

原 著

臍帯血中 CD4⁺T細胞, NK細胞のキモカインリセプター CXCR3発現の検討

獨協医科大学 小児科学 (血液)

坪井 龍生 杉田 憲一 江口 光興

獨協医科大学 産婦人科学

渡辺 博

要 旨 Th1細胞は造血幹細胞移植後の急性移植片対宿主病 (graft-versus-host disease : GVHD) の発症に深く関与しているといわれている。今回我々はTh1細胞に発現するとされるキモカインリセプターの1つであるCXCR3を測定し、臍帯血移植で急性GVHDがなぜ軽度なのかを検討した。臍帯血, 成人末梢血と移植後患者末梢血中のリンパ球, NK細胞をモノクローナル抗体 (抗CD4, 抗CD8, 抗CD56, 抗HLA-DR, 抗CD25) で染色し以下の結果を得た。CD4⁺T細胞のCXCR3発現, HLA-DRの発現はいずれも末梢血よりも臍帯血の方が少なかった ($p < 0.05$)。NK (CD56⁺) 細胞ではCXCR3, HLA-DR発現に有意差はなかった。IL-2で刺激したCD4⁺T細胞でのCXCR3発現は培養後5日でも臍帯血では末梢血より発現が少なかった ($p < 0.05$)。IL-2で刺激したNK細胞のCXCR3発現には両者に差がなかったが, HLA-DR発現は末梢血と比べて臍帯血で少なかった ($p < 0.05$)。移植1ヶ月後の末梢血CD4⁺T細胞のCXCR3発現を臍帯血移植例と対照の同種骨髄移植例と比較すると臍帯血移植例で低値であった ($p < 0.05$)。臍帯血のCD4⁺T細胞, NK細胞でのCXCR3発現の特徴は臍帯血移植で急性GVHDが発症しにくいということに関与していると考えた。

Key Words : CXCR3, CD4⁺T細胞, NK細胞, 臍帯血, 急性移植片対宿主病

緒 言

白血病などの血液悪性腫瘍や遺伝性疾患に対する治療法の1つとして造血幹細胞移植が行われている¹⁾。造血幹細胞移植後の合併症で移植片対宿主病 (graft-versus-host-disease : GVHD) はもっとも大きな問題の1つで, 予後に重大な影響を及ぼす。急性GVHDは以下に示した機序により活性化したT細胞がレシピエントの組織に直接, 間接に作用して発症するとされている。1つは移植前処置時に放出される lipopolysaccharide, tumor necrosis factor- α にドナーのマクロファージが反応し, これをドナーT細胞が認識し活性化することに起因する²⁾。また, そのほかには組織適合抗原 (HLA) の相違を認識しT細胞が活性化する。その際, 休止状態にあ

るCD4⁺T細胞は活性化され, Th1細胞へと分化する。このTh1細胞の存在が急性GVHDの発症に深く関わっている^{3~6)}。最近, Th1細胞への分化, 誘導にはキモカインが重要な役割をはたしている事がわかってきた⁷⁾。キモカインはシステイン残基の存在様式によりいくつかのサブファミリーに分類されており, T細胞表面にはそれぞれに対してキモカインリセプターも存在している。Th1細胞上にはCXCR3およびCCR5が発現している^{8~11)}。CXCR3はinterferon-inducible protein-10 (IP-10), monokine induced by interferon- γ (Mig), interferon-inducible T-cell α chemoattractant (I-TAC) のリセプターとされている。

現在, 造血幹細胞移植には骨髄, 末梢血, 臍帯血が使用されているが, その中で臍帯血の利用率が大きくなっていく。その理由の1つに臍帯血は骨髄, 末梢血を利用したときに比べGVHDが軽度なことにある^{1, 12)}。今回, 我々は臍帯血幹細胞移植時の急性GVHDの特徴を知るために臍帯血でのTh1細胞の動態を予測することが必要と考えた。そのため, CXCR3の発現を臍帯血, 末梢血の特

平成14年10月31日受付, 平成14年12月6日受理
別刷請求先: 坪井龍生

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林880
獨協医科大学 小児科学 (血液)

