

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号： 82603
研究種目： 基盤研究(B) (一般)
研究期間： 2013 ~ 2015
課題番号： 25293226
研究課題名 (和文) HIV感染症の治癒を目指した免疫細胞療法の確立

研究課題名 (英文) Development of immunotherapy for HIV cure

研究代表者

立川 愛 (Tachikawa, Ai)

国立感染症研究所・エイズ研究センター・室長

研究者番号： 10396880

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 14,300,000 円

研究成果の概要 (和文) : 本研究ではHIV感染症の治癒を目指し、iPS細胞技術を応用した新規免疫細胞療法の開発を行った。老化し、機能低下に陥っているHIV感染者の細胞傷害性T細胞(CTL)からiPS細胞を樹立(T-iPSC)、再分化させ得られたT細胞は、高い増殖能と多種類のサイトカイン産生能を有しており、HIV感染細胞を効率よく傷害した。低ウイルス量と関連する抗HIV効果の高いCTLのT-iPSC由来CTLを用いての新たな治療法の可能性が示された。

研究成果の概要 (英文) : Toward achievement of the HIV eradication strategy, we developed a new T cell therapy using induced pluripotent stem (iPS) cell technology. T cells are irreversibly senescent, less survival, dysfunctional, and lose potential for HIV suppression in chronic HIV-1 infection. We successfully generated iPS cells from HIV-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) in HIV-infected patients (T-iPSC), and redifferentiated the T-iPSC into T cells with the same antigen specificity. The T-iPSC-derived T cells had high proliferation capacity and produced multiple cytokines. HIV-infected cells were recognized and killed by the T-iPSC-derived HIV-specific T cells efficiently, suggesting rejuvenated T-iPSC-derived T cells could be a good effector in vivo. Our data show the possibility that immunotherapy using T-iPSC-derived HIV-specific T cells could be a new strategy for eradicating HIV-infected cells to achieve HIV cure.

研究分野： 感染免疫学

キーワード： HIV感染症 CTL iPS細胞 免疫細胞療法 免疫老化

1. 研究開始当初の背景

HIV 感染症は抗 HIV 治療薬の進歩により、多剤併用療法(HAART)を行うことでその予後は劇的に改善された。しかしながら HAART のみでは HIV は体内から完全に排除されることはなく、感染者は生涯 HAART を続けなければならない。若年層での感染が主である HIV 感染症において、長期 HAART による薬物毒性、副作用、医療経済上の問題は深刻である。このような状況で、治癒を目指す治療法の確立が急務である。HIV 感染症において治癒を妨げる最大の原因がウイルスリザーバーとなる潜伏感染細胞の存在である。ウイルスタンパク質の発現を伴わない HIV 潜伏感染細胞は宿主の免疫監視機構から逃れることができるため、どのように潜伏感染細胞を排除するかが、HIV 研究の最も重要な課題となっている。

近年、治癒を目指した”shock & kill”と呼ばれる治療戦略が提唱されるようになった(1)。HAART により新規感染を抑制した状態で、潜伏感染細胞を再活性化し、ウイルスタンパク質を発現させ、細胞死を誘導、あるいは宿主免疫により感染細胞を排除する、というものである。ウイルス感染細胞の排除にはウイルス特異的細胞傷害性 T 細胞(CTL)が有効なエフェクターであるが、慢性感染期には T 細胞が持続的活性化状態により不可逆的な老化、機能低下状態に陥っていることが知られており、私達は HAART を行っても T 細胞機能は十分に回復しないことも明らかにしてきた(2)。既存の免疫賦活化療法では、老化状態にあり不可逆的に増殖能や機能が低下した T 細胞の機能を回復することは不可能であり、再生医療技術によって HIV 感染における T 細胞ダメージを回復する可能性が期待される。

分担研究者らは、新規技術である人工多能性幹細胞(iPS 細胞)技術を用いて、世界で初めて抗原特異的ヒト T 細胞から iPS 細胞を樹立し(T-iPSC)、さらに再分化させ抗原特異性を維持したメモリー T 細胞を作成することに成功した(3)。

2. 研究の目的

本研究では、HIV 感染症治癒に向けた新規治療戦略として iPS 細胞技術を用いて機能を回復させた HIV 特異的 CTL による免疫細胞療法の開発を目指し、基礎検討を行う。HIV 感染細胞を効果的に排除し得る CTL を確保するために、以下について検討を行う。

(1) T-iPSC に由来する HIV 特異的 CTL の作製と抗 HIV 効果の検証

独自の新規技術を応用し、体内で増殖、長期維持が期待できる HIV 特異的 CTL の作製し、免疫学的解析を行い、さらに抗 HIV 効果の評価を行う。

(2) 抗原特異性(標的部位)の検討

HIV 感染では抗原特異性によって CTL の抗 HIV 効果が大きく異なることが明らかとなっている。これまでの報告で抗 HIV 効果の高いことが明らかとなっている Gag タンパク質について、日本人集団での抗 HIV 効果の高い標的部位の探索を行う。

HIV 感染では CTL からのエスケープウイルスが高頻度に出現することが知られている(4)。また、Gag や Nef のような抗原性の高い部位では複数の CTL に重複して認識される場合がある。エスケープウイルスの出現と対応する CTL 応答の相互作用について検討を行う。

3. 研究の方法

(1) T-iPSC に由来する HIV 特異的 CTL の作製と抗 HIV 効果の検証

HIV 感染者の末梢血単核球(PBMC)から HIV 特異的 CTL クローンを樹立し、センダイウイルスベクターを用いて OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC を導入して初期化を行い、T-iPSC を樹立した。試験管内で血液前駆細胞、T 細胞へと再分化させ、CD8 単独陽性 T 細胞を樹立した。樹立した T-iPSC 由来 T 細胞について、元の CTL クローンと並行して刺激培養を行い、増殖能について比較を行った。フローサイトメトリーにより表面抗原の発現解析、サイトカイン産生能の検討を行った。また、HIV 感染細胞を標的細胞として、特異的な細胞傷害活性について検討した。

(2) 抗原特異性の検討

① 日本人慢性 HIV 感染者を対象とし、PBMC を用いて HLA class I 遺伝子型を決定した。また、Gag タンパク質全体をカバーするオーバーラッピングペプチド(OLP)を抗原として Interferon γ ELISpot assay を行い、HIV 感染者 PBMC 中の Gag 特異的な T 細胞の頻度を測定し、臨床指標である血中ウイルス量(VL)との関連について検討を行った。

② Nef タンパク質由来の重複する 2 つの HLA-A*24:02 拘束性 CTL エピトープ、Nef126-10, Nef134-10 について、私達は両エピトープに含まれる Nef の 136 番目での Y から F へのアミノ酸置換(Y136F)は HLA-A*24:02 関連変異であることを既に報告しているが(4)、その出現と両エピトープに特異的な T 細胞応答の関与については明らかとなっていない。Nef126-10, Nef134-10 について、ウイルスゲノムと CTL 応答の解析を行った。HLA-A*24:02 陽性の HIV 慢性感染者の末梢血を用いて、血漿中ウイルスの nef 遺伝子のシーケンス解析を行い、PBMC を用いて Nef126-10, Nef13-10 特異的な T 細胞応答を調べた。さらに、試験管内での抗原提示様態を明らかにするため、両エピトープを含む Nef の一部を発現系を構築し、CTL クローンによる抗原認識について検討を行った。

本研究内容は研究実施機関の倫理審査委員会により承認されており、研究への参加同意の得られた対象者から臨床試料の提供を受けた。

4. 研究成果

(1) T-iPSCに由来する HIV 特異的 CTL の作製と抗 HIV 効果の検証

HIV 特異的 CTL クローン(HIV-CTL)より T-iPSC を樹立し、再分化させた T 細胞 (T-iPSC-CTL)を、試験管内で刺激培養を行ったところ、由来する HIV-CTL と比して著大な増殖が観察された。特異性を決定する TCR の発現について、pHLA テトラマーを用いて染色したところ、HIV-CTL とほぼ同程度の発現が見られた。抗原刺激後に産生される IFN- γ , IL-2, TNF- α , MIP1 β について細胞内染色を行ったところ、すべてのサイトカインが産生する能力を有していた。さらに、段階希釈した抗原ペプチドを用いて T-iPSC-CTL の抗原認識感度を解析したところ、HIV-CTL と同等であった。さらに、HIV 感染細胞を標的として T-iPSC-CTL の細胞傷害活性について検討したところ、T-iPSC-CTL は試験管内で HIV 感染細胞を傷害することが明らかとなった。

これらの結果より、私達の作製した T-iPSC-CTL は、iPS 細胞化することによって高増殖能を獲得しつつ、HIV 抗原を特異的に認識し感染細胞を傷害し、抗原刺激に対して多種類のサイトカインを産生可能な免疫学的に機能的な T 細胞であることが明らかとなった。

(2) 抗原特異性の検討

Gag 全体をカバーする 115 種類の OLP を用いてマトリックスを作成し、各 HIV 感染者で T 細胞応答の見られた OLP を特定した。T 細胞の標的となっている OLP の種類が多い感染者ほど VL が低かった。また、各 OLP について T 細胞応答の有無と VL の関連を解析したところ、p24 タンパク質前半の特定の領域に T 細胞応答を有する HIV 感染者で有意にウイルス量が低かった。その領域のウイルスのアミノ酸配列は高度に保存されていた。構造的な制約が多く、変異許容性の低い p24 の前半領域を標的とする T 細胞応答はウイルス抑制に寄与していることが示唆された。

一方、変異を起こしやすい Nef タンパク質に重複して存在する Nef126-10, Nef134-10 について、ウイルスの遺伝子解析と T 細胞応答の有無を調べた。ウイルスのアミノ酸配列が野生型の感染者では Nef134-10 に対する T 細胞応答が見られたが、Nef126-10 については T 細胞応答が見られなかったのに対して、Nef の 136 番目に Y から F へのアミノ酸置換 (Y136F)を有する感染者では、両エピトープに特異的な T 細胞応答が観察された。野生型と Y136F を有する両エピトープの HLA-A*24:02 との結合能を調べたところ、野生型の

Nef126-10 は HLA-A*24:02 に結合しなかった。さらに、Nef126-10, Nef134-10 特異的 CTL クローンを樹立し、野生型と Y136F を持つ Nef を発現する HLA-A*24:02 陽性細胞の認識能について検討したところ、Nef126-10 特異的 CTL クローンは Y136F-Nef を発現する細胞のみを認識したのに対し、Nef134-10 特異的 CTL クローンは野生型 Nef を発現する細胞を効率よく認識したが、Y136F-Nef を発現する細胞の認識が著しく低下していた。これらの結果から、Y136F 変異は、Nef134-10 に対する T 細胞応答からのエスケープ変異として出現したこと、Nef126-10 に対する T 細胞応答は Y136F 変異が出現したことによって新たに創出されたことが示唆された。HIV と宿主免疫応答間の相互作用においては、ウイルスが一方向的に宿主免疫応答から逃避するだけでなく、エスケープ変異により新たな T 細胞応答が創出され得ることが明らかとなった。

本研究では、新規技術である iPS 細胞技術により、高増殖能を有する免疫学的に機能的な再生 HIV 特異的 T 細胞の作成に成功した。また、ウイルスと細胞性免疫応答間の相互作用において双方向に影響を及ぼし合っていることを明らかにした。今後、本研究で明らかにした抗原特異性に関する知見を応用し効果的な抗原エピトープについて T-iPSC-CTL を作成し、HIV 感染症治療を目指した免疫細胞療法の開発に向けて、潜伏感染細胞モデル系や動物モデルでの効果検証を行う予定である。

<引用文献>

1. Deeks, SG. *Nature*. 2012 487:439-40.
2. Nakayama K, Kawana-Tachikawa A, et al. *AIDS and Human Retroviruses*. 2012 28:702-14.
3. Nishimura T, Kaneko S, et al. *Cell Stem Cell*. 2013;12:114-26.
4. Furutsuki T, Kawana-Tachikawa A, et al. *J. Virol*. 2004 78:8437-45.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 22 件)

1. Ueda N, Zhang R, Tatsumi M, Liu TY, Kitayama S, Yasui Y, Sugai S, Senju S, Kuzushima K, Kiyoi H, Kaneko S, Uemura Y. BCR-ABL-specific CD4+ T helper cells promote the priming of antigen-specific cytotoxic T cells via dendritic cells. *Cellular and Molecular Immunology*. 2016 in press doi: 10.1038/cmi.2016.7.
2. Ishizaka A, Sato H, Nakamura H, Koga M, Kikuchi T, Hosoya N, Koibuchi T, Nomoto

- A, Kawana-Tachikawa A, Mizutani T. Short intracellular HIV-1 transcripts as biomarkers of residual immune activation in patients on antiretroviral therapy. *J Virol*. 2016 90(12):5665-76. doi: 10.1128/JVI.03158-15
3. Katoh J, Kawana-Tachikawa A, Shimizu A, Zhu D, Han C, Nakamura H, Koga M, Kikuchi T, Adachi E, Koibuchi T, Gao GF, Brumme ZL, Iwamoto A. Rapid HIV-1 Disease Progression in Individuals Infected with a Virus Adapted to Its Host Population. *PLoS One*. 2016 11:e0150397 doi: 10.1371/journal.pone.0150397.
 4. Karagiannis P, Iriguchi S, Kaneko S. Reprogramming away from the exhausted T cell state. *Seminars in Immunology*. 2016 28:35-44. doi:10.1016/j.smim.2015.10.007.
 5. Kitayama S, Zhang R, Liu TY, Ueda N, Iriguchi S, Yasui Y, Kawai Y, Tatsumi M, Hirai N, Mizoro Y, Iwama T, Watanabe A, Nakanishi M, Kuzushima K, Uemura Y, Kaneko S. Cellular adjuvant properties and direct cytotoxicity of redifferentiated Va24 invariant NKT-like cells from human iPS cells. *Stem Cell Reports*. 2016 6:213-227 doi:10.1016/j.stemcr.2016.01.005.
 6. Ando M, Nishimura T, Yamazaki S, Yamaguchi T, Kawana-Tachikawa A, Hayama T, Nakauchi Y, Ando J, Ota Y, Takahashi S, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Miles JJ, Burrows SR, Brenner MK, Nakauchi H. A Safeguard System for Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Rejuvenated T Cell Therapy. *Stem Cell Reports*. 2015 5(4):597-608. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.07.011.
 7. Nakayama-Hosoya K, Ishida T, Youngblood B, Nakamura H, Hosoya N, Koga M, Koibuchi T, Iwamoto A, Kawana-Tachikawa A. Epigenetic repression of interleukin-2 expression in senescent CD4⁺ T cells during chronic human immunodeficiency virus type-1 infection. *Journal Infectious Diseases*. 2015 211:28-39. doi: 10.1093/infdis/jiu376.
 8. 金子新、iPS 細胞技術による腫瘍免疫・感染免疫の再生、*実験医学* 2015 33(2):115-120.
 9. Gu L, Kawana-Tachikawa A, Shiino T, Nakamura H, Koga M, Kikuchi T, Adachi E, Koibuchi T, Ishida T, Gao GF, Matsushita M, Sugiura W, Iwamoto A, Hosoya N. Development and Customization of a Color-Coded Microbeads-Based Assay for Drug Resistance in HIV-1 Reverse Transcriptase. *PLoS One*. 2014 9(10):e109823. doi: 10.1371/journal.pone.0134539.
 10. 金子新、iPS 細胞を用いた免疫細胞の in vitro 再生、*医学のあゆみ* 2014 251:643-648.
 11. Han C, Kawana-Tachikawa A, Shimizu A, Zhu D, Nakamura H, Adachi E, Kikuchi T, Koga M, Koibuchi T, Gao GF, Sat Y, Yamagata A, Martin E, Fukai S, Brumme ZL, Iwamoto A. Switching and emergence of CTL epitopes in HIV-1 infection. *Retrovirology*. 2014 11:38. doi: 10.1186/1742-4690-11-38. doi: 10.1186/1742-4690-11-38.
 12. Okame M, Takaya S, Sato H, Adachi E, Ohno N, Kikuchi T, Koga M, Oyaizu N, Ota Y, Fujii T, Iwamoto A, Koibuchi T. Complete Regression of Early-Stage Gastric Diffuse Large B-Cell Lymphoma in an HIV-1-Infected Patient Following *Helicobacter pylori* Eradication Therapy. *Clin Infect Dis*. 2014 58(10):1490-2. doi: 10.1093/cid/ciu111.
 13. Kawana-Tachikawa A, Llibre JM, Bravo I, Escrig R, Mothe B, Puig J, Puertas MC, Martinez-Picado J, Blanco J, Manzardo C, Miro JM, Iwamoto A, Pozniak AL, Gatell JM, Clotet B, Brander C; MARAVIBOOST investigators. Effect of Maraviroc Intensification on HIV-1-Specific T Cell Immunity in Recently HIV-1-Infected Individuals. *PLoS One*. 2014 9:e87334. doi: 10.1371/journal.pone.0087334.
 14. Shimizu A, Kawana-Tachikawa A, Yamagata A, Han C, Zhu D, Sato Y, Nakamura H, Koibuchi T, Carlson J, Martin E, Brumme CJ, Shi Y, Gao GF, Brumme ZL, Fukai S, Iwamoto A. Structure of TCR and antigen complexes at an immunodominant CTL epitope in HIV-1 infection. *Sci Rep*. 2013 3:3097. doi: 10.1038/srep03097.
 15. Teeranaipong P, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Fujii T, Koibuchi T, Nakamura H, Koga M, Kondo N, Gao GF, Hoshino H, Matsuda Z, Iwamoto A. Development of a rapid cell-fusion-based phenotypic HIV-1 tropism assay. *J Int AIDS Soc*. 2013 16(1):18723. doi: 10.7448/IAS.16.1.18723.
 16. Adachi E, Koibuchi T, Imai K, Kikuchi T, Shimizu S, Koga M, Nakamura H, Iwamoto A, Fujii T. Hemophagocytic syndrome in an acute human immunodeficiency virus infection. *Intern Med*. 2013;52(5):629-32.

[学会発表] (計 28 件)

1. 金子新. iPS細胞を介した抗原特異的T細胞の再生、第15回日本再生医療学会総会、2016年3月、大阪
2. 金子新. iPS細胞を介した抗原特異的T細胞の再生、第43回日本臨床免疫学会スイーツセミナー、2015年10月、神戸
3. 安井裕. iPS細胞を活用した抗原特異的T細胞療法の開発、第7回血液疾患免疫療法研究会学術集会、2015年9月、東京 ポスター
4. Yasui Y. Optimization of Xeno-Free culture system for in vitro induction of T cells from human induced pluripotent stem cells. International Society for Stem Cell Research 2015年6月、ストックホルム (スウェーデン)
5. 河合洋平. Generation of adaptive and innate-like lymphoid killer cells from a single T-iPSC. Kyoto T Cell Conference 2015年5月、京都
6. 齊藤泉、立川(川名)愛ら. 日本人 HIV-1感染者における Gag 特異的 CD8 陽性 T細胞の解析. 第 67 回日本産婦人科学会学術講演会. 2015 年 4 月、横浜
7. Nakayama-Hosoya K, Youngblood B, Kawana-Tachikawa A. Epigenetic regulation of interleukin-2 expression in senescent CD4+ T cells during chronic viral infection. 第 43 回日本免疫学会学術集会. 2014 年 12 月、京都.
8. 石坂彩、佐藤秀憲、立川(川名)愛、鯉淵智彦、水谷壮利ら. HIV-1 残存感染細胞の活性を測ることの意義. 第 28 回日本エイズ学会学術集会. 2014 年 12 月、大阪.
9. 立川(川名)愛. HIV/AIDS:慢性感染におけるウイルスと宿主免疫の攻防. 第 10 回霊長類医学科学フォーラム. 2014 年 11 月、茨城.
10. Kawana-Tachikawa A. Disruption of T cell immunity during chronic HIV-1 infection. The 21st East Asia Joint Symposium on Biomedical Research. 2014年7月、ソウル (韓国)
11. Hirao M, Suzuki K, Kawana-Tachikawa A, Nakauchi H, Cooper DA, Kelleher AD, Kaneko S. Proposal of new immune cell source for HIV-1 infection study based on iPSCs and evaluation of impact of viral replication in iPSCs-derived macrophage expressing shRNAs targeting HIV-1 promoter. 20th International AIDS Conference. 2014 年 7 月、メルボルン (オーストラリア).
12. Nakayama-Hosoya K, Ishida T, Hosoya N, Nakamura H, Koga M, Koibuchi T, Iwamoto A, Kawana-Tachikawa A. Low IL-2 expression by epigenetic modification is associated with immunosenescence in

HIV non-controllers. 10th to 14th Mar 2014. Keystone symposia, HIV Pathogenesis – Virus vs Host. 2014 年 3 月、バンフ(カナダ).

13. Kawana-Tachikawa A. Interaction between virus and host immune response during chronic HIV-1 infection. The 9th China-Japan Laboratory Workshop: Pathogenesis, Gene regulation, and signal transduction. 2013年11月、北京(中国).
14. 立川(川名)愛、韓忠勇、清水晃尚、鯉淵智彦、岩本愛吉ら. 重複するCTLエピトープ部位に生じた1アミノ酸変異によるエピトープの消滅と出現. 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月、神戸.
15. 立川(川名)愛. HIV感染症に対する免疫細胞療法の可能性. 第5回造血器腫瘍免疫療法研究会 2013年8月、名古屋.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

発明の名称：CD4陽性細胞の製造方法

出願番号：特願2015-203482

発明者：金子新、上田格弘、植村靖史

出願人：国立大学法人京都大学、国立研究開発法人国立がん研究センター

出願日：平成27年11月13日

発明の名称：多能性幹細胞から免疫細胞療法用T細胞を誘導する方法

出願番号: PCT/JP2015/070608

発明者：金子新、南川淳隆、堀田秋津、河本宏、増田橋子、島津裕、一瀬大志

出願人：国立大学法人京都大学、アストリム株式会社

出願日：平成27年7月17日

[その他]

ホームページ等

国立感染症研究所エイズ研究センター：

<http://www0.nih.go.jp/niid/ARC/>

iPS細胞研究所：<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/>
金子研究室：

<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/kaneko/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

立川 愛 (TACHIKAWA, Ai)

H25.4-H27.1: 東京大学医科学研究所・准教授

H27.2-H28.3: 国立感染症研究所 室長

研究者番号：10396880

(2)研究分担者

金子 新 (KANEKO, Shin)

京都大学 iPS 細胞研究所・教授

研究者番号：40361331

(3)研究分担者

鯉渕 智彦 (KOIBUCHI, Tomohiko)

東京大学医科学研究所・講師

研究者番号：50313094