

T細胞が認識する成人T細胞白血病ウイルス (HTLV-I) 抗原と網膜抗原との交叉反応性

福島 敦樹¹⁾²⁾, 上野 脩幸¹⁾, 藤本 重義²⁾

¹⁾高知医科大学眼科学教室, ²⁾高知医科大学免疫学教室

要 約

B 10.BR マウスに HTLV-I ヒト感染細胞ラインである MT-2 を免疫した後, 脾細胞を摘出し種々の HTLV-I 感染細胞ラインおよび網膜抗原に対するリンパ球増殖反応を³H-TdR の取り込みでみた. MT-2 免疫脾細胞は HTLV-I 感染細胞ラインに反応するのみならず, マウス, ラット, 牛網膜細胞抽出抗原にも反応した. この抗原特異的リンパ球増殖反応は, 抗 Thy-1.2, 抗 CD 4 抗体と補体で処理すると消失した. また, 増殖反応の系に抗 CD 3 抗体, 抗 CD 4 抗体, 抗 MHC class II 抗体を加え

ることにより増殖反応が完全に抑制された. これらのことから, HTLV-I 感染細胞ラインと網膜抗原との間に T 細胞が認識できる抗原の交叉反応性が存在することがわかり, HTLV-I 感染により網膜抗原反応性の T 細胞が増殖する可能性が示唆された (日眼会誌 98:157-161, 1994)

キーワード: 成人 T 細胞白血病ウイルス, ぶどう膜炎, 網膜抗原, 分子擬態説, CD 4 陽性 T 細胞

HTLV-I and Retinal Antigen Recognized by T Cells

Atsuki Fukushima¹⁾²⁾, Hisayuki Ueno¹⁾ and Shigeyoshi Fujimoto²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Kochi Medical School

²⁾Department of Immunology, Kochi Medical School

Abstract

MT-2 immune but not naive murine (B10.BR) spleen cells responded not only to HTLV-I-infected cell lines but also to retinal antigens of various species by antigen-induced cell proliferation. The phenotype of the responding cells against HTLV-I-infected cell lines as well as retinal antigens was Thy-1.2⁺, CD4⁺ and CD8⁻. The antigen-induced cell proliferation against both HTLV-I-infected cell lines and retinal antigens was clearly inhibited by

monoclonal antibodies to CD3, CD4, and MHC class II (I-A^K). These data indicate that an epitope of HTLV-I-infected cell lines recognized by the CD4⁺ T cell is crossreactive to that of retinal antigens. (J Jpn Ophthalmol Soc 98:157-161, 1994)

Key words: Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I), Uveitis, Retinal antigen, Molecular mimicry theory, CD4⁺ T cell

I 緒 言

ヒト成人 T 細胞白血病の原因ウイルスとして同定された成人 T 細胞白血病ウイルス (human T-lymphotropic virus type I, HTLV-I)¹⁾は, そのウイルス感染細胞が自己の MHC class II に反応することや²⁾, γ グロブリンの産生を亢進させる³⁾などの様々な免疫学的異常を引き起こすことが明らかとなってきた. また近年, HTLV-I 関連脊髄症 (HTLV-I associated

myelopathy, HAM)⁴⁾や HTLV-I 関連関節症 (HTLV-I associated arthropathy, HAAP)⁵⁾⁶⁾などの自己免疫異常に基づくと考えられる様々な疾患の原因であることも証明され, これらの疾患群を総称して HTLV-I 関連症候群⁷⁾と命名されるようになってきた. 眼科領域では九州地区を中心に原因不明のぶどう膜炎患者に対し, HTLV-I 抗体価が調べられ, HTLV-I 抗体価が上昇している症例の割合が既知のぶどう膜炎患者の中の HTLV-I キャリアーの割合よりも有意に上昇していることと,

別刷請求先: 783 高知県南国市岡豊町小蓮 高知医科大学眼科学教室 福島 敦樹

(平成5年7月6日受付, 平成5年9月2日改訂受理)

Reprint requests to: Atsuki Fukushima, M.D. Department of Ophthalmology, Kochi Medical School, Kohasu, Oko-cho, Nankoku-shi, Kochi-ken 783, Japan.

(Received July 6, 1993 and accepted in revised form September 2, 1993)

患者の前房水中に HTLV-I プロウイルスの存在が確認されたことから、HTLV-I とぶどう膜炎との間にも関連性があるものと考え、HTLV-I 関連ぶどう膜炎⁹⁾あるいは HTLV-I ぶどう膜炎⁹⁾として、一つのクリニカルエンティティーが確立されつつある。また、我々はすでに HTLV-I 感染している白色家兎におけるぶどう膜炎の発症を臨床的、病理学的、また分子生物学的に報告した¹⁰⁾。

ぶどう膜炎の動物モデルとしてマウスおよびラットで実験的自己免疫性ぶどう膜炎が作成されており、これらのぶどう膜炎は T 細胞、とくに CD 4 陽性 T 細胞の移入により生じさせ得ることが報告されている¹¹⁾¹²⁾。すなわち、細胞性免疫に基づく自己免疫異常の一つのモデルである。

以前からウイルス感染に基づく自己免疫異常の機序として、① 調節性 T 細胞の機能異常により免疫監視機構が破綻する¹³⁾、② ウイルス感染により宿主細胞が破壊され、漏出した自己抗原を免疫系が認識する¹⁴⁾、③ ウイルス抗原と自己抗原との交叉反応性によりウイルスを攻撃すべき細胞が誤って自己の組織を破壊する¹⁵⁾、の3つが考えられている。そこで我々は、③の抗原の交叉反応性に焦点をあて、HTLV-I 抗原と自己抗原である網膜抗原との交叉反応性を T 細胞が認識する系で確認することを目的として実験を行った。

II 実験方法

マウス：国立遺伝研究所(三島)から分与された B 10. BR マウスを高知医科大学動物実験施設において specific pathogen-free (SPF) 下で飼育した。系統維持は brother-sister mating により行い、実験には 6 週齢の雌を用いた。網膜抗原に関しては、他の系統のマウスを用いた。

細胞ライン：HTLV-I 感染細胞ラインは当大学第三内科三好勇夫博士から供与された MT-2¹⁶⁾、Ra-1¹⁷⁾、Melanecian ATL を用いた。HTLV-I 非感染細胞ラインとしては、T 細胞型急性白血病細胞ライン(以下 TALL)、EB トランスフォーム B 細胞ライン(以下 EB)、網膜芽細胞腫細胞ライン(WERI-Rb-1¹⁸⁾、以下 Rb) 細胞を用いた。TALL は三好勇夫博士から分与された。EB は当教室で樹立した。Rb は American Type Cell Culture (ATCC) から購入した。HTLV-I 感染の有無は DNA 抽出後 PCR 法で確認した。これらの細胞ラインはすべて 10% FCS を含む RPMI メディウムで培養した。

抗体：抗 Thy-1.2 抗体のハイブリドーマ(HO-13-4)は慶應義塾大学の石川博通博士により、抗 CD 4 抗体(GK 1.5)、抗 CD 8 抗体(3.155)、抗 CD 3 抗体(145-2 C 11)、抗 I-A^k 抗体(26-7-11 S)、抗ラットガンマグロブリンカップラー鎖抗体(MAR 18.5)のハイブリドーマは三菱ライフサイエンス研究所の篠原信賢博士から分与され

たものである。これらのモノクローナル抗体は、抗 I-A^k 抗体以外いずれも培養上清を 50% 硫酸にて沈降させ、その後 protein G sepharose 4 fast-flow chromatography (Pharmacia 社) を用い純化したものである。抗 I-A^k 抗体は硫酸沈降後透析し用いた。

免疫：B 10. BR マウスに 1×10^6 個の無処理の MT-2 細胞を腹腔内に 2 週間ごとに 7 回免疫し、最終免疫の 1 週間後に脾細胞を摘出し実験に用いた。

マウス、ラット、牛網膜可溶性抗原とヒト網膜芽細胞腫抽出抗原：マウス網膜可溶性抗原は Wacker ら¹⁹⁾の方法に従い作成した。要約すると、3,000 匹のマウスから網膜細胞を摘出し、3 度 freezing and thawing を繰り返し細胞内蛋白を抽出し、50% 硫酸で沈降させた後、磷酸緩衝溶液(PBS)で透析し、100,000 g で一時間超遠心した後の上清を網膜可溶性抗原として用いた(mouse retinal cell extract, MRCE)。同様の方法で、ラット(rat retinal cell extract, RRCE)および牛(bovine retinal cell extract, BRCE)の網膜可溶性抗原を作成した。網膜芽細胞腫抽出抗原は 1×10^8 個の網膜芽細胞腫細胞を同様の方法で処理し作成した(human retinoblastoma cell extract, HRbE)。

細胞増殖反応：免疫していない B 10. BR マウスおよび MT-2 を免疫している B 10. BR マウスの脾細胞 2×10^5 個を、100 Gy 放射線処理した HTLV-I 感染および非感染細胞あるいは各種の網膜可溶性抗原とともに、96 穴平底プレートで合計 200 μ l の 10% FCS 入り RPMI メディウムで 96 時間培養した。培養の最終 8 時間に ³H-TdR を 0.5 μ Ci/50 μ l ずつに加え、³H-TdR の取り込みでリンパ球の増殖反応をみた。

増殖リンパ球の表面マーカー：脾細胞を摘出後、CD 4、CD 8、Thy-1.2 に対するモノクローナル抗体と 45 分氷上で反応させ、その後ウサギの補体と 45 分 37°C で反応させて特定の表面マーカーを持つ細胞を除去することで増殖している細胞の表面マーカーを調べた。

モノクローナル抗体による増殖反応の抑制：増殖反応においてどの細胞表面分子を用いているかを調べるために、CD 3、CD 4、CD 8、I-A^k に対するモノクローナル抗体をアッセイ系に加えることにより検討した。対照として正常ラット IgG を用いた。

III 実験結果

MT-2 に対する反応：図 1 に示してあるように、MT-2 免疫脾細胞は MT-2 に対して stimulation index (SI) が 13 と反応がみられ、dose-response も認められた。また、免疫していないマウスの脾細胞では反応は全くみられなかった。

HTLV-I 感染細胞ラインと非感染細胞ラインに対する反応：3 種類の HTLV-I 感染細胞ラインに対しては MT-2 免疫脾細胞は増殖反応を認めるのに対し、非感染

