

201420056B

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24年度～平成26年度 総合研究報告書

研究代表者 上野 孝治

(関西医科大学)

平成27年 3月

目 次

I. 総合研究報告	
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	
II. . 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 18
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 19

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）
総合研究報告書

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。本研究ではヒト化マウスを用いた感染モデル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った。AZT・IFN- α 併用およびHsp90阻害剤17-DMAGは血中プロウイルス量・感染細胞数を長期間にわたり低いレベルで維持することができた。17-DMAGと同じHsp90阻害剤で新規構造を有するTAS-116に関しては、溶媒あるいは投与方法が原因で有効性の評価が困難であった。既存の抗ウイルス薬に関しては、対照群で未発症の個体が存在したことにより、有効性の統計的有意差は示せなかった。

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・治療法を開発を行う。

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。本研究を推進し感染細胞の増加を抑制する抗HTLV-1薬を探索することにより、ATLやHAMを含めHTLV-1関連疾患全体の発症予防が可能になる。本研究で検討する化合物は既存の

薬や低毒性が期待される開発中の薬剤であり、比較的短期間で臨床現場に導入可能であると考えられる。これにより発症予防が可能になれば、感染者はHAMの運動障害や将来的なATL発症の不安から解放されQOLが向上するだけでなく、発症に伴い必要になる多大な医療費の抑制にも繋がること期待される。

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- α 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日腹腔内投与を行った。17-DMAG 300 μ g/匹/日を感染2週後から4週間、週5日腹腔内投与を行った。化合物A 75 mg/kg/日で感染2週後から4週間、週5日腹腔内投与を行った。TAS-116 10mg/kg/日あるいは15mg/kg/日を感染2週後から2週間、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- α の抗HTLV-1活性評価

感染2週目からAZT、IFN- α 単独あるいは併用投与を行った。コントロールのPBS投与群では感染2週後から血中プロウイルス量が急激に増加し、6週後までに全個体が死亡した。IFN- α 単独投与群では3匹中2匹で血中プロウイルス量の増加が抑制され、内1匹は投与終了後も抑制が維持された。AZT単独投与群では投与期間中は全個体で、投与終了後は3匹中2匹でプロウイルス量が抑制されていた。AZT・IFN- α 併用群では全個体で投与期間中および投与終了後もプロウイルス量の増加は認められ、実験個体数を増やした検討においても有効性が認められた。この血中プロウイルス量の抑制が薬剤投与による骨髄抑制を原因とする可能性が考えられたため、各時点における血中の感染細胞数と非感染細胞数を計数した。その結果、いずれの群においても非感染細胞数はウイルスを接種していない非感染マウスとほぼ同等であり、感染細胞数の増加がPBS群と比較して顕著に抑制されていることが明らかとなった。AZT単独投与群で投与中止後に

プロウイルス量が増加した個体に関してさらに観察を続けたところ、感染後8週からプロウイルス量および感染細胞数が高い状態が続いた。この個体に対して感染18週の時点でAZT・IFN- α を投与したところ、プロウイルス量および感染細胞数が顕著に減少した。

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上昇した感染5週後に薬剤の投与を開始した。感染2週後からの投与で有効性が確認されているAZT・IFN- α 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. Hsp90阻害剤17-DMAGの評価

17-DMAGはタンパクシヤペロンHsp90の阻害剤であるGeldanamycin類縁体であり、in vitroにおいてHTLV-1 Taxタンパクの不安定化を誘導し、Tax発現細胞に対する増殖抑制効果を有する。in vivoにおける17-DMAGの抗HTLV-1効果を検証した。感染2週後から4週間投与した結果、コントロールのPBS群と比較して、顕著にプロウイルス量の増加が抑制された。また、血中の感染細胞数やATLの特徴的所見であるCD25陽性CD4T細胞の割合もPBS群と比較して明らかに低レベルであった。感染マウスの期間生存率もPBS群に比べ高かった。

4. Hsp90阻害剤17-DMAGの評価

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を

有する経口型Hsp90阻害剤TAS-116に関して有効性を評価した。感染2週後から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、個体数が少なかつたため有意差検定は困難であった。

5. 既存の抗ウイルス薬化合物Aの評価

化合物Aは他のウイルス性疾患に対する既存の抗ウイルス薬であり、同クラスの薬剤と比較して副作用が低く、安全性が比較的高い。この化合物Aを感染2週後から2週間、腹腔内投与した。その結果、血中プロウイルス量はPBS群よりも低く維持される傾向が認められたが、統計学的有意差は得られなかった。

D. 考察

AZT・IFN- α 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。これは薬剤投与による骨髓抑制が原因ではなく、新規感染の抑制、感染細胞の排除等により感染細胞が増加しなかったことが原因であると考えられた。また、感染5週後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- α 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。

Hsp90阻害剤17-DMAGもAZT・IFN- α 同様に有効性が認められた。これと同じ作用機序を有するTAS-116については、薬剤以外の理由によりマウスが死亡したため有効性を評価できなかった。溶媒の変更、投与方法の検討・改善をおこない再検証を行う必要がある。

E. 結論

AZT・IFN- α 併用およびHsp90阻害剤

17-DMAGは血中プロウイルス量・感染細胞数を長期間にわたり低いレベルで維持することができた。17-DMAGと同じHsp90阻害剤で新規構造を有するTAS-116に関しては、溶媒あるいは投与方法が原因で有効性の評価が困難であった。

AZT・IFN- α 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。その作用機序は骨髄抑制ではなく、感染細胞の増加を抑制すると考えられる。また、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。Hsp90阻害剤である17-DMAGはAZT・IFN- α と同様に非常に有効であった。

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。既存の抗ウイルス薬に関しては、対照群で未発症の

個体が存在したことにより、有効性の統計的有意差は示せなかった。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

An animal model of adult T-cell leukemia: humanized mice with HTLV-1-specific immunity.

Tezuka K, Xun R, Tei M, Ueno T, Tanaka M, Takenouchi N, Fujisawa J.

Blood. 2014 Jan 16;123(3):346-55.

Oral administration of an HSP90 inhibitor, 17-DMAG, intervenes tumor-cell infiltration into multiple organs and improves survival period for ATL model mice.

Ikebe E, Kawaguchi A, Tezuka K, Taguchi S, Hirose S, Matsumoto T, Mitsui T, Senba K, Nishizono A, Hori M, Hasegawa H, Yamada Y, Ueno T, Tanaka Y, Sawa H, Hall W, Minami Y, Jeang KT, Ogata M, Morishita K, Hasegawa H, Fujisawa J, Iha H.

Blood Cancer J. 2013 Aug 16;3:e132.

2. 学会発表

上野孝治、苟潤沢、齋藤峰輝、手塚健太、田中勇悦、藤澤順一

イラン型HTLV-1特異的なpX領域塩基配列に起因する感染性ウイルス粒子の産生促進

第5回HTLV-1研究会

2012年 9月 東京

手塚健太、上野孝治、鄭真美、荀潤沢、田中正和、竹之内徳博、藤澤順一

IBMI-ヒト化マウスを用いたHTLV-1感染マウスモデル

第5回 HTLV-1研究会

2012年 9月 東京

Kenta Tezuka, Mami Tei, Takaharu Ueno, Runze Xun, Jun-ichi Fujisawa

Carrier model of HTLV-1 infection in humanized NOG mice

第71回日本癌学会学術総会

2012年 9月 札幌

荀潤沢、上野孝治、齋藤峰輝、手塚健太、田中勇悦、藤澤順一

Altered pattern in viral mRNA expression of Iranian type HTLV-1 leading to enhanced viral production

第60回日本ウイルス学会学術集会

2012年 11月 大阪

手塚健太、上野孝治、鄭真美、荀潤沢、竹之内徳博、藤澤順一

HTLV-1感染ヒト化マウスを用いた抗ATL治療法の評価

第60回日本ウイルス学会学術集会

2012年 11月 大阪

Altered pattern in viral mRNA expression of Iranian type HTLV-1 leading to enhanced viral expression

Takaharu Ueno, Runze Xun, Mineki Saito, Kenta Tezuka, Yuetsu Tanaka and Jun-ichi Fujisawa

16th International Conference on Human Retrovirology : HTLV and Related Viruses

2013年6月 モントリオール カナダ

Carrier model of HTLV-1 infection in humanized NOG mice

Kenta Tezuka, Mami Tei, Takaharu Ueno, Runze Xun, Jun-ichi Fujisawa

16th International Conference on Human Retrovirology : HTLV and Related Viruses

2013年6月 モントリオール カナダ

Inhibition of ATL development in humanized mouse model by AZT/INF treatment

Kenta Tezuka, Mami Tei, Takaharu Ueno, Runze Xun, Hidekatsu Iha, Jun-ichi Fujisawa

16th International Conference on Human Retrovirology : HTLV and Related Viruses

2013年6月 モントリオール カナダ

ヒト化マウスモデルにおけるHSP90阻害剤17-DMAG投与によるATL発症抑制

手塚健太、池辺詠美、伊波英克、上野孝治、荀潤沢、藤澤順一

第72回日本癌学会学術総会

2013年10月 横浜

樹状細胞を介したin vitro HTLV-1感染モデルの構築

竹之内徳博、上野孝治、手塚健太、田中正和、藤澤順一

第25回日本神経免疫学会集会

2013年11月 山口

Altered pattern in viral mRNA expression of Iranian type HTLV-1 leading to enhanced viral

production

荀潤澤、上野孝治、齊藤峰輝、手塚健太、田
中勇悦、藤澤順一

第66回日本細菌学会関西支部総会・学術講
演会

2013年11月 大阪

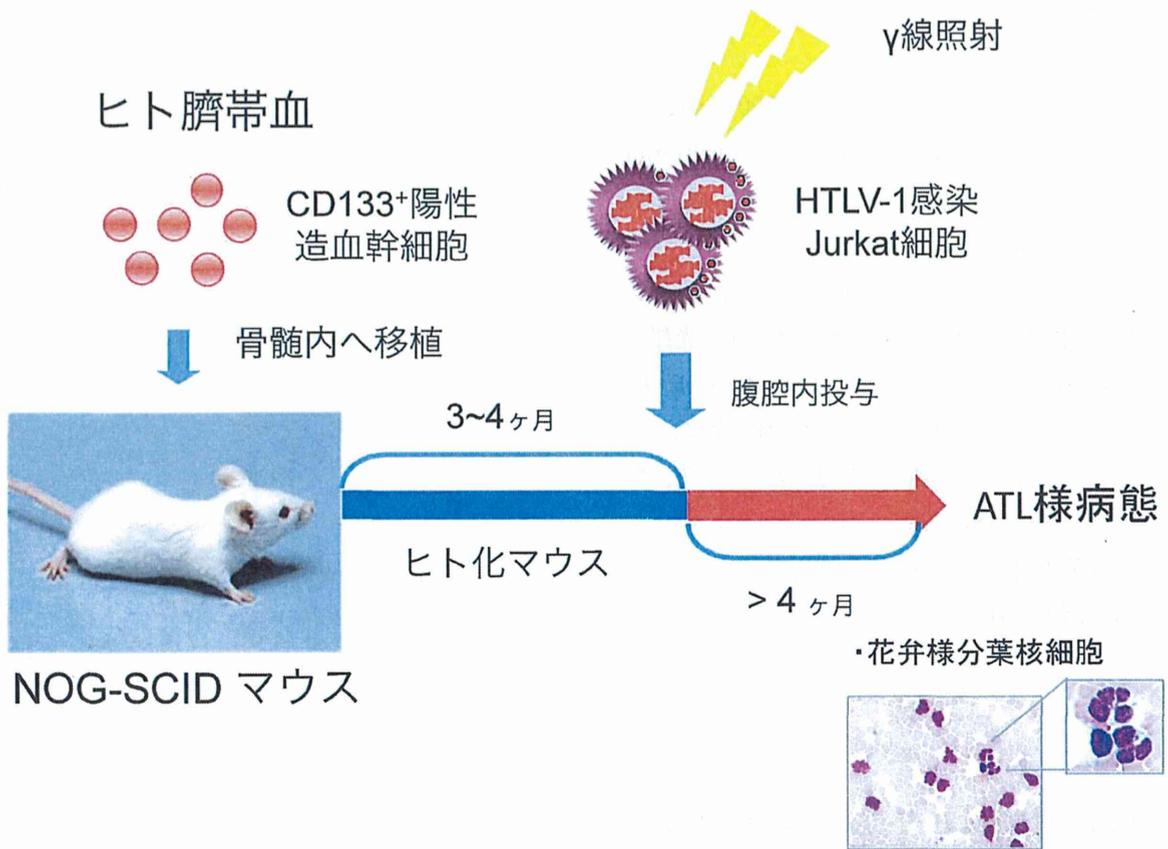
Oral administration of an HSP90 inhibitor,
17-DMAG, intervenes tumor-cell infiltration
into multiple organs and improves survival
period for ATL model mice

伊波 英克, 池辺 詠美, 川口 晶, 手塚 健太,
田口 慎也, 廣瀬 仁志, 西園 晃, 堀 光雄,
長谷川 寛雄, 山田 恭暉, 上野 孝治, 田中
勇悦, 澤 洋文, Hall William W, 南 康文,
Jeang Kuan-Teh, 緒方 正男, 森下 和広, 長
谷川 秀樹, 藤澤 順一

第36回日本分子生物学会年会

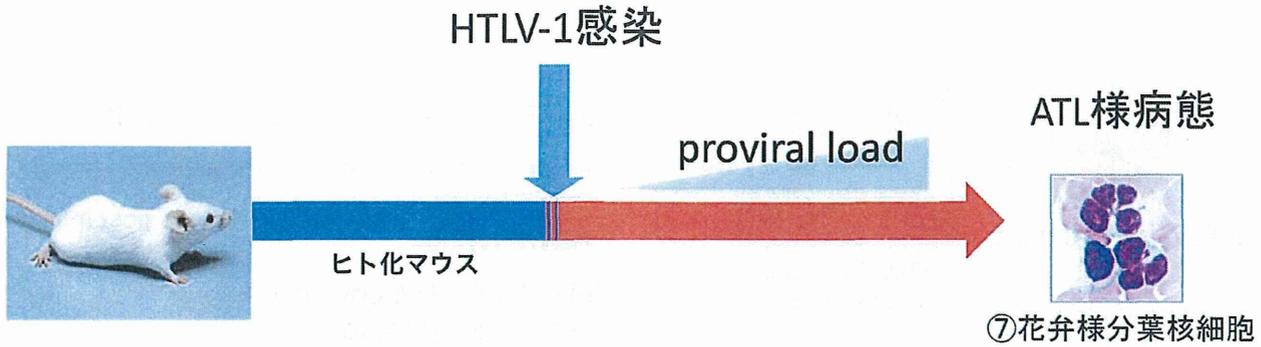
2013年12月 神戸

H.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
なし

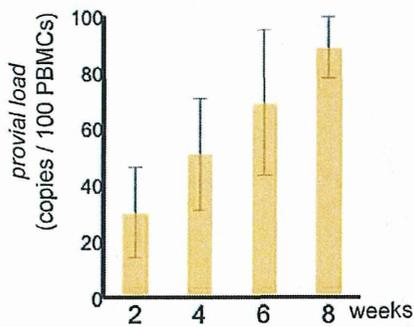


(Tezuka et al. Blood 2013)

