

卵白アルブミン特異的 T 細胞株の樹立と抗原認識機構の解析

千葉大学医学部小児科

勝木利行 下条直樹 本間季里

河野陽一 新美仁男

*Biological Resources Branch, National Institute of Allergy
and Infectious Diseases, NIH, USA*

J.E. Coligan

明治乳業ヘルスサイエンス研究所

角尾 肇

卵白アルブミン (OVA) に特異的な T 細胞株 (TCL) を卵アレルギー患者から樹立し, OVA に対する T 細胞の認識機構を分子レベルで解析した. 合成ペプチドを用いた解析から 2 つの OVA の T 細胞抗原決定基 (OVA111-120, OVA323-339) が明らかとなり, また抗 HLA クラス II 抗体の OVA 特異的 TCL の芽球化反応に対する抑制能の解析から, HLA-DP, -DQ, -DR の 3 種の HLA クラス II 分子が OVA の抗原提示に関与することが示唆された. これら分子レベルでの OVA に対する T 細胞応答の解析は, 卵アレルギーの発症機序の理解のみならず, その治療法の開発においてもきわめて重要であると考えられる.

Key words: epitope — hen egg allergy — HLA restriction — ovalbumin — T cell line

はじめに

近年, 小児の食物アレルギーは, 成長発育に及ぼす影響や, その後の気管支喘息の発症頻度を高める要因として注目されている. 卵白アルブミン (OVA) は, 代表的な食物アレルゲンである卵白成分中の主要な蛋白である¹⁾.

近年, アレルゲンに対する IgE 抗体産生において, T 細胞が産生するサイトカインがきわめて重要な役割を果たしていることが明らかとなりつつある²⁾. したがって, OVA に対するアレルギー反応の機序とその制御を考えるうえで, T 細胞の OVA の認識機構を分子レベルで解明することは大変重要な課題である. しかしながら, OVA に対する液性免疫応答については比較的解析が進んでいるのに対し, T 細胞の OVA に対する認識機構については, 現在までほとんど解析がなされていない. T 細胞の抗原に対する応答を解析するには, 抗原特異的 T 細胞株 (TCL) を用いた解析が必要であるが, 食物アレルゲン特異的 TCL の報告

はない. その原因として, 吸入抗原に应答する T 細胞に比較して末梢血中の抗原特異的 T 細胞数が少ない可能性が考えられる. 本研究では, 比較的効率の良い TCL の樹立法を用いて, 卵アレルギー患者末梢血単核球から OVA に特異的に应答する TCL を樹立し, それらの認識する抗原決定基および HLA 拘束分子を解析した.

対象と方法

1) 患者

除去および負荷試験などから, 臨床的に卵に対するアレルギーと診断され, 卵白に対する RAST スコアが 2 以上の患者 6 名を対象とした (Table 1).

2) 抗原

OVA (grade VII), β ラクトグロブリン (β -LG) は, Sigma 社 (St. Louis, MO, USA) から購入した.

3) 合成 OVA ペプチド

OVA に应答する TCL の抗原決定基を分子レベルで明らかにするために, OVA の合成ペプチドを用いた解析が必要となる. しかしながら, OVA はアミノ酸残基数 385 の蛋白であり, その全てのアミノ酸残基を含

Received: May 6, 1993

Accepted: July 8, 1993

Abbreviations: β -LG betalactoglobulin; OVA ovalbumin; TCL T cell line

Table 1 Profile of patients used in this study

Patient	Age	Sex	RAST score to egg white	Symptoms
P1	1y6mo	M	2	Atopic dermatitis
P2	1y	M	4	Atopic dermatitis
P3	3y	M	3	Atopic dermatitis
P4	1y	F	4	Atopic dermatitis
P5	10y6mo	F	4	Atopic dermatitis Urticaria
P6	2y6mo	M	3	Atopic dermatitis Urticaria

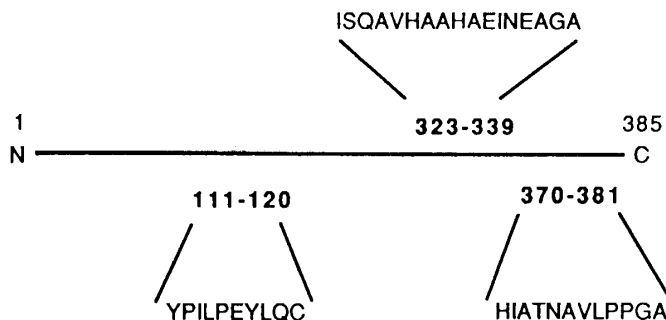


Fig. 1. Synthetic OVA peptides used in this study. Amino acids of the peptides are shown as single letter codes.

