

「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、レトロウイルス感染症 (HTLV-I, HIV, etc) によってひき起こされる腫瘍、免疫不全、自己免疫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析し、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。平成11年度までに、ラットのHTLV-I感染系において免疫不均衡による安定したHTLV-I腫瘍発生動物モデルを樹立した。これらのモデルを用いて宿主HTLV-I特異的T細胞免疫の生体内での抗腫瘍効果を証明した。また、同モデルを用いて抗腫瘍ワクチンの試みとしてHTLV-I 遺伝子のDNAワクチンの予備実験を行い、生体内での抗腫瘍効果を確認した。その他のワクチン実験のための準備にも着手した。HIV-1感染系では、SCID/huPBLおよびPBMCを用いたex vivoの解析で、T細胞subsetによるHIV-1株親和性に偏りがあることが分かり、HIVコレセプターの発現パターンとの相関が示唆された。また、HIV-1複製の前半期に重要なHIV-1 integraseの機能解析が進み、新たな治療標的となり得ることが分かった。その他、HTLV-IによるT細胞不死化の分子メカニズムとして、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についても解析が進んだ。

2. 研究実施内容

Aグループ

1. HTLV-I感染腫瘍動物実験：

HTLV-I感染による腫瘍発生動物モデルを樹立し、感染宿主の抗腫瘍免疫について解析を行い、抗腫瘍ワクチンの予備実験を行った。モデルの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 (特許申請済み)。この系では、種々の免疫を行った同系動物からのT細胞受動免疫により、生体内で抗腫瘍効果を調べることが可能である。これを応用しHTLV-I Tax cDNAを含むplasmidを遺伝子銃で免疫した。このDNAワクチンの結果得られた免疫T細胞は生体内で抗腫瘍効果を示した (論文印刷中)。もう一つのモデルでは、免疫正常ラットでも特異的免疫抑制によりHTLV-I腫瘍が誘導できることを示し

た。現在、これらのモデルを用い、抗腫瘍免疫のエフェクターの解析とペプチドワクチン実験の準備としてT細胞の認識エピトープの同定を試みている。

2. HIV-1抑制機序：

HIV-1のウイルス側酵素integraseの機序を調べ、integration とは別の新しい複数の機能を持つことを明らかにした。これらの機能は逆転写前から核移行の段階にあり、HIV-1複製に必須さらに、この機能に必要なintegrase配列中のアミノ酸が新たなHIV複製抑制の標的となりうることを見いだした（特許申請済み）。また、HIV-1感染者CD8陽性細胞のHIV複製抑制活性と病期のとの相関を調べ、進行期に移行す時期には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を明らかにした。

Bグループ

Th1-type cellにおけるマクロファージ指向性HIV-1の増殖効率を決定している機構の解明：

感染後の細胞内における各ステップのHIV-1特異的DNAを定量したところ、核への移行効率はJR-CSF (M-tropic) が高いものの、strong-stop DNAからcircular form DNAまでの絶対量については依然としてNL4-3 (T-tropic) のほうが高かった。しかしながら感染後のHIV-1特異的full-length RNAをリアルタイムRT-PCR法によって解析した結果からは、JR-CSFのfull-length RNA産生効率はNL4-3よりも高く、このことからTh1-type cellにおけるJR-CSFの高い増殖性は、その後期過程で決定されている可能性が強く示唆された。

Cグループ

Friendウイルスの活性化シグナル解析：

Friendウイルスはその保有するenv糖蛋白由来gp55がEPOレセプターと結合してJAK-STAT系を活性化し標的CFUe細胞を増殖させ、更にp53の変異、Spfi-1等他のオンコジーンの活性化が加わって、白血病フェノタイプが固定される。分担者らはEPOで分化が誘導されるFriend白血病細胞系（SKT-6）でRas-ERK経路の抑制が起こり、他の方法で同経路を抑制すると赤血球方向への分化が誘導されることを観察した。また、分担者らが単離したヒトp53のホモログp51/p63の遺伝子の発現の特異性、特に筋芽細胞分化やDNA損傷で誘導されることを見出した。

Dグループ

HTLV-I Taxによる細胞増殖機序の解析：

HTLV-I Taxが、増殖休止G0/G1期のヒト T 細胞株Kit 225をS期に誘導することを見い出している。また、Taxによる細胞周期誘導には細胞周期転写因子E2Fの活性化を伴い、TaxがE2Fの機能を誘導することを証明した。本年度は、TaxによるE2F活性化の分子機構を調べた。その結果、Taxを作用させるとE2Fの活性を抑制して

いるpRbファミリーのリン酸化が亢進し、E2Fが活性化することが明らかとなった。さらに、TaxはcyclinD2、cyclin E、cdk2、cdk4の各遺伝子の転写を促進し、cyclin dependent kinase活性を上昇させる。IL-2による細胞周期誘導ではこれらの遺伝子発現の上昇は認められない。従って、Taxの特異的作用点が明らかになったと考えている。

Eグループ

HIVの増殖を制御する宿主要因の解析：

HIV-1感染における主要なcofactorであるケモカイン受容体CXCR4とCCR5の発現制御や機能を解析する目的で新たな抗CXCR4および抗CCR5単クローン抗体を作製した。これらの中でT227抗CCR5は、蛍光抗体法のみならず免疫沈降やWBに使用できること、さらにA80抗CXCR4抗体が、活性化PBMCにおけるX4 HIV-1とR5 HIV-1の病原性を著明に促進することを見いだした。これらの抗体を応用することにより、HIV-1の病原性発現における宿主ケモカイン受容体の関与についての研究の新たな展開につながると期待される（学会発表、論文作成中）。EBVトランスフォームB細胞LCL-Yuの培養上清には、X4, R5 HIV-1両タイプのウイルスの増殖を有意に抑制しかつCD4+T細胞の減少を抑制する因子が存在することを明らかにした。この活性を持つ因子は、MIP-1 α 、 β を含む複数のサイトカインからなることがわかった（学会発表済み）。hu-PBL-SCIDマウスはHIVの増殖制御あるいは病原性制御をin vivoで観察するための動物モデルとして利用されている。今回ヒトPBMCをSCIDマウス脾臓に直接移植することにより、腹腔内接種法に比べてより高いPBMCが観察された。このマウスでは腹腔接種したR5 HIV-1が優位に増殖した（未発表）。より少ないPBMCサンプルの移植によってもhu-PBL-SCIDの作成が可能ならば、種々の抗ウイルス剤の評価等にもこの系が応用できるので、今後詳細な条件検討を行う必要がある。

Fグループ

HTLV-1 Taxによる細胞増殖誘導および成人T細胞白血病発症機序の解析：

HTLV-1 TaxがT細胞株CTLL-2の細胞増殖をIL-2依存性から非依存性へ変換することを明らかにした。その際、Taxはアポトーシスを抑制すると共に、細胞周期をIL-2非依存性に促進していた。このアポトーシス抑制および細胞周期の促進に、アポトーシス抑制因子bcl-xおよび細胞周期促進因子サイクリンD2のTaxによる発現誘導が関与することが示唆された。成人T細胞白血病患者から得られたすべての末梢血白血球細胞において、転写因子NF-kBおよびAP-1の活性化が観察され、これらの転写因子の白血病発症への関与が強く示唆された。この活性化はTaxに依存しない活性化であり、白血病発症の後期過程への関与が推定された。Taxが転写因子STAT1とSTAT5の発現を誘導することを明らかにした。この発現誘導

がウイルス感染T細胞のIL-2に依存した細胞増殖に関与することが示唆された。

Gグループ

HIV-1のCTLの活性抑制機序解析：ウイルスや腫瘍特異的なCTLが体内でAnergy状態となる原因の一つとして、エピトープペプチドがCTL表面のClass I MHC分子から提示され、これを自らのT細胞レセプターが認識した結果である可能性を見出し、そのメカニズムを詳細に追跡するとともにAnergy状態に陥ったCTLの活性化方法を検討した。その結果、B7-1分子のような共刺激因子がAnergy状態のCTL再活性化に必須であることを確認するとともに、様々な長さのエピトープ部分を含む浮遊ペプチドがCTL上に表出したClass I MHC分子に結合した後、血清中の蛋白分解酵素を介して最小単位のエピトープペプチドにtrimmingされる現象（論文印刷中）、またAnergy状態に陥る際にCTLはIFN-g等の大量の液性因子を放出し周囲の特異的ヘルパーT細胞およびCTLを活性化する現象（論文投稿中）を見出した。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

- 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.
- 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-kB in apoptosis-resistant T-cell transfectants with Tax. J. Virol., 73: 7981-7987, 1999.
- S. Hanabuchi, T. Ohashi, Y. Koya, H. Kato, F. Takemura, K. Hirokawa, T. Yoshiki, H. Yagita, K. Okumura, and M. Kannagi. Development of human T cell leukemia virus type I (HTLV-I)-transformed tumor in rats following suppression of T cell immunity by CD80 and CD86 blockade. J. Virol., 74: 428-435, 2000.
- N. Tsurutani, M. Kubo, Y. Maeda, T. Ohashi, N. Yamamoto, M. Kannagi, T. Masuda.

- Identification of critical amino acid residues in human immunodeficiency virus type 1 IN required for efficient proviral DNA formation at steps prior to integration in dividing and nondividing cells. *J. Virol.* 74: 4795-4806, 2000.
- Y. Suzuki, Y. Koyanagi, T. Tanaka, N. Murakami, T. Misawa, H. Kimura, H. Shida, J. A. Hoxie, W. A. O' Brien and N. Yamamoto: Determinant in human immunodeficiency virus type 1 for efficient replication under Cytokine-Induced CD4 + T-helper 1 (Th1)- and Th2-Type conditions. *J. Virol.*, 73: 316-324, 1999.
- Y. 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.
- Nakamura, N., Fujii, M., Tsukahara, T., Arai, M., Ohashi, T., Kannagi, M., Yamamoto, N. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein induces the expression of STAT1 and STAT5 genes in T-cells. *Oncogene*. 18:2667-2675.1999.
- K. Ichiyama, H. Akimoto, L. P. Neoh, N. T. Hitokawa, H. Kanemoto, S. Hirose, Y. Kanemoto, N. Yamamoto: HIV type 2 can bind to CD8 molecules but does not infect CD8 + T Cells. *AIDS Res. Hum. Retrov.*, 15(7), 687-688, 1999.
- N. Mori, M. Fujii, S. Ikeda, Y. Yamada, M. Tomonaga, D. W. Ballard and N. Yamamoto: Constitutive activation of NF- κ B in primary adult T-cell leukemia cells. *Blood*, 93, 2360-2368, 1999.
- T. Murakami, T.Y.Zhang, Y. Koyanagi, Y. Tanaka, J. Kim. Y. Suzuki, S. Minoguchi, H. Tamamura, M. Waki, A. Matsumoto, N. Fujii, H. Shida, J.A. Hoxie, S.C. Peiper and N. Yamamoto: Inhibitory mechanism of the CXCR4 antagonist T22 against human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.*, 73, 7489-7496, 1999
- N. Mori, Y. Nunokawa, Y. Yamada. S. Ikeda, M. Tomonaga and N. Yamamoto: Expression of human inducible nitric oxide synthase gene in T-cell lines infected with human T-cell leukemia virus type 1 and primary adult T-cell leukemia cells. *Blood*, 94: 2862-2870, 1999
- N. Mori, M. Fujii, K. Iwai, S. Ikeda, Y. Yamasaki, T. Hata, Y. Yamada, Y. Tanaka, M. Tomonaga and N. Yamamoto: Constitutive activation of transcription factor AP-1 in primary adult T-cell leukemia cells. *Blood*, 93:2360-8, 1999
- Tsurutani N, Kubo M, Maeda Y, Ohashi T, Yamamoto N, Kannagi M, Masuda T: Identification of critical amino acid residues in human immunodeficiency virus type 1 IN required for efficient proviral DNA formation at steps prior to integration in dividing and nondividing cells. *J. Virol.* 74:4795-806, 2000
- Y. Momoi, K. Ichiyama, I.H. Chowdhury, Y. Koyanagi, N. Yamamoto: Pertussis toxin

- enhances human immunodeficiency virus type 1 replication. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16:373-9, 2000
- Aisaki, K., Kanno, H., Oyaizu, N., Hara, Y., Miwa, S., and Ikawa, Y. Apoptotic changes precede mitochondrial dysfunction in red cell-type pyruvate kinase mutant mouse erythroleukemia cell lines. *Jpn. J. Cancer Res.* 90: 171-179., 1999.
- T. Matsuzaki, K. Aisaki, Y. Yamamura, M. Noda, and Y. Ikawa. Induction of erythroid differentiation by inhibition of Ras/ERK pathway in a Friend murine leukemia cell line, *Oncogene* 19 1500-1508, 2000
- S. Ikawa, M. Obinata and Y. Ikawa. Human p53-p51 (p53-Related) Fusion Protein: A Potent BAX Transactivator, *Jpn. J Cancer Res.* 90, 596-599, 1999
- S. Ikawa, A. Nakagawara and Y. Ikawa. p53 family genes: structural comparison, expression and mutation. *Cell Death and Differentiation* 6, 1154-1161, 1999
- Ohtani K, Iwanaga R, Nakamura M, Ikeda M, Yubata N, Tsuruga H, Nojima H. Cell growth-regulated expression of mammalian MCM5 and MCM6 genes mediated by the transcription factor E2F. *Oncogene*, 18: 2299-2309, 1999.
- T. Tsukahara, M. Kannagi, T. Ohashi, H. Kato, M. Arai, G. Nunez, Y. Iwanaga, N. Yamamoto, K. Ohtani, M. Nakamura, M. Fujii : Induction of Bcl-x(L) expression by human T-cell leukemia virus type 1 Tax through NF-kappaB in apoptosis-resistant T-cell transfectants with Tax. *J. Virol.*, 73: 7981-7987, 1999
- Ohtani, K., Iwanaga, R., Arai, M., Huang, Y-P., Matsumura, Y. & Nakamura, M. Cell type-specific E2F activation and cell cycle progression induced by the oncogene product Tax of human T-cell leukemia virus type I. *J. Biol. Chem.*, 275, 11154-11163, 2000.
- Suzuki Y, Koyanagi Y, Tanaka Y, Murakami T, Misawa N, Maeda N, Kimura T, Shida H, Hoxie A. J, O'brien A. W, Yamamoto N (1999) Determinant in human immunodeficiency virus type 1 for efficient replication under cytokine-induced CD4+ T-helper 1 (Th1)- and Th2-type conditions. *J. Virol.* 73 316-324.
- Santiago, F., Clark, E., Chong, S., Molina, C., Mozafari, F., Mahieux, R., Fujii, M., Azimi, N., Kashanchi, F. Transcriptional Up-Regulation of the Cyclin D2 Gene and Acquisition of New Cyclin-Dependent Kinase Partners in Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Infected Cells. *J Virol.* 73:9917-9927.1999.
- Mori, N., Yamamoto, N., Fujii, M. Activation of Nuclear Factor kappa B transcription factor by human T-cell leukemia virus type I. *Acta Med.Biol.* 47:85-96.1999.
- Nakatsuka, K., Sugiyama, H., Nakagawa, Y., Takahashi, H. : Purification of antigenic peptide from murine hepatoma cells recognized by class-I major histocompatibility complex molecule-restricted cytotoxic T-lymphocytes induced with B7-1-gene

transfected hepatoma cells. J. Hepatol. 30: 1119-1129, 1999.