

表 題 HTLV-I 無症候キャリアから ATL への進展制御に向けた
Tax 特異的 CTL に関する研究

論文の区分 博士課程

著 者 名 石原 優子

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
地域医療学系専攻
総合医学専攻分野
内科系総合医学専攻科

2018年1月10日申請の学位論文

内容

1. はじめに	2
2. HTLV-I 無症候キャリアから ATL への進展制御に向けた Tax 特異的 CTL の TCR レポ トア解析	
2.1 背景	4
2.2 方法	10
2.2.1 対象	
2.2.2 HTLV-I プロウイルス量の定量とキャリアリスク分類	
2.2.3 CD4 ⁺ 細胞における CADM1 vs CD7 発現パターンの解析	
2.2.4 HLA-A*24:02 拘束性 Tax 特異的 CTL の同定とフェノタイプ解析	
2.2.5 単細胞レベルでの Tax ₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL のレポトア解析	
2.3 結果	17
2.3.1 HTLV-I プロウイルス量とマルチカラーFACS による CADM1 vs CD7 発現パター ンの解析	
2.3.2 Tax 特異的 CTL の発現頻度と T 細胞の分化・成熟に関わるフェノタイプ解析結果	
2.3.3 HLA-A*24:02 拘束性 Tax ₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL のクローン型	
2.3.4 PDR 陽性 Tax ₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の存在と HTLV-I 感染の状態との関係	
2.4 考察	33
3. おわりに	38
4. 文献	39

1. はじめに

造血器悪性腫瘍とは、血液、骨髄、リンパ節が侵されるがんの総称で、白血病、リンパ腫、骨髄腫などに代表される疾患である。造血器悪性腫瘍は、様々な固形がんと比較しても、抗がん剤や放射線療法の感受性が高いことが特徴の一つに挙げられ、治癒が期待できる疾患も多い。さらに、従来の抗がん剤に加え、近年発展が目覚ましい分子標的薬や免疫調整薬が開発され、その治療法は格段に進歩している。一方で、一部の造血器悪性腫瘍では、治療抵抗性を示し予後不良な疾患も珍しくなく、中でも成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (adult T-cell leukemia/lymphoma, ATL) は最も難治性な造血器悪性腫瘍の一つと位置付けられている。

ATL はヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (human T-lymphotropic virus type-I, HTLV-I) によって引き起こされる造血器悪性腫瘍で、1977 年に西南日本に多発する T 細胞腫瘍として内山・高月らにより疾患概念が初めて提唱された[1]。HTLV-I の主要な感染ルートは母乳感染であり、感染後数十年の潜伏期間を経て、約 5% で ATL を発症する。体内の免疫調整の中心的な役割を担う制御性 T 細胞 (regulatory T-cell, Treg) が腫瘍化したものであるため、強い免疫不全をきたし、ニューモシスチス肺炎やサイトメガロウイルス感染症などの日和見感染を合併することも知られている。このように 1) 免疫不全が強いこと、2) 多くの抗がん剤に対して耐性を持つこと、3) 多臓器への浸潤傾向、4) さらに発症年齢が高いことなどが予後不良の要因とされている。近年の造血幹細胞移植法の発展や、分子標的薬の開発により ATL の治療成績は向上しつつあるが、これらの治療による重篤な治療関連有害事象も無視できるものではなく、やはり治癒に至る症例はいまだに限られているのが現状である。さらに ATL 発症年齢は中央値が 67 歳と高齢化が進んでおり、合併症の少ない特異的治療の開発や腫瘍進展予防法の開発などが課題として挙げられている。

HTLV-I は ATL の原因ウイルスとして同定されたレトロウイルスであり[2]、いったん感染が成立すると逆転写酵素の働きでウイルス RNA から DNA を合成し、宿主の CD4 陽性細胞の DNA にランダムに組み込まれ、一生涯の感染が持続する。感染者の大多数は生涯

にわたり無症状で、HTLV-I 無症候キャリア (asymptomatic HTLV-I carrier, AC) と呼ばれているが、上記のとおり約 5%が ATL を発症、約 0.3%が神経難病疾患である HTLV-I 関連脊髄症 (HTLV-I associated myelopathy, HAM) を発症するとされる[3]。その他にも HTLV-I 関連ブドウ膜炎 (HTLV-I associated uveitis, HAU/HTLV-I uveitis, HU)、HTLV-I 関連感染性皮膚炎 (infective dermatitis associated with human T-cell lymphotropic virus type1, IDH) など多彩な難治性の慢性炎症性疾患の引き金になっている。一般的に ATL 患者は免疫不応状態にあるが、これらの HTLV-I 関連疾患は自己免疫疾患様の病態を呈し、その発病の背景には何らかの免疫異常の関与が示唆されている。HTLV-I の感染経路は母乳を介した母子感染、輸血感染、性感染が知られているが、最も主要な感染ルートは母子感染であり、他の感染ルートに比べて ATL の発生頻度も高く、HTLV-I 感染予防対策として母子感染対策 (特に母乳感染対策) が重要である。妊婦の抗 HTLV-I 抗体のチェックと陽性者に対しての授乳の指導などの取り組みにより、児の感染率は大きく低減しているが、それでも現在も国内で約 110 万人の HTLV-I 感染者が存在しており、また人口の移動に伴って感染分布も九州・沖縄地方から大都市圏に広がっている。ATL を始めとした HTLV-I 関連疾患の根絶のためには、HTLV-I 感染予防法の確立が重要なテーマと言える。

近年、次世代シーケンス技術などの解析技術の進歩により、HTLV-I の遺伝子変異やエピジェネティック異常など網羅的な解析が可能になり、ATL 細胞において、長期間の腫瘍化過程で蓄積する多彩なゲノム異常が報告されている[4]。その結果、新たな分子標的が同定される可能性のみならず、患者の層別化に応用し、治療法の選択に利用する試みにより、ATL 治療戦略の改善がもたらされることが期待されている。一方で、複雑な腫瘍化メカニズムについては明らかにされていない点も多く、現在もウイルス側、宿主免疫側双方から様々な研究がなされている。その中でも本研究では、宿主免疫、特に T 細胞の免疫応答に焦点を当てた。宿主免疫の研究により、将来的に、腫瘍化リスクの高いキャリア症例から ATL 発症を阻止する予防法の開発へ繋がる可能性が期待され HTLV-I 感染細胞が長い年月を経て ATL に至るメカニズムの解明の一助となることを目指した。

2. HTLV-I 無症候性キャリアから ATL への進展制御に向けた Tax 特異的 CTL の TCR レパートア解析

2.1 背景

ATL は HTLV-I の感染によって引き起こされる予後不良の造血器腫瘍である [1,2,5,6]。HTLV-I 感染者のほとんどが、生涯にわたって HTLV-I 無症候キャリア (asymptomatic HTLV-I carrier, AC) であるが、50-60 年の潜伏期間後に約 5% が ATL を発症し、その中でも下山分類 (表 1) [7] でリンパ腫型あるいは急性型に分類される ATL は極めて予後不良とされる [8,9]。

表 1 成人 T 細胞性白血病の臨床病型分類 (文献 7 より引用・改変)

	急性型	リンパ腫型	慢性型	くすぶり型
抗HTLV-I抗体	+	+	+	+
リンパ球数(/ μ l)	*	<4,000	\geq 4,000	<4,000
異常リンパ球	+	\leq 1%	+	\geq 5%
Flower cells	+	—	時折	時折
LDH	*	*	\leq 2N	\leq 1.5N
血清Ca補正值	*	*	<11mg/dl	<11mg/dl
リンパ節腫大(病理学的に証明)	*	+	*	—
腫瘍部位:				
皮膚	*	*	*	**
肺	*	*	*	**
リンパ節	*	+	*	—
肝臓	*	*	*	—
脾臓	*	*	*	—
中枢神経系	*	*	—	—
骨	*	*	—	—
腹水	*	*	—	—
胸水	*	*	—	—
消化管	*	*	—	—

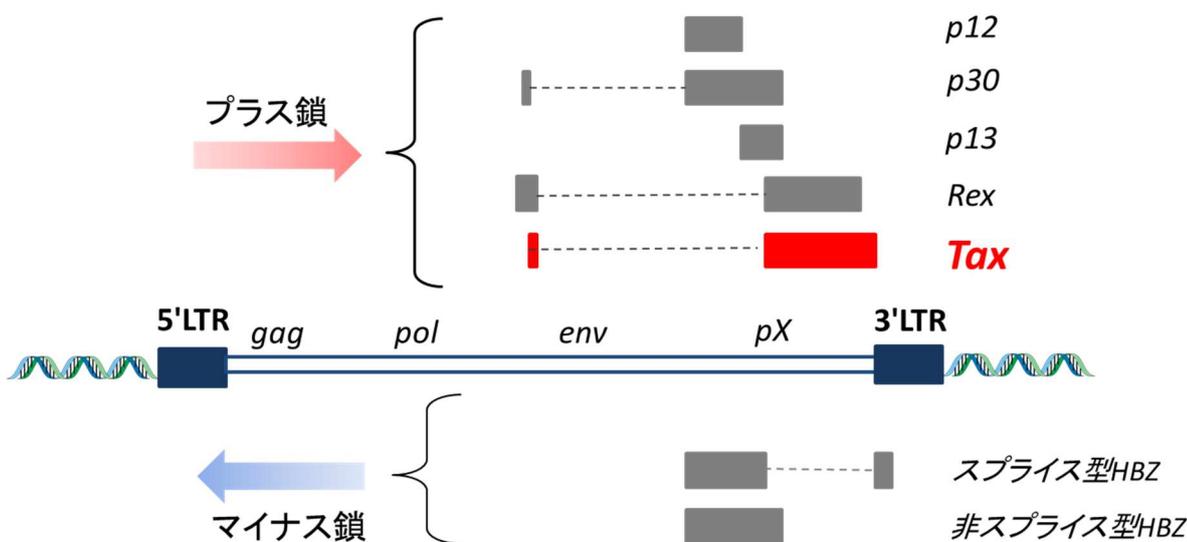
N : 基準値上限

* : 条件の制約はない

** : 他の項目が満たされれば不可欠ではないが、末梢血の異常リンパ球が 5%未満の場合は、病理学的に証明された腫瘍部位を必要とする

同種造血幹細胞移植 (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT) により一部の患者に根治が得られるようになったことで、allo-HSCT は ATL の治癒が期待できる唯一の治療法として認識されている[10]。また ATL に対する allo-HSCT は、移植片対宿主病 (graft versus host disease, GVHD) を発症した患者で移植後の再発率が低下することから、ドナー細胞による免疫学的な抗腫瘍効果、つまり graft-versus-ATL (Gv-ATL) 効果の存在が示唆されている[10]。この allo-HSCT 後の免疫応答において、腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T-cell, CTL) が重要な役割を担っていると考えられている。HTLV-I プロウイルスは、両端に long terminal repeat (LTR) が存在し、内部に *gag*、*pol*、*env* などの構造遺伝子を有している (図 1)[11]。HTLV-I の特徴として、*env* と 3'LTR との間に *pX* 領域を有していることが挙げられ、この *pX* 領域にはプラス鎖に p12 や p30、p13、Rex、Tax が、マイナス鎖には HTLV-I bZIP factor (HBZ) といった複数の調整遺伝子がコードされている。これらの調節遺伝子はウイルスおよび宿主遺伝子の発現および機能を多彩に修飾するが、Tax は特に多彩な機能を有するタンパク質であり、ATL 発症に重要な分子として注目されてきた。ウイルスゲノムの転写を促進するだけでなく、シグナル伝達を含む数多くの宿主遺伝子の転写の活性化や抑制を引き起こすことで、ウイルス感染細胞の増殖能亢進やアポトーシス抵抗性をもたらす。一方で、Tax は免疫原性が強く、CTL の主要標的抗原として注目されている。Allo-HSCT 後のドナー由来 Tax 特異的 CTL の存在は Harashima らによって報告され[12]、Tax 特異的 CD8⁺CTL の Gv-ATL 効果への積極的な寄与の可能性が広く認識されるようになった。他にも HTLV-I 感染における T 細胞免疫応答に関連して、HTLV-I Tax 特異的 CTL の存在が、HTLV-I 感染個体内でのウイルス制御において重要な役割を果たしていること、無症候キャリアにおいては ATL への疾患発症リスクを低下させる可能性があること、さらには、allo-HSCT を受けた ATL 患者においては再発予防の一端を担っている可能性が示唆されている[10,13-17]。

図 1 HTLV-I プロウイルス構造 (文献 11 より引用・改変)



プラス鎖には構造遺伝子である *gag*, *pol*, *env*に加えて、*pX*領域に *p12*, *p30*, *p13*, *Rex*, *Tax*がコードされている。一方、マイナス鎖には *HBZ* がコードされ、スプライス型と非スプライス型が存在する。これらの調節遺伝子はウイルスおよび宿主遺伝子の発現および機能を多彩に修飾する。

我々のこれまでの研究でも、allo-HSCT を受けて寛解に至った ATL 患者体内において *Tax* 特異的 CTL の増加が観察され[17]、allo-HSCT 後に *Tax* 特異的 CTL が活性化していることが考えられた。しかしながら、ウイルスや腫瘍抗原に対する CTL の免疫反応に関する最近の知見では、CTL の体内での活性化状態を決定するのに、CTL の数量よりもその質および機能を評価することがより重要であると提言されている[18-21]。

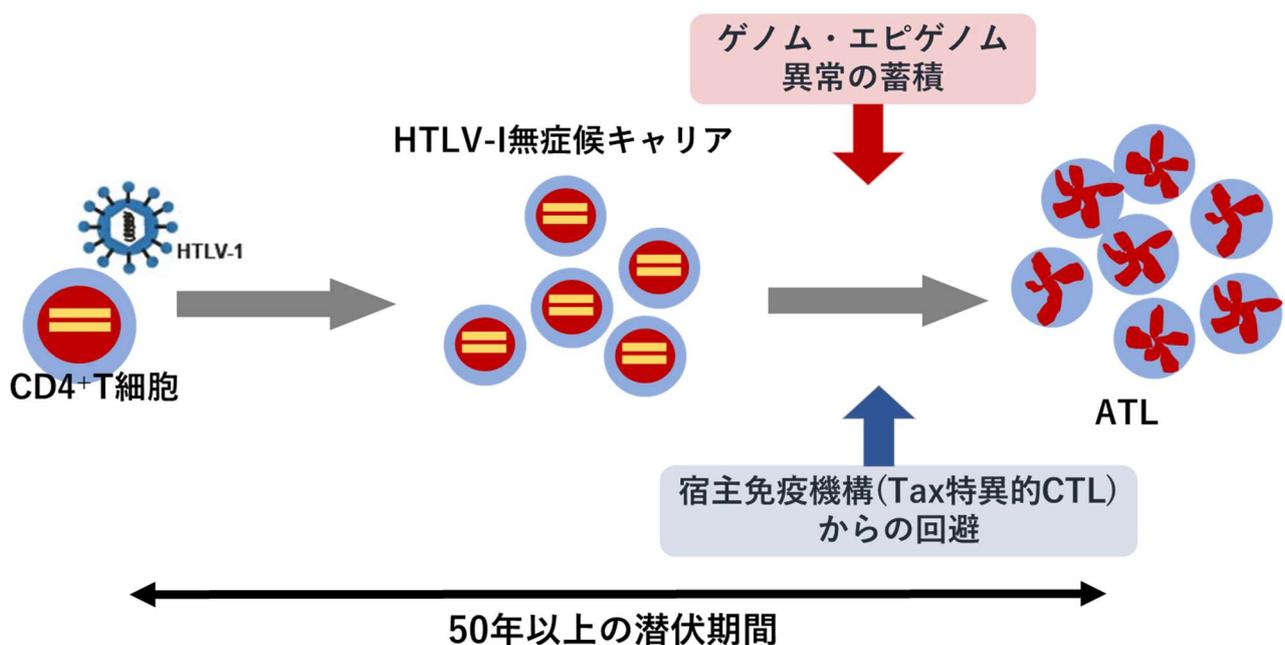
そこで我々は、*Tax* 特異的 CTL の質的評価を行うために、日本人集団における HLA-A としては最も高頻度 (約 60%) でみられる HLA-A*24:02 陽性の ATL 患者を対象に、HLA-A*24:02 拘束性 *Tax*₃₀₁₋₃₀₉ (SFHSLHLLF)-特異的 CTL の T細胞受容体 (T-cell receptor, TCR) レパトア解析を行ってきた。*Tax*₃₀₁₋₃₀₉ (SFHSLHLLF) は、HLA-A*24:02 に拘束される CTL の主要なエピトープとして Harashima らによって同定された[12]。Allo-HSCT を受けた HLA-A*24:02 陽性 ATL 患者 4 例において、*Tax*₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL のレパトアを単細胞レベルで解析したところ、*Tax*₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の TCR レパトアは、その多様性が高

度に制限されており、TCRβ鎖の相補性決定領域 (complementarity-determining region3, CDR3) に、特徴的なアミノ酸配列である “P (Proline) -D (Aspartic acid) -R (Arginine)” モチーフを持つ CTL が、各サンプルで dominant Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL クローンとして検出された。この PDR⁺Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL は個体間で共通して存在し、同一患者体内の allo-HSCT 前後でも保存されていることが判明した[22]。さらに、我々は、移植後に数年以上完全寛解を維持していた ATL 患者では、非常に限られた数の Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL クローンしか存在せず、その中でも PDR⁺Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL クローンが選択的に増殖し、HTLV-I 感染細胞に対して非常に強い細胞傷害活性を持つことを報告した[17]。PDR⁺Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL を含む Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL は、患者残存 T 細胞ではなく、allo-HSCT 後に HTLV-I 陰性のドナー細胞から新しく誘導された T 細胞であることも確認され、allo-HSCT 後のレシピエント体内においてわずかに残存する HTLV-I の Tax が抗原刺激となり Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL が活性化されていると推測された。これらの知見は PDR⁺Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の存在が、allo-HSCT を受けた ATL 患者の長期生存に寄与することを示唆しており、Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL における TCR レパトアの多様性、あるいは PDR⁺Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL のような圧倒的なクローンの存在が、ATL の疾患状態に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

一方で、キャリア状態から ATL への発癌機構における Tax 特異的 CTL の関与については不明な点も多く、特に AC における Tax 特異的 CTL の TCR レパトアについてはこれまで報告されていない。HTLV-I 感染後、一部のキャリアが数十年の年月をかけて ATL を発症するには、多段階の発癌機序が存在するとされる。キャリア状態ではウイルス遺伝子による増殖促進作用と宿主免疫による抑制作用が均衡状態にあるが、数十年という潜伏期間で、ウイルスの genetic 変化や epigenetic な異常が蓄積し、宿主側の genetic・epigenetic 変化や免疫能の変化が加わり、免疫監視機構からの回避が可能となり ATL の発症を誘発すると考えられているが (図 2)、その詳細は明らかにされていない点も多い。Tax 特異的 CTL は宿主の免疫監視機構において重要な役割を担っていると考えられ、HTLV-I 感染後、長いキ

キャリア状態の中で Tax 特異的 CTL のレパトアも変化している可能性がある。我々は allo-HSCT を受けた ATL 患者を対象に Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の TCR レパトアを調査し、PDR⁺Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の存在を発見したが、1) HTLV-I 感染者の疾患状態に応じて、Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の TCR レパトアは変化するのか、2) PDR⁺Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL は存在するのか、3) もし存在するのであれば、HTLV-I 感染の病態とどの程度関連があるのかということに関心を持った。

図2 HTLV-I 感染 T リンパ球の腫瘍化機構 (文献 11 より引用・改変)



キャリアではウイルス遺伝子 (Tax および HBZ) による増殖促進作用と宿主免疫 (主に Tax 特異的 CTL) による抑制作用の均衡状態にある。数十年という潜伏の過程で一部の感染細胞にゲノム・エピゲノム異常が多段階に蓄積し、宿主免疫機構からの回避が可能となり ATL の発症を誘発する。

本研究では、対象を allo-HSCT を受けた ATL 患者だけでなく、AC を含む幅広い病態の HTLV-I 感染者に拡大し、Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の TCR レポトアデータを集積し、疾患状態との関連を検証することを目的とした。本研究の意義としては、Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の体内動態やその性状と、病態との関連性を調査し、細胞性免疫の側面から HTLV-I のウイルス量の制御について検討することで、一部の HTLV-I 感染細胞が長い年月を経て ATL に至るメカニズムの解明の一助となることが期待される。将来的には、疾患メカニズムを解明するだけでなく、腫瘍化リスクの高いキャリア症例から ATL 発症を阻止する予防法の開発へ繋げ、発症抑制による罹患率低下と、ATL の生存率向上に寄与したいと考えている。

2.2 方法

2.2.1 対象

本研究は HLA-A*24:02 を有する AC 及び ATL 患者を対象とした。東京大学医科学研究所附属病院において、2015 年 7 月から 10 月に外来を受診した、AC17 名と未治療の ATL 患者 2 名から末梢血検体を採取し、自治医科大学附属さいたま医療センターにおいて、ATL 患者 3 名から末梢血検体を採取した。ATL の病型分類は、下山分類に従って行い[7]、急性型/リンパ腫型 (aATL) が 4 例、慢性型 ATL (cATL) が 1 例であった。

採取した末梢血はリンホプレップ (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway) を用いて密度勾配遠心を行い、末梢血単核球区分 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) を採取し、使用するまで凍結保存した。

本試験はヘルシンキ宣言の精神に則り、東京大学及び自治医科大学倫理審査委員会の承認を受け、計画書を遵守して実施された。全症例につき、検体の採取および研究使用に関し書面にて同意を得ている。

2.2.2 HTLV-I プロウイルス量の定量とキャリアリスク分類

末梢血単核球中の HTLV-I プロウイルス量 (proviral load, PVL) は ABI Prism 7000 sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いたリアルタイム PCR (TaqMan 法) で既報[23,24]と同様に測定した。AC において、PVL が高値であること、特に 100 末梢血単核球あたり 4 コピーを超えることが ATL を発症する主要なリスク因子の一つと考えられていることから[24]、本研究では PVL が 4 コピー/100 単核球以上であるキャリアを high-risk-AC (hrAC)、PVL が 4 コピー/100 単核球未満のキャリアを stable-AC (sAC) と定義した。

2.2.3 CD4⁺細胞における CADM1 vs CD7 発現パターンの解析

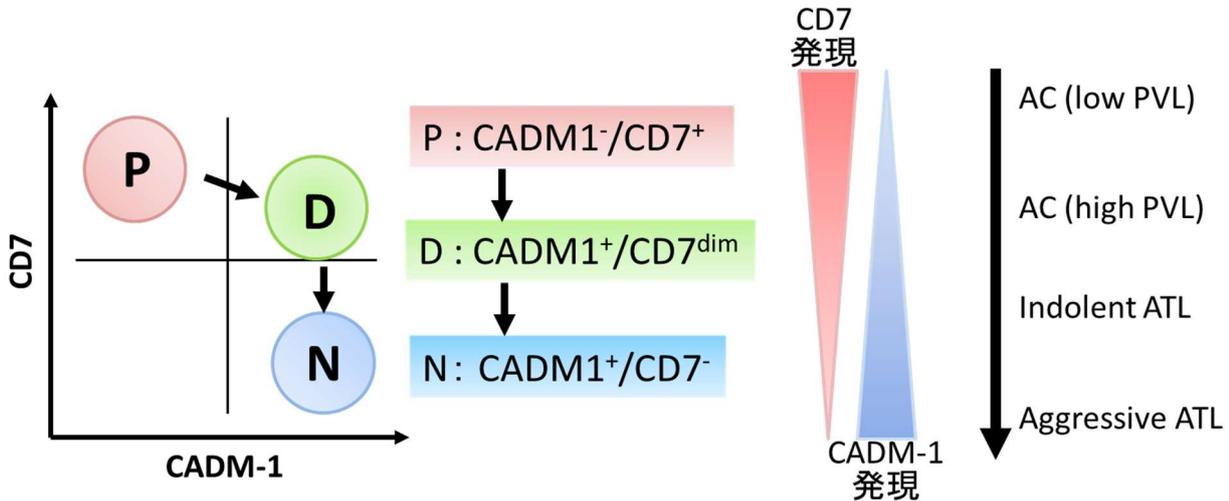
末梢血から分離した PBMCs は、抗ヒト CADM1 (cell adhesion molecule 1)、CD7、CD3、CD4、CD14 抗体を用いて染色した。CADM1-PE 抗体 (clone 3E1) は MBL (Tokyo, Japan) より購入し CD7-APC 抗体 (clone CD7-6B7)、CD4-APC-Cy7 と CD14-FITC 抗体は Biolegend 社 (San Diego, CA)、CD3-PE-Cy7 は BD Biosciences 社 (San Jose, CA) より購入した。PBMCs にこれらの蛍光色素標識抗体を加え氷上で 25 分反応させ、2%ウシ胎児血清を含むリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS) にて 2 回洗浄し、死細胞を標識除去するために 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD, BD Biosciences) を加えた後、FACS Verse (BD Biosciences) を用いてフローサイトメトリーにて表面抗原解析を施行した。データは FACS Diva ソフトウェア (BD Biosciences) を用いて解析した。

それぞれのサンプルにおいて CD3、CD4、CD7、CADM1 染色を行いフローサイトメーターで CD3⁺CD4⁺細胞集団 (HTLV-1 感染細胞が含まれていると考えられる) を抽出し、そのうちの CADM1⁻/CD7⁺(P)、CADM1⁺/CD7^{dim}(D)、CADM1⁺/CD7⁻(N)の集団の割合を解析した。

こうしたマルチカラーFACS を用いた CADM1 vs CD7 のプロットは、小林らより報告された。HTLV-I 感染細胞腫瘍化過程を解析する HAS (HTLV-I Analysis System) -flow と呼ばれ、CD4⁺T 細胞集団を CADM1⁻/CD7⁺(P)、CADM1⁺/CD7^{dim}(D)、CADM1⁺/CD7⁻(N) の 3 群に分類することができる。CADM1 は、免疫グロブリンスーパーファミリー細胞接着分子群に属する細胞間接着分子であり、TSLC1 (tumor suppressor in lung cancer 1) という別名が示す通り、もともと非小細胞肺癌における癌抑制遺伝子として注目された。現在では、多くの固形癌で癌抑制遺伝子として機能し、その発現が低下していることが知られているが、ATL では高発現し血管内皮への接着や臓器浸潤に機能することが知られている [25]。HAS-flow 法では、安定した HTLV-I キャリア→高プロウイルス量のハイリスクキャリア→くすぶり型や慢性型 (indolent ATL) →急性型 (aggressive ATL) と臨床病期の進行に伴い、優位な細胞集団が CADM1⁻/CD7⁺(P)→CADM1⁺/CD7^{dim}(D)→CADM1⁺/CD7⁻(N)と移り変わ

っていくことが観察される (図 3)[26,27]。

図 3 HAS-flow 法 (CD4+細胞における CADM1 vs CD7 発現パターン)



HTLV-I 無症候キャリア→Indolent ATL→Aggressive ATL と病期の進行に伴い、CD7 の発現が低下し、CADM1 の発現が増えるため、優位な細胞集団が CADM1-/CD7+(P) → CADM1+/CD7^{dim}(D) → CADM1+/CD7-(N)と移り変わっていく。

2.2.4 HLA-A*24:02 拘束性 Tax 特異的 CTL の同定とフェノタイプ解析

Tax 特異的 CTL の T 細胞分化に係るフェノタイプを調べるため、PE で標識された HLA-A*24:02 拘束性 Tax₃₀₁₋₃₀₉ ペプチド (SFHSLHLLF) テトラマー試薬 (MBL) と CD3-FITC、CD8-APC-Cy7、CD27-PerCP-Cy5.5、CD28-FITC、CD57-FITC (以上 Biolegend)、CCR7-PE-Cy7、CD45RA-APC 抗体 (以上 BD Biosciences) を使用した。まず PBMC に HLA-A*24:02/Tax₃₀₁₋₃₀₉ (SFHSLHLLF) テトラマー-PE を加え室温で 30 分反応させた後、他の蛍光色素標識抗体を加え氷上で 25 分反応させた。このようにして PBMC を染色した後、PBS にて 2 回洗浄し、FACS AriaII (BD Biosciences) を用いてフローサイトメトリーにて表面抗原解析を施行した。Tax 特異的 CTL は CD8 陽性かつ Tax₃₀₁₋₃₀₉ (SFHSLHLLF) テトラマー陽性細胞と定義し、同定した Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL 集団は、さらに次項に示すよ

うにセルソーターで個々に単離し TCR レパトア解析を行った。これらのデータ解析には FACS Diva ソフトウェアを用いた。

2.2.5 単細胞レベルでの Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL のレパトア解析

図 4 に我々が開発した direct single cell 解析方法を示す[22,28-30]。Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の T 細胞受容体 (TCR) -β 鎖の解析は、前項に示した表面抗原解析に使用した細胞と同じ細胞を引き続き使用した。まず FACA Aria II を用いて、HLA-A*24:02/Tax₃₀₁₋₃₀₉ (SFHSLHLLF) テトラマー染色で同定した Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL 集団を一細胞ずつ、逆転写酵素 (SuperScript III; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)、0.5 mM dNTPs (Invitrogen)、RNase 阻害剤 (Invitrogen)、100 µg/mL gelatin (Roche, Indianapolis, IN, USA)、100 µg/mL tRNA (Roche)、TCR-β 鎖 C 遺伝子に特異的な primer (5'- CACCAGTGTGGCCTTTTG-3')、細胞溶解 (0.5% Triton X-100) バッファーを含む相補的 DNA (complementary DNA, cDNA) reaction Mix の入った PCR チューブへ直接ソーティングした。ソートしたサンプルを cDNA reaction Mix の中で 50°C90 分反応させ TCRβ 鎖の cDNA を作成した。次に、カスタム作成した 24 種類の TCR-β 鎖 V 遺伝子と 2 種類の TCR-β 鎖 C 遺伝子に特異的な primer (表 2) と DNA 合成酵素 (Platinum Taq DNA Polymerase; Invitrogen)、0.25 mM dNTPs、2 mM MgCl₂、PCR バッファーで PCR reaction Mix を作成し、multiplex-PCR を行い、個々の細胞の TCR-β 鎖遺伝子を増幅する (1st.PCR)。1st.PCR の条件は、初期熱変性を 95°C2 分、サイクリングは熱変性 94°C45 秒、アニーリングを 57°C45 秒、伸長反応を 72°C1 分、40 サイクルとした。次に 24 種類の TCR-β 鎖特異的 forward primer を 8 群 (S1-S8、表 2) に分けて、1st.PCR 産物を鋳型として、Platinum Taq、0.25 mM dNTPs、2 mM MgCl₂、PCR バッファーを含む PCR reaction Mix で screening PCR を施行した。Screening PCR 条件は、初期熱変性を 95°C2 分、サイクリングは熱変性 94°C45 秒、アニーリングを 57°C45 秒、伸長反応を 72°C50 秒、37 サイクルとした。この PCR 産物の電気泳動を行い、増幅に寄与した primer 群を同定した。そして再度 1st.PCR 産物を鋳型として同定した primer 群に含まれる TCR-β 鎖特異的 forward primer を各々用いて PCR を行った

(2nd.PCR)。2nd.PCR 条件は Screening PCR と同条件で施行した。PCR 産物の電気泳動を行い、最終的に増幅に寄与した forward primer を一つ同定した。こうして同定された TCR- β 鎖特異的 forward primer により増幅された 2nd.PCR 産物から DNA の精製を行い、同定した TCR- β 鎖特異的 forward primer を用いてサーマルサイクリングを行った。最後に、ABI 3130xl Genetic Analyzer (Life Technologies) を用いてダイレクトシーケンス法を行い、IMGT human TCR gene database (<http://imgt.cines.fr>) を用いて Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の TCR- β 鎖 CDR3 領域の塩基配列を決定した。

表 2 プライマーの配列

	Screenig PCR Mix	TRBV gene	Forward primer sequence (5'-3')	
PCR forward primers (TCR-BV gene family -specific primers)	S1	TRBV9	ACAGCAAGTGAC<TAG>CTGAGATGCTC	
		TRBV25	GATCACTCTGGAATGTTCTCAAACC	
		TRBV10	CCAAGACACAAGGTCACAGAGACA	
	S2	TRBV20	GAGTGCCGTTCCCTGGACTTTCAG	
		TRBV28	GTAACCCAGAGCTCGAGATATCTA	
		TRBV2	GGTCACACAGATGGGACAGGAAGT	
	S3	TRBV29	TCCAGTGTCAAGTCGATAGCCAAGTC	
		TRBV7	ATGTAAC<CT>TCAGGTGTGATCCAA	
	S4	TRBV27	GTGACCCAGAACCCAAGATACCTC	
		TRBV7	GTGTGATCCAATTTTCAGGTCATAC	
	S5	TRBV12	GGTGACAGAGATGGGACAAGAAGT	
		TRBV11	CAGTCTCCCAGATATAAGATTATAGAG	
		TRBV19	CACTCAGTCCCCAAAGTACCTGTT	
	S6	TRBV30	GTCAGATCTCAGACTATTCATCAATGG	
		TRBV4	TACGCAGACACCAA<GA>ACACCTGGTCA	
		TRBV3	CCCAGACTCCAAAATACCTGGTCA	
		TRBV18	TGCAGAACCCAAGACACCTGGTCA	
	S7	TRBV21	AAGGTCACCCAGAGACCTAGACTT	
		TRBV14	ATAGAAGCTGGAGTTACTCAGTTC	
		TRBV23	ACAAAGATGGATTGTACCCCCGAA	
	S8	TRBV6	GTGTCACTCAGACCCCAAAATTC	
		TRBV24	GTTACCCAGACCCCAAGGAATAGG	
	Reverse primer sequence (5'-3')	1st-PCR (3'BC) Screening and 2nd-PCR (5'BC)	TRBV13	CTGATCAAAGAAAAGAGGGAAACAGCC
			TRBV15	CAAGATACCAGGTTACCCAGTTTG
				GCTTCTGATGGCTCAAACACAGC
				GGAACACGTTTTTCAGGTCTCT

我々が行ってきた direct single cell 解析の特徴としては、生体内のレパトア情報を direct に評価できる点にある。従来の CTL の TCR レパトア解析は、サンプルを数種類の サイトカインや特異的抗原と共培養して、目的とする T 細胞を増殖させた後に行われることが多かったが、この手法では培養後の T 細胞母集団にバイアスが生じ、T 細胞クローンの頻度やレパトアは生体内の真の状態を反映してはいなかった。これに対して我々が用いた direct single cell 解析では共培養で誘引されるバイアスを排除する事ができ、Tax 特異的 CTL の生体内の動態を in vitro で手を加えることなくより正確に評価する事が可能となるものである。本研究では、AC10 例 (AC1、3、4、5、7、9、10、11、16、17) において計 1107 個の Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL を解析し、ATL 患者 4 例 (aATL2、3、4、cATL1) では計 351 個の Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL を解析した。aATL2 と aATL3 の Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の TCR レパトア解析は既報でも報告している [22]。aATL2 の患者末梢血では Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL が検出できなかったため、骨髓検体を用いて TCR レパトアの解析を行った。

2.3 結果

2.3.1 HTLV-I プロウイルス量とマルチカラーFACSによる CADM1 vs CD7 発現パターンの解析

対象者背景と臨床情報を表 3 に示した。cATL1、aATL1 は治療開始前、aATL2、-3、-4 の 3 例は allo-HSCT 施行前の臨床情報である。PVL の測定結果より図 5a に示すように 3 例 (AC11、16、17) が hrAC に分類され、残りの 14 例は sAC に分類された。

さらに HAS-flow 法により CD4⁺T 細胞集団を CADM1⁻/CD7⁺(P)、CADM1⁺/CD7^{dim}(D)、CADM1⁺/CD7⁻(N)の 3 群に分類した解析結果の代表例を図 5b に示した。各サンプルの HAS-flow 解析における CADM1⁻/CD7⁺(P)、CADM1⁺/CD7^{dim}(D)、CADM1⁺/CD7⁻(N)の割合は表 3 に示し、sAC、hrAC、ATL 患者検体における CD4⁺細胞中の CADM1 陽性分画 (D+N 分画) の割合を図 5c に示した。ほとんどの AC ではその細胞集団が CADM1⁻/CD7⁺(P)分画に集中していたが (P 分画が 80%以上)、HTLV-I プロウイルス量から上記の通り hrAC と定義されたキャリア 3 例 (AC11、AC16、AC17) では、CADM1 vs CD7 のプロットパターンが CADM1 陽性分画である CADM1⁺/CD7^{dim}(D)と CADM1⁺/CD7⁻(N)にシフトしていた (D+N 分画が 13.1%から 46.2%)。さらに ATL 患者検体では、ほとんどの CD4⁺細胞が CADM1 陽性分画に集中し、CD7 の発現は低下していた。PVL が 4 コピー/100 単核球未満の sAC においては CADM1 陽性分画が 10%以下であったが、PVL が 4 コピー/100 単核球以上の hrAC (AC11、16、17)では CADM1 陽性分画の割合は 10%を超えており、さらに ATL 患者では CADM1 陽性分画の割合が著しく高値であった。

以上から、本研究の HAS-flow 解析による CADM1 vs CD7 プロットは、HTLV-I 感染者の臨床病期や腫瘍化進行度を反映する PVL と関連し、小林らが報告した結果と同様のものであった[26,27]。

表 3 AC 及び ATL 患者の被験者背景、フローサイトメトリー結果

ID	年齢	性別	臨床病期	白血球数 (μ l)	リンパ球 (%)	異型 リンパ球 (%)	HTLV-I プロウイルス量 (PVL) /100単核球	sIL2R (U/ml)	HAS-flow (CADM1 vs CD7) パターン				CD8 ⁺ T細胞中 のTax-CTL (%)
									CADM1 (-)		CADM1 (+)		
									P (%)	D (%)	N (%)	D+N (%)	
AC1	48	女性	sAC	3780	32.0	0.5	1.61	416	91.8	1.8	1.0	2.8	20.10
AC2	46	女性	sAC	7280	28.0	0	0.65	239			N.A		1.05
AC3	63	男性	sAC	4570	39.0	0	0.94	311	92.2	2.2	0.7	2.9	2.76
AC4	56	女性	sAC	5020	42.0	0	0.50	305	90.2	2.6	0.8	3.4	2.07
AC5	58	男性	sAC	3850	36.5	0.5	0.05	364	94.8	1.1	0.2	1.3	1.76
AC6	61	女性	sAC	4220	32.5	0	0.57	327			N.A		0.66
AC7	53	女性	sAC	6940	33.0	0.5	0.06	220	86.6	1.1	0.3	1.4	1.75
AC8	49	女性	sAC	3560	23.0	0.5	0.04	207			N.A		0.14
AC9	71	男性	sAC	5200	30.5	0.5	1.37	272	79.9	2.5	1.9	4.4	0.05
AC10	43	男性	sAC	5710	43.5	0	0.22	277	95.9	0.7	0.1	0.9	3.37
AC12	56	女性	sAC	10300	21.5	0.5	0.97	462			N.A		1.59
AC13	70	男性	sAC	3810	37.0	0	1.93	435			N.A		0.83
AC14	67	女性	sAC	5540	23.5	1.0	1.00	657			N.A		6.60
AC15	52	女性	sAC	5400	28.0	1.5	0.29	264			N.A		0.44
AC11	63	男性	hrAC	6070	25.0	1.0	5.26	378	71.1	7.1	6.0	13.1	3.12
AC16	66	女性	hrAC	5590	45.0	4.3	14.31	381	71.6	5.2	19.3	24.5	0.71
AC17	56	男性	hrAC	8780	32.0	1.0	17.53	700	50.0	27.2	19.0	46.2	2.53
cATL1*	60	男性	ATL (慢性型)	9850	12.5	57.5	83.17	4560	1.3	53.5	44.7	98.2	3.47
aATL1*	58	女性	ATL (急性型)	51200	1.5	96.0	280.25	29600	0.3	0.3	99.2	99.5	UD
aATL2**	57	男性	ATL (急性型)	1430	18.0	0	25.2	900			N.A		UD
aATL3**	54	男性	ATL (リンパ腫型)	1270	54	5	N.A	982			N.A		1.97
aATL4**	55	男性	ATL (リンパ腫型)	1310	25	1	N.A	817			N.A		0.08

HAS-flow パターン: CADM1⁻/CD7⁺(P)、CADM1⁺/CD7^{dim}(D)、CADM1⁺/CD7⁻(N)

N.A:欠損値、UD:測定感度以下

*cATL1、aATL1 は治療前、**aATL2、-3、-4 は allo-HSCT 施行前の臨床情報

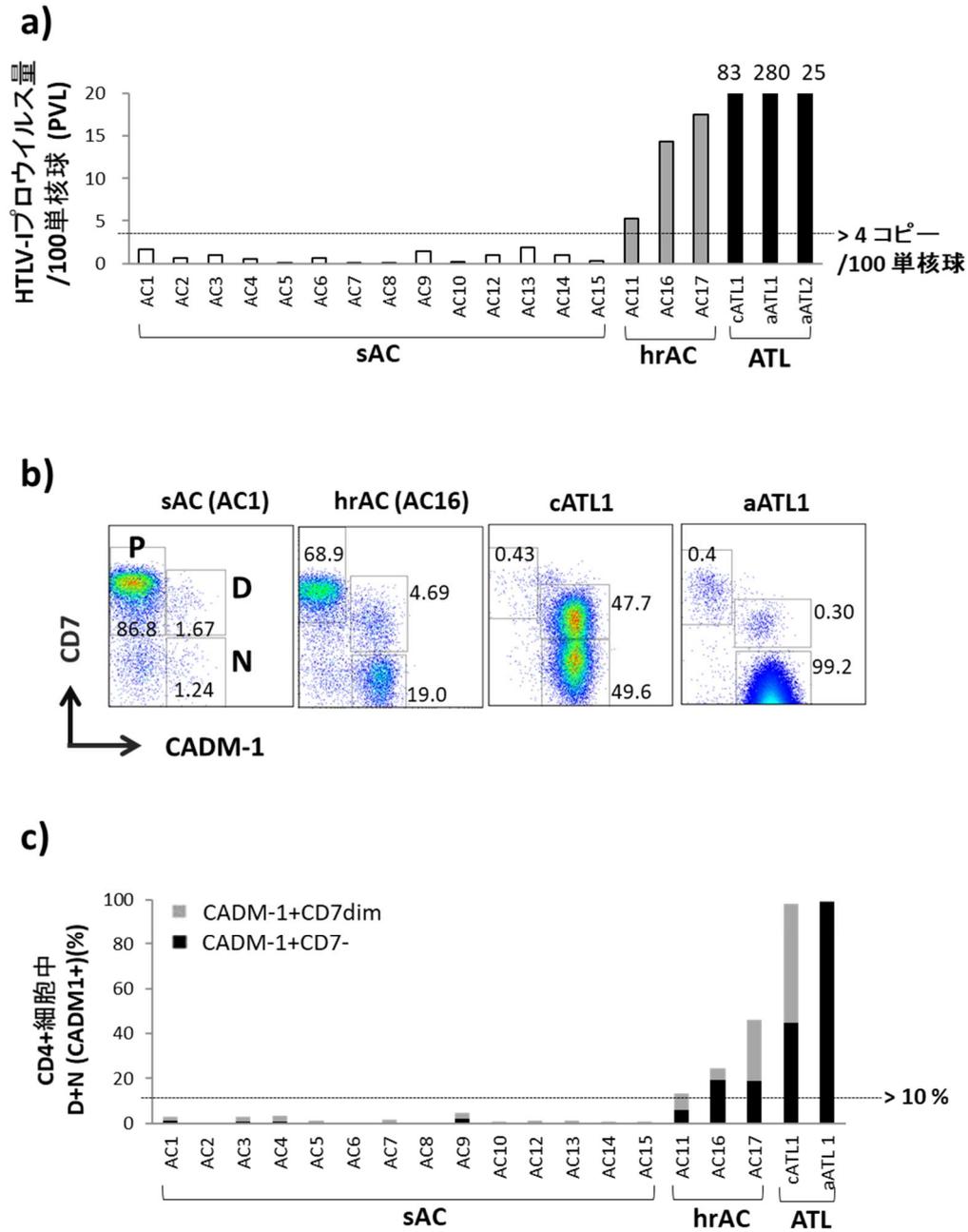


図5 PVLとCD4⁺T細胞中のCADM1 vs CD7発現パターン

a) AC17名とATL患者3名のPVL結果。ACはPVL結果に基づいて(4コピー/100単核球をカットオフとして)、stable AC (sAC) と high-risk AC (hrAC) に分類したところ、3例 (AC11、16、17) がhrACに、14例がsACに分類された。

b) sAC、hrAC、cATL、aATLのCD4⁺T細胞のCADM1 vs CD7発現パターン (HAS-flowパターン) 代表例を示す。病期の進行に伴いCADM1陽性細胞 (D+N分画) が徐々に増え、さらに病期が進行すると、CD7発現が低下しN分画が優勢となる。

c) CD4⁺T細胞中のCADM1陽性細胞 (D+N分画) の割合を示す。PVL 4コピー/100単核球未満のsACではCADM1陽性分画が10%以下であったが、hrACではCADM1陽性分画の割合は10%を超えており、さらにATL患者ではCADM1陽性分画の割合が著しく高値であった。

2.3.2 Tax 特異的 CTL の発現頻度と T 細胞の分化・成熟に関わるフェノタイプ解析結果

表 3 に CD8⁺T 細胞に占める Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の割合を示した。2.2.4 示した通り染色した PBMCs を FACS Aria II にて解析し、CD8 陽性かつ Tax₃₀₁₋₃₀₉ (SFHSLHLLF) テトラマー陽性の細胞集団を Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL とした (図 6a)。表 3 に示すように、AC1 では 20.1%、AC14 では 6.6%と sAC では Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL が高頻度で同定された症例があった一方で、ATL 患者では Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL が同定できない症例 (aATL1、aATL2)、著しく発現頻度が低かった症例 (aATL では 0.08%) があり、症例間でのばらつきを認めた。しかし CD8⁺T 細胞中に同定された Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の頻度を sAC vs hrAC、sAC vs ATL 患者で群間で比較したところ (Mann-Whitney U 検定を使用)、その発現頻度に有意差は見られなかった (図 6b)。

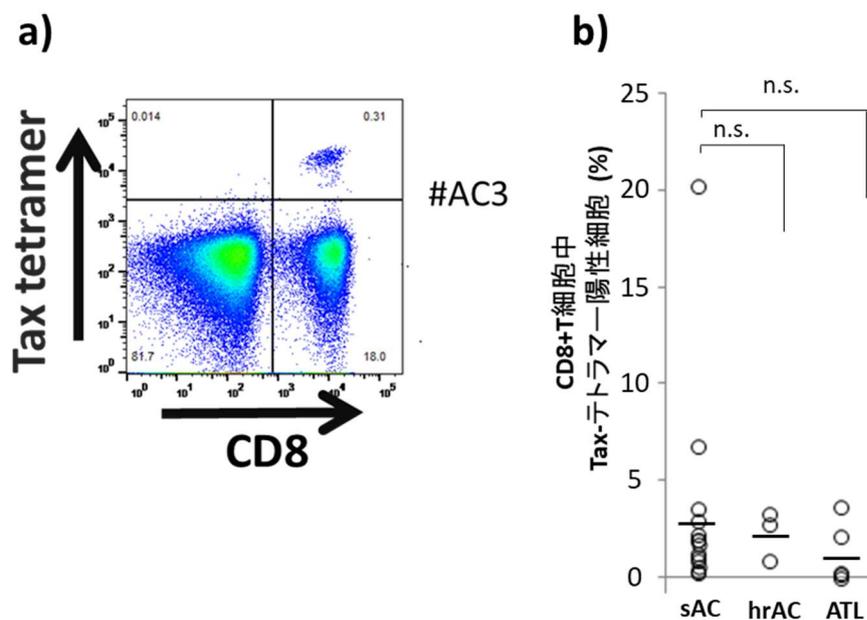


図 6 Tax 特異的 CTL 発現頻度の比較

a) AC3 のフローサイトメトリー結果を示す。CD8 陽性かつ HLA-A*24:02 拘束性 Tax₃₀₁₋₃₀₉ (SFHSLHLLF) テトラマー陽性細胞を同定し、Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL とした。

b) CD8⁺T 細胞中に同定された Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の頻度を sAC vs hrAC、sAC vs ATL 患者で比較したが発現頻度に有意差は見られなかった。

さらに、2.2.4 に示した方法で、T 細胞分化・成熟に関わるフェノタイプを調べ、sAC、hrAC、ATL 患者の 3 群間で比較した。T 細胞は CD45RA と CCR7 の発現パターンにより CD45RA⁺CCR7⁺ナイーブ T 細胞 (T_N)、CD45RA⁻CCR7⁺セントラルメモリー T 細胞 (T_{CM})、CD45RA⁻CCR7⁻エフェクターメモリー T 細胞 (T_{EM})、CD45RA⁺CCR7⁻エフェクター T 細胞 (T_E) に分類される[31]。図 7 に示したように、CD8⁺T 細胞は sAC、hrAC、ATL 患者の全ての群において、ナイーブ、メモリー、エフェクターとヘテロ集団で構成されていたのに対し、Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL はどの群においても CD45RA⁻CCR7⁻エフェクターメモリー T 細胞が大多数を占めており (平均値はそれぞれ 92.8%、90.9%、88.0%)、3 群間での明らかな差はみられず、臨床病期に関わらず T_{EM} に集中していた。

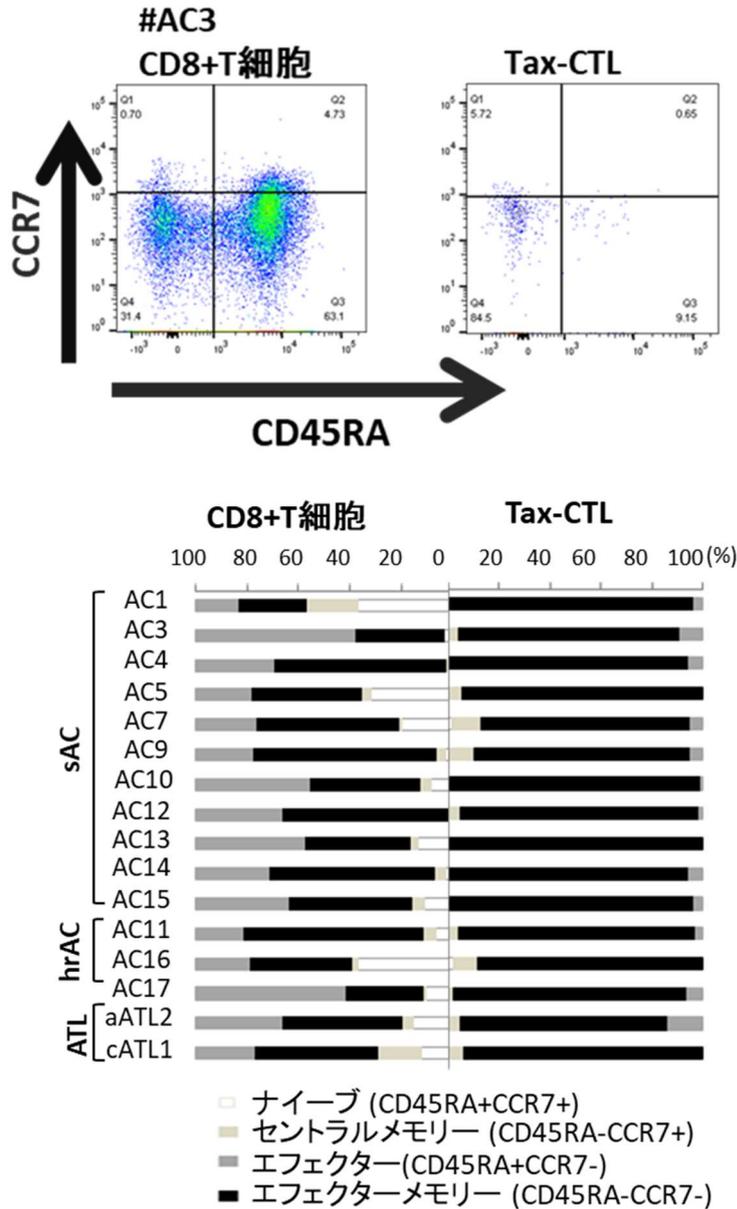


図7 T細胞のCD45RA/CCR7表現型

CD8⁺T細胞及びTax₃₀₁₋₃₀₉特異的CTLのフェノタイプをCD45RA/CCR7発現パターンで評価した。CD8⁺T細胞はナイーブ、メモリー、エフェクターとヘテロ集団で構成されていたのに対し、Tax₃₀₁₋₃₀₉特異的CTLはsAC、hrAC、ATL患者の3群すべてにおいてCD45RA⁻CCR7⁻エフェクターメモリーT細胞に集中していた。

本研究ではさらに、T_{EM}に属したCD8⁺T細胞及びTax₃₀₁₋₃₀₉特異的CTLの成熟度をCD27/CD28、CD27/CD57の発現パターンで評価した。これらはメモリーT細胞の成熟段階を評価するのに有用なマーカーであると報告されており、CD27/CD57の発現パターン

から、CD27⁺CD57⁻の未成熟 T 細胞 (immature)、CD27⁻CD57⁺の成熟 T 細胞 (mature)に分類され[32,33]、CD27/CD28 の発現パターンから CD27⁺CD28⁺ (early)、CD27⁺CD28⁻ (intermediate)、CD27⁻CD28⁻ (late) に分類される[34]。図 8a 及び図 8b に示したように、Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の T_{EM} は、sAC、hrAC、ATL 患者の 3 群すべてにおいて、その大多数が CD27 を発現しており、CD27⁺CD28⁺ (early) もしくは CD27⁺CD28⁻ (intermediate) に分類され、CD27⁺CD57⁻の未成熟 T 細胞 (immature) に分類されるものであった。一方 CD8⁺T 細胞の T_{EM} は比較的ヘテロな集団で構成されており、Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL と比べると CD27 の発現が低下した CD27⁻CD28⁻ (late)、さらに CD57 を発現した CD27⁻CD57⁺ (mature) に分類される T 細胞が多い傾向にあった。

以上より、Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL は、CD27 を発現し、比較的幼若なエフェクターメモリーT細胞集団で構成されており、このフェノタイプ構成は HTLV-I 感染者の臨床病期に関わらず一貫して同じ表現型が維持されていた。

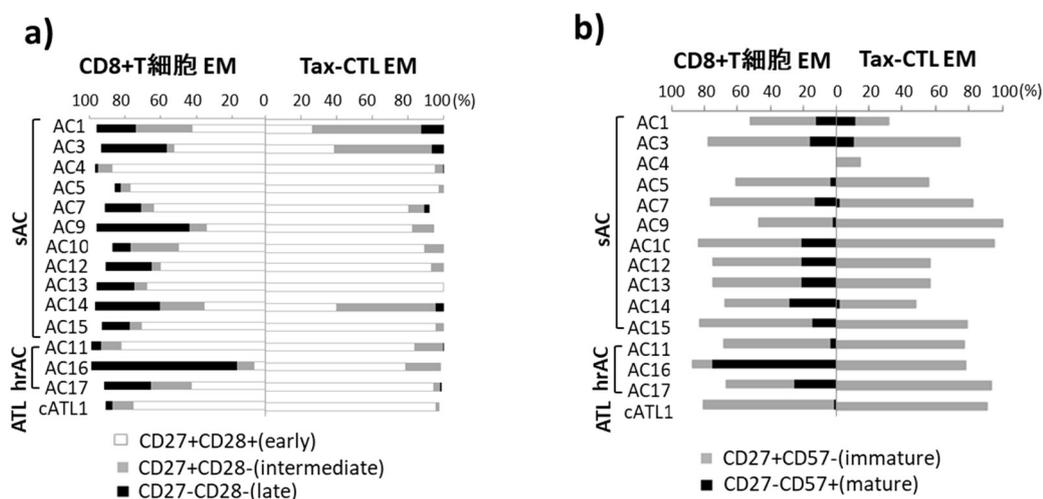


図 8 エフェクターメモリーT細胞の表現型

CD45RA⁺CCR7⁺エフェクターメモリーT細胞 (T_{EM}) に属した Tax 特異的 CTL の成熟度を、a) CD27/CD28、b) CD27/CD57 の発現パターンで評価し、CD8⁺T細胞中 T_{EM} の発現パターンと比較。Tax 特異的 CTL の T_{EM} は CD27⁺CD28⁺ (early) もしくは CD27⁺CD28⁻ (intermediate) に分類され、CD27⁺CD57⁻の未成熟 T 細胞 (immature) に分類される幼弱 T_{EM} で構成され、sAC、hrAC、ATL 患者すべてで同様の構成であった。

2.3.3 HLA-A*24:02 拘束性 Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL のクローン型

2.2.5 に示した方法で HLA-A*24:02 拘束性 Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の TCR レパトア解析を行った。実際に解析した Tax テトラマー陽性細胞は、AC10 例（うち sAC7 例：AC1、3、4、5、7、9、10、hrAC3 例：AC11、16、17）で 1107 細胞、ATL 患者 4 例で 351 細胞、総計 1458 細胞であった。

まず、AC と ATL 患者間で、HLA-A*24:02 拘束性 Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の TCR レパトアの違いを確認するため、sAC、hrAC そして ATL 患者において、FACS Aria II で一細胞ずつソートした Tax₃₀₁₋₃₀₉ テトラマー陽性細胞の TCR-BV 及び BJ gene family 使用割合を細胞レベルとクローンレベルで調べた。解析対象となった Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL は sAC7 例で 782 細胞、56 クローン、hrAC3 例では 325 細胞、28 クローン、ATL 患者では 351 細胞、56 クローンであり、各群で使用された gene の割合を細胞レベル、クローンレベルでそれぞれ計算した。TCR-BV gene の使用割合を図 9a に示したが、細胞レベルとクローンレベル両方において、キャリアから ATL のすべての病態で、Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の TCR レパトアは BV7 gene family に偏った、多様性が非常に制限された集団で構成されていた。細胞レベルでの使用割合をみると（図 9a 左側）、sAC で特にその偏りが強く、sAC→hrAC→ATL と HTLV-I 感染の臨床病期が進行するに従ってその偏りは弱くなっていた（細胞レベルでの BV7 使用割合はそれぞれ 87.5%、62.5%、47.9%）。しかしこの傾向に統計学的な有意差はみられなかった（Cochran-Armitage 傾向検定、 $P=0.157$ ）。また、この病態の変化に従って TCR BV の偏りが弱くなるという傾向は、クローンレベルでは観察されなかった（図 9a 右側）。プロウイルス量が高値であると CD8⁺T 細胞の機能的不活化を引き起こすことが示唆されており[35]、ATL 患者ではキャリアと比較すると、効率的に clonal expansion を起こす BV7 陽性細胞の数が減少している可能性が考えられる。その結果、上記のように細胞レベルとクローンレベルで異なった傾向が観察されたと推測される。一方で、TCR-BJ については、細胞レベルとクローンレベル共に、どの群においてもその構成にばらつきがみられた（図 9b）。

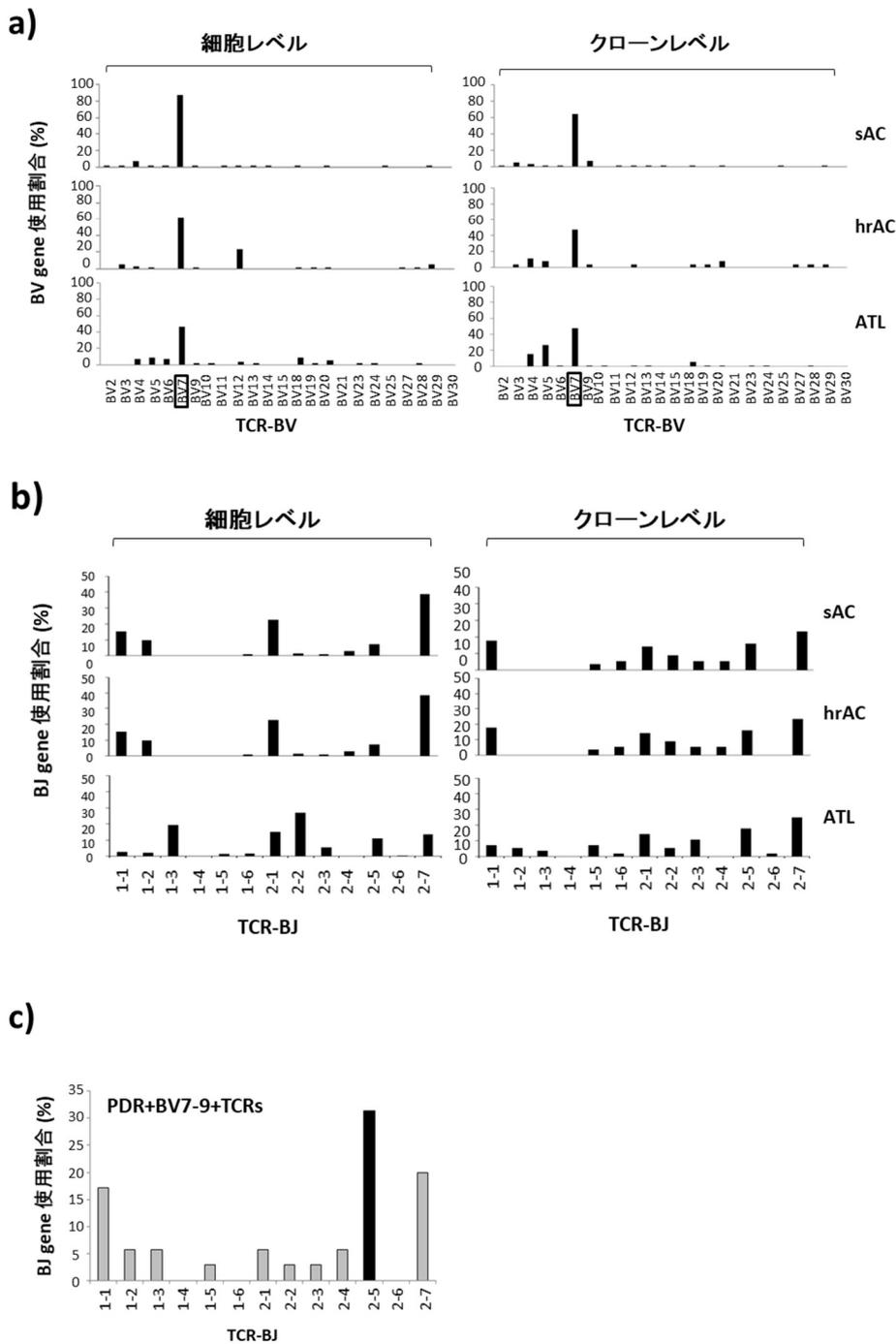


図9 Tax₃₀₁₋₃₀₉特異的 CTL の BV 及び BJ の使用割合

sAC(n=7、782 細胞、56 クローン)、hrAC(n=3、325 細胞、28 クローン)、ATL 患者(n=4、351 細胞、56 クローン)で検出された Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の **a)** TCR-BV 及び **b)** BJ gene family 使用割合を細胞レベルとクローンレベルで調べたところ、Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の TCR レパトアは BV7 gene family に偏った集団で構成されていた。TCR-BJ の構成はばらつきがみられたが、BV7-9 陽性 PDR モチーフ発現 Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL クローンにおいては、その構成が BJ2-5 に偏っていた(**c**)。

次に、キャリアと ATL 患者で同定された Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の全クローンの TCR- β 鎖 CDR3 領域のアミノ酸配列を表 4、5 にまとめた (表 4 : キャリア、表 5 : ATL 患者)。aATL2 と aATL3 については allo-HSCT 施行前に解析し、Pt-1 及び Pt-3 として先に報告しているが[22]、今回はその結果を引用した。BV7-9 陽性かつ、TCR- β 鎖 CDR3 領域の 108-110 番目に特徴的なアミノ酸モチーフ “P-D-R” を持つ CTL クロオンが AC10 例の全てで共通して保存されていることが判明したが、その検出頻度は広範囲にわたっていた (0.9% - 97.6%) (表 4)。さらに、ATL 患者においても 4 例すべてで BV7-9 陽性の PDR モチーフを CDR3 β 領域に持つ Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL クロオンが共通して検出され、やはり検出頻度は 11.5%から 66.4%と広範囲であった (表 5)。表 4、5 において PDR モチーフは太字かつ灰色で強調した。

表 4 AC の Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の TCR-β CDR3 アミノ酸配列と Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL における各クローンの割合

症例/ID	クローン ID	BV	CDR3領域のアミノ酸配列																				BJ	検出頻度	%	PDR ⁺ (%)
			AA position																							
			104	105	106	107	108	109	110	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123						
sAC/AC1	HTJC1-1	TRBV7-9	C	A	S	I	P	D	R	V	T	E	A	F	F	TRBJ1-1	109/123	88.6								
	HTJC1-2	TRBV7-9	C	A	S	S	P	D	R	T	Q	E	Q	Y	F	TRBJ2-7	6/123	4.9								
	HTJC1-3	TRBV7-9	C	A	S	S	P	D	R	E	L	F	H	T	F	TRBJ1-2	5/123	4.1								
	HTJC1-4	TRBV9-1	C	A	S	S	V	R	G	S	P	L	H	F		TRBJ1-6	1/123	0.8								
	HTJC1-5	TRBV11-3	C	A	S	S	L	V	G	T	A	Y	N	N	E	Q	F	F	TRBJ2-1	1/123	0.8					
	HTJC1-6	TRBV29-1	C	S	V	A	G	G	R	T	G	E	L	F	F	TRBJ2-2	1/123	0.8	97.6							
sAC/AC3	HTJC6-1	TRBV3-1	C	A	S	S	S	R	T	G	G	R	N	T	E	A	F	F	TRBJ1-1	8/111	7.2					
	HTJC6-2	TRBV4-1	C	A	S	S	Q	D	R	G	A	V	Y	G	Y	T	F	TRBJ1-2	8/111	7.2						
	HTJC6-3	TRBV7-2	C	A	S	S	L	N	G	G	H	Y	E	Q	Y	F	TRBJ2-7	1/111	0.9							
	HTJC6-4	TRBV7-6	C	A	S	S	L	M	V	D	E	Y	F				TRBJ2-7	14/111	12.6							
	HTJC6-5	TRBV7-9	C	A	S	S	P	D	R	A	Q	T	Q	Y	F	TRBJ2-5	33/111	29.7								
	HTJC6-6	TRBV7-9	C	A	S	S	L	D	R	G	N	I	Q	Y	F	TRBJ2-4	20/111	18.0								
	HTJC6-7	TRBV7-9	C	A	S	R	P	N	R	D	S	N	Y	G	Y	T	F	TRBJ1-2	12/111	10.8						
	HTJC6-8	TRBV7-9	C	A	S	I	I	D	R	S	N	E	Q	F	F	TRBJ2-1	2/111	1.8								
	HTJC6-9	TRBV7-9	C	A	S	L	P	G	R	A	T	E	A	F	F	TRBJ1-1	1/111	0.9								
	HTJC6-10	TRBV7-9	C	A	S	S	P	N	R	E	K	T	Q	Y	F	TRBJ2-5	1/111	0.9								
	HTJC6-11	TRBV7-9	C	I	S	V	P	A	A	R	T	G	H	R	T	Q	Y	F	TRBJ2-5	1/111	0.9					
	HTJC6-12	TRBV12-5	C	A	S	G	L	G	T	D	T	Q	Y	F		TRBJ2-3	1/111	0.9								
	HTJC6-13	TRBV18	C	A	S	S	P	P	R	G	R	E	N	E	Q	F	F	TRBJ2-1	9/111	8.1	29.7					
sAC/AC4	HTJC7-1	TRBV7-2	C	A	S	R	G	W	G	G	P	S	E	Q	Y	F	TRBJ2-7	87/115	75.7							
	HTJC7-2	TRBV7-9	C	A	S	R	P	D	R	G	N	T	Q	Y	F	TRBJ2-5	7/115	6.1								
	HTJC7-3	TRBV7-9	C	A	S	R	P	D	R	D	N	N	Y	G	F	G	F	TRBJ1-2	5/115	4.3						
	HTJC7-4	TRBV7-9	C	A	S	R	P	D	R	G	H	T	Q	Y	F	TRBJ2-5	5/115	4.3								
	HTJC7-5	TRBV7-9	C	A	S	S	P	P	R	T	D	T	Q	Y	F	TRBJ2-3	5/115	4.3								
	HTJC7-6	TRBV7-9	C	A	S	S	P	D	R	A	N	T	Q	Y	F	TRBJ2-5	3/115	2.6								
	HTJC7-7	TRBV7-9	C	A	S	R	P	E	R	D	N	N	C	F		TRBJ2-4	1/115	0.9								
	HTJC7-8	TRBV7-9	C	A	S	S	P	D	R	A	H	T	Q	Y	F	TRBJ2-5	1/115	0.9								
	HTJC7-9	TRBV14	C	A	S	S	Q	S	Q	G	W	A	Y	E	Q	Y	F	TRBJ2-7	1/115	0.9	18.2					
sAC/AC5	HTJC8-1	TRBV7-9	C	A	S	S	V	T	G	T	G	K	W	E	Q	Y	F	TRBJ2-7	117/119	98.3						
	HTJC8-2	TRBV7-9	C	A	S	T	P	D	R	V	A	K	N	I	Q	Y	F	TRBJ2-4	2/119	1.7	1.7					
sAC/AC7	HTJC10-1	TRBV2	C	A	S	S	A	G	Q	G	V	T	Y	E	Q	Y	F	TRBJ2-7	9/111	8.1						
	HTJC10-2	TRBV3-1	C	A	S	S	Q	R	Q	G	N	N	S	P	L	H	F	TRBJ1-6	1/111	0.9						
	HTJC10-3	TRBV3-1	C	A	S	S	Q	D	S	N	A	Y	N	E	Q	F	F	TRBJ2-1	1/111	0.9						
	HTJC10-4	TRBV4-1	C	A	S	S	Q	D	G	V	R	M	E	G	Y	T	F	TRBJ1-2	43/111	38.7						
	HTJC10-5	TRBV6-2	C	A	S	S	P	P	R	G	A	E	Q	Y	F	TRBJ2-7	1/111	0.9								
	HTJC10-6	TRBV7-2	C	A	S	S	V	T	S	P	G	S	C	F	F	TRBJ2-2	1/111	0.9								
	HTJC10-7	TRBV7-9	C	A	S	S	P	D	R	G	L	E	Q	Y	F	TRBJ2-7	54/111	48.6								
	HTJC10-8	TRBV20-1	C	S	A	R	D	G	R	A	A	S	R	D	Q	P	Q	H	F	TRBJ1-5	1/111	0.9	48.6			
sAC/AC9	HTJC12-1	TRBV5-6	C	A	S	S	P	S	S	T	G	F	Y	N	E	Q	F	F	TRBJ2-1	1/89	1.1					
	HTJC12-2	TRBV7-2	C	A	S	S	P	G	T	S	G	N	T	G	E	L	F	F	TRBJ2-2	7/89	7.9					
	HTJC12-3	TRBV7-9	C	A	S	S	L	R	G	N	E	G	F	Y	N	E	Q	F	F	TRBJ2-1	59/89	66.3				
	HTJC12-4	TRBV7-9	C	A	S	S	P	D	R	G	L	E	Q	Y	F	TRBJ2-7	8/89	9.0								
	HTJC12-5	TRBV7-9	C	A	S	S	P	D	R	G	T	E	A	F	F	TRBJ1-1	2/89	2.2								
	HTJC12-6	TRBV9	C	A	S	S	P	N	F	G	P	N	Y	G	Y	T	F	TRBJ1-2	3/89	3.4						
	HTJC12-7	TRBV9	C	A	S	S	V	R	G	N	E	Q	F	F	TRBJ2-1	1/89	1.1									
	HTJC12-8	TRBV9	C	A	S	S	V	R	G	S	P	L	H	F	TRBJ1-6	6/89	6.7									
	HTJC12-9	TRBV13	C	A	S	S	L	G	S	R	P	G	Y	F	TRBJ2-7	1/89	1.1									
	HTJC12-10	TRBV25-1	C	A	R	E	W	R	G	E	A	Y	E	Q	Y	F	TRBJ2-7	1/89	1.1	11.2						
sAC/AC10	HTJC14-1	TRBV7-2	C	A	S	I	A	R	V	P	S	P	G	S	C	F	TRBJ2-2	1/114	0.9							
	HTJC14-2	TRBV7-9	C	A	F	K	R	D	R	E	N	E	Q	F	F	TRBJ2-1	103/114	90.4								
	HTJC14-3	TRBV7-9	C	A	M	S	P	D	R	V	N	T	Q	Y	F	TRBJ2-5	3/114	2.6								
	HTJC14-4	TRBV7-9	C	A	S	S	P	D	R	A	G	E	Q	Y	F	TRBJ2-7	2/114	1.8								
	HTJC14-5	TRBV7-9	C	A	S	S	P	D	R	E	A	T	Q	Y	F	TRBJ2-5	2/114	1.8								
	HTJC14-6	TRBV7-9	C	A	S	S	P	D	R	E	K	T	Q	Y	F	TRBJ2-3	1/114	0.9								
	HTJC14-7	TRBV7-9	C	A	S	S	P	D	R	Q	P	D	Q	H	F	TRBJ1-5	1/114	0.9								
	HTJC14-8	TRBV7-9	C	A	S	S	E	D	R	A	A	T	G	E	L	F	F	TRBJ2-2	1/114	0.9	7.9					

表 5 ATL の Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の TCR-β CDR3 アミノ酸配列と Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL における各クローンの割合

症例/ID	クローン ID	BV	CDR3領域のアミノ酸配列																				BJ	検出頻度	%	PDR ⁺ (%)
			AA position																							
			104	105	106	107	108	109	110	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124					
慢性型ATL /cATL1	HTJC13-1	TRBV5-1	C	A	S	S	L	S	A	L	S	Y	N	E	Q	F	F					TRBJ2-1	1/113	0.9		
	HTJC13-2	TRBV5-1	C	A	S	S	S	S	T	S	G	N	T	G	E	L	F	F				TRBJ2-2	88/113	77.9		
	HTJC13-3	TRBV7-9	C	A	S	S		P	D	R	L	Q	T	Q	Y	F						TRBJ2-5	12/113	10.6		
	HTJC13-4	TRBV7-9	C	A	S	I		P	D	R	N	T	E	A	F	F						TRBJ1-1	6/113	5.3		
	HTJC13-5	TRBV7-9	C	A	S	S		P	D	R	V	K	T	Q	Y	F						TRBJ2-5	4/113	3.5		
	HTJC13-6	TRBV7-9	C	A	S	S	A	P	R	T	G	E	L	F	F							TRBJ2-2	1/113	0.9		
	HTJC13-7	TRBV24-1	C	A	T	S	D	R	G	Q	G	E	Y	N	E	Q	F	F				TRBJ2-1	1/113	0.9	19.4	
急性型ATL /aATL2, allo-HSCT前	OM001-1	TRBV4-1	C	A	S	S	H	P	A	G	N	F	H	G	Y	T	F					TRBJ1-2	4/50	8.0		
	OM001-2	TRBV5-5	C	A	S	S	L	E	G	T	G	V	S	G	A	N	V	L	T	F		TRBJ2-6	1/50	2.0		
	OM001-3	TRBV5-6	C	A	S	S	F	F	H	P	I	W	G	M	S	S	E	T	Q	Y	F	TRBJ2-5	3/50	6.0		
	OM001-4	TRBV5-6	C	A	S	S	L	G	D	R	L	Y	E	Q	Y	F						TRBJ2-7	1/50	2.0		
	OM001-5	TRBV6-5	C	A	S	S	D	P	L	T	E	G	T	D	T	Q	Y	F				TRBJ2-3	1/50	2.0		
	OM001-6	TRBV7-2	C	A	S	S	L	D	V	P	G	P	Y	E	Q	Y	F					TRBJ2-7	3/50	6.0		
	OM001-7	TRBV7-8	C	A	S	S	L	G	P	G	G	A	Y	E	Q	Y	F					TRBJ2-7	12/50	24.0		
	OM001-8	TRBV7-8	C	A	S	S	L	G	S	S	R	G	E	T	H	Y	F					TRBJ2-5	1/50	2.0		
	OM001-9	TRBV7-8	C	A	S	S	L	G	S	S	G	E	T	Q	Y	F						TRBJ2-5	2/50	4.0		
	OM001-10	TRBV7-9	C	A	S	I		P	P	R	G	Q	E	Q	F	F						TRBJ2-1	2/50	4.0		
	OM001-11	TRBV7-9	C	A	S	R		P	D	R	S	H	E	Q	Y	F						TRBJ2-7	8/50	16.0		
	OM001-12	TRBV7-9	C	A	S	S	L	D	R	V	H	E	Q	Y	F							TRBJ2-7	1/50	2.0		
	OM001-13	TRBV7-9	C	A	S	S	V	P	R	T	D	T	Q	Y	F							TRBJ2-3	6/50	12.0		
	OM001-14	TRBV10-3	C	A	I	G	G	G	G	A	E	T	Q	Y	F							TRBJ2-5	2/50	4.0		
	OM001-15	TRBV12-3	C	A	S	T	A	T	G	T	L	T	E	A	F	F						TRBJ1-1	1/50	2.0		
	OM001-16	TRBV20-1	C	S	A	R	E	T	G	A	A	G	E	T	Q	Y	F					TRBJ2-5	1/50	2.0		
	OM001-17	TRBV23-1	C	A	S	S	T	R	G	R	E	Q	Y	F								TRBJ2-7	1/50	2.0	16.0	
リンパ腫型ATL /aATL3, allo HSCT前	OM003-1	TRBV7-8	C	A	S	S		P	P	R	Q	R	D	T	Q	Y	F					TRBJ2-3	1/110	0.9		
	OM003-2	TRBV7-9	C	A	I	N	R	D	R	E	S	D	Q	Y	F							TRBJ2-5	6/110	5.5		
	OM003-3	TRBV7-9	C	A	S	I		P	D	R	E	K	T	Q	Y	F						TRBJ2-5	7/110	6.4		
	OM003-4	TRBV7-9	C	A	S	K	V	D	R	E	G	T	I	Y	F							TRBJ1-3	15/110	13.6		
	OM003-5	TRBV7-9	C	A	S	R	V	N	R	G	G	E	Q	Y	F							TRBJ2-7	1/110	0.9		
	OM003-6	TRBV7-9	C	A	S	S		P	D	R	A	H	T	I	Y	F						TRBJ1-3	53/110	48.2		
	OM003-7	TRBV7-9	C	A	S	S		P	D	R	A	N	T	G	G	A	F	F				TRBJ2-2	6/110	5.5		
	OM003-8	TRBV7-9	C	A	S	S		P	D	R	V	P	E	A	F	F						TRBJ1-1	1/110	0.9		
	OM003-9	TRBV7-9	C	A	T	L	L	D	R	Y	N	E	Q	F	F							TRBJ2-1	1/110	0.9		
	OM003-10	TRBV18	C	A	S	S	P	G	S	G	G	L	Y	E	Q	F	F					TRBJ2-1	1/110	0.9		
	OM003-11	TRBV18	C	A	S	S		P	P	R	L	R	D	T	Q	Y	F					TRBJ2-3	9/110	8.2		
	OM003-12	TRBV18	C	A	S	S		P	P	R	Q	I	Y	E	Q	Y	F					TRBJ2-7	2/110	1.8		
	OM003-13	TRBV18	C	A	S	S		P	D	R	R	I	Y	E	Q	Y	F					TRBJ2-7	6/110	5.5		
	OM003-14	TRBV19	C	A	S	S	I	G	G	R	T	R	G	W	T	D	T	Q	Y	F		TRBJ2-3	1/110	0.9	66.4	
リンパ腫型 ATL /aATL4, allo-HSCT前	OM012-1	TRBV4-1	C	A	S	S	Q	D	R	G	Q	V	Y	G	Y	T	F					TRBJ1-2	2/78	2.6		
	OM012-2	TRBV4-1	C	A	S	S	Q	V	A	G	A	S	F	N	E	Q	F	F				TRBJ2-1	45/78	57.7		
	OM012-3	TRBV4-2	C	A	S	S	Q	V	Q	G	A	S	N	Q	P	Q	H	F				TRBJ1-5	2/78	2.6		
	OM012-4	TRBV6-1	C	A	S	S	W	T	V	Y	Y	E	Q	Y	F							TRBJ2-7	1/78	1.3		
	OM012-5	TRBV6-2	C	A	S	S	F	L	P	D	S	G	Q	P	Q	H	F					TRBJ1-5	1/78	1.3		
	OM012-6	TRBV6-5	C	A	S	S	Y	S	G	D	D	T	Q	Y	F							TRBJ2-3	1/78	1.3		
	OM012-7	TRBV7-2	C	A	S	S	Y	H	L	A	G	I	Y	N	E	Q	F	F				TRBJ2-1	1/78	1.3		
	OM012-8	TRBV7-8	C	A	S	S	S	N	Q	G	A	G	G	N	Q	P	Q	H	F			TRBJ1-5	1/78	1.3		
	OM012-9	TRBV7-9	C	A	I	G	D	R	G	N	G	Y	T	F								TRBJ1-2	2/78	2.6		
	OM012-10	TRBV7-9	C	A	S	L		P	D	R	S	S	H	E	Q	Y	F					TRBJ2-7	9/78	11.5		
	OM012-11	TRBV7-9	C	A	S	K	E	D	R	Q	S	N	S	P	L	H	F					TRBJ1-6	6/78	7.7		
	OM012-12	TRBV9	C	A	S	G	N	S	Y	N	Q	P	Q	H	F							TRBJ1-5	1/78	1.3		
	OM012-13	TRBV12-3	C	A	S	S	L	L	P	V	E	T	Q	Y	F							TRBJ2-5	1/78	1.3		
	OM012-14	TRBV13	C	A	S	S	L	G	P	D	R	Y	E	Q	Y	F						TRBJ2-7	1/78	1.3		
	OM012-15	TRBV18	C	A	S	S		P	P	R	V	R	D	E	Q	F	F					TRBJ2-1	1/78	1.3		
	OM012-16	TRBV20-1	C	S	A	S	D	N	G	Q	G	S	Y	E	Q	Y	F					TRBJ2-7	1/78	1.3		
	OM012-17	TRBV20-1	C	S	A	R	D	Y	N	S	Y	E	Q	Y	F							TRBJ2-7	1/78	1.3		
	OM012-18	TRBV28	C	A	S	S	L	L	T	V	R	T	E	A	F	F						TRBJ1-1	1/78	1.3	11.5	

計351細胞, 56クローン

解析対象となった症例全てで PDR モチーフが保存されていたため、AC および ATL 患者で検出された BV7-9 陽性 PDR モチーフ発現 Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL (PDR+CTL) クロオン全 35 種類を集め、その中での TCR-BJ gene 使用割合を調査した。同定された 13 種類の BJ gene の使用割合のうち、BJ2-5 だけが平均値+2SD (7.7% + 18.9%) を上回っており、BV7-9 陽性 PDR+CTL クロオンが使用する BJ gene は BJ2-5 に偏っていたことが判明した (図 9c)。さらに、AC および ATL 患者で解析された CDR3 領域のアミノ酸配列を比較検討したところ、BV4-1 または BV7-9 または BV18 陽性の Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL において、その TCR-β 鎖 CDR3 領域の 108-110 番目に “PDR” と類似したアミノ酸モチーフである “P-R” もしくは “_DR” がしばしば観察された。表 4、5 において灰色で強調してあるように、このモチーフは sAC7 例中 4 例 (AC3、4、7、10)、hrAC3 例中 3 例 (AC11、16、17)、ATL 患者 4 例中 3 例 (aATL2、3、4) で観察された。

このように、AC および ATL 患者で検出された HLA-A*24:02 拘束性 Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL クロオンの TCR-β 鎖 CDR3 領域のアミノ酸配列の多くは類似しており、PDR モチーフを発現する BV7-9 陽性 Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 TCR は AC だけではなく ATL 患者においても保存されていた。また、この PDR 陽性 Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL クロオンの TCR レパトアは、BV7-9/BJ2-5 に偏って構成されている可能性が高いことも判明した。

2.3.4 PDR 陽性 Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の存在と HTLV-I 感染の状態との関係

この解析で検出された Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL クローン種の全てを、108-110 番目の CDR3 β アミノ酸配列に基づいて 1) PDR⁺、2) -DR⁺、3) P-R⁺、4) minor repertoires の 4 つの型に分類した。前者 3 つの型は 2.3.3 に記載したとおり、最も頻繁に検出されたアミノ酸配列モチーフであり、それ以外のクローンを 4) minor repertoires に分類した。sAC、hrAC および ATL 患者で検出された TCR レパトアの総数に対する 4 タイプのレパトアの割合を図 10a に示した。AC (sAC および hrAC) において、1) PDR⁺、2) -DR⁺ および 3) P-R⁺ を発現するクローンの割合は合わせて約 55% と、ATL 患者 (38%) よりも大きかった。特に PDR⁺ クローンの割合は sAC \rightarrow hrAC \rightarrow ATL の順に徐々に減少していたが (それぞれ 32%、25%、18%)、その減少傾向は統計学的に有意ではなかった (Cochran-Armitage 傾向検定、 $P=0.157$)。さらに、筆者は sACs、hrACs および ATL 患者における 4 タイプの Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL クローンの検出頻度を患者個人レベルで調べ、その結果を図 10b に示した。唯一 1) PDR⁺ クローンだけが sAC、hrAC、ATL 患者において全症例で検出された。一方、2) -DR⁺ と 3) P-R⁺ は複数の症例にわたって検出されたものの、全症例に共通するものではなかった。4) minor repertoires に至っては、個々に特有に検出され、他の症例と共通して検出されるものはなかった。これらのマイナークローンは個々に固有のものと考えられるが、単細胞レベルの TCR レパトア解析の感度のために単に検出されてしまった可能性も考えられた。以上の結果から、PDR⁺Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL のみが HTLV-I 感染の臨床病期に関わらず一貫して検出されたクローンであったと言える。

本研究では最後に、単細胞レベルでの TCR レパトア解析を行った症例において、末梢血液中の PDR⁺Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の絶対数 (μ l) と ATL 発症リスクの指標となる PVL の相関を調べたが (Spearman の順位相関係数を使用)、図 10c に示すように明らかな相関はみられなかった (相関係数: -0.152, $P=0.471$)。

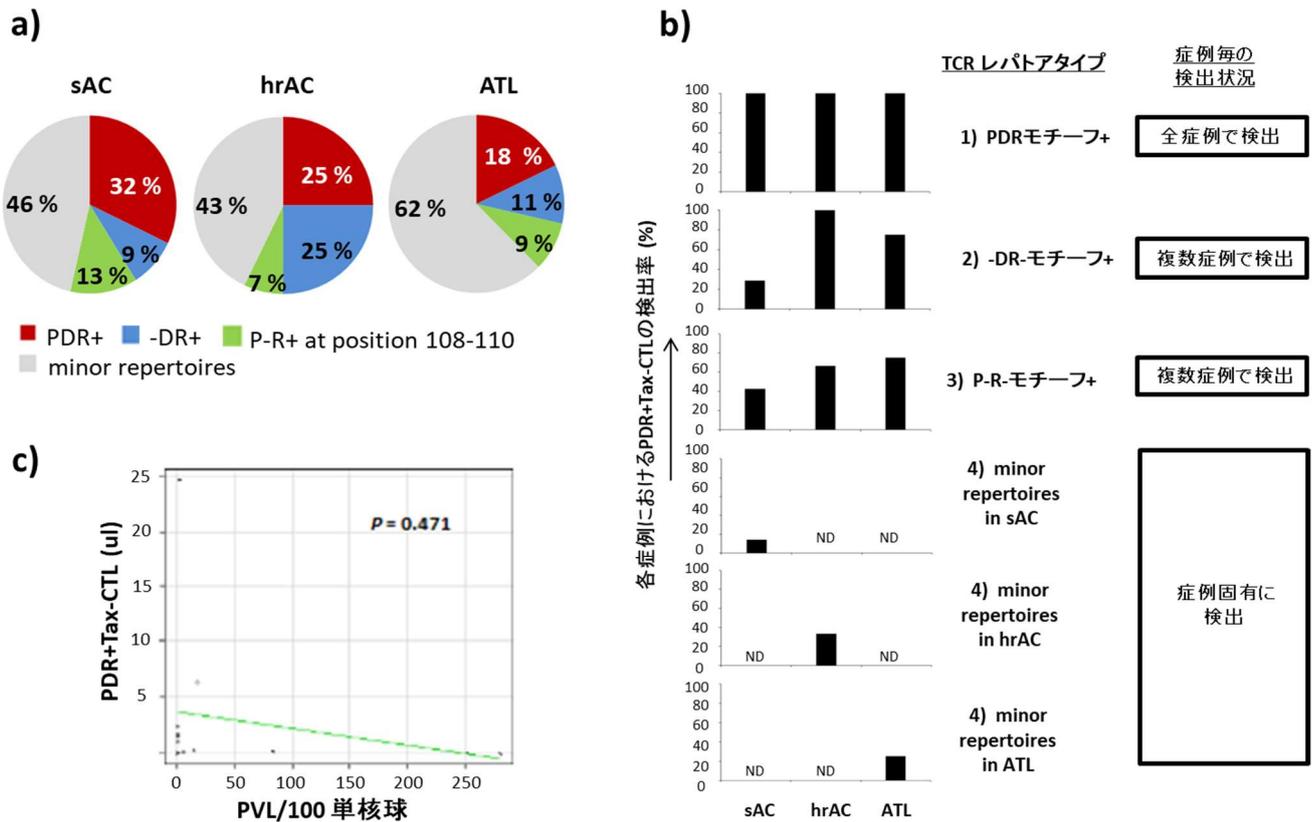


図 10 PDR 陽性 CTL クロンの存在と PVL との関係

Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL クロンの全てを、108-110 番目の CDR3 β アミノ酸配列に基づいて 1) PDR+, 2) -DR+, 3) P-R+, 4) minor repertoires の 4 つの型に分類した。

a) sAC、hrAC および ATL 患者で検出された TCR レパトアの総数に対する 4 タイプのレパトアの割合を比較すると、病期の進行に従い PDR+クロンの減少傾向がみられた (統計学的有意差なし)。

b) 被験者個人レベルにおける Tax 特異的 CTL クロンの 4 タイプの検出頻度を 3 群間で比較。PDR+クロンのみが sAC、hrAC、ATL 患者において全症例で検出された。

c) PDR 発現 Tax 特異的 CTL の絶対数 (μ l) と PVL の間に相関はみられなかった (相関係数: -0.152 , $P=0.471$)。

2.4 考察

本研究では direct single cell 解析を用いて、HLA-A*24:02 陽性の AC 及び ATL 患者を対象に、Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の TCR β 鎖のレパトア解析を行い、AC を含め、解析対象となった全症例で、“PDR” を共通モチーフとして有することを初めて明らかにした。一方で、PDR+TCR レパトアが AC 集団に比べて ATL の患者集団では減少しているという傾向は観察されたが、疾患状態と“PDR”との関連について明確な結論を導くことはできなかった。

まず、HTLV-I キャリアから ATL を発症する過程での HTLV-I 感染細胞と宿主免疫の変化を調査するために、CD4⁺T 細胞の表現型 (CADM1 vs CD7 プロット)、Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の検出頻度や表現型に焦点を当てたところ、キャリア状態から ATL への進行に従って、CD4⁺T 細胞の表現型が変化していたのに対し、Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の検出頻度及びフェノタイプは HTLV-I の感染状態に応じた変化が見られなかった。このことから、Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の頻度やフェノタイプを単に測定するだけでは、Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL が病態進行の抑制に寄与するかどうかを推定することはできないことが示唆された。実際、HTLV-I の複製が十分にコントロールされている AC だけでなく、HTLV-I ウイルス増殖が制御されていない ATL 患者においても、Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL は幅広い頻度で検出されていた。さらに、AC および ATL 患者の Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL はともに、そのほとんどが CD45RA⁺CCR7⁻エフェクターメモリー T 細胞 (T_{EM}) で構成され、分化段階早期 (early or immediate) の比較的幼若な (immature) 表現型である CD27⁺CD28⁺CD57⁻が優位に占めていた。ATL へ進展するまでに体内では慢性的な HTLV-I の刺激があるにも関わらず、分化段階後期の成熟した表現型 (CD27⁻CD28⁻CD57⁺) へ変化することなく、その表現型は一貫していた。この T 細胞分化状態に対して、HTLV-I 感染が原因で発症するもう一つの代表的な疾患である HTLV-I 関連脊髄症 (HTLV-I-associated myelopathy, HAM) の Tax 特異的 CTL は CD27⁻CD28⁻の分化段階後期の表現型が優位であったと報告されている [36]。しかし、これまでの研究では、CD27 および CD28 分子は、ウイルス感染における T 細胞免疫の生成および長期維持に必要であり、特に CD27 の発現は、TCR/CD3 刺激シグナルの開始

を抑えることで細胞分裂活性に影響を与えることなく、活性化されたウイルス特異的 T 細胞の生存を促進することが明らかにされている[37,38]。したがって、Tax 特異的 CTL に発現する CD27 および CD28 分子は、HTLV-I の慢性刺激下で生存するために必要であり、HTLV-I 感染個体において、PVL よりもどのような HTLV-I 関連疾患を発症しているのかということが、Tax 特異的 CTL の表現型を左右する可能性が高いと考えられる。

HTLV-I がコードする遺伝子産物の中で、Tax は免疫原性が高く、HTLV-I 特異的 CTL の最も主要な標的抗原であることが示され[39]、治療標的としても注目されている。我々は Tax に対する CTL の免疫反応をより詳細に検討するために、allo-HSCT を受けた HLA-A*24:02 陽性 ATL 患者を対象に Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の TCR レパトア解析を行ってきたが、その中で HTLV-I 感染細胞に対して強力な細胞傷害活性を有する PDR 陽性 Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の存在を報告してきた。筆者は、allo-HSCT 後の再発阻止だけではなく、キャリア状態から ATL への腫瘍化過程においても、この PDR 陽性 CTL の存在が ATL 発症阻止に寄与している可能性を考え、今回の研究を計画した。本研究では、Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の TCR レパトアは AC においても ATL 患者においても、BV7 gene family に偏った、多様性が非常に制限された集団で構成されていた。さらに TCR-β 鎖 CDR3 領域のアミノ酸配列 108-110 番目では、“PDR”、“-DR”、“P-R”といった似通ったモチーフが頻繁に認められた。特に、表 4、5 と図 10b で示したように PDR 陽性の Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL クローンだけが、この研究で解析対象となった AC 及び ATL 患者のすべてのサンプルで観察されたクローンであったということが、この研究で最も重要な発見であった。

さらに、PDR 陽性の Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL クローンに着目すると、TCR-β は BV7-9/BJ2-5 に偏って構成されており (図 9c)、Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL における PDR 陽性 CTL の割合は、統計学的には明らかではなかったもののキャリア状態から ATL に進行するに従って減少する傾向にあった (図 10a)。このように、HLA-A*24:02 陽性の HTLV-I 感染者における Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL は、胸腺における TCR-β 鎖の V-D-J 遺伝子組み換えの際に[40-42]、選択的な圧力が作用し、BV7 gene family が高頻度で使用され、CDR3 領

域では PDR モチーフが一貫して選択された結果、偏った TCR 構成を示すことになったと考えられる。

1990 年代以来、同一抗原エピトープに対するウイルス特異的メモリー T 細胞に着目した多くの研究が、多数の個人間において TCR- α 鎖および/または TCR- β 鎖における共通の配列による TCR レパトアの存在を報告してきた。それらの TCR は CDR3 領域において TCR の全アミノ酸配列が共通するもの、あるいは一部のアミノ酸モチーフが共通するもので、これらを総じて“public”と称されるようになった[43,44]。今日に至るまで、同じ HLA を有する個体間において、例えば EB ウイルス[45,46]、インフルエンザ A 型ウイルス[47]、サイトメガロウイルス[48,49]、およびヒト免疫不全ウイルス (HIV)[50-53]の抗原エピトープを標的とする TCR- α/β の共通配列、つまり “public TCR” または “public TCR モチーフ” が同定されている。HTLV-I に関しては、HLA-A2 陽性の HAM 患者において、BV6-5/BJ2-7 を発現した Tax₁₁₋₁₉-特異的 CTL で CDR3 β に “PG-G” というアミノ酸モチーフを共有する TCR レパトアが報告された[54]。これは、本研究で筆者が発見した、HLA-A*24:02 陽性の AC 及び ATL 患者における BV7-9 発現 Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の “PDR モチーフ” と類似している。さらに、こういった特徴的な TCR が、ウイルス感染時の CTL の有効性や臨床転帰に及ぼす影響について、いくつか報告されている。例えば、HIV 感染において、ある研究では、public CTL クローンが高い抗原感受性と高親和性 TCR を持ち、HIV 複製を効果的に抑制するという機能的な利点があることを示し[53]、また長期の非進行患者を観察した別の研究では、ある public TCR モチーフを発現した HIV-1 FL8 特異的 CTL の存在と良好な臨床転帰の関与の可能性を報告している[51]。HTLV-I については、先に述べた HAM 患者での Tax₁₁₋₁₉-特異的 CTL における public TCR モチーフが、CDR3 β ループの三次構造の維持に非常に重要であることが示されている[54]。

筆者もまた、本研究で HLA-A*24:02 拘束性 Tax₃₀₁₋₃₀₉ 抗原エピトープに対する “public TCR モチーフ” である “PDR” を同定した。しかしながら、PDR⁺Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の頻度と HTLV-I 感染者の疾患状態に明らかな関連はみられず、PDR⁺Tax₃₀₁₋₃₀₉

特異的 CTL と臨床病態との関連について断定的な結論は導くことができなかった。その原因としては、まず対象症例数、特に PVL が高値である hrAC と ATL 患者の症例数が少なかったことが挙げられる。そのため、Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL における PDR+CTL の割合が HTLV-I 感染病期に従い減少する傾向が観察されたものの、有意差がみられなかったという結果に繋がったと推察される。また、ATL 症例の約半数では tax 遺伝子自体のナンセンス変異や Tax のプロモーターである 5'LTR の欠失や 5'LTR のメチル化により、Tax 発現が不活化され[55]、免疫からの回避を可能にしているとも考えられている。一方で pX 領域のマイナス鎖にコードされている HBZ は、ATL 細胞に恒常的に発現している唯一のウイルス遺伝子と言われている。こういった知見から、病態進行には HTLV-I ウイルスや感染細胞の内因性変異の蓄積の寄与が大きく、今回検討した Tax 特異的 CTL の変化だけでは病態を評価できない可能性も考えられる。その他、プロウイルス量が高値であると CD8⁺T 細胞の機能的不活化に関与する可能性があるため[35]、ATL 患者が十分な数の PDR+Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL を有していても、腫瘍進展阻止に寄与できない状態になっているかもしれない。そのため PDR+Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の存在の有無や検出頻度だけではなく、病態毎に PDR+Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の機能評価を行う必要性がある。

ATL 発症過程における PDR+Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL 役割解明のためには様々な課題が残るが、我々がこれまで行ってきた allo-HSCT 後の ATL 患者を対象とした解析では、PDR+TCR は強い Tax 抗原認識能を持ち、その TCR を発現する PDR+Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL は患者正常細胞を全く攻撃することなく Tax を発現する腫瘍細胞だけを効率的に攻撃できるクローンであることを報告してきた[56]。Tax はウイルス由来の外来抗原であり、非常に強い免疫原性を持っているが、正常組織には全く発現せず腫瘍細胞特異的に発現するタンパク質である為、理想的な治療標的抗原として注目されている。中でも強固な Tax 抗原認識能と抗 HTLV-I 効果を有する PDR+Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL は ATL に対する免疫療法にとって非常に有用なツールになり得ることが確認されたため、我々は PDR+TCR の遺伝子を導入した健常人リンパ球、Tax-TCR-T 細胞を作成し（タカラバイオ株式会社との共

同研究)、現在 ATL に対する新規の免疫細胞療法の開発に取り組んでいる。今回の研究では、日本人が最も高頻度に有する HLA-A24:02 陽性の HTLV-I 感染者全員が、この PDR+Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL を有するということを発見した。これまでの研究[56]を考慮すると、本研究の被験者全症例に存在していた PDR+Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL も、Tax₃₀₁₋₃₀₉ ペプチドとの親和性が高く、HTLV-I 感染細胞に対して強い細胞傷害活性を持つ CTL クローンである可能性があるため、今後の治療や予防につながる重要な発見と言えるだろう。

本研究では、Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の検出頻度及びフェノタイプは、キャリアから ATL への進行における、*in vivo* での Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の有効性の推定に有用な指標ではないことが示された。しかし単細胞レベルでの HLA-A*24:02 拘束性 Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL のレパトア解析の結果から、すべての HLA-A*24:02 陽性 HTLV-I 感染者において、Tax₃₀₁₋₃₀₉ エピトープに対する “public TCR モチーフ” として、BV7-9 陽性 Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 TCR の CDR3 β に “PDR” モチーフが保存されていると推察された。この研究で得られた知見は、HTLV-I 感染における T 細胞制御の包括的な規則だけではなく、ウイルスの持続感染下における “public TCR” 保有の T 細胞の性能を理解するのに役立つ可能性がある。

3. おわりに

ATL は予後不良の疾患でありながら、いまだその発癌機序が解明されていない点も多い。HTLV-I は外来性病原体であり、宿主免疫機構はその排除と抑制に作用し、特に Tax 特異的 CTL を中心とした細胞性免疫が深く関わっている。今回 HLA-A*24:02 陽性の HTLV-I 感染者を対象に TCR レパトア解析を行ったところ、解析対象者すべてで Tax 特異的 CTL の TCR に PDR というモチーフが保存されていることが判明したが、これらの発癌メカニズムにおける役割は不明であった。しかし解析対象すべてで PDR が保存されているという重要な現象を捉えることができ、さらなる幅広い症例の追加、機能解析も含めた研究を行っていくことで、PDR モチーフが持つ臨床的意義が明らかになってくるかもしれない。HTLV-I 感染者が ATL を発症するまでの宿主側の変化を明確にしていくことで、疾患発症リスクの高い患者を同定することができ、早期に特異的な治療介入ができれば、ATL の予後は改善につながる可能性もある。今回の取り組みが今後の ATL 発症過程における CTL の役割解明と、さらには新規治療や予防法の開発に発展していくことを期待したい。

4. 文献

- 1 Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsuki K, Uchino H: Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood*, 50:481-492, 1977.
- 2 Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y: Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79:2031-2035, 1982.
- 3 Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Igata A, Matsumoto M, Tara M: HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet*, 1:1031-1032, 1986.
- 4 Kataoka K, Nagata Y, Kitanaka A, Shiraishi Y, Shimamura T, Yasunaga J, Totoki Y, Chiba K, Sato-Otsubo A, Nagae G, Ishii R, Muto S, Kotani S, Watatani Y, Takeda J, Sanada M, Tanaka H, Suzuki H, Sato Y, Shiozawa Y, Yoshizato T, Yoshida K, Makishima H, Iwanaga M, Ma G, Nosaka K, Hishizawa M, Itonaga H, Imaizumi Y, Munakata W, Ogasawara H, Sato T, Sasai K, Muramoto K, Penova M, Kawaguchi T, Nakamura H, Hama N, Shide K, Kubuki Y, Hidaka T, Kameda T, Nakamaki T, Ishiyama K, Miyawaki S, Yoon SS, Tobinai K, Miyazaki Y, Takaori-Kondo A, Matsuda F, Takeuchi K, Nureki O, Aburatani H, Watanabe T, Shibata T, Matsuoka M, Miyano S, Shimoda K, Ogawa S: Integrated molecular analysis of adult T cell leukemia/lymphoma. *Nat Genet*, 47:1304-1315, 2015.
- 5 Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC: Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77:7415-7419, 1980.
- 6 Hinuma Y, Nagata K, Hanaoka M, Nakai M, Matsumoto T, Kinoshita KI, Shirakawa S, Miyoshi I: Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78:6476-6480, 1981.
- 7 Shimoyama M: Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). *Br J Haematol*, 79:428-437, 1991.
- 8 Ishitsuka K, Tamura K: Human T-cell leukaemia virus type I and adult T-cell leukaemia-lymphoma. *Lancet Oncol*, 15:e517-526, 2014.
- 9 Tajima K: The 4th nation-wide study of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) in Japan: estimates of risk of ATL and its geographical and clinical features. The T- and B-cell Malignancy Study Group. *Int J Cancer*, 45:237-243, 1990.
- 10 Kanda J, Hishizawa M, Utsunomiya A, Taniguchi S, Eto T, Moriuchi Y, Tanosaki R, Kawano F, Miyazaki Y, Masuda M, Nagafuji K, Hara M, Takanashi M, Kai S, Atsuta Y, Suzuki R, Kawase T, Matsuo K, Nagamura-Inoue T, Kato S, Sakamaki H, Morishima Y, Okamura J, Ichinohe T, Uchiyama T: Impact of graft-versus-host disease on outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T-cell leukemia: a retrospective cohort study. *Blood*, 119:2141-2148, 2012.

- 11 Matsuoka M, Jeang KT: Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat Rev Cancer*, 7:270-280, 2007.
- 12 Harashima N, Kurihara K, Utsunomiya A, Tanosaki R, Hanabuchi S, Masuda M, Ohashi T, Fukui F, Hasegawa A, Masuda T, Takaue Y, Okamura J, Kannagi M: Graft-versus-Tax response in adult T-cell leukemia patients after hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Res*, 64:391-399, 2004.
- 13 Shimizu Y, Takamori A, Utsunomiya A, Kurimura M, Yamano Y, Hishizawa M, Hasegawa A, Kondo F, Kurihara K, Harashima N, Watanabe T, Okamura J, Masuda T, Kannagi M: Impaired Tax-specific T-cell responses with insufficient control of HTLV-1 in a subgroup of individuals at asymptomatic and smoldering stages. *Cancer Sci*, 100:481-489, 2009.
- 14 Okamura J, Utsunomiya A, Tanosaki R, Uike N, Sonoda S, Kannagi M, Tomonaga M, Harada M, Kimura N, Masuda M, Kawano F, Yufu Y, Hattori H, Kikuchi H, Saburi Y: Allogeneic stem-cell transplantation with reduced conditioning intensity as a novel immunotherapy and antiviral therapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*, 105:4143-4145, 2005.
- 15 Shiratori S, Yasumoto A, Tanaka J, Shigematsu A, Yamamoto S, Nishio M, Hashino S, Morita R, Takahata M, Onozawa M, Kahata K, Kondo T, Ota S, Wakasa K, Sugita J, Koike T, Asaka M, Kasai M, Imamura M: A retrospective analysis of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for adult T cell leukemia/lymphoma (ATL): clinical impact of graft-versus-leukemia/lymphoma effect. *Biol Blood Marrow Transplant*, 14:817-823, 2008.
- 16 Yonekura K, Utsunomiya A, Takatsuka Y, Takeuchi S, Tashiro Y, Kanzaki T, Kanekura T: Graft-versus-adult T-cell leukemia/lymphoma effect following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 41:1029-1035, 2008.
- 17 Tanaka Y, Nakasone H, Yamazaki R, Wada H, Ishihara Y, Kawamura K, Sakamoto K, Ashizawa M, Machishima T, Sato M, Terasako K, Kimura S, Kikuchi M, Okuda S, Kako S, Kanda J, Tanihara A, Nishida J, Kanda Y: 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.
- 18 Bangham CR: CTL quality and the control of human retroviral infections. *Eur J Immunol*, 39:1700-1712, 2009.
- 19 Addo MM, Yu XG, Rathod A, Cohen D, Eldridge RL, Strick D, Johnston MN, Corcoran C, Wurcel AG, Fitzpatrick CA, Feeney ME, Rodriguez WR, Basgoz N, Draenert R, Stone DR, Brander C, Goulder PJ, Rosenberg ES, Altfeld M, Walker BD: Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-

- specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load. *J Virol*, 77:2081-2092, 2003.
- 20 Asquith B, Mosley AJ, Barfield A, Marshall SE, Heaps A, Goon P, Hanon E, Tanaka Y, Taylor GP, Bangham CR: A functional CD8+ cell assay reveals individual variation in CD8+ cell antiviral efficacy and explains differences in human T-lymphotropic virus type 1 proviral load. *J Gen Virol*, 86:1515-1523, 2005.
- 21 Coulie PG, Connerotte T: Human tumor-specific T lymphocytes: does function matter more than number? *Curr Opin Immunol*, 17:320-325, 2005.
- 22 Tanaka Y, Nakasone H, Yamazaki R, Sato K, Sato M, Terasako K, Kimura S, Okuda S, Kako S, Oshima K, Tanihara A, Nishida J, Yoshikawa T, Nakatsura T, Sugiyama H, Kanda Y: 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.
- 23 Tian Y, Kobayashi S, Ohno N, Isobe M, Tsuda M, Zaike Y, Watanabe N, Tani K, Tojo A, Uchamaru K: Leukemic T cells are specifically enriched in a unique CD3(dim) CD7(low) subpopulation of CD4(+) T cells in acute-type adult T-cell leukemia. *Cancer Sci*, 102:569-577, 2011.
- 24 Iwanaga M, Watanabe T, Utsunomiya A, Okayama A, Uchamaru K, Koh KR, Ogata M, Kikuchi H, Sagara Y, Uozumi K, Mochizuki M, Tsukasaki K, Saburi Y, Yamamura M, Tanaka J, Moriuchi Y, Hino S, Kamihira S, Yamaguchi K: Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) proviral load and disease progression in asymptomatic HTLV-1 carriers: a nationwide prospective study in Japan. *Blood*, 116:1211-1219, 2010.
- 25 Sasaki H, Nishikata I, Shiraga T, Akamatsu E, Fukami T, Hidaka T, Kubuki Y, Okayama A, Hamada K, Okabe H, Murakami Y, Tsubouchi H, Morishita K: Overexpression of a cell adhesion molecule, TSLC1, as a possible molecular marker for acute-type adult T-cell leukemia. *Blood*, 105:1204-1213, 2005.
- 26 Kobayashi S, Nakano K, Watanabe E, Ishigaki T, Ohno N, Yuji K, Oyaizu N, Asanuma S, Yamagishi M, Yamochi T, Watanabe N, Tojo A, Watanabe T, Uchamaru K: CADM1 expression and stepwise downregulation of CD7 are closely associated with clonal expansion of HTLV-I-infected cells in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res*, 20:2851-2861, 2014.
- 27 Kobayashi S, Watanabe E, Ishigaki T, Ohno N, Yuji K, Nakano K, Yamochi T, Watanabe N, Tojo A, Watanabe T, Uchamaru K: Advanced human T-cell leukemia virus type 1 carriers and early-stage indolent adult T-cell leukemia-lymphoma are indistinguishable based on CADM1 positivity in flow cytometry. *Cancer Sci*, 106:598-603, 2015.
- 28 Tanaka-Harada Y, Kawakami M, Oka Y, Tsuboi A, Katagiri T, Elisseeva OA, Nishida

- S, Shirakata T, Hosen N, Fujiki F, Murao A, Nakajima H, Oji Y, Kanda Y, Kawase I, Sugiyama H: Biased usage of BV gene families of T-cell receptors of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific CD8⁺ T cells in patients with myeloid malignancies. *Cancer Sci*, 101:594-600, 2010.
- 29 Nakasone H, Tanaka Y, Yamazaki R, Terasako K, Sato M, Sakamoto K, Yamasaki R, Wada H, Ishihara Y, Kawamura K, Machishima T, Ashizawa M, Kimura SI, Kikuchi M, Tanihara A, Kanda J, Kako S, Nishida J, Kanda Y: Single-cell T-cell receptor-beta analysis of HLA-A*2402-restricted CMV- pp65-specific cytotoxic T-cells in allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*, 49:87-94, 2014.
- 30 Terasako-Saito K, Nakasone H, Tanaka Y, Yamazaki R, Sato M, Sakamoto K, Ishihara Y, Kawamura K, Akahoshi Y, Hayakawa J, Wada H, Harada N, Nakano H, Kameda K, Ugai T, Yamasaki R, Ashizawa M, Kimura SI, Kikuchi M, Tanihara A, Kanda J, Kako S, Nishida J, Kanda Y: Persistence of recipient-derived as well as donor-derived clones of cytomegalovirus pp65-specific cytotoxic T cells long after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis*, 16:930-940, 2014.
- 31 Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A: Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 401:708-712, 1999.
- 32 Focosi D, Bestagno M, Burrone O, Petrini M: CD57⁺ T lymphocytes and functional immune deficiency. *J Leukoc Biol*, 87:107-116, 2010.
- 33 Hoji A, Connolly NC, Buchanan WG, Rinaldo CR, Jr.: CD27 and CD57 expression reveals atypical differentiation of human immunodeficiency virus type 1-specific memory CD8⁺ T cells. *Clin Vaccine Immunol*, 14:74-80, 2007.
- 34 Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GM, Papagno L, Ogg GS, King A, Lechner F, Spina CA, Little S, Havlir DV, Richman DD, Gruener N, Pape G, Waters A, Easterbrook P, Salio M, Cerundolo V, McMichael AJ, Rowland-Jones SL: Memory CD8⁺ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med*, 8:379-385, 2002.
- 35 Oxenius A, Sewell AK, Dawson SJ, Gunthard HF, Fischer M, Gillespie GM, Rowland-Jones SL, Fagard C, Hirschel B, Phillips RE, Price DA: Functional discrepancies in HIV-specific CD8⁺ T-lymphocyte populations are related to plasma virus load. *J Clin Immunol*, 22:363-374, 2002.
- 36 Sabouri AH, Usuku K, Hayashi D, Izumo S, Ohara Y, Osame M, Saito M: Impaired function of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-specific CD8⁺ T cells in HTLV-1-associated neurologic disease. *Blood*, 112:2411-2420, 2008.
- 37 Hendriks J, Gravestein LA, Tesselaar K, van Lier RA, Schumacher TN, Borst J: CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity. *Nat Immunol*, 1:433-440, 2000.

- 38 Hendriks J, Xiao Y, Borst J: CD27 promotes survival of activated T cells and complements CD28 in generation and establishment of the effector T cell pool. *J Exp Med*, 198:1369-1380, 2003.
- 39 Kannagi M, Harada S, Maruyama I, Inoko H, Igarashi H, Kuwashima G, Sato S, Morita M, Kidokoro M, Sugimoto M, et al.: Predominant recognition of human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) pX gene products by human CD8+ cytotoxic T cells directed against HTLV-I-infected cells. *Int Immunol*, 3:761-767, 1991.
- 40 Pannetier C, Even J, Kourilsky P: T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunol Today*, 16:176-181, 1995.
- 41 Rosenberg WM, Moss PA, Bell JI: Variation in human T cell receptor V beta and J beta repertoire: analysis using anchor polymerase chain reaction. *Eur J Immunol*, 22:541-549, 1992.
- 42 Spits H: Development of alphabeta T cells in the human thymus. *Nat Rev Immunol*, 2:760-772, 2002.
- 43 Turner SJ, Doherty PC, McCluskey J, Rossjohn J: Structural determinants of T-cell receptor bias in immunity. *Nat Rev Immunol*, 6:883-894, 2006.
- 44 Venturi V, Price DA, Douek DC, Davenport MP: The molecular basis for public T-cell responses? *Nat Rev Immunol*, 8:231-238, 2008.
- 45 Argaet VP, Schmidt CW, Burrows SR, Silins SL, Kurilla MG, Doolan DL, Suhrbier A, Moss DJ, Kieff E, Sculley TB, Misko IS: Dominant selection of an invariant T cell antigen receptor in response to persistent infection by Epstein-Barr virus. *J Exp Med*, 180:2335-2340, 1994.
- 46 Tynan FE, Borg NA, Miles JJ, Beddoe T, El-Hassen D, Silins SL, van Zuylen WJ, Purcell AW, Kjer-Nielsen L, McCluskey J, Burrows SR, Rossjohn J: High resolution structures of highly bulged viral epitopes bound to major histocompatibility complex class I. Implications for T-cell receptor engagement and T-cell immunodominance. *J Biol Chem*, 280:23900-23909, 2005.
- 47 Moss PA, Moots RJ, Rosenberg WM, Rowland-Jones SJ, Bodmer HC, McMichael AJ, Bell JI: Extensive conservation of alpha and beta chains of the human T-cell antigen receptor recognizing HLA-A2 and influenza A matrix peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88:8987-8990, 1991.
- 48 Price DA, Brenchley JM, Ruff LE, Betts MR, Hill BJ, Roederer M, Koup RA, Migueles SA, Gostick E, Wooldridge L, Sewell AK, Connors M, Douek DC: Avidity for antigen shapes clonal dominance in CD8+ T cell populations specific for persistent DNA viruses. *J Exp Med*, 202:1349-1361, 2005.
- 49 Trautmann L, Rimbert M, Echasserieau K, Saulquin X, Neveu B, Dechanet J, Cerundolo V, Bonneville M: Selection of T cell clones expressing high-affinity public TCRs within Human cytomegalovirus-specific CD8 T cell responses. *J Immunol*,

175:6123-6132, 2005.

- 50 Gillespie GM, Stewart-Jones G, Rengasamy J, Beattie T, Bwayo JJ, Plummer FA, Kaul R, McMichael AJ, Easterbrook P, Dong T, Jones EY, Rowland-Jones SL: Strong TCR conservation and altered T cell cross-reactivity characterize a B*57-restricted immune response in HIV-1 infection. *J Immunol*, 177:3893-3902, 2006.
- 51 Dong T, Stewart-Jones G, Chen N, Easterbrook P, Xu X, Papagno L, Appay V, Weekes M, Conlon C, Spina C, Little S, Screatton G, van der Merwe A, Richman DD, McMichael AJ, Jones EY, Rowland-Jones SL: HIV-specific cytotoxic T cells from long-term survivors select a unique T cell receptor. *J Exp Med*, 200:1547-1557, 2004.
- 52 Yu XG, Lichterfeld M, Chetty S, Williams KL, Mui SK, Miura T, Frahm N, Feeney ME, Tang Y, Pereyra F, Labute MX, Pfafferott K, Leslie A, Crawford H, Allgaier R, Hildebrand W, Kaslow R, Brander C, Allen TM, Rosenberg ES, Kiepiela P, Vajpayee M, Goepfert PA, Altfeld M, Goulder PJ, Walker BD: Mutually exclusive T-cell receptor induction and differential susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 mutational escape associated with a two-amino-acid difference between HLA class I subtypes. *J Virol*, 81:1619-1631, 2007.
- 53 Iglesias MC, Almeida JR, Fastenackels S, van Bockel DJ, Hashimoto M, Venturi V, Gostick E, Urrutia A, Wooldridge L, Clement M, Gras S, Wilmann PG, Autran B, Moris A, Rossjohn J, Davenport MP, Takiguchi M, Brander C, Douek DC, Kelleher AD, Price DA, Appay V: Escape from highly effective public CD8+ T-cell clonotypes by HIV. *Blood*, 118:2138-2149, 2011.
- 54 Bourcier KD, Lim DG, Ding YH, Smith KJ, Wucherpfennig K, Hafler DA: 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.
- 55 Takeda S, Maeda M, Morikawa S, Taniguchi Y, Yasunaga J, Nosaka K, Tanaka Y, Matsuoka M: Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells. *Int J Cancer*, 109:559-567, 2004.
- 56 Tanaka Y, Yamazaki R, Terasako-Saito K, Nakasone H, Akahoshi Y, Nakano H, Ugai T, Wada H, Yamasaki R, Ishihara Y, Kawamura K, Sakamoto K, Ashizawa M, Sato M, Kimura S, Kikuchi M, Kako S, Kanda J, Tanihara A, Nishida J, Kanda Y: 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.