



Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

移植 (1984.04) 19巻2号:68～73.

MLC反応に関与するヒトClass-2抗原の役割に関する研究

平田哲, 片桐一, 池田久実

MLC 反応に關与するヒト Class-II 抗原 の役割に關する研究

平 田 哲・片 桐 一*・池 田 久 實*

The Role of Human Class-II Antigen Molecules in the Allogeneic and Autologous Mixed Lymphocyte Reactions

Satoshi Hirata, Makoto Katagiri and Hisami Ikeda

Department of Surgery, Asahikawa Medical College

**Department of Pathology, Asahikawa Medical College*

【Summary】

Two monoclonal antibodies (7 B 6, Sh 2-60-1) specific to human Class-II molecules were studied for inhibitory effects on allogeneic (EBV-Sh cells, DRw 6.2, Hon 5+, Hon 7-, as a stimulator) and autologous mixed lymphocyte reactions (MLR). 7 B 6 antibody reactive to monomorphic determinant of Class-II antigens was capable of inhibiting allogeneic and autologous MLR. On the other hand, Sh 2-60-1 antibody, specific to a determinant on the molecule carrying Hon 5 (MB-3 like) antigen, was not able to inhibit either allogeneic or autologous MLR.

Both antibodies were also examined for inhibitory effects on proliferation of alloreactive T cell clones which were established from allogeneic MLR (EBV-Sh cells as a stimulator) by limiting dilution and were maintained with IL-2.

7 B 6 antibody inhibited the proliferation of all the alloreactive T cell clones tested, whereas none was inhibited by Sh 2-60-1 antibody. The results suggest that the Class-II antigens defined by Sh 2-60-1 antibody may generate very few responding T cell clones.

Key words: human Class-II antigens,
mixed lymphocyte reaction,
monoclonal antibodies,
Hon 5 antigen,
alloreactive T cell clone

I. は じ め に

ヒト HLA-D 領域には、現在公認されている DR 抗原を code する遺伝子の他に、同様な抗原分子を code する遺伝子が複数個、存在すると考えられている。これ

らの遺伝子産物はマウスの I 領域遺伝子産物と同様にそれぞれ特別な機能を果たしていると考えられる。それらのヒト HLA-D/DR 領域に code される Class-II 抗原として、DR 抗原系以外にも DC 抗原系²⁾に属する Hon 5 抗原³⁾、Hon 7 抗原¹⁾ (または BR 抗原⁴⁾)、SB 抗原系⁵⁾等が存在することが報告されている。著者らは、主として Hon 5 抗原分子を検出する単クローン抗体を使用して、この抗体が血清学的に、Class-II 抗原の一部

旭川医大 外科学第 1 講座

*同 病理学第 2 講座

(58・11・18 受付)

の抗原分子を検出することおよび、この抗原分子または、抗原決定基に対応して増殖する T cell clone が非常に少ない可能性が強いことを示す結果を得たので報告する。

II. 材料および方法

1. ヒト Ia 様抗原に対する単クローン抗体および抗血清

ヒト培養 B 細胞でマウスを免疫して得たヒト Class-II 抗原に対する単クローン抗体は Köhler と Milstein の方法⁹⁾ に準じて作成した。実験に用いた単クローン抗体は、7B6 と Sh 2-60-1 で後者は藤沢薬品工業株式会社、山下達雄博士より供与された。7B6 は IgG1 に属しヒト Ia 様抗原 β 鎖の monomorphic determinant に対する抗体である⁹⁾。Sh 2-60-1 は polymorphic determinant を検出し IgG 2a に属する。Hon 5 抗原を検出するヒトアロ血清 Hon は腎移植患者血清であり⁷⁾、MT 2 を検出するアロ血清 3010 は妊婦血清である⁹⁾。

2. radioimmunoassay

HLA-D/DR 座に関してホモ接合体の培養 B リンパ芽球様細胞 EBV-Sh (DRw 6.2, Hon 5+, Hon 7-) の膜性成分から Katagiri らの方法⁹⁾ に準じ papain で可溶化し、¹²⁵I を標識した。この標識可溶化抗原材料 ¹²⁵I-pap-Sh と単クローン抗体またはヒトアロ血清との反応は、二重抗体法により検出した。抗血清または抗体の特異性は、Tanigaki らの方法に準じ、radioimmunoassay の inhibition によって検討した⁹⁾。inhibitor としては、Tanigaki らの方法に準じ各種培養細胞を Renex 30 で可溶化した材料を用いた。

3. Autologous MLR および Allogeneic MLR

Autologous MLR のために Ficoll-Conray を用いた比重遠心法で末梢血より分離したリンパ球を neuraminidase 処理ヒツジ赤血球を用いた rosette 法と比重遠心法を 2 回行って T cell と non-T cell に分離した。分離した T cell (1×10^5 /well) に対し、同数の mitomycin-C ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) で処理した non-T cell を stimulator とし、非動化ヒト AB 血清 20% を含む RPMI 1640 培養液中で全量 $200 \mu\text{l}$ にて 6 日間混合培養した。harvest 18 時間前に ³H-サイミジン ($0.5 \mu\text{Ci}/\text{well}$) を加え取り込みを測定した。一方 Allogeneic MLR は、末梢リンパ球 (1×10^5 /well) に対し mitomycin-C ($250 \mu\text{g}/\text{ml}$) 処理した培養 B 細胞 EBV-Sh (5×10^3 /well) を stimulator として 5 日間混合培養して ³H-サイミジ

ン ($0.5 \mu\text{Ci}/\text{well}$) の取り込み測定した。実験に用いた 7B6 および Sh 2-60-1 の 2 つの単クローン抗体は MLR 反応の開始と同時に抗体の含まれるマウスの腹水を RPMI 1640 で希釈し各 well に $30 \mu\text{l}$ ずつ加えた。

4. T cell clone の作成および T cell clone を用いた Allogeneic MLR

T cell clone は EBV-Sh を stimulator とした primary allogeneic MLR で増殖した responder の T cell を cloning して得た。mitomycin-C 処理 EBV-Sh および autologous の antigen presenting cell (APC) とともに limiting dilution 法を用いて、0.6 個/well の割合に用意した T cell を Terasaki plate 上で混合培養した。その際に phytohemagglutinin (PHA) で末梢リンパ球を activate した培養上清を 4 倍に濃縮して得た Interleukin-2 (IL-2) を 20% の濃度になるように加えた。5% CO₂ 存在下で 37°C、5 日～7 日間培養した後、増殖した細胞を 96 穴 U-plate にうつした。この T cell clone と stimulator (EBV-Sh) との反応は mitomycin-C 処理 EBV-Sh (5×10^3), mitomycin-C 処理 APC (1×10^4) および T cell clone (1×10^4) を 20% AB 血清入りの RPMI 1640, $200 \mu\text{l}$ 中に混合し、48 時間培養後、³H-サイミジンを加え測定した。

III. 結果

1. 培養 B 細胞における Sh 2-60-1 抗体および抗血清 Hon, 3010 で検出される抗原決定基の発現の検討

各種培養 B 細胞が各抗体または抗血清と EBV-Sh 細

表 1 各種培養細胞における Sh 2-60-1 抗体および抗血清 (Hon, 3010) の検出する抗原の発現

cell lines (inhibitor)	DR (D)	(% inhibition)		
		Sh 2-60-1	Hon	3010
LG-2	1 (w1)	5	-13	1
EBV-CMG	2 (w2)	—	3	10
Mat	3	13	62	95
EBV-Wa	4 (YT)	-12	34	-2
KT-13	4 (KT2)	95	101	2
ER	4 (w4)	99	95	1
Sweig	5	88	75	90
EBV-Hor	w6 (En)	-24	0	-6
EBV-Sh	w6.2	71	78	90
KT-11	w6 (w6)	1	0	90
LG-10	7 (w7)	6	12	13
EBV-Ky	w9 (KY)	98	99	6

胞 (DRw 6.2, Hon 5+, Hon 7-) から得た可溶性抗原材料 ^{125}I -pap-Sh との反応を阻止するか否かで、各抗体によって検出される抗原が培養細胞に発現しているかどうか検討した (表 1). その結果 Sh 2-60-1 反応抗原を発現している細胞と発現していない細胞があり Hon 血清の検出する Hon 5 抗原とはほぼ同様の分布を示した. アロ血清 3010 の検出する抗原は、すでに報告されているように⁹⁾ MT 2 特異性と一致した. 以上の結果より、Sh 2-60-1 抗体は特定の培養 B 細胞にのみ発現される polymorphic determinant を検出し、そしてアロ血清 3010 により検出される抗原決定基と異った決定基を検出するとみなされる.

2. 各単クローン抗体 (7 B 6, Sh 2-60-1) の検出する抗原分子の検討

標識可溶性抗原材料 ^{125}I -pap-Sh を用いた sequential co-precipitation 法を行った (表 2). ヒト Class-II 抗原の monomorphic な抗原決定基に対する抗体である 7 B 6 で前処理すると、すべての抗体、抗血清に対する反応が消失した. polymorphic determinant を検出する Sh 2-60-1 抗体で前処理し Sh 2-60-1 抗体と反応する抗原分子を除去した抗原材料と、抗 Hon 5 アロ血清 Hon との反応は消失するが、7 B 6 抗体や MT 2 を検出するアロ血清 3010 との反応にはあまり変化が認められない. さらに Hon 血清で Hon 5 抗原を除去した抗原材料は Sh 2-60-1 抗体との反応は大幅に減少したが、7 B 6 抗体およびアロ血清 3010 との反応はあまり影響されなかった. 以上の結果より、Sh 2-60-1 抗体の認識する抗原決定基は Hon 5 抗血清の認識する抗原決定基と同一分子上にあり、したがってこの Sh 2-60-1 抗体は Class-II 抗原の一部の抗原分子を検出すると考えられる.

3. Allogeneic MLR と Autologous MLR における T 細胞増殖に対する単クローン抗体 (7 B 6, Sh 2-60-1) の抑制効果 (表 3)

Allogeneic および Autologous MLR に対する単クローン抗体の抑制効果を検討した. 対照として、培養 Myeloma line NS-1 細胞を BALB/c マウスの腹腔に注射し反応性に浸出した腹水を、他の抗体同様 RPMI 1640 で希釈して使用した. responder として末梢リンパ球, stimulator として EBV-Sh 細胞を用いた Allogeneic MLR では、コントロールの ^3H -サイミジンの取り込み比べ、monomorphic な抗体 7 B 6 を加えた場合は 90% 前後の強い抑制をみたが、Sh 2-60-1 抗体を加えた場合では、抑制効果は認められなかった. responder のリンパ球が Sh 2-60-1 抗体に反応する抗原をもっている、いなくても効果は同じであった. 一方, responder を T cell, stimulator を autologous non-T cell にした Autologous MLR では、Allogeneic MLR と同様に 7 B 6 抗体で抑制が認められたが、Sh 2-60-1 抗体では抑制効果は認められなかった. Sh 2-60-1 抗体に、MLR 抑制効果がない理由についてわれわれは以下のよう考えた.

① Sh 2-60-1 抗体が Class-II 抗原の一部しか検出しないため、みかけ上抑制効果がないようにみられる. ② この抗体の検出する Class-II 抗原には Lad 機能すなわち、MLR 惹起能が欠如する可能性. 著者らは、上述の ①の仮定が正しいならば、Sh 2-60-1 抗体に対応する抗原に対する T cell clone が存在するのではないかと考え以下の実験を行った.

4. T cell clone を用いた Allogeneic MLR における単クローン抗体 (7 B 6, Sh 2-60-1) による抑制効果

EBV-Sh 細胞を stimulator とした primary allogeneic MLR で増殖した細胞を limiting dilution 法に

表 2 各種抗体または抗血清で処理した抗原材料の反応性の検討

前処理材料と反応させる抗体	前処理抗体または抗血清					
	monoclonal antibodies			alloantisera		
	7 B 6	Sh 2-60-1	NMS	3010	Hon	NHS
7 B 6	0.31	5.05	7.36	5.67	4.82	7.51
Sh 2-60-1	0.37	0.12	9.12	9.95	2.06	9.02
3010	0.28	5.27	4.36	-0.02	2.28	2.99
Hon	-0.09	0.01	1.88	1.97	0.13	2.28

(% binding)

て cloning し, IL-2 存在下で T cell clone を得た. stimulator である EBV-Sh 細胞に反応して増殖する T cell clone に対し抗体の抑制効果を検討した. 各 T cell clone は, 2名の responder から得られた. S.H. clone は Sh 2-60-1 抗体反応抗原陽性者から得た clone で, N.M. clone は陰性者から得た clone である. 抗原に反応する 22 個の clone はすべて 7B6 抗体によって増殖が強く抑制されるが, Sh 2-60-1 抗体によって増殖が抑制される clone は現在まで出現していない. 表 4 は, これらの T cell clone によって得られた結果の一部である.

IV. 考 案

ヒト HLA-D/DR 領域には DR 抗原系以外にも少なくとも DC²⁾, Hon 7¹⁾ (BR)²⁾, および SB 抗原系⁴⁾を code する遺伝子が存在すると考えられている. ヒト Class-II 抗原に対する抗血清や単クローン抗体が MLR を抑制するという報告¹⁰⁻¹²⁾ は以前より存在するが, 抑制実験に使用した抗血清または抗体がどの Class-II 抗原分子に特異性を有するかという点については必ずしも明らかではない. われわれはヒト Class-II 抗原に対する単クローン抗体のうち血清学的解析から明らかに Hon 5 抗原分子のみに特異性を有するものがあることに着目

表 3 Allo- および Auto-MLR における単クローン抗体 (7B6, Sh 2-60-1) の抑制効果

responders		stimulators	NS-1 (mean cpm ± SD)	7B6 Sh 2-60-1 (% inhibition)	
type	Sh 2-60-1 反応 抗原の発現				
S. H. whole PBL.	+	EBV-Sh	20082 ± 2152	98.6	6.6
S. H. whole PBL.	+	EBV-Sh	14785 ± 386	94.8	-6.5
H. H. whole PBL.	+	EBV-Sh	10550 ± 2036	N. D.	28.2
N. M. whole PBL.	-	EBV-Sh	69421 ± 3690	90.1	-14.9
N. M. whole PBL.	-	EBV-Sh	11749 ± 496	91.8	3.0
T. N. whole PBL.	-	EBV-Sh	7657 ± 458	91.3	15.0
T. N. whole PBL.	-	EBV-Sh	9059 ± 930	97.1	32.0
K. T. whole PBL.	N. D.	EBV-Sh	14851 ± 593	86.6	-10.5
S. H. PBL-T	+	S. H. PBL-non T	8871 ± 613	85.0	-12.8
S. H. PBL-T	+	S. H. PBL-non T	11156 ± 1417	99.4	-10.0
M. T. PBL-T	+	M. T. PBL-non T	16563 ± 870	86.3	-7.4

表 4 Alloreactive T cell clone に対する単クローン抗体 (7B6, Sh 2-60-1) の抑制効果

Responder		NS-1 (mean cpm ± SD)	7B6 Sh 2-60-1 (% inhibition)	
S. H. clone.	S-12	29353 ± 718	98.5	18.7
S. H. clone.	S-18	16643 ± 1402	93.7	19.7
S. H. clone.	S-37	15114 ± 1403	90.2	-5.4
S. H. clone.	S-38	8526 ± 541	96.7	4.5
S. H. clone.	S-42	17752 ± 830	97.0	2.8
S. H. clone.	S-45	21258 ± 1140	95.0	7.4
N. M. clone.	M- 4	3331 ± 15	69.0	5.0
N. M. clone.	M- 8	8595 ± 441	77.4	0.7
N. M. clone.	M- 9	6519 ± 438	93.1	-6.2
N. M. clone.	M-10	10248 ± 686	94.7	-2.6
N. M. clone.	M-12	8618 ± 522	91.7	-2.1
N. M. clone.	M-13	14244 ± 990	91.2	0.9

し, Hon 5 抗原分子の MLR における関与を検討した. 可溶性抗原材料を用いた inhibition assay (表 1) および sequential co-precipitation 法 (表 2) によって, 各抗体の検出する抗原分子の検討を行った. その結果, Sh 2-60-1 抗体は特定の培養 B 細胞にのみ発現される polymorphic determinant を検出する抗体で, Hon 5 抗原分子上の抗原決定基を検出していることが明らかとなった. 7 B 6 抗体は広く Class-II 抗原の monomorphic determinant を検出することが確認された. この 2 種類の単クローン抗体の検出する抗原分子が MLR 反応に関与しているか否か検討した.

その結果, Allogeneic MLR では 7 B 6 抗体で抑制がみられたが, Sh 2-60-1 抗体では抑制効果は認められなかった (表 3). また Autologous MLR においても Allogeneic MLR と同様の結果であった (表 3). Sh 2-60-1 抗体に MLR 抑制効果がない理由として, Sh 2-60-1 抗体が Class-II 抗原の一部しか検出しないため, みかけ上, 抑制効果がないようにみられるという可能性が考えられた. この可能性を検討するため, EBV-Sh 細胞に反応する responder T 細胞を clone 化して抑制効果を検討したが Sh 2-60-1 で反応が抑制される clone は発見されなかった.

最近, この Sh 2-60-1 抗体の検出する Hon 5 抗原系と相同な分子と考えられる MB 抗原系の機能を解析した報告が出されている^{13,14)}. Koide らによれば, MB-1 を検出する単クローン抗体は外来抗原および autologous B-LCL に対する細胞増殖を抑制しないが, alloantigen に対する増殖は抑制する¹³⁾. また Zeevi らは MB-3 抗原とよく相関する alloreactive な T cell clone の存在を報告している¹⁴⁾. われわれの成績との間に相違点がみられるが, その理由として, ① Hon 5 抗原と MB-1 抗原または MB-3 抗原は同じ group (DC 系) に属するとみなされるが同一の遺伝子によって code されているという確実な証拠はない. ② Sh 2-60-1 に比して, MB-1 を検出するのに使用した単クローン抗体のスペクトラムが広く, MB-1 以外の MLR に関与する抗原分子にも反応性を有する可能性. ③ Hon 5 抗原と MB-1 抗原は同一の gene で code されているが, Sh 2-60-1 抗体の向う抗原決定基は MLR に関与しない部位に存在するため, 抑制効果がない可能性が考えられる. しかしながら同じ Hon 5 抗原分子の異なる determinant に特異性を有する他の 2 つの単クローン抗体によっても, Allogeneic MLR の抑制効果がみられないこと (Hirata, 未発表) および, mouse の I-E 分子に対する cell mediated lysis や I-E 介在性の外来抗原に対するリンパ球増殖反

応が E β の allomorph に関係なく E α に対する単クローン抗体で抑制されるという事実^{15,16)}から③の可能性は少ないと考えられる. ①, ②の可能性に関しては今後の検討が必要であるが, Zeevi らの報告では, MB-3 反応性 clone は, 必ずしもすべての MB-3 陽性細胞に反応せず, MB-3 陰性者にも反応することから, MB-3 抗原そのものに MLR 惹起能が存在するという確実な証拠は未だ得られていないと思われる. われわれの成績では, 5 種類の responder の EBV-Sh 細胞に対する反応は, いずれも Sh 2-60-1 によって抑制されない. 今回われわれは Hon 5 抗原の MLR 惹起能についてのみ検討したが, 現在, Hon 5 抗原を含めた Class-II 抗原が外来抗原に誘導される T 細胞増殖にはたす役割や, これらの抗原の CML 活性についての解析をすすめている.

V. ま と め

ヒト末梢リンパ球を用いた Allogeneic および Autologous MLR はヒト Class-II 抗原に対する monomorphic な単クローン抗体 7 B 6 によって抑制されたが, Hon 5 抗原分子を検出する Sh 2-60-1 抗体では抑制されなかった. Sh 2-60-1 反応抗原陽性者及び陰性者を responder として Allogeneic MLR を行い, 増殖した細胞から得た T cell clone の stimulator に対する増殖反応は, すべて 7 B 6 抗体で抑制されるが, Sh 2-60-1 抗体では抑制されなかった. 以上より, Sh 2-60-1 抗体で検出される抗原に対応して増殖する clone は非常に少ない可能性が考えられた.

文 献

- 1) Katagiri, M., Ikeda, H., Maruyama, N., Moriuchi, J., Wakisaka, A., Kimura, S., Aizawa, M. and Itakura, K.: Evidence for two B-cell alloantigen loci in the HLA-D region. *Immunogenetics*, 9: 335, 1979.
- 2) Roberto Tosi, Tanigaki, N., Dora Centis, Giovanni Battista Ferrara and David Pressman: Immunological dissection of human Ia molecules. *J. Exp. Med.*, 148: 1592, 1978.
- 3) Tanigaki, N., and Tosi, R.: *Immunol. Rev.*, 66: 5-37, 1982.
- 4) Stephen Shaw, Robert DeMars, Stuart F. Schlossman, Paula L. Smith, Lois A. Lampson and Lee M. Nadler: Serologic of the human secondary B cell antigens. *J. Exp. Med.*, 156: 731, 1982.

- 5) Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256: 495, 1975.
- 6) 片桐 一・池田久實・比嘉敏夫・丹野正隆・東 寛・三代川齊之・橋 玄秀・平田 哲・古井秀典・林 朋子・佐藤英俊: 単クローン性抗体による HLA-DR 及び DR 様抗原分子の解析. 日本免疫学会総会記録, 11: 195, 1981.
- 7) Katagiri, M.: New B-cell alloantigen loci in the HLA-D region. *Jap. J. Med.*, 19: 63, 1980.
- 8) Tanigaki, N., Tosi, R., Sagawa, K., Minowada, J. and Ferrara, G.B.: The distribution of DR 5, MT 2, and MB 3 specificities on human Ia subsets. *Immunogenetics*, 17: 371, 1983.
- 9) Katagiri, M., Natori, T., Tanigaki, N., Kreiter, V.P. and Pressman, D.: Papain-solubilized Ag-B antigens. *Transplantation*, 19: 230, 1975.
- 10) Palacios, R.: Role of individual chains of HLA-DR antigens in activation of T cells induced by alloantigens. *Immunogenetics*, 14: 309, 1981.
- 11) C.M. Steel, Veronica van Heyningen, K. Guy, B.B. Cohen and D. L. Deane: Influence of monoclonal anti-Ia like antibodies on activation of human lymphocytes. *Immunology*, 47: 597, 1982.
- 12) Russo, C., Quaranta, V., Indiveri, F., Pellegrino, M.A., and Ferrone, S.: Effect of polyclonal and monoclonal HLA-DR xenoantibodies on xenogeneic mixed lymphocyte reactions. *Immunogenetics*, 11: 413, 1980.
- 13) Koide, Y., Awashita, F., Yoshida, T.O., Takenouchi, T., Wakisaka, A., Moriuchi, J., and Aizawa, M.: The role of three distinct Ia-like antigen molecules in human T cell proliferative responses: Effect of monoclonal anti-Ia like antibodies. *J. Immunol.*, 129: 1061, 1982.
- 14) Zeevi, A., Scheffel, C., Gayle, A., Marrari, M., and Duquesnoy, R.J.: Association of PLT specificity of alloreactive lymphocyte clones with HLA-DR, MB and MT determinants. *Immunogenetics*, 16: 209, 1982.
- 15) Juretic A., Nagy, Z.A., and Jan Klein: Generation of cytotoxic T lymphocytes by the H-2 encoded E molecules. *Immunogenetics*, 14: 73, 1981.
- 16) Marusic, M., Nagy, Z.A., Kosziowski, U., and Jan Klein: Involvement of Mhc loci in immune responses that are not Ir-gene-controlled. *Immunogenetics*, 16: 471, 1982.