

201318022B

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23年度～平成25年度 総合研究報告書

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23年度～平成25年度 総合研究報告書

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23～25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. 総合研究報告書

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. 研究成果の刊行に関する一覧表 3 1

III. 研究成果の刊行物・別刷 3 7

I. 総合研究報告書

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

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。コムギ無細胞系を用いて HTLV-1 がコードするすべてのタンパク質(Gag, Env, Tax-1, HBZ, p27REX, p27I, p30II) について、生理活性を保持した状態で完全長にて合成することを試み成功した。また、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、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。更に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ワクチンメーカーと共同で三量体型 HTLV-1 Env の合成を進めている。またヒト化マウスに対する Tax ペプチドワクチンの皮下あるいは経鼻投与の効果を検討したところ、HTLV-1 感染細胞の増殖抑制が観察され、同マウスモデルが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開発に有用な手段となることが示された。また HTLV-1 感染細胞を標的とする有効な細胞性免疫反応の誘導法開発に結びつけることを目指し、標的抗原候補として最重要と考えられる Tax 抗原特異的細胞傷害性 T リンパ球(CTL)反応の解析を進めた。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由来の ATL 細胞を用い、この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。またプロテアソームの機能異常は HTLV-1 関連疾患の免疫病態に関連している可能性が考えられ加齢と共に発症する ATL の発症モデルとして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、 β 5t-Tg)を用いて発症モデル動物を作製している。

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。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。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。

今回、我々は、HTLV-1 ワクチンの開発や患者血清中の微量抗体の測定に向け、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて HTLV-1 全長タンパク質の合成を行った。また、AlphaScreen 法を活用することで、血清中の微量抗体の検出法を新たに開発した。

HTLV-1 感染細胞を標的とする有効な細胞傷害性 T リンパ球(CTL)反応の誘導法開発に結びつけることを目指すこととした。

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 CTL 誘導は感染防御に結びつくことが期待されることに加え、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。我々はこれまでセンダイウイルス(SeV)ベクターを用いたワクチンシステムを開発し、その優れた CTL 誘導能を明らかにしてきた。そこで本研究では、まず、この SeV ベクターワクチンの潜伏感染ウイルス抗原特異的 CTL 誘導能を検証した。

次に、このデリバリーシステムを HTLV-1 感染症に対するワクチンとして応用するには、どの HTLV-1 抗原を標的とする CTL 反応を誘導すべきかを検討する必要がある。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。したがって、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知ることが重要である。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 抗原を標的とする CTL 反応を中心とした解析を推進した。Tax トランス

ジェニックマウス由来の ATL 細胞を利用して、この ATL 細胞を移植した同系マウスにおいて、Tax 特異的 CTL 反応を解析するとともに、リンパ球中の tax cDNA 量を測定し移植細胞の動向を解析した。

HTLV-1 関連疾患の発症予防において、抗 HTLV-1 感染細胞ワクチンは有効な対策の一つであるが、その開発には感染モデル動物系の開発が必須である。ところが、HTLV-1 は比較的狭い宿主特異性を示し、さらに感染が成立した場合も、宿主免疫制御機構が必ずしもヒトと一致しない可能性がこれまでも問題となってきた。

そこで我々は、重症免疫不全 NOG マウスにヒト造血幹細胞を移植することでヒト造血・免疫系を再構築したヒト化マウスを作成し、これに HTLV-1 を感染させることで HTLV-1 感染マウスモデル系の樹立を試み、同マウスにおける感染細胞の動態および抗 HTLV-1 免疫の誘導を検討した。

さらに、未発症感染者(ウイルスキャリア)に対する発症予防ワクチンの検討に資する目的で、ヒトと同様の経口感染による低レベルでの慢性感染モデルの作出も試み、宿主免疫との相互作用を解析した。

最後に抗 HTLV-1 ワクチン開発における同 HTLV-1 感染ヒト化マウスの有効性を検証するため、これまで HTLV-1 感染細胞に対する細胞障害性 T 細胞(CTL)の主要な標的であることが明らかとなっている Tax 蛋白のロングペプチド投与のワクチンとしての効果を検討した。

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。本研究では、プロテアソーム機能の減弱した β 5t-Tg を用い、プロテアソーム機能の低下と免疫応答の変化を明らかにした。続いて、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有用なモデルを樹立するために、新たなモデルである Tax/ β 5t ダブルトランスジェニックマウス(Tax/ β 5t-Tg)を作製した。

B. 研究方法

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。

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。

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、0.45 μ m 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 μ 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。

マウス

6~8 週齢、雌の BALB/c マウス一群 3 匹をワクチン接種群として利用した。また、交配のため 1 群あたり同週齢の BALB/c マウス雄 1 匹を利用した。動物への処置は国立感染症研究所の定める動物実験実施規定に則り、苦

痛を与えないように考慮した。

ワクチン接種と交配

マウス 1 匹あたり、HTLV-1 gp46 10 μ g をアジュバントである合成二本鎖 RNA Poly(I:C) 10 μ g と共に接種した。ワクチン接種は麻酔下で実施した。経鼻ワクチン接種群では片鼻 7.5 μ L ずつ(計 15 μ L)を鼻腔内に滴下し、皮下ワクチン接種群では 50 μ L を頸部の皮下に注射した。また、コントロール群としてワクチン未接種群を設けた。ワクチン接種は 2 週間間隔で計 3 回実施し、最後のワクチン接種後に雄マウスをケージに加えることで交配を行った。

採材とサンプル調製

各ワクチン接種前に部分採血を行い、ワクチン接種に伴う継時的な抗体応答の評価に用いた。交配の結果、出産した母親マウスに関しては、出産後 0 から 4 日の間に搾乳を行い母乳中の抗体応答の評価に用いるサンプルとした。搾乳は、仔マウスと母親マウスが接しないように同一ケージ内で分離しておき、約 6 時間後に母親マウスにオキシトシンを接種し吸引することにより行った。なお、搾乳は麻酔下で行った。回収した母乳は PBS で 5 倍に希釈し、遠心により得られた脂肪分を含まない上清をサンプルとし、測定まで -80 $^{\circ}$ C に保存した。

抗 gp46 抗体の定量

血清中あるいは母乳中に含まれる gp46 に対する抗体は、ワクチンとして用いた gp46 を 20 μ g/mL の濃度でコーティングした EIA プレートを用いた ELISA 法により定量を行った。gp46 に対する濃度既知のモノクローナ

ル抗体を標準物質とし、血清あるいは母乳サンプル中の IgG 抗体を定量した。

コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた HTLV-1 全長タンパク質の合成

HTLV-1 ATK-1 (HTLV1A) がコードする 7 種類のウイルス遺伝子 (gag, env, tax-1, hbx, p27rex, p27I, p30II) について、ヒトコドンに最適化した人工遺伝子を合成した。これらの遺伝子を制限酵素処理後、コムギ無細胞タンパク質合成系の発現ベクターである pEU-E01-bls-S1 にサブクローニングした (bls: biotin ligation site GLNDIFEAQKIEWHE, S1: linker sequence LHPPPPRIS)。上記の手法にて作製した pEU ベクターを鋳型に、SPu primer および AODA2303 primer を用いて PCR 法により転写鋳型を作製した。これら転写鋳型を SP6 polymerase を用いて転写し、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タンパク質合成系で合成した biotin ligase 1 μ l (~50ng/ μ l) および 終濃度 0.5 μ M Biotin を加えることにより行った。

HTLV-1 全長タンパク質の発現確認および定量

合成されたタンパク質は、Western Blotting により Streptavidin-HRP を用いて検出した。タンパク質の可溶化は、タンパク質合成液を 15000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10min で遠心し、その上清を回収、泳動することで確認した。可溶化が困難であった Gag, Tax-1, HBZ タンパク質に関して、塩化亜鉛や界面活性剤 Brij35 をタンパク質合成中に加え、タンパク質の可溶化条件を検討した。

タンパク質の定量は、作製した SDS-PAGE に

アプライし、電気泳動後、ゲルを固定化し、Quick-CBB PLUS(Wako, 178-00551)で染色した。ゲルはルミノ・イメージ・アナライザー LAS-3000(FUJIFILM)でスキャンし、汎用解析ソフト Multi Gauge(FUJIFILM)にて定量した。

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、AlphaScreen 法を用いた微量抗体検出法の開発

まず基質として用いる HTLV-1 全長タンパク質の N 末端にビオチン化配列を付加して無細胞合成し、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、横浜市立大学倫理委員会の承認を得た。実施に際しては倫理委員会規則に則り、当該患者(感染者)の同意を得た検体の

