

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650606

研究課題名（和文） HTLV-1 感染における消耗 T 細胞の特異的回復

研究課題名（英文） Specific recovery of exhausted T cells against HTLV-1

研究代表者 志田 壽利 (Shida Hisatoshi)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授

研究者番号：00144395

研究成果の概要（和文）：抗 HTLV-1 Tax CTL を特異的に認識する分子を作成した。本分子は麻疹ウイルスの F タンパク質と共発現させた細胞と Tax CTL 間で細胞融合を引き起こす。本分子と F タンパク質を表面に持つベクターは Tax CTL 特異的に遺伝子を導入する事が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We constructed the molecule that specifically recognizes anti HTLV-1 Tax CTL. The cells that express both this molecule and measles virus F protein are able to fuse with Tax CTL. The vector that possesses both this molecule and F protein on its surface may be expected to specifically introduce the genes into Tax CTL.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍免疫学

キーワード：HTLV-1, 消耗 T 細胞, 免疫療法

1. 研究開始当初の背景

癌ウイルスである HTLV-1 や HCV などは生涯潜伏感染し続けることで、細胞にダメージを与え細胞のがん化を催す。ウイルスの潜伏を許す主要な要因として、ウイルス特異的な CD4⁺/CD8⁺ T 細胞が誘導されて存在しているにもかかわらず、消耗(exhausted)しており、感染細胞を攻撃する能力を失っていることが分かってきた。（ちなみに、非病原性の常在ウイルスであるサイトメガロウイルスに対する T 細胞は消耗していない。）その機構として、PD-1 や Tim3 等のネガティブシグナルを伝える受容体が T 細胞膜上に up regulate されており、消耗の主原因である事が明らかにされた。さらに、消耗 T 細胞は抑制性サイトカインである IL-10 を放出して免疫系全体を抑制環境に置く。PD-1 は樹状細胞や他の細胞上に発現している PD-L1 と作用する事により T 細胞の活性化を抑え、末梢

における免疫寛容に関わっている。

他方、消耗 T 細胞は PD-L1 と PD-1 間のシグナルを遮断することによって復活し、感染細胞を攻撃できるようになることも報告された。顕著な例として、マウスの LCMV 慢性感染系において、抗 PD-L1 抗体を成体に接種する事によって、T 細胞が活性化されて、体内ウイルス量を激減させた。この結果は T 細胞の消耗がウイルスの潜伏を許す重要な要因である事を示しており、PD-L1/PD-1 等のネガティブシグナルを遮断する事によって、機能的 T 細胞を復活させ、癌ウイルスを排除しうる事を示唆している。又、癌細胞（特に悪性度の高い癌）表面に PD-L1 が発現されていることが見いだされている。そして、抗 PD-L1/PD-1 抗体による治療が坦癌マウスモデルでも行われ、有効性が報告されている。

しかし、上記の抗体は非特異的に全ての T

細胞に作用するために、自己免疫疾患を誘発する。実際に、ネガティブシグナルを担う受容体の1つCTLA-4に対する抗体を投与した臨床試験では、がん患者に自己免疫疾患様症状を誘起したために、中止された。そこで、T細胞全体の活性化ではなく、ウイルス(癌)特異的T細胞のみを活性化させることができるならば、副作用の少ない治療法になると考えられる。

2. 研究の目的

癌ウイルスであるHTLV-1やHCVなどの持続感染や、癌の存続を許す主要原因であるT細胞の消耗(exhaust)から、ウイルス(癌)特異的T細胞のみを回復させ、活性化する方法を提案する事が目的である。現在、消耗T細胞のネガティブシグナルを遮断する抗PD-L1/PD-1抗体が試されようとしているが、全てのT細胞を活性化するために、自己免疫疾患を誘発する副作用が懸念される。そこで、特定のT細胞へのみ活性化遺伝子を導入するターゲティング法を開発する。その方法の有効性をHTLV-1をモデルとして検証する。

