● 原著

CD3⁻ LAK 細胞のクローニングとその LAK 活性について

滝口 智夫・福徳 雅章・荒井 俊秀・吉岡 律子

Jpn. J. Clin. Immun., 16 (1) : 11~19, 1993.

Cloning of CD3 negative LAK cells and their NMRC activity

Tomoo Takiguchi, Masaaki Fukutoku, Toshihide Arai and Ritsuko Yoshioka

*Division of Haematology and Immunology, Department of Internal Medicine,
Kanazawa Medical University*

【Summary】

The proliferation of CD3⁻ LAK cells could be induced from normal peripheral blood mononuclear cells (PBMC) after *in vitro* treatment with CD2 monoclonal antibody (MoAb) plus rabbit complement and culture with IL-1 plus IL-2. This presentation exhibited the results of the cloning of the LAK cells.

PBMC from healthy donors were incubated with CD2 MoAb plus rabbit complement for 1 hr, then washed with HBSS and cultured with rIL-1 β (0.5 μ g/dl) plus rIL-2 (2 μ g/dl) in RPMI-1640 culture medium. Two to ten days later, the LAK cells were cloned under limiting conditions in 96-well microtiter plates. Ten to 14 days later the cloned cells were pipetted into a culture flask and continued to culture with the addition of rIL-1 plus rIL-2. After the cloned cells increased to sufficient numbers of cells, their surface markers were analyzed using various MoAb by FCM and histostaining techniques, and the non-major histocompatibility-restricted cytotoxicity (NMRC) was tested against target K562 cells.

The results showed 112 clones were WT31⁺ γ/δ -1⁻, 62 clones were WT31⁻ γ/δ -1⁺ and 101 clones were WT31⁻ γ/δ -1⁻. Most of the WT31⁻ γ/δ -1⁻ clones showed CD2⁺, CD7⁺ and CD56⁺, but no CD3, β F 1 and TCR δ -1 on their cell surfaces. Some of the WT31⁻ γ/δ -1⁻ clones showed CD2⁻ and CD56⁻. The NMRC showed 13 clones out of 27 WT31⁻ γ/δ -1⁻ clones tested had a strong cytotoxicity to K562 target cells but none of the WT31⁺ nor γ/δ ⁺ clones had.

The surface markers of 10 out of 13 NMRC positive clones showed both CD2 and CD56 were positive.

From these results, CD2 and CD56 antigens may have some important effect on CD3⁻ LAK cells regarding to the NMRC activity.

Key words : CD3⁻ NK cells,
cloning,
LAK activity,
CD2 and CD56

【概 要】

ヒト PBMC の表面形質をみると、大多数は CD3⁺TCR α/β ⁺ で、その他約 20% 前後の B 細胞を除くといわれる minor population として CD3⁺ γ/δ ⁺ 細胞や CD3-LGL が認められる。CD3⁻ 細胞には Pro T 細胞といわれる CD7⁺TdT⁺ 細胞や、Pre T 細胞といわれる CD2⁺CD7⁺CD38⁺ 細胞、または表面 CD3⁻ だが細胞内 CD3⁺ の細胞も一部含まれている。しかし、多くは CD3-LGL といわれるもので NK 活性をもっており、臨床上これらの増多症に遭遇して苦慮する場合がある。これら CD3⁻CD2⁺NK 細胞の性質を研究するため正常ヒト末梢血中から抗 CD2 と補体処理後、rIL-1 と rIL-2 とともに培養することによって表面形質ではこれに一致した細胞を増殖させ、さらに cloning をしてその NMRC 活性を調べることができた。その結果、CD3⁻ LAK 細胞は CD2 と CD56 が NMRC 活性に深い関係にあることが推察された。

I. 緒 言

ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) 中には CD3⁻ で CD2⁺CD7⁺CD56⁺ のいわゆる NK 細胞が数%存在しており、形態は大型で細胞質が広く典型的な Azur 顆粒をもったいわゆる LGL の形態を呈している。そしてある種の疾患に際し、また時には原因不明にこれらの細胞の増多をきたすことが知られている^{1,2)}。著者はこれら CD3⁻CD2⁺CD56⁺ NK 細胞増多症の臨床例につき考察を加えてきたが³⁾、これと同一表面形質の細胞を作成することを考え、正常ヒト PBMC を CD2 モノクローナル抗体 (MoAb) と補体にて処理後、IL-2 とともに培養することによってこれら表面形質をもった形態上 LGL を呈する細胞の clonal な増殖が起こることを発表してきた。ここでは、これら CD2 MoAb 処理 PBMC を rIL-1 と rIL-2 加培養下で cloning を行い、clone 細胞の表面形質と機能につき検討してみた。

II. 材料および方法

1. ヒト PBMC の培養

正常ドナーよりヘパリン加血液 40 ml を採血し Ficoll-Conray 液による比重遠心分離を行い、分離された細胞を 3 回 HANKS 液にて洗浄後、CD2 MoAb または CD3 MoAb と補体にて処理洗浄後、10% FCS 加 RPMI-1640 に rIL-2 (武田薬品、TGP-3) 2 μ g/dl および rIL-1 (大塚薬品) 0.5 μ g/dl を加えて 37°C、5% CO₂ 下にて 50 ml culture flask にて培養した。

2. CD2 および CD3 MoAb 処理

Ficoll-Conray 液にて分離した PBMC を Lymphokwik (Veritas) にて 37°C 1 時間加温して CD2 陽性細胞を除去後 3 回洗浄し、前述のごとく培養を行った。また CD3 MoAb 処理は CD3 MoAb と兎補体にて 37°C 1 時間加温して 3 回洗浄後、rIL-1 と rIL-2 加培養液にて培養を行った。培養液の交換は 3~4 日ごとに半量ずつ行った。

3. cloning

96 well microplate (Nunc 167668 F) に同一ドナーからの PBMC 5 $\times$ 10⁴/well、またはこれにさらに EBV-感染 B cell line (T.Y) 5 $\times$ 10³/well を加えた後、LINAC 10 MY X-ray にて 30 Gy 照射したものを feeder cells として使用した。そして well 当たり 1 個以下になるように CD2 MoAb 処理細胞を入れて培養した。

4. 使用 MoAb

CD2 (Leu 5 b, Nu-TER), CD3 (Leu 4, Nu-T 3), CD4 (Leu 3 a, Nu-TH/I), CD8 (Leu 2 b, Nu-T S/K), CD7 (Leu 9, T 55), CD56 (Leu 19), CD11a (SPU-L 7), CD11b (Leu 15, OKM 1), CD11c (Leu M 5), CD54 (Leu 54), CD34 (HPCA-1), WT31 (TCR-1), TCR γ/δ -1 (11 F 2) その他 T Cell Science INC. の TCR δ -1, δ TCS-1 および β F1 を使用した。

5. MoAb による細胞表面形質または細胞内抗原の同定

上記 MoAb を使用して表面形質を FCM (フローサイトメーター) にて測定した。FCM は米国 Bio/physics 社製 Cytofluorograf 50 F, Coulter Epics 751 A または FACS Can (Becton Dickinson) を使用した。また組織染色法としてはサイトスピンした標本をアセトン固定してニチレイヒストファイン SAB-PO (M) キットを使用し、発色は DAB 色素によった。

6. DNA 解析

Cellular DNA 5 μ g を各 restriction endonuclease にて digestion して電気泳動後、nylon membrane filter へ transfer を行った。probe としては TCR β : C β 1 region, TCR γ : J γ 1+3, J γ 2+3 region DNAs を random primer 法にて 32 P-label して hybridize した。

7. 51 Cr-release cytotoxicity assay

K562 を標的細胞とした主要組織適合因子非拘束性細胞毒試験 (NMRC) は松本ら⁴⁾の方法に従って E/T 比を 40:1, 4 時間, 37°C で反応させて測定した。対照として effector cell を入れないもので培養液のみ

のものを自然遊離量, 1/10 N 塩酸を入れたものを最大遊離として計算をした。そして

$$\% \text{NK 活性} = \frac{\text{平均実験群遊離量} - \text{自然遊離量}}{\text{最大遊離量} - \text{自然遊離量}} \times 100$$

を計算して 20% 以上を陽性とした。

III. 結 果

1. CD2 MoAb および CD3 MoAb 処理 PBMC の rIL-1 および rIL-2 加培養に伴う表面形質の変化と NMRC 活性

PBMC を *in vitro* で CD2 MoAb と補体処理を行うと、細胞数は処理前と比較して約 1/10 に減少する。また CD3 MoAb 処理でもほぼこれと同じであった。しかし、rIL-2 加培養により約 7 日から 10 日後には著明な細胞増殖がみられるようになる。図 1 はそれぞれの MoAb 処理後の表面形質を経時的に示したものである。すなわち CD2 MoAb 処理では、最初は CD2 および CD3 とともにほとんど陰性であったが、10 日前後から CD2 陽性細胞の著増をきたし、CD3 陽性細胞は増加せずその差はかなりはっきりと認められ、CD 2⁺CD3⁻CD56⁺ 細胞が増殖していることを示している。一方 CD3 MoAb 処理では、やがて CD3 陽性細

図 1 Surface markers and NMRC of CD2- or CD3-depleted PBL after *in vitro* culture with rIL-2

CD 3-depleted PBMC after 17 days-culture

CD 2-depleted PBMC after 13 days-culture

図 2 Two-dimension FCM analysis of CD3- or CD2-depleted PBMC after *in vitro* culture with rIL-1 and rIL-2

胞が増殖してくるため、ほとんどの細胞は CD2⁺CD3⁺CD56⁺を示すようになる。また K562 に対する NMRC 活性は両者ともに十分認められた。

図 2 は CD2 MoAb 処理後 13 日目、CD3 MoAb 処理後 17 日目の CD2 および CD3 の 2-dimension FCM を示した。すなわち CD2 MoAb 処理では CD2 側に、

CD3 MoAb 処理では CD3 側に偏って多くの陽性細胞が出現しているのがわかる。すなわち、それぞれの MoAb が mitogen として働いているのかもしれない。

次に写真 1 には、CD2 MoAb 処理 20 日後の LAK 細胞のサイトスピン標本を種々 MoAb で組織染色したものを示した。明らかなごとく、CD3 陽性細胞は

写真 1 Cytostaining of CD2-depleted PBMC after *in vitro* culture with rIL-1 and rIL-2 for 20 days. Most cells showed CD2⁺CD3⁻βF1⁻ and CD7⁺.

表 1 Surface markers of anti-CD 2-treated LAK cells

positive	CD 2, CD 56, CD 45 RA, CD 7, CD 34, CD 11 a
few cells positive	CD 3, CD 4, CD 5, CD 8, CD 11 C, CD 25, CD 33, TCRγ/δ-1, CD 57, DQ, DR, DP, WT 31, βF 1, TCRδ-1
negative	CD 1, CD 16, CD 19, CD 20, CD 22, CD 41 a, CD 11 b, CD 10, EMA, S 100, Esterase(except granules), MPO

EMA : epithelial membrane antigen, MPO : myeloperoxidase, S 100 : S 100 β protein, Esterase : α-naphtyl acetate and naphthol ASD chloroacetate

少なく、ここで増殖している細胞は CD2⁺CD56⁺CD34⁺CD7⁺CD45 RA⁺ であることがわかる。

表 1 にはこれら CD2 MoAb 処理後, rIL-1 と rIL-2 に反応して増殖する細胞の表面形質をまとめて示した。すなわちここで増殖する細胞は WT31-TCRγ/δ-1⁻ で細胞内 CD3 (CCD3) も陰性であり, CD3⁻NK 細胞と同一表面形質を示していることから, CD3⁻NK 細胞が rIL-1 と rIL-2 に反応して増殖したものと思われる。写真 2 はこれら CD2 MoAb 処理後, rIL-

1 と rIL-2 に反応して増殖した細胞の TCRβ と TCRγ 遺伝子の DNA 解析の結果を示した。すなわちいずれも再構成はみとめられず germline であった。

2. CD2 MoAb 処理 PBMC の cloning の結果について

次にこれら CD2 MoAb 処理後, rIL-1 と rIL-2 加培養した細胞の cloning を行ってみた。すなわち前も

って feeder cell を入れた 96 well microplate に well 当たり培養細胞が 1 個以下になるように入れて 10~14 日培養後、できた cluster を 24 well multidishes, ついで 50 ml culture flask に移して培養を続け、その clone 化細胞の表面形質とともに可能なかぎり NMRC 活性を測定した。

表 2 には合計 17 回の実験で作成した clone の細胞表面形質を、WT31 と TCR γ/δ -1 の 2 つの MoAb

でテストした結果を示した。すなわち feeder cell として EBV-感染 B cell line を使用した場合と、単に同一ドナー PBMC を使用した場合との比較では、前者の方がはるかに効率よく γ/δ -1 陽性 clone や WT31 $^{-}$ γ/δ -1 $^{-}$ clone を分離することができた。なお、WT31 陽性 clone はすべて CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ CD8 $^{-}$ CD56 $^{-}$ 、また γ/δ -1 陽性 clone は CD3 $^{+}$ だが CD4, CD8, CD56 は少数の細胞のみが陽性であった。また TCR γ/δ -1 $^{+}$ clone はすべて TCR δ -1 $^{+}$ であったが、 δ TCS-1 は一部の clone のみ陽性で、中には CD2 $^{-}$ CD3 $^{+}$ γ/δ -1 $^{+}$ clone もみられた。

次に K562 を標的とした NMRC 活性について検討してみた。表 3 に示したごとく、WT31 $^{-}$ γ/δ -1 $^{-}$ clone 27 のうち 13 clone のみに NMRC 活性を認めたが、その他 14 clone はテストした WT31 $^{+}$ および γ/δ -1 $^{+}$ clone も含めて活性は認められなかった。表 4 はその 27 clone の主な細胞表面形質と NMRC 活性を示した。すなわち CD2 と CD56 両者共陽性を示した clone は明らかに活性が認められたのに対し、CD56 のみ、または CD2 のみ陽性では十分な活性が認められないものが大部分であった。なお図 3 には、その一部の clone の FCM 解析による細胞表面形質を示した。

IV. 考 察

ヒト PBMC の大多数は TCR α/β をもったリンパ球で、この細胞の機能および役割に関してはすでに多くの事実が明らかにされてきている。minor population である TCR γ/δ をもったリンパ球や、CD3 $^{-}$ NK 細胞に関してはまだ不明の点が多い。しかし、いずれも IL-2 によく反応して増殖することが知られている。正常 PBMC を CD2 MoAb と補体とで処理後 rIL-2 とともに培養すると CD3 $^{-}$ LAK 細胞の選択的増加をきたす事実から、CD3 $^{-}$ NK 細胞の増殖分化および

写真 2 TCR β and γ gene analysis of CD2-depleted PBMC after *in vitro* culture with rIL-1 and rIL-2 for 20 days. Both TCR β and γ gene analysis showed germline configuration.

表 2 Cloning of LAK cells and their surface markers

	No. of clones			
	WT 31 $^{+}$ γ/δ -1 $^{-}$	WT 31 $^{-}$ γ/δ -1 $^{+}$	WT 31 $^{-}$ γ/δ -1 $^{-}$	Total
Exp. 1~11	106	19	33	158
Exp. 12~17	6	43	68	117

Exp. 1~11. Feeder cells were 30 Gy-irradiated autologous PBL (5×10^4) per well.

Exp. 12~17. Feeder cells were 30 Gy-irradiated autologous PBL (5×10^4) + EBV-infected B cell line (5×10^3) per well.

機能の解明になんらかの手がかりが得られないものかと考え追求してみた。CD2 MoAb 処理に関しては、すでに Furley ら⁵⁾が CD7⁺CD45⁺Pro T 細胞を分離するために行っており、また CD2 MoAb 処理後むしろ CD2⁺CD3⁻ 細胞が増加することは、CD2 MoAb 処理では一部 CD2 抗原の少ない細胞が生き残るのかもしれないし、逆に CD2 MoAb のある種のもが mitogen として働き CD2 経路の活性化が起こり⁶⁾、CD2⁺ 細胞の増殖をきたすのかもしれない。また CD3 MoAb 処理では、すぐ CD3 細胞の増殖をきたすことは同様 mitogen としての CD3 MoAb の働きとともに、CCD3⁺ 細胞が生き残って増殖分化するものと考えている。

