T 細胞の抗原認識と情報処理

中西 守

名古屋市立大学薬学部, 〒467 名古屋市瑞穂区田辺通 3-1

Antigen Recognition and Signal Transduction in T Lymphocytes

Mamoru NAKANISHI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University,
3-1, Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya 467, Japan

Stopped-flow fluorometry gave a unique opportunity to observe a direct cellular interaction between functionally different subsets of lymphocytes *in vitro*. By this method the molecular mechanism of receptor-mediated recognition and signaling in T lymphocytes (T cells) has been well analyzed. The method is further in progress to observe calcium signals in a single T lymphocyte by using a digital imaging fluorescence microscope.

Keywords—T lymphocyte; stopped-flow; digital imaging fluorescence microscope; calcium-signal; MHC antigen; fura-2; T cell receptor; antigen presentation; suppressor T cell; cluster of differentiation 4

高等動物は免疫系の働きにより、一度感染した病気に二度とかからない。これは、抗体の作用によるところが大きい。抗体は外から侵入した細菌やウイルスに結合し、補体の助けにより、それらを殺す。しかし、抗体や補体以外にも、免疫系の蛋白質や免疫担当細胞が生体の防御に重要な役割をはたしている。中でも、T 細胞 (T リンパ球) の役割はとりわけ重要である。T 細胞の一部には自らが癌細胞などのような標的細胞を排除する機能がある。また、T 細胞は免疫応答反応全体を制御する役割も担っている。

この T 細胞に関しては、遺伝子クローニング、T 細胞ハイブリドーマ、モノクローン抗体などの技術の導入により、最近急速に研究が進んできた。しかし、T 細胞の機能を解明するには、これらの技術だけでは不十分であり、機能解析のための新しい技術を開発する必要がある。

そこで、我々はこの数年、T 細胞の抗原認識とその応答機構を追究する新しい測定法の開発に力を注ぎ、研究を進めてきた。¹⁻⁸⁾ その結果、1) 支持体上の脂質平面膜 (LB 膜) の利用と、¹⁻⁴⁾ 2) 細胞内カルシウムイオンの測定が T 細胞の機能解析に有用であることが分かった。本論文では、後者の細胞内カルシウムイオンの研究を中心に、T 細胞の抗原認識と情報処理の機構について述べることにする。⁵⁻⁸⁾

1. 抗原を認識する分子

免疫系で外来の異物 (抗原) を認識するのは抗体、B 細胞レセプター、及び、T 細胞レセプターの 3 種の蛋白質である。これらはイムノグロブリンファミリーに属し、構造の類似した一群の蛋白質である。これらの蛋白質のドメイン構造の模式図を Fig. 1 に示した。⁹⁾ 抗体は X 線結晶解析により高次構造が明らかにされているが、B 細胞レセプターや T 細胞レセプターの高次構造は未だ明らかでない。ただし、B 細胞レセプターは抗体の膜結合型の分子であり、高次構造は抗体と変らないと考えられる。また、T 細胞レセプターは抗体や B 細胞レセプターとは明らかに異なった蛋白質である。しかし、T 細胞レセプターは抗体に特徴的なドメイン構造 (immunoglobulin fold) を持っているので、T 細胞レセプターには、抗体と類似した部分構造があると想像されている。^{8,10)}

一方、抗原認識の様式に関しては、T 細胞レセプターは、抗体や B 細胞レセプターと明らかに違っている。抗体や B 細胞レセプターは外来の抗原だけを認識する。しかし、T 細胞レセプターは、外来の抗原を認識する際に、自己の目印となる膜蛋白質 (主要組織適合性抗原; MHC 抗原) を同時に認識する。T 細胞レセプターの抗原認識のモデルを Fig. 2 a と 2 b に示した。1 つの T 細胞の細胞膜上には 1 種類の抗原レセプター (T 細胞レセプター) しか存在せず、1 種類の T 細胞レセプターが、非自己の成分である外来性の抗原と自己の成分である MHC 抗原をどのように認識するかは興味深い問題である。現在は、Fig. 2 a のモデルが正しいと考えられてい

Fig. 1. Schematic Drawings of a T Cell Receptor, a B Cell Receptor and MHC Glycoproteins

る.⁹⁻¹¹⁾

2. T細胞とMHC抗原

T細胞は機能の違いにより3種類に分類される。キラーT細胞、ヘルパーT細胞、及び、サプレッサーT細胞である。そのなかで、キラーT細胞はウイルスに感染した自己の細胞や、癌化した細胞を殺す。一方、ヘルパーT細胞とサプレッサーT細胞はB細胞による抗体産生や免疫応答全般の制御を行っている。^{9,10)} キラーT細胞レセプターとヘルパーT細胞レセプターはともにFig. 1に示したような α 鎖と β 鎖のヘテロダイマーであり、両者のレセプターには蛋白質としての区別はない。しかし、キラーT細胞レセプターはMHC抗原のクラスI分子を、ヘルパーとサプレッサーのT細胞レセプターはMHC抗原のクラスII分子を認識する。MHC抗原のクラスI分子とクラスII分子もFig. 1に模式的に示した。⁹⁾ クラスI分子は臓器移植のときの組織適合性に関与する抗原蛋白質である。

3. T細胞の活性化とカルシウムイオン

T細胞は抗原を認識すると活性化され、抗原に対する免疫応答を開始する。T細胞が抗原により活性化され、細胞内にその情報が伝達される過程は、ホルモンの分泌や筋収縮などの細胞活動と類似している。外来の刺激に対し、細胞内のカルシウムイオン

(a) altered-self recognition

(b) dual recognition

Fig. 2. Alternative Hypotheses of How T Cells Recognize Antigen in Association with MHC Glycoproteins

(a) T cells have a single class of receptor that recognizes a complex of foreign antigen and self MHC glycoprotein. (b) T cells recognize foreign antigen and self MHC glycoproteins by means of two different receptors.

の濃度が上昇し、カルシウムイオンが細胞内情報伝達のセカンドメッセンジャーとして働く。¹²⁾ このため、T 細胞内のカルシウムイオンの動態の追究から、T 細胞の活性化の初期過程や抗原認識に関する情報を得ることができる。^{5-8,13-16)}

細胞内のカルシウムイオンの濃度の測定には、蛍光試薬 fura-2 や indo-1 が利用できる。これらの蛍光試薬を用いると簡便に細胞内カルシウムイオンの測定ができる。¹⁷⁾ しかし、T 細胞のように細胞間相互作用により活性化反応が進行する場合には、問題は単純でない。いかにして 2 種類の細胞の細胞間相互作用を開始させるかが重要な問題となる。

そこで、我々はこのような問題を解決するために、蛍光ストップフロー法による細胞内カルシウムイオンの測定を企てた。⁵⁻⁸⁾ 次の章で、その方法を用いた T 細胞の細胞内カルシウムイオンの測定について述べる。

4. 蛍光ストップフロー法

ストップフロー法は高速反応の測定法の 1 つである。¹⁸⁾ 2 種類の溶液を高速 (1 ミリ秒) で混合し、混合後の溶液の反応をミリ秒単位で追跡する。我々は、この方法を T 細胞の細胞間相互作用の追跡に利用した。装置の概略を Fig. 3 に示した。⁵⁾ 蛍光色素 (fura-2) で標識した T 細胞の浮遊液と標的細胞 (又は抗原提示細胞) の浮遊液を細い管を通じて窒素圧により急速に混合し、会合させ、すぐさま電磁バルブで流れを止める。その結果、会合した 2 種類の細胞は観測用セルにとどまる。T 細胞が T 細胞レセプターを介して標的細胞 (抗原提示細胞) と特異的に結合すると、その情報が T 細胞内に伝達され、T 細胞の細胞内カルシウムイオンの濃度が上昇する。その結果、fura-2 を標識した T 細胞の蛍光強度が増大する。それを光電子増倍管で検出する。この方法の特徴は窒素圧により 2 種類の細胞を急速に混合し、細胞の会合効率を増大させ、細胞間相互作用を鋭敏に検出できるところにある。^{5,6)}

例えば、ヘルパー T 細胞が抗原提示細胞 (APC) を認識した後の、細胞内カルシウムイオンの濃度上昇をストップフロー法で観測した結果を Fig. 4 に示した。⁸⁾ このカルシウムイオンの濃度上昇は、T 細胞レセプターが抗原提示細胞膜上の抗原 (外来抗原) と MHC 抗原を特異的に認識したことにより起こる。これについては後の章で詳しく述べる。

Fig. 3. Schematic Drawing of Stopped-Flow Fluorometry

Fura-2 labeled T cells were mixed with antigen-presenting cells (or target cells).

5. 細胞内でのカルシウムイオンの役割

ここで、細胞内のカルシウムイオンの増大がどのような過程で起こるものなのかについて簡単に述べる。多くの細胞では、外からの刺激に対して細胞が応答するとき、Fig. 5 に示したプロセスを経ていくものと考えられている。これは、カルシウムイオンとイノシトール三リン酸をセカンドメッセンジャーとする過程である。^{12,19)}

レセプターに結合した細胞外のシグナルは、guanosine triphosphate (GTP) 結合蛋白質を経て、ホスホリパーゼ C の活性化をまず引き起こす。この酵素はホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸 (PIP₂) をイノシトール三リン酸 (IP₃) とジアシルグリセロール (DG) に加水分解する。加水分解された IP₃ は小胞体からカルシウムイオンを遊離する。一方、DG はプロテインキナーゼ C (C キナーゼ) を活性化し、蛋白質のリン酸化を促進させる。¹⁹⁾ これらの反応の進行とともに、細胞外から細胞内へカルシウムイオンが流入して細胞の活性化が起こる。細胞内へのカルシウムイオンの流入は、イノシトール四リン酸 (IP₄) によって引き起こされるのではないかと考えられている。²⁰⁾

6. ヘルパー T 細胞と抗原提示細胞の相互作用

生体内に異物 (抗原) が侵入するとマクロファージなどの抗原提示細胞は食作用でそれを細胞内に取り込む。抗原が蛋白質の場合、細胞内のリソゾームでそれを加水分解して、抗原のフラグメントを再び細胞膜上に提示する。ヘルパー T 細胞は抗原提示細胞上のこの抗原フラグメントと MHC 抗原 (クラス II 分子) を認識して活性化される。活性化されたヘルパー T 細胞は B 細胞の増殖を促し、B 細胞を抗体を分泌する抗体産生細胞に分化する。²¹⁾

そこで、我々はこのヘルパー T 細胞と抗原提示細胞の相互作用を蛍光ストップフロー法により追究し、T 細胞の抗原認識機構を解析した。

まず、抗原として低分子の ABA-チロシン (アゾベンゼンアルソネートチロシン) を認識するヘルパー T 細胞の結果を記す。⁸⁾ ABA-チロシンを APC の浮遊液に加え、fura-2 を標識したヘルパー T 細胞の浮遊液とストップフロー装置で混合した。T 細胞の蛍光強度は Fig. 4 a のように上昇した。細胞内カルシウムイオンの濃度はおよそ 100 nM から 400 nM に上昇した。ここで用いたヘルパー T 細胞は MHC 抗原のクラス II 分子の I-A^k に特異的な (拘束性のある) ものである。²²⁾ 抗原提示細胞として I-A^k を持った細胞 (B10. BR マウス脾細胞) を用いたときは、ヘルパー T 細胞の細胞内カルシウムイオンの濃度上昇が起こる。しかし、外来抗原を加えない抗原提示細胞だけでは、ヘルパー T 細胞の細胞内カルシウムイオンの濃度は変化しなかった (Fig. 4 b)。また、MHC 抗原のクラス II 分子が異なった抗原提示細胞 (B10 マウス, I-A^b) の場合は、特異的な外来抗原 (ABA-チロシン) が存在していても、ヘルパー T 細胞にシグナルを伝達しなかった (Fig. 4 d)。特異的な MHC 抗原 (I-A^k) が必要なことは抗体を用いた阻害反応によっても確認できた。抗 I-A^k 抗体はヘルパー T 細胞のカルシウムイオンの濃度上昇をほぼ完全に阻害した (Fig. 4 c)。⁸⁾

Fig. 4. Stopped-Flow Fluorimetry Traces Indicating How Foreign Antigen and Antigen-Presenting Cells Affect Calcium Influx into Helper T Cells

(a) Fura-2 loaded helper T cells (I-A^k restricted) were mixed with a premixed solution of antigen-presenting cells (B10. BR; H-2^k) and foreign antigen (ABA-L-tyrosine) at 25°C. (b) Fura-2 loaded helper T cells were mixed with antigen-presenting cells (H-2^k) alone. (c) Fura-2 loaded T cells were mixed with a premixed solution of antigen-presenting cells (H-2^k) and foreign antigen (ABA-L-tyrosine) in the presence of a monoclonal antibody (anti-I-A^k). (d) Control experiment in which fura-2 loaded helper T cells were mixed with a premixed solution of spleen cells (B10, H-2^b) and ABA-L-tyrosine.

Fig. 5. A Model of Calcium Ions as Second Messengers for Cell Activation

このように、ヘルパー T 細胞レセプターは瞬時 (1 秒以内) に抗原提示細胞上の MHC 抗原と外来抗原の両者を認識して、T 細胞活性化のシグナルを細胞内に伝えていることが分かった。また、T 細胞の抗原認識には抗原提示細胞膜上に、膜蛋白質である MHC 抗原と外来抗原の 2 者が存在するだけで十分である。それは、MHC 抗原 (I-A^k) を精製し、人工膜リボソームに再構成したものを用いて確認できた。MHC 抗原を再構成したリボソームと外来抗原の混合溶液は、ヘルパー T 細胞に Fig. 4 a と同様なカルシウムシグナルを伝達した。^{23,24)}

7. 抗原処理の過程

前章の実験で用いた抗原 (ABA-チロシン) は低分子の化合物であった。そのため、外来抗原は抗原提示細胞と混合するだけで、瞬時に T 細胞にシグナルを伝達した。ところが、KLH (keyhole limpet hemocyanin) のような高分子の蛋白質を抗原として用いると、様相は変わってくる。KLH と抗原提示細胞を混合しておき、その溶液をヘルパー T 細胞 (KLH 特異的) に加えても、T 細胞にシグナルは伝達されない。

しかし、この場合、あらかじめ蛋白質抗原 (KLH) と抗原提示細胞とを、37°C で 1—2 時間培養しておくと、抗原提示細胞はヘルパー T 細胞にカルシウムシグナルを伝達するようになる。²⁵⁾ これは、抗原提示細胞が蛋白質抗原をエンドサイトーシスで細胞内に取込み、細胞内の加水分解酵素でフラグメントにした後に、再び細胞膜表面に提示して、抗原としての機能を発揮できるようにするからである。ストップフロー法を用いることにより、抗原提示細胞内での抗原蛋白質の処理に、1—2 時間かかることが分かった。²⁵⁾

さて、その際、蛋白質抗原は細胞内のリソゾームに運ばれ、そこで加水分解され、加水分解されたペプチドフラグメントが再び細胞膜上に移動し、T 細胞レセプターにより抗原として認識されているものと考えられる。抗原提示細胞をリソゾーム酵素の阻害剤であるクロロキニンで処理しておくと、抗原提示細胞はもはや抗原処理の能力をなくしてしまい、ヘルパー T 細胞にカルシウムシグナルを伝達しない。²⁵⁾

8. MHC 抗原と抗原フラグメントとの相互作用

先の章で見たように、外来の蛋白質は抗原提示細胞により処理され、抗原フラグメントとなり機能を発揮する。

その際、抗原フラグメントは MHC 抗原のクラス II 分子と抗原提示細胞の表面上で相互作用し、その複合体を T 細胞レセプターは認識する。

ところで、MHC 抗原は細胞に自己と非自己の識別を与えている膜蛋白質である。MHC 抗原と外来抗原の結合の仕方は、個体の免疫応答性を決定する重要な因子である。²⁶⁾ ただし、それぞれの個体が持っている MHC 抗原の種類はそれほど多くない。それでは、特定の MHC 抗原が、無数に近い外来抗原とどのように相互作用して抗原提示をすることができるのであろうか。外来抗原の種類を変え、T 細胞のカルシウムシグナルを測定することによりこの問題を検討した。

6 章の ABA-チロシンの場合、ABA-チロシンは抗原提示細胞上の MHC 抗原とは強い親和性を持っていなかった。しかし、抗原提示細胞、ABA-チロシン、ヘルパー T 細胞の 3 者が存在すれば、抗原提示細胞は速やかに T 細胞にカルシウムシグナルを伝達できた。これは、MHC 抗原と ABA-チロシンとは安定な複合体を形成しないが、T 細胞レセプターが存在すると、これら 3 分子の間で安定な会合体を形成できることを示している。

一方、KLH や卵白アルブミンなどの蛋白質を抗原とした場合には、抗原蛋白質は抗原提示細胞内でフラグメントになった後に、MHC 抗原と安定な複合体を形成した。細胞を緩衝液で洗浄しても、抗原提示細胞表面の複合体 (MHC 抗原+抗原フラグメント) は安定であり、このような抗原提示細胞はヘルパー T 細胞にカルシウムシグナルを伝達した。²⁵⁾ また、あらかじめ抗原蛋白質を試験管内で一定の長さに切断した抗原フラグメント (15—20 個のアミノ酸残基) を用いても、ヘルパー T 細胞にカルシウムシグナルを伝達した。なお、この場合、抗原フラグメントと抗原提示細胞をあらかじめ 1—2 時間培養しておく、抗原提示細胞によるヘルパー T 細胞へのシグナル伝達はより有効に起こった。

このような実験結果からは次のことが言える。外来抗原と MHC 抗原との親和性には強弱があるが、親和性の弱い外来抗原でも、条件を整えばヘルパー T 細胞にシグナルを伝達できる。MHC 抗原と外来抗原の親和性が低い場合に、ヘルパー T 細胞へ有効にシグナルを伝達するには、1) 外来抗原の量が多いか、2) T 細胞レセプターの存在下で、3 分子複合体が有効に形成できるかによっている。2) のように考えると、たとえ MHC 抗原の種類が限定されていても、T 細胞の多数のレパートリーとの組合せにより、MHC 抗原は無数の外来抗原に対応できることを示している。²⁸⁾

参考までに、T 細胞レセプターの遺伝子について調べてみる。ヒトの場合、 β 鎖の V 領域遺伝子が 70 個、D 領域遺伝子が 2 個 (それぞれ、3 通りのコドンの組合せが可能)、J 領域遺伝子が 13 個見つかった。それゆえ、 β 鎖のアミノ酸配列には、少なくとも、 $70 \times 2 \times 3 \times 13 = 5460$ 通りの組合せが存在することになる。また、DNA の組み換えとは別に、V, D, J 遺伝子の接合部近辺に多様性が導入されることも知られている。このため、 α 鎖と β 鎖が任意に結合すると考えると、約 10 億個以上もの組合せが可能である。この値は T 細胞レセプターのレパートリーの数としては十分なものであり、さまざまな抗原に対応できる。²⁷⁾

9. アクセサリー分子の役割

ヘルパー T 細胞の細胞膜上には細胞の分化の指標となる、さまざまな膜蛋白質が存在する。中でも重要なのは

Fig. 6. A Hypothetical Scheme of How Accessory Molecules May Affect Antigen Recognition by T Cell Receptors

CD3 molecules act as signal transducers and CD4 molecules stabilized a complex of a T cell receptor, foreign antigen and a MHC glycoprotein.

CD3 分子と CD4 分子である (CD=cluster of differentiation). CD3 分子は T 細胞のシグナル伝達に関与しており, T 細胞レセプターが抗原を認識した情報を細胞内に伝達する働きをしている. この CD3 分子は 5 本のポリペプチド鎖よりなり, 細胞膜上で T 細胞レセプターと会合体を形成している (Fig. 6).²⁸⁾

一方, CD4 分子の役割はよく分かっていない.^{29,30)} 1 つの説は, T 細胞と抗原提示細胞の接着に補助的な役割をはたしているという考えである. もう 1 つは, 細胞内に負のシグナルを伝達しているという考えである. そこで, CD4 分子の機能を検討するため, ストップフロー法により, ヘルパー T 細胞のカルシウムイオン濃度の測定を行った. その結果, 抗原提示細胞によるヘルパー T 細胞へのカルシウムシグナルは, 抗 CD4 抗体の存在により完全に阻害されることが分かった. しかし, 抗 CD3 抗体によるヘルパー T 細胞のカルシウムシグナルは, 抗 CD4 抗体が存在していても阻害されなかった. これらの実験からは, CD4 分子は, T 細胞と抗原提示細胞の細胞間接着を促進する補助的機能があると想像された. CD4 分子は Fig. 6 のように, MHC 抗原と相互作用しているものと考えられた.

10. サプレッサー T 細胞の作用

ヘルパー T 細胞は免疫反応を促進する機能があるが, サプレッサー T 細胞は免疫応答を特異的に抑制する.³¹⁾ サプレッサー T 細胞の作用様式はよく分かっていないが, MHC 抗原に拘束されたサプレッサー T 細胞の存在が知られている. サプレッサー T 細胞の機能を追究するため, ストップフロー法により細胞内カルシウムイオンの測定を行った.

KLH に特異的なサプレッサー T 細胞に蛍光色素 fura-2 を標識し, KLH であらかじめ抗原処理した抗原提示細胞と混合すると, サプレッサー T 細胞の細胞内カルシウムイオンの濃度が急激に上昇した. これはヘルパー T 細胞と抗原提示細胞を混合した場合と同様であった. サプレッサー T 細胞も抗原提示細胞で活性化され, 細胞内カルシウムイオンの濃度が上昇することが分かる.

次に, サプレッサー T 細胞とヘルパー T 細胞の相互作用を調べた. その結果, あらかじめ抗原提示細胞で活性化されたサプレッサー T 細胞が存在すると, ヘルパー T 細胞へのカルシウムシグナルの伝達が完全に抑制された. 一方, 活性化されたヘルパー T 細胞が存在しても, サプレッサー T 細胞のカルシウムシグナルの伝達は阻害されなかった. T 細胞間のカルシウムシグナルの阻害様式を模式的に Fig. 7 に示した. サプレッサー T 細胞からヘルパー T 細胞に, 一方向的に, カルシウムシグナルの抑制がおきていることが分かった. この場合, サプレッサー T 細胞からのカルシウムシグナルの抑制は, 細胞間相互作用と抗原特異的な可溶性因子によってい

11. 画像処理法の利用

これまでの章で蛍光ストップフロー法により, T 細胞の細胞間相互作用が追跡できることを示した. ただし,

Fig. 7. Unidirectional Inhibition of Early Signal Transduction of Helper T Cells by Suppressor T Cells

Fig. 8. A Digital Imaging Fluorescence Microscope

The fluorescence microscopic images of T cells are taken under an inverted epifluorescence microscope with a silicon-intensified target (SIT) TV camera and a U-matic video tape recorder (VTR). The fluorescence image is analyzed with digital image processors which are controlled by a microcomputer.

Fig. 9. Pseudo-Color Images of the Fura-2 Fluorescence Intensity in Rat Basophilic Leukemia Cells (RBL-2H3)

Here, the gray level at each pixel was transformed into a defined color (blue, light blue, green, pink, red, yellow, or white) to enhance subtle intensity changes which are not perceptible to the human eye.

Fig. 10. Fura-2 Fluorescence Curves for RBL-2H3 Cells after Antigen Stimulation

(a) Individual cells observed by a digital imaging fluorescence microscope at 37°C and 25°C. (b) Fluorescence changes of the whole cell suspension.

Fig. 11. Pseudo-Color Images of the Fura-2 Fluorescence of T Cells
(a) Before stimulation. (b) After stimulation by anti-CD 3 antibody.

蛍光ストップフロー装置や蛍光分光器を用いている限り、多数の細胞の平均的な振舞しか追跡できない。この章で述べる蛍光画像処理法を使うと、1 個の細胞内のカルシウムイオンの動態が観測できる。これは、多数の細胞の平均値の解析からでは得ることのできない新しい情報を提供してくれる。³²⁻³⁶⁾

画像処理法の場合も蛍光色素 fura-2 を用いる。Fura-2 を標識した細胞は倒立型蛍光顕微鏡で観察する。そして、超高感度テレビカメラ (SIT-カメラ) を用いて蛍光像を撮影する。撮影した蛍光画像は、イメージプロセッサを用いてデータの蓄積、処理、計測を行う。ただし、イメージプロセッサだけでは画像情報を多量に記録することはできない。そこで、画像メモリ (デジタルメモリ) を増設し、同時にビデオテープレコーダを用いて画像の記録と保存を行っている。ビデオテープの場合、アナログ記録なので、デジタルメモリよりも再生画像の質が幾分劣化する。しかし、デジタルメモリでは一度には数十枚の画像しか記録できないが、ビデオテープでは 1/30 秒ごとの画像を長時間にわたって連続して記録できる。細胞内カルシウムイオンの動態のように、短い時間間隔でたくさんの画像情報を記録したい場合には、ビデオテープレコーダは大変有用である。また、イメージプロセッサだけではデータ解析に不十分なので、記録したデータをパソコンに転送し、更に詳細な解析を行っている。我々が組み立てた装置の概略図を Fig. 8 に示した。Fig. 8 の装置では励起光をフィルターで切り換え、2 波長励起 (340 nm と 360 nm) の fura-2 の蛍光画像を測定し、細胞内カルシウムイオンの濃度を決定できるようにしている。^{35,36)}

12. 単一細胞内のカルシウムイオン

まず初めに、好塩基球細胞に画像解析法を適用した結果を示す。³⁴⁾ 好塩基球細胞は肥満細胞と同様に、細胞膜に免疫グロブリン E (IgE) のレセプターがあり、細胞膜に IgE が結合している。IgE に抗原が結合すると、ヒスタミンを放出してアレルギー反応を引き起こす。このアレルギー反応は細胞内カルシウムイオンの濃度上昇が引き金になって進行する。

好塩基球細胞を fura-2 で標識し、抗原を添加した後の蛍光像を画像処理した結果を Fig. 9 に示した。抗原を添加すると、十数秒の time-lag の後に、細胞内カルシウムイオンの濃度が急激に上昇する。Fig. 9 は、抗原添加後の 11 秒から 15 秒までの蛍光画像を 1 秒間隔で示した。ここでは、fura-2 を標識した細胞を 340 nm の光で励起し、500 nm の蛍光を観測している。蛍光強度を 7 段階に区別して、疑似カラーで表示した。それぞれの細胞で明るさが違うのは、蛍光色素の標識のされかたが違うからである。2 波長の蛍光強度の比から細胞内カルシウムイオンの濃度を求めると、細胞間で濃度はほとんど変わらない。

さて、Fig. 9 の写真で、細胞 b は 11 秒から 12 秒の間で青色から緑色に変化する。また、細胞 c は 13 秒から 14 秒の間でピンク色から赤色に変化する。これは、それぞれの細胞でカルシウムイオンの濃度がこの間に急激に上昇したことを示している。実際には、細胞内カルシウムイオンの濃度は 0.1 秒程度の短い時間で急激に変化する。画像処理装置で 1/30 秒間隔で撮影した結果を Fig. 10 a に示した。³⁴⁾ カルシウムイオンの濃度上昇が起きるまでの time-lag が細胞間で大きく違っていることが分かる。細胞間での time-lag の違いは低温 (25°C) で、いっそう顕著である (Fig. 10a)。

ところで、好塩基球細胞に抗原を添加する反応では、細胞間相互作用の必要はない。そのため、通常の蛍光分光器で細胞内カルシウムイオンの濃度変化を測定できる。Fig. 10 b にその結果を示した。これは好塩基球細胞の浮遊液 (3.5×10^5 cells/ml) の平均値を表している。蛍光強度は十数秒の time-lag の後に非常に緩やかに上昇し、あたかも、細胞内カルシウムイオンの濃度変化が非常にゆっくりとしたもののように見える。これは、カルシウムイオンの濃度上昇の開始時間 (time-lag) が個々の細胞で違っているために、このように見えたのである。実際には、個々の細胞でのカルシウムイオンの濃度上昇は非常に速やかに起こっているのである。ここでは、クローン化した細胞を用いているが、クローン化した細胞でも細胞間で個性があることを示している。^{34,36)}

13. T 細胞の画像解析

先の章で述べたように、単一細胞の画像解析法は細胞機能の解析に有用だと考えられる。そこで、この方法を T 細胞の機能解析に応用した。

まず、ヒト T 細胞腫瘍 (Jurkat) を、情報伝達に関与する T3 複合体 (CD3) に対する抗体で刺激すると、細胞内カルシウムイオンの濃度が速やかに上昇する。画像処理装置で T 細胞の細胞内カルシウムイオンの変化を観測した結果を Fig. 11 に示した。³⁵⁾ ここでは、2 波長励起 (340 nm/360 nm) での蛍光強度の比を測定することに

より、細胞内カルシウムイオンの濃度が直接表示できるように示した。カルシウムイオンの濃度は細胞内ではほぼ均一であることが分かる。T 細胞 (Jurkat) の場合も、抗体刺激によるカルシウムシグナルには time-lag があり、先に述べた好塩基球細胞と同様の現象が見られた。

14. ヘルパー T 細胞の画像解析

蛍光画像処理法を用いると、ヘルパー T 細胞と抗原提示細胞の相互作用を可視化して見る事ができる。Fura-2 を標識したヘルパー T 細胞をスライドガラスに接着させておき、抗原をパルスした抗原提示細胞を上から添加すると、ヘルパー T 細胞の細胞内カルシウムイオンの濃度上昇が観測できた。この場合、カルシウムシグナルの time-lag が数分あり、個々の細胞で time-lag がかなり違っていた。ただし、この場合は、抗原提示細胞の溶液をヘルパー T 細胞の上側から添加しているので、両者の反応の開始時間には細胞ごとで多少のずれがあり、time-lag の違いにはその影響もでていたと考えられた。また、抗原提示細胞によるヘルパー T 細胞のカルシウムシグナルには、MHC 拘束性が観測された。非特異的な抗原提示細胞では細胞の応答は見られなかった。⁸⁵⁾

さて、画像処理法で観測しているのは個々の細胞のシグナル応答である。このため、画像解析法ではヘテロな細胞の集団から、特定の細胞を取り出し機能解析することができる。分光器を使った浮遊細胞の実験では 100 個の細胞中で 1 個だけが刺激応答する反応は追跡できない。しかし、画像解析法ではそのような 1 個の細胞に着目し反応を追跡できる。これまでの細胞集団の実験では全く不可能であった測定を、画像解析法は可能にし、しかも、直接“見える”ようにしたのである。

おわりに

本文では、T 細胞の抗原認識と情報処理の機構について、我々の研究を中心に紹介した。細胞内カルシウムイオンの測定から、細胞膜上での抗原認識とシグナル伝達がどのように展開されているのか、少しずつ分かってきた。しかし、細胞膜を舞台にした免疫系の認識と応答の分子機構に関しては方法論の制約もあり、これまでに明らかになっていることはほんのわずかである。このような研究の今後の大いなる進展には、新しい技術と方法論の導入が必要である。ここで述べた、蛍光画像処理法もこれらの新しい技術の 1 つに数えることができるであろう。この方法が、この分野の今後の研究の進展に大いに寄与することを期待したい。

謝辞 本研究の大部分は東京大学薬学部薬品物理化学教室で行ったものであります。荒田洋治教授には終始暖かいご支援とご指導を頂きました。厚くお礼申し上げます。ここで述べた研究は薬品物理化学教室の大学院生諸君の研究成果であります。また、本研究を開始するにあたり、薬学研究奨励財団から研究奨励金を頂きました。厚く御礼申し上げます。また、文部省科学研究費 (課題番号 63480513) の助成を頂きました。

引用文献

- 1) 中西 守, 生物物理, **26**, 129 (1986).
- 2) M. Nakanishi, A. Brian, H. M. McConnell, *Molec. Immunology*, **20**, 1227 (1983).
- 3) M. Nakanishi, K. Matsumoto, S. Takahashi, *FEBS Lett.*, **192**, 66 (1985).
- 4) K. Kimura, M. Nakanishi, M. Ueda, J. Ueno, H. Nariuchi, S. Furukawa, T. Yasuda, *Immunology*, **59**, 235 (1986).
- 5) 中西 守, 代謝, **24**, 209 (1987).
- 6) N. Utsunomiya, M. Tsuboi, M. Nakanishi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 1877 (1986).
- 7) N. Utsunomiya, M. Nakanishi, *J. Biol. Chem.*, **261**, 16514 (1986).
- 8) N. Utsunomiya, M. Nakanishi, Y. Arata, T. Yasuda, S. Saito, K. Koyama, T. Tadakuma, *J. Immunol.*, **141**, 1471 (1988).
- 9) P. Marrack, J. Kappler, *Sci. Am.*, **254**, 28 (1986).
- 10) N. Hozumi, S. Tonegawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 3628 (1976).
- 11) R. H. Schwartz, *Adv. Immunol.*, **38**, 31 (1986).
- 12) M. J. Berridge, R. F. Irvine, *Nature (London)*, **312**, 315 (1984).
- 13) A. Weiss, J. Imboden, K. Hardy, B. Manger, C. Terhost, J. Stobo, *Ann. Rev. Immunol.*, **4**, 593 (1986).
- 14) A. Alcover, D. Ramarli, N. E. Richardson, H. S. Chang, E. L. Reinherz, *Immunological Rev.*, **95**, 5 (1987).
- 15) D. C. Linch, D. L. Wallace, K. O'Flynn, *Immunological Rev.*, **95**, 137 (1987).

- 16) Y. Kobayashi, N. Utsunomiya, M. Nakanishi, T. Osawa, *Immunology Lett.*, **15**, 53 (1987).
- 17) G. Gryniewicz, M. Poenie, R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.*, **260**, 3440 (1985).
- 18) K. Hiromi, M. Nakanishi, M. Tsuboi, K. Akasaka, *Protein Protease Inhibitor*, Elsevier Sci. Pub., Amsterdam, 1985, pp. 120—138.
- 19) Y. Nishizuka, *Nature* (London), **308**, 693 (1984).
- 20) R. F. Irvine, A. J. Letcher, J. P. Heslop, M. J. Berridge, *Nature* (London), **320**, 613 (1986).
- 21) B. Jones, *Immunological Rev.*, **99**, 5 (1987).
- 22) T. Tadakuma, T. Yasuda, A. Tamura, S. Saito, T. Tsumita, K. Saito, *J. Immunol.*, **134**, 122 (1985).
- 23) 中西 守, 実験医学, **6**, 37 (1988).
- 24) T. Odaka, N. Utsunomiya, M. Nakanishi, Y. Arata, T. Tadakuma, *Eur. J. Immunol.*, 投稿中.
- 25) N. Utsunomiya, M. Nakanishi, Y. Arata, Y. Asano, T. Tada, *International Immunology*, 印刷中.
- 26) P. M. Allen, B. P. Babbitt, E. R. Unanue, *Immunological Rev.*, **98**, 131 (1987).
- 27) B. Toyonaga, T. W. Mak, *Ann. Rev. Immunol.*, **5**, 585 (1987).
- 28) J. M. Williams, D. Deloria, J. A. Hansen, C. A. Dinarella, R. Loertscher, H. M. Shapiro, T. B. Strom, *J. Immunol.*, **135**, 2249 (1985).
- 29) P. M. Rosoff, S. J. Burakoff, J. L. Greenstein, *Cell*, **9**, 845 (1987).
- 30) C. Doyle, J. L. Strominger, *Nature* (London), **330**, 256 (1987).
- 31) T. Tada, K. Okumura, *Adv. Immunol.*, **28**, 1 (1979).
- 32) D. A. Williams, K. E. Fogarty, R. Y. Tsien, F. S. Fay, *Nature* (London), **318**, 558 (1985).
- 33) A. J. O'Sullivan, T. R. Cheek, R. B. Moreton, M. J. Berridge, R. D. Burgoyne, *EMBO J.*, **8**, 401 (1989).
- 34) K. Kato, M. Nakanishi, Y. Arata, R. Teshima, T. Terao, H. Miyamoto, *J. Biochem.*, **102**, 1 (1987).
- 35) 宮川武彦, 中西 守, 荒田洋治, 宮本 宏, 生物物理学会要旨集, 名古屋, 10 月 1988, s 90.
- 36) 中西 守, 細胞工学, **18**, 271 (1989).