

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07327

研究課題名(和文) 新規高度Env発現組換えワクシニアウイルスワクチンによるHTLV-1感染制御

研究課題名(英文) Expression and immunogenicity of recombinant vaccinia virus containing the HTLV-1 env gene

研究代表者

高橋 良明 (Takahashi, Yoshiaki)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20639520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、HTLV-1エンベロープ(Env)を高度に発現する、弱毒組換えワクシニアウイルス m8 /env-X株を新たに開発し、そのHTLV-1ワクチンとしての有効性を検証した。その結果、m8 /env-X株は、マウス、ラット、ウサギ、ヒトの細胞株全てに感染し、Envタンパクを強く発現させた。また、WKAラットに m8 /env-X株を複数回接種したところ、血漿中に抗Env抗体が強く誘導された。さらに、その血漿を使って合胞体形成阻止試験を行ったところ、HTLV-1感染を中和できる抗体も誘導されることがわかった。以上のことから、m8 /env-X株はHTLV-1ワクチン候補として期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトT細胞白血病ウイルス1型 (HTLV-1)は、ヒトのT細胞に感染する成人T細胞白血病 (ATL)の原因ウイルスである。これまでにATLに対する根治療法は無く、発症すると数年以内に死亡するというたいへん予後不良の疾患である。そこで、HTLV-1感染を予防する対策も重要となる。本研究で新たに作製した組換えワクシニアウイルスワクチンは、その有効性が試験管内で証明された。今後は、感染動物モデルを使った生体内での評価が求められる。一方、本研究により、弱毒ワクシニアウイルスのワクチンベクターとしての価値が改めて認識され、今後、様々な感染症に対するワクチン開発への波及効果が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we determined whether newly generated recombinant vaccinia virus expressing HTLV-1 envelope protein (m8 /env-X) become a vaccine to prevent HTLV-1 infection. In vitro expression of the HTLV-1 envelope gene in the recombinant vaccinia virus was detected by immunofluorescence and Western blotting in mouse, rat, rabbit and human cell lines. WKA rats were primed and boosted intramuscularly with m8 /env-X. Such rats developed antibodies against the HTLV-1 envelope. Furthermore, neutralizing antibody was detected by syncytium inhibition assay using mix-culture of Molt-4 T-cell line and HTLV-1-producing ILT-M1 cell line. Results indicate that immunization regime that involve priming and boosting with recombinant vaccinia virus expressing HTLV-1 envelope might be useful in eliciting protective immune responses in vivo.

研究分野：感染免疫

キーワード：ワクチン 組換えワクシニアウイルス HTLV-1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトT細胞白血病ウイルス1型 (HTLV-1)は、ヒトのTリンパ球に感染するレトロウイルスで、その感染者は世界で2000万人、日本でも100万人と推定されている。通常数十年の長い潜伏期を経た後、キャリアの約5%は血液のがんである成人T細胞白血病 (ATL)を発症する。現在ATLに対する根治療法は無く、発症した場合には数年以内に死亡する割合が高く、たいへん予後不良の疾患である。現行の治療法には、化学療法や同種幹細胞移植療法がある。また新たな治療法として、患者に抗CCR4抗体 (mogamulizumab)を投与してHTLV-1感染細胞を死滅させる「抗体療法」や、体の外で調製したHTLV-1 Tax抗原ペプチド感作樹状細胞を患者に投与して、細胞傷害性T細胞 (CTL)を誘導する「樹状細胞ワクチン療法」が開発されている。しかし、これらの治療には特別な設備が必要であったり、費用がかかるなどの課題がある。

2. 研究の目的

我々は、HTLV-1感染を予防や治療できるもっと簡便な方法として、ワクチンに注目した。ワクチンで重要なことは、安全性と有効性であるが、弱毒化ワクシニアウイルスは、その安全性がすでにフィールドで実証されている。そして、廉価で製造しやすく、常温にも安定、投与法が簡単など多くの利点がある。また、様々な病原体の抗原遺伝子を挿入した、「組換えワクシニアウイルス」は、一度に体液性免疫と細胞性免疫の両方を誘導できる点でも優れた有効性も持っている。一方、HTLV-1はそのエンベロープタンパク (Env)を介して宿主T細胞に感染する。そこで、このHTLV-1 Envはワクチン開発の上で、重要なターゲットになる。以上のことから、本研究では、HTLV-1 Envを高発現する組換えワクシニアウイルスを新たに開発し、そのHTLV-1感染防御能を検証することにした。

3. 研究の方法

(1) 組換えワクシニアウイルスの作製と Env 抗原発現能

組換えワクシニアウイルスの作製

組換えワクシニアウイルス m8 VNC110株 (Suzuki Vaccine 2009)を使って、HTLV-1 Envタンパクを高度に発現誘導する組換えワクシニアウイルス (m8 /env-X株)を構築した。これを *in vitro*において増幅用 RK13細胞株に感染させて、33℃で5日間増やした後、感染細胞を回収した。細胞を破碎した後、ショ糖密度勾配遠心法によりウイルスを精製した。1 x 10¹⁰ pfu/mlのウイルスストック液を作製し、使用までマイナス80℃で保存した。

組換えワクシニアウイルス感染による各種細胞株での Env タンパクの発現

調製した組換えワクシニアウイルスを、マウス、ラット、ウサギ、ヒト由来の細胞株に感染させ、HTLV-1 Envタンパク抗原の発現を抗 Envモノクローナル抗体を使って、蛍光抗体法 (IF)により確認した。

(2) 動物モデルを使った組換えワクシニアウイルスによる HTLV-1 感染制御の検証

組換えワクシニアウイルス接種条件の検討

m8 /env-X株をラットの筋肉内または皮下に接種した後、定期的に採血をし、免疫血漿中の抗 Env抗体をWestern blot法とELISA法で検出した。また、中和抗体の確認を合胞体形成阻止試験で行った。T細胞株 (Molt-4)とHTLV-1産生細胞株 (ILT-M1)を1:1で混合し、さらに免疫血漿を添加して、一晚培養した。合胞体形成が阻止されたかを顕微鏡下で観察して、中和抗体の誘導を確認した。

ラットの HTLV-1 感染条件の検討

複数のラットに1 x 10⁷個のHTLV-1産生細胞株 (ヒト由来MT-2など)を腹腔内に投与した。定期的に一部の個体から脾臓を摘出し、HTLV-1 pX定量PCR法により、脾細胞中のHTLV-1感染コピー数を測定し、HTLV-1の感染を調べた。

4. 研究成果

(1) m8 /env-X株の Env 抗原発現能

新たに構築したm8 /env-X株を、*in vitro*にてマウス、ラット、ウサギ、ヒト由来の各細胞株に感染させたところ、全ての細胞株でHTLV-1 Envタンパクの発現が確認された (図1)。

(2) m8 /env-X 株の抗 Env 抗体誘導能

ラットに m8 /env-X 株を複数回接種した後、血漿中の抗 Env 抗体を Western blot 法と ELISA 法で調べた。その結果、単回接種でも Env に対する抗体誘導は見られたが、複数回接種するとより強く誘導された (図 2、図 3)。

(3) m8 /env-X 株の HTLV-1 中和抗体誘導能

抗 Env 抗体が誘導されたラット血漿を使って、*in vitro* にて合胞体形成阻止試験を行ったところ、m8 /env-X 株を複数回接種すると、HTLV-1 感染を中和できる抗体も誘導されることがわかった (図 4)。

(4) m8 /env-X 株の接種によるラットでの HTLV-1 感染防御能

ラットでの HTLV-1 感染効率が非常に低く、ウイルスを検出できなかったため、現時点で *in vivo* での感染阻止能を評価できていない。今後は、ラットでの HTLV-1 感染効率を高めるための工夫をして、*in vitro* だけでなく *in vivo* での組換えワクシニアウイルスワクチンの有効性を検証したい。

図 1 IF

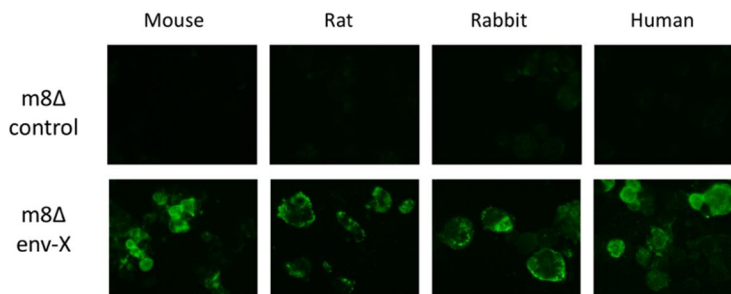


図 2 WB

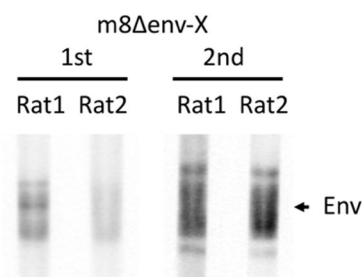


図 3 ELISA

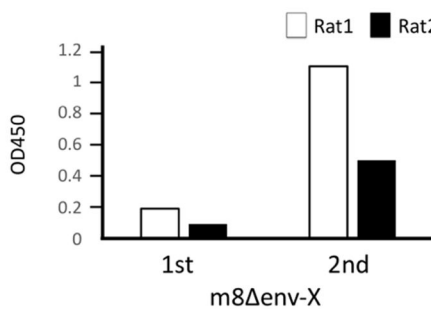
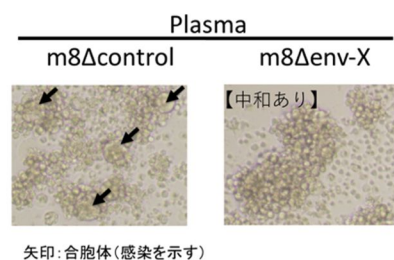


図 4 合胞体形成阻止試験



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mizuguchi Mariko, Takahashi Yoshiaki, Tanaka Reiko, Fukushima Takuya, Tanaka Yuetsu	4. 巻 9
2. 論文標題 Conservation of a Neutralization Epitope of Human T-cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) among Currently Endemic Clinical Isolates in Okinawa, Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pathogens9020082	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Yuetsu, Takahashi Yoshiaki, Tanaka Reiko, Miyagi Takuya, Saito Mineki, Fukushima Takuya	4. 巻 109
2. 論文標題 Association of high levels of plasma OX40 with acute adult T-cell leukemia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 319～327
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-018-02580-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋良明、志田壽利、田中礼子、水口真理子、田中勇悦
2. 発表標題 新規HTLV-1エンベロープ高発現型組換え弱毒ワクシニアウイルスによるHTLV-1中和抗体の誘導
3. 学会等名 日本HTLV-1学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋良明、清水衡、宮城拓也、水口真理子、田中礼子、田中勇悦
2. 発表標題 抗体を介したマクロファージによるHTLV-1感染制御
3. 学会等名 日本HTLV-1学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	志田 壽利 (Shida Hisatoshi) (00144395)	北海道大学・遺伝子病制御研究所・客員教授 (10101)	
研究 分担者	藤澤 順一 (Fujisawa Jun-ichi) (40181341)	関西医科大学・医学部・教授 (34417)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------