

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

HTLV-1 関連炎症性希少疾患の病態解析と免疫療法開発研究

研究代表者：京都大学ウイルス研究所 教授 松岡雅雄
研究分担者：京都大学ウイルス研究所 講師 安永純一郎

研究要旨

HTLV-1 bZIP factor (HBZ)は HTLV-1 感染細胞にて恒常的に発現している唯一のウイルス遺伝子であり、HBZ トランスジェニックマウス (HBZ-Tg) が全身の炎症と T 細胞性リンパ腫を発症することから、HTLV-1 の病原性に必須の役割を果たすと考えられる。HBZ-Tg 由来の CD4 陽性 T 細胞は接着・遊走能が亢進し、組織浸潤性が高いことが示唆されている。本課題での解析から、HBZ-Tg では制御性 T リンパ球 (regulatory T-cell: Treg) が増加しているものの、Foxp3 の発現は不安定であり、exFoxp3 T リンパ球への転換とそれに伴う IFN- γ の過剰産生が炎症に関与していることが示唆された。一方、本課題ではサルモデルを用いて新しい免疫療法開発の基盤研究を行った。マウス、サルを用いて HBZ および Tax 発現ワクシニアウイルスが特異的免疫を誘導することを確認した。またサル白血病ウイルス (simian T-cell leukemia virus type 1: STLV-1) に自然感染しているニホンザルが HTLV-1 感染者と感染動態、病態がよく似ていることを見出し、ワクチン開発に極めて有用であることを見出した。今後の新規治療法・予防法の開発に繋がると考えられる。

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 (adult T-cell leukemia: ATL) や HTLV-1 関連脊髄症 (HTLV-1-associated myelopathy: HAM) 等の炎症性疾患を惹起する。HTLV-1 関連疾患の発症機構には感染細胞の増加が関与しており、HTLV-1 のマイナス鎖にコードされる HTLV-1 bZIP factor (HBZ) が、感染細胞の増殖に重要な役割を果たしていると考えられている。我々が樹立した HBZ トランスジェニックマウス (HBZ-Tg) ではほぼ全例で肺、皮膚、腸管など多臓器に T 細胞浸潤による炎症が起こり、約 4 割の頻度で T 細胞性リンパ腫を合併する。また、末梢血中のエフェクターメモリー T 細胞および制御性 T リンパ球 (regulatory T-cell: Treg) の増加を認め、これらの表現型は HTLV-1 感染者と類似していることから、HTLV-1 関連疾患の病態解析に極めて有用と考えられる。本課題では HTLV-1 関連疾患における HBZ の役割を、HBZ-Tg を用いて解析することを目的とした。さらには、HTLV-1 感染者と感染動態が類似するサル白血病ウイルス (simian T-cell leukemia virus type 1: STLV-1) 感染ニホンザルを用いて、Tax および HBZ ワクチンの有効性評価を行い、新規発症予防法開発の基盤研究を行った。

B . 研究方法

HTLV-1 関連炎症性疾患の分子機構解析とワ

クチン有効性評価

1) HBZ-Tg を用いた炎症の分子機構解析と HTLV-1 感染者との比較解析

HBZ-Tg および HTLV-1 感染者由来のリンパ球に関して、T 細胞表面抗原マーカー、接着因子発現、増殖能・遊走能、網羅的発現解析を行い、疾患発症に関与するシグナル経路、分子の同定を試みた。

2) Tax および HBZ 搭載ワクシニアウイルスの有効性評価

HBZ 発現ワクシニアウイルス、Tax 発現ワクシニアウイルスを野生型マウスに接種し、免疫応答誘導能を評価した。さらに HTLV-1 感染サルにおける免疫誘導能と抗ウイルス効果を解析した。

(倫理面への配慮)

京都大学倫理委員会にてヒト遺伝子解析に関する承認を得ている (課題名「HTLV-1 関連炎症性疾患患者における HTLV-1 感染動態と病態の解析」、課題番号 G602)。本研究に用いられたすべての患者検体は、十分な説明と書面による同意を得て採取された。臨床情報と検体とは非連結匿名化した。動物実験は京都大学ウイルス研究所動物委員会の承認を得ている (課題名「HTLV-I による発がんの分子メカニズムの解明」・承認番号 D13-02、課題名「霊長類を用いた HTLV-1、STLV-1 生体内感染動態の解

C. 研究結果

HTLV-1 関連炎症性疾患の分子機構解析とワクチン有効性評価 (松岡、安永)

1) HBZ-Tg を用いた炎症の分子機構解析と HTLV-1 感染者との比較解析

HBZ-Tg では皮膚、肺、腸に T リンパ球の浸潤を認める。本課題遂行中に組織解析を行った重度の皮膚炎を有する HBZ-Tg の中には、唾液腺のリンパ球浸潤、ぶどう膜炎の合併を認めるケースもあり、HU や SS との関連も示唆された。HBZ-Tg では IFN- γ を産生する T リンパ球が増加しており、炎症の発症に関与していると考えられた。HAM 患者でも同様の IFN- γ 産生 T リンパ球が増加していることから、HBZ による IFN- γ 産生誘導の分子機構について解析を行った。フローサイトメトリーにより、HBZ-Tg にて増加している Treg は naturally occurring Treg (nTreg) の表面抗原マーカー Helios の発現が低いことから、末梢で誘導される inducible Treg (iTeg) であることが判明した。一方で HBZ-Tg 由来の Treg は ex vivo での培養により Foxp3 の発現を失いやすく、IFN- γ を産生する Foxp3 陰性 T リンパ球 (exFoxp3 T リンパ球) へと変換されることを見出した。さらに T リンパ球の遊走に関わるケモカインレセプター Cxcr3 の発現が亢進しており、この点も HAM 患者由来の T リンパ球と同じであった。HBZ-Tg の炎症局所において、IFN- γ 産生 T リンパ球の浸潤が認められることから、HBZ による exFoxp3 T リンパ球の増加とそれに伴う IFN- γ の過剰産生が炎症に関与していると考えられた。

2) Tax および HBZ 搭載ワクシニアウイルスの有効性評価

免疫原として HBZ と Tax を発現する組換えワクシニアウイルスを作成した。各々の病原性欠失変異体を抗原として発現させ、HBZ は LxxLL モチーフに点変異を導入した変異体、Tax は NF-kB 活性化機能を欠損する M22 変異体を用いた。これらを野生型 C57BL/6 野生型マウスに接種したところ、ELISPOT にて HBZ および Tax のペプチドに反応する CD4 および CD8 陽性 T 細胞の出現を認め、反復接種にて増加した。これらの組換えワクシニアウイルスがワクチンとして免疫応答を誘導しうることを確認した。HTLV-1 感染者の動物モデルとして、STLV-1 感染ニホンザルの有用性を評価した。京都大学霊長類研究所にて飼育中のニホンザルの約 60% が STLV-1 に自然感染していた。これらの末梢

血を解析し、CD4 陽性 T リンパ球優位に STLV-1 が感染していること、プロウイルス量には大きな個体差があること (0.001% から 53%) が判明した。次世代シーケンサーを用いた感染細胞クローナリティの解析により、プロウイルス量が高い個体では感染細胞のクローナルな増殖が認められた。研究期間中 1 頭の STLV-1 感染ニホンザルが T 細胞性リンパ腫を発症し、その細胞では STLV-1 のクローナルな組み込みが証明されたことから STLV-1 は HTLV-1 と同様に T リンパ系腫瘍の原因となることが明らかとなった。STLV-1 由来の Tax および STLV-1 bZIP factor (SBZ) は HTLV-1 の Tax、HBZ と同等の機能を有しており、STLV-1 感染ニホンザルは HTLV-1 感染者と病態が類似する有用な霊長類モデルであると考えられた。

ATL の治療法として臨床応用されている抗 CCR4 抗体 (モガムリズマブ) を STLV-1 感染ニホンザルに投与したところ、投与開始後速やかに感染細胞の減少を認めた。ELISPOT にて、モガムリズマブ投与後では、投与前に比較して Tax および SBZ 特異的 CD4、CD8 陽性 T 細胞が増加していることが判明し、モガムリズマブが STLV-1 に対する免疫機能を活性化させた可能性が示唆され、実際投与終了後も長期間にわたりプロウイルス量は投与前よりも低く維持された。

D. 考察

本研究結果から、HBZ が炎症を惹起する機序として、HBZ が Foxp3 の発現を誘導し iTreg を増やす一方で Treg としての機能は抑制されており、結果として IFN- γ を産生するエフェクター様の T 細胞を増やすことが一因であると考えられた。Tax は免疫原性が高いことが知られており、本研究でも Tax ワクチンにより高い免疫応答が獲得できた。一方 HBZ は HTLV-1 感染細胞に恒常的に発現するため、格好の治療標的となり得る。本研究では HBZ 発現ワクシニアウイルスが特異的免疫応答を誘導しうることを確認した。今後より有効なワクチンの開発に応用可能である。興味深い所見として、抗 CCR4 抗体投与後のニホンザルでは、投与前に比較し STLV-1 に対する免疫応答が増強していることが明らかとなった。その機序として抗 CCR4 抗体投与により CCR4 を発現する Treg が減少し、各々の抗原に対応する特異的免疫細胞が活性化されたと考えられた。モガムリズマブとワクチンの併用効果が期待できる。

E. 結論

1) HBZ が炎症を引き起こす機序に、Foxp3 発現

の不安定化と exFoxp3 細胞の増加による IFN- γ 産生亢進が関与する。

2) Tax および HBZ ワクチンは特異的免疫応答を誘導する。

3) STLV-1 感染ニホンザルは HTLV-1 感染者の有用な動物モデルであり、抗 CCR4 抗体投与によりウイルス特異的免疫応答を賦活しうる。

F . 健康危険情報

特になし

G . 研究発表

1 . 論文発表

1. Tanaka-Nakanishi A, Yasunaga J, Takai K, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP Factor Suppresses Apoptosis by Attenuating the Function of FoxO3a and Altering Its Localization. **Cancer Res**, 74; 188-200, 2014.
2. Miura M, Yasunaga J, Tanabe J, Sugata K, Zhao T, Ma G, Miyazato P, Ohshima K, Kaneko A, Watanabe A, Saito A, Akari H, Matsuoka M. Characterization of simian T-cell leukemia virus type 1 in naturally infected Japanese macaques as a model of HTLV-1 infection. **Retrovirology**, 10; 118, 2013.
3. Matsuoka M and Yasunaga J. Human T-cell leukemia virus type 1: replication, proliferation and propagation by Tax and HTLV-1 bZIP factor. **Curr Opin Virol**, 3; 684-691, 2013.

2 . 学会発表

1. Miura Michi, Junko Tanabe, Kenji Sugata, Tiejun Zhao, Guangyong Ma, Paola Miyazato, Jun-ichiro Yasunaga, Masao Matsuoka: STLV-1 infected Japanese macaque as a model of HTLV-1 infection: 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses 2013, Holiday Inn Montreal-Midtown, Montreal, Canada, June26-30, 2013.
2. Azusa Tanaka-Nakanishi, Jun-ichirou Yasunaga, Ken Takai, Masao Matsuoka: Molecular mechanisms of apoptosis suppression by HTLV-1 bZIP factor in HTLV-1 infected cells: 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses 2013, Holiday Inn Montreal-Midtown, Montreal, Canada, June26-30, 2013.
3. Guangyong Ma, Jun-ichiro Yasunaga, Jun fan, Shin-ichi Yanagawa, Masao Matsuoka: HTLV-1 mediated dysregulation of the Wnt pathways:

Roles of Tax and HBZ: 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses 2013, Holiday Inn Montreal-Midtown, Montreal, Canada, June26-30, 2013.

4. Akihiro Kawatsuki, Jun-ichiro Yasunaga, Masao Matsuoka: HTLV-1 bZIP factor suppresses c-Fos transcription and impairs T cell activation: HTLV and Related Viruses 2013, Holiday Inn Montreal-Midtown, Montreal, Canada, June26-30, 2013.
5. 松岡雅雄、安永純一朗: ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型による発がん: Tax と HBZ の拮抗と協調: 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場(兵庫県) 2013 年 11 月 10-12 日
6. 安永純一朗: ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型による病原性発現メカニズム: 第 4 回ナノバイオ創薬研究シンポジウム、京都大学杉浦ホール、2013 年 3 月 9 日
7. 安永純一朗: HTLV-1 がコードする二つのがん遺伝子 tax と HTLV-1 bZIP: 第 15 回白馬シンポジウム in 名古屋、(独)国立病院機構名古屋医療センター(愛知) 2013 年 7 月 19-20 日
8. 田中梓、安永純一朗、高井健、松岡雅雄: HTLV-1 bZIP factor(HBZ)は転写因子 FoxO3a の機能を阻害することによりアポトーシスを抑制する: 第 6 回 HTLV-1 研究会・シンポジウム(東京医科学研究所講堂) 2013 年 8 月 25-26 日
9. 田中梓、安永純一朗、松岡雅雄: HTLV-1 bZIP factor suppresses intrinsic and extrinsic apoptotic pathways by targeting FoxO3a: 第 72 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜(神奈川) 2013 年 10 月 3-5 日
10. 三浦未知、趙鉄軍、馬広勇、安永純一朗、松岡雅雄: Simian T-cell leukemia virus type 1-infected Japanese Macaques as a model for HTLV-1 research: 第 72 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜(神奈川) 2013 年 10 月 3-5 日
11. Jun-ichiro Yasunaga, Guangyong Ma, Jun Fan, Shin-ichi Yanagawa, Masao Matsuoka: Perturbation of the Wnt pathway by HTLV-1 is important in viral replication and cell proliferation: 第 75 回日本血液学会学術集会、ロイトン札幌・さっぽろ芸文館・札幌市教育文化会館(北海道) 2013 年 10 月 11-13 日
12. 菅田謙治、安永純一朗、三浦未知、明里宏

文、小柳義夫、小原道法、松岡雅雄：組換えウイルスを用いた抗 HTLV-1 ワクチンの作製と Macaque 属での応用：第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場（兵庫県）2013 年 11 月 10-12 日

13. 園直希、馬広勇、萩屋啓太、安永純一郎、松岡雅雄：FBXL11 は HTLV-1 bZIP factor と Tax の機能を共に増強し ATL 細胞の増殖を促進する：第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場（兵庫県）2013 年 11 月 10-12 日

14. 紀ノ定明香、安永純一郎、伊豫田智典、稲葉カヨ、松岡雅雄：HBZ による CD4 陽性 T 細胞増殖促進の免疫学的機序：第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場（兵庫県）2013 年 11 月 10-12 日

H . 知的財産権の出願・登録状況

1 . 特許取得

2 . 実用新案登録

3 . その他