

- リプトコッカス症. 日本臨床増刊号. 61:829-834, 2003.
16. 掛屋 弘, 宮崎義継, 河野 茂. 新世紀の感染症学 (上) —ゲノム・グローバル時代の感染症アップデート—: I. 感染症概論 真菌感染症の変遷. 日本臨床増刊号. 61:53-59, 2003.
  17. 掛屋 弘, 宮崎泰可, 宮崎義継, 河野 茂. カンジダ属の抗真菌薬耐性について—アゾール耐性を中心に—. 日本医真菌学会雑誌. 44:87-92, 2003.
  18. 宮崎義継, 河野 茂. 新しい抗真菌薬. Jpn J Antibiot. 55:911-912, 2002.
  19. 内田勝久, 澤江義郎, 竹迫一任, 堀 康宏, 大屋 哲, 吉田 稔, 宮崎義継, 松森浩士, 水兼隆介, 河野 茂, 山口英世. 深在性真菌症治療薬開発の問題点. 日本医真菌学会雑誌. 43:239-247, 2002.

## 和文書籍

1. 宮崎義継. 第 II 章 中級編 20. 腎炎治療中に肺異常陰影を呈した症例. 社団法人日本化学療法学会編. 感染症専門医テキスト 第 II 部 ケーススタディ編. p239-244, 2011 年, 南江堂, 東京.
2. 宮崎義継. 各論 II. 各病原体別にみた病態, 診断, 治療 H. 真菌感染症 2. クリプトコッカス症. 社団法人日本化学療法学会編. 感染症専門医テキスト 第 I 部 解説編. p1077-1079, 2011 年, 南江堂, 東京.
3. 宮崎義継. 各論 II. 各病原体別にみた病態, 診断, 治療 H. 真菌感染症 1. カンジダ症. 社団法人日本化学療法学会編. 感染症専門医テキスト 第 I 部 解説編. p1073-1076, 2011 年, 南江堂, 東京.
4. 樽本憲人, 前崎繁文, 宮崎義継. III 誤嚥性肺炎以外の高齢者肺炎 6. 肺真菌症・サイトメガロウイルス感染症. 松本慶蔵総監修・佐々木英忠・福地義之助監修, 山谷睦雄編. 高齢者の肺炎 治療・リハビリテーション・予防. p211-217, 2011 年, 医薬ジャーナル社, 大阪.
5. 掛屋 弘, 金子幸弘, 亀井克彦, 渋谷和俊, 宮崎義継, 若山 恵, 渡辺 哲. 輸入真菌症の診断・治療指針. 亀井克彦・渋谷和俊・宮崎義継編. 輸入真菌症の診断・治療指針. , 2011 年, 協和企画, 東京.
6. 樽本憲人, 宮崎義継, 賀来満夫. V. 感染症検査. 真菌. 真菌薬剤感受性試験 (酵母様真菌薬剤感受性試験). 中原一彦監修. パーフェクトガイド検査値事典. p491, 2011 年, 総合医学社, 東京.
7. 宮崎義継, 賀来満夫. V. 感染症検査. 真菌. アスペルギルス (アスペルギルス抗原、アスペルギルス抗体). パーフェクトガイド検査値事典. p488, 2011 年, 総合医学社, 東京.
8. 金子幸弘, 宮崎義継, 賀来満夫. V. 感染症検査. 真菌. 真菌関連遺伝子検査. 中原一彦監修. パーフェクトガイド検査値事典. p492, 2011 年, 総合医学社, 東京.
9. 金子幸弘, 宮崎義継, 賀来満夫. V. 感染症検査. 真菌. クリプトコックス グルクロノキシロマンタン抗原. 中原一彦監修. パーフェクトガイド検査値事典. p490, 2011 年, 総合医学社, 東京.
10. 金子幸弘, 宮崎義継, 賀来満夫. V. 感染症検査. 真菌. カンジダ抗原. 中原一彦監修. パーフェクトガイド検査値事典. p489, 2011 年, 総合医学社, 東京.

11. 金子幸弘, 宮崎義継. 慢性播種性カンジダ症の治療. 河野 茂編. 米国感染症学会 IDSA ガイドライン 真菌症治療の UP-TO-DATE~2008-2010 年のアスペルギルス, カンジダ, クリプトコックス IDSA GL 改訂版を踏まえて. p145-150, 2010 年, 医薬ジャーナル社, 大阪.
12. 金子幸弘, 宮崎義継. 5 カンジダによる各臓器感染症の推奨治療と予防 3) 慢性播種性カンジダ症の治療. 河野 茂編. 米国感染症学会 IDSA ガイドライン 真菌症治療の UP-TO-DATE~2008-2010 年のアスペルギルス, カンジダ, クリプトコックス IDSA GL 改訂版を踏まえて. p145-150, 2010 年, 医薬ジャーナル社, 大阪.
13. 宮崎義継. 深在性真菌症の診断と治療の進歩—現在の標準とは. 平潟洋一編. 別冊・医学のあゆみ 感染症と感染制御 Update—診断・治療から地域ネットワークまで. p59-62, 2010 年, 医歯薬出版株式会社, 東京.
14. 金子幸弘, 宮崎義継. 基礎編 II 各論 11 耐性真菌: Candida, Aspergillus, Cryptococcus. 一山 智・山口恵三監修, 飯沼由嗣・舘田一博編. 感染症診療の基礎と臨床~耐性菌の制御に向けて~. p123-134, 2010 年, 医薬ジャーナル社, 大阪.
15. 宮崎義継. 敗血症. 山口 徹・北原光夫・福井次矢編. 今日の治療指針 2008 年版. 2008 年, 医学書院, 東京.
16. 宮崎義継. Q30 慢性壊死性肺アスペルギルス症の診断は? 河野 茂編. 改訂版 深在性真菌症 Q & A. 2007 年, 医薬ジャーナル社, 大阪.
17. 宮崎義継. 日和見真菌感染症 1) Candidiasis, Cryptococcosis, 3) Aspergillosis, 接合菌症. 宮治誠編. 病原真菌ハンドブック. 2007 年, 医薬ジャーナル社, 大阪.

## 平成 23 年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 『成果概要』

研究課題：25 年間継続した妊婦の HTLV-I 抗体検査から得られた母子感染予防効果の検証  
および高精度スクリーニングシステム開発

課題番号：H23-新興-一般-026

予定期間：H23 年度から H25 年度まで

研究代表者：増崎 英明

所属研究機関：長崎大学

所属部局：大学院医歯薬学総合研究科展開医療科学講座（産婦人科）

職名：教授

年次別研究費（交付決定額）：1 年目 26,000,000 円

### I. 研究の意義

(1) 平成 23 年度より妊婦の HTLV-I 感染症スクリーニング検査が全国展開された。その効果を評価するには、スクリーニング導入後に出生した児が次の世代を出産するまで追跡して調査する必要がある。一方、長崎県では 1987 年より HTLV-I ウイルス母子感染予防事業を 25 年間継続しており、すでに申請者等は妊婦の HTLV-I スクリーニング検査導入後に出生した妊婦に関する情報とその疫学調査システムを構築しているため、全国展開された妊婦 HTLV-I 抗体スクリーニングがもたらす母子感染予防効果を推定することが可能である。

(2) 現在用いられている妊婦の HTLV-I ウイルス感染の抗体検査法には偽陽性・偽陰性が認められるため、HTLV-I の標準検査法として定量的 PCR 法を用いた妊婦 HTLV-I スクリーニングシステムの確立が望まれている。

### II. 研究の目的、期待される成果

(1) 申請者らが 25 年間継続した長崎県における妊婦の HTLV-I スクリーニング結果より、妊婦 HTLV-I 抗体スクリーニングがもたらす母子感染予防効果を検証する。

(2) 長崎県では 1987 年より 25 年間にわたり妊婦の HTLV-I 抗体スクリーニング検査を実施しており、スクリーニング開始後に出生した妊婦の世代における HTLV-I 母子感染の現状を把握することが出来る。

(3) 定量的 PCR 法を用いた高精度 HTLV-I スクリーニングシステムを導入し確立する

(4) 正確かつ簡便な HTLV-I キャリア妊婦の確定診断につながり、HTLV-I キャリア妊婦に対する結果説明と人工栄養あるいは短期母乳栄養などの介入の説明が容易になる。

