

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：⁵¹Cr 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 ⁵¹Cr を 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 μg/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、⁵¹Cr 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は高いタイト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, deMagalhães 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, Rodriguez C, SNchez 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 of 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 rnu/+, 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 / \square 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、フローサイトメーター解析から、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児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な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、

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の中和エピト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: PSQLPPTAPLLPHSNLDHILEPSI; 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 pep₁₈₀₋₂₀₄3 Cys: CGPSQLPPTAPLLPHSNLDHILEPSIGCGGGGS 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 の発現のない白血球細胞においても、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 の発現量が白血球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っ

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

- 3) 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
- 4) 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

- 5) 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
- 6) 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- 感染者血清中の抗体の HTLV- 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- 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- 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- 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- 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- 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- 感染者血清中の抗体の HTLV- 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0.1 μg/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

- 2) 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し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関与する 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 との会合がおり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關与する HTLV-I のウイルス側遺伝子産物の關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