

5. トキソプラズマ感染細胞による 抗原提示機構の分子論的解析

— 遺伝子導入法 (トランスフェクション法) による解析 —

矢野明彦

(掲載決定:平成3年8月7日)

寄生虫感染に対する免疫応答の解析すなわち寄生虫免疫学の領域にも分子生物学的手法が用いられてきている。今回はトキソプラズマを例にして遺伝子導入法 (transfection, トランスフェクション) を用いて解析している次の二点について話をしたい。その第一は遺伝子導入した抗原提示細胞によるワクチン開発に関する基礎的研究であり、その第二点目は人獣共通感染症であるトキソプラズマ感染に対する宿主免疫反応の解析における分子生物学的手法の応用である。

現在さまざまな病原体に対するワクチンの開発に分子生物学的手法が用いられ実際に応用されてきている。その一方で、レコンビナントワクチンが感染症の発症予防に機能する免疫反応を惹起できない場合が少なくない。この問題点を打破するために抗原提示細胞を用いたワクチン法を開発することが第一の研究の目的である。病原体に対する抗体産生におけるヘルパー T 細胞や細胞性免疫反応の役割を担う T 細胞群は抗原のみでは活性化されない。T 細胞が活性化しリンフォカインの産生や標的細胞を障害するためには、マクロファージや樹状細胞など様々なタイプの抗原提示細胞が不可欠である。そして、免疫応答性は免疫応答遺伝子 (Ir 遺伝子) によって遺伝的に統御されているが、Ir 遺伝子産物である主要組織適合抗原 (MHC) 分子は抗原提示細胞の細胞膜上に発現されている。そして免疫応答を惹起するにはまず抗原提示細胞膜上で抗原と MHC 分子との複合体が形成される必要がある。MHC 分子は二種類 (クラス I 分子, クラス II 分子) あって、抗原提示細胞内で MHC と抗原との複合体が形成される。クラス I 分子とクラス II 分子とでは MHC-抗原複合体形成の過程や、複合体の抗原提示細胞膜上への発現経路は異なると考えられている。レコンビナントワクチンあるいは合成ペプチドワクチンが無効の例では T 細胞を活性化すべき抗原提示細胞の抗原提示機能欠損による可能性が大きいと考えられる。

ここでは抗原提示機構に機能する細胞内情報伝達分子であるプロテインキナーゼ C (PKC) の遺伝子 (図 1-a) (1, 2) を導入することにより抗原提示機能を発現、増幅させた抗原提示細胞の作製を試みた。ヒト B 細胞腫 ARH に PKC 遺伝子を導入したトランスフェクタントは PKC の量がペアレントの ARH より増加しているのが Western blott 法により確認できた。このトランスフェクタントを抗原提示細胞として用いた。その結果、抗原提示機能が増幅したトランスフェクタント (ARH-RKC1) が得られ (図 1-b), このトランスフェクタントを用いた *in vivo* 実験の解析を進める予定である。ところで、同様にして得られたトランスフェクタント (ARH-PKC5) はむしろ抗原提示能の低下が見られ、ただ単に PKC 量を増加すればよいわけではないことが示された。その機構は今後の問題として残されている。

トランスフェクションの手法を用いた第二の実験は、抗原提示に機能する MHC 遺伝子を導入するもので、ヒトおよびマウスなど実験動物の MHC 遺伝子を目的とする細胞に導入する事によって人獣共通感染症を解析する試みである。人獣共通寄生原虫であるトキソプラズマの示す病原性 (強毒性, 弱毒性) を決定する要因の一つは宿主の種による因子が考えられる。すなわちトキソプラズマ RH 株はマウスに対して強毒性を示し少数寄生でも致死性であるが、ヒトやラットに対しては弱毒性を示す (しかし、実験中の感染で重篤な症例もありその扱いに関しては十分な注意と配慮が必要である。また、同一病原体による同種間における病態像の違いに関しては多くの研究報告があり、この場合にも MHC 遺伝子の関与が指摘されている)。このトキソプラズマの病原性を決定する宿主側要因として免疫反応が考えられるが、とくに抗原提示細胞の役割について遺伝子導入の手法を用いて解析を加えた。ヒト抗原提示細胞である B リンフォーマにマウス MHC 遺伝子 (図 2) (1) を導入し、ヒトおよびマウスのトキソプラズマに対する免疫反応の惹起機構、すなわち抗原提示機構について解析を試みたものである。図 2 に示すように、トランスフェクタントは一つの細胞膜上にヒトの MHC である HLA 分子と遺

