



| | |
|---------------------|---|
| Title | [B6-1pr→B6] 脾細胞移入系における急性期移植片対宿主様反応の解析 |
| Author(s) | 原田, 博幸 |
| Description | 短縮題名: [B6-1pr→B6]における1pr-GvHの解析 |
| Degree Grantor | 北海道大学 |
| Degree Name | 博士(医学) |
| Dissertation Number | 甲第3005号 |
| Issue Date | 1992-03-25 |
| DOI | https://doi.org/10.11501/3088378 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/51158 |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | 000000249555.pdf |



①

学位論文

[B6-lpr → B6]脾細胞移入系における
急性期移植片対宿主様反応の解析

短縮題名：[B6-lpr → B6]における
lpr-GvHの解析

原田 博幸

北海道大学免疫科学研究所免疫病態部門
(主任教授：上出利光)

はじめに

免疫系は自己と非自己を区別し非自己を排除するように働くシステムであるが、ヒトにおけるSLEや慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患においては、本来自己である抗原や組織に対して抗体産生や免疫反応による組織障害が惹起される。また、多クローン性のB細胞活性化を代表とするリンパ球の異常も数多く見いだされている。それではリンパ球の異常は幹細胞のレベルですでに規定されているものなのであろうか、あるいはリンパ球が分化成熟する過程での”リンパ球分化の場”の異常によるものであろうか？

この命題に答えるために自己免疫疾患モデルマウスを用いた実験が行われてきた。すなわちヒトの自己免疫疾患モデルマウスの骨髄を正常マウスに移植する、あるいはその逆に正常マウスの骨髄を自己免疫モデルマウスに移植するものである。その結果NZB、(NZB x NZW)F₁、BXSBマウスに発症する自己免疫疾

患は骨髄の幹細胞自体に起因することが判明した^{1) - 5)}。しかし、自己免疫疾患の早期発症が単一遺伝子である lpr 遺伝子に起因する、別のヒト自己免疫疾患モデルマウスである MRL/MpJ-lpr/lpr (MRL-lpr) マウスの場合は別であった。lpr (lymphoproliferation) 遺伝子をホモ接合で持つマウスは2~3ヶ月齢より顕著となるリンパ節腫脹、異常T細胞の増加と自己免疫疾患を特徴とし、5~6ヶ月齢で半数が死亡する^{6) - 8)}。MRL-lprマウスと lpr 遺伝子のみが異なる MRL/MpJ-+/+(MRL-+) マウスの骨髄細胞を MRL-lprマウスに移植した場合には、数カ月後に宿主由来のリンパ球によるリンパ節腫脹や血中の自己抗体産生が観察される。またその逆に MRL-lprマウスの骨髄細胞を MRL-+マウスに移植した場合には移植片対宿主 (graft versus host; GVH) 様反応の消耗性疾患が発症し、2次リンパ組織の退縮が観察された (lpr-GVH)^{8) - 11)}。従って MRL-lprマウスの自己免疫疾患の場合には、幹細胞

の異常に基づくものかそれ以外の異常によるものか、この実験からは確定できなかった。しかし、このGVH様反応はlpr遺伝子のみの違いに基づくものであるので、この現象を解析することは”lpr遺伝子とはいかなるものか？”という命題に対してのアプローチとして有用であると考えられた。

我々はlpr遺伝子を正常マウスであるC57BL/6 (B6)マウスに導入した、C57BL/6-lpr/lpr (B6-lpr)マウスの脾細胞をX線照射したB6マウスに移入する([B6-lpr → B6])と、骨髄移植と同様にGVH様反応が惹起されることを見いだした。しかもこの場合、GVH様反応は脾細胞移入10日目をピークとする早期に起こり、著明なCD8⁺T細胞の増殖を主体としている^{12) 13)}。さらにキメラマウス脾細胞は、正常マウス脾細胞のマイトジェンに対する増殖反応を抑制した^{12) 13)}。

本研究ではGVH様反応の主体となるCD8⁺細胞の前駆細胞の同定と、CD8⁺陽性細胞の増殖

が起こる条件、マイトジェン反応抑制の機序
およびGVH様反応に関与するリンホカインに
ついて検討し、lpr-GVHのメカニズムを探るこ
とにより lpr 遺伝子を解析することを目的と
した。

材料と方法

1. マウス

C57BL/6J-lpr/lpr、C3H/HeJ-lpr/lpr、C57
BL/6J-gld/gld及びB6.PL-Thy1^o/Cyマウスのb
reeding pairsとMRL/MpJ-lpr/lprマウスは、
米国Jackson研究所より購入した。breeding
pairsを購入したマウスは、当研究所附属免
疫実験動物施設において繁殖維持した。C57B
L/6CrSlc、C57BL/10SnSlc、B10.BR/Sg.SnSlc、
B10.D2/nSnSlc、MRL/MpJ-+/+マウスは静岡県
実験動物農業協同組合より購入した。(B6-lp
r x MRL-lpr)F1, (B6 x MRL-+)F1, B6-lpr-Thy
1.1マウスは当教室で作製し繁殖維持した。

2. 抗体

fluorescence isothiocyanate (FITC) 標識抗 CD8 抗体 (抗 Lyt2 抗体, 53-6.7¹⁴), phycoerythrin (PE) 標識抗 CD4 抗体 (抗 L3T4 抗体, GK1.5¹⁵), biotin 標識抗 Thy1.2 抗体 (30-H12¹⁴) は米国 Becton-Dickinson 社より購入した。抗 Thy1.1 抗体 (2D3.3, 当部門で作製)、抗 CD2 抗体 (RM2-1¹⁶), Dr. Okumura より供与)、抗 CD3 抗体 (145-2C11¹⁷), Dr. Bluestone より供与)、抗 B220 抗体 (RA3-6B2¹⁸), Dr. Coffman より供与)、抗 V β 3 抗体 (KJ-25¹⁹), Dr. Marrack より供与)、抗 V β 6 抗体 (RR4-7²⁰), Dr. Kanagawa より供与)、抗 V β 11 抗体 (RR3-15²¹), Dr. Kanagawa より供与)、抗 V β 8 抗体 (F23.1²²), Dr. Bevan より供与)、抗 IL-2 レセプター α 鎖抗体 (7D4²³)、米国 American Type Culture Collection (ATCC) より購入)、抗 トランスフェリン レセプター抗体 (T17 217.1.3²⁴), ATCC) と J11d 抗体²⁵ (ATCC) は biotin 化して細胞表面の解析に用いた。抗 Thy1.2 抗体 (HO-13.4²⁶), ATCC)、抗 Lyt2.2

抗体 (HO-2.2²⁷), ATCC)、抗 L3T4 抗体 (GK1.5¹⁵
)、Dr. Fitch より 供与)、抗 B220 抗体 (RA3-3A1¹⁸)、Dr. Coffman より 供与) と抗 ラット Igκ 鎖
抗体 (MAR18.5²⁸) は、補体依存性細胞障害に
用いた。

3. 細胞の調整

マウスより脾臓を無菌的に取り出しホモジ
ナイザーにより RPMI-1640 (Gibco 社) 液中に
単一浮遊細胞とし、トリス塩化アンモニウム
溶液にて赤血球を取り除き、最後に完全培養
液 (10% FCS, 2×10^{-5} M 2-メルカプトエタノー
ル、200 μ g/ml 硫酸カナマイシン、2 mM L-グ
ルタミン添加 RPMI-1640) でそれぞれの細胞
濃度を調整した。培養は 37°C, 5% CO₂ インキュ
ベーター内で行った。

4. キメラマウスの作製

9 Gy の全身 X 線照射を宿主マウスに行い、
翌日トリス塩化アンモニウム処理にて赤血球

を除去した lpr マウスの脾細胞 (5×10^7 / 匹) を宿主の後眼窩静脈叢より静注し、キメラマウスを作製した。脾細胞供与者としては 3-4 ヶ月齢の lpr マウスを用い、宿主としては 2-3 ヶ月齢のマウスを用いた。

5. 供与者細胞の分画

供与者脾細胞をモノクローナル抗体と共に 4°C で 30 分間培養後遠心し、上清を捨て抗ラット Ig κ 鎖抗体を加えさらに 4°C で 30 分間培養した。遠心後上清を捨て、補体 (ウサギ血清) と共に培養 (37°C , 30 分) した。lympholyte M (Cedarlane 社) による比重遠心法により死細胞を除去した。分画した細胞の純度は 90% 以上であった。

6. 細胞表面抗原の検索

キメラマウス脾細胞 5×10^5 個に FITC 標識抗 CD8 抗体と PE 標識抗 CD4 抗体、あるいは FITC 標識抗 CD8 抗体と biotin 標識抗体を加え、 4°

Cで30分インキュベートした。biotin標識抗体を用いた場合は細胞を遠心し上清を捨てた後、さらにstreptavidin-PE (biomeda社)を加え4°Cで30分インキュベートした。その後、死細胞を識別するためにpropidium iodide (Sigma社) ($2 \mu\text{g/ml}$)を加えて遠心し、細胞をリン酸緩衝液 pH7.2に浮遊させFACSscan (Becton Dickinson社)にて解析した。

7. 細胞増殖抑制活性の測定

B6マウスの脾細胞 (2.5×10^5 / 穴) と 30 Gy の X線照射したキメラマウスの脾細胞 (2.5×10^5 / 穴) を 96 穴マイクロプレート (No. 3595; Costar社) 中で concanavalin A (Con A) (Pharmacia社) $4 \mu\text{g/ml}$ 、または lipopolysaccharide (LPS) (Sigma社) $50 \mu\text{g/ml}$ の存在下で 2 - 4 日間混合培養した。ハーベストの 6 時間前に $^3\text{H-TdR}$ (17.5 kBq/穴) でパルスし、その取り込み量により増殖抑制能を測定した。

8. 可溶性因子による細胞抑制活性の測定

ミリセル (Millipore社) を用いて下層に B6 マウスの脾細胞 (2.5×10^6 / 穴) を上層に 30 Gy の X 線を照射したキメラマウスの脾細胞を 24 穴プレート中で LPS ($50 \mu\text{g/ml}$) と共に 3 日間培養し増殖抑制活性を測定した。ハーベストの 6 時間前に 1 穴の下層の細胞を 96 穴プレートの 3 穴に分注し ^3H -TdR でパルスし、その取り込み量により増殖抑制能を測定した。

9. Reverse transcriptase - polymerase chain reaction (RT-PCR)

5×10^6 個のキメラマウス脾細胞から Chomczynski らの方法²⁹⁾により RNA を抽出し、1 サンプルあたり 20 ng の RNA から逆転写酵素 (BRL社) により complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) を作製後、PC-700 (アステック社) で PCR を 94°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 60 秒の条件にて 27 サイクル行なった。PCR 産物を 4% アガロース (Nusieve 3:1; FMC bioproduct社) 上で

電気泳動を行なった後、エチジウムブロマイド (0.5 μ g/ml) で染色し、紫外線下で目的のバンドを確認した。

結果

1. マウス種間における急性GVH様反応の差異

図1に種々のlprマウスを脾細胞の供与者とし、同系の正常マウスを宿主としたキメラマウスの10日目における脾細胞のCD4/CD8抗原の発現を示す。[B6-lpr \rightarrow B6]キメラでは供与者の脾細胞中CD4⁺細胞が6%、CD8⁺細胞が3%であったが、移植後10日目には、宿主中でCD8⁺細胞の著明な増加がみられた。[MRL-lpr \rightarrow MRL-+]及び[C3H-lpr \rightarrow C3H]キメラでは供与者の脾細胞中のCD4⁺細胞はそれぞれ15%、13%であり、CD8⁺細胞はそれぞれ8%、6%であったが、CD8⁺細胞の増殖はみられなかった。[B6-lpr \rightarrow B6]キメラではCD8⁺細胞の増殖に引き続き2週以内に著明な脾の線維化がみられるので本研究ではCD8⁺細胞の増殖を早期lp

r-GVHの指標とした。

2. CD8⁺細胞表面抗原の検索

表1にCD8⁺細胞の表面抗原を示す。lpr異常T細胞がCD8⁺T細胞に分化するという報告があるが³⁰⁾、この細胞にはT細胞のマーカーであるThy1, CD3抗原は発現されていたがlpr異常T細胞に発現されているCD45R³¹⁾、J11d抗原³²⁾は発現されていなかった。また、活性化T細胞のマーカーであるIL-2R α 鎖²³⁾やトランスフェリンレセプター³³⁾も発現されていなかった。また、V β 8の発現はB6-lprマウスのCD8⁺細胞と変わりなく、表には示していないがV β 3, V β 6, V β 11の発現も変わりなかった。

3. GVH様反応における宿主側条件

上記のマウス種間におけるGVH様反応の差異が宿主により規定されているか否かを検討するため、[(B6-lpr x MRL-lpr)F₁ → (B6 x

MRL-+)F₁][[F₁-lpr → F₁-+]), [F₁-lpr → B6]及び[F₁-lpr → MRL-+]脾細胞キメラを製作した。表2に示すように[F₁-lpr → F₁-+], [F₁-lpr → B6]ではCD8⁺細胞の著明な増加がみられたが、[F₁-lpr → MRL-+]ではこの現象はみられなかった。この場合、前2者の宿主で発現され、後者の宿主で発現されていない抗原としてH-2^b抗原がまず考えられた。そこで、この早期のGVH様反応が宿主の主要組織適合抗原(MHC)に規定されているかどうか検討した。

4. CD8⁺細胞の増殖におけるMHCの関与

(B6-lpr x MRL-lpr)F₁マウスの脾細胞をX線照射したB10(H-2^b), B10.BR(H-2^k), B10.D2(H-2^d)マウスに移入し、キメラ脾細胞におけるCD8⁺細胞の増殖を検討した。表3の示すように、いずれの宿主においてもB6-lpr → B6脾細胞移入系でみられるような早期のGVH様反応が観察された。従って、早期のGVH様

反応を規定する宿主側の遺伝子は MHC 以外の遺伝子であることがわかった。

5. gld マウスとの相違

C57BL/6-gld/gld (B6-gld) マウスは B6-lpr マウスと同様にリンパ節腫脹、lpr マウスと同じ細胞表面抗原を持つ異常リンパ球の増殖と自己免疫疾患を特徴とするマウスである³⁴⁾。また gld 遺伝子も単一遺伝子であるが、[lpr x gld]F₁ マウスが自己免疫疾患を発症しないことから lpr 遺伝子とは別の遺伝子であることが確認されている^{34), 35)}。このマウスを宿主あるいは供与者として用いた時、[B6-lpr → B6] 脾細胞キメラマウスと同様の CD8⁺細胞の増殖がみられるかどうか検討した。表 4 に示すように CD8⁺細胞の著明な増殖が見られたのは、lpr マウスが供与者の組合せのみであり、gld マウスを供与者とした場合は、CD8⁺細胞の増加はみられなかった。

6. CD8⁺細胞の増殖に必須な細胞の解析

[B6-lpr → B6]脾細胞移入系ではMHCやマイナー抗原の違いに基づくGVH反応ではみられない極端なCD8⁺細胞の増加が認められる。このキメラマウスの脾において認められるCD8⁺細胞は、供与者であるlprマウスの脾CD8⁺細胞が増殖したものと考えられるが、Buddらはlprマウスの異常T細胞、すなわちThy1⁺B220⁺CD4⁻CD8⁻T細胞を一定条件の基で培養するとCD8⁺細胞に分化すると報告している³⁰⁾。そこでキメラマウスで増殖しているCD8⁺細胞はlpr CD8⁺細胞がそのまま増殖したものか、B220⁺T細胞が分化したものであるのか検討した。供与者となるlprマウスの脾細胞を各種モノクローナル抗体と補体で処理し、特定のサブセットを欠落させてB6マウスに移入した。

表5に示すように、抗CD4抗体と補体で処理したB6-lprマウスの脾細胞をB6マウスに移入しても、補体のみで処理した群と同様

に CD8⁺細胞の増加がみられた。しかし、抗 Thy1.2、抗 CD8、抗 B220抗体と補体で処理した群では、CD8⁺細胞の増加は認められなかった。また、抗 CD8抗体と抗 B220抗体でそれぞれ処理した脾細胞を同時に宿主に移入しても CD8⁺細胞の増殖が認められた。この結果より、キメラマウス CD8⁺細胞の前駆細胞は CD8⁺細胞または B220⁺細胞であると考えられた。

7. CD8⁺細胞の前駆細胞の解析

キメラマウスの脾で増加している CD8⁺細胞の直接の前駆細胞を決定するために、当教室において B6-lprマウスと B6-Thy1.1マウスより B6-lpr-Thy1.1マウスを作製し脾細胞移入実験を行った。すなわち B6-lpr-Thy1.1マウス由来の CD8陽性細胞と、CD8陽性細胞を欠落させた B6-lpr(Thy1.2)由来の脾細胞を混合して B6マウスに移入した(表6)。10日後に脾細胞を FACScan で解析すると CD8⁺細胞の増殖がみられ CD8⁺細胞のほぼ100%が Thy1.1陽性であった。したがってキメラ脾では供与者の

CD8⁺細胞がそのまま増殖しているのであり、そのためには B220⁺細胞もまた必要である事が示唆された。

8. キメラ脾細胞のサップレッサー活性

これまで [B6-lpr → B6]キメラ脾に CD8⁺T細胞が増加することを示してきた。[B6-lpr → B6]キメラ脾細胞中には、正常マウスリンパ球のマイトジェンに対する増殖を抑制する活性があることが知られている^{12), 13)}。そこで、この抑制活性の機序と CD8⁺T細胞との関わりについて検討した。

まず、この抑制活性に細胞間の接触が必要であるかどうかを検討した。30 Gyの X線を照射したキメラマウスの脾細胞を、ミリセル内に入れて細胞間接触を阻止し、B6マウス脾細胞の Con A および LPS 増殖反応系に加えて抑制活性を測定した。図 2 に示すように細胞間接触の無い状態で培養すると、Con A に対する増殖反応は全く抑制されなかったが、LPS 反応

は細胞間接触のある状態と比べ、50%程度抑制された。従って Con Aによる増殖反応の抑制には、キメラ脾細胞 - B6脾細胞の細胞間接触が必要であり、LPSによる増殖反応の抑制には細胞間接触による部分と、可溶性の因子による部分とがあることが示唆された。

9. LPS反応を抑制する可溶性因子の同定

一般的にインターフェロン- γ (IFN- γ)が、LPSに対する増殖反応を抑制することが知られている³⁶⁾。そこで前の実験で認められたLPS反応抑制(図2)にIFN- γ が関与しているか否かを検討した。ミリセルを用いてキメラ脾細胞とB6脾細胞の接触を断ち、更にモノクローナル抗IFN- γ 抗体を加えて、LPSに対する増殖反応を測定した。図3に示すように、加える抗体量に依存して抑制が解除されている。したがって、LPS反応を抑制する可溶性因子の大部分はIFN- γ によるものであることがわかった。

1 0 . サ ッ プ レ ッ サ ー 細 胞

Con A 反 応 抑 制 と LPS 反 応 抑 制 に 関 与 し て い
る 細 胞 に つ い て 検 討 し た 。 図 1 に 示 す よ う に
[B6-lpr → B6]キメラマウスの脾細胞はCD8⁺
細 胞 と CD8⁻細 胞 に 二 分 さ れ る の で 、 ソ ー テ イ
ン グ に よ り こ れ ら の ポ ピ ュ レ ー シ ョ ン を 純 度
99%以上で分離し、それぞれの抑制活性を測定
した。図4に示すように、Con A 反 応 抑 制 に
は CD8⁺細 胞 の み が 関 与 し 、 CD8⁻細 胞 は 関 与 し
て い な か っ た 。 し か し 可 溶 性 因 子 に よ る LPS
反 応 抑 制 に は CD8⁺細 胞 と CD8⁻細 胞 の 両 方 が 関
与 し て い た 。

1 1 . P C R 法 に よ る サ イ ト カ イ ン 産 生 の 検 討

RT-PCR法を用いてCD8⁺細胞とCD8⁻細胞のサ
イトカインmRNAを調べた。表7に示すように
CD8⁺細胞からはIFN- γ 、CD8⁻細胞からはTNF-
 α のmRNAが検出された。また、経時的にサイ

トカイン mRNA を調べると IFN- γ は day 8 以降に、
TNF- α は day 10 に検出された。

考 察

本研究は、B6-lpr の脾細胞を致死量の X 線を照射した B6 マウスに移入した際にみられる、特異的な lpr-GVH について研究したものである。lpr-GVH の際に出現するエフェクター細胞は、lpr 遺伝子の違いに基づく抗原刺激、または未知の刺激によって活性化され増殖していると考えられる。従って、エフェクター細胞の起源、増殖の条件および機能を解析することは、その違いを解明するうえでひとつの指標となると考えられた。これらの点に基づき以下に考察を述べる。

1. CD8⁺細胞増加の条件

[lpr \rightarrow +] 脾細胞キメラマウスにおいて移植後 10 日目に CD8⁺細胞の著明な増加がみられるのは、供与者が B6-lpr で宿主が B6 あるいは

B10のマウスの場合のみであり、これは宿主のMHCには依存しなかった。B6、B10マウスは、元来脾においてCD8⁺細胞の割合が他の系統のマウスに比べて高く、CD8⁺細胞の増殖能も高いことが知られている³⁷⁾。従って[B6-lpr → B6]脾細胞移入系においてCD8⁺細胞が著明に増加することには、B6マウスの背景遺伝子が深く関与している可能性がある。しかし、[B6 → B6]、[B6-lpr → B6-lpr]脾細胞移入系ではCD8⁺細胞の増加はみられないことから、CD8⁺細胞の増加が早期lpr-GVHを反映していることは明かである。[MRL-lpr → MRL-+]または[C3H-lpr → C3H]脾細胞移入系では明かな早期lpr-GVHが認められないので、[B6-lpr → B6]脾細胞移入系は早期lpr-GVHを解析する上で有用なモデルと言える。

gldマウスはlprマウスと同様にリンパ節腫脹、自己抗体の産生、異常T細胞の増殖を特徴とするマウスであり、5ヶ月齢以降腫脹リンパ節が退縮し始めるまで、病態の表現型か

ら lpr マウスと区別するのは晩期まで不可能である³⁴⁾³⁵⁾。Allenらは [C3H-gld → C3H] 骨髄キメラマウスでは GVH様の反応は起こらず、このキメラマウスは gldマウスの表現型を示してくることを報告している³⁸⁾。本研究においても、[B6-gld → B6]脾細胞移入系では CD8⁺細胞の増加は認められなかった。また、[B6-lpr → B6-gld]脾細胞移入系で CD8⁺細胞の増加が認められたことから、正常マウスに存在する lpr-GVH起因性の刺激に関しては gldマウスは無反応であり、むしろ正常マウスと同様に lpr-GVHを惹起させる抗原もしくは環境を内在していることが示唆された。

Okuyamaら³⁹⁾は、CD8⁺細胞を特異的に障害する L-leucyl-L-leucine methyl ester⁴⁰⁾で処理した B6-lpr脾細胞を X線照射した B6マウスに移入するとキメラマウスで CD8⁺細胞が増加しないことを示した。本研究でも B6-lprマウスの特定のサブセットを欠落させて B6マウスに移入する実験から、CD8⁺細胞が必須であ

ることが示唆された。Budd³⁰⁾らは、B220⁺T細胞をPMAとIL-2の存在下で培養すると、この細胞がCD8⁺細胞に分化すると報告している。従って、[B6-lpr → B6]脾細胞移入系で増加しているCD8⁺細胞も、B220⁺T細胞から分化している可能性が考えられた。しかし本研究において、[B6-lpr → B6]脾細胞移入系で増加しているCD8⁺細胞の前駆細胞は、供与者lprマウスのCD8⁺細胞であることが明らかとなった。

2. マイトジェン反応抑制の機序

[B6-lpr → B6]脾細胞移入系で誘導されるサプレッサー細胞が、正常マウス脾細胞のCon Aによる増殖反応を抑制するためには、キメラマウス脾細胞と正常マウス脾細胞との細胞間接触が不可欠であった。しかしこのサプレッサー細胞に、B6 Con A blastに対するCTL活性もNK活性も無いことが報告されている^{12) 13)}。また、キメラマウス脾細胞のエステラーゼ活性も正常B6脾細胞と同程度であ

る (data not shown)。従って、サップレッサー細胞による Con A 増殖反応抑制は Con A 反応細胞の障害を伴わず、細胞間接触を介して何らかの増殖抑制シグナルが Con A 反応細胞に伝達されると考えられる。本研究でキメラマウス CD8⁺細胞から LPS による増殖反応を抑制する IFN- γ が産生されていることが示唆されたが、キメラマウス脾細胞の培養上清からは定法では IFN- γ は検出されず、PMA を培養中に添加することで検出されるようになることが報告されている⁴¹⁾。本研究における LPS 反応抑制の実験系には PMA など通常の T 細胞を活性化する物質は添加されていないが、RT-PCR 法でもキメラ脾細胞に IFN- γ の mRNA が検出されたことから、定法の検出感度以下の IFN- γ がキメラ脾細胞より産生され LPS 反応を抑制している可能性が示唆された。

3. [B6-lpr \rightarrow B6] 脾細胞キメラマウスにおける CD8⁺細胞増殖の機序

lpr-GVH における CD8⁺細胞の増殖を従来の

GVH の概念で考えると、正常マウスに lpr マウスで欠損している抗原 (lpr 関連抗原) を想定し、その抗原を lpr CD8⁺ 細胞が認識して増殖していると考えることができる。しかもこの場合、lpr リンパ球と正常リンパ球でリンパ球混合反応の起こらないこと¹⁰⁾、供与者と宿主の MHC が異なっているにもかかわらず、MHC 不適合の GVH 反応では認められない著明な CD8⁺ 細胞の増殖が起こることから、供与者の抗原提示細胞が宿主の lpr 関連抗原を提示し、それを CD8⁺ 細胞が認識していると推測される。Boogら⁴²⁾ は、樹状細胞からの抗原刺激による CD8⁺ 細胞の活性化の際には CD4⁺ 細胞が必要ないことを報告している。[B6-lpr → B6] 脾細胞キメラマウスでも CD8⁺ 細胞の増殖に CD4⁺ 細胞は必要なく、T 細胞レセプターを介する一般的な T 細胞活性化の際にみられる IL-2 や IL-4 などの T 細胞増殖性のサイトカインの mRNA の発現、IL-2 レセプターの発現が見られないことから、CD8⁺ 細胞の増殖には樹状細胞の関与が重要で

あるかも知れない。[B6-lpr → B6]脾細胞キメラマウスにおける樹状細胞の機能に関する検索が今後の課題と思われる。

結論

1. [B6-lpr → B6]脾細胞キメラマウスにおいて増殖しているCD8⁺細胞はIFN- γ を産生し、その後の2次リンパ組織の線維化を引き起こす可能性が示唆された。
2. [B6-lpr → B6]脾細胞キメラマウスにおいて、lpr CD8⁺細胞がB220⁺細胞の存在下で増殖していることが判明した。
3. lpr CD8⁺細胞は、B6あるいはB10系マウスに存在する抗原もしくは環境を認識して増殖していることが示唆された。
4. 上記の抗原もしくは環境が、lprマウスと正常マウスの差異である可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるに当たり、御指導、御校閲を賜りました上出利光教授に深甚なる謝意を表します。また、御指導を賜りました奥山春枝名誉教授、ならびに小林清一助手に深謝致します。

文献

- 1) Morton, J. I., and Siegel, B. V.: Transplantation of auto-immune potential I. Development of antinuclear antibodies in H-2 histocompatible recipients of bone marrow from New Zealand Black mice. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71: 2162-2165, 1974.
- 2) Morton, J. I., and Siegel, B. V. : Early autoantibody formation in lethally irradiated or drug-treated H-2-compatible recipients of preautoimmune NZB bone marrow or fetal liver cells. *Transplantation*, 17: 624-626, 1974.
- 3) Jyonuchi, H., Kincade, P. W., Good, R. A., and Fernandes, G.,: Reciprocal transfer of abnormalities in clonable B lymphocytes and myeloid progenitors between NZB and DBA/2 mice. *J. Immunol.* 127: 1232-1235, 1981
- 4) Akizuki, M., Reeves, J. P., and Steinberg, A. D., : Expression of autoimmunity by NZB/NZW marrow. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 10: 247, 1987.
- 5) Eisenberg, R. A., Izui. S., McConahey, P. J., Hang, L.M., Peters. C. J., Theofilopoulos, A. N., and Dixon, F. J., : Male determined accelerated autoimmune disease in BXSB

- mice: Transfer by bone marrow and spleen cells. *J. Immunol.* 125: 1032-1036, 1980.
- 6) Andrews, B. S., Eisenberg, R. A., Theofilopoulos, A. N., Izui, S., Wilson, C. B., McConahey, P. J., Murphy, E. D., Roths, J. B., and Dixon, F. J.: Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunological manifestations in several strains. *J. Exp. Med.* 148:1198-1215, 1978.
- 7) Izui, S., Kelley, V. E., Masuda, K., Yoshida, H., Roths, J. B. and Murphy, E. D.: Induction of various autoantibodies by mutant gene *lpr* in several strain of mice. *J. Immunol.* 133:227-233, 1984.
- 8) Theofilopoulos, A. N., and Dixon, F. J.: Etiopathogenesis of murine SLE. *Immunol. Rev.* 55:179-216, 1981.
- 9) Theofilopoulos, A. N.: Role of the thymus in murine SLE and cellular transfer of the disease. *Arthritis Rheum.*, 25: 276, 1982
- 10) Theofilopoulos, A. N., Balderas, R. S., Gozes, Y., Aguado, M. T., Hang, L., Morrow, P. R and Dixon, F. J.: Association of *lpr* gene with graft-vs-host disease-like syndrome. *J. Exp. Med.*, 162: 1-18, 1985.

- 11) Fujiwara, W. and Kariyone, A. : One-way occurrence of graft-versus-host disease in bone marrow chimeras between congenic MRL mice. *Immunology*, 53: 251-256, 1984.
- 12) 松永 崇: [lpr/lpr→+/+キメラマウスにおける移植片対宿主 (GvH)様反応発症機序の解析. *北海道医学雑誌*, 62: 779-789, 1987.
- 13) Matsunaga, T., Kobayashi, S., Harada, H., Kawaguchi, Y., Wang, W., and Okuyama, H.: Analysis of the mechanism of graft-versus-host-like disease in B6 mice with transferred B6-lpr spleen cells. *Autoimmunity*, 8: 307, 1991.
- 14) Ledbetter, J. A. and Herzenberg, L. A. : Xenogenic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens. *Immunol. Rev.* 47: 63-90, 1979.
- 15) Diaynas, D. P., Wilde, D. B., Marrack, P., Pierres, A., Wall, K. A., Hawran, W., Otten, G., Loken, M. R., Pierres, M., Kappler, J. and Fitch, F. W. : Characterization of the murine antigenic determinant designated L3T4a, recognized by monoclonal antibody GK1.5: expression of L3T4a by functional T cell clones appears to correlate primarily with class II MHC reactivity. *Immunol. Rev.* 74: 29-56,

1983.

- 16) Yagita, H., Nakamura, T., Asakawa, J., Matsuda, H., Tansyo, S., Ligo, Y. and Okumura, K. : CD2 expression in murine B cell lineage. *Int. Immunol.* 1: 94-98, 1989.
- 17) Leo, O., Foo, M., Sachs, D. H., Samelson, L. E. and Bluestone, J. A. : Identification of a monoclonal antibody specific for a murine T3 polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83: 1374-1378, 1987.
- 18) Coffman, R. L. and Weisman, I. L. : B cell-specific member of the T200 glycoprotein family. *Nature* 289: 681, 1981.
- 19) Pullen, A. M., Marrack, P. and Kappler, J. W. : The T-cell repertoire is heavily influenced by tolerance to polymorphic self-antigens. *Nature* 335: 27, 1988.
- 20) Kanagawa, O., Plamer, E. and Bill, J. : The T cell receptor V β 6 domain imparts reactivity to the Mls-1a antigen. *Cell. Immunol.* 119: 412-426, 1989.
- 21) Bill, J., Kanagawa, O., Woodland, D. L. and Palmer, E. : The MHC molecule I-E is necessary but not sufficient for the clonal deletion of V β 11-bearing T cells. *J. Exp. Med.* 169: 1405-1419, 1989.

- 22) Staerz, U. D., Rammensee, H. G., Benedetto, J. D. and Bevan, M. J. : Characterization of a murine monoclonal antibody specific for an allotypic determinant on T cell antigen receptor. *J. Immunol.* 134: 3994-4000, 1985.
- 23) Malek, T. R., Robb, R. J. and Shevach, E. M. : Identification and initial characterization of a rat monoclonal antibody reactive with the murine interleukin 2 receptor-ligand complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80: 5694-5698, 1983.
- 24) Lesly, J., Hyman, R., Schulte, R., and Trotter, J. : Expression of transferrin receptor on murine hematopoietic progenitors. *Cell. Immunol.*, 83: 14-25, 1984.
- 25) Bruce, J., Symington, F. W., McKearn, J., Spent, J. : A monoclonal antibody discriminating between subset of T and B cells. *J. Immunol.*, 127: 2496-2501, 1981.
- 26) Marshak-Rothstein, A., Fink, P., Gridley, T., Raulet, D. H., Bevan, J. M. and Geftter, M. L. : Properties and applications of monoclonal antibodies directed against determinants of the Thy-1 locus. *J. Immunol.* 122: 2491-2497, 1979.

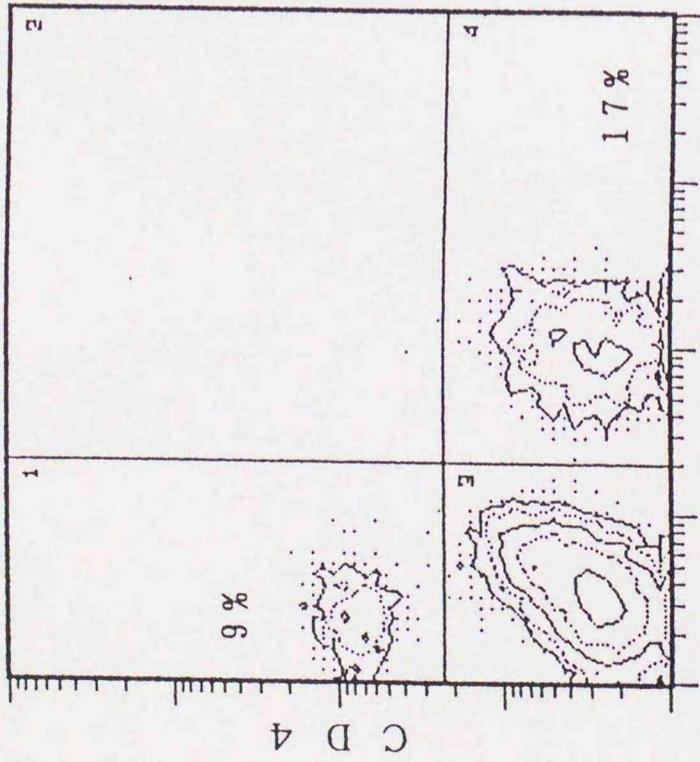
- 27) Raulet, D. H., Gottlieb, P. D. and Bevan, M. J. :Fractionation of lymphocyte populations with monoclonal antibodies specific for Lyt-2.2 and Lyt-3.1. *J. Immunol.* 125: 1136-1143, 1980
- 28) Lanier, L. L., Gutman, G. A., Lewis, D. E., Griswold, S. T. and Warner, N. L. :Monoclonal antibodies against rat immunoglobulin chains. *Hybridoma* 1: 125, 1982.
- 29) Chomczynski, P. and Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162: 156-159, 1987.
- 30) Budd, R. C., MacDonald, H. R., Lowenthal, J. W., Davignon, J. L., Izui, S. and Cerottini, J. C. :Growth and differentiation in vitro of the accumulating, Lyt2-/L3T4- subset in lpr mice. *J. Immunol.*, 135: 3704-3711, 1985.
- 31) Dumont, F. J., Habbersett, R. C., Nichols, E. A., Treffinger, J. A. and Tung, A. S. :A monoclonal antibody (100C5) to the Lyt2- T cell population expanding in MRL/MpJ-lpr/lpr mice detects a surface antigen normally expressed on Lyt2+ cells and B cells. *Eur. J. Immunol.* 13 : 455-459, 1983.

- 32) Seth, A., Pyle, R. H., Nagarkatti, M. and Nagarkatti, P. S. : Expression of The J11d marker on peripheral T lymphocytes of MRL-lpr/lpr mice. J. Immunol., 141: 1120-1125, 1988.
- 33) Takei, F., : Two surface antigens expressed on proliferating mouse T lymphocytes defined by rat monoclonal antibodies. J. Immunol., 130: 2794-2797, 1983.
- 34) Roth, J. B., Murphy, E. D. and Eicher, E. M. : A new mutation, gld, that produce lymphoproliferation and autoimmunity in C3H/HeJ mice. J. Exp. Med., 159: 1-20, 1984.
- 35) Davidson, W. F., Dumont, F. J., Bedigian, H. G., Fowlkes, B. J. and Morse III, H. C. : Phenotypic, functional, and molecular genetic comparisons of the abnormal lymphoid cells of C3H-lpr/lpr and C3H-gld/gld mice. J. Immunol. 136: 4075-4084, 1986.
- 36) Powell, M. B., Conta, B. S., Horowitz, M. and Ruddle, N. H. : The differential inhibitory effect of lymphotoxin and immune interferon on normal and malignant lymphoid cells. Lymphokine Res. 4: 13-26, 1985.
- 37) Roch, F. and Bach, M. A. : Strain differences in mouse

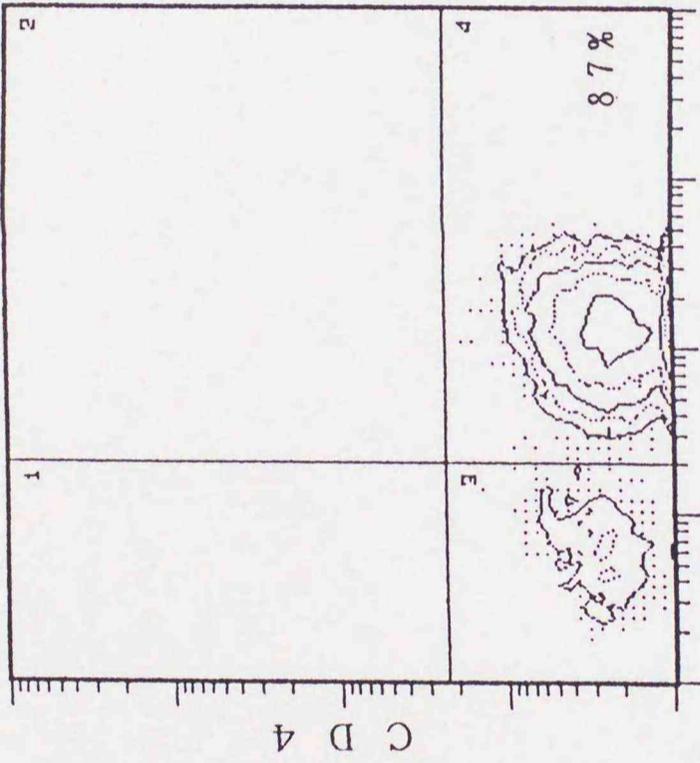
- cellular responses to *Mycobacterium lepraemurium* and BCG subcutaneous infections. I. Analysis of phenotype in local granulomas. *Clin. exp. Immunol.* 80: 332-338, 1990.
- 38) Allen, R. D., Marshall, J. D., Roth, J. B. and Sidman, C. L. Difference defined by bone marrow transplantation suggest that *lpr* and *gld* are mutations of genes encoding in interacting pair of molecules. *J. Exp. Med.*, 172: 1367-1375, 1990.
- 39) Okuyama, H., Kobayashi, S., Harada, H., Kawaguchi, Y. and Sekikawa, I. : Treatment of donor cells with L-Leucyl-L-Leucine Methyl Ester prevents induction of Graft-vs-Host-like reaction on [*lpr/lpr* → +/+] Chimera. *Clin. Immunol. Immunopath.*, 54: 26-39, 1990.
- 40) Thiele, D. L. and Lipsky, P. E. : The immunosuppressive activity of L-leucyl-L-leucine methyl ester : Selective ablation of cytotoxic lymphocytes and monocytes. *J. Immunol.*, 136: 1038-1048, 1986
- 41) 小林清一、水越紀子、橋本洋一、石原智明、奥山春枝 : GVHD様反応を呈する [*lpr/lpr* → +/+] 脾細胞キメラマウスにみられる複数のサプレッサー細胞について. 日本免疫学会総会記録, 17:

688, 1987.

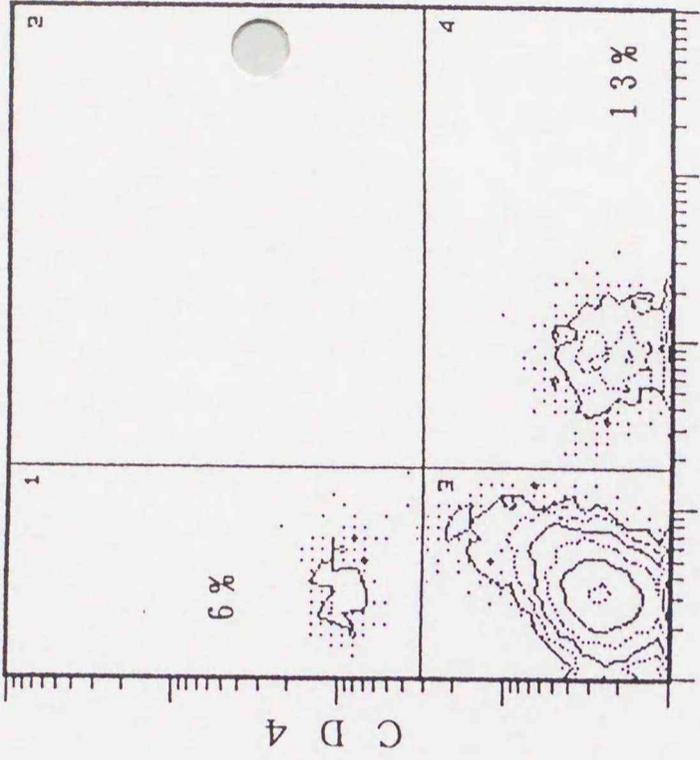
42) Boog, C. J. P., Boes, J. and Melief, C. J. M. : Stimulation with dendritic cells decreases or obviates the CD4+ helper cell requirement in cytotoxic T lymphocyte responses. *Eur. J. Immunol.*, 18: 219-223, 1988.



C D 8
[MRL-1pr → MRL-+]

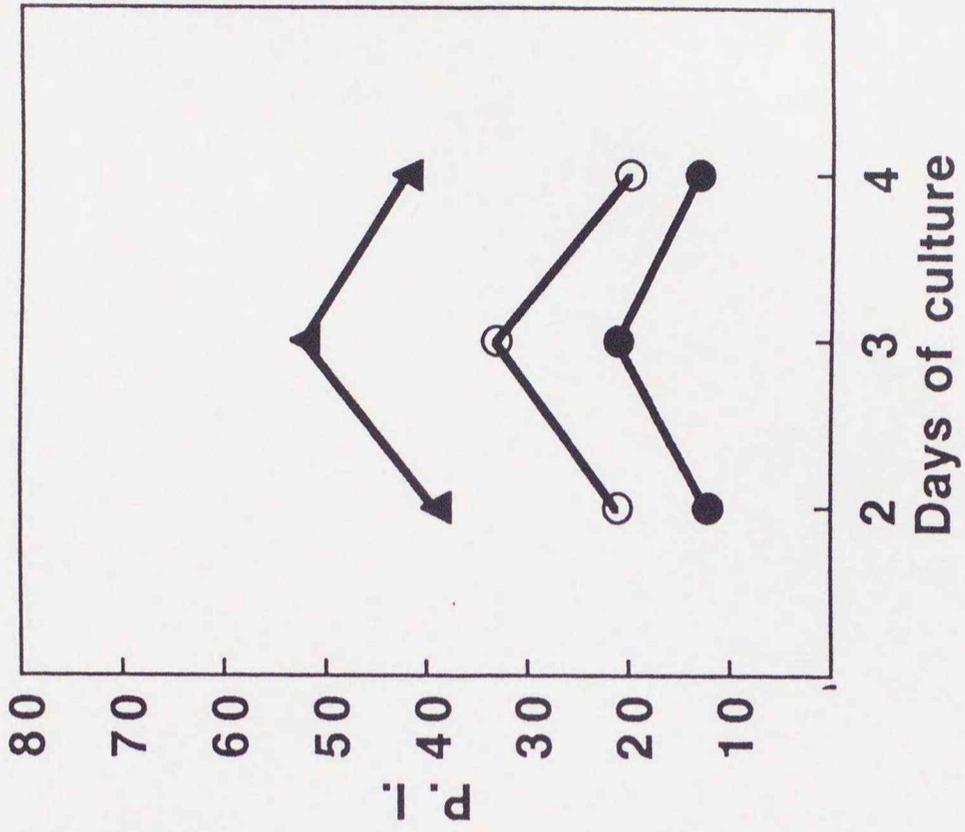


C D 8
[B6-1pr → B6]

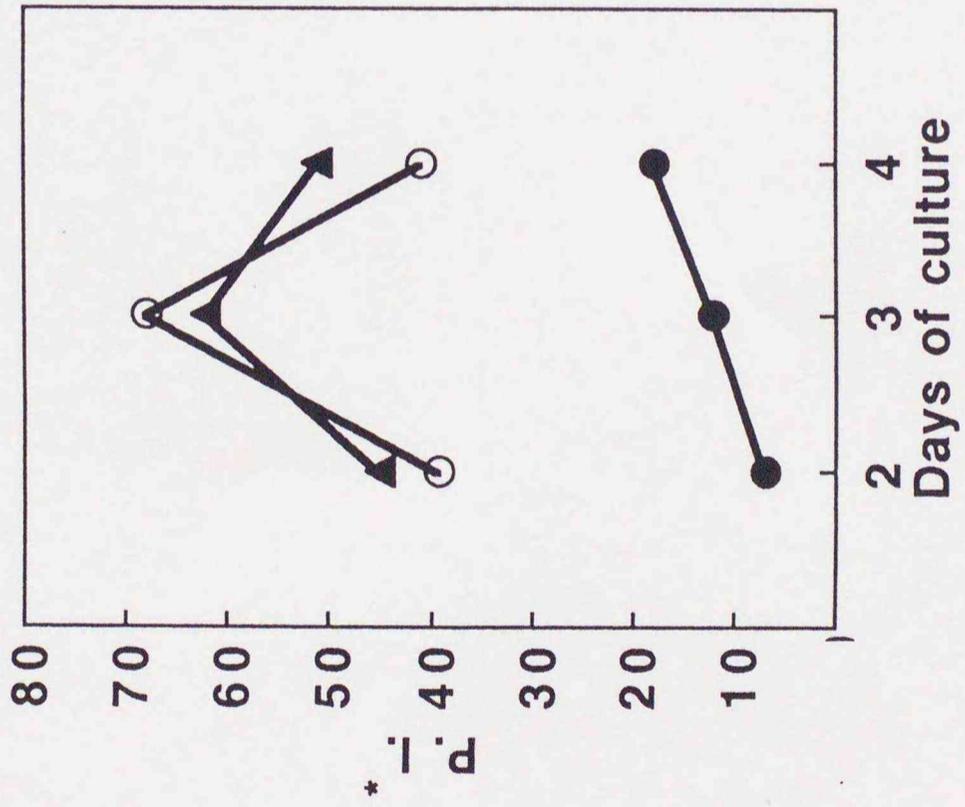


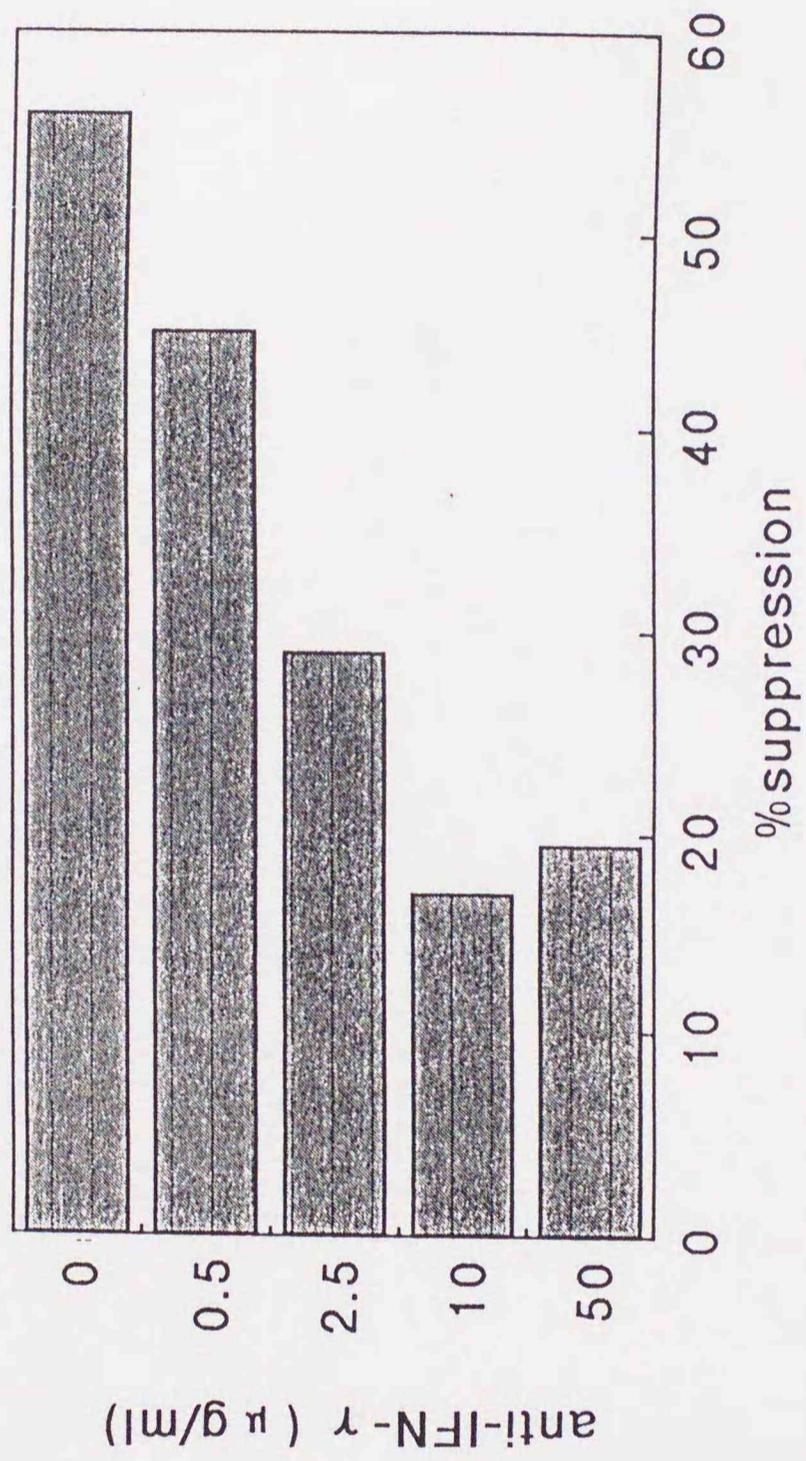
C D 8
[C3H-1pr → C3H]

LPS



Con A





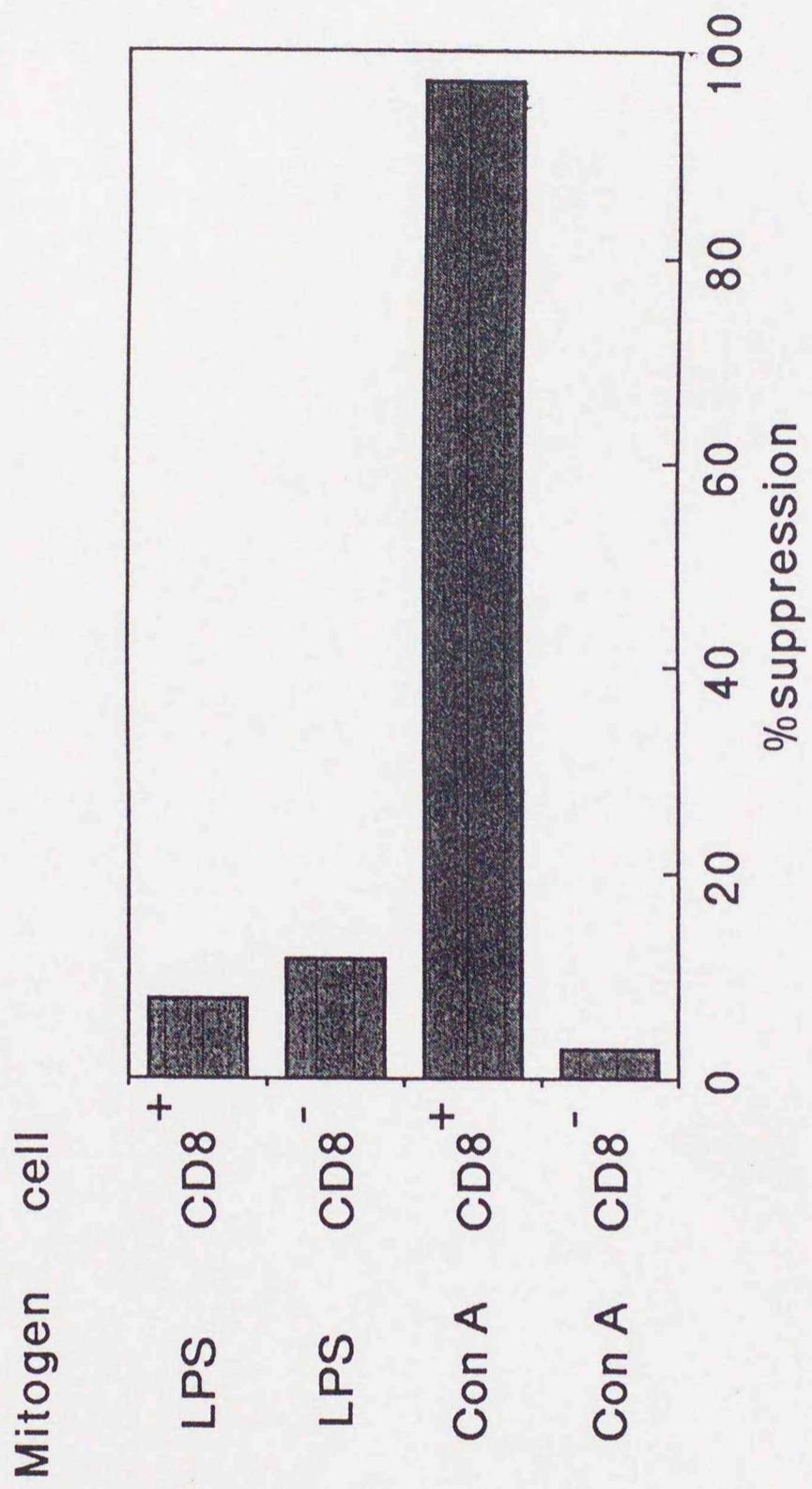


Table 1.

Cell surface antigen expression
by CD8⁺T cells in [B6-1pr → B6]
spleen chimera mice*.

| | |
|-------|-----|
| CD2 | + |
| CD3 | + |
| CD4 | - |
| J11d | +/- |
| TfR | - |
| IL-2R | - |
| Thy-1 | + |
| B220 | - |
| sIg | - |
| Vβ 8 | + |

+(20-25%)

*Chimera mice were analysed 10 days
posttransplantation..

Table 2. T cell subsets in [F₁-1pr⁻ → +] spleen chimera mice.

| Recipient | Total spleen cells ($\times 10^{-7}$) | % of spleen cell subsets | | |
|--|--|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | | CD4 ⁺ 8 ⁻ | CD4 ⁻ 8 ⁺ | CD4 ⁻ 8 ⁻ |
| B6 | 10.7 | 0.2 | 93.1 | 5.8 |
| (B6 \times MRL ⁻ +/+)F ₁ | 10.2 | 0.2 | 89.8 | 9.1 |
| MRL ⁻ +/+ | 1.0 | 10.3 | 19.1 | 70.3 |

* (B6-1pr \times MRL-1pr)F₁

Table 3. T cell subsets in [F₁-1pr* → B10 congenic] spleen chimera mice.

| Recipient | Total spleen cells ($\times 10^{-7}$) | % of spleen cell subsets | | |
|----------------------------|--|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | | CD4 ⁺ 8 ⁻ | CD4 ⁻ 8 ⁺ | CD4 ⁻ 8 ⁻ |
| B10 (H-2 ^b) | 16.6 | 0.8 | 81.3 | 16.2 |
| B10.BR (H-2 ^k) | 28.0 | 0.6 | 87.5 | 10.5 |
| B10.D2 (H-2 ^d) | 10.5 | 1.5 | 79.2 | 19.2 |

* (B6-1pr x MRL-1pr)F₁

Table 4. Spleen cells from gld mice don't induce acute GvH-like reaction.

| chimera of B6 back ground | Total spleen cell number (x10 ⁻⁷) | %CD8 ⁺ cells in chimera spleen |
|---------------------------|---|---|
| + → + | 5.6 | 6.1 |
| lpr ^{..} → + | 13.6 | 87.0 |
| lpr → gld ^{...} | 12.1 | 73.4 |
| gld → + | 4.3 | 6.8 |
| gld → lpr | 2.4 | 5.7 |
| gld → gld | 4.9 | 7.3 |

· B6

.. B6-lpr

... B6-gld

Table 5. Essential subsets for CD8+T cell expansion in [B6-lpr → B6] spleen chimera mice

| Treatment of B6-lpr spleen cells with | injected spleen cells ($\times 10^{-7}$) | Treatment of B6-lpr LN cells with | injected LN cells ($\times 10^{-7}$) | % of CD8+ cells in chimera spleen |
|---------------------------------------|--|-----------------------------------|--|-----------------------------------|
| Complement (C') only | 5.0 | (-) | 0 | <u>82.0</u> |
| anti-CD4+C' | 4.80 | (-) | 0 | <u>86.3</u> |
| anti-B220+C' | 0.5 | (-) | 0 | 0.8 |
| anti-CD8+C' | 4.85 | (-) | 0 | 11.5 |
| anti-B220+C' | 0.5 | anti-CD4+ anti-CD8+C' | 4.5 | <u>66.5</u> |
| anti-CD8+C' | 4.85 | anti-B220+ anti-CD4+C' | 0.1 | <u>49.9</u> |

Table 6. Identification of precursor cell of CD8⁺T cell

| Injected population from B6-lpr spleen | Injected population from B6-Thy1.1-lpr LN | % of CD8 ⁺ cells in chimera spleen | %Thy1.1 of CD8 ⁺ cells |
|--|---|---|-----------------------------------|
| Total spleen | (-) | 91.0 | NT* |
| (-) | CD8 ⁺ | 22.3 | 96.4 |
| B220 ⁺ | (-) | 4.5 | NT |
| B220 ⁺ | CD8 ⁺ | 68.3 | 98.1 |

Spleen cells from B6-lpr and/or B6-Thy1.1-lpr mice were treated with anti-CD4 mAb, anti-CD8 mAb and complement. LN cells from B6-lpr and/or B6-Thy1.1-lpr mice were treated with anti-CD4 mAb, anti-B220 mAb and complement. Then, treated cells were transplanted to B6 mice. 10days after transplantation, spleen cell from chimera mice were analysed by flow cytometer.

*Not tested

Table 7. Cytokine gene expression by
[B6-1pr → B6] spleen chimera mice.*

| | Exp. 1** | | | Exp. 2*** | |
|---------------|----------|-------|--------|------------------|------------------|
| | day 6 | day 8 | day 10 | CD8 ⁺ | CD8 ⁻ |
| IL-1 | - | - | - | - | - |
| IL-2 | - | - | - | - | - |
| IL-3 | - | - | - | - | - |
| IL-4 | - | - | - | - | - |
| IL-5 | - | - | - | - | - |
| IL-6 | - | - | - | - | - |
| IFN- γ | - | + | + | + | - |
| TNF- α | - | - | + | - | + |
| TNF- β | - | - | - | - | - |

* Cytokine mRNAs were detected by RT-PCR method.

** Kinetics of Cytokine gene expressions.

*** Chimera spleen cells were purified by FACS sorting.

Fig. 1 Expression of CD4/CD8 antigens by [lpr → +] spleen chimera r

Spleen cells from chimera mice were analysed 10 days post transplar
by flow cytometer.

Fig. 2 Effect of millicell culture on suppressor activity

B6 spleen cells were cultured with 30Gy irradiated spleen cells from
[B6-lpr → B6] chimera 10 days post transplantation. (—●—) B6 spleen
cells were mixed with chimera spleen cells. (—○—) B6 spleen cells
and chimera spleen cells were cultured without cell-to-cell interaction.
(—▲—) B6 spleen cells alone.

Fig. 3 Effect of IFN- γ on suppressor activity

B6 spleen cells and chimera spleen cells were cultured without cell-
interaction. Indicated volume of anti-IFN- γ mAb and LPS(50 μ g/ml)
added to the wells.

$$\% \text{suppression} = 1 - \frac{\text{cpm with chimera spleen cells}}{\text{cpm without chimera spleen cells}}$$

Fig. 4 Determination of suppressor cell.

[B6-lpr → B6] chimera spleen cells were purified 10days
post transplantation, and cultured as Fig. 2.

$$* \text{ Proliferation Index} = \frac{\text{cpm with mitogen}}{\text{CPM without mitogen}}$$



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

