

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07292

研究課題名（和文）ATL発症阻止における幹細胞様メモリーT細胞の役割の解明と治療応用

研究課題名（英文）Investigation of the role of virus-specific stem cell-like memory T-cells in the patients with ATL and their therapeutic application

研究代表者

田中 ゆきえ（TANAKA, YUKIE）

東京医科歯科大学・統合研究機構・助教

研究者番号：10814197

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：HTLV-1 Tax-CTLの幹細胞様メモリーT細胞（TSCM）の解析により、HTLV-1キャリア末梢血中にはTax-CTLのTSCMが存在し、Tax抗原に対し非常に強力な反応性を持つことを確認した。様々なTax-CTLクローンがTSCMとして存在するが、特にHLA-A24陽性HTLV-1感染者間の共有型TCR発現Tax-CTLは、TSCMから優先的に分化増殖して優勢メモリー集団を構成した。本研究の結果は、HLA-A24陽性HTLV-1感染者には共有型Tax-CTLのTSCMが存在し、キャリア期はウイルスを長期間持続的に監視する重要な免疫機構が体内に構築されていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Tax-CTLの幹細胞様T細胞がHTLV-1キャリア末梢血中に長期間存在すること、またそれらがTax抗原に対して極めて強い反応性を発揮し、メモリーTax-CTLの供給源であることを明らかにした。本研究の成果は、ATL発症抑制機構にTax-CTL幹細胞様T細胞が非常に重要であることを示したが、今後、自己血中のTax-CTL幹細胞様T細胞の増殖法を確立することで、日本人に最も多いHLA-A24陽性HTLV-1感染者を対象にした持続的CTL効果が期待できる幹細胞様T細胞の特性を活かした細胞療法の開発への貢献が予想される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed stem cell memory T cells (TSCMs) of HTLV-1 Tax-CTLs. The results showed that TSCMs of Tax-CTLs, although rare, are present in the peripheral blood of HTLV-1 carriers and have very strong reactivity to Tax antigens in the in vitro experiments, and that various Tax-CTL memory clones source TSCMs, especially Tax-CTLs shared by HLA-A24 positive HTLV-1 infected individuals, are preferentially differentiated and proliferated from TSCM. It is strongly suggested that TSCMs of shared Tax-CTLs are promoted to differentiate and proliferate within HTLV-1 carriers, allowing for continuous surveillance of virus growth as dominant memory Tax-CTLs for a long period of time.

研究分野：感染症免疫学

キーワード：HTLV-1 幹細胞様メモリーT細胞 HLA-A24

## 1. 研究開始当初の背景

HTLV-1 はヒトに感染するレトロウイルスの一種であり、このウイルスに感染後、約 40 年以上のキャリア期を経て ATL は発症する。ATL は多剤併用化学療法を行っても長期生存者が 10%未滿と極めて予後不良の難治性白血病であり、造血幹細胞移植以外に根治を目指せる治療法は未だ確立していない。そのため、新たな治療法や早期診断法の開発が喫緊の課題である。HTLV-1 に対する宿主免疫で最も重要なのが、HTLV-1 Tax 特異的細胞傷害性 T 細胞(Tax-CTL) である。我々はこれまでの研究で、日本人に最も多い HLA-A24 陽性の HTLV-1 感染者が、特徴的なアミノ酸配列(PDR)を T 細胞受容体 (TCR)  $\beta$  鎖 CDR3 領域に持つ Tax-CTL (PDR 型 Tax-CTL) を異個人間で共有しており、これらが強力な抗 HTLV-1 活性を持つことを発見し、報告している。

また、T 細胞の中には、幹細胞様の自己複製能と多分化能を持ち、メモリー T 細胞の源として体内に長期間に渡り存在する「幹細胞様メモリー T 細胞(TSCM)」が存在する。我々は、“Tax-CTL の TSCM”、または HLA-A24 陽性の HTLV-1 感染者の場合は“PDR 型 Tax-CTL の TSCM”がキャリア期には存在し、このウイルス特異的な TSCM によるメモリー T 細胞の持続的な供給が、HTLV-1 キャリアの ATL 発症予防や治療に有効であると予想した。

## 2. 研究の目的

これまでに PDR 型 Tax-CTL は HLA-A24 型 HTLV-1 キャリアと ATL 患者共通に存在し、極めて高い Tax 抗原認識能と抗 HTLV-1 活性を発揮することを明らかにしてきた。また、HTLV-1 ウイルス特異的 CTL の TSCM の存在と機能は明らかにされていない。本研究は、日本人に最も多い HLA-A24 型の HTLV-1 感染者に共通に存在し、極めて重要な Tax-CTL と考えられる PDR 型 Tax-CTL (共有型 Tax-CTL) の TSCM の存在を証明することと、ATL の発症阻止におけるその役割を探り、これらを用いた新たな細胞移入療法の開発に繋げることを目的とした。

## 3. 研究の方法

- 1) 検体はすべて HLA-A24 陽性を使用した。10-color マルチカラー抗体染色パネル(live/dead-CD3+CD8+Tax<sub>301-309</sub>Tetramer+CD45RA+CCR7+CD27+CD62L+CXCR3+CD95+)を組み立てることで、4 laser FACS Aria III Fusion で HTLV-1 キャリア群と ATL、HAM 患者群の末梢血中 Tax-CTL の TSCM を FACS で同定し、その頻度と病態との関係性を評価した。
- 2) Tax-CTL のエフェクターメモリー T 細胞 (TEM) ドミナントクローンの源(由来)は TSCM 細胞集団にあるのか、キャリア末梢血中の Tax-CTL の TSCM と TEM 各分画をシングルセルソート後、直接個々の細胞について TCR 遺伝子解析し、その両分画由来の遺伝子配列データを比較した。これにより、クローンレベルでの Tax-CTL のメモリー T 細胞の母細胞(源)が TSCM なのか、Tax-CTL のメモリー T 細胞の分化の由来を検討した。
- 3) Tax-CTL の TSCM 集団の免疫機能評価をするために、キャリアの末梢血単核球細胞を Tax<sub>301-309</sub> ペプチドで 24 時間刺激後、Tax-CTL の TSCM 分画の活性化分子 CD25、CD69、CD137 (休止期には発現せず、TCR 刺激 24 時間後をピークに再現性よく CD8T 細胞上に誘導される抗原特異的活性化分子) の発現と発現強度を FACS で評価した。

## 4. 研究成果

Tax-CTL の TSCM 同定用 10 カラーマルチカラー染色パネルを用いて HTLV-1 キャリア (AC)、ATL 患者、HAM 患者末梢血中の HTLV-1 Tax-CTL の TSCM を FACS で解析した。その結果、多症例の AC 末梢血中に Tax-CTL の TSCM は非常に低頻度ながら存在していることが明らかとなった。一方、ATL や HAM 発症群では AC に比べてさらに Tax-CTL の TSCM 頻度は低下していることも判明した(図 1)。さらに、Tax-CTL のエフェクターメモリー T 細胞 (TEM) のドミナントクローンの源(由来)となる細胞は TSCM 分画にあるのかどうか、AC の末梢血中の Tax-CTL の TSCM と TEM 分画をペアでシングルセル TCR 遺伝子解析し、その T 細胞レパトアを比較することで調査した(図 2)。その結果、Tax-CTL の TSCM 集団の T 細胞レパトアは、4/5 例で非常に多様性に富むパターンを示したが、一方の TEM 集団の T 細胞レパトアは非常に強く収束を示し、主に① PDR 型、② (P→Q) の QDR 型 Tax-CTL がドミナントであった。Tax-CTL の TSCM と TEM の両集団間の T 細胞レパトアを比較すると、TEM 中のドミナントクローンの遺伝子配列と同じ配列が TSCM 中にも検出されたことから、①、②のような特徴的なアミノ酸配列を持つドミナント Tax-CTL の源(由来)が TSCM にある事が判明した。さらに検出された各 Tax-CTL クローンの TSCM から TEM への増殖拡大率 (TEM 中の頻度/TSCM 中の頻度) を調べたところ、PDR 型は 3/4 例で、QDR 型は 2/3 例で 5 倍以上の高い増殖拡大率を示したが、他配列のクローンは、最大 3.3 倍であった。つまり、TSCM から TEM を含むメモリー T 細胞への分化段階で、PDR 型 Tax-CTL の優先的な分裂増殖が起きていることが示唆された。さらに、AC の末梢血単核球細胞を Tax<sub>301-309</sub> ペプチドで 24 時間刺激後、活

図1

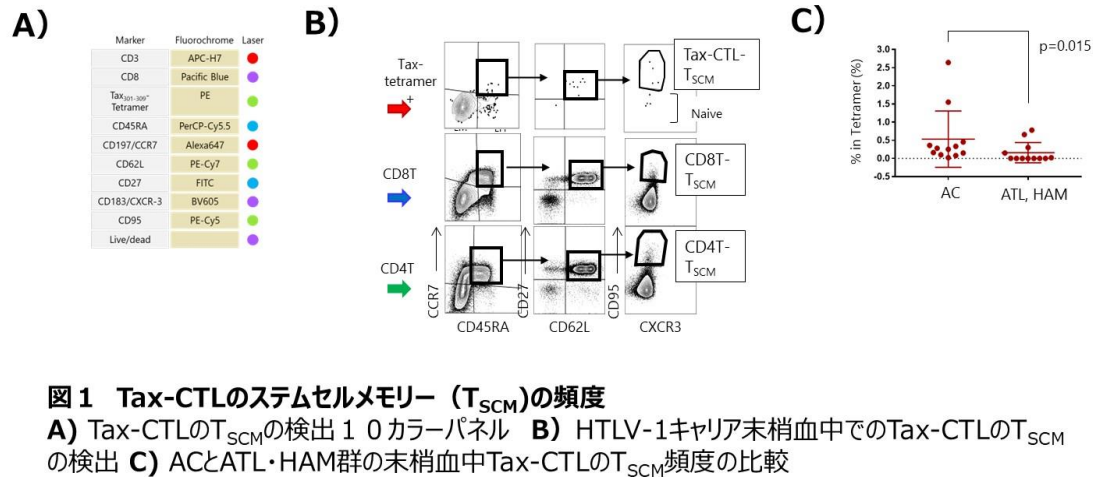
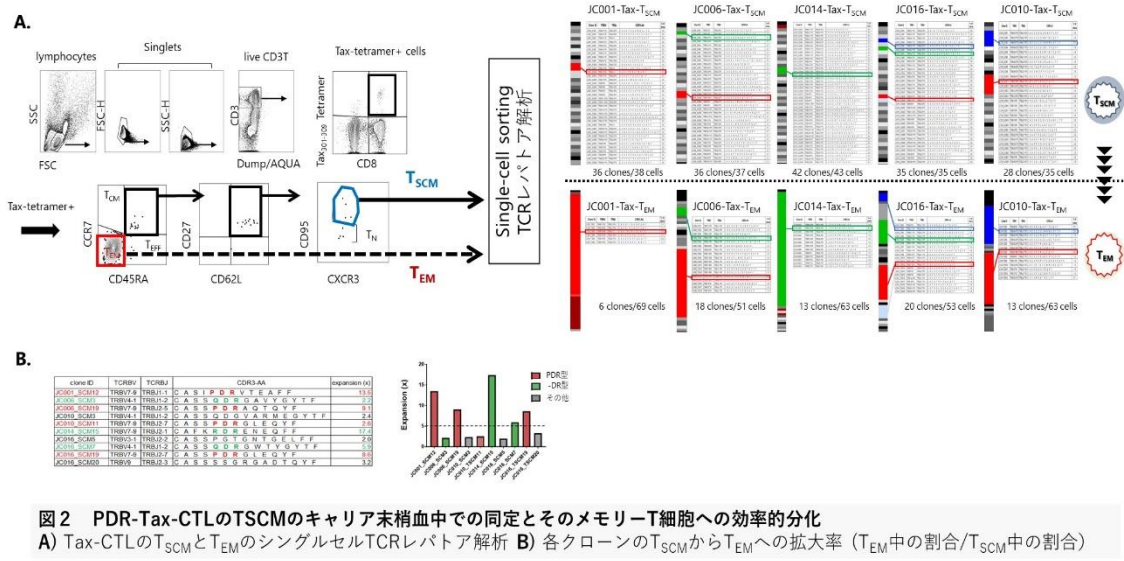


図2



性化分子 CD25、CD69、CD137 (休止期には発現せず、TCR 刺激 24 時間後をピークに再現性よく CD8T 細胞上に誘導される) の発現と発現強度を評価したところ、Tax-CTL のナイーブ細胞からエフェクター細胞への分化分画のうち TSCM で非常に強い細胞の活性化が観察された。中でも CD137 の発現は TSCM で最も強力であった。また、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2 いずれのサイトカインも Tax ペプチド刺激により TSCM はセントラルメモリー分画中の細胞と同等程度、大量に産生した。Tax-CTL の TSCM は非常に強い抗原特異的反応性を備えた HTLV-1 感染者のウイルス特異的 T 細胞集団として末梢血中に存在していることが示唆された。

以上より、本研究では、1) HTLV-1 感染によって、キャリア体内では Tax-CTL の TSCM が誘導される。体内での TSCM の減少が先か、ATL や HAM の発症が先かについてはいまのところ未解決ではあるが、ATL や HAM 発症後はキャリア期に比べて Tax-CTL の TSCM は減少していること、2) Tax-CTL の TEM 分画中のドミナントクローンの由来は TSCM にあること、3) キャリア期や造血幹細胞移植後の ATL 患者体内には Tax-CTL の TSCM が機能不全や枯渇を起こさない限り、PDR 型 Tax-CTL のような HTLV-1 に対して強い細胞傷害性を持つ Tax-CTL のドミナントメモリー CTL が持続的に供給され、ウイルスの増殖抑制に貢献できる可能性を示した。

現行の細胞療法では既にある程度分化が進んだメモリー T 細胞を使用することで効果は短期的で期間限定的な側面がある。Tax-CTL の TSCM の減少原因については検討を続けるが、今後、本研究の成果をもとに自己 Tax-CTL-TSCM の安定した培養増殖法が確立できれば、TSCM の幹細胞様の自己複製能と多分化能を利用し、長期的効果を狙った ATL の発症予防のための細胞療法の開発に繋げることができる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kawamura Koji, Tanaka Yukie, Nakasone Hideki, Ishihara Yuko, Kako Shinichi, Kobayashi Seiichiro, Tanaka Yuetsu, Ohmori Tsukasa, Uchimaruru Kaoru, Okamoto Sachiko, Mineno Junichi, Shiku Hiroshi, Nishimura Satoshi, Kanda Yoshinobu	4. 巻 26
2. 論文標題 Development of a Unique T Cell Receptor Gene-Transferred Tax-Redirected T Cell Immunotherapy for Adult T Cell Leukemia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology of Blood and Marrow Transplantation	6. 最初と最後の頁 1377 ~ 1385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbmt.2020.04.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 NISHIYAMA-FUJITA YURIKO, KAWANA-TACHIKAWA AI, ONO TOSHIAKI, TANAKA YUKIE, KATO TAKAFUMI, HESLOP HELEN E., MORIO TOMOHIRO, TAKAHASHI SATOSHI	4. 巻 20
2. 論文標題 Generation of multivirus-specific T cells by a single stimulation of peripheral blood mononuclear cells with a peptide mixture using serum-free medium	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cytotherapy	6. 最初と最後の頁 1182 ~ 1190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcyt.2018.05.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中ゆきえ、小林誠一郎、佐藤知雄、山野嘉久、神田善伸、内丸薫、森尾友宏。
2. 発表標題 HTLV-1感染により誘導されるウイルス抗原特異的幹細胞様メモリーT細胞の解析。
3. 学会等名 第12回日本血液疾患免疫療法学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤田由利子、立川（川名）愛、田中ゆきえ、Helen E Heslop、加藤節史、岡本圭祐、河野ゆり、辻彩子、草野純、柳町昌克、森尾友宏、高橋聡
2. 発表標題 造血細胞移植後難治性ウイルス感染症に対するHLA半合致以上血縁ドナー由来複数ウイルス特異的T細胞療法
3. 学会等名 第41回日本造血細胞移植学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	小林 誠一郎  (KOBAYASHI SEIICHIRO)  (70376622)	東京大学・医科学研究所・助教    (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------