

2018/8022A

厚生労働科学研究費補助金  
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

# HTLV-1 感染症予防ワクチンの 開発に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

平成26年 3 月

研究代表者 長谷川 秀樹

(国立感染症研究所)

厚生労働科学研究費補助金  
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

# HTLV-1 感染症予防ワクチンの 開発に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

平成26年 3 月

研究代表者 長谷川 秀樹

(国立感染症研究所)

平成25年度新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

HTLV-1感染症予防ワクチンの開発に関する研究

班員名簿

長谷川秀樹	国立感染症研究所 感染病理部	部 長
俣野 哲朗	国立感染症研究所 エイズ研究センター	センター長
梁 明秀	横浜市立大学 医学部微生物学	教 授
外丸 詩野	北海道大学大学院 医学研究科	准 教 授
田中 正和	関西医科大学 微生物学	助 教

# 目 次

## I. 総括研究報告書

- HTLV-1 感染症予防ワクチンの開発に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・ 1  
研究代表者：長谷川 秀樹 （国立感染症研究所 感染病理部）

## II. 分担研究報告書

1. HTLV-1 感染予防ワクチンを目指したワクチン抗原候補タンパク質の作製・・・・・・・・ 1 1  
研究分担者：長谷川 秀樹 （国立感染症研究所 感染病理部）
2. HTLV-1 感染細胞を標的とする細胞性免疫反応に関する研究・・・・・・・・ 1 7  
研究分担者：俣野 哲朗 （国立感染症研究所 エイズ研究センター）
3. HTLV-1 感染の克服に向けた病態の解明、感染・進展の防止、診断技術の  
向上等に関する研究：HTLV-1 感染症予防ワクチンの開発  
～微量抗体検出法の開発と抗原エピトープの決定に向けた基盤研究・・・・・・・・ 2 1  
研究分担者：梁 明秀 （横浜市立大学 医学部微生物学）
4. HTLV-I の免疫病態、発症予防ワクチンの解析を目指したマウスモデルの作製・・・・・・・・ 2 5  
研究分担者：外丸 詩野 （北海道大学大学院 医学研究科）
5. HTLV-1 感染モデルマウスを用いた抗 Tax DNA ワクチン及び  
ペプチドワクチンの評価・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3 1  
研究分担者：田中 正和 （関西医科大学 微生物学）

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・ 3 5

# I. 総括研究報告書

## HTLV-1 感染症予防ワクチンの開発に関する研究

研究代表者 長谷川 秀樹 国立感染症研究所感染病理部 部長

**研究要旨** ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (Human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1) 感染症は成人 T 細胞性白血病 (ATL) や関連脊髄症(HAM)等の重篤な疾患を引き起こすが有効なワクチンが無く開発が求められている。HTLV-1 の主な感染経路は母乳を介した母子感染であるが近年水平感染が想定以上に多い事が指摘されており、感染予防ワクチンの開発は急務である。ワクチン抗原として最も有力な感染防御抗原候補である Env タンパク質を抗原とした不活化ワクチン開発を目指し、Env タンパク質合成系の構築を試みた。その結果、三量体型可溶性 Env 抗原の合成に成功した。また Tax 特異的 CTL による in vivo での Tax 発現細胞排除効果の評価系として Tax トランスジェニックマウス由来 ATL 細胞を移植しその後 tax cDNA を測定する系を確認した。また発症モデルとして老化モデル遺伝子改変マウス ( $\beta 5t$ -Tg) と Tax トランスジェニックマウスのダブルトランスジェニックマウスを作成した。更にワクチン評価に用いる感染モデルとしてヒト化マウスを用い、予め Tax 発現マウス T リンパ腫細胞株の同種移植系で効果を確認した Tax ペプチドワクチンの経鼻および皮下投与の系について、HTLV-1 感染細胞抑制効果を検討した。何れの投与方法においても、HTLV-1 感染ヒト化マウス末梢血中プロウイルス量の増加が抑制され、同実験系が HTLV-1 感染予防ワクチンあるいは HTLV-1 関連疾患発症予防ワクチンの評価に有効であることが示された。また昨年度までに開発した抗体検出系であるアルファスクリーン法を活用し、HTLV-1 感染患者および ATL 患者の血清に含まれる抗 HTLV-1 ウイルスタンパク質抗体の検出を行なった。

### 研究分担者

侯野 哲朗 (国立感染症研究所エイズ研究センター・センター長)  
梁 明秀 (横浜市立大学医学部微生物学・教授)

外丸 詩野 (北海道大学大学院医学研究科・准教授)  
田中 正和 (関西医科大学微生物学・助教)

### A. 研究目的

成人 T 細胞白血病・リンパ腫 (ATL) なら

びに HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) は、HTLV-1 により引き起こされる疾患であり、現在有効な治療法は存在しない。2008～2010 年度に実施された厚生労働科学研究班による実態調査の結果、全国のキャリア数は約 108 万人と推定された。以前は、九州・沖縄地方の風土病と考えられていた HTLV-1 感染症が、関東・近畿地方の大都市圏への拡散し、国内における HTLV-1 キャリアは依然として多いことが明らかになった。また水平感染が想定以上に多く事が指摘されている。HTLV-1 キャリアにおける ATL の生涯発症率は約 5%とされるため、有効な治療法の開発が求められている。また、HTLV-1 の主たる感染経路は授乳による母子感染であることから、人工乳の利用を含めた授乳の制御により新たな感染を防止することは可能である。しかしながら、HTLV-1 キャリアが国内に拡散した現状を考えると、自身がキャリアであることを認識していない場合も考えられ、キャリア数は減る傾向にあるものの一定のレベルで維持される可能性は否定できない。

HTLV-1 キャリアに対する発症予防ならびに授乳による感染リスクを低減させる手段として、ワクチン接種が考えられる。現在までに実用化されたレトロウイルス感染症予防ワクチンは存在しないが、HTLV-1 の感染はウイルス表面の糖タンパク質である Env タンパク質に対する抗体により中和されることが知られていることから、Env タンパク質を主要抗原とする不活化ワクチンが感染予防ワクチンとして有望であると考えられる。従来ウイルス不活化ワクチンの製造方法では、HTLV-1 ワクチンを製造することは極めて難しい。そこで、感染防御抗原である Env タンパク質を何らかの方法で発現および精製したリコンビナントワクチンを開発する必要がある。

る。本年度の研究では、実際のウイルスの持つ Env タンパク質に近いリコンビナントタンパク質を得るために哺乳類培養細胞系を用いた HTLV-1 Env タンパク質合成系の構築を試みた。

また HTLV-1 関連疾患発症予防ワクチンの開発を目的に、ヒト造血・免疫系を持つ HTLV-1 感染ヒト化マウスの樹立を試み、ATL 様病態および抗 HTLV-1 宿主免疫の誘導を再現することに成功した。この HTLV-1 感染ヒト化マウスの系における抗 HTLV-1 ワクチン投与の有効性を検討した。また、ヒト化マウスでの検討に先立ち、Tax DNA ワクチン投与による抗 Tax 細胞障害性 T 細胞(CTL)の誘導を介した制御をこれまでに我々が明らかにした、Tax 発現マウス EL-4 T リンパ腫細胞株の同種移植系を用いて、抗 Tax ペプチドワクチンの投与方法およびアジュバントの評価を行った。

さらに HTLV-1 抗原発現細胞に対する有効な細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 反応を増強するワクチン開発に結びつく研究を進めることとした。HTLV-1 は感染細胞の伝播により感染が拡大することから、感染細胞発現抗原を標的とする免疫誘導は感染防御に結びつくことが期待される。また、CTL による HTLV-1 感染細胞の排除は、ATL 発症防御に結びつくことも期待される。mATL 細胞移植マウスにおける tax cDNA 量を測定し、移植細胞が維持されるかどうかを検証した。

HTLV-1 関連疾患の免疫病態を解析する目的で、さらにワクチン効果を判定する目的で、あたらしいモデルである Tax/ $\beta$ 5t ダブルトランスジェニックマウス (Tax/ $\beta$ 5t-Tg) を作製する。

また昨年度までに構築したコムギ無細胞系を用いて作製した可溶化全長 HTLV-1 タンパク質とアルファスクリーン法を用いた抗体検

出法により、HTLV-1 感染患者および ATL 患者の血清中に含まれる抗 HTLV-1 タンパク質抗体の検出を行なった。

## B. 研究方法

### 1. 可溶性 HTLV-1 Env タンパク質合成

ワクチンに用いる抗原としては、精製工程を簡略化するために膜タンパク質である Env タンパク質の細胞外領域のみからなる可溶性 Env タンパク質の作製を試みた。Env タンパク質の細胞外領域全長と、gp46 のみ、gp21 の細胞外領域のみからなるコンストラクトを構築し 293T 細胞に Fugene HD を用いてプロトコルに従い、トランスフェクションした。トランスフェクション 3 日後に細胞上清と細胞溶解液を回収し、SDS-PAGE および Western Blotting にて発現確認を行った。

### 2. 三量体型可溶性 HTLV-1 Env タンパク質合成

三量体形成ドメインを融合させ三量体型可溶性 HTLV-1 Env タンパク質を発現するコンストラクトを構築した。作製したコンストラクトを 293T 細胞に Fugene HD を用いてプロトコルに従い、トランスフェクションし 3 日後に細胞上清と細胞溶解液を回収し、SDS-PAGE および Western Blotting にて発現確認を行った。

### 3. HTLV-1 Env タンパク質の哺乳類培養細胞大量発現系の構築

発現が確認されたコンストラクトについては、哺乳類細胞による組換えタンパク質一過性発現系である Expi293™ Expression System (Invitrogen) を用いて大量発現を行った。濃縮後のサンプルを Superose 12 10/300 GL カラムを用いたゲル濾過クロマトグラフィーゲルに

供し分子サイズに基づき分画し、分画サンプルを SDS-PAGE および Western Blotting に供した。

### 4. ヒト化マウスへの HTLV-1 感染

ヒト化マウスは  $\gamma$  線全身照射 (5Gy) 処置した 6 週齢 NOG-SCID マウス下肢大腿骨髄内にヒト臍帯血由来 CD133 陽性造血幹細胞 ( $5 \times 10^4$  個) を注入・移植し作成した。骨髄移植 4 ヶ月時に、末梢血における CD3 陽性ヒト T リンパ球の発現を確認後、放射線照射 (10Gy) により増殖能を欠失させた HTLV-1 感染 Jurkat 細胞 (JEX 細胞)  $5.0 \times 10^6$  個を腹腔内接種した。細胞接種後、2 週毎に末梢血から採血を行い、感染ヒト血球細胞の動態を FACS 解析にて、また HTLV-1 感染細胞数を定量的 PCR にて計測した。

### 5. ヒト化マウスへのワクチン接種

骨髄移植 4 ヶ月時のヒト化マウスに、経皮的あるいは経鼻的に Tax ペプチドワクチンを投与し、ワクチン最終投与 1 週間後に JEX 細胞を腹腔内接種することで、HTLV-1 を感染させた。Tax ペプチドワクチンおよびアジュバントについては、EL4/Gax 同種移植系で使用した量および投与方法に従った。

### 6. FACS

蛍光標識された各種抗ヒト血球表面抗原抗体 (CD45、CD3、CD8、CD25) を用いてフローサイトメトリー (BD FACS Canto™II: BD) を行い、末梢血中の血球細胞の種類および表面抗原の発現変化を解析した。

### 7. 感染細胞の定量

分離された PBMC からゲノム DNA を分離し、HTLV-1 プロウイルス pX 領域を標的と

した TaqMan Probe 法による定量的 PCR (MyiQ®: Bio-Rad) を行った。内部標準として human  $\beta$ -globin 遺伝子を標的とした定量的 PCR を行い、ヒト単核球画分における HTLV-1 感染細胞の比率を算出した。

(倫理面への配慮)

ヒト臍帯血は日本赤十字近畿さい帯血バンクにおいて、提供者の同意の下に採取されたもののうち、移植に用いられないロットを、研究内容および倫理項目を審査、許可された後に研究用として提供されている。

また動物実験については、関西医科大学動物実験委員会に実験計画を提出し、審査の後承認されている。

8. 本研究事業の研究代表者が開発した独自の ATL 発症モデルである Tax トランスジェニックマウス (Nat Med 12:466, 2006) 由来の mATL 細胞を利用することとした。mATL 細胞  $1 \times 10^6$  を移植された同系の B6 マウスの移植後 1 週目・2 週目・3 週目の脾臓および非移植マウスの脾臓より分離したリンパ球から DNA を抽出した。tax 特異的プライマーおよびプローブを設計し、Light Cycler を用いた tax cDNA 定量法を構築して、抽出した DNA 中の tax cDNA 量を定量した。

(倫理面への配慮)

動物実験については、国立感染症研究所の動物実験委員会の審査・承認後に開始した。

9.  $\beta$  5t-Tg の作製には、発現プロモーター pCAGGS (CMV-IE、chicken  $\beta$ -actin、rabbit  $\beta$ -globin) を用い、C57BL/6N (B6) をバックグラウンドとして、マウス  $\beta$  5t cDNA を全身発現するトランスジェニックマウスの作製をオリエンタル酵母(株)に委託した。また、Tax トランスジェニックマウスを国立感染症研究

所より供与を受け、 $\beta$  5t-Tg と交配した。産出した仔マウスの尾組織より DNA を抽出し、 $\beta$  5t および Tax 遺伝子導入の状態を確認した。

10. 化学増幅型ルミネッセンスプロキシミティホモジニアスアッセイ、アルファスクリーン法による患者血清中の抗体検出

N 末端をビオチン化した HTLV-1 全長タンパク質 Gag, Env, Tax-1, HBZ を無細胞合成し、抗原特異的抗体または患者血清と混合後、Alphascreen 検出用ビーズを加えることで、抗原タンパク質の N 末端にストレプトアビジンコートされたドナービーズが結合し、抗原に結合した特異抗体にプロテイン G がコートされたアクセプタービーズが結合する。これら 2 つのビーズが近接した複合体を形成させた後、680 nm の励起光を照射することで、ドナービーズ周囲の酸素分子が一重項酸素に変換され 200 nm の範囲で溶液中を拡散し、アクセプタービーズを発光させシグナルとして検出される。

(倫理面への配慮)

本研究において、遺伝子組換え実験を用いることから、研究者が所属する機関の組換え DNA 実験安全委員会、バイオセーフティ委員会、動物実験委員会、医学研究倫理委員会等の承認・認可を得て実験を行った。また、本年度はヒト検体を使用した実験を実施しているが、臨床サンプルの解析及びデータの公表にあたっては、倫理委員会の規則に則り、当該患者 (感染者) の同意を得た上で行った。

## C. 研究結果

1. 可溶性 HTLV-1 Env タンパク質合成

哺乳類細胞を用いた発現系により Env タンパク質の合成を試みた。Env タンパク質の細胞外領域にアフィニティータグを融合させた

可溶性 HTLV-1 Env タンパク質の発現プラスミドを構築した。 Env タンパク質が正しくフォールディングできず不安定になり、細胞内で分解されている可能性が考えられた。

## 2. 可溶性 HTLV-1 Env タンパク質合成

三量体型可溶性 HTLV-1 Env タンパク質の合成を試みた。 293T 細胞に発現プラスミドをトランスフェクションし、経時的に細胞溶解液と培養上清を回収し、Western-blotting を行った。その結果、特異的なバンドが検出され、三量体型可溶性 HTLV-1 Env タンパク質の発現が確認できた。

次に、ワクチン抗原に用いるのに十分な量のリコンビナントタンパク質を得るために Expi293<sup>TM</sup> Expression System を用いて、三量体型可溶性 HTLV-1 Env タンパク質の発現および精製を試みた。 Expi293<sup>TM</sup> Expression System とは、哺乳類培養細胞を用いて組換えタンパク質を速やかに発現するための一過性発現システムであり、最大で 1 g/L 程度のリコンビナントタンパク質を発現できる。この系を用いて、発現させ Ni-NTA 担体カラムでアフィニティー精製を行ったところ、Western-blotting で特異的なバンドが検出された。

## 3. HTLV-1 感染ヒト化マウス系を用いた Tax ペプチドワクチンおよび投与方法の評価

EL4/Gax 同種移植系において Tax ペプチドワクチンの皮下投与および経鼻投与が腫瘍増殖抑制効果を持つことが示されたことから、これら 2 種類の投与方法を用いてヒト化マウスにおける Tax ペプチドワクチンの有効性を検討した。

その結果、CTB をアジュバントとした Tax ペ

プチド皮下投与群(3匹)においては、HTLV-1 感染 6 週における末梢血プロウイルス量の増加が、ワクチン非接種コントロールのそれぞれ 73.3%、10.3%、3.2%まで抑制された。同様に、R848 をアジュバントとした Tax ペプチドの経鼻投与群(3匹)においても、それぞれ対照の 55.5%、5.8%、2.6%までプロウイルス量の抑制効果が認められた。

4. mATL 細胞の野生株マウスへの移植。移植後 1 週目・2 週目および 3 週目のいずれの脾臓由来細胞においても、tax cDNA が検出された。mATL 細胞の tax cDNA 量を基準にして各サンプルの tax cDNA 量の相対値を算出したところ、1 週目よりむしろ 3 週目の方が高い傾向にあった。

5. Tax トランスジェニックマウスが系統を維持できる個体数に達した後、 $\beta$  5t-Tg と交配し、現在 10 匹の Tax/ $\beta$  5t-Tg が産出された。引き続き、交配を継続し、ATL 発症、免疫応答の変化等について検討を行う予定である。

## 6. アルファスクリーン法による抗体検出

抗原として 1. で作製した N 末端がビオチン標識された可溶性全長 HTLV-1 タンパク質、Gag、Env、Tax-1、HBZ と市販の各抗 HTLV-1 抗体及び琉球大田中勇悦先生より分与していただいた抗 HBZ 抗体を用いた抗原抗体反応を AlphaScreen 法によって検出した。その結果、すべての抗体で濃度依存的にシグナルが増加することがわかった。しかしながら、同時に行なった Western Blot の結果より、シグナルの強度は、抗体の特異性に左右されるものであることがわかった。

## 7. 患者血清中の抗体検出

本アッセイを活用し、HTLV-1 感染患者、ATL および関連疾患発症患者の血清中の抗体価の検出を行なった。本アッセイにおいて、プロウイルス量と TAX に対する抗体量に関しては過去の報告と同様の挙動が確認されたが、病態特異的な抗体価の変動などはみられなかった。一方、同一患者における治療前、治療後の血清において、上昇していた HTLV-1 抗体の減少がみられた。

#### D. 考察

本研究では、HTLV-1 感染症予防ワクチン開発のために最も有力な感染防御抗原候補である Env タンパク質合成系を検討した。哺乳類培養細胞タンパク質合成系を用いて可溶性 Env タンパク質の作製を試みたところ、単量体型 Env タンパク質は発現しなかったが、三量体化させることにより可溶性三量体型 Env タンパク質の合成に成功した。しかしながら、哺乳類培養細胞タンパク質合成系による可溶性三量体型 Env タンパク質合成は収率と精製度が悪く、ワクチン抗原製造系として適さないと考えられた。今後、実用的なワクチン抗原製造系確立を目指し、日本国内で GMP グレードの昆虫細胞タンパク質合成系を有する国内メーカーと共同で三量体型 HTLV-1 Env タンパク質の合成を進めていく予定である。当該メーカーは GMP グレードでの製造も可能であることから、基礎研究の結果がシームレスに臨床開発に繋がり、迅速な HTLV-1 感染症予防ワクチンの実用化が期待される。

Tax 発現 EL4 リンパ腫細胞(EL4/Gax)の同種移植系において、Tax DNA ワクチンおよびペプチドワクチンの皮下および経鼻投与で、いずれも EL4/Gax の腫瘍増殖効果が認められた。また、効果が減弱するものの、マイクロニー

ドル・パッチ法でもワクチン効果が認められたことから、今後、ペプチドの種類等を検討することで、臨床応用に向けた改良が期待される。

さらに、HTLV-1 感染ヒト化マウスの系において、Tax ペプチドワクチンの皮下および経鼻投与で、いずれも感染細胞の増殖抑制効果が認められたことから、今後、この抑制が感染時におけるものか、あるいは感染細胞の増殖抑制によるものかを明らかにすることで、感染予防ワクチンあるいは発症予防ワクチンとしての応用への展開が期待される。

mATL 細胞移植後 3 週目まで tax cDNA が検出されたことは、Tax トランスジェニックマウス由来 ATL 細胞を移植した同系マウスにおいて、少なくとも 3 週間は移植細胞が維持されることを示している。さらに 3 週目の tax cDNA 量が 1 週目より高い値を示したことは、移植後の mATL 細胞の増殖の可能性を示唆している。以前 mATL 移植マウスにおける Tax 特異的 CTL 反応誘導を確認したが、今回の結果は、この移植で誘導される CTL 反応では、3 週間で十分には mATL 細胞が排除されないことを意味している。したがって、この系において、ワクチン等で Tax 特異的 CTL 反応を誘導し、mATL 細胞が排除されるかどうかを調べることにより、CTL の有効性を検証することができると考えられる。HTLV-1 特異的 CTL の有効性評価に適した動物モデルの構築は重要課題の一つであるが、本研究結果は、mATL 細胞移植マウスが Tax 特異的 CTL の有効性評価に有用なモデルであること示すものである。

ATL は数十年の長い潜伏期間の後に発症するが、加齢による免疫応答の減弱がウイルス

感染細胞の増加の原因となり、ATL の発症につながる可能性が指摘されている。また、発症予防ワクチンの接種対象者には、成年期以降のキャリアが多く含まれるが、小児と成人や老年者ではワクチン効果に相違が見られることがしばしば遭遇され、HTLV-1 関連疾患のワクチン制御には免疫応答の年齢による変化とワクチン誘導に対して有効なウイルス抗原の網羅的解析が必要となる。本年度に新たに作製した Tax/ $\beta$  5t-Tg マウスは、ワクチン効果の検討に有用な、かつ、ATL 発症における免疫病態を明らかにする上で有用なマウスモデルになる可能性が考えられ、引き続き解析を継続する予定である。

合成した可溶性 HTLV-1 タンパク質は、機能および構造が保持されている状態であると考えられることから、生体内で誘導される構造を認識する抗体の検出も可能であると示唆される。また、全長タンパク質を用いることで、様々なエピトープに対する抗体が検出されることが期待できる。

