

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591414

研究課題名(和文) HTLV-1感染者における免疫抑制機序の解析

研究課題名(英文) HTLV-1-specific T cell suppression in infected individuals

研究代表者

長谷川 温彦 (Hasegawa, Atsuhiko)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：90508334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトT細胞白血病ウイルス1型(HTLV-1)感染者におけるHTLV-1特異的CD8+T細胞応答の低下は、成人T細胞白血病(ATL)の発症に関与していると考えられている。本研究では、一部の無症候性感染者やATL患者に認められるHTLV-1特異的CD8+T細胞応答の低下は、抗原提示細胞の機能低下や感染細胞を含む制御性T細胞による能動的免疫抑制が主な理由ではなく、HTLV-1特異的T細胞自身の機能喪失が主要な要因である可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：It is believed that a weak CD8+ T cell response specific for human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) may be one of risk factors for the development of adult T-cell leukemia (ATL). In this study, we showed that a low HTLV-1-specific CD8+ T cell response could be observed not only in most ATL patients but also in a small population of asymptomatic carriers. We also found that this low CD8+ T cell response might be attributed mainly to functional impairment of HTLV-1-specific CD8+ T cells themselves and in part to a reduced function of antigen-presenting cells and an immune suppression by regulatory T cells and infected cells.

研究分野：医歯薬学

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： immunosuppression CTL ATL HTLV-1

### 1. 研究開始当初の背景

ATL に関する HTLV-1 の免疫学的研究は流行地域である日本が主体であり、今日までの研究から、多くのウイルス感染症と同様に、HTLV-1 感染症でも HTLV-1 特異的 T 細胞が感染細胞の増殖を制御するのに重要であることが知られている。我々もまた HTLV-1 持続感染ラットモデルおよび ATL 様腫瘍ラットモデルを用いて、感染細胞の増殖制御や抗腫瘍効果に HTLV-1 特異的 T 細胞が重要であり、感染者のウイルス特異的 T 細胞応答の強弱が ATL 発症に大きく関与していることを示唆してきた。しかし、ほとんどの ATL 患者や一部の無症候性感染者 (AC) でこの T 細胞応答が低いことから、感染者の体内では何らかの免疫抑制メカニズムが潜在していることが示唆されている。HTLV-1 感染における免疫抑制について、(1) ATL 患者から採取した腫瘍細胞は制御性 T 細胞 (Treg) に酷似しており免疫抑制能を持つ、(2) HTLV-1 特異的 CD8+T 細胞は機能的に疲弊している、(3) ATL 患者の末梢血単球由来樹状細胞は成熟分化や抗原提示能、抗原取り込み能などの機能が低下している、などがこれまでに報告されている。しかしながら、感染者における HTLV-1 特異的 T 細胞応答の抑制メカニズムを明確に説明するには至っていないのが現状である。

### 2. 研究の目的

未だ明らかになっていない HTLV-1 特異的 T 細胞応答の低下を来す免疫抑制機序の解明は新たな ATL 発症予防法や治療法の開発に重要な情報を提供できると考えられる。本研究では、ATL 患者を含む感染者の HTLV-1、特に Tax に対する T 細胞応答を調べるとともに、T 細胞性免疫の惹起・維持・制御に最も重要な単球系細胞 (抗原提示細胞) に着目し、HTLV-1 感染者に認められる免疫抑制機序の解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) ATL 患者を含む HTLV-1 感染者の Tax 特異的 CD8+T 細胞およびサイトメガロウイルス (CMV) 特異的 CD8+T 細胞の存在および増殖能、IFN $\gamma$  産生能、細胞傷害活性についてテトラマーを用いて、感染者血液中の感染細胞について CD4、CD25、CCR4 分子を指標に flow cytometry で解析した。また、これらの結果をもとに、Tax 特異的 CD8+T 細胞応答の低下している感染者について、感染細胞 (CCR4+細胞) 除去による Tax 特異的 CD8+T 細胞の機能回復について機能解析 (増殖能、IFN $\gamma$  産生能) を行った。

(2) 感染者、特に ATL 患者を中心に単球由来樹状細胞を誘導し、抗原取り込み能、IL-12 産生能、アロ CD4+T 細胞刺激能、自

己の CMV 特異的 CD8+T 細胞刺激能について機能解析を行った。

(3) 骨髄移植を行い寛解に至った ATL 患者より、Tax 特異的 CD4+T 細胞株を樹立し、その認識エピトープを同定した。さらに、CD4+T 細胞のヘルパー機能を Tax 特異的 CD8+T 細胞の増殖を指標に検定した。

### 4. 研究成果

(1) ATL 患者 (N=21) や無症候性感染者 (AC, N=23) の血液中の Tax 特異的 CD8+T 細胞の存在についてテトラマーによる FACS 解析を行ったところ、ATL 患者の約 40%、AC の約 90% に Tax 特異的 CD8+T 細胞が確認された。テトラマー陽性細胞が高頻度に観察された感染者について、Tax 特異的 CD8+T 細胞の増殖能、IFN $\gamma$  産生能を調べたところ、本研究で試験した ATL 患者全例で Tax 抗原に対する増殖および IFN $\gamma$  産生が認められなかったのに対し、ほとんどの AC で Tax 特異的 CD8+T 細胞に増殖能、IFN $\gamma$  産生能が認められた。しかしその一方で、Tax 特異的 CD8+T 細胞に機能が認められない AC も存在することがわかった。このような AC の CMV 特異的 CD8+T 細胞の機能を解析したところ、CMV 抗原に対して増殖能、細胞傷害活性、IFN $\gamma$  産生能を保持していた。このような現象は比較的病勢の緩やかなくすぶり型 ATL 患者で高率に認められた。さらに、同じ AC の PBMC から CCR4+細胞 (Treg や感染細胞) を除去しても、Tax 特異的 CD8+T 細胞の機能回復が認められなかった。これは本研究で試験した ATL 患者全例で同様であった。これらの結果は、CD8+T 細胞応答の低下は HTLV-1 に対してのみ起こり、それは抗原提示細胞の機能低下や、Treg および感染細胞による能動的な免疫抑制が主要な原因ではない可能性が考えられた。

(2) ATL 患者の末梢血単球より樹状細胞 (MoDC) の誘導を試み、T 細胞を刺激するのに必要な分子、HLA class I、II、CD40、CD80、CD86、樹状細胞の活性化マーカーである CD83 の発現を確認したところ、発現レベルに差はあるが、どの ATL 患者由来の細胞からも発現が確認され、ATL 患者から MoDC が誘導可能であることがわかった。さらに、これら MoDC の IL-12 産生 (N=5) アロ CD4+T 細胞刺激能 (N=3) について検討したところ、IL-12 産生は試験した全例で認められたが、アロ CD4+T 細胞刺激能は 1 例で認められなかった。さらに、自己の CMV 特異的 CD8+T 細胞刺激能 (N=6) について検討したところ、程度に差はあるものの試験した全例で CMV 特異的 CD8+T 細胞の増殖が認められた。これらの結果は、ほとんどの ATL 患者の末梢血単球が樹状細胞に分化する能力を有して

いることを示唆している。

(3) Tax 特異的 CD8+T 細胞応答の抑制における HTLV-1 特異的 CD4+T 細胞の役割を調べるため、骨髄移植により寛解に至った ATL 患者の末梢血単核球より HTLV-1 特異的 CD4+T 細胞株を樹立した。エピトープマッピングおよび HLA 拘束性試験より、この細胞株は HLA-DRB1\*0101( HLA-DR1 ) に提示される Tax155-167 を認識することがわかった。続いて、Tax155-167 特異的 CD4+T 細胞を FACS で可視化するため Tax155-167/HLA-DR1 テトラマーを作製した。このテトラマーにより、HLA-DR1 を持つ HTLV-1 感染者 ( N=2 ) および骨髄移植を行い寛解に至った ATL 患者 ( N=3 ) の末梢血には Tax155-167 特異的 CD4+T 細胞が存在することがわかった。従って、Tax155-167/HLA-DR1 テトラマーは Tax 特異的 CD4+T 細胞の動態や機能を観察する良いツールになると考えられた。さらに、この CD4+T 細胞のヘルパー機能を観察した。その結果、Tax 特異的 CD4+ および CD8+T 細胞を同時に刺激した場合、Tax 特異的 CD8+T 細胞のみを刺激したときに比べ、Tax 特異的 CD8+T 細胞の増殖を著しく促進することがわかった。この結果は、HTLV-1 特異的 T 細胞応答誘導型のワクチンを開発する上で重要な知見となると考えられる。

本研究により、無症候性感染者や病勢の緩やかな ATL 患者では、CD8+T 細胞応答の低下が HTLV-1 に対して起こっており、CMV 特異的 CD8+T 細胞応答は正常であったこと、ATL 患者の単球は機能的な樹状細胞に分化可能であること、CCR4+細胞( Treg や感染細胞 ) を除去しても Tax 特異的 CD8+T 細胞の機能が回復しないことから、HTLV-1 特異的 CD8+T 細胞応答の低下は HTLV-1 特異的 CD8+T 細胞自身の機能喪失が最初に起こるのではないかと考えられた。

#### 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 5 件 )

1. Kinpara S, Kijiyama M, Takamori A, Hasegawa A, Sasada A, Masuda T, Tanaka Y, Utsunomiya A, Kannagi M. Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) suppresses HTLV-1 gene expression and cell cycling, while IFN- $\alpha$  combined with zidovudin induces p53 signaling and apoptosis in HTLV-1-infected cells. *Retrovirology*. 10:52, 2013. 査読有. doi: 10.1186/1742-4690-10-52.
2. Tamai Y, Hasegawa A\*, Takamori A, Sasada A, Tanosaki R, Choi I, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Eto T, Koh KR, Nakamae H, Suehiro

Y, Kato K, Takemoto S, Okamura J, Uike N, and Kannagi M. Potential contribution of a novel Tax epitope-specific CD4+ T cells to graft-versus-Tax effects in adult T-cell leukemia patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J. Immunol* 190: 4382-4392, 2013. 査読有. doi: 10.4049/jimmunol.1202971.  
\*Corresponding author

3. Kannagi M, Hasegawa A, Takamori A, Kinpara S, Utsunomiya A. The roles of acquired and innate immunity in human T-cell leukemia virus type 1-mediated diseases. *Front Microbiol*. 3:323., 2012. 査読有.  
doi: 10.3389/fmicb.2012.00323.

4. Takamori A, Hasegawa A\*, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Masuda M, Shimizu Y, Tamai Y, Sasada A, Zeng N, Choi I, Uike N, Okamura J, Watanabe T, Masuda T, Kannagi M. Functional impairment of Tax-specific but not cytomegalovirus-specific CD8+ T lymphocytes in a minor population of asymptomatic human T-cell leukemia virus type 1-carriers. *Retrovirology*. 8:100, 2011. 査読有.  
doi: 10.1186/1742-4690-8-100.  
\*Corresponding author

5. Kannagi M, Hasegawa A, Kinpara S, Shimizu Y, Takamori A, Utsunomiya A. Double control systems for human T-cell leukemia virus type 1 by innate and acquired immunity. *Cancer Sci*. 102(4):670-6, 2011. 査読有.  
doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01862.x.

[ 学会発表 ] ( 計 24 件 )

1. Ando S, Hasegawa A, Murakami Y, Masuda T, Kannagi M. Peptide-pulsed dendritic cell vaccine reinduced functional Tax-specific CD8+ T cells in orally HTLV-1 infected rats with impaired Tax-specific CD8+ T cells responses. 日本免疫学会 2013.12.11-13, 幕張.
2. Takamori A, Hasegawa A, Utsunomiya A, Choi I, Tanosaki R, Eto T, Kato K, Tamai Y, Sasada A, Suehiro Y, Uike N, Kannagi M. Kinetics of Tax-specific CTL in ATL patients following hematopoietic stem cell transplantation from uninfected donors. 第 72 回日本癌学会 2013.10.3-5, 横浜.
3. Suehiro Y, Hasegawa A, Iino T, Sasada A, Watanabe N, Tanosaki R, Utsunomiya A, Matsuoka M, Teshima T, Akashi K, Okamura J, Kannagi M, Uike N. The phase-I study of a therapeutic vaccine to ATL patients with autologous dendritic cells pulsed with Tax peptides. 第 72 回日本癌学会シンポジウム. 2013.10.3-5, 横浜.

4. Hasegawa A, Tamai Y, Takamori A, Sasada A, Tanosaki R, Choi I, Utsunomiya A, Suehiro Y, Maeda Y, Yamano Y, Uike N, Kannagi M. Identification of novel HTLV-1-specific CD4 epitopes in ATL patients after hematopoietic stem cell transplantation. 第 72 回日本癌学会 2013.10.3-5, 横浜.
5. Kannagi M, Hasegawa A, Suehiro Y, Takamori A, Kinpara S, Ando S, Utsunomiya A, Choi I, Uike N. Immunological control of HTLV-1: Prospective therapy towards prophylaxis of disease. 第 6 回 HTLV-1 研究会国際シンポジウム. 2013.8.23-25, 東京.
6. Hasegawa A, Tamai Y, Takamori A, Sasada A, Tanosaki R, Choi I, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Etoh T, Koh KR, Nakamae H, Suehiro Y, Kato K, Takemoto S, Okamura J, Uike N, Kannagi M. Augmentation of donor-derived Tax-specific CTL responses by a novel Tax epitope-specific CD4+ helper T-cells in ATL patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. 16th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses. June 26- 30, 2013, Montréal, Canada.
7. Suehiro Y, Hasegawa A, Iino T, Sasada A, Watanabe N, Choi I, Fukuda T, Takaishi S, Tanosaki R, Utsunomiya A, Miura O, Matsuoka M, Teshima T, Akashi K, Okamura J, Kannagi M, Uike N. The phase-I study of a therapeutic vaccine to ATL patients with autologous dendritic cells pulsed with peptides corresponding to Tax-specific CTL epitopes. 16th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses. June 26-30, 2013, Montréal, Canada.
8. Hasegawa A. Unresponsiveness of Tax-specific CTLs in Rats Orally Infected with HTLV-1 and Reinduction of Functional Tax-specific CTLs by Peptide-pulsed BMDC Vaccine. 第4回日本血液学会 (JSH) 国際シンポジウム 2013 5.24-25, 松山.
9. 長谷川温彦, 安藤聡美, 高森絢子, 玉井洋太郎, 笹田亜麻子, 神奈木真理. ATL発症予防、治療を目的としたペプチドパルス樹状細胞療法に関する研究. 第 2 3 回日本樹状細胞研究会 2013.5.17、京都.
10. Kannagi M, Kinpara S, Takamori A, Sasada A, Hasegawa A. Impact of innate and acquired immune responses in Adult T-cell Leukemia. The 9<sup>th</sup> AACR-Japanese cancer association joint conference, 2013.2.21-25, Maui, HI.
11. Hasegawa A, Tamai Y, Takamori A, Sasada A, Tanosaki R, Choi I, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Etoh T, Koh KR, Nakamae H, Suehiro Y, Kato K, Takemoto S, Okamura J, Uike N, Kannagi M. Identification of a novel HLA-DR1-restricted dominant epitope recognized by HTLV-1 Tax-specific CD4<sup>+</sup> T-cells augmenting HTLV-1-specific CTL expansion in ATL patients after allogeneic HSCT. The 9<sup>th</sup> AACR-Japanese cancer association joint conference, 2013.2.21-25, Maui, HI.
12. Ando S, Murakami Y, Hasegawa A, Masuda T, Kannagi M. Unresponsiveness of dominant Tax-specific CD8<sup>+</sup> T cells in rats orally infected with HTLV-1. 第41回 日本免疫学会総会・学術集会 2012.12.5-7, 神戸
13. Takamori A, Hasegawa A, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Masuda M, Tamai Y, Sasada A, Choi I, Uike N, Okamura J, Watanabe T, Kannagi M. Functional impairment of CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes selective for HTLV-1-specific responses in early stages of adult T-cell leukemia patients. 第 41 回 日本免疫学会総会・学術集会 2012.12.5-7, 神戸.
14. 安藤聡美, 村上悠二, 長谷川温彦, 増田貴夫, 神奈木真理. HTLV-1 経口感染ラットを用いたペプチドパルス樹状細胞ワクチン評価系作成のための基礎的研究. 第 60 回 日本ウイルス学会学術集会 2012.11.13-15, 大阪.
15. Tamai Y, Hasegawa A, Takamori A, Sasada A, Tanosaki R, Choi I, Utsunomiya A, Etoh T, Koh KR, Suehiro Y, Okamura J, Uike N, Kannagi M. A novel HLA-DR-restricted epitope recognized by Tax-specific CD4<sup>+</sup> T cells in ATL patients after allo-HSCT. 第 71 回 日本癌学会学術総会 2012.9.19-21, 札幌.
16. 長谷川 温彦, 高森 絢子, 宇都宮 與, 前田 裕弘, 山野 嘉久, 増田 昌人, 清水 由紀子, 玉井 洋太郎, 笹田 亜麻子, 崔 日承, 鶴池 直邦, 岡村 純, 渡邊 俊樹, 神奈木 真理. HTLV-1 感染者における Tax 特異的 T 細胞応答および ATL 発症予防. 第 1 回 ATL シンポジウム(第 5 回 HTLV-1 研究会/シンポジウム) 2012.8.25-26, 東京.
17. Takamori A, Hasegawa A, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Shimizu Y, Tamai Y, Sasada A, Zeng N, Choi I, Uike N, Okamura J, Watanabe T, Masuda T, Kannagi M. Functional impairment of Tax-specific but not CMV-specific CTLs in a minor population of asymptomatic carriers. 第 70 回 日本癌学会学術集会, 2011.10.3-5. 名古屋.
18. Hasegawa A, Zeng N, Masuda T, Kannagi M. Evaluation of peptide-pulsed dendritic cell vaccine using HTLV-1-infected rat model. 第 70

回 日本癌学会学術集会、2011.10.3-5. 名古屋.

19. Hasegawa A, Takamori A, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Shimizu Y, Tamai Y, Sasada A, Zeng N, Choi I, Uike N, Okamura J, Watanabe T, Masuda T, Kannagi M. Functional impairment of Tax-specific but not CMV-specific CD8+ T cells in a minor population of asymptomatic carriers. The XXV Symposium of the International Association for Comparative Research on Leukemia and Related Diseases. 2011.9.15-17, 東京.

20. Zeng N, Hasegawa A, Shimizu Y, Tamai Y, Takamori A, Sasada A, Kannagi M. The evaluation of peptide-pulsed dendritic cell vaccine in HTLV-1-infected rats with weak T cell responses against HTLV-1. XV International Congress of Virology, 2011.9.11-16, 札幌.

21. Takamori A, Hasegawa A, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Shimizu Y, Tamai Y, Sasada A, Zeng N, Choi I, Uike N, Okamura J, Watanabe T, Masuda T, Kannagi M. Functional impairment of Tax-specific but not CMV-specific CD8+ T cells in a minor population of asymptomatic carriers. XV International Congress of Virology, 2011.9.11-16, 札幌.

22. 笹田 亜麻子, 長谷川 温彦, 清水 由紀子, 末廣 陽子, 鶴池 直邦, 豊嶋 崇徳, 谷 憲三朗, 森尾 友宏, 福田 哲也, 三浦 修, 宇都宮 與, 神奈木 真理. 成人 T 細胞白血病リンパ腫 (ATLL) に対する樹状細胞免疫療法に向けた、基礎解析と第 I 相臨床試験コールドラン. 第 3 回 造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会、2011.8.20-21. 別府.

23. Kannagi M, Kinpara S, Hasegawa A, Takamori A, Shimizu Y, Utsunomiya A. The role of innate and acquired immune responses on HTLV-1 infection. The 15<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, 2011.6.5-8, Leuven, Belgium.

24. Hasegawa A, Takamori A, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Shimizu Y, Tamai Y, Sasada A, Zeng N, Choi I, Uike N, Okamura J, Watanabe T, Masuda T, Kannagi M. Functional impairment of Tax-specific but not CMV-specific CTLs in a minor population of asymptomatic carriers. The 15<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, 2011.6.5-8, Leuven, Belgium.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称 : HLA-DR1 拘束性 Tax 特異的 CD4+T 細胞エピトープ

発明者 : 玉井洋太郎, 長谷川温彦, 神奈木真理, 田野崎隆二

権利者 : 玉井洋太郎, 長谷川温彦, 神奈木真理, 田野崎隆二

種類 : 特許

番号 : 2003-002127

出願年月日 : 2013 年 1 月 9 日

国内外の別 : 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

長谷川 温彦 (HASEGAWA, Atsuhiko)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号 : 90508334

(2)研究分担者

( )

研究者番号 :

(3)連携研究者

( )

研究者番号 :