

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590532

研究課題名（和文）ゼノグラフトモデルマウスを用いた HTLV-1 感染バイオアッセイ系の確立と臨床応用に関する研究

研究課題名（英文）Development of bio-assay system of HTLV-1 infection using xenograft model mice

研究代表者

岡山 昭彦 (OKAYAMA AKIHIKO)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：70204047

研究成果の概要（和文）：本研究においては NOG マウスゼノグラフトモデルを用いて HTLV-1 キャリア類似環境を作成・解析することで、細胞間感染とクローン増殖のメカニズムの解明を試みた。結果として NOG マウスへ HTLV-1 キャリア由来感染細胞の生着がみられたが、キャリア血清および中和抗体により感染の抑制がみられた。さらに生着感染細胞クローナリティの解析により、感染細胞の中には増殖のポテンシャルを有する細胞と有さない細胞があることが示唆された。上記の結果より NOG マウス移植ゼノグラフトモデルがキャリア評価に有用であることが示された。

研究成果の概要（英文）：HTLV-1 is a causative agent of adult T-cell leukemia. In the present study, we tried to clarify the mechanism of cell to cell infection and clonal evolution of HTLV-1 infected cells using xenograft model of mice. The HTLV-1 infected cells from asymptomatic carriers survived and proliferated in NOG mice. The HTLV-1 proviral loads were higher when the PBMCs from long-term carriers were inoculated to the mice. Moreover, NOG mice, which received the sera from carriers or neutralizing antibodies, had decreased proviral loads and limited clonal proliferation of HTLV-1 infected cells. These data suggested this mouse model provide the novel information of the mechanism of HTLV-1 infection and may be applicable for the risk assessment of ATL development from HTLV-1 carriers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2012年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：病態検査学

科研費の分科・細目：

キーワード：HTLV-1, ATL, NOG マウス, ゼノグラフトモデル, 感染予防, 発症予防

1. 研究開始当初の背景

ヒト T リンパ向性ウイルス 1 型 (HTLV-1) は、

成人 T 細胞白血病 (ATL) の原因ウイルスである。HTLV-1 感染者の多くは ATL を発症せずに

健全な状態で一生を経過するキャリアであるが、その一部（約5%）が感染後長い潜伏期を経てATLを発症する。HTLV-1感染は感染細胞と非感染細胞との接触感染によって成立する。新規感染成立後は体内でも細胞間感染により感染が拡大し、HTLV-1に対する免疫の発動後は感染細胞のクローン増殖が感染の維持に大きな役割を果たすと考えられている。

これまでの知見より HTLV-1 感染機会の初期に介入を行い、感染防止、あるいは感染が成立した場合でもセットポイントのウイルス量を減少させることが HTLV-1 関連疾患の予防に有効と考えられる。しかし現在のところヒトの HTLV-1 新規感染に対して母乳遮断以外に有効な感染予防策は知られておらず、また感染ウイルス量を抑える方法も明らかでない。この問題の解決を目的として我々は HTLV-1 キャリアの末梢血液単核細胞（PBMC）を免疫不全マウスである NOG マウスに移植するゼノグラフトモデルを用いることで、HTLV-1 細胞間感染と感染細胞クローン増殖のメカニズムを解明し、HTLV-1 感染の予防と治療の可能性を探るという着想にいたった。

2. 研究の目的

キャリアにおいて HTLV-1 感染は①感染細胞と非感染細胞間での接触感染および②感染細胞のクローン増殖によって維持されている。本研究においては NOG マウスゼノグラフトモデルを用いてキャリア類似環境を作成・解析することで、細胞間感染と感染細胞クローン増殖のメカニズムを解明し、HTLV-1 感染の予防と治療の可能性を探索する。

1) キャリアにおける HTLV-1 感染細胞の解明：本研究においては移植するキャリア PBMC を表面マーカーにより分画し、感染成立に必須の組み合わせをアロおよびオートの系において明らかにする。

2) *in vivo* における細胞間感染成立因子の解明：HTLV-1 感染について、感染成立に関する因子を阻害する抗体や逆転写酵素・プロテアーゼ阻害剤などを明らかにする。

3) クローン増殖細胞の同定と ATL 発症危険因子：クローン化したキャリア由来の感染細胞を解析し、移植由来キャリアに ATL 細胞近似細胞が存在するか否かを検討する。

4) 臨床応用：

①HTLV-1 感染防止および関連疾患発症リスク軽減：HTLV-1 ヒト-ヒト感染を *in vivo* で阻止できる因子を探索することで将来的な HTLV-1 関連疾患の予防が可能にならないか検討する。

②ゼノグラフトを用いた ATL 類似感染細胞同定による ATL 発症リスクの絞込み：キャリアより得た HTLV-1 感染細胞を NOG マウスに移植し、増殖したクローンの性状を明らかにすることによりこのような ATL 発症高リスク群を同定し、ATL の発症前診断としての有用性を検討する。

3. 研究の方法

1) キャリアにおける HTLV-1 感染細胞の解明：HTLV-1 感染では CD4+CD25+CCR4+リンパ球が主な感染細胞のリザーバーであると報告されている。本研究においては移植する細胞群の同定を念頭に、キャリア PBMC の表面マーカーを解析、その特徴を検討した。

2) 免疫不全マウスへの HTLV-1 キャリアへの移植実験と細胞間感染成立因子の解明：NOG マウスや NOJ マウスの様な高度免疫不全マウスを用いて HTLV-1 感染を阻害する抗体などを免疫不全マウスに投与し、移植実験を行うことにより、*in vivo* において細胞間感染を阻止することが可能か否かを検討した。

3) クローン増殖細胞の同定と ATL 発症危険因子：細胞間感染を阻止した条件下でキャ

リア PBMC を移植し、そのパターンを IL-PCR 法等を用いることにより解析することで、キャリア由来 HTLV-1 感染細胞のなかでも増殖可能な細胞が選択的にクローン化されるか否かを検討した。さらに組み込まれたプロウイルスの欠損パターンの解析やウイルス遺伝子の活性化に重要な遺伝子のメチル化について合わせて検討を行った。

本研究に用いたヒトサンプルはインフォームドコンセントを得た研究協力者に由来し、研究プロトコールは宮崎大学医学部倫理委員会の承認をえた。

4. 研究成果

1) キャリアにおける HTLV-1 感染細胞の解明：HTLV-1 キャリア PBMC の表面マーカーを解析、その特徴を検討した。PBMC について T 細胞マーカーと T S L C 1 等による染色を行い、解析したが、HTLV-1 キャリアに特徴的なパターンを見出すことができなかった。(図 1)

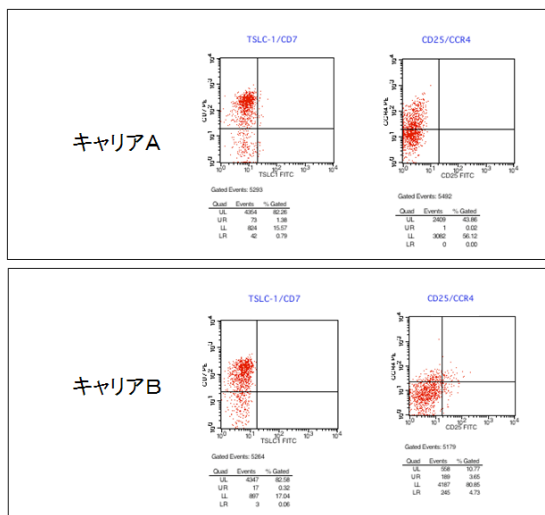


図 1

2) 免疫不全マウスへの HTLV-1 キャリアへの移植実験と細胞間感染成立因子の解明：

a) 長期キャリアと短期キャリア由来の感染細胞投与実験：免疫不全マウス (NOGマウ

ス) へ HTLV-1 キャリア由来細胞投与を末梢血及び腹腔内より行った。その結果、これまで報告してきた結果と同様に肺、腎臓、肝臓、脾臓等にヒト由来の単核細胞の強い浸潤がみられた。(図 2)

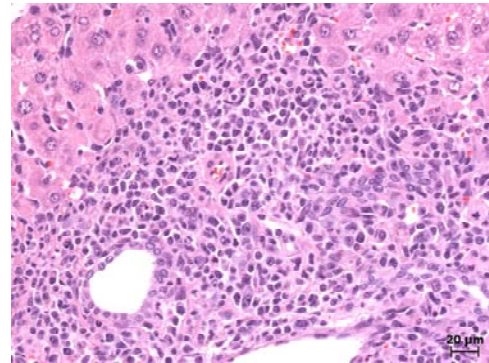


図 2 肝臓への浸潤

投与する細胞の由来として、夫妻の両者が陽性のキャリアより末梢血の供与を受け、PBMC を投与した。家族歴などから男性は長期、女性は短期キャリアと考えられた。長期キャリア細胞接種群では短期キャリア細胞接種群よりも感染細胞数の増加が著しい傾向を示した。(表 1)

表 1 キャリアPBMC移植によるマウスのプロウイルス量 (1)

	血清投与なし		血清投与あり	
	マウス1	マウス2	マウス3	マウス4
配偶者ペア1				
夫	334*	51	21	31
妻	30	54	27	22
配偶者ペア2				
夫	55	20	15	29
妻	13	5	6	0.3

*HTLV-1プロウイルスコピー数/100PBMCs

このことは長期キャリアには増殖能の高い細胞が存在することを示唆するものと思われた。

b) HTLV-1 感染阻害抗体投与実験：①HTLV-1 血清の投与：キャリア本人の血清を投与した。その結果投与群では非投与群に比して HTLV-1 コピー数が低い傾向がみられた。(表 1) ②HTLV-1 エンベロープ中和抗体の投与：HTLV-1 エンベロープ蛋白に対する中和活性を有するモノクローナル抗体(琉球大学田中勇悦教授より供与)の投与を行ったところ、

非投与群に比して HTLV-1 コピー数が低い傾向がみられた。(表2)

表2 キャリアPBMC移植によるマウスのプロウイルス量(2)

抗体投与なし		抗体投与あり	
マウス1	マウス2	マウス3	マウス4
46*	47	38	27

*HTLV-1プロウイルスコピー数/100PBMCs

これらの結果からキャリア血清には細胞間感染を抑制する因子があり、少なくともその活性の一部はエンベロープ蛋白に対する中和抗体により担われている可能性が示唆された。

3) クローン増殖細胞の同定とATL発症危険因子:

①キャリア由来 HTLV-1 感染細胞クローンの検討: NOGマウスに生着した感染細胞について IL-PCR 法を用いて感染細胞クローンの解析を行った。ヒト血清を投与した条件下キャリアPBMCを移植した場合、血清がない状態と比較して、異なる感染細胞クローンを表す電気泳動上のバンド数が減少し、感染細胞のなかでも増殖可能な細胞群が選択的に増加していることが示唆された(図3)。さらに中和抗体投与下においても同様にバンド数の減少がみられ、クローン選択が起こっていることが示唆された。

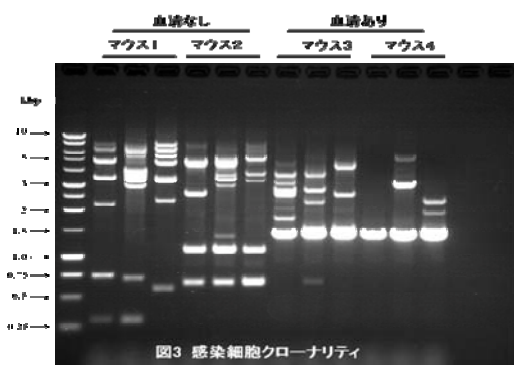


図3 感染細胞クローナリティ

このことから、無症候性キャリアの感染細胞の中には増殖のポテンシャルを有する細胞と有さない細胞があり、前者がATL幹細胞に近い性質を持っていることが考えられた。さらにそのような細胞の有無を判定する方法

として今回実験に用いた高度免疫不全マウスを用いたゼノグラフトモデルが有用であることが示唆された。

②HTLV-1po1 領域のメチル化についての検討: ヒト血清を投与した条件下キャリアPBMCをNOGマウスに生着させた場合、血清がない状態に比して、生着した感染細胞のpo1 領域のメチル化された状態であるプロウイルスが多い傾向が観察された。このことは血清が投与された状態では新規感染が起こらないため、本来キャリア生体内でメチル化された状態のプロウイルスを有する感染細胞がそのまま生着し、血清のない状態では新規感染が起こるため、それらの細胞ではメチル化されないプロウイルスが多くなることが考えられた。別の可能性としては、キャリア血清にはプロウイルスのメチル化を促進する因子が含まれておりこのため血清投与群ではプロウイルスのメチル化が顕著である可能性も考えられた。

上記の結果より NOG マウス移植ゼノグラフトモデルにキャリア血清や中和抗体投与を組み合わせることにより、よりキャリア生体内に近い条件を再現することが可能であることが示された。本モデルは HTLV-1 の細胞間感染と感染細胞クローン増殖のメカニズムを解明し、HTLV-1 感染の予防と治療を検討する新たな動物モデルとして有用であると考えられる。今回の研究では目的の4)として挙げた研究の臨床応用にまで及ばなかったが、さらに検討を続けることで無症候性キャリアの発症予防のためのリスク評価に応用したい。

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 10 件)

①岡山昭彦. 特集/ストップ ザ 性感染症
性感染症—診断・治療 HTLV-1 感染. 臨床
と研究. 2012, 89(7), 907-910. (7月) 査読有

②岡山昭彦. 日本国内の HTLV-1 感染の現状
と今後の対策. アボットニュース. 2012,
1-4. (7月) 査読有

③Ueno S, Umeki K, Takajo I, Nagatomo Y,
Kusumoto N, Umekita K, Morishita K,
Okayama A. Proviral loads of human
T-lymphotropic virus type 1 in
asymptomatic carriers with different
infection routes. Int J Cancer. 2012,
130(10), 2318-2326. (May 15) doi:
10.1002/ijc.26289. Epub 2011 Aug 29. 査
読有

④岡山昭彦. HTLV-1 感染症：母子感染予防対
策とその課題. 臨床とウイルス. 2012;40:
1, 8-13. (3月) 査読有

⑤Nakahata S, Saito Y, Marutsuka K, Hidaka
T, Maeda K, Hatakeyama K, Shiraga T, Goto
A, Takamatsu N, Asada Y, Utsunomiya A,
Okayama A, Kubuki Y, Shimoda K, Ukai Y,
Kurosawa G, Morishita K. Clinical
significance of CADM1/TSLC1/IgSF4
expression in adult T-cell
leukemia/lymphoma. Leukemia. 2012 Jan;26
(6) : 1238-46. doi: 10.1038/leu.2011.379.
Epub 2012 Jan 6. 査読有

⑥高城一郎, 岡山昭彦. 特集(1) : HTLV-1 感
染の検査と臨床 2. HTLV-1 感染の疫学. 医
療と検査機器・試薬 別冊 機器・試薬. 2011,
34(4), p. 447-452. (8月) 査読有

⑦ Takenouchi H, Umeki K, Sasaki D,
Yamamoto I, Nomura H, Takajo I, Ueno S,
Umekita K, Kamihira S, Morishita K,
Okayama A. Defective human T-lymphotropic
virus type 1 provirus in asymptomatic

carriers. Int J Cancer. 2011, 128(6), p.
1335-1343. (Mar.) 査読有

⑧Kamihira S, Yamano Y, Iwanaga M, Sasaki
D, Satake M, Okayama A, Umeki K, Kubota R,
Izumo S, Yamaguchi K, Watanabe T. Intra-
and inter-laboratory variability in human
T-cell leukemia virus type-1 proviral load
quantification using real-time polymerase
chain reaction assays: A multi-center
study. Cancer Science. 2010, 101(11), p.
2361-2367. (Nov.) 査読有

⑨Iwanaga M, Watanabe T, Utsunomiya A,
Okayama A, Uchimaru K, Ki-Ryang Koh, Ogata
M, Kikuchi H, Sagara Y, Uozumi K, Mochizuki
M, Tsukasaki K, Saburi Y, Yamamura M,
Tanaka J, Moriuchi Y, Hino S, Kamihira S,
and Yamaguchi K, for the Joint Study on
Predisposing Factors of ATL Development
investigators. Human T-cell Leukemia
virus type I (HTLV - 1) proviral load and
disease progression in asymptomatic HTLV
- 1 carriers: a nationwide prospective
study in Japan. BLOOD. 2010, 116(8), p.
1211-1219. (Aug.) 査読有

