

ヒト抗原呈示細胞による抗原特異的 異種マウスT細胞活性化現象の解析

藪 剛 爾
信州大学医学部第2内科学教室
(主任: 古田精市教授)

Antigen Presentation by Human Antigen-Presenting Cells to Antigen-Specific Xenogeneic Murine T cells

Kouji YABU

Department of Internal Medicine, Shinshu University School of Medicine
(Director: Prof. Seiichi FURUTA)

Large numbers of shared Ia determinants have been identified between mice and humans, and murine lymphocytes have been shown to recognize both polymorphic and shared determinants of human class II (Ia) antigens in mixed lymphocytes culture reaction (MLR) and cytotoxic T lymphocytes (CTL) systems. In this study, the functional replacement of murine Ia molecules in MHC restricted cell-interaction between T cells and APC by class II molecules of xenogeneic human APC was investigated. Successful antigen presentation by xenogeneic human APC in stimulating the proliferation of antigen-specific murine T cells was observed. This presentation was made with DR molecules on human APC, and $\text{Lyt } 1^+ \text{ Lyt } 2^-$ and Ia^- murine T cells, being the same population presented by syngeneic APC, were activated in this system. The data show that human Ia epitopes of DR antigens have a triggering ability equivalent to that of murine syngeneic Ia determinants on the molecule necessary for stimulation of antigen-specific murine T cells.
Shinshu Med. J., 34: 432-442, 1986

(Received for publication March 25, 1986)

Key words: antigen-presenting cells, antigen-specific T cells, class II antigen, phylogenetic hierarchy, xenogeneic APC-T cell interaction

抗原呈示細胞, 抗原特異的T細胞, クラスII抗原, 進化論的階級, 異種抗原呈示細胞-T細胞間相互作用

I 緒 言

多くの対立遺伝子からなる主要組織適合抗原遺伝子複合体 (major histocompatibility complex: 以下MHC) の示す多様性の意味は, 免疫担当細胞による自己・非自己の認識機構において機能すると考えられてきた¹⁾。この多様性は免疫担当細胞間, すなわち抗原呈示細胞 (antigen-presenting cells: 以下APC),

T細胞およびB細胞間における免疫反応の遺伝的統御に重要な意味を持っている²⁾⁻⁶⁾。最近ではMHC産物に対するモノクローナル抗体や抗原特異的T細胞クローンをを用いた系により免疫担当細胞間統御機構がさらに分子レベル, クローンレベルで解明されるようになってきている。Lunneyら⁷⁾, Pierresら⁸⁾は, Class II抗原に対するモノクローナル抗体を用いてマウスとヒトのClass II抗原間での血清学的交叉反応性を報告

しており、同様な MHC 産物に対する抗体を用いて異種 MHC 間での血清学的交叉反応性が報告されてきている⁹⁾⁻¹¹⁾。また最近では、混合リンパ球反応 (mixed lymphocyte reaction: 以下 MLR) や細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte: 以下 CTL) の系での、T 細胞による異種 MHC の認識における同種間 MHC 認識との類似性ならびに交叉反応性が、いくつかのグループによって報告されている¹²⁾⁻¹⁴⁾。さらに抗原特異的 T 細胞を用いた抗原特異性および Class II 拘束性に関する実験で、Longo と Schwartz¹⁵⁾ は同種 I-A^s 分子と交叉拘束性をもつ B10.A (I-A^k) 由来の卵白アルブミン (ovalbumin: 以下 OVA) 特異的マウス T 細胞クローンの存在を示した。また、Naqut ら¹⁶⁾ や Matis ら¹⁷⁾ によって合成ポリマー Glu⁶⁰-Ala³⁰-Tyr¹⁰ (GAT) あるいはチトクローム C 抗原に対する抗原特異的 T 細胞クローンで、自己 I 領域関連抗原 (I-region associated antigen: 以下 Ia 抗原) のみならず同種 Ia 抗原によっても抗原の存在下で活性化される (cross-presentation) クローンや、さらには抗原の非存在下で他の同種 Ia 抗原のみに反応して活性化する (allo-reactive) クローンの存在も報告されている。本研究では、抗原特異的 T 細胞と APC 間の遺伝的拘束現象の解明のために、マウスの抗原特異的 T 細胞が同系マウス APC による場合と同様に異種ヒト末梢白血球 (peripheral blood leucocytes: 以下 PBL) 中の APC によっても活性化される現象を報告し、それについて解析した。一方、Yamamoto と Yano¹⁸⁾ は、精製ツベルクリン (purified protein derivative of tuberculin: 以下 PPD) に特異的なヒト T 細胞を用いて、異種であるマウス脾細胞中の APC は抗原存在下にヒト PPD 特異的 T 細胞を活性化できないことを報告している。さらに最近では、このような APC の異種抗原特異的 T 細胞の活性化能に異種間 (ラット、マウスおよびヒト) で phylogenetic hierarchy がある事を報告しており¹⁹⁾²⁰⁾、それについてもあわせて検討を加えた。

II 材料および方法

1 動物

生後 6 週齢から 18 週齢の B10.S(9R)/SgSn 雌雄マウスを実験に供した。

2 抗原と免疫

50 μ g の卵白アルブミン (OVA: Sigma Chemical Co.) または 20 μ g の keyhole limpet hemocyanin

(KLH: Schwartz/Mann) を Freund's complete adjuvant (FCA: Difco Laboratories) と 1:1 の比率で混合しマウス足しよに免疫した³⁾。

3 抗原感作 T 細胞分画の作成ならびにヒト末梢白血球 (PBL) の分離

Schwartz ら²¹⁾²²⁾ の方法に準じて免疫したマウスから 10% thioglycollate broth (Bacto) で刺激誘導して腹腔浸出細胞を取り出すか、または鼠径および膝窩リンパ節からリンパ球を得た。この細胞をナイロンカラムを用いてそれぞれ非付着性 T 細胞分画である peritoneal exudate T lymphocyte-enriched cells (PETLES) ならびに lymph node lymphocytes (LNL) を作成した。PBL は、ヘパリン加ヒト静脈血より Ficoll-Conray 比重遠心法にて分離し、3 度洗浄後、APC 分画として用いた⁹⁾⁻¹¹⁾。

4 抗原パルスの方法

PBL (3-10 $\times 10^5$ /ml) またはマウス脾細胞 (10 $\times 10^6$ /ml) を 100 μ g/ml OVA または 50 μ g/ml KLH とともに 37 $^{\circ}$ C で 60 分間処理した。これらの細胞を 3 度洗浄して遊離抗原を除去し、1,000-2,000rad の X 線照射にて不活化後、culture medium に浮遊させて APC 分画として用いた³⁾¹⁸⁾²¹⁾。

5 抗血清、モノクローナル抗体ならびにインターロウキン 1 (interleukin 1: 以下 IL-1)

B10.S (9R) の Thy-1 抗原, Lyt-1 抗原ならびに Lyt-2 抗原に対する抗体としての抗 Thy 1.2, 抗 Lyt 1.2 ならびに抗 Lyt 2.2 抗血清 (抗体) は、Cederlane Laboratories Ltd. より購入したものを、また抗 HLA-DR (clone L243) ならびに Leu1 (抗ヒト T 細胞抗体, clone L17F12) モノクローナル抗体は Becton Dickinson より購入したものを使用した。HLA-DR 抗原と交叉反応性のある抗 I-E^k モノクローナル抗体 ISCR 3 (IgG 2b) は NIH 篠原信賢博士より供与されたものを使用した²³⁾。I-A^s 分子に特異的な抗 Ia モノクローナル抗体は、Drs. P. Marrack and J. Kappler が作成した MKS 4 (IgG2b) を使用した²⁴⁾。ヒト IL-1 は、Genzyme 社 (Denmark) より購入したものをを用いた。

6 PETLES, LNL ならびに PBL の各種抗体および補体による処理

PETLES ならびに LNL 中の APC を除去するために、細胞を ISCR3 (抗 I-E^k 抗体) と 4 $^{\circ}$ C 下 60 分間反応させた。その後細胞を 1 度洗浄し 1:10 に稀釈したウサギ補体で 37 $^{\circ}$ C 下 60 分間処理した。処理後、細

胞を3度洗浄し、10%牛胎児血清 (fetal calf serum : FCS, GIBCO) を含む RPMI 1640 culture medium に浮遊させて調製した³⁾¹⁴⁾¹⁸⁾。反応細胞の解析のために、B10.S(9R) PETLES ならびに LNL を抗 Thy 1.2, 抗 I-E^k(ISCR3), 抗 Thy1.2+抗 I-E^k, 抗 Lyt 1.2, 抗 Lyt 2.2, または抗 Lyt 1.2+抗 Lyt 2.2 抗体とウサギ補体にて上記と同様に処理して、実験に使用した。PBL は、抗 HLA-DR 抗体 (1:100 稀釈) または Leu1 (1:100 稀釈), とウサギ補体 (1:3 稀釈) にて処理した後に抗原をパルスし、さらに X線照射した後、抗原呈示能を調べた。

7 同系マウスおよび異種ヒト APC によるマウス抗原特異的 T 細胞増殖反応

材料と方法の項で示したように、ヒト PBL を抗原パルス後 $3 \times 10^5 - 3 \times 10^6$ /well の濃度に調整し、Ia 抗原陽性細胞を除去した 1×10^5 PETLES または 3×10^5 LNL とともに培養しヒト APC 細胞濃度によるマウス抗原特異的増殖反応を調べた (*in vitro* 1次反応)。In vitro 2次反応には抗原とともに14日間培養して得られた 2×10^4 /well の抗原特異的 T 細胞を反応細胞として用いた³⁾¹⁴⁾¹⁸⁾²¹⁾。1次反応は5日間、2次反応は3日間、96穴 U-plate (1-63302 Nunclon) を用いて 37°C, 5% CO₂ の条件下で培養した。ハーベストの18時間前に $0.5 \mu\text{Ci}$ の ³H-thymidine (³H-TdR : Specific activity 27 Ci/mol, the Radiochemical Center) を加え、半自動細胞ハーベスター (阿部科学 Co.) にてグラスウールファイバーディスク上にハーベストし、T細胞の ³H-TdR 取り込みを液体シンチレーションカウンター (Packard Instrument Co.) で測定した。抗原特異的増殖反応 (ΔCPM) は、次の式により計算した。 $\Delta\text{CPM} = (\text{抗原をパルスした APC による T 細胞の増殖反応 (CPMe)}) - (\text{抗原をパルスしない APC による T 細胞の増殖反応 (CPMc)})$

また反応の有意差は t-検定 (Welchi の方法) により 5%以下の危険率をもって認められるものに表中の数字の右上に (*) を付した。しかしながら標準偏差の大きな実験群では 5%以上の危険率を示すものもあったが、数回の実験をくりかえすことによりその有意性が確かめられている。

8 B10.S (9R) 抗原特異的 I-E^k 拘束性 T 細胞分画の樹立

KLH で感作した B10.S (9R) PETLES を抗原をパルスした同系 APC とともに、0.3% MKS4 (抗 I-A^s 抗体) 存在下で14日間培養した。

その後得られた細胞を3度洗浄し culture medium に浮遊させ、KLH 特異的 I-E^k 拘束性 T 細胞分画として2次反応に用いた。

9 ヒトおよびマウス抗 Ia モノクローナル抗体による阻止効果

抗原をパルスした同系ないし異種ヒト APC による抗原特異的マウス T 細胞増殖反応において、種々の抗 Ia 抗体 (ISCR 3 : 抗 I-E^k, MKS 4 : 抗 I-A^s および抗 HLA-DR 抗体) を濃度を変えて培養に加えて、その阻止効果を調べた。阻止効果は次の式によって計算した。

$$\% \text{阻止効果} = (1 - \Delta\text{CPM}(\text{Ab}+) / \Delta\text{CPM}(\text{Ab}-)) \times 100$$