にCD4⁺T細胞で検索した。また、NK (CD56⁺) 細胞もGVHDの発現調節に関与しており、同様にCXCR3の発現を測定しGVHDにおける役割を推測した。

対象と方法

1. 対象

ヘパリン加臍帯静脈血，成人末梢血を得て行った。臍帯血は38～42週で基礎疾患のない妊婦の正常分娩時のものを産婦人科医を通じて妊婦の許可のもとに採取した。末梢血は，同種骨髄移植，同種臍帯血移植児より得た。なお，対照の健康成人末梢血は，当科医師の肘静脈より採血した。

2. 抗体および薬剤

抗体はfluorescein isothiocyanate (FITC) およびphycoerythrin (PE) 標識マウスモノクローナル抗体を使用した。抗CD3抗体 (Leu4, DAKO, Denmark), 抗HLA-DR抗体 (Fujisawa, Japan), 抗CD25抗体 (IL-2R- α , DAKO), 抗CD56抗体 (DAKO), 抗CD4抗体 (DAKO), 抗CD8抗体 (Fujisawa), 抗CD13抗体 (Becton-Dickinson : BD, USA), 抗CD19抗体 (BD), 抗CD33抗体 (BD), 抗CXCR3抗体 (DAKO), および陰性コントロールとして同じサブクラス標識の抗体を使用した。インターロイキン2 (IL-2, S-6820) は塩野義製薬 (大阪) より得た。

3. 細胞の分離と培養

臍帯血，末梢血からの単核球の分離は，Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を用いた比重遠心法により行った。すなわち，プラスチックチューブ (栄研，東京) を用い，血液をFicoll-Hypaqueに重層したのち，400Gで30分間遠心後浮遊細胞を得た。細胞は洗浄後，培養液，10% FBS (SIGMA, ST, USA) 加RPMI 1640 (SIGMA) に浮遊した。細胞の培養は最終濃度 1×10^5 /mlに調整し，37℃，5% CO₂インキュベーター中で培養した。

4. *In vitro* におけるT細胞，NK細胞の活性化

プラスチックシャーレ (FALCON 3001, BD) 中で10% FBS加RPMI 1640培地に浮遊した臍帯血，末梢血単核球細胞 (1×10^6 /ml) にIL2 (100 U/ml) を添加し，37℃，5% CO₂インキュベーター中で培養した。

5. 表面マーカーの検出

細胞表面の解析は二重染色にて行った。培養細胞以外は全血法で行った。いずれの場合も，細胞浮遊液および

血液の50 μ lとFITC標識ないしはPE標識抗体の10 μ lを混合した。全血法の場合は20分後，赤血球溶解剤 (FACS Lysing Solution, BD) で処理後，洗浄し測定した。培養細胞は20分後洗浄した後に測定した。表面マーカーの測定はFACScan (BD) を用いたflow cytometry法により行なった。

6. 有意差検定

統計学的処理にはStudent's t-testを用いた。

結果

1. T細胞およびNK細胞のCXCR3の発現

二重染色法により，T細胞 (CD4⁺，CD8⁺)，NK細胞 (CD56⁺) におけるCXCR3の発現を検討した。臍帯血 (n = 5) でのCXCR3陽性率はCD4⁺T細胞2.6 \pm 1.4%，CD8⁺T細胞26.1 \pm 21.0%，CD56⁺細胞15.8 \pm 10.0であった。対照の成人末梢血 (n = 5) ではCD4⁺T細胞30.9 \pm 3.9%，CD8⁺T細胞37.5 \pm 4.2%，CD56⁺細胞26.2 \pm 8.3%であった (Fig. 1, Table 1)。臍帯血のCD4⁺T細胞のCXCR3発現は末梢血に比べて有意に少なかった (p < 0.05)。

2. CD4⁺T細胞におけるCD25，CXCR3，HLA-DRの発現

CXCR3⁺CD4⁺T細胞はTh1細胞をあらわしている。さらに，活性化抗原として知られているCD25，HLA-DRの発現をCD4⁺T細胞で測定し，CXCR3の発現と比較した。臍帯血 (n = 5) ではCXCR3は2.6 \pm 1.4%，CD25は11.9 \pm 1.9%，HLA-DRは2.9 \pm 1.8%であり，末梢血 (n = 5) ではCXCR3は30.9 \pm 3.9%，CD25は14.3 \pm 5.4%，HLA-DRは12.0 \pm 4.5%であった (Fig. 2, Table 2)。臍帯血における活性化抗原の発現は末梢血と比べてCXCR3，HLA-DRが有意に少なかった (p < 0.05)。

