

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

II型コラーゲン特異的細胞障害性T細胞樹立の試み

分担研究者 岡崎貴裕（聖マリアンナ医科大学
リウマチ膠原病アレルギー内科講師）

研究要旨：再発性多発軟骨炎（relapsing polychondritis、以下 RP）は、原因不明で稀な難治性疾患であり、重症例では時に致命的となる。現在までの報告では標的臓器である軟骨に存在するII型 collagen に対する抗体の存在報告はあるが、細胞障害性 T 細胞(CTL)の関与を示す報告はない。前年度、COL2A12 が有力な HLA-A2 拘束性の CTL 抗原になりうる可能性を報告したが、今回は、生体内でこの抗原特異的 CTL が誘導されうる可能性があるかどうかの検証をおこなった。ヒト Type II collagen 蛋白を HLA-A2 transgenic mice に免疫し、免疫後の脾細胞に COL2A12 (LLTLLVAAV)ペプチドに対する抗原特異的 CTL 反応がみられるかどうかを ELISPOT で検定したところ。抗原特異的反応と考えられる IFN- γ 産生 SPOT を検出することができた。このことより、生体内でも、Type II collagen 蛋白の抗原エピトープ特異的 CTL が誘導される可能性があることが示唆された。

A. 研究目的

再発性多発軟骨炎（relapsing polychondritis、以下 RP）は、原因不明で稀な難治性疾患であり、重症例では時に致命的となる。その病態像として、時に抗 Type II collagen 抗体の存在も指摘されているが、Kraus らの報告(Arthritis & Rheumatism, 48: 2942, 2003)では、治療経過に平行して、Th 1 サイトカイン (IFN- γ 、IL-12, IL-2)が血清レベルで変化しているとした報告を考慮すると、Th2 を主体とした抗体介在性の病態機序よりも、T 細胞を中心とした病態生理を検索す

る必要があると考えられる。前年度、2 つの HLA-A2 拘束性抗原エピトープの候補である COL2A12 (LLTLLVAAV) および COL2A1411 (LLIQGSNDV)を解析し、特に COL2A12 が強い抗原性をもちうる可能性を呈示した。この結果に基づき、今回、我々は、Type II collagen 蛋白を免疫しても抗原性のあるエピトープとなりうるのかを検証した。

B. 研究方法

ヒト Type II collagen 100 μ g と不完全フロインドアジュバントの emulsion を HLA-A2 transgenic mice (HHD mice)の皮

下に免疫した。14 日後に再度、同条件の抗原を追加免疫した。28 日後に免疫マウスより、脾細胞を抽出し、single cell suspension としたあと、mouse IFN- γ ELISPOT 用 96well-culture plate に 1×10^6 個/well の割合で 20 時間培養し COL2A12 に対する IFN- γ 産生 SPOT の出現の有無を検定した。

C. 研究結果

Fig. 1 に IFN- γ ELISPOT assay の結果を示す。ヒト Type II collagen の Whole protein を免疫した場合、 $10\mu\text{M}$ の COL2A12 を抗原として加え、20 時間の培養を経ると、抗原を入れてない Well と比較して明らかな IFN- γ 産生 SPOT の増加が認められた。

D. 考察

RP は、原因不明で稀な難治性疾患である。組織学的には診断に特徴的な所見はみられないものの、軟骨周囲には多くのリンパ球浸潤が認められる。我々は、その中で軟骨組織中の Type II collagen が CTL 抗原になりうるかに焦点をあて、今回、Type II collagen の Whole protein が生体内で、分解されても COL2A12 が CTL 抗原として成立しうるかどうかを HLA-A2 トランスジェニックマウスに対する Whole protein の免疫後の脾細胞を用いた IFN- γ

ELISPOT assay にて解析した。結果は、生体内でもこの COL2A12 が CTL 抗原として十分機能する可能性を示唆する結果が得られた。COL2A12 は元来ヒトの Type II collagen 蛋白より bioinformatics による予測計算でえられたペプチドのため、ヒトにおいても生体内で CTL 抗原となる可能性がある。しかしながら、抗原呈示には、細胞内の様々な Protease や TAP (Transporter of antigen processing) などの因子の問題から、今後ヒトにおいても抗原として存在しうるかどうかのさらなる検証は必要と考えられた。

E. 結論

ヒト Type II collagen における COL2A12 の部分は、生体内においても CTL 抗原として機能する可能性がある結果を得た。今後、このペプチドに対する純粋な CTL 株の樹立が期待される。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Fig. 1

ヒトType II collagen蛋白の免疫で誘導されるCOL2A12
特異的IFN- γ 産生細胞

