

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08494

研究課題名(和文) HTLV-1特異的CTLが発現するHAM関連遺伝子の探索

研究課題名(英文) Characterization of HTLV-1 specific CTLs detected in HAM patients

研究代表者

菅田 謙治 (Sugata, Kenji)

熊本大学・ヒトレトロウイルス学共同研究センター・講師

研究者番号：10650616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：HLA-A24陽性HAM患者の多くで脳脊髄液中のCD8T細胞はTax抗原を認識することがわかった。シングル解析によって得られたデータセットを用いてGene signature解析を行ったところ、脳脊髄液から由来するTax特異的CD8T細胞は末梢血の細胞に比べてcell cycling, proapoptotic, exhaustionなどのマーカーの発現が増加していることが分かった。HLA-A24拘束性Taxペプチドが2種類あり、HLAマルチマーの染色性に影響を与えることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではHAM患者の脊髄病変に浸潤しているHTLV-1抗原特異的CTLの遺伝子発現プロファイルに基づき、末梢血での同CTLが発現するHAMの発症リスク遺伝子を発見することを目的としている。HTLV-1特異的CTLが発現するHAMの発症リスク遺伝子を探索するため、次世代シーケンサーを用いて脳脊髄液中のCTLの1細胞遺伝子発現解析とTCRレパトア解析を行った。TCR-CDR3やclonotypeに基づき脳脊髄液中のHTLV-1特異的CTLとの比較を行うことでHAMの発症リスク遺伝子群の発見を目指し、それらを利用してHAMの早期発見・治療開始に繋げる。

研究成果の概要(英文)：To understand pathogenesis of HTLV-1-associated inflammatory diseases, we performed integrated single cell analysis using in peripheral blood and cerebrospinal fluid (CSF) cells derived from HAM/TSP patients. Among various cell types, CD8 T cells were increased in the CSF and contained significantly expanded anti-Tax cytotoxic T-lymphocytes (CTLs). Transcriptome analysis demonstrated that anti-Tax CTLs in the CSF showed reduced activation whereas enhanced pro-apoptotic and exhausted phenotype. Furthermore, we found that HLA-A24 presents two different peptides of Tax depending on Tax genotypes. That affects results of HLA multiuser staining in specific CD8 T cells of the infected patients

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：HTLV-1 HAM HLA-A24 Tax 特異的CD8T細胞

### 1. 研究開始当初の背景

CD4T 細胞に感染した HTLV-1 は長い潜伏期間(40-50 年以上)の後、感染者に悪性腫瘍である成人 T 細胞白血病 (ATL) と炎症性疾患である HTLV-1 関連脊髄症(HAM)を惹起する。日本では九州を中心に約 100 万人の HTLV-1 キャリアが存在し、その少数が ATL もしくは HAM を発症すると考えられている。特に脊髄に病変部位を持つ HAM 患者は非常に強い抗 HTLV-1 免疫を持っていることが知られている。しかし、その感染者は体内のウイルスを排除できず、難治性の炎症性疾患を発症することから宿主免疫が HAM 発症の起因に大きく関わっている可能性が予想されている。これまで HAM 患者では HLA class-I のリスクアレル (Jeffery *et al.*, *PNAS*, 1999) に関する報告がなされているものの、発症予測に有用な HAM マーカーは未だに見つかっていない。これまで HAM 患者での病態解析は主に末梢血 T 細胞を用いて行われてきた。しかし、有用な HAM マーカーは見つかっていない。

### 2. 研究の目的

HAM は HTLV-1 が CD4T 細胞に感染することで惹起される。多くの HTLV-1 キャリアは無症状で経過するものの感染者の一部で難治性の疾患を発症することから、その発症には宿主免疫が強く関与している可能性が示唆されている。炎症性疾患である HAM 患者は HTLV-1 抗原に対して強い T 細胞応答を持ち、病巣である脊髄では HTLV-1 感染 CD4T 細胞と HTLV-1 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の浸潤が観察される。HAM の発症予測や病態解析には主に末梢血 T 細胞を用いて行われてきた一方で、これまで有用な HAM マーカーは未だに見つかっていない。申請者はこれまで有用なマーカーが特定されなかったのは「HAM 患者の末梢血と病巣 (脊髄) では病態が異なり、末梢血での T 細胞の機能解析は必ずしも病巣の T 細胞の病態を反映していない」という可能性に着目した。本研究では HAM 患者の脊髄病変に浸潤している HTLV-1 抗原特異的 CTL の遺伝子発現プロファイルに基づき、末梢血での同 CTL が発現する HAM の発症リスク遺伝子を発見することを目的としている。

### 3. 研究の方法

申請者は HTLV-1 特異的 CTL が発現する HAM の発症リスク遺伝子を探索するため、次世代シーケンサーを用いて脳脊髄液中の CTL の 1 細胞遺伝子発現解析と TCR レパトア解析を行った。それらの解析からは TCR clonotype の割合、抗原認識領域を含む TCR 配列や T 細胞エフェクター遺伝子発現などの CTL の網羅的な情報を得る事が出来た。しかしながら、それらの結果からでは膨大な TCR のデータを得られるものの、TCR が認識する HTLV-1 のペプチドを決定することはできない。それを解決するために申請者は近年開発が進んでいる TCRb の構造からその epitope を予想するアルゴリズム解析 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetTCR/> : <https://tcrex.biodatamining.be>) を利用した。それらのアルゴリズム解析を用いることで HTLV-1 抗原を認識し得る TCR を人工

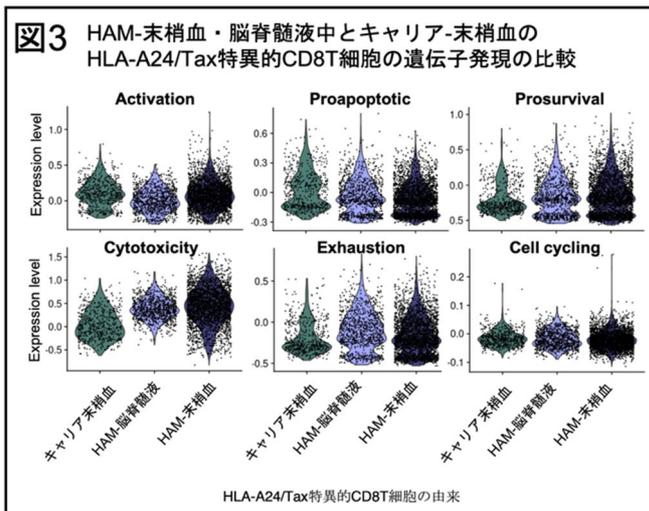
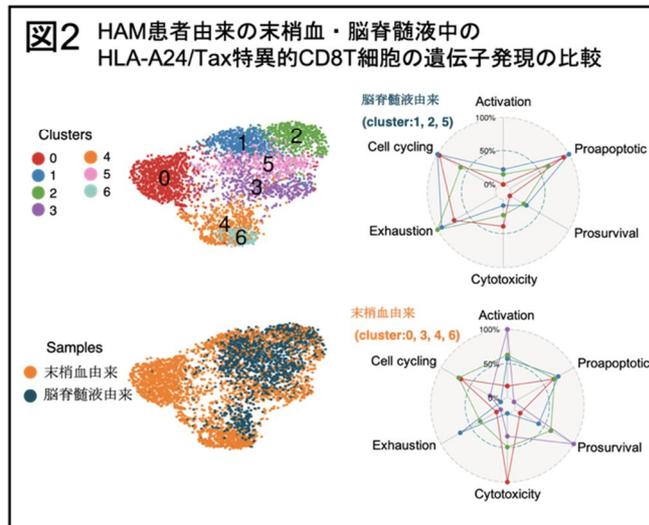
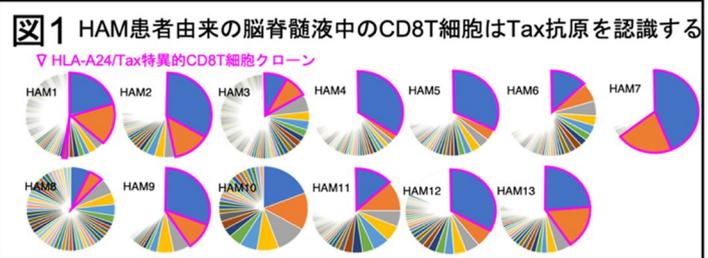
的に作成し、ウイルス抗原を発現する抗原提示細胞で刺激することで HTLV-1 抗原認識の有無を確認した。それらの結果から HTLV-1 特異的 CTL を決定し、病巣部の CTL が発現する遺伝子の特徴を解析した。同様に末梢血 CTL でも 1 細胞遺伝子発現解析と TCR レパトア解析を行い、TCR-CDR3 や clonotype に基づき脳脊髄液中の HTLV-1 特異的 CTL との比較を行うことで HAM の発症リスク遺伝子群の発見を目指した。

#### 4. 研究成果

これまで HLA-A24 陽性 HAM 患者の 1 例で脳脊髄液中の CD8T 細胞は Tax 抗原を認識することがわかった。同様の手法を用いて他の HLA-A24 陽性 HAM 患者で解析を進めたところ、13 例中 12 例で増加している CD8T 細胞クローンが HLA-A24 拘束性に Tax 抗原を認識することがわかった。これまで HAM の発症には感染 CD4T 細胞の浸潤が重要な役割を持つことが想定されていた。これらの結果は HLA-A24 陽性 HAM 患者の病巣部位（脊髄）では感染 CD4T 細胞と同様に抗原特異的 CD8T 細胞が病状の悪化を促進している可能性が予想された（図 1）。

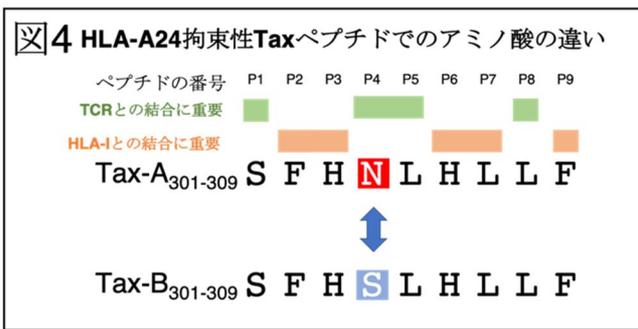
一方で HAM 患者の脳脊髄液と末梢血でのそれらの Tax 特異的 CD8T 細胞の遺伝子発現を比較した。シングル解析によって得られたデータセットを用いて Gene signature 解析を行ったところ、脳脊髄液から由来する Tax 特異的 CD8T 細胞は末梢血の細胞に比べて cell cycling, proapoptotic, exhaustion などのマーカーの発現が増加していることが分かった（図 2）。一方で HTLV-

1 キャリアの末梢血から由来する Tax 特異的 CD8T 細胞とそれらの HAM 患者由来細胞に組み合わせた Gene signature 解析を同様に行った。HAM 患者由来する特異的 CD8T 細胞では Cytotoxicity、Exhaustion、Prosurvial に関与する遺伝子群が活性化していたことがわかり、それらの特定の分子に着目した詳細な解析を今後行う予定にしている。

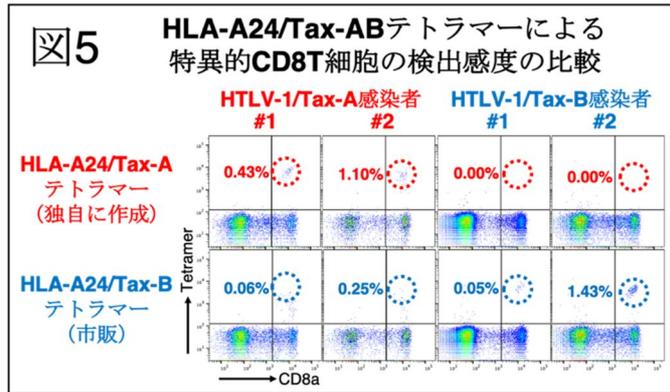


上記の解析の中で HLA-A24 拘束性 Tax ペプチドには2つのバリエーションが存在することが判明した。

これまで Tax には type-A(Tax-A)と-B (Tax-B) が存在することが知られていた。しかし日本国内での Tax-A の頻度の少なさから、主に Tax-B での解析が進められてきた。一方で HAM 患者は Tax-A が多い傾向があることが分かっている。HLA-A24 は Tax<sub>301-309</sub> を抗原提示する。Tax-A と-B のアミノ酸配列の比較を行ったところ、HLA-A24 拘束性 Tax ペプチドの中で 304 番目のアミノ酸が異なることがわかった (Asn(Tax-A)/Ser(Tax-B))。



これまでの解析で 9mer ペプチドの場合、2 番目と 9 番目のアミノ酸が HLA-A24 と結合することが知られており、この Asn/Ser の差異は TCR との結合に影響を与える可能性が示唆された ( 図 4 )。これまで市販の A24/Tax テトラマーは主に Tax-B である。テトラマーを用いた比較では Tax-A 感染者由来 CD8T 細胞は Tax-A に比べ、Tax-B テトラマーを用いた場合にテトラマー陽性細胞が著しく減少することがわかった ( 図 5 )。またその結果は Tax-B での不一致の場合でも観察された。



HLA-A24 拘束性 Tax ペプチドでの 304 番目の Asn/Ser の違いは Tax テトラマーの染色性に違いに影響を及ぼした事から、A24/Tax テトラマーを用いた解析では事前の Tax 遺伝子型の確認が必須と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tan Benjy J. Y., Sugata Kenji, Ono Masahiro, Satou Yorifumi	4. 巻 13
2. 論文標題 HTLV-1 persistence and leukemogenesis: A game of hide-and-seeK with the host immune system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 01-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.991928	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 Tan Benjy J.Y., Sugata Kenji et al.	4. 巻 131
2. 論文標題 HTLV-1 infection promotes excessive T cell activation and transformation into adult T cell leukemia/lymphoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/JCI150472	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 該当する

1. 著者名 Reda Omnia, Monde Kazuaki, Sugata Kenji, Rahman Akhinur, Sakhor Wajihah, Rajib Samiul Alam, Sithi Sharmin Nahar, Tan Benjy Jek Yang, Niimura Koki, Motozono Chihiro, Maeda Kenji, Ono Masahiro, Takeuchi Hiroaki, Satou Yorifumi	4. 巻 7
2. 論文標題 HIV-Tocky system to visualize proviral expression dynamics	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-024-06025-8	査読の有無 無
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 Nakahata Shingo, Enriquez-Vera Daniel, Jahan M. Ishrat, Sugata Kenji, Satou Yorifumi	4. 巻 13
2. 論文標題 Understanding the Immunopathology of HTLV-1-Associated Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma: A Comprehensive Review	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1543 ~ 1543
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom13101543	査読の有無 無
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 Matsuda Kouki, Islam Saiful, Takada Toru, Tsuchiya Kiyoto, Yang Tan Benjy Jek, Hattori Shin-ichiro, Katsuya Hiroo, Kitagawa Kosaku, Kim Kwang Su, Matsuo Misaki, Sugata Kenji, Delino Nicole S., Gatanaga Hiroyuki, Yoshimura Kazuhisa, Matsushita Shuzo, Mitsuya Hiroaki, Iwami Shingo, Satou Yorifumi, Maeda Kenji	4. 巻 1
2. 論文標題 A widely distributed HIV-1 provirus elimination assay to evaluate latency-reversing agents in vitro	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports Methods	6. 最初と最後の頁 100122 ~ 100122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.crmeth.2021.100122	査読の有無 無
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 Matsuo Misaki, Ueno Takaharu, Monde Kazuaki, Sugata Kenji, Tan Benjy Jek Yang, Rahman Akhinur, Miyazato Paola, Uchiyama Kyosuke, Islam Saiful, Katsuya Hiroo, Nakajima Shinsuke, Tokunaga Masahito, Nosaka Kisato, Hata Hiroyuki, Utsunomiya Atae, Fujisawa Jun-ichi, Satou Yorifumi	4. 巻 13
2. 論文標題 Identification and characterization of a novel enhancer in the HTLV-1 proviral genome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-30029-9	査読の有無 無
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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 菅田謙治
2. 発表標題 HAM患者末梢血および脳脊髄液のシングルセル解析によるHAM病態解明と疾患サロゲートマーカーの探索研究
3. 学会等名 第8回日本HTLV-1学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kenji Sugata
2. 発表標題 Integrated single cell analysis of HTLV-1 specific CD8 T cells in peripheral blood and cerebrospinal fluid from HAM patients
3. 学会等名 23rd KUMAMOTO AIDS Seminar
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kenji Sugata
2. 発表標題 Single cell analysis of cerebrospinal cord fluid (CSF) revealed expansion of anti-viral CTLs in HTLV-1-associated myelopathy patients
3. 学会等名 2nd Oxford-Kumamoto U Joint Symposium
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 菅田謙治
2. 発表標題 TCR配列に基づいた末梢血と脳脊髄液中のHTLV-1特異的CD8+T細胞の包括的解析
3. 学会等名 第7回HTLV-1学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菅田謙治
2. 発表標題 HLA-A24拘束性の異なるTaxエピトープを認識する特異的TCRの解析
3. 学会等名 第9回日本HTLV-1学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 菅田謙治、佐藤賢文	4. 発行年 2023年
2. 出版社 日本臨牀社	5. 総ページ数 6
3. 書名 新リンパ腫学	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 抗原ペプチド、核酸、ベクター、HLA/抗原ペプチド複合体、検出試薬、医薬組成物	発明者 佐藤賢文、菅田謙治	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2023-178883	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------