

主論文の要旨

**Identification of a novel HLA-A*24:02-restricted
adenovirus serotype 11-specific CD8⁺ T-cell epitope for
adoptive immunotherapy**

〔 HLA-A*24:02 拘束性アデノウイルス血清型 11 特異的
細胞傷害性 T 細胞の新規エピトープの同定 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 血液・腫瘍内科学分野

(指導：室原 豊明 教授)

今橋 伸彦

【背景】

アデノウイルス (Adenovirus:AdV) は 51 の血清型に分類される DNA ウイルスであり、臓器移植後や造血幹細胞移植後などの高度な免疫不全状態では、致死的な感染症をおこすことがある。抗ウイルス剤として Cidofovir が使用されることが多いが、その有効性は十分とは言えないだけでなく、腎毒性などの副作用が問題である。一方で、AdV の排除には AdV 抗原特異的 T 細胞が重要であるため、欧米では、移植後の AdV 感染症にたいして、AdV 抗原特異的 T 細胞を用いた細胞療法が行われ、その有効性が報告されている。これらの報告では AdV 血清型 5 に対して特異的な T 細胞を誘導し輸注しているが、我が国では造血幹細胞移植後の AdV 感染症としては、AdV 血清型 11 による出血性膀胱炎が多く報告されている。従って、我が国では、AdV 血清型 11 抗原特異的 T 細胞の誘導を試みるべきである。

日本人に最も多い HLA-A*24:02 (日本人の約 60%が保有) 拘束性の AdV 血清型 11 抗原特異的細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte:CTL) のエピトープを同定することにより日本人の多くの患者に AdV 血清型 11 感染症に対する細胞療法を行うことが可能となることが期待できる。そこで本研究では、HLA-A*24:02 拘束性の AdV 血清型 11 抗原特異的 CTL のエピトープを同定することを目的とした。

【方法】

AdV 血清型 11 の hexon のアミノ酸配列を、BIMAS 解析ソフトウェア (http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/) を用いて解析し、HLA-A24(A*24:02) に結合する構造モチーフを有する nonamer peptide を選択した。これらのペプチドの HLA-A24 への結合性を MHC stabilization assay により評価した。

HLA-A*24:02 を有する健常人より分離した末梢血単核球をエピトープ候補のペプチドで刺激し、ペプチド特異的 CD8⁺T 細胞の誘導を試みた。誘導されたペプチド特異的 CD8⁺T 細胞を、フローサイトメトリーを用いてソーティングし、抗 CD3 抗体 (OKT3) および IL-2 存在下で feeder cell とともに培養し、選択的に増殖させた。

ペプチド特異的 T 細胞の、各種標的細胞に対する反応性を、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法、Cr 放出試験、細胞内サイトカイン測定法により評価した。標的細胞としては、ペプチドを添加もしくは添加していない K562、K562 に HLA-A*24:02 を遺伝子導入した細胞 (K562/A*24:02)、Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cell line (LCL)、および AdV 血清型 11 を感染させた K562/A*24:02 を用いた。

AdV 血清型 11 による出血性膀胱炎を罹患した HLA-A*24:02 を有する患者において、末梢血中の AdV 血清型 11 抗原特異的 T 細胞の頻度を MHC テトラマー法により測定するとともに、末梢血及び尿中の AdV のウイルス量を real-time PCR 法により測定した。

【結果】

AdV 血清型 11 の hexon のアミノ酸配列を、BIMAS 解析ソフトウェアを用いて解析し、HLA-A24(A*24:02)に結合する構造モチーフを有する 10 種類の nonamer peptide を選択し合成した。これらのペプチドはいずれも、HLA-A24 に結合することを MHC stabilization assay により確認した (Table 1)。次に HLA-A*24:02 を有する健康人 5 人より分離した末梢血単核球をこれらの 10 種類のペプチドで刺激したところ、AdV 血清型 11 の抗体保有者 3 人中 3 人で TYFNLG $\underline{\text{N}}$ KF (TYF) に特異的な、抗体陰性者 2 人中 1 人で VYSGSIPYL (VYS) と LYANSAHAL (LYA) に特異的な CD8⁺T 細胞が誘導された (Figure 1)。誘導されたペプチド特異的 CD8⁺T 細胞を選択的に増殖させ、さらに解析をすすめた。

3 種類のペプチド特異的 CD8⁺T 細胞のうち、TYF 特異的 CD8⁺T 細胞のみが、AdV 血清型 11 を感染させた K562/A*24:02 に反応し IFN- γ を産生した (Figure 2)。TYF 特異的 CD8⁺T 細胞は、TYF ペプチドを添加した K562/A*24:02 に対して細胞傷害活性を示したが、同ペプチドを添加した K562 に対しては細胞傷害活性を示さなかった。これらのことから、3 種類のペプチドのうち、TYF ペプチドのみが、AdV 血清型 11 感染細胞内で処理され、HLA-A*24:02 上に提示され、CTL に認識されるエピトープペプチドであることが明らかになった。TYFN $\underline{\text{L}}$ G $\underline{\text{N}}$ KF 特異的 CD8⁺T 細胞は、HLA-A*24:02 拘束性 AdV 血清型 5 抗原特異的 CTL のエピトープ (TYFSL $\underline{\text{N}}$ NKF) を認識しなかった。