みを用いた。

SeV ベクター接種による抗原特異的 CTL 増強効果を検証

慢性ウイルス潜伏感染における SeV ベクター接種による抗原特異的 CTL 増強効果を検証するため、以前のワクチン接種後の SIV 感染実験で SIV 複製が制御されたアカゲサル 2 頭を用いた。この 2 頭では、ウイルス血症は検出限界以下で、慢性 SIV 潜伏感染の状態となっていた。この 2 頭のサルの感染慢性期 (SIV 感染後約 1 年) に、Gag 抗原発現 SeV (SeV-Gag) ベクターを経鼻接種した。接種直前および接種後 1 週目の末梢血リンパ球を用いて、ペプチド刺激後のインターフェロン γ (IFN- γ) 誘導を細胞内免疫染色で検出することにより、抗原特異的 CTL 反応を測定した。

Tax 特異的 CTL 反応

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 細胞を用いた実験を行った。研究代表者との共同実験で、mATL 細胞 1×10^6 を腹腔に移植された同系 B6 マウスより移植後 1 週目・2 週目・3 週目に採取された脾臓および非移植マウスの脾臓からリンパ球を分離した。このリンパ球を用い、Tax オーバーラッピングペプチドプール刺激後の特異的 IFN- γ 誘導を検出することにより、Tax 特異的 CTL 反応を測定した。さらに、Light Cycler を用いた tax cDNA 定量法を構築し、リンパ球から抽出した 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、所属機関の動物実験委員会の審査・承認後に開始した。

ヒト化マウスの作製

日本赤十字近畿さい帯血バンクより提供された研究用臍帯血より磁気ビーズを用いて CD133 陽性造血幹細胞を分離した。予め CD133 陰性細胞由来 DNA で HLA 型を決定した HLA-A2402 の CD133 陽性細胞 5×10^4 個を、5Gy の γ 線全身照射処置した 7 週齢 NOG-SCID マウス大腿骨骨髓内へ移植した。

HTLV-1 の感染

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、 γ 線照射 (10Gy) により増殖能を欠失させた HTLV-1 感染細胞株を、腹腔内あるいは経口で、それぞれ 2.5×10^6 個あるいは 1.0×10^7 個投与し感染を成立させた。HTLV-1 感染細胞株としては、MT-2 細胞、あるいは HTLV-1 感染分子クローン DNA の 293 細胞導入により産生させた HTLV-1 を感染した Jurkat 細胞 (JEX 細胞) を用いた。感染後 2 週間毎に末梢血を採取し、感染ヒト血球細胞の動態を FACS 解析にて、また HTLV-1 感染細胞数の計測を定量的 PCR 法にて行った。感染ヒト化マウスは体重の減少を指標に供死し、脾臓および各種浸潤臓器における感染細胞の解析を行った。

FACS

蛍光標識された各種抗ヒト血球表面抗原抗体 (CD45、CD19、CD33、CD14、CD1a、CD4、CD8、CD25、CD45RO、CD45RA) を用いてフローサイトメトリー (BD FACS Canto™II: BD) を行い、骨髓、末梢血および脾臓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。

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 β -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。

HTLV-1 抗体価

HTLV-1 抗体測定は、ゼラチン凝集(PA)法(富士レビオ)を用いて解析した。

CTL 測定

抗原特異的 CTL 細胞集団の検出・定量は蛍光標識 HLA-A*2402 HTLV-1 Tax301-309 テトラマー(MBL)を用いフローサイトメトリー法で解析した。

サイトカイン測定

HTLV-1 感染ヒト化マウス血清中のヒトサイトカイン・ケモカイン(IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF、CCL4/MIP-1 β)の濃度は multiplex beads-based assay (Bio-Plex Human Cytokine 8-plex Assay Beads Assay)を用いて測定した。

ワクチンおよびアジュバント投与

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、使用した[各 8 μ g、合計 96 μ g/匹/回]。アジュバントとして、皮下投与の場合はコレラ毒素 B サブユニット(CTB) [1 μ g] を、鼻腔投与の場合は TLR 7/8 アゴニスト(R848) [15 μ g] を使用した。

ワクチンの皮下投与は、7 日間隔で 3 回、経鼻投与は 15 日間隔で 2 回接種した。ワクチン最終接種 7 日後に γ 線照射 HTLV-1 感染細胞株(JEX 細胞)を投与した。その後 7 日毎、FACS ならびに感染細胞の定量用として採血を行った。

(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。

β 5t-Tg マウス

β 5t-Tg の作製には、発現プロモーター pCAGGS(CMV-IE、chicken β -actin、rabbit β -globin)を用い、C57BL/6N(B6)をバックグラウンドとして、マウス β 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。実験には雄性 β 5t-Tg と雌性 B6 野生型(wild type; WT)マウスを交配した F1 マウスを用いた。コントロールマウスは 4~24 週齢の雄性 B6 WT マウスを三共ラボより購入した。MLR 反応には BALB/c マウスを三共ラボより購入した。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、 β 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、 β 5t および Tax 遺伝子導入の状態を確認した。

