

免疫組織化学の基礎と応用

蓮井 和久 鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科・講師

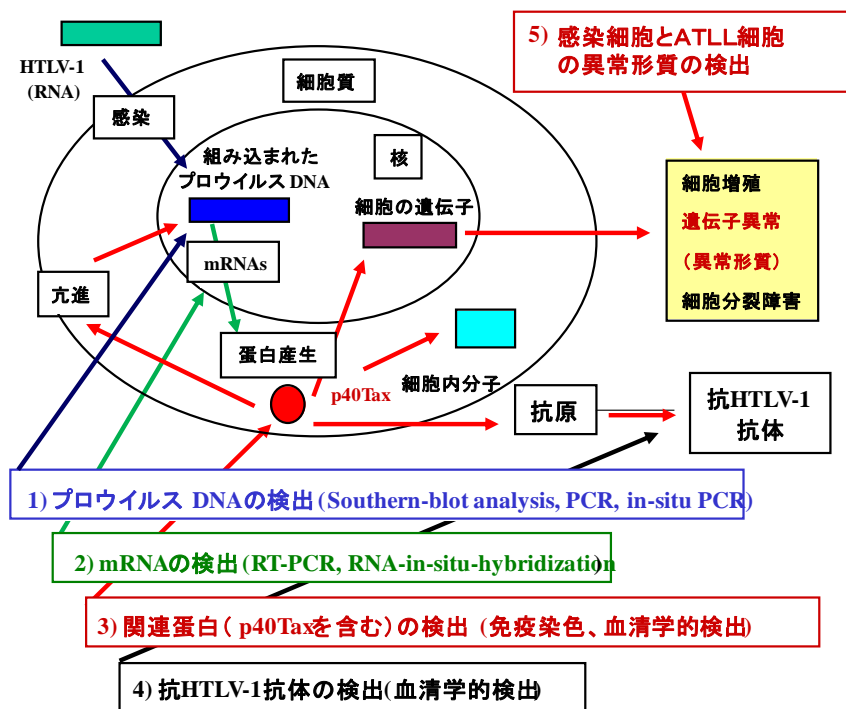
この講義は、2007 年から大学院専門基礎過程の選択科目として開講しているものである。教科書には、改訂四版 渡辺・中根の酵素抗体法（名倉宏、長村義之、堤寛 編集）学際企画を用いています。それに、最近のポリマー法の開発等と私の研究への応用等を基礎にしています。

XIII. HTLV-1 関連蛋白の免疫組織化学

Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)は、RNA レトロウイルスで、宿主細胞（ヒト T 細胞等）に感染するとプロウイルス DNA として、宿主細胞の DNA に不特定に組み込まれる。このプロウイルス DNA から、複数の mRNAs が RNA スプライシングにより作られ、pX 領域の p40Tax (Tax 蛋白 : Tax), p27Rex (Rex 蛋白 : Rex)、ウイルス膜蛋白 gp46 等が産生される。Rex はプロウイルス DNA

の活性化をウイルスの再生産に調節して、Tax は自己産生の亢進、ATLL の発癌に関係した種々の遺伝子のトランスな活性化や抑制、細胞質でのシグナル伝達系に作用する。関連蛋白は、細胞外に出ると、抗原となり、抗 HTLV-1 抗体が

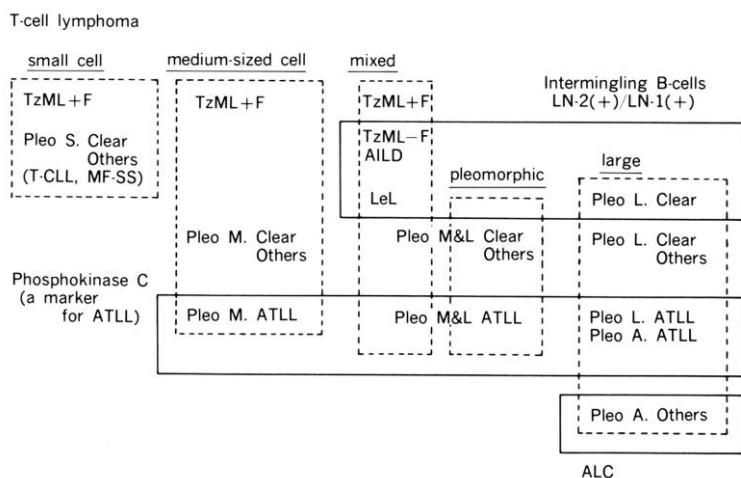
出来る。細胞の遺伝子の Tax による異常な活性化にて、宿主細胞は形質異常と癌化（ATLL 発病）を示す。



HTLV-1 の検出には、上図に示す様に、1) プロウイルス DNA の検出、2) mRNA の検出、3) 関連蛋白の検出、4) 抗 HTLV-1 抗体の検出、5) 感染細胞と ATLL 細胞の異常形質の検出がある。

