

論 文 要 旨

Severe loss of invariant NKT cells exhibiting anti HTLV-1 activity in patients with HTLV-1 associated disorders

HTLV-1 関連疾患における invariant NKT 細胞の
抗 HTLV-1 作用と重度な量的機能的不全

阿 座 上 和 子

【序論および目的】

ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) は、感染すると宿主の T 細胞に持続感染を成立する。感染者の大多数は無症候性キャリア (AC) のまま生涯を終えるが、感染者のごく一部に、HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) あるいは成人 T 細胞白血病 (ATL) などの HTLV-1 関連疾患を発症する。感染者において、HTLV-1 感染細胞数 (ウイルス量) はこれら疾患の発病リスクと相関することが知られており、HTLV-1 感染細胞の制御機構の解明は、発症予防法や治療法の開発に重要である。

これまで HTLV-1 感染細胞に対する宿主側の防御機構は、HTLV-1 特異的 CD8 陽性細胞障害性 T 細胞 (CTL) を中心に研究が進められてきた。HTLV-1 特異的 CTL は HTLV-1 抗原発現細胞に対して細胞障害活性を有し、感染細胞の制御に重要な細胞群であるが、興味深いことに、実際の HAM 患者では HTLV-1 特異的 CTL の頻度が高いにもかかわらず、HTLV-1 感染細胞数が多いという矛盾が存在する。それゆえ我々は、HTLV-1 感染細胞の制御において、HTLV-1 特異的 CTL 以外に関与する重要な細胞群が存在する可能性を考えた。

invariant NKT (iNKT) 細胞は、樹状細胞 (DC) や natural killer (NK) 細胞などの自然免疫系と、T 細胞などの獲得免疫系を橋渡しすることにより、感染、自己免疫疾患、癌に対する免疫応答を制御するユニークなリンパ球の一群である。しかし、HTLV-1 感染や関連疾患における iNKT 細胞の役割についてこれまで報告がない。そこで本論文では、iNKT 細胞の HTLV-1 感染者や関連疾患患者における頻度や機能的状態、抗 HTLV-1 作用の有無、治療としての有用性などに関する研究を行った。

【材料および方法】

患者より採取した臨床検体を用いて研究するため、患者からの採血に際してはインフォームドコンセントをとり、生命倫理委員会にて承認された同意書を得ている。HTLV-1 感染のチェックは粒子凝集反応法を用いて行い、ウエスタンブロット法にて確認した。患者のプライバシーを厳重に保護するために、研究組織に属さない個人情報管理者によりサンプルは匿名化され、番号が振り当てられた。研究者は、番号化された末梢血サンプルを用いて、Ficoll-Hypaque gradients 法によって末梢血単核球細胞 (PBMC) を分離し、凍結保存したものを実験に使用した。

健常者 (HD)、AC、HAM 患者、ATL 患者の末梢血 PBMC 中の iNKT 細胞、NK 細胞、DC の頻度、及び DC の表面マーカー発現量、iNKT 細胞中におけるパーフォリン発現量、などの測定はフローサイトメトリー法を用いた。DC や iNKT 細胞の分離には、セルソーティングを用いた。また、iNKT 細胞の増殖刺激は α -galactosylceramide (α -GalCer) と IL-2 を用いて行った。PBMC、培養後の PBMC、分離した DC や iNKT 細胞中の HTLV-1 プロウイルス DNA の定量は、リアルタイム PCR 法を用いて測定した。

【結果】

1. HAM患者とATL患者ではHDと比較してiNKT細胞、NK細胞、DCの頻度が有意に低かった。
2. HTLV-1感染者のPBMC中では、HTLV-1プロウイルス量とiNKT細胞の頻度とに逆相関の関係が有意に認められた。しかし、NK細胞、DCの頻度とは認められなかった。
3. HD、AC、HAM、ATL患者のmyeloid DC、CD14陽性細胞(単球)、CD19陽性細胞(B細胞)において、各群間でNKT細胞の活性化に必須のCD1d発現量の差は認められなかった。
4. DCにおけるHTLV-1の感染が確認され、ACよりもHAM患者でDC中のHTLV-1プロウイルス量が有意に高かった。また、HTLV-1感染者におけるDC中のウイルス量はPBMCプロウイルス量と関連していた。しかし、DC中HTLV-1プロウイルス量とDC細胞表面上のCD1dや成熟度マーカーの発現量との間に有意な相関は認められなかった。
5. *In vitro*におけるPBMCの α -GalCel刺激により、ACではiNKT細胞の増殖応答が認められ、HAMおよびATL患者では認められなかった。重要なことに、iNKT細胞が増殖したACではPBMC中HTLV-1ウイルス感染細胞数が減少したが、iNKT細胞が増殖しなかったHAMおよびATL患者では、PBMC中ウイルス感染細胞の減少は認められなかった。
6. α -GalCel刺激にさらにIL-2を加えてHD、AC、HAM患者、ATL患者PBMCを*in vitro*にて増殖し、iNKT細胞の絶対数を測定した。HDやACでは α -GalCel刺激によりiNKT細胞が増加し、IL-2を加えるとさらに増殖効率が高まったが、HAMやATL患者では、IL-2を加えてもiNKT細胞の増殖を得ることは出来なかった。
7. iNKT細胞の細胞障害活性を調べる為に、HD、AC、HAM患者でiNKT細胞のパーフォリン発現レベルを測定したところ、HTLV-1感染者ではHDと比較して有意に低かった。
8. iNKT細胞におけるHTLV-1の感染が確認されたが、感染率は通常のT細胞と同レベルであり、iNKT細胞へHTLV-1が感染しやすいという可能性は否定的であった。
9. HTLV-1感染者では、iNKT細胞の中でも抗ウイルス、抗腫瘍免疫作用が強いCD4陰性iNKT細胞が特に低下していた。

【結論及び考察】

HTLV-1感染細胞が多いHAMやATL患者において、末梢血中のiNKT細胞、NK細胞、DCの頻度が低いこと、またHTLV-1感染者において、末梢血中のiNKT細胞の頻度がHTLV-1プロウイルス量と逆相関することから、iNKT細胞がHTLV-1感染細胞の制御に重要な役割を果たしている可能性が示された。さらに、ACのPBMCを用いた α -GalCel刺激によるiNKT細胞増殖後のHTLV-1感染細胞数の減少により、iNKT細胞が抗HTLV-1作用を有することが示された。また、HAMやATL患者におけるiNKT細胞は頻度の低下のみならず、 α -GalCel刺激に対する増殖応答性も乏しく、IL-2を加えてもその機能不全は回復せず、重度な増殖機能の不全が認められた。さらに、患者のiNKT細胞におけるパーフォリン発現量も低く、細胞障害活性も低下している可能性が示された。このように、HTLV-1感染細胞の制御作用を有するiNKT細胞は、宿主がHTLV-1に感染することにより量的機能的な低下が誘発され、それが関連疾患の発症リスクや病態形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

そこで次に我々は、このHTLV-1感染によるiNKT細胞の量的機能的低下の発生機構として、エイズウイルス感染症において報告されている、1) DCへのウイルス感染によるCD1dの発現低下、2) iNKT細胞への直接感染による機能低下、などの可能性について検討した。その結果、DCやiNKT細胞へのHTLV-1感染は確認されたが、感染によるCD1dの発現低下や、iNKT細胞への感染指向性を示唆する結果は得られなかった。iNKT細胞はCD4陽性と陰性の2つの集団から構成されており、HTLV-1はCD4陽性細胞に感染指向性を示す為、直接感染が原因であればCD4陽性iNKT細胞が減少しているはずであるが、むしろHTLV-1感染者ではCD4陰性iNKT細胞が減少しており、iNKT細胞の量的機能的低下の機構としては、直接感染以外の、より複雑なメカニズムであることが示唆された。

このように、HTLV-1感染者、特に関連疾患患者においてiNKT細胞の量的機能的不全が示されたが、ACのPBMCを用いた α -GalCel刺激後のiNKT細胞増殖によるHTLV-1感染細胞減少という結果は、現在、肺癌患者などで臨床試験が行われている α -GalCelを用いたNKT細胞療法が、HTLV-1関連疾患の発症予防法として有用である可能性を示唆している。(Blood 2009; 114(15): 3208-3215 掲載)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 87 号		学位申請者	阿座上 和子
審査委員	主査	出雲 周二	学位	博士 (医学)
	副査	有馬 直道	副査	丸山 征郎
	副査	魚住 公治	副査	河井 一浩

Severe loss of invariant NKT cells exhibiting anti HTLV-1 activity in patients with HTLV-1 associated disorders

(HTLV-1 関連疾患における invariant NKT 細胞の抗 HTLV-1 作用と重度な量的機能的不全)

invariant NKT (iNKT) 細胞は、樹状細胞 (DC) や natural killer (NK) 細胞などの自然免疫系と、T 細胞などの獲得免疫系を橋渡しして、感染、自己免疫疾患、癌に対する免疫応答を制御するユニークなリンパ球の一群である。しかし、HTLV-1 感染や HTLV-1 関連疾患における iNKT 細胞の役割についてこれまで報告がない。そこで学位申請者らは iNKT 細胞の HTLV-1 感染者や HTLV-1 関連疾患患者における頻度や機能的状態、抗 HTLV-1 作用の有無、治療としての有用性に関する研究を行った。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- HTLV-1-associated myelopathy (HAM) 患者と adult T-cell leukemia (ATL) 患者では healthy donors (HD) と比較して iNKT 細胞、NK 細胞、DC の頻度が有意に低かった。
- HTLV-1 感染者の peripheral blood mononuclear cells (PBMC) 中では、HTLV-1 プロウイルス量と iNKT 細胞の頻度とに逆相関の関係が有意に認められた。しかし、NK 細胞、DC の頻度とは認められなかった。
- HD, asymptomatic carriers (AC)、HAM、ATL 患者の myeloid DC、CD14 陽性細胞 (単球)、CD19 陽性細胞 (B 細胞) において、各群間で NKT 細胞の活性化に必須の CD1d 発現量の差は認められなかった。
- DC における HTLV-1 の感染が確認され、AC よりも HAM 患者で DC 中の HTLV-1 プロウイルス量が有意に高かった。また、HTLV-1 感染者における DC 中のウイルス量は PBMC プロウイルス量と相関していた。しかし、DC 中 HTLV-1 プロウイルス量と DC 細胞表面上の CD1d や成熟度マーカーの発現量との間に有意な相関は認められなかった。
- In vitro* における PBMC の α -Galactosylceramide (α -GalCer) 刺激により、AC では iNKT 細胞の増殖応答が認められ、HAM および ATL 患者では認められなかった。さらに、iNKT 細胞が増殖した AC では PBMC 中 HTLV-1 ウイルス感染細胞数が減少したが、iNKT 細胞が増殖しなかった HAM および ATL 患者では、PBMC 中ウイルス感染細胞数が減少しなかった。
- HD や AC では α -GalCer 刺激により iNKT 細胞が増加し、IL-2 を加えるとさらに増殖効率が高まったが、HAM や ATL 患者では、IL-2 を加えても iNKT 細胞の増殖を得ることは出来なかった。
- iNKT 細胞の細胞障害活性の指標としてパーフォリン発現レベルを測定し、HTLV-1 感染者では HD と比較して有意に低かった。
- iNKT 細胞における HTLV-1 の感染が確認されたが、感染率は通常の T 細胞と同レベルであり、iNKT 細胞へ HTLV-1 が感染しやすいという可能性は否定的であった。
- HTLV-1 感染者では、iNKT 細胞の中でも抗ウイルス、抗腫瘍免疫作用が強い CD4 陰性 iNKT 細胞が特に低下していた。

本研究により、HTLV-1 感染者、特に HTLV-1 関連疾患患者において iNKT 細胞の量的機能的不全が示され、その機構は直接感染以外の、より複雑なメカニズムであると判明した。また、本研究では、AC の PBMC を α -GalCer 刺激した実験により、iNKT 細胞増殖によって HTLV-1 感染細胞が減少するという結果が確認され、 α -GalCer を用いた NKT 細胞療法が、HTLV-1 関連疾患の発症予防法として有用である可能性を示唆した。よって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 87 号		学位申請者	阿座上 和子
審査委員	主査	出雲 周二	学位	博士 (医学)
	副査	有馬 直達	副査	丸山 征郎
	副査	魚住 公治	副査	河井 一浩

主査および副査の5名は、平成22年2月4日、学位申請者 阿座上 和子 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。

質問1) iNKT細胞とNKT細胞の異同、割合は。

(回答) iNKT細胞はNKT細胞のサブセットで、NKT細胞の多数を占める一群であることが知られている。

質問2) NKT細胞に攻撃されるATL細胞、あるいはHTLV-1感染細胞にはCD1d 或は CD1d 類似分子の発現があるのか。また CD1d 様の分子を発現しているという報告があるか。

(回答) 今回の研究では感染細胞表面の CD1d 発現は確認していない。報告は認めなかった。

質問3) HAM と ATL ではともに iNKT 細胞の低下が認められるにもかかわらず、なぜ異なった病態が起こるのか。

(回答) iNKT 細胞の頻度低下は両疾患で認め、それが病態の相違点に関与しているよりも、両疾患において共通している感染細胞の制御破綻という病態に、関与していると考えられる。さらに ATL では HAM よりも PBMC 中の mDC の低下を確認した。この違いが病態に影響を与えている可能性が示唆された。

質問4) α -GalCer を用いた具体的な免疫療法の方法は。

(回答) 樹状細胞療法と NKT 細胞療法があり、これらは既に肺癌治験で安全に人体に投与できる事が確認されている。特に AC では α -GalCer に反応が良かったため、予防的治療に使用できる可能性が高い。

質問5) Fig.1 の n の数と Fig.3 の n の数が異なる理由は。同じ患者を使用しているのか。

(回答) Fig.1 の母体が最も大きく、他の Fig には同じ患者で、十分な検体が得られたものを使用した。

質問6) HD から取り出した iNKT 細胞と HTLV-1 感染者である HAM 患者や ATL 患者の CD4+T リンパ球とを共培養すると、 α -GalCer に対する応答性などで判断される iNKT 細胞の活性は低下すると予想されるか。iNKT 細胞に感染することがその活性を低下させないのであれば、なぜ iNKT 細胞の活性が低下するのか。

(回答) iNKT 細胞に HTLV-1 は感染しうるが感染嗜好性は認められず、直接感染で iNKT 細胞の活性が低下しないことが確認された。直接感染以外の原因、例えば iNKT 細胞を活性化する IL-12 の低下などが考えられる。

質問7) α -GalCer に対する反応が悪いのならば、治療の際は何を使用すればよいか。

(回答) HTLV-1 感染者のうち HAM や ATL 発症後には反応が悪いが、AC は反応した。ウイルス量の高いハイリスクキャリアーに対して予防的に治療することが可能である。

質問8) 検体は全て新鮮なものを使用したか。継代すると結果は変化するか。

(回答) 凍結保存した検体と新鮮な検体で結果に差が無い事を確認した。継代すると感染細胞が増殖する為、iNKT 細胞の頻度は低下してしまい、結果は変化すると思われる。

質問9) α -GalCer 刺激に対する NF κ B などの転写因子の動きはみたか。

(回答) 今回の実験では確認していない。

質問10) HTLV-1 の感染により、iNKT 細胞のマーカーとして今回使用している V α 24 がダウンレギュレートするために、iNKT 細胞の頻度が低下した可能性はあるか。

(回答) 論文中には示していないが、NKT 細胞のマーカーとして一部認識されている CD161 陽性細胞数も HTLV-1 関連疾患患者では低下しており、ダウンレギュレーションによる頻度の低下は考えにくい。

質問11) CD4-iNKT 細胞のウイルス量は測定したか。

(回答) iNKT 細胞量自体が少なく、CD4-iNKT 細胞のウイルス量測定はできなかった。

質問 12) AC の PBMC を α -GalCer で刺激する in vitro の実験で増殖する iNKT 細胞は HTLV-1 に感染している iNKT 細胞が増えるのか、感染していない iNKT 細胞が増えるのか。

(回答) 検討していないため、不明である。

質問 13) in vivo では iNKT 細胞は末梢血中、リンパ節、脾臓などのうち、どの臓器で抗ウイルス効果を出すのか。

(回答) 一般的にはリンパ節、脾臓などの網内系臓器で効果を示すと想像されるが、想像の域を出ない。将来的な動物モデルによる検証が必要であると考え。基本的には感染細胞を認識すれば直接的に抗ウイルス効果を出すと考えられる。

質問 14) iNKT 細胞の増殖場所は、CD4+T 細胞と同様にリンパ節で増殖するか。iNKT 細胞のリンパ節中割合は。

(回答) 分化については詳細不明であり、T 細胞同様に胸腺で分化するとの説と胸腺外との説がある。マウスで胸腺に CD161-iNKT 細胞が多く、末梢血に成熟した CD161+iNKT 細胞が多いとの報告や、高齢マウスでは CD161+細胞の割合が胸腺、脾臓、肝臓で増加しているとの報告があることから、胸腺で分化して必要臓器にストックされている可能性がある。iNKT 細胞は脾臓、骨髄、肝臓、胸腺に多いといわれている。リンパ節での割合は不明。

質問 15) iNKT 細胞の内因性のリガンドを高める治療は考えられるか。

(回答) iNKT 細胞の内因性リガンドには iGb3 が胸腺で同定されており、その治療の可能性もありうる。

質問 16) HIV 感染症でも iNKT 細胞は感染防御に関わっているのか。

(回答) HIV 感染者で HIV-1 ウイルスと PBMC 細胞数の逆相関が知られている。他に iNKT 減少により、AIDS 関連疾患である Kaposi's sarcoma の増加が確認されている。HAART 治療により HIV-1 ウイルス量が低下すると CD4-iNKT 細胞が CD4+iNKT 細胞よりも優位になるなどの報告が認められる。

質問 17) HAM 患者や ATL 患者で iNKT 細胞の頻度低下や機能低下が起こるのは、キャリアーの時点で起こっているのか。或は発症後に起こっているのか。

(回答) 健常者と比較して、AC においても iNKT 細胞の頻度の低下傾向や増殖応答の低下傾向が認められ、iNKT 細胞の量的機能的減少がキャリアーの状態でもひどくなれば、HTLV-1 感染細胞の制御が困難となり、HAM や ATL の発症リスクを上げるのではないかと考えられる。

質問 18) ATL の検体中の腫瘍細胞の割合が多く、他の群とその点で条件が大きく異なるが結果に影響はないのか

(回答) その影響を避けるために、論文では iNKT 細胞の頻度は CD3 陽性細胞中の割合ではなく、PBMC 全体中の割合で表示している。さらに、絶対数で表示できれば理想的であると考えているが、一部の健常者コントロールの白血球数と分画のデータが得られず、論文では表示できていない。本研究で使用した ATL 患者の多くは白血球数と分画のデータが得られており、iNKT 細胞の絶対数も計算してあるが、絶対数が算出出来ている対象で検討しても、結論は論文と同じであった。

質問 19) in vitro で iNKT 細胞に対して CD1d 上に α -GalCer が提示されるように、感染者の生体内で iNKT 細胞に対して HTLV-1 抗原が提示されるのはどういう状況か。

(回答) iNKT 細胞が、HTLV-1 感染細胞上の HTLV-1 抗原を認識して攻撃しているとは考えていない。iNKT 細胞には、NK 細胞と同様にウイルス感染細胞や癌細胞を非特異的に認識する能力があることが知られており、HTLV-1 感染細胞の iNKT 細胞による認識において HTLV-1 抗原の発現は必須ではない。

質問 20) α -GalCer 様の分子を発現する微生物や病原体がないか。そういった更なる感染が起こって、HTLV-1 関連疾患を発症することが考えられるか。

(回答) グラム陰性菌の LPS をもたない一部の菌では α -GalCer 類似の iNKT 細胞を活性化する壁成分を持つことが知られており、それらの感染症によって iNKT 細胞が疲弊して HTLV-1 関連疾患を発症する可能性はある。

質問 21) プロウイルス量は 100 細胞中の数であると思われるが、AC では HTLV-1 ウイルスが 20 コピーほどであるのに対して HAM や ATL ではスケールに違いが認められる。1 cell 1 コピー以上入っている iNKT 細胞が多数あるということか。

(回答) 1 cell 1 コピーが原則であり、ウイルス量計算の方法も検討の余地がある。

質問 22) iNKT 細胞療法の際に iNKT 細胞の機能を高める方法としてはどのような方法があるか。

(回答) low-dose DNA ワクチンを使用することなどが考えられる。また、最近では効率を高めるために樹状細胞に α -GalCer を混合して投与する方法なども試みられている。

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(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。