

## ヒト抗原呈示細胞に表現されている HLA-DR 抗原の機能

小 出 幸 夫\*      ・淡 嶋 史 佳\*\*  
赤 座 達 也\*\*、\*\*\*・吉 田 孝 人\*、\*\*

### Functional Expression of HLA-DR Antigens by Antigen-presenting Cells in T-lymphocyte Proliferative Responses

Yukio Koide\*, Fumiyoshi Awashima\*\*,  
Tatsuya Akaza\*\*, \*\*\*, Takato Yoshida\*, \*\*

\* *Department of Transfusion and Clinical Immunology,*

\*\* *Department of Microbiology, Hamamatsu University School of Medicine*

\*\*\* *Department of Clinical Laboratory, Aichi Cancer Center*

#### 【Summary】

Employing nylon wool-adherent cells as antigen-presenting cells (APC), it was demonstrated that T-lymphocyte could respond sufficiently well to PPD-pulsed APC sharing at least one of the HLA-DR antigens of the T-lymphocyte donor.

Antisera against HLA-DR but not HLA-A and -B antigens were shown to be able to block this proliferative responses when PPD-pulsed APC had been pretreated with anti-HLA-DR antisera.

These results indicate that HLA-DR antigens play a functional role in the antigen-presentation.

**Key words:** human antigen-presenting cells,  
HLA-DR antigens, PPD.

#### 【概 要】

ヒト抗原呈示細胞は PPD パルスされることにより自己の感作T細胞および一部のアロのT細胞を活性化することが認められた。PPD パルス抗原呈示細胞上の HLA-A, -B そして -DR 抗原を抗血清で選択的に被う実験で、HLA-DR 抗原に対する抗血清のみが抗原呈示能を阻止することから、感作T細胞は抗原呈示細胞上の PPD とDR 抗原を同時に認識することが判明した。このことはアロのT細胞の活性化には HLA-DR 抗原の少なくとも1つを抗原呈示細胞と共有していることが必要であることを示している。

\* 浜松医科大学輸血免疫部, \*\* 同 微生物学教室, \*\*\* 愛知県がんセンター臨床検査部

## I. はじめに

マウス主要組織適合複合体中の I 領域は調節性 T 細胞による免疫応答性を遺伝的に制御していることはよく知られている。たとえば, helper T 細胞は抗原呈示細胞との相互作用において抗原と I 領域遺伝子産物をともに認識し活性化されるが, この際に I 領域の一致が必要とされている<sup>1)</sup>。さらに抗 Ia 血清を使用することにより, このような T 細胞の活性化は抗原呈示細胞の Ia 抗原の機能的表現によっていることがあきらかとなり<sup>2)</sup>, Ia 抗原はきわめて重要な機能を分担していることが判明した。

筆者らはさきに purified protein derivative (PPD) を抗原として用いることにより, ヒト感作 T 細胞が抗原パルスされた抗原呈示細胞によって活性化されることを示し, この抗原呈示細胞は Ia 様抗原を表現していることを示した<sup>3)</sup>。そこで今回は, マウス Ia 抗原に相当する HLA-DR 抗原 (HLA-D related antigen) の重要性を検討するため, 同種免疫血清で抗原呈示細胞の DR 抗原を被覆することにより, 感作 T 細胞—抗原呈示細胞間の相互作用が阻止されるか否かを検討したところ DR 抗原の重要な役割を見出した。

## II. 材料および方法

### 1. 単核細胞の分離

PPD 皮内反応陽性健康者のヘパリン加末梢血から Ficoll-Paque (Pharmacia) 比重遠心法により単核細胞を得た。

### 2. ナイロンウール・カラムによる T 細胞の分離と付着細胞の回収

ナイロンウール・カラムによる T 細胞の enrichment の方法はすでにほかに記した<sup>3,4)</sup>。T 細胞分離後, 細胞の付着したナイロンウールを冷却 0.02% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 加 phosphate buffered saline (PBS) にひたし, 5°C 10 分放置した。その後, ナイロンウールをよくほぐすことにより付着細胞を集め, 2 回洗浄した。

### 3. 抗原パルスの方法

単核細胞 ( $1 \sim 5 \times 10^6$ ) または付着細胞 ( $0.5 \sim 2 \times 10^6$ ) を  $25 \mu\text{g/ml}$  の PPD (日本 BCG) と mitomycin-C (MMC; 協和醸酵)  $50 \mu\text{g/ml}$  を含む培養液中で 1 時間  $37^\circ\text{C}$  incubate することにより抗原パルスを行った。パルスされた細胞は 4 回洗浄し,  $1 \times 10^6/\text{ml}$  に調整した。

### 4. リンパ球培養と DNA 合成の測定

一定数の抗原パルスまたは非パルス抗原呈示細胞 (単核細胞:  $1 \times 10^5$ , 付着細胞:  $1 \times 10^4$ ) と  $1 \times 10^5$  の T 細胞 (ナイロンウール・カラム通過細胞) を  $200 \mu\text{l}$  の 10% ヒト AB 型血清添加 RPMI 1640 (日本製薬) に浮遊し, 丸底 microtiter plate (Nunc) の well 中で, 5%  $\text{CO}_2$ ,  $37^\circ\text{C}$  の条件下で 5 日間培養し, 細胞回収 16~18 時間前に  $0.5 \mu\text{Ci}$  の  $^3\text{H}$ -thymidine ( $^3\text{H}$ -TdR, New England Nuclear Co.) を各 well に添加, semiautomatic cell harvester (ラボサイエンス社) にて細胞を回収, 液体シンチレーション・カウンター (アロカ) により  $^3\text{H}$ -TdR のとり込みを測定した。

### 5. HLA タイピング

HLA-A, -B, -C タイピングは NIH 標準法によって行った<sup>5)</sup>。HLA-DR タイピングはトロンビン—ナイロンウール法によって B 細胞を回収し行った<sup>6)</sup>。

### 6. HLA-DR 抗血清

抗 DR 血清は妊産婦より得, 抗 HLA-A, -B, -C 抗体を除去するため, pooled 血小板にて吸収操作を行った。これらの抗血清の特異性は panel cell を用いて cytotoxicity test によって決定された。

### 7. 抗原呈示細胞上の HLA-A, -B そして -DR 抗原の抗血清による被覆

あらかじめ抗原パルスされた抗原呈示細胞 ( $0.5 \sim 2 \times 10^6$ ) を抗 HLA-A, -B または -DR 血清中に  $37^\circ\text{C}$ , 30 分 incubate し, その後 3 回洗浄した。一部の実験では Protein A (Pharmacia) をこれらの IgG 抗体の Fc 部分に付着させるため,  $2 \mu\text{g/ml}$  の Protein A を加え, さらに 30 分 incubate し, その後 3 回洗浄した<sup>7)</sup>。

## III. 結果および考察

さきの報告で筆者らは抗原呈示細胞として末梢単核細胞全体を用いることにより, 抗原呈示細胞がアロの組み合わせにおいては mixed leukocyte reaction (MLR) をおこさない単核細胞を抗原呈示細胞として用いた時のみ抗原特異的な T 細胞活性化を認めた<sup>3,8)</sup>。このことをさらに確認するため, HLA 抗原の判明している細胞を用いて感作 T 細胞—抗原呈示細胞間における HLA 抗原の関与を検討した。

表 1 に示すように, 抗原呈示細胞として単核細胞を用いた場合, Donor YK の T 細胞は自己の PPD パルス単核細胞に反応する ( $d\text{cpm} : 2,807$ ) (group 1). と

表 1 The responses of T-lymphocyte to PPD-pulsed mononuclear cells or adherent cells in allogeneic combinations.

Group	Responding T-lymphocyte donor	APC <sup>a</sup>			cpm		
		Donor		HLA antigens shared	Nonpulsed	Pulsed	$\Delta$ cpm <sup>d</sup>
		MNC <sup>b</sup>	Ad <sup>c</sup>				
1	YK	YK	—	A11	442 ± 39	3,249 ± 437	2,807
2		—	YK		1,530 ± 208	7,176 ± 255	5,646
3		TM	—	AW33, BW44, DRW 6	2,901 ± 121	3,029 ± 167	128
4		—	TM		2,908 ± 209	4,361 ± 431	1,453
5		NK	—	AW24	4,925 ± 752	3,696 ± 596	-1,229
6		—	NK		4,593 ± 143	5,162 ± 430	569
7	MM	MM	—	A11	896 ± 43	3,301 ± 373	2,405
8		—	MM		1,357 ± 65	4,126 ± 169	2,769
9		YK	—	AW24, DRW 2	4,732 ± 184	4,654 ± 401	-78
10		—	YK		4,562 ± 212	6,760 ± 259	2,198

HLA phenotypes of donors are : YK: AW24, AW33, BW44, BW51, DRW2, DRW6, TM: A2, AW33, BW44, 8W59, CW3, DRW4, DRW6, NK: A2, AW24, B7, BW35, CW3, DRW1, DRW8, MM: AW24, AW24, BW52, BW55, CW1, DRW 2, DRW4. <sup>a</sup> Antigen-presenting cells, <sup>b</sup> Monoclear cells, <sup>c</sup> Cells adhered to nylon wool columns, <sup>d</sup> Net counts per minute were calculated by subtracting cpm with noplused APC from cpm with pulsed APC.

ころが HLA-AW 33, BW 44, DRW6 を共有する Donor TM の PPD パルス単核細胞に対する反応は極度に低い ( $\Delta$ cpm: 128) (group 3). また, AW 24 のみを共有している Donor NK に対してはまったく反応を示さず back ground の MLR よりも低い反応性を示した (group 5). Donor MM の T 細胞は自己の PPD パルス単核細胞にはよく反応する (group 7) が AW 24, DRW 2 を共有している Donor YK の単核細胞による抗原呈示にはまったく反応を示さない (group 9).

これらの結果は抗原呈示細胞として単核細胞全体を用いた場合には, たとえ DR 抗原の中の1つを共有していても抗原呈示が有効に進まないことを示している.

筆者らはさらに, ナイロンウール付着性の細胞はプラスチック・ベトリ皿付着細胞に比し, 抗原呈示細胞のすべての population を損じることなく含んでいることを示した<sup>3)</sup>. そこで, ナイロンウール付着性の細胞を抗原呈示細胞として用いたところ, 表1にみるように Donor YK の T細胞あるいは Donor MM の T細胞に対してアロの抗原呈示細胞も有効な抗原呈示を行うことが認められた (group 4, 10). このことは, 抗原呈示細胞として単核細胞を用いた場合には, その中のT細胞が反応性T細胞の反応性よりはむしろ抗原認識を何らかの形で阻止していることを示す<sup>3)</sup>. これら (group 4, 10) は DR 抗原の片方を反応性T細胞と共有しており, 反応性T細胞—抗原呈示細胞間の有効な相互作用には DR 抗原の少なくとも1つを共有していることが必要で

あることを示唆している. しかしながら Donor TM (group 4) そして Donor YK (group 10) は反応性T細胞と HLA-A, -B 抗原をも共有しており, さらに Donor NK は HLA-AW 24 のみを共有しているにもかかわらず, 低いながらも抗原呈示能を示しており, 明確な結論は下せない. そこで抗 DR 血清によって抗原呈示細胞上の DR 抗原を選択的に被うことにより実際に DR 抗原が抗原呈示に重要な役割を担っているかどうかを検討した. 表2にはその結果を示す. Donor HM の反応性T細胞は自己の PPD パルス抗原呈示細胞に反応するが, これは抗 DR 血清により抗原呈示細胞上の DR 抗原を被うことにより阻止される. しかしながら, HLA-A そして -B 抗原を抗血清で被っても何ら影響は認めなかった. また, Donor NK の反応性も抗 DRW 8 血清によって阻止された. 抗原呈示細胞に反応させた IgG 抗体による steric hindrance の影響は, 抗 HLA-A, -B 血清が何ら作用しなかったことから否定的であるが, これをさらに確かめるため, Donor YK の抗原呈示細胞に感作させた主に IgG 抗体の Fc 部分に Protein A を結合させてからT細胞に反応させた<sup>7)</sup>. この場合も他と同じく抗 DR 血清は抗原呈示能を阻止し, 抗 HLA-A, -B 血清は阻止しなかった.

これらの結果から, T細胞に対する抗原呈示において, 抗原呈示細胞の DR 抗原が重要な役割を果たしていることが推察される. Bergholtz と Thorsby<sup>9)</sup> は培養液中に PPD が存在するシステムにおいて, さらに抗 HLA 抗血清を混入することによりT細胞の反応性が阻

表 2 Effect of anti-HLA serum blocking treatment of APC on T-lymphocyte responses

Cell donor	HLA phenotype				PPD	Antiserum <sup>a</sup>	cpm ± SD
	A	B	C	DR			
HM	24, —	35, 40, 1	—, —	2, 5	Nonpulsed	— — —	380 ± 14
					Pulsed	— — —	2,254 ± 214
					Pulsed	DRW2	583 ± 122
					Pulsed	DRW5, 6, 8	378 ± 51
					Pulsed	AW24	2,152 ± 474
					Pulsed	B40	2,143 ± 325
NK	2, 24	7, 35	3, —	1, 8	Nonpulsed	— — —	155 ± 53
					Pulsed	— — —	3,031 ± 705
					Pulsed	DRW 8	228 ± 119
YK <sup>b</sup>	24, 33	44, 51	—, —	2, 6	Nonpulsed	— — —	292 ± 33
					Pulsed	— — —	1,029 ± 114
					Pulsed	DRW 2	6,255 ± 29
					Pulsed	DRW 5, 6, 8	302 ± 86
					Pulsed	DRW 8	1,152 ± 149
					Pulsed	AW24	1,182 ± 66

<sup>a</sup> PPD-pulsed APC were incubated for 1/2 h at 37°C in antisera. Treated cells were washed extensively and added to T lymphocytes.

<sup>b</sup> APC from YK were incubated in antisera and then 2μg/ml Protein A as indicated in Materials and Methods section.

止できるとしている。この場合は抗 DR のみならず抗 HLA-A, -B 血清も反応性T細胞に作用してその反応を阻止してしまう。

マウスにおいては反応性T細胞と抗原呈示細胞間の相互作用に I-A 亜領域の一致が必要であることが認められている<sup>10)</sup>。このことは HLA-DR 領域がマウス H-2 の I 領域と対比されうるものであることを示すとともに、ヒトにおいては HLA-DR 亜領域の解析が始まってい

ることから<sup>11,12)</sup>、筆者らの行ったT細胞-抗原呈示細胞間に関する HLA-DR 亜領域の研究が今後、重要であることを示唆している。

稿を終わるにあたり、本研究にご協力いただきました浜松医科大学微生物学教室；葛巻 暹，原口惣一，松尾哲道，水野 充，皆川英孝，輸血免疫部；沢木良子，長屋昌幸，袴田洋子の諸氏に深謝致します。

#### 文 献

- Pierce, C.W., Kapp, J.A., Benacerraf, B.: Regulation by the H-2 gene complex of macrophage-lymphoid cell interactions in secondary antibody responses *in vitro*. J. Exp. Med., 144: 371~381, 1976.
- Thomas, D.W., Yamashita, U., Shevach, E. M.: Nature of the antigenic complex recognized by T-lymphocytes. IV. Inhibition of antigen-specific T cell proliferation by antibodies to stimulator macrophage Ia antigens. J. Immunol., 119: 223~226, 1977.
- 小出幸夫・若園清行・山本正彦・吉田孝人：ヒト末梢単核細胞による抗原呈示，アレルギー，29：129, 1980.
- Koide, Y., Takasugi, M.: Augmentation of human natural cell-mediated cytotoxicity by a soluble factor. I. Production of N-cell-activating factor (NAF). J. Immunol., 121: 872~879, 1978.
- Terasaki, P.I., Bernoco, D., Park, M.S. et al.: Microdroplet testing for HLA-A, -B, -C, and -D antigens. Am. J. Clin. Path., 69: 103~120, 1978.
- Danilovs, J., Terasaki, P.I., Park, M.S., Ayoob, G.: B lymphocyte isolation by thrombin-nylon wool. 8th International Workshop Newsletter, 6, 1978.
- Roseblatt, J., Zeltzer, P.M., Portaro, J.,

- Seeger, R.C. : Inhibition of antibody-dependent cellular cytotoxicity by Protein A from *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.*, 118 : 981~985, 1977.
- 8) Koide, Y., Yoshida, T.O. : Human antigen-presenting cells. I. Characterization and role of the cells in the T-lymphocyte proliferative response. (Submitted for publication)
- 9) Bergholtz, B.O., Thorsby, E. : HLA-D restriction of the macrophage-dependent response of immune human T lymphocytes to PPD *in vitro*: Inhibition by anti-HLA-DR antisera. *Scand. J. Immunol.*, 8 : 63~73, 1978.
- 10) Schwarz, R.H., Yano, A., Paul, W.E. : Interaction between antigen-presenting cells and primed T lymphocytes: An assessment of Ir gene expression in the antigen-presenting cells. *Immuno. Rev.*, 40 : 153~180, 1978.
- 11) Park, M.S., Terasaki, P.I., Nakata, S., Aoki, D. : Supertypic DR groups: MT 1, MT 2, and MT 3. 8th International Workshop Newsletter, 16 : 20~23, 1979.
- 12) 脇坂明美・相沢 幹・板倉克明 : ヒト免疫応答遺伝子の解析. *臨床科学*, 15 : 656~661, 1979,
-