

ウシインシュリン Antigenic Determinants の (B10.A×B6.C-H-2^{bm12})F₁ T リンパ球クローンによる解析

日本医科大学泌尿器科学教室

金森幸男 西村泰司 秋元成太

同 微生物学免疫学教室

横室公三

B6.C-H-2^{bm12}マウスは、C57BL/6 マウスの I-A subregion に mutation をおこし、ウシインシュリンに対して low responder となっている。しかし同様にウシインシュリンに対して low responder である B10.A マウスとの間の F₁ hybrids は high responder であり、gene complementation をおこしているものと考えられる。この(B10.A×B6.C-H-2^{bm12})F₁ マウスのウシインシュリン抗原に反応する T リンパ球をクローニングし、ウシインシュリンにのみ反応し、adjuvant として用いた PPD や無関係な抗原である OVA には反応しないウシインシュリン特異的クローンを得た。これらのクローンには、ウシインシュリンに存在しブタインシュリンに存在しない部位である A chain loop (A8-A10) を抗原決定基として認識するものと、ウシ及びブタインシュリンに共通する non A chain loop (A4 または B chain) を認識するものとの少なくとも2つの異なる特異性をもつクローンが存在した。またこの F₁ マウスは、Ia.W39 を発現しておらず、ウシインシュリンの A chain loop の認識と Ia.W39 の発現とは密接に関係するという従来の考えが誤りであることを証明した。

Key words: antigenic determinants — (B10.A×B6.C-H-2^{bm12})F₁ mouse — beef insulin — gene complementation — T lymphocyte clones

緒言

B6.C-H-2^{bm12}マウスは、C57BL/6(B6)マウスの I-A subregion の限られた部位に mutation を起こしたマウスで¹⁾、その結果 B6 が持っていた性質のうちウシインシュリン²⁾や H-Y 抗原³⁾に対する免疫応答性を失なって low responder となっている。しかしながら、これらの抗原に対して同様に low responder である B10.A と B6.C-H-2^{bm12} との間の F₁ hybrids は high responder であり、gene complementation をおこしているものと考えられる²⁾³⁾。

インシュリンのあるものは、アミノ酸配列のすべてがすでに知られており、Table 1 に示すようにいくつかの種属間では、限られた位置のアミノ酸のみが異なることも知られている⁴⁾。したがって異なる種属に由来

するいくつかのインシュリンを抗原として使用すると、インシュリン分子上のどの位置が抗原決定基として認識されたかを明らかにすることができる。たとえば、B6 マウスは、ウシインシュリンに対して high responder であるが、ブタインシュリンには low responder である。つまり、B6 マウスは、ウシインシュリンに存在し、ブタインシュリンにない部位であるウシインシュリン分子上の A chain loop (A8-A10) を抗原決定基として認識するものと理解される⁴⁾。

Table 1 Amino acid substitutions in insulins of beef and pork as compared with mouse insulin

Species	Amino acid positions					
	A chain				B chain	
	4	8	9	10	3	30
Mouse	Asp	Thr	Ser	Ile	Lys	Ser
Beef	Glu	Ala	Ser	Val	Asn	Ala
Pork	Glu	Thr	Ser	Ile	Asn	Ala

Sequence differences are represented in comparison with the amino acid sequence of both forms of mouse insulin.

Received: August 22, 1985.

Accepted: October 16, 1985.

Abbreviations: APC antigen presenting cells; B6 C57BL/6; CFA complete Freund's adjuvant; OVA ovalbumin; PPD purified protein derivative; TCGF T cell growth factor

近年 T リンパ球をクローニングする方法が確立し⁵⁾, T リンパ球の全 population を使用したのでは解決できなかった問題を, 各々 T リンパ球のクローンのレベルで検索することが可能となった。我々は, soft agar を使用してクローニングを行った (B10.A×B6.C-H-2^{bm12}) F₁ 由来のウシインシュリン特異的 T リンパ球クローンを用いて, この F₁ hybrids の T リンパ球が, ウシインシュリンの少なくとも 2 つの異なる antigenic determinants を認識することを明らかにしたので報告する。

材料および方法

1. マウス; B6 と B10.A マウスは, Jackson Laboratory より購入した。 (B10.A × B6.C-H-2^{bm12}) F₁ は, 我々の研究室で交雑, 飼育したものであり, すべてのマウスは 8-12 週齢の雌を使用した。