(5) 妊婦の HTLV-I 抗体スクリーニング検査と母乳介入試験の問題点の把握に繋がるため、高精度なスクリーニングシステムの開発に貢献し、厚生労働行政において確実な HTLV-I 母子感染予防政策を推進することが出来る。

### III. 1 年間の研究成果

・研究代表者（増崎英明）

(1) スクリーニングシステムの構築：HTLV-I ウイルス感染症の定量的 PCR 法を長崎県における妊婦とキャリアから産まれた児の HTLV-I 検査システムに導入した。2011 年 10 月末現在で 8092 名の妊婦をスクリーニングし、一次検査で 115 名が陽性もしくは偽陽性と判定され、ウエスタンブロット（WB）法もしくは定量的 PCR 検査による確認検査で 89 名が HTLV-I キャリアと診断された。

(2) HTLV-I キャリア妊婦への母乳介入試験を開始した 1987 年以降に出生した妊婦について、キャリア率と栄養法あるいは出生時の妊娠・分娩事象との関連を調査した。現時点における最新の調査結果では（1987 年-2010 年）、長崎県における妊婦の HTLV-I 抗体陽性率は 1987 年の時点には 7.2% であったが、2003 年には 2.0% 以下になり、2010 年には 1.2% にまで低下していた。2010 年の HTLV-I キャリア妊婦の陽性率を出生年代別にみると、介入試験が始まった 1987 年以前に出生した妊婦における HTLV-I 抗体陽性率は 1.26%（109/8655 例）であるのに対して、1987 年以降に出生した妊婦におけるそれは 0.74%（10/1343 例）であった。最終的な結論を得るには、さらに 2 年間の継続調査が必要であるが、介入試験以降に出生した妊婦における長崎県の HTLV-I キャリア率は、キャリア率が低頻度の関東や関西地域とほぼ同レベルにまで低下しており、現在のところ母乳介入試験は HTLV-I 母子感染予防と ATL 撲滅に対して有効であると示唆された。

- ・研究分担者(吉浦 孝一郎)

(1) 診断技術開発：2011年10月末現在で8092名の妊婦をスクリーニングし、一次検査で115名が陽性もしくは偽陽性と判定され、WB法もしくは定量的PCR検査による確認検査で89名がHTLV-Iキャリアと診断された。

- ・研究分担者(上平 憲)

(1) 診断技術開発：2011年10月末現在で8092名の妊婦をスクリーニングし、一次検査で115名が陽性もしくは偽陽性と判定され、WB法もしくは定量的PCR検査による確認検査で89名がHTLV-Iキャリアと診断された。

- ・研究分担者(森内浩幸)

(1) HTLV-I キャリアの妊婦から生まれた児の母子感染に関する疫学調査：人工栄養を選択したHTLV-I キャリア妊婦から出生した児の母子感染率は962名中23名(2.4%)、授乳期間が6ヶ月未満の短期母乳栄養児では169名中14名(8.3%)、6ヶ月以上の長期母乳栄養児では346名中71名(20.5%)であり、人工栄養 vs 短期母乳、短期母乳 vs 長期母乳、人工栄養 vs 長期母乳すべての比較において統計学的に有意差が認められ、児の母乳への暴露期間が長いほど母子感染率が上昇するという成績であった。

- ・研究分担者(木下 晃)

(1) 診断技術開発：2011年10月末現在で8092名の妊婦をスクリーニングし、一次検査で115名が陽性もしくは偽陽性と判定され、WB法もしくは定量的PCR検査による確認検査で89名がHTLV-Iキャリアと診断された。

- ・研究分担者(三浦清徳)

(1) HTLV-I キャリア妊婦が選択した栄養法に関する疫学調査：長崎県におけるHTLV-I キャリア妊婦が選択した栄養法に関する疫学調査をおこなった。長崎県ではHTLV-I キャリア妊婦に対して、人工栄養、3ヶ月未満の短期母乳栄養、長期母乳栄養、凍結母乳栄養について説明して、妊婦が希望する栄養法を支援している。1999年に人工栄養を選択したものは79.1%であったが、その後人工栄養を選択する妊婦は漸減し2008年には59.4%にまで落ち込んでいた。しかし、人工栄養を選択した妊婦は2009年には64.4%、2010年には69.3%にまで回復していた。これは、保健師、看護師、助産師および医師を対象としたHTLV-I 感染症とその関連疾患に関する講習会を開催したことが大きな要因になっていると考えられ、HTLV-I の母子感染症の予防には地域における啓発活動が重要であると示された。

- ・研究分担者(三浦生子)

(1) 検体集積：定量的PCR法を用いた妊婦HTLV-I スクリーニングシステムは機能しており、2011年10月末現在でCLEIA法もしくはPA法による一次検査が陽性もしくは偽陽性の115名の検体が集積され、当初の年度内目標は達成された。

#### IV. 平成24～25年度の課題

##### 平成24年度

(1) HTLV-I 感染症の定量的PCR法検査・診断法を用いて、母乳以外の感染経路の存在を明らかにする。

(2) 申請者等は母体血漿中に流入する胎児・胎盤由来核酸成分を定量化し、陣痛とその流入量との有意な相関を明らかにしており (Masuzaki H et al. Clin Chem. 2004;50:1709-1711)、本技術を血液中のHTLV-I 定量化に応用し、切迫早産や妊娠高血圧症候群などの妊娠合併症とHTLV-I ウイルス量との関連を明らかにし、HTLV-I 母子感染予防に対する栄養法の選択以外の介入の可能性を探る。

(3) 定量的PCR法を用いた妊婦のHTLV-I スクリーニングには妊娠週数によりウイルスロードが変化するか否か知る必要があるため、妊娠経過に伴う母体血中のHTLV-I ウイルスロードの推移を明らかにする。

##### 平成25年度

(1) 定量的PCR法を導入し、長崎県でのHTLV-I キャリア妊婦への介入試験開始後に出生した妊婦および児について、キャリア化と栄養法あるいは妊娠合併症との関連を明らかにする。

#### V. 行政施策への貢献の可能性

(1) 長崎県では1987年より25年間にわたり妊婦のHTLV-I 抗体スクリーニング検査を実施しており、本申請研究では、スクリーニング開始後に出生した妊婦の世代におけるHTLV-I 母子感染の現状を把握す

ることが出来る。

(2) したがって、本申請研究は、妊婦の HTLV-I 抗体スクリーニング検査と母乳介入試験の問題点の把握、さらには HTLV-I の母子感染経路の全容解明に繋がるため、高精度なスクリーニングシステムの開発に貢献し、厚生労働行政において確実な HTLV-I 母子感染予防政策を推進することが出来る。

#### **VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)**

※本研究費において行った研究に対するもののみを記載してください。

※研究代表者、研究分担者、研究協力者ごとに、発表論文名・学協会誌名・発表年(西暦)、知的財産権の取得及び申請状況、ガイドライン名・作成主体・策定年月日等を記載して下さい。

※執筆者全員を明記し、当該研究者名に下線を引いてください。

(1) 増崎英明 HTLV-I 母子感染について 日本医師会雑誌 2011;140:808-811.

(2) 三浦清徳、増崎英明 HTLV-1 臨床婦人科産科 2011;65:1029-1037.

## Ⅶ. Ⅲ(1年間の研究成果)の概要図等

※ポンチ絵等でわかりやすく簡潔に説明してください。

目的:妊婦のHTLV-I感染症スクリーニングがもたらした母子感染予防効果を検証し、HTLV-Iの母子感染経路の全容解明と高精度スクリーニングシステムを開発する。

年度内の研究項目:1.定量的PCR法を導入した妊婦HTLV-Iスクリーニングシステムを構築する。  
2.妊婦HTLV-I抗体スクリーニングがもたらす母子感染予防効果を検証する。

研究成果(2011年10月末現在):

- 1.定量的PCR法を導入した妊婦HTLV-Iスクリーニングシステムを構築する。
  - 1) 定量的PCR法を用いた妊婦HTLV-Iスクリーニングシステムが導入され、長崎県の妊婦を全て研究に登録可能な体制が整備された。
  - 2) 8092名の妊婦が一次スクリーニングを受けて、陽性もしくは偽陽性であった妊婦は115名であった。
  - 3) そのうちウエスタンブロット法もしくはPCR法確定診断でHTLV-Iキャリアと診断された妊婦は89名であった。
- 2.妊婦HTLV-I抗体スクリーニングがもたらす母子感染予防効果を検証する。
  - 1) 長崎県における妊婦のHTLV-1抗体陽性率:1987年の時点には7.2%、2003年には2.0%以下になり、2010年には1.2%にまで低下していた。
  - 2) 出生年代別にみたHTLV-1キャリア妊婦の陽性率(2010):  
介入試験が始まった1987年以前に出生した妊婦におけるHTLV-1抗体陽性率は1.26%(109/8655例)であるのに対して、1987年以降に出生した妊婦におけるそれは0.74%(10/1343例)であった。

進捗状況:

- 1) PCR法を用いた妊婦HTLV-Iスクリーニングシステムは順調に運用され、計画通りに検体とその成績が集積されている。
- 2) H23年度より全国展開された妊婦HTLV-I感染症スクリーニングは、HTLV-I母子感染予防に有用と示唆され、今後2年間の研究を継続することで最終結論が見出されると期待される。

期待される効果:

- 1) 定量的PCR法を導入した妊婦HTLV-Iスクリーニングシステムの構築は、HTLV-I母子感染予防のみならずキャリア発症リスクの解明などHTLV-I感染症対策に貢献する。
- 2) H23年度より全国展開された妊婦HTLV-I感染症スクリーニングの母子感染予防効果を現時点で推察することが出来るため、より確実なHTLV-I母子感染予防政策を推進することが出来る。

## ●研究代表者の研究歴等

※研究代表者に関するもののみを記載してください。(研究代表者には下線をつけて下さい)

### ・過去に所属した研究機関の履歴

1983年11月 長崎大学医学部産婦人科助手

1991年10月 長崎大学医学部産婦人科講師

1999年6月 長崎大学医学部産婦人科助教授

2006年8月～現在 長崎大学医歯薬学総合研究科展開医療科学講座(産婦人科)教授

1987年より長崎県ATLウイルス母子感染防止研究協力事業連絡協議会委員として、長崎県におけるHTLV-I母子感染予防事業に携わり、HTLV-I母子感染の経路が母乳感染であることを明らかにした。その後、母乳栄養への介入試験を産婦人科医の立場から推進し、HTLV-Iキャリア妊婦における人工栄養もしくは短期母乳栄養は母子感染を有意に予防することを明らかにした。2009年からは長崎県ATLウイルス母子感染防止研究協力事業連絡協議会会長としてHTLV-I母子感染予防に関する啓発活動と予防対策プロトコルの作成し、HTLV-I母子感染予防事業を発展継続させている。平成21年度厚生労働科学研究費補助金 厚生労働科学特別研究事業 HTLV-Iの母子感染予防に関する研究班(研究代表者 齊藤滋)では、分担研究者としてHTLV-Iキャリア妊婦に対する母乳制止の介入を通じた24年間のHTLV-I母子感染予防に関する研究成果を報告した。

### ・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

片峰茂(長崎大学学長)

新川詔夫(北海道医療大学学長)

吉浦孝一郎(長崎大学大学院医歯薬学総合研究科教授)

齋藤滋(富山大学産婦人科教授)

### ・主な研究課題

1. 科学研究費：一般研究(C)、平成7年度 研究代表者 増崎英明、陣野吉広  
ゲノム刷り込み機構の破綻と自然流産との関連性に関する研究

2. 科学研究費：一般研究(C)、平成9-10年度 研究代表者 増崎英明、陣野吉広  
発育遅延胎児の分子遺伝学的解析(ゲノム刷り込みおよび片親性ダイソミーの関与)

3. 科学研究費：一般研究(C)、平成13-14年度 研究代表者 増崎英明  
子宮内発育遅延の細胞遺伝学ならびに分子遺伝学的解析

4. 科学研究費：一般研究(C)、平成15-16年度 研究代表者 増崎英明、吉村秀一郎、中山大介

ヒト配偶子形成過程の分子遺伝学的解析(生殖補助技術におけるゲノム刷り込みの影響)

5. 科学研究費：一般研究(C)、平成17-18年度 研究代表者 増崎英明、三浦清徳  
双胎形成のメカニズムとその異常に関する検討(分子遺伝学的アプローチ)

6. 科学研究費：一般研究(C)、平成22-24年度 研究代表者 増崎英明、三浦清徳  
癒着胎盤の分子マーカーの同定とその臨床的意義に関する研究

7. 厚生労働科学研究費補助金 創薬基盤推進研究事業 平成19-21年度 研究分担者  
ヒトパピローマウイルス持続感染制御に関するゲノム医学からのアプローチ(H19-ゲノム一般-006) 吉浦孝一郎、三輪晋智、増崎英明、中山大介、三浦清徳、木住野達也、近藤新二

## ・これまでの研究実績

※研究代表者の本研究の成果以外の実績も記載してください。

(成果概要VIと重複するものや本研究成果によるものは、**太字・斜体**文字で記載してください)

※発表論文名・学協会誌名・発表年(西暦)、知的財産権の取得及び申請状況、研究課題の実施を通じた政策提言(寄与した指針又はガイドライン等)のうち、主なものを選択し、直近年度から順に記載してください。

- 1:長崎県ATLウイルス母子感染防止研究協力事業連絡協議会(会長 増崎英明) 平成22年度長崎県ATLウイルス母子感染防止研究協力事業(APP)報告書 2011年3月 pp1-11.
- 2:増崎英明 HTLV-I母子感染について 日本医師会雑誌 2011;140:808-811.
- 3:三浦清徳、増崎英明 HTLV-1 臨床婦人科産科 2011;65:1029-1037.
- 4: Miura K, Higashijima A, Shimada T, Miura S, Yamasaki K, Abe S, Jo O, Kinoshita A, Yoshida A, Yoshimura S, Niikawa N, Yoshiura K, and Masuzaki H. Clinical application of fetal sex determination using cell-free fetal DNA in pregnant carriers of X-linked genetic disorders. Journal of Human Genetics 2011;56:296-299.
- 5:増崎英明、森内浩幸、三浦清徳 HTLV-Iの母子感染予防に関する研究班(研究代表者 齊藤滋) 厚生労働科学研究費補助金 厚生労働科学特別研究事業 平成21年度 総括・分担研究報告書 2010年3月 pp39-51.
- 6: Miura K, Miura S, Yamasaki K, Higashijima A, Kinoshita A, Yoshiura K, Masuzaki H. Identification of pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma. Clinical Chemistry 2010;56:1767-1771.
- 7: Miura K, Miura S, Yamasaki K, Shimada T, Kinoshita A, Niikawa N, Yoshiura K, Masuzaki H. The possibility of microarray-based analysis using cell-free placental mRNA in maternal plasma. Prenatal Diagnosis 2010;30:849-861.
- 8: Miura K, Miura S, Yoshiura K, Seminara S, Hamaguchi D, Niikawa N, Masuzaki H. A case of Kallmann syndrome carrying a missense mutation in alternatively spliced exon 8A encoding the immunoglobulin-like domain IIIb of FGFR1. Human Reproduction 2010;25:1076-1080.
- 9: Shimada T, Inoue T, Abe S, Hiraki K, Miura K, Hayashi T, Masuzaki H. Placental multiple chronic cysts in maternal scleroderma. 2010;37:209-212.
- 10: Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Fujishita A, Nakashima M, Ishimaru T, Masuzaki H. Cell proliferation effect of GnRH agonist on pathological lesions of women with endometriosis, adenomyosis and uterine myoma. Hum Reprod. 2010;25:2878-2890.
- 11: Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Yamaguchi N, Katamine S, Matsuyama T, Nakashima M, Fujishita A, Ishimaru T, Masuzaki H. Escherichia coli contamination of menstrual blood and effect of bacterial endotoxin on endometriosis. Fertil Steril. 2010;94:2860-2863.



- 12: Araki M, Nishitani S, Ushimaru K, Masuzaki H, Oishi K, Shinohara K. Fetal response to induced maternal emotions. *J Physiol Sci.* 2010 ;60:213-220.
- 13: Shimada T, Yamaguchi N, Nishida N, Yamasaki K, Miura K, Katamine S, Masuzaki H. Human papillomavirus DNA in plasma of patients with HPV16 DNA-positive uterine cervical cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2010 ;40:420-424.
- 14: Shirendeb U, Hishikawa Y, Moriyama S, Win N, Thu MM, Mar KS, Khatanbaatar G, Masuzaki H, Koji T. Human papillomavirus infection and its possible correlation with p63 expression in cervical cancer in Japan, Mongolia, and Myanmar. *Acta Histochem Cytochem.* 2009;42:181-190.
- 15: Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Fujishita A, Sekine I, Ishimaru T, Masuzaki H. Effect of human seminal fluid on the growth of endometrial cells of women with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010;149:204-209.
- 16: Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Fujishita A, Sekine I, Ishimaru T, Masuzaki H. Changes in tissue inflammation, angiogenesis and apoptosis in endometriosis, adenomyosis and uterine myoma after GnRH agonist therapy. *Hum Reprod.* 2010;25:642-653.
- 17: Tagawa M, Minematsu T, Masuzaki H, Ishimaru T, Moriuchi H. Seroepidemiological survey of cytomegalovirus infection among pregnant women in Nagasaki, Japan. *Pediatr Int.* 2010;52:459-462.
- 18: 長崎県ATLウイルス母子感染防止研究協力事業連絡協議会 (会長 増崎英明) ATL (成人 T細胞白血病・リンパ腫) ウイルス母子感染の予防-指導者用テキスト- 2009 ; pp1-38.
- 19: Sumi M, Ohno Y, Sasaki R, Kondoh T, Tagawa M, Masuzaki H, Moriuchi H. Probable Noonan syndrome in a boy without PTPN11 mutation, manifesting unusual complications. *Pediatr Int.* 2009;51:138-140.
- 20: Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Fujishita A, Sekine I, Ishimaru T, Masuzaki H. Toll-like receptors in innate immunity: role of bacterial endotoxin and toll-like receptor 4 in endometrium and endometriosis. *Gynecol Obstet Invest.* 2009;68:40-52.
- 21: 長崎県ATLウイルス母子感染防止研究協力事業連絡協議会 (会長 増崎英明) 長崎県ATLウイルス母子感染防止研究協力事業 (APP) 報告書~20年のあゆみ~ 2008 ; pp1-21.
- 22: 三浦清徳、増崎英明、新川詔夫、吉浦孝一郎、山崎健太郎、三浦生子 優先権主張出願「胎盤機能の網羅的かつ非侵襲的評価方法および検査用試薬」出願番号：特願2008-10339 出願日：2008年4月13日

## 平成 23 年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 『成果概要』

研究課題 : HTLV-I 感染拡大を阻止するワクチンならびに抗体医薬等の開発基盤の確立  
 課題番号 : H23-新興-一般-027  
 予定期間 : H23 年度から H25 年度まで  
 研究代表者 : 田中勇悦  
 所属研究機関 : 琉球大学  
 所属部局 : 大学院医学研究科  
 職名 : 教授  
 年次別研究費(交付決定額) : 1 年目 30,810,000 円

**I. 研究の意義**

- (1) 現在、我が国の HTLV-I 感染者数は未だ 100 万人を超え、特に大都市部では感染者の増加が問題視されているが、HTLV-I 感染拡大を阻止するワクチンや医薬は未だに開発されていない。
- (2) 本研究は申請者らがこれまで蓄積してきた HTLV-I 感染防御に関するノウハウを生かし、“HTLV-I 感染拡大阻止の実現”のため HTLV-I 感染防御ワクチン、抗体医薬等の開発基盤を確立する基礎研究を行う。
- (3) HTLV-I の感染拡大阻止を実現するワクチンや抗体医薬等の開発基盤を確立する本研究の成果は、将来、日本が進める感染症対策に大きく貢献することと期待される。

**II. 研究の目的、期待される成果**

- (1) 本研究は、我が国における HTLV-I 感染拡大を阻止するための政策に寄与するため、“ワクチンや抗体医薬等による HTLV-I 感染防御法の開発基盤”を確立することを目的とする。
- (2) 本研究は、日本国内の“HTLV-I 感染拡大抑制”、“ATL や HAM などの HTLV-I 関連難治性疾患の予防”に寄与するものと期待できる。
- (3) さらに将来的には、本研究の成果を HTLV-I 感染が問題となっている諸外国に還元することにより、日本の海外支援の一つになるものと期待される。

**III. 1 年間の研究成果**

平成 23 年度の研究で、まず、第一の成果として、中和単クロン抗体がヒト化したマウスにおいて HTLV-I 感染を防御することを見いだした。また、試験管内ではあるが中和抗体が HTLV-I 感染細胞の不死化を抑制することをも見いだした。さらにラットの HTLV-I 経腸感染に成功した。これらの知見を弾みにして、次年度からはワクチンや抗体医薬の開発研究を進める。以下に具体的な成果を挙げる。

- ・ 研究代表者(田中)：ワクチン等の評価系の開発、抗体医薬の研究開発(総括)
  - (1) 単クロン抗体を用いて種々の HTLV-I 抗原の定性、定量法を確立した。
  - (2) *in vitro* で HTLV-I の中和抗体価を評価する方法として、合胞体形成阻止試験があるが、このアッセイに最も感受性のある細胞株ペアを選択し、実際に中和方法を確立した。
  - (3) さらに HTLV-I の細胞不死化能を阻害する中和抗体の力価測定方法として正常 T 細胞と HTLV-I 感染細胞を混合して不死化細胞の出現をみる方法があるが、この方法の期間短縮と最適な細胞の組み合わせを選択し、中和抗体の細胞不死化阻止能を見るアッセイ法を確立した。
  - (4) 中和抗体が HTLV-I 感染患者由来で、すでに HTLV-I 感染した細胞の抗原発現、ウイルス産生および不死化を監視することを新たに発見している。
- ・ 研究分担者(神奈木・長谷川)：ラットの HTLV-I 経口・経腸・血液感染系の確立と応用
  - (1) HTLV-I 感染ヒト T 細胞株 MT-2 を用いた免疫正常ラットへの経口感染では、腹腔感染に比べ HTLV-I 感染量が多くなるがその感染効率は低く、ワクチンや抗体医薬などの感染防御効果を感度良く評価するにはさらなる感染効率の向上が望まれる。
  - (2) そこで、HTLV-I の主要感染経路である経口感染は消化管粘膜を介した感染であると考え、MT-2 細胞をラットに経直腸投与したところ、感染が確認され、抗 HTLV-I 抗体は陰性であることがわか

った。

(3) 他の感染経路との感染効率については検討中である。

- 研究分担者(齊藤)：ヒト化マウスでの HTLV-I 感染系 とヒト免疫誘導系の開発
  - (1) 高度免疫不全マウス (NOD/SCID/ $\gamma$ Cnull : NOG) の脾臓内にヒト末梢血単核球 (PBMC) とマイトマイシン処理した HTLV-1 感染 T 細胞株 (MT-2) を同時移植し、2 週間後にはマウス体内でヒト T 細胞に HTLV-1 感染が成立することを確認した。
  - (2) この系で、自家製抗 HTLV-1 中和モノクローナル抗体 LAT27 は、マウス体内においてヒト T 細胞への HTLV-1 感染を完全に抑制した。
- 研究分担者(伊藤)：ヒト化用マウス系統の開発と供給
  - (1) 超免疫不全マウス NOD/SCID/ $\gamma$ Cnull (NOG) マウスの計画生産を行い提供した。
  - (2) これら免疫不全マウスをプラットフォームにして IL-2 を導入した NOG マウスの作製を試み、血清中に hIL-2 を分泌する免疫不全マウスを得ることができた。
  - (3) ヒト末梢血単核球を移入すると、NOG マウスと比較して、強い GVHD で死亡することが明らかとなった。これは、移入した T 細胞が hIL-2 により活性化することによると考えられ、このマウスへの HTLV-1 感染への高い感受性が示唆された。
- 研究分担者(上里)：HTLV-I 産生株の樹立、細胞内 HTLV-I 感染抵抗性因子の研究と応用
  - (1) 沖縄県での HTLV-I 感染状態を調べるため、平成 17 年から平成 22 年度までの過去 5 年間、琉球大学医学部附属病院を受診し、抗 HTLV-1 抗体検査が施行された患者を対象として抗体保有率を統計的に解析し年齢が高くなるにつれ徐々に増加傾向であることを明らかにした。
  - (2) HTLV-I 感染細胞の樹立研究は進行中である。
- 研究分担者(樋口)：細胞内 HTLV-I 感染抵抗性因子の研究と応用
  - (1) HTLV-1 Tax の結合蛋白として Ubiquitin Specific Protease 10 (USP10) を同定した。
  - (2) USP10 結合蛋白を網羅的に検索したところ、G3BP1 が同定された。
  - (3) Tax は USP10 に結合することにより、ストレス顆粒形成を阻害することがわかった。また HTLV-1 感染細胞では非感染細胞に比べストレス顆粒形成能が顕著に低下していた。
  - (4) したがって、USP10 は潜伏感染細胞または初感染細胞においてストレス時に蛋白合成を抑制し、ウイルス産生を阻害する機能をもつが、Tax はその抑制を解除することにより、ウイルス産生を増大させている可能性が示唆された。
- 研究分担者(松崎・新川)：小動物での HTLV-I ワクチン検証と HTLV-I 粘膜ワクチンの開発
  - (1) 三部構成免疫賦活複合体 (TIPS) は、①抗原、②コイルドコイルコア、③標的リガンドの三部から構成されるが、今回、HTLV-I 感染に対する防御エピトープ (gp46<sub>180-204</sub>) を搭載した TIPS を設計するにあたって、まず始めに 5 量体コイルドコイル構造形成タンパク質 (COMP) と標的リガンド (B 細胞レセプター (Ig) と結合するプロテイン A 由来の Z ドメイン) を融合タンパク質として大腸菌で発現させた。
  - (2) この二部構成 COMP-Z 融合分子は、Ig に特異的に結合し、また、ゲル濾過クロマトグラフィー解析では均一性の高い 5 量体分子を形成していることも確認した。
  - (3) 最終形としての三部構成複合体 (図 p46<sub>180-204</sub>:COMP-Z) とするため、今年度、その遺伝子融合化を完了させた。そのタンパク質発現と生化学的解析ならびに感染防御機能の解析を進行させている。

#### IV. 平成 24～25 年度の課題

- (1) 平成 24 年度は、23 年度に確立した第一段階の基盤に立ち、HTLV-I 感染を阻害する中和抗体の生体感染防御能の検証、中和抗体誘導ワクチンの構築、および他の抗体医薬候補 (anti-CD134, anti-CD25 など) や他の候補薬についてスクリーニングを実施し、実験とフィードバックを繰り返しながら取捨選択をし、ワクチンと抗体医薬の開発の第二段階の基盤作りに必要なノウハウを蓄積する。
- (2) 平成 25 年度は、次のステップである臨床試験へ向けた HTLV-I の感染拡大阻止プロジェクトへの第三段階の基盤を形づくる。

## V. 行政施策への貢献の可能性

(1) 本研究で得られた成果を公開することにより、HTLV-I ワクチン開発に関する具体的な可能性が示されるので、国策としての HTLV-I 感染拡大の阻止対策に貢献できると考えている。

## VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

(初年度なので平成 23 年度の研究成果のみならず、準備段階からの成果を発表する論文を含めた。)

### A. 研究代表者

- (1) Kitazono T, Okazaki T, Araya N, Yamano Y, Yamada Y, Nakamura T, Tanaka Y, Inoue M, Ozaki S. Advantage of higher-avidity CTL specific for Tax against human T-lymphotropic virus-1 infected cells and tumors. *Cell Immunol.* 2011;272(1):11-7.
- (2) Yoshita M, Higuchi M, Takahashi M, Oie M, Tanaka Y, Fujii M. Activation of mTOR by human T-cell leukemia virus type 1 Tax is important for the transformation of mouse T cells to interleukin-2-independent growth. *Cancer Sci.* in press
- (3) Shibata Y, Tanaka Y, Gohda J, Inoue J. Activation of the I $\kappa$ B kinase complex by HTLV-1 Tax requires cytosolic factors involved in Tax-induced polyubiquitination. *J Biochem.* 2011, 150(6):679-86.
- (4) Alberti C, Cartier L, Valenzuela MA, Puente J, Tanaka Y, Ramirez E. Molecular and clinical effects of betamethasone in human t-cell lymphotropic virus type-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients. *J Med Virol.* 2011, 83(9):1641-9.
- (5) Ndhlovu LC, Leal FE, Hasenkrug AM, Jha AR, Carvalho KI, Eccles-James IG, Bruno FR, Vieira RG, York VA, Chew GM, Jones RB, Tanaka Y, Neto WK, Sanabani SS, Ostrowski MA, Segurado AC, Nixon DF, Kallas EG. HTLV-1 tax specific CD8+ T cells express low levels of Tim-3 in HTLV-1 infection: implications for progression to neurological complications. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011, 5(4):e1030.
- (6) Belrose G, Gross A, Olindo S, Lézin A, Dueymes M, Komla-Soukha I, Smadja D, Tanaka Y, Willems L, Mesnard JM, Peloponese JM Jr, Césaire R. Effects of valproate on Tax and HBZ expression in HTLV-1 and HAM/TSP T lymphocytes. *Blood.* 2011, 118(9):2483-91.
- (7) Abdelbary NH, Abdullah HM, Matsuzaki T, Hayashi D, Tanaka Y, Takashima H, Izumo S, Kubota R. Reduced Tim-3 expression on human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) Tax-specific cytotoxic T lymphocytes in HTLV-I infection. *J. Infect Dis.* 2011, 203(7):948-59.
- (8) Rende F, Cavallari I, Corradin A, Silic-Benussi M, Toulza F, Toffolo GM, Tanaka Y, Jacobson S, Taylor GP, D'Agostino DM, Bangham CR, Ciminale V. Kinetics and intracellular compartmentalization of HTLV-1 gene expression: nuclear retention of HBZ mRNAs. *Blood.* 2011, 117(18):4855-9.

