

令和元年6月14日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09262

研究課題名(和文) V_{1V}1型 T細胞活性化生薬成分の同定：新たなHIV制御法開発に向けて

研究課題名(英文) Identification of ingredients for suppressing HIV-1 replication by type-1 gamma-delta T cells

研究代表者

高橋 秀実 (Hidemi, Takahashi)

日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授

研究者番号：40221361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の結果、V_{1V}1型のT細胞レセプター(TCR)を発現した T細胞株(clone 1C116)の樹立に成功し、このT細胞株がTCR特異的な抗原分子に遭遇した場合、IL-2を放出することを見出した。このシステムを利用し、天然生薬中に存在する糖質結合型フラボノイドである陳皮由来のヘスペリジン及び枸杞由来のリナリンがV_{1V}1型T細胞を刺激することを発見し、これらヘスペリジンあるいはリナリンの刺激でV_{1V}1型 T細胞が活性化され、IL-5並びにIL-13、及びMIP-1、MIP-1、RANTESが放出され、細胞内でのR5-型HIV-1の増殖が抑制されることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はこれまで、小腸粘膜内HIVが粘膜組織内のNKT細胞に潜伏感染したHIVが、治療の中断に伴い再活性化されること、そしてその再活性化の制御に粘膜内の1型 T細胞が関与することを見いだして参りました。今回この T細胞を活性化しウイルスの再活性化を防ぐ物質が、枸杞のリナリンや陳皮のヘスペリジンに含まれるフラボノイド多糖体であることを見だし、実際これら薬剤が1型 T細胞を活性化しCD4陽性NKT細胞内のみならずCD4陽性T細胞内の、潜伏したHIV増殖を抑制することを見出しました。こうした研究成果は、今後のエイズ制圧治療のみならず、様々な抗ウイルス剤の開発に先鞭をつけるものであります。

研究成果の概要(英文)：We established transfectants expressing T cell receptors (TCRs) for V_{1V}1 and V_{1V}1 (1C116) from the TCR-deficient line JRT3-T3.5. The amount of IL-2 secreted from these T cell clones accurately indicated TCR-dependent stimulation. The clone 1C116 is strongly stimulated by flavonoid glycosides such as hesperidin and linarin, having both rutinose at the A ring and methoxy (-OCH₃) substitution at the B ring, through the V_{1V}1 TCR. Additionally, hesperidin and linarin showed striking stimulatory activity for clone 1C116 to secrete IL-2 but also PBMC-derived T cells expressing V_{1V}1 TCR; the activated V_{1V}1 T cells also secreted IL-5, IL-13, MIP-1, MIP-1 and RANTES. The PBMC-derived V_{1V}1 T cells stimulated by hesperidin and linarin suppressed R5-HIV-1-NL(AD8) viral replication in both CD4+ NKT and CD4+ T cells. This is the first demonstration that flavonoid glycoside will activate functional V_{1V}1 T cells to inhibit R5 tropic HIV-1 replication in CD4+ T cells.

研究分野：感染免疫分野

キーワード：抗HIV薬 粘膜内HIV NKT細胞 V_{1V}1型T細胞 フラボノイド多糖体 ケモカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

報告者高橋の末梢血単核球より得た V_{1V1} 型 T 細胞に Herpes Saimiri を感染させ不活化させ、その中から限界希釈法を用いて V_{1V1} 型 TCR を発現した T 細胞株クローン 3-D より V₁ 及び V₁ の TCR 遺伝子を採取し、TCR 欠損株である J.RT3-T3.5 に遺伝子導入し V_{1V1} 型 T 細胞株 (1C116) を樹立した。これと同様の手法を用いて、高橋末梢血より得た V_{2V2} 型 T 細胞株由来、V₂ 及び V₂ の TCR 遺伝子を採取し、J.RT3-T3.5 に遺伝子導入し V_{2V2} 型 T 細胞株 (2C21) を樹立した。

そして、これらの樹立株 1C116 及び 2C21 が、抗 CD3 抗体を用いて TCR を cross-link させると IL-2 を放出することを確認し、これらの V_{1V1} 型 T 細胞が特異抗原刺激に伴い IL-2 を放出することを確認した。そして、2C21 がアルキルアミンである iso-butylamine に応答する TCR を発現していることを確認後、これまでに報告された他の V_{2V2} 型 TCR 刺激活性化物質である結核菌由来のピロリン酸 (IPP)、methylamine や ethylamine (Immunity, 11:57-65, 1999)、さらにはお茶由来のテアニン (PNAS, 100:6009-6014, 2003)、アミノビスフォスフォネート製剤 (Blood, 5:1616-1618, 2001) に応答することを検討した。

一方、V_{1V1} 型 TCR を発現した 1C116 株はこれらの抗原に全く応答しないことを確認後、天然生薬成分の中から煎じ薬 (熱水抽出法) に含まれると推測される成分群であるフラボノイド、テルペノイド、アルカロイド等に着目し、それらとの共培養により 1C116 から IL-2 の分泌が刺激されるかを指標として刺激物質を探ったところ、応答性を有する物質が同定された。すなわち、今回樹立したシステムを用い、V_{1V1} 型 TCR に応答する物質群を探索することが可能であることが判明した。

2. 研究の目的

申請者高橋らは、抗 HIV 療法である HAART 治療中の感染者において、末梢血中に HIV 粒子が認められなくなった固体においても、小腸粘膜内の CD4 陽性 NKT 細胞内において活発な R5-type の HIV ウイルス粒子の複製が認められることを見出し、そのウイルス複製制御に V_{1V1} 型 T 細胞株が関与することを見出し、報告してきた。本研究では、この V_{1V1} 型 T 細胞の認識分子を同定し、その分子が末梢血由来の V_{1V1} 型 T 細胞を活性化することを確認し、活性化された T 細胞が実際に CD4 陽性 NKT 細胞内の R5-type の HIV ウイルス粒子の複製を抑制するかを検討することを目的としている。

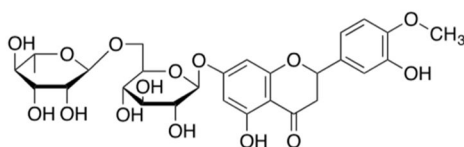
3. 研究の方法

上述したような V_{1V1} 型の TCR に応答性を有する物質群をの同定を、フラボノイド、テルペノイド、アルカロイド等に着目し、探索するのが本研究の最大の目標である。この様な物質を同定することができたならば、次に、こうした物質によって V_{1V1} 型 T 細胞が活性化されるか複製が抑制されるかを追跡する。

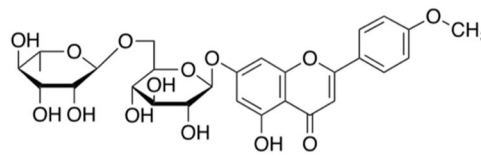
4. 研究成果

当初の予想通り、V_{1V1} 型の T 細胞レセプター (TCR) を発現した T 細胞株 (clone 1C116) の樹立に成功し、この T 細胞株が TCR 特異的な抗原分子に遭遇した場合、IL-2 を放出することを見出した。このシステムを利用し、天然生薬中に存在する糖質結合型フラボノイドである陳皮由来のヘスペリジン及び枸杞子由来のリナリンが V_{1V1} 型 T 細胞を刺激することを発見し、これらヘスペリジンあるいはリナリンの刺激で V_{1V1} 型 T 細胞が活性化され、IL-5 並びに IL-13、及び MIP-1、MIP-1、RANTES が放出され、細胞内での R5-型 HIV-1 の増殖が抑制されることを確認した。

以下に、今回同定した Hesperidin および Linarin の構造を示す。



Hesperidin



Linarin

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 27 件 (欧文論文 17 件, 和文論文 10 件))

Eiji Shinya, Masumi Shimizu, Atsuko Owaki, Samantha Paoletti, Lucia Mori, Gennaro De Libero, and Hidemi Takahashi: Hemopoietic cell kinase (Hck) and p21-activated kinase 2 (PAK2) are involved in the down-regulation of CD1a lipid antigen presentation by HIV-1 Nef in dendritic cells. Hemopoietic cell kinase (Hck) and p21-activated kinase 2 (PAK2) are involved in the down-regulation of CD1a lipid antigen presentation by HIV-1 Nef in dendritic cells. *Virology*, **487**: 285-295, 2016.
DOI: 10.1016/j.virol.2015.10.023.

Ryosuke Murakami, Yohko Nakagawa, Masumi Shimizu, Ayako Wakabayashi, Yasuyuki Negishi, Takachika Hiroi, Kimihiro Okubo, and Hidemi Takahashi: Effects of dendritic cell subset manipulation on airway allergy in a mouse model. *Intl Arch Allergy Immunol*, **168**:219-232, 2016.
DOI: 10.1159/000443237.

Ichikawa, T. Negishi, Y. Shimizu, M. Takeshita, T. and Takahashi, H: alpha-Galactosylceramide-activated murine NK1.1(+) invariant-NKT cells in the myometrium induce miscarriages in mice. *Eur J Immunol*, **46**:1867-1877, 2016.
DOI: 10.1002/eji.20154592

Hideko Azuma, Eri Watanabe, Yohei Ohtsuka, Yasuyuki Negishi, Sadayuki Ohkura, Eiji Shinya, and Hidemi Takahashi: Induction of langerin+ Langerhans cell-like cells expressing reduced TLR3 from CD34+ cord blood cells stimulated with GM-CSF, TGF-beta1, and TNF-alpha. *Biomed Res*, **37**:271-281. 2016.
DOI: 10.2220/biomedres.37.271.

Osono, E. Honda, K. Inoue, Y. Norose, Y. Takahashi, M. Ichimura, K. Kamano, C. Shinya, E. Takaku, S. Okamatsu, K. Kawamoto, S. Takizawa, and H. Takahashi. H.: Detection Method for Aquatic Bacteria of the Fingers, as a Potential Origin of the Aqueous Solution Contamination. *Biocontrol Science*, **22**: 61-65. 2017.
DOI: 10.4265/bio.22.61.

Negishi, Y. Shima, Y. Takeshita, T. and Takahashi, H.: Distribution of invariant natural killer T cells and dendritic cells in late pre- term birth without acute chorioamnionitis. *Am J Reprod Immunol*, **77**: 2017.
DOI: 10.1111/aji.1265.

Takaku, S., Shimizu, M. and Takahashi, H.: Japanese Kampo medicine ninjin'yoeito synergistically enhances tumor vaccine effects mediated by CD8+ T cells. *Oncology Letters*, **77**: 3471~3478, 2017.
DOI: 10.3892/ol.2017.5937.

Kogo, H. Shimizu, M. Negishi, Y. Uchida, E. and Takahashi, H.: Suppression of murine tumor growth through CD8+ CTLs via activated DEC-205+ dendritic cells by sequential administration of alpha-galactosylceramide in vivo. *Immunology*, **151**:324-339, 2017.
DOI: 10.1111/imm.12733.

Asayama, T., Tamura. H., Ishibash, M., Kuribayashi-Hamada Y., Onodera-Kondo A., Okuyama N, Yamada A., Shimizu, M., Moriya, K., Takahashi, H. and Inokuchi Koiti.: Functional expression of Tim-3 on blasts and clinical impact of its ligand galectin-9 in myelodysplastic syndromes. *Oncotarget*, **8**: 88904, 2017.
DOI: 10.18632/oncotarget.21492.

Wakabayashi, A., Shimizu, M., Shinya, E. and Takahashi, H.: HMGB1 released from intestinal epithelia damaged by cholera toxin adjuvant contributes to activation of mucosal dendritic cells and induction of intestinal cytotoxic T lymphocytes and IgA. *Cell Death & Disease*, **9**: 88904, 2018.
DOI: 10.1038/s41419-018-0665-w.

Negishi, Y., Ichiawa, T., Takeshta, T. and Takahashi, H.: Miscarriage induced by adoptive transfer of dendritic cells and invariant natural killer T cells into mice. *Eur J Immunol*, **48(6)**: 973-949, 2018.
DOI: 10.1002/eji.201747162.

Yohei Otsuka, Eri Watanabe, Eiji Shinya, Sadayuki Okura, Hidehisa Saeki, Teunis B.H. Geijtenbeek, and Hidemi Takahashi: Differentiation of Langerhans cells from monocytes and their specific function in inducing IL- 22-specific Th cells. *J Immunol*. 201(10): 3006-3016, 2018.
DOI: 10.4049/jimmunol.1701402.

Yasuyuki Negishi, Hidemi Takahashi, Yoshimitsu. Kuwabara, and Toshiyuki Takeshita: Innate immune cells in reproduction. *J Obstet Gynecol Res.*: 44(11): 2025-2036, 2018.
DOI: 10.1111/jog.13759

Takushi Masu, Masanori Atsukawa, Katsuhisa Nakatsuka, Masumi Shimizu, Daishu Miura, Taeang Arai, Hiroto Harimoto, Chisa Kondo, Keiko Kaneko, Seiji Futagami, Chiaki Kawamoto, Hidemi Takahashi, and Katsuhiko Iwakiri: Anti-CD137 monoclonal antibody enhances trastuzumab-induced, natural killer cell-mediated cytotoxicity against pancreatic cancer cell lines with low human epidermal growth factor-like receptor 2 expression. *PLoS ONE*. 13(12): e0200664, 2018.
DOI: 10.1371/journal.pone.0200664.

Hikaru Takeshita, Eri Watanabe, Yoshihiko Norose, Yasuhiko Ito, and Hidemi Takahashi: Neutralizing antibodies for Helicobacter pylori urease inhibit bacterial colonization in the murine stomach in vivo. *Biomed Res*, 40(2):87-95, 2019,
OI: 10.2220/biomedres.40.87.

Michiyuki Yonekawa, Masumi Shimizu, Atsushi Kaneko, Jiro Matsumura, and Hidemi Takahashi: Suppression of R5-type of HIV-1 in CD4+ NKT cells by $\gamma\delta 1+$ T cells activated by flavonoidglycosides, hesperidin and linarin. *Scientific Reports*, 60(7):9: 7506, 2019.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40587-6>.

Hidehiko Narazaki, Takeshi Yanagihara, Masumi, Shimizu, Hidemi Takahashi, and Yasuhiko Itoh: Pediatric immunoglobulin A complex secretory component deficiency. *Pediatr Int*; 60(7): 662-663, 2019.
DOI: 10.1111/ped.13575.

高橋秀実: 未病と自然炎症: 生薬成分も夜制御の可能性
日本東洋医学会雑誌、67(2):195-203、2016。
DOI: <http://doi.org/10.3397/kanpomed.67.195>.

高橋秀実: エイズウイルスの新たな感染標とその制御
アレルギー・免疫、23(4):349-356、2016。

高橋秀実: 最新の免疫学からみた東洋医学による治療戦略の意義
東京都医師会雑誌、69(5)、431-435、2016。

- 21 高橋秀実: HIV 感染と自然免疫
アレルギー・免疫、23(5)、684-695、2016
- 22 高橋秀実: HIV 感染と δ T 細胞
炎症と免疫、24(3)、173-177、2016
- 23 高橋秀実: アレルギー性鼻炎マウスモデルにおける樹状細胞群による感作マスト細胞の選択的活性化
臨床免疫・アレルギー科:68(1)、1-5、2017
- 24 高橋秀実: 第 26 回公開「シンポジウム」丸山ワクチンの作用機序について
日本医科大学雑誌:13(3)、140-144、2017。

25. 高橋秀実: α -ガラクトシルセラミドにより活性化された樹状細胞を介して誘導された CD8 陽性キラーT細胞による腫瘍制御
臨床免疫・アレルギー科 68(4):607-611, 2017.
26. 高橋秀実: 腫瘍制御に関わる各種細胞群
炎症と免疫: 26: 101-102, 2018.
27. 高橋秀実: 腫瘍内樹状細胞による腫瘍制御
炎症と免疫: 26: 103-109, 2018.

[学会発表] 計 18 件(うち招待講演 10 件/うち国際学会 6 件)

Hidemi Takahashi, Ryosuke Murakami, Yohko Nakagawa, Masumi Shimizu, Ayako Wakabayashi, Yasuyuki Negishi, Takachika Hiroi, Eiji Shinya, and Kimihiro Ohkubo: Airway allergy can be controlled through dendritic cell subset manipulation in a mouse model. 16th International Congress of Immunology (国際学会). 2016 年 08 月 21 日~ 2016 年 08 月 26 日 (Melbourne 市 Australia 国)

高橋秀実: 丸山ワクチン作用機序に関する最新の知見. 第 14 回 NPO「丸山ワクチンとがんを考える会」講演会(招待講演) 2016 年 05 月 28 日 (東京).

高橋秀実: 丸山ワクチン作用機序について(シンポジウム). 第 26 回日本医科大学公開シンポジウム(招待講演) 2016 年 06 月 04 日(東京) ..

高橋秀実: 丸山ワクチンの作用機序と展望(招待講演). 平成 28 年度第一回医療問題懇談会(招待講演) 2016 年 07 月 10 日 (東京).

高橋秀実: 免疫アレルギーに対する漢方「漢方に親しみ強くなる会」講演会(招待講演) 2017 年 01 月 21 日(飯田橋、東京)

高橋秀実: 漢方処方の構成と効果、副作用「葛根湯」第 3 回日本漢方教育懇話会(招待講演) 2017 年 02 月 05 日 鶴見(神奈川).

高橋秀実: 樹状細胞と粘膜免疫、北区医師会学術講演会(招待講演) 2017 年 08 月 02 日(東京).

高橋秀実: アレルギー疾患の治療総論、第 52 回日本アレルギー学会専門医教育セミナー(招待講演) 2017 年 11 月 12 日(東京).

高橋秀実: 東洋医学の根本的概念: 脂質制御医学としての東洋医学、平成 29 年度日本東洋医学会東京都部会(会長講演) 2017 年 11 月 23 日(東京).

高橋秀実: 漢方と免疫、2017 年度日本東洋医学会関東甲信越支部群馬県部会教育講演会(招待講演) 2017 年 11 月 23 日(前橋、群馬).

高橋 秀実: Induction of tumor-specific CD8+ CTLs from naive T cells by mycolic acid and lipoarabinomannan-stimulated dendritic cells. 平成 28 年度丸山ワクチン研究助成発表会(招待講演) 2018 年 03 月 10 日(東京).

高橋秀実: ここまで分かった丸山ワクチンの作用機序、第 16 回 NPO「丸山ワクチンとがんを考える会」講演会. 2018 年 05 月 19 日(東京).

Hideki, Kogo, Hidemi Takahashi, Masumi Shimizu, Yasuyuki Negishi, Eiji Uchida : Murine tumor growth suppression through CD8+ CTLs via activated DEC-205+ dendritic cells by sequential administration of α -galactosylceramide in vivo. American Association for Cancer

Research Annual Meeting(国際学会). 2018年04月14日～2018年04月18日(Chicago, Illinois, USA).

Hideki, Kogo, Hidemi Takahashi, Masumi Shimizu, Yasuyuki Negishi, Eiji Uchida, Suppression of murine tumor growing through CD8+ CTLs via activated DEC-205+ dendritic cells by sequential administration of alpha-galactosylceramide in vivo. DDW USA(2018)(国際学会)2018年06月02日～2018年06月05日(Washington DC, USA).

Yohei Otsuka, Eri Watanabe, Eiji Shinya, Hidehisa Saeki, T. B. H. Geijtenbeek, and Hidemi Takahashi: Differentiation of human Langerhans cells from monocytes and their specific function in inducing IL-22-specific T helper cells. 5th European Congress of Immunology (国際学会)2018年09月02日～2018年09月05日(Amsterdam, Nederland)

Hideki, Kogo, Hidemi Takahashi, Masumi Shimizu, Yasuyuki Negishi, Eiji Uchida: In vivo suppression of murine tumour growth through CD8+ CTL via activated DCs by sequential administration of alpha-galactosylceramide. 5th European Congress of Immunology(国際学会)2018年09月02日～2018年09月05日(Amsterdam, Nederland).

Ayako Wakabayashi, Masumi Shimizu, Eiji Shinya, and Hidemi Takahashi: HMGB1 released from intestinal epithelia damaged by cholera toxin adjuvant contributes to activation of mucosal DCs and induction of intestinal CTLs and IgA. 5th European Congress of Immunology(国際学会)2018年09月02日～2018年09月05日(Amsterdam, Nederland).

Hidemi Takahashi, Hideki Kogo, Masumi Shimizu, Yasuyuki Negishi, and Eiji Uchida: Suppression of murine tumor growth through CD8+ CTLs via activated DEC-205+ dendritic cells by sequential administration of α -galactosylceramide in vivo. 第47回日本免疫学会学術集会. 2018年12月12日～2018年12月13日(博多)

[図書](計0件)
[産業財産権]、

出願状況(計1件)

名称: V 1 V 1型T細胞活性化剤及びウイルス感染症治療剤
発明者: 高橋 秀実
権利者: 高橋 秀実
種類:
番号: 170989JP
出願年: 2018年
国内外の別: 国内

取得状況(計1件)

名称: 樹状細胞活性化剤、体内の樹状細胞を活性化させる方法、および、樹状細胞活性化剤の使用
発明者: 高橋 秀実
権利者: 高橋 秀実
種類:
番号: JP
出願年: 2017年
国内外の別: 国内(国際特許を申請中)

6. 研究組織
(1) 研究分担者
(2) 研究協力者