

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

研究課題名：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：川崎医科大学 微生物学 教授 齊藤 峰輝

### 研究要旨

HTLV-1 basic leucine zipper factor (HBZ) は、その発現量が HTLV-1 関連脊髄症患者のプロウイルス量・運動障害度・髄液中炎症マーカー濃度と有意な正の相関を示すこと、HBZ トランスジェニックマウスが CD3, 4 陽性細胞の皮膚・肺への浸潤、サイトカイン産生異常を示すことから、HTLV-1 感染症における慢性持続性炎症形成の原因遺伝子であると考えられている。これまでは HBZ 蛋白質に対する優れた抗体がなかったため、研究の進展に影響を及ぼしてきた。本研究では、HBZ 蛋白質に対する複数のモノクローナル抗体を作製し、HBZ の検出系と定量系を確立した。これらは、今後 HTLV-1 関連炎症性希少疾患の病態を解明するうえで有用なツールとなりうる。

### 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、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-1 関連脊髄症 (HTLV-1-associated myelopathy: HAM) および成人 T 細胞白血病 (Adult T-cell leukemia : ATL) の原因ウイルスである。一方、HTLV-1 感染者の一部に慢性炎症性肺疾患、ぶどう膜炎、多発性筋炎、シェーグレン症候群、リウマチ様関節炎など自己免疫疾患類似の慢性炎症性疾患が発症することが報告されている。ほとんどの HTLV-1 感染者が生涯にわたって未発症の無症候性キャリアとして経過するとはいえ、現在わが国には 100 万人を超える多数の HTLV-1 感染者が存在するため、一刻も早い HTLV-1 関連疾患の病態解明と発症予防法・新規治療法の開発が待たれている。特に、HTLV-1 感染者に発症する自己免疫疾患類似の慢性炎症性希少疾患については、発症頻度、病態を含めその実態がほとんど明らかにされていない。よって、HTLV-1 関連炎症性希少疾患の病態解明はわが国の HTLV-1 対策上きわめて重要である。

HTLV-1 basic leucine zipper factor (HBZ) は、HTLV-1 プロウイルスのマイナス鎖にコードされる遺伝子であるが、その発現量が HAM 患者のプロウイルス量・運動障害度・髄液中炎症マーカー濃度と有意な正の相関を示すこと、HBZ トランスジェニックマウスが CD3, 4 陽性細胞の皮膚・肺への浸潤、サイトカイン産生異常を示すことか

ら、HTLV-1 感染症における慢性持続性炎症形成の原因遺伝子であると考えられている。しかしながら、これまで HBZ 蛋白質に対する優れた抗体がなかったため、研究の進展に影響を及ぼしてきた。本研究の目的は、HBZ 蛋白質に対するモノクローナル抗体を作製し、HBZ の検出系と定量系を確立することで、HTLV-1 関連炎症性希少疾患の病態解明のために有用なツールを提供することである。

### B . 研究方法

2 種類の HBZ ペプチドおよびコムギ無細胞蛋白発現系により作製した組換え HBZ 蛋白質を C57BL/6 マウスに 3 回免疫した後、脾細胞とミエロマ細胞 (SP2/0) をポリエチレングリコールで融合した。HAT 選択後にハイブリドーマの培養上清を用いてスクリーニングを行った。陽性コロニーは限界希釈法によりクローニングした。陽性ハイブリドーマ細胞をマウス腹腔に接種して腹水化させ、ゲル濾過法で IgG を精製した。現在までに以下に示す合計 14 クローンを取得した。

peptide #1 配列 (LRRGPPGEKAPPRGETHRD)  
認識抗体

- pep#1 P6-A7 (Mouse, IgG2b)
- pep#1 P4-E12 (Mouse, IgG2b)

peptide #2 配列 (KAKQHSARKEKMQELGIDG)  
認識抗体

- pep#2 #20-H12 (Mouse, IgG1)
- pep#2 #62-B9 (Mouse, IgG2b)
- pep#2 #39-F2 (Mouse, IgG1)

## 組換え HBZ 蛋白質認識抗体

- ・ コムギ HBZ #1-1 (Mouse, IgG2a)
- ・ コムギ HBZ #2-1 (Mouse, IgM)
- ・ コムギ HBZ #5-1 (Mouse, IgM)
- ・ コムギ HBZ #6-1 (Mouse, IgG1)
- ・ コムギ HBZ #7-1 (Mouse, IgG2b)
- ・ コムギ HBZ #8-1 (Mouse, IgM)
- ・ コムギ HBZ #10-1 (Mouse, IgM)
- ・ コムギ HBZ #12-1 (Mouse, IgM)
- ・ コムギ HBZ #14-1 (Mouse, IgM)

これら 14 クローンに加え、すでに取得済みのラット抗体 (下記) を以降の実験に用いた。

peptide #3(VNYWQGRLEAMWLQ)配列認識抗体  
・ 4B12 (Rat, IgG2b)

作製した抗 HBZ モノクローナル抗体と各種 HTLV-1 感染細胞 (SLB1、MT-2、ILT-M1 など) や HBZ 強制発現細胞 (293T/HBZ-SI) を用いて (1) フローサイトメトリー (2) 蛍光免疫染色 (間接法) (3) ウエスタンブロットティング (4) サンドイッチ ELISA を行った。

## (倫理面への配慮)

本研究は、動物の福祉を考慮して、無駄な苦痛を与えず、かつ与えざるを得ない苦痛であっても最低限とし、使用する匹数を減らして必要最低限の匹数で実験を行うべく十分に計画した上で実験計画書を作成し、川崎医科大学動物実験委員会の承認を得た上で施行した。

## C. 研究結果

取得した新規抗 HBZ モノクローナル抗体を用いてウエスタンブロットティング、フローサイトメトリー、蛍光免疫染色 (間接法) により、HBZ 発現ベクターを強制発現した 293T 細胞のみならず、各種 HTLV-1 感染細胞株で HBZ 蛋白質の発現を確認することができた (図 1)。

抗 HBZ モノクローナル抗体を用いてサンドイッチ ELISA 系を構築し、HBZ 蛋白質を定量的に検出した (図 2)。

## D. 考察

HBZ 蛋白質を特異的に検出可能な複数の抗 HBZ モノクローナル抗体を新規に取得した。現在までのところ HBZ 蛋白質の検出や定量の感度が十分に高いとはいえないため、

より検出感度の高い方法の検討や、より反応性の強いモノクローナル抗体の取得を続ける必要がある。最終的に、患者由来検体 (血清や HTLV-1 感染細胞) 中の HBZ 蛋白質、抗 HBZ 抗体を定量的に検出可能な系を確立し、HTLV-1 感染症における慢性持続性炎症形成メカニズムにおける HBZ の関与を解明したい。

## E. 結論

HBZ 蛋白質を特異的に検出可能な複数の抗 HBZ モノクローナル抗体を新規に取得した。これらの抗体を用いて HBZ 蛋白質を定量的に検出可能なサンドイッチ ELISA 系を構築した。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Saito M. (textbook) HTLV-1. *Encyclopedia of Genetics 2nd Edition*. Stanley Maloy, Kelly Hughes ed. Elsevier, Oxford, UK, 543-545, 2013.
2. 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-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Retrovirology*. 10:51, 2013.
3. Kodama A, Tanaka R, Saito M, Ansari AA, Tanaka Y. A novel and simple method for generation of human dendritic cells from unfractionated peripheral blood mononuclear cells within 2 days: its application for induction of HIV-1-reactive CD4(+) T cells in the hu-PBL SCID mice. *Front Microbiol*. 4:292, 2013.
4. Saito M. (Review) Neuroimmunological aspects of human T cell leukemia virus type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurovirol*. 20:164-174, 2014.
5. 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-infected cells by neutralizing and antibody-dependent cellular cytotoxicity-inducing antibodies against human T cell leukemia virus type-1 envelope gp46. *AIDS Res Hum Retroviruses*. in press, 2014.

6. Saito M. Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into Th17 cells: is this also the case for multiple sclerosis? *Clin Exp Neuroimmunol*. in press, 2014.

## 2. 学会発表

### (発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. 齊藤峰輝、安間恵子、後川 潤、松崎敏男、高嶋 博、松岡雅雄：HTLV-1 関連脊髄症発症関連因子としての HTLV-1 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 30 日，東京  
第 54 回日本神経学会学術大会プログラム p113, 2013.
2. 齊藤峰輝、塩浜 康雄、後川 潤、高嶋 博、大原 義朗：HTLV-1 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 29 日，下関  
第 25 回日本神経免疫学会学術集会抄録集 p119, 2013.
3. Saito M, Tanaka R, Kodama A, Tanaka Y : Complete prevention of HTLV-1 infection in humanized mice (hu-PBL SCID) by a neutralizing monoclonal antibody to envelope gp46. 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. June 27, 2013, Montréal, Canada. *Retrovirology* 11(Suppl 1):09, 2014. doi:10.1186/1742-4690-11-S1-09

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

該当なし

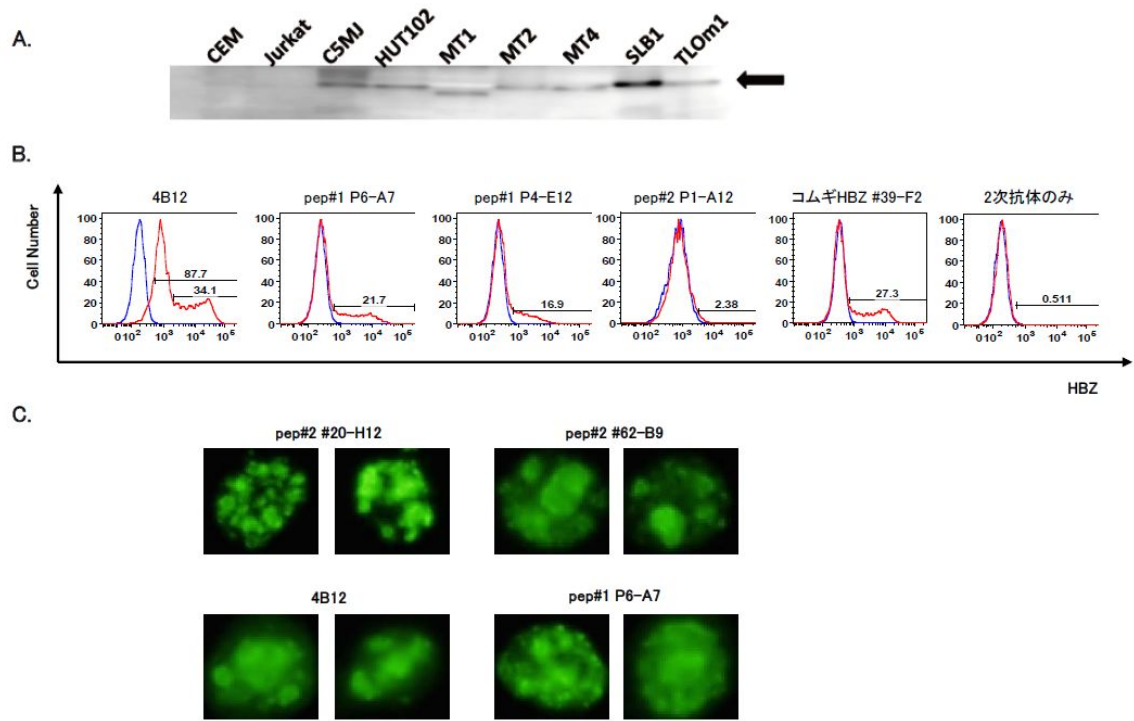
### 2. 実用新案登録

該当なし

## 3. その他

特記なし

図 1：新規抗 HBZ モノクローナル抗体による細胞内 HBZ 蛋白質の検出



A. ウエスタンブロッティング B. フローサイトメトリー C. 蛍光免疫染色（間接法）

図 2：サンドイッチ ELISA 系による HBZ 蛋白質の定量的検出

