

両生類発生過程におけるアポトーシスに關与する免疫システムの解析

Possible involvement of adult immune cells in larval cell apoptosis during anuran metamorphosis

研究代表者 北海道大学免疫科学研究所 助手 井筒 ゆみ
Instructor, Institute of Immunological Science, Hokkaido University
Yumi IZUTSU

The larval cells of the tadpole are completely eliminated by apoptosis during anuran metamorphosis. We have found a possible involvement of adult immune system in this apoptotic process. It was suggested by the previous reports showing that larval skin grafts were rejected by inbred strain of adult *Xenopus* and the larval cells were recognized by adult and/or metamorphosing T cells *in vitro* (Izutsu and Yoshizato, *J. Exp. Zool.*, **266**, 163-167, 1993; Izutsu *et al.*, *Differentiation*, **60**, 277-286, 1996). In the present study, it was first demonstrated that there were the larval specific antigens recognized by adult T lymphocytes via two pathway. We produced anti-larval antibodies by immunizing the adult frogs with syngeneic larval skin grafts. The antigen molecules reacted with this antiserum were localized on only the surface of larval epidermal cells and were 53 and 59 kDa of acidic proteins. At the climax stage of metamorphosis, the larval antigens were detected only in the tail epidermis of tadpoles but not in the trunk skin. We determined some of the partial amino acid sequences of the molecule in question. It was shown that the artificially produced oligopeptides having one of the sequences obtained as above induced the augmented proliferative response of adult T cells *in vitro*.

1. 研究目的

脊椎動物の形態形成過程には、一度つくった体の一部を壊わして体のリモデリングをする、というプログラムがある。その最も顕著な例は、両生類の幼生から成体への発生過程に見ることが出来る。この過程を、変態と呼ぶが、変態期における皮膚は部域特異的リモデリングをする。これまでの、我々の報告によると、胴体部分の皮膚は成体型へと変換し、変態後も生き続けるが、尾部は変態末期においても幼生型のままであり、アポトーシスに陥り消失してしまう事が明らかとなっている (Izutsu *et al.*, 1993)。

上記の研究から、我々は、幼生の皮膚と成体の皮膚では、免疫学的な性質も異なるのではないかと考えた。そこで、近交系のアフリカツメガエル J 系統を用い、幼生皮膚を成体に移植したところ、成体は幼生皮膚移植片を拒絶する事を発見した (Izutsu & Yoshizato,

1993)。さらに、成体リンパ球は幼生表皮細胞を認識し *in vitro* でアポトーシスに追いやることを報告した (Izutsu *et al.*, 1996)。この結果から、変態期に幼生型のままである尾部は、新たに出現する成体型免疫細胞に、非自己として認識され除去されてしまうという、従来の変態現象の説明には無い新しい仮説を呈示した。

本研究は、変態現象に免疫機構が関与しているという作業仮説を基に、成体リンパ球が非自己として認識する幼生特異的抗原分子を同定し、成体免疫細胞による認識と崩壊のメカニズムを、分子レベルにおいて解明することを目的とする。

2. 研究経過

2. 1. 方法

免疫組織染色による MHC 分子の検出

近交系のアフリカツメガエル *Xenopus laevis* J strain の各発生ステージの尾部と胴体

部を含む凍結切片を作製し、anti-*Xenopus* MHC class I 及び class II モノクローナル抗体で反応させ、Cy3-conjugated anti-mouse Ig モノクローナル抗体で検出した。

