 原 著

順天堂医学 43 (1)
p. 85 ~ 97 (1997)

全身性エリテマトーデス (SLE) モデルに発見された 新しい早期活性化 CD 4⁺T 細胞亜集団

Activated CD 4⁺T cell subpopulations in murine lupus detected by monoclonal antibodies to distinct early activation antigens

赤 倉 新^{*1)} 西 村 裕 之^{*1) 2)} 服 部 進^{*1)}
SHIN AKAKURA, M. D. HIROYUKI NISHIMURA, M. D. SUSUMU HATTORI, M. D.
石 川 昌^{*1)} 鶴 井 博 理^{*1)} 広 瀬 幸 子^{*1)}
SHO ISHIKAWA, M. D. HIROMICHI TSURUI, M. D. SACHIKO HIROSE, M. D.

SLE 患者の末梢 CD 4⁺T 細胞には, 早期 T 細胞活性化抗原が高い頻度で表現されており, 自己反応性 CD 4⁺T 細胞が持続的に活性化されていることが示唆される. 今回われわれは, マウスの早期 T 細胞活性化マーカーである CD69 と NTA204 を指標に, SLE モデル (NZB×NZW) F1 マウスとその親系および健常 BALB/c マウスで検討した結果, その頻度が自己免疫系である NZB と (NZB×NZW) F1 マウスで加齢とともに異常に高まることを明らかにした. これら早期活性化 CD 4⁺T 細胞中には, 各々 CD69 と NTA204 を単独に表現する亜集団に加え, この両抗原を同時に表現する異常な亜集団が高率に出現していた. 活性化 CD69⁺CD 4⁺T 細胞や NTA204⁺CD 4⁺T 細胞に, 特定の TCR V β レパートリーの使用頻度に偏りが生じているか否かを調べたが, これらに特定の偏りは見られなかった.

マウス CD 4⁺T 細胞は, CD62L (L-セレクチン) と NTA260 抗原の表現の有無から 4 分画されるが, 早期活性化 CD 4⁺T 細胞は全て CD62L⁺NTA260⁺CD 4⁺T 細胞分画に属していた. この分画は naive T 細胞や memory T 細胞を含まない新しく認識された機能的 CD 4⁺T 細胞亜集団であり, また, サイトカイン産生能から, Th1 にも Th2 にも属さない細胞であった. NZB と (NZB×NZW) F1 マウスでは, CD 4⁺T 細胞分画が加齢とともにいちじるしくこの分画に偏るので, この分画に含まれる CD 4⁺T 細胞亜集団のさらに詳しい形質と機能を解析することが, SLE における自己反応性 CD 4⁺T 細胞の性状と, その発生機構の理解に重要な手段になるものと考えられた.

キーワード: SLE, CD 4⁺T 細胞亜集団, 早期活性化抗原

Key words: SLE, CD 4⁺T cell subset, early activated antigen

* 1) 順天堂大学医学部病理学第二講座
* 2) 桐陰学園横浜大学人間科学工学センター
* 1) Department of Pathology (II), Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan

* 2) Toin Human Science and Technology Center, Toin University of Yokohama, Kanagawa, Japan
[Sept. 13, 1996 原稿受領] (Oct. 24, 1996 掲載決定)

序 論

全身性エリテマトーデス (SLE) はその名の示す如く、全身の諸臓器に病変の現われる自己免疫疾患であり、主として免疫複合体の関与したⅢ型アレルギー疾患と考えられている。免疫学的には、二本鎖DNAを始めとする様々な核物質に対する自己抗体や種々の細胞膜物質・細胞質内物質に対する多彩な自己抗体が出現するという特徴がある。これは多彩な自己反応性B細胞が異常なクローン性増殖と分化成熟を示す結果であるが、その原因が自己反応性T細胞を含むCD4⁺T細胞亜系の機能異常と密接に関係しているという示唆がある。しかし、現在その異常の本態は明らかになっていない。SLE患者の末梢CD4⁺T細胞には、健常人のそれと比較して種々の異常がある。なかでもT細胞活性化抗原であるHLA-DR抗原や、HLA-DP抗原が高い頻度で表現されていることがよく知られている¹⁾。このことは、免疫系で主役をなすCD4⁺T細胞がSLE患者では持続的に活性化されていることを意味している。

(NZB×NZW) F1マウスは、自己免疫性溶血性貧血と軽度のSLE症状を自然発症するNZB系マウスと、非自己免疫系であるNZW系マウスとの交配第一代雑種である²⁾。このマウス系には加齢に伴い、IgGクラスの抗二本鎖DNA抗体をはじめとする種々の核物質に対する自己抗体や、種々の細胞成分に対する自己抗体が産生されるとともに、重篤なループス腎炎などヒトSLEに酷似する病態を自然発症する²⁾。(NZB×NZW) F1マウス系のSLE病態や自己抗体産生には、ヒトSLEの場合と同様に両親系由来の遺伝的多因子が関与している^{2) 3)}。特に主要組織適合遺伝子H-2やT細胞受容体(TCR)β鎖遺伝子の特有のハプロタイプと密接な相関があるところから^{3) 4)}、その自己抗体産生は、T細胞による自己抗原認識というプロセスを介した現象であることが示唆されている。実際にSLEを発症した加齢(NZB×NZW) F1マウスの脾臓細胞中には、IgGクラスの抗DNA抗体産生を補助するCD4⁺T細胞が存在すること

が証明されているし^{5) 6)}、抗CD4抗体の投与によりSLEの発症が抑制されることが報告されている⁷⁾。このような観点から、ヒトSLEにおける同様に(NZB×NZW) F1マウスのSLE発症機構にCD4⁺T細胞の免疫異常が関係していると考えられているが、これら異常CD4⁺T細胞を特徴づける細胞表面形質や、その成熟過程・機能については未だ明らかになっていない。

CD4⁺T細胞の抗原認識の経験を通じた成熟過程には、抗原を認識した経験のないnaive T細胞、抗原を認識し活性化状態にあるeffector T細胞および抗原の認識を記憶しているmemory T細胞の3つの異なる成熟度の細胞が存在する。このような機能の分化と成熟のプロセスを識別する抗原にCD62L (L-セレクトイン)⁸⁾、あるいはCD45のalternative peptide Cの表現(CD45RC)があり⁹⁾、これらを表現しているCD4⁺T細胞がともにnaive CD4⁺T細胞(ThP)の機能と対応することが認められている⁸⁾。一方われわれは、NZBマウス由来のハイブリドーマモノクローナル胸腺細胞障害性自己抗体NTA260が、やはりマウスのCD4⁺T細胞を2分画に分けうることを発見するとともに、このNTA260抗原の表現はCD45RCの表現を欠くCD4⁺T細胞では、memory CD4⁺T細胞のマーカーとなることを示した¹⁰⁾。

マウスの場合、HLA-DR抗原に相当するH-2E抗原は早期活性化T細胞のマーカーとならないし、HLA-DP抗原に相当する抗原は存在しない。今回われわれは、マウス早期T細胞活性化マーカーとして一般に知られているCD69¹¹⁾とわれわれが発見した、やはりマウスの早期T細胞活性化抗原であるNTA204抗原¹²⁾を用いて、(NZB×NZW) F1マウスに出現する早期活性化CD4⁺T細胞について、細胞表面形質の特徴やレパートリー、サイトカイン産生能からみた機能を検索し、SLEの発症に関わる異常CD4⁺T細胞の性格を明らかにすることを試みた。

材料および方法

1. マウス

BALB/c・NZB・NZW および (NZB×NZW) F1 マウスは静岡実験動物(株)(静岡市)から入手し、順天堂大学の動物実験施設にて維持した。

2. 抗体

胸腺細胞障害性自己抗体産生ハイブリドーマである NTA204 と NTA260 は、7 カ月齢の NZB マウスの脾臓細胞より作成した¹³⁾。抗 CD4 抗体・抗 CD69 抗体・抗 CD62L (L-セレクチン) 抗体・抗 TCR V β 抗体は PharMingen 社 (San Diego; CA) より購入した。抗 CD3 ϵ 抗体 (2C11) は奥村 康教授 (順天堂大学) より供与されたものを用いた。

3. フローサイトメトリ解析

1×10^6 個の脾臓細胞を適量の FITC 標識抗体・Phycoerythrin (PE) 標識抗 CD4 抗体、ビオチン標識抗体を含む 0.2% BSA, 0.1% アジ化ナトリウムを含む $40 \mu\text{l}$ の PBS (pH7.4) で、4℃ 30 分間染色した。PBS で 3 回洗浄した後、アビジン化 RED-670 (Beckton Dickinson 社 Mountain View; CA) で 4℃ 30 分間染色した。2 回洗浄し、1% パラフォルムアルデヒドを含む PBS で固定し、FACS-Vantage あるいは FACStar-plus (Beckton Dickinson) を用いて測定し、「LYSIS-II」ソフトウェアを用いて解析した。

4. T 細胞増殖因子 (TCGF) 活性の測定

固相化抗 CD3 抗体刺激による脾臓 CD4⁺T 細胞の TCGF (IL-2 および IL-4) 産生は、Cherwinski ら¹⁴⁾の方法によって測定した。 1×10^5 個の脾臓細胞を $200 \mu\text{l}$ の $50 \mu\text{M}$ の 2-メルカプトエタノール (2 ME), 10% の牛胎児血清 (FCS) を含む RPMI 1640 培地中でプレートに固相化した抗 CD3 抗体を用いて刺激し、48 時間後に上清を採取した。 5×10^3 個の HT2 細胞を上清 $50 \mu\text{l}$ を含む $200 \mu\text{l}$ の $50 \mu\text{M}$ 2 ME, 10% FCS を含む RPMI 1640 培地中で 16 時間培養した後、 $[\text{H}^3]$ thymidine (Amersham 社 Buckinghamshire; UK) を 1 ウェルあたり 14.8 kBq ($10 \mu\text{mole}$) 加え、

更に 8 時間培養した。その後細胞をセルハーベスターで採取し、取り込まれた $[\text{H}^3]$ thymidine を β 線シンチレーションカウンター (1450 Micro Beta Wallac 社, Turku; Finland) によって測定した。HT2 細胞増殖因子の活性は、Stimulation Index $\{(\text{検体による HT2 細胞の } [\text{H}^3] \text{ の取り込み量 } \langle \Delta \text{cpm} \rangle) / (\text{標準 IL-2 による HT2 細胞の } [\text{H}^3] \text{ 最大取り込み量 } \langle \Delta \text{cpm} \rangle)\}$ として表示した。

5. IL-10 と IFN- γ の測定

マウスに対する IL-10 および IFN- γ の精製抗体は PharMingen 社より入手した。脾臓 CD4⁺T 細胞培養上清中に産生される IL-10 および IFN- γ 量の測定は、「サンドイッチ ELISA 法」により実施した¹⁵⁾。

結 果

1. New Zealand マウスにおける早期活性化 CD4⁺T 細胞

図-1 は、2 カ月齢と 10 カ月齢 NZB・(NZB×NZW) F1・NZW および BALB/c 系マウスの脾臓 CD4⁺T 細胞中における早期 T 細胞活性化抗原 CD69 および NTA204 陽性細胞の頻度を表したものである。2 カ月齢ではすべてのマウス系で各々 CD69 および NTA204 陽性細胞の頻度は 10% 以下であったが、10 カ月齢において、非自己免疫系である NZW および BALB/c 系マウスではその頻度に有意の変化が見られないのに対し、自己免疫系である NZB と (NZB×NZW) F1 系マウスでは、CD69 陽性細胞率および NTA204 陽性細胞率の両者がいじりしく増加していた。特に 10 カ月齢 (NZB×NZW) F1 マウスでは CD69⁺CD4⁺T 細胞率は約 40% と異常に高率であった。

続いて、各々のマウス系の脾臓 CD4⁺T 細胞において CD69 と NTA204 発現細胞間の相互関係を調べるため、CD4・CD69・NTA204 の 3 カラー FACS 解析を行った (図-2)。その結果、2 カ月齢マウス由来の脾臓 CD4⁺T 細胞中で、CD69 陽性細胞と NTA204 陽性細胞は各々異なる集団を形成

図-1 ニュージールランド系マウスの CD4⁺T 細胞における早期活性化マーカー表現の加齢変化

それぞれのマウスの脾臓細胞を CD69 と CD4 あるいは、NTA204 と CD4 で二重染色した。CD4⁺T 細胞中の陽性細胞の頻度を示した。平均値±標準誤差は少なくとも 3 匹から 7 匹までのマウスより算出した

図-2 各マウスの脾臓 CD4⁺T 細胞における CD69 と NTA204 の表現に関する 3 カラー FACS 解析

各マウスの脾臓細胞を FITC-NTA204・PE-CD4・ビオチン化 CD69 と反応させた後、アビジン化 RED-670 と反応させた。CD4⁺細胞中の CD69 および NTA204 陽性細胞率 (%) を示した

しており、それぞれが異なる CD4⁺T 細胞亜集団であることが示された。一方、10 カ月齢 NZB・(NZB×NZW) F1 マウスで見ると、CD69 と NTA204 抗原を各々単独に表現する分画に加えて、この両者を同時に表現する細胞の出現率が上昇し、明らかに異常な活性化状態にある CD4⁺T 細胞亜

集団の出現していることが明らかとなった。このような異常活性化 CD4⁺T 細胞率の上昇は、NZB・BALB/c 系マウスには認められなかった。

2. CD4⁺T 細胞の亜分画と活性化 T 細胞

マウス CD4⁺T 細胞中において各々独立した早期活性化亜集団として存在している CD69⁺CD4⁺T 細胞・NTA204⁺CD4⁺T 細胞・CD69⁺NTA204⁺CD4⁺T 細胞が、如何なる CD4⁺T 細胞亜分画に分布しているかを検討するために、CD4⁺T 細胞を 2 分画する各々 NTA260 あるいは、CD62L (L-セレクシン) 抗原の表現の有無と CD69 および NTA204 表現との関連を 3 カラー FACS 解析で検討した。図-3 には、10 カ月齢 NZB マウス CD4⁺T 細胞における CD69 と、各々 NTA260 および CD62L の表現との関係を示してあるが、CD69 陽性細胞は NTA260 陰性で、しかも CD62L 陰性の CD4⁺T 細胞亜集団中に主に存在することが明らかとなった。同様に、NTA204 と各々 NTA260 および CD62L の表現との関係を調べたところ、結果は示していないが、NTA204 陽性細胞もその多くが

図-3 マウス脾臓 CD4⁺T 細胞における CD69 と NTA260 および CD69 と CD62L の表現の相関関係

10 カ月齢 NZB マウスの脾臓細胞を FITC-NTA260・PE-CD4・ビオチン化 CD69、あるいは FITC-CD69・PE-CD4・ビオチン化 CD62L と反応させた後、アビジン化 Red670 と反応させた。CD4⁺細胞の CD69 と NTA260 および CD69 と CD62L の表現を示した

* p<0.001

* p<0.001

図-4 ニュージージーランド系マウスにおける CD4⁺T 細胞亜分画の表現型の加齢変化

それぞれのマウスの脾臓細胞を NTA260 と CD4、あるいは CD62L と CD4 で二重染色した。CD4⁺T 細胞中の陽性細胞の頻度を示した。平均値±標準誤差は少なくとも 3 匹から 7 匹までのマウスより算出した

