

平成 30 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：2015～2017

課題番号：15K08439

研究課題名(和文) HTLV-1キャリア高危険群への積極的介入に向けた進行阻止・発症予防法の開発

研究課題名(英文) Development of anti-HTLV-1 therapies towards active interventions for high-risk carriers

研究代表者

大隈 和 (OKUMA, Kazu)

国立感染症研究所・血液・安全性研究部・室長

研究者番号：80315085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000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)感染に対する治療法を開発することを目的に、HTLV-1感染細胞を標的化して死滅させることでHTLV-1を排除可能な薬剤候補の開発を行った。我々は、HTLV-1感染細胞のヒトケモカイン受容体CCR4を標的とした、ヒトCCR4リガンドを改変緑膿菌エクソトキシンに結合させた「組換えタンパク質」と、同細胞のHTLV-1エンベロープタンパク質を標的とした、HTLV-1受容体を発現する「組換えウイルス」を開発した。これらの薬剤候補について、in vitro及びin vivoにおいてHTLV-1(感染細胞)を排除可能か検討したところ有効性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, to establish antiviral therapies against human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) infection for HTLV-1-infected individuals (carriers), we developed two candidate drugs that can eliminate HTLV-1 by targeting and killing HTLV-1-infected cells: "a recombinant protein", truncated Pseudomonas exotoxin fused to CCL17 (a CCR4 ligand) to target CCR4 frequently expressed on HTLV-1-infected cells, and "a recombinant vesicular stomatitis virus" lacking the G gene and instead encoding HTLV-1 receptor, neuropilin 1, to target HTLV-1 envelope protein specifically expressed on HTLV-1-infected cells. We tested whether these candidate drugs selectively eliminated such infected cells, leading to the control of HTLV-1 infection in vitro and in vivo. Our present findings strongly indicated the therapeutic potential of these candidate anti-HTLV-1 drugs.

研究分野：ウイルス学、実験動物学

キーワード：HTLV-1感染 HTLV-1感染細胞 治療法開発 組換えタンパク質治療薬 組換えウイルス治療薬 ヒト化マウス感染モデル

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトT細胞白血病ウイルス1型(HTLV-1)による主な感染は母乳を介した母子感染であるため、断乳や人工乳により感染が効率良く排除されると考えられてきた。しかし最近の全国実態調査で、感染者(キャリア)は以前より減少しているものの依然として多く存在していることが分かった。しかも感染が高浸淫地域から全国に拡散していることが推定され、全国的な対策が早急に必要とも分かった(Satake M. et al., J Med Virol. 2012)。また、HTLV-1 関連疾患である成人T細胞白血病(ATL)および HTLV-1 関連脊髄症(HAM)の、キャリアからの年間発症数も改善は見られなかった(2008~2010年度厚生労働科学研究「本邦における HTLV-1 感染及び関連疾患の実態調査と総合対策」山口班、分担研究)。

(2) ATL や HAM は一旦発症すると治療による治癒が未だに困難な疾患であり、特に ATL は白血病・リンパ腫の中でも悪性度が高く治療抵抗性を示し予後不良である。しかも最近、HTLV-1 のプロウイルス量(PVL)が4%以上のキャリアから集中的に ATL が発症することが分かってきた(Iwanaga M. et al., Blood. 2010)。そのため、キャリアから発症する関連疾患の頻度は低いものの、PVL 4%以上のキャリアのような高危険群には、積極的な介入策として関連疾患への進行阻止や発症予防を可能とする治療・予防法が必要と考えられているが、まだ確立されていない。

(3) また、HTLV-1 関連疾患が多発し国民の健康に重大な被害を及ぼしているのは先進国の中では日本だけであることから、我が国が率先してこの課題に取り組み、世界に向けて成果を発信していく必要があるため、本研究の遂行は国内外を通じて意義がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、HTLV-1 のハイリスク感染者フォローのための積極的な介入策として、重篤な関連疾患への進行阻止や発症予防が可能となる新規抗 HTLV-1 療法を開発することである。具体的には、発症のリスク因子の一つである HTLV-1 の PVL を、プロウイルスを保持する感染細胞を標的化して駆逐することで減少させ、発症リスクを低減させる薬剤候補を開発する。既に我々は、感染細胞の表面分子マーカーを標的として当該細胞を特異的に殺傷する薬剤候補を創製し、ヒトの免疫機構を構築した「ヒト化マウス」を用いた HTLV-1 感染動物モデルを確立している。そこで本研究では、薬剤候補の有効性をヒト化マウス感染モデルなどで検討し、臨床応用に繋がる実効性の高い治療・予防法を開発する。