3. NK細胞のCXCR3，HLA-DR発現

NK (CD56⁺) 細胞についてもCD4⁺T細胞と同様にCXCR3に加えて活性化抗原のHLA-DRを測定した。臍帯血 (n = 5) ではCXCR3は15.8 \pm 10.0%，HLA-DRは1.2 \pm 0.8%であった。末梢血 (n = 5) ではCXCR3は26.2 \pm 8.3%，HLA-DRは2.8 \pm 0.9%であった (Table 3, Fig. 3)。末梢血のNK細胞でのCXCR3の発現の平均値は臍帯血よりも高値を示したが，HLA-DRの発現とともに有意差はなかった。

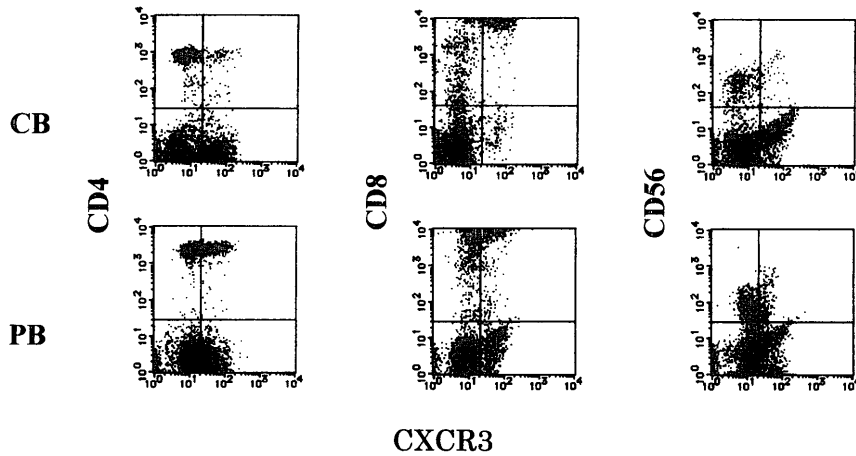


Fig. 1 Expression of CXCR3 on CD4⁺, CD8⁺ and NK cells. Mononuclear cells were treated with monoclonal antibodies for CXCR3 and the antigen expression was analyzed using flow cytometry. Representative profiles are shown in this figure. CB : cord blood, PB : peripheral blood.

Table 1 CXCR3 expression on CD4⁺, CD8⁺ and CD56⁺ cells

	Cord blood (n = 5)	Peripheral blood (n = 5)
CD4 ⁺ cells	2.6 ± 1.4 %	30.9 ± 3.9 %
CD8 ⁺ cells	26.1 ± 21.0 %	37.5 ± 4.2 %
CD56 ⁺ cells	15.8 ± 10.0 %	26.2 ± 8.3 %

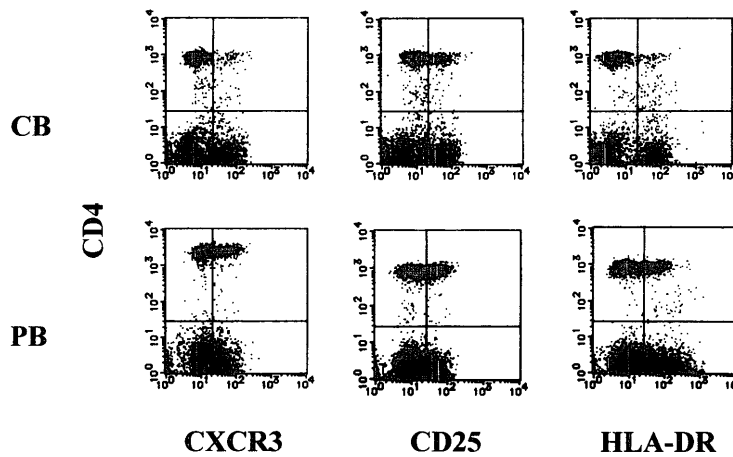


Fig. 2 Expression of CXCR3, CD25 and HLA-DR on CD4⁺ T cells. Mononuclear cells were treated with monoclonal antibodies for CD25, CXCR3 and HLA-DR and the antigen expression was analyzed using flow cytometry. Representative profiles are shown in this figure.

CB : cord blood, PB : peripheral blood.

Table 2 Expression of CXCR3, CD25 and HLA-DR on CD4⁺ T cells

	Cord blood (n = 5)	Peripheral blood (n = 5)
CXCR3	2.6 ± 1.4 %	30.9 ± 3.9 %
CD25	11.9 ± 1.9 %	14.3 ± 5.4 %
HLA-DR	2.9 ± 1.8 %	12.0 ± 4.5 %

Table 3 Expression of CXCR3 and HLA-DR on CD56⁺ cells

	Cord blood (n=5)	Peripheral blood (n=5)
CXCR3	15.8 ± 10.0%	26.2 ± 8.3%
HLA-DR	1.2 ± 0.8%	2.8 ± 0.9%

4. IL-2 刺激細胞における CXCR3 発現

IL-2 (200 U/ml) を添加して CD4⁺T 細胞を活性化し、その活性化した細胞における CXCR3 発現を臍帯血と末梢血で検討した。臍帯血では添加後 3 日目に CXCR3 は 4.5 ± 0.9%, CD25 は 8.9 ± 5.2%, HLA-DR は 5.1 ± 1.7%, 5 日目には CXCR3 は 17.2 ± 6.3%, CD25 は 21.7 ± 4.7%, HLA-DR は 18.5 ± 15.4%, 成人末梢血では添加後 3 日目に CXCR3 は 23.1 ± 7.8%, CD25 は 20.2 ± 7.5%, HLA-DR は 20.5 ± 16.4%, 5 日目には CXCR3 は 33.9 ± 6.7%, CD25 は 25.7 ± 3.9%, HLA-DR は 34.3 ± 10.4% であった (Fig. 4)。活性化した CD4⁺T 細胞における CXCR3 の発現は培養後 3 日、5 日のいずれもで、末梢血に比べ臍帯血で少なかった ($p < 0.05$)。

同様に NK (CD56⁺) 細胞に IL-2 を添加し、発現を測定しその変化を検討した。臍帯血では添加後 5 日目に CXCR3 は 26.2 ± 1.6%, HLA-DR は 9.8 ± 3.2%, 7 日目には CXCR3 は 41.4 ± 10.4%, HLA-DR は 11.5 ± 6.3%, 成人末梢血では添加後 5 日目に CXCR3 は 34.4 ± 8.8%, HLA-DR は 31.7 ± 25.0%, 7 日目には CXCR3 は 33.3 ± 5.3%, HLA-DR は 32.7 ± 2.7% であった (Fig. 5)。IL-2 で刺激した NK 細胞の CXCR3 発現は培養後 5 日および 7 日のいずれも臍帯血と末梢血で差はなかった。しかし、HLA-DR の発現は臍帯血ではいずれの培養期間で末梢血より少なかった ($p < 0.05$)。

5. 移植患者の末梢血の CXCR3 発現

臍帯血移植 1 ヶ月後の急性白血病患者 CD4⁺T 細胞の CXCR3 発現 (n = 3, 1 例が grade II の GVHD, 他 2 例は GVHD なし) は 49.4 ± 13.8%, であった。HLA 一致の骨髄移植患者 (n = 4, 1 例が grade II の GVHD, 他 3 例は GVHD なし) で 44.6 ± 4.9%, HLA 不一致の骨髄移植患者 (n = 4, 2 例が grade II GVHD, 2 例で grade III の GVHD) で 73.8 ± 11.0% であった。骨髄移植後 1 年以上の移植患者 (n = 10) で 28.8 ± 7.5%, 治療の終了した非移植患者 (n = 7) で 26.0 ± 11.4% であった (Table. 4)。1 ヶ月後は 1 年後に比較して CXCR3 発現の増加を認めた ($p < 0.05$)。さらに、臍帯血移植例はすべて HLA 不一致の移植例であったので、HLA 不一致の骨髄移植例を対照として CXCR3 発現を比較すると有意

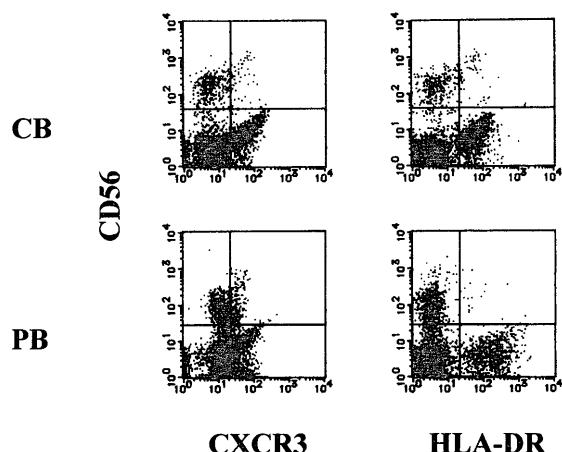


Fig. 3 Expression of CXCR3 and HLA-DR on CD56⁺ cells. Mononuclear cells were treated with monoclonal antibodies for CXCR3 and HLA-DR and the antigen expression was analyzed using flow cytometry. Most of CD56-bright cord NK cells were positive for CXCR3 and HLA-DR. Representative profiles are shown in this figure.
CB : cord blood, PB : peripheral blood.

