

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月25日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15519

研究課題名(和文)HLA組換えマウスを用いたCD8陽性T細胞のデングウイルス防御免疫への関与検討

研究課題名(英文)Analysis of cellular immunity on dengue infected HLA transgenic mouse

研究代表者

水上 修作(MIZUKAMI, Shusaku)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：00508971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：適切な実験モデルの欠如は、デング熱の免疫学的解析を妨げていた。樹状細胞(DC)は解析に必須であり、これまで主に単球由来DC(moDC)が用いられてきた。しかし、moDCには準備可能な細胞数や細胞形質(ドナーに依存する)など多くの制限があった。我々は、iPS細胞が問題を解決し、DCの代替供給源になると考え、iPS細胞由来DC株(iPS-DC)を用いて、デングウイルス(DENV)感染およびT細胞活性化モデルを準備した。iPS-DCのDENV感受性はmoDCと同等であり、さらにHLAが適合するT細胞を活性化し、その抗原提示能を示した。現在、システムの改良とそれを用いた動物実験の準備を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

デングウイルス(DENV)感染症における細胞性免疫(T細胞を中心とした免疫反応)の働きは、更なる解明が求められている。樹状細胞(DC)はこの解析に必須の細胞であり、これまでは「限られた細胞数」「実験毎の細胞の性質のばらつき」「細胞の性質のドナーへの依存」などの問題を持つヒト末梢血由来のものが主に使用されてきた。我々はこれらの問題を解決するため、iPS細胞由来DCを用いた実験系を構築し、DENV特異的なT細胞活性化に成功した。DENVは正常マウスに感染できず動物実験にも限界があるため、我々の実験系は(まだ改良の余地はあるが)免疫学的解析を中心としたデング熱研究の発展に貢献可能であると考えている。

研究成果の概要(英文)：The lack of appropriate model has been a concern in dengue research pertinent to immune response. Traditional sources of dendritic cell (DC) which is essential for the in vitro experiments, mostly monocyte derived DC (moDC), have been used despite their limitations such as quantity and donor dependent characters. Development of human iPS cell with consistent proliferation, stable characteristics and desired background has offered added advantages. Therefore, we hypothesized that iPS cell would be a reliable alternative source of DC for in vitro system for dengue virus (DENV). To develop DENV infection and T cell activation model, we utilized iPS cell derived DC line (iPS-DC). DENV infection sensitivity of our iPS-DC was similar to that of moDC. Moreover, iPS-DC had the ability to activate HLA-matched T cell. This affirmed the antigen-specific T cell activation by iPS-DC as a function of antigen presenting cell. Now we are in preparation for further development of this system.

研究分野：免疫学

キーワード：デング熱 細胞性免疫 抗原提示

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

1. 研究開始当初の背景

デング熱は世界中で年間 4 億人もの人々が罹患し、未だ拡大を続けている熱性疾患である (WHO home page, Media centre, updated May 2015)。重症化の頻度は低いものの、多臓器不全やショックなど重篤な状況に陥り死に至ることもある。重症化の確固たる要因は現在まで明らかではない。近年、流行地域拡大、患者数増大が認められており、我が国でも 2014 年に 70 年振りの国内感染が確認された。

そのためデング熱を引き起こすデングウイルスに対するワクチンの開発は急務であるが、これまでに実用化に至ったものは無い。また、最も実用化に近いワクチン候補を用いた第 3 相臨床試験の結果でも、奏効率は 4 種類ある血清型の内、1 型には 50%、2 型には 35%程度にとどまっていた(3 型・4 型には 75%以上の奏効率を示した。Capeding et al. Lancet, 2014; S0140-6736(14): 61060-6., Villar et al. N Engl J Med 372:113-123.)。これまでのデングウイルスワクチン開発は、他のワクチン開発同様に、液性免疫 (= 抗体誘導) を念頭に置いたものがほとんどであった。しかしながら、血中抗体価と臨床像が比例しないことは先の第 3 相試験でも報告されており、そればかりか、誘導された抗体が次回ウイルス感染時にウイルスの取り込みを促進し重症化に結び付くという報告もある (Halstead SB et al. Adv Virus Res, 60:421-467, 2003.)。他方、液性免疫とともに獲得免疫の両輪をなす細胞性免疫については、その主たるエフェクター細胞である抗原特異的な活性化 CD8 陽性 T 細胞 (細胞傷害性細胞 T 細胞, CTL) がデング熱の重症化を防ぐとの結果もマウスを用いた実験にて示されており (Zellweger et al. J Immunol, 193: 4117-4124, 2014.)、これはその重要性を示唆するものである。しかしながら、高い細胞傷害活性やサイトカイン産生能を持った CTL がヒトにおいて実際に感染や重症化の予防にどのように働いているかは、これまで明らかではなかった。

以上が、本研究開始時における本研究を取り巻く状況であった。

2. 研究の目的

1 で述べ、未だに明らかではない「細胞傷害活性やサイトカイン産生能を持った CTL がヒトにおいて実際に感染や重症化の予防にどのように働いているか」という問いの答えを、培養実験系やマウスを用いた動物実験などを用いて明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

本研究の当初案では、培養実験系でデングウイルス特異的な CTL を誘導し (1) 続いてこの CTL もしくはこの CTL を誘導するようなエピトープペプチド (8-11 アミノ酸) をマウスに投与し、デング熱に対する防御効果が認められるのかを確認し (2) これによりデング熱に対する防御免疫への細胞性免疫の関与について検討する予定であった。

しかし、研究期間中に得られた結果などへの対応により変更を行い、以下の方法で行うこととした。

(1) CTL 誘導系の確立及び CTL を効率よく誘導するペプチドの選定

病原体などの抗原特異的な活性化 T 細胞を誘導するために、ナイーブ T 細胞は樹状細胞 (dendritic cell, DC) などの抗原提示細胞 (antigen presenting cell, APC) から T 細胞受容体を通じて刺激を受けなくてはならない。

CD8 陽性細胞の場合、APC はこれを活性化するために自己の細胞膜表面 MHC クラス I 上に CD4

陽性 T 細胞の場合は MHC クラス II 上に) 病原体由来のエピトープを提示する必要がある。MHC には多くの多型が存在し、提示されるエピトープはそれぞれ異なる。抗原提示のプロセスは T 細胞活性化に必須であり、MHC 上に効率よく提示され T 細胞を活性するようなエピトープを探すことが、CTL 誘導には非常に重要である。

本研究で我々は、デングウイルス特異的な CD8 陽性 T 細胞の活性化を誘導する実験系構築を行った。まず、iPS 細胞由来樹状細胞株(iPS-DC)を本研究に用いる APC 候補とし、iPS-DC にデングウイルスを感染させ、これが宿主になりうるかを確認した。次いで、デングウイルス感染 iPS-DC とナイーブ T 細胞を共培養して、T 細胞の活性化が認められるかを確認した。本研究に用いる iPS-DC と T 細胞は異なるドナー由来のため、HLA は完全に一致しておらず、T 細胞は抗原非特異的な反応(アロ反応性)を示す。そのため、まず非感染 iPS-DC と T 細胞を共培養し、ここで活性化した(アロ反応性を示した) T 細胞は除き、残った T 細胞をデングウイルス感染 iPS-DC との共培養に使用した。なお、日本人に最も多い HLA 型(MHC クラス I)である HLA-A*24:02 に着目し、これを有するドナー由来の iPS-DC と T 細胞を使用した。

これと並行して、CTL 誘導用エピトープペプチド候補の選定を行った。既報論文(Weiskopf et al. J Virol. 2015 Jan;89(1):120-8.) に報告されているものの確認に加えて、データベースを用いた候補の選定も行った。

(2) CTL 投与によるデング熱に対する防御効果誘導の検討

当初案では、(1)で得られた CTL の移入(もしくはこれを誘導するようなペプチドを用いたマウスへの免疫)を行い、これによる抗デングウイルス防御免疫誘導の有無を確認し、細胞性免疫のデングウイルス感染防御免疫における役割を確認する予定であった。

デングウイルスは野生型マウスに感染しないため、通常はタイプ I, II の IFN (インターフェロン) 受容体が欠損したマウス (AG129) がこの種の実験に用いられる。本実験では HLA-A*24:02 特異的な細胞性免疫を誘導するために、ヒトの MHC である HLA-A*24:02 を持つ遺伝子組換えマウスを用いる必要がある。そのため、IFN 除去はこれに対する抗体投与により行う予定であった。しかし、研究成果の項に示すような事案が生じたため、研究期間終了の時点で動物実験は行っていない。

4. 研究成果

先ず行ったデングウイルス感染実験において、iPS-DC はウイルスに強い感受性を示した。このため、同細胞はデングウイルスの良い宿主になりうると考えられた。

続いて、デングウイルス感染 iPS-DC が T 細胞を抗原特異的に活性化することが可能かを検討した。アロ反応性を示すものを除いたのちに (CD8 陽性に加え CD4 陽性 T 細胞も含む) T 細胞をデングウイルス感染 iPS-DC と共培養し、活性化の指標として IFN γ 産生及び活性化マーカー CD69 の発現を測定した。その結果、両者が HLA-A*24:02 を持つデングウイルス感染 iPS-DC と T 細胞とを共培養に用いた場合、強い IFN γ *CD69⁺ の活性化した T 細胞集団を誘導することが出来た。これに対して HLA-A*24:02 を持たない T 細胞を用いた際には、同集団はごくわずかしか認められなかった (図 1)。

なお、図には CD8 陽性 T 細胞の結果のみを示しているが、CD4 陽性 T 細胞でも同様の結果が認められた。今回使用した iPS-DC と T 細胞は、MHC クラス II にも共通性が認められたため、CD8 陽性 T 細胞同様に CD4 陽性 T 細胞でも強い反応が認められたと考えられる。

上記の結果から、iPS-DC を抗原提示細胞として、用いる Dengue ウイルス 特異的な T 細胞 活性化の実験系が構築できた。この研究成果は、学術集会で発表され、学術論文にまとめられた。

次に iPS-DC にパルスして CD8 陽性 T 細胞の活性化に使用する エピトープペプチドの選定を行った。データベースでの選定には、Immune Epitope Database (IEDB) を用いた。Dengue ウイルスの配列に含まれ HLA-A*24:02 と強い親和性を示す 8-11 アミノ酸長のペプチドを、親和性の強い順にリストアップした。

当初計画に沿えば、ここからリストアップしたペプチドを用いた培養実験系での Dengue ウイルス 特異的な活性化 CD8 陽性 T 細胞 (CTL) の誘導と、Dengue ウイルス感染組換えマウスへの CTL 移入による Dengue ウイルス防御免疫に対する細胞性免疫の関与の検討を行う予定であった。

しかしながら、以下のような研究期間中に起きた事象のため計画の変更を行うこととなった。

(1) 抗原非特異的に活性化した iPS-DC の除去について：

本研究の実験では、Dengue ウイルス 特異的な T 細胞活性化実験において、T 細胞と iPS-DC の HLA が適合し、Dengue ウイルス感染 iPS-DC を用いた際に、その他の組み合わせと比べて多くの IFN γ *CD69⁺ 集団が認められた。しかしながら、アロ反応性 T 細胞を予め除いたにも拘らず、多くの CD69⁺ 集団は認められた。そのため、動物実験におけるこの集団の動向が危惧されたため、少しでもこの集団を減らすべく、iPS-DC から HLA-A*24:02 以外の HLA をノックダウンすることとした。ノックダウンには CRISPR/Cas9 システムを用いることとし、現在予備実験を終えた段階である。

(2) 動物実験における IFN 除去方法の再検討：

当初、本研究での IFN 除去は抗体投与により行う予定であった。通常、マウスを用いた Dengue ウイルス感染実験には、野生型マウスに Dengue ウイルスが感染しないため、IFN 受容体を欠いたマウスを使用する。しかし、本研究は細胞性免疫に着目したものであり、特に HLA-A*24:02 と提示された エピトープの複合体により刺激された T 細胞の解析を行うため、ヒトの HLA-A*24:02 を持つ組換えマウスの使用が必須である。従来の方でこの組換えマウスと IFN 受容体を欠いたマウスを掛け合わせて使用に足るマウスを作製するには非常に時間がかかると考えられたため、抗体投与によりマウス体内の IFN を除去する方法を選択した。

しかしながら、Keystone Symposia などの学会で発表を行い、参加者から長期間に渡る実験におけるこの方法の妥当性に疑問を呈された。そのため、骨髄キメラの作製などいくつかのこれに代わる案を再検討したが、近年(1)でも述べた CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集が用いられるようになってきており、組換えマウス作製を取り巻く状況は本研究開始時とは様変わりした。そのため、(1)同様 CRISPR/Cas9 を用いたマウス作製を現在準備しているところである。

今回残念ながら、当初予定していた動物を用いた実験を含む計画のすべてを終えることは出来なかった。しかしながら、我々は、iPS-DC が Dengue ウイルス 特異的な T 細胞活性化を誘導する際の抗原提示細胞として非常に有用であることを発見し、T 細胞活性化の培養モデルを構築した。これまで、同様の実験には、末梢血から精製した DC が主に用いられていた。その結果、細胞数や実験毎の細胞の均一性、得られる遺伝子背景など多くの制限が存在していた。

今回我々が明らかにした、iPS 細胞由来の DC が、Dengue ウイルスに感染し T 細胞を活性化し得るという事実は、今後の Dengue 熱研究、特に免疫学的解析の進歩に寄与するものと考えられる。

一方、我々の実験システムには未だ問題点も多い。上記に加え DC と T 細胞を同じドナーから得るなどより抗原非特異的な反応の少ない実験系を準備し、当初予定していた実験も今後行えるようにしたいと考えている。

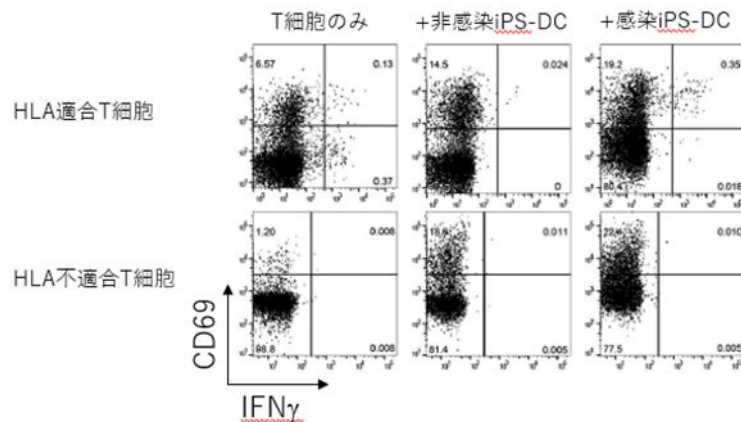


図1: デングウイルス感染 iPS-DC との共培養による CD8 陽性 T 細胞の活性化
共培養には CD3 陽性の T 細胞 (CD8 陽性、CD4 陽性の両者を含む) を用いた。図は、解析時に CD8 陽性細胞の結果のみを表示したものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. iPS cell serves as a source of dendritic cells for in vitro dengue virus infection model. Manh DH, Mizukami S, Dumre SP, Raekiansyah M, Senju S, Nishimura Y, Karbwang J, Huy NT, Morita K, Hirayama K. J Gen Virol. 2018 Sep;99(9):1239-1247. doi: 10.1099/jgv.0.001119. 2018. 査読有.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Shusaku Mizukami, iPS cell serves as a source of dendritic cells for in vitro dengue virus infection model, 第 47 回日本免疫学会総会・学術集会, 2018.
2. Shusaku Mizukami, iPS cell derived dendritic cell like cell is infected with dengue virus, and acts as antigen presenting cell, Keystone Symposia, 2017.
3. Shusaku Mizukami, iPS cell derived dendritic cell be a good host of dengue virus, 第 45 回日本免疫学会総会・学術集会, 2016.
4. Shusaku Mizukami, iPS cell derived dendritic cell be a good host of dengue virus, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tn.nagasaki-u.ac.jp/nekken/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

ダオ フィ マン (DAO, Huy Manh) 長崎大学・熱帯医学研究所・博士課程大学院生

シャム プラカシ ドゥムレ (DUMRE, Shyam Prakash) 長崎大学・熱帯医学研究所・助教

ムハレバ ライキエンシヤ (RAEKIANSYAH, Muhareva) 長崎大学・熱帯医学研究所・特任研究員

千住 覚 (SENJU, Satoru) 熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

西村 泰治 (NISHIMURA, Yasuharu) 熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

ロサポー ン チャントラ (KARBWANG, Laothavorn Juntra) 長崎大学・熱帯医学研究所・教授

グエン ティエン フイ (HUY, Nguyen Tien) 長崎大学・熱帯医学研究所・准教授

森田 公一 (MORITA, Kouichi) 長崎大学・熱帯医学研究所・教授

平山 謙二 (HIRAYAMA, Kenji) 長崎大学・熱帯医学研究所・教授

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。