

野口雄司(長崎県)昭和33年1月1日生

授与年月日 平成2年3月31日

主論文 HTLV-1感染細胞に対するラット細胞傷害性T細胞はgagおよびenv遺伝子領域で支配される抗原分子を認識する。  
Rat cytotoxic T lymphocytes against human T-lymphotropic virus type-1 infected cells recognize gag gene and env gene encoded antigens

#### 論文内容の要旨

##### 緒言

Human T-lymphotropic virus type 1(HTLV-1)はヒトT細胞性リンパ腫より初めて分離され、ウイルス学的及び生物学的検索により成人T細胞白血病/リンパ腫の発病に極めて重要な因子であることが明らかになった。更にHTLV-1 associated myelopathy やいくつかのHTLV-1関連疾患の存在も示唆されてきている。このように多岐にわたる疾患に関連するHTLV-1に関して、これまで主として液性免疫の解析が進められてきた。その結果はHTLV-1の構成分子の解析およびHTLV-1感染の診断等に大きく貢献してきた。一方、同ウイルスに対する細胞性免疫応答に関連する検討は極めて限られている。しかしウイルス感染細胞の除去に際して、細胞傷害性T細胞(CTL)が液性免疫に比してより重要な役割を持つことが既に多くのウイルスに関して明らかにされて来ている。そこで本研究においては、WKA/Hラット由来HTLV-1感染細胞を用いて同系ラットにおける細胞性免疫応答の詳細な解析、特にCTLの誘導及びその認識抗原の解析をおこなった。

##### 材料及び方法

動物及び細胞: WKA/Hラットは4~8週令の雌を使用した。HTLV-1感染細胞株としてWKA/Hラット由来のTARS-1, TARL-2, TART-1, ヒト由来のMT-2, HUT102, ウサギ由来のRa-1を用いた。

CTLの誘導: WKA/Hラットに $1 \times 10^7$ 個のTARS-1を皮注入すると腫瘤は平均径10mm前後まで増大し約2週間で拒絶される(in vivo感作)。拒絶後1週間以降に脾臓をとりだし、脾細胞 $4 \times 10^6$ /ml、マイ

トマイシンc処理したTARS-1細胞 $4 \times 10^5$ /mlに調整しそれぞれ10mlを培養フラスコに加え、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 下で1週間培養した(in vitro感作)。反応した細胞を回収し、 $^{51}\text{Cr}$ 標識細胞を用いた $^{51}\text{Cr}$ -releassayにて細胞傷害性を検討した。

組みかえワクシニアウイルス感染細胞の作製：被感染細胞として、WKA/Hラット由来及びFisherラット由来の線維肉種細胞株KMT114、FMT-7を使用した。組みかえワクシニアウイルスは、HTLV-1のgag、env、pxをそれぞれ組みこんだWR-proenv-1、WR-gagC、WR-p40を使用した。コントロールとして野生型ワクシニアウイルスWR株を使用した。 $2 \times 10^7$ 個の被感染細胞に $10^2$  pfu/cell以上のワクシニアウイルスを加え、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 下で1時間培養し、十分に細胞を洗った後 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 下で24時間から40時間培養を続けた。組み込まれた各々のHTLV-1領域の遺伝子産物の発現は、それぞれに特異的に反応するモノクローナル抗体で確認した。

### 結果

- 1) TARS-1のin vivo感作あるいはin vitro感作のみではCTLの誘導はできなかった。しかし、TARS-1でin vivo及びin vitro感作の両方を行うと同細胞に強い活性を持つキラー細胞が誘導された。TART-1、TARL-2でも同様であった。
- 2) TARS-1に対して誘導されたキラー細胞は、 $^{51}\text{Cr}$  release assay及びアイソトープ非標識細胞を用いた細胞傷害性阻害試験より、同系HTLV-1感染細胞株TARS-1、TART-1、TARL-2にのみ反応性を示し、異種HTLV-1感染細胞株、同系HTLV-1非感染細胞株及び正常細胞には反応しなかった。このキラー細胞は $\text{CD}3^+$ 、 $\text{CD}5^+$ 、 $\text{CD}8^+$ の表面形質を有し、MHC class I 抗原に拘束性を示すCTLであった。
- 3) in vivo感作にTARS-1を使用し、in vitro感作に異種HTLV-1感染細胞株MT-2、HUT102、Ra-1を用いた場合にも2)に述べたCTLと全く同じ性質を有するCTLが誘導された。in vitro感作時にラット脾細胞よりマクロファージを除くことにより、TARS-1による感作ではCTLが誘導できなかった。
- 4) TARS-1によるin vivo及びin vitro感作で誘導されたCTLの認識抗原を解析するため、組みかえワクシニアウイルス感染によってHTLV-1のgag、env、pxを選択的に発現した同系KMT-114及び同種FMT-7細胞群を作製した。各々の細胞群は導入されたHTLV-1遺伝子領域の産物を発現していた。これらの細胞を用いて、TARS-1に対するCTL活性の阻害し、px遺伝子産物を発現

した細胞は全く阻害しなかった。同種細胞FMT-7はHTLV-1のいずれの遺伝子産物を発現した場合にも阻害活性を示さなかった。阻害の程度および頻度はgag遺伝子産物を発現したKMT114がenv遺伝子産物を発現した細胞よりも高かった。

