

201225044A

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24年度 総括・分担研究報告書

平成25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24年度 総括・分担研究報告書

平成25年 3 月

研究代表者 長谷川 秀樹

(国立感染症研究所)

平成24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	准教授
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. ワクチン接種を行った母親マウスの母乳中における抗 HTLV 抗体応答の解析	11
--	----

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	17
-----------------------------------	----

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. HTLV-1 感染の克服に向けた病態の解明、感染・進展の防止、診断技術の 向上等に関する研究：HTLV-1 感染症予防ワクチンの開発 —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—	21
---	----

研究分担者：梁 明秀 (横浜市立大学医学部微生物学)

4. ワクチン応答性に影響を及ぼす免疫反応の解析	27
--------------------------	----

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	31
--	----

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	35
---------------------	----

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 ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (Human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1) 感染症は成人 T 細胞性白血病 (ATL) や関連脊髄症 (HAM) 等の重篤な疾患を引き起こすが有効なワクチンが無く開発が求められている。HTLV-1 の主な感染経路は母乳を介した母子感染である。母親に対してワクチン接種を行い母乳中に分泌型 IgA 抗体を誘導することで、授乳を介した感染リスクを低減できる可能性がある。皮下ワクチン接種は経鼻ワクチン接種と比較して、血清中に抗 HTLV-1 gp46 にたいする IgG 抗体を強く誘導し、それを反映する形で母乳中へ特異的な IgG 抗体が誘導されることが明らかになった。ワクチン抗原として HTLV-1 がコードするすべてのタンパク質を、生理活性を保持した状態で全長にて合成し、感染者および感染モデルマウス血清中の微量抗体の検出が可能なアッセイ系の構築を行った。また Tax トランスジェニックマウス由来 ATL 細胞を移植したマウスにおける Tax 特異的 CTL 反応誘導を示す結果を得た。ATL は高齢で発症する為、老化モデル遺伝子改変マウス ($\beta 5t$ -Tg) から分離した脾細胞を用い、MLR 反応を検討したところ、 $\beta 5t$ -Tg 由来脾細胞では MLR 反応が減弱していた。HTLV-1 感染発症モデルとしてヒト化マウスを用い感染細胞の経口投与による感染を試みたところ、低レベルでの感染が持続した。その際、HTLV-1 特異的ヒト抗体およびサイトカインの発現等、抗 HTLV-1 宿主免疫も持続することが確認された。

研究分担者

侯野 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・准教授)
田中 正和 (関西医科大学微生物学・助教)

A. 研究目的

成人 T 細胞白血病・リンパ腫 (ATL) ならびに HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) は、HTLV-1 により引き起こされる疾患であり、現在有効な治療法は存在しない。2008~2010 年度に実施された厚生労働科学研究班による実態調査の結果、全国のキャリア数は約 108 万人と推定された。以前は、九州・沖縄地方の風土病と考えられていた HTLV-1 感染症が、関東・近畿地方の大都市圏への拡散し、国内における HTLV-1 キ

キャリアは依然として多いことが明らかになった。HTLV-1 キャリアにおける ATL の生涯発症率は約 5%とされるため、有効な治療法の開発が求められている。また、HTLV-1 の主たる感染経路は授乳による母子感染であることから、人工乳の利用を含めた授乳の制御により新たな感染を防止することは可能である。しかしながら、HTLV-1 キャリアが国内に拡散した現状を考えると、自身がキャリアであることを認識していない場合も考えられ、キャリア数は減る傾向にあるものの一定のレベルで維持される可能性は否定できない。

HTLV-1 キャリアに対する発症予防ならびに授乳による感染リスクを低減させる手段として、ワクチン接種が考えられる。粘膜を介して感染する感染症には、粘膜上で働く特異的分泌型 IgA 抗体が有効であることがインフルエンザウイルスを用いた実験から明らかになっている。この分泌型 IgA 抗体は、汎粘膜機構によって全身の粘膜上にも分泌型 IgA 抗体の産生が誘導されるため、母乳中にも積極的に分泌される事が知られている。血中 IgG 抗体に加えて IgA 抗体が誘導される事により感染防御効果が高まる事が期待できる。

HTLV-1 ワクチンの開発や患者血清中の微量抗体の測定に向け、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて HTLV-1 全長タンパク質の合成を行った。また、AlphaScreen 法を活用することで、血清中の微量抗体の検出法を新たに開発した。

もう一つの戦略として、HTLV-1 抗原発現細胞に対する有効な細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 反応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、感染細胞発現抗原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一方、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。、標的抗原候補として最重要と考えられる HTLV-1 Tax を標的とする CTL 反応を中心とした解析を進めることとした。平成 24 年度は、Tax トランスジェニックマウス由来の mATL 細胞を移植した同系マウスにおける Tax 特異的 CTL 反応を解析した。

HTLV-I の感染予防および発症予防ワクチンを開発することを目的とする。有効なワクチンが開発されることで、感染者の減少、有効な治療法が未だ確立されていない HTLV-I 関連疾患の発症予防が期待される。

抗 HTLV-1 感染細胞ワクチンの開発を目的とし、ヒト免疫系を個体内に再構築したヒト化マウスに HTLV-1 を感染させることで、低レベルでの持続感染状態を維持する感染マウスを作製することを目的に、ヒトにおける主要な感染経路である経口による感染を試み、さらに同感染マウスにおける宿主免疫応答を検討した。

B. 研究方法

HTLV-1 gp46 の調製

ワクチンに用いる抗原として gp46 は、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて調製した。gp46 の精製は、Ni-NTA カラにより行い、リン酸バッファーで溶出を行った。その後、PD-10 カラムを用いて 0.025% Brij35 を含む PBS に溶媒を置換した。精製 HTLV-1 gp46 の濃度は、BCA 法により定量を行った。

ワクチン接種と交配

6~8 週齢、雌の BALB/c マウス一群 3 匹をワクチン接種群として利用した。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。マウス 1 匹あたり、HTLV-1 gp46 を合成二本鎖 RNA Poly(I:C) と共に接種した。ワクチン接種は麻酔下で実施した。皮下ワクチン接種群では頸部の皮下に注射した。また、コントロール

群としてワクチン未接種群を設けた。ワクチン接種は2週間間隔で計3回実施し、最後のワクチン接種後に雄マウスをケージに加えることで交配を行った。

抗 gp46 抗体の定量

血清中あるいは母乳中に含まれる gp46 に対する抗体は、ELISA 法により定量を行った。

コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた HTLV-1 全長タンパク質の合成

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, p27L, 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。

HTLV-1 全長タンパク質の発現確認および定量

合成されたタンパク質は、Western Blotting により Streptavidin-HRP を用いて検出した。可溶化が困難であった Gag, TAX-1, HBZ タンパク質に関して、塩化亜鉛や界面活性剤 Brij35 をタンパク質合成中に加え、タンパク質の可溶化条件を検討した。

化学増幅型ルミネッセンスプロキシミティホモジニアスアッセイ、AlphaScreen 法を用いた微量抗体検出法の開発

まず基質として用いる HTLV-1 全長タンパク質の N 末端にビオチン化配列を付加して無細胞合成し、患者血清と混合後、AlphaScreen 検出用ビーズを加えることで、抗原タンパク質の N 末端にストレプトアビジンコートされたドナービーズが結合し、抗原に結合した特異抗体にプロテイン G がコートされたアクセプタービーズが結合する。これら2つのビーズが近

接した複合体を形成させた後、680 nm の励起光を照射することで、ドナービーズ周囲の酸素分子が一重項酸素に変換され 200 nm の範囲で溶液中を拡散し、アクセプタービーズを発光させシグナルとして検出される。特異的抗体が存在しない場合は、ビーズ同士が近接できないためシグナルが検出されないというアイデアに基づいている。

(倫理面への配慮)

本研究において、遺伝子組換え実験を用いることから、研究者が所属する機関の組換え DNA 実験安全委員会、バイオセーフティ委員会、動物実験委員会、医学研究倫理委員会等の承認・認可を得て実験を行った。また、本年度はヒトおよび動物検体を使用した実験は実施していないが、今後の臨床サンプルの解析及びデータの公表にあたっては、倫理委員会の規則にのっとり、当該患者（感染者）の同意を得た上で行う予定である。

CTL 応答の検討

本研究事業の研究代表者が開発した独自の ATL 発症モデルである Tax トランスジェニックマウス (Nat Med 12:466, 2006) 由来の mATL 細胞を利用することとした。研究代表者との共同実験で、mATL 細胞 1×10^6 を、同系の正常 B6 マウスの腹腔に移植した後 Tax 特異的 CTL 反応を測定した。

(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・承認後に開始した。

老化モデルマウス、細胞分離と MLR 反応

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。コントロールマウスは B6 WT マウスを、MLR 反応には BALB/c マウスを三共ラボより購入した。

$\beta 5t$ -Tg および WT マウスを犠牲死させ、脾臓を摘出し、セルスクレーパー (BD Falcon)

と 100 μ m のセルストレイナー (BD Falcon) を用いて細胞を分離し、PBS に浮遊させた。マイトマイシン C 処理を行った BALB/c 脾細胞を stimulator として MLR 反応を行い、細胞増殖率を検討した。

MLR 反応を行った well 中の培養液を用い、マルチプレックスサスペンションアレイを用いて、各種サイトカイン、ケモカイン量を測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は北海道大学の動物実験指針に基づいて行った。

ヒト化モデルマウス

ヒト化マウスは、 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 (5x10⁴ 個)を注入・移植し作製した。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)に、腹腔内あるいは経口で、放射線照射 (10Gy) により増殖能を欠失させた HTLV-1 感染細胞を、それぞれ 2.5x10⁶ 個あるいは 1.0x10⁷ 個投与し感染を成立させた。

HTLV-1 感染 Jurkat 細胞(JEX)の作製

HTLV-1 感染性クローンプラスミド DNA(pX1 MT-M)を 293T 細胞に一過的に細胞導入し HTLV-1 を産生させた後、予め赤色蛍光蛋白 TOMATO を Tax 応答配列制御下に発現する Jurkat 細胞、JUL、と 24 時間共培養し、TOMATO を強発現する JUL 細胞を FACS にて分離した。得られた TOMATO 強発現 JUL 細胞群を更に段階希釈法にてクローニングし、細胞株を樹立した (JEX 細胞株)。

感染細胞の定量

分離された PBMC からゲノム DNA をカラム法 (PureLink Genomic DNA Mini Kit: Invitrogen) にて精製し、HTLV-1 プロウイルス pX 領域を標的とした TaMan Probe 法による定量的 PCR

(MyiQ®: Bio-Rad) を行った。また同時に内部標準として human β -globin 遺伝子を標的とした定量的 PCR を行い、ヒト単核球画分における HTLV-1 感染細胞の比率を算出した。

HTLV-1 抗体価

HTLV-1 抗体価は、ゼラチン凝集(PA)法 (富士レビオ) を用いて測定した。

サイトカイン測定

HTLV-1 感染ヒト化マウス血清中のヒトサイトカイン・ケモカイン (IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF、CCL4/MIP-1 β) の濃度は、multiplex beads-based assay (Bio-Plex Human Cytokine 8-plex Assay Beads Assay)を用いて測定した。

(倫理面への配慮)

ヒト臍帯血は京阪さい帯血バンクにおいて、提供者の同意の下に採取されたもののうち、移植に用いられないロットを研究内容および倫理項目を審査、許可後に、研究用として提供され使用している。

また動物実験については、関西医科大学動物実験委員会に実験計画を提出し、審査の後承認されている。

C. 研究結果

母乳中への抗体誘導

コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた gp46 の合成を行った。可溶化条件の検討を行った結果、界面活性剤として 0.025% の Brij35 を添加した場合に、ほぼ全ての合成 gp46 が可溶化することが明らかになった。

このコムギ無細胞タンパク質合成系により作製された gp46 をワクチンとして、マウスに対するワクチン接種を行った。また、経鼻インフルエンザワクチンの研究において、高い粘膜アジュバント活性を示すことが知られている合成二本鎖 RNA である Poly(I:C)をアジュバント

として用いた。10 μg の gp46 を 10 μg の Poly(I:C)と共に、経鼻あるいは皮下から 2 週間毎に計 3 回の接種を行った。皮下ワクチン接種を行った群においては、2 回のワクチン接種で gp46 に対する血清中 IgG 抗体応答の誘導が認められたが、経鼻ワクチン接種を行った群では 2 回のワクチン接種で抗体応答を誘導することが出来なかった。

ワクチン接種後に交配を行い出産した母親マウスの血清中ならびに母乳中の HTLV-1 gp46 特異的な IgG 抗体の定量を行った。血清中の抗体応答は皮下ワクチン接種群で高く、経鼻ワクチン接種群では低い傾向にあった。また、この血清中の IgG 抗体応答を反映し母乳中の IgG 抗体がみられることが明らかになった。

コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた 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無細胞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。無細胞合成用の pEU-E01-bls-S1 ベクターに各遺伝子を導入し、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いてビオチンが付加された HTLV-1 タンパク質の合成を行った。その結果、7 種類の全ての全長タンパク質の合成が確認された。

HTLV-1 全長タンパク質の可溶化の検討

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た。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。そこで、合成したタンパク質に塩化亜鉛および界面活性剤である Brij35 を各濃度で添加し、可溶化を試みた。その結果、Gag は 1 μM の塩化亜鉛および 0.05% の Brij35 の添加、Tax は 1 μM の

塩化亜鉛の添加、HBZ は 0.05% の Brij35 の添加により顕著に可溶性が亢進することが判明した。上記の検討により可溶化できた HBZ リコンビナントタンパク質を用いて、モノクローナル抗体の作製を試みた結果、抗原特異的なモノクローナル抗体の作製に至った。また、Tax リコンビナントタンパク質をリポソーム内に封入することに成功した。新たな HTLV-1 ワクチンの抗原として活用する予定である。

AlphaScreen を用いた血清中の抗 HTLV-1 抗体測定法の開発

上記の手法で合成された、N 末がビオチン化された HTLV-1 タンパク質に特異的抗体または血清を添加後、AlphaScreen 試薬（スロレプトアビジンコートアクセプタービーズ、プロテイン A コートドナービーズ）を付加し 60 分、26 $^{\circ}\text{C}$ でインキュベート後、AlphaScreen 検出器（EnvisionTM、パーキンエルマー社）で検出を行った。Env 抗体、Gag 抗体について、容量依存的に抗体価を簡便に測定することができた。

CTL 応答の検討

対照マウスでは、Tax 特異的 CTL 反応は認められなかったが、mATL 移植後 3 週目の解析では、いくつかの Tax ペプチドプール刺激による CTL 反応を認めた。特に Tax46-100 特異的および Tax301-353 特異的 CTL 反応が認められた。移植後 1 週目・2 週目の解析でも、ボーダーラインの反応が認められた。

老化モデルマウス

老化モデルマウス $\beta 5\text{t-Tg}$ 由来脾細胞ではコントロール WT 由来脾細胞に比べ、MLR 反応が低下していた。また、老齢 WT でも若齢マウスに比して MLR 反応が低下していた。また、 $\beta 5\text{t-Tg}$ 由来脾細胞では T 細胞刺激時に IL-2 や IFN- γ など、Th1 系のサイトカイン産生が低下していることが明らかになった。また、ケモカインの産生低下を認めた。

ヒト化マウス感染モデルの検討

HTLV-1 感染源の検討

これまで我々は、ヒト化マウスの HTLV-1 感染に、感染性の高いことが報告されている MT-2 細胞株を用いてきた。MT-2 細胞株から産生されるウイルスに含まれる HTLV-1 ゲノムを解析したところ、そのほとんどが欠損型であることが明らかとなった。同欠損型プロウイルスは、Tax 等の pX 遺伝子産物を産生しなかったが、HBZ の発現が予想されたため、よりヒトの感染系に近い状況を再現するため、完全長ウイルスのみを産生する感染細胞株の樹立を試みた。

そこで、HTLV-1 感染性クローンプラスミド DNA を用いて産生されたウイルスを感染させた Jurkat 細胞株、JEX、を樹立し（研究方法の項参照）、これを感染源としてヒト化マウス腹腔内に投与したところ、MT-2 細胞を用いた場合と同等の感染形態を示すことが明らかとなった。また、感染細胞内のプロウイルスを解析したところ、感染初期から完全長ウイルスの感染が確認された。従って、以後の感染実験には JEX 細胞を用いることとした。

経口感染による病態変化

感染細胞株のヒト化マウス腹腔内投与による感染においては、ATL 様の病態が再現されるものの、感染細胞の急激な腫瘍増殖の結果、抗 HTLV-1 宿主免疫は早期に破綻し、感染数ヶ月以内に感染個体は白血病死に至る。そこで、感染細胞と宿主免疫の平衡関係が維持されるウイルスキャリアと同等の感染状態を確立するため、ヒトにおける主要な感染経路である経口による感染を試みた。

1.0x10⁷ の JEX 細胞をヒト化マウスに経口投与したところ、末梢血中の CD3 陽性ヒト T 細胞数、T 細胞における CD25 陽性画分の割合はいずれも、対象群と比べて差は認められなかったものの、投与 3 週目前後から、有意な量のウイルス感染が観察され、90%以上の個体が 20 週

以上生存した。末梢血中の HTLV-1 プロウイルス量は、末梢血中 100 個において 1 コピー程度であった。また、血清中の抗 HTLV-1 抗体価を測定したところ、感染 3 週より継続的な抗体の産生が観察された。さらに感染 17 週の血漿中のヒトサイトカインの発現を計測したところ、IFN- γ の産生が対照群と比べ有意に増大しており、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13 についても増加傾向が確認された。

抗 CD8 抗体投与による感染細胞数の一過的増加

感染細胞株の経口投与による感染で樹立した HTLV-1 感染ヒト化マウスにおける低感染状態の維持における、抗 HTLV-1 宿主免疫の関与を明らかにする為、抗ヒト CD8 抗体の腹腔内投与による細胞障害性 T 細胞の血中からの枯渇・除去を試みた。抗ヒト CD8 IgG を隔日で 3 回経口感染ヒト化マウス腹腔内に投与したところ、投与 1 週目においてヒト CD8T 細胞の完全な除去が観察され、この状態は数週間以上維持された。この間における末梢血ヒト T 細胞中のプロウイルス量を測定したところ、投与前平均 0.2%前後であった感染率が、投与 1 週後に、平均 1.2%にまで上昇した。抗体投与 3 週目には、感染細胞の数は平均 0.4%程度にまで減少し、その後も維持された。抗体投与 1 週後の各感染個体での感染率の上昇は、5~30 倍に達し、持続感染状態を示す経口感染ヒト化マウス体内での感染細胞の制御における CD8 陽性細胞障害性 T 細胞の関与が強く示唆された。

D. 考 察

本研究では、HTLV-1 キャリアである母親から授乳を介して子へ感染するリスクを軽減することを目的とし、マウスを用いたワクチン接種実験において母乳中に誘導される抗 HTLV-1 gp46 特異的な抗体応答の評価を行った。我々

は、新生児へのインフルエンザウイルス感染のリスク軽減を目的として、同様の母子免疫を利用したワクチン効果を既に検討している。HTLV-1 gp46 を用いた研究においては、母乳中への gp46 特異的 IgG 抗体の誘導には皮下ワクチン接種が優れていることが明らかとなった。皮下接種の場合には 2 回のワクチン接種で抗体応答が認められたが、経鼻接種の場合には 3 回のワクチン接種が必要であることが明らかになった。アジュバントを用いているにも関わらず、特異的な抗体応答を誘導するために接種回数を要した原因として、コムギ無細胞タンパク質合成系で作製した gp 46 の抗原性が原因として考えられる。本合成系で合成した gp46 には糖鎖が付加されないため、実際の gp46 に比べて抗原性が著しく低下する可能性がある。我々は、この糖鎖付加の問題を解決するために、コドン出現頻度を最適化した哺乳類細胞系での gp46 の調製を試みているが、現在のところ収率が低下してしまう問題を抱えている。この収率の問題を克服できれば、より抗原性の高いワクチンを調製できるものと考えている。

コムギ無細胞タンパク質合成系を活用し、全長 HTLV-1 抗原タンパク質の作製を行った。本研究の特色としては、これまでの研究ではタンパク質の可溶化が困難であった HTLV-1 ウイルスタンパク質の合成・可溶化を簡便に行うことができること及び AlphaScreen 法を用いたハイスループットな抗体検出系を確立する点である。ウイルス研究における課題の一つに、可溶化ウイルスタンパク質の合成がある。HTLV-1 ウイルスタンパク質においても、大腸菌や生細胞を用いた合成ではタンパク質の凝集が起こるため、その後の解析に使用することが困難であった。本研究では、翻訳合成液内に界面活性剤を加えることで容易に可溶化タンパク質を合成できるコムギ無細胞タンパク質合成系を用いることによりウイルスタンパク質の可溶化を試みる。タンパク質の可溶化が可能となれば、ウイルスタンパク質の大量合成、

精製により様々な研究への応用が示唆される。また、感染阻止、発症阻止の為のワクチン開発にはそれぞれの対象疾患に適した抗原の検討が必要である。本研究では、AlphaScreen 法を用いた抗体検出系の確立を行い、可溶化ウイルスタンパク質と感染患者検体やモデルマウス血清に含まれる抗 HTLV-1 抗体の有無を調べる。これらのアッセイの結果により、HTLV-1 感染による様々な疾患に特異的な抗ウイルス抗体のプロファイリングが進み、ワクチン候補タンパク質の探索や同定した抗体による感染阻害効果などワクチン開発に繋がると考えられる。

mATL 細胞の移植による Tax 特異的 CTL 反応の誘導が初めて示された。移植した mATL 細胞における Tax 発現は mRNA レベルでは確認されているものの蛋白レベルでは確認されていなかったが、本研究では mATL 細胞の移植により Tax 抗原特異的 CTL 反応が誘導されることが明らかとなった。今後は、この Tax 特異的 CTL 反応の抗 ATL 細胞増殖抑制効果を解析する計画である。特に、Tax 特異的 CTL 反応増強による ATL 細胞排除効果を期待している。

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 MLR 反応の低下やサイトカインやケモカイン産生の低下を認め、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。

腹腔内投与によるこれまでの HTLV-1 感染ヒト化マウスは、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反面、急性の病態変化を伴うため宿主免疫の制御が困難であった。しかし今回、ウイルス発現細胞を経口投与し感染を成立させ

ることにより未発症感染者（ウイルスキャリア）と同等な持続感染モデルを確立することができた。このモデル系においては、低いウイルス量の維持とともに、有意な量の抗 HTLV-1 抗体やサイトカインの発現等、抗 HTLV-1 宿主免疫の誘導が確認され、更に抗 CD8 抗体投与による細胞障害性 T 枯渇実験では、一過的な感染細胞数の増加が観察されたことから、感染細胞と宿主免疫との平衡関係が成立している可能性が強く示唆された。

E. 結論

HTLV-1 の主たる感染経路は授乳である。授乳をコントロールすることで感染リスクが低減するが、HTLV-1 キャリアが国内に拡散している現状を考えると授乳のコントロールのみでは不十分である可能性がある。ワクチン接種により母乳中に HTLV-1 に対する抗体を誘導することで、授乳による感染を阻止できると考えられる。本研究から、ワクチン接種により母乳中に HTLV-1 gp46 に対する抗体を誘導可能であることが明らかとなった。母乳中抗体による HTLV-1 感染阻止効果が認められれば、HTLV-1 キャリアに対する新規ワクチンとなると期待している。

コムギ無細胞タンパク質合成系を活用し、HTLV-1 抗原タンパク質を作製した。またそれらを活用し、HTLV-1 タンパク質に対する抗体の測定法を開発した。今後は様々な臨床段階の患者血清中の抗 HTLV-1 抗体を測定するとともに、その抗原エピトープを特定することで、新たなワクチン開発のための基礎データとする予定である。

HTLV-1 Tax トランスジェニックマウス由来 ATL 細胞を移植したマウスにおける Tax 特異的 CTL 反応誘導を示す結果を得た。今後は、本研究結果をもとにこの系を発展させ、Tax 特異的 CTL 誘導効果を検討する計画である。

β5t-Tg マウスはプロテアソームの機能異常

による免疫応答の変化を解析できる有用なモデルであると考えられる。今後は、本老化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。

HTLV-1 感染細胞の経口投与によるヒト化マウス感染系において、ヒト未発症感染者（ウイルスキャリア）と同等な持続感染モデルを確立することに成功した。同マウスにおいては、感染細胞と宿主免疫との平衡関係が成立している可能性が強く示唆されることから、ATL 発症予防ワクチン開発を進める上で重要な実験基盤を提供すると考える。今後は、末梢血におけるウイルス感染率を指標に、DNA ワクチンやペプチドワクチン等の評価をおこなっていく予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakajima N, Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumasaka T, Thuy NT, Hasegawa H, San LT, Kawachi S, Liem NT, Suzuki K, Sata T. Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam. *Mod Pathol*. 2012 Nov 23. doi: 10.1038/modpathol.2012.193. [Epub ahead of print]
- 2) Sasaki I, Hoshino K, Sugiyama T, Yamazaki C, Yano T, Iizuka A, Hemmi H, Tanaka T, Saito M, Sugiyama M, Fukuda Y, Ohta T, Sato K, Ainai A, Suzuki T, Hasegawa H, Toyama-Sorimachi N, Kohara H, Nagasawa T, Kaisho T. Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development. *Blood*. 2012 Oct 11. [Epub ahead of print]
- 3) van Riet E, Ainai A, Suzuki T, Hasegawa

- H.Mucosal IgA responses in influenza virus infections; thoughts for vaccine design. *Vaccine*. 2012 Aug 31;30(40):5893-900. Epub 2012 Jul 24.
- 4) 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.
 - 5) Miyakawa K, Sawasaki T, Matsunaga S, Tokarev A, Quinn G, Kimura H, Nomaguchi M, Adachi A, Yamamoto N, Guatelli J, Ryo A. Interferon-induced SCYL2 limits release of HIV-1 by triggering PP2A-mediated dephosphorylation of the viral protein Vpu. *Sci Signal*. 245(5): ra73, 2012.
 - 6) Matsunaga S, Sawasaki T, Ode H, Morishita R, Furukawa A, Sakuma R, Sugiura W, Sato H, Katahira M, Takaori-Kondo A, Yamamoto N, Ryo A. Molecular and enzymatic characterization of XMRV protease by a cell-free proteolytic analysis. *J Proteomics*. 75(15): 4863-73, 2012.
 - 7) Furukawa A, Okamura H, Morishita R, Matsunaga S, Kobayashi N, Ikegami T, Kodaki T, Takaori-Kondo A, Ryo A, Nagata T, Katahira M. NMR study of xenotropic murine leukemia virus-related virus protease in a complex with amprenavir. *Biochem Biophys Res Commun*. 425(2): 284-9, 2012.
 - 8) Narita Y, Murata T, Ryo A, Kawashima D, Sugimoto A, Kanda T, Kimura H, Tsurumi T. Pin1 interacts with the Epstein-Barr virus DNA polymerase catalytic subunit and regulates viral DNA replication. *J Virol*. 87(4):2120-27, 2012.
 - 9) Kurihara K, Takahara Y, Nomura T, Ishii H, Iwamoto N, Takahashi N, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Moriya C, Matano T. Immunogenicity of repeated Sendai viral vector vaccination in macaques. *Microbes Infect* 14:1169-1176, 2012.
 - 10) Takahashi N, Nomura T, Takahara Y, Yamamoto H, Shiino T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Sakawaki H, Miura T, Igarashi T, Koyanagi Y, Naruse TK, Kimura A, Matano T. A novel protective MHC-I haplotype not associated with dominant Gag-specific CD8+ T-cell responses in SIVmac239 infection of Burmese rhesus macaques. *PLoS ONE*
 - 11) 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(3):963-72, 2012
 - 12) Nakazawa D, Tomaru U, Yamamoto C, Jodo S, Ishizu A. Abundant neutrophil extracellular traps in thrombus of patient with microscopic polyangiitis. *Front Immunol* 3:333. doi: 10.3389/fimmu.2012.00333, 2012
 - 13) Katsurada T, Kobayashi W, Tomaru U, Baba T, Furukawa S, Ishizu A, Takeda K, Sakamoto N, Asaka M, Takeda H, Kasahara M. Decrease of peripheral and intestinal NKG2A-positive T cells in patients with ulcerative colitis. *PLoS One* 7(9):e44113, 2012
 - 14) Baba T, Badr Mel S, Tomaru U, Ishizu A, Mukaida N. Novel process of intrathymic tumor-immune tolerance through CCR2-mediated recruitment of Sirpa+ dendritic cells: a murine model. *PLoS One* 7(7):e41154, 2012
 - 15) Nakazawa D, Tomaru U, Suzuki A, Masuda S,

- Hasegawa R, Kobayashi T, Nishio S, Kasahara M, Ishizu A. Abnormal conformation and impaired degradation of propylthiouracil-induced neutrophil extracellular traps: implications of disordered neutrophil extracellular traps in a rat model of myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheum* 64(11):3779-87, 2012
- 16) Tomaru U, Yamada Y, Ishizu A, Kuroda T, Matsuno Y, Kasahara M. Proteasome subunit $\beta 5t$ expression in cervical ectopic thymoma. *J Clin Pathol* 65(9):858-9, 2012
- 17) Fukaya S, Matsui Y, Tomaru U, Kawakami A, Sogo S, Bohgaki T, Atsumi T, Koike T, Kasahara M, Ishizu A. Overexpression of TNF- α -converting enzyme in fibroblasts augments dermal fibrosis after inflammation. *Lab Invest* 93(1):72-80, 2013
- 18) Nakazawa D, Tomaru U, Ishizu A. Possible implication of disordered neutrophil extracellular traps in the pathogenesis of MPO-ANCA-associated vasculitis. *Clin Exp Nephrol* (in press), 2013
- 19) 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.

2. 学会発表

各研究分担者の報告書参照

H. 知的所有権の出願・登録状況等

該当なし

II. 分担研究報告書

ワクチン接種を行った母親マウスの母乳中における 抗 HTLV 抗体応答の解析

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

協力研究者：鈴木 忠樹（国立感染症研究所感染病理部）

泉地 恭輔（国立感染症研究所感染病理部）

横浜市立大学大学院医学研究科 医科学専攻

相内 章（国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター）

研究要旨：ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型（Human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1）の主な感染経路は母乳を介した母子感染である。粘膜を介して感染する感染症には粘膜上で働く特異的分泌型 IgA 抗体が有効であり、母乳中にも積極的に分泌される事が知られている。母親に対してワクチン接種を行い母乳中に分泌型 IgA 抗体を誘導することで、授乳を介した感染リスクを低減できる可能性がある。本研究では、マウスを用いてワクチン接種により母乳中に誘導される抗体応答の評価をおこなった。その結果、皮下ワクチン接種は経鼻ワクチン接種と比較して、血清中に抗 HTLV-1 gp46 にたいする IgG 抗体を強く誘導し、それを反映する形で母乳中へ特異的な IgG 抗体が誘導されることが明らかになった。

A. 研究目的

成人 T 細胞白血病・リンパ腫（ATL）ならびに HTLV-1 関連脊髄症（HAM）は、HTLV-1 により引き起こされる疾患であり、現在有効な治療法は存在しない。2008～2010 年度に実施された厚生労働科学研究班による実態調査の結果、全国のキャリア数は約 108 万人と推定された。以前は、九州・沖縄地方の風土病と考えられていた HTLV-1 感染症が、関東・近畿地方の大都市圏への拡散し、国内における HTLV-1 キャリアは依然として多いことが明らかになった。HTLV-1 キャリアにおける ATL の生涯発症率は約 5%とされるため、有効な治療法の開発

が求められている。また、HTLV-1 の主たる感染経路は授乳による母子感染であることから、人工乳の利用を含めた授乳の制御により新たな感染を防止することは可能である。しかしながら、HTLV-1 キャリアが国内に拡散した現状を考えると、自身がキャリアであることを認識していない場合も考えられ、キャリア数は減る傾向にあるものの一定のレベルで維持される可能性は否定できない。

HTLV-1 キャリアに対する発症予防ならびに授乳による感染リスクを低減させる手段として、ワクチン接種が考えられる。粘膜を介して感染する感染症には、粘膜上で働く特異的分泌

型 IgA 抗体が有効であることがインフルエンザウイルスを用いた実験から明らかになっている。この分泌型 IgA 抗体は、汎粘膜機構によって全身の粘膜上にも分泌型 IgA 抗体の産生が誘導されるため、母乳中にも積極的に分泌される事が知られている。血中 IgG 抗体に加えて IgA 抗体が誘導される事により感染防御効果が高まる事が期待できる。

以上のことから本研究では、HTLV-1 gp46 に対するワクチン接種により母乳中に誘導される gp46 特異的抗体応答を評価することを目的とした。

B. 研究方法

1) HTLV-1 gp46 の調製

ワクチンに用いる抗原として gp46 は、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて調製した。WEPRO[®] 7240H expression kit を用い、全自動タンパク質合成装置 Protomist[®] DT II により合成を行った。gp46 全長に His-tag を付加したプラスミドを合成用の鑄型として用いた。gp46 の精製は、Ni-NTA カラにより行い、0.3 M NaCl、500 mM イミダゾール、0.025% Brij35 を含む 20 mM リン酸バッファーで溶出を行った。その後、PD-10 カラムを用いて 0.025% Brij35 を含む PBS に溶媒を置換した。精製 HTLV-1 gp46 の濃度は、BCA 法により定量を行った。

2) マウス

6~8 週齢、雌の BALB/c マウス一群 3 匹をワクチン接種群として利用した。また、交配のため 1 群あたり同週齢の BALB/c マウス雄 1 匹を利用した。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。

3) ワクチン接種と交配

マウス 1 匹あたり、HTLV-1 gp46 10 µg をアジュバントである合成二本鎖 RNA Poly(I:C) 10 µg と共に接種した。ワクチン接種は麻酔下で実施した。経鼻ワクチン接種群では片鼻 7.5 µL ずつ (計 15 µL) を鼻腔内に滴下し、皮下ワクチン接種群では 50 µL を頸部の皮下に注射した。また、コントロール群としてワクチン未接種群を設けた。ワクチン接種は 2 週間間隔で計 3 回実施し、最後のワクチン接種後に雄マウスをケージに加えることで交配を行った (図 1)。

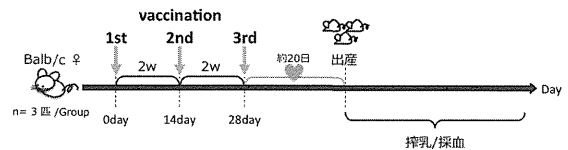


図 1. ワクチン接種実験のスケジュール

4) 採材とサンプル調製

各ワクチン接種前に部分採血を行い、ワクチン接種に伴う継時的な抗体応答の評価に用いた。交配の結果、出産した母親マウスに関しては、出産後 0 から 4 日の間に搾乳を行い母乳中の抗体応答の評価に用いるサンプルとした。搾乳は、仔マウスと母親マウスが接しないように同一ケージ内で分離しておき、約 6 時間後に母親マウスにオキシトシンを接種し吸引することにより行った。なお、搾乳は麻酔下で行った。回収した母乳は PBS で 5 倍に希釈し、遠心により得られた脂肪分を含まない上清をサンプルとし、測定まで -80°C に保存した。

5) 抗 gp46 抗体の定量

血清中あるいは母乳中に含まれる gp46 に対する抗体は、ワクチンとして用いた gp46 を 20 µg/mL の濃度でコーティングした EIA プレートを用いた ELISA 法により定量を行った。gp46 に対する濃度既知のモノクローナル抗体

を標準物質とし、血清あるいは母乳サンプル中の IgG 抗体を定量した。

C. 研究結果

最初に、ワクチンの抗原として用いる HTLV-1 gp46 の発現を試みた。哺乳類細胞を用いた発現系では、コドン出現頻度を最適化した発現プラスミドを用いた場合でも gp46 の発現は認められなかった。そこで、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた gp46 の合成を行った。可溶化条件の検討を行った結果、界面活性剤として 0.025% の Brij35 を添加した場合に、ほぼ全ての合成 gp46 が可溶化することが明らかになった。

次にこのコムギ無細胞タンパク質合成系により作製された gp46 をワクチンとして、マウスに対するワクチン接種を行った。また、経鼻インフルエンザワクチンの研究において、高い粘膜アジュバント活性を示すことが知られている合成二本鎖 RNA である Poly(I:C) をアジュバントとして用いた。10 µg の gp46 を 10 µg の Poly(I:C) と共に、経鼻あるいは皮下から 2 週間毎に計 3 回の接種を行った。皮下ワクチン接種を行った群においては、2 回のワクチン接種で gp46 に対する血清中 IgG 抗体応答の誘導が認められた (3 回目のワクチン接種前) が、経鼻ワクチン接種を行った群では 2 回のワクチン接種で抗体応答を誘導することが出来なかった (図 2)。

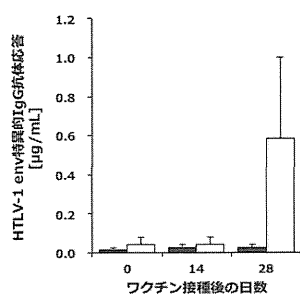


図 2. ワクチン接種に伴う血清中の HTLV-1 gp46 徳的な IgG 抗体応答

次に、ワクチン接種後に交配を行い出産した母親マウスの血清中ならびに母乳中の HTLV-1 gp46 特異的な IgG 抗体の定量を行った。血清中の抗体応答は皮下ワクチン接種群で高く、経鼻ワクチン接種群では低い傾向にあった。また、この血清中の IgG 抗体応答を反映し母乳中の IgG 抗体がみられることが明らかになった (図 3)。母乳中の IgA 抗体の測定は、現在検討中である。

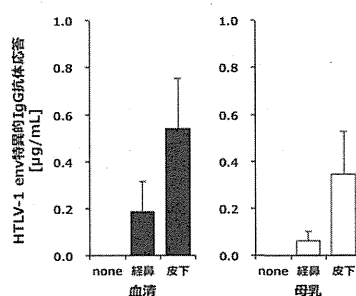


図 3. 母親マウスの血清および母乳中の HTLV-1 gp46 徳的な IgG 抗体応答

D. 考 察

本研究では、HTLV-1 キャリアである母親から授乳を介して子へ感染するリスクを軽減することを目的とし、マウスを用いたワクチン接種実験において母乳中に誘導される抗 HTLV-1 gp46 特異的な抗体応答の評価を行った。我々は、新生児へのインフルエンザウイルス感染のリスク軽減を目的として、同様の母子免疫を利用したワクチン効果を既に検討している。インフルエンザワクチンの場合、母親の母乳中に誘導される特異的 IgG 抗体はワクチンの皮下接種ならびに経鼻接種で同等のレベルである一方で、特異的 IgA 抗体は経鼻接種で優れていることを見いだしている。今回の HTLV-1 gp46 を用いた研究においては、母乳中への gp46 特異的 IgG 抗体の誘導には皮下ワクチン接種が優れていることが明らかとなった (図 3)。また、インフルエンザワクチン接種の場合には、Poly(I:C) をアジュバントとして用いた場合に

は、2回のワクチン接種で抗体応答を認めることが可能であった。今回の研究では、皮下接種の場合には2回のワクチン接種で抗体応答が認められたが、経鼻接種の場合には3回のワクチン接種が必要であることが明らかになった(図2, 3)。アジュバントを用いているにも関わらず、特異的な抗体応答を誘導するために接種回数を要した原因として、コムギ無細胞タンパク質合成系で作製したgp46の抗原性が原因として考えられる。本合成系で合成したgp46には糖鎖が付加されないため、実際のgp46に比べて抗原性が著しく低下する可能性がある。我々は、この糖鎖付加の問題を解決するために、コドン出現頻度を最適化した哺乳類細胞系でのgp46の調製を試みているが、現在のところ収率が低下してしまう問題を抱えている。この収率の問題を克服できれば、より抗原性の高いワクチンを調製できるものと考えている。

今後は、Tax 発現トランスジェニックマウスを用いたATL発症モデル、あるいはMT-2細胞を用いたラットにおけるHTLV-2発症モデル系においてワクチン接種により授乳を介した感染阻止効果の検討を行う予定である。

E. 結 論

HTLV-1の主たる感染経路は授乳である。授乳をコントロールすることで感染リスクが低減するが、HTLV-1キャリアが国内に拡散している現状を考えると授乳のコントロールのみでは不十分である可能性がある。ワクチン接種により母乳中にHTLV-1に対する抗体を誘導することで、授乳による感染を阻止できると考えられる。本研究から、ワクチン接種により母乳中にHTLV-1 gp46に対する抗体を誘導可能であることが明らかとなった。母乳中抗体によるHTLV-1感染阻止効果が認められれば、HTLV-1キャリアに対する新規ワクチンとなる

と期待している。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakajima N, Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumasaka T, Thuy NT, Hasegawa H, San LT, Kawachi S, Liem NT, Suzuki K, Sata T. Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam. *Mod Pathol*. 2012 Nov 23. doi: 10.1038/modpathol.2012.193. [Epub ahead of print]
- 2) Sasaki I, Hoshino K, Sugiyama T, Yamazaki C, Yano T, Iizuka A, Hemmi H, Tanaka T, Saito M, Sugiyama M, Fukuda Y, Ohta T, Sato K, Ainai A, Suzuki T, Hasegawa H, Toyama-Sorimachi N, Kohara H, Nagasawa T, Kaisho T. Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development. *Blood*. 2012 Oct 11. [Epub ahead of print]
- 3) van Riet E, Ainai A, Suzuki T, Hasegawa H. Mucosal IgA responses in influenza virus infections; thoughts for vaccine design. *Vaccine*. 2012 Aug 31;30(40):5893-900. Epub 2012 Jul 24.
- 4) 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.

2. 学会発表

- 1) 長谷川秀樹:次世代ワクチンとしての経鼻インフルエンザワクチン。第60回日本ウ