幼生表皮細胞に対する成体 T 細胞の増殖反応

MHC negative 幼生表皮細胞は、まず、J strain 幼生 (stage 55/56) の皮膚を剥離し、dispase で消化後、Percoll と bovine albumin-gradient で MHC negative 幼生表皮細胞を分離回収し、 1.2×10^5 cells を 96well U-bottom culture dish で培養した。MHC positive 幼生細胞を含む stimulator としては、J strain 幼生 (stage 55/56) の $1 \times 2 \text{ mm}^2$ 尾部皮膚組織片を用いた。異種 stimulator として、F1(J strain x *Xenopus borealis* B strain) の同サイズの成体背部組織片、同種 stimulator として、同サイズの J strain 成体背部組織片、それぞれ上記 culture dish にて培養した。responder として、 5×10^5 cells の J strain 成体脾臓細胞を各 stimulator と 4 日間混合培養し、24hr BrdU を取り込ませ、分裂している細胞を検出後、その割合を、stimulator 無しを 1 として index で示した。阻害実験には、anti-*Xenopus* MHC class I 及び class II モノクローナル抗体 (20 $\mu\text{g/ml}$) となるよう medium に加えた。

幼生皮膚移植による成体の免疫と抗血清の作製

2-3 years-old の成体を幼生 (stage 55/56) の 5 匹分の皮膚移植を一ヶ月ごとに 3 回行い、免疫した個体の心臓から全採血し、抗血清を得た。定法により、幼生及び成体皮膚組織の免疫染色と、幼生、成体皮膚 lysate のウエスタンブロット、及び、二次元電気泳動、二次元ウエスタンブロットを行った。

幼生抗原分子のアミノ酸シーケンス

二次元ウエスタンブロットの結果から同定した、幼生皮膚 lysate 特異的に検出されたスポットを、二次元電気泳動を銀染色した gel から切り出した。トリプシンで消化後、Q-TOF mass spectrometer でアミノ酸シーケ

ンスを行った。

ペプチドに対する成体 T 細胞の増殖反応

得られたアミノ酸シーケンスを含んだペプチドを合成し、成体脾臓細胞と共に 4 日間培養し、先に述べた方法で増殖反応を調べた。成体脾臓細胞は、幼生皮膚移植によってあらかじめ免疫した J strain 成体の脾臓から得た。

2. 2. 結果及び考察

T リンパ球は、*in vitro* で MHC class II 上に提示されたアロ抗原を認識し、増殖反応を示す事が知られている。これまで、幼生細胞には MHC が発現していないと報告されてきたが、本研究によって、幼生表皮細胞には、上層細胞とスケイン細胞の 2 種類があり、そのうち上層細胞は MHC を発現しているが、スケイン細胞は発現していない事が明らかとなった。これら 2 種類の幼生細胞それぞれに対する成体 T 細胞の増殖反応を調べた結果、成体脾臓細胞に、脾臓に含まれている成体抗原提示細胞 (APC; マクロファージ、B 細胞) が含まれている場合、両方の幼生細胞に対して、成体 T 細胞は増殖反応を示した (Fig 1A)。驚くべき事に、これら幼生細胞に対する増殖反応は、semigenogenic な組み合わせ JB 成体皮膚に対する反応とほぼ同程度であった。従って、これまで幼生と成体の違いは minor 抗原の違いではないかと示唆してきたが (Izutsu *et al.*, 1993)、それより大きい差異の存在が考えられた。一方、APC を取り除き、成体 T 細胞だけにしてやると、MHC を発現していない幼生細胞に対して、全く反応を示さなくなった (Fig 1B)。また、これら増殖反応は anti-MHC class II 抗体で完全に阻害される事から、MHC class II 拘束性であることが示唆された。従って、次のような認識経路が考えられた。MHC を発現している幼生細胞に対しては、成体 T 細胞は直接認識するが、MHC を発現していない細胞に対しては、いったん成体 APC 上に呈示された幼生特異的抗原 (赤丸) を認識するという、2 経路が明らかとなった (Fig 2) (投稿中)。