⑩Watanabe M, Nakahata S, Hamasaki M,
Saito Y, Kawano Y, Hidaka T, Yamashita K,
Umeki K, Taki T, Taniwaki M, Okayama A,
Morishita K. Downregulation of CDKN1A in
Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma despite
Overexpression of CDKN1A in Human
T-Lymphotropic Virus 1-Infected Cell
Lines. Journal of Virology. 2010, 84(14),
p. 6966-6977. (July) 査読有

[学会発表] (計7件)

①岡山昭彦. 本邦における HTLV-1 感染とキ
ャリア指導の留意点. 第36回日本血液事
業学会総会共催ランチョンセミナー. 2012.
(10月17日, 宮城県仙台市, 仙台国際センタ

一)

②梅木一美, 山本成郎, 橋倉悠輝, 上野史朗, 高城一郎, 森下和弘, 岡山昭彦. HTLV-1 キャリア末梢血単核球を移植した NOG マウスにおける HTLV-1 プロウイルス DNA のメチル化の動態. 第 5 回 HTLV-1 研究会. ポスターディスカッション P-27. 2012. (8 月 26 日, 東京都港区, 東京大学医科学研究所講堂)

③押領司大助, 松田基弘, 河野徳明, 姫路大輔, 甲斐泰文, 小野伸之, 上田章. 抗 HTLV-1 抗体陽性関節リウマチ患者の臨床像についての検討. 第 43 回九州リウマチ学会. 一般演題 2 関節リウマチ, 看護その他 0-2-2. 2012. (3 月 10 日-11 日 (10 日発表), 大分県大分市, iichiko 総合文化センター)

④梅木一美, 山本成郎, 上野史朗, 高城一郎, 岡山昭彦. HTLV-1 無症候性キャリアにおける 2 型欠損プロウイルスの解析. 第 58 回日本臨床検査医学会学術集会. 一般演題(口演) 白血病(1) 0-217. 2011. (11 月 17 日-20 日(19 日発表), 岡山県岡山市, 岡山コンベンションセンター)

⑤Iwanaga M, Watanabe T, Utsunomiya A, Okayama A, Uchimaru K, Koh K, Ogata M, Kikuchi H, Sagara Y, Uozumi K, Mochizuki M, Tsukasaki K, Saburi Y, Yamamura M, Tanaka J, Moriuchi Y, Hino S, Kamihira S, Yamaguchi K (JSPFAD investigators). HTLV-1 proviral load and the relation to disease progression in carriers: a nationwide cohort study (OS-3-147). The 72nd Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. 2010. (September 24-26, Japan Kanagawa-ken Yokohama, PACIFICO YOKOHAMA)

⑥上野史朗, 梅木一美, 野村創, 山本成郎, 竹之内博之, 高城一郎, 岡山昭彦. HTLV-1 無症候性キャリアの異なる領域のプロウイルス

量に基づいた感染経路の同定. 第 69 回日本癌学会学術総会 -がん征圧へ向けての知の統合-. ポスター, HTLV-1 (3). 2010. (9 月 22-24 日(22 日発表), 大阪府大阪市, 大阪インターナショナルコンベンションセンター)

⑦梅木一美, 竹ノ内博之, 山本成郎, 岡山昭彦, 佐々木大介, 上平憲. 無症候性キャリアにおける欠損型 HTLV-1 プロウイルス. 第 57 回日本臨床検査医学会学術集会. 一般演題(ポスター), 遺伝子感染症(2). 2010. (9 月 10-12 日(11 日発表), 東京都新宿区, 京王プラザホテル)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡山 昭彦 (OKAYAMA AKIHIKO)
宮崎大学・医学部・教授
研究者番号: 70204047

(2) 研究分担者

高城 一郎 (TAKAJO ICHIRO)
宮崎大学・医学部・講師
研究者番号: 20418841

(3) 連携研究者

()

研究者番号: