

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：17701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22879

研究課題名(和文) TCRレパトア解析によるHAMの診断および病勢指標となるバイオマーカーの探索

研究課題名(英文) TCR repertoire analysis targeting HTLV-1-infected cells in HAM patients for biomarker discovery

研究代表者

野妻 智嗣 (Satoshi, Nozuma)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：40884052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：HAM患者の末梢血HTLV-1感染細胞と髄液細胞を標的とし、分子バーコードを用いてTCRレパトア解析を行った。この解析によりHAMの感染細胞ではクローン増殖の程度が高く、ポリクローナルに増殖している感染細胞が多いことが判明した。また感染細胞のTCRレパトアは個々の患者に特有のもので、レパトアの特徴は長期に保持されていた。中枢神経系で増殖している感染細胞クローンは末梢血とは異なる分布を示し、炎症を来す病原性クローンと考えられた。
この結果からHAMの感染細胞で病原性のあるクローンを同定し経時的にかつ臓器横断的に追跡することで、診断および治療の指標となるバイオマーカーへの応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分子バーコードを用いたバイアスのないTCRレパトア解析のパイプラインを確立した。TCRレパトア解析により、HAM患者で病原性のあるHTLV-1感染細胞クローンは個々の患者に特有のものであり、長期に保存されていること、また中枢神経系では末梢血と異なる分布を示すことが判明した。これらの病原性のあるHTLV-1感染細胞クローンの同定・追跡は、疾患活動性の指標や治療介入時のバイオマーカーとして利用できるなど、テーラーメイド医療への応用が可能となると考える。

研究成果の概要(英文)：HTLV-1-infected cells in peripheral blood and CSF cells from HAM patients were targeted for TCR repertoire analysis using molecular barcodes. This analysis revealed a higher clonal expansion in HTLV-1-infected cells and a higher number of HTLV-1 infected cells with polyclonal expansion in HAM patients. The TCR repertoire of infected cells was unique to each patient, and the repertoire signatures were retained over time. Infected cell clones proliferating in the central nervous system showed a different distribution than those in the peripheral blood and were considered to be pathogenic clones that cause inflammation in the CNS of HAM patients. Our results indicate that TCR repertoire analysis in HTLV-1-infected cells of HAM patients could be used to identify pathogenic clones. Tracking the pathogenic clones longitudinally and across organs is expected as biomarkers for disease monitoring and therapeutic indicators.

研究分野：脳神経内科

キーワード：HTLV-1関連脊髄症 神経免疫性疾患 神経感染症 T細胞受容体レパトア解析 HTLV-1

1. 研究開始当初の背景

HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) は成人 T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) 感染者の一部に発症する神経免疫疾患である。末梢血で増加した HTLV-1 感染 CD4 陽性 T リンパ球と HTLV-1 特異的 CD8 陽性細胞障害性 T リンパ球 (CTL) が脊髄に浸潤し、CTL が感染細胞を認識して HTLV-1 特異的炎症反応が起き、神経細胞が傷害される。

T 細胞は T 細胞受容体 (TCR) を用いて抗原/主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) を認識する。抗原を認識した T 細胞は活性化されクローン増殖し、免疫反応を誘導する。TCR は多様な抗原を認識するために約 1×10^{15} ものレパートリー (レパトア) をもち、特定の TCR 変異体はクローン型と称される。次世代シーケンス (NGS) 技術の進歩は大量の TCR レパトア解析を可能とし、癌の微小残存病変の検出、移植後の免疫系の回復度の予測、ウイルス抗原特異的 CTL の TCR クローン型の同定など癌、免疫、感染症領域で多くの研究がなされている。

HAM は主に神経症候、HTLV-1 抗体陽性により臨床的に診断されるが、疾患に特異的な検査がないため診断が困難な場合がある。また疾患活動性を反映するバイオマーカーに乏しく、現在分子標的薬や抗ウイルス薬が臨床治験されているが、治療の指標となるバイオマーカーも必要である。そのため HAM に特異的な TCR レパトアがないか HTLV-1 感染細胞を標的に解析を行うことを考えた。また個々の患者において病勢と関連する TCR レパトアがないか縦断的に検討する計画とした。

2. 研究の目的

(1) HAM の診断のためのバイオマーカーの探索

HAM 患者に共通する特異的な TCR クローン型がないかを HTLV-1 キャリアを比較対象とし、末梢血単核球 (PBMC)、CD4 陽性 T リンパ球、HTLV-1 感染細胞において比較検討する。

(2) HAM の疾患活動性の指標のためのバイオマーカーの探索

TCR クローン増殖の程度や特異的な TCR クローン型が疾患活動性と関連するかについて HAM で検討する。また個々の患者で疾患活動性との関連を時系列に沿って縦断的に評価し、病勢のバイオマーカーへ応用可能かを検討する。さらに他のバイオマーカーである HTLV-1 プロウイルス量や MRI での脊髄萎縮との関連を検討する。

3. 研究の方法

(1) 対象

HAM12 例、HTLV-1 キャリア (AC) 5 例の計 17 例を対象とした。縦断的な解析は HAM4 例、3 時点を対象とした。HAM3 例で末梢血と髄液細胞をペアで解析した。

(2) HTLV-1 感染細胞の分離

HTLV-1 感染細胞の分離には抗 CD4 抗体、抗 CADM1 抗体を用い、HTLV-1 感染細胞を CD4+CADM1+、非感染細胞を CD4+CADM1-細胞とした。

(3) TCR レパトア解析

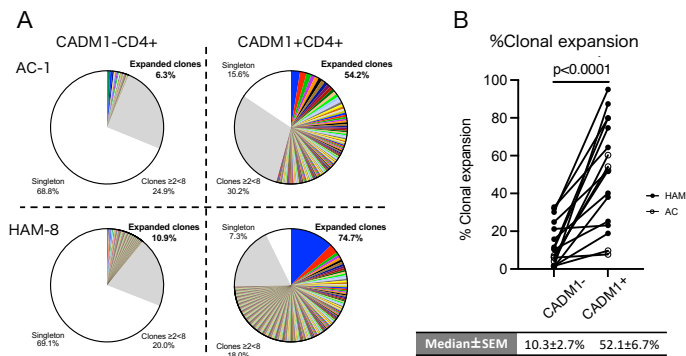
対象細胞から RNA を抽出し、5' RACE + UMI 法を用いて cDNA に合成し、nested PCR によりライブラリを作製した。UMI は 10 個のランダムな塩基配列からなる分子バーコードで 1 個の細胞由来の TCR を 1 個としてカウントでき、定量的に解析可能である。TCR ライブラリを次世代シーケンサー (Miseq) を用いて配列を決定し、バイオインフォマティクスにより解析した。

4. 研究成果

(1) HTLV-1 感染細胞で TCR クローン増殖の割合が高い

まず、HTLV-1 感染細胞で TCR レパトアに偏りがあるかを検討した。図 1A が代表的な TCR レパトアの解析例で、AC1 例と HAM1 例での CADM1 陰性と陽性細胞のクローン増殖の割合を提示した。我々は TCR クローン増殖の割合を分子バーコード(UMI) の数により群分けし、8 以上あるクローン型を Expanded clone と定義した。Expanded clones 群では、それぞれ一つの色は一つの TCR クローン型を示している。これら Expanded clone の割合を全ての Sample で比較したのが図 1B のグラフであり、有意に CADM1 陽性細胞でクローン増殖の割合が高かった。

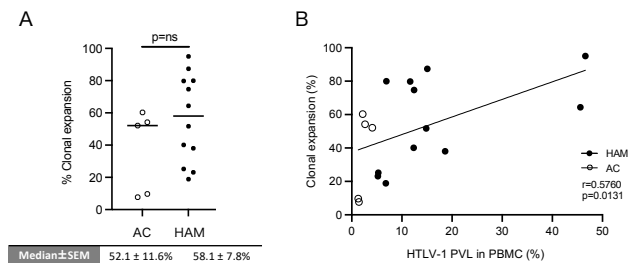
図1：HTLV-1感染細胞でTCRクローン増殖の割合が高い



(2) HAM とキャリアではクローン増殖の程度に差は無い

HAM では AC と比較して HTLV-1 プロウイルス量が高いことが知られており、今回の症例でも HAM で $12.4 \pm 4.2\%$ 、AC で $2.2 \pm 0.5\%$ と HAM で有意に高い ($p=0.0008$)。そこで、HAM と AC で HTLV-1 感染細胞の TCR レパトアのクローン増殖の割合に差があるかを解析した。しかし、HAM、AC とも症例によりクローン増殖の割合にばらつきがあるが、両群に有意差は認めなかった (図 2A)。図 2B では HTLV-1 プロウイルス量 (PVL) と TCR クローン増殖の相関を図示している。AC と比較して HAM で PVL は高いが、PVL が AC より高いにも関わらず、クローン増殖の割合が同等から低いものがある。これらは HAM の高ウイルス量はポリクローナルな感染細胞の増殖に起因していることを示唆している。また HAM の運動機能障害度とクローン増殖の割合について関連を解析したが有意な結果は得られなかった。

