

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501286

研究課題名(和文)成人T細胞性白血病リンパ腫に対する細胞傷害性T細胞のTCRレパトア解析

研究課題名(英文)Single-cell analysis of T-cell receptor repertoire of HTLV-1 Tax-specific cytotoxic T cells in patients with adult T-cell leukemia/lymphoma.

研究代表者

神田 善伸 (Kanda, Yoshinobu)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：30334379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：成人T細胞白血病・リンパ腫(ATL)の原因ウイルスHTLV-1に由来するTaxに特異的な細胞傷害性T細胞(CTL)のT細胞受容体(TCR)のレパトア解析を行なった。同種造血幹細胞移植後のATL患者において、特徴的なアミノ酸配列("P-D/P-R")を有するTCRレパトアを持つCTLが増加すること、主にeffector memory CTLとして存在すること、移植後長期にわたって存在すること、他の患者のHTLV-1感染細胞に対する細胞傷害性も示すことが判明した。今後はこれらのCTLのTCR遺伝子全長を健常人T細胞に遺伝子導入して細胞免疫療法を実現する。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the T-cell receptor repertoire of HTLV-1 Tax-specific cytotoxic T cells in patients with adult T-cell leukemia/lymphoma. We found that the Tax-CTLs share P-D/P-R motif, persist as effector memory CTLs for long term after transplantation, and show universal killing activity against third-party HTLV-1 infected cells. We are planning a redirected T-cell immunotherapy using T-cell receptor alpha/beta genes from these clones.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍免疫学

キーワード：細胞傷害性T細胞 レパトア 成人T細胞性白血病 HTLV-1 造血幹細胞移植

1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞白血病・リンパ腫(ATL)は難治性の造血器腫瘍であり、特に白血病型・リンパ腫型の患者の予後は不良である。近年、ATL に対して同種造血幹細胞移植が行われるようになり、一部の患者に根治が得られるようになった。我々は骨髄バンクを介した非血縁者間移植においても良好な成績が得られることを報告している (Biol Blood Marrow Transplant 2007;13:90-99)。同種造血幹細胞移植後に、ドナーの免疫担当細胞による抗腫瘍効果(GVL 効果)が存在することが知られている。その根拠となっているのは、移植後に移植片対宿主病(GVHD)を発症した患者において白血病の再発率が低下するという事実、そして移植後にドナーリンパ球を輸注することによって腫瘍が縮小することがあるという事実である。ATL においても、移植後に移植片対宿主病(GVHD)の発症とともに腫瘍が消退することから、GVL 効果が期待しやすい疾患のひとつとされている。しかし、GVHD と GVL は表裏一体の関係にあるため、単純に免疫抑制剤の減量などによって GVL 効果の増強を図ると、GVHD の増悪のために臓器障害や感染症による死亡率が高くなってしまふ。そこで、より腫瘍特異的に働く免疫療法の開発が熱望されている。

2. 研究の目的

ATL の発症には、その原因ウイルスであるヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型(HTLV-I)の転写活性化因子 Tax が重要であり、近年、この Tax を認識する細胞傷害性 T 細胞(CTL)が、患者体内でのウイルス感染細胞の除去とウイルス発現抑制に重要な役割を果たしていることが報告されている。そこで今回の研究では、同種造血幹細胞移植後に HLA-A24 拘束性の Tax 抗原特異的 CTL を検出、定量し、さらには single cell での T 細胞受容体(TCR)レパトアの解析を行うことにより、高感度な抗原特異的 CTL の定量を可能にするとともに、将来的な抗原特異的免疫療法として、非特異的 CTL に当該レパトアを遺伝子導入し、腫瘍特異的な CTL の大量輸注を可能にする治療法の開発研究を行う。

これまでに報告されている抗原特異的 T 細胞の免疫反応に関する多くの研究では、HLA-テトラマー解析や 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数週間共培養し、増殖させた後に行われていた。そのため培養後の T 細胞母集団には、ある種のクローンの増大や選択といったバイアスが生じる可能性が十分あり、得られた CTL の頻度やレパトアの結果は生体内の真の状態を反映しているとは言えなかった。これに対して、single-cell RT-PCR 法での TCR レパトア解析では、共培養によって誘引される解析結果へのバイアスが排除で

きるため、同種移植後の生体内の Tax 抗原特異的 CTL の頻度と個々の CTL クローンのレパトアの真の動態がより正確に評価できるようにする。

我々はこれまでに HLA-A24 を有する 4 症例の ATL 患者において、同種造血幹細胞移植後の CTL についての検討を行なった。移植後の Tax 特異的 CTL の TCR レパトアの多様性は制限されていること、移植後に特徴的なアミノ酸配列(“ P-D/P-R ”)を有する TCR レパトアを持つ CTL が増加すること、この配列は全ての患者において、そして一人の患者においては移植前後の両方に認められたこと、このアミノ酸配列を有する CTL は患者 HTLV-I 感染細胞に対して強力な細胞傷害活性を有することを報告した。

そこで、本研究では、より長期間の解析を行ない、移植後の臨床経過と CTL クローンの動態を照らし合わせることによって実際に臨床での GVL 効果に最も密接に関連している CTL クローンを同定する。さらに造血幹細胞移植後の GVL 効果に最も重要なレパトアを同定し、将来的な TCR 遺伝子導入 CTL 輸注療法の開発に結びつける。

3. 研究の方法

HLA-A*2402 を有する ATL 患者から、造血幹細胞移植前、および移植後に定期的に採取した骨髄サンプルや末梢血サンプルを用いる。単核球を分離し、HLA-A*2402 HTLV-1 Tax301-309 peptide (SFHSLHLLF) HLA テトラマー (MBL, Tokyo, Japan) を用いて CD3 陽性 CD8 陽性 Tax 特異的 CTL を同定する。Tax 特異的 CTL は FACS Aria (BD Bioscience) を用いて個々の細胞レベルに単離し、T 細胞受容体 (TCR)-鎖の Complementarily determining region 3 (CDR3) 領域のアミノ酸配列を single-cell RT-PCR 法によって決定する。個々のサンプルについて 10%以上の細胞に検出されたレパトアを “ preferred repertoires ” と定義する。

時系列での詳細な解析を行ない、移植後の臨床経過と CTL クローンの動態を照らし合わせることによって実際に臨床での GVL 効果に最も密接に関連している CTL クローンを同定する。

Single-cell RT-PCR の方法

- (1) 移植前後の末梢血および骨髄血単核球を PE 結合 HLA-A*2402 HTLV-1 Tax301-309 (SFHSLHLLF) HLA テトラマー (MBL, Tokyo, Japan) と室温で 30 分培養し、さらに FITC あるいは PerCP-Cy5.5 結合抗 CD3、抗 CD8 モノクローナル抗体 (BD Biosciences, San Jose, CA) で氷冷下で 25 分培養する。
- (2) FBS5%含有 PBS で洗浄後に FACS Aria instruments (BD Biosciences) を用いて

CD3+CD8+ Tax301-309 テトラマー陽性 CTL を PCR チューブあるいはマイクロプレートに直接ソートする。

- (3) PCR チューブ中に single cell にソートされた CTL から、reverse transcriptase で TCR- cDNA を合成する。
- (4) 次に 24 種の TCR- variable region (BV) gene family 特異的プライマーと 2 種類の TCR- constant region 特異的プライマーを用いた 2 段階の semi-nested PCR によって、用いられている BV gene family を同定する。
- (5) BV gene family 特異的プライマーを用いて V-D-J CDR3 領域の遺伝子配列を決定する。

4 . 研究成果

移植後の時系列の調査では、移植後の Tax 特異的 CTL は主に CD45RA-CCR7- effector memory CTL として存在することが判明した。そして single cell でのレパトア解析の結果、2 つのクローンの Tax 特異的 CTL が移植後 3 年以上長期にわたって存在し続けることが示された (J Clin Immunol. 2012;32:1340-1352)。さらにこれらの CTL は他の患者の HTLV-I 感染細胞に対する細胞傷害性も示すことが判明し、細胞療法に用いることができる可能性が高まった (Immunol Lett. 2014;158:120-125)。今後はこれらの CTL の TCR 遺伝子全長をクローニングして健康人 T 細胞に遺伝子導入し、CTL を産生することによって細胞免疫療法を実現することを目指す。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

1. Yukie Tanaka, Hideki Nakasone, Rie Yamazaki, Hidenori Wada, Yuko Ishihara, Koji Kawamura, Kana Sakamoto, Masahiro Ashizawa, Tomohito Machishima, Miki Sato, Kiriko Terasako, Shun-ichi Kimura, Misato Kikuchi, Shinya Okuda, Shinichi Kako, Junya Kanda, Aki Tanihara, Junji Nishida, Yoshinobu Kanda. 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. *Journal of Clinical Immunology* 32:1340-1352,2012
doi: 10.1007/s10875-012-9729-5.

2. Rie Yamazaki, Hideki Nakasone, Yukie Tanaka, Miki Sato, Kiriko Terasako, Hidenori Wada, Yuko Ishihara, Koji Kawamura, Kana Sakamoto, Masahiro

Ashizawa, Tomohito Machishima, Shun-ichi Kimura, Misato Kikuchi, Shinya Okuda, Shinichi Kako, Junya Kanda, Aki Tanihara, Junji Nishida, Yoshinobu Kanda. Allotype analysis to distinguish the origin of varicella-zoster virus immunoglobulin G after allogeneic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 19:1013-1020,2013
doi: 10.1016/j.bbmt.2013.04.007.

3. Yukie Tanaka, Rie Yamazaki, Kiriko Terasako-Saito, Hideki Nakasone, Yu Akahoshi, Hiroshi Nakano, Tomotaka Ugai, Hidenori Wada, Ryoko Yamasaki, Yuko Ishihara, Koji Kawamura, Kana Sakamoto, Masahiro Ashizawa, Miki Sato, Shun-ichi Kimura, Misato Kikuchi, Shinichi Kako, Junya Kanda, Aki Tanihara, Junji Nishida, Yoshinobu Kanda. 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. *Immunology Letters* 158:120-125, 2014
doi: 10.1016/j.imlet.2013.12.016

4. Hideki Nakasone, Yukie Tanaka, Rie Yamazaki, Miki Sato, Kiriko Terasako, Kana Sakamoto, Ryoko Yamasaki, Hidenori Wada, Yuko Ishihara, Koji Kawamura, Tomohito Machishima, Masahiro Ashizawa, Shun-ichi Kimura, Misato Kikuchi, Aki Tanihara, Junya Kanda, Shinichi Kako, Junji Nishida, Yoshinobu Kanda. Single-cell analysis of T-cell receptor-repertoire of HLA-A*2402-restricted cytomegalovirus pp65-specific cytotoxic T-cells in donor-patient pairs undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 49:87-94,2014
doi: 10.1038/bmt.2013.122.

5. Hideki Nakasone, Kiriko Terasako-Saito, Rie Yamazaki, Miki Sato, Yukie Tanaka, Kana Sakamoto, Masakazu Kurita, Ryoko Yamasaki, Hidenori Wada, Yuko Ishihara, Koji Kawamura, Tomohito Machishima, Masahiro Ashizawa, Shun-ichi Kimura, Misato Kikuchi, Aki Tanihara, Junya Kanda, Shinichi Kako, Junji Nishida, Shigeki Yamada and Yoshinobu Kanda. Impact of high-/middle-molecular-weight adiponectin on the synthesis and regulation of extracellular matrix in dermal fibroblasts. *Experimental Hematology* (in press)
doi: 10.1016/j.exphem.2013.12.009.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

神田 善伸 (KANDA, Yoshinobu)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号：30334379

(2)研究分担者

山崎 理絵 (Yamazaki, Rie)
自治医科大学・医学部・助教
研究者番号：80365262