ただし $\Delta\text{CPM}(\text{Ab}+)$ は抗体を培養に加えた時の抗原特異的反応, $\Delta\text{CPM}(\text{Ab}-)$ は抗体を培養に加えない時の抗原特異的反応を表す。

III 結 果

1 マウス抗原特異的 T 細胞増殖反応のためのヒト APC 最適細胞濃度の設定

マウス抗原特異的 T 細胞活性化のためのヒト APC の適切な条件を調べるために、材料と方法の項で示したようにヒト APC 分画としての PBL の濃度を変えて実験を行った。

本研究で用いている *in vitro* の実験系では、培養条件 (細胞濃度による培養液中の栄養要求度, 代謝産物による pH の変化, あるいはガス交換の効率等) がある範囲内においてのみ細胞の生理的機能を測定することができる。すなわち false negative を除外するために細胞濃度による最適条件を調べた。表1にみるように1次反応では、マウス同系 APC は 1×10^5 の濃度で最大の反応が生じ、ヒト PBL は $1 \times 10^4 - 3 \times 10^4$ の細胞濃度で最も大きな反応が得られた。2次応答においても同様なヒト APC 濃度で有意な反応が生じた。以上の結果より $1 - 3 \times 10^4$ の細胞濃度のヒト PBL を APC として以後の実験に用いた。

2 ヒト APC により活性化されるマウス抗原特異的増殖細胞の解析

OVA をパルスした異種ヒト APC に反応する B10.S(9R)PETLES 中の OVA 特異的増殖細胞の分画を解析するために、PETLES を抗体 (ISCR3 : 抗 I-E^k または抗 Thy1.2 抗体) とウサギ補体で処理した。表2に示したごとく B10.S(9R)PETLES を抗 Thy 1.2 抗体と補体で処理した後の細胞 (Thy1⁻) は抗原

表1 マウス抗原特異的1次および2次増殖反応におけるヒトAPC細胞濃度による反応性

Number of APC cells × 10 ³ /well	OVA-specific B10.S(9R) T cell proliferative response					
	B10.S (9R) APC (syngeneic)			Human APC (xenogeneic)		
	non-pulsed	OVA-pulsed		non-pulsed	OVA-pulsed	
	cpm ± SEM	cpm ± SEM	Δcpm	cpm ± SEM	cpm ± SEM	Δcpm
Exp. 1 primary response ^{a)}						
3		N. D. c)		3,320 ± 460	4,635 ± 1,095	1,315
10	7,135 ± 695	11,060 ± 480	3,925*	3,355 ± 25	8,365 ± 165	5,010*
30	13,795 ± 365	17,770 ± 710	3,985*	4,855 ± 125	10,860 ± 510	6,005*
100	20,460 ± 1,910	52,995 ± 20,035	32,535	6,620 ± 590	8,055 ± 35	1,475
300	17,725 ± 2,805	35,895 ± 955	18,170*	5,660 ± 120	4,000 ± 120	<0
1,000	5,485 ± 185	16,135 ± 1,225	10,650*	N. D.		
Exp. 2 secondary response ^{b)}						
3		N. D.		3,725 ± 1,115	6,945 ± 2,001	2,670
10	3,725 ± 835	8,545 ± 2,105	4,820	4,115 ± 915	17,020 ± 1,790	12,905*
30	3,405 ± 715	11,290 ± 1,140	7,885*	12,970 ± 3,140	24,365 ± 25	11,395*
100	7,360 ± 1,090	18,110 ± 470	10,750*	10,935 ± 2,325	11,510 ± 120	575

a) Ia 抗原陽性細胞を除去したOVA感作B10.S (9R) PETLES を反応細胞として用い、5日間培養した。

b) *in vitro* にて14日以上培養して誘導したOVA特異的T細胞を反応細胞として用い、3日間培養した。

c) not done

* p < 0.05

表4 抗原特異的マウスT細胞を活性化しうるヒト抗原呈示細胞の解析

APC cell number/well	B10.S (9R) derived KLH-specific T cell proliferative responses ^{a)}					
	Human APC sources (PBL) treated with					
	C alone		anti-DR+C		anti-Leul+C	
	cpm ± SEM	Δcpm	cpm ± SEM	Δcpm	cpm ± SEM	Δcpm
3 × 10 ⁴ Non-pulsed	9,044 ± 881		2,832 ± 322		8,776 ± 1,256	
KLH-pulsed	32,237 ± 3,151	23,193*	5,269 ± 956	2,437	37,254 ± 4,445	28,478*
1 × 10 ⁴ Non-pulsed	3,370 ± 261		2,480 ± 683		2,949 ± 295	
KLH-pulsed	10,320 ± 3,460	6,950	3,489 ± 933	1,009	15,500 ± 1,332	12,551*

a) Ia 抗原陽性細胞を除去した KLH 感作 B10.S(9R) PETLES の culture medium のみ、また KLH (20 μg/ml) に対する反応は、おのおの、1,273cpm, 2,135cpm を示した。

* p < 0.05

をパルスした同系および異種 APC の両者に活性化されなかった。他方、PETLES を抗 Ia 抗体と補体で処理した時には、OVA 抗原特異的反応は有意に減少したが、この細胞分画に OVA をパルスした同系または異種ヒト APC を加えて培養することにより補体単独処理の場合とほぼ同等の反応が得られた。以上により、抗原をパルスした同系または異種ヒト APC によって活性化される PETLES 中の抗原特異的増殖細胞はと

もに Thy1⁺ 細胞、すなわち T 細胞である。

3 ヒト APC によって抗原特異的に活性化されるマウス T 細胞亜型 (Lyt 表現型) の解析

異種ヒト APC によって活性化されるマウス抗原特異的 T 細胞について、さらに Lyt 表現型を解析した (表 3)。抗 Ia 抗体 (ISCR3) と補体で処理することにより Ia⁺ 細胞 (APC) を除去した PETLES を、さらに Lyt 抗原特異的抗体 (抗 Lyt1.2 抗体、または抗 Lyt

表2 ヒト APC により活性化されるマウス抗原特異的増殖細胞

B10. S (9R) PETLES treated with a)	APC non-added b)			B10. S (9R) APC			Human APC		
	medium	OVA	response	non-pulsed OVA-pulsed response	non-pulsed OVA-pulsed response	non-pulsed OVA-pulsed response	non-pulsed OVA-pulsed response	non-pulsed OVA-pulsed response	non-pulsed OVA-pulsed response
	cpm±SEM	cpm±SEM	Δcpm	cpm±SEM	cpm±SEM	Δcpm	cpm±SEM	cpm±SEM	Δcpm
(I) C alone	4,318±412	21,411±1,067	17,093*	4,718±411	13,754±3,754	9,036	13,310±431	22,416±388	9,631*
(II) anti-Thy-1 Ab+C	2,312±633	1,618±353	<0	1,184±107	1,451±38	267	4,271±315	5,248±568	977
(III) anti-Ia Ab+C	3,154±956	5,834±330	2,680	2,388±156	8,692±698	6,304*	9,281±727	15,282±2,452	6,001

a) OVA 感作 B10. S (9R) PETLES を反応細胞として用い、各分画は input 細胞数で well あたり 1×10^5 にて処理し (I)-(III) 分画とした。
 b) medium のみ、または OVA (100 μg/ml) を培養系に加えて反応性を調べた。

* $p < 0.05$

表3 ヒト APC により抗原特異的に活性化されるマウス T 細胞型型 (Lyt 表現型)

Ia ⁺ cells depleted B10. S (9R) PETLES treated with a)	KLH-specific B10. S (9R) T cell proliferative response			Human APC					
	APC non-added b)			B10. S (9R) APC					
	medium	KLH	response	non-pulsed KLH-pulsed response	non-pulsed KLH-pulsed response	non-pulsed KLH-pulsed response			
(I) C alone	518±31	666±218	148	2,849±525	9,773±232	6,924*	744±131	7,776±1,340	7,032*
(II) anti-Thy-1.2 Ab+C	411±14	547±28	136	440±13	385±13	<0	423±22	561±49	138
(III) anti-Lyt-1.2 Ab+C	404±4	413±24	9	429±14	463±30	34	452±18	749±294	297
(IV) anti-Lyt-2.2 Ab+C	385±16	512±57	127	2,025±414	11,098±25	9,037*	626±146	8,165±535	7,539*
(V) (anti-Lyt-1.2 Ab+ anti-Lyt-2.2 Ab)+C	379±4	384±28	5	409±49	536±28	127	433±10	898±159	465
(VI) (III)+(IV)	400±26	602±123	202	2,116±197	7,147±731	5,031*	891±145	5,858±565	4,967*

a) Ia 抗原陽性細胞を除去した KLH 感作 B10. S (9R) PETLES を反応細胞として用い、各分画は input 細胞数で well あたり 1×10^5 個にて処理し (I)-(V) とした。(VI) は (III) と (IV) を各々 1×10^5 個ずつ加えたものを用いた。
 b) medium のみ、または KLH (50 μg/ml) を培養系に加えて反応性を調べた。

* $p < 0.05$

表5 異種ヒトAPCにより活性化されるKLH特異的マウスT細胞増殖反応での外因性IL-1の効果

Dilution of anti-HLA-DR Ab	KLH-specific T cell proliferative responses ^{a)}					
	B10.S (9R) APC			Human APC		
	IL-1 (-)		IL-1 (+)b)	IL-1 (-)		IL-1 (+)b)
	non-pulsed	KLH-pulsed response	non-pulsed	KLH-pulsed response	non-pulsed	KLH-pulsed response
	cpm±SEM	cpm±SEM Δcpm	cpm±SEM	cpm±SEM Δcpm	cpm±SEM	cpm±SEM Δcpm
(-)	5,115±448	11,803±8 6,688*	6,583±711	20,915±43 14,332*	28,384±938	42,089±8,434 13,705
2×10 ⁻³	N.D. c)	N.D. c)	3,675±397	7,176±861 3,501	23,738±73	26,665±4,231 2,927
2×10 ⁻⁵	N.D.	N.D.	2,614±293	8,403±1,302 5,789	29,807±2,211	29,380±1,800 <0

a) KLH 感作 B10.S (9R) PETLES を KLH でパルスした同系 APC とともに14日間培養し KLH 特異的 T細胞を誘導し反応細胞とした。
 b) ヒト APC による KLH 特異的マウス T細胞増殖反応に外因性ヒト IL-1 (10μl/well) を加えた。
 c) not done
 * p<0.05