1. 感染細胞と ATLL 細胞の異常形質の検出

1980 年代後半に、ATLL 細胞の異常形質の一つとして、**Phosphokinase C** の **モノクローナル抗体のカクテルの ABC 法** で検出すると、多形細胞型 (Pleo) で ATLL が形態的に疑われた例では検出された。これは、右図の下に示した論文に報告している。



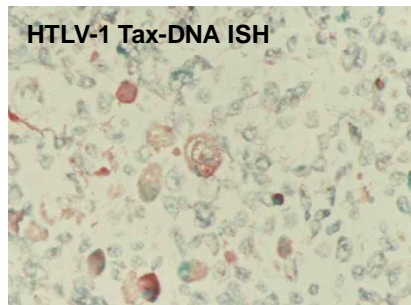
Hasui K. Paraffin-immunohistochemical analysis of 226 non-Hodgkin's malignant lymphomas in the endemic area of human T-cell leukemia virus type 1. Acta Pathol Jpn 41: 350-362, 1991

この ATLL における phosphokinase C の発現は、ATLL 細胞の異常形質の一つと考えられ、Tax の変異原性の結果、多彩の染色体異常の結果と考えられる。その後、この種の異常な形質発現についての報告はないようだ。

2. プロウイルス DNA と mRNA の検出

病理標本切片からの抽出 DNA 中の HTLV-1 プロウイルス DNA の polymerase chain reaction (PCR) が可能になると、pX Tax 領域のプライマーセットを用いて、ATLL 標本や HTLV-1 関連細胞株 MT-2 の切片からの抽出 DNA や吉田光昭先生から頂いたプラスミッドを鋳型に、ビオチン高度標識二本鎖 DNA プローブを製作出来た。その DNA ISH は、DNA と mRNA の検出を狙ったが、シングルコピーである HTLV-1 プロウイルス DNA の検出が出来ずに、mRNA の検出となった。その ISH シグナルは、主に、細胞質陽性像が見られた。また、ATLL 細胞以外に、介在リンパ球にも、シグナル陽性像があり、ATLL 以外の悪性リンパ腫における介在リンパ球のシグナル陽性例は、HTLV-1 キャリアーと評価した。その評価に基づき、年齢別 HTLV-1 感染のコホートを検討したが、より若年者コホートでの HTLV-1 キャリアー減少の傾向は見られなかった。

右図は、その ISH 像である (ISH の検出系には、ハイブリダイズしたプローブのビオチンをストレプトアビチン標識アルカリフォスターゼ(ALP) を反応させ、次にビオチン溶液反応、再度のストレプトアビチン標識 ALP 反応を行う増感法を用いている。



- Hasui K, Sato E, Iwamoto H, Goto M, Sueyoshi K, Kitajima S, Shirahama H, Nomoto M, Tokunaga M, Sakae K, Nakamura T, Okumura T, Tanaka S, Malignant lymphomas of young people under 20 years of age in an endemic area of human T-cell leukemia virus type 1. *Lymphoreticular cells and disease, Proceedings of the third Japanese-Korean Lymphoreticular Workshop*, Kim SH, Takahashi K eds., p.:181-198, Hematopoietic-Lymphoreticular Study Group, The Korean Society of Pathologists, Seoul, 1994.
- Hasui K, Sato E. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) infection in malignant lymphomas in a HTLV-1-endemic area, Kagoshima, Japan: HTLV-1 in-situ-hybridization (ISH) analysis employing a highly biotinylated concatamer probe synthesized by polymerase chain reaction (PCR) for HTLV-1 proviral DNA pX Tax region. *DENDRITIC CELLS* 4:125-137, 1994.
- Hasui K, Sato E, Sueyoshi K, Kitajima S, Goto M, Nakamura T, Matsumoto D. Cold in-situ hybridization of human T-cell leukemia virus type-1: Production of biotinylated probes by polymerase chain reaction and improvement of procedures. *DENDRITIC CELLS* 5: 27-35, 1995)

3. HTLV-1 関連蛋白の検出

a) ウイルス膜蛋白 gp46 (6C2)の検出

HTLV-1 Env gp46 およびその前駆体を標識する単クローン抗体(6C2, Cellular Product Inc.)のパラフィン免疫組織学的検索を行った。6C2 は、パラフィンセルブロック切片で、MT-2, MT-4 など HTLV-1 関連細胞株の細胞を標識し、Env 領域の欠失した HTLV-1 を有する ATLL 細胞株 KUT-2 を標識しなかった。62 例の T-Pleo を検索すると、ATLL 型の 91% (30/33 例)、明細胞型の 44%(7/16 例)、その他の 54%(7/13 例)が 6C2 陽性リンパ腫細胞を示した。6C2 陽性細胞と HTLV-1 pX Tax mRNA 発現とは、両者を検索した 58 例の T-Pleo で、2 例の Tax mRNA 発現のみ(前記の検索結果)の例と 11 例の 6C2 陽性細胞のみの ATLL 型以外の T-Pleo 例はあるものの、相関を示した。6C2 陽性細胞は、細胞表面に顆粒ないし膜状の陽性像を示すものと細胞質に淡い陽性像を示すものがあった。前者は、gp46 を標識し、後者はその前駆体を標識していると思われた。(1996 年日本病理学会 (名古屋) 抄録より、unpublished)

○現在、HTLV-1 の感染細胞から他の細胞への感染はウイルスシナプスを介することが示されており、その際にも、gp46 は感染細胞の膜に発現することから、上記の抗 gp46 抗体(6C2)の検索結果は妥当なものであったようだ。当時は、HTLV-1 のウイルス粒子が電子顕微鏡等の観察で見られないことから、この検索結果については、かなりに懐疑的な評価であったようだ。

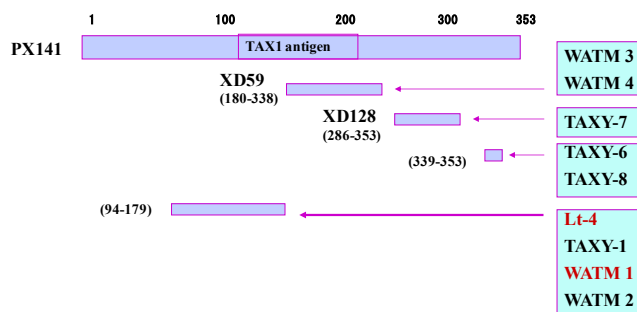
一方、HTLV-1 関連膜蛋白の抗体による HTLV-1 の細胞間感染阻止の抗体療法が期待されている。

b) HTLV-1 プロウイルス pX 領域の関連蛋白 (Tax, Rex) 免疫組織化学

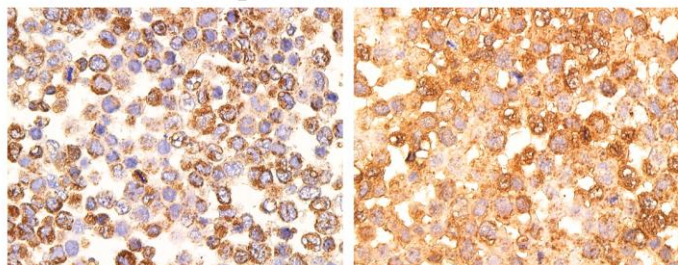
i. 抗 Tax・Rex 抗体：田中勇悦教授（琉球大学）から抗 Tax 抗体と抗 Rex 抗体の供与を受けて、HTLV-1 関連の病変の検討を行った。

供与を受けた抗 Tax 抗体の **Lt-4** と **WATM-1** は PX141 の 94-179 アミノ酸を標識し、この領域は TAX1 抗原の半分程度を含んでいる。

(Tanaka Y. et al: An antigenic structure of the trans-activator protein encoded by human T-cell leukemia virus type-1 (HTLV-1), as defined by a panel of monoclonal antibodies. AIDS Research and Human Retrovirology 8(3):227-235, 1992)。



Anti-HTIV-1 p40Tax antibodies in MT-2



Lt-4
(mouse monoclonal antibody)
x1000
Envision system

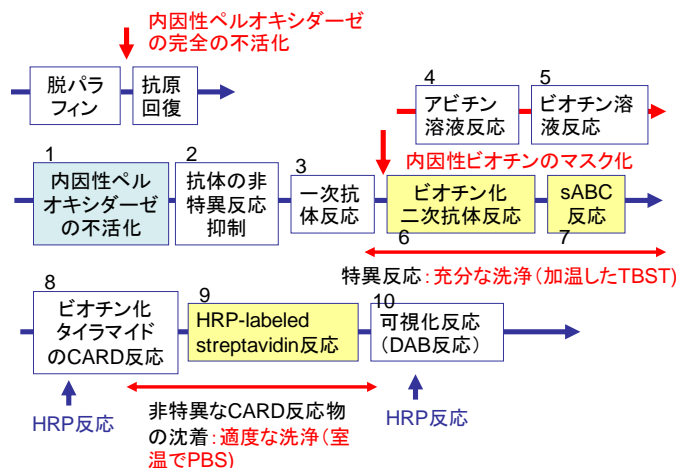
WATM-1
(Rat monoclonal antibody)
x1000
Supersensitive method
(Biotinylated tyramide)

MicroProbe 法



ii. MT-2 細胞での試験的染色；MT-2 細胞株のホルマリン固定パラフィン包埋標本では、Lt-4 は Envision system で陽性像が認められるが、WATM-1 では超抗原回復超高感度免疫染色（modified

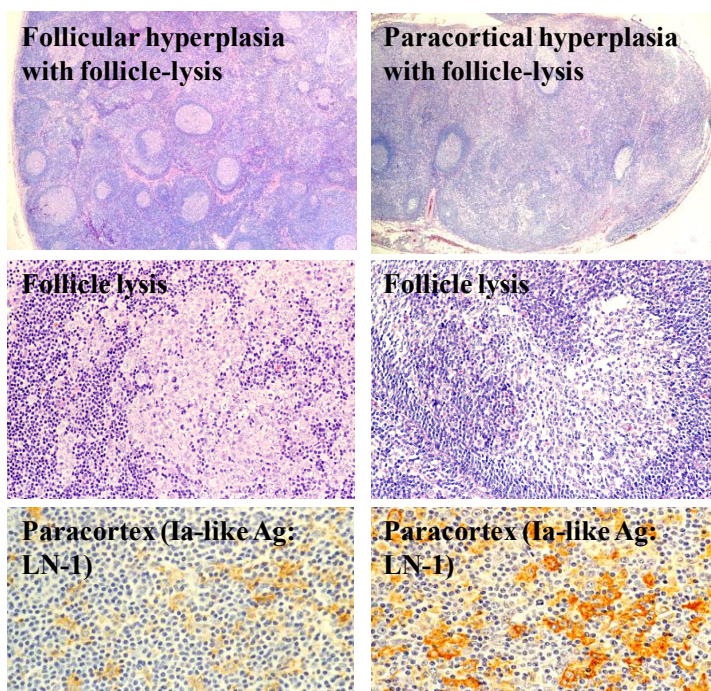
modified ImmunoMax/CSA 法 (Hasui et al. 1997)



ImmunoMax 法の MicroProbe 法での実施) を必要とする。共に、4M 尿素溶液に浸して圧力鍋による熱処理抗原回復を行っている。共に、細胞質の陽性所見が顕著で、核の染色は明瞭に識別できない。

iii. **HTLV-1-associated non-neoplastic lymphadenopathy (HANNLA)の HTLV-1 pX**

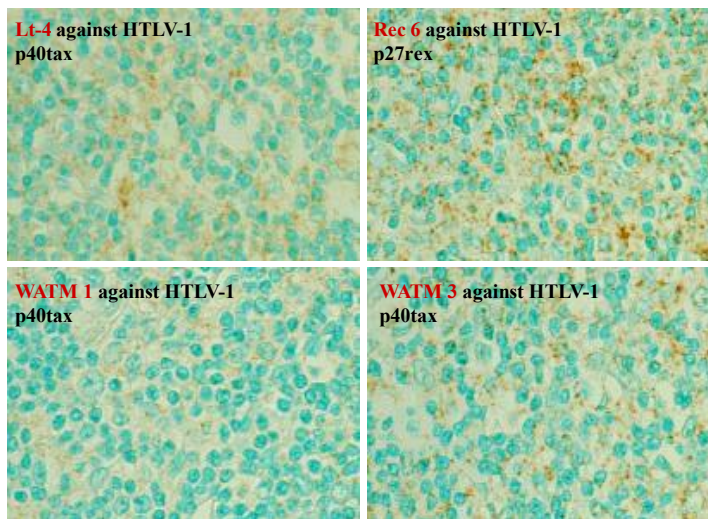
関連蛋白の高感度免疫組織化学: HTLV-1 キャリアーのリンパ節病変には、右図に示す様に、HIV 感染に見られる PGL (Persistent generalized lymphadenopathy)に見られる濾胞崩壊 (Follicle lysis) を伴う濾胞過形成型 (FH 型) が見られ、拡大した傍皮質(Paracortex)を示す PH 型は、LN-1 で標識される Ia-like 抗原を発現している抗原提示細胞の増加が見られる。



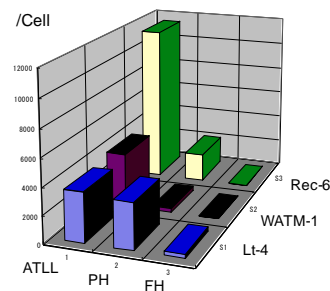
PH 型の傍皮質では、Rex (Rec-6)の発現が強く、Tax では、Lt-4, WATM-3 (TAX1 抗原を一部含む XD059 抗原を標識), WATM-1 の順に、弱い発現が見られた。

Paracortical hyperplasia in HANNLA

この modified Immuno-Max 法での染色結果のカラー画像を、RGB 分解して、その抗原量をピクセル x 濃度で算出し、棒グラフにした (右図)。



HANNLA の FH 型、PH 型、ATLL へと、Rec-6 は WATM-1 より強発現であるが、漸増した。Lt-4 は、HANNLA の PR 型で強い発現を示した。この WATM-1 と Lt-4 の標識量の相違は、前に示した MT-2 でのもの同様であった。しかし、実際のヒト病理標本では、Lt-4 の抗原回復と EnVision 法では何らの陽性染色像は得られなかった。

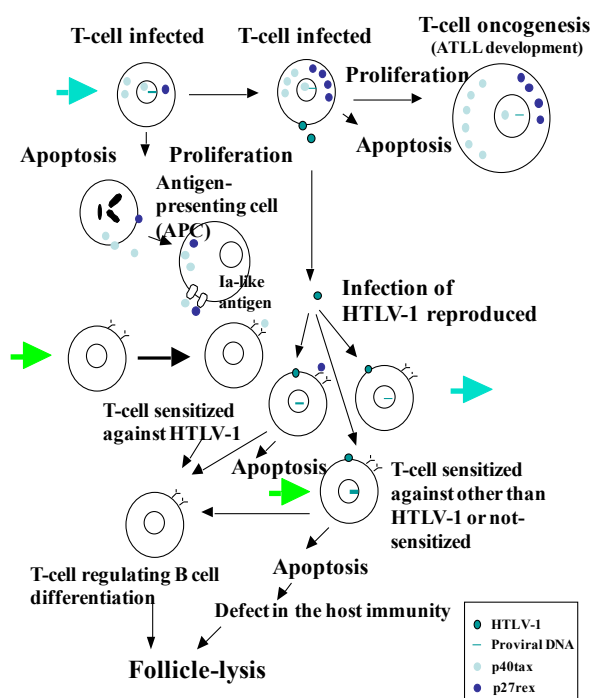


HANNLA の拡大している傍皮質では、HTLV-1 感染細胞から再感染、それに伴う感染細胞の増生と Tax 誘導のアポトーシス等で、免疫系に曝された Tax 等の HTLV-11 関連蛋白等への免疫が成立している場であるようだ。

○Hasui K, Sueyoshi K, Kitajima S, Sato E, HTLV-1-associated non-neoplastic lymphadenopathy: Atypical follicular lesions of lymph nodes found in anti-human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) antibodies-positive subjects without neoplastic disorders. Lymphoreticular cells, fundamentals and pathology, Proceedings of the second Japanese-Korean Lymphoreticular Workshop, Takahashi K, Kim SH eds., p.:239-251, Lymphoreticular Cell Foundation, Kumamoto, 1992

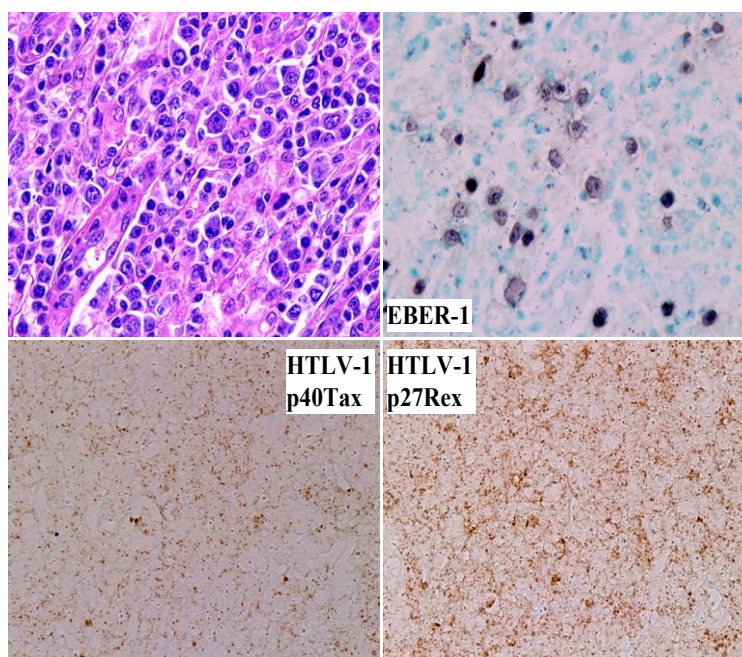
○ Hasui K, Sato E, Tanaka Y, Yashiki S, Izumo S. Quantitative highly-sensitive immunohistochemistry (Modified ImmunoMax) of HTLV-1 p40tax and p27rex proteins in HTLV-1-associated non-neoplastic lymphadenopathy (HANNLA) with estimation of HTLV-1 dose by polymerase chain reaction. DENDRITIC CELLS 7. 1997:19-27.

○ 蓮井和久、佐藤栄一、田中勇悦、屋敷伸治、賈心善、出雲周二 : HTLV-1 関連疾患病変に於ける HTLV-1 proviral DNA とそのシグナル mRNA や関連蛋白を検出する組織化学の現状。日本リンパ網内系学会会誌.39 (1) : 33-43, 1999



iv. アルゼンチンの ATLL の HTLV-1 pX 関連蛋白の高感度免疫組織化学

南米のアルゼンチンのアンデス山中のモンゴロイドの ATLL が見い出された。右図に示す様に、細胞形態は日本の ATLL と変わりなく、少数の EBER-1 シグナル陽性細胞を認める。この現象は、徳永正義らによ



り日本の ATLL でも同様であることが明らかにされている。

4M 尿素溶液中での圧力鍋による熱による抗原回復処理と modified ImmunoMaxx 法で、Tax (WATM-1)と Rex (Rec-6)が検出された。ATLL での HTLV-1 関連蛋白の発現は、Rex 優位の発現であり、Tax の発現は抑制されている。

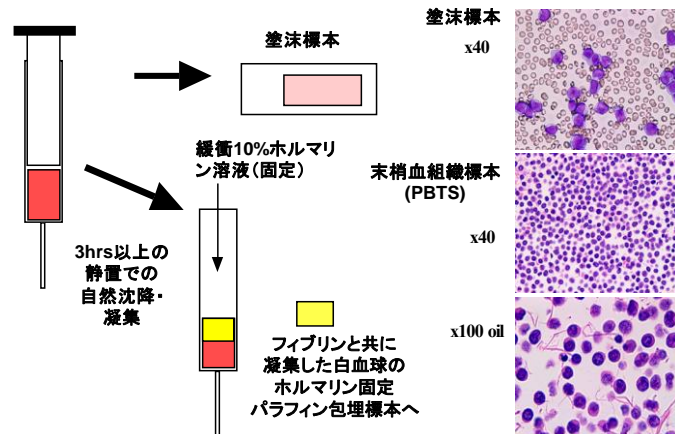
○Marin O, Hasui K, Remondegui C, Sato E, Aye MM, Takenouchi N, Izumo S, Tajima K. Adult T-cell leukemia/lymphoma in Jujuy, north-west Argentina. Pathol Int 52: 348 - 357, 2002

4. HTLV-1 関連蛋白 (Tax, Rex) の病原性解析の免疫組織化学

a) ATLL や HTLV-1 キャリア

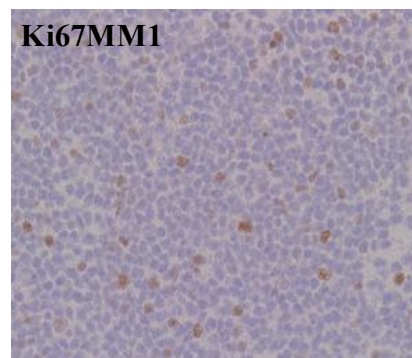
一の末梢血組織標本 (PBTS)

ATLL の半数の症例は白血病であり、HTLV-1 キャリアの多くは末梢血で HTLV-1 ウイルス量等の検査が行われている。右図に示す方法で PBTS を作製した。(PBTS では、白血球の収縮が生じるが、x100 oil での観察で、塗沫標本と同様の観察が可能。)



b) Tax の発現と ATLL 細胞の増殖の関係の解析

Tax の発現は、前記の熱による抗原回復と modified ImmunoMax 法で検出し、ATLL 細胞の増殖は Ki67 抗原 (Ki67 MM1) の 0.01M クエン酸緩衝液 pH 6 中でのオートクレーブによる熱による抗原回復とポリマー法で増殖細胞を標識した。右図は、急性白血病型 ATLL の Ki67 MM1 染色像である。陽性の増殖細胞を比較的多く認める。その結果、慢性白血病型 ATLL でも、急性白血病型 ATLL でも、Tax の発現が強い例では増殖細胞が多く、Tax の発現は ATLL 細胞の増殖を更新させていることが示された。



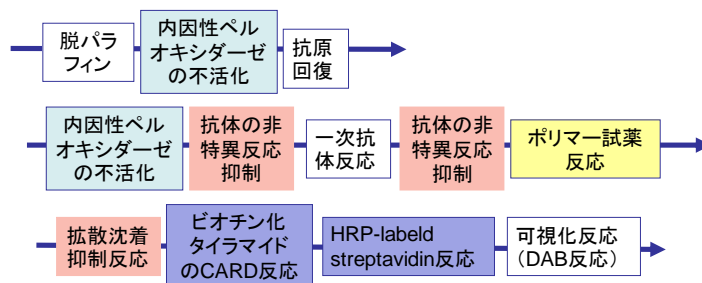
○Hasui K, Utsunomiya A, Izumo S, Goto M, Yonezawa S, Sato E, Kanzaki T, Murata: F. An immunohistochemical analysis of peripheral blood tissue specimens from leukemia cells: Leukemic cells of adult T-cell leukemia/lymphoma express p40Tax protein of human T-cell lymphotropic virus type 1 when entering re proliferation. Acta Histochem Cytochem. 36: 345-352, 2003

c) HTLV-1 キャリアー、慢性白血病型 ATLL、急性白血病型 ATLL における癌抑制遺伝子産物 p53 蛋白の免疫組織化学

HTLV-1 キャリアー、慢性白血病型 ATLL、急性白血病型 ATLL の PBTS にて、抗p53蛋白抗体の0.01M クエン酸緩衝液 pH6での熱による抗原回復とポリマー法による検討では、急性白血病型 ATLL での陽性核が多く観察され、急性白血病型 ATLL ではDNA 損傷等が進行していることが示唆された。また、アポトーシスのマーカーである cleaved caspase-3 陽性の増殖細胞も認められた。

○Wang J, Hasui K, Utsunomiya A, Jia XS, Matsuyama T, Murata F. Association of high proliferation in adult T-cell leukemia cells with apoptosis and expression of p53 protein in acute type ATL. *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology* 2008; 48 (1):1-10.

上記の超高感度免疫染色 (new simplified CSA system. 右図に示す。前項の超高感度染色を参照)による検索では、HTLV-1 キャリアーの段階から、p53 蛋白の生理



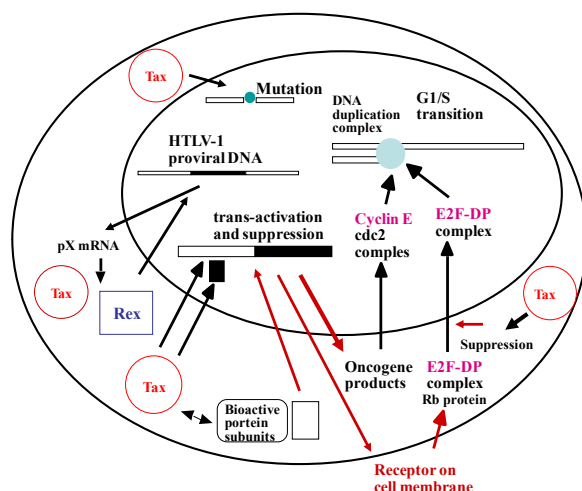
的発現が見られ、それに先行して、Tax によるリン酸化により機能不全となったリン酸化 p53 蛋白の出現が先行していた。これは、Tax 蛋白の変異原性の一つとして、p53 蛋白の機能抑制があることを示唆した。

○Hasui K, Wang J, Tanaka Y, Izumo S, Eizuru Y, Matsuyama T. Development of ultra-super sensitive immunohistochemistry and its application to the etiological study of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Acta Histochem. Cytochem.* 45 (2): 83-106, 2012.

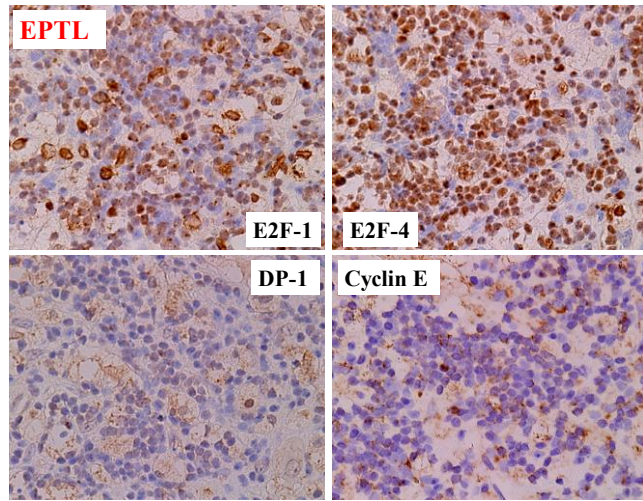
d) Tax と Rex の細胞周期への病原性の免疫組織化学的解析

細胞周期の G1 期、G1-S 移行期への増殖シグナルの入り方を、HTLV-1 感染のないヨーロッパの末梢 T 細胞リンパ腫 (EPTL) とリンパ腫型 ATLL で比較した。

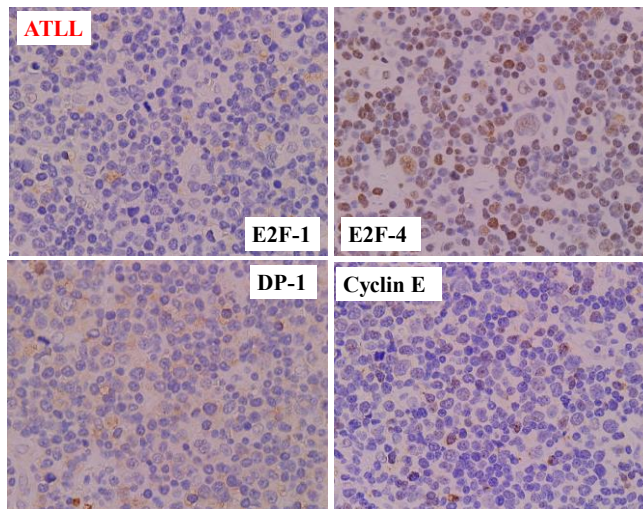
単純化すると、右図に示す様に、細胞の癌・増殖遺伝子からのシグナルは Cyclin E-cdc2 complex を介して G1 期に達し、細胞膜の受容体からの増殖シグナルは E2F-DP complex を介して G1-S 移行期に達する。



右に、HTLV-1 感染のない EPTL の染色結果の一例を示す。G1-S 移行シグナルの亢進側の E2F-1 の発現と共に抑制側の E2F-4 が発現し、G1-S 移行シグナルの調節が行われているようだ。しかし、ATLL では、E2F-4 のみの核内発現である。他の例でも、E2F-1 のみの発現か、E2F-1 と E2F-4 が共に発現していなかった。こ



れは、Tax の細胞膜受容体 (IL2-R) の恒常的な自己刺激 (オートクリン) による Rb-E2F の G1-S 移行シグナルの機構が崩壊していることを示唆した。これは、HTLV-1 basic leucine Zipper (HBZ) の mRNA による E2F-1 の直接的亢進による晩期 ATLL 細胞の増殖の仮説の可能性を否定した。



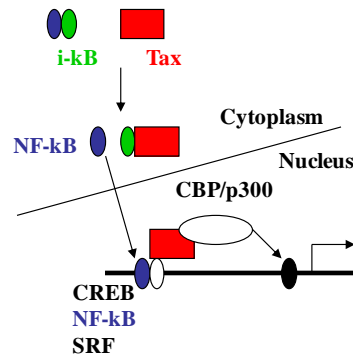
また、Tax の発現は、EPTL よりも低い発現ながら、cyclin

E の発現と相関し、Tax が ATLL 細胞の増殖シグナルの亢進に寄与している可能性が示唆されている。

○Hasui K, Wang J, Tanaka Y, Izumo S, Eizuru Y, Matsuyama T. Development of ultra-sensitive immunohistochemistry and its application to the etiological study of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Acta Histochem. Cytochem.* 45 (2): 83–106, 2012.

e) Tax の酵素処理超高度免疫組織化学

Tax の熱による抗原回復超高度免疫染色では、ATLL の 4 分の 3 程度の症例で、Tax の発現を検出出来た。Tax の細胞内での存在様式を分子生物学的研究成果から見ると、Tax は単純に他の分子と結合する (単純存在) のみならず、複数の分子と複合体を形成し (複合体存在)、種々の機能を示している。従って、酵素処理にて、単



純存在の Tax を消化し、複合体存在の Tax を免疫組織化学的に検出できるのではないかと考えられた。実際に、proteinase K 処理で nsCSA 法で検討すると、PBTS での HTLV-1 キャリアー、慢性白血病型、急性白血病型、病理組織でのリンパ腫型 ATLL の全例で、Tax 陽性リンパ球や ATLL 細胞を認めることが出来た。これは、晩期の ATLL 細胞でも、Tax はその病原性を示しているようである。また、この方法は、ATLL の病理組織学的診断の道を開くものであるようだ。

○Hasui K, Wang J, Tanaka Y, Izumo S, Eizuru Y, Matsuyama T. Development of ultra-super sensitive immunohistochemistry and its application to the etiological study of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Acta Histochem. Cytochem.* 45 (2): 83–106, 2012.

f) Tax の抗原処理超高感度免疫染色の期待以外の陽性像

Tax の核陽性像は、HTLV-1 研究の初期にも、蛍光顕微鏡での検索で報告されて来たが、Tax の抗原回復超高感度免疫染色でも、皮膚扁平上皮の核、骨髄性白血病細胞の核、B 細胞性大細胞性リンパ腫の核の陽性像が観察されている。

抗 Tax マウスモノクローナル抗体である Lt-4 と抗 Tax ラットモノクローナル抗体である WATM-1 の両者で、髄性白血病細胞と B 細胞性大細胞性リンパ腫の核陽性像が観察されている。

○Hasui K, Wang J, Tanaka Y, Izumo S, Eizuru Y, Matsuyama T. Development of ultra-super sensitive immunohistochemistry and its application to the etiological study of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Acta Histochem. Cytochem.* 45 (2): 83–106, 2012.

この現象は、抗 Tax 抗体で認識されているアロステリックサイトと同じものを有する他の核内分子、複合体ないし構造物が存在する可能性が高い。内因性レトロウイルス等の蛋白の可能性もあるが、この問題は、解決されていない。

5. HTLV-1 関連疾患等の（抗体）療法の動向

ATLL の画期的療法として、骨髄移植がある。これは、白血病細胞を放射線療法で殺し、新たに、骨髄移植を行うので、かなりの治療効果が得られている。

その一方で、ATLL 細胞は、制御 T 細胞の腫瘍であると報告され、制御 T 細胞がケモカイン受容体 CCR4 陽性であることから、CCR4 抗体療法が開発され、実用化されているが、その治療効果は 4 割程度で、その治療コストが跳ね上がっている。この CCD4 抗体療法は、CCR4 リンパ球の中での系列特異な分化抗原であり、近年、ATLL の癌幹細胞が見い出されていることから、その治療効果に限界があるようだ。

今後は、ATLL 発症前のキャリアー段階での HTLV-1 の感染拡大阻止の抗体量等が期待されているようだ。

最近、以下の総括論文を出したので、ご参考下さい！

Hasui K, Wang J, Tanaka Y, Izumo S, Eizuru Y, Matsuyama T. Development of ultra-super sensitive immunohistochemistry and its application to the etiological study of adult T-cell leukemia/lymphoma. Acta Histochem. Cytochem. 45 (2): 83–106, 2012.