

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

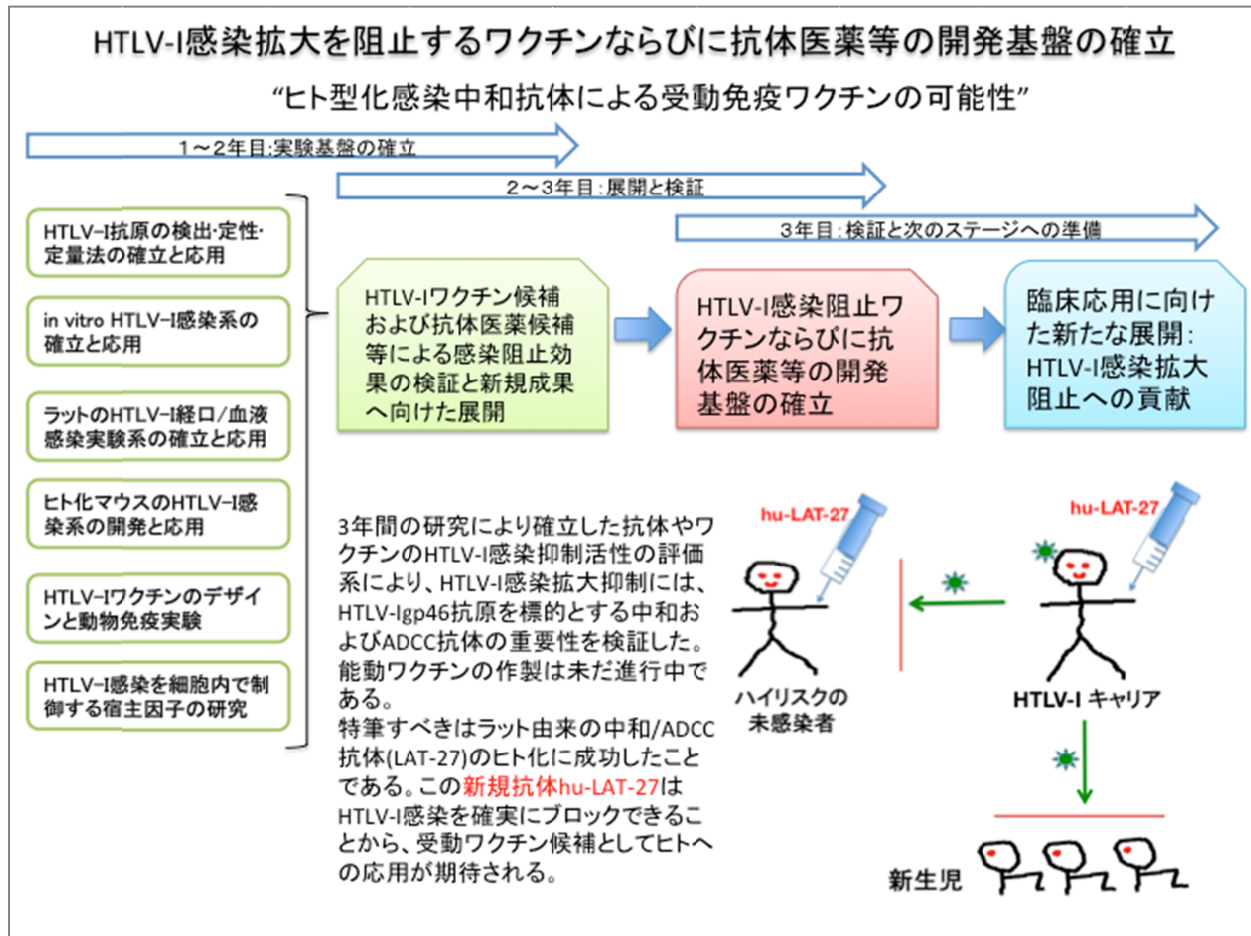
田中勇悦 琉球大学大学院医学研究科 教授

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/ 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/ 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 感染抵抗性因子の研究と応用

- (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、あるいはパ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、抗原、コイルドコイルコア、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 (CGPSQLPPTAPPLLPHSNLDHILEPSIGCGGGGSC) 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ーン抗体 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