

# HLA-DQによる起腎炎性溶連菌抗原に対する免疫応答性の制御機構の解析

小児腎の進行阻止に関する研究  
進行阻止に関する免疫・遺伝・病態生化学的研究

笹月 健彦

溶連菌感染は、糸球体腎炎の発症に重要な役割を果たしている。我々は、溶連菌壁抗原に対する免疫応答性を解析し、すでに、HLA-DQが低応答性を規定している可能性を示した。本年度は、DQ拘束性CD4<sup>+</sup>T細胞により誘導されたCD8<sup>+</sup>T細胞が、抗原非特異的にCD4<sup>+</sup>T細胞の増殖を抑制し、また、自己の単核球に対しクラスI拘束性の細胞傷害活性を示すことを明らかにした。これが、DQによる免疫抑制の機序の一つと考えられる。

溶連菌壁抗原、M蛋白、HLA-DQ、免疫抑制

## 【はじめに】

我々は、溶連菌感染後糸球体腎炎とHLA-Aw33-B12-Dw19-DQw6との相関を明かにし、本症の発症にHLAが重要な役割を果たしていることを示した。HLA領域は、多型性に富む領域で、免疫応答において重要な役割を担っており、本症をはじめとする種々の疾患と特定のHLA対立遺伝子との相関が知られている。HLAによる免疫応答性の制御機構を解明するために、我々は、起腎炎性溶連菌細胞壁抗原(SCW)に対する免疫応答性を解析し、これまでに、健康人集団において、低応答群と高応答群が存在すること、低応答性が優性形質として発現していること、さらに、HLA、特にDQが同抗原に対する低応答性を規定している可能性を示した。この系における免疫応答の制御機構を明らかにするため、昨年度はSCWに対する低応答者よりDQw6に拘束されたT細胞株を樹立し、この細胞の存在下にCD8<sup>+</sup>T細胞の著明な増殖を観察した。今回は、DQ拘束性T細胞の認識するエピトープの解析および、SCWに対する低応答者より得られた免疫抑制活性を有するCD8<sup>+</sup>T細胞株の特徴を解析した。

## 【方法】

免疫抑制活性の検討；SCW特異的CD4<sup>+</sup>T細胞株またはPPD特異的CD4<sup>+</sup>T細胞株 $2 \times 10^5$ 個にガンマ線照射した自己の末梢血リンパ球 $1 \times 10^6$ 個を抗原提示細胞として加え、各濃度のCD8<sup>+</sup>T細胞株を加え、1L-2100U/mlを添加した完全培養液(20%ヒト血清加RPM11640培養液、1-グルタミン、ストレプトマイシン、ペニシリン)で37℃、5%CO<sub>2</sub>の加湿条件下で培養し、7日目の生細胞数を算定するとともに、抗CD4モノクローナル抗体、抗CD8モノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリーによりCD4<sup>+</sup>T細胞およびCD8<sup>+</sup>T細胞の割合を決定した。

CD8<sup>+</sup>T細胞株の表面マーカーの検討；CD8<sup>+</sup>T細胞 $1 \times 10^5$ 個を各種モノクローナル抗体を用いた直接またはマウス抗ヒト免疫グロブリン抗体による間接蛍光抗体法により染色し、フローサイトメトリーにより解析した。

細胞傷害活性の測定；細胞傷害活性はクロミウム(Cr)遊離法により測定した。標的(ターゲット)細胞として、K562細胞とSCW特異性DQw6拘束性CD4<sup>+</sup>T細胞株および単核球を用いた。K562細胞およびCD4<sup>+</sup>T細胞株は標的細胞として $1 \times 10^6$

九州大学生体防御医学研究所・遺伝学部門

Takehiko Sasazuki

Department of Genetics, Medical Institute of Bioregulation,

Kyushu University., Fukuoka 812.

個を $200\mu\text{Ci}$ の $^{51}\text{Cr}$ でラベルし洗浄後、96穴プレートに1穴あたり $5 \times 10^4$ 個の割合でまいた。単核球は末梢血リンパ球を96穴プレート1穴あたり $1 \times 10^4$ 個の割合でまき、6日間培養し洗浄後プレートに付着した細胞を標的細胞として用いた。1穴あたりまいたリンパ球数の $1/10$ を単核球数とした。 $\text{CD}8^+\text{T}$ 細胞をエフェクター細胞として、E:T比 $10:1$ の割合でプレートにまき容積を $150\mu\text{l}$ として、 $37^\circ\text{C}$ で6時間培養後、プレートを遠心し、上清の放射活性をガンマカウンターで測定した。 $\text{Cr}$ の最大遊離cpmは $10\%$ トリトンを、自然遊離cpmは培養液のみを加えることにより測定した。エフェクター細胞による特異的細胞傷害活性は次式により算出した。

$$\text{細胞傷害活性} = (\text{実験群cpm} - \text{自然遊離cpm}) / (\text{最大遊離cpm} - \text{自然遊離cpm}) \times 100$$

モノクローナル抗体は最終濃度が腹水の $200$ 倍となるように調整し、エフェクター細胞を加える $30$ 分前にプレートに加えた。使用したモノクローナル抗体はW6/32(抗クラスI抗体)、3G7II(抗クラスII抗体)、1P4(抗 $\text{CD}8$ 抗体)、TS1/22(抗LFA1抗体)である。

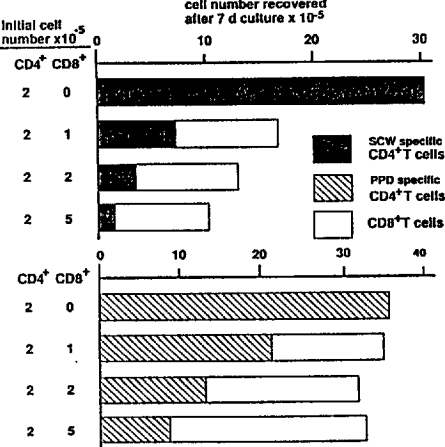
$\text{CD}8^+\text{T}$ 細胞の増殖能の検討; $\text{CD}8^+\text{T}$ 細胞の増殖する条件を検討するため、 $\text{CD}8^+\text{T}$ 細胞 $2 \times 10^4$ 個を96穴プレートにまき、ガンマ線照射した自己の単核球 $5 \times 10^3$ 個の添加の有無、IL-2の有無、SCW抗原の有無のそれぞれの条件下で72時間培養し、その増殖を検討した。増殖反応は、 $^3\text{-H}$ チミジンのTリンパ球内への取り込みを測定することで定量した。また、自己の単核球を $10$ から $10^3\text{U/ml}$ までの各濃度のIFN- $\gamma$ で前処理することによる増殖能の変化をしらべた。自己単核球 $5 \times 10^5$ 個を各濃度のIFN- $\gamma$ で前処理し、洗浄後、ガンマ線照射し、 $\text{CD}8^+\text{T}$ 細胞 $1 \times 10^6$ 個とともにIL-2を添加した

完全培養液で培養し、7日目の $\text{CD}8^+\text{T}$ 細胞の生細胞数を定量した。

### 【結果】

SCWのT細胞エピトープ; SCWは、溶連菌(M12)より熱酸抽出した抗原で、これをSDS-PAGEにより解析すると、分子量56000、41000、37000にメジャーバンドがある。これらの分画をゲルから溶出し、アミノ酸シーケンサーによりN末端より30個の配列を同定したところ(ミリジェン/バイオサーチ社に依頼)、いずれもこれまでに報告されているMタンパク(12型)のN末端の配列と一致し、また、3つの分画とも、DQw6あるいは、DR4に拘束されたSCW特異的T細胞株に対して刺激活性があった。溶連菌のM蛋白のC末端側約200残基はすべての型に共通であり、それよりN末端側に各型に特異的配列があることが知られている。リコンビナントM6蛋白(Rockefeller大学 V.A. Fischetti博士より供与)に対する反応性を検討したところ、DQw6に拘束されたSCW特異的T細胞株は強い増殖反応を示したがDR4に拘束されたSCW特異的T細胞

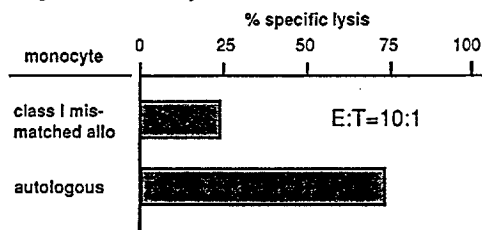
図1 Suppressive effect of  $\text{CD}8^+\text{T}$  cell line on the proliferation of a SCW specific and PPD specific  $\text{CD}4^+\text{T}$  cell line



SCWに対する低応答者より得られた $\text{CD}8^+\text{T}$ 細胞株がSCWおよびPPD特異的 $\text{CD}4^+\text{T}$ 細胞の抗原特異的増殖に与える増殖抑制効果を検討した。 $2 \times 10^5$ 個の $\text{CD}4^+\text{T}$ 細胞にそれぞれ示された数の $\text{CD}8^+\text{T}$ 細胞を加え、ガンマ線照射した末梢リンパ球 $2.5 \times 10^6$ 個とともにSCW  $1\mu\text{g/ml}$ 、IL-2  $100\text{U/ml}$ を含む培養液で培養し、7日目に生細胞数を算定し、 $\text{CD}4^+\text{T}$ 細胞あるいは $\text{CD}8^+\text{T}$ 細胞の割合を蛍光抗体染色により同定した。 $\text{CD}4^+\text{T}$ 細胞の増殖は $\text{CD}8^+\text{T}$ 細胞の共存により抑制された。

(図2)

Cytotoxic activity of  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup>T cell directed against monocytes



自己の単核球とMHCクラスI抗原を共有しない単核球とではCD8<sup>+</sup>T細胞の細胞傷害活性に有意の差が認められた。

胞株は増殖反応を示さなかった。

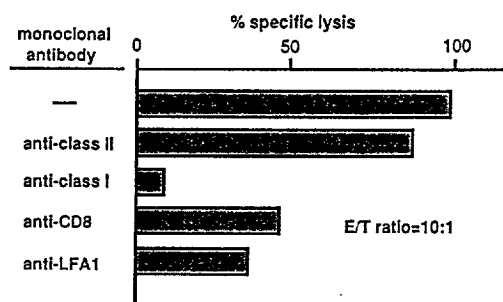
免疫抑制活性(図1)；抗原特異的CD4<sup>+</sup>T細胞株の増殖は、加えたCD8<sup>+</sup>T細胞株の数に比例して、抑制された。この増殖抑制は、SCW特異的DQ拘束性T細胞とDR拘束性T細胞に対して等しく観察され、PPD特異的CD4<sup>+</sup>T細胞の増殖に対しても認められた。CD8<sup>+</sup>T細胞の表面マーカー；CD8<sup>+</sup>T細胞株はすべて $\alpha\beta$ 型T細胞レセプター、CD3複合体を発現しており、ほとんどすべてのものがV $\beta$ 5.3を、8割の細胞がV $\alpha$ 2を使用していた。ナチュラルキラー(NK)細胞マーカーとされるCD11b、CD16は陰性であった。T細胞活性化のマーカーであるIL-2レセプターおよびクラスII分子はすべて陽性であった。

細胞傷害活性の検討；CD8<sup>+</sup>T細胞は、SCW特異的CD4<sup>+</sup>T細胞株およびNK細胞の標的細胞であるK562に対して細胞傷害活性を示さなかった。しかし、抗CD3モノクローナル抗体を加えることにより、CD8<sup>+</sup>T細胞に活性化のシグナルを与える条件下では、K562細胞を傷害した。しかし、同様な条件下ではCD4<sup>+</sup>T細胞株には傷害活性を示さなかった。CD8<sup>+</sup>T細胞は自己の単核球に対し、細胞傷害活性を示したが、MHCクラスI抗原を共有しないアロの単核球に対しては同活性を示さなかった(図2)。この細胞傷害活性は抗MHCクラスIモノクローナ

ル抗体により完全に抑制され、抗CD8および抗LFA1モノクローナル抗体により中等度に抑制された(図3)

(図3)

Blocking effect of monoclonal antibody on cytotoxic activity of autoreactive  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup>T cell



CD8<sup>+</sup>T細胞の細胞傷害活性は抗クラスIモノクローナル抗体により完全に、また抗CD8および抗LFA1モノクローナル抗体により中等度に抑制された。

CD8<sup>+</sup>T細胞の増殖；CD8<sup>+</sup>T細胞はその増殖にIL-2を必要とするが、SCWは必要としなかった。IL-2が存在する条件下では72時間後の増殖反応は、自己の単核球を加えた実験群と加えなかった実験群との間で有意差は認められなかった。しかし、7日間の培養では単核球の存在により、CD8<sup>+</sup>T細胞の増殖の促進が認められた。また、IFN- $\gamma$ の前処理により、その増殖は著しく促進された。

【考察】

SCWをはじめ、種々の抗原に対する免疫応答において、HLA-DRが主な拘束分子であることが知られている。これに対し、SCWに対する低応答者において、CD8<sup>+</sup>T細胞を除くか、抗DQ抗体を添加することにより応答性が回復し、この回復した応答性が抗DR抗体により阻止されることから、我々は、HLA-DQが免疫低応答性を規定している可能性を示した<sup>1)2)3)</sup>。昨年、SCWに対する低応答性とHLA-DQw6(DQA1\*0102、DQA1\*0103 および、DQB1\*0601)が相関し、DQw6に拘束されたSCW特異的T細胞が、CD8<sup>+</sup>T細

胞を強く活性化することを報告した<sup>4)</sup>。この仮説を検証していくために、S C W特異的D Q拘束性CD4<sup>+</sup>T細胞により誘導され、増殖したCD8<sup>+</sup>T細胞の特徴を解析した。この細胞は、抗原非特異的免疫抑制活性を有し、K562に対し細胞傷害活性を示さないことからNK細胞とは異なった細胞であることが示された。このCD8<sup>+</sup>T細胞が自己の単核球に対しクラスI拘束性の細胞傷害活性を示したことから、CD8<sup>+</sup>T細胞による免疫抑制の機序の一つとして自己の抗原提示細胞を傷害することにより免疫応答を抑制する可能性が考えられた。今後この細胞がS C Wに対する低応答性にどのように関与しているか、また、DQの拘束されたT細胞により強く活性化された機序を検討していく予定である。

一方、DQw6およびDR4に拘束されたS C W特異的T細胞株の認識する抗原の解析を行った。S C Wの主要成分がM蛋白であることが確認され、リコンビナントM6蛋白に対する応答性の違いから、DQw6およびDR4に拘束されたS C W特異的T細胞株は、それぞれM12蛋白の異なる部分を認識していると考えられた。今後、M蛋白の各部分のペプチドを合成し、それぞれのエピトープを同定することにより、DQ分子による免疫応答とDR分子による免疫応答をin vitroのみならず、in vivoにおいても区別し、両者の差異を明確にできるものと期待される。

#### 文献

- 1) Sasazuki, T., Kaneoka, H., Nishimura, Y., Kaneoka, T., Hayama, M., and Ohkuni, H.: An HLA-linked immune suppression gene in man. *J. Exp. Med.*, 152:297-313, 1980
- 2) Sasazuki, T., Nishimura, Y., Muto, M., and Ohta, N.: HLA-linked genes controlling the immune response and disease susceptibility. *Immunological Reviews* 70:51

-75, 1983

3) Nishimura, Y., and Sasazuki, T.: Suppressor T cells control the HLA-linked low responsiveness to streptococcal antigen in man. *Nature* 302:67-69, 1983

4) Kamikawaji, N., Fujisawa, K., Yoshizumi, H., Fukunaga, M., Yasunami, M., Kimura, A., Nishimura, Y., and Sasazuki, T.: HLA-DQ restricted CD4<sup>+</sup>T cells specific to streptococcal antigen present in low but not in high responders. *J. I.*, in press 1991.



## 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



溶連菌感染は、糸球体腎炎の発症に重要な役割を果たしている。我々は、溶連菌壁抗原に対する免疫応答性を解析し、すでに、HLA-DQ が低応答性を規定している可能性を示した。本年度は、DQ 拘束性 CD4+T 細胞により誘導された CD8+T 細胞が、抗原非特異的に CD4+T 細胞の増殖を抑制し、また、自己の単核球に対しクラス II 拘束性の細胞傷害活性を示すことを明らかにした。これが、DQ による免疫抑制の機序の一つと考えられる。