

ウシ α s1-カゼインにより誘導されるCD8⁺T細胞と
その免疫抑制機能に関する研究

久 恒 辰 博

ウシ α s1-カ⁺インにより誘導される CD8⁺ T 細胞とその免疫抑制機能に関する研究

久恒辰博

目次

略号	ページ
	0
第1章 緒論	1-10
第2章 α s1-カゼインに特異的な CD4 ⁺ ヘルパーT細胞クローンの樹立とその性質:	11-30
序	11-12
材料と方法	13-18
結果	19-28
考察	29-30
第3章 α s1-カゼインに特異的な CD8 ⁺ 抑制T細胞クローン13G2細胞の樹立とその性質:	31-54
序	31-32
材料と方法	33-35
結果	36-50
考察	51-54
第4章 α s1-カゼインに特異的な ポリクローナルCD8 ⁺ T細胞について:	55-86
序	55-57
材料と方法	58-60
結果	61-80
考察	81-86
第5章 α s1-カゼインにより誘導された 自己反応性CD8 ⁺ T細胞株の樹立とその性質:	87-104
序	87-88
材料と方法	89
結果	90-100
考察	101-104
第6章 要約	105-110
論文目録	111
謝辞	112
参考文献	113-117

略号

- Ag: Antigen, 抗原
APC: Antigen-presenting cells, 抗原提示細胞
 α s1-CN: α s1-casein, α s1-カゼイン
CD: Cluster of Differentiation, (細胞表面抗原の総称)
CFA: Complete Freund's Adjuvant, フロイントの完全アジュバント
CNBr: Cyanogen Bromide, シアン化臭素
Con A: Concanavalin A, (タチタマのレクチン)
CPM: Count Per Minute, (取り込んだアイソトプの量)
ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay, 酵素免疫測定法
FACS: Fluorescence-activated Cell Sorter, 蛍光細胞分離装置
FCS: Fetal Calf Serum, ウシ胎児血清
FITC: Fluorescein isothiocyanate, フルセインイソチオシアネート(蛍光色素)
GM-CSF: Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor,
顆粒球マクロファージ-コロニー刺激因子
HEL: Hen Egg White Lysozyme, ニワトリ卵白アルブミン
HPLC: High Performance Liquid Chromatography, 高性能液体クロマトグラフィー
IFN: Interferon, インターフェロン
Ig: Immunoglobulin, 免疫グロブリン
IL: Interleukin, インターロイキン(免疫系に作用する液性因子の総称)
KLH: Keyhole Limpet Hemocyanin, カガイのヘモシアニン
 β -LG: β -lactoglobulin, β -ラクトグロブリン
LPS: Lipopolysaccharide, リポポリサッカライド
mAb: monoclonal Antibody, モノクローナル抗体
MHC: Major Histocompatibility Gene Complex, 主要組織適合遺伝子複合体
NMS: Normal Mouse Serum, 正常マウス血清
PCR: Polymerase Chain Reaction, ホリメラーゼチェーンリアクション
PE: Phycocerythrin, ファイコリスリン(蛍光色素)
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate, ドデシル硫酸ナトリウム
TCR: T cell Receptor, T細胞抗原レセプター
TGF: Transforming Growth Factor, トランスフォーミンググロースファクター
TNF: Tumor Necrosis Factor, 腫瘍壊死因子
Th1: T helper cell type 1, タイプ1ヘルパー-T細胞
Th2: T helper cell type 2, タイプ2ヘルパー-T細胞

第1章 緒論

30年前に“食品アレルギー”についてその重要性を理解していたのは一部の専門家に限られていたであろう。それが今や、この食品アレルギーを含めアトピー性皮膚炎、花粉症、ダニアレルギー、アレルギー性鼻炎など、アレルギー性疾患に関する様々な話題が新聞やテレビといったマスメディアにも大きく取り上げられるようになってきた。アレルギー性疾患で悩む人が増えてきたことが原因であろう。

人間は元来、ウイルスやバクテリアといった生体にとっての異物を排除する機構を有しており、免疫系と呼ばれている。この免疫系が過剰な反応を起こしてしまうのがアレルギーである。アレルギーがここ30年来増えてきた原因の一つとして、人口の都市への一極集中がもたらした深刻な大気汚染が挙げられている(1)。工場や車からの排煙によって、免疫系が過剰に活性化されてしまうためと言われている。これを示す良い例として、近くに杉林を持つ山村の人々より、都会に住む人々の方が花粉症にかかっている割合が高いことが挙げられる。そのほかの原因として、特に食品アレルギーにおいては食生活の変化を、またダニアレルギーにおいては住宅環境の変化が挙げられている。視点を変えてみるとアレルギー性疾患は、急激に発展した文明社会に人類自体が遅れをとったため起きた一種の文明病であると捉える事も出来る。

“アレルギーを科学的に予防あるいは治療することができないであろうか。”我々の研究の出発点である。これらのアレルギー症状は原因物質であるアレルゲンによって引き起こされる事が知られている。特に、育児用粉乳によっておこる乳幼児の牛乳アレルギーの場合、アレルゲンとして牛乳中の蛋白質であるカゼインやラクトグロブリンが挙げられている(2)。このような牛乳アレルギー乳幼児に対する治療法として現在最も効果的な方法は、原因アレルゲンを食事の中から全て除去する食事療法である(3)。そのためこのような乳幼児は主に穀物(コメ、ダイズ、アワ、ヒエなど)から栄養分を摂取することもあるが、これらの穀物に対してもアレルギー症状を示してしまう患者も少なくはなく、このような場合何から栄養を取ればよいのかは深

刻な問題である。

食品アレルギーは経口的に摂取された食品が過度の免疫反応を誘起してしまうために起こる疾病である。健康人においては食品アレルギーにならないためのいくつかのシステムが備わっている。中でも、これから述べる経口寛容現象は中心的な役割を果たしていると考えられている。食品中に存在する蛋白質は極僅かではあるが腸管からそのままの形で吸収される事が知られている。このような蛋白質は当然のことながら生体にとっては異物である。しかしながらこういった投与方法によっては通常の免疫反応は起こらず、特異抗体価もその抗原を腹腔にアジュバントと共に免疫した場合と比較すると極めて低い。またこのように抗原をあらかじめ経口的に投与しておくとその後のアジュバント免疫による抗体価の上昇が著しく抑えられるという現象が多く、研究者によって報告されている(4)。このような経口寛容が全く観察されないマウスの変種(C3H/HeJ)が見いだされており(5)、ヒトにおいても食品アレルギーの発症が遺伝的に制御されていることが推察される。

この経口免疫寛容の成立は基本的には自己免疫寛容の成立機構と類似していると思われる。この自己免疫寛容とは“免疫系は非自己成分であるウイルスや細菌に対して攻撃しこれを排除するが、自己成分に対しては免疫応答は起こさず免疫寛容状態になっている”というBurnetの言葉に代表され(6)、免疫システムの中で最も重要な特性である。自己免疫寛容は基礎免疫学における最重要課題であり、精力的に研究が行われ、トランスジェニックマウスを用いた最新の数多くの研究から、自己成分に対する免疫細胞(T細胞とB細胞)は発生の初期には存在するが、胸腺などにおける教育により消失するかあるいは不応答化することが明らかにされた(7-10)。

この自己寛容が破綻して起きる疾病が自己免疫疾患であり、通常は反応してはならない自己成分に対して免疫系が異常な応答を示してしまうために発症する。悪性関節リウマチ、重症筋無力症、多発性硬化症、全身性エリテマトーデスなどがあげられており(11)、国の難病に指定されている。確かに、自己寛容と経口寛容は基本的には類似したシステムであるが、経口寛容は食べ物により後天的に寛容が誘導

できるという特性がある。そこでこの経口寛容現象を自己免疫疾患の治療に応用するために、実験動物モデルを用いて研究が進められている(12-14)。最近、ハーバード大学のWeinerらはこの経口寛容現象を用いた多発性硬化症の治療を試みており満足のいく結果を得ている(私信)。そして彼らはこの経口寛容の維持に抑制T細胞と呼ばれる調節性細胞が重要な役割を担っている事を示している(15)。

この抑制T細胞は、免疫反応を抑制する細胞としてここ20年来大変注目を集めている細胞集団である。この細胞の発見は1970-71年に行われたGershon & Kondoの実験に遡る(16-17)。彼らは、マウスにおける高濃度のヒツジ赤血球に対するトレランスの誘導がT細胞の存在に依存する事を見出した。引き続き行われた実験において、そのような低応答状態は、トレランスに入ったT細胞により、同系マウスに移入出来ることを示し、このような調節性T細胞のことを抑制T細胞と名付けた。以後精力的に研究が行われ、抑制T細胞は各種のトレランス状態(高濃度トレランス、低濃度トレランス、経口トレランス)及び低応答状態の維持に貢献している事が明らかとなった(18)。また、抑制T細胞によって抑制される免疫反応は抗体産生応答、遅延型過敏症反応、移植片拒絶反応(臓器移植の際にみられる拒絶反応)など非常に多岐に及んでいる事も示されている。さらに興味深いことに、ガン患者においては抑制T細胞の機能昂進が観察されており、これにより、ガン細胞に対する免疫応答が起こりにくくなり、結果としてガンの増殖をもたらしてしまうことが観察されている(19)。この場合は、抑制T細胞の働きを特異的に抑える事が肝要であると思われる。逆に、食品アレルギー患者においては抑制T細胞の機能低下あるいは細胞数の減少が観察されており、これがアレルギー症状の悪化に拍車を駆けているとされている(1)。本研究の最終目標はこの抑制T細胞を用いた食品アレルギーの治療である。

一般にこのアレルギー反応は4つのタイプに類別されている。I型アレルギーは、アレルゲンがマスト細胞上のIgE抗体に結合し、これによってマスト細胞から種々のケミカルメディエーターが放出することによって起こる。II型アレルギーは、自己の細胞の特定の抗原(赤血球抗原など)に対して産生された抗体によって自分自身の細胞が傷

害されてしまう反応である。これは自己免疫性のアレルギー疾患の場合によくみられる。III型アレルギーは、抗原と抗体の凝集体が基底膜などに沈着することによって起こる炎症反応である。この3つの反応は特異抗体を仲介とする液性免疫反応である。IV型アレルギーは、アレルゲンによって感作されたTリンパ球が種々のサイトカインを産生することによって起こる細胞性免疫反応である。これら4つのアレルギー反応全てが食品アレルギーの発症に関与していると考えられている(2)。特に、牛乳アレルギーにおいては、I型アレルギー反応が重要な役割を果たしていると考えられている(3)。4つのアレルギー反応に共通していることは、生体内に侵入してきたアレルゲンによる特異的T細胞の活性化反応がその後の反応の引き金となる点である。そのため抑制T細胞によってこの引き金となるヘルパーT細胞の活性化を抑える事ができたならば、全てのアレルギー反応を抑えることができ、結果的に様々なアレルギー症状の発現を食い止められるものと思われる。

抑制T細胞の性質についてこれまでに明らかになっている点を述べてみることにする。一般的に、T細胞はその表面抗原によって大きく2つのタイプに分類される。CD4⁺T細胞とCD8⁺T細胞である。最近人類に恐怖を与えているAIDSウイルスが感染するのはヒトのCD4⁺T細胞であり、このCD4⁺T細胞画分中には免疫系を促進的に制御するヘルパーT細胞が含まれているため、AIDSによりCD4⁺T細胞が傷害を受けると重篤な免疫不全状態になる。食品アレルギーの発症に関与しているのもこのCD4⁺T細胞であるとされている。もう一方のCD8⁺T細胞画分中にはウイルスなどに感染した細胞を傷害するキラーT細胞や免疫系を抑制的に制御する抑制T細胞などが含まれていることが知られている。T細胞の機能と表面抗原を結び付けたこの分類にはいくつかの例外があることが報告されているが、大半の細胞がこれに準拠すると現在考えられている。

これらのT細胞サブセットの機能に関する細胞生物学的な研究はいくつかのステップを踏んで行われる。まず機能的なT細胞を含む免疫担当器官そのものに何らかの免疫活性があるかどうかを検索する。そしてその中に含まれるT細胞サブセットをそのCD抗原によって分離

し、これらに活性があるかどうかを検討する。抑制T細胞の研究においてこのレベルまでの仕事は実に精力的に行われてきた。その結果、抑制T細胞を多く含むCD8⁺T細胞はIgGやIgEといった抗体産生応答だけではなく、IV型アレルギーに関連した遅延型過敏症反応やII型アレルギーに関与する臓器移植の際の拒絶反応など広範囲にわたる免疫反応を効果的に抑制する事が示された。

しかしながら、前述したようにこのCD8⁺T細胞は均一な細胞集団ではない。キラーT細胞や抑制T細胞など複数の機能的細胞集団を含んでいるため抑制T細胞のみを分離することが望まれた。そのため抑制T細胞に固有の表面抗原を捜す努力が積み重ねられた。東京大学の多田らが発見したI-J分子はこの一つの候補であり(20)、この分子のクローニングが急がれている。その他ヒトの系において、CD11bと呼ばれる細胞表面抗原によってキラーT細胞と抑制T細胞が識別出来るとする報告もあるが(21)、未だに確固とした抑制T細胞マーカーは得られていない。

一般的にT細胞は株化T細胞として継代培養が可能であり、ヘルパーT細胞やキラーT細胞についてはこの株化細胞を用いてかなり詳細に解析が行われ、その機能の全貌がほとんど明らかになっている。抑制T細胞は残念ながら継代培養が非常に難しく、安定な株化抑制T細胞は一つとして得られていなかったため、他のT細胞サブセットに比べ抑制T細胞の研究はかなり立ち遅れている。そのためか一部にはこの抑制T細胞の存在すらも疑い始める声もある。筆者はこれまでに得られた莫大な数の研究結果より、疑いもなく免疫抑制活性を有するT細胞集団が存在していることを確信している。しかしながら、抑制T細胞がキラーT細胞とは全く異なる独立した細胞集団であるかどうかについては未だに最終的な結論は得られていない。現時点で著者は何らかの免疫抑制活性(本論文においては、T細胞増殖応答あるいはB細胞による抗体産生応答に対する免疫抑制活性を指標にした。)を有する細胞は全て抑制T細胞であると定義しており、仮にこの細胞がある環境化においてキラー活性あるいはヘルパー活性を有していても、抑制活性を持つ以上は抑制T細胞として分類可能であると理解している。従ってこのような細胞を以下本論文では抑制T細胞と記述した。

次にこの抑制T細胞における抗原認識および抑制機構について触れてみたい。

一般に、T細胞の抗原認識において、自己の持つMHC（主要組織適合抗原複合体）分子が重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。抗原は抗原提示細胞に取り込まれある程度断片化された後、このMHC分子に結合し抗原提示細胞の細胞表面に提示される。この際、CD4⁺ヘルパーT細胞においてはMHCクラスII抗原と共に提示されたペプチド断片を、またCD8⁺キラーT細胞においてはMHCクラスI抗原と共に提示されたペプチド断片を認識する事が明らかとなっている。これはクラスI分子がCD8分子とまたクラスII分子がCD4分子と親和性を持つことに由来すると考えられている。さらに、ヘルパーT細胞は外来の抗原を主に認識するのに対して、キラーT細胞は主に自己の細胞によって生成された内在性抗原（感染したウイルスの抗原など）を認識することが示されている。このことは抗原の処理方法とMHC分子の細胞内輸送とに密接な関係があるためと考えられている。

抑制T細胞もヘルパーT細胞やキラーT細胞と同様に抗原によって特異的に誘導される事が知られている（22-24）。それでは抑制T細胞はどのように抗原を認識しているのであろうか。これまでに、抑制T細胞は主に可溶性の外来抗原によって特異的に誘導されることが示唆されている（18）。また、数少ないクローン化T細胞を用いた解析から抑制T細胞はこのような可溶性抗原をクラスII抗原拘束的に認識している事が示唆されている（25-26）。これまでに得られたほとんどの抑制T細胞は通常のT細胞レセプターを有しており（27-28）、細かい機構は明らかではないがヘルパーT細胞と類似の形態で抗原を認識していると推察される。また一方で一般的なCD8⁺キラーT細胞は内在性抗原をクラスI拘束的に認識している事が分子論的にも明らかになっているため、CD8⁺抑制T細胞が可溶性抗原を認識するためには通常のT細胞レセプターとは異なった機能分子を用いているのではないかと考えられている（29-31）。

それでは抑制T細胞はどういった機構により免疫応答を抑制しているのであろうか。二通りの機構が考えられる（18）。一つは表面抗

原などを介した細胞間相互作用により免疫応答を抑制しているとするモデルである。現象としての報告は数多く提出されているが、その解析の難しさから研究は分子レベルまでには至っていない。もう一つは、液性因子による免疫抑制である。抑制T細胞の培養上清が免疫抑制活性を有していることが数多く報告されてきた。そのため免疫学者らは、先を急いでこの免疫抑制因子の同定を試みた。多くの場合は、このような抑制因子を大量に産生する抑制T細胞ハイブリドーマの培養上清から、生物活性を指標にして分離精製が行われた。残念ながらこのようなハイブリドーマは概して性質がかなり不安定であり、免疫抑制因子の同定には至らなかった。

この抑制T細胞に限らず、ヘルパーT細胞やキラーT細胞においても少量ながら免疫抑制活性を有するリンホカインを産生していることが知られている。もっとも、通常は過剰のヘルパーリンホカインのために、それらの培養上清に抑制活性が検出されるケースはほとんどない。これら免疫抑制活性を有するリンホカインとしてγ-インターフェロン(32)、トランスフォーミンググロースファクターβ(33)、腫瘍壊死因子(TNF)(34)などが挙げられている。ごくまれに、強い免疫抑制活性を有するCD4⁺T細胞クローンが分離されることがあるが、何らかの影響によりこれらの抑制性リンホカインが多量に産生されたためであると考えられる。CD8⁺抑制T細胞においても同様にこれらの抑制性リンホカインが免疫抑制を担っていることが考えられるが、抑制T細胞のリンホカイン産生については現在のところほとんど分かっていない。

これまで述べてきた抑制T細胞に関する研究は1970年から1980年代の前半に集中して行われたものであり、現在は次に挙げる問題点によりその解析は進展していない。[1] 安定な抑制T細胞株を得ることが難しい点。[2] その抑制機構を担う機能分子が同定されていない点。[3] その抗原認識が不明な点。この問題点も含め、抑制T細胞に関して行われた代表的な研究を年代順に列挙してみた(表1-1)。

表1-1 抑制T細胞研究の流れ

年代	事象	論文
1970	Gershon & Kondoによる抑制T細胞の発見	16-17
1971	抑制T細胞によるIgE応答の抑制	35-37
1973	抑制T細胞による免疫抑制因子の産生	38
1974	各種のトレランスにおける抑制T細胞の関与	39-41
1976	担癌状態における抑制T細胞の関与	19
1977	CD 8 ⁺ 抑制T細胞の証明	42
1978	抑制T細胞エピトープの発見	43
1979	抑制T細胞サーキットの解明	44
1979	抑制T細胞ハイブリドーマの分離	45
1981	CD 8 ⁺ 抑制T細胞クローンの分離	46-47
1981	コントラ抑制T細胞の発見	48
1983	CD 4 ⁺ 抑制T細胞クローンの分離	49-50
1986	ライ病患者からの抑制T細胞株の分離	51-52
1987	ヘルパーT細胞による免疫抑制の可能性	53
1989	CD 8 ⁺ キラーT細胞による免疫抑制の可能性	54-55
1989	経口寛容現象における抑制T細胞の役割	15

現在の問題点

- [1] 安定な抑制T細胞株を得ることがかなり難しいこと
- [2] その抑制機構を担う機能分子が同定されていないこと
- [3] 抑制T細胞の抗原認識機構が不明である点

このような研究の歴史的背景のもとで、抑制T細胞の食品アレルギーへの応用を考える際、まず抑制T細胞の基本的な性質を明らかにすることが先決であると思われた。そのため食品アレルギーはヒトの疾患ではあるが、本研究の開始にあたり詳細な解析が可能であるマウスの系を採用した。抑制T細胞を誘導する抗原としては、将来的な食品アレルギーへの応用を鑑みウシ α s1-カゼインを用いた。この α s1-カゼインは牛乳中の総蛋白質の35%を占める主要な蛋白質であるが、乳幼児の牛乳アレルギーにおいては主要なアレルゲンであることが示されている(2)。当研究室青木らの研究によると、C57BL/6マウスは他の系統のマウスと比較するこの α s1-カゼインに対する免疫応答が低い事が示されている(56)。このため、C57BL/6マウスにおいて、この抗原に対する抑制T細胞が誘導されていることが予想される。さらにこのような抑制T細胞は特異抗原の免疫により増加することが挙げられているため(18)、本研究においてはカゼインの免疫によりC57BL/6マウス中に誘導されるCD8⁺抑制T細胞をモデル系に設定した。そして〈1〉抑制T細胞はどのようにして抗原を認識し誘導されるのか、さらには〈2〉これらの抑制T細胞が抑制作用を示す際の機能分子は何なのか、の以上2点に的をしぼり、株化T細胞およびポリクローナルT細胞を用いて解析を進めた。

抑制T細胞の免疫抑制活性を感度よく検知するためには、適切なアッセイ系を開発することが必要である。先に述べた様に、抑制T細胞がすべてのアレルギー症状を抑えるには、ヘルパーT細胞の活性化を阻害しなければならないと思われる。このヘルパーT細胞の活性化反応は株化ヘルパーT細胞を用いると簡便に測定する事が出来る。そこで第2章において α s1-カゼインに特異的なCD4⁺ヘルパーT細胞クローンの樹立を行った。そして、このヘルパーT細胞クローンの増殖応答を抑制する細胞を抑制T細胞とし、このスクリーニング系を用いて α s1-カゼインに特異的なCD8⁺抑制T細胞クローン13G2細胞を得ることに成功した。さらにこの細胞株の培養上清中にヘルパーT細胞の増殖を抑制する免疫抑制因子が産生されていることが見いだされた(第3章)。この物質は以後の解析により、ヘルパーT細胞が産生する抑制性のリンホカインであるインターロイキン-10であること

が明らかとなっている(57)。これら株化細胞である13G2細胞で得られた情報が普遍性を持つか否かは極めて重要な問題である。そこで、抑制T細胞を多く含んでいる免疫したリンパ節のCD8⁺T細胞画分を用いて抑制T細胞の抗原認識およびリンホカイン産生について総括的な解析を行った。その結果13G2と類似したCD8⁺抑制T細胞がこのリンパ節中に相当数存在していることが示された。(第4章)。また今回の研究によって、 α s1-カゼインを免疫したマウスより自己成分に反応性を有するCD8⁺T細胞クローンを樹立することができた。この細胞も免疫抑制活性を有しており、新しいタイプの抑制T細胞である可能性が高い(第5章)。このように牛乳アレルギーである α s1-カゼインに低応答性であるC57BL/6マウスには様々な種類の抑制T細胞が誘導されており、これらにより免疫応答が抑えられていることが示唆された。

第2章 α S1-細胞に特異的なヘルパー-T細胞クローンの樹立とその性質

序

抑制T細胞の免疫抑制活性を検定する系として、CD4⁺ヘルパーT細胞クローンを用いるに当たり、この細胞の応答性を熟知しておく必要がある。T細胞クローンを用いた多くの研究から抗原特異的にT細胞を刺激するには特異抗原を提示した抗原提示細胞が必要不可欠である事が確かに示されている。抗原のみによって刺激されるB細胞とは全く異なる点である。これはT細胞の抗原認識分子であるT細胞レセプターが抗原提示細胞上に表現された自己のMHC分子と共に抗原を認識していることに由来する。外来の抗原である食品アレルギーはMHCクラスII分子と共に抗原提示細胞の細胞表面に提示される（これはクラスII分子に拘束的な抗原の提示と呼ばれている）。通常、蛋白質抗原は特定の3次構造を取っているケースが多いため、このままの状況ではMHC分子に結合することは困難である。そのため、抗原提示細胞に取り込まれたこれらの抗原は酵素作用などによって部分的に分解された後、その抗原由来のペプチド断片がMHC分子の表面に張り付く様にして提示され、これがT細胞を活性化する（58）。一方で、安定な3次構造を取りにくい一部の蛋白質抗原においては抗原処理をうけずに、そのままの状態では提示されているケースも報告されている（59-61）。いずれにせよ抗原を提示したMHC分子とT細胞レセプターが結合することにより、T細胞の内部に刺激が伝達される。

T細胞が生理的な応答を示すためには、このT細胞レセプターを介した抗原刺激のほかに、T細胞表面のその他の細胞接着因子を介した追加的な刺激が必要であるとされている。これらは共時的刺激（Costimulatory Signal）と総称され、活性化した抗原提示細胞上の蛋白質分子などにより刺激が伝達されると考えられている。このようにして活性化されたヘルパーT細胞は種々のリンホカインを産生することによりT細胞やB細胞の増殖や分化といった一連の免疫応答を促進的に制御する事が示されている。

このようなヘルパーT細胞の働きを抑制する事ができたならばその

後の免疫応答（アレルギー反応など）を抑制することが可能になると考えられる。そこで、本章においては α s1-カゼインに特異的な HLA^b -T細胞クローンの樹立を行い、これらのT細胞クローンの抗原認識あるいは応答性について検討を行った。この細胞株は抑制T細胞のスクリーニングのための有効な実験系を提供するだけでなく、この細胞株で得られた基礎データはその後の抑制T細胞クローンの解析においても貢献するものと期待される。

（以下は非常に薄い文字で印刷された文章であり、ほとんど読み取れない。内容は上記の段落と関連すると思われる。）

表 1. 樹立された抑制T細胞クローンの特性

クローン番号	HLA型	抗原認識	抑制活性	自己反応性
107B.10	B*0801	+	+	-
107B.12	B*0801	+	+	-
107B.14	B*0801	+	+	-
107B.15	B*0801	+	+	-
107B.16	B*0801	+	+	-
107B.17	B*0801	+	+	-
107B.18	B*0801	+	+	-
107B.19	B*0801	+	+	-
107B.20	B*0801	+	+	-
107B.21	B*0801	+	+	-
107B.22	B*0801	+	+	-
107B.23	B*0801	+	+	-
107B.24	B*0801	+	+	-
107B.25	B*0801	+	+	-
107B.26	B*0801	+	+	-
107B.27	B*0801	+	+	-
107B.28	B*0801	+	+	-
107B.29	B*0801	+	+	-
107B.30	B*0801	+	+	-
107B.31	B*0801	+	+	-
107B.32	B*0801	+	+	-
107B.33	B*0801	+	+	-
107B.34	B*0801	+	+	-
107B.35	B*0801	+	+	-
107B.36	B*0801	+	+	-
107B.37	B*0801	+	+	-
107B.38	B*0801	+	+	-
107B.39	B*0801	+	+	-
107B.40	B*0801	+	+	-
107B.41	B*0801	+	+	-
107B.42	B*0801	+	+	-
107B.43	B*0801	+	+	-
107B.44	B*0801	+	+	-
107B.45	B*0801	+	+	-
107B.46	B*0801	+	+	-
107B.47	B*0801	+	+	-
107B.48	B*0801	+	+	-
107B.49	B*0801	+	+	-
107B.50	B*0801	+	+	-

実験材料と方法

動物

マウスが免疫学研究においてかくも多く用いられるのはそのとり扱い易さもさることながら、主要組織適合抗原 (MHC) 遺伝子にリンクした多くの近交系マウスが存在する点にある。そこで今回はH-2ハプロタイプの異なるC57BL/6(H-2b)、C3H/He(H-2k)、BALB/c(H-2d) (チャールズリバー・ジャパンより購入) および種々のH-2コンジェニックマウス (東大免疫学教室より供与) を実験に用いた。これらのH-2遺伝子座を表2-1に示した。クラスI遺伝子産物はKおよびD分子であり、クラスII遺伝子産物はI-AおよびI-E分子である。なおC57BL/6などにおいてはI-E分子は発現されていない。またB6.C-H-2^{bm12}(bm12)はクラスII分子に突然変異を起こした変異マウスである。

表2-1 近交系マウスのH-2遺伝子座

マウス	略称	H-2 遺伝子座			
		K	I-A	I-E	D
C57BL/6	B6	b	b	—	b
C57BL/10	B10	b	b	—	b
C3H/He	C3H	k	k	k	k
BALB/c	BALB	d	d	d	d
B10.BR	BR	k	k	k	k
B10.MBR	MBR	b	k	k	q
B10.A	B10.A	k	k	k	d
B10.A(2R)	2R	k	k	k	b
B10.A(3R)	3R	b	b	k	k
B10.A(4R)	4R	k	k	—	b
B10.A(5R)	5R	b	b	k	k
B6.C-H-2 ^{bm12}	bm12	b	bm12	—	b

抗原

α s1-カゼイン(バリエントB)はDEAE-Sephacelを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーにより調製し(62)、HPLCにより精製したものを実験に用いた。T細胞によって認識される抗原決定基を検索するために、 α s1-カゼインのCNBr分解フラグメント(1-54,61-123,136-196)、トリプシン分解フラグメント(43-58, 104-119, 133-151, 152-193)をHPLCにより精製し(63)、実験に供した。また、ペプチドシンセサイザー430Aにより合成した α s1-カゼインの全領域をカバーする十三種の合成ペプチドを用いた(64)。 α s1-カゼインの配列およびこれらのペプチドを図2-1に記載した。そのほかにニトリ卵白アルブミンを抗原として用いた。

1 Arg-Pro-Lys-His-Pro-Ile-Lys-His-Gln-Gly-Leu-Pro-Gln-Glu-Val-Leu-Asn-Glu-Asn-Leu-20
 Leu-Arg-Phe-Phe-Val-Ala-Pro-Phe-Pro-Gln-Val-Phe-Gly-Lys-Glu-Lys-Val-Asn-Glu-Leu-40
 Ser-Lys-Asp-Ile-Gly-Ser-Glu-Ser-Thr-Glu-Asp-Gln-Ala-Met-Glu-Asp-Ile-Lys-Gln-Met-60
 Glu-Ala-Glu-Ser-Ile-Ser-Ser-Ser-Glu-Glu-Ile-Val-Pro-Asn-Ser-Val-Glu-Gln-Lys-His-80
 Ile-Gln-Lys-Glu-Asp-Val-Pro-Ser-Glu-Arg-Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu-Glu-Gln-Leu-Leu-Arg-100
 Leu-Lys-Lys-Tyr-Lys-Val-Pro-Gln-Leu-Glu-Ile-Val-Pro-Asn-Ser-Ala-Glu-Glu-Arg-Leu-120
 His-Ser-Met-Lys-Glu-Gly-Ile-His-Ala-Gln-Gln-Lys-Glu-Pro-Met-Ile-Gly-Val-Asn-Gln-140
 Glu-Leu-Ala-Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu-Phe-Arg-Gln-Phe-Tyr-Gln-Leu-Asp-Ala-Tyr-Pro-160
 Ser-Gly-Ala-Trp-Tyr-Tyr-Val-Pro-Leu-Gly-Thr-Gln-Tyr-Thr-Asp-Ala-Pro-Ser-Phe-Ser-180
 Asp-Ile-Pro-Asn-Pro-Ile-Gly-Ser-Glu-Asn-Ser-Glu-Lys-Thr-Thr-Met-Pro-Leu-Trp-OH199

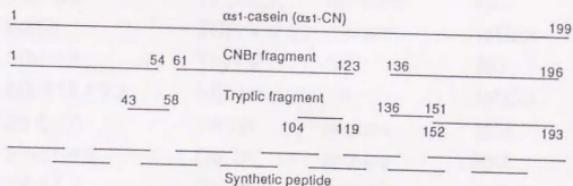


図2-1 α s1-カゼインのアミノ酸配列(上図)およびそのペプチド(下図)
 Ser: Phosphoserine

抗体

免疫生化学研究において特異抗体の果たす役割は大きい。特に、モノクローナル抗体は特異性の定まった抗体を大量に調整することが可能であり、しかもハイブリドーマとしての流通が一般化しているため利用価値が高い。主な研究用途として、蛍光抗体法を用いた細胞の識別、酵素抗体法を用いた微量成分の定量、特定蛋白質の機能阻害実験などが挙げられる(65)。本研究においては、T細胞あるいは抗原提示細胞の表面抗原に対する抗体、さらにリンホカインに対する抗体を用いた(表2-2)。これらの抗体は抗体産生ハイブリドーマの培養上清または腹水を硫酸沈殿により濃縮して用いた。また必要に応じて、アフィニータカラム(MAPS2キット)を用いてこれらの抗体を精製した。

表2-2 モノクローナル抗体

名前	特異性	由来	サブクラス	参考文献
145-2C11	CD3	hamster	ND	66
GK1.5	CD4	rat	IgG2b	67
53-7-313	CD5	rat	IgG2a	68
83-12-5	CD8 α .2	mouse	IgM	69
53-6-72	CD8 α .fw	rat	IgG2a	68
H57-597	TCR.C β	hamster	ND	70
F23.1	TCR-V β 8	mouse	IgG2a	71
30-H12	Thy1.2	rat	ND	68
M5/114.15.2	I-Ab.fw	rat	IgG2b	72
25-5-16	I-Ab.pv	mouse	IgM	73
27-11-13	Db, Dd	mouse	IgG	73
28-14-8	Db(Lb)	mouse	IgG2a	74
20-8-4	Kb(Qa2)	mouse	IgG2a	73
11B11	IL-4	rat	IgG1	75
SXC-1	IL-10	rat	IgM	76
XMG-1	γ -IFN	rat	ND	77

pv: private epitope, fw: flame work ND: not determined

リンホカイン

T細胞をin vitroで長期にわたり培養するためには、血清成分のほかに種々の増殖因子（リンホカイン；主にIL-2）が必要となる。この目的でRosenbergらの方法に準じ（78）ラットよりこのT細胞増殖因子を調製した。ラットの脾臓細胞を 5×10^6 /mlの濃度で、10%牛胎児血清・2-メルカプトエタノール 5×10^{-5} M・ペニシリン $100 \mu\text{g/ml}$ ・ストレプトマイシン 100U/ml 入りRPMI1640培地中 37°C ・ $5\% \text{CO}_2$ の条件でConA($5 \mu\text{g/ml}$)と共に2日間培養した。そしてこの培養上清を、 0.15M α -メチルマンノシド（Sigma社より購入）を用いて残存するConAを中和した後遠心し($2000 \times \text{G}$ で10分)、これをフィルター($0.22 \mu\text{m}$)滅菌しT細胞増殖因子を得た。また細胞株によっては増殖因子として組換え体ヒトIL-2（武田薬品工業より供与された）を用いた。

培養細胞株

抗原提示細胞の固定化実験において、ニワトリ卵白アルブミンの領域74-82に反応するT細胞ハイブリドーマAO1T.2.11細胞（79；UCLAのSercarz博士より供与）をコントロール細胞として用いた。この細胞の反応性はそのIL-2産生により評価された。

FACSによる細胞表面抗原の解析

これまでにT細胞に関して数々の表面マーカーが報告されており、この表面マーカーとT細胞の持つ機能についてたくさんの研究がなされてきた。そのため新しくT細胞クローンを樹立した際、その持つ表面マーカーを明らかにすることは他のクローンとの比較になるばかりか後の解析に対して非常に重要な情報となり得る。本研究においては2次抗体を用いる間接法により得られたT細胞クローンの表面抗原を解析した。まず細胞(10^5)を試験管に入れ遠心した後ペレットとした。これに各種抗体を $100 \mu\text{l}$ 加え、 4°C で30分間インキュベートした。これを遠心洗浄した後、抗体の由来に応じてFITC-標識の2次抗体を $50 \mu\text{l}$ 加え同条件でインキュベートした。そして遠心洗浄の後、プロピオディウムアイオデートを適量加えて死細胞を染色し（室温で1分）これを遠心洗浄した後サンプルとした。

T細胞クローンの樹立およびその増殖応答の測定法

ここ数年免疫学においてT細胞に関する研究が数多くなされこの分野が飛躍的に進歩した。このきっかけとなったのがKimotoとFathmanによって開発されたクローン化T細胞法である(80)。これによりそれぞれのT細胞は株化細胞として解析され、その性質が明らかとなった。この解析により、T細胞はいくつかの明確なサブクラス(免疫増強能があるヘルパーT細胞・細胞傷害活性を有するキラーT細胞・免疫抑制能がある抑制T細胞など)に分類可能であることが示唆された。

T細胞のクローン化に用いた方法は次のとおりである。 α s1-カゼインをアジュバント(CFA)と共にエマルジョン化し、マウスの両フットパッドおよび尾底部に一匹当たり50 μ g免疫した。そして、この1週間後にこのマウスのリンパ節細胞($10^7/5$ ml)を抗原(α s1-カゼイン)と共にフラスコ内で培養した。さらにこの1週間後に10%T細胞増殖因子・X線照射を行った同型マウスの脾臓細胞(抗原提示細胞)(10^6 /ml)と共に抗原で反復刺激した。そして培養開始2週間後に96wellプレート(falcon 3072)を用いて限界希釈法(0.3-3/well)によりクローン化を行った。その後1週間毎に抗原で反復刺激し増殖が観察された細胞を24wellプレートさらに5mlフラスコと拡大し数種のクローンを得た。図2-2にT細胞クローン化のプロトコルを示す。

T細胞クローンの抗原特異的な増殖を検討するためにT細胞増殖試験を行った。 2×10^4 個のT細胞クローンを3000-radでX線照射した同系の脾臓細胞(2×10^5)の存在下、抗原と共に培養した(96 well plate, 200 μ l)。そしてこの3日後に 3 H-チミジンを加え、20時間後に細胞を回収し、その増殖性をチミジンの取り込みにより評価した。各々の実験は3連で行い、その平均値および標準偏差を結果として表示した。

一般に、T細胞に抗原を提示する際、抗原提示細胞により抗原が断片化されることが必要である。このような抗原処理能力を持たない抗原提示細胞を調製することも可能である。今回は、脾臓細胞を0.1%パラホルムアルデヒドにより1分間処理し細胞を固定した。そして遊離の薬剤を洗浄し、固定化抗原提示細胞として実験に用いた(81)。

C57BL/6マウスのフットパッドおよび尾底部に
 α s1-抗原をフロイントの完全アジュバントと共に免疫する

↓
免疫の7-10日後にマウスよりリンパ節細胞を取り出し、
抗原と共にin vitroで培養を開始する

↓
この1週間後に培養している細胞を抗原提示細胞および
T細胞増殖因子の存在下、再度抗原で刺激する

↓
さらに1週間後にこれらの細胞を限界希釈し、
前述の抗原刺激を繰り返しながら、数週間にわたり培養を行う

↓
このようにして得られた株化細胞がT細胞クローンである

図2-2 T細胞クローンの分離方法

結果

ヘルパーT細胞クローンの作製

α s1-カゼインを免疫したリンパ節細胞を抗原で反復刺激し、限界希釈法によりクローン化を行った。この中から α s1-カゼインに応答する細胞を選択するために、 2×10^4 個のT細胞クローンを 2×10^5 個の抗原提示細胞の存在下 α s1-カゼインで刺激し、細胞の増殖性をチミジンの取り込みにより評価した(表2-3)。このようにして α s1-カゼインに特異的なT細胞クローン3D20および11D4が得られた。FACSによる表面抗原の解析によりこれらのクローンはCD3⁺, CD4⁺, CD5⁺, Thy-1⁺, CD8⁻であることが示された(図2-3)。またこれらのクローンは特異的な刺激によりIL-2を産生するヘルパーT細胞であることが示唆されている(82)。本章においては細胞の応答性が良好な3D20細胞について、その抗原認識に関する解析を進めた。

ヘルパーT細胞クローン3D20の抗原特異性

3D20細胞のMHC拘束性を検討するために、この細胞をB10コンジェニックマウスの脾臓細胞の存在下、抗原で刺激した。この結果、3D20はB10およびB10.5Rの抗原提示細胞の共存下において刺激したときにのみ応答性を示すことが観察された。またこの3D20細胞はクラスII分子であるI-A^b分子にポイントミューテーションが入っているbm12マウスでは刺激できないことが示された(表2-4)。そのため、この3D20はMHCクラスII抗原であるI-A^bに拘束されて α s1-カゼインを認識していると考えられた。

3D20細胞のエピトープ特異性を α s1-カゼインの部分合成ペプチドを用いて検討した。その結果、13種の合成ペプチドの中で、136-155のペプチドのみが反応性を有することが示された。さらにこのペプチドのトリプシン分解物であるペプチド136-151にも刺激活性があることが確認された。このため3D20のエピトープは領域136-151に含まれていることが示された。次に、抗原としてペプチド136-151、ペプチド136-196、および未処理

表 2-3 T細胞クローンの抗原応答性

クローン	抗原提示細胞	α s1-カ ^e イン	増殖反応 (cpm)
3 D 2 0	-	-	1178 \pm 278 ^a
	+	-	1240 \pm 112
	+	+	70963 \pm 2199
1 1 D 4	-	-	707 \pm 277
	+	-	791 \pm 474
	+	+	34015 \pm 1818

T細胞クローン(2×10^4)を抗原提示細胞(2×10^5)の存在下、 α s1-カ^eイン(100 μ g/ml)で刺激した。培養開始3日目にチミジンをパルスし、4日目に細胞をハーベストした。

^a Mean \pm SD

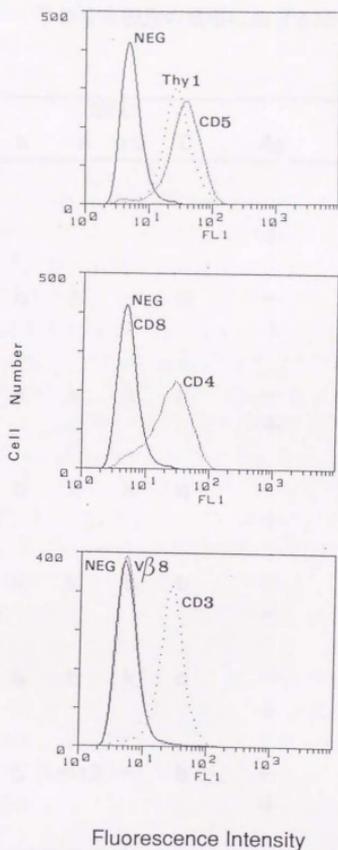


図 2-3 ヘルパーT細胞クローン (3D20) の表面抗原
11D4細胞も同様なパターンを示した。

表 2-4 3 D 2 0 細胞の増殖におけるMHC拘束性

APC	MHC				Ag	T cell response (cpm)
	k	I-A	I-E	D		
—					—	324±119
					+	503±128
B10	b	b	—	b	—	577±178
					+	87492±8100
BR	k	k	k	k	—	636±89
					+	1417±546
MBR	b	k	k	q	—	696±335
					+	915±363
4R	k	k	b	b	—	570±130
					+	1005±196
5R	b	b	k	d	—	512±212
					+	116758±9486
bm12	b	bm12	—	b	—	516±215
					+	2457±999

3 D 2 0 細胞を各々の抗原提示細胞の存在下、抗原 (α s1-カゼイン) で刺激した。

の α s1-カゼインを用い、それぞれの抗原のT細胞刺激活性の強さを検討した。図2-4に示すように、ペプチド136-151が最も良好な刺激活性を有しており、順に α s1-カゼイン、ペプチド136-196であることが示された。

3D20細胞の増殖に対する抗原処理の影響

α s1-カゼインは安定な高次構造を取りにくいため、抗原提示細胞による抗原処理を受けなくてもT細胞を刺激しうる可能性が考えられた。この抗原処理能力は抗原提示細胞を固定化することにより失活させられることが明らかとなっている(58)。本実験においてこの固定化の条件を検討するために、卵白アルブミンに特異的なT細胞ハイブリドーマを用いた。なおこの細胞の反応性はIL-2産生により評価した。図2-5に示すように、パラホルムアルデヒドにより固定化した抗原提示細胞はあらかじめ断片化されたペプチド抗原を用いた場合にのみこのハイブリドーマを刺激することができるが、未処理のHELを用いた場合はハイブリドーマを刺激できないことが観察された。また通常のX線照射した抗原提示細胞によって、双方の抗原は共にT細胞刺激活性があることが示された。これらの結果から、この固定化抗原提示細胞は、抗原処理能力はないものの、抗原提示作用は有していることが確認された。一般的に、ペプチド抗原は抗原処理を受けなくても直接MHC分子に結合できることが示されているため(83-84)、まずペプチド136-151によって3D20細胞が刺激可能であることを確認した(図2-6)。この際通常のX線照射した脾臓細胞を用いた場合に比べ弱い応答性であるのは、固定化抗原提示細胞には共時的刺激を伝達する能力が欠落していることが挙げられる。次にこの固定化抗原提示細胞を用いてT細胞クローンを未処理の α s1-カゼインで刺激した。この結果、弱いながら増殖応答が観察され、 α s1-カゼインは抗原提示細胞による抗原処理を受けなくてもT細胞を刺激しうることを示された。なお、この際の刺激活性の大きさは、ペプチド136-151>ペプチド136-196>未処理の α s1-カゼインであることが示された。

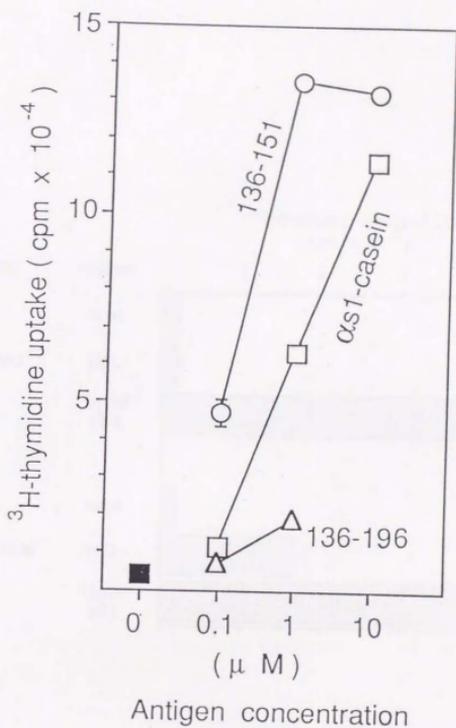


図2-4 X線照射脾臓細胞を用いた場合のT細胞刺激活性
 3D20細胞をX線照射脾臓細胞の存在下、各々の抗原で刺激し、
 その応答性をチミジンの取り込みにより評価した。

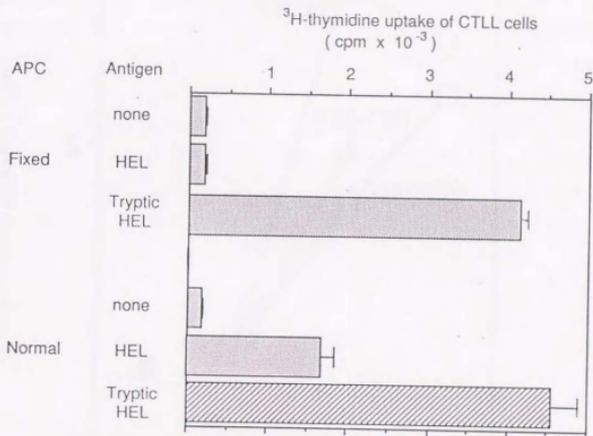


図 2-5 固定化脾臓細胞によるハイブリドーマ細胞のIL-2産生
HELに対するT細胞ハイブリドーマを固定化(Fixed)あるいはX線照射
(Normal)脾臓細胞の存在下、抗原(Intact-HEL, Tryptic-HEL)で刺激した
(79)。そしてこの細胞の培養上清をIL-2依存性株であるCTLL細胞に添
加し、CTLL細胞の増殖によりこのT細胞ハイブリドーマの応答 (IL-2
産生) を間接的に評価した。

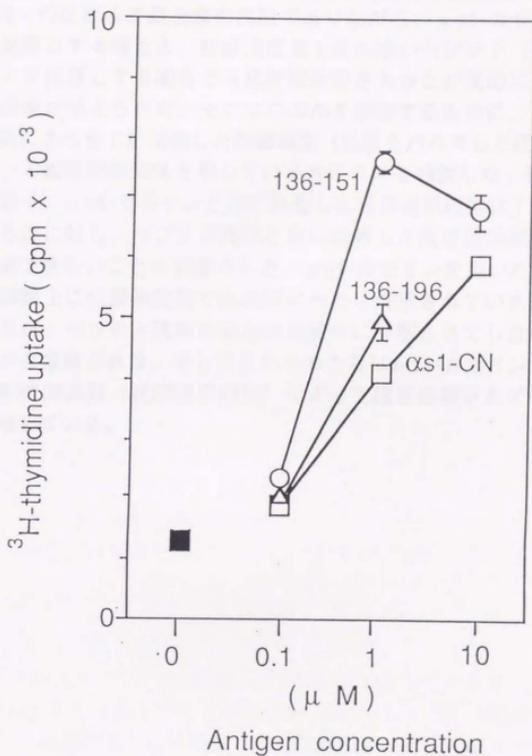


図2-6 固定化脾臓細胞によるT細胞刺激
 3D20細胞をFixed APCの存在下、各々の抗原で刺激した。

T細胞活性化におけるペプチド抗原と蛋白質抗原の質的な差異

同一の抗原決定基を含む抗原でありながら、 α s1-カゼインそのものを抗原とする場合と、抗原決定基を含む短いペプチド（136-151）を抗原とする場合では抗原提示のされかたが質的に異なっている可能性が考えられた。そこでこの点を検討するために、これらの抗原と共にあらかじめ培養した脾臓細胞（抗原をバルスした抗原提示細胞）が、T細胞刺激活性を有しているかどうかを検討した。表2-5に示す通り、 α s1-カゼインと共に培養した抗原提示細胞はT細胞を刺激できるのに対し、ペプチド抗原と共に培養した抗原提示細胞はT細胞を刺激できないことが観察された。 α s1-カゼインを用いた場合は抗原提示細胞上に抗原決定基が長時間にわたり提示されていたものと考えられるが、ペプチド抗原の場合は培養中に分解されてしまったのではないかと推察される。そしてこれらのことは α s1-カゼインが通常のX線照射脾臓細胞（抗原提示細胞）によって抗原処理されている可能性を示唆している。

表 2-5 抗原で前処理した抗原提示細胞による T 細胞刺激

Stimulation	³ H-thymidine uptake (cpm x 10 ⁻³)
None	3.2±0.8
α _{s1} -casein-pulsed APC	47.3±4.6
136-151-pulsed APC	3.8±0.2
APC plus 136-151	185.3±20.1

C57BL/6マウスの脾臓細胞をα_{s1}-casein(40 μM)およびペプチド^{*}136-151(40 μM)の存在下で20時間培養した。そして遊離の抗原を洗い流し、これらの細胞をX線照射し、α_{s1}-casein pulsed APCあるいは136-151 pulsed APCとして3D20細胞の刺激に用いた。さらに、陽性コントロールとして、3D20細胞をX線照射脾臓細胞の存在下においてペプチド136-151で刺激した(APC plus 136-151)。

考察

本章において、 α s1-カゼインに特異的なヘルパーT細胞クローン(3D20と11D4)を樹立することに成功した。この3D20細胞はMHCクラスII分子であるI-A^b分子と共に α s1-カゼインの領域136-151を認識していることが示された。この α s1-カゼインは固定化した抗原提示細胞を用いても3D20細胞をある程度刺激することが可能であるが、このT細胞クローンが生理的な増殖応答を発揮するためには抗原提示細胞による抗原刺激以外の共時的刺激が必要であることが示唆された。このように性質が詳細に解析されたヘルパーT細胞クローンをスクリーニング系として用いることにより、抑制T細胞クローンが樹立されることが期待される。

本研究の本題から幾分ずれてはしまうが、今回得られた実験結果は、抗原のT細胞活性化能力は抗原処理作用により著しく影響されることを示すものである。一般に、外来性の蛋白質抗原は抗原提示細胞に取り込まれある程度断片化された後、自己のMHCクラスII分子と共に細胞表面に提示され、これにより該当するT細胞を活性化する(58)。一方、抗原として酵素処理などによって既に断片化された抗原フラグメントを用いた場合、これは直接抗原提示細胞の表面に存在するMHC分子に結合できるため、抗原処理を受けなくてもT細胞を活性化することができる(83-84)。ところで、抗原フラグメントと未処理の抗原はT細胞の刺激において幾分異なった挙動を示すことも報告されている(85-87)。我々の実験系においても、ペプチド抗原は未処理の蛋白質抗原よりもT細胞刺激能力が優れていることが示されている。特に、固定化抗原提示細胞を用いた場合、それぞれの抗原の刺激活性が短いペプチド>長いペプチド>未処理の蛋白質の順になったことは、抗原決定基以外の部分が抗原決定基のT細胞刺激能力に悪影響を及ぼしていることを示唆するものと考えられる。

一方、通常のX線照射脾臓細胞を抗原提示細胞として用いた場合、未処理の α s1-カゼインの方がペプチド136-196よりも刺激活性が優れていることが観察された。これは、固定化した抗原提示細胞を用いた場合と矛盾する結果である。また α s1-カゼインは通常の抗原提示

細胞において抗原処理を受けている可能性が挙げられている。そこで、この矛盾点を説明するものとして次のモデルが挙げられる（図2-7）。固定化抗原提示細胞において、抗原決定基によるT細胞刺激活性は抗原分子内のそれ以外の領域によって阻害される。しかしながら、通常の抗原提示細胞を用いた場合は抗原処理によって、抗原決定基以外の部分による阻害作用が打ち消されてしまうため、刺激活性の大きさの順番が逆転してしまったのではないかというものである。このモデルの是非は今後の課題としても、今回の研究により抗原処理作用が抗原の刺激活性に大きな影響を及ぼしていることが示された。これらの研究結果がペプチドワクチンの設計などに利用されることが期待される。

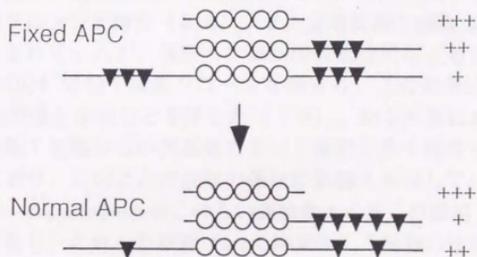


図2-7 抗原決定基のT細胞刺激活性に及ぼす
抗原決定基以外の領域の阻害効果（モデル）

抗原決定基による刺激活性は○○○○○で示した。また、それ以外の領域による阻害活性は▼で示した。なお各条件における抗原の刺激活性の強さを+++>++>+とした。

第3章 α s1-カゼインに特異的なCD8⁺抑制T細胞クローン13G2 細胞の樹立とその性質

序

抑制T細胞の免疫抑制機構を解析するためには、この細胞の生体内での振舞いを正確に反映し、かつ長期培養が可能な細胞株が必要である。この目的で、KimotoとFathmanにより開発されたクローン化T細胞法(80)を用いて抑制T細胞のクローン化が試みられ、これまでに極く僅かの抑制T細胞クローンが得られた。Fresnoらはヒツジ赤血球に特異的な抑制T細胞クローンを得、これが抗原特異的に抗体産生を抑制する因子を産生していることを見いだした(46-47)。多田らはKLHで過免疫されたマウスの脾臓細胞からこのKLHに結合するものを分画し、抗原特異的な抑制効果を有する抑制因子を分泌する抑制T細胞クローンを得た(88)。また従来抑制T細胞はCD8⁺T細胞であるとされていたが、浅野らは細胞間相互作用による免疫抑制効果を有するCD4⁺抑制T細胞クローンを樹立し、この効果に抗原特異性とMHC拘束性があることを示した(49)。ヒトの系において、このような抑制T細胞はらい病患者において非常に多く存在することが観察されており、このことが症状の悪化に影響を及ぼしていることが示唆されている。Bloomらはこのらい病患者より多くの抑制T細胞クローンを得ており、これらの細胞はMHC拘束的にT細胞の増殖応答を抑制することを示している(51)。しかしながら一般にこれらのクローンはin vitroにおける増殖性が芳しくなく、その免疫抑制作用も消失してしまうことが多かったため、抑制機構に関する詳細な解析はあまり進まなかった。

一方で、HeuerとKölschはBSAに対して寛容状態にあるマウスよりクラスII拘束的に抗原を認識するキラーT細胞クローンを分離し、この細胞が免疫抑制活性を有していることを示唆した(89-90)。同様にShinoharaらは抗原特異的なキラーT細胞が抗原を提示したB細胞を傷害することにより、抗原特異的な抗体産生応答を抑制していることを示した(54、55)。抑制T細胞の定義については様々な見解

があるが、本論文においては“抑制T細胞とは何らかの免疫抑制作用を有する細胞”としてとり扱っており、この範疇においてはこれらのキラーT細胞も抑制T細胞として捉えることもできる。この第3章においては、 α s1-カゼインに特異的なヘルパーT細胞クローンの増殖を抑制する活性を有する安定な抑制T細胞クローンを樹立することを試みた。

実験材料と方法

動物、抗原、リンホカイン、抗体 第2章に記載

そのほかにKLH、 β -ラクトグロブリン、リホホリサッカライドを抗原あるいはマイトジェンとして用いた。

培養細胞株

抗原提示細胞株としてマウスL細胞にI-A^b構造遺伝子を導入したFT2.3細胞(91;千葉大学の斉藤博士より供与)を用いた。

T細胞クローンの作製法については第2章(P17)に記載した方法を採用した。その結果、 α s1-カゼインに特異的なCD8⁺T細胞クローン13G2、および2種のCD4⁺T細胞クローン(AD11と4D9;コントロール細胞として使用)が得られた。そのほかに、第2章で作製した3D20と11D4、さらにはKLH特異的なCD4⁺T細胞クローン8-5あるいは自己反応性CD4⁺T細胞クローンMS-202(東大医学部多田富雄教授より供与)を比較のために実験に用いた。

FACSによる細胞表面抗原の解析 第2章に記載

免疫抑制活性の測定

リンパ節や脾臓といった末梢リンパ器官に存在する成熟T細胞は生体内に侵入してきた異物に应答し、これを排除するために次のような応答性を示す。T細胞増殖による抗原特異的T細胞数の増加、液性免疫を増強するためのリンホカインの産生、さらに細胞傷害活性による異物を含んだ自己細胞の除去などである。一方、これらのリンパ器官に存在するB細胞はこれらのT細胞に刺激されて特異抗体を産生することが知られている。これらの免疫反応の全てが抑制T細胞の作用の対象となりえる。各々の反応に対する免疫抑制活性は、抑制T細胞ある

いはその培養上清を培養開始時に反応系に添加することにより、それらの反応が抑制されるか否かにより評価された。用いられたアッセイ系は次に示すとおりである。

CD4⁺ヘルパーT細胞クローンの抗原特異的な増殖応答の詳細は第2章に記載した。要約すると次のとおりである。2×10⁴個のT細胞クローンを3000-radでX線照射した同系の脾臓細胞(2×10⁵)の存在下、抗原と共に培養し、その増殖性をチミジンの取り込みにより評価した。またT細胞などの培養細胞は³H-ホルムアルデヒドにより処理され、抗原提示細胞として用いられた。

抗T細胞レセプター抗体を用いてT細胞を刺激するにはこの抗体を架橋させることが必要である。精製した抗体(10μg/ml)30μlを96wellプレートに入れ、1時間37℃で処理することにより、プレートの表面に抗体を結合させた。そして遊離の抗体を洗い流した後、このプレート上でT細胞を培養した(92)。このような刺激方法のことを固相化抗体による刺激と呼ぶ。

免疫したマウスのリンパ節細胞の抗原特異的な増殖性を測定することも可能である。このリンパ節細胞はT細胞・B細胞・マクロファージなどを含んでいるためあらたに抗原提示細胞を加える必要はない。榎本らの方法にしたがい、4×10⁵個のリンパ節細胞を抗原で刺激し、4日間培養しその増殖性を測定した(93)。この場合、増殖する細胞は主にT細胞であるとされているため、時としてT細胞増殖アッセイと呼ばれることがある。

*in vitro*における抗体産生系として当研究室孫らにより開発された方法を用いた(94)。なおこのアッセイにおいてはFCSよりも反応性がよい同型正常マウス血清(NMS)を用いた。2週間前にαs1-カゼインを免疫したマウスのリンパ節細胞(2×10⁶/1ml)を抗原(αs1-カゼイン:10μg/ml)と共に1%NMS入り培地で培養(corning 48well)した。そして培養開始3日目と7日目に半量ずつ培地交換しそして11日目の培養上清中の抗αs1-カゼイン抗体の量を常法によりELISAで測定した。また脾臓細胞をLPS(25μg/ml)と共に培養し、産生される全IgM量をELISAにより測定した。

細胞傷害活性の測定

細胞傷害活性を測定するために ^{51}Cr 遊離試験を用いた。増殖期にある標的細胞(およそ $1-2 \times 10^6$)をエッペンドルフ(1.5ml)に採集し洗浄した後、ペレットにした。これに $^{51}\text{Cr}(\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O})$ を $10-20 \mu\text{Ci}$ に加え、15分置きによく攪拌しながら、 37°C で45分間インキュベートした。なお ^{51}Cr は半減期が約30日であるため、加える溶液の量は製造からの日数に応じて適宜調節した。そして遠心洗浄を3回繰り返し遊離の ^{51}Cr を完全に除去した後、細胞数を $10^5/\text{ml}$ に調節した。これをあらかじめ4-6段階に希釈したエフェクター細胞を $100 \mu\text{l}$ ずつ分注しておいたプレート(falcon 3072)に $100 \mu\text{l}$ ずつ添加し、 37°C 、5% CO_2 で4時間培養した。この培養上清を $100 \mu\text{l}$ ずつ試験管に採取し、遊離した ^{51}Cr の量(CPM)をガンマーカウンターを用いて測定した。なお細胞傷害活性を検定するための最大解離用として最終濃度で0.5%のSDSを用い、以下の式のようにspecific releaseを計算した。

$$\% \text{ specific release} = (a - b) / (c - b) \times 100$$

a = エフェクター細胞と混合した標的細胞の上清中のCPM

b = 標的細胞のみを培養した際の上清中のCPM (自然解離)

c = 標的細胞を0.5%SDSで処理した際の上清中のCPM (最大解離)

C57BL/6に対するアロキラーT細胞をリンパ球混合培養反応を用いてC3H/Heより作製した。まずX線照射を行ったC57BL/6の脾臓細胞(2×10^7)を刺激細胞としC3H/Heの脾臓細胞(2×10^7)を10%FCS入りRPMI培地10ml中で培養した(89)。なお、この際細胞の接触を最大限にするためにフラスコ(falcon 3013)を立てたままの状態を培養した。さらに細胞の増殖を増進するために培養開始4日後に細胞を遠心し、これを10%T細胞増殖因子・10%FCS入りRPMI1640で4日間培養しC57BL/6に対するアロキラーT細胞とした。

結果

抑制T細胞クローンの樹立

α s1-カゼインを免疫したC57BL/6のリンパ節細胞を同型X線照射脾臓細胞およびT細胞増殖因子と共に抗原で反復刺激することにより培養した。この培養開始二週間後に限界希釈法によりクローン化を行い、数種のT細胞株を得た。そして3D20細胞の増殖性を阻害する抑制T細胞クローン13G2を得た(表3-1)。

まずFACSを用いて13G2の表面マーカーを検討した(図3-1)。T細胞マーカーであるThy1は陽性であったが、CD5は陰性であった。また抑制T細胞およびキラーT細胞マーカーであるCD8抗原は陽性であり、ヘルパーT細胞マーカーであるCD4抗原は陰性であった。このため13G2はCD8⁺T細胞であることが示された。さらに13G2のT細胞レセプターについて解析を行った結果、抗CD3である2C11および抗T細胞レセプター定常部抗体であるH57-597に陽性であることが示された。また、 β 鎖可変領域の一つであるV β 8に対するF23.1抗体に陽性であった。そのため、13G2のT細胞レセプターはV β 8を含む α - β ヘテロダイマーであることが示された。

13G2細胞の抗原に対する増殖応答

まず13G2細胞が抗原である α s1-カゼインに対して応答性を示すか否かをT細胞増殖アッセイを用いて検討した(図3-2)。この13G2は同型マウスであるC57BL/6の抗原提示細胞の存在下において抗原に応答性を示すことが観察された。さらにこの反応性は抗クラスII抗体により完全に阻害される事が示された。この結果、13G2細胞はクラスII分子に拘束されて α s1-カゼインを認識していることが確認された。つぎに、 α s1-カゼインのCNBr分解物である1-54、61-123、136-196を用いて13G2が認識するエピトープを検索した(図3-3)。この結果13G2はこれらのペプチドのなかで136-196に反応性を示すことがわかった。さらに合成ペプチドf136-155およびf151-170を用いて同様の検討を行ったが、これらのペプチドには反応性を示さなかった。

このような抗原特異的な増殖性はかなり不安定であり、この13G2細

表 3-1 得られた T 細胞株の 3 D 2 0 細胞の増殖に及ぼす影響

T 細胞株	細胞数 ($\times 10^4$)	3D20の増殖 (CPM)	抑制%
—	—	23716 \pm 2305	—
AD11	4	39764 \pm 1817	-67
	1	35405 \pm 2786	-49
4D9	4	23856 \pm 3397	0
	1	20013 \pm 1266	16
8-5	4	25623 \pm 1432	-8
	1	18150 \pm 1256	23
13G2	4	12088 \pm 2688	49
	1	11394 \pm 3250	52

各々の株化 T 細胞を 3 D 2 0 細胞を抗原+APCで刺激するアッセイ系 (表 2-3 参照) に培養開始時に加えた。この 3 D 2 0 細胞の増殖性をチミジンの取り込みにより測定し、各々の T 細胞株の免疫抑制活性を評価した。

$$\text{抑制\%} = (1 - \frac{\text{【T細胞+3D20】}}{\text{【3D20】}}) \times 100$$

ただし 【】 = 【チミジンの取り込み値】

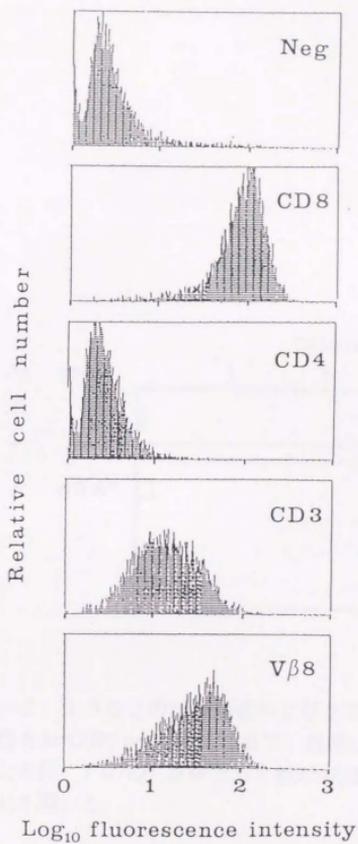


図3-1 13G2の表面抗原

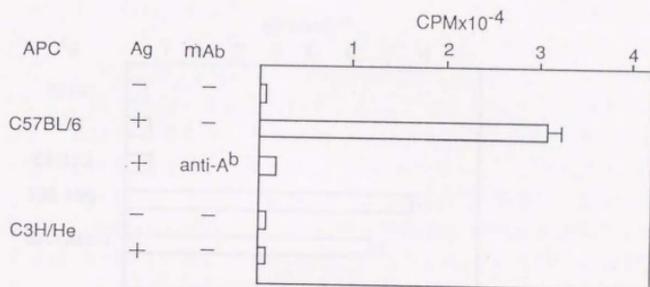


図3-2 13G2の増殖応答およびそのMHC拘束性
 13G2細胞をAPC(B6 or C3H)の存在下、抗原(α s1-抗原: 50 μ g/ml)で刺激した。この際、ブロッキグ抗体として抗Ab抗体(M5/114.15.2; 培養上清1/100希釈)を用いた。

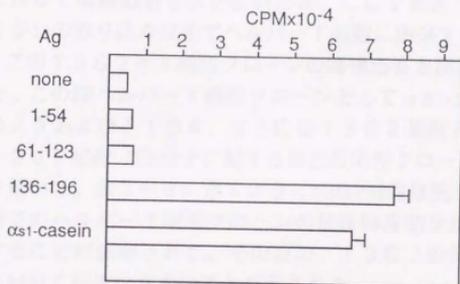


図3-3 13G2のエピトープ特異性

13G2細胞をAPCの存在下、各々の抗原(50 μ g/ml)で刺激した。

胞は長期培養により自己応答性細胞さらにはIL-2依存性細胞へと変わっていった。なおこのことに再現性があることも確かめられている。

13G2によるT細胞増殖の抑制

13G2細胞はヘルパーT細胞クローン3D20細胞の抗原刺激による増殖を抑制することが示されている。しかしこの系は抑制T細胞自身の増殖自体を考慮にいれなければならない、抑制機構を詳細に解析する系としては不向きであった。そこでこの後の実験においては抑制活性は有するが抗原に対して増殖性を示さない13G2の亜株であるIL-2依存性細胞株を用いて解析を行った。この場合の13G2細胞は α s1-カゼインに対して増殖応答を示さないため、ここで測定される抗原特異的なチミジンの取り込みは全てヘルパーT細胞に由来するものである。

この13G2がT細胞クローンの増殖応答を抑制するか否かを検討した。この際ヘルパーT細胞クローンとして α s1-カゼインに特異的な3D20および11D4、さらには13G2細胞とは由来が異なるMS-202細胞（Ek分子に対する自己反応性クローン；多田研より供与）を用いた。表3-2に示すように13G2細胞は抗原特異性に関わりなく全てのヘルパーT細胞クローンの抗原特異的な増殖をほぼ完全に抑制することが観察された。そのため、13G2の抑制効果に抗原特異性もMHC拘束性もないことが示された。

この結果の一般性を確認するために、標的細胞として α s1-カゼインを免疫したリンパ節細胞を用い、これらの抗原特異的な増殖を13G2が抑制するか否かを検討した。表3-3に示すとおり13G2を細胞数にして40分の1加えることにより α s1-カゼイン免疫リンパ節細胞の応答性はほとんど消失した。さらにX線照射を行った13G2も同じ様な効果を有していた。この際X線照射した11D4細胞には免疫抑制活性がないことが示されている。抑制効果の特異性についてもこの系を用いて追試した。そこでまずこの抑制効果に抗原特異性があるかどうかを検討した。応答細胞として β - α クトグロブリンおよびKLHを免疫したリンパ節細胞を用いた。表3-3に示すとおり13G2は α s1-カゼインの非存在下においてもこれらの反応を抑制した。つぎに応答細胞として α s1-カゼインを免疫したMHCの異なるマウス(C3H/He or BALB/c)のリンパ節細

表 3-2 ヘルパー T 細胞クローンに及ぼす 13G2 の抑制効果

T Cell Clones					T _s (13G2)	³ H-Thymidine Uptake (cpm × 10 ⁻³)
Th						
Cell	Origin	Restriction	Specificity			
3D20	B6	I-A ^b	αs1-CN	10 ³	92.9 ± 14.1 (0)	
				10 ⁴	45.3 ± 4.5 (51) 7.3 ± 1.3 (92)	
11D4	B6	I-A ^b	αs1-CN	10 ³	21.3 ± 3.5 (0)	
				10 ⁴	10.1 ± 0.9 (53) 3.8 ± 0.5 (82)	
MS-202	C3H	I-A ^k	-	10 ³	44.9 ± 8.2 (0)	
				10 ⁴	5.3 ± 0.5 (88)	

3D20あるいは11D4細胞は抗原+APCで刺激され、4日間培養された。MS-202細胞はAPCで刺激された。これらの培養系に13G2細胞(10³あるいは10⁴個)が添加された。

なお、()内は抑制%を示している。

表 3-3 リンパ節細胞の増殖に及ぼす 13G2 の抑制効果

Responding Cells		Cells Added (1×10^4)	^3H -Thymidine Uptake ($\text{cpm} \times 10^{-3}$)	Percent Suppression
Strain	Primed with			
C57BL/6	α 1-CN		77.7 ± 4.6	0
		13G2	16.5 ± 4.6	79
		Irradiated 13G2	14.7 ± 2.5	81
		Irradiated 11D4	90.5 ± 2.7	-16
C57BL/6	KLH		92.1 ± 5.4	0
		13G2	20.8 ± 1.2	77
C57BL/6	β -LG		55.0 ± 4.6	0
		13G2	10.8 ± 4.2	80
C3H/He	α 1-CN		156.4 ± 2.6	0
		13G2	25.9 ± 3.8	83
BALB/c	α 1-CN		165.1 ± 4.7	0
		13G2	18.7 ± 1.8	89

4×10^5 個のリンパ節細胞を正常あるいはX線照射(3000-rad)した株化T細胞(1×10^4)と共に抗原刺激下で、4日間培養した。

胞を用いて抑制効果のMHC拘束性を検討した。この結果13G2は異系マウスの反応性も抑制することが示された。このため13G2の抑制効果に抗原特異性もMHC拘束性もないことが再確認された。

抗体産生の抑制

13G2が抗体産生抑制能があるかどうかをin vitro抗体産生系を用いて検討した。表3-4に示すとおり、 α s1-カゼインを免疫したリンパ節細胞を抗原刺激下で培養すると抗 α s1-カゼイン抗体の産生が認められるが、これに細胞数で20000分の3の13G2を添加することにより抗体産生がほぼ完全に抑制されることが観察された。なおコントロールとして用いたヘルパーT細胞クローンは抑制効果を有していなかった。この場合の抗体産生はT細胞依存性であるとされている。それではT細胞非依存的なリボポリサッカライド刺激による抗体産生に対して13G2は抑制作用を有しているのだろうか。表3-4に示すとおり、通常の脾臓細胞をリボポリサッカライドで刺激することにより顕著な抗体産生が観察されるが、この13G2はこの際のT細胞非依存的な抗体産生に対しては抑制活性を有していないことが示された。これらの結果から、13G2はT細胞の働きを抑制することにより抗原特異的な抗体産生応答を抑制していることが考えられた。

13G2によるT細胞増殖抑制のメカニズムについて

これまでに13G2が抗原特異的なT細胞の増殖を抑制することが示されている。それでは抗原提示細胞の非存在下における抗原非特異的なT細胞増殖に対して13G2は抑制作用を有しているのだろうか。3D20細胞をIL-2あるいは固相化抗CD3抗体により刺激し、この反応における13G2の抑制作用を評価した(表3-5)。この際、13G2細胞はIL-2あるいは固相化抗CD3抗体によるT細胞の増殖応答には全く影響を及ぼさないことが観察された。このため、13G2が抑制効果を発揮するためには抗原提示細胞が必要であることが考えられた。

これまでT細胞クローンの抗原刺激の系において、抗原提示細胞としては自己の脾臓細胞そのものを用いていたため、13G2の抗原提示

表 3-4 抗体産生応答に及ぼす 13G2 の抑制効果

Responding Cells	Cells Added	α s1-CN Specific Antibody (ng/ml) ^a		LPS-Induced Total IgM ^b (μ g/ml)
		IgG	IgM	
α s1-CN primed-LNC ^a		510 \pm 18	48 \pm 7	32 \pm 3
or	13G2	22 \pm 5	2 \pm 1	28 \pm 2
Unprimed	3D20	450 \pm 52	54 \pm 3	34 \pm 2
spleen cells ^b	11D4	525 \pm 21	47 \pm 5	31 \pm 3

α s1-CN で免疫されたリンパ節細胞(2×10^6)を抗原刺激下で培養し、その特異抗体産生量をELISAにより測定した(IgGおよびIgM)。また、正常脾臓細胞(2×10^6)をLPSで刺激し、産生される全IgM量を測定した。これらの培養系に 3×10^2 個の株化T細胞を培養開始時に添加した。

表3-5 3D20細胞の非特異的な増殖における13G2の効果

Stimulated with	T Cell Clones		³ H-Thymidine Uptake (cpm × 10 ⁻³)	Percent Suppression
	Th(3D20)	Ts(13G2)		
Ag + APC	+	-	92.6 ± 6.5	56 (<i>p</i> < 0.01)
	+	+	40.7 ± 3.4	
	-	+	0.3 ± 0.1	
Anti-CD3	+	-	14.9 ± 2.9	-22
	+	+	18.2 ± 2.6	
	-	+	2.0 ± 0.2	
IL-2	+	-	174.9 ± 20.1	11 (<i>p</i> > 0.05)
	+	+	154.4 ± 14.7	
	-	+	2.8 ± 1.0	

3D20細胞(2×10^4)を抗原+APC、抗CD3抗体、あるいはIL-2により刺激した。そして、これらの系にX線照射(3000rad)を行った13G2細胞(1×10^4)を添加した。13G2の免疫抑制効果はStudent's t-testにより評価された。

細胞に対する働きを解析することは困難であった。そこで3D20に対する抗原提示細胞としてI-A^b遺伝子を導入したL細胞株FT2.3を用いた。この細胞がクラスII分子であるI-A^b抗原を発現していることはFACSにより確認されている。表3-6に示すとおり、このFT2.3細胞は抗原により3D20細胞を刺激することが観察された。そしてさらにこの反応性は13G2によって阻害されることが示された。この際、13G2の標的細胞が抗原提示細胞であるかどうかは大変興味深い点ではあるが、13G2細胞そのものを用いるこのアクセシ系では解析が困難である。この点については今後の実験に期待したい。

13G2の細胞傷害活性

13G2のヘルパーT細胞にたいする細胞傷害活性を調べるために、陽性対照としてC3H/HeのC57BL/6に対するアロキラーT細胞を用いて⁵¹Cr遊離試験により検討した。図3-4に示すように13G2はヘルパーT細胞(3D20)に対してspecific releaseでおよそ10%前後の傷害活性を有するが、これは陽性対照であるアロキラーの活性に比べるとかなり弱いことが示された。つぎに13G2の抗原提示細胞(APC)に対する細胞傷害活性を測定するために標的細胞として、FT2.3細胞を用いた。その結果13G2はFT2.3に対してspecific releaseで10-20%の傷害活性を有するがこの値はアロキラーの活性に比べると決して高いものではなかった。13G2はわずかに細胞傷害活性を有していることが示されたが、この傷害活性がかなり弱いため13G2はそのほかの作用により免疫抑制効果を発揮していることが考えられた。

13G2細胞が産生する免疫抑制因子

IL-2により培養した13G2細胞の培養上清がヘルパーT細胞の抗原刺激による増殖を抑制するかどうかを検討した。この際コントロールとしてヘルパーT細胞の培養上清を用い、これらの培養上清を希釈系列を付けて3D20細胞の抗原刺激の系に添加した。図3-5に示すとおり、13G2の上清は量依存的にT細胞クローンの増殖を抑制することが観察された。そのため13G2は免疫抑制因子を産生することにより免疫反応を抑制していることが示唆された。

表 3-6 株化抗原提示細胞による 3D20 細胞の増殖に及ぼす
13G2 の抑制効果

Th	APC	Ag	Ts (13G2)	³ H-Thymidine Uptake (cpm × 10 ⁻³)
3D20	FT2.3	f136-155	-	2 ± 1
		f136-155	-	114 ± 3
		f136-155	+	34 ± 5

3D20 細胞 (2×10^4) をハ^{*}ラホムアルテ^{*}ヒト^{*} で固定化した FT2.3 細胞の存在下、抗原 (ハ^{*}フ^{*}ホ^{*}136-155: 10 μ g/ml) で刺激した。また、13G2 細胞 (1×10^4) はこれらの培養開始時に添加された。

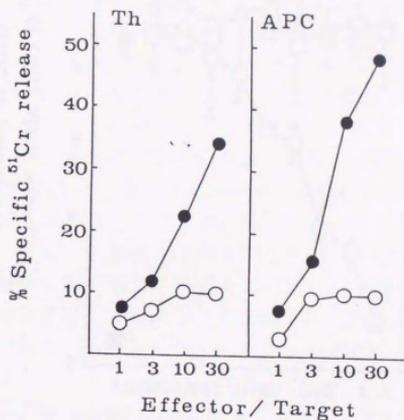


図3-4 13G2細胞の細胞傷害活性

本実験において、標的細胞として3D20細胞(Th)および抗原をバルスしたFT2.3細胞(APC)を用いた。なおエフェクター細胞として13G2(○)の他にC57BL/6に対するアロキラーT細胞(●)を陽性対照として用いた。

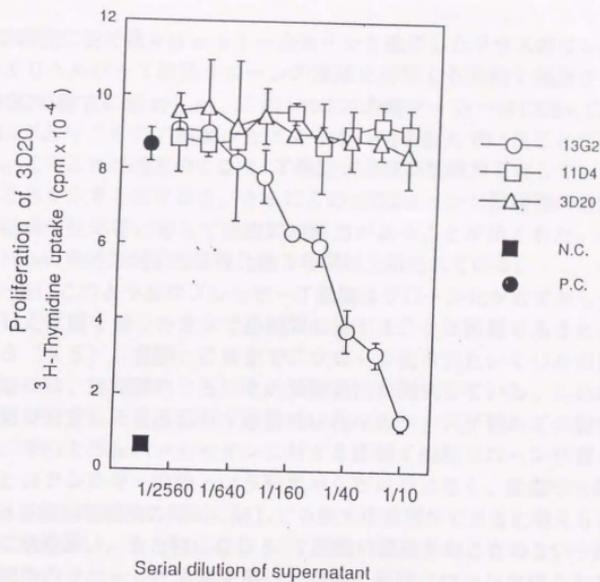


図3-5 13G2培養上清による免疫抑制作用

13G2細胞の培養上清 (IL-2 50U/mlで培養)を希釈系列を付けて3D20細胞の抗原刺激の系に培養開始時に添加した。コントロールとして同条件における11D4および3D20の上清を用いた。そしてこれらの培養上清が3D20細胞の増殖応答を抑制するかどうかを検討した。

考察

本研究に於て我々は $\alpha s 1$ -カゼインを免疫したマウスのリンパ節細胞よりヘルパーT細胞クローンの増殖を抑制する抑制T細胞クローン13G2の樹立に成功した。この13G2の表面マーカーはCD8+, CD4+, Thy1+であり、そのT細胞レセプターはV β 8を含んでいることが示された。このことは通常のCD8⁺T細胞が免疫抑制能力を有していることを示すものである。さらにこの13G2はリンパ節細胞の増殖および抗体産生応答に対して免疫抑制能力があることが示された。そしてこれらの免疫抑制活性は株化後3年間以上保たれている。

一般にこのようなサブプレッサーT細胞はクローン化がむずかしく、安定した性質を保ったままで長期間培養することは困難であると考えられている(95)。実際、これまでにクローン化されたいくつかの抑制T細胞株は、短期間のうちにその抑制活性が消失している。この意味で性質が安定した免疫抑制T細胞株は我々のケースが初めての報告である。そのため $\alpha s 1$ -カゼインに対する抑制T細胞クローンが得られたことはアレルギー治療という観点からだけでなく、免疫学一般における免疫抑制機構の解明に対しても多大な貢献ができると考えられ、非常に意義深い。また特にCD8⁺T細胞の濃縮をおこなわない一般的なT細胞のクローン化方法を用いて抑制T細胞クローンが得られたことは、 $\alpha s 1$ -カゼインに低応答性であるC57BL/6マウス中に抑制T細胞がかなり誘導されていたことを示唆している。

こうして得られた13G2は当初、抗原特異的な増殖が観察され、認識するエピトープは $\alpha s 1$ -カゼインの136-196に含まれていることが示された。そしてこの細胞はMHCクラスII分子に拘束されて抗原を認識していることが示された。このようなクラスII拘束的な抗原の認識はその他の抑制T細胞株においても観察されている。ところでこれまで抑制T細胞による免疫抑制に関しては、「これらの抑制T細胞には数種のサブセットが存在し、それらが複雑に相互作用することにより結果として免疫抑制が起こる」とするサブプレッサーサーキット説(44)が有力であった。この場合抑制T細胞を活性化するためには抑制T細胞誘導細胞が必要であると考えられていた。しかしながらこの13G2を

含め今までに得られた抑制T細胞クローンはすべて単独で活性化される細胞である(46、49-52、88)。そのため、これらの抑制T細胞もヘルパーT細胞と同様に生体内において抗原刺激により誘導され、そのクローンを増大させ、単独で免疫抑制効果を示していると思われる。残念なことにこのような抗原特異的な増殖性はかなり不安定であり、長期培養によりこの13G2細胞は自己応答性細胞へ、さらにはIL-2依存性細胞へと変わっていった。なおこのことに再現性があることも確かめられている。このような抗原特異性の変化が何に由来するのかは今のところ想像の域を出ない。

この13G2のヘルパーT細胞クローンに対する抑制活性は長期にわたり維持されていることが確認されている。この13G2の抑制機構の解析を進めるにあたり、抑制効果の特異性を明確にする必要がある。実験によっては抑制T細胞自身の増殖性も問題となることがあるため、抑制活性は有するが抗原に対しては増殖性を示さない13G2の亜株であるIL-2依存性細胞株を用いて以後の解析を行った。この際、13G2は培養に用いる増殖因子(IL-2)により常に活性化されていると考えられるため、ここで検討した特異性は抑制作用を及ぼす際(エフェクターフェーズ)についてである。そこで種々のT細胞クローンおよび由来の異なるリンパ節細胞を用いて増殖アッセイを行い、13G2の効果を検討した。この結果、抑制効果にはMHC拘束性も抗原特異性も存在しないことが観察された。そのため一旦活性化された抑制T細胞13G2は特異性に関わりなくT細胞の増殖を抑制するものと考えられた。またこの13G2はT細胞依存的な抗体産生応答は抑制するが、リポポリサッカライドによるT細胞非依存的な抗体産生応答は抑制しないことが観察されている。この場合は13G2がT細胞の働きを特異的に阻害することによりT細胞依存的な抗体産生応答のみが抑制されたものと考えられる。

それでは13G2はどのようにしてT細胞の増殖応答を抑制しているのだろうか。これまで我々は抗原刺激によるヘルパーT細胞の増殖応答を指標に13G2の抑制作用を解析してきた。このヘルパーT細胞の増殖アッセイにおいて、ヘルパーT細胞は抗原提示細胞上にMHC分子と共に提示された抗原によりT細胞レセプターが刺激され、

この信号が細胞内へと伝達されIL-2などの増殖因子を産生させ、そしてこのIL-2によりその細胞自身が分裂するわけである。そのため、このT細胞を抗原提示細胞を用いた抗原刺激以外の方法で単独に増殖させる方法として、IL-2あるいはT細胞レセプターを架橋する方法が挙げられる。そこでこれらの刺激に対する13G2の作用が評価された(表3-5)。しかしながら13G2はこのような刺激によるT細胞の増殖を抑制しないことが観察された。そのため13G2が抑制効果を有するためには抗原提示細胞が必要であることが推定された。

近年、篠原らは遺伝子導入により作製した特異抗体を発現するB細胞株を用いて、この細胞を特異的に傷害するキラーT細胞の存在を確認した(54)。そしてこれらのキラーT細胞により、抗原特異的な免疫抑制機構の一部が説明できることを示している(55)。そのため13G2が抗原提示細胞を特異的に傷害することにより免疫抑制効果を発揮していることが考えられた。しかしながら、図3-4に示すとおりこの13G2は抗原提示細胞あるいはT細胞に対してほんのわずかの傷害活性しか有していないことが観察されている。また13G2の抑制効果に抗原特異性が存在していないことも示されている。このため、13G2細胞が抗原非特異的に標的細胞を傷害することにより免疫抑制作用を発揮しているとする可能性はほとんどないものと思われる。

一方、図3-5において13G2細胞の培養上清中に免疫反応を抑制する物質が含まれていることが認められている。そのため13G2の免疫抑制は可溶性の免疫抑制因子に依存している可能性が挙げられる。そこでこの免疫抑制因子についてのこれまでの研究を紹介したい。このような免疫抑制因子は東大医学部の多田らにより初めてその存在が確認された。この因子は担体タンパク質で過免疫されたラットの胸腺及び脾臓細胞より抽出され、これの注入により抗原特異的なラットのIgE免疫応答が消失することが観察された(38)。さらにKappとPierceはGATやGTといったアミノ酸ポリマーに対して低応答性を示すマウスより同様な抑制性抽出物を得、これらがGATに対する親和性を持ち、さらにこの因子はGATカラムにより精製し得ることを見いだした(96-97)。つまりこれらの因子は抗原に結合する領域と免疫

抑制活性を受け持つ領域をあわせ持つ複合分子であると思われる。この中で抗原を認識する分子として可溶性のT細胞抗原レセプターが候補に上がっているが(29-31)、免疫抑制を担当する分子についてはその分子構造は明らかにされていない。

このような抑制T細胞が産生する免疫抑制因子のほかにも、ヘルパーT細胞が産生するリンホカインの中で免疫抑制作用を有するものがいくつか挙げられている。TGF- β は全ての種類のT細胞の増殖応答を阻害することが知られている(33)。腫瘍壊死因子として同定されたTNFは免疫担当細胞に対しても細胞傷害作用があることが報告されている(34)。またDNAX研究所のMosmannらはリンホカイン産生パターンによってヘルパーT細胞は二つのタイプ(タイプ1ヘルパーT細胞:IL-2, γ -インターフェロン産生、タイプ2ヘルパーT細胞:IL-4, IL-5, IL-10産生)にわかれることを見いだした(98)。そしてタイプ1ヘルパーT細胞によって産生される γ -インターフェロンはタイプ2ヘルパーT細胞の活性を阻害し(32)、逆にタイプ2ヘルパーT細胞によって産生されるIL-10はタイプ1ヘルパーT細胞の活性を阻害することを報告している(99)。このため抑制T細胞が産生する免疫抑制分子はこのようなヘルパーT細胞が産生する免疫抑制性のリンホカインと同じ物質である可能性も考えられる。

実際、我々が樹立した抑制T細胞クローン13G2細胞が産生する免疫抑制因子はその後の研究によりIL-10と同一であることが判明している(57)。そのため一般的に抑制T細胞はIL-10を産生することにより免疫応答を抑制することが想像される。この点については次に章において検討を試みた。さらにこのIL-10がどのようにして免疫反応を抑制しているかについては今後の研究の進展に期待したい。

またその後の解析によりこの13G2細胞はIgE応答を抑制するリンホカインとして注目されているIFN- γ (53)を産生することがELISA分析により確かめられている(葉袋ら、未発表データ)。このように抑制T細胞は免疫抑制活性を有する様々なリンホカインを産生することにより、いろいろな免疫抑制活性を発揮しているものと思われる。

序

$\text{CD} 8^+$ T細胞が免疫抑制において重要な役割を果たしていることが数多くの実験によって示されており(18、100-102)、特に外来性抗原に特異性を有する $\text{CD} 8^+$ T細胞は古くより免疫抑制T細胞として理解されてきた。このような $\text{CD} 8^+$ 抑制T細胞によって認識される抗原として可溶性の蛋白質(38、43、103-104)、細菌由来の膜蛋白質(51-52)、ある種のハプテン(97)などがあげられる。食品アレルギーの多くは可溶性の蛋白質であり、上記の抑制T細胞を誘導しうる外来性可溶性蛋白質抗原に分類される。そこでまず今までに知られている可溶性抗原と抑制T細胞の関係についてふれてみたい。卵白リゾチーム(HEL)を認識する抑制T細胞についてはUCLAのSercarzらによって、精力的に解析が行われてきた。この細胞はHELのN端の3残基を含む領域を認識している事が示されており、この抑制T細胞の働きにより抗体産生応答が完全に抑制される事が明らかとなっている(43)。また乳酸脱水素酵素においては抑制T細胞の影響により、系統間で免疫応答の強さが著しく異なっている事が知られている(25)。これらの抗原のほかに、 β -ガラクトシダーゼ(103)、ミエリン塩基性蛋白質(104)およびKLH(38)に対する抑制T細胞の存在が確認されている。

一般に、抗原認識を解析する上ではその細胞のMHC拘束性がまず問題となる。アロ抗原に対する $\text{CD} 8^+$ キラーT細胞の場合は、ほとんどの場合クラスI拘束的に抗原を認識するとされており、これは $\text{CD} 8$ 分子とクラスI抗原が親和性を持つことによるとされている。そのため $\text{CD} 8^+$ 抑制T細胞においてもクラスI拘束的であることが予想される。しかしながら、乳酸脱水素酵素に対する抑制T細胞の場合は、MHCクラスII分子に拘束されて抗原分子を認識している事が示唆されている(25)。このような抑制T細胞のMHC拘束性を明らかにするために、いくつかの $\text{CD} 8^+$ 抑制T細胞クローンが分離され、その抗原認識について解析が試みられた。しかしながら、これらのクロ

ーンは性質が非常に不安定であり、特に抗原特異的な増殖応答を保持出来るものは皆無に等しかった。我々も、第3章において α s1-カゼインに特異的なCD 8⁺T細胞クローンについて報告したが、この細胞も同様に抗原特異的な増殖性は不安定であった。一方で、外来性の抗原を特異的に認識するクラスI拘束性キラーT細胞の存在が確認されている(105)。これらは特異的に抗原提示細胞を傷害する活性を有しており機能的には抑制T細胞にも属しうる。これらの点を鑑み、抗原に特異的な抑制性細胞を多く含んでいると思われる α s1-カゼインを免疫したマウスより得られたポリクローナルCD 8⁺T細胞を用いて抑制T細胞の抗原認識について解析を試みた。

ポリクローナルなCD 8⁺T細胞の機能を測定するには、反応に用いる細胞集団からCD 4⁺T細胞を完全に取り除く必要がある。なぜなら、可溶性の抗原に対する見掛け上の反応(例えば増殖応答やリンホカイン産生など)はほとんどCD 4⁺T細胞に因っているからである。この目的で古くは抗体補体処理が用いられていた。この方法はCD 8細胞以外の不必要な細胞(CD 4⁺T細胞やB細胞など)を抗体補体処理によって傷害し、取り除くやりかたである。そのため非特異的な毒性がかなり問題となり、これまでCD 8⁺T細胞の反応性を測定出来たケースはなかった。一方、抗体を用いる選択法ではあるが、目的とする細胞集団のみをポジティブに選択する方法がある。蛍光標識された特異抗体を用いて任意の細胞のみを蛍光ラベルし、蛍光細胞分離装置により特定の細胞のみを選択する方法である。非常に精度良く目的の細胞を分離出来るが、分離に長時間を要する事さらに装置が高価な事からこの方法はあまり普及しなかった。これとほとんど原理は同じだが細胞を磁気標識した抗体により分離する技術が開発された。この方法により短時間の内に磁石を用いた簡単な分離装置を用いて目的の細胞を分離することができる。そして、その精度もさきほどの蛍光分離法と同程度である事が示されている。そこで本研究においては、抗CD 8抗体を結合させた磁気ビーズを用いてCD 8⁺T細胞の分離を行った。

これまでの様々な研究結果からCD 8⁺抑制T細胞は抗原に应答して何らかの免疫抑制作用を発揮するが、抗原刺激に対してはほとんど

増殖応答を示せないだろうと思われていた。そのため、 $CD8^+$ T細胞の応答性を測定する実験系として、抑制T細胞によりその反応が抑制される $CD4^+$ T細胞の増殖反応や抗体産生反応が用いられていた。しかしながら、このような間接的な測定系はそれ自体非常に複雑になることが多く、得られた結果が本当に抑制T細胞の働きを反映しているのかと疑問視される事も少なく無かった。

抑制T細胞は生体内において、増殖反応をしないのであろうか。一般に、抗原による刺激がない状態ではその抗原に対するT細胞の数は非常に少ないとされている。そのため抑制T細胞においても、生体内で何らかの免疫抑制作用を発揮する際、その細胞数をある程度増加させていなければならないのではないかと思われる。言い換えれば、抑制T細胞は環境条件の整った生体内においては、そのクローン数を増大させ、その後に免疫抑制活性を発揮しているものと考えられる。しかしながら残念なことに、*in vitro*において $CD8^+$ 抑制T細胞は強い増殖反応を示さないとするのが一般的である。そのため、カゼインに対する $CD8^+$ T細胞の増殖応答性もかなり低いであろう事が予想された。しかし、たとえ低い反応であっても直接的に抑制T細胞の応答を測定する事が肝要であると思われる。そこで本実験においては、磁気ビーズで精製したポリクローナル $CD8^+$ T細胞の抗原に対する増殖性を測定し、抑制T細胞の抗原認識機構の解明を目指した。

抑制T細胞の研究において、抗原認識の問題と同様に重要視されているのが抑制T細胞がどのようにして免疫抑制作用を示しているかについてである。この問題については第3章において一つの抑制T細胞クローンを用いて詳細に解析を行い、この免疫抑制が液性の因子によることを明らかにした。この第4章においてはポリクローナルな細胞集団を用いてこのことの普遍性を検討した。

実験材料と方法

動物、抗原、抗体 第2章に記載

細胞の分画

リンパ節細胞よりCD 8⁺T細胞を分離するために抗CD 8抗体を結合した磁気ビーズを用いた。抗体の磁気ビーズへの結合方法は次のとおりである。硫酸沈殿により調製したCD8抗体(IgM)を30-150 μ g/mlの濃度で0.05Mトリス-塩酸緩衝液(pH9.5)に溶解し、これに磁気ビーズ(Dynabeads M-450 Uncoated)を50mg加え、これらを結合させる(一晩、4℃)。そして、ウシアルブミン含有リン酸緩衝液で非特異的なものを十分に洗浄した後、これを実験に用いた(10⁸ビーズ/ml)。抗CD 4抗体の結合方法もほぼ同様であるが、これはIgG抗体であるためビーズへの結合においてTosylactivatedビーズならびに0.5Mホウ酸緩衝液(pH9.5)が用いられた。図4-1に、抗CD 8結合ビーズによるリンパ節細胞からCD 8⁺T細胞の分離パターンを示す(FACS解析については第2章を参照)。このように、ワンステップでかなり精度良くCD 8⁺T細胞が分離可能である。

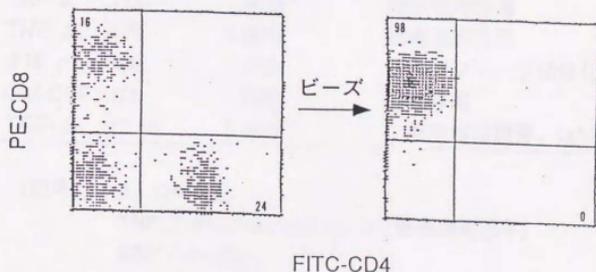


図4-1 磁気ビーズを用いたCD 8⁺T細胞の分離
リンパ節細胞(10⁶)をビーズ(5x10⁷)で処理した。

リンホカイン

T細胞増殖因子として組換え体ヒトIL-2（武田薬品工業より供与された）を用いた。T細胞は免疫応答を調節するために様々なリンホカインを産生することが知られている。表4-1に現在までに同定された各種のリンホカインの性質を列記した（106）。

表4-1 各種リンホカインとその性質

因子	分子量(Da)	産生細胞	作用
IL-1	17k	マクロファージ	T細胞活性化
IL-2	15.5k	T細胞	T細胞増殖
IL-3	30k	T細胞	造血作用
IL-4	15k	T細胞	IgE誘導、T細胞増殖
IL-5	12.4k	T細胞	IgA誘導
IL-6	19k	T細胞	B細胞分化
IL-7	25k	骨髓細胞	胸腺T細胞の活性化
IL-8	10k	単球	白血球走化作用
IL-9	16k	T細胞	T細胞活性化
IL-10	17k	T細胞	マクロファージ機能の阻害
TNF- α	17k	T細胞	腫瘍壊死作用
TNF- β	17k	T細胞	腫瘍壊死作用
IFN- γ	15k	T細胞	マクロファージ活性化
GM-CSF	16k	T細胞	造血作用
TGF- β	12.5k	T細胞	T細胞増殖阻害、IgA誘導

- (略号) IL: インターロイキン、
TNF: Tumor necrosis factor (腫瘍壊死因子)
IFN: インターフェロン、
GM-CSF: 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
TGF: トランスフォーミンググロースファクター

リンホカインの測定

刺激によりT細胞はリンホカインを産生することが知られている。本研究においてはT細胞が産生するIL-10(キットをPharmingen社より購入)およびIFN- γ (キットをGenzyme社より購入)の産生量をELISA法により測定した。

また、非常に感度が高いとされるPCR(ポリメラーゼチェーンリアクション)法により種々のリンホカインmRNAの発現を測定した。抗原刺激(α s1-カゼイン+抗原提示細胞で24時間刺激)およびマイトージェン刺激(ConA+抗原提示細胞で24時間刺激)を行ったT細胞よりグアニジンイソシアネート法により全RNAを抽出した。このRNAの1 μ gを用い一本鎖cDNAを合成し、この20分の1を用いてPCR反応を行った(107)。そしてこのPCR産物を5%アクリルアミドゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドによる染色によりリンホカインmRNAの発現を評価した。今回用いたプライマーの配列ならびに増幅される塩基対の長さを表4-2に示す。

表4-2 リンホカインmRNAを増幅するPCRプライマー

因子	sense	antisense	長さ(bp)	参考文献
IL-2	(203-227)	(370-346)	168	107
IL-3	(286-310)	(578-555)	293	107
IL-4	(231-255)	(411-387)	181	107
IL-5	(1182-1206)	(1424-1400)	243	107
IL-10	(240-270)	(660-630)	421	108
γ -IFN	(841-865)	(1084-1061)	244	107
TNF- α	(820-843)	(1127-1102)	308	107
TNF- β	(2822-2846)	(3038-3014)	217	107
GM-CSF	(122-146)	(435-411)	313	109
TGF- β 1	(1188-1213)	(1388-1363)	201	110
TGF- β 2	(2124-2144)	(2423-2400)	300	111
β -actin	(886-910)	(1234-1210)	349	107

結果

ポリクローナルCD8⁺T細胞の α s1- I-A^b インに特異的な増殖応答

α s1- I-A^b カゼインを免疫したCD8⁺T細胞が抗原応答性を有しているか否かを検討するために、同系X線照射脾臓細胞（抗原提示細胞）の存在下、このCD8⁺T細胞を段階的に希釈したインタナ α s1- I-A^b インで刺激した。図4-2に示すように、この α s1- I-A^b インによっては有意な増殖性は観察されなかったが、10 μ Mおよび50 μ Mの濃度において僅かながら応答している傾向がみられた。このように応答性のほとんどないことの一つの理由として、この条件において抗原処理が行われていないことが考えられた。そこで、このCD8⁺T細胞をトリプシンで完全に分解した α s1- I-A^b イン-トリプシン分解物で刺激した。その結果10 μ Mの濃度の α s1- I-A^b イン-トリプシン分解物によって、顕著な増殖応答が観察された。このため、CD8⁺T細胞であっても可溶性の外来抗原である α s1- I-A^b カゼインに対して反応性を有していることが示された。次に、この増殖応答の様子を時間を追って観察した。図4-3に示すように、培養開始4日目の応答が最も良好であった。また増殖応答は2日目より6日目まで観察された。

これらの反応性が非常に微量存在しているCD4⁺T細胞（0.5%以下）ではなく確かにCD8⁺T細胞に由来していることを確認するために抗CD4および抗CD8抗体を用いた阻害実験を行った。表4-3に示すように、この細胞の抗原応答性は抗CD8抗体によりかなり阻害を受けるが、抗CD4抗体によっては全く阻害されないことが示された。

免疫条件の検討

図4-2において α s1- I-A^b カゼインで免疫されたマウスから得られたCD8⁺T細胞画分が免疫に用いたインタナ α s1- I-A^b カゼインにはほとんど反応性を示さないものの、 α s1- I-A^b イン-トリプシン分解物に対して顕著な増殖反応を示すことが明らかとなった。そこで免疫抗原（インタナ α s1- I-A^b インおよび α s1- I-A^b イン-トリプシン分解物）の違いによるCD8⁺T細胞の増殖応答を比較した。本実験においては、抗原の「プライミング」効率を検討するために免疫を行っていない脾臓細胞から分離したCD8⁺T細胞

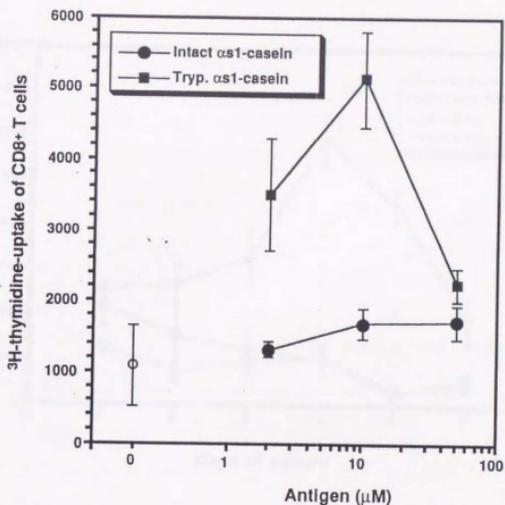


図4-2 トリプシンで完全分解した α 1-カゼインによる
ポリクローナルCD8⁺T細胞の増殖応答

CD8⁺T細胞(4x10⁵/well)を抗原提示細胞の存在下、トリプシンで完全分解した α 1-カゼインおよび intactな α 1-カゼインで刺激した。以後特に記載のないかぎり、このトリプシンで完全分解した α 1-カゼインフラグメント混合物を α 1-カゼイントリプシン分解物として実験に用いた。

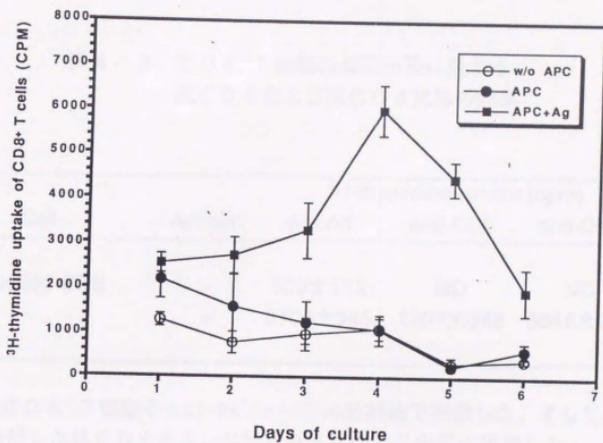


図 4-3 CD8⁺T細胞の増殖応答の経時変化

表 4-3 CD8⁺T細胞の増殖応答に対する
抗CD8および抗CD4抗体の効果

Cell	Antigen	³ H-thymidine uptake (cpm)		
		w/o Ab	anti-CD8	anti-CD4
Purified-CD8	-	606±115	ND	ND
	+	3709±348	1907±348	3846±247

CD8⁺T細胞を α s1-セイントリアジン分解物で刺激した。そして、適宜希釈した抗CD8あるいは抗CD4抗体をこの系に添加した。

およびCFAのみで免疫したマウスのリンパ節CD8⁺T細胞を用いた。なおin vitroにおける刺激抗原としてインタナαs1-カゼイン(50μM)およびαs1-カゼイントリプシン分解物(10μM)を用いた。表4-4に示すように、正常脾臓細胞から分離したCD8⁺T細胞はどちらの抗原に対しても有意な応答性を示さなかった。一方、CFAで免疫したマウス由来のリンパ節CD8⁺T細胞はαs1-カゼイントリプシン分解物に対してのみ有意な反応性を示した。そしてこの反応性の強さはインタナαs1-カゼインで免疫したマウス由来のCD8⁺T細胞>αs1-カゼイントリプシン分解物を免疫したもの>CFAのみを免疫したものの順であった。このことから抗原の免疫により僅かながら「ライミング」がかかっていることが示唆された。そして免疫抗原としてはαs1-カゼイントリプシン分解物よりもインタナαs1-カゼインの方が有効であることが示された。

αs1-カゼインに特異的なCD8⁺T細胞の反応性

CD8⁺T細胞の増殖応答の至適条件を検索するために、1 wellあたりに巻き込む細胞の数を変化させ(1-8x10⁵)、その応答性を測定した。図4-4に示すように、細胞数で2x10⁵以上加えると有意な応答性が観察された。この応答性は細胞数の増加に伴い比例的に増加したが、細胞数5x10⁵を越えるとばらつきが大きくなり反応はプラトーに達した。このグラフより細胞数は4x10⁵程度が最適であると思われる。

次に、限界希釈法を用いてαs1-カゼインに特異的なCD8⁺T細胞の頻度を測定した。なおこの実験においては、αs1-カゼインに特異的なCD4⁺T細胞の頻度もCD8⁺T細胞との比較のために同様に測定した。この系において、グラフの傾きから陰性ウエルの割合が37%になる点を求めこの際の細胞数の逆数を頻度とする(ポアソン分布による;文献112参照)。ただ1個のT細胞によってチミジンの取り込みが有意に測定できるかは疑問であるが、CD4⁺T細胞とCD8⁺T細胞の頻度の関係はほぼ正確に反映できると考えられる。図4-5に示すように、αs1-カゼインに特異的なCD8⁺T細胞の頻度は1/130,000であり、CD4⁺T細胞の頻度は1/30,000であることが示された。このことよりCD8⁺T細胞の頻度はCD4⁺T細胞の頻度と比較すると約4分の1であることが明らかとなった。

表 4 - 4 免疫条件の検討

CD8 derived from	Immunization with CFA	³ H-thymidine uptake by CD8 ⁺ T cells (cpm)		
		w/o Ag	Intact- α s1-CN	Tryptic- α s1-CN
Normal spleen	None	314 \pm 51	540 \pm 46	750 \pm 166
Lymph node	PBS/CFA	250 \pm 47	375 \pm 20	1378 \pm 123
Lymph node	Intact- α s1-CN	216 \pm 61	477 \pm 62	4235 \pm 604
Lymph node	Tryptic- α s1-CN	355 \pm 28	294 \pm 103	2080 \pm 623

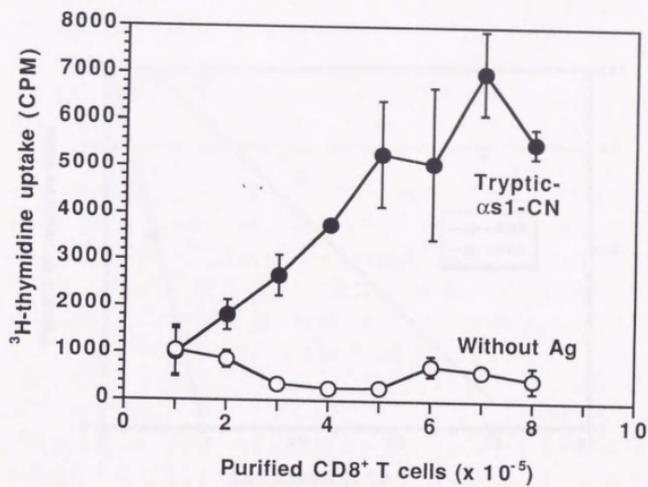


図 4-4 細胞数の検討

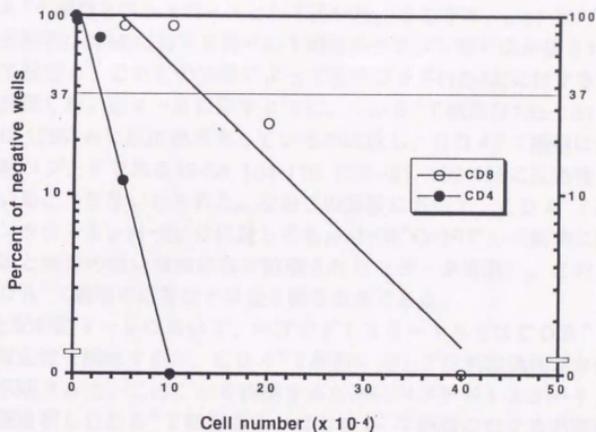


図4-5 抗原特異的なCD8⁺T細胞の頻度
(CD4⁺T細胞との比較)

各々の細胞数のCD8⁺およびCD4⁺T細胞をAPCと共に、抗原の非存在下 (negative response: 6 well使用) および存在下 (18 well使用) で培養した。この際、チミジンの取り込み値でnegative response+2SDを越えるものをpositive responseとした。この系において、グラフの傾きから陰性ウエルの割合が37%になる点を求めこの際の細胞数の逆数を頻度とする。たった1個のT細胞によってチミジンの取り込みが有意に測定できるかは疑問であるが、CD8⁺T細胞とCD4⁺T細胞の頻度の関係はほぼ正確に反映できると考えられる。

CD8⁺T細胞に対する α s1- κ カゼインの抗原決定基

CD8⁺T細胞に対する α s1- κ の抗原決定基を同定するために α s1- κ の4種のトリプシン分解物43-58, 104-119, 133-151, 152-193さらには α s1- κ カゼインの全領域をカバーする13種の合成ペプチドを用いて、精製CD8⁺T細胞を刺激した。なお本実験においてもCD4⁺T細胞をコントロールとして用いた。ここでは、 α s1- κ イントリプシン分解物(10 μ M)に対する各々のT細胞のチミジン取り込み値を100%として設定し、これとの比較によって各ペプチド(10 μ M)に対する応答性を評価した。図4-6に示すように、CD8⁺T細胞は133-151および136-155のみに反応性を有しているのに対し、CD4⁺T細胞はトリプシン分解ペプチドである43-58, 104-119, 133-151, 152-193に反応性を有していることが見いだされた。なおこの実験において、CD4⁺T細胞はインタクトな α s1- κ に対しても α s1- κ イントリプシン分解物に対するものと同等の強い増殖応答が観察された(データ省略)。このことはCD8⁺T細胞の応答性とは全く異なる点である。

上記の図4-6において、ペプチド136-155はCD8⁺T細胞の反応性を誘起するが、CD4⁺T細胞に対しては刺激活性がないことが示唆された。このことを確認するためにペプチド136-155を段階希釈しCD8⁺T細胞あるいはCD4⁺T細胞に対する応答性を比較検討した。図4-7に示すとおり、CD8⁺T細胞の場合はペプチドの濃度の上昇に伴いその反応性が増したが、CD4⁺T細胞においては50 μ Mの高濃度においてもペプチドに対する応答性は観察されなかった。この実験においても図4-6の場合と同様に α s1- κ イントリプシン分解物(10 μ M)に対する増殖応答を100%として設定し、これとの比較によってペプチド136-155(50 μ M)に対する応答性を評価した。その結果、CD8⁺T細胞においては92%の応答性を示したのに対し、CD4⁺T細胞においては僅かに数値上1%であり、有意な応答性とはいえないものであった。そのためこの条件において、CD4⁺T細胞は136-155に対して応答性を有していないものとして結論づけられる。

CD8⁺T細胞を特異的に活性化させるペプチドの特定をめざして

ここでペプチド136-155によってCD8⁺T細胞を特異的に活性化させ

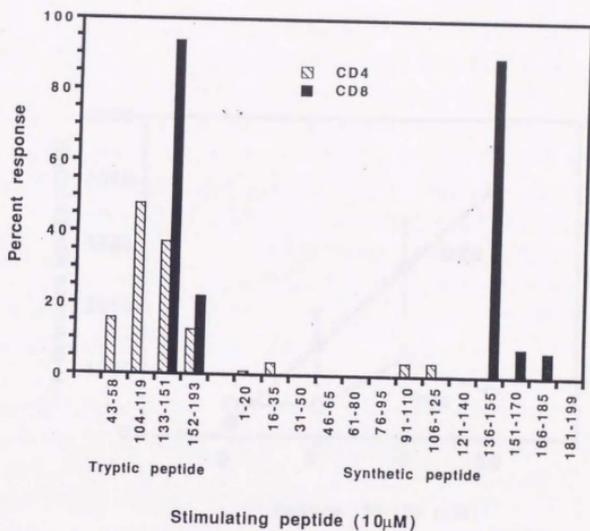


図4-6 CD8⁺T細胞の抗原決定基
(CD4⁺T細胞との比較)

ここでは、 α s1-カゼイントリプシン分解物(10 μ M)に対する増殖応答を100%として設定し、これとの比較によって各種のペプチド(各々10 μ M)に対する応答性を評価した。

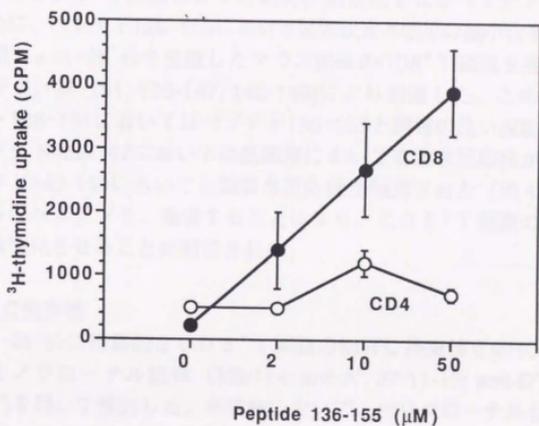


図4-7 ペプチド136-155に対するCD8⁺T細胞およびCD4⁺T細胞の応答性

この際、 α s1-カゼイン-トリプシン分解物(10 μ M)に対する反応性はCD8⁺T細胞(4235 \pm 604 CPM)、CD4⁺T細胞(33699 \pm 2744 CPM)であった。

る可能性が挙げられた。そこでこのペプチドを免疫したマウスに抗原特異的なCD8⁺T細胞が誘導されているかどうかを検討した。この結果、このマウスより得られたCD8⁺T細胞はペプチド136-155に対して顕著な増殖応答を示すことが観察された。さらにこの細胞は α s1-*gal*イントリプシン分解物(Tryptic- α s1-CN)に対しても同等の反応性を示すことが明らかとなった(図4-8)。このペプチド136-155が、CD4⁺T細胞の応答性を誘起せずに、CD8⁺T細胞のみを特異的に活性化させるか否かは今後の大きな研究課題である。

さらにCD8⁺T細胞のみを特異的に活性化させるペプチドを検索するために、ペプチド136-155における抗原決定基領域の縮小化を行った。この際、 α s1-*gal*インを免疫したマウス由来のCD8⁺T細胞を各種の合成ペプチド(136-151, 136-147, 142-149)により刺激した。この結果、ペプチド136-151においてはペプチド136-155と同等の高い反応性が、またペプチド136-147においては高濃度において有意な反応性が、さらにペプチド142-149においても顕著な反応性が観察された(表4-5)。これらのペプチドを、免疫することにより、CD8⁺T細胞のみを特異的に活性化させることが期待される。

MHC拘束性

α s1-*gal*インに特異的なCD8⁺T細胞のMHC拘束性をMHC分子に対するモノクローナル抗体(M5/114: anti-A^b, 27-11-13: anti-D^b, 20-8-4: anti-K^b)を用いて検討した。本実験において、ポリクローナルCD8⁺T細胞を α s1-*gal*イントリプシン分解物で刺激した。表4-6に示すように、これらの細胞の応答は抗A^bおよび抗D^b抗体により部分的に阻害されることが示された。しかしながら、抗K^b抗体によってはほとんど影響を受けなかった。そのため、このポリクローナルCD8⁺T細胞画分中にはクラスII(A^b)に拘束された応答を示す細胞とクラスI(D^b)に拘束された反応を示す細胞が含まれていることが示唆された。

MHCクラスIIに拘束された応答を示すCD8⁺T細胞の存在を確認するためにこのCD8⁺T細胞がA^b分子を遺伝子導入されたL細胞株(FT2.3)と抗原により刺激されるか否かを検討した。表4-7に示すように、このCD8⁺T細胞はこの条件下においても α s1-*gal*イントリプシン分解物

Ag (10 μ M)

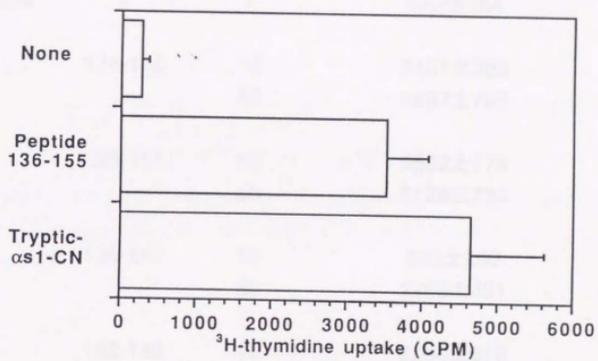


図 4-8 H^2D^b 136-155を免疫したマウス由来のCD8 $^+$ T細胞の抗原応答性

表 4-5 抗原決定基の限定化

Cell	Ag	Conc. (μM)	^3H -thymidine uptake
CD8	-	-	542 \pm 164
	136-155	10	3401 \pm 368
		50	5697 \pm 795
	136-151	10	3502 \pm 178
		50	6120 \pm 724
	136-147	10	583 \pm 269
		50	2988 \pm 451
	142-149	10	2530 \pm 610

CD8⁺T細胞を抗原提示細胞の存在下、各種のペプチドで刺激した。

表 4 - 6 CD 8⁺T 細胞の増殖応答に及ぼす抗MHC抗体の阻害効果

³ H-thymidine uptake in the presence of (cpm)					
Cell	Ag	w/o Ab	Anti-A ^b	Anti-D ^b	Anti-K ^b
CD8	-	263±41	ND	ND	ND
	+	3759±59	1494±141	1778±515	4803±876

精製したCD 8⁺T 細胞をAPC存在下、Tryptic- α_{s1} -casein (10 μ M)で刺激した。そして培養開始時に適宜希釈した抗MHC抗体を添加した。

ND; not done

表 4-7 I-A^bを遺伝子導入したL細胞株による
CD8⁺T細胞の増殖応答

Cell	APC	Ag	³ H-thymidine uptake
CD8	I-A ^b L cell	None	685±198
CD8	I-A ^b L cell	Tryptic- α s1-CN	4037±189
CD8	I-A ^b L cell	Peptide 136-155	3870±310

およびペプチド136-155に対して応答性を示すことが観察された。このため、外来抗原である α s1-カゼインをクラスIIに拘束的に認識するCD8⁺T細胞が存在することが確認された。

抗原特異的なCD8⁺T細胞株

表4-6においてこのポリクローナルCD8⁺T細胞画分中にはクラスII(A^b)拘束的に α s1-カゼインを認識する細胞とクラスI(D^b)拘束的に α s1-カゼインを認識する細胞が存在することが示唆された。この中で、クラスII(A^b)拘束的に α s1-カゼインを認識する細胞株としては既に13G2細胞が得られており、この種の細胞の存在は細胞株として実証されている。そこで今回、クラスI(D^b)拘束的に α s1-カゼインを認識する細胞株の分離を試みた。まず磁気ビーズにより分離されたCD8⁺T細胞を α s1-カゼイン-トリプシン分解物で刺激し、この細胞を限界希釈した。そして増殖してきた細胞株をFACSで解析し、CD8⁺T細胞株を分離した。そしてこれらの細胞の中から α s1-カゼイン-トリプシン分解物に応答性を示す3つの細胞株を得た(表4-8)。そこで次にこれらの応答性のMHC拘束性を抗体阻害実験により評価した。その結果これら3種のCD8⁺T細胞クローンは全て抗D^b抗体によりその応答性が阻害された。そのためこれらのクローンはクラスI分子であるD^b分子と共に α s1-カゼインを認識していることが示唆された。

リンホカイン産生

このような α s1-カゼインに特異的なCD8⁺T細胞は抗原刺激によりどのようなリンホカインを産生しているのであろうか。PCR法を用いてリンホカインmRNAの発現を検索したところ、ポリクローナルCD8⁺T細胞は抗原刺激によりIL-2、IL-3、IL-10、 γ -IFN、GM-CSFなどを発現していることが観察された(データ省略)。特にIL-10および γ -IFNについてはELISA解析によりその産生量の定量を試みた。表4-9に示すとおり、ポリクローナルCD8⁺T細胞は抗原刺激により γ -IFNを産生することが観察された。一方、この条件において、IL-10は検出限界以下であった。RT-PCRの結果から、IL-10の産生が示唆されているため、ポリクローナルCD8⁺T細胞は抗原刺激によりIL-10を若干産

表4-8 D^bに拘束して α s1-カゼインを認識する
CD8⁺T細胞クローン

Cell	IL-2	Ag	Ab	³ H-thymidine uptake
5F1	-	-	-	1200
	-	+	-	3300
	+	-	-	10000
	+	+	-	20050
	+	+	D ^b	10250
	+	+	A ^b	18450
6B1	-	-	-	350
	-	+	-	910
	+	-	-	28000
	+	+	-	89000
	+	+	D ^b	25500
	+	+	A ^b	68000
6G1	-	-	-	450
	-	+	-	360
	+	-	-	37000
	+	+	-	83000
	+	+	D ^b	36500
	+	+	A ^b	59200

表 4-9 CD8⁺T 細胞が産生するIL-10およびIFN- γ (ELISA解析)

Cell	Stimuli	IL-10(U/ml)	IFN- γ (U/ml)
poly-CD8	Antigenic	<1	8
5F1	Antigenic	42	350
	Mitogenic	80	256
6B1	Antigenic	18	380
	Mitogenic	27	900
6G1	Antigenic	26	256
	Mitogenic	125	850
13G2	IL-2	125	825
	Mitogenic	224	2015

このELISAの感度はIL-10(1U/ml)、IFN- γ (1U/ml)である。なお Antigenic StimulationとはAg+APCによる刺激を、またMitogenic StimulationとはConA+APCによる刺激をさす。

生してはいるものの、この量は測定感度以下であるものと推察された。なおこの実験においては先に樹立したCD8⁺T細胞株におけるIL-10およびγIFNの産生量の検討も同時に行った。抗原刺激あるいはマイトゲン刺激によりクラスII拘束性の全てのCD8⁺T細胞株において顕著なIL-10およびγIFNの産生が認められた。なお先に述べたとおり、クラスII拘束性CD8⁺T細胞株である13G2細胞においてはIL-10およびγIFNの産生が観察されている。これらの結果からαs1-カゼインに特異的なCD8⁺T細胞は抗原刺激により抑制性のリンホカインであるIL-10およびγIFNを産生することにより、ある種の免疫抑制作用を発揮していることが推察された。

考察

これまでに、間接的な測定方法である免疫抑制活性などを指標にして、外来性の可溶性抗原を認識するCD8⁺T細胞の存在が示唆されていた。しかしながら、通常これらの細胞の反応性を直接的に測定することが困難であったため、その細胞の存在を明確に示した研究はなかった。我々は本研究において、磁気ビーズを用いた分離法によりCD8⁺T細胞を高度に精製し、この細胞が可溶性の外来抗原である α s1-*gal*⁺インに対して応答性を有していることを見いだした。そしてこれらの細胞の抗原特異的な応答性は抗原の免疫により確実に増加することが示された。

初めに明確にしなければならないことは、これらの反応性が極く僅かに含まれるCD4⁺T細胞（精製CD8細胞中約0.5%）によるものではないことを示すことである。この目的で〈1〉抗体による阻害実験を行った。その結果、高度に精製されたCD8⁺T細胞の反応性は抗CD8抗体により阻害されるが、抗CD4抗体によっては全く影響を受けないことが示された。また〈2〉 α s1-*casein*に対して反応性を有するCD4⁺T細胞の頻度は計算上約 3×10^4 個に1個の割合であり、高度に精製した 4×10^5 個のCD8⁺T細胞に含まれるCD4⁺T細胞（約2000個）による反応は期待できない。さらに〈3〉高度に精製したCD4⁺T細胞はインタナ α s1-*gal*⁺インに対しても応答したが、CD8⁺T細胞においては有意な応答は観察されなかった。そしてこの両細胞において、*E_H7*特異性が明らかに異なっていることが示された。これら3つの実験結果から、CD8⁺T細胞が可溶性抗原である α s1-*gal*⁺インに対して反応性を示していることが明確に示された。今までに、CD8⁺T細胞クローンの外来性抗原に特異的な増殖応答はいくつか報告されているが、今回の我々の研究は生体より調製されたポリクローナルなCD8⁺T細胞の可溶性抗原に対する直接的な反応性を測定した初めてのケースである。一般に、CD4⁺T細胞は外来性の抗原のために用意されたレパートリーであり、CD8⁺T細胞は内在性の抗原を認識するレパートリーであるとする考え方が主流を占めている。そのため今回の研究対象である可溶性の外来抗原（ウシ α s1-*casein*）に特異性を有するCD8⁺T細胞は上記の定説から逸脱した新しい

種類の細胞集団であると捉えることができる。

本研究においては、まず初めにこのポリクローナルCD8⁺T細胞が抗原である α s1- κ カゼインを認識する際のMHC拘束性が検討された。

〈1〉抗体による阻害実験の結果、このCD8⁺T細胞の反応性は抗クラスII抗体および抗クラスI抗体により部分的に阻害されることが示された。〈2〉I-Abを遺伝子導入したL細胞と抗原によりこのCD8⁺T細胞が刺激された(クラスII拘束性の確認)。〈3〉このCD8⁺T細胞を出発材料としてクラスIIに拘束性のCD8⁺T細胞株が得られた。以上の結果からこのCD8⁺T細胞画分中にはクラスII拘束的に抗原を認識する細胞集団とクラスIIに拘束的に抗原を認識する細胞集団が含まれていることが明らかとなった。

T細胞の胸腺内での分化過程において、まず自己のMHC分子に対してある種の親和性を持つ細胞のみが選択され(Positive selection)、その後自己成分に应答性を有する細胞が消失する(Negative selection)ことがトランスジェニックマウスを用いた研究により明らかにされている(7-10)。この教育においてCD4⁺T細胞は自己のクラスII抗原で選択され、またCD8⁺T細胞は自己のクラスI抗原で選択されることが示されている。そのため我々の研究において確認されているクラスII拘束的に抗原を認識するCD8⁺T細胞は例外的な細胞集団であると思われる。

一方で、このT細胞の初期発生におけるPositive selectionの重要性を疑問視する向きもある。この根拠となるのがアロキラーT細胞の存在である。これらのT細胞は自己の胸腺には存在しない非自己のMHC抗原を認識し、そして非自己(異種)の細胞を傷害することが知られている。この場合、非自己のMHC抗原は自己の胸腺内には存在しないため、これらのT細胞がPositive selectionされることは原理的に不可能である。そのためこれらの細胞が胸腺においてどのようにして選択されているかは大きな問題である。そしてこの問題を更に複雑化しているのは非自己のクラスII抗原を認識するCD8⁺アロキラーT細胞の存在である(113)。この際これらの細胞は自己のクラスII抗原によってはPositive selectionされていないことが示唆されており(114)、むしろ自己のクラスIによって選択されている可能性が指摘されている

(篠原博士より私信)。クラスII拘束的に α s1-カゼインを認識するCD8⁺T細胞の起源に疑問が抱かれたが、この細胞もおそらくはクラスI抗原によってPositive selectionされた細胞であると思われる。またさらにこの細胞の抗原応答性は後天的に交差反応により獲得されたものであると考えられる。このような交差反応による抗原応答性がT細胞レパトリーの形成において重要な役割を果たしていることが想像される。

次に、MHCクラスI拘束的に外来抗原である α s1-カゼインを認識するCD8⁺T細胞における抗原認識機構について考察を進めたい。一般に、MHCクラスI分子は内在性の抗原（その細胞自身がこれをコードする遺伝子を持ち、この細胞により合成される蛋白質抗原）のみをT細胞に提示しているとされている。それではなぜ、外来性の抗原がMHCクラスIにより提示されるのであろうか。第2章において今回抗原として用いている α s1-カゼインは、特定の高次構造を取りにくいいためMHCクラスII分子に直接結合でき、これによりT細胞を活性化させることが示されている。そのため生体内において、種々の蛋白質分解酵素などの助けを借りて直接的にMHCクラスI分子に結合し、これにより特異的なT細胞を活性化している可能性が推察される。一方、in vitroにおいては刺激抗原としてペプチド抗原が用いられているため、MHCクラスI分子による抗原の提示は考えやすい。これらのことを考え合わせると、今回の研究において外来抗原に特異的なMHCクラスI拘束性のCD8⁺T細胞が検出されたことは、抗原として用いた α s1-カゼインに因るところが大きいものと推察される。このように蛋白質抗原を免疫することによりCD8⁺T細胞を誘起する試みはワクチンの開発と相俟って非常に盛んに行われている。特に、HIVウイルスに対するワクチンの製造においては、この方法がおおいに期待を集めている。

次にこれらの細胞の機能について解析を行った。一般に、外来性の抗原を認識するCD8⁺T細胞は免疫抑制活性を有しているケースが多い。このため α s1-カゼインに特異的なCD8⁺T細胞も免疫抑制活性を有していることが考えられた。まず、このポリクローナルCD8⁺T細胞のリンホカインの産生をPCR法により検討した。その結果これらのCD8⁺T細胞は抗原刺激によりIL-10およびIFN- γ といった抑制性の

リンホカインのmRNAを発現することが示された。そこでまずこの細胞のIL-10産生を検討する目的で、これらの細胞あるいはその培養上清のヘルパーT細胞クローンに対する免疫抑制活性が検討されたが、有意な抑制活性は観察されなかった（データ省略）。また更に、ELISA分析においても有意なリンホカインの産生は検出されなかった。

このような原因の1つとして、図4-5において示すように反応している細胞数が極端に少ないことがあげられる。またもう1つの理由として細胞の活性化が不十分であったことが推察される。これまでにDorfらによって、抑制T細胞を活性化するためには多種の細胞より構成されるカスケード系が必要であることが示されている(44)。そのため、これらの α s1-カゼインに応答性を有するポリクローナルCD8⁺T細胞も何らかの追加的な刺激により強い免疫抑制活性を有する細胞に分化しうる可能性が考えられた。実際、 α s1-カゼインに特異性を有する数種のCD8⁺T細胞クローンにおいて顕著な抑制性リンホカイン(IL-10 & IFN- γ)の産生が認められている。なおポリクローナルCD8⁺T細胞は抗原刺激によりIFN- γ を産生することはELISAにより確認されている。これらのことを考え合わせると、生体内である種のCD8⁺T細胞は外来性の抗原に应答し、抑制リンホカインを産生することにより、免疫応答を抑制していることが推察された。

この抑制リンホカインの中で、IL-10はT細胞の増殖を抑制するリンホカインとして注目されているが、そのほかに未成熟CD8⁺T細胞をキラーT細胞へと分化させる活性も報告されている(115)。そのためポリクローナルCD8⁺T細胞において産生されたIL-10によって、これらの細胞のキラーT細胞への分化が促進されている可能性も考えられた。確かに、 α s1-カゼインに特異的なポリクローナルCD8⁺T細胞は僅かながら細胞傷害活性を有していることが観察されている（データ省略）。Shinoharaらにより、抗原提示細胞に対する細胞傷害活性が、ある状況下における免疫抑制に寄与していることが示唆されている(55)。いずれにせよ、 α s1-カゼインに特異的なポリクローナルCD8⁺T細胞は免疫抑制リンホカインあるいは細胞傷害を介して免疫系を抑制的に制御する活性を有していることが予想される。

最後に、これらのCD8⁺T細胞の応用法について話を進めたい。

このCD8⁺T細胞によって認識される α s1- β 2ミクロglobulinの抗原決定基はCD4⁺T細胞の決定基とはかなり異なっていることが示された。そして、 α s1-カゼインの領域136-155はCD8⁺T細胞のみを活性化することが示唆されている。さらに、これらのCD8⁺T細胞は抗原刺激により抑制性のリンホカインを産生していることが示されている。Sercarzらはリゾチームを用いた研究において、CD8⁺抑制T細胞の抗原決定基とCD4⁺ヘルパーT細胞の抗原決定基が異なっていることを示している(24)。そしてこの抑制T細胞に特異的な抗原決定基を用いて、抑制T細胞のみを選択的に誘導する方法が模索されている。我々の研究においても10残基程度の α 1- β 2ミクロglobulin 136-147や142-149がCD8⁺T細胞を刺激することが示されており、これらは抑制T細胞のみを特異的に活性化しうる抗原として非常に有力な候補である。

これらの抗原により誘導されるCD8⁺抑制T細胞はそのMHC拘束性により2種類に分類されることが示されている。

免疫抑制リンホカインであるIL-10を多く産生するCD8⁺抑制T細胞として報告された13G2細胞(57)あるいはHD-8細胞(116)はいずれもMHCクラスII拘束性の細胞である。これらのMHCクラスII拘束的に抗原を認識するCD8⁺T細胞は細胞傷害活性が非常に弱いとされており、一つの原因として、このケースにおいてはCD8抗原によるシグナル伝達が行われていないことが挙げられる。このように細胞傷害活性を伴わないCD8⁺T細胞は従来より考えられてきた抑制T細胞のプロトタイプである(117)。そのため、不必要な細胞傷害を誘起することなしに、免疫抑制効果を誘導する際は、このMHCクラスII拘束的に抗原を認識するCD8⁺抑制T細胞の利用が有効であると思われる。しかしながらこの際、同一抗原によりMHCクラスII拘束的に抗原を認識するCD4⁺ヘルパーT細胞を誘導してしまう恐れがある。

一方、MHCクラスI拘束性のCD8⁺T細胞においても免疫抑制性リンホカインの産生が確認されている。確かにこの細胞集団の場合、抗原提示細胞に対する強い細胞傷害活性が観察されているが、MHCクラスI拘束的にCD4⁺T細胞を活性化することはまず考えられない。このため、CD8⁺抑制T細胞のみを特異的に活性化しうる抗原としては、MHCクラスIIに拘束的にCD8⁺T細胞を刺激する抗原を第一に挙げる

べきであろう。

将来、このようなMHC拘束性とCD8⁺T細胞の機能の関連を検討するにあたり、特定のMHC分子に拘束されてT細胞を刺激するペプチドを同定する必要がある。そして、これらのペプチド抗原の投与により生体内に免疫寛容状態が誘導されるかどうかを検討しなければならない。このような抑制T細胞に特異的な抗原決定基を投与することにより抗原特異的な免疫抑制を誘起し、これによりアレルギーや自己免疫疾患の治療法が新たに確立されることが望まれる。

第5章 α s1-カゼインにより誘導された自己反応性CD8⁺T細胞株の樹立とその性質

序

免疫系は、自己と非自己を識別しウイルスなどの非自己成分を生体外に排除する生体の持つ防御システムである。そのため自己の成分に対しては免疫寛容が成立しており、この機構にT細胞が重要な役割を果たしていると考えられている。この意味で自己反応性のT細胞は本来存在し得ないものであり、もし仮に存在したとするならば、自己免疫疾患の発症へと結びつくことも考えられる。しかしながら、健常動物においても自己反応性T細胞が存在していることが、Tリンパ球を自己の細胞で刺激する混合自己リンパ球反応において実証されている(118-120)。そして今までにこのような細胞集団から多くのCD4⁺自己反応性T細胞クローンが得られている(121-124)。これらの細胞は自己のMHC分子と共に何らかの自己成分を認識していると考えられている。免疫反応は通常はある特定の抗原に対して行われるものであるが、このような自己反応性細胞は生体内に存在する自己抗原に反応しているため常に活性化状態にあると考えられる。そのため特定の抗原による活性化を必要とせず、全ての免疫応答に参加できるため、広範囲にわたる免疫制御能力があると考えられている。多くのCD4⁺T細胞は強い免疫賦活活性を有しており、このCD4⁺自己反応性T細胞も同様にヘルパー活性を持っているものと思われる。生体の恒常性を考えると逆の反応性(免疫抑制活性)を有する細胞集団が存在している事が予想される。多くのCD8⁺T細胞は免疫抑制活性を有していることが報告されており、免疫抑制活性をもつ自己反応性細胞としてCD8⁺自己反応性T細胞が考えられる。

一般に、CD8⁺T細胞は増殖能力が芳しくないため、CD4⁺T細胞との混合培養を行うとCD8⁺T細胞が時間を追うごとに減少していき、ついにはほとんど消失してしまうことが観察されている。これまでに得られた自己反応性クローンの場合、T細胞全体を出発材料としていたためか、全てCD4⁺T細胞クローンであった。CD8⁺自己反

応性T細胞の存在を立証するために、CD 8⁺自己反応性T細胞クローンを得る努力が積み重ねられたが、今まではCD 8⁺T細胞をT細胞全体から分離することがとても困難であったため成功するに至らなかった。このためCD 8⁺自己反応性T細胞クローンを得るためにはCD 4⁺T細胞を完全に取り除くことが必要であると考えられる。最近、特定の細胞表面抗原に対する抗体を結合した磁気ビーズを用いて、短時間のうちに目的とする細胞集団を分離する技術が開発された。またこれまでの研究から、 α s1-加^レインで免疫されたC57BL/6マウスのリンパ節中にはCD 8⁺抑制T細胞が誘導されていることが分かっている。今回我々は、この α s1-加^レインで免疫したリンパ節細胞から、抗CD 8結合磁気ビーズを用いてCD 8⁺T細胞を調製し、自己反応性CD 8⁺T細胞クローンを樹立することに成功した。

このようなCD 8⁺自己反応性T細胞は生体の免疫系自体を不活性化することにより、全体的な免疫応答を抑制していることが予想される。食品アレルギーの発症には複数のアレルゲンが関与していることが一般的であり、これら全ての抗原に対する応答が自己反応性CD 8⁺T細胞によって抑制される可能性が考えられる。そこで本章においてはこの自己応答性細胞の抗原認識機構を解析し、さらにその免疫抑制作用について検討を行った。

実験材料と方法

動物、抗体およびFACS 第2章に記載

抗原 免疫原として α s1-抗原を用いた。

リンホカイン

T細胞増殖因子として組換え体ヒトIL-2を用いた。

リンホカインの測定 PCRおよびELISA法(第4章を参照)

培養細胞株

T細胞の細胞傷害活性の測定のためにP815細胞(マストサイトマ)、EL-4細胞(リンホマ)、(これらは篠原博士より供与された)、IC-21(マクロファージ; ATCC)、B1710細胞(125; Bリンホマ: 国立予防衛生研究所の牧野正彦博士より供与)を用いた。

細胞傷害活性の測定法については第3章を参照のこと。

T細胞クローンの樹立及びその増殖応答の測定法

第2章に記載のとおり

細胞の分画

リンパ節細胞よりCD8⁺T細胞を分離するために抗CD8抗体を結合した磁気ビーズを用いた(第4章を参照)。

通常は抗原提示細胞としてX線照射した脾臓細胞をそのまま用いている。しかしこの中にはB細胞やマクロファージなどが混在しているため、実験によってはこれらを分離して用いる必要があった。すなわち脾臓細胞をプラスチックディッシュ中で1時間培養することにより、附着性のマクロファージと非附着性のB細胞を分離し、これを抗原提示細胞として用いた(詳しくは文献126を参照)。

結果

CD 8⁺自己応答性T細胞株の樹立

α s 1-カゼインで免疫したマウスのリンパ節細胞から、抗CD 8抗体を結合した磁気ビーズを用いてCD 8⁺T細胞を分離した。そしてこの細胞をX線照射した同型マウスの脾臓細胞（自己の抗原提示細胞）の存在下、抗原と共に培養した。この細胞を限界希釈法によりクローニングし、その結果得られた細胞株の中で自己の抗原提示細胞のみに反応を示す細胞を選択した。このようにして得られた二つのT細胞クローン（4B4とD2）の表面抗原をFACSにより解析した。図5-1のように両方の細胞においてCD 8、CD 3、TCR抗原の発現が認められた。一方CD 4抗原は陰性であった。これら二つのクローンはごく一般的なCD 8⁺T細胞であることがわかった。

これらの細胞の抗原特異性をT細胞増殖試験により検討した。自己の抗原提示細胞であるC 57 BL/6マウスの脾臓細胞には反応したが異系マウスであるC 3 H/Heの脾臓細胞には反応性を示さなかった（表5-1）。この実験は添加する血清としてウシ胎児血清（FCS）を用いているために、これらのT細胞が血清中の何かの成分に反応していることが考えられた。そこでFCSを正常マウス血清（NMS）に変更して同様のT細胞増殖試験を行った。その結果、これらの細胞はNMSを用いても自己の抗原提示細胞に反応性を有していることが認められた。そのため、CD 8⁺T細胞クローンである4B4あるいはD2細胞は自己抗原に反応する自己応答性T細胞であることが明らかとなった。

自己応答性T細胞株のMHC拘束性

このような自己応答性T細胞は自己のMHC抗原と共に自己成分を認識しているとされている。このMHC抗原として何種類かの異なる分子が存在しており、マウスにおいてはMHCクラスII抗原としてI-A分子とI-E分子が、またクラスI抗原としてK分子やD分子などがクローニングされている。そこで今回得られた自己応答性T細胞がどのMHC分子に拘束されて自己抗原を認識しているかを明らかに

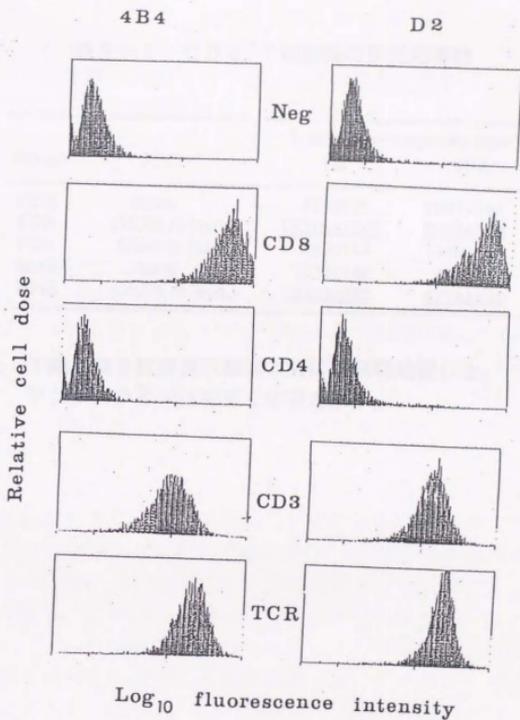


図5-1 自己応答性T細胞株の表面抗原

表 5-1 CD8⁺T細胞株の自己応答性

Serum	APC	Proliferative response (cpm)	
		D2	4B4
FCS	None	476±125	1241±561
FCS	C57BL/6 (syn.)	<u>13375±1007</u>	<u>9263±618</u>
FCS	C3H/He (allo.)	689±114	1446±196
NMS	None	400±140	391±146
NMS	C57BL/6 (syn.)	<u>3953±950</u>	<u>4714±492</u>

T細胞株を抗原提示細胞と共に4日間培養した。
アンダーラインは有意な応答を示す。

するために、MHC領域だけが異なっているコンジェニックマウスを用いてT細胞増殖試験を行った。表5-2に示すように、これらのT細胞はB10、2R、4Rマウスには反応するが、B10.Aおよび3Rには反応しない事が観察された。この結果は、これらのT細胞がD^b分子に拘束されて何らかの自己抗原を認識していることを意味するものである。この実験事実をさらに補強するために、D^b分子に対するモノクローナル抗体を用いたブロッキング実験を行った(図5-2)。その結果、これらの細胞の自己成分に対する反応性は抗D^b抗体によって完全に阻害されることが明らかとなった。これら二つの結果から自己反応性クローンである4B4細胞とD2細胞はクラスI分子であるD^b分子に拘束されて何らかの自己成分を認識し、これにより増殖反応を示している事が明らかとなった。

クラスI分子であるD^b分子はほとんどの細胞において発現している細胞表面抗原であり、これらのT細胞自身もD^b分子を発現していることがFACSにより確認されている。しかしながら、今回得られたT細胞クローンはそれ自身では相互に刺激しあうことはできないことが示されている(表5-1)。そのため、これらのT細胞クローンを刺激するためには新たに抗原提示細胞を加える必要がある。これまでは抗原提示細胞として自己の脾臓細胞をそのまま使っていたため、どの種類の免疫細胞がこれらの自己応答性クローンを活性化しているかは明らかではなかった。そこでまず脾臓細胞をプラスチックシャーレにより分画し、これらのT細胞刺激活性の有無を検討した。その結果、マクロファージを多く含むプラスチック付着性細胞はこれらのT細胞を強く活性化したが、B細胞を多く含むプラスチック非付着性細胞はこれらのT細胞をほとんど刺激しなかった(表5-3)。このため、4B4あるいはD2細胞を刺激する抗原提示細胞としては、B細胞やT細胞よりもマクロファージが適していることが示された。

自己応答性T細胞株の機能

これらのCD8⁺自己反応性T細胞クローンの機能について解析を行った。まず、これらのクローンのリンホカイン産生パターンをPCR法を用いて検討した。表5-4に示す通り、これらの細胞は抗原刺激に

表 5-2 自己応答性 T 細胞株の MHC 拘束性

Strain	APC Haplotype				Proliferative response (cpm)		
	K	A	E	D	D2	4B4	4G4
-					1513±529	845±428	893±190
B10	b	b	-	b	<u>9847±2767</u>	<u>16652±2673</u>	<u>84419±8004</u>
B10.A	k	k	k	d	1098±392	1660±320	1675±471
2R	k	k	k	b	<u>16047±1035</u>	<u>23241±819</u>	2367±218
3R	b	b	k	k	1883±115	2072±58	<u>75648±1937</u>
4R	k	k	-	b	<u>17180±1038</u>	<u>22305±2484</u>	2572±309

クラス II 拘束性自己反応性 CD 4⁺ T 細胞クローン 4 G 4 (当研究室で樹立) をコントロールとして用いた。

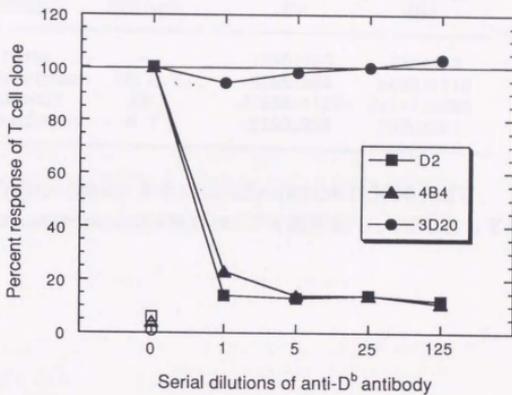


図5-2 抗クラスI抗体による増殖の阻害
T細胞株としてD2、4B4および3D20（陰性対照）を用いた。

表5-3 自己応答性T細胞株のAPC選択性

Category	APC Cell type	Proliferative response (cpm)	
		D2	4B4
None	-	1010±198	815±162
Whole spleen	M ϕ , B, T	9255±594	8450±1118
Adherent	M ϕ	37858±11224	24117±6386
Non-adherent	B, T	2150±255	3020±261

Whole spleen あるいは Adherent cell は 3000-rad で、
Non-adherent cell は 800-rad で X 線照射し、APC として用いた。

表 5-4 自己応答性 T 細胞株のリシカインパターン(PCR解析による)

Cell	γ -IFN	IL-2	TNF- β	IL-3	GM-CSF	TNF- α	IL-4	IL-5	IL-10
Th1	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Th2	-	-	-	+	+	+	+	+	+
D2	+	\pm	+	\pm	+	+	-	-	+
4B4	+	\pm	+	\pm	+	+	-	-	+

Th1細胞として#16(東大医科研、成内秀雄博士より供与)を、
Th2細胞としてD10(ATCC)を用いた。

よりIL-10、IFN- γ 、TNF- β 、TNF- α 、GM-CSFのmRNAを顕著に発現していることが確認された。これらのリンホカインの中でIL-10あるいはIFN- γ は免疫抑制活性を有していることが知られており、4B4とD2細胞は免疫抑制能力を有していることが示唆された。

次に、IL-10とIFN- γ についてはELISA法により産生量を測定した。この際刺激の条件としては通常の抗原(APC)刺激のほかに、マイトゲン(APC + ConA)刺激したものも用いた。表5-5に示すように両方の細胞とも抗原あるいはマイトゲン刺激によりIL-10およびIFN- γ を産生することが示された。

今回得られた自己応答性クローンはCD 8⁺T細胞であるため、細胞傷害活性を有していることが考えられた。そこでC57BL/6マウス由来の培養細胞を標的細胞としてこれらのT細胞の傷害活性を検討した。この実験で用いた細胞株はEL4細胞(T細胞系)、B1710細胞(B細胞系)、IC-21細胞(マクロファージ系)である。また、MHC非特異的な傷害活性を測定するためにP 8 1 5細胞(H-2^d由来)を用いた。図5-3に示すとおり、今回得られた二つの自己反応性T細胞クローンはD^b抗原を有するB1710細胞を傷害することが示された。そしてこの活性は抗D^b抗体の添加により阻害された(データ省略)。そのためこれらの自己応答性T細胞は何らかの自己成分をMHCクラスI拘束的に認識し、自己の細胞を傷害することが明らかとなった。また、これらの自己応答性T細胞株はIC-21細胞に対しても弱い細胞傷害活性を有していることが観察された。しかしながらEL4細胞(T細胞系)に対しては傷害活性を有していなかった。この理由として、この標的細胞が自己応答性T細胞によって認識されるある特定の分子を発現していない可能性が挙げられる。なお、P 8 1 5細胞に対する非特異的な傷害活性は観察されなかった。

表 5 - 5 自己応答性 T 細胞のリンカイン (IL-10あるいは IFN- γ) 産生

Cell	Stimuli	IL-10(U/ml)	IFN- γ (U/ml)
D2	APC	33	150
	APC+ConA	300	790
4B4	APC	26	209
	APC+ConA	125	996

T 細胞株($2 \times 10^6/2\text{ml}$)を APC または APC+ConA($5\mu\text{g/ml}$)で刺激し、24 時間後の上清を採取した。なお、ELISA の測定感度は IL-10(1U/ml)、IFN- γ (1U/ml)である。

この表は、3 回の独立した実験結果の平均値を示している。

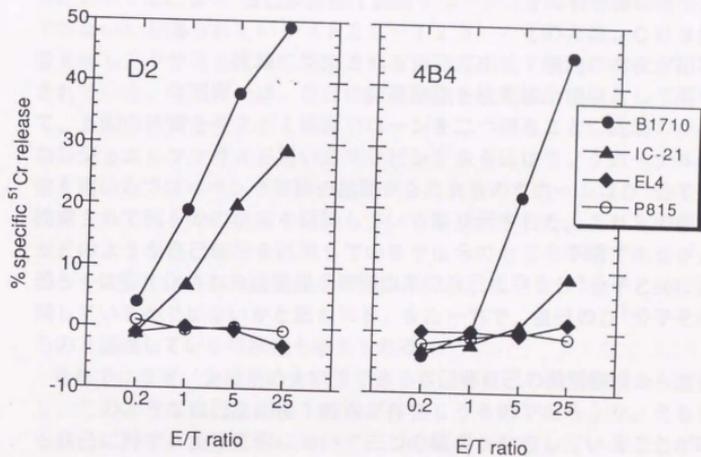


図5-3 自己応答性クローンの細胞傷害活性

考察

これまでに混合自己リンパ球反応を用いて多くの自己反応性クローンが得られたが、それらは全てクラスⅠ抗原に拘束性を有するCD4⁺T細胞であった(121-124)。しかしながら、マウスにおいては自己のクラスⅠ抗原に反応するハイブリドーマが(127)、またヒトにおいてはCD8⁺自己反応性T細胞クローン(その特異性は明らかではない)が得られている(128-129)。そのため、CD8抗原を有し、クラスⅠ抗原に拘束される自己反応性T細胞の存在が指摘されていた。今回我々は、自己の脾臓細胞を抗原提示細胞として用いて、上記の性質を有するT細胞クローンを二つ得ることに成功した。コンジェニックマウスを用いたマッピングさらにはモノクローナル抗体を用いたブロッキング実験の結果からこれらのクローンはD^b分子に拘束されて何らかの抗原を認識している事が示された。これらの細胞がどのような自己成分を認識しているかは今のところ不明であるが、恐らくは断片化された抗原提示細胞由来の自己成分をD^b分子と共に認識しているのではないと思われる。また一方で、自己のD^b分子そのものを認識している可能性も考えられる。

それではなぜ、免疫系の大前提である自己非自己の識別機構から逸脱し、このような自己反応性T細胞が存在しうるのであろうか。そもそも自己に対する免疫寛容において三つの機構が介在していることが明らかとなっている。自己成分に反応する免疫担当細胞(T細胞とB細胞)が消失すること“(1) clonal deletion”あるいは不応答化すること“(2) clonal anergy”、さらには自己成分に対する反応性が抑制T細胞によって抑制されていること“(3) suppression”である。この中でクローンの消失が自己寛容の維持においてもっとも重要であることが分かっている。しかしながら、クローンの消失はT細胞においてのみ観察される現象であり、抗体を産生するB細胞には当てはまらない。またこのT細胞の消失は胸腺において行われるため、ここで消失してしまうT細胞は胸腺内に存在する自己成分に対するものに限られてしまう。このため、胸腺内に存在しない自己抗原(いろいろな器官において特異的に発現される分子など)に対する免疫寛容は主にクローンの不応答化と免疫抑

制によって維持されると考えられている。しかしながら、このような反応は可逆的なものであり、外的環境の変化により免疫寛容が破綻してしまうことが十分考えられる。こういった外的環境の変化としてウイルスやバクテリアの侵入、ある種の感染症、大気汚染などが挙げられている。一部の自己免疫疾患においては特定のウイルスの侵入によって発病が促されるとする報告なども提出されている(130)。これはウイルスなどによって誘起された免疫担当細胞の中で自己の成分とクロスリアクションしてしまうものがあるためらしい。このような自己成分に反応する免疫担当細胞は通常は前述の可逆的な機構により反応性が停止しているがウイルスの刺激などにより反応性が復活すると考えられている。本研究によって、カゼインで免疫されたリンパ節細胞から二つのCD8⁺自己反応性T細胞株(4B4細胞とD2細胞)が得られたが、この場合カゼイン免疫により誘導されたCD8⁺T細胞の中で自己成分とクロスリアクションするものが選択され、これらがクローン化されたのではないかと考えられる。このような考え方は、ある種の抗原の免疫により様々な自己反応性クローンが効率良く樹立されていること(120)からも支持される。

今回得られた4B4あるいはD2細胞は自己のクラスI分子(D^b)に拘束されて増殖反応を示すことが明らかとなっている。このクラスI分子は生体のほとんどの細胞において発現している抗原であり、これらのT細胞自身もD^b分子を発現していることが確認されている。しかしながら、これらのT細胞クローンを刺激する為には新たに抗原提示細胞を加えることが必要である。そしてこの抗原提示細胞としては、B細胞よりもマクロファージの方が有効である事が示されている。このことの理由として、〈1〉今回得られた自己反応性クローンがマクロファージなどに優先的に発現している抗原を認識していることが挙げられる。このことを明らかにするために、D^b分子と共に提示される自己ペプチドを同定することが望まれる。

一方で、〈2〉これらの自己反応性T細胞が増殖応答を示すためには、マクロファージに特有な何らかの刺激が必須であることも考えられる。このような抗原提示細胞による二次的な刺激は主にCD4⁺T細胞を用いて研究が進められている。このCD4⁺T細胞はそのリンホカイン産

生パターンによってTh1細胞 (IL-2、IFN- γ 、TNF- β 、IL-3、GM-CSF、TNF- α) とTh2細胞 (IL-4、IL-5、IL-10、IL-3、GM-CSF、TNF- α) の二つのサブpopulationに分けられることが知られているが、このTh1細胞がマクロファージによる共時的刺激を、またTh2細胞がB細胞による共時的刺激を必要とするときとされている(131)。PCR解析の結果、今回得られたCD8⁺自己反応性T細胞クローンはTh1細胞と類似したリンホカインパターンであることが示唆されている。そのためにこれらのクローンにおいてもTh1細胞と同様にマクロファージによる共時的刺激を必要としていたことが考えられた。

自己成分により、活性化されたこのような自己反応性CD8⁺T細胞がどのような免疫機能を有しているかは生体の恒常性を考えるうえで大変興味深い。図5-3において、これらのクローンが自己由来のB細胞株を特異的に傷害していることが認められている。ある種のT細胞が抗原特異的にB細胞を傷害することにより、結果的に抗原特異的な抗体産生応答を抑制することが報告されている(54-55)。そのためこのような自己反応性CD8⁺T細胞の細胞傷害活性も結果的にはこの細胞の免疫抑制活性に寄与することが想定された。

また、PCR分析により、これらの自己反応性CD8⁺T細胞は免疫抑制作用を有するリンホカイン(IL-10、IFN- γ)を産生している可能性が挙げられた。この中でIL-10はT細胞増殖に対する抑制作用を、またIFN- γ はIgE産生を抑制する作用を有することが知られている。そこでこの二つのリンホカインに注目し、ELISAによりその産生量を測定した。この結果D2あるいは4B4細胞は抗原刺激によりIL-10およびIFN- γ を顕著に産生していることが認められた。そのため、これら二つのクローンは免疫抑制作用を有していることが示された。

これまで免疫抑制能を有するCD8⁺自己反応性T細胞の存在はNiedaらの行ったT細胞集団全体と何種類かの抗体を用いた阻害実験において示唆されていたが(132)、4B4とD2細胞の樹立によりこのような細胞集団の存在が実証されたことになる。特に、アレルギー治療の観点から考えた場合、自己応答性T細胞が自己成分に应答しIFN- γ を恒常的に産生することにより、IgE産生を抑制している可能性が挙げられたことは大変興味深い点である。免疫系を抑制的に制御す

る自己反応性CD8⁺T細胞は、これまでに知られていたような促進的に制御する自己反応性CD4⁺T細胞と協同して、生体のホメオスタシスの維持に貢献していることが予想された。

この研究において、アッセイ装置が反復的に調整され、大量の細胞を扱うことが可能になった。このようにして、アッセイ装置の改良がもたらした効果は、免疫系を研究することによって明らかになった。これらの結果は、免疫系がどのようにして自己反応性細胞を制御しているかを明らかにしている。また、アッセイ装置の改良がもたらした効果は、免疫系がどのようにして自己反応性細胞を制御しているかを明らかにしている。また、アッセイ装置の改良がもたらした効果は、免疫系がどのようにして自己反応性細胞を制御しているかを明らかにしている。

本研究においては、免疫系がどのようにして自己反応性細胞を制御しているかを明らかにしている。また、アッセイ装置の改良がもたらした効果は、免疫系がどのようにして自己反応性細胞を制御しているかを明らかにしている。また、アッセイ装置の改良がもたらした効果は、免疫系がどのようにして自己反応性細胞を制御しているかを明らかにしている。

6章 要約

近年、乳幼児においてアレルギー症状が高頻度に観察され、大きな社会問題として取り扱われるに至っている。このようなアレルギー症状は乳幼児が摂取する食品蛋白質抗原により誘発することが示されており、これらの抗原は食品アレルギーと呼ばれている。現在の最も効果的な食品アレルギーの治療法は原因となる食品アレルギーを摂取しないことであるが、栄養学的な見地からは望ましい方法とは言いがたい。一般に、アレルギー反応は過剰な免疫反応により起こるとされているため、この過剰な反応をうまく制御することができたならばアレルギー反応は抑さえられると予想される。このような免疫反応を抑制する細胞としてここ20年来免疫抑制T細胞が大きくクローズアップされている。そのため、食品アレルギーの抑制にこの抑制T細胞を利用することが期待される。しかしながら抑制T細胞の性質についてはいままのところ不明な点が多い。そのため、食品アレルギーへの応用を考える前に、抑制T細胞の基本的な性質を明らかにする必要があると思われる。

本研究においては、食品アレルギーはヒトの疾患ではあるが、詳細な解析が可能であるマウスの系を採用した。抑制T細胞を誘導する抗原としては、将来的な食品アレルギーへの応用を鑑み、 α s1-*gal*´インを用いた。この α s1-*gal*´インは牛乳中の総蛋白質の35%を占める主要な蛋白質であり、乳幼児の牛乳アレルギーにおいては主要なアレルギーであることが示されている。また、C57BL/6マウスは他の系統のマウスと比較するとこの α s1-*gal*´インに対する免疫応答が低い事が示されている。このため、C57BL/6マウスにおいては、この α s1-*gal*´インに対する応答を抑制する抑制T細胞が多く存在していることが予想される。そこで本研究においては α s1-*gal*´インをC57BL/6マウスに免疫することにより誘導された抑制T細胞の性質について解析を行った。

【CD4⁺ヘルパーT細胞クローンの樹立】

一般的に食品アレルギーは特異IgE抗体を仲介としたI型アレルギー反応に依存しているとされているため、抑制T細胞が標的とすべき最も適切な反応系はIgE産生反応であると考えられる。しかしながらこのIgE応答を実験動物を用いて再現する事は現在のところ困難である。これまでの研究からこのIgE産生応答は非常に複雑な一連の免疫反応により成立する事が明らかになっており、引き金となるのは抗原によるヘルパーT細胞の活性化反応であることが示されている。そのため抑制T細胞がこのヘルパーT細胞の動きを抑制する事ができたならばその後の免疫応答全体を抑制することが可能になると考えられる。そこで、抑制T細胞の抑制活性を評価するためのアッセイ系を確立するために、 α 1- β インに特異的なCD4⁺ヘルパーT細胞クローンの樹立を行った。

α 1- β インを免疫したリンパ節細胞を抗原で反復刺激し、限界希釈法によりクローン化を行った。そして、増殖性の良好な細胞株のなかで抗原提示細胞の存在下において α 1- β インに応答し増殖反応を示す細胞を選択し、CD4⁺T細胞クローン3D20を樹立した。この3D20細胞はMHCクラスII分子であるI-A^b分子上に提示された α 1- β インの領域136-151を認識していることが示され、抗原刺激によりインターロキン-2を産生するヘルパーT細胞クローンであることが明らかとなった。このようなヘルパーT細胞クローンは抑制T細胞のクローン化に役立つばかりか、抑制T細胞の免疫抑制機構の解明に大きく貢献するものと期待される。なお本論文の中では、何らかの免疫応答（T細胞増殖や抗体産生応答など）を抑制する活性を有する全てのT細胞を抑制T細胞として記載した。

【CD8⁺抑制T細胞クローン13G2の樹立とその機能について】

α 1- β インを免疫したリンパ節細胞を抗原で反復刺激し、クローニングを行い、数種のT細胞クローンを得た。そして、ヘルパーT細胞クローン3D20の増殖応答を抑制する活性を指標にスクリーニングを行い、CD8⁺抑制T細胞クローン13G2を樹立した。この13G2細胞はこのほかにもリンパ節細胞の増殖応答および抗体産生応答に対

する免疫抑制効果を有しており、これらの免疫抑制活性は長期にわたり維持されている。そのためこの13G2細胞は初めて樹立された安定な抑制T細胞株といえる。また、この細胞はMHCクラスIIに拘束的に $\alpha 1$ - $\beta 2$ インを認識し、そのクローンを増大させていたことが示唆された。

この13G2のT細胞増殖抑制作用においては抗原特異性もMHC拘束性もないことがはっきりと示された。しかしながら、13G2細胞は抗原提示細胞の非存在下においてT細胞を単独で刺激した場合、抑制作用を発揮しないことが観察された。そのため13G2がT細胞に対する抑制作用を発揮するためには抗原提示細胞の存在が必須であることが想定された。

先に挙げた3D20細胞の抗原刺激の系において、脾臓細胞そのものを抗原提示細胞として用いているため、13G2の抗原提示細胞に対する働きを詳細に解析することは困難であった。そこで3D20に対する抗原提示細胞としてクラスII遺伝子を導入したL細胞株FT2.3を用いた。その結果、3D20はこのFT2.3と抗原によって刺激されることが示され、この増殖反応は13G2によって阻害されることが明らかとなった。そこで次に、13G2の抗原提示細胞およびヘルパーT細胞に対する細胞傷害活性を測定した。その結果13G2はわずかに細胞傷害活性を有しているが、この活性によっては13G2の免疫抑制効果は説明出来ないであろうことがわかった。

一方で、この13G2細胞の培養上清中に免疫反応を抑制する物質が含まれていることが認められた。そして、抗体を用いたその後の解析により、この免疫抑制因子はヘルパーT細胞が産生するIL-10と同一であることが判明した。そのためヘルパーT細胞に対する13G2の抑制作用の大部分はこのIL-10によるものであると思われる。またさらにこの13G2はIgE産生に対する免疫抑制活性を有するインターフェロン γ (IFN- γ)を産生することも観察されている。

【 $\alpha 1$ - $\beta 2$ インに特異的なホリクロナルCD8⁺T細胞について】

13G2細胞で得られた情報が普遍性を持つか否かは重要な問題である。本実験においては $\alpha 1$ - $\beta 2$ インで免疫したリンパ節のCD8⁺T細胞

画分中に抑制T細胞が多く存在しているものと仮定し、このホリコロナルCD8⁺T細胞と13G2の性質の比較を試みた。

まずこのCD8⁺T細胞が抗原に反応するかどうかを検討した。リンパ節細胞からCD8⁺T細胞を分離するにあたり、CD4⁺T細胞をほとんど完全に排除する必要がある。この目的で抗CD8抗体を結合させた磁気ビーズを用いてCD8⁺T細胞の分離を行った。そして、このCD8⁺T細胞は抗原である α s1-*gal*インに対して増殖応答を示すことが確認された。このCD8⁺T細胞とCD4⁺T細胞では認識する抗原決定基が異なっていることが観察されており、これらの抗原決定基によりCD8⁺T細胞を特異的に刺激することも可能であると思われる。

PCR解析によりこれらのCD8⁺T細胞は抗原刺激によりIL-10およびIFN- γ を産生することが示された。また、このCD8⁺T細胞画分中には前述の13G2と同様にMHCクラスIIに拘束されて抗原を認識する細胞集団が存在することが確認された。そのため13G2様の抑制T細胞が生体内においても存在していることが実証された。

一方で、このCD8⁺T細胞画分中にはMHCクラスIIに拘束されて抗原を認識する細胞集団が存在することが認められた。さらに、この性質を有する3つのクローンが得られ、これらも免疫抑制性のリンホカイン(IL-10とIFN- γ)を産生することが確認された。このため、これらのクラスIIに拘束されたCD8⁺T細胞も免疫抑制T細胞の範疇に分類されるものと考えられる。今後、これらの二つの細胞集団(クラスIIに拘束された抑制T細胞とクラスIIに拘束された抑制T細胞)の性質を比較検討することにより抑制T細胞の全貌が明らかになることが期待される。

【自己反応性CD8⁺T細胞株の樹立】

α s1-*gal*インで免疫したマウスのリンパ節細胞から、自己の抗原提示細胞に対して増殖反応を示す自己反応性クローン4B4細胞およびD2細胞が得られた。これらの細胞はクラスI分子であるD^b分子に拘束されて何らかの自己成分を認識し、これにより増殖反応を示している事が明らかとなった。このようなCD8⁺自己反応性T細胞クローンは初めての報告である。

これらの自己反応性T細胞の免疫抑制作用を評価するために、これらのクローンのリンカイン産生をELISA解析により検討した。その結果これらのクローンは刺激によりIL-10とIFN- γ を産生していることが確認された。これらのリンホカインは免疫抑制活性を有していることが知られており、自己反応性クローンである4B4およびD2細胞は13G2細胞と同様に免疫抑制能力を有する抑制T細胞であることが示された。

【まとめ】

本研究において、 α s1- β 2ミクログリンに低応答性であるC57BL/6マウスを用いてCD8⁺免疫抑制T細胞の性質について解析を行った。表6-1にポリクローナルCD8⁺T細胞およびCD8⁺抑制T細胞クローンの抗原認識および機能に関する結果を列挙した。まずこのようなCD8⁺免疫抑制T細胞はそのMHC拘束性により2種類に分類できることが示された。第1群に属する13G2細胞は、クラスII拘束的に外来抗原である α s1- β 2ミクログリンを認識し、IL-10あるいはIFN- γ を産生することにより免疫抑制活性を発揮していることが示された。また、このような特異性を有する細胞はポリクローナルCD8⁺T細胞中にも相当数存在していることが確認された。

一方、クラスI拘束的に外来抗原を認識するCD8⁺T細胞も存在することが示された。これらも抑制性リンカインを産生することが確認されており、CD8⁺抑制T細胞の一種であると思われる。今回、自己抗原に応答するCD8⁺T細胞株4B4とD2が得られたが、これらも抑制性リンカインを産生しており、CD8⁺抑制T細胞に分類可能である。これらのクラスIIに拘束的なCD8⁺T細胞は強い細胞傷害活性を有することも観察されており、この性質は上記のクラスIIに拘束的なCD8⁺T細胞とは大きく異なっている。このように生体中には様々な種類の免疫抑制活性を有するCD8⁺T細胞が誘導されていることが明らかとなった。将来的にはこのようなCD8⁺抑制T細胞あるいは抑制性リンホカインを用いた食品アレルギーの新しい治療法が開発されることが期待され、止まない。今後のさらなる研究の進展が望まれている。

表 6-1 α s1-抗原により誘導された CD8⁺T 細胞

Group	Cell	Specificity			Effector function		
		MHC	Ag	Epitope	IL-10 [*]	IFN- γ [*]	Killing
1	Primary-CD8	A ^b	α s1-CN	136-155 [§]	+	+	ND
	13G2	A ^b	α s1-CN	136-196	+	+	±
2	Primary-CD8	D ^b	α s1-CN	136-155 [§]	+	+	ND
	5F1	D ^b	α s1-CN	136-151	+	+	+
	6B1	D ^b	α s1-CN	136-151	+	+	+
	6G1	D ^b	α s1-CN	136-151	+	+	+
	D2	D ^b	Auto	ND	+	+	+
	4B4	D ^b	Auto	ND	+	+	+

ND: not determined

§: major determinant

*: detected by PCR or ELISA

論文目録

1. Tatsuhiro Hisatsune, Atsushi Enomoto, Kenichi Nishijima, Yuji Minai, Yoshihiro Asano, Tomio Tada and Shuichi Kaminogawa
"CD8⁺ suppressor T cell clone capable of inhibiting the antigen- and anti-T cell receptor-induced proliferation of Th clones without cytolytic activity"
The Journal of Immunology (1990) 145:2421-2426
2. Tatsuhiro Hisatsune, Kenichi Nishijima, Yuji Minai, Atsushi Enomoto and Shuichi Kaminogawa
"CD8⁺ suppressor T cell clone 13G2 secretes a suppressive lymphokine, immune suppressive factor-T"
Animal Cell Culture and Production of Biologicals R.Sasaki and K. Ikura eds. Kluwer Academic Publishers, Netherlands (1991) p21-26
3. Tatsuhiro Hisatsune, Akio Ametani, Kenichi Nishijima, Atsushi Enomoto and Shuichi Kaminogawa
"Strong influence of the processing of the antigen on negative effects on T cell activation by regions outside the determinant area of bovine α s1-casein"
Bioscience, Biotechnology and Biochemistry (1992) 56:1616-1618
4. Tatsuhiro Hisatsune, Kenichi Nishijima Yuji Minai, Masako Koyama, and Shuichi Kaminogawa
"Self-reactive CD8⁺ T cell clones producing immune suppressive lymphokines, IL-10 and γ -interferon" (1993) *submitted*
5. Tatsuhiro Hisatsune, Kenichi Nishijima and Shuichi Kaminogawa
"CD8⁺ T lymphocytes specific for exogenous protein antigen, bovine α s1-casein " (1993) *submitted*

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇切なるご指導を賜った東京大学農学部農芸化学科畜産物利用学研究室の上野川修一教授に深く感謝いたします。また多大なるご指導を受け賜った山内邦男東京大学農学部名誉教授に深く感謝いたします。実験を進めるにあたり、種々の助言を頂いた現群馬大学工学部榎本淳博士に感謝いたします。

本研究の要であるT細胞のクローン化を教えていただき、常に専門家の立場から厳しい助言をしてくださった東京大学医学部免疫学教室多田富雄教授ならびに浅野喜博助教授に感謝いたします。また、PCR法を教えていただいた東京大学医科学研究所分子生物学部門新井賢一教授ならびに横田崇助教授に感謝いたします。さらに数々の細胞株を分与していただいた三菱化成生命科学研究所細胞免疫学研究室室長篠原信賢博士に感謝します。

本研究を進めるにあたりご協力を頂いた当研究室鈴木章夫助教授、八村敏志助手、戸塚護助手ならびに畜産物利用学研究室の皆様感謝いたします。特に貴重な時間をさいて多くのデータを取っていただいた西島謙一君ならびに共同研究者の皆様感謝します。

最後に、本学位論文の完成にあたり、経済的にそして精神的に大きな支えとなってくれた妻準子と家族に心より感謝いたします。

1993年6月

久恒辰博

参考文献

1. Roitt I, Brostoff J and Male D (1989) Immunology (Gower Medical Publishing, London)
2. Bahna SL (1985) Immunol. Today 6:153.
3. 上野川修一 (1992) 食品アレルギー (講談社ブルーバックス)
4. Mowat AM (1987) Immunol. Today 8:93.
5. Suzuki I, Kiyono H, Kitamura K, Green DR and McGhee JR (1986) Nature 320:451.
6. Burnet FM (1959) The clonal Selection Theory of Acquired Immunity (Vanderbilt University Press, Nashville)
7. Teh HS, Kisielow P, Scott B, Kishi H, Uematsu Y, Bluthmann H and von Boehmer H (1988) Nature 335:229.
8. Sha WC, Nelson CA, Newberry RD, Kranz DM, Russel JH and Loh DY (1988) Nature 336:73.
9. Goodnow CC, Crosbie J, Adelstein S, Lavoie TB, Smith-Gill SJ, Brink RA, Pritchard-Briscoe H, Wotherspoon JS, Loblay RH, Raphael K, Trent RJ and Basten A (1988) Nature 334:676.
10. Nossal GJV (1991) Current Opinion in Immunol. 3:193.
11. Schwartz RS and Datta SK (1989) in *Fundamental Immunology 2nd*. Paul WE ed. Raven Press, New York. p. 819.
12. Higgins PJ and Weiner HL (1988) J. Immunol. 140:440.
13. Nussenblatt RB, Caspi RR, Mahdi R, Chan C-C, Roberge F, Lider O and Weiner HL (1989) J. Immunol. 144:1689
14. Zang JZ, Lee CSY, Lider O and Weiner HL (1990) J. Immunol. 145:2489.
15. Miller A, Lider O and Weiner HL (1991) J. Exp. Med. 174:791.
16. Gershon RK and Kondo K (1970) Immunology 18:723.
17. Gershon RK and Kondo K (1971) Immunology 21:903.
18. Hodes RJ (1989) in *Fundamental Immunology 2nd*. Paul WE ed. Raven Press, New York. p. 587.
19. Berendt MJ and North RJ (1980) J. Exp. Med. 151:69.
20. Tada T, Taniguchi M and David CS (1976) J. Exp. Med. 144:713.
21. Koide J and Engleman EG (1990) J. Immunol. 144:32.
22. Carbone FR and Bevan MJ (1989) in *Fundamental Immunology 2nd*. Paul WE ed. Raven Press, New York. p. 541.
23. Jensen PE, Kapp JA and Pierce CW (1987) J. Mol. Cell. Immunol. 3:267.
24. Sercarz E and Krzych U (1991) Immunol. Today 12:111
25. Baxevanis CN, Nagy ZA and Klein J (1981) PNAS 78:3809.
26. Salgame P, Convit J and Bloom BR (1991) PNAS 88:2598.
27. Modlin RL, Brenner MB, Krangel MS, Duby AD and Bloom BR (1987) Nature 329:541.
28. Takeuchi T, Schlossman SF and Morimoto C (1988) J. Immunol. 141:3010.

29. Collins M, Kuchroo VK, Whitters MJ, O'Hara RM, Kelleher K, Kubo RT and Dorf ME (1990) *J. Immunol.* 145:2809.
30. Takata M, Maiti PK, Kubo RT, Chen Y, Holford-Strevens V, Rector ES and Schon AH (1990) *J. Immunol.* 145:2846.
31. Green DR, Bissonnette R, Zheng H, Onda T, Echeverri F, Mogil RJ, Steele K, Voralia M and Fotedar A (1991) *PNAS* 88:8475.
32. Gajewski TF and Fitch FW (1988) *J. Immunol.* 140:4245
33. Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Jakowlew S, Alvarez-mon M, Derynck R, Sporn MB and Fauci AS (1986) *J. Exp. Med.* 163:1037.
34. Paul LN and Ruddle HN (1988) *Annu. Rev. Immunol.* 6:407.
35. Tada T, Taniguchi M and Okumura K (1971) *J. Immunol.* 106:1012.
36. Okumura K and Tada T (1971) *J. Immunol.* 106:1019.
37. Okumura K and Tada T (1971) *J. Immunol.* 107:1682.
38. Tada T, Okumura K and Taniguchi M (1973) *J. Immunol.* 111:952.
39. Gershon RK (1974) *Contemp. Top. Immunobiol.* 3:1.
40. Basten A, Miller JFAP, Sprent J and Cheers C (1974) *J. Exp. Med.* 140:199.
41. Benacerraf B, Kapp JA, Debre P, Pierce CW and de la Croix F (1975) *Transplant. Rev.* 26:21.
42. Cantor H and Boyse EA (1977) *Immunol. Rev.* 32:105.
43. Sercarz EE, Yowell RL, Turkin D, Miller A, Araneo BA and Adorini L (1978) *Immunol. Rev.* 39:108.
44. Dorf ME and Benacerraf B (1984) *Annu. Rev. Immunol.* 2:127.
45. Taniguchi M, Saito T and Tada T (1979) *Nature* 278:555.
46. Fresno M, Nabel G, McVay-Boudreau L, Furthmayer H and Cantor H (1981) *J. Exp. Med.* 153:1246.
47. Fresno M, McVay-Boudreau L, Nabel G and Cantor H (1981) *J. Exp. Med.* 153:1260.
48. Gershon RK, Eardley DD, Durum DD, Shen FW, Yamauchi K, Cantor H and Murphy DB (1981) *J. Exp. Med.* 153:1533.
49. Asano Y and Hodes RJ (1983) *J. Exp. Med.* 158:1178.
50. Bottomly K, Kaye J, Jones B, Jones III F and Janeway CAJr (1983) *J. Mol. Cell. Immunol.* 1:42.
51. Modlin RL, Kato H, Mehra V, Nelson EE, Fan X-D, Rea TH, Pattengale PK and Bloom BR (1986) *Nature* 322:459.
52. Ottenhoff THM, Elferink DG, Klatser PR and De Vries RRP (1986) *Nature* 322:462.
53. Snapper CM and Paul WE (1987) *Science* 236:944.
54. Shinohara N, Watanabe M, Sachs DH and Hozumi N (1988) *Nature* 334:481.
55. Shinohara N, Huang Y-Y and Muroyama A (1991) *Eur. J. Immunol.* 21:23.
56. 青木喜和 (1987) 東京大学農芸化学科修士論文

57. Hisatsune T, Minai Y, Nishijima K, Enomoto A, Moore KW, Yokota T, Arai K and Kaminogawa S (1992) *Lymphokine Cytokine Res.* 11:87.
58. Unanue ER (1989) in *Fundamental Immunology 2nd*. Paul WE ed. Raven Press, New York. p. 95.
59. Streicher HZ, Berkower IJ, Busch M, Gurd FRN and Berzofsky JA (1984) *PNAS* 81:6831.
60. Lee P, Matsueda GR and Allen PM (1988) *J. Immunol.* 140:1063.
61. Sette A, Adorini L, Colon SM, Buus S and Grey HM (1989) *J. Immunol.* 143:1265.
62. Zittle CA, Cerbulis J, Pepper L and Della Monica ES (1959) *J. Dairy Sci.* 42:1897.
63. Shimizu M, Ametani A, Kaminogawa S and Yamauchi K (1986) *BBA* 869:259.
64. Enomoto A, Shon D-H, Aoki K, Yamauchi K and Kaminogawa S (1990) *Mol. Immunol.* 27:581.
65. Kearney JF (1984) in *Fundamental Immunology* Paul WE ed. Raven Press, New York. p. 751.
66. Leo O, Foo M, Sachs DH, Samelson LE and Bluestone JA (1987) *PNAS* 84:1374.
67. Dialynas DP, Wilde DB, Marrack P, Pierres A, Wall KA, Havran W, Otten G, Loken MR, Pierres M, Kappler J. and Fitch FW (1983) *Immunol. Rev.* 74:29.
68. Ledbetter JA and Herzenberg LA (1979) *Immunol. Rev.* 47:63.
69. Leo O, Foo M, Segal DM, Shevach E and Bluestone JA (1987) *J. Immunol.* 139:1214.
70. Kubo RT, Born W, Kappler JW, Marrack P and Pigeon M (1989) *J. Immunol.* 142:2736.
71. Staerz U, Rammensee H, Benedetto J and Bevan MJ (1985) *J. Immunol.* 134:3994.
72. Bhattacharya A, Dorf ME and Springer TA (1981) *J. Immunol.* 127:2488.
73. Ozato K and Sachs D (1981) *J. Immunol.* 126:317.
74. Ozato K, Hansen TH and Sachs DH (1980) *J. Immunol.* 125:2473.
75. Ohara J and Paul WE (1985) *Nature* 315:33.
76. Mosmann TR, Schumacher JH, Fiorentino DF, Leverah J, Moore KW and Bond MW (1990) *J. Immunol.* 145:2938.
77. Chervinski HM, Schumacher JH, Brown KD and Mosmann TR (1987) *J. Exp. Med.* 166:1229.
78. Rosenberg SA, Spiess PJ and Schwartz S (1978) *J. Immunol.* 121:1946.
79. Shastri N, Kobori J, Munt D and Hood L (1986) Regulation of immune gene expression, Teldmann M and McMichael A eds. (Humana Press, New Jersey) p. 167.
80. Kimoto M and Fathman CG (1980) *J. Exp. Med.* 152:759.
81. Lechler RI, Norcross MA and Germain RN (1985) *J. Immunol.* 135:2914.
82. 西島謙一 (1992) 東京大学農芸化学科修士論文
83. Shimonkevitz R, Colon S, Kappler JW, Marrack P and Grey HM (1984) *J. Immunol.* 133:2067.
84. Buus S and Werdelin O (1986) *J. Immunol.* 136:459.
85. Gammon G, Shastri N, Cogswell J, Wilbur S, Sadegh-Nasseri S, Krzych U, Miller A and Sercarz EE (1987) *Immunol. Rev.* 98:53.

86. Brett SJ, Ceasa KB and Berzofsky JA (1988) *J. Exp. Med.* 168:357.
87. Vacchio MS, Berzofsky JA, Krszula U, Smith JA, Hodes RJ and Finnegan A (1989) *J. Immunol.* 143:2814.
88. Nakauchi H, Ohno I, Kim M, Okumura K and Tada T (1984) *J. Immunol.* 132:88.
89. Heuer J and Kölsch E (1986) *Eur. J. Immunol.* 16:400.
90. Heuer J, Bruner K, Opalka B and Kölsch E (1982) *Nature* 296:456.
91. Norcross MA, Bently DM, Margulies DH and Germain RN (1984) *J. Exp. Med.* 160:1316.
92. Mercep M, Bluestone JA, Noguchi PD and Ashwell JD (1988) *J. Immunol.* 140:324.
93. Enomoto A, Aoki Y, Kurisaki J, Kaminogawa S and Yamauchi K (1988) *Agric. Biol. Chem.* 52:2531.
94. 孫東和 (1989) 東京大学農芸化学科博士論文
95. Waltenbaugh C (1986) *Pradox in Immunology* (CRC Press) p. 271.
96. Kapp JA (1975) *J. Exp. Med.* 147:997.
97. Kapp JA, Pierce CW, De La Croix F and Benacerraf B (1976) *J. Immunol.* 116:305.
98. Mosmann TR and Coffman RL (1989) *Adv. Immunol.* 46:11.
99. Fiorentino DF, Bond MW and Mosmann TR (1989) *J. Exp. Med.* 170:2081.
100. Koh D-R, Fung-Leung W-P, Ho A, Gray D, Acha-Orbea H and Mak T-W (1992) *Science* 256:1210.
101. Jiang H, Zhang S-L and Pernis B (1992) *Science* 256:1213.
102. Gaur A, Haspel R, Mayer JP and Fathman CG (1993) *Science* 259:91.
103. Shivakumar S, Sercarz EE and Krzych U (1989) *Eur. J. Immunol.* 19:681.
104. Miller A, Lider O, Roberts AB, Sporn MB and Weiner HL (1992) *PNAS* 89:421.
105. Ishioka GY, Colon S, Miles C, Gray HM and Chesnut RW (1989) *J. Immunol.* 143:1094.
106. Golub ES and Green DR (1991) *Immunology: a synthesis 2nd.* (Sinauer Associates Inc., Massachusetts)
107. Murray L, Lee R and Martens C (1990) *Eur. J. Immunol.* 20:163.
108. Moore KW, Vieira P, Fiorentino DF, Troustine ML, Khan TA and Mosmann TR (1990) *Science* 248:1230.
109. Miyatake S, Otsuka T, Yokota T, Lee F and Arai K (1985) *EMBO J.* 4:2561.
110. Derynck R, Jarrett JA, Chen EY and Goeddel DV (1986) *J. Biol. Chem.* 261:4377.
111. Miller DA, Lee A, Pelton RW, Chen EY, Moses HL and Derynck R (1989) *Mol. Endocrinol.* 3:1108.
112. Desaynard C and Waldmann H (1976) *Nature* 264:780.
113. Shinohara N, Hozumi N, Watanabe M, Bluestone JA, Johnson-Leva R and Sachs DH (1988) *J. Immunol.* 140:30.
114. Mizuochi T, Tentori L, Sharrow SO, Krusibeek AM and Singer A (1988) *J. Exp. Med.* 168:437.
115. Chen W-F and Zlotnik A (1991) *J. Immunol.* 147:528.

116. Inoue T, Asano Y, Matsuoka S, Furutani-Seiki M, Aizawa S, Nishimura H, Shirai T and Tada T (1993) *J. Immunol.* 150:2121
117. Tada T, Asano Y and Sano K (1989) *Res. Immunol.* 140:291.
118. Finnegan A, Needleman BW and Hodes RJ (1990) *Immunol. Rev.* 116:15.
119. Strober W and James SP (1990) *Immunol. Rev.* 116:117.
120. Zauderer M (1989) *Adv. Immunol.* 45:417.
121. Glimcher LH and Shevach EM (1982) *J. Exp. Med.* 156:640.
122. Rock KL and Benacerraf B (1983) *J. Exp. Med.* 157:359.
123. Finnegan A, Needleman BW and Hodes RJ (1984) *J. Immunol.* 133:78.
124. Sano K, Fujisawa I, Abe R, Asano Y and Tada T (1987) *J. Exp. Med.* 165:1284.
125. Klinken SP, Fredrickson TN, Hartley JW, Yetter RA and Morse III HC (1988) *J. Immunol.* 140:1123.
126. Gajewski TF, Pinna M, Wong T and Fitch FW (1991) *J. Immunol.* 146:1750.
127. Endres RO, Marrack P and Kappler JW (1983) *J. Immunol.* 131:1656.
128. Damle NK, Mohagheghpour N and Engleman EG (1984) *J. Immunol.* 133:1235.
129. Koide J and Engleman EG (1990) *J. Immunol.* 144:32.
130. Fujinami RS and Oldstone MBA (1985) *Science* 230:1043.
131. Gajewski TF, Pinna M, Wong T and Fitch FW (1991) *J. Immunol.* 146:1750.
132. Nieda M, Juji T, Imao S and Minami M (1988) *J. Immunol.* 141:2975.