細胞分離

β 5t-Tg および WT マウスを犠牲死させ、

脾臓を摘出し、セルスクレーパー(BD Falcon)と 100 μ m のセルストレイナー(BD Falcon)を用いて細胞を分離し、PBS に浮遊させた。細胞浮遊液に抗体を反応させ、MACS(Magnetic activated cell sorting, Miltenyi Biotec)により分離した。分離した細胞の純度はフローサイトメトリーにより確認した。

フローサイトメトリー

各週齢の β 5t-Tg および WT マウスより採血を行い、犠牲死後に脾臓、胸腺を摘出した。末梢血は溶血後に一次抗体を添加し、4°C で 30 分染色し、洗浄した後にフローサイトメトリーによる解析を行った。脾臓、胸腺はセルスクレーパーと 100 μ m のセルストレイナーを用いて細胞を分離し、PBS に浮遊させた。PBS 浮遊細胞を溶血後、一次抗体を添加し、4°C で 30 分染色し、洗浄した後にフローサイトメトリーによる解析を行った。フローサイトメトリーは FACS Calibur (BD Bioscience) を使い、Cell Quest software(BD Bioscience) でデータを解析した。抗体は PE-conjugated anti-mouse CD4、FITC-conjugated anti-mouse CD8、PerCP-conjugated anti-mouse CD3、PE-Cy5-conjugated anti-mouse TCR β 、PerCP-Cy5.5-conjugated anti-mouse CD69(いずれも BD Bioscience) とそれに対応するアイソタイプコントロールを用いた。

リンパ球混合反応(MLR)

β 5t-Tg および WT マウスを犠牲死させ、脾臓を摘出し、セルスクレーパー(BD Falcon)と 100 μ m のセルストレイナー(BD Falcon)を用いて細胞を分離し、PBS に浮遊させた。マイトマイシン C 処理を行った BALB/c 脾細胞を stimulator として MLR 反応を行い、細胞増

殖率を検討した。

サイトカイン、ケモカイン測定

MLR 反応を行った well 中の培養液を用い、マルチプレックスサスペンションアレイを用いて、各種サイトカイン、ケモカイン量を測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は北海道大学の動物実験指針に基づいて行った。

C. 研究結果

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。

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

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 Expi293TM 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。Expi293TM 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 μ 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。

最初に、ワクチンの抗原として用いる HTLV-1 gp46 の発現を試みた。哺乳類細胞を用いた発現系では、コドン出現頻度を最適化した発現プラスミドを用いた場合でも gp46 の発現は認められなかった。そこで、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた gp46 の合成を行った。可溶化条件の検討を行った結果、界面活性剤として 0.025%の Brij35 を添加した場合に、ほぼ全ての合成 gp46 が可溶化することが明らかになった。

次にこのコムギ無細胞タンパク質合成系により作製された gp46 をワクチンとして、マウスに対するワクチン接種を行った。また、経鼻インフルエンザワクチンの研究において、高い粘膜アジュバント活性を示すことが知られている合成二本鎖 RNA である Poly(I:C)をアジュバントとして用いた。10 μ g の gp46 を 10 μ g の Poly(I:C)と共に、経鼻あるいは皮下から 2 週間毎に計 3 回の接種を行った。皮下ワクチン接種を行った群においては、2 回のワクチン接種で gp46 に対する血清中 IgG 抗体応答の誘導が認められた(3 回目のワクチン接種前)が、経鼻ワクチン接種を行った群では 2 回のワクチン接種で抗体応答を誘導することが出来なかった。

コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた HTLV-1 全長タンパク質の合成

HTLV-1 タンパク質の合成を効率化するために、ヒトコドンに最適化した人工 HTLV-1 遺伝子を合成した。次に真核生物型無細胞タンパク質合成技術であるコムギ胚芽無細胞タンパク質合成システムを用いて、リコンビナント HTLV-1 全長タンパク質の作製を試みた。無細胞合成用の pEU-E01-bls-S1 ベクターに各

遺伝子を導入し、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いてビオチンが付加された HTLV-1 タンパク質の合成を行った。上記の手法にて作製した pEU ベクターを鋳型に PCR 法により転写鋳型を作製した。これら転写鋳型を SP6 polymerase を用いて転写し、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タンパク質合成系で合成した biotin ligase 1 μ l (~50ng/ μ l) および 終濃度 0.5 μ M Biotin を添加した。合成したビオチン化タンパク質を遠心分離後、SDS-PAGE で泳動し、Streptavidin-HRP を用いて検出を行った。その結果、7種類の全ての全長タンパク質の合成が確認された。収量としては 1~2 μ g/150 μ l と、通常のタンパク質とほぼ同様の合成効率を確保できた。また、ビオチン化効率も 50%以上の合成タンパク質で認められ、今後のアッセイ系の構築に本法が活用できることが確認された。

HTLV-1 全長タンパク質の可溶化の検討

次にタンパク質の可溶化を検討するため、ビオチン化全長タンパク質を、ストレプトアビジンセファロースビーズによるカラム法を用いて簡易精製した。次に可溶化および非可溶化分画を回収し、Western Blotting を行った。その結果、Gag、HBZ および Tax タンパク質の可溶性がきわめて低いことが判明した。そこで、合成したタンパク質に塩化亜鉛および界面活性剤である Brij35 を各濃度で添加し、可溶化を試みた。その結果、Gag は 1 μ M の塩化亜鉛および 0.05% の Brij35 の添加、Tax は 1 μ M の塩化亜鉛の添加、HBZ は 0.05% の Brij35 の添加により顕著に可溶性が亢進することが判明した。特に HBZ の可溶化率は 40

~50%程度に上昇した。上記の検討により可溶化できた HBZ リコンビナントタンパク質を用いて、モノクローナル抗体の作製を試みた結果、抗原特異的なモノクローナル抗体の作製に至った。また、Tax リコンビナントタンパク質をリポソーム内に封入することに成功した。本標品を新たな HTLV-1 ワクチンの抗原として活用する予定である。

AlphaScreen を用いた血清中の抗 HTLV-1 抗体測定法の開発

上記の手法で合成された、N末端がビオチン化された HTLV-1 タンパク質に特異的抗体または血清を添加後、AlphaScreen 試薬(スロレプトアビジンコートアクセプタービーズ、プロテイン A コートドナービーズ)を付加し 60 分、26 $^{\circ}$ C でインキュベート後、AlphaScreen 検出器(EnvisionTM, パーキンエルマー社)で検出を行った。予備実験として市販の抗 HTLV-1 抗体を段階希釈し抗体の検出を行った。上記で合成した HTLV-1 タンパク質と抗体を混ぜ合わせ、AlphaScreen 法を用いて HTLV-1 タンパク質に対する特異的抗体の有無およびエピトープを検出した。その結果、Env 抗体、Gag 抗体について、容量依存的に抗体価を簡便に測定することができた。

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(HAM, ぶどう膜炎、悪性リンパ腫)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、治療による寛解時に HTLV-1 抗体の減少がみられた。

SeV-Gag ベクターワクチン

SeV-Gag ベクター接種に用いたサル 2 頭では、SIV 感染前のワクチン接種後、Gag206-216 および Gag241-249 エピトープ特異的 CTL 反応誘導が認められたが、感染慢性期にはこれらの CTL 反応レベルは低下し、SeV-Gag ベクター接種直前には、検出限界付近あるいはそれ以下であった。SeV-Gag ベクター経鼻接種後 1 週目の末梢血リンパ球を用いた解析では、Gag206-216 特異的 CTL および Gag241-249 特異的 CTL 反応の増強が認められた。

mATL 移植マウス

mATL 移植マウスの研究では、Tax 特異的 CTL 反応誘導が認められた。特に移植後 3 週目の解析で、Tax46-100 特異的および Tax301-353 特異的 CTL 反応が確認された。一方、tax cDNA の解析では、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。この tax cDNA 量は、移植後 1 週目よりむしろ 3 週目の方が高い傾向にあった。

ヒト化マウスにおけるヒト血球細胞の増殖・分化

γ 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 (5x10⁴ 個) を注入・移植したところ、2 ヶ月後には骨髓中に 90% 以上の効率で CD45 陽性ヒト血球細胞の生着が達成され、B 細胞、骨髓系前駆細胞、単球/マクロファージ、樹状細胞の分化・増殖が確認された。さらに移植 4 カ月後において

は、末梢血中に CD4 および CD8 陽性の CD3 陽性成熟 T 細胞がヒト正常個体と同等の CD4/CD8 比で発現しており、CD45RO 陽性メモリー T 細胞への分化も確認された。

ヒト化マウスへの HTLV-1 感染

末梢血中にヒト T 細胞が確認された段階のヒト化マウス (骨髓移植 4 ヶ月後) 腹腔内に、放射線照射 (10Gy) した MT-2 細胞 (2.5x10⁶) あるいは JEX 細胞 (5.0x10⁶) を接種し、HTLV-1 感染を行った。感染 2 週間後から末梢血 CD3 陽性ヒト T 細胞数の増大が観察され、感染 2~3 カ月で 100 倍以上にまで達した。肝臓ならびに脾臓の腫大も観察され、末梢血には異型リンパ球数の出現が見られた。さらに感染 4 カ月以降では、ATL 患者末梢血で特徴的に見られる花弁様分葉核を持つ細胞が観察された。

抗 HTLV-1 抗体の産生

HTLV-1 感染ヒト化マウスにおける抗 HTLV-1 ヒト宿主免疫の発現を確認するため、血清中における抗 HTLV-1 抗体の産生を測定した。PA 法で抗 HTLV-1 gag 抗体価を測定したところ、感染 4 週で抗体価が最高 1000 倍にまで上昇した後減少し、一部の個体において 8 週目以降に次のピークが得られた。IgM から IgG へのクラススイッチを想定されたため、この時期の血清に対して抗ヒト IgM および抗ヒト IgG 抗体を用いた吸収実験を行なったところ、それぞれ抗体価が半分まで減少し、抗 HTLV-1 gag IgG 抗体の発現が確認された。

Tax 特異的 CTL の発現

HTLV-1 感染ヒト個体においては、抗 Tax CTL が HTLV-1 感染細胞に対する主要な宿主

免疫を担うことが報告されていることから、HLA-A*2402 造血幹細胞で作成した HTLV-1 感染ヒト化マウスにおける Tax CTL の発現を蛍光標識 HLA-A*2402 HTLV-1 Tax301-309 テトラマーを用いて定量した。その結果、脾臓 CD8 T 細胞の 1%前後が陽性を示し、感染ヒト個体末梢血と同等の結果が得られた。さらに、Tax ペプチド添加下、同一マウス脾臓細胞由来フィーダー細胞との共培養ではテトラマー結合細胞が 20%以上にまで上昇し、同マウス体内における機能的抗 Tax CTL の存在が確認された。

経口感染による病態変化

感染細胞株のヒト化マウス腹腔内投与による感染においては、ATL 様の病態が再現されるものの、感染細胞の急激な腫瘍増殖の結果、抗 HTLV-1 宿主免疫は早期に破綻し、感染数ヶ月以内に感染個体は白血病死に至る。そこで、感染細胞と宿主免疫の平衡関係が維持されるウイルスキャリアと同等の感染状態を確立するため、ヒトにおける主要な感染経路である経口による感染を試みた。

1.0x10⁷ の JEX 細胞をヒト化マウスに経口投与したところ、末梢血中の CD3 陽性ヒト T 細胞数、T 細胞における CD25 陽性画分の割合はいずれも、対象群と比べて差は認められなかったものの、投与3週目前後から、0.1~1%のヒト血球細胞においてウイルス感染が観察され、ほとんどの個体が20週以上生存した。また、血清中の抗 HTLV-1 抗体価を測定したところ、感染3週より持続的な抗体の産生が観察された。さらに感染17週の血漿中のヒトサイトカインの発現を計測したところ、IFN- γ の産生が対照群と比べ有意に増大しており、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13 についても増加傾向

が確認された。

抗 CD8 抗体投与による感染細胞数の変化

感染細胞株の経口投与により樹立した HTLV-1 感染ヒト化マウスでの低感染状態の維持における、抗 HTLV-1 宿主免疫の関与を明らかにする為、抗ヒト CD8 抗体の腹腔内投与による細胞障害性 T 細胞の血中からの枯渇・除去を試みた。抗ヒト CD8 IgG を隔日で3回経口感染ヒト化マウス腹腔内に投与したところ、投与1週目においてヒト CD8T 細胞の完全な除去が観察され、この状態は数週間以上維持された。この間における末梢血ヒト T 細胞中のプロウイルス量を測定したところ、投与前平均 0.2%前後であった感染率が、投与1週後に、平均 1.2%にまで上昇した。抗体投与3週目には、感染細胞の数は平均 0.4%程度にまで減少し、その後も維持された。抗体投与1週後の各感染個体での感染率の上昇は、5~30 倍に達し、持続感染状態を示す経口感染ヒト化マウス体内での感染細胞の制御における CD8 陽性細胞障害性 T 細胞の関与が強く示唆された。

ヒト化マウスを用いた経下投与方法ならび経鼻投与方法による感染細胞数の検討

HTLV-1 感染ヒト化マウスの、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開発における動物モデルとしての有効性を評価するため、皮下および経鼻投与方法での Tax ペプチドワクチンの効果を検討した。Tax 蛋白全長を 5~8 アミノ酸の重複を持ちつつ 12 分割して作成した 40 アミノ酸長の Tax ペプチド混合物(各 5 μ g)を、アジュバント(CTB あるいは R848)と共に、非感染ヒト化マウス皮下注射(隔週3回)あるいは経鼻滴下(15日間

隔 2 回)により投与した。ワクチン最終投与 1 週後に、 γ 線照射 HTLV-1 感染 Jurkat 細胞株 (JEX 細胞)を投与したところ、感染 6 週におけるプロウイルス量が、ワクチン皮下投与群および経鼻投与群では、それぞれ、対照群の平均 28.9%(73.3 %、10.3 %、3.2 %)および平均 21.3%(55.5 %、5.8 %、2.6 %)まで抑制された。

β 5t-Tg マウス末梢血の解析

4~24 週齢の β 5t-Tg マウス末梢血の白血球数、リンパ球数、T 細胞分画について、フローサイトメトリーにより解析を行った。その結果、白血球数、リンパ球数に β 5t-Tg と WT マウス間に有意な差は認めなかった。CD3+ T 細胞を検討した結果では一部の週齢で有意差が観察されたが、一定の傾向がなく、4~24 週齢のマウス全体で両群のデータを比較した結果では有意差は認めなかった。その一方で、T 細胞を CD4+ T 細胞と CD8+ T 細胞に分けて CD4/CD8 比を解析した結果では、 β 5t-Tg マウスで有意に CD4/CD8 比が増加していた。

β 5t-Tg マウス脾細胞の解析

4~24 週齢の β 5t-Tg マウス脾細胞の CD3+ T 細胞についてフローサイトメトリーで検討した結果では、 β 5t-Tg と WT マウス間に有意な差は認めなかった。しかしながら、脾細胞中の T 細胞を CD4+ T 細胞と CD8+ T 細胞に分けて CD4/CD8 比を解析した結果では、 β 5t-Tg マウスで有意に比が増加していた。

β 5t-Tg マウス胸腺細胞の解析

4~24 週齢の β 5t-Tg マウス胸腺細胞の分画について、double negative (DN)細胞、double positive(DP)細胞、CD4+ SP 細胞、CD8+ SP 細胞に分けて解析した。その結果、DN 細胞の

割合に β 5t-Tg と WT マウス間で有意な差は認めなかった。その一方、4~12 週齢の β 5t-Tg マウス胸腺細胞では DP 細胞が増加し、CD8+ SP 細胞が減少する傾向にあった。CD4+ SP 細胞に関しては、 β 5t-Tg と WT マウス間に有意差はなかったが、4 週や 8 週齢の β 5t-Tg マウスにおいて CD4+ SP 細胞の割合が減少している傾向が認められた。CD4/CD8 比を算出した結果では、末梢血や脾細胞と同様に β 5t-Tg マウスで有意な比の増加が認められた。

β 5t-Tg マウス胸腺細胞における TCR β 発現の解析

T 細胞受容体 β 鎖(T cell receptor β chain; TCR β)は胸腺細胞の分化に従って発現し、成熟した SP 胸腺細胞では高い TCR β の発現を示す。 β 5t-Tg マウス胸腺細胞における TCR β の発現をフローサイトメトリーにより解析した。TCR β 発現の強さにより 3 段階(dim, low, med+high)に分けて解析した結果、 β 5t-Tg マウス胸腺細胞では TCR β 発現が低い CD8+ SP 細胞の割合が増加し、中等度~高発現を示す CD8+ SP 細胞が減少していることが明らかとなった。そのような TCR β 発現の低下は CD8+ SP 細胞に特異的であり、DP 細胞や CD4+ SP 細胞では WT マウスと同程度の発現が観察された。

β 5t-Tg マウス胸腺細胞における CD69 発現の解析

CD69 分子は早期活性化マーカーとしてリンパ球活性化の指標として広く用いられている。また、胸腺では分化途中のセレクションを受けている T 細胞にも発現が認められることから、 β 5t-Tg マウス胸腺細胞のセレクションの状態を検討するために、CD69 の発現を

フローサイトメトリーにより解析した。その結果、 β 5t-Tg マウス胸腺細胞の DP 細胞や CD8+ SP 細胞では CD69 の発現低下が認められ、 β 5t-Tg マウスでは CD8+ SP 細胞の分化成熟の異常があることが考えられた。

MLR 反応の解析

β 5t-Tg 由来脾細胞ではコントロール WT 由来脾細胞に比べ、MLR 反応が低下していた。また、老齢 WT でも若齢マウスに比して MLR 反応が低下していた。

サイトカインケモカインの発現

β 5t-Tg 由来脾細胞では T 細胞刺激時に IL-2 や IFN- γ など、Th1 系のサイトカイン産生が低下していることが明らかになった。また、ケモカインの産生低下を認めた。

Tax/ β 5t-Tg マウスの作製

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、 β 5t-Tg と交配し、現在 10 匹の Tax/ β 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

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、哺乳類培養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を用いて可溶性 Env タンパク質の作製を試みた。哺乳類細胞では単量体型 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。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ワクチン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。共同研究を行うワクチンメーカーは、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。

またコムギ無細胞タンパク質合成系を活用し、全長 HTLV-1 抗原タンパク質の作製を行った。本研究の特色としては、これまでの研究ではタンパク質の可溶化が困難であった HTLV-1 タンパク質の合成・可溶化を簡便に行うことができること及び AlphaScreen 法を用いたハイスループットな抗体検出系を確立する点である。ウイルス研究における課題の一つに、可溶化ウイルスタンパク質の合成がある。HTLV-1 タンパク質においても、大腸菌や生細胞を用いた合成ではタンパク質の凝集が起こるため、その後の解析に使用することが困難であった。本研究では、翻訳合成液内に界面活性剤を加えることで容易に可溶性タンパク質を合成できるコムギ無細胞タンパ

ク質合成系を用いることにより、ウイルスタンパク質の可溶化に成功した。これにより、ウイルスタンパク質の大量合成、精製により様々な研究への応用が可能となる。また、感染阻止、発症阻止の為にワクチン開発にはそれぞれの対象疾患に適した抗原の検討が必要である。本研究では、AlphaScreen 法を用いた抗体検出系の確立を行い、可溶化ウイルスタンパク質と感染患者検体中に含まれる抗 HTLV-1 抗体の有無を調べた。これらのアッセイの結果により、HTLV-1 感染による様々な疾患に特異的な抗ウイルス抗体のプロファイリングが進み、ワクチン候補タンパク質の探索や同定した抗体による感染阻害効果などワクチン開発に繋がると考えられる。

サルでの SeV ベクター接種実験では、ウイルス潜伏感染慢性期においても SeV ベクター接種により潜伏ウイルス抗原特異的 CTL 増強が可能であることが確認された。

mATL 細胞移植実験では、移植後の Tax 特異的 CTL 反応の誘導が初めて示された。移植した mATL 細胞における Tax 発現は mRNA レベルでは確認されているものの蛋白レベルでは確認されていなかったが、本研究では mATL 細胞の移植により Tax 抗原特異的 CTL 反応が誘導されることが明らかとなった。一方、移植マウスにおける tax cDNA の検出結果は、移植細胞が少なくとも 3 週間は維持されることを示している。また、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 細胞増殖の可能性を示唆している。これらの結果は、移植後誘導される 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 細胞の排除の

有無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 の有効性の評価に適した動物モデル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している。

ヒト造血幹細胞の NOG マウス骨髄内移植法により作成したヒト化マウスは、これまで報告されている種々のヒト化マウスと比較し、ヒト造血細胞の生着率および T 細胞の分化・維持の程度において優れていることが示唆された。同ヒト化マウスに HTLV-1 を感染させることにより、感染 CD25 陽性 CD4 T 細胞の異常増殖に加え、ATL に特徴的である花弁様分葉核を持った T リンパ球の出現を見たことから、ATL の病態の多くを再現していると考えられる。

また、感染の経過とともに特定の感染クローン選択が進む一方、抗 HTLV-1 免疫の成立が確認されたことから、感染個体内における感染細胞と宿主免疫との平衡関係が成立している可能性が示唆された。

しかし、HTLV-1 感染細胞株の腹腔内投与による HTLV-1 感染ヒト化マウスは急性の病態変化を伴うため、宿主免疫の制御が困難であった。そこで、HTLV-1 感染細胞株を経口投与し感染を成立させたところ、未発症感染者(ウイルスキャリア)と同等な持続感染モデルを確立することが出来た。このモデル系においては、低いウイルス量の維持とともに、有意な量の抗 HTLV-1 抗体やサイトカインの発現等、抗 HTLV-1 宿主免疫の誘導が確認され、更に抗 CD8 抗体投与による細胞障害性 T 枯渇実験では、一過的な感染細胞数の増加が観察されたことから、低ウイルス量維持にお