

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860301

研究課題名(和文) HBZ特異的CTLの作製とその機能評価

研究課題名(英文) Characterization of HBZ specific T cells for new anti-HTLV-1 therapy

研究代表者

菅田 謙治 (SUGATA, Kenji)

京都大学・ウイルス研究所・研究員

研究者番号：10650616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：新たな抗HTLV-1療法の開発の為にHBZ抗原を発現するrecombinant vaccine virus (rVV)を用いて特異的CTLを誘導し、機能評価を行った。そのrVVを接種したマウスではHBZ特異的CTLの誘導が確認され、そのCTLはHBZ発現細胞に対して細胞障害機能を有していた。それらの結果はRhesus macaqueにrVVを接種した際も観察された。それらのHBZ特異的CTLはHBZ157-176ペプチドに反応した。HBZ157-176はin vitroでCD8T細胞からHBZ特異的CTLを誘導した。この研究でHBZがHTLV-1療法の標的になりうることを示した。

研究成果の概要(英文)：HTLV bZIP factor (HBZ) is consistently expressed in HTLV-1 infected cells and ATL cells. Therefore, HBZ is a potential therapeutic target for immunotherapy of HTLV-1 related diseases and adult T cell leukemia (ATL). In this study, we generated and characterized HBZ-specific CTLs using HBZ-expressing recombinant vaccine virus (rVV-HBZ). HBZ-specific CTLs were induced in rVV-HBZ immunized mice (C57BL/6) and produced effector cytokines (IFN- and TNF-) by HBZ peptide stimulation. HBZ specific T cell response was also observed in rVV-HBZ-immunized Rhesus macaque. These HBZ-specific CTLs were produced effector cytokines by HBZ157-176 peptide stimulation. Furthermore we generated human HBZ specific CTLs from HLA-A2 and HLA-A24 positive healthy donor using HBZ157-176 peptide. The HBZ specific CTLs produce effector cytokines when stimulated with HBZ157-176 peptide-pulsed BLCL. This study suggests that HBZ specific CTLs could be useful for ATL treatment.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HTLV-1 成人T細胞白血病 HBZ 細胞障害性T細胞 遺伝子組換えワクシニアウイルス

1. 研究開始当初の背景

HTLV-1 (Human T cell leukemia virus type-1) 感染者の約 5%は成人 T 細胞白血病 (ATL) を発症する。一方で HTLV-1 は慢性炎症性疾患 (HAM やぶどう膜炎) にも関与していることが知られている。その中でも ATL は難治性の白血病であり、その治療には化学療法や幹細胞移植が一般的に行われてきた。しかし、それらの方法では根治が困難であるため、効果的な治療法の開発が必要とされている。

近年、新たな腫瘍の治療法として癌抗原特異的 T 細胞を利用した免疫療法が注目されている。これまで ATL の免疫療法では HTLV-1 のウイルスタンパクである Tax に対する特異的 T 細胞を利用した T 細胞療法が検討されてきた。その一方で多くの ATL 細胞は Tax 発現が消失していることが報告されており、全ての ATL 患者に応用できる方法とは言い難かった。これまでに申請者は HTLV-1 抗原を発現する遺伝子組換えワクシニアウイルス (rVV) を作成して解析を行ってきた。その rVV はマウスに HTLV-1 抗原特異的 T 細胞応答を誘導できることが分かっている。

2. 研究の目的

本研究では HTLV-1 特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL) を人為的に誘導できる方法を探索し、新たな抗 HTLV-1 治療法の開発に繋げることである。また、これまで抗 HTLV-1 療法の標的タンパクとして用いられてきた Tax ではなく、HBZ (HTLV-1 bZIP factor) を用いる。HBZ は感染細胞で恒常的に発現する唯一のウイルス蛋白である。また、HBZ は Tax と同様に感染細胞へ細胞増殖やアポトーシス耐性に関与することがわかっている。それ故に HBZ 特異的 CTL の誘導法の開発やその機能解析は全 HTLV-1 感染者に有用な治療法へと繋がることが期待される。

3. 研究の方法

(1) ヒト HBZ 特異的 CTL の作成

HBZ 発現 rVV を接種した C57BL/6 やア

カゲザルでは HBZ 特異的 T 細胞応答が出現することを確認している。それらの HBZ 特異的 CD8T 細胞は HBZ₁₀₉₋₁₂₈ と HBZ₁₅₇₋₁₇₆ ペプチドによって刺激した際に強く IFN- γ /TNF- α を産生した。次にそれらペプチドを用いて HBZ 特異的ヒト CTL を作成する。HLA アリルとしては HTLV-1 感染に防御的に働く HLA-A2 と HLA-A24 を使用し、それらのアリルを持つ健常人から CD8T 細胞を回収する。ドナー CD14 陽性細胞は GM-CSF と IL-4 で培養することで樹状細胞を誘導する。樹状細胞は HBZ ペプチドをパルスし、ドナー CD8T 細胞を刺激することで HBZ 特異的 CTL を作成する。

(2) ヒト HBZ 特異的 CTL の機能解析

上記で作成した HBZ 特異的 CTL はペプチドをパルスした細胞を用いることで特異的な IFN- γ /TNF- α 産生や Killing assay などその機能を評価する。標的細胞はドナー末梢血単核細胞に EBV を感染させることにより不死化 B 細胞 (B-LCL) を作成して用いる。また本実験では 20mer ペプチドを用いて刺激を行う。本来多くの CD8T 細胞は 8-12mer のペプチドを認識して細胞を障害する。それ故に 20mer ペプチドでの epitope mapping を行う必要が生じる。ペプチドの epitope mapping を行うために N-terminus/C-terminus deletion peptide を作成して HBZ 特異的 CTL を刺激する。epitope mapping は CTL からの IFN- γ /TNF- α 産生を測定することで決定する。

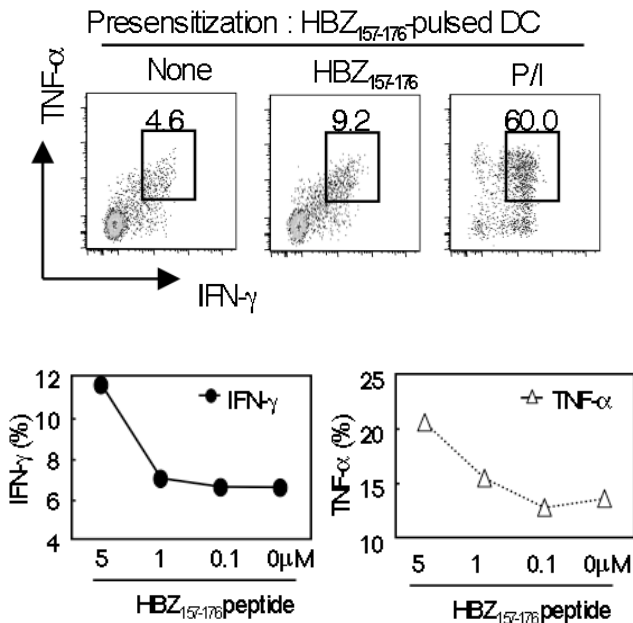
(3) HBZ ペプチドワクチンへの応用

それらの HBZ ペプチドが HBZ 特異的ヒト CTL を誘導できた場合、HBZ ペプチドワクチンへの応用を検討する。HBZ ペプチドはアジュバントと混合後に C57BL/6 の皮下へ摂取を行う。その後、特異的 T 細胞応答は IFN- γ /TNF- α などのサイトカイン産生を測定することで評価を行う。

4. 研究成果

(1) HBZ₁₅₇₋₁₇₆によるヒト HBZ 特異的 CTL 誘導

申請者は HLA-A2 と HLA-A24 アリルを持つ健常人から末梢血単核細胞を回収した。樹状細胞は GM-CSF と IL-4 を用いて CD14 陽性細胞から誘導した。また、樹状細胞は活性化のために OKT-432 で刺激した。一方で同じドナーから CD8T 細胞を回収し、HBZ ペプチド (HBZ₁₀₉₋₁₂₈ もしくは HBZ₁₅₇₋₁₇₆) をパルスした樹状細胞と共培養を行った。HBZ₁₅₇₋₁₇₆ で刺激を行った場合、HBZ 特異的 CTL は IFN- γ /TNF- α を産生した(上図)。一方でマウスとアカゲザルの HBZ 特異的 CTL を活性化させた HBZ₁₀₉₋₁₂₈ ペプチドでは HBZ 特異的 CTL を誘導することができなかった。HBZ₁₅₇₋₁₇₆ によって誘導された HBZ 特異的 CTL はペプチド濃度依存的に IFN- γ /TNF- α を産生した (下図)。それらの結果は HBZ₁₅₇₋₁₇₆ が HBZ 特異的 CTL 誘導のための候補ペプチドであることを示している。



(2) HBZ₁₅₇₋₁₇₆での epitope mapping

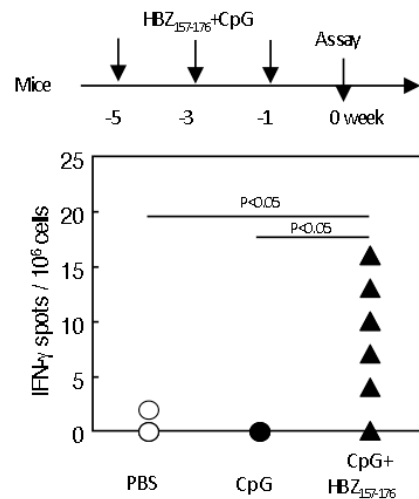
HBZ₁₅₇₋₁₇₆ ペプチド (QELGIDGYTRQLEGEVESLE)のエピトープを決定するために1アミノ酸ずつ削つ

た N-terminus/C-terminus deletion HBZ₁₅₇₋₁₇₆ peptide を作成して上記の HBZ 特異的 T 細胞を刺激した。Deletion peptide はドナー由来 B-LCL にパルスし、CTL を刺激した。機能評価は IFN- γ /TNF- α 産生細胞を測定することで行った。

しかし、両端の1アミノ酸 (Q と E) のどちらかを削るだけでも HBZ 特異的 CTL からのサイトカイン産生は消失した。それらの結果は HBZ₁₅₇₋₁₇₆ ペプチドで誘導された HBZ 特異的 CTL は HBZ₁₅₇₋₁₇₆ の全長を認識している可能性を示しており、その詳細は現在解析中である。

(3) HBZ₁₅₇₋₁₇₆ペプチドの Immunization

ペプチドワクチンへの応用の可能性を調べるために、HBZ₁₅₇₋₁₇₆を C57BL/6 への摂取を行った。HBZ₁₅₇₋₁₇₆と CpG(ODN1826)はマウスの皮下へ3回摂取を行った。申請者はマウス脾細胞での IFN- γ を測定した。HBZ₁₅₇₋₁₇₆は HBZ 特異的 T 細胞応答を誘導できたことから、HBZ₁₅₇₋₁₇₆は ATL の T 細胞治療・免疫療法での有望なペプチドであることが考えられた。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Kenji Sugata, Jun-ichirou Yasunaga, Michi Miura, Hirofumi Akari, Atae Utsunomiya, Kisato Nosaka, Yuko Watanabe, Hitoshi Suzushima, Ki-Ryang Koh, Masanori

Nakagawa, Michinori Kohara, Masao Matsuoka. Enhancement of anti-STLV-1/ HTLV-1 immune responses through multimodal effects of anti-CCR4 antibody” *Sci. Rep.* 6, 27150 (2016). 査読あり DOI: 10.1038/srep27150

- ② Keiko Yasuma, Jun-ichirou Yasunaga, Keiko Takemoto, Kenji Sugata, Yuichi Mitobe, Norihiro Takenouchi, Masanori Nakagawa, Yutaka Suzuki, Masao Matsuoka. HTLV-1 bZIP Factor Impairs Anti-viral Immunity by Inducing Co-inhibitory Molecule, T Cell Immunoglobulin and ITIM Domain (TIGIT). *PLoS Pathog.* 2016 Jan 6;12(1):e1005372 査読あり DOI : <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1005372>

- ③ Kenji Sugata, Jun-ichirou Yasunaga, Yuichi Mitobe, Michi Miura, Paola Miyazato, Michinori Kohara and Masao Matsuoka. Protective effect of cytotoxic T lymphocytes targeting HTLV-1 bZIP factor. *Blood.* 2015 Aug 27;126(9):1095-105 査読あり DOI : <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2015-04-641118>

[学会発表] (計 3 件)

- ① 菅田謙治、安永純一郎、古田梨愛、松岡雅雄、第 2 回 HTLV-1 学会学術集会、HBZ は CCR4 発現を誘導する、ポスター、2015 年 8 月 21-23 日 東京
- ② Kenji Sugata, Jun-ichirou Yasunaga, Kisato Nosaka and Masao Matsuoka, 17th International Conference on Human Retrovirology : HTLV&Related

Viruses, Anti-CCR4 antibody activates virus-specific immune response in STLV-1 infected Japanese monkey, 口頭, 2015年6月18-21日, フランス領マルティニーク

- ③ 菅田謙治, 安永純一郎, 三浦未知, 明里宏文, 小柳義夫, 小原道法, 松岡雅雄, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, Anti-CCR4 抗体は Treg と感染細胞を同時に標的にすることで, STLV-1 自然感染ニホンザルでのウイルス特異的免疫反応を活性化させる, ポスター, 2014 年 11 月 10-12 日, 横浜市

[図書] (計 1 件)

菅田謙治、松岡雅雄、HTLV-1感染の疫学と病原性発現機構, 日本臨床, 2015, 1087 巻 PP.49-54

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 1 件)

名称 : H T L V - 1 関連疾患の予防及び/
又は治療用ワクチン
発明者 : 松岡雅雄・菅田謙治
権利者 : 国立大学法人京都大学
種類 : 特許
番号 : 2014-155855
出願日 : 2014/7/31
取得年月日 : 2016/03/10

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅田 謙治 (SUGATA, Kenji)

京都大学 ウイルス研究所 研究員

研究者番号：10650616

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし