

学位論文題名

HTLV-II env 蛋白の作成とそれによる感染抑制効果

学位論文内容の要旨

Human T cell lymphotropic virus type II (HTLV-II) は HTLV-I と塩基配列上高い相同性を有し、抗原性も交叉する。HTLV-I が ATL, HAM などとの病因的関連性が明かにされているのに対し、HTLV-II は HAM 様疾患や LGL leukemia などとの関連性が報告されているものの、病因的関与及び感染病理は未だ十分に解明されていない。本研究では中和活性を担う抗体を同定することを目的とし、今回新に開発したバキュロウイルスによる HTLV-II env 蛋白 gp63 発現系を用いて家兎の能動免疫を行い、HTLV-II 感染防御効果につき検討した。

材料と方法

1. 細胞 HTLV-II 感染細胞として HTLV-II 持続感染者より樹立された HTLV-II トランスフォーム細胞株 Vines 及び hairy cell leukemia 患者より樹立された腫瘍細胞株で 90% 以上の細胞にウイルス産生が見られることが知られている Mo-T を用いた。合胞体形成効果の検出には HTLV-II 産生細胞と合胞体を形成することが知られている B 細胞株 BJAB を用いた。

2. Sf-9 Insect Cell による env 蛋白の発現 env 領域全域 (5,180~6,643) の 1,464bp を PCR にてバキュロウイルスの transform vector pVL1392 の BamH I site に挿入し、Sf-9 cell にコトランスフェクションし、env 発現 Sf-9 cell を得た。

3. Recombinant gp63 による家兎の免疫と実験的 HTLV-II 感染 家兎 (New Zealand White 2.5Kg) 4羽 (Ra-1, Ra-2, Ra-3, Ra-4) を用いた。recombinant gp63 による家兎の免疫は、2羽の家兎 (Ra-3, Ra-4) につきそれぞれ上記 gp63 発現 Sf-9 cell 5×10^6 個を PBS 1ml に懸濁したものと Freund adjuvant 1ml の混合液を週 1 回の割合で 4 回筋注により行った。HTLV-II 感染は上記免疫家兎 2 羽に加え、対照群として非免疫家兎 2 羽 (Ra-1, Ra-2) の計 4 羽につき、それぞれ HTLV-II 感染細胞株 Vines 細胞 1.0×10^7 個の耳静脈投与 1 回により行い、継時的に採血して Ficoll Conray 法によりリンパ球と血清を分離・採取した。

4. PCR 法による HTLV-II ゲノムの増幅 HTLV-II 遺伝子中、保存性の高い env 領域内の 631bp を増幅する目的で、プライマー対 E1 (6031~6051), E2 (6641~6661) を用いた。さらに Nested PCR を用いた E1/E2 領域内 411bp の増幅を行う目的で E1/E2 の内側にプライマー対 EN1 (6099~6118), EN2 (6490~6509) を作成し、35 サイクルの増幅をそれぞれ行った。

5. 特異的増幅産物の検出 PCR 増幅産物を 1% アガロースゲルにて電気泳動後、ナイロン膜に転写し Southern blot 法により検出を行った。

6. HTLV-II 特異的抗体の検出 家兎血清中の特異的抗体は、以下の 3 方法で検出した。

1. Particle Agglutination (PA) 法 HTLV-II と HTLV-I が抗原的に交叉することから、セロディア HTLV-I キット (FUJIREBIO INC) をもちいて PA 法で抗体価の測定を行った。
2. Western blot 法 プロブロット HTLV-I (HTLV-I 特異抗体検出キット: FUJIREBIO INC) を用いて各 HTLV-II 蛋白に対する特異抗体を検出した。
3. HTLV-II recombinant gp46 蛋白を用いた Western blot 法 HTLV-II env gp46 (5,180~6,103) を pGEX-2T ベクターに挿入大腸菌 JM109 で大量培養後 GST-gp46 を回収し、SDS-PAGE よりニトロセルロース膜に転写後抗 gp46 抗体検出のストリップ膜として作成した。

結果と考察

1. **Sf-9 Insect cellにおけるrecombinant gp63蛋白の発現** HTLV-II env 発現 Sf-9 cell をニトロセルロース膜に転写後ヒトHTLV-IIキャリアー血清でWestern blot法で調べたところ、Sf-9細胞膜上にgp63(63Kd)の発現が見られたのに対し、このバンドは非キャリアー血清では検出されなかった。またenv非発現Sf-9 cellにおいても陰性であった。
2. **Recombinant gp63免疫家兎におけるHTLV-II特異的血清抗体** env蛋白で免疫した1週間後の家兎(Ra-3, Ra-4)血清をrecombinant HTLV-II gp46蛋白を用いたWestern blot法により検討したところ、両家兎血清とも所定の分子量に特異的バンドが得られ抗HTLV-II gp46特異的抗体を保有することが確認された。一方免疫前血清にはgp46と反応する抗体は見いだされなかった。また、プロブロットHTLV-I法の結果、本免疫血清はenv蛋白gp46のみと特異的に反応しgag蛋白p24との反応は見られなかった。本免疫血清を用いてHTLV-II感染細胞塗沫標本を蛍光抗体法により染色した結果、Vines, Mo-T細胞はともに100%の細胞が染色されHTLV-IおよびHTLV-II非感染T細胞CEM, Molt-4は全く染色されなかった。
3. **免疫家兎血清によるHTLV-II細胞の合胞体形成抑制** HTLV-II産生細胞は、B細胞株BJABと融合し合胞体を形成することが知られている。上記血清を用いてVines及びMo-T細胞表面のHTLV-II env蛋白発現をflow cytometryで検討した結果、両細胞にenv蛋白が表出しており特にVines細胞で高い発現が見られた。又、BJABとの混合培養により、Vines細胞はMo-T細胞と比較して約3倍の頻度で合胞体を形成した。そこでVines細胞を用いて合胞体形成が上記抗env免疫血清で阻止されるか否かを検討したところ濃度依存性に合胞体形成を抑制した。
4. **家兎に対するHTLV-II感染実験と特異抗体の推移** recombinant env蛋白により免疫した家兎(Ra-3, 4)及び非免疫家兎(Ra-1, 2)に対し、Vines細胞接種によりHTLV-II感染を試み、特異的血清抗体の推移を検討した。PA法では非免疫家兎ではVines細胞接種2週目に抗体の出現を認めた後、抗体価は上昇傾向を示したが、免疫家兎では、Vines細胞接種後に抗体価が軽度上昇したものの、6週目以降低下する傾向が見られた。GST-gp46を用いたHTLV-II env特異的蛋白によるWestern blot法でも非免疫家兎では2週目に弱いバンドが出現し4週以降10週目迄強いバンドを維持した。又プロブロットHTLV-I法によりenv蛋白gp46及びgag蛋白p24の推移をみたところ非免疫家兎ではVines細胞接種後4週目で2羽中2羽抗gp46抗体が検出され、6週目以降では2羽中1羽に更に抗p24抗体が検出されたが、免疫家兎では全観察期間を通じて抗gp46抗体のみが検出可能でありしかも2週目以降徐々に弱くなる傾向を認めた。
5. **Vines細胞接種家兎におけるHTLV-II DNAの検出** Vines細胞接種によりHTLV-II感染を試みた免疫及び非免疫家兎につき、末梢血リンパ球におけるHTLV-II DNAの有無をPCR法により継時的に検討した。非免疫家兎(Ra-1, 2)ではそれぞれ4、及び2週目より検出可能となり、以後12週間の観察期間を通じてHTLV-II DNAが検出された。但しHTLV-II DNAはそれぞれ12、8週目以降Nested PCRのみにて検出可能となりこの時期を境にHTLV-II DNA量の減少が窺われた。一方、免疫家兎(Ra-3, 4)においては10週間の観察期間を通じて、HTLV-II DNAは検出されなかった。以上の結果より、Vines細胞投与によるHTLV-II感染家兎モデル作成とenv蛋白の能動免疫による感染予防の可能性が示唆された。今回感染モデルと免疫モデルが各2例と少なく今後多数例での検討が必要であるが、この研究はHTLV-IIに対する能動免疫成立の可能性を初めて示したものであり、今後のHTLV-II研究を進める基礎になるものと思われた。

結語

HTLV-II env 領域の機能を解析するため recombinant env 蛋白を作成して検討し、次の結果が得られた。

1. バキュロウイルスベクターを用いて作成したrecombinant HTLV-II gp63 env蛋白がHTLV-IIキャリアーヒト血清にて認識されることを確認した。
2. Recombinant env蛋白で家兎を免疫し、血清中にHTLV-II env特異的抗体の出現を認めた。
3. 家兎抗env血清は、HTLV-II産生細胞VinesとB細胞株BJABとの融合による合胞体形成を濃度依存性に抑制した。
4. 家兎にVines細胞を接種しHTLV-II感染を試みた結果、HTLV-IIプロウイルスDNAが持続的に検出され、recombinant env蛋白による能動免疫でこの持続が抑制される可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 大 里 外 譽 郎

学 位 論 文 題 名

HTLV-II env 蛋白の作成とそれによる感染抑制効果

HTLV-IIは特定の疾患との病因的関与及び感染病理は未だ十分に解明されていない。本研究では中和活性を担う抗体を同定することを目的とし、今回新に開発したSf-9・バキュロウイルスによるHTLV-II env 蛋白 gp63発現系を用いて家兎の能動免疫を行い、HTLV-II感染防御効果につき検討した。

