

移植後腫瘍の生着を確認した後、ヒト末梢血由来NK細胞 1×10^7 個を尾静脈より移入し、同時にハーセプチンの投与を行った。経時的に腫瘍の発育を観察した。

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

hIL-2-、hIL-15-NOG マウスを用いたヒト化マウスの特性

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た。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特異的な抗原が発現していた。そのNK細胞の障害性顆粒を細胞内染色法で確認すると、Granzyme や Perforin が確認できた。以上のことから、2系統マウスで分化するヒトNK細胞はヒト末梢血のNK細胞と同等であることが確認できた。これら表現型に両系統に差異は認められなかった。一方、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。

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

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。また、ヒト末梢血由来NK細胞を投与した系でも、ハーセプチン投与群でHER2陽性NCI-N87細胞の増殖を有意に抑制した。これら二つの実験から、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。

D. 考察

本年度の研究により、我々が樹立したhIL-2-NOGマウスを使うことによって、抗体の

NK依存性ADCC活性を評価できるin vivo評価系を確立できたと考えられる。現在は、末梢血由来NK細胞がより長期に維持できるhIL-15-NOGマウスでの試験系を検証中である。hIL-15-NOGマウスはhIL-2-NOGマウスよりもヒトNK細胞のマウス内での維持が長期にできることからより効果的なin vivo ADCC効果判定系ができる可能性がある。これらマウスを用いたin vivo ADCC検定系によって、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効果判定が可能と思われる。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。現在まで、in vivoでADCCを検定できる実験系はなく、今回確立した動物実験系は極めて貴重な実験系と考えられる。

E. 結論

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。すなわち、我々が開発したhIL-2-NOGマウスで分化するヒトNK細胞を用いることによって、in vivoで抗体医薬のADCC効果を判定できることが明らかとなった。また、新たに作製したhIL-15-NOGマウスでは、hIL-2-NOGマウスと比較して、ヒトNK細胞を長期に維持できることから、より良いADCC効果判定系を作製できると考えられる。

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) Sato, K., N. Misawa, S. Iwami, Y. Satou, M. Matsuoka, Y. Ishizaka, M. Ito, K. Aihara, D.S. An, and Y. Koyanagi. 2013. HIV-1 Vpr Accelerates Viral Replication during Acute Infection by Exploitation of Proliferating CD4(+) T Cells In Vivo. PLoS Pathog 9:e1003812.
- (2) Ito, R., T. Takahashi, I. Katano, K. Kawai, T. Kamisako, T. Ogura, M. Ida-Tanaka, H. Suemizu, S. Nunomura, C. Ra, A. Mori, S. Aiso, and M. Ito. 2013. Establishment of a Human

Allergy Model Using Human
IL-3/GM-CSF-Transgenic NOG Mice. J
Immunol 191:2890-2899.

2. 学会発表

(国際学会)

- (1) Ryoji Ito, Takeshi Takahashi, Ikumi Katano, Kenji Kawai, Satoshi Nunomura, Chisei Ra, Akio Mori, Sadakazu Aiso, Mamoru Ito. IgE-mediated allergic responses in human mast cells in humanized NOG mice expressing human IL-3 and GM-CSF. 国際免疫学会, ミラノ, イタリア, 10月23日
- (2) Ikumi Katano, Ryoji Ito, Takeshi Takahashi, Mamoru Ito. Functional NK cells developed from human hematopoietic stem cell in human interleukin-2 transgenic NOG mice. 国際免疫学会, ミラノ, イタリア, 10月27日
- (3) Ryoji Ito, Takeshi Takahashi, Ikumi Katano, Kenji Kawai, Mamoru Ito. Human mast cell mediated allergic responses in humanized NOG mouse expressing human IL-3 and GM-CSF. IWHM4, ソウル, 韓国, 9月30日
- (4) Ikumi Katano, Ryoji Ito, Takeshi Takahashi, Mamoru Ito. Predominant development of mature and functional human NK Cells in a novel human IL-2 producing transgenic NOD-scid,IL-2Rg KO (NOG) mouse. IWHM4, ソウル, 韓国, 9月30日 ポスター

(国内学会)

- (1) 伊藤亮治、片野いくみ、高橋武司、川井健司、上迫努、布村聡、相磯貞和、伊藤守. 「ヒト IL-3/GM-CSF トランスジェニック NOG マウスを用いたヒトアレルギーモデルの開発」 第60回日本実験動物学会総会、平成25年5月15-17日、つくば.

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

HTLV-I 感染阻止ワクチンの研究

松崎吾朗 琉球大学熱帯生物圏研究センター 教授
新川 武 琉球大学熱帯生物圏研究センター 准教授

研究要旨：キャリアタンパク質をこれまでの三部構成免疫賦活複合体（TIPS）からジフテリア毒素変異体（CRM197）に変更したことで、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。その力価はOVA/gp46pep₁₈₀₋₂₀₄と同等もしくはそれ以上であった。また、CRM197/gp46pep₁₈₀₋₂₀₄で誘導した抗体にはHTLV-I中和能も確認され、その機能はOVA/gp46pep₁₈₀₋₂₀₄とほぼ同等であった。以上のことから、CRM197を用いたコンジュゲートワクチンの有効性が確認されたことに基づき、現在、天然物由来の新規アジュバントを添加することでさらに機能増強が可能か検討している。

A. 研究目的

本研究課題では、HTLV-Iの中和抗体を誘導するための新たな免疫方法を確立することを目的に研究を進めている。すなわち、HTLV-Iの中和エпитープとして機能することが知られているgp46由来のペプチド鎖（pep₁₈₀₋₂₀₄: PSQLPPTAPPLPHSNLDHILEPSI; Tanaka et al., 1994）に対する特異的抗体誘導を可能にする系の確立である。本プロジェクトでは、我々独自のキャリアタンパク質「三部構成免疫賦活システム（TIPS）」を利用し、当該エピトープに対する中和抗体の誘導を試みたが、TIPS型コンストラクト（Z-COMP-gp46pep₁₈₀₋₂₀₄）では有意な抗体応答増強効果が認められなかった。これは、TIPS分子が保有するCD4⁺ T細胞エピトープ数の少なさや抗原の高分子量化がなされていなかったことが原因だと推察し、キャリアタンパク質をジフテリア毒素変異体（CRM197）に変更し、中和抗体誘導能を検証することにした。

