

CD244抗原発現とCD8⁺細胞傷害性T細胞の機能的分化

著者	笠原 善仁
著者別表示	Kasahara Yoshihito
雑誌名	平成17(2005)年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) 研究成果報告書
巻	2004-2005
ページ	7p.
発行年	2006-04
URL	http://doi.org/10.24517/00054991



CD244 抗原発現と CD8⁺細胞傷害性
T 細胞の機能的分化

研究課題番号 16591013

平成 16 年度-平成 17 年度科学研究費補助金
(基盤研究(C))研究成果報告書

平成 18 年 4 月

研究代表者 笠原善仁
金沢大学大学院医学系研究科助教授

はしがき

CD244 (2B4, NAIL) は CD150 (SLAM), CD48, CD58, CD84, など CD2 subfamily に属する 66 kDa の膜蛋白で、全ての NK 細胞、gdT 細胞と一部の CD8⁺T 細胞に発現する。CD150 および CD244 の細胞内に存在する SH domain に X 連鎖性リンパ増殖症候群 (XLP) の病因遺伝子産物である SAP が会合することで CD150 および CD244 からのシグナル伝達が調節されることが明らかとなり、NK 細胞では CD244 抗原架橋化により細胞傷害活性の増強や IFN-g, IL-2 等の産生増強、細胞内顆粒の放出など MHC 非拘束性細胞傷害機構への関与が示唆される。XLP 患者由来 NK 細胞では CD244, CD150 を介した活性化の欠如が報告され、CD244 の機能的な重要性が指摘される。CD244 陽性 CD8⁺T 細胞が effector/memory 機能を持つ細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) を含む細胞群であることが示され、CD244 が一つの effector/memory 細胞の機能的分子であることが示唆される。一方、CTL の機能的分化成熟過程において CD45RO/RA, CD28, CD62L, CCR7 など複数の表面抗原発現の組み合わせから、複数の分化段階の存在が明らかとなり、CD45RO 陽性 memory 細胞において homing receptor である CD62L や CCR7 を発現し組織移行能力高い central memory 分画と CD62L, CCR7 陰性で組織移行能力の少ないが細胞傷害性が強い effector memory 分画の存在が報告される。しかし、これらの二つの分画の分化成熟過程の順序・位置付けは未だに異論が多い。

CD244 と今まで CTL の指標として使用される CD62L, CD28, CCR7, CD27 等の複数の抗原との組み合わせで分画される CD8⁺T 細胞分画において、従来からの CTL 機能的解析法 (細胞傷害活性、サイトカン・ケモカイン産生、細胞増殖反応等) に加え、以下に述べる新しい 3 つの解析方法を同じ細胞対象に用い比較検討することで、CD8⁺T 細胞の機能的成熟分化段階の詳細を明らかとすることを目的とする。初年度は健康正常成人と新生児の比較解析を中心に行い、次年度は異常 CD8⁺T 細胞クローンが病態と関連すると考えられる全身性あるいは臓器特異的自己免疫性疾患症例等での解析を追加する。

1) TCR re-arrangement excision circle (TREC) 定量化

末梢リンパ組織に存在する T 細胞受容体 (TCR) abT 細胞が胸腺で TCR 再構成をうける過程で産生される環状 DNA である TREC は主に胸腺機能の指標として解析されてきた。胸腺以外の末梢組織では TCR 再構成や TREC の増加・産生はおきないため、細胞増殖・分裂の回数に比例し TREC 量は理論上指数関数的に減少する。つまり naïve 細胞から effector, memory 細胞へと分化成熟する過程では TREC 含有量は減少する事が予想される。複数の抗原発現の組み合わせで規定される細胞亜群を cell sorter にて高精度に分離し TREC 含有量を real-time PCR 法にて定量解析することで CD244 抗原発現と他の抗原発現で分画される細胞群における細胞増殖・分裂の履歴を評価し、これら細胞分画の細胞分化段階での位置づけを明らかとする。

2) TCRVβ 鎖 CDR3 spectratyping 法による T 細胞 repertoire 解析

抗原多様性を有する naïve T 細胞では反応抗原特異性を決定する TCRVβ 鎖の complimentary determined region 3 (CDR3) 領域は多様性に富み、CDR3 サイズ分布を解析すると一様にガウス分布を示す。一方、抗原特異的クローンが存在する effector/memory T 細胞における CDR3 の長さは限定される。上記 1) と同様に分画した複数の CD8⁺T 細胞分画で TCRVβ 鎖の絶対量を 4 重染色免疫蛍光染色し flow-cytometry 法にて解析するとともに、各細胞群から得た mRNA を

用い 25 種 TCRV β 鎖の CDR3 領域を PCR 法で増幅後、そのサイズ分布を解析する。さらに各 TCRV β 鎖につき、20 以上のクローンの CDR3 領域の塩基配列を解析し、細胞分画間で比較することで細胞分化の程度を評価する。

3) 抗原特異的 CTL の動態解析と細胞表面分子との関係

蛍光標識された抗原ペプチド-可溶性 MHC complex の 4 量体複合体のより成る MHC/ペプチド tetramer の開発により、flow-cytometry にて抗原特異的 CTL の直接の可視化と定量化が可能となっている。他の表面抗原との関係も多重染色することで可能となり、ウイルス (EBV, CMV, influenza virus) 感染症の急性期、回復期、あるいは慢性難治性感染での抗原特異的 CTL における CD244 抗原発現や他の表面抗原との関係を解析し、生体内での抗原特異的 CTL の経時的な細胞表面抗原の変化を明かとする。

研究組織

研究代表者：笠原善仁（金沢大学大学院医学系研究科助教授）

研究分担者：長沖周也（金沢大学医学部附属病院講師）

交付決定額（配分額）

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 16 年度	2,700,000	0	2,700,000
平成 17 年度	1,000,000	0	1,000,000
総計	3,700,000	0	3,700,000

研究発表

(1) 学会誌等

1. K. Mizuno, A. Yachie, S. Nagaoki, H. Wada, K. Okada, M. Kawachi, T. Toma, K. Ohta, Y. Kasahara, S. Koizumi. Oligoclonal expansion of circulating and tissue-infiltrating CD8⁺T cells with killer/effector phenotype in juvenile dermatomyositis syndrome. *Clin Exp Immunol*, 137:187-194, 2004.
2. S. Kondo, T. Horikawa, H. Takeshita, C. Kanegane, Y. Kasahara, T.S. Sheen, H. Sato, M. Furukawa, T. Yoshizaki. Diagnostic value of serum EBV-DNA quantification and antibody to viral capsid antigen in nasopharyngeal carcinoma patients. *Cancer Sci.* 95(6): 508-13, 2004.
3. K. Maruhashi, Y. Kasahara, K. Ohta, T. Wada, K. Ohta, N. Nakamura, T. Toma, S. Koizumi, A. Yachie. Paradoxical enhancement of oxidative cell injury by overexpression of heme oxygenase-1 in an anchorage-dependent cell ECV304. *J. Cell. Biochem.*, 93: 552-562, 2004.
4. T. Wada, T. Toma, H. Okamoto, Y. Kasahara, S. Koizumi, K. Agematsu, H. Kimura, A. Shimada, Y. Hayashi, M. Kato, A. Yachie. Oligoclonal expansion of T lymphocytes with multiple second-site mutations leads to Omenn syndrome in a patient with RAG1-deficient severe combined immunodeficiency. *Blood.* 106(6): 2099-101, 2005.
5. Y. Yang, K. Ohta, M. Shimizu, A. Nakai, Y. Kasahara, A. Yachie, S. Koizumi. Treatment with low-dose angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACEI) plus angiotensin II receptor blocker (ARB) in pediatric patients with IgA nephropathy. *Clin Nephrol.* 64(1): 35-40, 2005.
6. M. Shimizu, K. Ohta, Y. Yang, A. Nakai, T. Toma, Y. Saikawa, Y. Kasahara, A. Yachie, H. Yokoyama, H. Seki, S. Koizumi. Glomerular proteinuria induces heme oxygenase-1 gene expression within renal epithelial cells. *Pediatr Res.* 58(4): 666-71, 2005.
7. H Kanegane, Y. Kasahara, J Okamura, T Hongo, R Tanaka K Nomura, S Kojima and T Miyawaki Identification of DKC1 gene mutations in Japanese patients with X-linked dyskeratosis congenital. *Br. J. Hematol.*, 129(3): 432-434, 2005.
8. K. Mizuno, T. Toma, H. Tsukiji, H. Okamoto, H. Yamazaki, K. Ohta, Y. Kasahara, S. Koizumi, A. Yachie. Selective expansion of CD16^{high}CCR2-subpopulation of circulating monocytes with preferential production of haem oxygenase (HO)-1 in response to acute inflammation. *Clin. Exp. Immunol.*, 142(3):418-424, 2005.

(2) 口頭発表

1. 太田和秀, 石田華子, 中井明子, 清水正樹, 瀬野晶子, 笠原善仁, 谷内江昭宏, 小泉晶一. 微少変形型ネフローゼ症候群のT細胞抗原受容体構造の多様性の解析. 第40回日本小児腎臓病学会(2005, 5, 12, 仙台)
2. 和田泰三, 岡本浩之, 東馬智子, 笠原善仁, 小泉晶一, 谷内江昭宏, 加藤正彦, 嶋田明, 林泰秀. 2次的変異を伴うT細胞のオリゴクローン性増殖により Omenn 症候群を呈した RAG1 欠損症. 第17回日本アレルギー学会春季臨床大会(2005, 6, 2, 岡山)
3. 太田和秀, 石田華子, 中井明子, 清水正樹, 瀬野晶子, 笠原善仁, 谷内江昭宏, 小泉晶一. 微少変形型ネフローゼ症候群のT細胞抗原受容体構造の多様性の解析. 第48回日本腎臓病学会(2005, 6, 22, 横浜)
4. 柴田文恵, 東馬智子, 和田泰三, 笠原善仁, 小泉晶一, 谷内江昭宏, 岡本浩之. 乳児重症アトピー性皮膚炎と Omenn 症候群. 第284回日本小児科学会北陸地方会(2005, 6, 12, 福井)
5. 刀柝裕美, 柴田文恵, 和田泰三, 東馬智子, 笠原善仁, 小泉晶一, 谷内江昭宏, 川野充弘. 抗 CCP 抗体陽性の若年性突発性関節炎 (JIA) の1例. 第284回日本小児科学会北陸地方会(2005, 6, 12, 福井), 第43回北陸臨床免疫・症例検討/研究会(2005, 6, 25, 金沢)
6. 太田和秀, 清水正樹, 中井明子, 東馬智子, 笠原善仁, 小泉晶一, 有居千尋, 谷内江昭宏, 河村毅, 相川厚, 長谷川昭, 石川勲. 生体腎移植後のEBV慢性持続感染による慢性肝炎に Rituximab が著効した1例. 第41回中部日本小児科学会(2005, 8, 28, 名古屋)
7. 柴田文恵, 和田泰三, 東馬智子, 笠原善仁, 小泉晶一, 谷内江昭宏, 岡本浩之, 酒詰忍. パネル好中球を用いたフローサイトメトリー法により早期診断が可能であった乳児免疫性好中球減少症の1例. 第41回中部日本小児科学会(2005, 8, 28, 名古屋)
8. 笠原善仁, 東馬智子, 和田泰三, 谷内江昭宏, 石田也寸志, 脇口宏, 小原明, 徳山美香. 自己免疫性リンパ球増殖症候群 (ALPS) における double negative T 細胞の TCR レポートワ (TCR repertoire of double-negative T cell in ALPS). 第67回日本血液学会・第47回日本臨床血液学会(2005, 9, 17, 横浜)
9. 柴田文恵, 岡本浩之, 和田泰三, 金兼千春, 笠原善仁, 小泉晶一, 谷内江昭宏, 加藤雅彦. 重症アトピー性皮膚炎乳児に対する免疫学的検索と Omenn 症候群との鑑別. 第55回日本アレルギー学会秋季学術大会(2005, 10, 20, 盛岡)
10. 谷内江昭宏, 岡本浩之, 柴田文恵, 和田泰三, 金兼千春, 東馬智子,

笠原善仁，小泉晶一．好塩基球活性化試験による活性化抗原発現の特徴とスギ花粉症発症機構に関する考察．第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会（2005，10，20，盛岡），第 32 回北陸アレルギー研究会（2005，12，10，金沢）

11. Y. Kasahara. Characteristics of double negative T cell in autoimmune lymphoproliferative syndrome. (ALPS). First Congress of Asian Society for Pediatric Research. (2005, 11, 26, Tokyo)
12. 急性腎不全を合併したサルモネラ感染症の一例．伊川泰広，柴田文恵，和田泰三，太田和秀，笠原善仁，小泉晶一，渡部禮二，橋本浩之．第 285 回日本小児科学会北陸地方会，第 16 回日本小児科学会富山地方会．（2005，12，11，富山）
13. 思春期・青年期の糖尿病管理．笠原善仁．第 40 回糖尿病学の進歩。（2006，2，18，金沢）
14. 小児急性リンパ性白血病の同種造血幹細胞移植におけるサイトカインと GVHD の関連に関する検討．笠原善仁，他．第 28 回日本造血細胞移植学会．（2006，2，24，東京）

（3）出版物

1. Annual Review 免疫 2004, IX 免疫記憶 免疫調節、寛容 CD244 と CD8 記憶 T 細胞機能的分化．笠原善仁 中外医学社 2004 年 1 月出版

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

該当するものなし

研究成果

本研究成果の概要を以下に示す。詳細は添付する参考論文を参照されたい。

- (1) 新生児 CD8+T 細胞は CD244 陰性であるのに対し、成人 CD8+T 細胞は約 40-50%が CD244 陽性であり、CD244 陽性比率は加齢に伴い増加した。CD28, CD62L 発現とともに 3-color flow cytometry 解析すると CD244 陰性細胞は全て CD28 陽性 CD62L 陽性であるのに対し、CD244 陽性細胞は CD28 陽性、陰性、CD62L 陽性、陰性の亜群が存在した。伝染性単核球症 (IM) や麻疹の CD8+T 細胞では CD244+細胞の増加が顕かで、特に CD28, CD62L 陽性 CD244 陽性 CD8+T 細胞の増加が著明であった。
- (2) CD244 陽性 CD8+T 細胞亜群、CD244 陰性 CD8+T 細胞亜群における表面抗原、細胞内傷害性蛋白を解析した。CD244 陰性細胞は表面分子発現からもナイーブ細胞として表面形質を示し、パーフォリン、グランザイム B, TIA-1 発現も認めなかった。一方、CD244 陽性細胞は、メモリー細胞表面形質を呈し、パーフォリン、グランザイム B, TIA-1 発現も認められた。
- (3) Naïve T 細胞では TCR レパートワは多様性に富むが memory T 細胞では限られた T 細胞レパートワであることが予想される。TCR CDR3 spectrum 解析を CD244 陽性、陰性各細胞亜群において解析した。CD244 陰性細胞は全ての TCRV β でガウス分布を呈したが、CD244 陽性分画の多くの TCRV β では skewed パターンを示した。また、CD244 陽性細胞のなかでは CD28 陽性細胞より CD28 陰性細胞で、CD62L 陽性細胞より CD62L 陰性細胞で複雑指数はやや低下していた。
- (4) CD244 陽性 CD8+T 細胞への生体内での CD244 陰性細胞から陽性細胞への転換を *in vitro* にて CD244-CD8+T 細胞を刺激培養して確認した。CD244 発現は CD3 刺激にて培養早期から増強した。一方、CD28, CD62L-分画への転換は 2-3 週間かかり緩徐に進行した。
- (5) 機能的分化における細胞分裂の程度を定量化するため、各細胞分画における TREC 含有量を測定したところ、CD244 陰性細胞は最も多く TREC 量が多く、CD28CD62L 陽性 CD244 陽性細胞、CD28/CD62L 陰性 CD244 陽性細胞分画の順に TREC 含有量は減少した。
- (6) EBV 特異的細胞傷害性 CD8+T 細胞を MHC-class I tetramer 染色にて解析すると、感染初期および回復期においても EBV 特異的細胞傷害性 CD8+T 細胞は CD244 陽性細胞中に見いだされ、感染初期では CD28/CD62L 陽性分画に多く認められたが、回復期では CD28/CD62L 陰性分画にも見いだされるようになった。

以上より、TCR repertoire 解析、CDR3 spectrum 解析、TREC 定量および抗原特異的 C T L 解析など総合的に解析することで、CD244 発現と他の抗原発現から分画される CD8+T 細胞の機能的分化の詳細彰かとなった。