

「生体防御のメカニズム」

平成7年度採択研究代表者

神奈木 真理

(東京医科歯科大学医学系研究科 教授)

「ウイルス持続感染による免疫均衡の破綻機序と

その免疫治療法の開発」

1. 研究実施の概要

本研究では、ヒトレトロウイルス (HIV, HTLV-I 等) 感染症によってひきおこされる腫瘍、免疫不全、慢性炎症性疾患等の生体内での病態形成機序とその分子メカニズムを解明し、究極的にはウイルスを抑制し免疫不均衡を矯正する免疫治療法の開発をめざす。そのため、生体内解析を可能にするための動物モデル開発、宿主側の免疫応答およびウイルスによる細胞内シグナル修飾の解析を当面の目標とした。対象ウイルスのうち HTLV-I は日本で見つかった成人T細胞白血病の病原体であるが、これまで HTLV-I 感染腫瘍をおこす安定した動物モデルが無かったため、生体内レベルでの腫瘍化メカニズムや病態と宿主免疫の関係については解析が遅れていた。そこで我々は、平成10年度までに感染動物を取り扱うための研究実施体制の整備を行い、ラットを用いた新規 HTLV-I 感染腫瘍動物モデル作成を試み一部樹立に成功した。この系では生体内での抗腫瘍免疫解析が可能であり、今後、これを用いて抗 HTLV-I 腫瘍ワクチン等の開発に利用できる。一方、HIV 感染動物実験系としてヒトT細胞を移入した SCID/huPBL マウスを選び、生体内での HIV-1 感染増殖性を調べた。この系では優位となるT細胞サブセットと親和性 HIV 株に偏りが見られ、HIV-1 急性感染期のモデルと考えられた。これとは別に、HIV に対する宿主免疫防御機構にも解析を加えた。HIV 感染者の CD8 陽性細胞は HIV 抑制能を持つ宿主の重要な防御機構であるが、解析の結果これには2種類の抑制機序が存在すること、破綻には TNF α や IFN γ が関与すること等を明らかにした。これ以外に、HTLV-I Tax による細胞周期調節蛋白やアポトーシス抑制蛋白の遺伝子発現調節、また Friend ウイルスの活性化シグナルについても解析が進み、新知見が得られた。

2. 研究実施内容

(1) Aグループ (東京医科歯科大学)

① HTLV-I 感染動物実験：

HTLV-I 感染による腫瘍発生動物モデルを 2 種類樹立した。一つは胸腺欠損ヌードラットを用いた HTLV-I 感染同系腫瘍細胞の移入である。もう一つは、T 細胞活性化の costimulatory molecule に対する抗体投与による、免疫正常ラットにおける腫瘍増殖の誘導である。これらにより、はじめて HTLV-I 腫瘍が in vivo で解析できる安定した実験系がもたらされた。同時に、これらの系は、HTLV-I 感染腫瘍が T 細胞免疫に感受性であることを示しており、今後免疫標的の解析やワクチン開発に有用である。一方、HTLV-I 持続感染系では、感染条件により抗体産生応答を欠く持続感染が成立することを見出した。この事実は、抗体陰性 HTLV-I キャリアだけでなく抗腫瘍免疫能の低い集団の存在を示唆しており極めて重要な所見である。

② HIV-1 抑制機序：

HIV-1 感染者 CD8 陽性細胞の HIV 複製抑制を MHC-I 拘束の有無で 2 種類に分類し、両者の病期との相関を調べた。この結果、無症候感染者では両者とも高く、進行期患者では両者とも低く、移行期にあたる CD4 細胞数 50~200 / μ l の患者では MHC-I 非拘束性の CD8 依存性 HIV 抑制活性の低下が先行することが分かった。この抑制はケモカイン SDF-1 とは無関係であった。また、HIV-1 複製抑制の標的の一つとして HIV-1 のウイルス蛋白 integrase の機序を調べ、この蛋白が integration よりも前の逆転写の段階で既に HIV-1 複製に不可欠であることが分かった。

(2) Bグループ (東京医科歯科大学)

Th1 細胞と Th2 細胞における HIV strain によるウイルス増殖性の差とコレセプターの意義：

マクロファージ指向性 HIV-1 株 (JR-CSF, JR-FL) と T 細胞株指向性 HIV-1 株 (NL4-3) およびそれらの組換えキメラウイルスを作成し解析した結果、これらの親和性がヘルパー細胞サブセットによって異なることを見いだした。即ち、マクロファージ指向性 HIV-1 株は Th1 細胞で、T 細胞株指向性 HIV-1 株は Th2 細胞で選択的に増殖しやすい。さらに、これが HIV-1 envelope の V3 ループにより決定され、T 細胞上の HIV コレセプター (CCR5 と CXCR4) の発現の違いによることが分かった。

(3) Cグループ (東京医科歯科大学)

Friend ウイルスの活性化シグナル解析：

マウス Friend 白血病 FVp ウイルスの gp55 による EPO レセプターからの活性化シグナル伝達に解析を加えた。JAK1, STAT5 がリン酸化されるが、生理的な EPO による刺激とは異なり、STAT5 が核内移行しておらず、この系は細胞増

殖に関与していないことが分かった。また、赤血球ピルビン酸キナーゼ (R-PK) 変異マウスから FVp を用いて樹立した細胞株では顕著な自発的アポトーシスが観察され、ATP 産生低下条件下では、新たなアポトーシス経路が促進されることがわかった。

(4) Dグループ (東京医科歯科大学)

HTLV-I Tax による細胞増殖機序解析 (特に細胞周期に関して) :

HTLV-I Tax の細胞増殖の分子メカニズムを明らかにするため、ヒト T 細胞株を G1 期に arrest させた状態で、細胞周期関連遺伝子発現を調べた。この結果、HTLV-I Tax は転写因子 E2F を活性化し細胞周期促進させることを明らかにした。これは、NFκB を活性化できる Tax の変異体でのみ再現でき、また NF-AT の活性化とも一致していることが分かった。しかし、NFκB 活性化だけでは E2F の活性化は見られず、Tax による E2F の活性化にはさらに別の機作がはたらくことが示唆された。

(5) Eグループ (北里大学)

hu-PBL-SCID マウスにおける生体内 T 細胞の HIV-1 感受性の解析 :

HIV 感染 hu-PBL-SCID マウスにおける HIV の生体内増殖を調べた。この結果、マクロファージ指向性 HIV-1 が優位に増殖し、単球、マクロファージ系が hu-PBL-SCID マウスの HIV 初感染に重要な役割を果たすことが示唆された。

また、HIV-1 のコレセプター発現を調べるため、CCR5 と CXCR4 に対するモノクロナル抗体を数種作成し、ヒト PBMC の静止期、活性期における発現を調べた。現在、HIV 感染 hu-PBL-SCID マウスの生着ヒト T 細胞の生体内におけるコレセプター発現と HIV-1 感受性の関係を解析中である。また、gp34(OX40L) は免疫応答の初期において T 細胞の活性化に関与することを明らかにした。

(6) Fグループ (新潟大学)

HTLV-I Tax による細胞増殖機序解析 (特に細胞死抑制に関して) :

HTLV-I Tax がアポトーシス抑制効果を持つことを、マウス IL-2 依存性 T 細胞株 CTLL-2 を用いて実験的に証明した。また、HTLV-I 感染細胞は Fas を介するアポトーシスにも抵抗性を示し、これは Tax か FAP-1 の一方あるいは両方の発現と相関することを見出した。特に HAM/TSP 患者由来のものに FAP-1 の発現亢進が認められた。HTLV-I Tax が転写因子 STAT1 と STAT5 の発現を RNA レベルで誘導することを明らかにし、IL-2 依存性細胞増殖に関与する可能性を示した。

(7) Gグループ (日本医科大学)

HIV-1 の CTL の活性抑制機序解析 :

HIV-1 感染者の宿主防御機構の代表である CTL が機能破綻をおこすメカニズ

ムを解析した。HIV-1 の CTL エピトープ部位のペプチドを CTL に作用させると CTL 活性が著しく減弱することを見出し、このメカニズムを詳しく調べた。この結果、CTL 側の MHC-I 分子へのペプチド結合に引き続いておこる一時的な anergy であり IL-2 レセプターβ鎖の発現低下と IFN γ の大量産生を伴う事が分かった。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

- T. Ohashi, M. Arai, H. Kato, M. Kubo, M. Fujii, N. Yamamoto, A. Iwamoto, M. Kannagi. High SDF-1 expression in HIV-1 carriers does not correlate with CD8⁺ T cell-mediated suppression of viral replication. *Virology*. 244: 467-472, 1998.
- H. Kato, Y. Koya, T. Ohashi, S. Hanabuchi, F. Takemura, M. Fujii, H. Tsujimoto, A. Hasegawa, and M. Kannagi. Oral administration of HTLV-I induces immune unresponsiveness with persistent infection in adult rats. *J. Virol.* 1998.
- Arai, M., Kannagi, M., Matsuoka, M., Sato, T., Yamamoto, N., Fujii, M. Expression of FAP-1 (Fas-associated phosphatase) and resistance to Fas-mediated apoptosis in T-cell lines derived from human T-cell leukemia virus type 1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 14,261-267, 1998.
- M. Arai, T. Ohashi, T. Tsukahara, T. Murakami, T. Hori, T. Uchiyama, N. Yamamoto, M. Kannagi, M. Fujii. Human T cell leukemia virus type 1 Tax protein induces the expression of lymphocyte chemoattractant SDF-1/PBSF. *Virology*. 241: 298-303, 1998.
- T. Ohashi, M. Kubo, H. Kato, A. Iwamoto, H. Takahashi, M. Fujii, and M. Kannagi. Role of class I major histocompatibility complex-restricted and -unrestricted suppression of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication by CD8⁺ T lymphocytes. *J. Gen. Virol.* 80: 209 -216, 1999.
- H. Iwanaga, T. Tsukahara, T. Ohashi, Y. Tanaka, M. Arai, M. Nakamura, K. Ohtani, M. Kannagi, N. Yamamoto, and M. Fujii. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein has multiple distinct transforming activities in T-cells. *J. Virol.* 73: 1271-1277, 1999.
- N. Nakamura, M. Fujii, T. Tsukahara, M. Arai, T. Ohashi, H. Wakao, M. Kannagi, N. Yamamoto. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein induces the expression of STAT1 and STAT5 genes in T-cells. *Oncogene*. 18:

2667-75, 1999.

○Y. Koya, T. Ohashi, H. Kato, S. Hanabuchi, T. Tsukahara, F. Takemura, K. Etoh, M. Matsuoka, M. Fujii, and M. Kannagi. Establishment of a seronegative HTLV-I-carrier state in rats inoculated with a syngeneic HTLV-I-immortalized T cell line preferentially expressing Tax. *J. Virol.* 73: 6436-6443, 1999.

○T. Ohashi, S. Hanabuchi, H. Kato, Y. Koya, F. Takemura, K. Hirokawa, T. Yoshiki, Y. Tanaka, M. Fujii, and M. Kannagi. Induction of ATL-like lymphoproliferative disease and its inhibition by adoptive immunotherapy in T-cell deficient nude rats inoculated with syngenic HTLV-I-immortalized cells. *J. Virol.* 73: 6031-6040, 1999.

○T. Tsukahara, M. Kannagi, T. Ohashi, H. Kato, M. Arai, G. Nunez, Y. Iwanaga, N. Yamamoto, K. Ohtani, M. Nakamura, and M. Fujii. Induction of Bcl-xL expression by HTLV-I Tax through NF- κ B in apoptosis-resistant T-cell transfectants with Tax. *J. Virol.*, 73: 7981-7987, 1999.

他 11 件