

# AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

移植 (1984.04) 19巻2号:84～89.

ヒト末梢リンパ球幼若化反応に関与するT細胞表面抗原の解析

古井秀典、比嘉敏夫、池田久実

# ヒト末梢リンパ球幼若化反応に關与する T細胞表面抗原の解析

古井秀典・比嘉敏夫\*・池田久實\*

## Analysis of T-cell Surface Antigen Associated with Proliferative Response of Human Lymphocytes

Hidenori Furui, Toshio Higa\* and Hisami Ikeda\*

*Department of Surgery, Asahikawa Medical College*

*\*Department of Pathology, Asahikawa Medical College*

### 【Summary】

A monoclonal antibody 2A6 obtained by immunizing mouse with human thymocytes inhibits proliferative response of human peripheral blood lymphocytes (PBL) induced by Con A, PHA and mixed lymphocyte reaction. The antibody also inhibits the proliferation of IL-2 dependent human T-cells.

Immunoprecipitation of soluble antigen preparation from a cultured T cell line P12/ichikawa with 2A6 yielded single peak of 31K daltons by SDS-PAGE. Tissue distribution assessed by inhibition of radioimmuno cellular binding shows that thymocytes, PBL-T cells and cultured T cell lines are positive, whereas PBL-B cells, cultured B cell lines and cultured myeloid cell lines are negative.

The results suggest that antigen (s) detected by 2A6 antibody may differ from any of known T-cell antigens associated with proliferative response of PBL.

**Key words:** monoclonal antibody,  
T-cell antigen,  
lymphocyte proliferation,  
IL-2 dependent T-cell

### I. はじめに

ヒト末梢リンパ球幼若化の過程には、免疫学的に特異的であるか否かにかかわりなく、IL-1, IL-2 などの

cytokine やリンパ球およびマクロファージの class II 抗原が關与しているという多くの報告がある<sup>1)</sup>。しかしながら、T細胞の細胞膜の反応系への關与の報告は少なく、その詳細については不明の点が残されている。

今回、ヒト末梢リンパ球幼若化反応に關与するT細胞の細胞膜抗原を解析する目的で、T細胞表面に発現されている抗原に対する単クローン抗体・2A6抗体を作製

旭川医大 第2外科

\* 同 第2病理

(58・12・2 受付)

した。この抗体をヒト末梢リンパ球幼若化反応をおこす反応系に加えて解析すると、用いたすべての反応系を抑制した。この 2A6 抗体による抑制効果とヒト class II 抗原に対する単クローン抗体による抑制効果とは種々の相違を示し、2A6 抗体により検出される抗原はヒト class II 抗原とは異なる過程でリンパ球幼若化反応に關与すると考えられた。

## II. 材料および方法

### 1. 単クローン抗体の作製

Köhler と Milstein の方法<sup>2)</sup> に準じ、ヒト胸腺細胞で免疫した BALB/c マウスの脾細胞と、マウスミエロマ細胞 P 3X63/Ag 8-653 との細胞融合により、単クローン抗体・2A6 抗体を得た。以下の実験にはこの抗体を含むマウス腹水を用い、必要に応じて希釈して用いた。また、この抗体の免疫グロブリンクラスは IgG 1 である。

ヒト class II 抗原に対する単クローン抗体は、東らの報告<sup>3)</sup> したヒト class II 抗原の non-polymorphic determinant を検出する 7B6 抗体を用いた。

### 2. Radioimmunoassay (RIA)

被検材料の 2A6 抗体の検出する抗原の検討は 2 種類の RIA によった。第 1 に、2A6 抗体と被検細胞との反応を <sup>125</sup>I 標識抗マウス IgG F(ab')<sub>2</sub> を用いた二重抗体法により検討した。第 2 は、2A6 抗体と培養 T リンパ芽球様細胞 P 12/ichikawa との反応が各種細胞により阻止されるか否かで検討した。判定方法は比嘉の報告<sup>4)</sup> に準じた。

### 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

培養 T リンパ芽球様細胞 P 12/ichikawa の膜成分を Renex 30 を用いて可溶化後、部分精製した抗原材料に <sup>125</sup>I を標識し、<sup>125</sup>I-Renex P-12 を得た。この標識可溶化抗原材料と 2A6 抗体との免疫反応沈降物を、Leamlie の方法<sup>5)</sup> による SDS-PAGE により 2A6 抗体により検出される抗原を解析した。

