

氏名	いしはら ゆうこ 石原優子
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲第536号
学位授与年月日	平成30年3月19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	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
論文審査委員	(委員長) 教授 久米 晃 啓 (委員) 教授 大森 司 准教授 大嶺 謙 教授 亀岡 淳 一

論文内容の要旨

1 研究目的

成人T細胞性白血病・リンパ腫(ATL)は、HTLV-IがCD4⁺T細胞に感染し腫瘍化したもので、非常に予後不良の造血器悪性腫瘍である。同種造血幹細胞移植(allo-HSCT)により一部の患者に根治が得られるようになったが、他に根治を期待できる治療法は未だ確立されておらず、その病態解明と新たな予防法・治療法の開発が急務となっている。

ATLに対するallo-HSCTでは、腫瘍特異的細胞傷害性T細胞(CTL)による免疫攻撃が、移植後ウイルス量の制御とATLの再発阻止に重要な意義を持っていると考えられ、特にHTLV-Iの調節タンパク質であるTaxは、CTLの主要標的抗原として注目されている。我々は移植前後のHLA-A*24:02陽性ATL患者のTax特異的CTL(Tax-CTL)のT細胞受容体(TCR)レパトア解析で、TCRβ鎖の相補性決定領域(CDR3)において特徴的なアミノ酸配列“P-D-R”が①異患者間および同一患者移植前後で保存されていること、②非常に強力な細胞傷害活性を持つこと、③移植後長期生存患者で選択的に増殖していることを報告した。このことから、PDR⁺CTLが移植後のATL再発阻止に重要な役割を担っている可能性が示唆された。しかし、HTLV-I無症候キャリア(AC)からATLへの多段階発癌機構におけるTax-CTLに関する報告は限られ、特にACにおけるTax-CTLクローンのレパトアとTCRのアミノ酸配列の意義については不明のままであった。

本研究では、対象を幅広い病態のHTLV-I感染者に拡大し、Tax-CTLの動態、TCRレパトア解析のデータを集積し、病態との関連性を検討することを目的とした。HTLV-I感染細胞が長い年月を経てATLに至る複雑なメカニズムにおけるTax-CTLの意義を解明する一助となることが期待される。

2 研究方法

HLA-A*24:02陽性のAC及びATL患者を対象とした。

血液検体採取後、単核球分離を行い、以下の解析を行った。

1) 末梢血単核球中のHTLV-Iプロウイルス量(PVL)をリアルタイムPCRで測定し、PVLの値に応じて、ACを腫瘍化リスクの高いハイリスクキャリア(high-risk:hrAC)とその他のキャリア(stable:sAC)に分けた。また、CD3、CD4、CD7、CADM1染色を行いフローサイトメーターでCD3⁺CD4⁺T細胞集団を検出し、CADM1 vs CD7の発現パターンから、CADM1⁻/CD7⁺(P)、CADM1⁺/CD7^{dim}(D)、

CADM1⁺/CD7⁻ (N) の集団の割合を解析した。キャリアから ATL へ進展していく過程で P→D→N の割合が増加し PVL の増加と相関するとされており、我々も PVL と CADM1 vs CD7 の発現パターンを比較した。

2) HLA-A*24:02/Tax₃₀₁₋₃₀₉ (SFHSLHLLF) テトラマーを用いて Tax-CTL を検出し、sAC、hrAC、ATL 患者の 3 群間で CD8⁺T 細胞に占める Tax-CTL の検出頻度を比較した。さらに CD27、CD28、CD57、CD45RA、CCR7 染色で T 細胞の分化・成熟に関わるフェノタイプを解析し、3 群間で比較した。

3) 我々が allo-HSCT 後の ATL に対して行い確立した direct single cell 解析法を用いて、Tax-CTL の TCR β 鎖の CDR3 領域のアミノ酸配列を決定し、TCR レパトアの解析を行った。sAC、hrAC、ATL 患者 3 群間でのレパトアの比較、また腫瘍化リスクを反映する PVL と TCR レパトアを比較し、病態への関与を検討した。

3 研究成果

HLA-A*24:02 陽性の AC17 例及び ATL 患者 5 例が対象となった。

1) PVL の値から、4 コピー/100 単核球をカットオフ基準として、AC を sAC と hrAC に分類した (sAC:14 例、hrAC:3 例)。CD4⁺T 細胞の CADM1 vs CD7 の発現パターンは、sAC ではその細胞集団が P 分画に集中していたが、hrAC では CADM1 陽性分画である D と N にシフトし、さらに ATL 患者では CD7 の発現が低下し、ほとんどが N に集中していた。

2) Tax-CTL の検出頻度を sAC、hrAC、ATL 患者の 3 群で比較したところ 3 群間に差はみられなかった。T 細胞分化に関わるフェノタイプ解析では、Tax-CTL は CD45RA⁻CCR7⁻のエフェクターメモリー細胞に集中しており、さらに CD27⁺CD28[±]CD57⁻の early immature な集団で構成されていた。これらのフェノタイプ構成も 3 群間で差はみられず、病態に関わらず一貫して同じメモリー表現型が維持されていた。

3) 計 1458 細胞で direct single cell 解析を行い、計 140 種類の Tax-CTL クローンを同定した。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。また TCR β 鎖 CDR3 領域のアミノ酸配列では全例で特徴的なアミノ酸配列である “P-D-R” が検出されていた。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たが、その頻度と PVL には明確な相関は見られなかった。

4 考察

本研究では、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 (CADM1 vs CD7 プロット) が変化していたのに対し、Tax-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は認めなかった。このことから、HTLV-I 感染者が ATL を発症する過程のバイオマーカーとしては、CTL そのものの数や表現型は、活動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 Tax-CTL レパトア解析結果から、すべての HLA-A*24:02 陽性 HTLV-I 感染者において、TCR β 鎖 CDR3 領域で特徴的なアミノ酸配列である “P-D-R” が検出された。この PDR は全症例に共通してみられた唯一のアミノ酸モチーフであった。様々なウイルス感染において、患者間で共通する臨床的に重要な “public TCR” の存在がこれまでも報告されているが、PDR は 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 モチーフと考えられた。PDR⁺TCR の頻度と ATL への進行を反映する PVL には明確な相関は見られなかったが、

これまで我々が報告した PDR⁺CTL の機能解析の結果を考慮すると、今回観察された PDR⁺CTL も 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。

対象症例数、特に hrAC と ATL 患者の症例数が少なかったことが、PDR⁺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要因の一つと考えられるため、今後更なる幅広い症例におい解析を進め、病態への関与を解明することが課題である。

5 結論

HLA-A*24:02 拘束性 Tax-CTL のレパトア解析で、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、“PDR” モチーフが観察された。しかし本研究では PDR⁺CTL の頻度と PVL に相関がみられず、HTLV-I 感染から ATL を発症する過程における、“PDR” の役割を解明することはできなかった。ATL 発症メカニズムの中で重要な役割を担う宿主免疫において、我々が発見した PDR 陽性 Tax 特異的 CTL がどのような位置づけにあるのか、今後も解析を続けていく必要がある。

論文審査の結果の要旨

成人 T 細胞性白血病／リンパ腫 (ATL) は、ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-I) 感染によって引き起こされる造血器悪性腫瘍である。大多数の HTLV-I 感染者は無症候キャリア (AC) として経過するが、一部が数十年の潜伏期を経て ATL を発症し、一旦発症すると極めて予後が悪い。現在有効な治療法は同種造血幹細胞移植 (allo-HSCT) しかないが、その成功率は必ずしも高くはなく、有効な治療法の確率が切望されている。

HTLV-I 感染細胞に対する細胞性免疫においては、Tat 特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) が中心的役割を果たし、AC から ATL への進行や allo-HSCT 後の再発を抑制すると考えられている。先行研究において、allo-HSCT 成功例の CTL に T 細胞受容体 (TCR) の抗原認識部位に共通するアミノ酸配列モチーフ (PDR) が見出された。そこで申請者は、ATL の発症・病態進行や寛解後再発の抑制における TCR レパトア、その中でも PDR モチーフを含む TCR の意義について解析した。解析対象は HLA-A*24:02 を有する AC17 名 (安定期 14 名、ハイリスク 3 名) 及び ATL 患者 5 名 (急性型／リンパ腫型 4 名、慢性型 1 名) だった。解析した全症例において、Tax の主要抗原ペプチド (Tax₃₀₁₋₃₀₉) 特異的 TCR 形成に用いられたβ鎖の使用パターンは極めて偏っており、しかも例外なく PDR モチーフを含む TCR を有する CTL クローンを検出された。ただし、AC と ATL の比較において、このようなクローンの存在頻度に有意差は検出されなかった。

これまでに ATL 発症前の HTLV-I 感染者 (AC) における TCR レパトアの解析がなされたことはない。本研究は当該集団についての最初の解析報告であるだけでなく、その全例において PDR モチーフを含む TCR を有する CTL クローンを存在することを明らかにした。先行研究の結果とも合わせると、このような CTL クローンを ATL 発症や再発の抑制に重要な役割を果たしていることは十分推測され、その意義が評価されて既に定評ある米国の学会誌に掲載されている (J Virol 91:e00974-17, 2017)。病期の違いにおける差異が認められなかったことについては、申請者が挙げている症例数不足の可能性を含めて、考察において若干の補足が必要であることは審査員から指摘があった。一方で、本研究で得られた知見は、難治性悪性腫瘍に対する新規治療法として最

近注目されている TCR 遺伝子導入 T 細胞療法への応用に直結すると考えられる。

本研究は難治性悪性腫瘍である ATL の病態について新しい知見を提供し、その成果は新規治療法の開発にも繋がるものとして臨床的意義も大きい。以上の理由により、全審査委員が一致して、本学学位論文として相応しいものと判断した。

最終試験の結果の要旨

最終試験では、本研究の着想に至った背景と科学的問い、その問いに答えるために研究に用いた材料（対象）・方法の妥当性と限界、得られた結果と解釈、及び考察について口頭試問が行われた。

申請者は、それらに関する質問に対して全て適切に答え、研究全般及び関連情報について十分に理解していることが確認された。さらに、研究内容の発表から質疑応答を通して一貫して自信をもった態度で臨んでいたことは、申請者自身が自主性をもって学習し研究を遂行したことを示すものである。

以上から、申請者は本学大学院博士課程最終試験に合格と判断した。