

細菌由来スーパー抗原性毒素に対するin vivo免疫応答の解析

有 村 裕

動物科学科・動物生体防御学

要 約 細菌性スーパー抗原であるブドウ球菌腸管毒素A (SEA) を充填したミニ浸透圧ポンプ (SEAポンプ) をマウスに移植して, SEAに反応性のT細胞分画の免疫応答性を解析した。SEAポンプを移植されたマウスでは, SEA反応性の $V\beta 3^+CD4^+$ T細胞が30日間に渡る長期的かつ高度な増幅を示し, 同じくSEA反応性の $V\beta 11^+CD4^+$ T細胞は低いレベルの長期的増幅を示した。SEA反応性の $CD8^+$ T細胞亜集団はほんの一過性の増幅を示した程度であった。即ちT細胞は, それ自身が持つT細胞レセプター β 鎖の種類に応じて, その反応性増幅の程度は大きく多様であることが示された。またSEAポンプを移植したマウスから回収した $CD4^+$ T細胞を, 再刺激すると高度にIL-4を産生する記憶T細胞の形質を有していた。また一方で, 移植したSEAポンプを10日目に除去しても, $V\beta 3^+CD4^+$ T細胞の増幅程度に有意な変化はなかった。さらに, 細胞分裂をモニターできるCFSEで標識した $CD4^+$ T細胞を, SEAポンプ移植後15日目のマウスに移入したところ細胞分裂しなかった。したがって, $CD4^+$ T細胞は, 細胞分裂を引き起こすのに十分な量のSEAが存在しないにも拘わらず, 少なくとも30日間生存し続けていた。また, 移植後26日目の増幅した $CD4^+$ T細胞は, 大部分が細胞周期のG0/G1期にあって分裂が停止しており, 細胞周期の阻害因子であるp27^{Kip1}を高発現し, 反対に促進因子のCdk2は低下していた。この時期の細胞はin vitroでの細胞死を誘導する実験でも抵抗性を示し, 同時にBcl-2の発現が上昇していた。以上の結果より $V\beta 3^+CD4^+$ T細胞は, 細胞周期が停止した状態で長期生存している記憶T細胞であることが明らかになった。

キーワード：細菌性スーパー抗原, 毒素性ショック症候群, T細胞, アポトーシス, 細胞生存

日獣生大研報 62, 43-52, 2013.

はじめに

細菌由来のスーパー抗原性毒素 (Super Antigenic Toxin, SAGT) は, ヒトの毒素性ショック症候群 (TSS)^{1,2)}, 新生児TSS様発疹症 (NTED)³⁾, 仮性結核菌感染症^{4,5)}などの第一の病原因子として知られており, 特定のT細胞レセプター (TCR) β 鎖に特異的^{6,7)}にきわめて多数のT細胞を活性化する。TSSの成人患者では, TSS毒素-1 (TSST-1) 反応性 $V\beta 2^+$ T細胞が4~5週間にわたって長期かつ重度に増幅している症状が認められる。仮性結核菌感染症の亜急性期の患者においても, 同菌由来の細胞分裂促進因子 (YPM) 反応性である3つのT細胞 ($V\beta 3^+$, $V\beta 9^+$, $V\beta 13^+$) のうち1つのT細胞の増幅が認められた。これらの知見から, SAGTがその反応性T細胞の長期的な増幅をもたらしていて, しかもこの長期的増幅はSAGT反応性T細胞集団のうちの一部の亜集団に限定されていることが報告されていた。しかしながら, この知見はこれまでマウスを用いた実験では証明されたことがなかった。

SAGTを注射したマウスの実験では, SAGT反応性T細胞が均一かつ一過性に軽度に増幅し, すぐに大部分は

DNAの断片化を伴ったAICD (活性化後に誘導される細胞死) が誘導されて除かれ, 残った増幅T細胞は不応答状態 (アナジー) に陥っていた^{8,9)}。具体的には, ブドウ球菌腸管毒素SEAを注射したマウスでは, $CD4^+$ または $CD8^+$ 亜集団に関わらず, 事実上全てのSEA反応性 $V\beta 3^+$, $V\beta 11^+$ T細胞がほんの短期間増幅する様子が観察され, これらのT細胞は2次刺激に対してアナジーに陥っていた。SAGTを注射されたマウスとSAGTによって惹起される感染症の患者では, それぞれで観察されたT細胞応答に明らかな乖離があった。この乖離については, 以下の仮説で説明できるかもしれないと考察された。即ち, SAGTによって惹起される感染症の患者では長期間継続的に, 病原因子のSAGTに暴露されており, 一方SAGTを注射されたマウスではほんの短い間だけこの毒素に暴露されているのではないというものである。以前の報告で, 約7日間内容物を連続的に供給できるミニ浸透圧ポンプにTSST-1を充填してウサギに移植すると, ヒトのTSSで観察されたのと同じような病態が認められ, 一方で等量のTSST-1を注射した場合にはわずかな変化しか認められなかった¹⁰⁾。これらの知見は上記の仮説に合致していた。そこで, マウスにおいても毒素

に対する長期継続的な暴露があると、SAGT誘導性の感染症の患者におけるT細胞応答を再現できるかもしれないと思われた。

一般にT細胞の生存促進は、抗アポトーシス分子のBcl-2やBcl-X_Lの発現亢進によってもたらされるか、またはアポトーシス促進因子のBim, Bad, Bax, Bakの発現低下によってもたらされる¹¹⁾。サイトカインのIL-2, IL-4, IL-7, IL-15が共有するレセプター分子である γ 鎖(γ c)からのシグナルは、T細胞をアポトーシスから救済することが知られている^{12,13)}。一方、細胞周期は、サイクリン依存性キナーゼ(CDK)やその会合因子であるサイクリンまたはCDK阻害因子Cip/Kip1などによって制御されている。そして細胞周期もまた細胞の生存や死に関与している^{14,15)}。免疫応答の際には、抗原特異的なT細胞は始め増殖して、その後ごく一部の細胞が記憶T細胞に分化する。記憶T細胞はさらに機能の異なる2つの亜集団であるCCR7⁺(CD62L⁺)セントラルメモリーT細胞とCCR7⁻(CD62L⁻)エフェクターメモリーT細胞に分けられる^{16,17)}。またCD8⁺T細胞の増殖や生存は、ナイーブT細胞と記憶T細胞で異なった制御を受けている¹⁸⁾。さらにCD4⁺記憶T細胞とCD8⁺記憶T細胞とでは安定性が異なっており¹⁹⁾、CD4⁺記憶T細胞の生存に関わる細胞内の分子機序は殆ど分かっていない。

本研究では、SEAを充填したミニ浸透圧ポンプ(SEAポンプ)を移植したマウスにおいて、SEA反応性のいくつかのT細胞亜集団の応答性を解析した。その結果、このマウスのT細胞は、TCR β 鎖の種類やCD4⁺やCD8⁺T細胞の種類により長期的に増幅するものから短期的な変化を示すものまで多様な応答性を示した。ここで増幅したCD4⁺T細胞は免疫記憶細胞の形質を獲得していたので、さらに調べると、このT細胞はAICDに対して抵抗性になっており、高度なサイトカイン産生能力を有したCD62⁺の長期生存型のエフェクターメモリーCD4⁺T細胞に分化していた。どのような因子がこのSEA反応性のT細胞の運命に影響を与えているのだろうか？ T細胞の生物学的性状や細胞生存の機序を明らかにするために細胞周期や細胞死について解析した。ここでの解析はTSS患者のさらなる病態の理解や免疫療法の開発にとって有益であろうと思われる。本稿では、我々が以前に報告した2つの研究について主に紹介する^{20,21)}。

実験材料および方法

マウス

C57BL/6マウスは三協ラボより購入した。胸腺のないマウスは、5週齢のC57BL/6マウスから胸腺を切除して用意し、その3週間後に実験に供した。マウスはまた、浸透圧ポンプのレシピエントとして、または脾臓細胞の供給源としても用いた。Thy1.1コンジェニックマウスは米国ジャクソン研究所より購入した。本研究で行われた動物実験は、東京女子医科大学の動物倫理委員会で許可されたものであ

る。

試薬と細胞培養液

SEAはトキシシ・テクノロジーより購入した。CFSE (5-or 6-(N-Succinimidylloxycarbonyl)-fluorescein 3',6'-diacetate) はMolecular Probesから購入した。モネンシン(GolgiStop) はBD Biosciencesより購入した。A23187とPMAはSigma-Aldrichより購入した。細胞培養に用いたRPMI1640培養液にはペニシリン(100 U/ml)とストレプトマイシン(100 μ g/ml), 10% FCS, 2-ME (5 $\times 10^{-5}$ M)をそれぞれ添加した。

モノクローナル抗体

以前に報告したように^{20,21)}、モノクローナル抗体のanti-I-A^{b/d} (28-16-8S, IgM), anti-B (LR-1, IgM), anti-Thy1.2 (HO13, IgM), anti-CD4 (RL172.4, IgM), anti-CD8 (83.12.5, IgM), anti-V β 3 (KJ25, IgG), anti-V β 11 (RR3-15, IgG), anti-V β 6 (RR4-7, IgG) はハイブリドーマ上清を硫酸精製して用いた。さらにKJ25とRR3-15はビオチン標識して用いた。PE標識ストレプトアビジンはBD Biosciencesより購入した。FITC標識のanti-CD4 (RM4-5), anti-CD8 (53-6.7), anti-CD3 (2C11), anti-Thy1.1 (HIS51), およびPE標識のanti-CD4 (RM4-5), anti-CD8 (53-6.7), anti-Thy1.2 (53-2.1), ビオチン標識のanti-Thy1.1 (HIS51), さらにCyChrome標識のストレプトアビジンについてもBD Biosciencesより購入した。FITC標識のgoat anti-rat IgGとanti-mouse IgGはZymed LaboratoryとTago Scientificよりそれぞれ購入した。FITC標識のストレプトアビジンはVector Labより、PE標識のanti-PD-1 (J43) はeBioscienceより入手した。ウエスタンブロット用のanti-p21^{Cip1} (F5), anti-p27^{Kip1} (F-8), anti-Actin, anti-Bcl-3 (C-14) およびanti-Bax (P-19) はSanta Cruz Biotechnologyより購入した。Anti-BadはNew England Biolabsより、anti-BakはUpstate Biotechnologyより、anti-BimはStressgen Biotechnologies Corpより、anti-Cdk2 (#55), anti-Cdk4 (#97), anti-Cyclin D3 (#1), anti-Bcl-X_Lおよびanti-Bcl-2 (#7) はBD Biosciencesよりそれぞれ購入した。

脾臓細胞分画の精製

CD4⁺T細胞はC57BL/6マウスの脾臓細胞を上記の83.12.5, 28-16-8S, LR-1を反応させた後、モルモット血清(補体)で処理して得た。CD8⁺T細胞では、28-16-8S, RL172.4, LR-1を反応させた後、モルモット血清(補体)で処理して得た。抗原提示細胞(APC)は、T細胞を除いた脾臓細胞を用いた。即ち、脾臓細胞をHO13とモルモット血清で処理して得た。それぞれの細胞は、パーコール(Pharmacia)による密度勾配遠心法(密度1.055)で生きた細胞を集めるようにした。いくつかの実験では、anti-V β 3の反応後、anti-mIgG結合ビーズと磁石を用いてポジティブ選択によりV β 3⁺CD4⁺T細胞を濃縮した。

マウスへの浸透圧ポンプの移植

浸透圧ポンプ(ALZA)は、メーカーの指示に従い、SAGTを注入してマウスに移植した。モデル2001の浸透圧

ポンプに0.2 mlのSEAまたはYPMを充填した。マウスには10%ペントバルビタールナトリウムを0.2 ml接種して麻酔を施し、肩甲骨付近の皮下に小さな切り込みポケットを作った。SAGTの入った浸透圧ポンプを、この皮下のポケットに挿入し、切り込みは糸で縫って閉じ、すぐに感染予防のためにペニシリンG（2万単位）注射した。この浸透圧ポンプは、メーカーの説明によれば約7日間かけて充填された内容液を徐々に放出する。また実験によっては、移植したSEAポンプを10日後に取り出した。

フローサイトメトリー

調製した細胞は、フローサイトメーターを用いてさまざまな免疫学的形質について調べた。CD4⁺またはCD8⁺ T細胞のTCRV β の発現や、SEA応答性T細胞におけるCD69、CD44の発現については、細胞をまずビオチン標識のanti-V β 3, anti-V β 6, anti-V β 7, anti-V β 8, anti-V β 11のいずれかの抗体で染色した後、PE標識のストレプトアビジンとFITC標識anti-CD4, anti-CD8の組み合わせ、またはanti-CD44, anti-CD69, anti-OX40で染色した。それぞれのサンプルは、EPICS XLフローサイトメーター（Beckman Coulter）で解析した。細胞周期の解析では、まず細胞表面をビオチン標識のanti-V β 3とFITC標識のストレプトアビジンで染色した。そして70%の冷エタノールで2時間固定し、0.25 mg/mlのRNase（シグマ）で37度1時間処理した後、最後に50 μ g/mlのプロピジウム・アイオダイト（シグマ）で4度30分染色した。

CFSEを用いた細胞分裂の解析

脾臓CD4⁺ T細胞をPBS 1 mlに10⁷細胞の密度で浮遊し、CFSEを終濃度10 μ Mになるように加えた。37度で10分反応させた後、細胞をRPMI1640で洗浄し、水中に5分間置くことで染色反応を止めた。CFSE染色した細胞は、抗原提示細胞の存在下、10 ng/mlのSEAで刺激した。T細胞の分裂は、V β 3⁺CD4⁺またはV β 11⁺CD4⁺ T細胞に焦点を当てて3色のフローサイトメトリーで解析した。

In vivoの養子細胞移入

細胞分裂能の解析では、無処置マウスまたはSEAポンプを移植されたマウスからそれぞれCD4⁺ T細胞（1～2 x 10⁷）を上記した方法で調製した。細胞を10 μ MのCFSEで37度10分染色し、別の無処置マウスまたはSEAポンプ移植後2日目あるいは15日目のマウスの尾静脈に注入した。細胞移入後3日目に脾臓CD4⁺ T細胞を調製し、ビオチン標識のanti-V β 3とCyChrome標識のストレプトアビジン、PE標識のanti-CD4の組み合わせで2段階に染色した。得られたサンプルはCFSE染色の減衰程度に応じて細胞分裂回数を見積もった。

In vitroの細胞死誘導

細胞の生存能力を解析するために、3日前にSEAポンプを移植したThy1.1コンジュニックマウス（C57BL/6遺伝背景）、ならびに28日前にSEAポンプを移植したC57BL/6マウスよりそれぞれCD4⁺ T細胞（1 x 10⁷）を調製した。これらを1：1の比率で混合し、FCS非存在下で

5日間共培養した。時系列的にCD4⁺ T細胞を回収して、ビオチン標識のanti-V β 3抗体とCyChrome標識のストレプトアビジン、FITC標識のanti-Thy1.1, PE標識のanti-Thy1.2の組み合わせで染色した。さもなくば、ビオチン標識のanti-Thy1.1, FITC標識anti-CD4, PE標識anti-Thy1.2の組み合わせの後、CyChrome標識ストレプトアビジンで染色し、フローサイトメーターを用いて細胞生存の程度を比較した。

ウェスタンブロット解析

細胞は、プロテアーゼ阻害剤（シグマ）を添加したTNE溶解バッファー（10 mM Tris [pH 7.5], 0.15 M NaCl, 1% NP-40, 2 mM EDTA, 10%グリセロール）を用いてon ice 30分で可溶化した。溶解サンプルは、遠心によって不溶成分を除き、タンパク濃度をBradford試薬（BioRad）で測定した。6～10 μ gの溶解サンプルを3分間ボイルし、12%のSDS-PAGEにかけ、ニトロセルロース膜に転写した。膜は非特異反応を防ぐためにTBST緩衝液（10 mM Tris [pH 7.5], 0.15 M NaCl, 0.1% Tween）で溶かした3%ミルクに1時間反応させた後、2%BSAを加えたTBSTで適切な濃度に希釈した目的抗体に一晩反応させた。翌日、HRP標識の2次抗体に1時間反応させた後、メーカーの支持に従い化学発光試薬（Santa Cruz）で可視化した。陽性対照には、X線照射（3,500 rad）して37度で6時間放置したCD4⁺ T細胞、ならびにp21^{Cip1}を過剰発現させたCD4⁺ T細胞の溶解サンプルを用いた。

実験結果

SEAの注射とSEAポンプの比較（図1）

まず従来の注射による方法と今回の浸透圧ポンプによるT細胞応答に対する効果を比較検討するために、C57BL/6マウスに10 μ gのSEAを1回注射するか、または等量のSEAを充填した浸透圧ポンプを背部皮下に移植した。移植後、個々のマウスから経時的に脾臓T細胞を調製し、CD4⁺またはCD8⁺のT細胞亜集団の中のSEA反応性であるV β 3⁺およびV β 11⁺ T細胞の増幅程度を調べた。結果では、脾臓T細胞全体の中におけるSEA反応性T細胞の割合を%で示した。

10 μ gのSEAを1回注射されたマウスでは、以前の報告^{8,9)}と同様に、調べた4つのSEA反応性のT細胞亜集団の全てが均一かつ一過性に低いレベルで増幅していた（図1a）。対照的に、10 μ gのSEAを充填した浸透圧ポンプを移植されたマウスでは、6日目までにV β 3⁺CD4⁺ T細胞が無刺激時の10倍以上に増幅していた（図1b）。この増幅状態は、その後の14日間高いままで維持された。またV β 11⁺CD4⁺ T細胞は、移植後6日目までに無刺激時の3.5倍まで増幅し、この増幅状態は徐々に下降したが、それでも30日目までは対照より少し高い状態を維持した。一方でV β 3⁺CD8⁺ T細胞およびV β 11⁺CD8⁺ T細胞は、2日目の時点で一過性に軽度の増幅を示した程度であった。浸透圧ポンプに充填したSEA量の違いによるT細胞応答への影響に

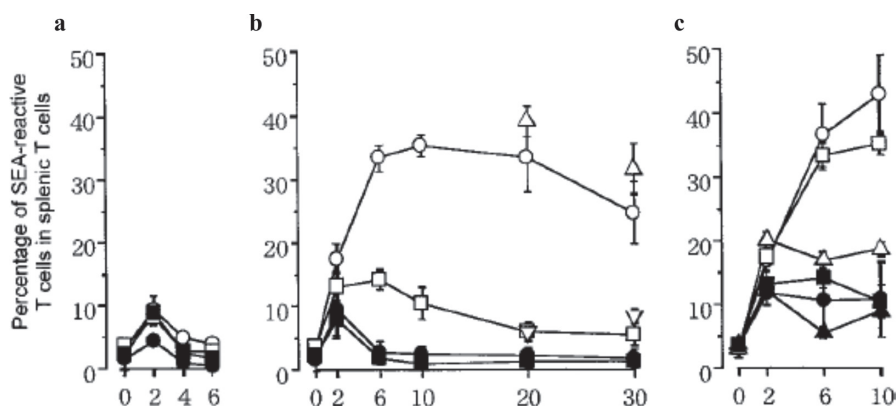


図 1. SEAの注射とSEAポンプの比較

(a) C57BL/6マウスの腹腔に10µgのSEAを注射した (各グループ 3～4 匹使用)。(b) C57BL/6 マウスに10µgのSEAを充填したミニ浸透圧ポンプ (SEAポンプ) を移植した (各グループ 6～8 匹使用)。(c) 異なる濃度のSEAを充填した浸透圧ポンプを移植した (各グループ 3～4 匹使用)。それぞれで脾臓中のSEA反応性T細胞の割合 (%)を追跡した。(a, b) 通常のマウスでのVβ3⁺CD4⁺ (○), Vβ3⁺CD8⁺ (●), Vβ11⁺CD4⁺ (□), Vβ11⁺CD8⁺ (■)の割合, および胸腺を除去したマウスでのVβ3⁺CD4⁺ (△), Vβ11⁺CD4⁺ (▲) の割合。(c) Vβ3⁺CD4⁺ (○, □, △), Vβ11⁺CD4⁺ (●, ■, ▲) のうち, 50µg (○, ●), 10µg (□, ■), 2µg (△, ▲) のSEAを充填した場合。

関しては, 10µgまたは50µgのSEAを充填した時にVβ3⁺CD4⁺ T細胞の顕著な増幅が見られたが, Vβ11⁺CD4⁺ T細胞は50µgのSEAの時でも高レベルな増幅には至らなかった (図1c)。Vβ3⁺CD8⁺ T細胞およびVβ11⁺CD8⁺ T細胞は共に50µgのSEAを使用してもほんの一過性の増幅のみであった。Vβ6⁺CD8⁺ T細胞およびVβ6⁺CD8⁺ T細胞は, もともとSEAに反応しない亜集団であり, 移植の前後で変化は見られなかった (結果は示さず)。加えて, Vβ3⁺CD4⁺ T細胞およびVβ11⁺CD4⁺ T細胞の増幅パターンは胸腺を除去しても殆ど影響を受けなかった。

SEA反応性のCD4⁺ T細胞の長期間の増幅の理由としては, (a) SEAの20日間以上の継続的な刺激によって誘導された可能性と, (b) 胸腺からの新しいT細胞の供給の亢進による可能性 (即ち, 繰り返される増幅とその後の急速な細胞除去) と, または (c) 増幅T細胞の生存延長, などによってもたらされたという可能性が成り立つかも知れない。しかしながら, 浸透圧ポンプは10日間しかSEAを供給しないということと胸腺を除去したマウスにおける知見から, 上記の (a) と (b) の可能性は除外してよいと思われる。それよりもむしろ, Vβ3⁺CD4⁺ T細胞がSEAに対して強く応答する亜集団であり, Vβ11⁺CD4⁺ T細胞は中等度に応答する亜集団であり, 反対に2つのCD8⁺ T細胞は低応答の亜集団であることを示している。

SEAポンプ刺激の持続時間の検討 (図 2)

SEAポンプによって, CD4⁺ T細胞中にエフェクターメモリーT細胞が誘導され, 少なくとも1ヶ月間維持されたようであった。この観察結果から, 少量のSEAが浸透圧ポンプの中に残存していて, それによって増幅したT細胞が少なくとも10日間維持されているのではないかと, という疑問が湧いてきた。そこで移植後10日目にSEAポンプを除

去し, その影響を見たが, Vβ3⁺CD4⁺ T細胞とVβ11⁺CD4⁺ T細胞の増幅に有意な変化は見られなかった (図2a)。したがって上の仮説は否定された。つぎに樹状細胞のような抗原提示細胞は, 抗原を長期間提示し続けることが報告されているので²²⁾, この可能性を試験した。無処置マウスまたはSEAポンプ移植後2日目および15日目のマウスから脾臓CD4⁺ T細胞を回収し, CFSE染色して, これを別の無処置マウスまたはSEAポンプ移植後2日目および15日目のマウスに養子細胞移入した。その結果, 無処置マウスからのCD4⁺ T細胞をSEAポンプ2日目のマウスに移入した場合は, 大部分のVβ3⁺とVβ11⁺CD4⁺ T細胞は2～5回の細胞分裂を示していた (図2b)。これとは対照的に, 無処置マウスおよびSEAポンプ15日目のマウスから回収したCD4⁺ T細胞を別のSEAポンプ15日目のマウスに移入した場合は大部分の移入細胞は分裂しなかった。またVβ6⁺CD4⁺ T細胞はSEAに反応しない陰性対照の細胞であり, ここでの実験では確かに分裂しなかった。したがって, SEAポンプ15日目のマウスの体内にはT細胞を分裂させるだけのSEAは残存していないことが明らかになり, CD4⁺ T細胞は十分な抗原量のない条件下で生存・維持されていることが分かった。

SEAポンプで増幅したT細胞の細胞周期の解析 (図 3 と 4)

つぎにSEAポンプで増幅し, 残存しているT細胞がどのような性状を有しているかを調べることにした。図2と同様に, 無処置マウスまたはSEAポンプ移植後26日目のマウスからCD4⁺ T細胞を回収し, CFSE染色して, 別の無処置マウスに養子細胞移入し, すぐにSEAポンプを移植してin vivoで刺激を開始した。SEAポンプ移植後26日目のマウスから回収したVβ3⁺CD4⁺ T細胞とVβ11⁺CD4⁺ T細胞は, 共に無処置マウスからの細胞よりも少ない分裂回

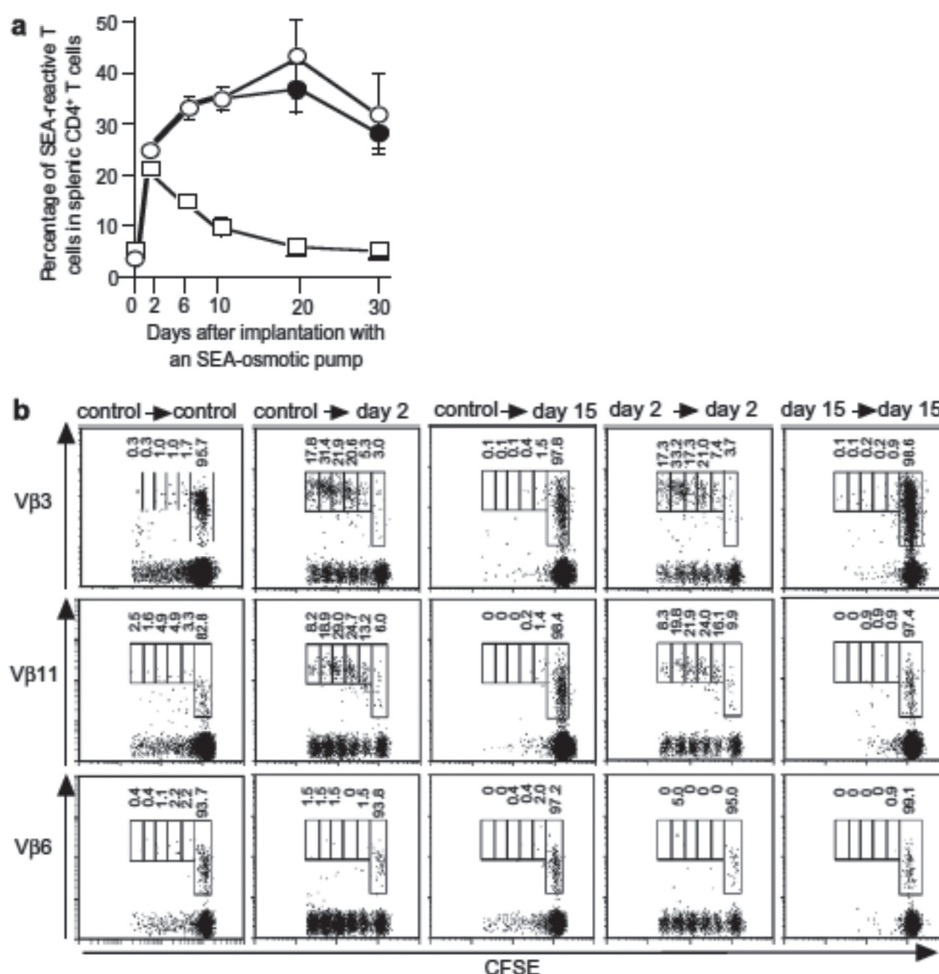


図2. SEAポンプ刺激の持続時間の検討

(a) 10 μ gのSEAを充填した浸透圧ポンプ（SEAポンプ）をC57BL/6マウスに移植して、脾臓中のV β 3⁺CD4⁺ (○), V β 11⁺CD4⁺ (□) T細胞の割合を30日間調べた。マウスによっては移植したSEAポンプを10日目に取り除いた(●)。(b) 無処置マウスまたはSEAポンプを移植したマウスから移植後2日目または15日目にCD4⁺ T細胞を回収しCFSE染色して、別の無処置マウスまたは予めSEAポンプを移植したマウス（2日目、15日目）の尾静脈に養子細胞移入した（各グループ2匹使用）。移入3日後、脾臓CD4⁺ T細胞を回収し、V β 特異的抗体で染色して細胞分裂の様子をフローサイトメーターで解析した。四角の枠の上の数字はそれぞれの分裂回数の割合（%）を示す。

数を示した(図3a)。また、これらの細胞が細胞周期のどの時期にいるのかをプロビジウム・アイオダイトで染色して調べた(図3b)。その結果、S/G2/M期にいるV β 3⁺CD4⁺ T細胞の割合は、SEAポンプ移植後6日目では無処置マウス(6.4%)よりも高く(10.8%)、分裂中であることを示していたが、26日目(記憶T細胞の時期)では対照よりも下がっており(2.8%)、細胞周期が停止していることが分かった。このことから、SEAの長期暴露はT細胞に分裂停止をもたらし、再刺激に対して抵抗性になることが分かった。PD-1はT細胞応答におけるよく知られた負の制御因子であるので²³⁾、その発現を調べてみたところ、V β 3⁺とV β 11⁺CD4⁺ T細胞でSEAポンプ移植後3～9日目に高発現を示し、27日目にはもとの低いレベルに戻っていた(図3c)。つぎに細胞周期を調節している細胞内分子の発現レベルを解析した。細胞周期の促進因子のCdk2とサイクリ

ンD3は移植後7日目に高発現を示した(図4)。Cdk4もバンドは薄いが発現が亢進していた。これらの結果は、細胞分裂が進行していることを細胞内分子の観点からも示していた。対照的にCdk阻害因子のp27^{Kip1}は、CD4⁺ T細胞全体とV β 3⁺CD4⁺ T細胞のいずれでも7日目に下がり、28日目に上昇していた。もう1つのCdk阻害因子のP21^{Cip1}は検出限界以下であった。これらの結果もSEAに長期暴露して26～28日目には細胞周期は止まる傾向にあることが分かった。

SEAポンプで増幅したT細胞の生存能力の検討(図5)

つぎに、長期間のSEA刺激後に増幅・維持されているCD4⁺ T細胞の性状を細胞生存の観点からさらに詳しく調べることにした。SEAポンプ移植後26日目のマウス(Thy1.2⁺)、および3日目のマウス(Thy1.1⁺)からCD4⁺ T細胞をそれぞれ回収して、in vitro (ex vivo) でFCS/サ

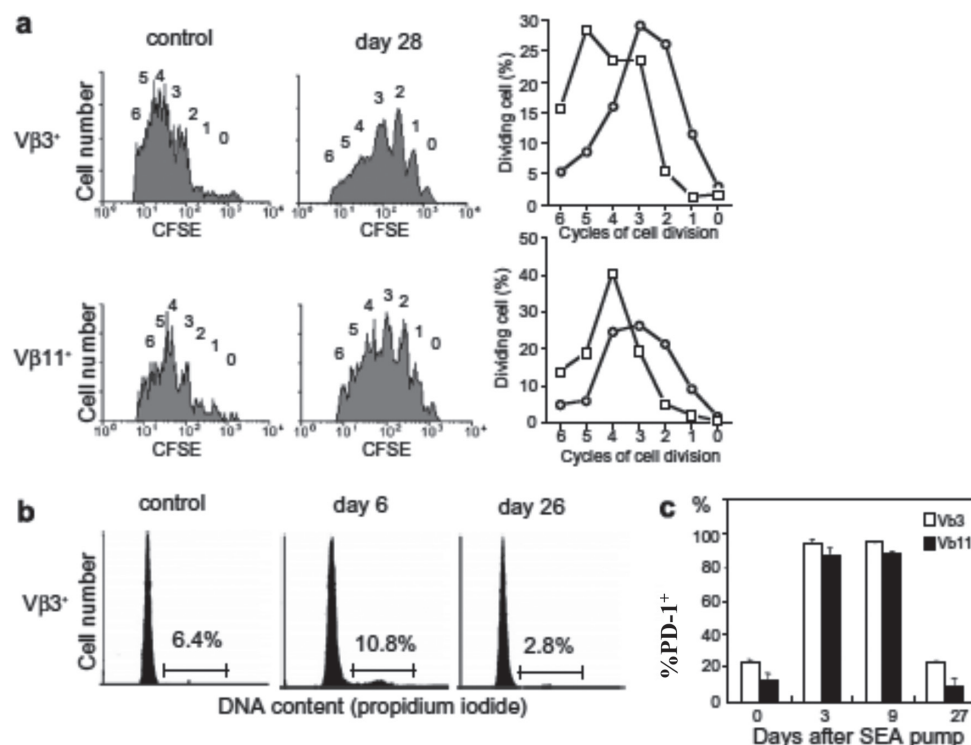


図 3. SEAポンプで増幅したT細胞の細胞周期の解析

(a) 無処置マウスまたはSEAポンプ移植後28日目のマウスから調製したCD4⁺ T細胞をCFSEで染色して、別の無処置マウスに養子細胞移入し、すぐにSEAポンプを移植した。3日後、CD4⁺ T細胞を回収し、フローサイトメーターで細胞分裂を測定した。分裂回数はヒストグラムの上に記し (左), 各分裂の割合 (%) をグラフにした (右)。(b) SEAポンプを移植したマウスから回収したCD4⁺ T細胞をanti-Vβ3とプロピジウム・アイオダイトで染色し、フローサイトメーターで細胞周期の解析をした。数字はS/G2/M期のVβ3⁺CD4⁺ T細胞の%を示す。(c) 脾臓中のVβ3⁺CD4⁺ (白い棒), Vβ11⁺CD4⁺ (黒い棒) T細胞のPD-1発現レベルの変動を27日目まで調べた。各時点で2～4匹のマウスを使用した。

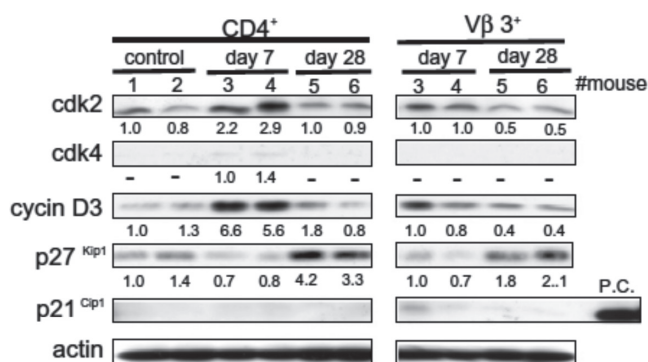


図 4. SEAポンプで増幅したT細胞の細胞周期の解析

SEAポンプを移植したマウスからのCD4⁺ T細胞の溶解サンプルを図に示すような抗体を用いたウェスタンブロットに供した。Vβ3⁺CD4⁺ T細胞はビーズと磁石を用いてポジティブ選択により精製し、これもサンプルに加えた。P.C.は陽性対照であり、p21^{Cip1}発現ベクターを強制発現した細胞の溶解サンプルを用いた。タンパクの発現強度はデンストメータで測定し、アクチンの発現レベルで補正し、最も左の対照サンプルのものを便宜上1.0に設定した。

イトカイン非存在下で共培養することで細胞死を誘導した。3日目から回収したVβ3⁺CD4⁺ T細胞 (Thy1.1⁺) の絶対数は急速に減少したが、26日目からのVβ3⁺CD4⁺ T細胞 (Thy1.2⁺) の絶対数の減少はとてもゆっくりであった (図4a左)。これを培養細胞中の%に変換すると、Thy1.2⁺ T細胞の割合は時間とともに増加し、Thy1.1⁺ T細胞の割合は急速に減少した (図4a右)。そこで細胞生存や細胞死に関する分子の発現を調べることにした。抗アポトーシス分子のBcl-2の発現は刺激後7日目に一過性に減少し、28日目には増加していた (図4b左)。この変化は特にVβ3⁺CD4⁺ T細胞で顕著であった (図4b右)。別の抗アポトーシス分子のBcl-X_Lは変化しなかった。反対にアポトーシス促進因子のBakは28日目のVβ3⁺CD4⁺ T細胞で軽度減少していた。BadやBaxは陽性対照以外では検出限界以下であり、Bimは変化しなかった。これらの結果から、SEAポンプによって誘導された長期生存型のCD4⁺ T細胞は細胞死に対して抵抗性であり、その理由としてはBcl-2を高発現しているからと考えられた。

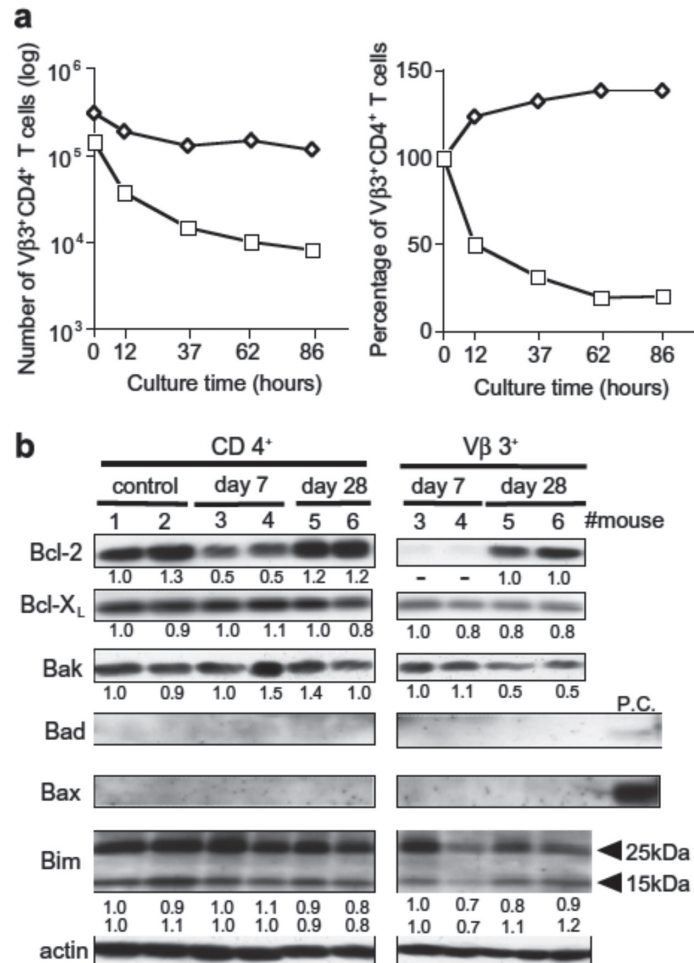


図5. SEAポンプで増幅したT細胞の生存能力の検討

(a) SEAポンプ移植後3日目のマウス (Thy1.1⁺) と26日目のマウス (Thy1.2⁺) からCD4⁺ T細胞を回収し、1:1の割合で混合し、FCSもサイトカインもない培養条件下でin vitro (ex vivo) で細胞死を誘導した。この培養細胞を経時的に回収し、anti-Thy1.1, anti-Thy1.2, anti-Vβ3抗体で染色し、その割合の変化を観察した。左図はVβ3⁺CD4⁺ T細胞の絶対数の変化を示し、右図はその相対的な割合の変化を示す。開始時点での割合をそれぞれ100%とし、その後の変動を表した。左右の図共に□はThy1.1⁺, ◇はThy1.2⁺ T細胞を示す。(b) SEAポンプを移植したマウスのCD4⁺ T細胞全体、またはポジティブ選択により精製したVβ3⁺CD4⁺ T細胞の溶解サンプルをウェスタンブロットによりタンパク発現量を解析した。P.C.は陽性対照であり、X線照射したCD4⁺ T細胞を37度6時間培養することで細胞死を誘導したサンプルを用いた。タンパクの発現強度はデンストメータで測定し、アクチンの発現レベルで補正し、最も左の対照サンプルのものを便宜上1.0に設定した。

考 察

本研究では、まずマウスにSEAを投与し、発現しているVβの種類に応じてCD4⁺ T細胞は多様な応答パターンを示した。即ち、長期にわたる高度な増幅を示した亜集団から一過性の増幅しか示さない亜集団まで多様性が見られた。CD8⁺ T細胞は、Vβの種類に拘わらず、低い応答しか示さなかった。またCD4⁺ T細胞は免疫記憶細胞に分化していた。これらの観察結果は、SAGTを注射した場合には決して認められなかったものであり、SAGTによって惹起される感染症の臨床研究での観察と一致するものである^{24, 25)}。

以前の研究では、SAGTとMHCクラスIIの複合体のTCRに対する結合親和性が、特定のVβを有するT細胞を好んで活性化する時に重要な役割を担っていることが示されている²⁶⁾。In vivoでSAGT刺激後にT細胞が増殖する能力に関しては、Vβ3⁺CD4⁺ T細胞とVβ11⁺CD4⁺ T細胞は、SEAに対して異なる応答性を有しており(図1)、一方Vβ7⁺CD4⁺ T細胞とVβ8⁺CD4⁺ T細胞もYPMに対して異なる反応性を持っていた(結果を示さず)。これらの結果から、SEAの結合親和性はVβ3⁺とVβ11⁺のTCRで幾分異なっており、YPMの結合親和性はVβ7⁺とVβ8⁺で異なっていることが強く示唆される。恐らくTCRへの結合力ないし解離速度を測定すればVβによる増殖応答の違いの理

由が明らかになるのではと思われる^{27,28)}。その一方で、CD4⁺ T細胞とCD8⁺ T細胞の増幅の違いについては、SAGTは直接MHCクラスIIに結合してT細胞を活性化することが分かっているので、そのせいでCD4⁺ T細胞でより強いだろうと想像される。

SEAポンプ移植後の日数が経つに連れて、SEA反応性CD4⁺ T細胞の分裂能力は減少していった (図3)。何らかの内因性のメカニズムによって分裂能力は時間に依存して失われていくようである。SEAが20日間以上残存していて、それが継続的にT細胞を刺激し続けている可能性は、これまでの解析から考えにくい (図2)。一方で、サイトカイン産生については時間経過とともに増強する傾向が見られている (結果を示さず)。したがっていわゆる記憶T細胞の形質は獲得しつつあると言える。サイトカイン産生は増強するが分裂能力は減少するという、いわば記憶T細胞の定義としては乖離して見える現象については、今後の研究によってその理由を明らかにしたい。

SEAポンプで増幅した細胞は、CD44^{high}CD62L^{low}CD69^{low}メモリーT細胞であったので (結果を示さず)、AICDを免れて生き残ったことを示している。また図5aで見たように、抗原が存在しない条件下でもSEAポンプ移植後26日目のVβ3⁺CD4⁺ T細胞は生存する傾向が認められたので、in vivoにおいてもこのCD4⁺ T細胞の生存・維持に抗原SEAは必要でないことが示唆される。細胞の生存と死は、抗アポトーシス分子とアポトーシス促進因子の発現のバランスによって制御されている¹¹⁾。以前には、T細胞のAICDには細胞表面分子のFas-Fasリガンドの相互作用が重要とされていたが²⁹⁾、その後の実験からFasやTNFRは必須ではなく、アポトーシス促進因子のBimが重要な役目を担っていることが明らかになっている³⁰⁾。実際、Fas遺伝子に異常があるlpr/lprマウスで同じようにSEAポンプを移植してもVβ3⁺CD4⁺ T細胞の長期増幅やVβ11⁺CD4⁺ T細胞の急速な減衰に変化は見られなかった (結果を示さず)。また本研究ではBimの発現レベルに変動を見出だせなかった。むしろBcl-2とBakが変動しており、これらの分子が長期生存型のCD4⁺ T細胞の細胞生存に関与していることが示唆された。

一般に同じ抗原に対する2次応答は、1個の細胞レベルであってもより早くより強い反応を示すと考えられている。しかしながら、増殖応答はむしろ低い応答を示し、in vitro²⁰⁾でもin vivoでも (図3a) むしろ刺激に対して抵抗性であった。負の制御因子のPD-1の発現は27日目には下がっていたので (図3c)、PD-1の発現レベルの違いが増殖応答に影響したとは考えにくい。以前の論文でvon Boehmerらが我々と同じ浸透圧ポンプとHAペプチド抗原を用いて長期間刺激したところ、制御性T細胞が分化誘導されたことを報告している³¹⁾。そこで我々も制御性T細胞の責任分子であるFoxp3の発現をSEA反応性T細胞において調べたが、亢進は見られなかった (結果を示さず)。異なる結果になった理由としては、用いたマウスの遺伝的背

景の違い (C57BL/6とBALB/c) や抗原の違い (SEAとHA) によるかも知れない。またSEAで長期間刺激したCD4⁺ T細胞ではp27^{Kip1}の発現が上昇していた。p27^{Kip1}が記憶T細胞で普遍的に高発現しているかどうかは今のところ不明であるが、Bcl-2やBcl-X_Lが線維芽細胞やT細胞においてp27^{Kip1}発現を高めることによって細胞周期を遅らせることが報告されている^{14,15)}。この報告に一致するように、長期生存型のCD4⁺ T細胞でp27^{Kip1}高発現と細胞死に対する抵抗性が同時に観察された (図4と5)。したがってp27^{Kip1}がCD4⁺ T細胞の維持にとって重要な役割を担っているかも知れない。この仮説を試すには、細胞分裂の停止している細胞にも遺伝子導入できるレンチウイルスベクターを用いてp27^{Kip1}の機能解析をする必要がある。その一方で、Bcl-2の細胞周期の調節に与える影響についても再検討の余地があると思われる。

今回の我々の研究の知見が、TSS患者においても当てはまるか否か、即ちSAGTを有する細菌がクリアされた後でも残存しているSAGT 反応性CD4⁺ T細胞がp27^{Kip1}やBcl-2を高発現しているかをまず解析したいと考えている。

謝 辞

ここで紹介した研究は、東京女子医科大学微生物学免疫学教室で行われた研究であり、内山竹彦名誉教授、八木淳二主任教授、今西健一准教授、多数の先生方に深く感謝致します。また終始、実験のサポートをして頂いた児玉直子氏、マウスのお世話を頂いた吉川雅途氏に感謝致します。

文 献

- 1) UCHIYAMA, T., KAMAGATA, Y., YAN, X.-J., KOHNO, M., YOSHIOKA, M., FUJIKAWA, H., IGARASHI, H., OKUBO, M., AWANO, F., SAITO-TAKI, T., and NAKANO, M. Study of the biological activities of toxic shock syndrome toxin-1. II. Induction of the proliferative response and the interleukin 2 production by T cells from human peripheral blood mononuclear cells stimulated with the toxin. Clin. Exp. Immunol. 1987 **68**, 638-647.
- 2) UCHIYAMA, T., IMANISHI, K., SAITO, S., ARAAKE, M., YAN, X.-J., FUJIKAWA, H., IGARASHI, H., KATO, H., OBATA, F., KASHIWAGI, N., and INOKO, H. Activation of human T cells by toxic shock syndrome toxin-1: the toxin-binding structures expressed on human lymphoid cells acting as accessory cells are HLA class II molecules. Eur. J. Immunol. 1989 **19**, 1803-1809.
- 3) TAKAHASHI, N., NISHIDA, H., KATO, H., IMANISHI, K., SAKATA, Y., and UCHIYAMA, T. Exanthematous disease induced by toxic shock syndrome toxin 1 in the early neonatal period. Lancet 1998 **351**, 1614-1619.

- 4) UCHIYAMA, T., MIYOSHI-AKIYAMA, T., KATO, H., FUJIMAKI, W., IMANISHI, K., and YAN, X.-J. Superantigenic properties of a novel mitogenic substance produced by *Yersinia pseudotuberculosis* isolated from patients manifesting acute and systemic symptoms. *J. Immunol.* 1993 **151**, 4407-4413.
- 5) ABE, J., TAKEDA, T., WATANABE, Y., NAKAO, H., KOBAYASHI, N., LEUNG, D.Y.M., and KOHSAKA, T. Evidence for superantigen production by *Yersinia pseudotuberculosis*. *J. Immunol.* 1993 **151**, 4183-4188.
- 6) WHITE, J., HERMAN, A., PULLEN, A.M., KUBO, R., KAPPLER, J.W., and MARRACK, P. The V β -specific superantigen staphylococcal enterotoxin B : stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. *Cell* 1989 **56**, 27-35.
- 7) UCHIYAMA, T., YAN, X.-J., IMANISHI, K., and YAGI, J. Bacterial superantigens : mechanism of T cell activation by the superantigens and their role in the pathogenesis of infectious diseases. *Microbiol. Immunol.* 1994 **38**, 245-256.
- 8) KAWABE, Y., and OCHI, A. Selective anergy of V β 8⁺CD4⁺ T cells in *Staphylococcus enterotoxin B*-primed mice. *J. Exp. Med.* 1990 **172**, 1065-1070.
- 9) KAWABE, Y., and OCHI, A. Programmed cell death and extrathymic reduction of V β 8⁺CD4⁺ T cells in mice tolerant to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *Nature* 1991 **349**, 245-248.
- 10) PARSONNET, J., GILLIS, Z.A., RICHTER, A.G., and PIER, G.B. A rabbit model of toxic shock syndrome that uses a constant subcutaneous infusion of toxic shock syndrome toxin-1. *Infect. Immun.* 1987 **55**, 1070-1076.
- 11) MARSDEN, V.S., and STRASSER, A. Control of apoptosis in the immune system : Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annu. Rev. Immunol.* 2003 **21**, 71-105.
- 12) NAKAJIMA, H., SHORES, E.W., NOGUCHI, M., and LEONARD, W.J. The common cytokine receptor gamma chain plays an essential role in regulating lymphoid homeostasis. *J. Exp. Med.* 1997 **185**, 189-195.
- 13) VELLA, A.T., DOW, S., POTTER, T.A., KAPPLER, J., and MARRACK, P. Cytokine-induced survival of activated T cells in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998 **95**, 3810-3815.
- 14) GREIDER, C., CHATTOPADHYAY, A., PARKHURST, C., YANG, E. BCL-X_L and BCL2 delay Myc-induced cell cycle entry through elevation of p27 and inhibition of G1 cyclin-dependent kinases. *Oncogene* 2002 **21**, 7765-7775.
- 15) LINETTE, G.P., LI, Y., ROTH, K., and KORSMEYER, S.J. Cross talk between cell death and cell cycle progression : BCL-2 regulates NFAT-mediated activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996 **93**, 9545-9552.
- 16) MASOPUST, D., VEZYS, V., MARZO, A.L., and LEFRANCOIS, L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* 2001 **291**, 2413-2417.
- 17) SALLUSTO, F., LENIG, D., FORSTER, R., LIPP, M., and LANZAVECCHIA, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999 **401**, 708-712.
- 18) TANCHOT, C., LEMONNIER, F.A., PERARNAU, B., FREITAS, A.A., and ROCHA, B. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naïve or memory T cells. *Science* 1997 **276**, 2057-2062.
- 19) HOMANN, D., TEYTON, L., OLDSTONE, M.B.A. Differential regulation of antiviral T-cell immunity results in stable CD8⁺ but declining CD4⁺ T-cell memory. *Nat. Med.* 2001 **7**, 913-919.
- 20) CHEN, L., KOYANAGI, M., FUKADA, K., IMANISHI, K., YAGI, J., KATO, H., MIYOSHI-AKIYAMA, T., ZHANG, R., MIWA, K., and UCHIYAMA, T. Continuous exposure of mice to superantigenic toxins induces a high-level protracted expansion and an immunological memory in the toxin-reactive CD4⁺ T cells. *J. Immunol.* 2002 **168**, 3817-3824.
- 21) KOYANAGI, M., FUKADA, K., UCHIYAMA, T., YAGI, J., and ARIMURA, Y. Long-term exposure to superantigen induces p27^{Kip1} and Bcl-2 expression in effector memory CD4⁺ T cells. *Cell. Immunol.* 2007 **248**, 77-85.
- 22) CELLA, M., ENGERING, A., PINET, V., PIETERS, J., and LANZAVECCHIA, A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 1997 **388**, 782-787.
- 23) NISHIMURA, H., and HONJO, T. PD-1 : an inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance. *Trends Immunol.* 2001 **22**, 265-268.
- 24) CHOI, Y., LAFFERTY, J.A., CLEMENTS, J.R., TODD, J.K., GELFAND, E.W., KAPPLER, J., MARRACK, P. and KOTZIN, B. L. Selective expansion of T cells expressing V β 2 in toxic shock syndrome. *J. Exp. Med.* 1990 **172**, 981-984.
- 25) MATSUDA, Y., KATO, H., YAMADA, R., OKANO, H., OHTA, H., IMANISHI, K., KIKUCHI, K., TOTSUKA, K., and UCHIYAMA, T. Early and definitive diagnosis of toxic shock syndrome by detection of marked expansion of T-cell-receptor V β 2-positive T cells. *Emerg. Infect. Dis.* 2003 **9**, 387-389.
- 26) LI, H., LLERA, A., MALCHIODI, E.L., and MARIUZZA, R.A. The structural basis of T cell activation by

- superantigens. *Annu. Rev. Immunol.* 1999 **17**, 435-466.
- 27) VALITUTTI, S., MULLER, S., CELLA, M., PADOVAN, E., and LANZAVECCHIA, A. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* 1995 **375**, 148-151.
- 28) VIOLA, A., and LANZAVECCHIA, A. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* 1996 **273**, 104-106.
- 29) BONFOCO, E., STUART, P.M., BRUNNER, T., LIN, T., GRIFFITH, T.S., GAO, Y., NAKAJIMA, H., HENKART, P.A., FERGUSON, T.A., and GREEN, D.R. Inducible non lymphoid expression of Fas ligand is responsible for superantigen-induced peripheral deletion of T cells. *Immunity* 1998 **9**, 711-720.
- 30) HILDEMAN, D.A., ZHU, Y., MITCHELL, T.C., BOUILLET, P., STRASSER, A., KAPPLER, J., and MARRACK, P. Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic Bcl-2 family member Bim. *Immunity* 2002 **16**, 759-767.
- 31) APOSTOLOU, I. and von BOEHMER, H. In vivo instruction of suppressor commitment in naïve T cells. *J. Exp. Med.* 2004 **199**, 1401-1408.
-