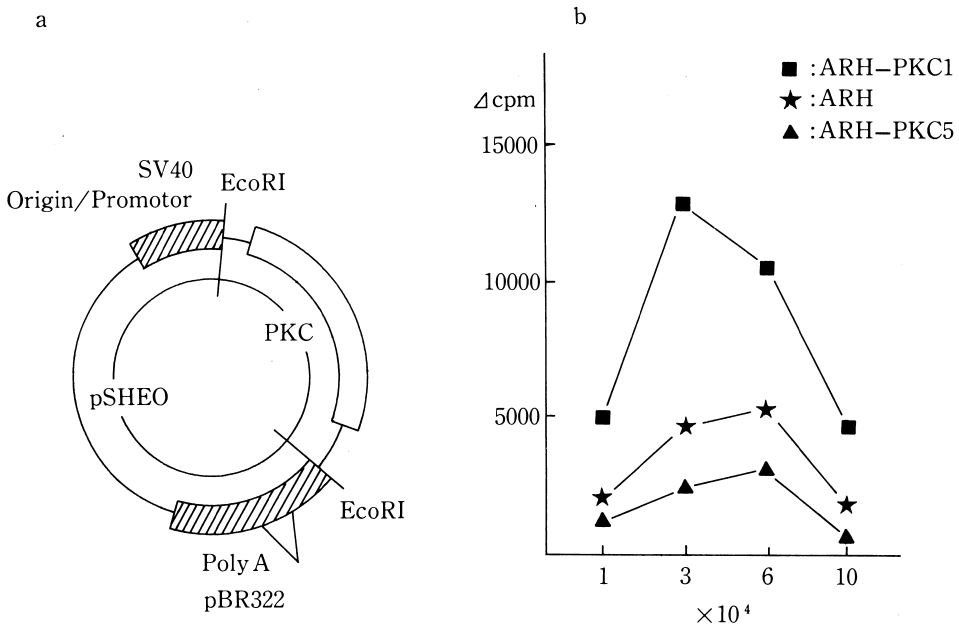


図1 プロテインキナーゼ C 遺伝子導入細胞 (トランスフェクタント) によるトキソプラズマ抗原提示
 a. プロテインキナーゼ C (PKC) の cDNA を pBR322 の EcoRI 切断部に挿入してコンストラクトした。
 b. エレクトロポレーション法により PKC 遺伝子をヒト B リンフォーマに導入し, G418 で選択してクローンを確立した。トランスフェクタントおよびベアレントの ARH 細胞にトキソプラズマを感染させてトキソプラズマ抗原の提示能をトキソプラズマ抗原特異的増殖 T 細胞の活性化能 ($^3\text{H-TdR}$ の取り込み) で測定した。

伝子導入によるマウス MHC 分子, $A\alpha^k A\beta^k$ を同時に発現している (斜線部分)。この遺伝子導入抗原提示細胞によるトキソプラズマ特異的ヒト T 細胞とマウス T 細胞の活性化能を解析した。その結果, トキソプラズマが感染した遺伝子導入抗原提示細胞はマウス T 細胞に対するよりもヒト T 細胞に対して強い抗原提示能を示した。このことからトキソプラズマの病原性を決定する宿主側要因として抗原提示細胞が重要な役割を演じていることが示唆された。

以上のように, ある機能分子をコードする遺伝子を研究目的とする細胞に導入することにより, 従来の方では不可能であった実験解析が可能となった。ここでは, クローン化された遺伝子 (cDNA, genomic DNA) を細胞に導入する方法について解説する。DNA を細胞に導入するために数多くの方法が工夫されている (図3)。遺伝子を導入する方法にはリン酸カルシウム法, リン酸カルシウム法 (Chen-Okayama 法), DEAE デキストラン法, エレクトロポレーション (電気穿孔法), レトロウイルスによる導入法, マイクロインジェクション

法などがある。DNA を導入する細胞の種類も培養細胞からトランスジェニックマウスの作製のための受精卵や gene targeting とよばれる相同組み換えによる遺伝子変異の ES 細胞への導入など, およそありとあらゆる細胞が試みられている。また導入された遺伝子が一過性 (トランジェント) に発現される場合と何代にわたって安定した (ステーブル) な遺伝子発現をする場合がある。研究目的, 使用する遺伝子, 導入する細胞, などの種類や性格によって遺伝子導入法を選択することになる。本研究ではエレクトロポレーション法で遺伝子導入したが, 他の遺伝子導入法の実験のながれについても簡単に述べてみたい。

1) リン酸カルシウム法および DEAE デキストラン法
 原理はリン酸カルシウムあるいは DEAE デキストランによって DNA と複合体, 共沈殿物を形成し, 細胞のエンドサイトーシスによってこの複合体を取り込むことによる。取り込んだのちの核への輸送などの詳細は分かっていない。これらの方法は特別な装置や技術は要求

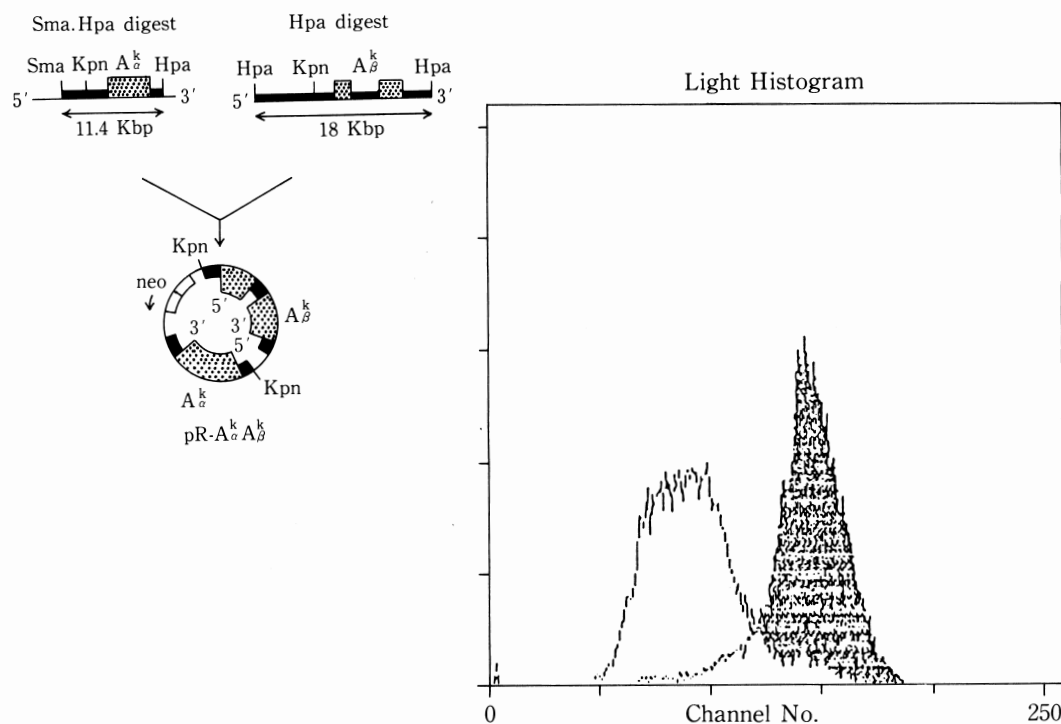


図2 マウス MHC クラス II 遺伝子を導入したヒト B リンフォーマにおける遺伝子発現
 マウス MHC クラス II 遺伝子 (gDNA; $A^k A^{\beta}$) をプラスミドにコンストラクトし、ヒト B リンフォーマに導入しトランスフェクタントを確立した。トランスフェクタントの細胞膜上に発現されたマウス MHC クラス II 遺伝子 ($A^k A^{\beta}$) 産物を FITC 結合抗マウス MHC クラス II 抗体で染色し flow cytometry で解析した。

されないが、複合体のサイズなどの至適条件が狭く、また一過性の発現の場合が多い。リン酸カルシウム法 (Chen-Okayama 法) は接着性細胞では 10% 以上の高効率を得られるように開発されている。

2) エレクトロポレーション法 (電気穿孔法) パルス発生装置によるパルス電圧で細胞膜に修復可能な程度に穴をあけ、遺伝子を導入する方法がエレクトロポレーション法である。本方法は装置が高価なことで、細胞の種類によってパルス電圧、電気容量などが異なったり、全く相性が合わない場合があるが、比較的安定して安易に行える方法である。

3) ウイルスをベクターに用いる方法

導入したい遺伝子をまず各種のウイルスの染色体に挿入し、組み換え体ウイルスを作成し、細胞に感染させて目的の遺伝子を導入する方法である。レトロウイルスを

ベクターに用いた方法が比較的良好に開発が進められている。

4) 融合法

大腸菌のプロトプラストや、遺伝子をリボソームや赤血球に入れ、目的の細胞とポリエチレングリコールや電気融合法 (エレクトロフュージョン) によって細胞膜を融合して遺伝子を導入する方法。

導入遺伝子の発現レベルを決定する要因としては、プロモーターの強さ、導入遺伝子のコピー数、mRNA の安定性、translation 効率、などが考えられる。

遺伝子導入のチェックは genomic Southern 法によって、また遺伝子発現のチェックは発現分子の種類によって異なるが、PKC のような細胞質内蛋白の場合は生化学的方法 (SDS-PAGE 法, Northern blott 法, Western blott 法などを含め) によって、また MHC 分子のよう

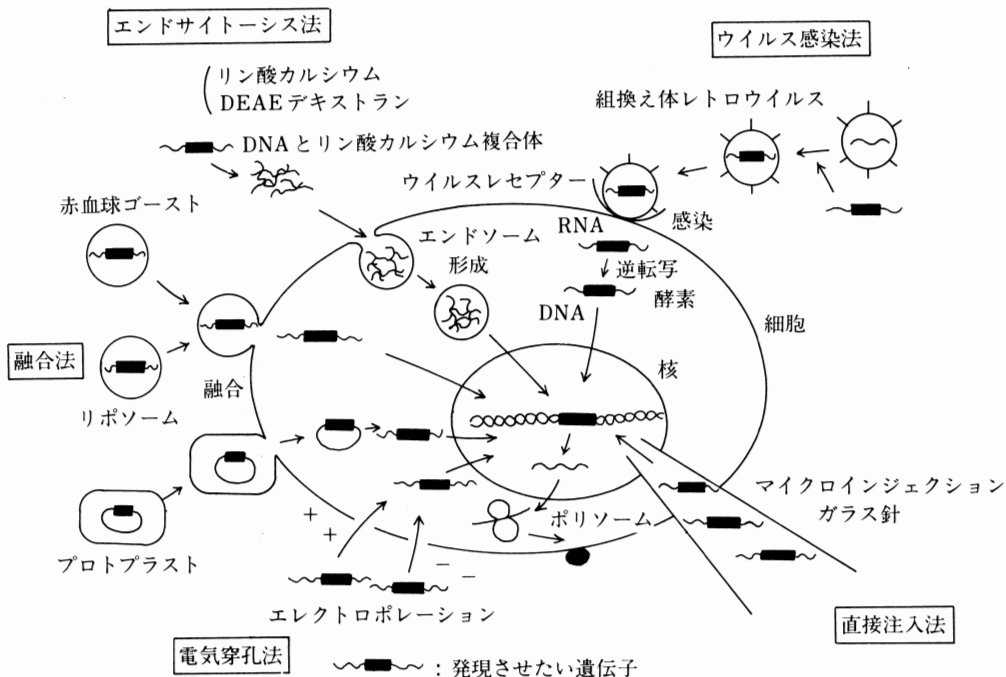


図3 遺伝子導入法の模式図

な細胞膜上発現分子の場合には生化学的方法の他に蛍光色素結合抗体を用いたフローサイトメトリーによって測定する。

これらの方法はそれぞれ利点、不利な点があり、また細胞側の性格から相性もあることから、実験目的に合わせて個々のケースで実験方法を選ぶ必要がある。

文 献

1) Watanabe, M., Shinohara, N., Ochi, A. and Hozumi, N. (1986) : Functional reconstitution of class II major histocompatibility complex molecules, I-A^K and I-A^B. Immunol. Letters, 13, 237-244.

2) Akita, Y., Ohno, S., Konno Y., Yano, A. and Suzuki, K. (1990) : Expression and properties of two distinct classes of the phorbol ester receptor family, four conventional protein kinase C types, and a novel protein kinase C. J. Biol. Chem. 265, 354-362.

3) Ohno, S., Konno, Y., Akita, Y., Yano, A. and Suzuki, K. (1990) : A point mutation at the putative ATP-binding site of protein kinase Ca abolishes the kinase activity and renders it down-regulation-insensitive. J. Biol. Chem. 265, 6296-6300.