

成人T細胞白血病の臨床病型と 白血病細胞内pHとの関係

石井俊徳, 我孫子わかana^①, 山口佳織^②

Relationship between Clinical Types and Intracellular pH
of Leukemic Cells in Adult T-Cell Leukemia

Toshinori Ishii, Wakana Abiko^①, Kaori Yamaguchi^②

Abstract Recently it is revealed that intracellular pH (pHi) plays a important role in cellular activation and growth and may be involved in pathogenesis of cancer. As adult T cell leukemia (ATL) is a leukemia of activated mature T cell origin, it is interested whether pHi is involved in pathogenesis and development of ATL or not. To elucidate the relation of pHi to ATL we measured pHi of peripheral blood lymphocytes (PBL) in three clinical types of ATL (smoldering, chronic and acute type).

The mean value with 1 SD of pHi was 6.99 ± 0.12 for healthy population, 7.11 ± 0.17 for smoldering type, 7.26 ± 0.09 for chronic type and 7.58 ± 0.13 for acute type. And these results were statistically significant between all groups. With all cases of ATL pHi of PBL correlated significantly with lymphocyte count ($r=0.41$), CD4 positive rate of PBL ($r=0.66$) and CD25 positive rate of PBL ($r=0.59$). To avoid the influence of normal PBL coexisted with leukemic cells on pHi, we calculated pHi of CD25 positive PBL which were almost all leukemic cells with pHi value and CD25 positive rate. In spite of different disease severity in each clinical type of ATL, pHi of CD25 positive PBL were raised to a similar level in all clinical types (7.52 for smoldering type, 7.77 for chronic type and 7.77 for acute type).

It may be given as a conclusion that alkalization of pHi relates to pathogenesis but not to aggravation of ATL.

Key Words : Adult T-cell Leukemia (ATL), Clinical Type, Intracellular pH (pHi)

はじめに

細胞が分化増殖したり本来の機能を発揮する場合、そこには多数の酵素反応が関与している。酵素反応には至適pHがあり、したがって細胞の種々の活動には細胞内のpH (pHi) が重要な関わりを持っていることは疑いの余地がない。一般にpHiはpH6.8~7.3と、H⁺が細胞外液pH (pHo) と膜電位に従って受動的に分布すると考えた時のDonnan equilibriumの計算値 (pH6.3~6.5) よりも実際にはアルカリ側に傾いている。その理由は細胞内の酵素反応の大部分の至適pHがこの範囲にあるからと考えられる。した

がってこの生理的なpHiを維持するためには、細胞内からH⁺が能動的に排出される機構が働く必要がある、その主役を担っているのが細胞膜のNa⁺/H⁺exchangerである¹⁾。Na⁺/H⁺exchangerはNa⁺の細胞内取り込みとH⁺の排出をカップルして行っているが、この反応には直接的にはATP代謝等のエネルギーを必要としない。H⁺の排出のエネルギーはNa⁺K⁺ATPase systemで維持されている細胞内外のNa⁺gradientから間接的にえられる。したがってNa⁺/H⁺exchangerは二次的能動輸送機構といえる。Na⁺/H⁺exchangerは生理的pHiの維持を行う以外に、細胞内アルカリ化による細胞の活性化

① 長崎市立病院成人病センター
② 宮崎保健所

増殖，血漿浸透圧の変化に伴う細胞容積を調節する役割を持っており，高血圧症，悪性腫瘍，臓器肥大，酸塩基平衡障害等の疾患に密接な関わりを持っている²⁾とされている。Na⁺/H⁺ exchanger を活性化する因子としては，interleukin-1 (IL-1)，IL-2，epithelial growth factor (EGF)，platelet derived growth factor (PDGF) 等のサイトカインやinsulin, angiotensin, vasopressin 等のホルモンなど²⁾が知られている(表1)。これらの因子は細胞の活性化増殖や，血漿浸透圧や血圧の調節に関与しており，その機能の発現がNa⁺/H⁺ exchanger を介していることを推測させる。