むペプチドの作製は容易ではない。そこで本研究では、マウスにおいて既に T 細胞が認識する OVA 抗原決定基であることが判明している部分 (OVA323-339³⁾ および OVA111-120, OVA370-381 (J.E. Coligan 未発表データ)) について、3 種の合成ペプチド) をペプチド合成機 (model 430A, Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) により作製した (Fig. 1)。これらのペプチドはすべて HPLC により 95% 以上に精製して実験に用いた。

4) OVA 特異的 TCL の樹立

TCL の樹立は、Pette らの方法⁴⁾ に準じて行った。すなわち、卵アレルギー患者の末梢血単核球 2×10^5 個を、96 穴培養プレートを用いて $30 \mu\text{g/ml}$ の OVA とともに $100 \mu\text{l}$ の培養液 (10% ヒト血清を含む RPMI1640 液体培地) 中で 37°C 、5% CO_2 の環境下で培養した。培養 3 日後に、 30 U/ml の組換えインターロイキン 2 (rIL-2) (武田薬品工業から分与) $100 \mu\text{l}$ を加え、その後 3~4 日ごとに新たな rIL-2 を追加した。培養開始から 18~20 日後に培養プレートを遠心して IL-2 を除いた後に、培養細胞を $100 \mu\text{l}$ の培養液に浮遊させた。こ

の培養細胞浮遊液を、96 穴培養プレートの隣り合った 2 ウェルに $50 \mu\text{l}$ ずつ、 4000 rad の照射を行った同一患者由来の末梢血単核球 10^5 個とともに分注し、さらに一方のウェルにのみ $30 \mu\text{g/ml}$ の OVA を加えた。OVA を加えないウェルの細胞と比べて、OVA を加えたウェルの細胞にのみ増殖が認められた場合、その細胞を 24 穴の培養プレートに移し、さらに抗原提示細胞、OVA、および rIL-2 の存在下で培養した。

5) Epstein-Barr ウイルス (EBV) による B 細胞株 (EBV-LCL) の樹立

患者の末梢血単核球 10^7 個を、EBV 分泌細胞株である B95-8 の培養上清 0.5 ml 、 $20 \mu\text{g/ml}$ サイクロスポリン A 0.5 ml 、10% ウシ胎児血清を含む RPMI1640 液体培地 4 ml とともに培養し、B 細胞株を樹立した。

6) リンパ球増殖反応

TCL の抗原特異的応答性は、抗原に対する増殖反応をもとに解析した。すなわち、 2×10^4 個の TCL を 5×10^4 個のマイトマイシン C 処理した同一の患者由来の EBV-LCL とともに 96 穴マイクロプレートにて培養した。抗原濃度は OVA および $\beta\text{-LG}$ については $50 \mu\text{g/ml}$ 、合成ペプチドについては $10 \mu\text{g/ml}$ とした。培養 72 時間後に、ウェルあたり $0.5 \mu\text{Ci}$ の ^3H チミジンを加え、その 18 時間後に細胞を回収して細胞内に取込まれた放射活性を β カウンターにて測定した。T 細胞株の芽球化反応は triplicate culture で行い、以下のように Stimulation index にて示した。

$$\text{Stimulation index} = \frac{[^3\text{H}]\text{thymidine uptake (cpm) in culture with antigen}}{[^3\text{H}]\text{thymidine uptake (cpm) in culture without antigen}}$$

7) 単クローン性抗 HLA 抗体による抗原特異的 T 細胞芽球化反応の阻害

単クローン性抗 HLA-DR framework 抗体 (HU-4)⁵⁾、抗 HLA-DP framework 抗体 (B7/21)⁶⁾ は、九州大学生体防御医学研究所笹月健彦教授より分与された。T 細胞芽球化反応の阻害試験は、上記に示した抗原特異的芽球化反応に、これらの抗体 (腹水) を 1:250 の最終濃度で加えて行った。

結 果

1) OVA 特異的 TCL の樹立

6 人の卵アレルギー患者から計 10 株の TCL を樹立

Table 2 OVA-specific T cell lines from patients with allergy to hen's egg

Patient	Name of line	Proliferative response (stimulation index)	
		OVA (50 μ g/ml)	β -LG (50 μ g/ml)
P1	2B7	10.6	0.5
	2G1	53.2	0.6
P2	D1	19.8	0.9
	G5	15.5	1.2
P3	2F5	47.2	1.6
	1G5	103	1.3
P4	1D9	160	0.7
P5	A1	2.9	1.3
P6	B2	4.1	1.0
	2E7	9.4	0.7

Numbers of stimulation index are means of the triplicate cultures. Standard deviation was <10% of the response for all T cell proliferative responses.

した. Table 2 に示すように, これらの TCL は対照抗原である β -LG に対しては応答を示さず, OVA に対してのみ応答していることから, OVA 特異的 TCL であることが示された.

2) OVA 特異的 TCL の合成 OVA ペプチドに対する応答

これら10株の, OVA 特異的 TCL の 3 種の合成 OVA ペプチドに対する芽球化反応を Table 3 に示した. 10株中 8 株は今回検討した 3 種の合成ペプチドに応答を示さなかったが, OVA 特異的 TCL A1 が OVA111-120 を認識して応答した. また, もう 1 株の OVA 特異的 TCL 2E7 は, OVA323-339 に対して高い応答性を示した.

3) OVA 特異的 TCL の抗原認識に関与する HLA 拘束分子

OVA 特異的 TCL の抗原認識に関与する HLA 拘束分子を解析するために, 4 株の OVA 特異的 TCL について, その抗原特異的芽球化反応を単クローン性抗 HLA 抗体により阻害した (Table 4). TCL 2B7 の OVA に対する芽球化反応は, 抗 HLA-DR 抗体である HU-4 および抗 HLA-DP 抗体である B7/21 によりほぼ完全に抑制された. 2 株の TCL 2G1 と 2E7 の OVA に対する応答は, HU-4 の存在下でのみほぼ完全に抑制された. これに対して, TCL 1D9 の OVA に対する芽球化反応は, HU-4 および B7/21 の存在下で全く影響を受けなかった.

Table 3 Peptide recognition of OVA-specific T cell lines from patients with allergy to hen's egg

Patient	Name of line	Proliferative response (stimulation index)			
		OVA	OVA111-120	OVA323-339	OVA370-381
P1	2B7	10.6	0.7	0.8	0.5
	2G1	53.2	1.9	0.9	1.9
P2	D1	19.8	1.2	0.8	0.9
	G5	15.5	0.8	0.8	0.7
P3	2F5	47.2	1.6	1.4	3.2
	1G5	102	0.9	1.1	0.8
P4	1D9	78.6	not tested	1.2	0.6
P5	A1	4.1	8.1	1.0	0.5
P6	B2	4.1	0.9	1.1	0.8
	2E7	9.4	0.9	44.3	0.8

Numbers of stimulation index are means of the triplicate cultures. Standard deviation was <10% of the proliferation for all cultures. [OVA] : 50 μ g/ml, [OVA peptide] : 10 μ g/ml.

Table 4 Antibody blocking of OVA-specific proliferation of TCL

OVA-specific T cell line	Blocking antibody		
	No antibody	HU-4	B7/21
2B7	10.6*	0.2	1.4
2G1	53.2	2.7	53.4
1D9	160	142	160
2E7	5.7	1.0	4.5

*Stimulation index.

Standard deviation was <20% for all proliferation assays.

考 察

代表的な食物アレルギーである卵アレルギーの主要抗原として、OVA, オボムコイド, オボトランスフェリンが挙げられているが、OVA が最も卵白蛋白のなかで高い割合を占めている¹⁾。OVA に対する IgE 抗体が結合する抗原決定基について、アミノ酸レベルでの解析が幾つか行われている⁷⁾⁸⁾。これに対して、ヒト、特にアレルギー患者における OVA に対する T 細胞応答の分子レベルでの理解はきわめて不十分である。そこで、本研究において我々は、臨床的に卵アレルギーと診断された患者の末梢血単核球を OVA と IL-2 により刺激して OVA 特異的 TCL を樹立し、それらの認識する抗原決定基と HLA 拘束分子を解析した。

OVA は385のアミノ酸残基よりなる蛋白であり、その抗原決定基を OVA の全配列にわたる合成ペプチドを作製して検討することは、現実的には容易ではない。そこで、本研究においては、マウスの系で判明している OVA T 細胞抗原決定基をもとに3つの合成ペプチドを作製し、これらの合成ペプチドに対する TCL の応答性を解析した。マウスの系で認識される T 細胞抗原決定基がヒトにおいても T 細胞抗原決定基でありうることは、幾つかの抗原について示されている⁹⁾¹⁰⁾。したがって、マウスにおける OVA T 細胞抗原決定基がヒトにおいても T 細胞抗原決定基である可能性があり、実際、今回の研究においても、卵アレルギー患者の T 細胞が認識する2つの OVA 抗原決定基をはじめ明かにすることができた。今回の解析からは、T 細胞 OVA 抗原決定基の一部が明らかになったが、10株の TCL のうち8株については抗原決定基を明らかにしえなかった。

Table 3 に示した OVA 特異的 TCL B2と2E7は同一の患者から樹立されており、その特異性が異なることから、一人の卵アレルギー患者においても T 細胞は複数の OVA 抗原決定基を認識することが示された。今後、さらに多数の合成ペプチドを作成して卵アレルギー患者において認識される主要な T 細胞 OVA 抗原決定基を明らかにする必要がある。

今回我々は、OVA 特異的 TCL の抗原認識における HLA 拘束分子を、HLA-DR および HLA-DP の framework に対する単クローン性抗体による抗原特異的芽球化反応の阻害試験から検討した。Table 2 の2G1および2E7は、抗 HLA-DR 抗体により完全にその抗原特異的応答能が阻害されたことから、これら2株の TCL は HLA-DR 拘束性に OVA を認識すると考えられた。1D9の OVA に対する芽球化反応は、抗 HLA-DR および抗 HLA-DP 抗体によっては阻害されなかった。HLA-DQ 分子の framework に対する抗体がないため結論は出せないが、1D9の抗原特異的芽球化反応が抗 HLA クラス I 抗体にては抑制されなかったことから(結果は示さず) HLA-DQ 分子が抗原提示に関与することが示唆された。一方、2B7の増殖反応は、抗 HLA-DR 抗体および抗 HLA-DP 抗体の両者により抑制された。この結果は、2B7が monoclonal でなく oligoclonal である可能性を示している。また、抗 HLA-DR 抗体と抗 HLA-DP 抗体が、それぞれ部分的でなくほぼ完全に2B7の芽球化反応を抑制したことは、HLA-DP 拘束性の TCL と HLA-DR 拘束性の TCL が互いの増殖に影響を及ぼしている可能性があり、2B7からの cloning が必要と思われる。以上の結果から、OVA に対する T 細胞応答については HLA-DR, -DP, -DQ のすべての HLA クラス II 分子が拘束分子として機能していることが強く示唆される。OVA に対する T 細胞の応答を規定する HLA 拘束分子について、野間らのグループ¹¹⁾は、末梢血リンパ球の OVA 特異的 IL-2反応性に対する抗 HLA 抗体の阻害能の検討から、HLA-DP および HLA-DQ が拘束分子であると報告している。我々は、OVA 特異的 TCL を抗原特異的 T 細胞芽球化反応を指標として樹立しており、彼らの結果と我々のそれとの違いは、一つには用いたシステムの違いによると考えられる。一方、Sasazuki ら¹²⁾が溶連菌細胞膜抗原に対する低応答性が HLA-DQ により規定されていることを報告していることから、異なる HLA クラス II 分子が異なる機能を有する T 細胞を誘導する可能性も示唆される。今後具

体的には、T細胞の機能と特異性を対応させてHLA分子の拘束性を解析する必要がある。今回我々の樹立したTCLを用いて、特定のHLAクラスII抗原により応答性が規定されるOVA応答性T細胞の機能を、サイトカインの産生能などを指標に解析していくことが可能である。インターロイキン4やインターロイキン5などのアレルギー反応に重要な機能を果たすサイトカインを産生するT細胞が認識する抗原決定基とHLAクラスII分子が明らかとなれば、この抗原決定基に対するT細胞応答を標的にしたアレルギーの治療が可能となりうる。実際、自己免疫疾患のモデルである実験自己免疫性脳脊髄炎において自己抗原であるmyelin basic proteinを認識するT細胞の活性化を、抗原決定基のanalog peptideを用いて阻害することにより、発症を予防しうる事が報告されている¹³⁾。現在我々は、OVA抗原決定基のanalog peptideによるT細胞応答の制御の実験を計画している。このように我々の樹立したOVA特異的TCLは、アレルギー反応に関わるT細胞の機能とその制御を解析していく上できわめて有用なモデルと考えられる。

抗HLA class II抗体を供与して頂いた九州大学の笹月健彦教授ならびに西村泰治助教授に深謝します。

本研究の一部は、文部省科学研究費(#05272203)によった。

文 献

- 1) Yunginger, J.W.: Food antigens. In "Food Allergy Adverse Reactions to Foods and Food Additives" (ed. by D.D. Metcalfe, H.A. Sampson, and R.A. Simon), Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp.36-51, 1991.
- 2) Plaut, M.: Antigen-specific lymphokine secretory patterns in atopic disease. *J. Immunol.* 144, 4497-4500, 1990.
- 3) Shimonkevitz, R., Colon, S., Kappler, J., Marrack, P. and Grey, H.M.: Antigen recognition by H-2-restricted T cells. II. A tryptic ovalbumin peptide that substitutes for processed antigen. *J. Immunol.* 133, 2067-2074, 1984.
- 4) Pette, M., Fujita, K., Wilkinson, D., Altman, D. M., Trowsdale, J., et al.: Myelin reactivity in multiple sclerosis; recognition of myelin basic protein in the context of HLA-DR2 products by T lymphocytes of multiple-sclerosis patients and healthy donors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 7698-7972, 1990.
- 5) Sone, T., Tsukamoto, K., Hirayama, K., Nishimura, Y., Takenouchi, T., et al.: Two distinct class II molecules encoded by the genes within the HLA-DR subregion of HLA-Dw1 and Dw12 can act as stimulating and restriction molecules. *J. Immunol.* 135, 1288-1298, 1985.
- 6) Watson, A., DeMars, J.R., Trowbridge, I.S. and Bach, F.: Detection of novel human class II antigen. *Nature* 304, 358-361, 1983.
- 7) Elsayed, S., Apold, J., Holen, E., Vik, H., Florvaag, E. and Dybendal, T.: The structural requirements of epitopes with IgE binding capacity demonstrated by three major allergens from fish, egg and tree pollen. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 204, 17-31, 1991.
- 8) Kahlert, H., Petersen, A., Becker, W.M. and Schlaak, M.: Epitope analysis of the allergen ovalbumin (Gal d II) with monoclonal antibodies and patients' IgE. *Mol. Immunol.* 29, 1191-1201, 1992.
- 9) Martin, R., Jaraquemada, D., Flerlage, M., Richert, J., Whitaker, J., et al.: Fine specificity and HLA restriction of myelin basic protein-specific cytotoxic T cell lines from multiple sclerosis patients and healthy individuals. *J. Immunol.* 145, 540-548, 1990.
- 10) Hosmalin, A., Clerici, M., Houghten, R., Pendleton, C.D., Flexner, C., et al.: An epitope in human immunodeficiency virus 1 reverse transcriptase recognized by both mouse and human cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2344-2348, 1990.
- 11) 吉沢いづみ: HLA restriction in OVA-induced IL-2 responsiveness to lymphocytes from patients with hen-egg allergy. *埼玉医大誌* 19, 57-69, 1992.
- 12) Kamikawaji, K., Fujisawa, K., Yoshizumi, H., Fukunaga, M., Yasunami, M., et al.: HLA-DQ-restricted CD4⁺ T cells specific to streptococcal antigen presented in low but not in high responders. *J. Immunol.* 146, 2560-2567, 1991.
- 13) Urbain, J.L., Horvath, S.J. and Hood, L.: Autoimmune T cells; immune recognition of normal and variant peptide epitopes and peptide-based therapy. *Cell* 59, 257-270, 1989.

ANALYSIS OF OVALBUMIN-SPECIFIC T CELL LINES ESTABLISHED FROM
PATIENTS WITH HEN EGG ALLERGY

Toshiyuki Katsuki, Naoki Shimojo, Kiri Honma, Yoichi Kohno and Hiroo Niimi
Department of Pediatrics, Chiba University School of Medicine

John E. Coligan
Biological Resources Branch, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH

Hajime Tsunoo
Meiji Institute of Health Science

Ten ovalbumin (OVA)-specific T cell lines (TCLs) were established from peripheral blood mononuclear cells of 6 patients with hen egg allergy, and the antigen recognition of these TCLs was characterized. Two OVA epitopes were determined by use of 3 synthetic OVA peptides which have been known as murine T cell epitopes. Blocking of antigen-specific T cell proliferation by anti-HLA class II monoclonal antibodies suggest that all 3 HLA class II molecules could act as restriction elements for T cell recognition of OVA. This is the first demonstration of OVA epitopes recognized by T cells in patients with hen egg allergy, as far as we know.