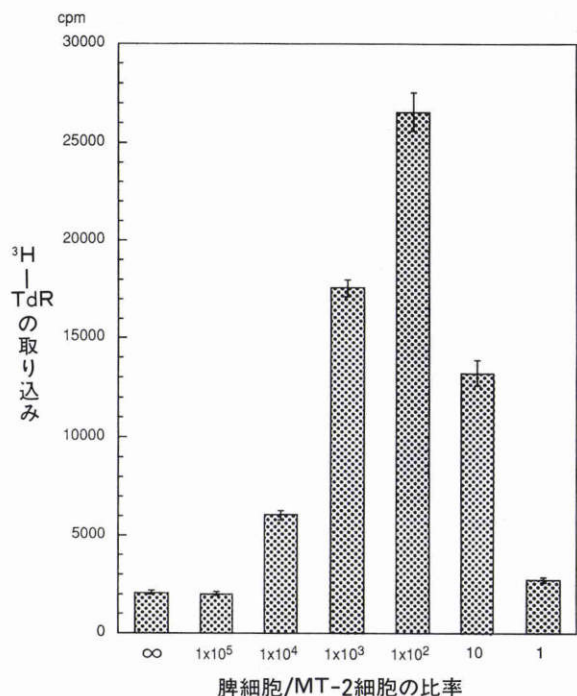


図1 MT-2 免疫脾細胞の MT-2 に対するリンパ球増殖反応。

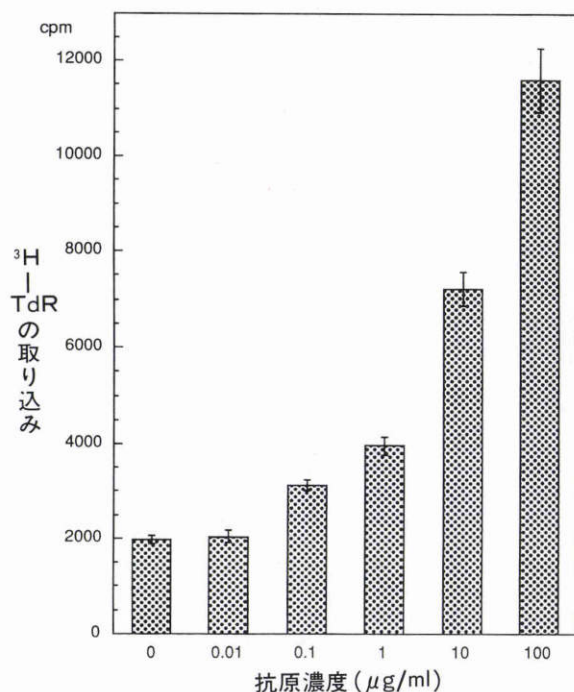


図3 MT-2 免疫脾細胞のマウス網膜細胞抽出抗原に対するリンパ球増殖反応。

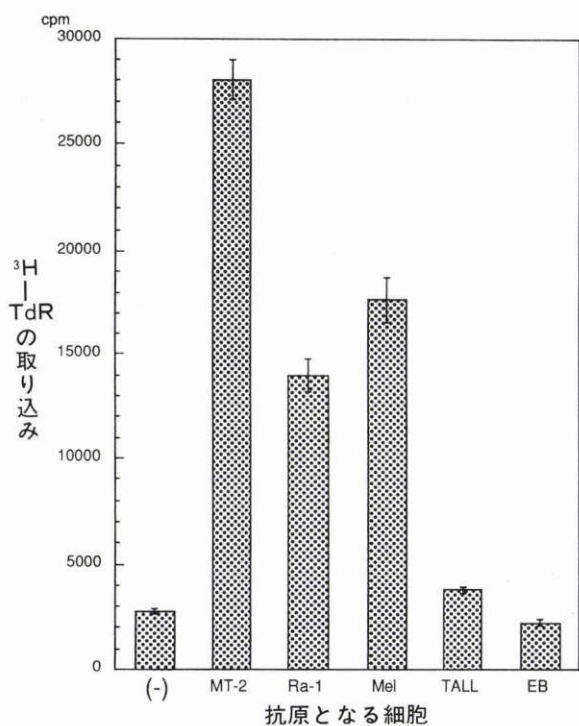


図2 MT-2 免疫脾細胞の HTLV-1 感染および非感染細胞ラインに対するリンパ球増殖反応。

細胞ラインである TALL と EB に対しては反応性がみられなかった。したがって、MT-2 免疫脾細胞は HTLV-I 感染細胞ラインに共通の部分、すなわち HTLV-I 抗原を認識していると考えられた(図 2)。また、免疫していないマウスの脾細胞はいずれの細胞ラインに対しても反応しなかった。

マウス網膜可溶性抗原に対する反応：MT-2 免疫脾細胞は MRCE に対し、100 µg/ml の濃度で SI 5.9 と反応がみられ、dose-response も認められた(図 3)。免疫していないマウスの脾細胞は全く反応しなかった。

各種網膜抗原に対する反応：MT-2 免疫脾細胞はマウス、ラット、牛のすべての網膜可溶性抗原に対して増殖反応を示した。また、網膜芽細胞腫およびその細胞内抗原に対しても同様に反応した(図 4)。免疫していないマウスの脾細胞は、いずれの抗原に対しても全く反応を認めなかった。

増殖反応を示す細胞の表面マーカー：MT-2 免疫脾細胞は抗 CD 4 抗体と補体、抗 Thy-1.2 抗体と補体で処理したとき増殖反応がみられなくなるのに対し、抗 CD 8 抗体と補体で処理した場合は補体のみで処理したときと同様の反応がみられた。すなわち、増殖している細胞の表面マーカーは Thy-1.2 陽性、CD 4 陽性、CD 8 陰性である。この現象は、抗原が MT-2 の場合も MRCE の場合も同様に認められた(表 1, 2)。

モノクローナル抗体による増殖反応の抑制：抗 CD 3 抗体、抗 CD 4 抗体、抗 I-A^K抗体を加えた場合、増殖反応は完全に抑制されたのに対し、抗 CD 8 抗体を加えても反応の抑制はみられなかった。すなわち、増殖反応の際に CD 3, CD 4, I-A^K分子を用いて抗原認識を行っていることがわかった。この抑制反応は、抗原が MT-2 のときも MRCE のときも同様に認められた(表 3, 4)。

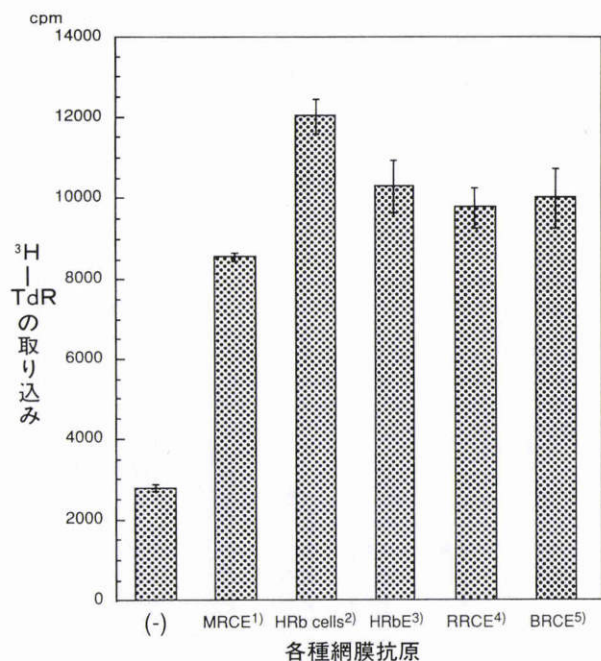


図4 MT-2免疫脾細胞の各種網膜抗原に対するリンパ球増殖反応。

MRCE：マウス網膜可溶性抗原，HRb cells：ヒト網膜芽細胞腫細胞，HRbE：ヒト網膜芽細胞腫抽出抗原，RRCE：ラット網膜可溶性抗原，BRCE：牛網膜可溶性抗原。

表1 MT-2を抗原とした場合の反応リンパ球の表面マーカー

処 理	抗原 (MT-2) ^{a)}	³ H-TdR の取り込み (cpm±SD)
Complement (C) alone	-	3,247±88
	+	33,106±1,581
Anti-Thy 1.2+C	+	3,111±158
Anti-CD 4+C	+	3,180±164
Anti-CD 8+C	+	32,535±2,198

a) 脾細胞/MT-2細胞：100

表2 マウス網膜細胞抽出抗原に対して反応しているリンパ球の表面マーカー

処 理	抗原 (MRCE) ^{a)}	³ H-TdR の取り込み (cpm±SD)
Complement (C) alone	-	1,985±88
	+	12,784±1,081
Anti-Thy 1.2+C	+	2,001±111
Anti-CD 4+C	+	1,976±164
Anti-CD 8+C	+	13,019±1,071

a) マウス網膜可溶性抗原

IV 考 按

原因不明のぶどう膜炎患者の中に HTLV-I キャリアの割合が比較的高いことが報告されており、HTLV-I 感染とぶどう膜炎発症との関連性を検討することを目的として本実験を行った。MT-2 を免疫するこ

表3 MT-2 を抗原とした場合のモノクローナル抗体添加によるリンパ球増殖反応の抑制

モノクローナル抗体	抗原 (MT-2) ^{a)}	³ H-TdR の取り込み (cpm±SD)
-	-	4,937±138
	+	24,421±899
Anti-CD 3	+	4,924±252
Anti-CD 4	+	5,025±81
Anti-CD 8	+	24,091±1,087
Anti-I-A ^k	+	4,992±222
Normal rat IgG	+	23,075±1,613

a) 脾細胞/MT-2細胞：100

表4 マウス網膜細胞抽出抗原に対して反応しているリンパ球のモノクローナル抗体添加による増殖反応の抑制

モノクローナル抗体	抗原 (MRCE) ^{a)}	³ H-TdR の取り込み (cpm±SD)
-	-	3,017±128
	+	15,627±899
Anti-CD 3	+	2,998±252
Anti-CD 4	+	3,109±81
Anti-CD 8	+	16,121±1,037
Anti-I-A ^k	+	3,098±222
Normal rat IgG	+	18,765±1,613

a) マウス網膜可溶性抗原

とにより得られた脾細胞はMT-2のみならず、他の HTLV-I 感染細胞ラインにも反応していることから、HTLV-I 感染細胞に共通の部分を経験していると考えられた。ただし、これらのラインに共通の部分は HTLV-I ウイルス蛋白のみとはいえないので、他の部分を経験している可能性も考えられるが、他の HTLV-I 非感染性血球系細胞には反応していないことから、HTLV-I 抗原に反応している可能性が大きいと考えられた。また、MT-2 免疫脾細胞は網膜抗原も同時に認識し反応することができた。すなわち、HTLV-I 抗原と網膜抗原との間には交叉する部分が存在すると考えられた。このような分子擬態説は、以前からウイルス抗原と自己抗原との間でペプチドレベルで報告されているものの、細胞性免疫とくに T 細胞レベルでの報告は少ない。今回我々がマウスの系で実験を行った理由は、マウスは HTLV-I に感染しないと考えられており、HTLV-I に感染しトランスフォームすることなく、免疫学的な解析ができると考えたからである。HTLV-I 感染細胞ラインおよび網膜抗原に反応している T 細胞は常に CD 3 と CD 4 陽性で、MHC class II 分子と HTLV-I および網膜抗原を同時に認識している。

HTLV-I 感染において、CD 8 陽性 T 細胞の解析の報告²⁰⁾²¹⁾は多いが、これらの細胞が自己抗原を認識しているという報告はない。一方、自己免疫疾患においては、CD 4 陽性 T 細胞が関与しているという報告が多い。

我々のシステムでは、ウイルス抗原と自己抗原とを同時に認識できる T 細胞の表面マーカーは CD 4 であることは興味深い。

今後はペプチドあるいは HTLV-I ウイルストランスフェクタントを用いることにより HTLV-I 感染細胞ラインに共通に反応している部分が HTLV-I ウイルス抗原であることを確認することと、HTLV-I 反応性 T 細胞クローンを樹立し抗原交叉部のエピトープを同定していきたいと考えている。

本論文の要旨は、第 97 回日本眼科学会総会(1993, 札幌)において報告した。

文 献

- Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC: Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci* 77: 7415-7419, 1980.
- Suciu-Foca N, Rubinstein P, Popovic M, Gallo RC, King DW: Reactivity of HTLV-transformed human T-cell lines to MHC class II antigens. *Nature* 312: 275-277, 1984.
- Suciu-Foca N, Rubinstein P, Rohowsky-Kochan C, Cai J, Popovic M, Gallo RC, et al: Functional modifications of alloreactive T cell clones infected with HTLV-I. *J Immunol* 137: 1115-1119, 1986.
- Rodgers-Johnson P, Gajdusek DC, Morgan OSC, Zaninovic V, Sarin PS, Graham DS: HTLV-I and HTLV-III antibodies and tropical spastic paraparesis. *Lancet* ii: 1247-1248, 1985.
- Nishioka K, Maruyama I, Sato K, Kitajima I, Nakajima Y, Osame M: Chronic inflammatory arthropathy associated with HTLV-I. *Lancet* i: 441, 1989.
- Iwakura T, Tosu M, Yoshida E, Takiguchi M, Sato K, Kitajima I, et al: Induction of inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in mice transgenic for HTLV-I. *Science* 253: 1026-1028, 1991.
- 江口勝美, 井田弘明, 石川直文, 長龍重信: HTLV-I キャリアーにみられる免疫異常. *臨床免疫* 23: 236-249, 1991.
- Nakao K, Ohba N: Clinical features of HTLV-I associated uveitis. *Br J Ophthalmol* 77: 274-279, 1993
- Mochizuki M, Watanabe T, Yamaguchi K, Takatsuki K, Yoshimura K, Shirao M, et al: HTLV-I uveitis: A distinct clinical entity caused by HTLV-I. *Jpn J Cancer Res* 83: 236-239, 1992.
- Fukushima A, Ueno H, Taguchi H, Sawada T, Miyoshi I: HTLV-I uveitis in a rabbit. *Ocular Immunology and Inflammation* 1: 275-281, 1993
- 白井正彦, 田口 修, 安藤祥司, 池田 洋, 奥村 康, 坂井潤一, 他: 実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎の発症機序について—Interphotoreceptor retinoid-binding protein を抗原とした実験モデルを中心に—. *日眼会誌* 96: 1580-1607, 1992.
- 望月 學, 安藤一彦, 南 隆彦, Chao-Chan C, 森茂郎, de Smet M, et al: 眼科領域における免疫療法. *日眼会誌* 96: 1608-1634, 1992.
- Morimoto C, Steinberg AD, Letvin NL, Hagan M, Takeuchi T, Daley J, et al: A defect of immunoregulatory T cell subsets in systemic lupus erythematosus patients demonstrated with anti-2H4 antibody. *J Clin Invest* 79: 762-768, 1987.
- Yoon JW, Austin M, Onodera T, Notkins AL: Virus induced diabetes mellitus: Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. *N Engl J Med* 300: 1173-1179, 1979.
- Oldstone MBA: Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* 50: 819-820, 1987.
- Miyoshi I, Kubonishi I, Yoshimoto S, Akagi T, Ohtsuki Y, Shiraishi Y, et al: Type C virus particles in a cord T-cell line derived by cocultivating normal human cord leukocytes and human leukaemic T cells. *Nature* 294: 770-771, 1981.
- Miyoshi I, Yoshimoto S, Kubonishi I, Fujishita M, Ohtsuki Y, Yamashita M, et al: Infectious transmission of human T-cell leukemia virus to rabbits. *Int J Cancer* 35: 81-85, 1985.
- McFall RC, Sery TW, Makadon M: Characterization of a new continuous cell line derived from a human retinoblastoma. *Cancer Res* 37: 1003-1010, 1977.
- Wacker WB, Donoso LA, Kalsow CM, Yankeelov JA Jr, Organisciak DT: Experimental allergic uveitis. Isolation, characterization and localization of a soluble uveitopathogenic antigen from bovine retina. *J Immunol* 119: 1949-1958, 1977.
- Tanaka Y, Tozawa H, Koyanagi Y, Shida H: Recognition of human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) gag and pX gene products by MHC-restricted cytotoxic T lymphocytes induced in rats against syngeneic HTLV-I-infected cells. *J Immunol* 144: 4204-4211, 1990.
- Kannagi M, Harada S, Maruyama I, Inoko H, Igarashi H, Kuwashima G, et al: Predominant recognition of human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) pX gene products by human CD8 cytotoxic T cells directed against HTLV-I-infected cells. *Int Immunol* 3: 761-767, 1991.