

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590504

研究課題名（和文）成人T細胞白血病に対する免疫療法・ウイルス療法の開発

研究課題名（英文）Development of immunotherapy and virotherapy against ATL

研究代表者

大橋 貴（OHASHI TAKASHI）

北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授

研究者番号：10282774

研究成果の概要（和文）：

ヒトT細胞白血病ウイルス（HTLV-I）による成人T細胞白血病（ATL）の新規治療法をラットモデルで開発・検証した。本研究では、MHC-I 単鎖三量体による抗 HTLV-I 免疫誘導システム、および低病原性ワクシニアウイルス m8Δ の HTLV-I 腫瘍に対する腫瘍溶解性ウイルスとしての有用性を評価し、動物モデルにおいて HTLV-I 腫瘍の増殖を抑制する可能性を示す結果が得られた。本研究成果は、ATL の発症予防・治療に役立つ知見になるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

The potential for novel therapies against Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) induced-adult T-cell leukemia (ATL) has been assessed in a rat model of HTLV-I infection. The results indicate that the single chain trimer (SCT) of MHC-I linked to HTLV-I epitope peptide is able to induce HTLV-I-specific cytotoxic responses and that LC16m8Δ, a highly attenuated vaccinia strain, has an ability to lyse HTLV-I-infected T cells. These results should be useful for further verifying the strategies to fight against HTLV-I.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	0	0	0
2013年度	0	0	0
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：HTLV-I、成人T細胞白血病、動物モデル、免疫治療、ウイルス療法

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトT細胞白血病ウイルスI型（HTLV-I）のキャリアーは日本に約100万人いると推定されており、そのうちの数%が成人T細胞白血病（ATL）を発症する。ATLは極めて予後が不良な疾患であり、日本におけるキャリアー

数を考えるとその発症予防法や新たな治療法の開発は重要な課題である。ATLの発症過程には、ウイルスがコードする転写活性化因子Taxの発現と、それに対する免疫応答が密接に関わっており、これらの制御が発症予

防・治療に重要である。

(2) 新規治療法の開発には動物モデルが必要であり、HTLV-I感染モデルはこれまでにサル、ウサギ、ラット等を用いて国内外の研究機関で開発が行われているが、抗HTLV-I免疫を解析できるモデルは限定されているのが現状である。Taxトランスジェニックマウス/ラットやSCIDマウスを用いたHTLV-Iのモデル系も開発されているが、これらはHTLV-I感染細胞の増殖やTax等のアクセサリー蛋白の機能解析に有用である一方で、抗ウイルス/腫瘍免疫の解析には適していなかった。我々が開発したATL様疾患モデルラットは、生体内で抗HTLV-I腫瘍免疫が解析できる点で独創的であり、遺伝子治療・免疫療法の効果判定には極めて有効なモデルである。実際に、このモデル系を用いてHTLV-Iに対するDNAワクチン、ペプチドワクチン、およびTaxを標的にしたsiRNAの有効性が示されている。さらに我々は、よりヒトに近いウイルス増殖を生体内で再現するために、ラットにおけるHTLV-Iの効率的な増殖に必須の因子であるヒトCRM1遺伝子導入ラットの樹立に成功しており、HTLV-I感染に関連した病態解析に適した動物モデルの開発が進んでいる。

(3) MHC-I単鎖三量体を用いたHTLV-I特異的CTL応答の誘導・検出システムの開発に成功し、これを基にさらに強力な抗HTLV-I腫瘍効果を発揮出来る治療法の開発が進められている。その一つとして、我々は、腫瘍溶解性ウイルスを用いた抗HTLV-I腫瘍効果について注目している。特に本研究室の志田壽利教授らにより開発された弱毒ワクシニアウイルスLC16m8 Δ (m8 Δ)はその高い安全性が特徴であり、腫瘍溶解性ウイルスとしての適性を解析することは癌に対するウイルス療法の発展に深く寄与するものと考えられる。実

際に我々が行った予備実験では、in vitroでHTLV-I感染細胞の増殖を抑制する結果が得られており、HTLV-I腫瘍に対する効果は十分に期待できる状況にある。

2. 研究の目的

本研究は、ATLに対する新規免疫治療、およびウイルス療法の可能性をラットモデルにおいて検証することを目的とする。本研究に用いるHTLV-I感染動物モデル、抗HTLV-I免疫誘導システム、および腫瘍溶解性ワクシニアウイルスについては我々が独自に開発・改良を進めたものであり、これらの独創的なシステムを用いてこれまでに検討されていない新しい発症予防・治療法の有用性を実験動物レベルで明らかにするとともに、本研究で得られた知見をATLのみならず広範な癌細胞に対する免疫療法・ウイルス療法の開発にも役立てることも目的となる。すでに樹立済みのHTLV-I Tax180-188発現MHC-I単鎖三量体発現ベクターを用いたHTLV-I Tax特異的免疫誘導系の確立、およびその抗腫瘍効果の検証を行うとともに、m8 Δ のHTLV-I感染細胞に対する増殖抑制効果や細胞溶解作用についての解析も行い、ウイルス療法への応用の可能性について評価する。近年、ヘルペスウイルスをはじめとする様々なウイルスを用いた腫瘍溶解性ウイルス治療の可能性が検証されていることから、本研究ではこれまでに検討されていないHTLV-I感染細胞に対するワクシニアウイルスの細胞溶解効果について検証し、ATL治療への応用の可能性をラットモデルで評価する。これまでの予備実験により既にin vitroでワクシニアウイルス感染により溶解するHTLV-I感染細胞を得ているので、この細胞を用いてワクシニアウイルスに対する感受性に関わる因子の同定も試み、ワクシニアウイルスによる細胞溶解のメカニズムを明らかにする。また、本研究ではMHC-I単鎖三量体で誘導した免疫細胞や、腫瘍

溶解性ワクシニアウイルスの単独投与による抗HTLV-I効果を検証するとともに、HTLV-I特異的CTLによるHTLV-I感染細胞へのワクシニアウイルス運搬能を利用した、両者の併用による抗HTLV-I作用の増強効果についても検証し、抗HTLV-I腫瘍効果を適切に誘導できる条件を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) MHC-I単鎖三量体によるTax特異的CTL誘導能の解析。MHC-I単鎖三量体は通常MHC-I、 β 2マクログロブリン、および抗原ペプチドの複合体よりも細胞表面での安定性が高く、抗原特異的T細胞を効率よく活性化することが報告されている。そこで、我々が樹立したTax180-188特異的MHC-I単鎖三量体発現ベクターについて、生体内でのCTL誘導能について解析を行う。また、同様なMHC-I単鎖三量体を発現するレンチウイルスベクター、およびワクシニアウイルスベクターによる抗HTLV-I免疫誘導についても評価する。

(2) 弱毒ワクシニアウイルスm8 Δ によるHTLV-I感染細胞に対する細胞溶解能の検証。我々が多数樹立したF344ラット由来のHTLV-I感染T細胞株について、m8 Δ 感染による増殖抑制・細胞溶解の感受性を評価する。本研究に用いるHTLV-I感染細胞株に関しては、Taxをはじめとするウイルス抗原の発現や各種細胞側因子の発現を個別に解析済みであるので、これらのデータと今回のm8 Δ に対する感受性を比較検討し、m8 Δ に対する感受性に関与する因子の同定も試みる。さらに、m8 Δ に対して感受性を示したHTLV-I感染細胞株に関しては、ヌードラットを用いて、m8 Δ による*in vivo*での抗HTLV-I効果を評価できる実験条件を整える。

(3) MHC-I単鎖三量体を用いた抗HTLV-I治療。HTLV-I腫瘍モデルラットに対して、MHC-I単

鎖三量体発現ベクターを用いて誘導した免疫細胞の移入を行い、抗HTLV-I腫瘍活性をHTLV-I感染細胞の接種部位での増殖や担癌ラットの生存率の評価などで検討する。また、既に樹立している単鎖三量体-EGFP融合蛋白によるエピトープ特異的CTL検出システムを利用し、Tax180-188特異的CTLの生体内での動態を解析する。抗原特異的CTLの活性化は細胞内サイトカイン染色等の手法を併用したFACSによる解析で明らかにする。

(4) MHC-I単鎖三量体とm8 Δ による相乗効果の検証。リンパ節等に転移した腫瘍細胞に効率よく腫瘍溶解性ウイルスを運搬するための手段として、腫瘍抗原特異的T細胞の有効性が報告されている。そこで本研究では、MHC-I単鎖三量体で誘導したHTLV-I特異的CTL細胞にm8 Δ を添加した後に、担癌ラットへの移入を行い、それぞれ単独で移入した場合、あるいはナイーブT細胞にm8 Δ を添加した場合で得られた抗腫瘍効果と比較検討することで2つの治療の併用効果を明らかにする。

4. 研究成果

(1) ラットHTLV-I感染モデルにおいて、抗HTLV-I免疫を効率的に誘導することを目的として、これまでの研究で確立したHTLV-I Taxエピトープ (Tax180-188) を提示するMHC-I単鎖三量体を応用し、レンチウイルスベクターおよびワクシニアベクターを用いた単鎖三量体発現系を構築した。樹立した両ベクターをそれぞれの感受性細胞に感染させ、Tax180-188特異的CTL細胞株(401/C8)と共培養したところ、どちらのベクターを感染した細胞においても401/C8細胞からのIFN- γ 産生誘導が確認された。このIFN- γ 産生はHIV-1 Envエピトープを提示する単鎖三量体発現ウイルスベクター感染細胞では誘導されないことから、構築したベクターがTax特異的にT細胞を活性化できることが確認された。本研

究で樹立したレンチウイルスやワクシニアウイルスベクターに組み込んだMHC-I単鎖三量体はこれまでに報告されていないものであり、ラットモデルにおける抗HTLV-I治療の解析に有用であると考えられる。また、これまでに我々が報告しているHTLV-I感染細胞、Tax発現DNA、およびエピトープペプチド投与によるCTL誘導についての解析結果と比較することにより、単鎖三量体の抗原提示能の相対的な強さが明らかになるとともに、免疫療法の抗原としての有用性の判断の指標になるデータが得られるものと考えられる。

(2) ワクシニアウイルスの腫瘍溶解性ウイルスとしての有用性について、これまでに樹立した種々のHTLV-I感染ラットT細胞株を用いて解析したところ、FPM1細胞等の多くの細胞株において、ワクシニアウイルスの増殖とともに、細胞増殖が抑制されることが確認された。このウイルス増殖、および細胞死は正常T細胞や、Tax特異的CTL細胞株では起らないことが確認されたことから、HTLV-I感染細胞の中には、ワクシニアウイルスによる腫瘍溶解活性に対する感受性が高いものが存在することが示された。また、ワクシニアウイルスとTax特異的CTLの併用によりHTLV-I感染細胞の細胞死が増強されることも確認できたことから、腫瘍溶解に伴いCTL活性の増強効果も期待できることが示唆された。既にTaxエピトープ発現単鎖三量体がin vitroで抗原特異的CTLを活性化することは確認し、報告済みであるが、本ベクターによるin vivoでのTax特異的CTL誘導能については予想に反して弱い可能性も想定される。このような場合には、単鎖三量体発現ベクターとDNA/ペプチド免疫を組み合わせる等の工夫を行うことで免疫誘導を増強できる可能性も期待される。他方、FCMT1細胞においては、ワクシニアウイルスが増殖している条件下で、細

胞増殖抑制が弱い傾向が認められ、腫瘍溶解活性に抵抗性を示すことが示唆された。このような抵抗性細胞は実際のATL細胞においても存在する可能性があることから、様々な感受性を呈するHTLV-I感染細胞の排除を想定した治療モデルの構築への応用が期待される。また、HTLV-I感染細胞に対するワクシニアウイルスの腫瘍溶解性ウイルスとしての機能を解析した報告はこれまでに無いため、本研究成果はHTLV-I腫瘍に対するウイルス療法の進展にも役立つものと考えられる。

(3) 同系ヌードラットを用いたHTLV-I腫瘍モデルにおいて、ワクシニアウイルスによる腫瘍溶解活性により腫瘍増殖が抑制可能であることが確認された。HTLV-I感染細胞の増殖をワクシニアウイルスによる腫瘍溶解活性で抑制することを示す報告は本研究が初めてのものと思われる。本研究の成果は、Taxエピトープを提示するワクシニアウイルスが、Tax特異的CTL誘導とともに、HTLV-I感染細胞に対する腫瘍溶解作用の面でも有用であることを示唆しており、今後HTLV-Iによる成人T細胞白血病の発症予防・治療に役立つ可能性が期待される。

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 6 件)

1. Nagai-Fukataki M, Ohashi T, Hashimoto I, Kimura T, Hakata Y, Shida H. Nuclear and cytoplasmic effects of human CRM1 on HIV-1 production in rat cells. *Genes Cells* 16, 203-216, 2011 (DOI:10.1111/j.1365-2443.2010.01476.x).
2. Zhang X., Kondo M., Chen J., Miyoshi H., Suzuki H., Ohashi T., and Shida H. Inhibitory effect of human TRIM5alpha

- on HIV-1 production. *Microbes Infect.* 12, 768-777, 2010. (DOI:10.1016/j.micinf.2010.05.004)
3. Takatsuka N., Hasegawa A., Takamori A., Shimizu Y., Kato H., Ohashi T., Amagasa T., Masuda T., Kannagi M.: Induction of IL-10- and IFN-g-producing T-cell responses by autoreactive T-cells expressing human T-cell leukemia virus type I Tax. *Int. Immunol.* 21, 1089-1100, 2009. (DOI:10.1093/intimm/dxp089)
4. Takayanagi R., Ohashi T., and Shida H.: Functional analysis of Foxp3 and CTLA-4 expressing HTLV-1-infected cells in a rat model. *Microbes Infect.* 11, 964-972, 2009. (DOI:10.1016/j.micinf.2009.06.007)
5. Okada H., Zhang X., Fofana IB., Nagai M., Suzuki H., Ohashi T., and Shida H.: Synergistic effect of human Cyt1 and CRM1 on HIV-1 propagation in rat T cells and macrophages. *Retrovirology*, 6, 43, 2009. (DOI:10.1186/1742-4690-6-43)
6. Suzuki H., Kidokoro M., Fofana IB., Ohashi T., Okamura T., Honda M., Yamamoto N., and Shida H.: Immunogenicity of newly constructed attenuated vaccinia strain LC16m8Δ that expresses SIV Gag protein. *Vaccine*, 27, 966-971, 2009. (DOI:10.1016/j.vaccine.2008.12.015)

[学会発表] (計 1 件)

1. 大橋 貴、中村貴史、木所 稔、志田壽利。ラットモデルを用いた低病原性ワクシニアウイルスの抗 HTLV-I 腫瘍効果の解析。第

4回 HTLV-I 研究会、平成23年9月19日
東京大学弥生講堂。

[その他]
ホームページ等
<http://www.igm.hokudai.ac.jp/molvir/index.html>

6. 研究組織
(1)研究代表者
大橋 貴 (OHASHI TAKASHI)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授
研究者番号：10282774

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：