

# 論 文 要 旨

## Anti-HTLV-1 Tax antibody and Tax-specific cytotoxic T lymphocyte are associated with a reduction in HTLV-1 proviral load in asymptomatic carriers

〔 抗 HTLV-1 Tax 抗体と Tax 特異的細胞傷害性 T リンパ球は無症候性キャリアにおいて HTLV-1 プロウイルス量の減少に関与する 〕

秋元 正樹

【序論および目的】従来の研究において抗 HTLV-1 抗体(ATLA)価高値と抗 HTLV-1 Tax 抗体反応低値は成人 T 細胞白血病(ATL)発症の危険因子であると指摘されてきた。本研究においてはこれらの抗体と、Tax 特異的細胞傷害性 T リンパ球(CTL)、HTLV-1 プロウイルス量などの因子との関係を分析し、ATL 発症に与える影響を考察した。

【材料および方法】45 例のキャリアが ATLA 抗体価と抗 Tax 抗体反応性を ELISA で測定された。加えて、45 例のうち HLA-A\*0201 かつ/または A\*2402 を保有している 43 例において Tax 特異的 CTL(HLA-A\*0201 拘束性 Tax11-19 特異的 CTL と HLA-A\*2402 拘束性 Tax301-309 特異的 CTL) frequency を HTLV-1/HLA テトラマーを用いて測定し、44 例において real-time PCR を用いて HTLV-1 プロウイルス量を測定した。これらの因子間の相関性を統計学的に分析した。

### 【結 果】

- ① 抗 Tax 抗体反応性と ATLA 抗体価の間には相関性が認められなかった。
- ② HLA-A\*0201 保有キャリアにおいて ATLA 抗体価と Tax11-19 特異的 CTL frequency の間には明らかな相関性がなかったが、抗 Tax 抗体陽性群における Tax11-19 特異的 CTL frequency は抗 Tax 抗体陰性群に比べて有意に高値であった。

- ③ HLA-A\*2402 保有キャリアにおいて ATLA 抗体価と Tax301-309 特異的 CTL frequency の間には有意な正の相関が認められ、抗 Tax 抗体陽性群における Tax301-309 特異的 CTL frequency も抗 Tax 抗体陰性群に比べて有意に高値であった。
- ④ ATLA 抗体価と HTLV-1 プロウイルス量の間には有意な正の相関が見られた。しかし、抗 Tax 抗体陽性群におけるプロウイルス量は抗 Tax 抗体陰性群と変わらないかあるいはやや減少しているように認められた。
- ⑤ 全症例を Tax11-19 特異的 CTL 陽性群と陰性群に分けると HTLV-1 プロウイルス量は CTL 陽性群において有意に低値であった。しかし、同様に全症例を Tax301-309 特異的 CTL 陽性群と陰性群に分けてもプロウイルス量に有意差は認められなかった。Tax11-19 特異的 CTL は Tax301-309 特異的 CTL より frequency が低値であるにもかかわらず Tax301-309 特異的 CTL より強力にプロウイルスを減少させると考えられた。
- ⑥ しかし、HLA-A\*2402 のみ陽性のキャリアにおいて Tax301-309 特異的 CTL frequency 低値群と高値群に分けると HTLV-1 プロウイルス量は高値群において有意に低値であり、Tax301-309 特異的 CTL も frequency が高いほうがより効果的にプロウイルス量を減少させることが分かった。

【結論及び考察】Tax 蛋白に対する液性免疫と細胞性免疫の強い相関性が HTLV-1 キャリアにおいて証明された。抗 Tax 抗体陽性キャリアにおいては Tax 特異的 CTL frequency が高値であり、そのため HTLV-1 プロウイルス量を減少させ、ATL 発症リスクを軽減させる可能性が示唆された。また、Tax 特異的 CTL の ‘efficiency’ のみならず ‘frequency’ も HTLV-1 プロウイルス量を減少させる因子になることが証明された。

(Journal of Medical Virology 2007 年掲載予定)

# 論文審査の要旨

報告番号	医研第 655 号	氏名	秋元 正樹
審査委員	主査	出雲 周二	
	副査	栄鶴 義人	河野 嘉文

Anti-HTLV-1 Tax antibody and Tax-specific cytotoxic T lymphocyte are associated with a reduction in HTLV-1 proviral load in asymptomatic carriers

(抗 HTLV-1 Tax 抗体と Tax 特異的細胞傷害性 T リンパ球は無症候性キャリアにおいて HTLV-1 プロウイルス量の減少に関与する)

従来の研究において抗 HTLV-1(ATLA)抗体価高値と抗 HTLV-1 Tax 抗体低値は成人 T 細胞白血病/リンパ腫(ATLL)発症の危険因子であると指摘されてきた。今回の研究は、これらの抗体と、Tax 特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL), HTLV-1 プロウイルス量との関係を分析し、ATLL 発症に与える影響を検討することを目的としている。

本研究では、2004 年 9 月から 2005 年 5 月までに鹿児島大学病院血液・膠原病内科で無症候性 HTLV-1 キャリアと診断された 45 例の末梢血を研究に用いている。ATLA 抗体価を ECLIA 法により、抗 Tax 抗体を ELISA 法により測定した。さらに、45 例のうち HLA-A\*0201 かつ/または A\*2402 を保有している 43 例において HLA-A\*0201 拘束性 Tax11-19 特異的 CTL と HLA-A\*2402 拘束性 Tax301-309 特異的 CTL 検出頻度(frequency)を HTLV-1/HLA テトラマーを用いたフローサイトメトリーで測定した。44 例において real-time PCR を用いて HTLV-1 プロウイルス量を測定した。これらの因子間の相関性を統計学的に分析した。

本研究で得られた新知見は次の 4 点である。

1. ATLA 抗体価と抗 Tax 抗体の間には相関が認められなかった。
2. HLA-A\*0201 保有キャリアにおいて ATLA 抗体価と Tax11-19 特異的 CTL frequency の間には明らかな相関性がなかったが、抗 Tax 抗体陽性群における Tax11-19 特異的 CTL frequency は陰性群に比べて有意に高値であった。HLA-A\*2402 保有キャリアにおいては、ATLA 抗体価と Tax301-309 特異的 CTL frequency の間には正の相関が認められたが、抗 Tax 抗体陽性群における CTL frequency はやはり陰性群に比べて有意に高値であった。
3. ATLA 抗体価と HTLV-1 プロウイルス量の間には有意な正の相関が認められたが、抗 Tax 抗体陽性群におけるプロウイルス量は抗 Tax 抗体陰性群と変わらないかあるいはやや減少しているように認められた。
4. HLA-A\*2402 のみ保有するキャリアにおいて Tax301-309 特異的 CTL frequency 高値群における HTLV-1 プロウイルス量は CTL frequency 低値群に比べて有意に低値であった。

以上により、HTLV-1 キャリアにおける Tax 蛋白に対する液性免疫と細胞性免疫の相関性が証明された。抗 Tax 抗体陽性キャリアにおいては Tax 特異的 CTL frequency が高値であり、そのため HTLV-1 プロウイルス量を減少させ、ATLL 発症リスクを軽減させる可能性が示唆された。また、Tax 特異的 CTL の効果 'efficiency' のみならず 'frequency' も HTLV-1 プロウイルス量を減少させる因子になることが証明された。

本研究は、南九州に多発する ATLL の原因である HTLV-1 に対する宿主免疫に関するいくつかの知見を提供し ATLL の発症リスクに関して新しい視点を与えた。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

# 最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 655 号	氏名	秋元 正樹
審査委員	主 査	出雲 周二	
	副 査	栄鶴 義人	河野 嘉文

主査および副査の3名は、平成19年3月6日、学位請求者秋元正樹君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) ATLL患者での抗Tax抗体陽性率は？

(回答) 以前の報告では, carrier 63% vs. ATLL 31%[Yokota et al., 1989. Int J Cancer], carrier 50% vs. ATLL 42%[Chen et al., 1997. Int J Cancer]などが報告されている。当科にて新たに検討しなおしたところ, carrier 30/76 (39.5%) vs. ATLL 6/20 (30%)であった。その差はわずかであるが、症例数を増やせば有意差が出る可能性はあると思われる。

質問2) キャリアの状態での抗Tax抗体陽性であった症例がATLL発症により陰性になることはありえるのか？

(回答) ATLL発症によりTaxが産生されなくなることはあるので、その可能性はあるが、Miyazaki Cohort Studyの症例ではATLL発症前のキャリアのときから抗Tax抗体が陰性であったことが分かっている。

質問3) Fig. 2においてATLA抗体はTax11-19特異的CTL frequencyとは相関がないのに、Tax301-309特異的CTLとは正の相関があるのはなぜか？

(回答) 正確な理由は不明である。ただし、Tax11-19特異的CTLは強力な殺感染細胞効果があるため、直ちにHTLV-1感染細胞を減少させ、すぐにfrequencyが収束してしまうのに対し、Tax301-309特異的CTLは感染細胞を減少させるのに十分増殖しなければいけないと考えられ、そのような増殖における動態の違いが原因となっている可能性がある。

質問4) Miyazaki Cohort StudyでのATLL発症の危険因子とこの研究の関係は？

(回答) Miyazaki Cohort Studyで特に抗Tax抗体低値が危険因子とされていることに注目した。抗Tax抗体が低値ということはTax特異的CTLも低値であろうと推測されていたが、これを証明するために本研究を行った。

質問5) HTLV-1に感染してからATLLを発症するまで60年と長期間かかる理由は何か？

(回答) HTLV-1 Taxが細胞増殖に関する細胞蛋白を制御し、ATLL発症の機序に関与すると考えられているが、白血病化するまでにはTaxによる作用が長期間続く必要があるかもしれない。また、若年者ではTax特異的CTLが正常に働くためATLL細胞の出現を抑えることができるが、高齢者になるとCTLの機能が衰えるため発症しやすくなるのかもしれない。しかし、同じ長期間感染でも、水平感染より垂直感染のほうがATLL発症のリスクが高いことが知られており、乳児期の免疫機能が完成していない段階で感染することや、経口的に感染することがHTLV-1に対する宿主免疫を不完全なものとし、このウイルスによるATLL発症を許すことになるのかもしれない。

質問6) 感染細胞内でTaxはどのような機能を持っているのか？

(回答) TaxはHTLV-1遺伝子増幅を促進させる蛋白であると同時に、感染細胞内で転写因子NF- $\kappa$ Bなどの活性化と、それに基づく多くの細胞性遺伝子の発現を引き起こすことがin vitroで証明されている。

質問7) ATLL発症のメカニズムは？

(回答) TaxがATLL発症にどのような影響を与えるのか現在のところ十分に理解されていない。Cell transformationの早い段階ではTax発現が必要だが、後期においてはほとんどのATLL細胞はTaxを発現しない。よってその他の遺伝子変異がATLLの病因に重要な役割を果たすと信じられている。

質問 8) HTLV-1 プロウイルス量の増加は ATLL 発症のトリガーになるのか？

(回答) HTLV-1 プロウイルス量の増加が直接 ATLL 発症の危険因子になるかは証明されていない。ただし、Miyazaki Cohort Study で ATLA 抗体価高値が ATLL 発症の危険因子とされている。ATLA 抗体価高値は HTLV-1 プロウイルス量と強い正の相関があるとされているので、HTLV-1 プロウイルス量は ATLL 発症の危険因子であると推測される。

質問 9) 抗体価や、Tax 特異的 CTL の種類および frequency は ATLL 発症後、治療効果や予後に関係するのか？

(回答) 現在のところ不明である。しかし、class I HLA は ATL の臨床経過に影響を及ぼすとする報告[Uno et al., 1988. Clin Exp Immunol]も見られるので Tax 特異的 CTL の機能によって治療効果や予後が変わる可能性はある。

質問 10) 現在研究している ATLL のワクチン療法にこの研究の知見が役に立つか？

(回答) 正確には不明な点も多いが、液性免疫と細胞性免疫に相関があるなら、抗原特異的 B 細胞を抗原提示細胞として memory CTL を誘導することも可能かもしれない。

質問 11) この研究での HTLV-1 キャリアのプロウイルス量は中央値 62.3/1000 cells と他の研究に比べて比較的高いようだが、信頼できる値か？他の施設でのプロウイルス量と直接比較できるか？

(回答) 従来の測定法より正確に測定できる方法を使用したので検査値は信頼できると考えている。同じ方法を用いた以前の論文でも中央値が 30-40 copies/1000 cells (0.2-200.2) であり[Sonoda et al., 2004. Cancer Sci], この方法では正常な範囲と考えられる。しかし、他の方法との直接比較には問題があると思われる。

質問 12) HLA-A\*0201 と A\*2402 双方保有しているキャリアはプロウイルス量がより低くなるはずなのに、この研究では高値のキャリアも認められる。その理由は？

(回答) HLA-A 以外の HLA-B, C, DR などの影響も今後検討が必要と考えられる。

質問 13) 男性と女性で HTLV-1 プロウイルス量などに差は認められたか？また、男性で ATLL 発症リスクが高いのはなぜか？

(回答) 本研究ではプロウイルス量を含め HTLV-1 関連マーカーに男女差は認められなかった。水平感染は男性から女性へ感染することが多いので、女性キャリア全体における垂直感染の率は男性より相対的に低い。垂直感染が ATLL 発症リスクを高くするため、性別だけでリスクを統計学的に検討すると垂直感染の率が高い男性の方がリスクが高くなってしまうと説明されている[Tajima et al., 1992. In Gann Monograph on Cancer Research]。

質問 14) Tax11-19 以外にも有力な標的となるエピトープが存在するのでは？

(回答) HLA-A\*0201 以外にもたとえば、HLA-Cw\*08 なども HTLV-1 プロウイルス量を抑制するといわれており、今後ほかの HLA に関しても検討すると興味深いデータが得られるかもしれない。

質問 15) HAM 患者が ATLL を発症することはあるのか？

(回答) 症例報告はあるが、無症候性キャリアと比べると発症率は低い。

質問 16) HAM 患者に ATLL が少ないのは CTL frequency が高いことだけで説明がつくのか？

(回答) HAM 患者では確かに CTL frequency が高いが、同時に HTLV-1 プロウイルス量も高値である。しかし、ATLL 発症には至らない。詳細は不明だが、CTL frequency 以外の要因が存在するかもしれない。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。