

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業
(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 移植医療研究分野)

分担研究報告書

ウイルス特異的 T 細胞療法における標的部位の同定 (エピトープマッピング)
に関する研究

研究分担者 立川 愛 国立感染症研究所エイズ研究センター第二室 室長
(東京大学医科学研究所 (~平成27年1月31日))

研究協力者 小野敏明 東京医科歯科大学大学院 大学院生

研究要旨

多ウイルス特異的 T 細胞療法の実臨床化に向けて、ウイルス特異的 T 細胞の品質評価法として標的
部位の同定法 (エピトープマッピング) を確立した。OLP マトリックスを用いた ELISpot assay によ
るエピトープマッピング法を構築し、健常成人の末梢血単核球より増幅した CMV, EBV, AdV 特異
的 T 細胞を用いて、標的部位の同定を行った。各 OLP に対する T 細胞応答を、高感度に定量するこ
とが可能となり、ウイルス特異的 T 細胞の質的評価系として有用であることが示唆された。

A . 研究目的

移植後免疫不全状態におけるウイルス感染症は、
患者の生命予後を脅かす要因の一つとなっている。
サイトメガロウイルス(CMV)、Epstein-Barrウイル
ス(EBV)、アデノウイルス(AdV)等の日和見感染症
では、有効な治療法が存在しないか、あるいは副
作用、費用対効果等の問題点があり、抗ウイルス
薬以外の治療法が求められている。

近年、移植後ウイルス感染症に対して試験管内
で増幅したドナーあるいはアロ由来のウイルス特
異的CTLを用いた免疫療法が行われる様になり、
劇的な成果を挙げている。特に、ウイルスタンパ
ク質全体をカバーするオーバーラップペプチド
(OLP)を抗原とした刺激培養による多ウイルス特
異的T細胞の増幅法が確立され、その安全性と有用
性が明らかとなりつつある。一つのウイルスタン
パク質においても多様なエピトープに特異的なT
細胞を増幅することが可能であるため、より多数
のウイルス特異的T細胞が増幅され、より高い抗ウ
イルス効果を発揮することが期待される。

本研究では、増幅されたウイルス特異的 T 細胞
の標的部位を同定するために、IFN- γ ELISpot

assay を用いたエピトープマッピングシステムの
構築を目的とする。

B . 研究方法

対象：

書面にて研究参加の同意が得られた日本人の
健常成人を対象とした。

ウイルス特異的 T 細胞の培養：

CMV (pp65, IE1)、EBV (EBNA1, LMP2,
BZLF1)、AdV (Penton, Hexon)の 3 ウイルス 7
タンパク質の OLP を抗原として、末梢血単核球
(PBMC)を IL-4/IL-7 存在下で 2-3 週間培養し、ウ
イルス特異的 T 細胞を増幅した。本研究では 10
アミノ酸重複する 15 アミノ酸長の OLP を使用し
た。

**フローサイトメトリーによるウイルス特異的 T
細胞の解析：**

CMV, EBV, AdV-OLP で 6 時間刺激後、IFN- γ
の細胞内染色を行い、FACS Aria にて解析した。

標的部位の特定：

3 ウイルス 6 タンパク質 (CMV-pp65/IE1, EBV-EBNA1/LMP2/BZLF1, AdV-Penton) をカバーする 718 種類の OLP を用いて、16x16 方陣を基本とした 3 つのマトリックス (計 92 pool) を作成した。1 pool に最大 17 種類の OLP を含む。陰性対象を 3well、陽性対照を 1well 設定し、96 穴プレート 1 枚にて IFN- γ ELISpot assay を行い (Matrix-ELISpot)、候補 OLP を決定した。その後、各候補 OLP を用いて ELISpot assay を行い (Deconvolution - ELISpot)、反応性 OLP を決定した。

(倫理面への配慮)

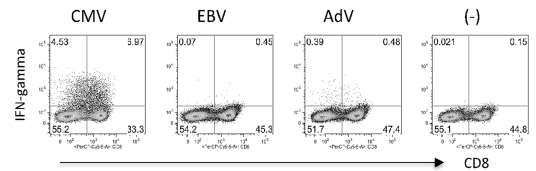
研究対象者には研究目的や不利益、危険性など必要事項に関して文書を用いて説明し、書面でインフォームドコンセントを得た。本研究内容は、東京大学医科学研究所および東京医科歯科大学の倫理審査委員会により承認済みである。

