

論文の内容の要旨

論文題名 無顎類ヌタウナギにおける抗原受容体の負の選択と免疫寛容成立機構の解明

Investigation of Negative Selection and Immune Tolerance Mechanisms for Antigen Receptors in the Agnathan Hagfish

氏名 高場 啓之

要旨 4000 字

免疫系は全ての生物が持つ、生体内に侵入してきた病原体を認識して除去する生体を保護する機構である。この免疫系は自然免疫機構と獲得免疫機構の二つに大別できる。自然免疫はほぼ全ての生物が所持しているが、獲得免疫は脊椎動物以上の生物が所持する高次の免疫機構である。獲得免疫はリンパ球と呼ばれる細胞の抗原受容体を中心に働く機構である。脊椎動物の中で魚類から哺乳類までの有顎類は、immunoglobulin (Ig)型の抗原受容体を用いて獲得免疫を機能させている。一方、無顎類の獲得免疫系では variable lymphocyte receptor (VLR)と呼ばれる自然免疫で用いられる Toll 様受容体に似た構造をもつ抗原受容体が用いられている。Ig 及び VLR 共に、どちらの抗原受容体も生後、体細胞に於て遺伝子の再編成を行うことで多様な受容体をつくりだしている。この遺伝子多様化は抗原非依存的にランダムな遺伝子再編によって起こるので、自身の成分に反応するようなものが含まれる。このような受容体は Burnet のクローン選択説に従えば、末梢に放出される前に除去(負の選択)される必要がある。有顎類では、自己抗原に対する免疫寛容を確立する為に、リンパ細胞の負の選択が知られているが、無顎類の VLR に対して同様の選択があるのかどうか未だ不明である。

本研究では無顎類ヌタウナギの抗体である VLR-B と白血球を用いた血清学的試験を行い、VLR の負の選択が機能しているかどうかを検証した。その結果、VLR-B は同種異個体の白血球に反応するが自己の白血球には反応しないことが見いだされた。これらの結果は、ヌタウナギの VLR においても負の選択が存在し、免疫寛容が成立していることを示している。次に我々は、同種異個体の白血球に対して VLR-B の認識する抗原の同定を試みた。血清学的試験の結果から、白血球抗原は膜抗原であることが示唆された。この抗原性は、糖鎖処理を行っても消失せず、タンパク質分解酵素処理によって消失した。従って、多型性の高い膜タンパク質が抗原であると考えられた。我々は、白血球の EST ライブラリーから作製したカスタムマイクロアレイ解析による膜タンパク質遺伝子をスクリーニングした。その

結果、allogeneic leukocyte antigen (ALA)を同定した。ALA は多型性の非常に高く、イムノグロブリン型(VドメインとCドメインを一つずつ持つ) 膜タンパク質であった。

複数個体のヌタウナギの血清(VLR-B)と白血球を用いた血清交差反応テストの結果、ALA のハプロタイプの違いの程度に依存して交差反応性が正の相関を示すことが見いだされた。また、ハプロタイプが異なる個体のALA を合成した293細胞において、自己由来のVLR-B は自己のALA を認識しないが、他個体のALA に対しては認識することを示した。以上の結果から、ALA はVLR-B の主要抗原であることが示唆された。

次にALA に対する抗体を作製し、末梢血についてフローサイトメトリー解析を行った結果、赤血球ではALA は発現していないが、白血球では発現していることが判った。さらに、白血球の中でもミエロイド系の細胞(単球や顆粒球)で高く発現していることが判った。我々は、スカシ貝ヘモシアニン(KLH)を抗原として腹腔に注射した1日後、末梢のALA 陽性白血球がKLH を10%程取り込んでいることを確認した。また、共焦点顕微鏡の解析から、細胞内のALA とKLH の分布が一致していることを観察した。別の実験で、取り込まれたKLH はリソソームに局在していることが判った。これらの結果から、ALA は白血球に取り込まれたKLH 抗原とリソソームで共局在していることが示唆された。このALA とKLH がどの程度共局在をしているかを測定する為に、我々は、proximity ligation assay(PLA)と呼ばれる解析方法を用いた。PLA とは二種類のタンパク質が相互作用している場合、それらを認識する特異抗体を用いて二種類のタンパクの共局在を可視化する方法である。マウスの単球・マクロファージの細胞株であるRAW264細胞にALA、VまたはCドメインを欠損させたALA を発現させて、KLH を取り込ませた場合にALA とKLH が近接しているかどうかを確認した。すると、Vドメイン、Cドメインを欠損したALA ではKLH との局在は見られず、ALA の全長を発現させた場合のみKLH との局在が検出された。これらの結果はKLH のみでなく卵白アルブミン(OVA)やウシ血清アルブミン(BSA)においても再現された。次に、ヌタウナギの腹腔にタンパク抗原KLH、OVA、BSA を投与した場合、末梢血の白血球でPLA 解析を行った。すると、10%の白血球でALA とタンパク抗原の共局在が検出された。以上の結果から、ALA とタンパク抗原はリソソームで相互作用している関係であると示された。さらに、我々はヌタウナギの末梢血白血球を培養し、タンパク抗原(KLH、OVA、BSA)と1時間共培養した後、細胞を洗浄しタンパク抗原を除いた後のALA とタンパク抗原の局在を確認した。すると、共培養一時間では細胞内でALA とタンパク抗原との相互作用が検出され、膜上では検出されなかった。しかし、抗原を除いた後の更に4時間の培養後、PLA を行うと膜上でALA とタンパク抗原の相互作用が検出された。以上の結果から、ALA がタンパク抗原と膜上でも相互作用出来る位置に存在することが示唆された。今回、無顎類のヌタウナギにおいて抗体として機能しているVLR-B と白血球を用いた血清学的試験からアロ白血球抗原の存在を見出した。我々はアロ白血球抗原をスクリーニングした結果、非常に多型性のある一型膜たんぱく質であるALA を同定した。さらに、ALA はVLR-B における主要なアロ白血球抗原であることが示された。ALA はイムノグロブリン様

受容体であり細胞膜外に V、C ドメインを一つずつもち、立体構造は T 細胞受容体に似ている。また ALA の細胞内領域には ITAM ドメインが存在した。このドメインを持つ受容体はリガンドと結合した際に、細胞内に活性化シグナルを入れ、細胞増殖、生存、分化にかかわっていることが知られている。従って、ALA はリガンドと結合した際、細胞内に活性化シグナルを入れている可能性がある。ALA は細胞膜外に多型が存在し、予測立体構造上一方向に片寄りがあることから、多型の部分でリガンドとの相互作用があると考えられる。ALA のアミノ酸配列を詳細に解析した結果、C 末の膜貫通領域近辺は有顎類の MHC class Ia と相溶性が高く保存されていることが判った。有顎類の MHC 分子は多様なペプチドと結合し提示することが知られている。MHC 分子は個体間で多型性が知られており、この多型によって個体間で病原菌に対する免疫応答の強度が異なることが知られている。MHC の多型性は病原菌の多様なペプチドとの結合親和性を変化させ、集団として感染からの種の保存のため出来上がったと考えられている。今回我々は、いくつかの可溶性タンパク質・ペプチドと ALA との相互作用を示唆した。これらの結果から、ALA はタンパク質・ペプチドの認識能、プロセッシング、または他細胞への情報伝達(ペプチド提示) 能を持つことを示唆している。

抗原受容体は生まれた後、抗原の感さ以前にランダムに創り上げられることが知られている。この際、自己成分に反応するものが創られた場合があるが、その抗原受容体は除去される必要がある。有顎類の場合、抗原受容体の選択は外来抗原の非存在下で行われる。T 細胞受容体は胸腺において選択され、B 細胞受容体は骨髄やファブリキウス嚢といったリンパ組織で選択が行われる。特に T 細胞受容体は胸腺で MHC 分子を介してポジティブセレクション(正の選択)とネガティブセレクション(負の選択)を行うことで創り上げられることがよく知られている。また、外界から病原菌の感染があった際、リンパ組織でアクセサリー細胞(例、樹状細胞)を介して特定の T 細胞が活性化されることが知られている。無顎類のヌタウナギにおいて主要白血球抗原 ALA が MHC 分子のようにリンパ組織で抗原受容体の選択にかかわっているかは未だ判っていない。これまでに、ヤツメウナギ幼生の鰓において胸腺様組織が報告され、VLR-A リンパ球の選択の可能性が示唆されている。考えられるシナリオの一つとして ALA がタンパク質・ペプチドの複合体を VLR に提示することで自己反応性の VLR リンパ球の選択や活性化をしている可能性がある。

進化における適応免疫の獲得は生物学的に大きな出来事である。獲得免疫は 5 億年前のカンブリアの大爆発のころに出来上がったシステムだと考えられている。獲得免疫の特徴は、リンパ球が生後抗原受容体を多種多様に創り出し、新規の病原菌に対しても特異的に応答することができる点である。さらに、一度侵入してきた病原菌は記憶をしており、二度目の侵入では速やかに応答することが可能な点である。現在、全ての脊椎動物で獲得免疫があることが知られているが、無顎類は遺伝子変換により創られた独自の抗原受容体 VLR をもつ。一方、有顎類の場合、RAG1/2 を介した VDJ 組み換えによって多種多様なイムノグロブリン抗原受容体を創り上げて感染に備えている。このシステムの違いは、5 億年前に一

つのイムノグロブリン受容体遺伝子にトランスポゾンが入り込んだことによるものであると考えられる。しかしながら、どちらの獲得免疫システムも生後ランダムに創り上げられる抗原受容体の中で、自己成分に反応するような抗原受容体は確率論的に出来てしまうので、外来抗原の感さ以前に予め除去されなければならない。今回、ヌタウナギにおいて、MHCの配列が保存された主要抗原 ALA が見つかったことは、今後免疫寛容のメカニズムを知る上で大きな手がかりになるかもしれない。1950年代 Burnet が獲得免疫システムの原理をクローナル選択説として提唱してきた。クローナル選択説の中でも、個体内での抗原特異的なリンパ球の免疫寛容の成立は、獲得免疫の成立において必須な要素である。我々の今回の発見は脊椎動物の獲得免疫の起源のみでなくクローナル選択説の免疫寛容を再考する重要な知見になるであろう。 3923 字