Cloning の方法としては、PHA blast⁷⁾ や EBV 感染 cell line⁸⁾ を feeder cell として使用することが cloning を容易にしているようであるが、その理由についてはよくわかっていない。

Clone 化 LAK 細胞の表面形質と NMRC 活性との

表 3 NMRC of cloned cells to K 562

	NMRC (positive/tested)*		
	WT 31 ⁺ γ/δ-1 ⁻	WT 31 ⁻ γ/δ-1 ⁺	WT 31 ⁻ γ/δ-1 ⁻
Exp. 1~11	0/5	0/6	5/15
Exp. 12~17	0/5	0/5	8/12

* Positive NMRC shows 20% or more cytotoxicity.

表 4 Surface markers of cloned cells and their NMRC

Clones and surface markers	NMRC(%)	Clones and surface markers	NMRC(%)
<u>CD 2⁺CD 3⁻CD 56⁺</u>		<u>CD 2⁺CD 3⁻CD 56⁻</u>	
5- 7 (CD 11 a ⁺ CD 54 ⁺ CD 11 C ⁻)*	103.6	2-17	2.4
6- 3 (CD 11 a ⁻ CD 54 ⁻ CD 11 C ⁻)	93.8	5- 8	0.9
6-13	97.8	10- 3 (CD 7 ⁺ CD 45 RA ⁺ CD 11 a ⁺)	23.3
12- 2	84.6	11- 1	-3.5
12- 3	77.7	11- 6	-6.2
12- 5	56.7	11-13 (CD 7 ⁺ CD 11 a ⁺)	-4.0
12- 8	65.5	11-15	4.6
12-10	55.1	11-20 (CD 7 ⁺ CD 45 RA ⁺ CD 11 a ⁺)	34.7
12-11 (CD 54 ⁺ CD 11 C ⁻)	77.5	<u>CD 2⁻CD 3⁻CD 56⁻</u>	
12-12 (CD 54 ⁺ CD 11 C ⁻)	75.1	1- 7	-2.6
<u>CD 2⁻CD 3⁻CD 56⁺</u>		6- 9 (CD 7 ⁻)	14.8
6- 1 (CD 7 ⁺)	-5.1	6-11	-3.6
12- 9	39.5	12- 4 (CD 7 ⁺ CD 45 RA ⁺ CD 11 a ⁺)	-6.3
16- 3	5.6	12- 6	0.5
16- 8	8.5		

*() showed other surface markers.

5-8

10-3

11-1

11-6

図 3 Surface phenotype of several clones

関係では、 $\text{TCR}\alpha/\beta^+$ または $\text{TCR}\gamma/\delta^+$ clone は調べた範囲ではまったく NMRC 活性をもっていなかった。これは先に述べたように、その他の表面形質すなわち CD4, CD8, CD56 などが関係してくるのかもしれない。また Kovacs ら⁹⁾がいうように CD3⁻ LAK 細胞は IL-2 と培養する以前から NK 活性をもっているが、T 細胞は IL-2 と培養してから活性がでてくるという機構とも何らかの関係があるのかもしれない。しかし、CD3 MoAb 処理後 rIL-2 加培養では十分な NMRC 活性が認められるのに、cloning 後の純粋な T cell clone では活性が認められなかったという事実は、少数の他の macrophage 様の細胞の混入が活性化のために必要となる可能性も考えられる。

WT31⁻ $\text{TCR}\gamma/\delta^+$ clone の表面形質を調べてみると、すべての clone が CD2⁺CD3⁻CD56⁺ ではなく、中には CD2⁻のものもみられる。これらははたして Pro T 細胞^{10,11)}なのかどうか、また NK 細胞に属するものなのかは不明であるが、CD7, CD34, CD45 や CD2 などの共通にもっている抗原がどのように関係しているのか興味もたれる。CD3⁻ LAK clone の NMRC 活性と表面形質の関係については CD2⁺CD56⁺ LAK 細胞が最も強力に NMRC 活性をもっていることが判明した。Robertson ら¹²⁾は CD3⁻ NK 細胞で CD11a MoAb と CD2 MoAb を一緒に作用させたときに最も著明な NMRC 活性の block を示してい

る。K562 には CD54 (ICAM-1) と CD58 (LFA-3) が細胞表面上に存在し、それぞれ LFA-1 (CD11a) と LFA-2 (CD2) が adhesion molecule として対応しているので、これらが LAK 活性の際に十分役割を果たしているのかもしれない。

CD56 の役割についていくつかの論文^{13,14)}が発表されており興味もたれるところであるが、CD56 MoAb では NMRC を block できなかった (準備中) ことから、adhesion molecule とは別の役割をもっているのかもしれない。今後の検討を必要とする。

V. 結 語

① ヒト PBMC を *in vitro* で抗 CD2 抗体と補体にて処理後、rIL-1 と rIL-2 を加えて培養し 90% 前後純粋な CD2⁺CD3⁻CD56⁺ LAK 細胞を得ることができた。

② これらの LAK 細胞の表面形質は T 前駆細胞と似ているが、DNA 解析では $\text{TCR}\beta$ および γ ともに germline であった。

③ これら抗 CD2 抗体処理細胞を cloning したところ、 $\text{TCR}\alpha/\beta^+$ 112 clones, γ/δ^+ 62 clones, 両者共陰性 101 clones を得ることができた。

④ K562 を標的とした LAK 活性では CD2⁺CD56⁺ LAK 細胞に強力な活性が認められたが、その他の表面形質との関係ははっきりしなかった。

文 献

- 1) 押味和夫：LGL 増多症・LGL 白血病。第四回新潟シンポジウム。白血病の新しい診断技術，柴田・高久編集，医歯薬出版，東京，1988，pp. 100～106.
- 2) 今村展隆・他：急激な臨床経過をたどった Natural killer 細胞白血病—第 3 リンパ球亜群由来の新しい臨床疾患群の可能性。臨床血液，30(2)：pp. 193～201, 1989.
- 3) 滝口智夫・他：NK cell leukemia と T-lymphocytosis。第四回新潟シンポジウム。白血病の新しい診断技術，柴田・高久編集，医歯薬出版，東京，1988，pp. 89～99.
- 4) 松本美富士・高野浩一・若園清行：ヒト NK 活性の測定。免疫実験操作法，9：2783～2790, 1980.
- 5) Furley, A.J.：Developmentally regulated re-arrangement and expression of genes encoding the T-cell receptor-T 3 complex. Cell, 46：75～82, 1986.
- 6) Meuer, S. et al.：An alternative pathway of T-cell activation：A functional role of the 50 Kd T11 sheep erythrocyte receptor protein. Cell, 36(4)：897～906, 1984.
- 7) Bottino, C. et al.：Two subsets of human T lymphocytes expressing γ/δ antigen receptor are identifiable by monoclonal antibodies directed to two distinct molecular forms of the receptor. J. Exp. Med., 168：491～505, 1988.
- 8) Rabinowich, H. et al.：Increased proliferation, lytic activity, and purity of human natural killer cells cocultured with mitogen-acti-

- vated feeder cells. *Cell. Immunol.*, 135 : 454~470, 1991.
- 9) Kovacs, E.J. et al. : Cytokine gene expression during the generation of human lymphokine-activated killer cells : Early induction of interleukin 1 β by interleukin 2. *Cancer Research*, 49 : 940~944, 1989.
- 10) Barton, F. et al. : Early events in human T cell ontogeny-Phenotypic characterization and immunohistologic localization of T cell precursors in early human fetal tissues. *J. Exp. Med.*, 168 : 1061~1080, 1988.
- 11) Terstappen, L.W.M.M. et al. : Flow cytometric assessment of human T-cell differentiation in thymus and bone marrow. *Blood*, 79(3) : 666~677, 1992.
- 12) Robertson, M.J. et al. : Human natural killer cell adhesion molecules-Differential expression after activation and participation in cytotoxicity. *J. Immunol.*, 145(10) : 3194~3201, 1990.
- 13) Nitta, T. et al. : Involvement of CD56 (NKH-1/Leu 19 antigen) as an adhesion molecule in natural killer-target cell interaction. *J. Exp. Med.*, 170 : 1757~1761, 1989.
- 14) Lanier, L.L. et al. : Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). *J. Immunol.*, 146 : 4421~4426, 1991.
-