

氏 名（本籍）	まつ 松	たに 谷	たか 隆	し 治
学位の種類	博 士（医 学）			
学位記番号	医 第 3 1 6 4 号			
学位授与年月日	平 成 11 年 3 月 3 日			
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 2 項該当			
最終学歴	平 成 4 年 3 月 31 日 大阪府立大学大学院農学研究科農芸化学 専攻修了			
学位論文題目	Development of new methods for detection of leukemia cell and analysis of T cell receptor repertoires. (新しい白血病細胞の検出法と T 細胞レセプター レパトア解析法の開発)			
	(主 査)			
論文審査委員	教授 伊 藤 恒 敏	教授 里 見 進		
	教授 土 屋 滋			

# 論 文 内 容 要 旨

## 【目 的】

T細胞は、T細胞受容体（TCR）による抗原認識を通して免疫応答での主要な役割を担っており、そのレパトアの解析はT細胞の多様性や特異性を明らかにする重要な方法である。近年、PCRを応用した様々な方法が利用されているにもかかわらず、未だ疾患特異的な抗原の同定や発症機序の解明が十分に進んでいないのは、優れた解析法がないからである。本研究は、多様なTCR遺伝子の均一な増幅を可能にしたAdaptor-ligation mediated PCR（AL-PCR）法を応用して、新しい白血病細胞の検出法とTCRレパトア解析法の開発を行ったものである。さらに、臨床試料を用いてその有用性を示すとともに、健常人個人間のレパトアの差異を明らかにし、遺伝的多様性が与えるレパトアへの影響を調べたものである。

## 【方 法】

Molt-4細胞を健常人末梢血細胞で段階希釈した試料、2例の健常人、8例の白血病患者由来の骨髓および末梢血細胞より全RNAを抽出し、cDNA合成後dsDNAを合成した。TCR遺伝子の5'末端部にアダプターを付加し、そのアダプタープライマーと共通のC領域プライマーとで全てのTCR遺伝子をPCR増幅した。増幅産物を4塩基認識制限酵素（Alu I, Hae III, Rsa I, Sau3A1）で切断し、10%ポリアクリドアミドゲルで電気泳動した（AL-PCR-REA法）。

TCRレパトア解析法（MHA法）に用いる43種のV $\alpha$ 、39種のV $\beta$ 鎖特異的プローブを設計し、諸条件を検討した。5'末端ビオチン化プライマーで標識したTCR遺伝子増幅産物を、96穴マイクロプレートに固相化したプローブで捕捉した。その後、ビオチン・ストレプトアビジン標識アルカリフォスファターゼ発色系を用いて定量し、各Vセグメントの発現頻度を求めた。MHA法を用い、14例の健常人末梢血における $\alpha$ および $\beta$ 鎖のTCRレパトアを解析した。さらに、個人間で発現頻度に差がみられたVBセグメントの塩基配列を決定した。

## 【結 果】

AL-PCR-REA法において、健常人では多様なTCR遺伝子を発現するためスメアーなバンドが検出された。一方、クローナルな腫瘍細胞からは単一のTCR遺伝子に由来する限られた数のバンドが検出された。Molt-4希釈系列モデルシステムにおいて0.1-1%の検出感度でMolt-4細胞に由来するバンドを検出することができた。このことから、従来のサザンロット法（数-10%の感度）と比べ高感度であることが示された。さらに、8例の白血病患者由来の試料すべてか

ら腫瘍細胞特異的なバンドを検出し、高感度で有用な白血病細胞の検出法であることが示唆された。

MHA 法において、水溶性カルボジイミド縮重反応によるマイクロプレートへの5'末端アミノ化オリゴヌクレオチドの固相化は酸性条件下 (pH5.4), 高いEDC濃度で最適化された。ハイブリダイゼーション後の最適洗浄条件はV $\alpha$ では0.4xSSC濃度, V $\beta$ では0.6xSSC濃度であった。この条件下でサブファミリー間の交差性は認められなかった。検出限界は40pg/wellであり, 40pg/well~1ng/wellまで十分な直線性が得られた。5例の健常人末梢血単核球細胞を用いて, 本法の結果とV $\alpha$ 2, V $\beta$ 2, V $\beta$ 18抗体を利用したFACS法の結果を比較し, 高い相関が得られた。14名の健常人末梢血のTCRレパトア解析を行った結果, V $\alpha$ 鎖は個人間で類似したレパトアの発現パターンを示した。一方, 数種のV $\beta$ セグメントでは, 個人間で発現頻度が大きく異なった。発現頻度の異なったVB3-1, VB4-1, VB6-4およびVB17-1について, Coding領域の塩基配列を決定し, そのうちVB4-1のCoding領域にアミノ酸置換を伴う新しい多型性部位を見つけた。さらに, この多型性部位を制限酵素解析により調べ, 複数の健常人に存在することが分かった。

### 【考 察】

T細胞クロナリティーを検出するAL-PCR-REA法は, 細胞表面マーカーによる白血病細胞検出法に比べ高感度である。また, 腫瘍細胞特異的のマーカーを必要とせず, 様々な腫瘍細胞の検出に利用できると考えられた。TCRレパトアの個人差は, Vセグメントの遺伝的多型性が大きく影響していると考えられた。また, 本研究で示されたVセグメントのCoding領域以外にも制御領域の多型性が影響する可能性がある。或いはHLAハプロタイプ等の影響を $\alpha$ 鎖に比べ,  $\beta$ 鎖の方がより強く受ける事を示しているのかもしれない。

健常人でのレパトアの差異をも明らかにしたMHA法は,  $\alpha$ および $\beta$ 鎖すべてのTCRVセグメントを, 1プレートで簡便に解析できる優れた方法である。多数の臨床試料の解析を飛躍的に進め, 様々な自己免疫疾患に関与するT細胞の特徴やその役割を明らかにできると期待される。

## 審査結果の要旨

T細胞は、T細胞受容体（TCR）による抗原認識を通して免疫応答の主要な役割を担っている。近年、自己免疫疾患等の発症機序解明のために、TCR レパトア解析は注目されている。しかし、いくつかのPCRによるTCR 遺伝子増幅法がこれまで報告されてはいるが、多数の primer が必要である等、精度、再現性、簡便性に問題があった。

本申請者は、様々な免疫反応の主役であるT細胞の特異性や多様性を明らかにする事が複雑な免疫システムを理解する上で重要であるという考えから、より優れた解析法の開発と健常人個人のレパトアの差異を明らかにする事を目的としている。そして、Adaptor-ligation PCR（AL-PCR）法では共通の primer により増幅できる点に着目し、研究を開始している。最初に、AL-PCR 法を制限酵素解析と組み合わせ、白血病細胞の検出に応用している。その検出感度は0.1-1%であり、8例の白血病患者試料から腫瘍細胞特異的なバンドを検出している。これらの結果から、従来のサザンブロット法に比べ高感度である事、腫瘍細胞特異的のマーカを必要としない事から様々な腫瘍細胞の検出に有用であると示唆している。

次に、TCR レパトア解析法の開発を行った。43種のV $\alpha$ 、39種のV $\beta$ 鎖特異的 probe を巧妙にデザインし、96穴マイクロプレートに化学的に固相化した後、ELISA で各V segment の発現頻度を求めた。様々な基礎的条件の検討により、最適化を行い、交差性を認めず、定量性、再現性に優れ、FACS法との高い相関も得ている。1プレートですべてのV segment を解析できる手法はこれまで報告がなく画期的であるといえる。

さらに、14例の健常人末梢血における $\alpha$ および $\beta$ 鎖のTCR レパトアを解析し、個人間で発現パターンを調べた。その結果、V $\alpha$ 鎖では発現パターンが類似し、V $\beta$ 鎖ではVB3-1、VB4-1、VB6-4およびVB17-1で発現頻度が大きく異なる事を明らかにした。このことから、V segment の遺伝的多型性がレパトアに影響することを推論し、これらVB segment のCoding領域の塩基配列を決定した。そのうちVB4-1のCoding領域にアミノ酸置換を伴う新しい多型性部位を見出した。さらに、制限酵素解析からこの多型性部位が複数の健常人に存在する事を証明している。あわせて、Coding領域以外の制御領域の多型性がレパトアに影響する可能性やHLAハプロタイプ等の影響を $\alpha$ 鎖に比べ、 $\beta$ 鎖がより強く受ける可能性も論じている。

本研究で開発されたレパトア解析法は、今後様々なT細胞の関与する自己免疫疾患の解明に貢献するであろう。そして、個人間のレパトアの差異を明らかにし、その起因を推論し、新しい多型性部位を示した点から、所見の正確明瞭さ、結論・考察の適切さにおいて学位授与に値すると判定する。