シンポジウム 生体防御 基礎と臨床

4. リンパ球の亜集団とその機能からみた生体防御のしくみ

島根医科大学第三内科

坂根 剛

SYMPOSIUM ON MECHANISMS OF HOST DEFENSE FROM
FUNDAMENTAL AND CLINICAL MEDICINE

4. SIGNIFICANCE OF AUTOLOGOUS MIXED LYMPHOCYTE REACTION-
ACTIVATED IMMUNE CIRCUITS FOR MAINTAINING
NORMAL IMMUNE HOMEOSTASIS IN HUMANS

Tsuyoshi SAKANE, MD

The Third Division, Department of Internal Medicine, Shimane Medical University

緒 言

免疫系は細胞間相互作用を通して、効率よくその機能を発揮するが、この細胞間の交信に自己認識過程が必須である。自己認識にかかわる最も重要な自己抗原決定基であるIa様抗原は、主に非T細胞表面に分布しており、T細胞を刺激して実際に機能する効果細胞に分化させたり、リンホカイン産生細胞に働いて、インターリウキン2（IL2）などの液性因子の産生を促す。IL2は他の活性化T細胞群に作用して、そのクローン性拡大と分化を促進する。このT細胞、自己非T細胞間の相互作用を反映するin vitro反応系が自己リンパ球混合培養反応（mixed lymphocyte reaction; MLR）で、この反応が引き金となつて、Ia様抗原認識を伴う多くの免疫反応が派生する¹⁾。

自己MLRの欠失はT細胞の分化過程の中断を意味しており、実際、免疫異常を伴うリンパ球増殖性疾患や全身性エリテマトーデス（SLE）などの自己免疫病では、自己MLRが低下している¹⁾²⁾。本稿では自己MLRにかかわるT細胞サブセットをモノクローナル抗体で解析し、自己MLRで誘導される免疫学的機能の活性化機序を明らかにして、自己MLRの生体内における存在意義を考察する。併せて自己MLRの欠陥がSLEの病態にどのよ

うに関連するかも言及する。

材料および方法

T細胞および非T細胞の分離：末梢血からFicoll-Hypaque比重遠心法で採集した単核細胞をヒツジ赤血球とのロゼット形成法で、ロゼット形成細胞と非形成細胞に分離した³⁾。ロゼット形成細胞をT細胞とし、ロゼット非形成細胞については、ペトリ皿に付着する単球を除去したあと、さらに、OKT3抗体（Ortho Pharmaceutical Corp.）と家兎補体（Behring Institut）で処理し、その分画を非T細胞とした³⁾。

T細胞の細分画：T細胞にOKT8あるいはOKT4抗体（Ortho Pharmaceutical Corp.）を加えて補体依存性細胞破壊を行ない、OKT4⁺細胞分画とOKT8⁺細胞分画を得た³⁾。

自己MLR刺激培養上清の作製：10%に正常血清を含有するRPMI 1640（Flow Laboratories）を培養液として用いた。

5×10⁴個のT細胞に同数のマイトマイシン処理自己非T細胞を加え、総量200μlにてマイクロタイタープレートで培養した。5%炭酸ガス培養器にて37℃で2日間培養したあと培養上清を収獲し、凍結保存した⁴⁾。

自己MLRおよびその評価：上清と同じ条件

下で作製した自己MLRを6日間培養し、培養終了前20時間の ^3H -サイミジン ([methyl- ^3H] thymidine, 2Ci/mmol; New England Nuclear) の取り込みから、自己非T細胞に反応したT細胞の増殖反応を評価した²⁾⁴⁾。さらに一部の実験系では培養3日後、6日後に細胞を収獲し、抗Tac抗体(京都大学第一内科 内山卓博士より供与)と反応する細胞比率を蛍光顕微鏡下で観察した。

一部の自己MLRは3日間培養後、標準IL 2 (Bethesda Research Laboratories) を $50\mu\text{l}$ 加えて、さらに培養を3日間継続して、IL 2の自己MLR反応に対する修飾効果を観察した⁴⁾。

また、他の実験系では、あらかじめ3日間前培養した自己MLRから上清を完全に除去したあと、先に作製した自己MLR刺激培養上清を $200\mu\text{l}$ 加えて、さらに3日間培養を継続し、培養上清による自己MLRの反応修飾を検討した⁴⁾。

自己MLRで活性化したOKT4⁺細胞のヘルパーおよびサプレッサー機能の測定 自己MLRで活性化したOKT4⁺細胞のヘルパー活性は、その

1×10^5 個を 2×10^5 個の pokeweed mitogen (PWM; Grand Island Biological Co.) 刺激新鮮正常非T細胞に加えて、5日後のプラーク形成細胞数から評価した⁵⁾。自己MLR由来OKT4⁺細胞のサプレッサー活性の評価は、 2×10^5 個の新鮮正常非T細胞に、同一正常者の新鮮OKT4⁺細胞をヘルパー細胞として 1×10^5 個加え、これに自己MLR由来OKT4⁺細胞を 1×10^5 個加えてPWMで刺激し、自己MLR由来OKT4⁺細胞による抗体産生の抑制を観察した⁵⁾。

結 果

T細胞サブセットの自己非T細胞に対する増殖反応： T細胞をOKT4⁺細胞とOKT8⁺細胞に細分画したサブセットの自己非T細胞に対する反応を、図1にあらわした。非分画およびOKT4⁺正常T細胞は、強い増殖反応を示したが、OKT8⁺細胞は、自己MLR反応をほとんど示さなかつた。一方、SLE患者のリンパ球では、分画、非分画T細胞を問わず、自己MLR反応に欠陥があつた(図1)。このSLEリンパ球の欠陥は病気の活動性に関係な

図1. 正常者およびSLE患者の自己MLR, およびIL 2による自己MLRの修飾。
 5×10^4 個のT細胞サブセットに同数の自己非T細胞を加え、6日間培養。一部は4日目に標準IL 2を終濃度が8倍希釈になるように加え、培養終了前20時間の ^3H -サイミジンの取り込みを計測した。成績は平均値±標準誤差であらわし、括弧内に検索症例数を示した。

くあらわれ、この欠陥がSLEリンパ球に固有の欠陥であることが窺えた。

自己MLRに対するIL 2の効果： 上に示したように、OKT4⁺細胞は自己MLRの発現に、培養開始時にその存在が必須である。次に、OKT8⁺細胞が自己MLRを起こすのに、いかなる条件が必要であるかを明らかにするために、細分画T細胞を自己非T細胞で3日間刺激したあと、各培養系に標準IL 2を添加してさらに3日間培養を継続し、³H-サイミジンの取り込みを観察した(図1)。自己非T細胞で刺激せず、T細胞のみのあらかじめ3日間の培養系にIL 2を添加しても、増殖反応は全く認められなかった。自己非T細胞であらかじめ3日間刺激したT細胞サブセットに、IL 2を加えると、非分画T細胞、OKT4⁺細胞由来の自己MLR反応は増強され、またOKT8⁺細胞にも、IL 2の添加によつてOKT4⁺細胞と同等の反応があらわれた(図1)。このように、培養条件によつては、OKT8⁺細胞も自己非T細胞に活性化され、自己MLRを起こすことが明らかになった。

OKT4⁺、OKT8⁺細胞の両者が自己MLR反応を欠くSLE患者では、そのOKT8⁺細胞に外来性IL 2を添加すると、正常OKT8⁺細胞と同等の反応を示したが、自己非T細胞刺激OKT4⁺細胞にIL 2を加えても無反応のままであつた(図1)。すなわち、SLE患者では、自己非T細胞刺激によつて、OKT8⁺細胞はIL 2に対する反応性を獲得できることを示している。

自己非T細胞刺激T細胞サブセットのIL 2レセプターの表現： 上に述べた成績は、正常者ではそのOKT4⁺細胞もOKT8⁺細胞も自己非T細胞刺激で活性化され、増殖シグナルに対するレセプターを獲得できるのに対し、SLE患者ではOKT4⁺細胞にその機能が欠落していることを示唆している。この可能性を確かめる目的で、自己MLRを3日間施したT細胞で標準IL 2を吸収し、吸収したあとのIL 2活性を測定した。その結果、正常者の自己MLR刺激OKT4⁺、OKT8⁺細胞およびSLE患者のOKT8⁺細胞はIL 2活性をほぼ完全に吸収したのに対し、自己MLR刺激SLE OKT4⁺細胞の場

合には、吸収したあとにも有意のIL 2活性が残存した。

さらに自己MLR刺激T細胞サブセットのIL 2レセプターの表現を、抗Tac抗体を用いて間接免疫蛍光法で調べた。表1に示すように、正常者ではOKT4⁺、OKT8⁺サブセットに、IL 2レセプターを表現した細胞が同等に分布し、また、自己非T細胞刺激したSLE OKT8⁺細胞も正常にIL 2レセプターを表現していたが、SLE OKT4⁺細胞では、抗Tac抗体と反応する細胞の減少が目立つた。これらの成績は、SLE患者のOKT4⁺細胞は自己MLR刺激によるIL 2レセプターの表現が障害されていることを示している。

自己MLR刺激培養上清のIL 2活性： 正常OKT4⁺、OKT8⁺細胞は自己MLRでIL 2レセプターを獲得できるにもかかわらず、OKT4⁺細胞のみが増殖反応を示し、OKT8⁺細胞単独では全く反応を示さなかった成績は、自己MLRでIL 2を産生する細胞が、OKT4⁺細胞に局限していることを示唆している。実際、正常者から得た非分画T細胞および分画T細胞を自己非T細胞で2日間刺激して得た培養上清のIL 2活性を測定^{a)}してみると、OKT4⁺細胞由来の自己MLR培養上清にはIL 2活性が見出されたが、OKT8⁺細胞由来の培養上清中

表1. 自己MLR刺激T細胞サブセットのTac⁺細胞比率^{a)}

培養期間	反応T細胞サブセット	刺激自己非T細胞	Tac ⁺ 細胞(平均%±標準誤差)	
			正常(4)	SLE(5)
3日	OKT4 ⁺	—	5.3±1.1	3.6±2.1
		+	45.0±1.7	19.8±4.2 ^{b)}
	OKT8 ⁺	—	5.5±0.9	4.4±1.8
		+	40.3±3.1	39.0±2.9
6日	OKT4 ⁺	—	6.7±2.3	5.8±1.6
		+	48.0±3.5	22.4±3.7 ^{b)}
	OKT8 ⁺	—	5.0±1.0	4.9±0.8
		+	44.6±4.2	38.0±3.0

a) 自己非T細胞存在下あるいは非存在下で培養したT細胞サブセットを抗Tac抗体(1:5,000)を用いて間接免疫蛍光法で解析した。括弧内に検索した症例数が示してある。

b) 他の自己MLR活性化T細胞サブセットのTac⁺細胞比率に比べ有意な減少を示す(p<0.02)。

表 2. 自己MLR刺激T細胞サブセットが産生するIL2活性^{a)}

自己MLRの T細胞サブセット	自己MLR由来培養上清のIL2活性(SI) ^{b)}	
	培養上清供給源 正常(6)	SLE(6)
	平均±標準誤差	
非分画	13.2±3.6	1.9±0.4 ^{c)}
OKT4 ⁺	16.4±2.1	2.5±1.1 ^{c)}
OKT8 ⁺	1.6±0.8	1.2±0.7

a) T細胞サブセットを2日間自己非T細胞で刺激したあと、得られた培養上清のIL2活性を測定^{b)}した。括弧内に検索症例数を示した。

b) Stimulation index(SI)=自己MLR刺激培養上清のIL2活性(cpm)/非刺激培養上清のIL2活性(cpm)

c) 対応する正常T細胞サブセットが産生するIL2活性に比べ有意の低下を示す(p<0.05)。

にはIL2活性が全く含まれていなかった(表2)。一方、SLE患者では、OKT4⁺、OKT8⁺を問わず、自己MLR刺激したいずれのサブセットも、IL2活性をほとんど産生できなかつた(表2)。このようにSLE患者では、IL2を産生するOKT4⁺T細胞にも欠陥のあることがわかつた。

自己MLR活性化OKT4⁺細胞の免疫調節性作用

我々は先に、自己非T細胞で3日間刺激した正常OKT4⁺細胞は、ヘルパー細胞として作用するが、サプレッサー細胞としての働きがなく、これとは逆に6日間活性化したOKT4⁺細胞には、ヘルパー活性がほとんど認められず、強いサプレッサー活性があらわれることを証明した⁵⁾⁷⁾

自己MLRで3日間あるいは6日間活性化したSLE OKT4⁺細胞の免疫調節機能についても、検索した。図2に示す如く、SLE患者でも、3日間自己MLRで刺激したOKT4⁺細胞は正常OKT4⁺細胞と同様に十分なヘルパー活性を示したが、サプレッサー活性は全くあらわれなかつた。自己MLRで6日間活性化したSLE OKT4⁺細胞については、正常OKT4⁺細胞と異なり、これらの細胞にサプレッサー活性を全く認めず、むしろヘルパー活性の亢進が目立つた(図2)。これらの成績は、SLE患者では、ヘルパー細胞は自己非T細胞に反応して、その機能をあらわすが、OKT4⁺サプレッ

サー細胞そのもの、あるいはその細胞を活性化するOKT4⁺インデューサー細胞に欠陥があることを示している。

さらに自己MLR培養系に外来性のIL2を加えても、SLE OKT4⁺細胞のサプレッサー活性は正常活性を示すことはなかつた。したがって、OKT4⁺細胞によるサプレッサー活性の消失は、インデューサー細胞レベルの欠陥だけでなく、サプレッサー細胞そのものにも欠陥があると考えられる。一方、OKT8⁺細胞によるサプレッサー活性は、自己MLR刺激、非刺激を問わず、正常のサプレッサー活性を示したが、これは、サプレッサー活性をアッセイする培養系の反応B細胞、ヘルパーT細胞が正常者に由来するため、アッセイ培養系でSLE OKT8⁺細胞が活性化され、サプレッサー効果を現わしたためと考えられる。このことは、SLE OKT8⁺サプレッサー細胞そのものの機能は比較的正常に保たれていることを示唆している。

考 案

自己MLRは自己認識系の一表現と考えられている。Smithらの自己MLRに関するスキーム¹⁾によると、T前駆細胞の自己Ia様抗原に対するレセプターは胸腺内で活性化され、自己を認識するT細胞群に成熟する。この細胞群はヘルパー/インデューサーとしての性格をもち、末梢ではIa陽性細胞の刺激を常に受け続ける状態にある。このような状態からIL2を介した細胞障害性細胞の誘導が行なわれ、自己体内で修飾された自己を示す細胞群が消去される。また同時に抑制回路も活性化され、これにより免疫系の恒常性が維持される。この自己MLRの欠落によつて、修飾自己細胞を消去する能力や免疫抑制系の活性が失われ、結果として、自己抗体産生を伴う自己免疫病やリンパ球増殖性疾患が発症するという。

一方、我々の成績を中心にして自己MLRを説明すると、次のようになる⁴⁾。非T細胞はまず自己OKT4⁺ヘルパー/インデューサー細胞を活性化して、それにヘルパー活性を賦与するとともに、その細胞群にIL2産生を促す。自己非T細胞はOKT4⁺およびOKT8⁺サプレッサー細胞プールに

図2. 自己非T細胞で活性化したSLE OKT4⁺細胞の免疫系の調節性作用。
他の活動性患者2例, 非活動性患者3例について行なった実験も同様の成績を得た。

も作用して、両細胞系列にIL 2レセプターを表現させる。IL 2レセプターを表現したサプレッサー細胞は、OKT4⁺ヘルパー/インデューサー細胞から産生されたIL 2を受信して、分裂増殖を繰り返し、効率よくサプレッサー効果細胞へと分化する。したがって、自己MLR反応系では、まずヘルパー活性が誘導され、続いてサプレッサー活性が表われてくることになる。

SLE患者では、OKT4⁺細胞もOKT8⁺細胞も自己非T細胞刺激で増殖することはない⁵⁾。この無反応の原因は、OKT4⁺ヘルパー/インデューサー細胞によるIL 2の産生レベルの欠陥と、OKT4⁺サプレッサー前駆細胞によるIL 2レセプターの表出の欠陥に基づく⁴⁾ したがって、SLEではOKT4⁺細胞が関与するサプレッサー回路の機能は廃絶しているが、OKT8⁺細胞については、自己非T細胞で刺激したそれは、IL 2レセプターを正常に獲得でき、IL 2の添加によつて、正常の自己MLR反応を示すことができる。このことは、OKT8⁺細胞がかかわるサプレッサー経路の障害は、OKT4⁺細胞のIL 2産生不全に基づく二次的な欠陥であり、この経路は、正常T細胞因子で人為的に制御し得ることを示している。このように、疾患による自己MLRの特異的な障害部位を突きとめ、欠如した細胞群、あるいはその因子を補填して、他の免疫反応を障害することなく欠陥部位のみを活性化して、欠如した免疫応答のみを活性化できれば、自己MLRの解析が病因の解明に役立つばかりでなく、理想の

治療法の開発にも結びつく。この意味で、今後の自己MLRの一層の発展を期待したい。

文 献

- 1) Smith JB and Talal N: Significance of self-recognition and interleukin-2 for immunoregulation, autoimmunity and cancer. *Scand J Immunol* 16: 269, 1982.
- 2) Sakane T, et al: Failure of autologous mixed lymphocyte reactions between T and non-T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 3464, 1978.
- 3) Takada S, et al: Functional heterogeneities among concanavalin A-activated OKT4⁺ and OKT8⁺ cells by using autologous erythrocyte rosette technique. *J Clin Invest* 72: 2060, 1983.
- 4) 坂根 剛, 他: 全身性エリテマトーデス患者の免疫機能に関する研究: 自己リンパ球混合培養反応が担う免疫調節性回路の異常とその人為的制御. *日内会誌* 72: 1697, 1983.
- 5) Sakane T, et al: A defect in the suppressor circuits among OKT4⁺ cell populations in patients with systemic lupus erythematosus occurs independently of a defect in the OKT8⁺ suppressor T cell function. *J Immunol* 131: 753, 1983.
- 6) 村川洋子, 他: 全身性エリテマトーデスにおけるインターロイキン2の産生ならびにインターロイキン2に対する反応性の欠陥. *アレルギー* 32: 386, 1983.
- 7) Kotani H, et al: Activation of immune regulatory circuits among OKT4⁺ cells by autologous mixed lymphocyte reactions. *Clin Exp Immunol* 56: 390, 1984.