3. 研究の方法

(1) HTLV-1 感染細胞上の CCR4 と TSLC1

(tumor suppressor in lung cancer 1)を標的分子として当該細胞を選択的に殺傷する新規薬剤候補を開発する。具体的には、それらのリガンドである CCL17/TARC (thymus and activation-regulated chemokine) と CRTAM (class I-restricted T cell-associated molecule) に、改変した緑膿菌エクソトキシン A (PE) を連結させた組換えタンパク質薬剤候補を開発する。これらの薬剤候補の殺細胞効果をまず HTLV-1 感染細胞株、またキャリアの臨床検体を用いて in vitro で検証する。期待した効果が得られない場合、ヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)感染細胞を標的化して殺傷する、HIV-1 受容体を発現する組換え水疱性口内炎ウイルス(VSV) (Okuma K. et al., Hum Immunol. 2011) を応用し、HTLV-1 感染細胞を標的化できる組換え VSV の作製を検討する。

(2) 次に重度免疫不全マウスである NOD/SCID/JAK3^{null} (NOJ マウス) にヒト臍帯血由来造血幹細胞を移植してヒト化マウスを作製する。このマウスに HTLV-1 を感染させ(感染細胞 MT-2 などを接種) HTLV-1 感染動物モデルを構築する。このモデルマウスを薬剤評価系として応用し、本薬剤候補の感染抑制効果を in vivo で検証する。

(3) 以上で得られたデータを基に当該実験系の最適化を図り、本研究目的のキャリア高危険群の HTLV-1 感染症に対する新規治療・予防法を開発を推し進める。

4. 研究成果

(1) HTLV-1 感染細胞を選択的に殺傷して排除することが可能な、以下の2種類の薬剤候補を既に産生した。

HTLV-1 感染細胞の表面マーカーであるヒトケモカイン受容体 CCR4 を分子標的とした組換えタンパク質: CCR4 のリガンドであるヒト TARC を、CD91 との結合部位を欠失させた PE (PE38) に連結させた融合タンパク質 (TARC-PE38) が創出された(Baatar D. et al., J Immunol. 2007)。この薬剤候補は、特異的な CCR4-TARC 分子間相互作用により選択的に HTLV-1 感染細胞に結合した後、細胞内に取り込まれ、PE の作用により標的細胞を殺傷する。

HTLV-1 感染細胞上のヒト TSLC1 を分子標的とした組換えタンパク質: TSLC1 のリガンドのヒト CRTAM の細胞外ドメインを PE38 に連結させた融合タンパク質 (CRTAM-PE38) を創出した。この薬剤候補は、特異的な TSLC1-CRTAM 分子間相互作用により選択的に HTLV-1 感染細胞に結合した後、細胞内に取り込まれ、PE の作用により標的細胞を殺傷すると考えられる。

(2) TARC-PE38 の有効性を検討するために、まず TARC-PE38 を HTLV-1 感染細胞株やキャリアの臨床検体に投与したところ、in vitro

において HTLV-1 感染細胞株を効率よく殺傷し、臨床検体の PVL を明らかに減少させた。次に、重度免疫不全マウスにヒト臍帯血由来造血幹細胞を移植して作製したヒト化マウスに、HTLV-1 感染細胞 MT-2 を接種して HTLV-1 感染動物モデルを構築し、in vivo における治療効果を検討したところ、TARC-PE38 投与により顕著な感染細胞の減少や PVL の低下が認められ、マウス個体内の感染は著明に抑制された。

(3) CRTAM-PE38 の有効性を検討するために、まず種々の細胞株において TSLC1 の細胞表面における発現をフローサイトメトリーで調べた。予想通り TSLC1 は HTLV-1 関連細胞で発現が認められ、非関連細胞では発現が認められなかった。そこで、これらの細胞株に CRTAM-PE38 を投与したところ、in vitro において HTLV-1 関連細胞を殺傷したが、非関連細胞は殺傷しなかった。また、HTLV-1 関連細胞株における殺細胞効果は、濃度依存的であったが、細胞間で TSLC1 の発現レベルとは無関係に効果に対する感受性に明らかな差が認められた。以上から、CRTAM-PE38 は薬剤候補 TARC-PE38 よりは有効性が低い可能性が考えられた。また、siRNA 等を効率良く運搬可能な、TARC にオリゴヌクレオチド結合領域を融合させた新規薬剤候補が創出されたので検証したところ、in vitro において HTLV-1 関連細胞に一定の殺傷効果を示した。

(4) 我々はこれまで、ウイルス感染症に対する新規治療薬候補として、標的ウイルス感染細胞の表面に存在するエンペロープタンパク質(Env)を標的として結合後、当該細胞を選択的に死滅させ、標的ウイルスを排除可能な「標的ウイルス感染受容体を発現する組換え VSV」の開発を進めてきた。そこで、HTLV-1 感染受容体である glucose transporter 1 (GL), neuropilin 1 (NP), syndecan 1 (SD)を単独又は複数発現する組換え VSV を創製した。

(5) これらの組換え VSV の効果を培養細胞で検証したところ、SD 単独発現組換え VSV 以外の組換え VSV は、Env 非発現細胞を死滅させず、Env 発現細胞のみを特異的に効率よく死滅させた。特に GL 単独発現組換え VSV と NP 単独発現組換え VSV は最大の効果を発揮した。次に HTLV-1 が感染増殖可能なヒト化マウス感染モデルを用いて、NP 単独発現組換え VSV の有効性を評価したところ、対照と比べ著明に HTLV-1 の感染細胞を減少させ、HTLV-1 の PVL を低下させた。また重要なことに、NP 単独発現組換え VSV はヒト化マウスのリンパ組織系臓器における Env 発現細胞を顕著に減少させた。以上の結果から、本組換え VSV は HTLV-1 感染を in vitro 及び in vivo において制御できたため、組換え VSV を用いた抗 HTLV-1 ウイルス療法の有用性が示された。

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2件)

Tezuka K, Okuma K, Kuramitsu M, Matsuoka S, Tanaka R, Tanaka Y, Hamaguchi I. Control of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) infection by eliminating envelope protein-positive cells with recombinant vesicular stomatitis viruses encoding HTLV-1 primary receptor. *J Virol*. 2018 Jan 30;92(4). pii: e01885-17. doi: 10.1128/JVI.01885-17. 査読有

Hiyoshi M, Okuma K, Tateyama S, Takizawa K, Saito M, Kuramitsu M, Araki K, Morishita K, Okada S, Yamamoto N, Biragyn A, Yamaguchi K, Hamaguchi I. Furin-dependent CCL17-fused recombinant toxin controls HTLV-1 infection by targeting and eliminating infected CCR4-expressing cells in vitro and in vivo. *Retrovirology*. 2015 Aug 20;12:73. doi: 10.1186/s12977-015-0199-8. 査読有

[学会発表](計5件)

Kazu Okuma, Kenta Tezuka, Madoka Kuramitsu, Yuetsu Tanaka, Reiko Tanaka, Isao Hamaguchi. Oncolytic recombinant vesicular stomatitis viruses encoding HTLV-1 receptor control HTLV-1 infection in vitro and in vivo. 第65回日本ウイルス学会学術集会, 2017年

Kazu Okuma, Kenta Tezuka, Madoka Kuramitsu, Arya Biragyn, Isao Hamaguchi. Establishment of a novel HTLV-1-specific CCR4-targeting therapy using a CCL17-bound oligonucleotide delivery system. 18th International Conference on Human Retrovirology, 2017

Kazu Okuma, Kenta Tezuka, Madoka Kuramitsu, Isao Hamaguchi. Cytolytic recombinant vesicular stomatitis viruses encoding HTLV-1 primary receptor target and eliminate HTLV-1-infected cells. 第64回日本ウイルス学会学術集会, 2016年

大隈 和、手塚健太、倉光 球、浜口 功. CCL17結合オリゴヌクレオチド導入システムを用いたHTLV-1特異的新規CCR4分子標的療法の開発. 第3回日本HTLV-1学会学術集会, 2016年

大隈 和、日吉真照、滝澤和也、齋藤益満、倉光 球、浜口 功. TARC 結合組換えトキシンによる CCR4・Furin 依存的な HTLV-1 感染制

御. 第 2 回日本 HTLV-1 学会学術集会, 2015
年

〔産業財産権〕
出願状況 (計 1 件)

名称: 組換え水疱性口内炎ウイルスを用いた
ワクチン・治療薬開発に向けたモニタリン
グのためのウイルスベクター定量法
発明者: 大隈 和、手塚健 太、浜口 功
権利者: 公益財団法人ヒューマンサイエンス
振興財団
種類: 特許
番号: 特願 2017-131361
出願年月日: 2017 年
国内外の別: 国内

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大隈 和 (OKUMA, Kazu)
国立感染症研究所・血液・安全性研究部・
室長
研究者番号: 80315085