

γ/δ T細胞による細胞性免疫調節機構の研究

指導教官 江川 隼二 教授

平成3年4月

東京大学大学院 医学系研究科

第3種博士課程 (医学)

第三病態免疫専攻 入学

学生番号 17332

瀬 尾 尚 哉

①

γ/δ T細胞による細胞性免疫調節機構の研究

指導教官 江川滉二 教授

平成3年4月

東京大学大学院 医学系研究科

第3種博士課程 (医学)

第三基礎医学専攻 入学

学生証番号 17332

瀬 尾 尚 宏

目次

	ページ
1、緒言	5
2、研究の目的	10
3、材料と方法	11
- 1、マウス	11
- 2、細胞	11
- 3、試薬	12
- 4、細胞培養用培地	13
- 5、抗体	14
- 6、器具	15
- 7、Phosphatidylinositol-specific Phospholipase C (PI-PLC) 処理	15
- 8、cDNAの合成	15
- 9、Oligonucleotideプライマー及びプローブ	16
- 10、Polymerase chain reaction (PCR)	16
- 11、PCRによる増幅DNAのクローニング及び 塩基配列の決定	17
- 12、染色体DNAの調製及びサザンハイブリダ イゼーション	17
- 13、ノーザンハイブリダイゼーション	18
- 14、Q5 ^t タンパクの合成とウェスタンブロッ ティング	19

- 15、	細胞のMitomycin C (MMC) 処理による 不活化	20
- 16、	ラットConcanavalin A培養上清 (Con A sup.) の調製	20
- 17、	リンバ芽球の作製	21
- 18、	CD3特異的単クローン抗体をコートした 培養プレート of 作製	21
- 19、	抗体と補体を用いた細胞の処理	21
- 20、	マグネチックビーズへの抗体の結合	22
- 21、	Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) を用いた細胞表面抗原の検出	22
- 22、	γ/δ T細胞の単離	23
- 23、	CTLアッセイの方法	24
- 24、	細胞障害性T細胞 (CTL) クローンの作製	25
- 1、	抗Q5 CTLクローンの作製	25
- 2、	抗H-2K ^b CTLクローンの作製	26
- 25、	細胞培養上清の調製	26
- 1、	癌細胞培養上清の調製	26
- 2、	正常マウス脾細胞培養上清の調製	27
- 3、	γ/δ T細胞培養上清の調製	27
- 26、	細胞培養上清の分子量による粗分画とpH または熱による処理	28
4、結果	-----	29
- 1、	H-2 ^k マウス由来の癌細胞上に表現される Qa-2形質の性質	29

- 2、	BW5147癌細胞のQa-2 ^k 形質をコードする 遺伝子の同定	3 1
- 3、	Q5癌抗原特異的CTL及びH-2K ^b 特異的CTL クローンの作製	3 6
- 4、	癌細胞培養上清存在下に培養した正常マウ ス脾細胞によるCTL活性抑制因子の産生	3 7
- 5、	CTL活性抑制因子の性質	3 8
- 6、	CTL活性抑制因子産生細胞の同定	3 9
5、	考察	4 1
6、	要約	4 4
7、	参考文献	4 7

図1-13、表1-4

謝辞

1, 緒 言

癌細胞に対して障害活性をもつ免疫細胞としては、 α/β T細胞抗原受容体 (TCR) を持ちクラス I 主要組織適合 (MHC) 抗原により提示される癌抗原ペプチドを認識すると思われる癌細胞障害性 T細胞 (抗癌CTL) や、MHC に拘束性がなく何らかの癌細胞表面物質を認識できるTCRを表現しているCTL、さらにMHC非拘束性のNK細胞や活性化マクロファージなどが知られている。

近年、癌障害性細胞を用いた癌の免疫治療法として、TIL (tumor infiltrating lymphocyte) 療法やLAK (lymphokine-activated killer) 療法に代表される養子免疫療法が盛んに行なわれるようになった⁽¹⁻⁸⁾。前者は癌組織に含まれるリンパ球を、後者は癌患者の末梢リンパ球から試験管内においてIL-2存在下で抗癌CTLを含む癌障害性細胞を誘導し、誘導された細胞を再び癌患者に戻すことによって癌治療を行なおうとする方法であるが、試験管内では癌障害活性が強く発揮されるにも拘わらず、その細胞を癌患者に戻すと癌組織への到達度が低いことや、到達しても増殖しない、または細胞障害能が発揮されないなどの理由から、確かな成果を上げるには至っていない⁽⁷⁾。しかしながら、担癌体由来のリンパ球を培養すると試験管内で強いCTL活性が誘導されることから、担癌状態では癌細胞が表現している癌抗原に特異的な抗癌CTLのクローン増幅が或る程度は起こっており、抗癌CTL前駆体もしくは成熟抗癌CTLは確かに存在するが、その細胞障害活性が抑制されている可能性が考えられる。した

がって、抗癌CTLを中心とした癌の免疫反応を理解するためには、抗癌CTLの活性を引き起こす癌抗原とは如何なる癌細胞表面分子であるかを正確に知ることと共に、担癌体における抗癌CTLの機能抑制の機構を理解することが最も重要であると考えられる。

TCRにより認識され、抗癌CTLを活性化しうる癌抗原については、癌ウイルスにより形質転換した癌細胞上のウイルスペプチド⁽⁹⁻¹²⁾、またメラノーマ上のMAGE-1、-2と呼ばれているある種の自己抗原ペプチドが知られている^(13, 14)。

マウス17番染色体のH-2領域遺伝子の近傍にはアロリンパ球抗原として知られているマウス非古典的MHCクラスI分子であるQa-2抗原をコードするQa-2, 3領域遺伝子群が存在する。例えばC57BL/6マウスではQ1からQ10の10個のクラスI遺伝子が存在し⁽¹⁵⁾、Qa-2抗原陽性のH-2^bマウス(C57BL/6またはC57BL/10マウスなど)のリンパ球表面に存在するQa-2抗原はQ7及びQ9遺伝子の産物であることが知られている^(16, 17)。また、Qa-2抗原陰性のH-2^kマウス(AKRまたはC3H/Heマウスなど)ではQ6からQ9遺伝子にわたるDNA領域が欠損しているためQa-2抗原が陰性になっている⁽¹⁸⁾。ところが、Qa-2抗原陰性のマウスに由来する多くの実験癌細胞表面には、Qa-2抗原特異的な単クローン抗体に反応性を持つ抗原が表現されており⁽¹⁹⁾、これが癌細胞の再移植に対して抵抗性を持つマウスの癌細胞移植拒絶抗原の一つとなること^(20, 21)、また、免疫賦活剤を投与したマウスに現われる非特異的癌細胞障害性細胞の中には、この抗原を認識する γ/δ T細胞が存在することが報告されている⁽¹⁹⁾。

一方、担癌体におけるT細胞機能の抑制機構については、(1) 癌細胞の産生する因子による機能抑制、(2) 抑制性T細胞(Ts)の産生する因子による機能抑制、(3) 癌特異的T細胞の消失、(4) 癌細胞表面に存在するMHCの発現減少によるT細胞の不应答、さらには(5) T細胞の活性化に必要な第二分子を刺激する癌細胞表面分子の発現低下によるT細胞の不应答、などの機構が知られている。(1) については分子として同定されている因子として、ヘルパーT細胞(Th)であるCD4陽性T細胞の機能を特異的に抑制し、リンパ球をも含めた幅広い種類の細胞から産生されるtransforming growth factor- β (TGF- β)^(22, 23)、T細胞の増殖能を抑制するlymphocyte blastogenesis inhibitory factor(LBIF)⁽²⁴⁾、そしてレトロウイルス感染により癌化した細胞が産生する因子でT細胞の増殖を抑制するp15Eタンパクがある⁽²⁵⁾、その他、分子としては同定されていないが、多数の抑制因子が知られている⁽²⁶⁻²⁸⁾。(2) は癌細胞に特異的なTsが担癌体で増加しその産生する因子がThの機能を抑制するという機構であるが、現在にいたるまでTsの実像が明確でない^(29, 30)。(3) としては癌細胞上にスーパー抗原性を持つminor lymphocyte stimulating(Mls)分子が強く発現され、これに反応したCD4陽性T細胞が消失していく現象が知られている⁽³¹⁾。(4) は古くから知られており、癌細胞表面のMHCクラスI分子の発現は一般的に低く、したがってそれに拘束性を持つCTLが増殖できず活性化されないという現象である⁽³²⁾。(5) は、休止CD8陽性T細胞が成熟CTLになるためにはMHCクラスI分子によるTCRへの刺激ばかりでなく第二分子による副刺激が同時に起こることが重要であることが知られているが、癌細胞

胞表面にはその副刺激を司る分子の発現が低下しているため成熟CTLが出来にくく、したがって不応答となる機構である。癌細胞表面のICAM-I分子によるリンパ球表面のLFA-I分子への刺激や、癌細胞表面のB7分子によるリンパ球表面のCD28分子への刺激などがこの例として知られるようになった^(33, 34)。しかしながらこれらの抑制機構のほとんどが癌特異的T細胞の誘導を抑制する機構であり、癌障害性T細胞の細胞障害活性自体に対する抑制機構については、癌細胞が産生する何らかの因子がCTLの細胞障害活性を抑制し、抑制されたCTLのTCRには細胞内へのシグナル伝達に重要なCD3複合体に異常が観察されるという報告があるにすぎない^(28, 35)。このように、いろいろな抑制機構の存在が報告されてはいるが、いずれが実際の担癌体の中で重要性をもっているのかは明らかではなく、これらが癌治療に応用されているというわけでもない。また、担癌個体全体を見れば、全身のエフェクター細胞の機能が抑制状態にあるとは必ずしも云えない。即ち、癌抗原に対する免疫反応が或る程度特異的に抑制されていると考えられる。上記の(3)、(4)、(5)などは癌細胞特異的免疫不応答性が癌細胞とエフェクター細胞との直接的な反応によってもたらされる機構を説明するものだろうが、抑制反応に抑制性の細胞が介在している場合、この特異性はどのようにしてもたらされることが出来るであろうか。まず第一に、その抑制性細胞が癌細胞上の抗原を認識することによって、癌組織に於いて局所的に活性化される場合が考えられる。第二に、癌細胞の産生する可溶性の因子が抑制性細胞の活性化に関与していて、その濃度の高い癌組織内でエフェクター細胞の活性抑制をもたらし場合が考えられる。また、これら二つの機構が複合し

て起こる場合も考えられる。もし、このような抑制性細胞が癌免疫反応の中心となるであろうCTLの機能発現に対しても存在しているとするならば、抑制性細胞がどのような細胞であるのか、その細胞がどのようにしてCTLに抑制作用を及ぼしているのか、また、抑制性細胞によって認識される癌細胞表面上のリガンドはどのような分子であるのか、などを明らかにすることは、癌免疫反応の実態を知るために極めて重要であると思われる。

2, 研究の目的

抗癌CTLを中心とした癌に対する生体の免疫反応を理解するためには、まず第一に、抗癌CTLの活性化を促す癌抗原を同定することが必要である。第二に、このような癌抗原を表現しているにも拘わらず、癌細胞がCTLによる攻撃を免れている機構を明らかにしなければならない。そこで本研究では、まずマウス実験癌細胞表面に存在し、Qa-2抗原特異的抗体によって認識される抗原を正確に同定することを目的とした。次いで、この癌抗原を認識するCTLが、担癌体に於いてどのような機構によって抑制されているかを、試験管内反応によって知ることを目的とした。

3、材料と方法

3-1, マウス

7から9週令のC3H/He ($H-2^k$, $Qa-2^{-},3^{-}$)、AKR ($H-2^k$, $Qa-2^{-},3^{-}$)及びC57BL/6 (B6) ($H-2^b$) マウスは日本S L C (静岡) より購入し、当研究所で維持した。B6.K1マウスは高橋利忠博士 (愛知がんセンター) より分与を受け、当研究所で維持した。B6マウスとB6.K1マウスはQa抗原に対するコンジェニックマウスで、B6は $Qa-1^{-}2^{+}3^{+}$ 、またB6.K1は $Qa-1^{+}2^{-}3^{-}$ の表現型を持つ⁽³⁶⁾。

3-2, 細胞

C3H/Heマウスのウイルス性乳癌の腹水型癌細胞株MM2, MM46及びFM3A、化学発癌剤により誘発したC3H/He肝癌の腹水型癌細胞株MH134は、同系のC3H/Heマウス腹腔内で移植継代した。これらの癌細胞株は、長山英男博士 (東北大学抗酸菌病研究所附属癌細胞保存施設) より分与を受けた。 L^{k-} 細胞 ($H-2^k$) に $Q7^b/K^b$ ハイブリッドDNA又は $H-2K^b$ ゲノミックDNAを導入することによって樹立された L^{Q7^b/K^b} 又は L^{K^b} 細胞は当研究部に於いて岡崎宇宏博士が樹立したものをういた⁽¹⁹⁾。 L^{Q7^b/K^b} 細胞は細胞外ドメインの $\alpha 1/\alpha 2$ ドメインが $Q7^b$ 遺伝子由来であり、 $\alpha 3$ ドメイン、細胞膜ドメイン、及び細胞質ドメインが $H-2K^b$ 遺伝子由来の抗原を表現している。 L^{K^b} 細胞は $H-2K^b$ 抗原を表現している。 L^{Q7^b/K^b} 細胞及び L^{K^b} 細胞はHAT (100 μ Mヒポキ

サンチン、 $0.4\mu\text{M}$ アミノプテリン及び $16\mu\text{M}$ チミジン)、10% fetal calf serum (FCS) 及び 2mM L-グルタミン (和光純薬工業株式会社、大阪) を添加したDulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (日本製薬株式会社、東京) 培地中で試験管内継代培養した。B6及びAKR (H-2^k) マウスそれぞれに由来するTリンパ腫細胞株EL-4及びBW5147は、10% FCSと 2mM L-グルタミンを添加したDMEM培地中で試験管内継代培養した。EL-4は場合によってはB6マウス腹腔内で移植継代した。

3-3, 試薬

マウスのリンパ球に対し毒性の低いラビット補体はCeder Lane Laboratories (Westbury) より購入した。ヒトrecombinant Interleukin-2 (rIL-2) は塩野義製薬株式会社 (大阪) より購入した。phosphatidylinositol-特異的 phospholipase C (PI-PLC) はサッポロビール株式会社 (東京) より購入した。Taq DNA polymerase はPerkin-Elmer/Cetus Corp. (Norwalk) より購入した。Oligo(dT)-celluloseはBoehringer Mannheim Corp. (Mannheim) より購入した。cDNA合成キット (cDNA synthesis plus) 及びnylon膜 (Hybond N^+) はAmersham Corp. (Arlington Heights) より購入した。DNA sequencing kit ver. 2はU. S. Biochemical Corp. (Cleveland) より購入した。Polyvinyl difluoride膜 (Immobilon) はMillipore Continental Water Systems (Bedford) より購入した。制限酵素BamHI, HindIII及びSmaIは宝酒造株式会社 (滋賀) より購入した。Mitomycin C (MMC) は協和醗酵工業株式会社 (東京) より購入

した。5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal) , isopropyl thio- β -D-galactoside (IPTG) , gelatin , Tween 20 , concanavalin A (ConA) , 2-mercaptoethanol (2-ME) 、 Ovalbumin (OVA) , polyvinyl-pyrrolidone (PVP-360) 及びbovine serum albumin (BSA) はSigma Chemical Co (M.O.) より購入した。Ethanolamine , paraformaldehyde , hypoxanthine , aminopterin、thymidine , 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride及びT細胞分離用ナイロンウールは和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入した。細胞分離用磁気ビーズ (Dynabeads tosylactivated M450) はDynal Inc. (Greatneck) より購入した。

3-4, 細胞培養用培地

動物細胞の培養にはDMEMまたはRPMI-1640 (和光純薬工業株式会社、大阪) 培地を用い、大腸菌の培養にはLまたはTY培地を用いた。この論文では、DMEM培地は、2mM L-グルタミン及び0.15% 重炭酸ナトリウムを添加したものを示し、RPMI-1640培地は、0.15% 重炭酸ナトリウム及び50 μ M 2-MEを添加したものを示す。また、L培地は、1 lの水にバクトトリプトン10g、イーストエキストラクト5g及び塩化ナトリウム5gを添加した培地であり、2xTY培地は、1 lの水にバクトトリプトン16g、イーストエキストラクト10g及び塩化ナトリウム5gを添加した培地である。

3-5, 抗体

Qa-2抗原の α 3ドメインに特異的なマウス（アロ）単クローン抗体141-15.8はAustralian Monoclonal Development (NSW) より購入した。Qa-2抗原の α 1/ α 2ドメインに特異的なマウス（アロ）単クローン抗体34-1.2はAmerican Type Culture Collection (MD) より購入した。Qa-2抗原特異的なマウス（アロ）単クローン抗体59は高橋利忠博士（愛知がんセンター）より分与を受けた。 α/β TCR又は γ/δ TCRそれぞれに特異性を持つハムスター単クローン抗体H57-597又はGL3はPharMingen (California) より購入した。 γ/δ TCRに特異性を持つハムスター単クローン抗体UC7-13D5産生ハイブリドーマはJ. A. Bluestone 博士 (Chicago Univ.) より分与を受けた。H-2K^b、H-2D^b、Thy-1.1及びThy-1.2それぞれに特異性を持つマウス単クローン抗体は明治乳業株式会社（神奈川）より購入した。*E. Coli*のNusAタンパクに特異的なマウス単クローン抗体は当研究部の中村義一博士より分与を受け、マウス抗体のコントロール抗体として使用した。Peroxidaseラベルされた抗マウスIgG抗体はAmersham Corp. (Arlington Heights) より購入した。マウスCD3、CD4又はCD8それぞれに特異性を持つラット単クローン抗体KT3、YTS191.1又はYTS169.4、またラットIgGに特異的な fluorescein isothiocyanate (FITC) 結合ヤギ抗体はCaltag Laboratories Inc. (California) より購入した。ハムスターIgGに特異的なヤギ精製抗体又はそのFITC結合抗体はOrganon Teknika Corp. (Durham) より購入した。

3-6, 器具

細胞培養に用いた全ての培養器具（シャーレ、25 cm²培養フラスコ、75 cm²培養フラスコ、12 穴培養プレート、24 穴培養プレート、96 穴培養プレート）はCorning Laboratory Sciences Company (NY) より購入した。DNA合成機はApplied Biosystems Inc. (Wilmington) のmodel 39を用いた。炭酸ガスインキュベーターはForma Scientific Co. (Ohio) のmodel 3158S/N31608-334を用いた。Polymerase chain reactionによるDNA増幅にはAtto Corp. (東京) のthermal cyclerを用いた。Fluorescence activated cell sorterはBeckton Dickinson (California) のFACSscanを用いた。⁵¹Crの放射活性の測定にはバッカード社 (東京) の γ -カウンターを用いた。紫外部 (UV) 吸収の測定には、日立製作所 (東京) のU-3200 spectrophotometerを用いた。

3-7, Phosphatidylinositol-specific Phospholipase C (PI-PLC) 処理

2×10^6 個の細胞を0.1mU PI-PLC及び1mg/ml OVAを含むDMEM培地30 μ lに懸濁し37℃で1時間処理した。処理後、細胞を2回DMEM培地で洗浄し、細胞表面抗原の分析に用いた。

3-8, cDNAの合成

胸腺細胞及び癌細胞のtotalRNAはグアニジンイソチオシアネートを用い

た方法により抽出した。TotalRNAからのmRNAの調製は、oligo(dT)-celluloseカラムを用いた方法により行った⁽³⁷⁾。mRNAからcDNAの合成は、oligo-dTプライマーを用いcDNA合成キットを使用することによって行った。

3-9, Oligonucleotide プライマー及びプローブ

プライマー及びプローブの塩基配列は、既に知られているC3H/HeマウスのQa-2,3領域遺伝子のDNAシーケンスを参考にして決定し⁽¹⁸⁾、その合成には、DNA synthesizerを用いた。このプライマー及びプローブの塩基配列及び特異性をFig 1及びTable 1に示した。1から6のoligonucleotideはそれぞれH-2D^k, Q1^k, Q2^k, Q4^k, Q5^kそしてQ10^kのExon1に見られるアンチセンスシーケンスに相補的な塩基配列をしている。10及び11はQ5^kのExon8及びExon7に見られるセンスシーケンスに相補的な塩基配列をしている。7から9は全てのclass I遺伝子に共通のセンスシーケンスに相補的な塩基配列をしている。1から6に相補的なoligonucleotide 12から17はノーザンハイブリダイゼーションのプローブとして使用するために合成した。

3-10, Polymerase chain reaction (PCR)

50 ngの鋳型のDNA、20 mM Tris-chloride (pH8.3)、1.5 mM MgCl₂、25 mM KCl、0.05% Tween20、0.1 mg/ml gelatin、50 μ M dNTP、及び1 U Taq DNA polymeraseを含む100 μ lの反応液に50 pmolのセンスおよびアンチセ

ンスの塩基配列を持つプライマーを加え、反応液の気化を防ぐ目的で100 μ lのミネラルオイルを重層しPCRを行った。PCRはthermal cyclerを用い、94℃で1分、55℃で1.8分、72℃で2分を1サイクルとし40サイクル行った。

3-11, PCRによる増幅DNAのクローニング及び塩基配列の決定

PCRによって増幅したDNAの塩基配列の決定は、それを直接塩基配列決定する方法及びpUC119のSmaIサイトにクローニング後行う方法を用いた。クローニング後の塩基配列決定に使用するDNAは以下のように調製した。SmaIサイトで切断したpUC119と増幅DNAをライゲーション後、competent MV1184 *E. Coli*に導入し、20mg/l X-gal, 20mg/l IPTG及び0.1g/l ampicillinを含むL-agar培地で培養した。培養後、白いコロニーを選択し2 xTY培地で培養した。この時にM13K07ヘルパーファージを加えた。12時間の培養の後、ファージを回収しそのDNAを抽出することによって1本鎖の増幅DNAを得た。増幅DNAの直接の塩基配列決定及び1本鎖の増幅DNAの塩基配列決定には、DNAシーケンスキットを使用し、作成したオリゴヌクレオチドまたはM13ユニバーサルプライマーを用いた。

3-12, 染色体DNAの調製及びサザンハイブリダイゼーション

B6, C3H/He, AKR, 及びBW5147の脾細胞を0.03% SDS 及び0.1mg/ml proteinase Kを含むTE (10mM Tris-chloride(pH7.5), 1mM EDTA) bufferに

懸濁し、60℃で一昼夜緩やかに攪拌した後、TE bufferで飽和したフェノールを用い染色体DNAを抽出した。抽出後、水相をTE bufferに対し透析し、染色体DNA溶液として実験に使用した。サザンハイブリダイゼーションは以下のように行った。それぞれの染色体DNA 10 μ gをHindIIIまたはBamHIにより切断し、0.8% agarose gelを用い電気泳動を行った後、agarose gel中で分離したDNA断片をナイロンフィルター (Hybond-N⁺) に転写した。このフィルターを乾燥後、1mgのsalmon sperm DNAを含む6 mlのハイブリダイゼーション buffer (6 xSSC(53g/l NaCl及び26g/l sodium citrate)、5 x Denhardt's solution(1g/l PVP-360, 1g/l Ficoll400及び1g/l BSA), 0.5% SDS, 50% formamide, 20mM sodium phosphate buffer (pH6.5)) を用い60℃で1時間予備処理後、ランダムプライマー法で³²PラベルしたDNAプローブを加え42℃で一晩穏やかに攪拌することによって、ハイブリダイゼーションを行った。その後フィルターを0.1% SDSを含む2 xSSCを用い室温で15分を2回、さらに0.1% SDSを含む0.2xSSCを用い37℃で30分を2回洗浄し、最後に0.1xSSCでリンスした後、X線フィルムを用い感光させた。

3-13, ノーザンハイブリダイゼーション

AKR胸腺細胞及びBW5147癌細胞より抽出したpoly(A)-RNAをglyoxalにより変性処理した後、20mM phosphate buffer (pH7.4) を含む1.2% agarose gelで電気泳動した。泳動されたpoly(A)-RNAをサザンハイブリダイゼーションと同様の方法でナイロンフィルターに転写した。フィルターを乾燥し、100 μ g salmon sperm DNAを含むハイブリダイゼーションbuffer 2 mlで60℃

で1時間予備処理後、5'末端で ^{32}P ラベルしたoligonucleotide プローブを加え42℃で1晩穏やかに攪拌することによってハイブリダイゼーションを行った。その後フィルターを2 xSSCを用い室温で15分を2回、さらに0.1% SDSを含む2 xSSCを用い50℃で30分を2回洗浄し、最後に0.2xSSCでリンスした後、X-線フィルムを用い感光させた。

3-14, Q5^kタンパクの合成とウェスタンブロッティング

BW5147cDNAからPCRにより増幅させたQ5^k遺伝子のexon1-4をpUC119のSmaIサイトに導入した。Competent *E. Coli*にこのプラスミドを導入しスクローニング後、塩基配列決定によりlacZプロモーターの下流にin frameで正しい方向に増幅DNAが入ったプラスミドを持つ*E. Coli*を選別した。この*E. Coli*をL培地で600nmでのoptical density が0.3になるまで培養したところで、50 μM IPTGを培地に添加し、さらにoptical densityが0.75になるまで培養した。大腸菌を集め10% TCAで処理することによって総タンパクを沈殿させた。次にこのタンパクをアセトンで洗浄し、2% SDS, 5% glycerol, 0.0125% bromophenol blue及び2.5% 2-MEを含む25mM Tris-chlorid (pH6.8)を用い100℃で5分処理することによってタンパクの溶解液を得た。この溶解したタンパクを0.1% SDSを含む12% polyacrylamide gelで電気泳動した後、分子量により分離したタンパクを25mM Tris base, 192mM glycine, 20% methanol及び0.02% SDSを含む溶液でpolyvinyl difluoride 膜に電気ブロッティングした。フィルターを0.15M塩化ナトリウム及び0.2% Tween20を含む10mM Tris-chloride (pH7.6) (TTBS) で洗浄し、10% ヤギ及び20% ウ

マ血清を含むTTBSで37℃で2時間処理した。このフィルターを水で洗浄した後、同様に血清の入ったTTBSに適当な濃度で希釈したQa-2抗原特異的マウス単抗体を添加した溶液で処理した。処理後フィルターを3回TTBSで洗浄し、ペルオキシダーゼでラベルされた抗マウスIgG及び0.15M塩化ナトリウムを含む10mM Tris-borate buffer (pH7.6) で処理した。最後にフィルターを3回TTBSで洗浄し、40mg 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride 及び15 μ l 30% hydrogen peroxideを含む50ml TTBSで処理することによってペルオキシダーゼによる発色を行った。

3-15, 細胞のMitomycin C (MMC) 処理による不活化

マウスリンパ球を40 μ g/mlのmitomycin C (MMC) を含むDMEM培地で30分培養後 (5×10^7 cells/ml)、MMCを含まないDMEMで3回洗浄し、これを不活化した細胞として用いた。

3-16, ラットConcanavalin A培養上清 (ラットConA sup.) の調製

ラット脾細胞を 1×10^6 cells/mlの濃度で10% FCSを含むRPMI-1640培地中で6時間培養後、最終濃度5 μ g/mlになるようにConcanavalin Aを添加し、3日目の培養上清をラットConA sup. として用いた。

3-17, リンパ芽球の作製

脾臓細胞を 1×10^6 cells/ml の濃度で 10% FCS を含む RPMI-1640 培地中で 6 時間培養後、最終濃度 $5 \mu\text{g/ml}$ になるように ConA を添加し、3 日目の細胞をリンパ芽球として用いた。

3-18, CD3 特異的単クローン抗体をコートした培養プレートの作製

50mM 炭酸緩衝液 (pH9.0) に $10 \mu\text{g/ml}$ の CD3 特異的単クローン抗体を加えたものを培養用のプレートに入れ、4℃で一晩静置した後、抗体液を取り除き DMEM 培養液で 3 回洗浄したものを、抗体をコートした培養用プレートとして用いた。

3-19, 抗体と補体を用いた細胞の処理

CD3, CD4, CD8, α/β TCR 又は γ/δ TCR を表現している細胞の除去法は次のように行った。それぞれに特異的な単クローン抗体を 10% ヤギ血清及び 1% BSA を添加した DMEM 培地に適当な濃度で添加し、この溶液に細胞を懸濁して、4℃で 1 時間処理した。1300rpm で 5 分遠心後、得られるそれぞれの細胞を補体を適当な濃度に添加した DMEM 培地に懸濁し、37℃で 1 時間処理した後、DMEM 培地で 3 回洗浄した。

3-20, マグネチックビーズへの抗体の結合

0.1M borate buffer (pH9.5) 中にハムスターIgGに特異的な精製ヤギ抗体とDynabeads M450 tosylactivatedを入れ(抗体75 μ gに対しビーズ15mg) 22℃で1日緩やかに攪拌しながら反応させた。反応後、ビーズを磁石を用いて集め0.05M phosphate buffered saline (PBS) で2回洗浄し、0.1% Tween 20の入った1M ethanolamine (pH9.5) 溶液中に入れ室温で2時間緩やかに攪拌しながら反応させた。得られたビーズは、0.1% BSA, 0.1M 塩化ナトリウム及び0.1% Tween 20 を添加した0.05M Tris buffer (pH7.2) を用い室温で5分間を2回、4℃で一晩、0.1% Tween 20の入っていない同様のbufferを用い室温で2時間、さらに0.1% BSAの入ったPBSを用い室温5分間で3回洗浄し、これをハムスターIgGに特異的な精製ヤギ抗体の結合したマグネチックビーズとして γ/δ T細胞の単離に用いた。

3-21, Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) を用いた細胞表面抗原の検出

試験管内培養の細胞をDMEM培地で3回洗浄後、一次抗体の入った10%ヤギ血清および1%BSAを添加したDMEM培地中で4℃で1時間時々攪拌しながら静置した後、DMEM培地で3回洗浄した。得られた細胞をfluorescein isothiocyanate (FITC) の結合した2次抗体の入った同様の培地中で4℃で1時間時々攪拌しながら静置した後、DMEM培地で3回洗浄した。最後に細胞は1% paraformaldehyde (PFA) の入ったPBSに懸濁し

(1×10^6 cells/ml)、FACSを用いそのFITCの蛍光強度から細胞表面における目的とする抗原の発現を検索した。

3-22, γ/δ T細胞の単離

正常C3H/Heマウス又はMM2を移植してから13日目の担癌C3H/Heマウスそれぞれの脾細胞を、0.17M 塩化アンモニウムを用いて赤血球を取り除き、DMEM培地で3回洗浄後、10%FCSを含むDMEM培地に懸濁し(1×10^6 cells/ml)、培養用シャーレにまき、37℃、1時間CO₂培養器で培養することによって、シャーレ付着性細胞を付着させた。この操作で付着しなかった細胞を遠心によって回収した後、10%FCSを含むDMEM培地に懸濁し(1×10^8 cells/ml)、7mlのナイロンウールカラムに乗せた。ナイロンウール内に細胞が入ったところで37℃で1時間静置した後、予め37℃に温めてあった10%FCSを含むDMEM培地を用いT細胞に富む画分を溶出した(溶出速度2滴/秒)。得られたT細胞画分を、抗 γ/δ TCR単クローン抗体(GL3)の入った10%FCSを含むDMEM培地に懸濁し、4℃で1時間静置後、DMEM培地で3回洗浄することにより抗体の結合したT細胞を得た。次に抗体結合T細胞を抗ハムスター抗体の結合したマグネチックビーズと共に、10%FCSの入ったDMEM培地中(3ビーズ/cell)で4℃で3時間非常に緩やかに攪拌することにより、T細胞とビーズを結合させた。ビーズと結合した細胞を磁石を用い分離し、3回DMEM培地で洗浄後、10%FCSの入ったRPMI-1640培地中に懸濁し37℃で一晩炭酸ガス培養器内で培養することでビーズと細胞を分離し、この細胞を単離 γ/δ T細胞として実験に用いた。

3-23, CTLアッセイの方法

細胞障害活性の測定は ^{51}Cr -release法により行った。 1×10^4 個の ^{51}Cr ラベルした標的癌細胞又はリンパ芽球 (target cell) を 1×10^4 個のCTLクローン細胞と共に10% FCSを添加したDMEM培地0.4ml中で12時間又は6時間培養した。その後、1400 rpmで5 min 遠心し、上清の一部の放射活性とその他の放射活性を γ -カウンターを用いて測定した。細胞障害活性は次の計算法により% specific lysisとして表わした⁽³⁸⁾。

$$\text{Lysis \%} = \frac{\text{The radioactivity released into the medium}}{\text{The total radioactivity of the target cells}} \times 100$$

$$\% \text{ Specific lysis} = \frac{\text{Experimental lysis \%} - \text{Spontaneous lysis \%}}{\text{Maximum lysis \%} - \text{Spontaneous lysis \%}} \times 100$$

$$\text{Maximum \% lysis} = \frac{\text{The radioactivity released into medium after freezing and thawing of the target cells}}{\text{The total radioactivity of the target cells}} \times 100$$

$$\text{Spontaneous lysis} = \text{Lysis \% after incubation of target cells without effector cells}$$

3-24, 細胞障害性T細胞 (CTL) クローンの作製

3-24-1, 抗Q5 CTLクローンの作製

抗Q5 CTLクローンの作製は、Q5癌抗原とQa-2抗原のQa-2⁻マウスにおける共通抗原性を利用して行った。2x10⁶個のB6脾臓リンパ球を2週間毎にB6.K1マウス腹腔内に注射しQa-2,3抗原に特異的なCTLの生体内での誘導を行った。3回目の免疫の後4日目に脾臓を摘出し、脾細胞の浮遊液を調製し、この細胞を予めMMC処理したB6リンパ球と共に10%FCS, 10%ラットConA sup及び50 U/ml rIL-2を含むRPMI-1640培地で試験管内培養した(脾細胞: MMC処理B6リンパ球= 2: 1、最終脾細胞濃度2x10⁶ cells/ml)。培養液は2日もしくは3日毎に半量新しい培養液と交換し、MMC処理したB6リンパ球による再刺激は10日毎に行ない、これを抗Qa-2,3 CTLとした。抗Q5 CTLクローンは、最後のMMC処理B6リンパ球による刺激を行ってから4日後の抗Qa-2,3 CTLを限界希釈することにより(0.5 cells/well in 96 well plate)、またfeeder cell及び刺激細胞としてはMMC処理B6リンパ球(1x10⁵ cells/well)を用いて作製した。得られた各々のCTLクローンのQ5癌抗原特異的細胞障害能の確認は⁵¹CrでラベルされたBW5147癌細胞(Q5⁺, Qa-2⁻, 3⁻)に対するCTLアッセイ及びそのアッセイ培地中にQ5癌抗原特異的単クローン抗体141-15.8を入れることによる細胞障害活性の抑制アッセイにより行った。

3-24-2, 抗H-2K^b CTLクローンの作製

2x10⁶個のB6脾臓リンパ球を2週間毎にC3H/Heマウス腹腔内に注射し、抗H-2^b免疫を行った。3回目の免疫後4日目の脾細胞を取り出し、試験管内でMMC処理したB6リンパ球と共に培養することにより、抗H-2^bCTLの刺激を行った。抗H-2^bCTLクローンの作製は抗Qa-2,3 CTL及び抗Q5 CTLクローンの作製と同様の方法で行った。得られた各々のCTLクローンのH-2K^b抗原特異的細胞障害能の確認は⁵¹CrでラベルされたEL-4に対するCTLアッセイ及びそのアッセイ培地中に抗H-2K^b単クローン抗体を入れることによる細胞障害活性の抑制アッセイにより行った。

3-25, 細胞培養上清の調製

3-25-1, 癌細胞培養上清の調製

MM2, MM46, MH134又はEL-4担癌マウスから癌細胞を腹水と共に取り出し、1000 rpmで10秒遠心し、得られた沈渣を同じ遠心条件でFCSを含まないDMEM培地で3回洗浄した。この方法によって癌細胞以外の細胞はほとんど検出されなくなる。このようにして得られたそれぞれの癌細胞を10% FCSを含むDMEM培地で細胞濃度1x10⁶ cells/mlで一日培養し、1500 rpmで5分遠心した培養上清を癌細胞培養上清として用いた。特にことわらない限り、MM2を用いて調製した培養上清をtumor cell culture supernatant (TCCS)として用いた。

3-25-2, 正常マウス脾細胞培養上清の調製

正常C3H/Heマウス脾臓より細胞浮遊液を調製し、0.17M 塩化アンモニウム溶液により赤血球を取り除いた後、10% FCS, 50 U/ml rIL-2 及びTCCS 50%を含むまたは含まないRPMI-1640培地で10日間培養した。得られた細胞をDMEM培地で3回洗浄後、10% FCS及び50U/ml rIL-2を含むRPMI-1640培地で細胞濃度 2×10^6 cells/mlで3日間再培養した。再培養後、細胞を1500rpmで5分の遠心によって除去した上清を正常マウス脾細胞培養上清として使用した。これらの培養上清はNSCS(TCCS,10d) (culture supernatant of normal splenocytes precultured in the presence of TCCS for 10 days) 及びNSCS(10d) (culture supernatant of normal splenocytes precultured in normal medium for 10 days) と呼ぶ。

3-25-3, γ/δ T細胞培養上清の調製

MM2担癌13日目のC3H/Heマウスまたは正常C3H/Heマウス脾臓リンパ球から単離された γ/δ T細胞を10% FCS, 50 U/ml rIL-2及び50%TCCSを含む、または含まないRPMI-1640培地を用い、抗CD3単クローン抗体 (KT3) をコートした、またはコートしていない24 well培養プレート中でMMC処理したC3H/Heマウス脾細胞をfeeder細胞として4日間培養培養した。培養後の γ/δ T細胞をDMEM培地で3回洗浄後、10% FCS及び50 U/ml rIL-2を含むRPMI-1640培地で細胞濃度 4×10^5 cells/mlで1日培養し、1500 rpmで5分遠心して得られる培養上清を γ/δ T細胞培養上清として実験に用いた。こ

れらの上清は次のように名付けた。例えば、culture supernatant of tumor-bearer γ / δ T cells after precultured for 4 days in normal mediumをTB γ / δ CS(4d)、culture supernatant of tumor-bearer γ / δ T cells after precultured for 4 days in the presence of TCCS and CD3 stimulationをTB γ / δ CS(TCCS-CD3,4d)、culture supernatant of normal γ / δ T cells after precultured in the presence of TCCS for 4 daysをN γ / δ CS(TCCS,4d)の様にである。

3-26, 細胞培養上清の分子量による粗分画とpHまたは熱による処理

CTL活性に対して抑制活性を持つ正常マウス脾細胞培養上清は、活性成分のおおよその分子量を知るために、分子量による粗分画を限外濾過によって行った。限外濾過装置はMicrocon (Amicon, MA) 3, 10, 30または100を使用した。Microcon 3, 10, 30及び100はそれぞれおよそ 3, 10, 30及び100 kDaの分子量を分画できるYM3, YM10, YM30又はYM100膜を持つ。また、培養上清は活性成分のpHによる安定性を知るために、0.145 Nの塩酸又は水酸化ナトリウムによってpH 3 またはpH10に調整し30分静置した後、それぞれ同じ濃度の水酸化ナトリウム又は塩酸によって中性に戻した。さらに、培養上清は、活性成分の熱による安定性を知るために、50℃で30分又は100℃で5分処理した後室温に戻した。

4, 結 果

4-1, H-2^kマウス由来の癌細胞上に表現されるQa-2形質の性質

H-2^k (Qa-2⁻) マウスに由来する癌細胞株の細胞表面上には、Qa-2抗原特異的単クローン抗体141-15.8に反応性を持つ抗原が表現されている⁽¹⁹⁾。しかし、H-2^kマウス17番染色体のQa-2, 3領域ではQ6からQ9遺伝子におよぶ領域に欠損があり、従ってH-2^kマウスではQ7又はQ9遺伝子の産物であるQa-2抗原は発現しえないことから、この抗原がQa-2抗原とは異なる抗原であると考え、まず各種の抗Qa-2単クローン抗体とH-2^kマウス由来癌細胞との反応性を検討した。用いた抗Qa-2単クローン抗体141-15.8はQa-2抗原の α 3ドメインを認識し、Qa-2抗原に対する特異性の高い抗体であることが報告されている⁽³⁹⁾。単クローン抗体34-1.2はQa-2抗原の α 1/ α 2ドメインを認識する抗体であるが、H-2K^d, -D^d, -L^d, -K^b, -K^r, -K^s, -K^p及びK^qとも多少の交叉反応性を有することが報告されている^(39, 40)。単クローン抗体59については、新たにその特異性についての検討を行った。この抗体はB6.K1及びC3H/Heマウスリンパ球とは反応せず、B6リンパ球とは反応するものであるが、Qa-2抗原の α 1/ α 2ドメインとH-2K^b抗原の α 3ドメインを持つハイブリッド抗原を表現しているL^{Q7b/Kb}細胞と反応し、H-2K^b抗原を表現しているL^{Kb}細胞とは反応しないことから、この抗体はQa-2抗原の α 1/ α 2ドメインを認識する抗体であると考えられた。Table 2はこれらの抗体を用いた検討の結果をまとめたものである。H-2^kマウス由来の癌細胞

MM2及びBW5147は、いずれも単クローン抗体141-15.8及び59が結合するが、34-1.2には結合しない。この結果は、これらの癌細胞表面に表現されていて抗Qa-2単クローン抗体の一部によって検出される抗原は、正常リンパ球のQa-2抗原とは異なっており、その構造が異なる部位の少なくとも一部は $\alpha 1/\alpha 2$ ドメインに存在することを示している。

H-2^bマウスの正常リンパ球抗原であるQa-2抗原は、PI-PLCに感受性があることが知られている⁽⁴¹⁾。これは、正常Qa-2抗原がglyco-phosphatidylinositol (GPI) アンカーを介して細胞表面上に存在していることを意味している。GPIアンカーは、細胞表面タンパク質のアスパラギン酸と結合していることが知られており⁽⁴²⁾、正常Qa-2抗原の場合、Q7^b及びQ9^b遺伝子のexon5にコードされる295番目のアミノ酸であるアスパラギン酸とGPIアンカーが結合していることが推定されている^(43, 44)。H-2抗原がPI-PLCに非感受性であるのは、同じ位置のアミノ酸がアスパラギン酸ではなくバリリンであるためと考えられている。そこで、H-2^kマウスに由来する癌細胞表面に存在し、Qa-2抗原特異的単クローン抗体と反応する抗原がPI-PLCに感受性かどうかを検討した。H-2^kマウスに由来する各種の癌細胞をPI-PLC処理した後、141-15.8抗体で検出される抗原の発現量を検討したところ、用いた全ての癌細胞でPI-PLC処理前後の発現量の間に有意の差は認められなかった (Table 3)。この結果は抗Qa-2単クローン抗体の一部によって検出される癌細胞抗原は、正常リンパ球のQa-2抗原と異なり、GPIアンカーによらずに、恐らくペプチドアンカーによって細胞膜に結合していることを示している。また、対照実験としてGPIアンカーにより細胞表面に存在することが知られているThy-1抗原について⁽⁴⁵⁾、T細胞系腫瘍由

来細胞であるBW5147癌細胞上に存在するものが、PI-PLC感受性かどうかを検討したところ、BW5147癌細胞上に存在するThy-1抗原も、PI-PLCに感受性であった (Table 4)。従って、抗Qa-2単クローン抗体によって検出される癌細胞抗原がGPIアンカーを持たないのは癌細胞にGPI合成能が欠如しているためではないと考えられる。

以上の所見から、H-2^k (Qa-2⁻) マウス由来の癌細胞表面に表現され、抗Qa-2単クローン抗体の一部によって検出される抗原 (ここで仮にQa-2^k抗原と呼ぶ) は、H-2^bマウスの正常リンパ球表面上に存在するQa-2抗原と異なる物質であることが推定された。

4-2, BW5147癌細胞のQa-2^k形質をコードする遺伝子の同定

Qa-2^k抗原陽性の種々の癌細胞株の中でBW5147癌細胞は、Qa-2^k抗原の発現量が比較的高いことがわかっている⁽¹⁹⁾。また、BW5147癌細胞は試験管内で培養できる細胞なので、宿主由来の細胞の混入なく単一の細胞のみを得ることができる。これらの理由から、Qa-2^k形質をコードする遺伝子の同定には、BW5147癌細胞を使用した。

C3H/Heマウスの17番染色体DNA上のQa-2, 3領域にはQ1^k, Q2^k, Q4^k, Q5^k及びQ10^kの5個のクラスI遺伝子が存在していることが報告されている^(18, 46)。Q3^k遺伝子は偽遺伝子であり、Q6, Q7, Q8, 及びQ9遺伝子の大部分に相当するDNA領域が欠損している。Q5^k遺伝子については、5'側の大部分がQ5遺伝子に由来し、3'側の非翻訳領域の一部がQ9遺伝子に由来するハイブリッド遺伝子であることが知られている。まずAKR及びAKR由来

BW5147癌細胞のクラス I 遺伝子の構成がC3H/Heマウスのそれと同様であるかを、B6, C3H/He及びAKRの脾細胞及びBW5147癌細胞から染色体DNAを抽出して、HindIIIまたはBamHIで切断し、得られたDNA断片に対してサザンハイブリダイゼーションによる解析を行った。プローブとしては、後述の如くBW5147 cDNAをテンプレートとし、プライマーno.5及びno.8を用いたPCRを行い、得られたQ5遺伝子のexon 2, 3及び4に対応する約800 bpのDNA断片を 32 Pランダムラベルして用いた。このプローブは用いた実験条件下ではクラス I 遺伝子一般と反応性を示した。得られたオートラジオグラフィーのパターンは、AKR脾細胞及びBW5147細胞の染色体DNAを用いた場合は、C3H/He脾細胞染色体DNAを用いた場合と本質的に変わらず、B6脾細胞の染色体DNAを用いた場合とは明らかに異なることが判った (Fig. 2)。このことから、AKR及びBW5147癌細胞におけるクラス I 遺伝子の構成は、B6のそれとは異なり、C3H/Heのそれと同様であろうと推測した。そこでAKRマウスの正常リンパ球中では発現しておらず、BW5147癌細胞内で発現している遺伝子がQa-2, 3遺伝子領域に存在するならば、それはQ1^k, Q2^k, Q4^k, Q5^kまたはQ10^k遺伝子のいずれの遺伝子であるかを知るために、それらの細胞から得られたpoly(A)-RNAをQ1^k, Q2^k, Q4^k, Q5^k及びQ10^k遺伝子の各々に特異的なプローブ (no.12~no.17) を用いたノーザンハイブリダイゼーション及びこのpoly(A)-RNAから合成したcDNAとQ1^k, Q2^k, Q4^k, Q5^k及びQ10^k遺伝子アンチセンスシーケンスの各々に相補的なプライマー (no.1~no.6) 及び全てのクラス I 遺伝子に共通なexon 5配列のセンスシーケンスに相補的なプライマー (no.8) を用いたPCRによるDNA増幅実験を行った。またコントロールとしては、H-2D^k特異的なブラ

イマー及びプローブを用いた。ノーザンハイブリダイゼーションの結果を Fig. 3 に示した。H-2D^k 特異的なプローブ (no. 12) を用いたとき、AKR 胸腺細胞 RNA 及び BW5147 RNA で 1.5 kb 付近に特異的なバンドが観察されたが、Q5^k 特異的なプローブ (no. 16) を用いたときには、BW5147 RNA で 1.2, 1.5 及び 4.0 kb 付近に特異的なバンドが観察されるにもかかわらず、AKR 胸腺細胞 RNA には特異的なバンドが観察されなかった。また、同じフィルターを用い、Q1^k, Q2^k, Q4^k 及び Q10^k それぞれに特異的なプローブ (no. 13, 14, 15 及び 17) を用いた実験では特異的なバンドは検出されなかった。これらの結果は、AKR 胸腺細胞の Qa-2, 3 領域遺伝子はいずれも mRNA レベルでの発現が見られないものの、BW5147 癌細胞では Q5^k 遺伝子が転写されていることを示している。この mRNA は 1.2, 1.5 及び 4.0 kb の三つ大きさを持つが、同様の現象が Q7 及び Q9 遺伝子の mRNA にも見られ、それぞれ alternative splicing によって短縮された mRNA, 正常 mRNA 及びプロセッシングされていない mRNA であることが報告されている^(16, 47-49)。PCR による cDNA の増幅実験の結果もノーザンハイブリダイゼーションの結果と同様で、H-2D^k 特異的なプライマーを用いた場合は AKR cDNA 又は BW5147 cDNA を鋳型として用いた場合はいずれも DNA の増幅が見られるが、Q5^k 特異的なプライマーを用いた場合には、BW5147 cDNA を鋳型として用いた場合のみ DNA の増幅が見られ、AKR cDNA を鋳型としたときには DNA の増幅が見られなかった (Fig. 4)。Q1^k, Q2^k, Q4^k 及び Q10^k 特異的なプライマーを用いた場合には BW5147 cDNA、AKR cDNA のいずれを鋳型とした場合にも DNA の増幅が認められなかった。この場合アニーリングの温度を 45℃ とし同様の実験を行った場合にも、DNA の増幅は観察されなかった。BW5147 cDNA を鋳型

としてQ5^k遺伝子exon1アンチセンスシーケンスに相補的なプライマー (no. 5) 及びクラス I 遺伝子に共通のexon4センスシーケンスに相補的なプライマー (no. 8) を用い増幅したDNAを直接、またはpUC119にクローニング後M13ファージ感染により一本鎖DNAにし、DNAの塩基配列決定を行った。塩基配列の決定にはno. 5, 7, 8及びM13ユニバーサルプライマーを用いた。その結果、増幅したDNAの塩基配列は、すでに知られているC3H/HeのQ5^k遺伝子の塩基配列から予想されるexon1-exon4の塩基配列と全く一致した。また、増幅したDNAを直接塩基配列決定を行ったが、Q5^k遺伝子の塩基配列以外の増幅DNAは検出されなかった。次に、BW5147 cDNAを鋳型とし、Q5^k遺伝子の予想されるexon8のセンスシーケンスに相補的なプライマー (no. 10) とクラス I 遺伝子に共通のexon4アンチセンスシーケンスに相補的なプライマー (no. 9) を用いPCRを行い、得られる増幅DNAを直接no.10及びno. 9プライマーで塩基配列決定を行った。この塩基配列をFig. 5に示した。結果は、exon4とexon5の間が一般のクラス I 遺伝子から発現するmRNAとは異なり、予想されたQ5^k遺伝子の塩基配列よりも9塩基増えている。この増加の原因は、知られているC3H/HeのQ5^k遺伝子の塩基配列からも予測できる。一般的なクラス I 遺伝子ではintron4の5'末端がスプライスドナーのGTであるものが、Q5^k遺伝子ではGCになっているため、この9塩基下流に存在するGTがスプライスドナーとなったのであろう。これと同様のことは、BALB/cマウスのQ7^d遺伝子に見られ、その産物ではGRWのアミノ酸が付加している⁽¹⁸⁾。細胞膜ドメインをコードしているexon5に関しては、Q5^k遺伝子の塩基配列から予想されるexon5の塩基配列と一致していた。細胞質内ドメインに関しては、exon6とexon7を

完全に欠失し、exon8の5'末端の2塩基があるのみであった。この原因についても知られているC3H/HeのQ5^k遺伝子の塩基配列から予測できる。一般的にクラス I 遺伝子のintron6は、その5'末端及び3'末端がスプライスドナーGT及びスプライスアクセプターAGであるのに対し、Q5^k遺伝子のそれはCA及びTGであるため、結果としてスプライシングはintron5の5'末端GTとintron7の3'末端AGとの間で行われたため、exon6とexon7が失われたのであろう。さらに、GPIアンカーの結合に必要なQ7^k産物の細胞膜ドメイン上に存在するアスパラギン酸と同じ295番のアミノ酸が⁽⁴³⁾、Q5^k遺伝子産物ではバリンに変化している。これは癌細胞表面に現われるQa-2^k形質がPI-PLCに耐性である理由であらう。

次に、Q5^k遺伝子のexon7のセンスシーケンスに相補的なプライマー (no. 11) とexon4のアンチシーケンスに相補的なプライマー (no.9) を用い、BW5147の染色体DNAまたはcDNAを鋳型としてPCRを行った。その結果、染色体DNAを用いて行ったPCRでは期待される大きさ (1020bp) の増幅DNAが観察されたが、cDNAを用いて行ったPCRではDNAの増幅は検出されなかった。この結果は、exon6及びexon7の欠失は染色体上では起こっておらず、mRNAに於いて起こっていることを示している。以上よりBW5147癌細胞に於いてはAKR胸腺細胞では発現していないQ5^k遺伝子が特異的に転写されていることが判った。このQ5^k遺伝子の産物が、免疫学的に癌細胞表面に現われるQa-2^k形質を示すかどうかを次に検討した。方法としては、BW5147 cDNAを鋳型として用い、プライマーno. 5とno.8を用いてPCRによって増幅した約800 bpのQ5^kDNA断片 (exon1からexon4を含む) をpUC119のSmaIサイトに組み込んだ後、LacZのinitiation codonの下流にin

frameでexon1から4の方向にQ5^kDNAを組み込んでいるプラスミドを選別した。次に、そのプラスミドを*E. coli* MV1184に導入後、IPTGによるlacZ-Q5^kタンパクの誘導を行った。最後に、このタンパクの抗Qa-2単クローン抗体に対する反応性をウェスタンブロッティングにより検討した。Fig. 6に示すように、lacZ-Q5^k融合タンパクに期待される分子量（35Kd）のcoomassie blueによって染色される物質がIPTGによって誘導され、またこの物質は単クローン抗体59及び141-15.8に反応性があるが、34-1.2には反応性が無いことが判った。

以上の結果から、H-2^kマウス（Qa-2⁻）に由来する癌細胞の表面に存在し、抗Qa-2単クローン抗体によって検出されるQa-2^k抗原はQ5^k遺伝子産物（Q5癌抗原と呼ぶ）であることをが確定された。

4-3, Q5癌抗原特異的C T L及びH-2K^b特異的C T Lクローンの作製

抗Q5癌抗原C T Lクローンの作製はQa-2⁻マウスにおけるQ5癌抗原とQa-2アロ抗原との共通抗原性を利用して行った。即ち、B6リンパ球によって免疫されたB6.K1マウス脾細胞より、MMC処理B6リンパ球による試験管内刺激及び限界希釈法によって、B6リンパ芽球を障害しB6.K1リンパ芽球を障害しないことを指標として、20株の抗Qa-2, 3C T Lクローンを作製した。さらに、これらのクローンの中からQ5癌抗原陽性でQa-2抗原陰性であるBW5147癌細胞を障害する活性を指標とし4株の抗Q5癌抗原C T Lクローンを選択した。これらのC T LによるBW5147障害活性はQ5癌抗原に対する交叉反応性を持つ抗Q5単クローン抗体141-15.8によって阻害され、交叉

反応性を持たない単クローン抗体34-1.2では阻害されなかった。したがって、これらのC T LクローンはQ5癌抗原に対する特異性を持つものであることが確かめられた。以下に行った全ての実験には、単クローン抗体141-15.8によって最も強く阻害されたC T L 1株を使用した (Fig. 7)。また、このC T Lクローンは $CD4^-$, $CD8^+$, $\alpha/\beta TCR^+$ の表現型を持っていた (Fig. 8)。この結果はQ5癌抗原がC T Lの認識標的となり得る細胞表面抗原であることを示していた。

抗H-2K^b C T Lクローンは、B6リンパ球で免疫されたC3H/He脾細胞より作製した。免疫されたC3H/He脾細胞をMMC処理B6リンパ球による試験管内刺激及び限界希釈法によって、B6リンパ芽球を障害するがC3H/Heリンパ芽球を障害しない30株のC T Lクローンを得た。これらのクローンから、EL-4に対する障害活性が、抗H-2K^b単クローン抗体によって阻害され、抗H-2D^b単クローン抗体で阻害されないことを指標として8株の抗H-2K^b C T Lクローンを得ることができた。以下に行った実験には、抗H-2K^b単クローン抗体によって最も強く阻害されたC T L 1株を使用した (Fig. 7)。このクローンも $CD4^-$, $CD8^+$, $\alpha/\beta TCR^+$ の表現型を持っていた (Fig. 8)。

4-4, 癌細胞培養上清存在下に培養した正常マウス脾細胞によるC T L活性抑制因子の産生

予備実験により、癌細胞培養上清存在下に正常マウス脾細胞を培養した際に、その脾細胞がC T L活性を抑制する液性因子を産生することを示唆する結果が得られていた。そこでこのことを確認するために、上記のC T

Lクローンを用いて実験を行った。癌細胞培養上清(TCCS)の存在下又は非存在下に正常マウス脾細胞を10日間培養し、細胞を洗浄して回収した後、TCCSを含まない培地を用いて3日間培養してその培養上清NSCS(TCCS, 10d)又はNSCS(10d)を得た。NSCS(TCCS, 10d)を各濃度でCTL反応測定系に加えたところ、抗Q5癌抗原CTLクローンの活性も抗H-2K^bCTLクローンの活性も同様の程度に抑制された。また、その抑制は濃度依存的であった。一方、TCCSの添加に対する対照であるNSCS(10d)はいずれのCTLクローンの活性に対しても阻害を示さなかった (Fig. 9)。また、TCCS自体をCTL活性測定系に加えても活性阻害は認められなかった。これらの結果は、正常マウス脾臓細胞の中に、TCCS中の何らかの因子の影響の下に、CTL活性を抑制する液性因子の産生能を獲得する細胞が存在することを示唆していた。また、このCTL活性抑制因子の作用はCTLの抗原特異性に無関係であった。TCCSの正常脾細胞にCTL活性抑制因子産生能を獲得させる活性は、MM46, MH134又はEL-4細胞を用いた場合にもMM2細胞を用いた場合と同様に認められた。

4-5, CTL活性抑制因子の性質

CTL活性抑制活性を持つNSCS(TCCS, 10d)を用いて、この因子のおおよその性質を知るために、限外濾過膜による分画、酸 (pH 3) 又はアルカリ (pH 10) による処理及び加熱処理を行った。分画によって得られた各画分、或いは処理前のNSCS(TCCS, 10d)を抗Q5癌抗原CTLクローンの活性測定系に加えてその影響を検討した。その結果、抑制活性は分子量1万以下の

画分に集中し、pH3で30分或いは50℃で30分の処理では失活しないものの、pH10で30分或いは100℃で5分の処理では失活する物質であることが判明した (Fig. 10)。

4-6, C T L 活性抑制因子産生細胞の同定

脾臓細胞に含まれる C T L 活性抑制因子産生細胞を同定するために、まず TCCS 存在下に10日間培養して C T L 活性抑制因子産生能を獲得した正常マウス脾細胞を、種々のリンパ球表面マーカーに特異的な単クローン抗体と補体により処理し、処理後の細胞を3日間再培養して得られた培養上清の抗 Q 5 癌抗原 CTL クローンの活性に対する影響を検討した。その結果、抗 CD4、抗 CD8 または抗 α/β T C R 単クローン抗体と補体とで処理した細胞を培養して得られる培養上清には、C T L 活性抑制活性が存在していたが、抗 CD3 または抗 γ/δ T C R 単クローン抗体と補体とで処理した細胞を培養して得られる培養上清には C T L 活性抑制活性が認められなかった (Fig. 11)。この結果は、C T L 活性抑制因子の産生が CD4 及び CD8 陰性の γ/δ T 細胞に依存していることを示唆していた。

次に、 γ/δ T 細胞が直接にこの因子を生産するか否かを検討するために、 γ/δ T 細胞の単離を行った。MM2 担癌 13 日目の C3H/He マウス及び正常 C3H/He マウス脾細胞から磁気ビーズを用いて単離を行った。いずれの場合も得られた γ/δ T 細胞分画は 98% 以上の純度をもつことが FACS による解析によって示された (Fig. 12)。得られた γ/δ T 細胞を各種条件下に4日間培養した後、細胞を回収し通常の培地中で1日再培養して得られた培養

上清の抗Q5癌抗原CTLクローンの活性に対する影響を検討した。担癌マウス脾細胞から得られた γ/δ T細胞を通常の培地中で培養することにより得られた培養上清(TB γ/δ CS(4d))は、TCCSを含む培地中で培養することによって得られる培養上清(TB γ/δ CS(TCCS, 4d))と同程度のCTL活性抑制活性を示し、また、 γ/δ T細胞を通常又はTCCSを含む培地中で培養する際にCD3刺激を加えることによって得られる培養上清(TB γ/δ CS(CD3, 4d)又はTB γ/δ CS(TCCS-CD3, 4d))にはこれに比べて強い抑制活性が認められたが、この場合もTCCS添加による差は認められなかった。即ち、抑制因子産生能は γ/δ TCRに対する刺激によって増強されたが、担癌体から単離された γ/δ T細胞に対してはTCCSの効果は認められなかった(Fig. 13-A)。一方、正常マウス脾細胞から単離された γ/δ T細胞の培養上清(N γ/δ CS(4d)、N γ/δ CS(TCCS, 4d)、N γ/δ CS(CD3, 4d)及びN γ/δ CS(TCCS-CD3, 4d))はいずれも抑制活性を示さなかった(Fig. 13-B)。これらの結果は、CTL活性抑制因子産生細胞が γ/δ T細胞であること、また、担癌体の γ/δ T細胞は生体内で癌細胞の影響によってCTL活性抑制因子産生能を獲得していること、 γ/δ T細胞のCTL活性抑制因子産生能の獲得に対して γ/δ TCRを介した刺激が有効に作用すること、及び、癌細胞の産生する因子は恐らく脾細胞に含まれる他の細胞を介したものであることを示していた。

5, 考 察

本研究により、H-2^kマウスに由来する癌細胞の表面に表現され、抗Qa-2単クローン抗体で検出される抗原（Qa-2^k抗原）が、Q7又はQ9遺伝子の産物であるQa-2抗原そのものではなく、抗原性についても生化学的性質についても異なるものであることが示された。この抗原をコードする遺伝子に対応するcDNAの塩基配列から、この抗原は一般の組織適合クラス I 抗原に比べてexon6及びexon7に由来する部分を欠き、exon4に由来する部分が長く、また細胞質内ドメインが極めて短いことが推定された。これらの性質は、すでに報告されているQ5遺伝子の塩基配列から予測されるものと完全に一致している。またQa-2抗原がPI-PLC感受性であるのに対してQa-2^k抗原がPI-PLC抵抗性であることは、Q7遺伝子のexon5に由来するアミノ酸配列の中の1個のグルタミン酸残基が、Q5遺伝子ではバリンとなっているためであると理解される。これらの結果は、Qa-2^k形質をコードしている遺伝子がQ5遺伝子であることを明瞭に示している。

Qa-2^kマウスにおける癌に対する生体反応の一つとして、抗Qa-2^k抗体が癌退行マウス血清中に検出されることが報告されている⁽²⁰⁾。正常生体からはこの抗体は検出されない。また、本研究で示されたように、Qa-2^kマウスをQa-2^kリンパ球で免疫することにより誘導されるCTLの一部はQa-2^k抗原（Q5癌抗原）に交叉反応性を示した。これらの結果は、宿主がQ5癌抗原に対して免疫寛容の状態になっておらず、正常生体ではこの抗原の発現が起こっていないことを示していると考えられる。

このように、癌細胞特異的に発現され、CTLの認識標的となり得る抗原が細胞表面上に発現されているにも拘わらず、癌細胞が担癌体体内ではCTLによる障害反応から免れている機構の一つとして、そこに γ/δ T細胞が関与している可能性を示した。癌と γ/δ T細胞の関係を示唆する現象として、担癌体末梢血リンパ球の中で γ/δ T細胞の占める割合が正常生体のそれに比べて増加していること、また癌組織及びその周辺部に γ/δ T細胞が増加していることが報告されている^(50, 51)。 γ/δ T細胞を癌組織または担癌体の末梢血から単離し、これをIL-2を含む培地を用いて培養すると、癌に対する細胞障害活性を示すようになることが知られている⁽⁵¹⁻⁵³⁾。さらに、その癌細胞障害における γ/δ TCRの認識標的となる癌細胞表面抗原については、非古典的組織適合クラスI抗原として知られているQa, TLまたはCD1c抗原⁽⁵⁴⁻⁵⁹⁾やMHCクラスI抗原により提示されるheat shock protein (HSP) などが報告されている⁽⁶⁰⁻⁶³⁾。また、免疫賦活剤を投与したマウスから得られるリンパ球の中にQa-2^k抗原に特異的な癌細胞障害性 γ/δ T細胞が存在することも報告されている⁽¹⁹⁾。これらの報告から、 γ/δ T細胞は癌細胞障害活性を持つ細胞として扱われている。 γ/δ T細胞が免疫調節に関与することを示唆するものとして、 γ/δ T細胞がIL-2, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ) 及びgranulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) などのサイトカインを産生することが報告されている⁽⁶⁴⁻⁶⁷⁾。また、マウスに抗 γ/δ TCR単クローン抗体を注射し γ/δ T細胞を除去すると、その後 α/β T細胞の激しい増殖が観察されるという報告がある⁽⁶⁸⁾。これは、正常状態では α/β T細胞の増殖が γ/δ T細胞によって抑制されており、 γ/δ T細胞

胞を除去することで抑制が解除された結果、激しい増殖活性化を起こしたものと理解されている。このように、 γ/δ T細胞はその置かれた状況によって細胞障害活性を示したり、また免疫調節を行ったりすることが出来るように思われるが、これらの機能が同一の γ/δ T細胞によって行われるか、或いは異なるサブセットが存在するのかについては不明である。また本研究に於いて示された γ/δ T細胞の産生するCTL活性抑制因子は、 γ/δ T細胞が産生することが知られている上記のサイトカインと分子量の面から異なる物質のように思われるが、正確な異同は今後のこの因子の物性の解明を待たねばならない。

6、要 約

(1) Qa-2抗原陰性のH-2^kマウスに由来する癌細胞表面に表現され、Qa-2抗原特異的単クローン抗体に反応する抗原 (Qa-2^k抗原) は、抗原性の微細な差及びPI-PLCに非感受性であることから、アロリンパ球抗原であるQa-2抗原とは異なる物質であることが推定された。

(2) マウス17番染色体Qa-2, 3領域に存在するQ遺伝子群のそれぞれに特異的なプローブ及びプライマーDNAを合成し、これを用いたノーザンハイブリダイゼーション解析及びPCRによるDNA増幅実験を行った。その結果、AKR (H-2^k) マウス由来のBW5147癌細胞に於いて、Qa-2, 3領域遺伝子群の中でQ5遺伝子が特異的に転写されていることが判った。

(3) BW5147癌細胞より調製したcDNAを鋳型としてQ5遺伝子特異的なプライマーを用いてPCRによって、Q5遺伝子のexon2-exon4に対応するcDNAを増幅し、これを過剰産生用発現プラスミドに組み込み、lacZタンパクとの融合タンパクを作製した。このタンパクはウェスタンブロッティング解析に於いてQa-2^k抗原と等しく、Qa-2抗原とは異なる抗原特異性を示した。

(4) BW5147のcDNAよりQ5遺伝子特異的プライマーを用いてPCRにより増幅されたDNAの塩基配列を、cDNAのcoding region のほぼ全域にわたって決定した。その結果、そのDNA塩基配列は、既に報告されているQ5遺伝

子の塩基配列から予想されるQ5 cDNAの塩基配列と完全に一致していた。従って、Qa-2^k抗原はQ5遺伝子産物（Q5癌抗原）であることが示された。またQa-2^k抗原のPI-PLC非感受性もQa-2抗原遺伝子（Q7又はQ9遺伝子）の exon5に由来するアミノ酸配列中の1残基のグルタミン酸がQ5抗原ではバリンになっていることが原因であると理解された。

（1）、（2）、（3）及び（4）は参考文献（69）に発表した。

（5）Qa-2陰性マウスにおけるQa-2抗原とQ5抗原の共通抗原性を利用して、Q5抗原に特異的なCTLクローンを作製した。

（6）このCTLクローンを用いて、脾細胞が癌細胞の影響の下に産生するCTL活性抑制因子についての検討を行った。正常マウス脾細胞を癌細胞培養上清存在下に培養すると、CTL活性抑制因子産生能を獲得した。その抑制因子産生能を獲得した脾細胞を種々の抗体と補体とで処理することにより、CD4及びCD8陰性の γ/δ T細胞がこの因子の産生に関与していることが示唆された。

（7）担癌マウス脾細胞から磁気ビーズを用いて γ/δ T細胞を単離したところ、単離された細胞の培養上清中にはCTL抑制活性が認められた。この活性の産生は γ/δ T細胞を抗CD3抗体によって刺激することにより増強されたが、癌細胞培養上清によっては増強されなかった。また正常マウス脾細胞から単離した γ/δ T細胞では、この抑制因子の産生が認められなかつ

た。

(5)、(6)及び(7)は参考文献(70)に発表した。

- (1) Rosenburg, S. A., M. T. Lyons, L. M. Muhl, S. Levine, A. E. Cheng, S. B. Eisenberg, T. L. Henry, J. M. Miller, B. Morav, J. E. Pohl, K. L. Sells, C. S. Sosa, and G. M. Stachurski. 1986. Characterization of the growth of *Staphylococcus aureus* in liquid and solid media by the use of a computerized microplate reader. *Journal of Clinical Microbiology* 24: 212-218.
- (2) Rosenberg, S. A., B. A. Farnard, P. M. Anderson, D. Johnson, R. P. Jones, B. J. Joy, P. Kline, M. T. Lyons, J. C. Pohl, C. A. Soper, C. M. Stachurski, D. A. D. Subramanian, J. E. Wain, and E. W. White. 1982. Use of a microplate reader to measure and monitor the growth of *Staphylococcus aureus* in liquid and solid media. *Antonie van Leeuwenhoek* 48: 159-167.
- (3) Rosenberg, S. A., M. B. Cohen, J. P. Jones, S. P. Jones, S. Wain, A. E. Rosenberg, J. P. Jones, J. P. Jones, B. J. Joy, P. Kline, J. P. Jones, A. E. Rosenberg, and S. A. Rosenberg. 1981. Growth of *Staphylococcus aureus* in liquid and solid media by the use of a computerized microplate reader. *Journal of Clinical Microbiology* 19: 282-287.
- (4) Rosenberg, S. A., J. P. Jones, J. P. Jones, J. C. Pohl, P. Kline, B. J. Joy, C. A. Soper, M. T. Lyons, J. M. Miller, B. Morav, J. E. Pohl, K. L. Sells, C. S. Sosa, and G. M. Stachurski. 1986. Characterization of the growth of *Staphylococcus aureus* in liquid and solid media by the use of a computerized microplate reader. *Journal of Clinical Microbiology* 24: 212-218.

