

2013/8020B

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 23～25 年度 総合研究報告書

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. 総括総合研究報告

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. 分担総合研究報告

(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、齊藤峰輝、高橋良明
：抗 HTLV-Igp46 中和抗体による新規 HTLV-I 感染予防・治療法
開発と HTLV-I bZIP factor (HBZ) タンパク検出系の確立による
新規診断技術の開発の試み

(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 . 総括総合研究報告

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

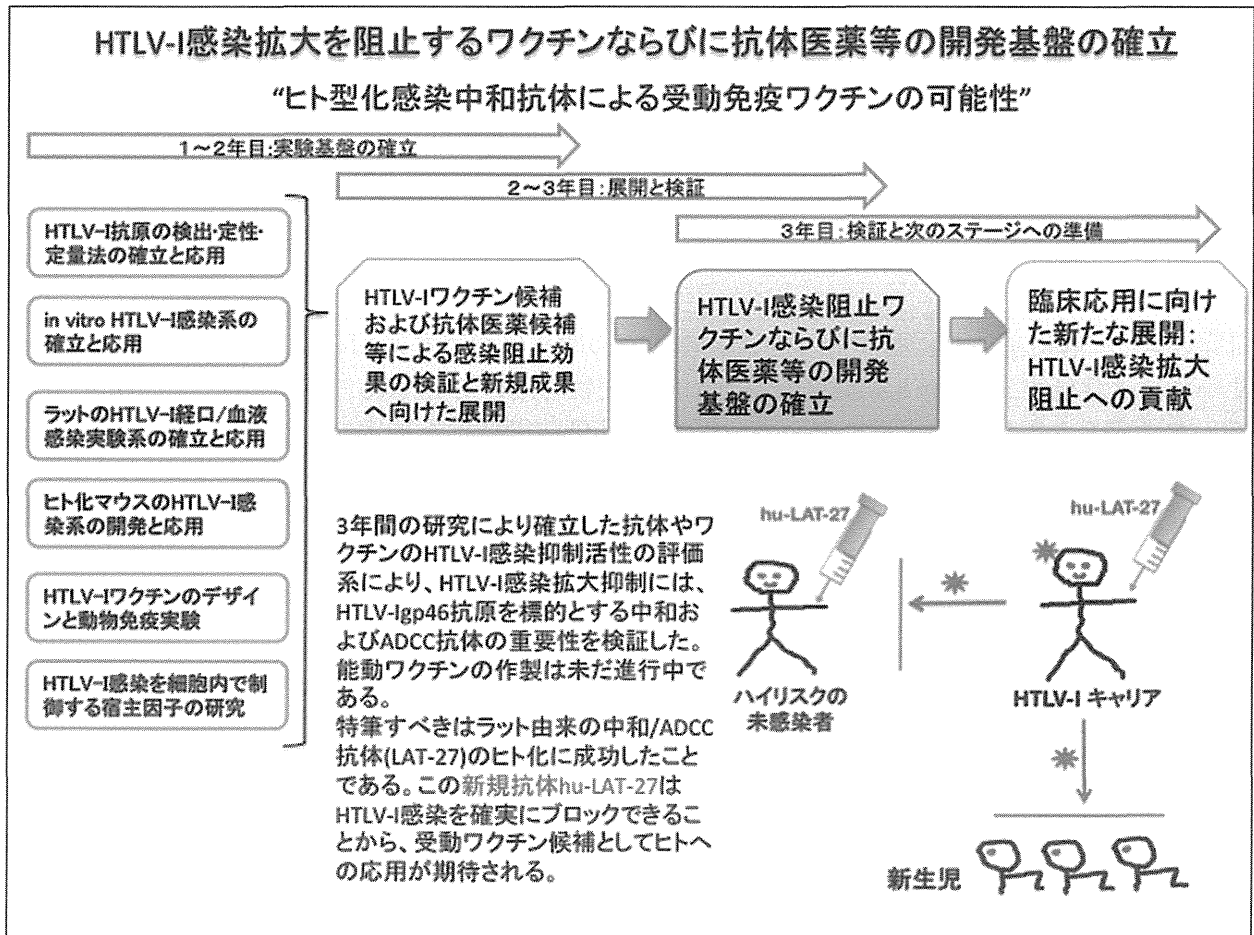
田中勇悦 琉球大学大学院医学研究科 教授

研究要旨：一般に感染症に対するワクチンや新薬の開発研究事業においては、種々の候補をスクリーニング評価する *in vitro* 細胞培養系と小型の動物を用いる *in vivo* モデルが必要である。そこで、本研究の 1 年目と 2 年目において、HTLV-I 感染防御活性を確実にしかも高感度で評価できる *in vitro* 実験系と HTLV-I 感受性のラットやヒト化したマウスを用いた *in vivo* の動物感染実験系を確立した。そして本研究目標を実現するために、ワクチンの標的とすべき HTLV-I 抗原は HTLV-I のエンベロープ gp46 であるという結論に到達し、それを動物実験レベルで検証した。能動ワクチンの作出研究は現在も進行中であるが、受動免疫ワクチン候補として、HTLV-I 特異的中和活性と ADCC 活性を同時に有するラット由来単クローン抗体 LAT-27 のヒト化を試み、HTLV-I 感染防御能を有する hu-LAT-27 の開発に成功した。本抗体医薬の HTLV-I 感染拡大への応用が期待される。（概要図を次ページに示した。）

研究分担者

- (1) 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
- (2) 藤猪英樹 琉球大学大学院医学研究科 准教授 (平成 25 年度)
齊藤峰輝 琉球大学大学院医学研究科 准教授 (平成 23 年 4 月～24 年 8 月まで)
高橋良明 琉球大学大学院医学研究科 助教 (平成 24 年 9 月～25 年 3 月まで)
- (3) 伊藤 守 公益財団法人実験動物中央研究所 副所長
- (4) 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
- (5) 樋口雅也 新潟大学医歯学系 准教授
上里 博 琉球大学大学院医学研究科 教授
- (6) 宮城拓也 琉球大学大学院医学研究科
- (7) 前田洋助 熊本大学大学院生命科学研究部 准教授 (平成 25 年度)

3年間の成果概要を示す図



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

班員全員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った。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った。ヒトの細胞材料入手は提供者の同意を得て、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した。

C. 3 年間の研究結果

まず、本研究目標を実現するために、ワクチンの標的とすべき HTLV-I 抗原は HTLV-I のエンベロープ gp46 であるという結論に到達しそれを動物実験レベルで検証した。能動ワクチンの作出研究は現在も進行中であるが、受動免疫ワクチン候補として、HTLV-I 特異的中和活性と ADCC 活性を同時に有するラット由来単クローン抗体 LAT-27 のヒト化を試み、HTLV-I 感染防御能を有する hu-LAT-27 の開発に成功した。

以下に具体的な成果を挙げる。

(1-a) 研究代表者 (田中) : 総括

- 2 年目の評価において以下のようなコメントを頂戴し、<>内に示すようにそれに対応した。
- (a) gp46 抗原がワクチン候補として最適であることを見出した点は評価できる。3 年目は研究員が一致団結してその評価に当たってほしい。<ご指導に沿えるように班員全体で計画を遂行しました>
 - (b) モノクローン抗体の研究は有用である。<抗体を利用したアッセイ系の精度保持に努め、抗体に特異的な生物活性の活用に努めました>
 - (c) HTLV-I でのワクチン研究には、本研究の進展が期待される。<ご期待に沿えるように研究のペースを落とさぬよう努力しました>
 - (d) 計画に沿って順調に研究は進展していると考えます。<計画通り順調に進展している中にも新たな発見があるように努力しました>
 - (e) HTLV-I の細胞実験系と動物実験系を組合せ、独創的な研究であり、治療抗体やワクチン開発をめざし、研究を早急に進めてほしい。<前臨床試験として私たちの系が一般にも普及するように、実験系がより正確で簡便になるように工夫をしております>
 - (f) gp46 抗体をペプチドへ。<候補となるペプチド抗原の作出とスクリーニングを行っております>

(1-b) 田中の分担 : ワクチン等の評価系の開発、抗体医薬の研究開発

- (a) 単クローン抗体を用いて種々の HTLV-I 抗原の定性、定量法を確立した。
- (b) *in vitro* で HTLV-I の中和抗体価を評価する方法として、高感度の合胞体形成阻止試験と細胞不死化阻止試験を確立した。
- (c) このようなアッセイ方法を駆使して、HTLV-I エンベロープ gp46 に対する中和単クローン抗体(LAT-27)と HTLV-I 感染患者由来 IgG は、HTLV-I の新規感染を防御するのみにとどまらず、すでに HTLV-I 感染した細胞

のウイルス産生および増殖を主に ADCC 機序を介して監視することを見いだした。

- (d) 既知の HTLV-I 中和抗体誘導 gp46 ペプチド (アミノ酸 180-204 番, P180-204) と、HTLV-I 感染に重要な役割をしていると報告されている receptor binding domain 領域の gp46 ペプチド P197-216 と gp21 ペプチド P400-429 の免疫原性を比較し、中和抗体が誘導できる gp46 ペプチドは P180-204 のみであることを検証した。
- (e) 最後に強調したいことは、LAT-27 のヒト型化を企業との共同研究において進め、新規に人型抗体 hu-LAT-27 の作出に成功したことである。この抗体は、オリジナル抗体と同等の HTLV-I 中和活性を保持し、より高い ADCC 活性を示した。

(2) 研究分担者(長谷川) : ラットの HTLV-I 経口・経腸・血液・母子感染系の確立とワクチン評価への応用

- (a) HTLV-I 感染が成立するラットを用いて、種々の HTLV-I 感染ルートの研究を進め、腹腔接種感染はもとより、経口感染、および経直腸感染を再現する実験系を開発した。また、ラットにおける母子感染を再現する系も開発した。
- (b) LAT-27 抗体を受動免疫することにより、腹腔内接種による HTLV-I 新規感染を効率良く防御できることを示した。

(3) 研究分担者(齊藤、高橋、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) 超免疫不全マウス (NOD/SCID/ γ Cnull : NOG) の脾臓内にヒト末梢血単核球 (PBMC) とマイトマイシン C 処理した HTLV-I 感染 T 細胞株 (ILT-M1) を同時移植し、2 週間後にはマウス体内でヒト T 細胞に HTLV-I 感染が成立することを確認した。
- (b) この系で、自家製抗 HTLV-I 中和モノクローナル抗体 LAT-27 は、マウス体内においてヒト T 細胞への HTLV-I 感染を完全に抑制した。さらに、HTLV-I 感染患者由来 IgG も同様に感染防御活性を示すことを確認した。
- (c) この系において、移植する PBMC の数を 10

倍多くすると HTLV-I 感染効率が低下することがわかり、HTLV-I の感染に自然免疫機構が防御的に関与することを見いだした。

- (d) 3 年目の重要成果として、この動物実験系において人型化した hu-LAT-27 による受動免疫が、HTLV-I 感染を完全に防御することを証明した。

(4) 研究分担者(伊藤) : ヒト化用マウス系統の開発と供給

- (a) 超免疫不全マウス NOD/SCID/ γ Cnull (NOG) マウスの計画生産を行い提供した。
- (b) これら免疫不全マウスをプラットフォームにして IL-2 を導入した NOG マウスの作製を試み、血清中に hIL-2 を分泌する免疫不全マウスを得ることができた。
- (c) ヒト末梢血単核球を移入すると、NOG マウスと比較して、強い GVHD で死亡することが明らかとなった。これは、移入した T 細胞が hIL-2 により活性化することによると考えられ、このマウスへの HTLV-I 感染への高い感受性が示唆された。
- (d) そこで、臍帯血由来の CD34 陽性血液幹細胞を移植することによりヒト T 細胞が増殖する NOG マウスの系を開発した。
- (e) さらに、抗体依存性細胞障害性を見る系として、ヒトの GM-CSF と IL-3 を恒常的に分泌する hGM-CSF/IL-3-NOG マウスを作製し、CD34 陽性血液幹細胞を移植すると単球と NK 細胞が増殖する系を確立した。

(5) 研究分担者(上里) : HTLV-I 産生株の樹

- (a) 皮膚科の ATL 患者の血液細胞の培養により、新規の HTLV-I 産生培養株を樹立した。
- (b) 病態と治療による HTLV-I 中和抗体の動向を検討するため、琉大病院の ATL 患者の血清サンプルを蓄積し、実際に中和抗体の定量、および抗体の ADCC 誘導性を比較検討した。

(6) 研究分担者(樋口) : 細胞内 HTLV-I 感染抵抗因子の研究と応用

- (a) HTLV-I Tax の結合蛋白として Ubiquitin Specific Protease 10 (USP10) を同定した。
- (b) Tax は USP10 に結合することにより、スト

レス顆粒形成を阻害することを解明した。

- (c) Tax は細胞内活性酸素種(ROS)を上昇させるが、USP10 との結合のない Tax 変異体では ROS 産生が低下した。したがって Tax は USP10 との結合により ROS を上昇させることを見いだした。
- (d) HTLV-I 感染細胞では亜硫酸によるストレス顆粒形成がみられず、亜硫酸によるアポトーシスが亢進した。これは Tax によるストレス顆粒形成阻害が ROS 産生制御不全を招き、ROS 産生を増大させることによって引き起こされることを発見した。
- (e) Tax 発現のない ATL 細胞株、あるいはバーキットリンパ腫や骨髄性白血病細胞株においても、亜硫酸によるストレス顆粒形成能とアポトーシス誘導は逆相関を示した。したがって白血病細胞におけるストレス顆粒形成不全は、亜硫酸に対する感受性を規定するマーカーとなり得ることを証明した。

(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) 三部構成免疫賦活複合体 (TIPS) は、①抗原、②コイルドコイルコア、③標的リガンドの三部から構成される。今回、HTLV-I 感染に対する防御エピトープ(gp46pep180-204)を搭載した TIPS を設計するため、5 量体コイルドコイル構造形成タンパク質 (COMP) と標的リガンド (B 細胞レセプター (Ig) と結合するプロテイン A 由来の Z ドメイン) を融合タンパク質として大腸菌で発現させた。そして、この融合分子 (TIPS/gp46pep180-204) が大腸菌から 5 量体として分泌発現することが確認され、Z の抗体結合機能があることも確認した
- (b) さらに、この融合分子を BALB/c および C57BL/6 マウスヘアラムアジュバントを添加して皮下接種したが、ペプチド特異的抗体応答は確認できなかった。しかし、以前の報告どおり、OVA/gp46pep180-204 (化学融合分子) の皮下接種では、エピトープ特異的な抗体応答が誘導された。これまで、比較的分子量の大きな抗原 (20 kDa 程度) を用いた場合、TIPS の効果が確認されてい

ることから、HTLV-I gp46pep180-204 内には T ヘルパー細胞エピトープが不十分ではないかと推察し、キャリアタンパク質を TIPS からジフテリア毒素変異体 (CRM197) に変更した。CRM197 との化学融合には、HTLV-I gp46pep180-204 の N および C 末にステイン (Cys) とヒンジ領域 (CGGGGS) を挿入した人工合成ペプチド (CGPSQLPPTAPPLL PHSNLDHILEPSIGCGGGGSC) を用い、CRM197 とクロスリンカー (EMCS) を介して融合させた。その後、限界濾過によってキャリアタンパク質と結合しなかったフリーのペプチドを除去し、化学融合分子 CRM197/gp46pep180-204 を得た。

- (c) この CRM197/gp46pep180-204 を BALB/c および C57BL/6 マウスヘアラムアジュバントを添加して、皮下接種した結果、抗原単独投与群よりも有意に高いペプチド特異的抗体応答が確認された。その力価は OVA/gp46pep180-204 と同等もしくはそれ以上であった。
- (d) CRM197/gp46pep180-204 コンジュゲートワクチンで誘導した抗血清は、一部、HTLV-I 中和能があることも確認された。その効果は OVA/gp46pep180-204 とほぼ同等であった。以上のことから、既に肺炎球菌ワクチンにも臨床応用されているジフテリア毒素変異体 (CRM197) を gp46pep180-204 のキャリアタンパク質に用いることで、一定の効果を発揮する HTLV-I ワクチン作成の可能性が示唆された。現在、アラムアジュバントを天然物由来の新規アジュバントへ変更することで、CRM197/gp46pep180-204 コンジュゲートワクチンの機能向上が可能か検証中である。

(8) 研究分担者(前田)：HTLV-I のエンベロープタンパク質 gp46 の中和抗体誘導性立体構造の解析

- (a) HTLV-Igp46 受容体 GLUT1 と gp46 が細胞内で異なるコンパートメントに局在することにより gp46 の GLUT1 との会合が回避され、結果として HTLV-I Env が膜融合能を有した構造を保持した状態で感染細胞からウイルス粒子へ取り込まれている可能性を見いだ

した。

D. 考察

上述のように3年間の研究で、HTLV-I 感染防御を実現させるワクチンが標的とすべき抗原はHTLV-Iエンベロープ gp46であることを検証できた。安全で中和能の高い中和抗体を誘導できる能動ワクチン候補の作出については今後も継続した研究が必要である。

本研究で新規に開発したヒト型抗HTLV-Igp46中和/ADCC抗体(hu-LAT-27抗体)を用いて動物をHTLV-I感染から完全に防御できることを検証できた。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。

E. 結論

本研究の1年目と2年目において、HTLV-I感染防御活性を確実にしかも高感度で評価できる *in vitro* 実験系とHTLV-I感受性のラットやヒト化したマウスを用いた *in vivo* の動物感染実験系を確立した。そして本研究目標を実現するために、ワクチンの標的とすべきHTLV-I抗原はHTLV-Iのエンベロープ gp46であるということを動物実験レベルで検証した。能動ワクチンの作出研究はさらなる検討が必要であるが、受動免疫ワクチン候補として、HTLV-I特異的中和活性とADCC活性を同時に有するラット由来単クロン抗体LAT-27のヒト化に成功した。本抗体については今後さらなる検証を計画している。

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. 分担総合研究報告

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：3年間の計画の1年目の研究では、HTLV-I 感染防御能あるいは HTLV-I 感染細胞増殖抑制能を定量的に評価する *in vitro* の系として3つの方法を確立した。2年目には、既存のラット抗 HTLV-I gp46 中和単クロン抗体(LAT-27)と HTLV-I 感染者由来の血清 IgG が HTLV-I の新規感染防御と同時に NK 細胞の共存下で HTLV-I 感染 T 細胞の増殖とウイルス産生を ADCC により抑制することを見いだした。また、中和抗体誘導ペプチドワクチン候補として gp46 アミノ酸番号 180-204 の領域が優れていることを見いだした。3年目には、HTLV-I 感染阻止のための受動ワクチンの第一候補として、LAT-27 中和単クロン抗体をヒト型化することに成功し、その感染防御能を検証できた。

A. 研究目的

感染症に対するワクチンや新薬を開発するには、抗体や薬剤の抗ウイルス効果を定量的に評価する *in vitro* の系と小型動物を使った *in vivo* の系が不可欠である。そこで、初年度の本研究では、まず、自家単クロン抗体ライブラリーを活用して HTLV-I 抗原測定系を確立すること、その系を使って抗体の HTLV-I 感染抑制能を *in vitro* で具体的に評価する系を確立することを目的とした。これらの系を使って2年目には HTLV-I 中和単クロン抗体および HTLV-I 感染者から分離した IgG 抗体の HTLV-I 感染抑制能と感染細胞監視能の確認とメカニズムを明らかにするとともに、中和抗体誘導ペプチドワクチンのスクリーニングを行い、能動ワクチンと受動ワクチン候補を選択することを目的とした。最終年には、受動免疫候補となるラット中和単クロン抗体のヒト型化、および能動ワクチンの候補としてペプチド抗原のさらなる検討を進めることを目的とした。

B. 研究方法

(1) 合胞体形成阻止試験：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系を開発した。抗体の中和価は、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：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効果で、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 試験： ^{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種々の HTLV-I gp46 合成ペプチドまたは gp21 合成ペプチド、およびキャリアフリーの gp46 合成ペプチドの MAP などについて WKA ラットや B6 マウス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) 合胞体形成阻止テストの確立：種々の HTLV-I 感染細胞株と非感染細胞株の組み合わせを検討し、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 1 日間混合培養すると大きな合胞体が形成され、顕微鏡観察で容易に判定できることを見いだした。この形成は既存の HTLV-I 中和能を持つ単クローン抗体 LAT-27 や HTLV-I 感染者 IgG で量依存的に阻止された。由来する患者の IgG で中和価は異なっていたが、中和価は gp46 に対する抗体価と比例した。この方法は最も簡便で短時間で中和抗体価を測定できる系である。

(2) 正常 T 細胞の不死化阻止テスト：正常人の末梢血単核球を OKT3 抗体と CD28 抗体で 24 時間活性化し、MMC 処理で増殖能を失活させた HTLV-I 感染細胞と *in vitro* で混合培養すると 2 週間程度で正常 T 細胞群から Tax 抗原陽性細胞の出現、および p24 抗原産生が確認できた。この不死化は、LAT-27 や HTLV-I 感染者 IgG で完全に阻害されることから HTLV-I 特異的であることが明らかとなった。

(3) HTLV-I 感染者由来 T 細胞の HTLV-I 発現誘導および不死化抑制テスト：HTLV-I 感染者(特に HAM 患者)由来の末梢血単核球を培養すると 24 時間以内に HTLV-I を産生する T 細胞が出現し、IL-2 を添加して培養すると不死化する例が多い。具体的には、HAM 患者の PBMC を培養すると 1 日目に Tax 陽性の細胞が数%~20%程度出現する。興味あることに、LAT-27 の添加は Tax 陽性細胞の頻度を約 50% に低下させた(n=3)。他の非中和抗体ではその効果がなかった。この培養系に IL-2 を加え 2 週間培養すると IL-2 依存性に不死化した Tax 陽性 HTLV-I 産生細胞株が出現した。LAT-27 添加培養系では 4 週間培養の時点でも Tax 陽性細胞は出現しなかった(n=3)。同様な感染阻止は、中和活性を持つ HAM 患者由来の血清 IgG でも観察された。

(4) 合胞体形成阻止を仲介する抗体の標的：単クローン抗体 LAT-27 と今回精製した HAM-IgG の中和価を測定し、合胞体完全阻止に必要な濃度はそれぞれ 5 μ g/ml および 50 μ g/ml であった。

この中和系にアフィニティ精製 gp46 を添加すると、LAT-27 の中和活性は完全に阻害された。HAM-IgG の中和も完全ではないにせよ優位に阻害された。HAM-IgG には gp46 以外の抗原に対する中和抗体、おそらく gp21 に対する抗体も含まれることが推定された。

