

ヒトT細胞レセプターV β 22特異的単クローン抗体の 作製, およびそれを用いた末梢血T細胞レパトアの解 析

岡本, 安弘
九州大学生体防御医学研究所遺伝学部門

<https://doi.org/10.15017/7329590>

出版情報: 福岡醫學雑誌. 84 (2), pp.58-67, 1993-02-25. Fukuoka Medical Association
バージョン:
権利関係:



ヒト T 細胞レセプター V β 22 特異的単クローン抗体の作製, およびそれを用いた末梢血 T 細胞レパトアの解析

九州大学生体防御医学研究所遺伝学部門 (指導: 笹月健彦教授)

岡 本 安 弘

Generation of a Monoclonal Antibody Specific to Human T Cell Receptor V β 22, and Analysis of Peripheral Blood T Cell Repertoire Utilizing This Monoclonal Antibody.

Yasuhiro OKAMOTO

Department of genetics (Director : Prof. T. Sasazuki)

Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University 69, Fukuoka 812

A murine monoclonal antibody, R1-21, against a HLA-DR4 restricted CD4⁺ T cell line specific to streptococcal cell wall (SCW) Ag was generated. R1-21 reacted with about 50% of the HLA-DR4 restricted CD4⁺ T cell line. R1-21 distinguished a diversity of TCR because it reacted with a small population of peripheral T lymphocytes, induced proliferative response in peripheral blood lymphocytes, immunoprecipitated a cell surface molecule of 80 kDa in non-reduced condition and 45 and 40 kDa in reduced condition, and the immunoprecipitates with R1-21 was precleared with a known anti-TCR mAb. Sequence analysis of cDNA clones corresponding to TCR α and β genes derived from R1-21 positive and negative T cell lines revealed that R1-21 recognized a V β 22 gene product. By utilizing R1-21, it was found that V β 22 positive cells existed $3.80 \pm 0.94\%$ and $3.56 \pm 0.59\%$ in healthy adult and neonatal cord blood T lymphocytes, respectively, and a V β 22 gene product was skewed expressed on CD4⁺ T cells. (CD 4/CD 8 ratio: 1.69 ± 0.57)

はじめに

T 細胞レセプター (TCR) は α 鎖と β 鎖がジスフィルド結合したヘテロ二量体の糖タンパクから成り立ち、抗原認識の際には主要組織適合抗原 (Major Histocompatibility Complex; MHC) と抗原ペプチドの複合体を認識する (MHC 拘束性)³⁶⁾。TCR は不連続に存在する V, D, J および C 領域が体細胞組換えする事に加え、その継ぎ目部分に N 領域という塩基の追加もしくは欠損がおこることにより多様性を獲得する²³⁾ことで、多種多様な抗原に対応しており、このことがまさに細胞性免疫における T 細胞の多様性を賦与している。この時点では T 細胞の多様性は 10^{15} ⁸⁾と考えられるが、胸腺における正もしくは負の選択を経て 10^{12} ほどの成熟した T 細胞レパトアが形成される³⁾²⁴⁾。

T 細胞レパトアを解析する際、TCR の V, D, J, C 領域およびその継ぎ目部分の塩基ならびにアミノ酸配

列を決定することが必須であるが、また各ファミリーに対する単クローン抗体も非常に有用であり、このことがマウスにおいて胸腺における正ならびに負の選択をはじめとした T 細胞レパトアに関する様々な貴重な研究が進んだ理由でもある。しかしヒトに関しては TCR の V 領域に対する単クローン抗体の種類が十分でないため T 細胞レパトアの解析はマウスほどには進められてはいない。近年ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction; PCR) 技術の発達にともない、各種の疾患病巣中に浸潤する T 細胞レパトアは任意ではなく、約 60 の V α ファミリー³⁴⁾、V β ファミリー¹⁰⁾の中からある特定の V ファミリーが使用されていることが明らかになった。例えば、慢性関節リウマチでは V β 3, 4, 17¹⁵⁾³¹⁾が、また多発性硬化症では V α 12.1 が末梢と比べて病巣中の T 細胞レパトアに多く認められ²⁹⁾、ブドウ膜メラノーマの腫瘍浸潤リンパ球では V α 7 が主として使用されている²⁸⁾こと

などが報告されている。

一般に TCR の V 領域に対する単クローン抗体には主に 2 つの有用性がある。第一には診断的有用性であり、疾患発症に関与すると考えられる T 細胞レパトアのフローサイトメトリーによる定量や、免疫組織染色による病変における疾患関連 T 細胞の局在の同定などに利用される。第二には、ヒト腎移植の際の急性拒絶反応の抑制³⁰⁾や実験的アレルギー性脳炎の発症抑制⁴³⁾で明らかにされたように免疫に基づく疾患の治療を目的とした有用性である。

これまでにヒト白血病 T 細胞株を主として免疫細胞として用いることで、いくつかの TCR の V 領域特異的単クローン抗体が作製された²⁾⁽⁴⁾⁽⁹⁾⁽¹⁶⁾⁽²⁵⁾⁽³³⁾⁽³⁸⁾。また最近では、Mycoplasma Arthritis mitogen 特異的な T 細胞株¹¹⁾や、マウスの T 細胞ハイブリドーマにヒト TCR の V 領域を発現させた細胞株を用いて作製した V 領域特異的抗体が報告された⁷⁾。しかしながらこれらの単クローン抗体は総計しても 10 種程度で、ヒト T 細胞レパトアの約 30% 程度を認識するにすぎず、残りの V ファミリーに対する特異的単クローン抗体の作製が待たれている。

我々は、溶連菌細胞壁 (Streptococcal cell wall, SCW) 抗原に対する低応答者より SCW 特異的 CD 4 陽性 DR 4 拘束性および DQ 4 拘束性の T 細胞株を複数樹立し、ヒトの免疫応答の遺伝的制御における両者の機能的差異について解析してきた¹⁷⁾。この差異を分子生物学的に解明するためには、cDNA ライブラリーを作製する手法、あるいはいずれかの細胞株にのみ特異的に反応する単クローン抗体を作製する手法のいずれかで解析が可能である。今回我々は、SCW 低応答者 (HY) より樹立した SCW 特異的 CD 4 陽性 DR 4 拘束性および DQ 6 拘束性の T 細胞株をマウスに免疫することによりハイブリドーマを作製し、両者を識別する抗体を作製した。その過程にて、DR 4 拘束性 T 細胞株には反応するが DQ 6 拘束性 T 細胞株とは反応しない単クローン抗体 R 1-21 を得た。解析の結果、R 1-21 は T 細胞レセプター V β 22 ファミリーに認識していることが明らかとなったため、R 1-21 を用いて健康人ならびに臍帯血を材料とした T 細胞レパトアの解析を行った。

材料および方法

1. 細胞

健康者 (HY) より樹立した、HLA-DR 4 および HLA-DQ 6 拘束性 SCW 特異的 CD 4 陽性 T 細胞株

(それぞれ HY-DR 4-SCW, HY-DQ 6-SCW と以下略す) を用いた。また別の 7 名の健康者からも上川路らの方法¹⁷⁾に従って DR 4 拘束性 SCW 特異的 CD 4 陽性 T 細胞株を樹立した。単クローン抗体 R 1-21 反応性 T 細胞株の樹立は Tumang らの方法⁴⁰⁾に従い、ヤギ抗マウス Ig (G+M) 抗体の結合した磁気ビーズを用いることで R 1-21 陽性率 99% 以上の T 細胞株を得た。末梢血 T 細胞および臍帯血 T 細胞は、フィコールパツクを用いた比重勾配遠心法の後、ナイロンウールカラムを通過させることにより調製した。

2. 単クローン抗体の作製

免疫動物として C 3 H/HeJ と HLA-DQ 6 遺伝子を導入した C 57 BL/6²⁷⁾ の 1 代雑種の雌を用い、初回免疫として 1×10^7 コの HY-DR 4-SCW を腹腔内に投与し、その 2 週後に同数の細胞株を追加免疫した。追加免疫後 4 日後のマウスより採取した脾細胞はミエローマ細胞 P 3 X-63-U 1 とポリエチレングリコール存在下にて融合した¹²⁾。融合細胞を HAT 選択培地にて培養し約 2000 コのハイブリドーマを得た。これらのハイブリドーマ上清を、HY-DR 4-SCW と HY-DQ 6-SCW との間で、ELISA 法により比較スクリーニングを行うことで、HY-DR 4-SCW には反応するが HY-DQ 6-SCW には反応しないハイブリドーマ R 1-21 を得た。

3. 単クローン抗体

OKT 3 は、ATCC より購入した。抗 CD 3 (抗 Leu 4)、抗 CD 4 (抗 Leu 3 a)、抗 CD 8 (抗 Leu 2 a) はベクトン・ディッキンソン社より購入した。抗ヒト TCR β 鎖フレームワーク抗体 β F 1 は、T セルサイエンス社より購入した。また二重染色に用いた R 1-21 はプロテイン A カラムにて精製後、通常の方法にてビオチン化した¹¹⁾。

4. HLA タイピング

T 細胞株ドナーの HLA クラス I およびクラス II 抗原は抗 HLA 血清パネルを用いて微小細胞傷害試験によりタイプした¹⁷⁾。さらに HLA クラス II の対立遺伝子型は、PCR 産物の塩基配列特異的オリゴヌクレオチドプローブとの反応性により決定した²⁰⁾。HLA 対立遺伝子の名称は WHO の HLA 命名委員会の勧告に従った⁴⁴⁾。

5. CD3-TCR 複合体に対する単クローン抗体による T 細胞の増殖

健康人末梢血 T 細胞を種々の CD3-TCR 複合体を認識する単クローン抗体と反応することで、単クローン抗体特異的 T 細胞反応を検討した。抗 Leu 4 抗体は希釈し有効濃度 (200 ng/ml) を用いた¹⁸⁾。対照群としての P3X-63-U1, また OKT 3, および R1-21 はそれぞれ腹水型を 500 倍希釈にて使用した。T 細胞の培養は、L-グルタミン、ストレプトマイシン-ペニシリン添加の RPMI 1640 に 10% のヒト男性血清を加えたものを用い、5% CO₂ 飽和水蒸気圧下にて 72 時間行った。³H-チミジン添加後さらに 12 時間培養を行い T 細胞の取り込みをシンチレーションカウンターにて測定した。

6. フローサイトメトリー

フローサイトメトリーは、ベクトン-ディッキンソン社の FACScan を用いて行い、いずれも 7-アミノアクチノマイシン D にて死細胞を除去した条件にて解析した。解析には、二次抗体として FITC 標識のヤギ抗マウス (IgG+IgM) ポリクローン抗体の F(ab') 部分を用いた間接蛍光抗体法、もしくはビオチン化 R1-21 にアビジン FITC を加えたものと抗 CD3, 抗 CD4, および抗 CD8 抗体の PE 標識の抗体との間での二重蛍光染色法いずれかでを行った。

7. 細胞の RI 標識および免疫沈降法

細胞表面の放射性ヨード標識は、 1×10^7 個の生細胞を冷却した PBS にて充分洗浄後、Na ¹²⁵I とラクトペロキシダーゼを用いて行った²⁶⁾。免疫沈降は、50% (V/V) のプロテイン G と有効濃度の抗体、すなわち R1-21 (腹水型) は 5 μ l, β F1 (0.5 mg/ml) は 40 μ l を用いて行った¹⁹⁾。免疫沈降物はその後 SDS-ポリアクリルアミド電気泳動により分離し、ゲル乾燥後 -80 °C にて増感紙存在下で Kodak-XAR-5 フィルムに露光することで標識蛋白を検出した。

8. インバース PCR および TCR 遺伝子の塩基配列決定

T 細胞株を SCW もしくは R1-21 により刺激した後、生細胞をフィコール-バックを用いて回収した。また RNA は、Scherrer らの方法に従いホットフェノール法により抽出した³⁷⁾。マルチプライミング法による cDNA 合成およびインバース PCR 法による T 細胞レセプター遺伝子のクローニングは Uematsu らの方

法に従った⁴¹⁾⁴²⁾。得られた T 細胞レセプター遺伝子のクローンの塩基配列はシークエナーゼキット (United States Biochemical) を用いてサンガー法により決定した。

9. V 領域特異的逆転写 PCR (RT-PCR) とそのプライマー

V β 特異的プライマーならびに C α の定常域を特異的に増幅する C α インターナルコントロールプライマーは Choi らの報告に従い合成した⁶⁾。また C β のアンチセンスプライマー (5'-TTT TGG GTG TGG GAG ATC TC) は Bragado らの報告に従った⁵⁾。V β 22 特異的プライマー (5'-AGG CCT GAT GGA TCA AAT TTC) は他の V β 特異的プライマーとほぼ同じ部位に作製した。プライマーはすべて MilliGen-Bioseach 社の DNA 合成装置にて合成し、PHA 刺激した末梢血リンパ球からの cDNA を用いて特異的 PCR 産物が得られることを確認した。

結 果

1. R1-21 の各細胞株に対する反応性 (図 1)

HY-DQ6-SCW は V β 5.2+5.3 に対する抗体 1 C1 と約 90% 反応した。R1-21 は、HY-DR4-SCW の約 50% に反応したが、HY-DQ6-SCW や、HY より樹立した EB ウィルス形質転換 B リンパ芽球様細胞株には反応性を有しなかった。また 1C1 と同様に、R1-21 は末梢血リンパ球の約 3% と反応した。

2. R1-21 による T 細胞増殖試験

健康者 6 名より末梢血リンパ球を回収し、R1-21 (IgG1 タイプ) に対する反応性から高応答者群 (グループ A) と低応答者群 (グループ B) に分類した (表 1)。グループ A は OKT3 (IgG2a タイプ) に対しては増殖性を示したが、抗 Leu4 (IgG1 タイプ) に対しては増殖性を示さなかった。グループ B においてはこの両者に対して増殖性を示した。このことは、IgG1 タイプの抗 TCR-CD3 複合体に対する増殖性には個体差が存在するという Kaneoka らの報告¹⁸⁾ と合致していた。高応答群において R1-21 に対する増殖性が抗 CD3 抗体に対する増殖性に比して小さいことが観察されたが、これは末梢血リンパ球における各単クローン抗体陽性細胞の存在比率を反映していると考えられた。

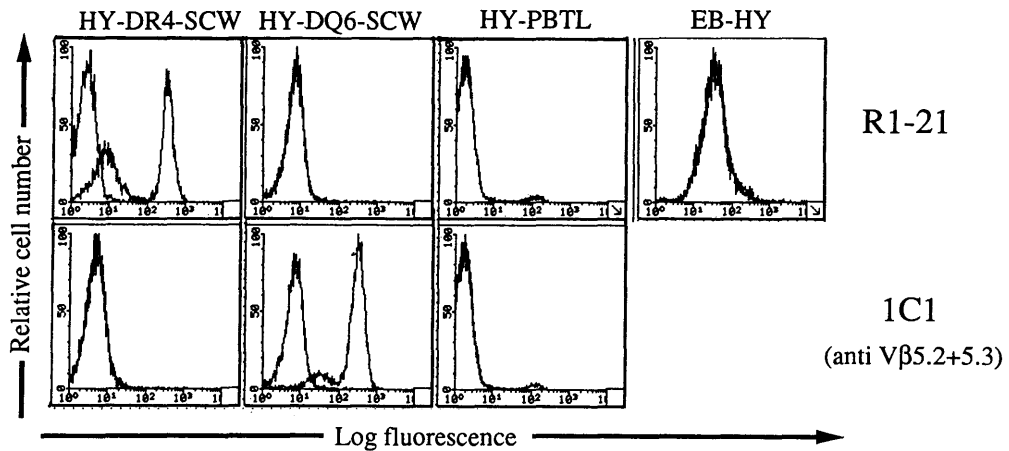


図1 R1-21の各細胞株への反応性

R1-21はHY-DR4-SCWの約50%,末梢血リンパ球の約3%に反応したが,同一ドナーより樹立したHY-DQ6-SCWやEBウィルス形質転換Bリンパ芽球様細胞株(EB-HY)とは反応性を有しなかった.比較対照としてV β 5.2+5.3特異的抗体1C1を用いた.また対照群としては精製マウスIgG1を用いた.

Table 1 Proliferative response of PBL co-cultured with mAbs

		³ [H] TdT incorporation induced by			
		mAb			
	Donor	Med	R1-21	Leu4	OKT3
Group A	YN	389 $\pm$ 82	659 $\pm$ 118	326 $\pm$ 62	15,374 $\pm$ 7,069
	SS	672 $\pm$ 87	717 $\pm$ 138	622 $\pm$ 120	22,077 $\pm$ 3,083
	RPD	692 $\pm$ 124	683 $\pm$ 267	582 $\pm$ 101	35,711 $\pm$ 3,240
Group B	NK	369 $\pm$ 48	1,235 $\pm$ 396	24,556 $\pm$ 3,492	15,913 $\pm$ 2,706
	TK	473 $\pm$ 140	5,916 $\pm$ 1,415	187,225 $\pm$ 715	11,437 $\pm$ 583
	YO	888 $\pm$ 147	3,026 $\pm$ 709	110,671 $\pm$ 3,289	250,112 $\pm$ 718

PBLs were co-incubated with anti-Leu4(200 ng/ml), OKT3, R1-21, and P3U-1 ascites (final dilution 500x). ³[H]thymidine incorporation was measured by scintillation counting, and expressed by mean $\pm$ SD of cpm in triplicate culture.

3. 免疫沈降法

R1-21が認識する分子を同定するため, R1-21とTCR β 鎖フレームワーク抗体である β F1を用いて,免疫沈降物を比較検討した(図2). R1-21を用いると β F1と同様に,非還元下にて85 KDa(図2レーン1, 2),還元下にて45と40 KDa(図2レーン7, 8)の免疫沈降物が検出された.さらに, R1-21および β F1で沈降した85 KDaのバンドは,それぞれ β F1とR1-21を試料とあらかじめ反応させておくことにより互いにその量が著明に減少した(図2レーン4, 5).このことはR1-21がT細胞レセプターを認識しているこ

とを示唆した.

4. インバースPCR法を用いたR1-21特異性の決定

HY-DR4-SCWと他の健常者(KH)より樹立したSCW特異的CD4陽性T細胞株(KH-DR4-SCW)について,それぞれR1-21を用いてR1-21陽性率約100%と0%の2群にT細胞を分別し,その各々についてインバースPCR法を用いてT細胞レセプター遺伝子をクローニングした.

まず,TCR β 鎖遺伝子について検討した. R1-21陽

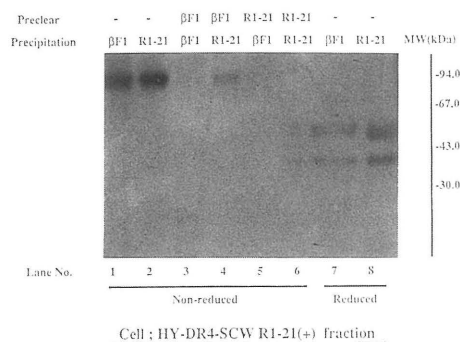


図 2 R 1-21 を用いた免疫沈降法

放射性ヨードにてラベルした HY-DR 4-SCW 中 R 1-21 陽性分画から β F 1, R 1-21 にて得られた免疫沈降物を、還元および非還元下にて SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて分離し、オートラジオグラフィーにて検出した。

	V β 22	N1	D β	N2	J β
HY-DR4-SCW R1-21(+)	Phe Cys Ala Ser Ser TTC TGT GCC AGC AGT		Gly Glu Ala GGA CAG G CT	Asn Tyr Gly AAC TAT GGC	
			D β 1.1	J β 1.2	
KH-DR4-SCW R1-21(+)	Phe Cys Ala Ser Ser TTC TGT GCC AGC AGT	Pro	Gly Leu Ala GGA CTA GC A	Gln Glu Thr CAA GAG ACC	
			D β 2.1	J β 2.5	

図 3 R 1-21 陽性 T 細胞における V β の決定

HY-DR 4-SCW および KH-DR 4-SCW の R 1-21 陽性分画の T 細胞レセプターをクローニングし、塩基配列を決定することによりそのアミノ酸配列を推定した。それぞれから得られたクローンの主体を占めるものについて示す。D β , J β の命名法は Toyonaga らの報告に従った。

性の HY-DR 4-SCW より得られたクローンをシーケンシングすると 11 クローンのうち 10 クローンが同一の塩基配列を有しており、これは V β 22 (IGRb 03)¹⁰⁾-D β 1.1-J β 1.2-C β 1 (図 3) であった。残りの一つは V β 11.2-D β 1.1-J β 1.6-C β 1 でありこれは、R 1-21 陰性の HY-DR 4-SCW より得られたクローンと同一であった。一方、R 1-21 陰性の HY-DR 4-SCW より得られた 12 クローン全てが前述した V β 11.2-D β 1.1-J β 1.6-C β 1 であった。R 1-21 陽性 KH-DR 4-SCW では 12 クローンのうち 11 クローンが V β 22-D β 2.1-J β 2.5-C β 2 であり (図 3), 残りの一つは V β 1-D β 1.1-J β 1.6-C β 1 であった。R 1-21 陽性 T 細胞の T 細胞レセプタークローンの塩基配列および対応するアミノ酸配列の一部を図 3 に示す。以上の結果は R 1-21 が T 細胞レセプター V β 22 ファミリーを認識する事を強く示唆した。

次に TCR α 遺伝子について検討した。R 1-21 陽性の HY-DR 4-SCW は表 2 にまとめたように、V α 1.3 が多数を占めるものの、他に少なくとも 3 種の V α -J α を使用する T 細胞がそれぞれ存在していた。さらに、これらは R 1-21 陰性の HY-DR 4-SCW から得られた T 細胞レセプター α 鎖の塩基配列とまったく異なるため、R 1-21 陰性分画の陽性分画への混入による不均一性を反映したものではないと考えられた。一方 R 1-21 陽性の KH-DR 4-SCW から得た 4 クローンは、すべてが V α 1.1 であり V α に関しては HY-DR 4-SCW と KH-DR 4-SCW のそれぞれの R 1-21 陽性分画の T 細胞レセプター間に共通性は見いだせなかった。

Table 2 Usage of TCR V α and J α gene in DR4 restricted SCW Ag-specific T cell lines

T cell line	Frequency	V α	Ref.	J α	Ref.
HY-DR4-SCW R1-21(+)	9/12	1.3(AA17)	[22]	HAVT33	[21]
	1/12	10.1(HAP 58)	[45]	HAVT27	[21]
	1/12	1.2(AE11)	[22]	AP511	[22]
	1/12	15.1(AC24)	[22]	AA17	[22]
HY-DR4-SCW R1-21(-)	4/7	12.1(AC25)	[22]	IGRJa14	[34]
	3/7	16.1(AE212)	[22]	HAP58	[45]
KH-DR4-SCW R1-21(+)	4/4	1.1(HAP10. HAP60)	[45]	IGRJa14	[34]

The nomenclature of V α and J α were according to those proposed by Klein et al. [22], Kimura et al. [21], Yoshikai et al. [45], and Roman-Roman et al. [34].

5. 逆転写酵素 (RT) PCR 法を用いた R 1-21 特異性の確認

前述したように R 1-21 は V β 22 の遺伝子産物を認識することが示唆されたため、HY-DR 4-SCW 中の陽性および陰性分画、KH-DR 4-SCW 中の陽性および陰性分画、R 1-21 刺激にて健常者 NT より樹立した R 1-21 反応性 T 細胞株 NT-R 1-21、ヒト白血病 T 細胞株である Jurkat を用いて、C α インターナルコントロールプライマー存在下に、V β 22、V β 8、V β 11 それぞれに特異的なプライマーと C β プライマーとの間で PCR を行った (図 4)。V β 22 特異的遺伝子増幅は R 1-21 陽性の T 細胞株では認められたが、他の細胞株では認められなかった。同様に Jurkat では V β 8、R 1-21 陰性の HY-DR 4-SCW では V β 11 の特異的遺伝子増幅を認めた。これらの V β 特異的 PCR の結果は R 1-21 陰性 T 細胞中には V β 22 を使用する T 細胞が存在しないことを明らかにし、前述のクローニングにより得られた結果を支持した。すなわち R 1-21 が V β 22 に特異的であることが確認された。

6. 末梢血 T リンパ球における V β 22 陽性 T 細胞頻度

成人健常人末梢血 T リンパ球、臍帯血 T リンパ球を用いて、抗 Leu 4 抗体との二重染色にて全 T リンパ

球に対する V β 22 陽性 T 細胞頻度を算出した (図 5) が、それぞれ $3.80 \pm 0.94\%$ 、 $3.56 \pm 0.59\%$ と有意差を示さなかった。またその分布も一峰性であった。さらに各人の HLA-DR, DQ, DP それぞれの対立遺伝子型との対応を検討したが、特定の遺伝子型と V β 22 使用 T 細胞レパトア頻度との相関は認められなかった。

7. V β 22 の CD 4 陽性 T 細胞あるいは CD 8 陽性 T 細胞いずれかへの偏位について

他の V β ファミリーでは、CD 4 もしくは CD 8 T 細胞いずれかに優位にその使用が偏位することが報告されている¹³⁾¹⁴⁾。そこで、成人健常人末梢血 T リンパ球および臍帯血 T リンパ球を用いて、抗 Leu 3 a (抗 CD 4)、抗 Leu 2 a (抗 CD 8) 抗体と R 1-21 との二重染色にて V β 22 使用偏位を検討した (図 6)。その結果、R 1-21 陽性細胞は成人では CD 4 中の $4.04 \pm 0.85\%$ 、CD 8 中の $2.59 \pm 0.83\%$ を占め、臍帯血では CD 4 中の $3.71 \pm 0.60\%$ 、CD 8 中の $2.36 \pm 0.61\%$ を占めており、V β 22 の使用は CD 4 陽性 T 細胞に有意に偏位していた ($P < 0.001$, ペア- t 検定)。

考 察

本研究では、SCW 特異的 DR 4 拘束性 CD 4 陽性 T

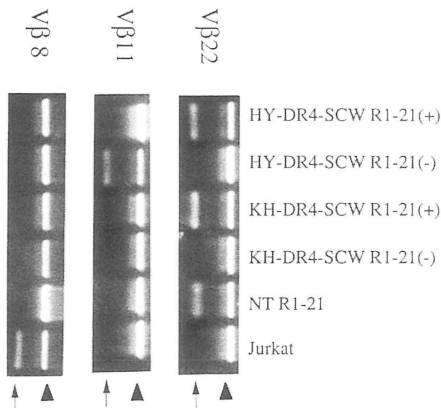


図 4 V β 特異的プライマーによる R 1-21 陽性細胞の特異的遺伝子増幅 HY-DR 4-SCW 中の R 1-21 陽性分画と陰性分画、KH-DR 4-SCW の R 1-21 の陽性分画と陰性分画、NT-R 1-21、Jurkat の 6 種の細胞株を用いて、C α インターナルコントロールプライマー存在下で V β 22、V β 11、V β 8 と C β プライマーとの間にて逆転写酵素 PCR を行った。C α 特異的 PCR 産物を矢印でまた V β 特異的 PCR 産物を矢印で示す。

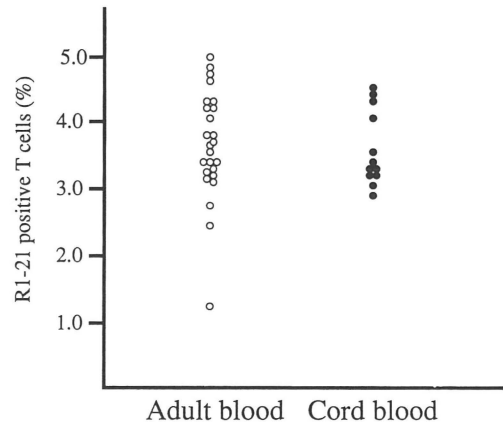


図 5 成人健常人末梢血リンパ球および臍帯血リンパ球における V β 22 陽性 T 細胞頻度
成人健常人末梢血リンパ球および臍帯血リンパ球を用いて、抗 Leu 4 抗体と R 1-21 とで二重染色を行った。相対的 R 1-21 陽性細胞頻度の算出法は以下の通りである。

R 1-21 陽性 T 細胞頻度 (%)

$$= 100 \times \frac{\text{R 1-21, 抗 Leu 4 とともに陽性な細胞数}}{\text{抗 Leu 4 陽性細胞数の総計}}$$

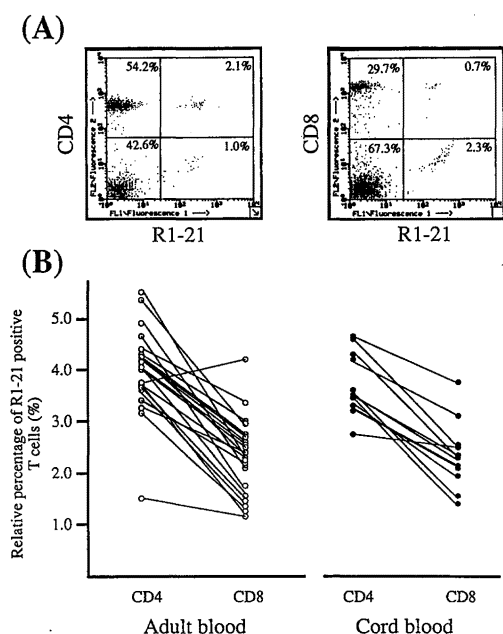


図6 R 1-21 陽性細胞の CD 4 陽性細胞への偏位
成人健康人末梢血リンパ球および臍帯血リンパ球を用いて、抗 CD 4 抗体もしくは抗 CD 8 抗体と R 1-21 との間で二重染色を行った。(A) HY より採取した末梢血リンパ球を用いた場合の CD 4 (抗 Leu 3 a) と R 1-21, CD 8 (抗 Leu 2 a) と R 1-21 の二重染色のフローサイトメトリーを例示した。(B) CD 4 および CD 8 陽性細胞中における R 1-21 陽性細胞の頻度を算出し各個人毎に線で結んだ。CD 4 もしくは CD 8 陽性細胞中における R 1-21 陽性細胞頻度の算出方法は以下の通りである。
CD 4 (もしくは CD 8) 陽性細胞における R 1-21 陽性細胞頻度 (%)

$$= 100 \times \frac{\text{R 1-21, 抗 Leu 3 a (もしくは抗 Leu 2 a) ともに陽性な細胞数}}{\text{抗 Leu 3 a (もしくは抗 Leu 2 a) 陽性細胞数の総計}}$$

細胞株に反応する単クローン抗体 R 1-21 を作製し、これがヒト T 細胞レセプター $V\beta 22$ を認識することを明らかにした。まず R 1-21 の認識している分子は免疫に用いた T 細胞株 (HY-DR 4-SCW) に特異的に存在し、同じドナーより樹立した拘束性の異なる T 細胞株 (HY-DQ 6-SCW) や B リンパ芽球様細胞株 (EB-HY) に反応しない一方、末梢血リンパ球には数%の反応性を有したことより T 細胞全体に共通の細胞表面分子ではなく、たとえば TCR の可変領域のような多様性を示す分子を認識していることが示唆された。抗 TCR 抗体や抗 CD 3 抗体などの T 細胞に増殖シグナルを与えることのできる抗体は、その抗体刺激により

末梢血リンパ球増殖を誘導する。R 1-21 も末梢血リンパ球増殖を誘導したが抗 CD 3 抗体に比べ刺激活性が弱かった。以上より R 1-21 は T 細胞中の限られたクローンにのみ発現しその増殖に関与する分子であることが示唆された。また免疫沈降法を用いた実験では、R 1-21 は TCR β 鎖のフレームワーク抗体である $\beta F 1$ と同様な免疫沈降物を還元下、非還元下にて示し、さらに予め $\beta F 1$ や R 1-21 で処理しておくことで、それぞれ R 1-21, $\beta F 1$ で得られる免疫沈降物が著しく減少することより、この二つの抗体は同一分子、すなわち TCR を認識していると考えられた。以上より R 1-21 は、TCR の定常域以外の部分すなわち V, D, J 領域のいずれかを認識していると考えられた。

R 1-21 が TCR のどの部位を認識しているかは、インバース PCR 法を用いて決定した。表 2 に示したように α 鎖に関して R 1-21 陽性 T 細胞間に $V\alpha 1$ ファミリー ($V\alpha 1.1, 1.2, 1.3$) を使用するものが多いこと以外のは共通性は見られなかった。 β 鎖に関しては、この異なるドナーより得られた 2 種の T 細胞間で $V\beta 22$ のみ共通していた。R 1-21 が $V\alpha 1$ ファミリーの共通部分、もしくは $V\alpha 1-V\beta 22$ の TCR クロノタイプを認識している可能性については、R 1-21 陽性率が約 100%である NT-R 1-21 においても、全くクローン化していない T 細胞同様に抗 $V\alpha 2.3$ 抗体 (F 1)¹⁶⁾ 陽性細胞が 7.0%存在することから否定的であった (未発表データ)。また R 1-21 が $D\beta, J\beta, J\alpha$ ないしこれらの結合部分を認識している可能性も、図 3 および表 2 で示したその著しい多様性から否定的であった。さらに図 4 で示したように、R 1-21 陽性細胞においてのみ $V\beta 22$ 特異的増幅が得られた。以上より、R 1-21 はヒト TCR $V\beta 22$ を認識していると結論された。

HY-DR 4-SCW と KH-DR 4-SCW の R 1-21 陽性分画主体である $V\beta 22$ の塩基配列を比較すると図 3 に示したように、 $V\beta 22$ の 3' 末のセリンのコドンに同義塩基置換 (それぞれ AGT, AGC) がみられた³⁵⁾。この部分は、すでに報告されている $V\beta 22$ を使用した HT 2.10 ではアルギニン (AGA) となっており³²⁾、 $V\beta 22$ サブファミリー間の相異もしくは $V\beta 22$ における遺伝的多型性であると考えられた。

R 1-21 を用いて末梢血リンパ球における $V\beta 22$ の頻度を検討したが、成人末梢血と臍帯血間に有意の差はなく、また各個人間における R 1-21 陽性細胞頻度の分布は抗 $V\beta 6.7$ 抗体 OT 145³³⁾ にみられるように 2 峰性を示さず、このことから、R 1-21 は $V\beta 22$ ファミリーの非多型部分を認識しているか、もしくは $V\beta 22$

自体に大きな対立遺伝子間変異が存在しないことが示唆された。また V β 22 の使用は CD 4 陽性 T 細胞に偏位していることが明らかとなったが、その程度は V β 5.1, V β 6.7 より小さく V β 8, V β 12 よりは大いいため、V β の使用偏位には階層形成が存在していると考えられた。しかしながら、V β 22 使用の CD 4 陽性 T 細胞への偏位は、外界の影響を殆ど除外できると考えられる臍帯血においても観察されたことより、後天的要因によるものではなく、むしろ CD 4 陽性 T 細胞もしくは CD 8 陽性 T 細胞に分化する時点で決定されたと考えられた。ヒトにおいて、V β 使用の偏在が胸腺内で決定されるか否かは本研究からはあきらかではないが、マウスの T 細胞レパトアから考慮すると³⁾²⁴⁾、胸腺における正の選択において決定されたと考えられた。また、HLA-B 38 と末梢血中の CD 8 陽性 V α 2.3 陽性 T 細胞比率との正の相関が報告されている¹⁴⁾。しかしながら V β 22 陽性 CD 4 あるいは CD 8 陽性 T 細胞比率は特定の HLA クラス I (A, B, C), クラス II (DRB 1, DQA 1, DQB 1, DPA 1, DPB 1) の存在と相関を認めなかった。このことより、V β 22 陽性 T 細胞はマウスの V β ファミリーにて観察されるような特定の MHC の存在により正もしくは負の選択においてファミリー全体が影響を受けるようなものではないことが示唆された。

総 括

1. ヒト TCRV β 22 と特異的に反応する抗体 R 1-21 を産生するハイブリドーマを樹立した
2. R 1-21 を用いて検討したヒト T 細胞レパトアから V β 22 の使用は CD 4 陽性 T 細胞に偏位していることが判明した。

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下さいました杉岡洋一教授に心から感謝いたします。またミエローマ細胞を供与して下さいました渡辺武教授、臍帯血を分与下さいました中野仁雄教授、ならびに研究の遂行にご協力いただきました熊本大学大学院医学研究科免疫識別講座の西村泰治教授、また木村彰方助教授、上川路信博助手、浜島廣学兄、藤田由香利女史をはじめとする遺伝学教室の方々に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Bayer E A and Wilchek M: The use of the avidin-biotin complex as a tool in molecular biology. *Methods Biochem. Anal.* 26: 1-45, 1980.
- 2) Bigler R D, Fisher D, Wang C Y, Rinnooy-Kan E, and Kunkel H G: Idiotype-like molecules

on cells of a human T cell leukemia. *J. Exp. Med.* 158: 1000-1005, 1983.

- 3) Blackman M, Marrack P and Kappler J: Influence of major histocompatibility complex on positive thymic selection of V β 17a+ T cells. *Science* 244: 214-217, 1989.

- 4) Boylston A W, Borst J, Yssel H, Blanchard D, Spitz H, and De Vries J E: Properties of a panel of monoclonal antibodies which react with the human T cell antigen receptor on the leukemic line HPB-ALL and a subset of normal peripheral blood T lymphocytes. *J. Immunol.* 137: 741-744, 1986.

- 5) Bragado R, Lauzurica P, Lopez D and Castro J L: T cell receptor V β gene usage in a human alloreactive response: Shared structural features among HLA-B27-specific T cell clones. *J. Exp. Med.* 171: 1189-120, 1990.

- 6) Choi Y, Kotzin B, Herron L, Callahan J, Marrack P and Kappler J: Interaction of *Staphylococcus Aureus* toxin superantigen with human T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8941-8945, 1989.

- 7) Choi Y, Kotzin B, Lafferty J, White J, Pigeon M, Kubo R, Kappler J and Marrack P: A method for production of antibodies to human T-cell receptor β -chain variable regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8357-8361, 1991.

- 8) Davis M M, and Bjorkman P J: T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334: 395-402, 1988.

- 9) DerSimonian H, Band H and Brenner M B: Increased frequency of T cell receptor V α 12.1 expression on CD8+ T cells: Evidence that V α participates in shaping the peripheral T cell repertoire. *J. Exp. Med.* 174: 639-648, 1991.

- 10) Ferradini L, Roman-Roman S, Azocar J, Michalaki H, Triebel F and Hercend T: Studies on human T cell receptor α/β variable region genes. II. Identification of four additional V β subfamilies. *Eur. J. Immunol.* 21: 935-942, 1991.

- 11) Friedman S M, Crow M K, Tumang J R, Tumang M, Xu Y, Hochtsev A S, Cole B C and Posnett D N: Characterization of human T cells reactive with the *Mycoplasma arthritidis*-derived superantigen (MAM): Generation of a monoclonal antibody against V β 17, the T cell receptor gene product expressed by a large fraction of MAM-reactive human T cells. *J. Exp. Med.* 174: 891-900, 1991.

- 12) Galfre G, Howe S C, Milstein C, Butcher G W and Howard J C: Antibodies to major histocompatibility antigen produced by hybrid cell line. *Nature* 266: 550-552, 1977.

- 13) Grunewald J, Janson C H and Wigzell H: Biased expression of individual T cell receptor V

gene segments in CD4+ and CD8+ human peripheral blood T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 21: 819-822, 1991.

14) Gulwani-Akolkar B, Posnett D N, Janson C H, Grunewald J, Wigzell H, Akolkar P, Gregersen P K and Silver J: T cell receptor V-segment frequencies in peripheral blood T cells correlate with human leukocyte antigen type. *J. Exp. Med.* 174: 1139-1146, 1991.

15) Howell M D, Dively J P, Lundeen K A, Esty A Winters S T, Carlo D J and Brostoff S W: Limited T-cell receptor β -chain heterogeneity among interleukin 2 receptor-positive synovial T cells suggests a role for superantigen in rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10921-10925, 1991.

16) Janson C H, Tehrani M, Mellstedt H, and Wigzell H: Anti-idiotypic monoclonal antibody to a T cell chronic lymphatic leukemia. *Cancer Immunol. Immunother.* 28: 225-232, 1989.

17) 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 exist in low responders but not in high responder. *J. Immunol.* 146: 2560-2567, 1991.

18) Kaneoka H, Perez-Rojas G, Sasazuki T, Benike C J and Engelman E G: Human T lymphocyte proliferation induced by a pan-T monoclonal antibody (anti-Leu4): Heterogeneity of response is a function of monocytes. *J. Immunol.* 131: 158-164, 1983.

19) Kessler S W: Use of protein A-bearing staphylococcus for the immunoprecipitation and isolation of antigens from cells. *Methods Enzymol.* 73: 442-469, 1981.

20) Kimura A, Dong R P, Harada H and Sasazuki T: DNA typing of HLA class II gene in B-lymphoblastoid cell lines homozygous for HLA. *Tissue Antigen*, in press.

21) Kimura N, Toyonaga B, Yoshikai Y, Du R-P and Mak T W: Sequences and repertoire of the human T cell receptor α and β chain variable region genes in thymocytes. *Eur. J. Immunol.* 17: 375-383, 1987.

22) Klein M H, Concannon P, Everett M, Kim L D H: Hunkapiller, T. and Hood, L., Diversity and structure of human T-cell receptor α -chain variable region genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6884-6888, 1987.

23) Laffille J J, DeCloux A, Boneville M, Takagaki Y and Tonegawa S: Junctional sequences of T cell receptor $\gamma\delta$ genes: Implications for $\gamma\delta$ T cell lineages and for a novel intermediate of V-(D)-J joining. *Cell* 59: 859-870, 1989.

24) MacDonald H R, Lees R, Schneider R: Zinkernagel, R. and Hengartner, H., Positive selection of CD4+thymocytes controlled by MHC class II gene products. *Nature* 336: 471-473, 1988.

25) Maecker H and Levy R: Prevalence of antigen receptor variants in human T cell lines and tumors. *J. Immunol.* 142: 1395-1405, 1989.

26) Marchalonis J J: An enzymatic method for the trace iodination of immunoglobulins and other protein. *Biochem. J.* 113: 299-305, 1969.

27) Nishimura Y, Iwanaga T, Inamitsu T, Yanagawa Y, Yasunami M, Kimura A, Hirokawa K and Sasazuki T: Expression of human major histocompatibility complex, HLA-DQw6 genes alters the immune response in B57 BL/6 mice. *J. Immunol.* 145: 353-360, 1990.

28) Nitta T, Okseberk J R, Rao N A and Steinman L: Predominant expression of T cell receptor V α 7 in tumorinfiltrating lymphocytes of uveal melanoma. *Science* 249: 672-674, 1990.

29) Okensberg J R, Stuart S, Begovich A B, Bell R B, Erlich H A, Steinman L and Bernard C C A: Limited heterogeneity of rearranged T-cell receptor V α transcripts in brains of multiple sclerosis patients. *Nature* 345: 344-346, 1990.

30) Ortho Multicenter Transplantation Group, A randomized clinical trial of OKT3 monoclonal antibody for acute rejection of cadaveric renal transplantation. *N. Engl. J. Med.* 313: 337-342, 1985.

31) Paliard X, West S G, Lafferty J A, Clements J R, Kappler J W, Marrack P and Kotzin B L: Evidence for the effects of a superantigen in rheumatoid arthritis. *Science* 253: 325-329, 1991.

32) Plaza A, Kono D H and Theofilopoulos A N: New human V β genes and polymorphic variants. *J. Immunol.* 147: 4360-4365, 1991.

33) Posnett D N, Wang C Y and Friedman S M: Inherited polymorphism of the human T-cell antigen receptor detected by a monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 7888-7892, 1986.

34) Roman-Roman S, Ferradini L, Azocar J, Genevee C, Hercend T and Triebel F: Studies on human T cell receptor α/β variable region genes. I. Identification of 7 additional V α subfamilies and 14 J α gene segments. *Eur. J. Immunol.* 21: 927-933, 1991.

35) Rosenberg W M C, Moss P A H and Bell J I: Variation in human T cell receptor V β and J β repertoire: analysis using anchor polymerase chain reaction. *Eur. J. Immunol.* 22: 541-549, 1992.

36) Sasazuki T, Nishimura Y, Muto M and Ota N: HLA-linked genes controlling the immune response and disease susceptibility. *Immunol. Rev.* 70: 51-75, 1983.

- 37) Scherrer K: Isolation and sucrose gradient analysis of RNA. In Habel K and Salzman N P (Eds), *Fundamental Techniques in Virology*, pp413-432, Academic Press, New York, 1969.
- 38) Tian W-T, Skibenns R, Kuibinec J, Henry L, Ko J-L, Yeh G and Ip S: Monoclonal antibodies specific to human T cell antigen receptor V β -beta gene products. *FASEB J.* 3: A486. (abstr), 1989.
- 39) Toyonaga B, Yoshikai Y, Vadasz V, Chin B and Mak T W: Organization and sequences of the diversity, joining, and constant region genes of the human T-cell receptor β chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8624-8628, 1985.
- 40) Tumang J R, Posnett D N, Cole B C, Crow M K and Friedman S M: Helper T cell-dependent human B cell differentiation mediated by a Mycoplasma superantigen bridge. *J. Exp. Med.* 171: 2153-2158, 1990.
- 41) Uematsu Y: A novel and rapid cloning method for the T-cell receptor variable region sequences. *Immunogenetics* 34: 174-178, 1991.
- 42) Uematsu Y, Wege H, Straus A, Ott, M, Bannwarth W, Lanchbury J, Panayi G and Steinmetz M: The T-cell-receptor repertoire in the synovial fluid of a patient with rheumatoid arthritis is a polyclonal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8534-8538, 1991.
- 43) Urban J L, Kumar V, Kono D H, Gomez C, Horvath S J, Clayton J, Ando D G, Sercarz E E and Hood L R: Restricted use of T cell receptor V genes in murine autoimmune encephalomyelitis raises possibilities for antibody therapy. *Cell* 54: 577-592, 1988.
- 44) WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA systems: Nomenclature for Factors of the HLA systems. *Tissue Antigens* 39: 161-173, 1991.
- 45) Yoshikai Y, Kimura N, Toyonaga B and Mak T W: Sequences and repertoire of human T cell receptor α chain variable region genes in mature T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 164: 90-103, 1986.

(受付 1992-12-25)