

201420056A

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感染モデルを用いた抗HTLV-1薬  
の探索および作用機序の解析

平成26年度 総括研究報告書

研究代表者 上野 孝治

(関西医科大学)

平成27年 3月

## 目 次

### I. 総括研究報告

HTLV-1感染モデルを用いた抗HTLV-1薬の探索および作用機序の解析----- 1

上野 孝治

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）  
総括研究報告書

HTLV-1感染モデルを用いた抗HTLV-1薬の探索および作用機序の解析

研究代表者 上野 孝治 関西医科大学 助教

HTLV-1関連疾患であるATLやHAMは未だ根治的治療法がないため、治療法の開発と並んで発症予防法の開発が急務となっている。いずれの疾患も高プロウイルス量と発症頻度が相関しているため、プロウイルス量を抑えることが発症予防に繋がると考えられる。そこで本研究では個体内でのプロウイルス量を指標として抗HTLV-1薬の探索および作用機序の解析を行う。このような抗HTLV-1薬の効果判定には感染者に類似した感染プロファイルを示す動物モデルが必要とされるものの、これまで適切なモデルは存在しなかったが、我々の研究室ではヒト化マウスを用いた感染モデルの構築に成功した。この感染モデルを用いて抗HTLV-1薬のスクリーニングおよび作用機序の解析を行う。これまでに、スクリーニング系の妥当性を検証し、いくつかの候補化合物が抗HTLV-1薬として有用であることを示した。

本年度は AZT・IFN- $\alpha$  併用投与に関して実験個体数を増やして検討したところ、血中プロウイルス量が有意に低く、期間生存率も亢進することが確認された。また、これまでは血中プロウイルス量が増加し始める前の感染2週間後から薬剤の投与を開始していたが、実際の ATL 治療を想定し、血中プロウイルス量が上昇した後の感染5週間後から投与をしたが、AZT・IFN- $\alpha$  併用投与の有効性は認められなかった。昨年度有効性が確認された 17-DMAG と同じ Hsp90 阻害剤である TAS-116（大鵬薬品工業）について検討を行ったが、コントロール群、薬剤投与群共に、投与中に約4割のマウスが死亡した。薬剤の溶媒あるいは投与の手技に問題があったと考えられる。生存したマウスに関して解析を行ったところ、半数のマウスで血中プロウイルス量が抑制されていたことから、薬剤の有効性が示唆されたが、個体数が少なかったため有意差検定は困難であった。

A. 研究目的

ヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV-1)は予後不良の成人T細胞白血病やHTLV-1関連脊髄症(HAM)などを引き起こす。ATLやHAMなどHTLV-1関連疾患は未だ根本的な治療法は確立されておらず、治療法だけでなく発症予防法の開発が喫緊の課題となっ

ている。これら疾患の発症率は高いプロウイルス量と相関する事が明らかとなっていることから、プロウイルス量の抑制、すなわち新規感染の抑制、感染細胞の増殖抑制、宿主免疫による感染細胞の排除の促進が有効であると予想される。そこで本研究では個体レベルでのプロウイルス量を指標に抗HTLV-1

薬を探索し、新規発症予防法・治療法の開発を行う。

抗HTLV-1薬の効果測定にはヒト免疫存在下でヒト細胞を標的とするHTLV-1感染モデルが必要であるが、近年、申請者らの研究室では、NOG-SCIDマウスにヒト造血・免疫系を再構築したヒト化マウスを構築し、これにHTLV-1を感染させることでATL様の病態を再現することに成功した。

この感染モデルを用いて、これまでの研究からウイルス産生の抑制、免疫賦活化、感染細胞増殖抑制をなど介したプロウイルス量抑制が期待される抗HTLV-1薬候補化合物を評価し、かつその作用機序を明らかにする。抗HTLV-1薬候補化合物として、安全性・開発期間・費用のいずれの面でも臨床応用へのハードルが低い既存の薬物やサプリメントを優先的に試す。

## B. 研究方法

### 【HTLV-1感染マウスモデル作製】

ヒト臍帯血から磁気ビーズ法によりCD133陽性造血幹細胞を単離し、NOG-SCIDマウスの骨髄内に移植した。移植後2～3ヶ月後に採血を行い、ヒト免疫細胞が生着し正常に分化したことを確認した。その後HTLV-1感染細胞を腹腔内投与することでHTLV-1感染を行った。

### 【プロウイルス量の測定】

モデルマウスから血液を採取し、ゲノムDNAを精製した後、HTLV-1 pX領域を増幅するプライマーセットを用いてRT-PCRを行い測定した。

### 【抗HTLV-1薬の投与】

AZT 125mg/ml/匹/日およびIFN- $\alpha$

30000U/ml/匹/日を感染2週後あるいは感染5週後より2週間、週5日経口投与を行った。TAS-116 10mg/kg/日あるいは15mg/kg/日を感染2週後から4週後まで週5日経口投与を行った。その後、経時的に採血しRT-PCRによりプロウイルス量を、FACSにより各種血液細胞数を測定した。

### (倫理面への配慮)

ヒト臍帯血は京阪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が研究内容および倫理項目を審査・許可後、研究用として提供された。また動物実験は本学動物実験管理委員会の承認の下に本学規定および研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針に従って実施した。

## C. 結果

### 1. AZT・IFN- $\alpha$ の抗HTLV-1活性評価

初年度に、AZT、IFN- $\alpha$ 単独投与群、併用群共にCD4陽性T細胞数および血中プロウイルス量の上昇が抑制されることを確認した。特に併用群では投与中止後も細胞数および血中プロウイルス量は低いレベルで長期間維持された。本年度は併用群に関して、実験個体数を増やして確認したところ、初年度と同様、有意に血中プロウイルス量および感染細胞数が低く維持され、投与中止後も感染細胞の増加は全く認められなかった。

### 2. 薬剤投与開始時期の変更

これまでの検討は全て血中プロウイルス量が増加する前の感染2週後から薬剤を投与したが、実際のATL治療時と同様に血中プロウイルス量が増加した感染5週後に薬剤の

投与を開始した。感染2週間からの投与で有効性が確認されているAZT・IFN- $\alpha$ 併用群と同じ量・期間・間隔で投与した。その結果、対照群と比較して投与群での有効性は認められなかった。

### 3. 新規Hsp90阻害剤TAS-116の評価

昨年度、Hsp90阻害剤である17-DMAGの有効性が認められたことから、同じHsp90阻害剤で大鵬薬品工業により開発された新規構造の経口型Hsp90阻害剤TAS-116に関して有効性を評価した。感染2週間から3週間経口投与したところ、コントロール群、薬剤投与群共に、投与中に約4割のマウスが死亡した。薬剤の溶媒あるいは投与の手技に問題があったと考えられる。生存したマウスに関して解析を行ったところ、半数のマウスで血中プロウイルス量が抑制されていたことから、薬剤の有効性が示唆されたが、個体数が少なかったため有意差検定は困難であった。

### D. 考察

AZT・IFN- $\alpha$ 併用は感染早期から投与を開始すると有意に血中プロウイルス量および感染細胞数を低く維持可能であり、期間生存率も顕著に亢進させたが、感染5週間から投与開始した場合は抗ATL効果を示さなかった。この原因としては、本HTLV-1感染ヒト化マウスモデルでは感染3,4週目あたりから血中プロウイルス量が急激に上昇し短期間で白血病死に至ることから、既に血中プロウイルス量が高い状態である感染5週目からのAZT/IFN- $\alpha$ 投与は無効であったと考えられる。今後、発症後の治療効果を評価するには緩やかな血中プロウイルス量の上昇を示

す感染モデルを開発する必要があり、血中プロウイルス量を低くを長期間維持可能な経口感染モデルやTaxペプチドで免疫した感染モデルが有用である可能性がある。また、有効性が確認された17-DMAGと同じ作用機序を有するTAS-116については、投与方法の検討・改善をおこない再検討を行う必要がある。

### E. 結論

AZT・IFN- $\alpha$ は血中プロウイルス量が低い時期から投与すると、投与中止後も血中プロウイルス量および感染細胞数を低く維持可能であった。血中プロウイルス量が高くなってから投与を開始した場合は効果が見られなかった。ただし、緩やかに血中プロウイルス量が上昇するモデルを用いて、さらに検討が必要であると考えられる。TAS-116に関しては薬剤以外の理由により有効性の評価が不可能であった。

### F. 健康危険情報

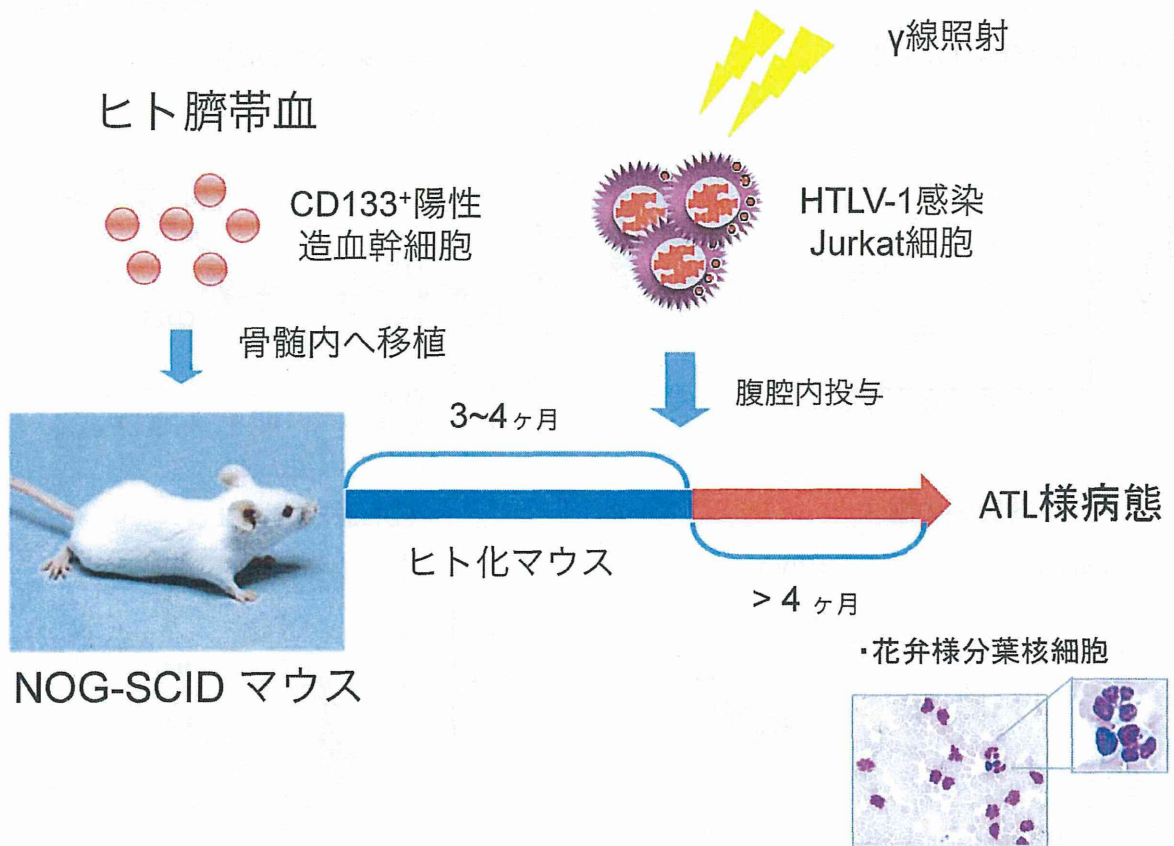
なし

### G. 研究発表

なし

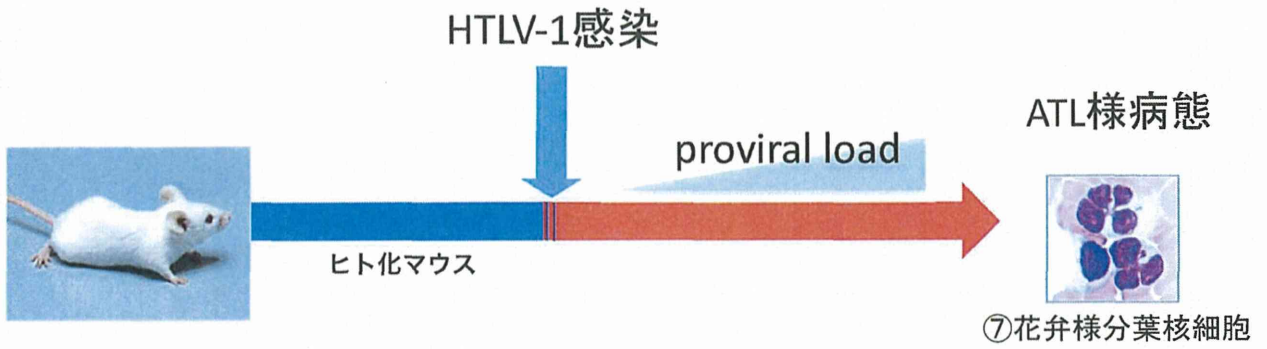
### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

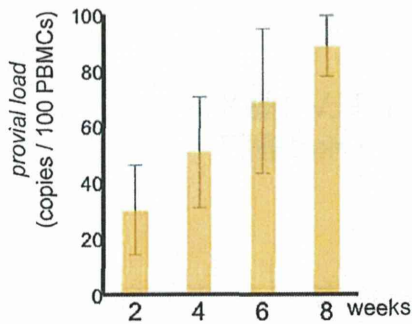


(Tezuka et al. Blood 2013)

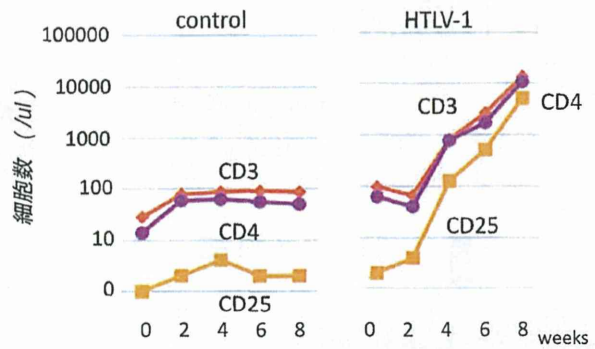
図1. HTLV-1感染モデルの構築



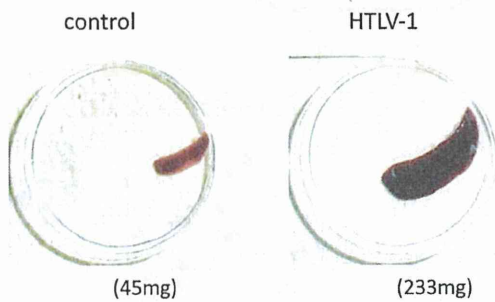
① 血中プロウイルス量



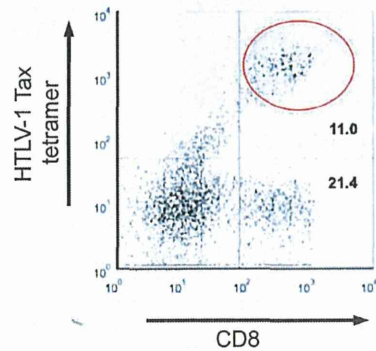
② ヒトリンパ球の異常増殖



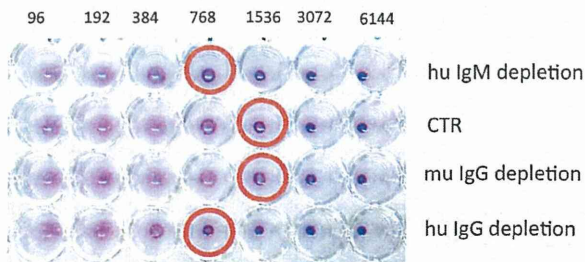
③ 脾臓の腫大



④ Tax特異的CTL



⑤ 抗HTLV-1抗体



⑥ 感染細胞のクローナル増殖

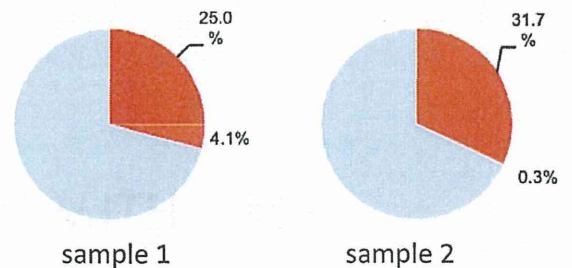


図2. HTLV-1感染モデルの病態

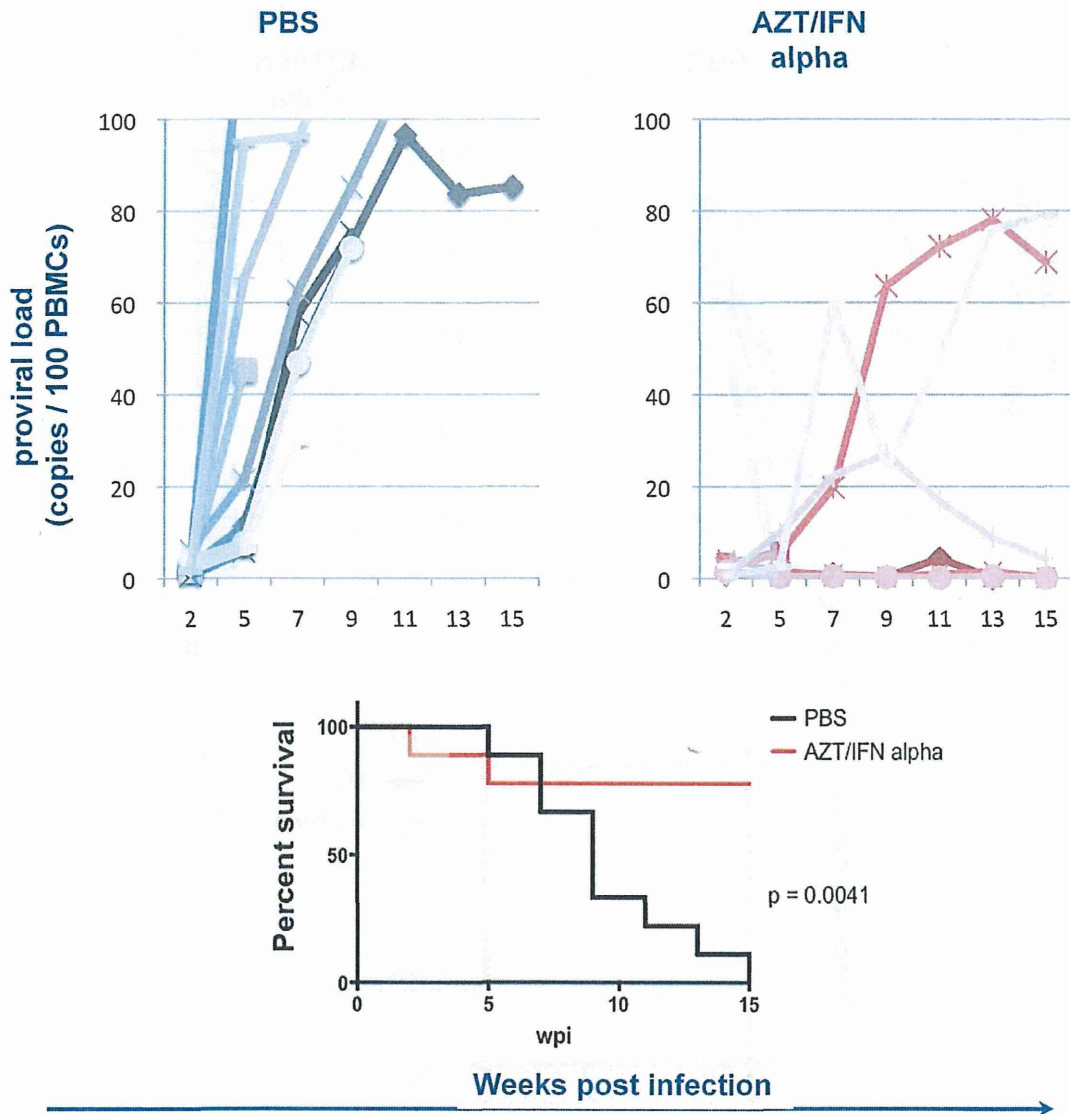


図3. AZT・IFN- $\alpha$ 投与に依る血中プロウイルス量の抑制



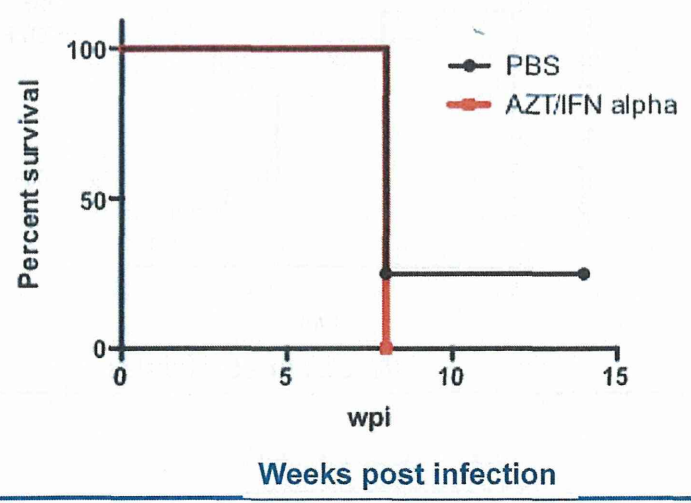
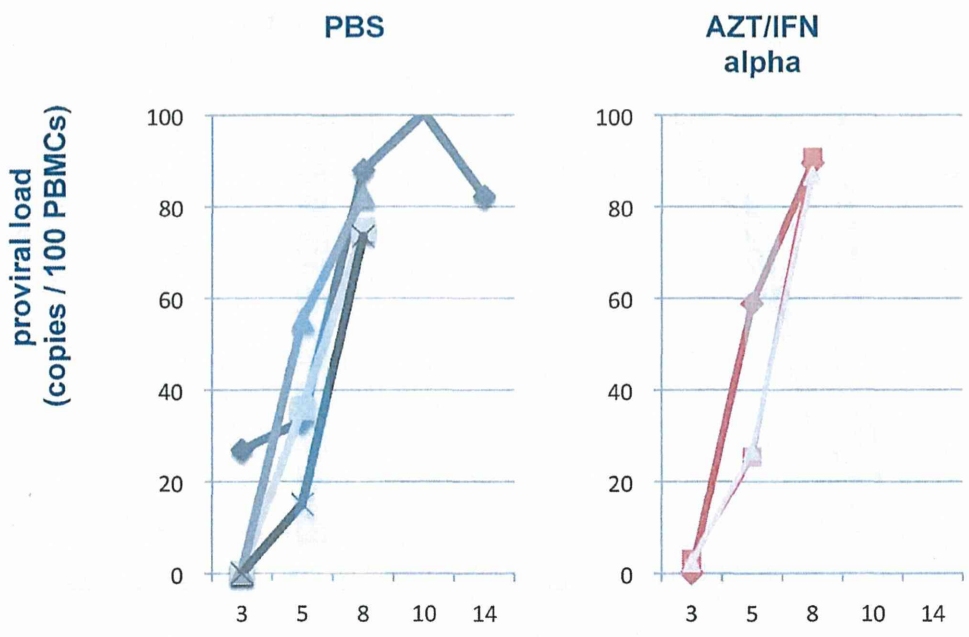
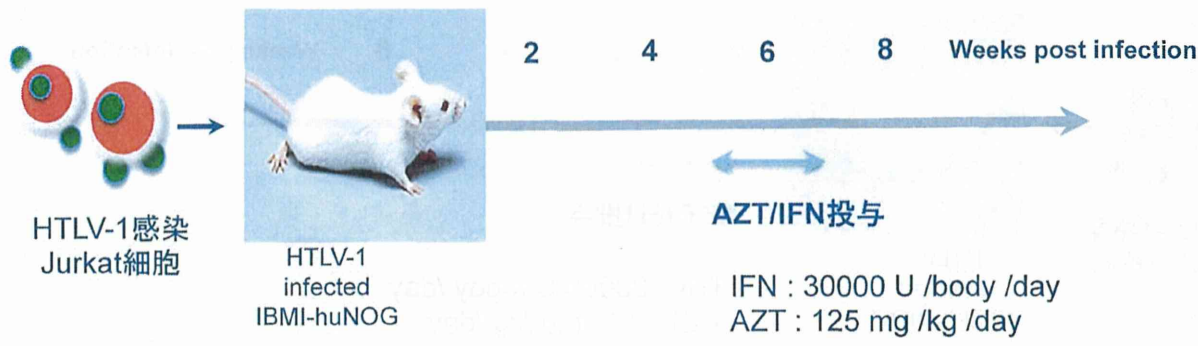


図4. 感染5週後からのAZT・IFN- $\alpha$ 投与に依る血中プロウイルス量の抑制

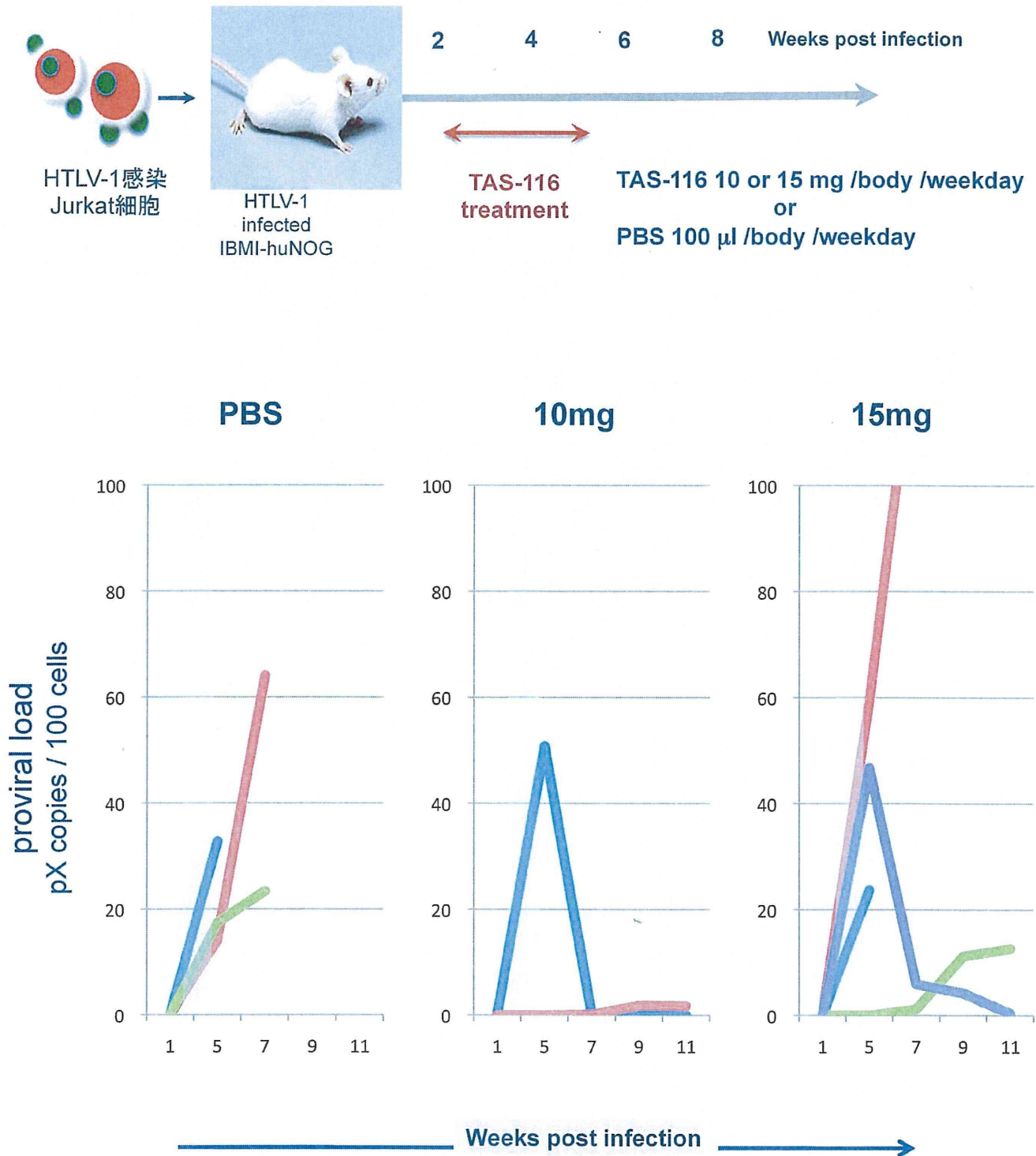


図5. 新規Hsp90阻害剤TAS-116投与による  
血中プロウイルス量の抑制

