

201225042A

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 24 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 25 (2013) 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) 長谷川 温彦：ラットの HTLV-I 経口／経腸／血液感染系の確立と応用

(3) 齊藤 峰輝、高橋 良明

: 抗 HTLV-Igp46 中和抗体による HTLV-I 関連疾患の新規発
症予防・治療法開発の試みと HTLV-I bZIP factor (HBZ) タ
ンパク検出系の確立

(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 吾郎

: HTLV-I 感染阻止ワクチンの研究

(6) 樋口 雅也：細胞内 HTLV-I 感染抵抗性因子の研究と応用

(7) 宮城 拓也、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

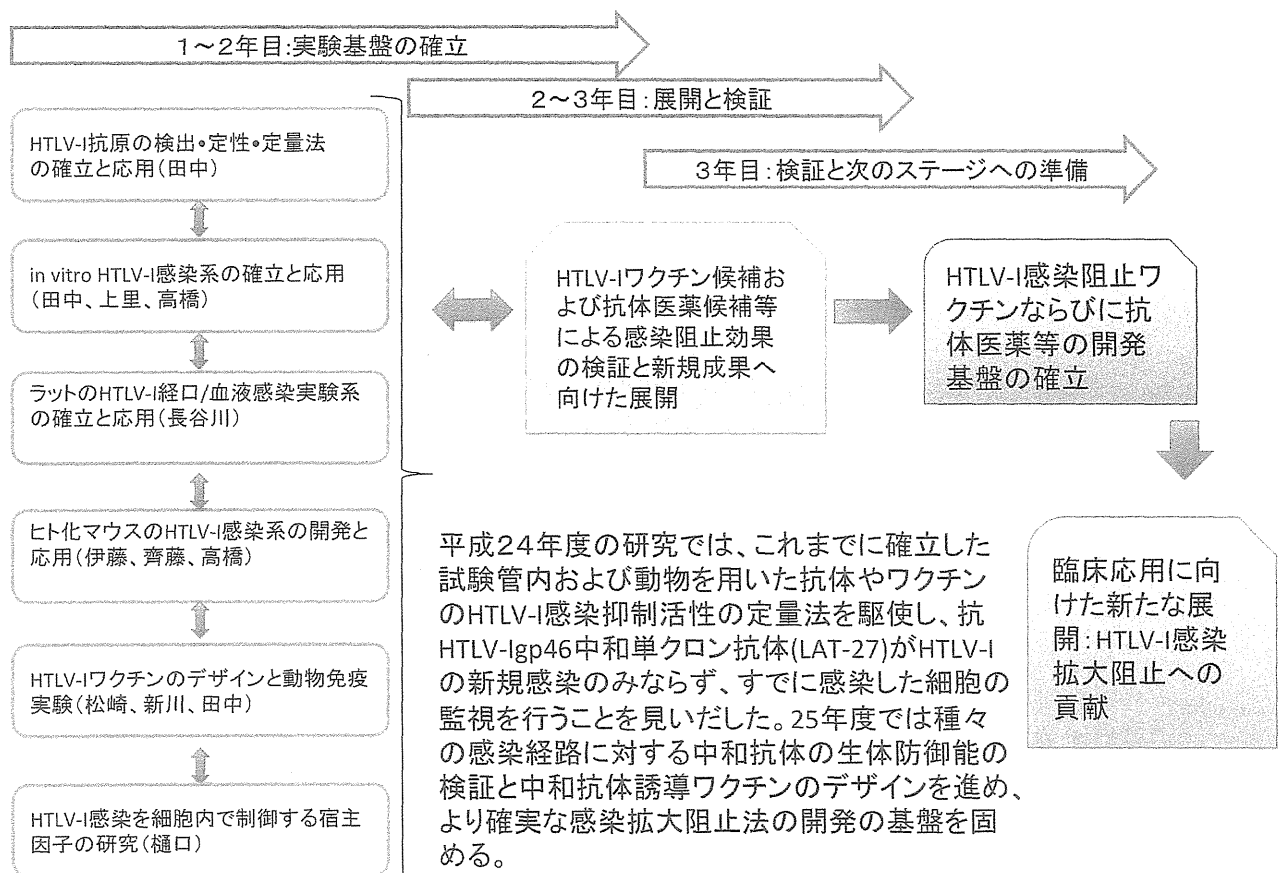
I. 総括研究報告

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2年目は計画通りに遂行された。昨年度の研究により、human T cell leukemia virus type-I (HTLV-1)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、本年度は特に HTLV-1 gp46 の中和エピトープを認識する中和抗体についてその感染防御能について深く検討した。並べて、HTLV-1 envelope 抗原である gp46 や gp21 に対する中和抗体を効率よく誘導できるワクチン候補について免疫実験を行った。

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(2年目成果概要)



A. 研究目的と背景

本研究は、我が国における HTLV-1 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-1 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-1 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に対する対策が早急に必要である。しかし、HTLV-1 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、本研究班員らがこれまで蓄積してきた HTLV-1 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-1 感染拡大阻止の実現”のため HTLV-1 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-1 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-1 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-1 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。

C. 一年間の研究結果

平成 24 年度の研究の第一の成果は、

試験管内において、HTLV-1 中和抗体が HTLV-1 の新規感染のみならず、既に感染した細胞の増殖とウイルス産生を ADCC を介して抑制することを見いだしたことである。したがって、生体内では、中和抗体が HTLV-1 新規感染防御はもとより、HTLV-1 感染細胞の増殖の監視に重要な働きをすることが強く示唆された。既に同定されている gp46 抗原の中和エピトープを含むペプチドが、他の領域のペプチドと比べて中和抗体誘導能が優れていることも明らかにできた。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) 昨年度に樹立したアッセイ方法を駆使して、HTLV-1 エンベロップ gp46 に対する中和単クロン抗体(LAT-27)と HTLV-1 感染患者由来 IgG は、HTLV-1 の新規感染を防御するのみにとどまらず、すでに HTLV-1 感染した細胞のウイルス産生および不死化を ADCC を介したメカニズムにより監視することを新たに発見した。

(b) ADCC に関与するエフェクター細胞は NK 細胞であった。

(c) 既知の HTLV-1 中和抗体誘導 gp46 ペプチド(180-204)と、HTLV-1 感染に重要な役割をしていると報告されている receptor binding domain 領域 gp46 ペプチド 197-216 と gp21 ペプチド 400-429 の免疫原性を比較し、中和抗体が誘導できる gp46 ペプチドは 180-204 であることを見いだした。

(2) 研究分担者 (長谷川): ラットの HTLV-1 経口・経腸・血液感染系の確立と応用

(a) HTLV-1 感染が成立するラットの HTLV-1 感染系 (腹腔・経口・経直腸感染) を用いて、感染防御を目的とする新規ワ

クチンの評価系を作成した。

(b) LAT-27 抗体を受動免疫することにより、腹腔内接種による HTLV-1 新規感染を効率良く防御できることを示した。

(3) 研究分担者(齊藤・高橋)：ヒト化マウスでの HTLV-1 感染系 とヒト免疫誘導系の開発

(a) 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 C 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。さらに、HTLV-1 感染患者由来 IgG も同様に感染防御活性を示すことを確認した。

(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、このマウスの HTLV-1 感染への高い感受性が示唆された。

(d) さらに、抗体依存性細胞障害性を見る系として、血液幹細胞を移植すると単球と NK 細胞が増殖する hGM-CSF/IL-3-NOG マウスを確立した。

(5) 研究分担者(上里)：HTLV-1 産生株の樹立、細胞内 HTLV-1 感染抵抗性因子の研究と応用

(a) 皮膚科の ATL 患者の血液細胞の培養により、新規の HTLV-1 産生培養株を樹立した

(b) 治療による ATL 患者の中和抗体の動向を検討するため血清サンプルを蓄積中である。

(6) 研究分担者(樋口)：細胞内 HTLV-1 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を解明した。

(d) HTLV-1 感染細胞の亜硫酸感受性について、ストレス顆粒形成不全による ROS 産生制御異常という観点から研究を試みている。

(7) 研究分担者(松崎・新川)：小動物での HTLV-1 ワクチン検証と HTLV-1 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-1 感染に対する防御エピトープ (gp46₁₈₀₋₂₀₄) を搭載した TIPS を設計するため、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) と標的用リガンド (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) TIPS/gp46 pep が大腸菌から 5 量体として分泌発現することが確認され、Z の抗体結合機能があることも確認した。

(c) この融合分子を BALB/c および C57BL/6 マウスへアラムアジュバントを添加して皮下接種した結果、OVA/gp46 pep は以前の報告 (Tanaka et al., 1994) どおり、エピトープ特異的な抗体応答を誘導した。しかし、TIPS/gp46 pep では抗体応答が確認できなかった。これまで、比較的分子量の大きな抗原 (20 kDa 程度) では TIPS の効果が確認されていることから、エピトープへの応用の面では更なる工夫が必要であると考察した。

D. 考察

本年度の研究成果により、HTLV-1 感染拡大を阻止するには中和抗体を誘導するワクチンや中和抗体そのものがワクチン候補として有力であることが強く示唆された。来年度は、より詳細にワクチンや抗体医薬の開発研究を進める

E. 結論

HTLV-1 の中和エピトープを認識する単クローン抗体と HTLV-1 感染者由来の IgG は、HTLV-1 の細胞間伝染を完全に阻害する中和活性を示すと同時に、HTLV-1 感染者体内における HTLV-1 感染細胞の増殖とウイルス産生を ADCC を介して生体防御的役割を果たしていることがより鮮明になった。したがって、HTLV-1 envelope に対する中和抗体を効率よく誘導するワクチンが、HTLV-1 の新規感染と HTLV-1 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 感染阻止ワクチンおよび抗体医薬の検証

田中勇悦 琉球大学 大学院医学研究科 教授

要旨：昨年度に開発した human T cell leukemia virus type-1 (HTLV-1)感染に対する防御能あるいは HTLV-1 感染細胞増殖抑制能を定量的に評価する in vitro 系を用いて、既存の抗 HTLV-1 gp46 中和単クロン抗体と高い中和活性を示す HTLV-1 感染者由来の IgG が HTLV-1 の新規感染防御と同時に CD16⁺NK 細胞の共存下では HTLV-1 感染 T 細胞の増殖とウイルス産生を ADCC を介して強力に抑制することを見いだした。また、中和抗体誘導ペプチドワクチン候補について比較検討し、gp46 アミノ番号 180-204 の領域が優れていることを見いだした。

A. 研究目的

昨年度の研究で樹立した HTLV-1 抗原測定系を使って HTLV-1 中和単クロン抗体および HTLV-1 感染者から分離した IgG 抗体の HTLV-1 感染抑制能と感染細胞監視能の確認とメカニズムを明らかにするとともに、中和抗体誘導ペプチドワクチンのスクリーニングを行い、能動ワクチンと受動ワクチン候補を選択することを目的とした。

B. 研究方法

HTLV-1 産生細胞は MT-2、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-1 感染細胞株および正常ドナーの T 細胞を ILT-M1 との混合培養法で不死化した細胞株等を使用した。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-1 感染者由来 PBMC サンプルとして 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、抗 Tax 抗体である 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。使用した単クロン抗体は、ラット抗 HTLV-1gp46 IgG 単クロン抗体はすでに報告済みで、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。ヒトの HTLV-1 中和抗体として HMA 患者プール血清から Protein-G により IgG を精製した。これを HAM-IgG とした。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：昨年度に確立した方法 (HAM患者由来HTLV-1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)で単クロン抗体LAT-27と今回精製したHAM-IgGの中和価を測定し、合胞体完全阻止に必要な濃度はそれぞれ5および50 ug/mlであった。この中和系にアフィニティ精製gp46を添加すると、LAT-27の中和活性は完全に阻害された。しかし、HAM-IgGの系では、部分的な阻害にとどまった。したがって、HAM-IgGには gp46以外の抗原に対する中和抗体、おそらく gp21に対する抗体も含まれることが推定された。

(2)中和抗体と新鮮末梢血単核球による HTLV-1感染細胞の増殖とウイルス産生阻止：昨年度には、HAM患者のPBMCを培養すると1日目にTax陽性の細胞が数%~20%程度出現するが、興味あることに、LAT-27を添加して培養するとTax陽性細胞の頻度を約50%に低下させ、

さらに長期培養すると不死化細胞の出現を阻害すること、他の非中和抗体ではその効果がないうこと、同様な感染細胞阻止は、中和活性を持つHAM患者由来の血清IgGでも観察されることを報告した。抗体依存性細胞性障害活性ADCCの関与が示唆された。そこで、そのメカニズムをより詳細に解明するため、試験管内で予めHTLV-1で不死化した健常人由来のT細胞株に対して抗体と新鮮末梢血単核球(PBMC)が細胞増殖阻害あるいはウイルス産生阻害効果を示すかを検討した。抗体のみでは何の効果も見られなかったが、中和抗体と自家PBMCを同時に作用させると有意にTax陽性細胞が減少し、p24産生が抑制された。自家PBMCだけでも弱い抑制活性があったが、抗体依存性抑制は明らかであった。さらに、LAT-27抗体のFc領域を酵素消化したF(ab)'₂では、HTLV-1中和活性があるものの、このような阻害活性は示さなかった。同様な阻害活性は、HAM-IgGでも観察できた。抗体と自家PBMC処理を3~4日おきに3回繰り返すと、全てのHTLV-1感染細胞が消滅した。したがって、このような自家PBMCと中和抗体によるHTLV-1感染細胞の増殖抑制は抗体の中和活性あるいは認識エピトープ依存性、かつ抗体のFc依存性であることが明らかとなった。ADCCの可能性が高い。

(3) ADCC (本実験は班員の高橋博士との共同研究である) : 上記の結果で推定されたように、自家HTLV-1感染細胞の増殖抑制とウイルス産生抑制がADCCによるかを直接証明するため、⁵¹Cr遊離細胞障害アッセイを行った。つまり、HTLV-1感染細胞をラベルし、一定の抗体の存在下、異なるPBMCとのE/T比において細胞障害を観察した。通常4時間の混合培養では、LAT-27抗体によるADCC活性は証明出来なかったが、培養時間を24時間に延ばすと有意な細胞障害性がE/T比90と30で観察された。このような障害性は、LAT-27 F(ab)'₂では観察されなかった。また、正常ヒトIgGはADCC活性を示さなかったが、HAM-IgGはLAT-27より高いADCC活性を示した。一般的にADCCを担うエフェクター細胞はPBMCにおいてはCD16⁺NK細胞である。そこで本ADCCのエフェクター細胞を同定するため、抗体マグネット法でPBMC分画から特定の細胞を除去したエフェクター

細胞のADCCを見たところ、CD16⁺細胞、またはNKマーカーであるCD56⁺細胞を除去した場合にのみADCCの減弱が明らかであった。したがって、CD16⁺NK細胞が本ADCCのエフェクターであることが明らかにされた。

(4) ペプチドワクチン: HTLV-1gp46合成ペプチドが中和抗体を誘導することはすでに明らかとなっている。そこで、どの領域のペプチドが最も効率よく中和抗体を誘導できるかを検討した。文献によるとgp46 197-216とgp21 400-429の領域はHTLV-1感染に必須な領域であることが報告されている。そこでこのペプチドを合成依頼し、OVAをキャリアにしてB6マウスを免疫したところ、ペプチドに対する抗体活性はあるものの、どれも中和活性を示さなかった。さらにこれらのマウスの脾臓細胞から数百個のハイブリドーマを作製し、中和抗体の産生をみたが、どのハイブリドーマも中和活性を持たなかった。コントロールとして用いたOVA-gp46 180-204はB6マウスにおいて有意な中和抗体を産生させた。

D. 考察

本年度の研究により、HTLV-1中和抗体が体内での新規HTLV-1感染を防御するとともに、既にHTLV-1に感染したT細胞の増殖とウイルス産生に対してNK細胞をエフェクター細胞とするADCCにより強く監視することが強く示唆された。HAM-IgGがLAT-27抗体より高いADCC活性を示すことは、FcのFcRへの親和性が高いこと、さらにはHTLV-1感染細胞の複数のエピトープに対するIgG抗体が同時に細胞に結合できることなどの理由が考えられる。今後、中和抗体のウイルス監視機能についてin vivoの系でも検討する。また、中和抗体誘導ペプチド抗原の選択については、感染系に加えると感染に重要な影響を与えることが報告されている合成ペプチドでも、動物に免疫した場合には全く中和抗体を誘導できないケースもあることがはっきりした。今回、スクリーニングを行った意義は大きい。

E. 結論

生体内においてHTLV-1の中和エピトープを認識する中和抗体が、HTLV-1の新規感染を完全

に阻害すると同時に、HTLV-1 感染細胞の増殖とウイルス産生をも監視することが示唆された。HTLV-1 感染および発症予防に対して CTL が重要であると言われているが、中和抗体の果たす生体防衛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) Malta TM, Silva IT, Pinheiro DG, Santos AR, Pinto MT, Panepucci RA, Takayanagui OM, Tanaka Y, Covas DT, Kashima S. Altered Expression of Degranulation-Related Genes in CD8(+) T Cells in Human T Lymphotropic Virus Type I Infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2013 Feb 5.
- (2) Makokha GN, Takahashi M, Higuchi M, Saito S, Tanaka Y, Fujii M. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein interacts with and mislocalizes the PDZ domain protein MAGI-1. *Cancer Sci*. 2013 Mar; 104(3):313-20.
- (3) Imai M, Higuchi M, Kawamura H, Yoshita M, Takahashi M, Oie M, Matsuki H, Tanaka Y, Aoyagi Y, Fujii M. Human T cell leukemia virus type 2 (HTLV-2) Tax2 has a dominant activity over HTLV-1 Tax1 to immortalize human CD4+ T cells. *Virus Genes*. 2013 Feb; 46(1):39-46.
- (4) Nicolete LD, Nicolete R, Haddad R, Azevedo R, Castro FA, Tanaka Y, Takayanagui OM, Covas DT, Kashima S. Upregulation of hsa-miR-125b in HTLV-1 asymptomatic carriers and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012 Sep; 107(6):824-7.
- (5) Shibata Y, Oyama M, Kozuka-Hata H, Han X, Tanaka Y, Gohda J, Inoue J. p47 negatively regulates IKK activation by inducing the lysosomal degradation of polyubiquitinated NEMO. *Nat Commun*. 2012 Sep; 3:1061.
- (6) Suzuki S, Masaki A, Ishida T, Ito A, Mori F, Sato F, Narita T, Ri M, Kusumoto S, Komatsu

H, Fukumori Y, Nishikawa H, Tanaka Y, Niimi A, Inagaki H, Iida S, Ueda R. Tax is a potential molecular target for immunotherapy of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer Sci*. 2012 Oct; 103(10):1764-73.

- (7) Hasui K, Wang J, Tanaka Y, Izumo S, Eizuru Y, Matsuyama T. Development of ultra-super sensitive immunohistochemistry and its application to the etiological study of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Acta Histochem Cytochem*. 2012 Apr 26; 45(2):83-106.
- (8) 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 syndrome: a distinct clinical subgroup? *J Rheumatol*. 2012 Apr; 39(4):809-15.

2. 学会発表

(国際学会)

- (1) M. Saito, R. Tanaka, A. Kodama, Y. Tanaka. Complete prevention of HTLV-I infection in humanized mice by a neutralizing monoclonal antibody to envelope gp46. 11th International Symposium on NeuroVirology New York, NY USA, May 29-June 2, 2012. *Journal of Neurovirology*. 2012;18(S1):95.

(国内学会)

- (1) NAKANO Satoko, IKEBE Emi, TANAKA Yuetsu, KUBOTA Toshiaki, NISHIZONO Akira, IHA Hidekatsu :TAXIBPI-deficiency evokes spatiotemporal development of systemic inflammatory symptoms and functional failures ofcardiovascularsystem in mice:第 41 巻日本免疫学会総会・学術集会記録・抄録集, 2012.12.5-7, 神戸. 33.
- (2) 大橋 貴, 田中 勇悦, 志田 壽利: HTLV-I に感染した Tax 特異的 CTL 細胞株の性状解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会・抄録集, 2012.11.13-15, 大阪. 236.
- (3) 荀 潤澤, 上野 孝治, 齊藤 峰輝, 手塚 健太, 田中 勇悦, 藤澤 順一: Altered pattern in viral mRNA expression of Iranian type HTLV-I leading to enhanced viral production. 第 60 回

- 日本ウイルス学会学術集会・抄録集, 2012.11.13-15, 大阪. 237.
- (4) 田中 勇悦, 長谷川 温彦, 神奈木 真理, 田中 礼子, 齊藤 峰輝: HTLV-I 感染 T 細胞の不死化とウイルス産生を制御する宿主免疫環境. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会・抄録集, 2012.11.13-15, 大阪. 356.
- (5) 池辺 詠美, 手塚 健太, 緒方 正男, 松本 昂, 中野 聡子, 藤澤 順一, 田中 勇悦, 末岡 栄三郎, 堀 光雄, 森下 和広, 山田 雅雄, 西園 晃, 伊波 英克: レクチンアレイによる ATL 細胞グリカンのプロファイリング:可能性と課題. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会・抄録集, 2012.11.13-15, 大阪. 357.
- (6) 伊波 英克, 池辺 詠美, 緒方 正男, 田中 勇悦, 松本 昂, 中野 聡子, 八尋 隆明, 堀 光雄, 森下 和広, 西園 昇: ATL 細胞における Tax1bp1 の過剰異所性発現. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 抄録集, 2012.11.13-15, 大阪. 357.
- (7) 村上 悠二, 安藤 聡美, 長谷川 温彦, 田中 礼子, 田中 勇悦, 神奈木 真理: ラットモデルにおける HTLV-I 中和単クロン抗体の HTLV-I 感染防御効果. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会・抄録集, 2012.11.13-15, 大阪. 358.
- (8) Mineki Saito, Reiko Tanaka, Akira Kodama, Yuetsu Tanaka: Complete prevention of HTLV-I infection in humanized mice(hu-PBL SCID)by a neutralizing monoclonal antibody to envelope gp46. 第 16 回日本神経ウイルス研究会抄録集, 2012.8.30-31, 東京.
- (9) 田中 勇悦, 田中 礼子, 高橋 良明, 長谷川 温彦, 齊藤 峰輝: HTLV-I gp46 中和抗体と HTLV-I 陰性ドナーの末梢血単核球 (PBMC)の相乗作用による自家 HTLV-I 感染 T 細胞の Tax 抗原発現及び HTLV-I 産生制御. 第 5 回 HTLV-I 研究会・シンポジウム・抄録集, 2012.8.25-26, 東京. 28.
- (10) 齊藤 峰輝, 田中 礼子, 児玉 晃, 田中 勇悦: ヒト化マウス(hu-PBL-SCID)を用いた抗 HTLV-Igp46 中和抗体による感染抑制効果の検討. 第 5 回 HTLV-I 研究会・シンポジウム・抄録集, 2012.8.25-26, 東京. 28.
- (11) 齊藤 峰輝, 田中 礼子, 児玉 晃, 田中 勇悦: 抗HTLV-Igp46中和抗体によるHTLV-I 関連脊髄症に対する新規治療法開発の試み. 第53回日本神経学会学術大会・プログラム, 2012.5.22-25, 東京.
- H. 知的所有権の出願・登録状況
なし

ラットの HTLV-I 経口/経腸/血液感染系の確立と応用

長谷川温彦 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 助教

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。HTLV-1 は主として感染母から母乳を介して子供へ感染 (垂直感染) することから、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。しかし、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。本年度は、平成 23 年度に作製した 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 感染系を用いて、HTLV-1 に対して中和活性を有することが示されている抗 HTLV-1 Env gp46 抗体 (LAT-27) の受動免疫による HTLV-1 感染防御効果について検討した。その結果、LAT-27 は ILT-M1 細胞を腹腔感染させたラットで感染防御効果を示した。この結果は、LAT-27 が生体内において、HTLV-1 感染防御効果を有していることを示している。平成 25 年度は、LAT-27 の垂直感染防御効果について *in vivo* の感染系で検証する予定である。

A. 研究目的

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、生体内における感染防御効果の検証が必要不可欠である。本研究は、新規ワクチン・抗体医薬候補の感染防御効果について、実験動物 (ラット) の HTLV-1 感染系を用いて評価することを目的としている。本年度は、平成 23 年度に作製した HTLV-1 感染ヒト T 細胞株 ILT-M1 細胞を感染源とした HTLV-1 感染系を用いて、抗体医薬の候補として着目している HTLV-1gp46 に対する中和抗体 (LAT-27) の感染防御効果について検討した。

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。

抗 HTLV-1 gp46 中和抗体 (LAT-27) の受動免疫と HTLV-1 感染

- (i) LAT-27 の受動免疫：生後 5 週の免疫正常ラット (F344N-Jcl rnu/+) に対して、HTLV-1 感染 24 時間前および 5 時間前に、抗 gp46 中和抗体 (LAT-27) を 1mg ずつ腹腔内投与した。
- (ii) LAT-27 投与後 5 時間後、HTLV-1 感染ヒト T 細胞株 ILT-M1 細胞 (2×10^7 個) を腹腔内、経口あるいは経直腸投与した。

(iii) ILT-M1 細胞投与 8 週後に、各ラットの末梢血単核球 (PBMC)、ナイロンウールカラムで分離した脾臓 T 細胞 (Spl-T) における HTLV-1 感染量を HTLV-1pX 領域を標的とした *real-time* PCR 法により定量した。その際、HTLV-1 感染に用いた ILT-M1 細胞の *genomic DNA* が残存していると、正確な感染量が測定できないため、ILT-M1 細胞由来の DNA が残存していないことを、ヒト GAPDH を標的とした PCR 法により確認した。

C. 研究結果

1. HTLV-1 腹腔感染系における ILT-27 による感染防御効果

LAT-27 あるいはコントロール抗体 (Ctrl-Ab) を予め受動免疫したラットに、HTLV-1 を腹腔内感染させた。感染 8 週後に、各ラットの PBMC、Spl-T より DNA を抽出し HTLV-1 pX 遺伝子を標的とした *real-time* PCR を行った。その結果、LAT-27 免疫群の Spl-T で、Ctrl-Ab 免疫群の Spl-T と比べ有意に感染量が低かった。また、PBMC においても LAT-27 免疫群で感染量が低かった。

2. HTLV-1 粘膜 (経口/経直腸) 感染系における LAT-27 による感染防御効果

LAT-27 あるいはコントロール抗体 (Ctrl-Ab)

を予め受動免疫したラットに、HTLV-1 を経口あるいは経直腸感染させた後、HTLV-1 腹腔感染系で行ったように、LAT-27 免疫群と Ctrl-Ab 免疫群の感染量を比較した。その結果、どちらの HTLV-1 感染系においても、LAT-27 免疫群と Ctrl-Ab 免疫群で、Spl-T, PBMC 中の感染量に差は認められなかった。

D. 考察

本年度は、新規ワクチンや抗体医薬等の感染防御効果を生体内で評価するために確立したラットの HTLV-1 腹腔/経口/経直腸感染系を用いて、抗体医薬の候補として着目している抗 HTLV-1 Env gp46 中和抗体 (LAT-27) の感染防御効果について検討した。その結果、LAT-27 は HTLV-1 腹腔感染系において感染量を低くしたことから、LAT-27 には生体内で HTLV-1 新規感染を防御する効果があると考えられる。一方、LAT-27 は消化管粘膜 (経口/経直腸) 感染を防御できなかった。これは、LAT-27 が IgG 型の抗体であるため、消化管管腔側への分布が困難であることや、受動免疫に用いた LAT-27 の投与量が少なかったことなどが理由として考えられる。

HTLV-1 は主として感染母から母乳を介して、乳幼児に垂直感染する。したがって、ヒトでの新規感染を防御するには、妊婦あるいは新生児、またはその両方への受動免疫が必要となる。

今後は、LAT-27 の受動免疫量を増量して、消化管粘膜における新規感染防御効果について再度評価するとともに、HTLV-1 垂直感染系での LAT-27 の感染防御効果について検証する予定である。

E. 結論

ラット HTLV-1 感染系による新規感染防御ワクチン・抗体医薬等の生体内評価系を用いることにより、抗体医薬の候補として想定している抗 HTLV-1 Env gp46 中和抗体 (LAT-27) には、生体内で HTLV-1 感染を防御する効果があることを示した。

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) Tamai Y, Hasegawa A, Takamori A, Sasada A, Tanosaki R, Choi I, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Eto T, Koh K-R, Nakamae H, Suehiro Y, Kato K, Takemoto S, Okamura J, Uike N, Kannagi M. Potential contribution of a novel Tax epitope-specific CD4+ T cells to graft-versus-Tax effect in adult T-cell leukemia patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Immunol.* 190(8): in press, 2013.
- 2) Kannagi M, Hasegawa A, Takamori A, Kinpara S, Utsunomiya A. The roles of acquired and innate immunity in human T-cell leukemia virus type 1-mediated diseases. *Front Microbiol.* 3:323, 2012.
- 3) Mehra S, Golden NA, Stuckey K, Didier PJ, Doyle LA, Russell-Lodrigue KE, Sugimoto C, Hasegawa A, Sivasubramani SK, Roy CJ, Alvarez X, Kuroda MJ, Blanchard JL, Lackner AA, Kaushal D. The Mycobacterium tuberculosis stress response factor SigH is required for bacterial burden as well as immunopathology in primate lungs. *J Infect Dis.* 205(8): 1203-13, 2012.
- 4) Yamaji O, Nagaishi T, Totsuka T, Onizawa M, Suzuki M, Tsuge N, Hasegawa A, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Arase H, Kanai T, Watanabe M. The development of colitogenic CD4(+) T cells is regulated by IL-7 in collaboration with NK cell function in a murine model of colitis. *J Immunol.* 188(6): 2524-36, 2012.

2. 学会発表

(国際学会)

- 1) Hasegawa A, Tamai Y, Takamori A, Sasada A, Tanosaki R, Choi I, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Eto T, Koh K-R, Nakamae H, Suehiro Y, Kato K, Takemoto S, Okamura J, Uike N, Kannagi M. Identification of a novel HLA-DR1-restricted dominant epitope recognized by HTLV-1 Tax-specific CD4+ T-cells augmenting HTLV-1-specific CTL expansion in ATL patients after allogeneic

HSCT. 9th AACR-JCA Joint Conference. February 2013. Maui, USA.

- 2) Kannagi M, Kinpara S, Takamori A, Sasada A, Hasegawa A. Impact of innate and acquired immune responses in adult T-cell leukemia. 9th AACR-JCA Joint Conference. February 2013. Maui, USA.

(国内学会)

- 1) Ando S, Murakami Y, Hasegawa A, Masuda T, Kannagi M. Unresponsiveness of dominant Tax-specific CD8⁺ T cells in rats orally infected with HTLV-1. 第 41 回日本免疫学会総会・学術集会 2012 年 12 月, 神戸.
- 2) Takamori A, Hasegawa A, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Masuda M, Tamai Y, Sasada A, Choi I, Uike N, Okamura J, Watanabe T, Kannagi M. Functional impairment of CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes selective for HTLV-1-specific responses in early stages of adult T-cell leukemia patients. 第 41 回日本免疫学会総会・学術集会 2012 年 12 月, 神戸.
- 3) Nagaishi T, Yamaji O, Onizawa M, Suzuki M, Yamazaki M, Hasegawa A, Arase H, Kanai T, Watanabe M. Natural killer cells suppress an animal model of colitis by targeting the early stage of pathogenic T cell development. 第 41 回日本免疫学会総会・学術集会 2012 年 12 月, 神戸.
- 4) 田中勇悦、長谷川温彦、神奈木真理、田中礼子、齋藤峰輝. HTLV-1 感染 T 細胞の不死化とウイルス産生を制御する宿主免疫環境. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 2012 年 11 月, 大阪.
- 5) 村上悠二、安藤聡美、長谷川温彦、田中礼子、田中勇悦、神奈木真理. ラットモデルにおける HTLV-1 中和単クローン抗体の HTLV-1 感染防御効果. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 2012 年 11 月, 大阪.
- 6) 安藤聡美、村上悠二、長谷川温彦、増田貴夫、神奈木真理. HTLV-1 経口感染ラットを用いたペプチドパルス樹状細胞ワクチン評価系作成のための基礎的研究. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 2012 年 11 月, 大阪.
- 7) 金原秀一、長谷川温彦、高森絢子、増田貴夫、神奈木真理. HTLV-1 感染 T 細胞のウイルス遺伝子発現に対する 1 型インターフェロンの効果. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 2012 年 11 月, 大阪.
- 8) Ahmed Nursarat、長谷川温彦、高森絢子、増田貴夫、山岡昇司、神奈木真理. Establishment of a human iTreg-like cell line susceptible to HIV-1 infection. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 2012 年 11 月, 大阪.
- 9) Tamai Y, Hasegawa A, Takamori A, Sasada A, Tanosaki R, Choi I, Utsunomiya A, Etoh T, Koh KR, Suehiro Y, Okamura J, Uike N, Kannagi M. A novel HLA-DR-restricted epitope recognized by Tax-specific CD4⁺ T cells in ATL patients after allo-HSCT. 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月, 札幌.
- 10) Kinpara S, Masuda T, Hasegawa A, Utsunomiya A, Nakamura M, Kannagi M. The presence of anti-sense transcripts containing the long terminal repeat region in HTLV-1 in ATL cells. 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月, 札幌.
- 11) Sasada A, Kakinuma T, Kinpara S, Takamori A, Hasegawa A, Masuda T, Yamaoka S, Kannagi M. Involvement of innate immune signaling in NK-kB activity in ATL cells. 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月, 札幌.
- 12) 神奈木真理、長谷川温彦、高森絢子、笹田亜麻子、玉井洋太郎、崔日承、末廣陽子、鶴池直邦. ヒト T 細胞白血病ウイルスに対する獲得免疫の臨床への応用. 第 21 回日本組織適合性学会(シンポジウム) 2012 年 9 月, 東京.
- 13) 長谷川温彦、高森絢子、宇都宮與、前田裕弘、山野嘉久、増田昌人、清水由紀子、玉井洋太郎、笹田亜麻子、崔日承、鶴池直邦、岡村純、渡邊俊樹、神奈木真理. HTLV-1 感染者における Tax 特異的 T 細胞応答および ATL 発症予防. 第 1 回 ATL シンポジウム(第 5 回 HTLV-1 研究会/シンポジウム) 2012 年 8 月, 東京.

H. 知的所有権の出願・登録状況
なし

抗 HTLV-Igp46 中和抗体による HTLV-I 関連疾患の新規発症予防・治療法開発の 試みと HTLV-I bZIP factor (HBZ)タンパク検出系の確立

齊藤峰輝 琉球大学大学院医学研究科 准教授 (平成24年4月から8月まで)
高橋良明 琉球大学大学院医学研究科 助教 (平成24年9月から現在まで)

要旨：(I) 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 感染マウスモデルを開発し、自家製 HTLV-1 中和抗 HTLV-1 gp46 抗体または HTLV-1 感染者から精製した IgG による HTLV-1 感染抑制効果を検討した。高度免疫不全マウス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 HTLV-1 感染の有無を検討した。非感染 PBMC と HTLV-1 感染細胞株の接種前後に自家製抗 HTLV-1 中和モノクローナル抗体 (LAT27) または HTLV-1 感染者から精製した IgG を投与することで、マウス体内におけるヒト T 細胞への HTLV-1 感染は完全に抑制された。

(II) HTLV-1 由来 HBZ タンパクの解析に有用なモノクローナル抗体の作製を試みた。その結果、今回新たに 1 クローン(B6-15: マウス IgG2a, κ) が得られ、間接蛍光抗体法やフローサイトメーター法、ウェスタン・ブロット法で HBZ タンパクを検出することができた。

A. 研究目的

(I) HTLV-1 は世界ではじめてヒトの疾患との関連が見いだされたレトロウイルスであり、HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) および成人 T 細胞白血病 (ATL) の原因ウイルスである。我が国には、先進国で最多の約 108 万人もの HTLV-1 感染者が存在しており、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。しかしながら、HTLV-1 の発見から 30 余年を経た今日においてもなお、HTLV-1 関連疾患の有効な治療法はもとより、母子感染および水平感染を防止するワクチンすら開発されていない。本研究では、*in vitro* において細胞間の HTLV-1 感染を阻害することが知られている抗 HTLV-1 中和モノクローナル抗体または HTLV-1 感染者血漿中の IgG が持つ HTLV-1 感染阻害効果が、*in vivo* においてヒト T 細胞に対しても認められるかどうかを検討するため、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新規 HTLV-1 感染マウスモデルを

開発し、以下の実験を行った。

(II) HTLV-1 プロウイルスのマイナス鎖にコードされる HTLV-1 bZIP factor (HBZ) 遺伝子は、mRNA レベルとタンパクレベルの両方で感染病態に様々な影響を与えることが報告されているが、未だ不明な点が多い。その理由の 1 つに、タンパク解析の際に重要なモノクローナル抗体が、これまでなかったことが挙げられる。そこで本研究では、まず、HBZ タンパクに対するモノクローナル抗体を作製することにした。

B. 研究方法

(I) (1) 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) 2×10^6 個とマイトマイシン処理した HTLV-1 感染 T 細胞株 (ILT-M1) 1×10^6 個を同時移植した。(2) 移植 2 週間後にマウスから脾臓細胞を回収し、ヒト CD4, CD8 T 細胞を抗体結合磁気ビーズにより分離した。(3) 分離したヒト CD4, CD8 T 細胞から Total RNA およびゲノム DNA を回収した。また、細胞保存液に再

懸濁して液体窒素中で保存した。(4) Total RNA から cDNA を合成し、HTLV-1 tax、HBZ mRNA の発現を Real Time RT-PCR 法で解析した。(5) ゲノム DNA 中の HTLV-1 プロウイルス量を、TaqMan プローブを用いた Real Time PCR 法により測定した。(6) HTLV-1 Tax タンパクの発現をフローサイトメーター(FCM)法で解析した。(7) 非感染 PBMC と HTLV-1 感染細胞株の接種前後に、自家製抗 HTLV-1 中和モノクローナル抗体 (LAT27) または HTLV-1 感染者血漿から分離精製した IgG を投与して、感染抑制効果を検討した。

(II) (1) コムギ胚芽無細胞タンパク発現系により作製した組換え HBZ タンパクを C57BL/6 マウスに 3 回免疫した。(2) 脾細胞とミエローマ細胞(SP2/0)を融合させた。(3) ハイブリドーマを HAT 培地で選択培養した。(4) 培養上清を使って ELISA 法にて 1 次スクリーニングを行った。(5) 陽性のコロニーについては、HBZ を強制発現させた 293T 細胞株(293T/HBZ(SI))を用いて間接蛍光抗体(IF)法で 2 次スクリーニングを行った。

なお、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

(I) NOG 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 ATL 患者の平均より低く、HAM 患者や無症候性キャリアーと同程度であった。一方、tax mRNA 発現量は HTLV-1 感染者の PBMC 同様極めて低かった。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 タンパク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。LAT27 および HTLV-1 感染者血漿から分離精製した IgG 分画は、いずれも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。

(II) スクリーニングの結果、今回新たに 1 クローン (clone B6-15; マウス IgG2a, κ) が得られた。この B6-15 抗体は、(i) IF 法では、293T/HBZ(SI)細胞の核内に存在する、HBZ タンパクに特異的に反応したが、HTLV-1 陽性細胞株の SLB1 や MT-2 では検出できなかった。同様に、(ii) FCM 法では、293T/HBZ(SI)細胞で陽性だったが、SLB1 や MT-2 では検出できなかった。また、(iii) ウェスタン・ブロット(WB)法では、293T/HBZ(SI)細胞で 37kDa に、SLB1 細胞では 33kDa にメインバンドを検出することができた。さらに、(iv)以前当研究室で得られた別のクローン (clone 4B12; ラット IgG2b, κ) とは HBZ タンパク上の異なるエピトープを認識することがわかった。

D. 考察

(I) HTLV-1 感染ヒト化マウスモデルを簡便に作製し、抗 HTLV-1 中和モノクローナル抗体の HTLV-1 感染抑制効果を示した。今後はこのマウスモデルを用いて、非中和性抗 gp46 モノクローナル抗体や HTLV-1 抗原で感作した免疫細胞 (成熟 DC、CTL 等) で感染防御が可能か否か、HTLV-1 を標的とした各種ワクチン、薬剤の効果についても検討し、最も効率の良い HTLV-1 感染防御法を探索したい。

(II) IF 法と FCM 法では HTLV-1 感染細胞の SLB1 と MT-2 で HBZ タンパクを検出することはできなかったが、WB 法では SLB1 の HBZ タンパクを検出することができた。我々の研究によれば、各種の HTLV-1 感染細胞中の HBZ mRNA 発現量には差があり、SLB1 は比較的 mRNA 発現量が高かった。そのため、IF 法や FCM 法と比べて感度が高い WB 法では、SLB1 細胞株の HBZ タンパクを検出できたと考える。今後、他の HTLV-1 感染細胞の HBZ についても調べていく。

E. 結論

(I) 抗 HTLV-1 中和モノクローナル抗体 (LAT27) または HTLV-1 感染者から精製した IgG は、マウス体内におけるヒト T 細胞への HTLV-1 感染を完全に抑制した。

(II) 本研究により、HBZ タンパク解析に有用なモノクローナル抗体が、これまでに 2 クロー

ン得られた。今後、高感度 HBZ タンパク定量システム (サンドイッチ ELISA 等) の開発を予定している。これらの検出系により、これまでタンパクレベルでの解析が難しかった HBZ 分子を、HTLV-1 感染病態との関連性も含め、より詳細に調べていく。

F. 健康危険情報

特記すべき情報なし

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

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 部長

要旨：ADCCやADCPを作用機序とする抗体医薬の効果判定のための動物評価モデルの開発を行った。前年度はヒトNK細胞が増殖するhIL-2-NOGマウスを、本年度はヒト顆粒球、単球が増殖するhGM-CSF/hIL-3-NOGマウスを開発した。hGM-CSF/hIL-3-NOGマウスでは、ヒトT細胞、各種顆粒球、マクロファージ、単球や肥満細胞が従来のNOGマウスと比べ飛躍的に増殖する。これら顆粒球では、FcγRの発現が認められ、抗体医薬のADCP活性を検定するための有用な動物と考えられる。

A. 研究目的

HTLV-1感染症の拡大を阻止するワクチン、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。そのため、HTLV-1に感染するヒトの細胞を生着、維持できる「ヒト化マウス」は動物モデルとして極めて有効である。本年度は、この「ヒト化マウス」を更に改良し、ワクチンで誘導される抗体、開発される医薬用抗体の治療効果のうち、顆粒球やマクロファージなどの骨髄系細胞が関与するADCC作用を判定できる「ヒト化マウス」の開発を行った。

B. 研究方法

1998年に我々が樹立、報告したヒトGM-CSF（顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子）およびIL-3（インターロイキン3）を分泌するhGM-CSF/IL-3トランスジェニックマウス（Fukuchi, Y. et al, Leukemia Research, 1998）をNOGマウスに戻し交配することによって、hGM-CSF/IL-3（GM/3）NOGマウスを作製した。このマウスの8-10週令に2.5 GyのX線照射を行った後に臍帯血由来CD34+血液幹細胞 5×10^4 個を静脈経路で移入した。移入後、経週の末梢血を採取し、その末梢血中のヒト細胞が占める割合、および細胞群についてフローサイトメトリーで解析した。移植後20-24週目にマウスを安楽死させた後、骨髄、脾臓、肺胞洗浄液等を採取し、そこで認められるヒト細胞

を解析した。本研究は公益財団法人実験動物中央研究所の動物実験委員会、遺伝子組換え安全委員会、研究倫理審査委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

(1) GM/3 NOGマウスの末梢血でのヒト細胞の生着率：CD34+細胞移植後、4週目から実験終了する20-24週目までの全期間を通じて、末梢血におけるヒトCD45+造血細胞の割合は、対照のNOGマウスと比較して、有意に高かった。GM/3 NOGマウスではヒト細胞が平均40%を占めたが、NOGマウスでは30%にも達しなかった。

(2) GM/3 NOGマウスの末梢血に認められるヒト細胞群：全期間を通じて、顆粒球、単球等のヒト骨髄系細胞はヒトCD45+造血細胞に占める割合が約20%で、対照のNOGマウス10%と比べて有意に高かった。T細胞は8週以降、末梢血で検出されるようになり、この比率は対照のNOGマウスと比べて有意に高かった。しかし、ヒトNK細胞の比率はGM/3 NOGとNOGマウス間で差は認められず、ヒトB細胞は逆にNOGマウスの方が高かった。

(3) 脾臓、骨髄、肺胞洗浄液でのヒト細胞生着率：脾臓はGM/3 NOGマウスで顕著に肥大し、その重量はNOGマウスの約3倍にも及んだ。細胞数は全細胞種でNOGマウスを上回ったが、比率では末梢血同様に、T細胞と骨髄系細胞が有意に高かった。一方、骨髄では脾臓に認められ

る数的な増大は認められなかったが、細胞種の比率は末梢血、脾臓と同様の傾向にあった。また、肺胞洗浄液でも、有意に細胞数が増加し、脾臓と同じ傾向にあった。

(4) GM/3 NOGマウスで分化するヒト顆粒球の解析：マウス末梢血からマウス細胞を磁気ビーズで除去した後に、塗沫標本を作製し、メイギムザ染色を施し、細胞の形態を顕微鏡下で観察した。その結果、好中球、好酸球、好塩基球、単球などヒト骨髄系細胞に含まれる全ての細胞が多数認められた。そのうち、好中球に関しては、ヒト末梢血に認められる多型核型ではなく、2~4分葉の比較的未分化な細胞として認められた。組織染色では、脾臓、肺や胃に多数のチマーゼ陽性、FceR陽性のヒト肥満細胞が数多く確認された。

D. 考察

本年度の研究により、従来重度免疫不全 NOG マウスへのヒト造血幹細胞移植で分化し難かった顆粒球をはじめとするヒト骨髄系造血細胞が高率に分化する「ヒト化マウス」の作製が GM/3 NOG マウスで可能となった。このマウスを用いることによって、HTLV-1 感染拡大を阻止するワクチンならびに抗体医薬等の開発のための基礎的検討が可能と思われる。すなわち、効果的な中和抗体の作製のための ADCC 活性を評価できる可能性があるからである。昨年度報告したヒト NK 細胞が分化する hIL-2-NOG マウスとともに、HTLV-1 感染阻止、または増殖阻止に効果的がある中和抗体の ADCC 活性スクリーニングに使用可能か否かを今後の課題としたい。

E. 結論

hGM-CSF/hIL-3 Tg マウスを NOG マウスに戻し交配することによって、ヒト顆粒球、単球が増殖する hGM-CSF/hIL-3-NOG マウスを開発した。このマウスにヒト造血幹細胞を移入することによって、ヒト T 細胞ばかりでなく、従来認め難かった、各種顆粒球、マクロファージ、単球や肥満細胞が従来の NOG マウスと比べ飛躍的に増殖する。このヒト骨髄系細胞を利用して、ADCC や ADCP を作用機序とする抗体医薬の効果判定のための動物評価モデルの開発が

可能になると思われる。

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) Ito R, Takahashi T, Katano I, and Ito M. Current advances in humanized mouse models. *Cell Mol Immunol.* 2012, 9:208-214.
- (2) Sato K, Misawa N, Fukuhara M, Iwami S, An D.S, Ito M, and Koyanagi Y. Vpu augments the initial burst phase of HIV-1 propagation and downregulates BST2 and CD4 in humanized mice. *J Virol.* 2012, 86:5000-5013.
- (3) Suzuki M, Takahashi T, Katano I, Ito R, Ito M, Harigae H, Ishii N, and Sugamura K. Induction of human humoral immune responses in a novel HLA-DR-expressing transgenic NOD/Shi-scid/gammacnull mouse. *Int Immunol.* 2012, 24:243-252.
- (4) Ito R, Katano I, Ida-Tanaka M, Kamisako T, Kawai K, Suemizu H, Aiso S, and Ito M. Efficient Xenoengraftment in Severe Immunodeficient NOD/Shi-scid IL2rgammanull Mice Is Attributed to a Lack of CD11c+B220+CD122+ Cells. *J Immunol.* 2012, 189(9):4313-20.
- (5) Ito R, Negishi N, Irie N, Matsuo K, Suzuki D, Katano I, Hayakawa E, Kawai K, Kamisako T, Eto T, Ogura T, Hozumi K, Ando K, Aiso S, Tamaoki N, Habu S, and Ito M. Osteosclerosis and inhibition of human hematopoiesis in NOG mice expressing human Delta-like 1 in osteoblasts. *Exp Hematol.* 2012, 40:953-963.

2. 学会発表

(国際学会)

- (1) Mamoru Ito. Development of humanized mice model. 1st Samsung Humanized Mice Workshop, 2012. 4. 14, Seoul, Korea.
- (2) Mamoru Ito. Immunodeficient mice and humanized mouse models. Symposium VI. The 2012 Spring conference of the Korea Association of Immunologist, 2012. 4. 12-13,