

126. 正の選択を介した T 細胞免疫応答制御機構

高田 健介

*徳島大学 疾患プロテオゲノム研究センター 遺伝子実験施設

Key words : 獲得免疫, T 細胞, 分化, 正の選択, 免疫記憶

緒言

獲得免疫系は抗原特異的な免疫応答を引き起こすことで、生体防御に不可欠な役割を果たす。その主役である T 細胞が非自己抗原に対して特異的に反応する能力は胸腺での分化過程で形成され、幼若 T 細胞がもつ抗原受容体 (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に依存する。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細胞は、負の選択を受けて排除され、自己寛容の成立に寄与する。一方、正の選択は、胸腺皮質上皮細胞上の自己ペプチド-MHC 複合体に対して低い親和性をもつ幼若 T 細胞が選択的に分化誘導される過程であり、生体に有用な抗原認識特異性レパトアを選別するための機構として理解されてきた。しかし、正の選択の過程で惹起される微弱な TCR シグナルが成熟 T 細胞の抗原応答性に影響を与えることが、我々を含むいくつかのグループから最近相次いで報告され、正の選択の新たな役割として注目されている¹⁻³⁾。近年、胸腺プロテアソームをはじめとする胸腺皮質上皮細胞固有のタンパク質分解機構が、正の選択を誘導する自己ペプチドの産生を担うことが明らかになってきた⁴⁻⁶⁾。我々は最近、胸腺プロテアソーム依存的な正の選択が、TCR と自己ペプチドの親和性に従って、個々の CD8⁺ T 細胞の抗原応答性を分化段階で規定することを報告した³⁾。興味深いことに、胸腺上皮細胞における胸腺プロテアソームの発現の有無は、モノクローナル TCR 発現 T 細胞に明らかな抗原応答性の違いを生じさせた³⁾。この知見は、胸腺皮質上皮細胞によって提示される自己ペプチドを介した正の選択が、抗原認識特異性レパトアの決定という既知の役割に加えて、個々の T 細胞の機能的教育を担うことを初めて示した。しかしながら、これまでの研究では、正の選択を介した T 細胞の機能的教育がどのように生体防御に寄与するかという、免疫システムにおける正の選択の意義を明らかにするには至っていない。そこで本研究では、正の選択が生体内免疫応答に及ぼす影響を検討した。

方法および結果

1. 胸腺プロテアソーム非依存的に選択された T 細胞の生体内応答

Ragl 欠損 OT-I TCR トランスジェニックマウスの骨髄細胞を、致死量の X 線で照射した正常マウスおよび胸腺プロテアソーム欠損マウス (*Psmbl1*^{-/-}) に移入することにより、骨髄キメラマウスを作製した (図 1A)。胸腺プロテアソーム依存的および非依存的に正の選択を受けたナイーブ CD8⁺ T 細胞を、これらのキメラマウスの末梢リンパ組織より分離し、Ly5.1 マウスに移入した。その後、レシピエントマウスに対し、OT-I TCR の特異的な抗原である卵白アルブミンペプチド (OVA_p) でパルスした骨髄由来樹状細胞および CpG アジュバントを投与することにより、ドナー OT-I 細胞を *in vivo* で活性化させた (図 1A)。レシピエントマウスの脾臓中に含まれるドナー細胞の細胞数を経時的に解析したところ、どちらの群でも免疫後 5 日目にかけての急激な細胞数の増加と、その後の細胞数の減少が同程度に認められ、いずれのタイムポイントにおいても統計的に有意な違いは見られなかった (図 1B)。

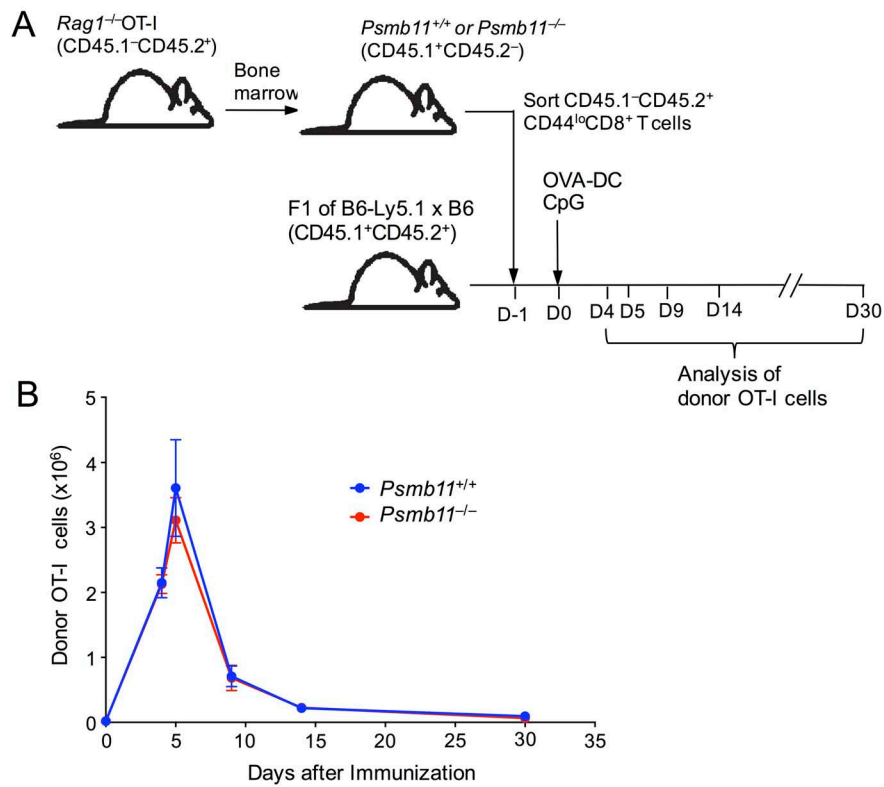


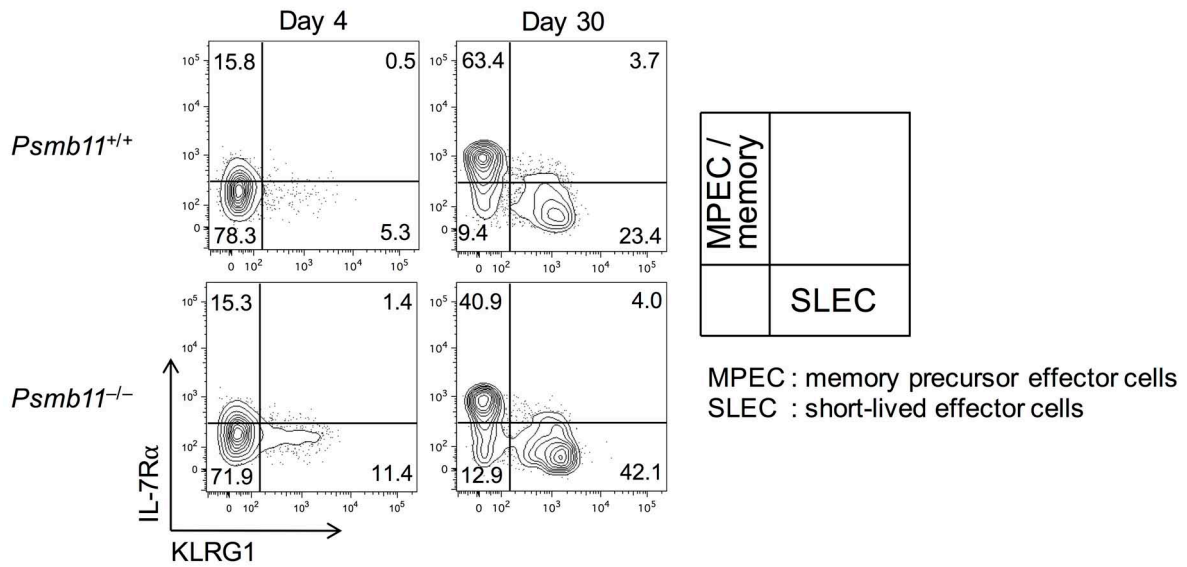
図1. 胸腺プロテアソーム非依存的に選択された T 細胞の生体内応答

(A) 実験系の概要。放射線照射した *Psmb11*^{+/+} および *Psmb11*^{-/-} マウスに *Rag1*^{-/-} OT-I トランスジェニックマウスの骨髄細胞を移入することで骨髄キメラを作製した。この骨髄キメラマウスの脾臓およびリンパ節から、CD44^{lo}CD8⁺ ナイーブ T 細胞を分離し、Ly5.1 マウスに移入後 (2×10^4 /recipient)、OVAp でパルスした樹状細胞 (DC) と CpG アジュバントで免疫した。(B) ドナー OT-I 細胞数の経時変化。Error bar: SE. Student's *t* test.

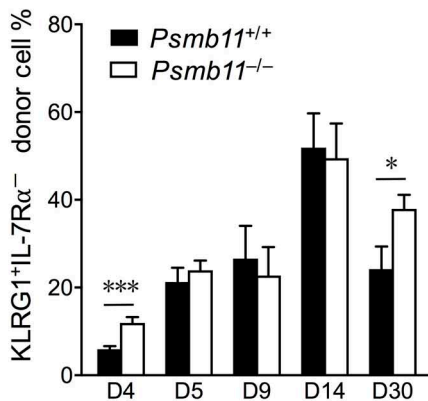
2. エフェクター期およびメモリー期における表現型

T 細胞は活性化によって急激に増殖しエフェクター細胞となるが、その後 90%以上が死滅し、ごく一部の細胞が長期生存の記憶細胞へと分化する。エフェクター T 細胞には、将来的に死にゆく運命にある短命エフェクター細胞 (short-lived effector cell, SLEC) および記憶細胞への分化ポテンシャルを持つ記憶前駆細胞 (memory precursor effector cell, MPEC) が含まれ、それらは KLRG1 と IL-7R α の発現により、それぞれ KLRG1⁺IL-7R α ⁻ および KLRG1⁻IL-7R α ⁺ の表現型に分けられる。レシピエントマウス免疫後の各タイムポイントにおける T 細胞の表現型を解析したところ、免疫後 4 日目および 30 日目において、胸腺プロテアソーム非依存的に分化した OT-I 細胞では対照群に比べ、SLEC の頻度が高い傾向が見られた (図 2A、B)。一方、応答初期における MPEC の頻度に両群で明らかな違いはなく、また、記憶形成期 (免疫後 30 日目) における記憶細胞の頻度は胸腺プロテアソーム欠損群で軽度に低い傾向は見られたものの、統計的な有意差は得られなかった (図 2A、C)。

A Gate: Donor OT-I cells



B



C

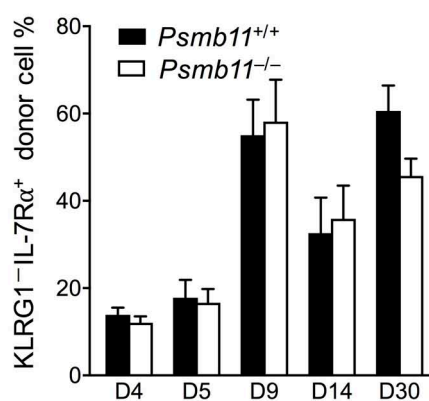


図2. エフェクター期およびメモリー期における表現型

(A) 免疫後4日目および30日目のドナー OT-I細胞の表現型解析。(B) 各タイムポイントにおけるドナー OT-I細胞中の KLRG1⁺IL-7R α ⁻細胞の割合。(C) ドナー OT-I細胞中の KLRG1⁻IL-7R α ⁺細胞の割合。Error bar: SE. *P < 0.05; ***P < 0.001. Student's *t* test.

3. エフェクター T細胞によるサイトカイン産生

次にエフェクター T細胞の機能を検討するため、細胞数が最も多い免疫後5日目において、二次刺激に対するドナー OT-I細胞のエフェクターサイトカイン産生を解析した。レシピエントマウスの脾細胞を OVA_p およびプレフェルディン A の存在下で培養し、細胞内サイトカインをフローサイトメトリーで解析した結果、胸腺プロテアソーム非依存的に分化した OT-I細胞では、対照群に比べ、抗原刺激後の IFN γ (図 3A) および TNF α (図 3B) の産生がともに低下していた。よって、胸腺プロテアソームを介した正の選択は、成熟 T細胞のエフェクター機能に影響することが示された。

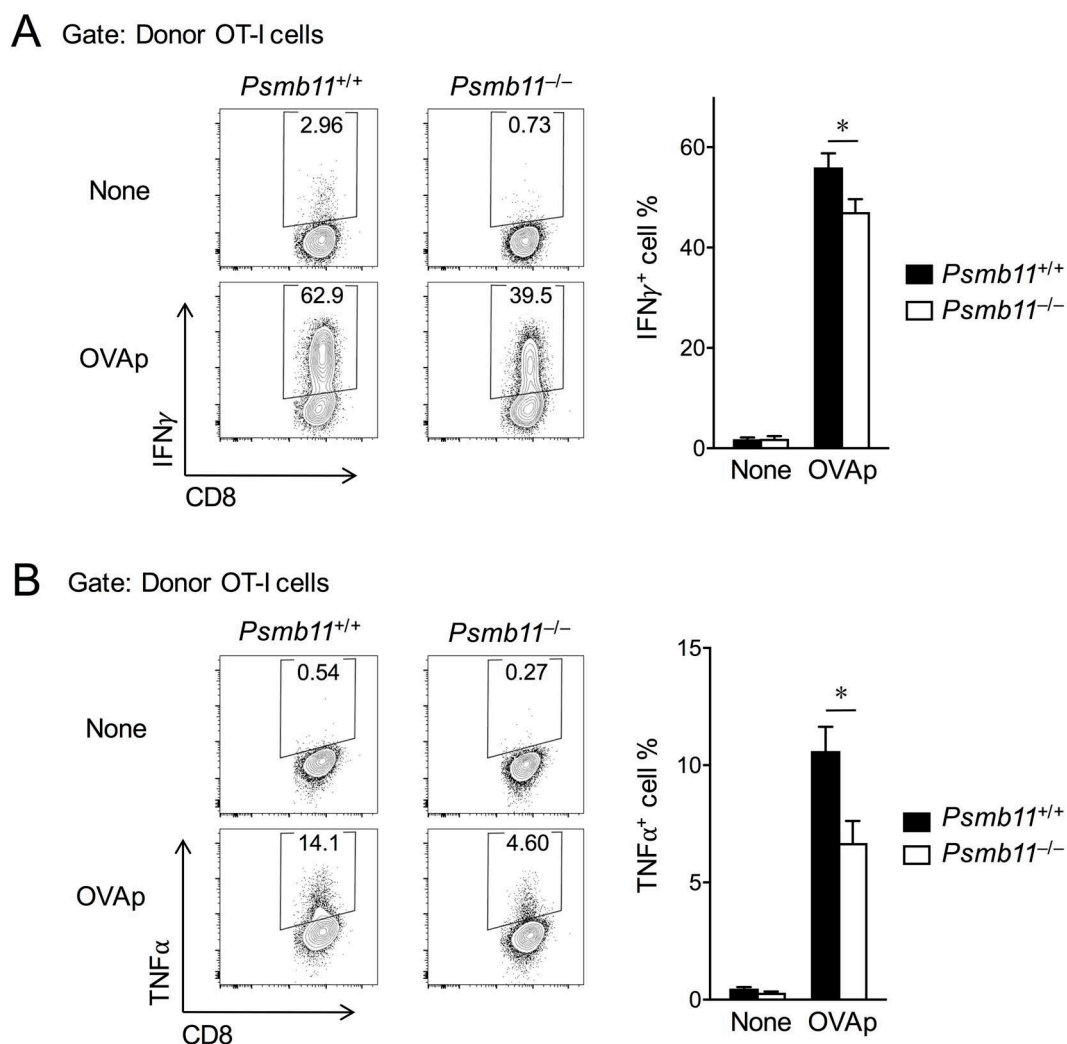


図3. エフェクター T 細胞によるサイトカイン産生

免疫後5日目にレシピエントマウスから脾細胞を採取し、OVApおよびブレフェルدين A の存在下で培養した。細胞内の IFN γ (A) および TNF α (B) をフローサイトメトリーで解析した。Error bar: SE. *P < 0.05. Student's *t* test.

4. 胸腺プロテアソーム非依存的に選択された T 細胞の生体内記憶応答

免疫後40日目に、OVApでパルスした樹状細胞をレシピエントマウスに再投与し、刺激前および刺激後のドナー OT-I 細胞の数を測定するにより、二次刺激に対する記憶 T 細胞の増殖応答を検討した。刺激前では、全 CD8⁺ T 細胞に占めるドナー OT-I 細胞の割合および絶対数ともに両群で違いは見られなかった。一方、二次刺激から4日後、対照群ではドナー細胞数の割合および絶対数ともに刺激前に比べて顕著な増加が見られたのに対し、胸腺プロテアソーム非依存的に分化した OT-I 細胞では、このような増殖応答がほとんど見られなかった (図3A, B)。したがって、正の選択による T 細胞の機能的教育は、記憶 T 細胞の二次免疫応答を規定することが示唆された。

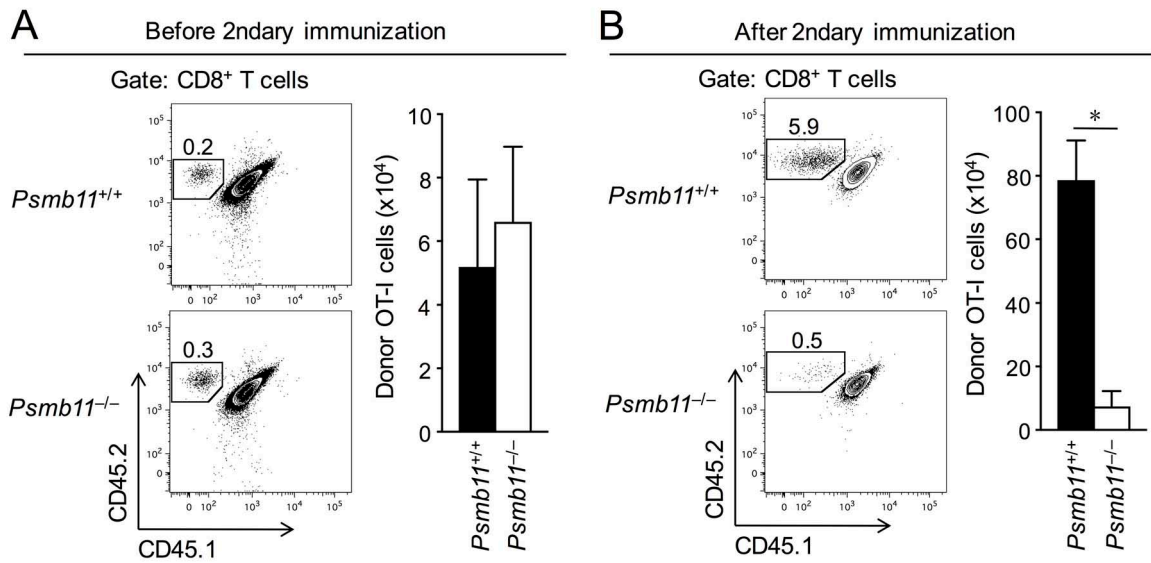


図 4. 胸腺プロテアソーム非依存的に選択された T 細胞の生体内記憶応答

(A) 免疫後 40 日目に、レシピエントマウスの脾細胞中に検出されたドナー OT-I 細胞。
 (B) 最初の免疫後 40 日目に再免疫し、二度目の免疫から 4 日後、レシピエントマウスの脾細胞に含まれるドナー OT-I 細胞を検出した。Error bar: SE. **P < 0.01, Student's *t* test.

考 察

これまでの検討から、胸腺プロテアソーム欠損胸腺で正の選択を受けた CD8⁺ T 細胞では、1) 免疫応答の初期とメモリー期において SLEC への分化が亢進している、2) エフェクター期においてサイトカイン産生能が低下している、3) メモリー期において二次増殖応答が障害されているといった異常が明らかとなった。このことから、胸腺プロテアソームを介した正の選択は、成熟後の T 細胞の機能を分化段階で規定する可能性が考えられた。また、正の選択における自己認識強度の違いが、抗原受容体の多様性のみならず、機能的にも多様な T 細胞集団を作り出すことで、免疫応答に寄与する可能性が考えられた。正の選択は、1970 年代後半の発見以来、T 細胞の抗原認識特異性を決定する機構として研究が進み、免疫学の重要な概念として広く認識されてきた。しかしながら、正の選択の生理的意義と分子メカニズムについては未だ不明な点が多い。近年、胸腺プロテアソームやカテプシン L、thymus-specific serine protease、恒常的なオートファジーなど、正の選択の場である胸腺皮質に特徴的な抗原プロセッシングおよび抗原提示機構について理解が深まりつつある⁶⁾。このような研究の進展は、これまでレバトア決定機構として捉えられてきた正の選択を根本的に問い直す契機を与え得る。本研究の結果をもとに今後検討を重ねることで、もはや古典的概念ともいえる正の選択の新たな役割を解明し、獲得免疫系の本質的理解と臨床応用への基盤形成に結びつけることが可能と期待される。

共同研究者

本研究の共同研究者は、徳島大学先端酵素学研究所の高浜洋介および近藤健太である。最後に、本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Persaud SP, Parker CR, Lo WL, Weber KS, Allen PM. Intrinsic CD4⁺ T cell sensitivity and response to a pathogen are set and sustained by avidity for thymic and peripheral complexes of self peptide and MHC. *Nat Immunol.* 2014;15(3):266-74. doi: 10.1038/ni.2822. PubMed PMID: 24487322.

- 2) Fulton RB, Hamilton SE, Xing Y, Best JA, Goldrath AW, Hogquist KA, Jameson SC. The TCR's sensitivity to self peptide-MHC dictates the ability of naive CD8(+) T cells to respond to foreign antigens. *Nat Immunol.* 2015;16(1):107-17. doi: 10.1038/ni.3043. PMID: 25419629.
- 3) Takada K, Van Laethem F, Xing Y, Akane K, Suzuki H, Murata S, Tanaka K, Jameson SC, Singer A, Takahama Y. TCR affinity for thymoproteasome-dependent positively selecting peptides conditions antigen responsiveness in CD8(+) T cells. *Nat Immunol.* 2015;16(10):1069-76. doi: 10.1038/ni.3237. PMID: 26301566.
- 4) Murata S, Sasaki K, Kishimoto T, Niwa S, Hayashi H, Takahama Y, Tanaka K. Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science.* 2007;316(5829):1349-53. PMID: 17540904.
- 5) Sasaki K, Takada K, Ohte Y, Kondo H, Sorimachi H, Tanaka K, Takahama Y, Murata S. Thymoproteasomes produce unique peptide motifs for positive selection of CD8(+) T cells. *Nat Commun.* 2015;6:7484. doi: 10.1038/ncomms8484. PMID: 26099460.
- 6) Takada K, Kondo K, Takahama Y. Generation of peptides that promote positive selection in the thymus. *J Immunol.* (in press)