2. 抗原; ウシインシュリンとブタインシュリンは, Novo Research Institute 社より購入した。 purified protein derivative of tuberculin (PPD) は, Connaught Medical Research Laboratory から, また ovalbumin (OVA) は, Miles Laboratories より購入した。

3. antigen presenting cells (APC); 正常マウス脾細胞を 2000 rads 放射線照射して APC として使用した。この viability は常に 87% 以上であった。

4. 免疫; complete Freund's adjuvant (CFA) を用いてウシインシュリン 100 μg/mouse となるように, 両足蹠及び尾根部の皮下に免疫した。

5. T リンパ球のクローニング; 免疫後 7 日目にマウスを屠殺し, 所属リンパ節を取り出し, ナイロンカラムを通過させて T リンパ球を調整した。24 well plate を用い, この T リンパ球 1-2 × 10⁶/well に同数の同系 APC とウシインシュリンを 100 μg/ml となるように加え, 37°C, 5 % CO₂ 下で培養した。5 日後に回収した細胞を, 6 well plate を用いて 1-2 × 10⁶/well とし, これに同数の同系 APC とウシインシュリンを加え再度 soft agar 内で刺激した。3 日から 5 日後 soft agar 内で形成された colonies を顕微鏡下で取り出し, 同系 APC とウシインシュリンを加え 10% T cell growth factor (TCGF) の存在下で培養して, T リンパ球クローンを得た。

6. TCGF; EL-4 1.5 × 10⁶/ml を phorbol myristate acetate を用いて刺激して得られた supernatant を TCGF として使用した。

7. T リンパ球の増殖の測定; 免疫後 7 日目のマウスからリンパ節を摘出し, ナイロンカラムを通過させて得られた T リンパ球 4 × 10⁵ を同系の APC 1 × 10⁵ と共に培養した。また T リンパ球クローンをを用いた場合には, 5 × 10³ の T リンパ球クローンを 1 × 10⁵ の同系 APC と共に 10% TCGF 存在下で培養した。T リンパ球クローンの viability は 90% 以上であった。Harvest の 18 時間前に ³H-thymidine を加え, 96 時間目に DNA に取り込まれる ³H-thymidine を測定することにより, T リンパ球の proliferative response を決定した。

Table 2 Complementation in T lymphocyte proliferative responses to beef insulin

Strain	³ H-thymidine incorporation (cpm)		
	Medium	Beef insulin	PPD
B10.A	990 ± 173	3019 ± 148	37136 ± 427
B6.C-H-2 ^{bm12}	679 ± 326	5549 ± 140	33890 ± 4169
(B10.A × B6.C-H-2 ^{bm12}) F ₁	837 ± 183	22498 ± 894	39443 ± 2834

Mice were immunized with 100 μg of beef insulin in CFA in hind footpads and at the base of the tail. Seven days after immunization, T lymphocytes from draining lymph nodes were collected and cultured in flat-bottomed well microtiter plates at 4 × 10⁵ cells/well with 1 × 10⁵ syngeneic irradiated spleen cells as the source of antigen presenting cells. The cultures were incubated at 37°C and 5 % CO₂ in air for 4 days. ³H-thymidine was added 18 to 24 hours before harvesting. Each experimental point represents the average of triplicate cultures. (p < 0.01)

結 果

1. B10.A, B6.C-H-2^{bm12}および(B10.A×B6.C-H-2^{bm12}) F₁マウス由来の T リンパ球のウシインシュリンに対する proliferative response

B10.A, B6.C-H-2^{bm12}および(B10.A×B6.C-H-2^{bm12}) F₁マウスを CFA を用いてウシインシュリンで免疫した。7日後にリンパ節を取り出し、ナイロンカラムを通過させて T リンパ球を得た。この T リンパ球 4×10⁵ を 1×10⁵ の同系 APC と共に抗原存在下で培養し、4日目に DNA 合成を測定した。Table 2に示すように B10.A と B6.C-H-2^{bm12} の T リンパ球は、共にウシインシュリンに対しては無応答であったが、もう一方の免疫抗原である PPD に対しては強く応答するところから、ウシインシュリンに対して low responder であることが確認された。一方この両者の間の F₁ hybrids は high responder であり、gene complementation をおこなっているものと思われる。

2. (B10.A×B6.C-H-2^{bm12}) F₁ 由来 ウシインシュリンクローンの抗原特異性

(B10.A×B6.C-H-2^{bm12}) F₁ が、ウシインシュリンに対して high responder となることが確認されたので、この (B10.A×B6.C-H-2^{bm12}) F₁ よりウシインシュリン特異的 T リンパ球のクローニングを試みた。CFA と共にウシインシュリンで免疫された (B10.A×B6.C-H-2^{bm12}) F₁ の T リンパ球を、in vitro でウシインシュリンを抗原としてクローニングを行うと、Table 3に示すように、得られた T リンパ球クローンのすべてはウシインシュリンに対しては応答したが、もう一方の免疫

Table 3 Antigen specificity of (B10.A×B6.C-H-2^{bm12}) F₁ beef insulin clones

Clone No.	³ H-thymidine incorporation (cpm)			
	Medium	Beef insulin	PPD	OVA
1	4154±727	58302±2332	1676±245	3723±331
2	1982±461	20781±2720	853±286	802±138
3	756±399	9469±471	404±219	936±289
4	322±28	8385±1079	973±83	398±76
5	5172±651	58002±5012	1372±93	4058±779
6	10917±1528	113149±2828	3302±571	8244±627
7	2543±745	34551±3355	1466±275	2759±631
8	11385±405	93623±9749	5246±538	8777±430
9	2690±455	54145±6622	930±86	1561±247
10	785±55	2883±169	456±225	236±43
11	2015±175	60906±5481	552±73	756±153

5×10⁵ cloned cells were cultured with 1×10⁵ syngeneic irradiated spleen cells as the source of antigen presenting cells in the presence of 10% TCGF and the appropriate antigens. Thymidine incorporation was measured on day 4. (*p*<0.01)

抗原である PPD に対しては、全く無応答であった。またこれらのマウスは OVA に high responder であるが、免疫に OVA 抗原を使用していないため、いずれのクローンも OVA 添加によって増殖することはなかった。これらの結果から、得られたすべての T リンパ球クローンが、クローニングに使用された抗原であるウシインシュリンに特異的であることが証明された。

3. ウシインシュリン特異的 T リンパ球クローンによるウシインシュリン分子上の antigenic determinants の解析

(B10.A×B6.C-H-2^{bm12}) F₁ 由来の T リンパ球ク

Table 4 Proliferative response of beef insulin specific (B10.A×B6.C-H-2^{bm12}) F₁ T lymphocyte clones to beef and pork insulins

Clone No.	³ H-thymidine incorporation (cpm)			Antigen specificity
	Medium	Beef insulin	Pork insulin	
1	7093±1134	57141±4114	34338±729	Beef & Pork insulin
2	11740±1056	90174±5164	52618±4735	Beef & Pork insulin
3	5440±1184	38255±3722	25889±423	Beef & Pork insulin
4	299±54	9307±825	2425±156	Beef & Pork insulin
5	1495±30	24960±2464	10770±1163	Beef & Pork insulin
6	9387±431	110275±8305	28757±1634	Beef & Pork insulin
7	371±112	10676±720	2657±120	Beef & Pork insulin
8	6979±531	81755±9015	45165±2711	Beef & Pork insulin
9	2015±230	61875±4010	16965±1321	Beef & Pork insulin
10	929±73	3599±209	725±85	Beef insulin
11	3769±425	55386±3042	3457±268	Beef insulin

Experimental conditions were the same as in Table 3. (*p*<0.01)

ローンがウシインシュリンに対して特異的であることが明らかとなったので、牛インシュリン以外にブタインシュリンを抗原として使用し、Tリンパ球の proliferative response を測定した。Table 4に示すように多くのクローンは、同系抗原提供細胞の存在下でウシインシュリンとブタインシュリンの両方で刺激された。しかしながら、少数のクローンは、ウシインシュリンのみで刺激されブタインシュリンでは刺激されなかった。これらの結果から、(B10.A×B6.C-H-2^{bm12})F₁由来のTリンパ球は、ウシインシュリンに存在しブタインシュリンに存在しない部位と、ウシとブタの両者のインシュリンに共通する部位の少なくとも2つを antigenic determinants として認識しうることが証明された。

考 察

近年の免疫学における方法論の進歩は、免疫応答に関与する細胞を、各々クローンのレベルで解析することを可能にした。

従来 (B10.A×B6.C-H-2^{bm12})F₁由来のTリンパ球は、ウシインシュリンとブタインシュリンの共通部分であるB chainを認識するものと理解されていた⁶⁾。このことは、Tリンパ球の全 population を使用した場合に、ウシインシュリン以外にブタインシュリンを抗原として使用してもTリンパ球の proliferative response が惹起されることから得られたものであった²⁾。今回の我々の実験から、ウシインシュリンに存在しブタインシュリンに存在しない部分であるA chain loop (A8-A10) を antigenic determinant として認識するクローンと、ウシとブタのインシュリンに共通する部位であるウシインシュリンのA4又はB chain を antigenic determinant として認識する2種類のクローンの存在することが明らかとなった。しかしながら、この両クローンの正常状態での割合をこの実験から算定することはできない。しかし soft agar 内で形成された colonies を at random に取り出した結果では、多数のTリンパ球クローンはウシとブタインシュリンの共通部分を認識していた。このことは、Tリンパ球の全 population が、ウシとブタ両者のインシュリンに応答を示したことをよく説明しうるものである。

これらのクローンは、免疫には用いたが、in vitro では使用しなかった抗原 PPD に対しては反応しなかつ

た。このことは、PPD を認識するTリンパ球クローンは in vitro で対応する抗原が存在しなかったためにクローニングの段階で増殖できず除去されたものと思われる。

マウスの免疫応答を支配する immune response gene の細胞表面上への発現が、I region associated (Ia) 抗原であることが証明されている⁷⁾。したがって、ある特定のIa抗原が細胞表面上に発現しているか否かが、ある抗原に対する免疫応答の有無を決定するものと考えられる。従来ウシインシュリン分子上に存在し、ブタインシュリンに存在しない部位であるウシインシュリンのA chain loop (A8-A10) に対する免疫応答は、Tリンパ球の proliferative response⁸⁾もBリンパ球による plaque formation⁶⁾⁹⁾も共に、H-2^bマウスの private specificity の一つであるIa.W39の発現と一致することが示されてきた。

Ia.W39の発現は、少なくとも2つの遺伝子によって支配されていることが明らかにされている¹⁰⁾。一つは、性染色体であるX chromosome 上にある遺伝子で¹⁰⁾、Ia.W39の細胞表面上への発現を支配している。したがって、xid を欠損するマウスでは、Ia.W39は cytoplasm 内で合成されても、細胞表面上には発現されない状態にある。B6.C-H-2^{bm12}マウスは、X chromosome は正常であるが、Ia.W39は発現されていない⁶⁾。すなわち、Ia.W39分子を code する遺伝子が mutation により消失したと考えられる⁶⁾。このような mutation をおこしたB6.C-H-2^{bm12}マウスでは、ウシインシュリンに対する免疫応答が、免疫Tリンパ球の proliferative response や抗体産生で見限りいずれも消失している²⁾。B10.Aマウスは、ウシおよびブタインシュリンに対して low responder であり⁴⁾、かつIa.W39も発現していない¹⁰⁾。このような両マウスから作られた (B10.A×B6.C-H-2^{bm12})F₁ は、Ia.W39 negative のままであるが、ウシおよびブタインシュリンに対して high responder となり、gene complementation をおこしているものと考えられる²⁾⁶⁾。この結果を説明するために、(B10.A×B6.C-H-2^{bm12})F₁ 由来のTリンパ球は、ウシおよびブタインシュリンの共通部位であるB chain を抗原決定基として認識するとした⁶⁾。そしてIa.W39を持たないマウスは、ウシインシュリンのA chain loop を認識できないという従来の立場を守ってきた⁶⁾。

しかしながら、Ia.W39 negative である (B10.A×B6.C-H-2^{bm12})F₁ 由来の抗原提供細胞が、ウシインシュリンのA chain loop (A8-A10) をTリンパ球に提示し

得たこと、さらに Ia.W39 negative の (B10.A×B6.C-H-2^{bm12})F₁の中に、抗原提供細胞上に発現された Ia.W39以外の Ia 抗原とウシインシュリンの A chain loop を認識する T リンパ球クローンが存在することを明らかにした本実験によって、従来の定説をくつがえして、Ia.W39の発現とウシインシュリンの A chain loop の認識の間に特に密接な関係のないことが証明された。

結 語

1. B10.A および B6.C-H-2^{bm12}マウスは共にウシインシュリンに対して low responder であるが、その両者に由来する F₁ hybrids は high responder となり、gene complementation をおこしているものと考えられる。

2. (B10.A×B6.C-H-2^{bm12})F₁由来ウシインシュリン特異的 T リンパ球クローンは、ウシインシュリン分子上の少なくとも 2 つの antigenic determinants を識別しうる。一つは、ウシインシュリンとブタインシュリンに共通する non A loop 又は B chain であり、もう一方は、ウシインシュリンに存在しブタインシュリンに存在しない A chain loop (A8-A10) である。

3. ウシインシュリンの A chain loop の認識と Ia.W39の発現には、従来信じられてきたような密接な関係はない。

文 献

- 1) McKenzie, I.F.C., Morgan, G.M., Sandrin, M.S., Michaelides, M.M., Melvold, R.W. and Kohn, K. I.: B6.C-H-2^{bm12}, a new H-2 mutant in the I region in the mouse. *J. Exp. Med.* 150, 1323-1338, 1979.

- 2) Lin, C.S., Rosenthal, A.S., Passmore, H.C. and Hansen, T.H.: Selective loss of antigen-specific Ir gene function in IA mutant B6.C-H-2^{bm12} is an antigen presenting cell defect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6406-6410, 1981.
- 3) Michaelides, M., Sandrin, M., Morgan, G., McKenzie, I.F.C., Ashman, R. and Melvold, R. W.: Ir gene function in an I-A subregion mutant B6.C-H-2^{bm12}. *J. Exp. Med.* 153, 464-469, 1981.
- 4) Rosenwasser, L.J., Barcinski, M.A., Schwartz, R.H. and Rosenthal, A.S.: Immune response gene control of determinant selection. II. Genetic control of the immune T lymphocyte proliferative response to insulin. *J. Immunol.* 123, 471-476, 1979.
- 5) Sredni, B., Tse, H.Y. and Schwartz, R.H.: Direct cloning and extended culture of antigen-specific MHC-restricted, proliferating T lymphocytes. *Nature* 283, 581-583, 1980.
- 6) Huber, B.T., Hansen, T.H., Skelly, R.R. and Thorley-Lawson, D.A.: Ia.W39 expression correlates with a specific Ir function. *J. Immunol.* 128, 2349-2352, 1982.
- 7) Fathman, C.G. and Kimoto, M.: Studies utilizing murine T cell clones. Ir genes, Ia antigens and MLR stimulating determinants. *Immunol. Rev.* 54, 57-79, 1981.
- 8) Rosenwasser, L.J. and Huber, B.T.: The xid gene controls Ia.W39-associated immune response gene function. *J. Exp. Med.* 153, 1113-1123, 1981.
- 9) Huber, B.T. and Rosenwasser, L.J.: Role of Ia.W39 in the interaction of antigen-presenting cells with T and B lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 12, 37-43, 1982.
- 10) Huber, B.T.: Antigenic marker on a functional subpopulation of B cells, controlled by the I-A subregion of the H-2 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 3460-3463, 1979.

CLONAL ANALYSIS OF THE ANTIGENIC DETERMINANTS IN THE RESPONSE
OF (B10.A $\times$ B6.C-H-2^{bm12})F₁ HYBRIDS TO BEEF INSULIN

Sachio Kanamori, Taiji Nishimura and Masao Akimoto

Department of Urology, Nippon Medical School

Kozo Yokomuro

Department of Microbiology and Immunology, Nippon Medical School

One point mutation in the I-A subregion of C57BL/6 major histocompatibility complex causes the mutant, B6.C-H-2^{bm12}, to lose its ability to respond to beef insulin. F₁ hybrids of two nonresponder mice, B10.A and B6.C-H-2^{bm12}, were found to be good responders to beef insulin suggesting gene complementation. T cell clones were isolated from (B10.A $\times$ B6.C-H-2^{bm12})F₁ mice that had been immunized with beef insulin. These F₁ T cell clones responded to beef insulin but not the other immunized antigen, PPD, or the unrelated antigen, OVA. When these clones were tested with the antigen pork insulin, which differs from beef insulin only in the amino acids in positions A8-A10 (A chain loop), a few clones failed to respond. From this we can say that these clones recognize an insulin determinant associated with the A chain loop. The remaining T cell clones responded to beef or pork insulin and therefore can be said to recognize a non-A chain loop determinant (A4 or B chain). Recognition of A chain loop on the beef insulin molecule is unrelated to the expression of Ia.W39 on antigen presenting cells because these F₁ mice do not express Ia.W39 on their cell surfaces.
