

氏 名	楠 田 待 子
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	甲第 679 号
学位授与年月日	令和 5 年 3 月 23 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	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
論文審査委員	(委員長) 教授 古 川 雄 祐 (委 員) 教授 久 米 晃 啓 准教授 大 嶺 謙

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

成人 T 細胞白血病/リンパ腫(Adult T-cell leukemia, ATL)はヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型(Human T-cell leukemia virus type1, HTLV-1)によって起こされる末梢 T 細胞の造血器悪性腫瘍の 1 つで、根治方法は同種造血幹細胞移植(Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HCT)以外に無く、その予後は非常に悪い。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が、その Tax に特異的な細胞傷害性 T 細胞(Tax-CTL)は ATL の再発予防効果があることなどが報告されてきた。当研究室でこれまで 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。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、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。HLA-A02:01 について解析すれば、HLA-A24:02 とあわせて日本人の約 7 割の ATL 患者の治療に貢献出来る可能性があることから、今回の研究では HLA-A02:01 拘束性 Tax-CTL の、TCR 遺伝子における CDR3 領域の特異的なアミノ酸(amino acid, AA)配列を明らかにすることを目標に行った。

### 2 研究方法

HLA-A02:01 を持つ合計 7 人の急性、慢性およびくすぶり型 ATL 患者ならびに HTLV-1 キャリアより得た 21 末梢血検体から Tax-CTL を 6325 細胞ソートし、TCR の CDR3 領域の AA 配列で規定されるレパトアに関し、次世代シーケンス(Next-generation sequence, NGS)を用いて解析を行った。TCR-α 鎖で 151、β 鎖で 206 の CTL クローンを同定し、遺伝子同士の相関を評価するために Circos plot を、多様性を定量的に評価する Shannon index、TCR と Tax ペプチドの結合の程度を示す Binding score を算出した。Tax-CTL の機能評価として遺伝子発現プロファイリング(gene expression profile, GEP)を行い、遺伝子オントロジー(Gene ontology, GO)に基づく

gene-set enrichment 解析を行った。患者 6 からは Tax-CTL クローンを樹立し、HLA-A02:01 陽性のヒト T/B リンパ芽球細胞株(T2 細胞)に対する細胞傷害性を評価した。

### 3 研究成果

過去の報告同様に、今回解析した HLA-A02:01 を持つ ATL 患者および HTLV-I キャリアの Tax-CTL は極めて限られた AV、AJ、BV、BJ 遺伝子ファミリーを使用し、Effector memory T 細胞(TEM)の形質を呈していた。TCR-CDR3 領域の AA 配列の長さは  $\alpha$  鎖で 13、 $\beta$  鎖で 15 が最も多く、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)で比較すると、長期生存群で AA 数は長くなる傾向があった。また、ほとんどの ATL 患者の TCR-CDR3 の AA 配列において  $\alpha$  鎖では「DSW GK」、 $\beta$  鎖では「LAG」というモチーフを認めた。Shannon index は慢性の経過で長期生存した群が、進行性の経過で早期死亡した患者より高値であり、CTL の多様性が高いことがわかった。TCR- $\beta$  鎖の Binding score については AA 数 14 以下の群と 15 以上の多い群で比較したが、有意な差はみられず、さらに LAG モチーフの有無だけでも統計学的な有意差は認められなかった。一方、BV 遺伝子ファミリーでも使用頻度が高く、Binding score も比較的高値であった BV28 遺伝子と LAG モチーフを有する場合、そうでない群と比較して高値となっていた。患者 4 において経時的な変化について検討したところ、限定的に使用されていた BV、BJ、AV、AJ 遺伝子ファミリーの遺伝子動態は経時的変化に乏しかった。この患者から得た 1 年目から 7 年目の全ての検体では、最も多くの割合を占めていたクローンを中心に LAG や DSW GK モチーフが認められた。Shannon index は緩徐に増加したが、Binding score はほとんど変化しなかった。一方、長期生存した慢性 ATL である患者 6 から樹立した Tax-CTL クローンは、Tax 刺激した HLA-A02:01 陽性の T2 細胞株に対して傷害作用を有していた。Tax-CTL の GEP の GO-enrichment 解析より、早期死亡群において、CD160 や IFITM1 といったインターフェロン  $\alpha$  応答、ナチュラルキラー細胞免疫や宿主防御に関わる遺伝子の発現が、長期生存群よりも低下していたことがわかった。

### 4 考察

TEM が細胞傷害性やウイルス感染制御に関わっていることが知られているが、Tax-CTL が TEM の特性を有していたことは、移植後であっても HTLV-1 を完全に排除することが難しい状況で、その機能を維持する必要があるためと考えられた。Shannon index は予後別の比較では長期生存でより高く、経時的には時間経過とともに数値が増加していた。これは、T 細胞の多様性が豊富な状況において ATL の再発や感染症死亡など致死的なイベントが減少することを示唆しており、TCR クローンのモニタリングが ATL 進行や再発を評価する上で有効である可能性がある。Tax-CTL の GEP 解析では、予後不良群において免疫応答に関わる遺伝子の発現低下がみられた。宿主免疫回避機構は ATL 細胞の遺伝子変異や On-Off 調節などいくつかが想定されているが、今回の結果はそれを裏付けるものだった。最後に、Tax-CTL の TCR $\alpha$  鎖で「DSW GK」、 $\beta$  鎖で「LAG」という特徴的なモチーフが認められたが、特に「LAG」に関しては、HTLV-1 関連脊髄炎における TCR $\beta$  鎖 CDR に関する先行研究でも構造的に重要な役割が想定されている。Binding score は LAG モチーフのみ、もしくは TCR 可変部アミノ酸長に関する因子のみでは有意な差はみられなかったものの、BV28 遺伝子と LAG モチーフの組み合わせで高い Binding score を示していた。

複数の因子の組み合わせによってより強い細胞傷害性を有する Tax-CTL クローンができるかを解明することは、将来的に細胞免疫療法で有用なエフェクター細胞を開発できる可能性に繋がる。

## 5 結論

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 領域では極めて限定された AV と AJ、BV と BJ 遺伝子ファミリーが使用されており、TCR $\alpha$  では「DSWGK」、TCR $\beta$  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 HLA-A02:01 陽性 T2 細胞に対して細胞傷害性を有していた。本研究で得られたこれらの知見は、ATL の免疫応答のより深い理解に繋がり、将来的な T 細胞養子免疫療法の臨床応用に貢献するものである。

## 論文審査の結果の要旨

本研究において申請者らは、adult T-cell leukemia(ATL)患者における免疫応答機構の解明を目的として、次世代シーケンシングにより HLA-A02:01-restricted Tax-specific cytotoxic T-lymphocytes(Tax-CTL)の TCR レパトア解析を行った。

ATL 患者において TCR CDR3 領域の gene usage は限られており、アミノ酸配列は  $\alpha$  鎖の多くは 13 個、 $\beta$  鎖で 14~16 個であり、かつ特徴的なモチーフ(DSWGK/LAG)が認められた。アミノ酸配列が長い患者の方が長期生存する傾向が認められた。また TCR 配列の多様性の大きい症例が長期生存した。TCR $\beta$  の Tax peptide への結合は、BV28 遺伝子を発現し、かつ LAG motif が認められる場合に強固であった。結合能は急性型・早期死亡群で有意に低かった。長期生存した 1 例で経時的に Tax-CTL を解析すると、遺伝子型と結合能はほぼ一定していたが、多様性は増加していった。Tax-CTL は Tax 刺激した HLA-A02:01 陽性リンパ系細胞株に対する細胞傷害性を示し、インターフェロン応答や NK 細胞介在免疫に関与する遺伝子の発現が高く、その発現量が患者予後と関連していた。

本研究は ATL に対する免疫応答機構のより深い理解と臨床応用につながる質の高いものである。学位論文も良く書けているが、以下の修正が必要と考えられた。

1) 表題が「HTLV-I に対する Tax-CTL の TCR 解析」となっているが、CTL はウイルスそのものには作用しないので、「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」など、実際の内容を反映したものに変更が必要である。

2) 図表は一部に説明不足があり、またタイトルの位置などに修正が必要である。文章の表記にも冗長な部分、逆に説明不足な部分があり、審査委員が直接加筆することとした。

## 最終試験の結果の要旨

申請者はほぼ学位論文のとおりにより発表を行った。発表は明快で、時間も厳守された。内容の骨子は「論文審査の結果」にまとめたとおりである。

審査委員からは以下のような質問があったが、申請者はほぼ的確に返答し、有意義な discussion が行われた。

1) 今回解析した Tax-CTL は ATL 細胞に反応するものか、それとも学位論文の表題のように HTLV-I 感染細胞に対するものなのか？ この点を明らかにするために、例えば経時的解析を行った症例でウイルス量や MRD とレパトアとの相関を見ると良いのではないか？

2) Tax-CTL のレパトアの多様性が大きい症例の予後が良く、長期観察した例でも経過とともに多様性が増加している。抗腫瘍免疫においては CTL の clonality の増加すなわち多様性の減少が予後の改善につながる例が多いが、違いをどう解釈するか？

3) 諸言において、以前に解析した HLA-A24:03 と今回の HLA-A02:01 の結果を合わせると日本人の約 7 割をカバーできるとしているが、計算根拠を示してほしい。

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、医学博士号を受けるに値すると審査委員全員が判断し、最終試験に合格とした。