



Title	HBV感染および非感染肝細胞株における各種サイトカインによるHLA class I 抗原誘導能に関する検討
Author(s)	砥綿, 崇博
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38178
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名 と 砥 綿 崇 博

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 10661 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 5 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当

医学研究科内科系専攻

学 位 論 文 名 HBV 感染および非感染肝細胞株における各種サイトカインによる
HLA class I 抗原誘導能に関する検討

論 文 審 査 委 員 (主査)
教 授 鎌 田 武 信

(副査)
教 授 谷 口 直 之 教 授 森 武 貞

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

B型肝炎ウイルス (HBV) の排除には, HLA class I 抗原拘束性の cytotoxic T cell が密接に関与していると考えられている。interferon (IFN), tumor necrosis factor (TNF) 等のサイトカインは, 細胞表面における HLA class I 抗原の誘導能を有することが知られており, また, B型慢性肝炎患者ではこれらのサイトカイン産生能低下が指摘されている。従って, サイトカインによる HLA class I 抗原誘導能は B型肝炎の慢性化と密接に関与していると考えられる。さらに最近, HBV 増殖は肝細胞表面の HLA class I 抗原誘導能にも影響を及ぼすことが示唆されている。そこで今回我々は, Huh 6 および HB611 を用いて, 各種サイトカインの HLA class I 抗原誘導能およびその相互作用について検討するとともに, これらのサイトカインによる HLA class I 抗原誘導時の細胞内情報伝達機構, およびそれらに対する HBV 増殖の影響についても検討した。

(方 法)

1) 細胞

Huh 6 : hepatoblastoma cell line

HB611 : Huh 6 に HBV genome を integrate させたことにより, 恒常的に HBV を産生する cell line

2) HLA class I 抗原の誘導および細胞内情報伝達機構の解析

Huh 6 または HB611 の培養中に, IFN- α , IFN- γ , TNF- α , または IL-1 β を各種濃度にて, あるいは各種組合せにて添加後48時間培養した。また, Huh 6 において acyclovir は HLA class I 抗原を誘導しないことが既に表示されているため, HBV 増殖を抑制する場合には acyclovir 100 μ g/ml にて12日間の preincubation を行った。さらに, 細胞内情報伝達機構の解析時には, サイトカインの他に H-7 (PKC inhibitor), PMA (PKC activator), HA 1004 (PKA inhibitor), dbcAMP (cAMP analogue), W-7 (calmodulin antagonist), または A23187 (calcium-ionophore) を用いた。

3) 免疫蛍光抗体法

培養細胞を collagenase 処理にて分散させ cell suspension とし, マウス抗 HLA class I 抗体を 4 $^{\circ}$ C にて 30min 反応させ, さらに FITC 標識ヤギ抗マウス抗体を 4 $^{\circ}$ C, 30min 反応させた後, flow cytometry により解析した。解析時, 10,000 個の細胞を計測することにより mean fluorescence intensity (MFI) を算出した。実験は3回行い同様の傾

向を認めたため、代表的な結果を示した。

(成 績)

1) 各種サイトカインによる HLA class I 抗原の誘導

各サイトカインにより濃度依存性に HLA class I 抗原の誘導が認められ、HB611 における HLA class I 抗原の発現は、どのサイトカインにおいてもすべての濃度において Huh 6 より大であった。さらに、その誘導能の強さは、 $\text{IFN-}\gamma > \text{IFN-}\alpha \gg \text{TNF-}\alpha \approx \text{IL-1}\beta$ であった。

2) 細胞内情報伝達機構の解析

$\text{IFN-}\alpha$ および $\text{IFN-}\gamma$ による HLA class I 抗原誘導能は H-7 により濃度依存性に抑制された。これに対して、 $\text{TNF-}\alpha$ および $\text{IL-1}\beta$ による HLA 抗原誘導能は H-7 により影響を受けなかった。さらに PMA によりサイトカイン無添加時および添加時の HLA class I 抗原誘導能の増強作用が認められた。

各サイトカインによる HLA 抗原誘導能は、HA1004, W-7 により影響を受けなかった。また、dbcAMP, A23187 には HLA class I 抗原誘導能、およびサイトカインによる HLA class I 抗原誘導能増強作用が認められなかった。

この結果は Huh 6 および HB611 双方において全く同様であった。

3) HLA class I 抗原誘導時における各種サイトカインの相互作用

IFN に比して $\text{TNF-}\alpha$ および $\text{IL-1}\beta$ は単独では HLA class I 抗原誘導能は弱いにもかかわらず、IFN を同時添加した場合 $\text{IFN-}\alpha$ および $\text{IFN-}\gamma$ を同時添加した時と同等の強い HLA class I 抗原誘導能が得られた。また、 $\text{TNF-}\alpha$ および $\text{IL-1}\beta$ を同時添加した時には上記のような強い HLA 抗原誘導能は認められなかった。

4) HBV 増殖抑制下での各種サイトカインの相互作用

HB611 において acyclovir により HBV の増殖を抑制すると HLA class I 抗原誘導能は増強された。同様の傾向は各種サイトカイン添加時にも、またサイトカインの各種組合せ添加時にも、さらに PMA 添加時にも認められた。

(総 括)

1) $\text{IFN-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ はすべて HLA class I 抗原誘導能を示したが、 $\text{IFN-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$ は、単独では $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ に比して HLA class I 抗原誘導能は強く認められた。一方、相互作用の検討から $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ は $\text{IFN-}\alpha$ あるいは $\text{IFN-}\gamma$ による HLA class I 抗原誘導能を強く増強した。この結果から、 $\text{TNF-}\alpha$ および $\text{IL-1}\beta$ は IFN と協調して強い免疫調節作用を有していることが示唆された。

2) $\text{IFN-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$ による HLA class I 抗原誘導時には PKC が関与しており、 Ca^{2+} -calmodulin 系と cAMP 系は関与していない。一方、 $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ による HLA class I 抗原誘導時には、上記三つの系はいずれも関与しておらず、IFN と monokine では細胞内情報伝達機構が異なることが明かとなった。

3) HBV 増殖は HLA class I 抗原誘導抑制作用を持っており、各種サイトカイン存在下でもこの作用は認められた。従って、HBV 増殖は PKC の関与する pathway と関与しない pathway の双方を抑制しているものと考えられた。

4) Huh 6 および HB611 において、各サイトカインによる HLA class I 抗原誘導時の細胞内情報伝達機構に関しては差異が認められなかった。

論文審査の結果の要旨

B 型肝炎ウイルスの排除には、HLA class I 抗原拘束性の cytotoxic T cell が密接に関与していると考えられている。interferon, tumor necrosis factor 等のサイトカインは、細胞表面における HLA class I 抗原の誘導能をもつことが知られており、また、B 型慢性肝炎患者ではこれらのサイトカイン産生能低下が指摘されている。従って、サイトカインによる HLA class I 抗原誘導能は B 型肝炎の慢性化と密接に関与していると考えられる。本論文は、Huh 6 および HB611 を用いて、各種サイトカインの HLA class I 抗原誘導能およびその相互作用、これらサイトカインによる HLA class I 抗原誘導時の細胞内情報伝達機構、およびそれに対する HBV 増殖の影響について明かにしており、学位を授与するに値すると考えられた。