

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08378

研究課題名(和文) HTLV-1キャリアのATL発症予防対策に向けた潜伏感染のメカニズム解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of latent HTLV-1 infection for preventing from ATL onset of HTLV-1 carriers

研究代表者

浜口 功 (Hamaguchi, Isao)

国立感染症研究所・血液・安全性研究部・部長

研究者番号：90348780

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)：これまでにヒト血液細胞を保持するHTLV-1キャリアマウスモデルを確立した。また次世代のin situ hybridization法により、感染マウスのリンパ系組織においてウイルスRNAのシグナルが検出された。胎盤内の栄養膜細胞がHTLV-1に感染することを確認し、この細胞をヒト化マウスの腹腔内に投与したところ、マウス生体で感染が成立したことから、栄養膜細胞がウイルスリザーバーや感染源となりうることが示唆された。さらにSTLV-1感染ニホンザルの子宮や膣にウイルスRNA陽性細胞が存在したことから、STLV-1感染ニホンザルは水平感染様式解明のための動物モデルとして有用であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新しい解析技術を開発し、HTLV-1感染細胞が臓器のどの部分に存在するかを明らかにできた。HTLV-1水平感染や胎盤感染など、これから感染対策が行われる状況において、有用な成果につながった

研究成果の概要(英文)：So far, we have established an HTLV-1 carrier mouse model that holds human blood cells. In addition, viral RNA signals were detected in the lymphatic tissues of infected mice by the next-generation in situ hybridization method. Since the trophoblasts in the placenta revealed to be infected with HTLV-1, we administrated these cells into the abdominal cavity of humanized mice. The infection was established in mouse organisms, suggesting that the trophoblasts can be viral reservoirs and sources of infection. Furthermore, viral RNA was detected in the uterus and vagina of STLV-1 infected Japanese macaques suggested that they are considered useful as an animal model for elucidating the horizontal infection route of HTLV-1.

研究分野：血液内科

キーワード：HTLV-1 STLV-1 水平感染 胎盤感染 マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

Human T-cell leukemia virus type-1 (HTLV-1)は本邦で発見され、Adult T-cell leukemia (成人 T 細胞白血病: ATL)や HTLV-1 associated myelopathy (HTLV-1 関連脊髄症: HAM)及びその他の炎症性疾患を含めた、HTLV-1 感染症の原因ウイルスである。本邦における HTLV-1 感染者 (キャリア)はおよそ 80~100 万人に上り、将来 HTLV-1 感染症を発症する危険性を有している。ATL や HAM を治癒することは困難であり、キャリアの段階で HTLV-1 感染症を予防する感染予防・発症予防の取り組みは極めて重要な課題である。

近年の疫学研究の結果において、男女ともに加齢に伴い HTLV-1 抗体の陽性率が増加傾向にあり、特に 50 代以降の女性に陽性例が急増することが明らかになった。これらの結果はこれまでに知られていた HTLV-1 の主要な感染経路である母乳を介した母子感染に加え、性交渉を介した水平感染例が急増していることを示すと共に、加齢に伴い潜伏感染状態から血清学的に陽転化する可能性を示唆している。しかしながら HTLV-1 の母乳以外の母子感染や青年期以降の水平感染の経路、および壮年期で見られる血清陽転化のメカニズムは全く解明されてこなかった。本研究においてマウスやサルを含めた感染動物モデルを用いることによりこれらの課題を解決することで、キャリアを対象とする新しい感染予防・発症予防戦略のための知見が得られると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、感染マウスモデルおよびサルモデルを用いることにより、HTLV-1 キャリアで起こっている HTLV-1 潜伏感染の実態と、性交渉による水平感染経路を含む、HTLV-1 の新たな感染経路を明らかにすることを目的とする。具体的な目標は以下の通りである。 HTLV-1 感染細胞の局在が解析可能な HTLV-1 特異的な高感度プローブの開発と in situ hybridization 法を確立する。 同手法を用いて組織検体を解析し、生体内の HTLV-1 の潜伏細胞・発現細胞を同定することで母乳以外の感染経路の解明に繋げる。 HTLV-1 の近縁である Simian T-cell leukemia virus type-1 (STLV-1) に自然感染しているニホンザルを用いて、感染細胞の局在を解析すると共に、加齢に伴う雌ザルでのウイルス動態の変化を検討する。

3. 研究の方法

HTLV-1 のプラス鎖 mRNA の全てに共通している領域である tax/rex mRNA 3rd exon に対して RNA 検出用プローブ(pX probe)を、並びに、マイナス鎖 mRNA の共通領域に対して RNA 検出用プローブ(HBZ probe)をそれぞれ作製し、in situ hybridization 法による系を構築した。組織内感染細胞を解析するため、ヒト臍帯血より精製した CD133 陽性ヒト造血幹細胞を生後 72 時間以内の NOJ マウス肝臓内に移植することでヒト化マウスを作製した。経口経路により HTLV-1 感染を成立させ、9 週後、各臓器を採材し (脾臓、肝臓、リンパ節、胸腺、肺、等)、上記手法によりマウス組織内における HTLV-1 発現細胞を解析・評価した。

母乳以外の母子感染経路を解析する目的で、絨毛組織を構成する初代培養細胞を用いて各細胞における HTLV-1 感受性を検討した。また、上記のヒト化マウスモデルを用いて種々の初代培養細胞の HTLV-1 感染伝播能を評価した。

性交渉を介した水平感染様式解明のため、STLV-1 感染雌ザル 2 頭を用いて生殖器におけるプロウイルス量を real-time PCR 法で定量し、in situ hybridization 法を用いて組織学的解析を実施した。

4. 研究成果

HTLV-1 の生体内でのリザーバー組織や感染細胞を同定する目的で、これまでに CD133 陽性ヒト造血幹細胞を移植したヒト化マウスを作製し、これらのマウスに HTLV-1 を感染させることで HTLV-1 キャリアマウスモデルを確立してきた。また、ウイルスリザーバー等の同定のための研究手法の改善に取り組んだ。HTLV-1 は生体内ではウイルス抗原の発現量が極めて低いレベルで維持されており、組織における感染細胞の正確な局在や分布を検討することが困難であった。近年、次世代の in situ hybridization 手法が開発され、低コピーの RNA 分子でも組織

内で直接検出可能であることが報告されている。そこで、本手法を用いて生体内 HTLV-1 RNA 検出法の確立を試みた。HTLV-1 ウイルスゲノムからは少なくとも 6 種類の転写産物がプラス鎖 mRNA として機能することが明らかになっているが、これらの RNA 種の共通配列にプローブを作成することで、全ての mRNA を網羅的に検出可能な系を開発した。共通配列を検出することで対象となる mRNA コピー数が増加し、検出感度を飛躍的に高めると考えられた。新規に開発した *in situ hybridization* 法を用いて HTLV-1 感染ヒト化マウスにおける各組織における HTLV-1 発現細胞を解析したところ、リンパ系組織（脾臓、胸腺、腸管膜リンパ節）において顕著なウイルス RNA のシグナルが検出され、これらの臓器において HTLV-1 は活発に発現していることが明らかになった。一方、腎臓、心臓、胃や小腸等の臓器ではほとんどウイルス RNA は検出されなかったが、肺や肝臓の一部ではリンパ濾胞状に集簇した HTLV-1 発現細胞が確認された。今後これらの HTLV-1 発現細胞についてウイルス学的な意義を検討する予定である。

HTLV-1 は主に母乳を介して感染細胞がキャリア母から児に経口的に移行することで母子感染が成立すると考えられている。一方で完全人工栄養保育の児でも一部に母子感染が成立している事実から、母乳を介さない感染経路（胎内感染や産道感染）の可能性が指摘されてきたが、詳細な機序は不明であったので、未知の HTLV-1 感染経路の機序の解明を試みた。母乳以外の母子感染経路として胎内感染の可能性に着目し、特に胎盤を介する経路について詳細に検討した。胎盤内の血液胎盤関門を構成する細胞群（栄養膜細胞、間葉系細胞、血管内皮細胞）の HTLV-1 感受性を検討したところ、他の細胞と比較して、栄養膜細胞において極めて高い感受性が確認された。この感受性は受容体分子の発現量に依存すると考えられた。さらに、HTLV-1 感染栄養膜細胞は HTLV-1 の転写が活性化しており、細胞表面に env タンパク質を高発現していた。そこで HTLV-1 感染栄養膜細胞をヒト化マウスの腹腔内に投与したところ、全例で個体レベルでの HTLV-1 感染が成立したことから、HTLV-1 感染栄養膜細胞は HTLV-1 の生体内でのウイルスリザーバーや感染源として機能することが示唆された。以上より HTLV-1 感染栄養膜細胞は経胎盤感染において主要な役割を果たしている可能性が考えられた。

近年では青年期以降のヒトにおいて HTLV-1 の水平感染が拡大していることが疫学調査から明らかにされているが、その機序は全く検討されていない。性交渉を介した水平感染様式解明にあたってはヒト化マウスまたはヒトの組織を用いて解析を行うことは困難である。そこで、HTLV-1 と類似の特徴を有する STLV-1 感染ニホンザルを用いて検討した。高齢ザル 2 頭を用いて生殖器を中心にプロウイルス DNA 量（PVL）解析を行った結果、脾臓に加えて子宮や膣において高い PVL が示された。さらに組織学的な解析を行うため、STLV-1 プラス鎖 mRNA の共通領域である tax/rex mRNA 3rd exon、並びにマイナス鎖 mRNA の共通領域に対する検出用プローブ（pX/SBZ probe）を構築し ISH 法の確立を行った。感染サル由来脾臓を用いて解析した結果、いずれのプローブにおいてもウイルス RNA が検出され、特に pX probe では白碑髄上で局所的な強い染色像が観察された。これは STLV-1 を標的とする ISH 法が機能していること、そして脾臓のリンパ濾胞にリザーバー細胞が存在することを強く示唆している。さらに生殖器を用いた解析を進めた結果、子宮や膣にウイルス RNA 陽性細胞が存在することを示唆する結果が得られた。以上の結果より、STLV-1 感染ニホンザルは水平感染様式解明のための動物モデルとして有用であると考えられ、今後さらに解析を進める予定である。

(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 3 件)

1.著者名

Tezuka K, Fuchi N, Okuma K, Tsukiyama T, Miura S, Hasegawa Y, Nagata A, Komatsu N, Hasegawa H, Sasaki D, Sasaki E, Mizukami T, Kuramitsu M, Matsuoka S, Yanagihara K, Miura K, Hamaguchi I.

2.論文標題

HTLV-1 targets human placental trophoblasts in seropositive pregnant women

3.雑誌名 : J Clin Invest.

4.巻 : 130(11)

5.発行年 : 2020 年

6.最初と最後の頁 : 6171-6186

掲載論文の DOI : 10.1172/JCI135525

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)

1.著者名

Okuma K, Kuramitsu M, Niwa T, et al.

2.論文標題

Establishment of a novel diagnostic test algorithm for human T-cell leukemia virus type 1 infection with line immunoassay replacement of western blotting: a collaborative study for performance evaluation of diagnostic assays in Japan

3.雑誌名 : Retrovirology

4.巻 : 17(1)

5.発行年 : 2020 年

6.最初と最後の頁 : 26

掲載論文の DOI : 10.1186/s12977-020-00534-0

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)

1.著者名

Ikebe E, Matsuoka S, Tezuka K, Kuramitsu M, Okuma K, Nakashima M, Kobayashi S, Makiyama J, Yamagishi M, Oyadomari S, Uchimaru K, Hamaguchi I.

2.論文標題

Activation of PERK-ATF4-CHOP pathway as a novel therapeutic approach for efficient elimination of HTLV-1-infected cells

3.雑誌名 : Blood Adv.

4.巻 : 4(9)

5.発行年 : 2020 年

6.最初と最後の頁 : 1845-1858

掲載論文の DOI : 10.1182/bloodadvances.2019001139

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)

〔学会発表〕(計 2 件)

- 1.発表者名 大隈和、倉光球、手塚健太、水上拓郎、村田めぐみ、明里宏文、浜口功
 - 2.発表標題 STLV-1 感染ニホンザルによる HTLV-1 標的ウイルス療法の開発に向けた検討
 - 3.学会等名 日本実験動物学会
 - 4.発表年 2020 年
-

- 1.発表者名 池辺詠美、松岡佐保子、手塚健太、倉光球、大隈和、中島誠、小林誠一郎、牧山純也、山岸誠、親泊政一、内丸薫、浜口功
 - 2.発表標題 小胞体ストレス応答を標的とした新規抗 HTLV-1 薬の開発
 - 3.学会等名 日本生化学会
 - 4.発表年 2020 年
-

〔出願状況〕(計 0 件)

無し

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Ikebe E, Matsuoka S, Tezuka K, Kuramitsu M, Okuma K, Nakashima M, Seichiro Kobayashi S, Makiyama J, Yamagishi M, Oyadomari S, Uchimaruru K, Hamaguchi I	4. 巻 4
2. 論文標題 Activation of PERK-ATF4-CHOP pathway as a novel therapeutic approach for efficient elimination of HTLV-1-infected cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood adv	6. 最初と最後の頁 1845-1858
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2019001139.	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 -

1. 著者名 Kuramitsu M, Okuma K, Tezuka K, Nakamura H, Sagara Y, Kurane I, Hamaguchi I	4. 巻 63
2. 論文標題 Development and evaluation of human T-cell leukemia virus-1 and -2 multiplex quantitative PCR	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiol. Immunol.	6. 最初と最後の頁 458-464
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-52686-5	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 -

1. 著者名 Kuramitsu M, Okuma K, Nakshima M, Sato T, Umeki K, Sasaki D, Hasegawa H, Kubota R, Sobata R, Matsumoto C, Kaneko N, Sasada K, Tezuka K, Uchimaruru K, Iwanaga M, Sagara Y, Yamano Y, Okayama A, Miura K, Satake M, Saito S, Watanabe T, Hamaguchi I	4. 巻 62
2. 論文標題 Value assignment of the reference material for HTLV-1 quantitative PCR in Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbiol. Immunol.	6. 最初と最後の頁 673-676
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12644.3.	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 -

1. 著者名 Kamoi K, Okayama A, Izumo S, Hamaguchi I, Uchimaruru K, Tojo A, Ohno-Matsui K	4. 巻 9
2. 論文標題 Adult T-cell leukemia/lymphoma-related ocular manifestations: analysis of the first large-scale nationwide survey	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Microbiol	6. 最初と最後の頁 3240
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2018.03240. eCollection 2018.	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 Tezuka Kenta, Fuchi Naoki, Okuma Kazu, Tsukiyama Takashi, Miura Shoko, Hasegawa Yuri, Nagata Ai, Komatsu Nahoko, Hasegawa Hiroo, Sasaki Daisuke, Sasaki Eita, Mizukami Takuo, Kuramitsu Madoka, Matsuoka Sahoko, Yanagihara Katsunori, Miura Kiyonori, Hamaguchi Isao	4. 巻 130
2. 論文標題 HTLV-1 targets human placental trophoblasts in seropositive pregnant women	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 6171 ~ 6186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI135525	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 -

1. 著者名 Okuma K, Kuramitsu M, Niwa T, et al.	4. 巻 17
2. 論文標題 Establishment of a novel diagnostic test algorithm for human T-cell leukemia virus type 1 infection with line immunoassay replacement of western blotting: a collaborative study for performance evaluation of diagnostic assays in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Retrovirology	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) 10.1186/s12977-020-00534-0	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10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 倉光球、大隈和、相良康子、中村仁美、手塚健太、浜口功
2. 発表標題 HTLV-1プロウイルス陽性のWB判定保留例に対するLIAの検討
3. 学会等名 第6回日本HTLV-1学会
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 手塚健太、淵直樹、大隈和、築山尚史、長谷川ゆり、長谷川寛雄、佐々木大介、三浦生子、東島愛、佐々木永太、水上拓郎、倉光球、松岡佐保子、増崎英明、三浦清徳、浜口功
2. 発表標題 キャリア妊婦におけるHTLV-1経胎盤感染の実態解明の試み
3. 学会等名 第6回日本HTLV-1学会
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 浜口功
2. 発表標題 HTLV-1検査法の改良と開発
3. 学会等名 第6回日本HTLV-1学会（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 大隈和、倉光球、手塚健太、倉根一郎、浜口功
2. 発表標題 血液製剤の安全性強化に向けたHTLV-1/2高感度マルチプレックス核酸検査法の開発
3. 学会等名 日本輸血・細胞治療学会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 倉光球、大隈和、内丸薫、山野嘉久、長谷川寛雄、野坂生郷、岡山昭彦、久保田龍二、佐竹正博、金子典章、渡邊俊樹、浜口功
2. 発表標題 HTLV-1定量PCRの標準化のための参照品の作成
3. 学会等名 日本HTLV-1学会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 大隈和、倉光球、手塚健太、中村仁美、相良康子、浜口功
2. 発表標題 HTLV-1/2マルチプレックス核酸検査法の開発と臨床検体を用いた評価
3. 学会等名 日本HTLV-1学会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 相良康子、中村仁美、倉光球、相良康弘、松永克希、平山秀明、島村益弘、岩永正子、大隈和、浜口功、入田和夫
2. 発表標題 献血検体から見出された抗体陰性HTLV-1キャリア
3. 学会等名 日本HTLV-1学会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Tezuka K, Mizukami T, Sasaki E, Kuramitsu M, Matsuoka S, Okuma K, Hamaguchi I
2. 発表標題 Highly sensitive detection of plus- and minus-strand HTLV-1 mRNAs by RNA in situ hybridization in a humanized mouse model
3. 学会等名 日本ウイルス学会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 大隈和、倉光球、手塚健太、水上拓郎、村田めぐみ、明里宏文、浜口功
2. 発表標題 STLV-1感染ニホンザルによるHTLV-1標的ウイルス療法の開発に向けた検討
3. 学会等名 日本実験動物学会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 池辺詠美、松岡佐保子、手塚健太、倉光球、大隈和、中島誠、小林誠一郎、牧山純也、山岸誠、親泊政一、内丸薫、浜口功
2. 発表標題 小胞体ストレス応答を標的とした新規抗HTLV-1薬の開発
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2020年～2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------