### 4. レクチンによるヒト末梢リンパ球幼若化反応

96 穴のマイクロプレートを用い、1 well あたり末梢リンパ球  $2 \times 10^5$  個/100  $\mu$ l に非動化ヒト AB 血清 30  $\mu$ l、レクチン溶液 20  $\mu$ l および 10 倍希釈抗体または培養液 30  $\mu$ l を加えて 3 日間培養後、<sup>3</sup>H-thymidine 0.5  $\mu$  Ci を加え、細胞内 DNA への <sup>3</sup>H-thymidine の取り込みを

測定した。

### 5. Mixed-Lymphocyte-Reaction (MLR)

健康成人の末梢血から Ficoll-Conray を用いた比重遠沈法によりリンパ球を分離し、さらにヒツジ赤血球を用いた rosette 法により T 細胞分画と B 細胞分画を得た。Responder として末梢血リンパ球 T 細胞分画  $1 \times 10^5$  個/100  $\mu$ l に、stimulator 細胞浮遊液 50  $\mu$ l を混じ、非動化ヒト AB 血清 30  $\mu$ l、10 倍希釈抗体または培養液を加え、5~6 日間培養後、<sup>3</sup>H-thymidine 0.5  $\mu$  Ci を添加し、細胞内 DNA への <sup>3</sup>H-thymidine の取り込みを測定した。Allogeneic MLR では stimulator として mitomycin C (MMC) 処理培養 B リンパ芽球様細胞  $5 \times 10^5$  個/well を、また autologous MLR では MMC 処理自己末梢リンパ球 B 細胞分画  $1 \times 10^5$  個/well を使用した。反応は 96 穴マイクロプレートを用いて triplicate で行なった。

### 6. IL-2 依存細胞の増殖反応

Allogeneic MLR にて増殖した細胞を限界希釈法によりクローニングし、MLR の stimulator および PHA に反応せず、IL-2 にのみ反応する細胞を用いた。IL-2 依存細胞  $1 \times 10^4$  個、非動化ヒト AB 血清 40  $\mu$ l、IL-2 40  $\mu$ l、10 倍希釈抗体または培養液 30  $\mu$ l で総量 200  $\mu$ l とし、24 時間培養後、<sup>3</sup>H-thymidine 0.5  $\mu$  Ci を加え、細胞内 DNA への <sup>3</sup>H-thymidine の取り込みを測定した。反応は 96 穴マイクロプレートを用いて行なった。また、リンパ球を PHA により刺激し、培養 48 時間後の培養上清を 4 倍に濃縮したものを IL-2 として使用した。

## III. 結果

### 1. 各種細胞における 2A6 抗体により検出される抗原の発現

各種細胞表面上の 2A6 抗体により検出される抗原を RIA で検討した。正常細胞では、末梢リンパ球 (PBL) のうち、T 細胞分画に発現されているが、B 細胞分画には発現されていなかった。また、胸腺細胞、脾細胞および扁桃細胞に発現されていた (表 1, Exp. 1)。また Con A または PHA と共に 4 日間培養した PBL は、レクチンなしで培養した PBL に比べ高い 2A6 抗体の結合能を示した (表 1, Exp. 2)。このことは、幼若化したリンパ球が未処置リンパ球より、より多くの抗原を発現している可能性を示唆している。次に 2A6 抗体により検出される抗原の発現を各種培養細胞で検討した (表



表 1 2A6 抗体で検出される抗原の正常細胞における発現

Exp. 1	Thymus		+	
	PBL	T rich fraction	+	
		B rich fraction	-	
	Spleen		+	
	Tonsil		+	
Exp. 2	cell number	2 A 6	PBS	
	PBL	$5 \times 10^5$	5,689	1,395
	Con-A PBL	$5 \times 10^5$	11,625	1,227
	PHA PBL	$5 \times 10^5$	12,299	1,403
			(cpm)	
	$^{125}\text{I-F(ab')}_2$ of goat anti mouse IgG			
		: 221,263 cpm		

- 1) Exp. 1 は阻止試験による  
2) Exp. 2 は二重抗体法による

表 2 2A6 抗体で検出される抗原の培養細胞における発現

T cell lines		
P 12/ichikawa	+	T-ALL
HSB-2	+	"
MOLT-4	+	"
RPMI 8402	+	"
CCRF-CEM	+	"
JURKATSKI	+	"
Peer	+	"
TALL-1	+	T-LML
B cell lines		
EBV-Wa	-	Normal B cell
LG 2	-	"
LG 10	-	"
EBV-Ho	-	"
DKy	-	"
BT-1	-	Burkitt's Lymphoma
Raji	-	"
Daudi	-	"
Others		
K 562	-	Erythroleukemia
HL-60	-	APL

判定は阻止試験による

2). 検討したすべての T リンパ芽球様細胞には発現されているが, B リンパ芽球様細胞およびミエロイド系細胞には発現されていない。以上より, 2A6 抗体は T 細胞表面抗原を検出することが示された。

## 2. SDS-PAGE による 2A6 抗体により検出される抗原の解析

2A6 抗体と  $^{125}\text{I}$ -Renex P-12 との免疫反応沈降物を SDS-PAGE で解析した (図 1)。2A6 抗体により検出される抗原は, 分子サイズ約 31K daltons に相当する分画に単一の放射活性のピークとして検出された。

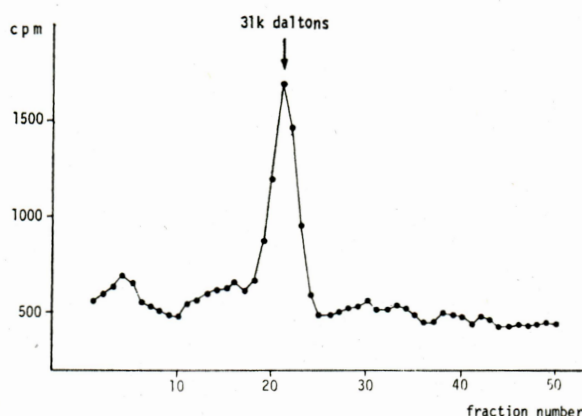


図 1 2A6 抗体が検出する抗原分子の SDS-PAGE 2A6 抗体と  $^{125}\text{I}$ -Renex P-12 との免疫反応沈降物を 2ME 存在下で行なった。

## 3. レクチンによるリンパ球幼若化反応におよぼす 2A6 抗体の抑制効果

種々の濃度の Con A および PHA によるヒト末梢リンパ球幼若化反応に対する 2A6 抗体の影響を検討した。Con A による幼若化反応は, Con A の濃度が  $49 \mu\text{g/ml}$  以下において明らかな抑制効果が認められた (図 2)。また, PHA による幼若化反応では, PHA の濃度が 200 倍以下の時著明な抑制効果が認められた (図 3)。しかし, 同時に行なったヒト class II 抗原に対する単クローン抗体・7B6 抗体においては, 東らの報告<sup>3)</sup>と同様に, Con A では行なったすべての濃度において 2A6 抗体を上回る抑制効果を示したが, PHA ではどの濃度においても抑制効果が認められず, 2A6 抗体と 7B6 抗体の抑制機序の違いが示唆された (図 2, 3)。

## 4. リンパ球幼若化反応に対する 2A6 抗体の抑制効果が発現される時期の解析

2A6 抗体による抑制がどのような時点で発現されるかを検討した。ヒト末梢リンパ球に Con A を添加した後, 種々の時期に 2A6 抗体を加え, その抑制効果を検討した (図 4)。Con A 添加後 36 時間までに 2A6 抗体を加えると抑制効果が認められるが, 48 時間後では抑制効果が認められなかった。すなわち Con A による幼若



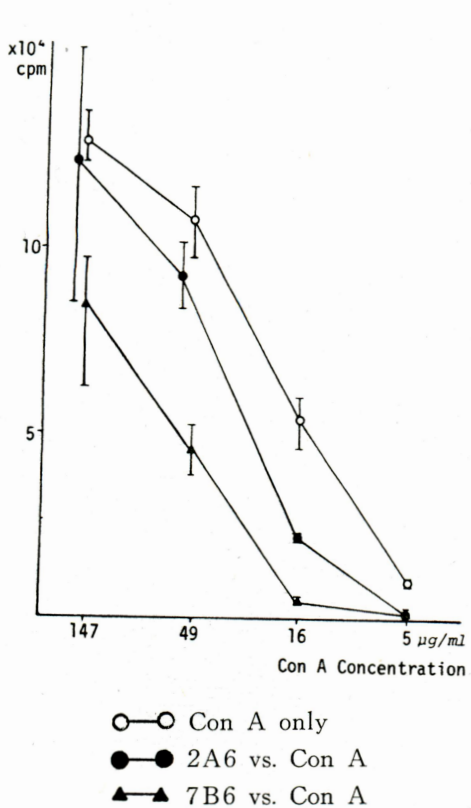


図2 Con Aによるヒト末梢リンパ球幼若化反応に対する2A6抗体の抑制効果

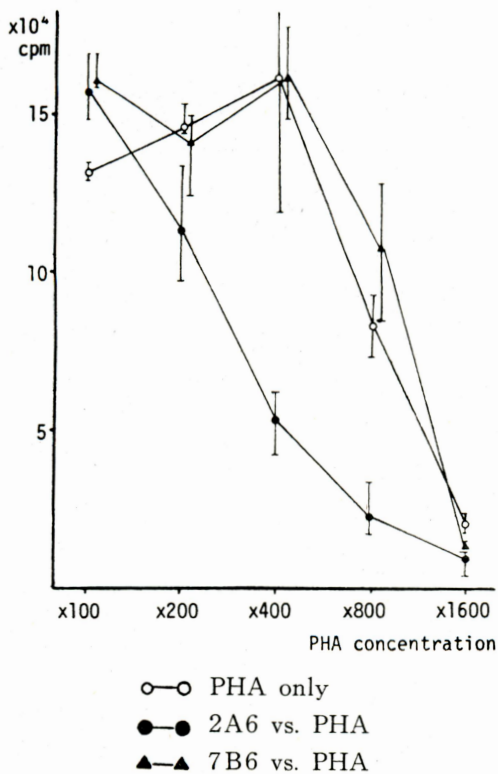


図3 PHAによるヒト末梢リンパ球幼若化反応に対する2A6抗体の抑制効果

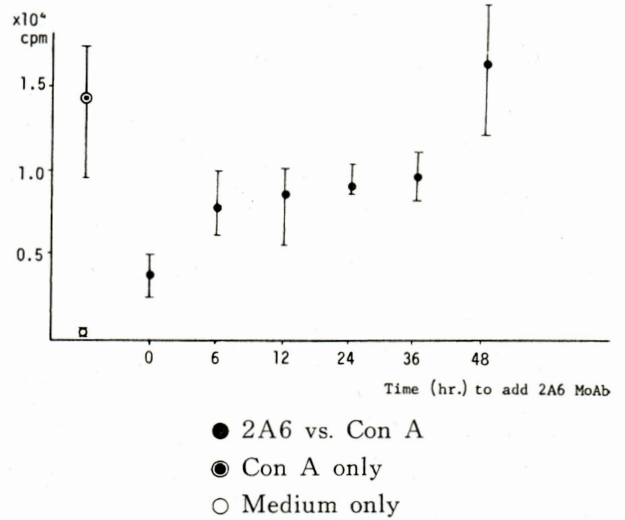


図4 Con Aによるヒト末梢リンパ球幼若化反応に対して2A6抗体による抑制効果の発現される時期の解析

化反応において2A6抗体は、反応系の比較的初期の段階に影響すると考えられる。7B6抗体においても同様の実験を行なった。図には示されていないが、東らの報告<sup>3)</sup>とはほぼ同様に7B6抗体添加が12時間以内でのみ抑制効果が認められた。このことは前述の結果と考え合わせると、2A6抗体と7B6抗体の抑制段階が異なっていることを示唆している。

### 5. MLR に対する 2A6 抗体の抑制効果

2A6抗体のMLRへの影響を検討した(表3)。培養Bリンパ芽球様細胞EBV-WaまたはEBV-Shをstimulatorとしたallogeneic MLRでは、2A6抗体の添加により60%から88.4%の抑制効果を示した。また、autologous MLRでも同様に、2A6抗体の添加により93%から97.1%と著明な抑制効果が認められた。

### 6. IL-2 依存細胞の増殖に対する 2A6 抗体の抑制効果

IL-2依存細胞である6種のクローンの増殖に対する2A6抗体の影響を検討した(表4)。これらのクローンはallogeneic MLRで増殖した細胞をクローニングしたもので、MLRのstimulatorおよびPHAに対して反応しない。2A6抗体存在下でこれらIL-2依存細胞クローンにPHAでリンパ球を刺激して得た培養上清をIL-2として加えると、2A6抗体の添加によりIL-2依存細胞の<sup>3</sup>H-thymidineの取り込みは57.9%から87.5%抑制された。

表 3 MLR における 2A6 抗体の抑制効果

Stimulator	2A6	mean cpm ± S. D.		
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
EBV-Wa	+	1,272.5 ± 31.5 (81.1%)	5,683.3 ± 1,259.1 (83.1%)	11,064.7 ± 457.1 (70.0%)
	-	6,739.5 ± 1,205.5	35,110.3 ± 1,969.6	37,034.0 ± 1,393.1
EBV-Sh	+	396.7 ± 168.2 (88.4%)	8,602.3 ± 2,926.3 (60.0%)	2,050.0 ± 1,706.0 (82.5%)
	-	4,366.0 ± 94.6	21,292.7 ± 1,362.6	12,109.3 ± 1,094.2
Autologous PBL	+	737.7 ± 425.5 (97.1%)	499.0 ± 378.5 (93.0%)	273.3 ± 291.2 (96.1%)
	-	35,281.0 ± 457.7	7,125.3 ± 713.0	6,676.7 ± 543.2

(% Inhibition)

表 4 IL-2 依存細胞の増殖に対する 2A6 抗体の抑制効果

Clone	2A6	—
S-2	362.0 ± 41.1 (81.8%)	1,989.7 ± 293.8
S-5	291.0 ± 57.8 (68.1%)	913.3 ± 82.4
S-7	153.7 ± 35.3 (87.5%)	1,227.3 ± 204.9
S-16	1,996.0 ± 83.7 (64.5%)	5,620.0 ± 363.8
S-20	4,708.3 ± 662.1 (57.9%)	8,138.0 ± 815.3
M-4	3,507.9 ± 367.5 (73.6%)	13,285.0 ± 357.8

mean cpm ± S. D. (% Inhibition)

## IV. 考 案

今回作製した 2A6 抗体により検出される抗原は T 細胞表面に存在するが、B 細胞およびミエロイド系細胞の表面上には発現されていない。この 2A6 抗体の検出する抗原の分子サイズは約 31 K daltons であり、細胞表面上で single component として存在していると考えられる。しかし、二次元電気泳動による解析により数個の荷電を異にするスポットとして検出される (三代川齊之・古井秀典; 未発表)。この二次元電気泳動によって示される多様性に関しては今後の解析が必要である。

2A6 抗体はレクチンや MLR によるヒト末梢リンパ球幼若化反応を抑制する。また、IL-2 依存細胞の増殖をも抑制する。2A6 抗体によるリンパ球幼若化反応の抑制が細胞障害性に作用するためではないことは、以下の事柄により説明される。① 2A6 抗体は IgG1 に属しており、補体結合性の細胞障害は生じない。② 培養開始後 48 時間を経過すると、Con A を用いた反応系で抑制効果がみられず、抗体自身による細胞障害も生じない。

Con A や PHA によるリンパ球幼若化反応に対する 2A6 抗体の抑制効果は、ヒト class II 抗原に対する単

クローン抗体・7B6 抗体による抑制効果とは以下の点で異なっている。① 7B6 抗体は PHA によるリンパ球幼若化を抑制しない。② Con A を用いた反応系では、反応開始後 12 時間以内の 7B6 抗体添加で抑制効果があり、2A6 抗体では 36 時間以内の添加で抑制効果がある。さらに、③ 7B6 抗体は IL-2 依存細胞の増殖に対し抑制効果を示さない (平田 哲; 私信)。IL-2 依存細胞に対して class II 抗原に対する抗体が抑制効果を示すという Moretta らの報告<sup>6)</sup> もあるので、③ に関してはさらに検討を要する。しかし、以上の諸点は 2A6 抗体により検出される抗原が、ヒト class II 抗原とは異なった過程でレクチンに誘導されるリンパ球幼若化反応に関与していることを示している。Class II 抗原に対する単クローン抗体・7B6 抗体が MLR を抑制することは、すでに報告されている<sup>7)</sup>。7B6 抗体による MLR の抑制は stimulator の class II 抗原を介して行なわれ、2A6 抗体による MLR の抑制は対応する抗原が T 細胞にのみ存在することから、responder を介して行なわれると考えられる。しかし、もし IL-2 依存細胞に関する Moretta らの結果が正しいならば、抗 Ia 抗体による MLR の抑制は stimulator のみならず responder をも介して行なわれている可能性がある。

2A6 抗体が IL-2 依存細胞の増殖を抑制することから、この抗体と IL-2 レセプターとの関係を検討しなければならない。この点についてはさらに解析を進めている。IL-2 レセプターに対する抗体と考えられている抗 Tac 抗体は、分子サイズが 47~50 K daltons の抗原分子を検出するとされている<sup>8)</sup>。もしこの抗原分子が IL-2 レセプターとするならば、2A6 抗体の検出する抗原分子 (約 31 K daltons) は、明らかにこの IL-2 レセプター分子とは異なる。IL-2 レセプターが複数個存在するかどうかは明らかではないが、もし 2A6 抗体が IL-2 レセプターと関係があるとすると、2A6 抗体による細胞



表面での抗原抗体反応が直接的または間接的に IL-2 感受性細胞の IL-2 に対する反応性を低下させ、幼若化を抑制する可能性が考えられる。また、Moretta らの報告<sup>6)</sup>にある抗 Ia 抗体による IL-2 依存細胞増殖の抑制効果は、IL-2 レセプターを直接的に介さない増殖抑制機構の可能性を示している。

抗 Tac 抗体のほかに、リンパ球幼若化反応を抑制する T 細胞抗原特異的な単クローン抗体としては、OKT-3 および 4F2 抗体がある。OKT-3 の検出する抗原は、約 20K daltons の糖蛋白が major component とされ<sup>9)</sup>、また、4F2 抗体により検出される抗原は、約 80K daltons および 40K daltons の 2 つの component から構成されており<sup>10)</sup>、両者とも 2A6 抗体の検出する抗原分子 (約 31K daltons) とは、分子サイズの点で異なっている。

## V. ま と め

ヒト T 細胞表面抗原に対する単クローン抗体・2A6 抗体は Con A や PHA による末梢リンパ球幼若化反応や MLR を抑制する。さらにこの抗体は IL-2 依存細胞の増殖をも抑制する。2A6 抗体の検出する T 細胞表面抗原は分子サイズ約 31K daltons であり、胸腺細胞、末梢 T 細胞および培養 T リンパ芽球様細胞に発現されており、リンパ球幼若化反応に関与する既知の T 細胞表面抗原とは、分子サイズおよび特異性などの点で異なっているとみなされる。

稿を終えるにあたり、本研究に御指導・御支援いただいた旭川医大第 2 病理片桐一教授、旭川医大第 2 外科水戸勉郎教授、御協力いただいた旭川医大第 2 病理平田哲、熊井恵美、長谷川浩各先生、および胸腺を供与いただいた市立旭川病院胸部外科に感謝申し上げます。

## 文 献

- Palacios, R.: Mechanism of T cell activation; role and functional relationship of HLA-DR antigens and Interleukins. *Immunol. Rev.*, 63: 73, 1982.
- Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256: 495, 1975.
- 東 寛・片桐 一・池田久實: Con A によるヒト末梢リンパ球増殖反応に及ぼす抗ヒト Ia 様抗原単クローン抗体の影響に関する研究. *移植*, 18: 351, 1983.
- 比嘉敏夫: ヒト TL 様抗原の解析. *移植*, 16: 232, 1981.
- Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680, 1970.
- Moretta, A., Accolla, R. S. and Cerottini J. C.: IL-2 mediated T cell proliferation in humans is blocked by a monoclonal antibody directed against monomorphic determinants of HLA-DR antigens. *J. Exp. Med.*, 155: 599, 1982.
- 平田 哲・片桐 一・池田久實: MLC 反応に関与するヒト class II 抗原の役割に関する研究. *移植*, 印刷中.
- Leonard, W. J., Depper, J. M., Uchiyama, T., Smith, K. A., Waldmann, T. A. and Greene, W. C.: A monoclonal antibody that appears to recognize the receptor for human T-cell growth factor; partial characterization of the receptor. *Nature*, 300: 267, 1982.
- Borst, J., Prendiville, M. A. and Terhorst, C.: Complexity of the human T lymphocyte-specific cell surface antigen T3. *J. Immunol.*, 128: 1560, 1982.
- Haynes, B. F., Hemler, M. E., Mann, D. L., Eisenbarth, G. S., Shelhamer, J., Mostowski, H. S., Thomas, C. A., Strominger, J. L. and Fauci, A. S.: Characterization of a monoclonal antibody (4F2) that binds to human monocytes and to a subset of activated lymphocytes. *J. Immunol.*, 126: 1409, 1981.