

脂質を中心とした非蛋白抗原に対する皮膚免疫応答機構の解明とその制御法の確立

京都大学ウイルス研究所

杉田 昌彦

Human group 1 CD1 molecules (CD1a, CD1b, CD1c) are expressed prominently in dendritic cells, and mediate presentation of non-protein lipid antigens to T cells. Langerhans cells are epidermis-resident dendritic cells that play a pivotal role in skin immunity. These cells are unique in their abundant expression of the CD1a protein, but its role in skin immunity remains to be determined. The principal investigator of this project previously isolated Langerhans cells from the human skin, and observed their striking ability to activate microbial lipid-specific T cells. To extend this finding further, this project has aimed to address whether CD1a-positive Langerhans cells mediate lipid-specific immune responses in vivo. To accomplish this, we have attempted to reconstitute by a transgenic technology CD1a-dependent immunity in mice that have deleted genes for CD1a. Generation of mice carrying the human *CD1A* genome has been completed, and we found that the human CD1a protein was expressed specifically in epidermal Langerhans cells. In addition, microbial lipid-specific, CD1a-restricted T cell responses were readily detected in these mice, suggesting that the positive selection for CD1a-restricted T cells indeed occurred as in humans. Therefore, these mice provide a valuable opportunity for our evaluating CD1a function in vivo.

1. 緒言

主要組織適合抗原 (MHC 分子) が、蛋白断片であるペプチド抗原を結合し、T細胞に抗原提示する現象は、近代免疫学が確立した中心的パラダイムのひとつである。感染免疫や癌免疫、アレルギーや自己免疫疾患の病態がこのパラダイムに基づいて説明されてきた。これに対して、研究代表者らの最近の解析から、脂質に対して特異的に応答する免疫経路の存在が明らかとなりつつある。ヒト CD1 分子 (CD1a, CD1b, CD1c) は、脂質抗原を結合し、T細胞に抗原提示する新しいタイプの抗原提示分子である^{1) 2) 3) 4)}。これらの CD1 分子は樹状細胞に発現して、脂質抗原特異的なT細胞応答を惹起する役割を担う。

ヒト表皮には、ランゲルハンス細胞と呼ばれる樹状細胞が分布し、皮膚免疫応答において中心的な役割を担う細胞として知られている。この表皮ランゲルハンス細胞は、CD1a 分子を多量に発現した生体内でも稀な樹状細胞である。そのため、CD1a 分子はランゲルハンス細胞のマーカーとして長らく注目されてきたが、その機能は不明であった。研究代表者は、ヒト CD1 分子の基礎解析成果を基に、CD1a 陽性ヒトランゲルハンス細胞は皮膚における脂質特異的な免疫応答を惹起する細胞であるとの作業仮説を立て、その検証を試みてきた。

これまでに研究代表者は、比重遠心法を用いてヒトランゲルハンス細胞を単離する技術を確立し、それを用いたインビトロでの機能解析を行ってきた^{5) 6)}。その結果、ヒト表皮より単離したランゲルハンス細胞は、CD1a 分子を介して細菌脂質をT細胞に提示することにより、脂質特異的なCD1a 拘束性T細胞を活性化する能力を有することが初めて実証された。

一方、これらのインビトロでの解析とは別に、脂質特異的な皮膚免疫応答を生体レベルで実証するにはそれに適した実験動物が必要である。研究代表者はこれまでモルモットがヒト脂質免疫応答の解析に適した実験動物であることを示し、抗酸菌感染モルモットにおける脂質免疫応答を実証してきた⁷⁾。しかしモルモットの免疫解析手法は限られていることから、細胞レベル、分子レベルでの詳細な解析は困難である。免疫研究に多用されるマウスやラットは、ヒト CD1a に相当する分子を欠如している。したがって、マウスにヒト *CD1A* 遺伝子を導入することにより、CD1a 依存的免疫応答をマウスに再構築すれば、CD1a 分子を介した皮膚免疫応答の生体レベルでの解析が可能になると考えられる。

このような学術的背景と考察を基に、本研究課題において、ヒト *CD1A* 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの作製を試みた。その結果、ランゲルハンス細胞に特異的に CD1a 分子を発現したマウス系統の樹立に成功した。

2. 実験

2・1 CD1a トランスジェニックマウスの樹立

すべてのエクソンを含むヒト *CD1A* ゲノム遺伝子を単離し、エクソン部分については核酸変異がないことを確認した。得られた遺伝子断片をマウス (C57BL/6) 受精卵前



Pathways for skin immunity directed against lipids and other non-protein antigens

Masahiko Sugita

Institute for Virus Research, Kyoto University

核中に注入し、仮親の卵管内へ移植を行ってマウスを誕生させた。得られたマウスの尾よりゲノム DNA を抽出し、これを鋳型とした PCR 法により *CD1A* 遺伝子のマウスゲノムへの挿入を確認した。

2・2 骨髄樹状細胞の単離と解析

得られたトランスジェニックマウスより骨髄細胞を採取し、マウスリコンビナント GM-CSF の存在下で 10 日間培養することにより、骨髄由来樹状細胞を得た。細胞は抗ヒト CD1a 抗体と蛍光色素で標識した抗マウス IgG 抗体を用いてラベルし、フローサイトメトリおよび蛍光顕微鏡による解析を行った。

2・3 表皮ランゲルハンス細胞の解析

マウス耳介より皮膚を採取し、0.5 M チオシアン酸アンモニウム処理を行ったのち、表皮と真皮を分離した。表皮を冷アセトン固定し、ピオチン化ヒト CD1a 抗体および horseradish peroxidase 標識ストレプトアビジンを用いて蛍光染色を行った。染色組織を封入したのち、蛍光顕微鏡下での観察を行った。

表皮細胞のフローサイトメトリによる解析には、dispace 処理を行った皮膚より表皮を剥離し、EDTA 処理を施して single cell suspension を得た。細胞の染色は 2・2 に記載した方法で行った。

2・4 ELISPOT 法

Mycobacterium avium complex (MAC) 感染 CD1a トランスジェニックマウスより脾臓細胞を回収し、MAC 菌体より抽出した脂質抗原の存在下に骨髄樹状細胞と混合培養した。活性化に伴いインターフェロンガンマ産生する細胞を市販の ELISPOT キットにより検出した。

3. 結果

産まれてきた 17 匹のマウス (オス 10 匹、メス 7 匹) について、PCR 法による genotyping を施行したところ、メス 2 匹が陽性であった (図 1、#3 と #7)。このうち 1 匹について骨髄樹状細胞を採取しフローサトメトリ解析を行ったところ、ヒト CD1a 分子の発現が確認できた (図 2)。さらにサポニン処理した骨髄樹状細胞を抗 CD1a 抗体とテキサスレッド標識二次抗体でラベルし、蛍光顕微鏡下で観

察すると、細胞表面および細胞内の小胞に CD1a 分子の発現が観察された (図 3)。この発現分布のパターンは、研究代表者がこれまでにを行ったヒト樹状細胞の解析結果とよく符合していた²⁾。

さらに交配を重ねて得られた CD1a トランスジェニックマウスについて、表皮ランゲルハンス細胞における CD1a 分子の発現を検討した。表皮シートを抗 CD1a 抗体を用いて染色すると、樹状細胞様の形態を保持した細胞において、特異的なシグナルが検出された (図 4A)。表皮より single cell suspension を得て、抗 CD1a 抗体と抗 MHC クラス 2 抗体を用いた二重染色をし、フローサイトメトリ測定を行ったところ、MHC クラス 2 陽性細胞が CD1a 分子を発現していることがわかった (図 4B)。以上のことから、この CD1a トランスジェニックマウスにおいて、表皮ランゲルハンス細胞が特異的に CD1a 分子を発現していることが確認された。

このマウスにおいて、CD1a 拘束性 T 細胞のポジティブセレクションが起きていることを検証する目的で、MAC 感染後の脾臓における MAC 脂質特異的 T 細胞の存在をインターフェロンガンマ ELISPOT 法を用いて調べた。その結果、CD1a 陽性骨髄樹状細胞の存在下で脂質抗原特異的な応答が観察され、その応答は抗 CD1a 抗体により阻止された。このことは、この CD1a トランスジェニックマウスにおいて、CD1a 拘束性の T 細胞が生成されていることを示唆している。

4. 考察

脂質特異的免疫応答の解析には、主としてモルモットが使用されてきた。しかしその機序の詳細な解析や、蛋白特異的免疫応答との差異を明確にするためには、遺伝子操作が容易なマウス実験系の樹立が必須である。本研究で樹立された CD1a トランスジェニックマウスの解析をさらに進めることにより、ランゲルハンス細胞の新しい機能が明らかにされることが期待される。接触性皮膚炎を惹起する原因分子の多くは非蛋白抗原であり、ウルシオールなど脂溶性の性質を持ったものも見られる。これらの脂質に対する応答には CD1a 分子が関与している可能性が高く、その実証は病態の理解だけでなく新たな制御法の開拓にも結びつくことが考えられる。

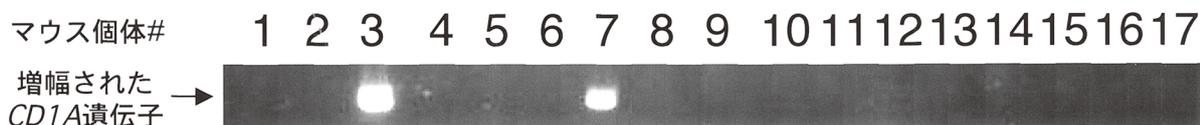


図 1 CD1a トランスジェニックマウスの genotyping 結果 (本文参照)

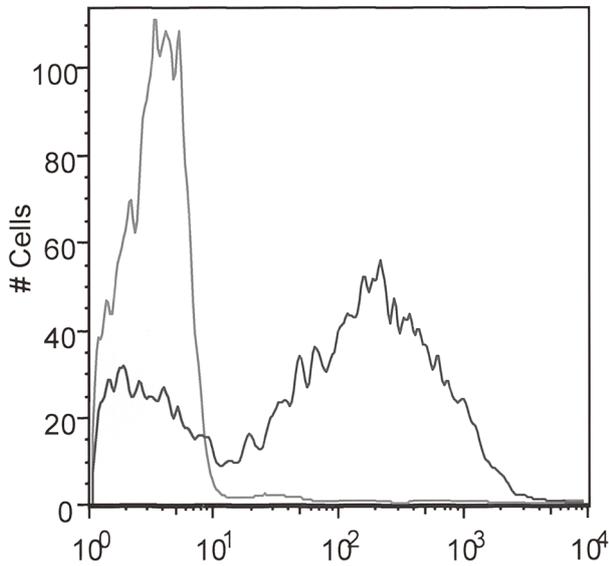


図2 CD1aトランスジェニックマウスより得られた骨髄樹状細胞のフローサイトメトリ解析結果
抗CD1a抗体(青線)およびネガティブコントロール抗体(赤地)の染色パターンを示した。樹状細胞の細胞表面に顕著なCD1a分子の発現が認められた。

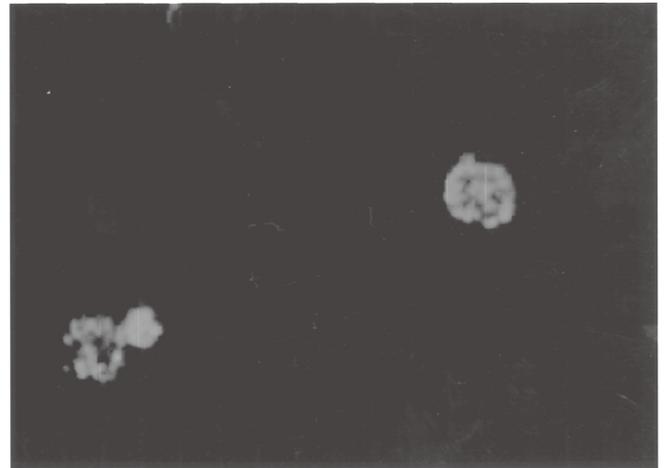


図3 CD1aトランスジェニックマウスより得られた骨髄樹状細胞の蛍光顕微鏡解析結果(本文参照)

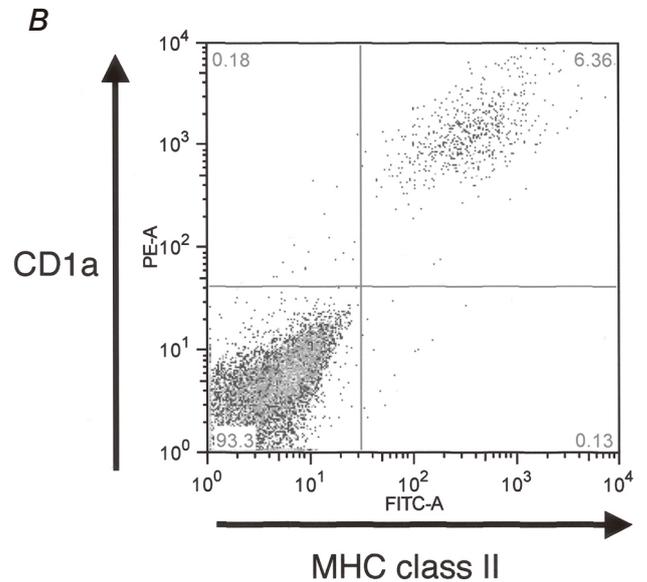
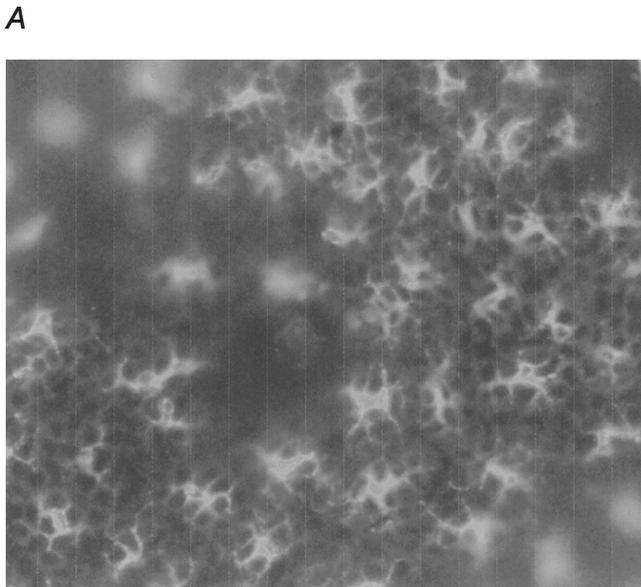


図4 CD1aトランスジェニックマウス表皮ランゲルハンス細胞におけるCD1a分子の発現
(A) 表皮シートを抗CD1a抗体を用いて蛍光染色した。(B) 表皮より得た細胞を抗CD1a抗体と抗MHCクラス2抗体を用いて二重染色し、フローサイトメトリにより解析した。

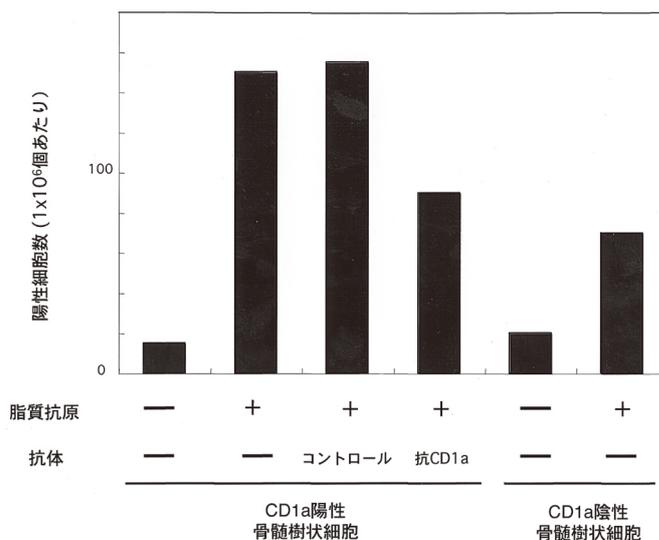


図5 CD1aトランスジェニックマウスにおける、CD1a拘束性T細胞の存在証明
MAC感染マウス脾臓よりT細胞を単離し、CD1a陽性あるいはCD1a陰性樹状細胞の存在下で、MAC由来脂質抗原による刺激を行った。一部は阻害抗体を加える条件で行った。活性化を受けインターフェロンガンマを産生したT細胞の数を、ELISPOT法により測定した。

(引用文献)

- 1) Sugita M, Jackman RM, van Donselaar E, et al.: Cytoplasmic tail-dependent localization of CD1b antigen-presenting molecules to MHCs. *Science*, 273, 349-352, 1996.
- 2) Sugita M, Grant EP, van Donselaar E, et al.: Separate pathways for antigen presentation by CD1 molecules. *Immunity*, 11, 743-752, 1999.
- 3) Sugita M, van der Wel N, Rogers RA, et al.: CD1c molecules broadly survey the endocytic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 8445-8450, 2000.
- 4) Sugita M, Cao X, Watts GF, et al.: Failure of trafficking and antigen presentation by CD1 in AP-3-deficient cells. *Immunity*, 16, 697-706, 2002.
- 5) Pena-Cruz V, Ito S, Oukka M, et al.: Extraction of human Langerhans cells: a method for isolation of epidermis-resident dendritic cells. *J. Immunol. Methods*, 255, 83-91, 2001.
- 6) Pena-Cruz V, Ito S, Dascher CC, et al.: Epidermal Langerhans cells efficiently mediate CD1a-dependent presentation of microbial lipid antigens to T cells. *J. Invest. Dermatol.* 121, 517-521, 2003.
- 7) Watanabe Y, Watari E, Matsunaga I, et al.: BCG vaccine elicits both T-cell mediated and humoral immune responses directed against mycobacterial lipid components. *Vaccine*, 24, 5700-5707, 2006.