

201225070A

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 感染モデルを用いた抗HTLV-1 薬
の探索および作用機序の解析

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 上野 孝治

(関西医科大学)

平成25年 3月

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感染モデルを用いた抗HTLV-1薬
の探索および作用機序の解析

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 上野 孝治

(関西医科大学)

平成25年 3月

目 次

I. 総括研究報告

HTLV-1感染モデルを用いた抗HTLV-1薬の探索および作用機序の解析----	1
上野 孝治	

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）
総括研究報告書

HTLV-1感染モデルを用いた抗HTLV-1薬の探索および作用機序の解析

研究代表者 上野 孝治 関西医科大学 助教

HTLV-1関連疾患であるATLやHAMは未だ根治的治療法がないため、治療法の開発と並んで発症予防法の開発が急務となっている。いずれの疾患も高プロウイルス量と発症頻度が相関しているため、プロウイルス量を抑えることが発症予防に繋がると考えられる。そこで本研究では個体内でのプロウイルス量を指標として抗HTLV-1薬の探索および作用機序の解析を行う。このような抗HTLV-1薬の効果判定には感染者に類似した感染プロファイルを示す動物モデルが必要とされるものの、これまで適切なモデルは存在しなかったが、我々の研究室ではヒト化マウスを用いた感染モデルの構築に成功した。この感染モデルを用いて抗HTLV-1薬のスクリーニングおよび作用機序の解析を行う。

まず、スクリーニング系の妥当性を検証するために海外でATLに対する治療効果が報告されているAZT・IFN- α 併用療法について検討を行った結果、血中プロウイルス量および感染細胞の増加が抑制されることが明らかとなった。

次に新規抗HTLV-1薬の候補化合物として、*in vitro*で抗HTLV-1効果が確認されているタンパクシャペロンHsp90阻害剤 17-DMAGについて検討を行ったところ、同様に血中プロウイルス量および感染細胞数の増加を抑制し、期間生存率を亢進させた。

以上の結果からAZT・IFN- α 併用療法でのATLに対する治療効果が再確認されるとともに、スクリーニング系の妥当性が確かめられ、17-DMAGも抗HTLV-1薬として有用であることが示された。

A. 研究目的

ヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV-1)は予後不良の成人T細胞白血病やHTLV-1関連脊髄症(HAM)などを引き起こす。ATLやHAMなどHTLV-1関連疾患は未だ根本的な治療法は確立されておらず、治療法だけでなく発症予防法の開発が喫緊の課題となっている。これら疾患の発症率は高いプロウイルス量と相関する事が明らかとなっているこ

とから、プロウイルス量の抑制、すなわち新規感染の抑制、感染細胞の増殖抑制、宿主免疫による感染細胞の排除の促進が有効であると予想される。そこで本研究では個体レベルでのプロウイルス量を指標に抗HTLV-1薬を探索し、新規発症予防法・治療法の開発を行う。

抗HTLV-1薬の効果測定にはヒト免疫存在下でヒト細胞を標的とするHTLV-1感染モ

デルが必要であるが、近年、申請者らの研究室では、NOG-SCIDマウスにヒト造血・免疫系を再構築したヒト化マウスを構築し、これにHTLV-1を感染させることでATL様の病態を再現することに成功した。

この感染モデルを用いて、これまでの研究からウイルス産生の抑制、免疫賦活化、感染細胞増殖抑制をなど介したプロウイルス量抑制が期待される抗HTLV-1薬候補化合物を評価し、かつその作用機序を明らかにする。抗HTLV-1薬候補化合物として、安全性・開発期間・費用のいずれの面でも臨床応用へのハードルが低い既存の薬物やサプリメントを優先的に試す。

B. 研究方法

【HTLV-1感染マウスモデル作製】

ヒト臍帯血から磁気ビーズ法によりCD133陽性造血幹細胞を単離し、NOG-SCIDマウスの骨髄内に移植した。移植後2~3ヶ月後に採血を行い、ヒト免疫細胞が生着し正常に分化したことを確認した。その後HTLV-1感染細胞を腹腔内投与することでHTLV-1感染を行った。

【プロウイルス量の測定】

モデルマウスから血液を採取し、ゲノムDNAを精製した後、HTLV-1 pX領域を増幅するプライマーセットを用いてRT-PCRを行い測定した。

【抗HTLV-1薬の投与】

AZT 125mg/匹/日 および IFN- α 3万単位/匹/日を感染2週後から4週後まで連日腹腔内投与を行った。17-DMAG 300 μ g/匹/日を感染2週後から6週後まで週5日腹腔内投与を行った。その後、経時的に採血しRT-PCRによりプロウイルス量を、FACSに

より各種血液細数を測定した。

(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が研究内容および倫理項目を審査・許可後、研究用として提供された。また動物実験は本学動物実験管理委員会の承認の下に規定に従って実施した。

C. 結果

【抗HTLV-1薬のスクリーニング】

1. AZT・IFN- α の抗HTLV-1活性評価

抗HTLV-1薬のスクリーニングを行うにあたり、スクリーニング系の妥当性を検証するため、海外でATLに対する治療効果が報告されているAZT・IFN- α の併用療法について検討を行った。

コントロールのPBS群では感染2週後からプロウイルス量が急激に増加し、6週後までに全個体が死亡した。IFN- α 単独投与群では3匹中2匹でプロウイルス量の増加が抑制され、内1匹は投与終了後も抑制が維持された。AZT単独投与群では投与期間中は全個体で、投与終了後は3匹中2匹でプロウイルス量が抑制されていた。AZT・IFN- α 併用群では全個体で投与期間中および投与終了後もプロウイルス量の増加は認められなかった。

このプロウイルス量の抑制が薬剤投与による骨髄抑制を原因とする可能性が考えられたため、各時点における血中の感染細胞数と非感染細胞数を計数した。その結果、いずれの群においても非感染細胞数はウイルスを接種していない非感染マウスとほぼ同等で

あり、感染細胞数の増加がPBS群と比較して顕著に抑制されていることが明らかとなった。

AZT単独投与群で投与中止後にプロウイルス量が増加した個体に関してさらに観察を続けたところ、感染後8週からプロウイルス量および感染細胞数が高い状態が続いた。この個体に対して感染18週の時点でAZT・IFN- α を投与したところ、プロウイルス量および感染細胞数が顕著に減少した。

2. 17-DMAGの抗HTLV-1活性評価

17-DMAGはタンパクシャペロンHsp90の阻害剤であるGeldanamycin類縁体であり、*in vitro*においてHTLV-1 Taxタンパクの不安定化を誘導し、Tax発現細胞に対する増殖抑制効果を有する。*in vivo*における17-DMAGの抗HTLV-1効果を検証した。感染2週後から4週間投与した結果、コントロールのPBS群と比較して、顕著にプロウイルス量の増加が抑制された。また、血中の感染細胞数やATLの特徴的所見であるCD25陽性CD4T細胞の割合もPBS群と比較して明らかに低レベルであった。感染マウスの期間生存率もPBS群に比べ高かった。

D. 考察

海外でATLに対する治療効果が報告されているAZT・IFN- α 併用療法は我々の感染モデルでもプロウイルス量の増加を抑制したことから、AZT・IFN- α 併用療法の有効性が確認され、同時にこの感染モデルを用いた抗HTLV-1薬のスクリーニング系が妥当であることが示された。AZT、IFN- α の単独投与、併用投与は血中の非感染細胞には影響を与えず、感染細胞のみを有意に抑制するこ

とから、このプロウイルス量抑制効果は骨髄抑制ではなく、個体内新規感染阻害、感染細胞の増殖抑制、感染細胞の排除などによる可能性が考えられた。今後AZT・IFN- α によるプロウイルス量の抑制機構を詳細に解析する必要がある。

17-DMAG投与もAZT・IFN- α 投与と同様に感染マウス個体内において、血中のプロウイルス量および感染細胞数の増加を抑制し、期間生存率の向上が認められた。この結果は抗HTLV-1薬としての有用性を示している。17-DMAGはGeldanamycinで問題となっていた肝毒性や水溶性を改善した類縁体であり、臨床応用が期待される。

E. 結論

上記の研究結果より、*in vivo*でのプロウイルス量を指標とした抗HTLV-1薬のスクリーニングにおける本感染モデルの妥当性が確認された。AZT・IFN- α 併用療法の有効性の再確認と同時に、投与中止後もプロウイルス量が低レベルで維持されるという興味深い知見が得られた。17-DMAGについてもAZT・IFN- α と同様に抗HTLV-1薬としての有効性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

上野孝治、荀潤沢、齋藤峰輝、手塚健太、田中勇悦、藤澤順一
Iranian型HTLV-1特異的なpX領域塩基配列に
起因する感染性ウイルス粒子の産生促進
第5回HTLV-1研究会
2012年 9月 東京

手塚健太、上野孝治、鄭真美、荀潤沢、田中正和、竹之内徳博、藤澤順一
IBMI-ヒト化マウスを用いたHTLV-1感染マウス
モデル
第5回 HTLV-1研究会
2012年 9月 東京

Kenta Tezuka, Mami Tei, Takaharu Ueno,
Runze Xun, Jun-ichi Fujisawa
Carrier model of HTLV-1 infection in
humanized NOG mice
第71回日本癌学会学術総会
2012年 9月 札幌

荀潤沢、上野孝治、齋藤峰輝、手塚健太、田中勇悦、藤澤順一
Altered pattern in viral mRNA expression of
Iranian type HTLV-1 leading to enhanced
viral production
第60回日本ウイルス学会学術集会
2012年 11月 大阪

手塚健太、上野孝治、鄭真美、荀潤沢、竹之内徳博、藤澤順一
HTLV-1感染ヒト化マウスを用いた抗ATL治療
法の評価
第60回日本ウイルス学会学術集会
2012年 11月 大阪

H.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
なし

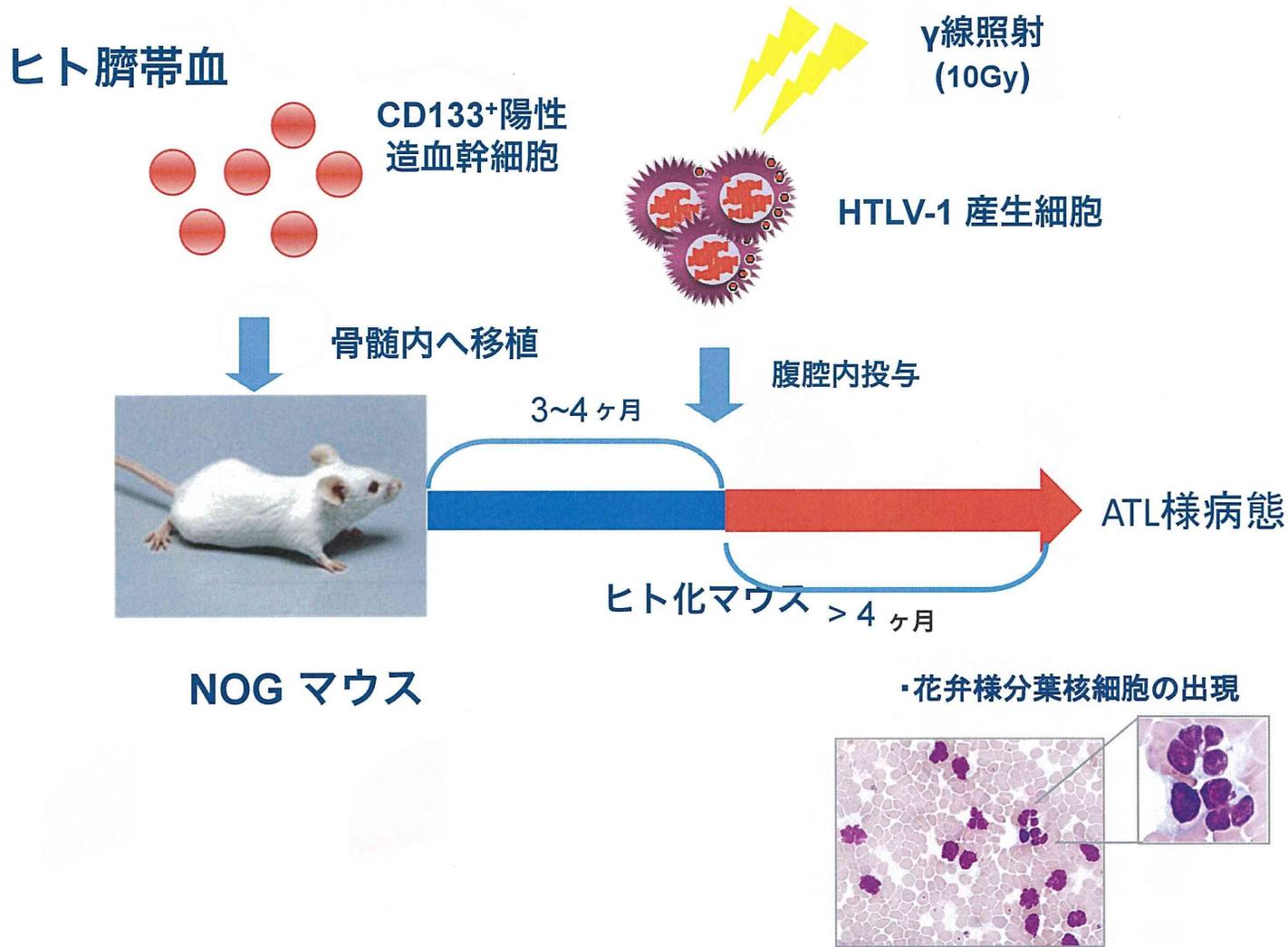
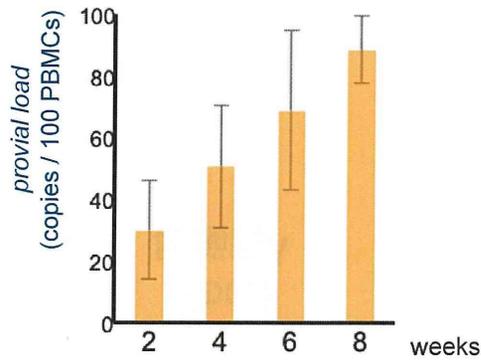
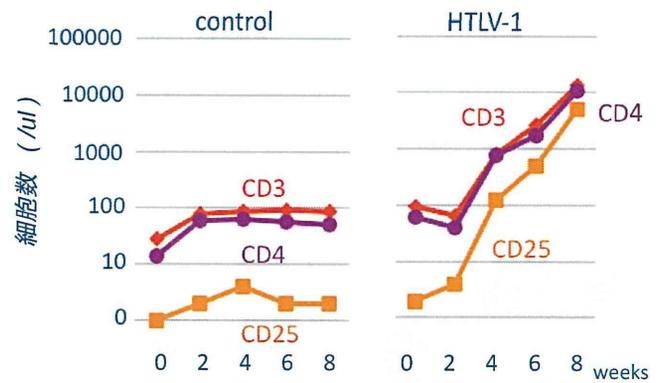


図1.HTLV-1感染モデルの構築

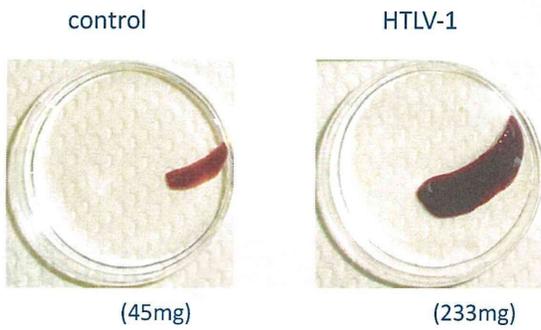
① 血中プロウイルス量



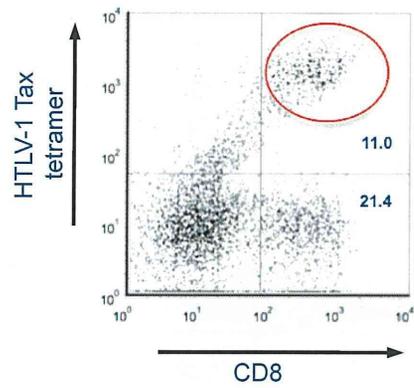
② ヒトリンパ球の異常増殖



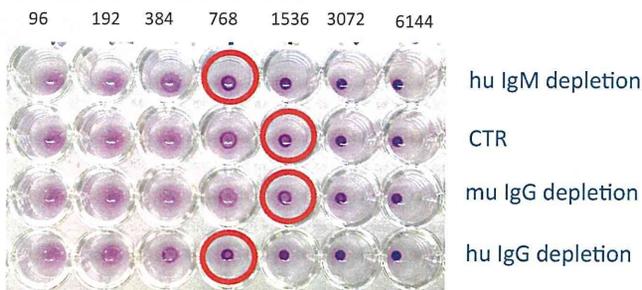
③ 脾臓の腫大



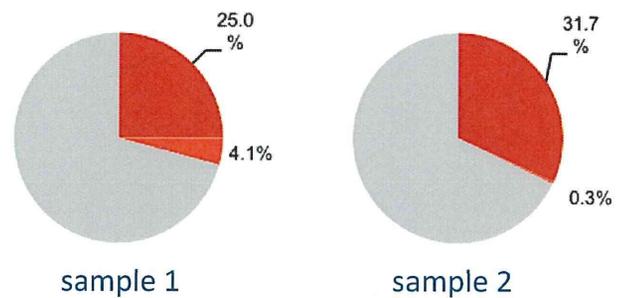
④ Tax特異的CTL



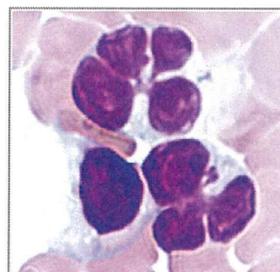
⑤ 抗HTLV-1抗体産生



⑥ 感染細胞のクローナル増殖



⑦ 花弁様分葉核細胞の出現



モデルの病態

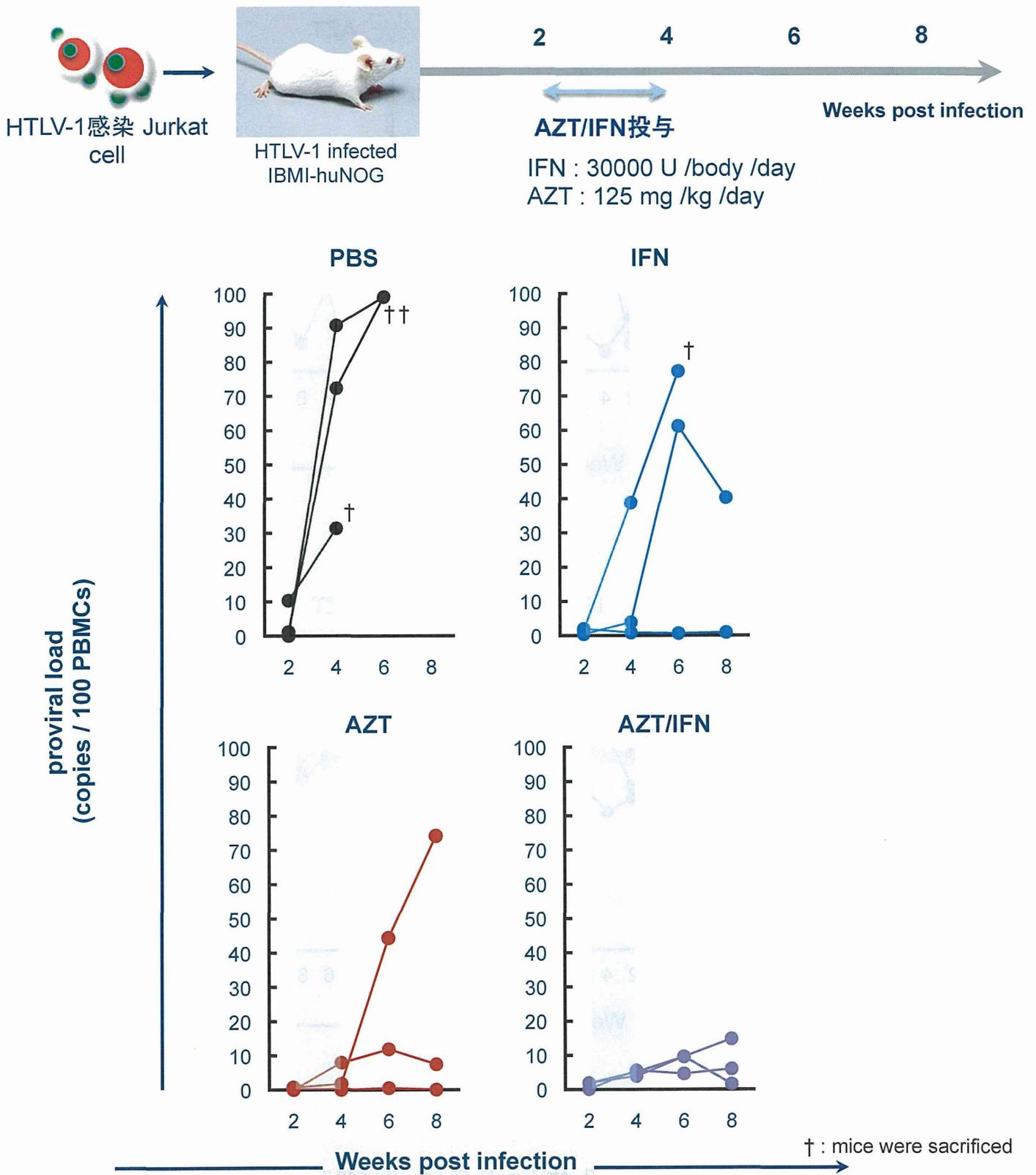
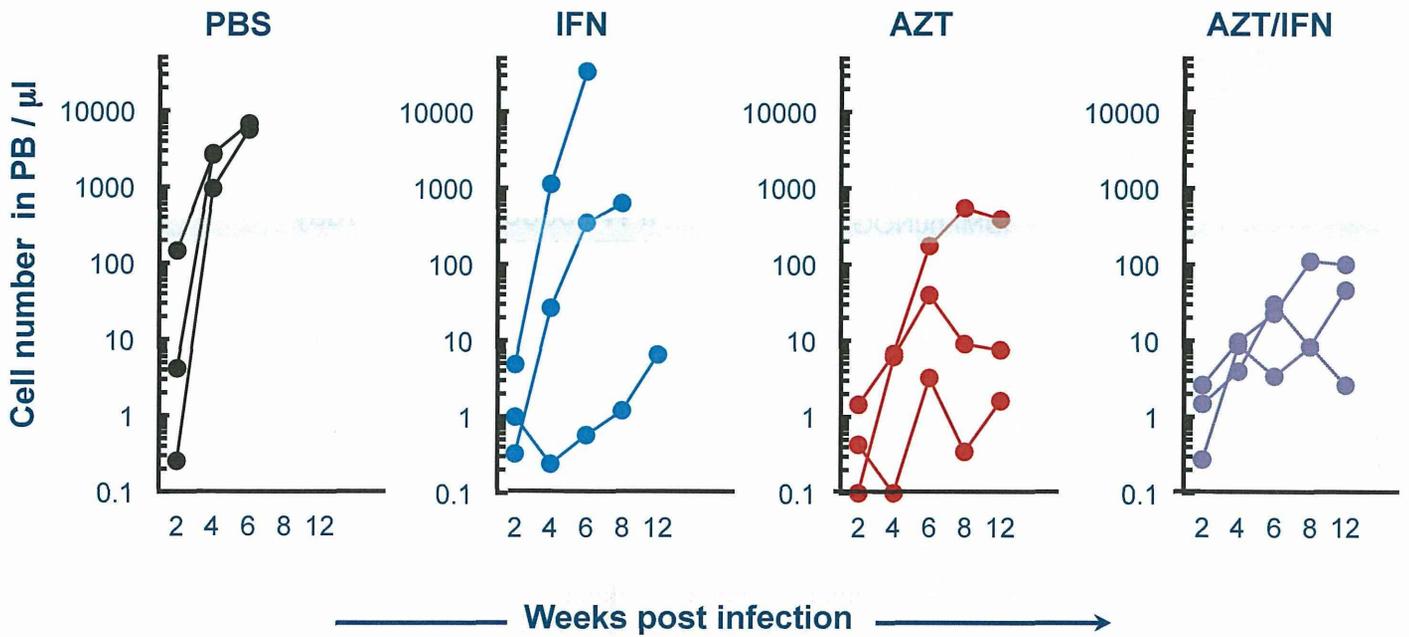
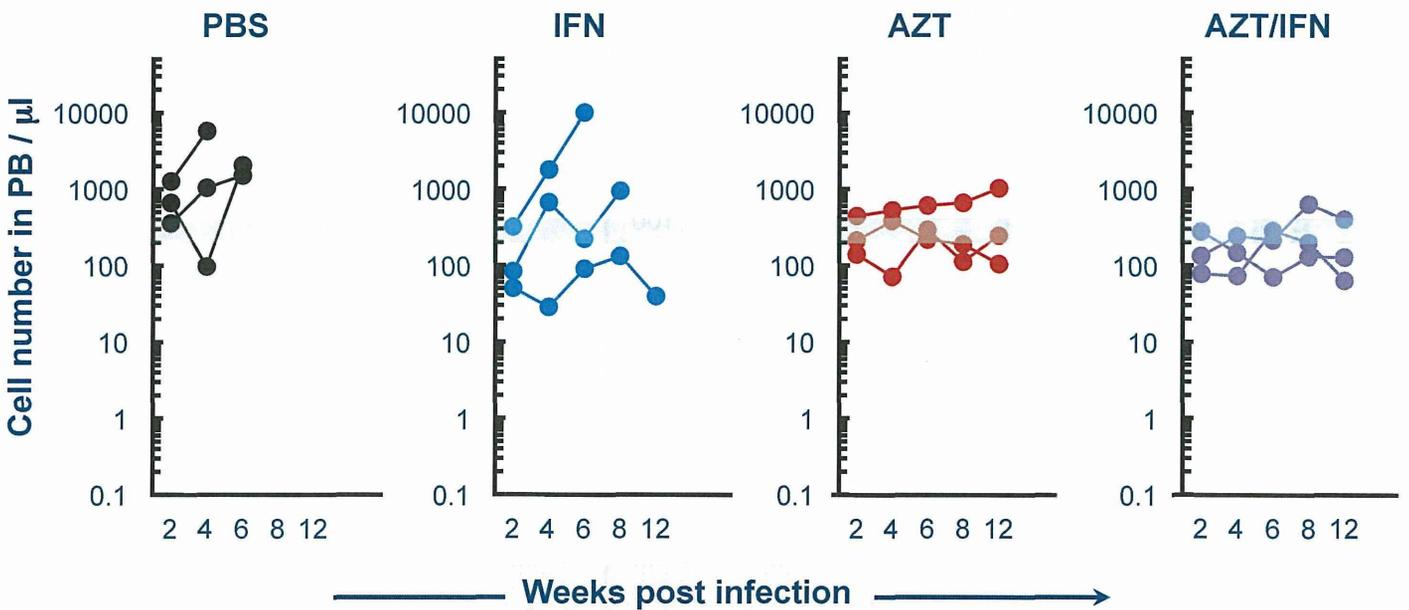


図3. AZT・IFN-α投与による血中プロウイルス量の抑制

感染細胞数

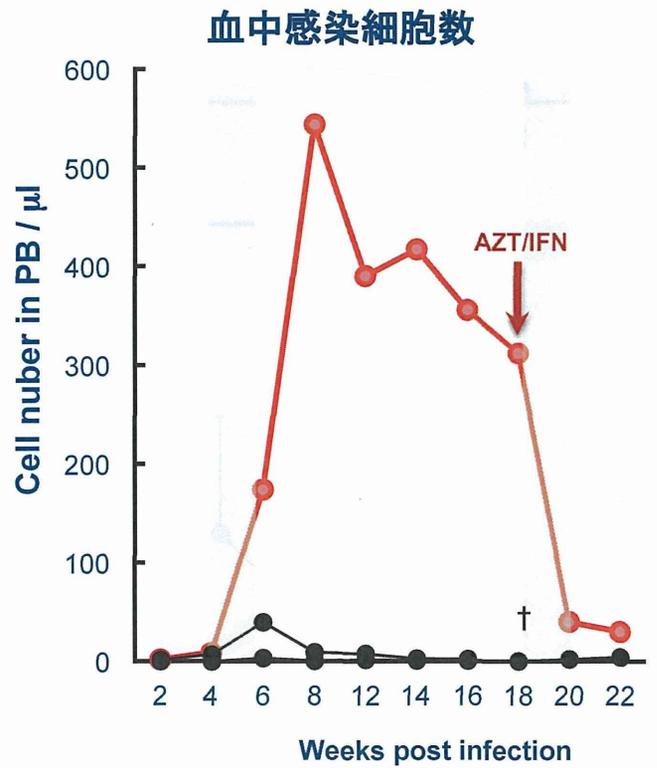
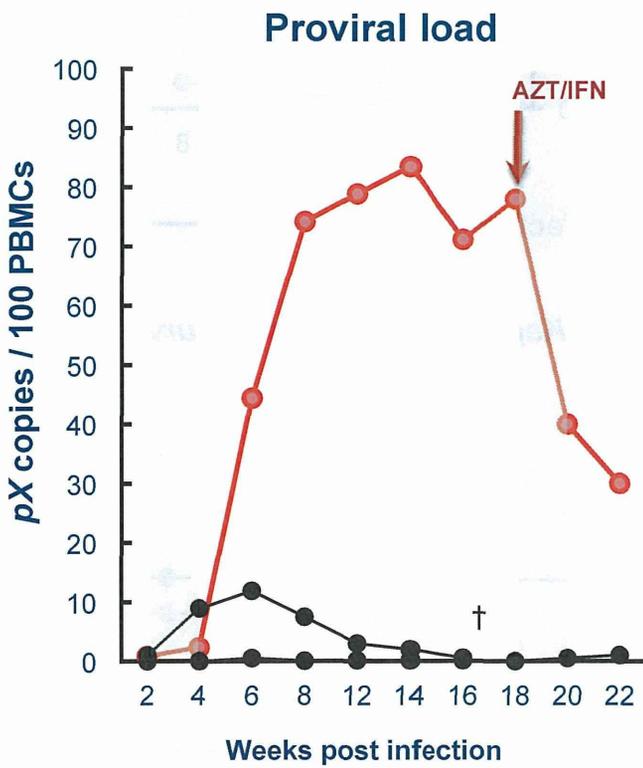


非感染細胞数



■ 非感染マウスの平均血中細胞数

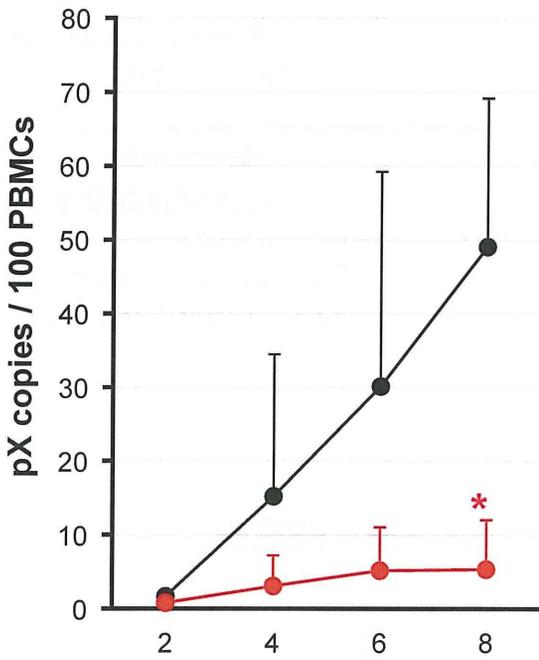
図4. AZT・IFN- α 投与による血中細胞数の変化



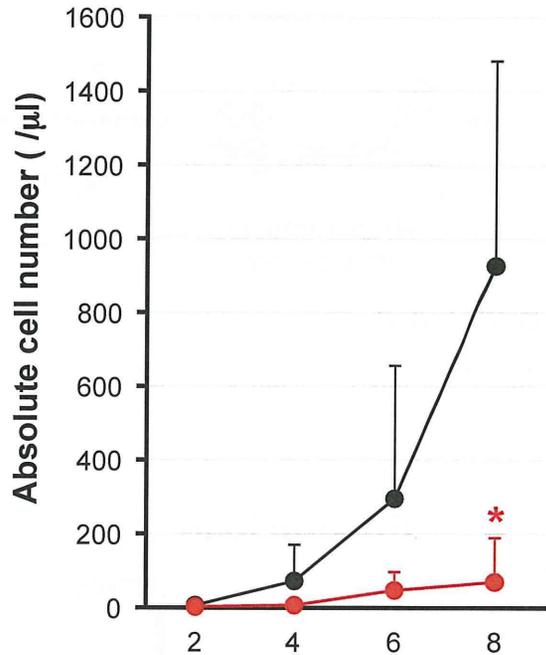
† : mice were sacrificed

図5. AZT・IFN- α 再投与による抑制効果

PVL

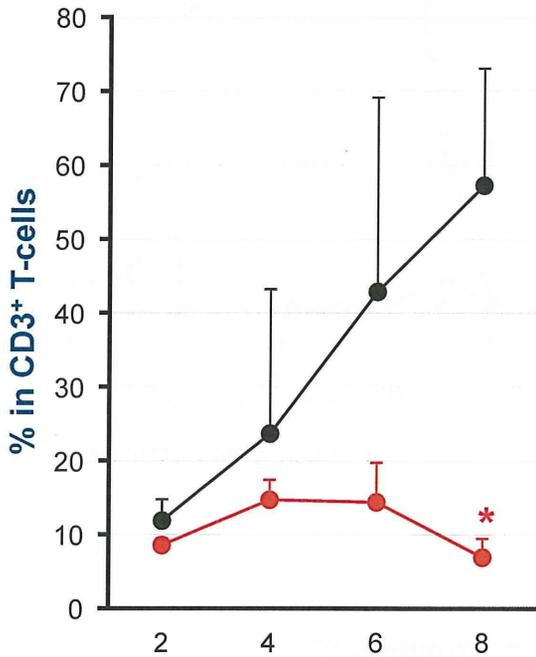


Number of infected cells

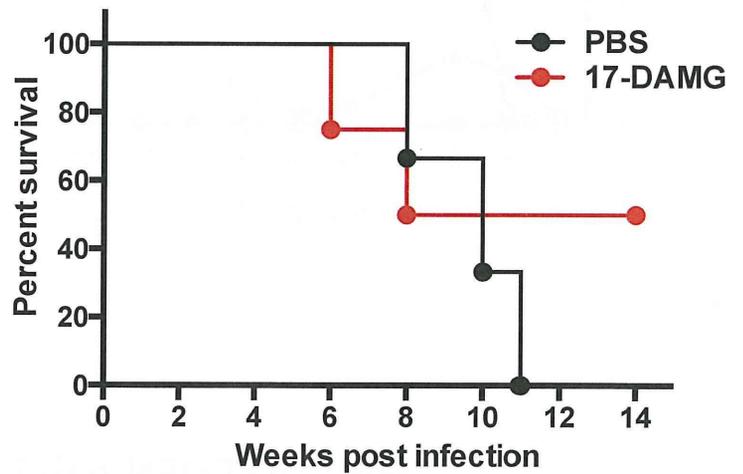


Weeks post infection →

Percentage of CD25⁺ T-cells



Kaplan-Meier survival curve



Weeks post infection →

●: PBS (N=3) ●: 17-DMAG (N=4)

* : $P < 0.05$ by Mann-Whitney U test

図6. 17-DMAG投与による抑制効果

