

論 文 要 旨

Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I)-specific CD8⁺ accumulate in the lungs of patients infected with pulmonary involvement

HTLV-I 陽性者の肺には
HTLV-I 特異的 CD8 陽性細胞が集積している

川 端 隆 史

【序論および目的】

統計学的に健常人に比較して、HTLV-I 感染症例では何らかの肺病変を呈していることが多い。肺病変とは胸部画像検査上の異常を指しており、その画像所見は多彩である。ATL 発症例でも肺病変は多いが、これは白血病細胞の浸潤と日和見感染症を主体とする感染症であると言われている。

しかしながら、ATL を発症していない HTLV-I 感染症例での肺病変が多い理由は明確ではない。現在までに、肺の局所の状態を反映するものとして肺胞洗浄液 (BALF) を検体として用いて研究されている。非特異的リンパ球や、IL-2 をなどの BALF での増加が宿主側の免疫反応の発現として同定され、感染側の HTLV-I に関しては、mRNA の発現、プロウイルス量の増加が証明されている。しかし、HTLV-I の特異的な宿主側の免疫反応については未だ研究されておらず、HTLV-I に特異的な CD8 陽性細胞について、肺胞洗浄液 (BALF) と末梢血単核球 (PBMCs) とで比較検討することとした。同時に、各検体で HTLV-I プロウイルス量も測定した。

また、HTLV-I 陽性で肺病変を呈する 1 症例の肺組織と HTLV-I 陰性の 1 症例の肺組織について、HTLV-I-Tax-tetramer を用いて染色し、HTLV-I に特異的な CD8 陽性細胞の存在について電子顕微鏡で観察し、比較検討した。

【材料および方法】

1. 肺病変を呈する 6 症例の協力により得られた、肺胞洗浄液と末梢血の各検体で HTLV-I プロウイルス量の測定を行い、さらに HTLV-I 特異的 CD8 陽性細胞を HTLV-I-Tax-pentamer を用いてフローサイトメトリー法で検出し、比較検討した。
2. HTLV-I 陽性で肺病変を呈する 1 症例の肺組織と HTLV-I 陰性の 1 症例の肺組織において、HTLV-I-Tax-tetramer を用いて染色し、電子顕微鏡で観察し、比較検討した。

【結 果】

1. BALF 中のリンパ球分画は 6 症例中 5 症例で増加していた。CD4/8 比は PBMCs で 1.60、BALF で 3.34 であった。HTLV-I プロウイルス量の比較は、BALF と PBMCs 中の CD4 陽性細胞 100 個あたりのコピー数で行い、平均値はそれぞれ、57.02 コピーと 51.38 コピーで有意差は認められなかった。一方、HTLV-I 特異的 CD8 陽性細胞に関しては、全 CD8 陽性細胞数あたりの HTLV-I 特異的 CD8 陽性細胞の比を算出し、PBMCs で 1.50%、BALF で 7.62%と統計学的有意差をもって、BALF で高い値を示した。

2. HTLV-I-Tax-tetramer 陽性 CD8 陽性細胞の集簇が HTLV-I 陽性で肺病変を呈する 1 症例の肺組織で認められたが、HTLV-I 陰性の 1 症例の肺組織においては陰性であった。HIV Gag tetramer 陽性細胞はいずれの検体でも認めなかった。

【結論及び考察】

HTLV-I 陽性者の BALF では、HTLV-I プロウイルス量が認められたが、PBMCs と比較して、増加はしていなかった。HTLV-I 特異的 CD8 陽性細胞は BALF で PBMCs より増加していた。

本研究では、HTLV-I 特異的 CD8 陽性細胞を antigen/HLA class I complex multimer を用いて検出しており、陽性細胞の中には、effector/memory cells だけではなく、naïve cells も含まれている。すべてが活動性のある細胞障害性 T 細胞とは言えない。

しかしながら、少なくとも肺に特異性をもって、宿主側の HTLV-I 特異的な免疫応答は認めた。HTLV-I 陽性患者の肺病変へ、何らかの修飾をしている可能性が示唆される。

(Journal of Medical Virology 2012 ;volume84, Issue7:1120-1127 掲載)

論文審査の要旨

報 告 番 号	総 研 第 2 0 1 号		学位申請者	川端 隆史
審 査 委 員	主 査	橋口 照人	学 位	博士 (医学・歯学・学術)
	副 査	有馬 直道	副 査	井上 博雅
	副 査	西 順一郎	副 査	魚住 公治

Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I)-specific CD8+ cells accumulate in the lungs of patients infected with HTLV-I with pulmonary involvement
 (HTLV-I 陽性者の肺には HTLV-I 特異的 CD8 陽性細胞が集積している)