表1 Na⁺/H⁺ exchanger を活性化する因子

I. mitogen 活性を有するもの
EGF
PDGF
IL-1
IL-2
Colony stimulation factor
Nerve growth factor
Prolactin
Insulin
Bombesin
Phorbol myristate acetate
Angiotensin
Vasopressin
Thrombin
Ca ²⁺ ionophore
Lipopolysaccharides
II. mitogen 活性を有しないもの
Catecholamines
Bradykinin
Caffeine

成人T細胞白血病(ATL)はhuman T cell lymphotropic virus I (HTLV-I) 感染と密接に関連していると考えられている成熟T細胞の白血病³⁾で，通常はウイルス感染後数年から数十年の経過でキャリアー，くすぶり型，慢性型を経て急性型へと進展重症化する。キャリアーでは腫瘍細胞は認められないが，くすぶり型では少数の白血病細胞が末梢血に出現し，慢性型と急性型ではリンパ球の大多数が腫瘍細胞であ

る。臨床的には急性型は慢性型と異なり，急激な細胞の増殖や臓器浸潤，高カルシウム血症がみられることから，同じ腫瘍細胞でありながら急性型と慢性型ではATL細胞に質的な変化が生じているのではないかと推測される。

そこで細胞増殖に関わりを持つpHiにこの質的な変化が反映されていないかどうかを明らかにするために，pHiとATLの臨床病型との関係について検討した。

試薬および方法

1. 蛍光pH指示薬

蛍光pH指示薬 2', 7'-bis(carboxyethyl) carboxyfluorescein (BCECF) は細胞膜非透過性のため，BCECFのtetraacetoxymethyl基をエステルに結合させ膜透過性にしたBCECF-AM (10M, Sigma) を10⁻⁶Mに調整したPBS溶液として用いた。

2. 緩衝液

リンパ球の洗浄液および浮遊液としては，リン酸緩衝食塩液(PBS, コスモバイオ)を用いた。検量線用の緩衝液としては細胞内液に類似した電解質組成のリン酸緩衝KCl液(PBK: 137mM KCl, 8.1mM K₂HPO₄, 1.5mM NaH₂PO₄, 2.7mM NaCl: pH 7.5)を用いた。

3. 抗体

リンパ球の膜抗原の染色にはCD4, CD25, CD71, HLA-DR (Ortho) に対するモノクローナル抗体を用いた。

4. リンパ球の採取

ヘパリン入り真空採血管(Becton-Dickinson)に静脈血を10ml採血し，同量のPBSを加え混和した。10mlのFicoll-Hypaque(比重1.078, Sigma)に重層し，室温で2,000 rpm 20分遠沈し，中間層を採取した。PBSで3回洗浄

後 5×10^6 /ml の濃度に PBS に再浮遊させ測定に用いた。

5. pH_i 測定

pH_i の測定は、蛍光 pH 指示薬 (BCECF-AM) を用いたフローサイトメトリー法で⁴⁾ 行った。その原理は、膜透過性で細胞内に入った BCECF-AM はエステラーゼにより代謝され膜非透過性の BCECF に変化し⁵⁾、フローサイトメトリー (FCM) の 488nm の光で励起され 530nm の蛍光を発するが、その蛍光強度が pH_i 依存性に变化する⁶⁾ ことを応用したものである。

a) BCECF のリンパ球への負荷

リンパ球浮遊液 1 ml と BCECF-AM 溶液 1 ml を混和し、遮光下で 37°C の恒温層で 30 分インキュベートする。PBS で 2 回洗浄後 PBS 1 ml に再浮遊させた。

b) 検量線の作成

蛍光強度を pH に換算するための検量線の作成は、Nigericin/K⁺ 法⁶⁾ で行った。PBK に BCECF 負荷リンパ球を浮遊させ、Na⁺/H⁺ exchanger のインヒビターである Nigericin を加える。そうすると細胞内 H⁺ 濃度すなわち pH_i が細胞外と等しくなるので、PBK の pH を変えることにより平均蛍光強度 (MFI) も変化し検量線を作成できる。実際には PBK (pH 7.5) を基に 1 N HCl または NaOH により pH 6.0, 6.5, 6.8, 7.0, 7.2, 7.5, 8.0 の PBK の pH 系列を作成し、各 pH の PBK 1 ml に BCECF 負荷リンパ球 0.1 ml を加え 1 回洗浄後 1 ml に再浮遊させる。Nigericin (1 mg/ml エタノール溶液) 10 μl を PBK 浮遊 BCECF 負荷リンパ球に加え混和し、5 分後に FCM でリンパ球の平均蛍光強度 (MFI) を測定した。

c) 検体 pH_i の測定

BCECF 負荷リンパ球 100 μl に PBS 1 ml を加え FCM で MFI を測定し、検量線より pH_i を読み取った。

6. リンパ球膜抗原の測定

リンパ球膜抗原の測定は FCM を用いた蛍光抗体法で行った。CD 4, CD 25, HLA-DR は fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗体を用い直接法で測定した。CD 71 は FITC 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Tago) による間接法で測定した。

症 例

対象は熊本大学医学部第 2 内科に入院中または通院中の ATL 患者 27 名 (表 2) で、その臨床病型は急性型 6 名、慢性型 6 名、くすぶり型 15 名であった。急性型の場合、初回化学療法開始前の症例のみを対象とした。慢性型とくすぶり型は全症例無治療で経過観察中であった。コントロールとして、健康人 16 名の静脈血を用いた。ATL の臨床病型は lymphoma study group の診断基準⁷⁾ に基づいて分類した。

表 2 ATL 症例の臨床および検査データ

臨床病型	くすぶり型	慢性型	急性型	健康人
症例数	15	6	6	16
年齢 (歳)	61.1 ±14.8*	66.7 ±13.1	56.5 ±10.2	50.7 ±20.8
性 (男:女)	6:9	3:3	3:3	8:8
リンパ球 (/ μ l)	2,252 ±2,109	13,198 ±8,230	31,540 ±32,329	1,931 ±584
LDH (u/l)	447 ±157	623 ±556	1,603 ±911	ND
Ca (mg/dl)	9.0 ±1.1	9.1 ±1.2	9.8 ±1.4	ND

*Mean ± SD, ND: not done

結 果

1. ATL の臨床病型とリンパ球 pH_i (図 1)

まず ATL におけるリンパ球の pH_i が正常人と異なっているか否かを明らかにするために、

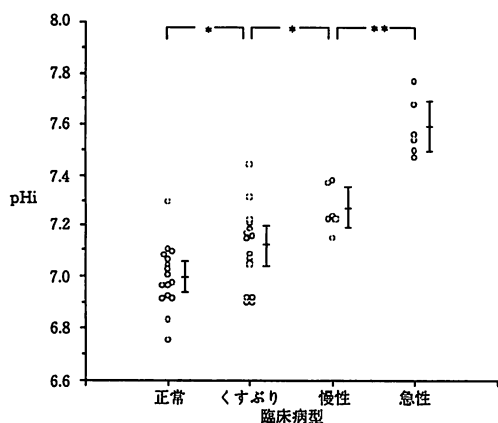


図1 ATLの臨床病型とリンパ球pHi
 王Mean ± 2 SEM, *p < 0.05, **p < 0.01

ATLの末梢血リンパ球のpHiを測定した。その結果pHiのmean ± SDは、正常コントロールが6.99 ± 0.12なのに対して、ATLでは7.24 ± 0.23となり、Student t-testで有意にATLリンパ球pHiのアルカリ化がみられた。またATLの臨床病型別のデータは、くすぶり型が7.11 ± 0.16、慢性型は7.26 ± 0.09、急性型は7.58 ± 0.12となり各病型間に統計学的有意差がみられ、ATLが重症化するほどpHiは増加していた。

2. 末梢血リンパ球数とpHi (図2)

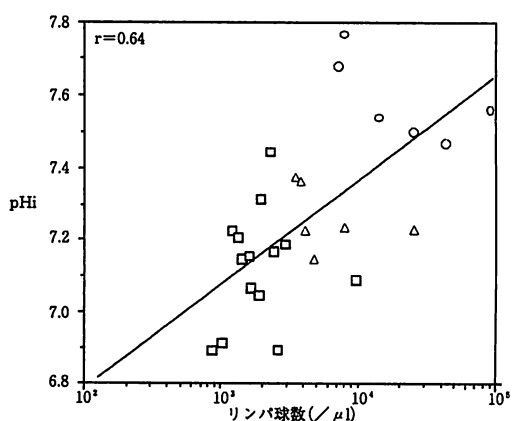


図2 ATLのリンパ球pHiとリンパ球数の関係
 ○急性型, △慢性型, □くすぶり型

ATLのリンパ球pHiのアルカリ化が細胞増殖と関係あるならば、リンパ球の増加があると推

測される。そこで末梢血リンパ球数とpHiとの関係を検討してみた。その結果リンパ球数の平均値はくすぶり型では2,252/μl、慢性型では8,230/μl、急性型では31,540/μlとpHiと同じくATLが重症化するにしたがって増加していた。したがってATL全体としてリンパ球数とpHiとの相関をみると、リンパ球数の対数とpHiの間には $r=0.64$ ($p < 0.001$)と有意の相関がみられた。

3. CD4陽性T細胞とpHi (図3)

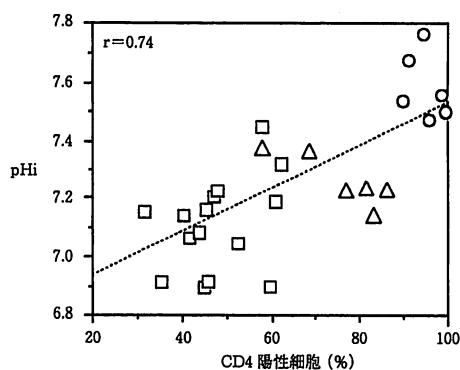


図3 ATLのリンパ球pHiとCD4陽性細胞の関係
 ○急性型, △慢性型, □くすぶり型

ATLで腫瘍化しているリンパ球は大多数の症例でCD4陽性リンパ球である。今回の我々の症例も全てCD4/CD8比は高くなっており(平均17.2)、CD4陽性リンパ球由来の白血病細胞と考えられる。そこでリンパ球のCD4陽性率とpHiとの関係を調べてみた。その結果リンパ球のCD4陽性率もコントロールの41.3%に対して、くすぶり型47.9%、慢性型75.7%、急性型95.0%と増加しており、CD4陽性リンパ球の絶対数も当然増加していた。そしてリンパ球のCD4陽性率とpHiの間には全体として $r=0.74$ ($p < 0.001$)と高い正の相関がみられた。

4. T細胞活性化抗原とpHi

ATL細胞は活性化T細胞由来の白血病細胞で

あり、したがって膜抗原CD25が陽性であることが特徴の一つである。そこでCD25陽性リンパ球とpHiとの関係を検討してみた。ATLリンパ球のCD25陽性率はくすぶり型が22.6%，慢性型46.7%，急性型77.3%とやはりATLが重症化するに従い高くなり、したがってpHiとの相関も(図4) $r=0.77$ ($p<0.001$) と非常に高くなっ

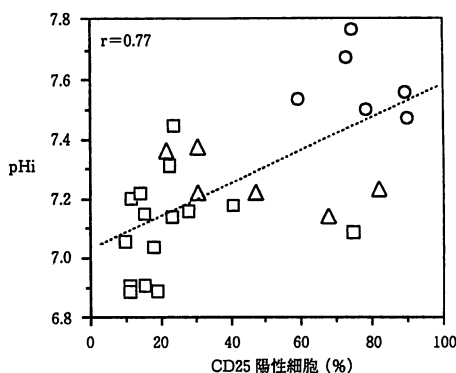


図4 ATLのリンパ球pHiとCD25陽性細胞の関係
○急性型, △慢性型, □くすぶり型

ている。次にCD25以外の活性化T細胞にみられる膜抗原についても調べてみた。その結果CD71(トランスフェリンレセプター)では0.39, HLA-DRでは0.58と、やや低いながらもいずれもpHiと有意の正の相関関係がみられた。

5. ATL白血病細胞のpHi

今までの結果でリンパ球全体のpHiはATLの重症化に伴い高くなっていることがわかった。したがってATL白血病細胞の悪性度とpHiは関係している可能性がある。しかしpHiとリンパ球数やCD4陽性率やCD25陽性率との間に正の相関があることからpHiのアルカリ化は単に腫瘍細胞の割合が増えたためとも考えられる。純粋に白血病細胞のみのpHiを求められればこの問題は解決する。しかし正常リンパ球と白血病細胞が混在している状態で、白血病細胞のみを分離採取することは非常に難しい。そこで我々は次善の策としてCD25陽性細胞をATL細胞と

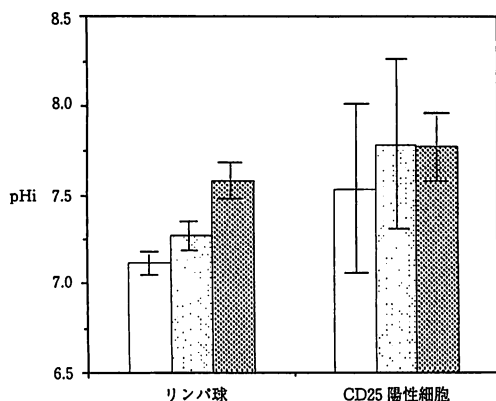


図5 ATLの臨床病型とCD25陽性細胞のpHi
■急性型, □慢性型, □くすぶり型,
± Wean ± 2 SEM

みなし、CD25陰性リンパ球を正常リンパ球と考えて正常リンパ球のpHi=6.99を用いてATL細胞のpHiを計算してみた(図5)。この結果くすぶり型 7.52 ± 0.92 、慢性型 7.77 ± 0.58 、急性型 7.77 ± 0.21 と、くすぶり型でやや低いもののATL細胞のpHiは各病型間で有意差はみられなかった。つまり病型にかかわらず腫瘍細胞であればそのpHiのアルカリ化の程度に差はないといえる。ATL細胞のpHiのアルカリ化と細胞腫瘍化の因果関係は明らかでないが、pHiのアルカリ化はATL細胞には必然的なものといえる。しかしATLの重症化、特に慢性型から急性型への移行にはpHiのアルカリ化だけでは不十分で、他の因子の関与が必要であると考えられた。

6. 血漿浸透圧とpHi(図6)

血漿浸透圧の上昇も Na^+/H^+ exchangerを活性化させる因子の一つである。そこでATL患者の血漿浸透圧とpHiとの関係について調べてみた。血漿浸透圧(Posm: mOsm/l)は直接測定していなかったので、 Na^+ (mEq/l), K^+ (mEq/l), 血糖(BS: mg/dl), 尿素窒素(BUN: mg/dl)値から次のような式で計算して出した。

$$\text{Posm} = 2 \times (\text{Na}^+ + \text{K}^+) + \text{BS}/18 + \text{BUN}/2.8$$

その結果ATLの浸透圧は 285.6 ± 9.3 で、正常人の275~290と比較して特に高くはなかった。またpHiとの関係では、正常では血漿浸透圧が高くなるとpHiは増加する²⁾のに対し、ATLではpHiが高いにもかかわらず血漿浸透圧は正常例

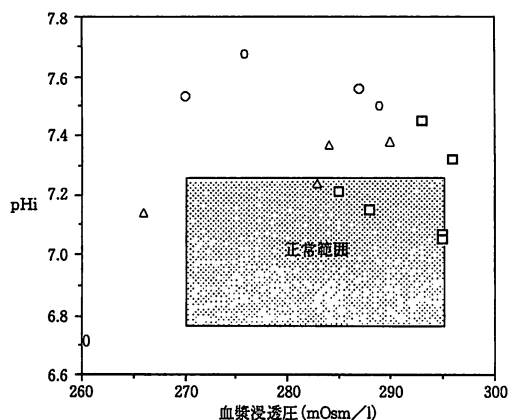


図6 ATLのリンパ球pHiと血漿浸透圧の関係
○急性型、△慢性型、□くすぶり型

が多く、血漿浸透圧はATLのpHiの上昇に関与していないと考えられた。

考 察

ATLでpHiが高い結果がえられた。この現象が腫瘍細胞に共通しているのか、増殖細胞に共通しているのか、それともATL細胞に特有なものなのかを考えてみた。ATL以外のリンパ性白血病について我々が測定した結果では、B細胞性慢性リンパ性白血病 (B-CLL) 7症例の末梢血リンパ球 (大部分が腫瘍細胞) のpHiは 7.22 ± 0.16 、T細胞性慢性リンパ性白血病 (T-CLL) 3例では 7.28 ± 0.24 、急性リンパ性白血病 (ALL) 4例では 7.34 ± 0.09 となった。また培養細胞ではHUT102が7.46、MOLT 2 7.57、RAJI 7.25、HL60 7.60、K562 7.73とやはりpHiは上昇していた。この結果はATL慢性型の 7.26 ± 0.09 、急性型の 7.58 ± 0.12 と大きな差はない。したがってpHiが高いのは腫瘍細胞に共通した現象といえよう。次にpHiの高値が腫瘍化ではなく細胞増殖によってもたらされたもの

の可能性について検討してみた。まず伝染性単核症 (IM) 2症例についてその末梢血リンパ球のpHiを測定してみると、7.38と7.33となりやはり高くなっていた。これらのリンパ球は大部分がEpstein-Barr virus (EBV) 感染B細胞に反応して増殖するT細胞なので、非腫瘍性に増殖する細胞のpHiは高いといえる。また正常人2名について、末梢血リンパ球をphytohemagglutinin (PHA) 刺激すると、刺激前後のpHiの変化は $7.11 \rightarrow 7.25$ 、 $7.16 \rightarrow 7.45$ となりやはり高くなっていた。したがってpHiのアルカリ化は腫瘍非腫瘍に関係なく増殖細胞に共通した現象と思われる。細胞増殖に必須の要因ではないかと考えられる。しかし腫瘍増殖は持続的なものに対して、非腫瘍性増殖は一時的であり、pHiアルカリ化の機序も腫瘍細胞と非腫瘍細胞では異なっている可能性がある。

ATL細胞pHiのアルカリ化がどのような機序で生じているのかは明らかではないが、自己増殖と密接な関係があり、したがって腫瘍化の原因とも関係しているものと考えられる。HTLV-I特有のpX遺伝子産物である分子量4万の蛋白p40^xはHTLV-Iの発現制御部分である5'側のlong terminal repeat (LTR)に作用し、ウイルスの転写を著しく活性化するが、それだけでなく種々の細胞遺伝子にも働き、細胞増殖因子を活性化させる⁸⁾。それらの細胞増殖因子の中にはIL-2、GM-CSF等のNa⁺/H⁺ exchangerを活性化させる因子も含まれている。またATL細胞からはIL-2レセプター (IL-2R)誘導因子が分泌されることが明らかにされ⁹⁾、ATL derived factor (ADL)と名付けられたが、このADFがIL-1様活性を持つこと、DNA合成に必須な物質といわれている酸化還元酵素thioredoxin (TRX)との相同性があることがわかり、やはりNa⁺/H⁺ exchangerの活性化に関係しているものと考えられる。HTLV-IによるATLの発症は白血病細胞が産生するIL-2が自己のIL-2Rに結合することにより細胞増殖が無

限に繰り返されることによるという autocrine 説¹⁰⁾が出された。しかしATL細胞がIL-2に対して増殖反応を示さないことが明らかとなり、HTLV-I感染細胞の腫瘍化前段階ではこのIL-2R発現による機序で細胞質アルカリ化や細胞増殖が生じ、腫瘍化を起し易い状態を作っているのではないかと推測されている。

ATL細胞pHiはアルカリ化し、そのアルカリ化の程度は病型間で差がみられなかった。ただしこの腫瘍細胞pHi測定は間接的なものなので、今後two color染色法を用いて、ウイルス抗原またはCD25陽性細胞のpHiを直接測定し確認する必要がある。ATLのpHiが腫瘍化には関係しているが重症化に関係していないとすれば、重症化に関与している因子は何かという問題が生じる。ATLの重症化とは臨床的にはa)ATL細胞の増加、b)ATL細胞の臓器浸潤(肺、肝、消化管、中枢神経、リンパ節、骨)、c)高Ca血症の出現と進行を指している。pHiのアルカリ化にもかかわらず病型間で細胞増殖に差が生じるのは、pHiアルカリ化に関与しない増殖因子や増殖抑制機構の異常を考える必要がある。臓器浸潤に関しては細胞接着分子の発現異常とHTLV-I tax遺伝子の関与を調べる必要がある。高Ca血症はATL細胞が分泌するparathyroid hormone-related protein (PTHrP)によって生じるとされ、HTLV-I tax遺伝子によるPTHrP遺伝子のトランス活性化作用がその原因¹¹⁾と考えられている。つまりHTLV-IキャリアーからATLの発症さらに重症化を考える場合、p40^{tax}の産生制御機構の解明がその手がかりとなると考えられ、今後の進展が期待される。

ま と め

ATLでは重症化に伴いリンパ球pHiが高くなるが、それはATL細胞の割合が増加するためであり、ATL細胞自体はpHiは高いものの病型間では差がみられない。したがって腫瘍化するためにはpHiのアルカリ化は必要であるが、ATLの重症化にはそれだけでは不十分で他の因子の関与が必要である。

文 献

- 1) Mahnensmith, R. L. et al. : The plasma membrane sodium-hydrogen exchanger and its role in physiological and pathophysiological processes. *Circ Res.* 56 : 773-788, 1985.
- 2) Grinstein, S. et al. : Na^+/H^+ exchange and growth factor-induced cytosolic pH change. Role in cellular proliferation. *Biochem Biophys Acta.* 988 : 73-97, 1989.
- 3) Uchiyama, T. et al. : Adult T cell leukemia : Clinical and hematological features of sixteen cases. *Blood.* 50 : 481, 1975.
- 4) 石井俊徳他 : フローサイトメトリーによるリンパ球の細胞内pH測定。月経周期およびT細胞亜群との関係について。熊本大学医療技術短期大学部紀要。4 : 69-74, 1994.
- 5) 米山彰子他 : フローサイトメトリーによる細胞内pHの測定。 *Med Immunol.* 18 : 813-817, 1989.
- 6) Thomas, J. A. et al. : Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ. *Biochem.* 18 : 2210-2218, 1979.
- 7) Shimoyama, M et al. : Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukemia-lymphoma. *Br J Haematol.* 79 : 428-437, 1991.
- 8) Yoshida, M. : Expression of HTLV-I genome and its association with a unique T-cell malignancy. *Biochem Biophys Acta.* 907 : 145-161, 1987.
- 9) 若杉尋他 : 3B6-IL-1とADF(ATL-derived factor). *Med Immunol.* 18 : 721-730, 1989.
- 10) Yodoi, J. et al. : T cell growth factor receptors in adult T-cell leukemia. *Blood.* 62 : 509-510, 1983.
- 11) Watanabe, T. : Constitutive expression of parathyroid hormone-related protein gene in human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) carriers and adult T cell leukemia patients that can be transactivated by HTLV-1 tax gene. *J Exp Med.* 172 : 759-765, 1990.