

# 学位論文

## Doctor's Thesis

論文名： ヒト Th1 細胞上に発現する HLA-DR 分子の  
架橋により誘導されるアナジーの解析  
(Cross-linking HLA-DR molecules on Th1 cells induces  
anergy in association with increased levels of Rap1 and  
cyclin-dependent kinase inhibitor p27<sup>Kip1</sup>)

著者名： 工藤 博徳 Hironori Kudo

指導教官名： 免疫病態学講座教授 満屋 裕明  
免疫識別学講座教授 西村 泰治

審査委員名： ウイルス制御分野担当教授 滝口 雅文  
分子病理学講座担当教授 山本 哲郎  
腫瘍医学講座担当教授 佐谷 秀行  
分子免疫学講座担当教授 阪口 薫雄

2002 年 3 月

# 目次

目次 .....	1
1 要旨 .....	2
2 発表論文リスト .....	5
3 謝辞 .....	6
4 略語一覧 .....	7
5 研究の背景と目的 .....	8
5-1) はじめに .....	8
5-2) MHC の構造と機能 .....	9
5-3) 免疫応答遺伝子としてのクラス II MHC .....	11
5-4) クラス II MHC 分子を介したシグナル .....	12
5-5) T 細胞の抗原特異的な活性化機構における Ras-MAP キナーゼ系 の役割 .....	14
5-6) 細胞周期の調節に関わる分子群 .....	16
5-7) 本研究の目的 .....	19
6 実験方法 .....	20
6-1) 本研究に使用した試薬と抗体 .....	20
6-2) ヒト CD4 <sup>+</sup> T 細胞クローン SF36.16 .....	20
6-3) 細胞表面抗原の解析 .....	21
6-4) T 細胞の免疫応答の定量 .....	21
6-5) アナジー誘導アッセイ .....	22
6-6) 固相酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) .....	22
6-7) ウェスタンイムノブロット解析 .....	23
7 実験結果 .....	24
7-1) 培養細胞系における、CD4 陽性細胞の割合と HLA-DR 分子の 発現の経時的変化 .....	24
7-2) T 細胞上の HLA-DR 分子を架橋した際に誘導される増殖反応の 経時的変化 .....	24
7-3) 可溶性抗原ペプチド、抗 CD3 モノクローナル抗体、抗 HLA-DR モノクローナル抗体によって誘導される T 細胞アナジーの解析 .....	25
7-4) T 細胞上の CD3 分子、HLA-DR 分子を架橋した際に観察される サイトカインの産生 .....	26
7-5) アナジーに陥った T 細胞における、Rap1、CDK インヒビター p27 <sup>Kip1</sup> 、p21 <sup>Cip1</sup> の発現 .....	26
8 考察 .....	28
9 おわりに .....	31
10 図およびその説明 .....	32
11 参考文献 .....	40

# 1 要旨

Human leukocyte histocompatibility antigen (HLA) クラス II 分子は、抗原提示細胞に発現し、CD4 陽性 T 細胞に抗原を提示するという重要な役割を担っている。また近年、抗原提示細胞が T 細胞に抗原提示する際に、HLA クラス II 分子を介して抗原提示細胞側にも刺激が入ることが明らかになってきている。HLA クラス II 分子は、マウス以外のげっ歯類やヒトの活性化 T 細胞上にも発現しているが、その機能については不明である。本研究は、ヒトの活性化 T 細胞上の HLA クラス II 分子を架橋することによって生じる、T 細胞応答の変化ならびにその分子機構を解析することを目的とする。

実験には、ヒト CD4 陽性 T 細胞クローン SF36.16 を用いた。SF36.16 は、HLA-DR4 (DRB1\*0405) 分子により提示された BCGa 蛋白の第 84-100 番アミノ酸残基に相当するペプチドを特異的に認識する。また SF36.16 は、プラトーレベルで IFN- $\gamma$  40.5 ng/ml と IL-4 102 pg/ml を産生するため、Th1/Th0 細胞に分類される。まず、抗原刺激後の培養 6 日目、7 日目、8 日目の細胞は、99% が CD4 陽性であり、HLA-DR を発現している T 細胞であることを FACS で確認し、以降の実験には培養 6 日目または 7 日目の細胞を用いた。ヒトの T 細胞表面の HLA-DR 分子を、固相化した単クローン抗体で架橋すると、CD3 分子を架橋した場合と同様に、T 細胞は刺激後 24 時間をピークとして増殖し、その後低応答（アナジー）に陥ることが明らかになった。また、ビオチン化抗 HLA-DR 単クローン抗体 + アビジンで刺激した T 細胞も増殖したが、ビオチン化抗 HLA-DR 単クローン抗体単独で刺激した T 細胞は増殖しなかった。よって、T 細胞が増殖するためには抗 HLA-DR 単クローン抗体が T 細胞表面の HLA-DR 分子に結合するだけでは不十分で、さらにそれらが架橋される必要があると考えられた。T 細胞上の CD3 分子の架橋と HLA-DR 分子の架橋では、同程度の IFN- $\gamma$  や IL-8 の産生が観察された。しかし、IL-10 の産生量は、HLA-DR 分子の架橋では、CD3 分子を架橋した場合の約 50% であった。したがって、IL-10 のような免疫抑制性液性因子の産生がアナジーを誘導しているとは考えられなかった。T 細胞上の CD3 分子あるいは HLA-DR 分子の架橋により T 細胞はアナジーに陥るが、この際に既に他のシステムでアナジーに陥った T 細胞で発現増強が報告されている、Rap1 とサイクリン依存性キナーゼ (CDK) インヒビターの一つ p27<sup>Kip1</sup> の発現が共に増強することが明らかとなった。いずれの場合も CDK インヒビター p21<sup>Cip1</sup> の発現増強は観察されなかった。同様に、可溶性抗原ペプチドを T 細胞に作用させ、T 細胞上の HLA クラス II 分子による抗原提示により T 細胞にアナジーを誘導した場合にも、Rap1 と p27<sup>Kip1</sup> の発現増強が起こり p21<sup>Cip1</sup> の発現増強は観察されなかった。

以上の結果から、活性化された CD4 陽性 T 細胞に発現している HLA-DR 分子を介するシグナルが、少なくとも Rap1 と p27<sup>Kip1</sup> の発現増強を通して、T 細胞のアナジー誘導に貢献していると考えられた。さらに可溶性抗原ペプチドによるヒト T 細胞アナジーの誘導には、T 細胞抗原受容体による T 細胞上の HLA-DR 分子の架橋が関与している可能性が推察された。

## Summary

HLA class II molecules are expressed on antigen presenting cell and play pivotal roles in antigen presentation to CD4<sup>+</sup> T cells. In recent years, it has been reported that signals are transmitted to antigen-presenting cells (APC) via HLA class II molecules when APCs present antigens to T cells. Activated T cells of humans and of most rodents but not of mice, express MHC class II molecules. However the functions of HLA class II molecules expressed on activated T cells are not sufficiently solved. The purpose of this research is investigation of T cell reaction and signaling via HLA-DR molecules expressed on activated CD4<sup>+</sup> T cells.

We used human CD4<sup>+</sup> T cell clone SF36.16 in the current experiment. Human CD4<sup>+</sup> T cell clone SF36.16 that recognizes DRB1\*0405 + residues 84-100 of BCGa protein (BCGap84-100; EEYLILSARDVLAVVSK) was as described. SF36.16 produced 40.5 ng/ml of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and 102 pg/ml of IL-4, at plateau responses, thus classified as Th1/Th0. First, we examined the proportion of CD4<sup>+</sup> cells and expression of HLA-DR molecules, in the culture of T cell clone SF36.16 on days 0, 6, 7 and 8, by using FACS. On days 6, 7 and 8, CD4<sup>+</sup> cells occupied the majority of cultured cells (98.8 %, 98.7 % and 99.1 %, respectively) and they indeed expressed HLA-DR molecules. Therefore we use SF36.16 on day 6 or 7, for subsequent experiments. When HLA-DR or CD3 molecules on cloned CD4<sup>+</sup> T cells were cross-linked by solid-phase mAbs, T cells showed proliferative response which reached maximum at 24 hr and this resulted in anergy. T cells incubated with biotinylated anti-DR + avidin proliferated as well. However, T cells stimulated by biotinylated anti-DR alone did not do so. Thus not only binding of anti-DR mAb molecules but also their cross-linking is necessary for T cells to proliferate. When HLA-DR and CD3 molecules on CD4<sup>+</sup> T cells were cross-linked by solid-phase mAbs, the same levels of IFN- $\gamma$  and IL-8 were secreted. However, secretion of IL-10 induced by cross-linking of HLA-DR was only half that induced by cross-linking of CD3 on CD4<sup>+</sup> T cells. Therefore secretion of a humoral factor such as IL-10 is not essential for the induction of anergy induced by anti-HLA-DR Ab. When HLA-DR or CD3 molecules on CD4<sup>+</sup> T cells were cross-linked by solid-phase mAbs, T cells resulted in anergy and expressed higher levels of Rap1 and CDK inhibitor p27<sup>Kip1</sup>. Increased and sustained expression of Rap1 and p27<sup>Kip1</sup> was reported to be associated with anergy induced by lack of co-stimulation. In contrast, both expressed the same levels of CDK inhibitor p21<sup>Cip1</sup>. Likewise, T cells with clonal anergy induced by

stimulation with the soluble form of an antigenic peptide, which accompanies with antigen presentation from HLA-DR expressed on T cells and TCR, expressed up-regulated levels of Rap1 and CDK inhibitor p27<sup>Kip1</sup> and the same levels of p21<sup>Cip1</sup>.

Therefore we propose that signaling via HLA-DR molecules on activated CD4<sup>+</sup> T cells at least in part contributes to the induction of T cell anergy, through the upregulated expression of the p27<sup>Kip1</sup> and Rap1. The implication of our finding is that cross-linking of HLA-DR molecules by TCR play a role in human T-cell anergy induced by a soluble form of antigenic peptide.

## 2 発表論文リスト

Hironori Kudo, Takako Matsuoka, Hiroaki Mitsuya, Yasuharu Nishimura and Sho Matsushita. Cross-linking HLA-DR molecules on Th1 cells induces anergy in association with increased level of cyclin-dependent kinase inhibitor p27<sup>Kip1</sup>.

**Immunology letters.** 81:149-155, 2002.

Senju. S., Iyama. K., Kudo, H., Aizawa, S., and Nishimura. Y. Immunocytochemical analyses and targeted gene disruption of GTPBP1.

**Molecular & Cellular Biology.** 20:6195-6200, 2000.

Kudo, H., Senju, S., Mitsuya H. Nishimura Y. Mouse and human GTPBP2, newly identified members of the GP-1 family of GTPase. **Biochemical & Biophysical Research Communications.** 272:456-465, 2000.

Sonoki T. Matsuzaki H. Asou N. Hata H. Matsuno F. Yoshida M. Nagasaki A. Kuribayashi N. Kudo H. Takatsuki K. Aggressive CD5-positive diffuse large B cell lymphoma showing c-myc rearrangements developed in a patient with autoimmune hemolytic anemia.

**International Journal of Hematology.** 63:71-76, 1996.

### 3 謝辞

本研究を行なうにあたり、全面的に御支援下さいました熊本大学大学院医学研究科免疫識別学講座西村泰治教授、同免疫病態学講座満屋裕明教授に深く感謝いたします。

また、本研究の立案、詳細な方針および研究方法に関して直接ご指導して頂きました熊本大学大学院医学研究科免疫識別学講座松下祥助教授（現埼玉医科大学免疫学講座教授）、ならびに研究方法などについて御助言を頂きました松岡多香子日本学術振興会特別研究員（PD）に深く感謝申し上げます。

## 4 略語一覽

BCG<sub>a</sub>, *Bacillus Calmette-Guérin a*:

cAMP, cyclic AMP;

ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay;

FACS, fluorescence activated cell sorter;

FITC, fluorescein isothiocyanate;

Fmoc, 9-fluorenylmethoxycarbonyl;

HLA, human histocompatibility leukocyte antigen;

IFN- $\gamma$ , interferon- $\gamma$ ;

IL, interleukin;

IL-2R, interleukin-2 receptor;

mAb, monoclonal antibody;

MHC, major histocompatibility complex;

PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis;

PBMC, peripheral blood mononuclear cells;

PBS, phosphate-buffered saline;

PI, propidium iodide;

PTK, protein tyrosine kinase;

rIL-2, recombinant interleukin-2;

SDS, sodium dodecyl sulfate;

TCR, T cell receptor;

Th1, T helper type 1



## 5 研究の背景と目的

### 5-1) はじめに

T 細胞が抗原提示細胞と接触し、T 細胞抗原受容体 (T cell receptor: TCR) がそのリガンドである主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex; MHC) の産物である MHC 分子と抗原ペプチドの複合体を認識すると、TCR を介して T 細胞側に活性化シグナルが入り、増殖反応やサイトカインなどの液性因子の分泌がおこることは周知の事実である (Janeway and Travers, 1997)。また、微細な構造変化を導入した TCR リガンド、例えば抗原ペプチドの一残基置換アナログペプチドを認識することによって、T 細胞側に質的に異なるシグナルが伝達され、その結果、T 細胞応答に質的な変化が誘導されるという報告も多数ある (De Magistris et al., 1992; Sloan-Lancaster et al., 1993; Evavold et al., 1993; Matsushita et al., 1997)。このように MHC 分子は抗原ペプチドを T 細胞に提示することにより、外向きの免疫応答の制御の一翼を担っている。しかしながら、MHC 分子が膜蛋白である以上、当然のことながら抗原提示細胞に内向きのシグナルを伝導して抗原提示細胞自身を活性化し、液性因子の産生や新たな膜蛋白の発現を促すことによって免疫制御に関わっている可能性がある。実際にその可能性を支持する観察が近年報告されるようになってきた。MHC 分子あるいは MHC 分子と会合している分子を介して抗原提示細胞内あるいは MHC 分子を発現している T 細胞内へ伝達されるシグナルを解析することは、これらを介した免疫制御機構を知る上でも重要である。また、いかなる分子がそのシグナル伝達に関与しているのかを検討することにより、新しい観点から免疫関連疾患を見直し、その原因究明に寄与できるかもしれない。

## 5-2) MHC の構造と機能

MHC は組織適合性に深く関与する蛋白をコードする遺伝子の総称である。マウスでは、H-2 (histocompatibility-2) と呼ばれ、同種皮膚移植実験の過程で同定され、その後多型に富む多数の遺伝子座から成り立っていることがわかってきた。ヒトでは、Dausset (1958) が輸血を受けたヒトの血清中に他人の白血球を凝集させる同種抗体の存在を発見し、この抗体が認識する分子として MHC が同定された。このためヒトの MHC は HLA (human histocompatibility leukocyte antigen ; ヒト白血球抗原) と呼ばれるようになった。HLA は白血球以外にも発現しているため、必ずしも適切な用語とは言い難いが、通常ヒト MHC のことを HLA と呼んでいる。

HLA 分子は 2 本のポリペプチド鎖が非共有結合で会合したヘテロ二量体 (heterodimer) であるが、その基本的な分子構成の違いからクラス I とクラス II に分類される。また、免疫グロブリンと相同性をもつドメイン構造を有し、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する。

クラス I 分子は  $\beta 2$  ミクログロブリン (分子量 11.5kDa) と  $\alpha$  鎖 (44kDa) が非共有結合により会合したヘテロ二量体であり、 $\alpha$  鎖のみが形質膜を貫通している。 $\alpha$  鎖の違いにより HLA-A、B、C、D、E、F、G に分類される。 $\alpha$  鎖は N 末端を細胞外にもつ I 型膜蛋白で、分子の先端部分に  $\alpha$  鎖の  $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$  ドメインからなる溝状の構造を有し、このなかに 8-11 アミノ酸残基 (多くは 9 アミノ酸残基) からなるペプチドを収容する。ヒト  $\beta 2$  ミクログロブリンに個体差はない。HLA-A、B、C は、ほとんどすべての有核細胞と血小板に発現している。HLA-E は休止期 T 細胞、皮膚などに、HLA-F は休止期 T 細胞、胎児肝などに、HLA-G は主に胎盤トロホプラストに発現している。核や細胞質に存在する自己蛋白やウイルス由来の非自己蛋白などは分解された後、そのペプチド断片が小胞体で HLA クラス I 分子と会合して細胞表面に運ばれ、非自己ペプチドは CD8<sup>+</sup>T 細胞により認識される。

クラス II 分子は、 $\alpha$  鎖 (35kDa) と  $\beta$  鎖 (27-29kDa) が非共有結合により会合したヘテロ二量体である。各構成鎖の細胞外領域は 2 つのドメイン ( $\alpha$

1、 $\alpha 2$  および  $\beta 1$ 、 $\beta 2$ ) に分けられ、細胞膜貫通領域、細胞内領域が続いている。ヒトでは HLA-DR、HLA-DQ、HLA-DP がこれに相当し、抗原提示細胞 (マクロファージ、樹状細胞、B 細胞、ミクログリアなど)、精子などに発現している。また、ヒトやほとんどの齧歯類の活性化 T 細胞の細胞膜表面にも発現するが、マウスでは活性化 T 細胞には発現しない。臓器特異的自己免疫疾患では標的細胞 (甲状腺の濾胞細胞、膵臓  $\beta$  細胞など) にも発現している。

抗原提示細胞のエンドソーム由来の自己蛋白や細胞外液中から取り込んだ自己あるいは非自己可溶性蛋白は、エンドソーム中に含まれるカテプシン B あるいは D などの蛋白分解酵素によってペプチド断片に分解される。これらのペプチドはペプチド負荷コンパートメント (compartments for peptide-loading: CPL) において、インバリアント鎖が解離した後に、クラス II 分子の先端に存在する  $\alpha 1$  と  $\beta 1$  ドメインにより構成されるペプチド収容溝に結合して膜表面に運ばれる (図 1C : Stern et al., 1994)。

クラス II 分子のペプチド収容溝には、クラス I 結合ペプチドと比較して長い 10~30 数個 (多くは 15 個前後) のアミノ酸からなるペプチドが、伸張された形で結合している。クラス I 分子ではペプチドを収容する溝の両端が閉じているのに対して、クラス II 分子では開放されているために、ペプチドの両端のアミノ酸残基は溝の両端からはみ出している (Brown et al., 1993; Stern et al., 1994)。HLA 分子の多型はペプチド収容溝内面のアミノ酸残基に集中しているため、異なるクラス II 対立遺伝子産物は異なる構造上の特徴 (モチーフ) をもったペプチドを結合して、T 細胞に提示することにより T 細胞応答を開始させる。抗原ペプチドを構成するアミノ酸残基のうち、特定の位置に存在するもののみが HLA との結合に重要な役割を担っている。このようなアミノ酸残基をアンカーと呼んでいる。アンカーの側鎖は HLA の抗原ペプチド収容溝内にある複数のポケットと疎水性相互作用、静電氣的結合、水素結合、ファンデルワールス力を介して結合している。クラス II 分子における主な研究対象は発現量の最も多い HLA-DR 分子である。これまでに報告された多くの DR 結合ペプチドの構造モチーフを総括すると、ペプチド収容溝に収容される 9 アミノ酸からなるペプチド  $P_1xP_4xP_6P_7xP_9$  ( $x$  は任意のアミノ酸) の  $P_1$ 、 $P_4$ 、 $P_6$ 、 $P_7$ 、 $P_9$  がア

ンカーとなっている例が多い。さらに、どのポジションがより重要か、また特定のポジションにおいてどのようなアミノ酸が高親和性を与えるかという点に関しては、DR 分子ごとに異なる特徴を有する (Hammer et al., 1993; Matsushita et al., 1994; Matsushita et al., 1996)。また、これらのアンカー残基の間に介在しているアミノ酸残基の側鎖は、ペプチド収容溝から露出しており TCR により認識される (図 1A)。Stern らのグループによる結晶 X 線解析の結果は、P<sub>1</sub>、P<sub>4</sub>、P<sub>6</sub>、P<sub>7</sub>、P<sub>9</sub> に一致して DR1 分子側に抗原ペプチドの側鎖を収容するポケットが存在することを示している (図 1B; Stern et al., 1994)。ペプチド収容溝に収まるペプチド部分は、クラス I 分子と同様に約 9 個のアミノ酸からなり、左巻き II 型ポリプロリンヘリックス様構造、すなわち、一残基ごとに側鎖の方向が約 130 度ずつ回転する構造をとる。

TCR を介してクラス II ・非自己ペプチド複合体を特異的に認識する CD4<sup>+</sup>T 細胞は、活性化シグナルを T 細胞内に伝えることにより、種々のサイトカイン、サイトカインレセプター遺伝子ならびに膜蛋白の発現を増強した後に増殖する (Janeway and Travers, 1997)。また CD4 分子は、クラス II β 鎖の β2 ドメインによく保存された第 137-143 アミノ酸残基が形成するループと特異的に結合することにより、CD4<sup>+</sup>T 細胞と抗原提示細胞との間の接着を高めると同時に、CD4 分子の細胞内ドメインに結合する Lck チロシンキナーゼを活性化して T 細胞に活性化シグナルを伝達する (Konig et al., 1992)。

このようにクラス II 分子の役割は抗原ペプチドを CD4<sup>+</sup>T 細胞に提示し、抗原特異的な T 細胞を活性化することが主要なものと考えられてきた。

### 5-3) 免疫応答遺伝子としてのクラス II MHC

単純な構造をもつアミノ酸重合体に対する反応性がモルモットの系統により異なることが、Benacerraf らにより発見され、抗原に対する免疫応答が遺伝的に制御されていることが初めて示された (Benacerraf et al., 1967)。アミノ酸重合体に対して、遅延型アレルギー反応や抗体産生が惹起される系とされない系が

あることが雑系モルモットで観察された。さらに近交系モルモットの解析で抗原に対する反応性が単純メンデル型の遺伝を示す形質であることが示され、この免疫応答性を制御する遺伝子は免疫応答遺伝子 (immune response gene, Ir gene) と命名された。また、近交系マウスを用いてアミノ酸の合成重合体に対する抗体産生能を調べたところ、その応答性は常染色体優性形質であり、抗原特異的であると判明した (McDevitt and Sela, 1967)。その後、(a) マウスでは I-E、I-A 亜領域に免疫応答遺伝子がマップされることが明らかとなり、(b) その免疫応答は T 細胞依存性であることや、抗クラス II 抗体で阻止できること、(c) I-A 分子  $\beta$  鎖の 3 アミノ酸残基に突然変異をもったマウスで、野生型のマウスとウシインスリンに対する反応性が異なること、さらに (d) 低応答系のマウスに高応答系のクラス II MHC 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスが免疫応答性を獲得したことなどから、クラス II MHC 遺伝子そのものが免疫応答遺伝子であると結論付けられた。すなわち T 細胞への抗原提示機構そのものが、免疫応答遺伝子による免疫制御機構であるということが明らかとなった。クラス II MHC 遺伝子がどのようにして免疫応答遺伝子として働くかという問題は、前述のようにクラス II MHC 分子の構造が解明され明らかとなった。このようにクラス II MHC の研究は抗原提示分子としての外向きの免疫制御機構を中心に展開されてきた。

#### 5-4) クラス II MHC 分子を介したシグナル

ところが、1990 年前後から、クラス II MHC 分子は単に抗原ペプチドを提示するだけではなく、TCR-ペプチド/MHC 複合体が相互作用を起こした際に、クラス II MHC 自身からシグナルが入り、抗原提示細胞も活性化されることが以下のような観察からわかってきた。(a) マウス B 細胞株、またはヒト末梢血 B 細胞のクラス II 分子を抗体で架橋すると細胞内  $Ca^{++}$  (Lane et al., 1990; Mooney et al., 1990) や cAMP (Cambier et al., 1987; Bishop, 1991) の濃度が上昇する。(b) クラス II MHC を介したシグナルは B 細胞の homotypic aggregation を引き起こす。(Kansas

and Tedder, 1991): (c) ヒト B 細胞株や活性化された末梢 B 細胞上の HLA-DR 分子を可溶性抗 DR 抗体で架橋すると、アポトーシスが誘導される。(Truman et al., 1994): (d) CD28 陽性自己反応性 T 細胞ハイブリドーマ細胞を用いて B 細胞リンパ腫上のクラス II を刺激すると、cAMP の上昇を介した CD80 の発現増強が見られるが、クラス II  $\alpha$  鎖  $\beta$  鎖の細胞内ドメインを切断すると、その現象も消失する。(Nabavi et al., 1992): (e) B 細胞株上のクラス II MHC の  $\beta$  鎖細胞内ドメインを切断すると、クラス II の架橋によって生じていた細胞内 cAMP の上昇 (Harton et al., 1995) や PKC  $\alpha$  と PKC  $\beta$  II の核内移行 (Rich et al., 1997) が観察されなくなる; (f) B 細胞株上の HLA クラス II 分子を Staphylococcal exotoxin A で架橋すると、Src ファミリーキナーゼ (Lyn, Fgr) のリン酸化が誘導される (Morio et al., 1994); (g) ヒト B 細胞上の DR 分子を可溶性抗体で架橋すると Syk のチロシンリン酸化が、促進される (Kanner et al., 1995)。一方、ヒト活性化 T 細胞上の HLA クラス II 分子を架橋すると、T 細胞側に刺激が入ることが、以下のような観察により知られている。T 細胞上に発現している HLA-DR 分子、-DP 分子を固相化モノクローナル抗体で架橋すると、IL-2 に対する T 細胞増殖反応が増強する (Odum et al., 1993)。しかし、HLA- DQ 分子の架橋では、このような現象は観察されない (Odum et al., 1993)。この現象は、少なくとも部分的には、高親和性 IL-2 レセプターの発現増加によりもたらされる (Odum et al., 1993)。T 細胞に発現している HLA-DR 分子の架橋によって、PLC- $\gamma$ 1 を含む種々の蛋白のチロシンリン酸化が誘導され、細胞質の遊離カルシウムイオン ( $[Ca^{2+}]_i$ ) の上昇が誘導される (Odum et al., Eur. J. Immunol. 1991; Odum et al., Hum. Immunol. 1991; Odum et al., Tissue Antigens. 1991; Spertini et al., 1992; Kanner et al., 1992)。これらのクラス II シグナルにとって protein tyrosine kinase (PTK) の活性化は、必須である (Odum et al., 1993; Odum et al., Hum. Immunol. 1991; Spertini et al., 1992)。また、ヒト活性化 T 細胞上の HLA-DR 分子を架橋すると、ZAP-70 分子のチロシンリン酸化が促進される (Kanner et al., 1995)。このような報告からみても、T 細胞上のクラス II MHC を介したシグナルが T 細胞自身に何らかの活性化シグナルを伝達していることは確実である。

活性化 T 細胞を可溶性ペプチドと共に培養すると T 細胞増殖反応が観察される。これは活性化 T 細胞上のクラス II MHC 分子により提示されたペプチド抗原を T 細胞が認識することにより生じるが、その後 T 細胞はアナジーに陥り、たとえ抗原提示細胞による抗原ペプチドの提示を受けても反応しない (LaSalle et al., 1992)。このアナジー誘導の分子メカニズムは依然不明のままである。ナイーブ T 細胞の活性化には TCR による MHC-ペプチド複合体の認識のみならず CD28 を介した副刺激 (co-stimulation) が必須である。副刺激が欠損した状態では、Rap1 (Boussiotis et al., 1997) と cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor p27<sup>Kip1</sup> (Boussiotis et al., 2000) の発現が増加し、T 細胞にアナジーが誘導される。また、*n*-ブチル酸によって誘導される T 細胞アナジーにおいては、CDK インヒビターである p27<sup>Kip1</sup> と p21<sup>Cip1</sup> の発現が共に増強している (Jackson et al., 2001)。

#### 5-5) T 細胞の抗原特異的な活性化機構における Ras-MAP キナーゼ系の役割

T 細胞は TCR により、抗原提示細胞上に提示された MHC-ペプチド複合体を特異的に認識し活性化する。図 2 に、TCR からのシグナル伝達をまとめて示した。TCR は、 $\alpha$  鎖、 $\beta$  鎖、あるいは  $\gamma$  鎖、 $\delta$  鎖の 2 本のポリペプチド鎖のダイマーから成り、それぞれ可変部と不変部の 2 つのドメインからなる。ほとんどの T 細胞はジスルフィド結合された  $\alpha$  および  $\beta$  鎖からなる TCR (TCR $\alpha\beta$ ) を発現している。可変部は無数の外来抗原に対応すべく多様な抗原を認識する部位であり、この部が各 T 細胞クローンで異なっており、TCR 遺伝子の再構成により決定される。 $\alpha\beta$  鎖、 $\gamma\delta$  鎖の細胞内ドメインは短く、シグナル伝達に必要な領域が見当たらない。抗原刺激の細胞内への伝達には、これらと密接に関連した CD3 分子が重要な役割を担っている。つまり、TCR は CD3 複合体とよばれる分子群と会合しておりこれらの分子群を介してシグナル伝達が行われる。CD3 複合体は CD3 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  鎖および  $\zeta$ - $\zeta$  ホモダイマーあるいは  $\zeta$ - $\eta$  ヘテロダイマーからなる。

これらの CD3 サブユニットには 1 分子当たり 1 コピー (ζ鎖は 3 コピー) のシグナル伝達領域 ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) を有する (Qian and Weiss, 1997)。ITAM は YxxI/L(x)<sub>6-8</sub>YxxI/L (x は保存されないアミノ酸) からなる配列であり、この配列内のチロシン残基はチロシンキナーゼ (protein tyrosine kinase: PTK) によるリン酸化を受ける部位である。このチロシンリン酸化には Src 型 PTK の Lck および Fyn が関与している。すなわち Lck および Fyn が活性化して CD3 分子群の ITAM をチロシンリン酸化する。リン酸化された ITAM は Syk ファミリー PTK である ZAP-70 (zeta-associated protein-70) の SH2 (Src homology 2) ドメインに認識され結合する。SH2 ドメインは約 100 アミノ酸からなる機能ドメインで、リン酸化チロシン残基を特異的に認識して会合する領域である。ZAP-70 には SH2 ドメインが連続して 2 個存在し、ITAM 内の 2 つのチロシン残基を効率よく認識すると考えられている (Futterer et al., 1998)。ITAM に結合した ZAP-70 は、さらに Src 型 PTK によりチロシンリン酸化を受け活性化する。ZAP-70 の基質としては、LAT (linker for activation of T cells)、SLP-76 (SH2-containing leucocyte protein-76)、Vav、PLCγ1 などがあり、これらが、Ras-MAP キナーゼ経路、JNK 経路、p38 経路、PLCγ1-Ca<sup>2+</sup>-カルシニューリン経路を活性化する。また、Vav/Rac/Nck を介した細胞骨格の再構成シグナルを惹起する。

Ras-MAP キナーゼ経路により、Ras→Raf-1→MEK→ERK1, 2→Elk-1→Fos とシグナル伝達分子が順次活性化される。JNK 経路及び p38 経路は、最終的に、Jun を活性化し、Jun は Ras-MAP キナーゼ経路の Fos と結合して、AP-1 を形成する。PLCγ1-Ca<sup>2+</sup>-カルシニューリン経路は、最終的に、NFAT (nuclear factor of activated T cells) を活性化する。また、PKCθは NFκB も活性化する。このように活性化された AP-1 と NFAT 及び NFκB が共同して、核内において IL-2 遺伝子のプロモーター領域に結合してその転写を開始させる (Jain et al., 1995)。

Rap1 は、Ras によって癌化した細胞を正常化させる分子として単離された (Kitayama et al., 1989)。Rap1 は低分子量 G 蛋白質 Ras スーパーファミリーに属し、アミノ酸配列上、Ras と約 55% のホモロジーがある。Rap1 は、T 細胞において、TCR/CD3 の刺激によっても Epac、C3G、CalDAG-GEF などを通介



て活性化され、LFA-1 を活性化し、LFA-1/ICAM を介した抗原提示細胞との細胞接着により、T 細胞の活性化が促進される (Katagiri et al., 2000; Reedquist et al., 2000)。しかし、活性型の Rap1 は Ras-MAP キナーゼ経路の Raf-1 と結合し、この経路をブロックする (図 2)。したがって細胞質内に Rap1 が過剰に発現していると、IL-2 の産生が抑制され、T 細胞は抗原刺激を受けても増殖しない状態、すなわちアナジーに陥る。

TCR/CD3 複合体の重要な機能は、T 細胞の分化過程や免疫応答において、T 細胞の増殖と生存または死を制御するシグナルを細胞内に伝達することである。休止期にある T 細胞を増殖可能な状態に移行させ、また逆に活性化された T 細胞に対しては細胞死を誘導する。

## 5-6) 細胞周期の調節に関わる分子群

真核生物の体細胞の細胞周期は通常 4 つの時期に分けられる。DNA 複製が起る時期を S 期 (Synthesis phase)、細胞の分裂が起きる時期を M 期 (Mitosis phase) と呼び、M 期と次の S 期まで、および S 期と M 期の間には間隔 (Gap) があり、それぞれを G1、G2 期 (Gap phase) と呼ぶ (図 3)。G1 期は細胞が増殖へのシグナルを受け、DNA 複製の準備や細胞の分裂に必要な代謝と成長のための時期で、G2 期は分裂に入る準備のための時期と考えられている。さらに細胞は細胞周期を逸脱し、成長も増殖もしない休止期 (G0 期) に入ることができる。G0 期の細胞は、適当なシグナルによって G1 期に戻り、再び成長と分裂を開始することができる。多細胞生物体を構成する多くの非成長性、非増殖性の細胞は G0 期にあるものと考えられている。

細胞周期の調節には、サイクリン、CDK (cyclin dependent kinase: サイクリン依存性キナーゼ)、CDK インヒビター (cyclin dependent kinase inhibitor: サイクリン依存性キナーゼインヒビター) が重要な役割を担っている。図 3 に細胞周期の制御に関わるものが広く認められているサイクリン、CDK、CDK インヒビターについてまとめて示した。

サイクリンは、もともと真核細胞の細胞周期の過程で、各時期に一過的に発現し分解される蛋白質の総称であった。これらの蛋白質はサイクリン box と呼ばれる共通の構造モチーフを持っていることから、現在はこのモチーフを持つ蛋白質を総称してサイクリンという傾向にあり、A から H までの 8 種類が報告されている。サイクリンは、CDK と結合しこれを活性化して細胞周期を回転させる方向に働く。また CDK の基質特異性を決めるとも考えられている。一般的に CDK の発現量は細胞周期を通して一定で、必要な時期にサイクリンが一過性に発現して CDK を活性化すると考えられている。細胞が G<sub>0</sub> 期から細胞周期に入るときは、増殖因子刺激によってサイクリン D が誘導され、その活性分子のパートナーである CDK4 や CDK6 と結合しそれらを活性化する。

CDK は、その活性がサイクリンとの結合に依存している蛋白質リン酸化酵素群で、共通の構造モチーフを持つ。哺乳類では現在までに CDK1 から CDK8 までの 8 種類が同定されている。高等多細胞生物では、複数種のサイクリン/CDK 複合体が細胞周期の制御に関わっている (図 3)。

CDK インヒビターは、サイクリン/CDK 複合体に結合し、その活性を阻害する因子群で、その 1 次構造上の特徴と、阻害する CDK の特異性から INK4 (Inhibitor of CDK4) ファミリーと CIP/KIP (CDK interacting protein / kinase inhibitory protein) ファミリーの 2 群に大別されている (Sherr and Roberts, 1995)。INK4 ファミリーには、p16<sup>INK4a</sup>、p15<sup>INK4b</sup>、p18<sup>INK4c</sup>、p19<sup>INK4d</sup> の 4 種が存在し、サイクリン D/CDK4 またはサイクリン D/CDK6 を特異的に阻害する。INK4 を培養細胞に過剰発現させると細胞は増殖を G<sub>1</sub> 期で停止する。p16<sup>INK4a</sup> は細胞の老化 (senescence) の進行に伴い、その細胞内の発現量が増加する。p15<sup>INK4b</sup> 量も TGF-βによる細胞増殖抑制シグナルに伴い増加する。CIP/KIP ファミリーには、p21<sup>Cip1</sup>、p27<sup>Kip1</sup>、p57<sup>Kip2</sup> の 3 種が存在する。CIP/KIP ファミリーが阻害する CDK は、サイクリン D/CDK4、6、サイクリン E または A/CDK2、サイクリン B/CDC2 など広範囲にわたっている。しかし、CIP/KIP を培養細胞に強制発現させると細胞は G<sub>1</sub> 期で増殖を停止するので、CIP/KIP ファミリーの細胞周期内での主要な作用点は G<sub>1</sub>/S 期であると考えられている。

T 細胞は、通常末梢血中において細胞周期は G<sub>0</sub> 期にある (静止期 T 細

胞)。これらの T 細胞は TCR による抗原認識を介して一連の活性化シグナルを受けると、初期遺伝子群とよばれる一群の遺伝子転写因子をコードする遺伝子の発現と、IL-2R (IL-2 receptor: インターロイキン 2 受容体) を誘導し、G0 期にある T 細胞を増殖可能な状態、即ち G1 期に移行させる。初期遺伝子群によってコードされる遺伝子転写因子は、G1 期から S 期への進行を支配するサイクリン D、E と CDK2、4、6 の発現を誘導する。しかし、その活性は、CDK インヒビターによって抑制されている。抗原刺激を受けて G1 期に入った T 細胞は、自らが産生する IL-2 のシグナルによって細胞周期をスタートさせることができる (Fripo et al., 1994; Ohtsubo and Roberts, 1993)。IL-2 の受容体を介した細胞増殖シグナルは、CDK インヒビターの一つである p27<sup>Kip1</sup> の蛋白レベルを減少させることにより CDK を活性化し、S 期への進行をうながす。免疫抑制剤の一つであるラパマイシンは、この IL-2R から p27<sup>Kip1</sup> に至るシグナル伝達経路をブロックすることにより IL-2 の増殖誘導作用を阻害する (Brown et al., 1994; Nourse et al., 1994)。p27<sup>Kip1</sup> 蛋白質は、サイクリンのように蛋白質の量がプロテアソーム依存性蛋白分解機構によって制御されている (Alessandrini et al., 1997; Loda et al., 1997)。CDK インヒビターの一つである p21<sup>Cip1</sup> は、p27<sup>Kip1</sup> とは逆に IL-2 によって発現が誘導され、細胞周期が回転している間、ある程度の発現レベルが維持される (Nourse et al., 1994)。

## 5-7) 本研究の目的

前述のように、T細胞上のクラス II MHC 分子が T 細胞自身に何らかの活性化シグナルを伝達することには、疑う余地はないと思われる。単球の場合は、クラス II からのシグナルでモノカインが産生されることは以前から明らかとなっていた。抗原ペプチドのアナログを用いた実験でクラス II HLA 分子からのシグナルを介して単球からの IL-12 産生が変化し、その作用で T 細胞による IFN- $\gamma$  産生に影響が生じることを当教室の松岡らが発見した (Matsuoka et al., 1996)。さらに、HLA-DR 分子からの刺激は Erk と p38 のリン酸化を介して炎症性モノカインの産生を、HLA-DQ 分子、-DP 分子からの刺激は p38 のリン酸化を介して抗炎症性モノカインの産生を、より強く誘導することが明らかになった (Matsuoka et al., 2001)。B 細胞の場合は、HLA-DR 分子を介した刺激により IgM 産生が顕著に増加し、その現象は Syk の活性化を介した  $\mu$ 鎖の transcription の増強を伴っているということを当教室の田畑らが発見した (Tabata et al., 2000)。そこで本研究では、クラス II を発現している活性化 T 細胞に注目し、T 細胞上の DR 分子を架橋することにより生じる増殖応答や T 細胞アナジーなどの T 細胞側の免疫応答を解析し、これにいかなるシグナル伝達分子が関与しているのかを解明することを目的とした。

## 6 実験方法

### 6-1) 本研究に使用した試薬と抗体

L243 (抗 HLA-DRB1+DRB4 モノクローナル抗体、マウス IgG2a; Robbins et al., 1987) はプロテイン A カラム(PIERCE, IL)を使用して腹水から精製した。マウス IgG とマウス IgG2a はそれぞれ BioPur AG 社(Bubendorf, Switzerland)と Biogenesis 社(Poole, United Kingdom)から購入した。L243 と コントロールマウス IgG はビオチン(ImmunoPure NHS-LC-Biotin, Pierce, IL)化した。ポリクローナル抗 p27<sup>Kip1</sup> 抗体 (SC-528) 、ポリクローナル抗 p21<sup>Cip1</sup> 抗体 (SC-397)、ポリクローナル抗 p16<sup>INK4a</sup> 抗体 (SC-468)、ポリクローナル抗 p15<sup>INK4b</sup> 抗体 (SC-612)、ポリクローナル抗 Rap1 抗体 (SC-65)は Santa Cruz Biotechnology 社(CA)から購入した。BCGa タンパクの N 末端から数えて 84 番目から 100 番目のアミノ酸残基からなるペプチド(BCGap84-100; EEYLILSARDVLAVVSK) (Matsushita et al., 1997) は C 末を固相化し、Fmoc(Fluorenylmethoxycarbonyl)法で N 末へ伸長させていく方法を用い、PSSM-8 ペプチド合成装置(Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)にて合成した。合成した粗ペプチドは C18 カラムを用いた逆相 HPLC (Millipore, Waters, Milford, MA)で精製した。

### 6-2) ヒト CD4<sup>+</sup>T 細胞クローン SF36.16

ヒト CD4 陽性 T 細胞クローン SF36.16 は、HLA-DR4 (HLA-DRB1\*0405) 分子により提示された BCGap84-100 (EEYLILSARDVLAVVSK)を認識する (Tanaka et al., 1998)。SF36.16 は、プラトーレベルで IFN- $\gamma$ 40.5 ng/ml と IL-4 102 pg/ml を産生するため、Th1/Th0 細胞に分類される (Tanaka et al., 1998)。SF36.16 細胞は、6-7 日毎に、ヒト組み換え IL-2 50U/ml の存在下に BCGap84-100 をパルスされ、4500cGy 照射された DRB1\*0405 陽性末梢血単核細胞 (PBMC) で抗原刺

激を加えて維持した。すべての細胞は、2 mM L-グルタミン、100 U/ml ペニシリン、100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン、10% 貯蔵非動化正常ヒト男性ヘパリン添加血漿を添加した RPMI 1640 培養液 (Life Technologies, Grand Island, NY) で、96 穴あるいは 24 穴平底プレート (Falcon, Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ) で培養した。なお培養液と抗体は、エンドトキシン陰性であることを確かめて使用した。ヒトからの採血と動物実験 (腹水調整) は、学内の倫理規定に従って行った。

### 6-3) 細胞表面抗原の解析

培養初日と 6 日間、7 日間、8 日間培養した培養細胞を、FITC 標識された抗 CD4 モノクローナル抗体 (PharMingen, San Diego, CA)、FITC 標識された抗 HLA-DR モノクローナル抗体 (PharMingen, San Diego, CA) と PI (propidium iodide) で染色した。染色した細胞を、FACScan (Becton Dickinson, San Diego, CA) を用いたフローサイトメトリーにより解析した。PI 染色で死細胞を識別して除外し、生細胞のみを解析した。データの解析は、Cell Quest Software (Becton Dickinson, San Diego, CA) を用いて行った。

### 6-4) T 細胞の免疫応答の定量

いずれも PBS で希釈した抗 HLA-DR モノクローナル抗体 (L243) 20  $\mu$ g/ml、抗 CD3 モノクローナル抗体 (OKT3) 5  $\mu$ g/ml、コントロール抗体マウス IgG2a 20  $\mu$ g/ml を、96 穴あるいは 24 穴平底プレートに 4°C で 2 日間コートした。プレートを PBS で 5 回洗浄した後、T 細胞を加え、37°C で 5%CO<sub>2</sub> の条件下で培養器中で培養した。培養開始 24 時間後に培養上清を採取し、リンホカイン濃度を測定するまで -80°C で凍結保存した。T 細胞上の HLA-DR 分子または CD3 分子を架橋することによって起こる T 細胞増殖の経時的変化を調べるために、各種

抗体で架橋して0時間、24時間、48時間、72時間、120時間、168時間培養した後、さらに、それぞれ16時間、 $^3\text{H}$ チミジン  $1 \mu\text{Ci}$  / ウェル と共に培養して、液体シンチレーションカウンターで増殖した T 細胞の DNA に取り込まれた放射能を測定した。細胞を回収する際には、細胞をプレートからよく剥離するために、0.1 規定 NaOH を培養プレートに加えた。

#### 6-5) アナジー誘導アッセイ

最初に SF36.16 T 細胞を 24 穴平底プレートで、可溶性 BCGap84-100 ペプチド  $1 \mu\text{M}$ 、固相化抗 HLA-DR モノクローナル抗体 (L243)、固相化抗 CD3 モノクローナル抗体 (OKT3) または、 $5 \mu\text{M}$  の BCGap84-100 ペプチドと  $37^\circ\text{C}$  で 5 時間インキュベートした PBMC を放射線照射 (X 線、 $4500\text{cGy}$ ) した後に加えて刺激した。培養 7 日目にこれらの T 細胞を培養液で洗浄し、様々な濃度の BCGap84-100 ペプチドの存在下に、放射線照射 (X 線、 $4500\text{cGy}$ ) した PBMC と共培養した。T 細胞の増殖は 96 穴平底プレートで 72 時間培養にて検討し、最後の 16 時間は $^3\text{H}$ チミジン  $1 \mu\text{Ci}$  / ウェル と共培養して、液体シンチレーションにて増殖 T 細胞の DNA にとりこまれた放射能を測定した。

#### 6-6) 固相酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)

培養 T 細胞の上清中のリンホカインを定量するために、ヒト IFN- $\gamma$  とヒト IL-10 ELISA キット (BioSource International, Camarillo, CA)、ヒト IL-8 ELISA キット (Central Laboratory of the Netherlands Red Cross, Amsterdam, Netherlands) を用いた。

## 6-7) ウェスタンイムノブロット解析

T細胞を、抗 HLA-DR モノクローナル抗体 (L243) あるいは抗 CD3 モノクローナル抗体 (OKT3) を固相化した 24 穴平底プレート中に加えた。37°C で 7 日間培養した後、T 細胞を RPMI 1640 で 2 回洗浄し、lysing buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH7.6, 0.5% Nonidet P-40, 2 mM sodium orthovanadate, 1 mM NaF and 5 mM EDTA plus a protease inhibitor mixture purchased from Sigma) で細胞を溶解した。遠心後、溶解液の上清を SDS-PAGE で電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜を 10 % スキムミルク液 (0.1 % Tween-20 / Tris-buffered saline) で 1 時間ブロックした後に、マウス抗 Rap1 抗体、マウス抗 CDK インヒビター抗体 (抗 p15<sup>INK4b</sup> 抗体、抗 p16<sup>INK4a</sup> 抗体、抗 p21<sup>Cip1</sup> 抗、抗 p27<sup>Kip1</sup> 抗体) を 1 時間反応させた。次いで、0.1 % Tween-20 / Tris-buffered saline にて膜をよく洗浄し、ペルオキシダーゼラベルした抗マウス IgG 抗体 (Amersham, U.K.) と 1 時間反応させた。その後、ECL キット (Amersham) を用いて、化学発色させ当該分子を検出した。



## 7 実験結果

### 7-1) 培養細胞系における、CD4 陽性細胞の割合と HLA-DR 分子の発現の経時的変化

クローン化 T 細胞(SF36.16)を、ペプチドをパルスし増殖を抑制するために放射線照射した PBMC と共培養した (day 0)。培養初日、6 日目、7 日目、8 日目の培養細胞中の CD4 陽性細胞の割合を FACS を用いて調べた (図 4)。PI と FITC を用いて二重染色を行い、PI 染色 (結果は示さず) に基づいて全体の 85%以上を占める生細胞だけについてゲートをかけて解析した。培養初日では、主にマクロファージ、B 細胞、CD4 陰性 T 細胞からなる多くの CD4 陰性細胞が存在した。しかし、培養 6 日目、7 日目、8 日目では、培養細胞のそれぞれ、98.8%、98.7%、99.1%が、CD4 陽性細胞であった。したがって、培養 6 日目、7 日目、8 日目の培養細胞のほとんどすべてが活性化された CD4<sup>+</sup> T 細胞に由来することがわかった。

次いで、培養初日、6 日目、7 日目、8 日目の培養細胞における HLA-DR 分子の発現を、CD4 陽性細胞の割合を調べた場合と同じ方法で、FACS を用いて調べた (図 4)。培養 6 日目、7 日目、8 日目と進むに従い、HLA-DR 分子の発現は徐々に減少して行ったが、確かに発現していた。HLA-DR 分子を強く発現する CD4 陽性 T 細胞を実験に供するために、培養 6 日目の T 細胞クローン SF36.16 を用いた。

### 7-2) T 細胞上の HLA-DR 分子を架橋した際に誘導される増殖反応の経時的変化

CD4 陽性 T 細胞上の HLA-DR 分子を、固相化モノクローナル抗体で架橋した際に誘導される T 細胞増殖の経時的変化について調べた (図 5)。抗 HLA-DR

モノクローナル抗体 L243 による架橋によって T 細胞は増殖したが、コントロール抗体による架橋では、T 細胞の増殖は観察されなかった。増殖は、抗 CD3 モノクローナル抗体で架橋した場合と同様に刺激後 24 時間でピークを示した。ビオチン化抗 HLA-DR モノクローナル抗体+アビジンで刺激した T 細胞も同様に増殖した（結果は示さず）。しかし、ビオチン化抗 HLA-DR モノクローナル抗体単独で刺激した T 細胞は、増殖しなかった（結果は示さず）。したがって、T 細胞が増殖するためには、抗 HLA-DR モノクローナル抗体が T 細胞表面の HLA-DR 分子に結合するだけでは不十分で、さらに、それらが架橋される必要があると考えられた。

### 7-3) 可溶性抗原ペプチド、抗 CD3 モノクローナル抗体、抗 HLA-DR モノクローナル抗体によって誘導される T 細胞アナジの解析

可溶性 BCGap84-100 ペプチドと共に 7 日間培養した SF36.16 T 細胞は、図に示した種々の濃度の BCGap84-100 ペプチドと放射線照射した末梢血単核細胞の存在下でも小さな増殖応答しか示さなかった（図 6 A）。これに対して、5  $\mu$ M の BCGap84-100 ペプチドをパルスして放射線照射した PBMC と 7 日間培養した SF36.16 T 細胞は、1 nM の BCGap84-100 ペプチドと放射線照射した PBMC で再刺激した際に、著しい増殖反応を示した（図 6 A）。

固相化抗 CD3 モノクローナル抗体 OKT3 存在下に SF36.16 細胞を 7 日間培養すると、同様の増殖応答を示した（図 6 B）。興味深いことに、固相化抗 HLA-DR モノクローナル抗体 L243 の存在下に 7 日間培養した SF36.16 細胞もまた低応答性を示した（図 6 C）。更に、200 U/ml の IL-2 を再刺激の際に加えると、低応答に陥った SF36.16 細胞の増殖が回復した ( $p = 0.0041$ ; 図 6 D)。一方、対照群（5  $\mu$ M の BCGap84-100 ペプチドをパルスして放射線照射した PBMC と 7 日間培養した SF36.16 T 細胞）にヒト組み換え IL-2 を加えても、有意な増殖反応の増加は認められなかった( $p = 0.25$ ; 図 6 D)。これらのすべての観察は、L243 で刺激された T 細胞はアナジに陥ることを示している。再刺激の際に

IL-2 が存在すると、L243 刺激を受けた T 細胞と対照群 (5  $\mu$ M の BCGap84-100 ペプチドをパルスして放射線照射した PBMC と 7 日間培養した SF36.16 T 細胞) とで増殖反応に差がない ( $p = 0.11$ ; 図 6 D) ことから、再刺激の際に固相化 L243 (抗 HLA-DR モノクローナル抗体) が培養系に持ち込まれて、これが T 細胞への抗原提示を阻止したとは考えられなかった。

#### 7-4) T 細胞上の CD3 分子、HLA-DR 分子を架橋した際に観察されるサイトカインの産生

高濃度の IL-10 の存在は T 細胞にアナジーを誘導することが知られているので、CD3 分子、HLA-DR 分子の架橋によって誘導される T 細胞アナジーが IL-10 の産生により誘導される可能性を検討するために、T 細胞によるサイトカイン産生について調べた。CD4 陽性 T 細胞上の CD3 分子、HLA-DR 分子を固相化モノクローナル抗体で架橋すると、IFN- $\gamma$ 、および IL-8 は同程度産生された (図 7)。これに対して、CD4 陽性 T 細胞上の HLA-DR 分子の架橋によって誘導される IL-10 産生は、CD3 分子の架橋の場合の 50% に過ぎなかった。

#### 7-5) アナジーに陥った T 細胞における、Rap1、CDK インヒビター p27<sup>Kip1</sup>、p21<sup>Cip1</sup> の発現

図 8 に示すように、可溶性 BCGap84-100 ペプチドの刺激でアナジーに陥った T 細胞は、培養 7 日目で、5 $\mu$ M の BCGap84-100 ペプチドをパルスして放射線照射した末梢血単核細胞で刺激された T 細胞と比べて、より多くの Rap1 と CDK インヒビター p27<sup>Kip1</sup> を発現していた。同様に、CD3 分子あるいは HLA-DR 分子を架橋されてアナジーに陥った T 細胞も高いレベルの Rap1 と CDK インヒビター p27<sup>Kip1</sup> を発現していた (図 8)。これに対して、いずれの T 細胞においても、CDK インヒビター p21<sup>Cip1</sup> の発現 (図 8) 及び CDK インヒビター p15<sup>INK4b</sup>、p16<sup>INK4a</sup> の発現 (結果は示さず) は同程度であった。コントロール IgG (図 5)、

あるいはペプチドをパルスしていない PBMC で刺激された T 細胞は、いずれも増殖を示さず、培養 7 日目には死滅しており、これらの細胞を用いた CDK インヒビターの発現検討は不可能であった。

## 8 考察

私達は、クローン化 Th1/Th0 細胞上に発現している HLA-DR 分子を架橋することによって、増殖した後にアナジーが誘導されるという証拠を得た。これまでに、可溶性抗原ペプチド (LaSalle et al., 1992)、共刺激の欠除 (Schwartz, 1990)、CD3 分子の架橋 (Nguyen et al., 1995)、IL-10 (Groux et al., 1996)、altered peptide ligand (Sloan-Lancaster and Allen, 1996)、*Staphylococcus aureus* enterotoxins A, B, D (O'Hehir and Lamb, 1990)、ラパマイシン (Powell et al., 1999)、プチル酸 (Gilbert and Weigle, 1993)、dimeric TCR ligands (Appel et al., 2001) などの様々な刺激が T 細胞アナジーを誘導することが報告されている。私達の知る限りでは、活性化 T 細胞上に発現している HLA-DR 分子の架橋単独で T 細胞アナジーが誘導されるというのは、これが最初の報告である。HLA-DR 分子の架橋によって誘導される IL-10 は、100 pg/ml よりも少なく、それは、CD3 分子の架橋によって誘導される量よりも少なかった。さらに、IL-10 の中和抗体は、抗 DR 抗体によるアナジー誘導を阻止しなかった(結果は示さず)。これは、T 細胞による IL-10 のような液成因子の産生が、抗 HLA-DR 抗体によって誘導されるアナジーの本質ではないことを示す証拠である。抗 HLA-DR 抗体によってアナジーに陥った T 細胞は、再刺激の際に外因性 IL-2 の存在下では増殖したので、staphylococcal enterotoxin A によって誘導されるアナジーで観察されるような IL-2 レセプターを介したシグナルの欠損 (Nielsen et al., 1995) によるものではないと考えられた。staphylococcal enterotoxin A は、HLA-DR 分子ばかりでなく、DQ 分子や DP 分子も架橋し、HLA-DR 分子、DQ 分子、DP 分子を介したシグナルは異なった MAPK を活性化する (Matsuoka et al., 2001) ため、staphylococcal enterotoxin A と抗 DR 抗体で誘導されるアナジーは異なるシグナル伝達系の修飾によりもたらされると考えられた。

抗 CD3 抗体と抗 DR 抗体で誘導されるシグナルの類似性が、すでに報告されている。MHC class II 分子を介してのシグナルは、ZAP-70 依存性にホスホリパーゼ C を活性化し (Kanner et al., 1995)、その結果、phosphoinositol の分解

と細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の増加をもたらす (Spertini et al., 1992)。しかし、以下の理由により、MHC クラス II 分子と共役しているシグナル伝達系は、TCR/CD3 分子と共役しているものとは異なると考えられる；(a) フォスファターゼ活性をもつ CD45 分子の抗体による架橋は、TCR/CD3 を介して誘導される細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の増加を抑制するが、MHC クラス II を介して誘導される細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の増加は抑制しない；(b) TCR/CD3 を介したシグナルによって、IL-2 産生が誘導されるが、MHC クラス II を介したシグナルによっては、IL-2 産生は生じない (Spertini et al., 1992)。

CD28 分子からの共刺激の欠損によって誘導されるアナジーにおいて、Rap1 と p27<sup>Kip1</sup> の持続的な発現増加が関係していることが報告されている (Boussiotis et al., 1997; Boussiotis et al., 2000)。私達の今回の研究でも同様の観察が得られた。可溶性抗原ペプチドによって誘導されるアナジーでは、CDK インヒビター p21<sup>Cip1</sup>、p15<sup>INK4b</sup>、p16<sup>INK4a</sup> の発現増強は起こらず、Rap1 と CDK インヒビター p27<sup>Kip1</sup> の発現増強が観察された。Rap1 は、Ras の下流にある Raf-1 に結合し、その結果、TCR 由来のシグナルはそこでブロックされ、ERK、FOS、AP-1 の活性化が起こらなくなる。このため、IL-2 の産生が起こらなくなり、T 細胞はアナジーに陥ることが報告されている。CDK インヒビター p27<sup>Kip1</sup> は、サイクリン D/CDK4,6 複合体及びサイクリン E/CDK2 複合体に結合し、これらの分子の働きを抑制することにより、G1 arrest に導くことが報告されている。したがって、これらの分子の持続的な発現増加は T 細胞アナジーの誘導の際に中心的な役割を果たすのは、理にかなっていると考えられる。

T 細胞は TCR と HLA-DR 分子の両方を発現しているので、可溶性抗原ペプチドによって誘導されるアナジーの場合には、シグナルは TCR を介してだけでなく、クラス II HLA 分子を介しても T 細胞に伝えられる。co-stimulation の欠損によって誘導されるアナジーでは CD28 分子を介したシグナルによってアナジーは回避されるが、可溶性抗原ペプチドによって誘導されるアナジーでは、CD28 分子を介したシグナルによってもアナジーを回避することはできない (LaSalle et al., 1992)。この現象は、本研究においても観察されている (結果は示さず)。以上より、たとえ Rap1 や CDK インヒビターの挙動は一見同じでも、

co-stimulation の欠損によって誘導されるアナジーと HLA-DR 分子の架橋によって誘導されるアナジーとは分子機構が異なると考えられる。すなわち後者では HLA-DR ないしはそれと会合した分子 (Lang et al., 2001) を介したシグナルが Rap1 や p27<sup>Kip1</sup> を介してアナジー誘導に貢献している可能性がある。そして、それが、可溶性抗原ペプチドによるヒト T 細胞アナジーの誘導の際に貢献しているのかもしれない。

## 9 おわりに

本研究では、まず増殖が起こる T 細胞上の HLA-DR 分子を介したシグナルが、Rap1 及び CDK インヒビター p27<sup>Kip1</sup> の発現増強を介して T 細胞アナジーを誘導することを発見した。DR 分子の架橋によるこのような T 細胞アナジーが生体内でも生じているか否か、さらに生じている場合の頻度とメカニズムについては今後の解析を待たなければならないが、この機構が末梢性トレランスの一翼を担い、自己免疫現象の抑制に役立っている可能性が推測される。



## 10 図およびその説明

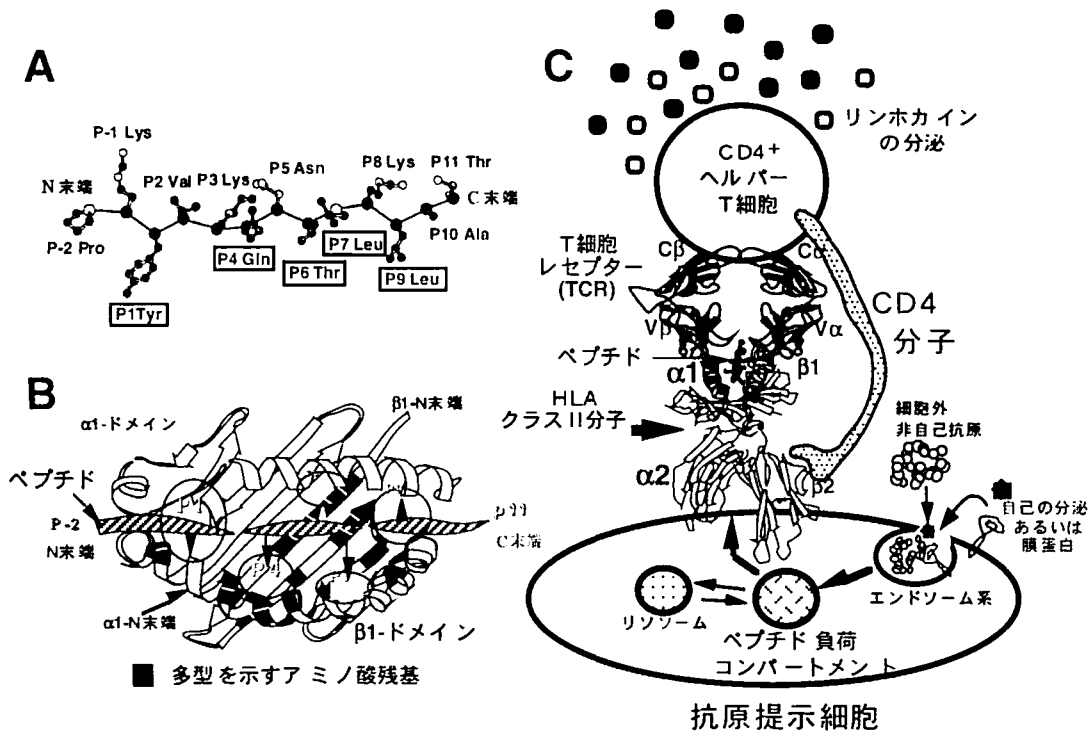


図 1 クラス II HLA 分子を介した抗原ペプチドの CD4<sup>+</sup>T 細胞への提示 (Stern et al., 1994)

**A** ; クラス II HLA 分子 (HLA-DR1)により抗原提示を受けるインフルエンザヘマグルチニンペプチド(HA306-318)の構造を示す。クラス II HLA 分子との結合に重要なアンカーアミノ酸残基で、最もN末端側の Tyr の位置を position 1 (P1)としてC末端方向に番号を付けた場合の、各残基の番号およびアミノ酸を表示した。またアミノ酸の側鎖が、クラス II 分子 HLA のペプチド収容溝の5個のポケットに収容されるアミノ酸残基を四角で囲んで示した。ペプチド結合で結ばれたペプチドの主鎖を黒の斜線で示す。 **B** ; HA306-318 を結合したクラス II HLA 分子を真上 (TCR 側) より見た立体構造を示す。円は、HA306-318 ペプチド上でクラス II HLA 分子との結合に重要な5個のアンカーアミノ酸残基(P1, P4, P6, P7 および P9) の側鎖を収容すべく、クラス II HLA 分子のペプチド収容溝に存在するするポケットの位置を示す。黒塗りの部分は、ヒトの代表的なクラス II HLA 分子である HLA-DR 分子において多型性を示すアミノ酸残基を示す。 **C** ; 細胞外から抗原提示細胞に取り込まれた抗原がペプチドへと分解され、クラス II HLA 分子と結合して CD4<sup>+</sup>T細胞に提示される様子を示す。α1, α2, β1 および β2 は、クラス II HLA 分子の細胞外ドメインを示す。TCR 部分のα, βは TCR のα鎖とβ鎖を、また C と V は定常領域と可変領域をそれぞれ示す。

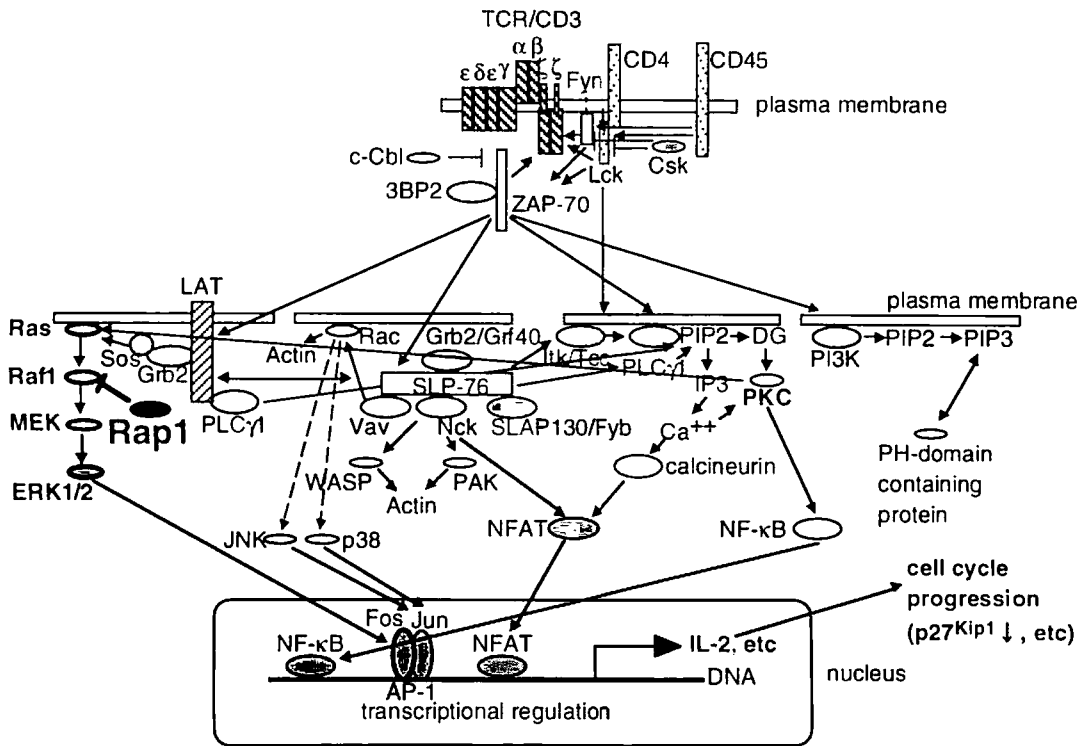


図 2 TCR/CD3 複合体を介するシグナル伝達の模式図

TCR は CD3 複合体とよばれる分子群と会合しておりこれらの分子群を介してシグナル伝達が行われる。CD3 複合体はシグナル伝達領域 ITAM を有する。Src 型チロシンキナーゼ Lck の活性化により、 $\zeta$ 鎖をはじめとする CD3 分子内の ITAM のチロシンリン酸化が生じ、これを ZAP-70 の SH2 ドメインが認識する。その後、ZAP-70 は Src 型チロシンキナーゼによるリン酸化を受けて活性化される。ZAP-70 の基質としては、LAT、SLP-76、Vav、PLC $\gamma$ 1 などがあり、これらが、Ras-MAP キナーゼ経路、JNK 経路、p38 経路、PLC $\gamma$ 1-Ca $^{2+}$ -カルシニューリン経路を活性化する。また、Vav/Rac/Nck を介した細胞骨格の再構成シグナルを惹起する。Ras-MAP キナーゼ経路により、Ras $\rightarrow$ Raf-1 $\rightarrow$ MEK $\rightarrow$ ERK1, 2 $\rightarrow$ Elk-1 $\rightarrow$ Fos とシグナル伝達分子が順次活性化される。JNK 経路、p38 経路は、最終的に Jun を活性化し、Jun は Ras-MAP キナーゼ経路の Fos と結合して、AP-1 を形成する。PLC $\gamma$ 1-Ca $^{2+}$ -カルシニューリン経路は、最終的に、NFAT を活性化する。PKC $\theta$ は、NF $\kappa$ B も活性化する。このように活性化された AP-1 と NFAT 及び NF $\kappa$ B が共同して、核内において IL-2 遺伝子のプロモーター領域に結合してその転写を開始させる。活性型の Rap1 は Ras-MAP キナーゼ経路の Raf-1 と結合し、この経路をブロックする。したがって細胞質内に Rap1 が過剰に発現していると、IL-2 の産生が抑制され、T 細胞は抗原刺激を受けても増殖しない状態、すなわちアナジーに陥る。

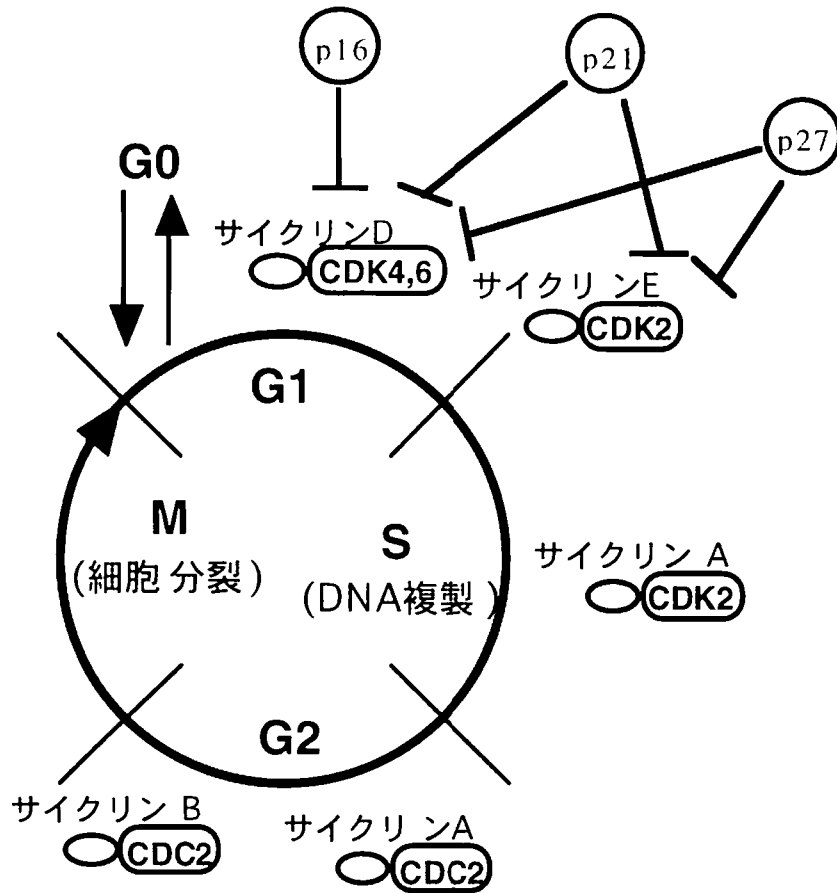


図 3 細胞周期制御におけるサイクリン、CDK、CDK インヒビターの役割

細胞周期は4つのステージに分けられる (G1 期→S 期→G2 期→M 期) が、各ステージの進行には特異的なサイクリン/CDK 複合体が関与している。さらに、それぞれのサイクリン/CDK 複合体は特異的な CDK インヒビターによって抑制される。サイクリンは、CDK と結合しこれを活性化して細胞周期を回転させる方向に働く。また CDK の基質特異性を決めるとも考えられている。CDK は、その活性がサイクリンとの結合に依存している蛋白質リン酸化酵素群で、共通の構造モチーフを持つ。哺乳類では現在までに CDK1 から CDK8 までの 8 種類が同定されている。一般的に CDK の発現量は細胞周期を通して一定で、必要な時期にサイクリンが一過性に発現して CDK を活性化すると考えられている。CDK インヒビターは、サイクリン/CDK 複合体に結合し、その活性を阻害する因子群である。p16<sup>INK4a</sup> はサイクリン D/CDK4、6 複合体を、p21<sup>Cip1</sup> と p27<sup>Kip1</sup> はサイクリン D/CDK4、6 複合体とサイクリン E/CDK2 複合体の両方を阻害し、いずれも細胞周期を G1 期で停止させる方向に働く。細胞が G0 期から細胞周期に入るときは、増殖因子刺激によってサイクリン D が誘導される。T 細胞は、通常末梢血中において細胞周期は G0 期にある。

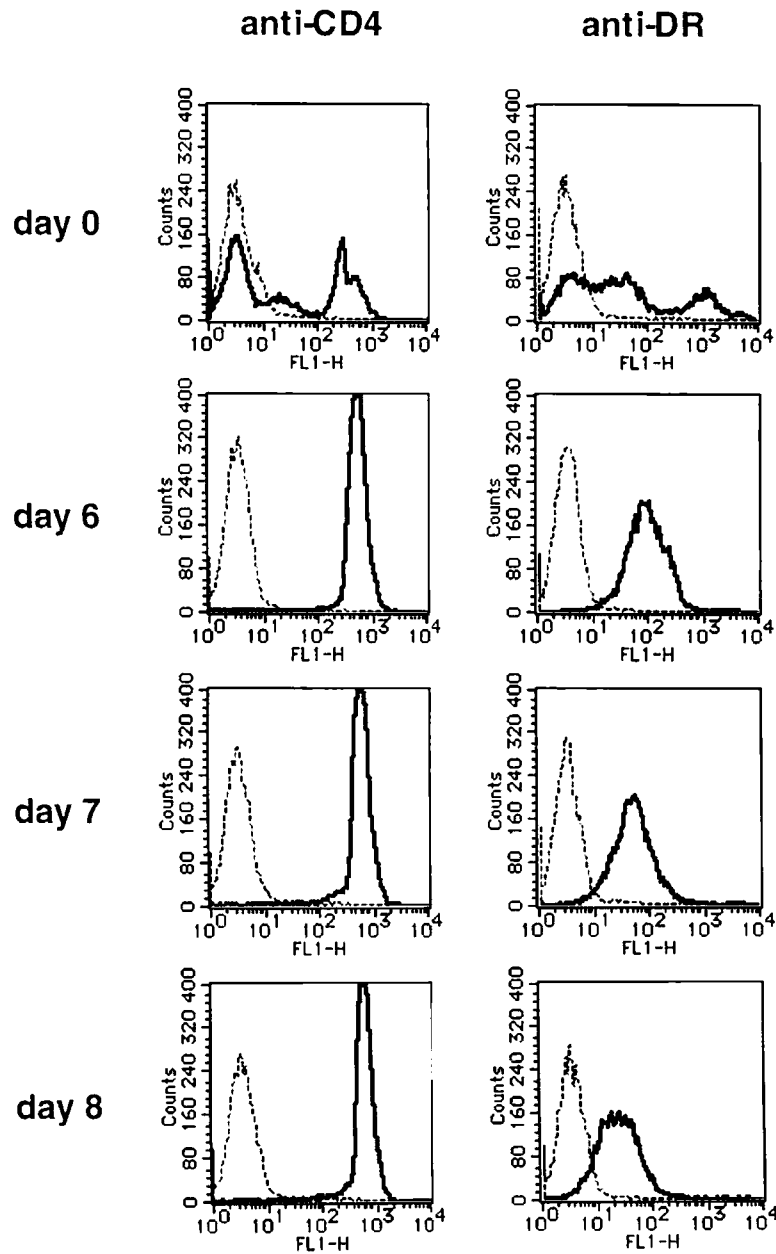


図 4 培養細胞系における CD4 陽性細胞の割合と HLA-DR 分子の発現の経時的変化

T 細胞クローン SF36.16 ( $0.1-0.5 \times 10^6$  個/ウエル) を、ペプチドをパルスして放射線照射した末梢血単核細胞 ( $1.5 \times 10^6$  個/ウエル) と共に培養し、培養初日、6 日目、7 日目、8 日目に FACS で CD4 陽性細胞の割合と HLA-DR の発現を調べた。PI と FITC で二重染色を行い、85 %以上を占める生きた細胞にゲートをかけ、解析した。抗 CD4 抗体、または、抗 DR 抗体による染色で得られたヒストグラムを実線で、陰性対照 (アイソタイプが一致したマウス抗体) で得られたヒストグラムは点線で示した。

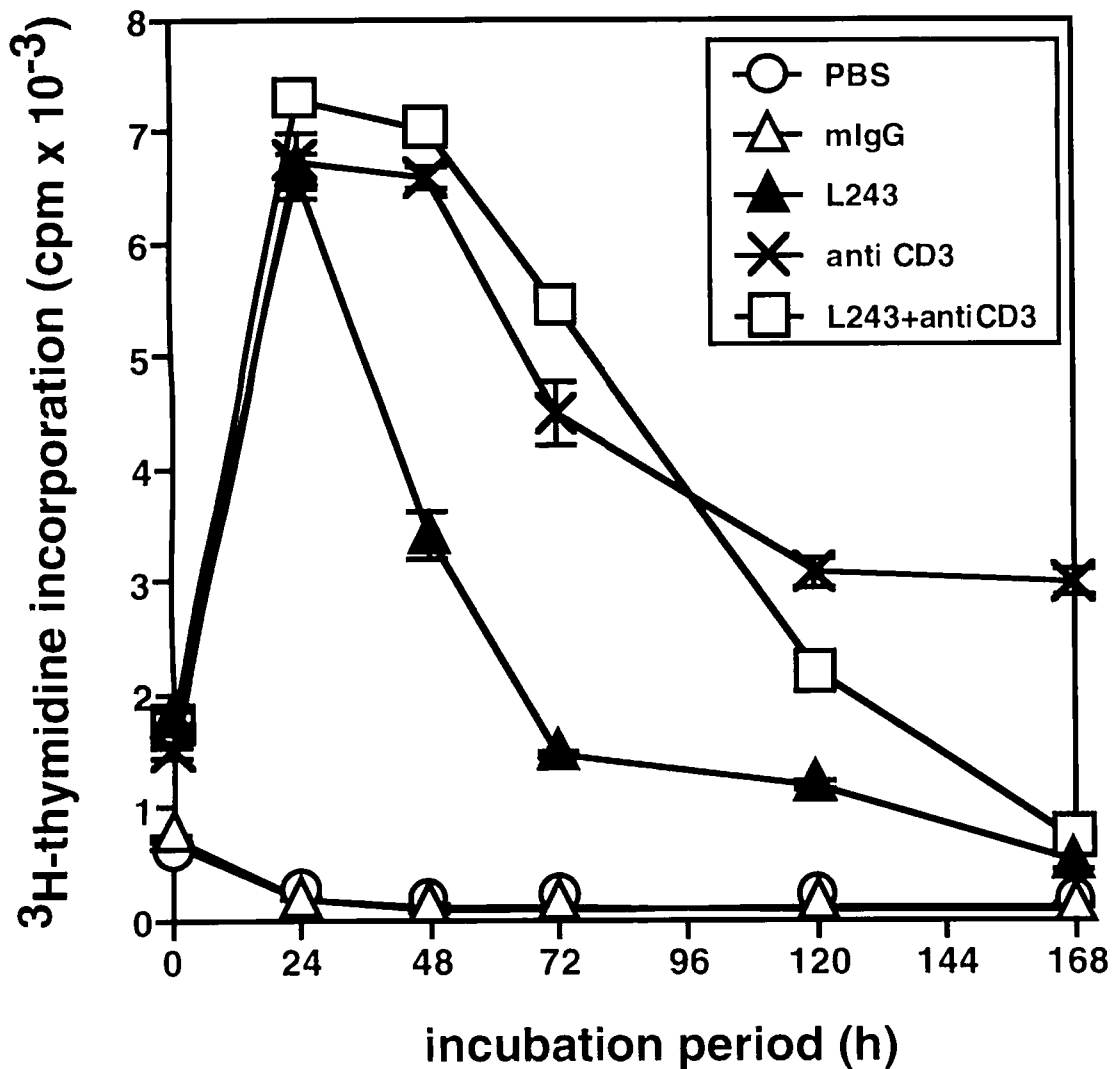


図 5 T 細胞上の HLA-DR 分子を架橋することによって誘導される増殖反応の経時的変化

CD4 陽性 T 細胞上の HLA-DR 分子、または CD3 分子を固相化モノクローナル抗体で架橋した際に観察される T 細胞増殖の経時的変化を調べた。図に示した培養期間 (0-168 hr) の後に、T 細胞を、さらに、16 時間、 $[^3\text{H}]$ チミジン  $1 \mu\text{Ci}$  / ウェル と共に培養し、液体シンチレーションカウンターで、増殖した T 細胞の DNA に取り込まれた放射能を測定した。すべてのデータは、duplicate で測定し、平均値 $\pm$ 標準誤差を示した。結果は、独立して 2 回行った実験のうちの 1 つを代表として示した。

