

正の選択を介したT細胞の中枢性トレランス成立機構

徳島大学 疾患プロテオゲノム研究センター
高田 健介

1. はじめに

獲得免疫系が病原体を始めとした非自己成分に特異的に反応する能力は、その主役であるリンパ球が、分化過程において自己成分と相互作用することにより形成される。胸腺では、T前駆細胞上の抗原受容体 (TCR) と、抗原提示細胞上の自己ペプチド-MHC複合体との相互作用を通して、生体防御に有用なクローンのみが分化成熟する。胸腺髄質上皮細胞および樹状細胞に提示された自己ペプチドに高い親和性をもつクローンは、負の選択を受けて排除され、自己寛容が成立する。一方、正の選択は、胸腺皮質上皮細胞上の自己ペプチドに対して弱い親和性をもつクローンが生存シグナルを供与される過程であり、T細胞の抗原認識特異性を規定する。このように現在、胸腺における有用T細胞集団の形成は、TCRの構造に基づいたT前駆細胞の選別 (レパトア選択) によると認識されており、この選択の過程がT細胞の機能形成に関わることを実証した例はない。

プロテアソームはMHCクラスIに提示されるペプチドの産生に重要な役割を担うプロテアーゼ複合体であるが、最近、触媒活性部位として $\beta 5t$ サブユニットを含有する胸腺プロテアソームが新たに発見された¹。胸腺プロテアソームは正の選択を司る胸腺皮質上皮細胞に特異的に発現され、従来知られていた構成型プロテアソームや免疫プロテアソームとは異なる基質特異性を示す。その構成鎖である $\beta 5t$ の欠損マウスでは、正の選択の異常によってCD8T細胞数の減少¹と、TCRレパトアの変容が認められる²。これらの知見は、胸腺プロテアソーム依存的に産生される、胸腺皮質上皮細胞特有の自己ペプチドレパートリーが、正の選択によるT細胞数と抗原特異性の決定に重要であることを明らかにした³。すなわち、胸腺プロテアソームは、正の選択を誘導する胸腺皮質上皮細胞の機能的独自性を規定する中心的分子といえる。

本研究では、特定のTCRを発現するモノクローナルCD8T細胞を用いて、胸腺プロテアソームの欠損がTCR構造とは無関係にT細胞の機能に及ぼす影響とそのメカニズムを検討した。

2. 方法および結果

2-1. 末梢CD8T細胞の表現型の異常

$\beta 5t$ 欠損マウスのCD8T細胞の表面抗原をフローサイトメトリーにより詳細に解析したところ、CD44hiCD122hiCD8T細胞の割合が顕著に増加していた (図1A)。一方、活性化の指標として一般的に用いられるCD69、CD25、CD62Lには変化が見られなかったことから、これらの細胞はメモリー様CD8T細胞と考えられた。この変化は、生後10日目ですでに認められ、末梢のCD8T細胞に限局する現象であった。 $\beta 5t$ 欠損マウスおよびRag欠損OT-Iトランスジェニックマウスを交配することにより、OT-I TCRを発現するモノクローナル $\beta 5t$ 欠損マウスを作成したところ、やはりメモリー様細胞の割合が増加しており、この変化は外来抗原による刺激に非依存的と考えられた (図1B)。 $\beta 5t$ 欠損マウスから得られたCD44loCD122loナイーブCD8T細胞を正常マウスに移入し、表現型を経時的に観察したところ、長期にわたりナイーブ表現型を維持しており、メモリー様細胞への変化は見られなかった (図1D)。また、 $\beta 5t$ 欠損マウスのCD8T細胞をcarboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) 染色した後に正常マウスに移入し、ドナー細胞の増殖を観察した実験において、CD44hiCD122hiメモリー様細胞およびCD44loCD122loナイーブ細胞ともに対照ドナー細胞と同程度の緩やかな増殖が認められたのみであった (図1E)。

よって表現型の変化は生後、T細胞プールが形成される過程で生じる可能性が考えられた。

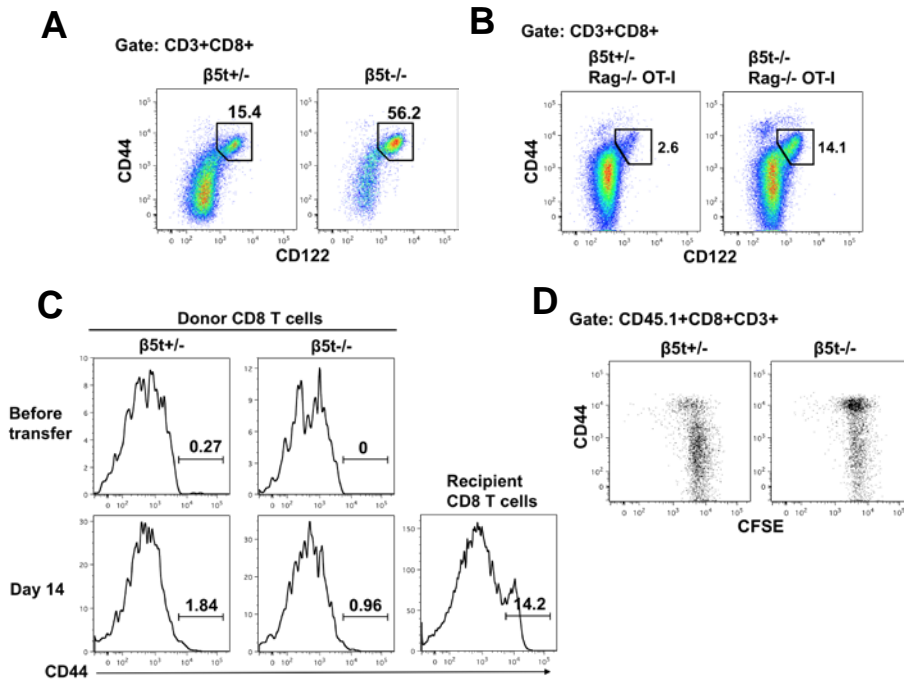


図1. $\beta 5t$ 欠損マウスで見られるメモリー様 CD8T 細胞 (A) $\beta 5t$ 欠損マウスにおける末梢 CD8T 細胞の FACS 解析。(B) $\beta 5t$ 欠損 OT-I トランスジェニックマウスにおける末梢 CD8T 細胞の FACS 解析。(C) $\beta 5t^{+/-}$ および $\beta 5t^{-/-}$ マウスから得られた CD44^{lo} ナイーブ CD8T 細胞を正常マウスに移入し、移入 14 日後に、レシピエントマウスの脾臓およびリンパ節中に存在するドナー細胞を解析した。(D) $\beta 5t^{+/-}$ および $\beta 5t^{-/-}$ マウスから得られた CD8T 細胞を CFSE 染色後、正常マウスに移入し、20 日後に、ドナー CD8T 細胞を観察した。

2-2. 抗原応答性およびサイトカイン応答性の異常

$\beta 5t$ 欠損下で産生された CD8T 細胞の抗原応答性を、卵白アルブミン由来ペプチド (SIINFEKL, OVAp) に特異的な OT-I トランスジェニックマウスを用いて検討した。その結果、 $\beta 5t$ 欠損マウスから得られた CD44^{lo} CD122^{lo} ナイーブ OT-I 細胞は、対照に比べ、より強い増殖応答を示した (図 2 A)。一方、活性化マーカーである CD69、CD25、CD44 の発現上昇は両群で同程度であった。抗原刺激による T 細胞の増殖には、活性化された T 細胞によって産生される IL-2 が重要であることから、次に、IL-2 の産生および IL-2 刺激に対する応答性を検討した。その結果、抗原刺激後の IL-2 産生に異常が見られなかった一方で、高濃度の IL-2 刺激に対する増殖が大きく亢進していた (図 2 B)。

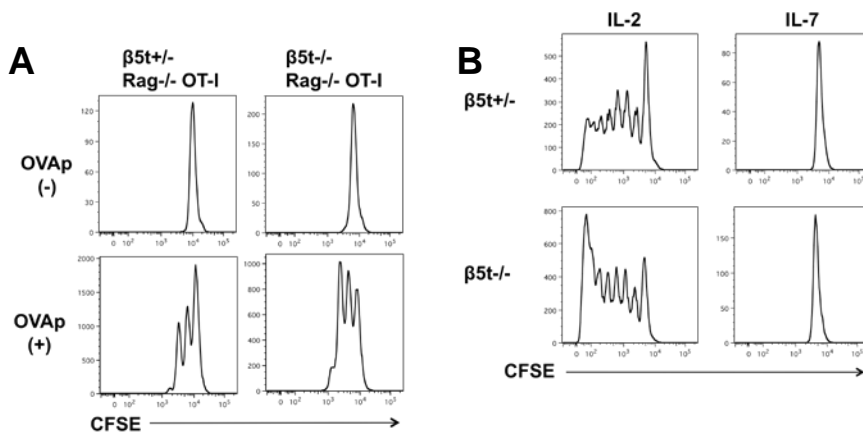


図2. $\beta 5t$ 欠損マウスにおける CD8T 細胞の機能 (A) $\beta 5t$ 欠損 OT-I トランスジェニックマウスから得られたナイーブ CD8T 細胞を CFSE 染色し、OVAp および抗原提示細胞の存在下で 2 日間培養した。(B) $\beta 5t^{+/-}$ および $\beta 5t^{-/-}$ マウスから得られたナイーブ CD8T 細胞を CFSE 染色し、サイトカイン存在下で 6 日間培養した。

2-3. メモリー細胞の分化異常

生体防御機構としての CD8T 細胞の役割に $\beta 5t$ 欠損がどのような影響をもたらすかを検討するため、エフェクター細胞およびメモリー細胞の分化を *in vivo* で検討した。Rag 欠損 OT-I トランスジェニックマウスから得られた骨髓細胞を放射線照射した野性型マウスおよび $\beta 5t$ 欠損マウスに移入した。これらの骨髓キメラマウスから得られたドナー OT-I 細胞を新たな野性型マウスに移入し、レシピエントマウスに LPS と OVAp の混合物を投与することで、OT-I 細胞に対する抗原刺激とした。抗原刺激から 5 日後および 30 日後をそれぞれエフェクター期およびメモリー期として、ドナー細胞を観察したところ、 $\beta 5t$ 欠損群では、CD62L を発現するセントラルメモリー細胞の割合が顕著に減少していた (図 3)。

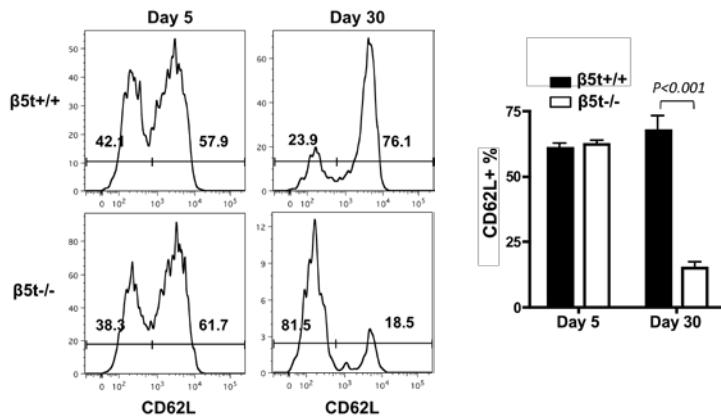


図3. $\beta 5t$ 欠損マウスにおけるCD8T細胞のメモリー細胞分化異常 Rag $^{-/-}$ OT-I トランスジェニックマウスから得られた骨髄細胞を $\beta 5t^{-/-}$ マウスおよび対照マウスに移入し、骨髄キメラマウスを作成した。得られたナイーブ OT-I 細胞を正常マウスに移入後、LPS および OVAp を投与した。抗原刺激から5日後および30日後のドナーOT-I細胞のCD62L発現を観察した。

3. 考察 まとめ

正の選択はこれまで、個々のT前駆細胞が抗原認識特異性に従って選択をうける過程として理解されてきたが、最近の胸腺プロテアソームの発見を契機として、正の選択の意義を再考する機会が生まれた。本研究では、単一の抗原受容体しか持たないTCRトランスジェニックCD8T細胞において、 $\beta 5t$ 欠損が末梢における表現型維持、サイトカイン応答性、およびメモリー細胞への分化に影響することを明らかにした。正の選択の異常がTCRレパトアとは無関係に、T細胞に機能的変容をもたらすというこれら知見は、胸腺プロテアソーム依存的な正の選択シグナルが、レパトア選択のみならず、T細胞の基本機能の獲得に重要であることを示唆する。CD44hiCD122hiメモリー様細胞の頻度の増加、セントラルメモリー細胞の分化不全といった知見はいずれも、CD8T細胞が過剰なサイトカインシグナルを受ける状況下で生じることが近年報告されており^{4,5}、 $\beta 5t$ 欠損マウスにおける一連の異常も過剰なサイトカイン応答性が中心となって引き起こされる結果と予測される。今後、 $\beta 5t$ 欠損マウスに認められるそれぞれのT細胞機能異常の関連と、正の選択を介したT細胞機能構築の分子基盤を明らかにすることが重要と考えられる。本研究の最終的な成果は、レパトア選択のメカニズムとして概念的に定着している正の選択に、免疫機能制御機構としての新たな生理的意義を加え、免疫学の発展と免疫関連疾患の病因解明に貢献しうる。

最後に、本研究を援助して頂きました公益財団法人アステラス病態代謝研究会に厚くお礼申し上げます。

4. 発表論文、参考文献

- Murata S, Sasaki K, Kishimoto T, Niwa S, Hayashi H, Takahama Y and Tanaka K. Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science* 316, 1349-1353 (2007)
- Nitta T, Murata S, Sasaki K, Fujii H, Mat Ripen A, Ishimaru N, Koyasu S, Tanaka K and Takahama Y. Thymoproteasome shapes immunocompetent repertoire of CD8 T cells. *Immunity* 32, 29-40 (2010)
- Takahama Y, Takada K, Murata S. and Tanaka K. $\beta 5t$ -containing thymoproteasome: specific expression in thymic cortical epithelial cells and role in positive selection of CD8+ T cells. *Curr Opin Immunol.* 24: 92-98 (2012)
- Prolonged interleukin-2/Ralpha expression on virus-specific CD8+ T cells favors terminal-effector differentiation in vivo. Kalia V, Sarkar S, Subramaniam S, Haining WN, Smith KA and Ahmed R. *Immunity* 32: 91-103 (2010)
- Suppressor of cytokine signaling 1 attenuates IL-15 receptor signaling in CD8+ thymocytes. Ilangumaran S, Ramanathan S, Ning T, La Rose J, Reinhart B, Poussier P and Rottapel R. *Blood* 102: 4115-4122 (2003)