

表 題 成人 T 細胞性白血病患者の細胞傷害性 T 細胞クローンにおける
HLA-A02:01 拘束性 Tax 特異的 T 細胞受容体の解析

論 文 の 区 分 博士課程

著 者 名 楠田 待子

担当指導教員氏名 神田 善伸 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
専攻 地域医療学系
専攻分野 総合医学
専攻科 内科系総合医学

2023 年 1 月 10 日申請の学位論文

成人 T 細胞性白血病患者の細胞傷害性 T 細胞クローンにおける HLA-A02:01 拘束性 Tax 特異的 T 細胞受容体の解析

目次

1, はじめに	2
2, 方法	4
2.1, 研究デザイン.....	4
2.2, フローサイトメーターによる Tax-CTL 抽出と次世代シーケンス解析...	4
2.3, 解析方法.....	9
2.3.1, Circos plot と Weblogo.....	9
2.3.2, Shannon 多様度指数	10
2.3.3, Binding score.....	10
2.3.4, 遺伝子発現プロファイリング.....	10
2.4, Tax-CTL クローンの樹立と細胞傷害性の評価	11
3, 結果	12
3.1, 患者背景.....	12
3.2, Tax-CTL の機能的特徴	13
3.3, Tax-CTL の TCR α 鎖と β 鎖における CDR3 領域の特徴	15
3.4, Tax-CTL の Shannon 多様度指数と Binding score.....	18
3.5, Tax-CTL の時間経過による変化	21
3.6, Tax-CTL クローンの T2 cell lines に対する in vitro での細胞傷害評価	26
3.7, Tax-CTL の GEP と PPI ネットワーク、GO Enrichment 解析.....	27
4, 考察	30
5, おわりに	34
6, 引用文献	35

1, はじめに

成人 T 細胞白血病 (Adult T-cell leukemia, ATL) に関連して、ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (Human T-cell leukemia virus type1, HTLV-1) が初めて報告されたのは 1970 年代後半である¹。およそ半世紀が過ぎ、病態に対する理解や治療法の開発が徐々に進んできた。最近の調査で HTLV-1 は日本の南西地域、サハラ砂漠以南アフリカ大陸、南アメリカ大陸、カリブ海諸国、中東地域やオーストラロ・メラネシア人で多く認められていることが知られている²。母乳による垂直感染や供血による水平感染を防ぐため、HTLV-1 に関する啓蒙活動や、HTLV-1 抗体検査による適切なドナー選択などにより、HTLV-1 感染者の数は徐々に減少してきた。しかし日本では社会全体の高齢化により、潜在的な HTLV-1 キャリアも高齢化が進み、ATL の発症頻度が高まることから、近年の日本において ATL 患者数は増加傾向となっている³。ひとたび ATL を発症すると、同種造血幹細胞移植 (Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HCT) 以外に根治は期待しがたい。基礎疾患を抱えることの多い高齢患者において、移植治療による致死的な合併症の危険性の高さは想像に難くないが、化学療法で病勢コントロールが十分につけられない、もしくは最適な血縁ドナーが確保出来ないなどの理由で移植治療にたどり着けないことも多い。当然、ATL 患者の長期予後は依然として悪く、新たな治療法の確立が望まれている。

Tax は HTLV-1 の持つウイルスタンパク質で、免疫回避や ATL への進展に関わることが知られている^{4,5}。一方で、Tax は T 細胞の有力な標的抗原であり⁶、Tax に特異的な CD8 陽性の細胞傷害性 T 細胞 (CD8+ cytotoxic T cells, CTLs) の増加は、HTLV-1 のプロウイルス量と逆相関すること⁷や、化学療法後に ATL の再発を予防する効果があること⁸が報告されてきた。昨今、養子細胞療法の一つである、キメラ抗体受容体療法 (chimeric antigen receptor T-cell therapy, CAR-T 療法) が、造血器腫瘍の悪性リンパ腫や急性リンパ性白血病に対して高い効果を発揮するこ

とが示され、その他の腫瘍の治療にも応用されるべく研究が進んでいる。本研究で Tax 特異的 CTL の解析を行うことは、CAR-T のように ATL に対する効果的な細胞療法確立の一助となる可能性があると考えられる。当研究室では、これまで HTLV-1 に対する HLA-A24:02 拘束性 Tax 特異的 CTL について、単一細胞レベルで T 細胞受容体 (T cell receptor, TCR) のレパトア解析を行い、そのレパトアが高度に制限されたオリゴクローナルな特徴を持っていること、特に TCR- β 鎖遺伝子の相補的決定領域 (complementarity determining region 3, CDR3) で、特徴的なアミノ酸配列「PDR」を持つことを報告した^{9,10}。さらにその「PDR」配列をもつ Tax 特異的 CTL は allo-HCT 後の長期生存患者や、無症候性 HTLV-1 キャリアでも認められ^{11,12}、ATL 患者由来の感染 T 細胞に対して細胞傷害性を有していることが分かっている¹³。日本人において最多の HLA-A24:02 の次に多い HLA-A アリル型は HLA-A02:01 であり¹⁴、それぞれ 35.6% と 10.9% に認められる。HLA-A02:01 拘束性 Tax 特異的 CTL について解析を行うことで、HLA-A24:02 拘束性 Tax 特異的 CTL の解析結果と合わせると、両親から引き継いだ 2 つのアレルとも、A24:02 も A02:01 も持たない確率を全体から減じた $1-(1-0.356-0.109)^2$ と計算されることから、日本人の約 7 割の ATL 患者の治療に貢献出来る可能性がある。

2, 方法

2.1, 研究デザイン

本研究では HTLV-1 感染患者検体より HLA-A02:01 拘束性 Tax 特異的 CTL (Tax-CTL) を抽出し、TCR- α 鎖と β 鎖における CDR3 領域のアミノ酸配列 (amino acid, AA) で基底されるレパトアに関し、次世代シーケンス (Next-generation sequence, NGS) の手法を用いて解析を行った。Tax-CTL についても NGS の手法で遺伝子発現プロファイリング (gene expression profile, GEP) を行った。さらに Tax-CTL からクローンを樹立し、細胞傷害性の評価をした。本研究はヘルシンキ宣言に基づき、自治医科大学倫理審査委員会の承認を受け、計画書を遵守して行われた。全症例で、検体の採取および研究使用について書面で同意を得ている。

2.2, フローサイトメーターによる Tax-CTL 抽出と次世代シーケンス解析

患者検体より分離した末梢血単核球細胞 (Peripheral blood mono-caller, PBMC) に、HLA-A02:01 HTLV-1 Tax₁₁₋₁₉ (LLFGYPVYV-PE) Tetramer (10 μ L, Medical & Biological Laboratories, Tokyo, Japan) 試薬を 30 分反応させた後、CD3, CD8, CCR7, CD45RA に対する蛍光標識抗ヒトモノクローナル抗体 5 μ L ずつ染色した。FACS Aria II フローサイトメーターで解析する直前に 7-aminoactinomycin D (7AAD) を追加し、死細胞除去の判定に用いた。Tax-CTL は CD3+CD8+Tax-tetramer+ の細胞集団と定義し、解析は FACSDiva™ ソフトウェアで行った。

抽出した Tax-CTL は 1000 細胞を上限に、Toriton を用意した PCR チューブに直接ソートし、SMARTer® Human TCR α/β Profiling Kit (Takara Bio, Inc., Otsu,

Japan)を用いて complementary DNA (cDNA)ライブラリーを作成した。手順は下記(表 1)に記す。作成したライブラリーは Agencout AMPure XP Beads (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)で精製し、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)と Agilent DNA1000 reagent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)で品質評価を行った。

表 1 SMARTer-RNA kit を利用した cDNA 合成までの手順

	内容	μ L/tube
1. ソート前準備	RNAse-free H ₂ O with 0.5% triton X 19 μ L	3.5
	RNAse inhibitor 1 μ L*	
2. 細胞ソート	PCR チューブに細胞をソートする	
	RNAse-free H ₂ O (ソート細胞数により量は調整)	
	合計	10.5
3. 逆転写反応の準備	上述までのソートした細胞と反応液	10.5
	TCR dT primer*	2.0
	合計	12.5
	72℃で3分反応後、4℃で2分静置する	
	上述までの反応させた細胞と反応液	12.5
	5× Ultra Low First-Strand Buffer*	4.0
	SMART-seq v4 Oligonucleotide*	1.0
	RNAse Inhibitor*	1.0
	SMARTScribe Reverse Transcriptase*	2.0
	合計	20.0
4. 逆転写反応	42℃ 45 min	

	70°C 10min	
	4°C forever	
5. PCR1 の準備	RT template	20.0
	2× SeqAmp PCR CB Buffer*	25.0
	SMART Primer1*	0.5
	TCRb Human Primer*	0.5
	SeqAmp DNA Polymerase*	1.0
	RNase-free H ₂ O	3.0
	合計	50.0
6. PCR1	95°C 1min	
	30 cycles	
	<div> <div>94°C 1min</div> <div>53°C 1min</div> <div>68°C 1min</div> </div>	
	72°C 10min	
	4°C forever	
7. PCR2 の準備	上述の PCR1 産生物	1.0
	2× SeqAmp PCR CB Buffer*	25.0
	SMART Primer2*	0.5
	SeqAmp DNA Polymerase*	1.0
	RNase-free H ₂ O	22.0
	TCRb Forward Primer2*	0.5
	合計	50.0
8. PCR2	95°C 1min	
	20 cycles	

94°C 1min
 53°C 1min
 68°C 1min
 72°C 10min
 4°C forever

9. 精製	PCR2 産生物	50.0
	10× Lysis Buffer*	1.0
	AMPure XP beads (Beckman Coulter)	25.0
	25°Cで 10 分静置後、磁性分離機器に 10 分静置する	
	上述で分離した上清	50.0
	AMPure XP beads (Beckman Coulter)	10.0
	25°Cで 10 分静置後、磁性分離機器に 10 分静置する	
	上清を除去する	
	80%エタノールで 2 回洗う	
	磁性分離機器におき、凝集したビーズを乾燥させる	
10. 品質評価	Elution Buffer*	17.0
	25°Cで 10 分静置後、磁性分離機器に 10 分静置する	
	上清の TCR library を採取する	
	Agilent Bioanalyzer 2100 と Agilent DNA 1000 reagent (Agilent Technologies)を用いて品質評価を行う	

* SMARTer® Human TCR a/b Profiling Kit (Takara bio)中の試薬

PCR, Polymerase chain reaction;ポリメラーゼ連鎖反応

また、抽出した Tax-CTL は SMART-Seq® v4 Ultra® Low Input RNA Kit for Sequencing (Takara Bio, Inc., Otsu, Japan) でも同様に cDNA ライブラリーを作

成した。作成したライブラリーは Agencourt AMPure XP Beads で精製し、Agilent 2100 Bioanalyzer と Agilent High Sensitivity DNA reagent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) で品質評価を行った。手順は(図 2)に記した過程とほぼ同様の流れにはなるが、大きく異なるのは、PCR が 1 回であることと、精製手順でビーズによる吸着反応が 1 回となっている点である。

SMARTer では 700–800 bp、SMARTseq v4 では 400–10000 bp と図 1 に示す様な適当なピークを BioAnalyzer で確認した後は Takara Bio, Inc. (Otsu, Japan) に検体を送付し、以降の処理を依頼した。

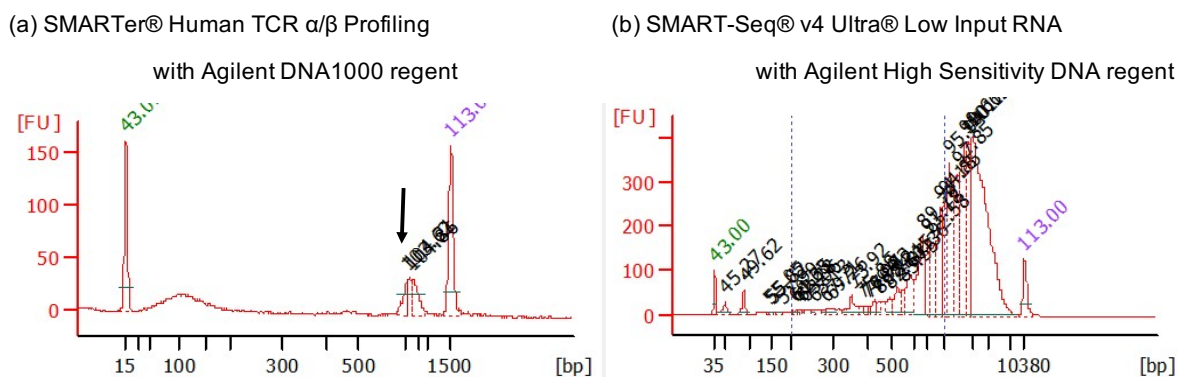


図 1 BioAnalyzer によるピークの確認

SMARTer では Miseq Reagent Kit v3 (Illumina, San Diego, CA, USA) と PhiX control Kit v3 (Illumina, San Diego, CA, USA)、Illumina MiSeq® sequencer (Illumina, San Diego, CA, USA) により、 2×300 の基底ペアを用いたエンドペア法で、次世代シーケンスが行われた。さらに MiSeq Control Software (MCS) v2.6.2.1、Real-Time Analysis (RTA) v1.18.54 そして bcl2fastq2 v2.17 で初期解析が行われた。なお、あるクローンの占める割合(%)とソートされた細胞数の積が 1 以下のクローンはエラーとして除外した。SMARTseq v4 は Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, USA)、NovaSeq 6000 [S4/SP] Reagent Kit

v1.5 (Illumina, San Diego, CA, USA)、そして NovaSeq [Xp 4-Lane/Xp 2-Lane] Kit v1.5 (Illumina) でシーケンス解析が行われた。シーケンスは NovaSeq Control Software v1.7.5、RTA v3.4.4、bcl2fasq2 v2.20 そして DRAGEN Bio-IT Platform v3.7.5 を利用し、GRCh38.primary_assembly.genome.fa.gz (GENCODE) と gencode.v39.primary_assembly.annotation.gtf.gz (GENCODE) を用いてマッピング、アノテーション(機能注釈)が実施された。

それ以降は SMARTer、SMARTseq いずれも自治医科大学さいたま医療センターでさらなる解析を行った。

2.3, 解析方法

全ての解析は EZR ver. 1.60 (<https://www.jichi.ac.jp/saitama-sct/SaitamaHP.files/statmedEN.html>)¹⁵ を用いて実施された。後述する Shannon 多様度指数や Binding score といった非正規分布する連続変数の解析には、Fisher の正確検定、Mann-Whitney の U 検定と Kruskal-Wallis 検定を用いて、特定のモチーフの有無や予後などで群別したクローン群間の差に関して評価した。

2.3.1, Circos plot と Weblogo

Tax-CTL の CDR3 領域における BV と BJ 遺伝子、AV と AJ 遺伝子の関係は無料のオンライン計算ツールである Circos plot (<http://circos.ca>) を利用して解析した。各アミノ酸のシーケンスの評価には Weblogo (<http://weblogo.threeplusone.com>) を用いた。Weblogo では横軸が N 末端から C 末端までのアミノ酸の位置を示し、縦軸における全体の高さは配列の保存性を示している。各アルファベットのシンボルの高さはアミノ酸の相対的な頻度を示している。

2.3.2, Shannon 多様度指数

Shannon 多様度指数は R の “vegan” package (ver. 2.6-2) を用いて、下記の計算式で計算された。この指数は生物多様性を定量的に評価する一つの指標として考えられており、これは種数が多いほど、かつ各種の均等度が高いほど、高い数値となり、集団の多様性が高いことを示すことが知られている。

1. $H = -\sum_{i=1} P_i \log(P_i)$, $P_i = \text{proportional abundance of clonotypes } i$
2. $E_H(\text{or } J) = H/\log S$, $S = \text{total number of clonotypes in the group}$

2.3.3, Binding score

TCR β -CDR3 と HTLV-1 Tax11-19 peptide (LLFGYPVYV-PE) の結合度を示す Binding score は GitHub code (<https://github.com/IdoSpringer/ERGO-II>) を利用した¹⁶。TCR のデータベースである VDJdb (<https://vdjdb.cdr3.net/>, February 2020) と Long Short-Term Memory (LSTM) モデルを用いて、数値を求めた。

2.3.4, 遺伝子発現プロファイリング

Tax-CTL の遺伝子発現プロファイル (Gene expression profiles, GEP) は R (ver. 4.2) と EZR の 「edgeR」 パッケージを用いて解析した^{17,18}。発現変動遺伝子 (Differentially expressed genes, DEGs) の検出には尤度比検定を用いており、遺伝子オントロジー (Gene ontology, GO) 的 Enrichment 解析における生物統計学手法は、過去の報告で記載している通りである^{19,20}。Tax-CTL におけるタンパク質相互作用 (Protein-protein interaction, PPI) は STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins)²¹ を通して Cytoscape (ver. 3.9.1, <http://www.cytoscape.org/>) にプラグインされた ClueGO²² と CluePedia²³ を用いて解析した。

2. 4, Tax-CTL クローンの樹立と細胞傷害性の評価

患者 6 から抽出した Tax-CTL よりクローンを樹立した。具体的には、AIM-V 培地 (12055-083, Thermo Fisher Scientific K.K., Waltham, MA, USA) に 10%AB 型ヒト血清 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) と増殖刺激因子として Teceleukin (Genetical Recombination; rIL-2) (200U/mL, Shionogi, Osaka, Japan)、Phytohemagglutinin-P ($5\mu\text{g/mL}$, FUJIFILM Wako Chemicals, Osaka, Japan) を混合した溶媒でコートした 96well 丸底プレートに、1 細胞ずつ Tax-CTL をソートし、mitomycin C solution ($50\mu\text{g/mL}$, Nacalai tesque, Kyoto, Japan) 処理した HLA-A0201 陽性健常人の PBMC ($8 \times 10^4/\text{well}$) と共培養した。1 週間培養したところで AIM-V に 10%AB 血清と rIL-2 (200U/mL) を混和した培地を追加し、Tax-CTL クローンを樹立した。

樹立した Tax-CTL クローンによる HLA-A0201 陽性のヒト T/B リンパ芽球細胞株 (T2 細胞) (Riken Bioresource Research Center, Tsukuba, Japan) への細胞傷害性は calcein-acetoxymethyl (AM) による方法で行った。標的となる T2 細胞は HLA-A0201 拘束性の Tax₁₁₋₁₉ ペプチド (Genscript, Nanjing, China) による刺激後、Calcein-AM (Dojindo Molecular Technologies, Mashiki, Japan) で標識し、標的細胞に対する細胞傷害性 T 細胞比 (Effector/target ratio, ET ratio) を変化させ、反応開始 4 時間後から 24 時間後の間で、その活性の度合いをテラスキャン (Minerva Tech, Tokyo, Japan) で評価した。なお、細胞傷害比は下記の式で表される。

% cytotoxicity

$$= 100 \times \left(\left[\frac{\text{average fluorescence of the sample wells} - \text{average fluorescence of maximal - release control wells}}{\text{average fluorescence of minimal - release control wells} - \text{average fluorescence of maximal - release control wells}} \right] \right)$$

3, 結果

3.1, 患者背景

対象となった症例は 7 例であり、合計 21 本の末梢血検体を得た。表 2 に詳細を記す。具体的には allo-HCT 後長期寛解症例 1 例、急性型 3 例、くすぶり型 ATL1 例、慢性型 1 例、無症候性キャリア 1 例だった。

患者 4 は allo-HCT 後、270 日、1 年、3 年、5 年と 7 年の時点での検体を採取できた。移植療法後の患者 4 と患者 5 のみ化学療法後の検体だったが、それ以外の症例(患者 1 と 2 ; 急性 ATL、3 ; くすぶり型 ATL、6 ; 慢性 ATL、7 ; 無症候性キャリア)は化学療法前の検体だった。患者 1、2、3 は化学療法後再発し、それぞれ 603 日目、435 日目、283 日目に死亡している。患者 4 は ATL 再発はしなかったものの、感染症により Allo-HCT 後 2817 日目で死亡した。

表 2 患者背景

	年齢(歳)	性別	病型	検体採取時期	治療	転帰
1	66	女	急性	治療前	化学療法	再発死亡
2	69	M	急性	治療前	化学療法	再発死亡
3	74	女	くすぶり	治療前	化学療法	再発死亡
4	57	M	急性	allo-HCT 後	Allo-HSCT	感染症死亡
5	66	女	急性	治療後	化学療法	寛解
6	48	M	慢性	-	経過観察	生存
7	72	女	キャリア	-	経過観察	生存

表 2 続き

	HLA-A	生存期間 (年)	白血球数 (/L)	リンパ球数 (/L)	異型リンパ球数 (/L)
1	02:01, - : -	1.58	28.9	0.75	0.00
2	02:01, - : -	1.17	36.7	4.84	0.00
3	02:01, 02:06	2.00	6.93	2.15	0.21
4	02:01, 24:02	8.08	4.29	1.54	0.00
5	02:01, 24:02	10.8	4.64	2.13	0.093
6	02:01, 26:01	12.4	7.98	2.87	0.40
7	02:01, 03:02	3.00	5.43	0.90	0.00

* 各データは本研究で使用した検体採取時のもの。患者 4 においては、allo-HCT 後 270 日目検体採取時のデータを記載した。

3. 2, Tax-CTL の機能的特徴

図 2 に示す通り、Tax-CTL は CD3+T 細胞の 0.35%(0.042-0.95%)、CD8+T 細胞の 1.11%(0.51-2.5%)に認めた。CD8+T 細胞中に占める割合について、急性 ATL とそれ以外、病態が慢性的で 3 年以上生存した群(長期生存群；患者 4、5、6、7)と進行性の経過で早期に死亡した群(早期死亡群；患者 1、2、3)で比較したものの、明らかな有意差は認められなかった。T 細胞は CD45RA と CCR7 により 4 つのサブタイプ (naive T, central memory T, effector memory T, effector T) に分類されることが知られている²⁴。Tax-CTL はどの患者においても Effector Memory T 細胞(T_{EM})が中心となっていた。

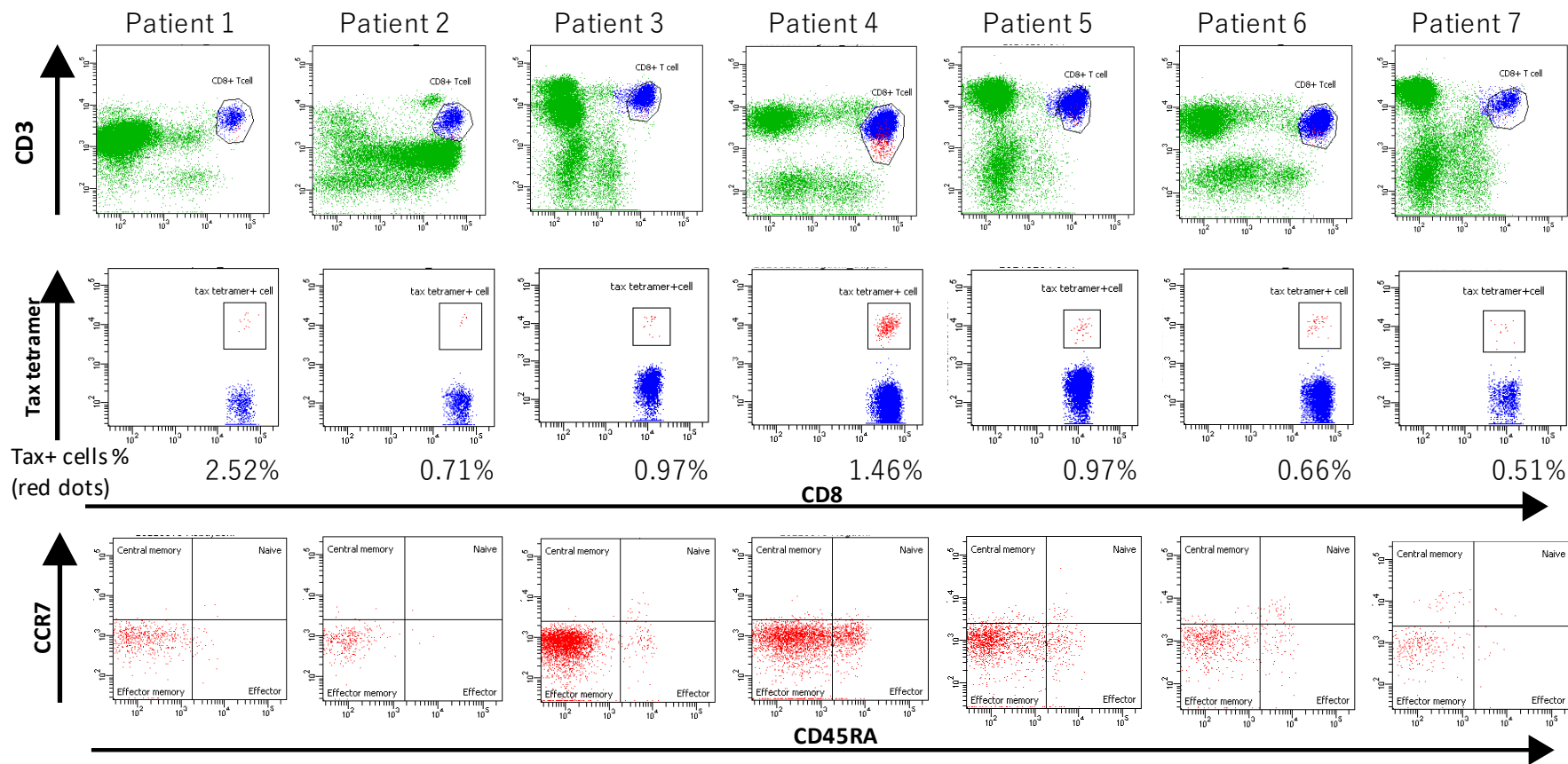


図2 Flow cytometer による患者毎の CD8 陽性 Tax テトラマー陽性 T 細胞の検出割合と特性

* CD8 陽性 Tax テトラマー陽性 T 細胞は CD8⁺細胞中 0.51%から 2.52%の割合で認められ、いずれもエフェクターメモリーT 細胞 (T_{EM}) の形質を示していた。

3.3, Tax-CTL の TCR α 鎖と β 鎖における CDR3 領域の特徴

7 人の患者の 21 検体から 6325 細胞[中央値:250 細胞(最小 153 細胞-最大 1000 細胞)]の Tax-CTL が解析され、 α 鎖では 151、 β 鎖では 206 のクローンが同定された。患者 4 は複数のサンプルがあったため、患者間比較を行う場合には移植後 5 年目の検体データを利用した。

TCR α 鎖については AV12-2 (29.4%)、AV12-1 (19.6%)、AV29/DV5 (11.8%) と AJ24 (40.0%) の組み合わせが多く認められ、 β 鎖については BV28 (26.4%)、BV6-5 (25.6%)、BV9 (9.9%) に対し BJ2-1 (24.8%)、BJ2-7 (19.0%)、BJ2-5 (12.4%)、BJ2-3 (14.0%) の組み合わせに偏って遺伝子利用されていた (図 3)。

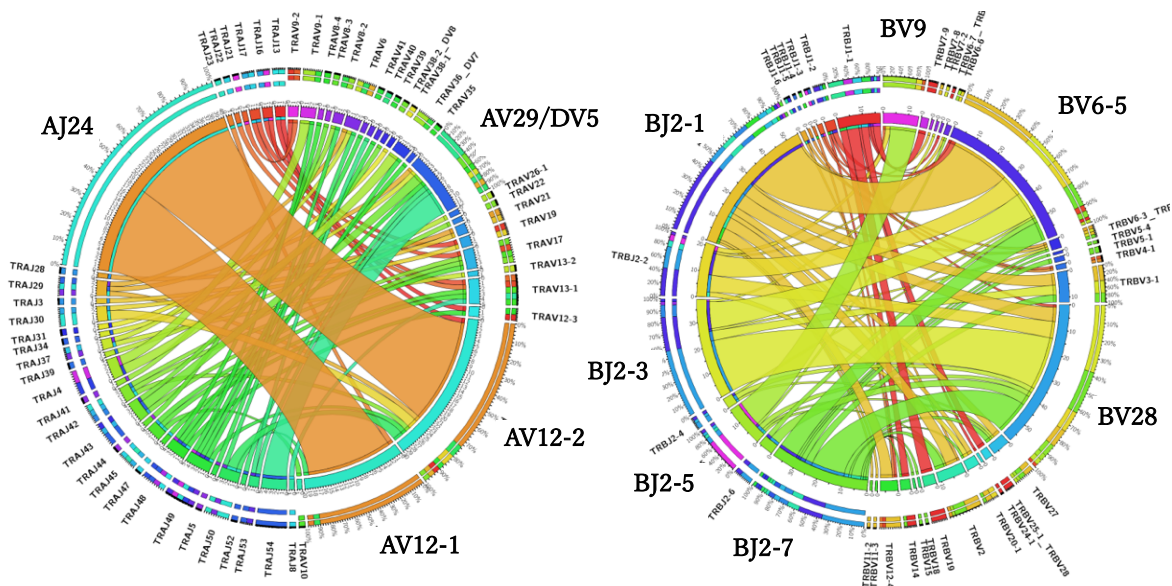


図 3 Tax-CTL の α 鎖 (AV と AJ) と β 鎖 (BV と BJ) 遺伝子ファミリーの Circos plot

アミノ酸の長さは TCR α 鎖で 13 個、 β 鎖は 15 個を頂点とする正規性に近い分布を示していた (図 4)。3.2 と同様に予後で群別し比較すると、両鎖において、長期生存群でアミノ酸数は長くなる傾向があった (図 5)。

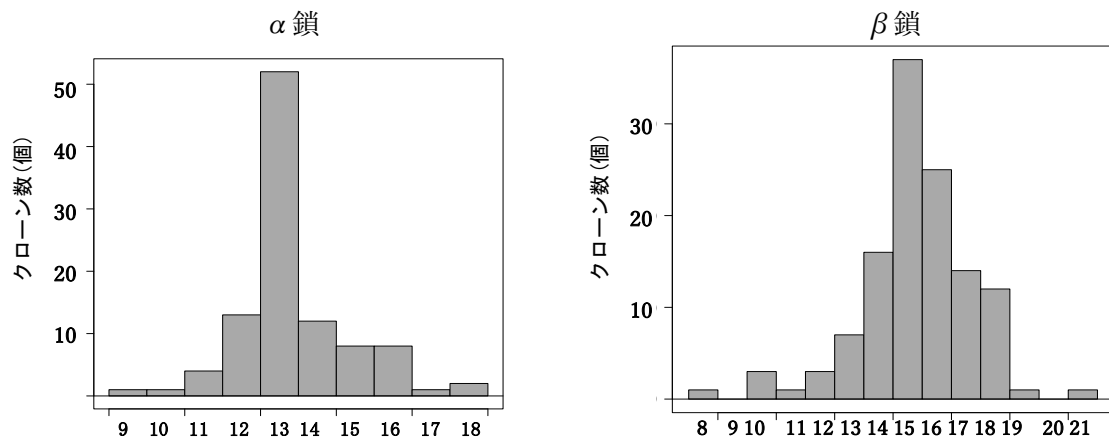


図4 Tax-CTL の CDR3 領域を構成するアミノ酸数の分布

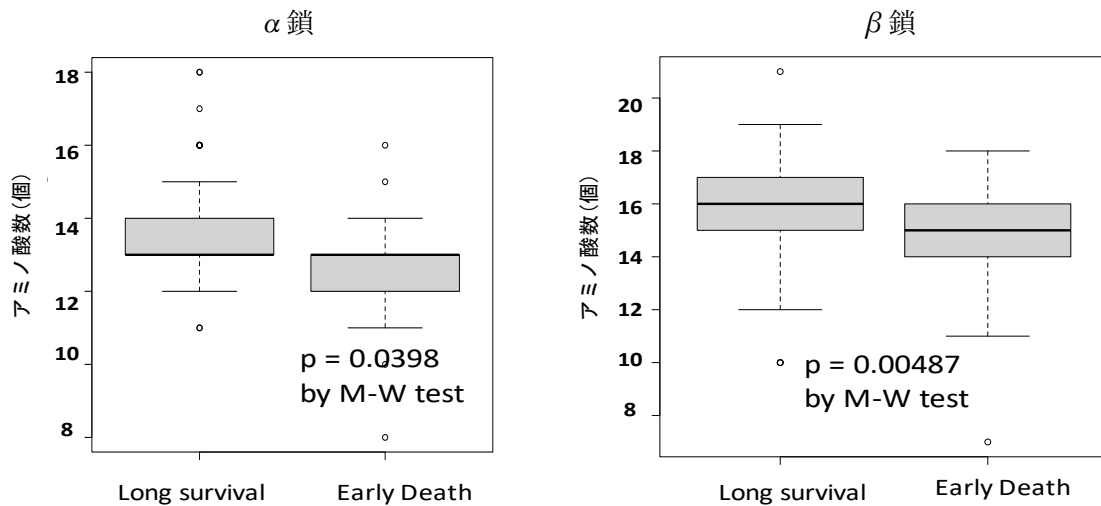
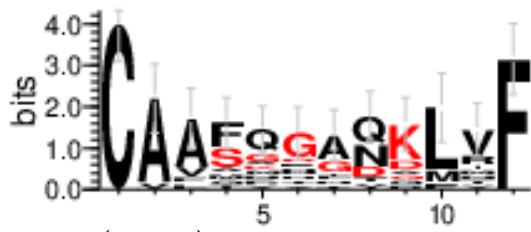


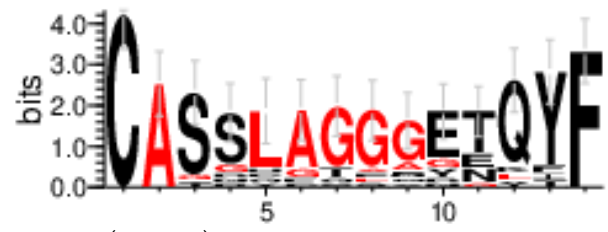
図5 Tax-CTL の CDR3 領域のアミノ酸数と患者予後の関係

Tax-CTL の CDR3 領域において、TCR α 鎖ではアミノ酸数 12、13、14、 β 鎖ではアミノ酸数 14、15、16 のシーケンスログを図 6 に示す。 α 鎖では患者 2 以外の症例の 65.9% (0-81.7%) で「DSWGK」を、 β 鎖では全症例の 64.9% (5.2%-90.1%) で「LAG」という特徴的なアミノ酸モチーフが認められた (図 7)。

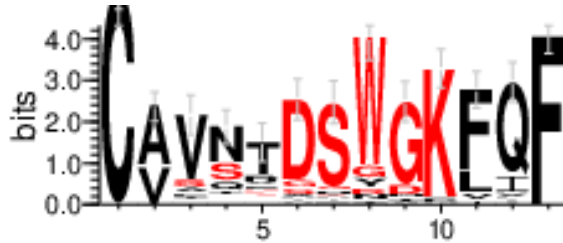
12AA (n=13)



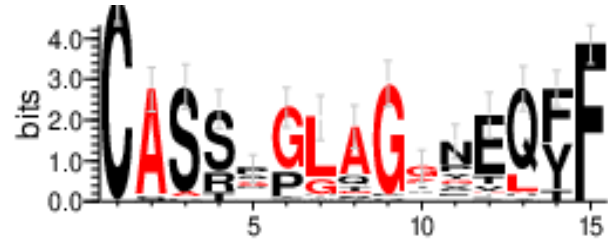
14AA (n=16)



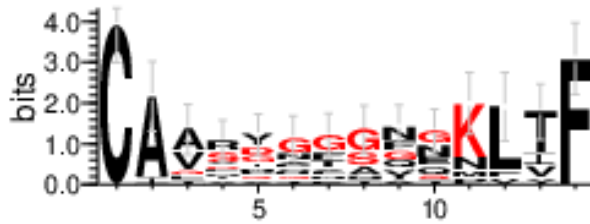
13AA (n=52)



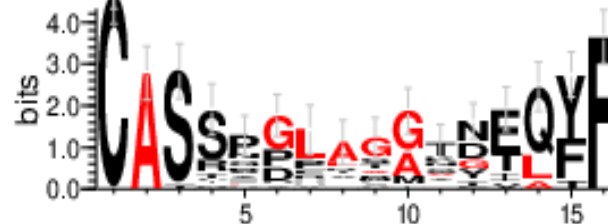
15AA (n=37)



14AA (n=12)



16AA (n=25)



α 鎖

β 鎖

図 6 Tax-CTL の CDR3 領域のアミノ酸配列ロゴ

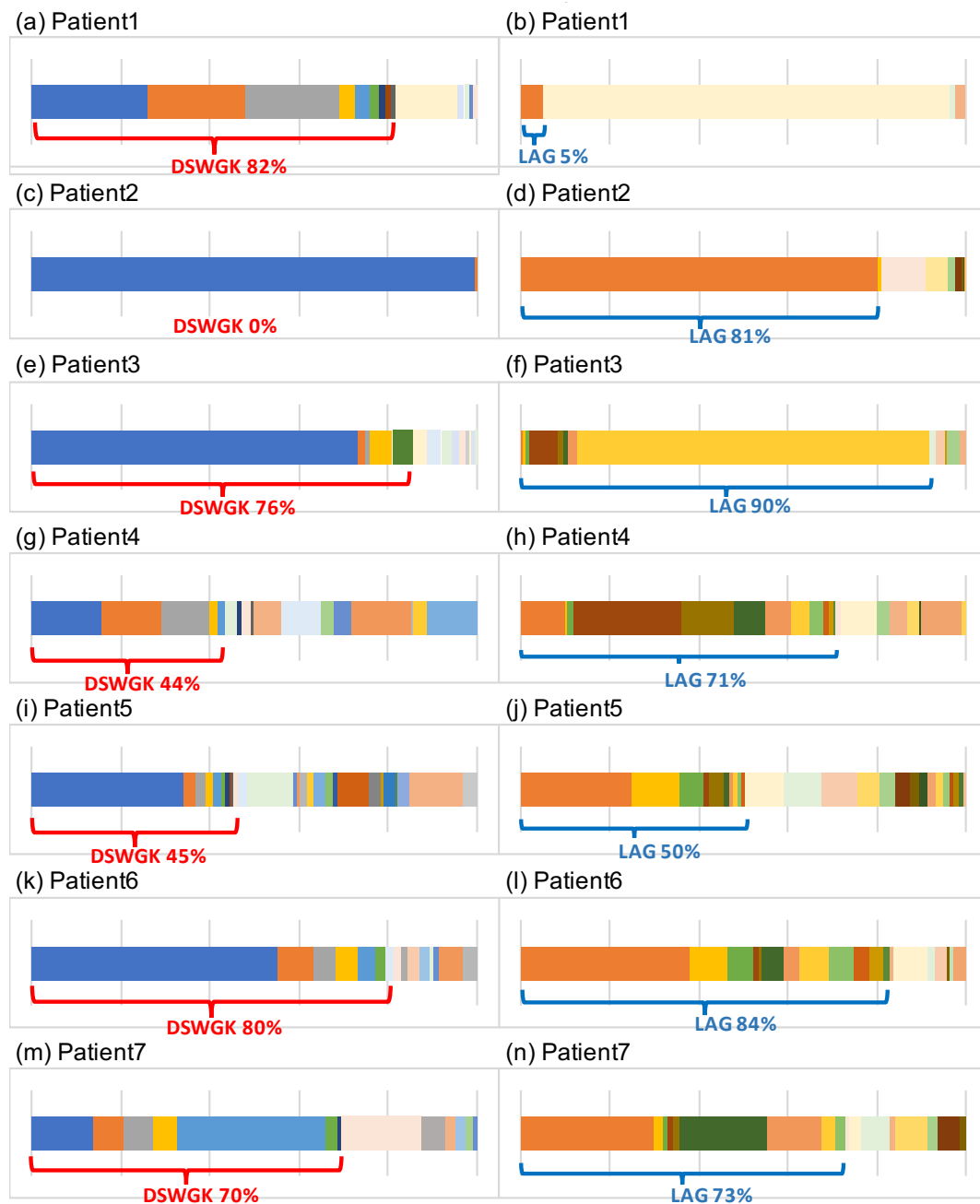


図7 患者毎の TCR-CDR3 に特徴的なモチーフを有するクローンの割合

* 各帯の幅はそれぞれの Tax-CTL クローンの頻度を反映している。患者4に関しては、allo-HCT 後5年目のデータを利用した。

3. 4, Tax-CTL の Shannon 多様度指数と Binding score

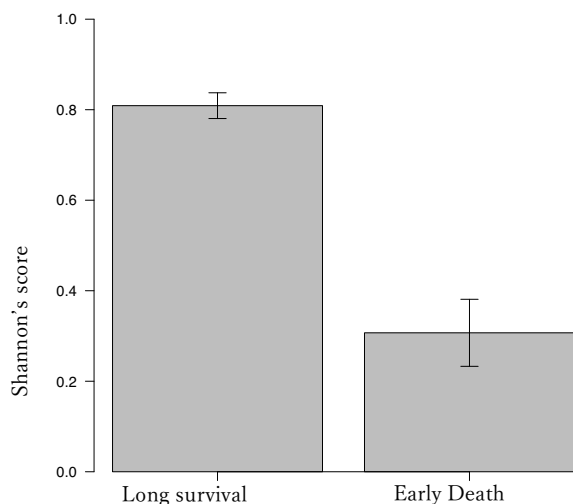


図 8 Shannon 指数の予後別比較

TCR β 鎖に注目してみると、早期死亡群において、多くは最も有意なクローンが全体の 50%以上を占め、長期生存群よりその傾向が強いことがわかった。(p=0.029、Fisher の正確検定)。そこで、Shannon の多様性指数を計算してみると、早期死亡群では有意にその数値が低く、多様性が乏しい傾向にあった(図 8 ; p<0.001、Fisher の正確検定)。

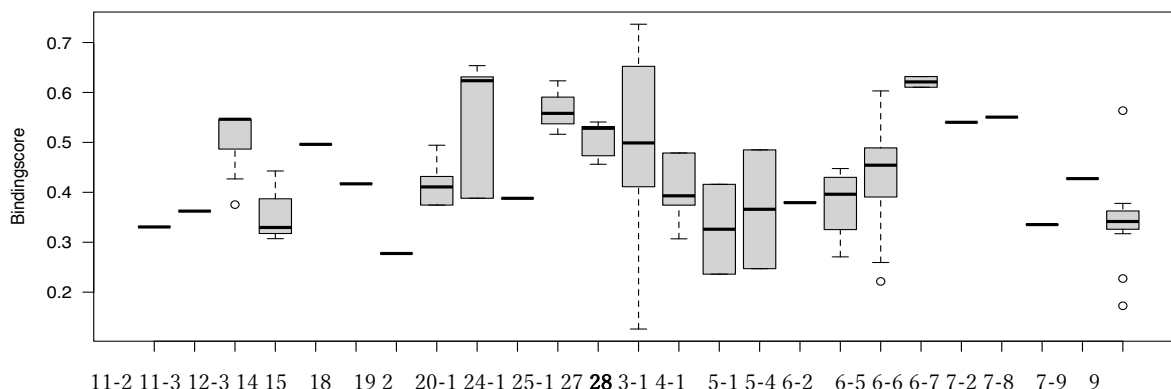


図 9 BV 遺伝子ファミリー毎の Binding score

TCR β の CDR3 領域と Tax ペプチドの Binding score を ERGO アルゴリズム¹⁶で算出した。LAG モチーフの有無のみでは、統計学的に有意なスコアの差はみられなかった。そこで、BV 遺伝子ファミリーで最も多く使用されている BV28 が binding score も高値であることより(図 9)、LAG モチーフと BV28 組み合わせに注目し、解析を行ったところ、LAG モチーフと BV28 の両方を有する場合に、より高い Binding

score を有することがわかった(図 10)。アミノ酸数に注目すると 14 個で Binding score は最小値をとるが、その後アミノ酸数が増えるにつれ、score も増加していた(図 11)。しかしアミノ酸数 14 以下とそれより多いアミノ酸数の比較では、有意な差はみられなかった。

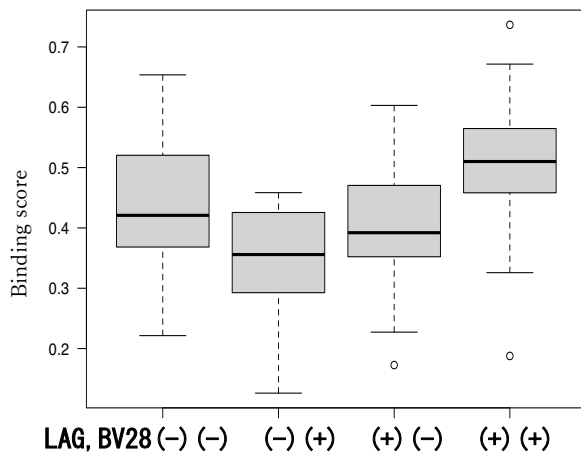


図 10 LAG と BV28 遺伝子の有無での Binding score の比較

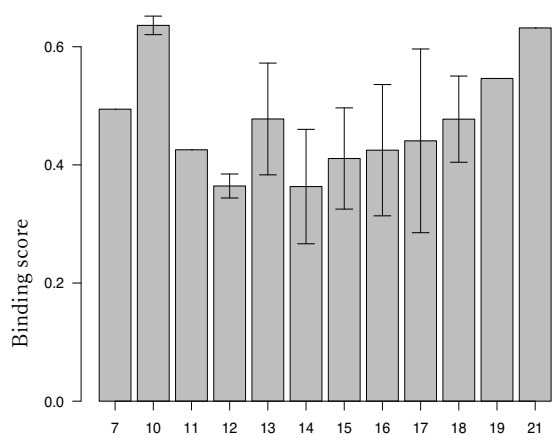


図 11 アミノ酸数毎の Binding score

病型の比較では急性 ATL(図 12 ; $p < 0.001$)、予後の比較では進行性の経過で早期死亡した群(図 13 ; $p = 0.0046$)で、そのスコアは有意に低くなる傾向があった。なお、これらの比較において、患者 4 は 5 年目のデータを使用している。

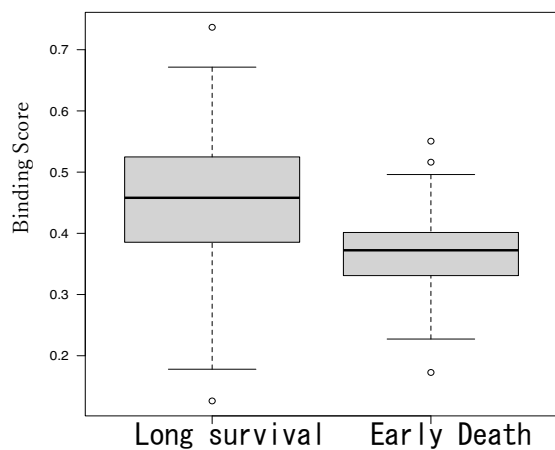


図 12 病型毎の Binding score; $P < 0.001$

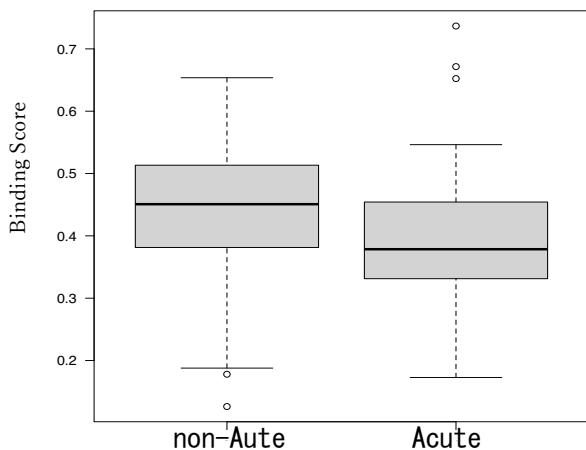


図 13 予後別の Binding score; $P = 0.0046$

3.5, Tax-CTL の時間経過による変化

患者 4 については、Allo-HCT 後 7.5 年間生存したので、複数の検体を採取・解析することができた。患者は、ATL 非寛解の状態で、フルダラビンを中心とした前処置をうけ、シクロスポリン (Cyclosporine, CsA) とメソトレキセートを移植片対宿主病 (Graft versus host disease, GVHD) 予防として用いながら、HLA 適合非血縁ドナーから骨髄提供をうけた。目立った急性 GVHD は認められず、CsA は漸減され Allo-HCT 後 6 ヶ月目で終了となった。しかし、9 ヶ月目より出現した慢性 GVHD のため、CsA とプレドニゾロンが導入され、5 年目まで少量継続投与された。6 年目に食道癌を発症し、放射線療法と化学療法をうけたものの、食道癌は治療抵抗性であり、7.5 年目に敗血症のため死亡した。その間 ATL の再発は認められなかった。

患者 4 において Tax-CTL は 3 ヶ月目までは検出されなかったが、9 ヶ月目 (day270) からは CD8 陽性細胞中 1.42% の割合で認められた。3 年目に 5.26% まで徐々に増加し、以降は 5% 前後で安定的となった (図 14)。Tax-CTL の表現型としては、他患者と同様に T_{EM} の形質を示していた。AJ と AV、BJ と BV 遺伝子ファミリーについては、 α 鎖については AJ24 と AV12-2、 β 鎖では BJ2-1、BJ2-2、BJ2-3、BJ2-7 と BV6-5、BV28 の組み合わせがどの採血タイミングでも多く (図 15)、これらの遺伝子ファミリー使用の傾向は、経年的に大きな変化が認められなかった。

β 鎖では、allo-HCT 後 1 年目で最も高頻度に検出された「CASSSGLAGGPEQYF」は年々頻度が低下し、7 年目にはほとんど検出されなくなっていた。このクローンは LAG と BV28 の両方を有し Binding score は 0.41 だった。当初 2 番目の頻度だった「CASSLGLAGGYGDTQYF」は同様に LAG と BV28 を有していたが、消失したクローンより高い Binding score 0.67 であり、経年的にはこのクローンがその優位性を最後まで維持していた (図 16)。

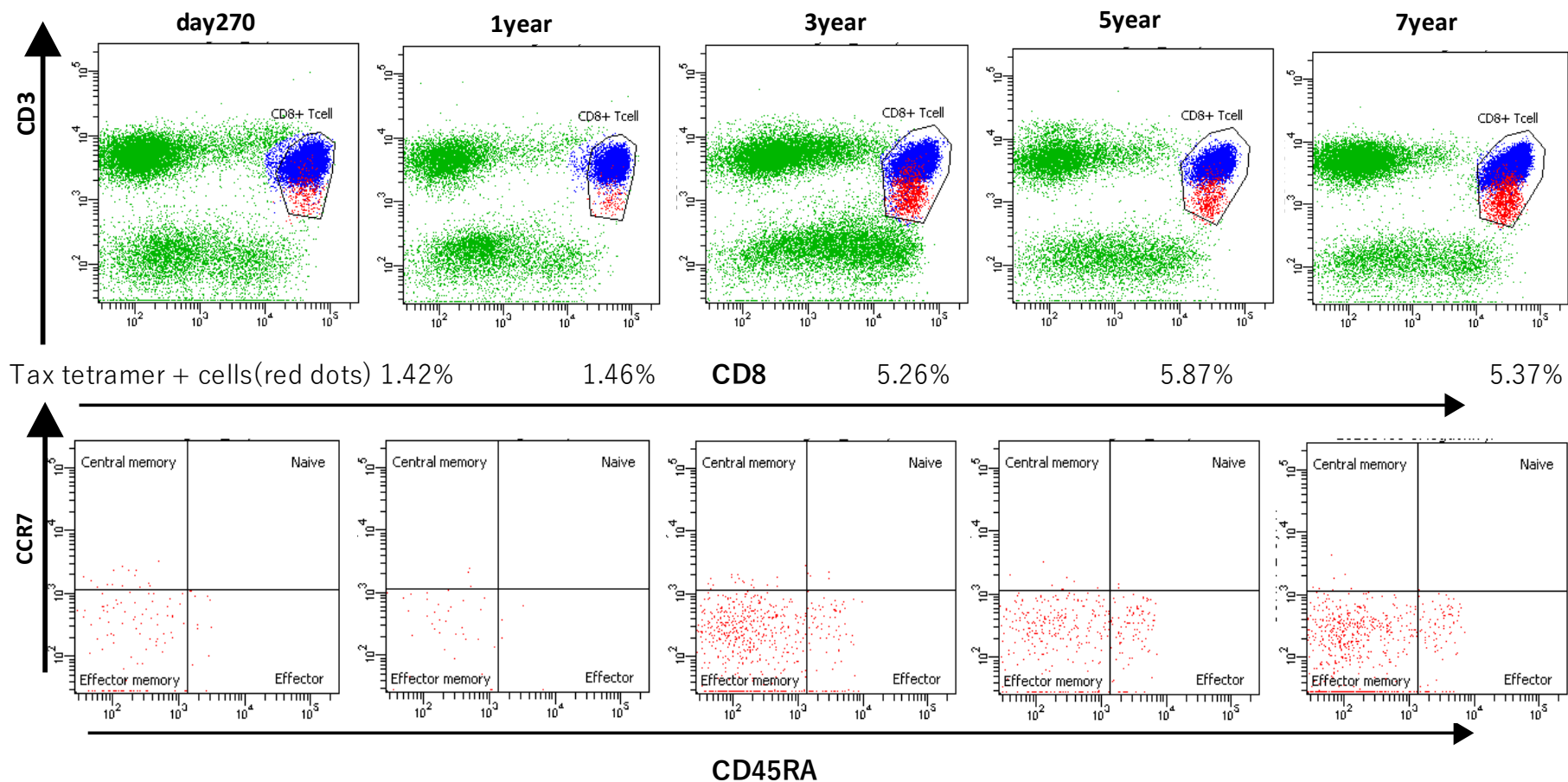


図 14 Flow cytometer による患者 4 の移植後経時的な CD8 陽性 Tax テトラマー陽性 T 細胞の検出割合と特性

* allo-HCT 後 3 年目にかけて CD8 陽性 Tax テトラマー陽性 T 細胞が CD8+T 細胞に占める割合は増加し、以降は 5% 台で継続して存在していた。また、それらの表現型としては全てエフェクターメモリー T 細胞だった。

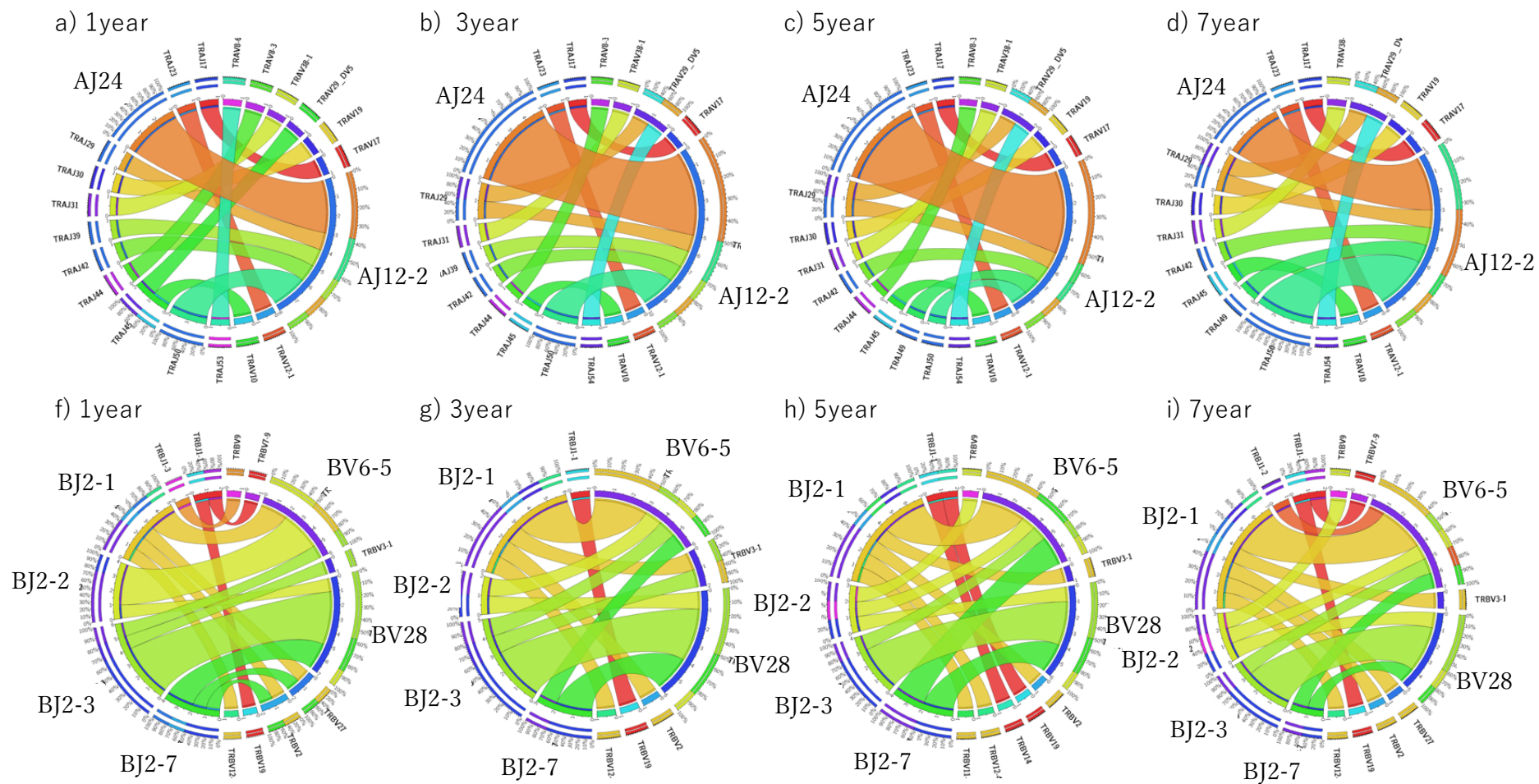


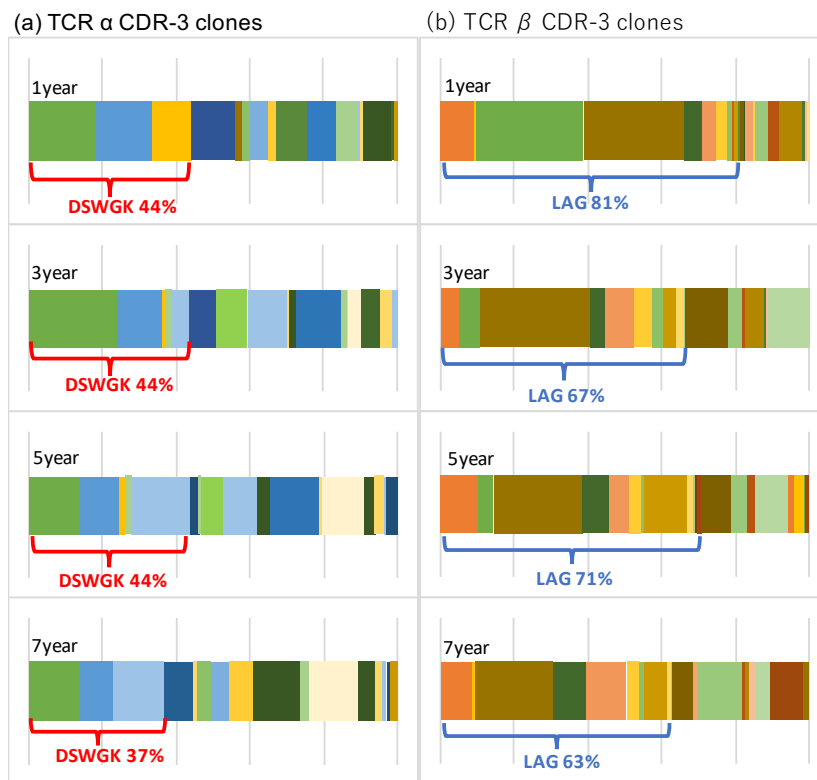
図 15 患者 4 における移植後経時的な AV と AJ、BV と BJ 遺伝子使用状況を示す Circos plot



図 16 患者 4 における優位 Tax-CTL クローンの変遷

TCR の CDR3 領域について、それぞれのクローンの変遷について着目すると、どのタイミングでも再頻出のクローンは「DSWGK」と「LAG」を有していた(図 17)。

図 17 患者 4 における「LAG」と「DSWGK」をもつ Tax-CTL の経時の変化



ただし、経年的には微減しており、Shannon 多様性指数を求めると、 α 鎖は 3 年目以降、 β 鎖は day270 から徐々に数値が増加し、多様化する傾向を認めた(図 18)。一方で Binding score は経年的に大きな変化がみられなかった。

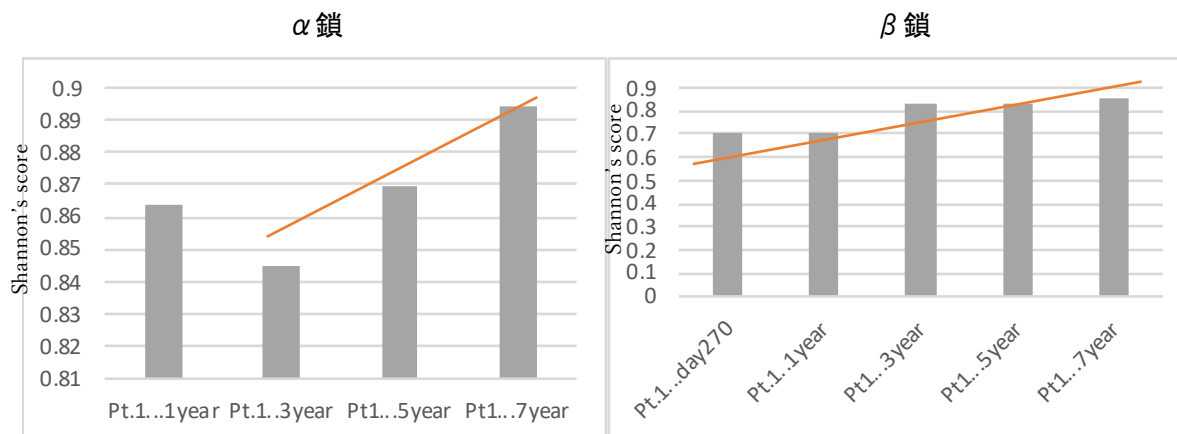


図 18 TCR 両鎖の CDR3 領域における Shannon 多様性指数の経時の変化

3.6, Tax-CTL クローンの T2 cell lines に対する in vitro での細胞傷害評価

患者 6 から分離した Tax-CTL でクローンを樹立し、Tax ペプチド刺激を行った T2 cell lines に対する、クローンの細胞傷害性の評価を行った。Tax-CTL クローンは TCR β -CDR3 は「CASSYSRLAGYNEQFF」というモチーフを有しており、対する TCR α -CDR3 は 73.3%が「CALSTRPFSGQKLLF」を、26.7%は「CALSVADGQKLLF」という 2 つのモチーフを有していた^{25,26}。樹立したクローンは LAG モチーフを有していたものの、元々の患者検体の中では少ないクローンから由来したものだったが、Tax 刺激 T2 cell line に対して十分な細胞傷害性を有していた(図 19)。これは Tax-CTL の ATL 腫瘍細胞に対する傷害効果を支持する結果だった。

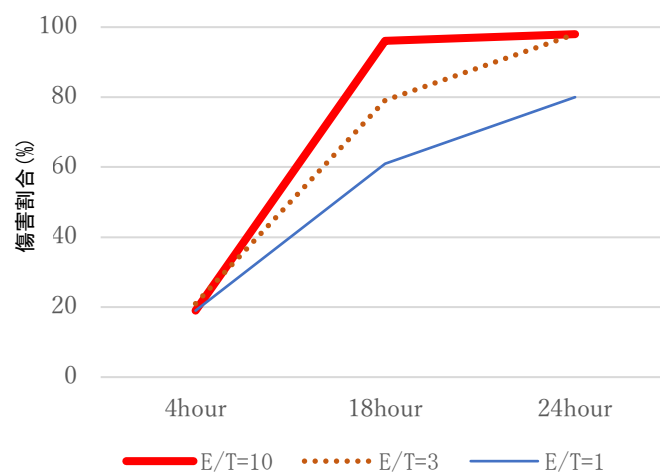


図 19 Tax-CTL 単細胞から樹立したクローンによる Tax ペプチド刺激 T2 細胞に対する細胞傷害性

3.7, Tax-CTL の GEP と PPI ネットワーク、GO Enrichment 解析

偽検出率(False discovery rate, FDR)が 0.1 未満だった 135 個の DEG を利用して PPI ネットワーク図を作成した(図 20)。円の大きさは遺伝子の Log CPM(counts per million)を示し、赤色の濃さは早期死亡群を長期生存群と比較した際の Log FC(fold change)の程度を表している。なお、5 つ以上のネットワークのある遺伝子のみ表示した。また、Tax-CTL の GEP 解析で認められた個別の遺伝子情報を(表 3)に示す。

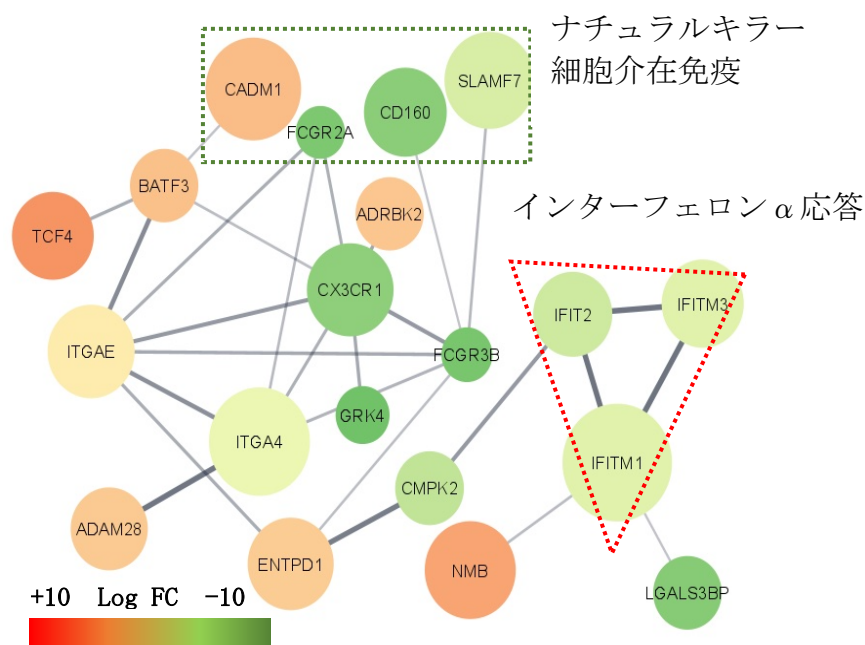


図 20 Tax-CTL の PPI ネットワーク

表 3 遺伝子略称と推定される機能の一覧

遺伝子略称	遺伝子がコードする因子
ADAM28	金属ペプチド加水分解酵素やメタロメプチダーゼ活性に関連する細胞膜アンカー蛋白
ADRBK2/GPK3	β アドレナリン受容体キナーゼ 2
BATF3	CD8(+) 胸腺通常型樹状細胞の分化制御を行う転写因子
CADM1	ナチュラルキラー細胞由来の細胞傷害性を含むシグナル因子の結合活性阻害因子
CD160	MHC クラス I 分子に対し幅広い特異度を有する受容体
CMPK2	単球の最終分化に関連する核酸合成酵素
CX3CR1	膜貫通蛋白で白血球接着や遊走に関与するフラクタルカインの受容体
ENTPD1	細胞外 ATP や ADP を AMP に加水分解する血漿膜蛋白
FCGR2A	種々の免疫細胞表面の γ 免疫グロブリンにおける Fc 領域結合因子
FCGR3B	γ 免疫グロブリンの Fc 領域に対する低親和性受容体
GRK4	G 蛋白質共役受容体活性型特異的リン酸化因子
IFIT2	IFN 誘発ウイルスメッセンジャー RNA 阻害抗ウイルス蛋白
IFITM1	IFN 誘発ウイルス宿主細胞侵入阻害抗ウイルス蛋白
IFITM3	IFN 誘発細胞内コレステロール恒常性破壊抗ウイルス蛋白
ITGA4	細胞表面接着やシグナリングに関わる α 鎖インテグリン蛋白
ITGAE	$\beta 7$ インテグリンと結合し、ヒト粘膜リンパ球 1 の受容体となる α 鎖インテグリン蛋白
LGALS3BP	ウイルスや腫瘍への宿主免疫応答を刺激するインテグリン介在性細胞接着促進因子
NMB	ボンベシン類似の平滑筋収縮刺激因子
SLAMF7	ナチュラルキラー細胞活性に作用する自己リガンド受容体
TCF4	免疫グロブリン転写促進因子の Mu-E5/KE5 モチーフ結合転写制御因子

CX3CR1、ITGA4、FCGR3B そして ITGAE は、周辺の多くの遺伝子と関連して中心的存在となっており、ハブ遺伝子としての役割を担っていると考えられた。GO Enrichment 解析では主に、DEGs は「インターフェロン α 応答」「ナチュラルキラー細胞介在免疫」「軟骨発生制御」と「心細胞発生」に分類された(図 21)。進行性の経過で早期死亡した群と 3 年以上の長期生存群で比較してみると、インターフェロン α 応答に関わる IFITM1、IFITM3 と IFIT2、およびナチュラルキラー細胞介在免疫に関わる CD160、SLAMF7 と FCGR2A、さらに宿主防御に関わる LGALS3BP とハブ遺伝子の CX3CR1 は早期死亡群でその発現が低下していた。

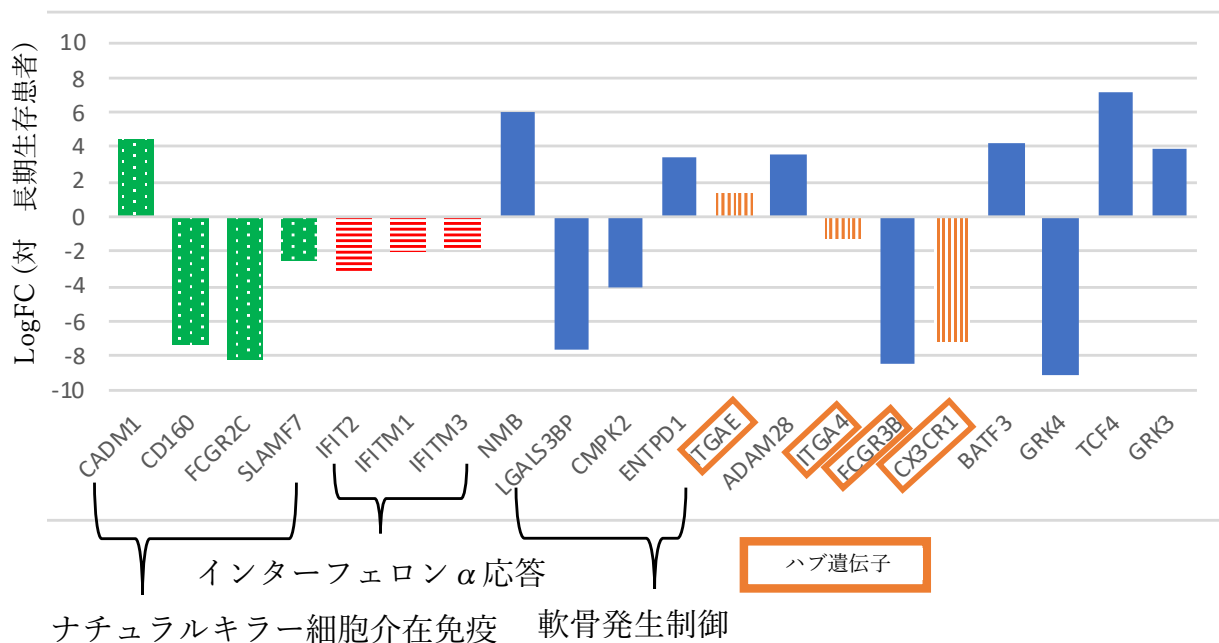


図 21 長期生存に対する早期死亡群遺伝子の LogFC

4, 考察

本研究では、TCR-CDR3 領域におけるアミノ酸配列を中心に、さまざまな側面から HLA-A02:01 拘束性 Tax-CTL の特徴を解析した。TCR-CDR3 領域では非常に限定された AV と AJ、BV と BJ 遺伝子ファミリーが使用されており、TCR α では「DSWGK」、TCR β では「LAG」というモチーフを認めた。「LAG」と BV28 遺伝子をもつクローンは高い Binding score を有しており、さらに「LAG」を有する CTL クローンは Tax ペプチド刺激 T2 Cell line に対して細胞傷害性を認めた。

まず、本研究では Tax-CTL の検出頻度は、ATL の病型によって差を認めなかった。過去の我々の報告でも、HTLV-1 無症候性キャリアと ATL 患者間で HLA-A24 拘束性 Tax-CTL の検出頻度には差がなかった¹¹。これらの結果は、ATL 進行のメカニズムを、単に Tax-CTL の量的評価だけで理解することが困難であり、Tax-CTL の質的評価、すなわち構造や機能的評価が必要であることを示唆している。

次に、ほとんどの Tax-CTL が T_{EM} の特性を有していた。この T_{EM} は一般的に炎症部位に遊走し、病原菌に対する傷害機能を担っていたり、慢性ウイルス感染症制御に関わっていたりすること^{8,27}が知られている。移植後であっても、HTLV-1 を完全に排除することが困難であることから、ウイルスの活動性を抑えるために Tax-CTL が CD8 陽性 T_{EM} の状態を維持する必要があると考えられた。また抗腫瘍免疫においても T_{EM} は、がん特異的免疫記憶に関連し、重要な役割を示すことが知られている。実際 T_{EM} は、癌患者における免疫チェックポイント阻害薬の効果や予後に関わること²⁸などが報告されており、Tax-CTL が ATL 再発を直接的に阻止している可能性も考えられた。

Tax-CTL CDR 領域のアミノ酸数は TCR α 鎖で 13、TCR β 鎖で 15 が最多だった。一

一般的に CD8 陽性 T 細胞の CDR 領域のアミノ酸数は、標的抗原に応じて異なり、10 から 14 の間であることが知られている²⁹。TCR の CDR3 領域のアミノ酸数は、サイトメガロウイルスに対する pp65₄₉₅₋₅₀₃ を標的とする場合、 α 鎖で 9、 β 鎖では 14、インフルエンザ A ウイルスに対する M1₅₈₋₆₆ を標的とする場合、 α 鎖で 13、 β 鎖では 11 だった³⁰。アミノ酸数は胸腺における T 細胞成熟過程における正の選択を反映していると考えられており³¹、Tax-CTL においてより長いアミノ酸数が認められたことは、蛋白と MHC の結合が、より強く行われることを示唆しているのかもしれない。

TCR α 鎖では「DSW GK」、TCR β 鎖では「LAG」という特徴的なモチーフが認められたが、先行研究においても、HTLV-1 関連脊髄炎 (HTLV-1 associated myelopathy/Tropical spastic paraparesis, HAM/TSP) での TCR β 鎖 CDR3 で「PGG」、「LAG」、「GLAG」や「PGLAG」といったモチーフが報告されており³²⁻³⁵、本研究の結果にも合致していた。HLA-A2 拘束性 TCR β -CDR3 の結晶構造解析では、「GLAG」はループを形成し、その頂点の一角が、HLA-A2 の $\alpha 1$ ヘリックスと Tax11-19 ペプチド側鎖のつくる疎水ポケットに挿入されることが分かっている。「LAG」という特徴的なモチーフが、Tax ペプチドと HLA-A2 結合において構造的にも重要な役割を果たしていると言えるだろう。

Tax-CTL の TCR と Tax ペプチドの結合の程度をみるために、ERGO-II system¹⁶ で求めた Binding score は細胞傷害活性の強さも反映すると考えられている⁹。前述の結果から、より長いアミノ酸長や「LAG」モチーフの存在が、高い Binding score を示すと予想したが、本研究では有意な差がみられなかった。そこで BV 遺伝子ファミリーごとの Binding score に注目したところ、CDR3 領域での使用頻度が高く score も高値を示していた BV28 と LAG の両方を有する場合で、そうではない群と比較して有意に高い Binding score を示していた。このことは HLA-A2 拘束性 TCR と Tax ペプチド複合体の結合では LAG という特定のモチーフという単一の要素だけ

ではなく、遺伝子ファミリーも重要であることを示している。より高い Binding score を示す Tax-CTL は、将来的には養子細胞療法でも重要であり、レセプターとペプチド複合体に関し 3D 構造や結合状況のさらなる解明が必要である。

Tax は ATL 患者において、遺伝子変異³⁶や On-off 調整によって³⁷、発現量が低下していることが知られている。また、ATL 腫瘍細胞は CCR4 や FoxP3 を介して IL-10 産生を行い³⁸、制御性 T 細胞のような宿主の免疫抑制機能を刺激して³⁹、Tax-CTL の機能不全を引き起こしている^{40,41}。Tax-CTL が十分な抗 ATL 作用を発揮できない状況は、本研究における GEP 解析で、ウイルス感染細胞抑制に直接に関わる IFITM1、IFITM3⁴²や IFIT2⁴³が、進行性の病態で早期死亡した患者群において低下していたことから説明されうる。さらに、CD160⁴⁴や SLAMF7⁴⁵のようにナチュラルキラー細胞活性を活性化する因子や、CX3CR1⁴⁶や ITGA4⁴⁷の様に腫瘍増殖を抑制する因子も早期死亡群で低下していた。一方で、Tax を標的とした樹状細胞ワクチンが ATL に対する新たな免疫療法として効果が確認され^{48,49}、またこれまで述べてきた様に、養子 T 細胞療法では、抗 ATL 作用がより高い Tax-CTL を導入することが望まれる^{6,8,13,50}。すなわち、Tax-CTL の細胞傷害機能の強化や、そのような Tax-CTL を効率的に増殖する技術について加速的に研究を進めて行く必要がある。

進行性の経過で早期死亡した群では、Tax-CTL の TCR-CDR3 のクローンの多様性は乏しい傾向にあった。HAM/TSP においても、健常者に比べて患者の TCR クローンの多様性が乏しいことは過去の研究でも触れられており³⁵、特定の T 細胞クローンに偏った状況は ATL 患者においてより重篤な病態を示唆しているのかもしれない。逆に T 細胞クローンの多様性が乏しい場合、免疫排除できなかった ATL subclone が優勢となり、疾患を進行させる可能性も推察される。患者 4 における経年的な評価でも、その多様性は年々増大する傾向がみられた。T 細胞免疫回復の遅れや、allo-HCT 後の TCR 画一性は感染症や再発リスクの増大と関わっていることが知られてお

り⁵¹、ATL 無再発で移植後長期生存した患者 4 でみられた多様性の増大は、ドナー由来 T 細胞の免疫回復が良好であったことを反映していたと考えられる。これらを踏まえ、Tax-CTL のレパトアをモニタリングすることは、ATL の進行や再発を評価する上で有効な可能性がある。

最後に我々の研究にはいくつかの限界がある。第一に、非常に限られた患者の解析であることから、レパトアの多様性や Binding score、TCR 構造と臨床経過の関連について、HLA-A2 陽性 ATL 患者集団に一般化できると結論づけるためには、さらに多くの症例の解析が必要である。第二に、HLA-A2 拘束性の Tax-CTL にのみ限定した解析であることから、他の Class- I HLA の Tax-CTL についても ATL や HTLV-1 に対する効果を調べる必要がある。第三は、実際には対になって抗原認識をしている TCR α 鎖と β 鎖をマッチングできなかったことから、個々の Tax-CTL クローンの機能については解析できていない。今後、単細胞の免疫学的解析方法が進歩して、200 細胞以下の希少細胞集団に対しても α と β 鎖を同定できるようになれば、TCR クローンの理解を進めて行くことが可能となる。残念ながら、本研究では患者検体数が少なく、ATL 患者検体からの細胞培養が容易ではないことから、1 つの Tax-CTL クローン樹立しか叶わなかった。今後さらなるクローン樹立と、その機能解析を進めることで、将来の細胞療法に貢献することが期待される。今後より大規模な研究開発が進んでいくことが望ましい。

