

平成 21 年 4 月 22 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790671  
 研究課題名（和文） 細胞性免疫誘導による ATL 発症予防キメラ粒子ワクチン免疫療法と腫瘍免疫への応用  
 研究課題名（英文） Efficient Induction of HTLV-1-specific CTL by HTLV-1/HBc Chimeric Particle without Adjuvant as a Prophylactic for HTLV-1-associated T-cell Leukemia  
 研究代表者  
 小迫 知弘（KOZAKO TOMOHIRO）  
 福岡大学・薬学部・助教  
 研究者番号：40398300

研究成果の概要：成人 T 細胞白血病（ATL）の原因ウイルス（HTLV-1）に特異的な CTL の誘導を抗腫瘍免疫療法のモデルとして、効率的な HTLV-1 特異的 CTL の誘導法を *in vivo* 及び *in vitro* において解析した。Hepatitis B core（HBc）粒子に HLA-A\*0201 が認識する HTLV-1 Tax エピトープを挿入した HTLV-1/HBc キメラ粒子を作製した後、HLA-A\*0201 改変トランスジェニックマウスに本キメラ粒子を免疫し、その免疫原性を検討した。本粒子免疫群において HTLV-1 特異的な IFN- $\gamma$  反応がみられ、テトラマー法により HTLV-1 特異的 CD8 陽性細胞が確認できた。またマウス骨髄樹状細胞と本粒子を共培養した結果、CD86、HLA-A\*02、MHC クラス 2、TLR4 分子の発現が有意に増加した。これらの結果より、粒子のヘルパー活性によりアジュバント無しで樹状細胞の成熟化が促進し効率的 CTL 誘導能を有する可能性が示唆された。本研究により、免疫細胞療法による HTLV-1 特異的 CTL の誘導を目的とする ATL 発症予防・治療のための免疫療法の臨床応用への基盤が確立できた。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	800,000	0	800,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,600,000	240,000	1,840,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：血液内科学

キーワード：免疫制御学、免疫療法

## 1. 研究開始当初の背景

HTLV-1 は日本で発見された世界最初のヒトレトロウイルスであり成人 T 細胞白血病（ATL）の原因ウイルスである。そのキャリアは日本において約 120 万人で長期潜伏を経てキャリアの約 2% に ATL を発症させる。近

年、白血病の治療は化学療法や骨髄移植療法で飛躍的に進歩し、患者の生命予後が大きく改善されてきたが、ATL 患者のほとんどは治療抵抗性を示し、特に急性型とリンパ腫型はこれらの治療法を用いてもほとんどの患者が発病後 1 年以内に死亡し予後不良である。

有効な治療法がない現状において、HTLV-1 特異的細胞性免疫による感染細胞及び腫瘍細胞の排除に働く CTL の誘導を主眼に置いた ATL 発症の予防・治療法の確立が焦眉の急であると考えられる。

我々は HTLV-1 抗原網羅的な HLA テトラマーアッセイを用い ATL 患者の HTLV-1 Tax 特異的 CTL の発現頻度、認識できるエピトープのレパートリー及びその機能がキャリアと比較し有意に減少していることを明らかにし、Tax 特異的 CTL が HTLV-1 感染細胞の腫瘍化を抑制する免疫エフェクターの主役であると共に、その減少が ATL 発症リスクである可能性を証明した (Kozako et al. J. Immunology, 2006)。HTLV-1 蛋白はウイルス抗原かつ癌抗原でもあり、感染症、癌免疫研究への応用が期待できる。HTLV-1 は分子疫学的知見が豊富で、腫瘍の多段階発がんを解析する上で格好のモデルであり、その治療法開発が C 型肝炎、HIV、SARS などの免疫療法に関する研究に有益な情報をもたらすと考えられる。

## 2. 研究の目的

癌や感染症に対する免疫を考える場合には、免疫抵抗力が著しく低下した癌患者体内で、いかにして細胞性免疫を高めるかを考えることが重要になる。ワクチンに関して、現在臨床試験中のペプチドワクチンは *in vivo* において免疫原性に乏しくアジュバントが必要となる。一方、hepatitis B core (HBc) などのウイルス粒子は感染・複製することなく、アジュバンド無しで強力な抗体及び CTL 応答を惹起することから、安全性に優れたワクチンキャリアとして有用である。そこで我々は HBc 粒子に日本人の HTLV-1 感染者の 85% が保有する HLA-A\*2402 が認識する Tax エピトープを挿入し、HTLV-1 Tax 特異的 CTL を誘導する HTLV-1/HBc キメラ粒子を作製し ATL 発症予防のための、HTLV-1 Tax 特異的 CTL を誘導する HTLV-1/HBc キメラ粒子の作製を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) HTLV-1/HBc キメラ粒子の作製 :

HLA-A\*0201 に拘束される HTLV-1 Tax のメジャーエピトープである Tax11-19 配列に含まれるエピトープを含むキメラ粒子の作製を試みた。プロテオソームにおけるプロセッシングを考慮し、この 9 つのアミノ酸エピトープにゆとりを持たせるために、前後 3 つずつのアミノ酸を含む計 15 のアミノ酸

(LFEEYTNIPISLLFN) を HBc の配列に挿入した。プラスミドベクター (pUC18HBc) を Stu I で切断後、DNA との Ligation 反応を行った。JM109 (TAKARA) を用いてクローニングを行い、HiSpeed Plasmid Midi Kit (キアゲ

ン) でプラスミド DNA を抽出し、HTLV-1/HBc プラスミドを得た。発現ベクターである pPIC3.5 (invitrogen) を用い、pPIC3.5-HTLV-1/HBc プラスミドを得た。エレクトロポレーション法により *Pichia pastoris* Sac I によって線状化した pPIC3.5-T311/HBc で、KM71 株を形質転換した。最小栄養培地で培養してヒスチジン非要求性の形質転換体を選別した。菌体にメタノールを加えキメラタンパク発現を誘導した。回収した菌体を超音波で破碎し、陰イオン交換クロマトグラフィー、ショ糖濃度勾配遠心、透析、無菌ろ過によりキメラタンパクを精製した。

(2) HLA-A\*0201 トランスジェニック (Tg) マウスにおける HTLV-1/HBc キメラ粒子による HTLV-1 特異的 CTL の誘導: HLA-A\*0201 Tg マウスの尾根部に、投与抗原として 4 群① HTLV-1/HBc キメラ粒子 20 $\mu$ g/dose、② Tax ペプチドを 1 $\mu$ g/dose (キメラ粒子に含まれる HTLV-1 の絶対量は 1/20 であるから) に固定してアジュバント無しで、③ HBc 粒子 20 $\mu$ g/dose+ Tax ペプチド 1 $\mu$ g/dose④ PBS を皮内に免疫した。2 週間後同様に追加免疫を行った。追加免疫終了 1 週間後 Tg マウスから鼠径リンパ節及び脾臓を摘出した。ペプチド 10 $\mu$ M の最終濃度で 2 時間共培養した 3x10<sup>5</sup> の BM-DC (ペプチド群は 1.5x10<sup>5</sup>、HBc+ペプチド群は 6x10<sup>5</sup>) を radiation (45Gy) した細胞を APC として、鼠径リンパ節 3x10<sup>6</sup> と 37 $^{\circ}$ C で 6 日間培養し ELISPOT アッセイを行った。2 週間おきにペプチド 10 $\mu$ M の刺激を加え 32 日間培養しテトラマーアッセイを行った。

(3) HTLV-1/HBc キメラ粒子による HTLV-1 特異的 CTL 誘導・活性能の解析

### (ア) ELISPOT アッセイ

6 日間 APC と共培養した鼠径リンパ節細胞をエフェクター細胞、BM-DC を 10 $\mu$ M のペプチド有無で 2 時間共培養した細胞をターゲット細胞として 16 時間培養後、産生された IFN- $\gamma$  の検出を行った。

### (イ) テトラマーアッセイ

ペプチド刺激し 32 日間培養した鼠径リンパ節及び脾臓細胞を mouse anti-CD8 IgG-FITC、Tax11-19/HLA-A\*0201 テトラマー-PE, 7-AAD で染色しフローサイトメーター (FCM) で、HTLV-1 特異的 CD8+ T cell を解析した。

(4) HTLV-1/HBc キメラ粒子と未熟樹状細胞の共培養 :

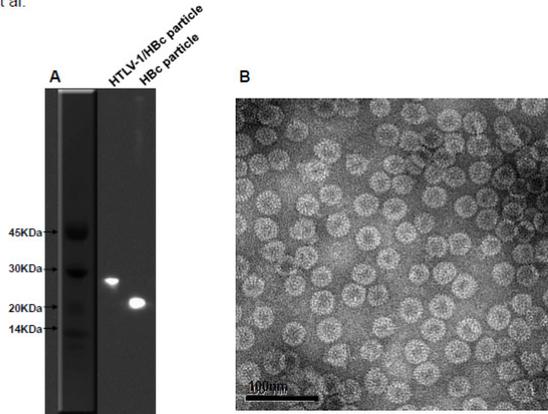
HLA-A\*0201 Tg マウス骨髄由来未熟樹状細胞と HTLV-1/HBc キメラ粒子を 2 日間共培養し、CD86、HLA-A\*02、MHC クラス 2、TLR4 分子の発現を FCM で測定した。

## 4. 研究成果

(1) HTLV-1/HBc キメラ粒子の作製 : *Pichia pastoris* の発現システムを用いて HTLV-1/HBc

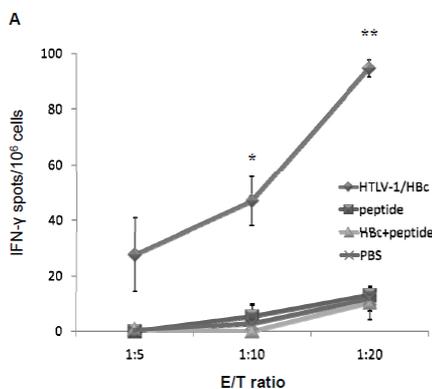
キメラタンパクを発現させた。シヨ糖濃度勾配遠心を後抗HBc抗体を用いHTLV-1/HBcキメラタンパク分画を確認した結果、HBc粒子と同じ42%スクロース分画に抗原があり、キメラタンパクは粒子を形成することが確認された (Figure 1A)。Western blottingの結果、キメラ粒子の分子量はHBc粒子の分子量より6kDa程高い約28kDaであった (Figure 1B)。

Figure 1  
Kozako et al.

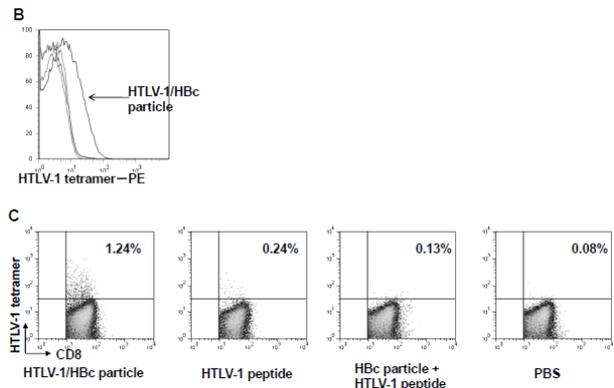


(2) HTLV-1/HBc キメラ粒子による HTLV-1 特異的細胞性免疫誘導：HLA-A\*0201Tg マウスに HTLV-1/HBc キメラ粒子群、HTLV-1 ペプチド群、HBc 粒子とペプチドを混合した群、PBS 群と 4 つの抗原群を尾根部に免疫し、2 週間後にブーストし、3 週間後に脾臓と鼠径リンパ節を採取し、ペプチド刺激し HTLV-1 特異的 CTL の誘導を試みた。ペプチド刺激後 6 日後、鼠径リンパ節細胞を用い HTLV-1 特異的 INF- $\gamma$  反応を検証するため ELISPOT アッセイを行った。HTLV-1/HBc キメラ粒子免疫群において、HTLV-1 特異的な反応が見られ、エフェクター細胞依存的に INF- $\gamma$  産生細胞の増加が見られた。一方他の 3 群においては有意な反応は確認できなかった (Figure 2A)。

Figure 2  
Kozako et al.



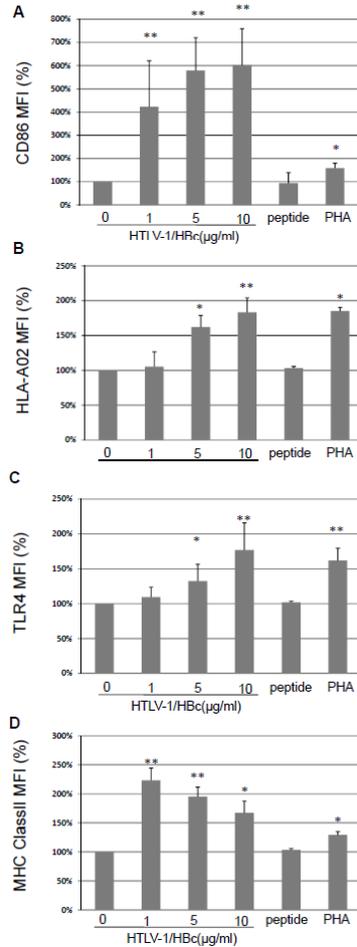
(3) HTLV-1/HBc キメラ粒子による HTLV-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞の誘導：鼠径リンパ節及び脾臓においてペプチド刺激後 32 日後にテトラマーアッセイを行い、HTLV-1 特異的 CD8 陽性細胞の検出を行った。HTLV-1 特異的 CD8 陽性細胞をフローサイトメトリーで抗 CD8 抗体及びテトラマー試薬で解析したところ、鼠径リンパ節及び脾臓においてキメラ粒子免疫群で HTLV-1 特異的 CD8 陽性細胞存在が確認され、本粒子によるアジュバント無しでの HTLV-1 特異的 CD8 陽性細胞の誘導効果が確認された (Figure 2B, C)。



(4) HTLV-1/HBc キメラ粒子による樹状細胞の成熟化：HTLV-1/HBc キメラ粒子の樹状細胞の成熟化に対する影響を、Tg マウスの BM を用いて検討した。Tg マウスの骨髓細胞を GM-CFS で 7 日間培養後非接着細胞を未成熟樹状細胞 (iDC) とし、iDC とキメラ粒子、ペプチド、phytohemagglutinine (PHA) を 2 日間培養し、キメラ粒子の DC 成熟能に対する影響を検討した。キメラ粒子により、DC の成熟マーカーである CD86、HLA-A02、MHC-classII、TLR4 の発現が上昇していた結果 (Figure 4) から、本キメラ粒子は TLR4 シグナルを介し効率的な樹状細胞の成熟化を促進させたことが示唆された。

以上の結果より、本発現システムにより HTLV-1 Tax/HBc キメラ粒子を得ることが出来た。このキメラ粒子は、アジュバント無しで、効率的に樹状細胞を成熟化させることにより、HTLV-1 特異的 CD8 陽性細胞を誘導する事が示された。このように、アジュバント無しで強力な細胞性免疫を誘導できることから本ワクチンは有用なワクチンキャリアで、エピトープを変えることで他の感染症にも応用できる可能性が示唆された。

Figure 3  
Kozako et al.



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Kozako T., Yoshimitsu M., et al. PD-1/PD-L1 expression in HTLV-1 carriers and adult T-cell leukemia/lymphoma patients. *Leukemia* 23:75-382 (2009) 査読有
- ② Soeda S., Koyanagi S., Yukako K., Kozako T., et al. Anti-apoptotic roles of PAI-1 as a neurotrophic factor in the central nervous system. *Thrombosis and Haemostasis* 100: 1014-1020 (2008) 査読有
- ③ Kozako T., Yoshimitsu M., et al. CTL exhaustion in persistent HTLV-1 infection and ATLL is restored through PD-1/PD-L1 pathway. *Blood* 110:511 (2007) 査読有
- ④ Akimoto M, Kozako T., et al. Anti-HTLV-1 Tax antibody and Tax-specific cytotoxic T lymphocyte are associated with a reduction in HTLV-1 proviral load in asymptomatic carriers. *Journal of Medical Virology* 79:977-986 (2007) 査読有

[学会発表] (計 12 件)

- ① Kozako T., Fukada K., et al. Efficient

Induction of HTLV-1-specific CTL by HTLV-1/HBc Chimeric Particle without Adjuvant as a Prophylactic for HTLV-1-associated T-cell Leukemia. The American Society of Hematology 50th Annual Meeting (2008.12.6) San Francisco, CA

② Kozako T., Yoshimitsu M., et al. Immunological Function against Human T-lymphotrophic virus type I in Carriers with Collagen Diseases and HAM/TSP. The American Society of Hematology 50th Annual Meeting (2008.12.6) San Francisco, CA

③ 小迫知弘, 平田真哉ら HTLV-1/HBc キメラ粒子による効率的HTLV-1 特異的CTL誘導法 第 67 回日本癌学会総会 (2008.10.28) 名古屋市

④ 小迫知弘, 吉満誠ら HTLV-1 特異的 CTL 疲弊における PD-1/PD-L1 経路の関与 第 1 回 HTLV-1 研究会 (2008.8.23) 東京都

⑤ 秋元正樹, 小迫知弘ら 無症候性 HTLV-1 キャリアと HTLV-1 感染膠原病患者における HTLV-1 特異的細胞傷害性 T 細胞認識エピトープの比較 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会 (2008.4.5) 札幌市

⑥ 小迫知弘, 吉満誠ら ATLL にみられる HTLV-1 特異的 CTL の機能不全における PD-1/PD-L1 経路の関与 第 1 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム (2007.12.15) 東京都

⑦ Kozako T., Yoshimitsu, M., et al. CTL exhaustion in persistent HTLV-1 infection and ATLL is restored through PD-1/PD-L1 pathway. The American Society of Hematology 49th Annual Meeting (2007.12.8) Atlanta, Georgia

⑧ 北國うらら, 小迫知弘ら 膠原病合併 HTLV-1 キャリアにおいて特異的 CTL が認識する HTLV-1 エピトープの解析 第 24 回日本薬学会九州支部大会 (2007.12.7) 福岡市

⑨ 吉満誠, 小迫知弘ら 成人 T 細胞白血病リンパ腫における PD-1/PD-L1 経路の関与の検討 第 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会 (2007.10.10) 横浜市

⑩ 小迫知弘, 有馬直道 Exhaustion of HTLV-1 Tax specific CTL in HTLV-1 carriers and adult T cell leukemia patients by PD-1/PD-L1 pathway. 第 66 回日本癌学会総会 (2007.10.3) 横浜市

⑪ Kozako T., Yoshimitsu, M., et al. Deficiency of CTL function in adult T-cell leukemia patients mediated by interaction of PD-1 and PD-L1. 13th International Conference of Human Retrovirology; HTLV (2007.5.22) Hakone, Japan

⑫ Hamada, H., Matsushita, K., Akimoto, M., Arima, N., Sawada, T., Kozako T., et al. Serum Anti-Tax Antibody Correlates to Lower Neutrophil Counts in Patients with HTLV-1 Infection. 13th International Conference of Human Retrovirology; HTLV (2007.5.22)

Hakone, Japan

**6. 研究組織**

(1)研究代表者

小迫知弘 (KOZAKO TOMOHIRO)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：40398300

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし