

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460446

研究課題名(和文) HTLV-1、EBV関連リンパ腫におけるウイルス抗原特異的CTLの病態解析

研究課題名(英文) Virus antigen specific CTL in HTLV-1 and EBV associated lymphoma

研究代表者

大島 孝一 (Ohshima, Koichi)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：50203766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：HTLV-1のTaxの発現は、多くのATLL細胞では低下しており、Tax-specific CTLの存在の有無とATLLとの関連ははっきりしていない。また、FoxP3の発現が見られることより、抑制性T細胞由来と考えられているが、抑制性の機能についてはまだ確定されていない。今回、Tax-specific CTLとFoxP3の発現の関連をATLLのリンパ腫において研究を行ったところ、一部の症例で、ATLLのリンパ節病変内にはTax-specific CTLが認められた。また、Tax-specific CTL数はFOXp3陽性の症例では優位に低く、FoxP3による免疫抑制の関与が考えられた。

研究成果の概要(英文)：HTLV-1 Tax has been reported to play an important role in ATLL and to be a target of HTLV-1-specific CTL. However, it is not clear how Tax-specific CTL behave in lymph nodes. We analyzed TAX-specific CTL. Furthermore, ATLL tumor cells are known to be positive for Foxp3 and to have regulatory T-cell (T-reg) like function. We also investigated the relationship between T-reg function and TAX-specific CTL. Immunohistochemical staining of tax protein showed positive lymphoma cells ranged 5% to 80%, and HLA-A24 showed positive cells ranged 1% to 95%. FoxP3 for T-reg were expressed in 0% to 90%. Some of cases showed Tax-specific CTL (HLA-A24-restricted) positive cells and there were inverse correlation between Tax-specific CTL and Foxp3. However, TAX and HLA A24 expression were not associated with CTL and FoxP3. The study showed the possibility that ATLL cells, which expressed TAX of CTL target, evade from CTL-mediated immune control by expression of FoxP3, as regulatory T cell function.

研究分野：病理

キーワード：ATLL HTLV1 TAX FoxP3 T reg CTL HLA A24

1. 研究開始当初の背景

ATLLは、中高年のヒトT細胞白血病ウイルスI型(HTLV-1)感染者の一部に発症する、T細胞の悪性腫瘍である。化学療法に抵抗性で予後不良であり、近年、造血幹細胞移植、抗体療法および抗ウイルス剤などの先進的治療も試みられているが、反応例が限られ、十分な治療効果は得られていない。近年の免疫解析や動物実験結果から、HTLV-1 tax 特異的細胞障害性T細胞(CTL)による免疫応答が抗腫瘍機構の1つであることが示されてきた。HTLV-1のコードする調節蛋白 tax は、感染細胞の維持と腫瘍化に貢献すると考えられており、HTLV-1 特異的 CTL のターゲットの一つであるとされている。また ATLL 患者における骨髄移植後は Tax 特異的 CTL の上昇が GVL 効果と相関することが報告されており、Tax 特異的 CTL が、ATLL の腫瘍免疫に重要であると考えられている。【研究背景；②HTLV-I ウイルスと ATLL：これまでの研究】HTLV-I 遺伝子 (HBZ, Tax) の ATLL 腫瘍発生・臨床病理への関与の解明：(2008-10) 年度文部科学省科学研究費補助金 基盤研究 (B) (一般) (代表) にて以下の点を明らかにしてきた。(概要)：成人 T 細胞性白血病/リンパ腫 (ATLL) の発症において、HTLV-1 の tax 遺伝子が中心的な役割を担うと考えられてきたが、新規に、HBZ 1 (HTLV-1 bZIP factor) 遺伝子が、tax を抑制する可能性が示唆されている。HBZ の発現を解析したところ、ATLL 培養細胞やモデルマウスで発現が確認でき、ATLL 症例でも HBZ の発現が確認できた。一方、Tax の発現は少数であった。また、制御性 T 細胞に関連した FoxP3 の発現が、ATLL 症例の約 3 割でみられ、これらの症例には、高率に日和見感染症がみられた。

1. 研究開始当初の背景 (1)

①Tax と HBZ の機能、②HBZ transgenic mouse (京都大学・松岡らとの共同研究) について、HTLV-1 のコードする調節遺伝子 tax 遺伝子が、ATLL の腫瘍発生において、中心的な役割を担うと考えられてきた。Tax は細胞内で種々の機能を発揮するが、これは Tax がいろいろな細胞性タンパク質と相互作用するためであると考えられる。Tax の多彩な機能の例として、Tax によるアポトーシス制御、Tax によるエピジェネティック転写制御などがある。しかしながら、Tax の発現は約 60% の ATLL で検出されない。(2) 一方、プロウイルスのマイナス鎖によってコードされる HBZ 遺伝子は、すべての ATLL 細胞で発現し増殖にかかわることを見いだされており、この HBZ は tax を抑制する可能性が示唆されている (Satou Y et al. PNAS 2006;103:720)。共同研究の HBZ のトランスジェニックマウスでは CD4 陽性 T リンパ球数の増加を認め、HBZ が生体内でも増殖促進効果を有し、FoxP3 の発現が誘導されている。(PLoS Pathogens Volume 7, Issue 2, February 2011, Article number e1001274)

(3) ATLL の腫瘍細胞は CD4+CD25+ の表面形質を示し、また Treg に特徴的な蛋白質、マ-

カ-FoxP3 も約半数の症例で発現を我々は確認し、ATLL の細胞由来、細胞機能、特に抑制機能に着目している。(Karube K et al. Br J Haematol. 2004;126::81)

2. 研究の目的

ATLL の発症においては、HTLV-I の Tax の発現が感染細胞の腫瘍化において、アポトーシスの抑制、細胞増殖を介して重要であると、従来、考えられてが、Tax の発現は、多くの ATLL 細胞では低下しており、これによる Tax-specific CTL の存在の有無と ATLL との関連ははっきりしていない。また、ATLL の由来は、CD4+CD25+ T 細胞と考えられていたが、最近の研究より FoxP3 の発現が見られることより、抑制性 T 細胞由来と考えられているが、抑制性の機能についてはまだ確定されていない。今回、Tax-specific CTL と FoxP3 の発現の関連を ATLL のリンパ腫において研究を行った。

3. 研究の方法

研究方法としては、病理診断のため採取された保存検体を使用し HLA-A*2402 MHC デキストラマーを用いた蛍光・免疫染色を行う。MHC デキストラマーは MHC (major histocompatibility complex) 分子複合体の形で提示される抗原特異的ペプチドを認識する。これを利用して、同じ特異性の T 細胞受容体を持つ T 細胞の集団を検出できる。LMP-1 (EBV 関連蛋白) や tax (HTLV-I 関連蛋白) ペプチドを結合した MHC デキストラマーにより、各種ウイルス関連リンパ腫の発生に関わる特異的 CTL を組織標本上で同定することができる。本手法により、ウイルス関連リンパ腫の臨床病理学的相違について検討する。HLA-A2402* MHC デキストラマーは細胞表面に HLA-A*2402 を発現する検体で使用可能であるため、HLA-A*2402 発現を PCR (polymerase chain reaction) 法にて確認する。また併せて特異的癌抗原についても同様の方法にて検索を行う。あわせて、免疫抑制作用を有する制御性 T (Treg) のマスター蛋白である FoxP3 の免疫染色を行い解析をおこなった。

1) 症例は、病理および臨床診断で ATLL と確定できた症例を選択した。2) PCR 法で HLA-A24 の確定できた 14 例の ATLL の凍結材料を用いた。3) MHC dextramer により HLA-A24 restricted Tax-specific CTL を蛍光染色を、凍結材料からの薄切切片で行った。4) CD20, CD3, CD4, CD8, TIA-1, FOXP3 の免疫染色を凍結材料からの薄切切片で行った。5) ホルマリン固定材料で、CD20, CD3, CD45RO, CD4, CD8, TIA-1, FoxP3 の免疫染色も行った。

4. 研究成果

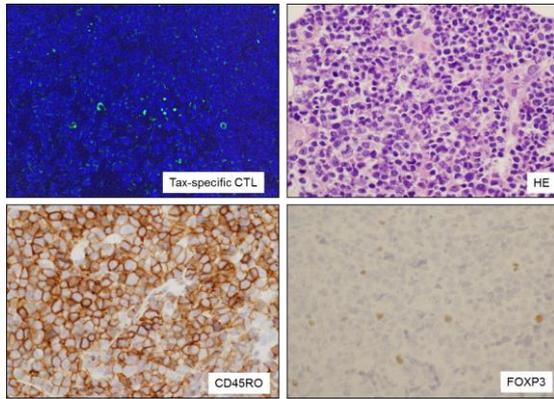


図 Case2: Tax-specific CTL が蛍光染色にて散在 (4 個/mm²) しており、HE の形態像では Large cell variant であることがわかる。また CD45RO 陽性であり T 細胞由来である。FOXP3 陽性細胞が全体の 2%ほどみられる。

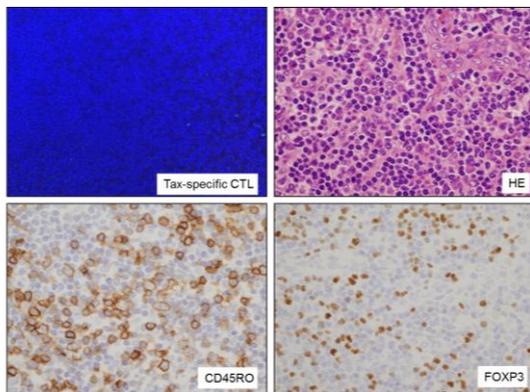


図 Case6: Tax-specific CTL が蛍光染色にてほとんどなく、HE の形態像では small cell variant であることがわかる。また CD45RO 陽性であり T 細胞由来である。FOXP3 陽性細胞が全体の 40%ほどみられる。

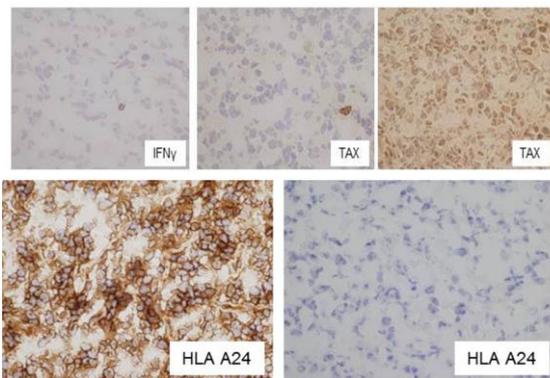


図 免疫染色: IFN γ は陰性で、TAX のタンパク発現は、少ないものもあるが、多い症

例もみられる。症例によっては HLA A24 の発現がみられる症例と消失した症例がみられる。

mRNA for TAX, HBZ in RT-PCR

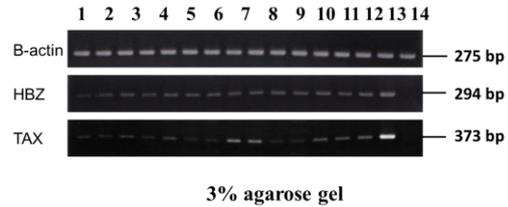


図 RT-PCR: すべての症例の HBZ の発現がみられる。TAX の発現はすべての症例がみられるが、強弱がみられる。

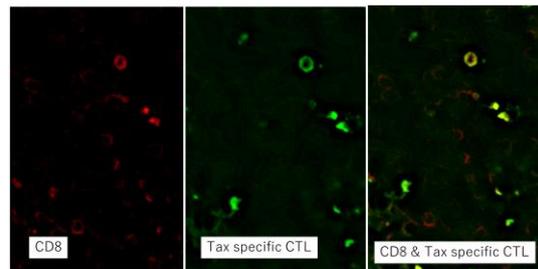


図 蛍光染色: CD8 陽性細胞の一部は TAX specific CTL であることが、二重染色で確認できる。

Case	Sex	Age	Morphology	Immunostaining							TAX (Rt-PCR) (PCR)	HLA-A24 (PCR)	
				CD3 (%)	CD4 (%)	CD8 (%)	Foxp3 (%)	HLA-A24 (%)	INP γ (/mm ²)	Tax:CTL (/mm ²)			TAX (%)
1	M	76	Large	34	100	0	10	50	0.5	4	10	+	+
2	M	55	Large	24	90	80	2	95	0.5	4	6	+	+
3	F	69	Small	90	100	0	90	95	0	0	14	+	+
4	F	72	Small	25	100	0	20	95	0	6	18	+	+
5	M	62	Small	70	60	70	50	95	1	0	9	+	+
6	F	76	Small	90	100	0	40	0	0	0	18	+	+
7	M	73	Large	100	100	90	10	80	1	2	18	+	+
8	F	80	Large	0	100	0	2	90	2.5	0	2	+	+
9	M	75	Small	90	100	90	40	10	0.5	0	6	+	+
10	F	71	Small	50	100	0	5	10	0.5	6	6	+	+
11	F	83	Large	70	100	0	5	80	1	8	8	+	+
12	M	61	Large	5	100	0	7	80	0.5	7	4	+	+
13	M	69	Anaplastic	10	100	0	7	5	3.5	5	12	+	+
14	F	72	Large	100	100	100	10	10	1	4	2	+	+
15	F	66	Large	50	100	0	0	90	0.5	8	3	+	+

表 1

		Tax-CTL(mean)
FOXP3 expression	FOXP3 positive rate>30%	0
	FOXP3 positive rate<30%	4.6
HLA-A24 expression	HLA-A24 positive rate>30%	3.4
	HLA-A24 positive rate<30%	3
TAX expression	TAX positive rate>10%	2.8
	TAX positive rate<10%	3.6
Morphology	Small cell predominant	2
	Large cell predominant	4
	Anaplastic variant	5

表 2

結果

- 一部の症例で、ATLL のリンパ節病変内には Tax-specific CTL が認められた。
 - Tax-specific CTL 数は FOX p 3 陽性の症例では優位に低く、FOX p 3 による免疫抑制の関与が考えられた。TAX, HLA-A24 陽性率と Tax-specific CTL 数に相関は見られなかった。
 - 同面積で比較した INF γ 陽性細胞数は Tax-specific CTL 数を下回った。Tax-specific CTL 活性は低下していると考えられた。
- 以上のことより、ATLL 患者のリンパ腫細胞では、TAX, HLA-A24 陽性細胞がすべての症例で見られるため、Tax-specific CTL は誘導されるものの、FOX p 3 の発現、HLA-A24、TAX の発現低下により CTL による免疫のコントロールから回避している可能性が考えられた。

考察

ATLL の発症においては、HTLV-I の Tax の発現が感染細胞の腫瘍化において、アポトーシスの抑制、細胞増殖を介して重要であると、従来、考えられてが、Tax の発現は、多くの ATLL 細胞では低下しており、これによる Tax-specific CTL の存在の有無と ATLL との関連ははっきりしていない。また、ATLL の由来は、CD4+CD25+ T 細胞と考えられていたが、最近の研究より FoxP3 の発現が見られることより、抑制性 T 細胞由来と考えられているが、

抑制性の機能についてはまだ確定されていないとされていたが、今回の研究により、ATLL のリンパ節病変内には Tax-specific CTL が認められ、また、Tax-specific CTL 数は、形態との関連はみられなかったが、FOX p 3 陽性の症例では優位に低い傾向がみられたことより、FOX p 3 による免疫抑制の関与が考えられた。今後、ワクチン療法の開発においての検討が期待される。

(Detection of Tax-specific CTLs in lymph nodes of adult T-cell leukemia/lymphoma patients and its association with Foxp3 positivity of regulatory T-cell function. AYAKO ICHIKAWA, HIROAKI MIYOSHI, FUMIKO ARAKAWA, JUNICHI KIYASU, KENSAKU SATO, DAISUKE NIINO, YOSHIZO KIMURA, MAKI YOSHIDA, RIKO KAWANO, HIROKO MUTA, YASUO SUGITA and KOICHI OHSHIMA ONCOLOGY LETTERS 13: 4611-4618, 2017)

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 23 件)

- 1). Prognostic impact of cytogenetic abnormalities in children and adolescents with mature B-cell non-Hodgkin lymphoma: A report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG). Sekimizu M, Mori T, Kikuchi A, Mitsui T, Sunami S, Kobayashi R, Fujita N, Inada H, Takimoto T, Saito AM, Watanabe T, Fujimoto J, Nakazawa A, Ohshima K, Horibe K, Tsurusawa M; Lymphoma Committee of the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Pediatr Blood Cancer*. 2015 Jul;62(7):1294-6.
- 2). Analysis of Wnt and β -catenin Expression in Advanced Colorectal Cancer. Yoshida N, Kinugasa T, Ohshima K, Yuge K, Ohchi T, Fujino S, Shiraiwa S, Katagiri M, Akagi Y. *Anticancer Res*. 2015 Aug;35(8):4403-10.
- 3). Interferon- γ Promotes Inflammation and Development of T-Cell Lymphoma in HTLV-1 bZIP Factor Transgenic Mice. Mitagami Y, Yasunaga J, Kinoshita H,

- Ohshima K, Matsuoka M. *PLoS Pathog.* 2015 Aug 21;11(8):e1005120. doi:
- 4). Thymoma in Patient with Myasthenia Gravis Has Significantly Fewer Forkhead Box P3 Positive Lymphocytes than that without One. Nishi T, Yokoyama S, Takamori S, Matsuo T, Murakami D, Akagi Y, Ohshima K. *Kurume Med J.* 2015;61(3-4):65-71.
 - 5). Low incidence of MYC/BCL2 double-hit in Burkitt lymphoma. Yoshida M, Ichikawa A, Miyoshi H, Kiyasu J, Kimura Y, Niino D, Ohshima K. *Pathol Int.* 2015 Sep;65(9):486-9.
 - 6). Clinicopathological features of double-hit B-cell lymphomas with MYC and BCL2, BCL6 or CCND1 rearrangements. Yoshida M, Ichikawa A, Miyoshi H, Kiyasu J, Kimura Y, Arakawa F, Niino D, Ohshima K. *Pathol Int.* 2015 Oct;65(10):519-27.
 - 7). Expression of programmed cell death ligand 1 is associated with poor overall survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. Kiyasu J, Miyoshi H, Hirata A, Arakawa F, Ichikawa A, Niino D, Sugita Y, Yufu Y, Choi I, Abe Y, Uike N, Nagafuji K, Okamura T, Akashi K, Takayanagi R, Shiratsuchi M, Ohshima K. *Blood.* 2015 Nov 5;126(19):2193-201.
 - 8). A High ROR γ T/CD3 Ratio is a Strong Prognostic Factor for Postoperative Survival in Advanced Colorectal Cancer: Analysis of Helper T Cell Lymphocytes (Th1, Th2, Th17 and Regulatory T Cells). Yoshida N, Kinugasa T, Miyoshi H, Sato K, Yuge K, Ohchi T, Fujino S, Shiraiwa S, Katagiri M, Akagi Y, Ohshima K. *Ann Surg Oncol.* 2016 Mar;23(3):919-27
 - 9). CCR4 frameshift mutation identifies a distinct group of adult T cell leukaemia/lymphoma with poor prognosis. Yoshida N, Miyoshi H, Kato T, Sakata-Yanagimoto M, Niino D, Taniguchi H, Moriuchi Y, Miyahara M, Kurita D, Sasaki Y, Shimono J, Kawamoto K, Utsunomiya A, Imaizumi Y, Seto M, Ohshima K. *J Pathol.* 2016 Apr;238(5):621-6.
 - 10). Analysis of the BRAFV600E mutation in 19 cases of Langerhans cell histiocytosis in Japan. Sasaki Y, Guo Y, Arakawa F, Miyoshi H, Yoshida N, Koga Y, Nakashima K, Kurita D, Niino D, Seto M, Ohshima K. *Hematol Oncol.* 2016 Apr 4. doi: 10.1002/hon.2293. [Epub ahead of print]
 - 11) BRAF V600E mutation correlates with suppressive tumor immune microenvironment and reduced disease-free survival in Langerhans cell histiocytosis. Zeng K, Wang Z, Ohshima K, Liu Y, Zhang W, Wang L, Fan L, Li M, Li X, Wang Y, Yu Z, Yan Q, Guo S, Wei J, Guo Y. *Oncoimmunology.* 2016 Jun 14;5(7):e1185582.
 - 12). A Clinicopathologic Study of Lennert Lymphoma and Possible Prognostic Factors: The Importance of Follicular Helper T-cell Markers and the Association With Angioimmunoblastic T-cell Lymphoma. Kurita D, Miyoshi H, Yoshida N, Sasaki Y, Kato S, Niino D, Sugita Y, Hatta Y, Takei M, Makishima M, Ohshima K. *Am J Surg Pathol.* 2016 Sep;40(9):1249-60.
 - 13). New mouse model of acute adult T-cell leukemia generated by transplantation of AKT, BCLxL, and HBZ-transduced T cells. Kasugai Y, Yoshida N, Ohshima K, Matsuo K, Seto M, Tsuzuki S. *Cancer Sci.* 2016 Aug;107(8):1072-8.
 - 14). BRAFV600E and MAP2K1 mutations in Langerhans cell histiocytosis occur predominantly in children. Zeng K, Ohshima K, Liu Y, Zhang W, Wang L, Fan L, Li M, Li X, Wang Z, Guo S, Yan Q, Guo Y. *Hematol Oncol.* 2016 Sep 6. doi: 10.1002/hon.2344. [Epub ahead of print]
 - 15). Prognostic Value of Programmed Death Ligand 1 and Programmed Death 1 Expression in Thymic Carcinoma. Yokoyama S, Miyoshi H, Nakashima K, Shimono J, Hashiguchi T, Mitsuoka M, Takamori S, Akagi Y, Ohshima K. *Clin Cancer Res.* 2016 Sep 15;22(18):4727-34.
 - 16). Clinicopathologic and Prognostic Implications of Programmed Death Ligand 1 Expression in Thymoma. Yokoyama S, Miyoshi H, Nishi T, Hashiguchi T, Mitsuoka M, Takamori S, Akagi Y, Kakuma T, Ohshima K. *Ann Thorac Surg.* 2016 Apr;101(4):1361-9.
 - 17). PD-L1 expression on neoplastic or stromal cells is respectively a poor or good prognostic factor for adult T-cell leukemia/lymphoma. Miyoshi H, Kiyasu J, Kato T, Yoshida N, Shimono J, Yokoyama S, Taniguchi H, Sasaki Y, Kurita D, Kawamoto K, Kato K, Imaizumi Y, Seto M, Ohshima K. *Blood.* 2016 Sep 8;128(10):1374-81.
 - 18). MYC translocation and/or BCL 2

protein expression are associated with poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. Kawamoto K, Miyoshi H, Yoshida N, Nakamura N, Ohshima K, Sone H, Takizawa J. *Cancer Sci.* 2016 Jun;107(6):853-61.

19). An Epstein-Barr virus susceptible immature T-cell line, WILL4, established from a patient with T-lymphoblastic lymphoma bearing CD21 and a clonal EBV genome. Hosoi H, Imadome KI, Tamura S, Kuriyama K, Murata S, Yamashita Y, Mushino T, Oiwa T, Kobata H, Nishikawa A, Nakakuma H, Hanaoka N, Isobe Y, Ohshima K, Sonoki T. *Leuk Res.* 2017 Apr;55:1-5.

20). Six Cases of CD20-Positive Adult T-Cell Leukemia. Kawano R, Niino D, Ohshima K. *J Clin Exp Hematop.* 2016;56(2):119-125.

21). Composite lymphoma of peripheral T-cell lymphoma and Hodgkin lymphoma, mixed cellularity type; pathological and molecular analysis. Ichikawa A, Miyoshi H, Yamauchi T, Arakawa F, Kawano R, Muta H, Sugita Y, Akashi K, Ohshima K. *Pathol Int.* 2017 Apr;67(4):194-201.

22). Hematopoietic stem cell transplantation in advanced cutaneous T-cell lymphoma. Saruta H, Ohata C, Muto I, Imamura T, Oku E, Ohshima K, Nagafuji K, Nakama T. *J Dermatol.* 2017 Apr 9. doi: 10.1111/1346-8138.13848. [Epub ahead of print]

23). Clinicopathological, Cytogenetic, and Prognostic Analysis of 131 Myeloid Sarcoma Patients. Kawamoto K, Miyoshi H, Yoshida N, Takizawa J, Sone H, Ohshima K. *Am J Surg Pathol.* 2016 Nov;40(11):1473-1483.

[学会発表] (計 1 件)

Detection of Tax-specific cytotoxic T lymphocyte in lymph nodes of adult T-cell leukemia/lymphoma Ayako Ichikawa, Junichi Kiyasu, Fumiko Arakawa, Yoshizo Kimura, Masanori Takeuchi, Maki Yoshida, Hiroaki Miyoshi, Kensaku Sato, Daisuke Niino, Yasuo Sugita, Koichi Ohshima 日本血液学会 2104

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大島 孝一 (OHSHIMA Koichi)

久留米大学 医学部 病理 教授

研究者番号：50203766

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()