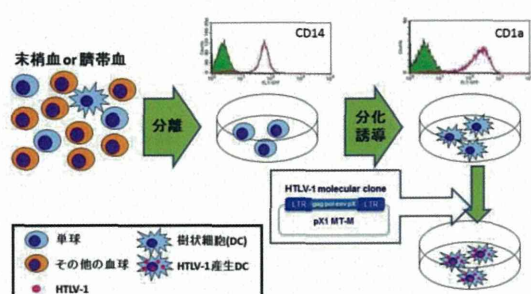


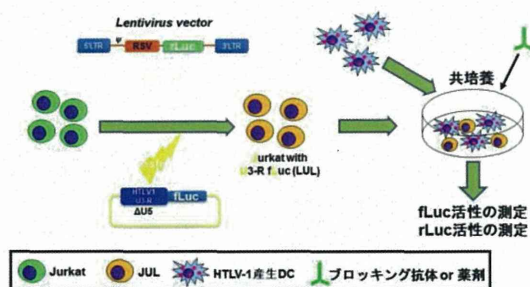
これとは別に、ヒト臍帯血より単球を分離し、サイトカインを添加培養し樹状細胞へ分化させた後、HTLV-1 molecular clone を electroporation することで HTLV-1 産生樹状細胞(HTLVDC2)を作製した (Fig2)。

Fig2. HTLV-1産生樹状細胞の作製



作製された HTLVDC1 or HTLVDC2 と HTLV-1 LTR(U3)-Luc を安定的に組み込んだ Jurkat 細胞(JUL)を共培養し、ルシフェラーゼ活性を測定することで HTLVDC から JUL への HTLV-1 感染の評価を行った (Fig3)。

Fig3. JULの作製と感染の評価



さらに、各種抗体(抗 CD4 抗体、抗 TSLC1 抗体)を共培養へ添加し、感染阻止実験も行った (Fig5)。

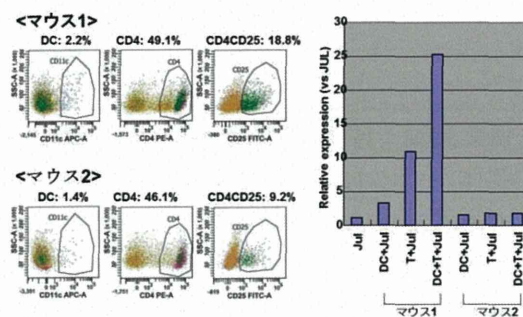
(倫理面への配慮)

使用された臍帯血は、京阪臍帯血バンク

より申請・審査の後に提供された研究用臍帯血を用いた。動物実験は、関西医科大学動物実験委員会から承認されている。

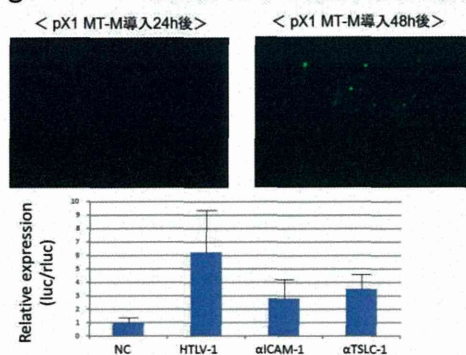
C. 研究結果

Fig4. HTLV-1感染効率



HTLV-1 感染ヒト化マウス脾臓における樹状細胞は 1.4~2.2%であった。HTLV-1 の主要な感染細胞である CD4 陽性 T 細胞は 46.1~49.1%であり、CD4CD25 陽性 T 細胞は 9.2~18.8 であった。この系から樹立された、HTLVDC1 を用いた感染実験では、一匹ではルシフェラーゼ活性は陰性対照に比べて、3~20 倍へ上昇していたが、もう一匹はほとんど差がなかった (Fig4)。

Fig5. HTLV-1感染効率と感染阻止実験



Electroporation の系では樹状細胞への HTLV-1 導入効率は導入 24 時間後で 10~20 程度であった。この系で樹立された HTLVDC2 を用いた感染実験では、ルシフェ

ラーゼ活性は陰性対照に比べて、3~5倍と上昇していた。この系を応用した感染阻止実験においては、抗 CD4 抗体、抗 TSLC1 抗体のいずれを用いた系でも、ルシフェラーゼ活性の上昇率の抑制が認められた (Fig5)。

D. 考案

マウスモデルを用いた系では、Electroporation の系より、より自然に近い感染樹状細胞が作製されることが予想されたため、このモデルを優先的に樹立する予定であったが、HTLV-1 感染効率の高いマウスの脾臓における樹状細胞は減少しており、逆に樹状細胞の多いマウスは HTLV-1 感染効率が低かった (data not shown)。HTLV-1 感染効率の高いマウスの脾臓はリンパ球が主体となっており、これは生体内における主要な感染細胞がリンパ球であり、それが活発に増殖していることが原因と思われた。よって、感染阻止実験に応用するために十分量の感染樹状細胞を確保するのが難しいと予想された。一方で、Electroporation の系では、単球からの樹状細胞への分化は問題なく行えており、分化された樹状細胞への HTLV-1 molecular clone の導入効率は 10~20%程度であった。ヒト生体内における樹状細胞の比率からすると、導入効率 10~20%は感染阻止実験に応用するのに十分と考えている。

HTLV-1 は cell to cell 感染を起こすときにウイルスシナプスを構成することが示されている。この構成要素と思われる接着分子や免疫シナプス構成要素をブロックすることで、感染効率が低減することが考えられるが、Electroporation の系を用いた感染阻止実験では予想通り感染効率の低減が認められた。このことは、今回樹立した系が、薬剤スクリーニングを行うための感染阻止実験へ応用することが可能であることを示

唆している。一方で、薬剤による感染低減効果を有意差を持って図るためには、ルシフェラーゼ活性の上昇率がまだ不十分であることが考えられたので、今後はさらなる系の最適化が必要と思われた。

E. 結論

ルシフェラーゼ活性の上昇は、HTLVDC から JUL への HTLV-1 感染を示しており、樹状細胞を介した T 細胞系への HTLV-1 感染モデルが樹立出来たと考えられた。抗体による感染抑止効果も認められたため、今後はこの系を薬剤のスクリーニングに応用可能かさらに検証していく予定である。

F. 健康危惧情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. Tezuka K, Xun R, Tei M, Ueno T, Tanaka M, Takenouchi N, Fujisawa JI. An animal model of adult T-cell leukemia-humanized mice with HTLV-1 specific immunity. *Blood*. 2014. 123(3): 346-55.

2. 学会発表

<学会発表>

1. 竹之内徳博、上野孝治、荀潤澤、田中正和、藤澤順一: 樹状細胞を介した HTLV-1 感染モデルの構築と薬剤スクリーニングへの応用: 第 19 回日本神経感染症学会総会学術集会 第 26 回日本神経免疫学会学術集会、2014,9,6 金沢(口演)(第 19 回日本神経感染症学会総会)

学術集会 第 26 回日本神経免疫学会
学術集会 合同学術集会 合同プログラム集 p38)

経学会学術大会、2014,5,23 福岡（口
演）（第 55 回日本神経学会学術大会プログラム・抄録集 p519)

2. 竹之内徳博、上野孝治、手塚健太、田中正和、藤澤順一：樹状細胞を介した HTLV-1 感染モデルの構築：第 55 回日本神

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
該当無し

業務項目：

新規治療標的分子の開発

厚生労働科学研究委託費 難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患等実用化研究事業) 難治性疾患実用化研究事業))
委託業務成果報告 (業務項目: 新規治療標的分子の開発)

脳脊髄液 (CSF) プロテオーム解析による新規重症度指針マーカーの同定及び 高精度 HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) 病態診断アルゴリズムの構築

研究分担者 氏名 : 植田 幸嗣
所属機関: 東京大学大学院 新領域創成科学研究科
職名 : 特任准教授

研究協力者 氏名 : 石原 誠人
所属機関: 東京大学大学院 新領域創成科学研究科
役職 : 客員共同研究員

研究要旨: HAM は HTLV-1 感染によって引き起こされる炎症性疾患であり、感染者の 0.5% が HAM を発症する。現行の HAM 病態を評価する手法はいずれも適切な治療を行う上で十分でない。本研究では分子生物学に裏付けられた新規 HAM 重症度診断システムを構築すべく、HTLV-1 感染者由来 CSF に対する定量プロテオーム解析を行った。無症候キャリア (AC) 6 例、HAM 患者 51 症例から採取した CSF に対するプロテオーム解析を実施した結果、14 タンパク質由来 16 ペプチドを重症度指針マーカー候補として同定した。この内 Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) 及び vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1) は血漿でも重症度と相関があり、ウイルス量を加味した予測モデルはウイルス量単独での予測より良好であり、絶対的な HAM 病態の評価システム構築に応用が期待される。

A. 研究目的

HAM 病態の評価には納の重症度指針 (OMDS) や血中可溶性 IL2 受容体・CSF 中ネオプテリン濃度が用いられるが、いずれも患者・医師の主観が入りやすい点、疾患特異的マーカーではない点から、患者病態の正確かつ客観的な評価においていずれも十分でない。本研究では患者 CSF を用いた定量プロテオーム解析を行い、HAM 患者特異的に CSF ないし血液中で変動する分子を同定する事で、新規高精度 HAM 重症度診断システムの開発を目して研究を行った。

B. 研究方法

57 症例 (AC (n = 6)、HAM 患者 (n = 51) (表 1) より CSF を採取し、うち 20 μ L を 8M 尿素で変性し、還元、アルキル化処理を行った後にトリプシン消化を行った。サンプルは Oasis HLB 96-well μ Elution Plate (Waters) を用いて脱塩精製し、回収した溶出物は乾燥後に 2%アセトニトリル、0.1%TFA 溶液に懸濁した。LC-MS/MS 解析では Ultimate3000 (Thermo Scientific) に C18 逆相カラム (日京テクノス社) を接続し、上記サンプルを流速 250 nL/min、120 分のアセトニトリルを用いたグラジエントによって分離しながらシー

	Male	Female	Total
AC	4	2	6
HAM SG1_3	3	4	7
HAM SG4_7	11	25	36
HAM SG8_11	1	7	8
Total	19	38	57

(表1) 治療標的探索に用いた CSF 液症例数リスト。AC: 無症候キャリア、SG: 納の運動障害度

ムレスに高感度質量分析計である LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific) に導入し、質量分析を行った。

解析によって得られた Raw データを高速データ処理が可能な Expressionist Proteome Server Platform (Genedata) に転送し、RefinerMS モジュール上にてペプチド由来のピーク及びその定量情報の抽出に必要な情報処理を行った (図1)。全 57 サンプルに対応する Raw ファイルのデータは質量電荷比 (m/z) 及び使用したカラムへの保持時間 (RT) によって 2 次元展開 (2D 定量クロマトグラム) された。次にノイズサブトラクトを行いケミカルノイズを除去した後、サンプル間で RT アライメントを行い、測定サンプル間で生じた RT 方向の誤差を補正した。この上で全 2D 定量クロマトグラムを重ね合わせ、検出された全ピークの m/z 及び RT をリスト化した。この中から単一分子由来のピークをクラスター化する目的でアイソトープッククラスターリングを行い、クラスター化された 1 価以上の分子に関する m/z、RT、価数及び定量情報を Analyst モジュールに転送し、データ処理及び統計解析を行った (図2)。

各サンプルを OMDS に基づき 4 群 (AC (n = 6)、HAM SG1_3 (n = 7)、HAM SG4_7 (n = 35)、HAM SG8_11 (n = 9)) に分割し、それぞれ 1 ~ 4 までの順序尺度基準を付与した。病態の

進行に伴って CSF 中で増加、ないし減少するペプチドを抽出する目的で、順序尺度基準とペプチドのイオン強度との間でピアソンの積率相関係数の有意性検定を行い、p 値の小さいものより 100 ペプチドを HAM 診断マーカー候補として抽出した。

選定した 100 ペプチドに対する同定を行うため、CSF のトリプシン消化物の同定データセットを作成した。アセトニトリルを用いた逆相分離では各ペプチドに対しての RT の再現性が極めて高いため、スクリーニング時とは独立に取得した同定情報をスクリーニング時に検出されたペプチドの同定に用いることができる。この同定に用いるデータセットを作成するため、スクリーニング時に用いた CSF トリプシン消化物を 2D-LC/MS/MS を用いて解析した。1 次元目の分離精製には 0.2 × 250 mm 強陽イオン交換モノリスカラム (GL Science) を使用し、2 次元目には C18 カラム (日京テクノス) を用いて分離を行いながら LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific) によって解析を行った。取得された解析データに対して SEQUEST 検索を行い未同定の 100 ペプチドの同定を行った。使用したパラメータは以下の通りであった。Taxonomy = Homo Sapiens, Enzyme = Trypsin, Miss cleavage = 2, Database = SwissProt 2012_12 (525,207 sequences), Static modification = Carbamidomethyl (C), Dynamic modification = Oxidation (M) + Deamidation (N or Q), MS tolerance = 3 ppm MS/MS tolerance = 0.8 Da, Peptide charge = +2 to +4, Instrument = ESI-TRAP。さらに Peptide Validator アルゴリズムを使用し、False Discovery Rate < 0.01 を同定信頼性の基準とした。得られた同定情報を m/z 及び RT に関連付けさせ、治療標的候補分子の同定を行った。ペプチド同定は m/z 方向に ±3 ppm、RT 方向に ±5 分の範囲を許容する基準

で行った。

ELISA を用いた Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) (R&D systems) 及び vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1) (abcam) に対する血漿レベルの測定は各製造会社のプロトコルに従い実施した。多次元ロジスティック回帰を用いた予測モデルは R を使用して最適化を行い

$$\log\left(\frac{P(x)}{1-P(x)}\right) = -11.19 - 0.01980(\text{SPARC}) + 0.009322(\text{VCAM1}) + 0.1142(\text{Viral Load}) \dots (1)$$

$$\log\left(\frac{P(x)}{1-P(x)}\right) = -11.19 - 0.01980(\text{SPARC}) + 0.009322(\text{VCAM1}) + 0.1142(\text{Viral Load}) \dots (2)$$

(1) を発症予測モデル、(2) を治療介入時予測モデルとして採用し、診断精度の解析を行った。

(倫理面への配慮)

CSF・血液試料の収集に関しては、患者本人からプロジェクトの趣旨や内容に十分な理解を得た上でインフォームドコンセントを取得し、採取の手続きを行った。採取され、凍結したサンプルは匿名化が行われ、個人情報(氏名、住所、生年月日)は聖マリアンナ医科大学病院外には一切漏出しないよう管理されている。匿名化された試料は、臨床情報(疾患の状況、治療歴、各種バイオマーカーの値など)のみ付加されて研究分担者の所属する研究室へと移動、保管した。これら試料の提供、本研究への使用に関しては、聖マリアンナ医科大学病院、東京大学双方の倫理審査委員会による承認を得た上で実施した。

C. 研究結果

57 症例の CSF トリプシン消化物に対する質量分析を行った結果、728,064 のピーク検出に至った。イオン化され質量分析計で検出された分子は 1 価以上に帯電しており、RefinerMS 上で作成された 2D 定量クロマトグラム上では m/z 方向に一定の間隔で複数の同位体イオンが並ぶ「アイソトピック・クラスター」を形成する。この性質を基に 2D 定量クロマトグラム上でアイソトピッククラスターを探索した所、83,639 個のクラスターの検出に至った。この内、トリプシン消化によって生ずるペプチドは 2 価以上の電荷を帯びる。全クラスターより 2 価以上のクラスターを抽出した結果、68,077 クラスターをペプチド由来として抽出し、定量解析を行った(図 2)。これらのクラスターには CBA 法によって CSF 濃度が測定されていた IP10 (CXCL10) が含まれ、定量性の検証の為、比較解析を行った結果、質量分析によるイオン強度と CBA 法による実測値の間で強い相関($R^2 = 0.911$)が見られた(図 3)。このことは低濃度(pg ~ ng/mL)領域においても本解析の定量性に極めて高い信頼性があることを示している。次に、検出されたペプチドよりピアソンの相関係数に基づき、p 値の最も小さい 100 ペプチドを病態進行に伴って増加ないし減少するペプチドとして抽出し、診断マーカー候補として以降の同定作業に供した。CSF トリプシン消化物に対する 2D-LC/MS/MS では 1,871 タンパク質由来の 14,541 ペプチドに対する同定情報、m/z 及び RT に関するデータセットを取得するに至った。このデータセットを用いて HAM 診断マーカー候補の同定作業を行った結果、14 タンパク質由来の 16 ペプチド(図 4)を HAM 診断マーカー候補として同定した。

候補タンパク質の絞り込み及び血漿マーカーとしての有用性を明らかにするため、

	Male	Female	Total
AC	17	38	55
HAM SG1_3	3	3	6
HAM SG4_7	8	21	29
HAM SG8_11	2	13	15
Total	30	75	105

(表 2) 定量バリデーションに用いた血漿症例数リスト。AC: 無症候キャリア、SG: 納の運動障害度

105 血漿検体(表 2)を用いた 14 タンパク質に対する ELISA を行った。その結果、SPARC 及び VCAM1 を血漿でも病態進行と強く相関($R = -0.373$ 及び $R = 0.431$)する HAM 血漿マーカーとして同定した(図 5)。次に既存の HAM 疾患活動性指標とされるプロウイルス量と、SPARC 及び VCAM1 の診断における有用性を検討するため、病態進行上最も重要なイベントである HAM の発症及び治療の介入が行われる OMDS の Severity Grade 3 から 4 に病態が進行するタイムポイントを予測するモデルを 3 因子 (SPARC、VCAM1 及びウイルス量)のいずれかの組み合わせを用いて作成し、その精度を比較した。その結果ウイルス量単独での予測モデルと比較して 3 因子を用いて作成した予測モデルが最も精度が高く、ROC カーブにおける AUC 値がウイルス量単独での予測モデルより大きく上回ることが分かった(AUC = 0.756 (ウイルス量単独、発症) 及び AUC = 0.726 (ウイルス量単独、治療介入)、AUC = 0.897 (3 因子、発症) 及び AUC = 0.879 (3 因子、治療介入))(図 6)。SPARC 及び VCAM1 それぞれ単独でもウイルス量での予測モデルと比較して同等ないし良好な成績が得られた(AUC = 0.756 (ウイルス量単独、発症) 及び AUC = 0.726 (ウイルス量単独、治療介入予測)、AUC = 0.748 (SPARC、発症) 及び AUC = 0.736 (SPARC、治療介入予測)、AUC = 0.768 (VCAM1、発症) 及び AUC = 0.774 (VCAM1、治療介入予測)(表 3)。この

ことから SPARC 及び VCAM1 が血漿から測定可能な HAM 重症度指針マーカーであり、ウイルス量との組み合わせで精度の高い予測モデルの作成ができることが証明された。

D. 考案

疾患に対する適切な治療介入や病態の評価において客観的な指標は必要不可欠である。HAM 病態の評価に用いられる既存のマーカーはウイルス量、CSF ネオプテリン濃度及び可溶性 IL-2 受容体であるが、いずれも継続的な計測に基づく相対評価のみで使用可能である。本研究によって新たに同定された SPARC 及び VCAM1 はウイルス量と合わせた予測モデルを作成する事で絶対的な病態評価を行う事が可能であり、さらにいずれのマーカーも血漿の採取を行う事で測定できる事から侵襲性も低く、実用化も容易であると考えられる。

SPARC は脳神経組織においてグリア細胞に発現が局限している。NMDA 誘導性の脳炎マウスモデルでは脳炎誘導後 24 時間の段階でグリア細胞の活性化に伴って SPARC の発現が低下する事が報告され、SPARC の発現を欠損させたは脳梗塞モデルでは脳神経組織の修復の促進に伴う運動機能の改善が観察されることが報告されている。これらの観点から HAM 病態の進行において (1) グリア細胞の減少、(2) 炎症に対抗した脊髄組織修復過程におけるグリア細胞内の SPARC の発現減少が誘発され、結果的に CSF 中の SPARC が減少していくものと考えられる。また、VCAM1 は血管内皮細胞に発現している接着分子の 1 種であり、炎症の亢進によって可溶性 VCAM1 濃度が血中で増加する事が知られている。HAM 病態では脊髄での炎症が亢進しており、VCAM1 の CSF 及び血中での増加は病態進行を

反映しているものと考えられる。

E. 結論

CSFのプロテオーム解析は脳神経疾患のバイオマーカー探索に非常に強力なツールとなり得るもので、本研究においてもHAM病態を反映するバイオマーカーの同定につながった。SPARC、VCAM1及びウイルス量を用いたHAM病態の評価システムは治験を進める新規治療法の予後判定や治療開始の判断などに役立つ可能性が強く期待されるものである。

F. 健康危惧情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) A plasma diagnostic model of human T cell leukemia virus-1 associated myelopathy.

Ishihara M, Araya N, Sato T, Saichi N, Fujii R, Yamano Y, and Ueda K.
Annals of Clinical and Translational Neurology, in press, 2014.

2) Antibody-coupled monolithic silica microtips for highthroughput molecular profiling of circulating exosomes.

Ueda K, Ishikawa N, Tatsuguchi A, Saichi N, Fujii R, and Nakagawa H.
Scientific reports, 4, 6232, 2014.

3) Critical role of lysine 134 methylation on histone H2AX for gamma-H2AX production

and DNA repair.

Sone K, Piao L, Nakakido M, Ueda K, Jenuwein T, Nakamura Y, and Hamamoto R.
Nature communications, 5, 5691, 2014.

4) SMYD2-dependent HSP90 methylation promotes cancer cell proliferation by regulating the chaperone complex formation.

Hamamoto R, Toyokawa G, Nakakido M, Ueda K, and Nakamura Y.
Cancer letters, 351 (1), 126-133, 2014.

5) Identification of a nuclear protein, LRRC42, involved in lung carcinogenesis.

Fujitomo T, Daigo Y, Matsuda K, Ueda K, and Nakamura Y.
International journal of oncology, 45 (1), 147-156, 2014

2. 学会発表

1) Membrane proteome analysis to discover therapeutic targets for adult T-cell leukemia (ATL).

Ishihara M, Araya N, Sato T, Saichi N, Fujii R, Tatsuguchi A, Utsunomiya A, Yamano Y, Sugano S, and Ueda K.
第76回日本血液学会学術集会 口頭
2014年11月1日

2) Comprehensive membrane-proteomic analysis for discovery of novel therapeutic targets against adult T-cell leukemia.

Ishihara M, Araya N, Sato T, Saichi N, Fujii R, Tatsuguchi A, Utsunomiya A, Yamano Y, Sugano S, and Ueda K.
第73回日本癌学会学術総会 口頭
2014年9月27日

3) Quantitative membrane proteome
Ishihara M, Araya N, Sato T, Saichi N,
Fujii R, Tatsuguchi A, Yamano Y, and Ueda
K.

13th Annual World Congress of the Human
Proteome Organization. Oral Presentation
2014年10月8日

4) CD4陽性T細胞を用いた膜プロテオーム
解析によるHTLV-1関連脊髄症に対する新規
治療標的分子の探索

石原 誠人、新谷 奈津美、佐藤 知雄、藤井 理
沙、最知 直美、宇都宮 與、山野 嘉久、菅
野 純夫、植田 幸嗣

第1回日本HTLV-1学会学術集会 口頭
2014年8月24日

5) 膜プロテオーム解析によるヒトT細胞白
血病ウイルス-I型 (HTLV-1) 関連疾患に対
する新規治療標的分子の探索

石原 誠人、新谷 奈津美、佐藤 知雄、龍口
文子、最知直美、宇都宮與、山野 嘉久、菅
野 純夫、植田 幸嗣

profiling to discover therapeutic targets
for HTLV-I associated diseases.

日本プロテオーム学会2014年会 ポスター
2014年7月17日

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含
む)

1. 特許取得

ヒトTリンパ好性ウイルス-1 (HTLV-1)関連
脊髄症(HAM/TSP)の検査方法、及び検査用キ
ット

日本出願番号: 特願 2014-226719

日本出願日: 2014年11月7日

発明者: 植田幸嗣、石原誠人、山野嘉久

出願国: 日本

2. 実用新案登録

該当なし

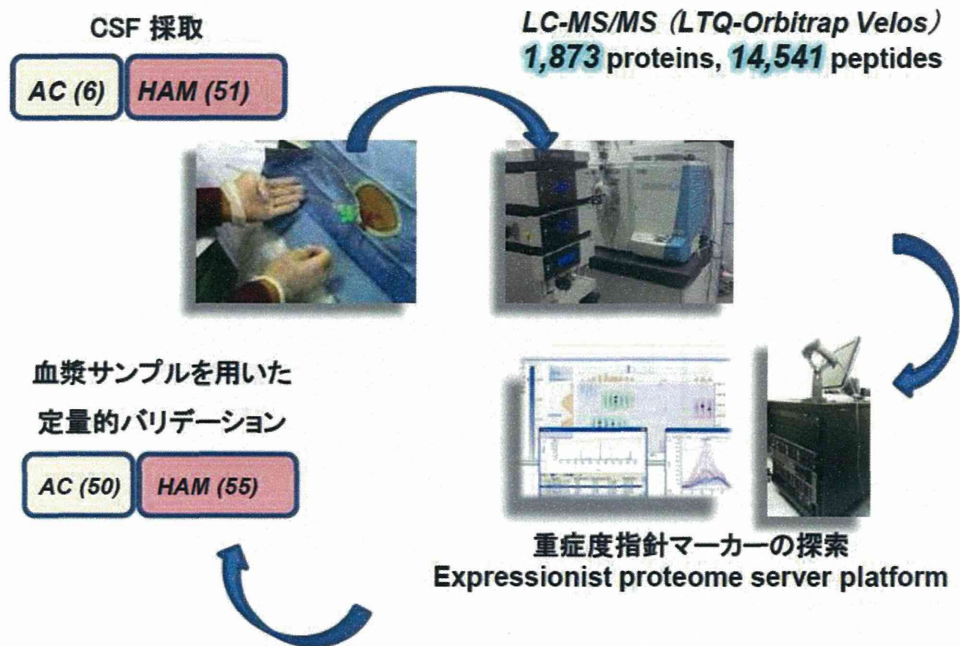


図1 重症度指針マーカ-探索の概略

無症候キャリア6例、HAM患者51例の脳脊髄液(CSF)を回収し、うち20 μ Lのトリプシン消化物に対するLC-MS/MS解析を行った。この中から統計解析によりHAM病態進行と相関して増加、ないし減少する因子をピアソンの積率相関係数の有意性検定を行う事により抽出した。うち最も重症度進行と高い相関性のある100ペプチドに関して1,873タンパク質 / 14,541ペプチドから構成される同定データセットと質量電荷比(m/z)及び保持時間(RT)を基に照合し、同定を行った。同定されたマーカ-候補はELISAを用いて105血漿サンプルにおける量的変化を明らかにし、血漿HAM重症度指針マーカ-を決定した。

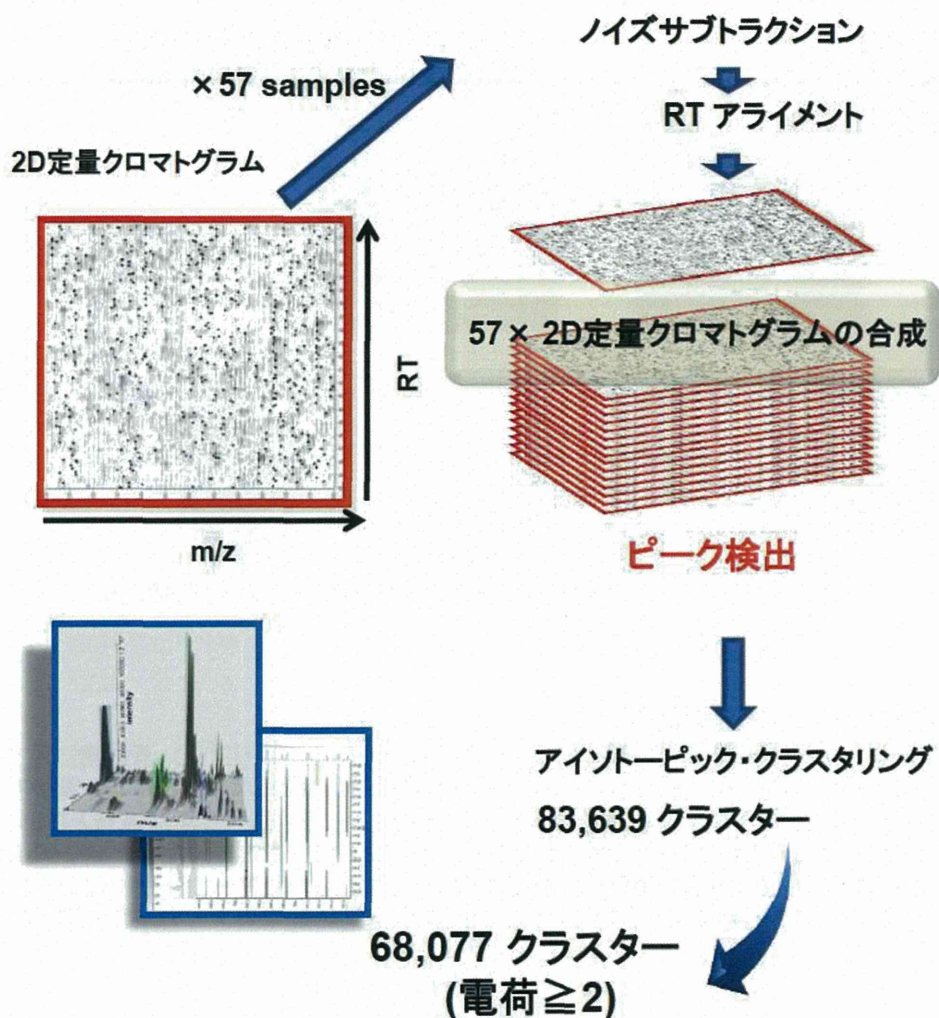


図2 RefinerMS上でのデータ処理の概要

LC-MS/MS解析によって得られたデータは質量電荷比(m/z)及びカラムへの保持時間(RT)を用いて2次元展開する事ができる。この結果得られた2D定量クロマトグラムはノイズサブトラクト、RTアライメントの後に、57枚全て結合され、全解析で検出されたピークの2Dクロマトグラム上での位置をリスト化する。この情報を基に単一分子由来のアイソトピック・クラスタを抽出し、2価以上のクラスタをペプチド由来として以降の統計解析に供した。

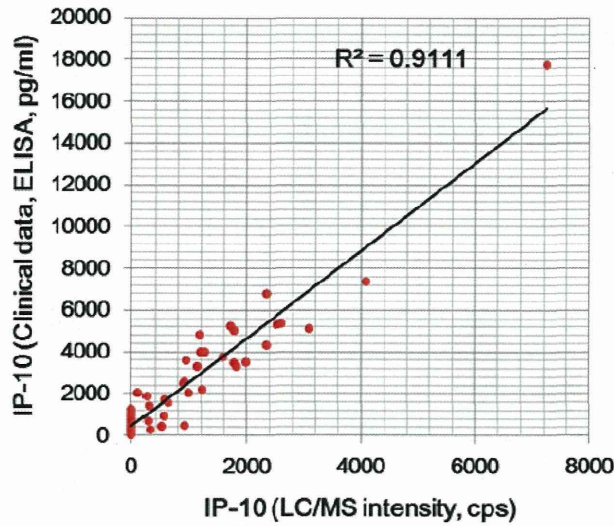


図3 CBA法によるIP-10実測値と質量分析によるIP-10検出強度の比較

脳脊髄液におけるCBA法(Flow cytometryによる定量解析)を用いたIP-10実測値と質量分析によって同定されたIP-10の検出強度を比較した結果、両者で高い相関があることが明らかとなった。この事は質量分析による定量性がELISAやCBA等の抗体を用いた測定法と同等であることを示している。

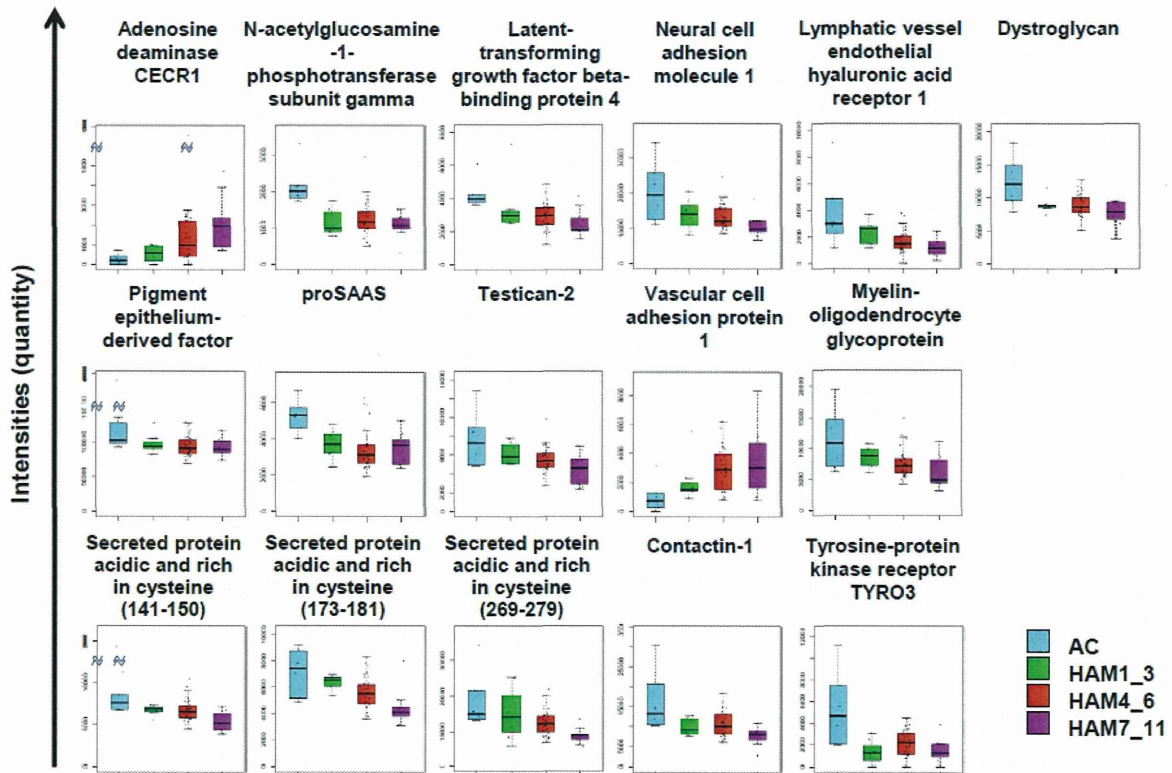


図4 HAM 重症度指針マーカー候補ペプチドの定量ボックスプロット
スクリーニングの結果同定された14タンパク質/16ペプチドの定量結果

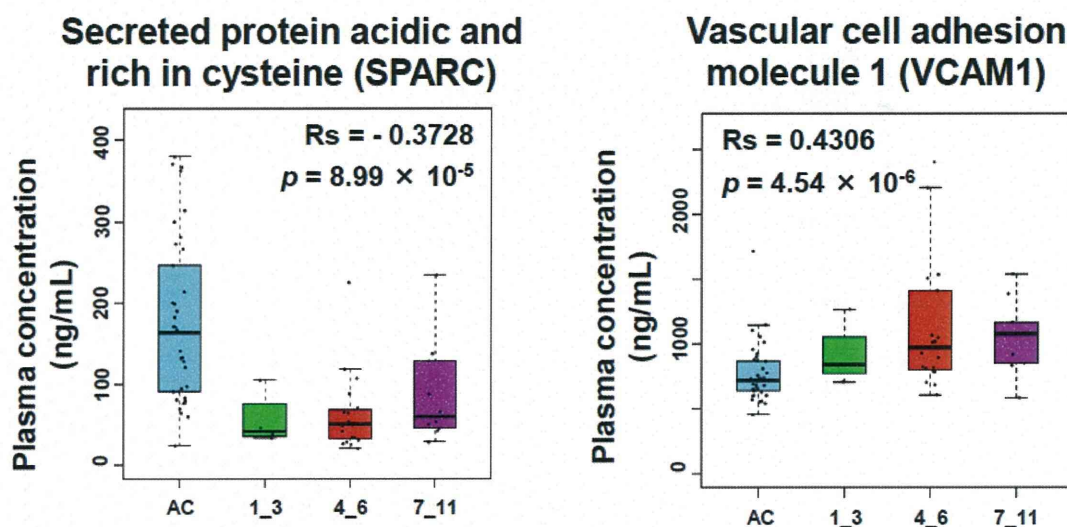
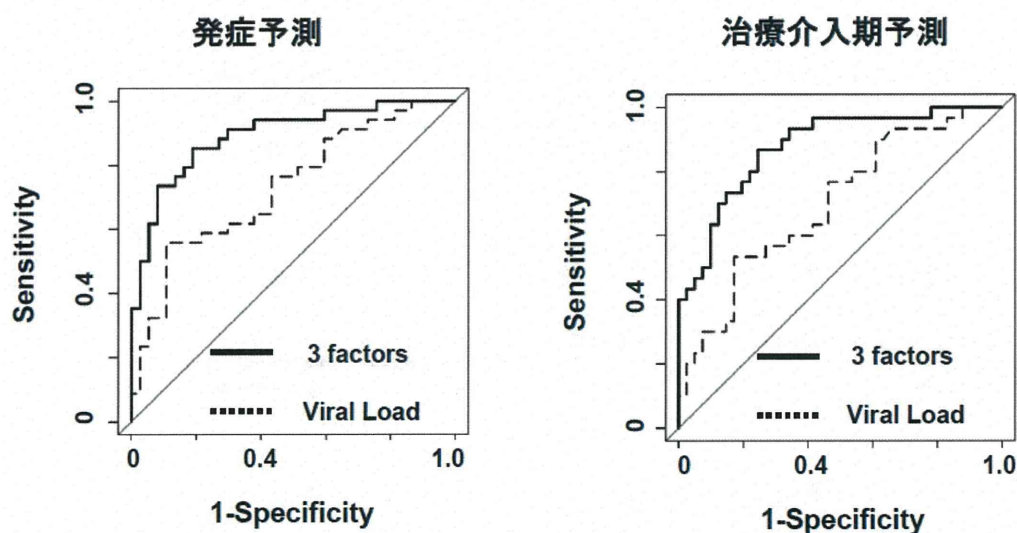


図5 血漿中のSPARC及びVCAM1

105血漿検体(無症候キャリア55例、HAM50例)を用いたSPARC及びVCAM1のELISAを行った結果、SPARC及びVCAM1は病態進行と相関する事が明らかとなった。



AUC
 0.897 for SPARC, VCAM1, Viral load
 0.756 for viral load

AUC
 0.879 for SPARC, VCAM1, Viral load
 0.726 for viral load

図6 ロジスティック回帰分析による予測モデルの構築

105血漿検体(無症候キャリア55例、HAM50例)を用いたSPARC及びVCAM1のELISAを行った結果、及びウイルス量を用いて予測モデルを構築した結果、発症及び治療介入基の病態の診断においてウイルス量単独より高い予測精度が得られた。

Test Set (n = 105)										
	Onset					Point of therapeutic intervention				
Predictors	3 factors	SPARC + VCAM1	SPARC	VCAM1	Viral load	3 factors	SPARC + VCAM1	SPARC	VCAM1	Viral load
Sensitivity %	86	88	82	80	62	81.8	79.5	81.8	56.8	61.4
Specificity %	81.8	69.1	49.1	63.6	83.6	82	80.3	54.1	82	78.7
Positive Predictive Value %	81.1	72.1	59.4	66.7	77.5	76.6	74.5	56.3	69.4	67.5
Negative Predictive Value %	86.5	86.4	75	77.8	70.8	86.2	84.5	80.5	72.5	73.8
AUC	0.897	0.861	0.748	0.768	0.756	0.879	0.856	0.736	0.774	0.726

表3 血漿SPARC、VCAM1及びウイルス量を用いた予測モデルの精度
 3 factors; SPARC + VCAM1 + ウイルス量

業務項目：

HAM のモデル動物開発と病態解明

免疫不全マウスを用いた HTLV-1 感染モデル作製と HAM 発症予防・治療法の開発

研究分担者 齊藤 峰輝 川崎医科大学微生物学教室 教授

研究要旨:

HTLV-1 感染症の予防と HAM に対する新規治療法開発のため、高度免疫不全マウスの脾臓内に直接ヒト細胞を移植するヒト化法を用いて HTLV-1 感染マウスモデルを開発し、自家製 HTLV-1 中和抗 Env gp46 単クローン抗体、抗 OX40 単クローン抗体および HAM 患者から精製した IgG による HTLV-1 感染抑制効果を検討した。マウスの脾臓内に非感染ヒト末梢血単核球 (PBMC) とマイトマイシン処理した HTLV-1 感染 T 細胞株を同時移植し、2 週間後にマウスから脾臓細胞を回収して HTLV-1 感染の有無を検討した。非感染ヒト PBMC と HTLV-1 感染細胞株の接種前後に HTLV-1 中和抗 Env gp46 単クローン抗体または HAM 患者から精製した IgG を投与することで、マウス体内におけるヒト T 細胞への HTLV-1 感染は完全に抑制された。一方、HTLV-1 Tax によって感染細胞特異的に発現誘導され、HAM 患者脊髄の病変局所浸潤細胞に強発現する分子である OX40 に対する単クローン抗体には、感染細胞を減少させる傾向が認められたが、感染阻止効果は認められなかった。

A. 研究目的

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 (HAM) および成人 T 細胞白血病 (ATL) の原因ウイルスである。我が国には、先進国で最多の約 108 万人もの HTLV-1 感染者が存在しており、ATL は死亡者数が年間 1000 人を超え、HAM 患者では約 40% が経過中に歩行不能となり生活の質が著しく障害される。HAM の病態や免疫応答、治療効果を個体レベルで解析するためには、簡便に作成可能な小動物モデルの確立が不可欠であるが、HTLV-1 がヒト細胞にのみ感染するウイルスであり、マウスの細胞に感染性がないこと等から作成できず、研究の進展に影響を及ぼしてきた。また、HTLV-1 の発見から 30 余年を経た今日においてもなお、母子感染および水平感染を防止するワクチンす

ら開発されていない。本研究では、高度免疫不全マウスの脾臓内に直接ヒト細胞を移植するヒト化法を用いて新規 HTLV-1 感染マウスモデルを作製し、*in vitro* において細胞間の HTLV-1 感染を阻害することが知られている抗 HTLV-1 中和単クローン抗体および HAM 患者血漿中の IgG が持つ HTLV-1 感染阻害効果が、*in vivo* においても認められるかどうかを解析し、将来の受動免疫療法への応用の可能性を検証した。

B. 研究方法

(1) 高度免疫不全マウス (NOD/SCID/ γ Cnull : NOG) の脾臓内にヒト末梢血単核球 (PBMC) 2×10^6 個とマイトマイシン処理した HTLV-1 感染 T 細胞株 (ILT-M1) 1×10^6 個を同時移植した。(2) 移植 2 週間後にマウスから脾臓細胞を回収し、ヒト CD4, CD8 T 細胞を抗体結合磁気ビーズにより分離した。(3)

分離したヒト CD4, CD8 T 細胞から Total RNA およびゲノム DNA を回収した。(4) Total RNA から cDNA を合成し、HTLV-1 tax、HBZ mRNA の発現を Real Time RT-PCR 法で解析した。(5) ゲノム DNA 中の HTLV-1 プロウイルス量を、TaqMan プローブを用いた Real Time PCR 法により測定した。(6) HTLV-1 Tax タンパクの発現をフローサイトメトリー (FACS) で解析した。(7) 非感染 PBMC と HTLV-1 感染細胞株の接種前後に、自家製 HTLV-1 中和抗 Env gp46 単クローン抗体 (LAT27)、HAM 患者血漿から分離精製した IgG、抗 OX40 単クローン抗体を投与して、in vivo での感染抑制効果を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、検体を提供して頂く各施設の倫理委員会の承諾を得た後に施行した。十分な説明と同意のもと、書面による研究協力承諾書が得られた被験者から採取した検体のみを用い、完全に匿名化した後に行った。動物実験は、無駄な苦痛を与えず、与えざるを得ない苦痛であっても最低限とし、必要最低限の匹数で実験を行うべく実験計画を作成し、動物実験委員会の承認を得た上で行った。

C. 研究結果

NOG マウスの脾臓から分離したヒト CD4, CD8 陽性細胞双方から HTLV-1 プロウイルス、tax および HBZ mRNA が検出され、マウス体内でヒト T 細胞に HTLV-1 感染が成立することを確認した。細胞あたりの HBZ mRNA 発現量は ATL 患者の平均より低く、HAM 患者や無症候性キャリアーと同程度であった。一方、tax mRNA 発現量は HTLV-1 感染者の PBMC 同様極めて低かった。HTLV-1 感染者の PBMC と同様に、マウスから回収したヒト PBMC に Tax 蛋白の発現は認められなかったが、短時間培養すると CD4 陽性 CCR4 陽性 T 細胞分画に選択的に発現誘導された。HTLV-1 中和抗 Env gp46

単クローン抗体である LAT27 と HAM 患者血漿から分離精製した IgG は、いずれもマウス体内においてヒト T 細胞への HTLV-1 感染を完全に抑制した (図 1)。一方、HTLV-1 Tax によって感染細胞特異的に発現誘導され、HAM 患者脊髄の病変局所浸潤細胞に強発現する分子である OX40 に対する単クローン抗体には、感染細胞を減少させる傾向が認められたが有意ではなく ($p=0.102$)、感染阻止効果も認められなかった (図 1)。

D. 考案

HTLV-1 はヒト T 細胞特異的に感染し、マウス細胞に感染性がないため、従来 HTLV-1 の感染モデル、HAM 病態モデルを作製することは困難であった。NOG (NOD-SCID/ γ cnull) マウスは、NOD-scid 系への IL-2 受容体 γ 鎖ノックアウト導入によって樹立された高度免疫不全マウスであり、ヒト T 細胞を生着させることができるため、ヒト細胞特異的に感染するウイルスによる病態モデルの作製が可能である。まず、NOG マウスの脾臓内にヒト PBMC とマイトマイシン処理した HTLV-1 感染 T 細胞株を同時移植して 2 週間後にマウスから脾臓細胞を回収し、マウス個体内に HTLV-1 感染が成立するかどうかを解析した。その結果、NOG マウスの脾臓から分離したヒト CD4, CD8 陽性細胞双方から HTLV-1 プロウイルス、tax および HBZ mRNA が検出され、マウス体内でヒト T 細胞に HTLV-1 感染が成立することを確認した。さらに、in vitro において細胞間の HTLV-1 感染を阻害することが知られている自家製 HTLV-1 中和抗 Env gp46 単クローン抗体と HAM 患者血漿から分離精製した IgG のいずれもが、in vivo における非感染ヒト T 細胞への細胞間 HTLV-1 感染を完全に抑制することを明らかにした。一方、HTLV-1 の転写制御因子 Tax によって HTLV-1 感染細胞特異的に発現誘導され、HAM 患者剖検脊髄の病変局所浸潤細胞に強発現

する分子である OX40 に対する単クローン抗体には、感染細胞を減少させる傾向はあるものの有意ではなく、感染阻止効果も認められなかった。今回、HTLV-1 感染ヒト化マウスモデルで抗 HTLV-1 中和単クローン抗体と HAM 患者血漿中 IgG の受動免疫による感染防御効果が示されたことは、これらが母子感染および水平感染を防止する有効な方法として将来臨床応用できる可能性を示している。

今後このマウスモデルを用いて、HTLV-1 抗原で感作した免疫細胞(成熟樹状細胞、CTL 等)で感染防御が可能か否か、HTLV-1 を標的とした各種ワクチン、HAM に対する薬剤の効果についても検討し、有効な HTLV-1 感染防御法、HAM 発症予防・治療法を探索したい。

E. 結論

HTLV-1 中和抗 Env gp46 単クローン抗体および HTLV-1 感染者から精製した IgG は、いずれもマウス体内におけるヒト T 細胞への HTLV-1 感染を完全に抑制した。HTLV-1 感染細胞特異的に発現する OX40 に対する単クローン抗体には感染抑制効果が認められなかった。

F. 健康危惧情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saito M. Neuroimmunological aspects of human T cell leukemia virus type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurovirol.* 20(2):164-174, 2014.
- 2) 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.*

30(6):542-552, 2014.

- 3) Saito M. Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into Th17 cells: is this also the case for multiple sclerosis? *Clin Exp Neuroimmunol.* 5(2):112-113, 2014.
- 4) Saito M., Tanaka R, Fujii H, Kodama A, Takahashi Y, Matsuzaki T, Takashima H, Tanaka Y. The neutralizing function of the anti-HTLV-1 antibody is essential in preventing in vivo transmission of HTLV-1 to human T cells in NOD-SCID/ γ cnull (NOG) mice. *Retrovirology.* 11(1):74, 2014.

2. 学会発表

- 1) 齊藤峰輝、塩浜康雄、後川 潤: HTLV-1 遺伝子およびサイトカイン発現抑制効果を指標とした HAM 治療薬・抗体医薬の検討. 第 55 回 日本神経学会学術大会, 2014 年 5 月 23 日, 福岡
- 2) 齊藤峰輝、安間恵子、松崎敏男、高嶋 博、松岡雅雄: HAM 発症関連ウイルス多型が宿主・ウイルス遺伝子発現および臨床経過に及ぼす影響の解析. 第 1 回 日本 HTLV-1 学会学術集会, 2014 年 8 月 23 日, 東京
- 3) 齊藤峰輝、塩浜康雄、後川 潤、田中勇悦: ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) 感染予防法と新規 HAM 治療薬の検討. 第 26 回神経免疫・第 19 回神経感染症合同学術集会, 2014 年 9 月 6 日, 金沢

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

ヒト T 細胞白血病ウイルス HBZ 蛋白質の検出方法（出願中）

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

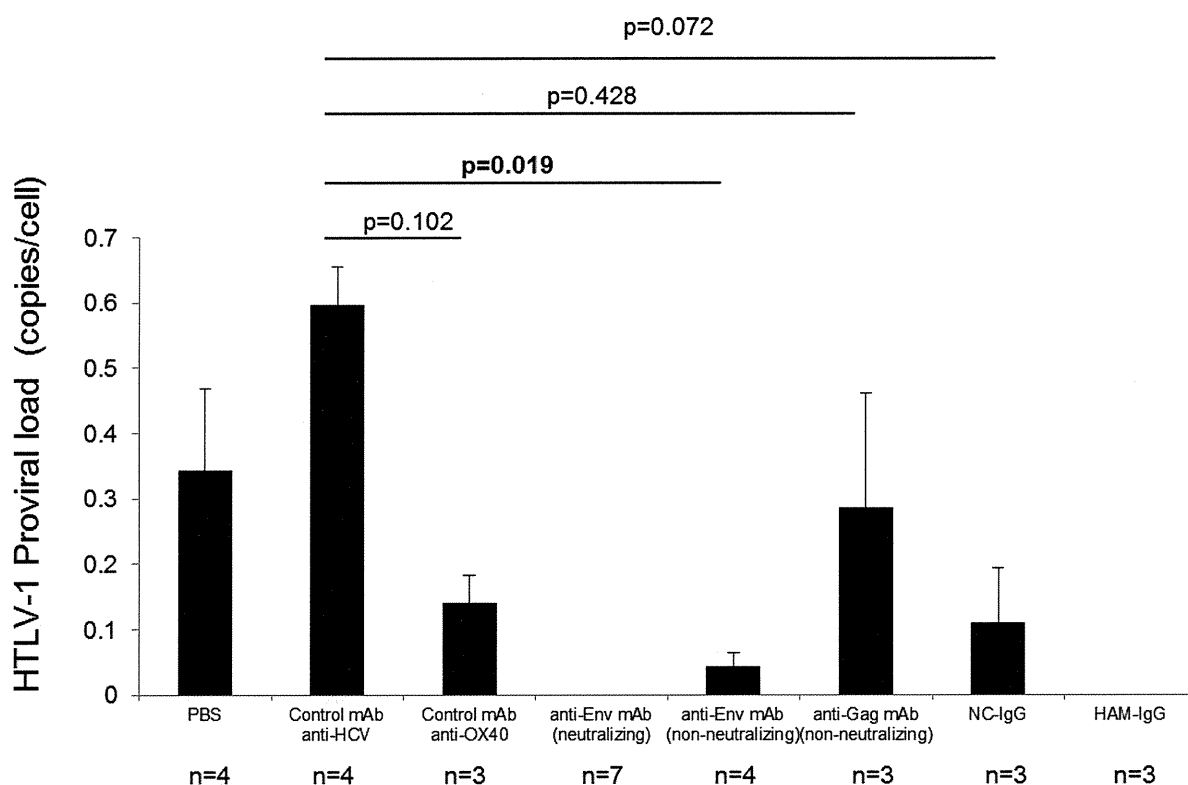


図1：ヒト化マウスを用いた各種抗体の in vivo での HTLV-1 感染阻止効果の検討
HTLV-1 中和抗 Env gp46 単クローン抗体と HAM 患者血漿から分離精製した IgG は、いずれも NOG マウス体内においてヒト T 細胞への HTLV-1 感染を完全に抑制した。一方、HTLV-1 Tax によって感染細胞特異的に発現誘導され、HAM 患者脊髄の病変局所浸潤細胞に強発現する分子である OX40 に対する単クローン抗体には、感染細胞を減少させる傾向が認められたが有意ではなく (p=0.102)、感染阻止効果も認められなかった。