

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 中和単クローン抗体(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 中和単クロー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、自家単クロー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 中和単クローン抗体および 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ーン抗体のヒト型化、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：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は高いタイトル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 μg/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御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. *Viol 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, Rodroguéz 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, Hori 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 :TAXIBPL-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 mu/+) 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 感染ラット不活化細胞 (FPM1-V1AX) を target 細胞、ヌードラット (F344N-Jcl rnu/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

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- 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.

- 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⁺ 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⁺ 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⁺ 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⁺ 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⁺ 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⁺ 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⁺ 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⁺ 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、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、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-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**

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：()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/ γ_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。

() 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。

() 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。

() 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

()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 ()。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 ()。

()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

() 高度免疫不全マウス

(NOD/SCID/ γ Cnull : NOG) の脾臓内にヒト末梢血単核球 (PBMC) 2×10^6 個とマイトマイシン処理した HTLV-I 感染 T 細胞株 (ILT-M1) 1×10^6 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。

() 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。

() 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。

() 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

() 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ーと同程度であった。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。

() 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。

() 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, κ) 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, κ) 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

(-) 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。

() 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

(-) 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 抗体は目的的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。

() 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 マウス前核期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 1×10^5 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。

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 1×10^5 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

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 5×10^4 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、HTLV-I 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髓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 系統は骨髓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/gammanull 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. I. 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/gammanull 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. 1st 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, 3rd 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, 3rd 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. 3rd 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、谷口智恵、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 pep₁₈₀₋₂₀₄）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 pep₁₈₀₋₂₀₄ 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 pep₁₈₀₋₂₀₄ 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（pep₁₈₀₋₂₀₄: 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 pep₁₈₀₋₂₀₄）を搭載した TIPS 融合タンパク質（Z-COMP-gp46 pep₁₈₀₋₂₀₄）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）とスペーサー領域（下線部）をもつ人工ペプチド（HTLV-I peptide pep_{180-204_3} Cys: CGPSQLPPTAPLLPHSNLDHILEPSICGGGGS

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 pep₁₈₀₋₂₀₄）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/gp46 pep₁₈₀₋₂₀₄）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、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ている。HTLV-I 感染に対する防御エピトープ（gp46 pep₁₈₀₋₂₀₄）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/gp46 pep₁₈₀₋₂₀₄）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、

gp46pep₁₈₀₋₂₀₄ 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/gp46pep₁₈₀₋₂₀₄(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 gp46pep₁₈₀₋₂₀₄ 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(CGPSQLPPTAPPLLPHSNLDHILEPSIGCGGG GSC) 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/gp46pep₁₈₀₋₂₀₄ コンジュゲートワクチンを作成した。

このCRM197/gp46pep₁₈₀₋₂₀₄ 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血液中IgGの誘導が確認された。また、その力価はOVA/gp46pep₁₈₀₋₂₀₄ 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/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

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 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。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/gp46pep₁₈₀₋₂₀₄ 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、gp46pep₁₈₀₋₂₀₄ 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

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發動していることが、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 週以内で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增加し、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-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 *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ると考えられているが、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さずである。

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- 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).
- 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. 16th 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. 15th 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

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：HTLV-I 感染者は九州・沖縄地方に多いことは周知のことであり、また 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。そこで我々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 の分離に加えて、沖縄県における HTLV-I の感染状況とその発症率とその動向を改めて再度把握した上で、抗 HTLV-I 抗体陽性者における臨床像について調査と HTLV-I 感染者血清中の抗体の HTLV-I 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。

2003 年から 2012 年までの琉球大学医学部附属病院受診患者 14,317 人中 1,815 人（12.67%）が抗体陽性者であり、抗体陽性者のうち 187 人（10.3%）が成人 T 細胞白血病・リンパ腫（ATLL）を発症していた。また 2011 年に抗 HTLV-I 抗体の有無について調査した対象は 1297 人で抗体陽性者は 66 人（5.09%）と 2003～2011 年までの 7 年間の陽性率（14.43%）と比べ低値であった。また、抗 HTLV-I 抗体陽性者で見られた皮膚疾患のうち、皮膚悪性腫瘍が多くみられ、その内訳は基底細胞癌、有棘細胞癌、悪性黒色腫の順で多く、それぞれ 33 人（2.27 名/1 千人・年）、30 名（1.93 名/1 千人・年）、10 名（0.69 名/1 千人・年）であった。

HTLV-I 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-I 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-I 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-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。皮膚病変組織に浸潤する HTLV-I 感染細胞培養株は樹立できなかった。

A. 研究目的

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 の分離に加え、沖縄県における HTLV-I の感染状況、発症率、および臨床的な特徴を調査するとともに HTLV-I 感染者の HTLV-I 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：2003 年から 2011 年までの 8 年間に琉球大学医学部附属病院を受診し、抗 HTLV-I 抗体検査を施行された患者を対象とした。そのうち、同意が得られた患者の血清や病理組織を用いて、HTLV-I 感染細胞培養株の確立や抗体に関する調査を行った。また、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 細胞白血病ウイルス 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。

感染状況、発症率、臨床的特徴
上記キットにて抗体を確認した症例の診療録を閲覧し後ろ向きに検討を行った。

感染細胞培養株の確立
ATLL の皮膚病変を外科的に切除し、Type コラゲナーゼ、DNase で処理し Percoll を用いて PBMCs を分離した後に RPMI1640（10% FCS・20U/ml IL-2 添加）培地にて培養を行った。

HTLV-I 感染者の HTLV-I 感染防御能に関する定量的解析

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

感染状況、発症率、臨床的特徴

抗HTLV- 抗体の有無の検査を受けた患者は2003年から2011年までの8年間で14,317名、そのうち抗体の陽性者は1815人(12.67%)であり、成人T細胞白血病・リンパ腫(ATLL)の発症例は187人(10.3%)であった。またその中で2011年に検査で抗HTLV-I抗体の検査を受けたのは1297名で、そのうち抗体の陽性者は66名(5.09%)とこれまでの陽性率と比べ低い値を示した。

抗 HTLV- 抗体陽性者の皮膚疾患のうち、皮膚

悪性腫瘍は基底細胞癌、有棘細胞癌、悪性黒色腫の順で多く、それぞれ33名(2.27名/1千人・年)、30名(1.93名/1千人・年)、10名(0.69名/1千人・年)であった。これまで基底死亡癌は5名/10万人・年、有棘細胞癌は2.5名/10万人・年、悪性黒色腫は1~1.5名/10万人・年という発生率が報告されており、それらと比べ高率となっていた。また皮膚感染症に関しては白癬、帯状疱疹、単純ヘルペス感染症の順で多くそれぞれ89人(6.13人/1千人・年)、30人(2.06人/1千人・年)、13人(0.90人/1千人・年)であった。これまでの報告されている帯状疱疹(4.6人/1千人・年)の発生率と比べ低率であった。さらに自己免疫疾患は乾癬16人(1.10人/1千人・年)、全身性強皮症9人(0.61人/1千人・年)、水疱性類天疱瘡7人(0.48人/1千人・年)の順で多く、これまで報告されている乾癬の罹患率(1人/1千人・年)とほぼ同等であった。

感染細胞培養株の確立

HTLV- 感染リンパ球の細胞株は確立できなかった。

HTLV- 感染者の HTLV- 感染防御能に関する定量的解析

(1)培養後16時間でJurkatとHTLV- 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- 感染者血清および血清由来精製IgG、ラットLAT-27抗体を添加したところ、ラットLAT-27抗体で合胞体形成は完全に阻害され、HTLV- 感染者血清中にも同様の作用を示すサンプルが存在した。

(3)HTLV- 感染者血清中にHTLV- 主要糖タンパクであるgp46に対する抗gp46抗体の存在を確認した。HTLV- 感染者血清が自己免疫疾患、健常人と比べ有意に高いOD値を示した($p<0.05$)。

D. 考察

感染状況、発症率、臨床的特徴

沖縄県の抗HTLV- 抗体陽性者においてみられた皮膚疾患のうち、皮膚悪性腫瘍が全国の統計データと比べ高率であった。しかし、この発生率の差は、紫外線の曝露量による影響で生じた可能性を否定できない。そのため、HTLV-

と皮膚悪性腫瘍発症との関連を明らかにするために、抗HTLV- 抗体の陽性者と陰性者の比較が必要である。

また、宿主の免疫によって発病が左右される帯状疱疹の罹患率において、抗HTLV- 抗体陽性者は過去の報告を下回った。従来、ATLL（成人T細胞白血病・リンパ腫）を発症すると細胞性免疫が低下することにより、日和見感染症を生じることが知られている。そのことを踏まえると、ATLL発症前の抗HTLV- 抗体陽性者は免疫機能が保たれていることが予想される。また、抗HTLV- 抗体陽性者が帯状疱疹を発病した場合、それがATLLの発症を予測するための指標となりうるかもしれない。しかし、その検証のためには、帯状疱疹を発症した際にも抗HTLV- 抗体陽性者を前向きに検討することが今後必要である。

また、HTLV- はHTLV- 関連脊髄症(HAM)やぶどう膜炎(HU)といったHTLV- 関連疾患のみならず自己免疫疾患との関連が指摘されているが、今回の結果では関連を示唆する十分な所見は得られなかった。

感染細胞培養株の確立

細胞分離後に自然免疫および獲得免疫を担うNK細胞や、細胞傷害性T細胞を除去する必要があるかもしれない。

HTLV- 感染者のHTLV- 感染防御能に関する定量的解析

HTLV- 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- 感染者におけるHTLV- 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- 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

琉球大学医学部附属病院受診患者 14,317 名

のうち抗体の陽性者は 1815 人(12.67%)であり、成人 T 細胞白血病・リンパ腫(ATLL)の発症例は 187 人(10.3%)であった。若年者の感染も見られ、若年者の感染対策が必要である。

併存疾患において皮膚悪性腫瘍がこれまでの報告と比べ多くみられ、自己免疫性疾患が多い傾向は確認できなかった。今後、コントロール群を設け比較検討が必要である。

また、有用な HTLV- 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。それらを用いた結果、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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 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

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関与する HTLV-I のウイルス側遺伝子産物の関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