B. 研究方法

キャリアタンパク質CRM197に、N、C両末端にシステイン残基（Cys）とスペーサー領域（下線部）をもつ人工ペプチド（HTLV-I peptide pep_{180-204_3} Cys: CGPSQLPPTAPPLPHSNLDHILEPSIGCGGGGS C）をクロスリンカーEMCSを介して融合させた。

化学反応後、フリーのペプチドを限界濾過で除去し、精製したコンジュゲートワクチン（CRM197/gp46pep₁₈₀₋₂₀₄）をBALB/cおよびC57BL/6マウスへアラムアジュバントと一緒に3回皮下投与した。その2週間後、血清中の抗エピトープIgG抗体価を測定した。陽性対象として、OVAをCRM197と同様の方法で融合体（OVA/gp46pep₁₈₀₋₂₀₄）を作成し、マウスへ投与した。

C. 研究結果

CRM197/gp46pep₁₈₀₋₂₀₄の免疫群では、BALB/cおよびC57BL/6の量マウスストレインで、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。また、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。

D. 考察

今回用いたキャリアタンパク質CRM197は、肺炎球菌結合型（コンジュゲート）ワクチン等で既に臨床応用されている。今後、CRM197/gp46pep₁₈₀₋₂₀₄コンジュゲートワクチンにアラムより強めのアジュバントを併用する皮下免疫法を提唱したい。現在、我々が見つけた

植物由来の免疫賦活物質をアラムの代替として用いた場合、gp46pep₁₈₀₋₂₀₄に対する抗体応答の増強効果が認められたため、この類のアジュバント候補物質をアラム、MPL、スクワレン、CpG ODNなど既に臨床応用されているアジュバントと組み合わせることで、さらなる抗体応答の増強効果が期待できると考えている。

E. 結論

gp46pep₁₈₀₋₂₀₄のようなエピトープワクチンには、CRM197などのキャリアタンパク質が必須であること、また、遺伝子融合法よりも化学融合法の方が有利である可能性が示唆された。さらに、アラムアジュバントは、安全性は高いが当該ワクチンには機能的に不十分であることも示されたため、アラムより強いアジュバントを採用する必要があると思われる。

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

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

細胞内 HTLV-I 感染抵抗性因子の研究と応用

樋口雅也 新潟大学医歯学系 准教授

研究要旨：HTLV-I の癌蛋白 Tax1 感染 T 細胞の不死化、潜伏感染および病原性発揮において重要な役割を果たしている。Tax1 に結合する宿主因子の一つである USP10 はストレス顆粒の形成因子であり、Tax1 は USP10 の機能を阻害することにより活性酸素種（ROS）産生を促す。KO マウスを用いた解析から、USP10 は血液幹細胞の維持に必須であることが明らかとなった。ATL を含む様々な白血病細胞において、USP10 の機能不全は亜硫酸への感受性を亢進させた。したがって、亜硫酸などの酸化剤は USP10 の機能不全を伴うがん細胞に対して、有力な治療薬となりうる。

A. 研究目的

HTLV-I がコードする癌蛋白 Tax1 は感染 T 細胞の不死化、ウイルス遺伝子の発現促進などの機能を有し、HTLV-I 感染成立において重要な役割を果たす。我々は Tax1 が結合する細胞内因子として Ubiquitin Specific Protease 10 (USP10) を同定した。USP10 はストレス顆粒の形成に関わり、細胞内活性酸素種（ROS）の産生を制御していることをすでに報告している。本年度の研究では、USP10 の生体内での機能を明らかにするため、USP10 ノックアウトマウスの解析をさらに進めた。また ATL を含む各種白血病、リンパ腫細胞に対する、USP10 の機能に基づいた治療薬の可能性についても検討した。

B. 研究方法

生体内における USP10 の機能を明らかにするため Usp10 ノックアウトマウスを作製した。マウス由来血球系細胞の解析は表面抗原染色とセルソーター AriaII を用いて行った。In vitro の解析には、HTLV-I 感染細胞株その他の各種細胞株を用いた。ストレス顆粒形成には亜硫酸による刺激を用い、免疫蛍光染色によりストレス顆粒形成能を定量化した。アポトーシスの定量には PI および AnnexinV 染色とフローサイトメーター解析を用いた。細胞株における USP10 ノックダウンは shRNA 発現レンチウイルスを感染させることにより行った。本研究は新潟大学動物実験倫理委員会、遺伝子組換え実験安全委員

会の承認を得て行った。

C. 研究結果

(1) USP10 の生体内機能解析：

前年度までの研究で、以下のことが明らかとなっている。

- USP10 KO マウスは極度の貧血に陥り、生後 1 年以内に死亡する。
- USP10 KO マウスでは骨髄細胞が激減しており、これは血液幹細胞が維持できないことによる。

これらの結果を踏まえて、本年度は血液幹細胞の維持における USP10 の役割について、さらなる解析を行った。

まず、USP10 KO マウスにおいて血液幹細胞の減少が始まる時期を同定するため、胎生 14.5 日および 17.5 日の胎児肝臓における血液幹細胞数を細胞表面抗原染色 (Lineage-, Sca-1+, c-Kit+, CD150+, CD48-) により検討した。その結果胎生 14.5 日までは、血液幹細胞はある程度維持されているものの、胎生 17.5 日ではその数が著しく減少していた。したがって、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。血液幹細胞の減少がアポトーシスによるものか、あるいは細胞周期の異常によるものなのかを明らかにするため、胎生 14.5 日の血液幹細胞を AnnexinV または Ki-67 およびヘキストで染色し FACS により解析したところ、KO マウスで AnnexinV の有

意な上昇が認められた。しかし細胞周期には違いが認められず、このことから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。

つぎに、血液幹細胞の減少が環境側の原因によるものなのか、幹細胞自体が異常なのかを検討するため、胎生 14.5 日の胎児幹細胞 (CD45.2) をガンマ線照射成体マウス (CD45.1) に移植し、末梢血白血球細胞の CD45.2 細胞の割合を追跡した。その結果 WT 細胞を移植したマウスではほとんどが CD45.2 細胞であったのに対し、KO 細胞移植マウスでは CD45.2 細胞の割合が低く、その割合は時間経過に伴いさらに減少した。したがって、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。

KO 細胞におけるアポトーシス亢進の分子メカニズムを明らかにするため、胎生 14.5 日の WT および KO の胎児肝臓細胞を IL-3、IL-6、TPO、SCF、FLT3L のサイトカインカクテルで培養し、血液幹細胞分画の培養を試みた。その結果、WT、KO とも LSK 細胞の同程度に活発な増殖がみられ、約 2 ヶ月培養を維持できた。しかし、サイトカイン飢餓状態では、WT に比べ KO LSK 細胞のアポトーシスが亢進していた。このことから 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。

(2) USP10 の機能不全と亜硫酸感受性の亢進：Tax1 は USP10 と結合する。前年度までの研究で以下の点が明らかとなっている。

- Tax1 は USP10 に結合することでその機能を阻害、亜硫酸によるストレス顆粒形成を阻害する。
- Tax1 は USP10 を阻害することで、細胞内 ROS を上昇させる。
- HTLV-I 感染細胞では亜硫酸によるストレス顆粒形成能が低下しており、亜硫酸によるアポトーシスが亢進する。

本年度は ATL 細胞株、各種白血病、リンパ腫細胞株の亜硫酸処理によるストレス顆粒形成とアポトーシスについて検討した。その結果、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。

ストレス顆粒形成能が低い細胞では USP10 の発現量が低下していた。このことより、USP10 の発現量が白血病細胞の亜硫酸感受性を規定する因子のひとつであることが示された。

(3) USP10 の機能不全と造腫瘍性：最近、USP10 は SIRT6 を脱ユビキチン化することで SIRT6 を安定化することが報告された。SIRT6 は myc の転写活性を抑制することから、USP10 はがん抑制遺伝子として機能すると考えられる。そこで、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増大していた。このことから USP10 の機能不全は成体内における細胞のがん化および悪性化に関わっていることが明らかとなった。

D. 考察

本研究で我々は、HTLV-I Tax1 結合蛋白 USP10 の生体内での機能をノックアウトマウスの解析により明らかにした。USP10 KO マウスでは胎生期においてすでに、血液幹細胞の減少が認められ、生後の悪性貧血の原因となっていた。KO 細胞はサイトカイン飢餓状態に感受性を示した。したがって、USP10 は生体内におけるサイトカイン飢餓状態などのストレス環境下においてストレス顆粒形成を促進し、血液幹細胞を細胞死から護る機能をもっていると考えられる。

一方、USP10 のノックダウンは ATL 細胞株の造腫瘍性を顕著に亢進させた。このことは USP10 はがん抑制因子としての機能をもつことを意味している。しかし同時に USP10 の機能不全はストレス顆粒形成不全を介した ROS の上昇を招き、亜硫酸に対する感受性を亢進させる。したがって USP10 の機能不全はがん細胞にとつ

て有利な反面、亜硫酸などの酸化剤に対する感受性を高め、がん細胞にとってのアキレス腱となり得ると考えられる。

E. 結論

USP10 は生体内において血液幹細胞の維持に必須の役割をもつ。HTLV-I 感染において、Tax1 による USP10 の機能阻害は、感染細胞の増殖およびウイルス産生促進に寄与すると考えられるが、一方で USP10 の機能不全は亜硫酸に対する感受性を増大させる。したがって亜硫酸をはじめとする酸化剤は ATL を含む白血病の有力な治療薬になりうる。

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) Mizukoshi T, Komori H, Mizuguchi M, Abdelaziz H, Hara T, Higuchi M, Tanaka Y, Ohara Y, Funato N, Fujii M, Nakamura M. Failure in activation of the canonical NF- κ B pathway by human T-cell leukemia virus type 1 Tax in non-hematopoietic cell lines. *Virology* 443: 226-235 (2013).
- 2) 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* 122: 715-725 (2013).

2. 学会発表

- 1) 高橋雅彦、樋口雅也、藤井雅寛 HTLV-I Tax は USP10 と結合することにより T 細胞における ROS 産生とアポトーシス誘導を活性化する。第 72 回日本癌学会学術総会、2013.10.3-5: パシフィコ横浜
- 2) 藤井雅寛、高橋雅彦、樋口雅也、Naswa Makokha Grace PDZ 蛋白 MAGI-1 の不活化は HTLV-I の Tax による T 細胞のトランスフォーメーションに関与する。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013.11.10-12: 神戸国際会議場

- 3) 高橋雅彦、樋口雅也、藤井雅寛 HTLV-I の Tax 蛋白は USP10 を介して ROS 産生と ROS 依存性アポトーシスを誘導する。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013.11.10-12: 神戸国際会議場
- 4) Masahiko Takahashi, Masaya Higuchi, Masahiro Fujii. Stress granules inhibit apoptosis by reducing ROS production, but this phenomenon is nullified by HTLV-I Tax. 16th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, June 26-30 2013 Montreal, Canada.

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

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

上里 博 琉球大学大学院医学研究科 教授
宮城拓也 琉球大学大学院医学研究科

研究要旨：ATL や HAM/TSP 等の難治性疾患の原因となる HTLV-I 感染において、HTLV-I 抗体が担う生体防御機能や該当する抗体群の力価と病態の関連性については、これまで詳細な研究がなされていない。そこで、本研究で HTLV-I 感染者血清中の抗体の HTLV-I 感染防御能に関する定量的解析の方法の確立および検討を行うこととした。

その結果、HTLV-I 産生 T 細胞株と非感染 T 細胞株の混合培養を用いた感染実験系、HTLV-I 感染者における血中の gp46 抗原に対する抗体の検出を目的とした ELISA 系、HTLV-I 感染者由来の精製 IgG を用い 51Cr 標識 HTLV-I 感染細胞を標的とした抗体依存性細胞傷害活性を測定する系を確立し、HTLV-I 感染者の血清中に HTLV-I 中和抗体および主要糖タンパク gp46 に対する抗体の存在を確認した。今後サンプル数を増やし、臨床病型と HTLV-I 抗体との関連について検討していく。

A. 研究目的

今回、私どもに与えられた課題は「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」を目的としている。しかし、その課題に入る前に、HTLV-I 感染者血清中の抗体の HTLV-I 感染防御能に関する定量的解析の方法の確立および検討を行うこととした。

B. 研究方法

対象：2011年から同意が得られた抗HTLV-I抗体陽性の患者および琉球大学皮膚科で加療中の自己免疫疾患患者および健常人を対象とした。
方法：抗HTLV-I抗体はルミパルスプレスト HTLV-I（富士レビオ株式会社）のヒトT細胞白血ウイルス1抗体キットを使用し、患者血清から抗HTLV-I抗体を検出した。

上記キットにて抗体で確認した後、下記の細胞、抗体を用い検討を行った。

【細胞】 HTLV-I産生T細胞株：MT-2、MT-1、SLB-1、ILT-M1、ILT-H2、YT/cM1、TAK/cH2
非感染T細胞株：Jurkat

【抗体】 ラットLAT-27単クローン抗体、ATLL/HAM患者血清精製IgG、ヤギanti-human IgG-HRP、マウスAnti-Human IgG1~4-HRP

【培地】RPMI1640（IL-2 20単位/ml・10%FCS 添加）

(1)HTLV-I産生T細胞株と非感染T細胞株の混合培養において最も顕著な合胞体形成を観察できる組み合わせをスクリーニングした。

(2)(1)で確立された感染系に血清またはIgGを添加し、中和抗体価は合胞体形成を完全に阻害する血清希釈倍数を中和抗体価とした。

(3)gp46に対する抗体価は、MT-2細胞上清から抗gp46単クローン抗体カラムでアフィニティ精製した自然gp46を用いたELISA法で測定した。自然gp46を0.1μg/mlでコーティング、血清および血清由来精製IgGを1次抗体、ヤギanti-human IgG-HRPを2次抗体として使用し、TMBで発色した。

OD値は自然gp46をコーティングした系で得られたOD値から1%BSAのみでコーティングした系で得られたOD値を差し引いた値を最終的なOD値とした。また、ELISA系が抗gp46抗体に対し特異的であることを確認するために自己免疫疾患患者血清および健常人血清と比較を行った。

なお、本研究は、琉球大学医学部倫理委員会の承認を得て行い、被検査者である患者の利益ならびに人権保護の取り扱いに十分配慮した。

C. 研究結果

(1)培養後16時間でJurkatとHTLV-I 産生T細胞株のILT-M1の混合培養で最も顕著な合胞体形成を認めた。

(2)(1)の結果確立されたJurkat・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。

(3) 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($p<0.05$)。

D. 考察

HTLV-I感染者血清中に、抗gp46単クローン抗体であるLAT-27抗体と同様の作用を示す中和抗体の存在が示唆された。また、抗gp46抗体を検出するELISA系で高いOD値を示すサンプルでは中和抗体価も高い傾向が見られた。そのため、HTLV-I 感染者におけるHTLV-I 感染制御においてgp46に対する抗体が重要な役割を果たしていると考えられた。

また、本研究で確立したELISA系で、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値を示したことから、本実験系が抗gp46抗体を特異的に検出していると考えられる。

E. 結論

有用な HTLV-I 感染防御能に関する抗体の定量的解析の方法を確立した。それらを用い結果、HTLV-I 感染者の血清中に HTLV-I 中和抗体および主要糖タンパク gp46 に対する抗体の存在を確認した。今後サンプル数を増やし、臨床病型と HTLV-I 抗体との関連について検討していく。

F. 健康危険情報

特記すべき情報なし

G. 研究発表

- 1) 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

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

前田洋助 熊本大学大学院生命科学研究部 准教授

研究要旨：HTLV-I エンベロープタンパク質 (Env)が、ウイルス産生細胞内でその膜融合活性を獲得するため、その受容体である GLUT1 をどのように制御しているかについて解析を行った。GLUT1 と HTLV-I Env のウイルス産生細胞での量的バランスを変化させるため GLUT1 をウイルス産生細胞に過剰発現させたところ、細胞表面への GLUT1 の発現ならびにレトロウイルス粒子内取り込みは増大し、HTLV-I Env の膜融合能ならびに感染性が用量依存的に減弱した。さらに細胞内の GLUT1 を細胞表面へ移動させる V-ATPase 阻害剤である Bafilomycin A1(BFLA1)でウイルス産生細胞を処理すると、HTLV-I Env の膜融合活性ならびに感染性が消失した。また BFLA1 処理により細胞内および細胞表面での GLUT1 と HTLV-I Env の共局在ならびに会合が確認された。以上の結果から、GLUT1 の発現が低いウイルス産生細胞では、HTLV-I Env が GLUT1 とは異なる細胞内コンパートメントに局在することにより GLUT1 との会合を逃れて粒子内へ取り込まれ、その膜融合能ならびに感染性が保持されることが示唆された。

A. 研究目的

HTLV-I のエンベロープタンパク質 (Env)はウイルス産生細胞内で前駆タンパク質として生成され、糖鎖修飾を受けた後 gp46 と gp21 に開裂してウイルス粒子に取り込まれ、標的細胞に存在する受容体分子群である HSPG, NRP-1, GLUT1 との会合により吸着・侵入を誘導する。したがって、HTLV-I Env を標的とした中和抗体誘導には、GLUT1 を含む受容体群に結合し膜融合能を有する HTLV-I Env を免疫原とすることが重要と考えられる。しかしながら感染が成立した細胞からのウイルス放出においてはこれらの受容体分子群の発現が HTLV-I Env の標的細胞への結合を阻害してしまうことが想定される。そこで本研究では中和誘導能が高い HTLV-I Env 抗原を作成するための基礎的研究基盤を確立する目的で、ウイルス産生細胞における受容体分子である GLUT1 がどのような制御を受けているか、さらには膜融合活性を有する HTLV-I Env の形成ならびにそのウイルス粒子内取り込み機序についての解析を行った。現時点では GLUT1 の発現がウイルス産生細胞内でどのように制御されているかについての

報告はない。HTLV-I の標的細胞である CD4 陽性の T リンパ球では CD8 陽性細胞に比較して GLUT1 分子の細胞表面発現が低いことが報告されていることから、感染した細胞での HTLV-I Env の発現レベルが GLUT1 の発現を凌駕すれば HTLV-I Env は膜融合活性を獲得する可能性もある。そこで本研究ではまずウイルス産生細胞内での GLUT1 の発現量の HTLV-I Env の膜融合能に与える影響について解析し、さらには細胞内から細胞表面へ GLUT1 を移動させる V-ATPase 阻害剤である Bafilomycin A1 (BFLA1) 処理により HTLV-I Env の膜融合能ないしウイルス粒子内取り込みがどのように修飾されるか、さらには両分子の細胞内分布やその会合について検討した。

B. 研究方法

Env 欠損 HIV-1 と HTLV-I Env を 293T 細胞に発現させて HTLV-I Env を発現するウイルス産生細胞とし、標的細胞である TZM-bl 細胞との共培養系で gp46 の cell-cell fusion 活性を、Luciferase をレポーターとして有する HIV-1 ベクターを使用して cell-free の感染性を、イント

ロンで分断されたレポーターを有する HIV-1 ベクターを使用して cell-cell 間感染の効率を検討した。レトロウイルス粒子内への HTLV-I Env ならびに FLAG でタグ化した GLUT1 の取り込みは gp46 に対するラットモノクローナル抗体である LAT-27 ならびに FLAG 抗体を使用して Western Blot により確認した。また両分子のウイルス産生細胞表面および細胞内への局在ないし会合についてはフローサイトメトリー、共焦点レーザー顕微鏡、共免疫沈降法により解析した。

C. 研究結果

HTLV-I Env を介した感染性が GLUT1 の量的バランスの変化によりどのような影響をうけるかについて解析を行った。まず 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することが判明した。また GLUT1 の相同分子である GLUT3 ではその減弱が観察されなかったことから、この膜融合阻止能および感染性減弱は GLUT1 特異的であることが確認された。次に 293T 細胞から siRNA を用いて内因性の GLUT1 をノックダウンするとその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。さらに HTLV-I Env による細胞膜融合阻止に参与する GLUT1 の領域を明らかにするため、GLUT3 とのキメラ分子を作製し、その責任領域を決定した。その結果、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。また 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 の取り込みは減弱することが判明した。次に BFLA1 が細胞内コンパートメントに存在している GLUT1 を細胞表面へ移動させることが報告されていたため、BFLA1 の HTLV-I Env 膜融合能ならびに感染性に与える影響について解析を行った。まず BFLA1 処理により 293T 細胞の GLUT1 の発現が細胞内から表面へ移動していることをフローサイトメトリーで確認した後、ウイルス産生細胞の BFLA1 処理によ

る感染性への影響を検討した。その結果、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することが判明した。そこで BFLA1 が細胞表面および細胞内での GLUT1 と HTLV-I Env の会合を促進するかどうかについて解析を行った。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限局していることが判明した。一方 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ることを確認した。また 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た。このことは、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を示唆している。

D. 考察

今回 HTLV-I Env 発現ウイルス産生細胞への GLUT1 の発現量が HTLV-I Env の膜融合活性と関連していること、その活性には GLUT1 の 6 番目の細胞外ドメインを含む領域が重要であることを示した。この領域は HTLV-I の吸着・侵入にも重要な領域であることが報告されており、ウイルス産生細胞内でも HTLV-I Env が GLUT1 と会合する可能性があることを示している。また GLUT1 の発現は同じでも、その局在場所が変わることにより GLUT1 と HTLV-I Env との会合がその膜融合能が修飾されることが V-ATPase 阻害剤である BFLA1 の実験から明らかになった。

以上よりウイルス産生細胞において GLUT1 発現が低レベルであれば、HTLV-I Env は GLUT1 とは異なる細胞内コンパートメントに輸送されることにより GLUT1 との会合を逃れ、糖鎖修飾ならびに開裂を受けて gp46 および gp21 が

生成されて膜融合能を有する状態でウイルス粒子内に取り込まれるものと考えられた。

しかしながら受容体分子である GLUT1 の細胞表面への発現をウイルス側因子により積極的に抑制している可能性も現時点では否定できないため、今後 GLUT1 細胞表面発現の阻止に関与する HTLV-I のウイルス側遺伝子産物の関与についても検討していきたい。また今回は付着系の細胞を使用して解析を行ったが、実際の標的細胞である CD4 陽性 T 細胞を使用した解析の必要があると考えている。

E. 結論

GLUT1 の発現が低いウイルス産生細胞内においては HTLV-I Env とその受容体分子である GLUT1 は異なる細胞内コンパートメントに局在することにより HTLV-I Env の膜融合活性ならびに感染性が保持されている可能性が示唆された。

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) Yuan Y, Yokoyama K, Maeda Y, Terasawa H, Harada S, Sato Y, Yusa K. Structure and dynamics of the gp120 V3 loop that confers noncompetitive resistance in R5 HIV-1_{JR-FL} to maraviroc. Plos One 2013; 8: e65115.
- 2) Suzuki K, Hattori S, Marks K, Ahlenstiel C, Maeda Y, Ishida T, Millington M, Boyd M, Symonds G, Cooper DA, Okada S, Kelleher A. Promoter targeting RNA suppresses HIV-1 infection in vivo through transcriptional gene silencing. Molecular Therapy Nucleic Acids 2013; 2: e137.
- 3) Nakano Y, Monde K, Terasawa H, Yuan Y, Yusa K, Harada S, Maeda Y. Preferential recognition of monomeric CCR5 expressed in cultured cells by the HIV-1 envelope glycoprotein gp120 for the entry of R5 HIV-1. Virology 2014; 452-453: 117-124.
- 4) Maeda Y, Terasawa H, Nakano Y, Monde K, Yusa K, Oka S, Takiguchi M, Harada S.

V3-independent competitive resistance of a dual-X4 HIV-1 to the CXCR4 inhibitor AMD3100. Plos One 2014; 9: e89515.

- 5) 遊佐敬介, 前田洋助, 高林誠, 小林哲, 苑宇哲. CHO細胞が産生するレトロウイルス様粒子とウイルス安全性. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 2013; 44: 852-856.
- 6) 前田洋助. ケモカイン受容体変異とHIV感染抵抗性. 化学療法の領域 2013; 29: 2466-2473.

2. 学会発表

- 1) Terasawa H, Maeda Y, Nakano Y, Monde K, Kawano R, Yusa K, Harada S. Competitive resistance of a CXCR4-using HIV-1 lacking amino acid substitutions in the V3 loop of gp120 to a CXCR4 inhibitor. XIV Kumamoto AIDS seminar; 2013; Kumamoto, Japan.
- 2) Nakano Y, Maeda Y, Monde K, Terasawa H, Yusa K, Harada S. Preferential recognition of monomeric forms of CCR5 by HIV-1 envelope glycoprotein gp120 for the entry of R5 HIV-1. XIV Kumamoto AIDS seminar; 2013; Kumamoto, Japan.
- 3) 中野雄介, 前田洋助, 門出和精, 寺沢広美, 遊佐敬介, 原田信志. HIV-1のcoreceptorのoligomer形成がHIV-1の感染感受性に与える影響. 第61回日本ウイルス学会学術集会; 2013; 神戸.
- 4) 前田洋助, 寺沢広美, 光浦智将, 中野雄介, 門出和精, 遊佐敬介, 原田信志. ウイルス産生細胞におけるGLUT1発現によるHTLV-Iエンベロープタンパク質の膜融合能の減弱. 第61回日本ウイルス学会学術集会; 2013; 神戸.
- 5) 寺沢広美, 前田洋助, 中野雄介, 遊佐敬介, 原田信志. CRF01_AE X4 HIV-1のCXCR4阻害剤耐性獲得機構の解析. 第27回日本エイズ学会学術集会; 2013; 熊本.

H. 知的所有権の取得状況

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
田中勇悦	HTLV-I感染拡大阻止 に有効なワクチンと抗 体医薬に関する研究		血液内科	科学評論社	日本	2014	23-29

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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-Infected Cells by Neutralizing and Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity-Inducing Antibodies Against Human T Cell Leukemia Virus Type-1 Envelope gp46.	AIDS Res Hum Retroviruses.	30	in press	2014
Rodrigues ES, de Macedo MD, Pinto MT, Orellana MD, Rocha Junior MC, de Magalhães DA, Tanaka Y, Takayanagui OM, Covas DT, Kashima S.	HTLV-1 infects human mesenchymal stromal cell <i>in vitro</i> and modifies their phenotypic characteristics.	Virology.	449	190 -199	2014
Medina F, Quintremil S, Alberti C, Barriga A, Cartier L, Puente J, Ramírez 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.	29	in press	2014

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.	Virolog J.	10	338	2013
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.	29	in press	2013
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.	3	e132	2013
Barros N, Risco J, Rodríguez C, Sánchez C, González E, Tanaka Y, Gotuzzo E, Clinton White A, Montes M.	CD4 ⁺ T cell subsets and Tax expression in HTLV-1 associated diseases.	Pathog Glob Health.	107 (4)	202 -206	2013
Mizukoshi T, Komori H, Mizuguchi M, Abdelaziz H, Hara T, Higuchi M, Tanaka Y, Ohara Y, Funato N, Fujii M, Nakamura M.	Failure in activation of the canonical NF-κB pathway by human T-cell leukemia virus type 1 Tax in nonhematopoietic cell lines.	Virology.	443 (2)	226 -235	2013
Takahashi M, Higuchi M, Makokha GN, Matsuki H, Yoshita M, Tanaka Y, Fujii M.	HTLV-1 Tax oncoprotein stimulates ROS production and apoptosis in T cells by interacting with USP10.	Blood.	122 (5)	715 -725	2013

Kinpara S, Kijiyama M, Takamori A, Hasegawa A, Sasada A, Masuda T, Tanaka Y, Utsunomiya A, Kannagi M.	Interferon- α (IFN- α) suppresses HTLV-1 gene expression and cell cycling, while IFN- α combined with zidovudin induces p53 signaling and apoptosis in HTLV-1-infected cells.	Retrovirology.	10	52 (1-15)	2013
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-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis.	Retrovirology.	10	51 (1-15)	2013
Melamed A, Laydon DJ, Gillet NA, Tanaka Y, Taylor GP, Bangham CR.	Genome-wide Determinants of Proviral Targeting, Clonal Abundance and Expression in Natural HTLV-1 Infection.	PLoS Pathog.	9	e1003 271 (1-13)	2013
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-1 Rex: implications for retroviral replication.	Microbes Infect.	15	491 -505	2013
Malta TM, Silva IT, Pinheiro DG, Dos 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.	29 (5)	826 -836	2013
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 -4392	2013
Sato, K., N. Misawa, S. Iwami, Y. Satou, M. Matsuoka, Y. Ishizaka, M. Ito, K. Aihara, D.S. An, and Y. Koyanagi.	HIV-1 Vpr Accelerates Viral Replication during Acute Infection by Exploitation of Proliferating CD4 ⁺ T Cells <i>In Vivo</i> .	PLoS Pathog.	9	e1003 812	2013

Ito, R., T. Takahashi, I. Katano, K. Kawai, T. Kamisako, T. Ogura, M. Ida-Tanaka, H. Suemizu, S. Nunomura, C. Ra, A. Mori, S. Aiso, and M. Ito.	Establishment of a Human Allergy Model Using Human IL-3/GM-CSF-Transgenic NOG Mice.	J Immunol.	191	2890 -2899	2013
新川武.	サブユニットワクチン開発のための分子デザインとアジュバント.	最新医学		in press	2014
Arakawa T, Tsuboi T, Sattabongkot J, Sakao K, Torii M, Miyata T.	Tricomponent complex loaded with a mosquito-stage antigen of malaria parasite induces potent transmission-blocking immunity.	Clin Vaccine Immunol.		in press	2014
Arakawa T, Harakuni T, Miyata T, Tafuku S, Tadano M.	Tricomponent fusion complex comprising a viral antigen, a pentameric α -helical coiled-coil, and an immunoglobulin-binding domain as an effective antiviral vaccine.	Vaccine	32	864 -871	2014
Yuan Y, Yokoyama K, Maeda Y, Terasawa H, Harada S, Sato Y, Yusa K.	Structure and Dynamics of the gp120 V3 Loop That Confers Noncompetitive Resistance in R5 HIV-1 _{JR-FL} to Maraviroc.	Plos One.	8	e65115	2013
Suzuki K, Hattori S, Marks K, Ahlenstiel C, Maeda Y, Ishida T, Millington M, Boyd M, Symonds G, Cooper DA, Okada S, Kelleher A.	Promoter Targeting shRNA Suppresses HIV-1 Infection <i>in vivo</i> Through Transcriptional Gene Silencing.	Molecular Therapy - Nucleic Acids.	2	e137	2013
Nakano Y, Monde K, Terasawa H, Yuan Y, Yusa K, Harada S, Maeda Y.	Preferential recognition of monomeric CCR5 expressed in cultured cells by the HIV-1 envelope glycoprotein gp120 for the entry of R5 HIV-1.	Virology.	452 -453	117 -124	2014
Maeda Y, Terasawa H, Nakano Y, Monde K, Yusa K, Oka S, Takiguchi M, Harada S.	V3-Independent Competitive Resistance of a Dual-X4 HIV-1 to the CXCR4 Inhibitor AMD3100.	Plos One.	9	e8951 5	2014
遊佐敬介, 前田洋助, 高林誠, 小林哲, 苑宇哲.	CHO細胞が産生するレトロウイルス様粒子とウイルス安全性.	医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス	44	852 -856	2013
前田洋助.	ケモカイン受容体変異と HIV 感染抵抗性.	化学療法の領域	29	2466 -2473	2013

IV. 研究成果の刊行物・別刷

特集

ATL/HTLV-1研究の最近の進展

HTLV-I感染拡大阻止に有効なワクチンと抗体医薬に関する研究*

田中勇悦**

Key Words : HTLV-I, neutralization, antibody, vaccine

はじめに

われわれの研究室では、ワクチンのHTLV-I感染抑制能を評価する*in vitro*および*in vivo*の実験系を確立し、HTLV-I gp46の中和エピトープを認識するラット由来の単クローン抗体LAT-27がHTLV-Iの細胞-細胞間伝染を完全に阻害すると同時に、すでにHTLV-Iに感染した細胞をADCC様の細胞障害性を介して駆逐することを明らかにした。同じような効果が高力価のヒト由来anti-HTLV-IポリクローナルIgGでも観察できた。これらの新たな発見はHTLV-I感染および発症予防に対してgp46特異的な中和抗体とADCC誘導性抗体が果たす生体防衛的役割はきわめて大きいことを示している。したがって、能動ワクチン候補はHTLV-I gp46に対する中和およびADCC抗体を効率よく誘導する活性を備えるべきであり、また、LAT-27抗体はHTLV-I感染防御抗体医薬の第1号候補としてヒト化に期待がかかる。

HTLV-I感染拡大予防策の必要性

今からおよそ20年前、それまで世界のトップであった日本のHTLV-I感染予防ワクチン研究の火は、HTLV-I感染は自然に消滅するであろうとの予測のもとに、自然に立ち消えた。しかし、最近のサーベイの結果、現在の日本ではHTLV-I

感染者数がいまだに100万人を上回ることが明らかにされた¹⁾。感染者の数はそれほど減少していなかったのである。したがって、感染拡大を予防する総合的な対策を施すため、関連する基礎および臨床研究を早急にしかも積極的に推進する必要性は明白である。

1981年、成人T細胞白血病(ATL)の原因ウイルスとして日沼博士らによって疫学的に同定されたHTLV-Iは、ヒトで疾病の原因として見つめられたはじめてのレトロウイルスである²⁾。日本におけるHTLV-Iの感染は縄文時代に遡るといわれる。感染者全体のおよそ5%が難病であるATLやHTLV-I関連脊髄症HAMを発症する。輸血による感染がなくなった日本では、主に母乳を介して感染する母子感染が主な感染ルートとされるが、他の垂直感染や静脈麻薬乱用や性行為による大人間の水平感染が問題となって浮上してきている。また、大都市では人の移動により感染者数が増加の傾向を示している。このような背景から、人為的にHTLV-I感染拡大を阻止する方法として感染予防ワクチンや抗体医薬品を開発することは社会的に高い必要性と緊急性を持つと考えられる。

日本ではHTLV-I感染予防ワクチン研究に20年の空白があった。この間、世界でも有効な感染予防ワクチンが開発されることはなかった。したがって本稿でレビューすべき最近の研究が少ないが、われわれの研究成果も含めて現状を紹介

* Studies of vaccine and antibody development for prophylaxis against HTLV-I infection.

** Yuetsu TANAKA, Ph.D.: 琉球大学大学院医学研究科免疫学講座[〒903-0215 沖縄県中頭郡西原町字上原207]; Department of Immunology, Graduate School of Medicine, Universities of the Ryukyus, Okinawa 903-0215, JAPAN

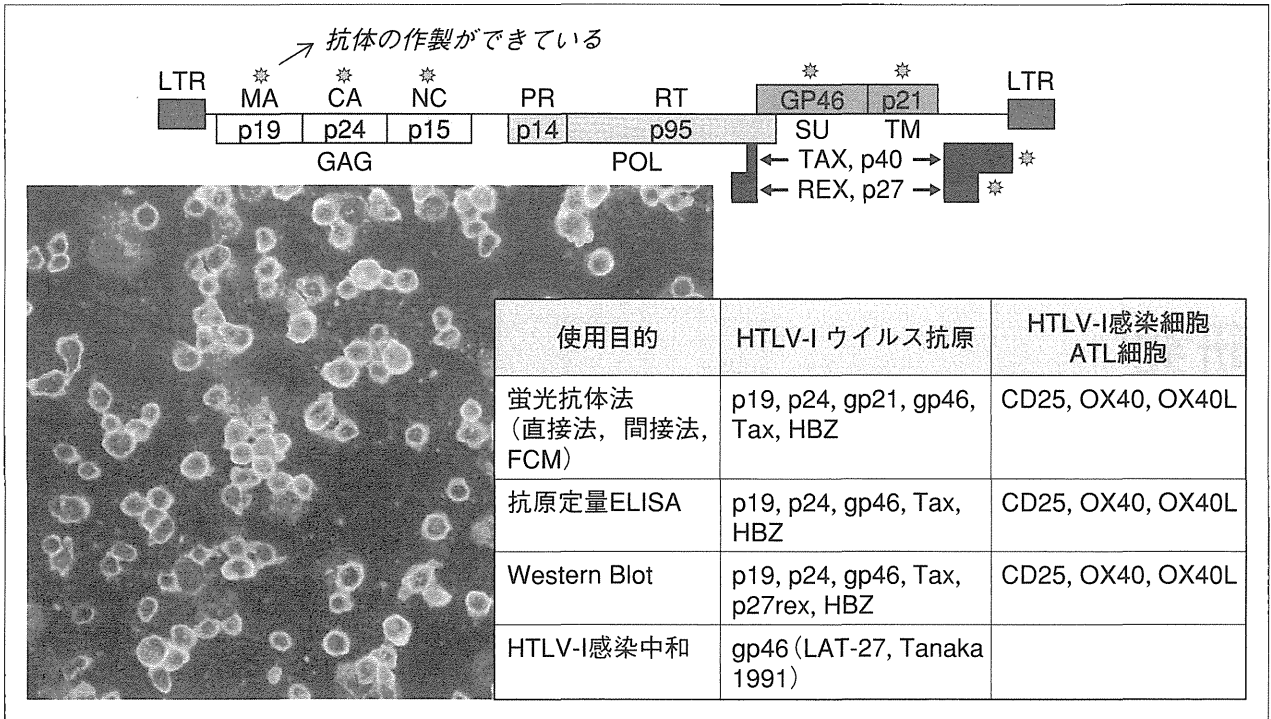


図1 HTLV-IやATL細胞に対する特異的抗体ライブラリー

蛍光抗体法によるHTLV-I感染細胞の可視化：アルコール固定したMT-2細胞をGIN-14 anti-HTLV-I p19で染色。

介したいと思う。

HTLV-I感染ワクチン研究に 必要な単クロン抗体パネル

ATLウイルスが発見された当時、日沼研の大学院生だった私の研究テーマは「EBVのCTL」から「HTLV-I単クロン抗体作製」となった。研究室の誰もハイブリドーマを作ったことはなく、“犬も歩けば”的な試みであった。幸運にも開始早々から“棒に当たり” anti-gag p19単クロン抗体GIN-14の作製に成功した³⁾。以後、作製された種々の単クロン抗体にはウイルス抗原だけでなく、ウイルス感染細胞に出現する特殊な宿主抗原を認識する抗体もあり、広い分野の研究に役立っている⁴⁾⁵⁾(図1)。この抗体リストの中で特に1991年に報告したHTLV-Iの中和単クロン抗体LAT-27は、世界ではじめてのHTLV-I中和単クロン抗体である⁶⁾。マウスではなくラットから作製された。LAT-27の認識エピトープは、エンベロップgp46タンパクのアミノ酸配列191-196に決定された。さらに、このエピトープを含む合成ペプチドで免疫することにより、ウサギを“HTLV-I産生細胞MT-2を静注するHTLV-I感染”から防御できることを同時に実証した。この研究成果が今の研

究基盤であり、私が“ワクチンでHTLV-Iの感染防御が可能である”と確信する理由である。

感染防御ワクチン開発の遅れ

LAT-27単クロン抗体を発表した1991年から1997年ころまで、日本ではHTLV-I感染防御ワクチンをテーマとした組み換えワクシニアウイルス開発⁷⁾、合成ペプチドワクチン開発⁸⁾やヒト由来のHTLV-I中和単クロン抗体の作製と同定⁹⁾など優れた研究成果が続々と報告され、日本のHTLV-Iワクチン開発研究は世界のトップを走っていた。しかしワクチンの完成をみることなく、HTLV-I研究は感染防御よりも腫瘍原性や発がん抑制に特化した研究が主流となった。また、エイズ研究に大々的に予算配分されるようになった。しかし、最近になってHTLV-I感染症対策のためHTLV-Iの研究を後押しする風が吹き始め、政策の一つとして臨床と基礎を含めたHTLV-I感染の広い研究領域に研究費が交付されることとなった。ここまでに至る多くの熱心な方々の努力とそのいきさつについては報道等を参照されたい。

HTLV-I感染機構とワクチンの標的

HTLV-Iはエンベロップgp46を使って標的細胞