抗 HTLV-I 抗体陽性症例 (HAM の症例や HTLV-I carrier の症例) において、肺病変を多く呈していることが知られている。現在までに、非特異的ではあるが T 細胞の関わる免疫応答が活性化していることや HTLV-I プロウイルスが存在していることは確認されているが、HTLV-I の特異的な免疫応答については未だ研究されていない。そこで学位申請者らは、HTLV-I-Tax-pentamer を用いて HTLV-I 特異的 CD8 陽性細胞を測定した。また RT-PCR 法を用いて HTLV-I プロウイルス量を測定し、肺胞洗浄液 (BALF) と末梢血単核球細胞 (PBMCs) とで比較検討をした。また、抗 HTLV-I 抗体陽性かつ肺病変を呈する症例の肺組織について、HTLV-I-Tax-tetramer を用いて染色し、HTLV-I に特異的な CD8 陽性細胞の存在について顕微鏡での観察を行った。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) BALF 中のリンパ球分画は 6 症例中 5 症例で増加していた。
- 2) HTLV-I プロウイルス量の比較は、BALF と PBMCs 中の CD4 陽性細胞 100 個あたりのコピー数で行い、平均値は、それぞれ 57.02 コピーと 51.38 コピーにて有意差は認めなかった。
- 3) HTLV-I 特異的 CD8 陽性細胞は、CD8 陽性細胞数あたりの HTLV-I 特異的 CD8 陽性細胞の比を算出した。PBMCs で 1.50%、BALF で 7.62% と BALF で有意に高い値を示した ($p=0.028$)。
- 4) HTLV-I-Tax-tetramer 陽性 CD8 陽性細胞の集簇が抗 HTLV-I 抗体陽性で肺病変を呈する症例の肺組織で認められたが、HIV Gag tetramer 陽性細胞は認められなかった。

本研究では、HTLV-I 特異的 CD8 陽性細胞を antigen/HLA class I complex multimer を用いて検出している。陽性細胞の中には、effector/memory cells だけではなく、naïve cells も含まれているので、すべてが活動性のある細胞障害性 T 細胞とは言えないが、少なくとも肺に特異性をもって、宿主側の HTLV-I 特異的な免疫応答を認めている。そして、ATL を発症していない抗 HTLV-I 抗体陽性患者の肺病変に何らかの修飾をしている可能性を示唆している。肺を対象とし、HTLV-I 特異的免疫応答を明らかにした点は、非常に興味深い。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	総 研 第 201 号		学位申請者	川端 隆史
審 査 委 員	主 査	橋口 照人	学 位	博士 (医学・歯学・学術)
	副 査	有馬 直道	副 査	井上 博雅
	副 査	西 順一郎	副 査	魚住 公治
<p>主査および副査の5名は、平成24年8月2日、学位申請者 川端 隆史 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、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。</p> <p>質問1) DPB (びまん性汎細気管支炎) の症例に副鼻腔炎の合併はありましたか？</p> <p>(回答) 実験1のDPB症例は副鼻腔炎を合併し、実験2のDPB症例は副鼻腔炎を合併していませんでした。</p> <p>質問2) Tax-specific CD8+ T lymphocyte の多い症例1, 5, 6のその後の肺病変の進展についてはどうですか？</p> <p>(回答) その後の胸部画像・肺機能の評価はしておりませんが、全ての症例とも酸素の使用は無く生活されています。</p> <p>質問3) Tax-specific CD8+ T lymphocyte と肺病変の関係をどのように考えますか？</p> <p>(回答) HTLV-I 感染細胞に対する細胞障害性 T 細胞として作用していますが、結果的に肺に病変をもたらしている可能性があると思われます。</p> <p>質問4) 6症例の選択の基準は何ですか？</p> <p>(回答) HTLV-I 感染者で画像上の何らかの異常所見を認めた症例に、bronchoalveolar lavage (BAL)を行っています。同時期に bronchoalveolar lavage fluid (BALF)細胞と末梢血リンパ球が保存してある症例のうち、研究承諾が得られた6例を対象としました。</p> <p>質問5) 肺病変のない HAM または HTLV-I キャリアの BALF のリンパ球は増えていますか？</p> <p>(回答) 画像上の変化が殆どないにも関わらず BAL を行うと、リンパ球増加のあるという報告がされていますので、おそらく BALF のリンパ球分画は増えていると思います。HTLV-I の感染細胞と過剰な免疫反応による CTL が増加していると考えます。</p> <p>質問6) HTLV-I キャリアと HAM では免疫の状態が異なりますが、肺病変ではどのような違いがありますか？</p> <p>(回答) HAM では HTLV-I キャリアの約10倍 HTLV-I ウイルス量が高く、HTLV-I 特異的免疫反応も高いので、HAM ではより高率に HTLV-I 関連肺疾患を合併すると考えられますが、その様な疫学研究はまだなされていません。</p> <p>質問7) 各症例の画像所見は統一性がないですが、どう考えますか？</p> <p>(回答) HTLV-I 関連肺疾患では、特定の画像変化は指摘されていません。また、HTLV-I 関連肺疾患は、画像上病変があるとは限らないと考えています。</p> <p>質問8) HIV での肺病変における検討はありますか？</p> <p>(回答) HIV での肺病変は日和見感染症としての、Pneumocystis jirovecii pneumonia や Cytomegalovirus pneumonia、非結核性抗酸菌症がみられます。稀ではありますが、HIV ウイルスの関連する病変としては、リンパ球性間質性肺臓炎(LIP:Lymphocytic interstitial pneumonitis)や肺病変を呈する HIV 関連悪性リンパ腫などがあります。また、肺病変のある HIV 抗体陽性症例において、HIV-specific-CTL が肺泡マクロファージを標的に反応していることが報告されています。</p>				

