ウイルス性スーパー抗原とその生物学的意義

吉 開 泰 信*

review article

JAPANESE JOURNAL OF INFLAMMATION

Exogenous mouse mammary tumor viruses and superantigens

Mouse mammary tumor virus(MMTV), a replication-competent B-type murine retrovirus, causes mammary adenocarcinomas in some strains of laboratory mice and it can be transmitted exogenously via milk or endogenously through the germ line. It has been established that the immune system is directly involved in the infection pathway of MMTV, because thymectomy in neonates can decrease or delay mammary tumor incidence, and both T and B cells become infected with the virus. It has been shown that exogenous and endogenous MMTV have an open reading frame(ORF) encoding superantigen in the 3' long terminal repeat, which binds to MHC class II molecules and leads to stimulation and subsequent deletion of T cells bearing particular $V\beta$ gene products.

MMTVORF product is a type II transmembrane molecules where the COOH-terminal is extracellular and the COOH-terminal is responsible for the $V\beta$ specificity of the superantigens. As T cell recognition of superantigens is predominantly mediated by the TCR $V\beta$ domain, superantigen can stimulate much higher proportions of T cells than conventional peptide antigens. This characteristic of superantigens plays an important role in infection with exogenous MMTV.

Rec. 3/22/1996, Acc. 3/25/1996, pp 227~232

*Yasunobu Yoshikai**

key words : MMTV, superantigen, infection, T cells

マウス乳癌ウイルス(mouse mammary tumor virus : MMTV)は、マウスに乳癌を引き起こすBタイプのレトロウイルスであり、母乳を介して、またはDNAに組み込まれたプロウイルスとして子孫に伝播される^{1~4)}。MMTVの末端反復配列(long terminal repeat : LTR)にコードされる遺伝子産物が、MHCクラスII分子に結合してスーパー抗原として特定のT細胞レセプター(T cell receptor : TCR) $V\beta$ 領域を有するT細胞を活性化させることが明らかとなった^{5~8)}。

スーパー抗原のT細胞による認識には、通常の一般抗原に対するT細胞の認識機構とは異なり、T細胞と抗原提示細胞上のMHCの一致の必要性(MHCの自己拘束性)はみられない。またTCRの $V\beta$ 領域のみがスーパー抗原の認識に重要であり、 $V\alpha$, $J\alpha$, $D\beta$, および $J\beta$ 遺伝子にコードされる領域や各遺伝子の結合領域(N領域)はスーパー抗原認識における関与は少ないと考えられている^{9~11)}。

一つのスーパー抗原に対応する $V\beta$ は複数存在する。このようなスーパー抗原の特性から全T細胞の5~10%以上がスーパー抗原に活性化されることになる。ウイルス感染症においてT細胞は感染防御機構の中心的役割を担う。

それではなぜMMTVはT細胞を強く活性化させるスーパー抗原活性を有しているのだろうか

* Laboratory of Host Defense, Research Institute for Disease Mechanism and Control, Nagoya University School of Medicine, 名古屋大学医学部附属病態制御研究施設生体防御研究部門

Offprint requests to : Yasunobu Yoshikai, Laboratory of Host Defense, Research Institute for Disease Mechanism and Control, Nagoya University School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya 466, Japan

表 1 ウイルス性スーパー抗原と V β 特異性

スーパー抗原	TCR V β	
	マウス	ヒト
<i>Mtv</i> -1	3,5,17 acz	
<i>Mtv</i> -3	3,5,17 acz,17al	
<i>Mtv</i> -6	3,5,17a2,17acz	
<i>Mtv</i> -13	3,5,17acz	
<i>Mtv</i> -27	3,5,17acz	
<i>Mtv</i> -MA1	3,17a2	
<i>Mtv</i> -7	6,7,8,1,9	12,13,14,15,23
<i>Mty</i> -43	6,7,8,1,9	
<i>Mtv</i> -50	6,8,1	
MMTV (SW)	6,7,8,1,9	
MMTV (SMN)	7,8,1,8,2,8,3	
MMTV (FM)	6,8,1,8,2,14	
<i>Mtv</i> X1	8,2	
<i>Mtv</i> -23	7	
<i>MTv</i> M12	7	
<i>Mtv</i> -8	5,11,12,17al	
<i>Mtv</i> -9	5,11,12,17al	
<i>Mtv</i> -11	5,11,12,17acz	
<i>Mtv</i> -2	14	
MMTV (C3H)	14,15	
MMTV (GR)	14	
MMTV (II-TES14)	14	
MMTV (D2, GD)	14	
<i>Mtv</i> -23	7	
<i>Mtv</i> -48(MMTV-II IES2)	2	
<i>Mtv</i> -51	2	
MMTV (BALB/cV)	2	
MMTV (C3H-K)	2	
MMTV (CS)	2	
<i>Mtv</i> -44	3,6,8,1,9,17acz	
<i>Mtv</i> RCS	16	
<i>Mtv</i> X2	4	
Rabies	2,6,7,8,3,14	8

か、本稿では、MMTV にコードされるスーパー抗原の特性とその MMTV 感染症の病態形成での生物学的意義について最近の知見を概説し、筆者らの研究結果についても紹介する。

ウイルス性スーパー抗原の種類

現在まで知られているウイルス性スーパー抗原を表 1 にあげた。Mls 抗原は 1973 年 Festenstein によってアロ抗原と同様に強く T 細胞を活性化するマイナー抗原として発見されたものである¹¹⁾。その実体はなが年不明であったが、Mls 抗原は染

色体に組み込まれたマウス乳癌プロウイルス (mammary tumor provirus: *Mtv*) 由来の抗原であることが証明された⁶⁾。マウス MHC クラス II の IE 分子に結合する B 細胞産物も Mls 抗原と同様なスーパー自己抗原として知られているが、やはり *Mtv* 遺伝子産物であることが明らかとなった。

Marrack らは母乳を介して伝達されるマウススーパー抗原を見出して、この抗原が MMTV の 3' long terminal repeat (LTR) の open reading frame (ORF) にコードされることを明らかにした⁷⁾。ウイルス性スーパー抗原の性質を有するものとして、ほかに狂犬病ウイルス (Rabies virus) のヌクレオカプシッドの成分である N 蛋白がある。AIDS の病因である HIV や MAIDS を引き起こす MuLV の *gag* 蛋白、さらに EBV にスーパー抗原活性があるとの報告もみられるが確かではない。

ウイルス性スーパー抗原の分子構造

ウイルス性スーパー抗原の分子構造は、まだ不明な点が多い。比較的研究が進んでいる *Mtv*-3'LTRORF 産物 (*Mtv sag*) は C 末端が細胞表面にあるタイプ 2 の膜蛋白質である。*Mtv*-7 *sag* 特異的抗体を用いた免疫沈降法によって *Mtv sag* は 45 kd と 18.5 kd の分子が得られ、45 kd から 18.5 kd 分子の可溶性分子が産生されと考えられている。168~171 アミノ酸領域に tetra cleavage motif (RxK/RR) があり、この領域で cleavage された最終産物が 18.5 kd の可溶性分子であると考えられる¹²⁾(図 1)。

MHC クラス II 分子との結合様式

Mtv sag は IE 分子と親和性が高い。IA 分子に対してはハプロタイプによって I-A^k>I-A^b>I-A^d>>I-A^s>>I-A^q の順番となる。*Mtv sag* は、マウスの T 細胞以外に種を越えてラットやヒトの T 細胞にも認識される。*Mtv*-7 *sag* が HLADR 1 や DR 4 に結合する。

Toress らは Mls-1^a の 76~119 番目のアミノ酸領域が MHC クラス II 分子の結合に重要であ

図 1 MMTV スーパー抗原の構造

ることを SEA との阻害実験で明らかとした¹³⁾。

Huber らは *Mtv-7* のスーパー抗原の 28 kd の細胞外ドメインと 18 kd の可溶性部分を大腸菌に産生させ、可溶性の HLADR 1 との結合を検討したところ、Mls-1^a の 76~119 番目のアミノ酸領域を含まない 18 kd の分子も結合することがわかった。このことから、Mls-1^a は 2 カ所に MHC 結合領域が存在すると考えられる。

一方、Mls-1^a と DR 分子との結合状態でも DR α 鎖を認識する抗体が認識できることから、彼らは Mls-1^a は DR β 鎖に結合していると推定している¹⁴⁾。

TCR との結合様式

Mtv sag の塩基配列から予想されるアミノ酸配列とそれぞれに対応する V β との比較、さらにはキメラ分子を用いた研究によって、ORF の C 末端の 21 から 38 個のアミノ酸から多様に富む領域が V β の認識に関わる領域であることが明らかとなった。

それでは V β エLEMENT 上のスーパー抗原認識部位はどこであろうか。 *Mtv-7 sag* に反応する V β 8.2 T 細胞と反応しない V β 8.2 T 細胞の V β 遺伝子の構造の比較や V β 8.2 を遺伝子工学的手法で突然変異させた T 細胞の *Mtv-7 sag* に対する反応性を調べた研究により、 *Mtv-7 sag* の認識には V β のアミノ酸残基 20, 70, 71 の部位が重要であることが明らかとなった^{11,15)}。これらのアミノ酸はいわゆる CDR とは離れた位置に存在している。

V β エLEMENT 以外の TcR エLEMENT はスーパー抗原の認識にまったく関与していないと考えられているが、V β 8.2 T 細胞が *Mtv-7 sag* を認識するときには V α 13 が必要であり、V β 8.1 T 細胞の *Mtv-7 sag* 認識には V α 11 が重要であるように、ある種のスーパー抗原では V β 以外にエLEMENT が認識に関与していると考えられる。

ウイルス性スーパー抗原の生物学的意義

ウイルス、特にレトロウイルスがスーパー抗原活性をもつことは、宿主に感染するための必要条件と考えられる。B タイプのレトロウイルスであるマウス乳癌ウイルスは、まず抗原提示細胞、特に B 細胞に感染し、宿主 DNA に組み込まれる。MMTV LTR にコードされるスーパー抗原が MHC クラス II と結合して、細胞表面に出現する。または、スーパー抗原は分泌されて抗原提示細胞の MHC クラス II 分子と結合することによって、感染が進展すると考えられる。スーパー抗原に対応する V β をもった T 細胞が活性化され、サイトカインや CD40L を介して感染 B 細胞を増殖させる。実際、MHC クラス II 欠損マウスや CD40L 欠損マウスでは MMTV 感染が成立しない。

Mls のような内因性スーパー抗原の発見は、自己反応性 T 細胞の寛容の機序としての clonal deletion の証明につながった。胸腺において新生児期より自己抗原として発現している *Mtv* 由来のスーパー抗原は、それに対応する V β T 細胞は CD4⁺ CD8⁺ 胸腺細胞から CD4⁺ CD8⁻、または CD4⁻ CD8⁺ の成熟胸腺細胞への分化段階で欠落させる。MMTV トランスジェニックマウスで特

図2 IE依存性 MMTV と IE 非依存性 MMTV の混合感染による MMTV 感染症の進展

定の $V\beta$ T細胞を欠落させた場合、その MMTV の感染症は成立しないことが明らかとなっている。

ウイルスのもつスーパー抗原活性は宿主への感染を成立・進展させるのに必須の道具といえよう。

結 果

(1) 新しい *Mtv* (プロウイルス) の検出

Japanese laboratory mouse strain, NC, CS および II-TES マウスの肝 DNA の Southern blot 解析の結果, NC マウスには新しい *Mtv*-48, 50, および 51 が, CS には *Mtv*-46, 48, 49, 51 が, II-TES マウスには *Mtv*-48 および 49 が見出された¹⁶⁾。

おのおのの MMTV のスーパー抗原活性を FACSscan で解析したところ, *Mtv*-48 または *Mtv*-51 が $V\beta$ 2T 細胞と¹⁷⁾, *Mtv*-50 が $V\beta$ 6, $V\beta$ 7, $V\beta$ 8.1 および $V\beta$ 9 と反応することが明らかとなった¹⁸⁾。 *Mtv*-48, 51 および *Mtv* 50 の 3'LTR の ORF 領域をサブクローニングしておのおのの塩基配列を決定し、すでに報告されている他の *Mtv* との homology を検索した。その結果, *Mtv*-48, 51 は *Mtv* DDO¹⁹⁾ と, *Mtv*-50 は *Mtv*-7 と 95% 以上の homology を見出した²⁰⁻²³⁾。

(2) 新しい外来性 MMTV の検出

BALB/cx (BALB/cxCS) F1 backcross mice を作製し, BALB/c 由来の *Mtv*-6, 8, 9 と CS 由

来の *Mtv*-48 または, *Mtv*-51 のみを有するマウスを得た。これらのマウスよりミルクを回収し, BALB/c マウスの皮下に投与して局所リンパ節での T細胞の $V\beta$ レパートアーを FACSscan で調べたところ, *Mtv*-48 を有する backcross mice 由来のミルクのみが $CD4^+ V\beta2^+$ T細胞を増殖させることがわかった。MMTV LTRORF 領域を RT-PCR によって増幅し、塩基配列を決定したところ, *Mtv*-48 の LTRORF と完全に一致した。

これらの結果より、プロウイルスである *Mtv*-48 は MMTV のウイルス粒子を産生しうることが明らかとなった¹⁷⁾。

(3) 二つの外来性 MMTV の複合感染機序

II-TES マウスのミルクに存在する外来性 MMTV の LTR 領域を RT-PCR を用いて解析すると, MMTV (II-TES 2) と MMTV (II-TES 14) の 2 種類の MMTV が見出された²⁴⁾。このうち, MMTV (II-TES 2) は II-TES マウスのもつ *Mtv*-48 由来と考えられた。

II-TES ミルクを BALB/c (I-E⁺) または C57BL/6 (I-E⁻) マウスの皮下に投与すると, BALB/c では感染 4 日目のリンパ節で $V\beta2^+ CD4^+$ T細胞と $V\beta14^+ CD4^+$ T細胞が増加し, その後末梢血で減少するのが認められた。

一方, C57BL/6 では $V\beta14^+ CD4^+$ T細胞の増加, 引き続いて減少が認められたが, $V\beta2^+ CD4^+$

T細胞の増加・減少ともに認められなかった。これらの結果より MMTV (II-TES 2) は IE 依存性の, MMTV (II-TES 14) は IE 非依存性スーパー抗原をコードすると考えられる。

感染 4 日目の所属リンパ節での MMTV プロウイルスを PCR で定量化することによって, 感染成立の有無を検討した。BALB/c, C57BL/6 とともに MMTV (II-TES 2) および MMTV (II-TES14) 由来の LTR 遺伝子の DNA への組み込みが認められ, 感染が成立していることが確認できた。

一方, (BALB/cxII-TES)F1 にミルク由来の MMTV (II-TES 2) を BALB/c または C57BL/6 に投与した場合, BALB/c マウスには $V\beta 2^+ CD 4^+$ T細胞の増加とともに感染症が成立したが, C57BL/6 では $V\beta 2^+ CD 4^+$ T細胞の増加が認められず, 感染の成立も起こらなかった²⁵⁾。

今回の結果より, IE 依存性のスーパー抗原をコードする MMTV は IE 陰性のマウスには感染せず, スーパー抗原による T細胞の活性化が感染の成立に必須であることがわかった。しかし, IE 非依存性の MMTV との複合感染によって IE 依存性 MMTV も IE 陰性マウスに感染した。

2 種類の MMTV は, まず B細胞などの抗原提示細胞に感染してプロウイルスとして宿主の DNA に組み込まれる。MMTV のコードするスーパー抗原は, クラス II に結合して細胞表面に提示される。スーパー抗原を認識した T細胞は, サイトカインや CD40L を介して感染 B細胞を増殖させ, MMTV の感染が進展する。おそらく IE 依存性 MMTV は IE 非依存性 MMTV によって活性化された T細胞の助けをかりて感染を成立させるのであろう。MMTV は混合感染によって宿主の幅を広げると考えられる (図 2)。

おわりに

後天性免疫不全症候群 (acquired immuno deficiency syndrome : AIDS) や成人 T細胞白血病 (adult T cell leukemia : ATL) などレトロウイルス感染症による免疫異常の解明, 治療法および予防法の確立が急がれている。これらヒトのレト

ロウイルスがスーパー抗原をコードする可能性が示唆されているが明らかではない²²⁾。

MMTV 感染症モデルの研究がこれらヒトレトロウイルス感染症の病態形成の理解につながれば幸いである。

文 献

- 1) Bentvelzen, P., Hilgers, J. : Murine mammary tumor virus. In Virus Oncology. (ed. Klein, G.) Raven Press, New York, 1980, p311.
- 2) Moore, D.H., Long, C.A., Vaidya, A.B., Sheffield, J. B., Dion, A.S., Lasfargues, E.Y. : Mammary tumor virus. Adv. Cancer Res. 29 : 347, 1979.
- 3) Nandi, S., MacGrath, C.M. : Mammary neoplasia in mice. Adv. Cancer Res. 17 : 353, 1973.
- 4) Salmons, B., Gnzburg, W.H. : Current perspectives in the biology of mouse mammary tumor virus. Virus Res. 8 : 81, 1987.
- 5) Acha-Orbea, H., Shakhov, A.N., Scarpellino, L., Kolb, E., Miller, V. et al. : Clonal deletion of $V\beta 14$ positive T cells in mammary tumor virus transgenic mice. Nature 350 : 207, 1991.
- 6) Choi, Y., Kappler, J.W., Marrack, P. : A superantigen encoded in the open reading frame of 3' long terminal repeat of mouse mammary tumor virus. Nature 350 : 203, 1991.
- 7) Marrack, P., Kushnir, E., Kappler, J.W. A maternally inherited superantigen encoded by a mammary tumor virus. Nature 349 : 524, 1991.
- 8) Held, W., Shakhov, A.N., Waanders, G., Scarpellino, L., Luethy, R. et al. : An exogenous mouse mammary tumor virus with properties of Mls-1^a (Mtv-7). J. Exp. Med. 175 : 1623, 1992.
- 9) MacDonald, H.R., Glasebrook, A.L., Schneider, R., Lees, R.K., Pircher, H. et al. : T cell reactivity and tolerance of Mls^a-encoded antigens. Immunol. Rev. 107 : 89, 1988.
- 10) Acha-Orbea, H., Held, W., Waanders, G.A., Shakhov, A.N., Scarpellino, L. et al. Exogenous and endogenous mouse mammary tumor virus superantigen. Immunol. Rev. 131 : 5, 1991.
- 11) Marrack, P., Winslow, G.M., Choi, Y., Schrer, M., Puleen, A. et al. : The bacterial and mouse mammary tumor virus superantigens; two different families of proteins with the same functions. Immunol. Rev. 131 : 79, 1993.
- 12) Acha-Orbea, H., MacDonald, R.H. : Superantigens of mouse mammary tumor virus. Ann. Rev. Immunol. 13 : 459-486, 1995.
- 13) Held, W., Acha-Orbea, H., MacDonald, R.H. et al. : Superantigen and retroviral infection : insights from mouse mammary tumor virus : Immunol. Today 15 : 184-190, 1994.
- 14) Mottershead, D.G., Hsu, P.N., Urban, R.G. et al. : Direct binding of the Mtv 7 superantigen (Mls-1) to soluble MHC class II molecules. Immunity 2 : 149-154, 1995.

- 15) Tmonari, K., Fairchild, S., Rosenwasser, O.A. : Influence of viral superantigen on V β - and V α -specific positive and negative selection. *Immunol. Rev.* 131 : 131, 1993.
- 16) Wajjwalku, W., Takahashi, M., Miyaishi, O., Lu, K. J., Sakata, T. et al. : Tissue distribution of mouse mammary tumor virus(MMTV) antigens and new endogenous MMTV loci in Japanese laboratory mouse strain. *Jpn. J. Cancer Res.* 82 : 1413, 1991.
- 17) Niimi, N., Wajjwalku, W., Ando, Y., Nakamura, N., Ueda, M., Yoshikai, Y. : A novel V β 2-specific endogenous mouse mammary tumor virus which is capable of producing a milk-borne exogenous virus. *J. Virol.* 69 : 7269-7273, 1995.
- 18) Wajjwalku, W., Ando, Y., Niimi, N., Yoshikai, Y. : A novel exogenous mammary tumor virus encoding MHC class II H2E-independent superantigen specific for Tcr-V β 14. *Immunogenetics* 41 : 156, 1995.
- 19) Yazdanbakhsh, K., Park, C.G., Winslow, G.M., Choi, Y. : Direct evidence for the role of COOH terminus of mouse mammary tumor virus superantigen in determining T cell receptor V β specificity. *J. Exp. Med.* 178 : 737, 1993.
- 20) Jouvin-Marche, E., Marche, P.N., Six, A., Lieber-Gris, C., Voegtli, D., Cazenave, P. : Identification of an endogenous mammary tumor virus involved in the clonal deletion of V β 2 T cells. *Eur. J. Immunol.* 23 : 2758, 1993.
- 21) Held, W., Acha-Orbea, H., MacDonald, H.R., Waanders, G.A. : Superantigens and retroviral infection : insights from mouse mammary tumor virus. *Immunol. Today.* 15 : 184, 1994.
- 22) Niimi, N., Wajjwalku, W., Ando, Y., Tomida, S., Takeuchi, M. et al. : Delay in expression of mammary tumor provirus is responsible for defective clonal deletion during postnatal period. *Eur. J. Immunol.* 24 : 488-491, 1994.
- 23) Niimi, N., Wajjwalku, W., Ando, Y., Tomida, S., Ueda, M., Yoshikai, Y. : A new gene encoding the ligand for deletion of T cells bearing TcR-V β 6 and V β 8.1 (*Mtv*-50). *Immunogenetics* 40 : 312, 1994.
- 24) Wajjwalku, W., Ando, Y., Niimi, N., Yoshikai, Y. : A novel exogenous mammary tumor virus encoding MHC class II H-2E-independent superantigen specific for Tcr-V β 14. *Immunogenetics* 41 : 156-158, 1995.
- 25) Ando, Y., Wajjwalku, W., Niimi, N., Hiromatsu, K., Morishima, T., Yoshikai, Y. : Concomitant infection with exogenous mouse mammary tumor virus encoding I-E dependent superantigen in IE-deficient mice. *J. Immunol.* 154 : 6219, 1995.