図-5 各マウスの脾臓 CD 4⁺T 細胞における NTA260 と CD62L の表現に関する 3 カラー FACS 解析

各マウスの脾臓細胞を FITC-NTA260・PE-CD 4・ビオチン化 CD62L と反応させた後、アビジン化 RED-670 と反応させた。CD 4⁺細胞中の CD62L および NTA260 陽性細胞率 (%) を示した

NTA260 陰性、CD62L 陰性の CD 4⁺T 細胞亜集団中に主に存在した。

3. New Zealand マウスにおける CD 4⁺T 細胞亜分画の加齢変化

図-4 は、2 カ月齢および 10 カ月齢の NZB・(NZB×NZW) F1・NZW と BALB/c 系マウスの脾臓 CD 4⁺T 細胞中の各々 NTA260 と、CD62L 陽性細胞の頻度を 2 カラー FACS 解析で調べた結果を示したものである。2 カ月齢のマウスでは系により多少の違いはあるが、平均で NTA260⁺CD 4⁺T 細胞が約 25～35%、CD62L⁺CD 4⁺T 細胞が約 54～62% を占めていた。これら細胞の加齢変化を 10 カ月齢マウスで調べたところ、非自己免疫系である NZW 系と BALB/c 系マウスでは、NTA 260⁺CD 4⁺T 細胞率と CD62L⁺CD 4⁺T 細胞率にともに加齢変化はみられなかったが、自己免疫疾患発症系である NZB 系と (NZB×NZW) F1 系マウスでこの両者に顕著な低下が認められた。

図-5 には、2 カ月齢と 10 カ月齢マウスの脾臓 CD 4⁺T 細胞における NTA260 表現と CD62L 表現と関連について 3 カラー FACS 解析した結果を示してあるが、2 カ月齢では系統間にあまり差はなく、CD 4⁺T 細胞がほぼ均等に NTA260⁻CD 62⁺ (I)・NTA260⁺CD62⁺ (II)・NTA260⁺CD62⁻ (III)・NTA260⁻CD62⁻ (IV) の 4 分画にわけられた。一方、これら各分画の加齢変化を調べたところ、NZW 系と BALB/c 系マウスではあまり差は見られなかったが、NZB と (NZB×NZW) F1 マウスでは加齢に伴って、I II III 分画の細胞がいちじるしく減少し、NTA260⁻CD62L⁻の表現型を持つ IV 分画細胞の増加がみられた。この所見は CD69⁺あるいは NTA204⁺活性化 CD 4⁺T 細胞が、NTA260⁻CD62L⁻の表現型を持つ CD 4⁺T 細胞分画に高率に認められるという先の成績と一致するもので、この IV 分画細胞中に SLE の発症に関連した異常 CD 4⁺T 細胞が存在することが強く

図-6 固相化抗 CD 3 抗体刺激による各マウス脾臓細胞からのサイトカイン産生の加齢変化

各マウスの脾臓細胞を抗 CD 3 抗体を固定化したプレート上加え、37℃・5%炭酸ガス下で72時間培養した後、培養上清中のサイトカイン量を HT 2 細胞を用いたバイオアッセイ、もしくはサンドイッチ ELISA 法により測定した。open circle は2カ月齢、closed circle は10カ月齢マウスを示す。B/W F1 は (NZB×NZW) F1 マウスを示す。平均値±標準誤差は3重検定により算出した。

示唆された。

4. CD 4⁺T 細胞亜分画のサイトカイン産生能とその加齢変化

NZB と (NZB×NZW) F1 マウスにみられるこのような CD 4⁺T 細胞亜分画の加齢変化が、CD 4⁺T 細胞機能の変化に反映されているか否かを調べるため、2 カ月齢と10 カ月齢の (NZB×NZW) F1 マウスの脾臓細胞を、種々の濃度の固相化抗 CD 3 抗体で刺激しそのサイトカイン産生能を調べた (図-6)。その結果、対照とした NZW マウスや2 カ月齢 (NZB×NZW) F1 マウスに比較し、10 カ月齢 (NZB×NZW) F1 マウスでは TCGF (IL-2 + IL-4)・IFN-γ・IL-10 の産生能がともに顕著に低下していた。NZW マウスにおいても加齢に伴う IL-10 産生能の低下はみられたが、その10 カ月齢での産生量は2 カ月齢 (NZB×NZW) F1 マウスのそれに匹敵するものであった。

5. 早期活性化 CD 4⁺T 細胞における TCR V β レパートリー

(NZB×NZW) F1 マウスに加齢とともに、いちじるしく増加する活性化 CD 69⁺CD 4⁺T 細胞や NTA204⁺CD 4⁺T 細胞に、特定の TCR V β の表現頻度に偏りが生じているか否かを、各 TCR V β レパートリーに対する抗体を用いた3 カラー FACS 解析により調べた。図-7には10 カ月齢 (NZB×NZW) F1 マウスの脾臓 CD 69⁺CD 4⁺T 細胞における各 TCR V β レパートリーの表現頻度を、CD 69⁺CD 4⁺T 細胞および2 カ月齢および10 カ月齢の (NZB×NZW) F1 マウスの総 CD 4⁺T 細胞のそれと比較してあるが、これらの間にいちじるしい差は見られなかった。また結果は示していないが、NTA204⁺CD 4⁺T 細胞に差は認められなかった。

考 察

加齢 (NZB×NZW) F1 マウスに自然発症する SLE は CD 4⁺T 細胞依存性である。従って、これらマウスの末梢のリンパ組織中には当然自己抗原に反応して、活性化状態にあると考えられる活性

図-7 (NZB×NZW) F1マウスにおけるT細胞レセプターVβ鎖レパートリーの解析

2ヵ月齢および10ヵ月齢(NZB×NZW) F1マウスの脾臓細胞を、各Vβに対するFITC標識抗体・PE-CD4・ビオチン化CD69抗体と反応させた後、アビジン化Red670と反応させた。平均値±標準誤差は少なくとも3匹以上のマウスより算出した

化CD4⁺T細胞の出現することが予測される。今回、T細胞の早期活性化マーカーであるNTA204¹²⁾とCD69¹¹⁾を指標として調べた結果、自己免疫系であるNZBと(NZB×NZW) F1マウス脾臓CD4⁺T細胞に、加齢とともに高率にこれらマーカーを表現する細胞の存在することが証明された。注目された点は、これら早期活性化CD4⁺T細胞中に各々CD69⁺CD4⁺T細胞・NTA204⁺CD4⁺T細胞・CD69⁺NTA204⁺CD4⁺T細胞という異なる活性化T細胞亜集団が存在したことである。若齢のNZBおよび(NZB×NZW) F1マウスや、若齢・老齢の非自己免疫系のマウスにも10%以下の割合で早期活性化マーカーを表現するCD4⁺T細胞が存在したが、興味あることにこれらはほぼ全てが、CD69⁺CD4⁺T細胞とNTA204⁺CD4⁺T細胞に分画され、CD69⁺NTA204⁺の形質を持つ

CD4⁺T細胞は見られなかった。このことから、自己免疫に関与する異常活性化T細胞は、CD69⁺NTA204⁺CD4⁺T細胞に属する可能性が強く示唆された。

NTA204抗原は、8ヵ月齢NZBマウス脾臓から単離されたハイブリドーマモノクローナル胸腺細胞障害性自己抗体NTA204によって認識される抗原で¹³⁾、構成的に末梢B細胞や末梢血顆粒球などに分布する抗原である。正常若齢マウスでは、末梢CD4⁺T細胞においてその発現頻度は10%未満であるが、*in vitro*でマイトゲンにより末梢T細胞を活性化すると、約3時間でその発現が誘導されるので、T細胞においては早期活性化抗原とみなされている¹²⁾。抗原の構造は未だ明らかでないが、細胞表面の糖脂質(セラミド)であり、細胞のシグナル伝達機構に関わっていることが示唆さ

れている。一方、CD69はC-タイプレクチンに共通する構造を持つ表面タンパク質であり¹⁰⁾、胸腺細胞のシグナル伝達機構に関与する分子である。胸腺ではCD4⁺CD8⁺両陽性細胞の一部がCD69陽性であるが^{16) 17)}、末梢リンパ球中ではCD69の発現頻度はわずか数%である。*in vitro*で末梢のT細胞を抗CD3抗体で活性化させると細胞は早期に一過性にCD69陽性となるので、これも早期T細胞活性化抗原とみなされている¹⁷⁾。この2つの活性化抗原で分画される末梢早期活性化CD4⁺T細胞が、異なる機能的CD4⁺T細胞亜集団の活性化なのか、異なる活性化状態、あるいは活性化過程を示しているのかについては未だ不明であるが、極めて興味深い問題であり、現在、これらT細胞亜集団の機能との関連から検討を進めている。

活性化自己反応性T細胞の自然発生の成因の一つに、内因性あるいは外因性のスーパー抗原が推定されている例がある¹⁸⁾。この仮説が正しいとしたら、活性化CD4⁺T細胞のT細胞レセプターVβ鎖レパートリーの使用頻度にいちじるしい偏りが現れるはずである。今回、この観点からSLEを発症した(NZB×NZW)F1マウスにおけるCD69陽性活性化CD4⁺T細胞のT細胞レセプターVβ鎖レパートリーの使用頻度を調べてみたが、CD69陰性CD4⁺T細胞と比較して有意な差は見られなかった。NTA204陽性とNTA204陰性のCD4⁺T細胞を比較しても、既に報告している通りで¹⁹⁾、特定のVβ鎖の使用頻度に偏りは見られなかった。一方、これら活性化CD4⁺T細胞が、自己抗原刺激で活性化された場合、特定のVβ鎖の使用頻度の解析では検索されないクローン性の増殖を示している可能性がある。今後CD69陽性およびNTA204陽性分画に、クローン性増殖を示すCD4⁺T細胞の頻度が有意に増加しているか否か検討する必要がある。いずれにしても、NZBおよび(NZB×NZW)F1マウスで早期T細胞活性化マーカーの発現が広い範囲のTCRレパートリーに及んでいることは、自己免疫現象の発現に多彩な、恐らく異なる機能を持ったCD4⁺T細胞亜集団が関与していることを示唆しており、注目に値

すると思われる。

マウスのCD4⁺T細胞の抗原認識の経験を通じた成熟過程については、抗原を認識した経験のないnaive T細胞、抗原を認識し活性化状態にあるeffector T細胞および抗原の認識を記憶しているmemory T細胞の3つの異なる成熟度にある細胞集団が存在する。このような機能の分化と成熟のプロセスを含むマウスのCD4⁺T細胞の発生過程は未だ十分に解明されていないが、末梢CD4⁺T細胞において、CD62L(L-セレクチン)あるいはCD45のalternative peptide Cの表現(CD45RC)が、naive CD4⁺T細胞(ThP)の機能と対応することは広く認められている⁸⁾。われわれはこれらのマーカーとNTA260との2色染色により、マウスのCD4⁺T細胞が4つの表現型の異なるサブセットに分画できることを発見した¹⁰⁾(図-5)。特にNTA260抗原の表現は、CD45RCの表現との組み合わせにおいてmemory CD4⁺T細胞を分画するマーカーとなるので、機能的CD4⁺T細胞亜集団の研究には極めて有用である。今回、加齢に伴いNZBや(NZB×NZW)F1マウスに出現する早期活性化CD4⁺T細胞の細胞表面形質を調べた結果、これらの大部分はCD62L⁻NTA260⁻CD4⁺T細胞分画に含まれることが明らかとなった。CD62Lの表現の有無はCD45RCのそれとほぼ一致するので、このCD62L⁻NTA260⁻CD4⁺T細胞分画は、naive CD4⁺T細胞をも、また、memory CD4⁺T細胞をも含まない分画ということになる。実際に加齢NZBや(NZB×NZW)F1マウスに存在するCD4⁺T細胞はその殆どがCD62L⁻NTA260⁻分画に属する細胞であるので、この分画に自己免疫と関連した異常CD4⁺T細胞サブセットが存在していることは明らかである。

(NZB×NZW)F1マウスにおけるこのようなCD4⁺T細胞サブセット構成の異常は、サイトカインの産生という観点から見たCD4⁺T細胞の機能異常に対応した現象である¹⁰⁾。抗原レセプターを介した刺激に対するサイトカイン産生パターンによって分画されるCD4⁺T細胞のサブセットについては、マウスの末梢CD4⁺T細胞より得られ

たCD4⁺T細胞クローン株の示すサイトカイン産生パターンに基づいて、現在、ThP Th0 Th1 Th2などの少なくとも4つ以上の機能的サブセットがあると推定されている^{20) 21)}。Th1は主にIL-2やIFN- γ を産生し、遅延型過敏症の発症に関わる細胞であるのに対し、Th2はIL-4・IL-5・IL-10などを産生し、抗体の関与する液性免疫に司る細胞である。重要な点は、これらTh1とTh2が相互に抑制的に働き、免疫系を統御している点である²¹⁾。一般に全身性自己免疫疾患では、Th2タイプのCD4⁺T細胞が優勢となって病態発症に重要な役割を果たしているという示唆があるが²⁰⁾、実際には、SLEにおける機能的CD4⁺T細胞サブセットの構成異常について詳しい検討はなされていなかった。今回、早期活性化CD4⁺T細胞の含まれるCD62L⁻NTA260⁻CD4⁺T細胞分画が大部分を占める加齢(NZB×NZW)F1マウスの脾臓細胞が、固相化CD3抗体の刺激に伴うIFN- γ ・IL-2・IL-4・IL-10産生能に顕著な低下を示すことが明らかとなり、SLEにおけるCD4⁺T細胞の異常は単純にTh1とTh2とのバランスの異常という観点のみでは説明できない現象であることが示された。なお、ヒトSLEや(NZB×NZW)F1マウスでは、種々の抗原やマイトジェンによる刺激に対してIL-2の産生能がいちじるしく低下していることがよく知られているが^{1) 22) 23)}、これは主にThP Th0を含むCD62L⁺CD4⁺T細胞やTh1を含むCD62L⁻NTA260⁺CD4⁺T細胞分画の減少によるものとして説明できる。

残された問題の一つは、何故、加齢NZBや(NZB×NZW)F1マウスにこのようなCD4⁺T細胞サブセットの構成異常が起こるのか、という点である。この点に関し、われわれは最近(NZB×NZW)F1マウスにおいて、加齢に伴いCD62Lに対する自己抗体の産生がみられることを発見した²⁴⁾。この抗体はCD62L⁺CD4⁺T細胞(naive細胞)を選択的に障害する活性がある上、これら細胞のリンパ組織へのhomingを阻害するので、(NZB×NZW)F1のCD4⁺T細胞サブセット構成の異常に関与している可能性が考えられる。一

方、ハイブリドーマNTA260抗体は8ヵ月齢NZBマウスより得られたモノクローナル胸腺細胞障害性自己抗体であり¹³⁾、この特異性を持った自己抗体がNZBや(NZB×NZW)F1マウスに高力価に存在すること、また、これらが実際に生体内においても細胞障害性を有する自己抗体であることが証明されている^{25) 26)}。従って、加齢に伴いNZBや(NZB×NZW)F1マウスにおける加齢に伴うNTA269⁺CD4⁺T細胞の消失も、NTA260様の自己抗体に依存した現象である可能性が強く示唆される。このような意味からも、SLEにみられるCD4⁺T細胞サブセット構成の異常は、CD4⁺T細胞表面の種々の分化抗原に対する自己抗体の出現に依存した現象である可能性があり、SLEに種々存在すると考えられる抗リンパ球自己抗体の特異性とその産生機序の解明が、SLEの免疫異常の発生機構を解明する上での一つの重要な課題であると思われる。

結 語

自己免疫疾患、特にSLEでは活性化T細胞が高頻度に存在することが知られている。今回、SLEモデルマウスであるNZBと(NZB×NZW)F1マウスのCD4⁺T細胞について、早期活性化抗原であるCD69とわれわれが発見したNTA204抗原を指標にして、活性化細胞を検索した結果、3種の異なるCD4⁺T細胞亜集団が活性化されていることが明らかとなった。これらの亜集団は、特にT細胞抗原受容体V β レパートリーに偏りがなかった。マウスではCD4⁺T細胞はCD62L(L-セレクチン)とNTA260抗原の表現の有無から4分画されるが、NZBと(NZB×NZW)F1マウスでは早期活性化CD4⁺T細胞は、全てCD62L⁻NTA260⁻CD4⁺T細胞分画に属していた。この分画はnaive T細胞やmemory T細胞を含まない新しく認識された機能的CD4⁺T細胞亜集団であり、サイトカイン産生能から、Th1にもTh2にも属さない細胞であった。NZBと(NZB×NZW)F1マウスでは、CD4⁺T細胞分画が加齢とともにいちじるしくこ

の分画に偏るので、この分画に含まれる CD4⁺T 細胞亜集団のさらに詳しい形質と機能を解析することが、SLE における自己反応性 CD4⁺T 細胞の形質と、その機能の理解に重要な手段になるものと考えられた。

文 献

- 1) Hishikawa T, Tokano Y, Sekigawa I, *et al.*: HLA-DR⁺T cells and deficient Interleukin-2 production in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol*, **55**: 285~296, 1990
- 2) Shirai T, Hirose S, Okada T, *et al.*: Immunology and Immunopathology of the autoimmune disease of NZB and related mouse strains. In Rihova EB and Vetvicka V eds. *Immunological Disorders in Mice*. CRC Press, Inc, N. W. Boca Raton, Fla. 95~136, 1991
- 3) Kohno A, Yoshida H, Sekita K, *et al.*: Genetic regulation of the class conversion of dsDNA-specific antibodies in (NZB×NZW) F1 hybrid. *Immunogenetics*, **18**: 513~524, 1983
- 4) Hirose S, Ueda G, Noguchi K, *et al.*: Requirement of H-2 heterozygosity for autoimmunity in (NZB×NZW) F1 hybrid mice. *Eur J Immunol*, **16**: 1631~1633, 1986
- 5) Sekigawa I, Ishida Y, Hirose S, *et al.*: Cellular basis of in vitro anti-DNA antibody production: evidence for T cell dependence of IgG class anti-DNA antibody synthesis in the (NZB×NZW) F1 hybrid. *J Immunol.*, **136**: 1247~1252, 1986
- 6) Sekigawa I, Okada T, Noguchi K, *et al.*: Class-specific regulation of anti-DNA antibody synthesis and the age-associated changes in (NZB×NZW) F1 hybrid mice. *J Immunol.*, **138**: 2890~2895, 1987
- 7) Wofsy D, Seaman WE: Successful treatment of autoimmunity in (NZB×NZW) F1 mice with monoclonal antibody to L3 T4. *J Exp Med.*, **161**: 378~391, 1985
- 8) Croft M, Bradley LM, Swain SL: Naive versus Memory CD4⁺T cell response to antigen: Memory cell are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells. *J Immunol.*, **152**: 2675~2685, 1994
- 9) Hayakawa K, Hardy RR: Murine CD4⁺T-cell subsets. *Immunol Rev.*, **123**: 145~168, 1991
- 10) Nishimura H, Hattori S, Ueda G, *et al.*: Functional CD4⁺T cell subsets defined by expression of CD45RC and NTA260 antigens and age-associated polarization in murine lupus. *Int Immunol.*, **7**: 1115~1123, 1995
- 11) Testi R, D'Ambrosio D, Maria RD, *et al.*: The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today*, **15**: 479~483, 1994
- 12) Ueda G, Hirose S, Shirai T: An early activation antigen of murine T cells recognized by monoclonal natural autoantibody NTA204 and the expression on T cells from aged (NZB×NZW) F1 mice with overt autoimmune disease. *Autoimmunity*, **12**: 117~125, 1992
- 13) Ohgaki M, Ueda G, Shiota J, *et al.*: Two distinct monoclonal natural thymocytotoxic autoantibodies from New Zealand Black mouse. *Clin Immunol Immunopathol*, **53**: 475~487, 1989
- 14) Cherwinski HM, Schumacher JH, Brown KD, *et al.*: Two types of mouse helper T cell clone III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays and monoclonal antibodies. *J Exp Med.*, **16**: 1229~1244, 1987
- 15) Mosmann TR, Schumacher JH, Fiorentino DF, *et al.*: Isolation of monoclonal antibodies specific for IL-4 · IL-5 · IL-6, and a new Th2 specific cytokine (IL-10), cytokine synthesis inhibitory factor, by using a solid phase radioimmunoassay. *J Immunol.*, **145**: 2938~2945, 1990
- 16) Vanhecke D, Leclercq G, Plum J, *et al.*: Characterization of distinct stages during the

- differentiation of human CD69⁺CD3⁺ thymocytes and identification of thymic emigrants. *J Immunol.*, **155** : 1862~1872, 1995
- 17) Yamashita I, Nagata T, Tada T, *et al.*: CD69 cell surface expression identifies developing thymocytes which audition for T cell antigen receptor-mediated positive selection. *Int Immunol.*, **5** : 1139~1150, 1993
- 18) Paliard X, West SG, Lafferty JA, *et al.*: Evidence for the effects of a superantigen in rheumatoid arthritis. *Science*, **253** : 325~329, 1991
- 19) 野口一雄, 西村裕之, 広瀬幸子, 他：全身性エリテマトーデスとT細胞レパトア. *臨床免疫*, **24** : 1501~1506, 1992
- 20) Powie F, Coffman RL: Cytokine regulation of T-cell function: potential for therapeutic intervention. *Immunol Today*, **14** : 270~274, 1993
- 21) Mosmann TR, Coffman RL: Two types of mouse helper T-cell clone: implications for immune regulation. *Immunol Today*, **8** : 223~227, 1987
- 22) Kroemer G, Martinez-AC: Cytokines and autoimmune disease. *Clin Immunol Immunopathol*, **61** : 275~295, 1991
- 23) Kroemer G, Wick, G: The role of interleukin 2 in autoimmunity. *Immunol Today*, **10** : 246~251, 1989
- 24) 服部 進, 西村裕之, 鶴井博理, 他：抗L-selectin 自然自己抗体の機能的意義. 日本免疫学会学術集会記録, **25** : 414, 1995
- 25) Shirai T, Mellors RC.: Natural thymocytotoxic autoantibody and reactive antigen in New Zealand Black and other mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, **68** : 1412~1417, 1971
- 26) Shirai T, Yoshiki T, Mellors RC. Effects of natural thymocytotoxic autoantibody of NZB mice and of specifically prepared anti-lymphocyte serum on the tissue distribution of ⁵¹Cr-labeled lymphocytes. *J Immunol.*, **110** : 517~523, 1973

Original Paper

Summary**Activated CD 4⁺T cell subpopulations in murine lupus detected by monoclonal antibodies to distinct early activation antigens**

High frequencies of CD 4⁺T cells bearing activation antigens such as HLA-DR and-DP in the blood of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) suggest that a continuous activation of autoreactive CD 4⁺T cells occurs in this disease condition. In the present studies, we analyzed spontaneously activated CD 4⁺T cells in the spleens of SLE-prone NZB and (NZB×NZW) F1 mice, using two distinct early T cell activation markers, CD69 and NTA204. A marked age-associated increase in the proportion of both CD69⁺ and NTA204⁺ activated CD 4⁺T cells was observed in NZB and (NZB×NZW) F1, but not in non-autoimmune NZW and BALB/c mice. Interestingly, there were three phenotypically separate types of activated T cells; one activated by CD69 alone, one by NTA204 alone, and one by both CD69 and NTA204. Studies of T cell receptor (TCR) V beta repertoire showed that these activated T cells had no skewed TCR V beta repertoire usages. Murine CD 4⁺T cells could be subdivided into 4 distinct subsets, either positive or negative for CD62L (L-selectin) and NTA260, an antigen detected by a hybridoma monoclonal autoantibody from autoimmune NZB mice. It was found that all three activated CD 4⁺T cell subpopulations were included in the CD62L⁻NTA260⁻CD 4⁺T cell subset. This subset was unique because it belonged to neither naive nor memory CD 4⁺T cells. It also did not function as either Th 1 or Th 2, based on its cytokine production patterns. As such CD62L⁻NTA260⁻CD 4⁺T cell subset became the major population of CD 4⁺T cells in aged NZB and (NZB×NZW) F1 mice, further phenotypical and functional analyses of this subset may provide insights into the mechanisms of the generation of autoreactive T cells responsible for the pathogenesis of SLE.

Key words : SLE, CD 4⁺T cell subset, early activated antigen

SHIN AKAKURA, M. D.¹⁾ HIROYUKI NISHIMURA, M. D.^{1) 2)}

SUSUMU HATTORI, M. D.¹⁾ SHO ISHIKAWA, M. D.¹⁾

HIROMICHI TSURUI, M. D.¹⁾ SACHIKO HIROSE, M. D.¹⁾

¹⁾ *Department of Pathology (II), Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan*

²⁾ *Toin Human Science and Technology Center, Toin University of Yokohama, Kanagawa, Japan*