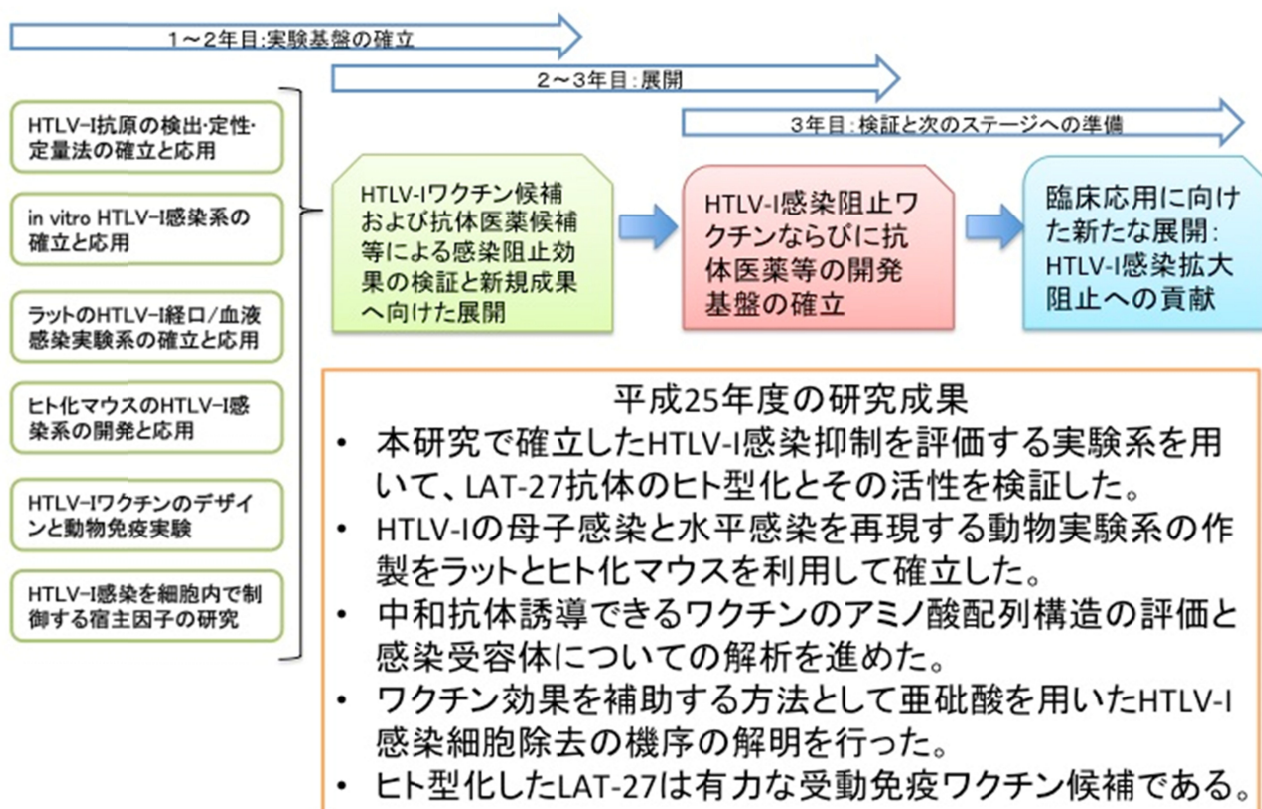


## HTLV-I 感染拡大を阻止するワクチンならびに抗体医薬等の開発基盤の確立

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  $\mu$ 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抑制：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、 $^{51}\text{Cr}$  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、CD16<sup>+</sup> 細胞、または NK マーカーである CD56<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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- 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- 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- 感染者血清中に HTLV- 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- 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増大していた。

(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/gp46pep<sub>180-204</sub> 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/gp46pep<sub>180-204</sub> と同等もしくはそれ以上であった。さらに、CRM197/gp46pep<sub>180-204</sub> 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 が共同在するようになり、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