

T 細胞の活性化刺激と HIV 感染制御

研究分担者 田中勇悦 琉球大学大学院医学研究科 免疫学講座 教授

研究要旨：免疫応答における T 細胞の活性化は抗原による TCR の直接刺激の他に、種々の補助刺激分子の影響を受ける。HIV-1 の増殖も同じである。補助刺激分子として我々が注目している OX40 は、T 細胞上に活性化により発現が誘導され、そのリガンドである OX40L と反応することにより、T 細胞のサイトカイン産生を促進し、また T 細胞の寿命を延ばす役割がある。我々はこれまで、活性化した末梢血単核球 (PBMC) を組換え OX40L で刺激すると CCR5 結合性 ケモカインの産生が促進され、その結果 R5 HIV-1 の感染が抑制されることを明らかにした。このように OX40/OX40L を介する T 細胞の活性化は、将来、臨床の場でもその応用が期待される。そこで我々は、HTLV-I でトランスフォーム (HTLV-I⁺) した T 細胞株が OX40L を構成的に発現することに注目し、HTLV-I⁺ T 細胞株が活性化した自家 PBMC における R5 HIV-1 感染を OX40L 依存的に抑制することをここに検証した。種々のドナーにおいて自家 HTLV-I⁺ T 細胞株は容易に樹立し培養できることから、HTLV-I⁺ T 細胞株が自家 OX40L 源として利用できる可能性が示唆された。一方、新鮮 T 細胞の活性化を抑制する方法として今回新たに抗体による CXCR4 の架橋を見いだした。

A. 研究目的

腫瘍壊死因子 (TNF) 受容体ファミリーである OX40 は活性化 T 細胞に誘導され、その特異的リガンドである OX40L と反応することにより、免疫 T 細胞を補助刺激 (co-stimulation) する。その結果、T 細胞ではサイトカイン産生促進や T 細胞の延命が促される。我々は、活性化した末梢血単核球 (PBMC) を組換え OX40L で刺激することにより、CCR5 結合性 ケモカインである MIP-1 β 、MIP-1 α および RANTES の産生が促進され、CCR5 指向性 (R5) HIV-1 感染を制御することを報告した。今回、我々は、HTLV-I⁺ T 細胞株が OX40L を大量に発現し、R5 HIV-1 の感染を抑制することを検証した。一方、HIV-1 の増殖は慢性的な T 細胞の活性化に依存することから、今回、CXCR4 を標的とした T 細胞の活性化抑制法について検討した。

B. 研究方法

HTLV-I⁺ T 細胞株として、既存の MT-2 細胞、HTLV-I 感染ドナーから樹立した IL-2 依存性 T 細胞株 (ILT)-M1 および健常人 PBMC と HTLV-I⁺ T 細胞株との混合培養で新たに樹立した T 細胞株を用いた。OX40L または OX40 を安定に発現する遺伝子導入 CEM 細胞をコントロールとして用

いた。ビオチン化組換え OX40L および OX40 は市販品を購入し、PE-streptavidin と合わせて FCM 解析に用いた。HIV-1 感染では、OKT-3 抗体で 1 日活性化した PBMC に R5 または X4 HIV-1 を感染させ、OX40L を発現する自家 HTLV-I 不死化細胞 (予め 4% PFA で固定したもの) と混合培養し p24 産生を定量する p24 ELISA や p24 陽性細胞を染色する FCM でモニターした。CXCR4 に対する抗体は自家製の抗体を用い、新鮮 PBMC の活性化培養に添加してその効果を判定した。(倫理面への配慮)

健常人の PBMC 使用実験は倫理委員会で承認され、また、遺伝子組換え生物等使用実験と動物実験も琉大で承認されている。

C. 研究結果

(1) HTLV-I 感染 T 細胞株は、調べた全てのドナーの株において機能的な OX40L を発現した。同時に発現する OX40 は、内在性の OX40L で飽和されて機能的ではないことが示唆された。

(2) HTLV-I⁺ T 細胞株は、組換え OX40L と同様に、活性化自家 PBMC の R5 HIV-1 の感染を ケモカイン依存性に強く抑制した。しかし、X4 HIV-1 感染は全く阻害しなかった。

(3) 4 種類の抗 CXCR4 抗体の内、CXCR4 使用

HIV-1 の感染を阻止する一種類の抗体は新鮮 PBMC の OKT-3 抗体による T 細胞の活性化を有意に阻害した。

D. 考察

種々の細胞における OX40L の発現は限定的であり、また、OX40L だけを発現する組換え OX40L が未だ作製されていないことから、前年度より HTLV-1⁺T 細胞株が OX40L を大量に発現することに着目し、自家 HTLV-1⁺T 細胞株が OX40L のソースとして使えないかを検討し、本年度にその有用性を証明した。in vitro の系であるが、パラフォルムアルデヒド (PFA) で不活化した自家 HTLV-1⁺T 細胞株が OX40L を介する刺激を活性化 T 細胞に入れることにより、T 細胞からのケモカインの産生を誘導し、R5 HIV-1 を選択的に抑制することを明らかにした。OX40L の OX40 刺激活性は、OX40 モノマーよりも OX40 オリゴマーの方が優れることが報告されているが、HTLV-1⁺T 細胞株表面に発現された OX40L はより密度が高く配置されることが推測され、単量体や多量体の OX40L に勝ると期待できる。

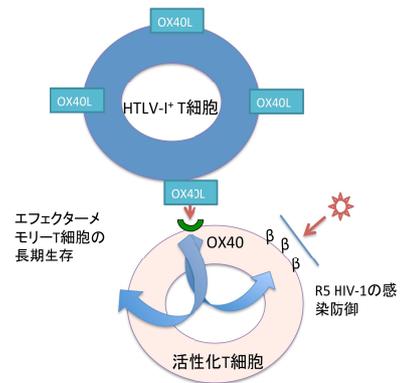
さらに、OX40L はワクチンによる T 細胞免疫を促進する活性もあるので、今後のエイズ予防ワクチン戦略への候補としてさらに研究を進めたい。

これと対照的に T 細胞の活性化は CXCR4 のエピトープ依存性架橋により抑制できることを見いだした。そのメカニズムと応用について明らかにするのは次年度の課題である。

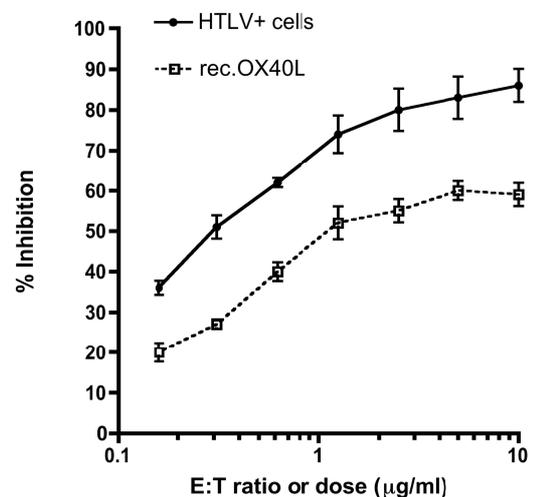
E. 結論

HTLV-1 で不死化した自家 T 細胞株は細胞表面に大量の機能的 OX40L を発現し、その OX40L による活性化 T 細胞への刺激は、ケモカイン産生を促進させ R5 HIV-1 感染を抑制する (図 1 & 2)。また、CXCR4 は新たな免疫抑制法の標的となる可能性がある。

HTLV-1感染自家T細胞のOX40Lを介する免疫促進とR5 HIV-1感染制御



(図 1) OX40 を介する HIV-1 制御



(図 2) HTLV-1⁺T 細胞株による R5 HIV-1 抑制

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Kasahara D, Takara A, Takahashi Y, Kodama A, Tanaka R, Ansari AA, Tanaka Y. Natural OX40L expressed on human T cell leukemia virus type-I-immortalized T cell lines interferes with infection of activated peripheral blood mononuclear cells by CCR5-utilizing human immunodeficiency virus. *Virology*. 2013; 547:338.
2. 学会発表
 - 1) 田中 勇悦, 田中 礼子: CXCR4 架橋による

HIV-1感染とT細胞活性化の抑制 第27回
日本エイズ学会学術集会・総会 熊本
(2013.11.20)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし