

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590547

研究課題名(和文)単鎖T細胞受容体とMHC-I単鎖三量体を用いたHTLV-I特異的癌治療法の開発

研究課題名(英文)Development of HTLV-I-specific anti-cancer therapy by using single chain T cell receptors and single chain trimers of MHC-I.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ラットモデルを用いてヒトT細胞白血病ウイルスによる成人T細胞白血病の新規治療法を検証した。Taxエпитープ提示型MHC-I単鎖三量体発現ワクシニアウイルスを用いて、エピトープ特異的CTLとの併用効果を検討したところ、CTL単独では細胞傷害を受けない感染細胞に対して、併用によりIFN- γ 産生を伴った細胞傷害が起き、ワクシニアウイルス単独の場合と比較しても、併用による細胞障害の方が高いことが示された。この結果は、エピトープ提示型ワクシニアウイルスによるCTLの活性化が感染細胞の傷害を増強したことを示唆し、CTLからエスケープ可能な感染細胞の排除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 an originally developed rat model of HTLV-I infection. The results indicate that combined treatment with m8 /RT1AISCTax180L, which can express a single chain trimer of MHC-I with a Tax-epitope, and the epitope-specific CTL line, 401/C8, increased the cytolysis of FPM1V.EFGFP/8R cells, a CTL-resistant subclone of HTLV-I-infected FPM1 cells, compared with that using 401/C8 and m8 presenting an unrelated peptide, suggesting that the activation of 401/C8 by m8 /RT1AISCTax180L further enhanced the killing of the HTLV-I-infected cells. Our results indicate that combined therapy of oncolytic m8 /RT1AISCTax180L, and HTLV-I-specific CTLs may be effective for eradication of HTLV-I-infected cells, which evade from CTL lysis and potentially develop ATL. The present results should be useful for further verifying the strategies to fight against ATL.

研究分野：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) が原因となる成人 T細胞白血病 (ATL) は極めて予後不良な疾患であり、約 100 万人と推定されてい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・検証には動物モデルが不可欠であり、HTLV-I に関してはこれまでにサル、ウサギ、ラット等を用いたモデル系が国内外で報告されているが、抗 HTLV-I 免疫を解析できるモデルは限定されている。我々がこれまでに開発している 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) 我々は既に MHC-I 単鎖三量体を用いた HTLV-I 特異的 CTL 応答の誘導・検出システムを開発しており、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を進めている。

(4) 我々は腫瘍溶解性ウイルスを用いた抗 HTLV-I 腫瘍効果についても注目している。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 (m8) 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。既に *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。

(5) 抗原特異的 T細胞受容体 (TCR) を導入したエフェクター細胞を体内に移入する治療は、様々なウイルス性、および腫瘍性疾患に対する新規治療法として注目され、実際に臨床試験も行われており、ATL に対しても応用の可能性が期待されている。我々のラットモデルで用いられる HTLV-I Tax 特異的 CTL 株はエピトープペプチド濃度 $10^{-9} \mu\text{M}$ という低濃度で標的細胞を障害できることから、その TCR の MHC-I に対する親和性が高く、また標的がウイルス由来抗原である点から副作用の問題は低いと予想され、TCR 遺伝子導入効果が期待できる適切なモデルであると考えられる。本研究で得られる知見は、ATL のみならず広範な癌細胞に対する免疫療法にも有益な情報になることが期待される。

2. 研究の目的

本研究は、HTLV-I 感染が原因となる ATL の新規治療法をラットモデルで開発・検証し、臨床応用の可能性を提示することを目的とする。申請者らは独自の HTLV-I 感染ラットモデルを開発しており、本研究では HTLV-I 特異的ラット T細胞から単離した T細胞受容体 (TCR) 鎖と 鎖遺伝子をリンカーで結合し

て発現させる単鎖 TCR と、HTLV-I エピトープ、
2 マイクログロブリン、および MHC-I 重鎖
を一つの蛋白として発現させる MHC-I 単鎖三
量体を応用して、ラットモデルにおいて ATL
の発症機序の解析を行なうとともに、ウイル
ス感染細胞を標的とした ATL の発症予防・治
療法の開発を目指す。また、すでに作製済で
ある 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 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。本 MHC-I 単鎖三
量体発現ワクシニアウイルスに関しては、
HTLV-I 感染細胞に対する腫瘍溶解効果に加
えて、単鎖 TCR 発現 CTL に対する活性化効果
も期待できることから、これらの相乗効果に
ついて解析する。さらに、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
てるとも目的となる。

