

## 2. 学会発表

- 1) 水上 拓郎, 滝澤 和也, 栗林 和華子, 平松 竜司, 倉光 球, 山崎 淳平, Hall William, 長谷川 秀樹, 山口 一成, 浜口 功 成人T細胞白血病マウスモデルを用いた癌幹細胞ニッチ形成における破骨細胞の機能解析と破骨細胞を標的とした治療法の開発 第156回日本獣医学会学術集会 岐阜 2013.8
- 2) 長谷川 秀樹 脳炎・脳症の病理 第18回日本神経感染症学会総会 宮崎 2013.9
- 3) 松永 智子、長谷川 秀樹、菱澤 方勝、高折 晃史、梁 明秀 無細胞合成 HTLV-1 全長タンパク質を用いた血清中微量抗 HTLV-1 抗体検出法の開発 第61回日本ウイルス学会学術集会 神戸 2013.11

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 (出願)  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし

## 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

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長  
研究協力者 松岡 佐織 国立感染症研究所エイズ研究センター研究員

**研究要旨** HTLV-1 感染症は ATL (成人 T 細胞白血病) 等の重篤な疾病発症に結びつくことから、その感染・発症防御法の開発は重要課題である。本研究では、HTLV-1 感染細胞を標的とする細胞性免疫反応の有効性を検討することを目指し、標的抗原候補として重要と考えられる Tax 抗原特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 反応の解析を進めることとした。平成 25 年度は、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ける tax cDNA 量を解析し、少なくとも移植後 3 週目まで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。

### A. 研究目的

本邦の HTLV-1 感染者数は 100 万人以上と推定されている。HTLV-1 感染症は ATL (成人 T 細胞白血病) あるいは HAM (HTLV-1 関連脊髄症) 等の重篤な疾病発症に結びつくことから、その感染・発症の防御法の開発は重要課題である。近年の母乳による感染予防対策だけでは不十分であることも指摘されており、HTLV-1 感染症克服に向け、ワクチン開発は重要な戦略である。

本研究では、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。

HTLV-1 は潜伏感染を呈し、感染細胞において HTLV-1 抗原の多くはその発現が抑制されている。そのため CTL が認識しうる標的抗原も限られていると考えられ、どの標的抗原特異的 CTL 反応の誘導が HTLV-1 感染細胞の排除あるいは ATL 発症阻止につながるかをすることは重要である。これまでの文献等をもとに、本研究では標的抗原候補として重要と考えられる HTLV-1 Tax を標的とする CTL 反応を中心とした解析を進めることとした。平成 24 年度には、Tax トランスジェニックマウス由来の mATL 細胞を移植した同系マウスにおける Tax 特異的 CTL 反応の誘導を確認したが、平成 25 年度は、この 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。

## B. 研究方法

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。研究代表者との共同実験で 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。

## C. 研究結果

mATL 細胞移植後 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 (図 1)。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。

## D. 考察

本研究で 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。平成 24 年度に 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、今年度の結果は、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。

## E. 結論

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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.

### 2. 学会発表

- 1) Nakamura M, Takahara Y, Matsuoka S,

Matano T. Reinforcement of CD8<sup>+</sup> cell capacity to control viral replication by therapeutic vaccination under antiretroviral therapy in SIV-infected rhesus macaques. The 31st annual symposium on non-human primate models for AIDS, Atlanta, GA, USA, 11/4/2013

- 2) 中村碧、高原悠佑、松岡佐織、三浦智行、小柳義夫、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗.

サルエイズモデルにおける抗 HIV 薬投与下の CTL 誘導治療ワクチン接種による SIV 増殖抑制能の増強効果の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、11/22/2013.

**G. 知的財産権の出願・登録状況**

特になし

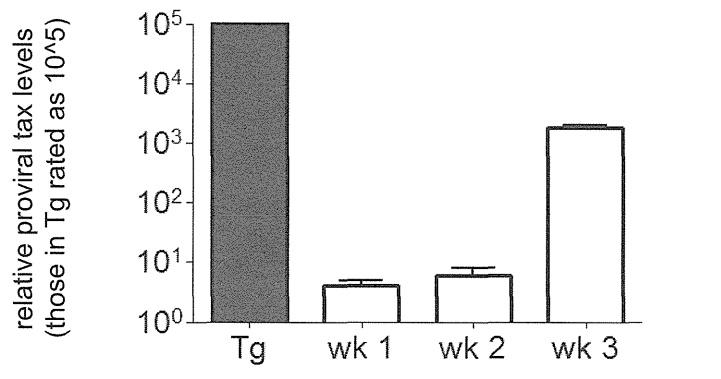


図 1. Taxトランスジェニックマウス由来mATL細胞移植マウスのtax cDNA量  
Taxトランスジェニックマウス由来細胞のtax cDNA量を10<sup>5</sup>とし、移植後1週目・2週目・3週目の脾臓由来細胞のtax cDNA量を相対値で示した。

## 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

研究分担者 梁 明秀 横浜市立大学 医学部微生物学 教授  
研究協力者 松永智子 横浜市立大学 医学部微生物学

**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)は、成人 T 細胞白血病・リンパ腫 (ATL) や HTLV-1 関連脊髄症(HAM)等を発症する原因ウイルスである。HTLV-1 感染者における関連疾患の生涯発症リスクは感染者の数%と少ないが、大都市を中心に感染者数は増加しつつある。現在、HTLV-1 の感染や関連疾患を予防する方法やワクチンは確立されていないため、感染および発症予防ワクチンの開発が望まれている。我々は、昨年度までに、コムギ無細胞タンパク質合成系により作製した可溶化全長 HTLV-1 ウイルスタンパク質と簡便で迅速な検出が可能な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を用いた抗原抗体反応の検出系を構築した。本年度は、本検出法を活用し、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。

### A. 研究目的

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型(Human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1)は、成人 T 細胞白血病・リンパ腫 (ATL) などの血液系の悪性疾患や HTLV-1 関連脊髄症(HTLV-1 associated myelopathy:HAM)等の重篤な神経疾患を引き起こす原因ウイルスである。HTLV-1 感染者における関連疾患の生涯発症リスクは感染者の数%と少ないが、現在 HTLV-1 感染者は全国で増加傾向にあり、上記の疾患の発症予防法の開発に向けた基礎研

究を進めることは重要である。しかしながら、HTLV-1 感染の防御や ATL の発症を予防するワクチンや効果的な治療薬は開発されていない。近年、ATL や HAM 発症患者における患者血清中の HTLV-1 特異的抗体のプロファイリングが報告され、発症患者血清中の抗体価と疾患発症の関連性が解明されつつある。しかしながら、報告されている手法は、培養細胞への遺伝子導入により合成したウイルスタンパク質を患者血清を用いて免疫沈降する方法であり、定量性に問題がある。また一般的

に結合能の弱い抗体は検出できない。

今回、我々は、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性全長 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. コムギ無細胞系による HTLV-1 タンパク質の合成

HTLV-1 (strain Japan ATK-1 subtype A)がコードする gag, env, tax-1, hbx, p27rex, p27I, p30II のヒトコドン最適化人工遺伝子を合成し、無細胞タンパク質発現ベクター pEU-bls-S1 (bls; biotin ligation site GLNDIFEAQKIEWHE, S1: linker sequence LHPPPPRIS) に導入した。作製した pEU ベクターを鋳型に SPu primer 及び AODA2303 primer を用いて PCR 法により転写鋳型を作製し、SP6 polymerase を用いた転写反応により mRNA を合成、続いてコムギ無細胞合成系・重層法によりタンパク質合成を行った。タンパク質のビオチン化は、下層にコムギ無細胞系で合成した biotin ligase 1 $\mu$ l (~50ng/ $\mu$ l) および終濃度 0.5 $\mu$ M Biotin を加えることにより行った。また、タンパク質合成では、界面活性剤である Brij35 や塩化亜鉛 ZnCl<sub>2</sub> の添加によりウイルスタンパク質の可溶化を亢進させた。

### 2. 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

まず、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。特異的抗体が存在しない場合は、ビーズ同士が近接できないためシグナルが検出されないというアイデアに基づいている。

(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. HTLV-1 タンパク質の合成

コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて作製した HTLV-1 タンパク質、Gag, Env, Tax-1, HBZ は、不溶化タンパク質であった。しかしながら、翻訳反応液中に界面活性剤 Brij35 を添加することで、30-80%程度可溶化率が亢進した。また、Gag および TAX は Zn<sup>2+</sup>を含む構造を持つため、Brij35 と同時に塩化亜鉛 ZnCl<sub>2</sub> を加えることでより構造が安定していると考えられる。

## 2. 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。

## 3. 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

本研究において、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

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. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) Senchi K, Matsunaga S, Hasegawa H, Kimura H, Ryo A. Development of oligomannose-coated liposome-based nasal vaccine against human parainfluenza virus type 3. *Front Microbiol.* In press.
- 3) 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.

### 2. 学会発表等

- 1) Satoko Matsunaga, Akihide Ryo: Generation and utilization of full-length recombinant proteins of Human T-cell leukemia virus type 1. HUPO2013, Yokohama, 2013.9.
- 2) 松永智子、長谷川秀樹、菱澤方勝、高折晃史、梁明秀：無細胞合成 HTLV-1 全長タンパク質を用いた血清中微量抗 HTLV-1 抗体検出法の開発. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 兵庫, 2013 年 11 月.

**G. 知的財産権の出願・登録状況**

特になし



## 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

研究分担者 外丸 詩野 北海道大学大学院医学研究科 准教授

**研究要旨** 成人T細胞白血病・リンパ腫(ATL)や HTLV-I 関連脊髄症(HTLV-I associated myelopathy: HAM) 等の HTLV-I 関連疾患は、HTLV-I 感染者(キャリア)に 50 年近い潜伏期を経て発症する重篤な疾患であり、ウイルスに対する免疫応答の減弱や異常が感染細胞の増加につながり、疾患発症に関わっていることが推定されている。HTLV-I の感染予防や関連疾患の発症予防のためには有効なワクチン開発が望まれているが、ワクチン効果を判定する目的、あるいはウイルスに対する免疫病態を検討する目的において、より有用なモデル動物の開発が必要である。

HTLV-I に対する免疫応答には T 細胞応答が重要であり、プロテアソームは T 細胞の免疫応答に重要な役割を果たしている。さらに、プロテアソームの機能は加齢により変化し、自己免疫疾患の発症や免疫老化に関連することが注目されており、プロテアソームの機能異常は HTLV-I 関連疾患の免疫病態に関連している可能性が考えられる。過去 2 年間の研究成果により、プロテアソーム機能の減弱した遺伝子改変マウス(老化マウスモデル、 $\beta$  5t-Tg)では、MLR 反応の低下やサイトカイン産生、細胞性免疫の異常等、免疫老化に類似した異常を呈することが明らかとなった。本年度では、ワクチン効果を判定する目的、あるいは HTLV-I 関連疾患の免疫病態を解析する目的で、班長の長谷川らが開発した Tax トランスジェニックマウス(ATL 発症モデル)と  $\beta$  5t-Tg を交配し、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)を作製した。

### A. 研究目的

HTLV-I 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。HTLV-I 関連疾患の免疫病態が明らかとなり、有効なワクチンが開発されることで、HTLV-I 関連疾患の発症予防が期待される。

### B. 研究方法

$\beta$  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。

### C. 研究結果

搬入した 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。

### D. 考察

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。

### E. 結論

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。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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
- 10) Miyatake Y, Oliveira AL, Jarboui 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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
2. 学会等での講演、発表  
国際会議
- 1) Miyatake, Y., André L.A. Oliveira., Mohamed Ali Jarboui., Ota, S., Tomaru, U., Teshima, T., William W. Hall and Kasahara,

M., : Epithelial cells protect survival of adult T-cell leukemia/lymphoma cells. 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses HTLV 2013, Montreal, Quebec, Canada, June 26 to 30, 2013

#### 国内会議

- 1) 外丸詩野：プロテアソームの機能異常と病態 第102回日本病理学会総会 札幌、2013
- 2) 中沢大悟、外丸詩野、西尾妙織、渥美達也、笠原正典、石津明洋：好中球細胞外トラップ (NETs) の異常と MPO-ANCA 関連血管炎の発症 第102回日本病理学会総会 札幌、2013
- 3) 川上 愛、飯沼千景、脇 雅、山口まどか、外丸詩野、笠原正典、吉木敬、石津明洋：自己血管内皮細胞反応性 NKT 細胞による血管炎発症モデル 第102回日本病理学会総会 札幌、2013
- 4) 宮武由甲子、Oliveira Andre L.A.、Jarbouli Mohamed Ali、太田秀一、外丸詩野、豊嶋崇徳、Hall William W.、笠原正典：成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (ATLL) の病態における正常上皮細胞の役割 第102回日本病理学会総会 札幌、2013
- 5) 池下隼司、宮武由甲子、大塚紀幸、外丸詩野、笠原正典：アテローム性動脈硬化症とヒト NKG2D リガンド MICA/B との関わりについての検討 第102回日本病理学会総会 札幌、2013
- 6) 紺野沙織、外丸詩野、岸本葉奈、石津明洋、笠原正典：プロテアソームの発現異常における免疫応答の変化 第102回日本病理学会総会 札幌、2013
- 7) 今本鉄平、中沢大悟、大塚紀幸、外丸詩野、笠原正典、石津明洋：顕微鏡的多発血管炎と血栓症は MPO-ANCA と好中球細胞外トラップを介して関連する 第102回日本病理学会総会 札幌、2013
- 8) 山本 岳、藤井真理子、大塚紀幸、光部兼六郎、櫻井宏治、外丸詩野、石津明洋、笠原正典：HELLP 症候群に合併した hepatic rupture の一剖検例 第102回日本病理学会総会 札幌、2013
- 9) 味藤 静、外丸詩野、大塚紀幸、石津明洋、笠原正典：リツキシマブ投与後に日和見感染症を併発した顕微鏡的多発血管炎の一剖検例 第102回日本病理学会総会 札幌、2013
- 10) 紺野沙織、外丸詩野、石津明洋、笠原正典：プロテアソームの発現異常による免疫応答の変化 第46回北海道病理談話会 (病理分科会) 札幌、2013
- 11) 外丸詩野：プロテアソームの機能異常と病理作用 第59回日本病理学会秋期特別総会、甲府、2013
- 12) Konno S, Tomaru U, Ishizu A, Kasahara M : Aberrant proteasomal expression affects T cell differentiation and functions. 第42回日本免疫学会学術集会 千葉、2013
- 13) Kawakami A, Iinura C, Waki M, Yamaguchi M, Tomaru U, Kasahara M, Yoshiki T, Ishizu A : Establishment of invariant NKT cell clone from vasculitis-prone rats, which recognizes autoantigen but not  $\alpha$ -galactosylceramide presented by CD1d. 第42回日本免疫学会学術集会 千葉、2013

- 14) 岩崎沙理、藤澤孝志、桑原博昭、外丸詩野、笠原正典、石津明洋、鈴木 昭：鑑別に苦慮した胸腺腫瘍の一例：Type A thyma から胸腺癌へのスペクトラムは存在するか？ 第 33 回日本胸腺研究会 東京、2014

**G. 知的財産権の出願・登録状況**

特になし

## 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

研究分担者 田中 正和 関西医科大学 微生物学講座 助教

**研究要旨** ヒト免疫系を基盤とした HTLV-1 関連疾患発症予防ワクチンの開発を目的に、感染細胞の白血病様増殖と花弁様分葉核を持つリンパ球の出現を含む HTLV-1 感染個体の病態、および抗ウイルス抗体や細胞障害性 T 細胞の誘導等のヒト免疫系を再現する HTLV-1 感染ヒト化マウスの系を構築した。同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。その結果、40 アミノ酸長の 12 種類の Tax ペプチドワクチン混合物の予備投与により、経鼻、経皮、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。

### A. 研究目的

成人 T 細胞白血病(ATL)や HTLV-1 関連脊髄症(HAM)の原因となるヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型(HTLV-1)の感染者は本邦に 100 万人以上存在するが、これら HTLV-1 関連疾患にたいする有効な治療法は未だ確立されていない。さらに、これまで HTLV-1 キャリアは九州・沖縄等南西日本に集中していたが、近年の疫学調査では、関東や関西の大都市圏で増大していることが報告されており、ウイルス排除と HTLV-1 関連疾患の発症予防を目指した対策が重要な課題である。

我々は 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。そこで本年度は、この HTLV-1 感染ヒト化マウスの系おける抗

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。

### B. 研究方法

#### 1. Tax 発現 EL-4 リンパ腫細胞株の同種移植系

U3 領域を HTLV-1 U3 に組み換えた、GFP-Tax 融合蛋白質(Gax)発現レトロウイルスベクターを感染させた EL4 マウス T リンパ腫細胞株 (EL4/Gax)  $5 \times 10^6$  個を、マウス背部に皮下移植し、経時的に腫瘍体積をノギスにて計測した。

## 2. EL4/Gax 同種移植系へのワクチン接種およびアジュバント

Tax DNA ワクチンは、pCG-Tax 50  $\mu\text{g}$ 、pCG-GM-CSF 10  $\mu\text{g}$ 、CpG-oligo 10  $\mu\text{g}$ を筋肉内投与した。Tax ペプチドワクチンは、Tax 全アミノ酸配列 (353 a.a.) を 12 分割し、ペプチド間で 5~8 アミノ酸の重複を持った 40 アミノ酸長のロングペプチドを合成し、1 匹につき 1 回あたり各 8  $\mu\text{g}$ 、合計 96  $\mu\text{g}$ を使用した。アジュバントとして、コレラ毒素 B サブユニット(CTB) [1  $\mu\text{g}$ ] および TLR 7/8 アゴニスト(R848) [15  $\mu\text{g}$ ] を使用、比較した。

ワクチンの筋肉内および皮下投与は 10 日間隔で 3 回、経鼻投与は 20 日間隔で 2 回接種した。ワクチン最終接種の 10 日後に EL4-Tax 細胞を皮下移植し、7 日毎に腫瘍体積をノギスにて計測した。

Tax ペプチドワクチンの皮下投与については、従来の注射法(ペプチド 96  $\mu\text{g}$  + CTB 1  $\mu\text{g}$ )に加え、マイクロニードル法(ペプチド 6  $\mu\text{g}$  + CTB 0.5  $\mu\text{g}$ )を比較検討した。

## 3. 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 マウス下肢大腿骨骨髓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。

骨髓移植 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。

## 4. ヒト化マウスへのワクチン接種

骨髓移植 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。

## 5. 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。

## 6. 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。

## C. 研究結果

### 1. EL4/Gax 同種移植系を用いた Tax ペプチ

## ドワクチンおよび投与方法の評価

Tax ペプチドワクチンの皮下投与による EL4/Gax の腫瘍増殖抑制効果を検討したところ、EL4/Gax 細胞接種 15 日目において、陽性対照としての Tax DNA ワクチン筋肉内接種群は、ワクチン非投与対象群の 8.1 %まで増殖が抑制されたのに対し、Tax ペプチド + CTB 群は 27.7 %、Tax ペプチド + R848 群は 34.5 %までの抑制効果が認められた。さらに EL4-Gax 細胞投与 22 日目では、それぞれ Tax DNA ワクチン群では 4.8 %、Tax ペプチド + CTB 群は 16.9 %、Tax ペプチド + R848 群は 19.8 %にまで腫瘍細胞の増殖抑制が観察され、DNA ワクチンには及ばないものの、ペプチドワクチンも腫瘍増殖抑制効果を有していることが示された。

さらに、ヒアルロン酸を主成分とするマイクロニードル・パッチ法を用いて Tax ペプチドの接種を行ったところ、容量の制限から DNA およびペプチドの量が約 16 分の 1 であったものの、同様の腫瘍増殖抑制効果（EL4/Gax 細胞投与 22 日目において、それぞれ Tax DNA ワクチン群で 30.7 %、Tax ペプチド + CTB 群で 32.2 %の細胞増殖）を得ることが出来た。

R848 をアジュバントとした Tax ペプチドの経鼻滴下によるワクチン接種では、EL4-Gax 細胞投与 15 日目において、ワクチン非投与対象群の 9.1 %まで腫瘍増殖増殖を抑制した。

## 2. 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。

## D. 考察

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。

## E. 結論

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。

Blood.123(3): 346-55.2014.

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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) 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.

### 2. 学会発表

- 1) 第 156 回日本獣医学会学術集会関連集会 獣医解剖サテライトフォーラム、2013 年 9 月 19 日 (岐阜)、田中正和 ヒト化マウスを用いた HTLV-1 感染モデル

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

特になし

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

| 著者氏名                                | 論文タイトル名                                    | 書籍全体の編集者名               | 書籍名         | 出版社名  | 出版地 | 出版年  | ページ   |
|-------------------------------------|--|-------------------------|-------------|-------|-----|------|-------|
| 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 | 日本ラクトフェリン学会第5回学術集会実行委員会 | ラクトフェリン2013 | 日本医学館 | 東京  | 2013 | 43-50 |

雑誌

| 発表者氏名   | 論文タイトル名  | 発表誌名                  | 巻号        | ページ     | 出版年  |
|---|--|-----------------------|-----------|---------|------|
| Senchi K, Matsunaga S, <u>Hasegawa H</u> , Kimura H, <u>Ryo A</u> .   | Development of oligomannose-coated liposome-based nasal vaccine against human parainfluenzavirus type 3.               | Front Microbiol.      | 4         | 346     | 2013 |
| Niikura K, Matsunaga T, Suzuki T, Kobayashi S, Yamaguchi H, Orba Y, Kawaguchi A, <u>Hasegawa H</u> , Kajino K, Ninomiya T, Ijiri K, Sawa H. | Gold nanoparticles as a vaccine platform: influence of size and shape on immunological responses in vitro and in vivo. | ACS Nano              | 7(5)      | 3926-38 | 2013 |
| 鈴木 忠樹、 <u>長谷川 秀樹</u>  | 【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                 | 31巻<br>2号 | 146-150 | 2013 |
| Shi S, Seki S, <u>Matano T</u> , Yamamoto H.  | IL-21-producer CD4+ T cell kinetics during primary simian immunodeficiency virus infection.                            | Microbes Infect       | 15        | 697-707 | 2013 |
| Iwamoto N, Takahashi N, Seki S, Nomura T, Yamamoto H, Inoue M, Shu T, Naruse TK, Kimura A, <u>Matano T</u> .                                | Control of SIV replication by vaccine-induced Gag- and Vif-specific CD8+ T cells.                                      | J Virol               | 88        | 425-433 | 2013 |
| Furukawa, A., Sugase, K., Morishita, R., Nagata, T., Kodaki, T., Takaori, A., <u>Ryo A.</u> , Katahira, M.                                  | Quantitative analysis of the location- and sequence-dependent deamination by APOBEC3G using real-time NMR.             | Angew. Chem., Int. Ed | In press  |         | 2014 |

|  |   |                               |            |           |      |
|--|---|-------------------------------|------------|-----------|------|
| 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            | 7 (4)      | e2188     | 2013 |
| Ando H, Sato T, Tomaru U, Yoshida M, Utsunomiya A, Yamachi J, Araya N, Yagishita N, Coler-Reilly A, Shimizu Y, Yudoh K, Hasegawa Y, Niishioka K, Nakajima T, Jacobson S, Yamano Y. | Positive feedback loop via astrocytes causes chronic inflammation in virus-associated myelopathy.   | Brain                         | 136 (Pt 9) | 2876-2887 | 2013 |
| 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)      | 357-365   | 2013 |
| Miyatake Y, Oliveira AL, Jarbouai 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)    | 1832-1842 | 2013 |
| Yamada Y, Tomaru U, Ishizu A, Kiuchi T, Kasahara M, Matsuno Y.   | Expression of thymoproteasome subunit $\beta 5t$ in type A/B thymoma.   | J Clin Pathol                 | 67(3)      | 276-278   | 2014 |
| 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)      | 557-566   | 2014 |
| 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        | 346-55    | 2014 |