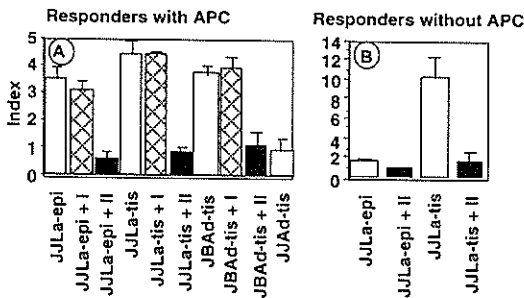


Figure 1. Stimulator-dependent proliferative responses by adult splenocytes. (A) Adult splenic leukocytes including APC. J strain adult splenocytes were co-cultured with syngeneic larval epidermal cells (JLa-epi) which are MHC class II negative, with larval tail tissues (JLa-tis) including MHC class II positive cells, with xenogeneic combination JB adult skin tissues (JBAd-tis), or with adult skin of J strain (JAd-tis). Inhibition of the responses was examined after adding anti-*Xenopus* MHC class II monoclonal antibody at 20µg/ml (■). Cultures added with anti-*Xenopus* MHC class I monoclonal antibody at 20µg/ml (☒), and without antibody (□). (B) proliferative responses of adult splenocytes removed their antigen presenting cells (APC; macrophages and B cells).

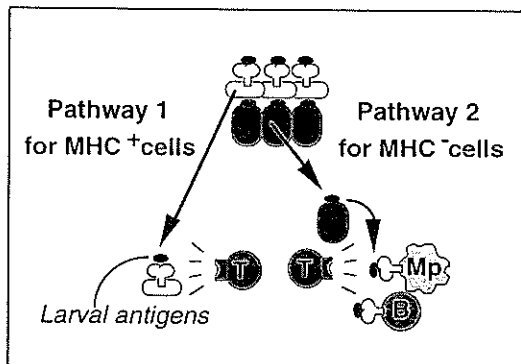


Figure 2. A schematic model depicting two pathways of the recognition by adult splenic T cells of larval antigens derived from the epidermal cells. Adult T cells recognize the larval specific antigens (red ball) on the MHC class II molecules (mushroom-like) of MHC positive larval apical cells or adult splenic APC. T, Mp, B, representing the responding T cells, the antigen-presenting macrophages, and the B cells, respectively.

上記の研究結果から示唆された、成体 T

リンパ球から、非自己として認識される幼生抗原分子はまだ同定されていない。そこで、成体は同系統の幼生皮膚移植片を拒絶するという研究結果から、抗幼生抗体を作ることが出来るのではないかと考え、同系統の幼生の皮膚を複数回移植する事によって成体を免疫した。その結果、幼生表皮細胞を特異的に認識する抗血清を得ることが出来た。得られた抗血清を用い、免疫組織染色、及び western blotting によって幼生抗原分子の発現パターンを調べると、発生初期には全身の幼生皮膚で見られるが、尾部が退縮する変態末期になると、胴体部分では発現は無くなるが、尾部皮膚のみで発現し続ける事が明らかとなった (Fig 3)。

その抗体を用いて、幼生抗原分子を精製し、アミノ酸部分シーケンスを行ったところ、既知分子とは異なる新分子であった。得られたアミノ酸シーケンスを含む合成ペプチドに対する成体 T 細胞の増殖反応を調べると、幼生皮膚で免疫した成体 T 細胞は、濃度依存的にペプチドに対して反応を示すことが明らかとなった。一方、免疫していない成体 T 細胞は、反応を示さなかった。このことは、幼生抗原分子由来のタンパクから得られたシーケンス中には、成体 T 細胞の認識部位が含まれている事が示されている (Fig 4)。

まとめ

本研究では、これまで報告が無かった幼生特異的抗原分子を初めて報告し、成体免疫細胞より、2 経路によって認識される事を明らかとした。幼生抗原分子に対する抗体を作り、発生過程における発現パターンを解析し、さらにそれを用いてアミノ酸部分シーケンスに成功した。以上の結果から、両生類の幼生から成体への変態過程で、尾部に残存する幼生抗原を発現する細胞の認識と崩壊に、成体型免疫細胞が関与している、という新しい考えを呈示した。

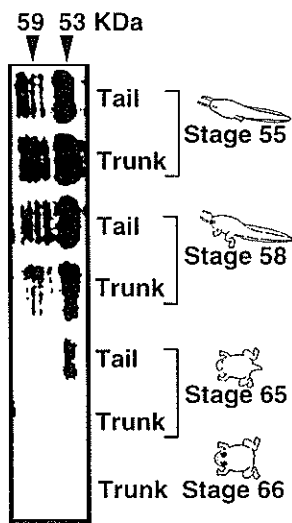


Figure 3. Western blot analysis of larval lysates. Developmental expression of the larval specific bands.

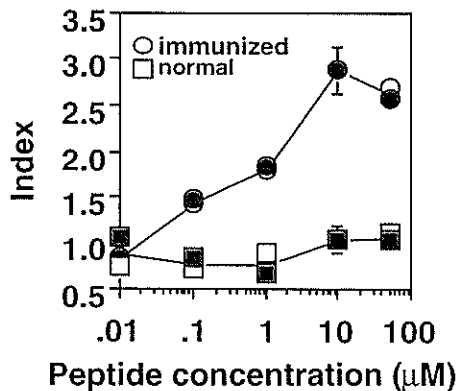


Figure 4. Dose dependent Proliferative responses to the synthetic peptide by adult splenic T cells. Adult splenocytes including the antigen presenting cells were obtained from 1-2 years-old frogs previously immunized by skin transplantation of larval tail (○) or not (□).

3. 研究成果

成体 T 細胞から認識される幼生抗原分子を初めて報告し、そのアミノ酸部分シーケンスに成功した。これによって幼生抗原分子は新規分子である事を示唆した。

4. 今後の課題と発展

本研究で同定された幼生特異的抗原分子は、新しい分子であることが、データベース検索によって示唆された。今後は、得られたシーケンス部位を基に、cDNA ライブラリーよりスクリーニングし、全 DNA 配列を決定する。それらを用いて、幼生抗原分子の発現の分子調節機構、及び免疫細胞による認識メカニズムを、分子レベルで解析する。アフリカツメガエルの成体型免疫システムは、あらゆる面において哺乳類に匹敵することが、既に様々な基礎研究より確認されている。従って、本研究で見いだされた、成体型リンパ球によって非自己として認識される幼生特異的抗原分子は、哺乳類も含め、アポトーシスをおこす脊椎動物細胞全般の有用なマーカーの1つとなることが期待できる。この実験モデル系を用いて、アポトーシスの分子メカニズムを解析する。さらに、従来体を守るためにあると考えられてきた免疫系の、“体を作る”という新しい機能の理解に寄与したい。

5. 発表論文リスト

1. Differential Distribution of Epidermal Basal Cells in the Anuran Larval Skin Correlates with the Skin's Region-Specific Fate at Metamorphosis. Izutsu, Y., Kaiho, M., & Yoshizato, K. *J. Exp. Zool.*, 1993, 267, 605-615.
2. Metamorphosis-Dependent Recognition of Larval Skin as Non-Self by Inbred Adult Frog (*Xenopus laevis*). Izutsu, Y., & Yoshizato, K. *J. Exp. Zool.*, 1993, 266, 163-167.
3. Adult-Type Splenocytes of *Xenopus* induce Apoptosis of Histocompatible Larval Tail Cells *In Vitro*. Izutsu, Y., Yoshizato, K., & Tochinai, S. *Differentiation*, 1996, 60, 277-286.
4. Larval Antigen Molecules Recognized by Adult Immune Cells of Inbred *Xenopus laevis* I. Two Pathways for Recognition by Adult Splenic T Cells Izutsu, Y., Tochinai, S., Iwabuchi, K., & Onoé, K. (投稿中)
5. Larval Antigen Molecules Recognized by Adult Immune Cells of Inbred *Xenopus laevis* II. Partial Characterization and Implication in Metamorphosis Izutsu, Y., Tochinai, S., Kristensen, D. B., Kuwamoto, H., Yoshizato, K., & Onoé, K. (投稿中)