

# Identification of a Novel Activation Antigen Preferentially Expressed on Human T Cells Susceptible to Apoptotic Cell Death by a Monoclonal Antibody IMN3.1

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8419">http://hdl.handle.net/2297/8419</a>

## 単クローン抗体 IMN 3.1の認識するヒト T細胞活性化抗原の 発現動態と細胞死 (アポトーシス) の関連性に関する研究

金沢大学医学部小児科学講座 (主任: 谷口 昂教授)

上 原 貴 博

(平成5年1月12日受付)

Epstein-Barr ウイルス (Epstein-Barr virus, EBV) 初感染による伝染性単核症 (infectious mononucleosis, IM) で増加する活性化 (CD 45RO 抗原陽性) Tリンパ球は、適当な細胞増殖因子を欠くと速やかにアポトーシスに陥るが、これは抗原刺激を介した末梢での T細胞選択機構のモデルとして興味深い。今回、IM 患者末梢血単核細胞を免疫原とし、アポトーシスに陥りやすい T細胞に特異的な細胞表面分子に対する単クローン抗体 (monoclonal antibody, mAb) の作成を試みた。得られた mAb (IMN 3.1) によって認識される IMN 3.1抗原は、IM 患者末梢血活性化 (CD45RO 抗原陽性) T細胞に強く発現するが、正常人末梢血メモリー・活性化 (CD45RO 抗原陽性) T細胞にはわずかな発現が認められるのみで、同疾患において増加した T細胞を明瞭に区分することができた。また、IMN 3.1抗原は同抗原陰性ナイーブ (CD45RO 抗原陰性) T細胞を活性化することにより比較的後期にその発現が誘導された。IMN 3.1抗原は、細胞外構造 120kDa の未知の T細胞活性化抗原で、主に IM 患者 T細胞、胸腺細胞、サイトカイン依存性 ATL 細胞株および抗 Fas mAb 感受性 T細胞株などアポトーシスに陥りやすい T細胞に発現するものと考えられた。

**Key words** Epstein-Barr virus, infectious mononucleosis, T cell, activation antigen, apoptosis

生体の恒常性維持において、細胞増殖と細胞死が一定の割合で保たれることは極めて重要であり、悪性新生物の発生および免疫不全の機序を解明する上で注目されている<sup>12)</sup>。細胞死は、非生理的条件 (低酸素状態、虚血など) による細胞膜障害を特徴とし周囲の組織障害を伴う壊死 (necrosis) と、生理的条件 (個体発生過程、ある種の抗原刺激など) において核の断片化 (nuclear fragmentation) を特徴とする変化のち組織障害を伴わず貧食細胞などによって処理されるアポトーシス (apoptosis)<sup>3)~5)</sup> に大別されている。

アポトーシスを介した細胞死は、個体発生の過程<sup>6)</sup> や胸腺での T細胞受容体-CD3 抗原複合体を介した自己反応性未熟 T細胞の排除<sup>7)~9)</sup>、リンパ節胚中心における B細胞の選択<sup>10)</sup> など免疫機能の樹立、調節過程において中心的役割を果たしている。また末梢成熟 T細胞の免疫応答や<sup>11)~14)</sup>、後天性免疫不全症候群 (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) 発症への関与<sup>15)~17)</sup> も報告されており注目されている。

Epstein-Barr ウイルス (Epstein-Barr virus, EBV) 初感染による伝染性単核症 (infectious mononucleosis, IM)<sup>18)</sup> で著明な増加が認められる活性化 T細胞<sup>19)</sup> では、メモリー (memory)・活性化 (activated) T細胞の指標である CD45RO 抗原<sup>20)</sup> の発現が増強している<sup>21)</sup> が、この活性化 (CD45RO 抗原陽性) T細胞は、細胞増殖因子の欠如により速やかにアポトーシスに陥る<sup>22)~24)</sup>。末梢で抗原刺激を受けた T細胞は CD45RO 抗原を発現しメモリー T細胞群を形成するとされているが<sup>25)~28)</sup>、IM において増加

した活性化 (CD45RO 抗原陽性) T細胞がアポトーシス死によって選択される可能性は、末梢における抗原刺激を介したメモリー T細胞群形成機構のモデルとして興味深い<sup>24)</sup>。

現在、B細胞においては CD77 抗原がリンパ節胚中心でアポトーシスを介して選択される細胞に発現するとされている<sup>30)</sup> が、胸腺細胞を含む T細胞に特異的なアポトーシス関連抗原は知られていない。今回、アポトーシスに陥りやすい IM 活性化 T細胞に発現する表面抗原を明らかにする目的で、単クローン抗体 (monoclonal antibody, mAb) IMN 3.1 を作成した。IMN 3.1 mAb によって認識される抗原は、各種細胞における発現分布および分子量の検討により、アポトーシス指向性 T細胞に特異的に発現する未知の T細胞活性化抗原と考えられる。

### 対象および方法

#### 1. IMN3.1 mAb の作成

臨床症状、血液所見および血清学的所見より IM と診断<sup>18)</sup> された5歳男児よりヘパリン加静脈血を採取、Ficoll-Hypaque 比重遠心法にて得られた末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) で BALB/c マウスを免疫し、mAb を作成した<sup>31)</sup>。5匹のマウスにそれぞれ  $2 \times 10^6$  の IM PBMC を、Freund 完全アジュバント (Difco Laboratories, Detroit, MICH, USA) と共に腹腔内接種、以後2週毎に3回皮下接種することにより追加免疫を行い、2週間後0.1Mリン酸緩衝塩化ナトリウム液 (phosphate-buffered saline, PBS) に再

Abbreviations: AIDS, acquired immunodeficiency syndrome; ATL, adult T cell leukemia; EBV, Epstein-Barr virus; FCS, fetal calf serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; Ig, immunoglobulin; IM, infectious mononucleosis; IL, interleukin; mAb, monoclonal antibody; 2ME, 2-melcaptoethanol; NK, natural

浮遊した同数の IM PBMC をマウス尾静脈より注入，最終免疫とした。最終免疫より 3 日後に 5 匹のマウスより得られた脾細胞を，50% ポリエチレングリコール (polyethylene glycol) 1500 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) にて SP2/0-Ag14 マウス骨髄腫細胞<sup>39)</sup> と融合，ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン選択培養液 (Flow laboratories, Mclean, VA, USA) 中にて 37°C，5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養しハイブリドーマを得た。ハイブリドーマ培養上清の IM PBMC および正常対照 PBMC に対する反応性を，フルオレスセイン・イソチオシアナート (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン (immunoglobulin, Ig) G+IgM 抗体 (TAGO Inc., Burlingame, CA, USA) による間接免疫蛍光法を用いてスクリーニングした。このうち IM PBMC と強く反応し正常対照 PBMC との反応が微弱なものを選択し，限界希釈法によってハイブリドーマ IMN 3.1 を樹立し，BALB/c-*nu/nu* マウスに移植した。得られたマウス腹水を，14% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> DEAE セルロースおよびプロテイン A セファロース (protein A Sepharose) CL-4B カラムクロマトグラフィーにて精製<sup>39)</sup>，Ig サブクラスは，ヤギ抗マウス抗体を用いた免疫酵素抗体法キット (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA, USA) にて決定した。免疫蛍光法による解析には，精製した IMN 3.1 mAb をビオチン標識して用いた<sup>39)</sup>。免疫沈降法による解析に際しては，同 mAb を CNBr 活性化セファロース 4B (Pharmacia, Uppsala, Sweden) と結合させた。この際，対照としてヒト補体 H 因子に対する SS-1 mAb (IgG 2b) (金沢大学がん研究所，坂井俊之助助教授より供与) を用いた。

## II. 他の mAb

FITC 標識抗 Leu-4 (CD3) (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA)，抗 UCHL1 (CD45RO) (Dakopatts a/s, Copenhagen, Denmark) mAb のほか，T 細胞活性化関連抗原と IMN 3.1 抗原発現の比較として，フィコエリスリン (phycoerythrin, PE) 標識抗 HLA-DR，抗インターロイキン (interleukin, IL)-2 受容体 (receptor, R) (CD25)，抗 Leu-45RO (CD45RO) (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) および抗 4B4 (CD29) (Coulter Immunology, Hialeah, FL, USA) mAb を用いた。また三重標識免疫蛍光染色による解析のため，ペリジニクロロフィル蛋白 (perdinin chlorophyll protein, Per-CP) 標識抗 Leu-3a mAb (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) を用いた。抗 Fas mAb (IgM)<sup>39)</sup> は，米原伸博士 (日本たばこ産業医薬基礎研究所，神奈川) より供与された。

## III. 免疫蛍光染色による解析

IMN 3.1 抗原の発現と他のリンパ球表面抗原との関係を明らかにするため，単，二重および三重標識免疫蛍光染色を行い，フローサイトメーター Cytoron Absolute (Ortho Diagnostic Systems K.K., 東京) を用いて解析した。ビオチン化 IMN 3.1 mAb と細胞を 4°C 15 分間反応させた後，3% 非働化ウシ胎仔血清 (fetal calf serum, FCS) (Flow Laboratories) 加 PBS にて二回洗浄，PE 標識ストレプトアビジン (streptavidin) (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) で蛍光染色した。二重

および三重標識免疫蛍光染色は，この細胞をさらに 5% 正常マウス血清存在下で FITC 標識抗体，Per-CP 標識抗体と反応させることを行なった。対照として標識または未標識のヒト白血球と反応しないマウス mAb を用いた。

## IV. 各種細胞の分離

正常満期新生児，1-15 歳までの健康小児，25-62 歳までの成人および前述のごとく IM と診断された 5-12 歳の患児より，ヘパリン加静脈血を得た。正常骨髄は健康成人有志より採取した。胸腺，扁桃，脾，腹腔内リンパ節はそれぞれ手術時に，血液免疫の異常が認められない患者より得た。血液および各組織細胞浮遊液より Ficoll-Hypaque 比重遠心法にて単核細胞を分離した。好中球，単球，血小板および赤血球は，フローサイトメーター Cytoron Absolute にてゲートを設定することにより解析を行った。CD45RO 抗原陰性である<sup>39)</sup> 新生児 CD4 陽性 T 細胞は，フローサイトメーター EPICS-C (Coulter Electronics Inc., Hialeah, FL, USA) を用いた細胞ソーティング法にて分離した<sup>39)</sup>。T 細胞刺激の際に用いられた単球は，プラスチックフラスコ No.3375 (Costar, Cambridge, MA, USA) 付着細胞を使用した。

## V. 細胞培養

本実験において用いた細胞株は，10% FCS，25mM HEPES，5×10<sup>-6</sup>M 2-メルカプトエタノール (2-melcaptoethanol, 2ME)，0.3mg/ml L-グルタミン，200U/ml ペニシリン，10μg/ml ゲンタマイシンおよび 2μg/ml アンホテリシン B を含む RPMI 1640 培養液 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) に適宜細胞増殖因子を加え維持した。Daudi, IM-9, RPMI1788, U937, HL-60, K562, JCRB-M および MOLT4-F 細胞は，国立衛生研究所細胞バンク (東京) より入手した。EBV 形質転換 B 細胞株は，当教室にて樹立したものを<sup>39)</sup> 用いた。IL-2 依存性成人 T 細胞白血病 (adult T cell leukemia, ATL) 細胞株である SY-1, NS-2 および NS-4 細胞，また IL-2 非依存性 ATL 株である MT-1 および HUT-102 細胞は内山卓博士 (京都大学ウイルス研究所) より供与された。IL-2 依存性 ATL 由来株 ILKT-1 細胞，IL-2 依存性非 ATL 由来株 ILKT-4.1 細胞および IL-6 依存性 Lennert リンパ腫由来 T 細胞株 KT-3 細胞<sup>40)</sup> は清水史郎博士 (金沢医科大学血液免疫内科) より供与された。IL-2 依存性 T 細胞株は，100U/ml のヒトリコンビナント (recombinant, r) IL-2 (Shionogi & Co., 大阪) 添加にて維持した。KT-3 細胞は，5ng/ml のヒト rIL-6 (大阪大学平野俊夫，岸本忠三両博士より供与) 存在下にて維持した。Jurkat 細胞は金沢大学がん研究所山本健一教授より分与された。また，数種の細胞株において抗 Fas mAb による細胞傷害活性<sup>41)</sup> を評価するために 1μg/ml の抗 Fas mAb とともに 24 時間培養を行った。細胞生存率は，フローサイトメーター Cytoron Absolute にて，よう化プロピジウム (propidium iodine, PI) の取り込みを解析することにより検討した<sup>42)</sup>。

また，活性化による IMN 3.1 抗原の発現を検討する目的で，新生児 CD4 抗原陽性 T 細胞を 3×10<sup>5</sup>/ml 濃度で，10% 付着単球および 0.1% PHA-P (Difco Laboratories) と共に 24 穴平底プレート (Corning Grass Works, Corning, NY, USA) にて培養，

killer; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PBL, peripheral blood lymphocytes; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PBS, phosphate-buffered saline; PE, phycoerythrin; Per-CP, perdinin chlorophyll protein; PI, propidium iodine; r, recombinant; R, receptor; SDS, sodium dodesyl sulfate

以後3日毎に100U/mlのrIL-2を含む培養液を添加し維持した。

#### VI. 免疫沈降法による解析

細胞表面の放射線同位元素による標識は、ラクトペルオキシダーゼ (lactoperoxidase) 触媒法によって行った<sup>43)</sup>。5×10<sup>7</sup>個の細胞を500μlのPBSに再浮遊し、1mCi/ml <sup>125</sup>I-Na (Amersham International plc, Amersham, UK) 5μl, 20μM ラクトペルオキシダーゼ (Sigma Chemical Co., St. Luis, MO, USA) 25μl および0.03%過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 12μl を添加、3分後に20μM ラクトペルオキシダーゼ 25μl および0.03%過酸化水素 12μl を加え、以後3分毎に3回0.03%過酸化水素を12μl ずつ追加した。この<sup>125</sup>I 標識細胞を0.5mlの溶解緩衝液 (lysis buffer) [1% NP-40, 0.15M NaCl, 1mM エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediamine tetraacetate), 2mM ふっ化フェニルメチルスルホニル (phenylmethylsulfonyl fuloride), 10mM Tris-HCl, PH 8.2] にて溶解、50%セファロース4B浮遊液50μlで4℃、12時間前処置し、IMN 3.1 mAb または SS-1 mAb と結合したセファロース4Bと4℃にて2時間反応させた。これを溶解緩衝液にて3回洗浄後、50μlのLaemmli 試料緩衝液 (Laemmli's sample buffer) [0.0625M Tris-HCl, PH 6.8, 2%ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodesyl sulfate, SDS), 10%グリセロール]<sup>44)</sup> に浮遊、5% 2ME 添加または非添加下で90℃、5分間処理したのち、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) を行い、バイオイメージアナライザー BA100 (富士写真フィルム, 神奈川) にて解析し、高分子量用標品 (molecular weight standards, high range) (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) をマーカーとして分子量を検討した。

### 成 績

#### 1. IMN 3.1 mAb の作成とその性状の解析

IM PBMC を用いて免疫した BALB/c マウス脾細胞と SP2/0 マウス骨髓腫細胞によって作成されたハイブリドーマの培養上清の、他の IM 患児より得た PBL に対する反応性を、間接免疫蛍光法にて検定した。樹立された500種のハイブリドーマのうち96種が IM PBL と反応する抗体を産生したが、その中で正常人 PBL との反応が微弱であるもの1種を選択した。同ハイブリドーマより限界希釈法にてクローンを樹立、得られた mAb (IgG 2bλ) を IMN 3.1 と命名した。IMN 3.1 による免疫蛍光染色と、HLA-DR, CD45RO, および CD29 抗原に対する mAb による免疫蛍光染色の比較を図1に示した。各抗原の発現は全般に IM PBL において強く正常人 PBL では弱い。HLA-DR, CD45RO, および CD29 抗原の発現が正常人 PBL においても二峰性に認められるのに比して、IMN 3.1 によって認識される抗原の発現は正常人 PBL においてはわずかであった。

IMN 3.1 mAb に反応する細胞の性格をさらに明らかにするため、二重および三重標識免疫蛍光染色による解析を行った。図2Aに示すように、IM 患児において IMN 3.1 mAb は CD3 抗原陽性 T細胞と強く反応し非 T細胞とは反応しなかった。また正常人 T細胞とも若干の反応が認められるが IM T細胞に比して微弱であった。CD45RO 抗原の発現は末梢メモリー (または活性化) T細胞の指標として重要であることが知られているが、CD4 および CD8 抗原陽性 T細胞における CD45RO 抗

原の発現と IMN 3.1 mAb により認識される抗原の発現との関係を、三重標識免疫蛍光染色によって解析した結果を示した (図2B)。IM・対照 PBL とともに IMN 3.1 mAb と反応する細胞群は、CD45RO 抗原陽性 T細胞であったが、IM 活性化 (CD45RO 陽性) T細胞に比して正常メモリー (CD45RO 陽性) T細胞の反応は微弱であった。

次に、T細胞の活性化による IMN 3.1 mAb との反応性の変化を検討した。新生児 CD4 抗原陽性 T細胞は大部分がナイーブ T細胞で、CD45RO 抗原の発現を欠くことが知られている。この新生児 CD4 抗原陽性 T細胞を、PHA 刺激し rIL-2 添加にて維持した。図3に示すように IMN 3.1 mAb によって認識される抗原の発現は、IL-2R (CD25) 抗原の発現に比して後期に認められ、CD45RO 抗原と同様に2日目以降で増強し、4-6日頃に最大となった。

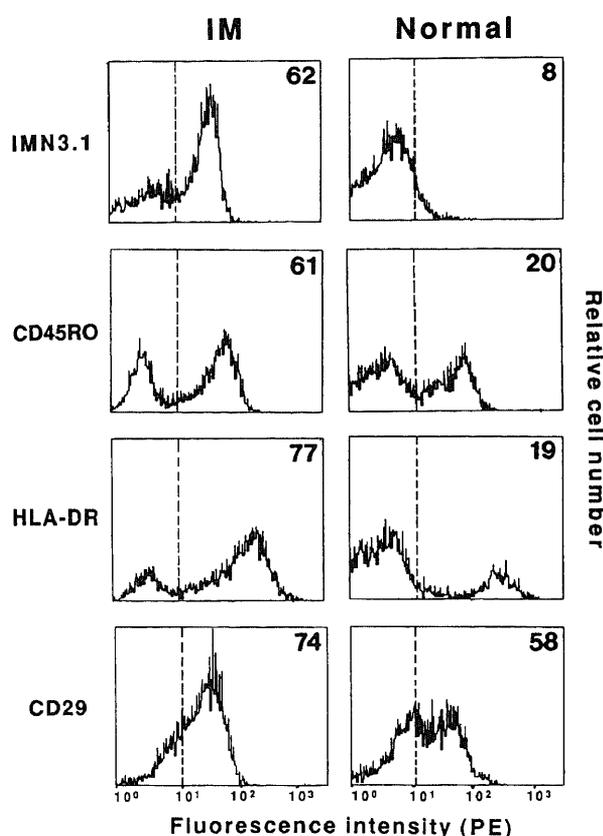


Fig. 1. Immunofluorescence analysis of PBMC stained with IMN 3.1, anti-CD45RO, anti-HLA-DR and anti-CD29 mAb. For IMN 3.1 staining, PBMC from a 7-yr-old patient with acute IM and an age-matched healthy donor were first incubated with biotin-conjugated IMN 3.1 mAb, and then treated with PE-conjugated streptavidin. Expression of CD45RO, HLA-DR or CD29 by PBMC were assessed by using PE-conjugated anti-CD45RO, anti-HLA-DR and anti-CD29 mAb. The stained cells were analyzed on a Cyturon Absolute flowcytometer. Fluorescence profiles are displayed as single parameter histograms. The dashed vertical lines show the controls containing irrelevant antibodies. The figures in histograms indicate the percentages of positive cells as compared with the controls. It was noted that the majority of IM cells were brightly stained with IMN 3.1, whereas IMN 3.1 staining of normal cells was much faint. Such characteristic profiles of IMN 3.1 staining were obtainable for all other IM patients examined in this study.

## II. IMN 3.1 mAb による各種組織血球成分の解析

表1に、IM 患児および様々な年齢の正常対照より得た末梢血リンパ球 (peripheral blood lymphocytes, PBL), 種々の血球成分およびリンパ組織由来細胞における IMN 3.1 抗原陽性率を示した。正常 PBL の IMN 3.1 抗原陽性率は加齢と共に増加したが、IM PBL に比して低値であった。また、脾、扁桃、リンパ節および骨髓細胞の IMN 3.1 抗原陽性率も低値で、血小板、単球、好中球および赤血球は全く IMN 3.1 mAb と反応しなかった。図4に示すように、二重標識免疫蛍光染色による解析では、B細胞、ナチュラルキラー (natural killer, NK) 細胞のいずれも IMN 3.1 mAb と反応しないと考えられた。興味深いことに、胸腺細胞は IMN 3.1 mAb と強く反応し、胸腺細胞の成熟に伴う CD3 抗原の発現との関連が認められた。図5に三重標識免疫蛍光染色にて、胸腺細胞における CD4, CD8 抗原の発現と IMN 3.1 抗原発現との関連の解析結果を示した。CD4 抗原 CD8 抗原ともに陽性である (double positive) 未熟 T 細胞の大部分が IMN 3.1 抗原陽性であったが、CD4 抗原 CD8 抗原ともに陰性な (double negative) 細胞は IMN 3.1 抗原陰性であった。

## III. IMN 3.1 mAb による各種細胞株の解析

表2に各種ヒト細胞株の、IMN 3.1 mAb による解析結果

を、図6には主な細胞株の免疫蛍光染色のパターンを示した。赤白血病細胞株である K562, 単球由来細胞株である U937 および骨髓球由来細胞株 HL-60 細胞は、IMN 3.1 mAb と反応しなかった。パーキットリンパ腫由来細胞株である Daudi 細胞は弱陽性であったが、他の EBV 形質転換細胞株を含む B 細胞由来細胞株は、全く IMN 3.1 mAb と反応しなかった。一方、T 細胞株のほとんどは IMN 3.1 抗原陽性で、特にサイトカイン依存性細胞株である KT-3, ILKT-4.1 および ILKT-1 細胞は強陽性であった。しかしながら IL-2 非依存性 T 細胞株である HUT-102 および MT-1 細胞は IMN 3.1 抗原陰性であった。

## IV. IMN 3.1 mAb によって認識される抗原の分子化学的解析

IMN 3.1 mAb によって認識される分子を明らかにするため、IMN 3.1 陽性 T 細胞株である JCRB-M 細胞をラクトペルオキシダーゼ法によって <sup>125</sup>I 細胞外標識し、IMN 3.1 mAb と結合したセファロース 4B と反応させた後、SDS-PAGE にて解析した。図7Aに示すように、IMN 3.1 mAb では還元、非還元下ともに約 120kDa の単一のバンドが認められたが、SS-1 mAb を用いた対照ではバンドは認められなかった。同様に IM PBMc, 胸腺細胞および U937 細胞を用いた免疫沈降法におい

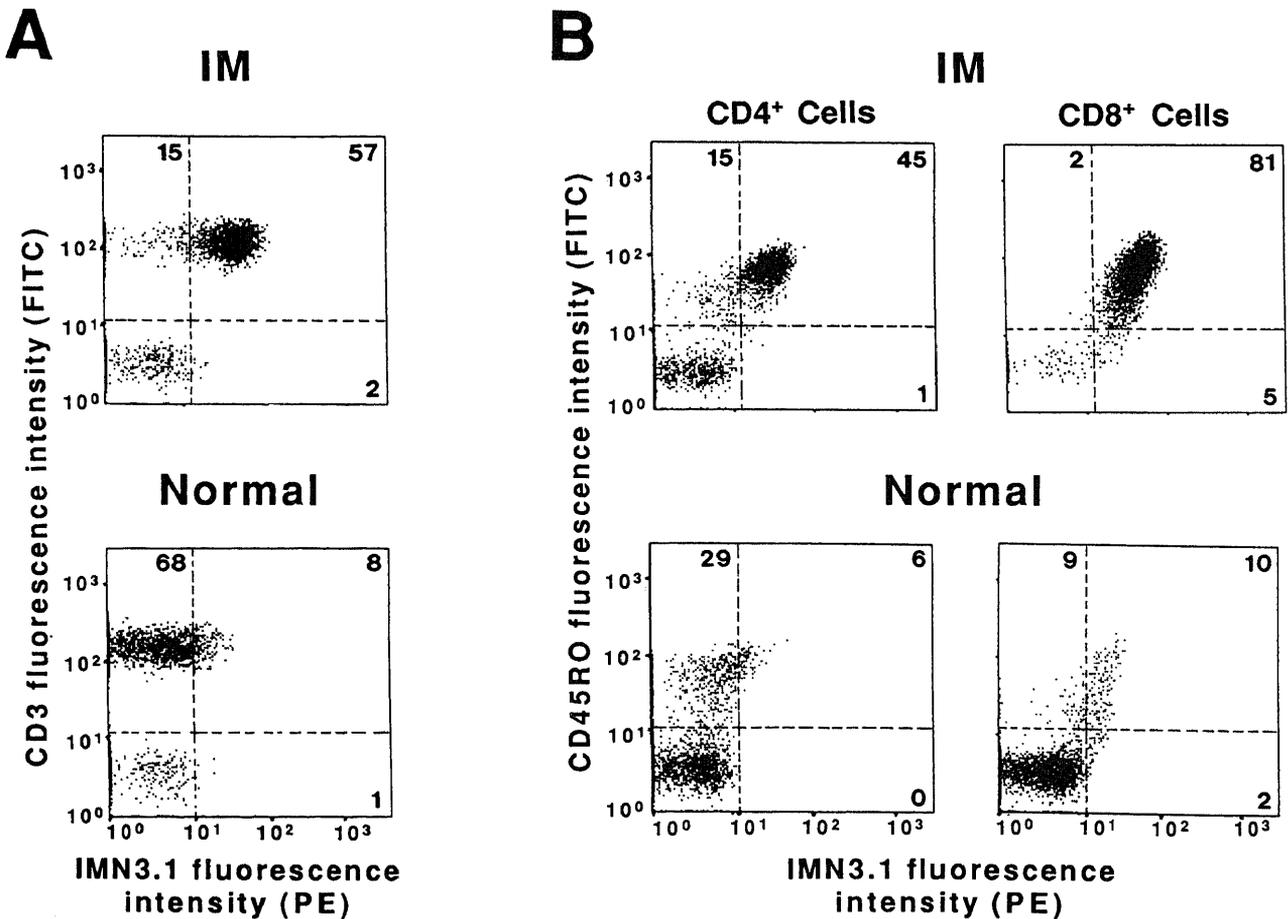


Fig. 2. Two- and three-color immunofluorescence analyses of IMN 3.1-stained cells. For a 10-yr-old patient with acute IM and an age-matched healthy donor, IMN 3.1 staining (PE fluorescence, X-axis) of PBMC was carried out as described in the legend of Fig. 1. The IMN 3.1-stained cells were further treated with anti-CD3 mAb (FITC fluorescence, Y-axis) for two-color staining (A), or incubated simultaneously with anti-CD45RO (FITC fluorescence, Y-axis) and Per-CP-conjugated anti-CD4 or CD8 mAbs for three-color staining (B). Two-color or three-color analyses were performed using a Cyturon Absolute flowcytometer as described in *Materials and Methods*. The dashed lines indicate the controls with irrelevant antibodies. For each quadrant, the percentage of total cells is given.