差を認めた ($p < 0.05$)。

考 察

臍帯血移植時の急性 GVHD は骨髄移植に比較して軽度であるとする報告が多い^{1, 12~13}。その理由の多くは臍帯血細胞の未熟性に求めることが多い^{14, 15}。臍帯血 CD4⁺T 細胞の抗体産生誘導能は成人に比較して低下していること¹⁷、臍帯血の CD4⁺T 細胞の多くは CD45RA の性質を示すナイーブ細胞であること^{15~16}、IL-10 などのサイトカイン産生能の相違していること^{6, 18} など種々の面で成人末梢血と相違している。また、最近、臍帯血 T 細胞は cyclosporin A に対する感受性が成人末梢血、骨髄よりも高く、臍帯血 T 細胞の IL-2 リセプター発現や IL-2 産生が強く抑制されるといった報告もある¹⁹。移植後の急性 GVHD にはこの IL-2 および INF- γ 産生に関わる Th1 細胞の役割が大きい。移植後急性 GVHD において Th1 細胞はキモカインなどによりナイーブ T 細胞より分化誘導される。この Th1 細胞への分化誘導にともない Th1 細胞表面には CXCR3 が発現するようになる。

今回の検討では、まず臍帯血と末梢血における CD4⁺, CD8⁺ および CD56⁺ 細胞での CXCR3 の発現を検討した。その結果、特に CD4⁺T 細胞で大きな差が存在した。さらに、CD4⁺T 細胞での CXCR3 の発現を CD25, HLA-DR と比較し、NK (CD56⁺) 細胞では HLA-DR と比較した。臍帯血 CD4⁺T 細胞の HLA-DR, CXCR3

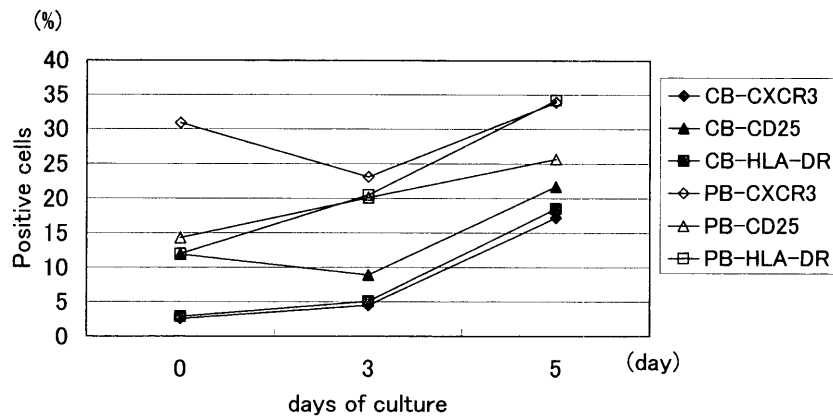


Fig. 4 Expression of CXCR3, CD25 and HLA-DR on IL-2 stimulated CD4⁺ T cells. The cells were freshly isolated, cultured with IL-2 (100 U/ml) at 37°C in 5% CO₂ and CXCR3 expression was analyzed using flow cytometry on days 3 and 5 of culture.
CB : cord blood, PB : peripheral blood.

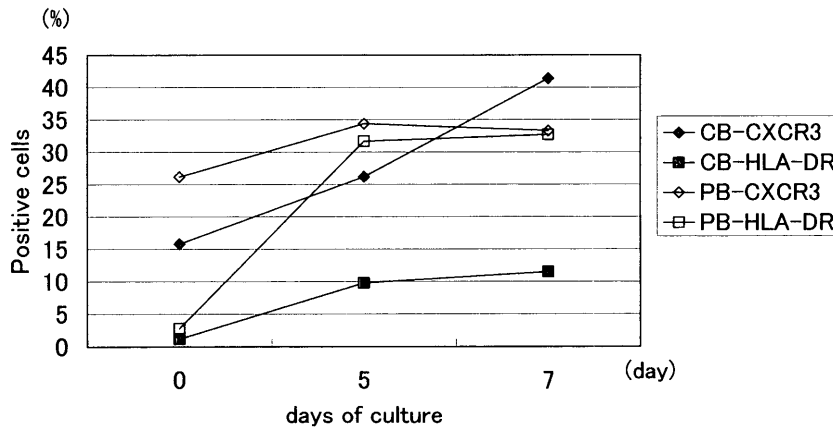


Fig. 5 Expression of CXCR3 and HLA-DR on IL-2 stimulated NK cells. The cells were freshly isolated, cultured with IL-2 (100 U/ml) at 37°C in 5% CO₂ and CXCR3 expression was analyzed using flow cytometry on days 5 and 7 of culture.
CB : cord blood, PB : peripheral blood.

Table 4 CXCR3 expressions on CD4⁺ cells from patients who received stem cell transplantation

Acute leukemia patient treated with	Expressions of CXCR3
CBSCT with HLA - miss - matched donor (1 month post SCT) (n = 3)	49.4 ± 13.8%
Allo - BMT with HLA mis - matched donor (1 month post SCT) (n = 4)	73.8 ± 11.0%
Allo - BMT with HLA - matched donor (1 month post SCT) (n = 4)	44.6 ± 4.9%
Allo - BMT (more than 1 year post SCT) (n = 10)	28.8 ± 7.5%
Chemotherapy alone (off therapy) (n = 7)	26.0 ± 11.4%

発現はいずれも低値であったが、CXCR3はより顕著であった。この結果は臍帯血CD4⁺T細胞の多くはナイーブ細胞でTh1細胞の機能のないことを示していると考えた。CD56⁺細胞でのHLA-DR発現は臍帯血と末梢血で差がなく、CXCR3の発現の差も明らかでなかった。NK (CD56⁺)細胞はCD56の発現の強さより2つにわけられ、一般にCD56が高発現 (CD56-bright) NK細胞の役割はサイトカイン産生細胞とされ自己、非自己を認識する機能が主であり、CD56が低発現 (CD56-dim) NK細胞はkiller細胞の役割が主としている²⁰⁾。CXCR3はCD56高発現細胞に存在しているとされている。Fig. 3に示したように、臍帯血NK細胞ではCXCR3に加えてHLA-DR発現もCD56高発現細胞に多く認められた。

次に、IL-2でT細胞を活性化した後の状態を両者において比較した。臍帯血CD4⁺T細胞におけるCXCR3の発現は培養後5日までに増加を認めた。しかし、末梢血のCXCR3の発現は臍帯血に比べて常に多く5日目になってもその差は消失しなかった。これは、臍帯血T細胞の多くがナイーブ細胞でIL-2に対する受容体陽性細胞の比率が小さいためIL-2刺激による反応に末梢血と差が出現したと考えられた。しかし、CD4細胞のIL-2刺激時のday 3からday 5での増加率は臍帯血と末梢血で差がなかった。このことは、臍帯血CD4⁺T細胞もサイトカイン反応性を有していることを示しているものと考えた。臍帯血細胞では、IL-2産生能が低下していることを含め、今後はTh1細胞への分化を誘導するサイトカインの産生能も考慮する必要を知った。CD4⁺T細胞のCD25⁺発現は培養後5日までに両者での差は消失した。CD25⁺CD4⁺T細胞には一般に自己反応性を抑える役割があり、それはTh2細胞の機能であるとされている²¹⁾。造血幹細胞移植において移植後初期にはHLA-DR⁺CD4⁺T細胞が増加しGVHDが発現し、その後CD25⁺CD4⁺T細胞が増加し始めるとGVHDは軽減していくとされている。今回、末梢血ではCD25発現に比較しHLA-DR発現が大きかったが、臍帯血ではHLA-DR発現とCD25発現に差がなかったことがわかった。この所見は臍帯血でGVHDが軽度であることを裏付けるものと考えた。また最近、臍帯血T細胞のTh2サイトカイン産生は末梢血より亢進しているとの報告もある²²⁾。IL-2刺激NK細胞ではHLA-DRの発現には差があったが、CXCR3の発現には差がなかった。これまでの報告で臍帯血NK細胞は、IL-2の存在下で容易に成人のNK細胞と差のない機能を有するLAK細胞になることとわかっており²³⁻²⁴⁾、今回のIL-2刺激NK細胞におけるHLA-DR発現の相違についての理由は今後解決すべき問題と考えた。また、今回のIL-2を用いての

検討は単核細胞を培養しての検討で、結果の解釈には細胞相互間の影響も考慮が必要と考えられる。その他、GVHDに関与するものとして最近NKT細胞もある。そのNKT細胞の一つとされているCD3⁺CD56⁺細胞の比率が臍帯血では少ないという報告がある。実際に移植後の長期にわたってCD3⁺CD56⁺細胞の比率が少ないことを我々は見出している (未発表データ)。

移植患者の検討では、CD4⁺T細胞上のCXCR3発現は臍帯血移植患者と骨髄移植患者とに差は見出せなかった。しかし、今回の臍帯血移植患者はHLA不一致であったため、同じ条件のHLA不一致骨髄移植患者と比較したところ差を認めた。また、NK細胞のCXCR3発現については結果を提示できなかったが、HLA-DR発現は臍帯血移植患者に少なく、骨髄移植患者との間に有意差を認めている (結果未提示見)。IL-2刺激NK細胞のHLA-DR発現の結果を支持するものであった。

前にも述べたように、急性GVHDではドナーT細胞が認識、活性化しTh1細胞へ分化することによって起こる。IL-2存在下臍帯血CD4⁺T細胞のCXCR3発現が徐々に起こるため臍帯血のCD4⁺T細胞がTh1 (CXCR3陽性)細胞に分化するのが遅延すると考えられた。また、IL2刺激CD4⁺T細胞では自己反応性を抑える役割をあらわすCD25の発現が十分に見られ、HLA-DRの発現が末梢血とは異なっていたこと、NK (CD56⁺)細胞ではCD56高発現の自己、非自己の認識にかかわるCXCR3陽性NK細胞の存在が十分に見られたこと、IL-2刺激でHLA-DRの発現が少なかったことなどが、GVHDが軽度であることに関係するものと考えた。

結 論

キモカインリセプターCXCR3の発現を臍帯血のTおよびNK細胞で測定し、成人末梢血と比較した。CD4⁺T細胞のCXCR3発現は臍帯血で少なく差を認めた。NK細胞ではCXCR3発現の差は明らかでなかった。CXCR3発現はGVHDの重症度に関与していると考えた。

謝 辞 稿を終わるにあたり、臍帯血採取にご協力いただいた産婦人科教授稲葉憲之先生、田所望先生および同科医局員、表面マーカー測定に関しご指導をいただいた臨床共同研究室野中康子技術員に深謝します。

文 献

- 1) Rocha V, Wagner JE Jr, Sobocinski KA, et al : Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow

- Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *N Engl J Med*, **342** : 1846-1854, 2000.
- 2) Vogelxang B. G, Hess D. A, et al : Graft -Versus -Host Disease : New Directions for a Persistent Problem. *Blood*, **84** : 2061-2067, 1994.
 - 3) Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells : different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, **7** : 145-173, 1989.
 - 4) Romangnani S. : The Th 1/Th 2 paradigm. *Immunol Today*, **18** : 263-266, 1997.
 - 5) Abbas AK, Murphy KM, Sher A. : Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, **383** : 787-793, 1996.
 - 6) Rainsford E, Reen DJ. : Interleukin 10, produced in abundance by human newborn T cells, may be the regulator of increased tolerance associated with cord blood stem cell transplantation. *Br J Haematol*, **116** : 702-709, 2002.
 - 7) Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR. : Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today*, **19** : 568-574, 1998.
 - 8) D'Ambrosio D, Iellem A, Bonocchi R, et al : Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells. *J Immunol.*, **161** : 5111-5115, 1998.
 - 9) Loetscher P, Uguccioni M, Bordoli L, et al : CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature*, **391** : 344-345, 1998.
 - 10) Kim CH, Rott L, Kunkel EJ, et al : Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo. *J Clin Invest*, **108** : 1331, 2001.
 - 11) Sallusto F, Lenigo D, Mackay CR, et al : Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med*, **187** : 875-883, 1998.
 - 12) Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, Krtzberg J, Adamson J, Migliaccio AR, Berkowitz RL, Cabbad M, Dobrila NL, Taylor PE, Rosenfield RE, Stevens CE. : Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med.*, **339** : 1565-1577, 1998.
 - 13) Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chamard A, et al : Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med*, **337** : 373-381, 1997.
 - 14) 章曉鳴, 朱曉東, 山本初実, 他 : 新生児の免疫能—成熟児臍帯血CD4⁺リンパ球の特徴—日本小児科学会雑誌, **101** : 1563-1570, 1997.
 - 15) Takahashi N, Imanishi K, Nishida H, et al : Evidence for immunologic immaturity of cord blood T cells. Cord blood T cells are susceptible to tolerance induction to in vitro stimulation with a super antigen. *J Immunol*, **155** : 5213-5219, 1995.
 - 16) Sebastiani S, Allavena P, Albanesi C, et al : Chemokine receptor expression and function in CD4⁺T lymphocytes with regulatory activity. *J Immunol.*, **166** : 996-1002, 2001.
 - 17) Yachie A, Miyawaki T, Nagaoki T, et al : Regulation of B cell differentiation by T cell subsets defined with monoclonal OKT4 and OKT8 antibodies in human cord blood. *J Immunol.*, **127** : 1314-1317, 1981.
 - 18) Chalmers IM, Janossy G, Contreras M, et al : Intracellular cytokine profile of cord and adult blood lymphocytes. *Blood.*, **92** : 11-18, 1998.
 - 19) Kadereit S, Kozik MM, Junge GR, et al : Cyclosporin A effects during primary and secondary activation of human umbilical cord blood T lymphocytes. *Exp Hematol*, **29** : 903-909, 2001.
 - 20) Coopa MA, Fehninger TA, Caligiuri MA. : The biology of human natural killer-cell subsets. *Trend in Immunology*, **22** : 633-640, 2002
 - 21) Wing K, Ekmark A, Karlsson H, et al : Characterization of human CD25⁺CD4⁺T cells in thymus, cord and adult blood. *Immunology*, **106** : 190-199, 2002
 - 22) Rainsford E, Reen DJ. : Interleukin 10, produced in abundance by human newborn T cells, may be the regulator of increased tolerance associated with cord blood stem cell transplantation. *Br J Haematol*, **116** : 702-709, 2002.
 - 23) Keever CA, Abu-Hajir M, Graf W, et al : Characterization of the alloreactivity and anti-leukemia reactivity of cord mononuclear cells. *Bone Marrow Transplant*, **15** : 407-419, 1995.
 - 24) Gardiner CM, O'Meara A, Reen DJ. : Differential cytotoxicity of cord blood and bone marrow-derived natural killer cells. *Blood*, **91** : 207-213, 1998.

CXCR3 Expression on Cord Blood CD4⁺T Cells and NK Cells

Tatsuo Tsuboi¹⁾, Kenichi Sugita¹⁾, Hiroshi Watanabe²⁾, Mitsuoki Eguchi¹⁾

¹⁾ *Department of Pediatrics, Dokkyo University School of Medicine*

²⁾ *Department of Obstetrics & Gynecology, Dokkyo University School of Medicine*

In order to know why the development of acute graft-versus-host-disease (aGVHD) is significantly milder after stem cell transplantation (SCT) using cord blood, we studied the CXCR3 expression on CD4⁺T cells and NK (CD56⁺) cells, based on the fact that CXCR3 is one of the chemokine receptors on Th1 cells. Cord blood (CB) and peripheral blood (PB) from healthy volunteers and patients who received SCT were treated with monoclonal antibodies against CD4, CD25, CD56, CXCR3, and HLA-DR and the antigen expression was analyzed using flow cytometry. The percentage of CXCR3 antigen on CB and PB CD4⁺T cells was $2.6 \pm 1.4\%$ and $30.8 \pm 3.9\%$, respectively, demonstrating a significant difference ($p < 0.05$). However, that on CB and PB NK cells

was not significantly different. CXCR3 expression on CB and PB CD4⁺T cells stimulated by IL-2 for 72h and 120h was significantly different ($p < 0.05$), but that on NK cells was not significant. CXCR3 expression on CD4⁺T cells from patients who received allo-CB-SCT and allo-bone marrow transplantation from HLA-mismatched donor was significantly different at one-month post-SCT ($p < 0.05$). We concluded that the lower CXCR3 expression on CB CD4⁺T cells and absence of difference in CXCR3 expression on cord blood NK cells facilitated a milder aGVHD.

Key Words : CXCR3, CD4⁺T cell, Cord Blood, Stem Cell Transplantation, acute graft-versus-host-disease (aGVHD)