免疫複合体存在下での Fc レセプター保持 T 細胞によるリンパ腫由来培養細胞の障害作用について

II. メカニズムおよび関与する免疫複合体の性状に関する検討

田 中 順 子・矢 田 純 一

Immune complex dependent cytotoxicity against the cultured lymphoma cells mediated by T-cells bearing Fc receptors

II. Studies on the mechanisms and the property of immune complexes concerned

Junko Tanaka, & Junichi Yata

*Department of Pediatrics, Faculty of Medicine
Tokyo Medical and Dental University, Tokyo*

We have reported that the T-cells bearing receptors for Fc portion of IgG (T_H cells) suppressed the growth of lymphoid cell line having Fc receptors in the presence of immune complexes (IC).

This phenomenon was tentatively named as "immune complex dependent T-cell mediated cytotoxicity (IDTC)". Further studies on the mechanisms of this phenomenon were described in this paper.

Presence of Fc receptors is necessary on both effector and target cells for cytotoxic effect to elicit, which suggested that effector cells act on target cells being bridged by IC via Fc receptors. When both cells were attached with IC independently, the phenomenon did not occur. This also indicated the necessity of bridging.

Growth of the target cells were inhibited by IDTC. However, this cytotoxic effect did not seem to be cytolytic.

Fractionation of IC by polyethylenglycol density or ultracentrifugation indicated that active IC was of large molecular size more than 10⁶ dt.

【概 要】

T_H 細胞が非特異的な免疫複合体 (IC) 存在下で Fc レセプターをもった標的細胞を障害する現象を見出し, immune complex dependent T-cell mediated cytotoxicity (IDTC) と名づけて報告してきたが, この IDTC に関してそのメカニズムや介在する IC の性状についてさらに検討を進めた. Effector cell と target cell はいずれも Fc レセプターが必要であり, この両者の Fc レセプターが IC を介して結合することにより IDTC は出現し, IC

は培養液中に free に存在していても, target cell または effector cell の Fc レセプターに先に結合していてもよいが, 両者の Fc レセプターに同時に別の IC が結合している状態では block された. またこの細胞障害は cytostasis (増殖抑制) であり, cytolysis ではなかった. 間に介在する IC の大きさを検討したところ, PEG による分画では分子量 100 万以上, 超遠心では rheumatoid factor の含まれる分画にのみ IDTC を出現させる活性がみられた.

I. はじめに

われわれは慢性関節リウマチ (RA) 患者の T 細胞がリンパ腫由来培養細胞である Raji 細胞の増殖を障害する現象を見出し, RA においては血中に免疫複合体 (IC) が存在すること, また IgG の Fc 部に対するレセプターをもつ T 細胞 (T γ 細胞) が RA において著明に増加していることより, RA では in vivo ですでに IC が T γ 細胞に結合していて, これが標的細胞を障害すると考え, immune complex dependent T-cell mediated cytotoxicity (IDTC) と名づけて報告してきた¹⁻³⁾. 正常人 T 細胞においても, in vitro で IC や凝集 IgG を結合させるとこの細胞障害現象が出現すること, さらに標的細胞の Fc レセプターを block するとこの現象は認められなくなることから, IDTC のメカニズムは, T γ 細胞と標的細胞とがそれぞれの Fc レセプターが IC を介して結合することにより, 細胞障害が出現することを想定してきたが (図 1), 今回このメカニズムに関して, effector cell, target cell, IC のそれぞれについてさらに検討を行ったので報告する.

II. 実験材料と方法

1. T細胞および non T 細胞の分離

健康人のヘパリン加末梢血を phosphate buffered saline (PBS) で 2 から 3 倍に希釈後, Ficoll-Conray 比重遠心法 (比重 1.077) により単核細胞 (peripheral blood lymphocytes, PBL) を分離回収した⁴⁾. この PBL に胎児ウシ血清 (fetal calf serum, FCS) 浮遊ヒツジ赤血球 (SRBC) (1×10^8 /ml) を 1:200 の割合で混合し, 300 G 5 分間の遠心後, 4°C 1 時間静置した. 反応後の細胞を Ficoll-Conray 比重遠心にかけ, interface からロゼット非形成細胞 (non T 細胞), 管底からロゼット形成細胞 (T 細胞) を回収し, 後者中の SRBC は 0.85% NH_4Cl 液で溶解除去した⁵⁾.

2. Theophylline 処理による T γ 細胞および T non γ 細胞の単離

Ig G 抗体感作ウシ赤血球 (EA) によって回収した T γ 細胞は, Fc レセプターに EA という免疫複合体 (IC) が結合しているため, IC との結合自体がシグナルとして必要な反応系の検討には不適当なため, 私達は T γ 細胞が Theophylline により SRBC とのロゼット形成, す

図 1 T γ 細胞と Raji 細胞の immune complex を介しての結合

なわちEロゼット形成能を失う性質を利用して, T γ -rich fraction と T non γ -rich fraction を集めてきた^{2,6-9)}.

PBL に SRBC を混合してEロゼット形成細胞を集め, その pellet に 0.4 mM Theophylline を 3 ml 加えてよく攪拌し, 37°C 1時間反応させた. Ficoll-Conray 比重遠心法により, interface から SRBC とのロゼット形成能を失った T 細胞 (Theophylline sensitive T-cell fraction, Tsen) を回収した. この分画には T γ 細胞が enrich されている. また Theophylline と反応させても相変わらずEロゼットを形成する Theophylline resistant T-cell fraction (Tres) は PBL に SRBC を混合してEロゼット形成細胞を集め, SRBC を 0.85 % NH₄Cl で溶解除去後, 4 mM Theophylline 3 ml を加えてよく攪拌後, 37°C 2時間反応させ, 4°C PBS にて3回洗浄後, 再度 SRBC とのロゼット形成を行い, Ficoll-Conray 比重遠心法にてEロゼット形成細胞を回収し, 0.85 % NH₄Cl で SRBC を溶解除去して単離した. このT細胞分画では T γ 細胞が deplete されている.

3. 凝集 IgG の作製

健康人血清を 30% 硫酸で3回塩析後, DEAE セファロースカラムまたは protein Aカラムにて IgG を回収し, 63°C 30分間の熱処理により凝集 IgG を作製した. またこれを用いて, T γ 細胞や株化培養細胞の Fc レセプターを検出するための Fluorescein isothiocyanate を conjugate した凝集 IgG も作製した.

4. ヒト抗タヌス血清およびタヌス・ヒト抗タヌス抗血清による免疫複合体の作製

健康人にタヌス抗原 (北研) を 0.5 ml 皮下注射し, 4週後に同量 boost したのち2週後の血清をヒト抗タヌス抗血清とした. この抗血清とタヌス抗原 (Leo. Levine. Jamaica Plain. Mass. USA) を ring test により最適比を定め, antibody excess とするためその 1.5 倍濃度の抗体を用いて免疫複合体を作製した.

5. Polyethylene glycol (PEG) による凝集 IgG の各分画の作製

水溶性で, 非イオン性ポリマーの PEG 6,000 を用いて, Creighton らの方法により, 凝集 IgG をいくつかの分画に分別した¹⁰⁻¹²⁾. このことにより凝集 IgG は主として分子量の差によって分けられる. PEG 6,000 は 0.1 M, pH 8.4 の borate buffer により, 3.5%, 5.0 %, 7.5% の濃度に調製し, 凝集 IgG の浮遊液を最初

に 3.5% の PEG 濃度に調製した. よく攪拌して, 4°C 18時間静置後 1,000 G 20分間遠心し, precipitate と supernatant に分けた. Precipitate は同濃度の PEG 溶液にて再度洗浄後, large molecular fraction (分子量約 100 万以上と想定される¹⁰⁾) とした. Supernatant にはそれよりも分子量の小さい凝集 IgG が浮遊しているわけだが, そこに濃度の高い PEG を加えて PEG 濃度を 5.0% に調製して, 4°C 18時間静置後 1,000G 20分間遠心し, precipitate と supernatant に分けた.

Precipitate は 5.0% PEG 溶液にて再度洗浄して, middle molecular fraction (分子量約 50 万から 100 万¹⁰⁾) とした. 5.0% PEG 溶液の supernatant は 7.5 %PEG に調製して, 4°C 18時間静置後 1,000 G 20分間遠心し, この precipitate に 7.5% PEG を加えて洗浄後, small molecular fraction (分子量約 15 万から 50 万¹⁰⁾) とした. これらの3種類の fraction は PBS に浮遊させて, Lawry 法により N 量を検定して, 蛋白濃度を測定した.

6. 超遠心による RA 患者血清蛋白各分画の分離

RA 患者血清を 40,000 r.p.m. 4時間の超遠心により, 次の4種の fraction に分画した. 遠心後の血清の上部 1/3 を top fraction, 中間 1/3 を middle fraction, 下部 1/3 を bottom fraction, さらに超遠心による precipitate も PBS に浮遊させてそれぞれについてラテックス結合反応により rheumatoid factor (RF) の検出を行った. 超遠心は東京大学血清学教室の超遠心機 (日立, 65 P. スイングローター) を使用させていただいた.

7. IDTC の測定法および評価法

IDTC の測定法および評価法はすでに報告しているが^{1,2)}, T細胞 2.0×10^6 をそのまま, あるいは免疫複合体や凝集 IgG, 患者血清を加えて 37°C 30分間 pre-incubate したT細胞 2.0×10^6 を標的細胞 4×10^4 と混合して, conditioned medium を 20~30% 加えた medium 1 ml に浮遊して 37°C 48時間培養後, trypan blue にて生存標的細胞を count し, 標的細胞のみを培養した対照と比較して, 細胞障害率を算定した. 標的細胞とリンパ球は大きさおよび形態学的特徴により鑑別した.

また IDTC の blocking を検討するために, 凝集 IgG を加えて 37°C 30分間 preincubate した標的細胞も作製した.

また, IDTC の effector cell が mitomycin C (MMC)

図 3 各種濃度のポリエチレングリコール (PEG) により大きさ別に分離した凝集 IgG による IDTC

図 4 IDTC に介在する RA 血清の超遠心分画による検討

を処理すると、分子量 100 万以上の fraction で、蛋白濃度 0.4 mg/ml 以上の場合にのみ、IDTC は出現した (図 3)。凝集 IgG で検討した場合は、蛋白濃度 0.1 mg/ml 以上で IDTC では出現したが (表 1)、PEG による fraction 0.4 mg/ml 以上必要となったのは、凝集 IgG に PEG が付着しているために、IDTC に有効な Fc 部がマスクされているものが含まれていることも考えられた。

4. 超遠心により分画された RA 患者血清の各 fraction による IDTC の検討

PEG による凝集 IgG の fraction による検討で、

IDTC に介在する IC は分子量が 100 万以上であることが考えられたが、RA 患者血清においては、分子量 100 万以上の IC として rheumatoid factor が存在する。この rheumatoid factor を含む fraction を得るために超遠心により、RA 患者血清を 4 種の fraction に分別した。図 4 のように precipitate あるいは bottom fraction によって IDTC は出現し、IDTC の出現した分画では RA test は陽性となった。

この検討により、RA 血清処理により出現する IDTC は、rheumatoid factor を含む分子量の大きな IC の存在によることが考えられた。

表 2 IDTC における Effector cell の検討

Target	Effector	T/E ratio	IDTC(%)
Raji cell	non T	1 : 40	2.0
		1 : 20	10.0
		1 : 10	10.2
	T	1 : 40	59.5
		1 : 20	44.0
		1 : 10	34.2
	T sen	1 : 2.5	19.5
		1 : 1.25	38.4
	T rec	1 : 10	7.5
		1 : 5	1.5

5. IDTC における effector cell の検討

IDTC における effector cell について, PBL を non T 細胞と T 細胞にわけて検討すると, T 細胞分画にその活性が認められた (表 2).

また T 細胞を T sen と T res にわけて, T 細胞中に存在する比率で target cell に加えて検討すると, T sen にその活性が認められた (表 2).

以上より IDTC の effector 活性は, Fc レセプターをもつ T γ 細胞分画にあると考えられた.

6. Target cell における Fc レセプターの必要性の検討

今までの検討で, Fc レセプターをもつ Raji 細胞では IDTC が出現するが, Fc レセプターの認められない MOLT 3 細胞では IDTC も出現しないこと, また Raji 細胞を凝集 IgG で処理すると IDTC が block されることより, IDTC が発現するためには target cell にも Fc レセプターが必要であると考えられたが¹⁾, この blocking は RA 患者血清やテタヌス抗原・抗テタヌス抗血清の IC で Raji 細胞を前処理しても認められた (図 5).

またリンパ系株化培養細胞である NC-37 細胞と Daudi 細胞を target として, Raji 細胞を target とした場合の IDTC と比較すると, Fc レセプターが 45% の NC-37 細胞では Raji 細胞における同様に IDTC が出現したが, Fc レセプターの検出されない Daudi 細胞では IDTC が認められなかった (図 6).

7. IDTC におけるメカニズムの検討—IC の存在および結合と IDTC の発現について

今までの IDTC の検討において, Effector である T

図 6 IDTC における Target cell の検討
() は Fc receptor 陽性細胞の%

細胞に IC を結合させてきた。これは患者の T 細胞に in vivo ですでに IC が結合している場合に出現する IDTC も評価できるように考えたわけであるが, 今回 target の Fc レセプターに IC を結合させて, IDTC を検討した。図 7 のように, effector である T 細胞に凝集 IgG を結合させても, IDTC の出現に差は認められなかったが, effector と target の両方の Fc レセプターに凝集 IgG を結合させると IDTC は出現せず, Raji 細胞と T 細胞を IC なしに混合培養した場合と同様になった。つぎに凝集 IgG による前処理をしないで, effector と target の混合培養中に凝集 IgG を添加すると, 図 8 のように通常前処理に使用する 10% 濃度の 1/100 量の free の凝集 IgG の存在で IDTC が出現した。また

図 7 IDTC における Fc レセプターと凝集 IgG の結合の検討
effector 処理, target 処理, 両者処理の比較

図 8 混合培養中に存在する遊離凝集 IgG の存在と IDTC の出現の検討

図 9 IDTC におけるメカニズムの検討
—killing について—

effector に凝集 IgG を結合させた系では, 混合培養中の凝集 IgG の存在により, 出現していた IDTC は block された (図 8).

8. IDTC におけるメカニズムの検討—killing について

IDTC における細胞障害として, 増殖抑制(cytostasis)を評価してきたが, cytolysis が存在するか否か, target

図 10 Effector の MMC 処理による IDTC の変化

Target : Raji cell

cell に ^{51}Cr をラベルして検討した. IDTC の評価は細胞分裂に差が出現してくる 48 時間で行っているが, 同様に 48 時間混合培養した Raji 細胞は, effector である T 細胞に凝集 IgG が結合していても, ^{51}Cr release は認

められなかった(図9)。この検討より IDTC の細胞障害は killing ではなく増殖抑制 (cytostasis) のみと考えられた。

9. IDTC におけるメカニズムの検討—effector の mitomycin C 感受性について

Effector であるT細胞を MMC 処理してから凝集 IgG を結合させると、MMC 未処理の場合と比較して約 50% IDTC の出現が抑制された(図10)。これはT細胞の Fc レセプターに変化が生じたものか、またはT細胞中の蛋白合成が抑制されて、IDTC に必要なリンフォカイン様物質の release がなくなったのかはまったく不明であるが、さらに検討する予定である。

IV. 考 案

T_H 細胞が非特異的な免疫複合体存在下で Fc レセプターをもった標的細胞を障害する現象を見出し、immune complex dependent T-cell mediated cytotoxicity (IDTC) と名づけて、報告してきたが^{1),2)}、この IDTC に関してそのメカニズム、effector cell, target cell, 介在する IC についてさらに検討を進めた。

Effector cell については、T_H 細胞であることはすでに報告したが¹⁾、T_H 細胞の enrich の方法として、IgG 抗体感作ウシ赤血球とのロゼット形成性を利用して集めたため、T_H 細胞の Fc レセプターに EA という IC が結合しており、in vitro でさらに IC を結合させなくても IDTC が出現してしまった¹⁾。今回 Theophylline を使用することにより、Fc レセプターが intact の状態で T_H 細胞を回収することができたので、正常 T_H 細胞では、in vitro で IC を結合させるとはじめて IDTC が出現することが確認できた。

IDTC の target cell としては、Fc レセプターが必要であるが、これは target cell に Fc レセプターの存在しないものでは IDTC が認められないこと、および target cell の Fc レセプターに IC を結合させると出

現していた IDTC が block されることより証明されたと思われる。

IDTC に介在する IC の検討として、native な IgG では IDTC は出現しないが、この IgG を加熱処理して凝集 IgG にすると IDTC が出現することから、specific な抗体を必要とする ADCC とは異なる細胞障害機構であることが明らかになった。また PEG や超遠心による分画で、凝集 IgG の大きさとしては分子量 100 万以上であること、また RA 患者血清中では rheumatoid factor と同じ分画の IC であることがわかった。

今回の検討により、IDTC のメカニズムとして、effector である T_H 細胞の Fc レセプター、または target cell の Fc レセプターに分子量 100 万以上の IC が結合して、effector cell と target cell の橋渡しをすることにより、細胞障害現象が出現すること、また ⁵¹Cr release assay により target cell の lysis は認められず、この細胞障害は cytostasis (増殖抑制) であることが確認された。

さらに effector cell と target cell の混合培養中に free に存在する IC は、IDTC を出現させるが、effector cell に IC がすでに結合している場合は、free の IC は IDTC を block した。Target cell と effector cell の両方の Fc レセプターに IC が結合していると、IDTC は block されることも考え合わせると、IC の存在はその結合によって IDTC を出現させることも、block することもありえることがわかった。

Effector cell を MMC 処理すると IDTC 効果が半減することは、非常に説明し難いが、おそらく effector cell のレセプターの変化 (Fc レセプターの減少?) や、細胞内蛋白合成抑制などが関係していると思われる。

IDTC のメカニズムの検討をさらに続けるとともに、実際に in vivo では IDTC がどのような役割を果たしているのかという点について、今後検討する予定である。

文 献

- 1) 田中順子・矢田純一：免疫複合体存在下での Fc レセプター保持 T 細胞によるリンパ腫由来培養細胞の障害作用について。アレルギー, 27: 799, 1978.
- 2) 田中順子・矢田純一：ヒト T_H 細胞の機能およびそれに関する Fc レセプターの意義について。臨床免疫, 11: 855, 1979.
- 3) 田中順子・矢田純一・入交昭一郎・他：膠原病におけるリンパ球の検討。1. 慢性関節リウマチ, SLE などの膠原病におけるリンパ球の subpopulation, T 細胞 subsets の検討と臨床像との相関および Levamisole の効果について。臨床免疫, 10: 828, 1978.
- 4) 辻 公美：比重遠心法によるリンパ球の分離。免

- 疫実験操作法 A. 日本免疫学会編, 金沢, 9443, 1975.
- 5) 矢田純一・中川俊郎・隅谷護人: 細胞性免疫の測定法. 小児科, 15: 402, 1974.
- 6) 田中順子・矢田純一・塩川優一・他: 膠原病におけるリンパ球の検討. 2. 慢性関節リウマチ, SLE, Behçet 病における T γ 細胞の変動とその suppressor activity の検討およびそれらに対する Levamisole の効果について. 臨床免疫, 11: 871, 1979.
- 7) Limatibul, S., Shore, A., Dosch, H.M., Gelfand, E.W.: Theophylline modulation of E-rosette formation: an indicator of T-cell maturation. Clin. exp. Immunol., 33: 503, 1978.
- 8) Shore, A., Dosch, H.M., Gelfand, E.W.: Induction and separation of antigen-dependent T helper and T suppressor cells in man. Nature, 274: 586, 1978.
- 9) Dosch, H.M., Gelfand, E.W.: Functional differentiation of B lymphocytes in agammaglobulinemia. III. Characterization of spontaneous suppressor cell activity. J. Immunol., 121: 2097, 1978.
- 10) Creighton, W.D., Lambert, P.H., Miescher, P.A.: Detection of antibodies and soluble antigen-antibody complexes by precipitation with polyethylene glycol. J. Immunol., 111: 1219, 1973.
- 11) Digeon, M., Laver, M., Riza, J., Bach, J.F.: Detection of circulating immune complexes in human sera by simplified assays with polyethylene glycol. J. Immunol., Methods, 16: 165, 1977.
- 12) Franklin, E.C., Holman, H.R., Müller-Eberhard, H.J., Kunkel, H.G.: An unusual protein component of high molecular weight in the serum of certain patients with rheumatoid arthritis. J. exp. Med., 105: 425, 1957.
- 13) Kunkel, H.G., Müller-Eberhard, H.J., Fudenberg, H.H., Tomasi, T.B.: Gamma globulin complexes in rheumatoid arthritis and certain other conditions. J. Clin. Invest., 40: 117, 1960.
- 14) 谷本潔昭・橋本 嘉・森藤忠夫: Fc レセプターによる immune complex の検出. 臨床免疫, 9: 1013, 1977.
-