3. 研究の方法

(1) F344 ラット由来 HTLV-I 特異的 CTL 株の
TCR 遺伝子クローニング、および各種発現ベ
クターの構築：我々はこれまでに複数の Tax
特異的 CTL 細胞株を樹立している。中でも、
認識エピトープのマッピング等の詳細な解
析が進んでいる CD8 陽性 CTL 細胞株である
401/C8 細胞から RACE 法を用いて TCR 鎖、
および 鎖の全長遺伝子を単離する。T 細胞
表面に発現して抗原認識可能な膜型単鎖 TCR
は、V_H-V_L-C の順に連結して発現ベク
ターに導入する。最近の報告では、膜型 TCR に
加えて C 領域を共発現させることで、膜上
での特異的テトラマーによる認識性の向上
や、CD3 からの適切なシグナル伝達が誘導

されることが示されており、本研究でもラッ
ト C 鎖発現ベクターを準備し、共発現効果
についても検証する。

(2) 膜型単鎖 TCR を用いた HTLV-I 特異的 CTL
誘導の可能性の検証：膜型単鎖 TCR を組込
んだレトロウイルスベクター/レンチウイルス
ベクターを用いて、Tax 特異性の無い T 細胞
株や初代培養 T 細胞に膜型単鎖 TCR を発現さ
せる。単鎖 TCR の発現はラット
MHC-I/Tax180-188 テトラマーや、Tax180-188
発現 MHC-I 単鎖三量体-EGFP 融合蛋白を用い
てフローサイトメーターで検出する。発現が
確認された T 細胞においては、HTLV-I 感染細
胞を標的にした細胞傷害活性を評価し、膜型
単鎖 TCR の機能を明らかにする。細胞膜での
テトラマー陽性率や CTL 活性強度については、
C 鎖の共発現効果についても検証し、効率
的な CTL 活性を誘導する条件を明らかにする。

(3) 単鎖 TCR と MHC-I 単鎖三量体の併用によ
る抗 HTLV-I 腫瘍効果の検証：本研究で確立
する単鎖 TCR と、申請者が既に樹立している
Tax180-188 提示型 MHC-I 単鎖三量体発現ワク
シニアウイルスベクターを併用し、抗 HTLV-I
効果が最大限に発揮される条件をラットモ
デルにおいて *in vitro*、および *in vivo* で明
らかにする。ワクシニアウイルスが有する腫
瘍溶解活性による腫瘍細胞の直接的溶解効
果とともに、MHC-I 単鎖三量体を発現させて
CTL による認識を高めることで、膜型単鎖 TCR
導入 CTL が効率的に HTLV-I 感染細胞を傷害
可能なプロトコルの確立を目指す。これら
一連の解析は、実際の治療を想定して全て同
系ラット由来の材料を用いており、本研究の
データを ATL 患者の病態に当てはめて評価す
ることで臨床応用の可能性を提示する。

4. 研究成果

(1) ラット由来 HTLV-I Tax180-188 エピトープ特異的 CD8 陽性 CTL 細胞株である 401/C8 細胞が発現する T 細胞受容体(TCR) 鎖および鎖の全長遺伝子を RACE 法で単離した。次に、V_H-V_L-C の順にリンカーを使って連結した遺伝子をレトロウイルスベクター、およびレンチウイルスベクターに組み込み、T 細胞表面に発現して抗原認識可能な膜型単鎖 TCR 発現ベクターを構築した。作製したベクターにより発現される蛋白は、ラット TCR 複合体特異的抗体によって認識されたが、Tax180-188 特異的テトラマーによる認識は最初に構築したベクター由来蛋白に関しては確認できなかった。PCR による解析結果から、単離した TCR 遺伝子が 401/C8 細胞特異的に発現していることは確認できていることから、発現した単鎖 TCR の MHC-I/ペプチド複合体への親和性が低いことや発現細胞における CD3、CD8 等の TCR/MHC-I 複合体形成に影響を及ぼす因子の発現に問題がある可能性が考えられた。そこで、再度鎖および鎖の全長遺伝子を P2A 配列で結合し、ピューロマイシン発現レトロウイルスベクターに組み込むことで構築した新たな発現ベクターを用いて CD8 陽性ラット T 細胞株に導入したところ、Tax180-188 特異的テトラマーによって認識されることが確認された。