5, おわりに

直接の病因が知られている悪性腫瘍は多くはなく、ATL はウイルスとの直接の関連が示された数少ない悪性腫瘍の一つである。しかし原因やウイルスの生活歴が判明し、母子感染や水平感染の予防を行なってもなお、キャリアから腫瘍への進展を防いだり、発症した ATL を根治させたりする方法は完全ではなく、むしろ治療は困難を伴うことが多い。地域性や感染経路、人種性などから、ATL で比較的身近な親族を失ったその本人が、再び同じ病に見舞われることもある。もしくはキャリアとして一抹の不安を抱えながら過ごしている人も少なくない。治療に関しては「はじめに」でも述べた通り、allo-HCT でのみ根治が期待されるものの、県内でも有数の移植治療を実施している当院でさえ、2008 年から 2021 年までで ATL に対して allo-HCT を実施した 18 人のうち、2022 年までで移植後 3 年以上の生存を確認出来たのは 5 人だった。このような状況から重ねての言及にはなるが、より治療効果が高く、副作用の少ない治療法の開発は急務である。本研究では、HLA-A2 拘束性の Tax-CTL に関して、RNA シークエンスによるレパトア解析をベースに様々な観点から、新たな免疫療法につながる報告をすることが出来た。一方で、新型コロナウイルスなど種々のウイルス感染症でも明らかな通り、ウイルスが次々と変異を繰り返し、治療薬に対して耐性を獲得するようなことは日々おこっている。本研究結果が万能ではないにしても、HLA-A24:02 から引き続き A02:01 でも同様のアプローチで Tax-CTL の有効性を示すことが出来たように、我々のアプローチを今後より汎用化できれば、免疫細胞療法を基軸に治療を模索することが可能になると思われる。最終的に一人でも多くの ATL 患者を救命すべく、様々な研究者達が継続してそれを進めて行くことが重要であると考えらる。

6, 引用文献

1. Uchiyama T, Y.J., Sagawa K, Takatsuki K, Uchino H. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood*. 1977;50(3):481-492. *Blood* **128**, 2745 (2016).
2. Gessain, A. & Cassar, O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front Microbiol* **3**, 388 (2012).
3. Koga, Y., *et al.* Trends in HTLV-1 prevalence and incidence of adult T-cell leukemia/lymphoma in Nagasaki, Japan. *J Med Virol* **82**, 668-674 (2010).
4. Felber, B.K., Paskalis, H., Kleinman-Ewing, C., Wong-Staal, F. & Pavlakis, G.N. The pX protein of HTLV-I is a transcriptional activator of its long terminal repeats. *Science* **229**, 675-679 (1985).
5. Mohanty, S. & Harhaj, E.W. Mechanisms of Oncogenesis by HTLV-1 Tax. *Pathogens* **9**(2020).
6. Rowan, A.G., *et al.* Cytotoxic T lymphocyte lysis of HTLV-1 infected cells is limited by weak HBZ protein expression, but non-specifically enhanced on induction of Tax expression. *Retrovirology* **11**, 116 (2014).
7. Akimoto, M., *et al.* Anti-HTLV-1 tax antibody and tax-specific cytotoxic T lymphocyte are associated with a reduction in HTLV-1 proviral load in asymptomatic carriers. *J Med Virol* **79**, 977-986 (2007).
8. Jo, T., *et al.* HTLV-1 Tax-specific memory cytotoxic T lymphocytes in long-term survivors of aggressive-type adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer Med* **11**, 3238-3250 (2022).
9. Tanaka, Y., *et al.* Single-cell analysis of T-cell receptor repertoire of HTLV-1 Tax-specific cytotoxic T cells in allogeneic transplant recipients with adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer Res* **70**, 6181-6192 (2010).
10. Tanaka, Y., *et al.* Long-term persistence of limited HTLV-I Tax-specific cytotoxic T cell clones in a patient with adult T cell leukemia/lymphoma after allogeneic stem cell transplantation. *J Clin Immunol* **32**, 1340-1352 (2012).
11. Ishihara, Y., *et al.* A Unique T-Cell Receptor Amino Acid Sequence Selected by Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Tax. *J Virol* **91**(2017).
12. Tanaka, Y., *et al.* Universal cytotoxic activity of a HTLV-1 Tax-specific T cell clone from an HLA-A*24:02⁺ patient with adult T-cell leukemia against a variety of HTLV-I-infected T-cells. *Immunol Lett* **158**, 120-125 (2014).

13. Kawamura, K., *et al.* Development of a Unique T Cell Receptor Gene-Transferred Tax-Redirected T Cell Immunotherapy for Adult T Cell Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* **26**, 1377-1385 (2020).
14. Tanaka, H., Akaza, T. & Juji, T. Report of the Japanese Central Bone Marrow Data Center. *Clin Transpl*, 139-144 (1996).
15. Kanda, Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* **48**, 452-458 (2013).
16. Springer, I., Tickotsky, N. & Louzoun, Y. Contribution of T Cell Receptor Alpha and Beta CDR3, MHC Typing, V and J Genes to Peptide Binding Prediction. *Front Immunol* **12**, 664514 (2021).
17. McCarthy, D.J., Chen, Y. & Smyth, G.K. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res* **40**, 4288-4297 (2012).
18. Robinson, M.D., McCarthy, D.J. & Smyth, G.K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**, 139-140 (2010).
19. Nakasone, H., *et al.* Increased CD83 expression of CD34-positive monocytes in donors during peripheral blood stem cell mobilization in humans. *Sci Rep* **9**, 16499 (2019).
20. Nakasone, H., *et al.* Features of repertoire diversity and gene expression in human cytotoxic T cells following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Commun Biol* **4**, 1177 (2021).
21. Szklarczyk, D., *et al.* STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res* **47**, D607-D613 (2019).
22. Bindea, G., *et al.* ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* **25**, 1091-1093 (2009).
23. Bindea, G., Galon, J. & Mlecnik, B. CluePedia Cytoscape plugin: pathway insights using integrated experimental and in silico data. *Bioinformatics* **29**, 661-663 (2013).
24. Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708-712 (1999).
25. Alam, S.M., Crispe, I.N. & Gascoigne, N.R. Allelic exclusion of mouse T cell

- receptor alpha chains occurs at the time of thymocyte TCR up-regulation. *Immunity* **3**, 449-458 (1995).
26. Padovan, E., *et al.* Expression of two T cell receptor alpha chains: dual receptor T cells. *Science* **262**, 422-424 (1993).
 27. Johnson-Nauroth, J.M., Graber, J., Yao, K., Jacobson, S. & Calabresi, P.A. Memory lineage relationships in HTLV-1-specific CD8+ cytotoxic T cells. *J Neuroimmunol* **176**, 115-124 (2006).
 28. Fairfax, B.P., *et al.* Peripheral CD8. *Nat Med* **26**, 193-199 (2020).
 29. Yu, K., Shi, J., Lu, D. & Yang, Q. Comparative analysis of CDR3 regions in paired human $\alpha \beta$ CD8 T cells. *FEBS Open Bio* **9**, 1450-1459 (2019).
 30. Chen, G., *et al.* Sequence and Structural Analyses Reveal Distinct and Highly Diverse Human CD8. *Cell Rep* **19**, 569-583 (2017).
 31. Yassai, M. & Gorski, J. Thymocyte maturation: selection for in-frame TCR alpha-chain rearrangement is followed by selection for shorter TCR beta-chain complementarity-determining region 3. *J Immunol* **165**, 3706-3712 (2000).
 32. Bourcier, K.D., *et al.* Conserved CDR3 regions in T-cell receptor (TCR) CD8(+) T cells that recognize the Tax11-19/HLA-A*0201 complex in a subject infected with human T-cell leukemia virus type 1: relationship of T-cell fine specificity and major histocompatibility complex/peptide/TCR crystal structure. *J Virol* **75**, 9836-9843 (2001).
 33. Saito, M., *et al.* In vivo selection of T-cell receptor junctional region sequences by HLA-A2 human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax11-19 peptide complexes. *J Virol* **75**, 1065-1071 (2001).
 34. Saito, M., *et al.* Molecular analysis of T cell clonotypes in muscle-infiltrating lymphocytes from patients with human T lymphotropic virus type 1 polymyositis. *J Infect Dis* **186**, 1231-1241 (2002).
 35. Nozuma, S., *et al.* Immunopathogenic CSF TCR repertoire signatures in virus-associated neurologic disease. *JCI Insight* **6**(2021).
 36. Takeda, S., *et al.* Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells. *Int J Cancer* **109**, 559-567 (2004).
 37. Mahgoub, M., *et al.* Sporadic on/off switching of HTLV-1 Tax expression is crucial to maintain the whole population of virus-induced leukemic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, E1269-E1278 (2018).
 38. Mori, N., *et al.* Interleukin-10 gene expression in adult T-cell leukemia. *Blood*

- 88, 1035-1045 (1996).
39. Chen, S., *et al.* Regulatory T cell-like activity of Foxp3⁺ adult T cell leukemia cells. *Int Immunol* **18**, 269-277 (2006).
 40. McLane, L.M., Abdel-Hakeem, M.S. & Wherry, E.J. CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. *Annu Rev Immunol* **37**, 457-495 (2019).
 41. Takamori, A., *et al.* Functional impairment of Tax-specific but not cytomegalovirus-specific CD8⁺ T lymphocytes in a minor population of asymptomatic human T-cell leukemia virus type 1-carriers. *Retrovirology* **8**, 100 (2011).
 42. Shi, G., Ozog, S., Torbett, B.E. & Compton, A.A. mTOR inhibitors lower an intrinsic barrier to virus infection mediated by IFITM3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, E10069-E10078 (2018).
 43. Perwitasari, O., Cho, H., Diamond, M.S. & Gale, M. Inhibitor of κ B kinase epsilon (IKK(epsilon)), STAT1, and IFIT2 proteins define novel innate immune effector pathway against West Nile virus infection. *J Biol Chem* **286**, 44412-44423 (2011).
 44. Chibueze, C.E., Yoshimitsu, M. & Arima, N. CD160 expression defines a uniquely exhausted subset of T lymphocytes in HTLV-1 infection. *Biochem Biophys Res Commun* **453**, 379-384 (2014).
 45. O'Connell, P., Amalfitano, A. & Aldhamen, Y.A. SLAM Family Receptor Signaling in Viral Infections: HIV and Beyond. *Vaccines (Basel)* **7**(2019).
 46. Shimizu, K., *et al.* Upregulation of CC chemokine ligand 18 and downregulation of CX3C chemokine receptor 1 expression in human T-cell leukemia virus type 1-associated lymph node lesions: Results of chemokine and chemokine receptor DNA chip analysis. *Cancer Sci* **98**, 1875-1880 (2007).
 47. Oh, J., Magnuson, A., Benoist, C., Pittet, M.J. & Weissleder, R. Age-related tumor growth in mice is related to integrin α 4 in CD8⁺ T cells. *JCI Insight* **3**(2018).
 48. Ishizawa, M., *et al.* Short-term cultured autologous peripheral blood mononuclear cells as a potential immunogen to activate Tax-specific CTL response in adult T-cell leukemia patients. *Cancer Sci* **112**, 1161-1172 (2021).
 49. Kannagi, M., *et al.* Maintenance of long remission in adult T-cell leukemia by Tax-targeted vaccine: A hope for disease-preventive therapy. *Cancer Sci* **110**, 849-857 (2019).

50. Rowan, A.G., *et al.* T Cell Receptor V β Staining Identifies the Malignant Clone in Adult T cell Leukemia and Reveals Killing of Leukemia Cells by Autologous CD8⁺ T cells. *PLoS Pathog* **12**, e1006030 (2016).
51. van Heijst, J.W., *et al.* Quantitative assessment of T cell repertoire recovery after hematopoietic stem cell transplantation. *Nat Med* **19**, 372-377 (2013).