

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16229

研究課題名(和文) HTLV-1感染サルモデルを用いたウイルス感染動態を規定する因子の解明

研究課題名(英文) Elucidation of factors defining viral infection dynamics using HTLV-1-infected macaque model

研究代表者

星 碧(中村碧)(Nakamura-Hoshi, Midori)

国立感染症研究所・エイズ研究センター・主任研究官

研究者番号：10758395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではヒトT細胞白血病ウイルス1型(HTLV-1)感染実験に供したカニクイザル検体を用い、感染前後の宿主免疫応答の解析と宿主制御因子の遺伝子型解析を行い、HTLV-1感染動態との関連について調べた。細胞性免疫応答、液性免疫応答とも、HTLV-1感染後に特異的免疫応答の誘導が認められた。細胞性免疫の感染動態への影響を示す結果は認められなかったが、一部では高い抗HTLV-1中和抗体価を示した一方HTLV-1プロウイルス量は低値に留まり、HTLV-1感染動態への抗HTLV-1抗体の関与の可能性が考えられた。宿主制御因子の一つであるTRIM5の遺伝子型と感染動態の間に関連は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HTLV-1感染症における重要課題の一つとして、HTLV-1感染予防方策の構築が挙げられ、このためにはHTLV-1感染動態に関する因子を明らかにすることが重要であった。本研究では、一部の抗HTLV-1抗体がウイルス感染動態に関与していることが示唆された。これまでも抗HTLV-1抗体のウイルス複製抑制効果を報告する研究成果はあったが、特にヒトに近い霊長類であるカニクイザルを用いたHTLV-1感染モデルでこのような結果が示されたことは、抗HTLV-1(中和)抗体のウイルス複製抑制への重要性と、さらなる研究の必要性を同時に提起するものである。

研究成果の概要(英文)：Host immune responses and restriction factor in human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-infected cynomolgus macaques were analyzed, and relation between these factors and viral infection dynamics were analyzed. Induction of HTLV-1-specific immune responses were observed. Cellular immune responses were not related to viral infection dynamics, while some of infected macaques showed higher neutralizing antibody responses and lower HTLV-1 proviral loads, suggesting the possibility of anti-HTLV-1 antibody response contribution to HTLV-1 infection dynamics. Genotypes of TRIM5, one of host restriction factors, were not related to infection dynamics in this study.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HTLV-1 宿主免疫応答 サルモデル

## 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、感染者の一部において成人T細胞白血病やHTLV-1関連脊髄症などの重篤な疾患を引き起こすレトロウイルスである。従来は、特に国内における感染は母乳を通じた母子感染が主体であると考えられていたが、近年の報告から、国内外における水平感染伝播が想定されていた以上に多いと見られることがわかった。こうしたことを背景として、HTLV-1感染症における関連疾患・病態の発症阻止と同時に、感染防御につながる因子の解明や予防ワクチンの開発といったHTLV-1感染予防方策の構築は、解決すべき重要な課題の一つであった。一方本研究の開始以前より、研究代表者はカニクイザルへのHTLV-1感染実験を行ってきた。カニクイザルへのHTLV-1感染実験において、HTLV-1産生細胞接種後の感染の成否や感染動態は個体によって異なっており、この違いには何らかの宿主因子が関与している可能性が考えられたことから、各個体の宿主因子の違いを明らかにすることで、HTLV-1感染病態に関与する宿主因子の解明につながることを期待された。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、カニクイザルにおけるHTLV-1感染実験前後の宿主免疫応答および宿主制御因子の解析を通じて、HTLV-1の感染動態や、感染の成否に関わる因子を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、以前にHTLV-1感染実験に供したカニクイザルより感染前後に取得した検体を用いて、以下の解析を行った。

#### (1) 末梢血リンパ球(PBMC)の表現型および機能解析

PBMCの表現型について、特に自然免疫を担うNK細胞に着目し、CD16抗原とCD56抗原を染色してフローサイトメトリー解析により表現型の比較を行った。また、ヒトにおけるHTLV-1感染においてHTLV-1特異的T細胞反応の代表的な免疫誘導抗原として知られているHTLV-1 Taxタンパク質に対する細胞性免疫応答について解析した。Tax特異的T細胞反応は、Tax全長をオーバーラップするペプチドプールによって刺激されたPBMCからのIFN- $\gamma$ 産生を、フローサイトメーターで検出することにより測定した。

#### (2) 抗HTLV-1抗原結合抗体および中和抗体応答の解析

抗HTLV-1結合抗体価について、市販のHTLV-1抗体検出キット(凝集法およびラインプロット法)を用いて測定した。また、HTLV-1産生細胞と標的細胞の共培養による合胞体形成の阻害を評価するsyncytium inhibition assay (SIA)により、抗HTLV-1中和抗体価を測定した。

#### (3) 宿主制御因子の遺伝子型解析

宿主制御因子のうち、同じレトロウイルスであるHIV-1に対する宿主制御因子として代表的なものの一つであるTRIM5と、TRIM5のPRYSPRY領域がCypA遺伝子に置き換わったTRIMcypについて、多型解析をPCR法により行った。

### 4. 研究成果

#### (1) PBMCの表現型および機能解析

##### NK細胞表現型の解析

HTLV-1感染実験を行った各カニクイザルについて、HTLV-1感染前後のNK細胞各表現型の頻度を比較した。HTLV-1感染後には、NK細胞の各表現型頻度には一過的な変化が認められたが、その分布変化は感染後のウイルス感染動態によらず、解析した全個体で同様であった。また、感染前の表現型頻度の違いと感染動態の間にも関連を認めることはできなかった。

##### Tax特異的T細胞反応の解析

Tax特異的T細胞反応を、PBMCへのTaxオーバーラップペプチドプール刺激を行い解析したところ、HTLV-1感染後一部の個体において、Tax特異的CD8陽性T細胞反応の誘導が認められた。これらの反応が認められた個体と認められなかった個体、あるいは同一個体におけるHTLV-1感染後タイムポイント間での比較を行ったところ、プロウイルス量とTax特異的CD8陽性T細胞反応誘導との間に明らかな関連を認めることはできなかった。しかし本研究において対象とした解析範囲では、プロウイルス量の高い検体においてTax特異的CD8陽性T細胞反応が誘導される傾向が認められ、Tax特異的CD8陽性T細胞反応はカニクイザルにおけるHTLV-1感染に対して抑制的に作用するよりも、抗原発現によって免疫応答が誘導された可能性が考えられた。一方、Tax特異的CD4陽性T細胞反応の誘導は、本研究で解析した範囲ではいずれの個体によってもほとんど認められなかった。

## (2) 抗 HTLV-1 結合抗体および中和抗体応答の解析

### 抗 HTLV-1 結合抗体解析

当初は ELISA 法を構築した後、これによって抗 HTLV-1 抗体価を測定する予定であったが、構築した方法によっては抗体反応の検出に至らなかったため、市販の抗 HTLV-1 抗体検出キットを用いて、凝集法およびラインプロット法により、感染前後の血中 HTLV-1 抗体価を測定した。いずれの方法によっても、HTLV-1 感染成立が確認された個体においては抗 HTLV-1 抗体が誘導されていることを確認した。抗 HTLV-1 抗体価とプロウイルス量との関連を解析したところ、結合抗体価とプロウイルス量は正相関する傾向にあった。また、一部の解析個体では HTLV-1 感染下でのウイルス産生細胞追加接種を行っていたが、ウイルス産生細胞接種後には HTLV-1 抗体価の上昇が認められた。これらのことから、本研究で認められた抗 HTLV-1 結合抗体誘導は HTLV-1 感染に対する抑制的な作用を示してはならず、感染による免疫誘導の結果を見ているものと考えられた。

### 抗 HTLV-1 中和抗体解析

HTLV-1 感染後の血中抗 HTLV-1 中和抗体価を SIA により測定した。抗 HTLV-1 結合抗体誘導が確認されたものでは中和抗体も誘導されているものが多く、全体的な傾向としては結合抗体価の高い検体では中和抗体価も高い傾向にあったが、結合抗体価と中和抗体価は必ずしも相関するものではなかった。一方中和抗体価とプロウイルス量の比較を行うと、有意ではないものの弱い逆相関の傾向が認められた。また、HTLV-1 感染下でのウイルス産生細胞追加接種を行っていた個体では、結合抗体価と同様に中和抗体価にも上昇が認められたが、このとき特に高い中和抗体価を示した個体ではプロウイルス量の上昇は認められなかった。これらのことから、HTLV-1 中和抗体は HTLV-1 感染動態に対して抑制的に働きうる可能性が示唆された。一方で中和抗体価が高くても一定度のプロウイルス量を示す個体が認められていたこと、結合抗体価が高いと中和抗体価も高い傾向であったことから、カニクイザルにおいて誘導されていた HTLV-1 中和抗体は一樣ではなく、標的領域の違いなどが生体内におけるウイルス感染・複製抑制効果に影響を及ぼす可能性が考えられた。

## (3) 宿主制御因子の遺伝子型解析

本研究で解析対象としたカニクイザル個体について、TRIM5 /Cyp の多型解析を行った。その結果、TRIM5 ホモの個体と 5 /Cyp ヘテロの個体が存在することがわかったが、この違いと HTLV-1 感染動態の差異、あるいは HTLV-1 感染の成否との間に関連を認めることはできなかった。一方本研究で用いた個体のうちでは Cyp ホモの個体は存在しなかったことから、Cyp ホモにおける HTLV-1 感染動態の差異の有無については、本研究では明らかにすることはできなかった。

HTLV-1 感染予防方策構築にむけてはウイルス伝播阻止につながる因子を明らかにすることが重要であり、特にウイルス感染前から持続的に解析可能な動物モデルが有用であるが、本研究開始以前には小動物モデルの解析や近縁異種であるサル T 細胞白血病ウイルス 1 型 (STLV-1) を用いたモデルの解析が主体であった。本研究では、ヒトに近い霊長類であるカニクイザルにおいて、HTLV-1 感染前後の免疫応答変化や宿主制御因子の違いを解析することにより、HTLV-1 感染病態に影響を及ぼす因子を明らかにしようとした。本研究の結果からは、カニクイザルにおける HTLV-1 感染において、特に抗 HTLV-1 抗体が HTLV-1 感染動態に影響を及ぼす可能性が考えられた。これまでに報告されてきた研究には抗 HTLV-1 抗体のウイルス感染抑制効果を示唆するものがあり、本研究でも一部個体において中和抗体によるウイルス複製抑制効果の可能性が示唆されたことは、HTLV-1 抗体のウイルス感染・複製抑制に対する有効性を期待させるものである。一方で、本研究では必ずしもすべての中和抗体誘導が認められた検体で低プロウイルス量が示されていたわけではなかったことも明らかとなった。このことから、単純に抗 HTLV-1 抗体価や中和抗体価のみでウイルス複製抑制の評価をするのは不十分であると考えられる。今後はさらに誘導されていた中和抗体の標的領域の解析や、中和抗体誘導に至るまでの免疫動態等の解析を進めることにより、具体的にどのような抗体誘導を目指すことが HTLV-1 感染予防方策構築、特にワクチン開発などの観点から重要であるか、より知見を深めることが期待される。また、本研究では解析対象としなかったが、抗体を介したウイルス抑制機序の一つに抗体依存性細胞傷害 (ADCC) が挙げられる。今後これについても解析を進めることで、HTLV-1 感染抑制に対する液性免疫の有用性のさらなる評価につながると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中村碧、野村拓志、石井洋、岡崎みどり、須崎百合子、網康至、俣野哲朗
2. 発表標題 カニクイザルにおけるHTLV-1感染動態の解析
3. 学会等名 第35回日本エイズ学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Midori Nakamura-Hoshi, Takushi Nomura, Hiroshi Ishii, Midori Okazaki, Yuriko Suzaki, Yasushi Ami, Tetsuro Matano
2. 発表標題 Analysis of immune responses after HTLV-1 infection in cynomolgus macaques
3. 学会等名 The 22nd Kumamoto AIDS Seminar
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Midori Nakamura-Hoshi, Hiroshi Ishii, Midori Okazaki, Yuriko Suzaki, Yasushi Ami, Takushi Nomura, Tetsuro Matano
2. 発表標題 CD8+ cell depletion results in an increase in proviral loads in HTLV-1-infected cynomolgus macaques
3. 学会等名 20th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses (国際学会)
4. 発表年 2022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
---------	---------