

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16032

研究課題名（和文）次世代ヒト化マウスを用いた革新的HTLV-1感染症モデルの開発

研究課題名（英文）Development of the next-generation humanized mouse model for HTLV-1 infection

研究代表者

手塚 健太（TEZUKA, Kenta）

国立感染症研究所・血液・安全性研究部・主任研究官

研究者番号：10754533

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではHLA分子を導入した次世代ヒト化マウスを用いて、ヒト型免疫応答を再現するHTLV-1感染ヒト化マウスモデルを確立することを目指した。新規ヒト化マウスに対しHTLV-1を感染させたところ、一部の個体でHLA拘束性のHTLV-1 Tax特異的CTLの誘導が確認された。HTLV-1 Tax特異的CTLは血中、骨髄では低頻度であったが、リンパ臓器では高頻度に存在していた。Tax特異的CTLが検出された個体では生体内でのウイルス量が抑制傾向を示したことから、HTLV-1の潜伏感染状態が一部再現されていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりヒトと同様のHTLV-1感染状態を再現するHTLV-1感染ヒト化マウスモデルが確立されれば、ヒトではこれまで困難であった、生体内でのHTLV-1感染細胞と宿主免疫応答との相互作用の詳細な解析が可能となり、ATL病態発症過程における感染細胞のゲノム・エピゲノムの変化、ATL前駆細胞出現の時期・部位の同定等、ATL治療戦略における重要な知見が得られるものと期待される。また本モデルは、ワクチンを中心とした免疫学的治療法の開発・評価にも有用であり、HTLV-1のみならず様々なウイルス感染症の個体レベルでの実験的検証に寄与するものと期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to establish a humanized mouse model of HTLV-1 infection that recapitulates human immune responsiveness using next-generation humanized mice transduced with HLA molecules. Induction of HLA-restricted HTLV-1 Tax-specific CTLs was observed in some HTLV-1-infected humanized mice. HTLV-1 Tax-specific CTLs were present at low frequency in blood and bone marrow, but at high frequency in lymphoid organs. The proviral load of mice in which Tax-specific CTLs were detected showed a suppressive trend in vivo, suggesting that the latent infection state of HTLV-1 is partially reproduced.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HTLV-1感染症 次世代ヒト化マウス Tax特異的CTL HLA-A*02:01遺伝子 潜伏感染

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、本邦で発見され、成人 T 細胞白血病 (ATL) や HTLV-1 関連脊髄症等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。HTLV-1 感染症の発症メカニズムを解明するためには、適切な動物モデルを用いた研究が必須であるが、HTLV-1 はヒトへの指向性が極めて強く、これまでの実験動物では主に感染効率の低さからヒトと同様の病態を再現することは困難であった。近年、ヒトの細胞や臓器を有するヒト化マウスの技術が確立され、ウイルス感染症研究に利用されている。研究代表者は 2014 年に、重度免疫不全マウス (NOG マウス) に対して CD133 陽性ヒト造血幹細胞を骨髄内直接移植法を用いて移植することで、従来よりもヒト血球系・免疫系がより高度に再構築されたヒト化マウスを樹立した。同ヒト化マウスに HTLV-1 を感染させることで ATL 様病態の再現に一部成功している。一方、同マウスモデルにおいては再現性良く抗 HTLV-1 特異的抗体が誘導されるものの、HTLV-1 特異的細胞性免疫応答については十分な活性が見られず、特に HTLV-1 キャリアにおいても感染細胞の排除に重要である Tax 特異的 CTL の存在比率はごく低頻度であった。HTLV-1 キャリア生体内では感染細胞とウイルス特異的 CTL を中心とした宿主免疫が平衡状態にあり、これによって HTLV-1 感染症発症までの長期の潜伏期間が成立すると考えられている。実際、同マウスモデルにおいてはこのような長期の潜伏期間が再現されず、HTLV-1 感染細胞数やウイルス抗原量は感染後急速に上昇する。これらの事実は、ヒト化マウス個体内での HTLV-1 特異的細胞性免疫応答能の不足が感染細胞の無秩序な増殖を許容していると考えられ、HTLV-1 感染症の発症過程をより適切に再現するためには、ヒト化マウスにおける細胞性免疫応答能の改善が必要であることを示している。

2. 研究の目的

上記モデルを含めた従来型のヒト化マウスでの細胞性免疫応答能の低下は、主にマウス MHC と移植したヒト造血幹細胞の HLA 分子の不一致によってもたらされることが報告されている。即ち、マウス胸腺内で分化・教育されたヒト T 細胞の大部分はマウス MHC によって拘束されており、ヒト T 細胞受容体と HLA を介した抗原提示応答が十分機能しない。その結果、CTL を含む抗原特異的な細胞性免疫応答が惹起されないと考えられる。この問題を解決するために HLA-A*02:01 遺伝子を導入したヒト化マウスが開発され、個体内で機能的な抗原特異的 CTL を誘導することに成功した。そこで本研究課題では、MHC 分子の一致による適切なヒト T 細胞分化がもたらす免疫監視機構の下、感染細胞の増殖が制御され、ヒトと同様の HTLV-1 感染状態を再現する HTLV-1 感染ヒト化マウスモデルの確立を目的とする。

3. 研究の方法

HLA-A*02:01 遺伝子を MHC クラス I プロモータの制御下で発現させた重度免疫不全遺伝子改変マウス (NOG-HLA-A2 Tg) を作出し、HLA 遺伝子の発現量を FCM で解析した。ホモ遺伝子型の NOG-HLA-A2 Tg マウスに対して、HLA-A アリルが一致する CD133 陽性ヒト造血幹細胞を骨髄内へ直接移植することでヒト化マウスを作製した。十分なキメリズムを示すヒト化マウスへ HTLV-1 を感染させ、経時的に血中におけるウイルス量、各免疫細胞の表現型の変動をモニタリングした。感染 8 週間以降にリンパ節、脾臓、骨髄等のリンパ系臓器を採材し、組織内の HTLV-1 特異的 CTL の頻度を FCM で解析した。

4. 研究成果

NOG-HLA-A2 Tg マウス系統は、遺伝子型がホモ個体の自然交配による妊孕性がヘテロ個体と比較して著しく低く (17.6% vs 45.1%)、自家繁殖が困難であるため、体外受精・胚移植法を用いた個体生産を実施する必要があった。自然繁殖群と体外受精群のHLA-A2 発現量を比較検討したところ、ホモ個体では発現率と発現強度ともに差は認められなかった (図 1A, B)。一方ヘテロ個体では自然繁殖群と比較して体外受精群において両者ともに有意に低値を示したことから (図 1C, D)、ヒト化マウス作製にはホモ個体を用いた。

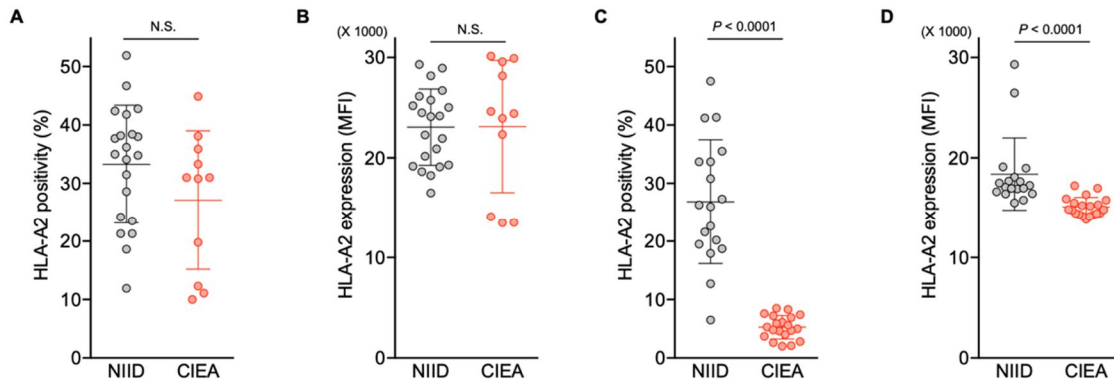


図1. IVF-ETで生産した個体と自然繁殖した個体におけるHLA-A2の発現量比較

ヒト化移植法の最適化のため、移植前処置である全身性放射線照射線量を検討した。X線放射 1 Gy 群、1.5 Gy 群、2.0 Gy 群、2.5 Gy 群の各群において造血幹細胞移植後 16 週および 21 週の末梢血ヒトキメリズムおよび生存率を比較した。その結果、移植経過時間および照射線量依存的にヒトキメリズムは増加し、2.0 Gy 群と 2.5 Gy 群では差は無かった。その一方、生存率は 2.5 Gy 群で著しく低下したことから、適正線量を 2.0 Gy と定めた (図 2)。

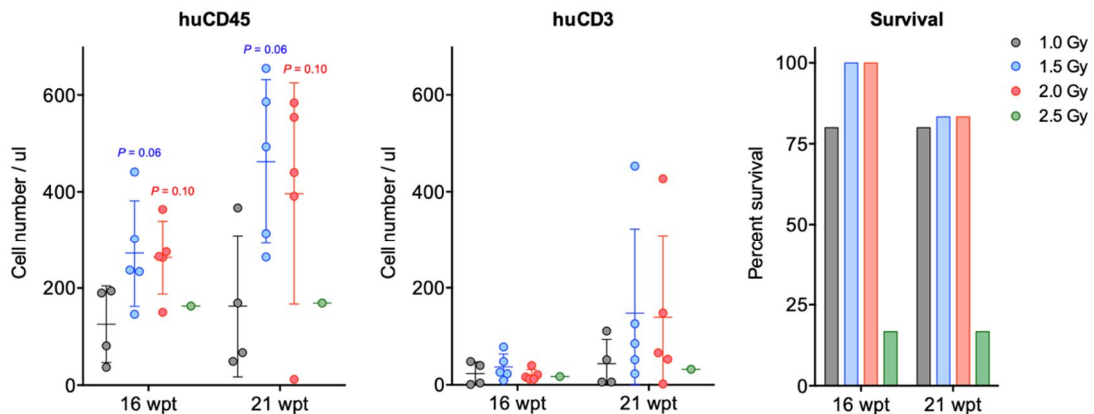


図2. 造血幹細胞移植前処置の放射線放射量の検討

作製した新規ヒト化マウスに対して HTLV-1 を感染させ、個体内の血中ウイルス量、細胞表現型、および免疫応答について解析した。HTLV-1 が感染した 3 個体のうち、1 個体で顕著な血中ウイルス量と細胞増殖の抑制が観察された。これらの 3 個体のウイルス特異的免疫応答を解析したところ、ウイルス量が抑制されていた個体でのみ HLA-A2 拘束性の HTLV-1 Tax 特異的 CTL が誘導されていた。同 HTLV-1 Tax 特異的 CTL は血中や骨髄では低頻度であったが (図 3A, B)、脾臓およびリンパ節では高頻度 (全 CD8 T 細胞中の 6.3%-12.1%) に存在していた (図 3C-E)。

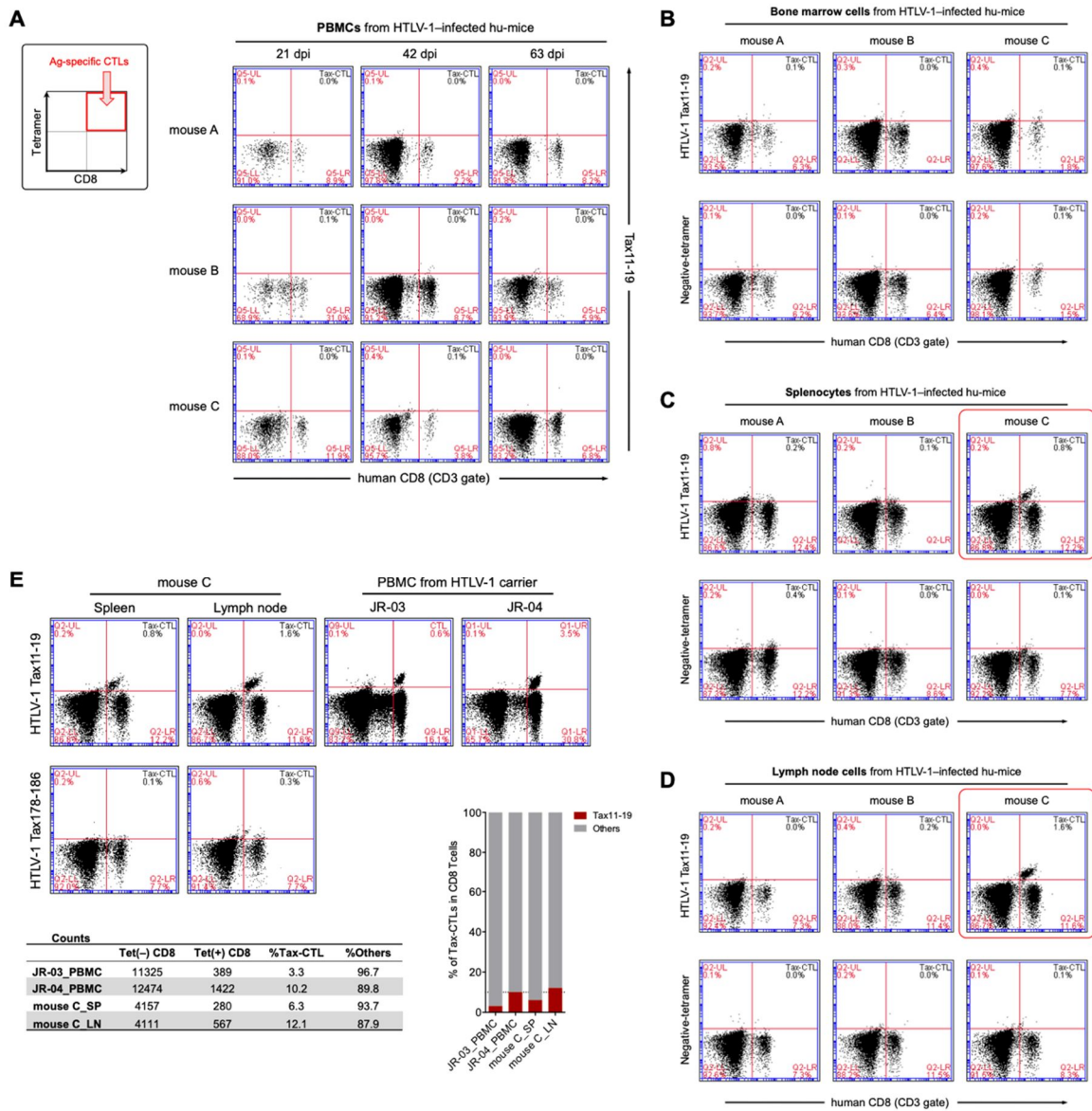


図3. HTLV-1感染ヒト化NOG-A2マウスにおけるTax-CTLの誘導

さらに上記実験の再現性を確認するため、臍帯血のドナーを変更してヒト化マウスを作製した。上記と同様、HTLV-1を感染させた7個体のうち、2個体で顕著な血中ウイルス量と細胞増殖の抑制が観察された。これら7個体のウイルス特異的免疫応答を解析したところ、ウイルス量が抑制されていた2個体でのみHLA-A2拘束性のHTLV-1 Tax特異的CTLが誘導されていた。同HTLV-1 Tax特異的CTLは骨髄中ではほとんど検出されなかったが、脾臓やリンパ節では比較的高頻度(全CD8T細胞中の0.25%-3.13%)に存在していた。以上の結果より、HTLV-1感染させた10個体中3個体でTax特異的CTLが誘導されていた。CTLが誘導された個体では血中プロウイルス量が低値に抑制されており、HTLV-1の潜伏感染状態が一部再現されていることが示唆された。

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 5件）

1. 著者名 Hidetoshi Nomoto, Satoshi Kutsuna, Kazu Okuma, Madoka Kuramitsu, Kenta Tezuka, Emi Ikebe, Sho Saito, Noriko Kinoshita, Mari Terada, Mio Endo, Tetsuya Suzuki, Yusuke Miyazato, Takato Nakamoto, Makoto Inada, Isao Hamaguchi, Norio Ohmagari.	4. 巻 27(4)
2. 論文標題 No SARS-CoV-2 RNA detected in the convalescent plasma of COVID-19 patients with different disease severity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Infect Chemother.	6. 最初と最後の頁 653-655
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2021.01.004	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 Terada M, Kutsuna S, Togano T, et al.	4. 巻 61(7)
2. 論文標題 How we secured a COVID-19 convalescent plasma procurement scheme in Japan.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transfusion	6. 最初と最後の頁 1998-2007
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/trf.16541	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 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.	4. 巻 130(11)
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 J Clin Invest.	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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okuma K, Kuramitsu M, Niwa T, et al.	4. 巻 17(1)
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 26
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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

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.	4. 巻 4(9)
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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Madoka Kuramitsu, Kazu Okuma, Kenta Tezuka, Hitomi Nakamura, Yasuko Sagara, Ichiro Kurane, Isao Hamaguchi.	4. 巻 63(11)
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 Microbiology and immunology.	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) 10.1111/1348-0421.12740	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11件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 関洋平、手塚健太、平舘裕希、水上拓郎、大隈和、村田めぐみ、明里宏文、浜口功
2. 発表標題 STLV-1自然感染ニホンザルを用いた水平感染様式解明に向けた検討
3. 学会等名 日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2021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

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

1. 発表者名 手塚健太、水上拓郎、佐々木永太、倉光球、松岡佐保子、大隈和、浜口功
2. 発表標題 ヒト化マウスモデルを用いた高感度HTLV-1ウイルスRNA検出法の開発
3. 学会等名 日本実験動物学会
4. 発表年 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 サル感染モデルを用いたHTLV-1治療薬評価に向けた検討
3. 学会等名 日本実験動物学会
4. 発表年 2019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 日本HTLV-1学会
4. 発表年 2019年

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 日本HTLV-1学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大隈和、倉光球、手塚健太、北村知也、水上拓郎、村田めぐみ、明里宏文、浜口功
2. 発表標題 HTLV-1感染制御に向けたサル薬剤評価系構築による新規ウイルス療法の開発
3. 学会等名 日本HTLV-1学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北村知也、倉光球、手塚健太、水上拓郎、明里宏文、村田めぐみ、大隈和、浜口功
2. 発表標題 ニホンザル (<i>Macaca fuscata</i>) のSTLV-1ゲノム解析
3. 学会等名 日本HTLV-1学会
4. 発表年 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 Application of STLV-1-infected Japanese macaques to a non-human primate model for HTLV-1 infection to develop VSV-based anti-HTLV-1 virotherapy
3. 学会等名 日本ウイルス学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K Nojima, T Mizukami, R Sobata, K Tezuka, M Kuramitsu, S Matsuoka, K Okuma, M Satake, I Hamaguchi
2. 発表標題 VIRAL SAFETY ASSESSMENT IN THE DEVELOPMENT OF HTLV-1 HYPERIMMUNE GLOBULIN
3. 学会等名 ISBT Bangkok 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大隈和、手塚健太、浜口功	4. 発行年 2021年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 601頁
3. 書名 創薬研究者がこれだけは知っておきたい最新のウイルス学	

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計2件

産業財産権の名称 検出及び/又は定量用プライマー対、検出及び/又は定量用プローブ、及び、検出及び/又は定量用キット	発明者 大隈 和、手塚 健太、浜口 功	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特許6990836	取得年 2021年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 発明の名称：血清型2のデングウイルス検出用キット、血清型3のデングウイルス検出用キット及びデングウイルス検出用キット	発明者 手塚 健太、倉光 球、大隈 和、浜口 功、高崎 智彦	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特許第6592697号	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

〔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
---------	---------