

「T 細胞クローンの抗原認識と応答の多様性 ; APL を用いた研究により明らかとなった T 細胞応答の本質」、西村 泰治、実験医学増刊号「免疫研究の新たな展開」、笹月健彦監修、羊土社（東京）、17(12):124-136、1999 年

サマリー : T 細胞が認識する抗原ペプチドにアミノ酸置換を導入した APL(altered peptide ligands) に対する T 細胞応答の研究により、T 細胞が認識するペプチドとその後の T 細胞応答は、決して単一ではなく多様であることが明らかとなった。この現象は T 細胞レセプター (TCR) とリガンドのユニークな結合特性に起因し、APL はこれを変化させることにより TCR を介したシグナル伝達を変化させ、T 細胞応答を修飾する。このような T 細胞応答の多様性に関する知識が、複雑な T 細胞の分化と応答の分子機構の解明に大きな貢献をもたらしつつある。

はじめに : 従来、T 細胞が認識する抗原の特異性は厳密に保たれていると考えられてきたが、抗原ペプチド上のアミノ酸残基を置換したアナログ (altered peptide ligands; APL) に対して、T 細胞はこれまでに記載されたことのないユニークな応答を示すことが明らかとなった。さらにこのような応答は T 細胞の活性化に関わるシグナル伝達系の変化を伴っており、単に T 細胞による抗原識別機構の詳細な解析にとどまらず、T 細胞の免疫応答の本質の解釈にまで切り込むユニークな研究分野が展開されつつある。その成果は、な

ぜ T 細胞が非自己抗原が存在しない胸腺で分化をとげ、非自己抗原への特異性および自己に対するトレランスを獲得するのか、非自己抗原の存在しない状況下でも非自己抗原に特異的な T 細胞が長期にわたって生存し、抗原に対する記憶 (メモリー) を維持できるのか、自己免疫疾患でトレランスが破綻するのはなぜなのか、といった問題に重要な手掛かりを提供しつつある。

本稿では、APL を利用して得られた MHC・ペプチド複合体と T 細胞レセプター (TCR) との相互作用と、その後の T 細胞活性化に関する研究成果を紹介し、その意義について考えてみたい。なお MHC と結合ペプチドの構造と機能の詳細については、他に記したので参照されたい[1]。

1. TCR による MHC・ペプチド複合体認識の分子機構 HLA-A2 分子と HTLV-I Tax ペプチド (LLFGYPVYV) の複合体を特異的に認識する T 細胞傷害性 T 細胞 (CTL) クローン A6 の TCR 分子が単離され、3 分子複合体の立体構造が解明された。図 1 に示すように、TCR・V 鎖は、HLA-A2 の 2 ドメインの ヘリックス部分と抗原ペプチドの N 末端寄りの半分を、また TCR V 鎖は 1 ドメインの ヘリックス部分と抗原ペプチドの C 末端寄りの半分を識別していることが明らかとなった。このように TCRV および V 鎖が、MHC・ペプチド複合体の表面を、あたかも対角線で分断するかのように分担して認識している様相を diagonal recognition と呼ぶ。さらに TCR V および V 領域の相補性決定部位 complementarity

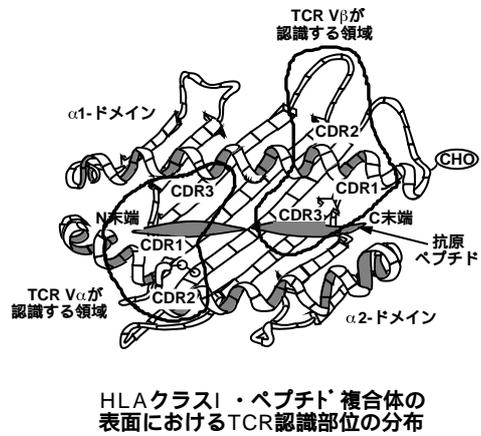
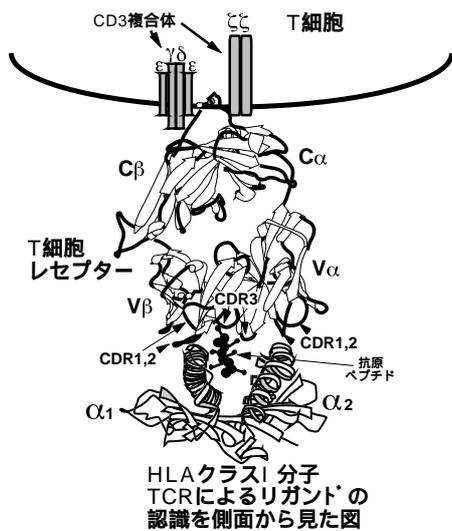


図 1. T細胞レセプター(TCR)によるHLAクラスI・ペプチド複合体の認識 (文献2より改変)
 細胞傷害性T細胞が発現する 型T細胞レセプター (TCR) は通常、自己のHLAクラスI分子と非自己ペプチドの複合体を認識する。このようなペプチドの多くは9個のアミノ酸からなり、図の右に示すようにHLAクラスI分子の先端のペプチド収容溝に結合する。この際に、TCR 鎖可変領域 (TCRV) はHLAクラスI分子の 2ドメインと抗原ペプチドのN末側を、またTCRβ鎖可変領域 (TCRVβ) はHLAクラスI分子の 1ドメインと抗原ペプチドのC末側を認識する。TCR可変領域の相補性決定領域 (complementarity determining region; CDR)-2 は、主にHLAクラスI分子と、またCDR3は抗原ペプチドと接触するような位置関係にある。CDR1はペプチド収容溝の側壁をつくる2本の α-ヘリックスの間に収まり、ペプチド、HLAの両方を認識できる。TCRにはCD3複合体 (γ, δ, ε, ζ, η 鎖からなる) が会合し、TCRの細胞表面への発現とTCRを介したシグナル伝達に必須の役割を担っている

determining region(CDR) 1 および 2 は、主に MHC クラス I の ヘリックス部分と、また CDR3 のほとんどと CDR1 の一部は、ペプチドと接触する位置関係にある。ペプチドの中央に位置するチロシン (Y) は、TCR,V および V 領域の 2 つの CDR3 により構成される疎水性の高いポケットに収容されている。

さらに、同グループは別のドナーから樹立された A6 とまったく同じ特異性を有する CTL である B7 に由来する TCR と、そのリガンドの複合体の立体構造を決定した。B7 TCR は A6 TCR とは、リガンドとの結合に関わる 17 個のアミノ酸残基のうち 16 個までが異なるが、A6 TCR とほとんど同様の diagonal recognition によりリガンドを認識した [2]。TCR がリガンドと diagonal binding mode で結合する理由に関してはまだ解明されていないが、他の coreceptor との結合あるいは、三者複合体のオリゴメライゼーションにとって必要である可能性が考えられる。

TCR の定常領域の構造は、TCR 単独の場合とリガンドと結合した TCR の場合とで、ほとんど差が認められなかったが、V 鎖には変化が認められた。しかし、この変化は TCR リガンドへの best fit をもたらす程度のものであり、TCR のコンフォメーションの変化を介して、シグナル伝達を誘導するとは考えにくい程度のものであった。マウスの MHC クラス II と TCR の結合に関しても同様の観察が蓄積されつつある。

2. MHC・ペプチド複合体の微細な変化に

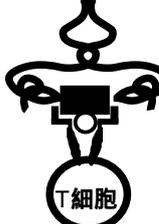
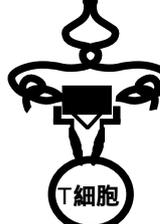
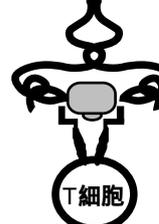
基づく T 細胞応答の変化

適切な MHC・ペプチド複合体(アゴニスト)を認識した T 細胞では、TCR に会合している TCR 鎖や ZAP-70 などのリン酸化を介して、種々の転写因子が活性化されサイトカインの分泌や細胞の増殖が始まる。この T 細胞の活性化は、従来 on / off 型のものと考えられてきた。ところが近年、T 細胞は APL を認識して、これまでにないタイプの応答を示すことが明らかにされた [3] (表 1)。

1) TCR **アンタゴニズム** MHC クラス I あるいはクラス II 分子により提示された APL のあるものは、TCR に認識されるが CD8+ あるいは CD4+ T 細胞クローンを活性化せず、過剰な APL の共存下に、T 細胞の野生型ペプチドに対する応答は抑制される。このような活性をもつ APL は、MHC へのペプチドの結合を競合的に阻害するために必要な濃度より、はるかに低い濃度で T 細胞クローンの野生型ペプチドに対する応答のみを特異的に抑制することより、TCR アンタゴニストと呼ばれる。アンタゴニスト APL を認識した T 細胞は、特にアナジーなどのトレランスの状態に陥ることもなく、再び MHC 分子により野生型ペプチドが提示されれば通常の応答を示す。この現象は、T 細胞上の TCR が抗原提示細胞上の MHC 分子により提示された多数のアンタゴニストを認識することに翻弄され、アゴニストを認識して完全な活性化シグナル(後述)を送るチャンスが小さくなるために生じると考えると理解しやすい。このような

表1 T細胞レセプターのリガンドの微細な変化に基づくT細胞応答の変化

(文献3ほかより)

T細胞レセプターのリガンドの性質	完全なアゴニスト	部分的アゴニスト	アンタゴニスト	無関係なリガンド
MHC分子				
T細胞レセプターのMHC-ペプチド複合体への結合	強い	中等度	弱い	なし
CD3と鎖とZAP70の活性(リン酸化)	完全	不完全	不完全	なし
細胞内カルシウム濃度の増加	大きい	中等度	小さい	なし
細胞容積の増加と膜蛋白(LFA-1など)の発現増強	強い	中等度*	なし	なし
リンホカインとその受容体遺伝子の発現	あり	部分的*にあり	なし	なし
細胞増殖	あり	なし	なし	なし
TCRアンタゴニズムの発現	なし	強い	弱強	なし

抗原ペプチド上のアミノ酸残基を他のアミノ酸に置換したAPLとMHC分子の複合体、あるいは軽微な多型を有するMHC分子と抗原ペプチドの複合体をT細胞クローンが認識した際に、T細胞の応答に質あるいは量的な変化が生じる場合がある。*：カルシウム応答のパターンの変化ならびに反応細胞数の減少も報告されている**：部分的アゴニズムにより発現するT細胞応答は、他にも多数報告されている(詳細は表2参照)。

TCR アンタゴニズムは、APL および TCR トランスジェニックマウスを用いた解析により、*in vivo* においても観察されている[4]。抗原特異性の異なる 2 種類の CTL に由来する MHC クラス I 拘束性 TCR を発現するマウス T 細胞に対する TCR アンタゴニストの作用を検討したところ、片方の TCR のアンタゴニストは、もう一方の TCR のアゴニストにより誘導される応答を抑制することはできなかった。したがって、TCR アンタゴニズムは、T 細胞に dominant negative signal を送る訳ではないと考えられる。またマウス T 細胞ハイブリドーマを用いて、アゴニズムの大きさは CD4 の発現の影響を強く受けるのに対して、アンタゴニズムの発現は CD4 非依存性であると報告されている[5]。

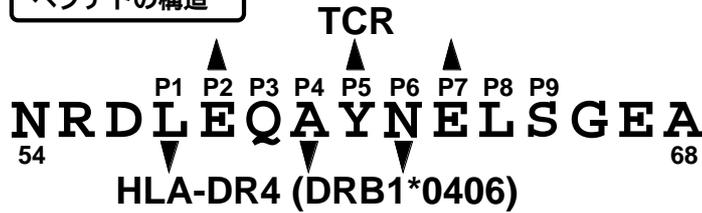
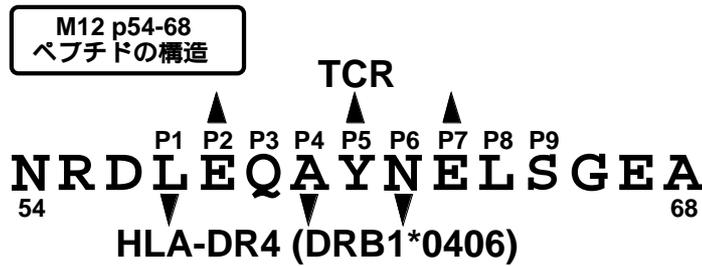
当教室の Chen らは、HLA-DR4 拘束性に溶連菌非自己ペプチドに反応するヒト CD4⁺ T 細胞クローンを用いて、ペプチド上で DR 分子のペプチド収容溝に収容されると考えられる 9 アミノ酸残基に関して、1 残基のみを他のアミノ酸に置換した 154 種類の APL を合成し、T 細胞応答を調べた[6]。図 2 に示すように、DR アンカー残基は性質の似たアミノ酸に置換した場合にアゴニズムを示す確率が他の残基よりも高く、逆に DR アンカー残基の周囲の TCR 認識部位と考えられる残基は、ごく性質の似通ったアミノ酸に置換した場合にのみしかアゴニズムを発現しなかった。さらに後者の APL でアゴニズムを発現しなかったものの多くがアンタゴニズムを発現し、その中のごく一部が細胞増殖を伴わない細胞

のサイズあるいは CD4, 11a, 28, 49d, 95 の発現増加を誘導する部分的アゴニズムを発現した。いっぽう DR アンカー残基を置換した APL がアンタゴニズムを発現することは稀であった。したがって、アンタゴニズムや部分的アゴニズムは、TCR と MHC・ペプチド複合体との接触状況の変化により生じるのではないかと推定された。

2) 部分的アゴニズム P. Allen らの定義に従って、TCR アンタゴニズムを発現する APL のうち、T 細胞に増殖応答以外の不完全な活性化を誘導するものを部分的 (パーシャル) アゴニストと呼ぶ。部分的アゴニストは、みずから小さい増殖応答を誘導する弱いアゴニストとは異なる点を強調しておく。

表 2 に示すように APL を認識した CD4⁺ T 細胞クローンに免疫応答の質的变化[3]、たとえば IL-4 産生あるいは細胞傷害活性を保存した増殖反応の消失、アポトーシスあるいはアナジの誘導、CD95 リガンドおよび TNF の分泌を伴わない CD95 あるいは TNF レセプターを介したアポトーシスへの感受性の誘導 (周囲の T 細胞が産生する CD95 リガンドあるいは TNF によりアポトーシスに陥る。) [7] などが観察されている。一般に部分的アゴニストを認識した T 細胞は、IL-2 レセプターや接着分子の発現を増強するが、増殖に必須の IL-2 を産生せず増殖しない。

いっぽうマウスの CD8⁺ CTL においても、APL による部分的アゴニズムが報告されている。たとえば、CD95L およびパーフォリン



応答を示したAPLの頻度(%)

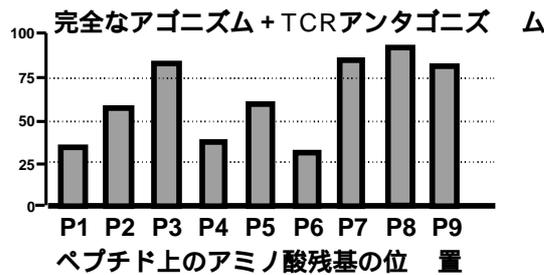
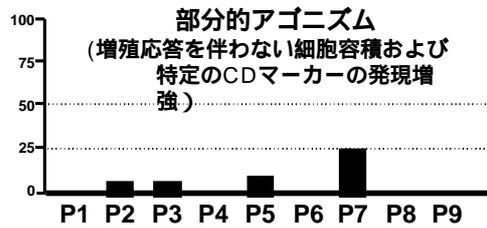
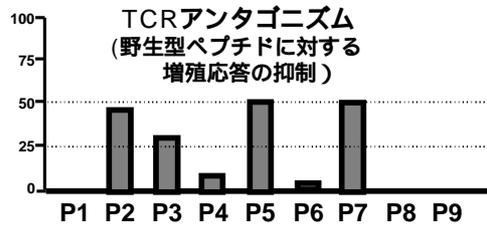
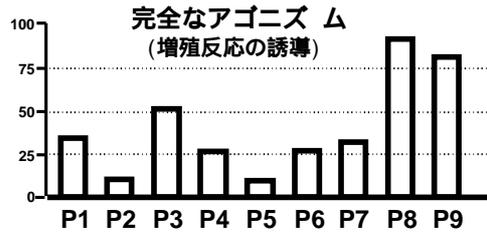


図2. ヒトCD4⁺T細胞クローンが、抗原ペプチド上のアミノ酸残基を1個だけ置換したAPLに対して示した免疫応答 (文献6より改変) HLA-DR4(DRB1*0406)により提示された溶連菌由来のM12p54-68ペプチドを認識して増殖するTh1細胞様クローンを用いた。図の最上段に示したペプチド上のP1~P9まで(ペプチド上の最もN末端よりのDRアンカー残基の位置をP1と呼び、P1~P9はDR分子のペプチド収容溝に収容されていると考えられる。)の各アミノ酸残基のうち、P1~P7に関しては他の19種類のすべてのアミノ酸に1残基のみを置換したAPLを、またP8およびP9についてはそれぞれ他の10あるいは11種のアミノ酸に置換したAPLを合成した。図の横軸は置換が導入されたペプチド上のアミノ酸残基の位置を、縦軸はAPLのうち図に示した応答を誘導したものの頻度を表す。P1, P4 およびP6 はDRアンカーであり、P2, P5およびP7はTCR認識部位と考えられる。各残基ごとにAPLが誘導するT細胞応答の質および頻度が異なることに注目したい。最下段はAPLが完全なアゴニズムあるいはTCRアンタゴニズムを示すことより、間接的にHLA-DR分子に結合することが確認できたAPLの頻度を示す。

表2. APLを認識したT細胞に誘導される部分的アゴニズム

T細胞サブセット	部分的アゴニズムの性格*	文献
CD4 ⁺ T細胞 (Th)	● IL-4 の産生	29
	● IL-3 の産生	30
	● アナジ-の誘導, CD11a, 25の発現増強	31
	● TGFβ の産生	32
	● 細胞傷害活性の誘導	21
	● CD4, 11a, 28, 49d, 95の発現増強	6
	● 細胞寿命の延長	22
	● アポトーシス感受性の誘導	7
	● in vivo Th2 ▶ Th1 変換	24
CD8 ⁺ T細胞 (Tc)	● パーフォリン系の作動を欠いた CD95L 系の作動による細胞傷害	33
	● 細胞傷害を欠いた細胞接着の増強	34

*TCRアンタゴニズムも併せもち,増殖応答を誘導することはない

を共に用いて細胞傷害性を発現するCTLが、APL を認識した際にはパーフォリンを介さず CD95L のみを介して細胞傷害活性を示したという観察がある[8]。また標的細胞への細胞接着のみを促進して、細胞傷害活性を刺激しない APL も報告されている。

3) スーパーアゴニズム APL のあるものは、T 細胞に野生型ペプチドよりもさらに強い増殖応答、あるいはサイトカイン産生を刺激する[9]。このような APL としては、MHC アンカー残基の置換により、より強固に MHC に結合するようになったものや、自己反応性 T 細胞の場合のように TCR のリガンドへの親和性が低い場合に、TCR による認識に関わるアミノ酸残基の置換により、TCR への親和性が増強したものなどが考えられる。

このように、TCR と MHC・ペプチド複合体の結合による T 細胞の活性化は、“on / off” タイプのものではなく、MHC・ペプチド複合体の微細な変化により T 細胞の応答も量のみならず質的にも変化する。この現象より T 細胞が APL に対して示す種々の応答には、それぞれ異なる活性化の閾値が存在し、伝達されるシグナルも異なると推測される。

3. APL・MHC 複合体と TCR との結合特性

精製された可溶性の TCR 分子と MHC・ペプチド複合体の物理的結合が、プラズモレゾナンス解析により直接検出できるようになり、両者の結合特性に関してユニークな特徴が明

らかにされた。つまり、すぐに結合してなかなか離れない抗原抗体反応 (fast on slow off、 $K_d=10^{-11} \sim 10^{-10}M$) と異なり、TCR と MHC・ペプチド複合体との反応は、すぐに結合してすぐに離れる (fast on fast off、 $K_d=10^{-4} \sim 10^{-7}M$) という特徴をもつ[10]。

TCR/CD3 は特異的なリガンドを認識したもののだけが細胞表面から消失する(TCR/CD3 の down regulation)。この現象を利用して、抗原提示細胞表面の MHC・ペプチド複合体の数と、これを認識した T 細胞の表面から消失した TCR の数との間の関係が解析され、1 個の MHC・ペプチド複合体が約 100~200 個の TCR と次々に接触して、その down regulation を誘導することが明らかにされた[11]。一方細胞表面の MHC 分子は通常自己ペプチドを結合するものが圧倒的多数を占めるが、そのわずかに 0.1~0.01% (数 10~数 100 分子/細胞) が非自己ペプチドを結合していれば、これに特異的な T 細胞が活性化されることが知られている。

以上の観察を統合すると、TCR はそのリガンドとのユニークな結合特性により、短時間に次々と抗原提示細胞(APC)上のリガンドを認識しては直ちに解離すると考えられる。こうして APC 上に低密度でしか発現されていない MHC・アゴニストペプチド複合体が、T 細胞上の多数の TCR をヒットして活性化シグナルを誘導すると考えられる(TCR シグナリングにおける kinetic model)。

TCR 分子はアゴニストのみならずアンタゴニスト活性を有する APL と MHC 分子の複合

体にも結合することが示されている[10]。さらにアンタゴニストペプチドはアゴニストペプチドに比べ、TCR との結合親和性が低いか TCR からの解離速度が速いことが示されている(図3)。また最新の情報によれば、TCR と APL・MHC 複合体の接触面積を接触の熱エネルギーをも加味して解析した結果、接触面積の大きさと T 細胞活性化の程度との間に相関関係が認められている。つまり、アゴニスト、部分的アゴニスト、アンタゴニストの順に接触面積が小さくなるという観察が得られている(D.Willey 口頭発表)。したがって TCR が、このような APL・MHC 複合体を認識した際には、T 細胞活性化に必要な種々の分子の集合ならびにシグナル伝達(後述)を行うために、十分なだけの TCR とそのリガンドの結合時間が得られない可能性がある。

いっぽうマウス CTL クローンにおいて、上記の方法と異なり、抗 TCR 抗体の生きた T 細胞上の TCR への結合が、可溶性 MHC・ペプチド複合体により、どの程度阻害されるのかを観察することにより、TCR とそのリガンドの結合親和性が間接的に定量化された。その結果、アンタゴニストは、弱いアゴニストよりも約 30 倍高い親和性で TCR に結合した[12]。このような結果の食い違いは方法の違いによるものである可能性があり、今後の追試が望まれる。

4. APL を認識した T 細胞における活性化シグナルの変化

アゴニストを認識したヒトおよびマウス T 細胞では、TCR の down regulation が生じる。

さらに TCR 鎖が完全なチロシンリン酸化を受けて、21kDa(p21)および 23kDa(p23)の TCR 鎖が出現し、同分子に ZAP-70 が結合して、それ自身がチロシンリン酸化を受けて活性化される。いっぽうアンタゴニズムや部分的アゴニズムを発現する APL を認識した T 細胞では、TCR の down regulation は観察されない。また TCR 鎖のリン酸化も不完全であり、p21TCR 鎖しか観察されず、ZAP-70 のリン酸化も起こらないことが数年前に明らかにされていた[3]。さらに、TCR 鎖をリン酸化するタンパク質チロシンリン酸化酵素(PTK)である Fyn の活性が低下していることも報告されている。以下に、その後に報告されたさらに詳細な解析結果について紹介する。

1) APL に対する T 細胞応答の解析結果から明らかになった活性化シグナルのヒエラルキー

APL を認識したマウス CD4⁺ T 細胞クローンにおける、T 細胞活性化の初期シグナルを解析した結果、アゴニストペプチドは細胞外への酸 (H⁺)放出を誘導したが、アンタゴニストは誘導しなかった。酸 (H⁺)放出を誘導した APL の一部が、持続性の細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を誘導し、さらにそのまた一部が増殖反応を刺激した[13]。したがって、T 細胞の活性化にはヒエラルキーがあり、鎖の部分的リン酸化、小さな細胞内 Ca²⁺濃度の上昇、細胞外への酸放出、持続的な細胞内 Ca²⁺濃度の上昇、鎖の完全なリン酸化、増殖の順に生じると考えられる(図4)。

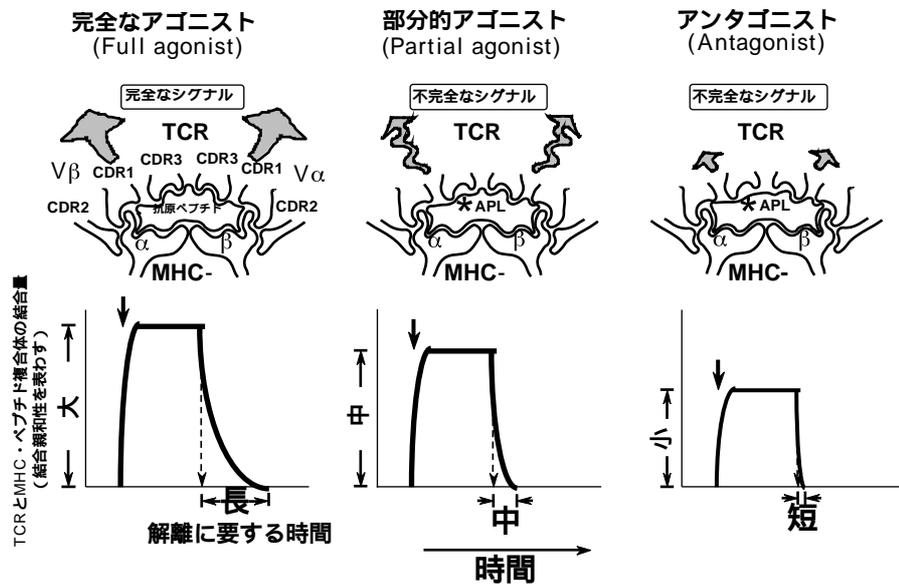


図3. 抗原ペプチド上のアミノ酸を置換するとT細胞レセプターとMHC・ペプチド複合体との間の結合特性が変化して、T細胞の応答にも変化が生じる。(文献10より) 図の下端に、固相化された可溶性T細胞レセプターに可溶性MHCクラスII・ペプチド複合体を添加して、両者の結合をプラズモレゾナンス解析により検出した実験データを模式的に示す。図中の矢印は、可溶性MHC-II・ペプチド複合体を添加した時間を示す。* APL中に示した* は、アミノ酸残基の置換が導入された部位を示す

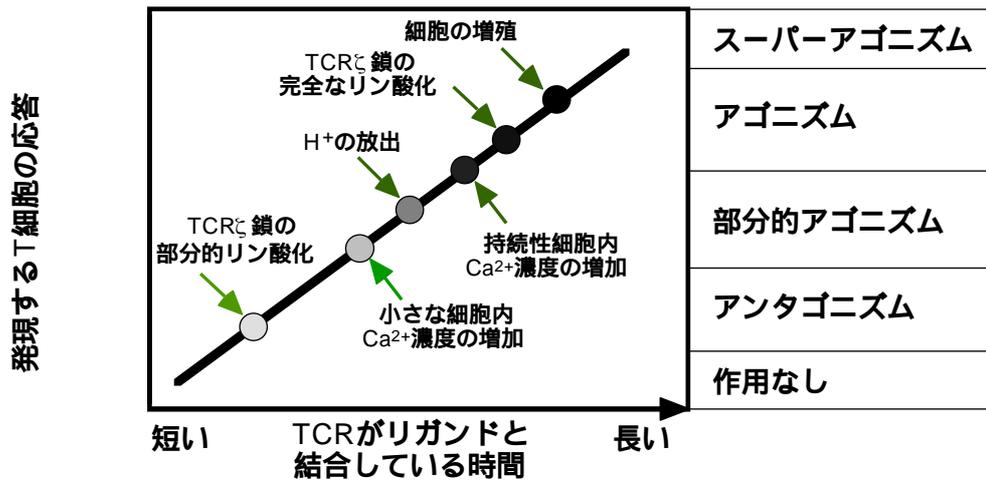


図4. TCRとMHC・ペプチド複合体の結合持続時間に依存してT細胞は種々の応答を発現する(文献13より改変)。マウスのCD4⁺ T細胞クローンでI-E^k 拘束性にHb p64-76ペプチドあるいはMCC p88-103ペプチドを認識するものを用いて、T細胞をアゴニストペプチドあるいはAPLで刺激した際の応答と、TCRとMHC・ペプチド複合体の結合特性との間に上図のような関係が推定された

2) APL 刺激による TCR 鎖および ZAP-70 のリン酸化

TCR 鎖は 3 個の ITAM (immuno receptor tyrosine-based activation motif) をもち、その中に TCR によるリガンドの認識によりリン酸化を受ける 6 個のチロシン残基が存在する。リン酸化を受けた各チロシン残基を特異的に識別するポリクローナル抗体を用いてマウス T 細胞クローンを解析した結果、以下のことが明らかとなった[14]。図 5 に示すように、チロシン残基 B1 と C2 は静止型 T 細胞でもリン酸化を受けており、これが p21 リン酸化鎖に対応している。いっぽう抗原刺激後には、A2, B1, C2 のリン酸化により p21 鎖のリン酸化が増強する。その後 A1, B2 および C1 を含むすべてのチロシン残基がリン酸化されて、p23 鎖として検出される。この際に A2 のリン酸化に次いで B2 の、また A1 のリン酸化に次いで C1 のリン酸化が起こるといふヒエラルキーが観察されている。

APL で刺激後の T 細胞でも A2, B1, C2 のリン酸化による p21 鎖と共に、A1 および B2 のリン酸化によりごく少量の p23 鎖の出現が認められたが、C1 のリン酸化は観察されなかった。この状態では、ZAP70 のリン酸化による活性化も起こらないと考えられる。このような鎖ホモ二量体の 12 個のチロシン残基のリン酸化の程度は、TCR リガンドの性質にもとづいて変化し、活性化される下流のシグナル伝達分子の種類も変化し、その後の T 細胞の応答も質あるいは量的に変化すると考えられる。

3) APL により誘導される細胞内カルシウム (Ca^{2+}) 応答

T 細胞活性化において、ZAP-70 の活性化の下流で生じる細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加は、NF-ATc の活性化を促して IL-2 遺伝子の発現を誘導する。

マウス T 細胞において、アンタゴニズムを示す 3 種類の APL が、アゴニストにより誘導される細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加を減弱させた。またアンタゴニストの中には、アゴニストと比べてより少数の T 細胞に小さな細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加を誘導するものがあつたが、まったく誘導しないものもあつた。したがって、TCR アンタゴニズムの発現には、細胞内 Ca^{2+} 応答は必須ではないと考えられた[15]。また部分的アゴニズムを発現してアナジーを誘導する APL は、たとえ ionomycin の共存下でも増殖反応を誘導することはなく、さらに細胞外 Ca^{2+} の非存在下に APL を認識した T 細胞もアナジーに陥った。したがって、APL によるアナジーの誘導も、細胞内 Ca^{2+} 応答とは無関係であると考えられた。

当教室の Chen らは、先に述べたヒト $CD4^+$ T 細胞クローンにおいて、 Ca^{2+} 応答を示す細胞数は、アゴニスト、部分的アゴニスト、アンタゴニストの順に減少し、さらに細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加パターンが三者で異なることを明らかにした。さらに、アゴニストによる Ca^{2+} 応答は、PTK 阻害薬 Genistein に感受性で、PKC 阻害薬 GF109203X には抵抗性であったが、部分的アゴニストおよびアンタゴニストのそれは、まったく逆であった[16]。

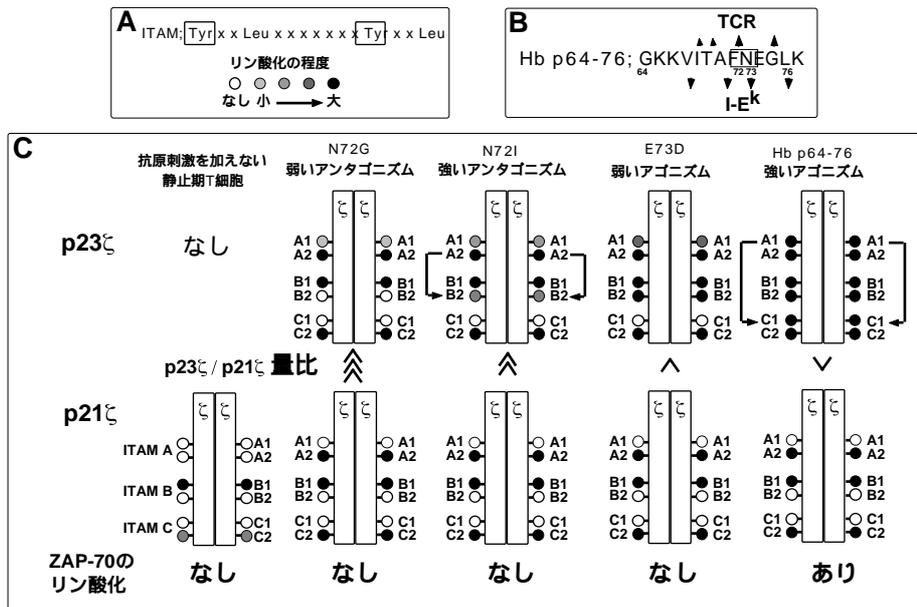


図 5. TCR ζ 鎖のリン酸化の程度は、TCRが認識するリガンドの性質により変化する。(文献14より改変)
 TCR 鎖はホモ二量体を形成し、各 鎖にはT細胞の活性化に重要なITAM (A) が3箇所が存在する。
 さらにそれぞれのITAMには、TCRによるリガンドの認識によりリン酸化を受ける2個のチロシン残基が存在する。
 リン酸化を受けた各チロシン残基を特異的に識別するポリクローナル抗体を用いて、マウスのI-E^k拘束性にHb p64-76ペプチド (パネルB)を認識するCD4⁺ T細胞クローンの、Hb p64-76およびこれに由来するAPL(N72Gは、第727^{Asn}/酸残基のAsnをGlyに置換したAPLを示す) に対する応答が解析された。その結果、 鎖ホモ二量体の12個のチロシン残基のリン酸化は、TCRリガンドの性質にもとづいて、その程度が変化し、その後のT細胞の応答を質あるいは量的に変化させると考えられた。説明の詳細は、本文を参照されたい

つまり、APLにより誘導される量および質の異なる細胞内Ca²⁺ 応答は、PKCに依存しPTKには依存性しないユニークなものであった。このような APL により誘導される細胞内Ca²⁺ 応答の変化が、T 細胞応答の変化にどのように寄与しているのかは今後の検討課題である。

4) T 細胞と APC の界面 (インターフェイス)におけるシグナル伝達分子の集合と APL 応答

T 細胞は抗原提示細胞上に発現する MHC・ペプチド複合体を認識するために、抗原提示細胞と接触し界面を形成する。この界面の T 細胞側の形質膜の中央部分には、TCR-CD3 複合体がクラスターを形成し、その直下の細胞質内には PKC、Lck および Fyn が集積する (図 6)。さらに、その周囲の膜上には LFA-1 分子が、細胞質内にはタリン分子が集積する。アゴニストペプチドで T 細胞を刺激した場合には、これら二種類の界面がともに形成されるが、アンタゴニスト活性を有する APL で刺激した場合には、CD3 とタリンは界面に集まるものの、上記の二種類の界面の分離は明確ではないと報告されている [17] (図 6)。

このようなシグナル伝達に関わる分子の集合は、分子間の相互作用による活性化シグナルの伝達を促進すると考えられ、アンタゴニストペプチドは、その形成能が低いためにアゴニズムを発現できないと推測される。

5. APL を利用して明らかとなった T 細胞の分化と応答の機構

1) 胸腺における T 細胞の分化

胸腺における T 細胞レパトアのポジティブあるいはネガティブ選択が TCR と、MHC・ペプチド複合体の親和性の総和 (TCR とリガンドのアビディティ) により微妙にコントロールされていることが、APL を利用して証明されている (図 7)。この実験にはβ2 ミクログロブリン あるいは TAP-1 遺伝子を標的破壊し、特定の MHC-クラス I・ペプチド複合体を認識する TCR 遺伝子を導入したマウスが利用された [18]。このようなマウスの細胞は、ごくわずかの MHC クラス I 分子しか発現しないが、外部よりペプチドを加えるとこれを結合した MHC クラス I 分子が、ペプチドの濃度に依存して発現する。胸腺臓器培養系に TCR トランスジェン産物が認識する野生型ペプチドを加えると、ごく低濃度ではポジティブ選択が生じたが、濃度を増加させるにつれてネガティブ選択が生じた。いっぽう TCR アンタゴニストや部分的アゴニストも、このような現象を効率よく誘導したが、より高濃度のペプチドを必要とした。つまり、胸腺細胞上の TCR とそのリガンドとの間のアビディティが低い状態でポジティブ選択が、また高い状態ではネガティブ選択が生じると考えられる。MHC クラス I 分子がより高密度で発現する in vivo では、将来非自己ペプチドに反応する T 細胞が、胸腺皮質上皮細胞に発現する自己 MHC・自己ペプチド複合体で、TCR に対してアゴニズムを示すもの

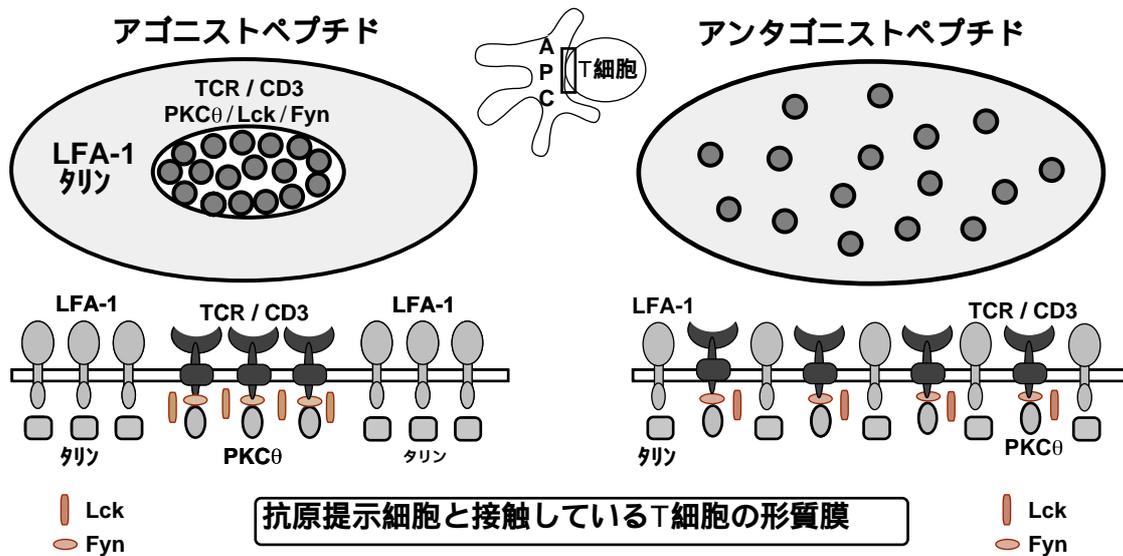


図6. T細胞形質膜上の抗原提示細胞との接触面(インターフェイス)におけるT細胞活性化に関わる分子の集合状況は、TCRリガンドの性質によって異なる。(文献17より改変) マウスI-A^k 拘束性にコンアルブミンペプチドを認識するCD4⁺T細胞と、同ペプチドをパルスした抗原提示細胞(CH12)をインキュベートし、2種類の細胞が接触しているものについて、そのT細胞形質膜上の各種分子の分布が蛍光ラベルした特異抗体を用いた染色により3次元的に解析された。図のようにアゴニストペプチドで刺激した場合のみ、各分子が異なる場所に集合する現象が観察された。

よりも、むしろアンタゴニズムを示すようなものによってポジティブ選択を受けていると推測される。同様の実験系を用いて、ダブルポジティブ(DP)胸腺細胞を、大小のアゴニズムあるいはアンタゴニズムを示す APL で刺激すると、いずれのペプチドも CD3⁺, CD3⁺, ZAP-70, Syk, Vav, SLP-76 および pp36-38 のリン酸化を誘導したと報告されている。ペプチド刺激によるこれらの分子のリン酸化の程度は、胸腺細胞にアポトーシス (ネガティブ選択)を誘導する活性の強さとよく一致した。しかし、予想外にポジティブ選択の誘導能とシグナル伝達分子のリン酸化の程度との間には相関関係は認められていない[19]。

RAG-2^{-/-} 背景で、マウスの I-Ek 拘束性に非自己ペプチドに反応する TCR を発現するトランスジェニックマウス由来の T 細胞と、1 アミノ酸置換により部分アゴニズムを示す APL を用いて、各種のペプチドに対する CD69 の発現、アポトーシスの誘導、あるいは IL-2 の産生などの応答が DP 胸腺細胞と末梢 CD4⁺ T 細胞との間で、大きく異なることが示された[20]。細胞を問わず、すべての反応において野生型ペプチドの方が APL より強い応答を誘導した。CD69 の発現およびアポトーシスに関しての末梢 CD4⁺ T 細胞では両ペプチドの刺激活性の間に大きな差が認められたが、いっぽう DP 細胞では、この差は非常に小さくなっていた。さらに重要なことに、野生型ペプチドに対する反応性は DP 細胞に比べて末梢 CD4⁺ T 細胞で増強していたが、いっぽう APL に対する反応性は CD4⁺ T 細胞に分

化することにより著明に減少した。

野生型ペプチドを認識した DP 胸腺細胞および末梢 CD4⁺ T 細胞では、完全なリン酸化を受けた p23TCR 鎖と ZAP-70 が観察された。いっぽう APL を認識した際には、DP 細胞では両分子の弱いリン酸化が観察されたが、末梢 CD4⁺ T 細胞ではごく弱い p23TCR 鎖の発現は認められたものの、ZAP-70 のリン酸化は観察されなかった。さらに Lck の総量は DP 細胞と末梢 CD4⁺ T 細胞との間で差は認められなかったが、TCR と結合する Lck の量および酵素活性は、末梢 CD4⁺ T 細胞と比べて DP 細胞でより大きいことがわかった。したがって、T 細胞の選択が行われる DP 細胞は、末梢 CD4⁺ T 細胞と比べて、よりアピデイターの低い TCR リガンドにも反応性を示し、これが TCR と会合する Lck 活性の増加によりもたらされ、ポジティブ選択にも寄与している可能性が示唆される。

2) 自己ペプチドによる末梢成熟 T 細胞の選択

APL を用いた解析により、T 細胞は胸腺のみならず末梢においても、自己の MHC・ペプチド複合体により、さらなる選択を受けているのではないかと考えさせる観察が報告されている。

I-Ek 拘束性でヘモグロビンアロ抗原に特異的な Th1 細胞クローンは、抗原ペプチドを認識して増殖するとともに、ごく低濃度のペプチド存在下でも B リンホーマ細胞にアポトーシスを誘導する。多数の合成 APL の中からアゴニズムあるいは部分アゴニズムを示す

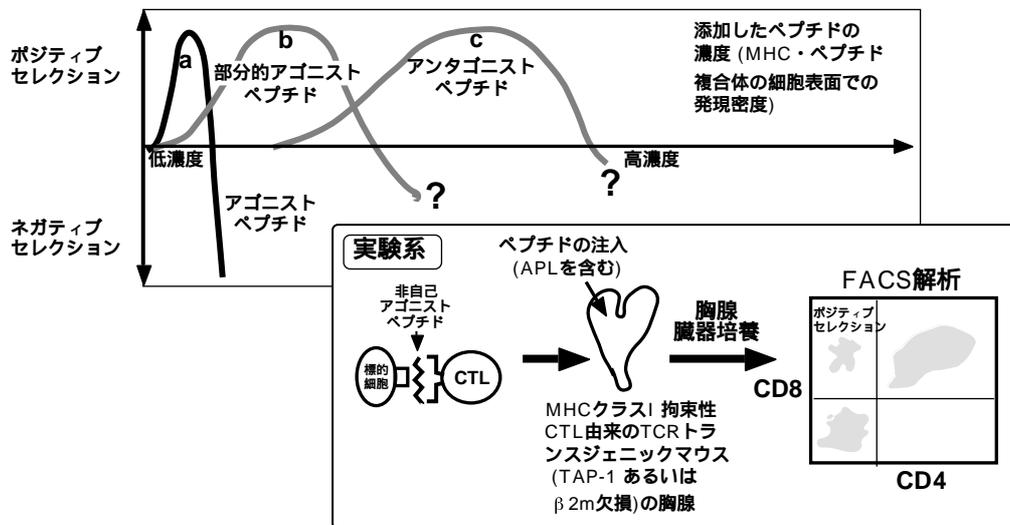


図7 胸腺におけるT細胞のポジティブおよびネガティブセレクションは、胸腺細胞上のTCRとそのリガンドであるMHC・ペプチド複合体とのアフィニティーにより決定される。(文献18より) MHCクラスI拘束性CTL由来のTCRトランスジェニックマウス(TAP-1あるいは $\beta 2m$ 遺伝子の発現を欠損)の胸腺臓器培養系に、MHCと複合体を形成した際に当該TCRとの結合特性が異なる3種類のペプチド(アゴニスト(a)、部分的アゴニスト(b)、およびアンタゴニスト(c))を種々の濃度で添加して $CD8^+$ T細胞の選択的分化の状況がフローサイトメトリーにより解析された。その結果、TCRアンタゴニスト(c)によってもT細胞の分化がよく誘導された。いっぽうアゴニスト(a)では低濃度でしかも狭いレンジでのみT細胞の分化が観察された。したがって、TCRとMHC・ペプチド複合体とのアフィニティーが低い状態でポジティブセレクションが、いっぽう高い状態ではネガティブセレクションが起こると考えられる。曲線の細かい形状は正確なものではなく推定によるものである。説明の詳細は本文を参照されたい。

ものが同定され、その情報をもとに Swiss protein database の中から類似性の認められる自己ペプチドが検索された。そして、アゴニズム、あるいは部分的アゴニズムの結果として標的 B 細胞にはアポトーシスを、T 細胞にはアナジーを誘導する自己ペプチドが同定された[21]。

当教室の松下らは、HLA-DR 拘束性 BCG 反応性ヒト CD4⁺ T 細胞クローンを用いて、部分的アゴニズムを発現して抗原刺激および IL-2 の非存在下における T 細胞の死を遅らせる作用をもつ自己ペプチドを同定している[22]。拘束 MHC 分子の発現を欠いたマウスでは、外部から導入された非自己反応性 T 細胞の寿命が短くなることが報告されており[23]、T 細胞メモリーとも関連する T 細胞の寿命の延長に、MHC・自己ペプチド複合体が関与していると推測される。

前述したように部分的アゴニズムの中には、T 細胞にアポトーシスあるいはアポトーシスへの感受性を誘導するものも知られており、自己反応性 T 細胞が、他の自己ペプチドによるこのような部分的アゴニズムの誘導により、除去されている可能性も考えられる。

つまり、T 細胞にとって体内は決して静かな環境ではなく、たえず自己ペプチドにより小さなノイズのような刺激が入っている可能性が考えられる。そして、これがメモリー T 細胞の維持、自己反応性 T 細胞の除去、あるいは自己免疫現象の誘導に重要な役割を担っている可能性がある。

3) Th1/Th2 細胞の分化および APC の応

答

APL のあるものは、*in vitro* における T 細胞クローンに対するアゴニズムの結果として誘導されるサイトカインの分泌のパターンを変化させることが知られている。さらに、Th1 あるいは Th2 クローン由来の TCR を発現するトランスジェニックマウスを用いて、APL 刺激による *in vivo* での Th1/Th2 表現型の変換が観察されている[24]。したがって、TCR とそのリガンドとの相互認識の強さが Th1/Th2 への分化を決める要因の一つとなりうると考えられる。

当教室の松岡らは、HLA-DQ 拘束性ダニアルレルゲン反応性ヒト CD4⁺ T 細胞クローンの APL に対する応答を解析し、T 細胞による IFN- γ の産生を著明に増加させるものを見つけた。この APL は、APC からの IL-12 産生を増強することにより、このようなスーパーアゴニズムを発現することがわかった[25]。マウスの TCR トランスジェニックマウスと APL を用いた解析によっても、弱いアゴニスト APL は、B 細胞における CD86 の発現増強や脾臓細胞からの IL-12 産生を促す活性が低いことが示されている。このような観察から、TCR とそのリガンドの結合特性は、T 細胞のみならず APC 側の応答にも影響を及ぼすことが明らかとなった。

6. APL の臨床医学への応用

APL を利用して諸疾患の病因の解析や、新しい治療戦略の開発が進んでいる。

1) 自己免疫疾患と APL 多発性硬化症 (MS)の発症に重要な役割を担っていると推定

されている、MBP 自己反応性 T 細胞が反応する自己抗原ペプチドのアナログで、微生物由来の非自己ペプチドが自己反応性 T 細胞に交差抗原性を発現することが示された。これは、従来より提唱されていた分子擬態 (molecular mimicry) による、微生物感染を誘因とする自己免疫疾患の発症という仮説に強い根拠を提供した[26]。いっぽう、逆に MS のモデルであるマウスの実験自己免疫性脳脊髄炎(EAE)では、ウイルス由来のペプチドが、自己反応性 T 細胞に対してアンタゴニズムを発現することにより、EAE の発症を抑制することが報告されている[27]。その他にも、ヒトおよびマウスで *in vitro* あるいは *in vivo* において、自己反応性 T 細胞の応答や自己免疫疾患の発症を抑制、増強あるいは質的に変化させる APL の報告が多数なされている。

2) 感染免疫と APL 最もよく知られているのは、HIV ウイルスが免疫監視機構から逃れるべく変異するという観察である。病初期の AIDS 患者から樹立された HIV 反応性 CTL に対して、TCR アンタゴニズムを発現するようなアミノ酸変異をもつウイルスが患者から同定されている。さらに最近、無症候性 HIV-1 感染者において、樹立された HIV 反応性ヒト CD4⁺ T 細胞クローンに対してアゴニズムを発現しない変異を獲得したウイルスの自然発生が報告されている[28]。

3) 抗腫瘍免疫、移植免疫およびアレルギー

ーと APL MHC 拘束性に腫瘍特異抗原ペ

プチドを認識する CTL あるいは CD4⁺ T 細胞は、抗腫瘍免疫を担う重要な細胞であり、特にメラノーマでは種々の抗腫瘍ペプチドワクチンが開発され、一部の患者で効を奏している。このうち、腫瘍特異抗原ペプチドにアミノ酸置換を導入した APL が、スーパーアゴニズムを発現し抗腫瘍免疫を増強すると報告されている。

さらに *in vitro* での観察ではあるが、アロ MHC 反応性 T 細胞を刺激するようなアロ MHC により提示される自己ペプチドのアナログで、TCR アンタゴニズムにより T 細胞のアロ反応性を抑制する APL に関して複数の報告がある。また、アレルゲンに特異的な IgE の産生を促進する Th2 細胞の応答をアンタゴナイズしたり、IL-4 産生を抑制あるいは IFN- の分泌を促進する APL についても複数の報告がある。

著者は、APL の臨床応用に関しては、特定の限られたエピトープに対する T 細胞の応答が患者にとって有利な場合に、スーパーアゴニズムによる T 細胞応答の増強は一考の価値があると考えている。しかし、APL による免疫抑制療法に関しては、実際に患者で生じているポリクローナルな T 細胞応答を抑制することは難しく、臨床応用にはほど遠いと考える。ただし自己免疫疾患のハイリスク者に対して、自己免疫疾患の最初にトランスが破綻する自己ペプチドに対する免疫抑制性 APL を、発症前に予防的に投与する治療法は考慮してみる価値があるであろう。

おわりに： MHC・ペプチド複合体および TCR

の構造が精力的に解明されつつあり、T 細胞と MHC・ペプチド複合体の結合特性、またその強弱がどのような要因によって決定されているのかが間もなく明らかにされるであろう。今後これらの成果は、TCR を介して T 細胞内に伝達される活性化シグナルの多様性を解明する際に重要な手掛かりを与え、胸線における T 細胞の分化、あるいは T 細胞におけるメモリーの維持の機構といった、T 細胞に関する難問の解明に貢献すると期待される。さらに HLA 結合性 APL によるヒト T 細胞性免疫応答の人為的修飾といった臨床医学への応用の可能性をも秘めている

著者のプロフィール : 著者は、1976 年に九州大学医学部を卒業し、東京医科歯科大学の笹月教授のもとで、ヒトの免疫遺伝学に関する大学院教育を受け、1984 年より九州大学生体防御医学研究所遺伝学部門（笹月教授）の助手、助教授をへて、1992 年に現職に就任し HLA クラス II 結合ペプチドの構造モチーフの決定、APL に対する T 細胞応答の解析、自己免疫疾患などの臨床免疫学的研究を展開してきた。この間に米国ダナファーマー癌研究所の S.J.Burakoff 博士の研究室で J.L.Strominger 博士らとの共同研究により、免疫応答の分子機構を研究した。今後、T 細胞の活性化機構、HLA により疾患感受性が決定される自己免疫疾患の病因解明、腫瘍拒絶抗原の同定、ならびに抗原提示細胞の分化と抗原のプロセッシングに関わる分子の同定について精力的に研究を展開したいと考えている。このような研究テーマに興味をもつ、

大学院生を歓迎致します。

文献（ここに示した文献の多くは、最新のものを優先したため、必ずしも現象を最初に発見して報告したものとは限らない。）

1. 西村泰治：日本臨床 55：1318-1325.1997
2. Ding, Y-H. et al.: Immunity, 8: 403-411, 1998
3. Sloan-Lancaster, J. and Allen, P.M.: Annual Review of Immunology, WE Paul, Fathman CG, Metzger H, Ed. Vol.14, Annual Reviews Inc, Palo Alto, CA, p1-28, 1996
4. Basu, D. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 14332-14336, 1998
5. Hampl, J. et al.: Immunity, 7: 379-385, 1997
6. Chen, Y.Z. et al.: J Immuno.I, 157: 3783-3790, 1996
7. Combadiere, B. et al.: Immunity, 9: 305-313, 1998
8. Kessler, B.M. et al.: J.Exp.Med., 185: 629-640, 1997
9. Nicholson, L.B. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 264-269, 1998
10. Kersh, G.J. et al.: Immunity, 9: 817-826, 1998
11. Itoh, Y. et al.: J. Immunol., 162:2073-2080, 1999
12. Sykulev, Y. et al.: Immunity, 9: 475-483, 1998
13. Rabinowitz, J.D. et al.: Immunity, 5: 125-135, 1996
14. Kersh E.N. et al.: Science 281: 572-575, 1998

15. Wulfing, C. et al.: J.Exp.Med., 185: 1815-1825, 1997
16. Chen, Y-Z., et al.: Eur.J.Immunol., 28: 3929-3939, 1998
17. Monks, C.R.F. et al.: Nature, 395: 82-86, 1998
18. Ashton-Rickardt, P.G. et al.: Cell, 76: 651-663, 1994
19. Smyth, L.A. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 8193-8198, 1998
20. Lucas, B. et al.: Immunity, 10: 367-376, 1999
21. Evavold, B.D. et al.: Immunity, 2: 655-663, 1995
22. Matsushita, S. et al.: J. Immunol., 158: 5685-5691, 1997
23. Kirberg, J. et al.: J.Exp.Med., 186: 1269-1275, 1997
24. Pingel, S. et al.: J.Exp.Med., 189: 1111-1120, 1999
25. Matsuoka, T. et al.: J. Immunol. 157: 4837-4843, 1996
26. Wucherpfennig K.W. et al.: Cell, 80: 695-705, 1995
27. Ruiz, P.J. et al.: J.Exp.Med., 189: 1275-1283, 1999
28. Harcourt, G.C. et al.: J.Exp.Med., 188: 1785-1793, 1998