

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07152

研究課題名(和文) HTLV-1慢性感染およびATL発症過程におけるがん微小環境の役割

研究課題名(英文) Role of tumor microenvironment in the chronic infection HTLV-1 and the ATL development

研究代表者

藤澤 順一 (Fujisawa, Jun-ichi)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：40181341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ATL発症における免疫チェックポイントシグナルの影響を解析するため、これまで我々が抗HTLV-1免疫が誘導されることを確認しているHTLV-1感染ヒト化マウスの系に抗PD-1抗体を投与したところ、非投与群では感染経過とともに数百倍に増加するCD4及びCD8 T細胞の増殖が抑制され、生存率も改善した。異常増殖したCD8 T細胞を解析したところ、大部分にHTLV-1感染が確認されたことから、HTLV-1感染CD8 T細胞の抗原非特異的な活性化に起因する免疫チェックポイントシグナルの影響で抗HTLV-1免疫が減弱し、これが抗PD-1抗体の投与により回復した可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト免疫系が再構築されたヒト化マウスの系で、抗PD-1抗体の投与がHTLV-1感染細胞の腫瘍性増殖を抑制したことから、ヒト化マウスが免疫チェックポイントシグナル制御を介したATL発症予防法の開発に有用な実験系を提供することが示された。また、ヒト化マウス脾臓内において増殖したCD8T細胞の多くにHTLV-1の感染が観察され、抗HTLV-1宿主免疫への影響が示唆されたことから、HTLV-1感染初期のヒトにおけるCD8T細胞のHTLV-1感染、およびその抗HTLV-1宿主免疫への関与に注目することで、ATL発症の初期過程の理解に新たな方向性を与えるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：To examine the role of PD-1/PD-L1 co-inhibitory signaling in ATL development, we analyzed the effect of anti-PD-1 antibody on the leukemic growth of T-cells in HTLV-1 infected humanized mouse, in which the human immune system against HTLV-1 infection is functionally established.

HTLV-1 infection of humanized mice induced hundreds fold increase of CD4 T-cells and most of infected mice died in 2 months, although the number of CD8 T-cells was similarly elevated in parallel with the overgrowth of CD4 T-cells. Administration of anti-PD-1 antibody substantially retarded the increase of CD4 T-cells as well as CD8+ T-cells in PBL and prolonged the survival of infected mice. Since most of CD8 T-cells in the infected mouse was found to be infected with HTLV-1, the co-inhibitory signals induced by the antigen non-specific activation of CD8 T-cells possibly suppress the anti-HTLV-1 immunity and the blocking of PD-1/PD-L1 pathway could have restored the immunity.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HTLV-1 ヒト化マウス 白血病 PD-1 免疫チェックポイント 細胞障害性T細胞 CADM1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 重症免疫不全 NOG-SCID マウス骨髄内への臍帯血由来造血幹細胞の移植により作製したヒト化マウスに HTLV-1 を感染させることにより、感染数ヶ月で、肝・脾腫を伴う白血病様病態の再現に成功した。
- (2) 同ヒト化マウスへの Tax ペプチドワクチン投与により、Tax テトラマー陽性 CD8⁺T 細胞の発現および感染リンパ系組織への集積と平行して、HTLV-1 感染 T 細胞の腫瘍性増殖の抑制が観察され、CTL を介した感染細胞制御機構が実証された。
- (3) ヒト化マウス脾臓内の HTLV-1 感染 T 細胞を用いた cDNA マイクロアレイ解析では、Treg の機能発現に關与する CTLA-4 や granzyme B 遺伝子の発現誘導が認められ、HTLV-1 感染細胞自体の Treg 機能を介した宿主免疫の抑制が想像された。
- (4) 一部の ATL 患者細胞において、免疫チェックポイント分子 PD-L1 の過剰発現による抗腫瘍免疫からの回避が報告されていることから、ATL 発症過程における様々なかたちの免疫抑制機構の關与が強く示唆された。

