



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1502号
学位記番号	第1074号
氏名	成田 朋子
授与年月日	平成 27年 7月 24日
学位論文の題名	HTLV-1 bZIP factor-specific CD4 T cell responses in adult T cell leukemia/lymphoma patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (ATLL 患者における HBZ 特異的細胞免疫応答の解析：移植後 GvL への関与) The Journal of Immunology. 2014 February 1, 2014;192:940-947
論文審査担当者	主査： 山崎 小百合 副査： 新実 彰男, 飯田 真介

論文内容の要旨

【背景】成人 T 細胞性白血病/リンパ腫 (ATL) は、HTLV-1 感染により引き起こされる悪性腫瘍であり、現在有効な治療法は確立されていない。長期生存の唯一の選択肢としては同種造血幹細胞移植のみであり、移植後の移植片対白血病効果 (GVL) が大きな役割を果たしている。

HBZ は HTLV-1 感染直後の細胞から、完全に腫瘍化した ATL 細胞まで、全ての時期の HTLV-1 感染細胞に発現するウイルス抗原である。T 細胞の腫瘍化に必須であり、ATL 免疫療法における標的抗原として期待されている。しかしながら、HTLV-1 免疫応答における HBZ の位置づけ、役割は明らかではなく、その解明が望まれている。そこで、HTLV-1 HBZ を標的とした細胞免疫療法、ATL 発症抑制の確立を目指すために、ATL 患者における HBZ に対する免疫応答を詳細に検討した。

【方法】ヒト T 細胞は T 細胞受容体を介し、HLA (ヒト白血球抗原) に提示された 8~12 アミノ酸からなる特定のペプチドを認識する。10 アミノ酸ずつを共有する 20 アミノ酸からなり、HBZ タンパク全長 (206 アミノ酸で構成) をカバーする合計 20 個のオーバーラップペプチドを合成し、これら各々のオーバーラップペプチドに対する、特異的免疫応答を細胞内 IFN γ の検出を指標により行った。本実験で HBZ 特異的エピトープを含むオーバーラップペプチドを絞り込む。引き続きオーバーラップペプチドを、N 端側および C 端側から 1 残基ずつ短くしたペプチドとの共培養で、T 細胞が特異的応答を示す最短長の配列を決定し、HBZ 特異的エピトープ 8-12 アミノ酸を特定した。

次に HBZ 特異的エピトープの HLA 拘束性を決定する。HLA 型の判明している ATL 細胞株を effector として用いて特異的免疫応答を確認し、HLA 拘束性の HLA アレルを推定し、さらに HLA アレルの抗体を用いたブロッキング実験で拘束性の確定を試みた。

【結果】骨髄非破壊的前処置併用の同種移植後寛解を維持している 5 症例の ATL 末梢血単核球を用いて検討したところ、ATL 症例#1 において、オーバーラップペプチド#12 に対する HBZ 特異的免疫応答を確認できた。引き続きオーバーラップペプチド#12 の塩基配列から短縮していき、HBZ 特異的免疫応答を示す最小塩基配列として RRRRAEKKAADVA (HBZ114-125) が同定された。引き続き ATL 細胞株を用いた HLA 拘束性の確定を試みたところ、HLA-DRB1*15:01 または HLA-DRB1*15:02 に拘束されていることが判明した。引き続き、HLA-DRB1*15:01 または HLA-DRB1*15:02 をもつ ATL キャリア 5 例、寛解期 ATL のうち非同種移植例の 7 例と同種移植後例の 7 例に対し、末梢血単核球に対するオーバーラップペプチド#12 による HBZ 特異的免疫応答を確認したところ、寛解期 ATL の同種移植後例の 3 例のみに HBZ 特異的免疫応答を確認できた。このうち ATL#2 の例では、移植前後の末梢血単核球で比較することができ、移植前では HBZ 特異的免疫応答は確認できなかった。

【考察】HBZ 特異的 CD4 陽性 T 細胞を誘導することができた。エピトープとして HBZ に由来する 12 アミノ酸配列 (RRRAEKKAADVA) が同定され、拘束 HLA は HLA-DR*15:01/*15:02 であると判明した。現在までのところ HBZ 特異的 T 細胞を誘導し得たのは同種骨髄移植後寛解期の ATL 患者のみであり、HBZ に対する特異免疫応答は移植後 GVL への関与が示唆された。

論文審査の結果の要旨

【背景】成人 T 細胞性白血病/リンパ腫 (ATLL) は、HTLV-1 感染により引き起こされる悪性腫瘍である。現時点では長期生存のための選択肢は同種造血幹細胞移植のみであり、移植片対白血病効果 (Graft versus Leukemia:GvL) が大きな役割を果たしている。HBZ は HTLV-1 感染直後の細胞からクローナルな増殖を示す ATLL 細胞まで、HTLV-1 感染細胞全てに発現するウイルス抗原であるため、ATLL に対する免疫療法における標的抗原として期待されている。そこで、HBZ を標的とした細胞免疫療法、無症候性キャリアからの ATLL 発症抑制を目指すために、ATLL 患者における HBZ に対する免疫応答の有無を検討した。【方法】ヒト T 細胞は T 細胞受容体を介し、HLA 上に提示された 8~12 アミノ酸からなる特定のペプチドを認識する。HBZ 蛋白全長 (206 アミノ酸) を網羅する 20 アミノ酸からなる計 20 個のオーバーラップ・ペプチドを合成し、各々のペプチドに対する特異的免疫応答を細胞内 IFN γ の発現を指標にして検出し、HBZ 特異的エピトープを特定する。次に、HLA 型の判明している HBZ 発現を有する ATLL 細胞株を effector として用いて特異的免疫応答を確認し、HLA 拘束性の HLA アレルを推定する。【結果】同種造血幹細胞移植後に寛解を維持している ATLL 患者#1 において、オーバーラップ・ペプチド#12 に対する HBZ 特異的な CD4 陽性 T 細胞の免疫応答を確認した。HBZ 特異的免疫応答を示す最小塩基配列として RRRRAEKKAADVA (HBZ114-125) を同定した。このエピトープは HLA-DRB1*15:01 または HLA-DRB1*15:02 に拘束されていることが判明した。これらの HLA ハプロタイプをもつ ATLL キャリア 5 例、寛解期 ATLL 患者のうち非同種移植例 7 例と同種移植後の 7 例のうちで、HBZ 特異的免疫応答を確認できたのは寛解期 ATLL の同種移植例 3 例のみであった。移植後に HBZ 特異的免疫応答が確認された ATLL 患者#2 においては、移植前の末梢血単核球でも検討したが、移植前には HBZ 特異的免疫応答は確認できなかった。【考察】同種造血幹細胞移植を受けて寛解に至った ATLL 患者の末梢血単核球から、HBZ 特異的 CD4 陽性 T 細胞を誘導することができた。エピトープとして HBZ に由来する 12 アミノ酸配列 (RRRAEKKAADVA) が同定され、HLA-DR*15:01/*15:02 に拘束されていることが判明した。HBZ 特異的 T 細胞を誘導し得たのは同種造血幹細胞移植後寛解期にある ATLL 患者のみであり、この HBZ に特異的な免疫応答は移植後 GvL への関与が示唆された。

【審査の内容】主査の山崎教授より、末梢血単核細胞の分離培養から FACS 解析までの具体的な方法、HBZ に対する CD8 陽性 T 細胞応答の有無、蛋白レベルでの HBZ 発現確認の有無、同種造血幹細胞移植後の長期寛解患者では HBZ 特異的免疫応答が維持されているのかなど 7 項目、第一副査の新実教授からは ATLL の国際的な診断基準と病型分類、少数例の同種造血幹細胞移植患者と非移植患者の結果から普遍的な結論を導けるのかなど 6 項目、そして第二副査の飯田からは ATLL の病型毎の治療方針、骨髄破壊的造血幹細胞移植と骨髄非破壊的造血幹細胞移植の違いと使い分けなど 3 項目の専門領域における質問がなされた。各々の質問に対して学位申請者からは概ね満足の出来る回答が得られ、学位論文の趣旨および臨床的意義を十分に理解していることが確認された。本研究により、同種造血幹細胞移植を受けた ATLL 患者において HTLV-1 由来の HBZ に対するクラス II MHC を介した CD4 陽性 T 細胞応答の存在を初めて証明し、移植片対白血病効果 (GvL) のバイオマーカーとなる可能性を示したことには重要な意義がある。以上より、審査委員会は申請者に対して博士 (医学) の称号を与えるに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 山崎 小百合 教授 副査 新実 彰男 教授、飯田 真介 教授