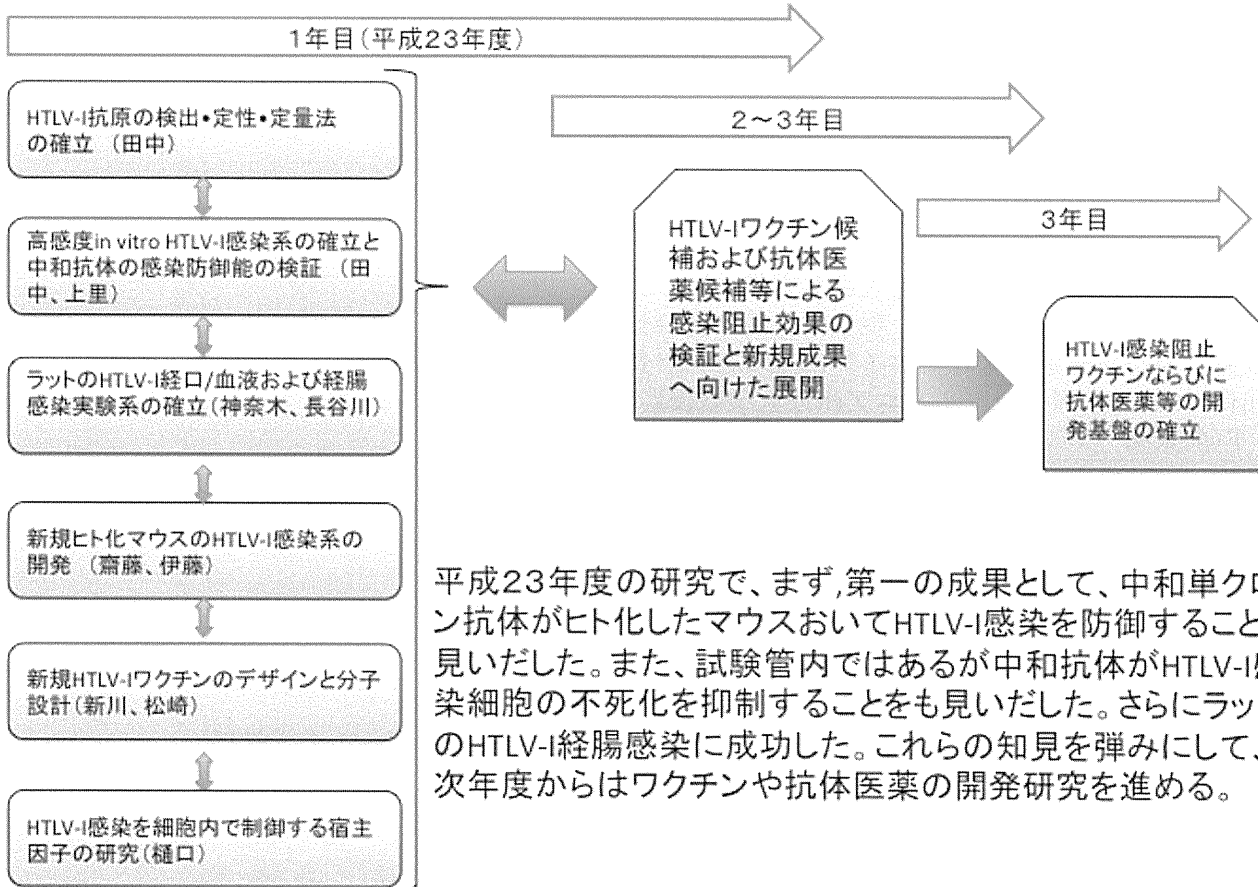
### B. 研究分担者

- (9) Yoshita M, Higuchi M, Takahashi M, Oie M, Tanaka Y, Fujii M. Activation of mTOR by human T-cell leukemia virus type 1 Tax is important for the transformation of mouse T cells to interleukin-2-independent growth. *Cancer Sci.* in press
- (10) Saito M, Bangham CRM. Immunopathogenesis of Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): Recent perspectives. *Leukemia Research and Treatment*, in press.
- (11) Sato, K., N. Misawa, C. Nie, Y. Satou, D. Iwakiri, M. Matsuoka, R. Takahashi, K. Kuzushima, M. Ito, K. Takada, and Y. Koyanagi. A novel animal model of Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in humanized mice. *Blood* 2011. 117:5663-5673.
- (12) Kuwana, Y., M. Takei, M. Yajima, K. Imadome, H. Inomata, M. Shiozaki, N. Ikumi, T. Nozaki, H. Shiraiwa, N. Kitamura, J. Takeuchi, S. Sawada, N. Yamamoto, N. Shimizu, M. Ito, and S. Fujiwara. Epstein-barr virus induces erosive arthritis in humanized mice. *PLoS One* 2011. 6:e26630.
- (13) Shimizu, N. Yamamoto, T. Morio, S. Ohga, H. Nakamura, M. Ito, O. Miura, J. Komano, and S. Fujiwara. Novel Mouse Xenograft Models Reveal a Critical Role of CD4+ T Cells in the Proliferation of EBV-Infected T and NK Cells. *Plos pathogens*, in press.
- (14) Hirose, T., H. Torikai, M. Yanagisawa, M. Kamei, N. Imahashi, A. Demachi-Okamura, M. Tanimoto, K. Shiraishi, M. Ito, K. Miyamura, K. Shibata, F. Kikkawa, Y. Morishima, T. Takahashi, N. Emi, K. Kuzushima, and Y. Akatsuka. Mismatched HLA class II-restricted CD8(+) cytotoxic T-cells may serve selective GVL effects following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Cancer Sci.* in press.

Ⅶ. Ⅲ (1年間の研究成果)の概要図等

※ポンチ絵等でわかりやすく簡潔に説明してください。

HTLV-I感染拡大を阻止するワクチンならびに抗体医薬等の開発基盤の確立  
(平成23年度の成果概要)



平成23年度の研究で、まず、第一の成果として、中和単クローン抗体がヒト化したマウスにおいてHTLV-I感染を防御することを見いだした。また、試験管内ではあるが中和抗体がHTLV-I感染細胞の不死化を抑制することを見いだした。さらにラットのHTLV-I経腸感染に成功した。これらの知見を弾みにして、次年度からはワクチンや抗体医薬の開発研究を進める。

●研究代表者の研究歴等・過去に所属した研究機関の履歴

- 昭和55年～58年 京都大学ウイルス研究所 (大学院博士課程)  
 昭和58年～平成5年 北里大学衛生学部 (助手58年～、講師平成3年～)  
 昭和60年～63年 米国ペンシルバニア大学医学部 (ポストドク)  
 平成5年～11年 北里大学理学部 (助教授)  
 平成11年～現在 琉球大学大学院医学研究科 (教授)

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

- ・ 指導を受けた研究者
  - 日沼頼夫 (文化勲章受章者、京都大学名誉教授)
  - 菅村和夫 (前東北大学医学部長、現日本免疫学会会長)
  - 山本直樹 (前国立感染症研究所エイズ研究センター長、現国立シンガポール大学教授)
  - Tevethia, SS (前米国ペンシルバニア州立大学教授)
  - Rapp, F (前米国ペンシルバニア州立大学教授)
  - 戸澤秀樹 (前北里大学教授)

・ 主な共同研究者

- Ansari, AA (米国エモリー大学教授)
- Bangham, CRM (ロンドン王立大学教授)
- 小柳義夫 (京都大学ウイルス研究所教授)
- 神奈木真理 (東京医科歯科大学教授)
- 山本直樹 (元国立感染症研究所エイズ研究センター長、現国立シンガポール大学教授)

・ 主な研究課題

HTLV-I および HIV-1 感染に対する生体防御の研究

・ これまでの研究実績

研究代表者 (田中勇悦) 最近の論文 (2008~現在まで、それ以前は割愛した)

- (1) **Kitazono T, Okazaki T, Araya N, Yamano Y, Yamada Y, Nakamura T, Tanaka Y, Inoue M, Ozaki S. Advantage of higher-avidity CTL specific for Tax against human T-lymphotropic virus-1 infected cells and tumors. *Cell Immunol.* 2011, 272(1):11-7.**
- (2) **Yoshita M, Higuchi M, Takahashi M, Oie M, Tanaka Y, Fujii M. Activation of mTOR by human T-cell leukemia virus type 1 Tax is important for the transformation of mouse T cells to interleukin-2-independent growth. *Cancer Sci.* 2011 in press**
- (3) **Shibata Y, Tanaka Y, Gohda J, Inoue J. Activation of the I $\kappa$ B kinase complex by HTLV-1 Tax requires cytosolic factors involved in Tax-induced polyubiquitination. *J Biochem.* 2011, 150(6):679-86.**
- (4) **Alberti C, Cartier L, Valenzuela MA, Puente J, Tanaka Y, Ramirez E. Molecular and clinical effects of betamethasone in human t-cell lymphotropic virus type-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients. *J Med Virol.* 2011, 83(9):1641-9.**
- (5) **Ndhlovu LC, Leal FE, Hasenkrug AM, Jha AR, Carvalho KI, Eccles-James IG, Bruno FR, Vieira RG, York VA, Chew GM, Jones RB, Tanaka Y, Neto WK, Sanabani SS, Ostrowski MA, Segurado AC, Nixon DF, Kallas EG. HTLV-1 tax specific CD8+ T cells express low levels of Tim-3 in HTLV-1 infection: implications for progression to neurological complications. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011, 5(4):e1030.**

- (6) Belrose G, Gross A, Olindo S, Lézin A, Dueymes M, Komla-Soukha I, Smadja D, Tanaka Y, Willems L, Mesnard JM, Peloponese JM Jr, Césaire R. Effects of valproate on Tax and HBZ expression in HTLV-1 and HAM/TSP T lymphocytes. *Blood*. 2011, 118(9):2483-91.
- (7) Abdelbary NH, Abdullah HM, Matsuzaki T, Hayashi D, Tanaka Y, Takashima H, Izumo S, Kubota R. Reduced Tim-3 expression on human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) Tax-specific cytotoxic T lymphocytes in HTLV-I infection. *J. Infect Dis*. 2011, 203(7):948-59.
- (8) Rende F, Cavallari I, Corradin A, Silic-Benussi M, Toulza F, Toffolo GM, Tanaka Y, Jacobson S, Taylor GP, D'Agostino DM, Bangham CR, Ciminale V. Kinetics and intracellular compartmentalization of HTLV-1 gene expression: nuclear retention of HBZ mRNAs. *Blood*. 2011, 117(18):4855-9.
- (9) Yoshii H, Kamiyama H, Goto K, Oishi K, Katunuma N, Tanaka Y, Hayashi H, Matsuyama T, Sato H, Yamamoto N, Kubo Y. CD4-independent human immunodeficiency virus infection involves participation of endocytosis and cathepsin B. *PLoS One*. 2011 25;6(4):e19352.
- (10) Pedroza-Gonzalez A, Xu K, Wu TC, Aspord C, Tindle S, Marches F, Gallegos M, Burton EC, Savino D, Hori T, Tanaka Y, Zurawski S, Zurawski G, Bover L, Liu YJ, Banchereau J, Palucka AK. Thymic stromal lymphopoietin fosters human breast tumor growth by promoting type 2 inflammation. *J Exp Med*. 2011 208(3):479-90.
- (11) Tsuruno C, Okuma K, Takahashi Y, Tanaka R, Tanaka Y, Takahama Y, Hamaguchi Y, Hamaguchi I, Yamaguchi K. A recombinant vesicular stomatitis virus encoding HIV-1 receptors and human OX40 ligand efficiently eliminates HIV-1-infected CD4-positive T cells expressing OX40. *Hum Immunol*. 2011 72(4):295-304.
- (12) Rende F, Cavallari I, Corradin A, Silic-Benussi M, Toulza F, Toffolo GM, Tanaka Y, Jacobson S, Taylor GP, D'Agostino DM, Bangham CR, Ciminale V. Kinetics and intracellular compartmentalization of HTLV-1 gene expression: nuclear retention of HBZ mRNAs. *Blood*. 2011 117(18):4855-9.
- (13) Hieshima K, Nagakubo D, Shigeta A, Tanaka Y, Hoshino H, Tsukasaki K, Yamada Y, Yoshie O. c-Maf suppresses human T-cell leukemia virus type 1 Tax by competing for CREB-binding protein. *Cancer Sci*. 2011 Apr;102(4):890-4.
- (14) Oh U, McCormick MJ, Datta D, Turner RV, Bobb K, Monie DD, Sliskovic DR, Tanaka Y, Zhang J, Meshulam J, Jacobson S. Inhibition of immune activation by a novel nuclear factor-kappa B inhibitor in HTLV-I-associated neurologic disease. *Blood*. 2011 117(12):3363-9.
- (15) Yamamoto K, Ishida T, Nakano K, Yamagishi M, Yamochi T, Tanaka Y, Furukawa Y, Nakamura Y, Watanabe T. SMYD3 interacts with HTLV-1 Tax and regulates subcellular localization of Tax. *Cancer Sci*. 2011 102(1):260-6.
- (16) Tanaka R, Takahashi Y, Kodama A, Saito M, Ansari AA, Tanaka Y. Suppression of CCR5-tropic HIV type 1 infection by OX40 stimulation via enhanced production of beta-chemokines. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2010 26(10):1147-54.
- (17) Toulza F, Nosaka K, Tanaka Y, Schioppa T, Balkwill F, Taylor GP, Bangham CR. Human T-lymphotropic virus type 1-induced CC chemokine ligand 22 maintains a high frequency of functional FoxP3+ regulatory T cells. *J Immunol*. 2010 185(1):183-9.
- (18) Kodama A, Tanaka R, Zhang LF, Adachi T, Saito M, Ansari AA, Tanaka Y. Impairment of in vitro generation of monocyte-derived human dendritic cells by human immunodeficiency virus-1: Involvement of type I interferon produced from plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol*. 2010 71(6):541-50.
- (19) Sato K, Nie C, Misawa N, Tanaka Y, Ito M, Koyanagi Y. Dynamics of memory and naive CD8+ T lymphocytes in humanized NOD/SCID/IL-2Rgamma null mice infected with CCR5-tropic HIV-1. *Vaccine*. 2010 28 Suppl 2:B32-7.
- (20) Aoyagi T, Takahashi M, Higuchi M, Oie M, Tanaka Y, Kiyono T, Aoyagi Y, Fujii M. The PDZ domain binding motif (PBM) of human T-cell leukemia virus type 1 Tax can be substituted by heterologous PBMs from viral oncoproteins during T-cell transformation. *Virus Genes*. 2010 40(2):193-9.
- (21) Tanaka M, Sun B, Tezuka K, Fujisawa J, Tanaka Y, Hoshino H, Miwa M. Neuraminidase enhances the initial steps of human T-cell leukemia virus type 1 replication. *Microbes Infect*. 2010 12(2):119-25.

- (22) Ghez D, Renand A, Lepelletier Y, Sibon D, Suarez F, Rubio MT, Delarue R, Buzyn A, Beljord K, Tanaka Y, Varet B, Hermine O. Tax unleashed: fulminant Tax-positive Adult T-cell Leukemia/Lymphoma after failed allogeneic stem cell transplantation. *J Clin Virol*. 2009 46(4):378-80.
- (23) Shoji T, Higuchi M, Kondo R, Takahashi M, Oie M, Tanaka Y, Aoyagi Y, Fujii M. Identification of a novel motif responsible for the distinctive transforming activity of human T-cell leukemia virus (HTLV) type 1 Tax1 protein from HTLV-2 Tax2. *Retrovirology*. 2009 6:83.
- (24) Toulza F, Nosaka K, Takiguchi M, Pagliuca T, Mitsuya H, Tanaka Y, Taylor GP, Bangham CR. FoxP3+ regulatory T cells are distinct from leukemia cells in HTLV-1-associated adult T-cell leukemia. *Int J Cancer*. 2009 125(10):2375-82.
- (25) Nie C, Sato K, Misawa N, Kitayama H, Fujino H, Hiramatsu H, Heike T, Nakahata T, Tanaka Y, Ito M, Koyanagi Y. Selective infection of CD4+ effector memory T lymphocytes leads to preferential depletion of memory T lymphocytes in R5 HIV-1-infected humanized NOD/SCID/IL-2R $\gamma$ manull mice. *Virology*. 2009 394(1):64-72.
- (26) Ohba K, Ryo A, Dewan MZ, Nishi M, Naito T, Qi X, Inagaki Y, Nagashima Y, Tanaka Y, Okamoto T, Terashima K, Yamamoto N. Follicular dendritic cells activate HIV-1 replication in monocytes/macrophages through a juxtacrine mechanism mediated by P-selectin glycoprotein ligand 1. *J Immunol*. 2009 183(1):524-32.
- (27) Nejmeddine M, Negi VS, Mukherjee S, Tanaka Y, Orth K, Taylor GP, Bangham CR. HTLV-1-Tax and ICAM-1 act on T-cell signal pathways to polarize the microtubule-organizing center at the virological synapse. *Blood*. 2009 114(5):1016-25.
- (28) Kattan T, MacNamara A, Rowan AG, Nose H, Mosley AJ, Tanaka Y, Taylor GP, Asquith B, Bangham CR. The avidity and lytic efficiency of the CTL response to HTLV-1. *J Immunol*. 2009 182(9):5723-9.
- (29) Murakami T, Kumakura S, Yamazaki T, Tanaka R, Hamatake M, Okuma K, Huang W, Toma J, Komano J, Yanaka M, Tanaka Y, Yamamoto N. The novel CXCR4 antagonist KRH-3955 is an orally bioavailable and extremely potent inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 infection: comparative studies with AMD3100. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 53(7):2940-8.
- (30) Kamiyama H, Yoshii H, Tanaka Y, Sato H, Yamamoto N, Kubo Y. Raft localization of CXCR4 is primarily required for X4-tropic human immunodeficiency virus type 1 infection. *Virology*. 2009 30;386(1):23-31.
- (31) Nagai K, Jinnai I, Hata T, Usui T, Sasaki D, Tsukasaki K, Sugahara K, Hishikawa Y, Yamada Y, Tanaka Y, Koji T, Mano H, Kamihira S, Tomonaga M. Adhesion-dependent growth of primary adult T cell leukemia cells with down-regulation of HTLV-I p40Tax protein: a novel in vitro model of the growth of acute ATL cells. *Int J Hematol*. 2008 88(5):551-64.
- (32) Okajima M, Takahashi M, Higuchi M, Ohsawa T, Yoshida S, Yoshida Y, Oie M, Tanaka Y, Gejyo F, Fujii M. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax induces an aberrant clustering of the tumor suppressor Scribble through the PDZ domain-binding motif dependent and independent interaction. *Virus Genes*. 2008 37(2):231-40.
- (33) Hayashi D, Kubota R, Takenouchi N, Tanaka Y, Hirano R, Takashima H, Osame M, Izumo S, Arimura K. Reduced Foxp3 expression with increased cytomegalovirus-specific CTL in HTLV-I-associated myelopathy. *J Neuroimmunol*. 2008 200(1-2):115-24.
- (34) Majorovits E, Nejmeddine M, Tanaka Y, Taylor GP, Fuller SD, Bangham CR. Human T-lymphotropic virus-1 visualized at the virological synapse by electron tomography. *PLoS One*. 2008 28;3(5):e2251.
- (35) Takahashi Y, Tanaka R, Yamamoto N, Tanaka Y. Enhancement of OX40-induced apoptosis by TNF coactivation in OX40-expressing T cell lines in vitro leading to decreased targets for HIV type 1 production. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2008 24(3):423-35.
- (36) Kubo Y, Yoshii H, Kamiyama H, Tominaga C, Tanaka Y, Sato H, Yamamoto N. Ezrin, Radixin, and Moesin (ERM) proteins function as pleiotropic regulators of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Virology*. 2008 375(1):130-40.
- (37) Kondo K, Okuma K, Tanaka R, Matsuzaki G, Ansari AA, Tanaka Y. Rapid induction of OX40 ligand on primary T cells activated under DNA-damaging conditions. *Hum Immunol*. 2008 69(9):533-42.



- (38) Takahashi Y, Tanaka R, Yamamoto N, Tanaka Y. Enhancement of OX40-induced apoptosis by TNF coactivation in OX40-expressing T cell lines in vitro leading to decreased targets for HIV type 1 production. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2008 24(3):423-35.
- (39) Zhang LF, Okuma K, Tanaka R, Kodama A, Kondo K, Ansari AA, Tanaka Y. Generation of mature dendritic cells with unique phenotype and function by in vitro short-term culture of human monocytes in the presence of interleukin-4 and interferon-beta. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008 233(6):721-31.
- (40) Yoshida T, Kawano Y, Sato K, Ando Y, Aoki J, Miura Y, Komano J, Tanaka Y, Koyanagi Y. A CD63 mutant inhibits T-cell tropic human immunodeficiency virus type 1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane. *Traffic*. 2008 9(4):540-58.
- (41) Koyanagi Y, Tanaka Y, Ito M, Yamamoto N. Humanized mice for human retrovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;324:133-48
- (42) Yoshida S, Higuchi M, Shoji T, Yoshita M, Ishioka K, Takahashi M, Oie M, Tanaka Y, Uchiyama M, Fujii M. Knockdown of synapse-associated protein Dlg1 reduces syncytium formation induced by human T-cell leukemia virus type 1. *Virus. Genes*. 2008 37(1):9-15.
- (43) Okuma K, Tanaka R, Ogura T, Ito M, Kumakura S, Yanaka M, Nishizawa M, Sugiura W, Yamamoto N, Tanaka Y. Interleukin-4-transgenic hu-PBL-SCID mice: a model for the screening of antiviral drugs and immunotherapeutic agents against X4 HIV-1 viruses. *J Infect Dis*. 2008 197(1):134-41.

## 平成23年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 『成果概要』

研究課題：プロウイルスゲノム破壊による革新的HTLV-1 関連疾患発症遅延法の開発

課題番号：H23-新興-一般-028

予定期間：H23年度からH25年度まで

研究代表者：駒野 淳

所属研究機関：国立感染症研究所

所属部局：エイズ研究センター

職名：主任研究官

年次別研究費(交付決定額)：1年目 12,000,000 円

## I. 研究の意義

- (1) HTLV-1 感染症には病態進展を防止する方法が存在しない。
- (2) 治療より発症防止の方が感染者の身体的負担は小さいうえ、社会経済的観点からもメリットがある。
- (3) 本治療法の原理は HTLV-1 ゲノムの破壊であるため、病態の進行を遅延させるだけでなく、感染者から放出される感染性ウイルスの量も減少させることも期待される。従って、ウイルス伝播を食い止める効果も期待できる。
- (4) 根本治療に結びつく研究は基礎研究における概念の立証だけでも感染者に大きな希望を与える。
- (5) 本技術と末梢血幹細胞移植および遺伝子治療を組み合わせることにより、将来 ATL に対するより確実な治療法開発の基盤を提供することもできる。
- (6) 治療分子送達技術や抗体工学は、HTLV-1 感染症領域を超えて遺伝子治療や抗体医薬の領域にも多大な貢献が期待できる。

## II. 研究の目的、期待される成果

- (1) HTLV-1 の潜伏感染に介入して発症を遅延させる方法として、潜伏感染するプロウイルスゲノムを物理的に傷害して病原性を欠落させる技術を開発する。
- (2) 長期間にわたる医療機関への受診や薬剤の長期投与を感染者に要求せずに発症を食い止める「感染者にやさしい発症予防法」の確立が期待される。不可逆的にウイルスを無力化する技術は根治療法の基盤を提供する極めて重要な技術であり、感染者に希望を与える研究として位置づけられる。
- (3) エピジェネティックな転写制御では達成できない不可逆的な治療効果を達成できる。本法と同等の治療分子で HIV-1 感染症にて治療に成功した報告(Holt et al, Nat Biotechnol 2010)は本法の成功と早期実現に期待を持たせる。
- (4) 治療分子は HTLV-1 LTR に特異的に反応するため、非感染細胞に送達されても重大な副反応を引き起こすとは考えにくい。

### Ⅲ. 1 年間の研究成果

- ・ 研究代表者

- (1) HTLV-1 プロウイルスのLTR配列の中にZFN標的配列をSangamo proprietary algorithmにより絞り込みを行った。
- (2) 複数のプロウイルスに共通する配列の中から 9 種類の治療標的候補配列を選択し、これを認識する ZFN を合成し、酵母細胞を宿主とした MEL1 アッセイにより生物活性の優れた候補を選択中である。

- ・ 研究分担者(岡田誠治)

- (1) HTLV-1 による腫瘍形成を評価するための小動物実験系の確立を試み、赤血蛍光を指標とした生体内腫瘍形成のモニターを実現した。これを ZFN による in vivo 治療評価と治療分子の送達選択性向上に関する解析を行う。

- ・ 研究分担者(星野忠治)

- (1) CD4 認識抗体の改良を支援するため大腸菌における抗原・抗体の大量生成系を構築した。
- (2) モデル抗体分子による In silico maturation 法のプログラムの評価と改良を行った。

- ・ 研究分担者(竹腰正隆)

- (1) ヒト由来モノクローナル抗体 HO538-213 の scFv 化に成功した。
- (2) CD4 反応性抗体のエピトープ解析に必要な大腸菌及びヒト細胞における抗原 D1D2 ドメイン発現精製系を構築した。

- ・ 研究分担者(武田 哲)

- (1) ヒト細胞における治療分子機能解析に必要な一次・二次評価系の詳細なデザインを行った。

### Ⅳ. 平成 24～25 年度の課題

- (1) 治療分子の最終候補を選抜し、ヒト細胞における機能試験を行う。
- (2) 治療分子によるプロウイルス機能破壊を核酸レベルで確認づける。
- (3) HTLV-1 感染細胞からのプロウイルス除去効率を評価する。
- (4) HTLV-1 感染細胞におけるプロウイルス LTR 機能破壊効率を評価する。
- (5) ゲノム完全性と遺伝子発現攪乱の観点および細胞生理攪乱の角度から治療分子の安全性の評価を評価する。
- (6) 小動物実験系を用いて治療分子の生物学的作用を確認する。
- (7) scFv 化 HO538-213 のエピトープ解析を行い生体内における免疫攪乱の有無を評価する。
- (8) In silico maturation 法を利用して scFv 化 HO538-213 の CD4 に対する親和性の改善を試みる。

(9) TNSALP C 末端由来のアミノ酸配列を利用して GPI アンカー化細胞膜発現 scFv 化 HO538-213 を作出する。

(10) レトロまたはレンチウイルスベクターの CD4 反応性 scFv 被覆を行い、CD4 陽性細胞への選択性向上を図る。

(11) In vivo におけるヒトの CD4 陽性細胞に対する治療分子送達選択性の向上を評価する。

## **V. 行政施策への貢献の可能性**

(1) 本研究でプロウイルス除去や LTR 不可逆的破壊が可能であることが証明されたら HTLV-1 感染者へ次世代医療の提供を前提とした新たな厚生研究の方向性を示す事ができる。

(2) 根治療法の実用化を念頭においた HTLV-1 病理学的基礎研究の方向性の提示に貢献できる。

## **VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)**

・研究代表者

(1) 論文発表 : Kosuke Miyauchi, Emiko Urano, Mari Takizawa, Reiko Ichikawa, Jun Komano\*. Therapeutic potential of HIV protease-activable CASP3. (in submission) : 関連演題を日本ウイルス学会およびエイズ学会に報告

論文発表: Emiko Urano, Kosuke Miyauchi, Reiko Ichikawa, Yuko Futahashi, and Jun Komano\*. Regulation of Cyclin T1 expression and function by an alternative splice variant that skips exon 7 and contains a premature termination codon. (in submission) : 関連演題を日本分子生物学会に報告

(2) 知的財産権については特記すべきことなし

(3) ガイドライン・マニュアル等については特記すべきことなし