OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	胸腺Tリンパ球によるMls抗原の発現と免疫寛容性誘導
Author(s)	山田, 聡
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3100613
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

①

胸腺Tリンパ球によるMls抗原の発現と免疫寛容性誘導

大阪大学大学院歯学研究科
歯学臨床系専攻（口腔治療学）
（指導教官：岡田宏教授）

山　田　　聡

大阪大学歯学部口腔治療学講座（主任：岡田　宏教授）
本論文の要旨は、第21回日本免疫学会総会（平成３年11月、熊本）、
第22回日本免疫学会総会（平成４年11月、名古屋）に於て発表した。

①

胸腺Tリンパ球によるMls抗原の発現と免疫寛容性誘導

大阪大学大学院歯学研究科
歯学臨床系専攻（口腔治療学）
（指導教官：岡田宏教授）

山　田　　聡

大阪大学歯学部口腔治療学講座（主任：岡田　宏教授）
本論文の要旨は、第21回日本免疫学会総会（平成３年11月、熊本）、
第22回日本免疫学会総会（平成４年11月、名古屋）に於て発表した。

緒言

Mls(Minor lymphocyte stimulating)抗原は、混合リンパ球反応(MLR; Mixed Lymphocyte Reaction)に於て、主要組織適合性複合体(MHC; Major Histocompatibility Complex)抗原以外にマウスTリンパ球を活性化する抗原として1973年にFestensteinらによって発見された[1,2]。Mls抗原の実体は長年不明であったが、最近Mls抗原はマウス染色体に組み込まれたmouse mammary tumor virus (MTV) 由来の抗原そのものであり、少なくとも２つのMls抗原遺伝子座(Mls-1及びMls-２)が存在することが明らかにされている[3]。しかし、その生理学的意義については依然として不明な点が多い。

通常、Tリンパ球はα及びβ鎖のヘテロダイマーから成る抗原受容体(TCR; T Cell Receptor)を介して、マクロファージ／樹状細胞やBリンパ球等の抗原提示細胞(APC; Antigen Presenting Cells)上に提示された自己MHCと外来抗原由来ペプチド断片との複合物を認識し活性化される。一方、Mls抗原反応性Tリンパ球の抗原認識はTCR Vα鎖の組み合わせとは無関係に特定のVβ鎖の発現により担われていることが明らかにされている[3~5]。このように、Mls抗原は一般の外来抗原とは極めて異なった機序でTリンパ球により認識されることからスーパー抗原と呼称される。スーパー抗原としては内因性自己抗原であるMls抗原の他に、外因性のブドウ球菌腸管内毒素が知られている。Mls抗原の最大の特徴は、他の一般の外来抗原に対するTリンパ球応答では検出されないような強い増殖反応を正常Tリンパ球に誘導することである。このTリンパ球の強い増殖反応は前述のTCR Vβ選択性の結果、正常Tリンパ球集団中にMls抗原反応性を示す細胞が極めて多数存在していることに起因する。高頻度に存在するMls抗原反応性Tリンパ球は抗-Vβ鎖特異抗体を用いて容易に検出できるので、Mls抗原系は対応するTリンパ球クローンの生体内での運命を解析するのに非常に有効な実験系となっている[6~9]。

Tリンパ球レパートリーは胸腺内で遭遇する自己抗原に対する正と負の選択機構（ポジティブ及びネガティブセレクション）を介して形成され[10,11]、Tリンパ球は自己と非自己を厳密に見分ける選別能力を獲得していく。即ち、Tリンパ球前駆細胞である骨髄由来の血液幹細胞は胸腺に入った後、胸腺皮質に存在する上皮細胞上のMHCクラスI又はクラスII分子との相互作用により分裂増殖し、即ちポジティブセレクションの過程を経て多様な抗原に対するレパートリーを獲得し、髄質に移行する。一方、自己MHC分子に対して非常に高い親和性を有するTCRを発現しているクローン、即ち自己反応性クローンはネガティブセレクションにより選択的に除去される（免疫寛容性）。一般に、MHC等の自己抗原に対するネガティブセレクションの誘導に於て、胸腺髄質中の骨髄由来マクロファージ系細胞が重要な役割を果たしていることが示唆されている[10,11]。

あるMls遺伝子を有するマウスに於て、対応するTリンパ球クローンは免疫寛容に陥っていることが知られている。Mls抗原はMLRに於ける刺激細胞活性の解析から、主とし

てBリンパ球に限局して発現されているものと考えられてきた[12,13]。しかし最近、Mls抗原に対する免疫寛容誘導実験から、末梢Tリンパ球もMls抗原を発現している可能性が示されている[14,15]。従って、胸腺内の未熟胸腺Tリンパ球は既にMls抗原を発現しており、胸腺内に極く僅かにしか存在しない胸腺Bリンパ球よりは大多数を占める胸腺Tリンパ球自身がMls抗原に対する免疫寛容性の誘導に多大な影響を及ぼしている可能性が考えられる。本研究では、胸腺Tリンパ球に於けるMls抗原の発現及びその免疫寛容性誘導活性に関して検討を試みた。

材料と方法

1　実験動物

8～10週齢の雄性AKRマウス(H-2^k, Mls-1^a)、B10.BRマウス(H-2^k, Mls-1^b)、CBA/Nマウス(H-2^k, Mls-1^b)、BALB/cマウス(H-2^d, Mls-1^b)、C3H/HeNマウス(H-2^k, Mls-1^b)、及びDBA/2マウス(H-2^k, Mls-1^a)を日本エスエルシー株式会社（浜松）より、またCBA/Jマウス(H-2^k, Mls-1^a)は日本クレア株式会社（大阪）から購入した。(CBA/N x AKR)F1雄及び雌マウス(H-2^k, Mls-$1^{b/a}$)は大阪大学医学部実験動物施設にて交配により作製し、実験に供した。

2　細胞の調製

マウス脾臓細胞からSephadex G-10(Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden)カラムに対する付着性を利用してマクロファージや樹状細胞を取り除いた後に[16]、抗-クラスII単クローン性抗体[10-2-16(抗-I-A^k)[17]+14-4-4S(抗-I-E^k)[18]]と家兎補体処理によりBリンパ球を除去した精製Tリンパ球を応答細胞として用いた。精製胸腺Tリンパ球画分は、Sephadex G-10カラムを用いてマクロファージ及び樹状細胞を除去したマウス胸腺細胞を、予めヤギ抗-マウス免疫グロブリン抗体(Oreganon Teknika Co.-Cappel Products, West Chester, PA)で固相化した100mmプラスチックディシュ(Corning Glass Works, Corning, NY)に加え60分間培養し、付着性のBリンパ球を取り除き非付着性の細胞を回収することにより調製した。この操作を2回繰り返すことにより得られた細胞画分は、フローサイトメトリーによる解析で表面IgM抗原及びマクロファージに発現されるMac-1抗原が共に陰性（0.1%以下）であることが確認された。

3　フローサイトメトリー解析

胸腺細胞に於けるTCR Vβ6鎖の発現に関しては、間接蛍光抗体単染色法により検討した。即ち、胸腺細胞1 x 10^6個にラット抗-マウスVβ6鎖抗体（44-22-1[6], IgGクラス）を添加し4°Cで20分間培養し、洗浄後FITC化マウス抗-ラットIgG抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA)を加え更に4°Cで20分間培養することにより染色し、FACStar(Becton-Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA)にて解析した。一方、脾臓細胞でのVβ6鎖及びVβ8鎖の発現は、2重免疫染色法により検出した。即ち、脾臓細胞1 x 10^6個にラット抗-マウスVβ6鎖抗体を添加し4°Cで培養し、洗浄後ビオチン化マウス抗-ラットIgG抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.)を加えフィコエリスリン結合アビジン(Becton-Dickinson Immunocytometry System)で染色した。次に、未飽和のマウス抗-ラットIgG抗体を正常ラットIgG(Oreganon Teknika Co.-Cappel Products)でブロッキングした後、FITC化ラット抗-マウスThy1.2抗体(Becton-Dickinson Immunocytometry System)あるいはFITC化ラット抗-マウスLy1抗体(Becton-Dickinson Immunocytometry System)で染色し、Thy1.2及びLy1抗原陽性細胞（T

リンパ球）中のVβ鎖発現細胞の割合をFACStarを用いて解析した。一方、Vβ8陽性Tリンパ球は、抗-Vβ8鎖抗体(F23.1[19], IgGクラス)—FITC化ラット抗-マウスIgG(Oreganon Teknika Co.-Cappel Products)とビオチン化抗-マウスThy1.2抗体(Becton-Dickinson)—フィコエリスリン結合アビジン(Becton-Dickinson)との２重染色により検出した。尚、細胞の洗浄及び試薬の希釈には0.5%BSA及び0.1%アジ化ナトリウムを含むフェノールレッド不含HANKS緩衝生理食塩水pH7.2（日水製薬、東京）を用いた。

4　免疫寛容性誘導

生後24時間以内のB10.BR新生仔マウスに、AKRマウス、(CBA/N x AKR)F1雄及び雌マウスから調製した精製胸腺Tリンパ球画分2x10^{6}個を50μlのHANKS緩衝生理食塩水pH7.2（日研バイオ医学研究所、京都）に懸濁し腹腔内投与した。対照群には、B10.BRマウスの精製胸腺Tリンパ球画分を投与した。

5　混合リンパ球反応(MLR)

細胞培養は10%牛胎児血清(FCS: Hyclone laboratory, Logan, UT)、25μg/ml gentamicin溶液(Sigma Chemical Co., St. Luis, MO)、及び5x10^{-5}Mの2-メルカプトエタノール（和光純薬、大阪）含有RPMI1640培地（日研バイオ医学研究所）にて行なった。応答Tリンパ球1x10^{5}個とマイトマイシンC（協和発酵、東京）で処理した刺激脾臓細胞あるいは刺激胸腺Tリンパ球画分とを200μlの培養液に懸濁し、96穴平底マイクロプレート(No. 25860 Corning Glass Works)にて37°C、5% CO_2、加湿気相条件下に５日間培養した。培養終了６時間前に18.5kBqの[^{3}H]-チミジン(NEN Research Products DUPONT, Wilmington, DE)を添加し、応答Tリンパ球への取り込みをβ-カウンター(Wallac, Turku, Finland)にて測定した。ある実験では、マクロファージ細胞株P388D.1をPMA(Phorbol Myristic Acetate)で刺激して調製した可溶性因子（co-stimulatory signal活性を有する）存在下に、MLRを行なった[20]。

6　RNA抽出及びPCR解析

Mls-1^{a}抗原をコードするマウス乳癌ウイルス-7(MTV-7; Mouse Mammary Tumor Virus-7)の3'-LTR(Long Terminal Repeat)に存在するORF(Open Reading Frame)を基に、Mls-1^{a}抗原特異的プライマー[14]（5'-プライマー；GTCAAAGAACAGGTGCAAGGAC及び3'-プライマー；AAGGGATCGAAGCCAACGCG）はバイオロジカ商会（名古屋）から購入した。一方、精製胸腺Tリンパ球画分からacid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform法[21]により総RNAを抽出し、更にMolony murine leukemia virus reverse transcriptase(Life Technologies Inc.-BRL Products, Gaithersburg, MD)を用いて逆転写する事によりcDNA標品を作製した。このcDNA標品をMls-1^{a}抗原特異的プライマーを用いたPCR(Polymerase Chain Reaction)法[22]により、MTV-7の3'-LTRに存在するORFを含むMls-1^{a}抗原特異的配列を増幅した。PCR増幅反応はサーマルサイクラー（アステック、福岡）にて94°C 1分、55°C 2分、72°C 3分の設定で30～40サイクル行なった。

PCR増幅DNAは２％アガロースゲルに電気泳動し、エチジュウムブロマイド（和光純薬）にて染色することにより、Mls-1^{a}抗原特異的配列の存在を解析した。

結果

(CBA/N x AKR)F1雄マウスに於けるMls-1^{a}抗原提示能及びTリンパ球のMls-1^{a}抗原に対する反応性

混合リンパ球反応(MLR)での抗原提示細胞に関する解析で、アロMHC抗原とは対照的にMls抗原はマクロファージや樹状細胞ではなく、主としてBリンパ球に発現されている事が報告されている[12,13]。また、X染色体連鎖免疫不全(xid)を呈するCBA/Nマウスに於ては、成熟Bリンパ球集団が欠損しておりBリンパ球機能の選択的不全が認められる事が明らかにされている[23]。従って、もしMls抗原の発現がBリンパ球にのみ限局されているのであれば、xidマウスに於ては、Mls抗原提示活性は認められず、その結果Mls抗原反応性Tリンパ球は免疫寛容に陥らずに存在している可能性が考えられる。そこで初めに、xidマウスに於けるMls抗原提示能及びTリンパ球のMls抗原に対する応答性について検討した。

xid CBA/N (H-2^k, Mls-1^b)マウスはTリンパ球刺激活性を示さないMls-1^{b}対立遺伝子型を有しているので、CBA/N 雌マウスと刺激活性を有するMls-1^{a}遺伝子型のAKR (H-2^k, Mls-1^a)雄マウスとの交配により、(CBA/N x AKR)F1雄 (H-2^k, Mls-1$^{b/a}$)及び(CBA/N x AKR)F1雌マウス (H-2^k, Mls-1$^{b/a}$)を作成した。(CBA/N x AKR)F1雄及び雌マウスは共にAKRマウス由来のMls-1^{a}遺伝子を有しているが、雄マウスのみがX染色体に連鎖したBリンパ球機能不全を示す。一方、(CBA/N x AKR)F1雌マウスは、片方のX染色体にのみxid遺伝子を発現しているので正常なBリンパ球機能を示す。そこで先ず、これらのF1マウスの脾臓細胞のMls-1^{a}抗原提示活性を調べるため、(CBA/N x AKR)F1雄及び雌マウスからの脾臓細胞をマイトマイシンで処理し、これら刺激細胞のB10.BRマウス(H-2^k, Mls-1^b)応答Tリンパ球を活性化する能力をMLRにて検討した。AKRマウス及び正常(CBA/N x AKR)F1雌マウスからの脾臓細胞は、B10.BR応答Tリンパ球を活性化しMls-1^{a}抗原に対する増殖反応を誘導したのに対して、xid (CBA/N x AKR)F1雄マウス刺激脾臓細胞は、B10.BR応答Tリンパ球を活性化することができなかった（表１）。一方、マクロファージや樹状細胞が主たる抗原提示細胞(APC)であるアロMHC に対するMLRに於て、(CBA/N x AKR)F1雄及び雌マウスの刺激脾臓細胞の機能に欠損は認められず、共にBALB/cマウス(H-2^d)応答Tリンパ球のアロH-2^{k}抗原に対する増殖反応を誘導できる事が示された（表１）。

Bリンパ球機能不全を示す(CBA/N x AKR)F1雄マウスに於てMls-1^{a}抗原提示活性が認められないので、Mls-1^{a}抗原反応性Tリンパ球は免疫寛容に陥っていない可能性が考えられる。一方、Mls-1^{a}抗原提示活性を示す正常(CBA/N x AKR)F1雌マウスに於ては、Mls-1^{a}抗原反応性Tリンパ球は免疫寛容に陥っているものと考えられる。そこで、(CBA/N x AKR)F1雄及び雌マウス応答Tリンパ球のAKRマウス刺激脾臓細胞(Mls-1^{a}抗

原)に対する応答性をMLRで検討した。事実、(CBA/N x AKR)F1雌マウス脾臓Tリンパ球は、Mls-1^{a}抗原に対して反応性を全く示さなかった（表2）。注目すべき事に、(CBA/N x AKR)F1雄マウスの応答Tリンパ球も増殖反応を示さなかった。尚、BALB/cマウス刺激細胞(アロH-2^{d}抗原)に対しては、(CBA/N x AKR)F1雄及び雌Tリンパ球は共に応答性を示した。以上の結果より、(CBA/N x AKR)F1雄マウスに於てはMls-1^{a}抗原提示活性は認められないにも拘わらず、Mls-1^{a}抗原反応性Tリンパ球は免疫寛容に陥っている事が明らかとなった。

(CBA/N x AKR)F1雄マウスでのMls-1^{a}抗原反応性Tリンパ球の欠損

Mls-1^{a}抗原陽性の正常マウスに於て、Mls-1^{a}抗原に特異的に反応するTCR Vβ6陽性Tリンパ球はネガティブセレクションにより除去されている事が報告されている[3,6,24]。そこで、(CBA/N x AKR)F1雄マウスに於ても同様の現象が起こっているのか否かについてフローサイトメトリー解析を行なった。その結果、Mls-1^{a}抗原陰性のCBA/Nマウス(Mls-1^b)ではVβ6強陽性胸腺Tリンパ球画分及びVβ6陽性脾臓Tリンパ球は存在するのに対して、Mls-1^{a}抗原陽性の正常(CBA/N x AKR)F1雌マウスではそれらの細胞集団は除去されていた（図1）。一方、xidを呈する(CBA/N x AKR)F1雄マウスに於ても、Vβ6強陽性胸腺Tリンパ球画分及びVβ6陽性脾臓Tリンパ球は欠損していた（図1）。この結果から、(CBA/N x AKR)F1雄マウスに於て、Mls-1^{a}抗原は胸腺内で提示されている事が示された。従って、Bリンパ球機能不全を示す(CBA/N x AKR)F1雄マウスに於て、Mls-1^{a}抗原提示能が認められないにも拘わらずMls-1^{a}抗原反応性Tリンパ球が除去されている事から、Bリンパ球以外にMls-1^{a}抗原を発現している細胞が胸腺内に存在しており免疫寛容性の誘導に重要な役割を果たしている事が強く示唆された。

(CBA/N x AKR)F1マウス胸腺Tリンパ球画分のMls-1^{a}抗原提示能

最近、末梢Tリンパ球にもMls抗原が発現している事が示されている[14,15]。従って、胸腺内でBリンパ球以外にMls抗原を発現している細胞として、胸腺Tリンパ球画分が考えられる。そこで、(CBA/N x AKR)F1雄及び雌マウスの胸腺Tリンパ球画分がin vitroの条件下でMls-1^{a}抗原反応性Tリンパ球を活性化できるか否かについて検討した。通常、Tリンパ球の活性化にはTCRからの刺激に加えて抗原提示細胞からのco-stimulatory signalが必要であるので[25]、co-stimulatory signalを提供する活性をもたないTリンパ球自身はMLRに於て刺激細胞として機能しないものと考えられる。実際、マイトマイシン処理した(CBA/N x AKR)F1雄及び雌マウスの胸腺Tリンパ球画分は、B10.BRマウス応答Tリンパ球を活性化することはできなかった(data not shown)。そこで、B10.BR応答Tリンパ球を(CBA/N x AKR)F1雄及び雌マウス胸腺Tリンパ球画分で刺激する際に、マクロファージ株P388D.1細胞をPMAで刺激して調製した可溶性因子をco-stimulatory

factorとして添加したところ、何れの場合にも高い増殖反応が誘導された（図２）。尚、この反応は抗-Vβ6鎖抗体の添加により、特異的に阻害される事が確かめられた(data not shown)。以上の結果より、(CBA/N x AKR)F1雄及び雌マウス胸腺Tリンパ球画分はMls-1^{a}抗原を発現しており、co-stimulatory factor存在下ではMls-1^{a}抗原提示細胞として機能し得る事が明らかとなった。

(CBA/N x AKR)F1マウス胸腺Tリンパ球画分に於けるMTV-7 mRNAの発現

最近、Mls-1^{a}抗原はマウス染色体に組み込まれたMTV-7由来の遺伝子産物である事が明らかにされている[26~30]。そこで、MTV-7特異的プライマーを用いたRT-PCR(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)法によりmRNAレベルでのMls-1^{a}抗原の発現を解析した。(CBA/N x AKR)F1雄及び雌マウス胸腺Tリンパ球画分より総RNAを抽出し、これらから逆転写反応によりcDNA標品を作製した後、MTV-7特異的プライマーを用いたPCR反応によりMTV-7の3'-LTR内のORFを増幅した。用いたプライマーの特異性は、Mls-1^{a}抗原陽性のCBA/J及びDBA/2マウスの脾臓細胞から抽出した総RNAを試料とした場合、MTV-7 特異的バンドは認められるが、Mls-1^{a}抗原陰性であるB10.BR, BALB/c, CBA/N, 及びC3H/HeNマウス脾臓細胞からの総RNAを試料とした場合には、MTV-7 特異的バンドは検出されない事から確認された（図３-A）。次に、このMTV-7特異的プライマーを用いて(CBA/N x AKR)F1雄及び雌マウスの胸腺Tリンパ球画分から抽出した総RNAを同様な方法で解析したところ、何れの場合にもMTV-7特異的バンドが検出された（図３-B）。逆転写反応を行なっていない群では全くバンドは認められないので、検出されたバンドは混入したゲノムDNAの増幅によりもたらされたのではない事が確認された。以上の結果より、胸腺Tリンパ球画分に於けるMls-1^{a}抗原の発現がmRNAレベルでも明らかとなった。

(CBA/N x AKR)F1マウス胸腺Tリンパ球画分の投与による免疫寛容性誘導

これまでの実験結果より、胸腺Tリンパ球画分は実際にMls-1^{a}抗原を発現している事が示された。そこで、果して(CBA/N x AKR)F1雄及び雌マウス(Mls-1$^{b/a}$, Thy1.2 x Thy1.1)の胸腺Tリンパ球画分はMls-1^{a}抗原に対する免疫寛容性を誘導し得るか否かを検討する為に、それぞれの胸腺Tリンパ球画分(2 x 10^6個)を生後24時間以内のB10.BR新生仔マウス(Mls-1^b, Thy1.2)に腹腔内投与した。投与してから９週間後にB10.BRマウスの脾臓Tリンパ球を取り出し、Mls-1^{a}抗原特異的免疫寛容性が成立しているか否かについて、Mls-MLRにて検討した。その結果、PBSのみを投与した対照群ではAKRマウス(Mls-1^a)刺激脾臓細胞に対する高い増殖反応が認められた（図４-A）。一方、(CBA/N x AKR)F1雄及び雌マウス胸腺Tリンパ球画分投与群からのB10.BR応答Tリンパ球は、Mls-1^{a}抗原に対して殆ど増殖反応を示さなかった（図４-A）が、MHCが異なるBALB/c

マウス(H-2^{d})刺激脾臓細胞に対しては対照群と同様な増殖反応を示した（図4-B）。この結果から、不応答性はMls-1^{a}抗原特異的に誘導されたことが明らかとなった。尚、フローサイトメトリー解析の結果、(CBA/N x AKR)F1マウス由来のThy1.1陽性Tリンパ球は全く検出されなかったので(<0.1%)、不応答性は投与した(CBA/N x AKR)F1マウス胸腺Tリンパ球画分の増殖によるMls-1^{a}抗原反応性B10.BRマウス由来Tリンパ球の希釈によりもたらされたのではない事が確認された(data not shown)。以上の結果より、(CBA/N x AKR)F1雄及び雌マウス胸腺Tリンパ球画分は、Mls-1^{a}抗原特異的な免疫寛容性を誘導できる事が明らかとなった。

(CBA/N x AKR)F1マウス胸腺Tリンパ球画分投与によるMls-1^{a}抗原反応性Vβ6陽性Tリンパ球の選択的除去

Tリンパ球の免疫寛容性は、主として特異的クローンの除去(clonal deletion)と機能的不応答性(clonal anergy；アナージー)の2つの機構により担われている事が明らかとなっている[31,32]。そこで、(CBA/N x AKR)F1マウス胸腺Tリンパ球画分の新生仔投与により誘導されたMls-1^{a}抗原に対する免疫寛容性がどちらの機構によるのかに関して検討した。(CBA/N x AKR)F1雄マウス胸腺Tリンパ球画分を投与されたB10.BRマウス胸腺に存在するVβ6陽性Tリンパ球についてフローサイトメトリー解析を行なったところ、B10.BR胸腺Tリンパ球画分投与の対照群と比較して、Vβ6強陽性Tリンパ球はほぼ完全に除去されている事が明らかとなった（図5）。また、Mls-1^{a}遺伝子型を有するマウスからの胸腺Tリンパ球画分を投与されたB10.BRマウスの脾臓に於ても、Vβ6陽性Thy1.2及びVβ6陽性Ly1Tリンパ球は部分的に除去されている事が明らかとなった（図6）。尚、脾臓に於けるVβ8陽性Tリンパ球(Mls-1^{a}抗原とは異なる特異性を有する)の割合は、対照群群と実験群との間に差が認められない事から、胸腺Tリンパ球画分投与によりVβ6陽性Tリンパ球が選択的に除去される事が確かめられた（表3）。以上の結果より、胸腺Tリンパ球画分を新生仔期に投与することにより誘導される免疫寛容性は、Vβ6陽性Tリンパ球の除去及び残存しているVβ6陽性Tリンパ球のアナージーにより担われている事が示された。

考察

Lyb5分化抗原や表面IgD抗原高発現に特徴づけられる成熟Bリンパ球亜集団を欠損しているX染色体連鎖免疫不全(xid)マウスの脾臓細胞はMls抗原特異的なMLR反応を誘導することができないという初期の実験結果[33]に基づいて、Mls抗原は主としてBリンパ球に限局して発現されているものとこれまで考えられてきた[12,13]。実際、抗-IgM抗体のin vivo投与によりBリンパ球を除去されたMls-1^{a}マウスに於ては、Vβ6陽性Tリンパ球の除去が阻害される事が報告されている[34]。また、Mls-1^{a}陽性胸腺Bリンパ球をMls-1^{a}陰性マウスの胸腺内に投与した場合、Mls-1^{a}抗原反応性Tリンパ球が除去される事が示されている[35]。更に、Mls-1^{a}陰性の胎児胸腺組織培養系(FTOC; Fetal Thymus Organ Culture)に、Mls-1^{a}陽性のBリンパ球を添加した時にVβ6陽性Tリンパ球の選択的除去が誘導されるという報告もなされている[36]。以上の結果から、Bリンパ球はMls抗原を発現している事、そしてMls抗原反応性Tリンパ球の選択的除去誘導活性を有する事は明らかである。しかし最近、Bリンパ球欠損マウスに於てもMls-1^{a}抗原反応性Vβ6陽性Tリンパ球が除去されている事が示されており[37]、Bリンパ球以外の細胞もMls-1^{a}抗原に対する免疫寛容性を誘導する活性を有する事が示されている。事実、Mls-1^{a}陽性マウスの脾臓Tリンパ球、特にCD8陽性Tリンパ球をMls-1^{a}陰性新生仔マウスに投与することによりVβ6陽性Tリンパ球の選択的除去を誘導できる事が報告されている[15]。この様に、末梢Tリンパ球もMls抗原を発現しているものと考えられる。従って、胸腺内でのMls抗原に対する免疫寛容性の誘導に於て、胸腺内に極く僅かにしか存在しない胸腺Bリンパ球よりは大多数を占める胸腺Tリンパ球自身が多大な影響を及ぼしている可能性が考えられる。本研究では、未熟な胸腺Tリンパ球自身もMls抗原を発現しており、Mls抗原に対する免疫寛容性の誘導に重要な役割を果たしている事を、以下に示す実験結果から明らかにした。1）Bリンパ球機能の選択的不全を呈するxidマウスに於て、Mls抗原反応性Tリンパ球が除去されている事から、Bリンパ球以外の細胞にもMls抗原が発現している事が示唆された。2）Mls-1^{a}胸腺Tリンパ球画分はco-stimulatory signal存在下に、Mls-1^{a}抗原に反応性を示すVβ6陽性Tリンパ球の増殖反応を誘導した。3）Mls-1^{a}特異的プライマーを用いたRT-PCR法により、胸腺Tリンパ球画分にMls-1^{a}抗原をコードするMTV-7 mRNAの発現が検出された。4）Mls-1^{a}陽性マウスの胸腺Tリンパ球画分をMls-1^{b}であるB10.BRマウスの新生仔期に投与することにより、Mls-1^{a}抗原反応性Vβ6陽性Tリンパ球の部分的な除去及びアナージーに起因する免疫寛容性が誘導された。

最近、Mls-1^{a}抗原をコードするMTV-7の3'- LTR遺伝子産物[26-30]を免疫することにより、単クローン性抗-Mls-1^{a}抗体が作製された[38,39]。この抗体はMTV-7の3'-LTR遺伝子導入細胞やLPS刺激Bリンパ球に対しては結合性を示すが、Tリンパ球に対しては全く

反応性をしめさない事が明らかにされている[38]。従って、LPS刺激Bリンパ球以外のTリンパ球ではMls-1^{a}抗原の発現量は非常に低く、抗-Mls-1^{a}抗体では検出することができないものと考えられる[38]。この様に、抗-Mls-1^{a}抗体を用いた蛋白レベルでの解析は困難であることから、Mls-1^{a}抗原特異的プライマーを用いたRT-PCR法によりMls-1^{a}抗原のmRNAレベルでの解析を行なった。その結果、胸腺Tリンパ球画分はMTV-7 mRNAを発現していることが明らかとなった（図3-B）。この結果は、ノーザンハイブリダイゼッション法によりMls-1^{a}抗原陽性マウスの胸腺細胞に於てMTV-7 mRNAの発現が認められたという研究報告と一致する[39]。

通常、Tリンパ球はTCRを介してAPC上に提示された自己MHCと外来抗原由来ペプチド断片との複合物をMHCハプロタイプ特異的に認識し活性化される。一方、Mls抗原反応性Tリンパ球の活性化にMHCクラスII分子は介在するがハプロタイプ拘束性は認められない事が明らかにされている[3~5]。今回興味深いことに、co-stimulatory signal を代替すると考えられるPMA刺激マクロファージ株P388D.1由来の可溶性因子存在下に[20]、Mls-1^{a}抗原陽性胸腺Tリンパ球画分はVβ6陽性Tリンパ球の増殖を誘導した（図2）。即ち、クラスII分子を合成していない応答及び刺激Tリンパ球間での相互作用によりMls-1^a-MLRが誘導される事が示された。従って、co-stimulatory factor存在下に於けるMls抗原反応性Tリンパ球の活性化にはクラスII分子は必要とされないものと考えられる。しかし、胸腺Tリンパ球はクラスII分子陽性細胞から遊離されたクラスII分子を少なからず細胞表面に獲得しているという事が報告されているので[40]、この様なクラスII分子がMls-1^{a}抗原の提示に介在しているという可能性は否定できない。

Mls-1^{a}抗原陽性胸腺Tリンパ球画分投与により、レシピエントの胸腺のVβ6陽性Tリンパ球がほぼ完全に除去される事から（図5）、投与されたMls-1^{a}胸腺Tリンパ球画分は、レシピエントの胸腺内に速やかに移行しMls-1^{a}抗原反応性Tリンパ球のネガティブセレクッションに関与しているものと考えられる。一方、胸腺Tリンパ球画分投与により脾臓Vβ6陽性Tリンパ球は部分的に除去され（図6、表3）、除去されずに残存しているVβ6陽性Tリンパ球はアナージーに陥っている（図4）事が示された。投与した胸腺Tリンパ球画分は2 x10^{6}個という少ない細胞数なので、Mls-1^{a}抗原に対して高い親和性を有する一部のTリンパ球(α鎖の違いにより規定されると思われる)だけが除去されたものと考えられる。従って、多数のMls抗原発現Tリンパ球が存在する胸腺内という生理的条件下では、対応する応答Tリンパ球は完全に除去されているものと考えられる（図1）。他方、この部分的除去は胸腺Tリンパ球の免疫寛容性誘導能が胸腺Bリンパ球よりも弱い事に起因している可能性も考えられるので、現在胸腺BリンパTリンパ球とに於ける免疫寛容性誘導能を比較検討しているところである。

胸腺Tリンパ球画分投与によるMls-1^{a}抗原反応性Vβ6陽性Tリンパ球の除去機構としては、投与されたMls-1^{a}抗原陽性胸腺Tリンパ球とレシピエントのVβ6陽性胸腺T

リンパ球との直接的な細胞間相互作用、或いは投与された胸腺Tリンパ球から遊離したMls-1^{a}抗原を捕捉したレシピエントのマクロファージ系細胞とVβ6陽性胸腺Tリンパ球との相互作用が考えられる。Mls抗原発現細胞からBリンパ球やマクロファージ等のAPCへのMls抗原の乗り移りは殆ど認められない事から[13]、前者の機構によりネガティブセレクッションが惹起されるものと考えられる。一般に、胸腺内での自己MHCや自己構成成分に対する免疫寛容性誘導は髄質に存在するマクロファージ系細胞により担われていると考えられている[10,11]。従って、胸腺内でのMls抗原に対するネガティブセレクションに胸腺Tリンパ球自身が重要な役割を担っている事を示唆する今回の結果は、免疫寛容性誘導機構の新しいモデルを提唱する非常に興味ある知見であると思われる。

結論

本研究では胸腺Tリンパ球に於けるMls抗原の発現及びその免疫寛容性誘導活性について検討した。その結果、1）Bリンパ球機能不全を呈するxidマウスに於て、混合リンパ球反応でのMls抗原提示能は検出されないにも拘わらず、Mls抗原反応性Tリンパ球が除去されている事から、Mls抗原はBリンパ球以外のリンパ系細胞にも発現しており免疫寛容性の誘導に関与している可能性が考えられた。2）実際に、Mls-1^a抗原陽性マウスからの胸腺Tリンパ球画分は、co-stimulatory signalを代替する活性化マクロファージ株由来可溶性因子存在下に、Mls-1^a抗原に反応性を示すVβ6陽性Tリンパ球の増殖反応を誘導した。3）またRT-PCR法を用いた解析で、胸腺Tリンパ球画分はMls-1^a抗原をコードするMTV-7 mRNAを発現している事も明らかとなった。4）Mls-1^a胸腺Tリンパ球画分をMls-1^bであるB10.BRマウスの新生仔期に投与することにより、Vβ6陽性応答Tリンパ球の除去及びアナージーに起因する免疫寛容性が誘導された。以上の結果から、胸腺Tリンパ球はMls抗原を発現しており、免疫寛容性誘導活性を有する事が明らかとなった。一般的に、胸腺内での自己抗原に対する免疫寛容性の誘導は、髄質に存在するマクロファージ系細胞により担われていると考えられている。従って、胸腺内でのMls抗原に対する免疫寛容性の誘導に胸腺Tリンパ球自身が重要な役割を担っている事を示唆する本研究の結果は、免疫寛容性誘導機構を解明する上で非常に興味ある知見であると思われる。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った大阪大学歯学部口腔治療学講座、岡田宏教授、並びに大阪大学医学部バイオメディカル教育研究センター腫瘍医学部門・腫瘍発生学研究部、濱岡利之教授に心より感謝いたします。また、本研究を進めるに当たり、終始適切な御助言と御指示を賜った大阪大学医学部バイオメディカル教育研究センター腫瘍医学部門・腫瘍発生学研究部、小野史郎講師に深く感謝いたします。最後に本研究の遂行に御協力戴いた、大阪大学歯学部口腔治療学講座並びに大阪大学医学部バイオメディカル教育研究センター腫瘍医学部門・腫瘍発生学研究部の方々に深く感謝いたします。

文献

1) Festenstein, H. (1973) : Immunogenetic and biological aspects of in vitro lymphocyte allotransformation (MLR) in the mouse. *Transplant. Rev.*, 15, 62-88.

2) Abe, R. and Hodes, R. J. (1989) : Properties of the Mls system: a revised formulation of Mls genetics and an analysis of T-cell recognition of Mls determinants. *Immunol. Rev.*, 107, 5-28.

3) Janeway, C., Jr. (1991) : Selective elements for the Vβ region of the T cell receptor: Mls and the bacterial toxic mitogens. *Adv. Immunol.*, 50, 1-53.

4) Abe, R. and Hodes, R. J. (1989) : T-cell recognition of minor lymphocyte stimulating (Mls) gene products. *Annu. Rev. Immunol.*, 7, 683-708.

5) Herman, A., Kappler, J. W., Marrack, P. and Pullen, A. M. (1991) : Superantigens: mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, 9, 745-772.

6) MacDonald, H. R., Schneider, R., Lees, R. K., Howe, R. C., Acha-Orbea, H., Festenstein, H., Zinkernagel, R. M. and Hengartner, H. (1988) : T-cell receptor Vβ use predicts reactivity and tolerance to Mls^a-encoded antigens. *Nature*, 332, 40-45.

7) Kappler, J. W., Staerz, U., White, J. and Marrack, P. C. (1988) : Self-tolerance eliminates T cells specific for Mls-modified products of the major histocompatibility complex. *Nature*, 332, 35-40.

8) Pullen, A. M., Marrack, P. and Kappler, J. W. (1988) : The T-cell repertoire is heavily influenced by tolerance to polymorphic self-antigens. *Nature*, 335, 796-801.

9) Kappler, J. W., Wade, T., White, J., Kushnir, E., Blackman, M., Bill, J., Roehm, N. and Marrack, P. C. (1987) : A T cell receptor Vβ segment that imparts reactivity to a class II major histocompatibility complex product. *Cell*, 49, 263-271.

10) Hugo, P., Kappler, J. W. and Marrack, P. C. (1993) : Positive selection of TCRαβ thymocytes: is cortical thymic epithelium an obligatory participant in the presentation of major histocompatibility complex protein? *Immunol. Rev.*, 135, 133-155.

11) Schwartz, R. (1989) : Acquisition of immunological self-tolerance. *Cell*, 57, 1073-1081.

12) Molina, I. J., Cannon, N. A., Hyman, R. and Huber, B. T. (1989) : Macrophages and T cells do not express Mls^a determinants. *J. Immunol.*, 143, 39-44.

13) Webb, S. R., Okamoto, A., Ron, Y. and Sprent, J. (1989) : Restricted tissue

distribution of Mls^a determinants: stimulation of Mls^a-reactive T cells by B cells but not by dendritic cells or macrophages. *J. Exp. Med.*, 169, 1-12.

14) Arase-Fukushi, N., Arase, H., Ogasawara, K., Good, R. A. and Onoe, K. (1993) : Production of minor lymphocyte stimulatory-1^a antigen from activated $CD4^+$ or $CD8^+$ T cells. *J. Immunol.*, 151, 4445-4454.

15) Webb, S. R. and Sprent, J. (1990) : Induction of neonatal tolerance to Mls^a antigens by $CD8^+$ T cells. *Science*, 248, 1643-1646.

16) Hathcock, K. S., Singer, A. and Hodes, R. J. (1981) : *Manual of Macrophage Methodology.* (Herscowitz, H. B., Holden, H. T.,Bellanti, J. A., & Ghaffar, A., editors). ed. 1, Marcel Dekker Inc., New York, 127-133

17) Oi, V. T., Jones, P. P., Goding, J. W. and Herzenberg, L. A. (1978) : Properties of monoclonal antibodies to mouse Ig allotypes, H-2, and Ia antigens. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 81, 115-129.

18) Ozato, K., Mayer, N. and Sachs, D. (1980) : Hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies to mouse H-2 and Ia antigens. *J. Immunol.*, 124, 533-540.

19) Staerz, U. D., Rammensee, H.-G., Benedetto, J. D. and Bevan, M. J. (1985) : Characterization of a murine monoclonal antibody specific for an allotypic determinant on T cell antigen receptor. *J. Immunol.*, 134, 3994-4000.

20) Mizuochi, T., Ono, S., Malek, T. R. and Singer, A. (1986) : Characterization of two distinct primary T cell populations that secrete interleukin 2 upon recognition of class I or class II major histocompatibility antigens. *J. Exp. Med.*, 163, 603-619.

21) Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162, 156-159.

22) Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) : *Molecular cloning. A laboratory manual.* (Irwin, N., Ford, N., Nolan, C., Ferguson, M. and Ockler, M., editors). ed. 2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 14.5-14.34.

23) Scher, I. (1982) : CBA/N immune defective mice; Evidence for the failure of a B cell subpopulation to be expressed. *Immunol. Rev.*, 64, 117-136.

24) Kanagawa, O., Palmer, E. and Bill, J. (1989) : The T cell receptor Vβ 6 domain imparts reactivity to the Mls-1^a antigen. *Cell. Immunol.*, 119, 412-426.

25) Liu, Y. and Linsley, P. S. (1992) : Costimulation of T-cell growth. *Curr. Opin. Immunol.*, 4, 265-270.

26) Acha-Orbea, H., Scarpellino, L., Shakhov, A. N., Held, W. and MacDonald, H. R. (1992) : Inhibition of mouse mammary tumor virus-induced T cell responses in vivo

by antibodies to an open reading frame protein. *J. Exp. Med.*, 176, 1769-1772.

27) Beutner, U., Frankel, W. N., Cote, M. S., Coffin, J. M. and Huber, B. T. (1992) : Mls-1 is encoded by the long terminal repeat open reading frame of the mouse mammary tumor provirus Mtv-7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89, 5432-5436.

28) Choi, Y., Kappler, J. W. and Marrack, P. (1991) : A superantigen encoded in the open reading frame of the 3' long terminal repeat of mouse mammary tumour virus. *Nature*, 350, 203-207.

29) Choi, Y., Marrack, P. and Kappler, J. W. (1992) : Structural analysis of a mouse mammary tumor virus superantigens. *J. Exp. Med.*, 175, 847-852.

30) Held, W., Shakhov, A. N., Waanders, G., Scarpellino, L., Luethy, R., Kraehenbuhl, J. P., MacDonald, H. R. and Acha-Orbea, H. (1992) : An exogenous mouse mammary tumor virus with properties of Mls-1^a (Mtv-7). *J. Exp. Med.*, 175, 1623-1633.

31) MacDonald, H. R., Lees, R. K., Baschieri, S., Herrman, T. and Lussow, A. R. (1993) : Peripheral T-cell reactivity to bacterial superantigens in vivo: the response/anergy paradox. *Immunol. Rev.*, 133, 105-117.

32) Marrack, P. C., Hugo, P., McCormack, J. and Kappler, J. W. (1993) : Death and T cells. *Immunol. Rev.*, 133, 119-129.

33) Ahmed, A. and Scher, I. (1976) : Studies on non-H-2-linked lymphocyte-activating determinants II. Nonexpression of Mls determinants in a mouse strain with an X-linked B lymphocyte immune defect. *J. Immunol.*, 117, 1922-1926.

34) Webb, S. R. and Sprent, J. (1989) : T-cell responses and tolerance to Mls^a determinants. *Immunol. Rev.*, 107, 141-158.

35) Inaba, M., Inaba, K., Hosono, M., Kumamoto, T., Ishida, T., Muramatsu, S., Masuda, T. and Ikehara, S. (1991) : Distinct mechanisms of neonatal tolerance induced by dendritic cells and thymic B cells. *J. Exp. Med.*, 173, 549-559.

36) Mazda, O., Watanabe, Y., Gyotoku, J. and Katsura, Y. (1991) : Requirement of dendritic cells and B cells in the clonal deletion of Mls-reactive T cells in the thymus. *J. Exp. Med.*, 173, 539-547.

37) Beutner, U., Kraus, E., Kitamura, D., Rajewsky, K. and Huber, B. T. (1994) : B cells are essential for murine mammary tumor virus transmission, but not for presentation of endogenous superantigens. *J. Exp. Med.*, 179, 1457-1466.

38) Winslow, G. M., Scherer, M. T., Kappler, J. W. and Marrack, P. (1992) : Detection and biochemical characterization of the mouse mammary tumor virus 7 superantigen (Mls-1^a). *Cell*, 71, 719-730.

39) Mohan, N., Mottershead, D., Subramanyam, M., Beutner, U. and Huber, B. T. (1993)

: Production and characterization of an Mls-1-specific monoclonal antibody. *J. Exp. Med.*, 177, 351-358.

40) Sharrow, S. O., Mathieson, B. J. and Singer, A. (1981) : Cell surface appearance of unexpected host MHC determinants on thymocytes from radiation bone marrow chimeras. *J. Immunol.*, 126, 1327-1335.

Expression of Mls-1^a antigens and tolerance induction by thymic T lymphocytes

Satoru YAMADA

Department of Periodontology and Endodontology,
Osaka University Faculty of Dentistry,
1-8, Yamadaoka, Suita, Osaka, 565, Japan

Key words : Minor lymphocyte stimulating antigens (Mls), Tolerance, Thymic T lymphocytes

The present study investigated mechanisms underlying tolerance induction to minor lymphocyte stimulating (Mls) antigens by taking advantage of high frequency of Mls-reactive T lymphocytes with certain Vβ chain of T-cell receptor. Mls antigens were thought to be mainly expressed on B lymphocytes as assessed by stimulator cell activity in mixed lymphocyte reaction (MLR). Interestingly, Mls-1^a-reactive T lymphocytes expressing Vβ6 were deleted in Mls-1^a mice carrying an X-linked defect (*xid*) of B-lymphocyte function, although their spleen cells failed to stimulate Vβ6$^+$ T lymphocytes in MLR. Considering the recent report that splenic T lymphocytes bearing Mls-1^a genotype can induce tolerance to the Mls antigens, this result raised a possibility that immature thymic T lymphocytes also expressed Mls-1^a antigens and contributed themselves to negative selection of Vβ6$^+$ T lymphocytes during intrathymic development. Indeed, Mls-1^a thymic T lymphocytes from *xid* mice as well as normal were shown to be capable of stimulating Vβ6$^+$ responding T lymphocytes in MLR when the culture was conducted in the presence of soluble factor(s) replacing co-stimulatory signal. Moreover, RT-PCR analysis revealed the expression of mRNA for MTV-7 encoding Mls-1^a antigens in thymic T lymphocytes from Mls-1^a mice. These results clearly showed that immature thymic T lymphocytes also produced Mls antigens. Finally, it was determined whether thymic T lymphocytes might have the ability to induce tolerance to Mls antigens. To examine this possibility, Mls-1^a thymic T lymphocytes were injected *i.p.* into neonatal Mls-1^b mice. The injection induced specific unresponsiveness of Vβ6$^+$ responding T lymphocytes through partial deletion and anergy. Thus, the present results demonstrate that thymic T lymphocytes also express Mls antigens, and play a crucial role in the negative selection. This seems to be a novel model of the tolerance induction, because it has been generally accepted that bone marrow-derived monocytes are predominantly responsible for negative selection to self antigens within thymus.

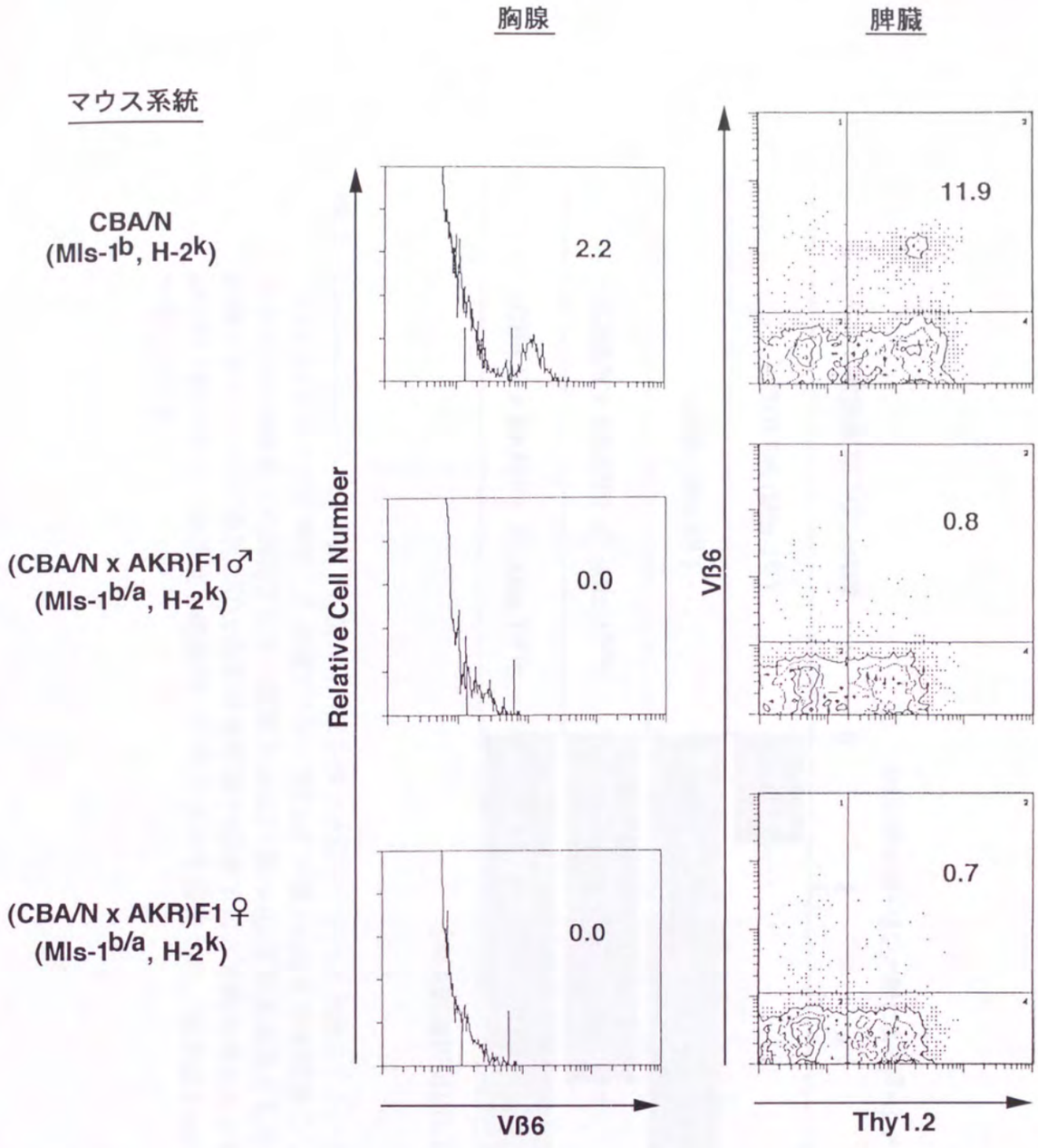


図１　X染色体連鎖Bリンパ球機能不全を呈する(CBA/N x AKR)F1雄マウスに於けるMls-1^{a}抗原反応性Tリンパ球の欠損

各マウス系統より胸腺細胞及び脾臓細胞を取り出し、胸腺細胞については抗-Vβ６鎖抗体による単染色、また脾臓細胞については抗-Vβ6鎖抗体と抗-Thy1.2抗体との２重染色を行ないFACSにより解析した。各パネル内の数字は胸腺細胞については全胸腺細胞中のVβ6強陽性細胞の割合(%)を、脾臓細胞についてはThy1.2陽性Tリンパ球中のVβ6陽性細胞の割合(%)を表している。

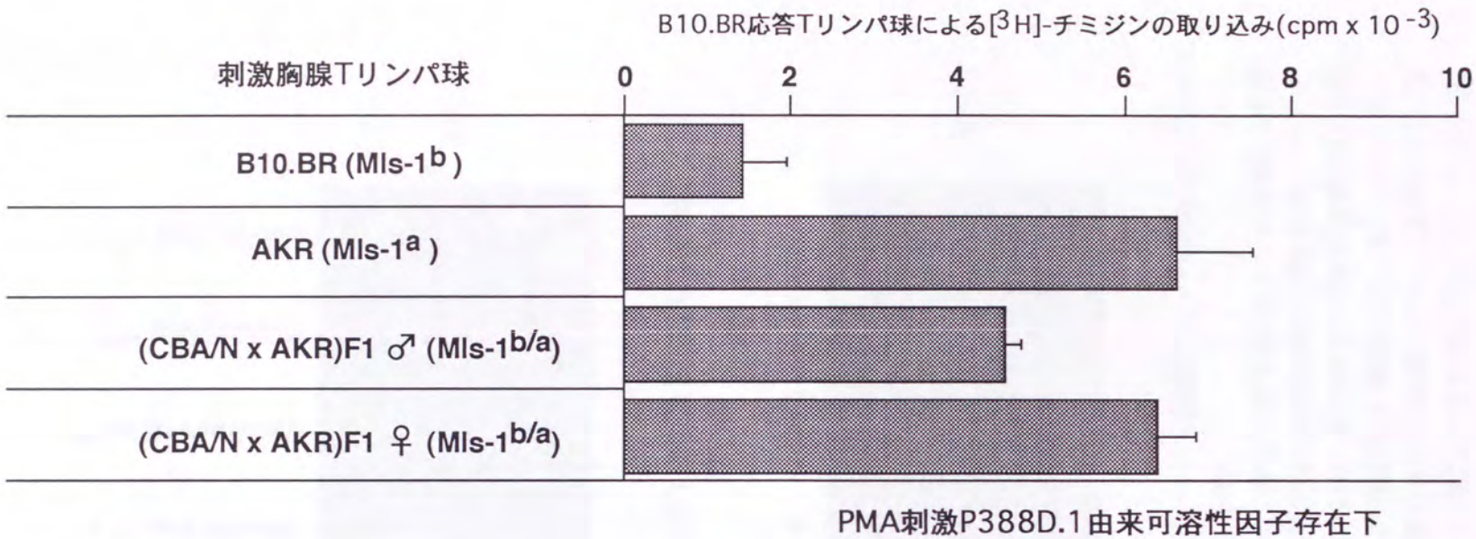


図2　Co-stimulatory factor存在下に於ける(CBA/N x AKR)F1マウス胸腺Tリンパ球画分のMls-1^{a}抗原提示能
B10.BRマウスから精製した脾臓Tリンパ球(1x10^{5}個/well)を応答細胞とし、マイトマイシン処理した各マウス系統からの胸腺Tリンパ球画分(8x10^{5}個/well)を刺激細胞としてco-stimulatory factor(PMA刺激マクロファージ株P388D.1由来可溶性因子)存在下に5日間培養した。細胞回収6時間前に18.5 kBqの[^{3}H]-チミジンを添加し細胞内への取り込みを測定した。結果は3 wellsの算術平均と標準誤差で表している。

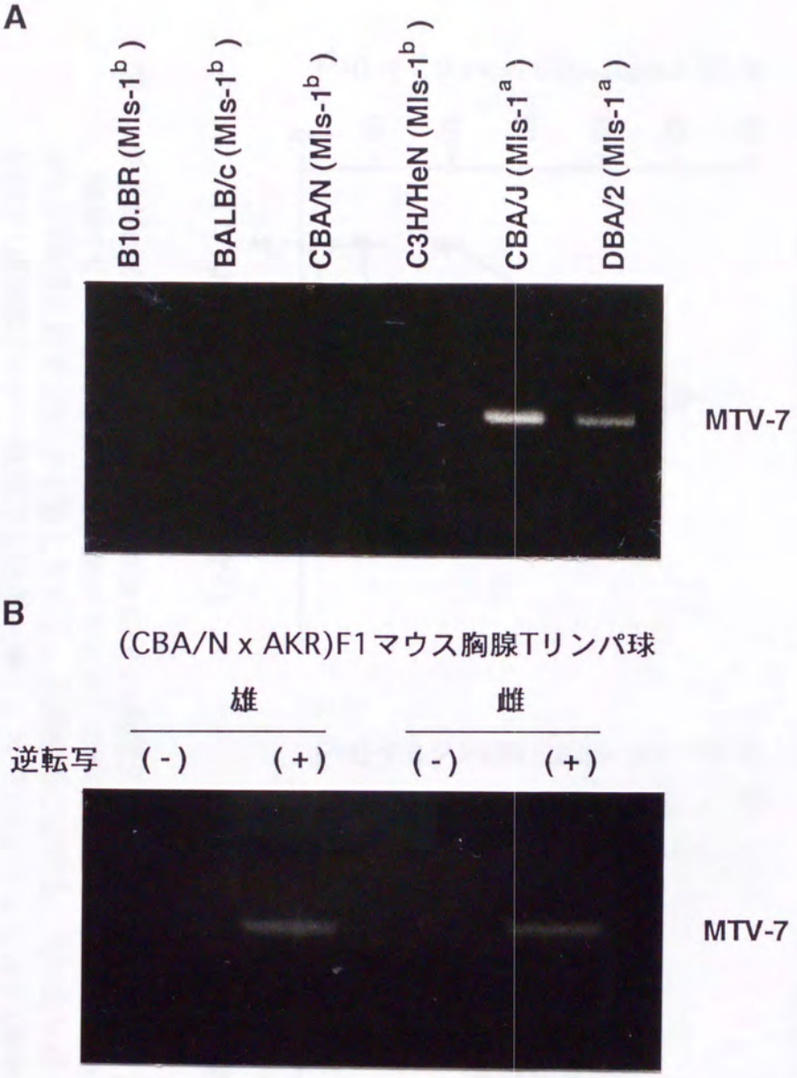


図3　(CBA/N x AKR)F1マウス胸腺Tリンパ球画分に於けるMTV-7 mRNAの発現

A）異なるMls-1遺伝子型を示すマウス系統の脾臓細胞より抽出した総RNAからMTV-7特異的プライマーを用いたRT-PCR法によりMTV-7特異的配列を増幅し、プライマーの特異性を確認した。B）(CBA/N x AKR)F1雄及び雌マウスの胸腺Tリンパ球画分から抽出した総RNAを、MTV-7特異的プライマーを用いたRT-PCR法によりMTV-7 mRNAの発現を解析した。

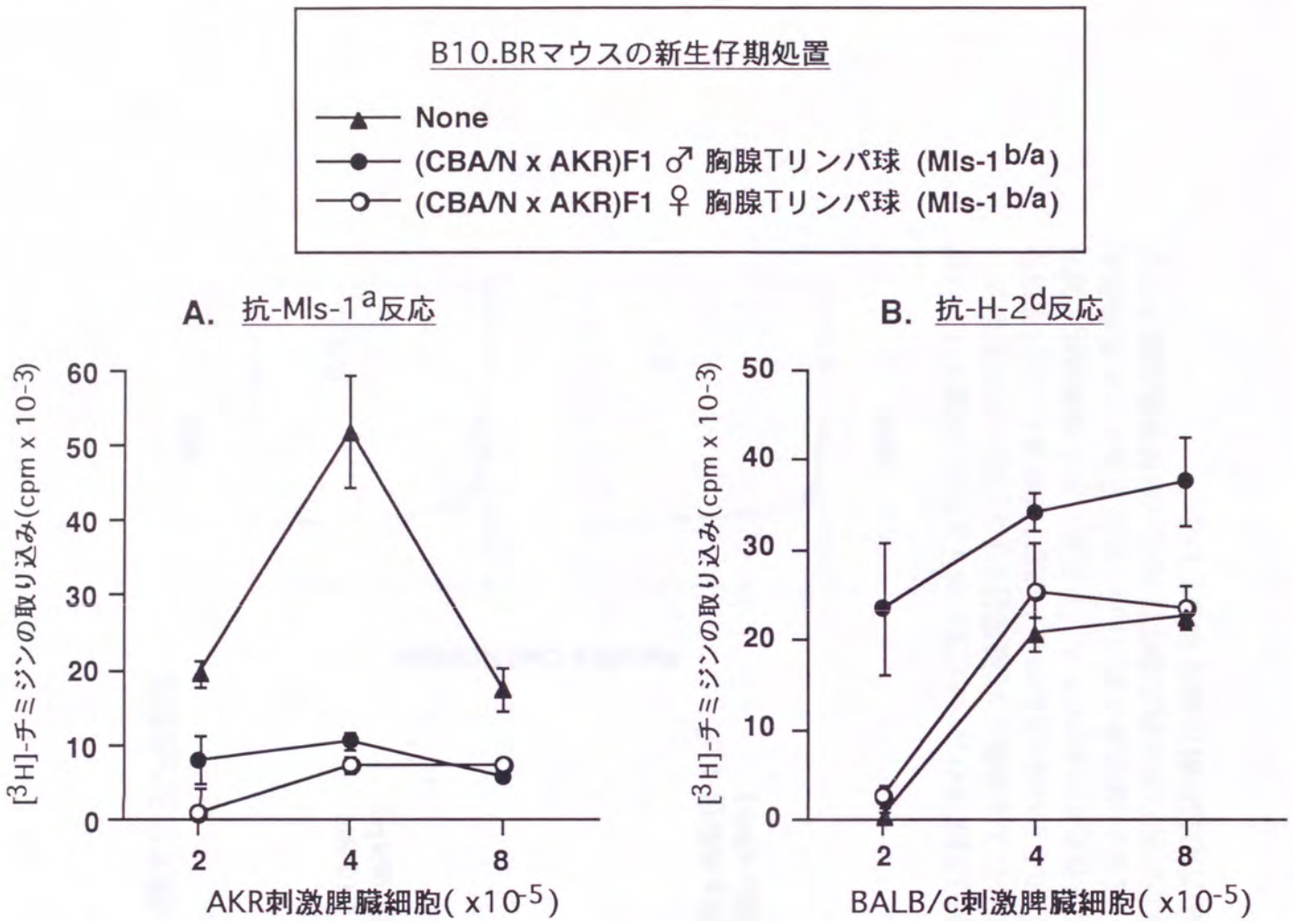


図4　新生仔B10.BRマウスへの(CBA/N x AKR)F1胸腺Tリンパ球画分投与による免疫寛容性誘導
胸腺Tリンパ球画分投与B10.BRマウスからの脾臓Tリンパ球のA)Mls-1a抗原、及びB)アロH-2d抗原に対するMLRを表している。9週齢時に於ける、PBS投与群（▲）、(CBA/N x AKR)F1雄胸腺Tリンパ球画分投与群（●）、及び(CBA/N x AKR)F1雌胸腺Tリンパ球画分投与群（○）からの応答Tリンパ球をマイトマイシン処理したAKRマウス(Mls-1a)脾臓細胞(A)、あるいはBALB/cマウス(H-2d)脾臓細胞(B)で5日間培養した。結果は3 wellsの算術平均と標準誤差で表している。

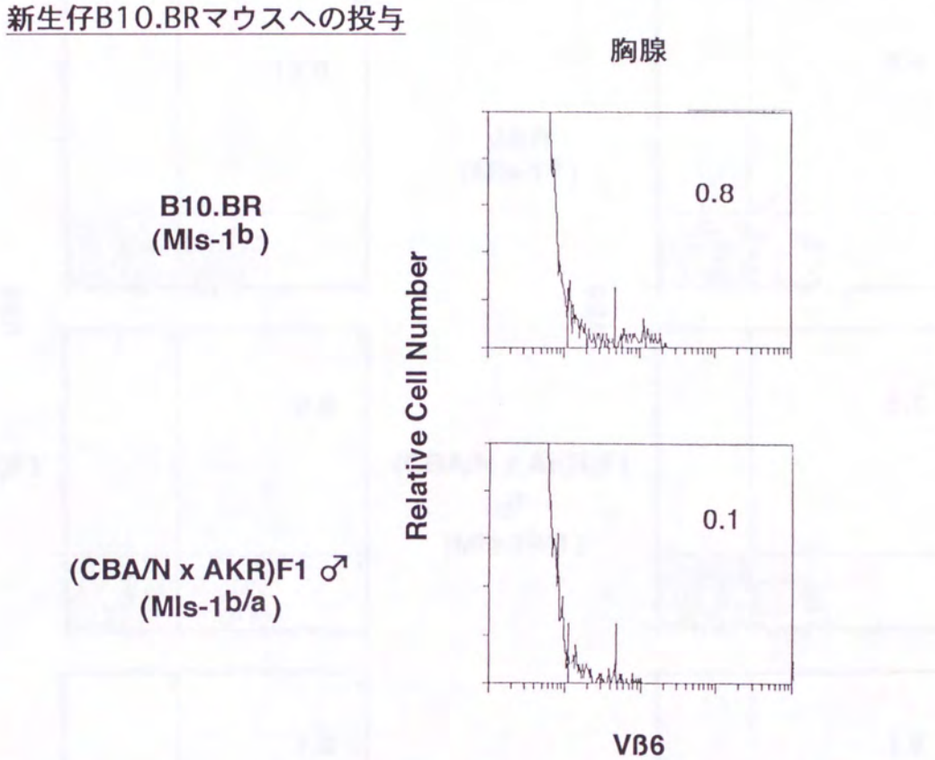


図５　新生仔B10.BRマウスへの(CBA/N x AKR)F1胸腺Tリンパ球画分投与による胸腺Vβ6強陽性Tリンパ球の選択的除去

B10.BRあるいは(CBA/N x AKR)F1雄胸腺Tリンパ球画分を投与されたB10.BRマウス（４週齢）から胸腺細胞を取り出し、抗-Vβ6鎖抗体と抗-Thy1.2抗体を用いて２重染色を行なった。各パネル内の数字はThy1.2陽性胸腺細胞中のVβ6強陽性細胞の割合(%)を示している。

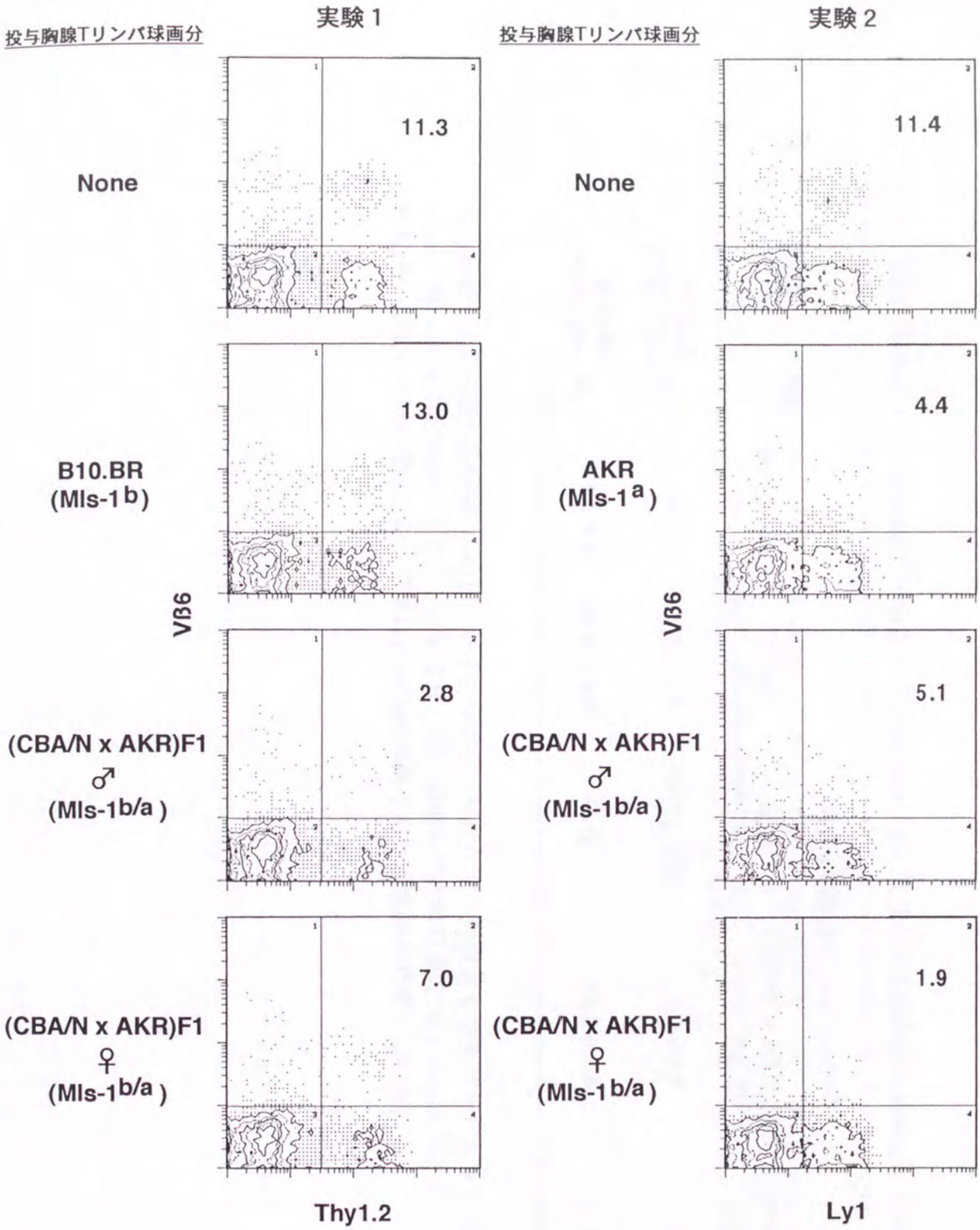


図 6　(CBA/N x AKR)F1雄マウス胸腺Tリンパ球画分投与によるB10.BRマウス脾臓Vβ6陽性Tリンパ球の選択的除去

胸腺Tリンパ球画分投与 9 週間後にB10.BRマウスから脾臓細胞を取り出し実験 1 に於ては抗-Vβ6鎖抗体と抗-Thy1.2抗体との 2 重染色法、実験 2 では抗-Vβ6鎖抗体と抗-Ly1抗体との 2 重染色法によりFACSにて解析した。各パネル内の数字はThy1.2陽性Tリンパ球中のVβ6陽性細胞の割合(%)、及びLy1陽性Tリンパ球中のVβ6陽性細胞の割合(%)を表している。

表 1　X染色体連鎖Bリンパ球機能不全を呈する(CBA/N x AKR)F1雄マウス脾臓細胞のMls-1^a 抗原提示能

応答Tリンパ球	刺激脾臓細胞(cpm x 10^{-3})				
	Syngeneic	CBA/N (H-2^k, Mls-1^b)	AKR (H-2^k, Mls-1^a)	(CBA/N x AKR)F1♂ (H-2^k, Mls-$1^{b/a}$)	(CBA/N x AKR)F1♀ (H-2^k, Mls-$1^{b/a}$)
B10.BR (H-2^k, Mls-1^b)	1.0 ± 0.1	1.6 ± 0.6	41.9 ± 10.8	1.2 ± 0.5	22.0 ± 6.5
BALB/c (H-2^d, Mls-1^b)	1.8 ± 0.4	43.1 ± 6.8	N. D.	12.0 ± 0.8	57.3 ± 14.0

応答脾臓Tリンパ球(1x10^5個/well)を、マイトマイシン処理により増殖能を消失させた各マウスの脾臓細胞(8x10^5個/well)を刺激細胞として、5日間培養した。細胞回収6時間前に18.5 kBqの[^{3}H]-チミジンを添加し細胞内への取り込みを測定した。結果は3 wellsの算術平均と標準誤差で表している。

表 2　X染色体連鎖Bリンパ球機能不全(CBA/N x AKR)F1雄マウスのTリンパ球のMls-1^a抗原に対する反応性

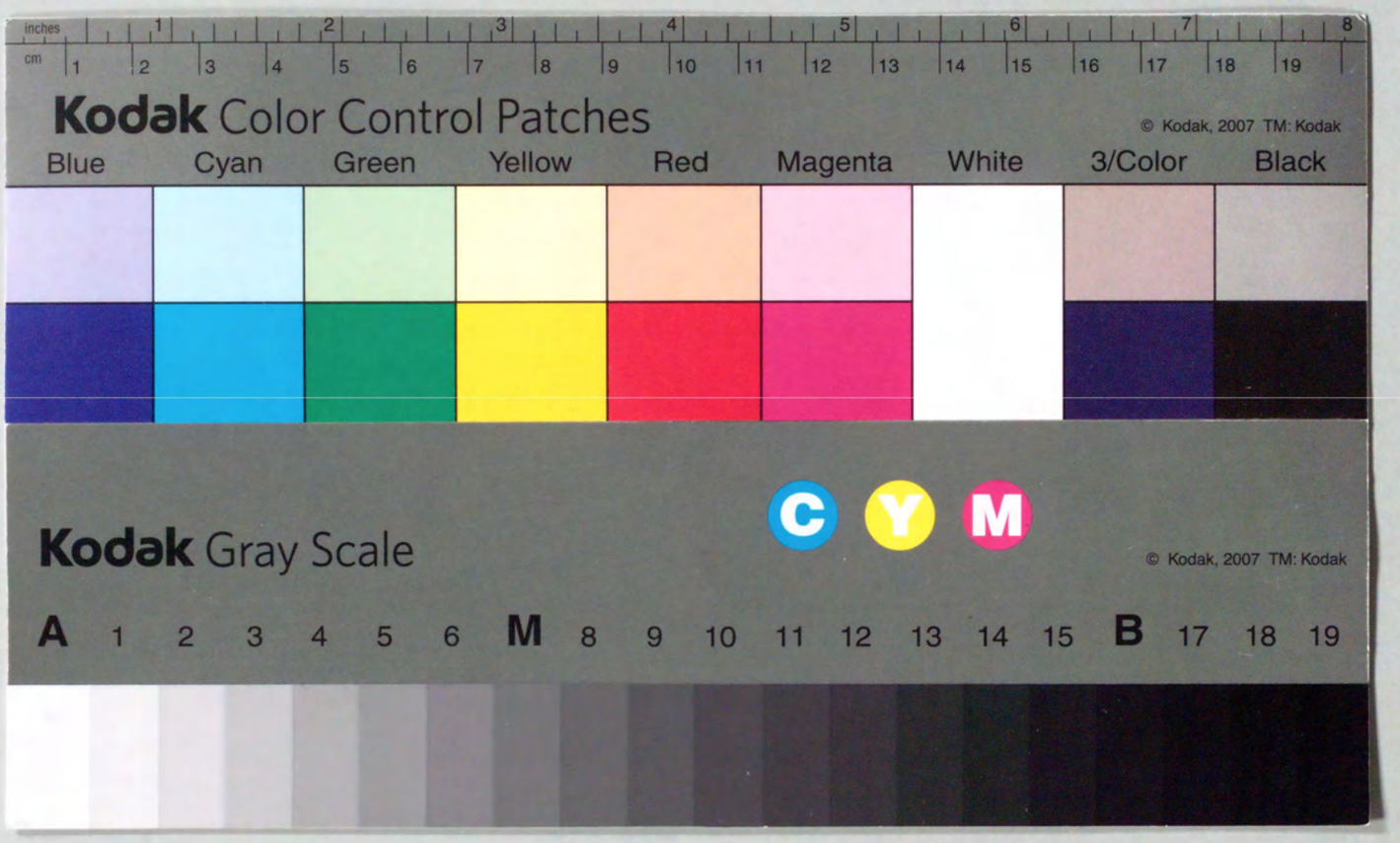
応答Tリンパ球	刺激脾臓細胞(cpm x 10^{-3})		
	Syngeneic	AKR (H-2^k, Mls-1^a)	BALB/c (H-2^d, Mls-1^b)
B10.BR (H-2^k, Mls-1^b)	1.4 ± 0.8	15.9 ± 1.5	18.9 ± 1.9
(CBA/N x AKR)F1 ♂ (H-2^k, Mls-$1^{b/a}$)	1.5 ± 0.4	1.6 ± 0.4	6.3 ± 0.6
(CBA/N x AKR)F1 ♀ (H-2^k, Mls-$1^{b/a}$)	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.1	5.5 ± 0.6

各マウス系統からの応答脾臓Tリンパ球($1x10^5$個/well)を、マイトマイシン処理刺激脾臓細胞($8x10^5$個/well)と共に、5日間培養した。細胞回収6時間前に18.5 kBqの[^{3}H]-チミジンを添加し細胞内への取り込みを測定した。結果は3 wellsの算術平均と標準誤差で表している。

表３　(CBA/N x AKR)F1雄マウス胸腺Tリンパ球画分投与によるMls-1^{a}抗原反応性Vβ6陽性Tリンパ球の選択的除去

新生仔B10.BRマウスに投与した胸腺Tリンパ球画分	Thy1.2陽性細胞中の割合(%)	
	Vβ6陽性細胞	Vβ8陽性細胞
None	11.4 ± 1.2	21.0 ± 3.3
B10.BR (Mls-1^{b})	10.0 ± 1.1	21.9 ± 3.2
AKR (Mls-1^{a})	6.9 ± 1.0	21.8 ± 2.1
(CBA/N x AKR)F1 ♂ (Mls-1$^{b/a}$)	4.8 ± 1.0	21.8 ± 2.0
(CBA/N x AKR)F1 ♀ (Mls-1$^{b/a}$)	6.3 ± 0.8	21.1 ± 2.4

胸腺Tリンパ球画分を投与投与されたB10.BRマウスの脾臓細胞に於ける、Vβ6陽性Tリンパ球及びVβ8陽性Tリンパ球について、抗-Vβ6鎖抗体又は抗-Vβ8鎖抗体と抗-Thy1.2抗体との２重染色法にてFACSにより解析した。結果は独立した３～４回の実験の算術平均と標準誤差で表している。


inches
cm
Kodak Color Control Patches
© Kodak, 2007 TM: Kodak
Blue
Cyan
Green
Yellow
Red
Magenta
White
3/Color
Black
C
Y
M
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