図2：HAMとキャリアではクローン増殖の程度に差は無い



(3) HTLV-1 感染細胞クローンは個々の患者で長期に保持される

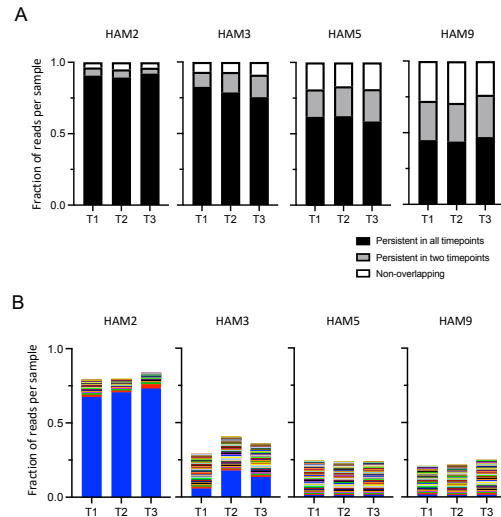
次に、個々の HTLV-1 感染細胞における TCR レパトアの経時的な変化を解析した。対象は HAM4 例の推移を 3 時点で比較した。まず始めにこれら 4 例、3 時点での TCR レパトアについて患者間で共有される TCR レパトアがないか CDR3 配列の一致を用いて比較したが、個々の HAM 患者に特有のレパトアを認めるのみで、HTLV-1 感染細胞に患者間で共有される Public なレパトアは認めなかった。

TCR レパトアが患者個々で経時的にどのように変化するか検討した。図 3A で示す様に 3 時点全てで共有される割合は 45-90% と高く、2 つ時点で共有される割合は 70-95% 以上と高い。また個々の患者では共有される割合に経時的にはほとんど変化がない。HAM の感染 T 細胞においては

長期に保持されるクローン型の割合が高く、その割合は長期的に変化がないことがわかる。

さらに個々の患者で高度に増殖している Clone 型に着目し、Expand している Top 100 クローン型についてそれぞれの患者で検討した。図 3B に示す様に Top 100 クローンの全体に占める割合は経時的に変化がない。特に 1% を超えるような高度に増殖した dominant clone (HAM2 や HAM3 での青色で示されるクローン型が代表的) は長期にわたり保持されている。これらは病原性を持つと考えられ、増加した際には HAM 増悪や成人 T 細胞白血病/リンパ腫への移行の危険性が高まると考えられ、モニタリングに使用できる。

図3：HTLV-1感染細胞クローンは個々の患者で長期に保持される



(4) 中枢神経系で増殖している HTLV-1 感染細胞クローンは末梢血のレパトアと異なり、中枢でより高度に増殖している

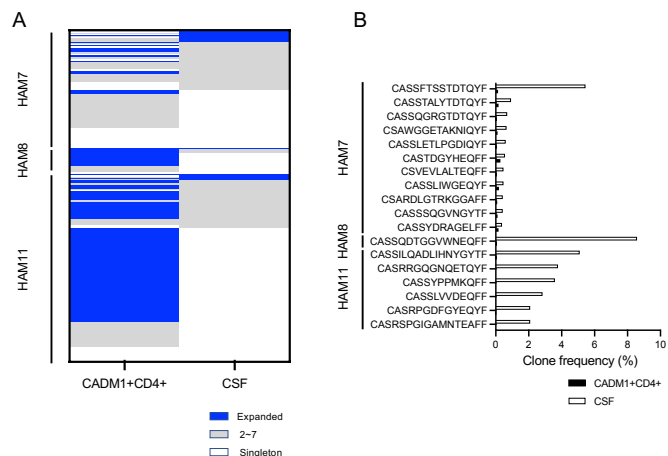
HAM おいて中枢神経系に浸潤している HTLV-1 感染細胞のレパトアについて解析するため、同一患者で末梢血での HTLV-1 細胞 T 細胞と髄液細胞での TCR レパトアについて HAM3 例において比較解析した。具体的には、髄液細胞と HTLV-1 感染細胞で共有されるクローン型が髄液に移行している感染細胞クローンと考えられ解析対象とした。まず、これら 3 例で共有される TCR レパトアがないか検討したが、患者個々に特有のレパトアを認めるのみで、HAM 患者の髄液細胞間で共有されるレパトアは認めなかった。

HTLV-1 感染細胞と髄液細胞で共有される TCR クローン型がそれぞれの compartment でどのように分布しているかを図 4A に示した。髄液細胞で Expanded clone に属しているものは必ずしも末梢血の感染細胞で Expanded clone に属している訳ではなく、増殖していない群に属しているものもある。一方、末梢血の感染細胞で Expanded clone に属しているものの髄液細胞では増殖していない群にあるものも多い。

図 4B では、末梢血と髄液で共有されるクローン型のうち、髄液細胞で増殖しているクローン型の頻度を髄液と末梢の感染細胞で割合を比較した。どのクローンにおいても末梢血よりも髄液細胞で増殖しているクローンの割合は高い。

髄液で増殖している HTLV-1 感染細胞クローンは末梢血の感染細胞クローンと分布が異なり、髄液でよりクローン増殖の割合は高く、中枢神経系で Enrichment している。

図4：中枢神経系で増殖しているHTLV-1感染細胞クローンは末梢血のレパトアと異なり、中枢でより高度に増殖している



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nozuma, S. Enose-Akahata, Y. Johnson, K. R. Monaco, M. C. Ngouth, N. Elkahloun, A. Ohayon, J. Zhu, J. Jacobson, S.	4. 巻 6
2. 論文標題 Immunopathogenic CSF TCR repertoire signatures in virus-associated neurologic disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e144869
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.144869	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Enose-Akahata, Y. Billioux, B. J. Azodi, S. Dwyer, J. Vellucci, A. Ngouth, N. Nozuma, S. Massoud, R. Cortese, I. Ohayon, J. Jacobson, S.	4. 巻 8
2. 論文標題 Clinical trial of raltegravir, an integrase inhibitor, in HAM/TSP	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Clinical and Translational Neurology	6. 最初と最後の頁 1970-1985
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/acn3.51437	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kodama, D. Tanaka, M. Matsuzaki, T. Nozuma, S. Matsuura, E. Takashima, H. Izumo, S. Kubota, R.	4. 巻 59
2. 論文標題 Anti-Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) Antibody Assays in Cerebrospinal Fluid for the Diagnosis of HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Microbiology	6. 最初と最後の頁 e03230-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JCM.03230-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Penova, M. Kawaguchi, S. Yasunaga, J. I. Kawaguchi, T. Sato, T. Takahashi, M. Shimizu, M. Saito, M. Tsukasaki, K. Nakagawa, M. Takenouchi, N. Hara, H. Matsuura, E. Nozuma, S. Takashima, H. Izumo, S. Watanabe, T. Uchimar, K. Iwanaga, M. Utsunomiya, A. Tabara, Y. Paul, R. Yamano, Y. Matsuoka, M. Matsuda, F.	4. 巻 118
2. 論文標題 Genome wide association study of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in the Japanese population	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2004199118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2004199118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tashiro Yuichi, Matsuura Eiji, Sagara Yasuko, Nozuma Satoshi, Kodama Daisuke, Tanaka Masakazu, Koriyama Chihaya, Kubota Ryuji, Takashima Hiroshi	4. 巻 38
2. 論文標題 High Prevalence of HTLV-1 Carriers Among the Elderly Population in Kagoshima, a Highly Endemic Area in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 AIDS Research and Human Retroviruses	6. 最初と最後の頁 363 ~ 369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/AID.2021.0164	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6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Satoshi Nozuma, Yoshimi Enose-Akahata, Kory R. Johnson, Maria Chiara Monaco, Nyater Ngouth, Abdel Elkahoun, Joan Ohayon, Jun Zhu and Steven Jacobson
2. 発表標題 Immunopathogenic TCR repertoire signature in CSF of virus-associated neurologic disease.
3. 学会等名 17th International Symposium on NeuroVirology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Satoshi Nozuma, Yoshimi Enose-Akahata, Kory R. Johnson, Maria Chiara Monaco, Nyater Ngouth, Abdel Elkahoun, Joan Ohayon, Jun Zhu and Steven Jacobson
2. 発表標題 Immunopathogenic CSF TCR repertoire signatures in HAM/TSP
3. 学会等名 20th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Satoshi Nozuma, Eiji Matsuura, Masakazu Tanaka, Toshio Matsuzaki, Ryuji Kubota, Steven Jacobson, Hiroshi Takashima
2. 発表標題 Immunopathogenic CSF TCR repertoire signatures in virus-associated neurologic disease
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野妻智嗣、松浦英治、田中正和、松崎敏男、久保田龍二、高嶋博
2. 発表標題 HTLV-1感染細胞を標的としたTCRレパトア解析によるHAMの診断および病勢指標となるバイオマーカーの探索
3. 学会等名 第33回日本神経免疫学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野妻智嗣、松浦英治、田中正和、松崎敏男、久保田龍二、高嶋博
2. 発表標題 HTLV-1感染細胞を標的としたTCRレパトア解析によるHAMの病勢指標となるバイオマーカーの探索
3. 学会等名 第7回日本HTLV-1学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野妻智嗣、松浦英治、田中正和、児玉大介、松崎敏男、久保田龍二、高嶋博
2. 発表標題 感染細胞を標的としたTCRレパトア解析によるHAMでのバイオマーカー探索
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会（国際学会）
4. 発表年 2022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

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
---------	---------