7, 参考文献

- 1) Rosenberg, S. A., M. T. Lotze, L. M. Muul, S. Leitman, A. E. Chang, S. E. Ettinghausen, Y. L. Matory, J. M. Skibber, E. Shiloni, J. T. Vetto, C. A. Seipp, C. Simpson, and C. M. Reichert. 1985. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *New England J. Med.*, 313: 1485.
- 2) Rosenberg, S. A., B. S. Packard, P. M. Aebersold, D. Solomon, S. Topalin, S. T. Toy, P. Simon, M. T. Lotze, J. C. Yang, C. A. Seipp, C. Simpson, C. Capter, S. Bock, D. Schwartzentruber, J. P. Wei, and D. W. White. 1998. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma: A preliminary report. *New England J. Med.* 319: 1676.
- 3) Bernstein, Z. P., M. H. Goldrosen, L. Vaickus, N. Friedman, H. Watanabe, R. Rahman, J. Park, S. G. Arbuck, J. Sweeney, D. S. Vesper, H. Takita, J. Zeffren, R. A. Dennin, and K. A. Foon. 1991. Interleukin-2 with ex vivo activated killer cells: therapy of advanced non-small-cell lung cancer. *J. Immunother.* 10:383.
- 4) Negrier, S., J. Michon, F. E. Bouffet, J. C. Gentet, I. Philip, P. Cochat, D. Stamm, J. Costil, M. Gaspard, G. Andreu, P. Palmer, C. R. Franks, J. M. Zucker, J. L. Bernard, W. H. Fridman, M. Favrot, and T. Philip. 1991. Interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells in 15 children with advanced metastatic neuroblastoma. *J. Clin. Oncol.* 9: 1363.

- 5) Rosenberg, S. A., L. T. Lotze, L. M. Muul, A. E. Chang, F. P. Avis, S. Leitman, W. M. Linehan, C. N. Robertson, R. E. Lee, J. T. Rubin, C. A. Seipp, C. G. Simpson, and D. E. White. 1987. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N. Eng. J. Med.* 316:889.
- 6) North, R. J., and I. Bursucker. 1984. Generation and decay of the immune response to a progressive fibrosarcoma. *J. Exp. Med.* 159:1295.
- 7) Sarzotti, M., S. Baron, and G. R. Klimple. 1987. EL-4 metastases in spleen and bone marrow suppress the NK activity generated in these organs. *Int. J. Cancer.* 39:118.
- 8) Miescher, S., T. L. Whiteside, S. Carrel, and V. von Flidner. 1986. Functional properties of tumor-infiltrating and blood lymphocytes in patients with solid tumor: effects of tumor cells and their supernatants on proliferative responses of lymphocytes. *J. Immunol.* 136:1899.
- 9) Zinkernagel R. M., and P. C. Doherty. 1974. Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature.* 251: 547.
- 10) Kast, W. M., R. Offringa, P. J. Peters, A. C. Voordouw, R. H. Meloen, A. J. Eb, and C. J. M. Melief. 1989. Eradication of Adenovirus E1-induced tumors by E1A-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cell.* 59: 603.

- 11) Nayersina, R., P. Fowler, S. Guilhot, G. Missale, A. Cerny, H.J. Schlicht, A. Vitiello, R. Chesnut, J. L. Person, A. G. Redeker, and F. V. Chisari. 1993. HLA A2 restricted cytotoxic T lymphocyte responses to multiple hepatitis B surface antigen epitopes during hepatitis B virus infection. *J. Immunol.* 150:4659.
- 12) Missale, G., A. Redeker, J. Person, P. Fowler, S. Guilhot, H. J. Schlicht, C. Ferrari, and F. V. Chisari. 1993. HLA-A31- and HLA-Aw68-restricted cytotoxic T cell responses to a single hepatitis B virus nucleocapsid epitope during acute viral hepatitis. *J. Exp. Med.* 177:751.
- 13) Bruggen, P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. Plaen, B. Eynde, A. Knuth, and T. Boon. 1991. A gene encoding an antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes on a human melanoma. *Science.* 254:1643.
- 14) Traversari, C., P. Bruggen, I. F. Luescher, C. Lurquin, P. Chomez, A. Pel, A. Amer-Costesec, and T. Boon. 1992. A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytotoxic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E. *J. Exp. Med.* 176:1453.
- 15) Weiss, E. H., L. Golden, K. Fahrner, A. L. Mellor, J. J. Devlin, H. Bullman, H. Tiddens, H. Bud, and R. A. Flavell. 1984. Organization and evolution of the class 1 gene family in the major histocompatibility complex of the C57BL/10 mouse. *Nature.* 310: 650.
- 16) Waneck, G. L., D. H. Sherman, S. Clavin, H. Allen, and R. A. Flavell. 1987. Tissue-specific expression of cell-surface Qa-2 antigen from a transfected Q7^b gene of C57BL/10 mice. *J. Exp. Med.* 165: 1358.

- 17) Soloski, M. J., L. Hood, and I. Stroyanowski. 1988. Qa-region class I gene expression : Identification of a second class I gene, Q9, encoding a Qa-2 phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85: 3100.
- 18) Watts, S., A. C. Davis, B. Gant, C. Wheeler, L. Hill, and R. S. Goodenow. 1989. Organization and structure of the Qa genes of the major histocompatibility complex of the C3H mouse. Implications for Qa function and class I evolution. *EMBO J.* 8: 1749.
- 19) Okazaki, T., C. Nakanishi-Ito, N. Seo, T. Tanino, M. Takiguchi, and K. Egawa. 1993. Recognition of the Qa-2* tumor antigen by T cell receptor γ / δ of an immunopotentiator-induced tumoricidal T cell of mice. *Cancer Immunol. Immunother.* 36:83.
- 20) Tanino, T., N. Seo, T. Okazaki, C. Nakanishi-Ito, M. Sekimata, and K. Egawa. 1992. Detection of allogeneic Qa/TL and Ly specificities on murine tumor cells with IgD in tumor-regressor serum. *Cancer Immunol. Immunother.* 35:230.
- 21) Seo, N., and K. Egawa. 1994. Utilization of leucine methyl ester for the generation of hybridomas producing monoclonal antibodies specific to tumor-associated antigens. *Cancer Immunol. Immunother.* 38:277.
- 22) Tada, T., S. Ohzeki, K. Utsumi, H. Takiuchi, M. Muramatsu, X-F. Li, J. Shimizu, H. Fujiwara, and T. Hamaoka. 1991. Transforming growth factor- β -induced inhibition of T cell function: susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in tumor bearing state. *J. Immunol.* 146:1077.

- 23) Zou, J. P., J. Shimizu, K. Ikegame, N. Yamamoto, S. Ono, H. Fujiwara, and T. Hamaoka. 1992. Tumor-bearing mice exhibit a progressive increase in tumor antigen-presenting cell function and a reciprocal decrease in tumor antigen-responsive CD4⁺ T cell activity. *J. Immunol.* 148:648.
- 24) Sugimura, K., T. Ohno, S. Fukuda, Y. Wada, T. Kimura, and I. Azuma. 1990. Tumor growth inhibitory activity of a lymphocyte blastogenesis inhibitory factor. *Cancer Res.* 50:345.
- 25) Cianciolo, G. J., T. D. Copeland, S. Oroszlan, and R. Snyderman. 1985. Inhibition of lymphocyte proliferation by a synthetic peptide homologous to retroviral envelope proteins. *Science.* 230:453.
- 26) Mizel, S. B., J. E. DeLarco, G. J. Todaro, W. L. Farrar, and M. L. Hilfiker. 1980. In vitro production of immunosuppressive factors by murine sarcoma virus-transformed mouse fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:2205.
- 27) Ting, C. C., D. Rodrigues, R. C. Ting, N. Wivel, and M. J. Collins. 1979. Suppression of T-cell-mediated immunity by tumor cells. *Int. J. Cancer.* 24:644.
- 28) Loeffler, C. M., M. J. Smyth, D. L. Longo, W. C. Kopp, L. K. Harvey, H. R. Tribble, J. E. Tase, W. J. Urba, A. S. Leonard, H. A. Young, and A. C. Ochoa. 1992. Immunoregulation in cancer-bearing hosts: down-regulation of gene expression and cytotoxic function in CD8⁺ T cells. *J. Immunol.* 149:949.
- 29) Kirchner, H. 1978. Suppressor cells of immune reactivity in malignancy. *Eur. J. Cancer.* 14:453.

- 30) Fujimoto, S., M. I. Greene, and A. H. Schon. 1976. Regulation of the immune response to tumor antigens. II. The nature of immunosuppressor cells in tumor-bearing hosts. *J. Immunol.* 116:800.
- 31) Webb, S., C. Morris, and J. Sprent. 1990. Extrathymic tolerance of mature T cells: clonal elimination as a consequence of immunity. *Cell.* 63:1249.
- 32) Kabawat, S., R. C. Jr. Bast, W. R. Welch, R. C. Knapp, and A. K. Bhan. 1983. Expression of major histocompatibility antigens and nature of inflammatory cellular infiltrate in ovarian neoplasms. *Int. J. Cancer.* 32:547.
- 33) Townsend, S. E., and J. P. Allison. 1993. Tumor rejection after direct costimulation of CD8⁺ T cells by B7-transfected melanoma cells. *Science.* 259:368.
- 34) Isobe, M., H. Yagita, K. Okumura, and A. Ihara. 1993. Specific acceptance of cardiac allograft after treatment with antibodies to ICAM-1 and LFA-1. *Science.* 255:1125.
- 35) Mizoguchi, H., J. J. O'Shea, D. L. Longo, C. M. Loeffler, D. W. McVicar, and A. C. Ochoa. 1992. Alterations in signal transduction molecules in T lymphocytes from tumor-bearing mice. *Science.* 258:1795.
- 36) Santon, T. H., and Boyse, E. A. 1976. A new serologically defined locus Qa-1, in the Tla region of the mouse. *Immunogenetics.* 3: 525.
- 37) Schibler, U., M. Tosi, A. -C. Pittet, L. Fabiani, and P. K. Wellauer. 1980. Tissue-Specific expression of mouse alpha-amylase gene. *J. Mol. Biol.* 142: 93.

- 38) Boyle, W. 1968. An extension of the ^{51}Cr -release method for the estimation of cytotoxins. *Transplantation*. 6: 761.
- 39) Ozato, K., N. M. Mayer, and D. H. Sachs. 1982. Monoclonal antibodies to mouse major histocompatibility complex antigens. IV. A series of hybridoma clones producing anti-H-2^d antibodies and an examination of expression of H-2^d antigens on the surface of these cells. *Transplantation*. 34: 113.
- 40) Sharrow, S. O., J. S. Arn, I. Stroynowski, L. Hood, and D. H. Sachs. 1989. Epitope clusters of Qa-2 antigens defined by a panel of new monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 142: 3495.
- 41) Steinberg, J., M. G. Low, L. Flaherty, and P.W. Kincade. 1987. Removal of lymphocyte surface molecules with phosphatidylinositol-specific phospholipase C: effects on mitogen responses and evidence that ThB and certain Qa-antigens are membrane-anchored via phosphatidylinositol. *J. Immunol.* 38: 3877.
- 42) Low, M. G. 1987. Biochemistry of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchors. *Biochem. J.* 244: 1.
- 43) Waneck, G. L., D. H. Sherman, P. W. Kincade, M. G. Low, and R. A. Flavell. 1988. Molecular mapping of signals in the Qa-2 antigen required for attachment of the phosphatidylinositol membrane anchors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 577.
- 44) Devlin, J. J., E. H. Weiss, M. Panslon, and R. A. Flavell. 1985. Duplication of gene pairs and alleles of class I genes in the Qa-2 region of the murine major histocompatibility complex: a comparison. *EMBO J.* 4: 3203.

- 45) Low, M. G., and P. W. Kincade. 1985. Phosphatidylinositol is the membrane-anchoring domain of the thy-1 glycoprotein. *Nature*. 318: 62.
- 46) Weiss, E. H., D. Bevec, G. Messer, S. Schwemmle, C. Grosshaus, M. Steinmetz, and W. Schmidt. 1989. Organization of the AKR Qa region: Structure of a divergent class I sequence, Q5^k. *J. Immunogenet.* 16: 283.
- 47) Soloski, M. J., M. O. Snoek, G. Einhorn, and P. Demant. 1989. Molecular basis of Qa-11 antigen and paradoxical Qa-gene expression in an H-2 recombinant. *J. Immunol.* 143: 3073.
- 48) Widacki, S. M., V. Mehta, L. Flaherty, and R. G. Cook. 1990. Biochemical differences in Qa-2 antigens expressed by Qa-2⁺, 6⁺ and Qa-2⁺, 6⁻ strains. Evidence for differential expression of the Q7 and Q9 genes. *Mol. Immunol.* 27: 559.
- 49) Ulker, N., K. D. Lewis, L. E. Hood, and I. Stroynowski. 1990. Activated T cells transcribe an alternatively spliced mRNA encoding a soluble form of Qa-2 antigen. *EMBO J.* 9: 3839.
- 50) Nanno, M., H. Seki, G. Mathioudakis, R. Suzuki, K. Itoh, C. G. Ioannides, S. Suzuki, P-F. Chen, and C. D. Platsoucas. 1992. γ / δ T cell antigen receptors expressed on tumor-infiltrating lymphocytes from patients with solid tumors. *Eur. J. Immunol.* 22:679.
- 51) Kitayama, J., Y. Atomi, H. Nagawa, A. Kuroda, T. Mutoh, M. Minami, and T. Juji. 1993. Functional analysis of TCR $\gamma \delta$ T cells in tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) of human pancreatic cancer. *Clin. Exp. Immunol.* 93:442.

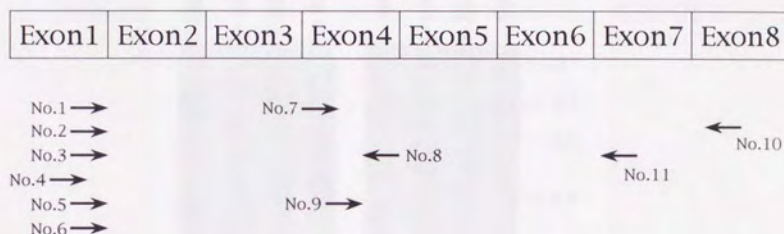
- 52) Zocchi, M. R., M. Ferrarini, and C. Rugarli. 1990. Selective lysis of the autologous tumor by δ TCS1⁺ γ δ ⁺ tumor-infiltrating lymphocytes from human lung carcinomas. *Eur. J. Immunol.* 20: 2685.
- 53) Bensussan, A., J-F. Lagabriele, and L. Degos. 1989. TCR γ δ bearing lymphocyte clones with lymphokine-activated killer activity against autologous leukemic cells. *Blood.* 73:2077.
- 54) Bluestone, J. A., R. Q. Cron, M. Cotterman, B. A. Houlden, and L. A. Matis. 1988. Structure and specificity of T cell receptor γ / δ on major histocompatibility complex antigen-specific CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ lymphocytes. *J. Exp. Med.* 168:1899.
- 55) Bonneville, M., K. Ito, E. G. Krecko, S. Itohara, D. Kappes, I. Ishida, O. Kanagawa, C. A. Janeway, D. B. Murphy, and S. Tonegawa. 1989. Recognition of a self major histocompatibility complex TL region product by γ δ T cell-receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:5928.
- 56) Ito, H., L. V. Kaer, M. Bonneville, S. Hsu, D. B. Murphy, and S. Tonegawa. 1990. Recognition of the product of a novel MHC TL region gene (27^b) by a mouse γ δ T cell receptor. *Cell.* 62:549.
- 57) Vidovic, D., M. Roglic, K. McKune, S. Guerder, C. McKay, and Z. Dembic. 1989. Qa-1 restricted recognition of foreign antigen by γ / δ T cell hybridoma. *Nature.* 340:646.
- 58) Faure, F., S. Jitsukawa, C. Miossec, and T. Hercend. 1990. CD1c, as a target structure for human T lymphocytes: analysis with peripheral blood γ / δ T cells. *Eur. J. Immunol.* 20:703.

- 59) Porcelli, P., Brenner, M. B., Greenstein, J. L., Balk, S. P., Terhost, C. 1989. Recognition of cluster of differentiation 1 antigen by human CD4 CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. *Nature*. 341: 447.
- 60) Haregervoin, A., G. Soman, R. C. Hom, and R. W. Finberg. 1989. Human $\gamma \delta$ T cells respond to mycobacterial protein. *Nature*. 340:309.
- 61) Udono, H., and P. K. Srivastava. 1993. Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *J. Exp. Med.* 178:1391.
- 62) Kaur, I., S. D. Voss, R. S. Gupta, K. Schell, P. Fisch, and P. M. Sondel. 1993. Human peripheral $\gamma \delta$ T cells recognize hsp60 molecules on daudi Burkitt's Lymphoma cells. *J. Immunol.* 150:2046.
- 63) Mahvi, D. M., S. W. Carper, F. K. Storm, S. R. Teal, and P. M. Sondel. 1993. Overexpression of 27-kDa heat-shock protein in MCF-7 breast cancer cells: effects on lymphocyte-mediated killing by natural killer and $\gamma \delta$ T cells. *Cancer Immunol. Immunothera.* 37:181.
- 64) Christmas, S. E., and A. Meager. 1990. Production of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha by human T-cell clones expressing different forms of the $\gamma \delta$ receptor. *Immunology*. 71:486.
- 65) Morita, C.T., S. Verma, P. Aparicio, C. Martinez-A, H. Spits, and M. B. Brenner. 1991. Functionally distinct subsets of human γ / δ T cells. *Eur. J. Immunol.* 21:2999.

- 66) Ishikawa, H., Y. Li, A. Abeliovich, S. Yamamoto, S. H. E. Kaufmann, and S. Tonegawa. 1993. Cytotoxic and interferon γ -producing activities of $\gamma\delta$ T cells in the mouse intestinal epithelium are strain dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:8204.
- 67) Munk, M. E., and S. H. E. Kaufmann. 1990. Target cell lysis and IL-2 secretion by $\gamma\delta$ T lymphocytes after activation with bacteria. *J. Immunol.* 145:2434.
- 68) Kaufmann, S. H. E., C. Blum, and S. Yamamoto. 1993. Crosstalk between α/β T cells and γ/δ T cells in vivo: Activation of α/β T-cell responses after γ/δ T-cell modulation with the monoclonal antibody GL3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:9620.
- 69) Seo, N., T. Okazaki, C. Nakanishi-Ito, T. Tanino, Y. Matsudaira, T. Takahashi, and K. Egawa. 1992. Expression of the Qa-2^k phenotype encoded by the Q5^k gene on the surface of tumor cells derived from H-2^k mice. *J. Exp. Med.* 175: 647.
- 70) Seo, N., and K. Egawa. 1995. Suppression of cytotoxic T lymphocytes by γ/δ T cells in tumor-bearing mice. *Cancer Immunol. Immunother.* in press.

Figure 1

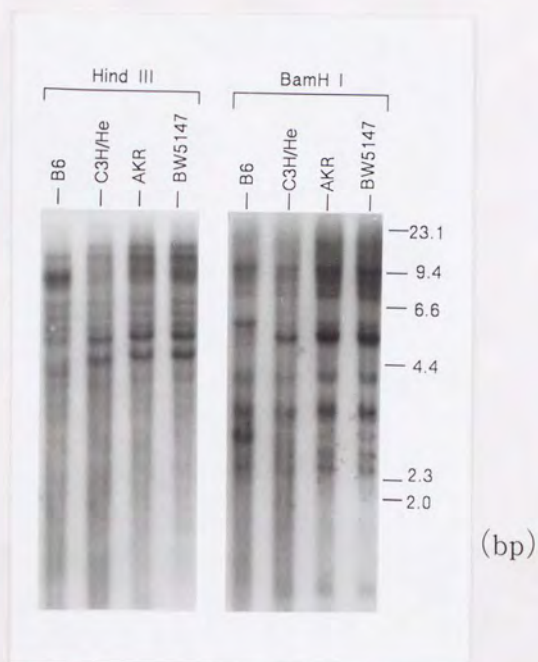
作製したオリゴヌクレオチドプライマー



DNA合成機により作製したオリゴヌクレオチドプライマーのクラス I 抗原遺伝子Exon1からExon8内における位置と 5' から 3' 方向を矢印を用いて表わした。No.はTable 1 のオリゴヌクレオチド番号に一致する。

Figure 2

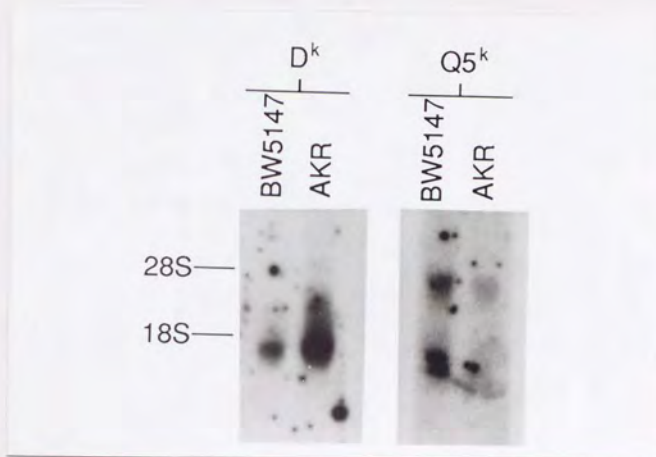
染色体DNA断片のクラス I 遺伝子プロブ
を用いたサザンハイブリダイゼーション



制限酵素HindIIIまたはBamHIで切断したB6、C3H/He、AKR
及びBW5147染色体DNAを、BW5147 cDNAをNo.5及びNo.8で
PCRを行い増幅したDNAのランダム³²Pラベルしたものをプロー
ブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。

Figure 3

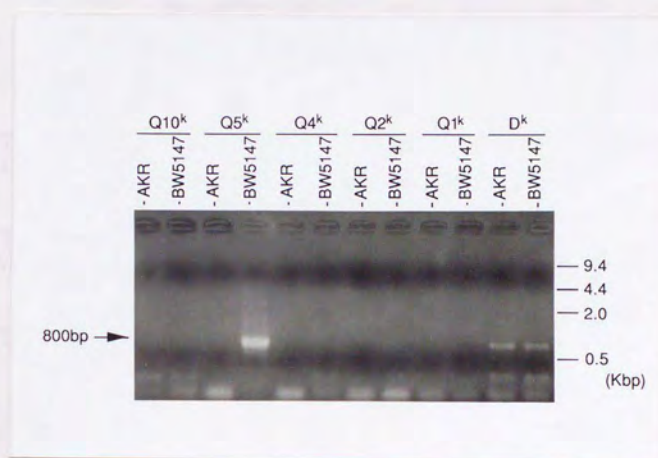
AKR胸腺細胞及びBW5147癌細胞 poly (A) - RNAを用いたノーザンハイブリダイゼーション



AKR胸腺細胞またはBW5147から抽出したpoly(A)-RNAを電気泳動し（各 $3\mu\text{g/slot}$ ）、5'末端 ^{32}P ラベルしたH-2 D^k 特異的プローブNo.12または $Q5^k$ 特異的プローブNo.16を用いてノーザンハイブリダイゼーションを行った。

Figure 4

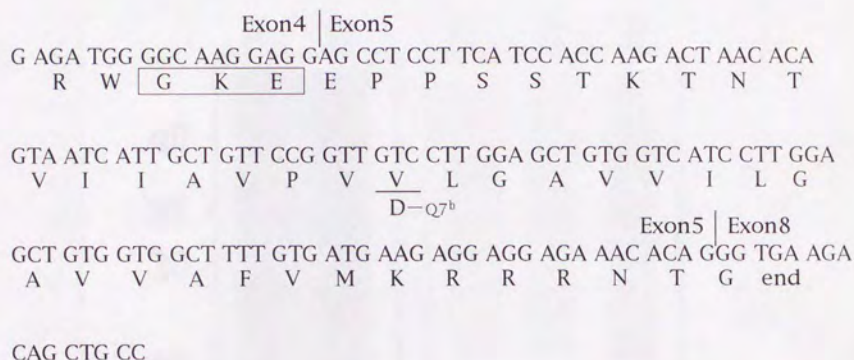
PCRによるcDNAの増幅



AKR胸腺細胞及びBW5147cDNAをH-2D^k、Q1^k、Q2^k、Q4^k、Q5^k及びQ10^kそれぞれに特異的プローブ (No.1-5及び6) とクラス I 抗原遺伝子全てに共通しているプローブ (No.8) を用いてPCRを行なった。反応後のサンプルを1%ゲルを用い電気泳動後、ethidium bromideで発色させた。

Figure 5

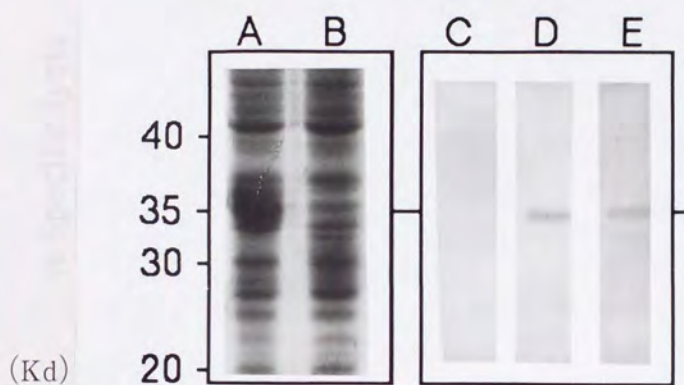
Q5^k遺伝子の3'端近傍の塩基配列とそれから 推定されるアミノ酸配列



BW5147 cDNAをQ5^k遺伝子exon8のセンスシーケンスに相補的なプライマー (No.10) とクラス I 抗原遺伝子に共通のexon4アンチセンスシーケンスに相補的なプライマー (No.9) を用いてPCRを行うことによって増幅したDNAを鋳型として、No.9及びNo.10プライマーを用いて塩基配列決定を行った。

Figure 6

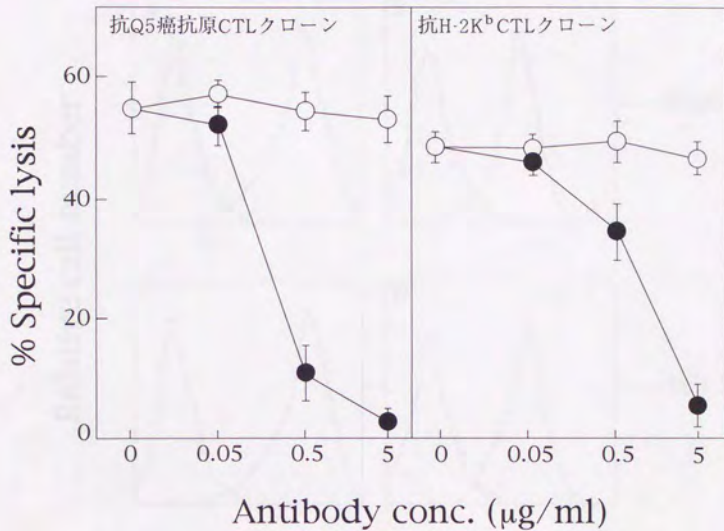
LacZ-Q5^k融合タンパクのQa-2特異的単クローン抗体によるウェスタンブロッティング



プライマーno.5とno.8を用いて増幅したQ5^kcDNA断片を組み込んだpUC119を大腸菌に導入し、これをIPTGを含む培地で培養した。培養後、その大腸菌から総タンパクを抽出し、電気泳動後、クマジブルーで染色した(A)。(B)はpUC119を導入した大腸菌を用いたコントロール。(A)をポリビニル膜に転写後Qa-2抗原特異的単クローン抗体34-1.2, 59及び141-15.8を用いウェスタンブロッティングを行った(それぞれ(C),(D)及び(E))。

Figure 7

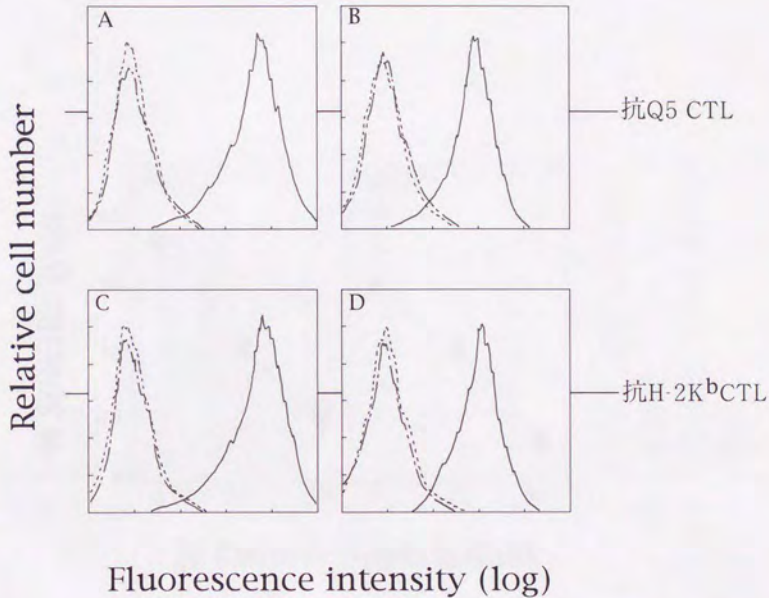
CTLクローンの抗原特異性の検討



CTLクローンによる細胞障害反応の精製抗体による阻害を測定した。抗Q5癌抗原CTLクローンの活性は⁵¹CrラベルしたBW5147細胞を標的細胞として測定し、活性測定系に抗Qa-2単クローン抗体34-1.2 (○) または141-15.8 (●) を種々の濃度で加えた。また、抗H-2K^bCTLクローンの活性は⁵¹CrラベルしたEL4細胞を標的細胞として測定し、活性測定系に抗H-2D^b単クローン抗体 (○) または抗H-2K^b単クローン抗体 (●) を種々の濃度で加えることにより検討した。

Figure 8

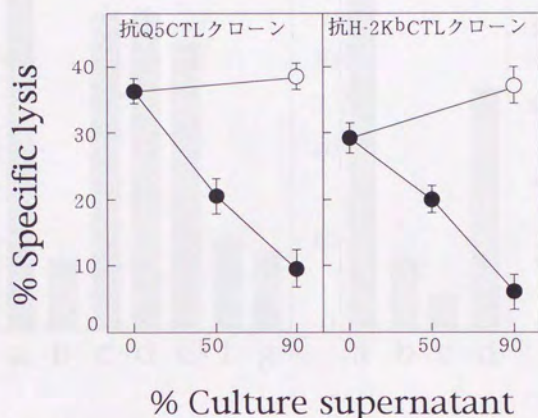
抗Q5 CTLクローンと抗H-2K^b CTLクローンの細胞表面抗原



抗Q5 CTLクローンまたは抗H-2K^b CTLクローンを1次抗体として抗CD4抗体 (YTS191.1) (---)、抗CD8抗体 (YTS169.4) (—) または抗体無し (——) で処理し、2次抗体としてFITC結合抗ラット抗体で処理した後 (A及びC)、また1次抗体として抗 α/β TCR抗体 (H57-597) (—)、抗 γ/δ TCR抗体 (GL3) (---) または抗体無し (——) で処理し、2次抗体としてFITC結合抗ハムスター抗体で処理した後 (B及びD)、FACSにより解析した。

Figure 9

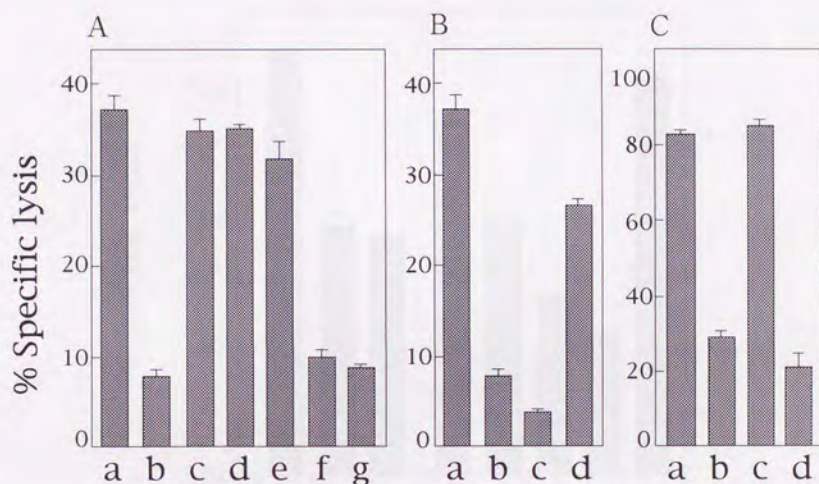
MM2癌細胞培養上清を含む培地中で前培養した正常マウス脾細胞によるCTL活性抑制因子の産生



作製した抗Q5 CTLクローンまたは抗H-2K^bCTLクローンをeffector細胞とし、⁵¹CrラベルしたBW5147またはEL-4をtarget細胞としたCTLアッセイを行う際、NSCS(10d) (○) 又はNSCS(TCCS, 10d) (●) を種々の濃度で加えた。

Figure 10

CTL活性抑制因子の分子量と性質



NSCS(TCCS, 10d)を限外濾過による分画、酸またはアルカリ条件による処理、熱による処理を行った後、それらを抗Q5 CTLクローンと⁵¹CrラベルしたBW5147のCTLアッセイに80%の濃度で加えた。

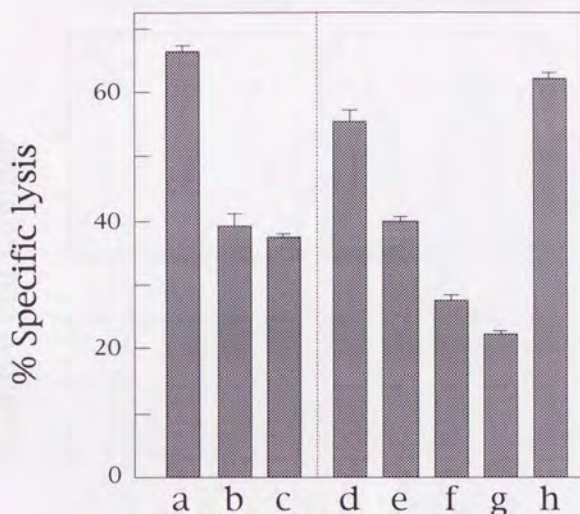
A; a: コントロールCTL活性、b: 未分画のNSCS(TCCS, 10d)、c: 分子量10万以上の分画、d: 分子量3万以上10万未満の分画、e: 分子量1万以上3万未満の分画、f: 分子量3千以上1万未満の分画、g: 分子量3千未満の分画。

B; a: コントロールCTL活性、b: 未処理のNSCS(TCCS, 10d)、c: pH3で室温30分処理、d: pH10で室温30分処理。

C; a: コントロールCTL活性、b: 未処理のNSCS(TCCS, 10d)、c: 100℃で5分処理、d: 50℃で30分処理。

Figure 11

CTL活性抑制因子産生細胞の検討

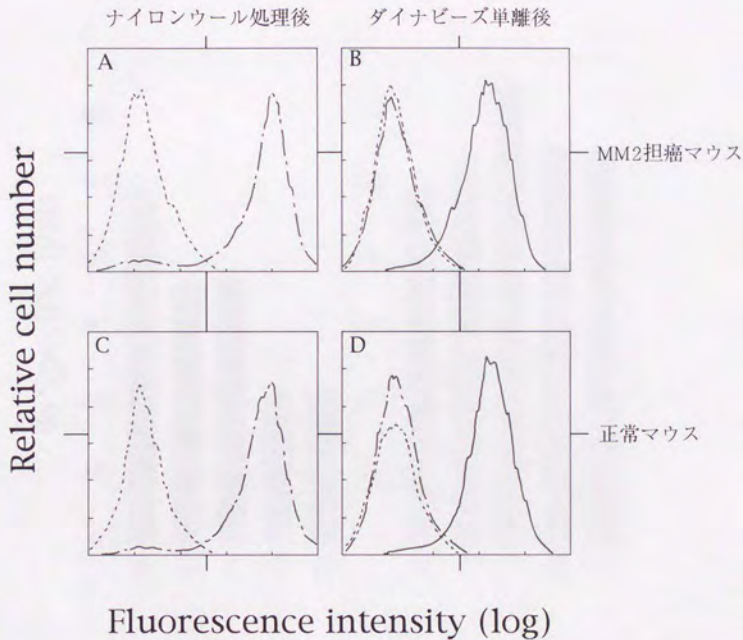


TCCSを50%含む培地で正常マウス脾細胞を10日間培養し、得られた細胞を種々のリンパ球抗原特異的単クローン抗体と補体で処理した。この細胞を正常培地で3日培養して得られる種々の培養上清を、抗Q5 CTLクローンと⁵¹CrラベルしたBW5147癌細胞を用いたCTLアッセイの培地に80%の濃度で加えた。

a : コントロールCTL活性、b : 抗体と補体処理無し、c : 補体のみで処理、d : 抗CD3抗体 (KT3) と補体で処理、e : 抗CD4抗体 (YTS191.1) と補体で処理、f : 抗CD8抗体 (YTS169.4) と補体で処理、g : 抗 α/β TCR抗体 (H57-597) と補体で処理、h : 抗 γ/δ TCR抗体 (GL3) と補体で処理。

Figure 12

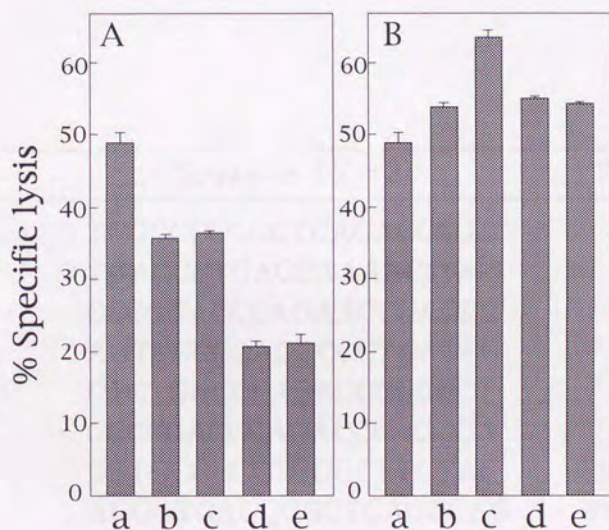
γ/δ T細胞の単離



MM2担癌マウスまたは正常マウス脾細胞からナイロンウールカラムを用いてT細胞分画を得た後 (A及びC)、それぞれから抗 γ/δ TCR抗体とダイナビーズを用いた細胞分離法により γ/δ T細胞の単離を行い (B及びD)、それぞれの細胞を1次抗体として抗 α/β TCR抗体 (H57-597) (---)または抗 γ/δ TCR抗体 (GL3) (---)を用い、また2次抗体としてFITCを結合した抗ハムスター抗体を用いて染色後、FACSを用い分析した。コントロールは1次抗体を加えない細胞を用いた (----)。

Figure 13

γ/δ T細胞によるCTL活性抑制因子の産生



抗Q5 CTLと ^{51}Cr ラベルしたBW5147癌細胞とを用いたCTLアッセイの培地に80%の濃度で加えた。

A-a: コントロールCTL活性、A-b: TB γ/δ CS(4d)、A-c: TB γ/δ CS(TCCS, 4d)、A-d: TB γ/δ CS(CD3, 4d)、A-e: TB γ/δ CS(TCCS-CD3, 4d)、

B-a: コントロールCTL活性、B-b: N γ/δ CS(4d)、B-c: N γ/δ CS(TCCS, 4d)、B-d: N γ/δ CS(CD3, 4d)、B-e: N γ/δ CS(TCCS-CD3, 4d)、

Table 1

合成オリゴヌクレオチドプライマー及びプローブの塩基配列と特異性

No.	Sequence (5'-3')	Specificity
1	TGGCCCCGGCTCAGACCCGC	H-2D ^k
2	TGACCCTGACCAAAACCGGA	Q1 ^k
3	CCCGGACCCAGAACCGAGCC	Q2 ^k
4	AGTCGCCCAGACCCTGATCG	Q4 ^k
5	CTCTGACCCAGACCCGCGCT	Q5 ^k
6	CCCCGACCCAGACCCAGGCA	Q10 ^k
7	GCTGGGCCCTGGGCTTCTAC	Pan class I
8	AGGGTGAGGGGCTCAGGCAG	Pan class I
9	CTGGCAGTTGAATGGGGAGG	Pan class I
10	ATCGTCTGTCACTCAGTCCA	Q5 ^k
11	GCTCTAGGAGCTGTCCCTGC	Q5 ^k
12-17*		

* nos. 1-6にそれぞれ相補的なオリゴヌクレオチド

Table 2

種々の細胞のQa-2抗原特異的単クローン抗体の反応性

Cell	Qa-2-specific mAb			Nonrelated mAb
	34-1.2	59	141-15.8	
B6 lymphocyte		156.1	59.0	22.3
B6.K1 lymphocyte		30.7	25.0	30.9
C3H/He thymocyte	16.7	17.4	16.6	16.8
AKR thymocyte	18.1	19.2	19.5	18.0
MM2	58.9	101.3	102.8	64.8
BW5147	46.4	80.4	102.3	45.2
L ^{Q7b/Kb}	192.0	180.2	42.1	48.4
L ^{Kb}		81.2	68.2	71.5

数値はFACS解析による mean fluorescence intensityを示す。

Table 3

種々の細胞に抗Qa-2単クローン抗体を用いて検出される抗原のPI-PLC処理に対する感受性

Cell	PI-PLC treatment			
	mAb 141-15.8		Nonrelated mAb	
	—	+	—	+
B6 lymphocyte	152.0	59.7	30.6	29.4
BW5147	85.1	96.4	35.8	36.2
MM2	88.2	98.0	73.2	74.6
FM3A	108.0	109.3	71.1	72.3
MH134	101.2	102.9	69.7	72.5

数値はFACS解析によるmean fluorescence intensityを示す。

種々の細胞をPI-PLCによる処理を行った(+)又は行わなかった(-)後、Qa-2抗原特異的単クローン抗体141-15.8又は抗nusA抗体(Nonrelated mAb)に対する反応性をFACSにより解析した。

Table 4

PI-PLC処理によるThy-1抗原の感受性

Cell	PI-PLC treatment				
	Anti-Thy-1.1		Anti-Thy-1.2		Nonrelated mAb
	—	+	—	+	—
AKR thymocyte	193.0	98.0			34.5
B6 thymocyte			176.0	79.7	40.1
BW5147	176.0	95.1			

数値はFACS解析によるmean fluorescence intensityを示す。

AKR、B6胸腺細胞及びBW5147癌細胞をPI-PLCによる処理を行った(+)又は行わなかった(−)後、抗Thy-1.1抗体、抗Thy-1.2抗体又は抗nusA抗体(Nonrelated mAb)に対する反応性をFACSにより解析した。

謝辞

本研究を行うに当たって、指導教官として始終御指導、御鞭撻を賜わりました本研究部の江川滉二教授に心から深く御礼申し上げます。

また始終有益な御助言を頂きました本研究部の中村義一助教授に御礼申し上げます。

B6.K1マウスを御供与下さいました愛知がんセンターの高橋利忠博士、UC7-13D5抗体を御供与下さいましたCicago Univ. の J. A. Bluestone博士、種々の癌細胞を御供与頂きました東北大学の長山英男博士に御礼申し上げます。

始終暖かく御指導頂きました本研究部の滝口雅文助手、川上浩一助手、伊藤耕一助手、谷野隆江博士、岡崎宇宏博士に心から感謝いたします。また、心の支えとなりました本研究部の方々に感謝いたします。

