

抗原特異的免疫反応における
T細胞クロノタイプの解析

1997年

池田 陽子

目次

緒言	3
第1章 自己免疫疾患患者および癌患者におけるT細胞クロノタイプの解析	10
第1節 序論	10
第2節 RT-PCR/SSCP法を用いたT細胞クロノタイプ解析法の原理	12
第3節 慢性関節リウマチにおけるT細胞クロノタイプの解析	26
1-3-1 実験材料と方法	
1-3-2 結果	
1-3-3 考察	
1-3-4 要約	
第4節 健常人およびサルコイドーシス患者の肺に集積したT細胞クロノタイプの解析	42
1-4-1 実験材料と方法	
1-4-2 結果	
1-4-3 考察	
1-4-4 要約	
第5節 ヒト固形癌におけるT細胞クロノタイプの解析	52
1-5-1 実験材料と方法	
1-5-2 結果	
1-5-3 考察	
1-5-4 要約	
第2章 T細胞クロノタイプ解析法を用いたモデル動物における免疫反応の解析	64
第1節 序論	64
第2節 C57BL/6マウス脾細胞におけるJ β 遺伝子使用頻度の検討	66
2-2-1 実験材料と方法	

2-2-2	結果	
2-2-3	考察	
2-2-4	要約	
第3節	マウス同系皮膚移植片に集積するT細胞クロノタイプの解析	… 77
2-3-1	実験材料と方法	
2-3-2	結果	
2-3-3	考察	
2-3-4	要約	
総括と展望	94
謝辞	98
参考文献	99
主論文目録	115
主査、副査名	116

緒言

本来、生体には外来からの異物による攻撃から自己を守る免疫系が存在する。免疫系は、未知の外来抗原に対して十分に特異的反応ができるほどに多様な抗原レセプターを持っている。しかも、それらは自己に対しては反応しないように免疫寛容（トレランス）の状態にもなりうる。免疫系で一番重要な点は自己、非自己の認識である。この区別の機構は未だ不明な部分も存在するが、少なくとも自己と強く反応するクローンは排除される clonal deletion という機構が働いている。例えば、自己に強く反応する T 細胞は胸腺内で除かれる。しかし、ある原因が引き金となって免疫細胞が自分自身の組織や細胞を攻撃し（トレランスの破綻）、時には個体の死を招く様な重篤な反応を示すことがある。これが自己免疫疾患である。自己免疫疾患の特徴は自己に対する抗体（自己抗体）や自己と反応する T 細胞（自己反応性 T 細胞）が存在することであり、ある種の疾患では自己抗体によって病像が形成されることも知られている。

自己免疫疾患は、インスリン依存性糖尿病や多発性硬化症のように標的抗原と組織障害が 1 つの組織に限局している臓器特異的自己免疫疾患と慢性関節リウマチやシェーグレン症候群、全身性エリテマトーデスのような多臓器に存在する抗原に対する組織障害の見られる全身性自己免疫疾患に大別される。臓器特異的自己免疫疾患では、本来トレランスとなっているはずの臓器特異的自己抗原に対するトレランスに破綻が生じ、その結果として免疫系が臓器を攻撃し、破壊する反応が起こる。すなわち、抗原特異的免疫反応の発生が疾患の発症において重要な役割を果たしていると考えられる。一方、全身性自己免疫疾患における発症原因は臓器特異的自己免疫疾患のときほどは単純ではない。これらの疾患の際に出現する自己抗体の多くは核内因子や細胞質成分であることから、自己抗体が直接組織に障害を与えるとは考えにくいためであるが、傷害された組織への T 細胞の浸潤および集積が認められることより、やはり抗原特異的免疫反応は病変局所で起きていることが示唆されている。

近年、自己免疫疾患の発症機構は少しずつ解明されており、一般的には、自己免疫反応の開始、免疫反応の進展、炎症そして臓器破壊というように病態が形成されていくとされる。はじめの引き金となる反応の一つには、外来微生物と自己

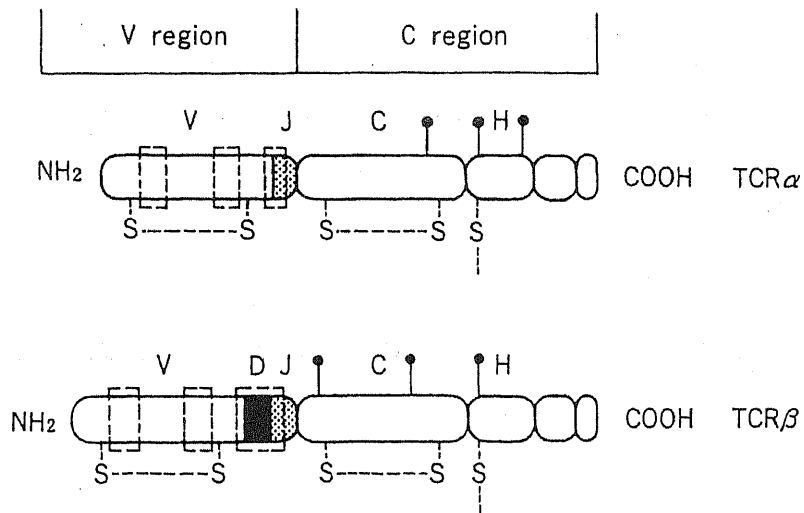
成分との分子相同性によるものがあると推測されている。すなわち、生体に侵入してきた微生物を攻撃するために活性化された免疫細胞が、外来抗原と良く似た自己成分を誤って認識し、攻撃してしまうことによってこれを発現している自己の組織に傷害を与えるためである。さらに、自己免疫疾患への罹患しやすさには主要組織抗原が関与していることもわかってきている。

最近、自己免疫疾患である多発性硬化症のモデル動物である実験的アレルギー性脳脊髄炎(experimental allergic encephalomyelitis: EAE)において病変局所に浸潤している自己反応性T細胞のT細胞レセプター(TCR)が限定されていることが判明した[1]。このモデルにおいて限定されたTCRに対する抗体やTCRの可変領域を含むペプチドワクチンが発症を予防できたことは抗原特異的治療法の可能性を示す画期的な結果であった[1,2]。このようにTCRのV領域が抗原認識のみならず自己免疫疾患の発症にも関与している可能性が示されたことより、"V-region disease hypothesis"が提唱されている[3]。同様の結果が他の実験的自己免疫疾患モデル動物を用いた研究で報告されており[4-9]、またヒトにおいては多発性硬化症について検討されている[10]。近年の分子生物学的手法の進歩により、生体内に存在する少数の自己反応性T細胞の遺伝子解析が可能となってきた。自己免疫疾患において自己反応性T細胞のTCRについて解析することはその発症機構の解明、さらには抗原特異的治療法の開発において重要と考えられる。

T細胞は抗原提示細胞に提示された抗原エピトープをTCRを介して認識する[11,12]。TCRを介したシグナルと、他の細胞表面分子を介した第2のシグナルの両者の共存によって細胞に増殖の刺激が入る[13,14]。このようにして特異抗原による刺激はT細胞のクローナルな増殖を引き起こしている。各々のT細胞の性格は主にTCRの最も可変性富んだ部分である相補性決定領域3(complementarity determining region; CDR3)の配列で決められている[15-17]。

TCRはT細胞の表面に α 鎖と β 鎖のヘテロダイマー或いは γ 鎖と δ 鎖のヘテロダイマーとして発現している。 $\alpha\beta$ TCRはFig. 1の様な構造をしている[18]。ヒトTCR遺伝子は β 鎖と γ 鎖が第7染色体上に α 鎖と δ 鎖が第14染色体上に存在し(Fig. 2)、T細胞が胸腺内で成熟するときに遺伝子の再構成を起し、各サブユニットを構成する[19]。 α 鎖と β 鎖はそれぞれ抗原を認識するのに必要な可変(variable region; V)領域を細胞外のN末端に、また膜貫通領域を含む定常

(A)



(B)

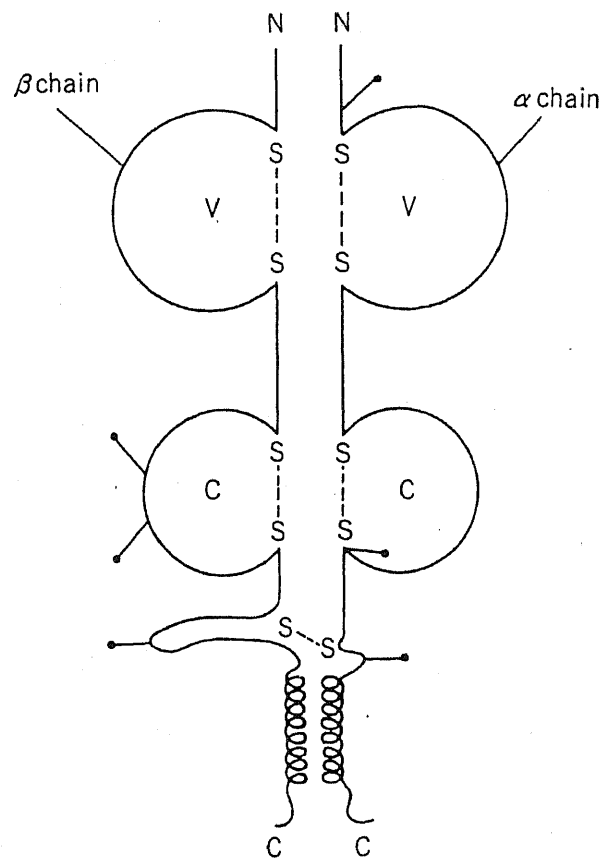


Fig. 1. Structure of $\alpha\beta$ T cell receptor. (A) schematic structure. (B) overall structure.

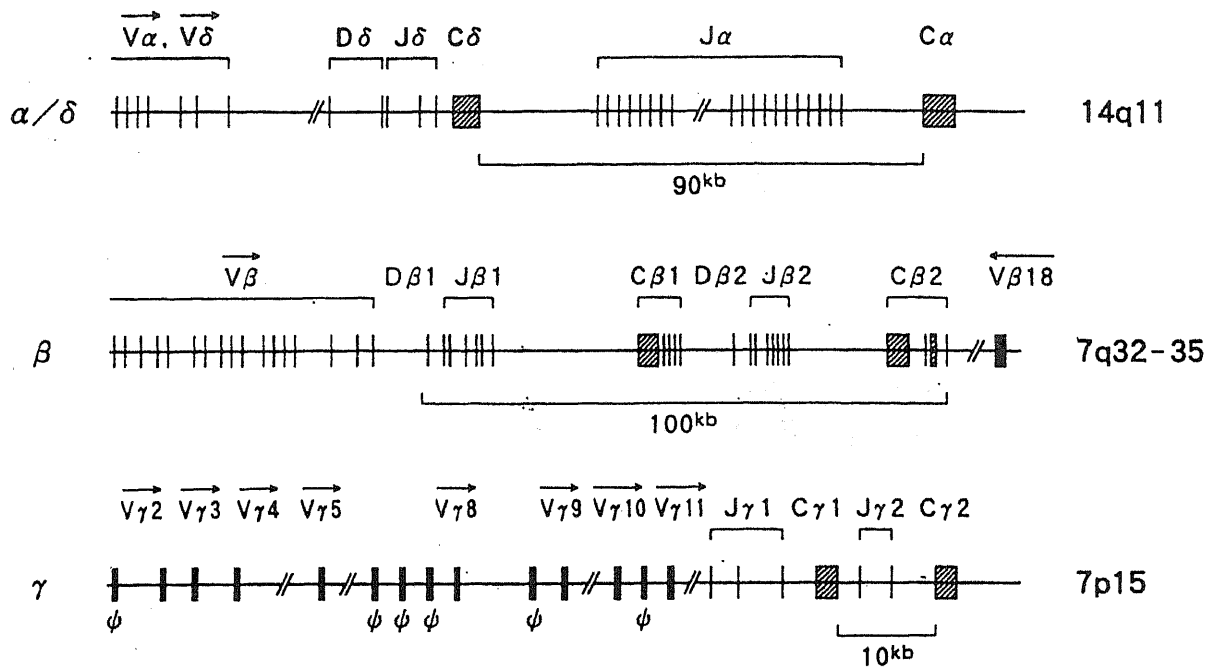


Fig. 2. Structure of human TCR genes. Arrows show the direction of open reading frames.

(constant region; C) 領域を細胞内のC末端に持ち、その間に α 鎖ではジャンクション (junctional region; J) 領域と呼ばれる領域を、 β 鎖ではJ領域とダイバーシティー (diversity; D) 領域を持っている。この α 鎖のV領域 ($V\alpha$) には約100個、 β 鎖のV領域 ($V\beta$) には約20個のファミリーが存在する。さらに $J\alpha$ には約50個、 $D\beta$ には2個、 $J\beta$ には13個、 $C\beta$ には2個のファミリーが存在し、これらに加え、V-(D)-J組み換えの際に起こる塩基挿入や欠失により理論上のレパトアは 10^{10} 以上になる。

理論上多数にのぼるレパトアを持つT細胞であるが、生体内で機能しているT細胞レパトアは限られており、特定の抗原に対しては限られたTCRが使用されている可能性が示されている。先にも述べたが、EAEマウスの実験でも見られたよ

うな限定されたTCRの使用がヒトの疾患でも認められれば、TCRレパトアの解析は対応抗原の想定や特異的なT細胞を標的とした治療法と結び付くと考えられる。特に発症機序の不明な自己免疫疾患などにおいてはTCRレパトアの解析が重要な手がかりとなる。

疾患におけるTCRの検出は、初めは抗TCRモノクローナル抗体を用いたTCRの発現を検討したものであった[20]。その後、TCRのV領域の塩基配列が明らかとなり、またpolymerase chain reaction(PCR)法[21]も開発され、目的とするT細胞のcDNAを鋳型としてV領域の遺伝子を増幅して解析する方法が行われるようになった[10,23]。V β 遺伝子の塩基配列はその長さに差があり、またGC含量も異なるため、1つのprimerではPCRの条件によって増幅が左右されやすいため、現在ではChoiらによって報告された各V β に対する特異的な5'-primerと共通の3'-C β primerを用いるmultiple primer法が利用されている[23]。しかしこの方法を用いても個々のTCRの発現率を正確に反映しているかを明らかにするためには、コントロールを用いた定量化の予備実験[10]やSouthern blottingを行う必要がある[24,25]。また、この方法ではレパトアについては解析できるが、V β とC β の配列は同じであっても、中間のD-J領域の異なるクローンの分離は不可能である。そこで、元来は点突然変異の検出や多形解析を行うために開発されたsingle strand conformation polymorphism (SSCP)法[26]を応用することによって新しい非常に高感度なTCR解析法が確立された[27]。この方法は1本鎖DNAの塩基配列の違いによって生じる立体構造の違いを電気泳動中の移動度によって検出する方法である。ゲル上に現われた1つのシグナルは1つのT細胞クローンの相当し、シグナルの強弱によってT細胞の集積度を表わすことができる。

疾患とTCRレパトアの関係についての解析はいろいろな研究グループでなされている (Table 1)。慢性関節リウマチだけをとってみても、あるレパトアに偏りがあると言うグループ[26,28,29-34]もあれば、レパトアには偏りは見られないとするグループ[35-37]もあり、非常に議論のあるところである。末梢血と病変局所に浸潤したT細胞を比較した場合、病変局所にある特定のT細胞が集積していることは明らかとなっている。しかしヒトの疾患では、モデル動物で見られたような特定の疾患特異的なレパトアの存在は当てはまらないようである。慢性関節リウマチにおいても限られたV遺伝子の偏りが見られるのみである。その原因

Table 1. Repertoire of T cell receptor in human autoimmune diseases.

disease	autoantigen	repertoire of TCR	method	reference
Multiple sclerosis	myelin basic protein	V α 10	PCR	10
		V β 5.2, V β 6.1	PCR	19
Rheumatoid arthritis	?	V β 7	PCR	24
		V β 14	PCR	29
		V β 3, V β 9, V β 14, V β 17	PCR	30
		V β 2, V β 3	PCR	37
		biased V α	PCR	19
		multiple clonotype	PCR/SSCP	27
Basedow's disease/ Hashimoto's disease	TSH receptor/ thyroglobulin	limited V α	PCR	19
Sjogren's syndrome	?	V β 2/ V β 13	PCR	24
		limited V α	PCR	19
mixed connective tissue disease	U1-snRNP A	multiple clonotype	PCR/SSCP	38

としてはTCR検出感度の違い、経時的なクローンの拡大の可能性、*in vitro*でのT細胞培養による影響などが挙げられる。

TCRファミリーの優先的使用には抗原エピトープや主要組織適合抗原 (major histocompatibility complex; MHC)などの複数の要因が関与しており、これを考慮した新しいクロナリティーの拡大の仮説が出されている。例えば、混合性結合組織病 (mixed connective tissue disease: MCTD) とその対応抗原であるU1-snRNP A proteinについて考えて見ると、自己抗原であるU1-snRNP A proteinに反応する自己反応性T細胞は患者末梢血中に少数ではあるが、数クローン存在する[38]。U1-snRNP A protein上には複数のエピトープが存在し、患者の自己反応性T細胞はこれらを認識するが、患者の抗原提示細胞やMHCによって認識するエピトープは限られ、T細胞も限定される。従って、個人のHLAや抗原の状態によってTCRレパトアにも違いが出てくるが、一部は共通のTCRが存在することが推察される。これらのことより、TCRレパトアの解析だけではTCR解析は不十分であり、個人ごとのT細胞クロナタイプの解析が重要と考えられる。

疾患におけるTCRクロナリティーの解析は方法論的に問題があり、大きな進展はなかったが、PCRとSSCPを組み合わせた方法[27]が開発され簡単に解析できるようになった。そこでこの方法を用いてT細胞が関与しているといわれている疾患についてT細胞クロナタイプを検討した。自己免疫疾患である慢性関節リウマチでは病変局所に顕著に浸潤したT細胞、抗原の特定されていない肉芽腫を形成するサルコイドーシスについては肺病変局所に浸潤したT細胞についてクロナタイプを検討した。また、固形癌においては免疫系が癌抗原を認識し癌細胞を排除するために、キラーT細胞やこの細胞の働きを助けるヘルパーT細胞が集積するといわれている。そこでこの癌に集積するT細胞についてもクロナタイプを解析した。これらの解析を行うことによって慢性関節リウマチやサルコイドーシスにおいては直接的に抗原の解析や抗原特異的治療法の検討ができ、また癌においては癌浸潤リンパ球（TIL）療法の可能性を検討することができる。さらにこれらのモデルとしてマウスを利用し、検討を重ねることによって治療法のシュミレーションができる。

以上のことを踏まえ、筆者は*in vivo*に集積したT細胞クロナタイプについて検討した。本論文の第1章では慢性関節リウマチ、サルコイドーシスおよび婦人科固形癌患者の病変局所に浸潤したT細胞クロナタイプについて解析を行い、第2章ではモデル動物系の検討としてマウスでの正常状態と皮膚移植で拒絶反応を起こした状態のT細胞クロナタイプについて病態との関連を検討した。

第1章 自己免疫疾患患者および癌患者におけるT細胞クロノタイプの解析

第1節 序論

免疫系は本来は自己と非自己を識別し、非自己を排除することによって自己を守る系である。この自己防衛の中心的役割を果たしているのがT細胞である。しかしすべての機構には破綻を起こす危険が存在し、自己認識の機構も例外ではない。臨床的に自己抗体や自己反応性T細胞が検出される多くの疾患—自己免疫疾患が知られている。例えば、臓器特異的な自己免疫疾患としては、橋本甲状腺炎、原発性粘液水腫、インスリン依存性糖尿病、重症筋無力症などが、全身性自己免疫疾患としては慢性関節リウマチ、多発性硬化症、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデス、混合性結合組織病などが知られている。慢性関節リウマチ (RA) は全身性の自己免疫疾患であり、主たる病変局所である関節滑膜への顕著なT細胞の浸潤が認められている。RAの病態にT細胞が関与していることを示唆するものとして、末梢血中や滑膜に浸潤したT細胞に活性化抗原が見られること[39]、RAと特定のHLA-classIIが相関すること[40]、T細胞をターゲットとした治療によるRAの改善がみとめられること[41]、また human immunodeficiency virus (HIV)に感染した患者でRAの寛解が得られたこと[42]などが挙げられる。しかしT細胞が実際の生体内でどのように働き、そしてどのような経緯を辿ってRAの病態を形成するのかは不明な点も多い。RAの病因に関するT細胞の関与の解析は、患者末梢血より分離したT細胞の*in vitro*増殖活性や、限界希釈法による推定される抗原特異的T細胞の頻度解析などで行われてきた。しかしながら、これらの方法では生体よりT細胞を取り出した後、培養系に移してから解析を行うため、必ずしも生体での出来事を反映しているとは言い切れない。そこでPCR法を用いて生体から分離したT細胞を直接解析することが試みられた。この方法では生体からT細胞を得た直後に各V β ファミリー特異的なprimerを用いてPCRで増幅後アガロース電気泳動を行い、増大しているT細胞レパトアについて検出する。ところが、この方法では同じV β およびC β を用いていながらもD β -J β (CDR3領域)の異なるクローンを分離することはできず、本当に増大しているクローンの検出はできない。そこで我々は点突然変異や遺伝子多形を解析する方法であるSSCP

法と組み合わせることによってCDR3領域の異なるクローン、即ちT細胞クロータイプを分離する方法を確立した。第1章ではこの方法を用い、T細胞関与の示唆されているRA患者の罹患局所に浸潤したT細胞、肉芽形成性疾患であるサルコイドーシス肺の肺胞洗浄液中のT細胞および固形癌とその周辺リンパ節に浸潤したT細胞について臨床検体を用いて検討した。

第2節 RT-PCR/SSCP法を用いたT細胞クロノタイプ解析法の原理

序論に述べたように自己免疫疾患におけるT細胞の役割は重要であり、疾患形成の中心を成している。特に慢性関節リウマチなどでは病変局所への顕著なT細胞の浸潤が認められ、このT細胞の解析が病因解明の鍵を握っていると考えられる。

T細胞はその細胞表面に抗原提示細胞によって提示された抗原を認識するT細胞抗原レセプター (TCR) を持っている。TCRの構造はイムノグロブリンと類似し、N末端に可変 (V) 領域を持ち、C末端に定常 (C) 領域を持っている。TCRはほぼ同じ大きさの2種類のサブユニットによって構成される。このサブユニットはC領域の構造から α 、 β 、 γ および δ の4種類に分類されるが、その組み合わせは $\alpha\beta$ 並びに $\gamma\delta$ の2種類である。約95%のT細胞は α 鎖と β 鎖の組み合わせを持つ $\alpha\beta$ T細胞であり、残りの5%は γ 鎖と δ 鎖から成る $\gamma\delta$ T細胞である。T細胞が非常に多くの抗原と反応することからわかるようにTCRは多様性を持っている。この多様性の獲得にはイムノグロブリンと同様に遺伝子が再構成されるということが重要である。染色体上のTCR遺伝子の構造を見ると各サブユニットとも数10個のV遺伝子群、数個のD遺伝子、10数個のJ遺伝子とC遺伝子から成り立っている。これらの遺伝子がT細胞の分化に伴って再構成され、 α 鎖ではV-J-C、 β 鎖ではV-D-J-Cより成る各サブユニットを形成する。この再構成時に α 鎖ではV-Jの、 β 鎖ではV-D-Jの連結領域に塩基の挿入や欠失が起こることによってさらに多様性が広がる。このTCRの構造によって分けるT細胞の分類をT細胞クロナリティーと呼び、分けられたT細胞クローンをクロノタイプと呼ぶ。これに対し、V領域遺伝子で分類されたT細胞集団をレパトアと呼んでいる。

ところで、今までのT細胞の解析法にはT細胞集団よりRNAを抽出しcDNAに変換後、TCR遺伝子をprobeとしてSouthern hybridizationで特定の再構成をしたTCRのバンドを検出する方法[10,21]やT細胞株を樹立する方法[35,42]、各V β に対するモノクローナル抗体を用いて陽性細胞の頻度を調べる方法[20]などである。しかしこれらの方法にも難点が存在する。Southern hybridizationで検出する系ではあるクローンが全体の数%以上は増大していなければ検出は不可能である。T細胞株の樹立は、1つのクローンについてTCR遺伝子のみならず他の遺伝子の解析

も可能であり、遺伝子の発現と機能を関連付けて検討できる良い系ではあるが、T細胞株の樹立はかなり困難であり、さらにこの樹立された株が*in vivo*を反映したものでなく、*in vitro*のartifactによって少数存在しているものを増幅した可能性を含んでいる。また各V領域に対するモノクローナル抗体による解析であるが、簡便なため適切な抗体さえあれば非常に有用な手段であり、マウスにおける解析では多くの知見が得られた。しかし、ヒトの場合では、マウスに比べ抗体が限られ、そのうえ、この方法ではV領域の種類の分類のみであり、クローンタイプの解析は行えない。近年、PCR法が確立されてからは、各V β 遺伝子に対するprimerとC β 遺伝子に対するprimerを用いてPCRを行い、各 β 鎖のPCR産物量を比較するレパトアの解析が中心であった。この方法についても異なるチューブで反応したPCR産物の増幅量を比較するので本当に*in vivo*でのクローンの存在比を反映しているとは明言できない。

以上のようにTCRの発現頻度を検出する系には問題点が残されている。また抗原特異性を調べるためにはV領域のみでなくクローンの解析が必要であり、これらの方法では不十分な点がある。そこで我々は元々は癌遺伝子の点突然変異の検出法として開発されたPCR産物を熱変性後に非変性ゲルで電気泳動を行い1本鎖DNAの高次構造によって分離するSSCP法[26]を利用してT細胞クローンタイプを解析する方法を開発した[27]。即ち、T細胞よりRNAの抽出を行い、次いでcDNAに変換して、各V β 遺伝子特異的primerと末端ラベルしたC β 遺伝子特異的primerを用いてPCRを行い（multiple primer法）、増幅された遺伝子を確認後、SSCP解析を行うという方法である（Fig. 3）。Multiple primer法で増幅された各V β 遺伝子に対するPCR産物はほぼ均一の長さであるが、クローンによるV-D-J領域の遺伝子配列の違いから、1本鎖に変性し非変性ゲルで電気泳動することによってクローン毎に異なる移動度を示す。例えば健常人の末梢血を解析した場合、非常に多様なクローンが存在するためSSCPではスメアー状に検出されることが予想される（Fig. 3A）。これに対し、モノクローナルなT細胞から単離したRNAを解析した場合はシングルバンドとして検出されるはずである（Fig. 3B）。そしてヘテロなT細胞集団中である特定のT細胞のみが増殖したならば、スメアー中にバンドとして検出されると考えられる（Fig. 3C）。実際に健常人の末梢血を解析するとFig. 4およびFig. 5Aに示すように個人差はあるもののほとんどのV β ファミ

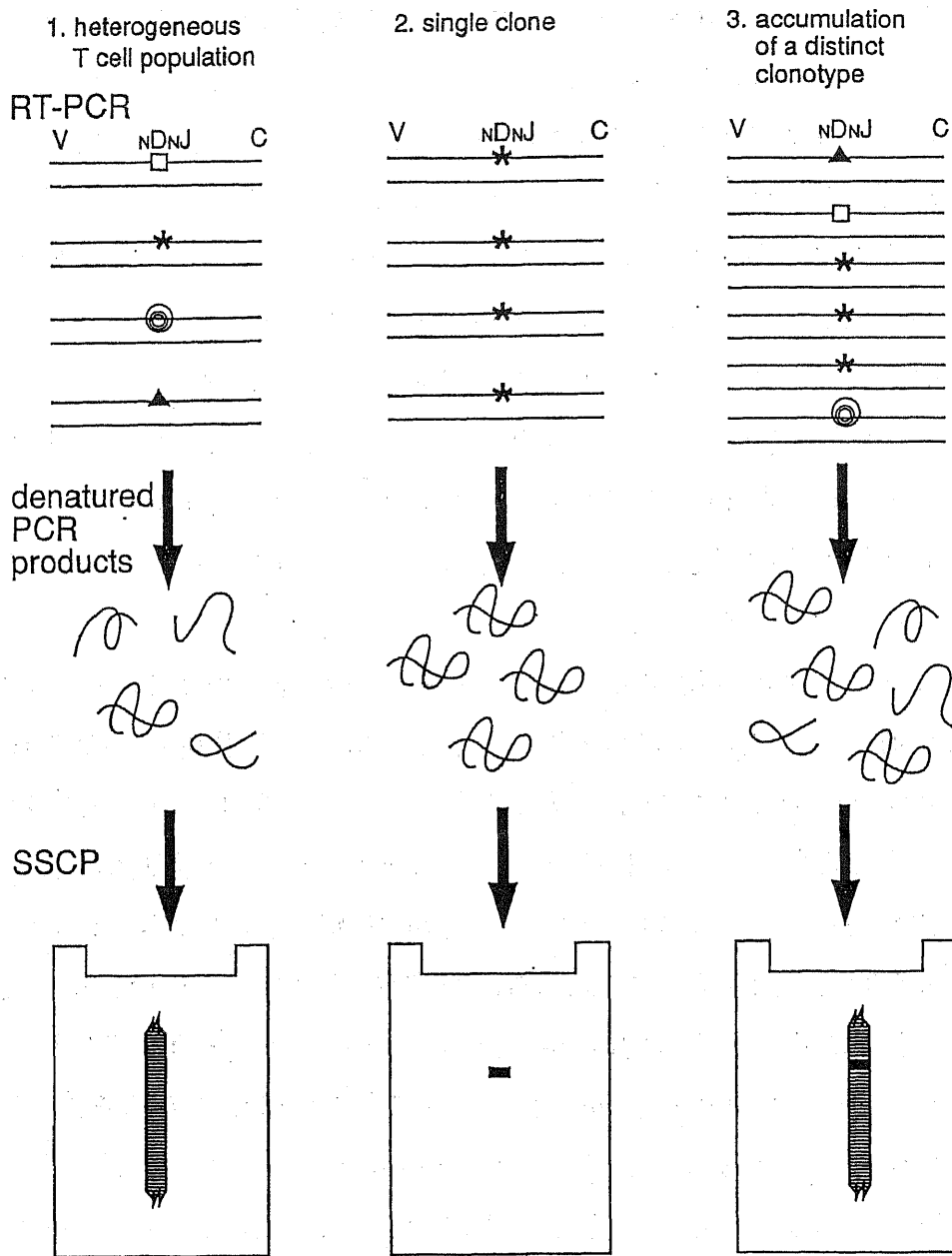


Fig. 3. The principle of a T cell clonality analysis using single-strand conformation polymorphism of T cell receptor messenger signals. The products of a reverse transcriptase- polymerase chain reaction of T cell receptor transcripts are heat denatured into a single strand and then are analyzed by non-denaturing polyacrylamide gel. A smear-like pattern is obtained from a heterogeneous T cell population (1). A single T cell clone exhibits a single band (2) and an accumulated T cell clone in a heterogeneous lymphocyte population shows a band in the background smear pattern (3).



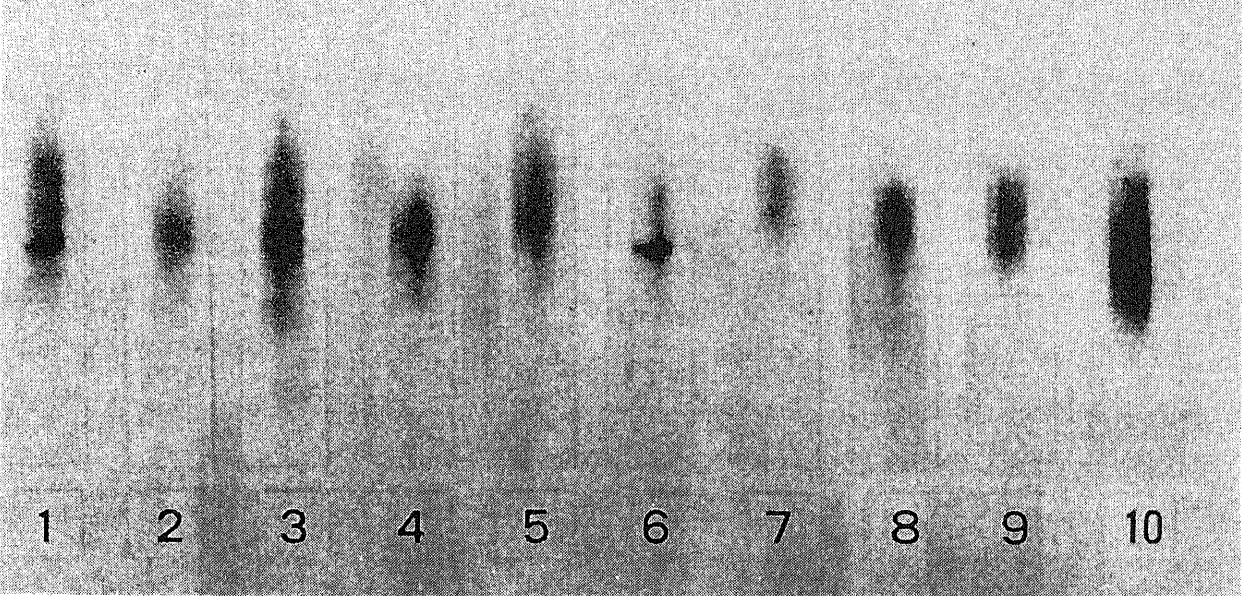
M 1

20

Fig. 4. Clonal analysis of TCR V β -chain message from healthy individual. Typical representative patterns of the analysis obtained with a set of primers are presented. From left to right; TCR V β families 1-20

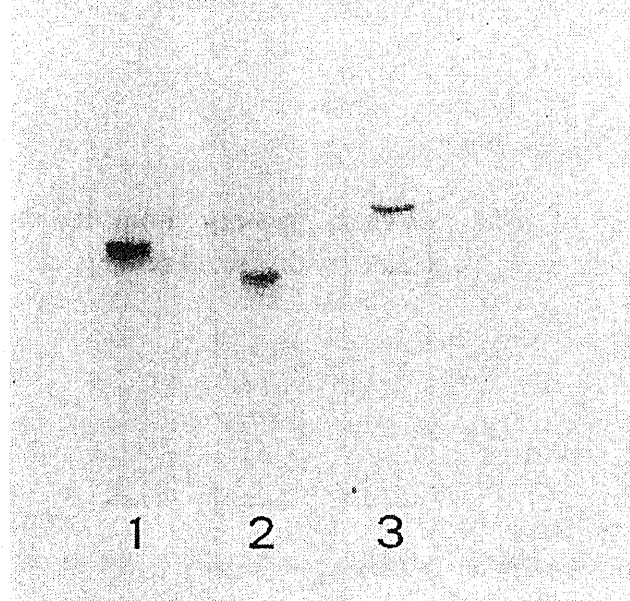
A

$V\beta 1$ $V\beta 2$ $V\beta 4$ $V\beta 8$ $V\beta 9$ $V\beta 10$ $V\beta 11$ $V\beta 15$ $V\beta 16$ $V\beta 19$



B

HPB-ALL cDNA clone
 $V\beta 5.2$ $V\beta 6.1$ $V\beta 6.1$



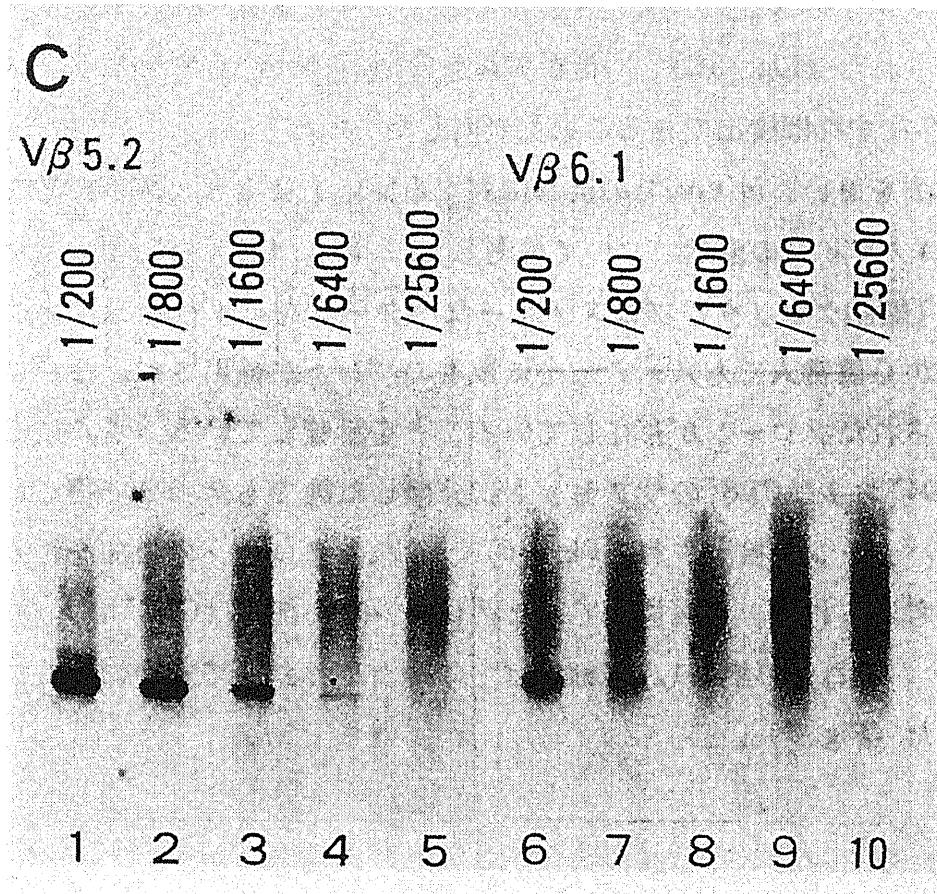


Fig. 5. Clonal analyses of TCR β -chain messages. PCR-amplified DNAs were denatured into single strands and electrophoresed in a non-denatured polyacrylamide gel. (A) PBL from a healthy individuals. 1-10 represent typical patterns of amplifies DNA obtained with a set of primers. (B) T cell tumor HPB-ALL with a different set of primers (V β 5.2 and 6.1) and a cloned cDNA with a V β 6.1 primer set. (C) RNA from HPB-ALL and RNA from healthy were mixed in 1:200 to 1:25600 dilution and analyzed in the same way.

リーでスメアーに検出された。これに対し、癌化したT細胞株であるHBP-ALL(V β 5.2とV β 6.1を発現している)とクローニングされたV β 6.1遺伝子を含むcDNAについて同じ解析を行った場合、いずれもモノクローナルな検体からはシングルバンドしか検出できなかった (Fig. 5B)。このT細胞株HBP-ALLから得たRNAと健常人末梢血から得たRNAを混合して同様にSSCP解析することによって、健常人由来のスメアーなバックグラウンド中にT細胞株由来のシングルバンドが検出された (Fig. 5C)。希釈実験も行い、1600から6400個に1個増幅したT細胞が存在すれば検出できることも判明した (Fig. 5C)。

この方法を用い、*in vivo*での抗原に対する反応を健常人が風邪に罹患した際のT細胞クロナタイプの変動について検討した。Fig. 4に示したように健常人の末梢血ではT細胞クロナタイプはスメアーなパターンを示すヘテロな集団であった。しかしながら健常人でもスメアー中に数本のバンドが検出され、これは健常人でもある限られたクローンが存在していることを示唆している。さらにこれらのバンドはCD4⁺およびCD8⁺のサブセットに分離した後でも全画分で得られたパターンと同じパターンで検出され (Fig. 6)、これはクローンの増加を相対的に示した結果と考えられた。増加していたクローンの大部分はCD8⁺であり (Fig. 6, Table 2)、これらの集積したT細胞は1年以上にわたって安定に存在することも認められた (Fig. 7)。

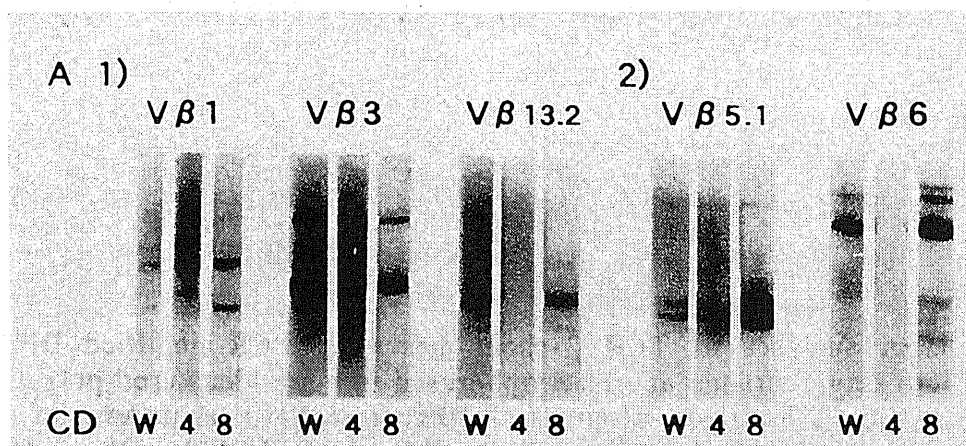


Fig. 6. Phenotypic analysis of accumulating clonotypes in healthy individuals. PBL were separated into CD4⁺ and CD8⁺ subsets and analyzed. Results of independent experiments on two subjects (1 and 2) are displayed. W, whole population; 4, CD4⁺; 8, CD8⁺ subsets of each V β -expressing subpopulation.

Table 2. Summary of clonotypic analyses of healthy individuals.

Healthy subject no.	Number of V β subfamilies analyzed	Number of accumulated clones amplified in:	
		CD4+	CD8+
1	19	0	13
2	18	9	27
3	19	4	17
4	19	0	11
5	19	5	16
6	18	6	21

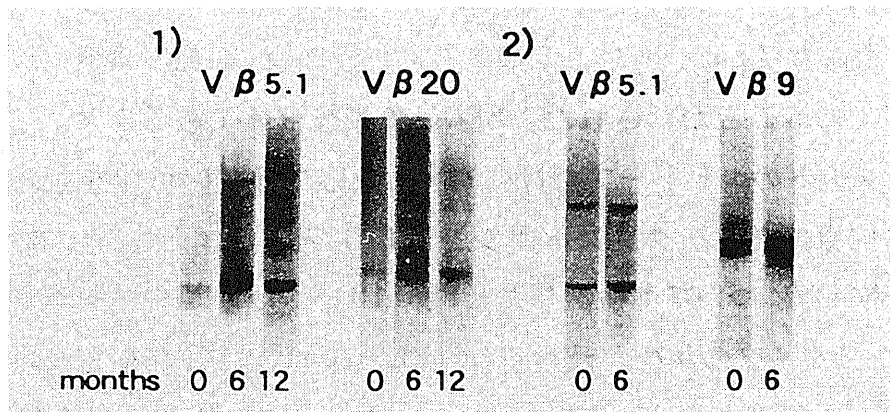


Fig. 7. Sequential analysis of accumulating clonotypes in healthy individuals. Sequential observation of distinct bands (in CD8⁺ subset) in two subjects are shown. The first samples are denoted as '0', and 6 or 12 month later PBL were sampled from the same individuals.

次に流感様の症状を呈した2名の健常人についてT細胞クロノタイプの経時的変化を検討した (Fig.8, Table 3)。両者とも健常時よりスメア一中に数本のバンドは検出されていたが、発熱後、4日目にはCD4⁺サブセットで新たなクローンの出現が認められ、17あるいは21日目にはほとんど消失した。これに対し、CD8⁺サブセットでは明らかに新しいクローンが認められたと同時に、これらは数週以上に渡って安定に存在し、CD8⁺サブセットの寿命が長いことを示した。これらの結果はこのT細胞クロノタイプ解析法で実際の*in vivo*の反応を検出できることを証明した。次いで*in vitro*における抗原刺激に対するT細胞の反応を検討した。健常人より採取したT細胞を抗原である purified protein derivatives (PPD)の存在下で4日間培養し、T細胞クロノタイプの解析を行った場合、数本の明瞭なバンドが形成され、抗原刺激でクローンが形成されたことが示された (Fig. 9A)。このバンドの数は培養中に徐々に増加し、またほとんどすべてのV β ファミリーで検出された (Table 4)。T細胞を抗原非存在下で培養した場合にはこのようなクローンの増大は認められず (Fig. 9B)、またMHC class II抗原に対するモノクローナル抗体 (HAK-75) とPPDの共存下で培養を行ってもクローンの増大は認められなかった (Fig. 9C)。このことより、このT細胞の集積はPPDに対する特異的反応であることが示された。PPDは免疫複合体であるため、これらのT細胞は抗原ペプチドのエピトープだけに対する反応ではない可能性もあったため、より単純な抗原であるテタヌストキシン (TT) とそのエピトープ部分のペプチド (TT830-844) についても検討した (Fig. 10)。TTの場合でもPPDの時と同様にT細胞クロノタイプの集積が認められ (Fig. 10A)、T細胞を2つのフラスコに分割して同一の処理を施すことによって同じクロノタイプの集積が認められた (Fig. 10B)。さらにTTの部分ペプチドで刺激した場合でもいくつかのTT刺激と共通のクロノタイプの増大が認められた (Fig.10C)。TTの結果より、より単純な抗原でもT細胞クロノタイプの増大が誘導されることが示された。これらの結果に対し、末梢血を非特異的抗原である phytohemagglutinin A(PHA)や Concanavarin Aで刺激をした場合には、CD4⁺、CD8⁺とも特異的なクローンの増加は認められなかった (Fig. 11, data not shown)。自己免疫疾患であるMCTDの患者の末梢血より採取したT細胞を用い、自己抗原であるU1-snRNP A proteinで刺激をした場合、*in vitro*で増大したクロノタイプと患者の末梢血中で集積している

クロナタイプは一致し、抗原非特異的刺激では特異的クローンが消失することが観察された (Fig. 12) [38]。以上のことよりこの方法が *in vitro* の抗原刺激での反応の解析も可能であることが証明された。

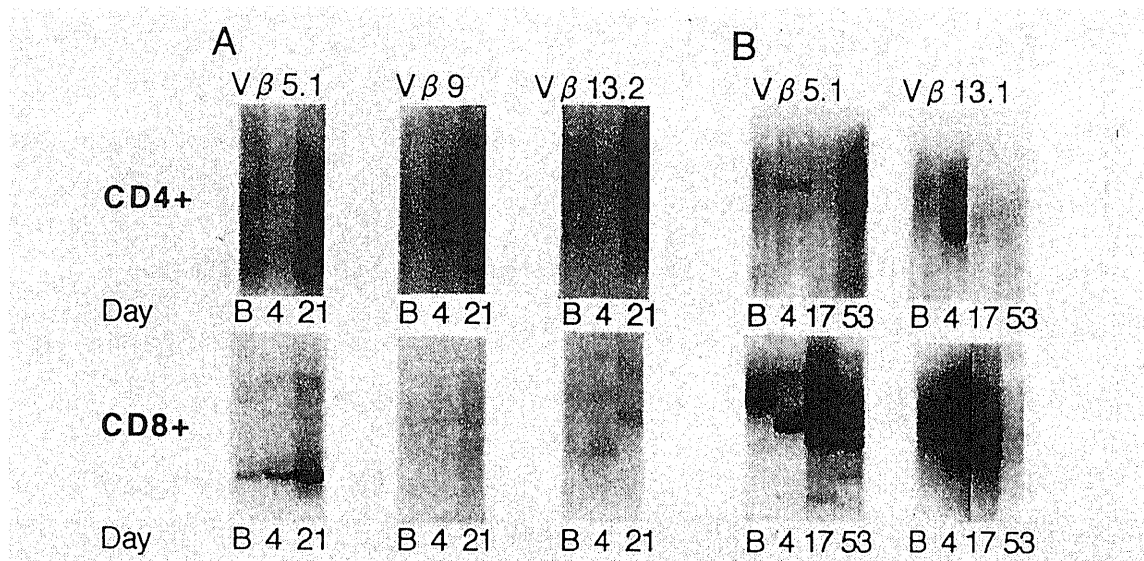


Fig.8. Transient clonal expansions during an acute flu-like infection *in vivo*. PBL samples from two immuno-competent individuals (A and B) before and after an infection were analyzed. B, PBLs before symptoms (disease-free status); other numbers, the day after the fever.

Table 3. Summary of clonotypic analyses during an acute viral infection.

	Subject A			Subject B			
	Before	Day 4	Day 21	Before	Day 4	Day 17	Day 53
CD4	0	15	1	0	12	7	0
CD8	31	32	36	9	15	25	16

PBLs were sampled on each indicated day before or after the onset of symptoms. Numbers show the total count of distinct bands.

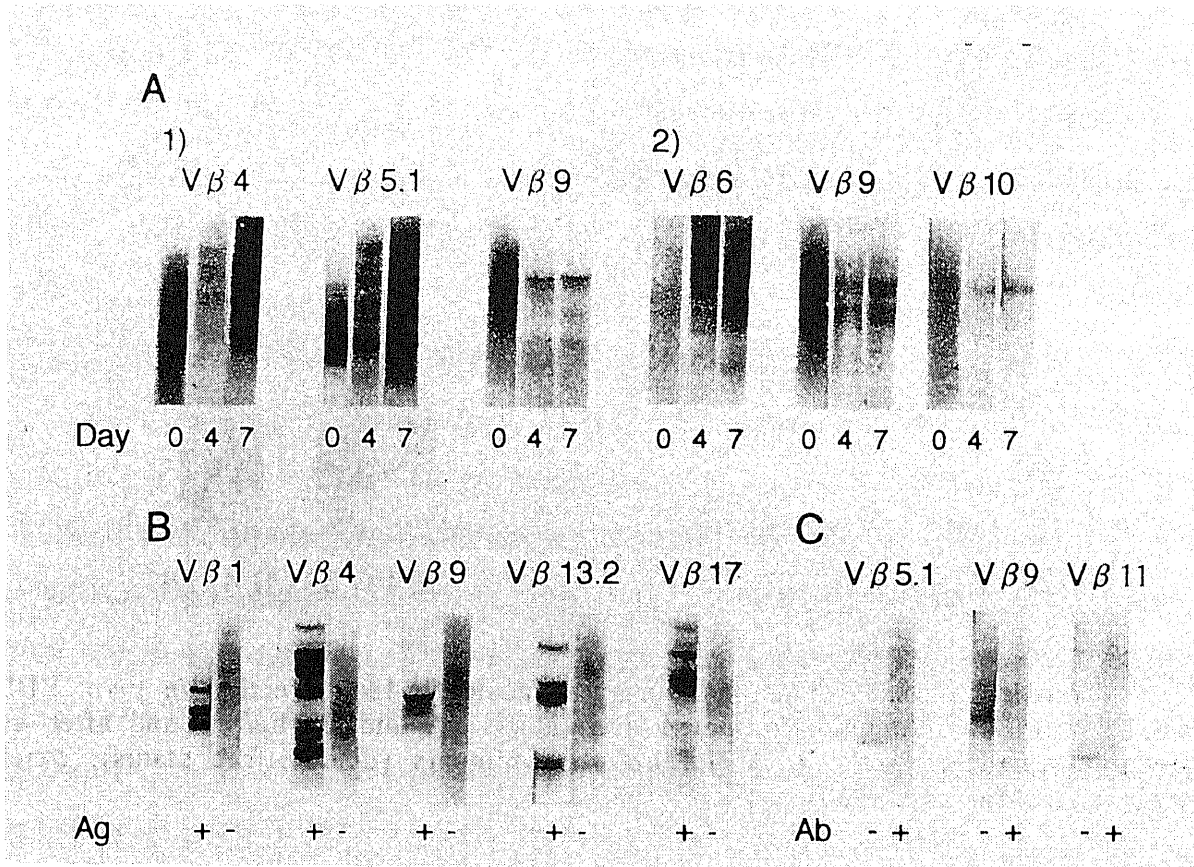


Fig. 9. *In vitro* antigenic stimulation induces distinct clonal accumulations. (A) Results of independent experiments on two subjects (1 and 2) are displayed. Whole PBL were stimulated with PPD and collected on day 0, 4 and 7 of culture. (B) PBL cultured in the presence (+) or absence (-) of PPD. Results on day 7 are displayed. (C) PBL cultured in the presence (+) or absence (-) of an anti-MHC class II antibody (HAK). Results are day 7.

Table 4. Numbers of accumulating clones during cell cultures with PPD.

subject no.	Day	Vβ																			total
		1	2	3	4	5.1	5.2	6	7	8	9	10	11	13.1	13.2	14	16	18	20		
1	0	CD4								2					3					5	
	1	CD8	1			1		2		1										16	
	7	CD4	4	7	5	2	1	1	1	3	2	3	3	4	5	8	2	4	5	63	
		CD8	1	3	2			3	1	1		N	2	3			2			21	
2	0	CD4				1	1								4					6	
		CD8	2			1		3		1	2	3	1	1	2	3	N	N	N	21	
	7	CD4	4	4	4	3	3	3	3	3	4	6	2	3	2	7	7	2	N	60	
		CD8	1	3	1	1	2	4	1	1	N	3	1		3	N	5	2	3	31	
3	0	CD4								N							N	N		0	
		CD8	2	1		1	2				2			2			2	1		13	
	7	CD4	N	2	2	3	4	3	6	2	4	4	4	2	4	5	N	2	1	52	
		CD8	N	5		2	2	4	7	1	2	2						2	1	31	
	14	CD4	2	7	3	2	3	N	8	2	3	6	5	6	7	5	6	10	5	84	
		CD8	5	5	1	3	6	1	10	2	7	8	8	11	8	7	8	6	N	106	

The numbers indicate the total count of distinct bands. Blank, smear pattern; N, only inadequate amplification was obtained from PCR.

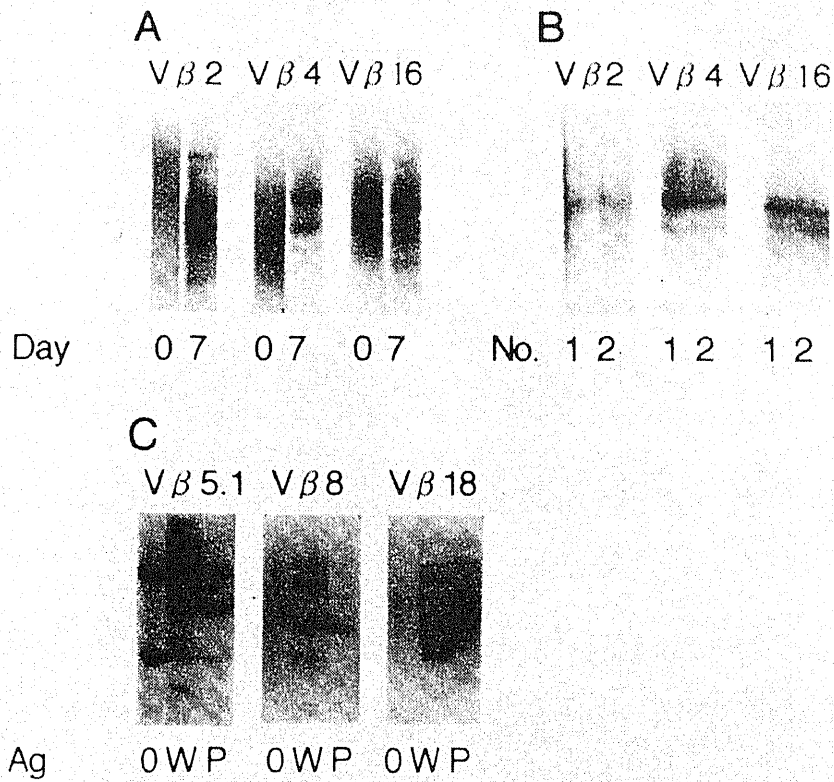


Fig. 10. Simple antigens also induced clonal expansions. (A) PBL cultured with TT (10 mg/ml) on days 0 and 7. (B) PBL cultured separately in two flasks otherwise under the same conditions. Results show analyses of the cells on day 7. (C) PBL cultured either without antigen (0), with TT whole molecule (W) or with known T cell epitope (P), on day 7.

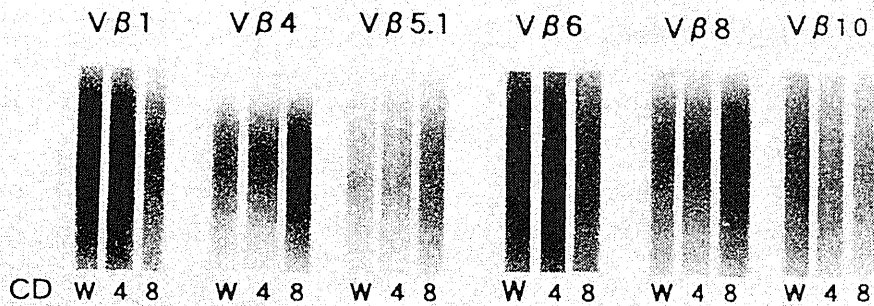


Fig. 11. Non specific stimulus causes no distinct clonal expansion. Phenotypic analysis of PHA-stimulated cells. W, whole population; 4, CD4⁺; 8, CD8⁺ subsets of each Vβ-expressing subpopulation.

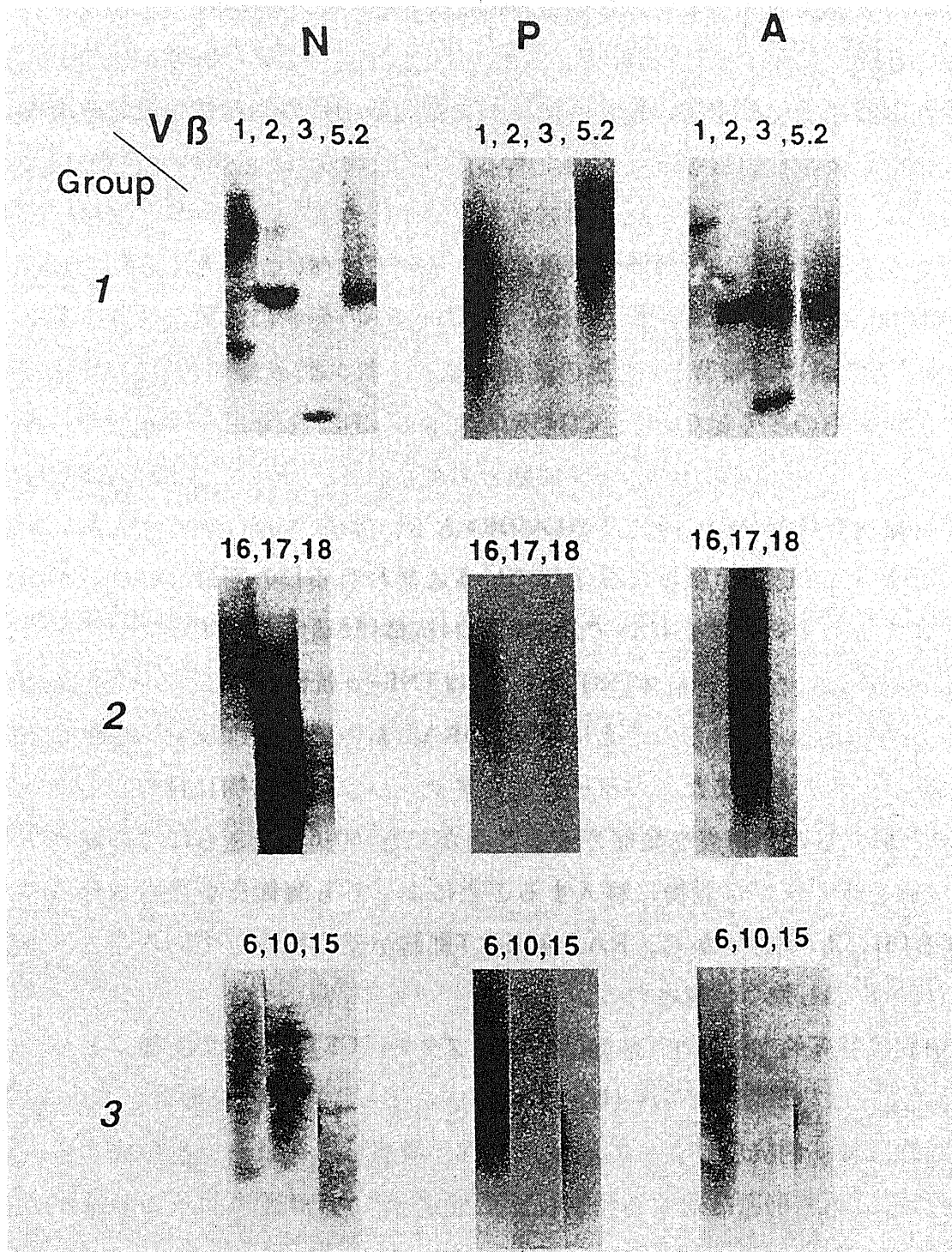


Fig. 12. Alterations of clonal accumulation in each TCR V β gene family of a patient with MCTD are shown. N: The result of a nonstimulated (fresh) samples. P: The result post PHA culture. A: The result after culture with the recombinant soluble RNP A protein. Group 1: T cells clones expressing TCR V β 1, 2, 3, and 5.2 showed more restricted clonal accumulations by RNP A stimulation *in vitro*. Group 2: T cell clones expressing TCR V β 16, 17, and 18 were a nonchanging group. Group 3: The bands of TCR V β 6, 10, or 15 after the stimulations disappeared.

第3節 慢性関節リウマチにおけるT細胞クロナタイプの解析

慢性関節リウマチ(RA)は慢性炎症、滑膜細胞の増殖や進行性の関節破壊などを特徴とする全身性の自己免疫疾患である[45]。この疾患の病因についてはほとんどわかっていないが、ある抗原に対する免疫反応がきっかけになり、次いで滑膜に炎症性細胞が浸潤し、滑膜の増殖が起こるのではないかと考えられている。

T細胞は免疫反応をコントロールしており、RAの発症に重要な役割を果たす。RA患者の滑膜には顕著なT細胞の浸潤が認められ、滑膜組織の20-30%になる。この浸潤細胞の多くはCD4⁺、CD45RO⁺およびCD29^{bright}のT細胞であることよりメモリータイプのヘルパーT細胞と考えられる[46-49]。大部分のRA患者は主要組織適合抗原(MHC)としてHLA-DR4あるいはHLA-DR1を持っており、このMHCが特定の抗原をT細胞に提示していると思われる[50-54]。さらにT細胞表面に存在する分子に対する抗体である抗CD4抗体[55-56]や抗IL-2レセプター抗体[57]、抗IL-6レセプター抗体[58]、あるいはTNF- α 抗体[59]などがRAの治療で効果を上げている。これらのことはT細胞がRAにおいて重要な役割を果たしていることを示している。また、コラーゲンやアジュバンドを動物に投与することでヒトRAと類似した関節炎を発症させることができ[60-63]、さらにこの動物から得たT細胞をナイーブな動物に移入することによっても関節炎を発症させることができる[61,63-66]ことから、RAの病因にT細胞が深く関与していることは実験動物のレベルでも強く示唆される。

T細胞は特異的な抗原をT細胞抗原レセプター(TCR)を介して認識するが、このレセプターはTCR遺伝子のV-(D)-J-C再構成によって多様性を獲得している。各々のT細胞は特異的な抗原によって活性化され、増殖し、クローンを形成する。しかしながら、ある抗原に対する免疫反応に限定されたT細胞クローンのみが必要とされるのか否かは明らかでない。近年の報告では、RAでのTCRレパトアは限定あるいは偏りがあると言われている[25,28-34]一方、いくつかのグループからはこのような限定はないとも報告されている[35-37]。このようにRAの病変局所におけるT細胞のクロナリティーについては非常に議論のあるところである。これらの矛盾した結果の原因にはT細胞の解析法の違いが影響していることも考えられる。

これらの手法的な問題を解決するために、第2節に述べたT細胞クロノタイプの解析法[27]を用いて患者のRA病変部位に浸潤したT細胞について、病変局所へのT細胞の集積はランダムな免疫反応なのか、それともある抗原によって動かされた反応なのかを検討した。このために、同一の病変滑膜中の異なる2ヵ所についてT細胞クロノタイプを比較し、また同一の患者の多関節についても同様な検討を行った。

1-3-1 実験材料と方法

1) 臨床検体

アメリカリウマチ学会で決定された診断基準[67]に適合したリウマチ患者6名を対象とした。各患者のHLAタイプはTable 5の通りである。その他の臨床データはTable 7に示した。全患者に対してインフォームドコンセントをとって研究を行った。

Table 5. HLA typing of six RA patients.

patient	A Locus	B locus	C Locus	DR Locus	DQ Locus
RA 1	A24(9)	B7, 54(22)	CW1, 7	DR1, 4	DQ1, 4
RA 2	A24(9), 31	B51(5), 48		DR4	DQ3, 4
RA 3	A2, 26(10)	B35, 61(40)	CW1, 3	DR8, 9	DQ1, 3
RA 4	A24(9)	B52(5), 59	CW1	DR15(2), 9	DQ1, 3
RA 5	A24(9)	B52(5), 7	CW7	DR15(2)	DQ1
RA 6	A24(9)	B51(5)	CW1	DR4, 12(5)	DQ3

2) cDNA合成、PCRおよびSSCP法による解析

ヘパリン処理した末梢血および滑液は患者より採取した後、Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Sweden)を用いた密度勾配遠心法でT細胞を含む単核球画分を分離し、直ちにtotal RNAを調製した。関節滑膜は根治的滑膜切除術によって切除された滑膜を細切し、total RNA調製を行った。

これらの細胞からのtotal RNAはacid guanidinium thiocyanate- phenol- chloroform (AGPC) 法[68]に従って抽出した。Total RNAはreverse transcriptase (Superscript; BRL, Gaithersburg, MD)とrandom hexamer oligonucleotide primer (100 pmole; BRL)を用いてcDNAに変換した。次いでcDNAを各primer set (各V β primerとbiotin化したC β primerのset; 各50 pmole; シークエンスはTable 6 [23]に示した)とdNTP、Taq polymerase (Promega, Madison, WI)を用いてPCR[21]を35サイ

Table 6. Oligo nucleotide sequences of the human V β gene segment-specific primers and the human C β gene-specific primer used in this study. The 5' end of the C β primer was biotinylated.

primer	sequence (5'→3')
V β 1	GCACAACAGTTCCTGACTTGCAC
V β 2	TCATCAACCATGCAAGCCTGACCT
V β 3	GTCTCTAGAGAGAAGAAGGAGCGC
V β 4	ACATATGAGAGTGGATTTGTCATT
V β 5.1	ATACT TCAGTGAGACACAGAGAAAC
V β 5.2	TTCCCTAACTATAGCTCTGAGCTG
V β 6	AGGCCTGAGGGATCCGTCTC
V β 7	CCTGAATGCCCCAACAGCTGTG
V β 8	ATTTACTTTAACAACAACGTTCCG
V β 9	CCTAAATCTCCAGACAAAGCTCAC
V β 10	CTCCAAAACTCATCCTGTACCTT
V β 11	TCAACAGTCTCCAGAATAAGGACG
V β 12	AAAGGAGAAGTCTCAGAT
V β 13.1	CAAGGAGAAGTCCCAAT
V β 13.2	GGTGAGGGTACAACCTGCC
V β 14	GTCTCTCGAAAAGAGAAGAGGAAT
V β 15	AGTGTCTCTCGACAGGCACAGGCT
V β 16	AAAGAGTCTAAACAGGATGAGTCC
V β 17	CAGATAGTAAATGACTTTTCAG
V β 18	GATGAGTCAGGAATGCCAAAGGAA
V β 19	CAATGCCCAAGAACGCACCCTGC
V β 20	ACGTCTGAGGTGCCCCAGAATCTC
C β	TTCTGATGGCTCAAACAC

クル行って、TCR β 鎖遺伝子を増幅した。増幅したDNAをdenaturation solution (95% formamide, 10 mM EDTA, 0.1% bromophenol blue, 0.1% xylene cyanol)で希釈後、90 °Cで2分間熱変性し、2 μ lを10% glycerol含有非変性4% polyacrylamide gelで電気泳動を行った[26]。泳動終了後、DNAをナイロン膜(Immobilon-S; Millipore Intertech, Bedford, MA)上に転写し、化学発光法 (Plex Luminescence kit; Millipore Intertech)で検出した[27]。

3) ダイレクトシーケンシング

TCRクロナタイプの位置に相当するSSCPゲルの小片を切り出し、マイクロチューブ中で50 μ lのTE.1 (10 mM Tris HCl/ 0.1 mM EDTA)に浸し、80 °Cで20分加温してDNAを抽出した。抽出液をvortex後、遠心して分離した。この上清5 μ lを用いて55サイクルのsecond PCRを行った。増幅したDNAは限外濾過 (SUPREC-2; Takara Shuzo, Kyoto, Japan)を行いdNTPを除去した後、VentR (exo-) DNA polymerase (New England BioLabs, Beverly, MA)とbiotin化internal C β primerを用いてサイクルシーケンスを行った[69, 77]。シーケンス反応物は6%変性polyacrylamidegelで電気泳動し、ナイロン膜に転写後、化学発光法で検出した。

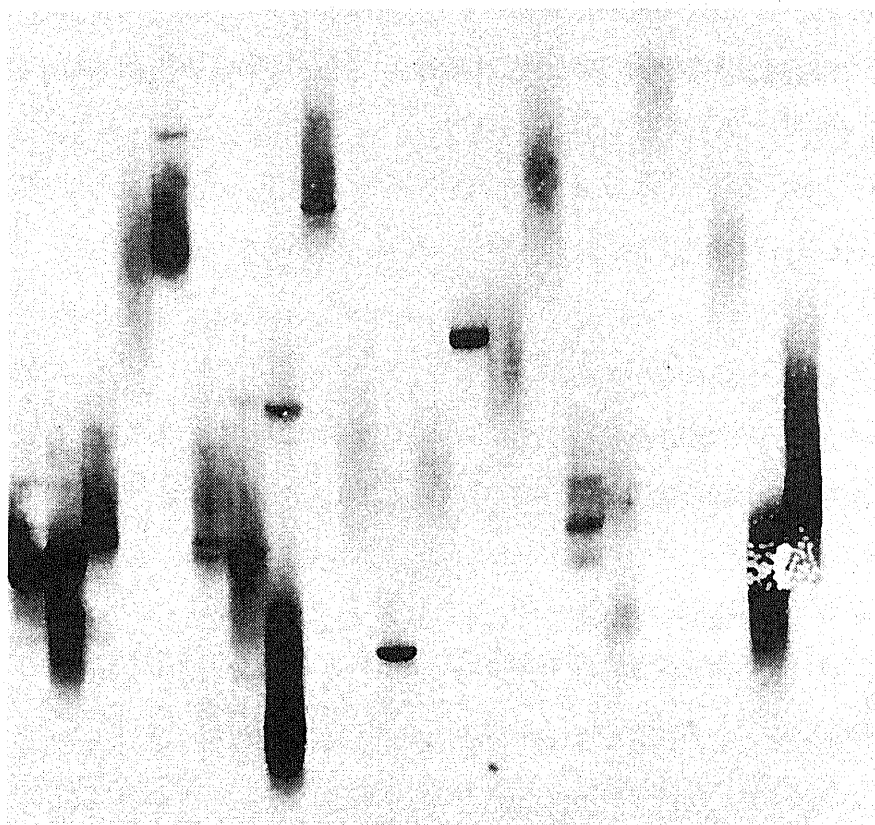
1-3-2 結果

1) T細胞のクローナルな増幅

RA患者の炎症を起こしている関節滑膜には明らかなT細胞の浸潤があることは以前より報告されている[45]。我々もRA患者の病変局所にT細胞クロナタイプが集積していることを報告してきた[27]。さらにこの集積したT細胞クロナタイプの特徴を見るために、同一の滑膜組織の異なる2ヵ所に存在するTCR β 鎖クロナタイプについて比較検討した。

RA患者から採取した末梢血 (PBL)、滑液 (SF) および滑膜 (ST) の典型的なパターンをFig. 13に示した。RA患者では病変局所に顕著なT細胞クロナタイプの集積が見られた。まずPBLについて詳細に見ると、4名の患者(RA3-6)から得られたPBLではSSCP解析を行うと、種々のV β ファミリーでT細胞クロナタイプがスメア-かスメア-上に数本のバンドとして検出された (Table 7)。このスメ

(A) PBL



(B) SF



(C) ST

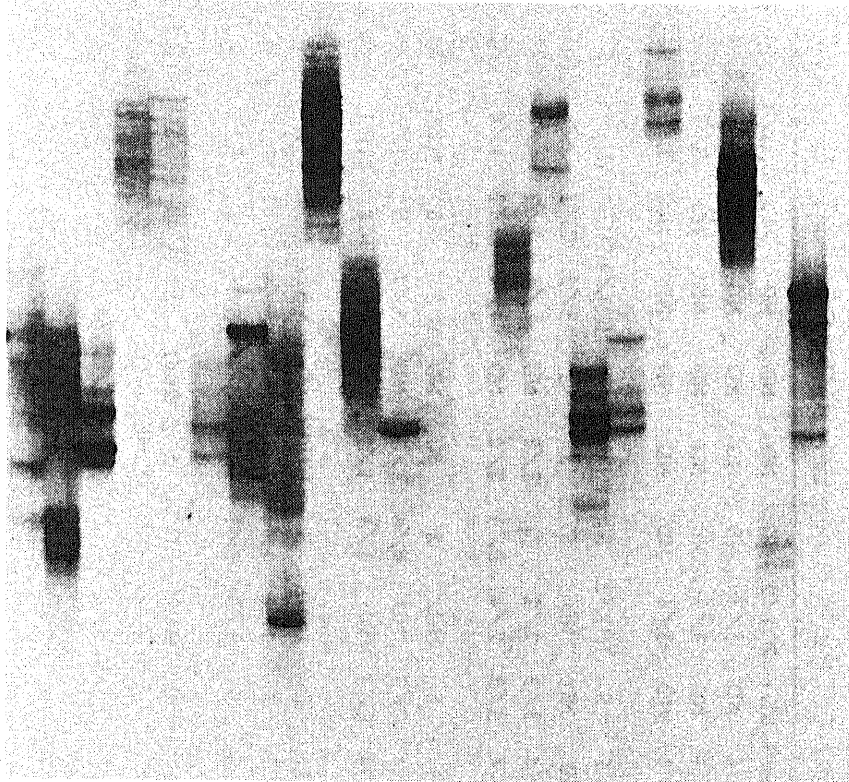


Fig.13. Clonal analyses of TCR V β -chain messages from RA patient. Typical representative patterns of the analysis obtained with a set of primers are presented. (A) PBL, (B) synovial fluid, (C) synovial tissue. From left to right; TCR V β families 1-20.

Table 7. Common T cell clonotypes accumulated in PBL, SF and different portions of affected joints from patients with RA^a.

Pt./joint	age	sex	duration (yrs.)	rheumatoid factor	portion	Numbers of distinct bands																				
						Vβ	1	2	3	4	5.1	5.2	6	7	8	9	10	11	12	13.1						
						C/T	b	c	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T				
RA 1 rt. knee	31	F	2	positive	PBL	1(1)d/4	ND	e	2(2)/2	ND	ND	ND	ND	ND	1(1)/1	S	2(2)/2	0(0)/1	ND	S						
					SF	1/4	ND	3/3	ND	ND	ND	ND	ND	7/8	2/4	6/10	0/1	ND	6/6							
					ST-1	4/4	ND	3/3	ND	ND	ND	ND	ND	7/7	2/2	3/3	S	ND	6/7							
					ST-2	5/5	ND	3/4	ND	ND	ND	ND	ND	7/7	S	6/6	S	ND	2/2							
RA 2 lt. knee	56	F	9	positive	PBL	S	f	1(1)/2	S	1(1)/1	S	1(1)/1	2(1)/2	1(1)/1	S	S	0(0)/1	S	1(1)/1							
					SF	ND	ND	ND	S	S	3/3	2/3	ND	ND	ND	ND	S	ND	S	ND						
					ST-1	4/4	3/3	2/2	S	2/2	ND	4/4	2/2	4/4	1/1	0/1	ND	S	2/2							
					ST-2	4/4	3/3	2/4	0/3	2/2	ND	4/4	2/2	4/4	1/2	ND	S	2/2								
RA 3 lt. elbow	48	F	17	positive	PBL	S	S	ND	S	S	ND	S	S	1(1)/1	S	1(1)/1	S	ND	ND	S						
					ST-1	4/4	2/3	ND	4/4	1/1	ND	5/7	S	1/1	4/4	S	0/1	3/3	S							
					ST-2	4/4	2/2	ND	4/4	1/2	ND	5/6	S	1/1	4/4	ND	ND	3/3	S							
RA 4 rt. knee	62	F	20	positive	PBL	S	S	1(0)/2	S	1(1)/1	S	S	0(0)/1	S	S	3(2)/3	S	ND	S							
					ST-1	3/3	S	1/6	1/1	3/3	2/3	5/6	0/1	2/2	S	ND	S	S	1/1							
					ST-2	3/3	S	1/3	1/1	3/6	2/2	5/5	0/1	2/2	S	0/2	0/1	S	1/3							
RA 5 lt. elbow	62	F	25	negative	PBL	S	0(0)/2	0(0)/1	S	S	0(0)/1	S	S	1(1)/1	S	1(1)/1	S	1(1)/1	ND	S						
					ST-1	2/9	ND	5/5	7/8	3/3	1/2	5/5	7/7	3/4	3/3	3/7	4/6	ND	3/3							
					ST-2	2/5	0/5	5/6	7/7	3/4	1/2	5/6	7/8	3/6	3/3	3/3	4/9	0/2	3/3							
RA 6 rt. elbow	49	F	14	negative	PBL	S	S	S	2(1)/2	S	1(1)/1	S	S	S	S	S	S	S	ND	S						
					ST-1	0/2	S	S	3/3	S	1/1	S	S	S	S	1/2	2/2	S	S							
					ST-2	S	S	S	3/3	S	1/1	S	S	S	S	1/1	2/2	ND	S							

continues

Pt/joint	portion	Vβ	13.2	14	15	16	17	18	19	20	Total	% g
		C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	
RA 1	PBL	2(2)/2	3(3)/3	2(2)/2	2(2)/2	ND	1(1)/1	2(1)/1	2(1)/2	2(2)/2	20(19)/24	83.3(95.0)
rt. knee	SF	3/3	5/5	4/4	5/5	ND	4/4	3/4	3/4	5/5	54/66	81.8
	ST-1	1/1	3/3	3/3	4/4	ND	4/4	3/3	3/3	3/3	46/47	97.9
	ST-2	3/4	5/5	4/4	5/5	ND	2/2	2/7	2/7	5/5	49/56	87.5
RA 2	PBL	S	2(2)/2	1(1)/1	1(1)/1	ND	0(0)/1	1(1)/1	1(1)/1	1(1)/1	13(11)/16	81.3(84.6)
lt. knee	SF	S	1/1	ND	ND	ND	S	S	S	S	6/7	85.7
	ST-1	S	3/5	2/2	1/1	ND	S	1/1	1/1	7/8	38/42	90.5
	ST-2	0/1	3/4	2/3	1/3	ND	S	1/1	1/1	7/9	38/51	74.5
RA 3	PBL	ND	1(0)/2	ND	S	S	S	ND	ND	0(0)/1	2(1)/4	50.0(50.0)
lt. elbow	ST-1	4/4	6/7	ND	2/2	S	ND	ND	ND	ND	36/41	87.8
	ST-2	4/7	6/8	ND	2/2	ND	ND	ND	ND	ND	36/43	83.7
RA 4	PBL	S	S	S	S	ND	ND	ND	S	2(0)/2	7(3)/9	77.8(42.9)
rt. knee	ST-1	S	5/5	0/7	4/4	S	3/3	ND	ND	0/2	30/47	63.8
	ST-2	S	5/5	ND	4/5	S	3/3	ND	ND	ND	30/42	71.4
RA 5	PBL	1(1)/1	S	ND	S	S	S	ND	ND	S	3(3)/7	42.9(100)
lt. elbow	ST-1	5/7	6/7	3/6	5/7	S	2/5	1/3	S	S	68/97	70.1
	ST-2	5/5	6/8	3/6	5/7	S	2/8	1/3	S	S	68/106	64.2
RA 6	PBL	S	1(1)/1	S	0(0)/1	ND	S	ND	ND	S	4(3)/5	80.0(60.0)
rt. elbow	ST-1	3/3	2/3	1/1	2/3	0/1	0/2	ND	ND	5/5	20/28	71.4
	ST-2	3/3	2/2	1/1	2/2	ND	S	ND	ND	5/5	20/20	100

a. Numbers of distinct bands are presented.

b. C/T ; numbers of common bands / numbers of total bands.

c. Common bands represent the bands which exist in more than 2 portions.

d. (.) ; numbers of bands identical with common bands in ST-1 and ST-2.

e. ND ; neither smear nor distinct bands are detected.

f. S ; smear

g. % of common T cell clonotypes

ア一様のパターンは健常人のPBLを解析した場合に得られたパターンと同様であった(data not shown)。残りの2名の患者(RA1とRA2)ではより多く(～20本)のバンドが検出された(Table 7)。臨床的特徴を比較すると、PBL中にバンド数の多い患者の方がスミア一様パターンを示した患者よりもRA罹患年数が短かった。しかしこの相関を確認するにはさらに多くの患者について検討する必要がある。

同様の解析をRAの滑液および滑膜について行った。病変局所ではPBLと比べてより多くの数のバンドが検出され、滑膜では検討した6例全例の患者で約20-100本のはっきりとしたバンドが検出され(Table 7)、滑液では1例で多数のバンドが検出された。集積したT細胞クロノタイプのV β 遺伝子ファミリーの使用については偏りは認められなかった。

興味深いことに、同じ滑膜の異なる2ヵ所より採取した検体を比較するといくつかのT細胞クロノタイプはSSCPゲル上で同一の移動度を示した(ST1とST2; Fig. 14)。この現象は検討した全ての患者のほとんど全てのV β 遺伝子について検出された(Table 7)。この同一の移動度を示すT細胞クロノタイプのTCR β 鎖遺伝子は同じシーケンスを示すことが予想されたので、塩基配列を検討した。

2) 増幅したT細胞クロノタイプTCR遺伝子の塩基配列の決定

SSCPゲル上で検出された集積したT細胞クロノタイプの塩基配列について解析した。分離されたT細胞クロノタイプに相当する部分のDNAをSSCPゲルより抽出し、PCRによって増幅した。PCR産物を精製後、cycle sequencing法で塩基配列を決定した。Fig. 15Aに示したように、各々のSSCPゲル上で分離されたバンドは明確なシーケンシングパターンを示し、ゲル上の1本のバンドは1つのクローンに相当することが示唆された。さらに異なる移動度を示したクロノタイプについても塩基配列決定を行ったが、同様の結果であり、SSCPゲル上で同一の移動度を示すT細胞クロノタイプのバンドは同じ塩基配列を持つことが示された。SSCP上で異なる移動度を示すバンドは異なるクローンであった(Fig. 15B)。このことはSSCPゲル上で同一の移動度を示すTCR β 遺伝子は同一のクロノタイプであることを表わした。またSSCPゲル上でスミア一様な部分では明確なシーケンスパターンは得られないことから(Fig. 15A)、スミア一様な部分ではTCR遺伝子が

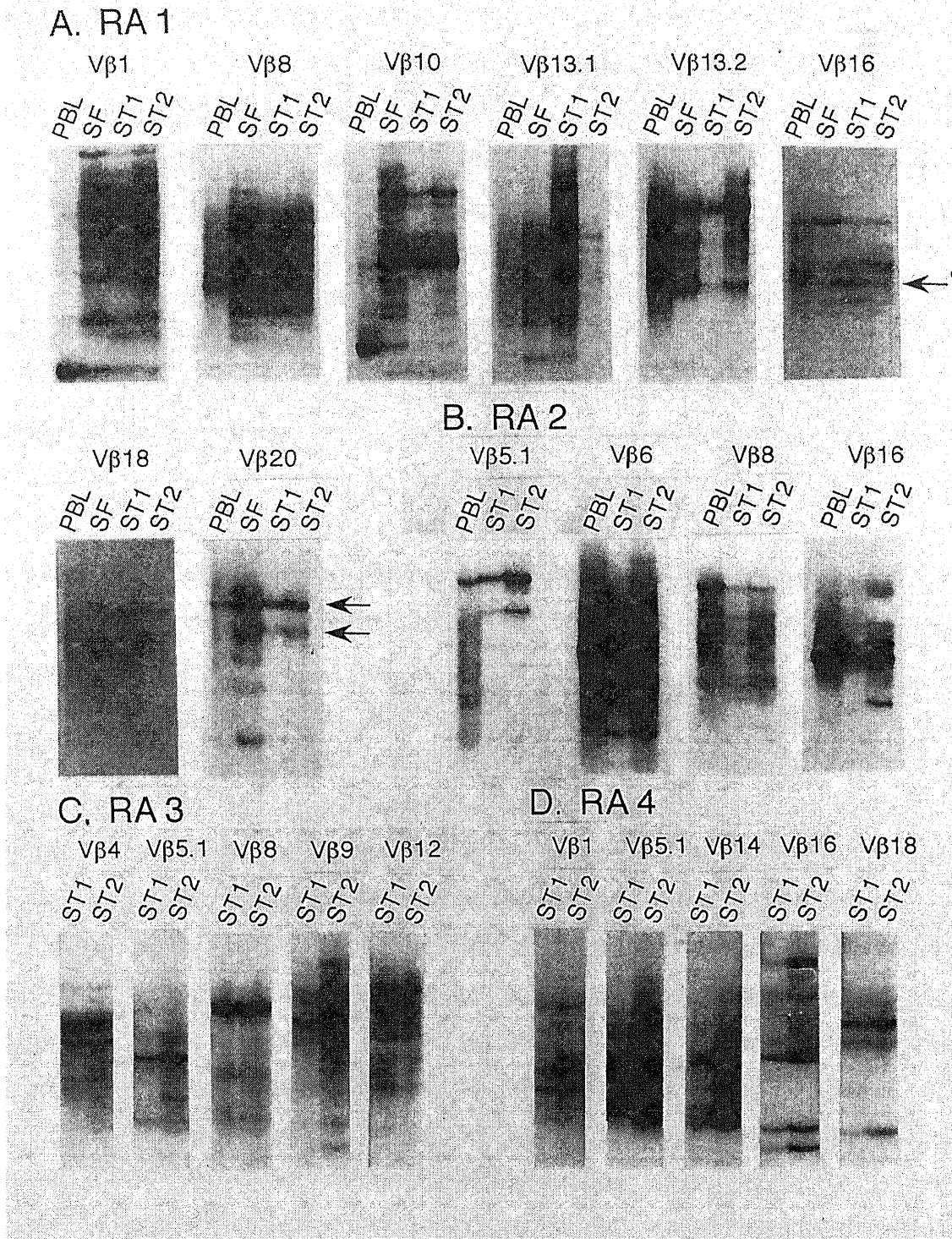


Fig. 14. Clonal analyses of T cells from RA patients. A, PBL, synovial fluid (SF) and 2 different portion of the same synovial tissue (ST) sample from patient RA1. B, PBL and 2 different portions of the same ST from patient RA2. C and D, Two different portions of the same ST from patient RA3 and RA4. Arrows show the bands used for direct sequencing in Fig. 15.

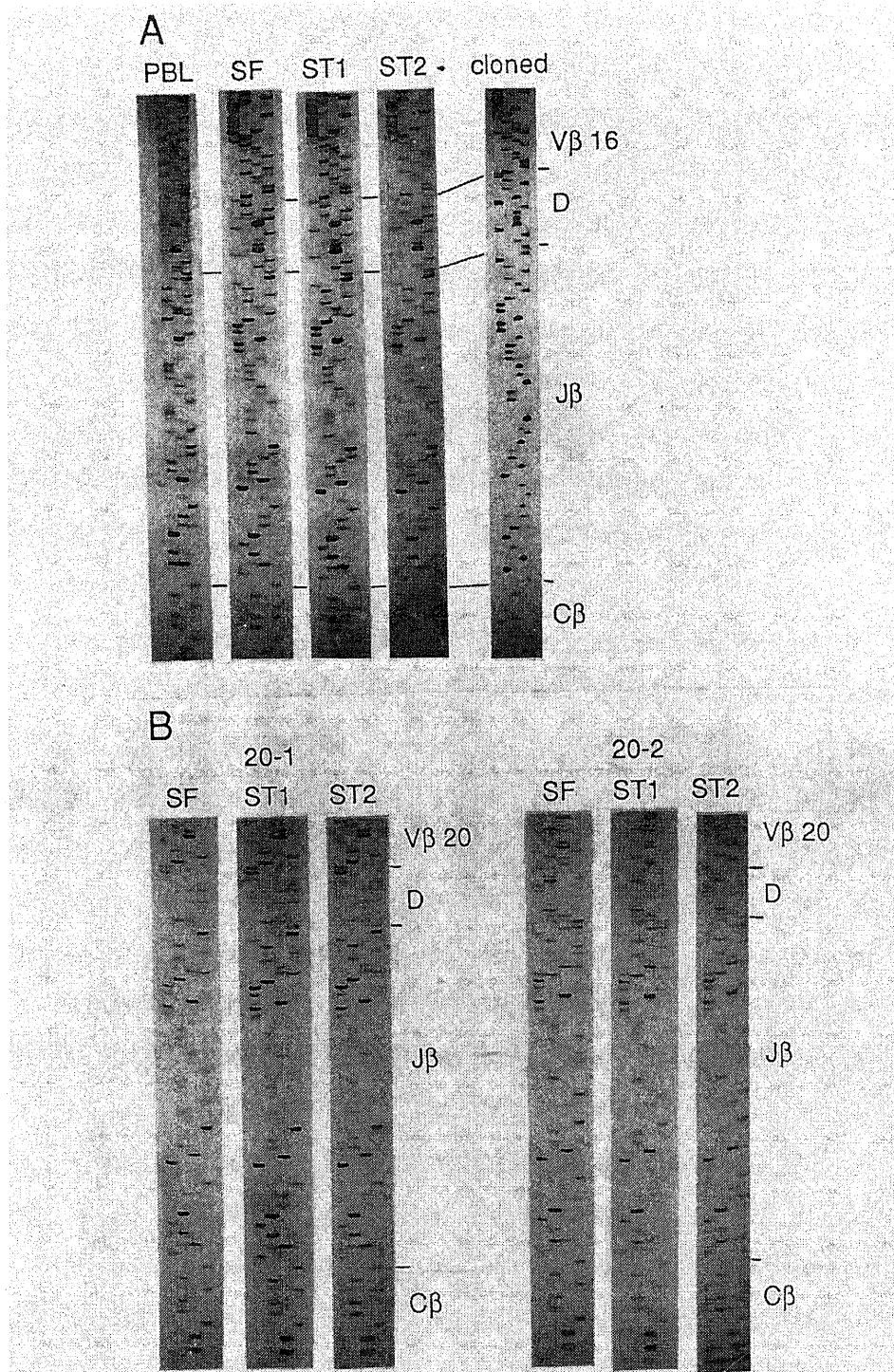


Fig. 15. Direct sequencing of accumulated T cell clonotypes. T cell clonotype messages detected in the SSCP gel were extracted and subjects to a second amplification by PCR. The amplified DNA was subjected to sequencing by the cycle-sequencing method. A, Sequencing patterns of accumulated T cell clonotypes with identical mobility in SSCP gels: PBL, SF and 2 different portion of the same ST from patient RA1 (as indicated by arrow in Fig.14A[Vβ16 analysis]). B, Sequencing patterns of accumulated T cell clonotypes with different mobilities: SF and 2 different ST samples from patient RA1 (see Fig. 14A[Vβ20 analysis]; clone 20-1 is indicated by the upper arrow and clone 20-2 is indicated by the lower arrow).

多様性に富んでいることを反映していると考えられた。他の患者検体においても同様の結果であった(data not shown)。

3) RA病変局所に共通に存在するT細胞クロノタイプの検討

同じ患者の病変滑膜の異なる2ヵ所で増幅しているT細胞クロノタイプ数を比較した。Table 7にまとめたように、20-100個のdominantなV β クローンの集積が各患者のそれぞれの滑膜で認められた。全患者の各々の関節の異なる部位で増幅したT細胞クロノタイプの60-100%が同一の移動度を示した。このことは60-100%のT細胞クロノタイプが両方の部位に共通に存在していることを表わしていた。また興味あることには、患者RA1とRA2のPBLで検出されたバンドの80-90%は同一の患者の病変滑膜で見られたのと共通のT細胞クロノタイプであった。

4) RA病変局所に共通に存在するT細胞クロノタイプの第3相補性決定領域のアミノ酸配列の検討

病変局所に共通して存在するT細胞クロノタイプの特徴を検討するために、患者RA1に共通に存在するT細胞クロノタイプが発現しているTCR β 鎖のCDR3領域のアミノ酸配列について検討した。塩基配列より推定したアミノ酸配列をTable 8に示した。CDR3領域に高頻度のグリシン残基の存在を認めたが、明確なモチーフは認められなかった。しかしながらJ β 2.1遺伝子が最も多く使用されていることが認められた(13クローン中7クローン)(Table 8)。J β 2.1遺伝子の使用頻度の上昇は検討したもう1例の患者でも同様に認められた(data not shown)。

5) RA患者の病変多関節間に共通に存在するクロノタイプの検討

RAの特徴として多関節の腫脹、対称性腫脹が挙げられる。すなわち左右の対称部位に同様の関節病変が認められる。そこで多関節滑膜切除術を行った患者より得られた複数箇所有病変部位に浸潤したT細胞クロノタイプについて検討した。その結果、Fig. 16に示したように多関節間に共通に存在するクロノタイプの存在が認められた。

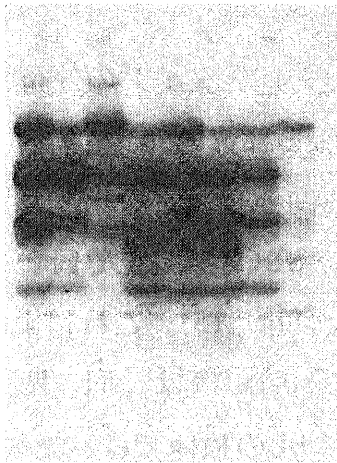
Table 8. Predicted amino acid sequences from accumulated T cell clonotypes in the affected joint of patient RA1.

clone	V β	N-D-N	J β	J β segment
1A	SALYFCAS	STGSTI	NTEAFFGQGTRLTVV	1.1
10B	FCAS	SLGEG	TEAFFGQGTRLTVV	1.1
13.2A	FCAS	SYSPL	NTEAFFGQGTRLTVV	1.1
13.2B	SVYFCAS	LGTAPFR	ELFFGEGSRLTVV	2.2
14A	TSLYFCA	VGS	SYNEQFFGPGTRLTVL	2.1
14B	TSLYFCA	AMGRRS	GELFFGEGSRLTVL	2.2
15A	FCAT	SGGRGP	YNEQFFGPGTRLTVL	2.1
15B	LYFCAT	APGLAA	NEQFFGPGTRLTVL	2.1
16A	FCAS	AQVRAP	YNEQFFGPGTRLTVL	2.1
18A	YFCAS	SLGQGTA	NEQFFGPGTRLTVL	2.1
20A	SGFYLCAW	SLRP	NEQFFGPGTRLTVL	2.1
20B	SGFYLCA	SWLG	TEAAFFGQGRTRYVL	2.1
20C	FYLCAW	SGRAW	HEQYFGTGRTVT	2.7

1-3-3 考察

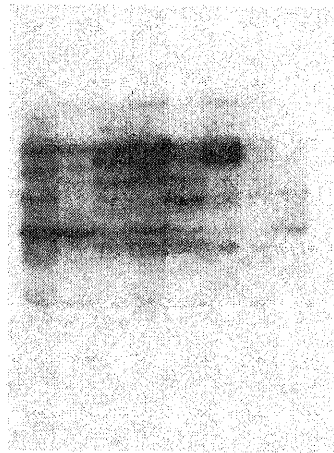
我々は最近RA患者の滑膜組織にクローナルに集積したT細胞の検出をSSCP法を用いることによって成功した[27]。抗原特異的免疫反応は、TCRやCD28のようなその他のアクセサリー分子[71,72]によって活性化されて増殖したT細胞を介して起こると言われており、滑膜でのクローナルなT細胞の増幅も抗原刺激によって引き起こされたと考えられる。実際にPBLをpurified protein derivative (PPD)で刺激してクローナルなT細胞の増幅を起こした場合、SSCP解析ではシャープなバンドとして検出された。これに対し、phytohemagglutininのようなマイトージェン刺激を行った場合にはスメアー様のバンドとして検出された[27,44]。さらに混合性結合組織病(MCTD)の患者末梢血で増幅しているT細胞クローノタイプのいくつかはMCTDの自己抗原であるU1-snRNP A proteinに特異的であった[38]。そのうえ、増幅した癌浸潤性T細胞クローンが転移したリンパ節でも検出されたことから、このT細胞クローノタイプが癌特異的であることが示唆された(第1章第

Vβ1



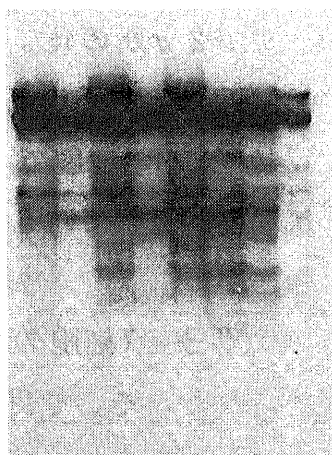
1 2 3 4 5 6 7 8

Vβ4



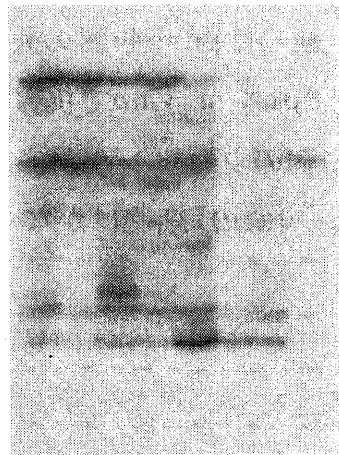
1 2 3 4 5 6 7 8

Vβ8



1 2 3 4 5 6 7 8

Vβ14



1 2 3 4 5 6 7 8

Fig. 16. Comparison of the T cell clonotypes among the different joint samples from patient with RA. 1, left ankle-1; 2, left ankle-2; 3, right ankle-1; 4, right ankle-2; 5, left PIP-1; 6, left PIP-2; 7, left elbow-1; 8, left elbow-2.

4節)[73]。もちろん、これらのデータは抗原非特異的なファクター、例えば接着分子などを介した活性化T細胞の増幅やランダムな浸潤などを巻き込んでいる可能性を残している。

もし滑膜組織内でT細胞がランダムに活性化され、増殖しているならば、同一関節内であっても異なる2ヵ所の部位でのT細胞クロノタイプの分布は異なることが考えられたため、同一関節内の異なる2ヵ所の部位のT細胞クロノタイプを検討し、RAの病変局所へのT細胞の集積が滑膜に関連した抗原刺激に因るものなのかを検討した。シーケンス解析の結果より、SSCPゲル上で同一の移動度を示すバンドは同一クローンであることが示された(Fig. 15)。これによると、RA患者の病変滑膜で増幅したT細胞クロノタイプの60-100%は、同一関節の異なる2ヵ所で共通に存在していた(Table 7)。さらにPBLの検体では、増幅したT細胞クロノタイプの40-100%が、滑膜で検出されたT細胞クロノタイプと共通であった。また1例であるが、多関節間で比較した場合にも共通に存在するT細胞クロノタイプが検出された。これらのことは共通の抗原によってT細胞のクローナルな増幅が起き、それらのうちのいくつかのT細胞は全身を循環していることが示唆された。

今回の実験では約30-40個の共通するT細胞クローンが2ヵ所の異なる部位に認められた。PBLを*in vitro*で抗原複合体であるPPDとIL-2の存在下で1週間培養すると、50個弱のクローンが得られた[44]。このことから、RA滑膜で共通に存在している30-40個のT細胞はかなり限定された数の抗原を認識していると考えられた。

興味深いことに同一検体の異なる部位から得られた共通のT細胞クロノタイプは、TCR β 遺伝子のCDR3領域に共通の特徴が認められた。そこでTCRV β 遺伝子について塩基配列を決定し、これよりアミノ酸配列を推定した。患者RA1ではTable 8に示したようにCDR3領域に3つの共通モチーフが存在する可能性がある。これらはG-X-G, LGおよびGRであるが、グリシン残基が多いのはすべてのTCRのCDR3領域の特徴でもある。これら3つのモチーフは多発性硬化症[74]や実験的アレルギー性脳脊髄炎[75-78]で見られる優位なクローンの配列とも異なっていた。さらにこれらのT細胞ではTCRのJ β 2.1遺伝子の使用頻度が高かった(13クローン中7クローンが使用)。このようにCDR3領域の配列のみならず、J β 遺伝子

の使用頻度にも偏りがあり、RA病変部位で共通に存在しているT細胞クロナタイプはかなり限定された抗原を認識していることが示唆された。

6名の患者のHLA-haplotypeを見てみると6人中3人はHLA-DR4を持っていたが、残りの3人はHLA-DR1, DR15(2), DR8あるいはDR9であった。このことはクローナルなT細胞の増幅は特定のHLAに依存していないことを示している。さらに集積したT細胞クロナタイプは、種々のV β 遺伝子を使っていたことより、スーパー抗原の影響はほとんどないか、あったとしてもわずかであると考えられた。

1-3-4 要約

慢性関節リウマチ患者におけるTCRクロナタイプについてRT-PCR/SSCP法を用いて検討した。慢性関節リウマチ患者より末梢血、関節滑液あるいは関節滑膜組織を採取し、検体中に存在するT細胞クロナタイプについて解析した。滑膜組織において顕著なT細胞の集積と、限定されたT細胞のクローナルな増幅が認められた。さらにSSCP解析の結果、同一の移動度を示すバンドが同じ罹患関節の異なる部位より検出された。これらのバンドについて塩基配列を決定したところ、同一の移動度を示すバンドは同一の塩基配列を示したことより、同じクローンであることが判明した。6名の患者についてSSCP解析したところ、集積したクローンの60-100%が異なる2つの部位で同一の移動度を示した。このことはT細胞クロナタイプが罹患関節内で共通に存在することを示した。また多関節間で共通に存在するT細胞クロナタイプも検出された。これらの増大したT細胞クロナタイプのTCR β 鎖ではJ β 2.1の遺伝子が優位に使われていた。J β 遺伝子は抗原認識に重要な役割を果たす部位であることから、この遺伝子が優位に使われたことはかなり限定された抗原が関与している可能性を示した。これらの結果より、慢性関節リウマチの患者の中で起きている免疫反応はランダムではなく、かなり共通な刺激によって起こされていることが判明した。

第4節 健常人およびサルコイドーシス患者の肺に集積したT細胞クロノタイプの解析

サルコイドーシスは、全身性非悪性疾患で、未知の抗原に対する免疫反応がこの疾患の発症に重要な役割を果たしているのではないかと推測されている[79-89]。少なくとも90%のサルコイドーシスの患者には肺症状が見られる[80]。肺ではサルコイドーシスの病変局所でリンパ球の活性化や増幅が起こり[90]、疾患の活動度と肺中のT細胞の増殖が相関している[81]。これらのことより限定されたTCRレパトアを持ったT細胞がこの疾患に重要な役割を果たしていると考えられている。サルコイドーシスの肺においてのV遺伝子レパトアについてはいくつかの報告がなされている[91-97]が、これらの結果はそれぞれの報告で一致していない。さらに、V遺伝子のレパトア使用頻度については患者の一部でしか行われておらず、全患者については解析されていない[91,93,95]。

もう一つの問題点は方法論的限界である。今までのTCRのV遺伝子の使用頻度の検討では、V β 8やV γ 9などといったあるV遺伝子ファミリーに対するモノクローナル抗体あるいは各V β ファミリーの特異的なprimerのセットを用いたPCRなどが行われてきた[91-97]。これらの方法ではモノクローナル抗体およびsense primerはV遺伝子中の限られた領域、通常はCDR2領域にしか認識あるいは反応できず、N、D、Jなどの他の領域の微妙な変化が検出できなかった[91-97]。このため、TCR V遺伝子のクローンレベルでの解析は進んでいなかった。

そこで、最近開発したT細胞ポピュレーション中のT細胞クロノタイプの検出法[27]を用いて、健常人と活動期のサルコイドーシス患者の肺のT細胞においてT細胞クロノタイプを検討した。その結果、ある種のファミリーには限定されないV β 遺伝子を持ったかなりの数のT細胞が健常人の肺でも観察され、このクローナルな増幅はサルコイドーシス患者の肺でより多様にそして激しく認められた。

1-4-1 実験材料と方法

1) 臨床検体

肺バイオプシーおよび気管支肺胞洗浄を含む診断基準[79-82,87]に基づき診断された肺サルコイドーシス患者7名より検体を採集した。このうち6名は肺のX

線撮影所見より肺門リンパ節腫脹を伴った広汎性の肺実質の病変が認められ、1名は葡萄膜炎を起こしていたが、X線撮影からは肺には異常は認められなかった。肺実質における非乾酪化類上皮細胞の肉芽腫は経気管支肺バイオプシーによって全例で認められた。⁶⁷Gaスキャンを行った5例では全例とも陽性であった。気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage: BAL)と血液は患者のサルコイドーシスの診断のための検査時に採取したものを使用した。患者群の特徴をTable 9に示した。尚、この研究以前にはどの患者もコルチコステロイドや他の免疫抑制剤は使用していなかった。コントロールとして、今までに通常の検査では過去に肺病歴がなく、正常な肺X線所見を示した健常人5人を用いた。これらの健常人は研究前の2ヵ月は上気道および下気道に感染を起こしてはいなかった。全患者およびボランティアに対してはインフォームドコンセントをとって行った。

2) BALと血液検体の単離

BALは通常の方法[98]を若干改良した方法により調製した。簡潔に述べると、37°Cに加温した滅菌生理食塩水を初め20 ml、ついで50 mlで3回(全量170 ml)を気管支ファイバースコープ(Olympus type BF20, オリンパス株式会社、東京、日本)を用い、右B5領域に灌流し、灌流終了後直ちにゆっくりと灌流液を吸引して回収した。最初の20 mlは気管支洗浄液とは別に保存し、解析には使用しなかった。50 ml 3回の洗浄より得られた細胞は、滅菌ガーゼで濾過して残滓を除き、1500 rpmで10分間遠心し回収し、さらにHBSS (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD)で2回洗浄した。細胞数を計算した後、一部をフローサイトメーターで解析した。2x 10⁵細胞を各モノクローナル抗体(Leu 4, 3aおよび2a)で処理した。Table 9で示したようにサルコイドーシスの患者では、総細胞数、リンパ球の割合、およびCD4/CD8の比率が上昇していた。フローサイトメーター解析において残ったBAL細胞(≤10⁶)を次の実験に用いた。PBLはFicoll-Hypaque密度勾配遠心法で分離し、直ちに実験に用いた。

3) PCR増幅およびSSCP解析

細胞からのtotal RNAはAGPC法[68]で調製した。RNA(1-4 μg)は200 Uのreverse transcriptase (SuperScript, GIBCO BRL)とrandom hexamer oligonucleotide

Table 9. Characteristics of study populations^a

	Healthy controls (n=5)	Sarcoidosis patients (n=7)
Age (years)	32.8 ± 7.5	45.0 ± 6.5
Sex	F2, M3	F6, M1
Smoking	S2, NS3	S3, NS4
% VC (% predicted value)	98.3 ± 3.7	86.3 ± 10.0
FEV1%	86.3 ± 3.1	80.5 ± 3.9
PaO ₂ (mmHg)	98.1 ± 10.6	80.6 ± 6.8 ^b
PaCO ₂ (mmHg)	44.3 ± 1.0	42.2 ± 0.5
Chest radiograph		
Bihilar adenopathy	0	6
Parenchymal involvement	0	6
ACE (IU/ ml)	ND	25.0 ± 3.5
BAL analysis		
Total cell count (x 10 ⁵ / ml)	1.9 ± 0.5	3.1 ± 0.6
differentials (%)		
Macrophage	85.0 ± 3.6	59.5 ± 6.8
Lymphocyte	11.3 ± 1.6	35.7 ± 6.3 ^b
Neutrophil	2.8 ± 2.0	3.0 ± 1.7
Eosinophil	0.9 ± 0.2	1.9 ± 0.7
CD4/ CD8 ratio	0.77 ± 0.2	11.8 ± 5.4 ^c

^a Data are shown as mean value ± SEM

^b *P*<0.05

^c *p*<0.01

VC, vital capacity

primer (100 pmol, GIBCO BRL) を用いて42 °Cで2時間反応してcDNAに変換した。2%のcDNAを各V β primerとbiotin化C β primer (50 μ molずつ) のセットとそれぞれ混合し、200 μ M dNTPと1 U Taq polymerase (Promega Co., Madison, WI)の存在下で35サイクル (94 °C 1.5分、60 °C 2分、72 °C 3分) Perkin-Elmer Cetus thermocycler (Norwalk, CT) でPCRを行った。増幅したDNAはdenaturation solution (95% formamide, 10 mM EDTA, 0.1% bromophenol blue, 0.1% Xylene cyanol)で1/20に希釈し、90°Cで3分間熱変性を行った。希釈した検体2 μ lを10%グリセロールを含有した非変性5% polyacrylamide gelで電気泳動した。ゲルは35W定電力で2時間泳動した。泳動後、DNAをナイロン膜 (Immobilon-S, Millipore Inter-tech, Bedford, MA)に転写し、streptavidin, biotin化alkaline phosphataseおよび化学発光基質(Plex Chemiluminescence kit, Millipore Intertech)を用いて検出した。X線フィルムに検出されたバンド数は3人によってそれぞれ計数し、結果について合意するまで討議した。

4) 統計解析

2グループ間のデータについてStudentのt-testとnon-t-testで解析した。p値が0.05以下を統計学的に有意と判定した。

1-4-2 結果

1) 健常人コントロールにおけるT細胞クロノタイプの解析

PCR-SSCP解析の結果をFig. 17およびTable 10に示した。明確なバンドはT細胞集団の中で増幅しているT細胞クロノタイプを表わしていた。健常人のPBLでは10から40本の明確なバンドが得られた。これらのバンドは10個以上のV β ファミリーにわたっており、特定のV β への偏りも見られなかった。このグループでの明確なバンド数の平均は 25.3 ± 7.2 (平均 \pm 標準誤差)であった。健常人のBALではPBLよりもずっと多くのT細胞クロノタイプの集積がほとんどすべてのV β ファミリーにわたって見られた。健常人BAL中のバンド数の平均は 62.8 ± 5.2 であった。このグループにおいてPBLとBAL中T細胞のバンド数について明らかな違いが認められた($p < 0.01$)。

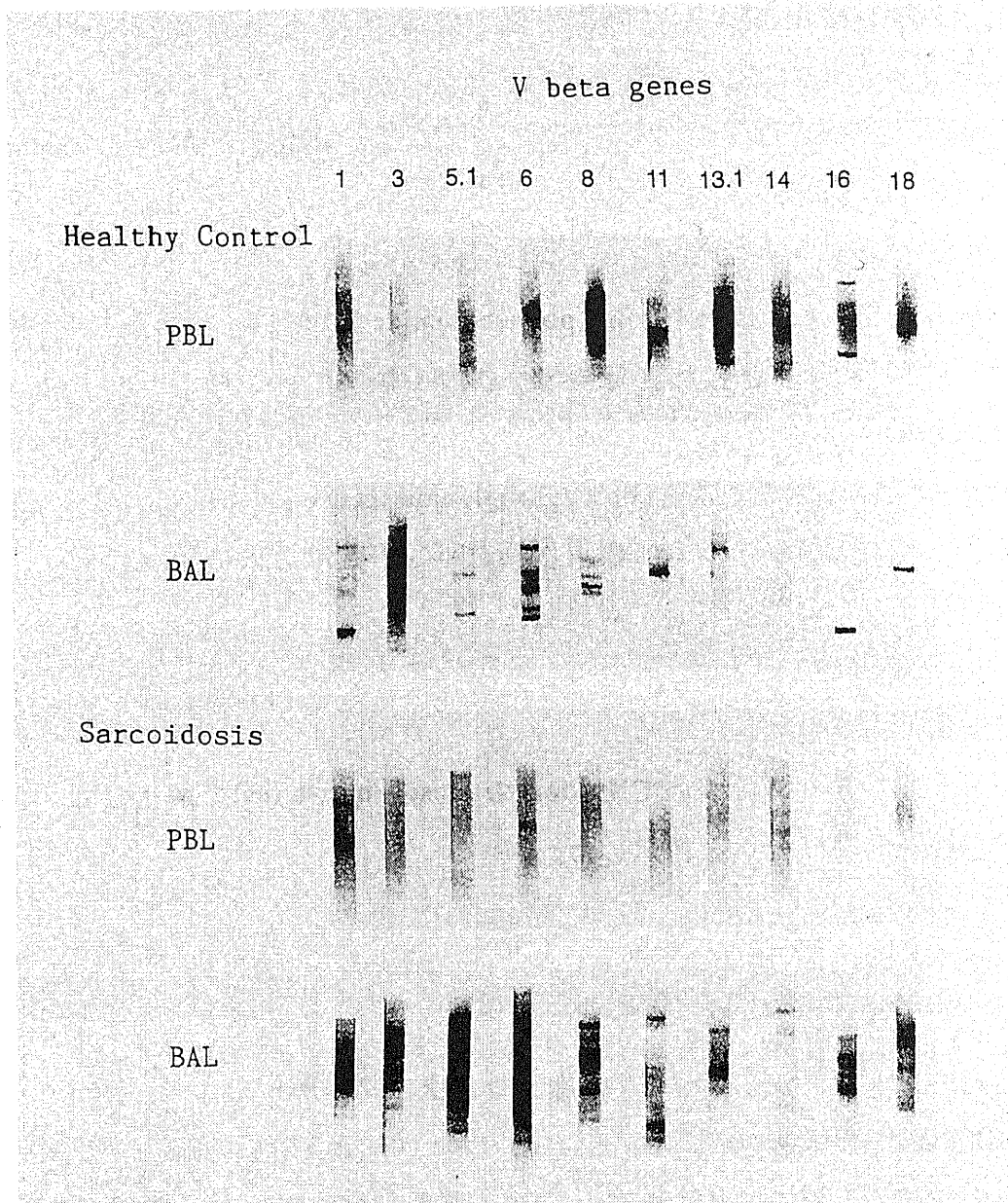


Fig. 17. Clonal analysis of TCR β chain messages. PCR-amplified DNAs were denatured and electrophoresed in a non-denaturing polyacrylamide gel as described in materials and methods. Typical representative patterns of the analysis obtained with a set of primers are presented. Samples from healthy control are from control No. 3 and samples of sarcoidosis are from patient No. 4 in Table 10, respectively.

Table 10. Clonotype analysis of TCR V β messages in PBL and BALF T cells from Healthy individuals and patients with pulmonary sarcoidosis^{a,b}.

V β	1	2	3	4	5.1	5.2	6	7	8	9	10	11	12	13.1	13.2	14	15	16	17	18	19	20	Total	
Control																								
PBL																								
1							1			1			1						1				4	10
3	3	2	2	1	2	2	2	1	1	2	2	3	3	2	3	3	4		4	1	2	4	4	40
4	2	1	3	1	2	1	2	3	ND ^c	2	2	2	1	2	2	1	2				ND	3	3	28
5			1	2		1	1	3	3	1	2	2	2	1	1	1	1		1	1	2	2	2	23
Mean \pm SEM																								25.3 \pm 7.2
BALF																								
1	4	1	3	3	3	1	2	4	5	2	3	3	5	2	4	4	4	5	1	4	6	4	4	73
2	3	4	3	1	4	4	4	4	4	4	3	1	6	2	2	2	3	4		4	ND	4	4	54
3	4	1	7	2	3	1	5	4	4	4	2	1	1	5	2	4	2	2	1	1	2	5	5	59
4	2		ND	2	5	3	2	1	2	4	3	2	10	2	2	2	ND	4		4	ND	3	3	51
5	1	2	1	3	6	3	7	1	6	6	4	2	2	3	2	4	3	4	1	8	3	5	5	77
Mean \pm SEM																								62.8 \pm 5.2
Sarcoidosis																								
PBL																								
1	ND	1	2	2	ND	3	3	1	2	2	ND	3	3	3	3	1	5	3	3	4		6	6	42
2	1	1	1	2	1	2	2						ND		4			3	ND	3		ND	5	5
3	3	2	1	2	2	2	1	1	1	2	1	1	2	2	4			3	ND	3		2	2	26
4	2	1	3	1	1	1	1	2	2	2	2	ND	ND	1	5		ND			2	2	2	2	22
5	1	2	2	2	1	1	5	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1	2	ND	1	ND	2	2	28
6															2									5
7	2	2	1	4	4	4	3	2	2	3	1	1	1	2	2	2	3	1	1	1	3	4	4	47
Mean \pm SEM																								25.0 \pm 6.2
BALF																								
1	6	5	4	7	7	9	8	ND	ND	3	9	4	ND	3	4	7	7	8	3	10	6	12	12	122
2	6	4	4	6	3	ND	5	2	5	6	7	7	3	4	5	4	4	5	ND	3	ND	ND	ND	83
3	7	4	5	6	5	5	7	4	5	6	4	6	1	3	5	8	ND	4	ND	6	5	ND	ND	96
4	2	4	6	7	6	2	5	4	5	6	2	5	4	3	3	4	3	6	2	3	3	4	4	89
5	3	2	3	6	3	2	10	7	5	4	7	6	ND	4	4	7	1	2	ND	6	ND	8	8	90
6	3	4	3	6	3	7	2	2	6	3	6	3	2	3	5	2	3	5	1	3	3	5	5	78
7	2	4	ND	4	5	ND	7	5	ND	3	3	ND	ND	6	4	ND	5	4	2	7	5	6	6	72
Mean \pm SEM																								90.0 \pm 6.6

^a Numbers of distinct bands are presented.

^b Open space represents smears.

^c ND, neither smear nor distinct bands are detected.

2) 肺サルコイドーシス患者におけるT細胞クロノタイプ解析

サルコイドーシス患者の末梢血における解析では、健常人と類似したパターンの明確なバンドの集積が見られた。バンド数の平均は 25.0 ± 6.2 であった。しかしPBLに比較して顕著なバンド数の増加が、すべてのV β ファミリーにわたってBALのT細胞で認められた。特定のV β 遺伝子やコントロールに対する特異的なバンドの優位性は認められなかった(Table 10)。バンド数の平均値は 90.0 ± 6.6 であり、PBLと肺中T細胞間で統計学的に明らかな違いが認められた($p < 0.01$)。

4) 健常人とサルコイドーシス患者間でのクロナリティーの相違点

各群におけるPBLとBAL中のT細胞間のクロナリティーの相関をFig. 18に示した。PBLにおける明確なバンドの数では健常人と肺サルコイドーシス患者との間に明らかな差は認められなかった。一方、肺中のT細胞に関しては健常人と患者の2群間で顕著な差が認められた($p < 0.012$)。

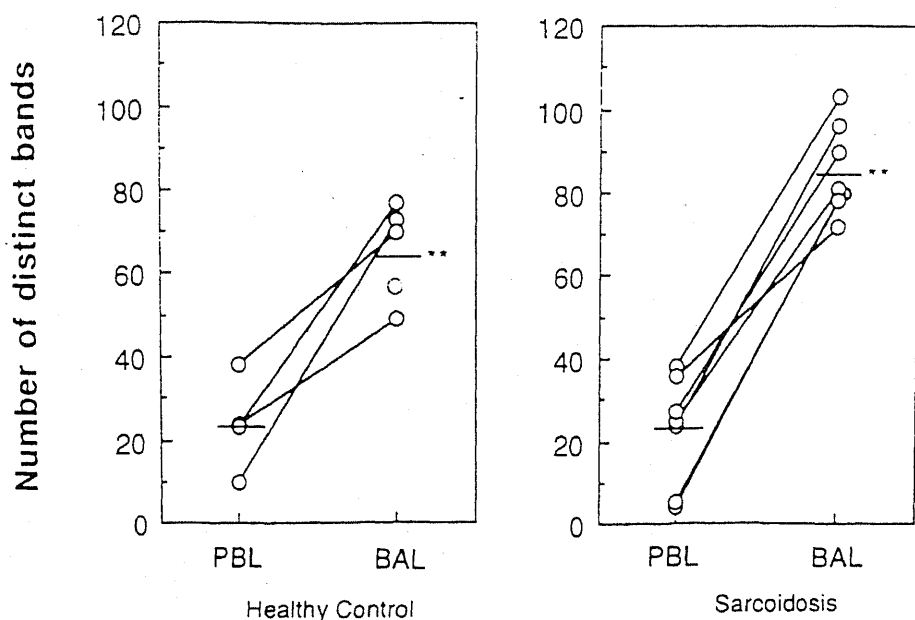


Fig. 18. Number of distinct bands detected in a sample from healthy controls (left) and patients with pulmonary sarcoidosis (right). Mean values are presented as a bar. In both groups, a significant difference was detected between PBL and BAL (** $p < 0.01$). Moreover, there was a significant difference in the number of bands in lung T cells between healthy controls and patients with sarcoidosis($p < 0.0012$).

1-4-3 考察

健常人およびサルコイドーシス患者の末梢血と肺洗浄液(BAL)中のT細胞クローンタイプについて解析した。健常人のPBL中のバンドの数は以前の報告[27]よりも多く検出された。このことは主に検出系の感度の改善によると考えられた。同一の検体から調製したRNAの量を変えて検討して得られた結果について比較した。検出できたバンドの数は、 1×10^5 細胞以上から得られたRNAで検討する限り差は認められなかった(data not shown)。したがって、バンド数の差は検体中の検出できるT細胞クローンの数を反映し、検体中のT細胞の数を単に反映しているのではなかった。

注目すべきことに、健常人でさえ肺の中ではある程度のT細胞のクローナルな増幅は認められた。これについては2つの可能性が考えられた。1つは正常な肺でも外部あるいは領域的な環境からの外来抗原によってT細胞集団が刺激され、活性化されている可能性である。現時点ではこれらの集積したクローンが新しく活性化され、増幅した細胞なのか、それともメモリー細胞として存在していた細胞なのかはわかっていない。もう1つの可能性はこれらのT細胞は肺でランダムに増殖したかもしれないということである。これらの集積した細胞の特徴の解析には、CD4/ CD8陽性細胞などの細胞の分布や塩基配列の決定などのさらなる研究が必要と考えられた。

肺サルコイドーシスは肺への顕著なT細胞の集積が特徴であり、これらの細胞は疾患の過程で何らかの重要な役割を果たしていると考えられている[79-89]。今回の解析ではサルコイドーシス患者の肺でのT細胞クローンタイプ数はPBLに比較して顕著に増加していた。このことはサルコイドーシス肺では、T細胞は、末梢血からの受動的な増殖というよりも病変部位で刺激に反応して増幅していることを示している。この結果は、以前に報告されたサルコイドーシスの肺ではT細胞はそのTCRを介して新しく活性化されていたという報告と一致した[90]。

健常人の肺とサルコイドーシス患者の肺では検出されたバンドの数が明らかに異なった(Fig. 10)。ほとんどのケースで、検出されたバンドの数はV β ファミリーにかかわらず、健常人のバンドの肺に比べてサルコイドーシス患者の肺では多かった。このことから、サルコイドーシス肺で増加しているT細胞クローンタイプ

は疾患の過程と関係があることが判明した。

それに加えて、これらの増幅したT細胞クローンはV β 1から20のファミリーのほとんど全てを用いており、ある限られたV β ファミリーのみを用いることはなかった。以前のTCRのV遺伝子の研究では、患者のサブグループでは限定されたV遺伝子の使用や偏ったV遺伝子の使用が、 α 鎖[94]、 β 鎖[91,96,97]、 γ 鎖[92,93]および δ 鎖[92,93,95]について報告されていた。このようなサブグループでは限定されたV遺伝子の使用は疾患の進行に重要な役割を果たしている可能性が強い。しかしながら、今回の結果では増幅したT細胞はより広いV β ファミリーにわたっており、サルコイドーシスの肺での免疫反応はもっとずっと複雑であることが明らかとなった。

もちろん、サルコイドーシスの肺に集積している全てのT細胞が疾患と関係した抗原に特異的ではない。しかし、これらのうちのいくつかは抗原特異的に肺に集積したものと考えられる。それに加え、サルコイドーシスの肺で炎症が進行したときに、ポリクローナルなB細胞の活性化を起こすいくつかのサイトカインによってT細胞の抗原非特異的な活性化と増殖が起こる[99,100]。そして炎症による組織破壊によって新たな抗原が作られる[101]。サルコイドーシスの発症は大抵サイレントであり、診断時には病状は確立されており、組織中での免疫反応は完全に進行している。それゆえ、今回の方法では検出されたT細胞クローンはこれらのヘテロなT細胞集団を反映していると考えられた。さらに健常人の肺の解析結果から、サルコイドーシス肺に集積したT細胞やBALによって得られたT細胞の全てが疾患に関与したT細胞ではないことが強く示唆された。言い換えれば、BALを用いた研究では肺にクローナルに増幅した疾患とは無関係なT細胞の偏りを見てしまう可能性が存在するということである。従って、この全身的な疾患についての未知な病因について解明するためには、増幅したT細胞や疾患の活動期のあとに消えていくT細胞について同定していくことがさらに必要であり、このことがサルコイドーシスの病態生理学で重要な役割を果たすと考えられた。

1-4-4 要約

サルコイドーシスに代表される免疫性肺疾患の病因として、肺でのT細胞の集積や活性化は重要な役割を果たしていると考えられる。そこで健常人5名と活動

期の肺サルコイドーシス患者7名の末梢血と肺気管支洗浄液(BAL)中に存在するT細胞クロノタイプについてRT-PCR/SSCP法で解析した。健常人およびサルコイドーシス患者いずれの末梢血でもいくつかのクローンの増大が認められた。いずれのグループも肺洗浄液中には末梢血と比較して多くのT細胞クロノタイプの集積が認められた(健常人:末梢血 25.3 ± 7.2 vs 肺洗浄液 62.8 ± 5.2 ;サルコイドーシス:末梢血 25.0 ± 6.2 vs 肺洗浄液 90.0 ± 6.6)。サルコイドーシス患者の肺では健常人コントロールに比較してさらに多くのT細胞クロノタイプの集積が認められた。これらの集積したT細胞クロノタイプはすべてのV β ファミリーで見られ、特定のV β ファミリーへの偏りは認められなかった。これらの結果より、健常人の肺でもT細胞クロノタイプの集積は認められたが、サルコイドーシスの肺におけるT細胞クロノタイプの集積はより顕著であり、また多数のV β ファミリーにわたって集積が起きていたことよりT細胞は病変局所で活性化されて集積していることが判明した。

第5節 ヒト固形癌に集積したT細胞クロノタイプの解析

ヒトの固形癌には多量の癌浸潤リンパ球(tumor infiltrating lymphocytes; TIL)が存在しているという報告がある[102-106]。しかしながら、このようなTILについての直接的な解析は、TILの単離、分離および定義が困難なため行われていない。それゆえ、TILが非特異的な炎症性細胞なのか、それとも宿主による抗原特異的免疫反応によるサブセットを反映しているのかは不明である。今までに行われてきた実験から、単離されて間もないヒトTILはautologousそして、あるいはallogenicな癌に対して弱い殺細胞性を示すが、NK活性はなく、また種々のマイトージェン刺激に対する細胞増殖性は落ちていることが知られている[107-110]。この活性の減少の説明としては、TILの機能を阻害するサプレッサー細胞やファクターの存在が示唆されている[111-114]。TILをIL-2の存在下で*in vitro*で増幅して機能が解析されたが、少なくともこれらの細胞は部分的ではあるが、autologousな癌細胞に対して殺細胞性が上昇していた[115-118]。また、これらの細胞がオリゴクローナルに増殖することも報告されている[119-121]。しかしながら、IL-2増殖性細胞は培養中のランダムな増殖の様な*in vitro*のアーティファクトである可能性も考えられる。実際に、*in situ*では通常はNK細胞はごく限られた数しか存在しないが、ある種の癌細胞ではIL-2増殖性TILの大部分がNK細胞か、あるいはMHC非拘束性CTLである[122]。それゆえ、*in vivo*で癌特異的な局所的反応が存在するのを見極めることは重要なことである。

一般的にT細胞はTCRによって明確なクロノタイプを示し、それぞれのクロノタイプは抗原特異的免疫反応を行っている。そこで、子宮癌と卵巣癌の患者より摘出した癌局所、固形癌周辺のリンパ節および末梢血からの検体についてRT-PCR/SSCP法でT細胞クロノタイプについて検討した。その結果TIL中に明確なT細胞クロノタイプの集積を認めた。そして集積したT細胞クロノタイプの数および存在部位は癌の浸潤や転移のステージとの相関があることが示された。

1-5-1 実験材料と方法

1) 臨床検体

癌浸潤リンパ球(TIL),リンパ節(LN)および末梢血(PBL)は10人の卵巣癌あるいは子宮癌の患者より手術時に摘出したものを用いた。各々の病巣の位置やステージはTable 11に示したとおりである。これらのうち5人は早期癌であり、患者1-3は腺癌、患者4と5は扁平上皮癌で、いずれの患者でもリンパ節への転移は認められなかった。患者6と7は中期癌の患者であり、近位の組織や数個のリンパ節に癌細胞の浸潤が認められた。患者8-10は進行癌であり、多数のリンパ節に癌細胞の転移が認められた。

2) T細胞クロノタイプの解析

TCR β 鎖のクロノタイプの解析はRT-PCR/SSCP法[27]により行った。各検体よりtotal RNAをAGPC法[68]で抽出し、2-4 μ gをreverse transcriptase (SuperScriptII, BRL)とrandom hexamer oligonucleotide primer (100 pmol, BRL)を用いてcDNAに変換、2%のcDNAを各V β に対応するprimer (50 pmol)と biotin化C β primer (50 pmol)でPCRを行って増幅した。PCRは200 μ M dNTP、Taq polymerase (Promega Co.)の存在下94 $^{\circ}$ C 1.5分、60 $^{\circ}$ C 2分、72 $^{\circ}$ C 3分を35 cycleで行った。増幅したDNAはdenaturation solution (95% formamide/ 10 mM EDTA/ 0.1% bromophenol blue/ 0.1% xylene cyanol)で希釈、90 $^{\circ}$ Cで2分間熱変性した後、10% glycerolを含む非変性 5% polyacrylamide gelで電気泳動した。泳動終了後、DNAをナイロン膜Immobilon-Sに転写し、streptavidin, biotin化alkaline phosphataseとchemiluminescent substrate(Lumigen PPD)を用いてDNAの検出を行った。

3) ダイレクトシーケンス

目的のバンドと一致するSSCPゲルの一部を切り出し、TE.1 (10 mM Tris \cdot HCl/ 0.1 mM EDTA(pH 8.0))にマイクロチューブ中で浸し、80 $^{\circ}$ C 20分加熱して、DNAを抽出した。この上清5 μ lを用いてセカンドPCRを55cycleで行った。増幅されたDNAのsequencingはVent (exo-) Taq polymerase (New England BioLabs, Beverly, MA)を用いたcycle sequencing法で行った。この反応物は6% 変性poly-

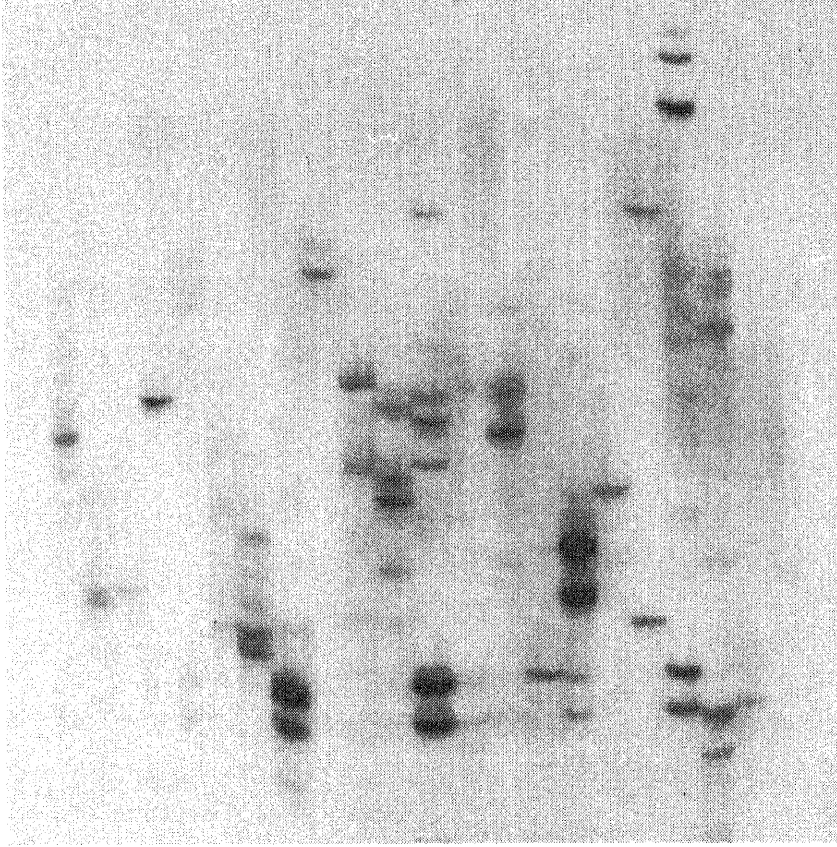
acrylamide gelで電気泳動し、解析した。

1-5-2 結果

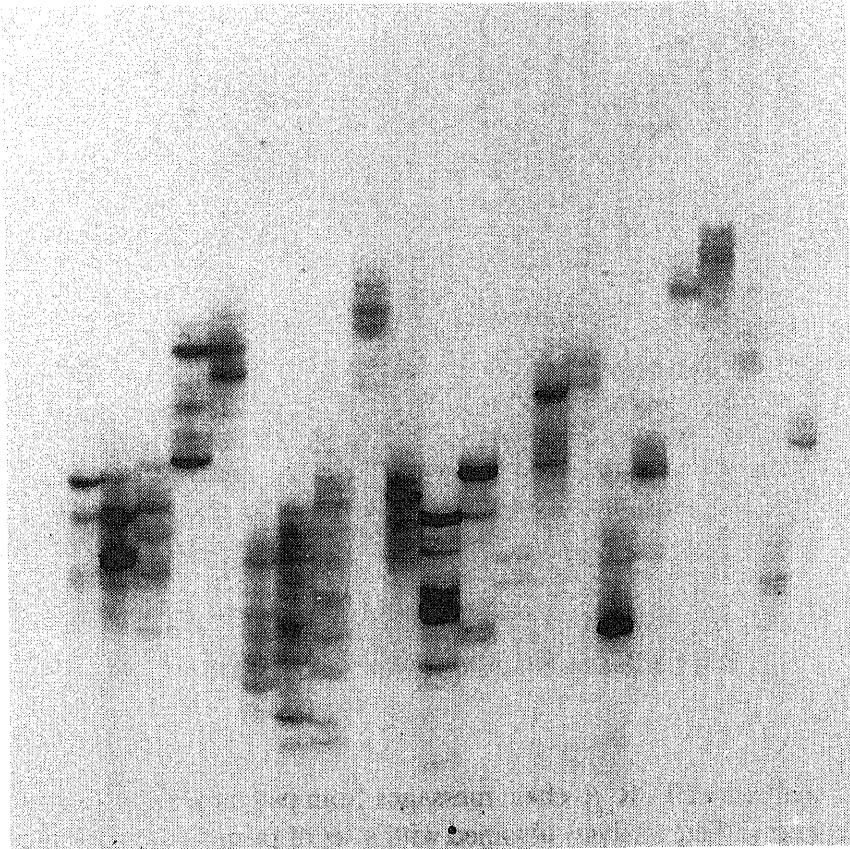
1) 癌患者の病変局所、周辺組織、リンパ節および末梢血に集積したT細胞クロノタイプの解析

悪性腫瘍患者より得られた検体中のT細胞クロノタイプを解析するために、TCR β 鎖のCDR3に対するRT-PCR/SSCPを行った。癌患者における解析の典型的な例をFig. 19に示した。癌局所には顕著なT細胞クロノタイプの集積が認められた。転移の無いLNではスメア一状であるが、転移の認められたLNではT細胞クロノタイプの集積が見られた。他の患者を含めての詳細な解析をFig. 20に示した。Table 11には10人の患者において明確に出たバンドの数をまとめた。Fig. 20およびTable 11で示されたように、病理学的にLNに明らかな転移が認められない患者1-5からのPBLやLNの検体はスメア一状のパターンを示した。これらの検体のなかにも数本のバンドが検出されたが、このようなパターンは健常人のPBLでも時々見られる[27,44]。これに対し、TILでははっきりとスメア一中に明確なバンドが検出された。ネガティブコントロールとして、良性の子宮筋腫の患者より摘出された検体を解析したが、この検体でははっきりとしたTCRのバンドは得られなかった(data not shown)。子宮内膜癌である患者6では、病理学的には子宮筋層に浸潤が認められたものの、LNには転移は認められなかった。この患者の検体では、子宮内膜と同様に子宮筋層でもはっきりとしたT細胞クロノタイプの集積が認められたが、LNとPBLではT細胞の集積は見られなかった。患者7では転移の疑いのある右外腸骨節にTILよりは数は少ないがTILと同様のクロノタイプの集積が見られた。しかし、子宮周囲のLNで明らかな転移の見られなかったLNではクロノタイプの検出はされなかった。さらに、進行癌の患者8-10ではTILのみならず、LN、PBLに多数の明確なバンドが検出された。これに対し、転移が見られない場合は、周囲のLNやPBLにもクローンレベルで検出できるようなT細胞の反応は見られなかった。そのうえ、 $V\beta$ の使用には偏りも認められなかった(Table 11 and data not shown)。これらの結果から、*in vivo*で癌に対する抗原特異的免疫反応が起こっていることが明らかとなった。

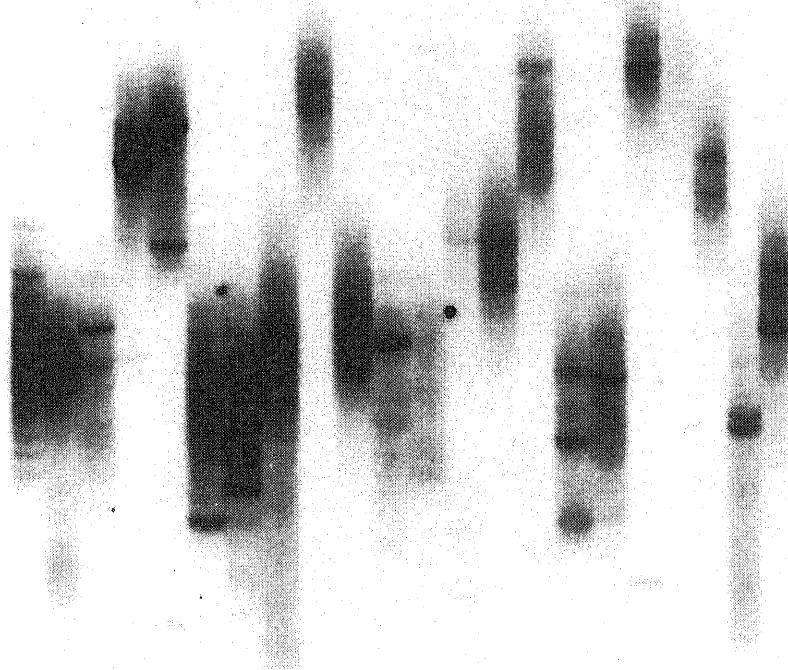
(A)



(B)



(C)



(D)

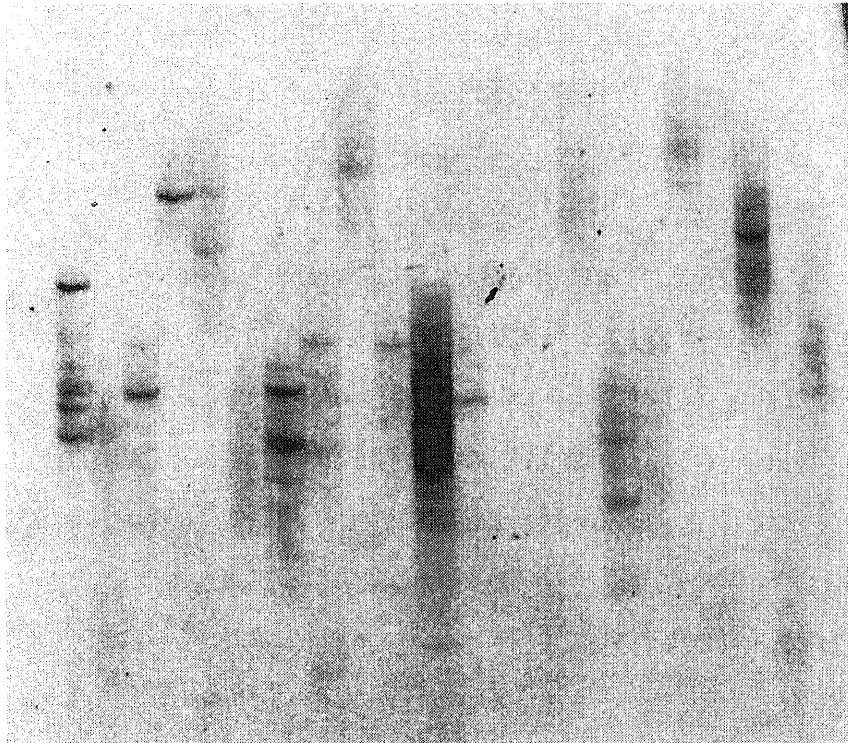


Fig. 19. Clonal analyses of TCR β -chain messages from patient with solid tumors. Typical representative patterns of the analysis obtained with a set of primers are presented. (A) TIL (endometrium), (B) TIL (right ovary) (C) LN (right inguinal) (D) PBL samples from patient 9. From left to right; TCR V β families 1-20.

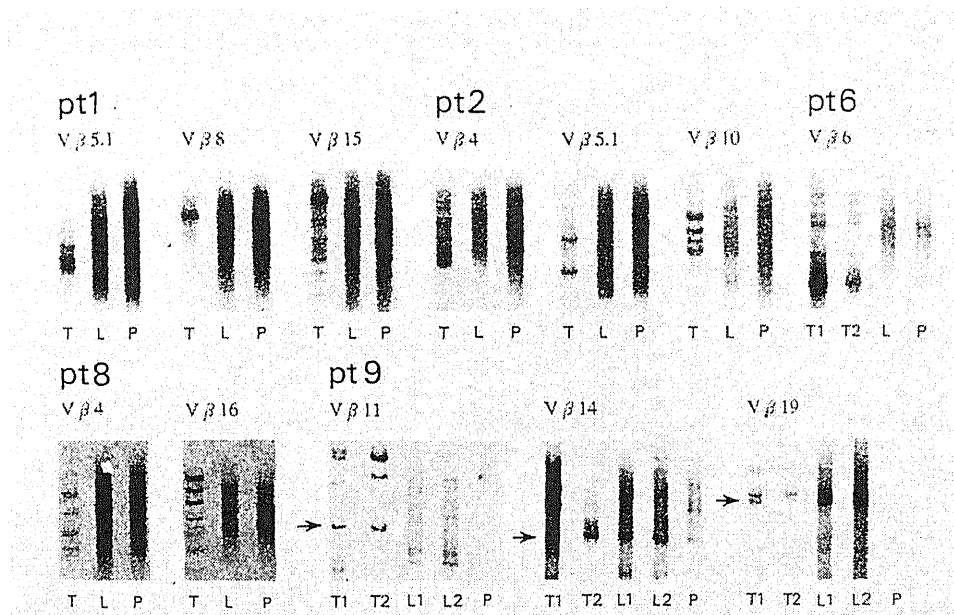


Fig. 20. Clonal analyses of TCR β -chain messages expressed in TIL(T), regional LN(L), and PBL(P) from patients with uterine or ovarian tumors. Representative results obtained from selected V β amplification are shown. Numbers of distinct bands in each lane are summarized in Table 10. The patient identification numbers correspond to those in Table 10. Arrows indicate the position of the bands used for DNA sequencing in Fig. 21.

Table 11. Accumulations of T cell clonotypes in TIL, LN, and PBL of cancer patients^a.

specimen	Pathologic Diagnosis	Vβ																			
		1	2	3	4	5.1	5.2	6	7	8	9	10	11	13.1	13.2	14	15	16	18	19	20
Patient 1																					
TIL(uterine cervix)	Adenocarcinoma	3	2	1	1	3		2	1	1				2		7					
LN(right external iliac)	No metastasis						1												1	N ^b	1
PBL							1														1
Patient 2																					
TIL(endometrium)	Adenocarcinoma				9	2	3	2		N		4	2	N		4	4	N	N		
LN(left obturator)	No metastasis					1									1						
PBL					1	1				1											
Patient 3																					
TIL(endometrium)	Adenocarcinoma	4	N	5	5	6	5	6	4	3	5	6	5	4	5	3	4	3	4	4	4
LN(left obturator)	No metastasis	2						1		2				2							
PBL			2		1	1				1									1	1	
Patient 4																					
TIL(uterine cervix)	Squamous carcinoma	4	2	3	4	5	5	6	3	5	4	3	3	2	7	2	4	6	2	N	4
LN(left obturator)	No metastasis	1										N			1	3					2
PBL			1		1	1	2					1	1						1		1
Patient 5																					
TIL(uterine cervix)	Squamous carcinoma	9	3	4	2	7	6	7	3	4	7	6	6	5	3	6	4	3	4		9
LN(left obturator)	No metastasis						2												1		3
PBL			2				2												1	N	1

(continued)

VPβ

Specimen	Pathologic Diagnosis	1	2	3	4	5.1	5.2	6	7	8	9	10	11	13.1	13.2	14	15	16	18	19	20
Patient 6		3	1	1	3	2	2	6	2	2	4	1	1	1	3	1	3	3	N	N	1
TIL(endometrium)	Adenocarcinoma	3	1		3	1		4	1		1	2		N	1		1		N	N	1
TIL(myometrium)	Invasion						1														1
LN(right common iliac)	No metastasis		2	1		1		1			1										1
PBL																					
Patient 7																					
TIL(uterine cervix)	Squamous carcinoma	1	N	N	1	1	3		4	4	1				3					2	3
LN(right external iliac)	Metastasis(±)	2	1	1	1	1		2													3
LN(parametrium)	No metastasis										1										
PBL																					
Patient 8 (advanced)																					
TIL(uterine cervix)	Leiomyosarcoma	4	2	8	7	3	7	8	9	7	6	3	5	4	5	N	7	4	4	4	4
LN(left obturator)	Metastasis	5	1	4	2		2	1	2	3	2			2	4	N	6	3	N	3	
PBL		4	2	3	1				2		1	1		1							
Patient 9 (advanced)																					
TIL(endometrium)	Adenocarcinoma	4	2	1	1	2	2	3	3	1	3	6	6	2	3	7	1	2	4	3	2
TIL(right ovary)	Adenocarcinoma	4	N	N	5	3	5	6	N	1	5	N	3	3	N	3	2	N	N	3	1
LN(right inguinal)	Metastasis	5	1	2	1	2	1	3	2	1	5	3			4	1	1	2	3	2	
LN(aortic)	Metastasis	4	1	2	1	2	1		2	1	5	3			4		4				3
PBL		4	2	1	2	3	2	N	1	3	1	N			3		2	1	N	2	
Patient 10 (advanced)																					
TIL(endometrium)	Adenocarcinoma	2	N	4	2	2	1	2	4	3	4	2	4	3	3	5	3	4	5	N	4
LN(left obturator)	Metastasis	2	2	2	2	4		2	2	2	3	2			3	5		3	N	2	
PBL			4	2	2	3	2	3	2	1	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1

^aRNA was extracted from the specimen, and RT-PCR was performed with TCR Vβ-family-specific primers and a Cβ primer. The amplified PCR products were analyzed by the SSCP method. Numbers of distinct bands observed on the smear are shown. A blank indicates a smear-like pattern without a distinct band.

^bN, no specific PCR amplification obtained.

3) 異なる部位に共通に存在するT細胞クローンの同一性の検討

患者の異なる部位から採取した検体でしばしば同一の移動度を示すバンドが検出された(例えば、Fig. 20の患者6のV β 6のT1とT2、患者9のV β 14やV β 19のT1, T2, L1とL2)。同一のクローンから増幅されたDNAはSSCPで同一の移動度を示すことは知られている[26,27]。このことを確認するためにダイレクトシーケンシング法で同一の位置に現われるバンドについて塩基配列を検討した。SSCP上でシングルバンドとして検出されるバンドはかなりはっきりしたシーケンスパターンを示し、シングルバンドが1つのT細胞クローンであることを示した。さらに同一の移動度を示したバンドは同一のシーケンスを示し、同じクローンであることが確認された(Fig. 21)。このことから、同一のT細胞クローンタイプが患者の他の部位にも存在することが示された。

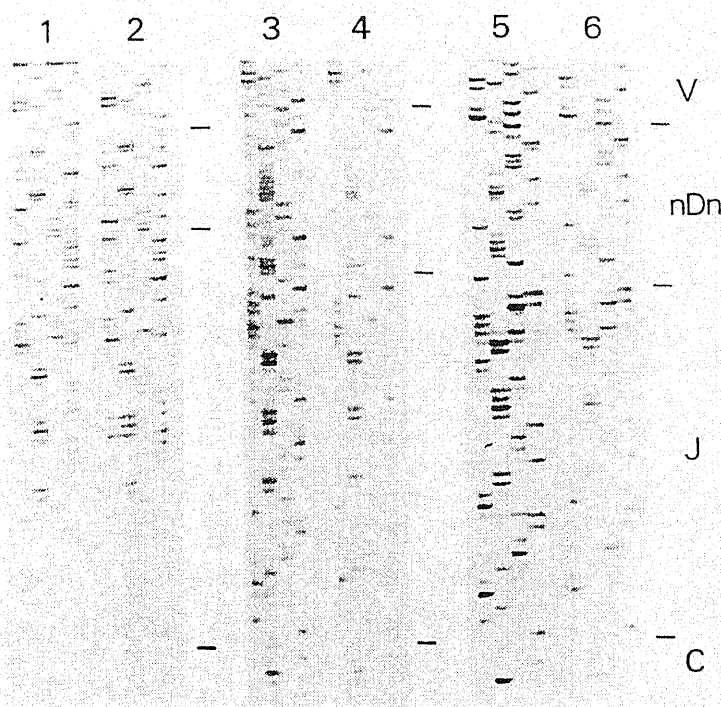


Fig. 21. Direct sequencing of accumulated T cell clonotypes observed in patient 9. T cell clonotype messages detected in the SSCP gel were extracted and submitted to the second amplification by PCR. The amplified DNA was subjected to the direct sequencing method. The arrows in fig. 19 indicate the position on the bands for sequencing. 1, T1 of V β 11; 2, T2 of V β 11; 3, T1 of V β 14; 4, T2 of V β 14; 5, T1 of V β 19, and 6, L1 of V β 19.

TILのphenotypeの検討より、これらのうちのかなりの細胞が活性化抗原を発現していることが明らかとされていた[123]。しかしながら、推定される癌関連抗原に対するT細胞関与の免疫反応を証明することは困難であった[124]。少なくとも部分的にはIL-2増殖性TILがautologousな癌に対して殺細胞性を示すが、この感作は*in vivo*でも起きるのか、それとも培養実験だから見られるのかは不明である。ある種の癌ではTILはアナジーの状態であることも示唆されている。

TILはオリゴクローナルな細胞集団なのか、それともポリクローナルな集団なのかについてもわかっていない。Fishlederらは癌部位に存在するリンパ球の集団はSouthern blot hybridizationで検討した結果ポリクローナルであると報告している[119]。Southern blot hybridizationでクローンをバンドを検出する方法が1つのクローンから少なくとも数パーセントまで増幅した細胞でないと検出できない程に感度が低いにもかかわらず、TILをIL-2存在下で15から26日間培養するとオリゴクローナルなT細胞の増幅が認められた。最近、Nittaらにより、メラノーマや悪性グリア細胞腫で限定されたTCR可変領域(V α 7)が発現することが報告された[125,126]。TILにおけるオリゴクローナルなV β 遺伝子の発現も報告されている[121,127]。しかし、特定のV α やV β 遺伝子が発現しているT細胞の集積がautologousな癌に対する特異的な免疫応答を必ずしも示しているわけではない。今回の実験では新しいT細胞クロナタイプの検出法を用いて癌部位に明確なT細胞の集積を見出した。近年、Feradiniによっても、1例の悪性メラノーマでPCR産物の塩基配列の解析から癌部位にクローナルなT細胞集団が増幅していることが報告された[128]。

典型的な免疫反応に関与しているT細胞を限界希釈法で解析するとこれらの存在は 10^3 から 10^4 に1個である。TILのうち殺細胞性の前駆細胞の比率は数千個に1個と言われている[129,130]。RT-PCR/SSCP法では正確な感度を検討するのは困難であるが、いくつかの基礎検討より、数千個に1個のクローンが存在すれば、バンドとして検出できる[27]。実際に多様なT細胞集団を抗原で刺激して*in vivo*と同様に*in vitro*でもバンドとして検出している[27,44]。今回の患者の検体から得られたバンドの数から考えると、これらのバンドは正常な免疫反応の存在を示

したものといえる。このことは改めて「悪性腫瘍を持った患者の体内では抗原特異的T細胞の増殖が起こっている」という考えを支持した。

今回の実験で見られた集積したT細胞クローンは部位に存在するリンパ球の集団を反映している可能性がある。また、ある種のサイトカインは癌周辺に存在する細胞によって産生されているため、これらのクローンは非特異的なファクターによってランダムに誘導されている可能性もある。しかし、中期や進行期の患者では、例えばFig. 20の患者6, 8, 9のように異なる癌病変部位やLN、PBLなどから得られたバンドはしばしば同一の移動度を示した。これらの点を明らかにするため、シーケンシングを行ったところ、SSCPで同一の移動度を示したバンドは、同一のクローンであることが判明した(Fig. 21)。このことは、同一患者の個体中では異なる局所に同一のT細胞クロータイプが存在することを示している。それゆえ、異なる組織中（例えば、子宮と周辺領域のLN）に共通のT細胞クロータイプが存在することは、これらのT細胞は組織中に残存あるいは組織特異的に存在するT細胞ではないことや、抗原非特異的に活性化された細胞ではないことを示している。

進行した癌では、はっきりとしたバンドがほとんどすべてのV β ファミリーで検出された。このことは複数の異なる抗原に対する多数の免疫反応が起こっていることを示唆している。一方、ヘテロなT細胞集団、例えば健常人の末梢血を精製蛋白誘導体(PPD)の存在下で培養すると、同様な多数のバンドのパターンが認められた[27,44]。PPDは1分子からなるものではないが、これらの多数のバンドはかなり限られた抗原に対して強い免疫反応を起こした結果である。最近、癌抗原あるいは癌関連抗原がT細胞クローンによって認識されることが報告された[131,132]。いくつかの変異した癌遺伝子産物や変異した癌抑制遺伝子産物[133,134]、ウイルス産物[135]、正常細胞ではサイレントであるが癌細胞では活性化されている遺伝子産物[136]などが癌特異的抗原の候補として挙げられている。

これらの明確なバンドとして得られたT細胞が実際にautologousな癌細胞に対して抗腫瘍効果を示すのかは明らかでなく、さらなる実験が必要である。この点を解明するには、TILの表面マーカー、例えばCD4、CD8、IL-2R、活性化マーカーやその他の指標などを検討し、これらのクローナルな集積を反映するT細胞亜

集団を同定することが必要である。

癌局所に存在している特異的T細胞クロノタイプの*in vivo*での検出に成功したことより、このT細胞のDNAを増幅し、解析することによって機能的な癌特異的エフェクターT細胞を分子生物学的手法で再構成することが可能となった。これによって、TILの*in vitro*での困難な培養はバイパスでき、バイオプシーで得られた微量の検体でもTILが得られ、抗原特異的免疫治療に応用できることが示唆された。

1-5-4 要約

癌浸潤リンパ球(TIL)の存在はいろいろなヒト固形癌で報告されてきた。しかし、この様なT細胞は抗原非特異的な免疫細胞であるのか、それとも宿種の特異的な免疫反応の結果現われたサブセットなのかは明らかでない。この点を検討するために、子宮癌あるいは卵巣癌の患者10名より採取したTIL、付属リンパ節および末梢血のT細胞クロノタイプについてRT-PCR/SSCP法で検討した。TILは明らかな転移のない患者でさえも癌局所ではっきりとしたT細胞クロノタイプの集積を示したが、転移を起こした患者ではクローナルな増大をしたT細胞の集積が付属リンパ節や末梢血でも認められた。この集積したT細胞クロノタイプの数や局在は癌浸潤のステージや転移の度合と相関していると考えられた。これらの結果より生体内では固形癌に対する抗原特異的免疫反応が起きていることが判明した。

第2章 T細胞クロナタイプ解析法を用いたモデル動物における免疫反応の解析

第1章 序論

第1章の検討からT細胞が発症に関与していると考えられる自己免疫疾患やサルコイドーシスあるいは固形癌における癌浸潤T細胞などは限定されたクローンが増大していることが示された。現在の医療における自己免疫疾患の治療には、進行した免疫異常と炎症を抑えるという考えより、免疫全体を抑制する免疫抑制剤や抗炎症剤が主体である。これらの薬剤は抗原非特異的な作用を示し、薬効としての一定の効果は上げているが、副作用の点からの問題があるのも事実である。第1章で述べたように現在、自己免疫疾患について比較的限定されたT細胞などがその発症にかかわっている可能性がある。従って、患者の体内で起こっている異常な抗原特異的な免疫反応を把握し、この異常反応だけを抑制し、正常な免疫反応には作用を示さない治療法ができれば、副作用が非常に軽減されるはずである。このためには病因に関与しているT細胞をコントロールすることは重要であると考えられる。ところで、現在行われている抗原特異的免疫療法の1つの方向は、特異的自己抗原カラムを用い体外循環により自己抗体を除去する方法である。別の方向としては、抗原特異性のコントロールはT細胞が行っており、自己免疫疾患はその発症に抗原特異的T細胞レセプターのV領域が関与しているという"V-region disease hypothesis"に則った抗原特異的T細胞除去である。こちらについては臨床ではまだ行われていないが、ミエリン塩基性タンパク(MBP)に対するT細胞の反応で起こる実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)マウスを用いた研究がなされている。このモデルでは、特定のTCR-V領域 ($V\alpha 2$ と $V\beta 8.2$)を発現したMBP特異的なT細胞クローンを移入するだけで発症することが判明している。このことは、このT細胞だけを抑えることによって病気の発症を抑えられることを示している。抗原特異的なT細胞の抑制法として、抗TCR-V領域モノクローナル抗体の投与、抗原擬似ペプチドの投与あるいはTCR-V領域ペプチドワクチン療法などが挙げられる。他の疾患モデルマウスでも同様なことが示され、TCRに注目した治療法の開発は将来の抗原特異的免疫療法につながると考えられる。

以上の知見より、筆者はマウスについてもT細胞クロナタイプの検出系を作成

し、治療法開発の研究として、正常状態のマウスのT細胞と、比較的早期にT細胞の集積が見られる系として皮膚移植における移植片の拒絶に関与するT細胞について検討した。

第2節 C57BL/6マウスの脾細胞におけるT細胞レセプターJ β 遺伝子の使用頻度の検討

T細胞は抗原特異的免疫反応においてMHC分子に結合している抗原ペプチドをTCRを介して認識する。この機構はマウスとヒトでほとんど同じである。マウスにおいても末梢に存在する大部分のT細胞は α 鎖と β 鎖から成るTCRを発現している[137,138]。この α 鎖および β 鎖はV、D（これは β 鎖のみであるが）、JおよびC遺伝子が再構成することによってつくられる。可変部位においてはMHC分子に支えられた抗原ペプチドと主に相互作用するとされるCDR3領域が、V領域のC末端部位、D領域（ β 鎖では）とJ領域のN末端部位の再構成によって形成される[15,17]。それゆえ、抗原特異的反応におけるTCRレパトアを研究する上でJ遺伝子を検討することはV遺伝子を研究することと同様に重要と考えられる。しかし多くの研究は、ヒトやマウスのV遺伝子の使用頻度について行われており、J遺伝子の使用頻度についてはほとんど知られていない。

この節では、マウスにおいてJ β 遺伝子は偏った使用をされているのか、またV β 遺伝子はJ β 遺伝子の使用に影響を与えているのかを検討した。先ず、12個のマウスのJ β 遺伝子に特異的なoligo DNA probeを作製し、これらのprobeを用いてV β 2、V β 8.2およびV β 14ファミリーのTCRを発現しているC57BL/6マウスの脾細胞のJ β 遺伝子の使用頻度について検討した。

2-2-1 実験材料と方法

1) マウス

5週令の雌性C57BL/6マウスは日本SLC（静岡、日本）から購入した。

2) TCR遺伝子の増幅とクローニング

Total RNAはAGPC法[68]を用い、マウス脾細胞より調製した。抽出したRNAはreverse transcriptase(Superscript, BRL, Gaithersburg, MD)とrandom hexamer oligonucleotide primer(100 pmol, BRL)を用い、42℃で1時間反応し、cDNAに変換した。このcDNA 0.2-0.4 μ gを鋳型とし、200 μ M dNTP, 0.5u Taq polymerase

(Promega Co., Madison, WI)と3種類のV β primerとC β primerを50 pmolずつを混合し、94°C 1分、56°C 1.5分、72°C 1.5分を36cycle行い、HYBAID thermocyclerで増幅した。尚、各primerの配列は、

C β	5'-GGCTCAAACAAGGAGACCTTG-3'	[139,140]
V β 2	5'-AGAGGTCAAATCTCTTCCCG-3'	[139,140]
V β 8.2	5'-CATATGGTGCTGGCAGCACT-3'	[139,140]
V β 14	5'-CCTCCAGCAACTCTTCTACT-3'	[141]

である。

3) TCR J β に対する oligo DNA probe の作成

マウスの12個の機能するJ β 領域[142-144]に対するprobeをTable 12のようにデザインし合成した。また、検出した遺伝子がTCR β 鎖由来であることを確認するために、C β 領域に対するprobeもPCR用のprimerのaneering部位よりも上流側に設計し(Table 12)、ABI社製のDNA synthesizerを用いて合成した。尚、これらのprobeはすべて化学発光法で検出できるように5'末端をbiotin化した。

4) J β probe とのハイブリダイゼーション

増幅したTCR遺伝子はplasmid vectorであるpCRscript(Stratagene Inc., CA)にクローニングした。Alkaline-SDS法で調製した後[145]、精製したplasmid 0.2 μ gを0.2 MのNaOHで変性し、ナイロン膜 (Immobilon-S, Millipore Intertech, Bedford, MA)上にドットブロットした。この膜を塩化テトラメチルアンモニウム(TMAC)溶液(3 M TMAC, 0.1 M NaPO₄ pH 6.8, 5x Denhardt's solution, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.6% SDS, 100 μ g/ml変性サケ精子DNA)中で3-6時間ブロッキングした[146,147]。ついでこのナイロン膜を1 pmol/mlの各J β のprobeを含むTMAC溶液で終夜インキュベーションした。その後、TMAC洗浄溶液(3 mM TMAC, 50 mM Tris-HCl pH8.0, 0.2% SDS)で10分間洗浄した。ブロッキング、ハイブリダイゼーションおよび洗浄は、J β 1.1-1.6とJ β 2.2-2.5は59°Cで、J β 2.1, 2.6とC β は62°Cで行った。さらに、洗浄溶液I (12.5 mM NaCl, 1.7 mM Na₂HPO₄, 8 mM NaH₂PO₄, 17.3 mM SDS)により、室温で2回洗浄後、streptavidin, biotin化 alkaline phosphataseと化学発光基質(PlexLuminescence kit, Millipore Intertech)で検

出した。

Table 12. Oligonucleotide sequences of the 12 J β gene segment specific probes and the murine C β gene-specific probe used in this study. The 5' end of each probes were biotinylated. The J β genes segment nomenclature and sequences are derived from references 142-143.

J β	oligonucleotide sequence
1.1	5'-GAAGTCTTCTTTGGTAAAGGAA-3'
1.2	5'-GCTCAGGGACCAGGCTTTTG-3'
1.3	5'-GAGAAGGAAGCCGGCTCATT-3'
1.4	5'-CGGTCATGGAACCAAGCTGT-3'
1.5	5'-AGAGGGGACTCGACTCTCTG-3'
1.6	5'-AATTCGCCCCTCTACTTTGC-3'
2.1	5'-ACCAGGGACACGACTCACCGTCC-3'
2.2	5'-TGGTGAAGGCTCAAAGCTGA-3'
2.3	5'-GTATTTTGGCTCAGGAACCA-3'
2.4	5'-GTGCGGGCACCCGACTATCG-3'
2.5	5'-GGCCAGGCACTCGGCTCCTC-3'
2.6	5'-TCCCGGCACCAGGCTCACGGTTT-3'
C β	5'-GAGGATCTGAGAAATGTGACTCCAC-3'

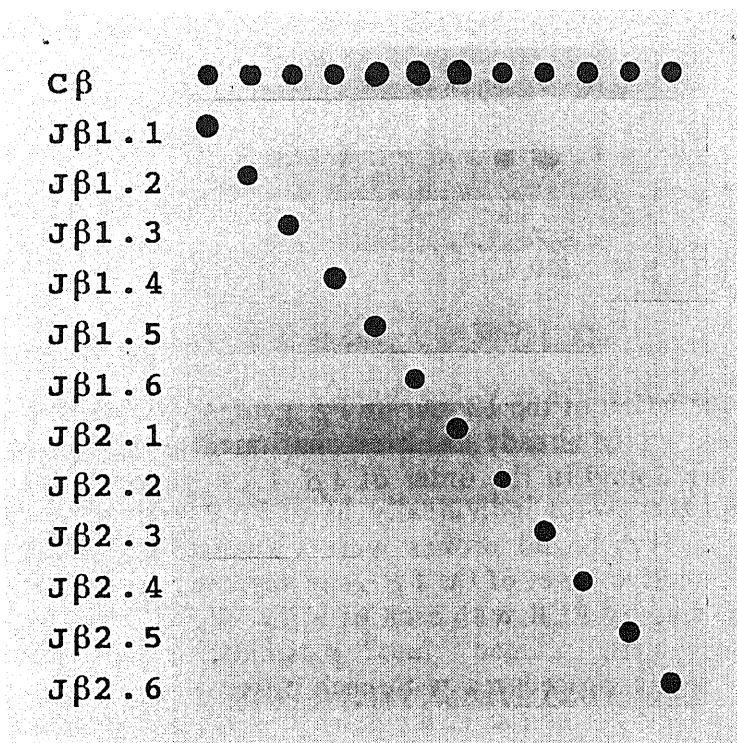
2-2-3 結果

1) 12個のTCR J β 遺伝子の特異的検出

Table 12に示した12個のoligo DNA probeをお互いの相同性が75%以下となるようにデザインした。融解温度は $2(A+T)+4(G+C)$ で計算し、58 °Cから76 °Cとなるようにした。

初めに、12個のJ β 遺伝子がこれらに対するprobeで区別できるか否かについて検討した。これを行うために、12個のJ β 遺伝子を1個ずつ含むTCR β 遺伝子を12クローン単離した。各々のplasmidをナイロン膜上にドットプロットした後、TMAC溶液中で12個のoligo DNA probeとハイブリダイゼーションを行った。Fig. 22A)に示したようにこれらのprobeによって効率よくマウスの12個のTCR J β 遺伝子は特異的に検出された。

(A)



(B)

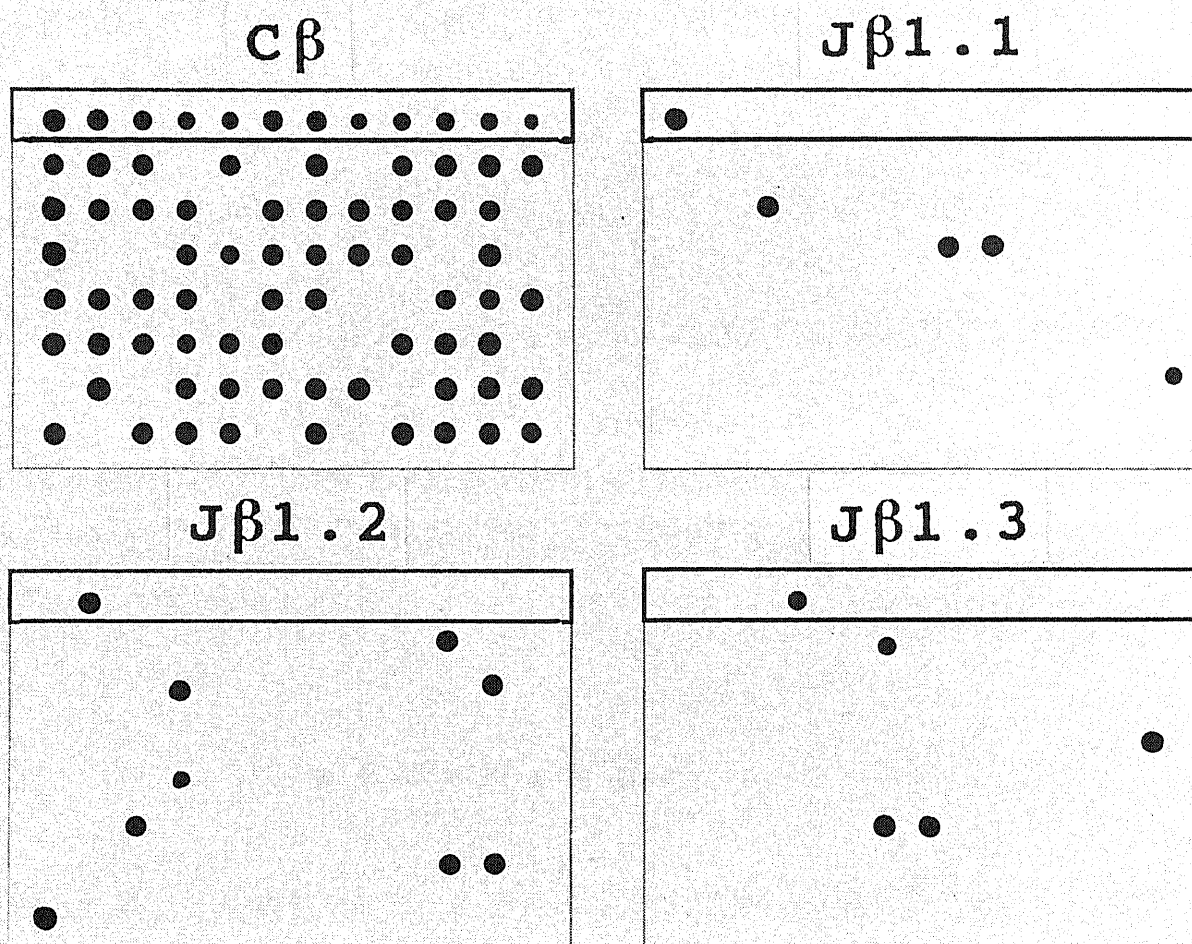


Fig. 22. (A) Differentiation of the 12 murine $J\beta$ gene segments. The TCR β samples cloned into plasmids, which already had been confirmed to contain each of the 12 $J\beta$ gene segments, were dotted in the order of $J\beta$ 1.1-1.6 and 2.1-2.6 on membrane strips. These strips then were individually hybridized with each of the 13 probes shown in Table 12. Hybridized probes were visualized by the chemiluminescent system. (B) Representative cases of the $J\beta$ gene segment determination. The TCR β gene samples, amplified by PCR with each of $V\beta$ 2, $V\beta$ 8.2 and $V\beta$ 14 primers and the $C\beta$ primer, were cloned into plasmids, then dotted on nylon membranes. Hybridization procedures with each probe were similar to those in (A). Each membrane had 96 dots and the 12 wells of the first line were dotted with known $J\beta$ templates in the order of $J\beta$ 1.1-1.6 and 2.1-2.6 as used in (A). Hybridization of the probes of $J\beta$ 1.1-1.3 and $C\beta$ to the $V\beta$ 14 TCR β genes is respectively shown.

2) C57BL/6マウスの脾細胞でのTCR J β 遺伝子の使用頻度の検討

次に、J β 遺伝子の使用頻度に偏りがあるのか、またTCR遺伝子の中でV β ファミリーの使用にJ β 遺伝子の使用頻度が影響しているのかを検討した。そのために、TCR β 遺伝子の中でV β 2, 8.2と14を選択した。これらの遺伝子はマウスの染色体上でそれぞれV β 2は5'末端に、V β 8.2は中間に、V β 14は3'末端に存在しており[137]、これらの遺伝子で検討することはTCR β 遺伝子の再構成におけるV β の染色体位置の効果を明らかにするのに適当と考えられた。

これらのV β ファミリーのTCR β 遺伝子は3匹のC57BL/6マウスのそれぞれの脾臓より調製したmRNAからRT-PCR法で増幅した。次いで、TCR β 遺伝子をplasmidにクローニングし、ナイロン膜にドットブロットし、各J β に対するprobeでハイブリダイゼーションを行った。それぞれのマウスで各V β について61-106個のクローンを解析した。典型的な例をFig. 22Bに示した。さらに、C β probeで検出された陽性の4743クローンについてJ β 使用頻度を検討した。この結果をTable 13にまとめた。

Table 13からわかるように、J β 2.6は最も頻繁に使用されていた。またJ β 2.1もV β 8.2とV β 14で頻繁に使用されていた($p < 0.003$)。これに対し、J β 1.6の使用頻度は非常に低かった。そして、J β 1.3やJ β 1.5もV β 8.2やV β 14ファミリーでの使用は明らかに低かった($p < 0.003$)。これらの3つのV β ファミリーを平均すると、J β 1.3, 1.4と1.6の使用頻度は著しく低く、逆にJ β 2.1と2.6の使用頻度は著しく高かった($p < 0.003$)。2つのJ β クラスター間での使用を比較すると、J β 2クラスターの使用は、V β 2で67.8%、V β 8.2で65.9%、V β 14で70.4%と、J β 1クラスターに比べて約2倍の頻度であることが判明した。ここで重要な点として、このJ β の使用頻度に対する偏りが3つのV β ファミリーで共通に認められた。

さらに、J β の使用の個体間の差はどのV β ファミリーを見てもかなり少なく、見られるとしてもV β 2におけるJ β 1.1やV β 8.2におけるJ β 2.3のケース位であった(Table 13)。

これらの結果より、J β 遺伝子はTCR β 遺伝子の中である偏りをもって使用されているが、この偏りはV β 遺伝子の選択にはほとんど依存していないこと、またいずれのマウスでも同様の挙動を示すことが明らかとなった。

Table 13. Summary of J β usage of the TCR β genes of the V β 2, V β 8.2, and V β 14 families. Cloned TCR β genes (61 to 106) in each of the 3 V β families were respectively tested in three C57BL/6 mice. The J β usage is shown by percentage. The underlined numbers and bold type numbers respectively indicate significantly high and low values ($p < 0.003$), compared to the total average usage of 8.3 +/- 5.7 %. Av.: average, M:mouse.

V β 2 (M1, n=80; M2, n=81, M3; n=61)													
J β	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	
M1	13.8	1.3	6.3	7.5	2.5	3.8	11.3	12.5	8.8	8.8	7.5	16.3	
M2	12.3	4.9	3.7	2.5	6.2	1.2	7.4	6.2	17.3	9.9	9.9	18.5	
M3	3.3	6.6	6.6	11.5	6.6	0.0	8.2	4.9	9.8	11.5	6.6	24.6	
Av.	9.8	4.3	5.5	7.2	5.1	<u>1.9</u>	9.0	7.9	12.0	10.0	8.0	19.8	
+/- SD	+/-5.7	+/-2.7	+/-1.6	+/-4.5	+/-2.2	+/-1.7	+/-2.0	+/-4.1	+/-4.7	+/-1.4	+/-1.7	+/-4.3	
V β 8.2 (M1, n=83; M2, n=105, M3; n=106)													
J β	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	
M1	9.6	6.0	4.8	3.6	1.2	1.2	10.8	2.4	13.2	12.0	8.4	26.5	
M2	7.6	8.5	4.8	7.6	4.8	5.7	12.3	4.8	3.8	6.7	16.2	17.2	
M3	17.0	7.5	5.7	4.7	0.9	0.9	12.1	3.8	12.3	11.3	5.7	19.8	
Av.	11.4	7.4	<u>5.1</u>	5.3	<u>2.3</u>	<u>2.9</u>	11.7	<u>3.7</u>	9.8	10.0	10.1	21.2	
+/- SD	+/-5.0	+/-0.3	+/-0.5	+/-2.1	+/-2.2	+/-2.4	+/-0.8	+/-2.1	+/-5.2	+/-2.9	+/-5.5	+/-4.8	

Vβ14 (M1, n=74; M2, n=82, M3; n=71)												
Jβ	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6
M1	5.4	9.5	5.4	4.1	4.1	0.0	12.1	2.7	17.5	6.8	8.1	24.3
M2	8.5	2.4	4.9	7.3	1.2	0.0	14.6	2.4	11.0	11.0	15.8	20.7
M3	13.0	6.9	1.4	9.7	2.8	1.4	11.3	6.9	13.9	9.7	9.7	12.5
Av.	9.3	6.3	3.9	7.0	2.7	0.5	12.6	4.0	14.1	9.2	11.2	19.2
+/- SD	+/-4.3	+/-3.6	+/-2.2	+/-2.8	+/-1.5	+/-0.8	+/-1.8	+/-2.5	+/-3.3	+/-2.2	+/-4.1	+/-6.1

Total (n=743 in total; M1, n=237; M2, n=268, M3; n=238)												
Jβ	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6
Av.	10.1	6.0	4.8	6.5	3.4	1.7	11.0	5.2	12.0	9.7	9.8	20.0
+/- SD	+/-4.1	+/-2.7	+/-1.6	+/-3.0	+/-2.2	+/-1.9	+/-2.2	+/-3.2	+/-4.3	+/-2.0	+/-3.8	+/-4.5

2-2-3 考察

J β 遺伝子の使用頻度は以前にもわずかに報告されており、Raaphorstらは、ヒトTCR V β 6ファミリーにおけるJ β 遺伝子の使用頻度を塩基配列により決定していた[148]。この方法はJ β 遺伝子の塩基配列を決定するため、明快な結果が得られていたが、手技に時間がかかるため、限られた数のTCR遺伝子しか解析されなかった。他の方法としてGrunewaldらは、ヒトTCR V β 5.1ファミリーについてTCR遺伝子をPCRで増幅後、J β 遺伝子に対する標識したprobeでハイブリダイゼーションを行い、相対的な強度で測定した[149]。しかし12個のJ β 遺伝子の塩基配列は互いに非常によく似ているため[142-144]、実際にJ β に対する種々のprobeを作成し、SSCやSSPEバッファーを用いて検討したところ、異なるJ β 遺伝子にもcross-reactすることが判明した (data not shown)。そのため、異なるprobeのcross-reactによるエラーを除くことが必須であった。

相当数のTCR遺伝子を解析し、かつcross-reactによるエラーを除去するために、今回特異的J β probeを用いてクローン毎にTCR J β usageを決定する新しい方法を確立した。また、ハイブリダイゼーションにはSSCやSSPEバッファーの代わりにTMAC溶液を用いた。TMAC溶液中では、DNA probeの融解温度は主にprobeの長さに依存することが知られている[146,147]。さらに、probeの非特異的結合を抑えるために、コロニーハイブリダイゼーションの代わりに、抽出したDNAを用いたドットハイブリダイゼーションで行うことにした。このようにして、今回のoligo DNA probeはTCR J β 遺伝子を明瞭に検出できるようになった。TCRのJ β 遺伝子についてはほとんど研究がされていないため、シーケンシングを行わないこの方法はマウスのJ β 遺伝子の使用頻度の解析に効果的である。

今回の解析より、J β 2.6の遺伝子がよく使われ(20.0%)、J β 1.6の遺伝子は使われにくい(1.7%)ことが判明した。この2つの遺伝子を含め、J β 遺伝子の使用に偏りがあることが調べた3つのV β ファミリーで共通に認められた。さらに、J β の使用頻度の違いが、それぞれのV β において個体差がほとんどなかったことより、このJ β の使用頻度の偏りは主として遺伝的に決定されていることが示唆された。

今回解析した3つのV β 遺伝子は、マウスの染色体上でお互いに離れた位置に

存在している[137]。さらに、V β 14遺伝子は他のV β 遺伝子と異なり、C β 2遺伝子の下流に逆向きに存在している[150]。この点を考慮すると、V-D-J再構成において選択されたV β 遺伝子の染色体上の位置や方向性は、J β の選択には影響がないようであった。これらのJ β 使用頻度の偏りについては以下のような可能性が考えられた。

1) V β 遺伝子の位置や方向性の意義については明らかではないが、J β の位置はJ β の偏りに対して何らかの役割を果たしているようであった。興味深いことに、今回の実験でJ β 2遺伝子の方がJ β 1遺伝子よりも好まれて使われていることが判明した。このことは、ヒトTCR β 鎖のV β 5やV β 6[148,149]および全T細胞ポピュレーション[151]において、J β 2の方がJ β 1よりも使用頻度が高かったという報告と一致する。ヒトでもマウスでもJ β 2クラスターの方がJ β 1クラスターよりも下流にあることを考えると、遺伝子再構成において2番目のクラスターの方が好まれて使われている可能性がある。

2) また、J β 遺伝子の使用頻度については、T細胞のpositive/ negative selectionによって影響されている可能性もある。このselectionの過程では、MHC class Iあるいはclass II分子のhaplotypeがJ β の偏りに影響することも考えられる。

3) さらにJ遺伝子は、CDR領域を形成するが、この領域は抗原認識においてMHC分子のペプチド結合部位に挟まれた抗原ペプチドと相互作用するとされる[15,17]。また最近では、ペプチドが直接的にpositive selectionに関与しているという報告もある[152]。それゆえ、self-peptidesのレパトアがT細胞selectionの過程でJ β の使用頻度に影響を及ぼしている可能性も示唆される。

2-2-4 要約

マウスのT細胞レセプター (TCR) におけるV-D-Jの組み合わせに偏りが存在するかを検討するために、C57BL/6マウス脾臓で発現しているV β 2、V β 8.2ならびにV β 14ファミリーの743個のTCR β 遺伝子について解析した。TCR β 遺伝子をRT-PCR法で増幅し、plasmidにクローニングを行った。3匹のマウスから調製した各々のV β ファミリーに属するクローン61から106個をランダムに選択し、マウスの12個のJ β 遺伝子に対応した12個のoligo DNA probeを用いてハイブリダ

イゼーション法で検討した。その結果、J β 2.6が調べたいずれのV β ファミリーで最も使用頻度が高く、V β 2で19.8%、V β 8.2で21.2%、V β 14で19.2%であった。これに対し、J β 1.6の使用頻度は最も低く、V β 2で1.9%、V β 8.2で2.9%、V β 14で0.5%であった。またJ β 2.1も高頻度に使用されており、逆にJ β 1.3やJ β 1.5などは使用頻度が低かった。全体的にはJ β 2クラスターのほうがV β 2で67.8%、V β 8.2で65.9%、V β 14で70.4%とJ β 1クラスターより優位に使用されていた。これらの偏りは調べたすべてのV β ファミリーで共通に認められ、個体差もほとんど見られなかった。これらの結果より、C57BL/6マウスの脾細胞ではTCRJ β 遺伝子は偏りをもって選択をされているが、V β 遺伝子とは独立して選択されていることが明らかとなった。

第3節 マウス同種移植片に集積したT細胞のT細胞レセプターβ鎖の解析

最近の移植手術では、種々の免疫抑制療法を行うことにより、その成功率は高いものとなってきた。免疫抑制剤やその他の抗原非特異的療法は同種移植片の生着にかなり効果的である。しかしながら、これらの療法は全身的な免疫反応を抑制するため、時によっては深刻な副作用を引き起こす。もしアロ抗原特異的な免疫抑制を行うことができれば、微生物やウイルスなどの感染に対する正常な免疫反応は残したまま移植片に対する拒絶反応を抑制できることが期待できる。

現在までにアロ抗原特異的免疫抑制療法として、MHCクラスII陽性細胞の除去[153]、肝臓を介した免疫寛容の誘導[154]やドナー特異的トランスフュージョン[155,156]などが研究されている。アロ移植片を拒絶するT細胞をターゲットとすることも免疫抑制療法の1つと成り得るが、この方法を確立するためには、アロ移植片の拒絶に関与しているT細胞クロノタイプの同定が必要となる。しかしながら、*in vivo*でアロ抗原を認識して増殖あるいは集積するT細胞を検出し、モニターする方法はほとんどなく、*in vitro*で樹立されたアロ特異的T細胞株の解析が為されているのみである。

今までに述べてきたように、TCRβ鎖に対するRT-PCRとSSCPを組み合わせた解析法を用いることにより、慢性関節リウマチやその他の疾患患者の病変局所に集積したT細胞について解析できる[27,73,157]。この方法は、アロ移植片に集積したT細胞の同定にも利用が可能である。そこで、この方法でB10.A(4R)マウスからC57BL/6マウスに移植した皮膚移植片に集積したマウス $\alpha\beta^+$ T細胞のTCRβ鎖を解析した。さらに、集積したT細胞クロノタイプのJβ遺伝子の使用頻度とCDR3のアミノ酸配列について、Jβに対するoligo DNA probeを用いたPCR-enzyme immunosorbent assay (PCR-ELISA) [158]と塩基配列決定法でそれぞれ検討した。

2-3-1 実験材料と方法

1) マウス

C57BL/6マウス（日本SLC、静岡、日本より購入）およびB10.A(4R)マウス（東京大学多田教授より供与）各々雌性6週令を皮膚移植実験に用いた。

2) 皮膚移植

C57BL/6マウスをレシピエント、C57BL/6マウスおよびB10.A(4R)マウスをドナーとし、背部の皮膚をBillinghamとMedawarの方法[159]に従って移植を行った。移植後8日で脾臓と皮膚移植片を回収し、検体とした。

3) cDNA合成、PCR増幅およびSSCP解析

2) で得られた検体は各々ホモジナイズし、直ちにRNA調製を行った。Total RNAはAGPC法[68]によって抽出した。得られたtotal RNAはreverse transcriptase (SuperScriptII, BRL, Gaithersburg, Maryland) およびrandom hexamer oligonucleotide primer (100 pmol, BRL)を用いて42 °Cで1時間反応させてcDNAに変換した。このcDNA 0.2 - 0.4 μ gを鋳型とし、200 μ M dNTP、0.5 u Taq polymerase (Promega Co., Madison, Wisconsin)および各々50 pmol濃度の各V β primerとC β primerの存在下でHYBAID thermocyclerで94 °C 1分、56 °C 1.5分、72 °C 1.5分のサイクルを36回行って各TCR V β 遺伝子を増幅した。各V β に対する特異的 primerの配列はTable 14に示す [139-141, 160-163]。増幅された各TCR遺伝子をdenaturation solution (95% formamide/ 10 mM EDTA/ 0.1% bromophenol blue/ 0.1% Xylene cyanol)で希釈、90 °Cで2分間変性後、2 μ lを10% glycerolを含む非変性5% polyacrylamide gelで泳動した。泳動は35 W constant powerで約2時間行った。泳動終了後、DNAをナイロン膜(Immobilon-S, Millipore Intertech, Bedford, Maine)に転写し、biotin化したinternal C β probe 5'-GAGGATCTGAGAAATGTGACTC CAC-3'でハイブリダイゼーションを行い、結合したprobeをstreptavidin, biotin化 alkaline phosphataseおよび化学発光基質を用いた検出系(Plex Chemiluminescence kit, Millipore Intertech)で検出した。

4) PCR-ELISAによるTCR J β 領域の使用頻度の解析

マウスの機能のある12個のTCR J β 領域に関して、Kohsakaらの方法[164, 165]を応用してPCR-ELISAを行った。用いたTCR J β probeの配列は第2章第2節に述べたとおりである。すなわち、SSCPゲル上のPCR産物のバンドを切り出し、DNAを抽出し、再度biotin化したC β primerと非標識のV β primerを用いてsecond PCRを行った。ここで増幅されたPCR産物をアガロース電気泳動によって精製し、

Table 14. Oligo nucleotide sequences of the murine V β gene segment-specific primers and the murine C β gene-specific primer used in this study. The 5' end of the C β primer was biotinylated.

primer	sequences	references
V β 1	5'-TTCGAAATGAGACGGTGCCC-3'	140
V β 2	5'-AGAGGTCAAATCTCTTCCCG-3'	139, 140
V β 3	5'-CTTCAGCAAATAGACATGAC-3'	160
V β 4	5'-TGGACAATCAGACTGCCTCA-3'	139, 161
V β 5.1	5'-GAGATAAAGGAAACCTGCCC-3'	161
V β 5.2	5'-GAGCAAAGGATTCTACCC-3'	161
V β 6	5'-CGACAGGATTCAGGGAAAGG-3'	139
V β 7	5'-ATACAGGGTCTCACGGAAGA-3'	162
V β 8.1	5'-CATATGTCGCTGACAGCACG-3'	161
V β 8.2	5'-CATATGGTGCTGGCAGCACT-3'	139, 140, 161
V β 8.3	5'-CATATGGTGCTGGCAACCTT-3'	140, 161
V β 9	5'-ACAGGGAAGCTGACACTTTT-3'	139
V β 10	5'-AATCAAGTCTGTAGAGCCGG-3'	139
V β 11	5'-GGAGTCCCTGACTTACTTTC-3'	139
V β 12	5'-AAGATGGTGGGGCTTTCAAG-3'	139
V β 13	5'-TCTATAACAGTTGCCCTCGG-3'	139
V β 14	5'-CCTCCAGCAACTCTTCTACT-3'	141
V β 15	5'-CGCCTCAAAAGGCATTTGAA-3'	141
V β 16	5'-CAGCAGTGGAGTTTCTGGT-3'	141
V β 17	5'-ACAGACTTGGTCAAGAAGAG-3'	163
C β	5'-GGCTCAAACAAGGAGACCTTG-3'	-

BWバッファー(6x SSC, 0.1% Tween-20)に溶解し、streptavidinをコートしたcarboxyl化96-ウェルマイクロタイタープレートに結合させた。0.1NのNaOHでsense strandを除去した後、残存したTCR V β anti-sense strandとdigoxigenin標識した各J β probeをhybridization solution (3 M TMAC, 0.1 M NaPO₄, pH 6.8, 1 mM EDTA, 5x Denhardt's solution, 0.6% SDS)中で60 °C、2時間ハイブリタイゼーションを行った。結合したprobeをperoxidase-conjugated抗digoxigenin抗体と反応させた後、抗体に結合したperoxidaseと3,3',5',5'-tetramethylbenzidineを反応させ、o-phosphoric acidを添加した後、450 nmの吸光度を測定した。

5) DNAシーケンス

J β 領域の使用頻度を解析したsecond PCR産物について、再度対応するV β primerと先に述べたJ β probeと相補的なJ β primerを用いてPCRを行い増幅した。増幅されたTCR β 遺伝子をpBluescriptIIにサブクローニングを行い、dideoxy-sequencing法で塩基配列を決定した。

2-3-2 結果

1) 皮膚移植片に集積したマウスT細胞のTCR β 遺伝子のRT-PCR/SSCP法による解析

第1章で述べてきたように、ヒトTCR β 遺伝子をSSCPによって分離することは、T細胞ポピュレーションの中で高度に発現しているT細胞クロノタイプを検出するのに非常に効率的な方法である[27]。この系をマウスのTCR β 遺伝子の解析に応用し、検討を行った。

マウスTCR β 遺伝子は共通のC β primerとV β 1からV β 17までのV β ファミリー特異的primerを組み合わせることでPCRによって増幅された。増幅されたTCR β 遺伝子はアガロースゲル上ではすべてのTCR β ファミリーとも1本のバンドを形成した(data not shown)。次に、高度に発現しているTCR β のクロノタイプを検出するためにSSCP[26]を行った。Fig. 23に正常なC57BL/6マウスの脾細胞でのTCR β 遺伝子のSSCP解析の結果を示した。増幅されたTCR遺伝子は、すべてのV β ファミリーでスメアー様のバンドとして検出された。このことから、脾

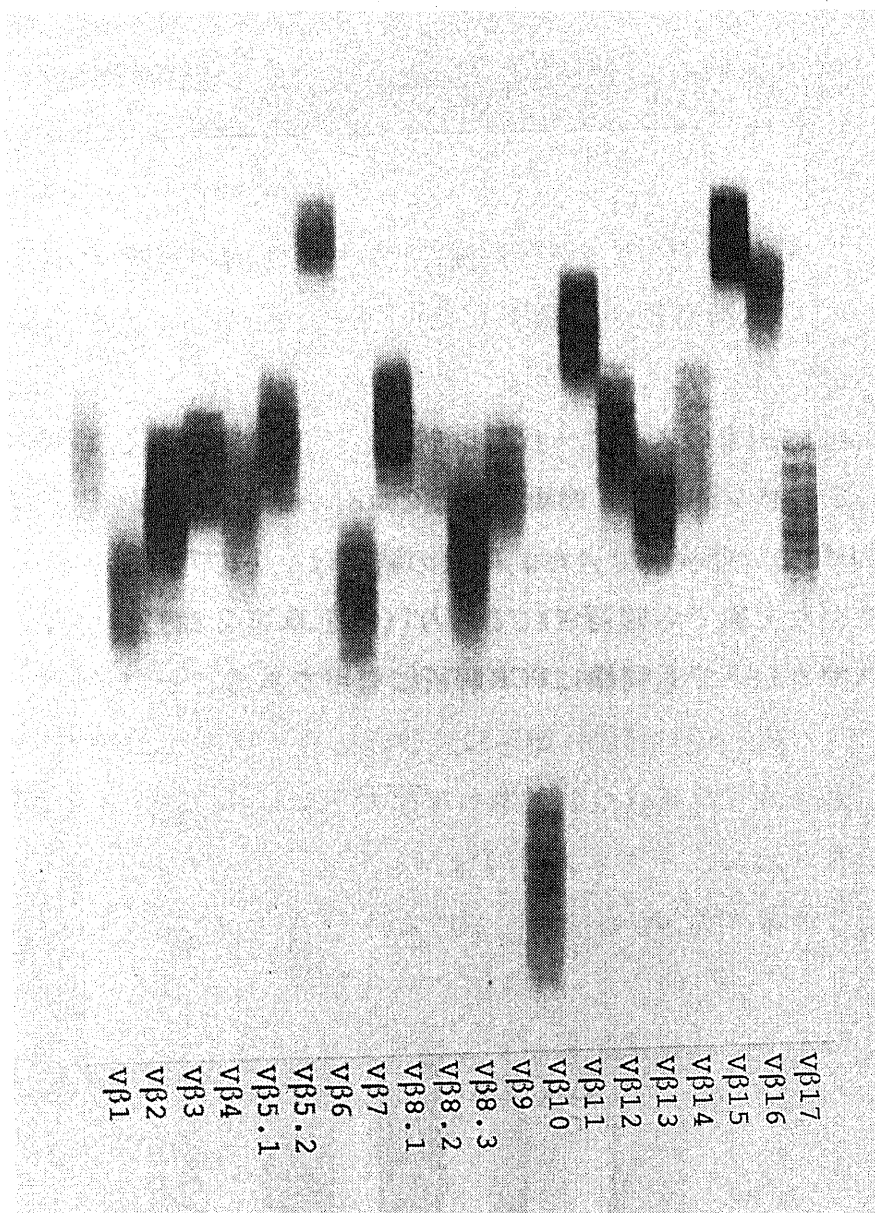


Fig. 23. Separation of TCR β genes from an untreated C57BL/6 mouse using their single strand conformation polymorphism (SSCP). TCR β genes, amplified from mRNA extracted from spleen cells by PCR with a common C β primer and one of the V β specific primers, were denatured and then separated by a non-denaturing 5% polyacrylamide gel. The TCR genes, transferred to a nylon membrane, were detected by hybridization with a biotinylated internal C β probe. Note that the TCR β genes migrated to form broad smear-like bands, reflecting extremely heterogeneous nucleotide sequences in the CDR3 regions.

細胞ではヘテロなTCR β 遺伝子のレパトアが多く使われていることが示された。これに対し、T細胞ハイブリドーマなどのひとつのクロノタイプのTCR β 遺伝子を増幅した場合には 1本のはっきりとしたバンドとしてSSCPゲル上に検出された。Fig. 24のlane1に示した様に、RL male-2ハイブリドーマでは再現性よく1本のはっきりとしたバンドとして検出されたが、正常のマウスの脾臓ではlane6に示すように広いスメアー状のバンドとなった。RL male-2細胞から調製したmRNAを正常マウス脾細胞から調製したmRNAと混合し、これをRT-PCR後、SSCP解析を同様に行ったところ(Fig. 24; lane2-5)、RL male-2細胞由来の1本のバンドが、脾細胞由来のスメアー状バンドの上にはっきりとしたバンドとして認められた。このバンドはRL male-2細胞のmRNAと脾細胞のmRNAの混合比が、1:500から1:2000までで検出できた。同様の結果はヒトのT細胞ハイブリドーマであるEL4を用いた実験でも確認されており（第1章第2節）、SSCPによる解析法は、マウスでもヒトでも同様にTCR解析に有用であることが示唆された。

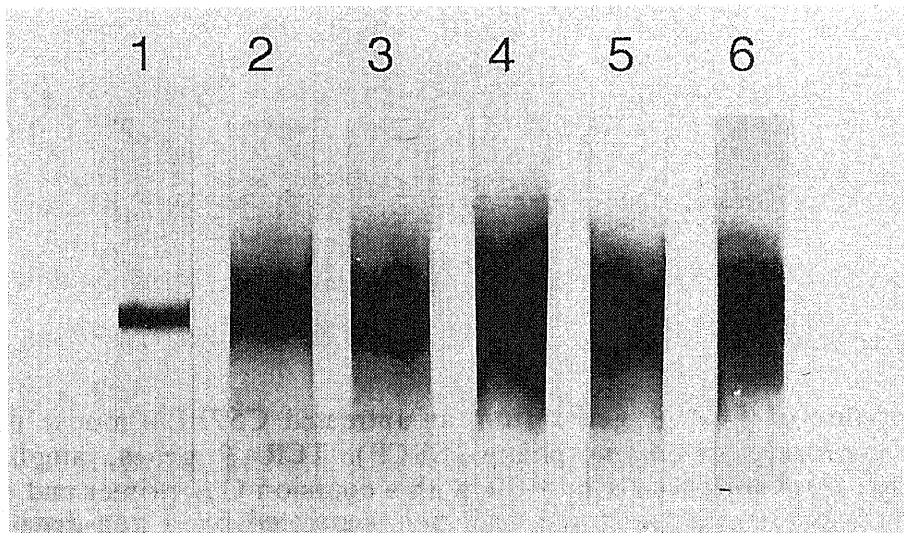


Fig. 24. Detection of a highly expressed TCR β gene by using their SSCP. TCR β genes, amplified from mRNA extracted from T cell hybridoma of RL male-2 by PCR with the common C β primer and a V β 6 primer, were separated by their SSCP (lane 1). After the mRNA from the hybridoma was mixed at various ratios with mRNA from normal spleen cells, the mixtures were similarly analyzed (lane 2, 3, 4, and 5). The mixture ratios of the hybridoma mRNA to the spleen cell mRNA were 1:100, 1:500, 1:2,000, and 1:4,000, respectively, in lanes 2, 3, 4, and 5. Lane 6 shows the result obtained with spleen cells alone.

皮膚移植片から調製したTCR β 遺伝子のmRNAについてRT-PCR/SSCP法で検討した。B10.A(4R)マウスの皮膚の小片をアロジェニックにC57BL/6マウスに移植を行い、移植片が完全に拒絶される前である8日目に移植片と脾臓を摘出しRNA抽出を行った。Fig. 25に示すように、移植片では全てのV β ファミリーについてSSCPゲル上でスメアーなバンドの上に数本のはっきりとしたバンドが形成された。このことから、皮膚移植片でT細胞が増殖あるいはオリゴクローナルに集積していることが明らかとなった。

2) 皮膚移植片に集積したTCR β 鎖の検出

1) で述べた基礎検討に基き、ランダムに選択した10個のV β ファミリーについて集積したT細胞のクロナタイプについて検討した。選択したV β ファミリーはV β 3, 4, 5.2, 6, 8.2, 9, 11, 13, 14と16である。各々についてB10.A(4R)からC57BL/6へのアロ移植4例とC57BL/6からC57BL/6へのシン移植2例を解析した。アロ移植マウス4例(Am1-4)と典型的なシン移植1例(Sm1)の結果をFig. 26に示した。レシピエントのC57BL/6マウスのアロ移植片から調製した検体は、検討した4例のマウスの全てのV β ファミリーにおいてスメアー上にはっきりとしたバンドを形成した(Am1-4; laneG)。これに対し、シン移植片から調製した検体では、検討した全てのV β ファミリーにおいてスメアー上に薄いバンドしか検出されなかった。これらのことより、T細胞クロナタイプの集積はシン移植よりもアロ移植でかなり強く起きており、アロ移植片中で増殖しているいくつかのT細胞クロナタイプはアロ抗原の認識に関与していることが示唆された。

注目すべきことに、このように明らかなT細胞の集積はアロ移植であれ、シン移植であれ、脾細胞からの検体ではほとんど検出されなかった(Sm1およびAm1-4; LaneS)。これらのスメアー様のパターンはFig. 23で示した正常脾細胞からの検体のパターンとほとんど同じであった。つまり脾細胞のT細胞レパトアはアロ移植された皮膚小片の拒絶には影響を受けないことが示唆された。また、正常のC57BL/6マウスの皮膚からの検体ではTCR β 遺伝子は十分には検出されなかったことより (data not shown)、今回の検討より除外した。

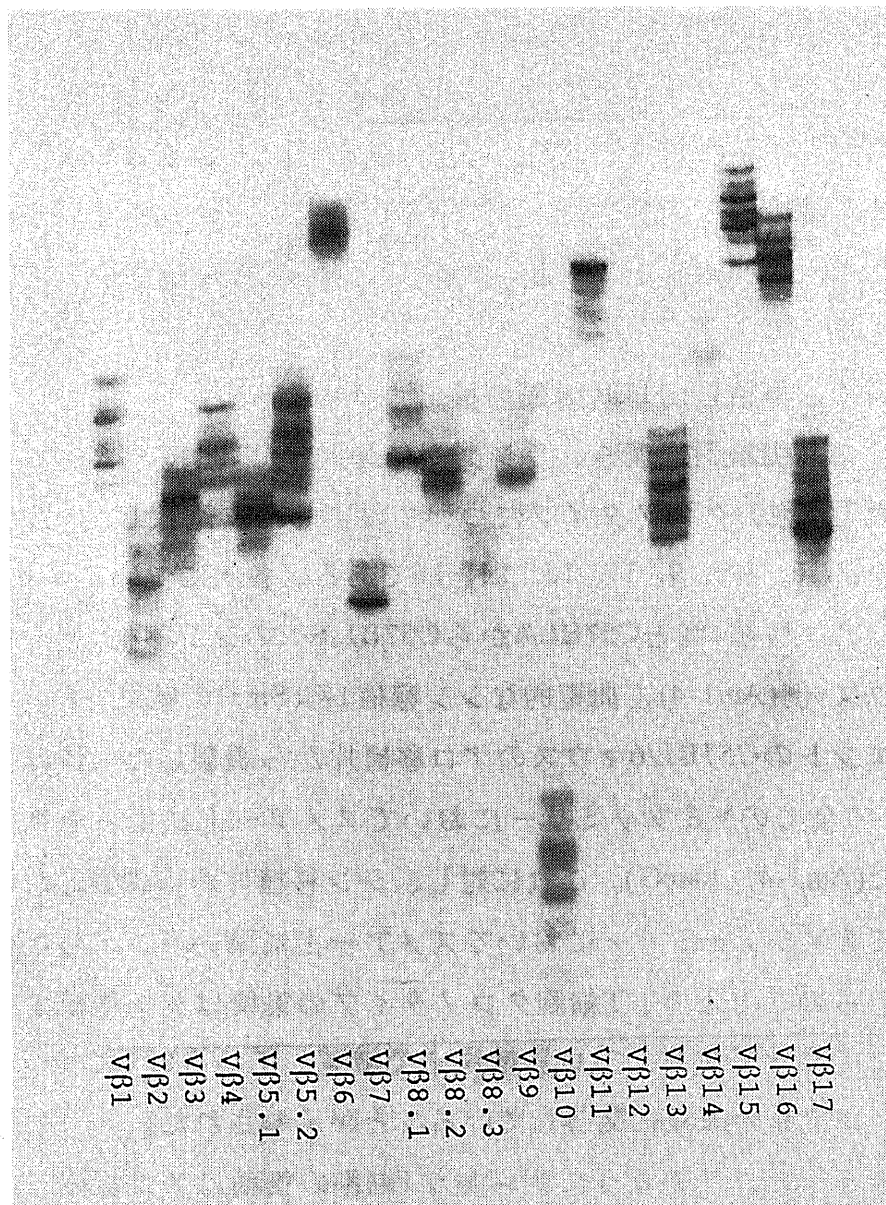


Fig. 25. Separation of TCR β genes from a skin allograft from a B10.A(4R) mouse to a C57BL/6 mouse. Eight days after skin grafting, mRNA was extracted from the graft, from which TCR β genes were amplified and analyzed in the same manner in Fig. 23.

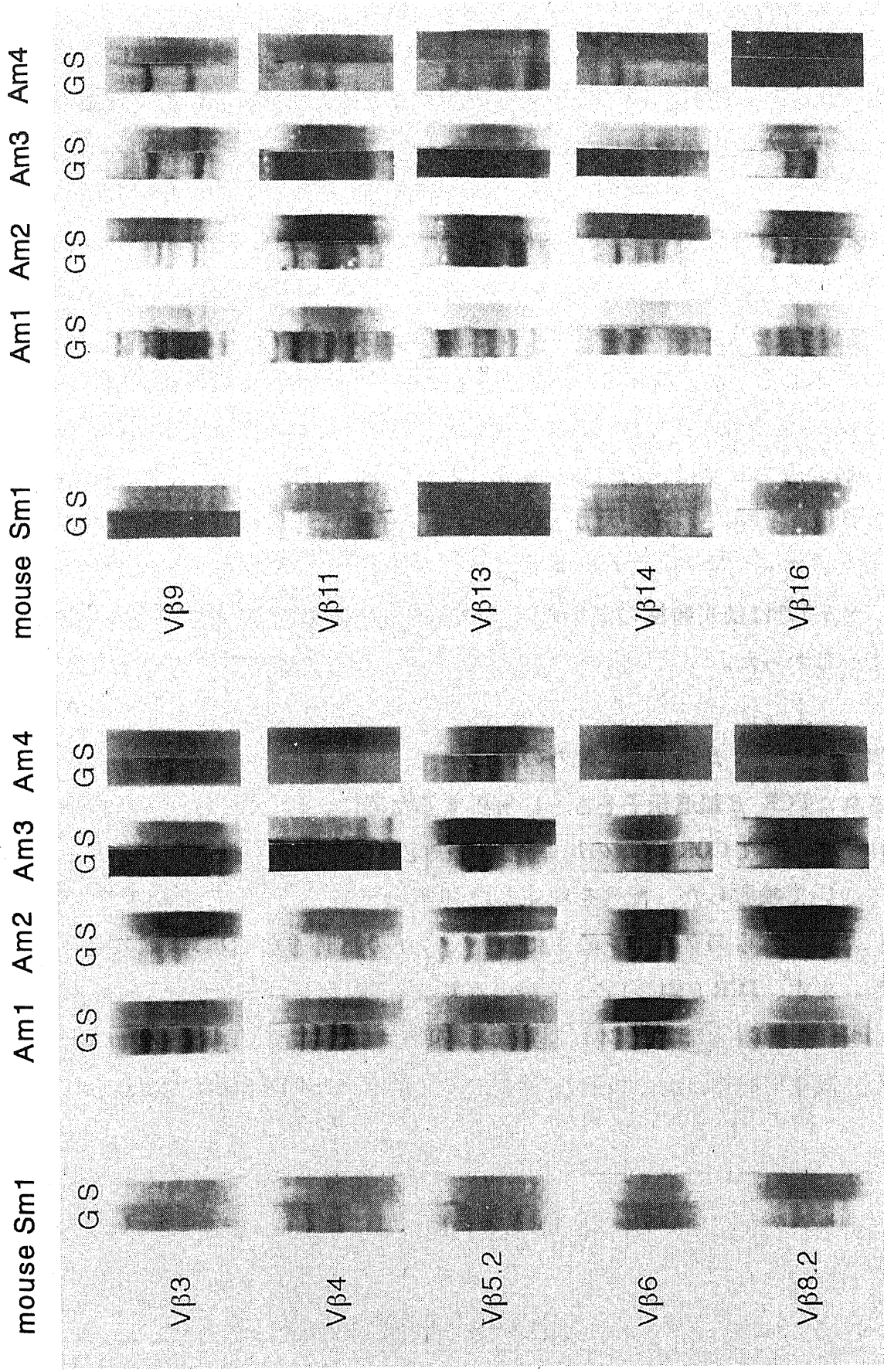


Fig. 26. SSCP separation of TCR β genes amplified by PCR with a common C β primer and one of 10 V β specific primers in syngeneically engrafted skin (from C57BL/6 to C57BL/6) and allogeneically engrafted skin (from B10.A(4R) to C57BL/6). The analytical methods used were those described in fig. 23. Sm1 indicates syngeneically engrafted mouse; Am1-4, allogeneically engrafted mouse 1-4; S, spleen; G, graft.

3) 集積したT細胞におけるTCR J β 使用頻度の検討

集積したT細胞のTCR β 鎖の特徴を明らかにするため、アロ移植片中に集積したT細胞クロナタイプ数を各V β ファミリー毎にまとめた(Table 15)。T細胞のオリゴクローナルな増幅が検討したほとんど全てのV β ファミリーで認められた。

次にこの集積したT細胞のTCR J β 使用頻度について検討した。各々のバンドに相当するPCR産物をSSCPゲルから回収し、マウスで機能している12個のJ β 遺伝子に対応する12個のオリゴDNA probeを用いてPCR-ELISAを行った。V β 3, 5.2, 6, 9, 16から得た68のバンドについてJ β 使用頻度を解析した (Table 16)。これらのTCR遺伝子は、種々のJ β 遺伝子を使っていたが、使用頻度として、あるJ β 遺伝子に偏る傾向が見られた。例えばV β 3ファミリーでは調べたTCR V β バンド16個のうち5個は、J β 1.2が使用されていた。同様にV β 9では13個のうち4個はJ β 1.4が使用されていたが、このJ β 遺伝子はV β 3ではあまり使用されていなかった。さらにV β 16においては11クローン中6クローンにJ β 2.6が認められたが、V β 3では使用頻度の高いJ β 1.2やV β 9での使用頻度の高いJ β 1.4は使用されていなかった。

4) 検出されたTCR β 鎖の塩基配列の検討

検出されたTCR β 鎖遺伝子をさらに解析するために、3) で検討した5つのV β ファミリーについてCDR3領域の塩基配列を決定し、それから推定されるアミノ酸配列について検討した。配列を決定した30個のバンドについての結果をTable 17に示した。これらのクローンの中にはいくつかの相同的なCDR3領域の配列が見られた。まず、TCR β 鎖の1アミノ酸のみ異なるT細胞クローンが同一マウス内にも (Table 17; no. 4と5, 28と29)、異なる2匹のマウスでも (Table 17; no. 1と2) 見られた。同様にいくつかの共通の3連続アミノ酸配列がCDR3領域で認められた (T-G-G, no. 4, 5, 10, 12, 17と20; S-R-D, no. 8, 15と25; D-W-G, no. 15と22)。TCRのCDR3領域はMHCによって提示された抗原を認識するのに必須の部位であるので、これらの相同的配列は同一かあるいは非常によく似た抗原、たぶんアロ抗原を認識している。これらを総合すると、このクロナタイプ解析法はアロ移植拒絶に関与するTCRクロナタイプを高効率に検出することができた。

Table 15. Number of accumulating T cell clonotypes in mouse skin allografts.

mouse	V β									
	3	4	5.2	6	8.2	9	11	13	14	16
Am1	7	6	6	5	7	7	7	7	9	5
Am2	2	4	4	5	5	5	6	4	6	4
Am3	6	4	5	4	3	5	5	6	7	3
Am4	3	2	4	2	1	3	2	5	2	3
total	18	16	19	16	16	20	20	22	24	15

Table 16. TCR J β usage of accumulating T cells in the skin allografts.

V β	mouse	J β											
		1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6
V β 3	Am1		1	2					1	1		1	
	Am2				1				1				1
	Am3		3									1	
	Am4	1	1										1
V β 5.2	Am1				1			1			2		2
	Am2		1										2
	Am3				1								
	Am4							1		1	1	1	
V β 6	Am1		2	1				2					1
	Am2				1							1	1
	Am3					1		2					
	Am4	2											
V β 9	Am1				2			2			1	1	1
	Am2				1								
	Am3	1			1	1							
	Am4								1				1
V β 16	Am1	1		1				1					2
	Am2	1											2
	Am3					1							
	Am4												2
		1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6

Table 17. Amino acid sequences of TCR β chain CDR3 regions of the accumulating T cells in skin allografts.

V β 3 family

No.	mouse	V β	CDR3	J β
1	Am1	TGT GCC AGC AGT C A S S	TGG GAC AAA ACA W D K T	AAC TCC GAC (1.2) N S D
2	Am4	TGT GCC AGC AGT C A S S	TGG GAC CAA ACA W D Q T	AAC TCC GAC (1.2) N S D
3	Am3	TGT GCC AGC C A S	AGA CGG GGA CAG GGA GCA R P G Q G A	AAC TCC GAC (1.2) N S D
4	Am3	TGT GCC AGC AGT CTG C A S S L	GGG ACA GGA GGC G T G G	TCC GAC (1.2) S D
5	Am3	TGT GCC AGC AGT C A S S	CCC GGG ACA GGG GGC P G T G G	TCC GAC (1.2) S D
6	Am1	TGT GCC AGC C A S	AGC CAC AGA AAT S H R N	TCT GGA AAT ACG (1.3) S G N T
7	Am1	TGT GCC AGC C A S	AGC CCC CTA CAG S P L Q	GGA AAT ACG (1.3) G N T
8	Am1	TGT GCC AGC C A S	AGC CGG GAC AGG GAG TCC S R D R E S	GGG CAG (2.2) G Q
9	Am1	TGT GCC AGC C A S	AAC CTG GGG GGT N L G G	AGT GCA GAA ACG (2.3) S A E T
10	Am2	TGT GCC AGC AGT CTG C A S S L	TCA ACT GGG GGG CTC S T G G L	TCC TAT GAA (2.6) S Y E
11	Am4	TGT GCC AGC C A S	AGA CTC GCG AGG R L A R	TAT GAA (2.6) Y E

Vβ 5.2 family

No.	mouse	Vβ	CDR3	Jβ	
12	Am1	TGT GCC AGC TCT CTC C A S S L	GGA ACA GGG GGC TTT GGG G T G G F G	GAA AGA E R	(1.4)
13	Am3	TGT GCC AGC TCT CTC C A S S L	GGA CAG ATT G E I	TCC AAC GAA AGA S N E R	(1.4)
14	Am4	TGT GCC AGC TCT C A S S	CAC GGG ACA GAC H G T D	ACC T	(2.4)
15	Am4	TGT GCC AGC C A S	TCC CGG GAC TGG GGC S R D W G	CAA GAC ACC Q D T	(2.5)
16	Am1	TGT GCC AGC TCT C A S S	CTG GAC AGG GGG CGA L D R G R	GAA E	(2.6)
17	Am1	TGT GCC AGC TCT C A S S	CCC ACC GGG GGC P T G G	TAT GAA Y E	(2.6)
18	Am2	TGT GCC AGC C A S	TGT CCA CAC TGG GGA AGC S P H W G S	TCC TAT GAA S Y E	(2.6)
19	Am2	TGT GCC AGC TCT C A S S	CCG GGA CTG GGG GGT P G L G G	TAT GAA Y E	(2.6)

Vβ 6 family

No.	mouse	Vβ	CDR3	Jβ	
20	Am1	TGT GCC AGC C A S	AGG TGG ACT GGG GGA R W T G G	AAC TAT GCT GAG N Y G Q	(2.1)
21	Am1	TGT GCC AGC AGT C A S S	ATA GTC AAT I V N	TAT GAA Y E	(2.6)
22	Am2	TGT GCC AGC AGT C A S S	ATA GAC TGG GGG I D W G	TAT GAA Y E	(2.6)

Vβ 9 family

No.	mouse	Vβ	CDR3	Jβ	
23	Am1	TGT GCC AGC AGT C A S S	AGA GTT CAG GGG GAT R V Q G D	TCC AAC GAA AGA S N E R	(1.4)
24	Am3	TGT GCC AGC AGT C A S S	AGA GAC AGG GAA CAC R R D E H	GAA AGA E R	(1.4)
25	Am1	TGT GCC AGC AGT C A S S	AGA GAT GGG ACT GGG GAA R D G T G E	GAC ACC D T	(2.5)

Vβ 16 family

No.	mouse	Vβ	CDR3	Jβ	
26	Am1	TGT GCC AGC AGC TTA C A S S L	TTT GGG GGG GCG CGT F G G A R	GAA E	(2.6)
27	Am1	TGT GCC AGC AGC C A S S	TCG GGA CTG GTC S G L V	TAT GAA Y E	(2.6)
28	Am2	TGT GCC AGC AGC TTA C A S S L	GCT GGG GGG GAA GGC A G G E G	TAT GAA Y E	(2.6)
29	Am2	TGT GCC AGC AGC C A S S	GCT GGG GGG GAA GGC A G G E G	TAT GAA Y E	(2.6)
30	Am4	TGT GCC AGC AGC C A S S	TTG ACT GGG GTC L T G V	TCC TAT GAA S Y E	(2.6)

RT-PCR/SSCP法は、第1章で述べた様にヒトのT細胞ポピュレーション中に集積したT細胞クロノタイプを検出することに応用できる方法である[27,44]。この節では、マウスのT細胞クロノタイプの検出系、特に皮膚アロ移植片中に集積したT細胞クロノタイプを検出する系を確立した。この方法を用いて、実際にマウスTCR β 鎖の増幅を検出した(Fig. 23-26)。検出感度はヒトの検体に対する感度と同等であった[27]。この解析法によりマウスおよびヒトの検体におけるT細胞の集積を効果的に検出できた。

オリゴクローナルなT細胞の集積は、RT-PCR/SSCP法による検討ではシン移植片よりもアロ移植片の方で激しく認められた。これらの集積したT細胞クロノタイプは、アロ移植片の拒絶に何らかの役割を果たしていると考えられ、これらのT細胞クロノタイプが共通の特徴を持っているのかを知ることは拒絶のメカニズムを考える上で重要である。V β 遺伝子の使用頻度を検討した限り、明瞭なバンドの数ではV β 遺伝子の使用には際立った偏りは認められなかった。しかし、偏ったTCR β 遺伝子の使用については今までに報告されており、ラットにおいて主要組織適合抗原あるいは非主要組織適合抗原の異なる心臓のアロ移植を行った場合の早期拒絶でみられる移植片に浸潤したT細胞は、V β 4を持ったT細胞が多く、このTCR β 遺伝子の偏りはTCR α 遺伝子の偏りよりも強かったと報告されている[166,167]。この報告と今回の結果の違いは、解析法（全TCR β 遺伝子の発現の検討か増幅したTCRクロノタイプのみ検出）、拒絶の状況あるいは移植した臓器などの実験状態の違いを反映していることが考えられた。さらに、各V β ファミリーでのTCRの発現は、明確なT細胞クロノタイプの検出感度に影響され、TCRクロノタイプの正確な定量化には現在のシステムではまだ改良の余地がある。

今回、調べたTCR β ファミリー間で明確なバンドの数にほとんど差が見られなかったが、検出されたすべてのT細胞クロノタイプがアロ移植片の拒絶に直接的に関わっているわけではないと考えられる。実際、Gossらはある種のV β に対するモノクローナル抗体の投与がMHCの異なるアロ移植の生着率を上昇させたと報告している[168]。また、今回の検討でもV β 3-J β 1.2、V β 9-J β 1.4、V β 14-J β 2.6などのV β -J β 遺伝子の組み合わせが優位に現われていた。特にJ β 1.2とJ

$\beta 1.4$ は正常のC57BL/6マウスでは使用頻度は高くない遺伝子である[158]。したがって、これらのJ β 遺伝子を持つことがアロ抗原の認識に重要な役割を果たす可能性が示された。

もう1つの重要な点は、これらの皮膚移植は脾細胞のT細胞クローナリティーには何ら影響を与えていない可能性があることである(Fig. 26)。このことは、臓器移植時に拒絶反応を起こすT細胞のモニタリングは末梢血だけでは困難であることを示唆している。

シン移植片で見られた弱いバンドは、移植による炎症反応によると考えられ(Fig. 26)、また、autologous混合リンパ球培養試験(MLR)[169]で見られるような免疫反応も起きていた。シン移植片で起きた反応については更なる解析が必要と考えられる。

TCR β 遺伝子は正常な皮膚の検体からは十分には増幅されず、それゆえ今回の実験では検討できなかった。このことは、たぶん正常なマウスの皮膚には $\gamma\delta^+$ T細胞が優位であり、 $\alpha\beta^+$ T細胞が少ないこと[170,171]を反映している。したがって、 $\alpha\beta^+$ T細胞がここで検出されたということは、これらの細胞がレシピエントに由来し、移植された皮膚中で増殖したと考えられる。

さらに興味深いことに、いくつかのTCRクロノタイプで共通のCDR3領域のアミノ酸配列を持っていたことが示された。同じTCR β 鎖を持つT細胞は、これを解明するためにはT細胞の機能解析をする必要があるが、同一のあるいは同様のアロ抗原を認識していると考えられた。

今回、検出されたT細胞クロノタイプの抗原特異性を明らかにすることは現時点では困難であるが、この方法には*in vivo*でアロ移植片に集積あるいはそこで増殖しているT細胞クロノタイプを直接的に検出するにはたいへん優れた方法であり、このアプローチは移植拒絶におけるT細胞の関与を検討する上で強力な武器となると考えられる。

2-3-4 要約

移植組織中で免疫反応を起こすT細胞について検討することは、組織移植におけるアロ移植の拒絶反応を制御する上での重要な情報を得ることができると思

られる。この点からB10.A(4R)マウスからC57BL/6マウスに皮膚移植を行い、*in vivo*でこの移植片に浸潤してきたT細胞の解析を行った。皮膚移植片に浸潤したT細胞よりTCR β 遺伝子をRT-PCRで増幅し、SSCPを行うことによってT細胞クロナタイプの分析を行った。この後J β 遺伝子の使用頻度とCDR3領域の塩基配列を決定した。アロ移植ではシン移植に比べて明瞭なオリゴクローナルなT細胞の移植片への集積が認められた。また、集積したT細胞クロナタイプは多くのV β ファミリー遺伝子を使用しているにもかかわらず、V β -J β の組み合わせに嗜好性が見られた。アロ移植片に集積したこれらのTCR β 遺伝子にはいくつかの共通アミノ酸配列が認められたことより、これらのT細胞は同一あるいは類似した抗原を認識している可能性が示された。さらにアロ移植あるいはシン移植を行ったマウスの脾臓ではほとんどT細胞の集積は認められなかった。以上のことより*in vivo*において皮膚アロ移植片に浸潤するT細胞クロナタイプが認められ、これらは共通性を持っていることが明らかとなった。このことは、臓器移植におけるT細胞クロナタイプ特異的免疫療法の可能性を示した。

総括と展望

生体での免疫反応時における抗原特異的T細胞の存在の証明をすることは非常に重要である。自己免疫疾患などにおいては、自己抗原特異的T細胞を特定することによって病因を明らかにすることができる。しかしながら、生体内に大量に存在するリンパ球集団の中から、特定のT細胞クロノタイプの存在を簡便に証明する方法はほとんどない。本論文ではRT-PCRとSSCP法を組み合わせた集積したT細胞クロノタイプ解析法を用い、種々の疾患や動物モデルにおいて、抗原特異的な免疫反応に参与しているT細胞を解析した。

第1章では各種疾患患者より採取した病変部位に浸潤したT細胞クロノタイプについて検討した。

TCRメッセージをRT-PCR法によって増幅した後、SSCP法で分離する方法は、簡便にT細胞クロノタイプを検出でき、数千個に1個割合での増幅したクローンが存在すれば検出が可能であった。この系を用いて慢性関節リウマチ患者(RA)におけるT細胞クロノタイプを解析した。RA患者の病変局所である関節には、顕著なT細胞の浸潤と限られたT細胞クロノタイプの集積が認められた。各患者の同一病変関節内の異なる部位に共通のT細胞クロノタイプが存在し、一部の患者では末梢血にも共通に認められるクローンが存在した。増大したT細胞クロノタイプのTCR β 遺伝子では、J β 2.1遺伝子が優位に使用されていた。J β 遺伝子は抗原認識に重要な部分のアミノ酸をコードしており、この遺伝子の使用に偏りが認められたことは、かなり限定された抗原が関与していることを示し、RA患者では抗原特異的な免疫反応が起きていることが明らかとなった。

免疫性肺疾患であるサルコイドーシスでは、肺と末梢血において集積しているT細胞の解析を行った。健常人およびサルコイドーシス患者とも、肺洗浄液中に末梢血と比較して、多くのT細胞クロノタイプの増大が認められた。サルコイドーシス患者の肺では、健常人に比較してさらに多くのT細胞クロノタイプの集積が見られ、これらの集積したT細胞クロノタイプはすべてのV β サブファミリーで認められた。これらのことより、T細胞はサルコイドーシス病変局所で活性化されていることが判明した。

婦人科固形癌においては癌局所、付属リンパ節および末梢血についてT細胞クロノタイプの解析を行った。癌局所におけるT細胞の浸潤およびクローナルな増大は、明らかな転移のない患者でも検出された。これに対し、転移を起こした患者ではT細胞のクローナルな集積が癌病変局所のみならず、近位の付属リンパ節や末梢血でも認められた。この集積したT細胞クロノタイプの数や局在は、癌浸潤のステージや転移の度合と相関している傾向が見られた。これらのことより癌患者の生体内では固形癌に対する抗原特異的免疫反応が起きていることが明らかとなった。

第2章ではマウスにおいてTCRJ β 遺伝子の使用頻度の解析と、免疫反応を起こした動物のモデルとして皮膚移植片に集積したT細胞クロノタイプの解析を行った。

マウスTCRにおけるV-D-J遺伝子の再構成における遺伝子の組み合わせの嗜好性をC57BL/6マウスの脾臓で発現しているTCRV β 2、8.2および14ファミリーについて検討した。J β 遺伝子は偏りをもって使用されており、J β 2.6遺伝子の使用頻度は調べたいずれのV β ファミリーでも最も高く、逆にJ β 1.6の使用頻度はいずれのV β ファミリーでも低かった。全体的にはJ β 2遺伝子の方がJ β 1遺伝子より優位に使用されていた。これらの偏りは個体差も認められなかったことより、C57BL/6マウスの脾細胞ではTCRJ β 遺伝子は偏りをもって選択されており、この選択はV β 遺伝子とは独立していることが示された。

マウス皮膚移植では、B10.A(4R)からC57BL/6に移植したアロ移植片中に顕著なT細胞クロノタイプの集積を認めた。これらのT細胞クロノタイプはほとんど全てのV β ファミリーにわたっていたが、V β -J β の組み合わせには偏りが見られた。また、CDR3領域のアミノ酸配列にいくつかの共通モチーフが存在したことより、集積したT細胞クロノタイプは同一あるいは類似の抗原を認識していることが判明した。

以上に述べてきたように、TCRメッセージのRT-PCR産物についてSSCPで解析する方法は、リンパ球集団のなかでクローナルに増幅しているT細胞を検出するのに最も適した方法の1つである。この方法は抗原特異的なT細胞の反応を臨床だけでなく、基礎免疫の解析法として応用できる。しかしながら、リンパ球集団のなかで集積しているT細胞クロノタイプを検出することは、悪性にトランスフォームしたT細胞や限られたT細胞を活性化できる未知の物質の存在も考慮しなくてはならず、必ずしも抗原特異的な反応だけを見ているとは限らない。

この方法では、PCRにおけるバイアスは考慮しなくてはならないが、特長として検体中のT細胞の解析を*in vitro*でのアーチファクトと切り離して解析できることが挙げられる。これまで、検体から限られた数のV β 遺伝子が増幅されたことのみでT細胞のオリゴクローナリティーを報告した例も存在した。しかしながら、TCR遺伝子の特徴を考えると、クローナリティーはCDR3領域の塩基配列の違いによって判断されるべきである。この点において、RT-PCR/SSCP法は直接T細胞クロノタイプを決定する最も簡便な方法である。そのうえ、異なる検体間でのT細胞クロノタイプの共通性の検討も簡単にできる。この方法を用いることによって、免疫反応はランダムな出来事ではないことが判明してきた。ただし、異なる個体間の比較に関しては、同じエピトープに対する反応であっても、アミノ酸配列にすれば同じであるにもかかわらず、個体によってT細胞のTCRの塩基配列は統計学的に異なり、SSCPではこのような場合には異なる移動度のバンドとして提示するため、解析が難しい。

簡便なT細胞クロノタイプ解析に加えて、我々はより詳細な情報収集にこの方法を拡大している。例えば、この検出系により明確な反応を起こす特異的抗原の決定に用いることができる。今までは、T細胞株を樹立する方法、推定抗原で刺激後総リンパ球集団に対するT細胞の増殖を測定する方法などが確立されていたが、臨床免疫において*in vivo*の標的抗原の特定には限られた方法しかなく、最終的な抗原の同定までには至っていない。これに関してはRT-PCR/SSCP法は有利な点がある。先に述べたように異なる検体中の同一のクローンは同じゲルで電気泳動することによって簡単に検出でき、例えば*in vivo*で集積している病変部位のT細胞クロノタイプと、同一患者より採取したPBLを*in vitro*で推定される抗原で刺激して産生させたT細胞クロノタイプを比較することができるのである。実際に予備検討ではあるが、RAや肝炎患者で*in vivo*で集積しているT細胞について同定したが、この系の感度は、通常のT細胞増殖試験に比較してかなり高感度であることが示されている。

これまでは、*in vivo*の反応に関与している特定のT細胞についてクローンレベルで評価することは困難であった。T細胞株の樹立は、これを目的として行われてきた実験である。これに関しても、我々の系では*in vivo*で集積しているT細胞のTCRの遺伝子情報まで得られた。それゆえ、我々は集積した細胞で使われているTCR α 鎖と β 鎖の組み合わせを正しく同定したかを、*in vitro*で再構成し抗原特異性で確認することが可能である。現在、これについてフォーカスをあてた研究もなされている。今

後、この方法は抗原特異的なT細胞の*in vitro*での大量に調製に役立つようになると思われる。

緒言にも述べたように、現在のところ自己免疫疾患の抗原特異的な治療法はない。自己免疫疾患の動物モデルであるEAEマウスや関節炎マウスにおいては、抗TCRV β 抗体による疾患治療が試みられ、成果が上げられている。ヒトにおいてはモデル動物と異なり疾患とTCRとの関係がより複雑であり、動物での方法を適応することは難しい。しかし、特定のT細胞クロノタイプと病態への関与が確認されたならば、先にEAEマウスや関節炎マウスで効果が認められたように特定の抗TCR抗体やTCRペプチド投与によるイディオタイプネットワークを介したT細胞ワクチネーションなどの抗原特異的な治療がヒトにおいても可能と思われる。また固形癌に対しては、癌を認識するTILを*in vitro*で再構成して投与することによりより効果的なTIL療法の開発が期待される。現在、本論文で応用したRT-PCR/SSCP法は、さらに多くの悪性疾患や自己免疫疾患をはじめとした免疫性疾患の治療や免疫学的現象の解析に応用されており、抗原特異的な治療法の開発が研究されている。

謝辞

終わりに臨み、本論文の作成にあたり、御指導と御鞭撻を賜りました千葉大学薬学部 五十嵐一衛教授に謹んで謝意を表します。

本研究の遂行にあたり、御指導と御鞭撻を賜りました聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター 水島裕教授ならびに西岡久寿樹教授に謹んで謝意を表します。

本研究の遂行にあたり、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました九州大学生体防御医学研究所（前聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター助教授）山本一彦教授に謹んで謝意を表します。

本研究の機会を賜りました大正製薬株式会社 上原明社長、大平明副社長、大関正弘監査役に謹んで感謝致します。また、終始暖かい御指導と御鞭撻を賜りました大正製薬創薬開拓部 花田和紀博士、村松信博士に心より感謝致します。また、御支援を賜りました大正製薬株式会社医薬企画室 並木信重郎博士、創薬研究所所長 森本繁夫博士、分子生物研究室 原寛次席研究員、創薬第2研究室 吉村広光博士に謹んで感謝致します。

本研究の遂行にあたり、御指導と御協力を賜りました聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター 五十嵐理慧助教授、林和彦助教授、加藤智啓博士、増子佳世博士、蓮沼智子博士、高橋誠治博士、日本医科大学 吉野槇一教授、東京大学医学部 土肥真博士、田中篤博士、福島県立医科大学 大久保光夫博士、ならびに黒川真奈絵博士に謹んで感謝いたします。

また、本研究の遂行に終始御協力頂きました聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター臨床遺伝部門 丹羽恵美さん、笹川広子さん、鈴木智さん、中井勇太さん、若松亜未さん他の皆様に心より感謝致します。

参考文献

1. Acha-Orbea, H., Mitchell, O. J., Timmermann, L., Wraith, D. C., Tansch, G. S., Waldor, M. K., Zamvil, S. S., McDevitt, H. D. and Steinman, L.: Limited heterogeneity of T cell receptor from lymphocytes mediating autoimmune encephalomyelitis allows specific immune intervention. *Cell* 54, 263-273 (1988)
2. Vandembark, A. A., Hashim, G. and Offner, H.: Immunization with a synthetic T-cell receptor V-region peptide protects against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nature* 341, 541-544 (1989)
3. Heber-Katz, E. and Acha-Orbea, H.: The V-region disease hypothesis. evidence from autoimmune encephalomyelitis. *Immunol. Today* 10, 164-169 (1989)
4. Infante, A. L., Levcovitz, H., Gordon, V., Wall, K. A., Thompson, P. A. and Krolick, K. A.: Preferential use of a T cell receptor V β gene by acetylcholine receptor reactive T cells from myasthenia gravis-susceptible mice. *J. Immunol.* 148, 3385-3390 (1992)
5. Kumar, V., Kono, D. H., Urban J. L. and Hood, L.: The T-cell receptor repertoire and autoimmune diseases. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 657-682 (1989)
6. Reich, E. P., Scaringe, D., Yagi, J., Sherwin, R. S. and Janeway, C. A. Jr.: Prevention of diabetes in NOD mice by injection of autoreactive T-lymphocytes. *Diabetes* 38, 1647-1651 (1989)
7. Bacelj, A., Charlton, B. and Mandel, T. E.: Prevention of cyclophosphamide-induced diabetes by anti-V β 8 T-lymphocyte-receptor monoclonal antibody therapy in NOD/Wehi mice. *Diabetes* 38, 1492-1495 (1989)
8. Maeda, T., Sumida, T., Kurasawa, K., Tomioka, H., Ito, I., Yoshida S. and Koike, T.: T-lymphocytes-receptor repertoire of infiltrating T lymphocytes into NOD mouse pancreas. *Diabetes* 40, 1580-1585 (1991)
9. Nakano, N., Kikutani, H., Nishimoto, H. and Kishimoto, T.: T cell receptor V gene usage of islet β cell-reactive T cells is not restricted in non-obese diabetic mice. *J. Exp. Med.* 173, 1091-1097 (1991)
10. Oksenberg, J. R., Stuart, S., Begovich, A. B., Bell, R. B., Erlich, H. A., Steinman, L. and Bernard, C. C. A.: Limited heterogeneity of rearranged T-cell receptor V α transcripts in brains of multiple sclerosis patients. *Nature* 345, 344-346 (1990)
11. Chothia, C., Boswell, D. R. and Lesk, A. M.: The outline structure of the T-cell α/β receptor. *EMBO J.* 7, 3745-3755 (1988)
12. Jorgensen, J. L., Reay, P. A., Ehrlich, E. W. and Davis, M. M.: Molecular components

- of T-cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 10, 835-873 (1992)
13. Malissen, B. and Schmitt-Verhulst, A. M.: Transmembrane signalling through the T-cell-receptor-CD3 complex. *Curr. Opin. Immunol.* 5, 324-333 (1993)
 14. Weiss, A. and Littman, D. R.: Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76, 263-274 (1994)
 15. Engle, I. and Hedric, S. M.: Site-directed mutations in the VDJ junctional region of a T cell receptor beta chain cause changes in antigenic peptide recognition. *Cell* 54, 473-484 (1988)
 16. Chein, E. H. and Davis, M. M.: How alpha-beta T-cell receptors 'see' peptide/MHC complexes. *Immunol Today* 14, 597-602 (1993)
 17. Jorgensen, J. L., Esser, U., de St. Groth, B. F., Reay, P. A. and Davis M. M.: Mapping T-cell receptor-peptide contacts by variant peptide immunization of single-chain transgenics. *Nature* 355, 224-230 (1992)
 18. Davis, M. M. and Bjorkman P. J.: T cell antigen receptor genes and T cell recognition. *Nature* 334, 395-402 (1988)
 19. 住田孝之: 自己免疫疾患とT細胞レセプター. 自己免疫疾患, 70-87 (1994)
 20. Gulwani-Akolkar, B., Posnett, D. N., Janson, C. H., Grunewald, J., Wigzell, H., Akolkar, P., Gregersen, P. K. and Silver, J.: T cell receptor V-segment frequencies in peripheral blood T cells correlate with human leukocyte antigen type. *J. Exp. Med.* 174, 1139-1146 (1991)
 21. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491 (1988)
 22. Marguerie, C. M., Lunardi, C. and So, A.: PCR-based analysis of the TCR repertoire in human autoimmune diseases. *Immunol. Today* 13, 336-338 (1992)
 23. Choi, Y., Kotzin, B., Herron, L., Callahan, J., Marrack, P. and Kappler, J.: Interaction of *Staphylococcus aureus* toxin "superantigens" with human T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 8941-8945 (1989)
 24. Sumida, T., Yonaha, F., Maeda, T., Tanabe, E., Koike, T., Tomioka, H. and Yoshida, S.: T cell receptor repertoire of infiltrating T cells in lips of Sjogren's syndrome patients. *J. Clin. Invest.* 89, 681-685 (1992)
 25. Sottini, A., Imberti, L., Gorla, R., Cattaneo, R. and Primi, D.: Restricted expression of T cell receptor V β but not V α genes in rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* 21,

- 461-466 (1991)
26. Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T. and Hayashi, K.: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5, 874-879 (1989)
 27. Yamamoto, K., Sakoda, H., Nakajima, T., Kato, T., Okubo, M., Dohi, M., Mizushima, Y., Ito, K. and Nishioka, K.: Accumulation of multiple T cell clonotypes in the synovial lesions of patients with rheumatoid arthritis revealed by a novel clonality analysis. *Int. Immunol.* 4, 1219-1223 (1992)
 28. Stamenkovik, I., Stegagno, M., Wright, K. A., Krane, S. M., Amento, E. P., Colvin, R. B., Duquesnoy, R. J. and Kurnick, J. T.: Clonal dominance among T-lymphocyte infiltrates in arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85,1179-1183 (1988)
 29. Paliard, X., West, S. G., Lafferty, J. A., Clements, J. R., Kappler, J. W., Marrack, P. and Kotzin, BL: Evidence for the effects of a superantigen in rheumatoid arthritis. *Science* 253, 325-329 (1991)
 30. Howell, M. D., Diveley, J. P., Lundeen, K. A., Esty, A., Winters, S. T., Carlo, D. J. and Brostoff, S. W.: Limited T-cell receptor β -chain heterogeneity among interleukin 2 receptor-positive synovial T cells suggests a role for superantigen in rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10921-10925 (1991)
 31. Williams, W. V., Fang, Q., Demarco, D., von Feldt, J., Zurier, R. B. and Weiner, D. B.: Restricted heterogeneity of T cell receptor transcripts in rheumatoid synovium. *J. Clin. Invest.* 90, 326-333 (1992)
 32. DerSimonian, H., Sugita, M., Glass, D. N., Maier, A. L., Weinblatt, M. E., Reme, T and Brenner, M. B.: Clonal $V\alpha 12.1^+$ T cell expansions in the peripheral blood of rheumatoid arthritis patients. *J. Exp. Med.* 177, 1623-1631 (1993)
 33. Davey, M. P. and Munkirs, D. D.: Patterns of T-cell receptor variable β gene expression by synovial fluid and peripheral blood T-cells in rheumatoid arthritis. *Clin Immunol Immunopath.* 68, 79-87 (1993)
 34. Jenkins, R. N., Nikaein, A., Zimmermann, A., Meek, K. and Lipsky, P. E.: T cell receptor $V\beta$ gene bias in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 92, 2688-2701 (1993)
 35. Keystone, E. C., Minden, M., Klock, R., Poplonski, L., Zalcborg, J., Takadera, T. and Mak, T. W.: Structure of T cell antigen receptor β chain in synovial fluid cells from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 31, 1555-1557 (1988)
 36. Duby, A. D., Sinclair, A. K., Osborne-Lawrence, S. L., Zeldes, W., Kan, L. and

- Fox, D. A.: Clonal heterogeneity of synovial fluid T lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6206-6210 (1989)
37. Uematsu, Y., Wege, H., Straus, A., Ott, M., Bannwarth, W., Lanchbury, J., Panayi, G. and Steinmetz, M.: The T-cell-receptor repertoire in the synovial fluid of a patient with rheumatoid arthritis is polyclonal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88, 8534-8538 (1991)
38. Okubo, M., Kurokawa, M., Ohto, H., Nishimaki, T., Nishioka, K., Kasukawa, R. and Yamamoto, K.: Clonotype analysis of peripheral blood T cells and autoantigen-reactive T cells from patients with mixed connective tissue disease. *J. Immunol.* 153, 3784-3790 (1994)
39. Cush, J. J. and Lipsky, P. E.: Phenotypic analysis of synovial tissue and peripheral blood lymphocytes isolated from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 31, 1230-1238 (1988)
40. 西村泰治: HLAの分子生物学と自己免疫疾患. *実験医学* 10, 127-133 (1992)
41. 山本一彦: 自己免疫疾患の薬物療法. *ファルマシア* 27, 335-338 (1991)
42. Lipsky, P. E.: Immunopathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *J. Rheum.* 19, 92-94 (1992)
43. Ben-Nun, A., Liblau, R. S., Cohen, L., Lehmann, D., Tournier-Lasserre, E., Rosenzweig, A., Jingwu, Z., Raus, J. C. M and Bach, M-A.: Restricted T-cell receptor V β usage by myelin basic protein-specific T-cell clones in multiple sclerosis: predominant genes vary in individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88, 2466-2470 (1991)
44. Masuko, K., Kato, T., Ikeda, Y., Okubo, M., Mizushima, Y., Nishioka, K. and Yamamoto, K.: Dynamic changes of accumulated T cell clonotypes during antigenic stimulation in vivo and in vitro. *Int. Immunol.* 6, 1959-1966 (1995)
45. Harris, E. D. Jr.: Rheumatoid arthritis pathophysiology and implications for therapy. *N. Engl. J. Med.* 322, 1277-1289 (1990)
46. Cush, J. J. and Lipsky, P. E.: Cellular basis for rheumatoid inflammation. *Clin Orthopedics Rel Res* 265, 9-22 (1991)
47. Nakao, H., Eguchi, K., Kawakami, A., Migita, K., Otsubo, T., Ueki, Y., Shimomura, C., Tezuka, H., Matsunaga, M., Maeda, K. and Nagataki, S.: Phenotypic characterization of lymphocytes infiltrating synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis: Analysis of lymphocytes isolated from minced synovial tissue by dual immuno-

- fluorescent staining. *J. Rheumatol.* 17, 142-148 (1990)
50. Goronzy, J., Weyand, C. M. and Fathman, C. G.: Shared T cell recognition sites on human histocompatibility leukocyte antigen class II molecules of patients with seropositive rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 77, 1042-1049 (1986)
 51. Nepom, G. T., Byers, P., Seyfried, C., Healey, L. A., Wilske, K. R., Stage, D. and Nepom, B.S.: HLA genes associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 32, 15-21 (1989)
 52. Wordsworth, B. P., Lanchbury, J. S. S., Sakkas, L. I., Welsh, K. I., Panayi, G. S. and Bell, J. I.: HLA-DR4 subtype frequencies in rheumatoid arthritis indicate that DRB1 is the major susceptibility locus within the HLA class II region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 10049-10053 (1989)
 53. Smith, C. A. and Arnett, F. C.: Epidemiologic aspects of rheumatoid arthritis. *Clin. Orthopedics. Rel. Res.* 265, 23-35 (1991)
 54. Todd, J. A., Archa-Orbea, H., Bell, J. I., Chao, N., Fronck, Z., Jacob, C. O., McDermott, M., Sinha, A. A., Timmerman, L., Steinman, L. and McDevitt, H. O.: A molecular basis for MHC class II-associated autoimmunity. *Science* 240, 1003-1009 (1988)
 55. Herzog, C., Walker, C., Muller, W., Rieber, P., Reiter, C., Riethmuller, G., Wassmer, P., Stockinger, H., Madic, O. and Pichler, W. J.: Anti-CD4 antibody treatment of patients with rheumatoid arthritis. I. Effect on clinical course and circulating T cells. *J. Autoimmun.* 2, 627-642 (1989)
 56. Walker, C., Herzog, C., Rieber, P., Riethmuller, G., Muller, W. and Pichler, W. J.: Anti-CD4 antibody treatment of patients with rheumatoid arthritis. II. Effect of in vivo treatment on in vitro proliferative response of CD4 cells. *J. Autoimmun.* 2, 643-649 (1989)
 57. Kyle, V., Coughlan, R. J., Tighe, H., Waldmann, H. and Hazleman, B. L.: Beneficial effect of monoclonal antibody to interleukin 2 receptor on activated T cells in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 48, 428-429 (1989)
 58. 西本憲弘, 嶋良仁, 吉崎和幸, 岸本忠三: ヒト型化抗IL-6レセプター抗体を用いた慢性関節リウマチに対する新しい治療. *リウマチ* 36, 227 (1996)
 59. Tak, P., Taylor, P. C., Breedveld, F. C., Smeets, T. J. M., Daha, M. R., Kluin, P. M., Meinders, A. E. and Maini, R. N.: Decrease in cellularity and expression of adhesion molecules by anti-tumor necrosis factor a monoclonal antibody treatment in

- patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 39, 1077-1081 (1996)
60. Pearson, C. M.: Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 91, 95-101 (1956)
 61. Trentham, D. E., Townes, A. S. and Kang, A. H.: Autoimmunity to type II collagen: An experimental model of arthritis. *J. Exp. Med.* 146, 857-868 (1977)
 62. Courtenay, J. S., Dallmann, M. J., Dayan, A. D., Martin, A. and Mosedale, B.: Immunization against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature* 283, 666-668 (1980)
 63. Cathcart, E. S., Hayes, K. C., Gonnermann, W. A., Lazzari, A. A. and Franzblau, C.: Experimental arthritis in a nonhuman primate. I. Induction by bovine type II collagen. *Lab. Invest.* 54, 26-31 (1986)
 64. Pearson, C. M. and Wood, F. O.: Passive transfer of adjuvant arthritis by lymph node or spleen cells. *J. Exp. Med.* 120, 547-560 (1964)
 65. Holmdahl, R., Klareskog, L., Rubin, K., Larsson, E. and Wigzell, H.: T lymphocytes in collagen II-induced arthritis in mice: characterization of arthritogenic collagen II-specific T cell lines and clones. *Scand. J. Immunol.* 22, 295-305 (1985)
 66. Holmdahl, R., Klareskog, L., Rubin, K., Bjork, J., Smedegard, G., Jonsson, R. and Andersson, M.: Role of T lymphocytes in murine collagen induced arthritis. *Agents Actions* 19, 295-305 (1986)
 67. Arnett, F. C., Edworthy, S. M., Bloch, D. A., McShane, D. J., Fries, J. F., Cooper, N. S., Healey, L. A., Kaplan, S. R., Liang, M. H., Luthra, H. S., Medsger, T. A. Jr., Mitchell, D. M., Neustadt, D. H., Pinals, R. S., Schaller, J. G., Sharp, J. T., Wilder, R. L. and Hunder, G. G.: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 31, 315-324 (1988)
 68. Chomczynski, P. and Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159 (1987)
 69. Ross, J. A. and Leavitt, S. A.: Improved sample recovery in thermocycle sequencing protocols. *Biotechniques* 11, 618-619 (1991)
 70. Sears, L. E., Moran, L. S., Kissinger, C., Creasey, T., Perry-O'Keefe, H., Roskey, M., Sutherland, E. and Slatko, B. E.: CircumVent thermal cycle sequencing and alternative manual and automated DNA sequencing protocols using the highly thermostable VentR(exo-) DNA polymerase. *Biotechniques* 13, 626-633 (1992)
 71. Jenkins, M. K., Taylor, P. S., Norton, S. D. and Urdahl, K. B.: CD28 delivers a

- costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells. *J. Immunol.* 147:2461-2466 (1991)
72. Harding, F. A., McArthur, J. G., Gross, J. A., Raulet, D. H. and Allison, J. P.: CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 356, 607-609 (1992)
73. Yamamoto, K., Masuko, K., Takahashi, S., Ikeda, Y., Kato, T., Mizushima, Y., Hayashi, K. and Nishioka, K.: Accumulation of distinct T cell clonotypes in human solid tumors. *J. Immunol.* 154, 3784-3790 (1994)
74. Oksenberg, J. R., Panzara, M. A., Begovich, A. B., Mitchell, D., Erlich, H. A., Murray, R. S., Shimonkevitz, R., Sherritt, M., Rothbard, J., Bernard, C. C. A. and Steinman, L.: Selection for T-cell receptor V β -D β -J β gene rearrangements with specificity for a myelin basic protein peptide in brain lesions of multiple sclerosis. *Nature* 362, 68-70 (1993)
75. Gold, D. P., Offner, H., Sun, D., Wiley, S., Vandembark, A. A. and Wilson, D. B.: Analysis of T cell receptor β chains in Lewis rats with experimental allergic encephalomyelitis: conserved complementary determining region 3. *J. Exp. Med.* 174, 1467-1476 (1991)
76. Padula, S. J., Lingenheld, E. G., Stabach, P. R., Chou, C.-H. J., Kono, D. H. and Clark, R. B.: Identification of V β -4-bearing T cells in SJL mice. Further evidence for the V region disease hypothesis? *J. Immunol.* 146, 879-883 (1991)
77. Zhang X.-M. and Heber-Kats, E.: T cell receptor sequences from encephalitogenic T cells in adult Lewis rats suggest an early oncogenic origin. *J. Immunol.* 148, 746-752 (1992)
78. Yamamura, T., Kondo, T., Sakanaka, S., Kozovska, M., Geng, T. C., Takahashi, K. and Tabira, T.: Analysis of T cell antigen receptor myelin basic protein specific T cells in SJL/J mice demonstrates a chain CDR3 motif associated with encephalitogenic T cells. *Int. Immunol.* 6, 947-954 (1994)
79. Hunninghake, G. W., Gadek, J. E., Young Jr., R. C., Kawanami, O., Ferrans, V. J. and Crystal, R. G.: Maintenance of granuloma formation in pulmonary sarcoidosis by T-lymphocytes within the lung. *N. Engl. J. Med.* 302, 594-598 (1980)
80. Crystal, R. G., Roberts, W. C., Hunninghake, G. W., Gadek, J. E., Fulmer, J. D. and Line, B. R.: Pulmonary sarcoidosis: a disease characterized and perpetuated by activating lung T-lymphocytes. *Ann. Intern. Med.* 94, 73-94 (1981)

81. Hunninghake, G. W. and Crystal, R. G.: Pulmonary sarcoidosis: a disorder mediated by excess helper T-lymphocyte activity at sites of disease activity. *N. Engl. J. Med.* 305, 429-434 (1981)
82. Hunninghake, G. W., Bedell, G. N., Zavala, D. C., Monick, M. and Brady, M.: Role of interleukin-2 release by lung T-cells in active pulmonary sarcoidosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 128, 634-638 (1983)
83. Vanet, A., Hance, A. J., Saltini, C., Robinson, B. W. S. and Crystal R. G.: Enhancement alveolar macrophage-mediated antigen-induced T lymphocyte proliferation in sarcoidosis. *J. Clin. Invest.* 75, 293-301 (1985)
84. Robinson, B. W. S., McLemore, L. and Crystal, R. G.: Gamma interferon is spontaneously released by alveolar macrophages and lung T lymphocytes in patients with pulmonary sarcoidosis. *J. Clin. Invest.* 75, 1488-1495 (1985)
85. Costabel, U., Bross, K. J., Rhule, K. H., Lohr, G. W. and Matthys, H.: Ia-like antigens on T-cells and their subpopulation in pulmonary sarcoidosis and hypersensitivity pneumonitis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 131, 337-342 (1985)
86. Saltini, C., Spurzem, J. R., Lee, J. J., Pinkston, P. and Crystal R. G.: Spontaneous release of interleukin 2 by lung T lymphocytes in active pulmonary sarcoidosis is primary from the Leu3⁺DR⁺ T cell subset. *J. Clin. Invest.* 77, 1962-1970 (1986)
87. Thomas, P. D. and Hunninghake, G. W.: Current concepts of the pathogenesis of sarcoidosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135, 747-760 (1987)
88. Konishi, K., Moller, D. R., Saltini, C., Kirby, M. and Crystal, R. G.: Spontaneous expression of the interleukin 2 receptor gene and presence of functional interleukin 2 receptors on T lymphocytes in the blood of individuals with active pulmonary sarcoidosis. *J. Clin. Invest.* 82, 775-781 (1988)
89. Siltzbach, L. E., James, D. G., Neville, E., Turiaf, J., Battesti, J. P., Sharma, O. P., Hosoda, Y., Mikami, R. and Odaka, M.: Course and prognosis of sarcoidosis around the world. *Am. J. Med.* 57, 847-852 (1974)
90. du Bois, R. M., Kirby, B., Balbi, B., Saltini, C. and Crystal, R. G.: T-lymphocytes that accumulate in the lung in sarcoidosis have evidence of recent stimulation of the T-cell antigen receptor. *Am. Rev. Respir. Dis.* 145, 1205-1211 (1992)
91. Moller, D. R., Konishi, K., Kirby, M., Balbi, B. and Crystal, R. G.: Bias toward use of a specific T cell receptor β -chain variable region in subgroup of individuals with sarcoidosis. *J. Clin. Invest.* 82, 1183-1191 (1988)

92. Tamura, N., Holroyd, K. J., Banks, T., Kirby, M., Okayama, H. and Crystal, R. G.: Diversity in junctional sequences associated with the common human V γ 9 and V δ 2 gene segments in normal blood and lung compared with the limited diversity in a granulomatous disease. *J. Exp. Med.* 172, 169-181 (1990)
93. Balbi, B., Moller, D. R., Kirby, M., Holroyd K. J. and Crystal, R. G.: Increase numbers of T lymphocytes with γ δ -positive antigen receptors in a subgroup of individuals with pulmonary sarcoidosis. *J. Clin. Invest.* 85, 1353-1361 (1990)
94. Grunewald, J., Janson, C. H., Eklund, A., Ohrn, M., Olerup, O., Persson, U. and Wigzell, H.: Restricted V α 2.3 gene usage by CD4⁺ T lymphocytes in bronchoalveolar lavage fluid from sarcoidosis patients correlates with HLA-DR3. *Eur. J. Immunol.* 22, 129-135 (1992)
95. Forrester, J. M., Newman, L. S., Wang, Y., King, T. E. and Koztin, B. L.: Clonal expansion of lung V δ 1⁺ T cells in pulmonary sarcoidosis. *J. Clin. Invest.* 91, 292-300 (1993)
96. Forman, J. P., Silver, R., Ankins, M., Britt, J., Scott, D., Schonfeld, S., Johns, C. S. and Moller, D. R.: Preferential expression of a limited number of T-cell receptor variable β -genes in active pulmonary sarcoidosis. *Am. Rev. Respir Dis.* 145, A414 (1992)
97. Forrester, J. M., Wang, Y., Loveless, J., Newman L. S., King, T. E. and Kotzin, B. L.: Preferential T cell receptor beta chain variable gene usage in pulmonary sarcoidosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 145, A414 (1992)
98. The BAL cooperative Group Steering Committee. Bronchoalveolar lavage constituents in healthy individuals, idiopathic pulmonary fibrosis, and selected comparison groups. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141(Suppl.), S168 (1990)
99. Fink, J. N. and Kelly, K. J.: Immunologic aspects of granulomatous and interstitial lung diseases and of cystic fibrosis. *JAMA* 268, 2874-2881 (1992)
100. Crystal, R. G., Bitterman, P. B., Rennard, S. I., Hance, A. J. and Koegh, B. A.: Interstitial lung diseases of unknown cause. *N. Engl. J. Med.* 310, 154-163 (1984)
101. Cooke, A.: Is there restricted T cell receptor usage in autoimmune diseases? *Clin. Exp. Immunol.* 83, 345-346 (1991)
102. Cander, I. and Aderne, W. The significance of lymphocytic infiltration in neuroblastoma. *Br. J. Cancer* 26, 321-328 (1972)

103. Undewood, J. C. E.: Lymphoreticular infiltration in human tumors: prognostic and biological implications: a review. *Br. J. Cancer* 30, 538-548 (1974)
104. McGovern, F. J., Shaw, H. M., Milton, C. W. and Farago, G. A.: Prognostic significance of the histological features of malignant melanoma. *Histopathology* 3, 385-394 (1979)
105. Ioachim, H. L.: Correlations between tumor antigenicity, malignant potential, and local host immune response. *Contemp. Top. Immunol.* 10, 213-238 (1980)
106. Vose, B. M. and Moore, M.: Human tumor-infiltrating lymphocytes: a marker of host response. *Semin. Hematol.* 22, 27-40 (1985)
107. Keong, A., Herman, J. and Rabson, A. R.: Supernatant derived from a human hepatocellular carcinoma cell line (PLC/PRF/5) depresses natural killer (NK) cell activity. *Cancer Immunol. Immunother.* 15, 183-187 (1983)
108. Moy, P. M., Holmes, E. C. and Golub S. H.: Depression of natural killer cytotoxic activity in lymphocytes infiltrating human pulmonary tumors. *Cancer Res.* 45, 57-60 (1985)
109. Miesher, S., Whiteside, T. L., Carrel, S. and von Fliedner, V.: Functional properties of tumor-infiltrating and blood lymphocytes in patients with solid tumors: effects of tumor cells and their supernatants on proliferative responses of lymphocytes. *J. Immunol.* 136, 1899-1907 (1986)
110. Rubbert, A., Manger, B., Lang, N., Kalden, J. R. and Platzer, E.: Functional characterization of tumor-infiltrating lymphocytes, lymph-node lymphocytes and peripheral-blood lymphocytes from patients with breast cancer. *Int. J. Cancer* 49, 25-31 (1991)
111. North, R. J. and Bursuker, I.: Generation and decay of the immune response to a progressive fibrosarcoma. I. $Ly-1^{+}2^{-}$ suppressor T cells down regulate the generation of $Ly-1^{-}2^{+}$ effector T cells. *J. Exp. Med.* 159, 1295-1311 (1984)
112. Mukherji, B., Chakraborty, N. G. and Sivanandham, M.: T cell clones that react against autologous human tumors. *Immunol. Rev.* 116, 33-62 (1990)
113. Yoshino, I., Yano, T, Murata, M., Ishida, T., Sugimachi, K., Kimura G. and Nomoto K.: Tumor-reactive T-cells accumulate in lung cancer tissues but fail to respond due to tumor cell-derived factor. *Cancer Res.* 52, 775-781 (1992)
114. Whiteside, T. L., Jost, L. M. and Herberman, R. B.: Tumor-infiltrating lymphocytes. Potential and limitations of their use for cancer therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 12,

- 25-47 (1992)
115. Rosenberg, S. A., Spiess, P. J. and Lafreniere, R.: A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* 233, 1318-1321 (1986)
 116. Hoe, D. S., Whiteside, T. L. Johnson, J. T., Chen, K., Barnes, E. L. and Herberman, R. B.: Long-term interleukin-2-dependent growth and cytotoxic activity of tumor-infiltrating lymphocytes from human squamous cell carcinomas of head and neck. *Cancer Res.* 47, 6353-6362 (1987)
 117. Beldegun, A., Muul, L. M. and Rosenberg, S. A.: Interleukin 2 expanded tumor-infiltrating lymphocytes in human renal cell cancer: Isolation, characterization, and anti-tumor activity. *Cancer Res.* 48, 206-214 (1988)
 118. Takagi, S., Chen, K., Schwarz, R., Iwatsuki, S., Herberman, R. B. and Whiteside, T. L.: Functional and phenotypic analysis of tumor-infiltrating lymphocytes isolated from human primary and metastatic liver tumors and cultured in recombinant interleukin-2. *Cancer* 63, 102-111 (1989)
 119. Fishleder, A. J., Finke, J. H., Tubbs, R. and Bukowski, R. M.: Induction by interleukin-2 of oligoclonal expansion of cultured tumor-infiltrating lymphocytes. *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 124-128 (1990)
 120. Bennett, W. T., Pandolfi, F., Grove, B. H., Hawes, G. E., Boyle, L. A., Kradin, R. L. and Kurnick, J. T.: Dominant rearrangements among human tumor-infiltrating lymphocytes. *Cancer* 69, 2379-2384 (1992)
 121. Ioannides, C. G. and Freedman, R. S.: Selective usage of TCR V β in tumor specific CTL lines isolated from ovarian tumor associated lymphocytes. *Anticancer Rev.* 11, 1991-1998 (1991)
 122. Whiteside, T. L., Miescher, S., Hurlimann, J., Moretta, L. and von Flidner, V.: Separation, phenotyping and limiting dilution analysis of T-lymphocytes infiltrating human solid tumor. *Int. J. Cancer* 37, 803-811 (1986)
 123. Whiteside T. L.: Tumor-infiltrating lymphocytes as anti-tumor effector cells. *Biotherapy* 5, 47-58 (1992)
 124. Ioannides, C. G. and Whiteside, T. L.: T cell recognition of human tumors: implications for molecular immunotherapy of cancer. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 66, 91-106 (1993)
 125. Nitta, T., Oksenberg, J. R., Rao, N. A. and Steinman, L.: Predominant expression of T

- cell receptor V α 7 in tumor-infiltrating lymphocytes of uveal melanoma. *Science* 249, 672-674 (1990)
126. Nitta, T., Sato, K., Okumura, K. and Steinman, L.: An analysis of T-cell-receptor variable-region genes in tumor-infiltrating lymphocytes within malignant tumors. *Int. J. Cancer* 49, 545-550 (1991)
 127. Weidmann, E., Elder, E. M., Trucco, M., Lotze, M. T. and Whiteside, T. L.: Usage of T-cell receptor V β chain genes in fresh and cultured tumor-infiltrating lymphocytes from human melanoma. *Int. J. Cancer* 54, 383-390 (1993)
 128. Ferradini, L., Mackensen, A., Genevee, C., Bosq, J., Duvillard, P., Avril, M.-F. and Hercend, T.: Analysis of T cell receptor variability in tumor-infiltrating lymphocytes from a human regressive melanoma.; evidence for in situ T cell clonal expansion. *J. Clin. Invest.* 91, 1183-1190 (1993)
 129. Gotch, F. M., Nixon, D. F., Apl, N., McMichael, A. J. and Borysiewicz, L. K.: High frequency of memory and effector gag specific cytotoxic T lymphocytes in HIV sero-positive individuals. *Int. Immunol.* 2, 707-712 (1990)
 130. Koup, R. A., Pikora, C. A., Luzuriaga, K., Brettler, D. B., Day, E. S., Mazzara, G. P. and Sullivan, J. L.: Limiting dilution analysis of cytotoxic T lymphocytes to human immunodeficiency virus gag antigens in infected persons: In vitro quantitation of effector cell populations with p17 and p24 specificities. *J. Exp. Med.* 174, 1593-1600 (1991)
 131. Ioannides, C. G., Fisk, B., Pollack, M. S., Frazier, M. L., Taylor-Wharton, J. and Freedman, R.: Cytotoxic T-cell clones isolated from ovarian tumour infiltrating lymphocytes recognize common determinants on non-ovarian tumour clones. *Scand. J. Immunol.* 37, 413-424 (1993)
 132. Anichini, A., Maccalli, C., Mortarini, R., Salvi, S, Mazzocchi, A., Squarcina, P., Herlyn, M. and Parmiani, G.: Melanoma cells and normal melanocytes share antigen recognized by HLA-A2-restricted cytotoxic T cell clones from melanoma patients. *J. Exp. Med.* 177, 989-998 (1993)
 133. Bishop, J. M.: Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 64, 235-248 (1991)
 134. Levine, A. J., Momand, J. and Finlay, C. A.: The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 351, 453-456 (1991)
 135. Chen, L., Thomas, E. K., Hu, S., Hellstrom, I. and Hellstrom, K. E.: Human papilloma virus type 16 nucleoprotein E7 is a tumor rejection antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 110-(1991)

136. van der Bruggen, C., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., de Plaen, E., van den Eynde, B., Knuth, A. and Boon, T.: A gene encoding antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643-1647 (1991)
137. Wilson, R. K., Lai, E., Concannon, P., Barth, R. K. and Hood, L. E.: Structure, organization and polymorphism of murine and human T-cell receptor alpha and beta chain gene families. *Immunol Rev.* 101, 149-172 (1988)
138. Davis, M. M.: T cell receptor gene diversity and selection. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 475-496 (1990)
139. Behlke, M. A., Spinella, D. G., Chou, H. S., Sha, W., Hartl, D. L. and Loh, D. Y.: T-cell receptor β -chain expression: Dependence on relatively few variable region genes. *Science* 229, 566-570 (1985)
140. Barth, R. K., Kim, B. S., Lan, N. C., Hunkapiller, T., Sobeck, N., Winoto, N., Gershenfeld, H., Okada, C., Hansburg, D., Weissman, I. L. and Hood, L.: The mature T-cell receptor uses a limited repertoire of expressed V β gene segments. *Nature* 316, 517-523 (1985)
141. Behlke, M. A., Chou, H. S., Huppi, K. and Loh, D. Y.: Murine T-cell receptor mutants with deletions of β -chain variable region genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83, 767-771 (1986)
142. Malissen, M., Minard, K., Mjolsness, S., Kronenberg, M., Gorman, J., Hunkapiller, T., Prystowsky, M. B., Yoshikai, Y., Fitch, F., Mak, T. W. and Hood, L.: Mouse T cell antigen receptor: Structure and organization of constant and joining gene segments encoding the β polypeptide. *Cell* 37, 1101-1110 (1984)
143. Chien, Y., Gascoigne, N. R. J., Kavaler, J., Lee, N. E. and Davis, M. M.: Somatic recombination in a murine T-cell receptor gene. *Nature* 309, 322-326 (1984)
144. Gascoigne, N. R. J., Chien, Y., Becher, D. M., Kavaler, J. and Davis, M. M.: Genomic organization and sequence of T-cell receptor β -chain constant- and joining-region genes. *Nature* 310, 387-391 (1984)
145. Kado, C. L. and Liu, S.-T.: Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145, 1365-1373 (1981)
146. Wood, W. I., Gitschier, J., Lasky, L. A. and Lawn, R. M.: Base composition-independent hybridization in tetraalkylammonium chloride: A method for oligonucleotide screening of highly complex gene library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82, 1585-1588 (1985)

147. Jacobs, K. A., Rudersdorf, R., Neill, S. D., Dougherty, J. P., Brown, E. L. and Fritsch, E. F.: The thermal stability of oligonucleotide duplex in sequence independent in tetraalkylammonium salt solutions: application to identifying recombinant DNA clones. *Nucl. Acids Res.* 16, 4637-4650 (1988)
148. Raaphorst, F. M., Kaijzel, E. L., von Tol, M. J. D., Vossen, J. M. and van den Elesen, P. J.: Non-random employment of V β 6 and J β gene elements and conserved amino acid usage profiles in CDR3 regions of human fetal and adult TCR β chain rearrangements. *Int. Immunol.* 6, 1-9 (1994)
149. Grunewald, J., Jeddi-Tehrani, M., Pisa, E., Janson, C. H., Anderson, R., and Wigzell, H.: Analysis of J β gene segment usage by CD4⁺ and CD8⁺ human peripheral blood T lymphocytes. *Int. Immunol.* 4, 643-650 (1992)
150. Malissen, M., McCoy, C., Blanc, D., Trucy, J., Devaux, C., Schmitt-Verhulst, A.-M., Fitch, F., Hood, L. and Malissen, B.: Direct evidence for chromosomal inversion during T-cell receptor β -gene rearrangement. *Nature* 319, 28-33 (1986)
151. Robinson, M. A.: Usage of human T-cell receptor V β , J β , C β and V α gene segment is not proportional to gene number. *Hum. Immunol.* 35, 60-67 (1992)
152. Hogquist, K. A., Jameson, S. C., Heath, W. R., Howard, J. L., Bevan, M. J. and Carbone, F. R.: T cell receptor antagonist peptide induce positive selection. *Cell* 76, 17-27 (1994)
153. Tilney, N. L., Kupiec-Weglinski, J. W., Heidecke, C. D. and Lear P. A. and Strom, T. B.: Mechanisms of rejection and prolongation of vascularized organ allografts. *Immunol. Rev.* 77, 185-216 (1984)
154. Kameda, N.: Transplantation tolerance and immunosuppression following liver grafting in rats. *Immunol. Today* 6, 336-340 (1985)
155. Azuma, T., Sato, S., Kitagawa, S., Hori, S., Kokudo, S., Hamaoka, T. and Fujiwara, H.: Tolerance induction of allo-class I H-2 antigen-reactive Lyt-2⁺ helper T cells and prolonged survival of the corresponding class I H-2-disparate skin graft. *J. Immunol.* 143, 1-8 (1989)
156. Kitagawa, S., Sato, S., Hori, S., Hamaoka, T. and Fujiwara, H.: Induction of anti-allo-class I H-2 tolerance by inactivation of CD8⁺ helper T cells, and reversal of tolerance through introduction of third-party helper T cells. *J. Exp. Med.* 172, 105-113 (1990)
157. Dohi, M., Yamamoto, K., Masuko, K., Ikeda, Y., Matsuzaki, G., Sugiyama, H.,

- Suko, M., Okudaira, H., Mizushima, Y., Nishioka, K. and Ito, K.: Accumulation of multiple T cell clonotypes in lung of healthy individuals and patients with pulmonary sarcoidosis. *J. Immunol.* 152, 1983-1988 (1994)
158. Kato, T., Suzuki, S., Sasakawa, H., Masuko, K., Ikeda, Y., Nishioka, K. and Yamamoto, K.: Comparison of the J β usage among different T cell receptor V β families in spleens of C57BL/6 mice. *Eur. J. Immunol.* 24, 2410-2414 (1994)
159. Billingham, R. E. and Medawar, P. B.: Technique of free skin grafting in mammals. *J. Exp. Biol.* 28, 385-401 (1951)
160. Goverman, J., Minard, K., Shastri, N., Hunkapiller, T., Hausburg, D., Sercarz, E. and Hood, L.: Rearranged β T cell receptor genes in a helper T cell clone specific for lysozyme: No correlation between V β and MHC restriction. *Cell* 40, 859-867 (1985)
161. Chou, H.S., Anderson S. J., Louie, M. C., Godambe, S. A., Pozzi, M. R., Behlke M. A., Huppi, K. and Loh, D. Y.: Tandem linkage and unusual RNA splicing of the T-cell receptor β -chain variable-region genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 1992-1996 (1987)
162. Saito, H., Kranz, D. M., Takagaki, Y., Hayday, A. C., Eisen, H., N. and Tonegawa, S.: Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences. *Nature* 309, 757-762 (1984)
163. Kappler, J. W., Wadsw, T., White, J. Kushnir, E., Blackman, M., Bill, J., Roeman, N. and Marrack, P.: A T cell receptor V β segment that imparts reactivity to a class II major histocompatibility complex product. *Cell* 49, 263-271 (1987)
164. Kohsaka, H., Taniguchi, A., Chen, P. P., Ollier, W. E. R. and Carson, D. A. : The expressed T cell receptor V genes repertoire of rheumatoid arthritis monozygotic twins: Rapid analysis by anchored polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. *Eur. J. Immunol.* 23, 1895-1901 (1993)
165. Kohsaka, H., Taniguchi, A., Richman, D. D. and Carson D. A.: Microtiter format gene quantification by covalent capture of competitive PCR products: application of HIV-1 detection. *Nucl. Acids Res.* 21, 3469-3472 (1993)
166. Shieman, H., Barwari, L., Fuss, I., Makowka, L. and Cramer, D. V.: Structure and repertoire usage of rat TCR α -chain genes in T cells infiltrating heart allografts. *J. Immunol.* 154, 1964-1072 (1995)
167. Shirman, H., Chi, D., Makowka, L. and Cramer, D. V.: Lymphocytes infiltrating rat cardiac allografts express a limited repertoire of T cell receptor V β genes. *J. Immunol.*

- 151, 5228-5238 (1993)
168. Goss, J. A., Pyo, R., Flye, M. W., Connolly, J. M. and Hansen, T. H.: Major histocompatibility complex-specific prolongation of murine skin and cardiac allograft survival after in vivo depletion of $V\beta^+$ T cells. *J. Exp. Med.* 177, 35-44 (1993)
 169. Tschachler, E., Schuler G., Hutterer, J., Leibel, H., Wolff, K. and Stingl, G. : Expression of Thy-1 antigen by murine epidermal cells. *J. Invest. Dermatol.* 81, 282-285 (1983)
 170. Bergstrasser, P. R., Tigelaar, R. E., Dees J. H. and Streilein J. W.: Thy-1 antigen-bearing dendritic cells populate murine epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 81, 286-288 (1983)
 171. Opelz, G., Kikuchi, M., Takasugi, M. and Terasaki, P. I.: Autologous stimulation of human lymphocyte subpopulations *J. Exp. Med.* 142, 1327-1333 (1975)

主論文目録

本学位論文内容は、下記の発表論文による。

1. Ikeda, Y., Masuko, K., Nakai, Y., Kato, T., Hasunuma, T., Yoshino, S., Mizushima, Y., Nishioka, K. and Yamamoto, K.: High frequencies of identical T cell clonotypes in synovial tissues of rheumatoid arthritis patients suggest the occurrence of common antigen-driven immune responses. *Arthritis Rheum.* 39, 446-453 (1996)
2. Dohi, M., Yamamoto, K., Masuko, K., Ikeda, Y., Matsuzaki, G., Sugiyama, H., Suko, M., Okudaira, H., Mizushima, Y., Nishioka, K. and Ito, K.: Accumulation of multiple T cell clonotype in lungs of healthy individuals and patients with pulmonary sarcoidosis. *J. Immunol.* 152, 1983-1988 (1994)
3. Yamamoto, K., Masuko, K., Takahashi, S., Ikeda, Y., Kato, T., Mizushima, Y., Hayashi, K. and Nishioka, K.: Accumulation of T cell clonotypes in human solid tumors. *J. Immunol.* 154, 1804-1809 (1995)
4. Kato, T., Suzuki, S., Sasakawa, H., Masuko, K., Ikeda, Y., Nishioka, K. and Yamamoto, K.: Comparison of the J beta gene usage among different T cell receptor V β families in spleen of C57BL/6 mice. *Eur. J. Immunol.* 24, 2410-2414 (1994)
5. Kato, T., Ikeda, Y., Zong, Z.-P., Sasakawa, H., Kurokawa, M., Masuko, K., Igarashi, R., Mizushima, Y., Nishioka, K. and Yamamoto, Y.: Characterization of T cell receptor β chains of accumulating T cells in skin allografts in mice. *Transplantation.* 62, 266-272 (1996)

主査、副査名

本学位論文の審査は、千葉大学大学院薬学研究科で指名された下記の審査委員により行われた。

主査	千葉大学教授（薬学部）	薬学博士	五十嵐一衛
副査	千葉大学教授（薬学部）	薬学博士	畝本 力
副査	千葉大学教授（薬学部）	薬学博士	堀江 利治
副査	千葉大学教授（薬学部）	薬学博士	小林 弘
副査	千葉大学教授（薬学部）	薬学博士	千葉 寛