(5) 中和抗体と新鮮末梢血単核球による HTLV-I 感染細胞株の増殖とウイルス産生阻止：試験管内で予め HTLV-I で不死化した健常人由来の T 細胞株に対して抗体と新鮮末梢血単核球(PBMC)が細胞増殖阻害あるいはウイルス産生阻害効果を示すかを検討した。抗体のみで何の抑制効果も見られなかったが、中和活性をもつ抗体と自家 PBMC を同時に作用させると有意に Tax 陽性細胞が減少し、p24 産生が抑制された。自家 PBMC だけでも弱い抑制活性があったが、抗体依存性抑制は明らかであった。さらに、LAT-27 抗体の Fc 領域を酵素消化した F(ab')₂ では、HTLV-I 中和活性があるものの、このような感染細胞に対する阻害活性は示さなかった。同様な阻害活性は、HAM-IgG でも観察できた。抗体と自家 PBMC 処理を 3~4 日おきに 3 回繰り返すと、HTLV-I 感染細胞が検出されず、しかも増殖する細胞も消失した。したがって、このような自家 PBMC と中和抗体による HTLV-I 感染細胞の増殖抑制は抗体の中和活性あるいは認識エピトープ依存性、かつ抗体の Fc 依存性であることが明らかとなった。ADCC の可能性が高い。

(6) 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。つまり、HTLV-I 感染細胞株をラベルし、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。通常の 4 時間の混合培養では、LAT-27 による ADCC 活性は証明出来なかったが、培養時間を 24 時間に延ばすと有意な細胞障害性が E/T 比 90 と 30 で観察された。このような障害性は、LAT-27 F(ab')₂ では観察されなかった。また、正常ヒト IgG は ADCC 活性を示さなかったが、HAM-IgG は LAT-27 より高い ADCC 活性を示した。一般的に ADCC を担うエフェクター細胞は PBMC においては CD16⁺NK 細胞である。

そこで本ADCCのエフェクター細胞を同定するため、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。

(7) ペプチドワクチン: HTLV-Igp46 合成ペプチドが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、どの領域のペプチドが最も効率よく中和抗体を誘導できるかを検討した。文献によると gp46 197-216 と gp21 400-429 の領域は HTLV-I 感染に必須な領域であることが報告されている。そこでこのペプチドを合成依頼し、OVA をキャリアにして B6 マウスを免疫したところ、ペプチドに対する抗体活性はあるものの、どれも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。コントロールとして用いた OVA-gp46 180-204 は B6 マウスにおいて有意な中和抗体を産生させた。

(8) ペプチドワクチン(その2): 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ラットで検討した。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結合 gp46ペプチド180-204は高いタイターの中和抗体を誘導した。

(9) LAT-27のヒト型化: (株)免疫生物研究所 (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 μ g/mlで完全にHTLV-Iを中和した。

(10) 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。

(11) 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20時間後には、有意でしかもオリジナル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。

D. 考察

本研究により、*in vitro*でのHTLV-I感染阻止評価系が確立された。さらにHTLV-I中和抗体が体内での新規HTLV-I感染阻止のみでなく、感染細胞の不死化を監視する生体防御エフェクターであることが強く示唆された。後者のメカニズムとして、NK細胞をエフェクター細胞とするADCCにより強く監視することが強く示唆された。HAM-IgGがLAT-27より高いADCC活性を示すことは、抗体のヒトNK細胞のFcRへの親和性の違い、さらにはHTLV-I感

染細胞の複数のエピトープに対する IgG 抗体群が同時に細胞に結合することなどの理由が考えられる。

中和抗体誘導ペプチド抗原の候補選択については、感染阻害能を示すことが報告されている合成ペプチドでも、本研究の系では全く効果がなかったり、さらに動物に免疫しても全く中和抗体を誘導できないケースもあることがはっきりした。今回、スクリーニングを行った意義は大きい。つまり、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、普遍的に中和抗体を誘導できたのは、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であったことから、今後のこの領域を基本としたペプチドワクチンの検討が急がれる。

受動免疫ワクチン候補としてヒト化 LAT-27 抗体を作製することに成功した。これはオリジナルの 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。

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衛的役割は極めて大きいと考えられる。このような抗体を効率よく誘導する能動ワク

チン候補として HTLV-I gp46 ペプチド(アミノ酸 191-196 を含む)、また受動ワクチン候補としてヒト型化 LAT-27 を提唱したい。

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. *Virol J*. 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, 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) 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 nonhematopoietic cell lines. *Virology*. 2013 443(2): 226-235
 - 9) 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.
 - 10) 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.
 - 11) 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.
 - 12) 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-I Infection. *PLoS Pathog*. 2013 9: e1003271.
 - 13) 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.
 - 14) 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.
 - 15) Makokha GN, Takahashi M, Higuchi M, Saito S, Tanaka Y, Fujii M. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein interacts with and mislocalizes the PDZ domain protein MAGI-1. *Cancer Sci*. 2013 Mar; 104(3): 313-320.
 - 16) Imai M, Higuchi M, Kawamura H, Yoshita M, Takahashi M, Oie M, Matsuki H, Tanaka Y, Aoyagi Y, Fujii M. Human T cell leukemia virus type 2 (HTLV-2) Tax2 has a dominant activity over HTLV-I Tax1 to immortalize human CD4+ T cells. *Virus Genes*. 2013 Feb; 46(1): 39-46.
 - 17) Nicolete LD, Nicolete R, Haddad R, Azevedo R, Castro FA, Tanaka Y, Takayanagui OM, Covas DT, Kashima S. Upregulation of hsa-miR-125b in HTLV-I asymptomatic carriers and HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012 Sep; 107(6): 824-827.
 - 18) Suzuki S, Masaki A, Ishida T, Ito A, Mori F, Sato F, Narita T, Ri M, Kusumoto S, Komatsu H, Fukumori Y, Nishikawa H, Tanaka Y, Niimi

- A, Inagaki H, Iida S, Ueda R. Tax is a potential molecular target for immunotherapy of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer Sci.* 2012 Oct; 103(10): 1764-1773.
- 19) Hasui K, Wang J, Tanaka Y, Izumo S, Eizuru Y, Matsuyama T. Development of ultra-super sensitive immunohistochemistry and its application to the etiological study of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Acta Histochem Cytochem.* 2012 Apr 26; 45(2): 83-106.
 - 20) Lee SJ, Lee JS, Shin MG, Tanaka Y, Park DJ, Kim TJ, Park YW, Lee SS. Detection of HTLV-I in the labial salivary glands of patients with Sjogren syndrome: a distinct clinical subgroup? *J Rheumatol.* 2012 Apr; 39(4): 809-815.
 - 21) Enose-Akahata Y, Matsuura E, Tanaka Y, Oh U, Jacobson S. Minocycline modulates antigen-specific CTL activity through inactivation of mononuclear phagocytes in patients with HTLV-I associated neurologic disease. *Retrovirology.* 2012 Feb 15; 9(1): 16.
 - 22) Kitazono T, Okazaki T, Araya N, Yamano Y, Yamada Y, Nakamura T, Tanaka Y, Inoue M, Ozaki S. Advantage of higher-avidity CTL specific for Tax against human T-lymphotropic virus-1 infected cells and tumors. *Cell Immunol.* 2011; 272(1): 11-17.
 - 23) Yoshita M, Higuchi M, Takahashi M, Oie M, Tanaka Y, Fujii M. Activation of mTOR by human T-cell leukemia virus type 1 Tax is important for the transformation of mouse T cells to interleukin-2-independent growth. *Cancer Sci.* 2012,103:369-374.
 - 24) Shibata Y, Tanaka Y, Gohda J, Inoue J. Activation of the I κ B kinase complex by HTLV-I Tax requires cytosolic factors involved in Tax-induced polyubiquitination. *J Biochem.* 2011, 150(6): 679-686.
 - 25) Alberti C, Cartier L, Valenzuela MA, Puente J, Tanaka Y, Ramirez E. Molecular and clinical effects of betamethasone in human t-cell lymphotropic virus type-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients. *J Med Virol.* 2011, 83(9): 1641-1649.
 - 26) Ndhlovu LC, Leal FE, Hasenkrug AM, Jha AR, Carvalho KI, Eccles-James IG, Bruno FR, Vieira RG, York VA, Chew GM, Jones RB, Tanaka Y, Neto WK, Sanabani SS, Ostrowski MA, Segurado AC, Nixon DF, Kallas EG. HTLV-I tax specific CD8+ T cells express low levels of Tim-3 in HTLV-I infection: implications for progression to neurological complications. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011, 5(4): e1030.
 - 27) Belrose G, Gross A, Olindo S, Lézin A, Dueymes M, Komla-Soukha I, Smadja D, Tanaka Y, Willems L, Mesnard JM, Peloponese JM Jr, Césaire R. Effects of valproate on Tax and HBZ expression in HTLV-I and HAM/TSP T lymphocytes. *Blood.* 2011, 118(9): 2483-2491.
 - 28) Abdelbary NH, Abdullah HM, Matsuzaki T, Hayashi D, Tanaka Y, Takashima H, Izumo S, Kubota R. Reduced Tim-3 expression on human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) Tax-specific cytotoxic T lymphocytes in HTLV-I infection. *J. Infect Dis.* 2011, 203(7): 948-959.
 - 29) Rende F, Cavallari I, Corradin A, Silic-Benussi M, Toulza F, Toffolo GM, Tanaka Y, Jacobson S, Taylor GP, D'Agostino DM, Bangham CR, Ciminale V. Kinetics and intracellular compartmentalization of HTLV-I gene expression: nuclear retention of HBZ mRNAs. *Blood.* 2011, 117(18): 4855-4859.
 - 30) Muguruma Y, Matsushita H, Yahata T, Yumino S, Tanaka Y, Miyachi H, Ogawa Y, Kawada H, Ito M, Ando K. Establishment of a xenograft model of human myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* 2013 96: 543.
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, Yuetsu Tanaka. 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.
 - 3) M. Saito, R. Tanaka, A. Kodama, Y. Tanaka. Complete prevention of HTLV-I infection in humanized mice by a neutralizing monoclonal antibody to envelope gp46. 11th International Symposium on NeuroVirology New York, NY USA, May 29-June 2, 2012. Journal of Neurovirology. 2012; 18(S1): 95.
 - 4) Saire R, Belrose G, Gross A, Olindo S, Lezin A, Dueymes M, Smadja D, Tanaka Y, Willems L, Mesnard J, Peloponese J. Opposite effect of valproate on Tax and HBZ expression in T-lymphocytes from HTLV-I asymptomatic carriers and HM/TSP patients. The Unlimited World of Microbes. XV International Congress of Virology. Sapporo, Japan. September 11-16, 2011: 56.
 - 5) Nakano K, Ando T, Ishida T, Ohsugi T, Tanaka Y, Watanabe T. A novel function of HTLV-I Rex in inhibition of the host mRNA surveillance mechanism for protection of the viral genomic mRNA. The Unlimited World of Microbes. XV International Congress of Virology. Sapporo, Japan. September 11-16, 2011: 113.
 - 6) Iha H, Ikebe E, Kawaguchi A, Taguchi S, Nishizono A, Tanaka Y, Sawa H, Ogata M, Horii M, Fujisawa J, Hasegawa H. Molecular chaperon inhibitor-based treatment against ATL: its in vitro and in vivo evaluation. The Unlimited World of Microbes. XV International Congress of Virology. Sapporo, Japan. September 11-16, 2011: 151.
- (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.
 - 4) NAKANO Satoko, IKEBE Emi, TANAKA Yuetsu, KUBOTA Toshiaki, NISHIZONO Akira, IHA Hidekatsu :TAX1BP1-deficiency evokes spatiotemporal development of systemic inflammatory symptoms and functional failures ofcardiovascularsystem in mice: 第 41 巻日本免疫学会総会・学術集会記録・抄録集, 2012.12.5-7, 神戸. 33.
 - 5) 大橋 貴, 田中勇悦, 志田壽利: HTLV-I に感染した Tax 特異的 CTL 細胞株の性状解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会・抄録集, 2012.11.13-15, 大阪. 236.
 - 6) 荀 潤澤, 上野孝治, 齊藤峰輝, 手塚健太, 田中勇悦, 藤澤順一: Altered pattern in viral mRNA expression of Iranian type HTLV-I leading to enhanced viral production. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会・抄録集, 2012.11.13-15, 大阪. 237.
 - 7) 田中勇悦, 長谷川温彦, 神奈木真理, 田中礼子, 齊藤峰輝: HTLV-I 感染 T 細胞の不死化

とウイルス産生を制御する宿主免疫環境.
第 60 回日本ウイルス学会学術集会・抄録集,
2012.11.13-15, 大阪. 356.

- 8) 池辺詠美, 手塚健太, 緒方正男, 松本 昂, 中野聡子, 藤澤順一, 田中勇悦, 末岡栄三郎, 堀 光雄, 森下和広, 山田雅雄, 西園 晃, 伊波英克: レクチンアレイによる ATL 細胞グリカンのプロファイリング:可能性と課題. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会・抄録集, 2012.11.13-15, 大阪. 357.
- 9) 伊波英克, 池辺詠美, 緒方正男, 田中勇悦, 松本 昂, 中野聡子, 八尋隆明, 堀 光雄, 森下和広, 西園 晃: ATL 細胞における Tax1bp1 の過剰異所性発現. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会,抄録集, 2012.11.13-15, 大阪. 357.
- 10) 村上悠二, 安藤聡美, 長谷川温彦, 田中礼子, 田中勇悦, 神奈木真理: ラットモデルにおける HTLV-I 中和単クローン抗体の HTLV-I 感染防御効果. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会・抄録集, 2012.11.13-15, 大阪. 358.
- 11) Mineki Saito, Reiko Tanaka, Akira Kodama, Yuetsu Tanaka: Complete prevention of HTLV-I infection in humanized mice(hu-PBL SCID)by a neutralizing monoclonal antibody to envelope gp46. 第 16 回日本神経ウイルス研究会,抄録集, 2012.8.30-31, 東京.
- 12) 田中勇悦, 田中礼子, 高橋良明, 長谷川温彦, 齊藤峰輝: HTLV-I gp46 中和抗体と HTLV-I 陰性ドナーの末梢血単核球(PBMC)の相乗作用による自家 HTLV-I 感染 T 細胞の Tax 抗原発現及び HTLV-I 産生制御. 第 5 回 HTLV-I 研究会・シンポジウム, 2012.8.25-26, 東京. 28.
- 13) 齊藤峰輝, 田中礼子, 児玉 晃, 田中勇悦: ヒト化マウス (hu-PBL-SCID) を用いた抗 HTLV-Igp46 中和抗体による感染抑制効果の検討. 第 5 回 HTLV-I 研究会・シンポジウム・抄録集, 28, 2012.8.25-26, 東京.
- 14) 齊藤峰輝, 田中礼子, 児玉 晃, 田中勇悦: 抗 HTLV-Igp46 中和抗体による HTLV-I 関連脊髄症に対する新規治療法開発の試み. 第 53 回日本神経学会学術大会・プログラム, 2012.5.22-25, 東京.
- 15) 田中勇悦, 田中礼子, 齊藤峰輝, 神奈木真

理. HTLV-I 中和抗体による HTLV-I 感染阻害と細胞不死化の監視: 予防ワクチン開発の基盤. 第 40 回日本免疫学会学術集会・学術集会記録, 2011.11.27-29: 千葉県. 149.

- 16) 齊藤峰輝, 田中礼子, 松崎敏男, 末原雅人, 田中勇悦: HTLV-I マイナス鎖にコードされる HBZ の HTLV-I 関連脊髄症における病因的意義. 第 52 回日本神経学会学術大会, 2011, 5. 名古屋
- 17) 齊藤峰輝, 田中礼子, 児玉 晃, 田中勇悦: HTLV-I 関連脊髄症(HAM)における OX40 陽性細胞の解析と HTLV-I 感染ヒト化マウス作製の試み. 第 64 回日本細菌学会九州支部総会・第 48 回日本ウイルス学会九州支部総会, 2011, 8. 北九州.
- 18) 齊藤峰輝, 田中礼子, 児玉 晃, 田中勇悦: ヒトリンパ球移植免疫不全マウス (hu-PBL-SCID)を用いた新規 HTLV-I 感染動物モデル作製の試み. 第 4 回 HTLV-I 研究会, 2011, 9. 東京.
- 19) 齊藤峰輝, 田中礼子, 田中勇悦: HTLV-I 関連脊髄症(HAM)における HBZ 遺伝子発現の意義. 第 23 回日本神経免疫学会学術集会, 2011, 9. 東京.

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をしている。

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。本研究では、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（腹腔、経口、経直腸感染）を確立し、試験管内で HTLV-I に対して中和活性を持つ抗 Env gp46 抗体 (LAT-27) について、生体内での HTLV-I 感染防御効果を評価した。その結果、LAT-27 は生体内でも感染防御効果を示すことがわかった。しかし、LAT-27 がその効果を発揮するためには、感染局所に LAT-27 を十分に分布させる必要があると考えられた。ラットでは、LAT-27 のような IgG 型抗体は胎盤および初乳を介して母から子へ移行することが知られている。また、LAT-27 の体内動態を調べると、ラットの妊娠期間（約 21 日）を超えて血液内に存在することがわかり、主要感染経路である母子感染に対する LAT-27 の感染防御効果について、ラットの垂直感染系を用いて十分検討可能であると考えられた。

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、HTLV-I 感染ヒト T 細胞株 ILT-M1 細胞を感染源とした HTLV-I 感染系を確立し、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。

HTLV-I 感染ヒト T 細胞株 (ILT-M1 細胞) を感染源としたラットにおける感染系の確立

ILT-M1 細胞 (2×10^7 個) を、生後 4 週を経過した免疫正常 F344 ヘテロラット (F344N-Jcl rnu/+) に腹腔内、経口あるいは経直腸投与し、投与後 2 ヶ月で、各ラットの末梢血単核球 (PBMC)、脾臓 T 細胞 (Spl-T) および腸間膜リンパ節

(MLN) 中の HTLV-I プロウイルスを HTLV-IpX 領域を標的とした PCR 法により確認した。

経口/経直腸感染系における LAT-27 の感染防御効果

5 週齢の F344 ヘテロラットに対して、HTLV-I 感染前 (-24h および -5h) に、LAT-27 を 1mg ずつ腹腔内投与後、ILT-M1 細胞 (2×10^7 個) を経口あるいは経直腸投与した。ILT-M1 細胞投与 8 週後に、各ラットの PBMC、Spl-T 中の HTLV-I 感染量 (PVL) を HTLV-IpX 領域を標的とした real-time PCR 法により定量した。

腹腔感染系における LAT-27 の感染防御効果

5 週齢の F344 ヘテロラットに対して、HTLV-I 感染 24 時間前に、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。HTLV-I 感染は、ILT-M1 細胞 (2×10^7 個) を腹腔内投与することにより行った。感染 8 週後に、各ラットの Spl-T 中の PVL を定量した。

LAT-27 による抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 効果

LAT-27 存在下で、Env gp46 を発現する HTLV-I 感染ラット不死化細胞 (FPM1-V1AX) を target 細胞、ヌードラット (F344N-Jcl mu/rnu) 由来 NK 細胞を effector 細胞とした細胞傷害試験を行った。

LAT-27 腹腔内投与後の血液内動態

LAT-27 (10mg) を成体 F344 ヘテロラットに腹腔内投与後、血清中 LAT-27 濃度の経時変化を ELISA により測定した。

C. 研究結果

ILT-M1 細胞を感染源としたラットの HTLV-I 感染系

ILT-M1 細胞を腹腔内、経口、経直腸投与したラットのいずれにおいても、PBMC、Spl-T で HTLV-I プロウイルスが検出され、感染が成立していることがわかった。

経口/経直腸感染系における ILT-27 の感染防御効果

LAT-27 あるいはコントロール抗体 (Ctrl-Ab) を予め受動免疫 (感染-24h および-5h) したラットに、HTLV-I を経口/経直腸感染 (粘膜感染) させた。感染 8 週後に、各ラットの PBMC、Spl-T 中の PVL を測定したところ、どちらの感染系においても PBMC、Spl-T 中の PVL について、LAT-27 免疫群および Ctrl-Ab 免疫群の間に差は認められなかった。

腹腔感染系における LAT-27 の感染防御効果

LAT-27 あるいはコントロール抗体 (Ctrl-Ab) を A の方法 (1mg, -24h, -5h) で受動免疫し、HTLV-I を腹腔感染させたラットでは、各ラットの Spl-T 中の PVL を測定したところ、LAT-27 免疫群の約 83% で検出感度以下となり、Ctrl-Ab 免疫群と比べ有意に低かった。一方、B の方法 (1mg, -24h, +5h) で受動免疫した場合、LAT-27 免疫群の PVL は、Ctrl-Ab 免疫群と比べ有意に低かったが、約 83% に HTLV-I プロウイルスが検出された。さらに、LAT-27 免疫群の PVL は、A と B では有意に A で低かった。

LAT-27 による ADCC 効果 LAT-27 あるいは Ctrl-Ab 存在下で、Env gp46 を発現する HTLV-I 感染 FPM1-V1AX 細胞を NK 細胞と共培養したところ、Ctrl-Ab では NK 細胞による細胞傷害は認められなかったが、LAT-27 では E/T ratio 依存的に細胞傷害が認められた。

LAT-27 腹腔内投与後の血液内動態

LAT-27 (10mg) を腹腔内投与後、LAT-27 の血液内動態を調べたところ、少なくとも投与後 22 日間 (ラットの妊娠期間: 約 21 日) は血中に持続することがわかった。

D. 考察

HTLV-I は主として感染母体の母乳を介して、乳幼児期に感染することから、消化管、特に腸管粘膜から感染すると考えられる。本研究では、新規ワクチン・抗体医薬等による HTLV-I 感染防御効果を生体内で評価する系として、HTLV-I 感染ヒト T 細胞株 ILT-M1 細胞の腹腔内、経口および経直腸投与によるラットの HTLV-I 感染系を作製した。これにより、ワクチンや抗体医薬に応じて、感染経路を変えて評価できるとともに、その感染防御効果について感染経路による違いを検討する良いツールになりうると考えられる。

これら感染系を用いて、抗体医薬の候補として着目している抗 Env gp46 中和抗体 (LAT-27) の感染防御効果について検討したところ、腹腔感染系では 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 の一部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。しかし、LAT-27 は消化管粘膜 (経口/経直腸) 感染を防御できなかった。これは、LAT-27 が IgG 型の抗体であるため、消化管管腔側への分布が困難であることが理由として考えられる。また、LAT-27 の ADCC 誘導活性が *in vitro* で認められた。しかし、経口/経直腸感染系において、LAT-27 受動免疫による PVL の低下が見られなかったことから、ラットの HTLV-I 感染系において、LAT-27 を介した ADCC は感染細胞の除去にそれほど大きく貢献していないと考えられる。

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