

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。成体ラットへの LAT-27 (10mg) の腹腔内投与により、少なくとも 22 日間 (ラットの妊娠期間: 約 21 日) 血中で LAT-27 を検出することができたこと、また LAT-27 のような IgG 型抗体は、低濃度ではあるがラット胎盤を通過可能であり、初乳中には高濃度に含まれていることが知られている。これらのことを考慮すると、妊娠・周産期ラットに投与された LAT-27 は子供へ十分に移行すると推察でき、LAT-27 の垂直感染防御効果についてラットの HTLV-I 垂直感染系を用いて検討可能であると考えられる。

## 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。また、HTLV-I の主要感染経路である母子感染での 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、その評価が今後の課題となる。

## 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) Kinpara S, Kijiyama M, Takamori A, Hasegawa A, Sasada A, Masuda T, Tanaka Y, Utsunomiya A, Kannagi M. Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) suppresses HTLV-I gene expression and cell cycling, while IFN- $\alpha$  combined with

zidovudine induces p53 signaling and apoptosis in HTLV-I-infected cells. *Retrovirology*. 10:52, 2013.

- 3) 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.
  - 4) Kannagi M, Hasegawa A, Takamori A, Kinpara S, Utsunomiya A. The roles of acquired and innate immunity in human T-cell leukemia virus type 1-mediated diseases. *Front Microbiol*. 3:323, 2012.
  - 5) Kannagi M, Hasegawa A, Kinpara S, Shimizu Y, Takamori A, Utsunomiya A. Double control of viral expression by innate and acquired immunity in Human T-cell leukemia virus type-I infection. *Cancer Sci*. 102 : 670-676, 2011.
  - 6) Takamori A, Hasegawa A, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Shimizu Y, Tamai Y, Sasada A, Zeng N, Choi I, Uike N, Okamura J, Watanabe T, Masuda T, Kannagi M. Functional impairment of Tax-specific but not CMV-specific CD8+ T-cells in a minor population of asymptomatic HTLV-I-carriers. *Retrovirology*, 8:100, 2011.
- ### 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<sup>+</sup> 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.
  - 4) 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. Identification of a novel HLA-DR1-restricted dominant epitope recognized by HTLV-I Tax-specific CD4<sup>+</sup> T-cells augmenting HTLV-I-specific CTL expansion in ATL patients after allogeneic HSCT. The 9th AACR-JCA Joint Conference. February 2013. Maui, USA.
  - 5) Kannagi M, Kinpara S, Takamori A, Sasada A, Hasegawa A. Impact of innate and acquired immune responses in adult T-cell leukemia. The 9th AACR-JCA Joint Conference. February 2013. Maui, USA.
  - 6) Kannagi M, Kinpara S, Hasegawa A, Takamori A, Shimizu Y, Utsunomiya A. The roles of innate and acquired immune responses on HTLV-I infection. The 15th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Retroviruses. June, 2011, Leuven.
  - 7) Hasegawa A, Takamori A, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Shimizu Y, Tamai Y, Sasada A, Na Zeng, Choi I, Uike N, Okamura J, Watanabe T, Masuda M, Okudaira T, and Kannagi M. Functional impairment of Tax-specific but not CMV-specific CTLs in a minor population of asymptomatic HTLV-I-carriers. The 15th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Retroviruses. June, 2011, Leuven.
  - 8) Kinpara S, Hayashi T, Hasegawa A, Masuda T, Kannagi M. Anti-sense transcripts encoded by HTLV-I in ATL cells. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sept. 2011, Sapporo.
  - 9) Takamori A, Hasegawa A, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Shimizu Y, Tamai Y, Sasada A, Zeng N, Choi I, Uike N, Okamura J, Watanabe T, Masuda T, and Kannagi M. Functional impairment of Tax-specific but not CMV-specific CD8<sup>+</sup> T cells in a minor population of asymptomatic HTLV-I-carriers. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sept. 2011, Sapporo.
  - 10) Hasegawa A, Takamori A, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Tamai Y, Sasada A, Choi I, Uike N, Okamura J, Watanabe T, Masuda T, and Kannagi M. Functional impairment of Tax-specific but not CMV-specific CD8<sup>+</sup> T-cells in a minor population of asymptomatic HTLV-I-carriers. The XXV Symposium of the International Association for Comparative Research on Leukemia and Related Diseases. Sept. 2011, Tokyo.
- (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<sup>+</sup> 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.
- 5) Ando S, Murakami Y, Hasegawa A, Masuda T, Kannagi M. Unresponsiveness of dominant Tax-specific CD8<sup>+</sup> T cells in rats orally infected with HTLV-I. 第 41 回 日本免疫学会総会・学術集会 2012 年 12 月, 神戸
- 6) Takamori A, Hasegawa A, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Masuda M, Tamai Y, Sasada A, Choi I, Uike N, Okamura J, Watanabe T, Kannagi M. Functional impairment of CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes selective for HTLV-I-specific responses in early stages of adult T-cell leukemia patients. 第 41 回 日本免疫学会総会・学術集会 2012 年 12 月, 神戸.
- 7) 田中勇悦、長谷川温彦、神奈木真理、田中礼子、齋藤峰輝. 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 2012 年 11 月, 大阪.
- 8) 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 2012 年 11 月, 大阪.
- 9) 安藤聡美、村上悠二、長谷川温彦、増田貴夫、神奈木真理. HTLV-I 経口感染ラットを用いたペプチドパルス樹状細胞ワクチン評価系作成のための基礎的研究. 第 60 回 日本ウイルス学会学術集会 2012 年 11 月, 大阪.
- 10) 金原秀一、長谷川温彦、高森絢子、増田貴夫、神奈木真理. HTLV-I 感染 T 細胞のウイルス遺伝子発現に対する 1 型インターフェロンの効果. 第 60 回 日本ウイルス学会学術集会 2012 年 11 月, 大阪.
- 11) Tamai Y, Hasegawa A, Takamori A, Sasada A, Tanosaki R, Choi I, Utsunomiya A, Etoh T, Koh KR, Suehiro Y, Okamura J, Uike N, Kannagi M. A novel HLA-DR-restricted epitope recognized by Tax-specific CD4<sup>+</sup> T cells in ATL patients after allo-HSCT. 第 71 回 日本癌学会学術総会 2012 年 9 月, 札幌.
- 12) Kinpara S, Masuda T, Hasegawa A, Utsunomiya A, Nakamura M, Kannagi M. The presence of anti-sense transcripts containing the long terminal repeat region in HTLV-I in ATL cells. 第 71 回 日本癌学会学術総会 2012 年 9 月, 札幌
- 13) Sasada A, Kakinuma T, Kinpara S, Takamori A, Hasegawa A, Masuda T, Yamaoka S, Kannagi M. Involvement of innate immune signaling in NK-kB activity in ATL cells. 第 71 回 日本癌学会学術総会 2012 年 9 月, 札幌.
- 14) 神奈木真理、長谷川温彦、高森絢子、笹田亜麻子、玉井洋太郎、崔日承、末廣陽子、鶴池直邦. ヒト T 細胞白血病ウイルスに対する獲得免疫の臨床への応用. 第 21 回 日本組織適合性学会 (シンポジウム) 2012 年 9 月, 東京.
- 15) 長谷川温彦、高森絢子、宇都宮與、前田裕弘、山野嘉久、増田昌人、清水由紀子、玉井洋太郎、笹田亜麻子、崔日承、鶴池直邦、岡村 純、渡邊俊樹、神奈木真理. HTLV-I 感染者における Tax 特異的 T 細胞応答および ATL 発症予防. 第 1 回 ATL シンポジウム (第 5 回 HTLV-I 研究会/シンポジウム) 2012 年 8 月, 東京.
- 16) Kannagi M, Hasegawa A, Kinpara S, Shimizu Y, Takamori A, Utsunomiya A. 30 years after discovery of HTLV-I: Acquired and innate immunity against HTLV-I (HTLV-I に対する獲得免疫と自然免疫の二重制御). 第 70 回 日本癌学会学術総会シンポジウム、2011 年 10 月、名古屋.
- 17) 笹田亜麻子、長谷川温彦、清水由紀子、末廣陽子、鶴池直邦、豊嶋崇徳、谷憲三郎、森尾友宏、福田哲也、三浦 修、宇都宮與、神奈木真理. 成人 T 細胞白血病リンパ腫 (ATL) に対する樹状細胞免疫療法に向けた、基礎解析と第 1 相臨床試験 コールドラン.

Dendritic cell Immunotherapy targeting for Adult T cell Leukemia/Lymphoma: Basic analysis and preparation for phase I clinical study. 第3回造血器腫瘍免疫療法研究会、2011年8月、別府.

- 18) 山口ちひろ、笹田亜麻子、金原秀一、長谷川温彦、追木宏宣、田中勇悦、増田貴夫、神奈木真理. HTLV-I 感染により誘導される I 型インターフェロン応答. 第4回 HTLV-I 研究会、2011年9月、東京.
- 19) 笹田亜麻子、長谷川温彦、清水由紀子、末廣陽子、鵜池直邦、豊嶋崇徳、谷憲三郎、森尾友宏、福田哲也、三浦 修、宇都宮與、松岡雅雄、岡村 純、神奈木真理. ATLL に対する新規ペプチドパルス樹状細胞療法に向けた基礎解析と第1相臨床試験コールドラン. 第4回 HTLV-I 研究会、2011年9月、東京.

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

## 抗 HTLV-Ig<sub>p</sub>46 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

藤猪英樹 琉球大学大学院医学研究科 准教授

齊藤峰輝 琉球大学大学院医学研究科 准教授

高橋良明 琉球大学大学院医学研究科 助教

研究要旨：(I) HTLV-I 感染症の予防と HTLV-I 関連疾患に対する新規治療法開発のため、高度免疫不全マウス (NOD/SCID/ $\gamma_c$  null : NOG) の脾臓内にヒト末梢血単核球とマイトマイシン処理した HTLV-I 感染 T 細胞株を直接同時移植する HTLV-I 感染マウスモデル系を開発した。移植 2 週間後にマウスの脾臓から分離したヒト CD4、CD8 陽性 T 細胞双方から HTLV-I プロウイルス、Tax および HBZ mRNA が検出され、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。

(II) 上記 HTLV-I 感染マウスモデルを用い、自家製 HTLV-I 中和抗 HTLV-I gp46 抗体 (LAT-27 : gp46 のアミノ酸 191-196 を認識) または HTLV-I 感染者から精製した IgG による HTLV-I 感染抑制効果を検討した。NOG マウスの脾臓内にヒト末梢血単核球と HTLV-I 感染細胞株の接種前後に LAT-27 または HTLV-I 感染者から精製した IgG を投与することで、マウス体内におけるヒト T 細胞への HTLV-I 感染は完全に抑制された。

(III) LAT-27 をヒトに接種後に誘導されるヒト抗ラット抗体出現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。

(IV) 新たな診断手法の確立を目的として HTLV-I 由来 HBZ タンパクの解析に有用なモノクローナル抗体の作製を試みた。その結果、今回新たに 1 クローンが得られ、間接蛍光抗体法やフローサイトメーター法、ウェスタン・ブロット法で HBZ タンパクを検出することができた。

### A. 研究目的

(I) HTLV-I は世界ではじ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 関連脊髄症 (HAM) および成人 T 細胞白血病 (ATL) の原因ウイルスである。我が国には、先進国で最多の約 108 万人もの HTLV-I 感染者が存在しており、ATL は死亡者数が年間 1000 人を超え、HAM 患者では約 40%が経過中に歩行不能となり生活の質が著しく障害される。しかしながら、HTLV-I の発見から 30 余年を経た今日においてもなお、HTLV-I 関連疾患の有効な治療法はもとより、母子感染および水平感染を防止するワクチンすら開発されていない。本研究では、*in vitro* において細胞間の HTLV-I 感染を阻害することが知られている抗

HTLV-I 中和モノクローナル抗体 (LAT-27) または HTLV-I 感染者血漿中の IgG が持つ HTLV-I 感染阻害効果が、*in vivo* においてヒト T 細胞に対しても認められるかどうかを検討するため、マウスの脾臓内に直接ヒト細胞を移植するヒト化法を用いて新規 HTLV-I 感染マウスモデルを開発した。このモデルを用い、LAT-27 およびヒト化 LAT-27 の感染抑制効果を検討した (II)。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 (III)。

(IV) HTLV-I プロウイルスのマイナス鎖にコードされる HTLV-I bZIP factor (HBZ) 遺伝子は、mRNA レベルとタンパクレベルの両方で感染病態に様々な影響を与えることが報告されて

いるが、未だ不明な点が多い。その理由の1つに、タンパク解析の際に重要なモノクローナル抗体がこれまでなかったことが挙げられる。そこで本研究では、HBZ タンパクに対するモノクローナル抗体を作製した。

## B. 研究方法

### (I) 高度免疫不全マウス

(NOD/SCID/ $\gamma$ Cnull : NOG) の脾臓内にヒト末梢血単核球 (PBMC)  $2 \times 10^6$  個とマイトマイシン処理した HTLV-I 感染 T 細胞株 (ILT-M1)  $1 \times 10^6$  個を同時移植し、移植 2 週間後にマウスから脾臓細胞を回収して、ヒト CD4, CD8 T 細胞を抗体結合磁気ビーズにより分離した。分離したヒト CD4, CD8 T 細胞から Total RNA およびゲノム DNA を回収した。Total RNA から cDNA を合成し、HTLV-I tax、HBZ mRNA の発現を Real Time RT-PCR 法で解析し、ゲノム DNA 中の HTLV-I プロウイルス量を、TaqMan プローブを用いた Real Time PCR 法により測定した。さらに HTLV-I Tax タンパクの発現をフローサイトメーター法で解析した。非感染 PBMC と HTLV-I 感染細胞株の接種前後に、自家製抗 HTLV-I 中和モノクローナル抗体 (LAT27) または HTLV-I 感染者血漿から分離精製した IgG を投与して、感染抑制効果を検討した。

(II) 上記のモデルを用い、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。

(III) 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。

(IV) コムギ胚芽無細胞タンパク発現系により作製した組換え HBZ タンパクを C57BL/6 マウスに 3 回免疫し、脾細胞とミエローマ細胞

(SP2/0) を融合させたハイブリドーマを HAT 培地で選択培養した。培養上清を使って ELISA 法にて 1 次スクリーニングを行い、陽性のコロニーについては、HBZ を強制発現させた 293T 細胞株 (293T/HBZ(SI)) を用いて間接蛍光抗体 (IF) 法で 2 次スクリーニングを行った。

### (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、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

(I) NOG マウスの脾臓から分離したヒト CD4, CD8 陽性 T 細胞双方から HTLV-I プロウイルス、tax および HBZ mRNA が検出され、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。細胞あたりの HBZ mRNA 発現量は ATL 患者の平均より低く、HAM 患者や無症候性キャリアと同程度であった。一方、tax mRNA 発現量は HTLV-I 感染者の PBMC 同様極めて低かった。HTLV-I 感染者の PBMC と同様に、マウスから回収したヒト PBMC に Tax タンパクの発現は認められなかったが、短時間培養すると CD4 陽性 CCR4 陽性 T 細胞分画に選択的に発現誘導された。LAT27 および HTLV-I 感染者血漿から分離精製した IgG 分画は、いずれも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。

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

(III) 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。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。

(IV) スクリーニングの結果、今回新たに 1 クローン (clone B6-15; マウス IgG2a, $\kappa$ ) が得られた。この B6-15 抗体は、IF 法では、293T/HBZ(SI) 細胞の核内に存在する、HBZ タンパクに特異的に反応したが、HTLV-I 陽性細胞株の SLB1 や MT-2 では検出できなかった。同様に、FCM 法では、293T/HBZ(SI) 細胞で陽性だったが、SLB1 や MT-2 では検出できなかった。また、ウェスタン・ブロット法では、293T/HBZ(SI) 細胞で 37kDa に、SLB1 細胞では 33kDa にメインバンドを検出することができた。さらに、以前当研究室で得られた別のクローン (clone 4B12; ラット IgG2b, $\kappa$ ) とは HBZ タンパク上の異なるエピトープを認識することがわかった。

#### D. 考察

(I-III) HTLV-I 感染ヒト化マウスモデルを簡便に作製し、抗 HTLV-I 中和モノクローナル抗体の HTLV-I 感染抑制効果を示した。今後はこのマウスモデルを用いて、非中和性抗 gp46 モノクローナル抗体や HTLV-I 抗原で感作した免疫細胞 (成熟 DC、CTL 等) で感染防御が可能か否か、HTLV-I を標的とした各種ワクチン、薬剤の効果についても検討し、最も効率の良い HTLV-I 感染防御法を探索したい。ヒト化 LAT-27 抗体は、*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。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。

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、生体内の NK 活性を上昇させる方法の探索を試みる。

(IV) IF 法と FCM 法では HTLV-I 感染細胞の SLB1 と MT-2 で HBZ タンパクを検出することはできなかったが、WB 法では SLB1 の HBZ タンパクを検出することができた。我々の研究では、各種の HTLV-I 感染細胞中の HBZ mRNA 発現量には差があり、SLB1 は比較的 mRNA 発現量が高かった。そのため、IF 法や FCM 法と比べて感度が高い WB 法では、SLB1 細胞株の HBZ タンパクを検出できたと考えられるため、今後、検出感度を上げる方策の検討を行う

#### E. 結論

(I-III) 本研究で構築した新規 HTLV-I 感染マウスモデルを用いて、感染抑制を評価することが可能となり、抗 HTLV-I 中和モノクローナル抗体 (LAT-27) とそのヒト化 LAT-27 抗体はマウス体内におけるヒト T 細胞への HTLV-I 感染を完全に抑制することを示した。さらに、妊娠ラットのモデルにおいて仔への受動免疫も成立することが明らかとなった。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、今後、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。

(IV) HBZ タンパク解析に有用なモノクローナル抗体が、これまでに 2 クローン得られた。今後、高感度 HBZ タンパク定量システム (サンドイッチ ELISA 等) の開発を予定している。これらの検出系により、これまでタンパクレベルでの解析が難しかった HBZ 分子を、HTLV-I 感染病態との関連性も含め、より詳細に調べていく。

#### 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) Saito M. (Review) Neuroimmunological aspects of human T cell leukemia virus type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. J Neurovirol. in press (published online but not assigned to an issue).
- 3) 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 May 7;10:51
- 4) Saito M, Bangham CR. (Review) Immunopathogenesis of Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-I) -associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): Recent perspectives. Leukemia Research and Treatment. 2012 ; 259045. 3.
- 5) Saito M. (textbook) HTLV-I. Encyclopedia of Genetics 2nd Edition. Stanley Maloy, Kelly Hughes ed. Elsevier, Oxford, UK, 2013 ; 543-545.

## 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総会、2013年11月、神戸.
- 2) 高橋良明, 齊藤峰輝, 梁 明秀, 田中勇悦 HTLV-I basic leucine zipper factor(HBZ)抗原に対するモノクローナル抗体の作成と HBZ 抗原検出系及び定量系確立の試み 第61回日本ウイルス学会総会、2013年11月、神戸.
- 3) 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-I gp46 中和活性及び 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総会、2013年11月、神戸.
- 4) Tanaka Y, Shimizu M, Takahashi Y, Fujii H, Tanaka R. Generation of humanized rat monoclonal antibody (h-LAT-27) that mediates both neutralization and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) specific for human T leukemia virus type-I (HTLV-I): a possible potential for passive immunization. 第42回日本免疫学会総会、2013年12月、千葉.
- 5) 齊藤峰輝、安間恵子、後川 潤、松崎敏男、高嶋博、松岡雅雄. HTLV-I関連 脊髄症発症関連因子としてのHTLV-Iウイルス型の解析. 第54回日本神経学会学術大会、2013年5月、東京.
- 6) 齊藤峰輝、塩浜康雄、後川 潤、高嶋 博、大原義朗. HTLV-I標的遺伝子 CCL1のHAM発症における病因的意義. 第25回日本神経免疫学会学術集会、2013年11月、下関.
- 7) 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年5月、名古屋.
- 8) 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年8月、北九州.
- 9) 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年9月、東京.
- 10) 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年9月、東京.

## 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 副所長

研究要旨：本研究期間 3 年間で、HTLV-I が感染するヒト化マウスが容易な重度免疫不全 NOG マウス、臍帯血 CD34+造血幹細胞移植 NOG マウス、および後述の hIL-2-NOG マウスの研究班への供給を行った。また、これら動物の供給とともに、抗体医薬の ADCC 活性検定に有用な改良型 NOG マウスを作製し、その能力を検定した。作製したマウスは、ヒトインタロイキン 2 (hIL-2)、hIL-15 またはヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子/hIL-3 (hGM-CSF/hIL-3) の遺伝子を導入した hIL-2-、hIL-15-および hGM-CSF/hIL-3-NOG マウスの 3 系統である。hIL-2-、hIL-15-NOG マウスに臍帯血造血幹細胞を移植するとヒト NK 細胞が優位に分化増殖することが分かった。それら分化ヒト NK 細胞は表現型および機能的にヒト NK 細胞と同等であった。また、hIL-15-NOG マウスでは、ヒト末梢血由来 NK 細胞を長期にマウス内で維持されることが分かった。hGM-CSF/hIL-3-NOG マウスでは、従来の NOG マウスでは困難であったヒト顆粒球、単球が増殖することが明らかとなった。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ならびに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。しかしながら、免疫学的に正常なマウスは HTLV-I に感染しない。したがって、ヒト細胞が生着し、その中で HTLV-I が感染するヒト細胞を持ったヒト化マウスが必要となる。一般的に HTLV-I は患者では感染しても発症しないか、または発症に時間を要する。この発症機序の研究にも動物モデルは極めて重要と考えられる。本研究は、ヒトの細胞を拒絶せず、増殖させることができる重度免疫不全 NOG マウス等の研究班への供給と、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を目的に実施した。

### B. 研究方法

#### 1. 改良型 NOG マウスの作出

##### 1) hIL-2-、hIL-15-NOG マウスの作製

CMV プロモーター下にヒト IL-2 または IL-15 cDNA を配した遺伝子断片を NOG マウス前核胚に注入することによって作製した。得られた hIL-2-NOG マウスでは hIL-2 が 1～5ng/mL、hIL-15-NOG マウスでは hIL-15 が 0.1pg/mL が血清中に検出された。

##### 2) hGM-CSF/hIL-3-NOG マウスの作製

1998 年に我々が樹立、報告したヒト GM-CSF および IL-3 を分泌する hGM-CSF/hIL-3 Tg-SCID マウス(Fukuchi, Y. et al, Leukemia Research, 1998)を NOG マウスに戻し交配することによって、hGM-CSF/hIL-3-NOG マウスを作製した。

#### 2. 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  $1 \times 10^5$  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 $1 \times 10^6$ 個を移植し、同様の解析を行った。

### 3. 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 $1 \times 10^5$ 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 $1 \times 10^7$ 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

### 1. マウスの生産と供給

本期間中に、ヒト化マウス用のNOGマウスの供給の他に、hIL-2-NOGマウス♂9匹、♀9匹の計18匹(半数がTgマウス)を琉球大学に供給した。また、臍帯血CD34+造血幹細胞 $5 \times 10^4$ 移植し、ヒトCD45+細胞がマウス末梢血に存在することが確認されたヒト化NOGマウス6匹を琉球大学に供給した。

### 2. 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。

### 3. hGM-CSF/IL-3-NOGマウスを用いたヒト化マウスの特性

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の解析のため、ヒト化マウス末梢血からマウス細胞を磁気ビーズで除去した後に、塗沫標本作製し、メイギムザ染色を施し、細胞の形態を顕微鏡下で観察した。その結果、好中球、好酸球、好塩基球、単球など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。

### 4. 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

本研究期間中に、3 種類の改良型 NOG マウスの作製に成功した。

NOG マウスでの hIL-2 産生量は血清中で 1~5ng/mL と極めて高濃度に産生されている。このマウスでの hIL-2 による T 細胞の活性化は、PBMC 移入後の NOG-hIL-2 マウスでの細胞の増殖と早期の死亡で確認された。また、このマウスではヒト細胞を拒絶できない。したがって、HTLV-I 感染ヒト細胞または細胞株の移植が可能であり、また hIL-2 が高濃度に分泌されていることから、HTLV1 感染細胞の増殖には極めて向いており、抗体医薬の検定系として使えると考えられた。

興味深いことに、NOG マウスに CD8+ T 細胞を移入しても GVHD は発症してこない。これに少量の CD4+ T 細胞を混入させることによって、極めて重篤な GVHD を発症することが分かった。また、NOG-hIL-2 マウスでは、CD8+ T 細胞単体移入でも同様の GVHD が発症することが分かった。すなわち、NOG-hIL-2 マウスでは、移入された CD8+ T 細胞が hIL-2 で活性化されることで GVHD が発症すると説明でき、CD8+ T 細胞に CD4+ T 細胞を混入すると認められる GVHD は CD4+ T 細胞から分泌される hIL-2 による CD8+ T 細胞と考えられた。また、CD4+ T 細胞、CD8+ T 細胞の移入によって異なる GVHD を発症することから、GVHD の興味深いモデルにもなる可能性が示唆された。また、NOG-hIL-2 マウスでの感染モデルを考える時、CD4+ および CD8+ T 細胞での HTLV-I 感染の面白いモデルとなりうると考えられる。

また、従来重度免疫不全 NOG マウスへのヒト造血幹細胞移植で分化し難かった顆粒球をはじめとするヒト骨髄系造血細胞が高率に分化する「ヒト化マウス」の作製が hGM-CSF/IL-3-NOG マウスで可能となった。このマウスを用いることによって、HTLV-I 感染における顆粒球、単球やマクロファージ等の役割を調べることができると考えられる。

hIL-2-、hIL-15-NOG マウスでヒト造血幹細胞より分化する NK 細胞はヒト末梢血 NK 細胞と

同等であることが確認された。この hIL-2-NOG マウスでヒト造血幹細胞より分化する NK 細胞およびヒト末梢血 NK 細胞を用いて、抗体医薬の ADCC 活性を検定できることを明らかにできた。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、今後 HTLV-1 感染治療、予防のために開発される抗体医薬の効果を *in vivo* で検証できる実験系として使うことができると考えられる。

#### E. 結論

HTLV-I 感染症モデルとして、hIL-2-、hIL-15-NOG マウスおよび hGM-CSF/hIL-3 Tg マウスを開発した。前 2 系統は NK 細胞を、後 1 系統は骨髄系細胞を主に研究できるヒト化動物モデルと考えられる。特に、今回検討した hIL-2-NOG マウスを用いることで、HTLV-I に感染可能でかつ抗体医薬の ADCC 効果検定を *in vivo* でできることから、HTLV-I 感染のための抗体医薬の開発に極めて有用と思われる。

#### 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

- 1) 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 *In Vivo*. *PLoS Pathog.* 2013, 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. Establishment of a Human Allergy Model Using Human IL-3/GM-CSF-Transgenic NOG Mice. *J Immunol.* 2013, 191: 2890-2899.
- 3) Zhang, Y., S. Patel, H. Abdelouahab, M. Wittner, C. Willekens, S. Shen, A. Betems, V. Joulin, P. Opolon, O. Bawa, F. Pasquier, M. Ito, N. Fujii, P. Gonin, E. Solary, W. Vainchenker, P. Coppo, S. De Botton, and F. Louache.

- CXCR4 inhibitors selectively eliminate CXCR4-expressing human acute myeloid leukemia cells in NOG mouse model. *Cell Death Dis.* 2012, 3: e396.
- 4) Ito, R., Takahashi, T., Katano, I., and Ito, M. Current advances in humanized mouse models. *Cell Mol Immunol.* 2012, 9: 208-214.
  - 5) Sato, K., Misawa, N., Fukuhara, M., Iwami, S., An, D.S., Ito, M., and Koyanagi, Y. Vpu augments the initial burst phase of HIV-1 propagation and downregulates BST2 and CD4 in humanized mice. *J Virol.* 2012, 86: 5000-5013.
  - 6) Suzuki, M., Takahashi, T., Katano, I., Ito, R., Ito, M., Harigae, H., Ishii, N., and Sugamura, K. Induction of human humoral immune responses in a novel HLA-DR-expressing transgenic NOD/Shi-scid/gammacnull mouse. *Int Immunol.* 2012, 24: 243-252.
  - 7) Ito, R., Katano, I., Ida-Tanaka, M., Kamisako, T., Kawai, K., Suemizu, H., Aiso, S., and Ito, M. Efficient Xenoengraftment in Severe Immunodeficient NOD/Shi-scid IL2rgammanull Mice Is Attributed to a Lack of CD11c+B220+CD122+ Cells. *J Immunol.* 2012, 189(9): 4313-4320.
  - 8) Ito, R., Negishi, N., Irie, N., Matsuo, K., Suzuki, D., Katano, I., Hayakawa, E., Kawai, K., Kamisako, T., Eto, T., T. Ogura, K. Hozumi, K. Ando, S. Aiso, N. Tamaoki, S. Habu, and M. Ito. Osteosclerosis and inhibition of human hematopoiesis in NOG mice expressing human Delta-like 1 in osteoblasts. *Exp Hematol.* 2012, 40: 953-963.
  - 9) Yahata, T., T. Takanashi, Y. Muguruma, A. A. Ibrahim, H. Matsuzawa, T. Uno, Y. Sheng, M. Onizuka, M. Ito, S. Kato, and K. Ando. Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells. *Blood.* 2011, 118: 2941-2950.
  - 10) Shirakura, Y., Y. Mizuno, L. Wang, N. Imai, C. Amaike, E. Sato, M. Ito, I. Nukaya, J. Mineno, K. Takesako, H. Ikeda, and H. Shiku. T-cell receptor gene therapy targeting melanoma-associated antigen-A4 inhibits human tumor growth in non-obese diabetic/SCID/gammacnull mice. *Cancer Sci.* 2011, 103: 17-25.
  - 11) Sato, K., N. Misawa, C. Nie, Y. Satou, D. Iwakiri, M. Matsuoka, R. Takahashi, K. Kuzushima, M. Ito, K. Takada, and Y. Koyanagi. A novel animal model of Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in humanized mice. *Blood.* 2011, 117: 5663-5673.
  - 12) Muguruma, Y., H. Matsushita, T. Yahata, S. Yumino, Y. Tanaka, H. Miyachi, Y. Ogawa, H. Kawada, M. Ito, and K. Ando. Establishment of a xenograft model of human myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* 2011, 96: 543-551.
  - 13) Kato, I., A. Niwa, T. Heike, H. Fujino, M. K. Saito, K. Umeda, H. Hiramatsu, M. Ito, M. Morita, Y. Nishinaka, S. Adachi, F. Ishikawa, and T. Nakahata. Identification of Hepatic Niche Harboring Human Acute Lymphoblastic Leukemic Cells via the SDF-1/CXCR4 Axis. *PLoS One.* 2011, 6: e27042.
  - 14) Hirose, T., H. Torikai, M. Yanagisawa, M. Kamei, N. Imahashi, A. Demachi-Okamura, M. Tanimoto, K. Shiraiishi, M. Ito, K. Miyamura, K. Shibata, F. Kikkawa, Y. Morishima, T. Takahashi, N. Emi, K. Kuzushima, and Y. Akatsuka. Mismatched human leukocyte antigen class II-restricted CD8 cytotoxic T cells may mediate selective graft-versus-leukemia effects following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Cancer Sci.* 2011, 102: 1281-1286.
  - 15) Hasegawa, M., K. Kawai, T. Mitsui, K. Taniguchi, M. Monnai, M. Wakui, M. Ito, M. Suematsu, G. Peltz, M. Nakamura, and H. Suemizu. The reconstituted 'humanized liver' in TK-NOG mice is mature and functional. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011, 405: 405-410.
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.
  - 5) Mamoru Ito. Development of humanized mice model. 1<sup>st</sup> Samsung Humanized Mice Workshop, 2012. 4. 14, Soul, Korea.
  - 6) Mamoru Ito. Immunodeficient mice and humanized mouse models. Symposium VI. The 2012 Spring conference of the Korea Association of Immunologist, 2012. 4. 12-13, Soul, Korea.
  - 7) Ito, M. Development of NOG mouse based immunodeficient mice in CIEA, 3<sup>rd</sup> International Workshop of Humanized Mice, 28-31, Oct. 2011, Pittsburgh, USA.
  - 8) Yaguchi, T., Kobayashi, A., Ito, M., Ito, R., Kawakami, Y., Katano, I. Analysis of human immune responses using newly developed murin MHC class I and II-deficient NOG mice by human PBMC inoculation, 3<sup>rd</sup> International Workshop of Humanized Mice, 28-31, Oct. 2011, Pittsburgh, USA.
  - 9) Katano, I., Suemizu, H., Sasaki, M., Takahashi, T., Kamisako, T., Ito, M. Generation of novel NOG mouse expressing human interleukin-2 and its characteristics as a humanized mouse model. 3<sup>rd</sup> International Workshop of Humanized Mice, 28-31, Oct. 2011, Pittsburgh, USA.
- (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.
  - 2) 伊田 幸、上迫 努、江藤智生、佐々木正史、伊藤 守. NOG マウス由来 ES 細胞を用いた遺伝子改変による NOG マウスの改良. 第 59 回日本実験動物学会総会、平成 24 年 5 月 24-26 日、別府.
  - 3) 片野いくみ、伊藤亮治、上迫 努、小倉智幸、末水洋志、日置恭司、高橋武司、伊藤 守. ヒト IL-2 遺伝子導入 NOG マウスで分化したヒト造血幹細胞由来 NK 細胞の特性. 第 59 回日本実験動物学会総会、平成 24 年 5 月 24-26 日、別府.
  - 4) 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 マウスにおけるヒトミエロイド系細胞の分化亢進. 第 59 回日本実験動物学会総会、平成 24 年 5 月 24-26 日、別府.
  - 5) Katano, I., Ito R., Takahashi, K. and Ito, M. Characteristics of NK cells developed from hematopoietic stem cell in human interleukin-2 transgenic NOG mice. 第 41 回日本免疫学会総会、平成 12 月 5-7 日、神戸.
  - 6) Ito R., Takahashi, K., Katano, I., Kawai, K., Nunomura, S., Ra, C., Kamisako, T., Aiso, S. and Ito, M. Functional maturation of human myeloid cells in NOG transgenic humanized mouse strain expressing human IL-3 and GM-CSF. 第 41 回日本免疫学会総会、平成 12 月 5-7 日、神戸.
  - 7) 伊藤亮治、高橋武司、片野いくみ、川井健司、上迫 努、布村 聡、羅智 靖、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確立. 第 62 回日本アレルギー学

会秋季学術大会、平成 24 年 11 月 29 日～12 月 1 日、大阪。

- 8) Katano, I., Ito, R., Kamisako, T., Suemizu, H., Ito, M. NK cells predominantly differentiate from human hematopoietic stem cells in NOG mice expressing human interleukin-2. 第 40 回日本免疫学会. 2011 年 11 月 27 日～29 日. 千葉.
- 9) 小林明日香、谷口智憲、伊藤亮治、片野いくみ、伊藤 守、河上 裕. ヒト PBMC 移入 MHC ノックアウト NOG マウスにおけるヒト免疫応答の解析。第 40 回日本免疫学会. 2011 年 11 月 27 日～29 日. 千葉.

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし

## 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：HTLV-I の中和抗体を誘導するための新たな免疫法を確立することを目的とし、初めに、中和エピトープ（gp46 pep<sub>180-204</sub>）を搭載した三部構成免疫賦活複合体（TIPS）を作成した。しかし、ペプチド特異的抗体応答は確認できなかった。この結果は、TIPS 分子や gp46 pep<sub>180-204</sub> エピトープに十分な T ヘルパー細胞エピトープが存在しないことが原因ではないかと推察した。よって、キャリアタンパク質を TIPS 分子からジフテリア毒素変異体（CRM197）に変更した。その結果、抗原単独投与群よりも有意に高いペプチド特異的血中 IgG の誘導が確認された。その力価は OVA/gp46 pep<sub>180-204</sub> と同等もしくはそれ以上であり、HTLV-I 中和能も確認された。以上のことから、CRM197 コンジュゲートワクチンが有望であると考えている。現在、アラムより強いアジュバントと CRM197 コンジュゲートワクチンの併用を検討している。

### 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（pep<sub>180-204</sub>: PSQLPPTAPLLPHSNLDHILEPSI; Tanaka et al., 1994）に対する特異抗体誘導を可能にする系の確立を目指す。

### B. 研究方法

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、HTLV-I 中和エピトープ（gp46 pep<sub>180-204</sub>）を搭載した TIPS 融合タンパク質（Z-COMP-gp46 pep<sub>180-204</sub>）を構築した。その後、当該エピトープに対する中和抗体の誘導を試みた。しかし、残念ながら TIPS 型コンストラクトでは有意な抗体応答増強効果が認められなかったため、次に、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した。キャリアタンパク質 CRM197 と N、C 両末端にシステイン残基（Cys）とスパーサー領域（下線部）をもつ人工ペプチド（HTLV-I peptide pep<sub>180-204\_3</sub> Cys: CGSQLPPTAPLLPHSNLDHILEPSIGCGGGGS

C）をクロスリンカー EMCS を介して融合させた。その後、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/gp46 pep<sub>180-204</sub>）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/gp46 pep<sub>180-204</sub>）を作成し、マウスへ投与した。

### C. 研究結果

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ている。HTLV-I 感染に対する防御エピトープ（gp46 pep<sub>180-204</sub>）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/gp46 pep<sub>180-204</sub>）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 の抗体結合能があることも確認した。次に、この融合分子を BALB/c および C57BL/6 マウスへアラムアジュバントを添加して皮下接種したが、

gp46pep<sub>180-204</sub> エピトープ特異的抗体応答は確認できなかった。しかし、以前の報告 (Tanaka et al., 1994) では、OVA/gp46pep<sub>180-204</sub> (化学融合分子) の皮下接種で、エピトープ特異的な抗体応答が誘導されているため、キャリアタンパク質を TIPS 分子からジフテリア毒素変異体 (CRM197) に変更することを考案した。CRM197 と人工合成 gp46pep<sub>180-204</sub> エピトープの化学融合には、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 (CGPSQLPPTAPPLPHSNLDHILEPSIGCGGGGSC) 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、CRM197/gp46pep<sub>180-204</sub> コンジュゲートワクチンを作成した。

この CRM197/gp46pep<sub>180-204</sub> コンジュゲートワクチンの免疫群では、BALB/c および C57BL/6 で、抗原単独投与群よりも有意に高いエピトープ特異的 IgG の誘導が確認された。また、その力価は OVA/gp46pep<sub>180-204</sub> コンジュゲートタンパク質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。

#### D. 考察

これまで、比較的分子量の大きな抗原 (20 kDa 程度のマラリア原虫や日本脳炎ウイルス由来の抗原) を用いた場合、TIPS の高い感染防御効果が確認されていることから、HTLV-I gp46pep<sub>180-204</sub> 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。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おり、実用化の面でも有利であると考えている。今後、CRM197/gp46pep<sub>180-204</sub> コンジュゲートワクチンにアラムアジュバント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と考えている。最近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、gp46pep<sub>180-204</sub> に対する抗体応答の増強効果が認

められたため、最終的には MF59 のような既に臨床応用されているアジュバントを構築し、コンジュゲートワクチンと組み合わせることで、HTLV-I ワクチンの構築を進めていきたい。

#### E. 結論

gp46pep<sub>180-204</sub> 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は機能的に不十分である可能性も示唆されたため、さらに強いアジュバントを採用する必要があると考えている。

#### 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。我々は Tax1 に結合する宿主因子の一つである USP10 がストレス顆粒の形成因子であり、生体内において血液幹細胞の維持に必須の分子であることを明らかにした。Tax1 は USP10 の機能を阻害することにより活性酸素種（ROS）産生を促進させ、HTLV-I 感染成立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よるアポトーシスの亢進を引き起こした。亜硫酸は成人 T 細胞白血病（ATL）治療薬として有望であるが、本研究はその作用機構の一端を明らかにするものである。

### A. 研究目的

細胞はウイルスに対して様々な感染抵抗性因子を有しており、一種の自然免疫システムを発動していることが、最近の研究で明らかになりつつある。一方ウイルスは自らがコードするウイルス蛋白によりこれらの因子の機能を阻害し、感染を成立させている。HTLV-I のもつトランスフォーミング蛋白 Tax1 は、感染細胞の不死化、ウイルス遺伝子の発現を促進する、HTLV-I 感染成立における最重要因子である。我々は Tax1 が結合する細胞内因子の中に HTLV-I 感染抵抗因子が存在すると考え、Tax1 に結合する細胞内因子の網羅的な同定を試みた。本研究は、HTLV-I に対する細胞内感染抵抗性因子を同定し、その機能を明らかにすることで、感染抵抗性因子活性化の手段の開発と HTLV-I 感染阻止への応用を目的とする。

### B. 研究方法

GST と Tax1 の融合蛋白を大腸菌にて作成、マウス T 細胞株 CTLL-2 の細胞抽出液と反応させ、Tax1 結合蛋白を精製した。ゲルで分離後 CBB 染色を行い、バンドを切り出して、LC-MS/MS による質量分析により蛋白を同定した。同定された細胞内因子の機能を明らかにするためノックアウトマウスを作成した。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。

ノックアウトマウスより作成した Mouse Embryonic Fibroblast (MEF)、HTLV-I 感染細胞株その他の各種細胞株を用いて *in vitro* の解析を行った。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 AnnexinV および PI 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) HTLV-I Tax1 結合因子の同定：HTLV-I Tax1 の結合蛋白として Ubiquitin Specific Protease 10 (USP10) を同定した。USP10 はユビキチン化された蛋白からユビキチンを切り離す、脱ユビキチン化酵素の一種である。続いて USP10 結合蛋白を網羅的に検索したところ、G3BP1 が同定された。G3BP1 はストレス顆粒の形成因子であることが示されている。ストレス顆粒とは細胞が様々なストレス（ウイルス感染を含む）に曝された際、蛋白の翻訳を一時停止し、mRNA を一時的に貯蔵あるいは分解するためのシステムであり、細胞のストレス応答システムのひとつである。

(2) USP10 の機能解析 : USP10 の機能を明らかにするため、USP10 ノックアウト (KO) マウスを作成し、MEF 細胞を樹立した。MEF 細胞を酸化ストレス誘導剤である亜硫酸で処理したところ、WT MEF 細胞では速やかにストレス顆粒が形成されたが、KO MEF 細胞ではその形成能が顕著に低下していた。このことから、USP10 は細胞内ストレス顆粒形成に必須の分子であることが明らかとなった。さらに亜硫酸刺激後の ROS の量を定量したところ、KO MEF では WT に比べ ROS の量が顕著に増加しており、KO MEF は ROS の増大に伴いアポトーシスに陥った。以上の結果より、USP10 によるストレス顆粒形成は細胞内 ROS を低下させ、細胞死を抑制していることが明らかとなった。

(3) USP10 の生体内機能解析 : USP10 KO マウスは極度の貧血に陥り生後 1 年以内に死亡した。KO マウスでは重度の骨髄不全の病理組織像が認められ、生後 1 週以内に骨髄の血液幹細胞が激減していた。血液幹細胞の減少は胎生期から起こっており、この減少はアポトーシスによるものであった。以上より、USP10 はストレス顆粒形成を介して、血液幹細胞の維持に関わっていることが明らかとなった。

(4) Tax1 による USP10 の機能阻害 : Tax1 は USP10 と結合する。Tax1 の各種変異体を用いて USP10 との結合を調べたところ、62-353 変異体 (N 末端 61 アミノ酸欠失変異体)、SH1 変異体 (Pro58→Ser)、SH2 変異体 (Leu205→Ala) で、USP10 との結合が認められなかった。次に 293T 細胞に Tax1 を発現させ、亜硫酸によるストレス顆粒形成能を観察したところ、Tax1 発現細胞ではストレス顆粒形成がほとんど見られなかった。上記 Tax1 変異体のストレス顆粒抑制作用は顕著に低下していたことから、Tax1 は USP10 に結合することで、ストレス顆粒形成を阻害することが明らかとなった。次にヒト T 細胞株である Jurkat で USP10 をノックダウンところ、コントロールに比べ細胞内 ROS 量が増加した。また Jurkat 細胞に Tax1 を発現させると ROS の増加がみられたが、USP10 と結合しない Tax1 変異体では ROS の増加は認められなかった。以上より Tax1 による ROS の

増加は USP10 の機能を阻害することによって示された。

(5) HTLV-I 感染細胞の亜硫酸感受性亢進 : 次に HTLV-I 感染 T 細胞株 SLB1、MT4、非感染細胞株 Jurkat、MOLT4 を亜硫酸で処理し、ストレス顆粒形成能とアポトーシスに関して検討した。HTLV-I 感染細胞株では非感染細胞株にくらべ亜硫酸によるストレス顆粒形成能が顕著に低下していた。それに伴い感染細胞ではアポトーシスが増加し、ストレス顆粒形成能と逆相関を示した。HTLV-I 感染細胞において Tax1 は USP10 を阻害することで、ストレス顆粒形成を抑制するが、この作用は亜硫酸による ROS の異常な亢進を招き、アポトーシスを誘導することが示された。

(6) 各種白血病細胞における USP10 の機能不全と亜硫酸感受性亢進 : 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。

(7) 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-Oml 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 *in vitro* および *in vivo* 解析を通じてその機能を明らかにした。USP10 は細胞のストレス応答の際に、細胞内ストレス顆粒形成を促進し、ストレス暴露時の細胞内 ROS の上昇を抑制する分子である。USP10 は生体内での血液幹細胞の維持に必須であるが、これは幹細胞中での ROS の産生を低く抑えることによるものと考えられる。

HTLV-I Tax1 は USP10 に結合しその機能を阻害することにより、ストレス顆粒形成を抑制する。その結果、細胞内 ROS が Tax1 発現細胞では上昇する。ストレス顆粒はウイルス感染の際にも形成され、ウイルス蛋白の合成を抑えられているが、Tax1 は HTLV-I 感染細胞でのストレス顆粒形成を阻害することで、ウイルス感染の成立およびウイルス産生に寄与していると考えられる。またストレス顆粒形成阻害による ROS の上昇は、ウイルスゲノムの転写活性の上昇を促し、ウイルス産生の増大をもたらすはずである。

一方で HTLV-I 感染細胞におけるストレス顆粒阻害および ROS の上昇は、亜硫酸に対する高い感受性を招くことが明らかとなった。この現象は HTLV-I 感染細胞に限らず、ストレス顆粒形成能の低い ATL 細胞株や各種白血病細胞株でも認められた。近年、亜硫酸を含む混合剤が一部の ATL に対して著効を示すことが臨床研究により報告されている。したがって、ストレス顆粒による HTLV-I 感染の制御機構の解析を通して、ATL 治療薬の作用機構の解明が期待される。

## E. 結論

HTLV-I Tax1 結合蛋白 USP10 は細胞内ストレス顆粒形成に必須の分子であり、細胞内 ROS の制御因子として機能する。Tax1 は USP10 と結合しストレス顆粒形成を抑えることでウイルス感染成立および感染細胞の増殖に寄与する。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- $\kappa$ 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).
- 3) 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*. 104: 313-320 (2013).
- 4) Takahashi M, Higuchi M, Matsuki H, Yoshita M, Ohsawa T, Oie M, Fujii M. Stress granules inhibit apoptosis by reducing ROS production. *Mol. Cell Biol*. 2013 Feb; 33(4): 815-829.
- 5) Matsuki H, Takahashi M, Higuchi M, Makokha GN, Oie M, Fujii M. Both G3BP1 and G3BP2 contribute to stress granule formation. *Genes Cells*. 2013 Feb; 18(2): 135-146.
- 6) 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.
- 7) 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 Science*. 2012 103: 369-374.

## 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) Takahashi M, Higuchi M, Fujii M. Stress granules inhibit apoptosis by reducing ROS production, but this phenomenon is nullified by HTLV-I Tax. 16<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, June 26-30 2013 Montreal, Canada.
- 5) 高橋雅彦, 樋口雅也, 藤井雅寛. ストレス顆粒は ROS 産生を抑制することによりアポトーシスを阻害するが、これを HTLV-I の Tax1 は解除する。第 71 回日本癌学会学術総会, 2012.9.19-21: 札幌市教育分化会館, 北海道.
- 6) Higuchi M, Fujii M. HTLV-I Tax1 represses the proapoptotic protein Bim, which is crucial for T-cell transformation. 15<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. 2011.6.4-8, Leuven, Belgium.
- 7) 樋口雅也, 高橋雅彦, 藤井雅寛. HTLV-I Tax1 と HTLV-2 Tax2 の違いが病原性に寄与する。第 70 回日本癌学会学術総会, 2011.10.3-10.5: 名古屋.

## H. 知的所有権の出願・登録状況

なし