

**厚生労働科学研究費補助金
がん対策推進総合研究事業（革新的がん医療実用化研究事業）**

分担研究報告書

ATL 症例の HTLV-1 プロウイルス解析

研究分担者：松岡 雅雄 京都大学ウイルス研究所 教授

研究要旨

成人 T 細胞白血病(adult T-cell leukemia: ATL)は、ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型(human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1) の感染により引き起こされる末梢性 T リンパ球の腫瘍である。Tax 発現は ATL 症例では、しばしば障害されているが、全ての症例で HTLV-1 bZIP factor (HBZ) は発現しており、免疫療法の標的となることが期待できる。HBZ を発現するワクチニアウイルスを作製し、その免疫原性を解析した。免疫により細胞傷害性 T リンパ球の誘導が可能であり、その細胞傷害性 T リンパ球は HBZ 発現細胞の抑制、担がんマウスの生存延長をもたらした。

A. 研究目的

ATL 症例では、Tax の発現は、しばしば障害されているのに対して HBZ は全ての症例で発現が認められる。Tax は抗原性が高く、細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) の標的となるのに対して HBZ の免疫原性は低いために発現しても細胞傷害性 T リンパ球の標的となりにくいことが予想される。しかし、HBZ の恒常的な発現から、HBZ に対する免疫応答を誘導できれば治療の有力な手段になることが予想される。この HBZ に対する細胞傷害性 T リンパ球の誘導、抗腫瘍効果に関して検討を加えた。

B. 研究方法

1) Tax、HBZ 発現ワクチニアウイルスの作製：抗原遺伝子として HTLV-1 Tax と HBZ の変異体を使用した。Tax は TL130/131AS 変異 (Tax M22) ・ S258A 変異 (Tax S258A) を挿入した。一方で HBZ は LL27/28AA 変異 (HBZ LL/AA) を挿入した。野生型ワクチニアウイルス株 LC16m8 はニワトリ胚線維芽細胞 (CEF) に感染させた。LC16m8 感染 CEF は neon transfection system (Invitrogen) によって pBMSF-7c プラスミドを導入することによって相同組換えを起こさせた。それによって抗原遺伝子は LC16m8 株のヘマグルチニン領域に組み込まれる。作製した組換えウイルスは RK13 細胞株により増やした。組換えウイルスでの挿入遺伝子発現は抗 Tax 抗体 (MI73) と HBZ 抗体 (HBZ ペプチド免疫ウサギ血清) を使い、ウェスタンブロットで確認した。

2) 実験動物へのワクチン接種

作製したウイルスは二又針を使い、実験動物の皮膚に 10^7 PFU で接種させた。マウス (C56BL/6) での追加免疫は 3-4 週間に 1 回接種し、計 6 サイクル行った。H4、ワクチン接種動物での抗原特異的反応の検出

3) 抗原特異的反応の解析：マウスでは脾細胞を使用した。マウス脾細胞とサル PBMC は CD4 or CD8 magnetic beads (BD) を使用する事で T 細胞を除去し、ELISPOT assay (Mabtech) に使用した。CTL アッセイとサイトカイン産生誘導の為に CD4 除去マウス脾細胞は 1 μ M ペプチドで前刺激を行った。サイトカイン産生はペプチドをパルスした bone marrow-derived DC で刺激する事で誘導した。CTL の細胞障害性を解析する為に Ly5.1 C57BL/6 マウス脾細胞は 1 μ M pooled peptide で 1 週間刺激し、effector 細胞として使用した。Ly5.2 EL4 細胞株は FCS(-) RPMI 中で 1 μ M peptide を 37 1hr パルスし、target 細胞として使用した。Target に対する細胞障害性は flowcytometry を使い、AnnexinV (BD) の発現を測定する事で下記公式によって決定した。
$$\left(\frac{E:T_{x:1} - E:T_{0:1}}{100 - E:T_{0:1}} \right) \times 100 = \text{細胞障害性} (\%)$$

(倫理面への配慮)

本研究におけるプロウイルス解析は京都大学倫理委員会の承認 (承認番号 G-311、844) を基に遂行している。動物実験に関しては、動物愛護法に基づいた京都大学動物委員会の承認を得て遂行している (承認番号 : D13-02) 。

C. 研究結果

1) HBZ, Tax に対する CTL 誘導

作製した組換えウイルスは C57BL/6 に 6 回接種した。脾細胞での IFN-g 産生は 20mer オーバーラップペプチド刺激によって ELSIPOT で測定した。rVV-Tax の両方で Tax 特異的 CD4 と CD8 T 細胞の誘導を確認した。一方で rVV-HBZ LL/AA も同様にワクチン接種マウスに特異的 T 細胞を誘導可能であった。これまで生体内に Tax 特異的 T 細胞を誘導する方法は多数報告されてきた。しかし、HBZ 特異的 T 細胞の誘導する方法の報告は無く、今回示した組換えウイルスを用いた方法は HBZ 特異的 T 細胞誘導の出来る唯一の方法である。

2) CTL の細胞傷害性確認

ワクチンによって誘導された CTL の細胞傷害性を解析する為に CTL killing アッセイを行った。rVV-Tax M22 をワクチン接種マウスの脾細胞は Tax-PA and-PB で前刺激した。その Tax 特異的 bulk CTL は Tax ペプチドをパルスした EL4 細胞に対して障害した。その障害性は Tax-PA と Tax-PB EL4 の両方で確認された。一方で rVV-HBZ LL/AA から生じた HBZ 特異的 bulk CTL は HBZ-PB をパルスした EL4 に対してのみ細胞傷害性を示した。一方で HBZ-PA EL4 に対しては killing 活性を示さなかった。rVV-Tax M22 での結果と異なり rVV-HBZ LL/AA が誘導した CTL は主に HBZ アミノ酸配列の後半部 (HBZ₉₁₋₂₀₆) を認識して細胞を障害する可能性が示された。一方で rVV 誘導 Tax 特異的 CTL は Tax-PA と-PB の両方に対して細胞傷害性を示した事から、その認識配列には偏りが観察されなかった。これは Tax の非常に免疫原性が高い理由の 1 つと考えられる。

3) HBZ トランスジェニックマウスから樹立した T 細胞株に対する CTL の効果

C57BL/6 を HBZ 発現ワクチニアウイルス接種により免疫した。その後、HBZ トランスジェニックマウスから樹立した T 細胞株 (Ht48) を接種した。Ht48 は HBZ を発現しており、C57BL/6 に生着可能な細胞株である。HBZ 免疫マウスでは、生存期間の延長が認められ、HBZ に対する免疫反応が抗腫瘍効果を発揮したことが示唆された。

D. 考察

これまで感染細胞数 (プロウイルス量) を規定する因子として HBZ に対する細胞傷害性 T リンパ球が報告されてきたが、その細胞数の少

なさから解析が進んでいなかった。今回、我々は HBZ 発現ワクチニアウイルスを使って、HBZ に対する CTL を誘導して、その細胞傷害活性を明らかにした。重要なことに HBZ によって免疫を誘導したマウスは、HBZ 発現 T リンパ腫を接種後、その生存期間延長が認められた。このことは HBZ に対する免疫の抗腫瘍活性が確認できたことを示している。HBZ は免疫原性が低く、CTL 誘導の効率がポイントであるが、ワクチニアウイルスのように効率良く免疫誘導できると抗 ATL 効果が期待できるものと考えられる。

E. 結論

Tax に加えて HBZ も免疫治療の標的となることが示された。Tax と異なり HBZ は全ての症例で発現しており、その免疫誘導は ATL に対する免疫療法の対象を上げるだけでなく Tax と組み合わせることによる相乗効果も期待できる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ma G, Yasunaga J-I, Akari H, and Matsuoka M. TCF1 and LEF1 act as T-cell intrinsic HTLV-1 antagonists by targeting Tax. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (in press).
2. Takachi T, Takahashi M, Takahashi-Yoshita M, Higuchi M, Obata M, Mishima Y, Okuda S, Tanaka Y, Matsuoka M, Saitoh A, Green P, Fujii M. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein represses the expression of the BCL11B tumor suppressor in T-cells. Cancer Sci, (in press).
3. Kinpara S, Ito S, Takahata T, Saitoh Y, Hasegawa A, Kijiyama M, Utsunomiya A, Masuda M, Miyazaki Y, Matsuoka M, Nakamura M, Yamaoka S, Masuda T, Kannagi M. Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase and anti-sense viral RNA in the constitutive NFκB activation in adult T-cell leukemia/lymphoma cells. Leukemia (in press).
4. Suehiro Y, Hasegawa A, Iino T, Sasada A, Watanabe N, Matsuoka M, Takamori A, Tanosaki R, Utsunomiya A, Choi I, Fukuda T, Miura O, Takaishi S, Teshima T, Akashi K, Kannagi M, Uike N, Okamura J. Clinical outcomes of a novel therapeutic vaccine with Tax peptide-pulsed dendritic cells for adult T-cell leukemia/lymphoma in a pilot study. Br J Haematol (in press).

5. Niederer HA, Laydon DJ, Melamed A, Elemans M, Asquith B, Matsuoka M, Bangham CR. HTLV-1 proviral integration sites differ between asymptomatic carriers and patients with HAM/TSP. *Virology J.* 11: 172, 2014.
 6. Lavorgna A, Matsuoka M, Harhaj EW. A critical role for IL-17RB signaling in HTLV-1 Tax-induced NF- κ B activation and T-cell transformation. *PLoS Pathogens* (in press).
 7. Cook LB, Melamed A, Niederer H, Valganon M, Laydon D, Foroni L, Taylor GP, Matsuoka M, Bangham CR. The role of HTLV-1 clonality, proviral structure and genomic integration site in adult T cell leukemia/lymphoma. *Blood*, 123: 3925-3931, 2014.
 8. Furuta RA, Ma G, Matsuoka M, Otani S, Matsukura H, Hirayama F. Re-evaluation of screening of plasma positive for human T-cell leukemia virus type 1 using a luciferase immunoprecipitation system in blood donors. *Transfusion*, (in press).
 9. Zhao T, Satou Y and Matsuoka M. Development of T cell lymphoma in HTLV-1 bZIP factor and Tax double transgenic mice. *Arch Virol*, 159: 1849-1856, 2014.
 10. Azuma Y, Kükenshöner T, Ma G, Yasunaga JI, Imanishi M, Arndt KM, Matsuoka M, and Futaki S. Controlling leucine-zipper partner recognition in cells through modifications of a-g interactions. *Chem. Commun.* 50: 6364-6367, 2014.
 11. Tanaka-Nakanishi A, Yasunaga J-I, Takai K and Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor suppresses apoptosis by attenuating the function of FoxO3a and altering its localization. *Cancer Res*, 74:188-200, 2014.
 12. Miyazato P and Matsuoka M. Human T-cell leukemia virus type 1 and Foxp3 expression viral strategy in vivo. *Int Immunol.* 26: 419-425, 2014
- 2. 学会発表**
1. Matsuoka M. How Human T-cell Leukemia Virus Type 1 Causes Diseases: The 4th International Symposium on Carcinogenic Spiral Infection, Immunity, and Cancer, Keio Plaza Hotel Sapporo, Japan, February 10-11, 2014.
 2. 松岡雅雄: HTLV-1 感染が仕掛ける巧妙な罠: HBZ タンパク質: 成人 T 細胞白血病 (ATL) と原因ウイルス (HTLV-1) 「ATL 細胞の培養から始まった HTLV-1 研究: ATL シンポジウム、高新文化ホール(高知) 2014 年 5 月 24 日
 3. Matsuoka M. Mechanism of leukemogenesis by human T-cell leukemia virus type 1: The 12th Annual Meeting of Japanese Society of Medical Oncology. Fukuoka Sunpalace, Japan, July 17-19, 2014.
 4. 安永純一郎、園直希、馬広勇、萩谷啓太、松岡雅雄: 宿主 F-box タンパク質 FBXL11 は Tax と HBZ のユビキチン化を誘導し機能を活性化する: 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京大学医科学研究所 1 号館講堂 (東京) 2014 年 8 月 22 日-24 日
 5. 栗林和華子、水上拓郎、滝澤和也、倉光球、浅田善久、岩間厚志、松岡雅雄、瀧口功: HTLV-1 モデルマウスである HBZ-Tg マウスにおける癌幹細胞の同定と機能解析: 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京大学医科学研究所 1 号館講堂 (東京) 2014 年 8 月 22 日-24 日
 6. 三田上侑生、安永純一郎、大島孝一、松岡雅雄: HTLV-1 bZIP factor が惹起する炎症には IFN γ が重要な役割を果たす: 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京大学医科学研究所 1 号館講堂 (東京) 2014 年 8 月 22 日-24 日
 7. Ma G, Yasunaga JI, Matsuoka M. TCF1/LEF1 are T-cell natural HTLV-1 Tax antagonists that restrict viral expansion in thymus. The 1st Annual Meeting of the Japanese Society of HTLV-1 and Associated Diseases. The Institute of Medical Science, Tokyo University, Japan, August 22th-24th, 2014.
 8. 松岡雅雄: HTLV-1 による発がん機構: 第 73 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜 (神奈川) 2014 年 9 月 25 日-27 日
 9. 川月章弘、安永純一郎、松岡雅雄: HTLV-1 bZIP factor (HBZ) は Rb タンパクと相互作用し、E2F-1/Rb 経路を改変する: 第 73 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜 (神奈川) 2014 年 9 月 25 日-27 日
 10. 安永純一郎、松岡雅雄: 転写因子 TCF1、LEF1 は HTLV-1 Tax を阻害し末梢 T リンパ球への感染指向性に関与する: 第 73 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜 (神奈川) 2014 年 9 月 25 日-27 日

11. 三田上侑生、安永純一郎、大島孝一、松岡雅雄：
HTLV-1 bZIP factor が惹起する炎症における IFN の役割：第 62 回日本ウイルス学会
学術集会、パシフィコ横浜（神奈川）、2014
年 11 月 10 日-11 月 12 日
12. 菅田謙治、安永純一郎、三浦未知、明里宏
文、小柳義夫、小原道法、松岡雅雄：
Anti-CCR4 抗体は Treg と感染細胞を同時に
標的にする事で、STLV-1 自然感染ニホンザ
ルでのウイルス特異的免疫反応を活性化さ
せる：第 62 回日本ウイルス学会学術集会、
パシフィコ横浜（神奈川）、2014 年 11 月
10 日-11 月 12 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし