

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25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591060

研究課題名（和文）

ウイルス持続感染におけるリンパ球の抗原特異性と機能に関する研究

研究課題名（英文）

Antigen specificity and function of lymphocyte in persistent viral infection

研究代表者

西田 徹也 (NISHIDA TETSUYA)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80508929

研究成果の概要（和文）：同種造血幹細胞移植後難治性 CMV 感染における CD8 陽性 CMV 特異的 T 細胞の機能低下への抑制性受容体 PD-1 の関与が明らかとなった。CD33 陽性接着細胞が産生する IL-6 が PD-1 の発現を調節し、接着細胞表面上の PD-1 リガンドと T 細胞上の PD-1 が結合することで抗原特異的 T 細胞の増殖を低下させている可能性が示唆された。CMV 持続感染患者では血清中 IL-6 が有意に高く、IL-6 が移植後 CMV 持続感染の有用なバイオマーカーとなる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：PD-1 was associated with exhaustion of CMV-specific CD8⁺ T cells in persistent CMV infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. It was suggested that CD33⁺ adherent cells produced IL-6 and regulated PD-1 expression and growth of CMV-specific CD8⁺ T cells through cell-to-cell contact. Serum from patients with persistent CMV infection showed a significantly higher IL-6 level and IL-6 may be useful for a biomarker of persistent CMV infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：血液内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：サイトメガロウイルス、抗原特異的 T 細胞、Programmed cell death-1、IL-6、CD33 陽性接着細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) サイトメガロウイルス (CMV) やエプスタインバールウイルス (EBV) などのヘルペス属ウイルスは、ほとんどの成人において既感染であるものの、健常人では自己の免疫力によってウイルスの活性化が制御され、感染症を起こすことはほとんどない。しかし、同種造血幹細胞移植後などの高度な免疫不全状態では、致死的な感染症となることもある。

同種造血幹細胞移植後に最も高頻度で合

併する CMV 感染は、肺炎・胃腸炎・網膜炎・肝炎など多彩な臨床症状を呈する。近年、CMV アンチゲネミアなどによる感染モニタリングや抗ウイルス剤であるガンシクロビル の早期投与により、致死的な CMV 感染症は減少してきている。しかし、薬剤耐性ウイルスなどの問題があり、CMV 感染症は現在も、移植後の克服すべき課題である。

ウイルス排除には宿主の免疫能が重要であり、欧米においては、移植後 CMV 感染症治

療および予防に、CMV 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 輸注療法が行われ、その有用性が報告されている。研究代表者が所属する研究機関において、「同種造血幹細胞移植後において生じる難治性 CMV 感染症に対する CMV 抗原特異的 CTL を用いた治療の安全性に関する臨床第 I 相試験」(試験 ID:UMIN000001749) を実施している。この治療法を行うには、ドナー末梢血単核球から CMV 特異的 CTL を樹立する必要があり、感染が持続してから CTL 樹立を開始しては、CTL 増幅中に感染が重症化する恐れがあるため、本研究を通じて、難治性 CMV 感染症の予測因子を明らかにし、早期に CMV 特異的 CTL の準備を開始し、感染症が致死的となることを防ぐことに繋げたい。

(2) CMV 持続感染の原因解明には、CMV 特異的 T 細胞の機能低下のメカニズムを検討する必要がある。Programmed death 1 (PD-1) や cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) は、T 細胞の活性化を抑制する分子 (免疫抑制受容体) として知られている。これらの免疫抑制受容体と慢性ウイルス感染時の T cell exhaustion との関連についての報告がなされている (Naure. 2006; 439: 682-687, Immunity 2007; 27: 670-684)。Blackburn SD らは、マウスにおける lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) 慢性感染時の T cell exhaustion に対する、複数の免疫抑制性受容体の関与について検討し、特に、PD-1 が重要な働きをしていることを報告している (Nat. Immunol. 2009; 10: 29-37)。ヒトにおいては、HIV 感染と HIV 特異的 T 細胞上の PD-1 高発現との関連が示されており、PD-1 とそのリガンドとの結合を阻害することにより HIV 特異的 T 細胞の機能回復が得られ、治療への可能性が報告されている (Nature. 2006; 443: 350-354, Nat Med. 2006; 12: 1198-1202, Blood. 2007; 109: 4671-4678)。しかしながら、HIV 以外のヒトへのウイルス感染と PD-1 との関連を詳細に検討した報告はない。そこで、CMV などのウイルス特異的 T 細胞における免疫抑制受容体発現と T 細胞機能を検討することで、ウイルス持続感染のメカニズム解明や持続感染を予測する因子の同定に繋がる可能性がある。

2. 研究の目的

免疫不全状態、特に、同種造血幹細胞移植後の CMV や EBV などのウイルス感染に対して、ウイルス特異的 T 細胞の機能低下のメカニズムを解明し、その機能回復の方法を明らかにすることで、細胞療法への応用の可能性を探ることを目的とする。

(1) 経時的なウイルス量変化とウイルス特異的 T 細胞上の免疫抑制受容体などの発現を検討することにより、ウイルス持続感染を予測する因子を明らかにする。

(2) ウイルス持続感染時にウイルス特異的 T 細胞の反応性が低下するメカニズムを、T 細胞表面上の免疫抑制受容体発現と T 細胞機能を解析することにより明らかにする。

(3) 免疫抑制受容体とそのリガンドとの結合を阻害することなどにより、ウイルス特異的 T 細胞の機能が回復することを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 同種造血幹細胞移植後の CMV 感染と末梢血中 CMV 抗原特異的 T 細胞の検討: 同種造血幹細胞移植後の末梢血中ウイルス量変化を、リアルタイム PCR 定量法により、経時的にモニタリングした。末梢血単核中 (PBMC) の CMV 抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の頻度を、MHC テトラマー法を用いて、フローサイトメトリーで解析した。抗原特異的 CD8 陽性 CTL とともに、ウイルス抗原を認識する CD4 陽性細胞もサイトカイン産生などを介して、ウイルス排除にとって重要であるため、CMV 抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞も検出するために、T 細胞の標的となる CMV pp65 タンパク質すべてをカバーするように設計された、主として 11 アミノ酸ずつオーバーラップしている 15-mer のペプチドからなる Peptivator ペプチドプール (Miltenyi Biotec) を用いた。Peptivator ペプチドプールにより末梢血単核球を 4 時間刺激後に、IFN- γ secretion assay にて、ウイルスを認識する全ての T 細胞を検出した。

(2) ウイルス特異的 T 細胞上の免疫抑制受容体発現と機能解析: PBMC 中のウイルス特異的 T 細胞表面上の PD-1 の発現をフローサイトメトリーにより検討した。通常、ウイルス抗原特異的 T 細胞の頻度は非常に低く、少ない細胞での機能解析は困難であるため、IL-2 存在下で PBMC をエピトープペプチド

(QYDPVAALF) で刺激し、14 日間培養することで、CMV 抗原特異的 T 細胞を増殖させ、その T 細胞上の免疫抑制受容体の発現を検討した。さらに、それらの細胞の増殖能、cytokine secretion assay によるサイトカイン産生能などの機能解析を行った。

(3) サイトカイン測定: 血清および培養上清中のサイトカイン (IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL21, TNF, IFN γ , TGF- β) を Cytometric Bead Array each flex set (BD Biosciences) により測定した。

4. 研究成果

(1) 移植後難治性 CMV 感染を合併した患者 PBMC を用いて、CMV 持続感染のメカニズムを検討した。CMV 感染にも関わらず CMV pp65 に反応して IFN- γ を産生する CD8 陽性 T 細胞は、健常人から得られたコントロール PBMC と比べて少なかった。CMV エピトープペプチ

ド (QYDPVAALF) での 14 日間刺激後の CMV 抗原特異的 T 細胞は、患者 PBMC から樹立した場合、コントロール PBMC と比べて増殖が不良であり、その細胞表面上の PD-1 が高発現していた。抗 PD-L1 抗体を用いて PD-1/PD-L1 pathway をブロックすると、患者 PBMC からの CMV 抗原特異的 T 細胞の増殖は改善した。以上の結果から、移植後難治性 CMV 感染を合併した患者における CD8 陽性 CMV 特異的 T 細胞は機能が低下しており、その機能低下には抑制性受容体である PD-1 が関与していることが明らかとなった。

(2) 患者血清または健康人から得られたコントロール血清を培養液に加えて CMV 特異的 T 細胞を誘導したところ、コントロール血清を用いた場合、患者 PBMC からの CMV 特異的 T 細胞の増殖が改善し、さらに PD-1 発現も低下した。このことから、患者血清中に PD-1 発現を調節する因子が存在することが示唆された。そこで、PD-1 発現を調節する因子の同定を試みた。患者と健康人の血清中サイトカインを測定したところ、抑制性サイトカインである IL-10 と TGF- β は高くなく、IL-6 が患者で高かった。さらに、患者と健康人の PBMC および血清を用いて CMV 特異的 T 細胞を誘導した際に、増殖が不良となるにつれて培養液中の IL-6 濃度が高くなり、CMV 特異的 T 細胞の PD-1 も高発現となった (図 1)。

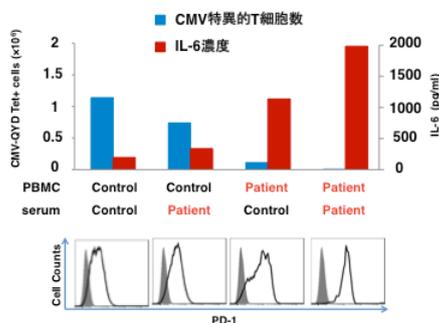


図1 CMV特異的T細胞の増殖能・PD1発現とIL-6の関係

そして、抗 IL-6 受容体抗体を用いて、IL-6 と IL-6 受容体の伝達経路を阻害したところ CMV 特異的 T 細胞の増殖が改善した。以上より、IL-6 が PD-1 を介した T 細胞機能低下に関与していることが示唆された。

また、CMV 持続感染患者では、コントロール良好な CMV 感染患者や健康人と比較して IL-6 は有意に高いことが示された (図 2)。IL-6 が移植後 CMV 持続感染の有用なバイオマーカーとなる可能性がある。

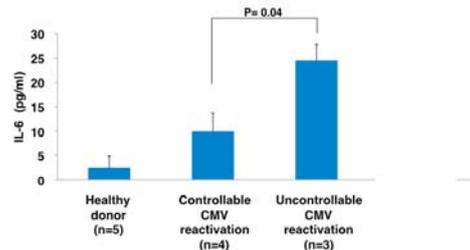


図2 同種造血幹細胞移植後CMV感染患者血清中のIL-6濃度

(3) IL-6 の PD-1 を介した T 細胞機能低下への関与が示唆されたため、そのメカニズムについて検討した。CD33 陽性接着細胞が IL-6 を産生し、その IL-6 が接着細胞をさらに増殖させ、その接着細胞上の PD-1 リガンドと T 細胞上の PD-1 が結合することで抗原特異的 T 細胞の増殖を低下させている可能性が示唆された。CD33 陽性接着細胞を除去することにより、抗原特異的 T 細胞の増殖効率を改善させ、CMV 抗原に限らず、他のウイルス抗原や腫瘍抗原に対する細胞療法の発展に寄与するものと考えられる。

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 2 件)

① 西田徹也 同種造血幹細胞移植後ウイルス感染に対するドナーリンパ球を用いた養子免疫療法
日本アフエーシス学会雑誌 2012;31(3) 223-228. 査読無

② Murase M, Nishida T, Onizuka M, Inamoto Y, Sugimoto K, Imahashi N, Murata M, Miyamura K, Kodera Y, Inoko H, Naoe T. Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 haplotype correlates with relapse and survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant. 2011;46(11):1444-1449. 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

① Imahashi N, Nishida T, Terakura S, Ito Y, Kawada J, Nakazawa Y, Kato T, Murata M, Naoe T, Identification of an HLA-A*24:02-restricted adenovirus serotype 11 epitope recognized by cytotoxic T-cells.
39th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, 2013 年 4 月 9 日、ExCel London、ロンドン (英国)

- ② 西田徹也、竹中克斗、森 有紀、大島久美、谷口修一、小川啓恭、大橋一輝、岩戸康治、坂巻 壽、森島泰雄、加藤剛二、鈴木律朗、福田隆浩、同種造血幹細胞移植後サイトメガロウイルス感染症の後方視的検討—一元化データを用いた研究—
第35回日本造血細胞移植学会総会、2013年3月9日、ANAクラウンプラザ金沢、金沢
- ③ 西田徹也、加藤智則、伊藤嘉規、村田誠、直江知樹、Correlation of serum IL-6 with exhaustion of CMV-specific T cells after allogeneic stem cell transplantation. 第74回日本血液学会学術集会、2012年10月19日、国立京都国際会館、京都
- ④ Kato T, Nishida T, Murase M, Ito Y, Murata M, Naoe T. Correlation of Serum IL-6 Level with Exhaustion of Cytomegalovirus-specific T Cells After Hematopoietic Stem Cell Transplantation. The 53rd Annual Meeting of the American Society of Hematology. 2011年12月12日、Marriott Hall、サンディエゴ (米国)
- ⑤ 加藤智則、西田徹也、村瀬未帆、村田誠、直江知樹. Exhaustion of Cytomegalovirus specific T cells after allogeneic stem cell transplantation. 第73回日本血液学会学術集会、2011年10月15日、名古屋国際会議場、名古屋
- ⑥ Kato T, Nishida T, Murase M, Murata M, Naoe T. Exhaustion of CMV specific T cells with enhanced PD-1 expression in persistent cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. The 52nd Annual Meeting of the American Society of Hematology. 2010年12月6日、Orange County Convention Center、オーランド (米国)
- ⑦ 西田徹也、鈴木進、村田誠、高橋義行、小島勢二、直江知樹. Generation of CMV antigen specific CTL using closed culture system. 第72回日本血液学会学術集会、2010年9月24日、パシフィコ横浜、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 徹也 (NISHIDA TETSUYA)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80508929

(2) 研究分担者

伊藤 嘉規 (ITO YOSHINORI)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20373491

(3) 連携研究者

該当無し