2. 研究の目的

「がん微小環境」における免疫チェックポイント分子を標的とした種々の試薬が、HTLV-1 感染ヒト化マウスにおける感染細胞の腫瘍増殖を抑制し得るかどうかを個体レベルで検証し、さらにその機構をリンパ系組織レベル、および感染細胞あるいは宿主免疫細胞のレベルで明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 重症免疫不全 NOG-SCID マウス骨髄内への臍帯血由来造血幹細胞の移植により作製したヒト化マウス腹腔内に 線照射した HTLV-1 感染 Jurkat 細胞を注入する事で HTLV-1 を感染させ、末梢血細胞における CD45、CD3、CD4、CD8、CD25、PD-1 の発現を感染 2.5~3 週毎にセルソーターを用いて経時的に測定した。
- (2) HEC293 細胞に発現させ精製した組換え IgG-4 抗 PD-1 抗体を、感染 2.5 週のヒト化マウスに 3 日毎に 3 回、腹腔内投与 (0.1mg/マウス) した。
- (3) HTLV-1 感染 6 週のヒト化マウス脾臓内リンパ球を各種表面抗原 (CD45, CD3, CD4, CD7, CD8, CADM1) および細胞内抗原 (Ki67, Foxp3, T-bet, Granzyme B) に対する抗体を用いて蛍光染色し、セルソーターを用いて感染ヒト化マウス脾臓内 T リンパ球の性状を解析した。
- (4) CD45、CD3、CD4、CD7、CD8、CADM1 を用いてセルソーターで分画・分取した T リンパ球から精製したゲノム DNA 用い、HTLV-1 pX 領域の定量的 PCR を行うことで、プロウイルス量 (ウイルス感染率; PVL) を定量した。

4. 研究成果

(1) HTLV-1 感染ヒト化マウスへの抗 PD-1 抗体の投与による感染 T 細胞の腫瘍性増殖抑制

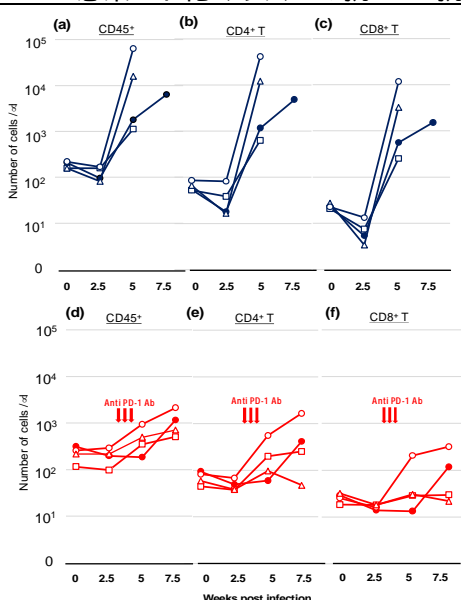


図 1. HTLV-1 感染によるヒト化マウス T 細胞の腫瘍性増殖 (a, b, c) と抗 PD-1 抗体投与による増殖抑制 (d, e, f)

ヒト化マウスに HTLV-1 を感染したところ、数週間で CD45(+)ヒト血球細胞数が、感染前の数倍~数百倍に増加し、8 週以内に全頭 (4 匹) 死亡した。増加した細胞の 65-75% は CD4(+)T 細胞であり、約 20% が CD8(+)T 細胞であった (図 1a, b, c)。

一方、感染 2.5 週で抗 PD-1 抗体を腹腔内投与したところ、感染細胞の腫瘍性増殖は 10 倍以下に抑制され (図 1d, e, f)、全頭 (4 匹)、2 ヶ月以上生存した (図 2)。

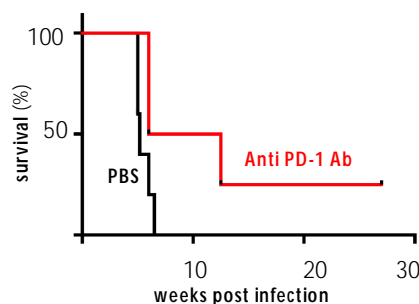


図 2. HTLV-1 感染ヒト化マウスの生存率

(2) HTLV-1 感染による PD-1 陽性 CD4(+)T 細胞の増加

感染ヒト化マウス末梢血 CD4(+)T 細胞における PD-1 の発現を経時的に解析したところ、感染前は 10~20% が PD-1 陽性であったのに対し、感染 5 週では発現率が 30~50% にまで上昇した(図 3a)。増加した CD4(+)T 細胞の大部分が HTLV-1 感染細胞であることから、感染細胞の約半数が PD-1 陽性であることが示された。

一方、抗 PD-1 抗体を投与したヒト化マウスにおいては、投与終了 2.5 週(感染 7.5 週)において、感染により 10 倍程度まで増加した CD4(+)T 細胞において PD-1 の発現が全く観察されなかった(図 3c)。この事実は、抗 PD-1 抗体内投与により増殖抑制された感染個体では PD-1 陰性の CD4(+)T 細胞のみが増殖したことを示している。

(3) HTLV-1 感染による CD8(+)T 細胞の増殖と抗 PD-1 抗体投与による増殖抑制

HTLV-1 感染ヒト化マウス末梢血では CD8(+)T 細胞も、感染前の数倍~数百倍に増加した(図 1b,c)。また、CD8(+)T 細胞における PD-1 の発現も、CD4(+)T 細胞と同様、感染 5 週で発現率が 30~50% にまで増加し(図 3b)、抗 PD-1 抗体投与により、細胞数増加の抑制と共に PD-1 の発現が失われた(図 3d)。

(4) 抗 PD-1 抗体投与による CD8/CD4 比の減少

ヒト化マウス末梢血の CD4(+)T 細胞および CD8(+)T 細胞の数は、HTLV-1 感染によりともに数倍~数百倍に増加し、CD8/CD4 比は、感染 5 週において 0.26~0.48(平均: 0.36)を示したが、抗 PD-1 抗体投与により細胞数の増加を抑制すると、CD8/CD4 比は 0.14~0.37(平均: 0.26)にまで減少し、抗 PD-1 抗体投与後の CD8(+)T 細胞の方が、感染 T 細胞の増殖を抑制する効率が高い可能性が示された(図 4)。

また、抗 PD-1 抗体投与後、PD-1 陽性 T 細胞が欠失したことから、感染細胞における PD-1 の発現が、抗 HTLV-1 免疫の主たる標的である HTLV-1 Tax 遺伝子の発現と関連している可能性も考えられた。

(5) ヒト化マウスにおける感染 CD4(+)T 細胞の機能

感染により高い増殖性を示した CD4(+)T 細胞および CD8(+)T 細胞の機能を明らかにする為、感染 6 週のヒト化マウス脾臓内 CD4(+)および CD8(+)T 細胞の表面抗原および核内転写調節因子の発現を解析した。

これまでの多くの報告から、ATL 患者における CD4(+)T 細胞は転移関連細胞表面抗原 CADM1 を特異的に発現していることが明らかとなっていることから、HTLV-1 感染ヒト化マウスにおける脾臓由来 CADM1(+)CD4(+)T 細胞を分取し、HTLV-1 の感染率を調べたところ、ほぼ 100% が HTLV-1 陽性である一方、CADM1(-)細胞の感染率は 10% 以下であった(図 5)。

そこで、細胞増殖関連核内抗原 Ki67 の発現を見たところ、CADM1(+)CD4(+)T 細胞の 50% が Ki67 陽性であり、細胞増殖が活発である事が確認された。次に、ヘルパー T 細胞の分化と機能を決定する転写因子の発現を解析したところ、Treg の形質を決定する Foxp3 の発現は観察されなかったのに対し、ほとんどの CADM1(+)CD4(+)T 細胞は Th1 への分化を規定する T-bet を発現していた。このことから、感染 6 週におけるヒト化マウス脾臓の感染 CD4(+)T 細胞は、ほぼ全て Th1 型であることが明らかとなった(図 6)。また、これらの細胞の一部は、細胞障害性を発揮する Granzyme B を高発現していた。

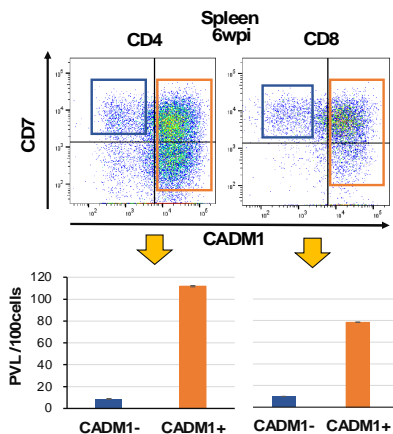


図 5. CADM1(+)T 細胞における HTLV-1 感染

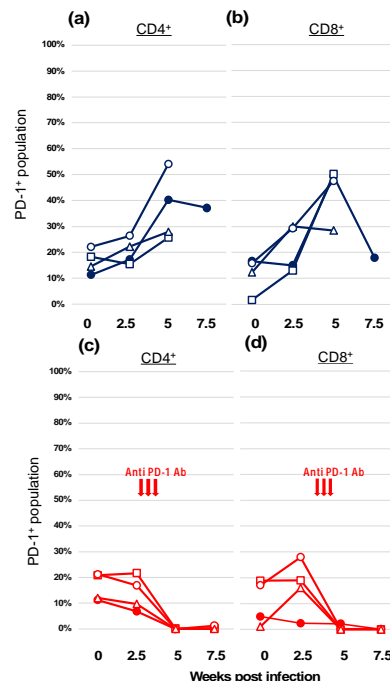


図 3. HTLV-1 感染によるヒト化マウス T 細胞における PD-1 の発現上昇(a,b,c)と抗 PD-1 抗体投与による消失

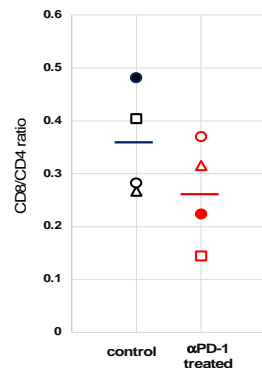
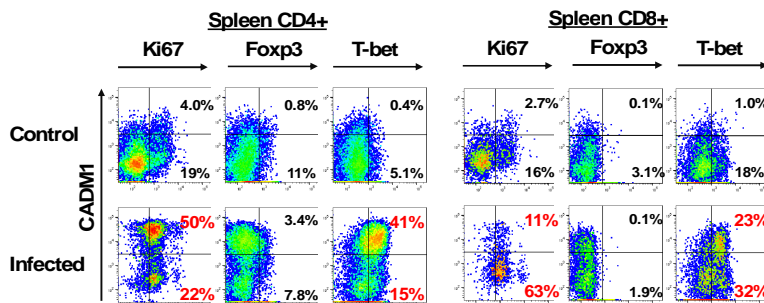


図 4. 抗 PD-1 抗体投与による CD8/CD4 比の変動



(6) ヒト化マウスにおける CD8(+)T 細胞の HTLV-1 感染

図 6. HTLV-1 感染 T 細胞の増殖と Th1 様表現系

HTLV-1 感染によりヒト化マウス末梢血 CD8(+)T 細胞も、感染前の数倍～数百倍に増加したことから、感染 6 週のヒト化マウス脾臓 CD8(+)T 細胞での CADM1 の発現を調べたところ、80%以上が CADM1 陽性であった。そこで、これらの細胞の HTLV-1 感染を測定すると、80%が HTLV-1 陽性であった(図 5)。

また、細胞の増殖を示す Ki67、分化を決定する核内転写因子 T-bet、細胞障害性タンパク質 Granzyme B のいずれも、HTLV-1 感染 CD4(+)T 細胞と同様に陽性であった(図 6)。従って、感染 6 週のヒト化マウス脾臓内 CD8(+)T 細胞は、高率に HTLV-1 に感染し、その結果、抗原刺激非依存的に増殖していることが示唆された。

