

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461446

研究課題名(和文) 同種造血幹細胞移植後の細胞免疫療法における免疫抑制受容体の制御に関する研究

研究課題名(英文) Control of inhibitory immunoreceptor in cell therapy after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

研究代表者

西田 徹也 (NISHIDA, Tetsuya)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80508929

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：同種造血幹細胞移植後の出血性膀胱炎の原因となるアデノウイルス血清型11の日本人に最も頻度が高いHLA-A*24:02拘束性の新規エピトープを同定し、体内で抗原特異的T細胞の標的として機能していることを示した。T細胞上に発現する共刺激分子のレセプター4-1BBに対する抗体を用いることで、抗原提示細胞を用いずに、簡便に抗原特異的T細胞を樹立できることを明らかにした。また、抑制性受容体PD-1のリガンドであるPD-L1は、CD80/86とともに抗原提示細胞上に発現することで抗原特異的T細胞の誘導において促進的に作用していることを示した。以上の成果は、今後、細胞療法への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Adenovirus serotype 11 (AdV-11) occasionally causes hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. A novel T-cell epitope (TYFNLGNKF) of AdV-11 presented by HLA-A*24:02 was identified, and the epitope indeed functions as a target for TYFNLGNKF-specific T cells in vivo. It was demonstrated that antigen-specific T cells could be generated rapidly and efficiently by the use of anti-4-1BB antibody without antigen-presenting cells. And PD-L1 expressed on antigen-presenting cells along with CD80/86 showed to enhance the induction of antigen-specific T cells. These findings are applicable to cell therapy in the future.

研究分野：血液内科学

キーワード：免疫抑制受容体 抗原特異的T細胞 抗原提示細胞 細胞療法

1. 研究開始当初の背景

免疫抑制受容体は、T細胞の表面に発現し、T細胞の機能を抑制する分子であり、Programmed death 1 (PD-1)の他に cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4), T cell immunoglobulin and mucin domain 3 (TIM3), lymphocyte-activation gene 3 (LAG3)などが知られている。これらの免疫抑制受容体と慢性ウイルス感染時のT細胞の疲弊化との関連についての報告がなされた(Nature. 2006;439:682-7, Immunity. 2007;27:670-84)。また、近年では、白血病や悪性リンパ腫などの造血器腫瘍も含め様々な腫瘍の免疫監視機構からのエスケープに、PD-1とそのリガンドである programmed death-ligand 1 (PD-L1)との相互作用が関与しているという報告がなされており(Nat Med. 2002;8:793-800, Blood. 2009 ;114:1537-44)、PD-1/PD-L1結合を阻害する抗PD-1抗体や抗PD-L1抗体を用いた臨床試験が担癌患者に対して実施されている(N Engl J Med. 2012; 366:2443-54, N Engl J Med. 2012; 366: 2455-65)。

一方、ヒトの同種造血幹細胞移植後のアロ免疫反応における免疫抑制受容体の関与についての報告は限られている。Gallez-Hawkins GMらは、同種造血幹細胞移植後の急性移植片対宿主病およびサイトメガロウイルス(CMV)感染患者において、T細胞でのPD-1の発現が高まっていることを示し(Biol Blood Marrow Transplant. 2009; 15: 872-80)、また、Norde WJらは、同種移植後の急性白血病再発にPD-1/PD-L1を介したマイナー組織適合抗原特異的T細胞の抑制が関与していることを報告している(Cancer Res. 2011;71:5111-22)。

研究代表者は、同種造血幹細胞移植後の難治性CMV感染合併患者において、CMV持続感染のメカニズムを検討し、ドナー由来CMV抗原特異的T細胞の機能低下とPD-1の関与を明らかにし、さらに、IL-6がPD-1の発現調節やCMV抗原特異的T細胞の機能低下に関与している可能性を示唆する結果を示してきた。PD-1の発現調節について詳細に検討することにより、抗原特異的T細胞を疲弊させず、機能を維持する方法を明らかにできれば、同種造血幹細胞移植後のウイルス感染や造血器悪性腫瘍の再発を克服できるだけでなく、抗原特異的T細胞を効率よく増殖させ、細胞療法へも応用できる可能性がある。

2. 研究の目的

T細胞での免疫抑制受容体発現制御のメカニズムを詳細に検討することにより、抗原特異的T細胞の機能を調節し、同種造血幹細胞移植後のドナー由来T細胞による抗ウイルス効果や抗腫瘍効果を維持、増強させる方法を明らかにする。また、T細胞を疲弊させず機能を維持する方法を明らかにし、細胞療法への応用の可能性を探ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) アデノウイルス血清型11(AdV-11)のエピトープ同定: AdV-11のヘキソン蛋白においてHLA-A24に結合する可能性が高いエピトープ候補をコンピューターアルゴリズム(BIMAS)により推定し、ペプチドを合成した。MHC安定化試験によりHLA-A24への結合能を確認した上で、AdV-11既感染者の末梢血単核球をIL-2存在下で、これらのペプチドで3週間刺激後に、インターフェロン分泌試験を行った。また、クロム放出試験にて細胞傷害活性を測定した。

(2) 抗4-1BB抗体、抗CD28抗体を用いた抗原特異的T細胞の誘導: IL-2存在下に健常ドナー末梢血単核球を培養し、CMV、エプスタインバーウイルス(EBV)、AdV-11の抗原ペプチド1 μ g/mlで週1回刺激した。その培養中に抗4-1BB抗体、抗CD28抗体を0.3 μ g/mlで添加した。2週間培養後にウイルス抗原特異的T細胞をテトラマー法により検出し、フローサイトメトリーでCD45RA/CD27/CD28/CD62L発現を測定した。また、CFSEにより細胞増殖能、細胞内サイトカイン染色法によりIFN- γ 、IL-2産生能、CD107a発現を検出することにより細胞傷害活性を解析した。

(3) 樹状細胞の樹立: 健常ドナー末梢血中の接着細胞をGM-CSF(80ng/ml)、IL-4(17ng/ml)存在下で5日間培養した。成熟樹状細胞とするために、6日目にTNF- α (10ng/ml)、IL-1 β (2ng/ml)、IL-6(10ng/ml)、PGE2(1000ng/ml)を添加し、培養8日目に回収して、抗原提示細胞として用いた。

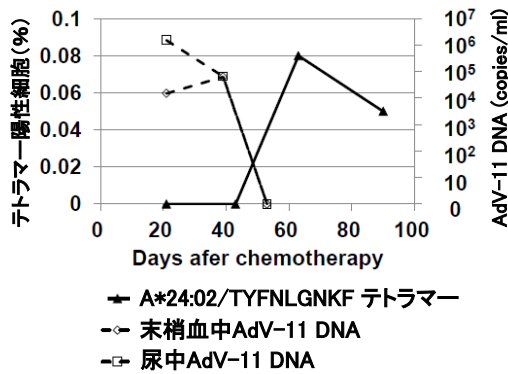
(4) 人工抗原提示細胞による抗原特異的T細胞の誘導: K562細胞株に、レトロウイルスによりHLAクラスI分子及びCD80/86、PD-L1を遺伝子導入して人工抗原提示細胞を作成した。CD3陽性T細胞をペプチドパルスした人工抗原提示細胞で週1回刺激を行い、28日間培養して抗原特異的T細胞を誘導した。

4. 研究成果

(1) 同種造血幹細胞移植後の出血性膀胱炎の原因となるAdV-11のエピトープはこれまでも報告されているが、日本人に最も頻度の高いHLA-A*24:02拘束性エピトープは同定されていなかった。そこで、HLA-A24に結合することが予想される10個のペプチドを合成、これらのペプチドで末梢血単核球を刺激して抗原特異的T細胞の誘導を試みたところ、3つのペプチドに反応してインターフェロン γ を産生するT細胞を樹立できた。しかしながら、AdV-11感染細胞には、ペプチドTYFNLGNKFに特異的なT細胞のみが反応してインターフェロン γ を産生したことから、TYFNLGNKFをAdV-11のHLA-A*24:02拘束性エピトープと同定した。TYFNLGNKF特異的T細胞

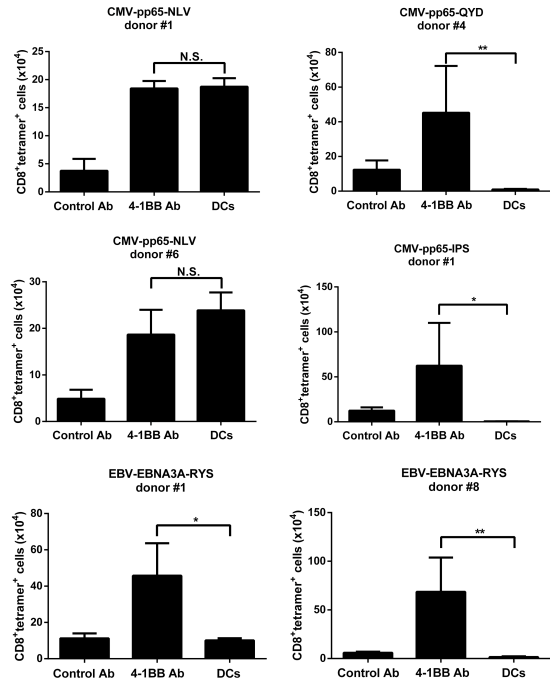
胞を検出するための MHC-テトラマーを作成し、悪性リンパ腫に対する化学療法後に AdV-11 による出血性膀胱炎を合併した患者において、血液・尿 AdV-11 DNA 定量および末梢血中の TYFNLGKGF 特異的 T 細胞を経時的にモニターしたところ、TYFNLGKGF 特異的 T 細胞の出現と一致して血液と尿から AdV-11 DNA が消失した (図 1)。また、TYFNLGKGF 特異的 T 細胞は AdV-11 抗体陽性健康者 3 名全員から誘導できた。以上のことから、TYFNLGKGF 特異的 T 細胞は体内において、AdV-11 の排除に関与していることが示唆され、今後、AdV-11 感染症に対する細胞療法に適用できる可能性が考えられる。

(図1) AdV11による出血性膀胱炎患者



(2) T 細胞の活性化には、MHC 上に提示される抗原ペプチドを T 細胞レセプターが認識することによるシグナルに加え、抗原提示細胞上の CD80 などの共刺激分子からのシグナルも必要である。樹状細胞は、T 細胞を活性化する能力に優れたプロフェッショナルな抗原提示細胞であり、細胞療法において抗原特異的 T 細胞を誘導、増殖させるために用いられるが、樹状細胞の樹立は時間を要し、煩雑である。そこで、細胞療法への応用のため、T 細胞上に発現する共刺激分子のレセプターである CD28 と 4-1BB に対するアゴニスト抗体を用いて、抗原特異的 T 細胞の誘導を試みた。抗原提示細胞は用いず、抗 4-1BB 抗体存在下で CMV, EBV, AdV-11 由来のペプチドにより末梢血単核球を刺激した際に、ウイルス抗原特異的 T 細胞の誘導促進効果が確認された。一方、抗 CD28 抗体では同様の効果は認められなかった。抗 4-1BB 抗体によるウイルス抗原特異的 T 細胞誘導を樹状細胞と比較したところ、抗 4-1BB 抗体による誘導効率率は樹状細胞と同等、抗原ペプチドの種類によっては樹状細胞より優れていた (図 2)。また、樹立された抗原特異的 T 細胞の分化や機能においては同等であった。以上の結果より、抗 4-1BB 抗体は、抗原提示細胞を用いることなく、簡便に抗原特異的 T 細胞を樹立することができ、細胞療法での応用も期待できる。

(図2) 抗4-1BB抗体と樹状細胞によるウイルス抗原特異的T細胞の誘導

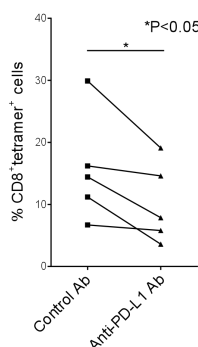


(3) 慢性的な抗原刺激における PD-L1 の抗原特異的 T 細胞に対する抑制的な作用については詳細に検討されている。一方で、T 細胞への抗原提示能、さらに分化・増殖を誘導する能力に優れたプロフェッショナルな抗原提示細胞である樹状細胞には、正の共刺激分子である CD80/86 とともに、抑制性のリガンドである PD-L1 も高発現しているが、その役割は明らかになっていない。そこで、CD3 陽性 T 細胞を CMV pp65 由来ペプチドをパルスした樹状細胞で刺激し、抗 PD-L1 抗体存在下で CMV 抗原特異的 T 細胞の誘導を行ったところ、予想に反して CMV 抗原特異的 T 細胞誘導能が低下した (図 3)。この結果から、樹状細胞に発現する PD-L1 が抗原特異的 T 細胞誘導においては促進的に作用している可能性が示唆された。さらに、抗原特異的 T 細胞誘導時の PD-L1 の影響を詳細に検討するために、人工抗原提示細胞として用いられることが多い K562 細胞株に HLA クラス I 分子及び CD80/86、PD-L1 を遺伝子導入した人工抗原提示細胞を作成した。CD3 陽性 T 細胞を CMV pp65 由来ペプチドパルスした人工抗原提示細胞で刺激したところ、CD80/86 のみを導入した K562+CD80/86 よりも CD80/86 と PD-L1 をともに発現させた K562+CD80/86+PD-L1 を用いた場合に、より多くの CMV 抗原特異的 T 細胞が誘導された。ただし、K562 にわずかに発現している CD80 を CRISPR/Cas9 システムを用いてノックアウトして、PD-L1 のみを発現させた K562 では CMV 抗原特異的 T 細胞の誘導能は増加せず、CD80/86 とともに PD-L1 を発現させた場合にのみ有意な増加を認めた。以上のことから、PD-L1 自体は抗原特異的 T 細胞誘導に促進的に働いておらず、CD80/86

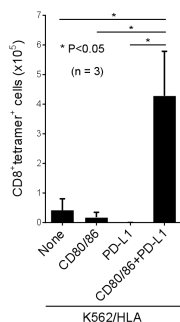
とともにPD-L1が抗原提示細胞上に発現していることでCMV抗原特異的T細胞の誘導が促進されると考えられた。PD-L1による抗原特異的T細胞誘導の促進作用の詳細なメカニズムは明らかではなく、今後解明すべき課題である。

また、K562にCD80/86、PD-L1を遺伝子導入した人工抗原提示細胞は、健常ドナーの末梢血より分離したT細胞から、腫瘍抗原であるウィルス腫瘍遺伝子(WT1)特異的T細胞を誘導することも可能であったため(図4)、健常ドナーから誘導した腫瘍抗原特異的T細胞を用いた細胞療法の開発において有用な人工抗原提示細胞となり得る可能性がある。

(図3) 樹状細胞によるCMV抗原特異的T細胞誘導における抗PD-L1の影響



(図4) 人工抗原提示細胞を用いたWT1特異的T細胞の誘導



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)

①Imahashi N, Nishida T, Goto T, Terakura S, Watanabe K, Hanajiri R, Sakemura R, Imai M, Kiyoi H, Naoe T, Murata M. Simple and Efficient Generation of Virus-specific T Cells for Adoptive Therapy Using Anti-4-1BB Antibody. *Journal of Immunotherapy*. 2015 Feb-Mar;38(2):62-70. doi: 10.1097/CJI.000000000000069. (査読有)

②Kato T, Nishida T, Ito Y, Murase M, Murata M, Naoe T. Correlations of programmed death 1 expression and serum IL-6 level with exhaustion of cytomegalovirus-specific T cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cellular Immunology*. 2014 Mar-Apr;11;288(1-2):53-59. doi: 10.1016/j.cellimm.2014.02.007. (査読有)

③Imahashi N, Nishida T, Ito Y, Kawada J, Nakazawa Y, Toji S, Suzuki S, Terakura S, Kato T, Murata M, Naoe T. Identification of a novel HLA-A*24:02-restricted adenovirus serotype 11-specific CD8+

T-cell epitope for adoptive immunotherapy. *Molecular Immunology*. 2013;56(4):399-405. doi: 10.1016/j.molimm.2013.05.232. (査読有)

[学会発表] (計 5件)

①西田徹也 Adoptive immunotherapy with third-party virus-specific CTL. 第38回日本造血細胞移植学会総会 2016年3月5日 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

②Goto T, Nishida T, Takagi E, Miyao K, Koyama D, Sakemura R, Hanajiri R, Watanabe K, Imahashi N, Terakura S, Murata M, Kiyoi H. PD-L1 on antigen-presenting cells facilitates the induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. The American Society of Hematology 57th Annual Meeting. 2015年12月5日 オーランド(米国)

③後藤辰徳、西田徹也、高木えり奈、宮尾康太郎、小山大輔、酒村玲央奈、葉名尻良、渡邊慶介、今橋伸彦、寺倉精太郎、村田誠、清井仁. Roles of PD-L1 on antigen-presenting cells for the generation of antigen-specific T cells. 第77回日本血液学会学術集会 2015年10月16日 ホテル日航金沢(石川県金沢市)

④後藤辰徳、西田徹也、高木えり奈、宮尾康太郎、小山大輔、酒村玲央奈、葉名尻良、渡邊慶介、今橋伸彦、寺倉精太郎、村田誠、清井仁. 抗原特異的T細胞の誘導における抗原提示細胞に発現するPD-L1の役割. 第7回血液疾患免疫療法研究会学術集会 2015年9月26日 東京大学伊藤謝恩ホール(東京都文京区)

⑤西田徹也、村田 誠、寺倉精太郎、勝見 章、直江知樹. 非血縁者間骨髄移植後難治性CMV感染に対してCMV抗原特異的CTLが著効した2症例. 第36回日本造血細胞移植学会総会 2014年3月8日 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 徹也 (NISHIDA, Tetsuya)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 80508929

(2) 研究分担者

伊藤 嘉規 (ITO, Yoshinori)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 20373491