

免疫応答とトリプトファン代謝

長瀬 文彦

今春、名古屋大学を定年退職しました。在職中の主な研究を紹介します。

1. ニワトリの免疫応答機構

1974年、名古屋大学医学部細菌学教室の中島泉先生のもとでニワトリの免疫機構の研究を始めた。当時、マウスを中心とする研究において哺乳類のタンパク抗原に対する抗体産生応答や免疫記憶と免疫寛容（トレランス）の誘導はT細胞とB細胞の相互作用によって誘導されることが知られていた。進化的に下等動物であるニワトリの抗体産生において細胞間の相互作用機構がどれほど備わっているかは明らかでなかった。

タンパク抗原に対する哺乳類の抗体産生はアジュバンドを必要とするがニワトリはアジュバンドなしで牛血清アルブミン(BSA)に対する抗体産生を容易に誘起した。トレランスを誘導する少量と大量のBSAにも正常に応答した。また、哺乳類で抗体産生と免疫記憶を誘導する加熱凝集させたBSAと抗体産生を誘起せずトレランスを誘導する超遠心で凝集塊を除去したBSAもニワトリにおいては同様に抗体産生を誘起し、免疫記憶もトレランスも誘導しなかった。ただし、適量のBSAの頻回投与やフロイドのアジュバンドの併用により免疫記憶を誘導することができたことから、免疫記憶の誘導には持続的な抗原刺激が必要であるようだ。これらの成績はニワトリの抗体産生応答が哺乳類の胸腺非依存性抗原に対する抗体産生応答と似ており、ニワトリでは抗体産生におけるT-B細胞間相互作用が十分に発達していないことを示している。

ハプテン・キャリアー抗原（担体のキャリアーにハプテンを結合させた抗原；ハプテンをB細胞が認識しキャリアーをT細胞が認識する）を用いたハプテンに対する抗体産生応答のシステムにより、ニワトリではB細胞単独でB記憶が誘導されるとともに抑制性のT細胞記憶が誘導され、それらのバランスによって免疫記憶が成立すること、しかし、抗体産生の誘起にはヘルパーT細胞機能が必要であることを明らかにした。

2. Tハイブリドーマによる抗原認識

二重特異性を有する (BALB/c X C57BL/6)F₁ T 細胞ハイブリドーマを作製した。このT細胞ハイブリドーマは I-A^dに拘束された抗原 KLH と自己の I-A^b 単独を二重に認識した。外来抗原に反応するT細胞が自己のMHCによって絶えず活性化され、自己免疫疾患の発症につながることもあり得ることを示した。

3. T細胞クローンによる抗腫瘍免疫の誘導機構

白血病 L1210 細胞に対する特異 CTL クローン (K7L) は *in vitro* および *in vivo* で強力な抗腫瘍免疫を誘導した。L1210 細胞を腹腔に投与されたマウスは 10 日程で腫瘍死したが、L1210 と K7L を投与されたマウスでは 10 日目に一時的に腫瘍が増殖した。この増殖した腫瘍細胞は K7L に不感受性であった。増殖した腫瘍細胞はその後拒絶され、その後強力な抗腫瘍特異免疫が誘導されたが、その際、宿主の CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞が必要であった。K7L に不感受性の L1210 に特異的な CTL クローン (K4L) も K7L と同様に強力な腫瘍特異免疫を誘導したが、K4L の標的腫瘍抗原は安定に発現した。腫瘍患者の免疫細胞を *in vitro* で活性化させ、*in vivo* にもどして治療することが有効と考えられている。本研究は、その際にも宿主の免疫の活性化が重要であることを示した。

4. 抗 CD3 抗体による FcR 陽性細胞の調節

リンパ球の抗原レセプター (イディオタイプ抗原) に対して抗イディオタイプ抗体が反応し、リンパ球を活性化したり抑制したりして調節している。この研究ではイディオタイプ抗体のモデルとしてT細胞抗原レセプター複合体の CD3 に対する抗体 (すべてのT細胞を活性化する) を用いた。抗 CD3 抗体は CD4⁺のヘルパーT細胞と CD8⁺のキラーT細胞の増殖と CD8⁺T細胞の細胞傷害活性を誘導した。抗 CD3 抗体で活性化された CD8⁺T細胞は脾臓のT細胞の抗 CD3 抗体による増殖を抑制し、抗原提示細胞である Fc レセプター陽性細胞を傷害した。この機構を解析した結果、抗 CD3 抗体は抗原結合部位でT細胞に結合し Fc 部分で Fc レセプター陽性の抗原提示細胞に結合することで最初にT細胞が活性化されるが、この機構で活性化された CD8⁺T細胞はその後抗 CD3 抗体を介した逆方向の細胞傷害活性により抗原提示細胞活性を抑制し、免疫応答を終息させることが明らかとなった。これは免疫応答における抗イディオタイプ抗体による免疫応答の調節の重要性を示すものである。

5. 細胞死の誘導機構

アポトーシスの誘導には死のレセプターの Fas を介した場合と種々のストレスによるミトコンドリアの機能低下を介する場合がある。アポトーシスはシステインプロテアーゼである数種のカスパーゼが活性化されて誘導されるが、カスパーゼの活性化を伴わない細胞死のネクローシスの機構はよく知られていなかった。ビタミン K₃ (メナディオール、MD) は DNA フラグメンテーションを伴わないネクローシスを Jurkat T 細胞に誘導した。MD によるネクローシスの誘導は濃度をさらに増加させると抑制される二相性を示し、これはシグナル伝達分子 JNK の活性化の程度に依存した。当時、ネクローシスもアポトーシスと同様にシグナル伝達を介することを示めず研究であった。

糖の最終代謝産物であるメチルグリオキサール (MG) は糖尿病患者において多く産生され、アポトーシスを誘導する。MG による Jurkat T 細胞のアポトーシスの誘導は PMA によって抑制された。MG はシグナル伝達分子 JNK を活性化することによりミトコンドリアの機能を低下させてチトクローム c を放出させアポトーシスを誘導したが、PMA はシグナル伝達分子 ERK を活性化してミトコンドリア上で JNK の作用に抵抗しアポトーシスの誘導を阻止した。

6. トリプトファン代謝による免疫の調節

Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) はトリプトファン代謝のキヌレニン経路の律速酵素であり、この経路の最終産物は NAD である。1998 年に IDO のインヒビターによる異系マウス間の妊娠における流産が報告された。IDO は肝臓以外の組織に発現し、炎症において樹状細胞やマクロファージに発現が誘導される。発現誘導物質に INF- γ 、IFN- α/β 、LPS、CpG、CD80/CD86 のリガンド (CTLA-4)、GITR 等がある。IDO を発現した形質細胞様 (plasmacytoid) 樹状細胞 (DC) やリンパ系 DC は免疫抑制活性を示し、制御性 (サブレッサー) T 細胞と常に協力関係にある。IDO による免疫抑制機構は (1) 局所的なトリプトファンの枯渇による増殖の阻止、(2) キヌレニン経路の代謝産物によるアポトーシスの誘導が知られている。IDO は炎症を抑制するが、一方で、腫瘍免疫の抑制や脳神経疾患の促進等をする。

トリプトファンのキヌレニン経路の代謝産物 3-ヒドロオキシアントラニル酸 (3HAA) は T 細胞にアポトーシスを誘導することが知られていた。3HAA による胸腺細胞のアポトーシスの誘導は SOD とカタラーゼで増強される不思議な現象を示した。その機構を解析した結果、3HAA は SOD とカタラーゼにより酸化されて 2 分子が重合しシナバリン酸が産生されることにより、10 倍以上強いアポ

トーシス誘導活性を有するようになること示した。

IDOの活性を測定するのに血清や細胞培養上清を除タンパク後、キヌレニン量をHPLCで測定することが多い。マウスの骨髄系樹状細胞のように刺激によって酸化窒素(NO)を産生する場合には、酸で除タンパクする際にNOから生じたナイトライトとキヌレニンのジアゾ化反応のためにキヌレニン量を低く見積もる危険があるので、メタノールで除タンパクするように警告した。

骨髄細胞をGM-CSFで培養して分化させた樹状細胞(BMDC)は実験によく用いられるが、BMDCにおけるIDOについては未知であった。BMDCをCpG(細菌のDNA)で刺激するとIDOタンパクの発現が誘導されたが、同時に産生されるNOによって活性が抑制されることを示した。形質細胞様DCに発現するIDOが免疫抑制を示すのに対し、骨髄系DCは免疫の誘導に作用する。

溶血の際のヘモグロビン(Hb)による細胞傷害は主としてHbを分解するヘムオキシゲナーゼによって防御される。炎症性溶血性疾患の患者においてキヌレニン/トリプトファンの比が増加することが報告された。このことはHbによってIDOが誘導されることを示唆した。やはりHbはBMDCにおいて活性を示すIDOの発現を誘導した。IDO発現の誘導のためにはHbのタンパクとヘムの両方を必要とした。また、HbによるIDOの発現にはPI3K-PKC-活性酸素の産生経路とPI3K-Akt経路の両方によるNF- κ Bの活性化が必要であった。

7. 長寿遺伝子 SIRT1 と免疫

哺乳類のSIRTは長寿遺伝子と言われるイーストのSir2に相同な分子ファミリーであり、SIRT1~SIRT7が存在する。SIRTはキヌレニン経路の最終産物であるNADを基質として脱アセチル化する酵素である。SIRT1はFOXO、p53、NF- κ B、PGC-1 α などを脱アセチル化し転写活性を調節する因子である。Sir2がカロリー制限による延命に関与することがイースト、線虫、ハエなどで知られているがヒトにおいてSIRT1が寿命に関与しているかは明らかでない。カロリー制限や適度の運動がメタボリックシンドロームを防ぐことは認められている。この調節にSIRT1が関与しているようである。カロリー制限はミコンドリアの数と機能の増加を介して、活性酸素の産生を抑制し、効率的なエネルギー(ATP)産生を誘導することにより効果を示すと報告されている。ブドウに多く含まれるポリフェノールのレスベラトロールはSIRT1を最も強く活性化する物質であり、マウスモデルで過食による肝臓障害を防ぐことが報告されている。SIRT1欠損マウスは自己免疫疾患症状を示し、SIRT1は免疫応答に重要なNF- κ Bを抑制する。一方、SIRT1は炎症性のTh17細胞を誘導する転写因子ROR γ と共同して日内変

動(circadian rhythms)を調節する。研究室の大学院生はT細胞の応答において SIRT1 が重要な働きをしていることを発見し、現在研究中である。私の免疫学の研究の最後にこのような健康と深く結び付いている分子に出会うことができたことを大変幸せに思う。

(元名古屋大学医学部教授、保健学科検査技術科学専攻・名古屋大学名誉教授)