

|           |                                                                                                                         |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名       | やま した せい じ<br>山 下 誠 二                                                                                                   |
| 学 位 の 種 類 | 博 士 (生命科学)                                                                                                              |
| 学 位 記 番 号 | 生 博 第 13 号                                                                                                              |
| 学位授与の日付   | 平 成 16 年 3 月 23 日                                                                                                       |
| 学位授与の要件   | 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当                                                                                                 |
| 研究科・専攻    | 生 命 科 学 研 究 科 高 次 生 命 科 学 専 攻                                                                                           |
| 学位論文題目    | Mechanism for human $\gamma\delta$ T cell recognition of nonpeptide antigens<br>(ヒト $\gamma\delta$ 型T細胞による非ペプチド性抗原認識機構) |

論文調査委員 (主 査) 教 授 湊 長 博 教 授 稲 葉 カ ヨ 教 授 清 水 章

### 論 文 内 容 の 要 旨

ヒトの $\gamma\delta$ 型T細胞は、健康成人の末梢血中T細胞の高々数パーセントを占める小亜集団であるが、結核やマラリア等の感染症において30～60パーセントに増加することが知られている。これらの $\gamma\delta$ 型T細胞は、多くの病原性細菌によって産生されるピロリン酸モノエステル、アルキルアミンなどの非ペプチド性代謝産物を認識し、様々なサイトカインを分泌することにより、感染免疫のエフェクターとして機能すると考えられている。しかしながら、 $\gamma\delta$ 型T細胞のこれらの非ペプチド性抗原の詳細な抗原認識機構についてはほとんどわかっていない。申請者は、健康成人および臍帯血における $\gamma\delta$ 型T細胞の $\gamma$ 鎖と $\delta$ 鎖のDNA配列解析とそれらのcDNAの遺伝子導入による機能解析により、非ペプチド性抗原の認識機構の解明をめざした。健康成人の $\gamma\delta$ 型T細胞受容体(TCR)のCDR3配列解析によって、 $\gamma\delta$ 型T細胞の割合に比例して $\gamma$ 鎖 $\delta$ 鎖とも多様性の低下が認められること、 $\gamma$ 鎖においてはJ $\gamma$ 1.2遺伝子の使用頻度が非常に高いこと、 $\delta$ 鎖においてはN領域に位置する97番目のアミノ酸がロイシン、バリン、あるいは、イソロイシンである割合が有意に高いこと、が明らかとなった。これらの特性は非ペプチド性抗原による刺激後も保持された。次に、これらの $\gamma\delta$ 型TCRの特性と非ペプチド性抗原認識の相関を知る目的で、臍帯血を非特異的刺激であるPHA-Lあるいはピロリン酸モノエステル抗原で刺激後、CDR3領域の配列を比較検討した。その結果、健康成人に認められた $\gamma\delta$ 型TCRの上記特性は、後者においてのみ出現し、前者においては全く認められなかった。この結果は、健康成人の $\gamma\delta$ 型TCRのレパートリーは、生後の多様な病原性細菌が産生する非ペプチド性抗原によるエピジェネティックな選択により形成されることを示唆している。さらに、 $\gamma\delta$ 型TCRのJ $\gamma$ 1.2領域にコードされている108, 109番目のリジン残基、V $\delta$ 2領域にコードされている51番目のアルギニン残基、そして、 $\delta$ 鎖N領域の97番目のロイシン残基をアラニン置換し、それらの変異体をTCR欠損型ジャックカット細胞に遺伝子導入し、変異型 $\gamma\delta$ TCRを発現したジャックカット細胞を樹立した。これら細胞はすべて抗CD3抗体に強く反応することから、変異型 $\gamma\delta$ TCRがCD3と会合して機能的に発現していることが確認された。これらをエチルピロリン酸、イソブチルアミン、あるいは、パミドロネートでパルスしたヒト膀胱ガンで刺激をし、IL-2の産生量を測定した。その結果、野生型 $\gamma\delta$ TCR発現細胞はこれらすべての非ペプチド性抗原に対して有意な反応を示すのに対し、 $\gamma$ 108A,  $\delta$ 51A,  $\delta$ L97A変異型 $\gamma\delta$ TCRを発現している細胞株はこれらのいずれの非ペプチド性抗原に対しても全く反応しないことが明らかとなった。以上の結果は、 $\gamma\delta$ TCRのCD3領域に配意される $\gamma$ K108,  $\delta$ R51,  $\delta$ L97の3つのアミノ酸残基がすべてのタイプの非ペプチド性抗原の認識に必須であることをしめすものであり、 $\gamma\delta$ TCRのCD3ポケット構造の表面上にある2つの正電荷をもった残基と1つの疎水性残基からなる構造と荷電性非ペプチド性抗原の直接的結合が $\gamma\delta$ TCRによる非ペプチド性抗原の認識の分子機構であることが強く示唆された。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

T細胞はその抗原受容体(TCR)の種類によって $\alpha\beta$ 型と $\gamma\delta$ 型の2種類に分けられる。ほ乳類では前者はT細胞の大部

分を占め、その抗原認識様式についても研究が進んでいるのにたいし、後者については未解明の点が多い。 $\alpha\beta$ 型T細胞は主要組織適合抗原（MHC）に提示されたペプチド抗原を認識するのに対し、 $\gamma\delta$ 型T細胞は多くの病原性細菌によって産生されるピロリン酸モノエステル、アルキルアミンなどの非ペプチド性代謝産物をMHC非依存性に認識することがわかっているが、 $\gamma\delta$ 型T細胞のこれらの非ペプチド性抗原の詳細な抗原認識機構についてはまだほとんどわかっていない。申請者は、健康成人およびお臍帯血における $\gamma\delta$ 型TCRのDNA配列解析とそれらの遺伝子導入による機能解析により、非ペプチド性抗原の認識機構の解明をめざした。健康成人の $\gamma\delta$ 型T細胞受容体（TCR）のCDR3配列解析によって、 $\gamma\delta$ 型T細胞の割合に比例して $\gamma$ 鎖 $\delta$ 鎖とも多様性の低下が認められること、 $\gamma$ 鎖においてはJ $\gamma$ 1.2遺伝子の使用頻度が非常に高いこと、 $\delta$ 鎖においてはN領域に位置する97番目のアミノ酸がロイシン、バリン、あるいは、イソロイシンである割合が有意に高いこと、が明らかとなった。これらの特性は非ペプチド性抗原による刺激後も保持された。次に、臍帯血を非特異的刺激であるPHA-Lあるいはピロリン酸モノエステル抗原で刺激後、CDR3領域の配列を比較検討した結果、健康成人に認められた $\gamma\delta$ 型TCRの上記特性は、後者においてのみ出現し、前者においては全く認められなかった。この結果は、健康成人の $\gamma\delta$ 型TCRのレパトリーは、生後の多様な病原性細菌が産生する非ペプチド性抗原によるエビジェネティックな選択により形成されることを示唆している。さらに、 $\gamma\delta$ 型TCRのJ $\gamma$ 1.2領域にコードされている108, 109番目のリジン残基、V $\delta$ 2領域にコードされている51番目のアルギニン残基、そして $\delta$ 鎖N領域の97番目のロイシン残基をアラニン置換し、それらの変異体をTCR欠損型ジャークット細胞に遺伝子導入し変異型 $\gamma\delta$ TCRがCD3と会合して機能的に発現している細胞株を樹立した。これらをエチルピロリン酸、イソブチルアミン、あるいは、パミドロネートでパルスしたヒト膀胱ガンで刺激した結果、野生型 $\gamma\delta$ TCR発現細胞はすべての非ペプチド性抗原に対して有意な反応を示すのに対し、 $\gamma$ 108A,  $\delta$ 51A,  $\delta$ L97A変異型 $\gamma\delta$ TCRを発現する細胞株はいずれの非ペプチド性抗原に対しても全く反応しなかった。以上の結果は、 $\gamma\delta$ TCRのCD3領域に配置される $\gamma$ K108,  $\delta$ R51,  $\delta$ L97の3つのアミノ酸残基がすべてのタイプの非ペプチド性抗原の認識に必須であることを示すものであり、CD3ポケット構造の表面にある2つの正荷電性残基と1つの疎水性残基のユニットと荷電性非ペプチド性抗原の結合が $\gamma\delta$ TCRによる非ペプチド性抗原の認識の分子機構であることが強く示唆された。

以上の結果は病原細菌に対する免疫応答の機構の解明とその応用の可能性に大きな貢献をなすものであり、本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。また申請者は、平成16年1月27日、論文内容とそれに関連した口頭試問を受け調査委員全員一致で合格と認められたものである。