MHC クラスII分子を介したシグナル伝達と免疫制御

—— 免疫応答遺伝子再訪 ——

松 下 祥*

review article

INFLAMMATION AND REGENERATION

Signaling through class II MHC molecules—Ir-genes revisited—

Signals transmitted by class II MHC molecules are important regarding cell function related to antigen presentation. Cross-linking HLA-DR molecules on B cells led to an increased production of IgM, with an enhanced expression of both membrane- and secretory-type IgM heavy chain mRNA. Increased IgM production was also observed in TCR-peptide-HLA-DR interaction, without the involvement of CD 40-CD 154 interaction. This event was inhibited specifically by piceatannol but not by PP 2, and ligation of HLA-DR on B cells enhanced Syk activity. Thus, HLA-DR molecules on B cells not only present antigenic peptides to T cells, but also up-regulate IgM production, in association with Syk activation. We next found that peptide-pulsed monocytes preferentially produce proinflammatory monokines, by interacting with emetine-treated and DR-restricted T cells, whereas both DQ-restricted and DP-restricted T cells stimulated relatively higher levels of anti-inflammatory monokine IL-10. Moreover, activation patterns of MAP kinases by anti-DR, anti-DQ and anti-DP Abs were distinct, which was further evidenced by the effect of MAP kinase inhibitors. HLA-DR, -DQ and -DP molecules may transmit distinct signals into monocytes through distinct MAP kinases and are functionally heterogeneous, which provide a clue to the need for generation of a multigene family of class II MHC.

Rec. 1/22/2001, Acc. 3/12/2001, pp 541~555

Sho Matsushita*

key words : *HLA, Ir-genes, MAP kinases, Syk, monokines*

TCR(T cell receptor: T細胞抗原受容体)がそのリガンドであるMHC(major histocompatibility complex: 主要組織適合抗原複合体)+ペプチドと相互作用を起こすと、T細胞側にシグナルが入りT細胞が活性化される。一方、MHC-ペプチド-TCR相互作用により誘導される抗原提示細胞側へのシグナリングに関してはCD 40などがよく知られているが、MHCそのものも重要な役割を担っているという報告は多く、

1990年前後に、主にB細胞を用いてPKC, Ca^{2+} , cAMPなどの動きに焦点をあてた解析が行われた。しかし、シグナル伝達分子一般に関する研究がSrc family, Jak-Stats, MAPK familyなどを中心に飛躍的な進歩をとげる間、クラスII MHC分子を介したシグナリングに関して包括的な解析は行われてこなかった。

筆者らはHLA-ペプチド相互作用に関する長年の研究から、このシグナリングが免疫応答の制御に重要な役割を担っているという結論に到達し¹⁾、さらに、クラスII HLAからのシグナルが単球系の細胞ではMAPKを介してモノカイン・ケ

* Division of Immunogenetics, Kumamoto University Graduate School of Medical Sciences, 2-2-1 Honjo, Kumamoto 860-0811, Japan 熊本大学大学院医学研究科免疫識別学教室

モカインの²⁾、また B 細胞では Syk を介して免疫グロブリンの³⁾産生に影響を与えており、これらを通じて免疫応答の質の制御に関わっていること、および DR, DQ, DP が異なるシグナルを活性化して抗原提示細胞の応答の質を決定していること²⁾を明らかにしたのでご紹介したい。

クラス II MHC の構造と機能

クラス II MHC 分子は、 α 鎖 (35 kDa) と β 鎖 (27-29 kDa) が非共有結合により会合したヘテロ二量体である。各構成鎖の細胞外領域は二つのドメイン (α 1, α 2 および β 1, β 2) に分けられ、細胞膜貫通領域、細胞内領域がつづいている。ヒトでは HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP がこれに相当し、抗原提示細胞 (マクロファージ、樹状細胞、B 細胞、ミクログリアなど)、精子などに発現している。また、ヒトやほとんどの齧歯類の活性化 T 細胞の細胞膜表面にも発現するが、マウスでは活性化 T 細胞には発現しない。自己免疫疾患では標的細胞 (甲状腺の濾胞細胞、膵臓 β 細胞など) にも発現している。

抗原提示細胞のエンドソーム由来の自己蛋白や細胞外液中から取り込んだ可溶性蛋白 (自己、非自己) は、エンドソーム中に含まれるカテプシン B あるいは D などの蛋白分解酵素によってペプチド断片に分解される。これらのペプチドはペプチド負荷コンパートメント (compartments for peptide-loading: CPL) において、インバリアント鎖が解離したクラス II MHC 分子の先端に存在する α 1 と β 1 ドメインにより構成されるペプチド収容溝に結合して膜表面に運ばれる。MHC 分子の多型は収容溝内部のアミノ酸残基に集中しているため、異なるクラス II MHC 対立遺伝子産物は異なる構造上のルール (モチーフ) に従うペプチドと結合して、T 細胞応答を開始させる。TCR を介してクラス II MHC・非自己ペプチド複合体を特異的に認識する CD 4⁺T 細胞は、活性化シグナルを T 細胞内に伝えることにより、種々のサイトカインおよびサイトカインレセプター遺伝子、や膜蛋白の発現を増強したあとに増殖する。また

CD 4 分子はクラス II MHC β 鎖の β 2 ドメインによく保存された第 137-143 アミノ酸残基が形成するループと特異的に結合することにより、CD 4⁺T 細胞と抗原提示細胞との間の接着を高めると同時に、CD 4 細胞内ドメインに結合する Lck チロシンキナーゼを活性化して T 細胞に活性化シグナルを伝達する。このようにクラス II MHC 分子の役割は異物断片を CD 4⁺T 細胞に提示し、抗原特異的な T 細胞を活性化することが主要なものと考えられてきた。

クラス II MHC 分子を介したシグナル

ところが、クラス II MHC 分子は単に抗原断片を提示するだけではなく、TCR-ペプチド/MHC 複合体が相互作用を起こした際にクラス II MHC 自身から入るシグナルによって、抗原提示細胞が活性化されることが以下のような観察からわかってきた。① マウス B 細胞株、またはヒト末梢 B 細胞のクラス II 分子を抗体で架橋すると細胞内 $\text{Ca}^{++4,5)}$ や cAMP^{6,7)} の濃度が上昇する。② クラス II MHC を介したシグナルは B 細胞の homotypic aggregation を引き起こす⁸⁾。③ ヒト B 細胞株や活性化された末梢 B 細胞上の HLA-DR 分子を可溶性抗 DR 抗体で架橋すると、アポトーシスが誘導される⁹⁾。④ CD 28 陽性自己反応性 T 細胞ハイブリドーマ細胞を用いて B 細胞リンパ腫上のクラス II MHC を刺激すると、cAMP の上昇を介した CD 80 の発現増強が見られるが、クラス II MHC α 鎖 β 鎖の細胞内ドメインを切断すると、その現象も消失する¹⁰⁾。⑤ B 細胞株上のクラス II MHC の β 鎖細胞内ドメインを切断すると、クラス II MHC の架橋によって生じていた細胞内 cAMP の上昇¹¹⁾ や PKC α と PKC β II の核内移行¹²⁾ が観察されなくなる。⑥ B 細胞株上のクラス II HLA 分子を staphylococcal exotoxin A で架橋すると、Src ファミリーキナーゼ (Lyn, Fgr) のリン酸化が誘導される¹³⁾。⑦ ヒト B 細胞上の DR 分子を可溶性抗体で架橋すると Syk のチロシンリン酸化が、また、ヒト活性化細胞上の HLA-DR 分子を架橋すると、ZAP-70 分

図1 エメチン処理したT細胞によるB細胞の刺激

CD4⁺ T細胞上のTCRがB細胞上のクラスII HLA/ペプチド複合体を認識した際に、クラスII HLAからシグナルが入ると同時にTCRからもシグナルが入りT細胞も活性化され新しい膜蛋白の発現やサイトカインなどの可溶性因子の産生が起こり、これがB細胞からのIgM産生に影響を及ぼす可能性がある。この可能性を除外するために、*de novo* 蛋白合成阻害剤であるエメチンで処理したT細胞を使用して、すでに発現しているTCRや他の膜蛋白のみでB細胞上のクラスII HLAからシグナルを入れることによりIgM産生増強が観察されるか否かを検討した。

子のチロシンリン酸化がそれぞれ促進される¹⁴⁾。このような報告から、B細胞上のクラスII MHCを介したシグナルがB細胞自身にも何らかの活性化シグナルを伝達していることは確実である。

エメチン処理T細胞によるB細胞の刺激

まず生理的なHLAのリガンドであるTCRを用いて検討した。T細胞上のTCRがB細胞上のHLA/ペプチド複合体を認識した際に、T細胞が活性化されて新しい膜蛋白の発現やサイトカインなどの可溶性因子の合成が起こり、B細胞の応答に影響を与える。この可能性を除外するために、*de novo* 蛋白合成阻害剤であるエメチンで前処理したT細胞を使用して、すでに発現しているTCRや他の膜蛋白のみでB細胞への刺激を試みた(図1)。90 μg/mlの濃度でエメチン処理したT細胞はもはや蛋白合成を起こさないが、HLA-ペプチドとの相互作用を起こすことを予備実験で確認したうえで、DR14拘束性を示すT細胞クローンBC20.7(非自己BCGaペプチド特異的)と自己由来のB細胞を使用して実験を行った。

表1 エメチン処理したDR拘束性T細胞クローンにより刺激されたB細胞における各種免疫グロブリンの産生

peptide	IgM	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgE	IgA (ng/ml)
-	37.5	124.5	<3.1	<3.1	3.13	31.2	480
+	223.5	96.0	<3.1	<3.1	1.41	21.2	980

エメチン処理したT細胞クローン、BC20.7(DRB1*1405拘束性)とそのT細胞クローンが認識する抗原ペプチド、BCGa p84-100をパルスしたB細胞、または、パルスしていないB細胞とを5日間共培養し、その上清中の各種免疫グロブリン濃度をELISA法にて定量した。B細胞を単離したドナーとT細胞クローンを樹立したドナーは同一で、DRB1*1405/1502を有している。duplicateで培養して得た測定値(ng/ml)の平均値を示した。標準偏差は25%未満であった。

表1に示すように、エメチン処理したT細胞クローンとペプチドパルスしていないB細胞とを共培養すると、IgM、IgG1、IgG4、IgE、IgAは若干産生されるが、ペプチドパルスしたB細胞と共培養すると、IgMの産生がアイソタイプ特異的に著明に増強した。ペプチドパルスしたB細胞のみの培養(T細胞なし)ではこのようなIgM産生の増強は観察されなかった。

図2 T細胞-B細胞相互作用によるIgM産生の増強にCD40からのシグナルは関与していない。

(A, B)末梢単核細胞(1.5×10^5 個/ウェル)と抗ヒトCD154(CD40リガンド)中和抗体, またはコントロールマウスIgGを30分間前処理したあと, 20 U/ml IL-4, 1 µM イオノマイシン, 10 ng/ml PMAを加えた。IgE測定のためには3日間培養(A)を, 増殖反応を検定するためには3日間培養した(B)。 (C)表1で用いたT細胞クローンと抗ヒトCD154中和抗体(1 µg/ml), またはコントロールマウスIgG(1 µg/ml)で30分間前処理したあと, ペプチドパルスした末梢B細胞と5日間共培養し, その培養上清中のIgMを測定した。
 $\Delta\text{IgM} = (\text{各培養上清中のIgM濃度}) - (\text{B細胞のみの培養上清中のIgM濃度})$

このような抗原ペプチド存在下におけるIgM産生増強がCD40-CD154相互作用によるものではないことは, 抗CD154阻止抗体(Ancell社)の存在下でもIgM産生増強が完全に抑制されてしまわないことから明らかである。ちなみに, この抗体はPBMCをPMA+ionomycin+IL-4で刺激したときに誘導されるIgE産生(CD40-CD154依存性)をほぼ完全に抑制することができる(図2)。

図3 B細胞上のDR分子を固相化抗体で架橋すると, IgM産生が増強するが(A), 増殖は誘導しない(B)。

BSA, マウスIgG2a, 抗DR抗体HU4, 抗DR抗体L243, をそれぞれ10 µg/mlの濃度で96穴プレートに2日間固相化した。抗体を固相化したプレートに単離した末梢B細胞を 5×10^4 個/ウェルで, 37°C 3日間(増殖アッセイ, B)あるいは, 5日間(IgM濃度測定, A)それぞれ培養した。B細胞ドナーのHLAはDRB1*0101/1201である。

固相化抗体を用いたDR分子の架橋により誘導されるB細胞応答

しかし, CD40-CD154以外の相互作用(たとえばICAM-1やLFAを介したような)がIgM産生を誘導している可能性もあるので, 単純に抗HLA-DR抗体で架橋した場合のB細胞の応答を観察してみた。

図3に示すように, 培養プレートに抗HLA-DR抗体を固相化してB細胞を培養した場合にのみ, IgM産生の増強が観察された。これには増殖反応を伴っていなかった。

可溶性抗DR抗体, または固相化抗DR抗体で細胞上のDR分子を架橋した24時間後にアポトーシスの有無を検討した。固相化抗DR抗体による架橋で誘導されるアポトーシスはバックグラウンドレベルであった(図4C, D)。一方, 可溶性抗DR抗体による架橋では顕著にアポトーシスが

図4 固相化抗DR抗体は末梢B細胞にアポトーシスを誘導しない。

可溶性マウスIgG(A), 可溶性抗DR抗体, L243(B), 固相化マウスIgG(C)または, 固相化抗DR抗体, L243(D)を用いて24時間刺激後における末梢B細胞のアポトーシスの有無を検討した。アポトーシスはアネキシンVとPI染色で評価した。

誘導された(図4B)。この解離がいかにかに生じるかは不明であるが、今回用いた実験系、つまり固相化抗DR抗体による架橋で誘導されるIgM産生の増加はB細胞のアポトーシスに起因するものではない。

つぎに、末梢B細胞を抗HLA-DR抗体で刺激したあと、経時的にmRNAを回収し、膜型 μ 鎖と分泌型 μ 鎖を特異的に増幅できるように設計したプローブを用いてRT-PCRを行った。特異的バンドをエチジウムブロマイドで検出できない程度のサイクル数にとどめ、 μ 鎖cDNAをプローブとして定量的に解析した(RT-PCR-Southern法)。

図5に示すように、抗HLA-DR抗体による刺激により、12時間をピークとして膜型 μ 鎖と分泌型 μ 鎖のmRNAが増加する様子が観察された。また、PRDI-BF1のmRNAレベルは変化しなかった。PRDI-BF1はBlimp-1のヒトホモログである¹⁵⁾。Blimp-1はlate B細胞や形質細胞に特異的に発現する転写因子であり、B細胞株に強制発現させると免疫グロブリンの産生やJ鎖の発現

図5 B細胞上のDR分子を架橋すると μ 鎖のmRNAの発現レベルが増加する。

末梢血から単離したB細胞を抗DR抗体が固相化された24穴プレートにて 1×10^6 個/ウェルで0, 3, 6時間(A), または6, 12, 24時間(B), それぞれ培養した。膜型 μ 鎖(μ m: open columns), 分泌型 μ 鎖(μ s: closed columns), PRDI-BF1(hatched columns), β アクトン(shaded columns)のmRNAの発現をRT-PCRとサザンプロテイング法により解析した。mRNAの発現量はNIH imageを用いて定量化し、(A)では0時間膜型 μ 鎖, 0時間PRDI-BF1, 0時間 β アクトンを、また(B)では6時間膜型 μ 鎖, 6時間PRDI-BF1, 6時間 β アクトンをそれぞれ基準として比較した。B細胞ドナーのHLAはDRB1*0101/1201である。

増強が観察される^{16,17)}。すなわち、DR分子を介したシグナルがB細胞から形質細胞への分化を促すことによってIgM産生を増強している可能性は否定的であった。

ではどのようなシグナルがHLA-DRを介した刺激で動き、IgM産生増強へと導いているのであろうか。図6に示したように、HLA-DRを介した刺激によるIgM産生の増加は、PTK inhibitorで抑制されたが、PKC inhibitorでは抑制されなかった。各種PTK inhibitorのうち、Syk inhibitorであるpiceatannolは効率よく抑制したが、Src inhibitorであるPP2は抑制しなかった。この観察からDR分子の架橋によって誘導される

図6 DR架橋で誘導されるIgM産生の増加はPTK阻害剤とpiceatannolで抑制される。

ペプチドパルスした末梢B細胞を各阻害剤と30分間共培養したあと、エメチン処理したT細胞クローンを加えて5日間培養し、上清中のIgMの濃度を測定した。

IgM産生はSrcファミリーキナーゼではなく、Sykキナーゼを介して起きている現象であることが推測された。

DR分子の架橋によるSykキナーゼのチロシンリン酸化と活性の増強

つぎに末梢B細胞とB細胞株LD2Bを抗DR抗体またはコントロールマウスIgGで架橋したあと、イムノブロットを行った。図7に示すように、末梢B細胞上のDR分子の架橋により種々の蛋白チロシンリン酸化が促進された。チロシンリン酸化が促進された各バンドの分子量は約65, 110, 130 kDaであった。同様に、LD2B細胞のDR分子の架橋により約65, 70 kDaの蛋白質のチロシンリン酸化が促進された。LD2B細胞を抗DR抗体または対照マウスIgGで架橋すると、DR分子の架橋1分後にわずかなSykのリン酸化が、架橋10分後には著明なリン酸化が観察された(図7C)。また、LD2B細胞をビオチン化抗HLA-DR抗体とアビジンで刺激後10分のlysateを調整し、これを抗Syk抗体で免疫沈降したのち、MBPを基質として*in vitro* kinase assayを行った。

図8に示したように、HLA-DRを介した刺激によりSykの活性は上昇しており、これはSyk特異的基質であるHS-1ペプチドによって阻害された。同様の結果は抗HLA-DR抗体のF(ab')₂

でも観察されたことから、Fc部分を介したシグナルではなく、HLA-DRのクロスリンキングそのものがSykの活性化を誘導しているものと考えられた。

これら一連の結果より、B細胞上のDR分子がただ単にT細胞に抗原ペプチドを提示するだけではなく、B細胞内へのシグナル伝達に関与し、Srcキナーゼファミリー非依存性かつSykキナーゼ依存性にIgM産生増強を誘導することが明らかとなった。

単球におけるクラスII HLAシグナルの効果

以前から、DR vs DQ¹⁸⁾、I-A vs I-E¹⁹⁾が異なる種類のT細胞を活性化するという報告はあったが、ペプチドとの結合性や発現レベルを超えて何らかの異なる機構を有しているか否かは明らかになっていなかった。そこで、拘束分子の異なる三つのヒトTh0クローン(BC20.7:DR14拘束性, DT13.2:DQ6拘束性, OT1.1:DP5拘束性)をモデルとして選び、これらのT細胞クローンをエメチン処理して*de novo* 蛋白合成系を停止させておき、ペプチドをパルスした末梢単球とを共培養することで産生されるモノカインを比較した。DR拘束性クローンは炎症性モノカインであるIL-1 β やTNF α の産生をより強く誘導する傾向があった。一方、DQ拘束性クローンとDP拘束性クローンは、抗炎症性モノカインである

図 7 DR 架橋による Syk キナーゼのチロシンリン酸化の促進

末梢 B 細胞 (A) と B 細胞株, LD2B (B) をビオチン化抗 DR 抗体 (L243), あるいは, コントロールのビオチン化マウス IgG で刺激後, アビジンで 10 分間架橋した。その後, 細胞を溶解し, 9% SDS-PAGE で泳動後, ニトロセルロース膜に転写し, 抗リン酸化チロシン抗体 (4G10) にてイムノプロットした。(C) 同様に LD2B を各抗体で刺激し, アビジンで 1 分間, または 10 分間架橋したあと, 溶解し, 抗 Syk 抗体で免疫沈降した。免疫沈降した蛋白 (Syk+抗 Syk 抗体) を等量に分け, 4G10 と抗 Syk 抗体でイムノプロットした。

IL-10 の産生をより強く誘導する傾向があった (表 2)。このような傾向は固相化抗体を用いた刺激でも認められたので (表 3), これらのモノカイン産生の不均衡が, 拘束分子でなく CDw 150 (SLAM) などの他の分子を介した現象である可能性は低いと考えられる。

つぎに固相化抗 HLA 抗体による架橋で誘導される IL-1β の産生系に対する各種シグナル伝達抑制剤の効果を検討した。図 9A に示すように,

図 8 DR 架橋による Syk キナーゼ活性の上昇

(A) B 細胞株, LD2B をビオチン化抗 DR 抗体 (L243), またはコントロールビオチン化 mIgG で刺激後, アビジンで 10 分間架橋し, 細胞を融解させ抗 Syk 抗体で免疫沈降した。免疫沈降した蛋白 (Syk+抗 Syk 抗体) を等量に分け, 抗 Syk 抗体でイムノプロットした (最下段)。アガロースビーズで吸着させた残りの蛋白 (Syk+抗 Syk 抗体) を用いて MBP を基質とした *in vitro* kinase assay を行い, Syk キナーゼの活性を評価した。また, Syk 特異的な基質である HS1 ペプチドや無関係なペプチドを大過剰に加えて特異性を検討した。(B) B 細胞株, LD2B をビオチン化抗 DR 抗体 (L243) F(ab')₂ 断片で, また, コントロールビオチン化 mIgG F(ab')₂ 断片で刺激後, アビジンで 10 分間架橋し, 細胞を溶解させた。同様に免疫沈降し, *in vitro* immune complex kinase assay を行った。MBP のリン酸化は, 0 分 (A) と 10 分無刺激 (B) を基準として相対的に評価した。

p38 阻害剤 (SB203580) と MEK-1 阻害剤 (PD98059) がこれを部分的に抑制した。また, PTK 阻害剤である genistein は二相性の効果を示し, 低濃度では増強的, 高濃度では抑制的であった。実際, MAPK/Erk の活性化は DR を介した刺激でのみ観察されたが, MAPK/p38 の活性化は DR, DQ, DP を介した刺激により観察された (図 9B)。抗 DR 抗体で誘導されるこのような

表 2 ペプチドパルスした末梢単球(monocytes)をエメチン処理 T 細胞クローンで刺激した場合のモノカイン産生

モノカイン	T 細胞クローン		
	BC20.7 DR 拘束性	DT13.2 DQ 拘束性	OT1.1 DP 拘束性
			(pg/ml)
IL-1 β	10.5	2.4	2.1
IL-6	87.5	62.5	140.0
IL-10	172.5	787.5	725.0
IL-18	<15.0	<15.0	<15.0
IL-12(p70)	177.5	115.0	55.0
IL-12(p40+p70)	145.0	75.0	20.5
GM-CSF	475.0	150.0	887.5
TNF- α	887.5	642.5	230.0
IL-10 : IL-12(p70)比	1.0	6.8	13.2
IL-10 : IL-1 β 比	16.4	328.1	345.2

拘束分子の異なる三つの T 細胞クローン(BC20.7 : DR14 拘束性, DT13.2 : DQ6 拘束性, OT1.1 : DP5 拘束性)をエメチン処理し, ペプチドをパルスした末梢単球(monocytes)と共培養した。パルスしたペプチドの濃度はそれぞれの ED50 の 625 倍とした(プラトー応答の領域)。培養上清を 16, 24, 48 時間後に採取し, それぞれのモノカイン濃度を ELISA にて定量した。

現象は F(ab')₂ でも観察される(図 10 A)。また, TNF α で誘導される IL-1 β 産生に対して中和活性を有する抗 TNF α 抗体は, 抗 DR 抗体で誘導される Erk の活性化を阻止することができなかった(図 10 B, C)。すなわち Fc 部分や TNF α は HLA-DR の架橋によって誘導される Erk の活性化と IL-1 β の産生に関与していないと考えられた。

T-monocyte 相互作用の系に対する抑制剤の効果も同様な結果を示した。図 11 に示したように, IL-1 β の産生は PD でも SB でも部分的に抑制されたが, 両者の効果は相加的であった。また IL-10 の産生に対して PD はむしろ増強的に作用し, SB は抑制的に作用した。このような結果から, 図 12 に示したように, DR は p 38 と Erk の活性化を介して IL-1 β 産生を強く誘導しているのに対して, DQ/DP は p 38 活性化を介して IL-1 β 産生と IL-10 産生の両方を誘導していると考えられた。

そこでさらに, PBMC レベルでの検討を行っ

表 3 固相化抗体で刺激した場合でも DR を介した刺激は IL-1 β 産生をより強く誘導する。

固相化抗体	IL-10/IL-1 β
HU4/L243(DR)	1.8
I a3(DQ)	12.8
B7/21(DP)	14.4

DR, DQ, DP に対する抗体を固相化し, 単球を刺激した。エメチン処理 T 細胞で認められたように IL-10/IL-1 β 比は, DR 刺激では低値を, また DQ あるいは DP 刺激では高値を示す傾向にあった。すなわち, TCR-ペプチド-HLA 相互作用を起こして刺激を入れた場合にも, また固相化抗体を用いて刺激を入れた場合にも, DR を介した刺激はより炎症性応答を, DQ あるいは DP を介した刺激はより抗炎症性応答を誘導することがわかった。

た, そのためにまず, グニ粗抗原特異的なヒト T 細胞株を樹立した。樹立した DR 拘束性, DP 拘束性の T 細胞株のリンホカイン産生パターンを調べたところ, 完全に区別することはできないが, 前者は Th 1, 後者は Th 2 の傾向があった(図 13 A)。この傾向は PPD 特異的な DR 拘束性, DQ 拘束性の T 細胞株のリンホカイン産生パターンにおいても同様であった(図 13 B)。さらに, random 19-mer peptide 反応性 DR 拘束性 T 細胞も DQ/DP 拘束性 T 細胞にくらべて, より Th 1 寄りのサイトカイン産生パターンを示した(図 13 C)²⁰⁾。すなわち, PBMC レベルで polyclonal な反応にも同様な傾向があることが確認された。以上より, DR, DQ, DP 分子は MAPK family を介して異なるシグナルを単球へ伝達し, *in vivo* において T 細胞応答に影響を与えていると結論した。多重遺伝子族として進化したクラス II 遺伝子はシグナル伝達機構においても多様性を獲得し, 異なる機能を担っていると考えられる。

APC 上の発現レベルは, DR>DQ>DP であり, 仮にペプチドがそれぞれ同程度の親和性をもつとすると, APC 表面での TCR リガンド密度は DR-ペプチド>DQ-ペプチド>DP-ペプチドである。したがって筆者らが観察した現象は高密度リガンドは Th 1 を, 低密度リガンドは Th 2 を誘導するという現象²¹⁾と本質的には変わらない現象であるとも考えられる。しかし, DR 拘束性クローン

図 9 固相化抗クラス II HLA 抗体での MAP kinase の活性化

A: HLA-DR 分子に対する固相化抗体で単球を刺激する系に、シグナル伝達分子に対する阻害剤を共培養させ、その効果を検討した。MEK 1-Erk と p 38 に対する阻害剤が、IL-1 β の産生を特異的に抑制した。

B, C: そこで, DR, DQ, DP に対する固相化抗体で刺激し, MAPK family である Erk, JNK, p 38 のリン酸化型に対する抗体で western blot すると, DR から刺激を入れた場合のみ, Erk が活性化状態になった。p 38 の活性化は DR/DQ/DP で程度の違いはあるもののいずれでも観察できた。JNK の活性化は認められなかった。

図 10 Fc と $\text{TNF}\alpha$ は、クラス II HLA の架橋によって誘導される Erk の活性化と IL-1 β の産生には関与しない。

で刺激する際のペプチドの濃度をいくらか低くしても IL-10/IL-1 β の比は DQ 拘束性や DP 拘束性のパターンにはならなかった。つまり、質的に異なる APC 応答であるということが出来る。すなわち、これらの現象はリガンド密度だけでは説明ができない。

考 察

IgM は初期感染防御において非常に重要な役割を担っている。分泌型 IgM が欠損した変異マウスの細菌性腹膜炎による感染実験では 70% の変異マウスが 32 時間以内に死亡した²²⁾。一方、野生型マウスの死亡率は 20% であった。B 細胞が非自己抗原、たとえば、細菌蛋白などに遭遇した場合、その抗原に特異的な膜型 IgM を発現している B 細胞は抗原を捕捉し、T 細胞に効率よく抗原を提示することができる。DR 分子の架橋による分泌型 IgM の産生促進に関しては、T 細胞-B 細胞相

互作用が起きて間もない感染初期、すなわち T 細胞も B 細胞もクローナル増殖を示していない時期、HLA 由来のシグナルで IgM 産生が促進されるのは合目的的であると言えよう。換言すれば、サイトカイン非依存性かつペプチド依存性にヘルパー T 細胞が IgM 産生を促進しているのかもしれない。しかし、T 細胞非依存性に B 細胞は抗体を産生できる²³⁾ので、初期の IgM 産生が完全にクラス II 分子からのシグナルに依存していると考えるのは誤りであろう。

一方、DR 分子の架橋による膜型 IgM の発現増強に関して、TCR が B 細胞上の HLA-DR-ペプチド複合体を認識した際に、T 細胞自身も増殖する一方で、B 細胞内へも DR 分子経由でシグナルが入り、膜型 IgM の発現が促進され、それによってより多くの抗原を捕捉することができ、T 細胞への抗原提示を促進しているのかもしれない。BCR-抗原複合体が形成され B 細胞内に取り込まれると、細胞内で抗原がペプチドと分解される。その後 HLA-ペプチド複合体として膜表面に移動し、TCR と相互作用を起こすと、結果的に B 細胞にはクラススイッチが誘導されるため IgM の産生が減少する²⁴⁾。

今回の筆者らの実験系では BCR と抗原蛋白の接触もなく、T 細胞もエメチン処理していたためにサイトカインの産生や膜蛋白の合成が起こらず、クラススイッチ圧が生じていない。このような実験系で観察された IgM 産生増強の程度は生理的なそれを上回っていた可能性を残している。生理的条件下ではクラススイッチや alternative splicing による膜型 IgM のダウンレギュレーションが起きるわけであるが、クラススイッチが始まる前の T-B 相互作用が起きているごく短いクリITICALな時間において、DR 分子からのシグナルは新しい IgM 蛋白を供給して抗原提示を維持していると考えられることもできる。生体内では、DR ミスマッチの臓器移植の場合のような過度なアロ反応性 T 細胞-B 細胞相互作用が生じた際に、DR 分子由来の過度なシグナルが B 細胞に伝達されるであろう。実際に HLA-DR の DNA タイピングがまだできなかった時代においては

図 11 エメチン処理 T 細胞+ペプチドで誘導される IL-10, IL-1 β 産生に対する MEK 1 阻害剤と p 38 阻害剤の効果

A: DR 拘束性のエメチン処理 T 細胞を使ったモノカイン産生についても, シグナル伝達分子に対する抑制剤の効果を検討した. PD 98059 を用いて MEK 1-Erk の系を阻害することにより, IL-1 β の産生は濃度依存性に抑制された.

B: MEK 1-Erk と p 38 に対する阻害剤の効果を検討した. IL-10 は, p 38 阻害剤で抑制されたが, MEK 1-Erk 阻害剤では抑制されなかった. IL-1 β は, MEK 1-Erk, p 38 阻害剤ではともに単独では部分的に抑制されているが, 組み合わせると完全に抑制された. PD 98059 は IL-10 産生をやや増強させた.

図 12 クラス II HLA 分子を介した MAPK の活性化

DR からの刺激は Erk を活性化し, その結果炎症性モノカインが産生される. p 38 の活性化は DR/DQ/DP いずれからの刺激でもおこり, 抑制剤の結果から炎症性モノカイン, 抗炎症性モノカインいずれの産生にも関与している. ただし, MAPK カスケードを修飾する他の要素は図示していない.

graft versus host disease が頻回に発生し, そのような患者では表皮-真皮境界に IgM 分子が多量に沈着していたという報告もある²⁵⁾.

クラス II MHC KO マウスの血清では IgM は

上昇し, IgG 1 は減少している²⁴⁾. また, ほかのアイソタイプも減少傾向にある. この KO マウスでは CD 4⁺T 細胞がほとんど末梢血中には存在しないので, B 細胞はクラススイッチを促すようなさまざまなヘルプを受けることができず, 相対的に IgM が高くなったと考えることができる. クラス II HLA からのシグナルで IgM 産生が促されることをより生理的に証明するには遺伝子 KO 以外の方法が必要である.

Syk^{-/-}マウスの研究では B 細胞の分化障害が観察されている. pre-BCR からのシグナルが入らなくなったためと考えられるが, pre-B の段階で分化が停止していて, これらの B 細胞の増殖も抑制されていた^{26,27)}. また, Syk^{-/-}マウスでは immature B 細胞(B 220⁺, IgM⁺)から μ 鎖の転写が増強されて mature B 細胞(B 220⁺, IgM⁺⁺, IgD⁺)となる分化段階も阻害されていた. Syk の生理的な役割は容易には解明されないが, BCR のシグナ

図 13 末梢 T 細胞の拘束分子とサイトカイン産生パターン

Der-f または PPD に特異的な short-term T 細胞株と X 19 ペプチドに特異的な T 細胞クローンを複数樹立し、それらの拘束分子と産生される IFN- γ /IL-4 比を検討した。DR 拘束性では炎症性サイトカインの IFN- γ がより多く産生され、DQ, DP 拘束性では炎症性サイトカインの IL-4 がより多く産生されていた。これらより、すでに活性化されている末梢 CD 4 T 細胞のうち DR 拘束性の T は、DQ/DP 拘束性の T とくらべて、より Th 1 の傾向を示していると推測される。

ルからだけでなく、pro-B 細胞や immature B 細胞から開始される μ 鎖の転写にも関与しているのかもしれない。

HLA-DR β 鎖は PKC の活性化や核内への移行に関与しているという報告がある¹²⁾が、今回の研究では PKC 阻害剤は IgM 産生に何ら影響を及ぼさなかった。IL-4 レセプター²⁸⁾や血小板由来成長因子レセプター(platelet-derived growth factor receptor)²⁹⁾で観察された現象と同じように、DR 分子からのシグナルは複数のシグナル伝達分子を活性化し³⁾、それぞれが異なる生理活性を担っていると考えられる。

DR 分子を介したシグナルが Syk を活性化したわけであるが、DR の α 鎖も β 鎖も ITAM モチーフをもっていない。IL-2 レセプター³⁰⁾、CD 29³¹⁾や血小板インテグリン α II b β 3³²⁾は ITAM モチーフはもっていないが、Syk を活性化することができる。DR 分子が Syk を直接活性化した可能性は残っているが、DR 分子に会合して、Syk の活性化に関与している蛋白が存在するのかもしれない。DR 分子と CD 81 分子は会合しているという報告があるが、CD 81 分子にも ITAM モチーフは存在しない³³⁾。未知の分子が DR 分子と会合して Syk の活性化に関与しているのかもしれない。また最近報告されたように、DR 分子からのシグナルが膜マイクロドメインの構築を変化させ³⁴⁾、これによって Syk の活性化が起こった可能性もあり、今後の検討課題である。では、シグナル伝達を直接担当する分子と DR, DQ, DP 分子との会合性が異なる、または DR/DQ/DP 間で膜の局在が異なると予測できる分子基盤は存在するであろうか？現時点では推測でしかないが、DR, DQ, DP の transmembrane domain, および cytoplasmic domain の一次構造はかなり異なっていることが関係してくるかもしれない。これには Cys 残基の数や位置も含まれる。同じ意味で、対立遺伝子間でも細胞表面分子との関連において差が存在することも十分に考えられる。

哺乳類の進化のなかで最大の淘汰圧は感染症であった。微生物(寄生虫を含む)に対する免疫応答がすべて合目的でないことは Th の亜集団が知られるようになってから、かなり明確になってきた。すなわち細胞内寄生細菌に対しては Th 1 が圧倒的に有利であり、腸管内寄生虫に対しては Th 2 が有利であるといったように応答の“質”が生体防御における価値をかなり左右している³⁵⁾。いま仮に、Th 1 応答に傾きやすい形質を支配する遺伝子と、Th 2 応答に傾きやすい形質を支配する遺伝子があるとしよう。その形質が類別変数(単一遺伝子支配)であるか、間隔・比率変数(ポリゾン支配)であるかはここでは問わない。医療の存在しないヒト集団に結核が大流行したとしよう。結

核菌体成分に対する免疫応答遺伝子(一)の個体と Th 2 形質の個体は淘汰されて激減する。ときを置かず腸管内寄生虫や、中和抗体が重要な意義をもつウイルス感染症が大流行するとどうなるであろう。Th 1 形質と Th 2 形質が相補的遺伝形質であるのなら、この集団は壊滅的打撃を受けるはずである。生物(ヒト)は感染症というきびしい淘汰圧に対してこのようにもろいシステムで対抗し得たであろうか。

おそらく種の存続のためにもっとも安全な方法は、集団として応答できる抗原の種類を上げたうえで、しかも抗原特異性と Th 1/Th 2 形質をモザイク状に組み合わせたような多型性をもつことであろう。これにより前述のような壊滅的打撃をうけるリスクを下げることができる。HLA がこのような役割を担いいうるとすれば古い Ir-gene の概念に登場する抗原特異の高応答者(high responder)は抗原特異的 Th 1 responder と Th 2 responder とに分けられるということになる。もちろん HLA がすべてを支配する必要はまったくない。ここで重要な点は、免疫応答の高低すなわち“量”を抗原特異的に支配すると考えられてきた HLA が、Th 1/Th 2 すなわち“質”をも“抗原特異的に”支配できれば都合がよいのではないかという点である。

筆者らは以前の研究で、スギ花粉抗原に対する IgE 応答³⁶⁾や日本住血吸虫抗原に対する T 細胞応答¹⁸⁾が HLA によって支配されていることを遺伝疫学・細胞免疫学的に明らかにした。前者は明らかに Th 2 依存性であり、後者における高応答性は Th 1 主体である。この分子機構の詳細を解明するには至らなかったが、HLA が APC 内へのシグナル伝達の一翼を担っているという概念で解析し直すことであらたな知見が得られるかもしれない。

おわりに

現在の免疫学の教科書には、T 細胞と抗原提示細胞の相互作用の結果、T 細胞側に誘導される複雑なシグナリングカスケードが図示されている

が、本稿でご紹介した研究を発展させることにより、抗原提示細胞側にもシグナリングカスケードが描けるようになって期待できる。また、特定の HLA 対立遺伝子と免疫関連疾患の相関について細胞・分子レベルでより深い理解が進むと期待できる。慢性関節リウマチはその代表であるが・特定のクラス II HLA 対立遺伝子との相関が明らかな他の自己免疫病(インスリン依存性糖尿病・多発性硬化症・原田病・高安病・原発性胆汁うっ滞性肝硬変、自己免疫性炎症性腸炎、自己免疫性甲状腺疾患、一部の糸球体腎炎など)においても、標的側の応答を理解するという意味において、魅力的な作業仮説を提供するであろう。

本稿でご紹介した概念の追求は、HLA が多重遺伝子族として存在するのはなぜか、異なる遺伝子座の対立遺伝子間に密な連鎖不平衡が存在するのはなぜか、といった疑問に解決の糸口を与えるだけではなく、ペプチド収容溝の多型性のみに着目することで分子レベルで確認されてきた(ように見える)免疫応答遺伝子の概念を、根本から見直す必要性をも提示することになるかもしれない。また、このような問題追求は、免疫応答の効果相における組織適合抗原分子の役割だけではなく、系統発生・個体発生・細胞分化における組織適合抗原分子の役割をも明らかにする糸口を与えてくれるにちがいない。TCR や CD 4/8 が MHC のリガンドのすべてではないという最近の知見はその可能性をさらに広げている。

文 献

- 1) Matsuoka T, Kohroggi H, Ando M, Nishimura Y, Matsushita S: Altered TCR ligands affect antigen-presenting cell responses: up-regulation of IL-12 by an analogue peptide. *J Immunol* 157: 4837-4843, 1996.
- 2) Matsuoka T, Tabata H, Matsushita S: Monocytes are differentially activated through HLA-DR, -DQ and -DP molecules via MAP kinases. *J Immunol* 166: 2202-2208, 2001.
- 3) Tabata H, Matsuoka T, Endo F, Nishimura Y, Matsushita S: Ligation of HLA-DR molecules on B cells induces enhanced expression of IgM heavy chain genes in association with Syk activation. *J Biol Chem* 275: 34998-35005, 2000.
- 4) Lane PJ, McConnell FM, Schieven GL, Clark EA, Ledbetter JA: The role of class II molecules in

- human B cell activation. Association with phosphatidyl inositol turnover protein tyrosine phosphorylation, and proliferation. *J Immunol* 144 : 3684-3692, 1990.
- 5) Mooney NA, Grillo-Courvalin C, Hivroz C, Ju LY, Charro D : Early biochemical events after MHC class II-mediated signaling on human B lymphocytes. *J Immunol* 145 : 2070-2076, 1990.
  - 6) Cambier JC, Newell MK, Justement LB, McGuire JC, Leach KL, Chen ZZ : Ia binding ligands and cAMP stimulate nuclear translocation of PKC in B lymphocytes. *Nature* 327 : 629-632, 1987.
  - 7) Bishop GA : Requirements of class II-mediated B cell differentiation for class II cross-linking and cyclic AMP. *J Immunol* 147 : 1107-1114, 1991.
  - 8) Kansas GS, Tedder TF : Transmembrane signals generated through MHC class II, CD 19, CD 20, CD 39, and CD 40 antigens induce LFA-1-dependent and independent adhesion in human B cells through a tyrosine kinase-dependent pathway. *J Immunol* 147 : 4094-4102, 1991.
  - 9) Truman JP, Ericson ML, Choqueux-Seebold CJ, Charron DJ, Mooney NA : Lymphocyte programmed cell death is mediated via HLA class II DR. *Int Immunol* 6 : 887-896, 1994.
  - 10) Nabavi N, Freeman GJ, Gault A, Godfrey D, Nadler LM, Glimcher LH : Signalling through the MHC class II cytoplasmic domain is required for antigen presentation and induces B7 expression. *Nature* 360 : 266-268, 1992.
  - 11) Harton JA, Van Hagen AE, Bishop GA : The cytoplasmic and transmembrane domains of MHC class II beta chains deliver distinct signals required for MHC class II-mediated B cell activation. *Immunity* 3 : 349-358, 1995.
  - 12) Rich T, Lawler SE, Lord JM, Blancheteau VM, Charron DJ, Mooney NA : HLA class II-induced translocation of PKC alpha and PKC beta II isoforms is abrogated following truncation of DR beta cytoplasmic domains. *J Immunol* 159 : 3792-3798, 1997.
  - 13) Morio T, Geha RS, Chatila TA : Engagement of MHC class II molecules by staphylococcal superantigens activates src-type protein tyrosine kinases. *Eur J Immunol* 24 : 651-658, 1994.
  - 14) Kanner SB, Grosmaire LS, Blake J, Schieven GL, Masewicz S, Odum N, Ledbetter JA : ZAP-70 and p 72 syk are signaling response elements through MHC class II molecules. *Tissue Antigens* 46 : 145-154, 1995.
  - 15) Keller AD, Maniatis T : Identification and characterization of a novel repressor of beta-interferon gene expression. *Genes and Development* 5 : 868-879, 1991.
  - 16) Turner CA Jr, Mack DH, Davis MM : Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell* 77 : 297-306, 1994.
  - 17) Huang S : Blimp-1 is the murine homolog of the human transcriptional repressor PRDI-BF 1. *Cell* 78 : 9, 1994.
  - 18) Hirayama K, Matsushita S, Kikuchi I, Iuchi M, Ohta N, Sasazuki T : HLA-DQ is epistatic to HLA-DR in controlling the immune response to schistosomal antigen in humans. *Nature* 327 : 426-430, 1987.
  - 19) Ikezawa Z, Nagy ZA, Klein J : Manipulation of anti-LDH-B response by T suppressor factors. *J Immunol* 132 : 1605-1607, 1984.
  - 20) Matsushita S, Tanaka Y, Matsuoka T, Nakashima T : Clonal expansion of freshly isolated CD 4 T cells by randomized peptides and identification of peptide ligands using combinatorial peptide libraries. *Eur J Immunol* 2001 (in press).
  - 21) Hosken NA, Shibuya K, Heath AW, Murphy KM, O'Garra AO : The effect of antigen dose on CD 4⁺ T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model. *J Exp Med* 182 : 1579-1584, 1995.
  - 22) Boes M, Prodeus AP, Schmidt T, Carroll MC, Chen J : A critical role of natural immunoglobulin M in immediate defense against systemic bacterial infection. *Journal of Experimental Medicine* 188 : 2381-2386, 1998.
  - 23) Andersson J, Coutinho A, Lernhardt W, Melchers F : Clonal growth and maturation to immunoglobulin secretion *in vitro* of every growth-inducible B lymphocyte. *Cell* 10 : 27-34, 1977.
  - 24) Markowitz JS, Rogers PR, Grusby MJ, Parker DC, Glimcher LH : B lymphocyte development and activation independent of MHC class II expression. *J Immunol* 150 : 1223-1233, 1993.
  - 25) Tsoi MS, Storb R, Jones E, Weiden PL, Shulman H, Witherspoon R, Atkinson K, Thomas ED : Deposition of IgM and complement at the dermoepidermal junction in acute and chronic cutaneous graft-vs-host disease in man. *J Immunol* 120 : 1485-1492, 1978.
  - 26) Turner M, Mee PJ, Costello PS, Williams O, Price AA, Duddy LP, Furlong MT, Geahlen RL, Tybulewicz VL : Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature* 378 : 298-302, 1995.
  - 27) Cheng AM, Rowley B, Pao W, Hayday A, Bolen JB, Pawson T : Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature* 378 : 303-306, 1995.
  - 28) Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE : The IL-4 receptor : signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol* 17 : 701-738, 1999.
  - 29) Heldin CH, Ostman A, Ronnstrand L : Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochimica et Biophysica Acta* 1378 : 79-113, 1998.
  - 30) Minami Y, Nakagawa Y, Kawahara A, Miyazaki T, Sada K, Yamamura H, Taniguchi T : Protein tyrosine kinase Syk is associated with and activated by the IL-2 receptor : possible link with the c-myc induction pathway. *Immunity* 2 : 89-100, 1995.
  - 31) Miller LA, Hong JJ, Kinch MS, Harrison ML, Geah-

- len RL : The engagement of betal integrins on promonocytic cells promotes phosphorylation of Syk and formation of a protein complex containing Lyn and betal integrin. *European Journal of Immunology* 29 : 1426-1434, 1999.
- 32) Gao J, Zoller KE, Ginsberg MH, Brugge JS, Shattil SJ : Regulation of the pp72 syk protein tyrosine kinase by platelet integrin alpha II b beta 3. *EMBO Journal* 16 : 6414-6425, 1997.
- 33) Schick MR, Levy S : The TAPA-1 molecule is associated on the surface of B cells with HLA-DR molecules. *J Immunol* 151 : 4090-4097, 1993.
- 34) Anderson HA, Hiltboldm EM, Roche PA : Concentration of MHC class II molecules in lipid rafts facilitates antigen presentation. *Nature Immunol* 1 : 156-162, 2000.
- 35) Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM : Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expression of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med* 169 : 59-72, 1989.
- 36) Matsushita S, Muto M, Suemura M, Saito Y, Sasazuki T : HLA-linked nonresponsiveness to cryptomeria japonica pollen antigen. I nonresponsiveness is mediated by antigen-specific suppressor T cell. *J Immunol* 138 : 109-115, 1987.