

# 論文要旨

## Reduced Foxp3 expression with increased cytomegalovirus-specific CTL in HTLV-I-associated myelopathy

HAM 患者における CMV 特異的細胞障害性  
T リンパ球の増加に関連する Foxp3 発現の減少

林 大輔

### 【序論および目的】

HAM/TSP の患者は HTLV-I に対して高い免疫反応を示すが、他の慢性感染ウイルスに対して免疫反応が高いかどうかは不明である。そこで私たちは慢性感染ウイルスに対する免疫反応を調べ、その反応の高さと制御性 T 細胞の発現の関係について調べた。

### 【材料および方法】

HAM/TSP 患者、無症候性 HTLV-I キャリア、健康コントロール人の血液サンプルを用い、ウイルス特異的 CTL の検出にはペンタマー、制御性 T 細胞の検出には Foxp3 抗体を用い、フローサイトメーターで解析した。

### 【結果】

HAM/TSP 患者の CMV 特異的 CTL の頻度は、健康コントロール人に比べ高い傾向を示した。また CMV 特異的 CTL の頻度と HTLV-I 特異的 CTL の頻度は正に相関した。HAM/TSP 患者の CD4+ リンパ球中における Foxp3+細胞の頻度は、無症候性 HTLV-I キャリアや健康コントロール人に比べ高い傾向を示した。一方、HAM/TSP 患者の Foxp3 発現レベルは健康コントロール人に比べ低く、CMV 特異的 CTL の頻度と逆相関した。Foxp3+細胞の頻度と HTLV-I プロウイルス量は正に相関した。

### 【結論及び考察】

HAM/TSP 患者は、HTLV-I に対してのみならず CMV に対しても高い免疫反応を示した。Foxp3 発現の低下は CMV に対する高い免疫反応に関与している可能性がある。また、Foxp3+制御性 T 細胞は HTLV-I 感染における免疫反応の調整に関与している可能性がある。

(Journal of Neuroimmunology 2008 年掲載予定)

# 論文審査の要旨

報告番号	医研第 671 号	氏名	林 大輔
審査委員	主査	馬場 昌範	
	副査	丸山 征郎	金蔵 拓郎

## Reduced Foxp3 expression with increased cytomegalovirus-specific CTL in HTLV-I-associated myelopathy

(HAM 患者における CMV 特異的細胞障害性 T リンパ球の増加に関連する Foxp3 発現の減少)

HAM では、HTLV-I に対して高い免疫反応、特に HTLV-I Tax 特異的 CTL (cytotoxic T lymphocyte) の頻度が高いことがわかっている。しかし、それが HTLV-I のみに対する特異的な現象なのか、あるいは他の慢性感染ウイルスに対しても、同様に高い免疫応答を示すかどうかについては、明らかにされていない。今回、学位申請者は HTLV-I に対する免疫応答とともに、HTLV-I 以外の慢性感染ウイルス (EBV や CMV) に対する免疫応答を調べ、それらに寄与する因子について検討することを目的として、本研究を行った。

HAM32 例、HTLV-I キャリア 25 例、HTLV-I 非感染健常人 17 例のリンパ球に対し、HLA-A2 / ペプチド五量体 (ペプタマー) を用いて、HTLV-I Tax, EBV, CMV に特異的な CTL の頻度について、フローサイトメーターを用いて検討し、3 群間の比較を行った。同様に、HAM29 例、HTLV-I キャリア 23 例、HTLV-I 非感染健常人 27 例のリンパ球について、制御性 T 細胞 (Treg) のマスター遺伝子蛋白である Foxp3 の発現について調べ、3 群間の比較を行った。さらに、Foxp3 と CTL の関連、Foxp3 と HTLV-I プロウイルス量の関係について調べるとともに、Tax と Foxp3 の二重染色を行った際の両者の陽性率や、HAM における Treg の機能が HTLV-I 非感染健常人のそれと比較して低下しているのかどうかについても検討した。

本研究で得られた新知見は次の 5 点である。

1. CMV 特異的 CTL の頻度は、HAM の方が HTLV-I 非感染健常人に比べて高く、HTLV-I 感染者では、HTLV-I Tax 特異的 CTL の頻度との間に有意な正の相関関係を認めた。一方、EBV 特異的 CTL に関しては、ペプタマーの検出感度が低く、評価不能であった。
2. HAM や HTLV-I キャリアでは、HTLV-I 非感染健常人と比較して、Foxp3 染色の平均蛍光強度 (MFI) が低く、Foxp3 の発現が低下していた。
3. HAM において、CMV 特異的 CTL の頻度と Foxp3 の発現 (MFI) は逆相関した。すなわち Foxp3 の発現が低いと CMV 特異的 CTL の頻度が高かった。
4. HAM や HAM と HTLV-I キャリアを合わせた群において、HTLV-I プロウイルス量と Foxp3 陽性細胞の頻度との間には正の相関が認められた。
5. HAM において、Treg の一部は Tax 陽性であり、Tax 陽性細胞の一部は Treg であった。

本研究は、HAM における、HTLV-I と HTLV-I 以外の慢性感染ウイルス (CMV) に対する免疫応答を調べ、HAM では両者に対する免疫応答が上昇していることを明らかにした。それらに寄与する共通のファクターとして Treg を考え、HAM における Treg の発現、CTL との関係、HTLV-I ウイルス量との関係について、新しい知見を与えるものである。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 <b>671</b> 号	氏名	林 大輔
審査委員	主 査	馬場 昌範	
	副 査	丸山 征郎	金蔵 拓郎

主査および副査の3名は、平成20年7月16日、学位請求者 林 大輔 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) ペンタマーというのは、何をもってペンタというのか？

(回答) ペンタマーにはMHCが5つあり、その上にペプチドがのっている。例えばTaxペンタマーだと、MHC上にTax 11-19ペプチドがのっており、それが5個結合している。それに蛍光物質がついている。ペンタマーのMHC1つに対し、T細胞レセプター1つが対応する。テトラマーはMHCが4つだが、ペンタマーは5つである。

質問2) CTL検出のときと、Foxp3検出のときは、対象サンプルを変えているが、これはなぜか？HLA-A2でCTLを評価して、同じサンプルでFoxp3を評価することに意義はないのか？

(回答) CTL検出に関しては、MHC拘束性の理由から、1つのHLAに限定して検討せざるを得なかった。Foxp3検出に関して、サンプル選択の際にHLAをランダムにした理由は、HLA-A2に限った場合よりも、より一般的なFoxp3に関する結論が得られるのではないかと考えたからである。しかし、ランダムといってもその中にはHLA-A2のサンプルも含まれているのであって、CTLとFoxp3の両者の関係を検討するには、HLA-A2でなければ検討できない。したがって、対象サンプルを変えず、すなわちCTL検出のときと同じサンプルでFoxp3を評価することの意義はあると考える。

質問3) 統計学上、各群で有意差があったのは事実だが、個々のドットを見るとかなりオーバーラップしている。生体内での病態を解釈するときに、統計学的な有意差がどれだけ意義をもっていると考えるか？

(回答) ある因子に関して2群を比較したとき、そこに統計学的な有意差を認めた場合は、少なくともその因子に関しては、2つの群間に差があったと考える。すなわち、それは病態に関連している因子と思われる。

質問4) Foxp3の頻度はHAMで高く、MFIはHAMで低い。また、HTLV-Iのプロウイルス量はFoxp3の頻度と相関し、一方CMV特異的CTL頻度はFoxp3のMFIと相関している。Foxp3の頻度とMFIの関係をどう解釈するか？

(回答) Foxp3の頻度、MFI両者ともに、Tregの強さに関係していると思われる。実際、Foxp3のMFIとCMV特異的CTLの頻度は逆相関し、Tregが強いとCTLが抑制されると考えられ、一方、Foxp3の頻度とHTLV-Iのプロウイルス量は正に相関し、Tregが強いと、おそらくTax特異的CTLの反応が抑制され、その結果、ウイルス量が増えると考えられ、この両者に矛盾はない。Foxp3のMFIとHTLV-Iのプロウイルス量については相関関係が認められず、他の因子が修飾している可能性がある。

質問5) MFIをトータルで積算したものでは、比較していないか？

(回答) MFIと頻度を積算して検討したが、有意差を認めなかった。

質問6) なぜCMVを選んだのか？

(回答) 既感染が多く、正常人のほぼ9割以上が感染しているという理由からCMVを選んだ。CMVに関しては抗体を調べて既感染を確認した。

質問7) HAMではFoxp3の発現が低下しているが、それはHTLV-Iに感染した結果Tregが変化してFoxp3の発現が低下したのか、それとも、もともとFoxp3発現のプロモーターに異常がある人にHTLV-Iが感染してFoxp3の発現が低下したのか、どちらか？また、Foxp3の発現の低下は、HAMで起こる自己免疫疾患に関連しているか？

(回答) Tregにtax遺伝子を移入するとfoxp3の発現が低下したという報告がある。したがって、HTLV-Iに感染した結果Tregが変化してFoxp3の発現が低下したのではないかと考える。HTLV-IがTregに感染することでFoxp3の発現が低下し、それにより自己免疫疾患が起こりやすくなる可能性はあると考えられる。

質問 8) IL-10 などもみたいと思うが、そのあたりの報告はあるか？

(回答) HAM と正常人に関して IL-10 の産生を比較した報告はある。本研究でも IL-10 の比較を試みてみたが、検出感度が低く評価不能であった。

質問 9) Discussion の中で HTLV-I プロウイルス量が高い人は Tax 特異的 CTL がたくさん誘導されていると述べられているが、実際 CTL はウイルス増殖の抑制には効いていないのか？

(回答) HAM では HTLV-I プロウイルス量が高く、Tax 特異的 CTL も高い。一般的には CTL が高ければウイルス量は低くしなければならないが、HAM では両者とも高い。予想としては、高い HTLV-I プロウイルス量に対して、ある程度は CTL がウイルスの増殖抑制に貢献しているのだろうけれども、十分に抑えきれないために、ウイルス量が高くなっているのではないかと考えている。

質問 10) Foxp3 は Treg のマーカーだが、その本来の分子の生理的活性などはわかっているのか？

(回答) Foxp3 は転写因子の一種で、GITR, CTLA-4, IL-2, IFN- $\gamma$  といった Treg 関連分子の発現をコントロールしている。

質問 11) 細胞を培養し、時間経過でみると、Foxp3 の頻度はいったん低下して 8 時間ほどで元に戻る。なぜこのようなことが起こるのか？

(回答) なぜかはわからなかったが、2つの可能性、つまり Foxp3 の発現が一度低下して、その細胞にて再度 Foxp3 の発現が上昇したという可能性と、Foxp3 の発現が低下した細胞と異なる新たな細胞の Foxp3 の発現が上昇してカーブが重なった可能性を考えた。

質問 12) Foxp3 は細胞に穴を開けなければ染まらず、最終的に染めるときに Tax と二重染色しているが、最初に Foxp3 染色した後に固定し、別の方法で HTLV-I を検出して、Foxp3 と二重に染色するという方法は考えなかったか？

(回答) それは考えつかなかった。

質問 13) HAM において、NK や NKT も、感染細胞に対して何らかの応答をしていると考えられるが、それらに関してはどうか？

(回答) 今回は NK や NKT に関する検討は行わなかった。

質問 14) 「HAM では EBV に対する液性免疫が上がっている」と引用しているが、EBV と CMV とでは、一方は液性免疫、一方は細胞性免疫というように、同じヘルペス科のウイルスで宿主の免疫応答能に違いはあるか？

(回答) HAM では EBV 抗原に対する IgG 血清抗体価が高いという報告があり、それを HAM では EBV に対する液性免疫が上がっていると表現した。今回の研究では抗体価の検討は行わず、細胞性免疫の検討を行ったが、EBV と CMV の違いについてはわからなかった。

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と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判定した。