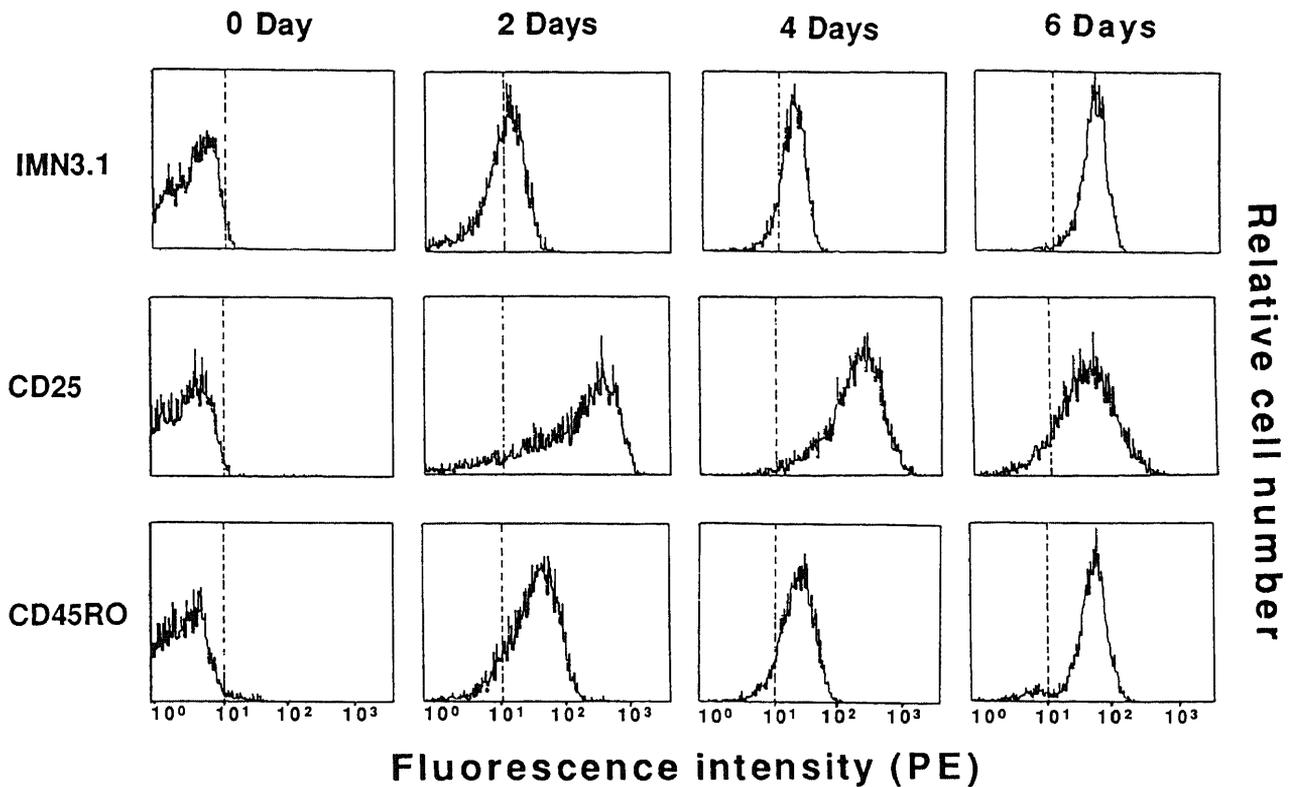


Fig. 3. Kinetics of expression of IMN 3.1 antigen and other activation antigens (CD25 and CD45RO) on T cells stimulated with PHA and IL-2. CD4<sup>+</sup> T cells from the neonatal cord blood were isolated by a cell sorting, stimulated with PHA-P, and maintained in the presence of IL-2. At each time point (0-6 days), the cells were collected, and stained for IMN 3.1 antigen as described in the legend of Fig. 1 and for other antigens using PE-conjugated corresponding mAbs. Fluorescence profiles are displayed as single parameter histograms. The dashed vertical lines show the controls containing irrelevant antibodies.

Table 1. Reactivity of lymphoid and nonlymphoid cells with IMN3.1 mAb

Cell source and type	Number of samples tested	Ratio of IMN3.1 reactive cells to total cells (Mean±SEM, %)
Peripheral blood		
lymphocytes		
IM	16	74±9
Adults	15	15±4
Children	10	8±3
Cord blood	5	2±1
Monocytes	4	<1
Platelets	4	<1
Neutrophils	4	<1
RBC	4	<1
Lymphoid tissues		
Tonsil	3	12±3
Spleen	3	5±2
Lymph node	3	6±3
Thymocytes	5	78±7
Bone marrow cells	3	4±2

IMN3.1 reactivity was determined by single-color immunofluorescence assays with a combined use of biotin-conjugated IMN3.1 mAb and PE-conjugated streptavidin as described in the legend of Fig. 1.

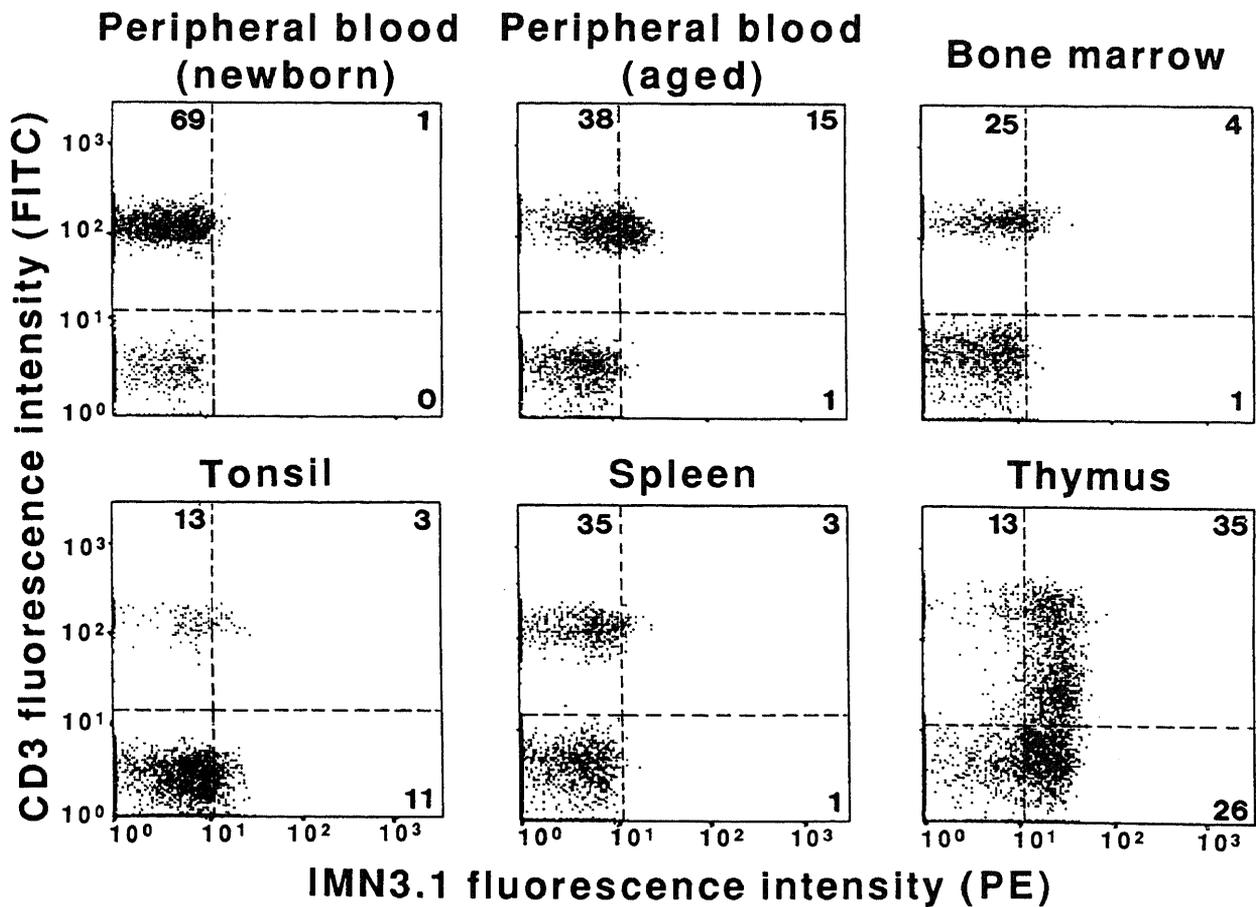


Fig. 4. Two-color immunofluorescence analysis of IMN 3.1-stained cells in various lymphoid tissues. MNC from the neonatal cord blood, the blood of aged (62-yr-old) person, bone marrow, tonsil, spleen, or thymus were stained for IMN 3.1 (PE fluorescence, X-axis) as in legend of Fig. 1, and further treated with anti-CD3 antibody (FITC fluorescence, Y-axis). The dashed lines indicate the controls with irrelevant antibodies. For each quadrant, the percentage of total cells is given.

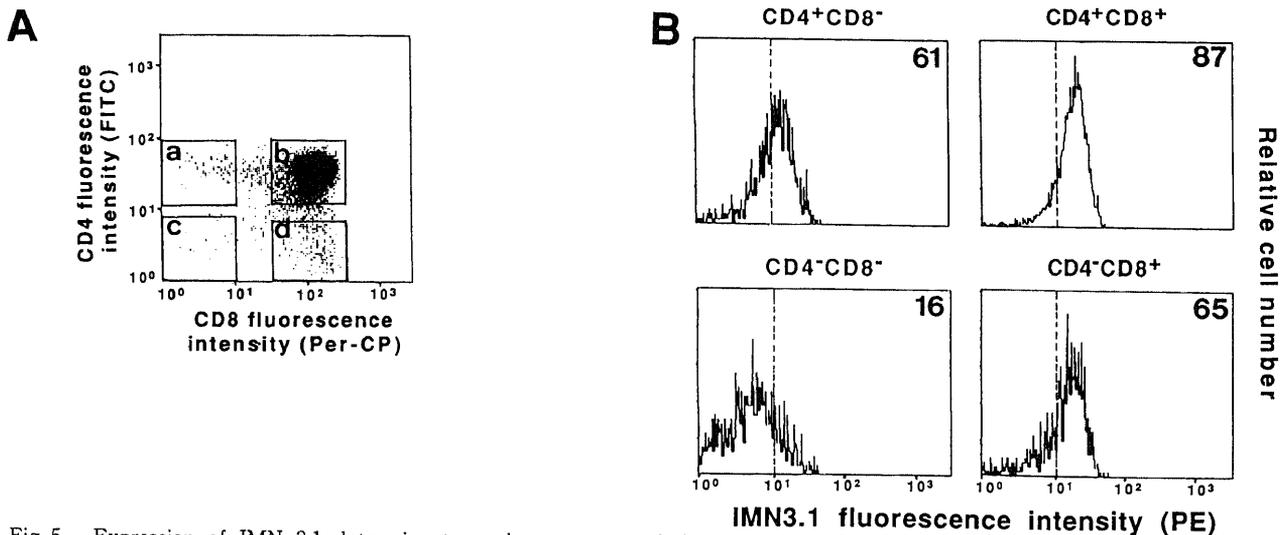


Fig. 5. Expression of IMN 3.1 determinant on thymocyte populations evaluated by three-color immunofluorescence analysis. Thymocytes were treated with IMN 3.1 mAb, followed by an incubation with PE-conjugated streptavidin. Next, these IMN 3.1-stained cells were simultaneously stained for CD4 and CD8 using FITC-conjugated anti-Leu-3a and Per-CP-conjugated anti-Leu-2a mAb, respectively. (A) The cytogram indicates the CD4 (FITC fluorescence, Y-axis) versus CD8 (Per-CP fluorescence, X-axis) staining in thymocytes. The four thymocyte subpopulations (a, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>; b, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>; c, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>; d, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) were identified in the boxes enclosed by solid lines for subsequent analysis of cellular IMN 3.1 expression. (B) Histograms display IMN 3.1 staining (PE fluorescence) in each of four thymocyte populations defined in (A). The dashed vertical lines show the controls, and the figures in histograms indicate the percentages of positive cells as compared with the controls.

て、IM PBMC および胸腺細胞では同一のバンドが認められたが、U937 細胞ではバンドは得られなかった (図 7 B)。

#### V. T細胞株における抗 Fas mAb 感受性と IMN3.1 抗原発現との関連

抗 Fas mAb は、同 mAb によって認識される Fas 抗原を発現するヒト細胞株に対しアポトーシスを介した細胞傷害活性を持つことが知られている。本実験に用いた T および B 細胞株は全て Fas 抗原を発現しているが、今回 T 細胞株における抗 Fas mAb 感受性と IMN 3.1 抗原発現との関連を検討した。図 8 に示すように、非サイトカイン依存性 ATL 由来細胞株である HUT-102 および MT-1 細胞以外の全ての T 細胞株において著明なアポトーシス死が観察された。抗 Fas mAb 感受性 T 細胞株においては種々の程度の IMN 3.1 抗原発現が認められたが、抗 Fas mAb 非感受性である HUT-102 および MT-1 細胞には IMN 3.1 抗原の発現は認められなかった (表 2)。

#### 考 察

EBV 初感染による良性リンパ球増殖性疾患である IM で増加する活性化 T 細胞のマーカーとして、CD45RO および HLA-DR といった活性化抗原が有用であるとされている<sup>19,20</sup>。しかしながら、正常末梢血メモリー T 細胞においても

CD45RO, HLA-DR および CD29 などの活性化抗原の発現が増強していることが知られている<sup>45,46</sup>。さらに B 細胞, 単球, NK 細胞および血小板といった他の血球成分にもこれらの活性化抗原の発現が認められる<sup>47</sup>。このような活性化抗原に対する mAb を用いたフローサイトメーターによる解析では、正常人 PBL においても IM PBL と同様な 2 峰性のパターンが認められ、IM における活性化 T 細胞を区分する上で特異性に乏しい。

本実験において作成した IMN 3.1 mAb によって認識される抗原は、IM 活性化 (CD45RO 陽性) T 細胞に著明な発現が認められるが正常末梢血においてはメモリー (CD45RO 陽性) T 細胞にあっても発現は微弱であって、IM 活性化 T 細胞を明確に区分することができる。また B 細胞, 単球, NK 細胞および血小板は IMN 3.1 抗原陰性であり、各種細胞株における発現の検討と併せ、IMN 3.1 抗原は T 細胞に特異的であると考えられる。さらに、ナイーブ (CD45RO 陰性) T 細胞には IMN 3.1 抗原の発現は認められないが、マイトゲン (mitogen) 刺激により比較的後期にその発現が誘導されることより、IMN 3.1 抗原は後期活性化抗原であると思われる。さらに IMN 3.1 抗原陽性 T 細胞株および胸腺細胞を用いた免疫沈降法による解析より、同抗原の細胞表面構造は約 120kDa であると考えられる。

以上より IMN 3.1 抗原は分子量 120kDa の T 細胞特異的後期

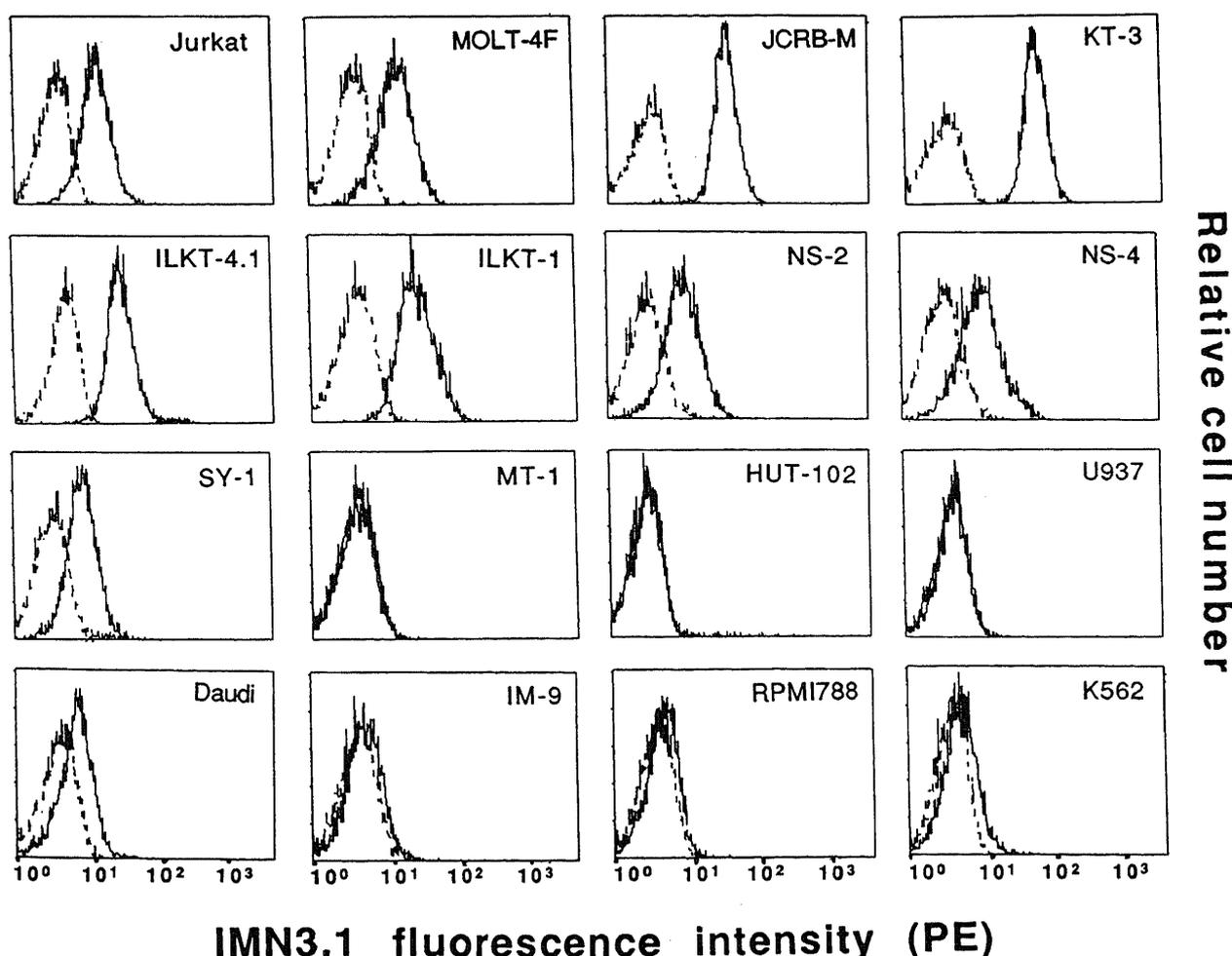


Fig. 6. Immunofluorescence profiles of various hematopoietic cell lines stained with IMN 3.1 mAb. The cells were first stained with biotin-conjugated IMN 3.1 (solid line) or irrelevant control (broken) antibodies, and then treated with PE-conjugated streptavidin.

Table 2. Expression of IMN3.1 antigen on hematopoietic cell lines

Cells	Ratio of IMN3.1 antigen-positive cells to total cells (%)
T-cell lineage	
KT-3	100
JCRB-M	98
Jurkat	65
MOLT-4F	67
IL-2-dependent non-ATL lines	
ILKT-4.1	98
IL-2-dependent ATL lines	
ILKT-1	90
NS-2	52
NS-4	41
SY-1	36
IL-2-independent ATL lines	
MT-1	<1
HUT-102	<1
B-cell lineage	
Daudi	6
IM-9	<1
RPM11788	<1
EBV-transformed lines	<1
Others	
U937	<1
HL-60	<1
K562	3

Reactivity with IMN3.1 mAb was determined by single-color immunofluorescence analysis.

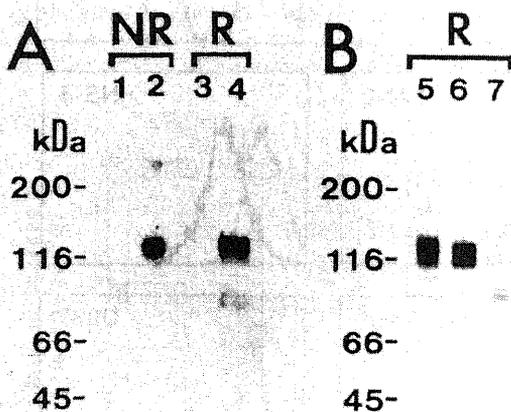


Fig. 7. SDS-PAGE analysis of immunoprecipitates with IMN 3.1 mAb. (A) An IMN 3.1-reactive T cell line, JCRB-M, (lanes 1-4) was surface-labeled with  $^{125}\text{I}$  and lysed as described in *Materials and Methods*. The resulting cell lysates were immunoprecipitated with IMN 3.1-(lanes 2 and 4) or SS-1-(lanes 1 and 3) mAb-linked to Sepharose 4B. SDS gel electrophoresis was performed under non reducing (NR) or reducing (R) conditions. (B) Similarly, radiolabeled immunoprecipitates with IMN 3.1 mAb were obtained from acute IM cells (lane 5), thymocytes (lane 6) and U937 cells (lane 7), and were electrophoresed in a SDS slab gel under reducing (R) condition. Autoradiography of the dried gel was enhanced by X-ray intensifying screens.

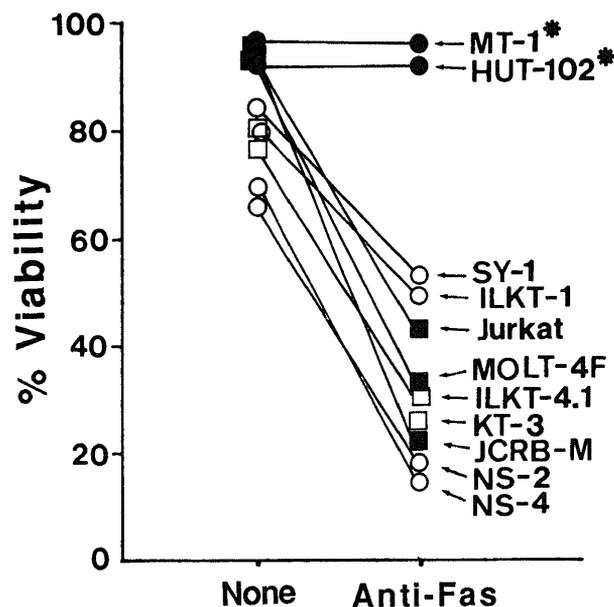


Fig. 8. Susceptibility of cultured T cell lines to cytolytic action of anti-Fas mAb. T cell lines employed in this work are derived (circles) or not (square) from ATL patients. In addition, these cells could be grouped into growth factor-dependent (open) and-independent (closed) lines. The cells were incubated for 24 hr in the presence or absence of 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  anti-Fas mAb. Percent cell viability was determined by a flowcytometry with PI staining. It was found that IMN 3.1-negative lines (\*) such as MT-1 and HUT-102 was refractory to the cytolytic ability of anti-Fas mAb.

活性化抗原と考えられるが、比較的分子量の類似した既知の T 細胞活性化抗原として Tal (CD26) 抗原が知られている<sup>48)49)</sup>。しかしながら、単球および単球由来細胞株である U937 細胞は Tal 抗原陰性とされていた<sup>48)</sup>が実際には Tal 抗原陽性で、一方 IMN 3.1 抗原は陰性であること、胸腺細胞の大部分は IMN 3.1 抗原陽性であるが Tal 抗原は陰性であること、今回免疫沈降法による IMN 3.1 抗原の分子量決定に用いた JCRB-M 細胞は Tal 抗原陰性であることより各種細胞における両抗原の発現は全く異なっていた。さらに IMN 3.1 mAb および抗 Tal mAb による IM PBL の二重標識免疫蛍光染色での解析 (未発表データ) においても両者は異なる抗原であると思われる。近年報告された他のいくつかの T 細胞活性化抗原は、分子量より IMN 3.1 抗原と異なると考えられる<sup>50)~52)</sup>。IMN 3.1 抗原の機能に関しては、T 細胞活性化抗原自身が活性化機構に参与する例が知られている<sup>48)50)51)</sup>が、現時点において抗 CD3 mAb や PMA を用いた刺激系での IMN 3.1 mAb 添加による増強効果は確認されていない。

免疫系の成熟および AIDS の発症過程においてアポトーシスを介した細胞死が重要な位置を占めているとされている<sup>11)~17)</sup>が、アポトーシス関連抗原として Fas 抗原が Yonehara ら<sup>36)41)</sup>によって報告され注目されている。同抗原は、全身性紅斑性狼瘡 (systemic lupus erythematosus) のモデルマウスである *lpr* マウスにおいてその発現が欠如していることが見いだされ<sup>53)</sup>免疫調節における関与が示唆されている。Fas 抗原は、腫瘍壊死因子受容体 (tumor necrosis factor R), 神経成長因子受容体 (nerve growth factor R), B 細胞抗原である CD40, T 細胞および活性化 B 細胞に発現する CD27 抗原などと共通した構造を持ち<sup>54)</sup>、抗 Fas mAb によりアポトーシスが誘導される。同様にアポトーシスを誘導する mAb として、APO-1 mAb が報告されている<sup>55)</sup>が、APO-1 mAb によって認識される抗原は、Oehm ら<sup>56)</sup>によって Fas 抗原と同一であることが明らかとなった。ここで、アポトーシス関連抗原として重要と考えられる Fas/APO-1 抗原と、著明なアポトーシスが観察される IM 活性化 T 細胞<sup>24)</sup>に強く発現する IMN 3.1 抗原を比較検討することは興味深い。著者らの検討によると、Fas 抗原は IM 活性化 (CD45RO 陽性) T 細胞と同様に正常末梢血メモリー (CD45RO 陽性) T 細胞においても強い発現が認められるが、IMN 3.1 抗原陽性 IM 活性化 T 細胞はサイトカイン非存在下で容易にアポトーシスを示すのに対し、IMN 3.1 抗原陰性正常メモリー T 細胞は抗 Fas mAb 刺激によってもアポトーシスは誘導されなかった<sup>57)</sup>。さらに各種 T, B 細胞株などにおいても、Fas/APO-1 抗原発現とアポトーシス感受性の間に解離が認められることが知られている<sup>58)</sup>。またサイトカイン依存性の造血細胞や T 細胞株においてサイトカインの枯渇によってアポトーシスを示す例が報告されており<sup>59)60)</sup>、サイトカイン依存性細胞は比較的アポトーシスに陥りやすいと考えられるが、本実験で用いたサイトカイン依存性 T 細胞株は抗 Fas mAb の添加によって著明なアポトーシスが誘導された。しかしながら、サイトカイン非依存性 ATL 由来細胞株である HUT-102 および MT-1 細胞は、Fas 抗原を強く発現しているにも関わらず抗 Fas mAb 添加による細胞死は認められず、Fas 抗原を介したアポトーシスの誘導には何らかの他の因子が関与していると思われる。ここで注目すべきことは、サイトカイン依存性 T 細胞株には IMN 3.1 抗原が強く発現していたのに対し、サイトカイン非依

存性 T 細胞株には IMN 3.1 抗原の発現が認められなかったことで、アポトーシスに陥りやすい細胞の特徴として Fas 抗原の発現に加え、IMN 3.1 抗原の発現が何らかの意義を有している可能性が示唆される。

T 細胞分化において胸腺は重要な役割を果たしており、自己反応性の CD4 抗原 CD8 抗原ともに陽性な未熟 T 細胞は T 細胞受容体/CD3 複合体を介した刺激によってアポトーシスに陥り、排除 (negative selection) されるとされている<sup>7)~9)</sup>。IMN 3.1 抗原は、この胸腺未熟 T 細胞、IM 活性化 T 細胞およびサイトカイン依存性 ATL 細胞株、抗 Fas mAb 感受性 T 細胞株などアポトーシスに陥りやすい T 細胞に特異的に発現する未知の抗原と考えられる。アポトーシスを介した T 細胞選択の機構を検討する上で同抗原は非常に重要であると思われる、現在分子クローニングによる構造解析を続行中である。

## 結 論

1) IM 患者 PBMC を免疫原としてマウス mAb IMN 3.1 を作成した。

2) IMN 3.1 mAb によって認識される IMN 3.1 抗原は、IM 活性化 (CD45RO 陽性) T 細胞に強く発現し、正常末梢血メモリー (CD45RO 陽性) T 細胞にはわずかな発現が認められるのみであって、IM 活性化 T 細胞を明瞭に区分することができた。

3) 各種細胞における発現の検討から、IMN 3.1 抗原は細胞表面構造 120kDa の未知の T 細胞後期活性化抗原と考えられる。

4) IMN 3.1 抗原の機能は明かではないが、IM 活性化 T 細胞、胸腺未熟 T 細胞、サイトカイン依存性 ATL 細胞株および抗 Fas mAb 感受性 T 細胞株などアポトーシスに陥りやすい T 細胞に選択的発現が認められることから、その解析はアポトーシスを介した T 細胞選択機構を解明する上で有用と思われる。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、ご指導ご校閲を賜りました恩師谷口 昂教授に深謝いたします。また直接ご指導いただきました宮協利男講師、坂井俊之助癌研免疫生物学教室助教授、終始研究に御協力いただきました免疫グループをはじめとする教室員の皆様に感謝いたします。さらに、抗 Fas 抗体を供与下さいました米原 伸博士、各種 T 細胞株を供与下さいました内山 卓、山本健一、清水史郎博士、臍帯血を御提供いただきました金沢精霊病院木下陸郎先生に深謝致します。

なお、本研究の一部は文部省科学研究費、厚生省特定疾患免疫不全症候群調査研究費によったことを付記する。本論文の一部は第34回臨床血液学会総会 (大阪, 1992)、第22回日本免疫学会総会 (名古屋, 1992) において発表した。

## 文 献

- 1) Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R. & Currie, A. R.: Cell death: The Significance of Apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, **68**, 251-306 (1980).
- 2) Raff, M. C.: Social controls on cell survival and death. *Nature*, **356**, 397-400 (1992).
- 3) Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. & Currie, A. R.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, **26**, 239-257 (1972).
- 4) Golstein, P., Ojcius, D. M. & Young, J. D. -E.: Cell

- death mechanisms and the immune system. *Immunol. Rev.*, **121**, 29-65 (1991).
- 5) Cohen, J. J. & Duke, R. C.: Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, **10**, 267-293 (1992).
- 6) Hengartner, M. O., Ellis, R. E. & Horvitz, H. R.: *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature*, **356**, 494-499 (1992).
- 7) Smith, C. A., Williams, G. T., Kingston, R., Jenkinson, E. J. & Owen, J. T.: Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature*, **337**, 181-184 (1989).
- 8) Shi, Y., Bissonnette, R. P., Parfrey, N., Szalay, M., Kubo, R. T. & Green, D. R.: In vivo administration of monoclonal antibodies to the CD3 T cell receptor complex induces cell death (apoptosis) in immature thymocytes. *J. Immunol.*, **146**, 3340-3346 (1991).
- 9) McConkey, D. J., Hartzell, P., Amador-Pérez, Orrenius, S. & Jondal, M.: Calcium-dependent killing of immature thymocytes by stimulation via the CD3/T cell receptor complex. *J. Immunol.*, **143**, 1801-1806 (1989).
- 10) Liu, Y. -J., Joshua, D. E., Williams, G. T., Smith, C. A., Gordon, J. & MacLennan, I. C. M.: Mechanism of antigen-driven selection in germinal centers. *Nature*, **342**, 929-931 (1989).
- 11) Webb, S., Morris, C. & Sprent, J.: Extrathymic tolerance of mature T cells: Clonal elimination as a consequence of immunity. *Cell*, **63**, 1249-1256 (1989).
- 12) Russell, J. H., White, C. L., Loh, D. Y. & Meleedy-Rey, P.: Receptor-stimulated death pathway is opened by antigen in mature T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 2151-2155 (1991).
- 13) Rocha, B. & von Boehmer, H.: Peripheral selection of the T cell repertoire. *Science*, **251**, 1225-1228 (1991).
- 14) Kawabe, Y. & Ochi, A.: Programmed cell death and extrathymic reduction of  $V\beta^+$  CD4<sup>+</sup> T cells in mice tolerant to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *Nature*, **349**, 245-248 (1991).
- 15) Terai, C., Kornbluth, R. S., Pauza, C. D., Richman, D. D. & Carson, D. A.: Apoptosis as a mechanism of cell death in cultured T lymphoblasts acutely infected with HIV-1. *J. Clin. Invest.*, **87**, 1710-1715 (1991).
- 16) Ameisen, J. C. & Capron, A.: Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis. *Immunol. Today*, **12**, 102-105 (1991).
- 17) Meyaard, L., Otto, S. A., Jonker, R. R., Mijster, M. J., Keet, R. P. M. & Meidema, F.: Programmed death of T cells in HIV-1 infection. *Science*, **257**, 217-219 (1992).
- 18) Chin, T. D. Y.: Diagnostic criteria and differential diagnosis. In D. Schlossberg (ed.), *Infectious Mononucleosis*, 2nd ed., p117-125, Springer-Verlag, New York, (1989).
- 19) Tomkinson, B. E., Wagner, D. K., Nelson, D. L. & Sullivan, J. L.: Activated lymphocytes during acute Epstein-Barr virus infection. *J. Immunol.*, **139**, 3802-3807 (1987).
- 20) Thomas, M. L. & Lefrançois, L.: Differential expression of the leukocyte-common antigen family. *Immunol. Today*, **9**, 320-325 (1988).
- 21) Miyawaki, T., Kasahara, Y., Kanegane, H., Ohta, K., Yokoi, T., Yachie, A. & Taniguchi, N.: Expression of CD45RO (UCHL1) by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells as a sign of *in vivo* activation in infectious mononucleosis. *Clin. Exp. Immunol.*, **83**, 447-451 (1991).
- 22) Moss, D. J., Bishop, C. J., Burrows, S. R. & Ryan, J. M.: T lymphocytes in infectious mononucleosis. I. T cell death *in vivo*. *Clin. Exp. Immunol.*, **60**, 61-69 (1985).
- 23) Bishop, C. J., Moss, D. J., Ryan, J. M. & Burrows, S. R.: T lymphocytes in infectious mononucleosis. II. Response *in vitro* to interleukin-2 and establishment of T cell lines. *Clin. Exp. Immunol.*, **60**, 70-77 (1985).
- 24) Uehara, T., Miyawaki, T., Ohta, K., Tamaru, Y., Yokoi, T., Nakamura, S. & Taniguchi, N.: Apoptotic cell death of primed CD45RO<sup>+</sup> T lymphocytes in infectious mononucleosis. *Blood*, **80**, 452-458 (1992).
- 25) Mueller, D. L., Jenkins, M. K. & Schwartz, R. H.: Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signaling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu. Rev. Immunol.*, **7**, 445-480 (1989).
- 26) Jenkins, M. K. & Miller, R. A.: Memory and anergy: challenges to traditional models of T lymphocyte differentiation. *FASEB J.*, **6**, 2428-2433 (1992).
- 27) Sanders, M. E., Makgoba, M. W. & Shaw, S.: Human naive and memory T cells: reinterpretation of helper-inducer and suppressor-inducer subsets. *Immunol. Today*, **9**, 195-199 (1988).
- 28) Sanders, M. E., Makgoba, M. W., Sharrow, S. O., Stephany, D., Springer, T. A., Young, H. A. & Shaw, S.: Human memory T lymphocytes express increased levels of three cell adhesion molecules (LFA-3, CD2 and LFA-1) and three other molecules (UCHL1, CDw29 and Pgp-1) and have enhanced IFN- $\gamma$  production. *J. Immunol.*, **140**, 1401-1407 (1988).
- 29) Akber, A. N., Terry, L., Timms, A., Beverley, P. C. L. & Janossy, G.: Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. *J. Immunol.*, **140**, 2171-2178 (1988).
- 30) Mangeney, M., Richard, Y., Coulaud, D., Tursz, T. & Wiels, J.: CD77: an antigen of germinal center B cells entering apoptosis. *Eur. J. Immunol.*, **21**, 1131-1140 (1991).
- 31) Sato, H., Natsuume-Sakai, S., Miyawaki, T., Taga, K., Hatano, M. & Taniguchi, N.: Monoclonal antibody which has the neutralizing activities for human IL-2. *J. Biol. Response Mod.*, **5**, 191-201 (1986).
- 32) Shulman, M., Wilde, C. D. & Köhler, G.: A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature*, **276**, 269-270 (1978).
- 33) Natsuume-Sakai, S., Sudoh, K., Kaidoh, T.,

- Hayakawa, J. & Takahashi, M.: Structural polymorphism of murine complement factor H controlled by a locus located between the Hc and the  $\beta$  2M locus on the second chromosome of the mouse. *J. Immunol.*, **134**, 2600-2606 (1985).
- 34) Miyawaki, T., Butler, J. L., Radbruch, A., Gartland, G. L. & Cooper, M. D.: Isotype commitment of human B cells that are transformed by Epstein-Barr virus. *Eur. J. Immunol.*, **21**, 215-220 (1991).
- 35) Pilarski, L. M., Yacyszyn, B. R., Jensen, G. S., Pruski, E. & Pabst, H. F.:  $\beta$ 1 integrin (CD29) expression on human postnatal T cell subsets defined by selective CD45 isoform expression. *J. Immunol.*, **147**, 830-837 (1991).
- 36) Yonehara, S., Ishii, A. & Yonehara, M.: A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.*, **169**, 1747-1756 (1989).
- 37) Kanegane, H., Miyawaki, T., Kato, K., Yokoi, T., Uehara, T., Yachie, A. & Taniguchi, N.: A novel subpopulation of CD45RA<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells expressing IL-2 receptor  $\alpha$ -chain (CD25) and having a functionally transitional nature into memory cells. *Int. Immunol.*, **3**, 1349-1356 (1991).
- 38) Kasahara, Y., Miyawaki, T., Kato, K., Kanegane, H., Yachie, A., Yokoi, T. & Taniguchi, N.: Role of interleukin 6 for differential responsiveness of naive and memory CD4<sup>+</sup> T cells in CD2-mediated activation. *J. Exp. Med.*, **172**, 1419-1424 (1990).
- 39) Miyawaki, T., Kubagawa, H., Butler, J. L. & Cooper, M. D.: Ig isotypes produced by EBV-transformed B cells as a function of age and tissue distribution. *J. Immunol.*, **140**, 3887-3892 (1988).
- 40) Shimizu, S., Taniguchi, T., Sugai, S., Matsuoka, M. & Konda, S.: An established CD4<sup>+</sup> T lymphoma cell line derived from a patient with so-called Lennert's lymphoma: possible roles of cytokines in histopathogenesis. *Blood*, **71**, 196-203 (1988).
- 41) Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S. -I., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y. & Nagata, S.: The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*, **66**, 233-243 (1991).
- 42) Janssen, O., Wesselborg, S., Heckl-östreicher, B., Pechhold, K., Bender, A., Schondelmaier, S., Moldenhauer, G. & Kabelitz, D.: T cell receptor/CD3-signaling induces death by apoptosis in human T cell receptor  $\gamma\delta$  + T cells. *J. Immunol.*, **146**, 35-39 (1991).
- 43) Springer, T. A.: Immunoprecipitation. *In* J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, & W. Strober (eds.), *Current Protocols in Immunology*, Unit 8.3., Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, (1991).
- 44) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 45) Beverley, P. C. L.: Is T-cell memory maintained by crossreactive stimulation? *Immunol. Today*, **11**, 203-205 (1990).
- 46) Akber, A. N., Salmon, M. & Janossy, G.: The synergy between naive and memory T cells during activation. *Immunol. Today*, **12**, 184-188 (1991).
- 47) Horějši, V.: Surface antigens of human leukocytes. *Adv. Immunol.*, **49**, 75-147 (1991).
- 48) Fox, D. A., Hussey, R. E., Fitzgerald, K. A., Acuto, O., Poole, C., Palley, L., Daley, J. F., Schlossman, S. F. & Reinherz, E. L.: Ta<sub>1</sub>, a novel 105 kD human T cell activation antigen defined by a monoclonal antibody. *J. Immunol.*, **133**, 1250-1256 (1984).
- 49) Hegen, M., Niedobitek, G., Klein, C. E., Stein H. & Fleisher, B.: The T cell triggering molecule Tpl03 is associated with dipeptidyl aminopeptidase V activity. *J. Immunol.*, **144**, 2908-2914 (1990).
- 50) Bougeret, C., Mansur, I.-G., Dastot, H., Schmid, M., Mahouy, G., Bensussan, A. & Bousmell, L.: Increased surface expression of a newly identified 150-kDa dimer early after human T lymphocyte activation. *J. Immunol.*, **148**, 318-323 (1992).
- 51) Wang, P. L., O'Farrell, S., Clayberger, C. & Krensky, A. M.: Identification and molecular cloning of Tactile. A novel human T cell activation antigen that is a member of the Ig gene superfamily. *J. Immunol.*, **148**, 2600-2608 (1992).
- 52) Lederman, S., Yellin, M. J., Krichevsky, A., Belko, J., Lee, J. J. & Chess, L.: Identification of a novel surface protein on activated CD4<sup>+</sup> T cells that induces contact-dependent B cell differentiation (help). *J. Exp. Med.*, **175**, 1091-1101 (1992).
- 53) Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. & Nagata, S.: Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature*, **356**, 314-317 (1992).
- 54) Foxwell, B. M. J., Barrett, K. & Fedmann, M.: Cytokine receptors: structure and signal transduction. *Cin. Exp. Immunol.*, **90**, 161-169 (1992).
- 55) Trauth, B. C., Klas, C., Peters, A. M. J., Matzku, S., Möller, P., Falk, W., Debatin, K. M. & Krammer, P. H.: Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*, **245**, 301-305 (1989).
- 56) Oehm, A., Behrmann, I., Falk, W., Pawlita, M., Manier, G., Klas, C., Li-Weber, M., Richards, S., Dhein, J., Trauth, B. C., Ponsting, H. & Krammer, P. H.: Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. *J. Biol. Chem.*, **267**, 10709-10715 (1992).
- 57) Miyawaki, T., Uehara, T., Nibu, R., Tsuji, T., Yachie, A., Yonehara, S. & Taniguchi, N.: Differential expression of apoptosis related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. *J. Immunol.*, **149**,

3753-3758 (1992).

58) Falk, M. H., Trauth, B. C., Debatin, K. -M., Klas, C., Gregory, C. D., Rickinson, A. B., Calender, A., Lenoir, G. M., Ellwart, J. W., Krammer, P. H. & Bornkamm, W.: Expression of the APO-1 antigen in Burkitt lymphoma cell lines correlates with a shift towards a lymphoblastoid phenotype. *Blood*, **79**, 3300-3306 (1992).

59) Williams, G. T., Smith, C. A., Spooncer, E., Dexter, T. M. & Taylor, D. R.: Haematopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature*, **343**, 76-79 (1990).

60) Duke, R. C. & Coheri, J. J.: IL-2 addiction: withdrawal of growth factor activates a suicide program in dependent T cells. *Lymphokine Res.*, **5**, 289-299 (1986).

**Identification of a Novel Activation Antigen Preferentially Expressed on Human T Cells Susceptible to Apoptotic Cell Death by a Monoclonal Antibody IMN3.1** Takahiro Uehara, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med. Soc., **102**, 49—60 (1993)

**Key words** Epstein-Barr virus, infectious mononucleosis, T cell, activation antigen, apoptosis

#### Abstract

When cultured without appropriate growth factors, most activated (CD45RO<sup>+</sup>) T cells expanded in acute Epstein-Barr virus (EBV)-induced infectious mononucleosis (IM) easily die through an apoptotic cell death mechanism, indicating one antigen-driven selection in the periphery. In this work, the author attempted to raise the monoclonal antibody (mAb) against cell surface molecules, preferentially expressed on T cells entering apoptosis, by immunizing peripheral blood mononuclear cells from an acute IM patient. The author obtained one mAb, termed IMN3.1, that could define clearly the expansion of activated (CD45RO<sup>+</sup>) T cells in the blood of acute IM patients. In contrast to its intense expression on IM T cells, the IMN3.1-reactive antigen was only dimly expressed on CD45RO<sup>+</sup> (memory or previously activated) populations of T cells from normal individuals. Although naive (CD45RO<sup>-</sup>) populations of T cells usually lacked IMN3.1 antigen, this antigen was inducible relatively late after *in vitro* activation of naive T cells. The cellular distribution and molecular characterization of IMN3.1-reactive antigen suggested that IMN3.1 mAb appeared to recognize a novel activation-associated cell surface determinant of about 120 kDa, which might be predominantly expressed on apoptosis-predisposed T cell-lineage cells, such as IM T cells, thymocytes, cytokine-dependent T cell lines, and anti-Fas sensitive T cell lines.