

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460507

研究課題名(和文)レトロウイルスのToll様受容体を利用した免疫回避機構の解明

研究課題名(英文)Retroviral immune evasion

研究代表者

河原 佐智代(KAWAHARA, Sachiyo)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：60297629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではレトロウイルス感染制御におけるB細胞TLR7の関与を調べた。B細胞のTLR7を欠いた個体ではレトロウイルスに対する中和抗体を誘導できないが、Th細胞認識ペプチド(i18)によりウイルス特異的Th細胞を予め活性化しておくと、B細胞TLR7欠損下でも中和抗体の産生を認めることから、抗体誘導の初期反応にB細胞TLR7が必要であると考えられた。しかし抗体を欠くにも関わらず、B細胞TLR7欠損個体ではレトロウイルス誘発白血病の発症は遅延した。またi18免疫個体における白血病発症がTLR7欠損B細胞の移入により遅延することからも、B細胞TLR7が白血病発症の促進に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：TLR7 is expressed on several types of cell including dendritic cells and B cells. In this study, we analyzed roles of B cell-intrinsic TLR7 signaling on humoral immune responses against retrovirus infection. We found that primary B cell responses to retroviral infection required B cell-intrinsic TLR7 signaling, whereas preexisting virus-specific memory Th cells elicited the B cell responses without TLR7 signaling. Moreover, we showed that in the presence of virus-specific memory Th cells, the lack of TLR7 signaling in B cells facilitated anti-virus antibody responses and led to delayed progression of virus-induced leukemia.

研究分野：感染制御

キーワード：レトロウイルス TLR7 B細胞 免疫回避 ウイルス中和抗体 白血病

1. 研究開始当初の背景

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染症では、ウイルス複製が充分阻止されずに慢性持続感染が成立してしまい、最終的にエイズ発症に至る。この持続感染成立の要因として病原体の免疫回避能が挙げられる。HIV感染者におけるウイルス中和抗体の産生低下は、CD4陽性 T 細胞の数的ならびに質的な低下だけではなく、B 細胞機能の直接的な抑制もその要因ではないかと考えられている。ウイルスの免疫回避機構の解明は、慢性持続感染症の病態の理解と有効な治療・予防薬の開発のために肝要であるが、HIV による B 細胞機能障害の分子機構は未解明のままである。

我々は、持続感染ののちに白血病を誘発するマウスレトロウイルスであるフレンドウイルス(FV)を用いて、ウイルス持続感染を制御する免疫応答とそれに関わる宿主因子の同定、ならびに持続感染阻止に有効なワクチンの条件を明らかにしてきた。これまでの研究から、レトロウイルス持続感染の阻止には中和抗体の迅速な誘導が、感染細胞を殺傷する細胞傷害性 T 細胞(CTL)の活性化より有効且つ重要であることが分かってきた。実際、持続感染が成立してしまうFV感受性のマウス系統すべてにおいて感染急性期の中和抗体産生の遅延と低下が認められることから、マウスレトロウイルス感染においてもウイルスによる抗体産生抑制が持続感染成立の大きな要因になっていると考えられる。ウイルス免疫回避機構について、我々は今までのところ、レトロウイルス抗原過剰認識による CTL の機能不全を見出したが、この機構だけでは感染急性期の抗体産生抑制現象を説明することはできなかった。また米国 NIH の Hasenkrug らにより FV が制御性 T 細胞を介して CTL 機能を抑制しているという報告がなされたが (*Immunity* 20:293, 2004)、これも抗体産生抑制の理解には繋がらなかった。

最近我々は、脾臓内の IgM 高発現型 B 細胞が FV に強く感染していることを見出した。脾臓の IgM 高発現型 B 細胞群は、レトロウイルスゲノムなどの一本鎖 RNA を感知する Toll 様受容体の一種である TLR7 を多く発現し、そのリガンドに強く反応することがわかっている。また興味深いことに、Th1 型の細胞性免疫を抑制する制御性 B 細胞も IgM 高発現型であり、TLR 刺激により抑制性サイトカイン IL10 を産生する。これらの事実から我々は、レトロウイルスがある特定の B 細胞群に発現する TLR7 を標的とすることで B 細胞反応を抑制しているという仮説を打ち立てた。ウイルスが細胞内シ

グナル伝達分子を遮断することで I 型インターフェロンの産生を抑制するという報告はあるが、自然免疫受容体を介してある特定の細胞の機能や分化を修飾することで獲得免疫反応を制御するという機構は知られていない。

2. 研究の目的

FV 感受性マウスでは通常、ウイルス感染後 8 週までに全個体が白血病死するが、TLR7 欠損個体では、感染から白血病死に至るまでの期間が有意に延びた。この結果は上記の仮説を後押しするものであり、本研究は、B 細胞特異的 TLR7 を介したレトロウイルスによる抗体産生抑制機構を明らかにすることを目的とする。

(1) B 細胞の TLR7 のみを欠失させた FV 感受性マウス(CB6F₁ 系統)を作製し、B 細胞 TLR7 の有無が、中和抗体産生の誘導、ウイルス誘発白血病の発症経過、ならびに T 細胞や樹状細胞等の機能に与える影響を検証する。(2) TLR7 欠損個体から調整した B 細胞、あるいはそのサブセットを B 細胞欠損マウスに移入することで、B 細胞サブセットの TLR7 シグナルがレトロウイルス感染制御にどのように関与しているかを、中和抗体産生誘導と抑制性サイトカイン IL10 の産生等との両側面から検討する。(3) B 細胞の TLR7 シグナルがレトロウイルスの免疫回避に関与しているという結果が得られたときには、その機構を分子レベルで明らかにする。またウイルスによるその免疫抑制を解除する、または凌駕する方法を探索する。

3. 研究の方法

(1) B 細胞特異的 TLR7 欠損キメラマウスの作製

TLR7、TLR3、TLR9 欠損 CB6F₁ マウスは、それぞれの遺伝子を欠失させた BALB/c と C57BL/6 マウスの交配により作製した。B 細胞のみの TLR を欠いたキメラマウスは、各 TLR 欠損マウス及び B 細胞欠損マウスから骨髓を採取し、それらを骨髓破壊した B 細胞欠損マウスに移植することにより作製した。移植 6 週後に末梢血キメリズムを確認した。

(2) ペプチド免疫と FV 感染

FV の Env 上にある Th 細胞認識エピトープを含むペプチド : i18(HPPSYVYVSQFEKSYRHKR) を皮内に接種し、その 3 週間後に FV を静脈内注射した。感染後、1 週間毎に採血を行い、ヘマトクリット値、抗体価、ウイルス価を測定した。

(3) 中和抗体価と抗ウイルス抗体の検出

血中の中和抗体価は、*Mus Dunnii* 細胞へのウイルス感染を 75%阻害する血清希釈率として算出した。抗ウイルス抗体は、FV 感染細胞

株を用いた蛍光抗体染色法により検出した。
(4)血中ウイルス価とウイルス産生細胞数の測定

血漿中のウイルス価と脾臓ウイルス産生細胞数は、段階希釈した血漿、あるいは脾細胞を *Mus Dunnii* 細胞に添加し2日間培養した後、ウイルス感染細胞フォーカスを抗 FV 抗体により検出することにより測定した。

(5) 抗ウイルス抗体産生細胞の検出

ELISPOT 法により実施した。FV を吸着させた PVDF 膜マイクロプレートに脾臓あるいは骨髄から採取した細胞を加え、24 時間培養した。ウイルスに結合した抗体は、マウス IgM、IgG に特異的な抗体を用いて検出した。

(5) サイトカイン産生細胞の解析

ELISPOT 法と細胞内サイトカイン染色法により行った。ELISPOT 法：PVDF 膜に抗サイトカイン抗体を固相化したマイクロプレートに、感染個体から採取した脾臓細胞あるいは骨髄細胞を加え、2 日間培養した。サイトカイン産生細胞のスポットは各サイトカイン検出用抗体を用いて発色させた。細胞内染色法：MHC テトラマーでウイルス認識 T 細胞を標識した後に、細胞内サイトカインを蛍光抗体により染色し、フローサイトメーターを用いて測定した。

(6) B 細胞の分離と移入

磁気細胞分離装置を用いて、脾臓細胞から B 細胞以外の細胞を取り除くことで B 細胞を得た。また、各 B 細胞サブセットは、蛍光抗体を結合させた後にセルソーターを用いて分離抽出した。i18 ペプチド免疫した B 細胞欠損 CB6F₁ マウスに B 細胞を移入し、その 24 時間後に FV を接種した。

4. 研究成果

(1) B 細胞 TLR7 欠損マウスにおけるレトロウイルス感染後の中和抗体誘導と白血病発症

TLR7 欠損マウスの骨髄と B 細胞欠損マウスからの骨髄を B 細胞欠損個体に移植することにより B 細胞特異的 TLR7 欠損キメラマウス (FV 感受性 CB6F₁ 系統) を作製した。対照として、野生型マウスの骨髄を B 細胞欠損マウスの骨髄と混ぜて移植を行った。野生型 B 細胞キメラマウスでは、FV 感染 3 週目には中和抗体が検出されたが、B 細胞の TLR7 を欠いた個体では、IgM 型中和抗体の誘導も認められず、脾臓内 FV 抗体産生細胞も検出限界以下であった。この結果は、FV 初期感染時の液性免疫反応の起動が B 細胞の TLR7 シグナルに大きく依存していることを示唆した。しかし、中和抗体が誘導されていないにもかかわらず B 細胞 TLR7 欠損個体では、FV 感染後にヘマトクリット値が上昇する時期、白血病発症により死亡する時期ともに野生型マウスに較べて明らかに遅延した。つまり、B 細胞の TLR7 シグナルは抗体誘導の初期反応に必要であるが、その一方で、レトロウイルス誘発白血病を進行させる方向にも働いている可能性が示唆された。B 細胞の TLR3 または TLR9

を欠いても、FV 感染後の抗体誘導、白血病発症経過に影響はなかった。

(2) B 細胞 TLR7 欠損マウスにおける FV 感染後の T 細胞機能

B 細胞 TLR7 欠損マウスで認められた FV 誘発白血病の発症遅延は T 細胞機能の低下によるのではないかと考え、それらマウスにおける CTL と Th 細胞の数とサイトカイン産生能を調べた。ウイルス抗原特異的 Th および CTL の細胞数、またそれら T 細胞の IL-2、IFN- γ を含むサイトカインの産生能については、野生型マウスと比較して有意な差を認めなかった。

(3) 中和抗体産生誘導における B 細胞 TLR7 の関与

(1) の解析結果から、B 細胞 TLR7 はレトロウイルス初期感染時の抗体誘導に必要であることがわかった。そこで我々は、Th ならびに濾胞 T 細胞 (Tfh) の活性化を誘導する Env ペプチドワクチン (i18) で予めマウスを免疫したときにも、中和抗体産生誘導に B 細胞の TLR7 シグナルが必要であるか否かを調べた。その結果、B 細胞 TLR7 欠損マウスでも、i18 ペプチドで免疫することにより野生型マウスと同様に、感染早期に中和抗体が産生され、感染 5 日目には抗 FV 抗体産生細胞が誘導されることがわかった。これらの結果は、B 細胞の TLR7 シグナルが初期感染の抗体誘導には必要であるが、予め抗原で感作された Th (あるいは Tfh) 細胞の存在下では、必ずしもそのシグナルが中和抗体産生誘導に必要ではないことを示した。

(4) TLR7 欠損 B 細胞移入個体を用いた感染実験

(3) の結果を踏まえ、次に我々は、B 細胞欠損マウスを予め i18 ペプチドで免疫し、その後 TLR7 欠損 B 細胞を移入するという実験系により、B 細胞 TLR7 の抗体産生誘導への関与を解析した。対照としては野生型マウスの脾臓 B 細胞を移入した。興味深いことに、TLR7 欠損 B 細胞を移入したマウスでは、FV 感染早期に中和抗体が誘導され、それら抗体のクラススイッチも認められたが、野生型 B 細胞を移入したマウスでは IgM 型の中和抗体も誘導されなかった。また、野生型 B 細胞移入個体の方が TLR7 欠損 B 細胞移入個体より早くに白血病を発症した。i18 免疫を行わなければ、どちらの B 細胞移入群でも中和抗体は誘導されず、全個体が早期に白血病死に至った。(3) の結果に一致して、レトロウイルス抗原特異的 Th (あるいは Tfh) 細胞が予め活性化された状態であれば、B 細胞の TLR7 シグナルが中和抗体の誘導に必要ではないことがこの実験系からも証明された。またこの結果からも、B 細胞 TLR7 シグナルが白血病の発症の促進に働いている可能性が示された。現在、各 B 細胞サブセットの移入実験により、いかなる B 細胞サブセットの TLR7 シグナルがレトロウイルス誘発白血病発症の促進に関与しているのかを解析している。

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6件)

1. Yasuda Y, Fujita M, Koike E, Obata K, Shiota M, Kotani Y, Musha T, Tsuji-Kawahara S, Satou T, Masuda S, Okano J, Yamasaki H, Okumoto K, Uesugi T, Nakao S, Hoshiai H, Mandai M. Erythropoietin receptor antagonist suppressed ectopic hemoglobin synthesis in xenografts of HeLa cells to promote their destruction. PLoS One. 査読有, 10(4), 2015, e0122458.
DOI: 10.1371/journal.pone.0122458.
2. Kato M*, Tsuji-Kawahara S*, Kawasaki Y, Kinoshita S, Chikaishi T, Takamura S, Fujisawa M, Kawada A, Miyazawa M. Class switch recombination and somatic hypermutation of virus-neutralizing antibodies are not essential for control of friend retrovirus infection. J Virol. 査読有, 89(2), 2015, pp.1468-1473. (*equal contribution)
DOI: 10.1128/JVI.02293-14.
3. Takamura S, Kajiwarra E, Tsuji-Kawahara S, Masumoto T, Fujisawa M, Kato M, Chikaishi T, Kawasaki Y, Kinoshita S, Itoi M, Sakaguchi N, Miyazawa M. Infection of adult thymus with murine retrovirus induces virus-specific central tolerance that prevents functional memory CD8+ T cell differentiation. PLoS Pathog. 査読有, 10(3), 2014, e1003937.
DOI: 10.1371/journal.ppat.1003937
4. Tsuji-Kawahara S, Miyazawa M. Elimination of Friend retrovirus in the absence of CD8+ T cells. J Virol. 査読有, 88(3), 2014, pp.1854-1855.
DOI:10.1128/JVI.03271-13
5. Tsumiyama K, Hashiramoto A, Takimoto M, Tsuji-Kawahara S, Miyazawa M, Shiozawa S. IFN- γ -producing effector CD8 T lymphocytes cause immune glomerular injury by recognizing antigen presented as immune complex on target tissue. J Immunol. 査読有, 191(1), 2013, pp. 91-96.
DOI:10.4049/jimmunol.1203217
6. Tsuji-Kawahara S, Kawabata H, Matsukuma H, Kinoshita S, Chikaishi T, Sakamoto M, Kawasaki Y, Miyazawa M. Differential requirements of cellular and

humoral immune responses for Fv2-associated resistance to erythroleukemia and for regulation of retrovirus-induced myeloid leukemia development. J Virol. 査読有, 87(24), 2013, pp.13760-74.

DOI:10.1128/JVI.02506-13

〔学会発表〕(計3件)

1. Tsuji-Kawahara S, Kawasaki Y, Motozono C, Takamura S, Miyazawa M. B cell-intrinsic TLR7 signaling is required to prevent the generation of recombinant viruses following retrovirus infection. 第44回日本免疫学会, 2015年11月18-20日, 札幌コンベンションセンター(札幌)
2. Motozono C, Tsuji-Kawahara S, Takamura S, Yagita H, Miyazawa M. Vaccine-elicited preferential induction of germinal center follicular helper T cells is associated with protection against retroviral infection. 第44回日本免疫学会, 2015年11月18-20日, 札幌コンベンションセンター(札幌)
3. Motozono C, Tsuji-Kawahara S, Takamura S, Miyazawa M. Preferential induction of germinal center follicular helper T cells upon retroviral infection in the presence of vaccine-elicited protective CD4 T cells. 第43回日本免疫学会, 2014年12月10-12日, 国立京都国際会館(京都)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.med.kindai.ac.jp/immuno/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河原 佐智代 (KAWAHARA, Sachiyo)
近畿大学・医学部・講師
研究者番号：60297629

(2) 研究分担者

宮澤 正顯 (MIYAZAWA, Masaaki)
近畿大学・医学部・教授
研究者番号：60167757

高村 史記 (TAKAMURA, Shiki)
近畿大学・医学部・医学部講師
研究者番号：90528564

(3) 連携研究者

()

研究者番号：