

抗原提示細胞に対する自己反応性CD8陽性T細胞の解析

吉住, 秀之
九州大学生体防御医学研究所遺伝学部門

<https://doi.org/10.15017/7329366>

出版情報：福岡醫學雑誌. 84 (1), pp.15-24, 1993-01-25. Fukuoka Medical Association
バージョン：
権利関係：



抗原提示細胞に対する自己反応性 CD8 陽性 T 細胞の解析

九州大学生体防御医学研究所遺伝学部門 (指導: 笹月健彦)

吉 住 秀 之

Analysis of Autoreactive CD8⁺ T Cells against Antigen Presenting Cells

Hideyuki YOSHIZUMI

*Department of Genetics (Director: Prof. T. Sasazuki), Medical Institute of Bioregulation
Kyushu University 69, Fukuoka 812*

We reported the existence of high and low responders to streptococcal cell wall antigen (SCW) in human population. To analyze the mechanism of low responsiveness to SCW at the cellular level, we previously established SCW specific CD4⁺ T cell lines. During the course of generation of a SCW specific CD4⁺ T cell line restricted by HLA-DQ from a low responder, we obtained autoreactive CD8⁺ CTLs. Once the CTL was established as a line (HYCD8), they proliferated in the presence of autologous monocytes and IL-2 without SCW. HYCD8 lysed autologous monocytes and EBV transformed B lymphoblastoid cell line (BLCL). This cytotoxic activity was specifically inhibited by an anti-HLA class I framework mAb and restricted by HLA-B specificity, as judged by killing activity against panel cells and HLA class I-transfected BLCLs. Although HYCD8 contained perforin in the cytoplasm, this HLA-class I restricted cytotoxicity was observed only in the presence of the supernatant of cultured PBLs which could not be replaced by known cytokines and their mixtures. The biological activity of the soluble factor for cytotoxic activity (SFCA) was purified in a single peak fraction by HPLC. Thus, HYCD8 down-regulated the proliferation of SCW specific CD4⁺ T cells through killing autologous APCs in SFCA dependent manner suggesting a unique immunoregulatory role of autoreactive CD8⁺ CTLs in immune responses.

はじめに

著者らは、溶連菌細胞壁抗原 (SCW) や、日本住血吸虫抗原、らい菌抗原、スギ花粉抗原などの自然感作抗原、破傷風トキソイドや B 型肝炎表面抗原などの計画免疫において、免疫された集団中にその抗原に対する低応答者群が存在することを報告してきた¹⁷⁾²³⁾²⁷⁾²⁸⁾³⁰⁾³⁷⁾、SCW においては、この低応答性が HLA に連鎖した優性形質として遺伝することを家族解析²⁷⁾ および集団解析により報告した¹¹⁾。さらに SCW に対する低応答者のリンパ球増殖反応による免疫応答が、CD8 陽性分画のリンパ球を除去することで回復すること²¹⁾、HLA-DQ 対立遺伝子産物が低応答者における CD4 陽性 T 細胞の SCW 特異的増殖に関係しているが、高応答者ではその関与がみとめられないこと¹¹⁾、また HLA-DQ に対する単クローン抗体を増殖系に加えることにより低応答者の免疫応答が回復

すること²⁹⁾ から、HLA-DQ 分子が CD8 陽性 T 細胞による免疫低応答性に関与している可能性が示唆された。SCW に対する低応答者一名 (HY) から樹立した HLA-DR4 および HLA-DQ6 分子のそれぞれを認識する抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞株において、後者の CD4 陽性 T 細胞のみが自己反応性 CD8 陽性 T 細胞の増殖を促進することが観察され、その細胞が抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞の増殖抑制活性を有することを報告した¹⁰⁾。本論文では、分離され自己反応性 CD8 陽性 T 細胞の免疫抑制の機序について解析した。

材料および方法

1. 単クローン抗体

抗 CD3 (抗 Leu4)、抗 CD8 (抗 Leu2a)、抗 T 細胞レセプター (TCR) β (TCR1)、抗 CD11b (OKM1)、抗 CD16 (抗 Leu11b) 抗 CD25 (IL-2 レセプター α 鎖) は Becton Dickinson 社より購入した、ヒト TCRV α 2

(clone F1), TCRV β 5.1+5.2(clone W112), TCRV β 5.2+5.3(clone 1C1)に対する抗体は, T Cell Science 社より購入した, 抗 HLA クラス I 抗体(W6/32)は, American Type Culture Collection より購入した. HLA-B 分子に対する単クローン抗体 G4 は, UCLA の Billing 博士より提供された. HLA-B51 および B52 に対する単クローン抗体 4D12 は Joslin 糖尿病センターの G. S. Eisenbirt 博士より提供された. HU-4 (抗 HLA-DR 抗体), HU-11 (抗 LA-DQ1+6 抗体)は, 北海道大学協坂明助教授より提供された. 抗 β 2 マイクログロブリン抗体 (clone B1G6) は, コスモバイオ社より購入した. 抗 LFA-1 β (TS1/22) 抗体および抗 LFA-3 抗体 (TS2/9) は Dana-Farber 癌研究所の S. J. Burakoff 教授より提供された. OKT3 (抗 CD3 抗体)および IKT4.3 (抗 CD4 抗体), B7/21 (抗 HLA-DP 抗体)を産生するハイブリドーマは, American Type Culture Collection より購入した. 1P4 (抗 CD8 抗体)を産生するハイブリドーマは, Dana-Farber 癌研究所の S. J. Burakoff 教授より提供された.

2. サイトカイン

ヒト合成 IL-1 β は Collaborative Research Incorporated 社より購入した. ヒト合成 IL-2 は味の素中央研究所の三輪清志博士より提供された. ヒト合成 IL-4 は小野薬品工業より提供された. ヒト合成 IL-6 は大阪大学バイオメディカル教育センターの平野俊夫教授より提供された. IFN- γ は東レより提供された. TNF- α は Genzyme 社より購入した. TGF- β は宝酒造より購入した.

3. 細胞株

本論文で使用した EB ウイルス形質転換 B リンパ芽球様細胞 (BLCL) は以下の通りである; EB-HY は HYCD8 のドナーと同一者より樹立した. Hmy2CIR はその表面上に HLA クラス I 分子をほとんど発現していない変異株であり, その細胞に HLA-A24, B52, cd-2 遺伝子をそれぞれ導入し, 各遺伝子産物を発現させた形質転換細胞株は東京大学医科学研究所の滝口雅文博士より提供された.⁸⁾³²⁾ 赤白血病細胞株 K562 は American Type Culture Collection より購入した.

4. 自己反応性 CD8 陽性 T 細胞株 (HYCD8) の増殖条件の検討と同細胞株の樹立

SCW に反応して増殖する T 細胞集団から, CD8 陽性分画を単離するため, 増殖した T 細胞を抗 CD4 単クローン抗体 (OKT 4.3) と抗マウス IgG 添加磁気ビーズ (Dynabeads) で処理した⁷⁾. 得られた CD8 陽性

T 細胞 2×10^5 個を放射線照射 (30 Gy) した自己またはアロの単核球 1×10^5 個と IL-2 100 u/ml, SCW 1 μ g/ml の存在または非存在下で 48 穴プレートにまき, 20% ヒト血清加 RPMI-1640 培養液で 5% CO₂, 37°C で飽和水蒸気圧の条件で培養した. 7 日目に生細胞を計数し, その増殖を比較した. また分離した HYCD8 は, 放射線照射した自己の単核球と IL-2 の存在下で 20% ヒト血清培養液で培養し以後の実験に用いた. さらに HYCD8 を抗ヒト TCRV α 2 単クローン抗体を用い, さらに TCRV α 2 陽性分画と陰性分画に分離した. 得られたそれぞれの分画の純度は 95% 以上であった.

5. 細胞障害性試験

標的細胞としての単核球は, 細胞障害試験の 6 日前に末梢血リンパ球を 96 穴 U 底マイクロプレートに 1×10^5 個ずつまき, 10% ヒト血清加 RPMI-1640 培養液で培養後付着する約 10 分の 1×10^4 個を用いた²²⁾. 付着した単核球に各ウェルあた 2μ Ci の ⁵¹Cr を加え 18 時間培養し標識したのち 3 回洗浄し, 培養液またはリンパ球培養上清 100 μ l を加えた. T 細胞株は 200 μ Ci の ⁵¹Cr を加えた IL-2 加培養液で 2 時間培養し標識した. BLCL および K562 は 100 μ Ci の ⁵¹Cr を加えた培養液で 2 時間培養し標識した. 標的細胞は培養液またはリンパ球培養上清に浮遊させ各ウェルに 100 μ l ずつ加えた. 細胞障害性 T 細胞は障害細胞/標的細胞比 (E/T 比) に応じた細胞の浮遊液を調製し, 各ウェルに 50 μ l ずつ加え, 37°C で 6 時間培養した. 抗体を用いた細胞障害阻止試験では抗体を予め標的細胞と 2 時間培養後細胞障害性 T 細胞を加えた. 6 時間培養後各ウェルより 100 μ l の培養液を回収し, 標的細胞から放出された ⁵¹Cr をガンマカウンターで計測した. 測定はすべてトリPLICATEで行い, その中央値をとった. 細胞障害指数は次式で算出した; (実験解離 (cpm) - 自然解離 (cpm)) / (最大解離 (cpm) - 自然解離 (cpm)) $\times$ 100 (%) 最大解離の測定には 10% triton X-100 を用いた. 自然解離は最大解離の 20% 以下であった. 標的細胞とリンパ球培養上清または抗体との培養は自然解離に影響しなかった.

6. リンパ球培養上清の調整および精製

自己またはアロの抹消血リンパ球 (10×10^6 /ml) を RPMI-1640 培養液中で 37°C 5% CO₂ 飽和水蒸気圧の条件で 18 時間培養後, 浮遊液を 2000 g で遠心し 0.22 μ m のフィルターを通し培養上清を得た. リンパ球培養上清中の活性成分を精製するために, 上清 50 ml につき活性炭 (和光純薬) 1 g を加え上清中の成分を吸着

した。吸着した成分をアセトニトリルで溶出した後凍結乾燥し、得られた粉末を蒸留水に再溶解し、C18 逆相カラム (3.9×150 mm; $5 \mu\text{m}$, μ Bondasphere, Waters) を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて展開した。展開の条件は移動相に 0.1% トリフルオロ酢酸加アセトニトリルの直線勾配をかけ (0~60%, 2%/分), 流速 1 ml/分で行った。経時的に分画した溶出液は、凍結乾燥後 PBS に再溶解し、細胞障害活性試験に用い、活性分画を同定した。

上清より抽出した成分の塩酸加水分解は、Pico Tag work station (Waters) を用い、6 規定の塩酸で 110°C 6 時間おこなった。

7. フローサイトメトリー

単クローン抗体を用いて 5% FCS, 0.1% アジ化ナトリウム加 PBS に浮遊させた T 細胞株を直接または間接蛍光抗体法により染色し、FACS can (Becton Dickinson) を用いたフローサイトメトリーにより解析した²⁰⁾。二次抗体には FITC をラベルしたヤギ抗マウス (IgG+IgM) ポリクローン抗体の F (ab')₂ 部分を用いた。

8. HLA タイピング

HLA クラス I およびクラス II 抗原は微小細胞障害試験によりタイプした²⁸⁾。HLA-D タイピングは HLA ホモ接合体タイピング細胞を用いて MLR によりなされた¹⁸⁾。HLA 対立遺伝子の名称は、HLA の WHO 命名委員会の名称にしたがった³³⁾。

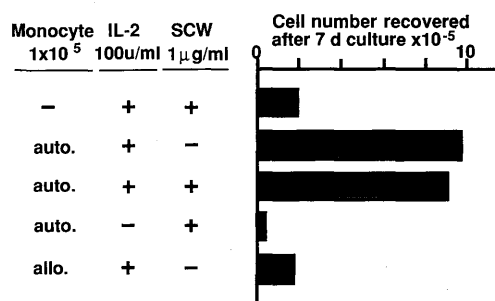


図 1 HYCD8 の増殖条件の検討

HYCD8 (2×10^5 個) を放射線照射 (30 Gy) した自己 (HLA-A24/-, B52/54, C-/-) または HLA クラス I を共有しないアロ (HLA-A2/26, B61/-, Cw7/-) の末梢血単核球, ヒト IL-2 (100 u/ml), SCW (1 $\mu\text{g/ml}$) の存在または非存在下に 7 日間培養し、生細胞を計数した。

実験結果

1. 自己反応性 CD8 陽性 T 細胞 (HYCD8) の増殖

HYCD8 を放射線照射 (30 Gy) した自己または HLA クラス I 分子を共有しないアロの単核球とともに IL-2 および SCW の存在下または非存在下で 7 日間培養しその増殖を検討した結果、HYCD8 は増殖に自己の単核球と IL-2 を必要としたが、抗原としての SCW は必要としなかった。HLA クラス I を共有しないアロの単核球では HYCD8 の増殖は認められなかった (図 1)。

2. HYCD8 の表面マーカー

図 2 にまとめたように、HYCD8 は $\alpha\beta$ 型の TCR を発現していた。ヒト TCRV α および β ファミリーに対する単クローン抗体による染色では、TCRV β についてはすべて TCRV β 5.2 陽性で、TCRV α については TCRV α 2 陽性分画と陰性分画が存在した。ナチュラルキラー細胞の表面マーカーである CD11b および CD16 はいずれも陰性であったが、CD56 は発現の高い集団と低い集団の二つが認められた。HLA クラス II 分子 (DR, DQ) および IL-2 レセプター α 鎖はすべて

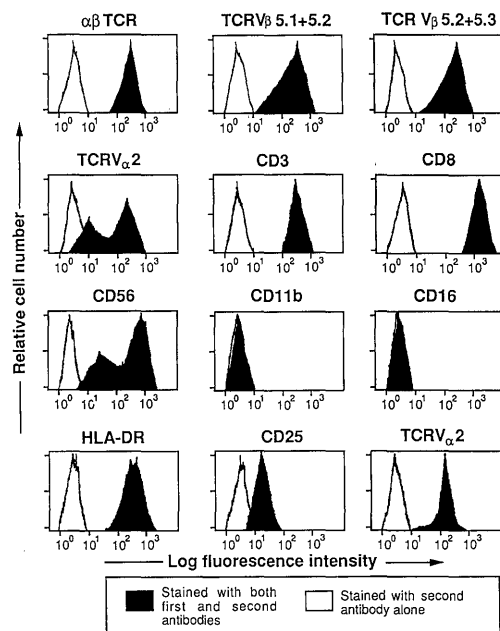


図 2 HYCD8 の細胞表面マーカー

HYCD8 を単クローン抗体を用いて直接または間接蛍光抗体法により染色し、フローサイトメトリーを用いて解析した。白ヌキのものは二次抗体のみを加えたものを示す。

陽性であった。V α 陽性分画は分離後一峰性の分布を示した(右最下段)。

3. HYCD8の細胞障害活性

ヒトのパーフォリンと交差反応性を有するマウス抗パーフォリン抗体 P1-8¹⁸⁾により HYCD8細胞内のパーフォリンの存在が示されたこと(未発表データ), 抗CD3単クローン抗体の存在下で K562 に対する細胞障害活性が認められたこと(表1)から, HYCD8は細胞障害性T細胞と考えられた。しかし, 通常の方法による細胞障害活性試験では HYCD8は, 自己の単核球,

SCW 特異性 CD4陽性T細胞, 自己由来の BLCL に対してまったく細胞障害活性を示さなかった。

そこで IL-1 β と IL-2, IL-4, IL-6, 腫瘍壊死因子(TNF), TGF- β , IFN- γ を単独または組み合わせて細胞障害試験を行ったがいずれの場合も標的細胞に対する障害性は認められなかった(表2)。HYCD8が細胞障害性を発現する条件を探すためにリンパ球の培養上清を細胞障害活性試験に用いた。表1に示すように末梢血リンパ球の培養上清の存在下に HYCD8は, 自己の単核球および BLCL を障害した。しかし, 自己由

表1 Cytotoxic activity of HYCD8 in the presence or absence of SFCA

Target cells	SFCA	Percent specific lysis ^a E/T ratio					
		20/1	10/1	5/1	2.5/1	1.25/1	0.6/1
autologous monocyte	+	99.2	81.8	44.5	27.3	13.9	12.4
	—	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
EB-HY	+	N.E.	44.5	36.8	13.0	6.5	6.3
	—	0.1	0.3	1.0	1.0	0.0	0.0
autologous DQw6-restricted CD4 ⁺ T cell line	+	0.4	0.2	0.6	0.2	0.0	0.0
	—	0.7	0.0	0.0	N.E.	N.E.	N.E.
autologous DR4-restricted CD4 ⁺ T cell line	+	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	—	0.3	0.2	3.3	N.E.	N.E.	N.E.
K562	+	N.E.	1.7	7.6	4.4	4.1	1.8
K562+anti-CD3 mAb ^b	—	N.E.	51.0	50.9	35.6	16.5	16.7

a ⁵¹Cr-labeled target cells were incubated with HYCD8 for 6h in the presence or the absence of SFCA.

Values given represent the median of triplicate determinations.

b Anti-CD3 mAb (OKT3) was added at a final concentration of 1/200 dilution of ascites.

N. E.; not examined

表2 Cytotoxic activity of HYCD8 in the presence of cytokines or SFCA

cytokines	percent specific lysis	cytokines	percent specific lysis
IL-1 10 u/ml	0.3	IFN- γ 100 u/ml	0.0
IL-2 100 u/ml	1.6	TNF- α 10 u/ml	0.0
IL-4 10 u/ml	3.5	TGF- β 1 ng/ml	7.3
IL-6 10 u/ml	0.0	IFN- γ 100 u/ml + TNF- α u/ml	3.7
IL-1 100 u/ml + IL-2 100 u/ml	1.1	TGF- β 1 ng/ml + IFN- γ 100 u/ml	0.0
IL-2 100 u/ml + IL-4 10 u/ml	2.5	SFCA	81.8
IL-2 100 u/ml + IL-6 10 u/ml	2.3		

Cytotoxicity assay was performed in the presence of cytokines at the final concentrations indicated above. E/T ratio was 10/1. Percent specific lysis in the absence of HYCD8 and in the presence of SFCA was 0.6.

来の SCW 特異的 CD4 陽性 T 細胞に対してはリンパ球培養上清を加えてもまったく障害性を認めなかった。リンパ球培養上清自身は単独では標的細胞にまったく細胞障害活性を示さなかった。表には示していないが、自己またはアロの血清では同活性は認められなかった。HYCD8 の細胞障害活性を誘導するリンパ球培養上清中の成分を Soluble Factor for Cytotoxic Activity (SFCA) と名付けた。

4. 単クローン抗体による HYCD8 の細胞障害活性の阻止

HYCD8 の細胞障害活性に関わる分子を明らかにするために、単クローン抗体の存在下に細胞障害性試験を行った。HYCD8 抗体の細胞障害活性は抗 HLA クラス I 抗体 (W6/32)、抗 CD8 (1P4)、抗 LFA1 β 抗体 (TS1/22)、抗 LFA3 抗体 (TS2/9) の存在下で完全に抑制され、抗 β 2 マイクログロブリン抗体により部分的に抑制されたが、抗 HLA-DR (HU-4)、抗 HLA-DQ (HU-11)、抗 HLA-DP (B7/21) 抗体ではいずれもまったく抑制されなかった (図 3 A)。さらに標的細胞、HYCD8 をそれぞれ W6/32 と予め反応させ、洗浄後細胞障害性試験を行うと前者を W6/32 と反応させたときのみ細胞障害活性の抑制が観察された (図 3 B) ことから、HYCD8 は標的細胞上の HLA クラス I 分子を認識し細胞障害活性を発現すると考えられた。

5. HYCD8 が認識する分子の同定

HYCD8 が認識する HLA クラス I 分子を同定するために単核球と BLCL のパネルを用いて細胞障害性試験を行った。TCRV α 2 陽性と陰性の細胞集団が存在するため、抗 TCRV α 2 単クローン抗体を用いて両者を分離し、パネル細胞と反応させた。TCRV α 2 陽性 HYCD8 は、ドナー HY と HLA-B54 を共有する標的細胞を SFCA 存在下に障害した。この細胞障害活性は抗 HLA-B 抗体 G4 により完全に抑制された。TCRV α 2 陽性 HYCD8 は、ドナー HY と HLA-B52 または HLA-B54 分子を共有する標的細胞と HLA-B52 分子を発現させた Hmy2CIR 細胞を障害した。HLA-B52 分子を発現した標的細胞に対する細胞障害活性は、抗 HLA-B5 (B51+B52) 抗体 4D12 により抑制された (図 4)。以上から TCRV α 2 陽性 HYCD8 は、標的細胞上の HLA-B54 分子を認識し、TCRV α 2 陰性 HYCD8 には HLA-B54 分子と HLA-B52 分子を認識する細胞が混在していると考えられた。

6. SFCA の精製

リンパ球培養上清中の SFCA を精製するため、上清に活性炭を加え混合したあとその上清をのぞき、活性

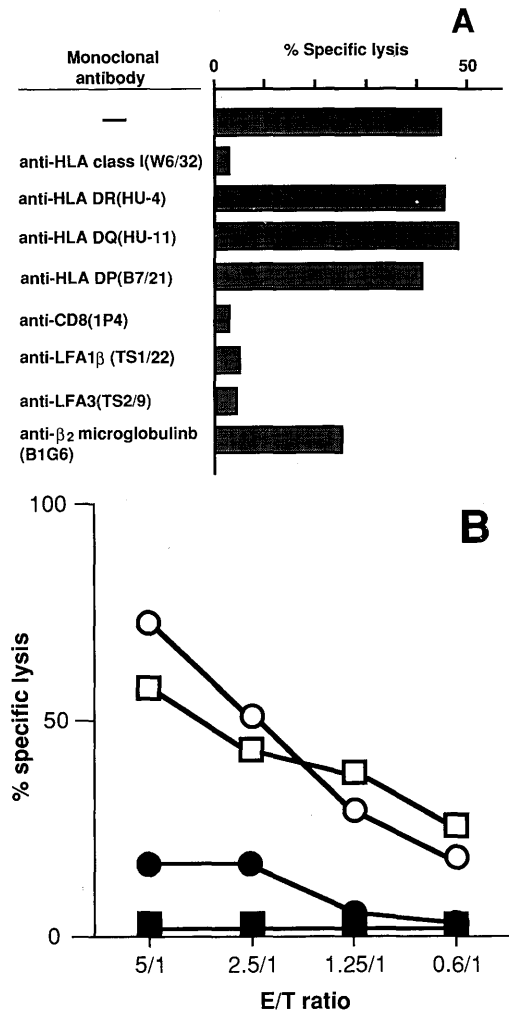


図 3 単クローン抗体による HYCD8 の細胞障害活性の抑制

A. 図に示した単クローン抗体を HYCD8 を加える 2 時間前に標的細胞とともに培養した後 HYCD8 を E/T 比 10 の割合で加え細胞障害性試験を行なった。単クローン抗体はそれぞれ最終濃度を腹水の 200 倍希釈で用いた。

B. 抗クラス I 抗体 (W6/32) を実験系に加えない場合 (□)、加えた場合 (■)、HYCD8 と実験前 2 時間反応させ洗浄した場合 (○)、標的細胞と 2 時間反応させ洗浄した場合 (●) の各条件で図に示す E/T 比において細胞障害性試験を行った。抗体濃度は前 2 者の場合は腹水の 200 倍希釈で、後 2 者の場合は腹水の 50 倍希釈で行った。トリプリケート間の標準誤差は 10% 以内であった。

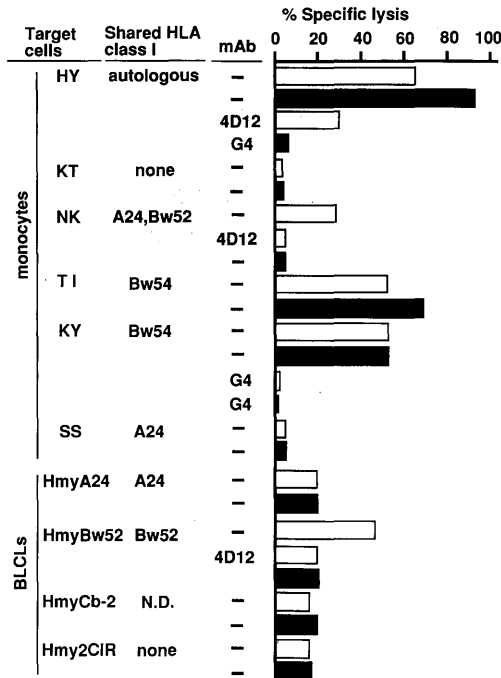


図4 HYCD8が認識するHLAクラスI分子の同定
TCRV α 2陰性HYCD8(白ヌキ)とTCRV α 2陽性HYCD8(黒塗り)のそれぞれについてクラスI分子の異なる標的細胞に対して細胞障害性試験を行った。用いたパネル細胞のHLAは以下の通り; HY A24, -, B52, 54, C-, -, KT A2, 26, -, B61, -, Cw7, -, NK A24, -, B7, 52, Cw7, -, TI A2, 26, B54, 35, Cw1, 9, KY A2, 11, B54, -, Cw1, -, SS A24, 11, B62, 7, Cw4, 7. HmyA24, HmyB52, HmyCb-2はそれぞれHmy2CIR細胞にHLA-A24, B52, Cb-2の各遺伝子を導入したB細胞形質転換細胞株である。単クローン抗体G4はHLA-B分子を認識する。単クローン抗体4D12はHLA-B5分子(B51+B52)を認識する。抗体濃度は腹水の200倍希釈で行った。E/T比は10で行った。トリプレートの標準誤差は10%以内であった。

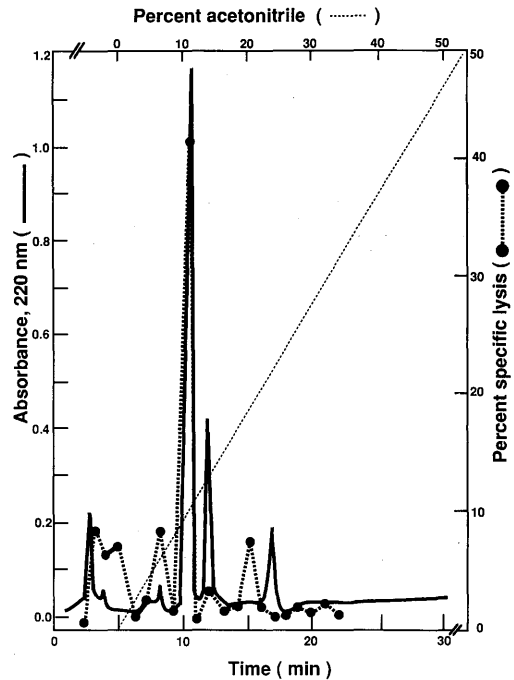


図5 HPLCによるSFCA活性分画の同定
リンパ球培養上清を活性炭と混合し、その吸着成分をアセトニトリルで溶出後、凍結乾燥し純水に再溶解後C18逆相カラムを用いたHPLCにより分画分取し、各分画を細胞障害性試験に用いて活性のある分画を同定した。溶出は0.1%トリフルオロ酢酸の移動相に2%/分の割合でアセトニトリルの直線勾配をかけて行った。細胞障害性試験は標的細胞に自己の単核球を用い、E/T比は10で行った。

それぞれを再度凍結乾燥しPBSに再溶解したのち細胞障害活性試験を行いSFCAの活性のある分画を同定した。SACAの活性は保持時間10分から11分の間のピークに認められた(図5)。この分画の成分を6規定の塩酸で110°C 6時間の加水分解した。SFCAの活性は塩酸加水分解後も認められた(表3)。

考 察

炭焼に吸着した成分をアセトニトリルで溶出させた。溶出した成分は、凍結乾燥後PBSに溶解し細胞障害性試験に用いた。活性炭による吸着により上清中のSFCAの活性は消失し、アセトニトリルにより溶出した分画に移行することが示された(表3)。さらに精製するためアセトニトリルにより溶出した成分を凍結乾燥し、純水に溶解したあとC18逆相カラムを用いたHPLCにより展開した。経時的に溶出分画を分取し、

本論文で、著者らはリンパ球培養上清中の液性因子存在下に自己の単核球およびB細胞を障害する特殊な自己反応性CD8陽性T細胞を記載した。この細胞はSCWに対する低応答性ハプロタイプ(HLA-DR15, DQ6, Dw12)をもつ健常者よりSCW特異的CD4陽性T細胞株を樹立する過程で得られた細胞で、HLA-DQ分子を認識するSCW特異的CD4陽性T細胞によりその増殖が促進され、CD4陽性T細胞の増

表 3 Purification of SFCA and cytotoxic activity of HYCD8

	Percent specific lysis ^a E/T ratio		
	20/1	10/1	5/1
fraction A	99.2	81.8	44.5
fraction B	0.0	0.0	1.9
Fraction C	82.0	64.2	39.4
medium	0.0	2.7	1.2
SFCA after hydrolysis*	N. E.	49.0	N. E.

a. ⁵¹Cr-labeled autologous monocytes were incubated with HYCD8 for 6 h. Values given represent the median of triplicate determinations. Each fraction in steps of purification was examined the effect on cytotoxic activity of HYCD8: Cell free supernatants obtained from cultured PBLs (10×10^6 cells/ml) in RPMI 1640 medium for 18 h (fraction A) were adsorbed by activated charcoal. Supernatants after adsorption (fraction B) were removed and elution from charcoal with acetonitrile was performed. The eluent was lyophilized and resuspended in PBS (fraction C).

*Hydrolysis was performed with 6 N HCl at 110° C for 6 h. N. E.; not examined

殖を抑制した¹⁰⁾。自己反応性 T 細胞は、マウス²⁾⁵⁾⁶⁾³⁵⁾、モルモット³⁾などにおいて記載されており、ヒト健常者においても自己混合リンパ球反応¹³⁾²⁶⁾や自己の抗原反応性 T 細胞クローンにより刺激された T 細胞¹⁾、液性抗原により刺激した T 細胞培養¹⁴⁾³⁴⁾の実験系で記述されている。これらの自己反応性 T 細胞はいずれも HLA クラス II 抗原に拘束されており¹⁾²⁾³⁾⁵⁾⁶⁾¹³⁾²⁶⁾³⁴⁾³⁵⁾、その機能は、ヘルパー T 細胞¹⁾²⁾⁶⁾¹³⁾³⁴⁾³⁵⁾、サブレッサー T 細胞²⁾¹³⁾²⁶⁾、細胞障害性 T 細胞²⁶⁾³⁴⁾などさまざまである。自己免疫疾患の場合を除けばヒトの自己反応性 CD8 陽性細胞障害性 T 細胞の記載はほとんどなく、アロの胎児肝臓と胸腺を移植された重症免疫不全患者で報告されているのみである²⁵⁾。著者らが記載した自己反応性細胞障害性 T 細胞は、HLA クラス I 分子を認識し、その活性の発揮に通常の細胞障害性 T 細胞と異なり、リンパ球培養上清中の液性因子を必要とする点で特異である。

HYCD8 は外来性の抗原を必要とせず自己の単核球の存在下に増殖したこと、HLA クラス I 分子に単クローン抗体によりその細胞障害活性が抑制されたことから、抗原提示細胞上の HLA クラス I 分子を認識し、増殖するとともに細胞障害性を示すと考えられた。HYCD8 は胞体内にパーフォリンを有し細胞表面マーカーは $\alpha\beta$ TCR, CD8, CD56 が陽性で、HLA クラス II 分子と IL-2 レセプターを発現していることから活性化した細胞障害性 T 細胞としての特徴を有することが示された。

細胞障害性 T 細胞を分化させ、パーフォリンやセリンエステラーゼを誘導するサイトカインとして IL-2⁴⁾⁹⁾、IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF¹⁵⁾などが知られている。また IL-2, IL-6 による細胞障害性 T 細胞の細胞障害活性は IFN- γ により増強されることも報告されている³¹⁾。しかし、これらのサイトカインはいずれも HYCD8 の細胞障害活性の発現には関与していなかった。

一般に HLA クラス I 分子は細胞内で合成、分解される蛋白に由来する内因性の抗原ペプチドと結合し、細胞表面に発現している¹⁹⁾。HYCD8 は、標的細胞上の HLA クラス I 分子を認識することから、内因性の自己抗原ペプチドをはさんだ HLA を認識していると考えられる。しかし外来性のペプチドを添加することにより細胞障害性 T 細胞による障害を誘導できること³⁰⁾、また外来性の蛋白抗原が HLA クラス I 分子により提示されること²⁹⁾も報告されている。培養上清より精製した成分の中に抗原となるペプチドが存在し、それにより細胞障害活性が観察されている可能性を否定するため、ペプチド結合を分解する条件である 6 規定塩酸による 110°C 6 時間の加水分解を行った。SFCA の活性は加水分解後も認められたことから、SFCA の作用は外来性の蛋白やペプチドがクラス I 分子により提示されることによるものではないと考えられた。またこの結果は、SFCA の活性が未知のサイトカイン蛋白によるものである可能性も否定するものである。

HYCD8 は, SFCA の存在下でも自己の CD4 陽性 T 細胞株を障害しなかった。マウスでは細胞が異なると同じ H-2 分子を発現している T 細胞の認識に影響することが報告¹⁰⁾されており, この場合にも単核球および B 細胞と T 細胞の間で HLA クラス I 分子により提示される自己抗原が異なっている可能性が考えられる。⁵¹Cr でラベルしていない CD4 陽性 T 細胞を加えることにより単核球に対する HYCD8 の細胞障害活性が抑制されなかったこともこの可能性を示唆する (未発表データ)。

SFCA 自体が標的細胞に細胞障害活性を有していることは, SFCA を加えたときの⁵¹Cr の自然解離が増えないときの自然解離と差がないことから否定される。HYCD8 の細胞障害活性は常に HLA-B 分子に拘束されていること, アロに対する細胞障害性 T 細胞の細胞障害活性を増強しないこと (未発表データ) から, SFCA は T 細胞に非特異的な刺激を与え細胞障害活性を誘導または増強する作用はないと考えられる。したがって SFCA は HYCD8 の TCR を介した標的細胞の特異的認識が起きたときの細胞障害活性の発現に関与していると考えられる。

HYCD8 は標的細胞上の HLA クラス I 分子を認識し, 抗原提示細胞として機能する自己の単核球および B 細胞を特異的に障害することから, その CD4 陽性 T 細胞に対する増殖抑制は抗原非特異的と考えられる。事実 HYCD8 は SCW 特異的 CD4 陽性 T 細胞に対する増殖抑制活性を有するとともに, 同じドナーから得た PPD 特異的 CD4 陽性 T 細胞の増殖に対しても *in vitro* で抑制的に作用する (未発表データ)。しかしドナー HY の T リンパ球は SCW に対しては低応答性であったが, PPD に対しては高応答性を示めたことから, HYCD8 の免疫応答抑制の抗原特異性は, 別の細胞により制御されていると考えられる。すでに報告されているように SCW に特異的で HLA-DQ6 を認識する CD4 陽性 T 細胞が HYCD8 の増殖を促進したが, HLA-DR4 を認識する CD4 陽性 T 細胞ではそのような現象は観察されなかったことから, 前者の CD4 陽性 T 細胞が HYCD8 の誘導, 活性化に関与していると考えられる。HLA-DQ 分子を認識する抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞の増殖を介して抗原提示細胞を障害する自己反応性 T 細胞が誘導され, 抗原提示細胞を障害することにより抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞の増殖が最終的に抑制されるとすれば, HYCD8 の免疫抑制に対する抗原特異性が説明できる。

SFCA は活性炭により吸着され, HPLC により展開

したときにその分画の一つに活性が存在することが示された。ここまでの段階はまだ部分的な精製にとどまり, その化学的組成は不明であるが, 今後その成分を同定し構造を決定することにより HYCD8 の細胞障害性の分子レベルでの解析が可能になると考えられる。

総 括

HLA-DQ 分子を認識する CD4 陽性 T 細胞により活性化された CD8 陽性 T 細胞の免疫抑制機序について解析した。

その CD8 陽性 T 細胞は CD4 陽性 T 細胞の増殖を抑制することがこれまでの研究で明らかにされていた。その免疫抑制の機序を解析するためにその CD8 T 細胞を単離し細胞株 HYCD8 として樹立した。

1. HYCD8 は, 外来性の抗原なしに自己の単核球と IL-2 の存在下に増殖し, 自己反応性を示すこと, 表面マーカーと免疫細胞染色の結果から細胞障害性 T 細胞としての特徴を有することが示された。

2. HYCD8 の細胞障害性の発現には, 通常の細胞障害性 T 細胞とは異なりリンパ球培養上清中の液性因子 (SFCA) を必要とした。SFCA の存在下に HYCD8 は HLA-B52 および B 54 分子を認識して抗原提示細胞 (単核球および B 細胞) を障害することが観察された。

3. SFCA は塩酸加水分解に抵抗性の物質で, その活性は HPLC により展開された分画の一つに存在することが示された。

以上より SCW に対する T 細胞増殖反応において増殖した CD8 陽性 T 細胞は, SFCA の存在下に自己の抗原提示細胞を障害することにより免疫応答を抑制することが明らかにされた。

稿を終えるにあたり, 直接ご指導賜りました笹月健彦教授, ならびに研究の機会をお与えくださいました藤島正敏教授に心より感謝いたします。また, 単クローン抗体を供与していただきました北海道大学協坂明助教授, UCLA の Billing 教授, ジョスリン糖尿病センターの Eisenbirt 教授, 単クローン抗体およびハイブリドーマを供与していただきました Dana-Faber 癌研究所の Burakoff 教授, HLA クラス I 遺伝子導入形質転換細胞を供与していただきました東京大学医科学研究所の滝口雅文博士, サイトカインを供与していただきました味の素中央研究所の三輪清志博士, 大阪大学バイオメディカル教育センターの平野俊夫教授, ならびに研究の遂行にご協力いただきました熊本大学院医学研究科免疫識別講座の西村泰治教授, 木村彰方博士, 上川路信博博士をはじめとする教室の方々に感謝いたします。

文 献

- 1) Bensussan A, Meuer SC, Schlossman SF and Reinherz EL: Delineation of an immunoregulatory amplifier population recognizing autologous Ia molecules. *J. Exp. Med.* 159: 559-576, 1984.
- 2) Clayberger C, Dekruffy RH and Cantor H: Immunoregulatory activities of autoreactive T cells: an I-A specific T cell clone mediates both help and suppression of antibody responses. *J. Immunol.* 132: 2237-2243, 1984.
- 3) Dos Reis GA and Shevach EM: Analysis of autoreactive I region-restricted T cell colonies isolated from the guinea pig syngeneic mixed leukocyte reaction and from immune responses to conventional foreign antigens. *Eur. J. Immunol.* 15: 466-472, 1985.
- 4) Erard F, Corthesy P, Nabholz M, Lowenthal JW, Zaech P, Plaetinck G and MacDonald HR: Interleukin 2 is both necessary and sufficient for the growth and differentiation of lectin-stimulated cytolytic T lymphocyte precursors. *J. Immunol.* 134: 1644-1652, 1985.
- 5) Faherty DA, Johnson DR and Zauderer M: Origin and specificity of autoreactive T cells in antigen-induced populations. *J. Exp. Med.* 161: 1293-1301, 1985.
- 6) Finnegan A, Needleman B and Hodes RJ: Activation of B cells by autoreactive T cells: cloned autoreactive T cells activate B cells by two distinct pathways. *J. Immunol.* 133: 78-85, 1984.
- 7) Gaudernack G, Leivestad T, Ugelstad J and Thorsby E: Isolation of pure functionally active CD8⁺ T cells: Positive selection with monoclonal antibodies directly conjugated to monosized magnetic microspheres. *J. Immunol. Methods* 90: 179-187, 1986.
- 8) Hayshi H, Ennis PD, Ariga H, Salter RD, Parham P, Kano K and Takiguchi M: HLA-B51 and BLA-Bw52 differ by only two amino acids which are in the helical region of the α 1 domain. *J. Immunol.* 142: 306-311, 1989.
- 9) Hefeneider SH, Conlon PJ, Henney CS and Gillis S: In vivo interleukin 2 administration augments the generation of alloreactive cytolytic T lymphocytes and resident natural killer cells. *J. Immunol.* 130: 222-227, 1983.
- 10) Kamikawaji N: CD4⁺ T cells restricted DQ not DR support CD8⁺ T cells to grow, Fukuoka *Acta Medica* 81: 88-96, 1990.
- 11) Kamikawaji N, Fujisawa K, Yoshizumi H, Fukunaga M, Yasunami M, Kimura A, Nishimura Y and Sasazuki T: HLA-DQ restricted CD4⁺ T cells specific to streptococcal antigen present in low but not in high responders. *J. Immunol.* 146: 2560-2567, 1991.
- 12) Kawasaki A, Shinkai Y, Kuwana Y, Furuya A, Iigo Y, Hanai N, Itoh S, Yagita H and Okumura K: Perforin, a pore-forming protein detectable by monoclonal antibodies, is a functional marker for killer cells. *Int. Immunol.* 2: 677-684, 1990.
- 13) Kotani H, Mitsuya H, Jarrett RF, Yenokida GG, James SP and Strober W: An autoreactive T cell clone that can be activated to provide both helper and suppressor function. *J. Immunol.* 136: 1951-1959, 1986.
- 14) Leung DY, Young MC and Geha RS: Induction of IgG and IgE synthesis in normal B cells by autoreactive T cell clones. *J. Immunol.* 136: 2851-2855, 1986.
- 15) Liu C-C, Joag SV, Kwon BS and Young JD: Induction of perforin and serine esterases in a murine cytotoxic T lymphocyte clone. *J. Immunol.* 144: 1196-1201, 1990.
- 16) Marrack P and Kappler J: T cells can distinguish between allogeneic major histocompatibility complex products on different cell types. *Nature.* 332: 840-843, 1988.
- 17) Matsushita S, Mutoh M, Suemura M, Saito Y and Sasazuki T: HLA-linked non-response to *Cryptomeria* pollen antigen T. nonresponsiveness is mediated by antigen-specific suppressor T cell. *J. Immunol.* 138: 109-115, 1987.
- 18) McMichael AJ and Sasazuki T: suppressor T cell in the human mixed lymphocyte reaction. *J. Exp. Med.* 146: 358-380, 1977.
- 19) Monaco JJ: A molecular model of MHC class I-restricted antigen processing: *Immunol. Today* 13: 173-179, 1992.
- 20) Nishimura Y, Iwanaga T, Inamitsu T, Yanagawa Y, Yasunami M, Kimura A, Hirokawa K and Sasazuki T: Expression of the human MHC, HLA-DQw6 genes alters the immune response in C57BL/6 mice. *J. Immunol.* 145: 353-360, 1990.
- 21) Nishimura Y and Sasazuki T: Suppressor T cells control the HLA-linked low responsiveness to streptococcal antigen in man. *Nature* 302: 67-69, 1983.
- 22) Ottenhoff THM, Kale AB, van Embden JDA, Thole JER and Kiessling R: The recombinant 65 kilodalton heat shock protein of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin/*m. tuberculosis* is a target molecule for CD4⁺ cytotoxic T lymphocytes that lyse human monocytes. *J. Exp. Med.* 168: 1947-1952, 1988.
- 23) Ottenhoff THM, Walford C, Nishimura Y, Reddy NBB and Sasazuki T: HLA DQ molecules and the control of *Mycobacterium leprae* specific T cell non responsiveness in lepromatous leprosy patients. *Eur. J. Immunol.* 20: 2347-2350, 1990.

- 24) Rock KL, Gamble S and Rothstein L: Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules. *Science* 249: 918-921, 1990.
- 25) Roncarolo MG, Yssel H, Touraine JL, Betuel H, Vries JED and Spits H: Autoreactive T cell clones specific for class I and class II HLA antigens isolated from a human chimera. *J. Exp. Med.* 167: 1529-1534, 1988.
- 26) Rosenkrantz K, Dupont B, Williams D and Flomenberg N: Autocytotoxic and autosuppressor T-cell lines generated from autologous lymphocyte cultures. *Hum. Immunol.* 19: 189-203, 1987.
- 27) Sasazuki T, Kaneoka H, Nishimura Y, Kaneoka R, Hayame M and Ohkuni H: An HLA-linked immune suppression gene in man. *J. Exp. Med.* 152: 297s-313s, 1980.
- 28) Sasazuki T, Kohno Y, Iwamoto I, Tanimura M and Naito S: Association between an HLA haplotype and low responsiveness to tetanus toxoid in man. *Nature* 272: 359-361, 1978.
- 29) Sasazuki T, Nishimura Y, Kikuchi I, Hirayama K, Tsukamoto K, Yasunami M, Matsushita S, Muto M, Sone T and Hirose T: HLA-linked immune suppression gene maps within HLA-DQ subregion, In Feldmann M and McMichael A (ed): Regulation of immune gene expression. 1st ed. pp. 197-206, The Human Press, Clifton, NJ, 1986.
- 30) Sasazuki T, Ohta N, Kaneoka R and Kojima S: Association between and HLA haplotype and low responsiveness to schistosomal worm antigen in man. *J. Exp. Med.* 152: 314s-318s, 1980.
- 31) Takai Y, Wong GG, Clark SC, Burakoff SJ and Herrmann SH: B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 140: 508-512, 1988.
- 32) Takiguchi M, Nishimura I, Hayashi H, Karaki S, Kariyone A and Kano K: The structure and expression of genes encoding serologically undetected HLA-C locus antigens. *J. Immunol.* 143: 1372-1378, 1989.
- 33) The WHO Nomenclature Committee for factors of the HLA system. Nomenclature for factors of the HLA system, *Tissue antigens* 39: 161-173, 1991.
- 34) Tilkin AF, Michon J, Juy D, Kayibanda M, Henin Y, Sterkers G, Betuel H and Levy JP: Autoreactive T cell clones of MHC class II specificities are produced during responses against foreign antigens in man. *J. Immunol.* 138: 674-679, 1987.
- 35) Tomonari K: In vivo helper activity of autoreactive T cell clones. *J. Immunol.* 135: 1598-1602, 1985.
- 36) Townsend ARM, Rothbard J, Gotch FM, Bahadur G, Wraith D and McMichael AJ: The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. *Cell* 44: 959-968, 1986.
- 37) Watanabe H, Matsushita S, Kamikawaji N, Hirayama K, Okumura M and Sasazuki T: Immune suppression gene on HLA-Bw54-DR4-DRw53 haplotype controls nonresponsiveness in humans to hepatitis B surface antigen via CD8⁺ suppressor T cells. *Hum. Immunol.* 22: 9-17, 1988.

(受付 1992-12-17)