

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590556

研究課題名(和文) HTLV-1によるヒト慢性炎症形成機序の解明とその制御法の開発

研究課題名(英文) Analysis of chronic inflammation caused by HTLV-1 infection and development of novel strategies to prevent HTLV-1 associated diseases.

研究代表者

齊藤 峰輝 (Saito, Mineki)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：40398285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：HTLV-1 bZIP factor (HBZ) 遺伝子の慢性炎症形成における意義を明らかにするため、抗HBZ単クローン抗体を作製してHBZ蛋白質の高感度検出系を確立し、世界で初めてATL患者末梢血単核球中のHBZ蛋白質の定量に成功した。一方、免疫不全マウスの脾臓内にHTLV-1非感染末梢血単核球とマイトマイシン処理したHTLV-1感染細胞株を混合して接種する感染ヒト化マウスモデル系を作製し、HTLV-1中和抗Env gp46単クローン抗体およびHTLV-1関連脊髄症(HAM)患者から精製したIgGが、いずれもマウス体内においてヒトT細胞へのHTLV-1感染を完全に抑制することを示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have developed novel monoclonal antibodies (mAbs) against HBZ, and established novel ELISA system that allow the quantitative analysis of HBZ protein. Using this newly developed ELISA, we successfully detect and quantified the HBZ protein in HTLV-1 infected T cell lines as well as ATL cells from patients. Meanwhile, we have established a simple humanized mouse model of HTLV-1 infection for evaluating prophylactic and therapeutic interventions. Using this model, we found that neutralizing mAbs specific to HTLV-1 Env gp46 as well as human IgG isolated from HAM patients completely blocked the HTLV-1 infection in vivo, indicating that the neutralizing function of the antibody is essential for preventing the in vivo transmission of HTLV-1.

研究分野：神経ウイルス学、神経免疫学

キーワード：HTLV-1 HBZ 慢性炎症 感染防御 ワクチン

1. 研究開始当初の背景

ヒト T 細胞白血病ウイルス (Human T cell leukemia virus type 1: HTLV-1) は、世界ではじめて発見されたヒトレトロウイルスであり、HTLV-1 関連脊髄症 (HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: HAM) および成人 T 細胞白血病 (Adult T cell leukemia: ATL) の原因ウイルスである。HTLV-1 の発見以来約 30 年以上にわたり、HTLV-1 がコードする転写制御因子 Tax が発癌や炎症誘導に重要な疾患原因遺伝子であると考えられてきたが、Tax は半数以上の HTLV-1 感染者の CD4 陽性 T 細胞で発現が抑制されており、Tax のみで HTLV-1 関連疾患の多様な病態を説明することは困難であった。近年、HTLV-1 プロウイルスのマイナス鎖にコードされる転写制御因子 HBZ を CD4 陽性 T 細胞に選択的に強発現するトランスジェニックマウスにおいて、T 細胞の皮膚・肺への浸潤とサイトカイン産生異常が起こることが報告され、HBZ は HTLV-1 感染による慢性炎症形成の原因遺伝子と考えられている。しかしながら、in vivo における HBZ 蛋白質の発現が極めて微量であることから、臨床検体を用いた解析は困難であり、ヒトの慢性炎症病態との関連は明らかでなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、HTLV-1 関連疾患の発症病態との密接な関連が報告されたにもかかわらず、in vivo における発現量が低いこと、優れた抗体がないことから臨床研究が進展していないウイルス因子である HBZ の鋭敏な検出・定量系を開発し、HTLV-1 関連疾患の病態解明に資すること、および これまでに報告がなかった HTLV-1 の感染病態とヒト免疫応答を個体レベルで解析するヒト化マウス実験系を構築した上で、HTLV-1 感染細胞に対する免疫応答を人為的に制御する方法を探索し、将来の HAM および ATL に対する発症予防・免疫治療の臨床応用に向けた方法論の基盤を確立することである。

3. 研究の方法

(1) HBZ 蛋白質の鋭敏な検出・定量系の開発
HBZ 蛋白質のアミノ酸配列を Blast 検索にかけて、ヒト蛋白質と相同性を示す配列領域を避けて 3 種類の候補ペプチド (#1: LRRGPPG EKAPPRGETHRD, #2: KAKQHSARKEKMQELGIDG, #3: KEDLMGEVNYWQGRLEAMW) を選択した。一方、コムギ無細胞発現系により組換え HBZ 蛋白質を作製した。これらを抗原として C57BL/6 マウスおよび WKAH ラットを免疫し、ハイブリドーマ法により抗 HBZ 単クローン抗体を作製した。得られた単クローン抗体の特異性は、蛍光免疫染色、ウエスタンブロット、フローサイトメトリーで確認した。特異性が確認された抗体の中から最もバックグラウンドが低く、かつ感度が高い抗体の組み合わせを選択し、HTLV-1 感染細胞中の HBZ 蛋白質

を検出・定量するサンドイッチ ELISA を構築した。この新規サンドイッチ ELISA を用いて、HTLV-1 感染・非感染ヒト T 細胞株および ATL、HAM 患者の末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cell: PBMC) 抽出液中の HBZ 蛋白質の検出・定量を行った。

(2) HTLV-1 感染モデルマウスの作製と抗 HTLV-1 中和抗体による感染抑制効果の検討
HTLV-1 非感染健常者から分離した PBMC とマイトマイシン処理した HTLV-1 感染 T 細胞株 (ILT-M1) を 1×10^6 個ずつ混合して高度免疫不全マウス (NOD/SCID/ Cnu11: NOG) の脾臓内に移植した。移植 2 週間後にマウスから脾臓細胞を回収し、磁気ビーズを用いてヒト CD4 および CD8 陽性 T 細胞を分離した。HTLV-1 感染の有無は、Tax、HBZ mRNA の発現、HTLV-1 プロウイルス量の Real Time PCR による検出・定量により評価した。非感染 PBMC と HTLV-1 感染細胞株の接種前後に、自家製 HTLV-1 中和抗 Env gp46 単クローン抗体 (LAT27)、HAM 患者血漿から分離精製した IgG、抗 OX40 単クローン抗体を投与して、in vivo における HTLV-1 感染抑制効果を検討した。

4. 研究成果

(1) HBZ 蛋白質の鋭敏な検出・定量系の開発

A: 抗 HBZ 単クローン抗体の作製

3 種類の HBZ ペプチド (図 1A) およびコムギ無細胞発現系により作製した組換え HBZ 蛋白質を用いて、ハイブリドーマ法により合計 14 クローンの抗 HBZ 単クローン抗体を作製した。単クローン抗体の HBZ 蛋白質に対する特異性は、蛍光免疫染色 (図 1B)、フローサイトメトリー (図 1C)、ウエスタンブロット (図 1D) により確認した。

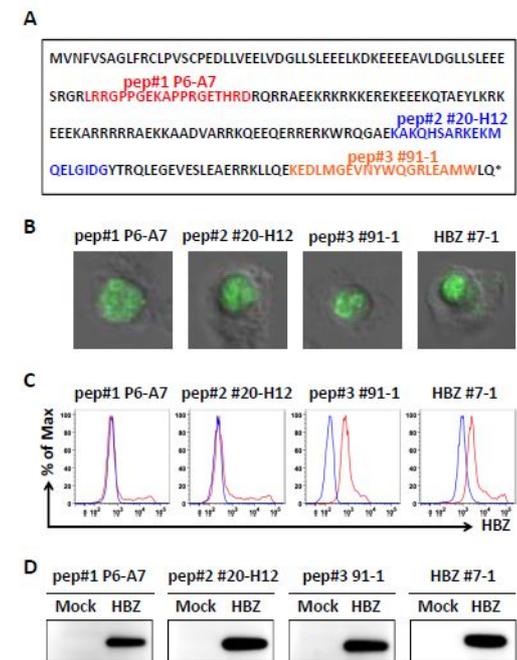


図 1 A: HBZ ペプチド配列 B-D: HBZ 発現プラスミド⁺又は空ベクター⁻を 293T 細胞に導入 (HBZ #7-1 は組換え HBZ で作製)

B:HTLV-1 感染細胞内 HBZ 蛋白質の検出・定量
 抗 HBZ 単クローン抗体のうち、HBZ に対する結合能が最も高い抗体を捕獲抗体として、HTLV-1 感染細胞内の HBZ 蛋白質を定量するサンドイッチ ELISA を構築した。このサンドイッチ ELISA は、HBZ 強制発現細胞 (293T-HA-HBZ) や各種 HTLV-1 感染細胞株 (C5MJ、HUT102、MT-1、MT-2 など) に発現する HBZ 蛋白質のみならず、ATL 患者 PBMC 中の HBZ 蛋白質も再現性よく定量的に検出可能であった (図 2: ATL63)。一方、HAM 患者 PBMC 中の HBZ 蛋白質は測定系の感度以下で検出できなかった (図 2: KMS-H6)。今後、さらなる改良が必要である。

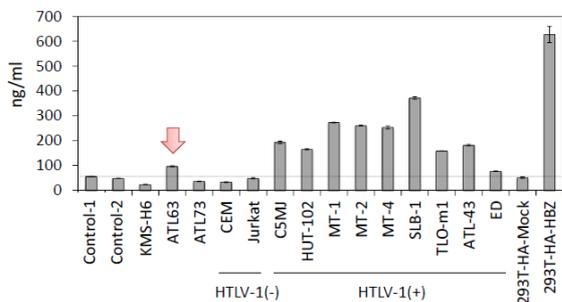


図 2 新規サンドイッチ ELISA による HTLV-1 感染細胞内 HBZ 蛋白質の定量

(2) HTLV-1 感染モデルマウスの作製と抗 HTLV-1 中和抗体による感染抑制効果の検討
 NOG マウスの脾臓から分離したヒト CD4、CD8 陽性細胞の双方から HTLV-1 プロウイルス、tax および HBZ mRNA が検出され、マウス体内でヒト T 細胞に HTLV-1 感染が成立することを確認した。HTLV-1 中和抗 Env gp46 単クローン抗体である LAT27 と HAM 患者血漿から分離精製した IgG (HAM-IgG) は、いずれもマウス体内においてヒト T 細胞への HTLV-1 感染を完全に抑制した (図 3)。一方、HTLV-1 Tax によって感染細胞特異的に発現誘導され、HAM 患者脊髄の病変局所浸潤細胞に強発現する分子である OX40 に対する単クローン抗体には、感染細胞を減少させる傾向が認められたものの有意ではなく ($p=0.102$)、感染阻止効果も認められなかった。

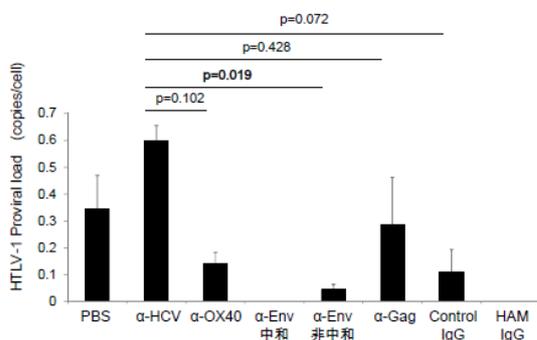


図 3 HTLV-1 中和抗体による in vivo での感染抑制

考察

HTLV-1 のマイナス鎖にコードされる HBZ は、HTLV-1 感染症における発がん (ATL)・慢性炎症形成 (HAM) 双方の原因遺伝子であり、HAM の治療法・発症予防法開発の有効な標的と考えられる。本研究により、HBZ 蛋白質を特異的に検出可能な複数の新規抗 HBZ 単クローン抗体を取得して、HBZ 蛋白質の鋭敏な検出・定量系が構築できた。特に、サンドイッチ ELISA により、世界で初めて ATL 患者 PBMC 中の HBZ 蛋白質の定量に成功した。今のところ HAM 患者 PBMC 中の HBZ 蛋白質の検出には成功していないが、今後改良を重ね感度を上げることで、HAM 患者および無症候性キャリアー PBMC 中の HBZ 蛋白質を検出可能な系を確立したい。さらに、今後引き続き HAM の臨床病態と HBZ mRNA、蛋白質発現動態との関連を詳細に解析することで、HAM の慢性持続性炎症形成メカニズムに対する HBZ 蛋白質の病因的意義を解明したい。一方、HTLV-1 感染モデルマウスを用いて抗 HTLV-1 中和単クローン抗体および HAM 患者血漿中 IgG の受動免疫による感染防御効果が示されたことは、これらが HTLV-1 の母子感染および水平感染を防止する有効な抗体医薬候補であり、将来臨床応用できる可能性を示している。今後もこのモデルマウスを用いて、HTLV-1 抗原で感作した免疫細胞 (成熟樹状細胞、CTL 等) による感染防御の可否や、HTLV-1 を標的とした各種ワクチン、HAM に対する薬剤の効果についても検討し、有効な HTLV-1 感染防御法、HAM 発症予防・治療法を探索したい。

結論

HBZ 蛋白質を定量するサンドイッチ ELISA を作製し、世界で初めて ATL 患者 PBMC 中の HBZ 蛋白質の定量に成功した。また、HTLV-1 中和抗 Env gp46 単クローン抗体および HTLV-1 感染者から精製した IgG が、いずれもマウス体内においてヒト T 細胞への HTLV-1 感染を完全に抑制することを示した。本研究により、HAM の病態を反映する新規バイオマーカーや、新規治療薬の開発に資するシーズを同定するための研究基盤が構築できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. **Saito M**, Tanaka R, Fujii H, Kodama A, Takahashi Y, Matsuzaki T, Takashima H, Tanaka Y. The neutralizing function of the anti-HTLV-1 antibody is essential in preventing in vivo transmission of HTLV-1 to human T cells in NOD-SCID/ cnull (NOG) mice. *Retrovirology*. 11:74, 2014. doi: 10.1186/s12977-014-0074-z. 査読あり

2. Tanaka Y, Takahashi Y, Tanaka R, Kodama

- A, Fujii H, Hasegawa A, Kannagi M, Ansari AA, **Saito M.** Elimination of human T cell leukemia virus type-1-infected cells by neutralizing and antibody-dependent cellular cytotoxicity-inducing antibodies against human T cell leukemia virus type-1 envelope gp46. **AIDS Research and Human Retroviruses.** 30(6): 542-552, 2014. doi: 10.1089/AID.2013.0214. 査読あり
3. **Saito M.** Neuroimmunological aspects of human T cell leukemia virus type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Journal of Neurovirology.** 20(2):164-174, 2014. doi: 10.1007/s13365-013-0192-8. 査読あり
 4. **Saito M.** Pathogenic conversion of forkhead box protein 3-positive T cells into T helper 17 cells: Is this also the case for multiple sclerosis? **Clinical and Experimental Neuroimmunology.** 5(2): 112-113, 2014. doi: 10.1111/cen3.12114. 査読あり
 5. **Saito M,** Tanaka R, Kodama A, Arishima S, Matsuzaki T, Ishihara S, Tokashiki T, Ohya Y, Takashima H, Umehara F, Izumo S, Tanaka Y. Increased expression of OX40 is associated with progressive disease in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Retrovirology.** 10:51, 2013. doi: 10.1186/1742-4690-10-51. 査読あり
 6. Kodama A, Tanaka R, **Saito M,** Ansari AA, Tanaka Y. **Frontiers in Microbiology.** 4:292, 2013. doi: 10.3389/fmicb.2013.00292. 査読あり
 7. **Saito M,** Bangham CR. Immunopathogenesis of Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): Recent perspectives. **Leukemia Research and Treatment.** Article ID 259045, 2012. doi: 10.1155/2012/259045. 査読あり
 8. **齊藤峰輝**「HTLV-1 関連脊髄症の病因と病態」**神経感染症** 17(1):122-131, 2012. 査読あり
- 〔学会発表〕(計 7 件)
1. **齊藤峰輝**、塩浜康雄、後川 潤、田中勇悦：ヒトT細胞白血病ウイルス1型(HTLV-1)感染予防法と新規 HAM 治療薬の検討 第 26 回神経免疫・第 19 回神経感染症合同学術集会 2014 年 9 月 6 日 金沢歌劇座 金沢市
 2. **齊藤峰輝**、安間恵子、松崎敏男、高嶋 博、松岡雅雄：HAM 発症関連ウイルス多型が宿主・ウイルス遺伝子発現および臨床経過に及ぼす影響の解析 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会 2014 年 8 月 23 日 東京大学医科学研究所講堂 東京都港区
 3. **齊藤峰輝**、塩浜康雄、後川 潤：HTLV-1 遺伝子およびサイトカイン発現抑制効果了指標とした HAM 治療薬・抗体医薬の検討 第 55 回 日本神経学会学術大会 2014 年 5 月 23 日 福岡国際会議場 福岡市
 4. **齊藤峰輝**、塩浜 康雄、後川 潤、高嶋 博、大原 義朗:HTLV-1 標的遺伝子 CCL1 の HAM 発症における病因的意義」第 25 回 日本神経免疫学会学術集会 2013 年 11 月 29 日 海峡メッセ 下関市
 5. **Saito M,** Tanaka R, Kodama A, Tanaka Y: Complete prevention of HTLV-1 infection in humanized mice (hu-PBL SCID) by a neutralizing monoclonal antibody to envelope gp46. 16th International Conference on Human Retroviruses: HTLV and Related Viruses. 2013.6.22. Montréal, Canada.
 6. **齊藤峰輝**、安間恵子、後川 潤、松崎敏男、高嶋 博、松岡雅雄：HTLV-1 関連脊髄症発症関連因子としての HTLV-1 ウイルス型の解析 第 54 回 日本神経学会学術大会 2013 年 5 月 30 日 東京国際フォーラム 東京都千代田区
 7. **齊藤峰輝**、田中礼子、田中勇悦：HTLV-1 関連脊髄症発症関連ウイルス多型と HBZ、FoxP3 遺伝子発現の解析 第 24 回日本神経免疫学会学術集会 2012 年 9 月 20 日 軽井沢プリンスホテル 軽井沢市
- 〔図書〕(計 1 件)
1. **Saito M** HTLV-1 **Encyclopedia of Genetics 2nd Edition.** Stanley Maloy, Kelly Hughes ed. Elsevier, Oxford, UK. 4368 pages, p543-545, 2013.
- 〔産業財産権〕
出願状況(計 1 件)
名称：ヒト T 細胞白血病ウイルス HBZ 蛋白質の検出方法

発明者：塩浜康雄、齊藤峰輝
権利者：学校法人 川崎学園
種類：特許
番号：2014-250359
出願年月日：2014年12月10日
国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ：

<http://www.kawasaki-m.ac.jp/microbiology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 峰輝 (SAITO MINEKI)
川崎医科大学医学部・教授
研究者番号：40398285

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし