

Selective Activation and Proliferation of Specific TCRV β Repertoires within Neonatal CD4+T Cells in Response to Superantigens

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/2297/8526

スーパー抗原刺激による新生児 CD4⁺T 細胞 V β レパートリーの選択的活性化

金沢大学医学部小児科学講座 (主任: 谷口 昂教授)

丹 生 龍 太 郎

本研究では新生児 CD4⁺T 細胞のスーパー抗原応答の特徴を、成人 CD4⁺T 細胞と比較し検討した。成人 CD4⁺T 細胞は新生児と異なり、CD45 イソフォームの発現によりナイーブならびにメモリー T 細胞の二つの異なる亜群から構成されることが知られている。スーパー抗原に対する T 細胞反応性は、初期活性化抗原 CD69 発現、³H-チミジンの取り込み、細胞数の増加、ならびにインターロイキン 2 (interleukin 2, IL-2) 産生を指標として評価した。スーパー抗原刺激による CD69 発現の誘導は、新生児ならびに成人 CD4⁺T 細胞ではほぼ同様に認められた。しかしながら、細胞増殖に関しては新生児と成人 CD4⁺T 細胞で著明な差異が認められた。新生児 CD4⁺T 細胞はスーパー抗原刺激に強く反応し、持続的な細胞増殖が認められた。対照的に、成人 CD4⁺T 細胞のスーパー抗原応答は一過性であり、細胞増殖はきわめて僅かであった。さらに、このような新生児 CD4⁺T 細胞の細胞増殖に伴い、著明な IL-2 産生と IL-2 mRNA 発現の増強が認められた。次に、スーパー抗原刺激による特異的 T 細胞抗原レセプター (T cell receptor, TCR) V β レパートリーの選択的増殖を、TCR V β 2a と特異的に活性化する毒素性ショック症候群外毒素-1 (toxic shock syndrome toxin-1, TSST-1) を用いて検討した。新生児 CD4⁺T 細胞、あるいは成人ナイーブ CD4⁺T 細胞の培養では、TSST-1 刺激に伴い TCR V β 2a レパートリーの著明な増殖が認められた。一方、成人メモリー CD4⁺T 細胞を用いた場合には、このような TCR V β 2a レパートリーの選択的増殖は殆ど認められなかった。これらの結果より、スーパー抗原刺激による新生児 CD4⁺T 細胞の高応答性が、特異的 TCR V β レパートリーの選択的増殖と、強い IL-2 産生の誘導によることが示された。このようなスーパー抗原高応答性は、新生児期・乳児期におけるスーパー抗原の関与する種々の疾患の、特徴的な臨床像発現に深く関与すると考えられた。

Key words neonate, CD4⁺T cell, TCRV β repertoire, superantigen, IL-2

乳児期・小児期には発熱、紅斑形成性、あるいは皮膚剝離性病変を伴う全身疾患が種々認められる。このうちブドウ球菌熱傷皮膚症候群はブドウ球菌表皮剝脱毒素 (exfoliative toxin) が、また猩紅熱は溶連菌発赤毒素 (erythrogenic toxin) が発症の原因となることが知られている^{1)~3)}。これらはいずれも細菌外毒素であり、他の多くの細菌外毒素と共にスーパー抗原としての性質を有し、強い T 細胞活性化とサイトカイン産生を誘導することが明らかとなっている⁴⁾。また最近同様に発熱、発疹を特徴とする川崎病やエルシニア感染症でも細菌外毒素の関与が示唆されつつあり⁵⁾⁶⁾、これらの疾患に共通の症状が細菌外毒素のスーパー抗原活性によると理解されてきている⁷⁾。しかし外毒素産生菌の多くは普遍的に存在し、すべての感染例でこれらの外毒素に起因する病態が発症するとは考えられない。むしろ個々の症例における菌の感染形態、外毒素産生能、個体の感受性などが発症のための重要な要素となると考えられる⁸⁾。乳児期・小児期に細菌外毒素が関与する、あるいは関与が示唆される種々の疾患が好発する事実は、原因となる細菌外毒素のスーパー抗原活性に対するこの時期の T 細胞の応答性の高さを反映している可能性を示唆している。

本研究では外毒素であるブドウ球菌腸管毒素 B (staphylococcal enterotoxin B, SEB) ならびに毒素性ショック症候群外毒素-1 (toxic shock syndrome toxin-1, TSST-1) などを用いて、新生児および成人 CD4⁺T 細胞のスーパー抗原応答性を比較、新生児 CD4⁺T 細胞が高い応答性を示すことを明らかにし、さらにその機序を T 細胞初期活性化、インターロイキン 2 (interleukin 2, IL-2) 産生、細胞増殖、特異的 T 細胞レパートリーの増殖などの観点から検討した。

対象および方法

1. 各種細胞の分離

新生児臍帯血、成人末梢血よりフィコルーハイパック (Ficoll-Hypaque) 比重遠心法により単核球を採取し、さらに 2-アミノエチルisonチオウロニウム ブロマイド (2-aminoethylisothiouonium bromide) (Sigma Chemical, St Louis, Mo, USA) 処理ヒツジ赤血球を用いたロゼット法とフィコルーハイパック比重遠心法にて 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。E⁺細胞はさらに CD4⁺T 細胞を精製するために使用した。また E⁻細胞は 5% 非働化ウシ胎児

平成 5 年 12 月 17 日受付、平成 6 年 1 月 19 日受理

Abbreviations: APC, antigen presenting cell; bp, base pair; FCS, fetal calf serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; ³H-TdR, tritiated thymidine; IL-2, interleukin 2; IFN- γ , interferon γ ; PBS, phosphate-buffered saline; PCR, polymerase chain reaction; PE, phycoerythrin; PHA, phytohemagglutinin; RT reverse

血清 (fetal calf serum, FCS) (Flow Laboratories, Mc Lean, VA, USA), 25mM HEPES, 5×10^{-5} M2-メルカプトエタノール, 0.3mg/ml L-グルタミン, 200U/ml ペニシリン, 10mg/ml ゲンタマイシンを含む RPMI1640 培養液 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) に浮遊し, プラスチックフラスコ No. 3375 (Costar, Cambridge, MA, USA) にて37°Cで30分間培養した. 付着した細胞はセルスクレイパー No. 3010 (Costar) にて剥がして, T細胞刺激の際の抗原提示細胞 (antigen presenting cells, APC) として用いた.

II. 単クローン抗体

フルオレッセイン・イソチオシアン酸 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識抗 Leu-3a (抗 CD4) 抗体, FITC 標識抗 Leu-2a (抗 CD8) 抗体 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, CA, USA), FITC 標識 OKNK (抗 CD16) 抗体, FITC 標識 OKB20 (抗 CD20) 抗体 (オーソ・ダイアグノスティック・システム, 東京), フィコエリスリン (phycoerythrin, PE) 標識 2H4 (抗 CD45RA) 抗体 (Coulter Immunology, Hialeah, FL, USA), PE 標識抗 Leu-3a (抗 CD4) 抗体, PE 標識抗 LeuRO (抗 CD45RO) 抗体 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, CA, USA) を用いて成人および新生児 E⁺細胞を染色し CD4⁺T 細胞亜群を精製した. CD4⁺T 細胞中の各 T細胞抗原受容体 (T cell receptor, TCR) V β レパートリー分布を FITC 標識抗体 (Diversi-T T Cell Sciences, MA, USA) を用いて検討した. ただし V β 2a の染色には FITC 標識 TCR V β 2a 抗体 (Immunotech, Marseille, France) を用いた. T細胞の活性化を検討するために PE 標識抗 Leu-23 (抗 CD69) 抗体 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) を用いた.

III. 免疫蛍光染色による解析

CD4⁺T 細胞中の各 TCR V β レパートリーの解析は, PE 標識抗 Leu3a 抗体と FITC 標識抗 TCR V β 抗体により二重染色し解析した. 培養した CD4⁺T 細胞は, PE 標識抗 Leu23 抗体で染色し, 活性化抗原としての CD69 発現を経時的に検討した. TSST-1¹¹⁾ 刺激による細胞の活性化と, V β 2a, V β 5a レパートリーの構成比の変化は各々の亜群を FITC 標識抗 V β 抗体で染色し, 細胞の大きさと FITC 蛍光を指標として検討した. 各々の単クローン抗体は細胞と 4°C, 15分間反応させた後, 3% FCS 加 0.15M 酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) にて二回洗浄し, 細胞を 3% FCS 加 PBS に浮遊し, フローサイトメーター Cytoron Absolute (オーソ・ダイアグノスティック・システム) を用いて解析した.

IV. セル・ソーティングによる CD4⁺T 細胞亜群の単離

成人および新生児 E⁺細胞を FITC 標識抗 Leu3a 抗体で染色した後セル・ソーター EPICS Elite (Coulter Electronics Inc.) を用いて CD4⁺T 細胞を単離した. 一部の実験では成人ナイーブ CD4⁺T 細胞とメモリー CD4⁺T 細胞を単離するために, E⁺細胞をさらに FITC 標識 OKNK, PE 標識 2H4, および PE 標識抗 Leu2a 抗体で染色, あるいは FITC 標識 OKNK, PE 標識抗 Leu-45RO 抗体, および PE 標識抗 Leu2a 抗体で染色した後に, セル・ソーターで FITC 陰性, PE 陰性領域のリンパ球として単離した. CD8⁻CD45RO⁻CD4⁺T 細胞をナイーブ CD4⁺T 細胞として, また CD8⁻CD45RA⁻CD4⁺T 細胞をメモ

リー CD4⁺T 細胞として以下の実験に用いた. さらに一部の実験では, 単離した T細胞の V β レパートリーの初期活性化を検討するために, これら T細胞亜群をさらに FITC 標識抗 TCR V β 2a 抗体を用いた V β 2a⁻, および V β 2a⁺ 亜群に分画した.

V. 細胞培養

T細胞分画は 1×10^6 /ml の濃度で, 10% APC と共に 10% 非働化ウシ胎児血清を含む RPMI1640 培養液に浮遊し, 96穴丸底マイクロタイタープレート No. 25860 (Corning Glass Works, Corning, NY, USA) に 200 μ l ずつ分注, スーパー抗原 SEB (Toxin Technology, Sarasota, FL, USA) および TSST-1 (Toxin Technology) を 100ng/ml の濃度でまたフィトヘマグチニン (phytohemagglutinin, PHA) (Difco laboratories, Detroit, MI, USA) を 0.1%vol/vol の濃度でを加えて炭酸ガス培養器 (37°C, 5% CO₂) にて培養した.

VI. 細胞増殖反応

新生児 CD4⁺T 細胞及び成人 CD4⁺T 細胞の各種スーパー抗原に対する増殖反応を ³H 標識チミジン (tritiated thymidine, ³H-TdR, New England Nuclear, Boston, MA, USA) の取り込みにより検討した. 各々の細胞を 5×10^5 /ml の濃度で, 10% 付着単球と共に 10% 非働化ウシ胎児血清を含む RPMI1640 培養液に浮遊し, 96穴丸底マイクロタイタープレートに 200 μ l ずつ分注, スーパー抗原であるブドウ球菌腸管毒素 A (staphylococcal enterotoxin, A, SEA) (Toxin Technology), SEB, ブドウ球菌腸管毒素 E (staphylococcal enterotoxin E, SEE) (Toxin Technology), TSST-1 を各々 100ng/ml の濃度で加え, 80時間炭酸ガス培養器 (37°C, 5% CO₂) にて培養し, 培養停止 8時間前に ³H-TdR を 1穴あたり 0.2 μ Ci 添加し, ³H-TdR の取り込みを液体シンチレーションカウンタ LSC-700 (アロカ, 東京) にて測定した.

VII. IL-2 測定

新生児 CD4⁺T 細胞および成人 CD4⁺T 細胞をスーパー抗原刺激により 36時間培養した後上清を採取, IL-2 生物活性を IL-2 依存性細胞株 CTLL-2 の増殖を指標にして検討した. 最大量の ³H-TdR 取り込みを示す IL-2 活性の半分を一単位とした⁹⁾.

VIII. IL-2mRNA 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

IL-2mRNA および対照としてのベータアクチン mRNA の増幅は RT-PCR 法により Brenner らの方法⁹⁾ に準じて行った.

1. RNA の抽出

RNA の抽出はシングル・ステップ法¹⁰⁾ にて行った. それぞれ 12, 24, 48, 72, 120時間, 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, 大阪) 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. キャリアーとして酵母由来の tRNA を加えた.

2. RNA から cDNA への逆転写

$1 \times 10^5 \sim 10^6$ の細胞から得られた RNA を 2 μ g のオリゴ dT (Pharmacia LKB Biotechnology, Bromma, Sweden) をプライマーとして 10単位の逆転写酵素 (RAV-2) (宝酒造, 京都) を含む 50 μ l の反応液中にて 42°C で 1時間反応させ, cDNA を得た. 反

transcriptase; SEA, staphylococcal enterotoxin A; SEB, staphylococcal enterotoxin B; SEE, staphylococcal enterotoxin E; TCR, T cell receptor; TSST-1, toxic shock syndrome toxin-1

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, 東京) を通して純化し, 使用した.

3. PCR ならびに電気泳動

得られた cDNA のうち $5\mu\text{l}$ を 2 単位の *Taq* ポリメラーゼ (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CN, USA) と $1\mu\text{M}$ の 3' 側, 5' 側オリゴヌクレチドプライマーを含む $45\mu\text{l}$ の反応液に加えた. IL-2-5' プライマー (ATGTACAGGATGCAACTCCTG), IL-2-3' プライマー (TCAAGTCAGTGTTGAGATGATGCT) およびベータアクチン 5' プライマー (GTGGGGCGCCCCAGGCACCA), 3' プライマー (CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC) はそれぞれクローニングされた cDNA をもとにして DNA 合成装置 (Beckman Instruments, Palo Alto CA, USA) にて作成した. IL-2, ベータアクチンの期待される増幅産物の長さはそれぞれ 462, 548 塩基対 (base pair, bp) である. 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, 40 回増幅を行った. 増幅された産物の $10\mu\text{l}$ を 1.0% 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.

成 績

I. 新生児 $\text{CD4}^+\text{T}$ 細胞と成人 $\text{CD4}^+\text{T}$ 細胞のスーパー抗原反応性

新生児 $\text{CD4}^+\text{T}$ 細胞と成人 $\text{CD4}^+\text{T}$ 細胞を種々のスーパー抗原で刺激し, マイクロタイタープレートを直接倒立顕微鏡下で観察した. 図 1 に SEB あるいは TSST-1 で刺激 60 時間後の典型像を示す. 成人 $\text{CD4}^+\text{T}$ 細胞は培養初期より強い細胞集塊を形成したが, その大きさの増加は緩やかであり, 細胞増殖が極

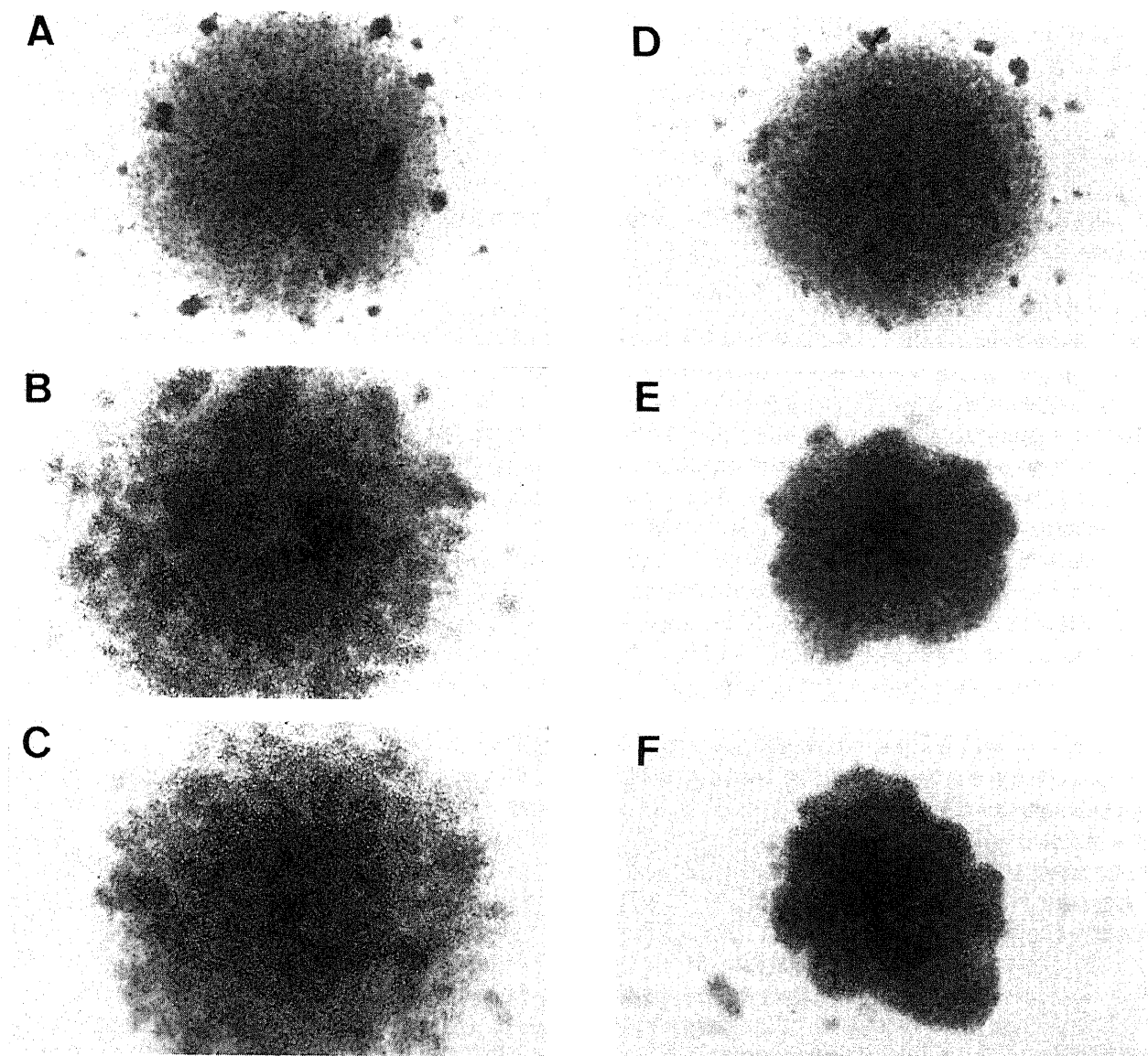


Fig. 1. Microscopic views of neonatal (A, B, C) and adult (D, E, F) $\text{CD4}^+\text{T}$ cells unstimulated (A, D) or stimulated by staphylococcal enterotoxin B (SEB) (B, E) or toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) (C, F). Neonatal and adult $\text{CD4}^+\text{T}$ cells were cultured with SEB (100 ng/ml) or TSST-1 (100 ng/ml) for 72 hr and the cell clusters were observed under an inverted microscope.

めて軽度であることが推察された。一方、新生児 CD4⁺T 細胞では初期の細胞集塊の形成はわずかであったが、次第に細胞集塊は増大し、持続的に著しい細胞増殖が起こっていることが示唆された。次に、これらの細胞増殖を ³H-TdR の取り込みにより比較検討した。培養3日間の比較では、各スーパー抗原刺激において、新生児 CD4⁺T 細胞は成人 CD4⁺T 細胞に比べて有意に強い増殖を示した(図2)。

II. SEB 刺激による成人 CD4⁺T 細胞および新生児 CD4⁺T 細胞の初期活性化と細胞増殖

新生児 CD4⁺T 細胞と成人 CD4⁺T 細胞のスーパー抗原応答

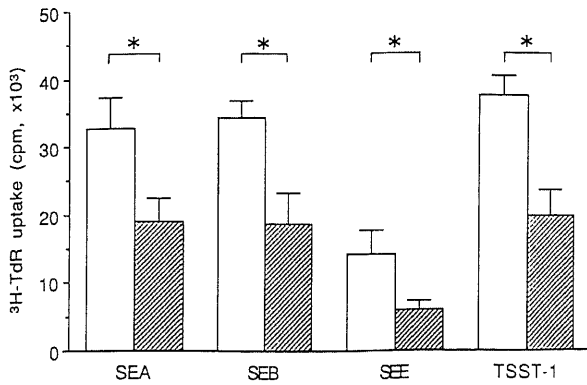


Fig.2. Proliferative responses of neonatal (□) and adult (▨) CD4⁺T cells stimulated by superantigens. CD4⁺T cells were incubated with staphylococcal enterotoxin A (SEA), staphylococcal enterotoxin B (SEB), staphylococcal enterotoxin E (SEE) or toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) for 72 hr and pulsed with tritiated thymidine for final 8 hr. ³H-TdR uptake was determined by a liquid scintillation counter as described in Materials and Methods. Data represent means±SD of 5 separate experiments. * P<0.01.

性の差異をさらに SEB 刺激により検討した。図3は、新生児 CD4⁺T 細胞と成人 CD4⁺T 細胞を SEB あるいは PHA 添加により培養、36時間後の T細胞初期活性化抗原 CD69 の典型的発現パターンを示したものである。新生児、成人ともに PHA 刺激後は CD4⁺T 細胞のほとんどが CD69 を強く発現する。一方、SEB 刺激では PHA 刺激の場合と異なり一部の細胞のみが強く CD69 を発現、CD4⁺T 細胞の特定の亜群にのみ初期活性化が起こっていることが示された。このような初期活性化が持続的な細胞活性化、さらには細胞増殖に至るか否かを明らかにするために、CD69 抗原の発現を経時的に検討した。培養開始12時間ならびに60時間後の CD69 抗原発現を、新生児ならびに成人 CD4⁺T 細胞で比較した。刺激開始12時間後の活性化は両細胞群で著明な差は認められないが、むしろ成人 CD4⁺T 細胞の方が強い傾向が認められた。しかし、刺激開始60時間後では新生児 CD4⁺T 細胞では活性化分画の著明な増加が認められるのに対して、成人 CD4⁺T 細胞ではわずかの増加が認められるのみであった(図4)。次に細胞活性化を CD69 発現、細胞数、さらに ³H-TdR の取り込みを指標に経時的に比較検討した。新生児 CD4⁺T 細胞が培養開始後、³H-TdR の取り込み、細胞数共に経時的に増加するのに対して、成人 CD4⁺T 細胞は初期活性化のみ強く認められ、一過性の細胞数増加も観察されたが、³H-TdR の取り込み、細胞数の増加は一定時間後には極めて緩やかとなり、持続的細胞増殖が起こらないことが示唆された(図5)。

III. 新生児 CD4⁺T 細胞と成人 CD4⁺T 細胞のスーパー抗原刺激に対する IL-2 産生と IL-2mRNA 発現の経時的変化

スーパー抗原刺激によりT細胞による種々のサイトカイン産生が強く誘導されることが知られている。新生児 CD4⁺T 細胞と成人 CD4⁺T 細胞の SEB 反応性の差が、これらサイトカイン、特に IL-2 産生の差による可能性を検討した。新生児

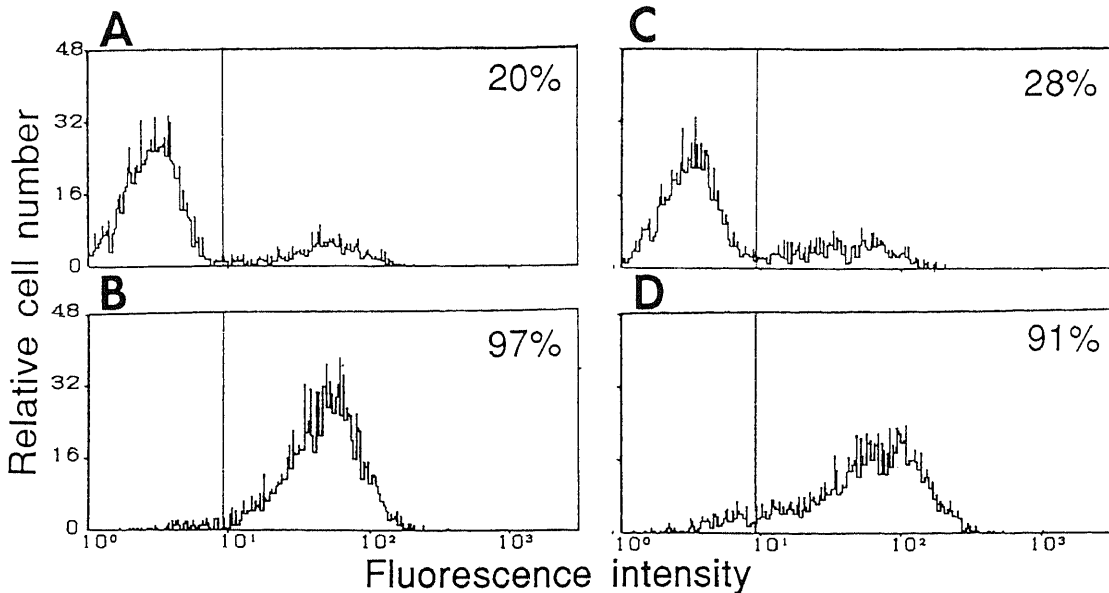


Fig.3. Expression of an early activation antigen, CD69, after SEB or phytohemagglutinin (PHA) stimulation in neonatal (A, B) and adult (C, D) CD4⁺T cells. Neonatal and adult CD4⁺T cells were stimulated by SEB (100 ng/ml) (A, C) or PHA (1:1,000 dilution) (B, D) for 36 hr. The cells were harvested and stained with phycoerythrin (PE)-conjugated anti-Leu23 and analyzed by Cytoron Absolute. The fluorescence profiles are displayed as single parameter histograms. The vertical lines show unstained controls cells.

CD4⁺T 細胞と成人 CD4⁺T 細胞を PHA と SEB 刺激により培養し、上清中の IL-2 生物活性を経時的に測定した。新生児 CD4⁺T 細胞の培養では、PHA 刺激によっても成人に比し高い IL-2 産生が認められたが、上清中の IL-2 活性は培養開始36時間をピークに低下傾向を示した。これに対して、SEB 刺激ではさらに著明な IL-2 産生が誘導され、上清中の IL-2 活性は継続

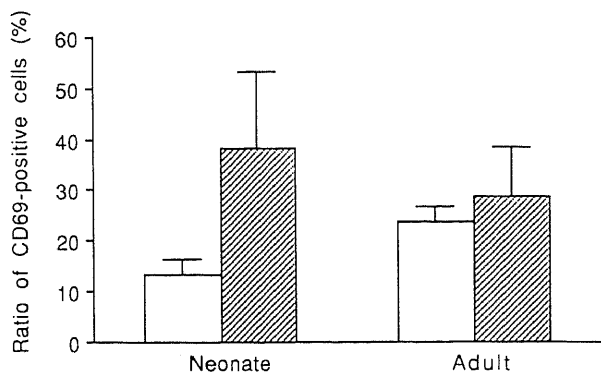


Fig. 4. SEB-induced expression of CD69 on neonatal and adult CD4⁺ T cells at 12 hr (□) and 60 hr (▨) of cultures. Expression of CD69 was evaluated at two different points of cultures.

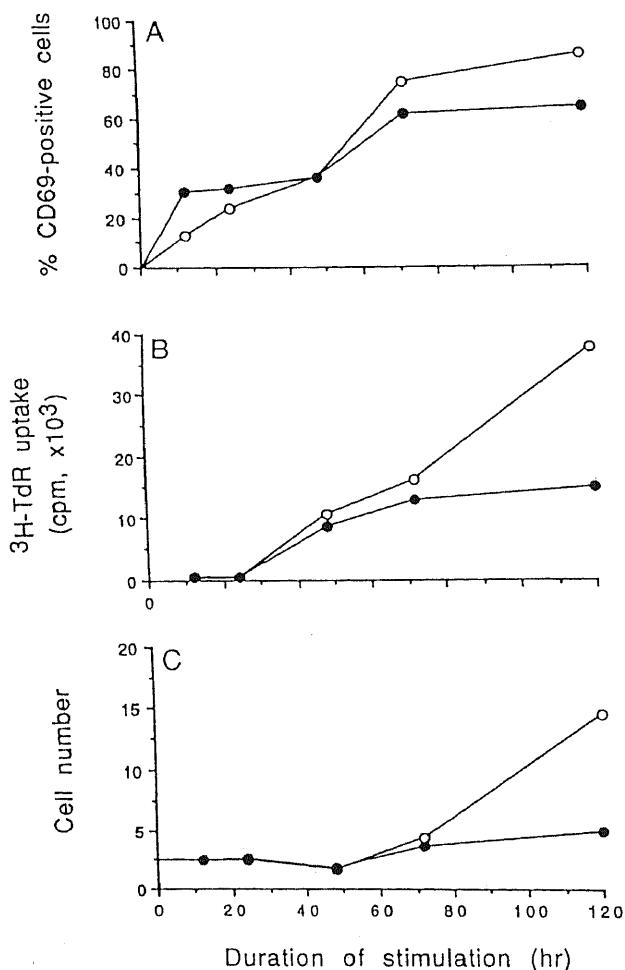


Fig. 5. Kinetics of CD69 expression (A), ³H-TdR uptake (B), and cell numbers (C) after SEB-induced activation of neonatal (○) and adult (●) CD4⁺ T cells.

的に増加した。一方、成人 CD4⁺T 細胞では SEB 刺激によっても誘導される IL-2 産生はわずかであり、培養開始60時間後も上清中の活性は低値に留まった (図6)

次に、スーパー抗原刺激による新生児 CD4⁺T 細胞と成人 CD4⁺T 細胞培養上清中の IL-2 活性が新たな IL-2 合成を反映していることを確認するために、IL-2mRNA の発現を経時的に RT-PCR 法を用いて検討した。新生児、成人ともに培養開始12時間で少量の IL-2mRNA の発現が認められ、24時間でピークに達した。新生児 CD4⁺T 細胞の培養では IL-2mRNA 発現はより強くかつ持続的に認められ、培養開始72時間でも検出可能であった。一方、成人 CD4⁺T 細胞による IL-2mRNA 発現は、培養開始24時間でピークに達した後急速に低下し、48時間以降は殆ど検出感度以下となった (図7)。

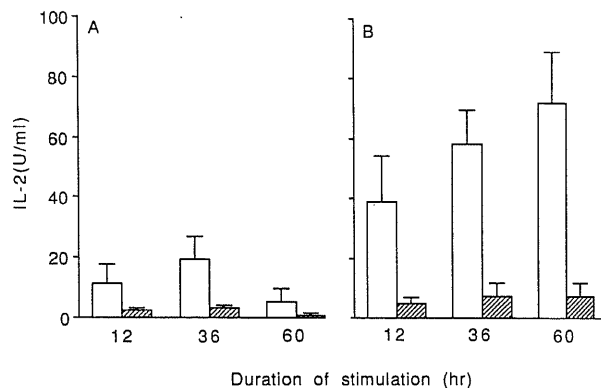


Fig. 6. Kinetics of IL-2 production by neonatal (□) and adult (▨) CD4⁺ T cells stimulated by PHA (A) and SEB (B). The data represent the means \pm SD of 5 separate experiments.

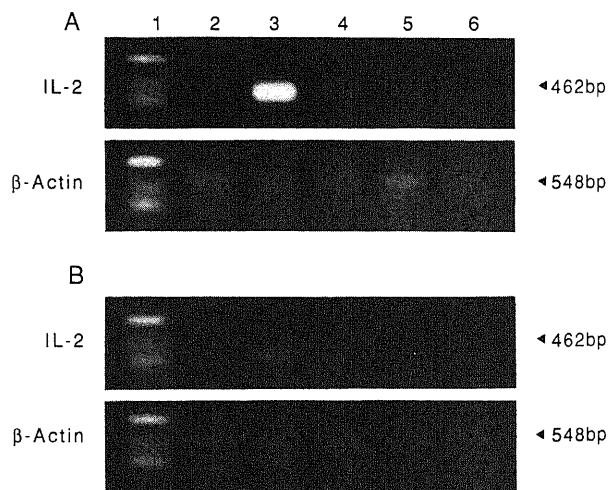


Fig. 7. Time course of IL-2 mRNA expression of neonatal (A) and adult (B) CD4⁺ T cells stimulated by SEB. The expression of mRNA for IL-2 was evaluated using RT-PCR as described in Materials and Methods. Neonatal and adult CD4⁺ T cells were stimulated by SEB and the expression of mRNA for IL-2 was evaluated at 12 (lane 2), 24 (lane 3), 48 (lane 4), 72 (lane 5), and 120 hr (lane 6). For reference, β -actin mRNA was evaluated at the same time. Lane 1 denotes molecular weight markers.

IV. 新生児 CD4⁺T 細胞と成人 CD4⁺T 細胞の TCR Vβ レパートリー分布

T細胞のスーパー抗原に対する増殖反応は、一般に特定の TCR Vβ レパートリーの特異的、選択的活性化によると考えられている。新生児 CD4⁺T 細胞と成人 CD4⁺T 細胞のスーパー抗原応答性の違いが、TCR Vβ レパートリー分布の差異により説明できるか否かを検討した。表1に、新生児 CD4⁺T 細胞ならびに成人 CD4⁺T 細胞中の TCR Vβ レパートリー分布を示す。検討可能であった TCR Vβ レパートリーの中では、両群間でその分布に有意差を認めないものが多く、特に SEB に反応するとされる Vβ12a の構成比は新生児と成人ではほぼ同様であった。ただし、Vβ2a は新生児 CD4⁺T 細胞が、Vβ5b は成人 CD4⁺T 細胞が明らかな高値を示した。しかし、その差はわずかであり、これにより新生児と成人 CD4⁺T 細胞の SEB 応答性の差を説明できるとは考えられなかった。

V. TSST-1 刺激による Vβ2a⁺T 細胞の CD69 発現

次に、このような CD4⁺T 細胞のスーパー抗原応答性の差が、特定の Vβ レパートリーの選択的活性化および増殖の差によるものであるのかを、TSST-1 を用いて検討した。TSST-1 は SEB 同様ブドウ球菌外毒素であり、スーパー抗原として Vβ2a のみを選択的に刺激、その活性化を誘導することが知られている。さらに、Vβ2a は新生児 CD4⁺T 細胞ならびに成人 CD4⁺T 細胞の双方で最も多くを占めるレパートリーであり、TSST-1 刺激培養はスーパー抗原刺激による特定の TCR Vβ レパートリーの選択的増殖を評価するために、最も適切であると考えられた。

最初に、このような反応性の違いが、特異的 CD4⁺T 細胞レパートリーの初期活性化機構の違いによるか否かを検討するために、CD4⁺T 細胞をナイーブ、メモリー亜群に分け、さらに Vβ2a 陽性ならびに陰性細胞に分画した。それらを自己 APC 存在下で TSST-1 を添加36時間培養し、初期活性化を CD69 発現を指標として検討した。ナイーブ、メモリーT細胞共 Vβ2a 陽性細胞は TSST-1 刺激に反応し、初期活性化抗原 CD69 を強く発現した。これに対して Vβ2a 陰性亜群の CD69 発現は低く、少なくとも培養初期においてはメモリー、ナイーブ CD4⁺T 細胞共に Vβ2a の特異的活性化が起こっていることが推察された(表2)。

VI. TSST-1 刺激による CD4⁺T 細胞芽球化と Vβ2a⁺T 細胞の選択的増加

培養6日間の観察では新生児 CD4⁺T 細胞、成人ナイーブ CD4⁺T 細胞は時間経過と共に幼若化しその多くが Vβ2a を発現していた。これに対して、Vβ5a 陽性芽球の増加はほとんど認められなかった。一方、メモリーT細胞は初期に細胞増殖が認められるがその後は穏やかであり、Vβ2a 陽性芽球の比率も極めて低かった(図8)。ナイーブ CD4⁺T 細胞では緩やかではあるが持続的に細胞増殖が観察され、さらに新生児に比し低いが、Vβ2a の選択的増殖も認められた。図9に、培養6日目の典型的なフローサイトメトリーによる解析パターンを示す。新生児 CD4⁺T 細胞のほとんどが幼若化しその多くが Vβ2a を発現しているのに対して、メモリー CD4⁺T 細胞では大型芽球が少なく、芽球化した細胞においても Vβ2a の発現はごくわずかに認めるのみであった。ナイーブ CD4⁺T 細胞は、メモリー

Table 1. TCRVβ repertoires of CD4⁺ T Cells

TCRVβ repertoire	Expression (mean ± S.D. %) of each TCRVβ repertoire of CD4 ⁺ T cells in	
	Neonate	Adult
2 a	11.8±1.2	8.8±1.8*
5 a	2.3±0.4	2.6±0.8
5 b	0.8±0.2	1.3±0.4*
5 c	5.9±1.1	4.7±1.2
6 a	1.5±1.6	2.0±2.0
8 a	3.6±1.0	3.8±1.3
12 a	2.2±0.6	2.1±0.9

Mononuclear cells from neonatal cord blood or adult peripheral blood were stained with phycoerythrin (PE)-conjugated Leu3a and fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated Vβ repertoire. Stained cells were analyzed by Cytoron Absolute.

*P<0.001 vs. neonate.

Table 2. CD69 expression in Vβ2a⁺ or Vβ2a⁻ cells by TSST-1 stimulation

Experiment	Naive CD4 ⁺ T cells		Memory CD4 ⁺ T cells	
	Ratio (%) of CD69 expression in cells of		Ratio (%) of CD69 expression in cells of	
	Vβ2a ⁺	Vβ2a ⁻	Vβ2a ⁺	Vβ2a ⁻
1	84.9	15.9	74.1	34.9
2	50.9	9.1	65.5	25.2

Naive CD4⁺ T cells and memory CD4⁺ T cells were further separated into Vβ2a⁺ and Vβ2a⁻ fractions and they were stimulated by TSST-1 independently for 36 hr.

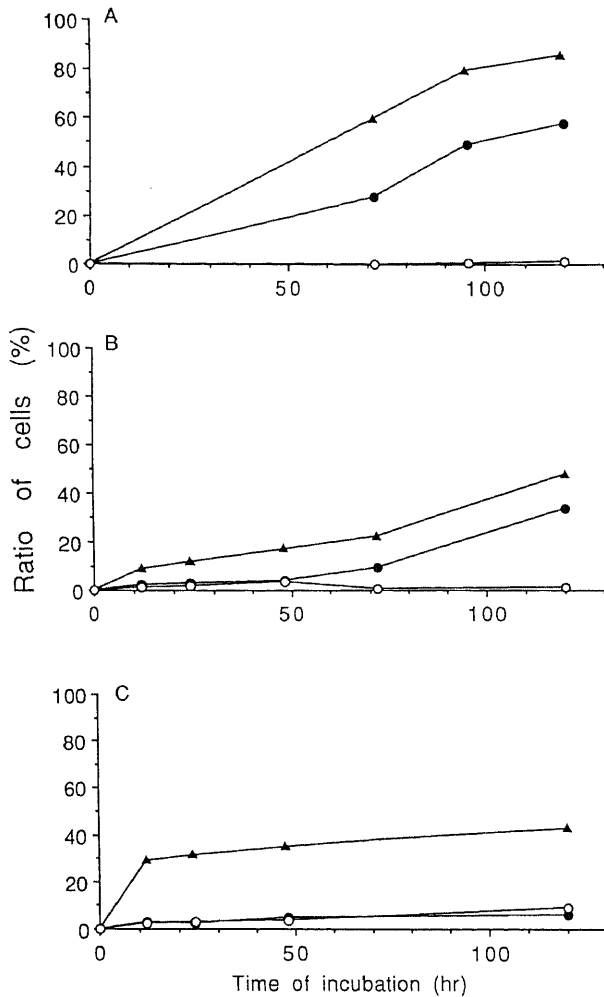


Fig. 8. Kinetic analysis of cell size and V β 2a and 5a expression of neonatal and adult CD4⁺ T cells. Neonatal CD4⁺ T cells (A), or separated adult naive (B) or memory (C) CD4⁺ T cells were cultured with TSST-1 (100 ng/ml) for 6 days. Fractions of blast cells (▲) and the percentages of V β 2a⁺ (●) or V β 5a⁺ (○) blasts were examined at each time period. Figures show the representatives of three separate experiments.

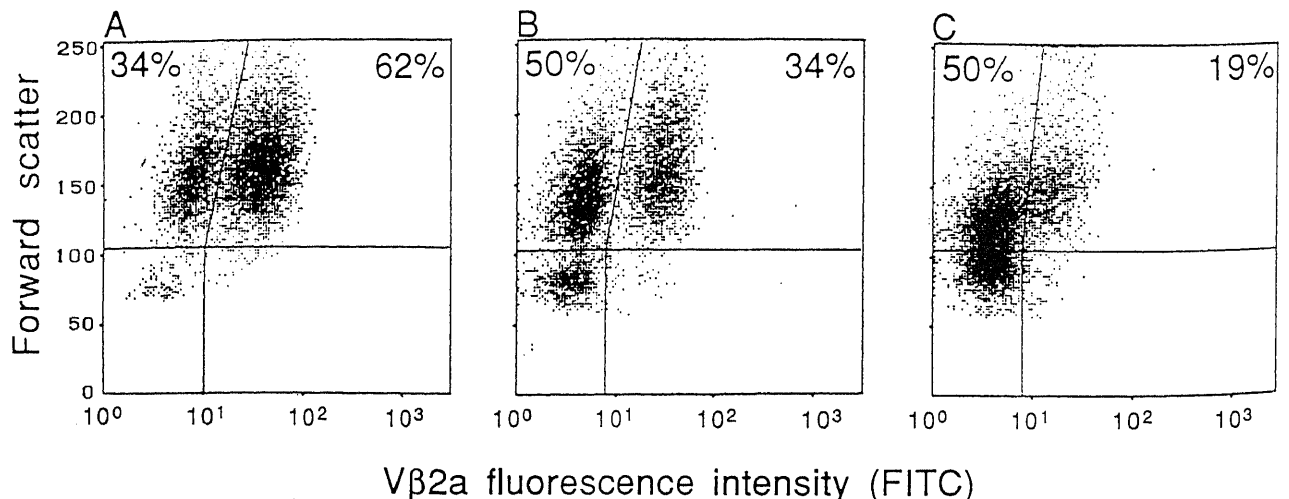


Fig. 9. Flowcytometric analysis of V β 2a expression after TSST-1 stimulation. Neonatal CD4⁺ T cells (A), and adult naive (B) or memory (C) CD4⁺ T cells were incubated for 6 days with TSST-1 (100 ng/ml). The cells were stained with FITC-conjugated V β 2a and the blast cell and green fluorescence were evaluated by Cyturon Absolute.

CD4⁺T 細胞に比べて明らかに強い V β 2a 発現を示した. 表 3 に新生児, 成人ナイーブ, およびメモリー CD4⁺T 細胞の培養開始 6 日目の芽球化および V β 2a 出現比率をまとめた. 新生児 CD4⁺T 細胞の芽球化細胞の比率は成人ナイーブ, およびメモリー CD4⁺T 細胞に比べて高い傾向を示した. さらに, V β 2a 陽性細胞はメモリー CD4⁺T 細胞に比べて新生児ならびにナイーブ CD4⁺T 細胞で有意に増加していた.

考 察

乳児期や幼児期にはブドウ球菌熱傷皮膚症候群, 猩紅熱, マイコプラズマ感染症, エルシニア感染症など発熱や皮膚粘膜の発赤, 皮膚剥離を伴う全身性の疾患にしばしば遭遇する. これらの疾患の一部は, 原因菌の産生する細菌外毒素が要因となり発症することが明らかとなりつつある³⁾. 細菌外毒素はスーパー抗原としての性質をもち¹⁾, T 細胞中の特定の TCR V β レパートリーを有する分画を活性化し, 種々のサイトカイン産生を誘導することが知られている¹²⁾⁻¹⁶⁾. スーパー抗原は一般ペプチド抗原とは異なり, 抗原提示細胞の存在を必要とするがプロセッシングを必要とせず, 主要組織適合抗原 (major histocompatibility complex, MHC) による制限を受けることなく TCR V β レパートリーの外側に結合する¹⁷⁾¹⁸⁾. さらにペプチド抗原に比べてはるかに低い濃度 (10^{-13} ~ 10^{-16} M) で, 特定の TCR V β レパートリーをもつ T 細胞 (5~25%) を一度に活性化し¹⁹⁾²⁰⁾, IL-2, インターフェロンガンマ (interferon- γ , IFN- γ), 腫瘍壊死因子アルファ (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) などの様々なサイトカインを大量に産生し¹²⁾ 炎症性の全身性疾患を惹起することが知られている²¹⁾²²⁾. 最近, 川崎病⁹⁾, エルシニア感染症²¹⁾ や伝染性単核症²²⁾ の発症とスーパー抗原との関連性を示唆する事実も報告されており, これらの疾患に共通の病態発現に T 細胞レパートリーの選択的活性化とサイトカイン産生が重要な役割を果たしていることが示唆されている. さらに, これらの疾患の多くが, 乳児期ならびに小児期にしばしば認められることより, この時期の T 細胞のスーパー抗原応答性が成人 T 細胞に比し著しく高いことが予想される.

しかしながら, 従来より新生児期や幼児期の T 細胞は増殖反応や IFN- γ などのサイトカイン産生が, 成人 T 細胞に比べて劣

Table 3. Activation and selective expansion of Vβ2a+ CD4+ T cells by TSST-1 stimulation

CD4+ T cells	Blast cells/total cells (mean ± S.D., %)	Vβ2a+ cells/total cells (mean ± S.D., %)	Vβ2a+ cells/blast cells (mean ± S.D., %)
Neonatal	95.0 ± 2.0	67.0 ± 8.6	70.6 ± 10.5
Adult naive	62.9 ± 18.7	29.5 ± 3.6	49.2 ± 18.8
Adult memory	68.0 ± 15.7	12.0 ± 5.0*	17.5 ± 6.0*

*p<0.001 vs. neonate.

Neonatal CD4+ T cells, adult naive or memory CD4+ T cells were cultured with TSST-1 for 120 hr and the blast and Vβ2a expression were evaluated. *p<0.001 vs. neonate.

ることが指摘されてきた^{23)~29)}。その違いは主として、新生児や幼児期 CD4+T 細胞の大部分を占めるナイーブ CD4+T 細胞と、成人 CD4+T 細胞の過半数を占めるメモリー CD4+T 細胞の抗原刺激に対する反応性の違いによると考えられている³⁰⁾。一般に、新生児あるいはナイーブ CD4+T 細胞はメモリー CD4+T 細胞に比べ蛋白抗原刺激や抗 CD3 抗体、あるいは抗 CD2 抗体刺激に対する反応性が不良であり²⁹⁾³¹⁾、IL-3, IL-4, IL-6, IFN-γ などのサイトカイン産生についても劣ることが報告されている^{29)32)~38)}。しかし、一部の刺激系では APC として付着細胞を添加することにより、ナイーブ CD4+T 細胞の著明な増殖反応を認めており^{39)~41)}、さらに抗 CD2, 抗 CD3 抗体によるナイーブ T 細胞の反応は IL-4 や IL-6 添加で促進することが報告されている³⁷⁾⁴²⁾。これらの事実より新生児あるいはナイーブ CD4+T 細胞とメモリー CD4+T 細胞の反応性の差異の少なくとも一部は、APC 依存性の差異によって説明できると考えられる。スーパー抗原刺激を用いた検討でも、APC が無い場合ナイーブ T 細胞の反応性が極めて不良であり、十分な APC、特に付着細胞の添加によりナイーブ T 細胞の反応性が回復したと報告されている⁴³⁾⁴⁴⁾。

本研究では APC として自己付着細胞を用い、新生児期ならびに成人 CD4+T 細胞の応答性を比較検討した。付着により活性化された APC を用いたこと、十分量のスーパー抗原濃度を用いたことより、本研究では新生児 CD4+T 細胞の高応答性が得られた可能性がある。従来、レクチン刺激ではナイーブ CD4+T 細胞による IL-2 産生はメモリー CD4+T 細胞と同等に認められるとの報告がされており³⁹⁾、本研究においても、SEB 刺激後のみでなく、PHA 刺激による IL-2 産生も新生児 CD4+T 細胞の方が良好であった。しかしスーパー抗原刺激により、特に新生児 CD4+T 細胞で著明な IL-2 産生誘導が認められる詳細な機構は不明である。最近、スーパー抗原刺激による T 細胞活性化の際に、T 細胞表面抗原 CD28 と APC 上のリガンド B7 の役割が重要であることが報告されており⁴⁵⁾、さらに B7/CD28 を介したシグナルによりスーパー抗原刺激系での IL-2 mRNA 発現が調節されることも知られている⁴⁶⁾。本研究でも、SEB 刺激後の IL-2 mRNA 発現を検討すると、新生児 CD4+T 細胞の培養ではその発現が極めて強く、かつ持続的に認められた。これらの事実より、T 細胞亜群には異なる IL-2 産生制御機構が存在すること、さらにスーパー抗原を介したナイーブあるいはメモリー CD4+T 細胞の刺激の際には B7/CD28 など TCR 以外の膜刺激を含め、異なるシグナル伝達機構が関与している可能性が示唆される。

スーパー抗原に対する新生児 CD4+T 細胞の応答性のもう一つの重要な特徴は、極めて著しい、特異的 TCR Vβ レポート

リー選択的増殖が誘導されることである。対照的に成人 CD4+T 細胞を用いた場合には、このような選択的増殖は殆ど認められず、むしろ特定のレパートリーの不応答が観察された。Kawabe らはスーパー抗原をマウスに投与することにより、特異的レパートリーが一過性に増殖することを報告している⁴⁷⁾。しかし、これらは未分画 CD4+T 細胞を用いた検討であり、ナイーブあるいはメモリー CD4+T 細胞のそれぞれの応答性を検討したものは少ない。今回の検討では、新生児、あるいはナイーブ CD4+T 細胞のスーパー抗原応答の殆どが、特異的 TCR Vβ レパートリーの選択的増殖によること、さらにメモリー CD4+T 細胞の応答が初期活性化のみ TCR Vβ 選択的に認められるが、その後の緩徐な細胞増殖が非特異的なものであることが示された。このような Vβ 選択性の差は、産生される IL-2 の差のみでは説明されず、メモリー CD4+T 細胞とナイーブ CD4+T 細胞に内在する機能的差異、さらにそれぞれの細胞活性化機構の相違を反映していると考えられる。

Kawabe らは、SEB 刺激の後一過性に増加した細胞がアポトosisを介した細胞死により除去されることにより、その後の SEB 刺激に反応しない状態が誘導されるとしている⁴⁷⁾。さらに Rellahan らは SEB 投与マウスにおいて、Vβ8 の増加、あるいは減少が認められないにも関わらず、SEB 特異的に不応答が誘導されたとしている⁴⁸⁾。また Lee らはマウスを用いた検討で、SEB 投与後のマウスでメモリー T 細胞の SEB 反応性が低いことを認めている。しかし、このような SEB 不応答性は無処置マウスや蛋白抗原であるスカンガイのヘモシアニン (keyhole limpet hemocyanin, KLH) 投与後のマウスでも認められることから必ずしも SEB 投与マウスに特異的に認められる現象ではなく、メモリー CD4+T 細胞の一般的性質としてのスーパー抗原不応答性を示すものと結論している⁴⁹⁾。Lee らはさらに、メモリー T 細胞の SEB 不応答が IL-2 添加により回復すること⁴⁹⁾を、また Beverly らは不応答に陥ったマウス T 細胞が IL-2 添加により再び増殖することを示している⁵⁰⁾。これらの結果は、メモリー T 細胞のスーパー抗原不応答性の少なくとも一部は IL-2 産生の欠如により説明できることを示している。

このような、ナイーブならびにメモリー CD4+T 細胞のスーパー抗原応答性の特徴は、免疫応答の個体発生と生理的制御機構を考える上で、レクチン刺激や蛋白抗原刺激系では得られない、様々な示唆に富むモデルを提供すると考えられる。すなわち、ナイーブ CD4+T 細胞の高応答性は、生後種々の抗原刺激を受けながら抗原特異的 T 細胞レパートリーを形成していくためには極めて有利な機能と考えられ、またメモリー CD4+T 細胞の低応答性は、逆に生体にとって不利な、外来抗原刺激に対する過剰反応を制御する生理機構を示しているとも考えられ

る。さらに臨床的には、新生児 CD4⁺T 細胞のスーパー抗原応答の特徴、すなわち著明な IL-2 産生誘導と選択的 V β レパートリーの増殖は、時に過剰な生体反応を惹起し、新生児・乳児期におけるスーパー抗原の関与する種々の疾患の病態発現に深く関与する可能性が示唆される。

結 論

1. SEB, TSST-1 などのスーパー抗原による刺激によって、新生児 CD4⁺T 細胞の強い増殖が誘導された。一方、成人 CD4⁺T 細胞の培養では一過性の増殖が認められるのみであった。

2. このような新生児 CD4⁺T 細胞スーパー抗原高応答性は、著明な IL-2 mRNA 発現と持続的な IL-2 産生を伴っていた。一方、成人 CD4⁺T 細胞の IL-2 mRNA 発現は明らかに低く、一過性であり、上清中の IL-2 活性も著しく低かった。

3. スーパー抗原に対する新生児 CD4⁺T 細胞の反応性は、スーパー抗原に特異的に反応する TCR V β レパートリーの選択的増殖によることが示された。一方、成人メモリー CD4⁺T 細胞の培養では、特異的 TCR V β レパートリーの増殖は殆ど認められなかった。

4. このような新生児 CD4⁺T 細胞のスーパー抗原高応答性の特徴すなわち著明な IL-2 産生誘導と選択的 TCR V β レパートリー増殖は、新生児・乳児期におけるスーパー抗原の関与する種々の疾患の特徴的な病態形成に関与していることが示唆された。

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 昂教授に深謝いたします。また御指導いただきました宮脇利男講師、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に感謝いたします。さらに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大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る。本論文の一部は第23回日本免疫学総会(仙台、1993)において発表した。

文 献

- 1) Marrack, P. & Kappler, J.: The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science*, **248**, 705-711 (1990).
- 2) Fleischer, B. & Hartwig, U.: T-lymphocyte stimulation by microbial superantigens. *Chem. Immunol.*, **55**, 36-64 (1992).
- 3) Schlievert, P. M.: Role of superantigens in human disease. *J. Infect. Dis.*, **167**, 997-1002 (1993).
- 4) Miethke, T., Wahl, C., Heeg, K., Echtenacher, B., Krammer, P. H. & Wagner, H.: T cell-mediated lethal shock triggered in mice by the superantigen staphylococcal enterotoxin B: critical role of tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.*, **175**, 91-98 (1992).
- 5) Abe, J., Kotzin, B. L., Jujo, K., Melish, M. E., Glode, M. P., Kohsaka, T. & Leung, D. Y.: Selective expansion of T cells expressing T-cell receptor variable regions V β 2 and V β 8 in Kawasaki disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 4066-4070 (1992).
- 6) Uchiyama, T., Miyoshi-Akiyama, T., Kato, H.,

Fujimaki, W., Imanishi, K. & Yan, X. J.: Superantigenic properties of a novel mitogenic substance produced by *Yersinia pseudotuberculosis* isolated from patients manifesting acute and systemic symptoms. *J. Immunol.*, **151**, 4407-4413 (1993).

7) Todd, J. K., Todd, B. H., Franco, B. A., Smith, C. M. & Lawellin, D. W.: Influence of focal growth conditions on the pathogenesis of toxic shock syndrome. *J. Infect. Dis.*, **155**, 673-681 (1987).

8) Gillis, S., Ferm, M. M., Ou, W. & Smith, K. A.: T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J. Immunol.*, **120**, 2027-2032 (1978).

9) 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).

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

11) Choi, Y., Lafferty, J. A., Clements, J. R., Todd, J. K., Gelfand, E. W., Kappler, J., Marrack, P. & Kotzin, B. L.: Selective expansion of T cells expressing V β 2 in toxic shock syndrome. *J. Exp. Med.*, **172**, 981-984 (1990).

12) Miethke, T., Gaus, H., Wahl, C., Heeg, K. & Wagner, H.: T-cell-dependent shock induced by a bacterial superantigen. *Chem. Immunol.*, **55**, 172-184 (1992).

13) Jupin, C., Anderson, S., Damais, C., Alouf, J. E. & Parant, M.: Toxic shock syndrome toxin 1 as an inducer of human tumor necrosis factors and γ interferon. *J. Exp. Med.*, **167**, 752-761 (1988).

14) Kotzin, B. L., Leung, D. Y. M., Kappler, J. & Marrack, P.: Superantigens and their potential role in human disease. *Adv. Immunol.*, **54**, 99-166 (1993).

15) 丹生龍太郎, 谷内江昭弘, 榊原方枝, 太田和秀, 関秀俊, 宮脇利男, 谷口 昂: 急性骨髄性白血病寛解導入中に発症した Toxic shock syndrome の 1 例: 急性期炎症性サイトカイン値の変動. *日臨免誌*, **16**, 376-382 (1993).

16) Parsonnet, J.: Mediators in the pathogenesis of toxic shock syndrome: overview. *Rev. Infect. Dis.*, **2** (suppl. 1), s263-269 (1989).

17) Fraser, J. D.: High-affinity binding of staphylococcal enterotoxins A and B to HLA-DR. *Nature*, **339**, 221-223 (1989).

18) Dellabona, P., Peccoud, J., Kappler, J., Marrack, P., Benoist, C. & Matis, D.: Superantigens interact with MHC class II molecules outside of the antigen groove. *Cell*, **62**, 1115-1121 (1990).

19) Johnson, H. M., Russell, J. K. & Pontzer, C. H.: Staphylococcal enterotoxin microbial superantigens. *Faseb J.*, **5**, 2706-2712 (1991).

20) Marrack, P., Blackman, M., Kushnir, E. & Kappler, J.: The toxicity of staphylococcal enterotoxin B in mice is

- mediated by T cells. *J. Exp. Med.*, 171, 455-464 (1990).
- 21) Abe, J., Takeda, T., Watanabe, Y., Nakao, H., Kobayashi, N., Leung, D. Y. M. & Kohsaka, T.: Evidence for Superantigen Production by *Yersinia-pseudotuberculosis*. *J. Immunol.*, 151, 4183-4188 (1993).
- 22) Smith, T., J., Terada, N., Robinson, C. C. & Gelfand, E. W.: Acute infectious mononucleosis stimulates the selective expression/expansion of V β 6.1-3 and V β 7 T cells. *Blood*, 81, 1521-1526 (1993).
- 23) Lewis, D. B., Yu, C. C., Meyer, J., English, B. K., Kahn, S. J. & Wilson, C. B.: Cellular and molecular mechanisms for reduced interleukin 4 and interferon- γ production by neonatal T cells. *J. Clin. Invest.*, 87, 194-202 (1991).
- 24) Wilosn, C. B., Westall, J., Johnston, L., Lewis, D. B., Dower, S. K. & Alpert, A. R.: Decreased production of interferon-gamma by human neonatal cells. Intrinsic and regulatory deficiencies. *J. Clin. Invest.*, 77, 860-867 (1986).
- 25) Wakasugi, N. & Virelizier, J. L.: Defective IFN- γ production in the human neonate I, II, *J. Immunol.*, 134, 167-176 (1985).
- 26) Lewis, D. B., Larsen, A. & Wilson, C. B.: Reduced interferon-gamma mRNA levels in human neonates. Evidence for an intrinsic T cell deficiency independent of other genes involved in T cell activation. *J. Exp. Med.*, 163, 1018-1023 (1986).
- 27) Bryson, Y., J., Winter, H. C., Gard, S. E., Fischer, T. J. & Stiehm, E. R.: Deficiency of immune interferon production by leukocytes of normal new borns. *Cell. Immunol.*, 55, 191-200 (1980).
- 28) Miyawaki, T., Seki, H., Taga, K., Sato, H. & Taniguchi, N.: Dissociated production of interleukin-2 and immune(γ) interferon by phytohaemagglutinin stimulated lymphocytes in healthy infants. *Clin. Exp. Immunol.*, 59, 505-511 (1985).
- 29) 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).
- 30) Akbar, A. N., Salmon, M. & Janosy, G.: The synergy between naive and memory T cells during activation. *Immunol. Today*, 12, 184-188 (1991).
- 31) Byrne, J. A., Butler, J. L. & Cooper, M. D.: Differential activation requirements for virgin and memory T cells. *J. Immunol.*, 141, 3249-3257 (1988).
- 32) Cerottini, J. C. & MacDonald, H. R.: The cellular basis of T-cell memory. *Annu. Rev. Immunol.*, 7, 77-89 (1989).
- 33) Salmon, M., Kitsa, 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).
- 34) Sleasman, J. W., Morimoto, C., Schlossman, S. F. & Tedder, T. F.: The role of functionally distinct helper T lymphocyte subpopulations in the induction of human B cell differentiation. *Eur. J. Immunol.*, 20, 1357-1366 (1990).
- 35) Dohlsten, M., Hedlund, G., Sjogren, 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 UCHL 1 monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.*, 18, 1173-1178 (1988).
- 36) Freeden, U., Zessack, N., Valen, F. & Burdach, S.: Defective interferon gamma production in neonatal T cells is independent of interleukin-2 receptor binding. *Pediatr. Res.*, 30, 270-275 (1991).
- 37) 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⁺ T cells in CD2-mediated activation. *J. Exp. Med.*, 172, 1419-1424 (1990).
- 38) Ehlers, S. & Smith, K. A.: Differentiation of T cell lymphokine gene expression: the in vitro acquisition of T cell memory. *J. Exp. Med.*, 173, 25-36 (1991).
- 39) Luqman, M. & Bottomly, K.: Activation requirements for CD4⁺ T cells differing in CD45R expression. *J. Immunol.*, 149, 2300-2306 (1992).
- 40) Horgan, K. J., Van, S. G., Shimizu, Y. & Shaw, S.: Hyporesponsiveness of "naive" (CD45RA⁺) human T cells to multiple receptor-mediated stimuli but augmentation of responses by costimuli. *Eur. J. Immunol.*, 20, 1111-1118 (1990).
- 41) Croft, M., Duncan, D. D. & Swain, S. L.: Response of naive antigen-specific CD4⁺ T cells in vitro: characteristics and antigenpresenting cell requirements. *J. Exp. Med.*, 176, 1431-1437 (1992).
- 42) Wasik, M. A. & Morimoto, C.: Differential effects of cytokines on proliferative response of human CD4⁺ T lymphocyte subsets stimulated via T cell receptor-CD3 complex. *J. Immunol.*, 144, 3334-3340 (1990).
- 43) Fischer, H., Gyorloff, A., Hedlund, G., Hedman, H., Lundgren, E., Kalland, T., Sjogren, H. O. & Dohlsten, M.: Stimulation of human naive and memory T helper cells with bacterial superantigen. Naive CD4⁺45RA⁺ T cells require a costimulatory signal mediated through the LFA-1/ICAM-1 pathway. *J. Immunol.*, 148, 1993-1998 (1992).
- 44) Gyorloff, A., Hedlund, G., Kalland, T., Sansom, D., Fischer, H., Trowsdale, J., Sjogren, H. O. & Dohlsten, M.: The LFA-3 adhesion pathway is differently utilized by superantigenactivated human CD4⁺ T-cell subsets. *Scand. J. Immunol.*, 36, 243-250 (1992).
- 45) Goldbach-Mansky, R., King, P. D., Taylor, A. P. & Dupont, B.: A co-stimulatory role for CD28 in the activation of CD4⁺ T lymphocytes by staphylococcal enterotoxin B. *Int. Immunol.*, 4, 1351-1360 (1992).
- 46) Fraser, J. D., Newton, M. E. & Weiss, A.: CD28 and T cell antigen receptor signal transduction coordinately regulate interleukin 2 gene expression in response to

superantigen stimulation. *J. Exp. Med.*, **175**, 1131-1134 (1992).

47) Kawabe, Y. & Ochi, A.: Programmed cell death and extrathymic reduction of V β 8⁺ CD4⁺ T cells in mice tolerant to staphylococcus aureus enterotoxin B. *Nature*, **349**, 245-248 (1991).

48) Rellahan, B. L., Jones, L. A., Kruisbeek, A. M., Fry, A. M. & Matis, L. A.: In vivo induction of anergy in

peripheral V β 8⁺ T cells by staphylococcal enterotoxin B. *J. Exp. Med.*, **172**, 1091-1100 (1990).

49) Lee, W. T. & Vitetta, E. S.: Memory T cells are anergic to the superantigen staphylococcal enterotoxin B. *J. Exp. Med.*, **176**, 575-579 (1992).

50) Beverly, B., Kang, S. M., Lenardo, M. J. & Schwartz, R. H.: Reversal of in vitro T cell clonal anergy by IL-2 stimulation. *Int. Immunol.*, **4**, 661-671 (1992).

Selective Activation and Proliferation of Specific TCR V β Repertoires within Neonatal CD4⁺ T Cells in Response to Superantigens Ryutaro Nibu, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. *J. J. Med. Soc.*, **103**, 220—230 (1994)

Key words superantigen, TCR V β repertoire, neonate, CD4⁺ T cells, IL-2

Abstract

The present study was undertaken to examine some responsive characteristics of neonatal CD4⁺ T cells to superantigens (SEA, SEB, SEE and TSST-1) in comparison with that of adult CD4⁺ T cells, which were constituted with two populations (naive and memory) defined by differential expression of CD45 isoforms. The cellular responses to superantigen were evaluated by expression of an early activation antigen CD69, ³H-thymidine uptake, increase in cell number, and IL-2 production. Induction of CD69 expression by superantigens was comparable in neonatal and adult CD4⁺ T cells. However, there was a marked difference between neonatal and adult CD4⁺ T cells with respect to proliferative responses. Neonatal CD4⁺ T cells responded vigorously to superantigens and proliferative response were sustained for a long period of culture. Intense responses to superantigens were also observed for naive populations of adult CD4⁺ T cells. In contrast, adult memory CD4⁺ T cells responded only transiently to superantigens with limited cellular proliferation. The proliferation of neonatal CD4⁺ T cells was associated with prolonged secretion of high levels of IL-2 in culture, which was confirmed by expression of IL-2 mRNA. Additionally, selective expansion of cell populations with specific T cell receptor (TCR) V β repertoire was assessed in the stimulated cultures with TSST-1, which has been shown to selectively activate T cells with TCR V β 2a. It was here demonstrated that T cells with V β 2a within neonatal CD4⁺ T cells as well as adult naive CD4⁺ T cells were largely expanded in response to TSST-1, but such an expansion of T cells with V β 2a was negligible in adult memory CD4⁺ T cell cultures. These results suggested that strong proliferative responses of neonatal naive CD4⁺ T cells to the superantigen might be attributed to selective expansion of T cells with a specific TCR V β repertoire and their profound secretion of IL-2. High responsiveness of T cells to superantigens appears to contribute to the clinically salient features of superantigen-related diseases during the neonatal and infantile period.