

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19590

研究課題名(和文) iPS細胞由来細胞障害性T細胞を用いた新規HTLV-1感染症治療法の開発

研究課題名(英文) Development of iPSC-based CTL therapy for HTLV-1 infection

研究代表者

手塚 健太 (TEZUKA, Kenta)

国立感染症研究所・血液・安全性研究部・研究員

研究者番号：10754533

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)：本研究ではHTLV-1感染症の発症予防・治療法開発を目指し、iPS細胞を介した新規免疫細胞療法の検討を行った。血中プロウイルスロードが4%以上の検体を収集し、Tax特異的CTLの頻度と機能解析を実施した結果、一部の検体でTax特異的CTLの機能不全が確認された。慢性感染状態におけるCTLの老化や機能不全はHTLV-1感染症の発症に繋がると考えられ、iPS細胞を介した再生CTL療法に期待が持たれた。

研究成果の概要(英文)：Toward achievement of the HTLV-1 prophylaxis and cure strategy, I assessed the potential for using induced pluripotent stem (iPS) cell technology for development of a new immunotherapy. The frequency of Tax-specific CTLs was quite low, and its phenotypes showed senescent, less survival, and dysfunctional behaviors in a portion of chronic HTLV-1 carriers with high proviral load (4% > PVL). Patient-derived HTLV-1-specific regenerated CTL therapy could be a promising strategy to prevent or treat HTLV-1-associated diseases among these carriers.

研究分野：血液内科学

キーワード：HTLV-1 感染症 発症高リスク群 Tax特異的CTL iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

Human T-cell leukemia virus type-1 (HTLV-1)は、本邦で発見され、Adult T-cell leukemia (成人 T 細胞白血病: ATL)や HTLV-1 associated myelopathy (HTLV-1 関連脊髄症: HAM)及びその他の炎症性疾患を含めた、HTLV-1 感染症の原因ウイルスである。本邦における HTLV-1 感染者(キャリア)はおよそ 80~100 万人に上り、将来 HTLV-1 感染症を発症する危険性を有している。ATL や HAM を治癒することは困難であり、キャリアの段階で HTLV-1 感染症を予防する発症予防の取り組みは極めて重要な課題であると考えられているが、実用化には至っていない。

一方で、体外において増幅した患者自身の抗原特異的 CTL を用いてがんや感染症を治療する試みは、CTL の持つ高い抗原特異性と細胞障害能を利用した効率的な治療法であり、近年急速に基礎及び臨床応用が進められている。HTLV-1 においては、キャリアの約 7 割をカバーする主要な HLA-A アリルで提示される Tax 抗原エピートープが既に明らかであること、Tax 特異的 CTL が強力な感染細胞殺傷能を有することから、体外で増幅した患者自身の Tax 特異的 CTL を患者体内に輸注することで高いウイルス抑制効果を得られることが期待される。

そこで本研究では、高リスク群キャリアの発症予防・治療法確立に向けて、患者由来 Tax 特異的 CTL を iPS 細胞を介して初期化・再分化誘導することで、HTLV-1 感染症に対する新規細胞療法の可能性を検討する。

2. 研究の目的

HTLV-1 感染は ATL や HAM 等の重篤な疾患の原因となるが、感染者の発症高リスク群において有用な発症予防・治療法や効果的なワクチンは存在しない。多くの感染者で検出される Tax 特異的 CTL は感染細胞に対して強い抑制作用を有しており、患者自身の Tax 特異的 CTL を利用した細胞療法の確立が期待されている。本研究では、HTLV-1 感染症の発症予防・治療法開発に向けて、iPS 細胞を介した再生 CTL 療法の基盤的検討を目的とする。

3. 研究の方法

プロウイルスロードが 4%を超える高リスク群キャリア検体を収集した。これらの検体から治療標的を選定するために、HLA-A2 及び HLA-A24 アリルを有する高リスク群キャリアにおける Tax 特異的 CTL を検出し、培養系を用いて CTL 機能を評価した。また、iPS 細胞からのリンパ系細胞への分化誘導法を検討した。

4. 研究成果

培養条件下で増殖させた抗原特異的 CTL を用いて、HTLV-1 に対する新規細胞療法の開発を目的としている。本研究において血中プロウイルスロードが 4%以上の検体を合計 28 検体収集・保存した。PBMC において HLA-A2 あるいは A24 アリルを有する検体のうち、Tax 特異的 CTL が検出されるものについてはその頻度と機能解析を実施した。その結果一部の検体において、Tax 抗原ペプチドの刺激培養によっても CTL が増殖しない、抗原刺激による IFN- γ の放出能が著減している、機能不全は Tax 特異的 CTL に限定され CMV 特異的 CTL に異常は見られないことを明らかにした。これらの検体は Tax 特異的 CTL が持続的な抗原刺激を受けることで疲弊・老化し、不可逆的な機能低下状態に陥っていると考えられる。iPS 細胞を介した再生 CTL 療法では CTL の幼若性を回復させることが可能であり、機能低下が見られる患者は治療対象となり得る。

また、iPS 細胞からの再生 CTL 培養法の確立を目指し以下の基盤的な検討を行った。

iPS 細胞培養法の簡略化のため、ラミニン-511 でプレートコーティングし、フィーダーレスでの長期培養と未分化能維持に成功した。マウス由来ストローマ細胞株である OP9-DL1 は、培養条件下で幹細胞からのリンパ系細胞への分化を支持する。臍帯血由来 CD34 陽性ヒト造血幹細胞と OP9-DL1 を共培養し T 細胞への分化誘導を試みた結果、共培養した幹細胞のうち、10%程度を CD4/8 陽性未成熟 T 細胞へ分化させることに成功した。iPS 細胞からの抗原特異的 CTL 誘導法に応用できる成果であると考えられた。

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3件)

Tezuka K, Okuma K, Kuramitsu M, Matsuoka S, Tanaka R, Tanaka Y, Hamaguchi I. Control of HTLV-1 Infection by Eliminating Envelope Protein-Positive Cells with Recombinant Vesicular Stomatitis Viruses Encoding HTLV-1 Primary Receptor. **Journal of Virology**, 2018;92:e01885-17. 査読有
DOI: 10.1128/JVI.01885-17.

Nojima K, Okuma K, Ochiai M, Kuramitsu M, Tezuka K, Ishii M, (他8名). Establishment of a reference material for standardization of the anti-complementary activity test in intravenous immunoglobulin products used in Japan: A collaborative study. **Biologicals**, 2017;46:68-73. 査読有
DOI: <http://10.1016/j.biologicals>.

Tezuka K, Kuramitsu M, Okuma K, Nojima K, Araki K, (他7名). Development of a novel dengue virus serotype-specific multiplex real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for blood screening. **Transfusion**. 2016; 56: 3094-3100. 査読有
DOI: <http://10.1111/trf.13875>.

[学会発表](計11件)

Kenta Tezuka, Kazu Okuma, Isao Hamaguchi. Development of a novel high-sensitive nucleic acid testing method for quantifying VSV vector in vivo. 第65回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2017

Kazu Okuma, Kenta Tezuka, Madoka Kuramitsu, Yuetsu Tanaka, Reiko Tanaka, Isao Hamaguchi. Oncolytic recombinant vesicular stomatitis

viruses encoding HTLV-1 receptor control HTLV-1 infection in vitro and in vivo. 第65回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2017

手塚健太, 大隈和, 倉光球, 田中勇悦, 田中礼子, 浜口功. HTLV-1 受容体をコードする組換え水疱性口内炎ウイルスを用いた HTLV-1 感染の制御. 第4回日本 HTLV-1 学会学術集会, 大阪, 2017

平舘裕希, 水上拓郎, 関洋平, 村田めぐみ, 鷺崎彩夏, 手塚健太, 鈴木樹理, 兼子明久, 佐々木永太, 野島清子, 石上暁代, 安永純一郎, 蔵田潔, 松岡雅雄, 明里宏文, 明里宏文, 浜口功. 閉経期雌ニホンザルの生殖器官における STLV-1 感染動態の解析. 第4回日本 HTLV-1 学会学術集会, 大阪, 2017

平舘裕希, 水上拓郎, 関洋平, 村田めぐみ, 鷺崎彩夏, 手塚健太, 鈴木樹理, 兼子明久, 石上暁代, 安永純一郎, 蔵田潔, 松岡雅雄, 明里宏文, 明里宏文, 浜口功. 閉経期雌ニホンザルの生殖器官における STLV-1 感染動態の解析. 第160日本獣医学会学術集会, 鹿児島, 2017

Kenta Tezuka, Kazu Okuma, Madoka Kuramitsu, Yuetsu Tanaka, Reiko Tanaka, Isao Hamaguchi. Targeting and Eliminating HTLV-1-infected Cells with Cytolytic Recombinant Vesicular Stomatitis Viruses Encoding HTLV-1 Primary Receptor. 18th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, Tokyo, 2017

Kazu Okuma, Kenta Tezuka, Madoka Kuramitsu, Arya Biragyn, Isao Hamaguchi. Establishment of a Novel HTLV-1-specific CCR4-targeting Therapy Using a CCL17-binding Oligonucleotide Delivery System. 18th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, Tokyo, 2017

Kazu Okuma, Kenta Tezuka, Madoka Kuramitsu, Isao Hamaguchi. Cytolytic recombinant vesicular stomatitis viruses encoding HTLV-1 primary receptor target and eliminate HTLV-1-infected cells. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2016

大隈 和、手塚健太、倉光 球、浜口 功. CCL17 結合オリゴヌクレオチド導入システムを用いた HTLV-1 特異的新規 CCR4 分子標的療法の開発. 第 3 回日本 HTLV-1 学会学術集会, 鹿児島, 2016

手塚健太、倉光球、大隈和、野島清子、荒木久美子、篠原直也、松本千恵子、佐竹正博、浜口功. Multiplex RT-qPCR によるデングウイルス 4 血清型の高感度同時検出法の開発. 第 64 回日本輸血・細胞治療学会、京都、2016

野島清子、水上拓郎、松本千恵子、蕎麦田理英子、佐竹正博、大隈和、手塚健太、倉光球、荒木久美子、山口一成、浜口功. HTLV-1 感染防止を目指した血漿由来抗 HTLV-1 ヒト免疫グロブリン製剤の開発. 第 64 回日本輸血・細胞治療学会、京都、2016

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：検出及び/又は定量用プライマー対、検出及び/又は定量用プローブ、及び、検出及び/又は定量用キット (組換え水疱性口内炎ウイルスを用いたワクチン・治療薬開発に向けたモニタリングのためのウイルスベクター定量法)

発明者：大隈 和、手塚 健太、浜口 功

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2017-131361

出願年月日：平成 29 年 7 月 4 日

国内外の別：国内

6 . 研究組織

(1)研究代表者

手塚 健太 (TEZUKA, Kenta)

国立感染症研究所

血液・安全性研究部

研究員

研究者番号：10754533