3. 研究の方法

(1) 麻疹H-SCT融合蛋白とF蛋白でコートされたレンチ/レトロベクターの作成: 当研究室ではラットATLモデルの研究を行っており、抗HTLV-1 Tax CTL line(4O1/C8)を保有している。このCTL lineを特異的に認識する分子をH遺伝子に連結した。他方、細胞質を欠損するF遺伝子の変異体を作成した。次いで、通常のレンチ/レトロベクター作成の要領で、改変F蛋白発現 plasmid と GFP 発現遺伝子とともに293T/Cos7細胞にトランスフェクションし、本分子とFでコートされたGFP発現レンチベクター粒子をつた。Tax CTL line 4O1/C8細胞とコントロールの自己抗原認識ラットCD8 line G14にTransduceすることによって遺伝子導入の特異性を検討した。又、VSV Gタンパク質でコートしたレンチベクターと比較することによって導入効率を検討した。また、以下の工夫をした。すなわち、ラットT細胞はHIV-1の侵入阻害因子を有しており、その阻害はcyclosporinA(CsA)で解除されることを私は見いだしている。そこで、CsA存在下でのtransductionを検討した。

(2) CTL lineとの細胞融合アッセイ: 4O1/C8をCFSEで蛍光標識し、Fと本分子をco-transfectionした293T/Cos7上に重層して、一晚保温後、CFSE蛍光の293T/Cos7への拡散を蛍光顕微鏡下で観察した。

4. 研究成果

まずHTLV-1のTaxを認識するCTLを特異的に認識するための分子を作製し、本分子

が特異的にTax認識CTLを刺激してIFN- γ を産生させることを先ず確認した。本分子を表面に持つレトロ/レンチウイルスベクターを作製し、遺伝子を導入するためにはCTLと特異的に結合するだけでは不十分で、ベクターとCTL間の膜融合を引き起こすことが必要である。そこで、麻疹ウイルスのHとの融合分子を作製した。そして、改変Fタンパク質と共発現させることにより、表面に本分子とFタンパク質を持つレンチ/レトロベクターを作成し、4O1/C8へのGFPの導入を試みた。しかし、CSAの添加等種々の試みにも関わらず、結果はnegativeであった。その原因を調べたところ、融合タンパク質は合成され、細胞内に安定して存在するにも関わらず、通常の培養条件では細胞表面への輸送効率が低く、野生型Hタンパク質の1/100しか表面膜に存在しないことが分った。そこで、輸送効率を上げるために以下の試みをした。①本分子とHタンパク質の間にスペーサーアミノ酸を挿入し、個々のドメインが正しい立体構造を取りやすいようにした。②不安定なタンパク質の輸送効率を上げる方法として知られている低い培養温度を試みた。③Fタンパク質の細胞質部分をHIV-1 Gagと相互作用できる配列に変えた。④細胞表面への別経路の輸送を司るGRASP55を共発現させた。その結果、培養温度を33Cに下げると約50%の分子が細胞表面に輸送される事が分った。次いで、Tax認識CTL line (4O1/C8)との細胞融合能を測定するために、CFSEでラベルしたCTL lineをFと本分子共発現細胞に重層してCFSEの拡散を蛍光顕微鏡で観察す

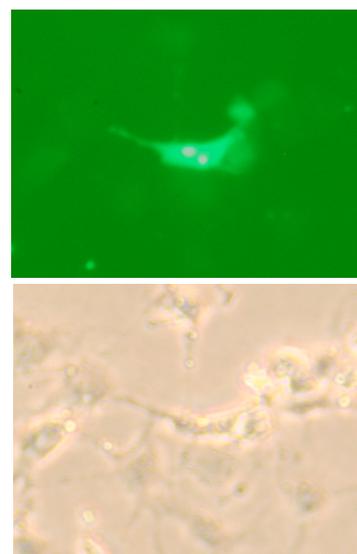


図 CFSE標識したCTLと、本分子とFを共発現した細胞との細胞融合

る方法を開発した。その結果、同分子は 33C と 37C の両温度で T 細胞受容体を認識して細胞融合引き起こす事が分った。

他に以下を試みた。①本分子を表面に持つリポソームを作製するために本分子大量発現ワクシニアを作製した。②Tax 認識 CTL は培養の難しい細胞で、常時良い状態で維持できない。そこで、TCR α と β 遺伝子をクローニングした。そして、同 TCR 発現細胞を作製して標的細胞とする予定である。

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 5 件)

- (1) Xianfeng Zhang, Tomoyoshi Sobue, Mao Isshiki, Shun-ichi Makino, Makoto Inoue, Kazunori Kato, Tatsuo Shioda, Takashi Ohashi, Jun Komano, Hideji Hanabusa, Hisatoshi Shida (2012): Elicitation of both anti HIV-1 Env humoral and cellular immunities by replicating Vaccinia prime Sendai virus boost regimen and boosting by CD40Lm. Plos One 7: e51633. 査読有
- (2) Hisatoshi Shida (2012): Role of nucleocytoplasmic RNA transport during the life cycle of retroviruses. Frontiers in Microbiology. 3:Article17 査読有
- (3) Fofana IB, Colantonio AD, Reeves RK, Connole MA, Gillis JM, Hall LR, Sato S, Audin CR, Evans DT, Shida H, Johnson RP, Johnson WE (2011): Flow cytometry based identification of simian immunodeficiency virus Env-specific B lymphocytes. J Immunol Methods. 370:75-85 査読有
- (4) Mina Hikichi, Minoru Kidokoro, Takeshi Haraguchi, Hideo Iba, Hisatoshi Shida, Hideaki Tahara, Takafumi Nakamura (2011): MicroRNA Regulation of Glycoprotein B5R in Oncolytic Vaccinia Virus Reduces Viral Pathogenicity without Impairing its Antitumor Efficacy. Mol. Ther. 19:1107-15 査読有
- (5) Mika Nagai-Fukataki, Takashi Ohashi, Iwao Hashimoto, Tominori Kimura, Yoshiyuki Hakata, Hisatoshi Shida (2011): Nuclear and Cytoplasmic Effects of Human CRM1 on HIV-1 Production in Rat Cells. Genes to Cells 16:203-216. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

1. Xianfeng Zhang, Hiromi Sakawaki, Tomoyuki Miura, Tatsuhiko Igarashi, Shigeo Horibata,

Kaori Yokomizo, Kazuhiro Matsuo, Naoki Yamamoto, Ismael Ben Fofana, Welkin Johnson, Takashi Ohashi, Hisatoshi Shida: Protection against highly pathogenic SIV by BCG-SIV recombinant priming and attenuated replicating vaccinia-SIV recombinant boosting. AIDS VCCINE 2012. September 2012, Convention Center, Boston, USA

2. 張陰峰 他：弱毒ワクシニアプライム、センダイウイルスブーストエイズワクチン法の免疫評価およびhCD40Lmアジュバント効果の検討。日本エイズ学会 2012. 11. 24 横浜 慶応義塾大学日吉キャンパス
3. Xianfeng Zhang, Tomoyoshi Sobue, Hisatoshi Shida: Enhancement of CD40Lm on Vaccine Elicited Anti-HIV-1 Immunity. July 2011, 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. Rome, Italy.
4. Tomoyoshi Sobue, Shun-ichi Makino, Xianfeng Zhang, Takashi Ohashi, Kazunori Kato, Tatsuo Shioda, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa, Hisatoshi Shida: Immunogenicity of Lc16M8 Δ Vaccinia Prime/Sendai Virus Vector Boost Targeting the Envelope Glycoprotein of HIV-1 and Contribution of CD40Lm. September 2011, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan.
5. H. Shida: Immunogenicity of LC16m8 Δ Vaccinia Virus/Sendai Virus Vector Expressing the gp160 of HIV-1 and Effect of CD40Lm AIDS VCCINE 2011 September 2011 Intercontinental hotel, Bangkok Thailand

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：ワクシニアウイルスベクターおよびセンダイウイルスベクターからなるプライム／ブーストワクチン用ウイルスベクター

発明者：志田壽利、祖父江友芳、加藤和則、井上誠、長谷川護

権利者：国立大学法人 北海道大学、北海道公立大学法人札幌医科大学、ディナベック株式会社

種類：特許

番号：PCT/JP2011/074349

出願年月日：平成 25 年 4 月 1 7 日

国内外の別：国外

[その他]

ホームページ等

<http://www.igm.hokudai.ac.jp/molvir>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者

志田 壽利 (Shida Hisatoshi)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授
研究者番号：00144395

(2) 研究分担者
無し ()

(3) 連携研究者
無し ()