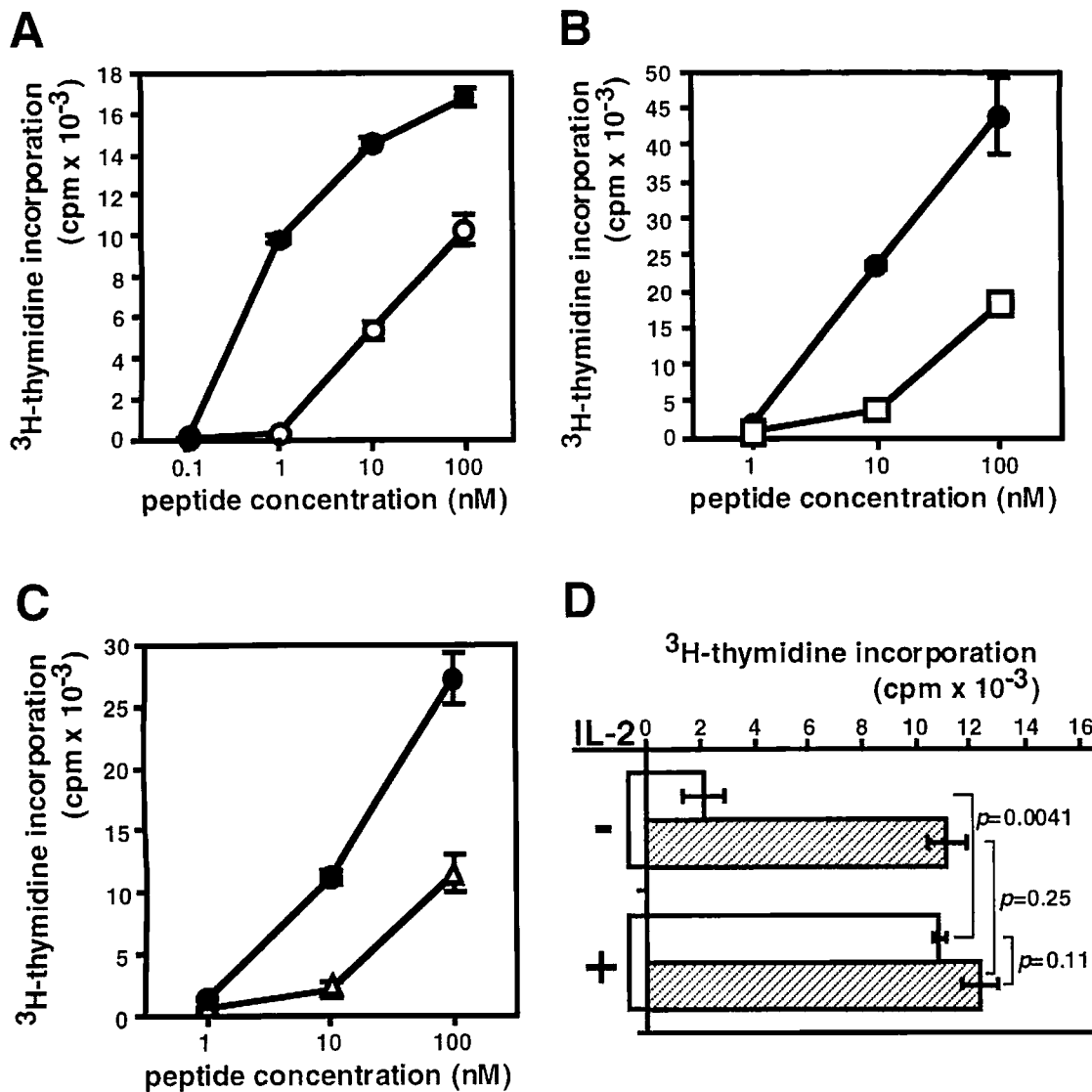


図 6 可溶性抗原ペプチド(A)、抗 CD3 モノクローナル抗体(B)、抗 HLA-DR モノクローナル抗体(C, D)によって誘導される T 細胞アナジー

SF36.16 T 細胞を、最初に、5  $\mu$ M の BCGap84-100 ペプチドをプレパルス (37°Cで 5 時間) して放射線照射した末梢血単核細胞 (closed circle or hatched bar)、1  $\mu$ M の可溶性 BCGap84-100 ペプチド (open circle)、プラスチックに固相化した抗 CD3 抗体 (OKT3; open square)、または、プラスチックに固相化した抗 DR 抗体 (L243; open triangle or open bar) で刺激した (1 次刺激)。培養開始 7 日後に、これらの T 細胞を、様々の濃度の BCGap84-100 ペプチドと放射線照射した末梢血単核細胞 (A, B, C)、あるいは 10nM の BCGap84-100 ペプチドと放射線照射した末梢血単核細胞と共に外因性ヒト組み換え IL-2 200 U/ml の存在下あるいは非存在下に、共培養した (D) (2 次刺激)。2 次刺激では、T 細胞を、96 穴プレートで 72 時間培養し、<sup>3</sup>H]thymidine の T 細胞芽球への取り込みを測定した。すべてのデータは、duplicate で測定し、平均値 $\pm$ 標準誤差を示した。結果は、独立して 2 回行った実験のうちの 1 つを代表として示した。

(D) 外因性 IL-2 の存在下での、T 細胞の増殖反応；1 次刺激、2 次刺激と T 細胞増殖反応の定量は、上記と同様に行った。結果は、duplicate で測定し、平均値 $\pm$ 標準偏差を示した。統計的有意差は、Student's *t* 検定を用いて解析した。

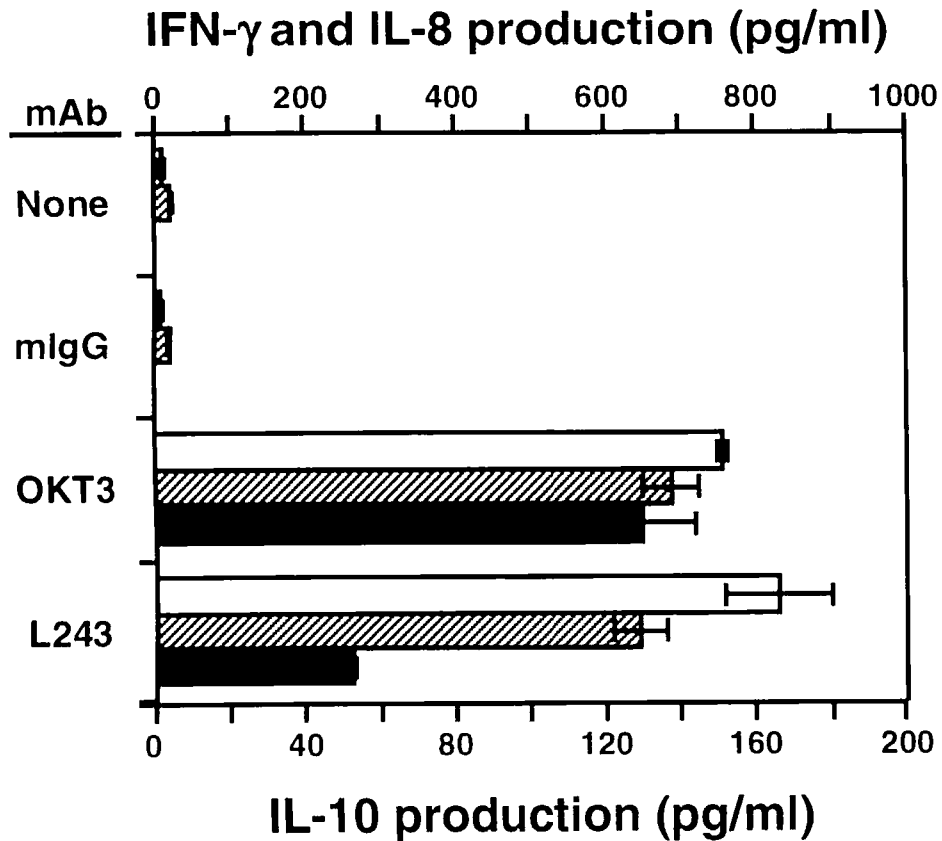


図 7 T 細胞上の CD3 分子、HLA-DR 分子を架橋した際に観察されるサイトカインの産生

SF36.16 T 細胞を、コントロール (PBS)、固相化したコントロールモノクローナル IgG、固相化した抗 CD3 抗体 (OKT3)、固相化した抗 DR 抗体 (L243) の存在下に、37°C で培養した。刺激 24 時間後に、培養上清中の IFN- $\gamma$  (open bars)、IL-8 (hatched bars)、あるいは IL-10 (closed bars) の濃度を ELISA で測定した。結果は、duplicate で測定し、平均値  $\pm$  標準偏差を示した。

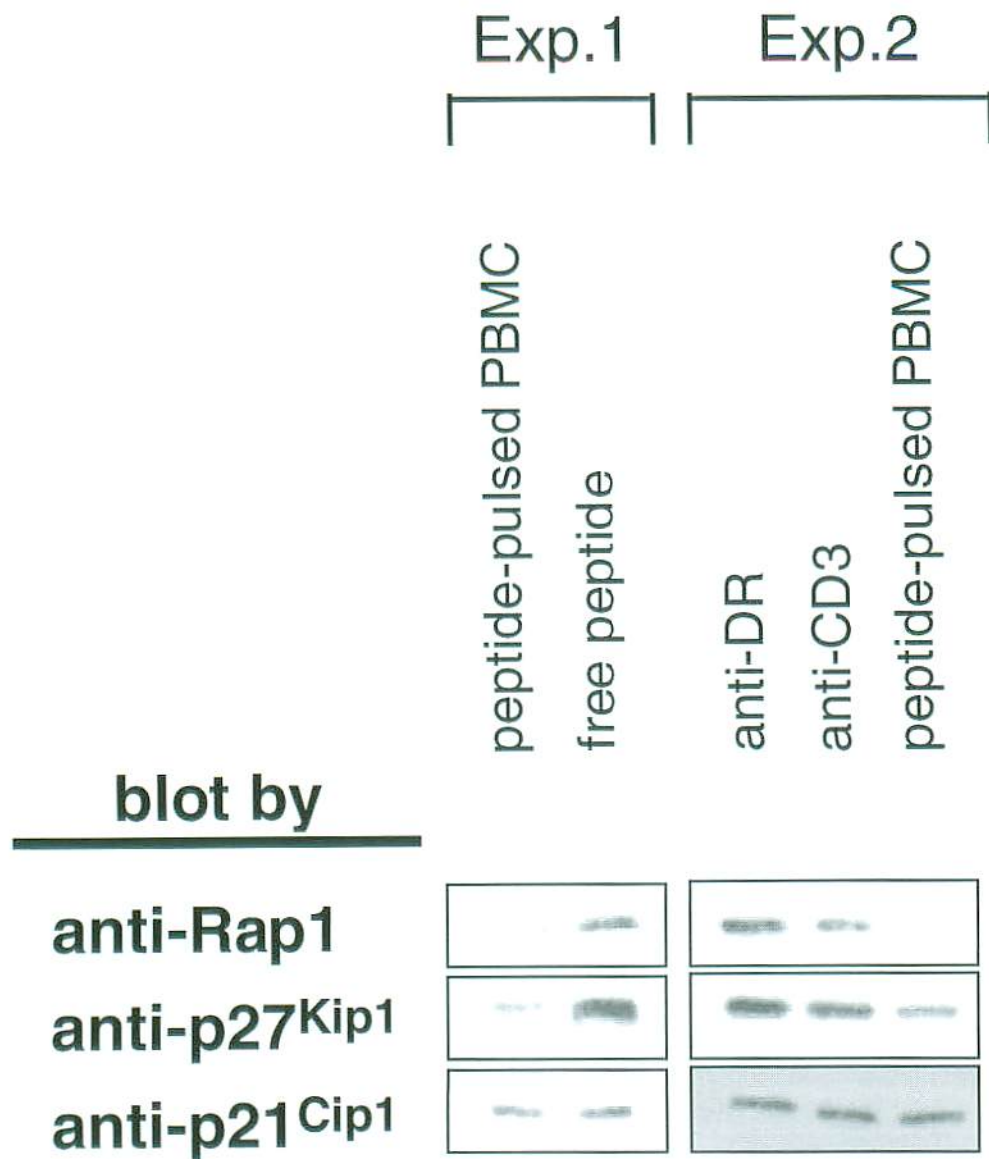


図 8 アナジーに陥った T 細胞における、Rap1、CDK インヒビター p27<sup>Kip1</sup>、p21<sup>Cip1</sup> の発現

T 細胞クローン SF36.16 を、可溶性抗原ペプチド(1 μM BCGap84-100)、固相化抗 CD3 抗体(OKT3)、固相化抗 DR 抗体(L243)、あるいは、BCGap84-100 ペプチド(5 μM BCGap84-100)と 37°C で 5 時間インキュベートした後に放射線照射した末梢血単核細胞と共に、37°C で培養した。培養 7 日後に、T 細胞を溶解し、直接 13.5 % SDS-PAGE で泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、抗 Rap1 抗体、抗 CDK inhibitor p27<sup>Kip1</sup> 抗体、抗 CDK inhibitor p21<sup>Cip1</sup> 抗体を用いてイムノプロットした。



## 11 参考文献

**Alessandrini, A., Chiaur, D. S., and Pagano, M.** (1997). Regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 by degradation and phosphorylation. [Review] [63 refs]. *Leukemia 11*, 342-5.

**Appel, H., Seth, N. P., Gauthier, L., and Wucherpfennig, K. W.** (2001). Anergy induction by dimeric TCR ligands. *Journal of Immunology 166*, 5279-85.

**Benaceraff, B., Green, I., and Paul, W. E.** (1967). The immune response of guinea pigs to hapten-poly-L-lysine conjugated as an example of the genetic control of the recognition of antigenicity. *Cold Spring Harbor Symposium Quant. Biol.*32; 569

**Bishop, G. A.** (1991). Requirements of class II-mediated B cell differentiation for class II cross-linking and cyclic AMP. *Journal of Immunology 147*, 1107-14.

**Boussiotis, V. A., Freeman, G. J., Berezovskaya, A., Barber, D. L., and Nadler, L. M.** (1997). Maintenance of human T cell anergy: blocking of IL-2 gene transcription by activated Rap1. *Science 278*, 124-8.

**Boussiotis, V. A., Freeman, G. J., Taylor, P. A., Berezovskaya, A., Grass, I., Blazar, B. R., and Nadler, L. M.** (2000). p27<sup>kip1</sup> functions as an anergy factor inhibiting interleukin 2 transcription and clonal expansion of alloreactive human and mouse helper T lymphocytes. *Nature Medicine 6*, 290-7.

**Brown, E. J., Albers, M. W., Shin, T. B., Ichikawa, K., Keith, C. T., Lane, W. S., and Schreiber, S. L.** (1994). A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 369. 756-8.

**Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Strominger, J. L., and Wiley, D. C.** (1993). Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364. 33-39.

**Cambier, J. C., Newell, M. K., Justement, L. B., McGuire, J. C., Leach, K. L., and Chen, Z. Z.** (1987). Ia binding ligands and cAMP stimulate nuclear translocation of PKC in B lymphocytes. *Nature* 327. 629-32.

**Cambier, J. C., and Lehmann, K. R.** (1989). Ia-mediated signal transduction leads to proliferation of primed B lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine* 170, 877-86.

**Chan, A. C., Iwashima, M., Turck, C. W., and Weiss, A.** (1992). ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* 71, 649-62.

**Couture, C., Baier, G., Altman, A., and Mustelin, T.** (1994). p56lck-independent activation and tyrosine phosphorylation of p72syk by T-cell antigen receptor/CD3 stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 5301-5.

**De Magistris, M. T., Alexander, J., Coggeshall, M., Altman, A., Gaeta, F. C., Grey, H. M. and Sette, A.** (1992). Antigen analog-major histocompatibility complexes act as antagonists of the T cell receptor. *Cell* 68, 625-34.

**Evavold, B. D., Sloan-Lancaster, J., Hsu, B. L., and Allen, P. M. (1993).** Separation of helper 1 clone cytotoxicity from proliferation and lymphokine production using analog peptides. *Journal of Immunology* *150*, 3131-40.

**Firpo, E. J., Koff, A., Solomon, M. J., and Roberts, J. M. (1994).** Inactivation of a Cdk2 inhibitor during interleukin 2-induced proliferation of human T lymphocytes. *Molecular & Cellular Biology* *14*, 4889-901.

**Futterer, K., Wong, J., Grucza, R. A., Chan, A. C., and Waksman, G. (1998).** Structural basis for Syk tyrosine kinase ubiquity in signal transduction pathways revealed by the crystal structure of its regulatory SH2 domains bound to a dually phosphorylated ITAM peptide. *Journal of Molecular Biology* *281*, 523-37.

**Gilbert, K. M., and Weigle, W. O. (1993).** Th1 cell anergy and blockade in G1a phase of the cell cycle. *Journal of Immunology* *151*, 1245-54.

**Greer, S. F., Lin, J., Clarke, C. H., and Justement, L. B. (1998).** Major histocompatibility class II-mediated signal transduction is regulated by the protein-tyrosine phosphatase CD45. *Journal of Biological Chemistry* *273*, 11970-9.

**Groux, H., Bigler, M., de Vries, J. E., and Roncarolo, M. G. (1996).** Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. [see comments]. *Journal of Experimental Medicine* *184*, 19-29.

**Hammer, J., Valsasini, P., Tolba, K., Bolin, D., Higelin, J., Takacs, B., and Sinigaglia F. (1993).** Promiscuous and allele-specific anchors in HLA-DR-binding peptides. *Cell* *74*, 197-203.

**Harton, J. A., and Bishop, G. A.** (1993). Length and sequence requirements of the cytoplasmic domain of the A beta molecule for class II-mediated B cell signaling. *Journal of Immunology* *151*, 5282-9.

**Harton, J. A., Van Hagen, A. E., and Bishop, G. A.** (1995). The cytoplasmic and transmembrane domains of MHC class II beta chains deliver distinct signals required for MHC class II-mediated B cell activation. *Immunity* *3*, 349-58.

**Jackson, S. K., DeLoose, A., and Gilbert, K. M.** (2001). Induction of anergy in Th1 cells associated with increased levels of cyclin-dependent kinase inhibitors p21<sup>Cip1</sup> and p27<sup>Kip1</sup>. *Journal of Immunology* *166*, 952-8.

**Jain, J., Loh, C., and Rao, A.** (1995). Transcriptional regulation of the IL-2 gene. [Review] [112 refs]. *Current Opinion in Immunology* *7*, 333-42.

**Janeway, C. A. J. and Travers, P.** (1997). *Immunobiology*. Garland Publishing. New York.

**Kanner, S. B., Odum, N., Grosmaire, L., Masewicz, S., Svejgaard, A., and Ledbetter, J. A.** (1992). Superantigen and HLA-DR ligation induce phospholipase-C gamma 1 activation in class II+ T cells. *Journal of Immunology* *149*, 3482-8.

**Kanner, S. B., Grosmaire, L. S., Blake, J., Schieven, G. L., Masewicz, S., Odum, N., and Ledbetter, J. A.** (1995). ZAP-70 and p72syk are signaling response elements through MHC class II molecules. *Tissue Antigens* *46*, 145-54.

**Kansas, G. S., and Tedder, T. F. (1991).** Transmembrane signals generated through MHC class II. CD19, CD20, CD39, and CD40 antigens induce LFA-1-dependent and independent adhesion in human B cells through a tyrosine kinase-dependent pathway. *Journal of Immunology* *147*, 4094-102.

**Katagiri, K., Hattori, M., Minato, N., Irie, S., Takatsu, K., and Kinashi, T. (2000).** Rap1 is a potent activation signal for leukocyte function-associated antigen 1 distinct from protein kinase C and phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Molecular & Cellular Biology* *20*, 1956-69.

**Kitayama, H., Sugimoto, Y., Matsuzaki, T., Ikawa, Y., and Noda, M. (1989).** A ras-related gene with transformation suppressor activity. *Cell* *56*, 77-84.

**Kolanus, W., Romeo, C., and Seed, B. (1993).** T cell activation by clustered tyrosine kinases. *Cell* *74*, 171-83.

**Konig, R., Huang, L. Y., and Germain, R. N. (1992).** MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8. *Nature* *356*, 796-798.

**Lane, P. J., McConnell, F. M., Schieven, G. L., Clark, E. A., and Ledbetter, J. A. (1990).** The role of class II molecules in human B cell activation. Association with phosphatidyl inositol turnover, protein tyrosine phosphorylation, and proliferation. *Journal of Immunology* *144*, 3684-92.

**Lang, P., Stolpa, J. C., Freiberg, B. A., Crawford, F., Kappler, J., Kupfer, A., and Cambier, J. C. (2001).** TCR-induced transmembrane signaling by peptide/MHC class II via associated Ig-alpha/beta dimers. *Science* *291*, 1537-40.

**LaSalle, J. M., Tolentino, P. J., Freeman, G. J., Nadler, L. M., and Hafler, D. A.** (1992). Early signaling defects in human T cells anergized by T cell presentation of autoantigen. *Journal of Experimental Medicine* *176*, 177-86.

**Latour, S., Fournel, M., and Veillette, A.** (1997). Regulation of T-cell antigen receptor signalling by Syk tyrosine protein kinase. *Molecular & Cellular Biology* *17*, 4434-41.

**Loda, M., Cukor, B., Tam, S. W., Lavin, P., Fiorentino, M., Draetta, G. F., Jessup, J. M., and Pagano, M.** (1997). Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. [see comments]. *Nature Medicine* *3*, 231-4.

**Matsuoka, T., Kohrogi, H., Ando, M., Nishimura, Y., and Matsushita, S.** (1996). Altered TCR ligands affect antigen-presenting cell responses: up-regulation of IL-12 by an analogue peptide. *Journal of Immunology* *157*, 4837-43.

**Matsuoka, T., Tabata, H., and Matsushita, S.** (2001). Monocytes are differentially activated through HLA-DR, -DQ, and -DP molecules via mitogen-activated protein kinases. *Journal of Immunology* *166*, 2202-8.

**Matsushita, S., Takahashi, K., Motoki, M., Komoriya, K., Ikagawa, S., and Nishimura, Y.** (1994). Allele specificity of structural requirement for peptides bound to HLA-DRB1\*0405 and -DRB1\*0406 complexes: implication for the HLA-associated susceptibility to methimazole-induced insulin autoimmune syndrome. *Journal of Experimental Medicine* *180*, 873-883.

**Matsushita, S., Nishi, T., Oiso, M., Yamaoka, K., Yone, K., Kanai, T., and Nishimura, Y. (1996).** HLA-DQ-binding peptide motifs. 1. Comparative binding analysis of type II collagen-derived peptides to DR and DQ molecules of rheumatoid arthritis-susceptible and non-susceptible haplotypes. *International Immunology* 8, 757-764.

**Matsushita, S., Kohsaka, H., and Nishimura, Y. (1997).** Evidence for self and nonself peptide partial agonists that prolong clonal survival of mature T cells in vitro. *Journal of Immunology* 158, 5685-91.

**McDevitt, H. O. and Sela, M. (1967).** Genetic control of the antibody response. II. Further analysis of the specificity of determinant-specific control, and genetic analysis of the response to (H.G)-A--L in CBA and C57 mice. *Journal of Experimental Medicine* 126: 969-78.

**Mehindate, K., Thibodeau, J., Dohlsten, M., Kalland, T., Sekaly, R. P., and Mourad, W. (1995).** Cross-linking of major histocompatibility complex class II molecules by staphylococcal enterotoxin A superantigen is a requirement for inflammatory cytokine gene expression. *Journal of Experimental Medicine* 182, 1573-7.

**Mooney, N. A., Grillot-Courvalin, C., Hivroz, C., Ju, L. Y., and Charron, D. (1990).** Early biochemical events after MHC class II-mediated signaling on human B lymphocytes. *Journal of Immunology* 145. 2070-6.

**Morio, T., Geha, R. S., and Chatila, T. A. (1994).** Engagement of MHC class II molecules by staphylococcal superantigens activates src-type protein tyrosine kinases. *European Journal of Immunology* 24, 651-8.

**Nabavi, N., Freeman, G. J., Gault, A., Godfrey, D., Nadler, L. M., and Glimcher, L. H. (1992).** Signalling through the MHC class II cytoplasmic domain is required for antigen presentation and induces B7 expression. *Nature* *360*, 266-8.

**Nguyen, D. D., Beck, L., and Spiegelberg, H. L. (1995).** Anti-CD3-induced anergy in cloned human Th0, Th1, and Th2 cells. *Cellular Immunology* *165*, 153-7.

**Nielsen, M., Svejgaard, A., Ropke, C., Nordahl, M., and Odum, N. (1995).** Staphylococcal enterotoxins modulate interleukin 2 receptor expression and ligand-induced tyrosine phosphorylation of the Janus protein-tyrosine kinase 3 (Jak3) and signal transducers and activators of transcription (Stat proteins). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *92*, 10995-9.

**Nourse, J., Firpo, E., Flanagan, W. M., Coats, S., Polyak, K., Lee, M. H., Massague, J., Crabtree, G. R., and Roberts, J. M. (1994).** Interleukin-2-mediated elimination of the p27<sup>Kip1</sup> cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature* *372*, 570-3.

**Odum, N., Kanner, S. B., Ledbetter, J. A., and Svejgaard, A. (1993).** MHC class II molecules deliver costimulatory signals in human T cells through a functional linkage with IL-2-receptors. *Journal of Immunology* *150*, 5289-98.

**Odum, N., Martin, P. J., Schieven, G. L., Hansen, J. A., and Ledbetter, J. A. (1991).** Signal transduction by HLA class II antigens expressed on activated T cells. *European Journal of Immunology* *21*, 123-9.

**Odum, N., Martin, P. J., Schieven, G. L., Masewicz, S., Hansen, J. A., and Ledbetter, J. A. (1991).** HLA-DR molecules enhance signal transduction through the CD3/Ti complex in activated T cells. *Tissue Antigens* *38*, 72-7.



**Odum, N., Martin, P. J., Schieven, G. L., Norris, N. A., Grosmaire, L. S., Hansen, J. A., and Ledbetter, J. A.** (1991). Signal transduction by HLA-DR is mediated by tyrosine kinase(s) and regulated by CD45 in activated T cells. *Human Immunology* 32. 85-94.

**O'Hehir, R. E., and Lamb, J. R.** (1990). Induction of specific clonal anergy in human T lymphocytes by *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87. 8884-8.

**Ohtsubo, M., and Roberts, J. M.** (1993). Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. *Science* 259. 1908-12.

**Palacios, R., Martinez-Maza, O., and Guy, K.** (1983). Monoclonal antibodies against HLA-DR antigens replace T helper cells in activation of B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, 3456-60.

**Powell, J. D., Lerner, C. G., and Schwartz, R. H.** (1999). Inhibition of cell cycle progression by rapamycin induces T cell clonal anergy even in the presence of costimulation. *Journal of Immunology* 162. 2775-84.

**Qian, D., and Weiss, A.** (1997). T cell antigen receptor signal transduction. [Review] [71 refs]. *Current Opinion in Cell Biology* 9, 205-12.

**Rich, T., Lawler, S. E., Lord, J. M., Blancheteau, V. M., Charron, D. J., and Mooney, N. A.** (1997). HLA class II-induced translocation of PKC alpha and PKC beta II isoforms is abrogated following truncation of DR beta cytoplasmic domains. *Journal of Immunology* 159. 3792-8.

**Reedquist, K. A., Ross, E., Koop, E. A., Wolthuis, R. M., Zwartkruis, F. J., van Kooyk, Y., Salmon, M., Buckley, C. D., and Bos, J. L. (2000).** The small GTPase, Rap1, mediates CD31-induced integrin adhesion. *Journal of Cell Biology* *148*, 1151-8.

**Robbins, P. A., Evans, E. L., Ding, A. H., Warner, N. L., and Brodsky, F. M. (1987).** Monoclonal antibodies that distinguish between class II antigens (HLA-DP, DQ, and DR) in 14 haplotypes. *Human Immunology* *18*, 301-13.

**Saouaf, S. J., Mahajan, S., Rowley, R. B., Kut, S. A., Fargnoli, J., Burkhardt, A. L., Tsukada, S., Witte, O. N., and Bolen, J. B. (1994).** Temporal differences in the activation of three classes of non-transmembrane protein tyrosine kinases following B-cell antigen receptor surface engagement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 9524-8.

**Schwartz, R. H. (1990).** A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* *248*, 1349-56.

**Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1995).** Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. [Review] [153 refs]. *Genes & Development* *9*, 1149-63.

**Sloan-Lancaster, J., Evavold, B. D., and Allen, P. M. (1993).** Induction of T-cell anergy by altered T-cell-receptor ligand on live antigen-presenting cells. *Nature* *363*, 156-9.

**Sloan-Lancaster, J., and Allen, P. M. (1996).** Altered peptide ligand-induced partial T cell activation: molecular mechanisms and role in T cell biology. [Review] [81 refs]. *Annual Review of Immunology* *14*, 1-27.

**Sone, T., Tsukamoto, K., Hirayama, K., Nishimura, Y., Takenouchi, T., Aizawa, M., and Sasazuki, T. (1985).** Two distinct class II molecules encoded by the genes within HLA-DR subregion of HLA-Dw2 and Dw12 can act as stimulating and restriction molecules. *Journal of Immunology* 135, 1288-98.

**Spertini, F., Chatila, T., and Geha, R. S. (1992).** Signals delivered via MHC class II molecules synergize with signals delivered via TCR/CD3 to cause proliferation and cytokine gene expression in T cells. *Journal of Immunology* 149, 65-70.

**Stern, L. J., Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Urban, R. G., Stominger, J. L., and Wiley, D. C. (1994).** Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 368, 215-21.

**Tabata, H., Matsuoka, T., Endo, F., Nishimura, Y., and Matsushita, S. (2000).** Ligation of HLA-DR molecules on B cells induces enhanced expression of IgM heavy chain genes in association with Syk activation. *Journal of Biological Chemistry* 275, 34998-5005.

**Tanaka, Y., Ogawa, M., Nishimura, Y., and Matsushita, S. (1998).** Efficient induction of human CD4+ T cell lines reactive with a self-K-ras-derived peptide in vitro using a mAb to CD29. *Human Immunology* 59, 343-51.

**Truman, J. P., Ericson, M. L., Choqueux-Seebold, C. J., Charron, D. J., and Mooney, N. A. (1994).** Lymphocyte programmed cell death is mediated via HLA class II DR. *International Immunology* 6, 887-96.