

201123055A

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

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 総括・分担研究報告書

研究代表者 田中 勇悦

琉球大学大学院医学研究科

平成 24 (2012) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

田中 勇悦：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

II. 分担研究報告

(1) 田中 勇悦：HTLV-I 感染阻止 in vitro 評価系の確立

(2) 神奈木真理：ラットの HTLV-1 経口／血液感染系の確立と応用

(3) 齊藤 峰輝：HTLV-1 感染予防ワクチン開発のための新規ヒト化マウスモデル系の確立

(4) 伊藤 守：ヒト化用マウス系統の開発と供給

(5) 新川 武、松崎 吾朗

：三部構成免疫賦活複合体 (TIPS) の HTLV-I 感染防御ワクチンへの応用

(6) 樋口 雅也：細胞内 HTLV-1 感染抵抗性因子の研究と応用

(7) 上里 博：皮膚病変組織に浸潤する HTLV-I 感染細胞培養株の樹立と野生型 HTLV-I の分離

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

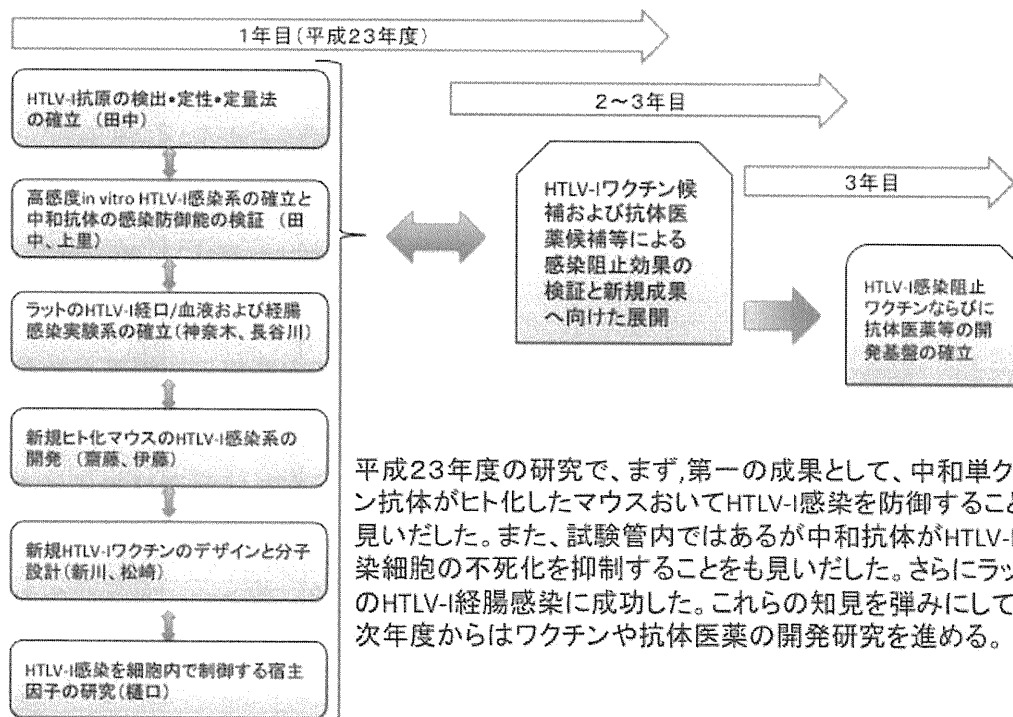
I . 総括研究報告

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

田中勇悦 琉球大学 大学院医学研究科 教授

要旨：以下の図に示すように、3年間研究の一年目は計画通りに遂行された。本年度の研究により、HTLV-I 感染抑制を評価する in vitro および in vivo の系がほぼ確立された。そして新たに HTLV-I gp46 の中和エピトープを認識する中和抗体が HTLV-I の細胞間伝染を完全に阻害すると同時に、HTLV-I 感染者体内における HTLV-I 感染細胞の不死化をも監視することが分かってきた。この新たな観察は重要であり詳細な機序の解明が必要であるとともに、HTLV-I 感染および発症予防に対して CTL と同等に中和抗体の果たす生体防衛的役割は極めて大きいことを示している。したがって、HTLV-I envelope に対する中和抗体を効率よく誘導するワクチンが、HTLV-I の新規感染と HTLV-I の体内での増殖を制御するものと期待される。ワクチン作製と抗体医薬の作製と検証が次年度の作業ポイントである。

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。

A. 研究目的と背景

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。

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。主に母乳を介する母子感染の他にも水平感染感染に対する対策が早急に必要である。しかし、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。このような背景において、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と他の研究領域の専門家の経験と知恵を生かし、“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ことで目的を達成しようとしている。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、現在日本が進める HTLV-I 感染症対策に大きく貢献することと期待される。

B. 研究方法

班員総勢 8 名がそれぞれの研究機関において、試験管内および実験動物を用いて HTLV-I 感染実験やワクチンによる免疫誘導実験を行う。全ての研究は各研究機関のバイオハザード委員会、動物実験委員会、遺伝子組換え生物等使用実験安全委員会、臨床試験倫理委員会等の承認を得て行う。ヒトの細胞材料入手は提供者の同意を得て行い、その人の利益ならびに人権保護につとめるようサンプルとデータの取り扱いに十分配慮すること言は言うまでもない。

C. 一年間の研究結果

平成 23 年度の研究の第一の成果として、確立した感染防御実験系をフルに活用し、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。また、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も見いだした。したがって、中和抗体の誘導が HTLV-I 新規感染防御に重要であることが強く示唆された。

以下に具体的な成果を挙げる。

- (1) 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)
 - (a) 自家製単クローン抗体ライブラリーを用いて種々の HTLV-I 抗原の定性、定量法を確立した。
 - (b) *in vitro* で HTLV-I の中和抗体価を簡便に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、実際に中和抗体価を測定する方法を確立した。
 - (c) 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以前より報告されているが、この方法の観察期間短縮と最適な細胞の組み合わせを選択し、中和抗体等の細胞不死化阻止能を測定するアッセイ法を確立した。
 - (d) 中和抗体が、HTLV-I 感染患者体内ですでに HTLV-I に感染した T 細胞の抗原発現と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た。
- (2) 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
 - (a) HTLV-1 感染ヒト T 細胞株 MT-2 を用いた正常ラットへの経口感染では、腹腔感染に比べ HTLV-1 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ため、HTLV-1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-1抗体は陰性であることがわかった。
- (b) ラットの系での中和単クロン抗体の評価の準備を整えた。
- (3) 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
- (a) 実中研より供与された高度免疫不全マウス(NOD/SCID/ γ 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。
- (b) この系で、自家製抗HTLV-1中和モノクローナル抗体LAT-27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。つまり、この系での中和抗体の感染防御能を初めて証明した。
- (4) 研究分担者(伊藤)：ヒト化用マウス系統の開発と供給
- (a) 超免疫不全マウスNOD/SCID/ γ Cnull(NOG)マウスの計画生産を行い提供した。
- (b) 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。
- (c) 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。
- (5) 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
- (a) 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。
- (b) HTLV-I感染細胞の樹立研究は進行中である。
- (6) 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
- (a) HTLV-1 Taxの結合蛋白としてUbiquitin Specific Protease 10(USP10)を同定した。
- (b) USP10結合蛋白を網羅的に検索したところ、G3BP1が同定された。
- (c) 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ベストレス顆粒形成能が顕著に低下していた。
- (d) 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。
- (7) 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
- (a) 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 (gp46₁₈₀₋₂₀₄) 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。

- (b) 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。
- (c) 最終形としての三部構成複合体 (図 p46₁₈₀₋₂₀₄: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。

D. 考察

これまで述べた本年度の研究成果により、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の基盤となるウイルス感染阻止能の評価系がおおまかに整った。さらに HTLV-I 中和抗体が体内での新規 HTLV-I 感染と感染細胞の不死化を監視する重要な生体防御エフェクターであることが強く示唆された。来年度は、中和抗体の ADCC 活性やウイルス監視機能について in vitro, in vivo の系で詳細に検討することが必要と考えている。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

E. 結論

HTLV-I の中和エピトープを認識する単クローン抗体と HTLV-I 感染者由来の IgG は、

HTLV-I の細胞間伝染を完全に阻害すると同時に、HTLV-I 感染者体内における HTLV-I 感染細胞の不死化をも監視することが示された。抗体が HTLV-I 感染および発症予防に対して CTL と同等に生体防御的役割を果たしていると考えられる。したがって、HTLV-I envelope に対する中和抗体を効率よく誘導するワクチンが、HTLV-I の新規感染と HTLV-I の体内での増殖の制御に寄与するものと期待される。

F. 健康危険情報

特記すべき情報なし

G. 研究発表

各班員の報告を参照

II. 分担研究報告

HTLV-I 感染阻止 in vitro 評価系の確立

田中勇悦 琉球大学 大学院医学研究科 教授

要旨：ワクチンで誘導される抗体や医薬品の HTLV-I 感染防御能あるいは HTLV-I 感染細胞増殖抑制能を定量的に評価する in vitro 系として、(1)HTLV-I 合胞体形成抑制テスト、(2)正常 T 細胞不死化抑制テスト、(3)HTLV-I 感染者由来 T 細胞の HTLV-I 発現および不死化抑制テストの 3 方法を確立した。この方法を用いて、既存の抗 HTLV-I gp46 中和単クロン抗体と HTLV-I 感染者由来の血清 IgG が HTLV-I の新規感染と感染者由来の T 細胞の不死化を抑制することを見いだした。

A. 研究目的

一般に感染症に対するワクチンや新薬を開発するには、抗体や薬剤の抗ウイルス効果を定量的に評価する in vitro の系と小型動物を使った in vivo の系が不可欠である。初年度の本研究では、まず、自家製単クロン抗体ライブラリーを活用した HTLV-I 抗原測定系を確立すること、その系を使って抗体の HTLV-I 感染抑制能を in vitro で具体的に評価する系を作ることが目的とした。

B. 研究方法

HTLV-I 産生細胞は班員の神奈木教授より分与された HAM 患者由来 CD8+T 細胞株 ILT-M1、ATL 患者由来 CD4+T 細胞株 ILT-H2、他の IL-2 依存性 HTLV-I 感染細胞株および MT-2 細胞を使用した。非感染細胞 T 細胞株は Jurkat, Molt-4, CEM や PM-1 細胞を用いた。健常人末梢血単核球 (PBMC) は固相化 anti-CD3/可溶性 anti-CD28 抗体で 1 日刺激した。HTLV-I 感染者由来 PBMC として HAM 患者の PBMC を IL-2 を含む培地内で培養した。培養細胞の感染の判定には Lt-4 抗体による細胞内 Tax 抗原のフローサイトメトリー解析、培養上清中の gag p24 抗原の自家製 ELISA による定量システムを用いた。

使用したラット抗 HTLV-Igp46 IgG 単クロン抗体は報告済みで、中和能を持つ LAT-27 (gp46 アミノ酸 (aa) 191-196 を認識)、非中和抗体として LAT-12 (aa 175-199) および LAT-125 (aa 288-317) を使用した。HMA 患者血清から

Protein-G により IgG を精製した。

本研究は琉球大学のバイオハザード委員会、動物実験委員会、遺伝子組換え生物等使用実験安全委員会、臨床試験倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

(1) 合胞体形成阻止テスト：種々の HTLV-I 感染細胞株と非感染細胞株の組み合わせを検討し、HAM 患者由来 HTLV-I 感染 CD8+T 細胞株 ILT-M1 と非感染 T 細胞株 Jurkat とを 1 日間混合培養すると大きな合胞体が形成され、顕微鏡観察で容易に判定できることを見いだした。この形成は既存の HTLV-I 中和能を持つ単クロン抗体 LAT27 や HTLV-I 感染者 IgG で量依存的に阻止された。患者 IgG 間で中和価は異なっていたが、中和価は gp46 に対する抗体価と比例した。この方法は最も簡単な中和抗体価測定系である。

(2) 正常 T 細胞の不死化阻止テスト：正常人の末梢血単核球を OKT3 抗体と CD28 抗体で 24 時間活性化し、MMC 処理で増殖能を失活させた HTLV-I 感染細胞と in vitro で混合培養すると 2 週間程度で正常な T 細胞群の不死化と Tax 抗原発現および p24 抗原産生が確認できた。限界希釈法でみると ILT-M1 が不死化させる能力が最も強かった。この不死化は、LAT-27 や HTLV-I 感染者 IgG で完全に阻害された。

(3) HTLV-I 感染者由来 T 細胞の HTLV-I 発現および不死化抑制テスト：HTLV-I 感染者の末梢血単核球を短期間（24 時間以内）培養すると HTLV-I を産生する T 細胞が出現し、IL-2 を添加して培養すると不死化する例が多い。具体的に

は、HAM患者のPBMCを培養すると1日目にTax陽性の細胞が数～20%程度出現する。興味あることに、LAT-27の添加はTax陽性細胞の頻度を約50%に低下させた(n=3)。他の非中和抗体ではその効果がなかった。この培養系にIL-2を加え2週間培養すると不死化したTax陽性HTLV-I産生細胞が出現したが、LAT-27添加培養系では4週間の時点でもTax陽性細胞は出現しなかった(n=3)。同様な感染阻止は、中和活性を持つHAM患者由来の血清IgGでも観察された。

D. 考察

本年度の研究により、in vitroでのHTLV-I感染感阻評価系がおおまかに整った。さらにHTLV-I中和抗体が体内での新規HTLV-I感染と感染細胞の不死化を監視する生体防御エフェクターであることが強く示唆された。今後、中和抗体のADCC活性やウイルス監視機能についてin vitro, in vivoの系で詳細に検討することが必要と考える。

E. 結論

HTLV-I gp46の中和エピトープを認識する中和抗体は、HTLV-Iの細胞間伝染を完全に阻害すると同時に、HTLV-I感染者体内におけるHTLV-I感染細胞の不死化をも監視することが示唆された。HTLV-I感染および発症予防に対してCTLと同等に中和抗体の果たす生体防御的役割は極めて大きいと考えられる。

F. 健康危険情報

特記すべき情報なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Lee SJ, Lee JS, Shin MG, Tanaka Y, Park DJ, Kim TJ, Park YW, Lee SS. Detection of HTLV-1 in the Labial Salivary Glands of Patients with Sjogren's Syndrome: A Distinct Clinical Subgroup. *J Rheumatol*. 2012, in press
- (2) Enose-Akahata Y, Matsuura E, Tanaka Y, Oh U, Jacobson S. Minocycline modulates antigen-specific CTL activity through inactivation of mononuclear phagocytes in patients with HTLV-I associated neurologic disease. *Retrovirology*. 2012 Feb 15;9(1):16.
- (3) 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.
- (4) 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*. 2012,103:369-374.
 - (5) Shibata Y, Tanaka Y, Gohda J, Inoue J. Activation of the IκB kinase complex by HTLV-1 Tax requires cytosolic factors involved in Tax-induced polyubiquitination. *J Biochem*. 2011, 150(6):679-86.
 - (6) 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.
 - (7) 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.
 - (8) 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.
 - (9) 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.
 - (10) 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.

2. 学会発表

(国際学会)

- (1) saire R, Belrose G, Gross A, Olindo S, Lezin A, Dueymes M, Smadja D, Tanaka Y, Willems L, Mesnard J, Peloponese J. Opposite effect

of valproate on Tax and HBZ expression in T-lymphocytes from HTLV-1 asymptomatic carriers and HM/TSP patients. The Unlimited World of Microbes. XV International Congress of Virology. Sapporo, Japan. September 11-16, 2011:56.

- (2) Nakano K, Ando T, Ishida T, Ohsugi T, Tanaka Y, Watanabe T. A novel function of HTLV-1 Rex in inhibition of the host mRNA surveillance mechanism for protection of the viral genomic mRNA. The Unlimited World of Microbes. XV International Congress of Virology. Sapporo, Japan. September 11-16, 2011:113.
- (3) Iha H, Ikebe E, Kawaguchi A, Taguchi S, Nishizono A, Tanaka Y, Sawa H, Ogata M, Hori M, Fujisawa J, Hasegawa H. Molecular chaperon inhibitor-based treatment against ATL: its in vitro and in vivo evaluation. The Unlimited World of Microbes. XV International Congress of Virology. Sapporo, Japan. September 11-16, 2011:151
- (4) Saito M, Tanaka R, Kodama A, Matsuzaki T, Suehara M, Tanaka Y: Successful development of novel monoclonal antibodies against HTLV-1 bZIP factor and their applications in studying the pathogenesis of HAM/TSP. 15th International Conference on Human Retroviruses: HTLV and Related Viruses. 2010, 6. Leuven, Belgium.

(国内学会)

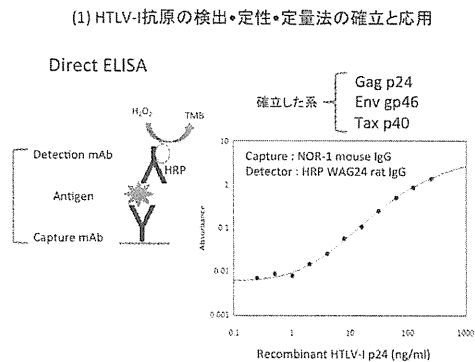
- (1) 田中勇悦, 田中礼子, 齊藤峰輝, 神奈木真理. HTLV-1 中和抗体による HTLV-1 感染阻害と細胞不死化の監視: 予防ワクチン開発の基盤. 第 40 回日本免疫学会学術集会・学術集会記録, 2011. 11. 27-29: 千葉県. 149.
- (2) 齊藤峰輝, 田中礼子, 松崎敏男, 末原雅人, 田中勇悦: HTLV-1 マイナス鎖にコードされる HBZ の HTLV-1 関連脊髄症における病因的意義. 第 52 回日本神経学会学術大会, 2011, 5. 名古屋
- (3) 齊藤峰輝, 田中礼子, 児玉 晃, 田中勇悦: HTLV-1 関連脊髄症(HAM)における OX40 陽性細胞の解析と HTLV-1 感染ヒト化マウス作製の試み. 第 64 回日本細菌学会九州支部総会・第 48 回日本ウイルス学会九州支部総会, 2011, 8. 北九州.
- (4) 齊藤峰輝, 田中礼子, 児玉 晃, 田中勇悦: ヒトリンパ球移植免疫不全マウス (hu-PBL-SCID)を用いた新規 HTLV-1 感染動物モデル作製の試み. 第 4 回 HTLV-1 研究会, 2011, 9. 東京.
- (5) 齊藤峰輝, 田中礼子, 田中勇悦: HTLV-1 関

連脊髄症(HAM)における HBZ 遺伝子発現の意義. 第 23 回日本神経免疫学会学術集会, 2011, 9. 東京.

H. 知的所有権の出願・登録状況

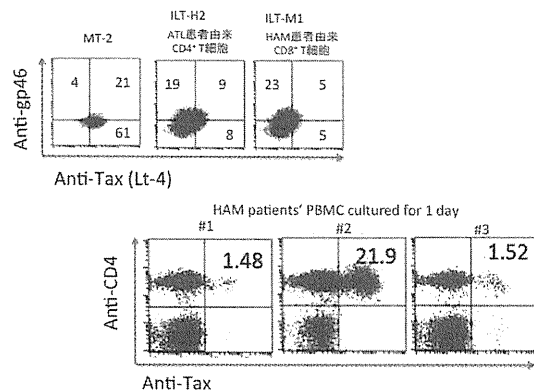
なし

(補足参考図)



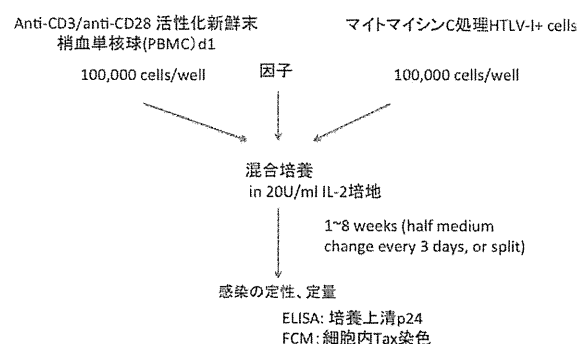
(2) HTLV-I抗原の検出・定性・定量法の確立

HTLV-I感染細胞のフローサイトメトリー(多重染色):感染細胞の同定



in vitro HTLV-I感染系の確立と応用

正常T細胞の不死化抑制実験プロトコル



ラットの HTLV-1 経口/血液感染系の確立と応用

神奈木真理 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 教授

要旨：成人 T 細胞白血病（ATL）の原因ウイルスであるヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型（HTLV-1）の感染者数は大都市部で増加傾向にあり問題視されている。妊婦に対する HTLV-1 検査の推奨ランクが上がり既に感染告知が開始されているが、感染拡大を阻止する有効なワクチンや抗体医薬が未だないのが現状である。本研究班では、新規感染防御ワクチンや抗体医薬等の開発を目的として、本年度は、新規ワクチン・抗体などの *in vivo* での感染防御効果を評価するため、HTLV-1 感染ヒト T 細胞株 ILT-M1 細胞を感染源としたラットの HTLV-1 感染系を確立した。これと平行して、HTLV-1 に対して中和活性を有することが示されている抗体（LAT-27）を受動免疫治療モデルの抗体薬の候補と想定し、まず *in vitro* の実験系でその効果を検討した。その結果、LAT-27 はラットの NK 細胞による抗体依存性細胞傷害活性（ADCC）を誘導し、感染細胞を傷害することがわかった。この結果は、LAT-27 が生体内において、HTLV-1 感染防御だけでなく ADCC を介した感染細胞排除に働く可能性を示している。今後、LAT-27 の感染防御効果、ADCC 誘導効果について *in vivo* の感染系で検証する予定である。

A. 研究目的

本研究は、HTLV-1 感染防御を目的とした新規ワクチン・抗体医薬などの開発には、生体内での感染防御効果についての検証が必要不可欠である。本年度は、その評価系を確立するため、HTLV-1 感染ヒト T 細胞株 ILT-M1 細胞を感染源としたラットにおける HTLV-1 感染系の作製を目的とした。

B. 研究方法

本研究は、本学実験動物委員会の承認を得て行われた。

1. HTLV-1 感染ヒト T 細胞株（ILT-M1 細胞）を感染源としたラットにおける感染系の確立

(i) ILT-M1 細胞の投与と感染の確認：ILT-M1 細胞（ $2\sim 3 \times 10^7$ 個）を、生後 4 週を経過した免疫正常ラット（F344N-Jcl rnu/+）に腹腔内、経口的あるいは経直腸的に投与した。投与後 2~4 ヶ月で、各ラットの末梢血単核球（PBMC）、ナイロンウールカラムにより分離した脾臓 T 細胞（Spl-T）および腸間膜リンパ節（MLN）における HTLV-1 プロウイルスを HTLV-1 pX 領域を標的とした PCR 法により確認した。

(ii) Particle Agglutination（PA）法による感染ラットにおける抗 HTLV-1 抗体の確認：投与後 2~4 ヶ月の感染ラットより血清を採取し、PA 法により抗 HTLV-1 抗体を定性的に検出した。

2. HTLV-1 に対する中和抗体（LAT-27）のラットにおける ADCC 誘導効果の検証

(i) HTLV-1 感染ラット不死化細胞（FPM1-V1AX）の HTLV-1 Env gp46 の発現：FPM1-V1AX 細胞表面上の、LAT-27 の認識抗原である gp46 の発現を FACS により評価した。

(ii) LAT-27 を用いた ADCC 試験：ヌードラット（F344N-Jcl rnu/rnu）の脾臓よりナイロンウールカラムを用いて NK 細胞を分離し、LAT-27 存在下であらかじめ ^3H で標識した FPM1-V1AX 細胞と 6 時間共培養し、NK 細胞の細胞傷害活性を測定した。

C. 研究結果

1. ILT-M1 細胞投与によるラットへの HTLV-1 感染の確認

ILT-M1 細胞を腹腔内、経口、経直腸投与したラットの PBMC、Spl-T、MLN より DNA を抽出し HTLV-1 pX 遺伝子を標的とした PCR を行った結果、どの投与経路を用いても PBMC、

Spl-T で HTLV-1 プロウイルスが検出された。

2. ILT-M1 細胞を投与されたラットの抗 HTLV-1 抗体産生

各感染ラットの血清中の抗 HTLV-1 抗体を PA 法により確認した結果、経口感染および経直腸感染ラットからは抗 HTLV-1 抗体は検出されなかった。一方、腹腔感染ラットの血清中から抗 HTLV-1 抗体が検出された。

3. FPM1-V1AX 上の HTLV-1 Env gp46 の発現

同系ラット由来 HTLV-1 感染 T 細胞株 (FPM1-VIAX) 細胞表面上の gp46 の発現を、LAT-27 抗体を用いて FACS で評価したところ、細胞表面上に発現が確認された。

4. NK 細胞を用いた ADCC 試験

LAT-27 あるいはコントロール抗体存在下で、FPM1-V1AX を NK 細胞と共培養したところ、コントロール抗体では NK 細胞による細胞傷害は認められなかったが、LAT-27 抗体では E/T ratio 依存的に細胞傷害が認められた。

D. 考察

本年度は、新規ワクチン・抗体医薬等による感染防御効果の生体内評価系を確立する目的で、HTLV-1 感染ヒト T 細胞株 ILT-M1 細胞によるラットの HTLV-1 感染系の樹立を試みた。HTLV-1 は主として感染母体の母乳を介して、乳幼児期に感染することから、消化管、特に腸管粘膜から感染すると考えられる。そこで、ILT-M1 細胞を腹腔内、経口投与のほかに、経直腸的に投与したところ、どの投与経路でも HTLV-1 感染が確認できた。これにより、ワクチンや抗体医薬に応じて、感染経路を変えて評価できるとともに、その感染防御効果について感染経路による違いを検討する良いツールになりうると考えられる。また、抗体医薬の候補と想定した LAT-27 は、ラットにおいて ADCC を誘発する効果を有していることがわかった。これは、生体内において HTLV-1 感染を中和する効果だけでなく、感染細胞の排除を誘導する効果を有していると考えられる。今後、LAT-27 の HTLV-1 感染防御効果および ADCC 誘導効果について、ラット生体内で検証する予定である。

E. 結論

新規ワクチン・抗体医薬等の感染防御効果に

関する生体内評価系として、HTLV-1 感染ヒト T 細胞株 ILT-M1 細胞を用いたラットの HTLV-1 感染系を作出した。また、抗体医薬としての候補である LAT-27 はラットにおいて ADCC を誘導し、感染細胞の除去に貢献できる可能性があることがわかった。

F. 健康危険情報

特記すべき情報なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kannagi M, Hasegawa A, Kinpara S, Shimizu Y, Takamori A, Utsunomiya A. Double control of viral expression by innate and acquired immunity in Human T-cell leukemia virus type-I infection. *Cancer Sci.* 102 : 670-676, 2011.
- 2) Takamori A, Hasegawa A, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Shimizu Y, Tamai Y, Sasada A, Zeng N, Choi I, Uike N, Okamura J, Watanabe T, Masuda T, and Kannagi M. Functional impairment of Tax-specific but not CMV-specific CD8⁺ T-cells in a minor population of asymptomatic HTLV-I-carriers. *Retrovirology*, 8:100, 2011.
- 3) Choi I, Tanosaki R, Uike N, Utsunomiya A, Tomonaga M, Harada M, Yamanaka T, Kannagi M, Okamura J. on behalf of the ATLL allo-HSCT Study Group. Long-term outcomes after hematopoietic SCT for adult T-cell leukemia/lymphoma: results of prospective studies. *Bone Marrow Transplantation* 46: 116-118, 2011.
- 4) 神奈木真理. 「ATL に対する免疫療法の展望」*血液フロンティア* 22: 251-257, 2012.

2. 学会発表

(国際学会)

- 1) Kannagi M, Kinpara S, Hasegawa A, Takamori A, Shimizu Y, Utsunomiya A. The roles of innate and acquired immune responses on HTLV-1 infection. 15th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Retroviruses. June, 2011, Leuven.
- 2) Hasegawa A, Takamori A, Utsunomiya A, Maeda

- Y, Yamano Y, Shimizu Y, Tamai Y, Sasada A, Na Zeng, Choi I, Uike N, Okamura J, Watanabe T, Masuda M, Okudaira T, and Kannagi M. Functional impairment of Tax-specific but not CMV-specific CTLs in a minor population of asymptomatic HTLV-I-carriers. 15th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Retroviruses. June, 2011, Leuven.
- 3) Kinpara S, Hayashi T, Hasegawa, A. Masuda T, Kannagi M. Anti-sense transcripts encoded by HTLV-I in ATL cells. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sept. 2011, Sapporo.
- 4) Takamori A, Hasegawa A, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Shimizu Y, Tamai Y, Sasada A, Zeng N, Choi I, Uike N, Okamura J, Watanabe T, Masuda T, and Kannagi M. Functional impairment of Tax-specific but not CMV-specific CD8⁺ T cells in a minor population of asymptomatic HTLV-1-carriers. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sept. 2011, Sapporo.
- 5) Hasegawa A, Takamori A, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Tamai Y, Sasada A, Choi I, Uike N, Okamura J, Watanabe T, Masuda T, and Kannagi M. Functional impairment of Tax-specific but not CMV-specific CD8⁺ T-cells in a minor population of asymptomatic HTLV-1-carriers. The XXV Symposium of the International Association for Comparative Research on Leukemia and Related Diseases. Sept. 2011, Tokyo.
- Immuno-therapy targeting for Adult T cell Leukemia/Lymphoma: Basic analysis and preparation for phase I clinical study. 第3回造血器腫瘍免疫療法研究会、2011年8月、別府
3. 山口ちひろ、笹田亜麻子、金原秀一、長谷川温彦、追木宏宣、田中勇悦、増田貴夫、神奈木真理. HTLV-1感染により誘導されるI型インターフェロン応答. 第4回 HTLV-1 研究会、2011年9月、東京
4. 笹田亜麻子、長谷川温彦、清水由紀子、末廣陽子、鶴池直邦、豊嶋崇徳、谷憲三郎、森尾友宏、福田哲也、三浦修、宇都宮與、松岡雅雄、岡村純、神奈木真理. ATLLに対する新規ペプチドパルス樹状細胞療法に向けた基礎解析と第1相臨床試験コールドラン. 第4回 HTLV-1 研究会、2011年9月、東京

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

(国内学会)

1. Kannagi M., Hasegawa A, Kinpara S, Shimizu Y, Takamori A, Utsunomiya A. 30 years after discovery of HTLV-1: Acquired and innate immunity against HTLV-1(HTLV-1に対する獲得免疫と自然免疫の二重制御). 第70回日本癌学会学術総会シンポジウム、2011年10月、名古屋
2. 笹田亜麻子、長谷川温彦、清水由紀子、末廣陽子、鶴池直邦、豊嶋崇徳、谷憲三郎、森尾友宏、福田哲也、三浦修、宇都宮與、神奈木真理. 成人 T 細胞白血病リンパ腫(ATL)に対する樹状細胞免疫療法に向けた、基礎解析と第1相臨床試験コールドラン. Dendritic cell

HTLV-1 感染予防ワクチン開発のための新規ヒト化マウスモデル系の確立

齊藤峰輝 琉球大学大学院医学研究科 准教授

研究要旨： HTLV-1 感染症の予防と HTLV-1 関連疾患に対する新規治療法開発のため、マウスの脾臓内に直接ヒト細胞を移植するヒト化法を用いて HTLV-1 感染マウスモデル系を開発した。高度免疫不全マウス (NOD/SCID/ γ Cnull: NOG) の脾臓内にヒト末梢血単核球とマイトマイシン処理した HTLV-1 感染 T 細胞株を同時移植し、2 週間後にマウスから脾臓細胞を回収して Tax、HBZ mRNA・蛋白の発現、HTLV-1 プロウイルス量を Real Time PCR、フローサイトメトリーで解析した。マウスの脾臓から分離したヒト CD4、CD8 陽性 T 細胞双方から HTLV-1 プロウイルス、Tax および HBZ mRNA が検出され、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。細胞あたりの HBZ mRNA 発現量は HAM 患者や無症候性キャリアーと同程度であったが、Tax mRNA 発現量は HTLV-1 感染者の PBMC 同様極めて低かった。HTLV-1 感染者の PBMC と同様に、マウスから回収したヒト PBMC に Tax 蛋白の発現は認められなかったが、短時間培養すると CD4 陽性 CCR4 陽性 T 細胞分画に選択的に発現誘導された。

A. 研究目的

ヒト T 細胞白血病ウイルス1型 (HTLV-1) は世界ではじめてヒト疾患との関連が見いだされたレトロウイルスであり、成人 T 細胞白血病 (ATL) および HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の原因ウイルスである。平成 20 年度に国立感染症研究所から報告された約 20 年ぶりの全国調査によると、我が国にはいまだに約 108 万人もの HTLV-1 感染者が存在しており、従来多かった九州・沖縄では減少しているものの、都市部では逆に増加している。ほとんどの HTLV-1 感染者が生涯にわたって未発症の無症候性キャリアー (asymptomatic healthy carrier: HC) として経過し、HAM や ATL を発症するのは感染者全体の 5% 前後ではあるものの、最も予後不良の白血病の一つである ATL は死亡者数が年間 1000 人を超え、HAM 患者では約 40% が経過中に歩行不能となり生活の質が著しく障害される。よって、HTLV-1 感染拡大を阻止するワクチンならびに抗体医薬等を開発することは HTLV-1 感染症制圧のために極めて重要である。この目的達成のため、本年度はまず、HTLV-1 の感染抑制効果を検討するための小型動物を用いた HTLV-1 感染モデル系の確立を試みた。

B. 研究方法

HTLV-1 非感染健康者から末梢血単核球

(PBMC) を密度勾配遠心法で分離した。PBMC とマイトマイシン処理した HTLV-1 感染 T 細胞株 (ILT-M1) を 1×10^6 個ずつ混合し、高度免疫不全マウス (NOD/SCID/ γ Cnull: NOG) の脾臓内に移植した (ヒトリンパ球移植免疫不全マウス: hu-PBL-SCID)。移植 2 週間後にマウスから脾臓細胞を回収し、磁気ビーズ (Miltenyi Biotec) を用いて CD4 および CD8 陽性 T 細胞を分離した。分離後、ゲノム DNA と全 RNA を AllPrep™ DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて同時に抽出し、さらに全 RNA から PrimeScript RT reagent Kit (Takara) を用いて逆転写反応を行い鋳型 cDNA を合成した。Tax、HBZ mRNA の発現は Real Time PCR で、Tax 蛋白の発現はフローサイトメトリーで解析した。HTLV-1 プロウイルス量 (=感染細胞数) は Real Time PCR で定量した。

C. 研究結果

マウスの脾臓から分離したヒト CD4、CD8 陽性 T 細胞双方から HTLV-1 プロウイルス、Tax および HBZ mRNA が検出され、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 (図 1)。細胞あたりの HBZ mRNA 発現量は HAM 患者や無症候性キャリアーと同程度であった (図 2A)。一方、Tax mRNA 発現量は HTLV-1 感染者の PBMC 同様極めて低かった (図 2B)。HTLV-1 感染者の PBMC と同様に、

マウスから回収したヒト PBMC に Tax 蛋白の発現は認められなかったが (data not shown)、短時間培養すると CD4 陽性 CCR4 陽性 T 細胞分面に選択的に発現誘導された (図 3)。

D. 考察

HTLV-1はヒトCD4陽性Tリンパ球を主要な感染標的細胞とするウイルスであり、マウスのT細胞には感染しない。そのため、HTLV-1感染症の病態・防御免疫機構を取扱いの容易な小型動物を用いて個体レベルで解析するため、高度免疫不全マウス (NOD/SCID/ γ Cnull: NOG) の脾臓内にヒトPBMCとマイトマイシン処理したHTLV-1感染T細胞株を同時移植するヒト化法 (hu-PBL-SCID) を用いた。この方法は、マウスの脾臓内に直接細胞を移植することで、移植するPBMCの数を腹腔内投与を用いた場合の約1/10にまで減らすことが可能であり、多くのマウスを一度に処理できる利点がある。今回の検討により、マウス生体内で感染させたヒトCD4、CD8陽性T細胞内のHTLV-1は、HAM患者や無症候性キャリアー (HC) に感染しているHTLV-1と同じ動態を示すことが明らかになった。すなわち、CD4陽性T細胞優位に感染し (HTLV-1プロウイルスが検出され)、未培養では検出できないTax蛋白が、短時間の培養によってCD4陽性CCR4陽性T細胞分面に選択的に発現誘導された。また、TaxおよびHBZ mRNAの細胞あたりの発現量もHTLV-1感染者 (HAM、HC) 由来の感染細胞とほぼ同程度であった。これらの結果は、比較的簡便に作製可能なこの系によって、ヒト生体内のHTLV-1感染をマウス体内で再現できることを示している。来年度以降は、この系を用いてHTLV-1感染者 (HAM患者、HC) から分離したIgG分画、HTLV-1中和活性のある抗gp46モノクローナル抗体、HTLV-1抗原で感作した免疫細胞 (成熟DC、CTL等) によるHTLV-1感染予防効果を検討したい。

E. 結論

簡便に作製可能な方法により、生体内でのHTLV-1感染を再現するヒト化マウスモデル系を確立した。今後はこのマウスモデルを用いて、抗HTLV-1モノクローナル抗体、HTLV-1抗原で感作した免疫細胞、各種薬剤等の効果について検討し、最も効率の良いHTLV-1感染防御法・治療法の開発を進めていきたい。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- [1] Saito M, Bangham CR. Immunopathogenesis of Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): Recent perspectives. *Leukemia Research and Treatment*. 259045, 2012. (Online Journal のため論文番号のみ)
- [2] Adachi T, Tanaka R, Kodama A, Saito M, Takahashi Y, Ansari AA, Tanaka Y. Identification of a unique CXCR4 epitope whose ligation inhibits infection by both CXCR4 and CCR5 tropic human immunodeficiency type-I viruses. *Retrovirology*. 8: 84, 2012.
- [3] Saito M. HTLV-1. *Encyclopedia of Genetics 2nd Edition*. Stanley Maloy, Kelly Hughes ed. Elsevier, Oxford, UK, in press, 2012.

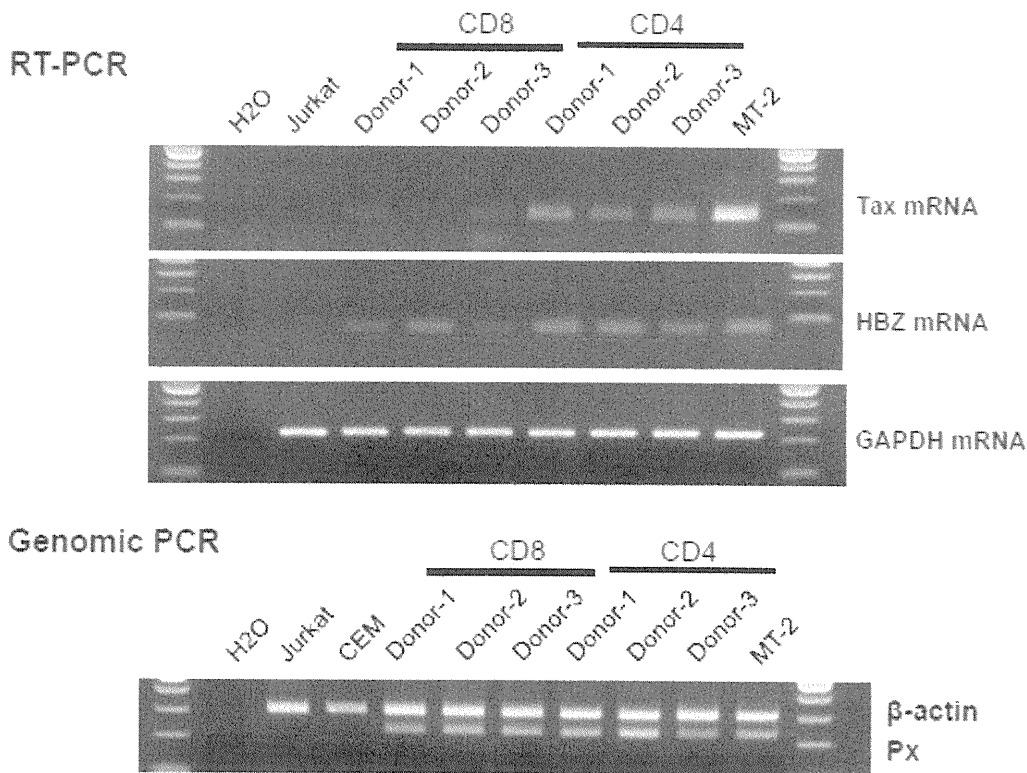
2. 学会発表

- [1] 第 52 回日本神経学会学術大会, 2011, 5. 名古屋 齊藤峰輝, 田中礼子, 松崎敏男, 末原雅人, 田中勇悦: HTLV-1 マイナス鎖にコードされるHBZ のHTLV-1関連脊髄症における病因的意義.
- [2] 15th International Conference on Human Retroviruses: HTLV and Related Viruses. 2010, 6. Leuven, Belgium. Saito M, Tanaka R, Kodama A, Matsuzaki T, Suehara M, Tanaka Y: Successful development of novel monoclonal antibodies against HTLV-1 bZIP factor and their applications in studying the pathogenesis of HAM/TSP.
- [3] 第 64 回日本細菌学会九州支部総会・第 48 回日本ウイルス学会九州支部総会, 2011, 8. 北九州 齊藤峰輝, 田中礼子, 児玉 晃, 田中勇悦: HTLV-1 関連脊髄症(HAM)におけるOX40 陽性細胞の解析とHTLV-1 感染ヒトマウス作製の試み.
- [4] 第 4 回 HTLV-1 研究会, 2011, 9. 東京 齊藤峰輝, 田中礼子, 児玉 晃, 田中勇悦: ヒトリンパ球移植免疫不全マウス (hu-PBL-SCID)を用いた新規 HTLV-1 感染動物モデル作製の試み.
- [5] 第 23 回日本神経免疫学会学術集会, 2011, 9. 東京 齊藤峰輝, 田中礼子, 田中勇悦: HTLV-1 関連脊髄症(HAM)におけるHBZ 遺伝子発現の意義.

H. 知的所有権の出願・登録状況

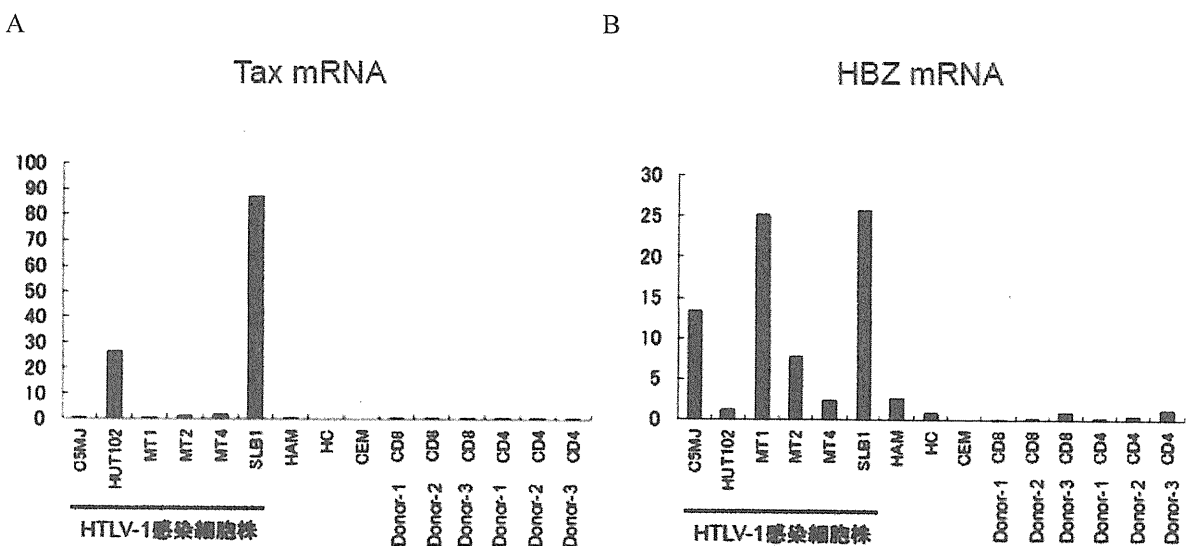
なし

図1: ヒトリンパ球移植免疫不全マウス (hu-PBL-SCID) 体内でヒト末梢血単核球 (PBMC) に HTLV-1 感染が成立する。



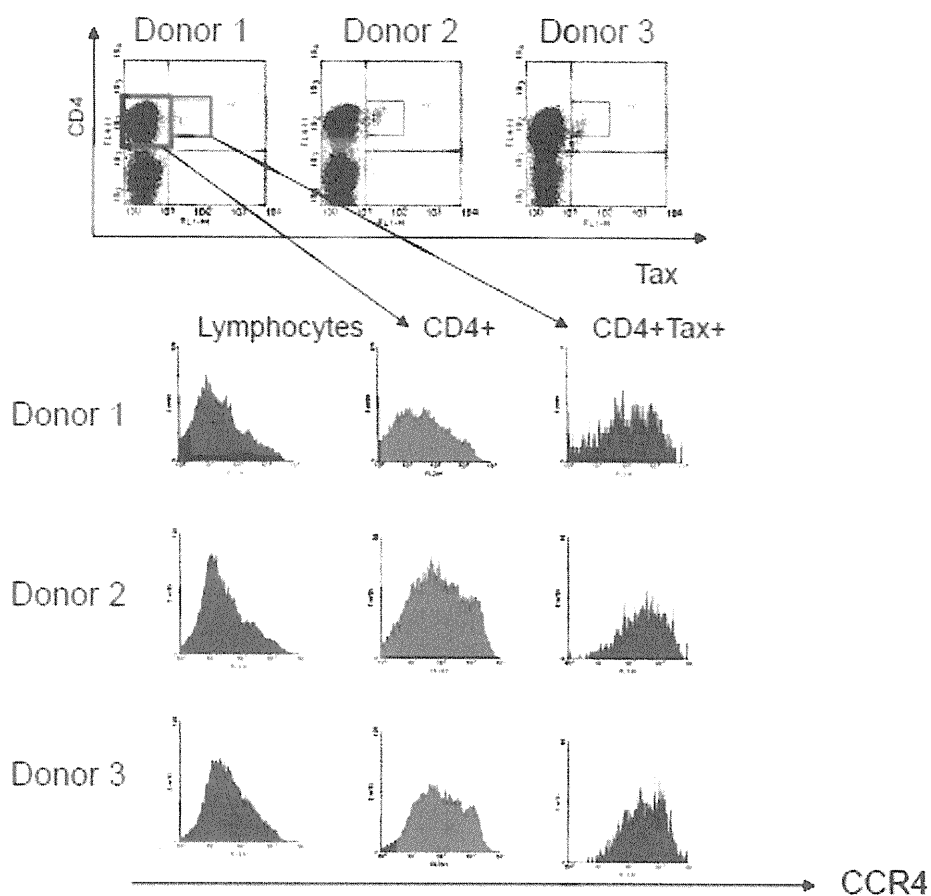
高度免疫不全マウス (NOD/SCID/ γ Cnull: NOG) の脾臓内にヒト末梢血単核球 (PBMC) とマイトマイシン処理した HTLV-1 感染 T 細胞株 (ILT-M1) を同時移植した。移植 2 週間後にマウスから脾臓細胞を回収し、磁気ビーズ (Miltenyi Biotec) を用いて CD4 および CD8 陽性細胞を分離した。分離後、ゲノム DNA と全 RNA を抽出し、さらに全 RNA から逆転写反応を行い鋳型 cDNA を合成した。Tax、HBZ mRNA の発現、HTLV-1 プロウイルスの有無を PCR で解析した。

図 2: マウスから回収したヒト PBMC における細胞あたりの HTLV-1 mRNA 発現量



細胞あたりの HBZ mRNA 発現量は HAM 患者や無症候性キャリアー (asymptomatic healthy carrier: HC) と同程度であった。一方、Tax mRNA 発現量は HTLV-1 感染者の PBMC 同様極めて低かった。

図 3: hu-PBL-SCID マウス体内で感染したヒト PBMC における HTLV-1 Tax 蛋白の発現誘導。



HTLV-1 感染者の PBMC と同様に、マウスから回収したヒト PBMC を *in vitro* で 16 時間培養すると、CD4 陽性 CCR4 陽性 T 細胞分画に Tax 蛋白が発現誘導された。

ヒト化用マウス系統の開発と供給

伊藤守 公益財団法人実験動物中央研究所 実験動物研究部

要旨：我々は重度免疫不全 NOG マウスにヒトインタロイキン 2 (hIL-2) 遺伝子を導入し、末梢血で 1～5 ng/ml 分泌するトランスジェニック NOG (NOG-hIL-2) マウスを作製した。このマウスはヒト細胞を拒絶することなく生着させ、HTLV-1 の増殖に必要な hIL-2 を分泌することから、HTLV-1 感染モデルとして有用と考えられる。このマウスを HTLV-1 感染研究に用いるために生産コロニーの立ち上げを行い、研究班への供給を行った。加えて、NOG-hIL-2 マウスのヒト化マウスとしての特性を検討した。NOG マウスにヒト末梢血単核球 (PBMC) を移入すると、T 細胞の増殖により急性移植片対宿主病 (GVHD) により死亡するが、PBMC から CD8+ T 細胞を単離し、移入すると NOG マウスは GVHD を発症しない。しかし、この CD8+ T 細胞を NOG-hIL-2 マウスに移入すると早期の GVHD が発症する。すなわち、CD8+ T 細胞はこのマウス内の hIL-2 の刺激によって活性化し、GVHD を引き起こすことが明らかとなった。

A. 研究目的

HTLV-1 感染症の拡大を阻止するワクチンならびに抗体医薬の開発のためには HTLV-1 に感染する動物モデルは必須である。しかしながら、免疫学的に正常なマウスは HTLV-1 に感染しない。したがって、ヒト細胞が生着し、その中で HTLV-1 が感染するヒト細胞を持ったヒト化マウスが必要となる。一般的に HTLV-1 は患者では感染しても発症しないか、または発症に時間を要する。この発症機序の研究に動物モデルは極めて重要と考えられる。本研究は、ヒトの細胞を拒絶せず、増殖させる重度免疫不全 NOG マウスに改良を加えることによって、HTLV-1 感染症のためのワクチンならびに抗体医薬の開発に適切な動物モデルを作製すること、およびその生産と本研究班への供給を目的とした。

B. 研究方法

重度免疫不全 NOG マウスの前核期胚に、CMV プロモーター下にヒト IL-2 遺伝子を配した遺伝子を注入することによって得た NOG-hIL-2 マウ

スは、血清中に 1～5 ng/mL が検出される。

HTLV-1 感染モデル作製のために、本マウスの凍結保存胚からの個体復元を行い、生産コロニーの樹立を行う。得られた生産コロニーで生産した産子を、研究班（琉球大学）に搬出する。

NOG-hIL-2 マウスのヒト化マウスとしての特性を調べるために、NOG-hIL-2 および NOG マウスに健常人から得られた PBMC 2.5×10^6 を尾静脈より移入し、各々マウスの細胞生着、増殖性およびマウスの体重の変化および生存率を検討した。また、PBMC を Magnetic beads (MACS, Miltenyi Biotec) を用いて、CD4+ および CD8+ T 細胞に分離し、各々細胞 2.5×10^6 を、または CD4+, CD8+ を混合させたものを、NOG-hIL-2 および NOG マウスの尾静脈より移入し、同様の検討を行った。本研究は、公益財団法人実験動物中央研究所（実中研）の遺伝子組換え安全委員会、動物実験委員会および研究倫理審査委員会の承認を得て行い、動物愛護および検体供与者の利益ならびに人権保護の取り扱いに十分配慮した。

C. 研究結果

NOG-hIL-2 マウスの生産と供給

NOG-hIL-2 マウスの凍結保存胚から個体復元を生殖学的手法で行い、産子を得た。得られた産子の♂9匹、♀9匹の計18匹（半数がTgマウス）を琉球大学に輸送した。また、残りの産子を用いて、PF ビーニールアイソレーター内でのペア交配による生産を開始した。これらマウスでは、凍結前後のマウス血清中 hIL-2 量に差は認められなかった。

NOG-hIL-2 マウスにおける GVHD

PBMC 移入後の NOG-hIL-2 および NOG マウスの生存率を比較した。その結果、NOG-hIL-2 マウスでは移入後2週間以内に全例死亡したが、NOG マウスではその期間では全例生存した。すなわち、NOG-hIL-2 マウス内では、hIL-2 によりヒト T 細胞が活性化、増殖することが明らかとなった。そこで、PBMC より分離した CD4+ および CD8+ T 細胞移入での、NOG-hIL-2 および NOG マウスの GVHD を検討した。CD4+ T 細胞移入群では NOG-hIL-2 および NOG マウスともに GVHD が発症した。一方、CD8+ T 細胞移入群では、NOG-hIL-2 マウスで極めて早期の GVHD で全例死亡した。一方、NOG マウスでは GVHD の発症は認められなかった。この移入実験で、CD4+ T 細胞と CD8+ T 細胞での GVHD の発症の表現型が異なることが明らかとなった。

D. 考察

本年度は、NOG-hIL-2 マウスの HTLV-1 感染モデルとしての検討のために、本マウスの生産コロニーの確立と供給を行い、また NOG-hIL-2 マウスの PBMC 移入後の特性を明らかにした。

NOG-hIL-2 マウス凍結卵より復元した産子での hIL-2 産生量、および遺伝子伝達率は、通常生産で得られる結果とほぼ同等で、凍結保存

の影響はないことが明らかとなり、その産子での生産が問題ないと考えられた。

NOG マウスでの hIL-2 産生量は血清中で 1~5 ng/mL と極めて高濃度に産生されている。このマウスでの hIL-2 による T 細胞の活性化は、PBMC 移入後の NOG-hIL-2 マウスでの細胞の増殖と早期の死亡で確認された。また、このマウスではヒト細胞を拒絶できない。したがって、HTLV-1 感染ヒト細胞または細胞株の移植が可能であり、また hIL-2 が高濃度に分泌されていることから、HTLV-1 感染細胞の増殖には極めて向いており、抗体医薬の検定系として使えると考えられた。

興味深いことに、NOG マウスに CD8+ T 細胞を移入しても GVHD は発症してこない。これに少量の CD4+ T 細胞を混入させることによって、極めて重篤な GVHD を発症することが分かった。また、NOG-hIL-2 マウスでは、CD8+ T 細胞単体移入でも同様の GVHD が発症することが分かった。すなわち、NOG-hIL-2 マウスでは、移入された CD8+ T 細胞が hIL-2 で活性化されることで GVHD が発症すると説明でき、CD8+ T 細胞に CD4+ T 細胞を混入すると認められる GVHD は CD4+ T 細胞から分泌される hIL-2 による CD8+ T 細胞と考えられた。また、CD4+ T 細胞、CD8+ T 細胞の移入によって異なる GVHD を発症することから、GVHD の興味深いモデルにもなる可能性が示唆された。また、NOG-hIL-2 マウスでの感染モデルを考える時、CD4+ および CD8+ T 細胞での HTLV-1 感染の面白いモデルとなりうると考えられる。

E. 結論

HTLV-1 感染症モデルとしての NOG-hIL-2 マウスの有用性を調べる目的で、本マウスの生産を確立し、供給を行った。また、NOG-hIL-2 マ