

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670229

研究課題名(和文)獲得免疫システムの起源と進化

研究課題名(英文)Origin and evolution of the adaptive immune system

研究代表者

西住 裕文(Nishizumi, Hirofumi)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：30292832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物には、一度感染した病原体に対して抵抗性を持つ「獲得免疫」が備わっている。原始的な脊椎動物である無顎類の免疫系を調べることによって、獲得免疫システムの起源とその進化を理解しようと試みた。本研究では、無顎類のヌタウナギにおいて自己に反応する抗体を排除する負の選択機構が存在することを示すとともに、MHCに相当する候補分子としてアロ白血球抗原を同定することに成功した。この研究成果は、獲得免疫の理解やMHC分子の進化的な起源に迫るのみでなく、クローン選択説の自己免疫寛容のメカニズムを再考する上で重要な知見であり、将来的には組織移植時の拒絶反応や自己免疫疾患の理解にも繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：All vertebrates possess adaptive immune systems that can detect and inactivate non-self-antigens through a vast repertoire of antigen receptors. Unlike jawed vertebrates, the hagfish utilizes variable lymphocyte receptors (VLRs) that are unrelated to immunoglobulin molecules but are diversified by copy-choice gene conversion mechanism. Here, we report that hagfish VLRs react with allogenic leukocyte antigens but not with self-antigens. We found that a highly polymorphic membrane protein, NICIR3, is recognized by VLRs as an allogenic leukocyte antigen (ALA). In a serological cross-reactivity test, a close correlation was observed between the amino acid differences in the protein sequences and the VLR cross-reactivities. This leukocyte antigen was predominantly expressed in phagocytic leukocytes, where it was associated with phagocytosed protein antigens. These findings suggest that a polymorphic leukocyte antigen, NICIR3/ALA, plays a pivotal role in jawless vertebrate adaptive immunity.

研究分野：分子生物学

キーワード：無顎類 抗原受容体 VLR 自己抗体 アロ白血球抗原 MHC 獲得免疫 進化

1. 研究開始当初の背景

生体内に侵入する病原体を認識し排除する免疫系は、自然免疫と獲得免疫に大別される。自然免疫は生物全般に備わっており、遺伝的に決まった Toll 様受容体や酵素群を用いて病原体の共通部分を認識し排除する (Medzhitov and Janeway, 2002; Akira et al., 2006)。一方獲得免疫は、脊椎動物からその存在が確認されており、体細胞において遺伝子再編成を行って多様な抗原受容体を創出し、無数の外来抗原を認識し排除するとともに、一度感染した病原体を記憶し、抵抗性を獲得する。従って獲得免疫システムの鍵は、どうやって多様な抗原受容体を用意するかにある。魚類以降の高等生物は、V(D)J 組換えと呼ばれる遺伝子再編機構を用いて immunoglobulin (Ig) タイプの抗原受容体を用意する。一方、原始的な脊椎動物である無顎類は、我々の研究などから、copy choice に似た遺伝子再編機構を用いて、Leu rich repeat (LRR) 配列を有する variable lymphocyte receptor (VLR) を抗原受容体として用意することが近年明らかになった (Pancer et al., 2004; Nagawa et al., 2007)。両獲得免疫システムにおいて、全く異なる抗原受容体を独自の遺伝子再編成機構により多様化していることは非常に興味深い。

抗原受容体の遺伝子再編成による多様化は抗原非依存的に行われるため、自己に反応する抗原受容体も出来る。そこで自己を認識する抗原受容体を排除するシステムが必要となる。Ig タイプの抗原受容体を発現するリンパ球は、胸腺や骨髄等の一次リンパ組織で選択が行われ (Cooper et al., 1965; Roitt et al., 1969)、特に T リンパ球は胸腺で MHC 分子を介して正・負の選択が行われることで成熟することが知られている (Zinkernagel and Doherty, 1973)。それに対し無顎類は、胸腺に相当する組織が存在せず、自己抗原を認識する抗原受容体を排除するシステムはないのではないかというモデルが提唱されている (Boehm and Bleul, 2007)。しかし、我々の研究により明らかになった VLR 遺伝子の再編成機構を勘案すると (Nagawa et al., 2007)、自己に反応する VLR が遺伝子再編成によって偶然に生じる可能性が十分ある。また最近我々は、無顎類ヌタウナギ血清中に含まれる分泌型 VLR-B タンパク質の中に、自分の白血球には反応しないが、同種異個体の白血球に反応するものが存在することを見出した。従って無顎類においても、自己抗原に対する抗原受容体 VLR を排除、あるいはその機能を抑えるシステムが存在する筈だと考えるに至った。

2. 研究の目的

脊椎動物には、一度感染した病原体に対して抵抗性を持つ「獲得免疫」が備わっている。魚類から哺乳類までの有顎類では、Ig タイプの抗原受容体を発現するリンパ球が中心となって高次免疫機能を発揮していることが

広く知られている。それに対して原始的な脊椎動物である無顎類は、近年の研究から、LRR 配列を有する VLR が遺伝子再編成され、抗原受容体として機能することが少しずつ明らかになってきた。本研究では、獲得免疫システム成立の為に重要な次の命題である、自己反応性抗原受容体の排除の分子機構を解明することを目指す。更に、無顎類の研究で得られた成果を高等動物である有顎類のこれ迄の知見と比較することで、獲得免疫システムの起源と進化に迫ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) アロ白血球抗原の同定

我々の予備実験から、無顎類ヌタウナギ血清中に含まれる分泌型 VLR-B の中に、同種異個体の白血球を認識するアロ白血球抗原 (allogenic leukocyte antigen: ALA) が存在することが示唆されていた。白血球抗原が糖鎖抗原の可能性を疑い、糖鎖切断酵素処理を行って VLR-B とアロ白血球との交差反応性を調べたが、VLR-B の反応性に変化は見られなかった。一方、タンパク質分解酵素処理を行うと抗原性が消失した。以上の結果は、VLR-B が白血球に発現し多型性を持つ膜タンパク質を白血球抗原として認識している可能性を強く示唆する。そこで本研究では、ヌタウナギ白血球の cDNA ライブラリーから、白血球で高発現し、多型性を持つ膜タンパク質をコードする遺伝子を探索した。

(2) リンパ球が選別される場の探索

自己反応性 VLR が遺伝子再編成によって偶然作られた場合、何らかの選別がリンパ球の分化の過程で起こっていると考えられる。無顎類には、哺乳類におけるリンパ球選別の場である胸腺に相当する組織は見つかっておらず、もし選別が行われているとしても、何処でそれが起こっているかについても明らかにする必要はある。無顎類の幼生では、腸管の中に盛り上がっている腸内縦隆起と呼ばれるところでリンパ球が作られている事が分かっており、この組織において何らかの選別が行われている可能性が高い。また無顎類の成体では、原始骨髄や腸管でリンパ球の産生と選別が起こっている可能性が報告されている。そこで本研究ではこれらの組織に注目し、ALA を発現する白血球がこれらの組織に集積していないかを *in situ* hybridization 法や免疫染色法により調べた。

(3) ALA が抗原提示分子である可能性の検証

無顎類において MHC 様の分子の存在は報告されておらず、現在までのところ、どのような分子がどのような機構で VLR リンパ球の選択にかかわっているか全く不明である。そこで本研究では、無顎類ヌタウナギに外来抗原を免疫し、白血球が外来抗原を貪食した時に、ALA が抗原提示に関わる可能性について検証した。

4. 研究成果

(1) 無顎類ヌタウナギ血清中に含まれる分泌型 VLR-B の中に、同種異個体の白血球を認識するアロ白血球抗原(ALA)が存在することが我々の予備実験から示唆されていた。また、ALA は白血球に高発現し、多型性を有する膜タンパク質であろうと想定された。そこでヌタウナギ白血球の cDNA ライブラリーを作成し、白血球で高発現し、多型性を持つ膜タンパク質をコードする遺伝子を、マイクロアレイ法等を駆使して絞り込んだ。その結果、以前 NICIR3 という名前で報告されていた、多型性に富む膜タンパク質が、ALA ではないかと考えられた。複数のヌタウナギ個体を用いて血清学的な交差試験を行ったところ、VLR-B とアロ白血球の交差反応性が ALA の多型具合に依存していることが明らかとなった。更に、アロ白血球抗原の候補分子に対する抗体を作製し、予め中和抗体として抗体を白血球に振り掛けておくと、VLR-B による交差反応性が無くなったことから、この分子が ALA であると結論づけた。

(2) 自己の ALA に反応する VLR が遺伝子再編成によって偶然作られた場合、何らかの選別がリンパ球の分化の過程で起こっていると考えられる。そこで、哺乳類における胸腺のように、無顎類のどこでリンパ球の選別が行われているかを免疫組織学的な解析を駆使して解析した。ALA と共に VLR-A や VLR-B が集積している場所を、ヌタウナギ全身に渡って免疫染色法により解析した結果、小腸にある造血巣(hematopoietic nest)がその場らしいことを見出した。

また、無顎類において MHC 様の分子の存在は報告されておらず、VLR リンパ球の選別機構は全く不明である。無顎類における ALA が、有顎類における MHC と相同の機能を有すると想定し、ALA が抗原提示分子である可能性について検証した。まず無顎類ヌタウナギに外来抗原(BSA や KLH など)を腹腔投与して免疫し、白血球に外来抗原を取り込ませた。免疫電子顕微鏡観察により調べたところ、外来抗原を貪食したマクロファージの中で、外来抗原と ALA が近接して局在していることを見出した。また、PLA 法や免疫沈降法によって、外来抗原が ALA と相互作用していることを生化学的に示すことに成功した。

(3) 外来抗原と ALA の間に相互作用が認められたので、外来抗原が白血球に貪食され、ALA と共に細胞膜上に提示されるプロセスを、免疫染色法等を駆使して経時的に観察しようとした。しかし現在までに、ヌタウナギの白血球細胞株は存在せず、初代培養系も上手く行かなかったため、経時的な観察は出来なかった。

また、ALA の生体内での機能を解析するために、ヌタウナギで ALA を欠損させる事に

挑戦した。ヌタウナギでは、特定の遺伝子をノックアウトする技術は未だ開発されていないので、末梢血より調精した白血球を用い、RNAi によって ALA をノックダウンした場合、白血球に貪食した外来抗原を膜上に提示する機能がなくなるかを調べようと試みた。しかし前述したように、ヌタウナギ白血球細胞の初代培養系技術が確立していないこともあって、残念ながら研究期間内に結果を出すことが出来なかった。

本研究では ALA の生体内での生理機能解明までは至らなかったが、ALA の同定を始めて得られた研究成果は、自己反応性 VLR がどの様にして排除されるかを明らかにする手掛かりとなる重要なものであった。今後 ALA の更なる機能解析を行うことで、獲得免疫の成り立ちや進化の起源を理解出来るようになると共に、将来的には、組織移植時の拒絶反応や自己免疫疾患の原理解明に繋がる事が大いに期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

H. Nishizumi and H. Sakano: Decoding and deorphanizing an olfactory map. *Nature Neuroscience*, **18**, 1432-1433 (2015)、査読有
DOI: 10.1038/nn.4121.

H. Nishizumi and H. Sakano: Developmental regulation of neural map formation in the mouse olfactory system. *Developmental Neurobiology*, **75**, 594-607 (2015)、査読有
DOI: 10.1002/dneu.22268.

H. Takaba, T. Imai, S. Miki, Y. Morishita, A. Miyashita, N. Ishikawa, H. Nishizumi, and H. Sakano: A major allogenic leukocyte-antigen in the agnathan hagfish. *Scientific Reports*, **3**, 1716 (2013)、査読有
DOI: 10.1038/srep01716.

〔学会発表〕(計2件)

H. Nishizumi and H. Sakano: Circuit formation of mitral/tufted cells in the mouse olfactory system. The 13th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception, Nov.3-4 (2015), 九州大学(福岡市).

H. Nishizumi and H. Sakano: A proximity model for synapse formation of mitral cells in the olfactory bulb. European Chemoreception Research Organization 24th Congress, Sep.10-13 (2014), Dijon (France).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況（計0件）

〔その他〕

高等生物の繁栄の鍵「獲得免疫システム」の
起源に新たな知見

<https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2013/17.htm>
1

高等生物繁栄の鍵「獲得免疫システム」の起
源

<https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/story/newsletter/45/3.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

西住 裕文（NISHIZUMI, Hirofumi）

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：30292832

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし