

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：18001

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15285

研究課題名(和文) 医薬品等のHTLV-I母子感染阻止能を評価する新規カニクイザル感染実験系の確立

研究課題名(英文) Establishment of a non-human primate model using cynomolgus monkeys for evaluating anti-HTLV-I mother to child infection drugs.

研究代表者

田中 勇悦 (Tanaka, Yuetsu)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30163588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：成人T細胞白血病の原因ウイルス(HTLV-I)の感染拡大対策として、母子感染を予防する医薬品等の開発が強く望まれているが、その前臨床試験として霊長類の実験系は未だ確立されていない。そこで、本研究はカニクイザルを用いた新たなHTLV-I母子感染阻止評価系を開発することを目的とした。HTLV-I感染性の高い細胞株を選択し、雌のカニクイザルに静脈内接種した。4例中4例の個体でHTLV-I感染が成立したことが、PCR陽細胞の検出と抗HTLV-I抗体の陽転化および維持で検証された。現在、これらキャリア化した雌ザルの自然交配による妊娠/出産の準備に入った。

研究成果の概要(英文)：Human T cell leukemia virus type-I (HTLV-I) is transmitted through contact with bodily fluids containing infected cells most often either vertically from mother to child via breastfeeding or horizontally in adults. However, no prophylactic vaccine or drug has been developed. In order to explore the potential of anti-HTLV-I vaccines/drugs in humans, it is prerequisite to test its ability in non-human primates. In attempts to establish such an animal model for testing, we have examined whether cynomolgus monkeys (CM) that have been housed in SPF conditions were susceptible to productive infection with HTLV-I in vivo. It is note worthy that all the four female CM that had been infected intravenously with highly infectious HTLV-I-producing cell line cells became carriers of HTLV-I as determined by HTLV-I specific PCR and antibody tests. These HTLV-I carrier CM will be mated to test whether HTLV-I can be transmitted vertically.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HTLV monkey infection vaccine

1. 研究開始当初の背景

- (1) 成人T細胞白血病(ATL)の原因ウイルス (HTLV-I)の感染者(キャリア)の数は日本では沖縄九州地方を中心に100万人以上と推定されており、感染拡大対策として、母子感染を予防する医薬品等の開発が強く望まれている。全世界のキャリアは1,000~2,000万人にのぼると推定され、現在も母子感染により新たな感染が起こっている。キャリアの母親から赤ちゃんへのHTLV-I感染を医薬品で防止できる手だてを開発することはキャリア妊婦さん達の悲願であり、日本の社会では非常に意味のある試みである。その開発のためには本研究で開発される霊長類を用いた医薬品評価系がキーポイントになることは明白である。しかし、それらの医薬品候補を前臨床試験として評価する霊長類の実験系は未だ確立されていない。
- (2) HTLV-Iの主な感染ルートはキャリアの母親から乳児に母乳を介する垂直感染である。母乳遮断によりある程度の効果が得られているが、母乳保育の重要性からも、直接授乳ができるようなHTLV-I感染防御医薬品の実験系が強く望まれている。現在、候補医薬品のスクリーニングは、*in vitro*およびラット、ウサギそしてヒト化マウス等の小型動物実験系で行われているが、霊長類を用いた前臨床試験系を日本で開発することの必要性和緊急性は高い。過去にカニクイザルを用いたHTLV-I攻撃感染実験が行われているが、HTLV-Iの感染効率が低いことから、サルを用いたHTLV-Iの母子垂直感染実験系は未だに確立されていない。それを実現化するために具体的に行うべき研究項目として、100%の感染効率を実現するHTLV-I感染ソース(感染細胞株)の選

択、他の感染性因子の影響のないSPFグレードのサルの確保、さらには、HTLV-Iの定量法の高感度化などが挙げられる。

- (3) 一方、実験宿主としてサルの確保と感染法であるが、霊長類研究センターは約1600頭のカニクイザル繁殖コロニーを保持している。これらカニクイザルは世界で唯一、系統を維持しSPF化しており、全ゲノムシーケンスの解析にも成功している。また、国内唯一の医科学研究に特化した霊長類センターとして免疫・感染実験を行う設備も整っている。カニクイザルは、小型軽量の旧世界ザルであり、ヒトに類似した子宮胎盤構造をもちヒトと同様の性周期(約28日)で周年繁殖可能なことから、母乳感染はもとより経胎盤感染についても検討ができる動物モデルとして最適といえる。さらにこのサルのHTLV-I感染病態を探索する上で有利なことは、ヒトとカニクイザル間では、CD25やCD134といったHTLV-I感染で誘導される共通抗原が保存されており、研究代表者の既存抗体ライブラリーにはカニクイザル交差性を示す複数の単クローン抗体が整備されている。
- (4) 本研究が成功すれば、今後の種々の医薬品のHTLV-I母子感染防御能の実際の評価が可能となり、我が国のHTLV-I感染拡大防止対策にも寄与することが期待されるなど、学術成果の社会還元が実現すると期待できる。

2. 研究の目的

- (1) 本研究は、研究代表者のこれまで培ったHTLV-I感染実験のノウハウを基盤に、霊長類を用いた感染症研究のエキスパートである研究分担者と協力し、我が国で入手可能であるSPFグレードのカニクイザルを用いて、新たなHTLV-I母子感染阻止

評価系を開発することを目的とし、その実用化につなげることである。

- (2) 過去にカニクイザルで、ワクチン接種の効果を HTLV-I 静脈注射による人為的攻撃感染で検証した実験が報告されている。しかし、今回のような“HTLV-I 母子感染の防御”を評価する系の開発研究は未だにない。本研究は、研究代表者がこれまで積み重ねてきた HTLV-I 感染免疫研究でのノウハウと単クローン抗体ライブラリーを出発基盤として、霊長類を使ったワクチン免疫研究のエキスパートである研究分担者と協力し、未だ効果的な解決法がない HTLV-I の母子感染防御法の開発に必須な評価系としての霊長類 HTLV-I 母子感染実験モデルを作出しようとするチャレンジ研究である。

- (3) この挑戦では、研究代表者が沖縄の ATL 患者から分離した高い感染性を持つ野生株 HTLV-I 産生細胞株を感染性 HTLV-I ソースとして用い、宿主として specific pathogen free (SPF) グレードの国産のカニクイザルに感染させることによりキャリア化させ、母子感染モデル開発まで引き上げる。このようなチャレンジは国内外でも未だなく、先進国の中で HTLV-I 感染が最も深刻な日本でやるべき挑戦の一つであると考えます。

3. 研究の方法

- (1) カニクイザルの HTLV-I キャリア化の最適感染条件の確立：出生地の異なるカニクイザル 10 頭の末梢血単核球(PBMC)を T 細胞増殖刺激物質である PHA で活性化させ、種々の HTLV-I 産生ヒト細胞株との混合培養により HTLV-I を恒常的に産生するサルの T 細胞株が樹立できる最適の細胞株を選択する。選択された HTLV-I 産生ヒト細胞株をサルに経静脈内接種する。感染後、定期的に採血し、HTLV-I 感染の成立を検証する。調べる方法は 2 つあり、

一つは抗体検査であり、他方は、通常に HTLV-I 感染検査で行われている HTLV-I プロウイルス Tax 遺伝子増幅検査法 (PCR) である。これらの指標をもとに感染の推移を個別にモニターする。また、キャリア化されたサルの PBMC から HTLV-I 感染細胞の株化も同時に検討する。HTLV-I 抗体の特異性はウエスタンブロットで、抗体価は PA 法および中和活性は合胞体阻止法でモニターする。

- (2) カニクイザルの HTLV-I 母子感染の感染系の確立：上記の最適な方法で雌のカニクイザルを HTLV-I キャリア化に成功した場合、早急に自然交配を行い、自然分娩後の母子感染の様子を検証する。

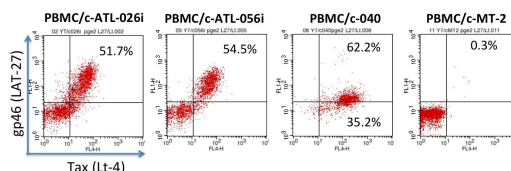
4. 研究成果

- (1) 感染性の高い HTLV-I 産生細胞の選択：沖縄県でバンキングされている HTLV-I 感染者由来の PBMC を IL-2 培地で長期培養し、樹立された培養株の中から、HTLV-I 非感染ドナー由来の PBMC (OKT3 抗体で 1 日刺激した) との混合培養により、最もトランスフォーメーション活性の高い 2 株(ATL-040 と ATL-026i)が選択された。前者は B 細胞、後者は CD4+T 細胞である。

Selection of highly infectious HTLV-I-producing cell line

OKT-3 activated normal human PBMCs were co-cultured with MMC-treated HTLV-I⁺ cells and maintained for 2 months in IL-2-containing

Cell line	Origin	Syncytium	HTLV-I gp46
ATL-026i	ATL-patient T cell	+	++
ATL-056i	ATL-patient T cell	+	++
040	Carrier B cell	+++	+++
MT-2	Co-culture	-	++



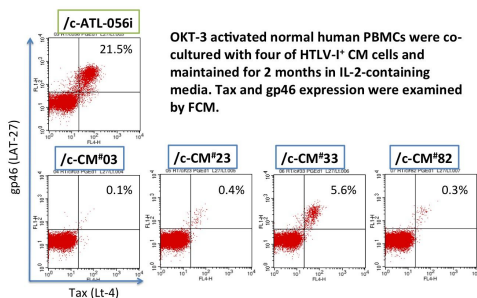
- (2) サル PBMC の HTLV-I 感染：ヒトの場合と同様に、PHA で 1 日刺激した 10 頭のカニクイザルの PBMC とマイトマイシン C(MMC) で処理した ATL-040 または ATL-056i を IL-2 培地の中で 2~4 週間

混合培養したところ、全ての例において、Tax 陽性細胞の出現と細胞の IL-2 依存性増殖（不死化）が観察された。

(3) これらの細胞は、サルの T 細胞であり、CD8+T または CD4+T 細胞であった。ヒトの場合と同様に、HTLV-I エンベロープ蛋白の gp46 およびヒト CD25 (IL-2R alpha) を発現した。しかもヒト HTLV-I トランスフォーム細胞に見られる CCR4 や CD134 (OX40) および OX40L の同時発現が観察された。

(4) これらのサル細胞株が、HTLV-I 感染力があるかどうかについて、OKT-3 抗体刺激ヒト PBMC との混合培養法で確認し、調べた 4 株（4 頭のサルに由来する別々の細胞株）の全てがヒト T 細胞をトランスフォームすることが観察された。したがって、カニクイザルの T 細胞は、HTLV-I に産生的感染をすることが *in vitro* で確認された。

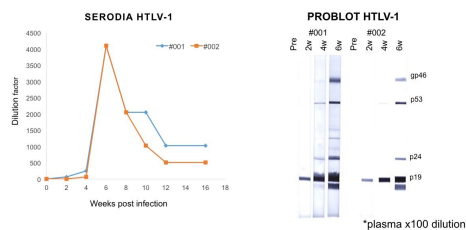
Transmission of HTLV-I from Cynomolgus monkey cell T lines to human T cells



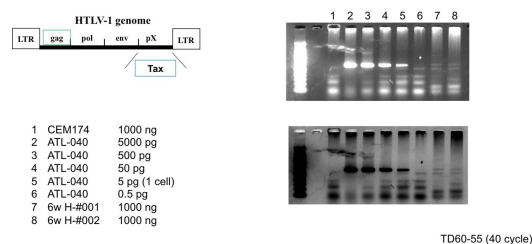
(5) これらの基盤に立ち、実際にカニクイザルへ HTLV-I 感染細胞株を経静脈内接種した。まずは、2 頭の雌に ATL-040 と ATL-056i 細胞の混合液を感染させ、2 週間ごとに採血し、PBMC の HTLV-I プロウイルス検出および抗 HTLV-I 抗体テストを行った。次の図に示すように、これら 2 頭 (#001, #002) のサルの血清は陽転し、HTLV-I の各蛋白に対する抗体が証明された。また、PCR の結果より、HTLV-I 感染

細胞の存在が確認された。

Detection of anti-HTLV-1 Abs

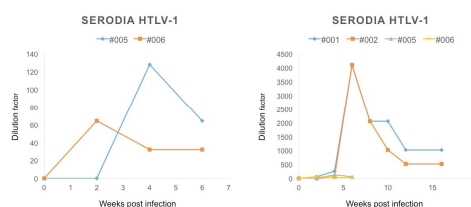


Detection of viral DNA by PCR (approx. 2x10⁵ cells)

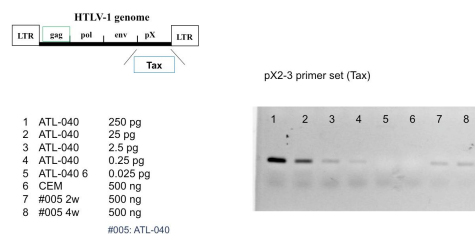


(6) これらカニクイザルに対する HTLV-I 感染成立の確認と、ATL-040 と ATL-056i のどちらが HTLV-I 感染を仲介したかを調べるために、さらに 2 頭の雌カニクイザルに ATL-040 または ATL-056i 細胞を経静脈内接種した。図に示すように、どのサル (#005, #006) も感染が確認された。

Detection of anti-HTLV-1 Abs



Detection of viral DNA by PCR (approx. 1x10⁵ cells)



(7) 現在、定量的 PCR で感染ザルの HTLV-I プロウイルスの定量系を確立し、経時的変化を見ている。

(8) また、上記のようにしてキャリア化した雌カニクイザルについては、自然交配による妊娠/出産をさせ、小猿への HTLV-I 感染が成立するのかを検討中である。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

Tanaka Y., Yasutomi Y. Toward establishing a non-human primate model of HTLV-I infection using specific pathogen-free (SPF) cynomolgus monkeys (CM). 日本ウイルス学会 平成 28 年 10 月 24 日 札幌コンベンションセンター (札幌、北海道)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 勇悦 (Yuetsu Tanaka)
琉球大学大学院医学研究科・教授
研究者番号：30163588

(1) 研究分担者

保富 康宏 (Yasuhiro Yasutomi)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター・センター長

研究者番号：90281724

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()