### 考察及び結論

WKA/Hラット由来のHTLV-1感染細胞株を用いて、同系HTLV-1感染細胞株に特異的なCTLが誘導され、さらに異種HTLV-1感染細胞株をin vitro感作に用いると同様な性質を有するCTLが誘導された。このことはCTLによりWKA/HラットHTLV-1感染細胞株と異種HTLV-1感染細胞株に共通なHTLV-1関連抗原が認識されていることを示唆した。しかし異種HTLV-1感染細胞自身は、ラットCTLに対して直接抗原を提示し得ず、CTLと同一のMHCを有するマクロファージの存在が必要であった。また組みかえワクシニアウイルスを用いることによって、ラット抗HTLV-1CTLはgag及びenv遺伝子産物を共に認識することを明らかにしたが、本システムではgag遺伝子産物がenv遺伝子産物に比してより強くCTLに認識された。この結果を基礎としてさらに詳細な認識抗原の解析を進めることは、HTLV-1感染に対するワクチン開発の免疫生物学的技術基盤としても重要と考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

野口雄司は昭和59年3月長崎大学医学部を卒業、昭和59年5月医師国家試験に合格、同年6月長崎大学医学部附属病院病棟第二内科に入局。2年間の研修後、昭和61年4月長崎大学大学院医学研究科に入学。大学院では病理系を修め、腫瘍生物学を主科目、呼吸器病学を副科目、細胞遺伝学を選択科目とし、平成2年3月までに所定の単位を修得した。この間長崎大学医学部腫瘍医学教室珠玖洋教授のもと学位論文「Rat cytotoxic T lymphocytes against human T-lymphotropic virus type 1-infected cells recognize gag gene and env gene encoded antigens」を完成、Journal of Immunologyに投稿し、これを主論文とし、その他参考論文1編を附して、長崎大学院医学研究科委員に学位申請した。平成2年3月7日、同委員会は上記論文内容の要旨を検討、研究経歴などを審査し、受理を決定後、上記3名の審査委員を選定。同委員らは主査を中心として慎重に審査し、平成2年4月11日の大学院研究発表会にて同都学位論文発表、質疑に回答した。同日の定例大学院医学研究科委員会でその結果を併せて報告した。

主論文は、WKA/HラットHTLV-1感染細胞株TARS-1、TART-1、TARL-2を用いて、同系WKA/H

Hラットにおける HTLV-1 感染細胞株に対する細胞性免疫の解析を目的としたものである。特に, HTLV-1 感染細胞株に対する細胞障害 T 細胞 (CTL) の誘導およびその認識抗原の解析を検討したものであり, 要旨は以下のごとくである。

TARS-1, TART-1/TARL-2 をそれぞれ *in vivo* 及び *in vitro* 感作した場合にのみ, killer 細胞の誘導が可能であり, TARS-1 の場合に最も障害性の強い killer 細胞が誘導された。(以下の実験はすべて TARS-1 を使用した)。誘導される killer 細胞は CD3<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> の CTL であり, MHC class I 抗原に拘束され, 同系 HTLV-1 感染細胞株に特異的であった。さらに *in vivo* 感作に TARS-1, *in vitro* 感作に異種 HTLV-1 感染細胞株を使用した時にも上記同様の性質を有する CTL が誘導可能であった。このことは *in vitro* 感作で CTL が誘導される際, TARS-1 を含めた HTLV-1 感染細胞株に共通な抗原が必要であることが示唆された。しかし異種 HTLV-1 感染細胞株を *in vitro* 感作に使用する場合, マクロファージを除くと CTL の誘導はできなかった。つまり異種 HTLV-1 感染細胞株による有効な *in vivo* 感作にはマクロファージを含めた抗原提示細胞の存在が必要であることが示唆された。さらに *in vivo* 及び *in vitro* 感作に TARS-1 を使用して誘導される CTL の認識抗原の解析のために, WKA/H ラット由来 HTLV-1 感染細胞株 KMT-114 に HTLV-1 の gag, env, p40 を code する遺伝子を含んだ組みかえワクシニアウイルスを感染させ, それぞれの遺伝子産物を選択に発現させた。KMT-114 における HTLV-1 の遺伝子産物の発現はそれぞれの抗原に対するモノクローナル抗体で確認した後, cold target cell inhibition test の inhibitor として使用した。gag 遺伝子産物を発現した KMT-114 は 7 回の実験中 7 回 CTL 活性を抑制した。その抑制の程度も TARS-1 と同程度であった。env 遺伝子産物を発現した KMT-114 は 7 回の実験中 2 回 CTL 活性を抑制したが, 抑制の程度は TARS-1 よりもかなり弱かった。また p40 を発現した KMT-114 は全く CTL 活性を抑制しなかった。つまり我々の系においては HTLV-1 感染細胞株に対する CTL は env 遺伝子産物よりも gag 遺伝子産物を主に認識していたことが示された。

本研究は HTLV-1 感染細胞株に対する CTL の誘導の検討に加え, 初めてその認識抗原を解明したという点で画期的なものである。本研究の成果が今後様々な生物学分野, 医学分野に与える影響は大きく, その研究成果は高く評価されるものと考えられる。

医学研究科委員会は審査員の報告に基づいて, これを討論に付して審査した結果学位に値するものとして合格とした。

審査担当者	主査	教授	宮本	勉
	副査	教授	五十嵐	章
	副査	教授	矢野	明彦