

2013/8020A

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 25 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 26 (2014) 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 感染阻止ワクチンおよび抗体医薬の検証

(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) 藤猪英樹：ヒト化抗 HTLV-I gp46 中和抗体による in vivo HTLV-I 感染制御

(4) 伊藤 守：ヒト化用マウス系統の開発と供給

(5) 松崎吾郎、新川 武
：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) 上里 博、宮城拓也
：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

(8) 前田洋助：ウイルス産生細胞内での HTLV-I エンベロープタンパク質と
受容体分子 GLUT1 の挙動の解析

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

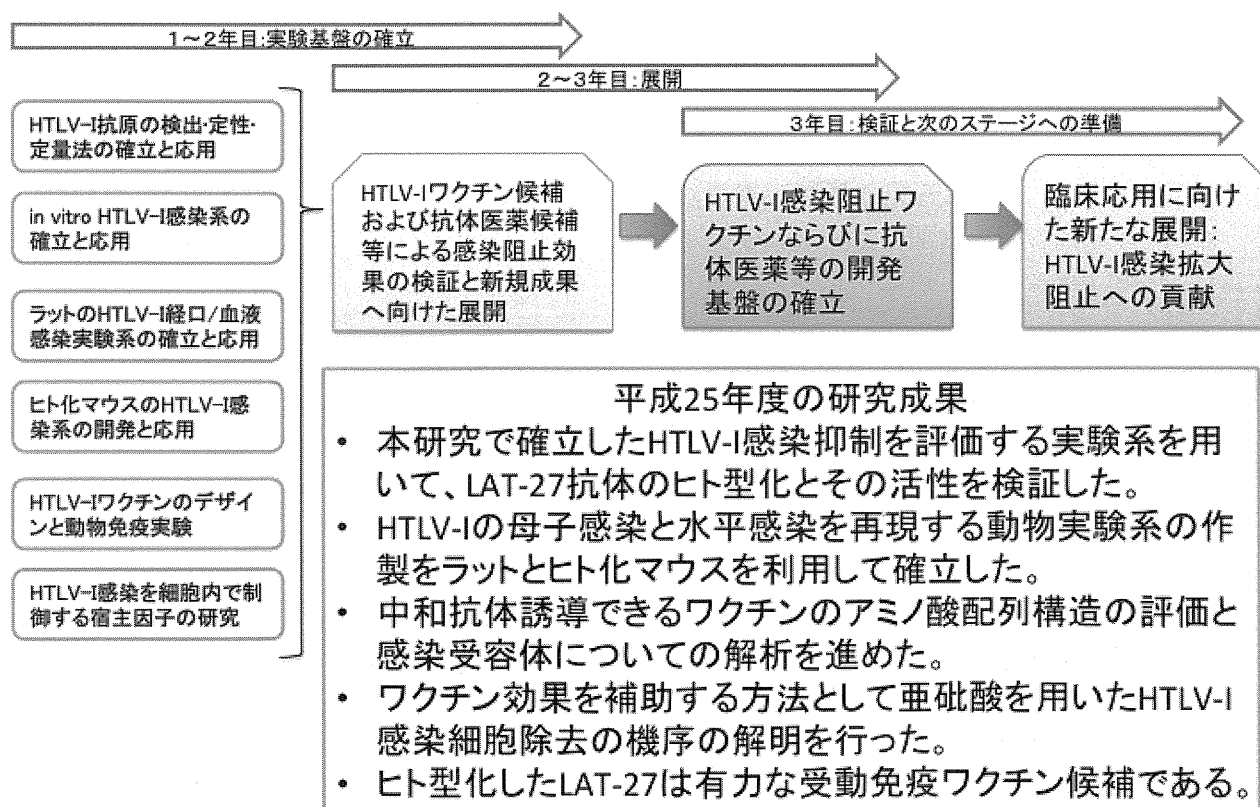
I . 総括研究報告

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

研究要旨：以下の図に示すように、3年間計画の3年目の研究を実施した。昨年までの研究成果の展開と検証および次のステージに向けた準備を行うと同時に3年間の総括を行った。2年目までの研究でHTLV-I感染抑制を評価する実験系がほぼ確立され、HTLV-I gp46が感染中和抗体の主な標的であること、さらにgp46に対するラット由来中和単クロン抗体LAT-27はADCC活性をも有し、*in vitro*においてHTLV-I感染細胞をNK細胞等の共存下で駆除する活性があることを明らかとした。そこで、LAT-27抗体のヒト型化を進め、その活性の検証を行った。また、HTLV-Iの母子感染と水平感染を再現する動物実験系の作製を試みた。さらに、中和抗体を効率よく誘導できるワクチンの構造評価と感染受容体についての解析実験を行った。また、ワクチン効果を補助する方法として亜硫酸を用いたHTLV-I感染細胞除去の機序の解明を行った。

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



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、本研究班員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。

C. 一年間の研究結果

平成 25 年度の研究の第一の成果は、ラット HTLV-I 中和抗体 LAT-27 のヒト型化に成功したことである。これを用いることにより臨床に近い環境で研究が進む。本抗体は、*in vitro* ではヒト化前の LAT-27 と同等な中和活性を示した。またより強い ADCC 活性を示した。一方、動物実験系では、ラットを用いた HTLV-I の経口や粘膜感染を観察する系と母子感染を検討する系ができた。さらに、ヒト NK 細胞が選

択的に増殖するので抗体の ADCC 活性を評価できるヒト化マウスの作製ができた。中和抗体誘導能が優れる能動ワクチン候補として gp46 を模倣するペプチドを検討した。

以下に具体的な研究成果の概要について述べる。

(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と総括

(a) LAT-27 のヒト型化: (株)免疫生物研究 (IBL) との共同研究において、LAT-27 の抗原結合部位の遺伝子を単離し、ヒト IgG1 バックボーンに組み込んで CHO 細胞に発現させ protein-G で精製した。この抗体は、WB で抗ヒト IgG と反応し、合胞体形成阻止テストでは、 $5 \mu\text{g/ml}$ で完全に HTLV-I を中和した。

(b) ヒト化 LAT-27 中和抗体の HTLV-I 感染細胞の増殖とウイルス産生阻止: オリジナルのヒト化 LAT-27 を添加して HTLV-I 感染細胞を自家 PBMC と混合培養すると、培養 3 日目で Tax 陽性細胞の頻度を約 50% に低下させ、さらに新たな PBMC を加えて 3 日培養すると Tax 陽性細胞が殆ど消滅した。また、p24 産生も検出限界以下に抑制された。このような効果はオリジナルの LAT-27 抗体よりも高く、ADCC においてヒト化 LAT-27 のヒト NK 細胞との親和性が高いことが示唆された。

(c) ADCC: 上記の結果で推定されたように、自家 HTLV-I 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、 ^{51}Cr 遊離細胞障害アッセイを行った。HTLV-I 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。培養時間を 20 時間後のは、有意な細胞障害性がしかもオリジナル LAT-27 よりも高い活性の ADCC が観察された。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、 $\text{CD}16^+$ 細胞、または NK マーカーである $\text{CD}56^+$ 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、 $\text{CD}16^+$ 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。

- (d) ペプチドワクチン HTLV-Igp46のアミノ酸191-196を含む合成ペプチドはキャリアに結合させてFCAとエマルジョンでラットやB6マウスに免疫すると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、今回は、キャリア蛋白に結合しないが、6分子の側鎖からなるHTLV-Igp46のマックスペプチドが中和抗体を誘導できるかをWKAラット検討した。得られた抗血清はペプチドに対する抗体活性はあるものの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。同時にコントロールとして用いたKLH-gp46 180-204は高いタイターの中和抗体を誘導した。

(2) 研究分担者(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) LAT-27 あるいはコントロール抗体(Ctrl-A)をAの方法(1mg, -24h, -5h)で受動免疫したラットに、HTLV-Iを腹腔内感染させ、感染8週後に、各ラットのSpl-T中の感染量を測定した。その結果、LAT-27免疫群約83%で感染量は検出感度以下となり、Ctrl-Ab免疫群と比べ有意に低くなった。一方、Bの方法(1mg, -24h, +5h)で受動免疫した場合、LAT-27免疫群の感染量は、Ctrl-Ab免疫群と比べ有意に低かったが、約83%でHTLV-I遺伝子を検出することができた。さらに、LAT-27免疫群の感染量は、AとBでは有意にAで低かった。
- (b) LAT-27 あるいはコントロール抗体(Ctrl-Ab)をCの方法(10mg, -5h)で受動免疫したラットに、HTLV-Iを腹腔感染させた後、LAT-27免疫群とCtrl-Ab免疫群の感染量を比較した。その結果、LAT-27免疫群(2/3)とCtrl-Ab免疫群(3/3)でウイルス遺伝子を検出できなかった。

(3) 研究分担者(藤猪): 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) NOGマウスの脾臓から分離したヒトCD4陽性T細胞中にHTLV-I TaxのmRNAが検出されるがヒト化LAT-27抗体を予め投与することによって、その発現は完全に阻害された。
- (b) また、フローサイトメトリー解析から、HTLV-I感染細胞中に出現するHTLV-I Taxタンパクの発現もヒト化LAT-27抗体を予め投与することによって、その発現が完全に阻止された。
- (c) しかしながら、感染後にヒト化LAT-27抗体を投与してもTax発現の効果は認められなかった。
- (d) 妊娠ラットの親にヒト化LAT-27抗体を投与すると、新生仔ラットに抗体が十分な濃度で移行すること確かめられた。さらに移行抗体は十分な中和活性を維持していることも確認された。
- (e) これらのことから、ヒト化LAT-27抗体は体内においてHTLV-I感染細胞株からヒトT細胞へのHTLV-I感染を阻止する事を明らかにしたことに加え、妊娠母体に投与することで新生仔への受動免疫が成立することが明らかとなった。

(4) 研究分担者(伊藤): ヒト化用マウス系統の開発と供給

- (a) hIL-2-, hIL-15-NOGマウスにCD34+造血幹細胞移植後、2~3週で2系統のマウス末梢血にヒト細胞が検出でき、その細胞のほとんど(80~90%)はCD56+のヒトNK細胞であることが観察された。そのNK細胞の表現型を詳細に検討した結果、KIR, NKG2AやNKG2DなどのNK特異的な抗原、GranzymeやPerforinが確認できた。
- (b) ヒト末梢血由来NK細胞を移入した場合、hIL-2-NOGマウスでは数週間という短期でマウス末梢血から消失するのに、hIL-15-NOGマウスでは数ヶ月に及ぶ長期の検出が可能であった。以上の結果から、この2系統の改良型マウスはヒトNK細胞の基礎的研究およびこれを使った応用研究が可能であることが示唆された。
- (c) hGM-CSF/IL-3-NOGマウスに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。hGM-CSF/IL-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。マウスの末梢血に認められるヒト細胞は全期間を通じて、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 hGM-CSF/IL-3-NOG マウスと NOG マウスの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。hGM-CSF/IL-3-NOG マウスで分化するヒト顆粒球は、好中球、好酸球、好塩基球、単球などで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。以上の結果から、hGM-CSF/IL-3-NOG マウスは NOG マウスで従来困難であった骨髄系細胞の研究に優れていると考えられた。

- (d) hIL-2-NOG マウスにヒト CD34+細胞移入後に移植されたCCR4発現L428腫瘍細胞は抗CCR4抗体の投与によって、抗CCR4抗体単体投与に比べ、有意な腫瘍増殖抑制が確認された。この実験系は抗体医薬のin vivo ADCC効果を検定する系として使うことができることが示された。

(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) ILT-M1混合培養系にHTLV-I 感染者血清および血清由来精製IgG、ラットLAT-27抗体を添加したところ、ラットLAT-27抗体で合胞体形成は完全に阻害され、HTLV-I 感染者血清中にも同様の作用を示すサンプルが存在した。
- (b) HTLV-I 感染者血清中にHTLV-I 主要糖タンパクであるgp46に対する抗gp46抗体の存在を確認した。HTLV-I 感染者血清が自己免疫疾患、健常人と比べ有意に高いOD値を示した(p<0.05)。

(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) USP10 KO マウスでは胎生期からすでに、血液幹細胞の減少が始まっていることがわかった。血液幹細胞の減少はアポトーシスによるものであることがわかった。
- (b) USP10 KO マウスにおける血液幹細胞減少は幹細胞自体の異常が原因で引き起こされることが判明した。
- (c) USP10 は血液幹細胞が生体内でサイトカイン飢餓などのメタボリックストレスに曝された際、アポトーシスを抑制する機能をもつと考えられた。
- (d) 亜硫酸によるストレス顆粒形成能が低い細胞ではアポトーシスが亢進し、逆にストレス顆粒が効率よく形成される細胞ではアポトーシスは抑制された。このことから Tax の発現のない白血病細胞においても、ストレス顆粒形成と亜硫酸感受性は逆相関を示すことが明らかとなった。
- (e) ATL 細胞株 TL-OmI で USP10 のノックダウンを行い、免疫不全マウスである NOG マウスに移植し造腫瘍性を検討した。USP10 ノックダウン細胞はコントロールに比べ顕著に造腫瘍性が增大していた。

(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) CRM197/gp46pep₁₈₀₋₂₀₄ の免疫群では、BALB/cおよびC57BL/6の量マウスストレスインで、抗原単独投与群よりも有意に高いIgGの誘導が確認された。
- (b) その力価はOVA/gp46pep₁₈₀₋₂₀₄と同等もしくはそれ以上であった。さらに、CRM197/gp46pep₁₈₀₋₂₀₄で誘導されたマウス抗血清の20~40%は、HTLV-I中和能をもつことが分かった。

(8) 分担研究者 (前田): ウイルス産生細胞内での HTLV-I エンベロープタンパク質と受容体分子 GLUT1 の挙動の解析

- (a) HTLV-I Env を発現したウイルス産生 293T 細胞に GLUT1 を過剰発現させたところ、

GLUT1 容量依存的に HTLV-I Env を介した膜融合能および感染性が減弱した。これは GLUT1 特異的であった。

- (b) 内因性 GLUT1 をノックダウンすると感染性が逆に増強したことから、ウイルス産生細胞における GLUT1 の発現量が HTLV-I Env の活性に依存していることが明らかとなった。
- (c) GLUT1 の 6 番目の細胞外ドメイン (ECL6) を含む領域が GLUT1 による膜融合阻止に重要であることが判明した。
- (d) GLUT1 の過剰発現によりレトロウイルス粒子内への GLUT1 の取り込みが促進され、逆に HTLV-I Env の取り込みは減弱した。
- (e) BFLA1 は HTLV-I Env を介した cell-cell 間の膜融合能、cell-cell 間の感染、cell-free の感染のすべてを阻害した。
- (f) 共焦点レーザー顕微鏡の解析から BFLA1 非存在では GLUT1 は HTLV-I Env の細胞内局在とは異なる細胞内の特定のコンパートメントに局限した。
- (g) BFLA1 でウイルス産生細胞を処理すると細胞表面ならびに細胞内で HTLV-I Env と GLUT1 が共局在するようになり、さらに共免疫沈降法にて両者の会合が増強された。
- (h) BFLA1 処理により両分子のレトロウイルス粒子内取り込みが増大すること、さらにはウイルス粒子中に取り込まれたエンベロープタンパク質は GLUT1 非存在下では 46kD のサイズで、開裂および糖鎖修飾を受けている gp46 と考えられるが、GLUT1 過剰発現ないし BFLA1 処理では分子量が約 55kD と大きいことが判明し、HTLV-I Env の細胞内での GLUT1 との会合が、HTLV-I Env の糖鎖修飾ならびに gp46 と gp21 への開裂を阻害している可能性が示唆された。

D. 考察

本年度の計画では、より詳細にワクチンや抗体医薬の開発研究を進めることを目標とした。まずは LAT-27 単クローン抗体のヒト化に成功したことがトピックスとして挙げられる。このヒト化抗体は IgG1 タイプの抗体で、中和能の他、より高い ADCC 活性を示すことからハイリス

ク環境にある人の感染防御受動ワクチンとして期待される。このような LAT-27 の活性は、精製した HAM 患者の polyclonal IgG にもあるが、HTLV-I 感染者由来の抗 HTLV-I 抗体の中には、人の正常組織と反応する抗体があることが報告されており、この臨床応用の際には十分な注意が必要と考えられる。

ヒト型 LAT-27 ではなく、純粋に人由来の中和あるいは ADCC 単クローン抗体が受動ワクチン候補として安全性が高いと考えられるが、これまで作製された人由来単クローン抗体に中和と同時に ADCC 能を同時に兼ね備える抗体はなく、それらの HTLV-I 感染抑制活性は実際に *in vitro* と *in vivo* で検証する必要がある。

能動ワクチンとしては、これも安全面から感染性のない gp46 組換え体や gp46 ペプチド抗原が候補として挙げられる。本研究では gp46 アミノ酸 191-196、つまり LAT-27 抗体の最小エピトープ領域を含むペプチドが中和抗体誘導性に優れている事が分かった。今後、アジュバントの選択やより免疫原活性の高い構造体をデザインする必要があると考える。

HTLV-I 感染防御を評価する系として、ラットの経口や経直腸感染系、種々のサイトカインを導入したヒト化マウスを立ち上げ、それぞれの特徴を検討したことにより、今後の応用が期待される。特に、ラットを用いた LAT-27 単クローン抗体の受動免疫による母子感染の制御の検証はぜひ行うべきである。また、ラットとヒト化マウスを用いた HTLV-I の粘膜感染制御実験は、人における水平感染制御法を開発する上で欠かせない系であることから今後さらなる改良が必要である。

E. 結論

HTLV-I 感染抑制には、HTLV-I envelope gp46 に対する中和抗体と ADCC 抗体がそれぞれ第 1 次エフェクターそして第二次エフェクターとして協調的に働くことが分かってきた。このような抗体を効率良く誘導できる能動ワクチンについては gp46 のアミノ酸配列 191-196 を含むペプチドワクチンが候補として挙げられる。また、受動ワクチンとしてはヒト化 LAT-27 が現在のところ最も有力な候補である。

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

研究要旨：HTLV-I 感染阻止のための受動ワクチン第一候補として、ラット由来の抗 HTLV-I gp46 中和単クローン抗体(LAT-27)をヒト型化することに成功した。この抗体は、*in vitro* およびヒト化マウスの動物実験系で、HTLV-I の新規感染の防御と同時に NK 細胞の共存下で HTLV-I 感染細胞を駆除しウイルス産生を強力に抑制することを検証した。他方、能動ワクチンの候補としてエンベロープ抗原の機能的領域のアミノ酸配列をもつペプチドの中和抗体誘導能を比較し、gp46 アミノ酸 191-196 を含むペプチドの優位性を見いだした。

A. 研究目的

HTLV-I 感染を阻止する能動ワクチンと受動ワクチン候補それぞれの機能を検討することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 合胞体形成阻止テスト：本研究で確立した方法（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 とを抗体存在下で 1 日間混合培養し、形成される巨大合胞体の阻止を判定する。中和価は、合胞体完全阻止に必要な濃度とした。

(2) 中和抗体と新鮮末梢血単核球(PBMC)による HTLV-I 感染細胞の増殖とウイルス産生阻止：試験管内で HTLV-I で不死化した健常人由来の T 細胞株と新鮮末梢血単核球(PBMC)の混合培養系に抗体を添加し、HTLV-I 感染細胞の増殖阻害を Tax 抗原陽性細胞の減少で、ウイルス産生阻害効果は培養上清中の HTLV-I p24 を ELISA で定量することで検討した。

(3) ADCC： ^{51}Cr 遊離細胞障害アッセイを行った。HTLV-I 感染細胞をラベルし、一定の抗体の存在下、PBMC を加えて 20 時間培養し、培養上清中に放出された ^{51}Cr を γ カウンターで測定した

(4) ペプチドワクチン キャリア蛋白に結合させた HTLV-I gp46 合成ペプチド 197-216 または gp21 合成ペプチド 400-429、およびキャリアフリーの gp46 合成ペプチド 188-222 の MAP について WKA ラットに免疫して中和抗体誘導能を比較検討した。

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) LAT-27 のヒト型化：(株)免疫生物研究(IBM)との共同研究において、LAT-27 の抗原結合部位の遺伝子を単離し、ヒト IgG1 バックボーンに組み込んで CHO 細胞に発現させ、protein-G で精製した。この抗体は、WB で抗ヒト IgG と反応し、合胞体形成阻止テストでは、 $5 \mu\text{g/ml}$ で完全に HTLV-I を中和した。

(2) ヒト化 LAT-27 中和抗体の HTLV-I 感染細胞の増殖とウイルス産生阻止：オリジナルのヒト化 LAT-27 を添加して HTLV-I 感染細胞を自家 PBMC と混合培養すると、培養 3 日目で Tax 陽性細胞の頻度を約 50% に低下させ、さらに新たな PBMC を加えて 3 日培養すると Tax 陽性細胞が殆ど消滅した。また、p24 産生も検出限界以下に抑制された。このような効果はオリジナルの LAT-27 抗体よりも高く、ADCC においてヒト化 LAT-27 のヒト NK 細胞との親和性が高いことが示唆された。

(3) ADCC：上記の結果で推定されたように、自家 HTLV-I 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、 ^{51}Cr 遊離細胞障害アッセイを行った。HTLV-I 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。

培養時間を20時間後の、有意な細胞障害性がしかもオリジナルLAT-27よりも高い活性のADCCが観察された。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-Igp46のアミノ酸191-196を含む合成ペプチドはキャリアに結合させてFCAとエマルジョンでラットやB6マウスに免疫すると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、今回は、キャリア蛋白に結合しないが、6分子の側鎖からなるHTLV-Igp46のマックスペプチドが中和抗体を誘導できるかをWKAラット検討した。得られた抗血清はペプチドに対する抗体活性はあるものの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。同時にコントロールとして用いたKLH-gp46 180-204は高いタイターの中和抗体を誘導した。

D. 考察

ヒト化 LAT-27 抗体が、オリジナルの LAT-27 のように新規 HTLV-I 感染を防御するとともに、既に HTLV-I 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 により強く監視できること分かった。中和抗体価は LAT-27 と同等であったが、より高い HTLV-I 感染細胞抑制活性と ADCC 活性はヒト化 LAT-27 が ADCC 活性の高い IgG1 タイプに改変されたことが理由と考えられる。ヒト化 LAT-27 の in vivo の中和活性は共同研究者の藤猪らが本研究で証明した。したがって、hu-LAT-27 を HTLV-I キャリア妊婦やハイリスクの未感染者への受動ワクチン応用を想定した動物実験や臨床試験を目指した研究が今後の新たな課題となる。

また、能動ワクチンとしての中和抗体誘導ペプチド抗原の選択については、過去の報告をそのまま引用することなく、実際に動物に免疫して中和抗体の誘導を確認する必要がある。これま

での研究によって、gp46 アミノ酸 191-196 領域を含むペプチドでかつキャリア蛋白に結合させた免疫原が優れていることが示された。

E. 結論

生体内において HTLV-I の中和エピトープを認識する中和抗体が、HTLV-I の新規感染を完全に阻害すると同時に、HTLV-I 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-I 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御の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) Tanaka Y, Takahashi Y, Tanaka R, Kodama A, Fujii H, Hasegawa A, Kannagi M, Ansari AA, Saito M. Elimination of human T cell leukemia virus type-1 (HTLV-I)-infected cells by neutralizing and ADCC-inducing antibodies against HTLV-I envelope gp46. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2014 in press.
- 2) Rodrigues ES, de Macedo MD, Pinto MT, Orellana MD, Rocha Junior MC, deMagalhes DA, Tanaka Y, Takayanagui OM, Covas DT, Kashima S. HTLV-I infects human mesenchymal stromal cell in vitro and modifies their phenotypic characteristics. *Virology*. 2014 449:190-199.
- 3) Medina F, Quintremil S, Alberti C, Barriga A, Cartier L, Puente J, Ramirez E, Ferreira A, Tanaka Y, Valenzuela MA. Tax Posttranslational Modifications and Interaction with Calreticulin in MT-2 Cells and Human Peripheral Blood Mononuclear Cells of Human T Cell Lymphotropic Virus Type-I-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis Patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2014 in press.
- 4) Kasahara D, Takara A, Takahashi Y, Kodama A, Tanaka R, Ansari AA, Tanaka Y. Natural OX40L expressed on human T cell leukemia

- virus type-I-immortalized T cell lines interferes with infection of activated peripheral blood mononuclear cells by CCR5-utilizing human immunodeficiency virus. *Virology*. 2013 10:338.
- 5) Pinto MT, Malta TM, Rodrigues ES, Pinheiro DG, Panepucci RA, de Farias KC, De Paula Sousa A, Takayanagui OM, Tanaka Y, Covas DT, Kashima S. Genes Related to Antiviral Activity, Cell Migration, and Lysis Are Differentially Expressed in CD4(+) T Cells in Human T Cell Leukemia Virus Type 1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis Patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2013 in press.
 - 6) Ikebe E, Kawaguchi A, Tezuka K, Taguchi S, Hirose S, Matsumoto T, Mitsui T, Senba K, Nishizono A, Hori M, Hasegawa H, Yamada Y, Ueno T, Tanaka Y, Sawa H, Hall W, Minami Y, Jeang KT, Ogata M, Morishita K, Hasegawa H, Fujisawa J, Iha H. Oral administration of an HSP90 inhibitor, 17-DMAG, intervenes tumor-cell infiltration into multiple organs and improves survival period for ATL model mice. *Blood Cancer J*. 2013 3:e132.
 - 7) Barros N, Risco J, Rodrogez C, SNnchez C, Gonzalez E, Tanaka Y, Gotuzzo E, Clinton White A, Montes M. CD4+ T cell subsets and Tax expression in HTLV-I associated diseases. *Pathog Glob Health*. 2013 107(4):202-206.
 - 8) Takahashi M, Higuchi M, Makokha GN, Matsuki H, Yoshita M, Tanaka Y, Fujii M. HTLV-I Tax oncoprotein stimulates ROS production and apoptosis in T cells by interacting with USP10. *Blood*. 2013 122(5):715-725.
 - 9) Kinpara S, Kijiyama M, Takamori A, Hasegawa A, Sasada A, Masuda T, Tanaka Y, Utsunomiya A, Kannagi M. Interferon-alpha (IFN- α) suppresses HTLV-I gene expression and cell cycling, while IFN- α combined with zidovudine induces p53 signaling and apoptosis in HTLV-I-infected cells. *Retrovirology*. 2013 10:52.
 - 10) Saito M, Tanaka R, Arishima S, Matsuzaki T, Ishihara S, Tokashiki T, Ohya Y, Takashima H, Umehara F, Izumo S, Tanaka Y. Increased expression of OX40 is associated with progressive disease in patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Retrovirology*. 2013 10:51.
 - 11) Nakano K, Ando T, Yamagishi M, Yokoyama K, Ishida T, Ohsugi T, Tanaka Y, Brighty DW, Watanabe T. Viral interference with host mRNA surveillance, the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) pathway, through a new function of HTLV-I Rex: implications for retroviral replication. *Microbes Infect*. 2013 15(6-7):491-505.
 - 12) 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 29(5):826-836.
- ## 2. 学会発表
- (国際学会)
- 1) Yuetsu Tanaka, Yoshiaki Takahashi, Akira Kodama, Reiko Tanaka, Mineki Saito: Neutralizing antibodies against human T cell leukemia virus type-I (HTLV-I) eradicate HTLV-I in combination with autologous peripheral blood mononuclear cells via antibody-dependent cellular cytotoxicity while preventing new infection. 16th international conference on human retrovirology HTLV and related viruses. カナダ モントリオール 2013.6.27
 - 2) Reiko Tanaka, Yoshiaki Takahashi, Akira Kodama, Mineki Saito. Generation of direct antigen-sandwich enzyme-linked immune-sorbent assays (ELISA) for quantitation of HTLV-I gp46, p24, Tax and related host cellular antigens OX40, OX40L and CD25 Reiko Tanaka, Yoshiaki Takahashi, Akira Kodama, Mineki Saito, Yuetsu Tanaka. 16th international conference on human retrovirology HTLV and related viruses. カナダ モントリオール 2013.6.27

(国内学会)

- 1) 宮城 拓也, 高橋 良明, 藤猪 英樹, 田中 礼子, 齊藤 峰輝, 上里 博, 田中 勇悦: HTLV-I 感染者血清抗体の HTLV-I 感染防御能に関する定量解析: 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2013.11.10.神戸
- 2) 田中 勇悦, 田中 礼子, 高橋 良明, 長谷川 温彦, 神奈木 真理, 齊藤 峰輝: HTLV-Igp46 中和活性および ADCC 活性を有する抗体による HTLV-I 感染の制御: 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2013.11.10.神戸
- 3) Yuetsu Tanaka, Mamoru Shimizu, Yoshiaki Takahashi, Hideki Fujii, Reiko Tanaka: Generation of a humanized rat monoclonal antibody (h-LAT-27) that mediates both neutralization and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) specific for human T cell leukemia virus type-I (HTLV-I): a possible potential for passive immunization against HTLV-I infection. 第 42 回 日本免疫学会総会・学術集会 2013 年 12 月, 幕張

H. 知的所有権の出願・登録状況

ヒト化 LAT-27 については IBL と共同で特許の出願している。

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

研究要旨：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-I)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-Iの主要感染経路は感染母から子供への垂直感染であることから、妊婦に対してHTLV-I検査・感染告知が行われるようになった。しかし、感染を阻止する有効なワクチンや抗体医薬は未だ開発されていない。平成23,24年度では、HTLV-I感染ヒトT細胞株ILT-M1細胞を感染源としたラットのHTLV-I感染系を確立し、HTLV-Iに対して中和活性を有する抗Env gp46抗体(LAT-27)が生体内でHTLV-I感染防御効果を有することを示した。本年度は、HTLV-I腹腔感染系を用いて、LAT-27を受動免疫する時期とその感染防御効果について検討した。その結果、感染細胞に曝露される場所にLAT-27が十分量分布していることがLAT-27受動免疫による感染防御には必要であることが示唆された。現在、LAT-27の感染防御効果について垂直感染系で検討中である。

A. 研究目的

HTLV-I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-I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-I感染ヒトT細胞株ILT-M1細胞を感染源としたHTLV-I感染系を用いて、抗体医薬の候補として着目しているHTLV-I Env gp46に対する中和抗体(LAT-27)の投与時期とそ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-I gp46中和抗体(LAT-27)の受動免疫、HTLV-I腹腔感染および感染量の測定

(i) LAT-27の受動免疫：免疫正常ラット(F344N-Jcl mu/+, 5wo)に対して、HTLV-I感染24時間前に、抗gp46中和抗体(LAT-27)1mgを腹腔内投与した後、感染5時間前(A)あるいは5時間後(B)に再度LAT-27(1mg)を腹腔内投与した。また、高用量のLAT-27受動免

疫のため、(C)HTLV-I感染5時間前に、LAT-27(10mg)を腹腔内投与した。

(ii) HTLV-I感染は、HTLV-I感染ヒトT細胞株ILT-M1細胞(2×10^7 個)を腹腔内投与することにより行った。

(iii) ILT-M1細胞投与8週後に、各ラットの脾臓T細胞(Spl-T)をナイロンウールカラムで分離し、HTLV-I感染量をHTLV-IpX領域を標的としたreal-time PCR法により定量した。

C. 研究結果

1. HTLV-I腹腔感染系における低用量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-A)をAの方法(1mg, -24h, -5h)で受動免疫したラットに、HTLV-Iを腹腔内感染させ、感染8週後に、各ラットのSpl-T中の感染量を測定した。その結果、LAT-27免疫群約83%で感染量は検出感度以下となり、Ctrl-Ab免疫群と比べ有意に低くなった。一方、Bの方法(1mg, -24h, +5h)で受動免疫した場合、LAT-27免疫群の感染量は、Ctrl-Ab免疫群と比べ有意に低かったが、約83%でHTLV-I遺伝子を検出することができた。さらに、LAT-27免疫群の感染量は、AとBでは有意にAで低かった。

2. 高用量 LAT-27 による HTLV-I 感染防御効果
LAT-27 あるいはコントロール抗体 (Ctrl-Ab) を C の方法 (10mg, -5h) で受動免疫したラットに、HTLV-I を腹腔感染させた後、LAT-27 免疫群と Ctrl-Ab 免疫群の感染量を比較した。その結果、LAT-27 免疫群 (2/3) と Ctrl-Ab 免疫群 (3/3) でウイルス遺伝子を検出できなかった。

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-I 腹腔感染系を用いて、抗体医薬の候補として着目している抗 HTLV-I Env gp46 中和抗体 (LAT-27) の免疫時期と感染防御効果について検討した。その結果、LAT-27 (1mg) を感染-24h および-5h (A) に投与したラットのほとんどで感染を抑えることができたことから、生体内で LAT-27 は感染防御効果を有すると考えられた。また、LAT-27 (1mg) を感染-24h および+5h (B) に受動免疫したラットでは感染量を低くしたが、(A) に比べ感染防御効果は低かった。この結果から、感染-24h に投与した LAT-27 のほとんどは血中に拡散してしまい、感染部位に十分量の LAT-27 が存在しなかったために感染防御効果が低下したものと考えられた。一方、高用量の LAT-27 (10mg) を感染-5h に投与したラットではコントロール抗体投与群でも感染が認められなくなった。原因は分からないが、高用量の抗体投与により、感染部位での Fc レセプターを介した NK 細胞、マクロファージの活性化により、投与した ILT-M1 細胞が速やかに排除されたのかもしれない。

HTLV-I 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。現在、HTLV-I 垂直感染系での LAT-27 の感染防御効果について検証している。

E. 結論

ラット HTLV-I 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-I Env gp46 中和抗体 (LAT-27) には、生体内で HTLV-I 感染を防御する効果があり、こ

の感染防御効果を最大限に得るためには、感染時のウイルス曝露部位に LAT-27 が分布していることが重要であることを示した。

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) Kinpara S, Kijiyama M, Takamori A, Hasegawa A, Sasada A, Masuda T, Tanaka Y, Utsunomiya A, Kannagi M. Interferon- α (IFN- α) suppresses HTLV-I gene expression and cell cycling, while IFN- α combined with zidovudine induces p53 signaling and apoptosis in HTLV-I-infected cells. *Retrovirology*. 10:52, 2013.
- 2) 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): 4382-92, 2013.

2. 学会発表

(国際学会)

- 1) Suehiro Y, Hasegawa A, Iino T, Sasada A, Watanabe N, Choi I, Fukuda T, Takaishi S, Tanosaki R, Utsunomiya A, Miura O, Matsuoka M, Teshima T, Akashi K, Okamura J, Kannagi M, Uike N. The phase-I study of a therapeutic vaccine to ATL patients with autologous dendritic cells pulsed with peptides corresponding to Tax-specific CTL epitopes. The 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. June 2013. Montreal, Canada.
- 2) 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. Augmentation of

donor-derived Tax-specific CTL responses by a novel Tax epitope-specific CD4⁺ helper T-cells in ATL patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. The 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. June 2013. Montreal, Canada.

- 3) Hasegawa A, Ando S, Takamori A, Kannagi M. Unresponsiveness of Tax-specific CTLs in rats orally infected with HTLV-I and re-induction of functional Tax-specific CTLs by peptide-pulsed BMDC vaccine. The 4th JSH International Symposium. May 2013. Ehime, Japan.

(国内学会)

- 1) Ando S, Hasegawa A, Murakami Y, Masuda T, Kannagi M. Peptide-pulsed dendritic cell vaccine re-induced functional Tax-specific CD8⁺ T cell responses. 第42回 日本免疫学会総会・学術集会 2013年12月, 幕張
- 2) Hasegawa A, Tamai Y, Takamori A, Sasada A, Tanosaki R, Choi I, Utsunomiya A, Suehiro Y, Maeda Y, Yamano Y, Uike N, Kannagi M. Identification of novel HTLV-I-specific CD4 epitopes in ATL patients after hematopoietic stem cell transplantation. 第72回 日本癌学会学術集会 2013年10月, 横浜
- 3) 田中勇悦、田中礼子、高橋良明、長谷川温彦、神奈木真理、齋藤峰輝. HTLV-I gp46 中和活性および ADCC 活性を有する抗体による HTLV-I 感染の制御. 第61回 日本ウイルス学会学術集会 2013年11月, 神戸
- 4) 長谷川温彦、安藤聡美、高森絢子、玉井洋太郎、笹田亜麻子、神奈木真理. ATL 発症予防、治療を目的としたペプチドパルス樹状細胞療法に関する研究. 第23回 日本樹状細胞研究会 2013年5月, 京都

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

ヒト化抗 HTLV-I gp46 中和抗体による in vivo HTLV-I 感染制御

藤猪英樹 琉球大学大学院医学研究科 准教授

研究要旨：HTLV-I 感染症に対する抗体医薬の開発が急がれている中で、我々が樹立したラット抗 HTLV-I gp46 IgG 単クローン抗体（LAT-27：gp46 のアミノ酸 191-196 を認識）が in vitro やヒト化した高度免疫不全マウスの体内において HTLV-I 感染を阻止することを明らかにしてきた。本研究では、LAT-27 接種後に誘発されるヒト抗ラット抗体産生を回避する目的で作成したヒト化 LAT27 抗体が、HTLV-I 感染ヒト化マウスモデルにおいて感染抑制効果が得られることを明らかにし、さらに妊娠ラットを用いてヒト化 LAT27 抗体が母子間で受動免疫が成立することを明らかにした。

A. 研究目的

HTLV-I は世界で初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-I 関連髄膜症（HAM）および成人 T 細胞白血病（ATL）の原因ウイルスである。特に ATL においては、発症後の予後は極めて悪く、1 年以内にほぼ死亡するという極めて深刻な現実がある。しかしながら、今日 HTLV-I 関連疾患の有効な治療法はもとより、主な感染ルートである母子感染を防御するワクチンの開発もなされていない。本研究では、我々が樹立したラット抗 HTLV-I 抗体（LAT-27）を LAT-27 接種後に誘発されるヒト抗ラット抗体産生を回避する目的で作成したヒト化 LAT27 抗体が、HTLV-I 感染ヒト化マウスモデルにおいて感染抑制効果が得られるか、さらに妊娠ラットを用いてヒト化 LAT27 抗体が母子間で受動免疫が成立するかを検討した。

B. 研究方法

(I)高度免疫不全マウス（NOG: NOD/SCID/□C null）の脾臓内にヒト末梢血単核球(PBMC) 5×10^5 個と HTLV-I 感染 T 細胞株(ILT-M1) 5×10^5 個を同時移植し、ヒト化 LAT-27 抗体 1mg を移植の 2 時間前、あるいは 1 日後に尾静脈から投与した。移植 2 週間後にマウスから脾臓を摘出し脾臓細胞を回収した。細胞の一部から抗体結合磁気ビーズを用いて CD4 陽性 T 細胞を分離し、Total RNA を回収し real time PCR によ

り HTLV-I Tax の発現を測定した。さらに脾細胞の一部は IL-2 添加 RPMI 培地で 24 時間培養後フローサイトメーターにて細胞内の HTLV-I Tax タンパクの発現を解析した。

(II)母子間におけるヒト化 LAT-27 抗体の受動免疫を検討する目的で、妊娠 FD ラットに 25mg のヒト化 LAT-27 抗体を出産予定日の 7 日前と 2 日前の 2 回腹腔内投与し、2 日目の新生仔ラットと親マウスから採血し、血中の抗体濃度と中和活性を測定した。

（倫理面への配慮）

本研究は、琉球大学のバイオハザード委員会、動物実験委員会の審査を受け、その承認を得てから開始した。

C. 研究結果

NOG マウスの脾臓から分離したヒト CD4 陽性 T 細胞中に HTLV-I Tax の mRNA が検出されるがヒト化 LAT-27 抗体を予め投与することによって、その発現は完全に阻害された。また、フローサイトメトリー解析から、HTLV-I 感染細胞中に出現する HTLV-I Tax タンパクの発現もヒト化 LAT-27 抗体を予め投与することによって、その発現が完全に阻止された。しかしながら、感染後にヒト化 LAT-27 抗体を投与しても Tax 発現の効果は認められなかった。妊娠ラットの親にヒト化 LAT-27 抗体を投与すると、新生仔ラットに抗体が十分な濃度で移行するこ

とが確かめられた。さらに移行抗体は十分な中和活性を維持していることも確認された。これらのことから、ヒト化 LAT-27 抗体は体内において HTLV-I 感染細胞株からヒト T 細胞への HTLV-I 感染を阻止する事を明らかにしたことに加え、妊娠母体に投与することで新生仔への受動免疫が成立することが明らかとなった。

D. 考察

ヒト化 LAT-27 抗体は、本研究の結果から、*in vivo* での完全な感染予防効果は得られたが、感染細胞の抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC) による排除を誘導することが出来なかった。HTLV-I 感染キャリア患者、及び ATL/HAM 発症患者のいずれの血液中にも抗 HTLV-I 抗体は確認されるが、その防御効果は十分でないと考えられており、その原因として以下の2点が考えられる。

- 1) HTLV-I 感染細胞上で、抗体が認識する HTLV-I 抗原の発現が減弱している
- 2) 抗体が結合した標的細胞の細胞傷害を担うナチュラルキラー(NK)細胞の数および機能が減弱している。

ヒト化 LAT-27 抗体の *in vivo* での感染細胞排除効果が得られなかった原因も共通すると考えられるため、今後ヒト化 LAT-27 の効果をより高めるために、ウイルス感染細胞のウイルス抗原の発現上昇を誘導する方法を探索し、さらに、ヒト化 LAT-27 の投与をする際に、生体内の NK 活性を上昇させる方法の探索を試みる。

E. 結論

ヒト化 LAT-27 抗体はオリジナルのラット HTLV-I gp46 中和抗体と同等の *in vivo* における HTLV-I の感染を完全に阻害することが明らかになった。このことからヒト化 LAT-27 抗体は目的の作用を失うこと無くヒト化されたことが明らかになったため、抗抗体の出現の有無を検討し、ヒトへの適用の可能性を模索していく。

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) Tanaka Y, Takahashi Y, Tanaka R, Kodama A, Fujii H, Hasegawa A, Kannagi M, Ansari AA, Saito M. Elimination of human T cell leukemia virus type-1 (HTLV-I)-infected cells by neutralizing and ADCC-inducing antibodies against HTLV-I envelope gp46. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2014 Feb 13 in press.

2. 学会発表

- 1) 宮城拓也、高橋良明、藤猪英樹、田中礼子、齊藤峰輝、上里博、田中勇悦. HTLV-I 感染者血清抗体の HTLV-I 感染防御能に関する定量的解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 2013 年 11 月. 神戸.

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

研究要旨：本年度は、NOG マウスおよび臍帯血造血幹細胞移植 NOG マウスの研究代表者への供給に加え、ADCC 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。新たに作製した hIL-15-NOG マウスはヒト NK 細胞が増殖する。本年度は、このマウスと既に作製されている hIL-2-NOG マウスで分化するヒト NK 細胞の性状を比較した。その結果、これらマウスの中で分化したヒト NK 細胞の性状に大きな差は認められなかった。ADCC 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のため、hIL-2-NOG マウスに造血幹細胞またはヒト末梢血由来 NK 細胞を移植後、腫瘍細胞を移植し、既存の抗体医薬を投与して、その ADCC 効果による腫瘍萎縮効果を検討した。その結果、この In vivo 実験系で抗体医薬の ADCC 効果を検定できることが明らかとなった。

A. 研究目的

HTLV-I 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-I に感染する動物モデルは必須である。そのため、HTLV-I 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」は動物モデルとして極めて有効である。また、ヒト NK 細胞は腫瘍、感染細胞への直接的な細胞障害を与える細胞として知られ、ADCC 活性を担う細胞としても知られている。In vivo で HTLV-I 関連抗体医薬の ADCC 活性を評価できる系が確立できれば、抗体医薬の開発に極めて有用と思われる。すなわち、HTLV-I 関連抗体医薬の ADCC 活性関与による HTLV-I 増殖抑制効果を検定できる動物実験系は極めて重要である。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-I 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

本年度は、NOG マウスおよび臍帯血造血幹細胞移植 NOG マウスの研究代表者への供給に加え、我々が作製した hIL-2-NOG または hIL-15-NOG マウスで分化するヒト細胞の検証、

このマウスを用いて、抗体医薬の ADCC 活性を評価できるか否かを検討した。

改良 NOG マウスでのヒト化マウスとしての特性解析

これらマウスのヒト化マウスとしての特性を調べるために、マウスに 2.5 Gy の X 線照射を行った後に、臍帯血 CD34+造血幹細胞 1×10^5 個を尾静脈より移入し、経時的にマウス末梢血を採取し、その中のヒト細胞を flow cytometry で解析した。また、hIL-2-、hIL-15-NOG マウスについては、健常人から得られた末梢血より分離した NK 細胞 1×10^6 個を移植し、同様の解析を行った。

hIL-2-NOG マウスを用いた抗体医薬の in vivo ADCC 効果判定系の作製とその検証

1) 造血幹細胞移入後に分化する NK 細胞を用いた系の作製とその検証

マウスに 2.5 Gy の X 線照射を行った後に、臍帯血 CD34+造血幹細胞 1×10^5 個を尾静脈より移入し、その 3 週間後に CCR4 発現 L428 腫瘍細胞を皮下に移植し、その 3 週間後から週 2 回抗 CCR4 抗体を投与した。経時的に腫瘍の発育を観察した。

2) ヒト末梢血由来 NK 細胞を用いた系の作製とその検証

マウスに HER2 陽性 NCI-N87 細胞を移植し、