以上の実験結果から、HTLV-1 感染ヒト化マウス脾臓においては、感染 CD8(+)T 細胞が抗原非特異的にポリクローナルに増殖することで、宿主免疫系全体に PD-1/PD-L1 をはじめとする免疫チェックポイントシグナルが誘導され、その結果、HTLV-1 特異的な細胞障害性 T 細胞の活性が减弱した可能性が考えられた。一方、抗 PD-1 抗体投与により、免疫チェックポイントシグナルが抑制され、HTLV-1 特異的 CD8(+)T 細胞の活性が回復することで、感染 CD4(+)および CD8(+)T 細胞の排除が進行したと解釈された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Katsuya H, Islam S, Tan, Ito J, Miyazato P, Matsuo, Inada Y, Iwase, Uchiyama Yoshikazu, Hata Hiroyuki, Sato T, Yagishita N, Araya N, Ueno T, Nosaka K, Tokunaga M, Yamagishi M, Watanabe T, Uchimaru K, Fujisawa J-i, Utsunomiya A, Yamano Y, Satou Y	4. 巻 29
2. 論文標題 The Nature of the HTLV-1 Provirus in Naturally Infected Individuals Analyzed by the Viral DNA-Capture-Seq Approach	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 724 ~ 735.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.09.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yao J, Tanaka M, Takenouchi N, Ren Y, Lee S-I, Fujisawa J-I	4. 巻 17
2. 論文標題 Induction of APOBEC3B cytidine deaminase in HTLV 1 infected humanized mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental and Therapeutic Medicine	6. 最初と最後の頁 3701-3708
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/etm.2019.7375	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 T. Ueno, A. Joseph, T. Matsunaga, T. Otaka, Y. Ren, J. Yao, S-I. Lee, A. Ryo, J-I Fujisawa
2. 発表標題 Anti-PD-1 antibody suppressed the leukemic growth of HTLV-1 infected cells in humanized mouse model
3. 学会等名 19th International Conference on Human Retrovirology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Matsuo, T. Ueno, P. Miyazato, H. Katsuya, S. Islam, B.J. Tan, S. Iwase, M. Tokunaga, K. Nosaka, A. Utsunomya, J. Fujisawa, Y. Satou
2. 発表標題 Identification and Molecular Characterization of a New HTLV-1 Enhancer
3. 学会等名 19th International Conference on Human Retrovirology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大高時文、中嶋伸介、李 成一、上野孝治、任 翊華、姚 錦春、藤澤順一
2. 発表標題 HTLV-1感染ヒト化マウスリンパ球における Tax および HBZ mRNAの発現
3. 学会等名 第6回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中嶋伸介、大高時文、李 成一、藤澤順一
2. 発表標題 HTLV-1感染ヒト化マウスにおける感染細胞の表現型解析
3. 学会等名 第6回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松尾美沙希, 上野孝治, 宮里パオラ, 勝屋弘雄, タン ベンジー, ジャック ヤン, イスラム サイフル, 徳永雅仁, 野坂生郷, 宇都宮與, 藤澤順一, 佐藤賢文
2. 発表標題 HTLV-1ウィルスエンハンサーはウィルス遺伝子および宿主遺伝子発現の亢進を誘導する
3. 学会等名 第6回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上野孝治、ジョセファンシー、松永智子、大高時文、任翊華、姚錦春、李成一、梁明秀、藤津順一
2. 発表標題 HTLV-1 感染ヒト化マウスへの抗PD・1 抗体投与による感染細胞の増殖抑制
3. 学会等名 第5回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tokifumi Odaka, Yiha Rin, Jinchen Yao, Sung-il Lee, Jun-ichi Fujisawa
2. 発表標題 Alternate expression of Tax and HBZ genes in the course of HTLV-1 infection in humanized mouse
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 T Ueno, A Joseph, T Matsunaga, T Otaka, Y Ren, J Yao, S-l Lee, A Ryo, J-l Fujisawa
2. 発表標題 Anti-PD-1 antibody suppressed the leukemic growth of HTLV-1 infected cells in humanized mouse model
3. 学会等名 19th Internatonal Congress HTLV 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------