

平成 21 年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590466

研究課題名 (和文) MHC—I 単鎖三量体を用いた抗 HTLV—I 免疫応答の解析と免疫療法の開発

研究課題名 (英文) Analysis of anti-HTLV-I immune response and development of immunotherapy by using single-chain trimers of MHC-I

研究代表者

大橋 貴 (OHASHI TAKASHI)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授

研究者番号：10282774

研究成果の概要：ラットを用いたヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-I) 感染モデルにおいて、抗 HTLV-I 免疫を細胞レベルで解析することを目的とし、F344 ラット特異的 MHC-I である RT1-AI 拘束性エピトープを認識する T 細胞を活性化、および検出する系を確立した。本研究の成果は、今後 HTLV-I 特異的免疫誘導や白血病に対する免疫治療、および感染個体におけるウイルス特異的 T 細胞の動態解析に有用であると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：MHC-I 単鎖三量体、レトロウイルス、成人 T 細胞白血病、動物モデル、細胞傷害性 T 細胞

## 1. 研究開始当初の背景

HTLV-I のキャリアーは日本に約100万人いると推定されており、そのうちの数%が成人 T 細胞白血病 (ATL) を発症する。ATL は極めて予後が不良な疾患であり、日本におけるキャリアー数を考えるとその発症予防法や新たな治療法の開発は重要な課題である。ATL の発症過程には、ウイルスがコードする転写活性化因子 Tax の発現と、それに対する免疫応答が密接に関わっており、これらの制御が発症予防・治療に重要である。また、生体内におけるウイルス感染細胞とそれに対する免

疫応答の関連を理解し、新規治療法開発に結びつけるためには動物モデルが必要不可欠である。HTLV-I の動物モデルはこれまでにサル、ウサギ、ラット等を用いて国内外の研究機関で開発が行われているが、抗 HTLV-I 免疫を解析できるモデルは限定されているのが現状である。我々が開発した ATL 様疾患モデルラット (Ohashi *et. al.* *J. Virol.* 73, 6031-6040, 1999) は、生体内で抗 HTLV-I 腫瘍免疫が解析できる点で独創的であり、遺伝子治療・免疫療法の効果判定には極めて有効なモデルである。実際に、このモデル系を用い

てHTLV-Iに対するDNAワクチン (*Ohashi et al. J Virol.* 74, 9610-9616, 2000)、ペプチドワクチン (*Hanabuchi et al., J Natl Cancer Inst.* 93, 1775-1783, 2001)、およびTaxを標的としたsiRNA (*Nomura et al., J. Virol.* 78, 3827-3839, 2004)の有効性を示している。さらに我々は、よりヒトに近いウイルス増殖を生体内で再現するために、ラットにおけるHTLV-Iの効率的な増殖に必須の因子であるヒトCRM1遺伝子導入ラットの樹立に成功している。以上のように、ウイルス感染細胞、あるいはウイルス自身の生体内における増殖が再現できるモデル系が準備できている状況において、ATLの発症機序の理解と有効な治療法の開発をさらに進めて行くためには、これらのモデル系におけるHTLV-I特異的免疫細胞の動態・機能等の詳細な解析を行い、ウイルス増殖との関連を明らかにすることが重要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

これまでに報告されている、Tax トランスジェニックマウス/ラットや SCID マウスを用いた HTLV-I のモデル系は、HTLV-I 感染細胞の増殖やTax等のウイルス抗原の機能解析に有用であったが、抗ウイルス/腫瘍免疫の解析には適していなかった。そこで、抗 HTLV-I 免疫応答と HTLV-I 関連疾患の病態との関連に関する研究は、主に感染者の協力から得られる検体を用いて行われているのが現状である。ここから得られるデータは非常に重要なものであるが、感染時期や発症時期等に関連して得られる検体は非常に限定されてしまうことも事実であり、宿主免疫応答とウイルス、あるいは感染細胞の増殖との相互作用を深く理解するためには必要な時期に採材できる動物モデルが重要である。そこで本研究では、ラットモデルにおける抗 HTLV-I 免疫を細胞レベルで解析することを目的とし、MHC-I 単鎖三量体というこれまではラットにおける解析で用いられていない手法を導入し、HTLV-I 特異的 CD8 陽性細胞の誘導システム、および検出システムの確立を行う。次に確立されたシステムを基に、HTLV-I 特異的細胞傷害性 T 細胞の生体内動態、および機能的変化を評価し、HTLV-I、および感染細胞の増殖との関連を明らかにする。さらには得られた材料、および情報を基に強力な抗 HTLV-I 免疫が誘導可能なプロトコルを作製し、ラットモデルにおいてその抗 HTLV-I 活性/抗腫瘍活性を評価する。本研究で得られる知見は、ATLのみならずその他のウイルス、あるいは癌遺伝子を標的とした遺伝子治療・免疫療法にも有益な情報になることが期待される。

## 3. 研究の方法

(1) MHC-I 単鎖三量体発現ベクターの構築：  
F344 ラット特異的 MHC-I である RT1-A1 に提示される HTLV-I 抗原エピトープを活性化する T 細胞を検出するための MHC-I 単鎖三量体発現ベクターを構築する。MHC-I 単鎖三量体は細胞表面に発現させることにより、抗原性の無い細胞を抗原提示細胞に変えることが可能であるとともに、分泌型 MHC-I の C 末端に EGFP 遺伝子を繋げることでテトラマー法と同様にエピトープ特異的 T 細胞を検出できるという利点を持つ。具体的手順としては、はじめに MHC-I/ $\beta$  2 マイクログロブリン/エピトープペプチドをコードする塩基配列を 1 つの遺伝子として繋げ、MHC-I 単鎖三量体を融合蛋白として発現させる。これら 3 つの遺伝子を適当なリンカー配列を使って結合し、T 細胞の活性化を指標に最適な MHC-I 単鎖三量体を選択する。我々はこれまでの研究で F344 系ラットから Tax180-188 特異的ラット CD8 陽性 T 細胞株を複数樹立している。そのうちの 401/C8 細胞を用いて、作製した Tax180-188 特異的 MHC-I 単鎖複合体発現ベクターが実際に RT1-A1 拘束性 Tax180-188 エピトープを提示可能かどうかについて検証する。具体的には、Tax180-188 特異的 MHC-I 単鎖複合体発現ベクターを導入したヒト T 細胞株 (MOLT4) をホルマリン固定した後に、401/C8 細胞と共培養し、その後の 401/C8 細胞の増殖、あるいはインターフェロン $\gamma$  産生を指標に活性化能を有する発現ベクターを選択する。活性化能が確認できたベクターに関しては HTLV-I 感染ラット由来プライマリー T 細胞に対する活性化についても同様の解析を行い、in vitro での Tax180-188 特異的 CTL 誘導能を検証する。以上の活性が確認できたベクターに関しては、in vivo トランスフェクション試薬を用いたナイーブラットへの投与を行い、生体内での CTL 誘導についても解析を行う。

(2) MHC-I 単鎖三量体/EGFP 融合蛋白発現ベクターの構築：  
F344 ラット特異的 MHC-I である RT1-A1 に提示される HTLV-I 抗原エピトープを認識する T 細胞を検出するための MHC-I 単鎖三量体/EGFP 融合蛋白発現ベクターを構築する。(1)で作製した MHC-I 単鎖三量体発現ベクターの C 端に EGFP 遺伝子を連結し、細胞表面に MHC-I 単鎖三量体/EGFP 融合蛋白が発現可能なベクターを構築する。作製されたベクターはヒト細胞に導入し、MHC-I 単鎖三量体/EGFP 融合蛋白を安定して発現する細胞を選択する。樹立した細胞は、Tax 特異的 CTL 細胞株と共培養した後に、CTL へ移行した融合蛋白の EGFP の発現を指標に CTL 検出能を評価する。

#### 4. 研究成果

(1) エピトープペプチド-b<sub>2</sub>m-RT1.A<sup>1</sup> 融合蛋白発現ベクターの構築: HTLV-I の Tax 特異的 CTL の活性化システムを構築するために図 1 A とに示すようなエピトープペプチド-b<sub>2</sub>m-RT1.A<sup>1</sup> 融合蛋白発現ベクターを構築した。RT1-A1、ラット β 2 マイクログロブリン遺伝子、および HTLV-I Tax のエピトープ配列を結合して発現ベクターに導入した後に、ヒト細胞株である 293T 細胞に発現させ、T 細胞の活性化を指標に発現蛋白の TCR 認識を検証した。その結果、Tax 発現 MHC-I 単鎖三量体が Tax 特異的 CTL を刺激し IFN-g、および TNF-α 産生を誘導することが確認され、構築した MHC-I 単鎖三量体が TCR を認識可能であることが示された (図 1 C と D)。

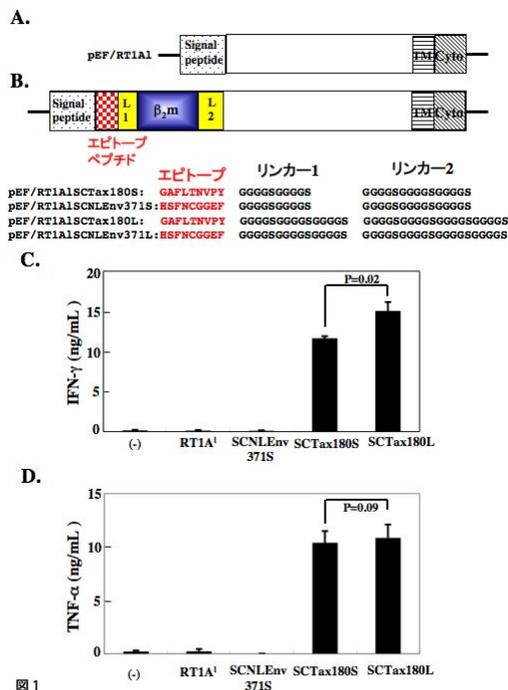


図 1

(2) エピトープペプチド-b<sub>2</sub>m-RT1.A<sup>1</sup> 蛋白発現細胞株の樹立。MHC-I 単鎖三量体発現ベクター中のリンカーの長さが T 細胞の活性化に与える影響を詳細に解析するためにリンカーの長さの異なる MHC-I 単鎖三量体が同レベルに発現するヒト細胞株をヒト由来 T 細胞株である MOLT-4 を用いて構築した。図 2 A に示すように、Tax エピトープを提示する MHC-I 単鎖三量体でリンカーの短いものの発現が 96.7%、長いものの発現が 95.4%となり、その蛍光強度に両者間で差がないことから、ほぼ同量の MHC-I 単鎖三量体を発現する細胞株が樹立できた。樹立した細胞間での Tax 特異的 CTL の活性化能を Tax180-188 特異的 CTL 細胞株との共培養で評価したところ、長いリンカーを持つ MHC-I 単鎖三量体の方がリンカーの短いものよりも有意に高い IFN-g、および

TNF-α 産生を誘導することが示された (図 2 B と C)。以上の結果から、本エピトープ特異的 T 細胞の活性化には長いリンカーを有する MHC-I 単鎖三量体を用いる方が効率的であると考えられた。

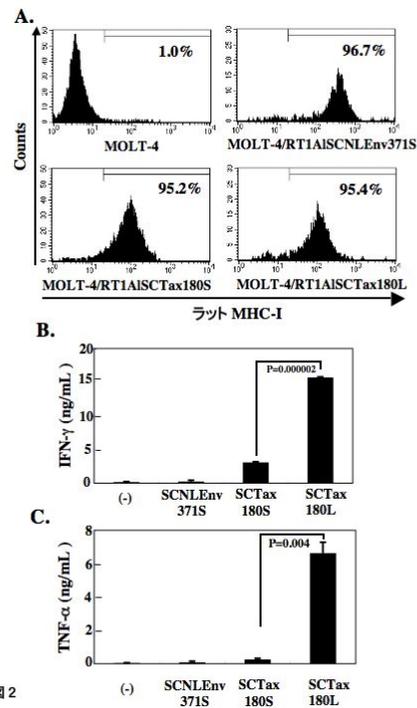


図 2

(3) MHC-I 単鎖三量体/EGFP 融合蛋白発現ベクターの構築。F344 ラット特異的 MHC-I である RT1-A1 に提示される HTLV-I 抗原エピトープを認識する T 細胞を検出するための MHC-I 単鎖三量体/EGFP 融合蛋白発現ベクターを図 3 A に示すように構築した。本ベクターにより発現される蛋白は MHC-I 単鎖三量体の C 端に EGFP 遺伝子が連結されるため、細胞表面に MHC-I 単鎖三量体/EGFP 融合蛋白として発現される。構築した MHC-I 単鎖三量体/EGFP 融合蛋白発現ベクターをヒト細胞へ導入し、Tax 特異的 CTL 細胞株と共培養したところ、EGFP 融合蛋白の Tax 特異的 CTL 細胞株への特異的な移行が、コントロールである HIV-1 エンベロープのエピトープを発現する MHC-I 単鎖三量体を用いた場合には検出できず、Tax エピトープを発現する MHC-I 単鎖三量体を用いた場合のみ確認されることが示された。また Tax エピトープを提示する MHC-I 単鎖三量体/EGFP 融合蛋白は、Tax 特異性を持たないラットの CD8 陽性 T 細胞株である G14 細胞には移行しないことも確認された (図 3 B)。以上のことから、Tax エピトープを提示する MHC-I 単鎖三量体/EGFP 融合蛋白を発現させた細胞を用いることで、Tax 特異的 T 細胞を EGFP の蛍光を指標にして検出可能であることが示された。

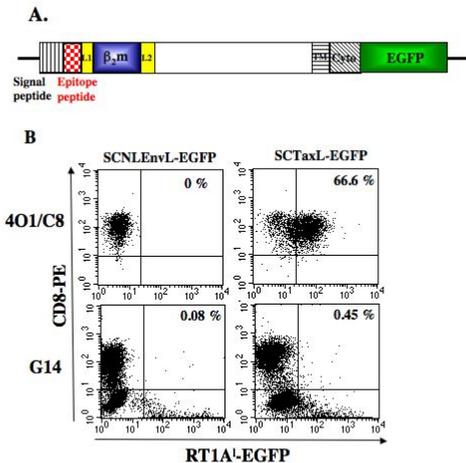


図3

(4) MHC-I 単鎖三量体を用いた HTLV-I 感染ラットでの Tax 特異的 CTL の検出。HTLV-I 持続感染ラットより脾臓細胞を採取し、同系 HTLV-I 感染細胞株で 1 回、ないし 2 回刺激をした後に脾臓細胞中の Tax 特異的 CTL を MHC-I 単鎖三量体/EGFP 融合蛋白発現細胞を用いて検出を試みた。その結果、2 回の繰り返し刺激の後に得られた脾臓細胞においては、非感染ラットのものと比較して HTLV-I 感染ラットにおいて有意に高い Tax 特異的 CTL が検出された (図 4 A)。また、得られた CTL の出現頻度は脾臓細胞による IFN-g 産生量と相関していた (図 4 B)。以上のことから、MHC-I 単鎖三量体/EGFP 融合蛋白を用いて HTLV-I 感染ラットにおける Tax 特異的 CTL が検出可能であることが示された。

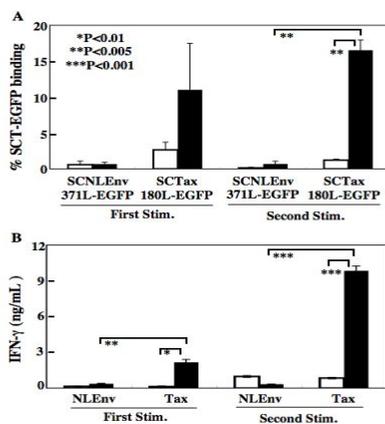


図 4

本研究により、これまで検出不可能であった HTLV-I 抗原エпитープ特異的 CTL を感染モデルラット内で検出し、その動態解析が可能になった。HTLV-I Tax 特異的 CTL の動態は ATL の発症に深く関連すると考えられていることから、本研究の成果はラットモデルを用いた ATL の発症機序の解析に有用であると考えられる。また、本研究で構築した MHC-I 単鎖三量体は HTLV-I 特異的免疫活性化能を示したことから、ATL の発症予防・治療を目的とした免疫療法の動物モデルを用いた実験的検証への応用も可能であると期待される。

#### 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 2 件)

1. Ohashi T., Nagai M., Okada H., Takayanagi R. and Shida H.: Activation and Detection of HTLV-I Tax-specific CTLs by Epitope expressing Single-Chain Trimers of MHC Class I in a rat model. *Retrovirology*, 5, 90, 2008.
2. Takayanagi R., Ohashi T., Yamashita E., Kurosaki Y., Tanaka K., Hakata Y., Komoda Y., Ikeda S., Tsunetsugu-Yokota Y., Tanaka Y., and Shida H.: Enhanced Replication of Human T-cell Leukemia Virus Type 1 in T Cells from Transgenic Rats Expressing Human CRM1 That Is Regulated in a Natural Manner. *J Virol.* 81, 5908-5918, 2007.

[学会発表] (計 1 件)

1. 大橋貴、志田壽利。ラットモデルにおける MHC-I 単鎖三量体を用いた HTLV-I Tax 特異的 CTL の活性化と検出。第 4 回日本ウイルス学会北海道支部会夏季シンポジウム、ニセコ、2008 年 7 月 26 日。

[その他]

ホームページ等

<http://www.igm.hokudai.ac.jp/molvir/ind>

ex.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大橋 貴 (OHASHI TAKASHI)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授

研究者番号：10282774

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし