免疫のサイクルが回り始める。すなわち, 広義の cryptic self であることが明らかとなった。これは遺伝要因と環境要因の相互作用で自己免疫病が発症する分子機構を示したはじめての例となった³⁾。

IAS に関するこの一連の成果は, HLA-DRB1*0406 という遺伝要因を有する個体 (日本人集団の 5%) には, 還元剤を投与しない, または副作用としての IAS を慎重にモニターしながら投与するというこで, 病気の発症を予防できることを意味している。同様の発想で, 米国では 1 型糖尿病に対して, 経口ワクチンを用いた予防医学的アプローチが試みられている。ここで対象となるのは近親に 1 型糖尿病の患者がおり, しかも 1 型糖尿病の遺伝要因である HLA-DR4 を有する健康人である。経口免疫寛容を期待して, イン

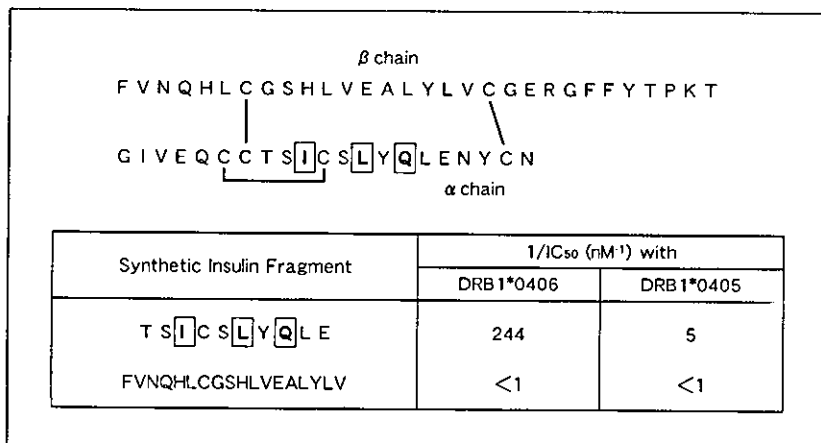


図 3 インスリン α 鎖中に存在する HLA-DRB1*0406 結合モチーフ

HLAと疾病

スリン分子を継続的に経口投与し、耐糖能を追跡調査したところ、「予防効果あり」という結論が得られた。この例にみられるように、多因子疾患においては、特定の遺伝要因を有する集団に対して環境要因の側からアプローチすることが非常に効率的であり、予防医学的に重要であるといえることができる。アレルギーにおいては遺伝要因がより複雑であるが、将来的にはこのようなアプローチが重要になるであろう。

Human ~~Genetics~~

ワクチンと抗原提示分子

抗原ペプチドワクチンは、腫瘍免疫、感染免疫、自己免疫、アレルギーなどの予防・治療において脚光を浴びているが、デメリットもある。その最大のもは、HLAの多型性が大きいため、「個人個人にとっての主要T細胞エピトープの多様性」を考慮する必要があるという点である。また、民族間でもそのタイプは大きく異なるため、特定の民族にはそのHLAタイプにマッチしたワクチンデザインが必要となる。

近年、結核菌に対するヒトT細胞応答の解析などから、蛋白抗原と同様に糖脂質抗原もまた生体にさまざまな応

答を誘導する重要な抗原であることが明らかになった。このような糖脂質抗原の提示を担っているのがCD1蛋白である。ヒトCD1分子は相同性の程度によりグループ1(CD1a, CD1b, CD1c)とグループ2(CD1d)に分類される。グループ2は α -ガラクトシルセラミドを結合してNKT細胞を活性化する(図1)。NKT細胞はごく限られた種類のT細胞レセプター(TCR)しか発現しておらず、多様な抗原認識には関与していない。それに対して、グループ1は胸腺外ではおもに樹状細胞に発現しており、自己・非自己由来のさまざまな脂質・糖脂質を効率よくT細胞に提示する。そのようなT細胞のTCRは多様である。つまり、TCR遺伝子の再構成をともなう多様な抗原認識機構を支えている抗原提示分子は古典的MHC分子とグループ1CD1分子であるといえよう。しかし、グループ1CD1分子はマウス・ラットに発現しておらず、しかもヒトグループ1の発現には厳密な組織特異性があるため、そのリガンドに関する研究はあまり進んでいない。

このような糖脂質抗原は感染免疫のみならず、自己免疫やアレルギーの分野でも注目されはじめており、今後のトピックスとなるであろう。CD1に

は個体差が存在しないため、HLA分子によって提示されるペプチド抗原で問題になるような「個人個人にとっての主要T細胞エピトープの多様性」を考慮する必要がない。つまり万人に効く薬剤をデザインできるという点で非常に魅力的である。

References

- 1) Stern LJ, Brown JH, Jardetzky TS et al: Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 368: 215-221, 1994
- 2) Matsushita S, Takahashi K, Motoki M et al: Allele specificity of structural requirement for peptides bound to HLA-DRB1*0405 and -DRB1*0406 complexes: implication for the HLA-associated susceptibility to methimazole-induced insulin autoimmune syndrome. *J Exp Med* 180: 873-883, 1994
- 3) Matsuoka T, Tabata H, Matsushita S: Monocytes are differentially activated through HLA-DR, -DQ, and -DP molecules via mitogen-activated protein kinases. *J Immunol* 166: 2202-2208, 2001
- 4) Miyamoto K, Miyake S, Yamamura T: A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature* 413: 531-534, 2001



Th2応答とアジュバント

松下 祥*

Summary

TLRがTh1アジュバントの受容体であることは最近の免疫学のトピックスであるが、ここ2~3年の間に、Th2応答に向かわせるアジュバントが存在することが知られ、注目を浴びている。寄生虫などのアレルギー誘導物質は、まず樹状細胞の性質を変化させ、それによってナイーブT細胞を刺激してTh2細胞への分化を促進させることができる。そのような物質の多くは哺乳類が持っていないユニークな構造のリン脂質や糖脂質である。

Key words : アジュバント, リン脂質, 糖脂質, アレルギー, TLR, 寄生虫, Th2応答



まつした・しょう

1981年九州大学医学部卒業、同第一内科入局、1983年より東京医科歯科大学と九州大学生体防御医学研究所にて研究、1987年医学博士、1988年米国MBI (La Jolla, CA) 免疫学部門フェロー、1990年同研究所副主任研究員、1992年熊本大学大学院医学研究科免疫識別学講座助教授、2001年埼玉医科大学免疫学講座教授、現在に至る

プロフェッショナル抗原提示細胞

ナイーブT細胞に抗原を提示して活性化できる(一次応答を誘導できる)細胞。これに対して、ノンプロフェッショナル抗原提示細胞とは、活性化されたT細胞に抗原を提示できる細胞のこと。

Toll-like receptor

*Drosophila*のTollタンパクに類似した細胞膜または核膜受容体。刺激されると細胞は炎症性サイトカインやメディエーターを産生する。

アジュバント

抗原特異性に關せず、免疫応答を増強する物質。

*埼玉医科大学免疫学講座
〒350-0495
埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38
E-mail
shomat@saitama-med.ac.jp

はじめに

アレルギーは特定の抗原に対するIgEクラスの抗体が産生されることにより引き起こされる。このような抗体が結合する抗原をアレルゲンと呼ぶ。このIgEクラスの抗体が産生されるためにはT細胞の中でもTh2細胞が分化誘導される必要がある。最近、Th2細胞の分化において、特定の性質をもった樹状細胞(DC; Dendritic cells)が重要な役割を演じていることがわかった。さらに、アレルギー誘導物質には蛋白アレルゲン以外にも重要な活性物質を含んでいることがわかってきた。その多くは低分子物質であり、アジュバント様活性を有している。そのような物質と生体のinterfaceにあって重要な監視役を担っているのがDCである。つまり、DCは環境要因と免疫応答の接点になっている重要な細胞の一つである、ということが出来る。この点において、DCはT細胞やB細胞とは大きく異なっていると言えよう。アレルギー誘導物質に含まれるアジュバント様物質は従来のアレルゲンとしてではなく、多

数のアレルゲンに対するIgE免疫応答の成立に抗原非特異的に関与する、と考えられる。この分野はアレルギー学とその応用の新たなホットスポットになろうとしている。

I. Th1アジュバント

近年、プロフェッショナル抗原提示細胞としての樹状細胞(DC)に関する研究が急速に進展してきた。その中で得られた重要な情報の中に、DCに発現するToll-like receptor (TLR)がアジュバント受容体として機能しているという知見がある¹⁾。細菌などに特徴的な構造を持つ核酸^{2, 3)}、LPS (lipopolysaccharide)⁴⁾、さらには真菌由来のユニークな糖タンパク⁵⁾などは、TLRの特定のisoformと結合することにより、DCの形質を変化させ、Th1細胞を誘導しやすくする。このようなDCをDC1細胞と呼ぶ。誘導されたTh1細胞は炎症反応を媒介する重要な細胞である。このようにDC1細胞の誘導を介してTh1細胞を誘導する物質はTh1アジュバントと呼ばれている(図1)。

II. Th2アジュバント

同様な機序でDCの形質を変化させ (DC2細胞), これを介してTh2細胞を誘導するような物質も次第に知られるようになってきた。Whelanらは2000年に発表した論文の中で, 初めてTh2アジュバントES-62を物質として記載した⁶⁾。ES-62はフィラリアのnematode由来であり, phosphorylcholine含有糖蛋白である。骨髓由来の未熟DCにGM-CSFとES-62を加えて24h培養後, DO11.10-Tgマウスのnaive CD4T cellsとOVAペプチドを加え3日間培養した。これをPMA+ionomycinで刺激し上清のサイトカインを測定する系を用いて, ES-62のTh2アジュバント活性を証明した。この活性はCD80/86の発現バランスには依存していなかった。

van der Kleijらは2002年に発表した論文の中で, 住血吸虫由来のphosphatidylserineがDCを直接刺激し, その結果T細胞応答がTh2寄りに傾くことを示した(図2)。合成されたphosphatidylserineや哺乳類由来のphosphatidylserineにはこのような活性がない。おそらく住血吸虫由来のphosphatidylserineがユニークな構造のアシル基をもっているからだと考えられる⁷⁾。すなわち, 寄生虫は抗原特異的な免疫応答を誘導する以前に抗原提示細胞の応答を抗原非特異的に動かすことによってTh2アジュバント活性を発揮できるがゆえに「アレルゲン」なのである。

住血吸虫は*de novo*の脂肪酸合成を行

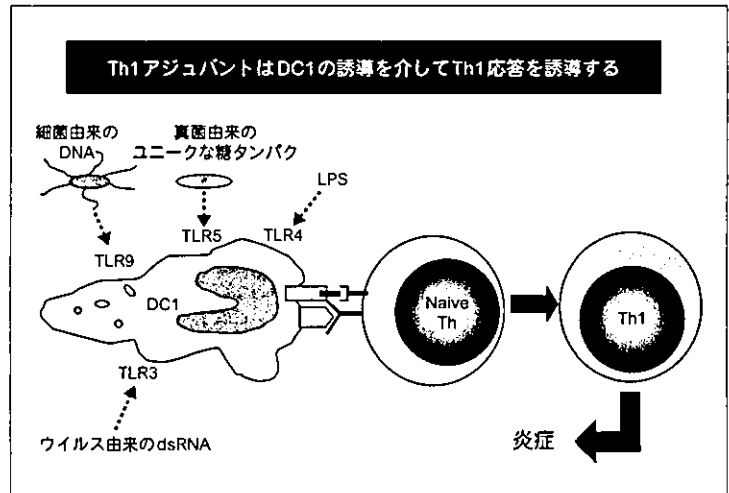


図1 Th1アジュバント
 微生物由来のユニークな分子パターンをTLRを介して認識した樹状細胞 (DC) はナイーブT細胞を活性化してTh1分化を促進するような性質に変化する。図中には示していないが, TLR3, 7, 8, 9はエンドソームに, 他のTLRアイソフォームは形質膜上に発現している。

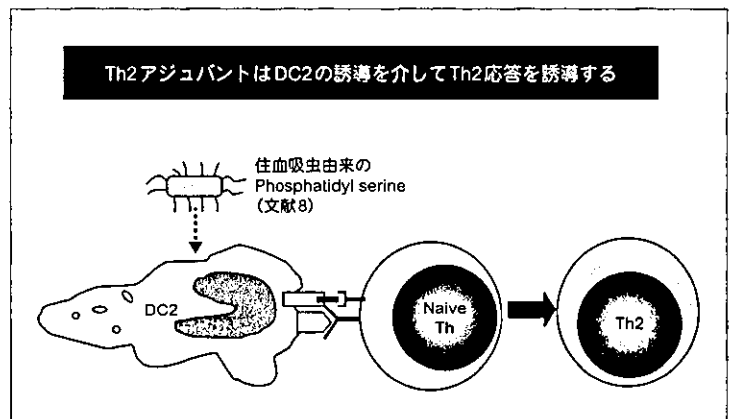


図2 Th2アジュバント
 寄生虫由来のユニークなリン脂質を認識した樹状細胞 (DC) はナイーブT細胞を活性化してTh2分化を促進するような性質に変化する。

っていない。脂肪酸の供給はホストの側から受けており, 寄生虫自らが持つ酵素によって, アシル基の伸長を行うことでユニークな構造の脂肪酸を作り出している。興味深いことに, アシル基が1本で不飽和のLysophosphatidylserine (Lyso-PS) はIL-10産生性のregulatory T細胞 (Tr) を誘導するようなDCを誘導する。この現象は抗TLR2抗体により部分的に阻止される。前述のようにアシル基が2本のphosphatidylserineはTh2を誘導するようなDCを誘導するが, これに関与するレセプターは不明である(図3)^{8,9)}。Lysophosphatidic acid (Lyso-PA) や

regulatory T細胞
 TGFβやIL-10を産生する調節性T細胞。最近ではCD4(+) CD25(+) T細胞も注目されている。

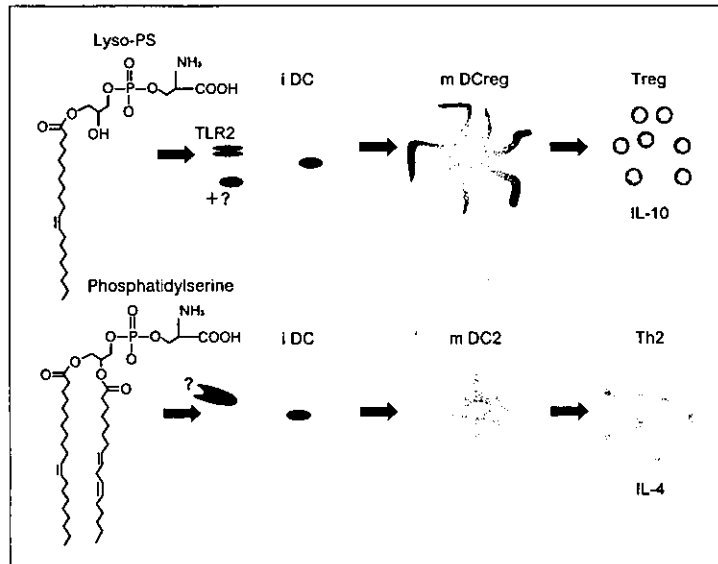


図3 Trを誘導するLyso-PSとTh2を誘導するphosphatidylserineの構造(文献8を改変)

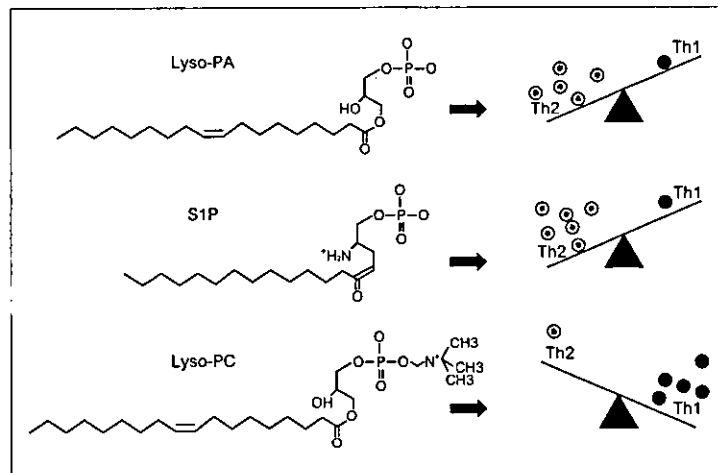


図4 Lyso-PA, S1P, Lyso-PCの構造比較(文献8を改変)

二次リンパ器官

骨髄、胸腺などの一次リンパ器官に対して、リンパ節、脾臓などは二次リンパ器官と呼ばれる。

sphingosine-1-phosphate (S1P) も同じようにTh2を誘導するが、Lysophosphatidylcholine(Lyso-PC)はTh1を誘導する。構造から考えると、head groupが重要であると推測される(図4)。

具体的に、DCが発現するどのような分子がT細胞分化を制御しているかについては不明な点が多い。monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)はCCL2とも呼ばれており、DCからも産生される。Guらによれば、CCL2^{-/-}マウスではTNP-OVAを免疫してもTh2応答が激減しIgG1応答も下がる。リーシュマニア感染に対しても抵抗性となる。

リンパ球のtraffickingには異常がないため、CCL2はT細胞分化をTh2に傾ける方向に直接影響を与えていると思われる¹⁰⁾。しかし、ヒトにおける活性は未知数である。

プロスタグランジンE2 (PGE2) やプロスタグランジンD2は昔からTh2アジュバント様の活性を有していることが知られていた。やはりDCに直接作用できるようである。Kalinskiらによると、TNF α +PGE2でiDCを刺激するとp40は産生されるがp70は産生されない。LPSやCD40L刺激ではp40もp70も産生されるが、これらの系をPGE2は抑制する。p40のmonomerやhomodimerはp70のアンタゴニストであることが知られており、これがPGE2のTh2 adjuvant活性の本態の1つである。このような機序以外にも、PGE2は、Tに直接働いてIFN- γ を抑制する、IL-12Rの発現を抑制する、monocyte分化の初期にIL-10産生を誘導する、などの作用も有している¹¹⁾。

では、Th2アジュバントは二次リンパ器官に到達する必要性があるのだろうか? Cokerらは、アレルギー性鼻炎患者の粘膜を用いてnested RT-PCRを行い、VH領域の体細胞突然変異にgenealogical treeを描くことができた。その中にはVDJがそっくりなIgEとIgAも含まれていた。傍証として、局所のactivation-induced cytidine deaminase (AID)の発現上昇もみられた。このような現象は鼻炎のないアレルギー患者にはあてはまらなかった。つまり、二次リンパ節だけではなく末梢においても、体細胞突然変異とクラススイッチは起きているとい

うことになる¹²⁾。もちろん活性化されたDCはリンパ節に移動するわけであるが、局所における相互作用でもアレルギー応答は成立するというを示している。

局所での反応に関連して、Soumelisらは興味深い知見を得ている¹³⁾。Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) はIL-7様サイトカインである。マウスTSLPはT/Bの初期分化に重要であるがDCには影響を及ぼさない。しかしヒトではCD11cDCを活性化するにもかかわらず、T/B分化には影響を与えない。TSLPはIL-7 α + TSLPRのヘテロダイマーに受容されるが、ヒトではこれがT/BではなくDCに発現しているからである。TSLP, LPS, CD40Lなどで24h刺激したDCをヒトprimary T cell response (アロ認識反応)に加え、その6日後に洗浄後、CD3とCD28を介した刺激を入れた後に産生されるサイトカインを測定するという系を用いて実験した結果、TSLPで刺激されたDCはTARCやMDCを産生し、ヒトT細胞分化をTh2寄り(但しTNF α は作りIL-10は作らない)に片寄らせることが判明した。TSLPは骨髄系ではほぼ肥満細胞のみに発現している点も興味深い。その他、lung fibroblasts, bronchial smooth muscle cells, skin keratinocytes, などへの発現が重要である。実際、皮膚、特にアトピー性皮膚炎患者の皮膚では、DC-LAMP陽性DC(活性化DC)とTSLP陽性keratinocytesが共存している。おそらく、抗原が侵入した皮膚細胞においてTSLPが産生されてDCを活性化し、このDCがTh2-attracting

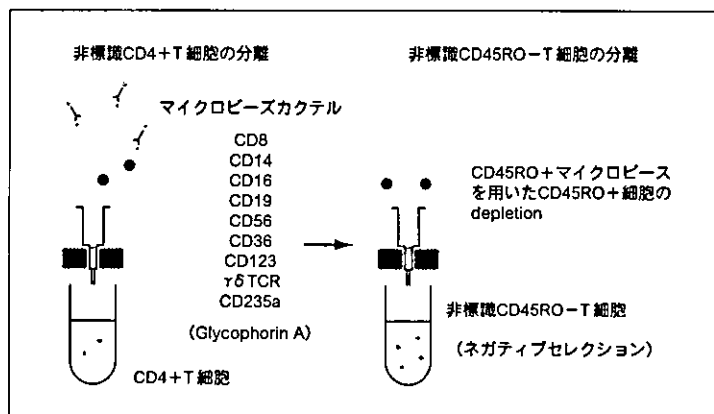


図5 ナイーブCD4T細胞の磁気細胞分離

chemokinesを産生し、所属リンパ節に移動したDCはアレルギー特異的T細胞の分化をTh2に向かわせ、このTh2はTARC/MDCのグラジエントに従って局所にもどってアレルギー炎症を起こしているのでは、と考えることができる。このように環境要因とDCとの間にkeratinocytesが介入しているわけであり、このような中間的存在は肥満細胞、NKT細胞などを用いた系でも検討されるべきであろう。

III. Th2アジュバントの アッセイ法

著者らは、他のアレルギー誘導物質の中にも同様のTh2アジュバント活性を有するものがある、という作業仮説のもと、食品、環境ホルモン、ダニ抽出物、スギ花粉抽出物を用いて研究を進めてきた。その結果、複数の物質にDC2誘導活性があることが明らかとなった。具体的には、PBMCsより、抗ヒトCD14マイクロビーズを用いてCD14陽性細胞を分離し、IL-4, GM-CSFで6日間培養したものをモノサイト由来樹状細胞(Mo-DC)として用いた。この細胞を回収し、DCを成熟させる刺激としてTNF α , ならびに試験したいアジュバントを加えた。2日後に培養上清を回収した後、Mo-DCを洗浄した。この培養上清については、

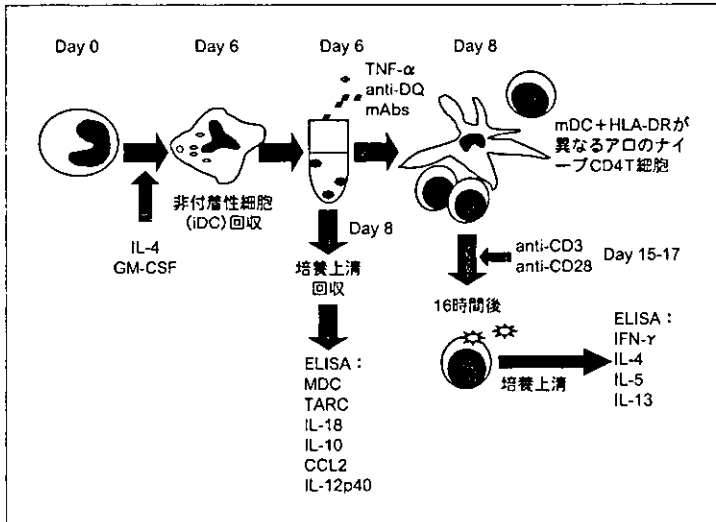


図6 アジュバント活性アッセイの流れ

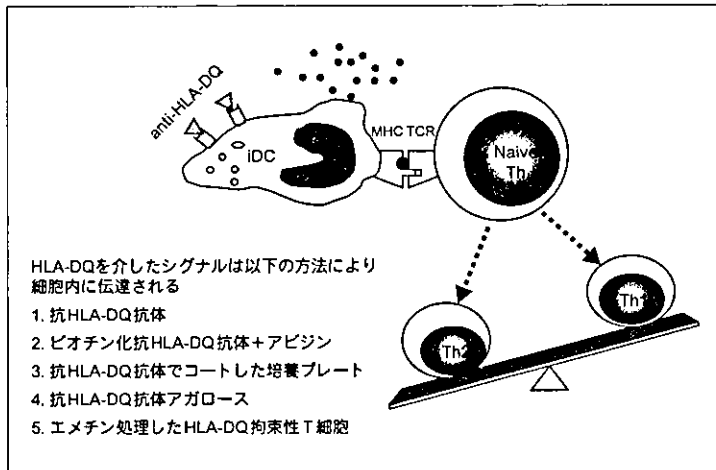


図7 HLA-DQを介した刺激はDC2を誘導する

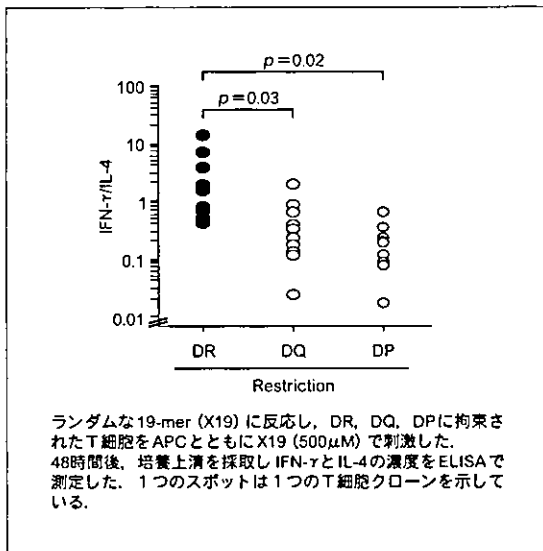


図8 T細胞の拘束分子とTh1/Th2分化

IL-12p40, MDC, TARC, CCL2, IL-10などを定量した。一方、HLA-DRタイピング済みのアロPBMCsから、negative selection法により naive CD4T細胞を調整した(図5)。これを洗浄済みのMo-DCと共培養し、MLRを誘導した。これにより、naive CD4T細胞にはTh1またはTh2への分化圧が加わることになる。7~9日後、分化したT細胞にanti-CD3とanti-CD28で再刺激を加え、その16時間後に培養上清を回収した。培養上清中のIL4, 5, 13, IFN- γ を測定し、Th1またはTh2への分化を判定した。方法の全体の流れ図を図6に示した。

IV. 抗原提示分子とアジュバント活性

著者らは以前の研究から、通常の蛋白抗原を認識するT細胞クローンにおいてもその拘束分子(抗原提示分子)によって性質が異なっており、これは、MHC-peptide-TCR複合体が形成された際にMHCを介して抗原提示細胞内に伝えられるシグナルの差に由来することを示していた¹⁴⁾。そこで、抗HLA-DQ抗体を用いて抗原提示細胞に刺激を入れ、そのT細胞分化誘導能を観察した。予想された通り、HLA-DQ分子を介した刺激はDC2を誘導することが明らかとなった¹⁵⁾(図7)。

そこで、実際にPBMCから得られたshort-term T cell lineの拘束分子によってTh1/Th2シフトがみられるかを観察した。図8に示すようにHLA-DR拘束性クローンに比べると、HLA-DQおよび

HLA-DP拘束性のT細胞クローンは明らかにTh2にシフトしたパターンを示すことが明らかとなった。この一連の知見は申請者らが17年前に発表した免疫抑制遺伝子を細胞レベルで説明するものである¹⁶⁾。

おわりに

著者が20年前に取り組んだ博士号のテーマは「スギ花粉症の免疫遺伝学的解析」であった。当時も今も同じであるが、花粉抗原の抽出の第一ステップはエーテルによる脂質の除去である。そうしなければ可溶性のアレルゲンタンパクを得ることができないし、そもそも当時、水に溶けない物質を*in vitro*の系に持ち込むことは至難の技であった。当時の私は、エーテルに溶け出した黄色の脂質溶液を「これ、本当に捨てていいのだろうか？」と思いつつ、自分で採集した大量の花粉と格闘していたが、20年経ったいま、当時の「ゴミ」で研究を展開することになってしまった。

また、アレルギー誘導物質の研究の流れを振り返ると、糖脂質に対するグループ1 CD1分子拘束性のヒトT細胞応答が完全に見落とされている可能性もある。応用面では、免疫治療学、環境医学、予防医学など、幅広い可能性を有しており、今後の展開が楽しみな分野である。

参 考 文 献

- 1) Takeda K, Akira S. Toll receptors and pathogen resistance. *Cell Microbiol* 2003; 5: 143.
- 2) Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 709.
- 3) Matsumoto M, Kikkawa S, Kohase M, Miyake K, Seya T. Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem. Biophys. Research Communications* 2002; 293:1364-9.
- 4) Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, Brint E, Dunne A, Gray P, Harte MT, McMurray D, Smith DE, Sims JE, Bird TA, O'Neill LA. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 2001; 413: 78-83.
- 5) Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13766-71.
- 6) Whelan M, Harnett MM, Houston KM, Patel V, Harnett W, Ringley KP. A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells. *J Immunol* 2000; 164: 6453-60.
- 7) van der Kleij D, Latz E, Brouwers JFHM, Kruize YCM, Schmitz M, Kurt-Jones EA, Espevik T, deJong EC, Kapsenberg ML, Golenbock DT, Tielens AGM, Yazdanbakhsh M. A novel host-parasite lipid cross-talk. *J Biol Chem* 2002; 277: 48122-9.
- 8) van der Kleij D, Yazdanbakhsh M. Control of inflammatory diseases by pathogens: lipids and the immune system. *Eur J Immunol* 2003; 33: 2953-63.
- 9) Redecke V, Haecker H, Datta SK, Fermin A, Pitha PM, Broide DH, Raz E. Activation of

MLR

Mixed lymphocyte reaction (混合リンパ球培養反応)。T細胞にとってはMHCが自己由来でペプチド抗原が非自己由来のときに反応するというパターンが生理的であるが、ある種のクローンは交差反応によってアロのMHC(ヒトではHLA-DR) + ペプチド抗原を認識する。このような反応はnaive CD4T細胞によって担われている。

HLA-DQ

クラスII HLA分子のアイソフォームの1つ。抗原提示細胞上の発現量はHLA-DRよりも少ない。構造上はマウスのI-A分子に近い。

免疫抑制遺伝子

抗原特異的にT細胞が応答する個体差を優性遺伝形質として支配しているのが免疫応答遺伝子であるが、免疫抑制遺伝子は抗原特異的にT細胞が応答しないという個体差を優性遺伝形質として支配している。

- Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J Immunol* 2004; 172: 2739-43.
- 10) Gu L, Tseng S, Horner RM, Tam C, Loda M, Rollins BJ. Control of Th2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature* 2000; 404: 407-11.
- 11) Kalinski P, Vieira PL, Schuitemaker JHN, de Jong EC, Kapsenberg ML. Prostaglandin E2 is a selective inducer of interleukin-12 p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer. *Blood* 2001; 97: 3466-9.
- 12) Coker HA, Durham SR, Gould HJ. Local somatic hypermutation and class switch recombination in the nasal mucosa of allergic rhinitis patients. *J Immunol* 2003; 171: 5602-10.
- 13) Vassili Soumelis, Pedro A, Reche, Holger Kanzler, Wei Yuan, Gina Edward, Bernhart Homey, Michel Gilliet, Steve Ho, Svetlana Antonenko, Annti Lauerma, Kathleen Smith, Daniel Gorman, Sandra Zurawski, Jon Abrams, Satish Menon, Terri McClanahan, Rene de Waal-Malefyt, Fernando Bazan, Robert A, Kastelein, and Yong-Jun Liu. Human epithelial cells trigger dendritic cell-mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nature Immunol* 2002; 3: 673-80.
- 14) Matsuoka T, Tabata H, Matsushita S. Monocytes are differentially activated through HLA-DR, -DQ and -DP molecules via MAP kinases. *J Immunol* 2001; 166: 2202-8.
- 15) Matsushita S, Liu T-Y, Ohyama H, Uemura Y. Signal transduction through HLA-DQ molecules alter dendritic cell function to enhance Th2 differentiation. In EAACI 2004, Amsterdam (abstract).
- 16) Hirayama K, Matsushita S, Kikuchi I, Iuchi M, Ohta N, Sasazuki T. HLA-DQ is epistatic to HLA-DR in controlling the immune response to schistosomal antigen in humans. *Nature* 1987; 327: 426-30.



総説

MHC class II 分子を介した シグナル伝達機構*

松下 祥**

Key Words : class II MHC, antigen presentation, MAP kinase, dendritic cells, HLA-DQ

はじめに

主要組織適合抗原複合体(major histocompatibility complex; MHC) + ペプチドがTCR(T cell receptor; T細胞抗原受容体)と相互作用を起こすと, T細胞側にシグナルが入りT細胞が活性化される。一方, T細胞-抗原提示細胞相互作用により誘導される抗原提示細胞側へのシグナリングに関してはCD40などがよく知られているが, MHCそのものも重要な役割を担っているという報告は多く¹⁾, 1990年前後に, 主にB細胞を用いてPKC, Ca²⁺, cAMPなどの動きに焦点をあてた解析が行われた。われわれはHLA-ペプチド相互作用に関する長年の研究から, このシグナリングが免疫応答の制御に重要な役割を担っているという結論に到達し²⁾, さらに, class II MHCからのシグナルがB細胞, マクロファージ³⁾, 樹状細胞, 活性化T細胞, 繊維芽細胞などの機能に重要な影響を与えていることを明らかにしたのでご紹介したい。

B細胞における MHC class II シグナルの効果

B細胞におけるclass II HLAシグナルの効果に関して, まず生理的なHLAのリガンドであるTCRを用いて検討した。T細胞上のTCRがB細胞上のHLA/ペプチド複合体を認識した際に, T細胞が活性化されて新しい膜蛋白の発現やサイトカインなどの可溶性因子の合成が起こり, B細胞

の応答に影響を与える。この可能性を除外するために, *de novo*蛋白合成阻害剤であるエメチンで前処理したT細胞を使用して, すでに発現しているTCRや他の膜蛋白のみでB細胞への刺激を試みた(図1)。そのほかにも固相化抗HLA抗体やビオチン化抗HLA抗体+アビジンを用いた⁴⁾。その結果, HLA-DRを介した刺激により, 増殖反応を伴わずにIgMの産生がアイソタイプ特異的に著明に増強した。固相化抗DR抗体を用いた刺激では増殖やアポトーシスは誘導されなかった。また, IgM産生増強にCD40-CD154分子の関与は否定的であった。この現象には膜型ならびに分泌型μ鎖のmRNA発現増強を伴っており, 各種シグナル伝達抑制剤のなかでも, PTK抑制剤, ならびにSyk抑制剤のpiceatannolがIgM産生を効率よく抑制した。実際, DR分子の架橋により, Sykのリン酸化ならびにSyk活性の増強が誘導された。これらの結果は, B細胞上のHLA-DR分子がペプチドをT細胞に提示するだけでなく, それ自身がB細胞内部にシグナルを伝達する分子として機能しており, Sykの活性化を介してIg産生パターンの変化を誘導できることを示している。とくに, 膜型IgMの発現増強は, T-B相互作用のごく初期におけるBCR発現レベルの維持に貢献しているのかもしれない。

マクロファージにおける MHC class II シグナルの効果

以前から, DR vs DQ⁴⁾, I-A vs I-E⁵⁾が異なる種

* Signal transduction via class II MHC molecules.

** Sho MATSUSHITA, M.D., Ph.D.: 埼玉医科大学免疫学(〒350-0495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38); Department of Allergy and Immunology, Saitama Medical School, Saitama 350-0495, JAPAN

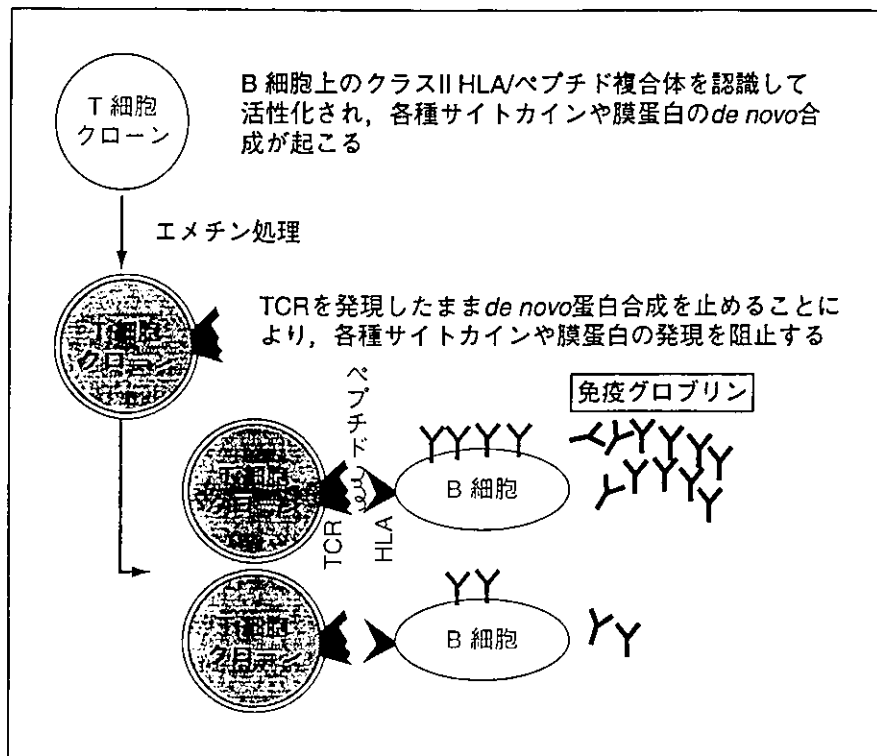


図1 エメチン処理した T 細胞による B 細胞の刺激

CD4⁺T細胞上のTCRがB細胞上のclass II HLA/ペプチド複合体を認識した際に、class II HLAからシグナルが入ると同時にTCRからもシグナルが入りT細胞も活性化され新しい膜蛋白の発現やサイトカインなどの可溶性因子の産生が起こり、これがB細胞からのIgM産生に影響を及ぼす可能性がある。この可能性を除外するために、*de novo*蛋白合成阻害剤であるエメチンで処理したT細胞を使用して、すでに発現しているTCRやほかの膜蛋白のみでB細胞上のclass II HLAからシグナルを入れることによりIgM産生増強が観察されるか否かを検討した。

類のT細胞を活性化するという報告はあったが、ペプチドとの結合性や発現レベルを超えてなんらかの異なる機構を有しているか否かは明らかになっていなかった。そこで、拘束分子の異なる3つのヒトTh0クローン(BC20.7; DR14拘束性, DT13.2; DQ6拘束性, OT1.1; DP5拘束性)をモデルとして選び、これらのT細胞クローンをエメチン処理して*de novo*蛋白合成系を停止させておき、ペプチドをパルスした末梢血単球(マクロファージ)とを共培養することで産生されるモノカインを比較した。DR拘束性クローンは炎症性モノカインであるIL-1 β やTNF α の産生をより強く誘導する傾向があった。一方、DQ拘束性クローンとDP拘束性クローンは、抗炎症性モノカインであるIL-10の産生をより強く誘導する傾向があった(表1)。このような傾向は固相化抗体を用いた刺激でも認められたので、これらのモノカイン産生の不均衡が、拘束分子でなくCDw150

(SLAM)などの他の分子を介した現象である可能性は低いと考えられる。

次に固相化抗HLA抗体による架橋で誘導されるIL-1 β の産生系に対する各種シグナル伝達抑制剤の効果を検討したところ、p38阻害剤(SB203580)とMEK-1阻害剤(PD98059)がこれを部分的に抑制した。また、PTK阻害剤であるgenisteinは二相性の効果を示し、低濃度では増強的、高濃度では抑制的であった。実際、MAPK/Erkの活性化はDRを介した刺激でのみ観察されたが、MAPK/p38の活性化はDR, DQ, DPすべてを介した刺激により観察された。抗DR抗体で誘導されるこのような現象はF(ab')₂でも観察される。また、TNF α で誘導されるIL-1 β 産生に対して中和活性を有する抗TNF α 抗体は、抗DR抗体で誘導されるErkの活性化を阻止することができなかった。すなわちFc部分やTNF α はHLA-DRの架橋によって誘導されるErkの活性化とIL-1 β の産生に関

表1 ペプチドパルスした末梢血単球(monocytes)をエメチン処理したT細胞クローンで刺激した場合のモノカイン産生

モノカイン	T細胞クローン		
	BC20.7 DR拘束性	DT13.2 DQ拘束性	OT1.1 DP拘束性
IL-1β	10.5pg/ml	2.4	2.1
IL-6	87.5	62.5	140.0
IL-10	172.5	787.5	725.0
IL-18	<15.0	<15.0	<15.0
IL-12(p70)	177.5	115.0	55.0
IL-12(p40+p70)	145.0	75.0	20.5
GM-CSF	475.0	150.0	887.5
TNFα	887.5	642.5	230.0
IL-10:IL-12(p70)比	1.0	6.8	13.2
IL-10:IL-1β比	16.4	328.1	345.2

拘束分子の異なる3つのT細胞クローン(BC20.7; DR14拘束性, DT13.2; DQ6拘束性, OT1.1; DP5拘束性)をエメチン処理し, ペプチドをパルスした末梢血単球(monocytes)と共培養した。パルスしたペプチドの濃度はそれぞれのED₅₀の625倍とした(プラトー応答の領域)。培養上清を16, 24, 48時間後に採取し, それぞれのモノカイン濃度をELISAにて定量した。

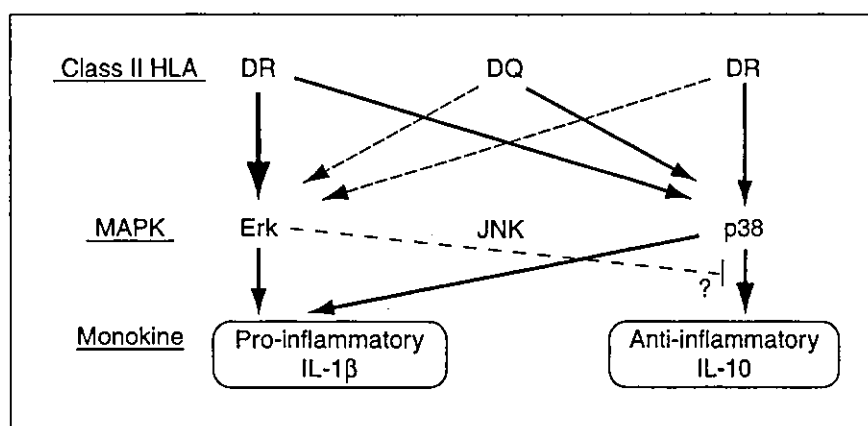


図2 Class II HLA分子を介したMAPKの活性化

DRからの刺激はErkを活性化し, その結果炎症性モノカインが産生される。p38の活性化はDR/DQ/DPいずれからの刺激でも起こり, 抑制剤の結果から炎症性モノカイン, 抗炎症性モノカインいずれの産生にも関与している。ただし, MAPKカスケードを修飾しうるほかの要素は図示していない。

与していないと考えられた。T-マクロファージ相互作用の系に対する抑制剤の効果も同様な結果を示した。このような結果から, 図2に示したように, DRはp38とErkの活性化を介してIL-1β産生を強く誘導しているのに対して, DQ/DPはp38の活性化を介してIL-1β産生とIL-10産生の両方を誘導していると考えられた。

そこでさらに, PBMCレベルでの検討を行った。そのためにまず, ダニ粗抗原特異的なヒトT細胞株を樹立した。樹立したDR拘束性, DP拘束性

のT細胞株のリンホカイン産生パターンを調べたところ, 完全に区別することはできないが, 前者はTh1, 後者はTh2の傾向があった(図3A)。この傾向はPPD特異的なDR拘束性, DQ拘束性のT細胞株のリンホカイン産生パターンにおいても同様であった(図3B)。さらに, random 19-mer peptide反応性DR拘束性T細胞もDQ/DP拘束性T細胞に比べて, よりTh1寄りのサイトカイン産生パターンを示した(図3C)⁶⁾。すなわち, PBMCレベルでpolyclonalな反応にも同様な傾向があることが確

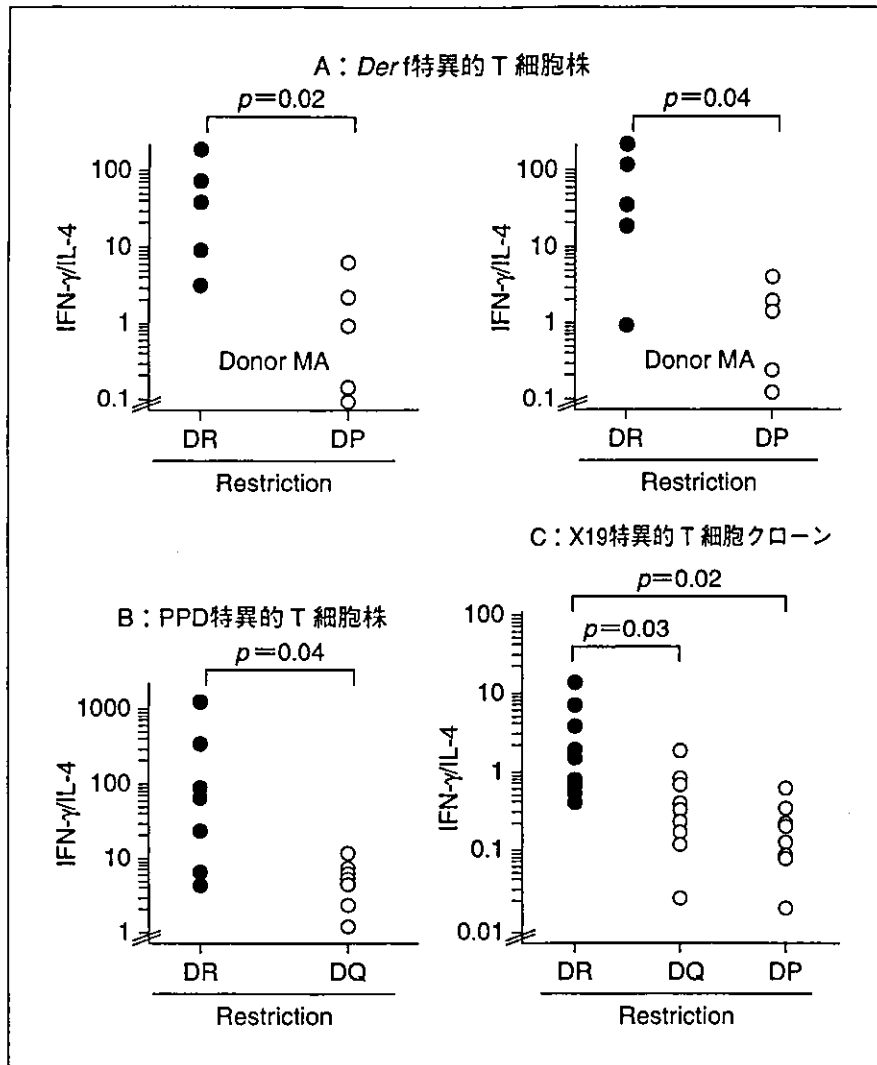


図3 末梢血 T 細胞の拘束分子とサイトカイン産生パターン
 Der-f, PPDに特異的なShort-term T細胞株とX19ペプチドに特異的な T細胞クローンを複数樹立し, それらの拘束分子と産生されるIFN- γ , IL-4比を検討した. DR拘束性では炎症性サイトカインであるIFN- γ がより多く産生され, DQ, DP拘束性では抗炎症性サイトカインであるIL-4がより多く産生されていた. これらより, すでに活性化されている末梢CD4 T細胞のうちDR拘束性のTは, DQ/DP拘束性のTと比べて, よりTh1的傾向を示していると推測される.

認められた. 以上より, DR, DQ, DP分子はMAPK familyを介して異なるシグナルをマクロファージへ伝達し, *in vivo*においてT細胞応答に影響を与えていると結論した. 多重遺伝子族として進化したclass II遺伝子はシグナル伝達機構においても多様性を獲得し, 異なる機能を担っていると考えられる.

APC上の発現レベルは, DR>DQ>DPであり, 仮にペプチドがそれぞれ同程度の親和性をもつとすると, APC表面でのTCRリガンド密度はDR-ペプチド>DQ-ペプチド>DP-ペプチドである.

したがってわれわれが観察した現象は高密度リガンドはTh1を, 低密度リガンドはTh2を誘導するという現象⁷⁾と本質的には変わらない現象であるとも考えられる. しかし, DR拘束性クローンで刺激する際のペプチドの濃度をいくら低くしてもIL-10/IL-1 β の比はDQ拘束性やDP拘束性のパターンにはならなかった. つまり, 質的に異なるAPC応答であるということが出来る. すなわち, これらの現象はリガンド密度だけでは説明ができない.

HLA-DR β 鎖はPKCの活性化や核内への移行に

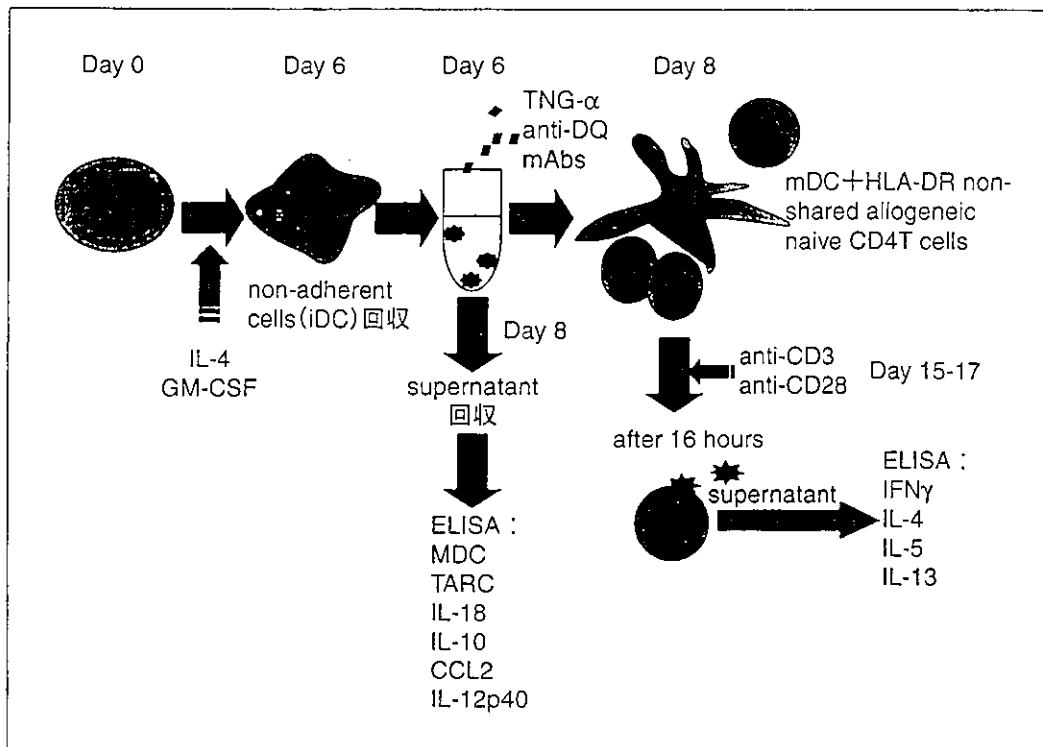


図4 アジュバント活性アッセイの流れ

関与しているという報告がある⁹⁾が、今回の研究ではPKC阻害剤はIgMやモノカイン産生に大きな影響を及ぼさなかった。IL-4レセプター⁹⁾や血小板由来成長因子レセプター (platelet-derived growth factor receptor)¹⁰⁾で観察された現象と同じように、DR分子からのシグナルは複数のシグナル伝達分子を活性化し²⁾、それぞれが異なる生理活性を担っていると考えられる。また、DR分子を介したシグナルがErkやSykを活性化したわけであるが、DRのα鎖もβ鎖もITAMモチーフをもっていない。IL-2レセプター¹¹⁾、CD29¹²⁾や血小板インテグリンαIIbβ3¹³⁾はITAMモチーフをもっていないが、Sykを活性化することができる。DR分子がSykを直接活性化した可能性は残っているが、DR分子に会合していて、Sykの活性化に関与している蛋白が存在するのかもしれない。他の報告にもあるように、DR分子からのシグナルが膜マイクロドメインの構築を変化させ¹⁴⁾、これによってSykの活性化が起こった可能性や、Igα/βの会合がシグナルを制御している可能性もあり¹⁵⁾、今後の検討課題である。

樹状細胞上のHLA-DQからのシグナルとアジュバント活性

そこで、抗HLA-DQ抗体を用いて樹状細胞に刺激を入れ、そのT細胞分化誘導能を観察した。具体的には、PBMCsより、抗ヒトCD14マイクロビーズを用いてCD14陽性細胞を分離し、IL-4、GM-CSFで6日間培養したものをモノサイト由来樹状細胞(Mo-DC)として用いた。この細胞を回収し、DCを成熟させる刺激としてTNFα、抗HLA-DQ抗体による刺激を入れた。2日後に培養上清を回収した後Mo-DCを洗浄した。この培養上清については、IL-12p40、MDC、TARC、CCL-2、IL-10などを定量した。一方、HLA-DRタイピング済みのアロPBMCsから、negative selection法によりnaive CD4 T細胞を調整した。これを洗浄済みのMo-DCと共培養し、MLRを誘導した。これにより、naive CD4 T細胞にはTh1またはTh2への分化圧が加わることになる。7~9日後、分化したT細胞にanti-CD3とanti-CD28で再刺激を加え、その16時間後に培養上清を回収した。培養上清中のIL-4、5、13、IFNγを測定し、Th1またはTh2への分化を判定した。方法の全体の流れ図