HLA-A*24:02 分子/TYF ペプチドを 4 量体化した MHC tetramer (A*24:02/TYF tetramer) を作製した。AdV 血清型 11 による出血性膀胱炎に罹患した HLA-A*24:02 を有する患者において、末梢血中に TYF 特異的 CD8⁺T 細胞 (A*24:02/TYF tetramer 陽性 CD8⁺細胞) が出現するとともに、末梢血及び尿中から AdV が検出されなくなった (Figure 3)。

【考察】

本研究では、HLA-A*24:02 拘束性の AdV 血清型 11 抗原特異的 CTL が認識するエピトープが TYFN $\underline{\text{L}}$ G $\underline{\text{N}}$ KF であることを明らかにした。さらに、AdV 血清型 11 感染症が軽快するとともに TYF 特異的 CD8⁺T 細胞が末梢血中に出現したことから、TYF 特異的 CD8⁺T 細胞は *in vivo* において AdV 血清型 11 を排除でき、AdV 血清型 11 感染症に対して TYF 特異的 CD8⁺T 細胞を用いた細胞療法が有用である可能性が示唆された。

AdV 抗原特異的 T 細胞は複数の subgroup の AdV に対して交叉反応性を示すことが報告されているが、TYF 特異的 CD8⁺T 細胞は、AdV 血清型 5 のエピトープペプチドを認識しなかった。AdV 抗原特異的 T 細胞を用いた細胞療法を行う際には、患者が感染している AdV の subgroup を明らかにする必要があることが示唆された。

A*24:02/TYF tetramer は、造血幹細胞移植後などに AdV 血清型 11 に対する免疫能をモニターすることや、輸注した AdV 血清型 11 抗原特異的 T 細胞の体内動態をモニターすることに、有用であると考えられる。

【結語】

HLA-A*24:02 拘束性の AdV 血清型 11 抗原特異的 CTL が認識するエピトープを同定した。同定したエピトープペプチドを AdV 血清型 11 感染症に対する細胞療法に応用できる可能性が示唆された。A*24:02/TYF tetramer は、造血幹細胞移植後や AdV 血清型 11 抗原特異的 T 細胞輸注後の AdV 血清型 11 抗原特異的 T 細胞のモニターに有用であると考えられる。

Table 1 Ad11 hexon protein derived peptides predicted to bind to HLA-A24, and the results of the MHC stabilization assays.

Amino acid sequence	Start position	Score ^a	% MFI increase ^b
KYTPSNVTL	482	480	141
DYLSAANML	641	360	77
SYQLLLDSL	366	360	57
LYSNVALYL	469	280	186
VYSGSIPYL	696	200	583
LYANSAHAL	889	200	37
NYNIGYQGF	769	180	142
TYFNLGNKF	37	158	82
NYIGFRDNF	322	150	89
GYKDRMYSF	782	120	27

Ad11, adenovirus serotype 11; MFI, mean fluorescence intensity.

^a Estimated half-time of dissociation from HLA-A24 (minutes).

^b Percent MFI increase of HLA-A*24:02 molecules on T2-A24 cells.

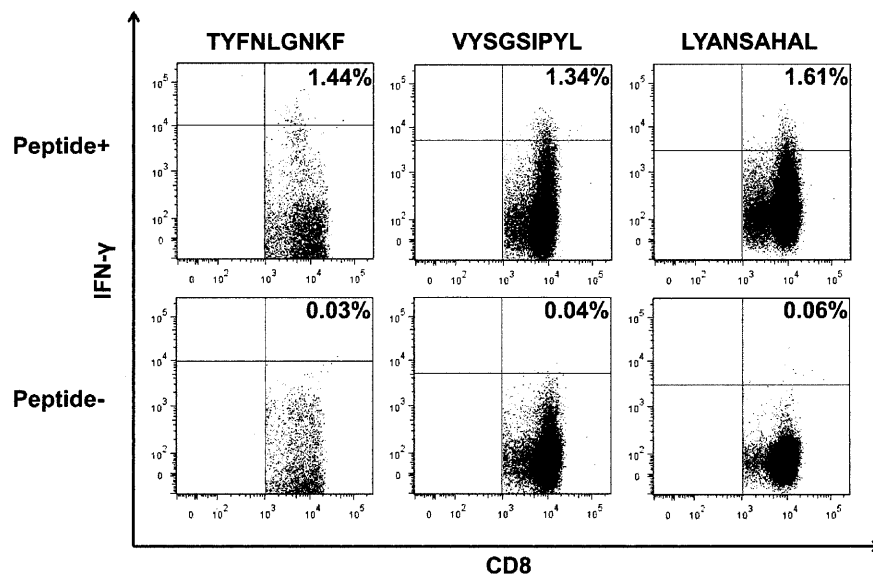


Figure 1 Induction of peptide-specific CD8⁺ T-cells from peripheral blood mononuclear cells of HLA-A*24:02+ healthy donors. Peripheral blood mononuclear cells from five HLA-A*24:02+ healthy donors were stimulated with each of the 10 epitope candidate peptides, and frequencies of IFN- γ -producing CD8⁺ cells were determined by IFN- γ secretion assays. The numbers in the upper right quadrants are the percentage of IFN- γ -producing cells among CD8⁺ cells in the presence (upper row) or absence (lower row) of the peptide. Among the 10 peptides tested, 3 induced IFN- γ -producing CD8⁺ cells.

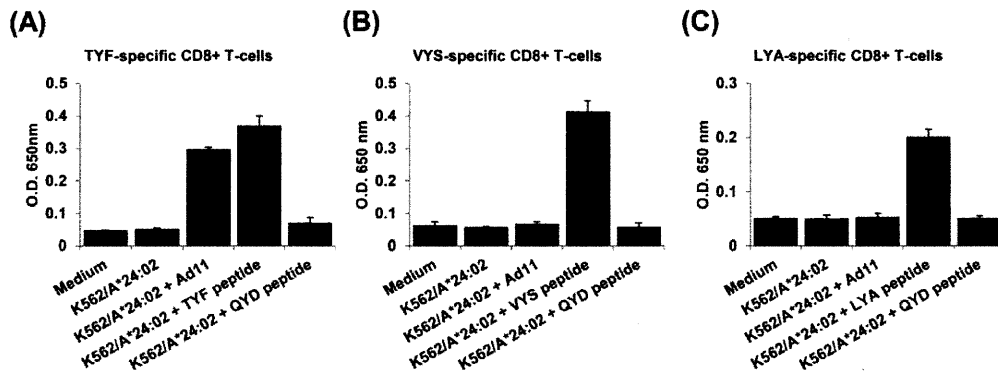


Figure 2 TYF-specific, but not VYS- and LYA-specific, CD8⁺ T-cells produce IFN- γ against K562/A*24:02 infected with adenovirus serotype 11. Expanded TYF-specific CD8⁺ T-cells (A), VYS-specific CD8⁺ T-cells (B), and LYA-specific CD8⁺ T-cells (C) were incubated with K562/A*24:02, those loaded with the respective peptides, those infected with adenovirus serotype 11, or those loaded with an irrelevant peptide for 24 hours. IFN- γ production in the supernatant was measured by an ELISA. Data are representative of two independent experiments and are the mean \pm s.d. of triplicate experiments.

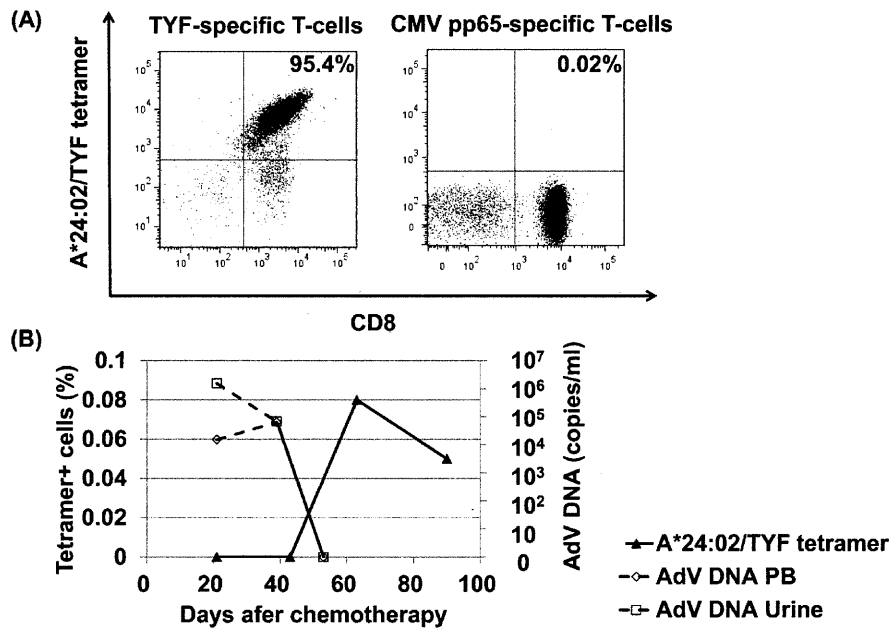


Figure 3 Frequencies of TYF-specific CD8⁺ T-cells in a patient with Ad11 disease as determined by staining with HLA-A*24:02/TYF tetramer. (A) TYF-specific CD8⁺ T-cells and HLA-A*24:02 restricted CD8⁺ T-cells specific for CMV pp65 peptide QYDPVAALF were stained with PE-labeled HLA-A*24:02/TYF tetramer. Data are representative of two independent experiments. (B) Increase in the percentage of A*24:02/ TYF tetramer-positive cells among CD8⁺ cells coincided with the decrease in adenoviral load in urine and peripheral blood in a patient with Ad11 disease.