最終試験の結果の要旨

質問 9) T 細胞の組織への移動についての機序は、どのようなものですか？

(回答) T 細胞は感染局所へ移動するために必要な表面分子を発現します。リンパ節へホーミングする L-セレクトリン分子の発現が低下し、T 細胞表面のインテグリン分子 VLA-4 発現が増強し、感染局所で産生されたサイトカインの作用で内皮細胞に誘導された VCAM-1 に結合します。また、T 細胞表面 LFA-1 は内皮細胞の ICAM-1 に結合します。T 細胞は血管内皮に付着した後通過し、ケモカインの濃度勾配によって炎症局所に移動すると考えられています。

質問 10) HTLV-I proviral load と HTLV-I-specific CTL とが負の相関があると考えた理由は何ですか？

(回答) CTL は HTLV-I 感染細胞を攻撃して排除する細胞ですので、CTL の頻度が高いほど HTLV-I 感染細胞を効率的に減らし、結果的にウイルス量と CTL 頻度は負の相関があるのではないかと考えました。しかし、有意差はありませんでした。その理由として、症例数の少ないこと、及び他の要因が関連していると考えます。

質問 11) HTLV-I ウイルス量が BALF と PBMC で差がないのは何故ですか？

(回答) 以前の報告で BALF の方が PBMC より HTLV-I ウイルス量が高いという報告があり、本研究でも検討しましたが差を認めませんでした。更なる検討が必要と考えます。

質問 12) CD4 の高い症例において、クローナリティーは認めているのですか？

(回答) 精査しておりません。

質問 13) 何故、6 症例ともに女性なのですか？

(回答) 中年以降の成人では HTLV-I 抗体陽性者は女性が多いと言われています。また、HAM では女性が男性の約 2.5 倍と多いです。これらのことが関係しているのではないかと考えます。しかし、承諾が得られなかった症例の中には男性も含まれておりました。

質問 14) HTLV-I-proviral load を PCR で測定しているが、細胞 1 個当たりのウイルスのコピー数は個人毎に異なるのですか？

(回答) 末梢血液中の感染細胞の HTLV-I コピー数は 1 細胞あたり 1 コピーであると考えられています。BALF 中の HTLV-I 感染細胞のコピー数はこれまで検討されておりませんが、おそらく 1 細胞あたり 1 コピーであり、ウイルス量が感染細胞数とほぼ同じと思われます。

質問 15) 論文中に HTLV-I の蛋白は検出できなかったとありますが、検索手法を含め、その理由をどのように考えますか？

(回答) HTLV-I の Tax と Gag 蛋白に対する抗体を用い、蛍光二次抗体を反応させた後、蛍光顕微鏡で観察しました。一般に HTLV-I の蛋白は、HAM や HTLV-I キャリアの流血中の感染細胞では検出されません。ただし、HAM の脊髄内ではウイルス蛋白の検出が報告されており、肺組織においても検出される可能性を考え実験しましたが陰性でした。その理由は不明です。

質問 16) 組織の HTLV-I-Tax-tetramer を用いた免疫染色の結果、染まっているのは肺のどの組織ですか？ HTLV-I-specific CTL は何を認識しているのですか？

(回答) HTLV-I-specific CTL は、末梢肺胞の隔壁内に検出されました。肺内では HTLV-I 蛋白は検出できませんでしたが、BALF でウイルス DNA が検出されたことより HTLV-I-specific CTL は HTLV-I 感染細胞上のウイルス蛋白/MHC 複合体を認識していると思います。肺組織に浸潤した HTLV-I 感染細胞のうちウイルス蛋白を発現した細胞は、CTL により効率的に除去され、ウイルス蛋白陽性の細胞が減少している可能性も考えられます。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。