

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20790409

研究課題名（和文） ヒト末梢血に検出される CD8 陽性単球に関する研究

研究課題名（英文） Analysis of CD8 positive monocytes in human peripheral blood

研究代表者 岩崎 沙理（IWASAKI SARI）

（北海道大学・大学院保健科学研究所・客員研究員）

研究者番号：60455631

研究成果の概要（和文）：全血溶血法を用いたヒト末梢血のフローサイトメトリーにおいて、CD14 陽性の単球上に CD8 分子が検出される現象を見出した。必要な血清因子の存在下において、T リンパ球上の CD8 分子に抗 CD8 抗体が結合することにより、抗体の Fc 部分と単球上の Fc $\gamma$ R II（CD32）が結合して T リンパ球と単球を架橋し、細胞膜の流動性や細胞骨格の変動を伴って、CD8 や CD3、TCR といった T リンパ球上の機能分子が単球へと移動すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：CD8 is mainly expressed on cytotoxic T lymphocytes. In this study, CD8<sup>+</sup> monocytes in human peripheral blood were identified by whole blood erythrocyte lysis method in flow cytometry. CD8 molecules on monocytes were constituted by CD8 $\alpha$  and CD8 $\beta$  subunits; however, the mRNA expression of neither CD8 $\alpha$  nor CD8 $\beta$  was detected in CD8<sup>+</sup> monocytes. We therefore hypothesized that CD8 molecules were transferred to monocytes from cells other than monocytes. Initially, it was shown that serum was essential for the detection of CD8<sup>+</sup> monocytes. Next, we revealed that CD8 molecules were derived from T cells, and that cell-to-cell contact between the monocytes and T cells was required for the transfer of CD8 molecules to monocytes. Furthermore, Fc $\gamma$  receptor II (CD32) on monocytes and dynamism of cell membrane and cytoskeleton were involved in the mechanism of the CD8 translocation. Interestingly, CD3 and  $\alpha\beta$  T cell receptor (TCR) were also transferred from T cells to monocytes accompanied by CD8. Collective evidences indicated that cell surface CD8, and also CD3 and  $\alpha\beta$  TCR molecules on T cells, were transferred to monocytes via an intercellular exchange of plasma membrane, which is recently termed trogocytosis, under the presence of serum and the anti-CD8 monoclonal antibody.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生命科学

科研費の分科・細目：血液学、免疫学

キーワード：単球、CD8、ヒト、末梢血、フローサイトメトリー、Fc $\gamma$ R II

## 1. 研究開始当初の背景

CD8 分子は、細胞傷害性 T 細胞 (Cytotoxic T lymphocytes : CTL) の最も重要な表面マーカーとして知られている (Ledbetter JA et al, JEM 1981)。CD8 分子の機能は、CTL 上の T cell receptor (TCR) が結合する、抗原提示細胞 (Antigen presenting cell : APC) 上に発現した MHC class I 分子に補助的に結合して、TCR と MHC class I 分子とで形成される複合体の結合性を高める co-receptor である。CD8 分子なくしては CTL の活性化が起きないことが証明されており、CD8 分子は CTL の機能を決定付ける key molecule であると言える (Connolly JM et al, PNAS 1990 ; Salter RD et al, Nature 1990)。CD8 分子は、CD8 $\alpha\beta$  の heterodimer もしくは CD8 $\alpha\alpha$  の homodimer として存在する。CD8 $\alpha\beta$  が、TCR $\alpha\beta$  T cell や TCR $\alpha\beta$  thymocyte に発現するのに対し、CD8 $\alpha\alpha$  は TCR $\gamma\delta$  T 細胞や Dendritic cell : DC、腸管の intraepithelial T cell、NK 細胞の一群など、より多様な細胞での発現が報告されている (Gangadharan D, Curr Opin Immunol 2004 ; Hayday A, Nat. immunol. 2001)。また、CD8 $\alpha\beta$  は CD8 $\alpha\alpha$  に比して co-receptor としての機能が高いことが報告され (Bosselut R, Immunity 2000)、両者の機能的な解析や、結晶構造解析に加え、CD8 $\alpha\beta$  heterodimer が lipid raft に存在するなど、細胞局在の違いも明らかになりつつある (Pang DJ, JBC 2007)。

研究代表者らは、ラットの末梢血および脾臓内に、CD8 $\alpha\beta$  を発現する単球・マクロファージ系細胞が存在することを明らかにした (Baba et al, Blood 2006)。この CD8 陽性単球・マクロファージは、CD8 陽性 T 細胞 (CTL) と NK 細胞とを合わせたような非常にユニークな機能的特色を持つ。結核死菌を含む Adjuvant 免疫により有意に誘導され、一部の癌細胞株に対し細胞傷害活性を認め、それが Granzyme B/Perforin といった細胞傷害因子の発現や、NKG2D を介したメカニズムであることを明らかにした (Baba et al, J immunol 2008)。本細胞は、今まで全く注目されていなかった新たな細胞である。

ヒトにおいても、ラットと同様の手法で、ヘパリン加末梢静脈血 (全血) に抗体を添加して染色し、フローサイトメトリーによる解析

を行った結果、CD8 陽性単球が存在することを発見した。この細胞の割合には個人差があり、多い人では、末梢血単球中の 10%前後に検出される。また、ヒト末梢血から CD8 陽性単球を分離し、mRNA を抽出して RT-PCR を行ったところ、 $\alpha$ 鎖 $\beta$ 鎖いずれの発現も確認されなかった。さらに、血液を Ficoll で処理した後に単核球を染色してフローサイトメトリーを行った場合には、単球上の CD8 分子の検出率は著しく低下した。これらのことから、ヒト CD8 陽性単球における CD8 分子は、単球ではなく他の細胞由来であり、血清依存的に確認される分子であると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、全血溶血法によるサンプル調整でフローサイトメトリーを行った際に、ヒト末梢血の単球上に CD8 分子が検出されるメカニズムと病態との関連の解析を行うことを目的としている。

## 3. 研究の方法

- 1) ヒト単球での CD8 分子の発現解析
- 2) 可溶性 CD8 との関連の検討
- 3) 可溶性 CD8 以外の血清中の分子との関連の検討
- 4) 単球の膜機能や細胞骨格が関与する可能性の検討
- 5) 他の血球から単球へ CD8 分子が cell to cell transfer される可能性の検討
- 6) 単球へと移動する CD8 分子が CTL 由来である可能性の検討
- 7) CD8 分子以外の他の膜分子の移動を伴う現象である可能性についての検討
- 8) 単球以外の細胞への CD8 分子の移動が起こる可能性についての検討
- 9) この現象と病態との関連性についての解析

## 4. 研究成果

まず、初年度の検討により、CD8 陽性単球の検出について以下のことが明らかとなった。

- 1) ヒト単球上に検出される CD8 分子は CD8 $\alpha$  CD8 $\beta$  のヘテロダイマーが主である。
- 2) CD8 陽性単球の検出には血清ないし血漿が必要である。

3) 血清中に含まれる可溶性 CD8 は、CD8 陽性単球の検出との関連性には乏しい。

4) CD8 陽性単球の CD8 は T 細胞由来であり、T 細胞から単球への CD8 の移動には両者の接触が必要である。

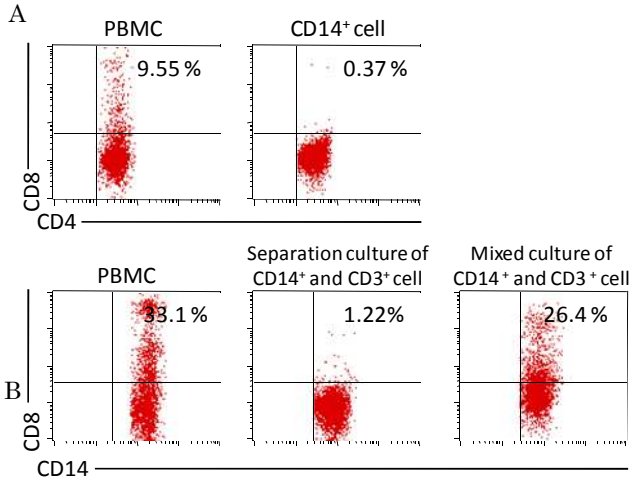


Figure 1. T リンパ球の関与

A) CD14<sup>+</sup>細胞のみでは DP 単球は検出されなかった。B) DP 単球は CD3<sup>+</sup>細胞と CD14<sup>+</sup>細胞の分離培養では検出されなかった。

5) CD8 抗体の Fc 部分と単球上の Fc $\gamma$ R II (CD32) の結合が関与している可能性がある。

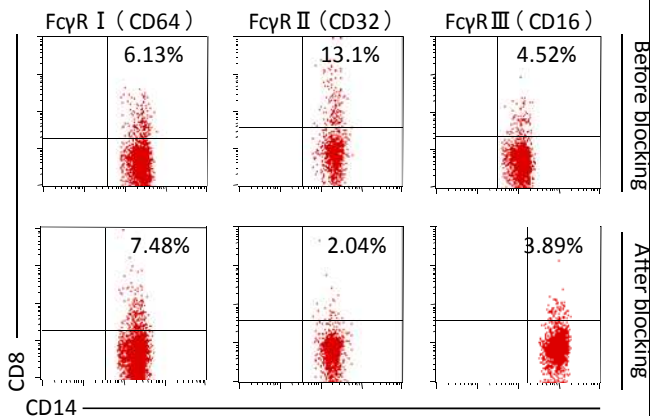


Figure 2. Fc $\gamma$ R の関与

Fc $\gamma$ R I と III をブロックした場合、DP 単球の割合に変化はなかったが、Fc $\gamma$ R II をブロックすることにより、DP 単球の割合が減少した。

6) 細胞膜や細胞骨格の流動性が必要である。

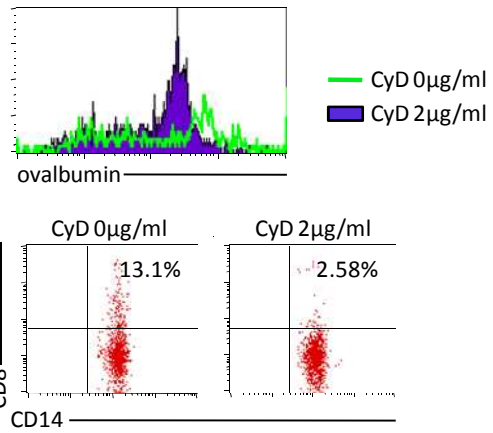


Figure 3. 細胞骨格の変動の関与

A) 細胞骨格の変動を抑制するサイトカリン D (CyD) により、ovalbumin の endocytosis が抑制された。B) CyD 添加により、DP 単球の割合が減少した。

7) CD8 とともに CD3 や TCR も T 細胞から単球上へ移動する。

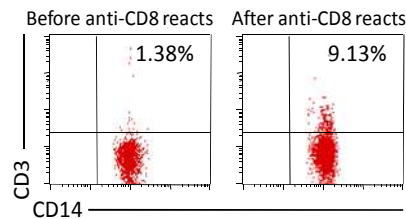


Figure 4. CD8 以外の分子の移動

抗 CD8 抗体反応後、単球表面に CD3 が検出された。

次に、次年度の検討により、以下のことが明らかになった。

- 1) 単球へと移動しているのは NK 細胞などの CD8 分子ではなく T 細胞上の CD8 分子に他ならない。
- 2) T 細胞からの CD8 分子の移動は単球のみならず、顆粒球系細胞においても起こる。
- 3) 顆粒球系細胞においては Fc $\gamma$ R II に加え、Fc $\gamma$ R III もこの反応に関与している。

以上の結果を総合すると、必要な血清因子の存在下において、T リンパ球上の CD8 分子に抗 CD8 抗体が結合することにより、抗体の Fc 部分と Fc $\gamma$ R を有する単球や顆粒球が結合して T リンパ球との間を架橋し、細胞膜の流動性や細胞骨格の変動を伴って、CD8 や CD3、 $\alpha\beta$  TCR といった T リンパ球上の機能分子が膜ごと単球や顆粒球へと移動することが証明された。

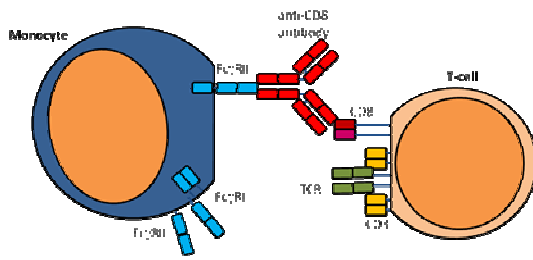


Figure 5. シェーマ

Tリンパ球上のCD8分子に抗CD8抗体が結合することにより、抗体のFc部分と単球上のFcγRII (CD32)が結合してTリンパ球との間を架橋し、細胞膜の流動性や細胞骨格の変動を伴って、CD8、CD3、αβTCRといったTリンパ球上の機能分子が膜ごと単球へと移動する。

今回我々が見出した、本来単球自身が発現していないCD8分子が単球上に検出される現象は、全血溶解法によるフローサイトメトリーの盲点として重要な知見であることが指摘される。また、近年報告され注目されつつある trogocytosis と呼ばれる細胞膜交換現象と一致している (Daubeuf S et al, J Immunol, 2010)。この現象は、例えば、生体へのリツキシマブ (抗CD20抗体) 投与によりCD20分子がB細胞表面から除去される現象を説明づけるメカニズムと考えられており、近年急速に臨床応用されている分子標的療法への耐性化に関連する重要な細胞メカニズムと考えられる。今後引き続いて、抗CD8抗体によって引き起こされるこの現象の生理学的、病理学的意義の検討、特に分子標的療法への耐性メカニズムという点について解析、また、この現象を規定する血清中の因子の解明が急務であると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

岩崎沙理 ヒト末梢血におけるCD8陽性単球の解析 北海道医学雑誌 84巻、257-266, 2009

[学会発表] (計 3 件)

1) 岩崎沙理 ヒト末梢血におけるCD8陽性単球の解析 第98回日本病理学会総会・学術集会 平成21年4月27日 京都国際会議場

2) 岩崎沙理 ヒト末梢血におけるCD8陽性単球の解析 第56回日本臨床検査医学会総会・学術集会 平成21年8月26日 札幌コンベンションセンター

3) 益田紗季子 ヒト末梢血におけるCD8陽性単球の解析 第39回日本免疫学会総会・学術集会 平成21年12月2日 大阪国際会議場(グランキューブ大阪)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者 岩崎 沙理  
(北海道大学・大学院保健科学研究院・客員研究員)

研究者番号： 60455631

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし