

氏 名	齋 藤 桐 子
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 479 号
学位授与年月日	平成 27 年 3 月 18 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	同種造血幹細胞移植後サイトメガロウイルス特異的細胞傷害性 T 細胞の動態に関する研究
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教 授 花 園 豊 (委 員) 教 授 岡 本 宏 明 准教授 水 田 耕 一

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

難治性造血器疾患に対する同種造血幹細胞移植 (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, Allo-HCT) では、免疫抑制状態下での感染症管理が極めて重要となってくる。しかしながら、Allo-HCT 後、患者体内で感染症に対する免疫をどのように再構築し生体防御にかなげているのか不明な点も多い。このため、本研究では移植後合併症の中でも頻度が高く臨床特特に重要なサイトメガロウイルス (cytomegalovirus, CMV) に着目し、Allo-HCT 後の CMV 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CMV specific cytotoxic T cell, CMV-CTL) の推移を解析することとした。

### 2 研究方法

#### 1. 対象および期間

本研究はレシピエント・ドナーともに HLA-A\*2402 を有し、かつレシピエントが血清学的 CMV 陽性、ドナーが血清学的 CMV 陰性のペア 3 組を対象とした。各症例において、同種移植後 day30 から 2 年までの間を 5-7 ポイント選択し解析した。また好中球生着から週に 1 回 CMV 再活性化のモニタリングを施行し、一定の基準を満たした場合、pre-emptive therapy として抗ウイルス薬を投与した。

#### 2. HLA-A\*2402 拘束性 CMV 特異的 CTL のモニタリング

末梢血単核球の細胞表面を HLA-A\*2402 CMV-pp65 テトラマーおよび抗ヒト CD8 抗体で標識した。CD8 陽性かつ CMV テトラマー陽性細胞を CMV-CTL と定義し、移植後の検出頻度をモニターした。同時に抗ヒト CD45RA、CCR7、CD27、CD57 抗体にて標識し、これらの発現パターンにより分化・成熟度をモニターした。

#### 3. Direct single-cell analysis 法を用いた HLA-A\*2402 拘束性 CMV 特異的 CTL の T 細胞受容体 β 鎖の解析

FACS AriaII を用いて CMV-CTL を 1 細胞ずつ単離し、逆転写反応により T 細胞受容体 β 鎖の相補的 DNA を作成した。その後 3 回 PCR を繰り返して、DNA を増幅した。最後に 3rd.PCR 産物から精製した DNA を用いてサーマルサイクリングを行った後、Genetic Analyzer を用いて β 鎖内の相補性決定領域 (complementarity-determining region3, CDR3) の遺伝子配列を

決定した。

#### 4. HLA-A\*2402 拘束性 CMV 特異的 CTL のキメリズム解析

CMV-CTL から DNA を抽出し、Power Plex16 system を用いて遺伝的多型を有する 16 ロークラスを PCR 法にて増幅しタイピングを行った。これにより CMV-CTL がドナー・レシピエントのいずれに由来するかを判定した。また、各症例で初めて CMV-CTL が検出されたポイントでは、造血細胞集団、骨髄系細胞集団、CD4 陽性 T 細胞集団、CD8 陽性 T 細胞集団、B 細胞集団の各細胞集団についてもキメリズム解析を施行した。

#### 5. 単細胞からの CMV-CTL クローン樹立および IFN- $\gamma$ ELISPOT 解析

96 ウェルプレートに細胞培養液を満たし、各ウェルに CMV-CTL を FACS Aria II を用いて 1 細胞ずつソーティングし培養した。2 週間後、上述の 3 と同じ方法により CDR3 領域遺伝子配列を同定し、3 週間後、ELISPOT 法により IFN- $\gamma$  産生能を調べた。

### 3 研究成果

#### 1. 臨床経過および HLA-A\*2402 拘束性 CMV 特異的 CTL の発現頻度

3 症例全例で生着を認め、かつ CMV 感染症の発症は認めなかった。症例 1 は CMV 再活性化を認めることはなかった。症例 2 は移植後早期に CMV 活性化を一度のみ認めたが、抗ウイルス薬による治療を要することなく陰性化した。症例 3 は頻回に CMV 再活性化を認め、抗ウイルス薬による pre-emptive therapy を要した。

Allo-HCT 後の CMV-CTL は、CMV 再活性化を認めなかった症例 1 では CD8 陽性 T 細胞の 1.1-8.1% を占めた。一方、症例 2 では経過中 0.5%、症例 3 では 1.1% を超えることはなかった。

#### 2. HLA-A\*2402 拘束性 CMV 特異的 CTL の分化・成熟

分化段階に関して、全例においてエフェクターメモリー T 細胞およびエフェクター T 細胞への分化傾向を認めた。成熟度に関しては、全例において成熟した T 細胞が主要分画を構成していた。これらの傾向は頻回に CMV 再活性化を認めた症例 3 において最も顕著であった。

#### 3. HLA-A\*2402 拘束性 CMV 特異的 CTL のクローン型

CMV-CTL の BV gene family の使用割合に関して、3 例全例で共通の BV gene family が用いられる傾向を認めた。CDR3 の配列に関しては、全症例において、移植後早期に同定された CMV-CTL クローン型がその後も検出され、かつ主要クローンを占めていた。症例間で同一の配列は認めなかったものの、3 症例全てにおいて共通するモチーフが検出された。

#### 4. HLA-A\*2402 拘束性 CMV 特異的 CTL のキメリズム解析

症例 1 では、移植後 30 日の造血細胞集団、骨髄系細胞集団、CD4 陽性 T 細胞集団、CD8 陽性 T 細胞集団は、全てが混合キメラであった。しかしながら CMV-CTL に関しては、移植後 2 年間にわたり完全レシピエント型であることが判明した。症例 2 および症例 3 では全ての解析ポイントにおいて CMV-CTL は完全ドナー由来であった。

#### 5. CMV-CTL クローンの IFN- $\gamma$ ELISPOT 解析

症例 1 における最頻出クローンにつき、クローン樹立に成功した。本クローンは、ELISPOT 法において著明な IFN- $\gamma$  産生を認めた。

#### 4 考察

今回解析した CMV-CTL は分化傾向を認めた。これは、CMV 再活性化に対抗するために、より細胞傷害活性能を有する段階へ分化していたためと考えられる。また、特定の BV gene family が使用される傾向を認めた。既報にもある通り、同種移植後の CMV-CTL は HLA 拘束性に特定の BV gene family を選択する傾向があるのかもしれない。

症例 1 のキメリズム解析に関して、今回初めて CMV-CTL と他の細胞集団のキメリズムが乖離していることを証明した。また、症例 1 では移植後汎血球減少が持続したにもかかわらず、一度も CMV 再活性化を認めることなく経過した。これより残存したレシピエント由来の CMV-CTL が CMV 再活性化制御に有効であった可能性が考えられた。

また今回の解析からは、以前の我々の報告と同様、極めて限定された特定のクローンのみで CMV 再活性化を抑えられる可能性が示唆された。

ただし、今回は 3 症例のみの解析であるため、今後も臨床症状とリンクしながらの基礎研究による追試が必要である。

#### 5 結論

Allo-HCT 後 HLA-A\*2402 拘束性 CMV-CTL の動態を解析した。いずれの症例も CMV-CTL は分化・成熟傾向を認めた。また特定の BV gene family を限定的に使用し、かつ、特定のモチーフを有する傾向をみとめた。更に、移植後長期にわたりレシピエント由来の CMV-CTL が残存し CMV 感染予防に有益であった可能性を初めて報告した。今後も症例を重ねることで、Allo-HCT 後の CMV-CTL の動態を明らかにしたいと考えている。

### 論文審査の結果の要旨

同種造血幹細胞移植後のサイトメガロウイルス(CMV)特異的細胞傷害 T 細胞(CTL)の体内動態を詳細に解析した論文である。対象患者数は 3 例。3 例とも CMV 感染既往のないドナーから CMV 感染既往のあるレシピエントに移植が行われた。症例 1 は CMV の再活性化がなく、症例 2 及び 3 においては再活性化が認められた。症例 1 の CMV-CTL はレシピエント由来、症例 2 及び 3 の CMV-CTL はドナー由来であった。3 症例とも CTL の認識するエピトープの多様性は低く、特定のエピトープを認識する傾向が強かった。

対象症例が 3 例と少ないのが難点といえど、各症例の解析は詳細かつ綿密であった。CMV-CTL に関してクローナルな解析を行い、(1)それがレシピエント由来であるか、ドナー由来であるかを示し、(2)さらに CTL の T 細胞受容体を解析してそのクローナリティを示した。今回、新たになった事実は、以下のとおりである。

(1) 3 例中 1 例においてレシピエント由来の CTL が CMV 再活性化の抑制に働いていたこと。従来、ドナーに由来する免疫系が再構築されてウイルス感染防御に働くと考えられていた。しかし、レシピエント由来の CTL が移植後も残存し、ウイルス感染防御に貢献していることがわかった。

(2) CMV 再活性化の抑制に働く CTL の多様性は思ったより低かった。大多数の CMV-CTL が少数のクローンに由来しそれが繰り返し出現する。このことは、ウイルス感染防御に際して重要なエピトープは限られていて、そのエピトープをしっかり抑えればウイルス感染は制御可能であ

ることを示唆する。

論文は新規性のあるデータを含んでおり示唆に富む。また、論文は読みやすく誤植は極めて少なかった。実験データは分子生物学手法に基づく明快なもので十分説得力をもつ。審査員全員一致で論文審査は合格とした。

## 最終試験の結果の要旨

学位審査会では、審査委員から数々の質問やコメントが出され、活発な討議が行われた。

主たる論点を上げると、まず、症例1における CMV-CTL がレシピエント由来だった点について。これは既報にはないユニークな点である。本症例は、このままレシピエント由来の CTL が残存し続けるのか、あるいは、いずれドナー由来の CTL に置換されるのか、今後も経過観察を継続すれば興味深い知見が得られるであろう。

また、CMV-CTL が極めて少数のクローンに由来する点について。これも本報のユニークな点である。特定のエピトープの制御で CMV 再活性化を抑制できるとすれば、そのエピトープを抑制する低分子化合物による新規 CMV 治療の道を開くかもしれない。

発表および質疑応答から、申請者が研究者として十分な資質・能力を有することは明らかで、学位を受けるに値すると審査員全員が判断、最終試験に合格とした。