

論 文 要 旨

HTLV-1–Infected CD4+ T Cells Drive Spontaneous Lymphoproliferation and Virus-Specific CD8+ CTL Expansion in HAM/TSP

HTLV-1 感染 CD4+T 細胞は HAM/TSP におけるリンパ球の自発的増殖
とウイルス特異的 CD8+T 細胞の増殖を促進する

堂園 美香

【序論及び目的】

HTLV-1 関連脊髄症 (HAM/TSP) は痙性対麻痺、排尿障害などを特徴とする。根本的な治療法はなく、治療法開発が進められているが、本疾患の脊髄病態を反映した動物モデルはない。そのため、脊髄病態を反映しているであろうと推測されている Spontaneous lymphoproliferation (SP) という現象が、治療法開発の指標として用いられてきた。SP は、HAM/TSP 患者のリンパ球に特徴的で、生体外で外因刺激無しに培養すると自発的に増殖する現象である。これまでに CD8+T 細胞が優位に増殖すること、増殖した CD8+T 細胞の 2-4 割は HTLV-1 特異的 CD8+T 細胞 (CTL) だったこと、HTLV-1 蛋白である Tax の発現が増加したことなどが報告されている。しかし、増殖した他の CD8+T 細胞の認識抗原や感染細胞の動態、SP 中のサイトカイン、ウイルス量の変化などについては詳細な解析がなく、SP の正確な機序は未解明であり、HAM/TSP の治療法開発の評価系として有用であるかは不明である。本研究では、SP で増殖した CD8+T 細胞の認識抗原、CD4+T 細胞中の感染細胞の比率、サイトカインやウイルス量の変化などを測定し、SP で起きている細胞間の免疫現象を解析した。これらの解析結果を脳脊髄液炎症所見やこれまでの脊髄病理の報告と比較することによって、SP が HAM/TSP の脊髄病態を一部反映するのか、および新規治療法の評価系として用いて良いかを検討した。

【材料及び方法】

30 人の HAM/TSP 患者、12 人の無症候性 HTLV-1 キャリア (AC)、8 人の非感染者 (HC) から採取した血液から密度勾配遠心法で、リンパ球を分離し、凍結保存したものを使用した。培養前に CellTrace™ キットで染色し、増殖細胞を追跡した。外因刺激を加えずに 6 日間培養し、フローサイトメトリーで T 細胞分類、HTLV-1 感染細胞、HTLV-1 特異的 CD8+CTL を同定した。さらに CD8+T 細胞は、HTLV-1 各蛋白のペプチドミックスで刺激し、認識抗原を特定した。また、培養前後でのウイルス量、T 細胞の表現型 (分化、活性化、疲弊マーカー) や培養上清のサイトカイン、ケモカインを測定した。

【結 果】

SP では CD8+T 細胞が CD4+T 細胞より優位に増殖した。増殖した CD4+T 細胞の内、感染細胞

のマーカーの CADM1 陽性細胞が 38.15%、ウイルス蛋白 Tax 陽性細胞が 61.84%であったが、ウイルス量解析では 100.7%が HTLV-1 感染細胞であることが示された。HLA-A*24:02 陽性 HAM 患者では、CD8+T 細胞の中では、HTLV-1-Tax301-309 特異的 CTL が 3.81%から 17.67%に増加した。さらに、その他の認識抗原を特定するために、HTLV-1 関連ペプチド (Tax, HBZ, Gag/Env) をパルスした抗原提示細胞と培養後の CD8+T 細胞を共培養し、細胞内 IFN- γ 染色にて抗原特異的細胞を同定した。結果、37.38%が Tax に、33.42%が HBZ に反応し、増殖した CD8+T 細胞の 70%以上が HTLV-1 特異的 CD8+CTL だった。また、CD4+T 細胞、CD8+T 細胞をそれぞれ分取し、単独培養すると、CD4+T 細胞は単独でも良好に増殖した。一方、CD8+T 細胞は単独では増殖せず、再度 CD4+細胞を追加すると増殖したことより、CD8+T 細胞の増殖には HTLV-1 感染 CD4+T 細胞が必要であることが示された。T 細胞の表現型解析では、増殖した感染細胞は Th1 細胞で、増殖した T 細胞の多くが、活性化マーカーと疲弊マーカーの両方を示した。培養上清のサイトカインは、IL-6 と IFN- γ が HC に比較して上昇し、IFN- γ の上昇の程度は、患者の髄液でのウイルス量に相関した。SP を HAM/TSP 患者と AC で比較したが、AC では一部で SP が起きるものの、SP の程度は HAM/TSP 患者より低かった。

【結論及び考察】

SP では CD8+T 細胞優位の増殖を認めたが、CD8+T 細胞は単独では増殖せず、CD4+T 細胞の増殖を必要とした。増殖した CD4+T 細胞は、その多くが HTLV-1 Tax 蛋白陽性で、ウイルス量解析ではほとんどが感染細胞であることが示された。また、増殖した CD8+T 細胞は、70%以上が HTLV-1 特異的 CD8+CTL だった。CD8+T 細胞のサブセット分類では、エフェクターメモリーT細胞 (TEM) やセントラルメモリーT細胞 (TCM) の表現型が増加した。TEM は、炎症の局所に持続的に存在し、高レベルのサイトカイン産生を行う細胞の一つである。培養上清では、IL-6 や IFN- γ などの炎症性サイトカインが上昇していた。これらの結果から、SP は HTLV-1 感染 CD4+T 細胞が増殖し、それに反応した HTLV-1 特異的 CD8+CTL が増殖する免疫反応現象であると考えられる。

脊髄病理では、CD4+T 細胞や CD8+T 細胞の浸潤が報告されており、後者は HTLV-1 特異的 CD8+CTL の高度浸潤が確認されている。CD4+T 細胞には感染細胞が含まれていたが、神経細胞には感染細胞が確認されていない。そのため、神経細胞は、感染細胞と HTLV-1 特異的 CD8+CTL が起こす免疫反応によってバイスタンダー的に傷害されたと推測されている。つまり、HAM/TSP の病態の中心は、感染細胞と HTLV-1 特異的 CD8+CTL の相互反応であり、SP はこの病態と類似する。さらに、SP のパラメーターと髄液炎症所見の相関の検討では、SP の培養上清の IFN- γ が髄液のウイルス量と有意に相関し HAM/TSP の中枢神経炎症のバイオマーカーである髄液 CXCL-10 とも相関傾向を示した。これは、SP が HAM/TSP の中枢神経炎症を反映していることを示唆する。

一方、SP は神経細胞などが含まれていないため、完全に脊髄病理を反映しているとはいえない。また脊髄に浸潤した細胞は増殖マーカーがほとんど確認されず、脊髄病理での HBZ 特異的 CD8+CTL の検討はされていないなど、SP と脊髄病理では異なる点や不明な点も残っている。

しかし、今回の検討で、HTLV-1 感染細胞が最初に増殖し、引き続いて HTLV-1 特異的 CD8+CTL が増殖する反応である SP は、脊髄病態の中心の免疫反応に類似しており、生体外での治療法評価、特に感染細胞増殖を抑制できるか、その結果として免疫反応を抑制できるかを評価する系として有用であることが示された。

(Neurology, Neuroimmunology & Neuroinflammation 2026 In press)