表6 同系ないし異種ヒトAPCによるKLH特異的I-E^k拘束性T細胞増殖反応における抗class II抗体の阻止効果

Dilution of antibodies	KLH-specific I-E ^k restricted T cell proliferative responses ^{a)}					
	Syngeneic APC			Human APC		
	non-pulsed		KLH-pulsed response blocking ^{b)}	non-pulsed		KLH-pulsed response blocking ^{b)}
	cpm±SEM	cpm±SEM Δcpm	%	cpm±SEM	cpm±SEM Δcpm	%
(-)	21,949±1,446	42,353±3,179 28,404*	0	19,564±162	30,571±3,341 11,007*	0
MKS4 : anti-I-A ^s 2×10 ⁻³	13,581±411	42,638±488 29,057*	0	N.D. c)	N.D.	
2×10 ⁻⁴	18,043±661	40,158±312 22,116*	0	N.D.	N.D.	
ISCR3 : anti-I-E ^k 2×10 ⁻³	9,928±1,048	18,078±1,182 8,150	60	N.D.	N.D.	
2×10 ⁻⁴	9,148±767	21,706±76 12,558	39	N.D.	N.D.	
anti-HLA-DR 2×10 ⁻³	N.D.	N.D.		9,672±63	12,119±4,109 2,447	88
2×10 ⁻⁴	N.D.	N.D.		8,238±1,786	13,277±395 5,039	55

a) KLH 感作 B10.S (9R) PETLES を KLH パルスした同系 APC とともに、抗 I-A^s 抗体存在下で14日間培養して I-E^k 拘束性 KLH 特異的 T細胞を誘導した。
 b) %阻止効果=(1-抗体を加えた時のΔCPM/抗体を加えない時のΔCPM)×100
 c) not done
 * p<0.05

2.2 抗体)と補体で処理した。抗 Lyt1.2 抗体と補体で処理することにより処理細胞の抗原をパルスした同系または異種ヒト APC に対する増殖反応はほぼ完全に除去された。他方、抗 Lyt2.2 抗体と補体での処理は同系および異種ヒト APC に対する抗原特異的増殖反応を減じず、むしろ増強する効果が見られた。また (VI) にみるように、Lyt1⁻ Lyt2⁺ 細胞分画は Lyt1⁺ Lyt2⁻ 細胞分画とともに培養することによって、抗 Lyt2.2 抗体+補体により処理された PETLES の反応 (Lyt1⁺ Lyt2⁻ 細胞分画のみ) に比して反応はむしろやや減弱するが、抗原をパルスした同系および異種ヒト APC に対する有意な抗原特異的増殖反応が観察された。したがって Lyt1⁻ Lyt2⁺ 細胞は反応にむしろ抑制的に作用し、さらにその抑制効果は (VI) により Lyt1⁺ Lyt2⁻ 細胞にむけられたものであることが示唆された。また Lyt1⁻ Lyt2⁻ 細胞は本反応系には関与していないことが (V) により示された。以上の実験より、抗原をパルスしたヒト APC によって刺激される マウス抗原特異的増殖性 T 細胞は、同系 APC によって刺激される T 細胞と同様に Lyt1⁺ Lyt2⁻ 表現型であることが示された。

4 抗原特異的マウス T 細胞を活性化しうるヒト抗原呈示細胞の解析

ヒト PBL 中の APC 分画を解析するために、PBL をモノクローナル抗体 (抗 HLA-DR 抗体, Leu1: 抗ヒト T 細胞) と補体で処理後、マウス抗原特異的 T 細胞への抗原呈示能を調べた。

表 4 にみるように、補体のみで処理したヒト APC は可溶性抗原である KLH をマウス T 細胞に抗原呈示した。これらの増殖反応は、PBL を抗 HLA-DR 抗体と補体で前処置することによって著明に抑制されたが、他方 Leu1 (抗ヒト T 細胞) と補体で処理した場合は、反応はまったく抑制されなかった。以上により、PBL 中の DR 陽性細胞が抗原特異的マウス T 細胞の活性化に必要であり、さらに、この反応において Leu1⁺ 細胞 (ヒト T 細胞) ならびに Leu1⁺ 細胞により分泌されるヒト T 細胞由来因子 (ヒト IL-2 など) が関与していないことが判明した。

5 ヒト APC による抗原特異的マウス T 細胞活性化における外因性ヒト IL-1 添加の効果

異種ヒト APC による抗原特異的マウス T 細胞の活性化が、細胞間の直接的接触を必要としない修飾された非生理的ヒト IL-1 分泌自体によるものでないことを証明するために、外因性 IL-1 を培養に加えて反応

を調べた。表 5 にみるように、ヒト APC によって活性化される KLH 特異的 B10.S(9R) T 細胞増殖反応は、抗 HLA-DR 抗体によって抑制されるが、外因性 IL-1 の培養への添加は back ground の反応を増強するにもかかわらず KLH 特異的反応を増強せず、この反応は抗 HLA-DR 抗体で抑制をうけた。すなわち外因性 IL-1 は非特異的反応を増強するにもかかわらず、マウス抗原特異的増殖反応には影響をあたえなかった。以上の結果からヒト APC によって活性化される抗原特異的マウス T 細胞増殖反応は、ヒト APC に由来する非生理的 IL-1 分泌によるものではなく、DR 分子を介した分子間相互作用によるものであることが示唆された。

6 抗原特異的マウス T 細胞を活性化するヒト Class II 分子の性状ならびにマウス Ia 拘束性と関係

さらに解析をすすめるために、材料と方法の項でのべたように B10.S (9R) 抗原特異的 T 細胞を抗 I-A^s 抗体存在下で同系 APC および KLH とともに培養し、得られた T 細胞分画に対する同系および異種ヒト APC の抗原呈示を解析した。表 6 に示したごとく、抗 I-A^s 抗体存在下で誘導された抗原特異的 T 細胞分画は同系 APC の抗原呈示に対して抗 I-E^k 抗体で反応を阻止され、他方、抗 I-A^s 抗体によっては阻止されなかったことより I-E^k 拘束性と判断された。この T 細胞分画に対してヒト APC は同系 APC と同様に抗原特異的に活性化でき、その反応は抗 HLA-DR 抗体で完全に阻止できた。すなわち、ここではヒト APC が DR 分子を介して KLH と連関することにより活性化できる KLH 特異的 I-E^k 拘束性 T 細胞分画が誘導された。

IV 考 察

抗原特異的 T 細胞は、自己抗原の allele 特異的な多様性部分と連関した時のみに外来可溶性抗原を認識し反応することが、MHC congenic strain を用いた同種異系統間の相互作用による解析や抗 Ia 抗体を用いての阻止実験などで明らかにされてきた²⁾³⁾⁶⁾。他方、MLR においては T 細胞は自己以外の allele 特異的多様性部分に反応することが知られているが、異種間ヒト抗マウス MLR を用いた系でヒト T 細胞はマウスの H-2 多様性部 (主に I-A 亜領域) を認識して反応することが Lindahl と Bach¹²⁾ および Swain ら¹³⁾ によって明らかにされてきた。また Yoshizawa と Yano¹⁴⁾ はマウス抗ヒト MLR において、マウス T 細胞は同系 APC 存在下でヒト Class II 抗原非多様性部

を認識し反応することを報告した。

さらに、抗原特異的T細胞に対する活性化能から見た Class II 抗原の機能では、多くの Class II 抗原決定基がヒトとマウスで血清学的交叉性を示すにもかかわらず、ヒト抗原特異的T細胞は抗原をパルスしたマウス APC によって活性化されない¹⁸⁾。本研究ではヒト APC が抗原特異的マウスT細胞を活性化するという異種間の細胞相互作用を報告し解析した。ヒト APC によるマウスT細胞への抗原呈示は DR 抗原陽性細胞を介して行われ、またヒトT細胞ならびにヒトT細胞由来因子 (IL-2 など) の関与は否定的である。この異種間の抗原呈示反応が細胞膜上の分子間の直接的反応を介している1つの証拠として、ヒト APC からマウスT細胞への抗原呈示が抗 HLA-DR モノクローナル抗体によって特異的に阻止される事が挙げられる。HLA-DR 抗原以外の他のヒト Class II 抗原として HLA-DP, DQ 抗原の存在が知られている²⁵⁾が、これらの分子の異種マウスT細胞への抗原呈示反応への関与については現在のところ明らかではない。しかしながら、著者らの予備実験では、抗ヒト DC (DQ) 抗体 (Leu10)²⁶⁾ は、異種ヒト APC-T細胞の相互作用を阻止できなかった (Data not shown)。次に、ヒト DR 抗原を介して抗原特異的に活性化されるマウスT細胞分画の性状についての解析を試みた。

異種ヒト APC を用いた本研究での抗原特異的増殖反応では、反応細胞は $\text{Lyt1}^+ \text{Lyt2}^-$ T細胞に属していた。MLR と CTL の系を用いて解析した Swain ら²⁷⁾²⁸⁾の報告によれば、T細胞分画としての Lyt 表現型とT細胞によって認識される MHC の Class I 抗原および Class II 抗原との関係に関して、Class I 抗原は Lyt2^+ T細胞によって認識され Class II 抗原は Lyt1^+ T細胞によって認識されるとしている。また Yoshizawa と Yano¹⁴⁾によれば、異種マウス抗ヒト MLR においてマウス同系 APC の存在下でヒト DR 抗原 (Class II 抗原) を認識して反応するマウスT細胞は、 Lyt1^+ であることを報告している。しかしながら、これらの関係は一定ではなく Vivodic ら²⁹⁾によれば Class II 抗原を認識する CTL には $\text{Lyt1}^+ \text{Lyt2}^-$ T細胞および $\text{Lyt}^- \text{Lyt2}^+$ T細胞の両者が存在しているとしている。また、腫瘍細胞を APC として用いた Ramila と Erb³⁰⁾の実験では、腫瘍細胞によって抗原特異的に活性化される増殖性T細胞は Lyt2^+ T細胞に属しており suppressor 機能を有していた。本研究では、異種ヒト MHC Class II 抗原を抗原特異的

増殖反応において認識するマウスT細胞分画が同系統 APC によって抗原特異的に活性化されるT細胞と同じ分画であり、T細胞の Lyt 表現型と MHC Class II 抗原認識の対応が種を越えて存在することが示された。また異種間の抗原特異的増殖反応におけるヒト APC 由来因子の関与については、外因性ヒト IL-1 はヒト APC の抗原特異的マウスT細胞活性化能に代替できないことが判明した。

Glimcher ら³¹⁾は、IL-1 非分泌性であるB細胞腫を APC として用いた系で抗原特異的に活性化をうける IL-1 非依存性T細胞クローンの存在を報告している。異種間の抗原呈示反応においても異種ヒト IL-1 は反応の十分条件ではなく、この反応が修飾された非特異的 IL-1 分泌に由来する増殖反応ではないことが明らかにされた。他方、さらに異種間のヒト APC-抗原特異的マウスT細胞相互作用が生じている直接的な証拠として抗原特異的に確立されたT細胞分画ならびにT細胞ラインの存在がある。表6に示されたように B10.S (9R) の KLH 特異的 I-E^k 拘束性T細胞分画が、同系ならびに異種ヒト APC によっても抗原特異的に活性化される。このような交叉反応性を有するマウスT細胞ラインとして、マウス I-A 分子とヒト DR 分子の両者に拘束性を有する B10.S(9R) 由来 OVA 特異的T細胞ライン 9-0-A1 (I-A^s 拘束性)、や B10.A (4R) 由来の PPD 特異的T細胞ライン 4-P-1 (I-A^k 拘束性) を著者らはすでに報告している¹⁹⁾²⁰⁾。Waters ら³²⁾もまた、KLH 特異的 I-E^k 拘束性T細胞ハイブリドーマがヒト APC によっても活性化され IL-2 を分泌したことを報告している。したがって、ヒト APC は抗原と関連した DR 分子によってマウス I-A 拘束性T細胞と I-E 拘束性T細胞の両者を活性化しうる可能性が示された。

ヒト APC がマウスT細胞に抗原呈示できることの1つの説明として、異種 Class II 分子上の多様性部分が allele 特異的抗原決定基としてB細胞によって認識されると同様に、T細胞によっても認識されるのかもかもしれない。

しかしながら、著者らが観察したこのようなヒト APC T細胞間の相互作用が、すべて Matis ら¹⁷⁾の示した同種間にみられるような cross-presentation を受けるクローンによるとするのは、そのような遺伝的支配の境界領域の特異性を有するT細胞クローンの頻度からみても無理があると考えられる。

むしろマウスT細胞は異種であるヒト APC DR 抗

原上の抗原決定基において、自己抗原部位(同系統 Ia 抗原特異的部位)と非自己抗原部位(同種 Ia 抗原特異的部位)の両者を allelism の観点から認識し、抗原特異的の反応においては DR 抗原上の自己としての Ia epitope に対して遺伝的拘束性を受けものとして反応している可能性が考えられる。

以上、異種ヒト-マウス間での APC-抗原特異的 T 細胞相互作用を解析したが、ここで示したように、ヒト APC は抗原特異的マウス T 細胞を活性化できるが逆に、Yamamoto と Yano¹⁸⁾がしめしたように、マウス APC は抗原特異的ヒト T 細胞を活性化できなかった。

この一方通行の異種 T 細胞への抗原呈示の意味するところは、免疫現象における phylogenetic hierarchy の存在を示している。その説明としては、1つには、マウス Ia 抗原上の Ia epitope が抗原特異的ヒト T 細胞を活性化するのに必要なヒト DR 分子上の Ia epitope に匹敵しうる決定基を持たないという可能性や、あるいは、ヒトが可溶性抗原をパルスしたマウス Ia 抗原分子と交叉反応しうる T 細胞クローンを持たないことなどが考えられる。これらの研究は、MHC の多様性の本質的意味や免疫系による自己認識の際の Class II 抗原の役割、とくに、Ia 抗原が可溶性抗原と連関して、抗原特異的 T 細胞によって自己認識される際の役割などについての考察に新しい可能性を示唆するものである。

V 結 語

抗原特異的 T 細胞増殖反応において、抗原呈示細胞上の Class II 抗原が、種を越えて機能して T 細胞を活

性化することがあり、その交叉反応性につき解析し、以下の結果および結論を得た。

1 ヒト APC は、抗原と連関することによりマウス抗原特異的増殖反応を引き起こす。

2 その際活性化されるマウス反応細胞は、Thy1⁺ Lyt1⁺ Lyt2⁻ Ia⁻ 表現型を有する T 細胞である。

3 マウス抗原特異的 T 細胞を活性化しうるヒト抗原呈示細胞は、Leu1⁻ DR⁺ であり、ヒト T 細胞の関与 (T 細胞由来因子など) は必要としない。

4 ヒト APC によるマウス T 細胞の活性化は抗 DR 抗体によって阻止できる事より DR 分子との直接の相互作用が必要であり、この反応のヒト IL-1 による代替は不可能である。

5 I-E 分子拘束性の KLH 抗原特異的マウス T 細胞が抗原と連関したヒト APC 上の DR 分子によって活性化される。

マウス抗原特異的 T 細胞は、遺伝的拘束現象として同系の抗原呈示細胞上の Class II 抗原と感作抗原が連関した時のみ反応が生じるとされているが、以上により異種であるヒトの抗原呈示細胞上の Class II 抗原によっても反応が生じる。この現象は Class II 抗原の異種間交叉反応性が血清学的のみならず機能的にも存在していることが示された。このことは、遺伝的拘束現象に新たな問題を提起するものと思われる。

稿を終わるに臨み、終始御指導ならびに御校閲を賜りました古田精市教授ならびに寄生虫学教室の矢野明彦博士に深謝します。

本論文の要旨は、第13回日本免疫学会1982年11月、第5回国際免疫学会1983年8月および第10回国際網内系学会1984年9月において発表した。

文 献

- 1) Zinkernagel, R.M. and Doherty, P.C. : Restriction of *in vitro* T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*, 248 : 701-702, 1974
- 2) Rosenthal, A.S. and Shevach, E.M. : Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. I. Requirement for histocompatible macrophages and lymphocytes. *J Exp Med*, 138 : 1194-1212, 1973
- 3) Yano, A., Schwartz, R.H. and Paul, W.E. : Antigen presentation in the murine T-lymphocyte proliferative response. I. Requirement for genetic identity at the major histocompatibility complex. *J Exp Med*, 146 : 828-843, 1977
- 4) Bergholtz, B.O. and Thorsby, E. : HLA-D restriction of the macrophage-dependent response of immune human T lymphocytes to PPD *in vitro* : Inhibition by anti-HLA DR antisera. *Scand J Immunol*, 8 : 63-73, 1978
- 5) Thorsby, E., Berle, E. and Nousiainen H. : HLA-D region molecules restrict proliferative T cell responses to antigen. *Immunol Rev*, 66 : 39-56, 1982

- 6) Rosenthal, A. S. : Determinant selection and macrophage function in genetic control of the immune response. *Immunol Rev*, 40 : 136-152, 1978
- 7) Lunney, J. K., Mann, D. L. and Sachs, D. H. : Sharing of Ia antigens between species. III. Ia specificities shared between mice and human beings. *Scand J Immunol*, 10 : 403-413, 1979
- 8) Pierres, M., Mercier, P., Madsen, M., Mawas, C. and Kristensen, T. : Monoclonal mouse anti-I-A^k and anti-I-E^k antibodies cross-reacting with HLA-DR supertypic and subtypic determinants rather than classical DR allelic specificities. *Tissue Antigens*, 19 : 289-300, 1982
- 9) Uemura, K. and Yano, A. : Serological cross reactivity of murine allo-anti-Ia^a antibody with the molecule on human antigen presenting cells. *Immunol Lett*, 5 : 293-299, 1982
- 10) Okubo, Y., Kusama, S., Yamashita, Y., Kitazawa, K., Nagasaka, M. and Yano, A. : Serological cross-reactivity of murine A.TH anti-A.TL antibody (anti-I-E^k antibody) with Ia like molecules of human antigen presenting cell. *Cell Immunol*, 76 : 1-9, 1983
- 11) Aosai, F., Yui, K., Shigematu, H. and Yano, A. : Serological cross-reactivities of murine and human class II antigen determined by murine xeno anti-human class II antibody. *Microbiol Immunol*, 28 : 1223-1240, 1984
- 12) Lindahl, K. F. and Bach, F. H. : Genetic and cellular aspects of xenogeneic mixed leukocyte culture reaction. *J Exp Med*, 144 : 305-318, 1976
- 13) Swain, S. L., Dutton, R. W., Schwab, R. and Yamamoto, J. : Xenogeneic human anti-mouse T cell responses are due to the activity of the same functional T cell subsets responsible for allospecific and major histocompatibility complex-restricted responses. *J Exp Med*, 157 : 720-729, 1983
- 14) Yoshizawa, K. and Yano, A. : Mouse T lymphocytes proliferative responses specific for human MHC products in the mouse anti-human xenogeneic MLR. *J Immunol*, 132 : 2820-2829, 1984
- 15) Longo, D. L. and Schwartz, R. H. : T-cell specificity for H-2 and Ir gene phenotype correlates with the phenotype of thymic antigen-presenting cells. *Nature*, 287 : 44-46, 1980
- 16) Naqut, P., Pierres, A. and Pierres, M. : Dissection of the poly (Glu⁰⁰-Ala³⁰-Tyr¹⁰) (GAT)-specific T-cell repertoire in H-2I^k mice. I. GAT plus self-I-A^k -reactive T-cell clones can recognize alloactivating and/or restriction determinants on non-self-Ia molecules. *Immunogenetics*, 18 : 475-488, 1983
- 17) Matis, L. A., Longo, D. L., Hedrick, S. M., Hannum, C., Margolish, E. and Schwartz, R. H. : Clonal analysis of the major histocompatibility complex restriction and the fine specificity of antigen recognition in the T cell proliferative response to cytochrome C. *J Immunol*, 130 : 1527-1535, 1983
- 18) Yamamoto, M. and Yano, A. : Serological and biological cross-reactivity of class II antigens between mice and humans in antigen-specific T cell proliferative responses. *Cell Immunol*, 87 : 659-673, 1984
- 19) Yano, A., Yabu, K., Yui, K., Yamashita, K. and Aosai, F. : Interspecies cross-reactivity of class II antigen of MHC determined by syngeneic, allogeneic and xenogeneic B and T cells. *Immunobiology*, 168 : 154-166, 1984
- 20) Yano, A., Yui, K., Yamashita, K., Aosai, F., Okumura, N. and Yabu, K. : Phylogenetic hierarchy of antigen-presenting ability in antigen-specific T cell activation. *Immunol Lett*, 11 : 9-13, 1985
- 21) Schwartz, R. H., Jackson, L. and Paul, W. E. : T lymphocyte-enriched murine peritoneal exudate cells. I. A reliable assay for antigen-induced T lymphocyte proliferation. *J Immunol*, 115 : 1330-1338, 1976
- 22) Corradine, G., Etlinger, H. M. and Chiller, J. M. : Lymphocyte specificity to protein antigens. I. Characterization of the antigen-induced *in vitro* T cell-dependent proliferative response with lymph node cells from primed mice. *J Immunol*, 119 : 1048-1053, 1977

- 23) Watanabe, M., Suzuki, T., Taniguchi, M. and Shinohara, N. : Monoclonal anti-Ia murine alloantibodies cross-reactive with the Ia-homologues of other mammalian species including humans. *Transplantation*, 36 : 712-718, 1983
- 24) Kappler, J. W., Skidmore, B., White, J. and Marrack, P. : Antigen-inducible, H-2-restricted interleukin-2-producing T cell hybridomas. : Lack of independent antigen and H-2 recognition. *J Exp Med*, 153 : 1198-1214, 1981
- 25) Bodmer, J. and Bodmer, W. : Histocompatibility 1984. *Immunology Today*, 51 : 251-254, 1984
- 26) Wang, C. Y., Al-Katib, A., Lane, C. L., Koziner, B. and Fu, S. M. : Induction of HLA-DC/DS (Leu10) antigen expression by human precursor B cell lines. *J Exp Med*, 158 : 1757-1762, 1983
- 27) Swain, S. L., Dennert, G., Wormsley, S. and Dotten, R. : The Lyt phenotype of a long-term allospecific T cell line. Both helper and killer activities to Ia are mediated by Lyt-1 cells. *Eur J Immunol*, 11 : 175-180, 1981
- 28) Swain, S. L. : Significance of Lyt phenotypes : Lyt2 antibodies block activities of T cells that recognize class I MHC antigens regardless of their function. *Proc Natl Acad Sci*, 78 : 7101-7105, 1981
- 29) Vivodic, D., Klein, J. and Nagy, Z. A. : The role of T cell subsets in the generation of secondary cytolytic responses *in vitro* against class I and class II major histocompatibility complex antigens. *J Immunol*, 132 : 1113-1117, 1984
- 30) Ramila, G. and Erb, P. : Accessory cell-dependent selection of specific T-cell functions. *Nature*, 304 : 442-445, 1983
- 31) Glimcher, L. H., Kim, K. J., Green, I. and Paul, W. E. : Ia antigen-bearing B cell tumor lines can present protein antigen and alloantigen in a major histocompatibility complex-restricted fashion to antigen-reactive T cells. *J Exp Med*, 155 : 445-459, 1982
- 32) Waters, S. J., Winchester, R. J., Nagase, F., Thorbecke, G. J. and Bona, C. A. : Antigen presentation by murine and human cells to a murine T-cell hybridoma : Demonstration of a restriction element associated with a major histocompatibility complex class II determinant (s) shared by both species. *Proc Natl Acad Sci*, 81 : 7559-7563, 1984

(61. 3. 25 受稿)