



成人T細胞白血病細胞およびHTLV-1感染細胞株におけるウイルス関連抗原の局在について

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 金, 芬香 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/991

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 138号	学位授与年月日	平成 5年 3月26日
氏 名	金 芬 香		
論文題目	成人 T細胞白血病細胞および HTLV-1 感染細胞株におけるウイルス 関連抗原の局在について		

医学博士 金 芬 香

論文題目

成人T細胞白血病細胞およびHTLV-1感染細胞株におけるウイルス関連抗原の局在について

論文の内容の要旨

研究の目的：

成人T細胞白血病 (adult T cell leukemia, ATL) は日本で発見され記載された疾患である。ATL患者が human T-cell lymphotropic virus-type 1 (HTLV-1) に対する抗体を保有し、腫瘍細胞からHTLV-1のプロウイルス DNA が検出されることから、HTLV-1 が ATL発症の重大な一因子であると考えられる。さらに HTLV-1 関連症候群の存在も明らかになってきた。HTLV-1 の感染により腫瘍化したT細胞は、細胞増殖因子である interleukin-2 に対するレセプターを持続的に発現しており、ATL における腫瘍化の一つの機序として注目されている。今回の研究は、種々の疾患と関連性が注目されている HTLV-1 抗原の細胞内外での発現様式を知ると同時に、in vivo における ATL細胞の性状と、in vitro の ATL細胞や樹立ATL細胞株の性状の差異をウイルス抗原の発現の点から明らかにした。

材料と方法：

急性型のATL患者の末梢血からリンパ球を分離し、約3ヶ月培養後に細胞株を樹立した。HTLV-1感染細胞株の代表として35T^o、EDを用いた。私達の研究室で作製したP19およびP24に対する単クローン性抗体と抗HTLV-1抗体を持つATL患者血清により、ヒト抗HTLV-1抗体を精製した。これらの抗体を用いて、HTLV-1感染細胞株およびATL患者から得たリンパ球の細胞塗沫標本に蛍光抗体間接法を施行した。さらに、Western blot法で反応する抗原の分子量を測定した。免疫電顕法では、ATL細胞株のクリオスタット切片を作製し、P19、P24に対する単クローン性抗体を用いて、ATL細胞株におけるHTLV-1抗原の局在を観察した。また、レトロウイルスの発現を亢進させることが知られている5-iodo-2'-deoxyuridine (IdUrd) を培養に添加し、HTLV-1抗原の発現を調べた。

結 果：

Western blot法による解析では、多クローン性ヒト抗HTLV-1抗体はP19、24、28、37、52などに対する抗体が含まれていた。ATL患者から分離した新鮮リンパ球では、ATLに特徴的とされる花弁状の核を持つ異型細胞が認められた。多クローン性および単クローン性抗体を用いて検査した結果では、ウイルス抗原陽性所見は見出せなかった。しかし、3-7日間培養すると、P19およびP24抗原は3-5%の細胞の膜上に点状に見られた。ヒト抗HTLV-1抗体では細胞膜および細胞質にび慢性の蛍光が認められ、陽性細胞数は約10%へと増加した。一方、樹立されたHTLV-1感染株35T^oは大型細胞で、95%以上がP19とP24抗原陽性であった。ED株の95%は活性化リンパ球と同じくらいの大きさで、その中の10%の細胞がウイルス抗原陽性であった。残る5%のED細胞は35T^o細胞と同様95%がP19、P24抗原陽性であった。免疫電顕ではP19とP24抗原はウイルス粒子のcoreに一致して認められた。IdUrdを添加したATL細胞培養では、細胞増殖は抑えられるが、個々の細胞でのウイルス産生は亢進した。

考 察：

ATL患者およびHTLV-1キャリアは、主に gag と env 遺伝子の産物、すなわちP19、P24、28、37、53などに対する抗体を保有する。P19とP24はともにHTLV-1粒子のcoreに存在する最終産物と考えられ、これらに対する単クローン性抗体とヒトの多クローン性抗体を適切に使い分けることによって、HTLV-1の最

終産物であるP19, 24の局在と前駆体の局在を区別できると思われた。

白血病化したATL患者から採取した新鮮なリンパ球にはウイルス抗原の発現は認められないが、3-7日間培養すると、3-5%の細胞にウイルスが出現してきた。in vivoにおけるATL細胞はHTLV-1の産生が抑えられており、かりに発現があったとしてもごくわずかであると考えられる。

IdUrdがレトロウイルスの複製を増加させることはよく知られている。本実験においてもHTLV-1感染細胞にIdUrdを添加することで、細胞増殖は抑制するが、ウイルス抗原の発現は増加した。IdUrdの添加培養は臨床において、HTLV-1抗原の検出率を上げるために利用価値の高い方法である。

今回の実験に用いた2種類のATL細胞株EDと35T^oはともにCD4陽性、IL-2レセプター陽性のHTLV-1感染細胞株であるが、ウイルスの産生という点では大きな差異が認められた。形態的には35T^oは大型で染色体の異常も顕著で(未発表データ)、ATL細胞としてのin vivoの性質は失われていると考えられた。一方、EDは細胞形態および染色体分析からは、短期間の培養ATL細胞に近い性状を有していた。したがって、樹立細胞株を研究に用いる場合、それらの細胞株がどこまで本来の腫瘍細胞の性質を保っているかを明らかにしておく必要がある。

論文審査の結果の要旨

成人T細胞白血病(adult T cell leukemia, ATL)の発症の主要な因子はhuman T cell lymphotropic virus-type 1 (HTLV-1)であるが、HTLV-1ウイルスの感染によりT細胞は、IL-2レセプタを発現しているためIL-2刺激を受けて腫瘍化が進展すると考えられ、その機序が注目されている。本申請者はHTLV-1抗原の細胞内外での発現様式を各種の抗HTLV-1抗体を準備して解析し、in vivoにおけるATL細胞の性状と比較検討した。

審査委員会において申請者によりなされた口頭発表と論文内容について審査した結果、本論文の特徴として次の点があげられた。

1. 材料として用いたリンパ球としては、急性ATL患者末梢血から分離し樹立した細胞株と、HTLV-1感染細胞株(35T^o、ED)を準備し、抗HTLV-1抗体としては、P19とP24単クローン抗体をハイブリドーマ法で作成し特異性の検索をした。

リンパ球におけるHTLV-1抗原の局在は、上記抗体を用いた蛍光抗体間接法とPAP法による免疫電顕法によって検索し、反応抗原の分子量の定量はWestern blot法で測定した。委員会において、本研究で用いられた材料、解析法、判定法等はいずれも本研究目的を追求する上で適切であると判断された。

2. ATL患者から分離した新鮮リンパ球群にはATLに特徴的な異型細胞が含まれたが、ウイルス抗原陽性の所見は見られなかった。しかし3-7日間培養するとP19及びP24抗原陽性細胞が3-5%出現し、HTLV-1抗原陽性細胞も5-10%見いだされた。同時に電顕的にもウイルス粒子が膜表面に確認された。これらの所見から申請者は、in vitroではATL細胞のHTLV-1ウイルス産生がみられるが、in vivoではその産生が抑制されていると主張している。
3. HTLV-1感染株においては、35T^o(大型細胞)は95%以上がED細胞株は約10%が、それぞれP19、P24抗原陽性細胞であった。また、35T^oにおいてP19とP24抗原はウイルス粒子のcoreに一致して検出された。一方、レトロウイルス発現を亢進するIdUrdをATL細胞に添加すると、増殖は抑制されるもののウイルス産生は亢進された。これらの所見から、申請者は35T^oとED細胞株はいずれもCD4陽性、IL-2レセプター陽性のHTLV-1感染細胞株であるが、ウイルス産生の面では違いがみられることを明ら

かにし、これらの細胞株は in vivo における腫瘍細胞とは異なる性質を示している可能性を主張した。

審査委員会において本研究の独創的な点として評価されたところは、HTLV-1抗原に対する各種の抗体を作成することに成功し、これらを適切に使い分けることによってHTLV-1の最終産物のP19、P24の局在と前駆体の局在を解析する方法を確立した点である。また、ATL細胞と感染細胞株はいずれも in vitro と in vivo でその形態、増殖、ウイルス産生の面で異なる性状を示すことを明らかにした点である。

本審査の過程において、申請者に対し次のような質疑がおこなわれた。

1. 細胞の培養条件、とくに添加血清（患者血清等）の検討をおこなったか
2. ATL患者の新鮮リンパ球が培養後にP19、P24抗原陽性化する機構について
3. 抗env クローン抗体を用いて同様の解析をおこなったか
4. CD8⁺ 新鮮 ATL リンパ球が培養後 CD8抗原を消失する理由について
5. HTLV-1感染細胞株樹立の確認方法と、その増殖形式について
6. ATL患者の皮膚生検により皮膚の組織学的検索をおこなったか
7. HTLV-1感染細胞はいかにしてCD4⁺ T細胞に接着し、感染を起こさせるか

以上の質問に対し、申請者はほぼ適切な解答をおこなったので、本論文は博士の（医学）の学位授与に値するものであると審査委員全員で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 山 下 昭

副査 教授 吉 田 孝 人 副査 教授 渡 邊 郁 緒

副査 助教授 梶 村 春 彦 副査 講師 戸 倉 新 樹