

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：平成23年度～平成24年度

課題番号：23791103

研究課題名(和文) 自己免疫寛容破綻のメカニズムの解析—拡張抗原提示によるT細胞活性化機構の解明—

研究課題名(英文) Studies on the mechanism of the tolerance break of autoimmunity—Analysis of the T cells activation mechanism by epitope spreading—

研究代表者

澁谷 美穂子 (SHIBUYA MIHOKO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20366363

研究成果の概要(和文)：

3種類のTCRトランスジェニックマウスのCD4陽性T細胞(TEa・OT-II・2D2)を用いた実験系を構築し、Responder、Associatorとは別に特異抗原の存在しないThird partyを設定した実験を行った。これにより拡張抗原提示によるT細胞活性化の抗原特異性を証明出来た。また、各々のT細胞の役割を入れ替えて解析を行い、拡張抗原提示が特定の抗原特異的T細胞にのみ観察される現象でないことが証明された。

研究成果の概要(英文)：

We have investigated ‘Extended antigen presentation (EAP)’, a new mechanism of naïve T cell activation, using two pairs of cognate antigens and antigen-specific T cells, TEa and OT-II. In this project, we used third antigen-specific T cells; 2D2. With three T cells model, we proved antigen dependency and universality of EAP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：膠原病学・エピトープスプレディング

1. 研究開始当初の背景

<免疫学的背景>

自己免疫疾患ではDNAや免疫グロブリンなど自己成分に対する免疫反応が病態に関与している。現行の主要な治療法である副腎皮質ステロイドと免疫抑制剤は、薬剤が免疫応答全体を抑制してしまうため、時として致死的な感染症を引き起こすことが現在でも大きな問題となっている。より安全な副作用の少ない治療法の開発のためにも、自己免疫疾

患のさらなる病態解明が急務である。

自己免疫疾患における1つの特徴として、複数の自己抗原に対するT細胞およびB細胞レベルでの免疫応答が出現することが挙げられる。全身性エリテマトーデスでは核抗原、リン脂質、二本鎖DNA、SS-A、SS-B、RNP、Smなどの複数のアポトース細胞関連抗原に対する自己抗体が(Arbuckle M. R., N Engl J Med 349:1526-33, 2003)、関節リウマチではIgGのFc領域、BiP、gp39(Sean R. Bennett, Current Rheumatology Reports 5:255-263,

2003)に対する自己抗体が出現する。この多様な自己抗原に対する免疫応答の出現には、「エピトープスプレディング」と呼ばれる現象の関与が示唆されている。自己または外来の抗原に対する典型的な免疫応答は、通常その抗原内の1つか2つのエピトープに集中し、これをドミナントエピトープと呼ぶ。初期のエピトープ特異的な免疫応答から、サブドミナントエピトープへのエピトープの多様化はエピトープスプレディングと定義されている (Lehmann, P. V., Nature 358:155-157, 1992, Lehmann, P. V., Immunol Today 14:203-208, 1993)。慢性組織障害においてエピトープスプレディングが自己免疫を誘導しうることが報告されており (Vanderlugt, C. L., Nat Rev Immunol 2:85-95, 2002)、これらの研究では初期抗原刺激がウイルス感染・臓器拒絶・自己免疫に関わらず、炎症を惹起した抗原以外の自己エピトープに広がっていく。このエピトープスプレディングは、炎症を伴う組織障害時に、自己反応性 T 細胞が活性化されるであろうことを想定しており、自己免疫疾患成立のカギとなる現象だと考えられる。すなわち、エピトープスプレディングの機序の解明は、自己免疫応答の抗原特異的な制御を目指す上で非常に重要と考えられる。しかし、現象としての記載以外にエピトープスプレディングが自己免疫疾患の発症に直接関わることを示した研究はいまだなく、今後の解明のためには試験管内で解析できる良い実験モデルが必要と考えられる。

<申請者のこれまでの研究成果>

そこで申請者らはこのエピトープスプレディングの解析を行うことを目的に、抗原特異性の判明している2種類の T 細胞レセプター (TCR) トランスジェニックマウスの CD4 陽性 T 細胞を用いた実験系 (拡張抗原提示モデル、Two T cells model) を構築した。具体的には、マウス MHC クラス II 分子 I-E α 上のエピトープ (E α 52-68) に特異的な TE α T 細胞とニワトリオボアルブミン (OVA323-339) に特異的な OT-II T 細胞を用いた共培養系である。OT-II T 細胞を大量の OVA 抗原に反応して十分に増殖する Responder、TE α T 細胞をごく少量の E α ペプチドに反応する Associator とし、この二組の T 細胞と抗原を抗原提示細胞と共に、抗原量を種々に変化させて培養した。すると、E α ペプチドが少量で単独では Associator の TE α が殆ど分裂しない条件下でも、十分量の OVA ペプチド存在下に OT-II が強く分裂すると、TE α T 細胞は著明に分裂した。逆に OT-II を Associator、TE α を Responder としても Associator である OT-II T 細胞に同様の著明な分裂を認めた。

一般的に T 細胞の活性化に関与する刺激と

して、抗原特異的な刺激と抗原非特異的な刺激 (サイトカンや共刺激分子) の大きく二つが挙げられる。T 細胞の活性化を誘導する機序の一つとして知られている bystander activation は「ある抗原 X に特異的な T 細胞の活性化が、別の抗原 Y に対する免疫応答に伴って生ずること」と定義され、サイトカイン等の液性因子の影響が大きいと考えられている (Bangs, S. C., Trends Immunol 27:518-524, 2006)。そこで抗原特異的な刺激と抗原非特異的な刺激 (サイトカンや共刺激分子) の寄与の重要性を検討するために、MHC クラス II (I-A^b) と E α ペプチドの複合体に結合する抗体 (Y-A ϵ) を用いて TE α T 細胞への抗原提示の阻害を試みたところ、OT-II 増殖下の TE α T 細胞の分裂は著明に抑制された。また、液性因子の影響を一定にし細胞間接着を制限したトランスウェルを用いた実験でも Associator の TE α T 細胞の増殖は認められなかった。さらには少量の E α ペプチド存在下に Responder の OT-II の代わりに高濃度 IL-2 を添加しても TE α はほとんど分裂せず、Responder OT-II が産生する IL-2 だけではこの現象は説明できないと考えられた。

これらの結果より、抗原 X が大量に存在しその X に特異的な T 細胞が十分に増殖する条件下で、ごく少量しか存在しない抗原 Y に依存して Y 特異的な T 細胞が活性化する現象を観察した。また、抗原 X 以外の抗原 Y による刺激に依存性が高い点で、従来 of bystander activation とは異なる新しい活性化様式と考え、これを拡張抗原提示 ‘Extended antigen presentation (EAP)’ と命名した。拡張抗原提示では免疫反応を惹起した抗原とは異なる抗原に対する免疫反応が出現しており、自己免疫病態において観察されるエピトープスプレディングの基盤現象である可能性が考えられた。また、拡張抗原提示によって T 細胞を活性化する抗原濃度は通常の抗原提示によって T 細胞を活性化する濃度より約 10 倍低い濃度であり、その濃度での抗原提示細胞上の MHC の占有率は、まさに通常の自己抗原の占有率と同じオーダーであった。

上で示した実験で使用した OT-II 細胞は CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞を含んでいるが、CD25 陽性細胞を除去した OT-II を Responder として使用すると、OT-II の十分な分裂は変わらないにもかかわらず、Associator の TE α の分裂は著明に増強した。このことは特定の Responder に対する反応の特異性 (Associator は分裂せず Responder は分裂する) を、Responder と同じ特異性の制御性 T 細胞が保っていることを示唆しており興味深い。また制御性 T 細胞が抑制能を発揮する際の抗原特異性については意義が定まっていないが、制御性 T 細胞の抗原認識に拡張

抗原提示が関与している可能性もある。

2. 研究の目的

拡張抗原提示による T 細胞活性化のメカニズムを解明することである。

これまでに試験管内において、拡張抗原提示という免疫惹起抗原とは異なる別の抗原に特異的な T 細胞の活性化現象が存在することを確認した。そこで本研究では、以下の 3 項目について解析する。

- 1) 3 種類の抗原特異的な T 細胞を用いた拡張抗原提示モデルの解析
- 2) 拡張抗原提示に重要な役割を担う共刺激分子やサイトカインの試験管内における検索
- 3) 生体内での拡張抗原提示による T 細胞活性化と自己免疫疾患発症との関連の検討

3. 研究の方法

- 1) 3 種類の抗原特異的な T 細胞を用いた拡張抗原提示モデルの解析

拡張抗原提示はこれまで C57BL/6 マウスバックグラウンドマウスを使用し、MHCclass II I-Ab 上に提示される抗原に特異的な CD4 陽性 T 細胞、TEa と OT-II を用いて解析を行った。本研究では新たに 3 つ目の抗原特異的な T 細胞を用いて解析を行う。追加するのは MOG ペプチド(ミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白質 MOG35-55)特異的な 2D2 T 細胞である。これまでは Responder を OT-II とし Associator を TEa、もしくは Responder と Associator の OT-II と TEa を入れ替えた実験系で拡張抗原提示による Associator T 細胞の活性化を示した。これからは Responder や Associator に 2D2 を用いて、拡張抗原提示が起こることを示し、拡張抗原提示が特定の抗原特異的な T 細胞にのみ観察される現象でないことを証明したい。また、これまで抗原提示を阻害する抗体(Y-Ae)やトランスウェルを用いて、拡張抗原提示の抗原特異性について明らかにしてきたが、従来の拡張抗原提示モデルの実験系にまったく抗原刺激を有しない 3 つ目の T 細胞として 2D2 を共培養する実験系を構築する。この実験系では 3 種類の T 細胞は抗原濃度のみが異なっており、細胞間接着やサイトカインなどの液性因子の条件はまったく同じである。この実験において、抗原が多量にある Responder が十分に分裂し、かつごく少量の抗原が存在する Associator の分裂が増強する条件下で、この 3 つ目の抗原がない T 細胞が分裂しなければ、拡張抗原提示によ

る T 細胞活性化の抗原特異性をさらに確認することができると考えている。またこの 3 種類の T 細胞を共培養する実験系(Three T cells model)においても各々の役割を入れ替えて解析することで、拡張抗原提示モデルの普遍性を検証する。

- 2) 拡張抗原提示に重要な役割を担う共刺激分子やサイトカインの試験管内における検索

In vitro で観察された拡張抗原提示による T 細胞の活性化には抗原提示が必須であるが、通常の抗原刺激で T 細胞が活性化する抗原濃度よりも 10 倍程度低い抗原濃度で活性化が生じていた。この低い抗原濃度での T 細胞の活性化には、活性化を補助および増強する抗原提示細胞上の共刺激分子やサイトカインの関与が想定され、これらを特定することを目的とする。すでに細胞傷害性 T 細胞を誘導する機能を抗原提示細胞に付与するライセンシングを担う分子である CD40L についてブロック抗体を用いて拡張抗原提示に対する影響を検討したところ、拡張抗原提示は部分的にのみ抑制された。今後検討予定の共刺激分子としては T 細胞活性化に関連する B7-1、B7-2、ICOSL、OX40、4-1BB などを候補に想定している。サイトカインについては特に T 細胞の分裂に重要な STAT5 を介して T 細胞の活性化に関連するサイトカイン、IL-2、IL-4、IL-7、IL-15、IL-21 などを候補に考えている。具体的なシグナルが判明すれば特定の分子を阻害することにより、複数の自己抗原に対する免疫応答の進行を阻害できる可能性があり、重要な検討課題と考えられる。

- 3) 生体内での拡張抗原提示による T 細胞活性化と自己免疫疾患発症との関連の検討

拡張抗原提示が、疾患の発症に本当に関与するかどうかを検討することは重要である。生体内で実際に拡張抗原提示による T 細胞の活性化がおこるのか、また拡張抗原提示によって自己免疫疾患が発症するかを検討する。まずは生体内で拡張抗原提示による T 細胞の活性化を示す。具体的には Thy1.1 マウスに TEa T 細胞と OT-II T 細胞を移入し、E α ペプチドと OVA ペプチドの抗原濃度を種々に変化させて免疫し、拡張抗原提示による Associator T 細胞の活性化を FACS にて解析する。

自己免疫疾患発症の検討には 2D2 マウスを用いた実験的自己免疫性脳脊髄炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)モデルを予定している。具体的には、Rag1 ノックアウトマウスに 2D2 T 細胞と TEa T 細胞もしくは OT-II T

細胞を移入し、MOG ペプチドと E α ペプチドもしくは OVA ペプチドの抗原濃度を種々に変化させて免疫し、実験的自己免疫性脳脊髄炎発症モデルを作成する。臨床症状は EAE スコアで、拡張抗原提示によって活性化した T 細胞の中樞神経浸潤は組織学的に評価する。拡張抗原提示によって疾患が惹起されることが示されれば、炎症に伴う自己抗原特異的な免疫寛容の破綻が初めて証明されることになり、その意義は大きいと考えている。また拡張抗原提示による疾患発症モデルが確立した場合には、2) で同定した共刺激分子やサイトカインの抗体などによる生体内での阻害により、疾患への予防・治療効果がみられるかどうか検討する。これらの検討により、自己免疫疾患制御への新たなアプローチの提示が可能である。

4. 研究成果

1) 3 種類の TCRTg マウスの CD4 陽性 T 細胞 (TEa, OT-II と 2D2) を用いた実験系 (Three T cells model) を新たに構築し、Responder、Associator とは別に特異抗原の存在しない Third party を設定した。十分量とごく少量の特異抗原存在下に Responder と Associator T 細胞が強く分裂するような培養条件において、特異抗原の存在しない Third party の T 細胞は分裂を認めなかった。この結果より、拡張抗原提示による T 細胞活性化には特異抗原が必要であることを証明出来た。また、各々の T 細胞の役割を入れ替えて解析を行い、拡張抗原提示が特定の抗原特異的 T 細胞にのみ観察される現象でないことも証明された。

2) 拡張抗原提示に重要な役割を担う少量の抗原刺激を増幅する因子を検索した。共刺激分子である ICOSL、OX40 については、拡張抗原提示に関する寄与は見出せなかった。

3) 生体内での拡張抗原提示による T 細胞の活性化や、自己免疫疾患の発症への関与を検討するために in vivo の実験系を構築しつつある。

多様な自己抗原に対する免疫応答の出現は自己免疫疾患の特徴であるが、拡張抗原提示による T 細胞の活性化はその免疫学的基盤の一つと考えられるエピトープスプレディングの細胞レベルでの現象である可能性が考えられる。本研究では拡張抗原提示の抗原特異性と普遍性が証明され、自己免疫疾患の発症や病勢に拡張抗原提示による T 細胞の活性化が関与している可能性を示唆する重要な結果と考えられる。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 澁谷美穂子 : 特異抗原が存在しないと拡張抗原による T 細胞の活性化は起こらない、日本免疫学会、2011 年 11 月 29 日、幕張メッセ
- ② Mihoko Shibuya : Without cognate antigens T cell proliferation induced by 'Extended antigen presentation' was not observed, 第 8 回国際自己免疫疾患学会議、2012 年 05 月 12 日、Palacio de Exposiciones y Congresos de Granada、スペイン

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
澁谷 美穂子 (SHIBUYA MIHOKO)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 : 20366363
- (2) 研究分担者 なし
- (3) 連携研究者 なし