



# 論文内容要旨

## 【序 論】

正常T細胞は抗原刺激により活性化される。活性化T細胞はIL-2を産生し、またIL-2レセプター(IL-2R)を発現し、IL-2依存性に増殖する。このようにIL-2/IL-2R系はT細胞の主要な増殖機構である。一方、成人T細胞白血病ウイルス(HTLV-I)に感染したT細胞はIL-2Rを例外なく発現する。このIL-2R発現がHTLV-IのpX遺伝子産物によって支配されていることが明らかにされた。従ってHTLV-Iによる細胞癌化機構においてIL-2Rが重要な役割を担っていると考えられる。これらT細胞増殖機構あるいはHTLV-Iによる細胞腫瘍化機構を究明するためにはIL-2Rからの増殖シグナル伝達機構の解析が必要と思われる。

TPAやPDBuなどのホルボールエステルは腫瘍プロモーターであるが、近年これらのホルボールエステルはCキナーゼの活性化剤であることがわかった。マウスT細胞はTPAによって一時的に増殖し、またこれらの細胞ではIL-2によってCキナーゼが活性化されると報告されている。本研究では、IL-2Rからの増殖シグナル伝達にCキナーゼが関与しているかどうかを検討するために、HTLV-Iが感染したIL-2依存性増殖T細胞株よりTPA依存性に増殖するT細胞株の分離を試みた。

## 【結論と考察】

成人T細胞白血病患者の末梢血よりHTLV-Iに感染したIL-2依存性増殖T細胞株を5株樹立した。これらの細胞株は一時的にTPAによって増殖促進された。これら細胞株の中からILT-Mat細胞株を選び以下の実験に用いた。96ウェルプレートを用い、ILT-Mat細胞をウェル当り $1 \times 10^4$ 個植えつけ81nMTPA存在下で3週間培養した。約80%のウェルで細胞が増殖しているのが観察された。その中の1ウェルからTPA依存性増殖細胞株TPA-Matが樹立された。TPA-Mat細胞と親ILT-Mat細胞のDNAをT細胞受容体・ $\beta$ 鎖とHTLV-I・pX領域遺伝子をプローブとしてサザンブロットハイブリダイゼーション法により比較したところ、TPA-MatはILT-Matと同一クローン由来であることがわかった。TPA-MatはTPAもしくはIL-2の存在下で増殖し、その2分裂時間は約24時間であった。一方、親ILT-Mat細胞はIL-2に依存して増殖するがTPAの存在下では6日間で死滅してしまう。TPA-MatはCキナーゼを活性化する他のホルボールエステル、PDBu、 $4\beta$ -PDDによっても増殖するが、Cキナーゼを活性化しないホルボールエステル、 $4\alpha$ -PDD、 $4-O$ -メチルTPA、

4- $\beta$ ホルボールでは増殖しない。またホルボールエステル以外のCキナーゼ活性化剤であるテレオシジン、アプリアトキシン、メゼレインによっても増殖した。これらの知見はCキナーゼ活性化がTPA-Matの増殖に深く関わっていることを示唆している。

次にTPA-MatがIL-2を産生しているかどうかを検討した。中和活性のある抗IL-2単クローン抗体の存在下でTPA-Matを培養したところTPA依存性増殖は阻害されなかったが、IL-2依存性増殖は完全に阻害された。またTPA-Matの培養上清にIL-2活性は認められなかった。以上の結果からTPA-MatはIL-2産生を介して増殖しているのではないことが明らかとなった。従って、TPA-Mat細胞においてホルボールエステルは細胞内の増殖シグナル伝達に直接関与していると考えられる。

次にTPA-Mat細胞中のCキナーゼ活性を測定した。PDBu存在下ではTPA-Mat細胞中にCキナーゼ活性はほとんど検出されないが、培地からPDBuを除くと少なくとも1時間後からCキナーゼが顕著に検出された。さらにCキナーゼ $\beta$ 遺伝子のmRNAはPDBuの存在、非存在にかかわらず検出された。細胞中のCキナーゼはTPAやPDBuで活性化された後、短時間で分解されることが知られていることから、TPA-Mat細胞でもPDBuによって活性化されたCキナーゼはただちに分解されると考えられる。またこのことは、CキナーゼのmRNAの発現からも推察される。

TPA-Mat細胞はIL-2に代ってTPAで増殖し、TPAとIL-2は相加的に増殖を促進する。またIL-2によりCキナーゼが活性化される報告もあることからIL-2のシグナルにCキナーゼが関与している可能性が示唆される。しかしながら、最近、TPA-Mat細胞のTPAによる増殖はcAMPによって阻害されるにもかかわらず、IL-2による増殖は阻害されないことを見出した。以上の観察から考えられることは、IL-2による増殖シグナル伝達経路は単一ではなく、少なくとも2つの経路が存在する可能性である。1つはcAMP感受性でCキナーゼ活性化を介する経路であり、他の1つはcAMP非感受性でCキナーゼ活性化を介さない経路である。TPA-Mat細胞を用いて、IL-2依存性増殖とTPA依存性増殖を比較することにより、T細胞の増殖シグナル伝達機構がさらに明らかにされるものと考えられる。

## 審査結果の要旨

インターロイキン2 (IL-2) はT細胞の増殖因子であり、その作用は細胞表面の特異的レセプター (IL-2R) によって担われている。しかし、IL-2 がIL-2R に結合後どのような増殖シグナル伝達機構を有しているのかは全く不明である。IL-2 によるT細胞増殖機構を明らかにすることは、免疫応答系を理解する上からも、またT細胞腫瘍化機構を解明する上からも、重要である。

本研究では、ヒトIL-2 依存性細胞株 (ILT-Mat) を用いて、従来種々の細胞で増殖シグナル伝達に関与することが示唆されているCキナーゼとIL-2 依存性増殖シグナルとの関係を調べた。その結果、ILT-Mat細胞がCキナーゼ活性化剤であるTPAやPDBu等のフォルボールエステルによって増殖維持され、ILT-Mat細胞からTPA (PDBu) 依存性増殖細胞株 (TPA-Mat) が樹立された。TPA-Mat細胞の性状解析から、TPA-Mat細胞はTPA、PDBuばかりではなくCキナーゼ活性化剤として知られている非フォルボールエステル系腫瘍プロモーターによっても増殖維持されること、また自分自身ではIL-2 産生能が全くないことが明らかになった。これらの結果からTPA-Mat細胞はTPAによって細胞内のCキナーゼが活性化されることにより増殖シグナルが伝達され、増殖していることが示唆された。一方このTPA-Mat細胞株はIL-2 によっても増殖することから、TPA-Mat細胞でのIL-2 による増殖シグナル伝達系にCキナーゼが係わっている可能性も考えられる。このようにTPA-Mat細胞はIL-2 /IL-2R系の増殖機構の解析においてばかりではなく、シグナル伝達機構におけるCキナーゼの役割を解明する上でも貴重な実験材料となり得る。

以上の研究成果から、本研究は学位授与に値するものである。