

長井一浩 論文内容の要旨

主 論 文

Adhesion-dependent growth of primary adult T cell leukemia cells with down-regulation of HTLV-1 p40Tax protein: a novel in vitro model of the growth of acute ATL cells.

ヒト成人 T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) 由来 p40Tax 蛋白の発現抑制を伴う成人 T 細胞白血病 (ATL) 細胞の接着依存性増殖：急性 ATL 細胞の新規 in vitro 増殖モデル

〔共著者〕陣内逸郎、波多智子、臼井哲也、佐々木大介、塚崎邦弘、菅原和行、菱川善隆、山田恭暉、田中勇悦、小路武彦、間野博行、上平 憲、朝長万左男

(International Journal of Hematology • 88 巻 5 号 551—564 頁 2008 年)

長崎大学大学院医学研究科 専攻
(指導教授：朝長万左男教授)

【緒言】成人 T 細胞白血病 (ATL) の発症機構に関しては、特にその病因とされる Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) とヒト遺伝子との相互作用機構をはじめ、分子レベルの知見が集積されてきた。しかし、本疾患の臨床病態の多様性や ATL 細胞の増殖機構については未解明の部分も依然多い。われわれは、ATL の生物学的特性を明らかにするために、その生体内増殖モデルとなる in vitro 増殖系の確立を目指した。

【対象と方法】ATL 症例より樹立した細胞株および臨床検体より得られた ATL 細胞を、造血細胞を長期に亘って in vitro で支持し得ることが知られているマウス骨髄間質細胞株 MS-5 のフィーダー層と、20% ウシ胎仔血清含有 RPMI 培地にて共培養した。定期的に培地交換を行いながら、増殖動態を位相差顕微鏡下に連日観察した。

増殖した細胞は、培地内に於いて直接ギムザ染色を施し形態学的観察を行った。更に、免疫細胞化学染色による形質解析及び HTLV-1 関連蛋白発現解析や in situ hybridization 法による HTLV-1 関連蛋白遺伝子発現解析を実施した。増殖細胞を培地より分離、核酸を抽出した上で、サザン・ブロット法による HTLV-1 プロウイルスの組み込み解析、HTLV-1 関連遺伝子 (Tax, HBZ) 発現解析を行った。更に、オリゴヌクレオチド・マイクロアレイ解析によって、共培養系における増殖細胞の遺伝子発現プロファイリングを実施した。

【結果】ATL 細胞は、細胞株及び臨床検体由来細胞共に、IL-2 非添加でフィーダー層

に接着した状態で増殖して cobblestone area (CA) を形成した。細胞株では、IL-2 非依存性 (MT-2 等) のみならず、依存性 (ST-1 等) のものも増殖可能であった。臨床検体由来細胞は、培養開始後 10-14 日の間に CA を形成し、その後も最長 4 週にわたり増殖を維持した。CA を構成する細胞は、CD4 陽性 CD25 陽性といった免疫学的形質より ATL 細胞であることが確認された。急性型及びリンパ腫型 ATL 細胞 10 例中 8 例 (80.0%) で CA 形成を認めた。一方、慢性型やくすぶり型由来の細胞では増殖を認めなかった。一部症例で実施した HTLV-1 プロウイルス組み込み解析結果より、元の臨床細胞と同一クローンであることを証明した。マイクロポア・メンブレンを培地に挿入することで標的 ATL 細胞とフィーダー層の接着を阻害した状態では、ATL 細胞の増殖を認めないことから、この増殖が接着依存性であることが示された。また、コラーゲンゲル半固形培地を用いて観察した結果より、標的細胞数と CA 数間に直線性の相関を認め、この CA 形成細胞 (CA forming cell: CAFC) 頻度は、急性型・リンパ腫型において 0.03-1.04% であった。

共培養系で増殖する ATL 細胞の Tax 遺伝子発現について、蛋白及び mRNA レベルで *in situ* 解析を実施したところ、検討した 4 例の臨床検体の全てにおいて明らかな低下を認めた。一方、増殖細胞より RNA を抽出し得た細胞株 (MT-2、HUT-102) において、Tax 及び HBZ 遺伝子 mRNA の定量解析を実施したところ、液体培養状態や接着阻害状態の同細胞と比較して、Tax mRNA の低下を認める一方で、HBZ mRNA の発現に関しては同等と言う結果が得られた。

CA 形成細胞から十分な全 RNA を抽出し得た臨床症例由来の 3 例について、元の検体細胞との間で、マイクロアレイ解析による遺伝子発現プロファイルと比較検討した。その結果、前者に於いて発現が亢進ないしは抑制していると考えられる候補遺伝子を各々 110 および 98 個選択し得た。この中でインテグリン・ファミリー等リンパ球系における既知の接着分子群の発現の差異については明らかではなかった。一方、定量 RT-PCR による上記候補遺伝子の評価の結果、腫瘍細胞の増殖、生存、浸潤、接着等を制御する事が知られている 8 遺伝子 (CDH11、Twist、HBP1 等) が同定された。

【考察】我々が樹立した共培養系で増殖する ATL 細胞の HTLV-1 関連遺伝子発現 (特に Tax の低下及び HBZ の発現維持) は、臨床細胞におけるパターンと同様であり、それらのヒト分子との相互作用に鑑みれば、本培養系は、*in vivo* と同様の分子病態を反映する ATL 細胞を *in vitro* で増殖させることを可能にするものと考えられる。また、CA の定量解析より CAFC が ATL の腫瘍性前駆細胞である可能性が示唆され、更に接着依存性増殖に特有の遺伝子発現プロファイルが認められたことから、本培養系は ATL 腫瘍細胞の階層性や微小環境との相互作用を解析するモデルとなり得ると共に、新規治療薬の *in vitro* アッセイ系として有用であると考えられる。