(2) 既に樹立している Tax180-188 提示型 MHC-I 単鎖三量体発現ワクシニアウイルスベクターに関しては、持続感染ラットに対する Tax 特異的免疫誘導能の検討を行った。その結果、本ワクシニアウイルス接種持続感染ラットにおいては、接種 1 週間後に末梢血での Tax180-188 特異的テトラマー陽性細胞の割合が上昇するとともに、Tax180-188 ペプチド刺激に対する IFN- γ 産生が亢進しているこ

とが確認された。さらに、接種 1 週間後の末梢血プロウイルス量が、持続感染時と比較して低下していることも確認され、本ワクシニアウイルスがプロウイルス量の抑制に有効である可能性が示唆された。

(3) Tax180-188 提示型 MHC-I 単鎖三量体発現ワクシニアウイルスベクターを用いて、401/C8 細胞との併用効果について CTL 耐性 HTLV-I 感染細胞株 (FPM1V.EFGFP/8R 細胞) を標的とした細胞傷害活性を指標に検討したところ、401/C8 細胞細胞は単独では FPM1V.EFGFP/8R 細胞に対する細胞傷害活性を発揮出来なかったが、Tax180-188 提示型 MHC-I 単鎖三量体発現ワクシニアウイルスベクターとの併用により、IFN- γ 産生を伴った FPM1V.EFGFP/8R 細胞の細胞傷害を誘導することが確認された。この細胞傷害の程度は、ワクシニアウイルス単独の腫瘍溶解活性よりも有意に高かったことから、CTL の活性化が HTLV-I 感染細胞の傷害を増強したことが示され、本ワクシニアウイルスと CTL の併用が CTL からエスケープ可能な HTLV-I 感染細胞の排除に役立つ可能性が示唆された。

(4) F344 ノードラットにおいて HTLV-I 感染 T 細胞と 401/C8 細胞との混合培養細胞の投与により、高率に下肢の麻痺が起こるモデル系を樹立した。HTLV-I 感染 T 細胞を単独で投与した場合には、全身的な HTLV-I 腫瘍の増殖が確認できるものの、下肢麻痺を発症する個体は皆無であったことから、HTLV-I 感染 T 細胞と Tax 特異的 CTL の共存が発症に關与する可能性が示唆された。一方で、下肢麻痺発症個体の脊髄には CTL ではなく、HTLV-I 感染細胞が浸潤していることが示されたことから、CTL の発症への役割に関してはさらなる解析の必要性が示された。本モデル系は多様な病

態を呈する HTLV-I 関連疾患の発症機序の解析に有用であるとともに、Tax180-188 提示型 MHC-I 単鎖三量体発現ワクシニアウイルスベクターと CTL の併用による発症予防効果の検証への応用の可能性も考えられた。

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 4 件)

1. Isshiki M, Zhang X, Sato H, Ohashi T, Inoue M, and Shida H. Effects of different promoters on the virulence and immunogenicity of a HIV-1 Env-expressing recombinant vaccinia vaccine. *Vaccine*, 32, 839-45, 2014. 査読 有 (Doi: 10.1016/j.vaccine.2013.12.022)
2. Ohashi T, Nakamura T, Kidokoro M, Zhang X, and Shida H. Combined Cytolytic Effects of a Vaccinia Virus Encoding a Single Chain Trimer of MHC-I with a Tax-Epitope and Tax-Specific CTLs on HTLV-I-Infected Cells in a Rat Model. *Biomed Research International*, vol 2014, Article ID 902478, 2014. 査読有 (Doi: 10.1155/2014/902478)
3. Sato H, Jing C, Isshiki M, Matsuo K, Kidokoro M, Takamura S, Zhang X, Ohashi T, Shida H. Immunogenicity and safety of the vaccinia virus LC16m8 vector expressing SIV Gag under a strong or moderate promoter in a recombinant BCG prime-recombinant vaccinia virus boost protocol. *Vaccine* 35, 3549-57, 2013. 査読 有 (Doi: 10.1016/j.vaccine.2013.05.071)

4. Zhang X, Sobue T, Isshiki M, Makino S, Inoue M, Kato K, Shioda T, Ohashi T, Sato H, Komano J, Hanabusa H, Shida H. 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(12):e51633, 2012. 査読 有 (DOI: 10.1371/journal.pone.0051633)

[学会発表](計 1 件)

1. 大橋 貴、田中勇悦、志田壽利。HTLV-I に感染した Tax 特異的 CTL 細胞株の性状解析。第 60 回日本ウイルス学会学術集会、平成 24 年 11 月 14 日、大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

[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