材料と方法

- 1.細胞 HTLV-II感染細胞としてHTLV-II持続感染者より樹立されたHTLV-IIトランスフォーム細胞株Vines及びhairy cell leukemia患者より樹立確立されたMo-Tを用いた。
- 2.Sf-9 Insect Cell によるenv蛋白の発現 env領域全域の1,464bpをPCRにて増幅後バキュロウイルスのtransform vector pVL1392のBamH I siteに挿入し、Sf-9 cellとコトランスフェクションし、env発現Sf-9 cellを得た。
- 3.recombinant gp63による家兎の免疫と実験的HTLV-II感染 家兎の免疫は、2羽の家兎(Ra-3,4)につきそれぞれ上記gp63発現Sf-9 cellとFreund's adjuvantの混合液を週1回の割合で4回筋注により行った。HTLV-II感染は上記免疫家兎に加え、対照群として非免疫家兎2羽(Ra-1,2)の計4羽につき、それぞれHTLV-II感染細胞株Vines細胞 1.0×10^7 個を耳静脈投与1回により行い、継時的にリンパ球と血清を分離採取した。
- 4.PCR法によるHTLV-IIゲノムの増幅 HTLV-II遺伝子中、保存性の高いenv領域内の631bp(6,031~6,661)をPCRで増幅後、その内側411bp(6,099~6,509)をNested PCRで増幅し、Southern blot法で特異性を確認した。
- 5.HTLV-II特異的抗体の検出 家兎血清中の特異的抗体は、Particle Agglutination (PA)法 (セロディアHTLV-Iキット)、プロブロットHTLV-I法 (HTLV-I特異抗体検出キット)を用いた。HTLV-II recombinant gp46蛋白を用いたWestern blot法にはHTLV-II env gp46を大腸菌にて発現しニトロセルロース膜に転写したものを作成して用いた。

結果と考察

- 1.Sf-9 Insect cellにおけるrecombinant gp63蛋白の発現 HTLV-II env 発現Sf-9 cellをニトロセルロース膜に転写後ヒトHTLV-IIキャリアー血清でWestern blot法で調べたところSF-9細胞膜上にgp63(63Kd)の発現が確認された。
- 2.recombinant gp63免疫家兎におけるHTLV-II特異的血清抗体 env蛋白で免疫した家兎(Ra-3,4)血清にはHTLV-II gp46蛋白に特異的バンドが得られ抗HTLV-II gp46特異的抗体が確認された。本免疫血清を用いたHTLV-II感染細胞塗沫標本でVines, Mo-T細胞はともに100%の細胞が染色された。
- 3.免疫家兎血清によるHTLV-II細胞の合胞体形成抑制 上記血清を用いてVines及びMo-T細胞表面のHTLV-II env蛋白発現をflow cytometryで検討した結果両細胞にenv蛋白が表出しており特にVines細胞で高い発現が見られた。また上記抗env免疫血清は濃度

依存性にVines細胞の合胞体形成を抑制した。

4. 家兎に対するHTLV-II感染実験と特異抗体の推移 PA法で非免疫家兎(Ra-1, 2)ではVines細胞接種2週目に抗体の出現を認めた後、抗体価は上昇傾向を示したが、免疫家兎(Ra-3, 4)では、接種後に抗体価が軽度上昇したものの、6週目以降低下する傾向が見られた。非免疫家兎では接種後4週目で2羽中2羽に抗gp46抗体が検出され、6週目以降では2羽中1羽に更に抗p24抗体が検出された。免疫家兎では全観察期間を通じて抗gp46抗体のみが検出可能でありしかも2週目以降徐々に弱くなる傾向を認めた。

5. Vines細胞接種家兎におけるHTLV-II DNAの検出 Vines細胞接種後HTLV-II DNAの存在の有無をPCR法により継時的に検討した結果、非免疫家兎(Ra-1, 2)ではそれぞれ4週目及び2週目より検出可能となり以後12週間の観察期間を通じてHTLV-II DNAが検出された。しかし、免疫家兎(Ra-3, 4)においては10週間の観察期間を通じて、HTLV-II DNAは検出されなかった。以上の結果は、Vines細胞投与によるHTLV-II感染家兎モデルとenv蛋白の能動免疫による感染予防の可能性が示唆された。

以上本研究は、新しく作成したrecombinant HTLV-II env蛋白による能動免疫によるHTLV-II感染抑制の可能性を初めて示したものといえHTLV-II感染機構の解明に寄与したものであり、よって博士(医学)の学位授与に充分値するものと判定された。