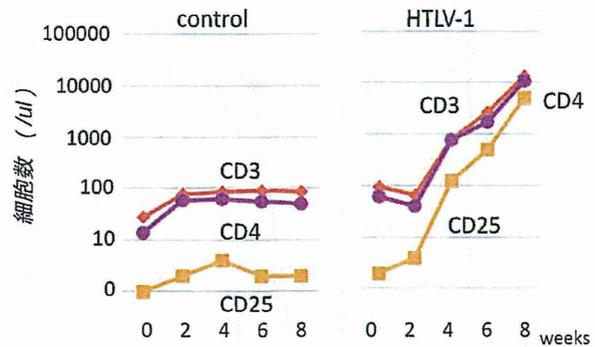
図1. HTLV-1感染モデルの構築



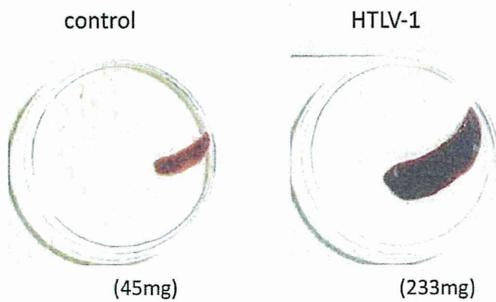
① 血中プロウイルス量



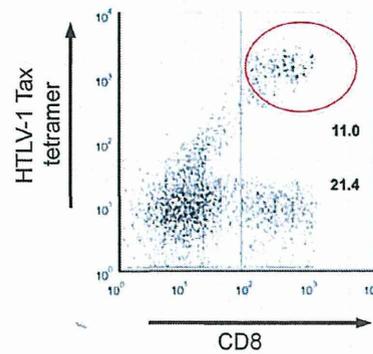
② ヒトリンパ球の異常増殖



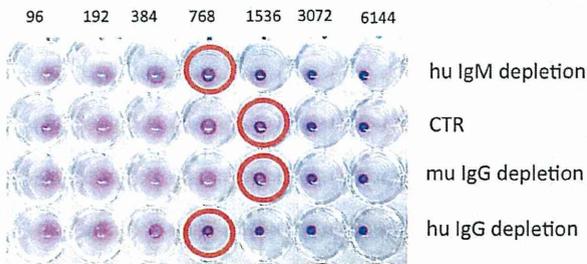
③ 脾臓の腫大



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

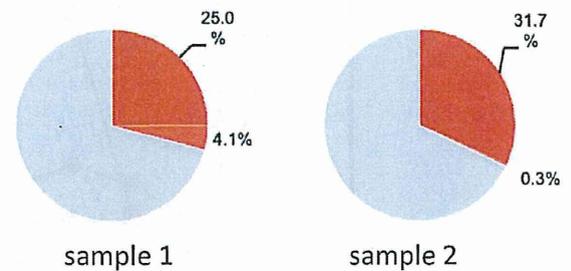


図2. HTLV-1感染モデルの病態

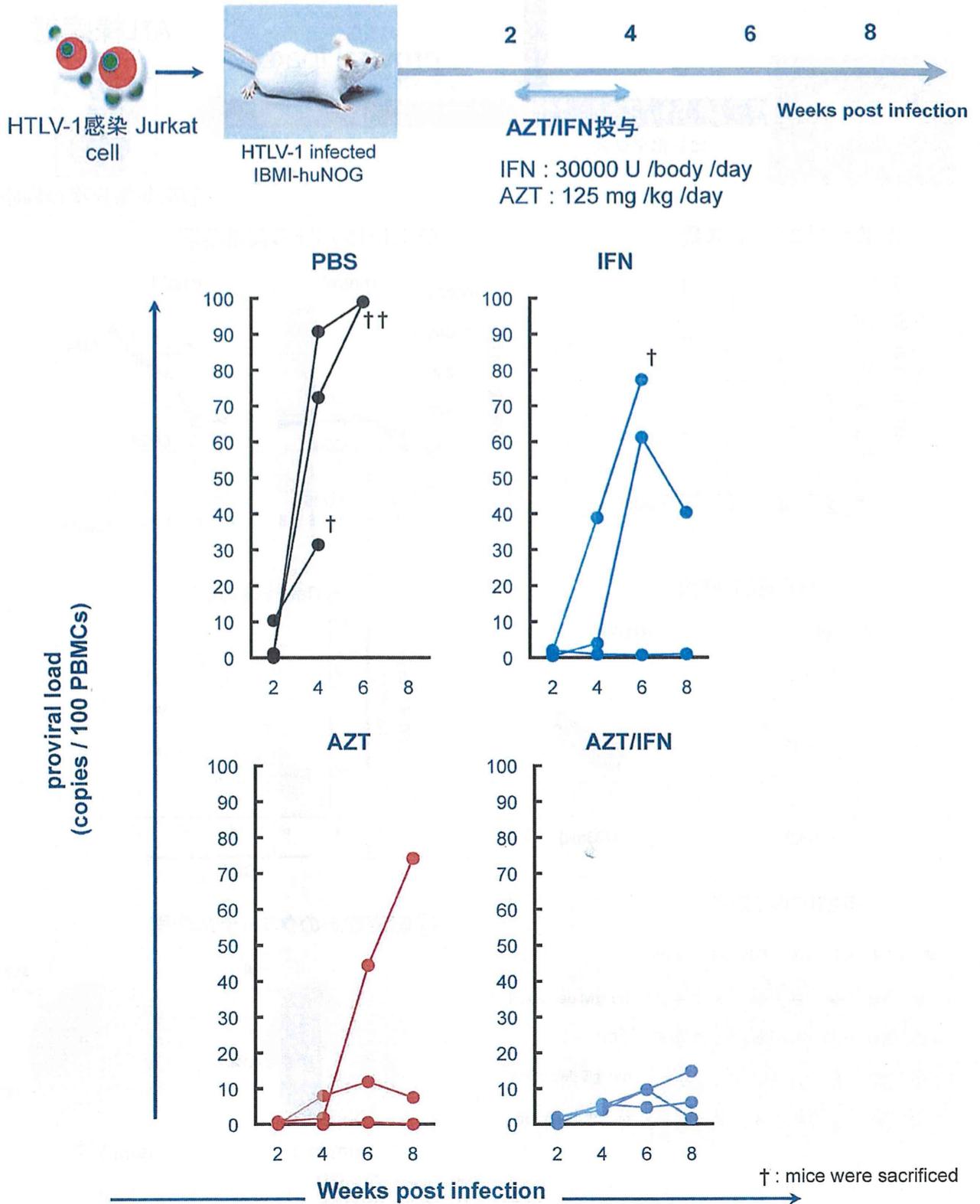
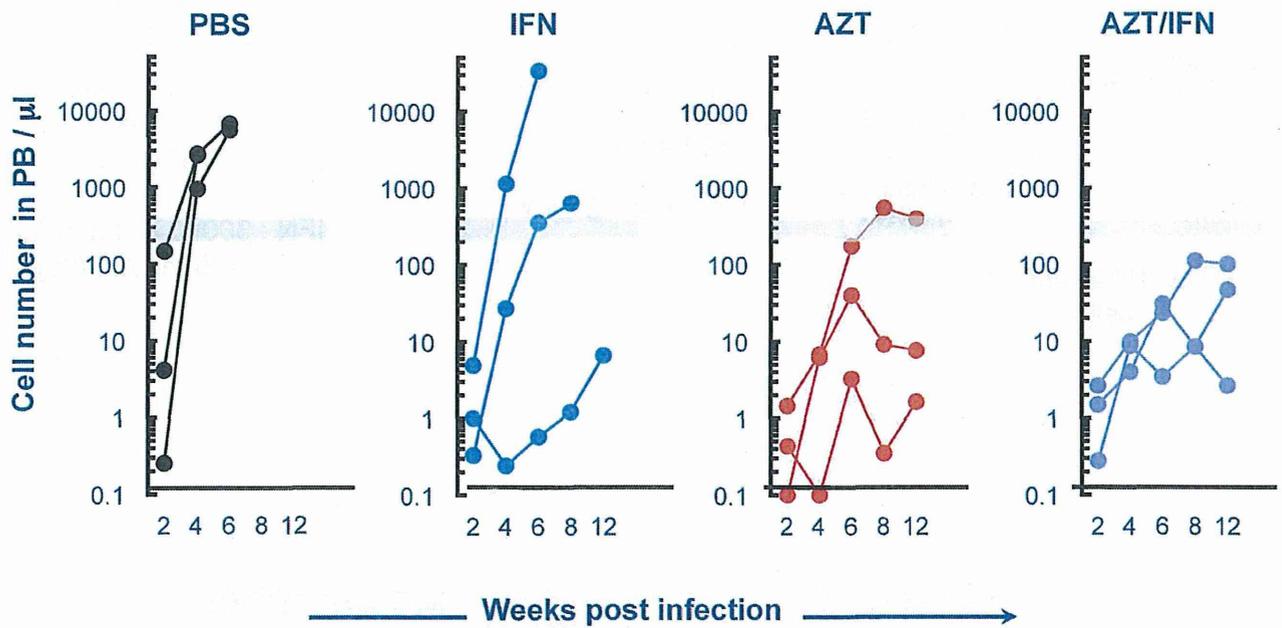
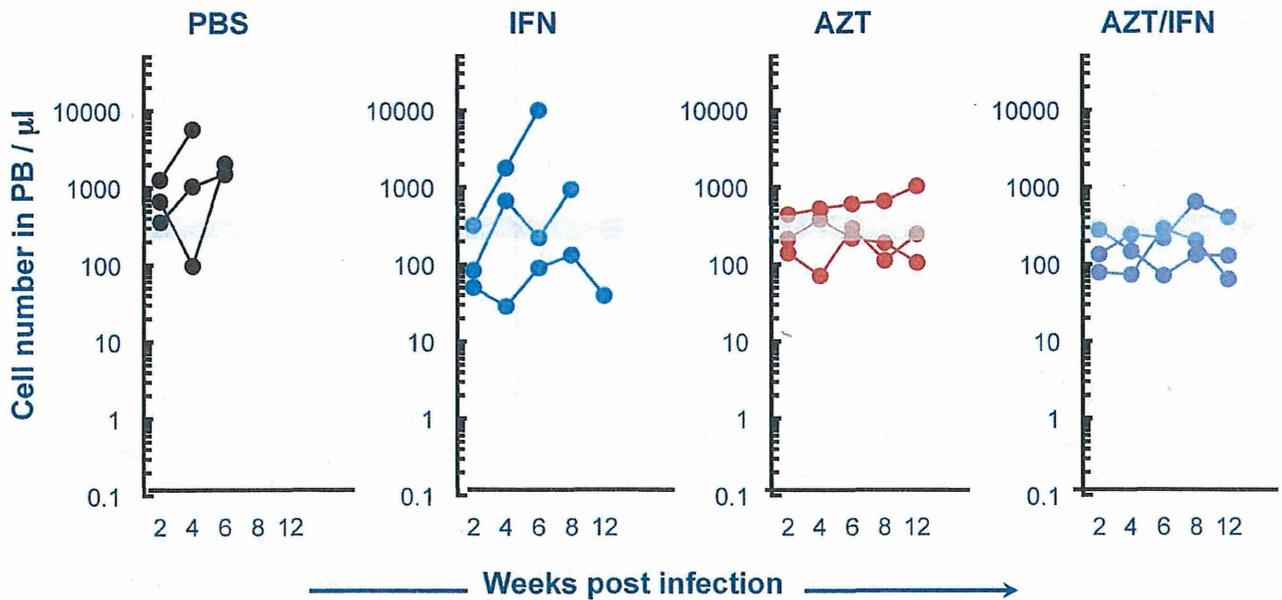


図3. AZT・IFN- α 投与による血中プロウイルス量の抑制

感染細胞数

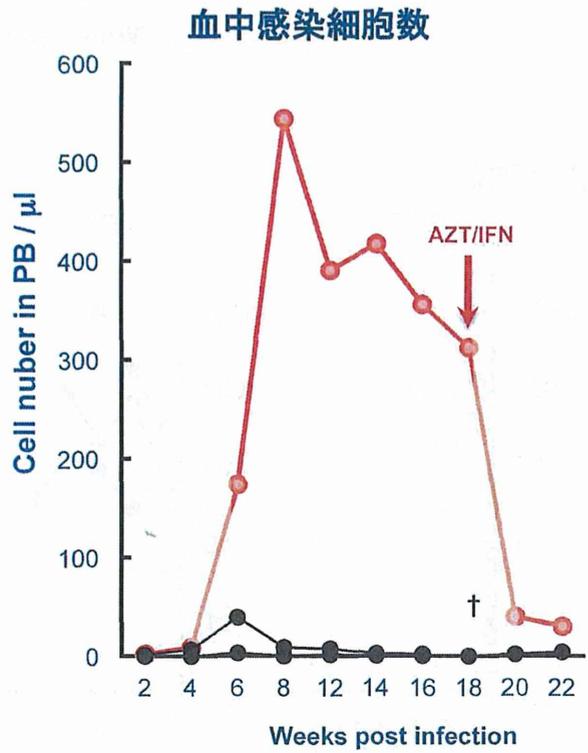
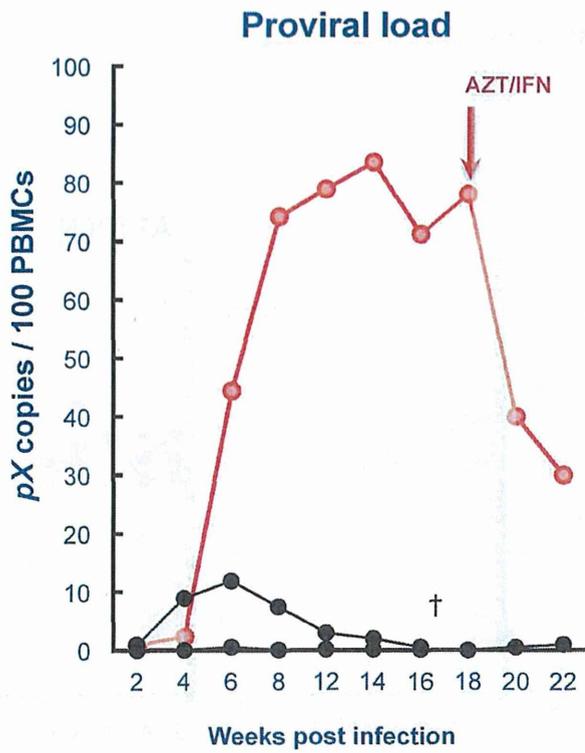
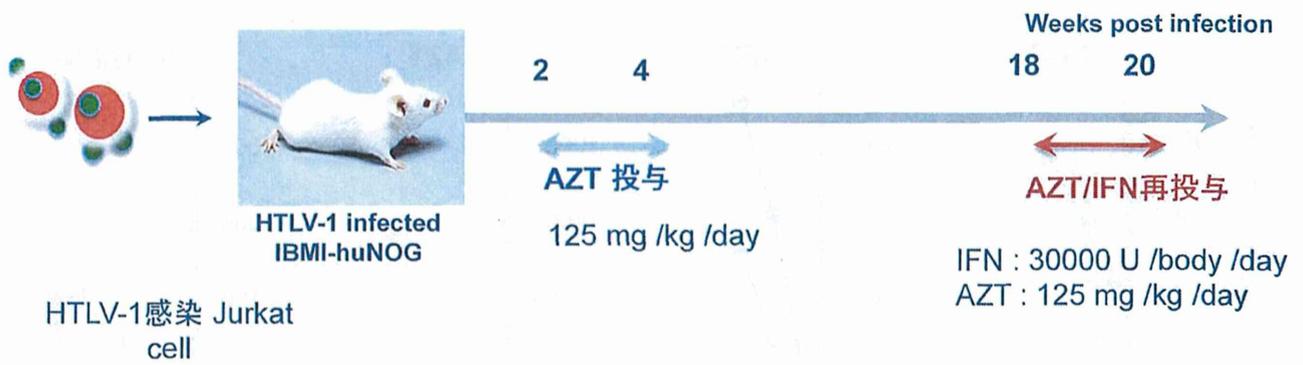


非感染細胞数



■ 非感染マウスの平均血中細胞数

図4. AZT・IFN- α 投与による血中細胞数の変化



† : mice were sacrificed

図5. AZT・IFN- α 再投与による抑制効果

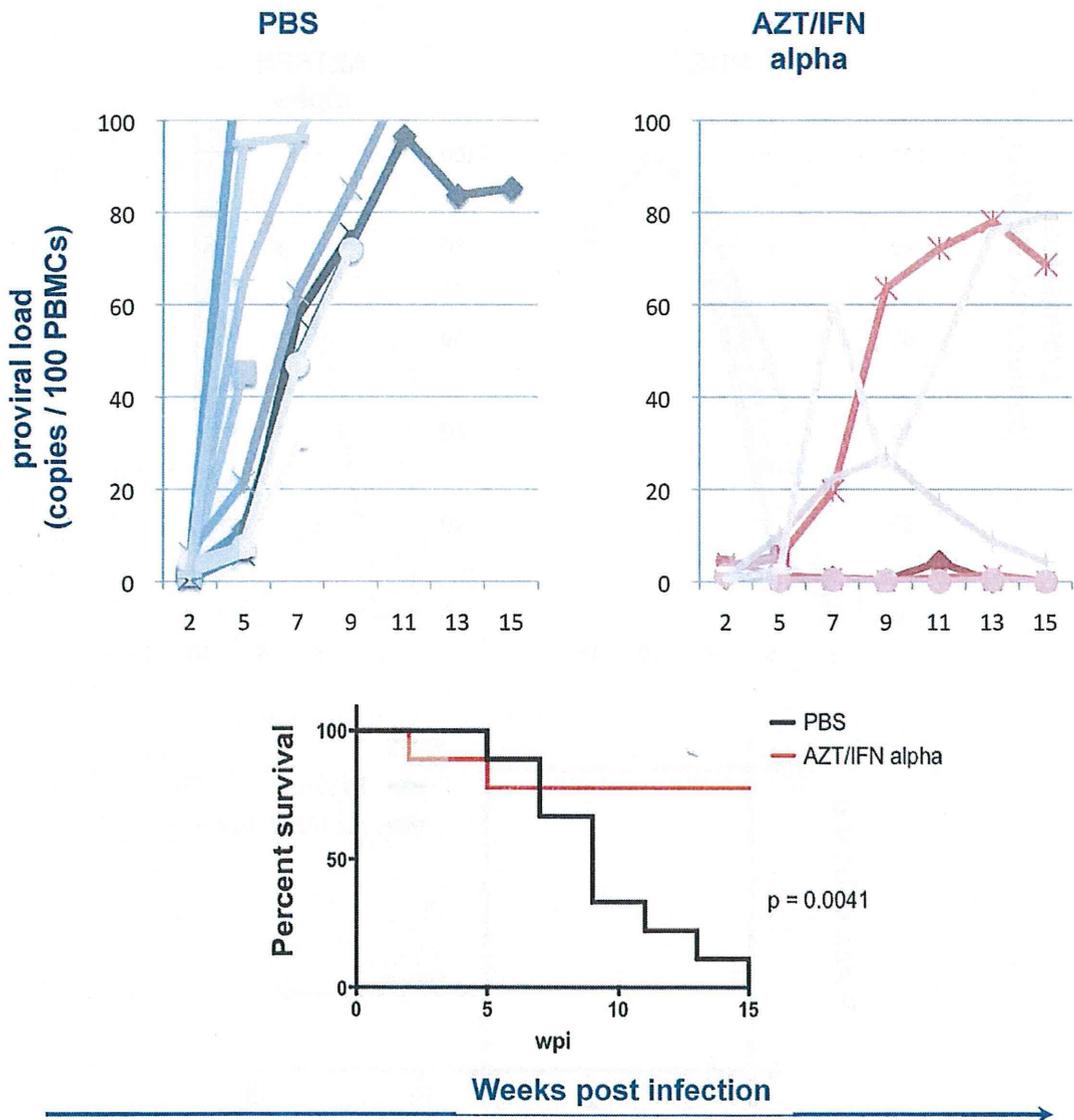


図6. AZT・IFN- α 投与による血中プロウイルス量の抑制

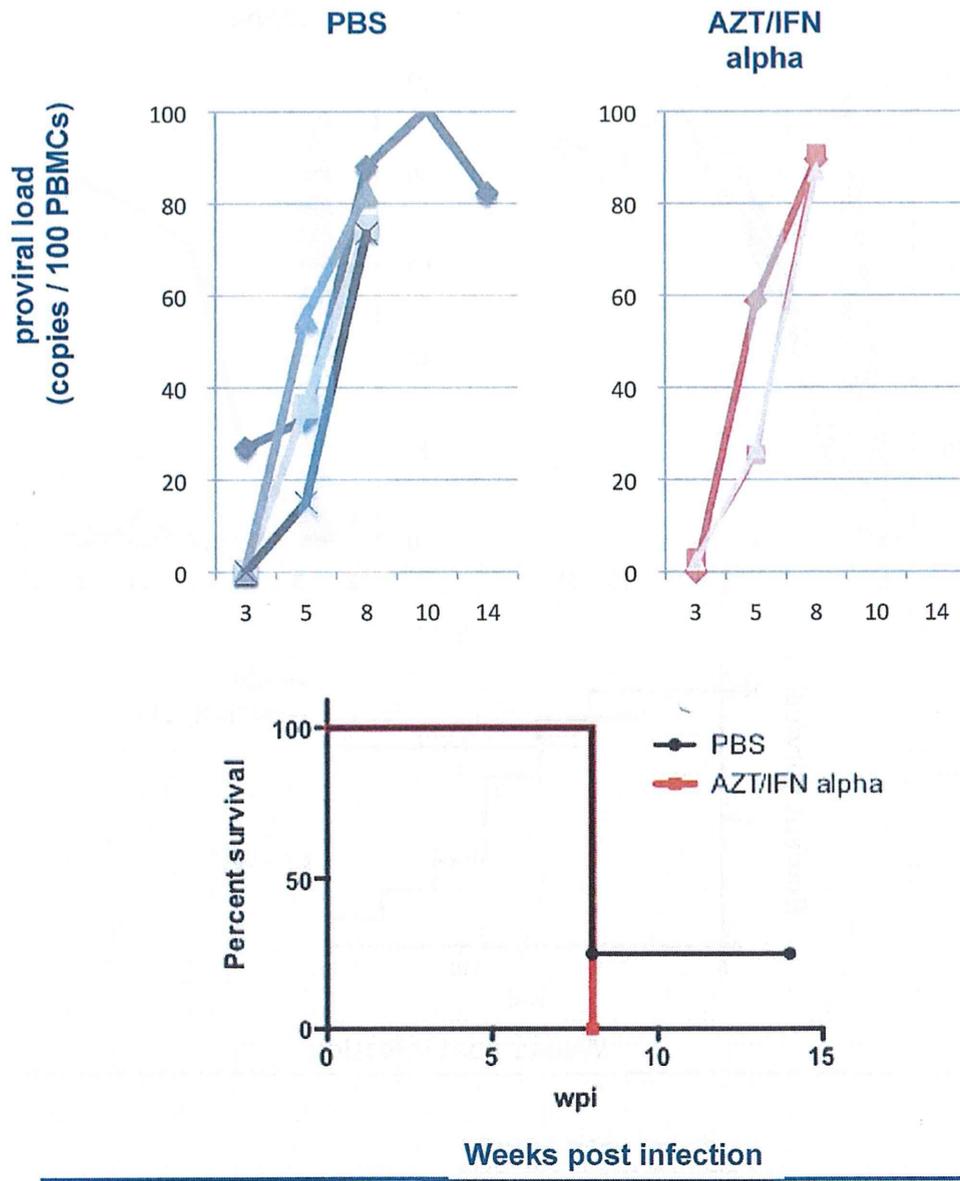
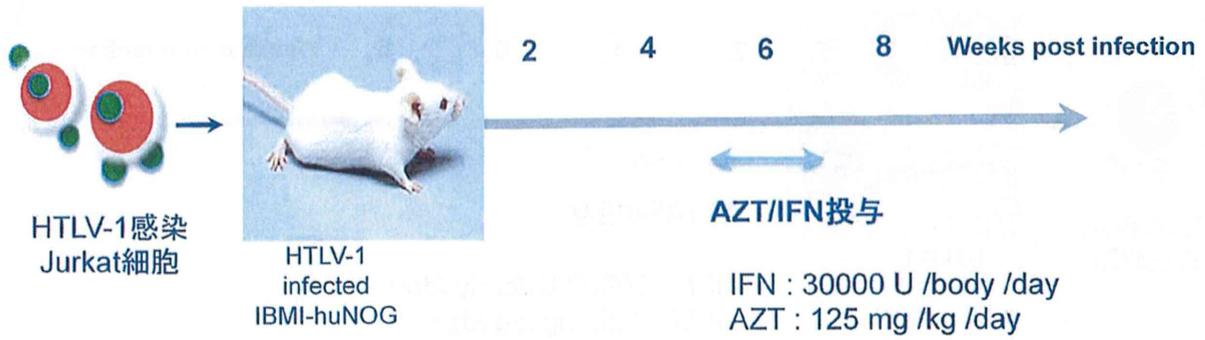


図7. 感染5週後からのAZT・IFN- α 投与による血中プロウイルス量の抑制

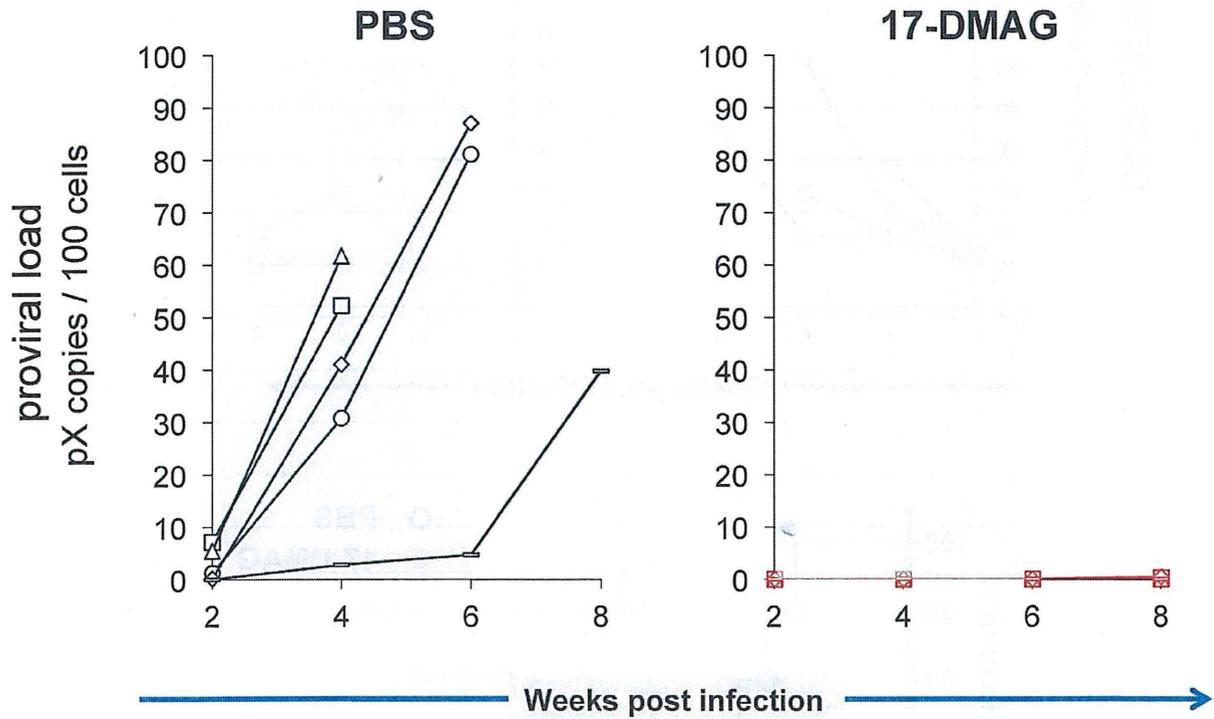
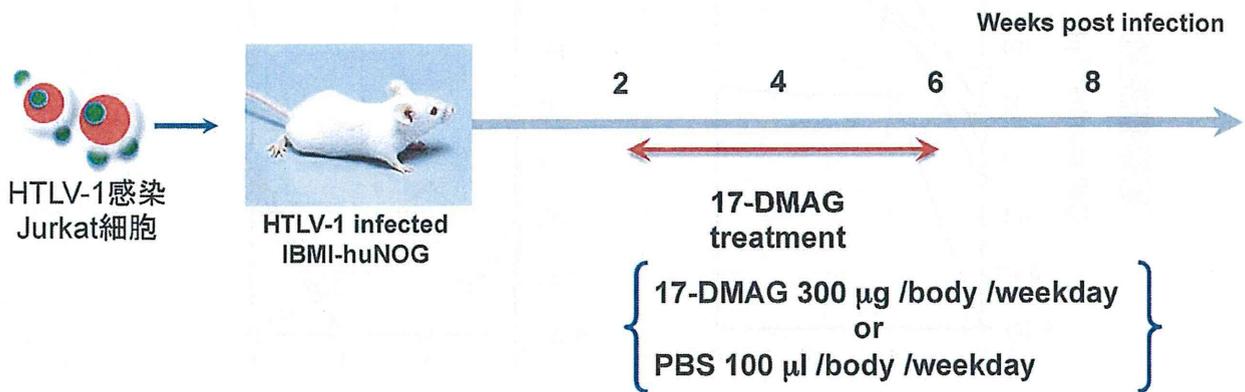


図8. 17-DMAG投与による血中プロウイルス量の抑制

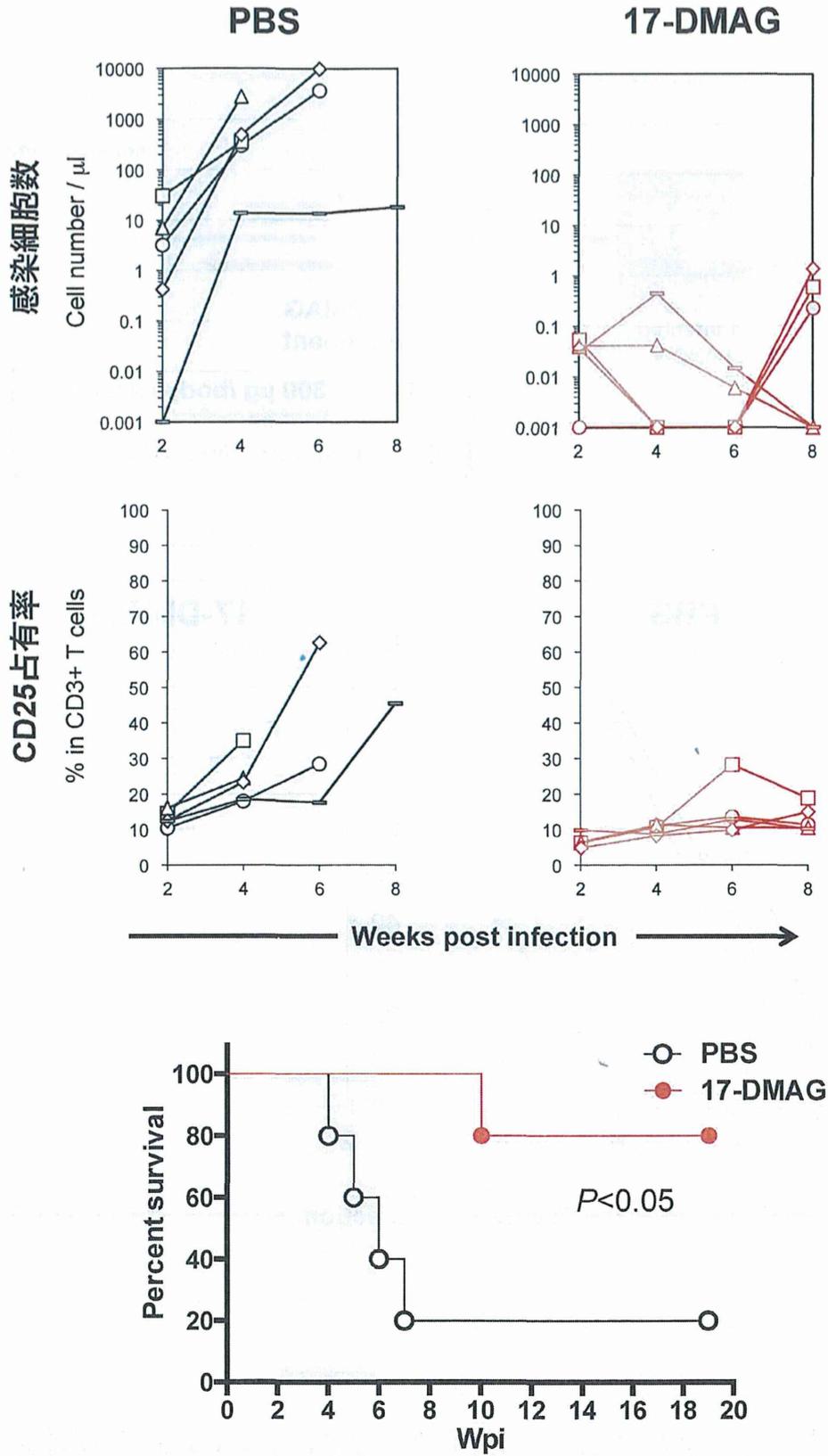


図9. 17-DMAG投与による期間生存率の向上

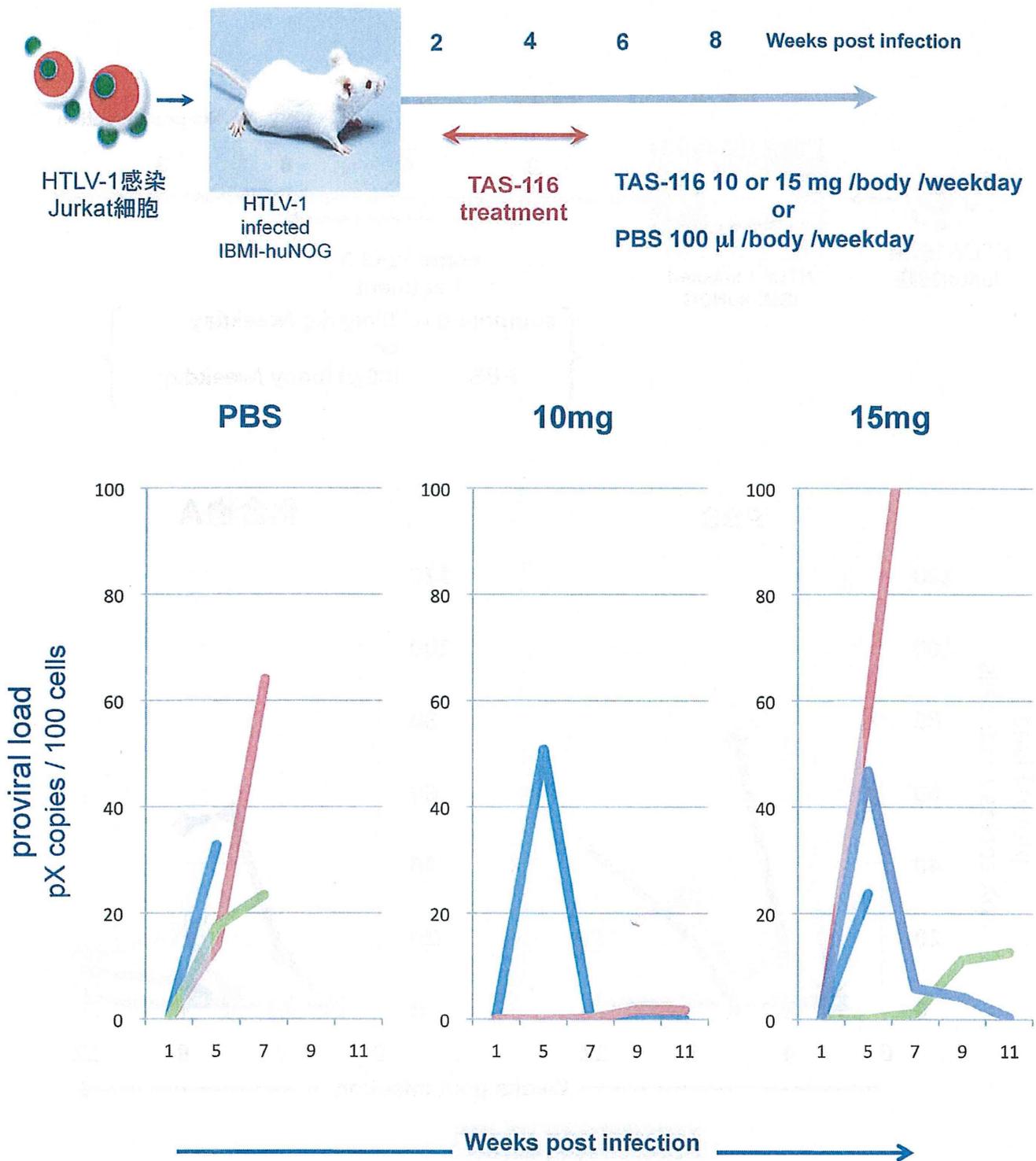


図10. 新規Hsp90阻害剤TAS-116投与による血中プロウイルス量の抑制

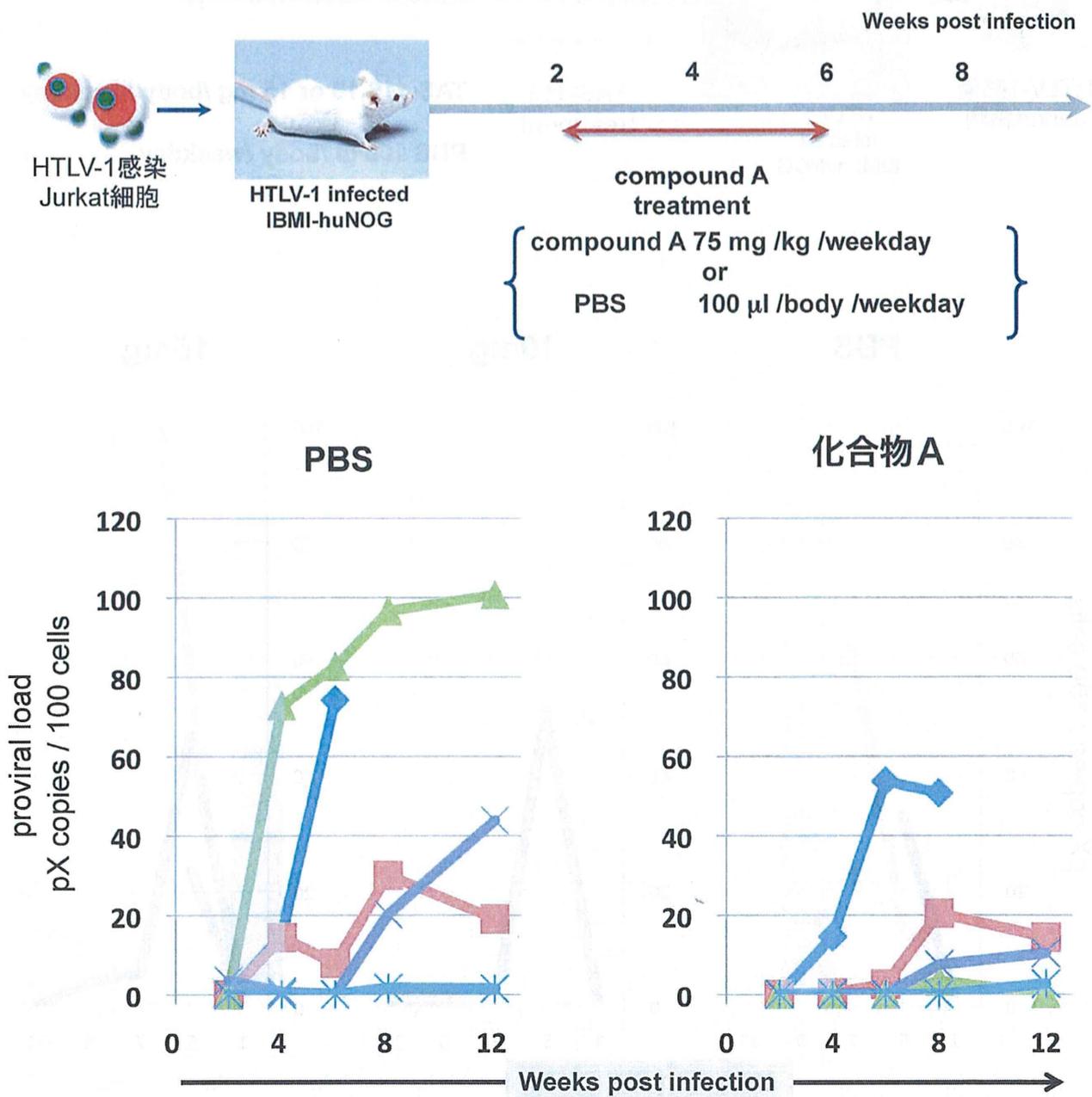


図11. 化合物A による血中プロウイルス量の抑制

研究成果の刊行に関する一覧表

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
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	Vol.123 No. 3	346-55	2014
Ikebe E, Kawaguchi A, Tezuka K, Taguchi S, Hirose S, Matsumoto T, Mitsui T, Senba K, Nishizono A, Hori M, Hasegawa H, Yamada Y, Ueno T, Tanaka Y, Sawa H, Hall W, Minami Y, Jeang KT, Ogata M, Morishita K, Hasegawa H, Fujisawa J, Iha H.	Oral administration of an HSP90 inhibitor, 17-DMAG, intervenes tumor-cell infiltration into multiple organs and improves survival period for ATL model mice.	Blood Cancer J	vol.3	e132	2013