

HLA-DQw6 遺伝子導入マウスにおける起腎炎性溶連菌抗原への免疫応答性の獲得

小児腎疾患の進行阻止に関する研究
進行阻止に関する免疫・遺伝・病態生化学的研究

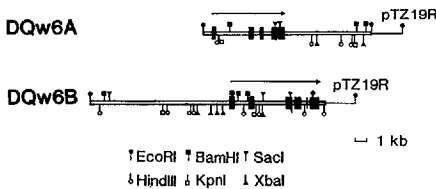
笹月 健彦

HLA-Dw12ハプロタイプに由来するDQw6AおよびB遺伝子をC57BL/6マウス(B6)に導入し、これを安定に発現したトランスジェニックマウス1系統(DQw6-B6)を樹立した。DQw6-B6におけるDQw6分子発現の組織特異性は、I-A分子と同様であった。さらにDQw6-B6はDQw6分子に対する免疫学的寛容および起腎炎性溶連菌(SCW)抗原に対する応答性を獲得した。

HLA-DQ遺伝子、トランスジェニックマウス 起腎炎性溶連菌抗原、免疫遺伝

(研究方法) HLA-DQw6トランスジェニックマウスの樹立：HLA-DR2-Dw12-DQw6ホモ接合体より樹立されたBリン芽球様細胞株EB-TOKよりDQw6AおよびB遺伝子に対応するcDNAをプローブとして単離した¹⁾。DQw6A遺伝子は約1KbのDQw6B遺伝子は約10Kbのプロモーター領域を含んでいた(図1)。両遺伝子の混合物を、B6マウスの受精卵に注入し偽妊娠状態のICRマウスの子宮内に戻した。生まれたマウスの尾よりDNAを抽出し、DQw6 cDNAをプローブとしたサザンハイブリダイズ法により、DQw6遺伝子の有無を検討した。

(図1)



DQw6遺伝子の発現の解析：マウスの各組織よりRNAを抽出し、DQβ鎖cDNAをプローブとし

た exonuclease S1 protection 法によりDQw6 mRNAを検出した。ビオチン化抗DQw1(DQw5+6)単クローン抗体(mAb)およびペルオキシダーゼ・アビジンを用いて組織化学的方法でDQw6分子の組織特異的発現を検討した。胸腺、脾臓あるいはリンパ節の細胞におけるDQw6分子の発現は、蛍光抗体染色の後にFACSを用いて検討した。脾細胞を35Sメチオニンで標識し、これより抗I-Aあるいは抗DQw6 mAbを用いて免疫沈降物を得、これをNEPHGEおよびSDS-PAGEによる2次元電気泳動法により解析した²⁾。

免疫応答の解析：DQw6-B6とC3Hを交配して得たDQw6陽性のDQw6-B/CF1およびDQw6陰性のB/CF1の腹腔内にEB-TOKを数回免疫し抗血清を得、これをL細胞で吸収した。L細胞およびDR2あるいはDQw6遺伝子を発現したL細胞トランスフェクタントを抗血清と反応させ間接蛍光抗体染色法により抗DQw6あるいは抗DR2抗体を検出した。起腎炎性A群12型β溶連菌の細胞壁(SCW)抗原は、ブラウンのホモジナイザーで菌体を破碎した後、溶連菌細胞壁分画を塩酸熱処

九州大学生体防御医学研究所・遺伝学部門

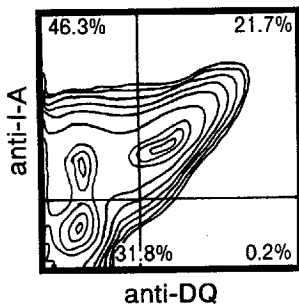
Takehiko Sasazuki, M.D.

Department of Genetics, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Fukuoka 812.

理により可溶化し、硫酸塩析により粗精製した³⁾。マウスの足底部および尾根部に、完全フロイントアジュバントに懸濁した各種の可溶性抗原 20-50 μ g を免疫し 7~12 日後に膝窩部、ソケイ部および傍大動脈部のリンパ節を摘出して単離細胞浮遊液を作製した。細胞 (5×10^5 個) を可溶性抗原 (10~100 μ g/ml) と共に 2~4 日間培養し、T リンパ芽球への 3 日チミジンの取り込みを測定することにより抗原特異的 T 細胞の *in vitro* 二次免疫応答を定量した。各種 mAb の免疫応答に及ぼす影響は腹水型あるいは培養上清中の mAb を適当に希釈して培養系に加えることにより検討した。

(結果) 安定した HLA-DQw6 トランスジェニックマウス 1 系統 (DQw6-B6) を樹立した。DQw6-B6 はタンデムに連鎖した DQw6A および B 遺伝子 4~5 コピーを有し交配実験より DQw6 分子は、常染色体性優性形質として発現されており、DQw6 遺伝子に関してヘミ接合体と考えられた。DQw6 BmRNA の発現は、ヒト B 細胞株と同様で第 5 エクソンを発現するものが主体で、発現しないものが少量混在していた。DQw6 分子の発現は I-A^b 分子と同様の組織特異性を示した。また DQw6 分子の発現は I-A^b 分子と比較すると少なく、I-A^b 陽性脾細胞の約 30% が DQw6 陽性であり (図 2)、両分子ともにマウス組み換え IL-4 との 24 時間培養により著明に発現が増加した。

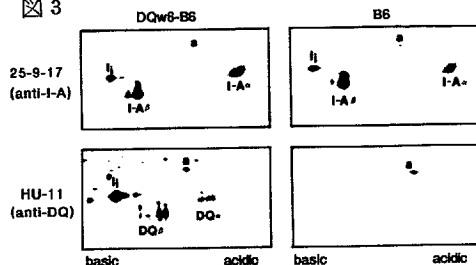
図 2



MLR で活性化された T 細胞には DQw6 分子の発現は認めなかった。二次元電気泳動法による

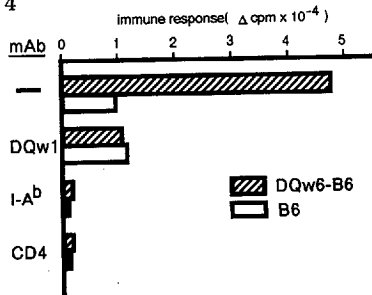
クラス II 分子の蛋白レベルでの解析では、I-A^b 分子に関して B6 と DQw6-B6 との間に差は認められなかった。DQw6-B6 に発現している DQw6 分子の性状は、ヒト B 細胞株のそれと同一であり、さらに I-A^b 分子との間に雑種クラス II 分子の形成は認められなかった (図 3)。

図 3



EB-TOK の免疫により B/CF1 マウスは、抗 DR2 および抗 DQw6 抗体を産生したが、DQw6-B/CF1 は抗 DR2 抗体は産生したが抗 DQw6 抗体は産生せず DQw6 分子に対する免疫学的寛容を獲得していると考えられた。B6 のリンパ節細胞は DQw6-B6 の脾細胞に対して MLR を示した。B6 は溶連菌 (SCW) 抗原に対して低応答を示したが、すべての DQw6-B6 は SCW 抗原に対する応答性を獲得した。DQw6-B6 の SCW 抗原に対する *in vitro* 二次免疫応答は、抗 DQw1 (DQw5+6) mAb を加えることにより B6 の免疫応答と同程度にまで抑制された。さらに抗マウス CD4 (L3T4) mAb のみならず、抗 I-A^b β 鎖 mAb も免疫応答を、ほぼ完全に抑制した (図 4)。

図 4



用いた mAbs の交差反応性を間接蛍光抗体染色法により検討したところ抗 DQw1 (DQw5+6) mAb

は、B6の脾細胞と反応せず、また抗I-A^bmAbは、EB-TOKおよびDQw6を発現したL細胞とは反応しなかった。さらに抗クラスII mAbsによる免疫応答の阻止が非特異的でないことは、これらのmAbsがDQw6-B6あるいはC3Hの適当な抗原に対する免疫応答には影響を与えないことより明らかであった。

(考察) 著者らは、溶連菌感染後急性糸球体腎炎とHLA-Aw33-B12-Dw19-DQw6との強い相関を明らかにし、本症の遺伝要因としてHLAが重要であることを明らかにした⁴⁾。さらにSCW抗原に対する人の免疫低応答性は、抑制性T細胞の誘導を介して⁵⁾HLAと密に連鎖した単純優性の免疫抑制(Is)遺伝子により支配されていることを明らかにした³⁾。Is遺伝子はDQ対立遺伝子と連鎖不平衡にあることより、DQ対立遺伝子がIs遺伝子であるとの仮説を得た。DQ遺伝子の機能を解析する目的でマウスにDQw6遺伝子を導入し、主要組織適合抗原クラスII分子としての機能を有したHLA-DQw6遺伝子の発現に成功した。DQw6遺伝子の発現状況は、マウス固有のI-A^b遺伝子と同様であり両遺伝子は共にIL-4により発現を増強したことよりDQw6遺伝子の発現調節領域は、マウスにおいても作動していると考えられた。また、ヒト活性型T細胞ではクラスII分子の発現が認められるのに対し、DQw6-B6ではこれが観察されなかったことより、DQw6遺伝子の発現調節はマウス型のものとなっていることが明かとなった。mAbsによるDQw6-B6のSCW抗原に特異的なT細胞増殖反応の阻止実験および蛋白レベルでの解析により異種雑種クラスII分子の発現が認められなかったことより、この免疫応答ではDQw6分子、I-A^b分子、およびCD4分子が重要な役割を担っていると考えられた。おそらくT細胞レセプターはDQw6分子とSCW抗原を認識し、CD4分子は主にI-A^b分子と結合することにより免疫応答を促進しているものと推測される。以上より少なくとも第5エクソンを発現したDQ分子はこれを拘束分子とするT細胞の出現を促し、

さらに抗原提示の能力を有すると考えられる。DQw6-B6はDQ分子の機能及び溶連菌感染症に合併する急性糸球体腎炎あるいはリウマチ性疾患の遺伝要因の解析に有用なモデルとなることが期待される。

(文献)

- 1) Tsukamoto, K., Yasunami, M., Kimura, A., Inoko, H., Ando, A., Hirose, T., Inayama, S. and Sasazuki, T.: DQw1 gene from HLA-Dw12 consists of six exons and expresses multiple DQw1 polypeptide through alternative splicing. *Immunogenetics*, 25: 343-346, 1987.
- 2) Sone, T., Tsukamoto, K., Hirayama, K., Nishimura, Y., Takenouchi, T., Aizawa, M. and Sasazuki, T.: Two distinct class II molecules encoded by the genes within HLA-DR subregion of HLA-Dw2 and Dw12 can act as stimulating and restriction molecules. *Journal of Immunology* 135: 1288-1298, 1985.
- 3) Sasazuki, T., Kaneoka, H., Nishimura, Y., Kaneoka, R., Hayama, M., and Ohkuni, H.: An HLA-linked immune suppression gene in man. *Journal of Experimental Medicine*, 152: 297s-313s, 1980.
- 4) Sasazuki, T., Hayase, R., Iwamoto, I. and Tsuchida, H.: HLA and Acute postsreptococcal glomerulonephritis. *The New England Journal of Medicine*, 301: 1184-1185, 1979.
- 5) Nishimura, Y. and Sasazuki, T.: Suppressor T cells control the HLA-linked low responsiveness to streptococcal antigen in man. *Nature* 302: 67-69, 1983.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



HLA-Dw12 ハプロタイプに由来する DQw6A および B 遺伝子を C57BL/6 マウス(B6)に導入し、これを安定に発現したトランスジェニックマウス 1 系統(DQw6-B6)を樹立した。DQw6-B6 における DQw6 分子発現の組織特異性は、1-A 分子と同様であった。さらに DQw6-B6 は DQw6 分子に対する免疫学的寛容および起腎炎性溶連菌(SCW)抗原に対する応答性を獲得した。