患者血清を用いたアッセイにおいては、本アッセイの結果と臨床背景との相関を検討し、HTLV-1 感染または ATL および関連疾患の発症に伴って上昇する抗体を探索することで、ATL の発症予測や予後判定に応用できると期待される。

## E. 結論

HTLV-1 感染症を流行地域から減少させるために感染阻止を目指したワクチン開発を目的とし、感染防御抗原として機能することが予想される Env タンパク質合成系構築を試みた。哺乳類培養細胞タンパク質合成系を用いて可溶性 Env タンパク質の作製を試みたところ、三量体化させることにより可溶性三量体

型 Env タンパク質の合成に成功した。しかしながら、哺乳類培養細胞タンパク質合成系による可溶性三量体型 Env タンパク質合成は収率と精製度が悪く、ワクチン抗原製造系として適さないと考えられた。今後、実用的なワクチン抗原製造系確立を目指し、日本国内で GMP グレードの昆虫細胞タンパク質合成系を有するメーカーと共同で三量体型 HTLV-1 Env タンパク質合成の検討を進めていく予定である。

HTLV-1 感染ヒト化マウスの系で、Tax ペプチドワクチンの皮下および経鼻投与により感染細胞の増殖抑制効果が認められたことから、同マウスモデルはヒト免疫系を基盤とした HTLV-1 発症予防ワクチンの開発において有用な評価系を提供すると考えられる。

Tax トランスジェニックマウス由来 ATL 細胞を移植した同系マウスにおける tax cDNA 量を解析し、移植後 3 週目までは移植細胞が維持されることを確認した。この移植マウスは、Tax 特異的 CTL による *in vivo* での Tax 発現細胞排除効果の評価系として有用と考えられる。

Tax/ $\beta$  5t-Tg マウスは、HTLV-I 関連疾患の免疫病態、発症予防ワクチンの解析に有用なマウスモデルになる可能性が考えられる。

コムギ無細胞タンパク質合成システムを活用して作製した HTLV-1 抗原タンパク質および血清中に含まれる少量の抗体を検出できる測定法を開発した。またそれらを活用し、HTLV 感染患者血清を用いた抗体の検出に成功した。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Senchi K, Matsunaga S, Hasegawa H, Kimura H, Ryo A. Development of oligomannose-coated liposome-based nasal vaccine against human parainfluenzavirus type 3. *Front Microbiol.* 2013 Nov 26;4:346.
- 2) Niikura K, Matsunaga T, Suzuki T, Kobayashi S, Yamaguchi H, Orba Y, Kawaguchi A, Hasegawa H, Kajino K, Ninomiya T, Ijio K, Sawa H. Gold nanoparticles as a vaccine platform: influence of size and shape on immunological responses in vitro and in vivo. *ACS Nano.* 2013 May 28;7(5):3926-38.
- 3) 鈴木 忠樹、長谷川 秀樹【感染症と癌、病理からのメッセージ】 HTLV-1 と白血病・リンパ腫 病理と臨床(0287-3745)31 巻 2 号 Page146-150 2013.02
- 4) Shi S, Seki S, Matano T, Yamamoto H. IL-21-producer CD4<sup>+</sup> T cell kinetics during primary simian immunodeficiency virus infection. *Microbes Infect* 15:697-707, 2013.
- 5) Iwamoto N, Takahashi N, Seki S, Nomura T, Yamamoto H, Inoue M, Shu T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Control of SIV replication by vaccine-induced Gag- and Vif-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *J Virol* 88:425-433, 2013.
- 6) Furukawa, A., Sugase, K., Morishita, R., Nagata, T., Kodaki, T., Takaori, A., Ryo, A., Katahira, M. Quantitative analysis of the location- and sequence-dependent deamination by APOBEC3G using real-time NMR. *Angew. Chem., Int. Ed.*, in press.
- 7) Ichiyama K, Gopala Reddy SB, Zhang LF, Chin WX, Muschin T, Heinig L, Suzuki Y, Nanjundappa H, Yoshinaka Y, Ryo A, Nomura N, Ooi EE, Vasudevan SG, Yoshida T, Yamamoto N. Sulfated polysaccharide, curdlan sulfate, efficiently prevents entry/fusion and restricts antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in vitro: a possible candidate for clinical application. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013 Apr 25;7(4):e2188.
- 8) Fukaya S, Matsui Y, Tomaru U, Kawakami A, Sogo S, Bohgaki T, Atsumi T, Koike T, Kasahara M, Ishizu A. Overexpression of TNF- $\alpha$ -converting enzyme in fibroblasts augments dermal fibrosis after inflammation. *Lab Invest.* 93(1):72-80, 2013
- 9) Hamano R, Baba T, Sasaki S, Tomaru U, Ishizu A, Kawano M, Yamagishi M, Mukaida N. Ag and IL-2 immune complexes efficiently expand Ag-specific Treg cells that migrate in response to chemokines and reduce localized immune responses. *Eur J Immunol.* doi:10.1002/eji.201343434, 2013
- 10) Yamada Y, Tomaru U, Ishizu A, Kiuchi T, Kasahara M, Matsuno Y. Expression of thymoproteasome subunit  $\beta 5t$  in type AB thymoma. *J Clin Pathol.* doi:10.1136/jclinpath-2013-201930, 2013
- 11) Masuda S, Iwasaki S, Tomaru U, Baba T, Katsumata K, Ishizu A. Possible implication of Fc  $\gamma$  receptor-mediated trogocytosis in susceptibility to systemic autoimmune disease. *Clin Dev Immunol.* 2013

- 2013:345745
- 12) Ando H, Sato T, Tomaru U, Yoshida M, Utsunomiya A, Yamauchi J, Araya N, Yagishita N, Coler-Reilly A, Shimizu Y, Yudoh K, Hasegawa Y, Nishioka K, Nakajima T, Jacobson S, Yamano Y. Positive feedback loop via astrocytes causes chronic inflammation in virus-associated myelopathy. *Brain*. 136(Pt 9):2876-87, 2013
  - 13) Takeuchi S, Kimura S, Soma Y, Waki M, Yamaguchi M, Nakazawa D, Tomaru U, Ishizu A, Kawakami T. Lysosomal-associated membrane protein-2 plays an important role in the pathogenesis of primary cutaneous vasculitis. *Rheumatology (Oxford)*. 52(9):1592-8, 2013
  - 14) Ishizu A, Tomaru U, Murai T, Yamamoto T, Atsumi T, Yoshiki T, Yumura W, Yamagata K, Yamada H, Kumagai S, Kurokawa MS, Suka M, Makino H, Ozaki S; JMAAV. Prediction of response to treatment by gene expression profiling of peripheral blood in patients with microscopic polyangiitis. *PLoS One*. 17;8(5):e63182, 2013
  - 15) Michimata R, Watari H, Tomaru U, Sakuragi N, Ishizu A. Human papillomavirus 16-positive uterine cervical squamous cell carcinoma with coinfection with human papillomavirus 34 has a lower incidence in lymph node metastasis than that without coinfection with human papillomavirus 34. *Pathobiology*. 80(5):259-64, 2013
  - 16) Tomaru U, Kasahara M. Thymoproteasome: role in thymic selection and clinical significance as a diagnostic marker for thymic epithelial tumors. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 61(5):357-65, 2013
  - 17) Miyatake Y, Oliveira AL, Jarbouli MA, Ota S, Tomaru U, Teshima T, Hall WW, Kasahara M. Protective roles of epithelial cells in the survival of adult T-cell leukemia/lymphoma cells. *Am J Pathol*. 182(5):1832-42, 2013
  - 18) Nakazawa D, Tomaru U, Ishizu A. Possible implication of disordered neutrophil extracellular traps in the pathogenesis of MPO-ANCA-associated vasculitis. *Clin Exp Nephrol*. 17(5):631-3, 2013
  - 19) Imamoto T, Nakazawa D, Shida H, Suzuki A, Otsuka N, Tomaru U, Ishizu A. Possible linkage between microscopic polyangiitis and thrombosis via neutrophil extracellular traps. *Clin Exp Rheumatol*. 32(1):149-150, 2014
  - 20) Sato T, Yamano Y, Tomaru U, Shimizu Y, Ando H, Okazaki T, Nagafuchi H, Shimizu J, Ozaki S, Miyazawa T, Yudoh K, Oka H, Suzuki N. Serum level of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 as a biomarker of disease activity in relapsing polychondritis. *Mod Rheumatol*. 24(1):129-36, 2014
  - 21) Ströbel P, Hartmann E, Rosenwald A, Kalla J, Ott G, Friedel G, Schalke B, Kasahara M, Tomaru U, Marx A. Corticomedullary differentiation and maturational arrest in thymomas. *Histopathology*. 64(4):557-66, 2014
  - 22) Nakazawa D, Shida H, Tomaru U, Yoshida M, Nishio S, Atsumi T, Ishizu A. Enhanced Formation and Disordered Regulation of NETs in Myeloperoxidase-ANCA-Associated Microscopic Polyangiitis. *J Am Soc Nephrol*. 2014, in press

- 23) Tezuka K, Xun R, Tei M, Ueno T, Tanaka M, Takenouchi N, Fujisawa J. An animal model of adult T-cell leukemia: humanized mice with HTLV-1-specific immunity. *Blood*.123(3): 346-55.2014.
- 24) 田中正和、和田直樹、橋本岩雄、竹之内徳博、津田洋幸、藤澤順一、三輪正直 HTLV-1 の Tax 発現リンパ腫細胞のウシラクトフェリンによる腫瘍増殖抑制効果の検討. *ラクトフェリン* 2013, p43-50,2013.

## 2. 学会発表

各研究分担者の報告書参照

## H. 知的所有権の出願・登録状況等

該当なし

## II. 分担研究報告書

## HTLV-1 感染予防ワクチンを目指したワクチン抗原候補 タンパク質の作製

研究分担者 長谷川 秀樹 国立感染症研究所 感染病理部 部長  
研究協力者 鈴木 忠樹 国立感染症研究所 感染病理部 室長  
齊藤 慎二 国立感染症研究所 感染病理部  
相内 章 国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究  
センター 主任研究官

**研究要旨** HTLV-1 感染症のコントロールのために、HTLV-1 感染予防ワクチンの開発が求められている。そこで、本研究では、最も有力な感染防御抗原候補である Env タンパク質を抗原とした不活化ワクチン開発を目指し、Env タンパク質合成系の構築を試みた。その結果、哺乳類培養細胞タンパク質合成系を用いて三量体型可溶性 Env 抗原の合成に成功した。しかしながら、哺乳類培養細胞タンパク質合成系による三量体型可溶性 Env 抗原合成は収率と精製度が悪く、ワクチン抗原製造系として適さないと考えられた。今後、実用的なワクチン抗原製造系確立を目指し、日本国内で GMP グレードの昆虫細胞タンパク質合成系を有する (株) UMN ファーマと共同で三量体型 HTLV-1 Env の合成を進めていく予定である。

### A. 研究目的

成人 T 細胞白血病・リンパ腫 (ATL) ならびに HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) は、HTLV-1 により引き起こされる疾患であり、現在有効な治療法は存在しない。2008~2010 年度に実施された厚生労働科学研究班による実態調査の結果、全国のキャリア数は約 108 万人と推定された。以前は、九州・沖縄地方の風土病と考えられていた HTLV-1 感染症が、関東・近畿地方の大都市圏への拡散し、国内における HTLV-1 キャリアは依然として多いことが明らかになった。HTLV-1 キャリアにおける ATL の生涯発症率は約 5%とされるため、有効な治療法の開発が求められている。また、

HTLV-1 の主たる感染経路は授乳による母子感染であることから、人工乳の利用を含めた授乳の制御により新たな感染を防止することは可能である。しかしながら、HTLV-1 キャリアが国内に拡散した現状を考えると、自身がキャリアであることを認識していない場合も考えられ、キャリア数は減る傾向にあるもののある一定のレベルで維持される可能性は否定できない。

HTLV-1 キャリアに対する発症予防ならびに授乳による感染リスクを低減させる手段として、ワクチン接種が考えられる。現在までに実用化されたレトロウイルス感染症予防ワクチンは存在しないが、HTLV-1 の感染はウ

ウイルス表面の糖タンパク質である Env タンパク質に対する抗体により中和されることが知られていることから、Env タンパク質を主要抗原とする不活化ワクチンが感染予防ワクチンとして有望であると考えられる。一般的なウイルス感染症の不活化ワクチンは、感染性ウイルス粒子をホルマリンなどで不活化することにより作成するが、HTLV-1 は、*In vitro* において、ほとんど cell free virus を産生しないことから、従来のウイルス不活化ワクチンの製造方法では、HTLV-1 ワクチンを製造することは極めて難しい。そこで、感染防御抗原である Env タンパク質を何らかの方法で発現および精製したリコンビナントワクチンを開発する必要がある。昨年度までの研究で、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて作製した HTLV-1 Env 全長タンパク質を用いたリコンビナントワクチンの開発を進めたが、同抗原はマウスを用いた動物実験において免疫原性が低く、十分な免疫を誘導するのに多量の抗原を必要とすることから、製造コストなどを考慮すると実用化は非常に難しいと考えられた。また、コムギ無細胞タンパク質合成系は、多様なタンパク質を簡便に発現できる優れた系であるが、合成されたタンパク質には糖鎖修飾がなく、Env のように糖鎖修飾が多いウイルス膜タンパク質では、抗原性が変化してしまう可能性も考えられた。そこで、本年度の研究では、実際のウイルスの持つ Env タンパク質に近いリコンビナントタンパク質を得るために哺乳類培養細胞系を用いた HTLV-1 Env タンパク質合成系の構築を試みた。

## B. 研究方法

### 1. 単量体型可溶性 HTLV-1 Env タンパク質合成

ワクチンに用いる抗原としては、精製工程を簡略化するために膜タンパク質である Env タンパク質の細胞外領域のみからなる可溶性

Env タンパク質の作製を試みた。Env タンパク質はホモ三量体を形成することが知られているが、膜貫通領域を除いた可溶性 Env タンパク質は単量体で発現すると考えられた。Env タンパク質は分子表面を覆う gp46 と膜貫通領域を含む gp21 からなるが、細胞外領域全長と、gp46 のみ、gp21 の細胞外領域のみからなるコンストラクトを構築した。作製したコンストラクトを 293T 細胞に Fugene HD を用いてプロトコルに従い、トランスフェクションした。トランスフェクション 3 日後に細胞上清と細胞溶解液を回収し、SDS-PAGE および Western Blotting にて発現確認を行った。

### 2. 三量体型可溶性 HTLV-1 Env タンパク質合成

ウイルス表面に存在する Env タンパク質はホモ三量体を形成している。膜貫通領域を欠損させた Env タンパク質は正しく三量体を形成できないことから、中和エピトープが保持されていない可能性が考えられる。そこで、膜貫通領域の代わりに三量体形成ドメインを融合させ三量体型可溶性 HTLV-1 Env タンパク質を発現するコンストラクトを構築した。作製したコンストラクトを 293T 細胞に Fugene HD を用いてプロトコルに従い、トランスフェクションした。トランスフェクション 3 日後に細胞上清と細胞溶解液を回収し、SDS-PAGE および Western Blotting にて発現確認を行った。

### 3. HTLV-1 Env タンパク質の哺乳類培養細胞大量発現系の構築

発現が確認されたコンストラクトについては、哺乳類細胞による組換えタンパク質一過性発現系である Expi293™ Expression System (Invitrogen) を用いて大量発現を行った。トランスフェクション後、3~5 日後に培養上清を回収し、遠心後、0.45μm フィルターで清澄化を行った。清澄化済みの培養上清サンプルを

Ni-NTA アフィニティーカラムである HisTrap excel (GE) にアプライし、20 mM のイミダゾールを含む溶液でカラムを洗浄後、500 mM のイミダゾールを含む溶液で溶出した。溶出後のサンプルを脱塩カラムにて溶媒を PBS(-) 置換後、遠心型濃縮チューブ (Vivaspin) により 500 $\mu$ l 程度まで濃縮した。濃縮後のサンプルを Superose 12 10/300 GL カラムを用いたゲル濾過クロマトグラフィーゲルに供し分子サイズに基づき分画し、分画サンプルを SDS-PAGE および Western Blotting に供した。

## C. 研究結果

### 1. 単量体型可溶性 HTLV-1 Env タンパク質合成

コムギ無細胞タンパク質合成系で作製した全長 Env 抗原ワクチンの結果を考慮すると、感染防御抗体を誘導できるワクチン抗原作製のためには HTLV-1 ウイルスの持つ Env タンパク質により近いリコンビナントタンパク質を作成する必要があると考えられた。そこで、哺乳類細胞を用いた発現系により Env タンパク質の合成を試みた。発現後の精製工程を簡略化するために Env タンパク質の細胞外領域にアフィニティータグを融合させた可溶性 HTLV-1 Env タンパク質の発現プラスミドを構築した。しかしながら、western blotting においても Env タンパク質の発現は確認できなかった。この系で発現する Env タンパク質は、膜貫通領域を欠くことから三量体を形成できず単量体で存在することが考えられた。このことにより、Env タンパク質が正しくフォールディングできず不安定になり、細胞内で分解されている可能性が考えられた。

### 2. 三量体型可溶性 HTLV-1 Env タンパク質合成

単量体型可溶性 HTLV-1 Env タンパク質の合成に失敗したことから、インフルエンザウイルスの三量体型可溶性 HA タンパク質合成

に汎用されている三量体形成ドメインを融合させた三量体型可溶性 HTLV-1 Env タンパク質の合成を試みた。293T 細胞に発現プラスミドをトランスフェクションし、経時的に細胞溶解液と培養上清を回収し、Western-blotting を行った。その結果、いずれにおいても特異的なバンドが検出され、三量体型可溶性 HTLV-1 Env タンパク質の発現が確認できた。

次に、ワクチン抗原に用いるのに十分な量のリコンビナントタンパク質を得るために Expi293<sup>TM</sup> Expression System を用いて、三量体型可溶性 HTLV-1 Env タンパク質の発現および精製を試みた。Expi293<sup>TM</sup> Expression System とは、哺乳類培養細胞を用いて組換えタンパク質を速やかに発現するための一過性発現システムであり、最大で 1 g/L 程度のリコンビナントタンパク質を発現できる。この系を用いて、発現させ Ni-NTA 担体カラムでアフィニティー精製を行ったところ、夾雑物が多いが、Western-blotting で特異的なバンドが検出された。

次に、この粗生成物をゲル濾過クロマトグラフィーに供したところ、HTLV-1 Env タンパク質は、分子量 150KDa 以上のフラクション 20-21 に溶出され、三量体を形成していると考えられた。ゲル濾過クロマトグラフィー精製後も宿主細胞由来と考えられる多くの夾雑物が混入しており、収率としては 100 ml 培養の系で 20 $\mu$ g 程度であると考えられた。同じ系を用いてインフルエンザウイルスの三量体型可溶性 HA タンパク質を合成すると 90%以上の純度で 100ml 培養当たり 1mg 以上のリコンビナントタンパク質を得ることができることを考慮すると、哺乳類培養細胞による発現系は実用的な HTLV-1 Env ワクチン抗原製造には適していない可能性が考えられた。

## D. 考察

本研究では、HTLV-1 感染症予防ワクチン開発のために最も有力な感染防御抗原候補である Env タンパク質合成系を検討した。まず、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて全長 Env タンパク質を合成したところ、この全長 Env タンパク質は抗体誘導能を有していたが、抗原性が低く、実用的なワクチン開発のために何らかの抗原の改良が必要と考えられた。コムギ無細胞タンパク質合成系では、糖鎖が付加されないため、実際のウイルス粒子に存在する Env タンパク質に比べて抗原性が著しく低下した可能性がある。そこで、この糖鎖付加の問題を解決するために、哺乳類培養細胞タンパク質合成系を用いて可溶性 Env タンパク質の作製を試みたところ、単量体型 Env タンパク質は発現しなかったが、三量体化させることにより可溶性三量体型 Env タンパク質の合成に成功した。しかしながら、哺乳類培養細胞タンパク質合成系による可溶性三量体型 Env タンパク質合成は収率と精製度が悪く、ワクチン抗原製造系として適さないと考えられた。今後、実用的なワクチン抗原製造系確立を目指し、日本国内で GMP グレードの昆虫細胞タンパク質合成系を有する (株) UMN ファーマと共同で三量体型 HTLV-1 Env タンパク質の合成を進めていく予定である。まずは、合成系の構築を行い、数 L 単位で試験製造し、精製系の初期検討および合成物の抗原性を検討する。さらに、より良い抗原設計やエピトープ解析のための基礎情報となる HTLV-1 Env 立体構造の解明を X 線結晶構造解析により試みる。(株) UMN ファーマは、バキュロウイルス・昆虫細胞系を用いたインフルエンザ HA ワクチン開発の実績があり、GMP グレードでの製造も可能であることから、基礎研究の結果がシームレスに臨床開発に繋がり、迅速な HTLV-1 感染症予防ワクチンの実用化が期待される。

## E. 結論

HTLV-1 感染症を流行地域から減少させるために感染阻止を目指したワクチン開発を目的とし、感染防御抗原として機能することが予想される Env タンパク質合成系構築を試みた。哺乳類培養細胞タンパク質合成系を用いて可溶性 Env タンパク質の作製を試みたところ、三量体化させることにより可溶性三量体型 Env タンパク質の合成に成功した。しかしながら、哺乳類培養細胞タンパク質合成系による可溶性三量体型 Env タンパク質合成は収率と精製度が悪く、ワクチン抗原製造系として適さないと考えられた。今後、実用的なワクチン抗原製造系確立を目指し、日本国内で GMP グレードの昆虫細胞タンパク質合成系を有する (株) UMN ファーマと共同で三量体型 HTLV-1 Env タンパク質合成の検討を進めていく予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Senchi K, Matsunaga S, Hasegawa H, Kimura H, Ryo A. Development of oligomannose-coated liposome-based nasal vaccine against human parainfluenzavirus type 3. *Front Microbiol.* 2013 Nov 26;4:346.
- 2) Niikura K, Matsunaga T, Suzuki T, Kobayashi S, Yamaguchi H, Orba Y, Kawaguchi A, Hasegawa H, Kajino K, Ninomiya T, Ijiro K, Sawa H. Gold nanoparticles as a vaccine platform: influence of size and shape on immunological responses in vitro and in vivo. *ACS Nano.* 2013 May 28;7(5):3926-38.
- 3) 鈴木 忠樹、長谷川 秀樹【感染症と癌、病理からのメッセージ】 HTLV-1 と白血病・リンパ腫 病理と臨床(0287-3745)31 巻2号 Page146-150 2013.02