C . 研究結果

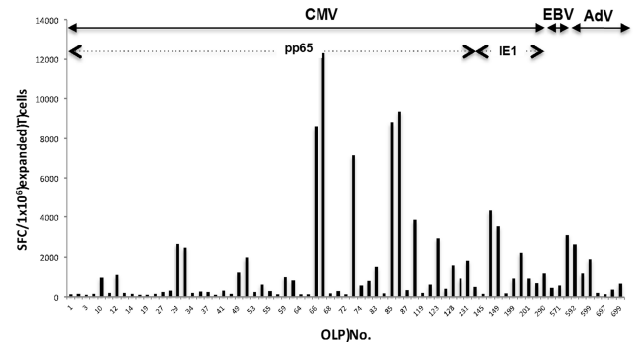
日本人健常成人 1 名の PBMC を用いて、3 ウイルス 7 抗原をカバーする OLP を抗原として T 細胞の刺激培養を行った。まず、フローサイトメトリーにより各ウイルス特異的 T 細胞の頻度を、IFN- γ 産生解析の結果、CMV 特異的 T 細胞が最も多く存在しており、T 細胞中の 6.97% が CMV 特異的 CD8 陽性 T 細胞、4.53% が CMV 特異的 CD4 陽性 T 細胞であった (図)。低頻度ではあったが、EBV, AdV 特異的 T 細胞も検出された。続いて、同一の細胞を用いて、Matrix-ELISpot を行い、198 種類の候補 OLP を決定し、さらに各 OLP を抗原として ELISpot assay を行い、反応の見られた OLP を決定した。多くの場合、隣り合う 2 種類の OLP に反応が見られているが、10 アミノ酸ずつ重複する OLP を使用しているため、同一エピートープに対する反応と考えられるため、1 領域とカウントすることとした。その結果、34 領域で Background 以上の IFN- γ 産生細胞が検出された (図)。強い反応 (1000SFC/1x10⁶ cells) の見られた部位だけでも、17 領域存在しており、CMV-pp65 で 11 領域、CMV-IE1 で 3 領域、EBV-LMP2 で 1 領域、AdV-Penton で 2 領域存在していた。本結果は、CMV に対する T 細胞が高頻度に検出されたフローサイトメトリー解析結果と合致するものであった。

同様の方法で、計 5 名の健常人ドナーの PBMC を用いて標的部位の同定を行った結果、CMV に対する反応が全く検出されなかった 1 名を除いて、CMV に対する T 細胞が最も高頻度に存在しており、標的部位の数も最も多かった。

<フローサイトメトリーによるウイルス特異的 T 細胞の検出>



<ELISpot assayによる標的部位の同定>



D . 考察

OLP マトリックスを用いた ELISpot assay を構築し、増幅培養されたウイルス特異的 T 細胞中に存在する各エピートープ特異的 T 細胞の頻度を正確に検出することに成功した。本法を用いれば、細胞製剤としてのウイルス特異的 T 細胞の品質管理上重要な情報を得ることが可能となる。さらに、ウイルス特異的 T 細胞を CD4、CD8 陽性 T 細胞に分画後、本法により標的部位を同定することで、HLA class I 拘束性に作用する CD8+T 細胞応答と、HLA class II 拘束性に作用する CD4+T 細胞応答をそれぞれ評価することも可能となる。

ウイルス特異的 T 細胞は HLA 拘束性に機能を発揮するため、レシピエントと適合する HLA に提示されるエピートープ特異的 T 細胞のみが効果を発揮する。そのため、増幅したウイルス特異的 T 細胞中の、真に抗ウイルス効果を発揮する T 細胞、すなわちレシピエントと T 細胞ドナー間で共有する HLA に拘束性のエピートープ特異的 T 細胞の頻度を明らかにすることは、細胞製剤としての品質評価として重要である。今後、HLA 遺伝子型の明らかとなっている対象者についてエピートープマッピングを行い、各 T 細胞応答の HLA 拘束性を明らかにする。

E . 結論

3ウイルス6タンパク質におけるウイルス特異的T細胞の標的部位同定のためのエピトープマッピング法の確立に成功した。

G . 研究発表

1. 論文発表

1. Nakayama-Hosoya K, Ishida T, Youngblood B, Nakamura H, Hosoya N, Koga M, Koibuchi T, Iwamoto A, **Kawana-Tachikawa A**. Epigenetic repression of interleukin-2 expression in senescent CD4+ T cells during chronic human immunodeficiency virus type-1 infection. *J Infect Dis*. **211**:28-39, 2015.
2. Gu L, **Kawana-Tachikawa A**, Shiino T, Nakamura H, Koga M, Kikuchi T, Adachi E, Koibuchi T, Ishida T, Gao GF, Matsushita M, Sugiura W, Iwamoto A, Hosoya N. Development and Customization of a Color-Coded Microbeads-Based Assay for Drug Resistance in HIV-1 Reverse Transcriptase. *PLoS One*. **9**:e109823, 2014.
3. Han C, **Kawana-Tachikawa A**, Shimizu A, Zhu D, Nakamura H, Adachi E, Kikuchi T, Koga M, Koibuchi T, Gao GF, Sat Y, Yamagata A, Martin E, Fukai S, Brumme ZL, Iwamoto A. Switching and emergence of CTL epitopes in HIV-1 infection. *Retrovirology*. **11**:38, 2014.
4. **Kawana-Tachikawa A**, Llibre JM, Bravo I, Escrig R, Mothe B, Puig J, Puertas MC, Martinez-Picado J, Blanco J, Manzardo C, Miro JM, Iwamoto A, Pozniak AL, Gatell JM, Clotet B, Brander C; MARAVIBOOST investigators. Effect of Maraviroc Intensification on HIV-1-Specific T Cell Immunity in Recently HIV-1-Infected Individuals. *PLoS One*. **9**:e87334, 2014.

2. 学会発表

1. **Kawana-Tachikawa A**. Disruption of T cell immunity during chronic HIV-1 infection. **The 21st East Asia Joint Symposium on Biomedical Research**. Seoul, Korea. Jul 2014.

2. Hirao M, Suzuki K, **Kawana-Tachikawa A**, Nakauchi H, Cooper DA, Kelleher AD, Kaneko S. Proposal of new immune cell source for HIV-1 infection study based on iPSCs and evaluation of impact of viral replication in iPSCs-derived macrophage expressing shRNAs targeting HIV-1 promoter. **20th International AIDS Conference**. Melbourne, Australia. Jul 2014.
3. Kamori D, 村上知行, Hasan Z, Meribe S, Carlson J, Siarot L, 三浦聡之, **立川(川名)愛**, 岩本愛吉, 湯永博之, 岡慎一, 間陽子, 上野貴将 : Effects of natural variability of an immunodominant Vpr region on immunological footprints, clinical outcome and protein functions. **第 62 回日本ウイルス学会学術集会**, 横浜, 2014 年 11 月
4. 細谷(中山)香, 石田尚臣, 中村仁美, 細谷紀彰, 古賀道子, 鯉淵智彦, 岩本愛吉, **立川(川名)愛** : HIV-1 感染における CD4 陽性 T 細胞の IL2 遺伝子発現低下分子メカニズムの解明, **第 62 回日本ウイルス学会学術集会**, 横浜, 2014 年 11 月
5. Gu L, Han Y, Guan S, Yang F, Zhu T, 合田仁, Cao Y, **立川(川名)愛**, 細谷紀彰, Gao FG, 岩本愛吉, Li T, 石田尚臣 : 中国 HIV-1 感染者の未治療検体における副受容体指向性の検査, **第 62 回日本ウイルス学会学術集会**, 横浜, 2014 年 11 月
6. 佐藤秀憲, 細谷(中山)香, 菊地正, 安達英輔, 古賀道子, 中村仁美, 鯉淵智彦, 岩本愛吉, **立川(川名)愛** : HIV 感染者の CD8 陽性 T 細胞における補助刺激分子 OX40 の検討, **第 62 回日本ウイルス学会学術集会**, 横浜, 2014 年 11 月
7. 石坂彩, 佐藤秀憲, **立川(川名)愛**, 中村仁美, 古賀道子, 細谷紀彰, 鯉淵智彦, 野本明男, 岩本愛吉, 水谷壮利 : HIV-1 残存感染細胞の活性と免疫活性化の相関, **第 62 回日本ウイルス学会学術集会**, 横浜, 2014 年 11 月
8. 藤田由利子, 小野敏明, 落合央, **立川(川名)愛**, Leen AM, Heslop HE, 森尾友宏, 高橋聡 :

実臨床応用に向けたウイルス特異的 T 細胞療法の開発、**第 6 回血液疾患免疫療法研究会学術集会**、京都、2014 年 9 月

9. 小野敏明、藤田由利子、**立川(川名)愛**、高橋聡、森尾友宏：臨床応用に向けた多ウイルス特異的 T 細胞培養法の確立とその特性解析、**第 42 回日本臨床免疫学会総会**、東京、2014 年 9 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
国内特許出願（申請中）

出願人：公益財団法人微生物化学研究会、発明者：水谷壮利、石坂彩、立川愛 「免疫状態

の判定方法、CD4+ T 細胞数の増加予測方法、及び CD4+ T 細胞数の減少予測方法、並びにそれらのためのキット」特願 2014-128028、出願日：2014 年 6 月 23 日

2. 実用新案登録
特記事項なし
3. その他
特記事項なし