

201123057A

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-1 感染症予防ワクチンの 開発に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

平成24年 3 月

研究代表者 長谷川 秀樹

(国立感染症研究所)

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-1 感染症予防ワクチンの 開発に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

平成24年 3 月

研究代表者 長谷川 秀樹

(国立感染症研究所)

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

HTLV-1感染症予防ワクチンの開発に関する研究

班員名簿

長谷川 秀樹	国立感染症研究所感染病理部	部長
俣野 哲朗	国立感染症研究所エイズ研究センター	センター長
梁 明秀	横浜市立大学医学部微生物学	教授
外丸 詩野	北海道大学大学院医学研究科	講師
田中 正和	関西医科大学微生物学	助教

目 次

I. 総括研究報告書

- HTLV-1 感染症予防ワクチンの開発に関する研究 1
研究代表者：長谷川 秀樹 (国立感染症研究所感染病理部)

II. 分担研究報告書

1. HTLV-1 感染阻止の為の粘膜免疫誘導に関する研究 9
研究分担者：長谷川 秀樹 (国立感染症研究所感染病理部)
2. HTLV-1 感染細胞を標的とする細胞性免疫反応に関する研究 15
研究分担者：俣野 哲朗 (国立感染症研究所エイズ研究センター)
3. 微量抗体検出法の開発と抗原エピトープの決定に向けた基盤研究 19
研究分担者：梁 明秀 (横浜市立大学医学部微生物学)
4. ワクチン評価の為の免疫老化モデルマウスの研究 23
研究分担者：外丸 詩野 (北海道大学大学院医学研究科)
5. HTLV-1 感染ヒト化マウスにおける ATL 様病態と抗 HTLV-1 免疫 27
研究分担者：田中 正和 (関西医科大学微生物学)

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 33

I. 総括研究報告書

総括研究報告書

HTLV-1感染症予防ワクチンの開発に関する研究

研究代表者 長谷川 秀樹 国立感染症研究所感染病理部 部長

研究要旨 HTLV-1は国内に100万人を超える感染者がおり過去20年間でその数は僅かに減ったのみである。今後日本国内から感染者を減らす為に感染予防ワクチン及び成人T細胞性白血病(ATL)発症予防ワクチンの開発を目的とする。HTLV-1がコードするすべての全長タンパク質を合成しワクチン抗原および抗体アッセイに用いる。感染の予防を目指して粘膜免疫を利用し母乳への抗体誘導の試みや発症予防を目指しHTLV-1感染細胞を標的とする細胞性免疫反応の増強法の開発のため細胞傷害性Tリンパ球(CTL)反応の解析を進めることとした。CTL増強のためのデリバリーシステムとして有用と考えられるセンダイウイルスベクターを用い、感染慢性期のウイルス抗原特異的CTL増強能を確認した。またワクチンの評価系としてHTLV-1感染ヒト化マウスにおいてATL様病態と抗HTLV-1ヒト宿主免疫系が再現できる事が確認されヒト免疫系を基盤としたHTLV-1関連疾患発症予防ワクチン開発における動物モデルとしての利用が期待される。発症に免疫の老化に係る事より免疫老化のマウスモデルを用い、ワクチン効果の影響を明らかにする。

研究分担者

俣野 哲朗 (国立感染症研究所エイズ研究センター・センター長)

梁 明秀 (横浜市立大学医学部微生物学・教授)

外丸 詩野 (北海道大学大学院医学研究科・講師)

田中 正和 (関西医科大学微生物学・助教)

病やリンパ腫(ATL)などの血液系の悪性疾患やHTLV-1関連脊髄症(HTLV-1 associated myelopathy:HAM)等の重篤な神経疾患が引き起こされる。また国内に約108万人以上いると推定される感染者は、九州地方から人口の移動により関東や関西の大都市圏に移りそれらの地域では増加しており全国への拡散傾向が見られている。またこれらのHTLV-1感染者の中から今後成人T細胞性白血病(ATL)を発症する人が約5万人いると推計される。HTLV-1感染者のATL発症を防ぐ為のワクチンも同時に望まれている。そこで本研究ではHTLV-1感染症予防および発症予防を目指したワクチン開発を目的とする。

A. 研究目的

HTLV-1感染症はヒトT細胞白血病ウイルス1型(Human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1)の感染によっておこる感染症であり、感染者(キャリア)の中から成人T細胞白血

B. 研究方法

1. 抗原の作成と解析

HTLV-1 ATK-1 (HTLV1A) がコードする 7 種類のウイルス遺伝子 (gag, env, TAX-1, HBZ, p27REX, p27I, p30II) について、ヒトコドンに最適化した人工遺伝子を合成した。これらの遺伝子を制限酵素処理後、コムギ無細胞タンパク質合成系の発現ベクターである pEU-E01-bls-S1 にサブクローニングしコムギ無細胞合成系・重層法によりタンパク質合成を行った。

2. ワクチン投与ルートの検討

HTLV ワクチンの効果的な接種ルートを調べるためにワクチン抗原ができるまで、モデル抗原を用いて経鼻粘膜投与でワクチン接種した際に母乳中の抗原特異的 IgA 抗体と IgG 抗体を調べた。モデル抗原として、HA ワクチンを用いた。粘膜アジュバントとして、TLR3 に対するアゴニストである合成二本鎖 RNA の Poly(I:C)を用いた。ワクチンを 3 週間間隔で 2 回経鼻接種した後に妊娠させ出産後の母乳を回収し母乳中の抗体応答を測定した。母乳中 HA 特異的 IgA 抗体、IgG 抗体応答は、A/PR8 HA に対する ELISA により測定した。

3. CTL 解析

慢性ウイルス潜伏感染における SeV ベクター接種による抗原特異的 CTL 増強効果を検証するため、以前のワクチン接種後の SIV チャレンジ実験で SIV 複製がコントロールされたアカゲサル末梢血リンパ球を用いて、ペプチド刺激後のインターフェロン γ 誘導を細胞内免疫染色で検出することにより、抗原特異的 CTL 反応を測定した。

核内蛋白 Tat 抗原特異的 CTL 反応測定系の確認のため、SIV 感染サル末梢血リンパ球を用いて、Tat オーバーラッピングによる抗原刺激後のインターフェロン γ 誘導を細胞内免疫染色で検出することにより、Tat 抗原特異的 CTL 反応を測定した。

4. ヒト化マウスの作製

京阪臍帯血バンクより提供された研究用臍帯血より CD133 陽性細胞分離磁気ビーズを用いて造血幹細胞 (CD133 陽性細胞) を分離した。CD133 陽性細胞 5×10^4 個を、予め 5Gy の γ 線全身照射処置した 7 週齢 NOG-SCID マウス大腿骨骨髓内へ移植した。移植 1 ヶ月後に骨髓細胞を一部採取し FACS にて CD45 陽性ヒト骨髓細胞の生着および分化を測定・確認した。骨髓移植 4 ヶ月時に、末梢血における CD3 陽性ヒト T リンパ球の発現を確認後、同ヒト化マウス腹腔内に放射線照射 (10Gy) により増殖能を欠失させた HTLV-1 感染 MT-2 細胞 2.5×10^6 個を接種した。MT-2 細胞接種後、2 週間毎に末梢血を採取し、感染ヒト血球細胞の動態を FACS 解析にて、また HTLV-1 感染細胞数の計測を定量的 PCR 法にて行った。感染ヒト化マウスは体重の減少を指標に供死し、脾臓および各種浸潤臓器における感染細胞の解析を行った。

5. 免疫老化マウスの作成

プロテアゾーム $\beta 5t$ cDNA を全身発現するトランスジェニックマウスを作成した。実験には雄性 $\beta 5t$ -Tg と雌性 B6 野生型 (wild type; WT) マウスを交配した F1 マウスを用いた。

C. 研究結果

1. 抗原の作成と可溶化の検討

無細胞系を用いた HTLV-1 全長タンパク質の合成

HTLV-1 タンパク質の合成を効率化するために、ヒトコドンに最適化した人工 HTLV-1 遺伝子を合成した。次に真核生物型無細胞タンパク質合成技術であるコムギ胚芽タンパク質合成システムを用いて、リコンビナント HTLV-1 全長タンパク質の作製を試みた結果 HTLV-1 がコードする 7 種類のウイルス遺伝子 (gag, env, TAX-1, HBZ, p27REX, p27I,

p30II) 全ての全長タンパク質の合成が確認された。

タンパク質の可溶化を検討するため、ビオチン化全長タンパク質を、ストレプトアビジンセファロースビーズによるカラム法を用いて簡易精製し可溶化および非可溶化分画を回収し、ウエスタンブロットを行った。その結果、Gag、HBZ および Tax タンパク質の可溶性がきわめて低いことが判明した。界面活性剤である Brij35 添加により顕著に可溶性が亢進することが判明した。Rex, p27, Tax, p30, HBZ, Gag の 6 つの全長タンパク質が可溶化できた。(梁)

2. ワクチンの接種ルートを検討

HTLV-1 の感染ルートには母乳を介して母親から子へ感染する垂直感染と血液や性行為による水平感染とがある。我々は HTLV-1 の母乳を介する感染を阻止する為にモデル抗原を用い、母乳に抗体を誘導する方法を試みた。妊娠前の Balb/c マウスに対し HA 抗原を粘膜アジュバントとして poly(I:C) と共に経鼻接種した。ワクチンにより誘導された HA 特異的 IgA 抗体は出産後母乳中に分泌され、出産後日が経つごとに抗体量が増加していった。妊娠前にワクチン接種したマウスにおいて出産後母乳中にワクチン特異的な IgG 抗体も含まれており IgA の約 10 倍の濃度であった。妊娠前の母体を粘膜経路でワクチン接種する事により出産後の母乳中にワクチン特異的 IgA 抗体だけでなく IgG 抗体も誘導することを確認した。経母乳感染する HTLV-1 の感染防御ワクチンのワクチンルートとして粘膜投与の可能性が示唆された。(長谷川)

3. CTL の検討

モデル抗原を用いたワクチンデリバリーとして SeV-Gag ベクター接種に用いた。ワクチン接種後、SIV チャレンジ前のサルで Gag206-216 エピトープおよび Gag241-249 エピトープ特異的 CTL 反応が誘導されたが、感

染慢性期にはこれらの CTL 反応レベルは低下し検出限界付近あるいはそれ以下であった。SeV-Gag ベクター経鼻接種後 1 週目の末梢血リンパ球を用いた解析では、Gag206-216 特異的 CTL および Gag241-249 特異的 CTL 反応の増強が認められた。また、別の SIV 感染サルの末梢血リンパ球を用いた解析では、Tat 抗原特異的 CTL 反応が測定できた。(俣野)

4. ヒト化マウスの作成

HTLV-1 感染時の病態の理解とワクチン評価の為にヒト化マウスを作成した。γ 線全身照射 (5Gy) 処置した 6 週齢 NOG-SCID マウス下肢大腿骨骨髓内にヒト臍帯血由来 CD133 陽性造血幹細胞 (5×10^4 個) を注入・移植したところ、2 ヶ月後には骨髓中に 90% 以上の効率で CD45 陽性ヒト血球細胞の生着が達成された。さらに、血球分化特異抗体を用いて骨髓内のヒト血球系細胞を解析した結果、B 細胞、骨髓系前駆細胞、単球/マクロファージ、樹状細胞の分化・増殖が確認された。さらに移植 4 カ月後においては、末梢血中に CD4 および CD8 陽性の CD3 陽性成熟 T 細胞がヒト正常個体と同等の CD4/CD8 比で発現しており、CD45RO 陽性メモリー T 細胞への分化も確認された。(田中)

5. ヒト化マウスへの HTLV-1 感染

末梢血中にヒト T 細胞が確認された段階のヒト化マウス (骨髓移植 4 ヶ月後) 腹腔内へ HTLV-1 感染細胞である MT-2 細胞 (2.5×10^6 細胞数) を放射線処理 (10Gy) 後に接種し、HTLV-1 感染を行った。感染 2 週間後から末梢血 CD3 陽性ヒト T 細胞数の増大が観察され、感染 2~3 カ月で 100 倍以上にまで達した。肝臓ならびに脾臓の腫大も観察され、末梢血には異型リンパ球数の出現が見られた。さらに感染 4 カ月以降では、ATL 患者末梢血で特徴的に見られる花弁様分葉核を持つ細胞が観察された。

HTLV-1 感染ヒト化マウスにおける抗

HTLV-1 ヒト宿主免疫の発現を確認するため、まず血清中における抗 HTLV-1 抗体の産生を測定した。抗 HTLV-1 gag IgG 抗体の発現が確認された。また同マウス体内における機能的抗 Tax CTL の存在が確認された。(田中)

6. 免疫老化マウスの作成と解析

免疫老化マウスモデルとしてプロテアソーム $\beta 5t$ -Tg マウスを作成し末梢血の白血球数、リンパ球数、T 細胞分画について、フローサイトメトリーにより解析を行った。その結果、白血球数、リンパ球数に $\beta 5t$ -Tg と WT マウス間に有意な差は認めなかった。T 細胞を CD4+ T 細胞と CD8+ T 細胞に分けて CD4/CD8 比を解析した結果では、 $\beta 5t$ -Tg マウスで有意に CD4/CD8 比が増加していた。 $\beta 5t$ -Tg マウス胸腺細胞では TCR β 発現が低い CD8+ SP 細胞の割合が増加し、中等度～高発現を示す CD8+ SP 細胞が減少していることが明らかとなった。そのような TCR β 発現の低下は CD8+ SP 細胞に特異的であり、DP 細胞や CD4+ SP 細胞では WT マウスと同程度の発現が観察された。(外丸)

D. 考 察

ワクチン抗原候補の作成にコムギ無細胞タンパク質合成システムを活用し、全長 HTLV-1 抗原タンパク質の作製を行った。このシステムは、真核型の無細胞タンパク質生産であるため、真核細胞に発現するタンパク質を自由に生産することが可能である。特にウイルス由来のタンパク質の生産においては、従来の大腸菌や昆虫細胞を用いた発現系より高い実績が示されている。

一方、効果的なワクチン開発には対象疾患の病態を理解した上で効果的な免疫を誘導する必要がある。HTLV-1 は母乳を介した母子感染が問題となっている。モデル抗原を用いたワクチン投与ルートの検討でワクチン抗原を粘膜経路で接種する事により母乳中にワクチン特異的な抗体が誘導される事が示された。

チン特異的な IgA 抗体と IgG 抗体が誘導される事が明らかとなった。母乳中の抗体を誘導する事により母子感染を防ぐことができる可能性がある事が示された。またこれまで SeV ベクターの優れた抗原特異的 CTL 反応誘導能を報告してきたが、本研究では、ウイルス潜伏感染慢性期にウイルス抗原特異的 CTL 反応が検出限界付近となっている状況での SeV ベクター接種による抗原特異的 CTL 増強能をサルにて確認した。また、核内蛋白 Tax 抗原と類似の局在・機能性を示す Tat 抗原特異的 CTL 反応測定を行った。HTLV-1 感染発症防御に結びつく CTL の標的抗原の検討を進める計画である。

ヒト造血幹細胞の NOG マウス骨髄内移植法により作成したヒト化マウスは、これまで報告されている種々のヒト化マウスと比較し、ヒト造血細胞の生着率および T 細胞の分化・維持の程度において優れていることが示唆された。同ヒト化マウスに HTLV-1 を感染させることにより、感染 CD25 陽性 CD4 T 細胞の異常増殖に加え、ATL に特徴的である花弁様分葉核を持った T リンパ球の出現を見たことから、ATL の病態の多くを再現していると考えられる。また免疫応答の加齢による変化に関して、プロテアソームの機能異常という着眼点に基づき、基礎的な検討を行った。その結果、プロテアソーム機能の減弱した遺伝子改変マウス（老化マウスモデル、 $\beta 5t$ -Tg）では CD4/CD8 比の増加や CD8+ T 細胞機能の低下を認め、いわゆる免疫老化に類似した異常を呈している可能性が示された。

E. 結 論

ワクチン抗原候補の検討の為 HTLV-1 がコードする 7 種類のウイルス遺伝子 (gag, env, TAX-1, HBZ, p27REX, p27I, p30II) 産物が合成できた。ワクチン抗原を妊娠前の母体に経粘膜投与する事により出産後の母乳中にワクチン特異的な抗体が誘導される事が示された。

HTLV-1 に感染している母親に経粘膜ワクチン投与により母子感染を防げる可能性が示唆された。また CTL 増強のためのデリバリーシステムとして有用と考えられる SeV ベクターのサルへの経鼻接種実験により、ウイルス潜伏感染慢性期の抗原特異的 CTL 増強能を確認した。また、標的抗原候補の一つである Tax 抗原と類似の局在を示す Tat 抗原特異的 CTL 反応の測定法を確認した。HTLV-1 感染およびワクチン評価の為のモデルとしてヒト化マウスでの HTLV-1 感染及び ATL 様疾患の発症が確認されプロテアソーム $\beta 5t$ -Tg マウスでは免疫老化が確認された。これらの研究結果を有機的に結び付けて HTLV-1 ワクチンの開発につなげる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yanagita H, Yamamoto N, Fuji H, Liu X, Ogata M, Yokota M, Takaku H, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T. Mechanism of Drug Resistance of Hemagglutinin of Influenza Virus and Potent Scaffolds Inhibiting Its Function. ACS Chem Biol. 2012 Jan 13.
- 2) Ainai A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine. J Med Virol. 2012 Feb;84(2):336-44.
- 3) Nakao R, Hasegawa H, Ochiai K, Takashiba S, Ainai A, Ohnishi M, Watanabe H, Senpuku H. Outer membrane vesicles of Porphyromonas gingivalis elicit a mucosal immune response. PLoS One. 2011;6(10):e26163. Epub 2011 Oct 14.
- 4) Suzuki T, Ainai A, Nagata N, Sata T, Sawa H, Hasegawa H. A novel function of the N-terminal domain of PA in assembly of influenza A virus RNA polymerase. Biochem Biophys Res Commun. 2011 Nov 4;414(4):719-26. Epub 2011 Oct 6.
- 5) Fukumoto H, Kanno T, Hasegawa H, Katano H. Pathology of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection. Front Microbiol. 2011;2:175. Epub 2011 Aug 25.
- 6) Nakajima N, Sato Y, Katano H, Hasegawa H, Kumasaka T, Hata S, Tanaka S, Amano T, Kasai T, Chong JM, Iiduka T, Nakazato I, Hino Y, Hamamatsu A, Horiguchi H, Tanaka T, Hasagawa A, Kanaya Y, Oku R, Oya T, Sata T. Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection. Mod Pathol. 2012 Jan;25(1):1-13. Epub 2011 Aug 26.
- 7) Nomura W, Masuda A, Ohba K, Urabe A, Ito N, Ryo A, Yamamoto N, Tamamura H. Effects of DNA Binding of the Zinc Finger and Linkers for Domain Fusion on the Catalytic Activity of Sequence-Specific Chimeric Recombinases Determined by a Facile Fluorescent System. Biochemistry 2012;51:1510-7.
- 8) Fujitsuka A, Tsukagoshi H, Arakawa M, Goto-Sugai K, Ryo A, Okayama Y, Mizuta

- K, Nishina A, Yoshizumi M, Kaburagi Y, Noda M, Tashiro M, Okabe N, Mori M, Yokota S, Kimura H. A molecular epidemiological study of respiratory viruses detected in Japanese children with acute wheezing illness. *BMC Infect Dis* 11: 168, 2011.
- 9) Tsukagoshi H, Mizuta K, Abiko C, Itagaki T, Yoshizumi M, Kobayashi M, Kuroda M, Kozawa K, Noda M, Ryo A, Kimura H. The impact of Saffold cardiovirus in patients with acute respiratory infections in Yamagata Japan. *Scand J Infect Dis* 43: 669-671, 2011.
- 10) Nishi M, Akutsu H, Masui S, Kondo A, Nagashima Y, Kimura H, Perrem K, Shigeri Y, Toyoda M, Okayama A, Hirano H, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW, Ryo A. A distinct role for Pin1 in the induction and maintenance of pluripotency. *J Biol Chem* 286: 11593-11603, 2011.
- 11) Nakamura M, Takahara Y, Ishii H, Sakawaki H, Horiike M, Miura T, Igarashi T, Naruse TK, Kimura A, Matano T, Matsuoka S. Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses during primary simian immunodeficiency virus infection in Burmese rhesus macaques. *Microbiol Immunol* 55: 768-773, 2011.
- 12) Moriya C, Horiba S, Kurihara K, Kamada T, Takahara Y, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Matano T. Intranasal Sendai viral vector vaccination is more immunogenic than intramuscular under pre-existing anti-vector antibodies. *Vaccine* 29: 8557-8563, 2011.
- 13) Ishii H, Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Matsuoka S, Shiino T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Naruse TK, Kimura A, Takiguchi M, Matano T. Impact of vaccination on cytotoxic T lymphocyte immunodominance and cooperation against simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques. *J Virol* 86: 738-745, 2012.
- 14) Tanaka M, Nitta T, Sun B, Fujisawa J, Miwa M. The route of primary HTLV-1 infection regulates HTLV-1 distribution in reservoir organs of infected mice. *Exp Thr Med* 2: 89-94. 2011.
- 15) 田中正和: ウシラクトフェリンによる HTLV-1 抗腫瘍効果について (ラクトフェリン学会賞受賞研究). ラクトフェリン ニュースレター. 第1巻, p8-9, 2011.
- 16) 田中正和、鄭真美、長谷川翔、和田直樹、橋本岩男、津田洋幸、藤澤順一、三輪正直. ウシラクトフェリンによる HTLV-1 抗腫瘍効果について. ラクトフェリン 2011, p14-20, 2011.
- 17) Tsuda M, Tanaka M, Mushiake M, Takahashi J, Tanaka K, Watase J, Fujisawa JI, Miwa M. A novel pathway of centrosome amplification that does not require DNA lesions. *Cancer Sci* 103: 191-196, 2012.
- 18) Iwasaki S, Masuda S, Baba T, Tomaru U, Katsumata K, Kasahara M, Ishizu A. Plasma-dependent, antibody- and Fcγ receptor-mediated translocation of CD8 molecules from T cells to monocytes. *Cytometry A* 79(1): 46-56, 2011.

- 19) Watari H, Michimata R, Yasuda M, Ishizu A, Tomaru U, Xiong Y, Hassan MK, Sakuragi N. High prevalence of multiple human papillomavirus infection in Japanese patients with invasive uterine cervical cancer. *Pathobiology* 78(4): 220-226, 2011.
- 20) Yamada Y, Tomaru U, Ishizu A, Kiuchi T, Marukawa K, Matsuno Y, Kasahara M. Expression of proteasome subunit $\beta 5t$ in thymic epithelial tumors. *Am J Surg Pathol* 35(9): 1296-1304, 2011.
- 21) Sutoh Y, Kondo M, Ohta Y, Ota T, Tomaru U, Flajnik MF, Kasahara M. Comparative genomic analysis of the proteasome $\beta 5t$ subunit gene: implications for the origin and evolution of thymoproteasomes. *Immunogenetics* 64(1): 49-58, 2012.
- 22) Tomaru U, Takahashi S, Ishizu A, Miyatake Y, Gohda A, Suzuki S, Ono A, Ohara J, Baba T, Murata S, Tanaka K, Kasahara M. Decreased proteasomal activity causes age-related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities. *Am J Pathol* 180: 963-972, 2012

2. 学会発表

各研究分担者の報告書参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得（出願）

特許第 4817625 号 粘膜免疫誘導アジュバントを含む新規ワクチン
登録日平成 23 年 9 月 9 日

2. 実用新案登録

なし

II. 分担研究報告書

HTLV-1 感染阻止の為の粘膜免疫誘導に関する研究

研究分担者 長谷川 秀樹 国立感染症研究所感染病理部 部長

研究協力者 鈴木 忠樹 国立感染症研究所 感染病理部

研究要旨 HTLV-1 は国内に 100 万人を超える感染者がおり過去 20 年間でその数は僅かに減ったのみである。今後日本国内から感染者を減らす為に感染予防ワクチン及び白血病発症予防ワクチンの開発を目的とする。本研究では HTLV-1 の感染ルートにおいて母乳を介した母子感染が問題となっている事に注目し、母乳中への抗体誘導を試みた。モデル抗原を用いて TLR3 アゴニストの粘膜アジュバントと共にワクチンを経鼻接種したところ出産後の母乳中にワクチン特異的 IgA 抗体、IgG 抗体を誘導する事ができた。

A. 研究目的

HTLV-1 感染者は国内に約 108 万人以上いると推定され、九州地方に限局していた感染者が人口の移動により関東や関西の大都市圏に移りそれらの地域では増加しており全国への拡散傾向が見られている。感染経路には母乳による母子感染、性交渉及び血液を介した水平感染が考えられている。しかし、HTLV-1 の感染を完全に予防する方法及びワクチンは確立されておらず、大都市圏での感染拡大傾向を示す現状では HTLV-1 感染を防ぐ為のワクチン開発が望まれる。またこれらの HTLV-1 感染者の中から今後成人 T 細胞性白血病（ATL）を発症する人が約 5 万人いると推計される。HTLV-1 に感染しているけれど ATL の発症を防ぐ為のワクチンも同時に望まれている。そこで本研究では HTLV-1 感染症予防および発症予防を目指したワクチン開発を目的とする。

B. 研究方法

1. ワクチン抗原としての HTLV-1 エンベロープ蛋白の作成

ワクチンの開発の為、ターゲット分子となりうるエンベロープ蛋白をコードする遺伝子をコドンの最適化し哺乳動物細胞を用いた発現系を作成した。

Human T-cell leukemia virus type 1 の envelope タンパク質の細胞外領域の 442 アミノ酸（1-442a.a.）をコードする配列、gp42 をコードする配列（312 アミノ酸, 1-312a.a.）、シグナル配列（1-20a.a.）と gp21（313-442a.a.）を融合させたタンパク質をコードする配列を哺乳類細胞で最大限のタンパク質発現量が得られるようにコドンの最適化を行った後、遺伝子合成した。合成した遺伝子配列を pEXPR-IBA3 ベクターおよび pEXPR-IBA42 ベクター（IBA GmbH 社）にサブクローニングし、タンパク質精製のためのストレプトアビジンに結合する 8 アミノ酸残基（Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys）から成るタグ（Strep-tagII）を C 末端に付加した。

2. HTLV ワクチンの効果的な接種ルートを調べるためにワクチン抗原ができるまで、モデル抗原を用いて経鼻粘膜投与でワクチン接種した際に母乳中の抗原特異的 IgA 抗体と IgG 抗体を調べた。

1) マウス

6~8 週齢、雌の BALB/c マウスを一群 5 匹で利用した。動物への処置は国立感染症研究所の定める動物実験実施規定に則り、苦痛を与えないように考慮した。

2) ワクチンとアジュバント

ワクチンとして、エーテル不活化処理を行った実験室株 A/PR8 ウイルスの HA ワクチンを用いた。粘膜アジュバントとして、TLR3 に対するアゴニストである合成二本鎖 RNA の Poly(I:C)を用いた。

ワクチンを 3 週間間隔で 2 回経鼻接種した後に妊娠させ出産後の母乳を回収し母乳中の抗体応答を測定した。母乳中 HA 特異的 IgA 抗体、IgG 抗体応答は、A/PR8 HA に対する ELISA により測定した。

C. 研究結果

1. ワクチン抗原の哺乳動物細胞での作成

HTLV-1 ワクチン抗原として HTLV-1 のエンベロープ蛋白の哺乳動物細胞での作成を行っている。哺乳動物細胞での発現効率を上げる為に gp63 遺伝子のコドン最適化をし CHO 細胞へ遺伝子導入する事で蛋白の作成を試みている。その他の内部蛋白については横浜市立大学でワクチン抗原の作成を行っている。

2. ワクチンの接種ルートの検討

HTLV-1 の感染ルートには母乳を介して母親から子へ感染する垂直感染と血液や性行為による水平感染とがある。ワクチンによって効率よく感染を防御する為にはその感染様式にともなった防御免疫を効果的に引き出す必

要がある。そこで我々は HTLV-1 の母乳を介する感染を阻止する為にモデル抗原を用い、母乳に抗体を誘導する方法を試みた。ワクチン抗原の粘膜投与により母乳中に分泌型の IgA 抗体が誘導される事が期待された為、妊娠前の Balb/c マウスに対し HA 抗原を粘膜アジュバントとして poly(I:C)と共に経鼻接種した。Poly(I:C)は合成二本鎖 RNA で Toll 様受容体 3 (TLR3) を刺激し自然免疫を活性化し獲得免疫を誘導する事が知られている。3 週間隔で 2 回ワクチン接種しその後妊娠させ出産後の母乳中の HA 特異的 IgA 抗体、IgG 抗体価を測定した。図 1 に示すようにワクチンにより誘導された HA 特異的 IgA 抗体は出産後母乳中に分泌され、出産後日を経つごとに抗体量が増加していった。図 2 に母乳中の HA 特異的 IgG 抗体価を示す。妊娠前にワクチン接種したマウスにおいて出産後母乳中にワクチン特異的な IgG 抗体が含まれており絶対量としては IgA の約 10 倍の濃度であった。妊娠前の母体を粘膜経由でワクチン接種する事により出産後の母乳中にワクチン特異的 IgA 抗体だけでなく IgG 抗体も誘導することを確認した。経母乳感染する HTLV-1 の感染防御ワクチンのワクチンルートとして粘膜投与の可能性が示唆された。

(倫理面への配慮)

動物実験については、国立感染症研究所の動物実験委員会の審査をうけ、その承認を得てから開始した。

D. 考 察

HTLV-1 感染予防ワクチンおよび ATL 発症予防ワクチンを考える時ウイルス側のどの抗原をワクチン抗原とするのか、また感染予防、発症予防に重要な働きをする免疫は何かを考える必要がある。ワクチン抗原の準備の為に HTLV-1 がコードするほとんど全ての遺伝子産物をワクチンとして有効か検討する事とし

たが我々はエンベロープ蛋白を哺乳類細胞で作成する事を分担する事となった。哺乳類動物細胞で抗原を作成する為にはコドンの最適化が必要になる。現在各抗原を準備中である。

一方、効果的なワクチン開発には対象疾患の病態を理解した上で効果的な免疫を誘導する必要がある。HTLV-1 は母乳を介した母子感染が問題となっている。今回、モデル抗原を用いたワクチン投与ルートを検討でワクチン抗原を粘膜経路で接種する事により母乳中にワクチン特異的な IgA 抗体と IgG 抗体が誘

導される事が明らかとなった。母乳中の抗体を誘導する事により母子感染を防ぐことができる可能性がある事が示された。

E. 結 論

ワクチン抗原を妊娠前の母体に経粘膜投与する事により出産後の母乳中にワクチン特異的な抗体が誘導される事が示された。HTLV-1 に感染している母親に経粘膜ワクチン投与により母子感染を防げる可能性が示唆された。

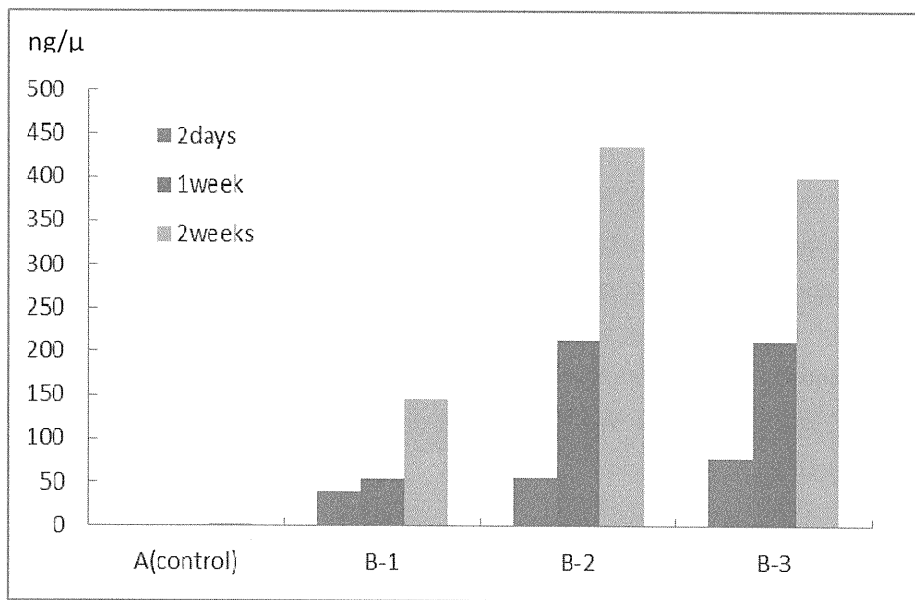


図1. 母乳中の抗原特異的 IgA 抗体価

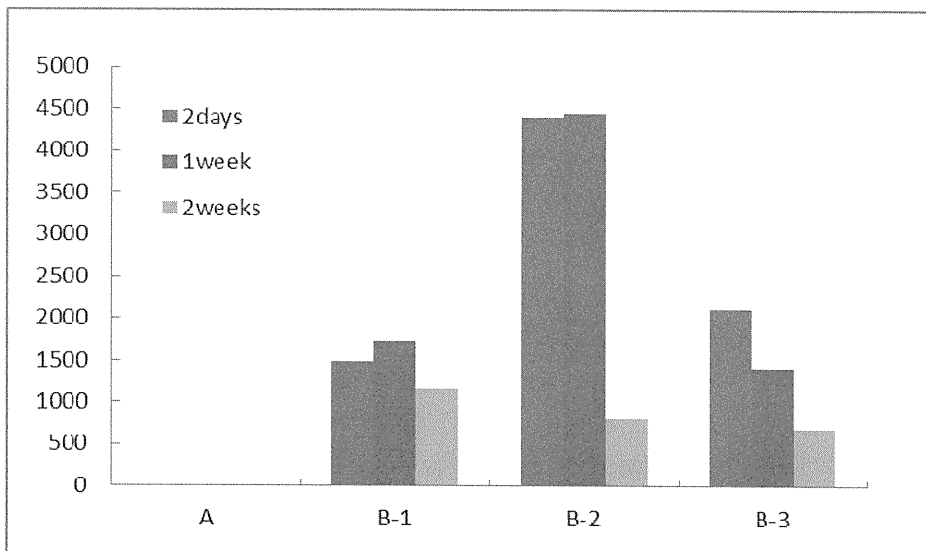


図2. 母乳中の抗原特異的 IgG 抗体価

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yanagita H, Yamamoto N, Fuji H, Liu X, Ogata M, Yokota M, Takaku H, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T. Mechanism of Drug Resistance of Hemagglutinin of Influenza Virus and Potent Scaffolds Inhibiting Its Function. ACS Chem Biol. 2012 Jan 13.
- 2) Ainai A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine. J Med Virol. 2012 Feb;84(2):336-44.
- 3) Nakao R, Hasegawa H, Ochiai K, Takashiba S, Ainai A, Ohnishi M, Watanabe H, Senpuku H. Outer membrane vesicles of Porphyromonas gingivalis elicit a mucosal immune response. PLoS One. 2011;6(10):e26163. Epub 2011 Oct 14.
- 4) Suzuki T, Ainai A, Nagata N, Sata T, Sawa H, Hasegawa H. A novel function of the N-terminal domain of PA in assembly of influenza A virus RNA polymerase. Biochem Biophys Res Commun. 2011 Nov 4;414(4):719-26. Epub 2011 Oct 6.
- 5) Fukumoto H, Kanno T, Hasegawa H, Katano H. Pathology of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection. Front Microbiol. 2011;2:175. Epub 2011

Aug 25.

- 6) Nakajima N, Sato Y, Katano H, Hasegawa H, Kumasaka T, Hata S, Tanaka S, Amano T, Kasai T, Chong JM, Iiduka T, Nakazato I, Hino Y, Hamamatsu A, Horiguchi H, Tanaka T, Hasagawa A, Kanaya Y, Oku R, Oya T, Sata T. Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection. Mod Pathol. 2012 Jan;25(1):1-13. Epub 2011 Aug 26.

2. 学会発表

- 1) 長谷川秀樹 : 成人 T 細胞性白血病(ATL) モデルマウスを用いた新規治療法の試み 第 100 回日本病理学会総会 (横浜) 2011 年 4 月
- 2) 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹、熊坂利夫、羽田 悟、田中伸哉、笠井孝彦、鄭子文、飯塚利彦、仲里 巖、樋野陽子、濱松晶彦、堀 尚、田中智之、長谷川章雄、尾矢剛志、佐多徹太郎 : 2009H1N1 パンデミックインフルエンザウイルス感染症 20 剖検例の臨床病理学的解析 第 100 回日本病理学会総会 (横浜) 2011 年 4 月
- 3) Akira Ainai, Ryo Ito, Hideki Asanuma, Tadaki Suzuki, Takeshi Tanimoto, Takato Odagiri, Shin-Ichi Tamura, Tetsutaro Sata, Masato Tashiro, Hideki Hasegawa: INTRANASAL ADMINISTRATION OF 2009/10 ANNUAL INFLUENZA VACCINE INDUCE THE CROSS-PROTECTION AGAINST 2009 PANDEMIC INFLUENZA VIRUS INFECTION. XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo

- 4) Elly van Riet, Akira Ainai, Ryo Ito, Tadaki Suzuki, Shin-Ichi Tamura, Masato Tashiro, Hideki Hasegawa: INFLUENZA SPECIFIC IGA PRODUCING SERUM MEMORY B CELLS CORRELATE TO PROTECTIVE ANTIBODIES IN THE SERUM AS WELL AS LOCAL IGA RESPONSES. XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
- 5) Ryo Ito, Akira Ainai, Hideki Asanuma, Tadaki Suzuki, Joe Chiba, Shin-Ichi Tamura, Masato Tashiro, Tetsutaro Sata, Hideki Hasegawa: ANALYSIS OF THE IMMUNE RESPONSES AFTER INTRANASAL BOOSTER INFLUENZA VACCINE WITH HETEROLOGOUS VIRUS PRIMING. XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
- 6) Hideki Hasegawa, Akira Ainai, Elly van Riet, Tadaki Suzuki, Ryo Ito, Takeshi Tanimoto, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Tetsutaro Sata, Takeshi Kurata, Shin-Ichi Tamura: INTRANASAL ADMINISTRATION OF AN INACTIVATED WHOLE-VIRION INFLUENZA VACCINE EFFECTIVELY INDUCES THE NEUTRALIZING ANTIBODIES BOTH IN THE SERUM AND THE NASAL WASH IN HUMAN. XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
- 7) Hideki Asanuma, Mina Nakauchi, Kayoko Sato, Eri Nobusawa, Akira Ainai, Norio Yamamoto, Nami Konomi, Hideki Hasegawa, Masato Tashiro: COMPARISON OF INFLUENZA A/H1N1 PDM09 VACCINE PRODUCTIONS IN EGGS VERSUS CELL CULTURES AND THE PROTECTIVE IMMUNE RESPONSES INDUCE IN MICE. XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
- 8) Tadaki Suzuki, Akira Ainai, Noriyo Nagata, Tetsutaro Sata, Hideki Hasegawa: ROLE OF THE N-TERMINAL REGION OF THE PA SUBUNIT IN NUCLEAR IMPORT AND ASSEMBLY OF INFLUENZA A VIRUS RNA POLYMERASE. XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
- 9) Tatsuya Yamazaki, Yasutomo Teshima, Daisuke Ninomiya, Maria Nagashima, Yuka Arai, Akira Fujimoto, Akira Ainai, Hideki Hasegawa, Joe Chiba: PASSIVE IMMUNOTHERAPY AGAINST INFLUENZA VIRUS INFECTION USING THE EXPRESSION OF NEUTRALIZING ANTI-HEMAGGLUTININ MONOCLONAL ANTIBODIES FROM PLASMIDS BY HYDRODYNAMICS-BASED PROCEDURE. XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
- 10) Hidekatsu Iha, Emi Ikebe, Akira Kawaguchi, Shinya Taguchi, Akira Nishizono, Yuetsu Tanaka, Hirofumi Sawa, Masao Ogata, Mitsuo Hori, Jun-Ichi Fujisawa, Hideki Hasegawa: MOLECULAR CHAPERON INHIBITOR-BASED TREATMENT AGAINST ATL: ITS IN VITRO AND IN VIVO EVALUATION. XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
- 11) Masayuki Saijo, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Noriyo Nagata, Naoko Yoshikawa, Hideki Hasegawa, Shuetsu Fukushi, Tetsuya Mizutani, Tetsutaro Sata, Ichiro Kurane, Shigeru Morikawa: IMMUNE RESPONSES AGAINST EEV AND IMV IN NON-HUMAN PRIMATES INFECTED

WITH MONKEYPOX VIRUS OR
VACCINATED WITH A HIGHLY
ATTENUATED SMALLPOX VACCINE
LC16M8 AND PROTECTION FROM
LETHAL MONKEYPOX. XV International
Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo

12) Noriyo Nagata, Naoko Iwata, Hideki Hasegawa, Yuko Sato, Shigeru Morikawa, Tetsutaro Sata: INTERFERON GAMMA PROTECTS ADULT BALB/MICE FROM LETHAL RESPIRATORY ILLNESS AFTER MOUSEADAPTED SARS-COV INFECTION. XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo

13) 長谷川秀樹：感染防御に効くインフルエンザワクチンを目指して．第15回日本ワクチン学会学術集会（東京）2011年12月

14) 相内 章、浅沼秀樹、谷本武史、小田切孝人、田村慎一、田代真人、長谷川秀樹：2009/10 季節性インフルエンザワクチンの経鼻投与による A/H1N1pdm09 ウイルスの感染防御. 第15回日本ワクチン学会学術集会（東京）2011年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得（出願）

特許第 4817625 号 粘膜免疫誘導アジュバントを含む新規ワクチン
登録日平成 23 年 9 月 9 日

2. 実用新案登録

なし

HTLV-1 感染細胞を標的とする細胞性免疫反応に関する研究

研究分担者 俣野 哲朗 国立感染症研究所 エイズ研究センター長

研究要旨 HTLV-1 感染症は ATL（成人 T 細胞白血病）等の重篤な疾病発症に結びつくことから、その感染・発症の防御法の開発は重要課題である。本研究では、HTLV-1 感染細胞を標的とする細胞性免疫反応の増強法の開発を目的として、細胞傷害性 T リンパ球（CTL）反応の解析を進めることとした。平成 23 年度は、CTL 増強のためのデリバリーシステムとして有用と考えられるセンダイウイルスベクターを用い、感染慢性期のウイルス抗原特異的 CTL 増強能を確認した。また、標的抗原候補の一つである Tax 抗原と類似の局在を示す Tat 抗原特異的 CTL 反応の測定法を確認した。平成 24 年度以降は、これらの手法を用い、HTLV-1 の各種抗原特異的 CTL 反応の解析を行い、HTLV-1 感染・発症防御に結びつく CTL の標的抗原の検討を進める計画である。

A. 研究目的

本邦の HTLV-1 感染者数は 100 万人以上と推定されている。HTLV-1 感染症は ATL（成人 T 細胞白血病）あるいは HAM（HTLV-1 関連脊髄症）等の重篤な疾病発症に結びつくことから、その感染・発症の防御法の開発は重要課題である。近年の母乳による感染予防対策だけでは不十分であることも指摘されており、HTLV-1 克服に向け、ワクチン開発は重要な戦略である。

本研究では、HTLV-1 感染細胞を標的とする細胞性免疫を増強するワクチン開発を目指すこととした。HTLV-1 は、感染細胞の伝播により感染が拡大することから、感染細胞を標的とする免疫誘導は感染防御に結びつくことが期待される。さらに、免疫増強による HTLV-1 感染細胞の排除は、ATL 発症防御に結びつくことも期待される。

HTLV-1 は潜伏感染を呈し、感染細胞においてウイルス抗原の多くはその発現が抑制されている。したがって、細胞傷害性 T リンパ

球（CTL）が認識しうる標的抗原も限られていると考えられ、どの標的抗原特異的 CTL 反応の誘導が HTLV-1 感染細胞の排除あるいは ATL 発症につながるかを知ることは重要である。これまでの文献等をもとに、本研究では、HTLV-1 Tax および HBZ 抗原特異的 CTL 反応を中心とした解析を進めることとした。また、抗原特異的 CTL 反応増強のためのデリバリーシステムとしては、我々がこれまでエイズワクチンとして開発を進めてきたセンダイウイルス（SeV）ベクターを応用することとした。

平成 23 年度は、SeV ベクター接種が、慢性ウイルス潜伏感染におけるウイルス抗原特異的 CTL 反応増強能を有するかを、サルにおいて検証した。さらに、標的抗原候補の一つである Tax 抗原が核内蛋白であることに留意し、類似の局在を示す Tat 蛋白を用いて、抗原特異的 CTL 反応の測定法を確認した。