

Functional Properties and Expression Patterns of CD45 Family Antigens of Naive CD4+T Cells Expressing α Chain of Interleukin 2 Receptor in the Neonatal Period

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	http://hdl.handle.net/2297/8250

新生児期のインターロイキン2レセプター α 鎖陽性 ナイーブ CD4⁺T 細胞の機能と CD45 抗原 ファミリーの発現に関する研究

金沢大学医学部小児科学講座 (主任: 谷口 昂教授)

金 兼 弘 和

(平成3年1月16日受付)

白血球共通抗原 (CD45) はリンパ球, 顆粒球, 単球などの血液細胞に広く存在し, 分子量の異なるいくつかのイソフォームが知られているが, それらイソフォームは CD45 遺伝子のスプライシングの違いによって生ずるとされている。これら CD45 抗原のイソフォームに対する単クローン抗体を用いた解析により, ヒト T 細胞は CD45RO 陽性のメモリー細胞と CD45RA 陽性のナイーブ細胞との二つの細胞分画に識別しうることが明らかとなった。それらの細胞分画間には種々の機能的相違が存在することが指摘されているが, ナイーブ細胞からメモリー細胞への分化・成熟のメカニズムについてはこれまでのところほとんど明らかにされていない。また成人メモリー CD4⁺T 細胞にはインターロイキン2レセプター (interleukin 2 receptor, IL-2R) サブユニットのうち α 鎖 (CD25) が選択的に発現し, その発現はメモリー T 細胞の機能と深く関わっていると報告されている。しかし臍帯血を用いた検討では, メモリー (CD45RO 陽性) 細胞がほとんど認められない新生児 CD4⁺T 細胞においても, IL-2R α 鎖 (CD25) を発現する細胞集団が少なからず認められた (3~8%)。本研究は, 新生児ですでに存在するこの IL-2R α 鎖を発現した CD4⁺T 細胞の機能と免疫発達における意義を明らかにすることを目的として行った。わずかな細胞のメッセンジャー RNA (messenger RNA, mRNA) の解析にもすぐれる逆転写酵素・ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR) 法を利用して, CD25 陽性新生児 CD4⁺T 細胞は実際に IL-2R α 鎖の mRNA を発現していることが確認された。そして興味深いことには, 二重標識免疫蛍光染色によれば新生児 CD4⁺T 細胞における CD25 陽性分画は, 成人と異なり, ナイーブの表面形質 (CD45RA 陽性かつ CD45RO 陰性) を有していた。IL-2R α 鎖を発現した新生児 CD4⁺T 細胞は, 成人の CD45RO 陽性メモリー CD4⁺T 細胞と同様に, 刺激によりインターロイキン4, インターロイキン5, インターフェロン γ のリンホカイン mRNA が発現することが RT-PCR 法により認められ, ポークウィードマイトジェン刺激系における B 細胞の免疫グロブリン産生に対するヘルパー活性も有していた。また RT-PCR 法にて CD45 抗原の mRNA のスプライシングを検討したところ, IL-2R α 鎖を発現した新生児 CD4⁺T 細胞には, CD45RA 抗原をコードする mRNA 転写産物の他に, CD45RO 抗原をコードする mRNA 転写産物が含まれていた。ナイーブ (CD45RA 陽性かつ CD45RO 陰性) の表面形質を有するような CD25 抗原陽性 CD4⁺T 細胞は乳幼児のみならず小児の末梢血においても認められるが, 成人末梢血においてはほとんど認められなかった。以上の結果より, IL-2R α 鎖 (CD25) を発現したナイーブ CD4⁺T 細胞はナイーブからメモリー CD4⁺T 細胞への成熟の過程に存在するユニークな細胞集団を形成している可能性が考えられた。

Key words CD45 isoforms, naive and memory CD4⁺T cells,
IL-2R α (CD25), RT-PCR, lymphokines

Abbreviations: bp, base pair; cDNA, complementary DNA; Con A, concanavalin A; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FCS, fetal calf serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; GM-CSF, granulocyte macrophage colony stimulating factor; IFN- γ ,

胸腺に端を発した未熟なヒトT細胞は、リンパ節、扁桃、脾臓、腸管パイエル板などの末梢リンパ組織において、出生後著しく増加する外来抗原に曝されることにより、より機能的なT細胞へと分化成熟するものと考えられる¹⁾。つまり、抗原暴露の経験のない“ナイーブ”T細胞は抗原の刺激を受けるとともに成熟し、比較的半減期の長い“メモリー”T細胞へと形質転換し流血中を循環することになる。メモリーT細胞は、再度同一の抗原に接すると速やかに反応し、特異免疫応答におけるエフェクター細胞として機能する。

T200ファミリー抗原に属する白血球共通抗原(CD45)は顆粒球、単球、リンパ球などの血液細胞に広く分布するが、180より220キロダルトン(kilodalton, kDa)からなる分子量の異なる種々のイソフォームの存在が明らかにされている²⁻⁴⁾。CD45遺伝子は全長130キロ塩基対、33のエクソンから構成される遺伝子であり、CD45抗原細胞外部分をコードする第4、5、6エクソンのスプライシングのちがいによりいくつかのメッセンジャーRNA(messenger RNA, mRNA)転写産物が作られ、その結果としてサイズの異なるイソフォームが生ずるとされる⁵⁻⁹⁾。Bリンパ球やNK細胞が比較的分子量の大きい(220kDa)CD45抗原を発現するのに対して、T細胞にあつてはその分化段階に対応した様々なCD45抗原のイソフォームを発現することが知られている⁹⁾。多くの胸腺細胞ではより小さな分子量180kDaのCD45抗原を有するのに対して、循環血液中や末梢リンパ組織に移行した未熟なナイーブT細胞は比較的大きな分子量(205および220kDa)のCD45RA抗原を発現し、これは単クローン抗体(monoclonal antibody, mAb)の2H4により同定される¹⁰⁾。他方、メモリーT細胞はより小さな分子量(180kDa)のCD45RO抗原を発現し、UCHL1 mAbにより識別される¹¹⁾。最近の研究により、CD45抗原の細胞内部分にシグナル伝達に重要なチロシンホスファターゼ活性が見いだされているが¹²⁾、ナイーブT細胞からメモリーT細胞への分化に伴ってみられるCD45抗原イソフォーム発現の意義はこれまでのところ明らかではない。

メモリーT細胞はナイーブT細胞と異なりCD2、CD11a、CD54、CD58などの細胞間接着分子が強く発現しており、メモリーT細胞の活性化におけるこれらの分子の役割が注目を集めている¹³⁾¹⁴⁾。最近、われわれ

は、メモリーT細胞がT細胞増殖因子であるインターロイキン2(interleukin 2, IL-2)に対する受容体(interleukin 2 receptor, IL-2R)を構成的に発現することを報告している¹⁵⁾。つまり、成人末梢血のメモリーCD4陽性(CD4⁺)T細胞がIL-2Rを構成する2つの単位のうち分子量55,000の α 鎖(CD25)を有し、メモリーCD8(CD8⁺)T細胞が分子量75,000の β 鎖を発現して、IL-2R発現がメモリー細胞機能に深く関わっていることが示されている。一方、出生直後の新生児臍帯血のT細胞ではCD45抗原の発現よりみて大部分がナイーブT細胞と考えられ、IL-2Rの発現も極めて軽微であると思われた。しかし、この研究を進める過程で、新生児CD4⁺T細胞にあっても少数ながら有意なIL-2R α 鎖(CD25)を発現する細胞亜群の存在を観察した。本研究では、新生児のみならず乳児・小児期に見いだされ、ナイーブ細胞の形質を持ちながら、IL-2R α 鎖(CD25)を発現するCD4⁺T細胞亜群の細胞表面形質および機能的性状を解析するとともに、メモリーCD4⁺T細胞への成熟過程での意義について明らかにすることを目的とした。

対象および方法

I. 単クローン抗体

ヒトIL-2R α 鎖(CD25)に対する抗Tac mAb(IgG2a)¹⁶⁾はT.A.Waldmann博士(National Institutes of Health, Bethesda, U.S.A.)から供与された。非標識ならびにフルオレスセイン・イソチオシアン酸(fluorescein isothiocyanate, FITC)標識のUCHL1(抗CD45RO)mAb(IgG2a)¹⁷⁾はDakopatts a/s(Copenhagen, Denmark)から購入した。フィコエリスリン(phycoerythrin, PE)標識の2H4(抗CD45RA)mAb(IgG1)¹⁸⁾はCoulter Immunology(Hialeah, FL, U.S.A.)から購入した。FITC標識の抗Leu-3a(抗CD4, IgG1)、抗Leu-2a(抗CD8, IgG1)、抗Leu-16(抗CD20, IgG1)、抗IL-2R(抗Leu-2R α 鎖, IgG1)、T細胞抗原レセプター γ/δ 鎖(T cell receptor γ/δ , TCR- γ/δ)に対する抗TCR- γ/δ -1 mAb(IgG1)はBeckton Dickinson Immunocytometry Systems(Mountain View, CA, U.S.A.)から購入した。OKNK(抗CD16, IgM)、OKM14(抗CD14, IgG2a)mAbはOrtho Diagnostic Systems K.K.(東京)から購入した。非標識の抗UCHL1および抗

interferon γ : Ig, immunoglobulin; IL-2, interleukin 2; IL-3, interleukin 3; IL-4, interleukin 4; IL-5, interleukin 5; IL-2R, interleukin 2 receptor; kDa, kilodalton; mAb, monoclonal antibody; mRNA, messenger RNA; PBS, phosphate buffered saline; PCR,

Tac mAb の免疫蛍光染色はビオチン標識家兎抗マウス IgG2a 抗体 (Zymed Laboratories, San Francisco, CA, U.S.A.) と FITC 標識アビジンもしくは PE 標識ストレプトアビジン (いずれも Beckton Dickinson Immunocytometry Systems) とを組み合わせた間接法にて行った。

II. 単核細胞の分離

1. 対象

新生児臍帯血は、満期正常分娩児の臍帯静脈より、ヘパリン加採血した。また、乳児より12歳までの小児および25~35歳までの健康成人より、ヘパリン加静脈血を得た。

2. 単核細胞の分離方法

ヘパリン加静脈血から、Ficoll-Hypaque 比重遠心法により単核細胞を採取し¹⁷⁾、5%非働化ウシ胎児血清 (fetal calf serum, FCS) (Flow Laboratories, McLean, VA, U.S.A.), 25mM Hepes, 5×10^{-5} M 2-メルカプトエタノール, 0.3mg/ml L-グルタミン, 200 U/ml ペニシリン, 10 μ g/ml ゲンタマイシンを含む RPMI1640 培養液 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, U.S.A.) に浮遊した。その単核細胞をプラスチックフラスコ (No.3375; Costar, Cambridge, MA, U.S.A.) にて37°Cで30分間培養した。付着細胞を除去した後、2-aminoethyl-isothiuronium bromide (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, U.S.A.) 処理ヒツジ赤血球を用いたロゼット形成と Ficoll-Hypaque 比重遠心法にて E-ロゼット形成細胞 (E⁺細胞) と非形成細胞 (E⁻細胞) に分離した¹⁸⁾。E⁺細胞と E⁻細胞はそれぞれ CD4⁺ T 細胞, B細胞を精製するために使用した。またプラスチックフラスコに付着した細胞はセルスクレイパー (No.3010; Costar) にて剥がして、単球として使用した。

III. 免疫蛍光染色による解析

細胞は2つの異なる表面抗原を直接法もしくは間接法にて二重標識染色して、3% FCS および0.1%アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS) にて洗浄後、Epics-C フローサイトメーター (Coulter Electronics, Inc., Hialeah, FL, U.S.A.) にて解析した¹⁹⁾。

IV. T細胞亜群とB細胞の精製

必要な細胞分画は Epics-C フローサイトメーターを用いた細胞ソーティング法により得た²⁰⁾。まず E⁺細胞

を抗 Tac mAb にて染色した、次にビオチン標識家兎抗マウス IgG2a 抗体にて染色し、さらに PE 標識ストレプトアビジンならびに FITC 標識抗 Leu-3a (抗 CD4) mAb にて染色した。このように二重標識免疫蛍光染色したものを解析して、CD25 陽性ならびに陰性の CD4⁺ T 細胞を得た。同様に E⁺細胞を PE 標識した抗 CD45ROmAb と FITC 標識した抗 CD4mAb による二重標識染色により、CD45RO 陰性のナイーブ CD4⁺ T 細胞と CD45RO 陽性のメモリー CD4⁺ T 細胞とに分離した。CD4⁺ T 細胞における CD45RA 抗原と CD45RO 抗原もしくは CD25 抗原との関係を解析するために、E⁺細胞より CD8 陽性 T細胞, TCR- γ/δ 陽性 T細胞, CD16 陽性ナチュラルキラー細胞, CD20 陽性 B細胞, CD14 陽性単球をソーティング法にて除去して、98%以上の CD4⁺ 細胞とし、CD4⁺ T 細胞分画を得た。また CD20 陽性 B細胞は E⁻細胞よりソーティング法にて得た。

V. CD4⁺ T 細胞亜群の刺激培養条件

培養液は10%非働化ヒト血清を含む RPMI1640 培養液を用いた。1穴あたり 1×10^5 の細胞を96穴平底マイクロタイタープレート (No.25860; Corning Glass Works, Corning, NY, U.S.A.) に200 μ l ずつ分注し、10 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma Chemical Co.) と250 ng/ml カルシウムイオノフォア A23187 (Behring Diagnostics, La Jolla, CA, U.S.A.) を加えた。それらの細胞を炭酸ガス培養器 (37°C, 5% CO₂) にて12時間培養し、RNA 抽出に使用した。

VI. リンホカイン mRNA 解析のための逆転写酵素・ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR) 法

RT-PCR 法は Brenner らの方法に準じて行った²¹⁾。

1. RNA の抽出

RNA の抽出はシングル・ステップ法にて行った²²⁾。すなわち刺激培養した細胞をグアニジニウム・チオシアン酸 (和光純薬工業株式会社, 大坂) にて蛋白変性させ、フェノールおよびクロロホルム処理にて RNA を抽出した。なおキャリアーとして3 μ g 酵母由来のトランスファー RNA を加えた。

2. RNA から cDNA への逆転写

$1 \times 10^5 \sim 10^6$ の細胞から得た RNA を2 μ g のオリ

polymerase chain reaction; PE, phycoerythrin; PHA, phytohemagglutinin; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; PWM, pokeweed mitogen; RT, reverse transcriptase; TCR- γ/δ , T cell receptor γ/δ

ゴ dT (Pharmacia LKB Biotechnology, Bromma, Sweden) をプライマーとして10単位の RT (RAV-2) (宝酒造株式会社, 京都) を含む $50\mu\text{l}$ の反応液中にて 42°C で1時間以上反応させ, 相補的 DNA (complementary DNA, cDNA) を得た. 反応後, cDNA はセファデックス G-50 (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden) を入れたミニカラム (生化学工業株式会社, 東京) を通して純化し, 使用した.

3. PCR ならびに電気泳動

先に得た cDNA の $1/10$ 量 ($5\mu\text{l}$) を2単位の Taq ポリメラーゼ (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CN, U.S.A.) とそれぞれ $1\mu\text{M}$ の $3'$ 側, $5'$ 側オリゴヌクレオチドプライマーを含む $95\mu\text{l}$ の反応液に加えた. 用いたオリゴヌクレオチドプライマーはクローニングされた cDNA^{23)~26)} をもとにして DNA 合成装置 (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA, U.S.A.) にて作成した (表1). インターロイキン 2 (interleukin 2, IL-2), インターロイキン 4 (interleukin 4, IL-4), インターロイキン 5 (interleukin 5, IL-5), インターフェロン γ (interferon- γ , IFN- γ) の増幅産物の期待される長さはそれぞれ462塩基対 (base pair, bp), 462bp, 405bp, 501bp であった. PCR による増幅は DNA サーマルサイクラー (Perkin-Elmer Cetus) を用いて, 変性を 94°C で90秒, アニーリングを 55°C で90秒, DNA 合成を 72°C で120秒の条件で, 30回増幅を行った. 増幅された産物の 10

μl を1.3%寒天ゲルにて電気泳動後, エチジウムブロミド染色を行い, 紫外線照射下で PCR 増幅産物を確認した.

VII. IL-2R α 鎖 (CD25) mRNA 解析のための RT-PCR 法ならびにサザンブロット法

上記に従って, 表1に示すオリゴヌクレオチドプライマーを用いて RT-PCR 法にて増幅を行い, IL-2R α 鎖の mRNA を解析した. 期待される長さは620bp であった. 増幅された産物の一部 ($10\mu\text{l}$) を1.3%寒天ゲル上で電気泳動後, ナイロンメンブレン (Pall BioSupport Division, Glen Cove, NY, U.S.A.) にトランスファーした. 次に制限酵素 EcoRI で切断した IL-2R α 鎖の cDNA²⁹⁾ を digoxigenin (Behringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN, U.S.A.) にて標識したものをプローブとして用いてハイブリダイゼーションを行った. ハイブリダイズした DNA は DNA ラベリングキット (Behringer Mannheim Biochemicals) を用いて発色させた.

VIII. CD45mRNA 転写産物の解析

CD45 遺伝子の転写段階におけるスプライシングのされ方により, CD45mRNA はいくつかのタイプに分けられるが, それらを RT-PCR 法による増幅を行い, 検討した. エクソン 4, 5, 6 をはさむようにして, CD45 遺伝子のそれぞれエクソン 2, 9 の一部をコードするように $5'$, $3'$ 側のプライマーを作成した (表1)⁵⁴⁾²⁹⁾. したがって増幅された産物は異なるスプ

Table 1. Sequence of Oligonucleotides used as PCR Primers

Oligonucleotide	Fragment Size (bp)	Sequence
IL-2-5'	462	ATGTACAGGATGCAACTCCTG
IL-2-3'		TCAAGTCAGTGTGAGATGATGCT
IL-4-5'		ATGGGTCTCACCTCCCAACTG
IL-4-3'		TCAGCTCGAACACTTTGAATAT
IL-5-5'	405	ATGAGGATGCTTCTGCATTTG
IL-5-3'		TCAACTTTCTATTATCCACTCGGT
IFN- γ -5'	501	ATGAAATATACAAGTTATATC
IFN- γ -3'		TTACTGGGATGCTCTTCGACCTCG
IL-2R α -5'	601	ACTGCTCACGTTTCATCATGG
IL-2R α -3'		TGACGAGGCAGGAAGTCTCA
CD45-II-5'	380~863	ATGTATTTGTGGCTTAAACTCTTG
CD45-IX-3'		GCAGTACATGAATTATGAGATATGG

The oligonucleotides were used as primers in the PCR reaction.

ライシングを受けた mRNA 転写産物に由来し、380~863bp のいくつかの大きさのものが期待される。

IX. ポークウィードマイトジェン (pokeweed mitogen, PWM) 刺激系における B 細胞の免疫グロブリン (immunoglobulin, Ig) 産生に対するヘルパー活性

1. 刺激培養条件

成人の CD20 陽性 B 細胞 (2.5×10^4) に CD4⁺ T 細胞の亜分画 (7.5×10^4), 単球 (1×10^4), 1/200 量の PWM (Gibco Laboratories) を加えて, 96 穴平底マイクロタイタープレートを用いて 0.2 ml の 10% FCS を含む RPMI1640 培養液中で培養した³⁰⁾. 10 日間培養した後, 上清を採取した。

2. 上清 Ig 測定

上清の Ig 濃度は酵素結合免疫吸着定量法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) にて測定した³¹⁾. まず pH9.6 の 0.05 M 炭酸緩衝液でヤギ抗ヒト IgG, IgM, IgA 抗体 (Tago, Inc., Burlingame, CA, U.S.A.) を希釈し, 96 穴平底イムノアッセイプレート (Flow Laboratories Inc.) に分注し 4°C で一晩コーティングした. 0.02% アジ化ナトリウム含有 PBS に 0.05% Tween20 (Sigma Chemical Co.) を加えたもの (PBS-Tween) で洗浄し, 1% FCS 加 PBS-Tween で段階希釈した被検上清ならびに既知濃度の標準ヒト血清を加えて, 室温で 2 時間反応させた. 反応終了後, PBS-Tween で洗浄し, 1% FCS 加 PBS-

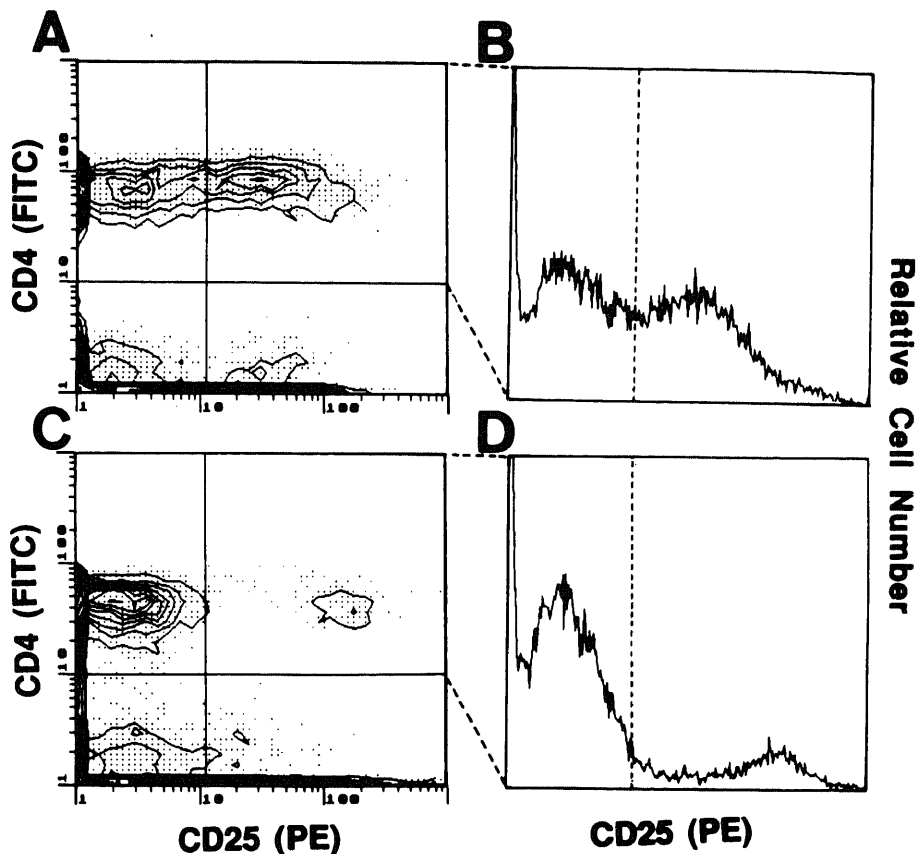
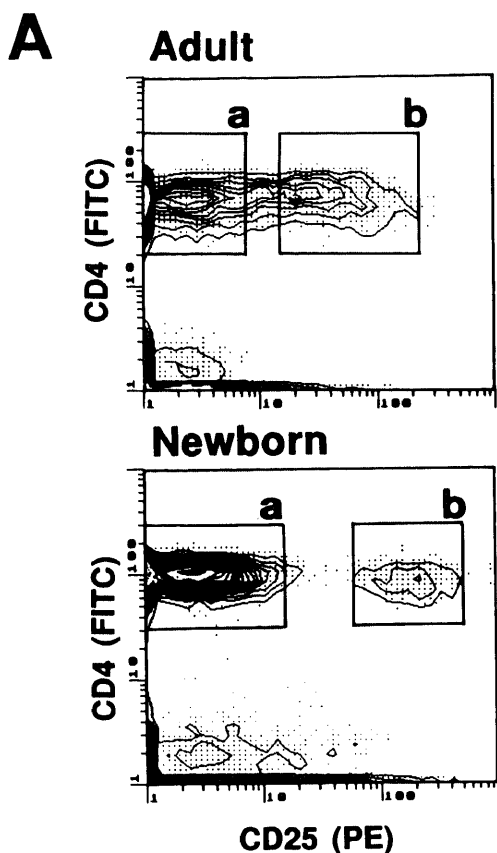


Fig. 1. Immunofluorescence analysis of CD25 expression by adult and neonatal CD4⁺ T cells. Mononuclear cells from adults (A and B) and newborn (C and D) were stained for CD25 and CD4 in the two-color immunofluorescence method, and analyzed with an Epics-C flow cytometer. Contour maps (A and C) show two-color staining pattern of lymphocytes gated by forward and 90° light scatters. A second gate was set to include the whole population of CD4⁺ T cells and 10,000 cells accumulating within the gate were analyzed for CD25 expression, which was expressed as the histogram pattern (B and D). A vertical dashed line in the histogram indicate the negative control.

Tween で希釈したアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ヒト Ig 抗体 (Tago, Inc.) を加えて室温で 2 時間反応させた。その後、PBS-Tween で洗浄し、最後に pH9.8 のジエタノールアミン緩衝液で p-nitrophenyl phosphate (SigmaChemical Co.) を 1mg/ml に調節したものを加えて室温で約 2 時間発色反応させた。呈色反応は吸光度計 EAR400 (SLT-Labinstruments, Salzburg, Austria) により波長 405nm で測定し、標準血清を用いて被検上清の Ig 値を算出した。



B

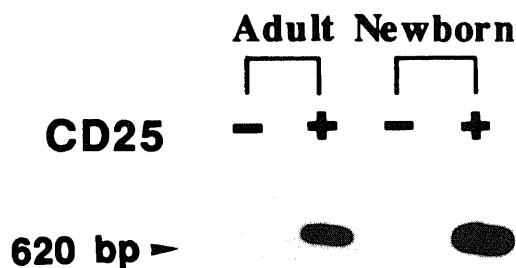


Fig. 2. A. Isolation of CD25⁻ and CD25⁺ populations of adult and neonatal CD4⁺ T cells. E-rosetting cells were stained for CD25 and CD4 by the two-color staining, and CD25⁻ (a) and CD25⁺ (b) populations of CD4⁺ T cells were obtained by a cell sorting using an Epics-C flow cytometer. B. Expression of mRNA for IL-2R α by CD25⁺ populations of adult and neonatal CD4⁺ T cells. Ten percent of total cellular RNA from each freshly isolated population (1×10^6) was incubated with oligo-dT and RT to generate first strand DNA. One-tenth of first strand cDNA was subjected to 30 cycles of PCR with a pair of primers for IL-2R α . Southern blots of amplified products were hybridized with a probe for IL-2R α labeled with digoxigenin. The hybridized products were detected by an immunoenzymatic method. Each lane contains 1/10 of amplified product.

成 績

I. 成人および新生児 CD4⁺ T 細胞における IL-2R α 鎖 (CD25) の発現

1. フローサイトメーターによる検討

成人末梢血と新生児臍帯血の単核細胞を抗 Tac mAb を用いた間接法で IL-2R α 鎖 (抗 CD25) を PE 標識し、FITC 標識抗 Leu-3a (抗 CD4) mAb を用いた直接法で CD4 抗原を染色し、解析した (図 1)。Taga ら¹⁰⁾や Jackson ら²⁰⁾の報告にもあるように、成人の CD4⁺ T 細胞の一部はその表面に CD25 抗原を発現していた。また新生児 CD4⁺ T 細胞においてもその表面に CD25 抗原を発現している細胞集団が少数ではあるが明らかに存在していた (3~8%)。

2. RT-PCR とサザンブロット法による IL-2R α 鎖 mRNA 発現の検討

新生児 CD4 $^{+}$ T 細胞に認められた CD25 抗原の発現が非特異的な染色によるものでないことを確認することは重要である。そこで成人および新生児 CD4 $^{+}$ T 細胞より得られたそれぞれ CD25 陽性ならびに CD25 陰性分画に IL-2R α 鎖 mRNA が発現しているかどうかを検討した。それぞれの亜分画の細胞から RT-PCR 法により増幅された産物を電気泳動し、IL-2R α 鎖の cDNA を用いてハイブリダイズした。図 2 に示すよう

に、成人と同様に新生児においても CD4 $^{+}$ T 細胞の CD25 陽性分画には明らかな IL-2R α 鎖 mRNA を認めたが、いずれの CD25 陰性分画にも有意な IL-2R α 鎖 mRNA は認められなかった。

II. 成人および新生児の CD25 陽性 CD4 $^{+}$ T 細胞における CD45 イソフォームの発現の違い

成人末梢血および新生児臍帯血から細胞ソーティング法により他のリンパ球亜群を除いて98%以上の純度で得られた CD4 $^{+}$ T 細胞を、二重標識免疫蛍光染色にて CD25 陽性 CD4 $^{+}$ T 細胞における CD45 イソ

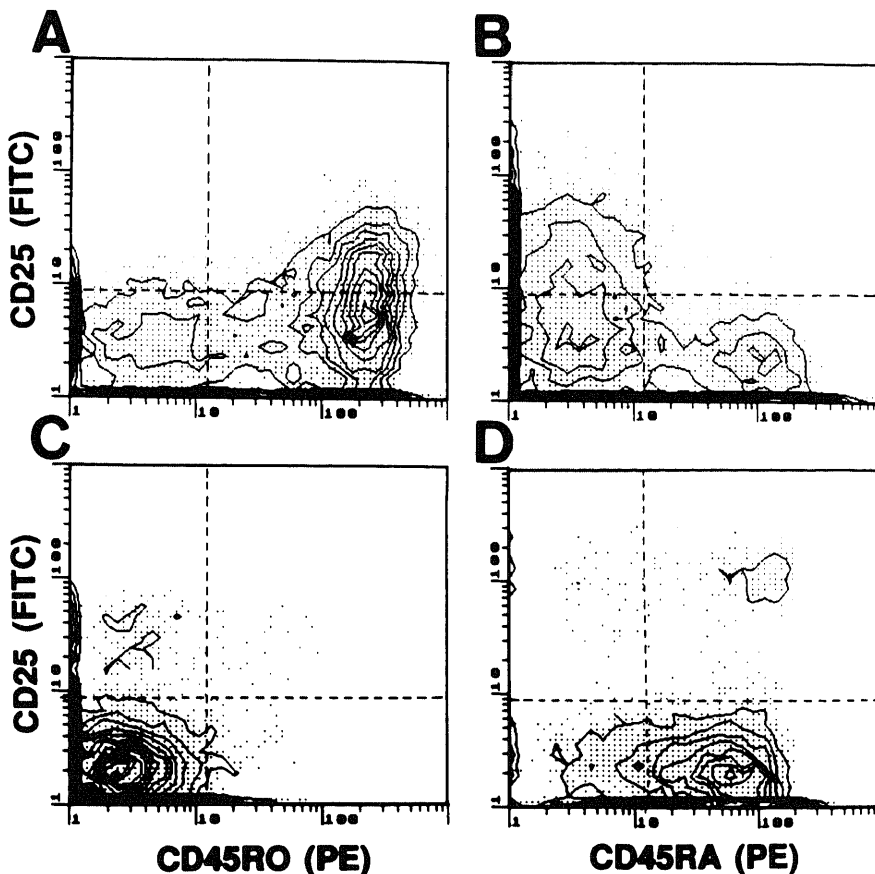


Fig. 3. Two-color immunofluorescence analysis of relation of CD25 expression to CD45RO or CD45RA expression on adult (A and B) and neonatal (C and D) CD4 $^{+}$ T cells. Highly purified CD4 $^{+}$ T cells were obtained negatively by the depletion of other lymphocyte subsets. Expression of CD45RO was detected by the indirect staining with unconjugated UCHL1 mAb (IgG2a) and rabbit biotinylated anti-mouse IgG2a antibody followed by PE-streptoavidin, and CD45RA by the direct staining with PE-conjugated 2H4 mAb (IgG1) (x-axis). Expression of CD25 (y-axis) in relation to CD45RO or CD45RA was evaluated by staining with a combination of unconjugated anti-IL-2 (IgG1) mAb or anti-Tac mAb (IgG2a), rabbit biotinylated anti-mouse IgG1 or IgG2a and FITC-conjugated avidin or PE-conjugated streptoavidin, respectively. The negative control is represented as the dashed line.

フォーム (CD45RO および CD45RA) の発現を調べた (図3). 成人の CD25 陽性 CD4⁺ T 細胞のほとんどはメモリー細胞の表面形質 (CD45RA 陰性かつ CD45RO 陽性) を持っていた. しかしながら, 新生児 CD4⁺ T 細胞における CD25 抗原の発現は, CD45RO 分画よりはむしろ CD45RA 分画に主として認められた.

III. 新生児 CD25 陽性 CD4⁺ T 細胞のリンホカイン (IL-4, IL-5, IFN- γ) mRNA の発現

新生児の IL-2R α 鎖 (CD25) を発現した CD4⁺ T 細胞

の機能を明らかにするために, PMA およびカルシウムイオノフォアの刺激にてリンホカイン (IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ) mRNA の発現が認められるかどうかを RT-PCR 法を利用して検討した. まず成人末梢血による検討では, IL-2mRNA はナイーブ (CD45RO 陰性) CD4⁺ T 細胞とメモリー (CD45RO 陽性) CD4⁺ T 細胞のいずれにも認められたが, IL-4, IL-5, IFN- γ の mRNA は主としてメモリー CD4⁺ T 細胞にのみ認められた (図4). 重要なことには, 未分画の新生児 CD4⁺ T 細胞は刺激によって IL-4, IL-5,

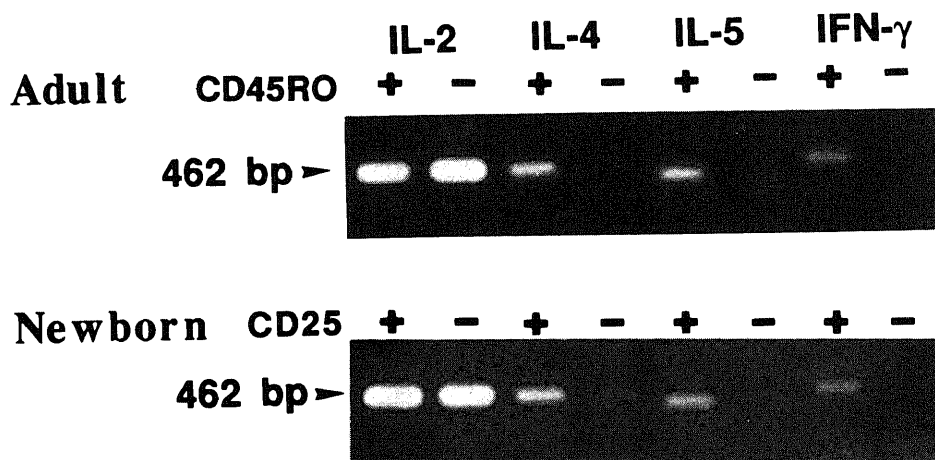


Fig. 4. Expression of mRNA for lymphokines (IL-2, IL-4, IL-5, and IFN- γ) by CD4⁺ T cell subpopulations from adults and newborns on activation. Total of 1×10^6 cells were incubated with PMA and calcium ionophore for 12 hours. Ten percent of total cellular RNA were converted to first strand cDNA. Thirty cycles of PCR was performed to amplify cDNA product of each lymphokine using corresponding primers. Amplified products were subjected to gel analysis. Each lane is equivalent to 1/10 of the amplified product.

Table 2. Induction of Ig-Production of B Cells by CD25⁺ CD4⁺ T Cells from Newborns in PWM-Stimulated Cultures

Donor	CD4 ⁺ T Cells	Secreted Ig (ng/ml)		
		IgM	IgG	IgA
Adult	None	92 $\pm$ 38	26 $\pm$ 13	12 $\pm$ 4
	Unfractionated	1,855 $\pm$ 466	662 $\pm$ 194	216 $\pm$ 88
Newborn	Unfractionated	70 $\pm$ 29	27 $\pm$ 5	14 $\pm$ 5
	CD25 ⁺	718 $\pm$ 237	225 $\pm$ 52	156 $\pm$ 57
	CD25 ⁻	83 $\pm$ 45	27 $\pm$ 19	12 $\pm$ 5

B cells (2.5×10^4 /well) from unrelated adult subjects were cultured with CD25⁺ and CD25⁻ populations of neonatal CD4⁺ T cells or adult CD4⁺ T cells (7.5×10^4 /well), irradiated monocytes (1×10^4 /well) and PWM (1:200) in microtiter plates for 10 days, and the levels of IgM, IgG, and IgA in culture supernatants were determined by an ELISA. Data represent the means $\pm$ SEM of four separate experiments.

IFN- γ mRNA の発現がほとんど認められないが、新生児の CD4⁺ T 細胞のうち CD25 陽性分画のみを集めて調べると、IL-4, IL-5, IFN- γ の mRNA の強い発現が認められた (図 4)。

IV. 新生児 CD25 陽性 CD4⁺ T 細胞の B 細胞の Ig 産生に対するヘルパー活性

新生児 CD25 陽性 CD4⁺ T 細胞が PWM 刺激培養系において成人 B 細胞の Ig 産生に対するヘルパー活性を有しているかを検討した (表 2)。成人の CD4⁺ T 細胞と異なり、新生児 CD4⁺ T 細胞は未分画では B 細胞の Ig 産生に対するヘルパー活性をほとんど有していなかった。しかしながら新生児の CD25 陽性 CD4⁺ T 細胞は、成人の CD4⁺ T 細胞に比べれば弱いながらも、未分画に比べ明らかなヘルパー活性を示した。

V. 成人および新生児 CD4⁺ T 細胞の亜分画に発現する CD45 mRNA 転写産物の解析

図 5 に示すように、成人 CD4⁺ T 細胞のメモリー (CD45RO⁺) 細胞には主として 380bp の産物が認めら

れ、一方、ナイーブ (CD45RO⁻) 細胞には主として 863 bp の産物が認められた。また CD45RO 弱陽性 (CD45RO⁺) の細胞には中間の大きさの転写産物が主に発現していた。新生児 CD4⁺ T 細胞の CD25 陰性分画は、380bp を除く 3 本のバンドが認められた。CD25 陽性分画は、同様に大きい方の 3 本のバンドを認めるが、加えて弱いながらも 380bp のバンドも認められた。しかも 380bp を示すと考えられる CD45RO 陽性細胞の混入の可能性を否定するために、新生児 CD25 陽性 CD4⁺ T 細胞より CD45RO 陽性細胞をソーティング法により除去しても 380bp のバンドが認められた。

VI. 幼児ならびに小児における IL-2R α 鎖 (CD-25) を発現している CD45RA 陽性 CD4⁺ T 細胞について

IL-2R α 鎖 (CD25) を発現した CD45RA 陽性 CD4⁺ T 細胞は、これまでの成績よりメモリー CD4⁺ T 細胞に近い機能を持つことが示されたが、ナイーブからメモリー CD4⁺ T 細胞への成熟過程での意

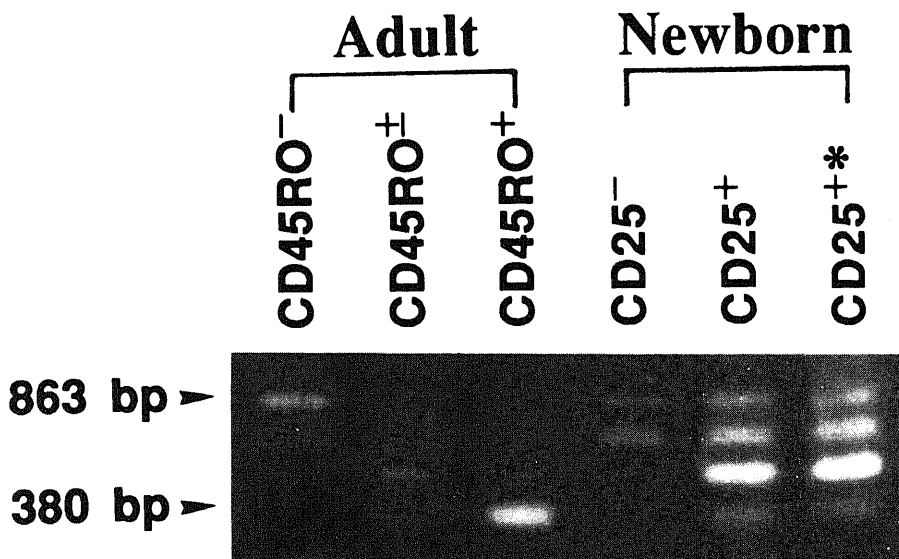


Fig. 5. RT-PCR analysis of CD45 mRNA transcripts expressed by CD4⁺ T cell subpopulations from adults and newborns. With respect to CD45RO expression, adult CD4⁺ T cells were separated into three (CD45RO⁻, CD45RO⁺, CD45RO⁺) populations. CD25⁻ and CD25⁺ populations were selected from neonatal CD4⁺ T cells. An asterisk (*) indicates neonatal CD25⁺ CD4⁺ T cells which had been depleted of CD45RO⁺ cells. Ten percent of total cellular RNA from 1×10^5 freshly isolated cells were converted to first strand cDNA, and amplified (30 cycles) using primers corresponding to exons 2 and 9 of CD45 gene. Amplified products were electrophoresed through ethidium bromide-stained agarose gels to separate fragments. Each lane is equivalent 1/10 of the amplified product.

義を明らかにするために、さまざまな年齢の小児より得られた CD4⁺T 細胞における CD25, CD45RA および CD45RO 抗原の発現について検討した (図 6). Hayward ら³³⁾や Pirruccello ら³⁴⁾の報告にもあるように、メモリー (CD45RO 陽性かつ CD45RA 陰性) CD4⁺T 細胞の割合は年齢とともに増加する。一方、メモリー CD4⁺T 細胞と相補的な関係にあるナイーブ (CD45RO 陰性かつ CD45RA 陽性) CD4⁺T 細胞は年齢とともに減少していた。また CD25 抗原を持つ CD45RA 陽性 CD4⁺T 細胞分画は、3 歳以下の乳幼児のみならず、6 歳から 10 歳くらいの小児においても、少数ではあるが、明らかな細胞集団として存在していた。数かしながらこの細胞分画は 12 歳以降の年齢ではほとんど認められなかった。

考 察

T 細胞に発現する CD45 抗原はその分化段階に応じていくつかのイソフォームの存在が知られ、それぞれのイソフォームに対する種々の mAb の開発によりヒトナイーブおよびメモリー T 細胞の同定・分別が可能となった。すなわちヒト T 細胞は CD45RA (2H4) 抗原もしくは CD45RO (UCHL1) 抗原の発現により、CD45RO 陽性かつ CD45RA 陰性のメモリー T 細胞と CD45RO 陰性かつ CD45RA 陽性のナイーブ T 細胞に

分けられる。さらにこのような CD45 抗原イソフォーム発現の違いを利用することにより、ナイーブ、メモリー T 細胞の単離、機能解析が進み、両細胞間の機能的相違が明らかとなった。Phytohemagglutinin (PHA) や concanavalin A (Con A) といったマイトジェンに対する増殖反応はナイーブ T 細胞にもメモリー T 細胞にもみられるが、精製ツベルクリンや破傷風トキソイドといったリコール抗原に対する増殖反応はメモリー T 細胞にのみ認められ、ナイーブ T 細胞にはほとんどみられない¹⁰⁾⁽³³⁵⁾。また抗 CD3mAb に対する増殖反応や単球非存在下での抗 CD2 mAb に対する増殖反応もナイーブ T 細胞にはほとんどみられず、メモリー T 細胞にのみみられる³⁶⁾。またメモリー CD4⁺T 細胞は PWM 刺激系で成人 B 細胞を Ig 産生細胞へ分化させること、すなわちヘルパー活性を持っているが、ナイーブ CD4⁺T 細胞にはそのようなヘルパー活性はほとんどなく、むしろサプレッサー活性を持ち、CD8⁺T 細胞の Ig 産生抑制機能を誘導するとともにそれ自身が B 細胞の分化を抑制する¹⁰⁾。さらにメモリー CD4⁺T 細胞の機能としてさまざまなリンホカインの産生が認められ、IL-2 の産生はナイーブ CD4⁺T 細胞にもメモリー CD4⁺T 細胞にも認められるが、インターロイキン 3 (interleukin 3, IL-3), IL-4, IFN- γ , 顆粒球マクロファージコロニー刺激因

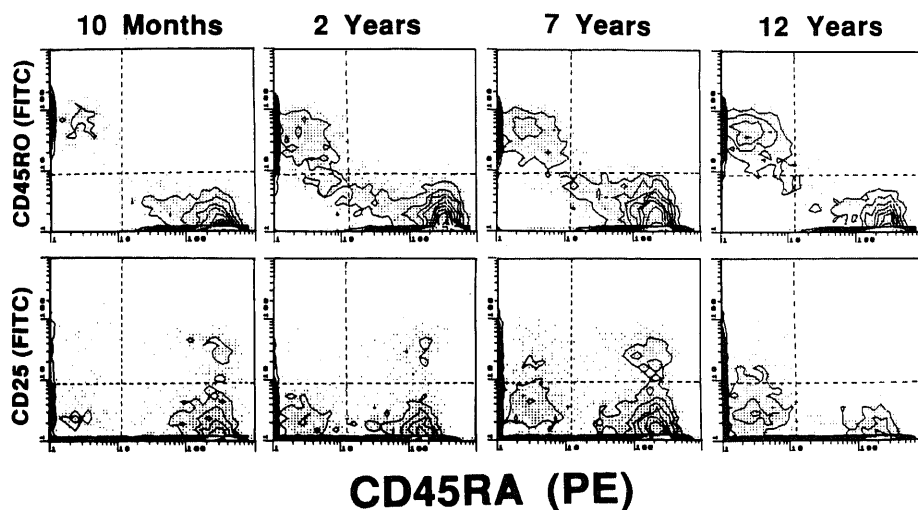


Fig. 6. Age-dependent changes in frequencies of CD45RO⁺ or CD45RA⁺ CD4⁺T cells and IL-2R α (CD25)-expressing CD45RA⁺ CD4⁺T cells. CD4⁺T cells from children of various ages were obtained and analyzed by the two-color immunofluorescence method. The staining for CD45RA and CD45RO was carried out using PE-conjugated 2H4 and FITC-conjugated UCHL1, respectively. For CD25 expression, the cells were stained indirectly with anti-Tac mAb and biotinylated anti-mouse IgG2a followed by PE-streptavidin.

子 (granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) といったリンホカインの産生はメモリー CD4⁺ T 細胞には認められるが、ナイーブ CD4⁺ T 細胞にはほとんど認められないと報告されている^{13)37)~40)}。しかし IL-5 産生に関する報告はこれまでのところない。今回 RT-PCR 法を使って IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ の遺伝子発現を検討したところ、図 4 に示すようにナイーブおよびメモリー CD4⁺ T 細胞のどちらにも IL-2 の遺伝子発現が認められたが、IL-4, IFN- γ のみならず IL-5 遺伝子発現はメモリー CD4⁺ T 細胞にのみ認められた。IL-5 遺伝子はヒト第 5 染色体の q23-31 に IL-3, GM-CSF, IL-4 遺伝子とクラスターをなして存在していることが報告されている⁴¹⁾。IL-5 の産生が IL-4 などと同様にメモリー CD4⁺ T 細胞にのみ認められたことは、これらの遺伝子の発現が同一の制御を受けている可能性を示唆しており興味深い。

新生児リンパ球は成人リンパ球と機能的に異なることが知られ、新生児 CD4⁺ T 細胞は PHA や Con A に対する増殖反応は成人と同程度に認められるが、リコール抗原ならびに CD3mAb や CD2mAb に対する増殖反応はほとんどみられない⁴²⁾⁴³⁾。新生児 CD4⁺ T 細胞は PWM 刺激系で成人 B 細胞を Ig 産生細胞へと誘導させるヘルパー活性を持たないばかりでなく、それ自体が強いサプレッサー活性を持つことも知られている⁴⁴⁾⁴⁵⁾。また新生児 CD4⁺ T 細胞は IL-2 産生能は成人に匹敵するが、IFN- γ や IL-4 産生能が成人に比べて低いことがこれまで報告されている⁴⁶⁾⁴⁷⁾⁴⁸⁾。新生児未分画 CD4⁺ T 細胞では今回の RT-PCR 法による検討では、図 4 に示すように IL-2 の mRNA 発現は認められるものの IL-4, IL-5, IFN- γ の mRNA 発現はほとんど認められず、B 細胞の Ig 産生細胞へのヘルパー活性も低いことが確認された。成人においては CD4⁺ T 細胞のうちの 30~50% がメモリー T 細胞であるが、新生児臍帯血の CD4⁺ T 細胞は子宮内でほとんど抗原刺激を受けていないことを反映して、ほとんどが CD45RA 陽性、CD45RO 陰性のナイーブ T 細胞である³³⁾³⁴⁾。これらのことより新生児 CD4⁺ T 細胞の機能的特異性はメモリー T 細胞のプールがほとんどないことと関係していると考えることができる。

メモリー CD4⁺ T 細胞は CD2, CD11a, CD54, CD58 といった細胞間接着分子の発現が、ナイーブ T 細胞に比べてより強いことが報告され、メモリー T 細胞の活性化に関わっていると考えられている¹³⁾¹⁴⁾。T 細胞は抗原やマイトジェンなどの刺激を受けると、T 細胞増殖因子としての IL-2 を産生しながら増殖し、

活性化された T 細胞はその表面に IL-2R を発現する⁴⁹⁾。機能的な IL-2R は少なくとも 2 つのサブユニット、分子量 55,000 の α 鎖 (p55 あるいは IL-2R α) と分子量 75,000 の β 鎖 (p75 あるいは IL-2R β) から構成されている⁵⁰⁾⁵¹⁾。IL-2R サブユニットに対する mAb を用いた解析によってリンパ球の亜群におけるそれぞれのサブユニットの発現が調べられている¹⁶⁾⁵²⁾⁵³⁾。最近、IL-2R α 鎖 (CD25) がメモリー CD4⁺ T 細胞に構成的に発現していることが報告され⁴⁹⁾⁵²⁾、外来刺激に対してすみやかに活性化、増殖する必要性を持つメモリー CD4⁺ T 細胞の機能と密接に関係しているものと考えられる。

新生児 CD4⁺ T 細胞はほとんどがナイーブ (CD45-RA 陽性) の表面形質を有し、CD45RO 陽性分画がわずか 2~3% しかないが、図 1 に示すように IL-2R α 鎖 (CD25) の発現が明らかに認められた (3~8%)。しかも図 2 に示すように RT-PCR 法とサザンブロット法により mRNA レベルでもその発現が確認された。二重標識免疫蛍光染色を行ったところ、図 3 に示すように大部分の CD25 抗原を発現した新生児 CD4⁺ T 細胞はナイーブの表面形質を持っていて、成人の CD25 陽性 CD4⁺ T 細胞がメモリー分画に認められたのとは異なっていた。CD25 抗原を発現したナイーブ CD4⁺ T 細胞は、図 6 に示すように 1 歳以下の乳児のみならず 10 歳くらいまでの小児の末梢血に認められたが、それ以降の年齢の小児や成人の末梢血には認められなかった。本研究にて新生児の CD25 陽性 CD4⁺ T 細胞の機能をリンホカイン遺伝子発現とヘルパー活性でみたところ、新生児 CD4⁺ T 細胞は未分画ではナイーブ T 細胞としての機能を持つが、新生児 CD4⁺ T 細胞の CD25 陽性分画はメモリー T 細胞に近い機能を持つことが明らかとなった。つまり新生児 CD25 陽性 CD4⁺ T 細胞は CD25 陰性分画と異なり、IL-4, IL-5, IFN- γ の mRNA 発現が認められた、成人のメモリー CD4⁺ T 細胞には及ばないもの成人 B 細胞の PWM 刺激培養系で有意な Ig 産生を認めた。

CD25 抗原を持つ CD45RA 陽性 CD4⁺ T 細胞は成人 B 細胞に対するヘルパー活性やリンホカイン mRNA 発現でみるとメモリー CD4⁺ T 細胞様の機能を持ち、しかも幼児・小児の末梢血においても認められることを考え合わせると、この細胞分画はナイーブ T 細胞からメモリー T 細胞への成熟過程の中間段階に位置するのではないかと考えられた。さらにこの仮説を強く示唆する事実が、図 5 に示すように RT-PCR を用いた CD45mRNA 転写産物の解析によって得られた。新生児 CD4⁺ T 細胞の CD25 陽性分画は

CD25 陰性分画と同様に大きな分子量のイソフォーム, すなわち CD45RA 抗原の発現をコードする CD45mRNA 転写産物を発現していた。この CD25 陽性分画は CD45RO 陰性にもかかわらず, 小さい分子量のイソフォーム, すなわち CD45RO 抗原をコードする転写産物をも発現していた。これらのことより, IL-2R α 鎖 (CD25) を発現した CD45RA 陽性 CD4⁺ T 細胞は, 最近抗原刺激を受け, ナイーブ CD4⁺ T 細胞からメモリー CD4⁺ T 細胞へと移行しつつ細胞ではないかと考えられた。新生児臍帯血においてすでにこのような細胞分画が存在するということは, 胎児も母体子宮内でなんらかの抗原刺激を受けている可能性が考えられるが, それらの抗原が母親からどのようにして胎盤移行するのかはまだ明らかにされておらず, 今後解決すべき問題として残される。

結 論

ヒト新生児 CD4⁺ T 細胞は, その表面形質がほとんどナイーブ (CD45RA 陽性) であるにもかかわらず, これまでメモリー (CD45RO 陽性) 細胞にのみ発現すると考えられていた IL-2R α 鎖 (CD25) の発現が少なからず認められたため, その発現の意義について検討し, 以下の結論を得た。

1. 新生児 CD4⁺ T 細胞は, 成人の CD4⁺ T 細胞に比べれば少ないが, CD25 抗原を発現していた (3~8%)。しかも RT-PCR とサザンブロット法によりその CD25 陽性分画には IL-2R α 鎖 mRNA が認められた。

2. 成人の CD25 陽性 CD4⁺ T 細胞はほとんどがメモリーの表面形質を持っていたが, 新生児の CD25 陽性 CD4⁺ T 細胞はほとんどがナイーブの表面形質を持ち, 違いが認められた。

3. 新生児 CD25 陽性 CD4⁺ T 細胞は PMA とカルシウムイオノフォアの組み合わせ刺激にて, 成人のメモリー CD4⁺ T 細胞と同様に IL-2 はもちろんのこと IL-4, IL-5, IFN- γ といったリンホカインの mRNA の発現が RT-PCR 法にて認められた。

4. 新生児 CD25 陽性 CD4⁺ T 細胞は成人 B 細胞の PWM 刺激培養系における Ig 産生に対するヘルパー活性は, 成人の CD4⁺ T 細胞に比べれば弱いながらも有意に認められた。

5. 新生児 CD4⁺ T 細胞のうちの CD25 陽性分画は, CD25 陰性分画と同様に CD45RA 抗原の発現をコードする mRNA 転写産物の他に, CD45RO 抗原の発現をコードする mRNA 転写産物がわずかながら認められた。

6. CD25 抗原を持つ CD45RA 陽性 CD4⁺ T 細胞は新生児のみならず, 6~10歳の小児においても認められたが, 12歳以降の高年齢の小児や成人においてはほとんど認められなかった。

7. IL-2R α 鎖 (CD25) を発現した CD45RA 陽性 CD4⁺ T 細胞はメモリー CD4⁺ T 細胞様の機能を持ち, 新生児のみならず幼児・小児においても認められることから, 最近なんらかの抗原刺激を受けて, ナイーブからメモリー CD4⁺ T 細胞への成熟の中間段階に存在する細胞集団の可能性が考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導と御校閲を賜りました恩師谷口 昂教授に深謝致します。また直接御指導頂きました宮脇利男講師, 横井 透助手, 谷内江昭宏助手をはじめ, 終始研究に御協力頂きました小児科免疫グループの諸兄ならびに教室員の皆様方に感謝致します。さらに快く新生児臍帯血を御提供下さいました金沢聖霊病院産婦人科の太下睦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20回日本免疫学会総会 (東京, 1990) において発表した。

文 献

- 1) Beverley, P. C. L.: Is T-cell memory maintained by crossreactive stimulation? *Immunol. Today*, 11, 203-205 (1990).
- 2) 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).
- 3) Cerottini, J.-C. & MacDonald, H. R.: The cellular basis of T-cell memory. *Annu. Rev. Immunol.*, 7, 77-89 (1989).
- 4) Thomas, M. L.: The leukocyte common antigen family. *Annu. Rev. Immunol.*, 7, 339-369 (1989).
- 5) Hall, L. R., Streuli, M., Schlossman, S. F. & Saito, H.: Complete exon-intron organization of the human leukocyte common antigen (CD45) gene. *J. Immunol.*, 141, 2781-2787 (1988).
- 6) Streuli, M., Hall, L. R., Saga, Y., Schlossman, S. F. & Saito, H.: Differential usage of three exons generates at least five different mRNAs encoding human leukocyte common antigens. *J. Exp. Med.*, 166, 1548-1566 (1987).
- 7) Thomas, M. L., Reynolds, P. J., Chain, A.,

- Ben-Neriah, Y. & Trowbridge, I. S.:** B-cell variant of mouse T200 (Ly-5): Evidence for alternative mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5360-5363 (1987).
- 8) **Saga, Y., Tung, J.-S., Shen, F.-W. & Boyse, E. A.:** Alternative use of 5' exons in the specification of Ly-5 isoforms distinguishing hematopoietic cell lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5364-5368 (1987).
- 9) **Thomas, M. L. & Lefrançois, L.:** Differential expression of the leukocyte-common antigen family. *Immunol. Today*, **9**, 320-326 (1988).
- 10) **Morimoto, C., Letvin, N. L., Distaso, J. A., Aldrich, W. R. & Schlossman, S. F.:** The isolation and characterization of the human suppressor inducer T cell subset. *J. Immunol.*, **134**, 1508-1515 (1985).
- 11) **Smith, S. H., Brown, M. H., Rowe, D., Callard, R. E. & Beverley, P. C. L.:** Functional subsets of human helper-inducer cells defined by a new monoclonal antibody, UCHL1. *Immunology*, **58**, 63-70 (1986).
- 12) **Tonks, N. K., Charbonneau, H., Diltz, C. D., Fischer, E. H. & Walsh, K. A.:** Demonstration that the leukocyte common antigen CD45 is a protein tyrosine phosphatase. *Biochemistry*, **27**, 8695-8701 (1988).
- 13) **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 enhance IFN- γ production. *J. Immunol.*, **140**, 1401-1407 (1988).
- 14) **Wallace, D. L. & Beverley P. C. L.:** Phenotypic changes associated with activation of CD45RA⁺ and CD45RO⁺ T cells. *Immunology*, **69**, 460-467 (1990).
- 15) **Taga, K., Kasahara, Y., Yachie, A., Miyawaki, T. & Taniguchi, N.:** Differential expression of IL-2 receptor subunits on memory populations within CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Immunology*, in press.
- 16) **Uchiyama, T., Broder, S. & Waldmann, T. A.:** A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cells. I. Production of anti-Tac monoclonal antibody and distribution of Tac (+) cells. *J. Immunol.*, **126**, 1393-1397 (1981).
- 17) **Miyawaki, T., Yachie, A., Nagaoki, T., Mukai, M., Yokoi, T., Uwadana, N. & Taniguchi, N.:** Expression ability of Ia antigens on T cell subsets defined by monoclonal antibodies on pokeweed mitogen stimulation in early human life. *J. Immunol.*, **128**, 11-15 (1982).
- 18) **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).
- 19) **Yachie, A., Ueno, Y., Takano, N., Miyawaki, T. & Taniguchi, N.:** Developmental changes of double-negative (CD3⁺ 4⁻ 8⁻) T cells in human peripheral blood. *Clin. Exp. Immunol.*, **76**, 258-261 (1989).
- 20) **Miyawaki T., Kasahara, Y., Taga, K., Yachie, A. & Taniguchi, N.:** Differential expression of CD45RO (UCHL1) and its functional relevance in two subpopulations of circulating TCR- γ / δ ⁺ lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **171**, 1833-1838 (1990).
- 21) **Brenner, C. A., Tam, A. W., Nelson, P. A., Engleman, E. G., Suzuki, N., Fry, K. E. & Larrick, J. W.:** Message amplification phenotyping (MAPPING): A technique to simultaneously measure multiple mRNAs from small numbers of cells. *Biotechniques*, **7**, 1096-1103 (1989).
- 22) **Chomczynski, P. & Sacchi, N.:** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159 (1987).
- 23) **Taniguchi, T., Matsui, H., Fujita, T., Takaoka, C., Kashima, N., Yoshimoto, R. & Hamuro, J.:** Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature*, **302**, 305-310 (1983).
- 24) **Yokota, T., Otsuka, T., Mosmann, T., Banchereau, J., DeFrance, T., Blanchard, D., De Vries J. E., Lee, F. & Arai, K.:** Isolation and characterization of a human interleukin cDNA clone, homologous to mouse B-cell stimulatory

factor 1, that expresses B-cell-and T-cell-stimulating activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 5894-5898 (1986).

25) Azuma, C., Tanabe, T., Konishi, M., Kinashi, T., Noma, T., Matsuda, F., Yaoita, Y., Takatsu, K., Hammarström, L., Smith, C. I. E., Severinson, E. & Honjo, T.: Cloning of cDNA for human T-cell replacing factor (interleukin-5) and comparison with the murine homologue. *Nucleic Acids Res.*, **14**, 9149-9158 (1986).

26) Nishi, T., Fujita, T., Nishi-Takaoka, C., Saito, A., Matsumoto, T., Sato, M., Oka, T., Itoh, S., Yip, Y. K., Vircek, J. & Taniguchi, T.: Cloning and expression of a novel variant of human interferon- γ cDNA. *J. Biochem.*, **97**, 153-159 (1985).

27) Nikaido, T., Shimizu, A., Ishida, N., Sabe, H., Teshigawara, K., Maeda, M., Uchiyama, T., Yodoi, J. & Honjo, T.: Molecular cloning of cDNA encoding human interleukin-2 receptor. *Nature*, **311**, 631-635 (1984).

28) Leonard, W. J., Depper, J. M., Crabtree, G. R., Rudikoff, S., Pumphrey, J., Robb, R. J., Kronke, M., Svetlik, P. B., Pfeffer, N. J., Waldmann, T. A. & Greene, W. C.: Molecular cloning and expression of cDNAs for the human interleukin-2 receptor. *Nature*, **311**, 626-631 (1984).

29) Saltini, C., Kirby, M., Trapnell, B. C., Tamura, N. & Crystal R. G.: Biased accumulation of T lymphocytes with "memory"-type CD45 leukocyte common antigen gene expression on the epithelial surface of the human lung. *J. Exp. Med.*, **171**, 1123-1140 (1990).

30) Yachie, A., Miyawaki, T., Yokoi, K., Nagaoki, T. & Taniguchi, N.: Ia-positive cells generated by PWM-stimulation within OKT4⁺ subset interact with OKT8⁺ cells for inducing active suppression on B cell differentiation in vitro. *J. Immunol.*, **129**, 103-106 (1982).

31) Yarchoan, R., Tosato, G., Blaese, R. M., Simon, R. M. & Nelson, D. L.: Limiting dilution analysis of Epstein-Barr virus-induced immunoglobulin production by human B cells. *J. Exp. Med.*, **157**, 1-14 (1983).

32) Jackson, A. L., Matsumoto, H., Janszen, M., Maino, V., Blidy, A. & Shye, S.: Restricted

expression of p55 interleukin 2 receptor (CD25) on normal T cells. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **54**, 126-133 (1990).

33) Hayward, A. R., Lee, J. & Beverley, P. C. L.: Ontogeny of expression of UCHL1 antigen on TcR-1⁺ (CD4/8) and TcR δ ⁺ T cells. *Eur. J. Immunol.*, **19**, 771-773 (1989).

34) Pirruccello, S. J., Collins, M., Wilson, J. E. & McManus, B. M.: Age-related changes in naive and memory CD4⁺ T cells in healthy human children. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **52**, 341-345 (1989).

35) Tedder, T. F., Cooper, M. D. & Clement, L. T.: Human lymphocyte differentiation antigens HB-10 and HB-11 II. Differential production of B cell growth and differentiation factors by distinct helper T cell subpopulations. *J. Immunol.*, **134**, 2989-2994 (1985).

36) Sanders, M. E., Makgoba, M. W., June, C. H., Young, H. A. & Shaw, S.: Enhanced responsiveness of human memory T cells to CD2 and CD3 receptor-mediated activation. *Eur. J. Immunol.*, **19**, 803-808 (1989).

37) Dohlsten, M., Hedlund, G., Sjögren, H.-O. & Carlsson, R.: Two subsets of human CD4⁺ T helper cells differing in kinetics and capacities to produce interleukin 2 and interferon- γ can be defined by the Leu-18 and UCHL1 monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.*, **18**, 1173-1178 (1988).

38) Salmon, M., Kitas, G. D. & Bacon, P. A.: Production of lymphokine mRNA by CD45R⁺ and CD45R⁻ helper T cells from human peripheral blood and by human CD4⁺ T cell clones. *J. Immunol.*, **143**, 907-912 (1989).

39) Bettens, F., Walker, C., Gauchat, J.-F., Gauchat, D., Wyss, T. & Pichler, W. J.: Lymphokine gene expression related to CD4 T cell subset (CD45R/CDw29) phenotype conversion. *Eur. J. Immunol.*, **19**, 1569-1574 (1989).

40) Budd, R. C., Cerottini, J.-C. & MacDonald, H. R.: Selectively increased production of interferon- γ by subsets of Lyt-2⁺ and L3T4⁺ T cells identified by expression of Pgp-1. *J. Immunol.*, **138**, 3583-3586 (1987).

41) Le Beau, M. M., Lemons, R. S., Espinosa III, R., Larson, R. A., Arai, N. & Rowley, J.

D.: Interleukin-4 and interleukin-5 map to human chromosome 5 in a region encoding growth factors and receptors and are deleted in myeloid leukemias with a del (5q). *Blood*, **73**, 647-650 (1989).

42) Papadogiannakis, N., Johnsen, S.-A. & Olding, L. B.: Monocyte-regulated hyporesponsiveness of human cord blood lymphocytes to OKT3-monoclonal-antibody-induced mitogenesis. *Scand. J. Immunol.*, **23**, 91-102 (1986).

43) Gerli, R., Bertotto, A., Crupi, S., Arcangeli, C., Marinelli, I., Spinozzi, F., Cernetti, C., Angelella, P. & Rambotti, P.: Activation of cord T lymphocytes. I. Evidence for a defective T cell mitogenesis induced through the CD2 molecule. *J. Immunol.*, **142**, 2583-2589 (1989).

44) Miyawaki, T., Seki, H., Kubo, M. & Taniguchi, N.: Suppressor activity of T lymphocytes from infants assessed by co-culture with unfractionated adult lymphocytes in the pokeweed mitogen system. *J. Immunol.*, **123**, 1092-1096 (1979).

45) Yachie, A., Miyawaki, T., Nagaoki, T., Yokoi, T., Mukai, M., Uwadana, N. & Taniguchi, N.: Regulation of B cell differentiation by T cell subsets defined with monoclonal OKT4 and OKT8 antibodies in human cord blood. *J. Immunol.*, **127**, 1314-1317 (1981).

46) Miyawaki, T., Seki, H., Taga, K., Sato, H. & Taniguchi, N.: Dissociated production of interleukin-2 and immune (γ) interferon by phytohemagglutinin stimulated lymphocytes in healthy infants. *Clin. Exp. Immunol.*, **59**, 505-511 (1985).

47) Seki, H., Taga, K., Matsuda, A., Uwadana,

N., Hasui, M., Miyawaki, T. & Taniguchi, N.: Phenotypic and functional characteristics of active suppressor cells against IFN- γ production in PHA-stimulated cord blood lymphocytes. *J. Immunol.*, **137**, 3158-3161 (1986).

48) Wilson, C. B. & Lewis, D. B.: Basis and implications of selectively diminished cytokine production in neonatal susceptibility to infection. *Rev. Infect. Dis.*, **12**, S410-S420 (1990).

49) Smith, K. A.: Interleukin-2: Inception, impact, and implications. *Science*, **240**, 1169-1176 (1988).

50) Sharon, M., Klausner, R. D., Cullen, B. R., Chizzonite, R. & Lenonard, W. J.: Novel interleukin-2 receptor subunit detected by cross-linking under high-affinity conditions. *Science*, **234**, 859-863 (1986).

51) Tsudo, M., Kozak, R. W., Goldman, C. K. & Waldmann, T. A.: Demonstration of a non-Tac peptide that binds interleukin 2: A potential participant in a multichain interleukin 2 receptor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 9694-9698 (1986).

52) Tsudo, M., Kitamura, F. & Miyasaka, M.: Characterization of the interleukin 2 receptor β chain using three distinct monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 1982-1986 (1989).

53) Ohashi, Y., Takeshita, T., Nagata, K., Mori, S. & Sugamura, K.: Differential expression of the IL-2 receptor subunits, p55 and p75 on various populations of primary peripheral blood mononuclear cells. *J. Immunol.*, **143**, 3548-3555 (1989).

Functional Properties and Expression Patterns of CD45 Family Antigens of Naive CD4⁺ T Cells Expressing α Chain of Interleukin 2 Receptor in the Neonatal Period
Hirokazu Kanegane, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med. Soc., **100**, 141—156 (1991)

Key words CD45 isoforms, naive and memory CD4⁺ T cells, IL-2R α (CD25), RT-PCR, lymphokine

Abstract

Various isoforms of the leukocyte-common antigen (CD45), which arise from alternate splicing of its gene, are expressed widely on lymphocytes, granulocytes and monocytes. Studies using monoclonal antibodies against these CD45 isoforms have shown that human T cells can be divided into CD45RO-positive memory and CD45RA-positive naive cell populations. Although some functional difference between memory and naive T cells have been demonstrated, the maturation step of naive into memory T cells remains to be elucidated. It has been reported that memory CD4⁺ T cells in adult individuals express the α chain (CD25) of the receptors for interleukin 2 (IL-2R), seemingly being involved for their own functional roles. In spite of the paucity of memory (CD45RO⁺) T cells in the neonatal blood, it was observed that a substantial proportion (3~8%) of CD4⁺ T cells from the newborn expressed the IL-2R α chain (CD25). The present study was undertaken to investigate the function and the developmental significance of the IL-2R α chain (CD25)-expressing CD4⁺ T cells found in the neonatal blood. Using the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) as a sensitive method for the detection of cellular mRNA, a small CD25-positive population of neonatal CD4⁺ T cells were demonstrated to actually express the IL-2R α chain mRNA. Interestingly, the two-color immunofluorescence analysis disclosed that these CD25-positive neonatal CD4⁺ T cells possessed the phenotypic characteristics (CD45RA⁺ and CD45RO⁻) of naive T cells. In a similar fashion to adult memory CD4⁺ T cells, CD25-positive neonatal CD4⁺ T cells were able to produce lymphokines such as interleukin-4, interleukin-5 and interferon- γ , and were also able to provide appreciable helper function for the immunoglobulin-production of B cells in the pokeweed mitogen-stimulated cultures. The splicing patterns of CD45 mRNA analyzed by RT-PCR indicated that CD25-positive neonatal CD4⁺ T cells expressed the mRNA transcripts encoding CD45RO in addition to major transcripts for CD45RA. The important finding was that a significant proportion of CD25-positive CD4⁺ T cells with the naive (CD45RA⁺ and CD45RO⁻) phenotype were often demonstrable in early childhood as well as infancy, but only few of them were detected in adult blood. These results suggest that IL-2R α (CD25)-expressing CD4⁺ T cells with the naive phenotype represent a novel transitional population in the maturation process of naive to memory CD4⁺ T cells.