

**Banyu Foundation Research Grant 2014－女性研究者支援－**  
**研究成果報告書（追加助成）〈概要〉**

<b>所 属</b>	国立感染症研究所 エイズ研究センター
<b>氏 名</b>	立川 愛
<b>研究テーマ</b>	HIV 感染症における新規免疫細胞療法の開発

概要の構成は自由ですが、研究助成報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。研究目的、研究手法、研究成果などを 1 ページにまとめてください。（図表、写真などの貼付を含む）

**【研究目的】**

HIV 感染症は、現行の多剤併用療法(HAART)のみでは治癒を達成するのは困難であると考えられており、感染者は生涯 HAART を継続しなければならない。治癒を妨げているのは長期生存可能な HIV 潜伏感染細胞である。本研究では、HIV 感染症の治癒を目指した新たな治療法として、HIV 感染者体内からの HIV 潜伏感染細胞除去を目的とした HIV 特異的細胞傷害性 T 細胞(CTL)による細胞免疫療法の開発に向けた基礎基盤の確立を目的とした。慢性期 HIV 感染者の免疫システムは「免疫老化」と呼ばれる状態に陥っており、T 細胞の増殖能や機能が低下し、HIV 特異的 CTL による抗 HIV 効果も減弱している。本研究では、人工多能性幹(iPS)細胞作製技術を用いて HIV 特異的 CTL を若返らせ、抗 HIV 効果の高い HIV 特異的 T 細胞の作製を行った。昨年までにその作製に成功し、性状解析を行った。本年度はさらに機能的側面について、HIV 感染細胞に対する抗 HIV 活性を検討した。

**【研究手法】**

HIV 感染者の末梢血単核球から HIV 特異的 CTL クローンを樹立し、センダイウイルスベクターを用いて山中因子を導入して初期化を行い、iPS 細胞(T-iPS)を樹立した。さらに試験管内で血液前駆細胞、CD8 陽性 T 細胞へと再分化させ得られた細胞(T-iPS-CTL)について、性状を明らかにするとともに、抗原特異的応答や HIV 感染細胞の傷害活性について解析を行った。

**【研究成果】**

作製した T-iPS-CTL について、元となる HIV 感染者末梢血単核球から樹立した HIV 特異的 CTL クローンと同様の条件で刺激培養を行い、その増殖能と抗原認識能について検討した。T-iPS-CTL は pHLA テトラマー陽性であり、抗原特異的に多種類のサイトカイン産生する能力を保持していた。また、増殖能について比較したところ、元となる CTL クローンに比して高い増殖能を有しており、複数回の刺激培養後も高い増殖能を維持していた。抗原認識能についてより詳細に解析するために、段階希釈した抗原ペプチドを用いて IFN- $\gamma$ 産生を ELISpot assay により検討したところ、元の CTL クローンと同程度の感度を維持していることが明らかとなった。さらに、HIV 感染細胞に対する細胞傷害活性を明らかにするため、フローサイトメトリーを用いた細胞傷害活性試験を構築し、HIV 感染により GFP を発現する CD4 陽性 T 細胞株を用いて、T-iPS-CTL による HIV 感染細胞の傷害活性を確認した。その結果、T-iPS-CTL は、短時間の共培養の間に効率良く HIV 感染細胞を傷害する能力を有していた。また、HIV 非感染細胞、当該 HLA を発現していない HIV 感染細胞には細胞傷害活性を示さず、HIV 感染細胞のみを特異的に認識し、傷害し得ることが明らかとなった。

連携研究者らが開発した抗原特異的 T 細胞からの iPS 細胞作製、T 細胞への再分化技術を用いて作製された T-iPS-CTL が、高増殖能を有し、HIV 感染細胞を効果的に排除可能であることが明らかとなった。本研究成果は HIV 感染症のみならず、T-iPS-CTL の他ウイルス感染症やガン等に対する免疫細胞療法としての T-iPS-CTL の有用性を示唆するものである。

本研究は、連携研究者である京都大学 iPS 細胞研究所 金子新博士との共同研究で行われた。

Banyu Foundation Research Grant 2014－女性研究者支援－

研究成果報告書(追加助成) <詳細>

所 属	国立感染症研究所 エイズ研究センター
氏 名	立川 愛
研究テーマ	HIV 感染症における新規免疫細胞療法の開発

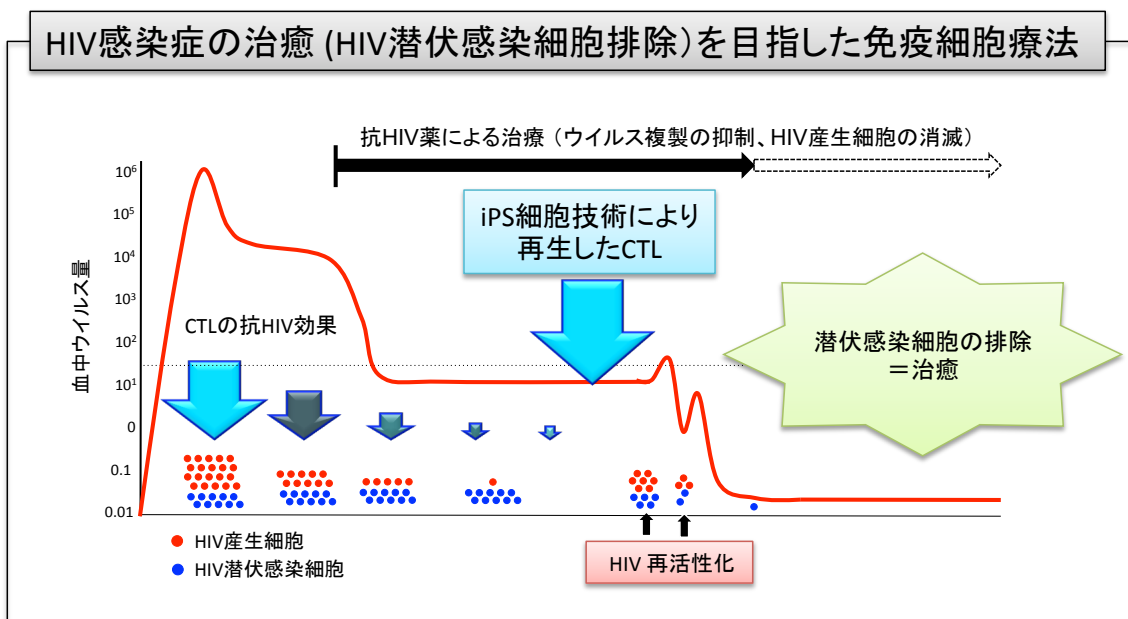
目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

【目的】

HIV 感染症は、抗 HIV 治療薬の進歩により多剤併用療法(HAART)を行うことでその予後は劇的に改善された。しかしながら、長期間 HAART を行っても治癒すること(体内から HIV を完全に排除すること)はなく、感染者は生涯 HAART を続けなければならない。若年層での感染が主である HIV 感染症において、長期 HAART による薬物毒性、副作用、医療経済上の問題は深刻である。このような状況で、治癒を目指す治療法の確立が急務である。

HIV 感染症において治癒を妨げる最大の原因がウイルスリザーバーとなる潜伏感染細胞の存在である。ウイルスタンパク質の発現を伴わない HIV 潜伏感染細胞は宿主の免疫監視機構から完全に逃れることができる上、HIV 感染休止期 CD4+T 細胞の半減期は数年とされており、長期 HAART 後でもウイルスリザーバーとして残存する。「どのように潜伏感染細胞を排除するか」が現在の HIV 研究の最も重要な課題である。

HIV 潜伏感染細胞根絶のための戦略として、潜伏感染細胞を再活性化することでウイルスタンパク質産生を促し、HIV 特異的 CTL に感染細胞を認識・排除させる”Kick & Kill”戦略が考えられている(図)。抗 HIV 治療薬の進歩により HIV 産生細胞をほぼ消滅させることが可能になり、また臨床で使用されているヒストン脱アセチル化酵素阻害剤等により HIV 感染者体内の HIV 潜伏感染細胞再活性化が可能であることが示され、本治療戦略の実現可能性が高まってきた。



## 目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

しかしながら、最も重要な「再活性化された HIV 感染細胞の排除」を担うエフェクターである HIV 特異的 CTL については、HIV 感染症では老化、疲弊により不可逆的な機能低下に陥っていることが知られており、回復させる方法はない。本治療戦略実現化の最大の課題は、再活性化された HIV 感染細胞を効果的に排除可能な、優良な HIV 特異的 CTL を供給することである。

連携研究者である金子新博士(京都大学 iPS 細胞研究所)らは、私が樹立した HIV 特異的 CTL クローンを人口多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell, iPS 細胞)技術を用いて若返らせ(T-iPS 細胞)、さらに抗原特異性を維持した T 細胞(T-iPS-CTL)に再分化させることに成功した(Nishimura N, et al. *Cell Stem Cell*, 2013)。本研究は、本技術をさらに発展させ、老化、疲弊した HIV 感染者の CTL を、抗 HIV 効果の高い、長期生存可能な CTL に再生させ、その性状と機能を解析することを目的とする。昨年度までに、T-iPS-CTL の性状解析と抗原特異性について検討し、また培養条件を改善することで、安定的に T-iPS-CTL を拡大/維持培養することが可能となった。本年度は、増殖能、抗原認識能、細胞傷害活性等機能解析に重点を置き、抗 HIV 効果について検討を行った。

## 【方法】

日本人が高頻度に有する HLA-A\*24:02 拘束性の HIV-1 Nef 由来の CTL エピトープに特異的な CTL クローンから樹立した iPS 細胞(T-iPS)を、CD8 陽性 T 細胞へ再分化させ、T-iPS-CTL を作製した。元の CTL クローンと同条件で刺激、拡大培養を行い、増殖能を比較した。機能解析として、以下の検討を行った。

- 1) IFN- $\gamma$  ELISpot assay: 抗原認識の感度を明らかにするため、段階希釈したペプチドを抗原として用い、stimulator となる HLA-A\*24:02 を発現する CD4T 細胞株とともに 4 時間培養した後、ELISpot assay を行った。
- 2) HIV 感染細胞傷害性試験: HIV-LTR 依存性に GFP を発現する CD4 陽性 T 細胞株, CEM-GXR (Brockman MA, et al. *J Virol Methods* 131:134- (2006))に、HLA-A\*24:02 を遺伝子導入し標的細胞とした(A24-GXR)。HIV NL4-3 株を感染させ 50%以上が GFP 陽性になった時点で、T-iPS-CTL と 4 時間共培養を行い、フローサイトメトリーにて GFP 陽性細胞数を計測した。陰性対照として HLA-A\*24:02 を発現しない CEM-GXR に HIV を感染させ、同時に測定を行った。また、フローサイトメーターでの解析時に T-iPS-CTL と標的細胞を明確に分画できるように、A24-GXR, CEM-GXR は Cell tracker を用いて標識したのちに共培養を行った。フローサイトメーターでの解析では、標的細胞のみを gating し、HIV 感染細胞(GFP<sup>+</sup>HLA-I<sup>low</sup>)の頻度を測定することで、細胞傷害活性を算出した。

## 【結果】

T-iPS-CTL と CTL クローンの増殖能を比較したところ、T-iPS-CTL は 2 週間の刺激培養で安定して 100 倍以上に増殖しており、CTL クローンと比較して倍以上の増殖が見られた。いずれもエピトープペプチドを提示する HLA:A\*24:02 テトラマーの結合能は同程度であったことから、特異性を決定する TCR の発現レベルは同様であることがわかった。段階希釈した抗原を用いて抗原認識の感度を比較したところ、5nM 程度の抗原ペプチドを用いた場合でも IFN- $\gamma$  産生細胞が見られ、元の CTL クローンとほぼ同程度の感度を示した。

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

HIV 感染細胞排除能について明らかにするため、HIV 感染により GFP を発現する CD4 陽性 T 細胞株を用いて、HIV 感染細胞傷害活性試験を行った。その結果、HIV 感染細胞が HLA-A\*24:02 を発現している場合のみ、T-iPS-CTL を共培養したことによる HIV 感染細胞頻度(GFP<sup>+</sup>HLA-I<sup>low</sup>)の低下が見られ、49%の感染細胞が傷害された(E:T=1:1) (下図)。

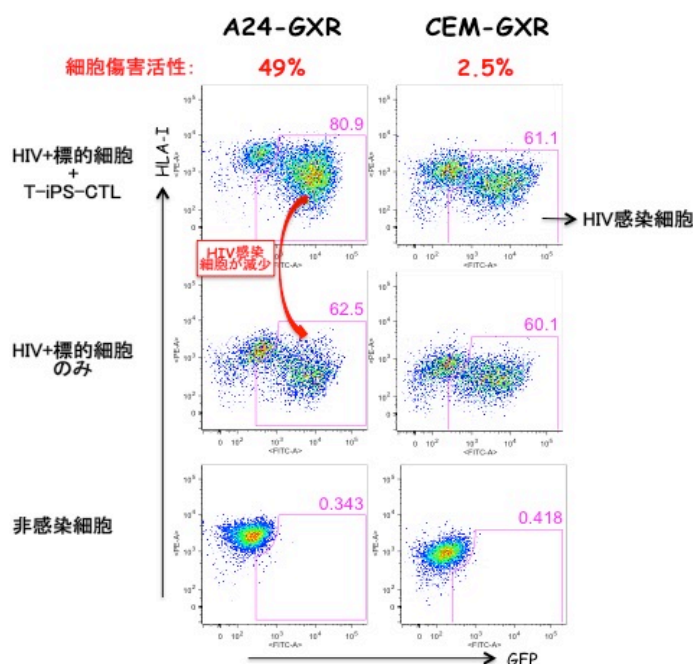
【考察・今後の課題】

iPS 細胞技術を用いて、慢性期 HIV 感染者由来 HIV 特異的 CTL から高増殖能を獲得し、かつ抗原特異的に多様なサイトカイン産生可能な、HIV 感染細胞排除能を有した T 細胞の作製に成功した。上述した”Kick & Kill”戦略では、再活性化した潜伏感染細胞を標的とするため、現在潜伏感染細胞の認識能について検討を進めている。

本研究では、試験管内での検討を行い、有効性を示したが、臨床応用を目指す場合、動物モデルによる in vivo での有効性の検証が必須である。また、iPS 細胞はその安全性について未だ保証されておらず、その検証が慎重になされるべきであるが、大型動物モデルを用いた検証は未だなされていない。現在、私たちはサルエイズモデルを用いて、TiPS-CTL の安全性・有効性の検証を行っている。

近年、癌や免疫不全時のウイルス感染症に対して特異的 T 細胞を用いた免疫細胞療法の開発が進み、一部の疾患についてはその有効性が報告されている。本研究成果は、iPS 細胞技術によって T 細胞の質の改善が可能であることを示したものであり、HIV 感染症と同様、特異的 T 細胞の疲弊が問題となる癌に対する細胞療法への応用も期待される。

末筆になりましたが、計3年間にわたるご支援をいただき、大変ありがとうございました。引き続き真摯に研究を進め、本研究成果が新規治療法として臨床の現場に貢献できるよう、努力して参ります。



**Banyu Foundation Research Grant 2014－女性研究者支援－**  
**研究成果報告書(追加助成) <発表実績/予定一覧>**

所 属	国立感染症研究所エイズ研究センター
氏 名	立川 愛

<b>1. 論文発表実績 (主要 5 報)</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 主要論文5報については PDF を添付。</li> <li>・ 掲載年次順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。</li> <li>・ 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。</li> <li>・ 国内外雑誌を問わない。印刷中は in press と記入。</li> </ul>	
1	Ishizaka A, Sato H, Nakamura H, Koga M, Kikuchi T, Hosoya N, Koibuchi T, Nomoto A, <u>Kawana-Tachikawa A</u> , Mizutani T. Short intracellular HIV-1 transcripts as biomarkers of residual immune activation in patients on antiretroviral therapy. J Virol. 2016 May 27;90(12):5665-76. 査読有り
2	Katoh J, <u>Kawana-Tachikawa A*</u> , Shimizu A, Zhu D, Han C, Nakamura H, Koga M, Kikuchi T, Adachi E, Koibuchi T, Gao GF, Brumme ZL, Iwamoto A. Rapid HIV-1 Disease Progression in Individuals Infected with a Virus Adapted to Its Host Population. PLoS One. 2016 Mar 8;11(3):e0150397.査読有り
3	Ando M, Nishimura T, Yamazaki S, Yamaguchi T, <u>Kawana-Tachikawa A</u> , Hayama T, Nakauchi Y, Ando J, Ota Y, Takahashi S, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Miles JJ, Burrows SR, Brenner MK, Nakauchi H. A Safeguard System for Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Rejuvenated T Cell Therapy. Stem Cell Reports. 2015 Oct 13;5(4):597-608. 査読有り
4	Kikuchi T, Iwabu Y, Tada T, <u>Kawana-Tachikawa A</u> , Koga M, Hosoya N, Nomura S, Brumme ZL, Jessen H, Pereyra F, Trocha A, Walker BD, Iwamoto A, Tokunaga K, Miura T. Anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif protein is attenuated in elite controllers. J Virol. 2015 May;89(9):4992-5001. 査読有り
5	Nakayama-Hosoya K, Ishida T, Youngblood B, Nakamura H, Hosoya N, Koga M, Koibuchi T, Iwamoto A, <u>Kawana-Tachikawa A</u> . Epigenetic repression of interleukin-2 expression in senescent CD4 <sup>+</sup> T cells during chronic human immunodeficiency virus type-1 infection. Journal Infectious Diseases. 211:28-39, 2015. 査読有り
<b>2. 学会発表実績 (主要 5 報)</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 主要5件の学会アブストラクト、プログラム等の PDF を添付</li> <li>・ 発表年順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。</li> <li>・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。</li> </ul>	
1	立川 愛. Disruption of T cell immunity during chronic HIV-1 infection. 東京大学医科学研究所 第 90 回幹細胞治療研究フォーラム
2	立川(川名)愛、小野敏明、藤田由利子、田中ゆきえ、高橋聡、森尾友宏. 多ウイルス特異的 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)法の確立. 第7回血液疾患免疫療法研究会.
3	立川(川名)愛, 細谷(中山)香, 吉村和久, 俣野哲朗. 慢性 HIV-1 感染者の CD4 陽性 T 細胞における IL2 遺伝子発現抑制機序の解析. 第 17 回白馬シンポジウム.

4	
5	

