

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790441

研究課題名（和文） レトロウイルス誘発抗原特異的 CD8T 細胞機能不全機構の解明

研究課題名（英文） Retrovirus evasion of CD8⁺ T cell immunity

研究代表者

高村 史記（TAKAMURA SHIKI）

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：90528564

研究成果の概要（和文）：

ウイルス等の持続感染個体では、ウイルス特異的メモリーCD8T 細胞に対して特異抗原による継続的な刺激が繰り返されることにより種々の抑制性受容体の発現が持続し、結果 T 細胞機能が低下するいわゆる疲弊（exhaustion）が起こる。マウスに持続的なウイルス血症とそれに引き続く致死性の赤白血病を誘発するレトロウイルスであるフレンドウイルス（FV）感染個体ではウイルス特異的 CD8T 細胞の著しい機能低下が認められるが、その機構は不明であった。研究代表者、はこの機能不全の原因が他の持続感染ウイルス同様の疲弊に起因すること、しかも通常持続感染期にみられるウイルス特異的 CD8T 細胞疲弊の誘発が、FV 感染個体の場合では感染初期より観察されることを見出した。この成果により、FV 感染により増加した制御性 T 細胞（Treg）によりウイルス特異的 CD8T 細胞が機能不全に陥るといふこれまでの説が根底から覆された。

研究成果の概要（英文）：

During chronic viral infection, persistent exposure to viral antigens leads to the overexpression of multiple inhibitory cell-surface receptors that cause CD8⁺ T cell exhaustion. Friend virus (FV) is a murine retrovirus complex that induces acute high-level viremia followed by persistent infection and leukemia development. Here we provide conclusive evidence that FV infection results in the generation of virus-specific effector CD8⁺ T cells that are terminally exhausted. Acute FV-induced disease is characterized by a rapid increase in the number of virus-infected erythroblasts, leading to massive splenomegaly. Most of the expanded erythroblasts strongly express PD-L1 and MHC class I, thereby creating a highly tolerogenic environment. Consequently, FV-specific effector CD8⁺ T cells uniformly express multiple inhibitory receptors, such as PD-1, Tim-3, LAG-3, and CTLA-4, rapidly become non-responsive to restimulation, and are no longer reinvigorated by combined *in vivo* blockade of PD-1 and Tim-3 during the memory phase. Combined blockade of PD-1 and Tim-3 during the priming/differentiation phase, however, rescued FV-specific CD8⁺ T cells from becoming terminally exhausted, resulting in improved CD8⁺ T cell functionality and virus control. These results highlight FV's unique ability to evade virus-specific CD8⁺ T cell responses and the importance of an early prophylactic approach for preventing terminal exhaustion of CD8⁺ T cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：感染防御・ワクチン

1. 研究開始当初の背景

フレンド白血病ウイルス(FV)は成体マウスに免疫抑制に伴う持続的なウイルス血症とそれに引き続く致死性の赤白血病を誘発するレトロウイルスで、マウス系統間で異なる病原性を示すことから、レトロウイルス感染における宿主免疫応答及びこれを調節している宿主因子(遺伝子)解析ツールとして使用されている。

これまで、FVによる免疫抑制の実態はFV感染の結果誘導される制御性T細胞(Treg)による抑制効果と考えられてきた。しかしながら、FV持続感染マウスにおけるメモリーCD8T細胞機能不全はFV特異的CD8T細胞のみで観察され、他の抗原特異的メモリーCD8T細胞の機能は正常であること、FV感染マウスにおけるFV特異的CD8T細胞の機能不全は、ウイルス抗原提示標的細胞を殆ど排除することができないほど極端な物であり、このような極端な細胞傷害性の低下はTregのみによる抑制では説明し難く、サイトカイン産生能低下の程度とも一致しない。従って、FVにおける免疫抑制メカニズムは再度検討する必要がある。

2. 研究の目的

FV感染はTregの誘導に伴う強力な免疫抑制を誘発し、その結果ウイルス特異的メモリーCD8T細胞の機能不全を引き起こすと報告されてきた。しかしながら、ウイルスの持続感染性及びウイルス特異的T細胞に限定した極端な機能低下という事実から、メモリーCD8T細胞機能不全の全要因がTregに起因するとは考え難く、持続的特異抗原刺激によるメモリーCD8T細胞のexhaustion及び胸腺におけるFV抗原発現に伴うウイルス特異的ナイーブCD8T細胞の新規供給抑制の複合的な要因により免疫抑制が生じるのが真の実態である可能性がある。これら二つの機構によるメモリーT細胞機能不全は、ヒト免疫不全症ウイルス(HIV)感染で観察されているものに近い。よって本研究は、FV感染におけるウイルス特異的CD8T細胞機能不全の機構を再検討し、これを通じてFVによる免疫抑制機構の本質に迫ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)ウイルスの病原性の発揮とウイルス特異的CD8T細胞機能の関係を解明するために、抵抗性のC57BL6と感受性のA/WySnJのF1

マウス(発症はするが大半は快復する)を用いた。FV感染により誘導されるウイルス特異的CD8T細胞数の経時的変化を検討するために、FVを静脈内接種したマウス脾臓におけるウイルス特異的CD8T細胞数をテトラマーにて検出・定量した。また、その活性化状態を評価するために再刺激非存在下でのグランザイムB発現を検討した。同時に感染状態評価の目的で、脾臓における感染性ウイルス産生細胞数を検討した。比較対照として、強力かつ機能的CD8T細胞誘導実績のあるFBL3(FV抗原を発現する腫瘍細胞)の皮下接種群を用いた。

(2)FV感染もしくはFBL3接種により誘導されたウイルス特異的CD8T細胞の機能を比較するため、感染(接種)2週後(CD8T細胞免疫応答のピーク)にそれぞれの個体より採取した脾細胞をFV抗原にて再刺激し、CD8T細胞におけるサイトカイン産生を検討した。また、CD8T細胞の抗原特異的細胞傷害活性も検討した。

(3)FV感染もしくはFBL3接種により誘導されたウイルス特異的CD8T細胞における抑制性受容体の発現及び他のメモリーCD8T細胞分化の指標となる細胞表面抗原を比較するため、感染(接種)2週から10週後にかけて、それぞれの個体より採取した脾臓に存在する抗原特異的CD8T細胞のフェノタイプを検討した。

(4)CD8T細胞疲弊が極度に進行すると、抑制性受容体からのシグナルを遮断しても機能回復がみられない終末疲弊(terminal exhaustion)の状態に陥る。FV感染個体にて観察された疲弊型ウイルス特異的CD8T細胞が終末疲弊状態か否かを確認するために、既に極度の疲弊状態が確認されているウイルス感染2週後から、抑制性受容体シグナルの遮断効果を検討した。遮断にはPD-1もしくはTim-3からの抑制性シグナルを特異的に遮断する抗PD-1抗体もしくは抗Tim-3抗体の投与を用いた。

(5)(4)にて効果の見られなかった抗PD-1抗体もしくは抗Tim-3抗体による治療を早期に(終末疲弊に陥る前の段階で)開始することで、その効果が現れるかを検討するために、感染2日目から14日目まで抗体の投与を行

い、ウイルス特異的 CD8T 細胞機能の評価を行った。

4. 研究成果

(1) FV 感染個体では FBL 接種個体とほぼ同様の数の FV 特異的 CD8T 細胞が誘導され、メモリー CD8T 細胞として維持されていることが解った (図 1A)。しかしながら、FV 感染個体の FV 特異的 CD8T 細胞は FBL 接種個体のもものと比較し極度の活性化状態 (グランザイム B 陽性、CD43 陽性) であることが確認された (図 1B、C)。このようなウイルス特異的 CD8T 細胞の極度な活性化が観察される個体において、非常に多数のウイルスが常に産生され続けていること、また、CD8T 細胞の活性化がウイルスの直接感染に起因しない事が確認された (図 1D、E)

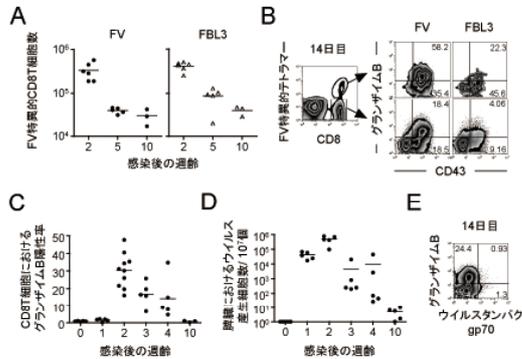


図1 FV感染個体におけるウイルス特異的CD8T細胞免疫応答

(2) FV 感染個体の CD8T 細胞は刺激前より多量のグランザイム B を含んでいたが、その量は再刺激を行っても増加しなかった (図 2A)。また、CD8T 細胞疲弊に最も耐性とされるインターフェロンガンマ産生に関しても全く検出されない、つまりウイルス特異的 CD8T 細胞が、その免疫応答のピークの時点 (感染 2 週後) で既に極度の機能不全に陥っていることが確認された (図 2A、B)。一方、正常な CD8T 細胞誘導可能な FBL3 接種においては、CD8T 細胞による強力なウイルス抗原特異的インターフェロンガンマ産生が確認された (図 2A、B)。更に、FV 感染個体もしくは FBL3 接種個体におけるウイルス特異的 CD8T 細胞の細胞傷害活性を比較すると、FV 感染個体のものは FBL3 接種個体のもものと比較し極端に低い傷害活性しか持たないことが明らかとなった。したがって、FV 感染個体ではウイルス特異的 CD8T 細胞は、インターフェロン産生能のみならず、細胞傷害活性までも早期に失ってしまうことが明らかとなった。

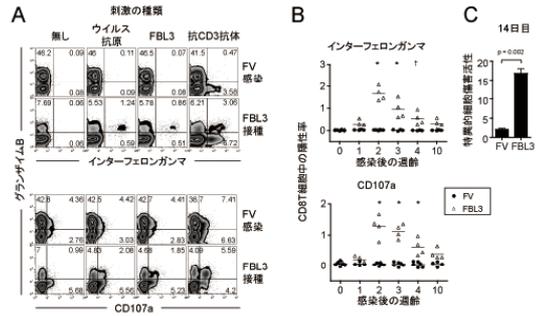


図2 FV感染個体におけるウイルス特異的CD8T細胞機能

(3) 極度のウイルス特異的 CD8T 細胞機能不全が観察された FV 感染初期にて、ウイルス特異的 CD8T 細胞表面には、主要な抑制性受容体である PD-1 が、例外なく高頻度に発現していることが解った (図 3A)。また、その発現は感染 10 週目においても全く変化がみられなかった (図 3B)。一方、FBL3 接種群にみられる機能的 CD8T 細胞は PD-1 の発現が低く抑えられていることが解った。(図 3A、B)。それ以外にも、FV 感染個体のウイルス特異的 CD8T 細胞は、FBL3 接種個体のそれと比較し、疲弊状態にあるメモリー CD8T 細胞特有のフェノタイプを (CD69 高、CD62L 低、CD122 低、CD127 低) 呈していることが解った (図 3C)。更に、FV 感染個体のウイルス特異的 CD8T 細胞は、PD-1 のみならず他の抑制性受容体 Tim-3、LAG-3、CTLA-4 など高発現していることが確認された (図 3D)。

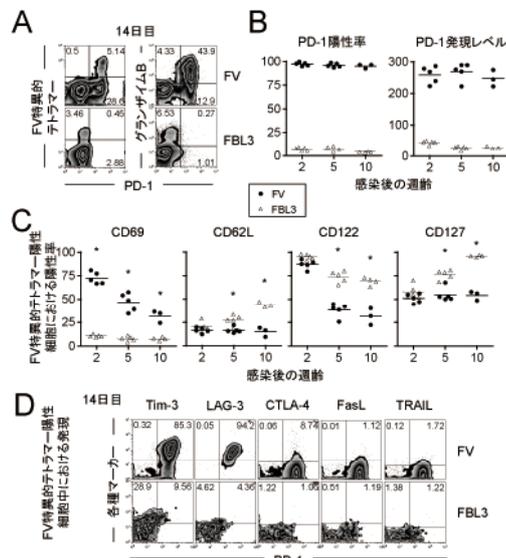


図3 FV感染個体におけるウイルス特異的CD8T細胞フェノタイプ

(4) FV 感染後 2 週目から 4 週目にかけて抗 PD-1 抗体、抗 Tim-3 抗体もしくはこの両者の投与を行った (図 4A)。これらの抗体はリガンドのレセプター (PD-1 もしくは Tim-3) に対する反応を抑制することが示された (図 4B)。ウイルス特異的 CD8T 細胞に対するこ

れら抑制性受容体シグナル遮断効果を検討したところ、PD-1 もしくは Tim-3 単独、更には PD-1 と Tim-3 の両者を遮断したときでさえ、機能不全に陥った CD8T 細胞の機能回復（インターフェロンガンマの産生を指標）は確認されなかった（図 4C、D）。このことより、FV 感染個体のウイルス特異的 CD8T 細胞は、感染 2 週目の段階で終末疲弊の状態に陥っていることが明らかとなった。

(5) FV 感染 2 日目から 14 日目まで抗体の投与を行い（図 5A）、14 日目におけるウイル

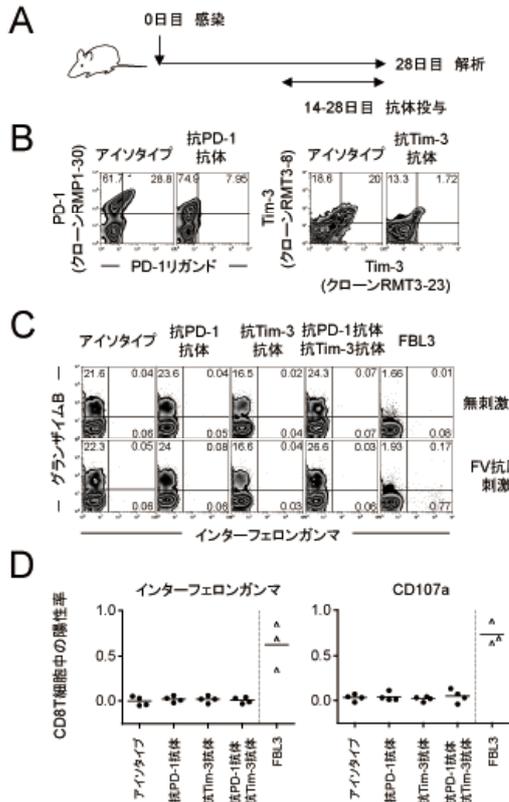


図4 FV感染後期における抑制性受容体遮断効果

ス特異的 CD8T 細胞機能の評価を行ったところ、抗 PD-1 抗体、抗 Tim-3 抗体単独投与を行った群にて軽度のウイルス特異的 CD8T 細胞機能回復を確認した。更に、抗 PD-1 抗体および抗 Tim-3 抗体共投与群においては、FBL3 接種個体で見られる機能的ウイルス特異的 CD8T 細胞と匹敵するほどの機能回復がみられた（図 5B、C）。これらの治療群では、治療中断 2 週間後においても機能的なメモリー CD8T 細胞が確認された（図 5D）。機能回復が見られたウイルス特異的 CD8T 細胞では、PD-1 発現レベルが著しく低下しており（図 5E）、機能的ウイルス特異的 CD8T 細胞出現に伴い脾臓に存在するウイルス産生細胞数、FV の病態の指標となる脾臓重量の低下が確認された（図 5F）。またウイルス特異的 CD8T 細胞機能が快復することにより、成熟するメ

モリー CD8T 細胞数も増加すること（図 5G）、そしてそれは、ウイルス特異的 CD8T 細胞のアポトーシス率の低下に起因することが示された（図 5H）。これらの結果より、FV は感染初期にウイルス特異的 CD8T 細胞表面における種々の抑制性受容体発現を強力に誘導することにより、CD8T 細胞の早期機能不全を誘発することで、宿主免疫応答を回避していることが示された。

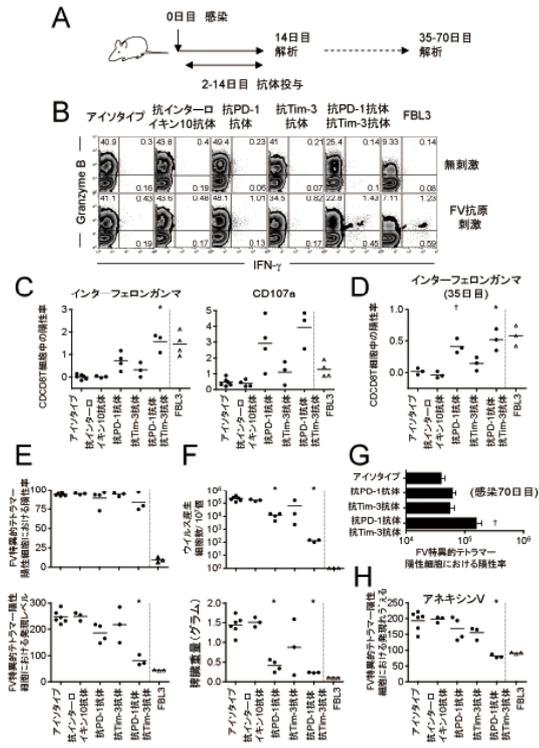


図5 FV感染初期における抑制性受容体遮断効果

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Miyazawa M, Takamura S, Tsuji-Kawahara S, Kajiwara E, Chikaishi T, and Kato M. A hole in the T-cell repertoire induced after retroviral infection of immunocompetent adult mice. *Retrovirology*. 2011, 8 (Suppl. 2):O30. 査読有り <http://www.retrovirology.com/content/8/S2/O30>
- ② Kurachi M, Kurachi J, Suenaga F, Tsukui T, Abe J, Ueha S, Tomura M, Sugihara K, Takamura S, Kakimi K, Matsushima K. Chemokine receptor CXCR3 facilitates CD8⁺ T cell differentiation into short-lived effector cells leading to memory degeneration.

J Exp Med. 2011, Aug 1;208(8):1605-20.

査読有り

<http://jem.rupress.org/content/208/8/1605.long>

- ③ Ogawa T, Tsuji-Kawahara S, Yuasa T, Kinoshita S, Chikaishi T, **Takamura S**, Matsumura H, Seya T, Saga T, Miyazawa M
Natural Killer cells recognize Friend retrovirus-induced erythroid progenitor cells through NKG2D-RAE-1 interactions in vivo.

J Virol. 2011, June;85(11):5423-35.

査読有り

<http://jvi.asm.org/content/85/11/5423.long>

- ④ **Takamura S***, Miyazawa M*.
(*Corresponding authors)
Response to comment on “Premature terminal exhaustion of Friend virus-specific effector CD8⁺ T cells by rapid induction of multiple inhibitory receptors”.

J Immunol. 2010, Aug 1;185(3):1349-50.

査読無し

<http://www.jimmunol.org/content/185/3/1349.2.full>

- ⑤ **Takamura S***, Roberts AD, Jelley-Gibbs DM, Wittmer S, Kohlmeier JE, Woodland DL*.
(*Corresponding authors)
Route of priming influences the ability of respiratory virus-specific memory CD8⁺ T cells to be activated by residual antigen.

J Exp Med. 2010, June 7;207(6):1153-60.

査読有り

<http://jem.rupress.org/content/207/6/1153.long>

- ⑥ Tsuji-Kawahara S, Chikaishi T, Takeda E, Kato M, Kinoshita S, Kajiwara E, **Takamura S**, Miyazawa M.

Persistence of viremia and production of neutralizing antibodies differentially regulated by polymorphic APOBEC3 and BAFF-R loci in Friend virus-infected mice.

J. Virol. 2010, June;84(12):6082-95.

査読有り

<http://jvi.asm.org/content/84/12/6082.long>

- ⑦ **Takamura S***, Tsuji-Kawahara S, Yagita H, Akiba H, Sakamoto M, Chikaishi T, Kato M, Miyazawa M*.
(*Corresponding authors)
Premature terminal exhaustion of Friend virus-specific effector CD8⁺ T cells by rapid induction of multiple inhibitory receptors.

J Immunol. 2010, May 1;184(9):4696-707.

査読有り

<http://www.jimmunol.org/content/184/9/4696.1ong>

[学会発表] (計 6 件)

- ① **高村史記** 他

CD69 controls a balance between S1P- and CXCL16-induced chemotaxis during the process of memory CD8⁺ T cell recruitment to

the lung airways.

Keystone Symposia (Viral Immunity)

2012年3月21-26日 Keystone, CO

- ② **高村史記**

Mechanisms regulating the continual recruitment of memory CD8⁺ T cells to the lung airways.

第40回日本免疫学会・国際シンポジウム

2011年11月27-29日 千葉

- ③ **高村史記** 他

Infection of thymus with murine retrovirus induces virus-specific central tolerance that prevents dynamic differentiation of functional memory CD8⁺ T cells.

第40回日本免疫学会

2011年11月27-29日 千葉

- ④ **高村史記** 他

Programmed migration of antigen-specific CD8 T cells to the lung airways following respiratory virus infection.

XV International Congress of Virology

2011年9月11-16日 札幌

- ⑤ **高村史記**

Friend virus evasion of CD8⁺ T cell immunity. The 5th Chiba University Global COE Symposium

2010年12月4日 東京

- ⑥ **高村史記** 他

Premature terminal exhaustion of Friend virus-specific effector CD8⁺ T cells by rapid induction of multiple inhibitory receptors.

14th International Congress of Immunology

2010年8月23-27日 神戸

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kindai.ac.jp/immuno/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高村 史記 (TAKAMURA SHIKI)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：90528564