

- JL. Biotransformation of halothane, enflurane, isoflurane, and desflurane to trifluoroacetylated liver proteins: association between protein acylation and hepatic injury. *Anesth Analg* 1997;84:173-8.
65. Sinha A, Clatch RJ, Stuck G, Blumenthal SA, Patel SA. Isoflurane hepatotoxicity: a case report and review of the literature. *Am J Gastroenterol* 1996;91:2406-9.
66. Kenna JG. Immunoallergic drug-induced hepatitis: lessons from halothane. *J Hepatol* 1997;26 Suppl 1:5-12.
67. Eliasson E, Gardner I, Hume-Smith H, de Waziers I, Beaune P, Kenna JG. Interindividual variability in P450-dependent generation of neoantigens in halothane hepatitis. *Chem Biol Interact* 1998;116:123-41.
68. Bourdi M, Chen W, Peter RM, Martin JL, Buters JT, Nelson SD, et al. Human cytochrome P450 2E1 is a major autoantigen associated with halothane hepatitis. *Chem Res Toxicol* 1996; 9:1159-66.
69. Gut J, Christen U, Frey N, Koch V, Stoffler D. Molecular mimicry in halothane hepatitis: biochemical and structural characterization of lipoylated autoantigens. *Toxicology* 1995; 97:199-224.
70. Sasaki M, Ansari A, Pumford N, van de Water J, Leung PS, Humphries KM, et al. Comparative immunoreactivity of anti-trifluoroacetyl (TFA) antibody and anti-lipoic acid antibody in primary biliary cirrhosis: searching for a mimic. *J Autoimmun* 2000;15:51-60.
71. Leung PS, Coppel RL, Ansari A, Munoz S, Gershwin ME. Antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1997;17:61-9.
72. Koike K, Ishibashi H, Koike M. Immunoreactivity of porcine heart dihydrolipoamide acetyl- and succinyl-transferases (PDC-E2, OGDC-E2) with primary biliary cirrhosis sera: characterization of the autoantigenic region and effects of enzymatic delipoylation and relipoylation. *Hepatology* 1998; 27:1467-74.
73. Steinman L. Absence of 'original antigenic sin' in autoimmunity provides an unforeseen platform for immune therapy. *J Exp Med* 1999;189:1021-4.
74. Lam KS. Determination of peptide substrate motifs for protein kinases using a 'one-bead one-compound' combinatorial library approach. *Methods Mol Biol* 1998;87:83-6.
75. Long SA, Quan C, Van de Water J, Nantz MH, Kurth MJ, Barsky D, et al. Immunoreactivity of organic mimetopes of the E2 component of pyruvate dehydrogenase: connecting xenobiotics with primary biliary cirrhosis. *J Immunol* 2001; 167:2956-63.
76. Leung PS, Quan C, Park O, Van de Water J, Kurth MJ, Nantz MH, et al. Immunization with a xenobiotic 6-bromohexanoate bovine serum albumin conjugate induces antimitochondrial antibodies. *J Immunol* 2003;170:5326-32.

Editorial

Are antibodies to carbonic anhydrase disease specific marker?

Although autoantibodies are characteristic of many autoimmune diseases, their involvement in the pathogenesis has long been debated. One of the most interesting features of the autoantibody responses in autoimmune liver diseases, including autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis (PBC), is the ubiquitous expression of most autoantigens. Indeed, the major autoantigens in PBC recognized by anti-mitochondrial antigens (AMAs) has been defined as the E2 components of pyruvate dehydrogenase complexes (PDC-E2), and the reason for the specificity of damage to the intrahepatic biliary epithelial cells despite the presence of autoantibody response to the ubiquitous antigens is an important enigma [1,2].

Carbonic anhydrases (CA) is a family of zinc metal enzymes and catalyze the reversible hydration of carbon dioxide to bicarbonate and hydrogen ions. Anti-CA antibody responses have been observed in a variety of autoimmune diseases. Carbonic anhydrase II (CA-II) is one of its subtype and expressed in a variety of glandular tissues including salivary gland and pancreatic epithelia. Specifically, anti-CA II antibody responses have provoked considerable interest because of its selective expression in cholangiocytes in the liver.

Gordon et al. reported that serum antibody response to CA II was a new marker for anti-mitochondrial antibody (AMA) negative primary biliary cirrhosis [3]. They also suggested that autoimmune cholangitis (AIC) and PBC are distinct entities with unique autoantibody responses. Ueno et al. reported that PBC patients with anti-CA II antibodies have distinct immunological backgrounds, including higher anti-nuclear antibody response, complication of Sjogren's syndrome, and distinct HLA allotype [4]. On the contrary, Comay et al. suggested that anti-CA II antibodies are commonly detected in patients with autoimmune liver disease and are likely a non-specific marker of autoimmunity [5]. It is still controversial whether PBC with anti-CA II antibodies represents a distinct disease entity. Furthermore, Hosoda et al. have reported that anti-CA II antibodies were also detected in patients with chronic viral hepatitis, too [6].

Nishimori et al., in this issue of the journal, examined that serum antibodies to carbonic anhydrase II as well as carbonic anhydrase I (CA I) in patients with chronic viral hepatitis and

reported that the frequency of anti-CA II antibody was significantly higher than control in patients with chronic hepatitis type C. They also suggested that cross-reactivity may occur between anti-CA II antibody and anti-CA I antibody based on the observation of anti-CA I antibody response in patients with chronic hepatitis type C, too [7].

Infection is one of the most important environmental factors associated with autoimmunity [8]. The production of autoantibodies in patients with chronic viral hepatitis provokes considerable interests regarding the role of infection as a trigger of autoimmunity. In addition, hepatobiliary system has unique immunological circumstances in which liver and biliary system may be interrelated. Autoimmune pancreatitis (AIP) is a novel clinical entity with unknown etiology. Anti-CA II antibody are also detected in patients with AIP [9]. Further investigations on the anti-CA II antibody and hepatic involvement in AIP are still open to discussion.

References

- [1] Gershwin ME, Ansari AA, Mackay IR, Nakanuma Y, Nishio A, Rowley MJ, et al. Primary biliary cirrhosis: an orchestrated immune response against epithelial cells. *Immunol Rev* 2000;174:210–25.
- [2] Miyakawa H, Kawaguchi N, Kikuchi K, Fujikawa H, Kitazawa E, Matsushita M. Definition of antigen specificity for antimitochondrial proteins detected by Western blotting using native mitochondrial proteins in primary biliary cirrhosis. *Hepato Res* 2001;21:101–7.
- [3] Gordon SC, Quattrocchi-Longe TM, Khan BA, Kodali VP, Chen J, Silverman AL, et al. Antibodies to carbonic anhydrase in patients with immune cholangiopathies. *Gastroenterology* 1995;108:1802–9.
- [4] Ueno Y, Ishii M, Igarashi T, Mano Y, Yahagi K, Kisara N, et al. Primary biliary cirrhosis with antibody against carbonic anhydrase II associates with distinct immunological backgrounds. *Hepato Res* 2001;20:18–27.
- [5] Comay D, Cauch-Dudek K, Hemphill D, Diamandis E, Wanless I, Heathcote EJ. Are antibodies to carbonic anhydrase II specific for anti-mitochondrial antibody-negative primary biliary cirrhosis? *Dig Dis Sci* 2000;45:2018–21.
- [6] Hosoda H, Okawa-Takatsuji M, Tanaka A, Uwatoko S, Aotsuka S, Hasimoto N, et al. Detection of autoantibody against carbonic anhydrase II in various liver diseases by enzyme-linked immunosorbent assay using appropriate conditions. *Clin Chim Acta* 2004;342:71–81.

- [7] Nishimori I, Akisawa N, Miyaji E, Kohsaki T, Iwasaki S, Onishi S. Serum antibody to carbonic anhydrase II in patients with chronic viral hepatitis: a review of its prevalence in liver diseases. *Hepatology Res* 2004;30:210–3.
- [8] Waldner H, Collins M, Kuchroo VK. Activation of antigen-presenting cells by microbial products breaks self tolerance and induces autoimmune disease. *J Clin Invest* 2004;113:990–7.
- [9] Hirano K, Shiratori Y, Komatsu Y, Yamamoto N, Sasahira N, Toda N, et al. Involvement of the biliary system in autoimmune pancreatitis: a follow-up study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2003;1:453–64.

Hiroto Kita
*Division of Gastroenterology, Department of Internal
Medicine, Jichi Medical School, Yakushiji
Kawachi, Tochigi 329-0438
Japan*

■ 細胞生物学講座 ■

PBCの発症機序

*喜多 宏人

はじめに

原発性胆汁性肝硬変 (PBC) は中年女性に好発する慢性進行性の胆汁うっ滞症であり、病理学的に慢性非化膿性破壊性胆管炎を特徴とする。抗ミトコンドリア抗体をはじめとする自己抗体や、他の自己免疫性疾患を合併することより自己免疫機序が重要と考えられているが、真の病因はあきらかでない¹⁾。本稿では、PBCの発症機序に関するこれまでの知見を紹介したい。

1. PBCの発症における遺伝因子と環境因子

PBCの発症には遺伝性因子と環境因子の相互の関連が重要な役割を果たしているものと考えられている²⁾。PBCの発症を遺伝的な観点からみると、PBC患者の1親等の血縁者がPBCを発症する割合は一般人の100倍以上と報告されている。また、PBC患者の兄弟がPBCを発症する割合は一般人の10倍程度であり、他の自己免疫疾患と同様であるとの報告もある。PBCの免疫遺伝学的素因に関しては、HLA分子や、サイトカイン遺伝子等で検討されているが、PBCの疾患感受性やPBCの疾患感受性や重症度を説明するのに十分な単一遺伝子は存在せず、PBCは多数の遺伝子多型によるpolygenetic diseaseであると考えられている。

一方、移民における発症率や疫学調査などから環境因子がPBCの発症に重要であるとの報告もみられる。又、感染症とPBCとの関連を示唆する報告もみ

られる。肉芽腫は細菌感染に伴う変化であるが、肉芽腫性変化はPBCの病理学的な特徴のひとつでもあり興味深い。感染症とPBCとの関連を直接証明した報告はないが、感染症が自己免疫疾患の引き金になるという仮説は、自己免疫性疾患発症における分子相同性をうまく説明できる点で魅力的である³⁾。

2. PBCにおける免疫異常

PBCの成因に免疫現象が関連していることはほぼ確実であるが、その機序に関しては不明な点も多い。肝臓は独自の免疫環境を構築していると考えられており⁴⁾、肝臓を病変の主座とするPBCは病因論的にも興味深い。一般に、自己抗原に対する免疫寛容の破綻が自己免疫疾患の引き金になると考えられており、PBCに関しても自己抗原に対する特異的免疫応答が解析されている。免疫系は、免疫記憶なしに反応する自然免疫とT細胞やB細胞等免疫記憶を特徴とする獲得免疫に大別可能である。PBC患者には自己抗体や自己反応性T細胞等、自己抗原を認識する獲得免疫の異常が見られるという報告が多い。一方、近年のいわゆる自然免疫系に関する新たな知見により、PBCの病態における自然免疫の関与を示唆する研究結果も散見される。抗ミトコンドリア抗体 (AMA) はPBCに特異性の高い自己抗体であり、その対応抗原はピルビン酸脱水素酵素のE2コンポーネント (PDC-E2) を含む2-オキソ酸脱水素酵素複合体上に存在することが明らかにされている⁵⁾。AMAはPBC患者の血清中だけでなく、尿中や胆汁

"Pathogenesis of PBC"

Hiroto Kita

Key words : PBC, AMA, autoimmune,

*自治医科大学消化器内科 : Department of Gastroenterology, Jichi Medical School

〒329-0434 栃木県河内郡南河内町薬師寺3311-1 Fax: 0285-44-8297 e-mail: hkita@jichi.ac.jp

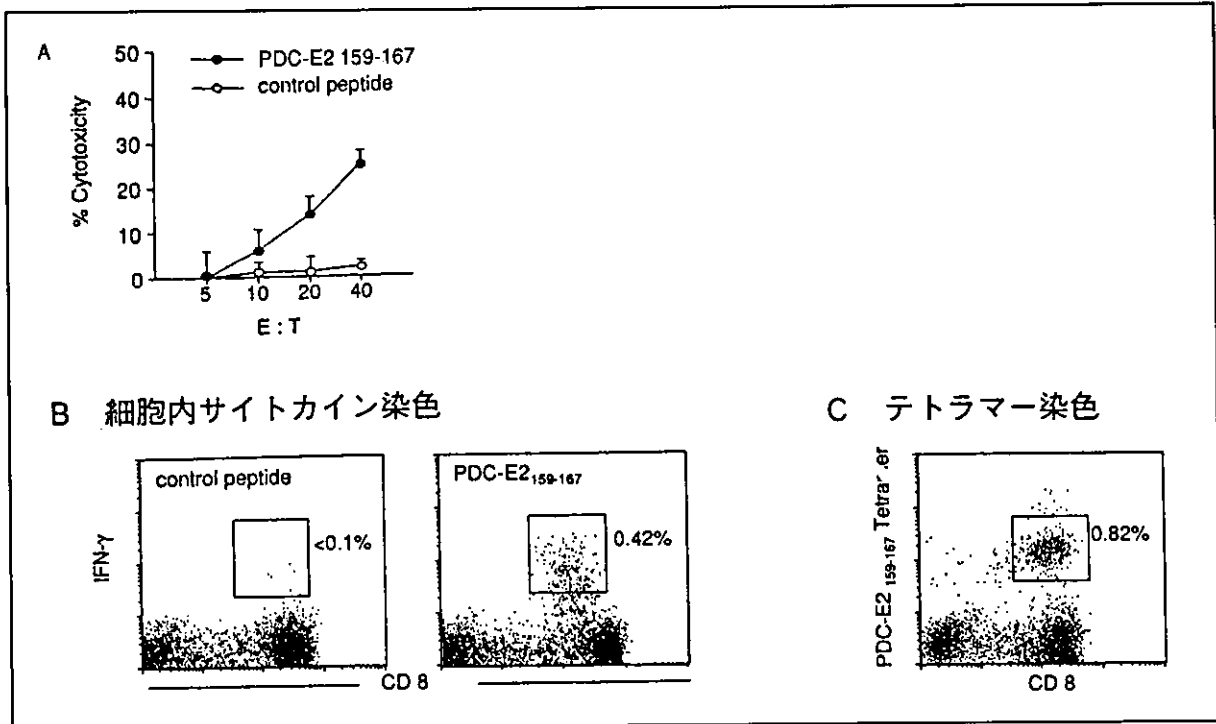


図1 PBCにおける自己抗原特異的細胞障害性T細胞 (文献5より改編)

- (A) PDC-E2特異的CTLはPBC患者末梢血より誘導され、抗原特異的細胞障害性活性を示した。
- (B) PDC-E2特異的CTLは抗原刺激に伴いインターフェロン γ を産生した。
- (C) PDC-E2特異的CTLは抗原エピートープを添加したテトラマーにより明確に可視化された。

中にも存在しており、分泌型抗体が胆管上皮から分泌される過程で何らかの機序により自己抗原を補足し、細胞表面に提示する機序も想定されている。抗ミトコンドリア抗体の主たる対応抗原であるPDC-E2分子を認識する自己抗体や自己反応性T細胞に関して解析が進んでいる。

3. PBCにおける自己抗原特異的T細胞応答

AMAの主たる対応抗原であるPDC-E2を標的とした自己反応性T細胞はよく解析されており、これまでにCD4陽性あるいはCD8陽性自己反応性T細胞のエピートープがそれぞれ同定されている。われわれはPDC-E2を認識する自己抗原特異的CD8陽性T細胞の抗原エピートープを同定し、PBC患者末梢血および肝浸潤リンパ球をこの抗原エピートープで刺激することによりPDC-E2特異的CTLを誘導することに成功した(図1)²⁾。T細胞受容体1分子がMHC・ペプチド複合体1分子と結合する力は弱いが、

MHC・ペプチド複合体の4量体(テトラマー)を形成するとその結合力の総和は抗原抗体反応に匹敵する⁶⁾。テトラマーを用いることで抗原特異的T細胞をT細胞受容体の抗原認識に基づき直接可視化することが可能となった。PDC-E2由来の抗原エピートープであるPDC-E2₁₅₉₋₁₆₇をHLA-A2分子に結合させたHLA-A2テトラマーを作成し、PBC患者末梢血と肝浸潤リンパ球中のPDC-E2特異的CTLの頻度を解析したところ、PBC患者における肝浸潤リンパ球中のPDC-E2特異的CD8陽性CTLは末梢血と比較して約10倍程度高頻度であり、自己抗原特異的CTLが標的臓器である肝臓内に集積していた。又、PBCの病期が進行するほど末梢血におけるPDC-E2特異的CD8陽性CTLの頻度が低下していた(図2)⁷⁾。

これらのCTLやエピートープ解析はPBCの病因における抗原特異的T細胞の意義を考える上で極めて重要であるだけでなく、抗原特異的なT細胞の免疫抑制という治療応用に結びつく可能性がある。我々はCTLのエピートープであるPDC-E2₁₅₉₋₁₆₇ペプチド中

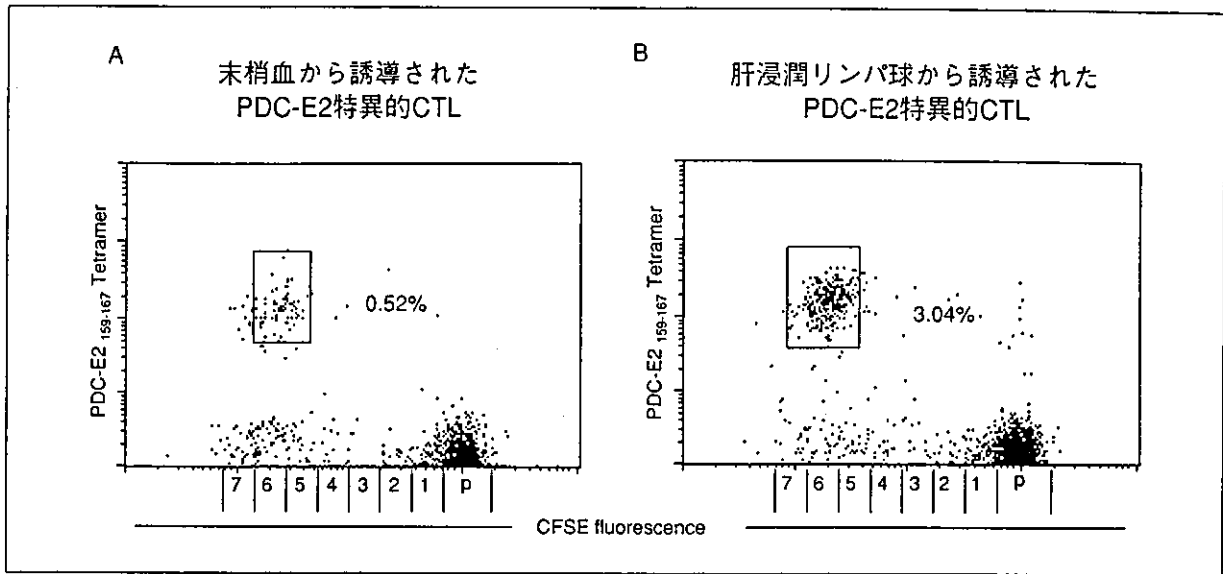


図2 PBC患者末梢血および肝浸潤リンパ球におけるPDC-E2特異的CTLの頻度解析(文献7より改編)

- (A) テトラマー陽性細胞は、6回分裂して、0.52%となったことより、抗原刺激前のもとの頻度は0.0081%と計算できる。テトラマー陽性細胞のほとんどが、分裂をくり返しているのに対し、テトラマー陰性細胞は、ほとんどが分裂していない。
- (B) 同様の計算により、抗原刺激前の頻度は0.048%と計算できる。

のMHC結合部位とT細胞受容体結合部位を各々固定し、自己抗原特異的CTLの抗原特異的な活性化を抑制するアンタゴニストとなるアミノ酸配列を同定している⁹⁾。

4. 樹状細胞と抗原提示

樹状細胞は最も強力な抗原提示細胞であり、近年その役割が注目されている。リンパ球やマクロファージなどのいわゆるプロフェッショナルな抗原提示細胞は、MHCクラスI分子やクラスII分子に結合した抗原エピトープを細胞表面に提示し、T細胞は提示された抗原を副刺激分子と共に認識する。これらの抗原提示細胞の中でも、樹状細胞は未だ抗原に出会ったことのない、ナイーブなT細胞を刺激し活性化させる唯一の細胞である。従って、PBC患者における自己抗原特異的T細胞の活性化には樹状細胞による自己抗原の提示が重要な役割を果たしていると考えられる。

一般に、細胞内で合成された抗原(内因性抗原)はMHCクラスI分子と複合体を形成し、細胞外から細胞内へ取り込まれた抗原(外因性抗原)はMHCクラスII分子と複合体を形成する。外因性の

抗原を積極的に取り込みMHCクラスI分子に抗原提示することをクロスプレゼンテーションと呼び、近年その役割が注目されている。抗原提示細胞以外の細胞の場合、MHCクラスI分子が抗原をプロセッシングする経路は外来性抗原を取り込む際に形成されるエンドゾームの経路と交叉しないので、クロスプレゼンテーションは通常起こらない。一方、抗原提示細胞は外因性抗原を貪食作用やエンドサイトーシスにより細胞内に取り込む能力を持っており、特に樹状細胞は外因性の抗原を積極的に取り込むだけでなくMHCクラスI分子にクロスプレゼンテーションする経路が発達している。樹状細胞はレセプターを用いて外因性抗原を効率よく取り込みMHCクラスIの経路で抗原提示することが知られている。特に、Fcγレセプターを介して免疫複合体を取込む経路がクロスプレゼンテーションに関与していることが、マウスを使った実験で明らかにされている。抗PDC-E2抗体は、PBC患者の末梢血中のみならず胆汁、尿中などにも存在する極めて疾患特異性の高い抗体である。PDC-E2特異的CTLは、抗原エピトープペプチドの代わりにPDC-E2抗原と抗PDC-E2抗体の免疫複合体を樹状細胞に添加することで効率よく誘導された⁹⁾。この結果は、PBC患者の体内に

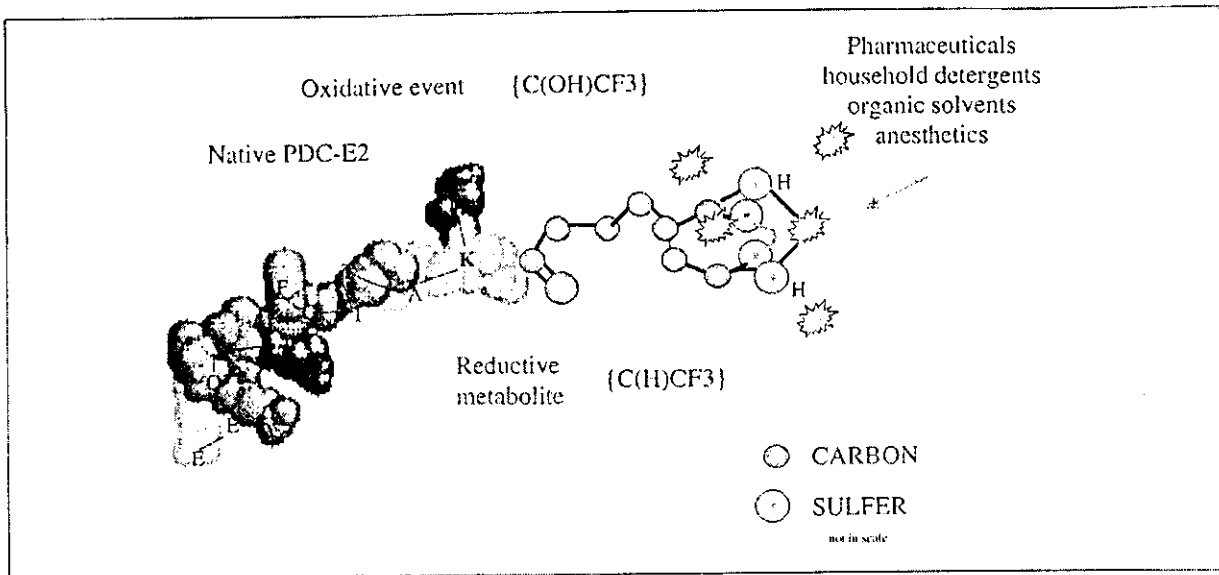


図3 化学修飾されたPDC-E2抗原に対する免疫応答 (文献2)より改編

ある抗ミトコンドリア抗体が組織破壊に伴い放出されるPDC-E2抗原と免疫複合体を形成しレセプターを介して樹状細胞に取り込まれる経路が、PDC-E2特異的CTLの活性化に結びつく可能性を示唆している。

又、PDC-E2免疫複合体が樹状細胞に取り込まれた後、抗原提示にいたるプロセッシングの経路を明らかにするため、樹状細胞をプロテアゾームの選択的阻害剤であるLactacystinや、エンドゾームの経路を阻害するBafilomycinで処理後、免疫複合体を添加することにより自己抗原特異的CTLが誘導可能かどうかを検討した。自己抗原特異的CTLの誘導はLactacystin濃度依存性に抑制された。又、Bafilomycin処理も自己抗原特異的CTLの誘導を抑制する傾向にあった²¹⁾。自己免疫疾患の発症機序を明らかにする上で、組織破壊に伴い放出されるPDC-E2等の自己抗原がどのような経路を経て抗原提示細胞に取り込まれ、自己免疫反応を惹起するのには興味深い。

5. 分子相同性と、化学修飾された抗原に対する免疫応答 (図3)

自己抗原と自己と無関係な外来抗原との分子相同

性は、自己抗体産生細胞や自己反応性T細胞が活性化をうけ自己免疫疾患が発症する機序を説明する仮説である。PBCの主たる自己抗原であるPDC-E2分子は哺乳類や細菌等を含めた生物間での相同性が極めて高い。PDC-E2分子に対する抗体反応や、自己反応性ヘルパーT細胞、あるいは自己反応性CTLにおいて他の微生物由来の抗原との交差反応性が各々報告されており興味深い。

抗原特異的な液性免疫や抗原特異的T細胞応答、NKT細胞²²⁾等が、お互いに関連しあってPBCにおける胆管上皮細胞の選択的破壊へと結びつくステップが徐々に明らかにされようとしているが、残された課題も多い。その中でも、PDC-E2に対するB細胞やT細胞の免疫応答がどのようなきっかけで起きるのかという問題は解決すべき重要な課題である。感染症が分子相同性の機序により免疫寛容を破壊させる可能性については既に言及したが、近年、化学修飾されたPDC-E2抗原に対する免疫反応が注目されている²³⁾。実際、動物モデルでPDC-E2と無関係な抗原に化学修飾を加えることにより、AMAが誘導されたという報告も見られる。これまでPBCの動物モデルでは、PDC-E2分子に対する免疫寛容の破壊をB細胞レベルで引き起こすことは可能であるが、PDC-E2特異的な自己反応性T細胞を誘導する

ことは困難であった。今後はT細胞レベルでの免疫寛容の破綻を起こす機序に関する研究に焦点が向けられてゆくであろう。

文 献

- 1) Kita, H., Nalbandian, G., Keefe, E.B., Coppel, R.L., and Gershwin, M.E. 2003. Pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis* 7: 821-839.
- 2) Kita, H., He, X.-S., and Gershwin, M.E. Autoimmunity and Environmental Factors in the Pathogenesis of Primary Biliary Cirrhosis. *Annals of Med.* 36: 72-80, 2004.
- 3) Kita, H. 2003. Primary Biliary Cirrhosis and E.Coli-induced Pyelonephritis; Are infectious Agents Related to the Pathogenesis OF Primary Biliary Cirrhosis? *Int Med* 42:1063-1064.
- 4) Kita, H., Mackay, I.R., Van De Water, J., and Gershwin, M.E. 2001. The lymphoid liver: considerations on pathways to autoimmune injury. *Gastroenterology* 120:1485-1501.
- 5) Kita, H., Lian, Z.X., Van De Water, J., He, X.S., Matsumura, S., Kaplan, M., Luketic, V., Coppel, R.L., Ansari, A.A., and Gershwin, M.E. 2002. Identification of HLA-A2-restricted CD8(+) Cytotoxic T Cell Responses in Primary Biliary Cirrhosis: T Cell Activation Is Augmented by Immune Complexes Cross-Presented by Dendritic Cells. *J Exp Med* 195:113-123.
- 6) Kita, H., He, X.S., and Gershwin, M.E. 2003. Application of tetramer technology in studies on autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2:43-49.
- 7) Kita, H., Matsumura, S., He, X.S., Ansari, A.A., Lian, Z.X., Van de Water, J., Coppel, R.L., Kaplan, M.M., and Gershwin, M.E. 2002. Quantitative and functional analysis of PDC-E2-specific autoreactive cytotoxic T lymphocytes in primary biliary cirrhosis. *J Clin Invest* 109:1231-1240.
- 8) Kita, H., Matsumura, S., He, X.S., Ansari, A.A., Lian, Z.X., Van De Water, J., Coppel, R.L., Kaplan, M.M., and Gershwin, M.E. 2002. Analysis of TCR antagonism and molecular mimicry of an HLA-A0201- restricted CTL epitope in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 36:918-926.
- 9) Kita, H., Ansari, A.A., He, X.S., Lian, Z.X., Van de Water, J., Coppel, R.L., Luketic, V., Kaplan, M., Inamori, H., Isoda, N., *et al.* 2003. Proteasome is required for class I-restricted presentation by Fcγ receptor-mediated endocytosis in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 21:175-182.
- 10) Kita, H., Naidenko, O.V., Kronenberg, M., Ansari, A.A., Rogers, P., He, X.-S., Koning, F., Miyakawa, T., Van de Water, J., Coppel, R.L., *et al.* 2002. Quantitation and phenotypic analysis of NKT cells in healthy individuals and primary biliary cirrhosis using a human CD1d tetramer. *Gastroenterology* 123:1031-1043.

(9) 原発性胆汁性肝硬変における樹状細胞の自己抗原提示機序

自治医科大学内科学講座消化器内科学部門¹⁾,

カリフォルニア大学デービス校²⁾

喜多 宏人¹⁾, M.E. Gershwin²⁾

はじめに

抗ミトコンドリア抗体は、原発性胆汁性肝硬変 (PBC) において非常に疾患特異性の高い自己抗体である。また、その主たる対応抗原であるピルビン酸脱水素酵素 E2 コンポーネント (PDC-E2) を標的とした CD4 陽性あるいは CD8 陽性自己反応性 T 細胞のエピトープがそれぞれ同定されている。樹状細胞は最も強力な抗原提示細胞であり、近年その役割が注目されている。リンパ球やマクロファージなどのいわゆるプロフェッショナルな抗原提示細胞は、MHC クラス I 分子やクラス II 分子に結合した抗原エピトープを細胞表面に提示し、T 細胞は提示された抗原を副刺激分子と共に認識する。これらの抗原提示細胞の中でも、樹状細胞はいまだ抗原に出会ったことのない、いわゆるナイーブな T 細胞を刺激し活性化させる唯一の細胞である。従って、PBC 患者において自己抗原特異的 T 細胞が活性化するためには、樹状細胞による自己抗原の提示が重要な役割を果たしていると考えられる。

一般に、細胞内で合成された抗原 (内因性抗原) は MHC クラス I 分子と複合体を形成し、細胞外から細胞内へ取り込まれた抗原 (外因性抗原) は MHC クラス II 分子と複合体を形成する。外因性の抗原を積極的に取り込み MHC クラス I 分子に抗原提示することをクロスプレゼンテーションと呼び、近年その役割が注目されている。抗原提示細胞以外の細胞の場合、MHC クラス I 分子が

抗原をプロセッシングする経路は外来性抗原を取り込む際に形成されるエンドゾームの経路と交差しないので、クロスプレゼンテーションは通常起こらない。一方、抗原提示細胞は外因性抗原を貪食作用やエンドサイトーシスにより細胞内に取り込む能力を持っており、特に樹状細胞は外因性の抗原を積極的に取り込むだけでなく MHC クラス I 分子にクロスプレゼンテーションする経路が発達している。われわれは、樹状細胞が自己抗原を提示し、PDC-E2 特異的 CD8 陽性 CTL を誘導する系を用いて、ヒト樹状細胞の自己抗原の取り込みや細胞内プロセッシングの経路を解析した。

方法および結果

PDC-E2 分子 561 アミノ酸の中に存在する HLA-A2 拘束性 CTL エピトープである PDC-E2 159-167 ペプチドを用いて、PBC 末梢血より自己抗原特異的 CTL を誘導した。PBC 患者末梢血から IL-4 と GM-CSF を用いて樹状細胞を誘導し、ペプチド抗原をパルスした樹状細胞を患者末梢血リンパ球と *in vitro* で混合培養することにより、抗原特異的 T 細胞を選択的に増殖させた。誘導された PDC-E2 特異的 CTL は、抗原を添加した標的細胞を特異的に破壊し、また抗原添加によりインターフェロンを産生した。また、抗原ペプチドを結合した HLA-A2 テトラマーを用いることにより明確に可視化された。これまでの実験では、抗原エピトープである PDC-

E2 159-167 をペプチド抗原として PDC-E2 特異的 CTL を誘導してきたが、抗原ペプチドの代わりにリコンビナント PDC-E2 抗原を外因性に樹状細胞に添加することにより、このリコンビナント抗原が樹状細胞により取り込まれ、プロセッシングを受けて、クロスプレゼンテーションの経路で MHC クラス I 分子に抗原提示されないか検討した。PDC-E2 特異的 CTL はリコンビナント抗原を添加した樹状細胞を用いて誘導可能であったが、リコンビナント抗原を用いて特異的 CTL を誘導した場合には、抗原ペプチドを用いた場合と比較して、100 倍程度高濃度のリコンビナント抗原が必要であった(図 1)。

樹状細胞は外来抗原を貪食作用やエンドサイトーシスにより取り込むだけでなく、レセプターを介して抗原を効率良く取り込むことが知られている。特に、Fcγ レセプターを介して免疫複合体を取り込む経路がクロスプレゼンテーションに関与していることが、マウスを使った実験で明らかにされている。抗 PDC-E2 抗体は、PBC 患者の末梢血中のみならず胆汁、尿中などにも存在する極めて疾患特異性の高い抗体である。組織破壊に伴い放出された PDC-E2 抗原が抗 PDC-E2 抗体と免疫複合体を形成し、その免疫複合体が Fcγ レセプターを介して樹状細胞に取り込まれ、クロスプレゼンテーションを受ける経路が PDC-E2 特異的 CTL の活性化につながるのではないかと考えた。

PDC-E2 抗原と抗 PDC-E2 抗体を用いて免疫複合体を形成し、免疫複合体を樹状細胞に添加したところ、PDC-E2 特異的 CTL が抗原ペプチド添加と同等に効率良く誘導された(図 2)。この結果は、PBC 患者の体内にある抗ミトコンドリア抗体が組織破壊に伴い放出される PDC-E2 抗原と免疫複合体を形成しレセプターを介して樹状細胞に取り込まれる経路が、PDC-E2 特異的 CTL の活性化に結びつく可能性を示唆している。

また、PDC-E2 免疫複合体が樹状細胞に取り込まれた後、抗原提示に至るプロセッシングの経路を明らかにするため、樹状細胞をプロテアゾー

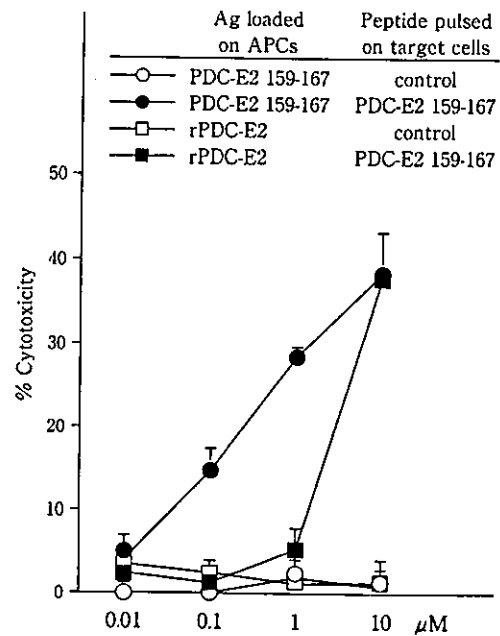


図 1 リコンビナント PDC-E2 抗原を添加した樹状細胞を用いた PDC-E2 特異的 CTL の誘導(文献 2 より改編)

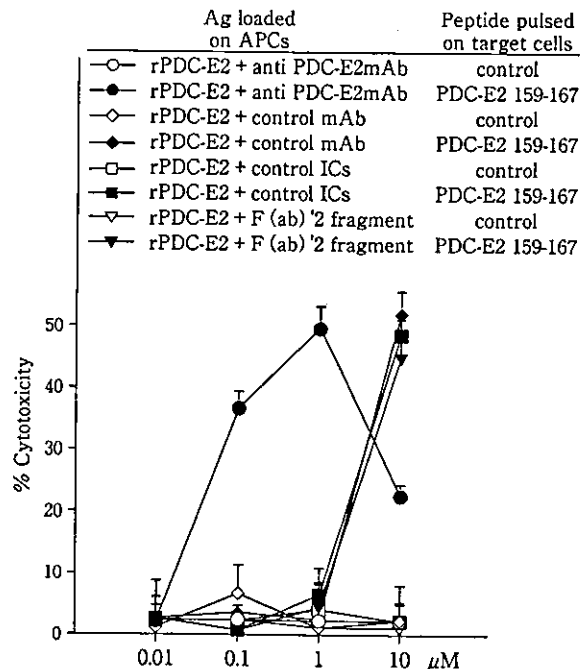


図 2 PDC-E2 抗原と抗 PDC-E2 抗体による免疫複合体を添加した樹状細胞を用いた PDC-E2 特異的 CTL の誘導(文献 2 より改編)

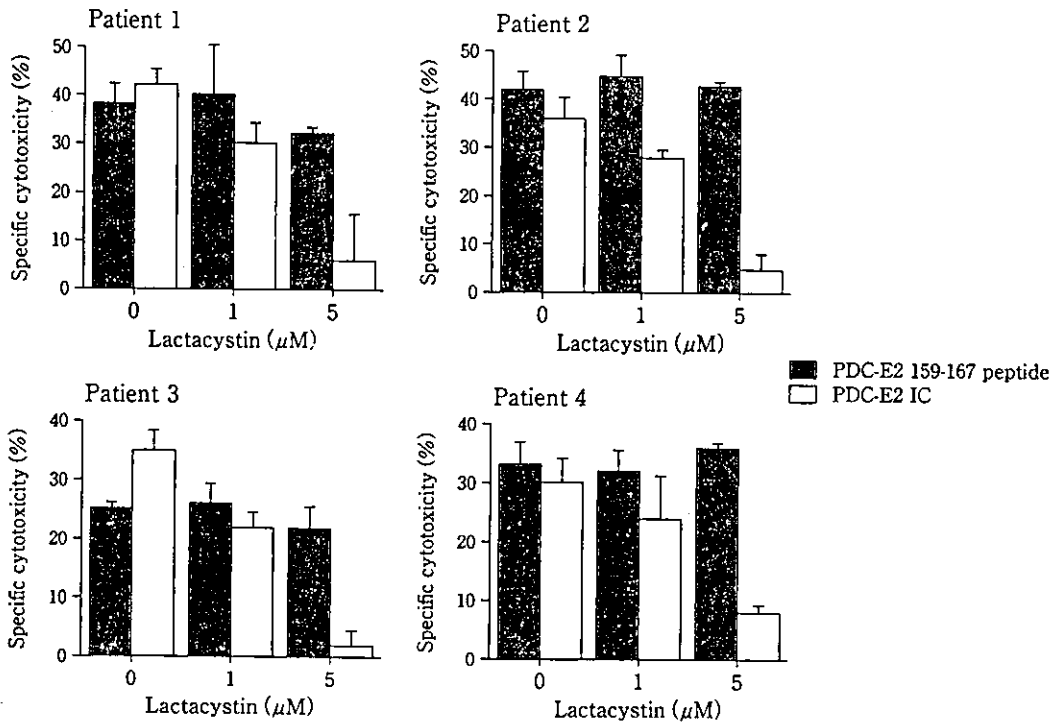


図3 樹状細胞をLactacystinで処理することによる自己抗原特異的CTLの誘導性の変化(文献3より改編)

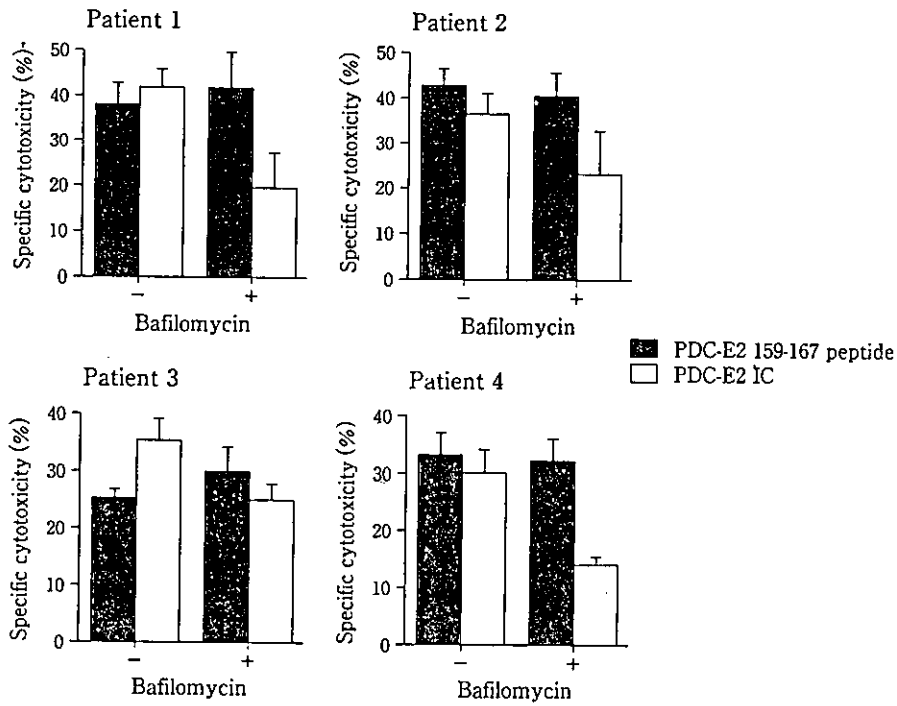


図4 樹状細胞をBafilomycinで処理することによる自己抗原特異的CTLの誘導性の変化(文献3より改編)

ムの選択的阻害剤である Lactacystin や、pH を上昇させることでエンドゾームの経路を阻害する Bafilomycin で処理後、免疫複合体を添加することにより自己抗原特異的 CTL が誘導可能かどうかを検討した。自己抗原特異的 CTL の誘導は Lactacystin 濃度依存性に抑制された(図 3)。また、Bafilomycin 処理も自己抗原特異的 CTL の誘導を抑制する傾向にあった(図 4)。

以上の結果は、PDC-E2 抗原が免疫複合体を作製することで効率良く樹状細胞に取り込まれ、さらに取り込まれた外因性抗原がクラス I の経路を介してクロスプレゼンテーションされる可能性を示唆している。また、免疫複合体が樹状細胞に取り込まれた後プロセッシングを受ける過程にブ

ロテアソームが必要であることを示唆している。

文 献

- 1) Kita, H., Nalbandian, G., Keeffe, E.B., Coppel, R. L. and Gershwin, M.E.: Pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *Clin. Liver Dis.*, 7, 821-839, 2003.
- 2) Kita, H., Lian, Z.X., Van De Water, J., et al.: Identification of HLA-A2-restricted CD8(+) cytotoxic T cell responses in primary biliary cirrhosis: T cell activation is augmented by immune complex cross-presented by dendritic cells. *J. Exp. Med.*, 195, 113-123, 2002.
- 3) Kita, H., Ansari, A.A., He, X.S., et al.: Proteasome is required for class I-restricted presentation by Fcγ receptor-mediated endocytosis in primary biliary cirrhosis. *J. Autoimmun.*, 21, 175-182, 2003.

抗ミトコンドリア抗体

自治医科大学消化器内科 喜多宏人

■ 基準値

間接蛍光抗体法：陰性(10倍未満)
MESACUP-2テスト：ミトコンドリアM2
index値：7未満

■ 何を知るための検査か

抗ミトコンドリア抗体は、ミトコンドリア内膜タンパクを抗原とする自己抗体である。原発性胆汁性肝硬変(PBC)において高頻度に陽性となり、疾患特異性も高い。原因不明の肝障害で、とくに胆汁うっ滞性変化が強い場合、ウイルス性肝炎やアルコール性肝障害以外の鑑別診断として、PBCの鑑別は重要である。通常、凍結ラット胃・腎複合組織切片を基質とした間接蛍光抗体法(IF法)を用いてスクリーニングを行う。

近年、PBCにおける抗ミトコンドリア抗体の対応抗原であるPDC-E2、BCOADC-E2、OGDC-E2の3つのタンパクを固相したELISA法(MESACUP-2テスト：ミトコンドリアM2)が臨床応用され、従来のIF法より高感度であることが知られている。

■ 異常値を示す場合

1. 異常高値を示す場合：PBCを疑う。とくに抗体価が高い場合は、PBCを強く疑う。

2. 異常低値を示す場合：健常人では陰性となる。

■ 異常値を示すメカニズム

PBCは中年以降の女性に好発し、組織学的に肝小葉内の細胆管の慢性非化膿性破壊性胆管炎(chronic non-suppurative destructive cholangitis)を特徴とする慢性胆汁うっ滞性疾患である。病因として自己免疫機序が想定されているが、発症機序は不明である。

抗ミトコンドリア抗体は、臨床的にPBCにきわめて疾患特異性の高い自己抗体である。PBCのような特定の組織に炎症が及ぶ疾患において、ミトコンドリア抗原のような全身の細胞に存在する抗原に対する自己免疫現象が起こってくる原因はわかっていない。細菌やウイルス感染、あるいは化学物質に対する交差免疫反応が、このような自己抗体産生や、細胆管の破壊に結び付く可能性が示唆されている。

■ どう検査を進めるか

PBCを疑い、肝生検の適応を検討する。組織所見の診断的意義は高い。ただし、厚生省(現厚生労働省)の診断基準では、臨床像や経過からPBCと考えられ、しかも高ミトコンドリア抗体または抗PDH抗体が陽性であれば、病理検索をしていなくてもPBCと診断すると記載されている。

なお、頻度は少ないが抗ミトコンドリア抗体陰性のPBCも存在するので注意が必要である。また、PBCと自己免疫性肝炎とのオーバーラップと臨床的に考えられる症例も、ときに存在する。

■ 異常値と対策

PBCかどうかの診断確定後、病期や合併症に応じた適切な治療法を選択する。

PDC-E2 とキラー T 細胞

喜 多 宏 人*

索引用語：PDC-E2, NKT 細胞, 原発性胆汁性肝硬変, T 細胞

1 はじめに

原発性胆汁性肝硬変 (PBC) は中年女性に好発する慢性進行性の胆汁うっ滞症であり, 病理学的に慢性非化膿性破壊性胆管炎を特徴とする. 抗ミトコンドリア抗体をはじめとする自己抗体や, 他の自己免疫性疾患を合併することより自己免疫機序が重要と考えられているが, 真の病因は明らかでない^{1,2)}. 肝臓は独自の免疫環境を構築していると考えられているが, PBC は肝臓を病変の主座とする自己免疫疾患であり病因論的にも興味深い³⁾. 免疫系は, 免疫記憶なしに反応する自然免疫と T 細胞や B 細胞等免疫記憶を特徴とする獲得免疫に大別可能である. PBC 患者には自己抗体や自己反応性 T 細胞など, 自己抗原を認識する獲得免疫の異常がみられるという報告が多い. 一方, 近年のいわゆる自然免疫系に関する新たな知見により, PBC の病態における自然免疫の関与を示唆する研究結果も散見される. 抗ミトコンドリア抗体 (AMA) は PBC に特異性の高い自己抗体であり, その対応抗原はピルビン酸脱水素酵素の

E2 コンポーネント (PDC-E2) を含む 2-オキソ酸脱水素酵素複合体上に存在する⁴⁾. 本稿では PDC-E2 分子を標的とした抗原特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL) および, NKT 細胞に関するこれまでの解析結果を中心に, PBC における胆管障害の機序につき考察する.

2 PDC-E2 特異的 CTL

AMA の主たる対応抗原である PDC-E2 を標的とした自己反応性 T 細胞はよく解析されており, これまでに CD4 陽性あるいは CD8 陽性自己反応性 T 細胞のエピトープがそれぞれ同定されている. われわれは PDC-E2 を認識する自己抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の抗原エピトープを同定し, PBC 患者末梢血および肝浸潤リンパ球をこの抗原エピトープで刺激することにより PDC-E2 特異的 CTL を誘導することに成功した⁴⁾. また, 自己抗原由来のエピトープペプチドを結合させたテトラマーを用いることで, 抗原特異的 T 細胞を T 細胞受容体の抗原認識に基づき直接可視化することが可能となった. PDC-E2 由来の抗原エピトープである PDC-E2₁₅₉.

Hiroto KITA : PDC-E2 and Killer T cell

*自治医科大学消化器内科学教室 [〒 329-0434 栃木県河内郡南河内町薬師寺 3311-1]

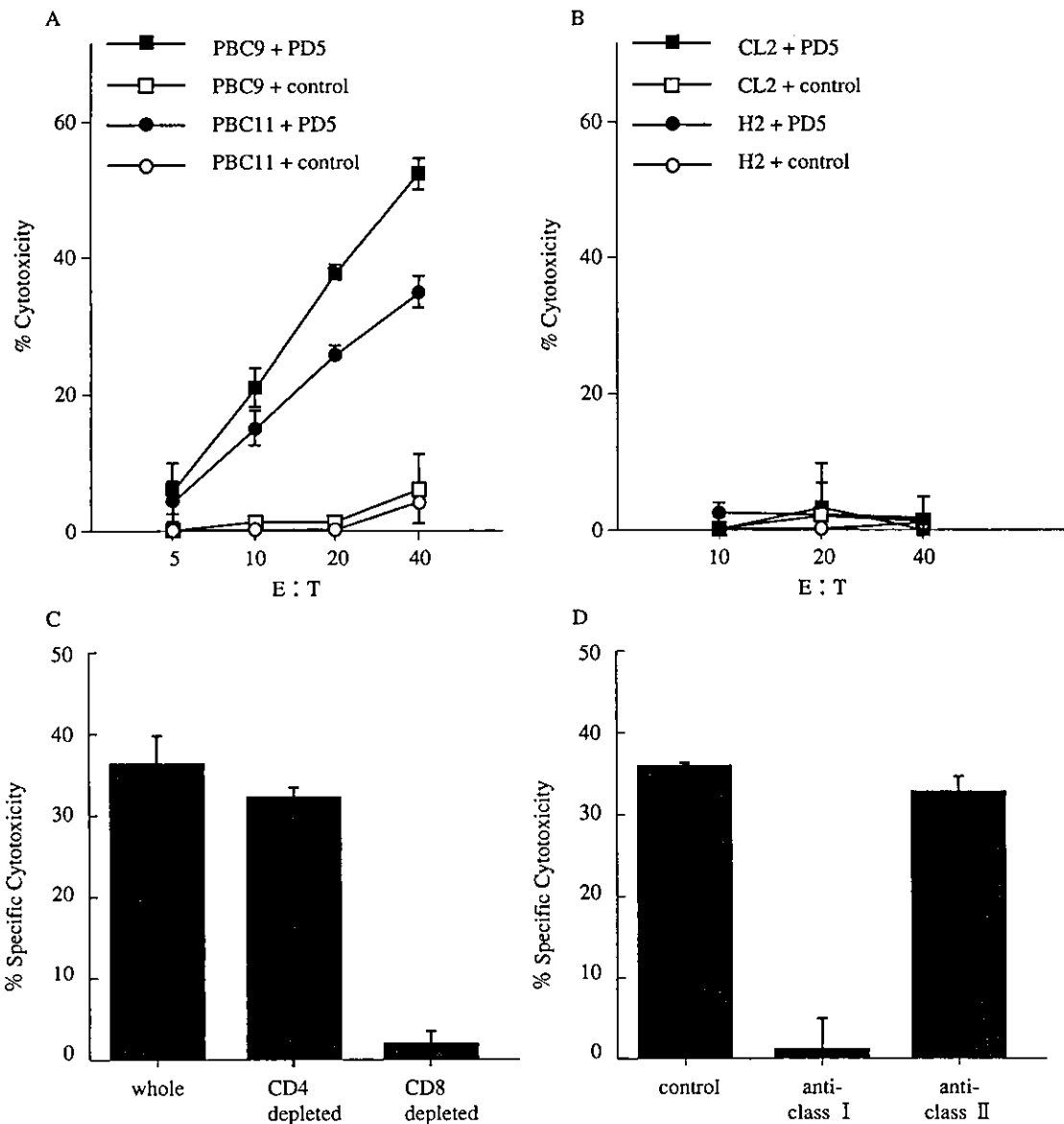


図1 PDC-E2 特異的 CTL の抗原特異的細胞障害性活性 (文献4より改編)

- A: PDC-E2 特異的 CTL は PBC 患者 (PBC9, PBC11) 末梢血より誘導され, 抗原特異的細胞障害性活性を示した。
 B: PDC-E2 特異的 CTL は他の肝疾患患者 (CL2) や健常人 (H2) 由来の末梢血より誘導されなかった。
 C: PDC-E2 特異的 CTL は CD8 分画中に存在した。
 D: PDC-E2 特異的 CTL の抗原特異的細胞障害性活性は抗 HLA クラス I 抗体の添加により, 抑制された。

167 を HLA-A2 分子に結合させた HLA-A2 テトラマーを作成し, PBC 患者末梢血と肝浸潤リンパ球中の PDC-E2 特異的 CTL の頻度を解析したところ, PBC 患者における肝浸潤リンパ球中の PDC-E2 特異的 CD8 陽性 CTL は末梢血と比較して約 10 倍程度高頻

度であり, 自己抗原特異的 CTL が標的臓器である肝臓内に集積していた。また, PBC の病期が進行するほど末梢血における PDC-E2 特異的 CD8 陽性 CTL の頻度が低下していた⁵⁾。

これらの CTL やエピトープ解析は PBC の

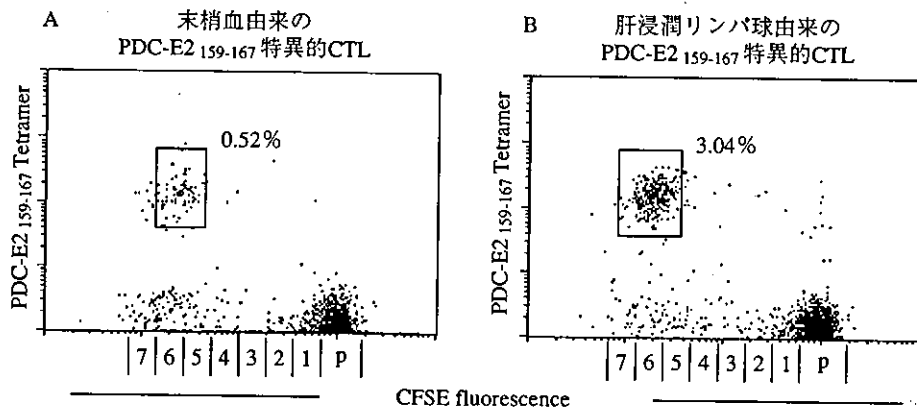


図2 PBC患者末梢血および肝浸潤リンパ球におけるPDC-E2特異的CTLの頻度解析(文献5より改編)

- A: テトラマー陽性細胞は、6回分裂して、0.52%となったことより、抗原刺激前のもとの頻度は0.0081%と計算できる。テトラマー陽性細胞のほとんどが、分裂を繰り返しているのに対し、テトラマー陰性細胞は、ほとんどが分裂していない。
- B: 同様の計算により、抗原刺激前の頻度は0.048%と計算できる。

病因における抗原特異的T細胞の意義を考える上で極めて重要であるだけでなく、抗原特異的なT細胞の免疫抑制という治療応用に結びつく可能性がある。われわれはCTLのエピトープであるPDC-E2₁₅₉₋₁₆₇ペプチド中のMHC結合部位とT細胞受容体結合部位をおのおの同定し、自己抗原特異的CTLの抗原特異的な活性化を抑制するアンタゴニストとなるアミノ酸配列を同定している⁶⁾。

3 PBCとNKT細胞

NKT細胞はNK細胞とT細胞の両方の表面マーカーを持つユニークな細胞集団である。NKT細胞はT細胞受容体を有するが、どちらかという自然免疫に近い性質を有していると考えられている。従来のT細胞は蛋白質由来のペプチドを認識するが、NKT細胞は α ガラクトシルセラミド(α GalCer)などの糖脂質を認識する。NKT細胞の定義は報告者により異なる。一般にマウスにおいてはNK1.1陽性T細胞をNKT細胞と定義していることが多い。近年マウスCD1dテトラ

マーが利用可能となり、NKT細胞をCD1d分子の認識に基づき可視化することが可能となった⁷⁾。ヒトにおいてもマウスV α 14、V β 8.2とおのおのの相同性の高いV α 24、V β 11のTCRを発現する細胞集団が認められる。ヒトV α 24陽性NKT細胞は主にCD4陽性分画とダブルネガティブに分かれるが、CD8陽性分画の存在も報告されている。マウスと同様にヒトにおいてもヒトCD1dテトラマーが利用可能である。健康人を用いた自験例でも末梢血中のV α 24陽性V β 11陽性T細胞はヒトCD1d- α GalCerテトラマー陽性細胞ほぼ完全にオーバーラップしており、その頻度は全リンパ球の0.07%であった⁸⁾。一方、T細胞マーカーであるTCRやCD3と、NKマーカーであるCD56、CD57あるいはNKR-P1A関連分子であるCD161の両者を発現する細胞をNKT細胞と定義している報告もみられる。われわれはヒトCD1d- α GalCerテトラマーを用いて原発性胆汁性肝硬変(PBC)患者末梢血および肝浸潤リンパ球中のヒトCD1d- α GalCerテトラマー陽性細胞

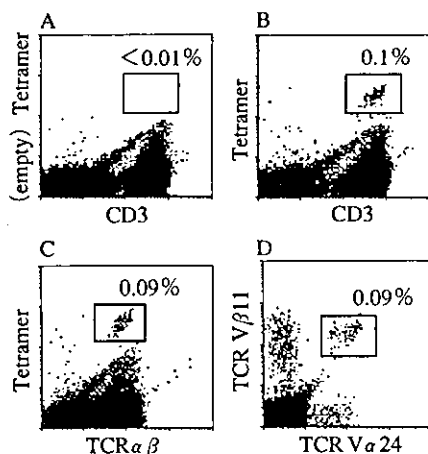


図3 ヒト CD1d テトラマーを用いた FACS 解析
(文献 8 より改変)

- A : α GalCer を load していないテトラマー。
 B : α GalCer を load したテトラマー。
 C : CD1d テトラマーと TCR $\alpha\beta$ 抗体との co-staining.
 D : TCR V α 24 抗体と TCR V β 11 抗体との co-staining.
 いずれも健常人末梢血検体を使用

の頻度を健常者と比較検討した⁸⁾。PBC 患者末梢血中のヒト CD1d- α GalCer テトラマー陽性細胞は健常人と比較して著しく減少しており、ほとんど同定できなかつた。一方 PBC 患者中の肝臓内には健常人の肝臓と比較して、約 3 倍のヒト CD1d- α GalCer テトラマー陽性細胞がみられた。これらの結果は、ヒト CD1d- α GalCer テトラマー陽性細胞が PBC 患者の肝臓内に病態に集積していることを示唆している。PBC 患者肝組織中の門脈域に CD3 陽性 CD57 陽性細胞が増加しているという報告もある。自己免疫性疾患のモデルマウスである NOD マウスでは NKT 細胞が減少しているし、NKT 細胞のサイトカイン産生障害もみられる。最近の報告によると、 α GalCer の投与により NOD マウスの糖尿病の発症が抑制された。また、 α GalCer のアナログを投与することでマウス自己免疫性脳脊髄炎の発症を抑えたという報告もあ

る。多くの自己免疫性疾患において NKT 細胞の頻度は減少している。PBC におけるダイナミックな NKT 細胞の変化は、他の自己免疫性疾患の結果ともあわせて興味深い。

4 おわりに

PBC の発症機序を明らかにする目的で、PDC-E2 を標的とした細胞障害性 T 細胞と NKT 細胞反応を解析した。これらの細胞分画は肝浸潤リンパ球中なかで相対的に増加していたが、その割合は決して多くない。近年リンパ球解析技術の進歩により、例えば樹状細胞にみられるように、リンパ球中のほんのわずかな細胞集団が免疫系の司令塔として重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。逆に炎症反応はサイトカインやケモカインを介して非特異的な炎症細胞を大量にリクルートメントするため、浸潤臓器から得られたリンパ球は PBC の発症に直接関与する細胞分画と炎症に伴いリクルートメントされた細胞とが混然としており、このことが結果の解釈を困難にしている。今後は PBC 発病初期の検体を用いた解析や動物モデルを用いた解析により、PBC 発症機序に関する新たな展望が開かれていく可能性がある。

文 献

- 1) Kita H, Nalbandian G, Keeffe EB et al : Pathogenesis of primary biliary cirrhosis. Clin Liver Dis 7 : 821-839, 2003
- 2) Gershwin ME, Ansari AA, Mackay IR et al : Primary biliary cirrhosis: an orchestrated immune response against epithelial cells. Immunol Rev 174 : 210-225, 2000
- 3) Kita H, Mackay IR, Van De Water J et al : The lymphoid liver: considerations on pathways to autoimmune injury. Gastroenterology 120 : 1485-1501, 2001
- 4) Kita H, Lian ZX, Van De Water J et al : Identification of HLA-A2-restricted CD8(+) Cytotoxic T Cell Responses in Primary Biliary

Cirrhosis: T Cell Activation Is Augmented by Immune Complexes Cross-Presented by Dendritic Cells. *J Exp Med* 195 : 113–123, 2002

- 5) Kita H, Matsumura S, He XS et al : Quantitative and functional analysis of PDC-E2-specific autoreactive cytotoxic T lymphocytes in primary biliary cirrhosis. *J Clin Invest* 109 : 1231–1240, 2002
- 6) Kita H, Matsumura S, He XS et al : Analysis of TCR antagonism and molecular mimicry of an HLA-A0201- restricted CTL epitope in primary

biliary cirrhosis. *Hepatology* 36 : 918–926, 2002

- 7) Kita H, He XS, Gershwin ME : Application of tetramer technology in studies on autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2 : 43–49, 2003
- 8) Kita H, Naidenko OV, Kronenberg M et al : Quantitation and phenotypic analysis of natural killer T cells in primary biliary cirrhosis using a human CD1d tetramer. *Gastroenterology* 123 : 1031–1043, 2002

* * *

特集II 肝疾患における免疫療法

CD8陽性自己反応性 T 細胞の活性化を抗原特異的に阻害する T 細胞受容体アンタゴニスト*

喜多 宏人**

Key Words : PBC, CTL antagonist, autoimmune

はじめに

自己免疫疾患において T 細胞は抗原特異的なエフェクター細胞として重要な役割を果たしている。自己抗原を認識する T 細胞は健常人では制御されているが、なんらかの原因により自己反応性 T 細胞が本来の制御から逸脱することが自己免疫性疾患の発症に重要な役割を果たしているものと考えられている。したがって、T 細胞の抗原認識を理解し自己反応性 T 細胞反応を制御することは、自己免疫疾患に対してきわめて疾患特異性の高い治療となりえる。

近年 T 細胞の抗原認識機序の全容が解明されつつある。MHC 分子は細胞内で分解された抗原蛋白質を結合させ、T 細胞に抗原提示する。一方 T 細胞は α 鎖と β 鎖から形成される T 細胞受容体を用いて抗原を認識する。主要組織適合 (MHC) 分子はヒトでは HLA とよばれており、抗原のペプチド断片を乗せて T 細胞に提示する器の役割を果たす。クラス I MHC 分子は体内のほとんどの細胞がもっており、CD8 陽性 T 細胞に抗原提示する。炎症や組織傷害に直接関与する細胞障害性 T 細胞は CD8 陽性 T 細胞である。

肝臓は独特の類洞構造を有し、腸管から吸収された多様な物質が門脈を介して直接流入する。肝臓内にはクッパー細胞や樹状細胞などが存在

することや、肝在住リンパ球は末梢血中とフェノタイプが異なることなどから肝臓は一種の独立した免疫臓器としての役割を果たしていると考えられている¹⁾。原発性胆汁性肝硬変は、中年女性に好発し胆汁うっ滞性肝障害をひき起こす原因不明の自己免疫性肝疾患である²⁾。遺伝因子と環境因子の両方が発病に関与すると考えられている³⁾。抗ミトコンドリア抗体は原発性胆汁性肝硬変患者に検出される非常に特異性の高い自己抗体であり、その対応抗原は細胞のミトコンドリア分画に存在するピルビン酸脱水素酵素であることが明らかにされている。最近、原発性胆汁性肝硬変における自己抗原特異的 CD8 陽性細胞障害性 T 細胞 (CTL) が末梢血および肝組織由来のリンパ球より誘導された⁴⁾。われわれは自己抗原特異的 CD8 陽性 CTL の活性化を抗原特異的に阻害する T 細胞受容体アンタゴニストを同定した⁵⁾。

PDC-E2 特異的 CTL

PDC-E2 分子 561 アミノ酸の中に存在する HLA-A2 拘束性 CTL エピトープである PDC-E2₁₅₉₋₁₆₇ ペプチドを用いて、PBC 末梢血より自己抗原特異的 CTL を誘導した⁴⁾。PBC 患者末梢血から IL-4 と GM-CSF を用いて樹状細胞を誘導し、ペプチド抗原をパルスした樹状細胞を患者末梢血リンパ球と *in vitro* で混合培養することにより、抗原特異的 T 細胞を選択的に増殖させた。誘導された PDC-E2 特異的 CTL は、抗原を添加した標的細胞を特

* T cell receptor antagonism that inhibit antigen specific CD8 positive autoreactive T cell responses.

** Hiroto KITA, M.D.: 自治医科大学内科学講座消化器内科部門 [〒329-0434 栃木県河内郡南河内町薬師寺3311-1]; Department of Internal Medicine, Division of Gastroenterology, Jichi Medical School, Tochigi-ken 329-0434, JAPAN

表1 PDC-E2₁₅₉₋₁₆₇ペプチドの各々のアミノ酸配列をアラニンに置換したアナログペプチド

	name	sequence
prototype peptide		KLSEGDLLA
analogue peptide	K1A	ALSEGDLLA
	L2A	KASEGDLLA
	S3A	KLAEGDLLA
	E4A	KLSAGDLLA
	G5A	KLSEADLLA
	D6A	KLSEGALLA
	L7A	KLSEGDALA
	L8A	KLSEGDLLA

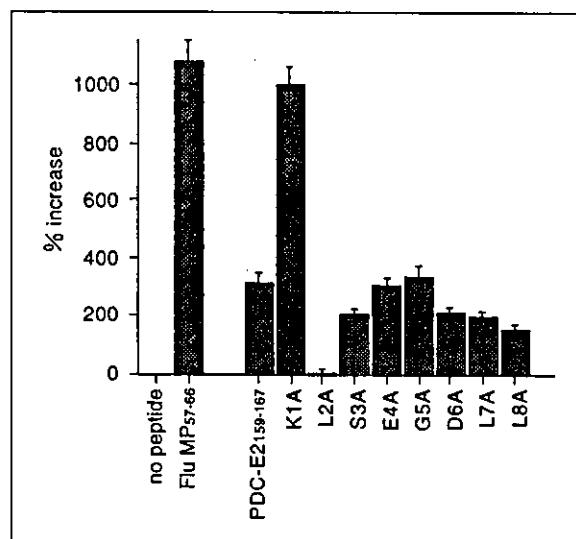
(文献⁵⁾より引用改変)

異的に破壊し、また抗原添加によりインターフェロン γ を産生した。また、抗原ペプチドを結合したHLA-A2テトラマーを用いることにより明確に可視化された⁶⁾。

T細胞受容体アンタゴニストの同定

HLA-A2拘束性CTLエピトープであるPDC-E2₁₅₉₋₁₆₇ペプチドのアミノ酸配列には、HLA分子に結合する部位とTCRによる抗原認識に重要な部位が含まれている。理論的には、HLA分子がT細胞受容体アンタゴニストと結合した場合、PDC-E2特異的CTLに認識はされるが、ワイルドタイプのエピトープと異なりCTLの活性化を起こさない。このようなアンタゴニストを同定する目的で、PDC-E2₁₅₉₋₁₆₇ペプチドの各々のアミノ酸配列をアラニンに置換したアナログペプチドを作成した(表1)。初めに、これらのアナログペプチドがHLA-A2分子に結合できるかどうかを検討した。

T2細胞はHLA-A2陽性人のリンパ球由来の細胞株であり、TAPを欠損しているため、内因性のペプチドを抗原提示できない。ペプチドを提示しないHLA-A2分子は構造的に不安定であり、膜表面からすみやかに除去される。一方、このT2細胞にHLA-A2結合ペプチドを添加することにより、細胞膜表面のHLA-A2分子が安定化するため、HLA-A2分子が膜表面に安定して表出されるようになる。この性質を利用して、ペプチドとHLA-A2分子との結合性を定量化することが可能となる。この方法を用いて、アナログペプチドとHLA-A2分子との結合性をワイルドタイプと比較した。図1

図1 T2細胞株を用いたHLA-A2とアナログペプチドとの結合実験 (文献⁵⁾より引用改変)

に示すように2番目のアミノ酸置換により、HLA-A2分子との結合性はほぼ消失し、2番目のアミノ酸が、HLA-A2分子との結合に重要であることが示された。

PDC-E2特異的CTLは、ワイルドタイプのペプチドを添加したT2細胞に対する特異的細胞障害性活性を示す。この特異的細胞障害性活性がアナログペプチド添加により抑制されれば、そのペプチドがアンタゴニストであることが証明できる。PDC-E2特異的CTLの抗原特異的細胞障害性活性が、各々のアナログペプチドを添加することにより抑制を受けるかどうか検討した。その結果、図2に示すように5番目のアミノ酸置換をうけたペプチドの添加により、抗原特異的細胞障害性活性が抑制された⁵⁾。また、PDC-E2特異的CTLはワイルドタイプのペプチドを添加すると、抗原特異的にIFN- γ を産生する。PDC-E2特異的CTLのIFN- γ 産生は細胞内染色を用いてFACsで可視化できる。図3に示すように、PDC-E2特異的CTLの抗原特異的IFN- γ 産生もまた、5番目のアミノ酸置換をうけたペプチド添加により抑制された。

おわりに

T細胞の抗原エピトープのアミノ酸を変異させたアンタゴニストペプチドが、PDC-E2特異的CTLのエフェクター作用である細胞障害性活性と、