

氏 名	河 村 浩 二
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 543 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	成人 T 細胞性白血病に対する Tax 特異的 T 細胞受容体遺伝子導入細胞療法の開発
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教 授 室 井 一 男 (委 員) 教 授 水 上 浩 明 教 授 八木澤 隆

論文内容の要旨

1 研究目的

成人 T 細胞白血病 (ATL) は、ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-1) 感染を契機に発症する予後不良の末梢性 T 細胞腫瘍である。通常の化学療法では治癒を見込めず、唯一治癒の可能性のある同種移植もその適応は限られている。一方、同種移植後の長期生存例の存在から ATL に対する腫瘍免疫が治癒および再発抑制に重要な役割を果たしていることが推測される。

我々はこれまで、ATL に対する腫瘍免疫、特に Tax 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) に着目して研究を行ってきた。Tax は HTLV-1 のコードするウイルス蛋白の一つで、重要な転写制御因子である一方、CD8 陽性 CTL の主要な標的抗原でもある。複数の HLA-A*24:02 の ATL 患者および無症候性 HTLV-1 キャリアに対して Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 CTL の T 細胞受容体 (TCR) のレパトア解析を単細胞レベルで行った結果、全例で TCR- α 鎖の complementarily determining region 3 (CDR3) 領域に選択的かつ特徴的なアミノ配列: PDR を有する CTL が検出されることを見出した。この PDR+Tax 特異的 CTL は正常細胞を傷害することなく、HTLV-1 感染細胞に対して選択的に細胞傷害活性を示すことが明らかになり、PDR+Tax 特異的 CTL が ATL に対する新規の免疫療法になり得ると期待している。

本研究では、PDR+Tax 特異的 CTL の TCR 遺伝子を導入した T 細胞を作製し、この細胞を用いて抗 ATL/HTLV-1 効果について評価した。

2 研究方法

標的細胞として HTLV-1 感染細胞株である MT-2、MT-4、TL-Su、ATL 細胞株である ATN-1、および 3 例（急性型 2 例、慢性型 1 例）の患者由来の ATL 細胞を使用した。Tax 発現は、フローサイトメトリーを用いて解析した。

以前に樹立した同種造血幹細胞移植後の急性型 ATL 患者由来の PDR+CTL クローンの HLA-A*24:02 拘束性 Tax₃₀₁₋₃₀₉ 特異的 TCR- α 鎖および β 鎖の全遺伝子配列をクローニングした。次に、small-interfering RNAs を搭載した siTCR ベクターを用いて、健常ドナーの末梢血単核細胞 (PBMCs) に Tax 特異的 TCR 遺伝子を導入した (Tax-siCTLs)。

標的細胞と反応させたときの Tax-siCTLs からのサイトカイン (IFN γ , IL-2, TNF- α) 産生能を

評価するために細胞内サイトカイン染色を施行した。また、Tax-siCTLs の *in vitro* での抗 ATL/HTLV-1 効果を評価するために calcein-acetoxymethyl を用いた細胞傷害試験を施行した。

最後に、Tax-siCTLs の *in vivo* での抗 ATL/HTLV-1 効果を評価するために MT-2 を NOD/Sh-scid, IL-2R β 染色を施 (NOG) マウスに移植し腫瘍形成させた後、Tax-siCTLs を用いた免疫療法を施行した。MT-2 の腫瘍の拡大をみるために、MT-2 にルシフェラーゼ (Luc) 遺伝子を導入したものを (Luc-MT-2)、NOG マウス 9 匹に腹腔内注射した。3 週間後 Tax-siCTLs または遺伝子非導入 PBMCs (non-gene-modified PBMCs, NGM) をそれぞれ 2 週毎に 6×10^6 cells/匹ずつ各群 3 匹に週 1 回、合計 4 回尾静脈から投与した。また、Luc-MT-2 を腹腔内注射した残りの 3 匹はコントロールにした。腫瘍の拡大は、IVIS イメージングシステムで経時的に評価した。

3 研究成果

Tax-siCTLs は MT-2 (Tax $^+$, HLA-A*24:02 $^+$) および TL-Su (Tax $^+$, HLA-A*24:02 $^+$) に対して大量のサイトカインを産生した。しかし、ATN-1 (Tax $^+$, HLA-A*24:02 $^+$) に対しては少量しか産生せず、MT-4 (Tax $^+$, HLA-A*24:02 $^-$) に対しては産生しなかった。同様に Patient #2 (Tax $^+$, HLA-A*24:02 $^+$) に対しては大量のサイトカインを産生したものの、Patient #1 (Tax $^+$, HLA-A*24:02 $^+$) に対して産生量はやや少なく、Patient #3 (Tax $^-$, HLA-A*24:02 $^-$) に対してはほとんど産生しなかった。NGM はいずれの HTLV-1 感染/ATL 細胞株および患者由来 ATL 細胞に対してもサイトカインを産生しなかった。細胞傷害試験においても Tax-siCTLs は MT-2 および TL-Su に対しては強力な細胞傷害活性を示したが、ATN-1 に対しては弱く、MT-4 に対しては示さなかった。同様に Patient #2 に対しては強力な細胞傷害活性を示したが、Patient #1 に対しては示さなかった。

Luc-MT-2 を NOG マウスに移植した動物実験では、Tax-siCTLs 投与群は 3 匹全て速やかに腫瘍が縮小し、9 週間後には完全に消失した。肉眼的解剖所見からも腫瘍形成はなく、明らかな臓器障害もみられなかった。一方、NGM 投与群およびコントロール群の NOG マウスは腫瘍が急速に増大し、9 週の時点で全例が腫瘍死した。

4 考察

最初に健常ドナーPBMCs に siTCR ベクターを用いて PDR $^+$ TCR 遺伝子を導入した T 細胞 (Tax-siCTLs) を作製した。次に Tax-siCTLs の抗 ATL/HTLV-1 効果を *in vitro* および *in vivo* で評価したところ、正常細胞や組織には反応せずに、一部の HTLV-1 感染/ATL 細胞株および患者由来 ATL 細胞に対して強力な HLA-A*24:02 拘束性の Tax 特異的な細胞傷害活性を示した。したがって、Tax-siCTLs は一部の ATL 患者に対して有力な免疫療法のツールになる可能性が示唆された。

しかしながら、Tax を標的とした免疫療法の問題点の一つは、Tax 発現の有無およびその発現レベルである。約半数の ATL 患者においては特異的な免疫応答を惹起するのに十分なレベルの Tax 発現があるとされているが、約半数の ATL 患者は遺伝子変異やエピジェネティック変異によって、Tax の発現が欠如していると報告されている。

本研究で、ATN-1 と Patient#1 由来の ATL 細胞はともに HLA-A*24:02 かつ Tax の発現が検出可能であったにもかかわらず、Tax-siCTLs の *in vitro* での細胞傷害活性は弱かった。近年、ATL

細胞は多くの遺伝子異常や DNA メチル化異常を獲得することによって、免疫監視機構から回避すると同時に、生存や増殖に必要な Tax などのウイルス由来の遺伝子の機能も補うようになることが示唆されている。したがって、今後、Tax-siCTLs を用いた免疫療法の臨床応用にむけて、免疫療法の恩恵を受ける可能性がある ATL 患者をいかに同定していくかが課題である。

本研究における主な限界点として、実験で用いた患者由来の ATL 細胞検体数が少なかったことが挙げられる。今後、多くの患者由来の ATL 細胞を用いて Tax 発現レベルと Tax-siCTLs の効果との関係を調査する予定である。

5 結論

Tax-siCTLs は正常細胞や組織を傷害することなく、*in vitro* および *in vivo* で強力な抗 ATL/HTLV-1 効果を発揮することが示された。したがって、Tax-siCTLs を使った免疫療法が ATL 患者にとって新規の免疫療法になることが期待される。しかしながら、Tax の発現が検出できたにも関わらず一部の細胞では効果が乏しかったことから、今後の研究で、ATL 細胞の Tax 発現レベル、免疫回避機構の有無、および Tax-siCTLs の傷害活性の強弱の関係を解明する必要がある。

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、HTLV-I の持続感染によって引き起こされる T 細胞性腫瘍である。化学療法や同種造血幹細胞移植が行われるが、満足する成績は得られていない。同種造血幹細胞移植によって長期間寛解が得られている例では、HTLV-I がコードするウイルス蛋白の一つである Tax に対する特異的 CD8 陽性 CTL が認められ、この細胞が残存する ATL 細胞を排除することが明らかとなってきた。この CTL は、TCR β 鎖の CDR3 領域に特徴的なアミノ酸配列（PDR）を有することが判明した。ATL 患者から樹立された PDR+CTL クローンから、HLA-A*24:02 拘束性を有する Tax 特異的 TCR の全遺伝子配列がクローニングされた。siRNA を搭載した siTCR ベクターを用いて、健常ドナーの末梢血単核球に PDR+Tax 特異的 TCR 遺伝子を導入し、Tax-siCTL を作成した。

申請者は、この Tax-siCTL を用いて研究を行い、以下の成果を得た。Tax-siCTL は、HLA-A*24:02 を有し Tax 陽性 T 細胞性細胞株の MT-2、TL-Su、ATL 患者検体 2 と共培養すると、多量の IL-2、IFN- γ 、TNF- α を産生した。Tax-siCTL は、細胞濃度依存性にこれらの細胞に対し強い細胞傷害性を示した。HLA-A*24:02 を有しない Tax 陽性 T 細胞性細胞株の MT-4 と Tax 陰性患者検体 3 では、Tax-siCTL による IL-2、IFN- γ 、TNF- α の産生はほとんど見られず、細胞傷害性も見られなかった。一方、HLA-A*24:02 を有する Tax 陽性 T 細胞性細胞株の ATN-1 と Tax 陽性患者検体 1 に対しては、Tax-siCTL による上記のサイトカイン産生と細胞傷害性は、ほとんど見られなかった。MT-2 にルシフェラーゼ（Leu）遺伝子を導入した Leu-MT-2 を作成した。この細胞を NOG マウスに移植し、腫瘍が形成された 3 週間後から、Tax-siCTL を週 1 回 4 週間尾静脈から投与した。1 回の投与数は、マウス当たり 2×10^6 個であった。Tax-siCTL を投与したマウス 3 匹は、全て速やかに腫瘍は縮小し 9 週後に完全消失した。また、臓器障害は見られなかった。コントロール群（ベクターのみ 3 匹と無投与 3 匹）は全て腫瘍の増大により死亡した。

他家細胞を用いる Tax-siCTL 療法は、HLA-A*24:02 を有し Tax 陽性 ATL への治療として有望

と考えられた。一方、HLA-A*24:02 を有し Tax 陽性 ATL であっても Tax-siCTL が無効な場合があることが明らかとなった。今後、Tax-siCTL が無効な場合のメカニズムを解明すること、他の免疫療法との併用が議論された。

研究は新規性に富み結果は明確である。審査委員の指摘に従い学位論文は適正に修正された。以上から、全員一致で論文審査を合格と判定した。

最終試験の結果の要旨

申請者は、学位論文の内容に沿って、Tax-siCTL の実験結果について発表した。PDR+Tax 特異的 TCR 遺伝子導入の効率、導入された細胞の性状、Tax 特異的自家 CTL と Tax 特異的他家 CTL との違い、実臨床を考えた場合の Tax-siCTL の投与細胞数などについて質問が出たが、どの質問に対しても明解に返答された。今回の結果を踏まえ、ATL に対する CTL 療法の今後の展望が述べられた。申請者は、ATL を含む癌に対する CTL 療法に関する深い知識を有していることが伺えた。以上から、全員一致で諮問の結果は合格と判定した。