

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 以外に關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、ウェ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)