

前日に 1.0×10^6 cells/mL として、2 本の 3 L スピナーフラスコ（培養液量 500 mL）に細胞を調製した。培地は PSFM 培地とした。生細胞密度が 2.0×10^6 cells/mL 及び生存率が 97.1%であることを確認し、10 mL（培養液 500 mL の 2%容量）の vP3（ロット番号：YVHT032414）を添加した。発現培養時の温度は 28°C とし、スピナーフラスコの回転数は 100 rpm とした。播種後 0 日から回収日まで毎日培養液をサンプリングし、生死細胞数計測装置にて細胞パラメータを計測した。播種後 48 時間まで発現培養をおこない、発現培養液を遠心ボトルに回収した。5,000 xg で 10 分間の遠心をおこない、培養上清を回収した。発現培養期間中の培養液は、毎日サンプリングし、総細胞密度、生細胞密度、及び生存率を測定した。また、サンプリング試料のうち 500 μ L は、5,000 xg で 10 分間遠心し、培養上清（medium）と細胞画分に分けて回収して -80°C ですべての試料がサンプリングできるまで保管した。凍結した細胞画分を 100 μ L の 0.5% トリトン X-100/PBS で再懸濁し、氷上で 15 分間静置した後、10,000 rpm で 15 分間遠心し、上清（可溶画分、supernatant）と沈殿（不溶画分、pellet）に分けて回収した。不溶画分は、回収した可溶画分と同量の 0.5% トリトン X-100/PBS に再々懸濁した。培養上清、可溶画分及び不溶画分に 5 \times DB 又は 5 \times NDB を混和し、95°C で 5 分間加熱し試料として SDS-PAGE および Western Blotting に供した。

（倫理面への配慮）

全ての実験は、国立感染症研究所 組換え DNA 実験安全委員会の承認の下に適切な封じ込め設備を有した実験室内で実施された。

C. 研究結果

1. 組換えバキュロウイルスの作製

2 回のトランスファーベクター共移入試験より得たウイルスシード液を用いてプラークアッセイをおこなった。プラークカウント数を表 1 と表 2

に記載する。プラークにはいずれも封入体は見られなかったため、相同組換え体と判断した。共移入試験 1 回目より 10 個、共移入試験 2 回目より 10 個のプラークをピックアップし、ウイルス液 1 継代目を調製した。

表 1. 共移入試験 1 回目のプラーク純化試験（プラーク数）

ウイルスシード液の希釈倍率	ウェル番号 2 番 (インキュベーション時間 5 時間)	ウェル番号 3 番 (インキュベーション時間 一晚)	ウェル番号 5 番 (陰性対照)
10	0	10	0
100	0	0	
1,000	0	0	
10,000	0	0	

表 2. 共移入試験 2 回目のプラーク純化試験（プラーク数）

ウイルスシード液の希釈倍率	ウェル番号 5 番 (インキュベーション時間 3 時間)	ウェル番号 6 番 (インキュベーション時間 一晚)	ウェル番号 4 番 (陰性対照)
10	>200	>100	0
100	308* (77)	116* (29)	
1,000	17	9	
10,000	1	2	

* プラークアッセイプレートの 1/4 面積のプラーク数を 4 倍した数値となっている。括弧内はプレートの 1/4 面積のプラーク数を示す。

2. 培養上清回収後の細胞画分を用いた目的タンパク質の発現確認

共移入試験 1 回目及び 2 回目の培養上清回収後の細胞画分を用いて抗 His-tag 抗体によるウェスタンブロットを実施したが、明らかに抗体と交叉したバンドは検出されなかった。

3. ウイルス液 1 継代目の調製

ウイルス液を添加したフラスコの細胞は、添加後 3 日目あたりから細胞が浮遊し、細胞密度が上昇しなかった。陰性対照として、ウイルス液を添加しなかった（あるいは、ダミーをピックアップして調製した培地を添加した）細胞は、回収時にはフラスコ底面全面に細胞が付着しており、培養開始時と比して細胞密度が上昇した。ウイルス液 1 継代目を回収後の細胞残渣に、DB 又は NDB を添加して試料を調製し、抗 His-tag 抗体によるウェスタンブロットを実施した（図 1）。クローン番号 018-#01～10 番は、還元条件及び非還元条件のいずれにおいても、50 kDa と 60 kDa 付近に主たる 2 本のバンドを検出した。Env キメラタンパク質は、プロセスを受けて 50 kDa を示すと考えられ、下のバンドがプロセス後のキメラタンパク質のバンドと考える。上のバンドは、プロセス前、又は部分的プロセスを受けたキメラタンパク質と考えた。

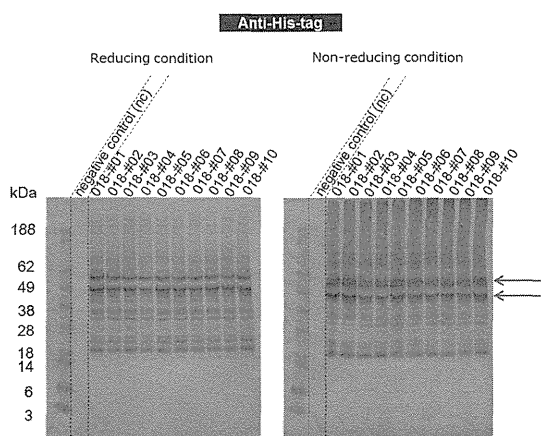


図 1. クローン番号 018-#01～10 番における目的タンパク質の発現の確認

vP1 回収後の試料を用いて抗 His-tag 抗体によるウェスタンブロットを実施した。左側は還元条件下 (Reducing condition)、右側は非還元条件下 (Non-reducing condition)

で実施した。018-#01～#10 はクローン番号、Negative control (nc) は陰性対照を示す。赤矢印は、抗体に交叉した 50 kDa 及び 60 kDa の主たる 2 本のバンドを示す。

共移入試験 2 回目の試料についてもウイルス液回収後の細胞残渣を用いて目的タンパク質の発現をウェスタンブロットにて確認した。2 回目の共移入試験においては、0.5% トリトン X-100/PBS での可溶画分 (supernatant) と不溶画分 (pellet) に分け、それぞれをサンプルバッファで抽出し、ウェスタンブロットに供した (図 2)。クローン番号 12 番～16 番及び 18 番～21 番のクローンでは、不溶画分で 2 本の交叉バンドを検出した。バンドのサイズは、50 kDa 及び 60 kDa に主たる 2 本のバンドとして検出した。クローン番号 01 番から 10 番と同じ結果となった。陰性対照ではバンドが検出されないことから、いずれもキメラタンパク質由来のバンドと考えている。共移入試験の結果、目的タンパク質を確認した結果を表 3 にまとめた。2 回の共移入試験で合計 20 個のプラークをピックアップし、そのうち 19 クローンで目的タンパク質の発現を確認し、発現が確認できなかったのは 1 クローンのみであった。ウイルス液 2 継代目 (vP2) の調製には、クローン番号 12 番を選択した。

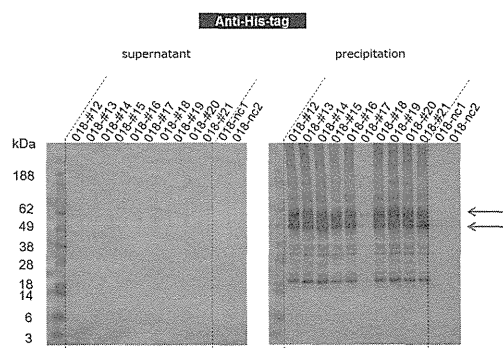


図 2. クローン番号 018-#12～21 番における目的タンパク質の発現の確認

2 回目共移入試験のウイルスシード液より単離したクローンの vP1 回収後の試料を用いて抗 His-tag 抗体によるウェスタンブロットを実施した。左側は、0.5% トリトン X-100 可溶画分、右側は不溶画分を使用した。018-#12～#21 は共移入した試料、018-nc1 及び 018-nc2 は陰性対照を示す。

赤矢印は、抗体に交叉した 50 kDa 及び 60 kDa の主たる 2 本のバンドを示す。

表 3. 目的タンパク質を発現するバキュロウイルス組換え体の取得

目的たん白質の発現の有無	クローン数と番号
有	19 クローン 018-#01~#10, #12~#16, #18~#21
無	1 クローン 018-#17

4. ウイルス液 2 継代目の調製

ウイルス液 2 継代目の調製時の細胞形態の変化と細胞パラメータを表 4 に示した。播種後 25 時間で総細胞密度及び生細胞密度は前日から倍化せず、増殖が鈍化した。細胞径も 16.50 μm から 18.84 μm に膨化した。顕微鏡により細胞の形態を観察したところ、播種後 25 時間でほぼすべての細胞でストローマ構造を観察した (図 3A)。以上の結果より、ウイルスが感染したことを確認した。播種後 52 時間において増殖が停止した。細胞の形態も、ストローマ構造からフィブリラー構造へ変化を観察した (図 3B)。以上の結果を確認して、52 時間でウイルス液 2 継代目 (vP2) を回収した。

表 4. ウイルス液 2 継代目調製時の細胞パラメータ

細胞パラメータ	播種後時間 (hpi)				
	-17.5	0	22	50	71
総細胞密度 ($\times 10^6$ cells/mL)	1.11	1.83	2.15	2.3	2.3
生細胞密度 ($\times 10^6$ cells/mL)	1.08	1.77	2.09	2.12	1.82
生存率 (%)	97.1	96.5	97.1	92.1	78.9
細胞径 (μm)	16.81	16.72	18.51	19.42	19.17

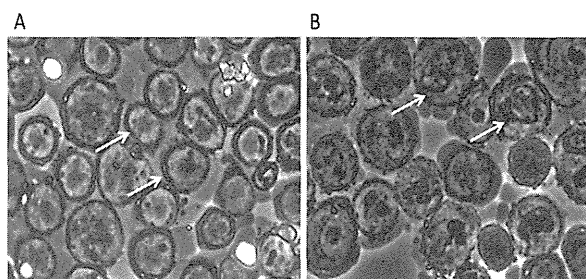


図 3. ウイルス液 2 継代目調製時の細胞形態の変化

Sf9 細胞にウイルス液 1 継代目を播種し、25 及び 52 時間後の細胞形態変化を顕微鏡により観察した。A: 25 時間後、B: 52 時間後。A の矢印はストローマ構造を、B の矢印はフィブリラー構造を示す。

5. ウイルス液 3 継代目の調製

ウイルス液 3 継代目の調製時の細胞パラメータを表 5 に示した。種後 22 時間で総細胞密度及び生細胞密度は前日から倍化せず、増殖が鈍化した。細胞径も 16.72 μm から 18.51 μm に膨化した。ウイルス液 2 継代目調製時と同様に、ほぼすべての細胞でストローマ構造を観察したことより、組換えバキュロウイルスが感染したことを確認した。播種後 50 時間において、増殖が完全に停止した。フィブリラー構造を持つ細胞が多くなったことより、感染が進行していることを確認した。播種後 71 時間において、死細胞が増えて生存率が低下し始めたことを確認して、ウイルス液 3 継代目を回収した。ウイルス液 3 継代目の調製時の細胞パラメータを表 5 に示した。

表 5. ウイルス液 3 継代目調製時の細胞パラメータ

細胞パラメータ	播種後時間 (hpi)			
	-17.5	0	25	52
総細胞密度 ($\times 10^6$ cells/mL)	1.21	1.78	2.13	2.14
生細胞密度 ($\times 10^6$ cells/mL)	1.17	1.73	2.06	1.97
生存率 (%)	96.6	97.0	96.8	92.4
細胞径 (μm)	16.98	16.50	18.84	19.33

6. 発現培養条件の検討

発現培養条件の検討時の細胞パラメータの変化を示した。播種後1日目で総細胞密度及び生細胞密度は前日から倍化せず、増殖が鈍化した。細胞径も16.16 μm から18.21 μm に膨化した。ほぼすべての細胞でストローマ構造を観察したことより、組換えバキュロウイルスが感染したことを確認した。播種後2日目において、増殖が完全に停止した。フィブリラー構造を持つ細胞が多くなったことより、感染が進行していることを確認した。播種後3日目で生存率が90%を下回り、感染が後期になったことを確認した。播種後4日目以降、顕微鏡観察で死細胞を多く見つけるようになり、播種後6日目ではほぼすべての細胞が死細胞とみられる。適切な試料の回収時期を決めるために、播種後1日目～6日目までの試料を培養上清と細胞画分（可溶画分及び不溶画分）に分けて回収し、ウエスタンブロット法により Env キメラタンパク質を検出した。細胞画分の可溶画分は、播種後1～3日目までは目的たん白質を検出した。播種後1日目はバンドが最も強く、2日目から3日目と経過するに従い、バンドは次第に薄くなり、播種後4日目以降は検出されなかった。一方、細胞画分の不溶画分は、播種後1日目よりバンドを検出し、2日目以降6日目まで強くバンドを検出した。培養上清の結果のコントラストを強調すると、2日目及び3日目で60 kDa 付近にバンドを認めたことより、非常に少ない量の目的たん白質が培養上清中に分泌されていた。今回の結果を受けて、発現培養試料は播種後48時間、もしくは2日目で発現培養液を回収し、培養上清と細胞画分を分けて回収することとした。

7. Env キメラタンパク質の発現培養

Sf9 細胞及び無血清培地を用いて目的たん白質の発現培養をおこなった。ウイルス液は、発現培養条件の検討と同じロット番号の vP3 を使用した。発現培養液ロット番号：FU1301802S 及び FU1301803S のいずれにおいてもウイルス液播種

後24時間で生細胞密度の増加が鈍化した。細胞径も15.32 μm から18.32 μm (FU1301802S)、15.78 μm ～18.23 μm (FU1301803S) へ膨化した。細胞の形態観察により、いずれの発現培養においてもすべての細胞にストローマ構造を認めたことより、組換えバキュロウイルスの感染が成立したと考えている。また、播種48時間では細胞増殖が完全に停止したことより、感染が継続していた。以上の結果より、FU1301802S 及び FU1301803S は発現培養条件の検討の結果の2 dpi までの細胞パラメータの結果を再現したと判断した。

8. Env キメラタンパク質の発現解析

特異抗体を用いたウエスタンブロットより、試料中の Env キメラタンパク質の検出を試みた。原図のコントラストを強調したが、24 及び 48 hpi の培養上清のいずれにおいても60 kDa 付近の主たるバンドは検出できなかった。次に試料を濃縮する目的で TCA 沈殿した試料を用いたウエスタンブロットでは、48 hpi の培養上清において2ロットともコントラストを強調せずに60 kDa 付近の主たるバンドを確認した。一方、細胞画分では、容易にバンドを検出した。可溶画分では24 hpi から48 hpi にかけて60 kDa 付近の主たるバンドが薄くなった。代わって、不溶画分では24 hpi から48 hpi にかけて60 kDa 付近の主たるバンドと、HTLV-1 Env キメラタンパク質由来と考えるバンドが著しく増えた。以上の結果は、発現培養条件の検討の結果を再現したものであり、狙い通りに試料を回収したことを確認した。

D. 考 察

本研究では、主要な中和抗体誘導抗原として考えられている HTLV-1 のエンベロープである Env タンパク質の細胞外ドメインに三量体化シグナルを誘導し感染性ウイルスのエンベロープと同様の構造、抗原性を持つ Env キメラタンパク質をバキュロウイルス発現ベクターシステムにより製造することを目的とした。Env キメラタンパク質を、

ポリヘドリン遺伝子と相同組換えした組換えバキ
ュロウイルスを作製し、特異抗体によるスクリー
ニングで Env キメラタンパク質を発現するクロー
ンを得た。ウエスタンブロットにより 60 kDa 及び
50 kDa 付近に主たる 2 本のバンドとして検出され
た。当初計画では、培養上清への分泌を期待した
が、発現培養条件の検討の結果、細胞画分の不溶
画分に多く回収された。時間経過とともに不溶画
分には 60 kDa 付近のバンドだけでなく、高分子か
ら低分子まで複数のバンドが検出されることにな
った。これらのバンドは、Env キメラタンパク質
由来と考えられる。60 kDa よりもサイズの小さ
いバンドは分解物と考えられ、サイズの大きなバ
ンドは、細胞内で強固な凝集体を形成し、SDS に
より可溶化できなかつたものと考えている。播種
後 48 時間の培養上清には、非常に弱いバンドであ
るが、目的タンパク質を検出したことより、目的
タンパク質の一部は培養上清に分泌されていたと
考えられた。今後、大量培養を行い、培養上清か
ら目的タンパク質の精製を試みるが、発現効率自
体の改善のために中和エピトープが集まる SU 以
外を削っていくなど抗原設計の変更を考慮する必
要があると考えられた。

E. 結 論

HTLV-1 感染予防ワクチンの開発のために最も
有力な感染防御抗原候補である Env タンパク質抗
原を実用的なワクチン抗原製造系として実績のあ
る昆虫細胞タンパク質合成系を用いて Env タンパ
ク質合成系の構築を試みた。目的のタンパク質合
成に成功したが、その収量は多くなく、今後さら
なる改良が必要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) El Hajj H, Khalil B, Ghandour B, Nasr R, Shahine S, Ghantous A, Abdel-Samad R, Sinjab A, Hasegawa H, Jabbour M, Hall WW, Zaatari G, Dbaibo G, Pisano C, Bazarbachi A, Darwiche N. Preclinical efficacy of the synthetic retinoid ST1926 for treating adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*. 2014 Sep 25;124(13):2072-80.
- 2) Hasegawa H, van Reit E, Kida H. Mucosal immunization and adjuvants. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;386:371-80.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

高い HTLV-1 感染細胞傷害能を有する CTL 誘導に関わる研究開発

担当責任者 俣野 哲朗 国立感染症研究所エイズ研究センター センター長
研究協力者 松岡 佐織 国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官

研究要旨 HTLV-1 tax トランスジェニックマウス由来の ATL 細胞を移植したマウスにおいて、脾臓由来のリンパ球中の tax cDNA の定量法を確立し、移植後 3 週間にわたり tax cDNA 量が維持されていることを確認した。このことは移植細胞が維持されていることを示すものであり、この移植系は Tax 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の有効性の評価系として有用な可能性が示された。また、この評価系に用いることを目的に、HTLV-1 tax cDNA を組み込んだアデノウイルス (AdV) ベクターを作製した。

A. 研究目的

HTLV-1 感染症は ATL (成人 T 細胞白血病) あるいは HAM (HTLV-1 関連脊髄症) 等の重篤な疾病発症に結びつくことから、その感染・発症の防御法の開発は重要課題であり、HTLV-1 感染症克服に向け、ワクチン開発は重要な戦略である。本研究では、HTLV-1 抗原発現細胞に対する有効な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 反応を増強するワクチン開発に結びつく研究を進めることとした。HTLV-1 は、感染細胞の伝播により感染が拡大することから、感染細胞発現抗原を標的とする免疫誘導は感染防御に結びつくことが期待される。また、CTL による HTLV-1 感染細胞の排除は、ATL 発症防御に結びつくことも期待される。

HTLV-1 は潜伏感染を呈し、感染細胞において HTLV-1 抗原の多くはその発現が抑制されている。これまでの文献等をもとに、本研究では標的抗原候補として重要と考えられる HTLV-1 Tax を標的とする CTL 反応を誘導し、その効果を検証することとした。我々はこれまで、Tax トランスジェニック

クマウス由来の mATL 細胞の同系マウスへの移植実験を行ってきたが、平成 26 年度には、この系を Tax 特異的 CTL 評価系に活用できるかどうかを検討することとした。具体的には、リンパ球中の provirus tax cDNA の定量法を確立し、mATL 細胞を移植されたマウスにおける tax cDNA を定量することにより、移植 mATL 細胞の動態を調べることにした。また、この系を用いて Tax 特異的 CTL 誘導効果を検証するために、HTLV-1 tax cDNA を組み込んだアデノウイルス (AdV) ベクターを作製した。

B. 研究方法

本研究事業の研究代表者が開発した独自の ATL 発症モデルである Tax トランスジェニックマウス (Nat Med 12:466, 2006) 由来の mATL 細胞を利用した。研究代表者との共同実験で mATL 細胞 1×10^6 を移植された同系の B6 マウスの移植後 1 週目 (3 頭) および 3 週目 (3 頭) の脾臓および非移植マウス (2 頭) の脾臓より分離したリンパ球から各群各個体の脾臓由来 DNA を抽出した。これまでに

構築した Light Cycler を用いた tax cDNA 定量法を改良して確立し、抽出した DNA 中の tax cDNA 量を定量した。一方、tax cDNA を組み込んだ AdV (AdV-Tax) ベクターを構築した。

(倫理面への配慮)

動物実験については、国立感染症研究所の動物実験委員会の審査・承認後に開始した。用いた組換え生物等については、機関承認済みである。

C. 研究結果

mATL 細胞移植後 1 週目および 3 週目のいずれの脾臓由来細胞においても、tax cDNA が検出された。1 週目と 3 週目では、tax cDNA 量に明確な差は認められなかった。また、AdV-Tax ベクターを作製した。

D. 考察

mATL 細胞の移植後 3 週目まで tax cDNA が検出され、1 週目と 3 週目で明確な差が認められなかったことは、Tax トランスジェニックマウス由来 ATL 細胞を移植した同系マウスにおいて、3 週間は移植細胞が維持されることを示している。この系を利用することにより、ワクチンにより誘導された Tax 特異的 CTL 反応が、mATL 細胞をどの程度排除するかを調べることができると考えられる。したがってこの系は、Tax 特異的 CTL の有効性評価に有用であると期待される。本年度に作製した AdV-Tax ベクターを用い、今後、この系を活用して、AdV-Tax ベクター接種による Tax 特異的 CTL 誘導による mATL 細胞排除効果を検証する計画で

ある。

E. 結論

Tax トランスジェニックマウス由来 ATL 細胞を移植した同系マウスにおける tax cDNA 量の解析系を確立し、移植後 3 週目までは移植細胞が維持されることを確認した。この系は、ワクチンによる Tax 特異的 CTL 誘導効果の評価系として有用と考えられる。また、Tax 特異的 CTL 誘導のための Tax 発現 AdV ベクターを作製した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Terahara K, Ishii H, Nomura T, Takahashi N, Takeda A, Shiino T, Tsunetsugu-Yokota Y, Matano, T. Vaccine-induced CD107a⁺ CD4⁺ T cells are resistant to depletion following AIDS virus infection. J Virol 88:14232-14240, 2014.

2. 学会発表

- 1) 中村碧、高原悠佑、松岡佐織、三浦智行、小柳義夫、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗：抗 HIV 薬投与下の治療ワクチン接種により誘導される CD8 陽性 T 細胞の SIV 複製抑制能の解析。第 28 回日本エイズ学会学術集会、大阪、2014 年 12 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

プロテオミクス解析、バイオマーカー探索、 薬剤スクリーニングに関わる研究開発 —無細胞蛋白質合成系を用いた HTLV-1 蛋白質の 合成とワクチン開発への応用—

担当責任者 梁 明秀 横浜市立大学医学部微生物学 教授
研究協力者 松永 智子 横浜市立大学医学部微生物学 特任助手

研究要旨 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・リンパ腫(ATL)や HTLV-1 関連脊髄症(HAM)等を発症する原因ウイルスである。HTLV-1 感染者における関連疾患の生涯発症リスクは感染者の数%と少ないが、大都市を中心に感染者数は増加しつつある。現在、HTLV-1 の感染や関連疾患を予防する方法やワクチンは確立されていないため、感染および発症予防ワクチンの開発が望まれている。我々は、これまでに、コムギ無細胞タンパク質合成系により作製した可溶性全長 HTLV-1 ウイルスタンパク質と簡便で迅速な検出が可能な化学増幅型ルミネッセンスプロキシミティホモジニアスアッセイ、アルファスクリーン法を用いた抗原抗体反応の検出系を構築し、HTLV-1 感染患者および ATL 患者の血清に含まれる抗 HTLV-1 ウイルスタンパク質抗体の検出を行なった。本年度は、全長 Gag、Tax-1、Env に対する抗体が検出された患者血清を用いて、抗体認識部位の同定および HTLV-1 感染ヒト化マウスにおける抗 HTLV-1 抗体の検出を試みた。

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・リンパ腫(ATL)などの血液系の悪性疾患や HTLV-1 関連脊髄症(HTLV-1 associated myelopathy:HAM)等の重篤な神経疾患を引き起こす原因ウイルスである。HTLV-1 感染者における関連疾患の生涯発症リスクは感染者の数%と少ないが、現在 HTLV-1 感染者は全国で増加傾向にあり、上記の疾患の発症予防法の開発に向けた基礎研究を進めることは重要である。しかしながら、HTLV-1

感染の防御や ATL の発症を予防するワクチンや効果的な治療薬は開発されていない。近年、ATL や HAM 発症患者における患者血清中の HTLV-1 特異的抗体のプロファイリングが報告され、発症患者血清中の抗体価と疾患発症の関連性が解明されつつある。しかしながら、報告されている手法は、培養細胞への遺伝子導入により合成したウイルスタンパク質を患者血清を用いて免疫沈降する方法であり、定量性に問題がある。また一般的に結合能の弱い抗体は検出できない。

我々は、これまでにコムギ無細胞系により作製

した可溶性全長 HTLV-1 タンパク質とアルファスクリーン法を活用した抗体検出法により、HTLV-1 感染患者および ATL 患者の血清中に含まれる抗 HTLV-1 タンパク質抗体の検出を行なった。本年度は、全長 Gag、Tax-1、Env タンパク質に対する抗体が検出された患者血清を使って、抗体の認識部位の同定を試みた。

B. 研究方法

1. コムギ無細胞系による HTLV-1 Gag、Tax-1、Env 部分タンパク質の合成

これまでに作製した HTLV-1 (strain Japan ATK-1 subtype A) がコードする全長 *gag*, *env*, *tax-1* を挿入した無細胞タンパク質発現ベクター pEU-His-ORF-bls (bls; biotin ligation site GLNDIFEAQKIEWHE, S1: linker sequence LHPPPPRIS) を鋳型に、各々 Gag; p19, p24, p15、Tax-1; 1-115, 116-248, 249-353、Env; gp46, gp21 の deletion mutant タンパク質 (図 1) を発現するベクターを作製した。作製した pEU ベクターを鋳型に SPu primer 及び AODA2303 primer を用いて PCR 法により転写鋳型を作製し、SP6 polymerase を用いた転写反応により mRNA を合成、続いてコムギ無細胞合成系・重層法によりタンパク質合成を行った。合成時には、界面活性剤である Brij35 や塩化亜鉛 ZnCl₂ の添加によりウイルスタンパク質の可溶性を亢進させた。タンパク質のビオチン化は、下層にコムギ無細胞系で合成した biotin ligase 1μl (~50ng/μl) および 終濃度 0.5μM Biotin を加えることにより行った。

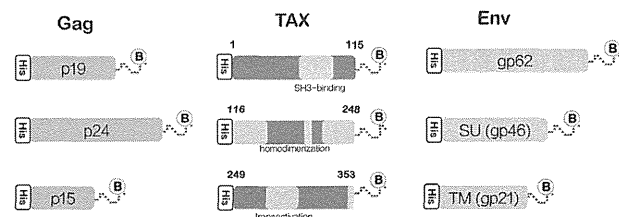


図 1. Deletion mutant 模式図

2. 化学増幅型ルミネッセンスプロキシミティホモジニアスアッセイ、アルファスクリーン法による

患者血清中の抗体検出

まず、C 末端をビオチン化した HTLV-1 全長タンパク質 Gag, Tax-1, Env の各 deletion mutant タンパク質を無細胞合成し、抗原特異的抗体または患者血清と混合後、Alphascreen 検出用ビーズを加えることで、抗原タンパク質の C 末端にストレプトアビジンコートされたドナービーズが結合し、抗原に結合した特異抗体にプロテイン G がコートされたアクセプタービーズが結合する。これら 2 つのビーズが近接した複合体を形成させた後、680 nm の励起光を照射することで、ドナービーズ周囲の酸素分子が一重項酸素に変換され 200 nm の範囲で溶液中を拡散し、アクセプタービーズを発光させシグナルとして検出される。特異的抗体が存在しない場合は、ビーズ同士が近接できないためシグナルが検出されないというアイデアに基づいている。

(倫理面への配慮)

本研究において、遺伝子組換え実験を用いることから、研究者が所属する機関の組換え DNA 実験安全委員会、バイオセーフティ委員会、動物実験委員会、医学研究倫理委員会等の承認・認可を得て実験を行った。また、本年度はヒト検体を使用した実験を実施しているが、臨床サンプルの解析及びデータの公表にあたっては、倫理委員会の規則に則り、当該患者 (感染者) の同意を得た上で行った。

C. 研究結果

1. HTLV-1 タンパク質の合成

コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて作製した HTLV-1 Gag, Tax-1, Env の deletion mutant タンパク質は、Brij 35 および ZnCl₂ 添加により可溶性タンパク質として合成が確認された (図 2)。これらの全長タンパク質を活用し、血清中の微量抗体の測定を実施した。

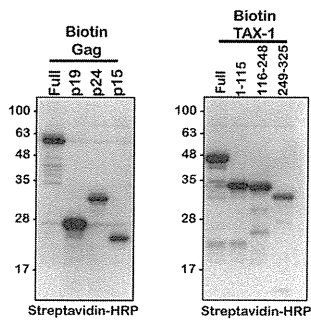


図 2. ビオチン化 Gag および Tax deletion mutant タンパク質発現

2. アルファスクリーン法を用いた抗 HTLV-1 抗体の測定および抗体認識部位の同定

昨年度行なった全長タンパク質を用いたアッセイにおいて、抗体が検出された患者血清を Gag は 10 検体、Tax-1、Env は 7 検体ずつ選択した(図 3)。

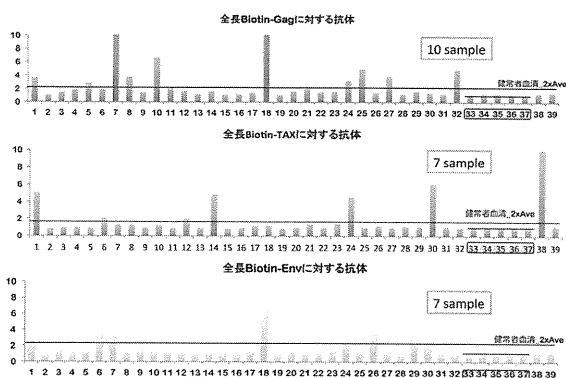


図 3. 全長タンパク質に対する抗体検出

抗原として 1. で作製した C 末端がビオチン標識された deletion mutant タンパク質を用い、上記のように選択した血清を用いて抗体のエピトープ解析を行なった(図 4)。Gag に対するエピトープは、p19 もしくは p24 に対する抗体の産生がみられ、Tax に対するエピトープは、Tax-1 の N 末端側(1-115)に対する抗体が産生されている傾向があった。

また、HTLV-1 感染ヒト化マウスにおける抗 HTLV-1 抗体の検出を試みた結果、7 匹中 2 匹の血清において Gag、Env および Tax に対する微量抗体が検出された。

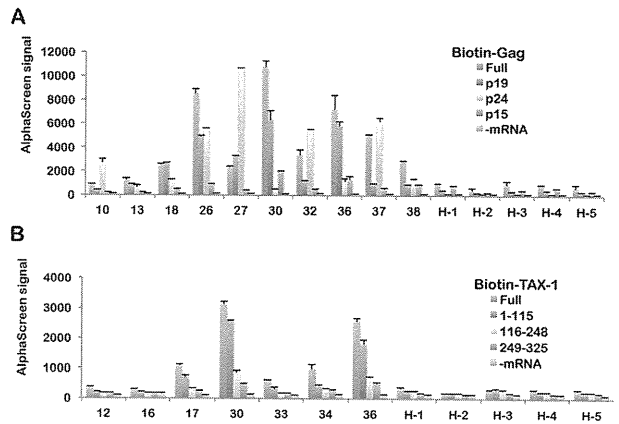


図 4. Deletion mutant タンパク質を用いた Gag (A)、Tax-1 (B) に対するエピトープマッピング

D. 考察

本研究において、HTLV-1 感染患者および ATL 発症患者血清中に存在する抗 HTLV-1 抗体のエピトープに違いがあることが予想された。今後は本アッセイの結果と臨床背景との関連を検討し、症例数を増やしてデータを集積することで、患者抗体レパートリーによる ATL の発症予測に結びつく可能性がある。

E. 結論

これまでに開発したコムギ無細胞系とアルファスクリーン法を組み合わせた抗体検出系を用い、HTLV-1 Gag, Tax-1, Env に関して抗体が検出された患者血清に含まれる抗 HTLV-1 抗体の認識部位を同定した。また、モデル動物において誘導された微量抗 HTLV-1 抗体の検出にも成功した。今後は本法を用いて、HTLV-1 感染に伴う抗体誘導の詳細な解析を行う予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Zhang LF, Tan DQ, Jeyasekharan AD, Hsieh WS, Ho AS, Ichiyama K, Ye M, Pang B, Ohba K, Liu X, de Mel S, Cuong BK, Chng WJ, Ryo A, Suzuki Y, Yeoh KG, Toan NL, Yamamoto N. Combination of vaccine-strain measles and mumps virus synergistically kills a wide

- range of human hematological cancer cells:
Special focus on acute myeloid leukemia.
Cancer Lett. 2014, 354(2):272-80.
- 2) Furukawa A, Sugase K, Morishita R, Nagata T, Kodaki T, Takaori-Kondo A, Ryo A, Katahira M. Quantitative analysis of location- and sequence-dependent deamination by APOBEC3G using real-time NMR spectroscopy. Angew Chem Int Ed Engl. 2014, 53(9):2349-52.
- 3) Matsunaga S, Kawakami S, Matsuo I, Okayama A, Tsukagoshi H, Kudoh A, Matsushima Y, Shimizu H, Okabe N, Hirano H, Yamamoto N, Kimura H, Ryo A. Wheat germ cell-free system-based production of hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of human parainfluenza virus type 3 for generation and characterization of monoclonal antibody. Front Microbiol. 2014, 5:208.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

エピトープ解析、モデルマウスに関わる研究開発 —HTLV-1 の免疫病態、発症予防ワクチンの 解析を目指したマウスモデルの作製—

担当責任者 外丸 詩野 北海道大学大学院医学研究科 准教授

研究要旨 成人T細胞白血病・リンパ腫 (ATL) や HTLV-1 関連脊髄症 (HTLV-1 associated myelopathy: HAM) 等の HTLV-1 関連疾患は、HTLV-1 感染者 (キャリア) に 50 年近い潜伏期を経て発症する重篤な疾患であり、ウイルスに対する免疫応答の減弱や異常が感染細胞の増加につながり、疾患発症に関わっていることが推定されている。HTLV-1 の感染予防や関連疾患の発症予防のためには有効なワクチン開発が望まれているが、ワクチン効果を判定する目的、あるいはウイルスに対する免疫病態を検討する目的において、より有用なモデル動物の開発が必要である。

HTLV-1 に対する免疫応答には T 細胞応答が重要であり、プロテアソームは T 細胞の免疫応答に重要な役割を果たしている。さらに、プロテアソームの機能は加齢により変化し、自己免疫疾患の発症や免疫老化に関連することが注目されており、プロテアソームの機能異常は HTLV-1 関連疾患の免疫病態に関連している可能性が考えられる。

本年度では、ワクチン効果を判定する目的、あるいは HTLV-1 関連疾患の免疫病態を解析する目的で、班長の長谷川らが開発した Tax トランスジェニックマウス (ATL 発症モデル) と $\beta 5t$ -Tg を交配し、あたらしいモデルである Tax/ $\beta 5t$ ダブルトランスジェニックマウス (Tax/ $\beta 5t$ -Tg) を作製し、解析を行った。6 ヶ月間の観察では末梢血に異型リンパ球を少数観察するものの、明らかな ATL の発症は観察されなかった。引き続き、Tax/ $\beta 5t$ -Tg の観察期間を延長して、表現型の解析を行う。さらに、プロテアソーム遺伝子改変マウスへの ATL 細胞株の移入実験を推進し、有用なモデル動物の開発を目指す計画である。

A. 研究目的

HTLV-1 関連疾患の免疫病態を解析する目的で、さらにワクチン効果を判定する目的で、あたらしいモデルである Tax/ $\beta 5t$ ダブルトランスジェニックマウス (Tax/ $\beta 5t$ -Tg) を作製する。HTLV-1 関連疾患の免疫病態が明らかとなり、有効なワクチンが開発されることで、HTLV-1 関連疾患の発症予防が期待される。

B. 研究方法

1. マウスモデルの作製

$\beta 5t$ -Tg の作製には、発現プロモーター-pCAGGS (CMV-IE, chicken β -actin, rabbit β -globin)

を用い、C57BL/6N (B6) をバックグラウンドとして、マウス $\beta 5t$ cDNA を全身発現するトランスジェニックマウスの作製をオリエンタル酵母(株)に委託した。また、Tax トランスジェニックマウスを国立感染症研究所より供与を受け、 $\beta 5t$ -Tg と交配した。産出した仔マウスの尾組織より DNA を抽出し、 $\beta 5t$ および Tax 遺伝子導入の状態を確認した。

2. 組織学的解析

Tax/ $\beta 5t$ -Tg を 6 ヶ月の経過観察の後、犠牲死させ、組織を採取した。HE 染色標本、および末梢血の塗抹標本を作製し、ATL 発症の有無を検討した。

C. 研究結果

6 ヶ月齢の Tax/ $\beta 5t$ -Tg では末梢血に核のくびれの目立つ異型リンパ球を少数観察したが、明らかな ATL の発症は認めなかった。引き続き、観察期間を延長し、表現型の解析を行う。

D. 考察

ATL は数十年の長い潜伏期間の後に発症するが、加齢による免疫応答の減弱がウイルス感染細胞の増加の原因となり、ATL の発症につながる可能性が指摘されている。また、発症予防ワクチンの接種対象者には、成年期以降のキャリアが多く含まれるが、小児と成人や老年者ではワクチン効果に相違が見られることがしばしば遭遇され、HTLV-1 関連疾患のワクチン制御には免疫応答の年齢による変化とワクチン誘導に対して有効なウイルス抗原の網羅的解析が必要となる。作製した Tax/ $\beta 5t$ -Tg マウスは、6 ヶ月の観察で明らかな ATL の発症は認めなかったが、引き続き、観察期間を延長し、表現型の解析を行う。また、プロテアソーム遺伝子改変マウスへの ATL 細胞株の移入実験を推進し、有用なモデル動物の開発を目指す計画である。

E. 結論

HTLV-1 関連疾患の免疫病態、発症予防ワクチンの解析に有用なマウスモデルの作製を目指し、引き続き Tax/ $\beta 5t$ -Tg マウスの解析、新たなモデルの作製を推進する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hamano R, Baba T, Sasaki S, Tomaru U, Ishizu A, Kawano M, Yamagishi M, Mukaida N. Ag and IL-2 immune complexes efficiently expand Ag-specific Treg cells that migrate in response to chemokines and reduce localized immune responses. *Eur J Immunol.* 2014, 44(4):1005-15.
- 2) Imamoto T, Nakazawa D, Shida H, Suzuki A, Otsuka N, Tomaru U, Ishizu A. Possible linkage between microscopic polyangiitis and thrombosis via neutrophil extracellular traps. *Clin Exp Rheumatol.* 32(1):149-150, 2014
- 3) Sato T, Yamano Y, Tomaru U, Shimizu Y, Ando H, Okazaki T, Nagafuchi H, Shimizu J, Ozaki S, Miyazawa T, Yudoh K, Oka H, Suzuki N. Serum level of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 as a biomarker of disease activity in relapsing polychondritis. *Mod Rheumatol.* 24(1):129-36, 2014
- 4) Ströbel P, Hartmann E, Rosenwald A, Kalla J, Ott G, Friedel G, Schalke B, Kasahara M, Tomaru U, Marx A. Corticomedullary differentiation and maturational arrest in thymomas. *Histopathology.* 64(4):557-66, 2014
- 5) Matsui Y, Tomaru U, Miyoshi A, Ito T, Fukaya S, Miyoshi H, Atsumi T, Ishizu A. Overexpression of TNF- α converting enzyme promotes adipose tissue

- inflammation and fibrosis induced by high fat diet. *Exp Mol Pathol.* 2014, 97(3):354-8.
- 6) Nakazawa D, Shida H, Tomaru U, Yoshida M, Nishio S, Atsumi T, Ishizu A. Enhanced Formation and Disordered Regulation of NETs in Myeloperoxidase-ANCA-Associated Microscopic Polyangiitis. *J Am Soc Nephrol.* 2014, 25(5):990-7.
- 7) Ando R, Noda K, Tomaru U, Kamoshita M, Ozawa Y, Notomi S, Hisatomi T, Noda M, Kanda A, Ishibashi T, Kasahara M, Ishida S. Decreased proteasomal activity causes photoreceptor degeneration in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014 3;55(7):4682-90.
- 8) Araya N, Sato T, Ando H, Tomaru U, Yoshida M, Coler-Reilly A, Yagishita N, Yamauchi J, Hasegawa A, Kannagi M, Hasegawa Y, Takahashi K, Kunitomo Y, Tanaka Y, Nakajima T, Nishioka K, Utsunomiya A, Jacobson S, Yamano Y. HTLV-1 induces a Th1-like state in CD4+CCR4+ T cells. *J Clin Invest.* 2014 124(8):3431-42.
- 9) Iinuma C, Waki M, Kawakami A, Yamaguchi M, Tomaru U, Sasaki N, Masuda S, Matsui Y, Iwasaki S, Baba T, Kasahara M, Yoshiki T, Paletta D, Herrmann T, Ishizu A. Establishment of a vascular endothelial cell-reactive type II NKT cell clone from a rat model of autoimmune vasculitis. *Int Immunol.* 2014, 27(2):105-14.
- 10) Tomaru U, Tsuji T, Kiuchi S, Ishizu A, Suzuki A, Otsuka N, Ito T, Ikeda H, Fukasawa Y, Kasahara M. Decreased expression of a thymus-specific proteasome subunit b5t in Down syndrome patients. *Histopathology.* 2015, in press.
- 11) Tsuchisaka A, Kaneko S, Imaoka K, Ota M, Kishimoto K, Tomaru U, Kasahara M, Ohata C, Furumura M, Takamori S, Morita E, Hashimoto T. Presence of autoimmune regulator and absence of desmoglein 1 in thymoma associated with a pemphigus foliaceus patient. *Br J Dermatology* 2015, in press.
- 12) Honma R, Kinoshita I, Miyoshi E, Tomaru U, Matsuno Y, Shimizu Y, Takeuchi S, Kobayashi Y, Kaga K, Taniguchi N, Dosaka-Akita H. Expression of Fucosyltransferase 8 Is Associated with an Unfavorable Clinical Outcome in Non-Small Cell Lung Cancers. *Oncology.* 2015, in press.
2. 学会等での講演、発表
- 1) 木内静香、外丸詩野、紺野沙織、石津明洋、宮島祥太、平川彩香、笠原正典：胸腺におけるプロテアソームキモトリプシン様活性サブユニットの発現とT細胞選択 第103回日本病理学会総会、広島、2014年4月
- 2) 伊藤智樹、外丸詩野、大村優、石津明洋、笠原正典：プロテアソーム機能異常と脳機能の低下 第103回日本病理学会総会、広島、2014年4月
- 3) 竹中淳規、大塚紀幸、藤田裕美、中馬誠、外丸詩野、石津明洋、笠原正典：高齢男性でみられたEBV陽性肝脾 $\gamma\delta$ T細胞リンパ腫の一例 第103回日本病理学会総会、広島、2014年4月
- 4) 三次有奈、山田真衣、舘山ゆう、楠由宏、志田玄貴、中沢大悟、外丸詩野、三好秀明、渥美達也、石津明洋：高血糖による好中球細胞トラップ（neutrophil extracellular traps: NETs）の形成亢進 第47回北海道病理談話会（病理分科会）、旭川、2014年10月

- 5) 志田玄貴、中沢大悟、舘山ゆう、山田真衣、楠由宏、三次有奈、外丸詩野、渥美達也、石津明洋：抗ラクトフェリン抗体の病原性 第47回北海道病理談話会(病理分科会)、旭川、2014年10月
- 6) 伊藤智樹、外丸詩野、大村優、戸松留花、石津明洋、笠原正典：プロテアソーム機能低下モデルマウスにおける脳機能障害の解析 第47回北海道病理談話会(病理分科会)、旭川、2014年10月
- 7) Shizuka Kiuchi, Utano Tomaru, Saori Konno, Shota Miyajima, Akihiro Ishizu, Masanori Kasahara : Aberrant expression of proteasomal $\beta 5$ subunit affects T cell repertoires in the thymus. 第43回日本免疫学会総会・学術集会、京都、2014年12月
- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

ヒト化マウスを用いた感染予防ワクチンの評価 —HTLV-1 感染モデルマウスを用いた 抗 Tax ペプチドワクチンの評価—

担当責任者 田中 正和 関西医科大学微生物学講座 助教

研究要旨 HTLV-1 感染個体内における感染細胞の制御において、抗 Tax 細胞障害性 T 細胞 (CTL) が重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。ヒト免疫系を基盤とした HTLV-1 関連疾患発症予防ワクチンの開発を目的にヒト免疫系を再現する HTLV-1 感染ヒト化マウスの系を構築した。本年度は同ヒト化マウスを用いて Tax ペプチドワクチンの経鼻および皮下投与による HTLV-1 感染細胞抑制効果を検討した。非投与マウス群は感染 8 週間後にほとんどのマウスが白血病死したのに対し、ワクチン投与マウス群においては、低レベルの感染は成立するものの半数以上が長期に生存した。HTLV-1 感染予防ワクチンあるいは HTLV-1 関連疾患発症予防ワクチンとして Tax ペプチドワクチンの皮下投与および鼻腔投与が有効であることが示された。

A. 研究目的

成人 T 細胞白血病 (ATL) や HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の原因となるヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) の感染者が本邦に 100 万人以上存在しているが、これら HTLV-1 関連疾患に対する有効な治療法は未だ確立されていないというのが現状である。また近年の疫学調査で、関東や関西の大都市圏におけるキャリア患者の増加が報告されており、ウイルス排除ならびに HTLV-1 関連疾患の発症予防を目指した対策が必要である。

HTLV-1 感染キャリア個体内における HTLV-1 感染細胞の制御には、Tax 特異的 CTL が主要な役割を果たしていることが、ATL の幹細胞移植治療後の寛解時に Tax 特異的 CTL の再構築が観察されることや、免疫不全ラットへの Tax 特異的 CTL の移植により HTLV-1 感染 T 細胞の腫瘍増殖が抑制されることなどから示されている。

我々は HTLV-1 関連疾患発症予防ワクチンの開発

を目的として、ヒトの造血・免疫系を持つ HTLV-1 感染ヒト化マウスの樹立を試み、ATL 様病態および抗 HTLV-1 宿主免疫の誘導を再現した。そこで本年度は、HTLV-1 感染ヒト化マウスの系を用いて、抗 Tax 細胞障害性 T 細胞 (CTL) の誘導を介した抗 HTLV-1 ワクチンの有効性を検討した。

B. 研究方法

1. ヒト化マウスへの HTLV-1 感染

ヒト化マウスは γ 線全身照射 (5Gy) 処置した 6 週齢 NOG-SCID マウス下肢大腿骨骨髓内にヒト臍帯血由来 CD133 陽性造血幹細胞 (5×10^4 個) を注入・移植し作成した。

骨髓移植 4 ヶ月時に、末梢血における CD3 陽性ヒト T リンパ球の発現を確認後、放射線照射 (10Gy) により増殖能を欠失させた HTLV-1 感染 Jurkat 細胞 (JEX 細胞) 5.0×10^6 個を腹腔内接種した。細胞接種後、2 週毎に末梢血から採

血を行い、感染ヒト血球細胞の動態を FACS 解析にて、また HTLV-1 感染細胞数を定量的 PCR にて計測した。

2. ヒト化マウスへのワクチン接種

骨髄移植 4 ヶ月時のヒト化マウスに、経皮的あるいは経鼻的に Tax ペプチドワクチンを 7 日間隔で 3 回および 2 回それぞれ投与し、ワクチン最終投与 1 週間後に JEX 細胞を腹腔内接種することで、HTLV-1 を感染させた。Tax ペプチドワクチンは、Tax 全アミノ酸配列 (353 a. a.) を 12 分割し、ペプチド間で 5 ~ 8 アミノ酸の重複を持った 40 アミノ酸長のロングペプチドを合成し、皮下投与では 1 匹につき 1 回あたり各 8 μg 、合計 96 μg を使用し、鼻腔投与では 1 匹につき 1 回あたり各 0.5 μg 、合計 6 μg を使用した。アジュバントとして、コレラ毒素 B サブユニット (CTB) [1 μg] および TLR 7/8 アゴニスト (R848) [15 μg] を使用、比較した。

3. FACS

蛍光標識された各種抗ヒト血球表面抗原抗体 (CD45、CD3、CD8、CD25) を用いてフローサイトメトリー (BD FACS Canto™ II: BD) を行い、末梢血中の血球細胞の種類および表面抗原の発現変化を解析した。

4. 感染細胞の定量

分離された PBMC からゲノム DNA を分離し、HTLV-1 プロウイルス pX 領域を標的とした TaqMan Probe 法による定量的 PCR (MyiQ®: Bio-Rad) を行った。内部標準として human β -globin 遺伝子を標的とした定量的 PCR を行い、ヒト単核球画分における HTLV-1 感染細胞の比率を算出した。

5. サイトカインの測定

分離された PBMC から遠心法を用いて血清を調製し、Bio-Plex Human Cytokine 17-Plex Panel (Bio-Rad) を用いて計測した。

6. HTLV-1 Tax tetramer の測定

HTLV-1 Tax 特異的 CTL を測定するためにテトラマー試薬 (MBL 社) を用いた。

(倫理面への配慮)

ヒト臍帯血は日本赤十字近畿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を、研究内容および倫理項目を審査、許可された後に研究用として提供されている。

また動物実験については、関西医科大学動物実験委員会に実験計画を提出し、審査の後承認されている。

C. 研究結果

HTLV-1 感染ヒト化マウス系を用いた Tax ペプチドワクチンの評価

骨髄移植 4 ヶ月時のヒト化マウスに、皮下方法あるいは経鼻方法で各 2 回、12 種類の Tax ロングペプチド混合物を投与した後に経時的に感染ヒト T 細胞の動態を観察した。ワクチン非投与対照群では感染 2 ヶ月以内に末梢血中の HTLV-1 感染 T 細胞の数が一万倍近くまで増加し、白血病死したのに対し、ワクチンを皮下あるいは経鼻で投与した群では何れも 5 匹中 2 匹がウイルスロード数%から数十%に維持された持続感染の状態となった。また、ワクチン接種群での感染拡大は穏やかであり、ともに 5 匹中 3 匹がコントロールに遅れて死亡した。

ワクチン投与群で死亡した個体については、何れもコントロール群の 1/10 ~ 1/100 量のより少ない感染細胞数の状態で死亡しており、その原因を探る目的で、各個体の末梢血における各種サイトカインの発現を測定した。その結果、感染細胞の数に関係なく、死亡する直前の感染マウスにおいては IL-6 の発現が上昇していた。

ワクチン接種後の末梢血における IL-12 発現量を測定したところ、その発現増大が確認され、Th1 の誘導を介した細胞性免疫の活性化が示唆された。さらに、HLA 拘束性 Tax tetramer を用いて CD8 細胞中の Tax 特異的 CTL の発現を解析したところ、ワクチン接種により発現の増加を認めた。以上の結果より、

Taxペプチドワクチンの接種によってTax特異的CTLが誘導された結果、ヒト化マウス個体内での感染細胞の増殖が抑制された可能性が強く示された。

実際、末梢血中における感染細胞とCD8 T細胞の比率を見ると、持続感染状態を維持している個体においてはCD8 T細胞数が感染細胞数を上回るのに対し、CD8 T細胞数が感染細胞数を下回ったマウスは全て白血病死する結果となった。また、各リンパ系組織でのプロウイルスロードを調べたところ、ワクチン接種群においては末梢血と比較してウイルスロードが著しく低下しており、リンパ系組織における抗HTLV-1 Tax CTLの機能が強く示唆された。

D. 考察

HTLV-1感染ヒト化マウスの系において、Taxペプチドワクチンの皮下および経鼻投与で、いずれも感染細胞の増殖抑制効果が認められた。今後、この抑制が感染の抑制によるものか、あるいは感染細胞の増殖抑制によるものかを明らかにすることが必要である。

死亡する直前の感染マウスでは、感染細胞の数に関係なくIL-6の発現が上昇していることから、マクロファージや樹状細胞の過剰な活性化が想定され、今後、アジュバントの選定を含め、ワクチンの投与方法を検討する上で重要な指標となると考えられた。

また、生存マウスに関しては、プロウイルスロードが数%に維持され、感染キャリアの状態を再現していることから、ATL発症予防法の開発を考える上で、ワクチンの追加投与あるいは抗HTLV-1薬の投与効果に興味を持たれる。さらに、ペプチドワクチンの鼻腔投与でも皮下と同等の効果が確認されたことから、ウイルスエンベロープ蛋白等、感染予防ワクチンの標的候補探索への応用が期待される。

E. 結論

HTLV-1感染ヒト化マウスの系で、Taxペプチドワクチンの皮下および経鼻投与により感染細胞の増殖抑制効果が認められ、ヒト免疫系を基盤としたHTLV-1発症予防ワクチン開発での有用な評価系を

提供出来るマウスモデルであることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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*. 123(3): 346-55. 2014.

2. 学会発表

- 1) 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回日本神経学会学術大会、福岡、2014年5月
- 2) 田中正和、李成一、荀潤澤、姚錦春、藤澤順一：ヒト化マウスを用いたHTLV-1感染防御ワクチンの開発 第1回日本HTLV-1学会学術集会、東京、2014年8月
- 3) 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合同学術集会、金沢、2014年9月
- 4) 田中正和、李成一、荀潤澤、姚錦春、藤澤順一：ヒト化マウスモデルにTaxロングペプチドワクチン投与を行うことでHTLV-1感染細胞の増殖を抑えることが出来た 第73回日本癌学会学術総会、横浜、2014年9月
- 5) 藤澤順一、田中正和、上野孝治、荀潤澤、姚錦春、李成一：ATLのマウスモデル 第73回日本癌学会学術総会、横浜、2014年9月
- 6) 田中正和、李成一、荀潤澤、姚錦春、藤澤順一：Taxロングペプチドワクチンのヒト化マウス鼻腔投与によるHTLV-1感染抑制 第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

III. 学会等発表実績

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「HTLV-1 予防ワクチンの開発に関する研究」

機関名 国立感染症研究所 感染病理部

国立感染症研究所エイズ研究センター

横浜市立大学 医学部微生物学

北海道大学大学院 医学研究科分子病理学分野

関西医科大学 微生物学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
抗HIV薬投与下の治療ワクチン接種により誘導されるCD8陽性T細胞のSIV複製抑制能の解析（口演）	中村碧、高原悠佑、松岡佐織、三浦智行、小柳義夫、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗	第28回日本エイズ学会学術集会	2014月12年	国内
胸腺におけるプロテアソームキモトリプシン様活性サブユニットの発現とT細胞選択	木内静香、外丸詩野、紺野沙織、石津明洋、宮島祥太、平川彩香、笠原正典	第103回日本病理学会総会	2014年4月	国内
プロテアソーム機能異常と脳機能の低下	伊藤智樹、外丸詩野、大村優、石津明洋、笠原正典	第103回日本病理学会総会	2014年4月	国内
高齢男性でみられたEBV陽性肝脾γδT細胞リンパ腫の一例	竹中淳規、大塚紀幸、藤田裕美、中馬誠、外丸詩野、石津明洋、笠原正典	第103回日本病理学会総会	2014年4月	国内
高血糖による好中球細胞トラップ（neutrophil extracellular traps: NETs）の形成亢進	三次有奈、山田真衣、館山ゆう、楠由宏、志田玄貴、中沢大悟、外丸詩野、三好秀明、渥美達也、石津明洋	第47回北海道病理談話会（病理分科会）	2014年10月	国内
抗ラクトフェリン抗体の病原性	志田玄貴、中沢大悟、館山ゆう、山田真衣、楠由宏、三次有奈、外丸詩野、渥美達也、石津明洋	第47回北海道病理談話会（病理分科会）	2014年10月	国内