

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500493

研究課題名(和文)動物モデルを用いた成人T細胞病発症に関連する免疫不全の解析

研究課題名(英文)Relationship between onset of T cell leukemia and immunodeficiency in young age in a mouse model of adult T-cell leukemia

研究代表者

大杉 剛生(OHSUGI, Takeo)

酪農学園大学・獣医学群・教授

研究者番号：00211102

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のtax遺伝子を導入したマウスは、成人T細胞白血病と類似の白血病を引き起こす。発症前の若齢のマウスの一部に皮膚感染症を引き起こすマウス群を見出した。これらマウスは接種細菌に対する排除能が低かった。また、Treg細胞(CD4+CD25+Foxp3+)の上昇を認め、この増加が細菌排除能の低下をもたらしている可能性が示唆された。細菌排除能の低下が顕著なマウスと正常の排除能をもつマウスの白血病発症を長期間比較観察したが、白血病発症率に有意差は見いだせなかった。

研究成果の概要(英文)：Transgenic (Tg) mice expressing Tax, a human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) developed a mature T-cell leukemia similar to adult T-cell leukemia. While expanding the Tax-Tg mouse colony, we found several mice within 6 months of ages developed infectious dermatitis. These mice could not eliminate the inoculated bacteria in the skin. In addition, Treg cells (CD4+CD25+Foxp3+) counts were increased in these mice. Thus, the mice are considered to be an immunodeficiency state. Next, we investigated to compare the incidence of T cell leukemia between immunodeficiency and normal mice possessed the possibility of elimination of inoculated bacteria in Tax-Tg mice. There was no significant difference for leukemia onset in the two mouse groups.

研究分野：実験動物学

キーワード：HTLV-1 animal model mice immunodeficiency

1. 研究開始当初の背景

ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-1) は、約 60 年もの長い潜伏期間の後、腫瘍性疾患である成人 T 細胞白血病 (Adult T-cell leukemia: ATL) あるいは炎症性疾患である HTLV-1 関連脊髄症/熱帯瘧疾 (HAM/TSP) を引き起こす。このウイルスは、pX と呼ばれる特異な領域をもち、tax 遺伝子をコードする。我々は、その遺伝子産物 Tax を成熟 T 細胞に発現する Tax トランスジェニック (Tg) マウスを作製し、Tax が成熟 T 細胞白血病を引き起こすことを証明した (Ohsugi et al., Nature Medicine, 2007)。また、マウスの繁殖コロニー拡大中に、炎症性の関節炎の発症を認めた。同一の Tg マウスで、腫瘍性疾患 (T 細胞白血病) と炎症性疾患 (関節炎) を引き起こすはじめてのマウスであり、HTLV-1 感染者が ATL と HAM/TSP を発症する病態と非常に類似している (図 1; Ohsugi et al., AACR meeting, 2008)。

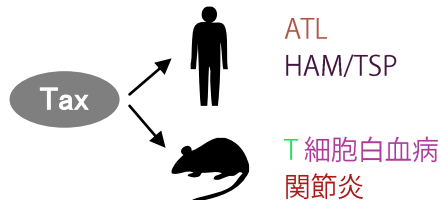


図 1. Tax は、HTLV-1 感染症を引き起こす

また、この関節炎のリンパ球のフェノタイプは、ヒトあるいはリウマチ動物モデルの関節炎よりも HAM/TSP に類似していることを証明した (Ohsugi & Kumasaka, PLoS ONE, 2011)。我々はこのマウス (遺伝的背景 BDF₁) において、離乳直後から 6 か月齢くらいまでの間に皮下膿瘍の多発を認めた。検出細菌は、*Escherichia coli*、*Staphylococcus aureus*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Proteus mirabilis* 等多種にわたっており、ある一定細菌による感染症とは考えにくかった。そのため、Tax 発現 Tg マウスが、離乳直後から数か月、細菌を排除できない免疫不全の状態であることが示唆された。

2. 研究の目的

HTLV-1 感染は、母乳を介した母子感染、性交渉あるいは輸血の可能性があるが、母子感染が主体であると考えられている。とくに ATL は、母乳感染以外の輸血あるいは性交渉を介した感染では発症例がない。このことは、乳幼児期のイベントがその後の ATL 発症に重要であることを示唆する。しかし、ヒトでの検索は、幼児を検査する必要があること、

60 年にもおよぶ長い潜伏期を考えると非常に困難である。また、ATL の発症が HTLV-1 感染者のわずか 5% であることも解析を困難にする。

我々は、Tax-Tg マウスを作製し、このマウスが 2 年以内に T 細胞白血病および関節炎を発症することを報告してきた。また、最近、6 か月齢以内のマウスにおいて皮膚感染症にかかりやすいマウス群を見出し、これらマウス群の白血病発症に興味をもった。これはヒトにおける HTLV-1 感染症の乳幼児時期の重要なイベントにあたるのかもしれない。実際、カリブ海沿岸諸国のヒト HTLV-1 感染では、生後 6 か月齢くらいからの幼少期に、免疫不全による *Staphylococcus aureus*、*Proteus mirabilis* 等の感染性皮膚炎が報告されている。これら症例は infective dermatitis associated with HTLV-1 (IDH) と総称されている。重要なことは、この IDH を発症した小児は、成人してから ATL あるいは HAM/TSP にかかる率が高いことである。一方、日本において、これら症例はみあたらない。衛生環境の差により、細菌感染にかかりやすい状態にもかかわらず、見過ごされているのかもしれない。

そこで本研究では、離乳直後から 6 か月齢までの免疫不全状態を遺伝的背景の異なるマウスについて調べ、この免疫状態と白血病発症との関連について検討する。我々が作製した Tax 発現 Tg マウスは、2 年以内に約 20% のマウスが T 細胞白血病を発症する。免疫不全状態を細菌の排除能を指標に同定できれば、2 年間の追跡も容易になり、さらに予防法の開発にもつながると考えられる。

3. 研究の方法

- 1) Tax 発現 Tg マウス皮下への細菌接種
 遺伝的背景が BDF₁ (C57BL/6 × DBA/2)、2~5 か月齢 Tax 発現 Tg マウスの皮下膿瘍から細菌を分離した。血液寒天培地に膿瘍を塗布し、出現したコロニーについて API-20E で同定した。分離した *Staphylococcus aureus*、および *Proteus mirabilis* については HI 培地等で増殖培養後、10% にグリセロールを添加し、-80°C に使用するまで保存した。実験時に細菌を融解し、対数増殖期の菌数を測定後、0.2-1 × 10⁸ 個/ml に調整した。マウスは背部皮下をヨードチンキ・アルコールで消毒後、各マウスに 100 μl を皮下に接種し、経時的に 3 週間まで膿瘍の大きさを測定した。
- 2) 接種細菌の増殖したマウスにおける脾臓細胞サブセットの解析
 離乳直後から 6 か月齢まで、Tax によって

免疫系を抑制する制御性 T 細胞(Treg)が増加することにより、免疫不全の状態になっている可能性がある。そこで接種細菌を排除できなかったマウス、同腹の正常および non-Tg マウスの脾臓細胞における Treg のフェノタイプ $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ の細胞を中心に解析した。脾臓細胞を 1×10^6 に調整し、各蛍光色素ラベル抗体を反応させ、FACS (Millipore 社) によって解析した。

3) 免疫不全状態と T 細胞白血病発症の相関

上記 1) および 2) の *S. aureus* の皮下増殖と Treg 増加の関連が明確となったため、*S. aureus* の排除能低下を指標に免疫不全状態と判断されたマウスについて長期間観察した。同腹の免疫不全、正常 Tax 発現 Tg マウスおよび non-Tg マウスを 2 年間追跡し、T 細胞白血病発症率を比較した。白血病は白血球数の明らかな増加 ($>20,000/mm^3$)、FACS 解析によってその細胞の表面マーカーが CD4 および CD8 であり、NOD/SCID マウスに移植したときに増殖可能であることを指標とした。

4. 研究成果

1) Tax 発現 Tg マウス (BDF₁) に観察される皮膚膿瘍および白血病発症との関連
 遺伝的背景が BDF₁ (C57BL/6 × DBA/2)、2~5 か月齢 Tax 発現 Tg マウスの皮下膿瘍から細菌を分離した。図 2 にみられるように腹部皮下に多くの膿瘍 (約 1~5 mm) を形成していた。7 匹のマウスより分離した細菌は以下である。



Escherichia coli (血液寒天培地にて優勢菌)
Pseudomonas aeruginosa
Proteus mirabilis (血液寒天培地にて優勢菌)
Staphylococcus gallinarum
Staphylococcus cohnii
Staphylococcus xylosum
Staphylococcus aureus

図 2. Tax-Tg マウス (BDF₁) に観察された皮膚膿瘍

これら膿瘍においては *E. coli* および *P. mirabilis* が優勢であった。しかし、各膿瘍で単一の菌種からなるものはなかった。膿瘍形成の多かったマウス 3 匹について脾臓の FACS 解析を行った (図 3)。対照とした同腹の膿瘍を形成していない non-Tg との比較では CD3 陽性細胞の増加、CD19⁺細胞の低下がみられ、とくに CD4⁺T 細胞の増加が顕著であった。このうち CD4⁺CD25⁺細胞増加、さらには CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞の有意な上昇が観察された (図 4)。

これらマウスは全例、6 か月齢をすぎた頃から膿瘍は自然消失した。

以上のように Tax-Tg マウス (BDF₁) マウスの 6 か月齢未満のマウスは細菌に感染する可能性が高く、それは Treg 細胞の上昇による免疫不全の状態が原因と推察された。この膿瘍を形成し、細菌を分離できたマウス 7 匹と膿瘍非形成 Tax-Tg マウス 5 匹について 30 か月齢まで観察した。膿瘍を形成したマウスのうち 1 匹が T 細胞白血病と診断された。一方、膿瘍非形成の Tax-Tg マウスも 1 匹が T 細胞白血病、また 2 匹が各々肺腫瘍、肝腫瘍により 24 か月齢未満で死亡した。これらのことから、6 か月齢未満で膿瘍を形成したマウス群と白血病との関連は、見出せなかった。

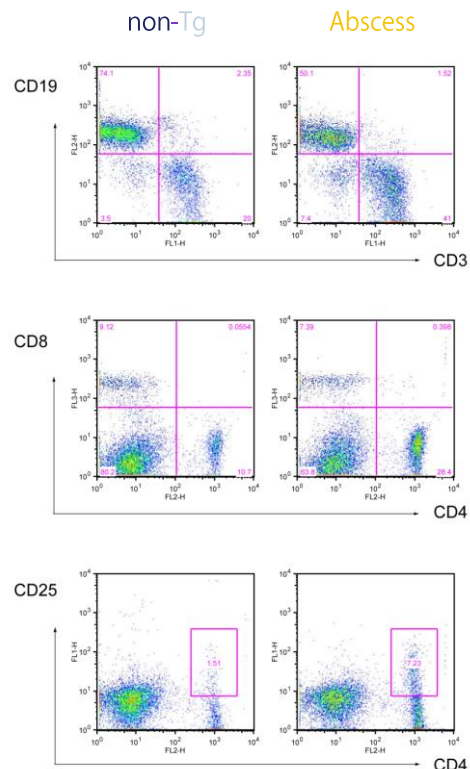


図 3. 皮膚膿瘍形成マウスにおける CD4⁺CD25⁺細胞の上昇

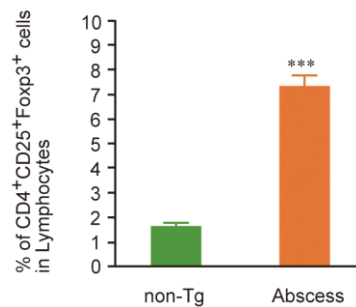


図 4. 皮膚膿瘍形成マウスにおける Treg (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) 細胞の上昇

2) Tax 発現 Tg マウス皮下への細菌接種

BDF₁ 背景の Tax-Tg マウスの膿瘍から分離された 7 つの菌種のうち、増殖の良好であった *Staphylococcus aureus*、および *Proteus mirabilis* を用いた接種実験をおこなった。予備実験において *Proteus mirabilis* では膿瘍形成が認められなく、主に *S. aureus* を接種実験に用いた。C57BL/6 および BALB/c 背景の Tax-Tg マウスの腹部皮下に $0.2-1 \times 10^7$ 個の *S. aureus* を接種した。菌を接種されたマウスは C57BL/6 および BALB/c 背景マウスともに non-Tg マウスに比較し明瞭な膿瘍を形成した (図 5)。



図 5. BALB/c 背景 Tax-Tg マウス (3 か月齢) への腹部皮下への *S. aureus* 接種。右は皮膚を切除したものの。

non-Tg マウスでは *S. aureus* を接種しても最大でも 5mm 程度であり、ほぼすべてのマウスで 3 週間以内には膿瘍が観察されなくなった (図 6)。

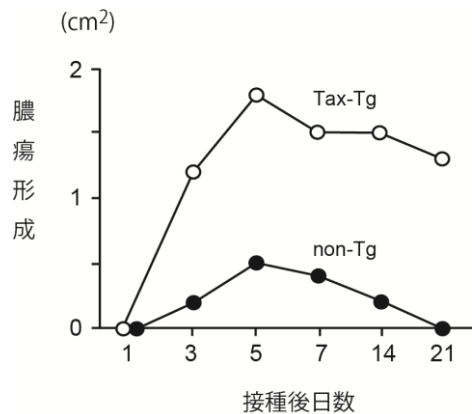


図 6. C57BL/6 背景 Tax-Tg マウス (3 か月齢) への *S. aureus* 接種。

一方、Tax-Tg マウスでは最大で 10mm 以上、接種後 3 週間を過ぎても膿瘍は排除されない。このことから Tax-Tg マウスでは細菌の排除能が低下していることが明らかとなった。しかし、異なる Litter のマウスでは、顕著でない場合も観察された。そこで、C57BL/6 および BALB/c 背景の Tax-Tg マウスのうち明らかに細菌排除能の低下しているマウス各々 7 匹を 30 か月齢まで観察し、その白血病発症との関連について検索した。C57BL/6 および BALB/c 背景のマウスで T 細胞白血病

発症は、各々 1 例ずつ観察されたのみであった。このことから、6 か月齢未満に見られる細菌排除能の低下と白血病発症との関連は BDF₁ 背景のマウス同様、見出すことができなかった。

結論

- ① 一部、Tax-Tg マウスは 6 か月齢未満で細菌感染症にかかりやすく、多様な菌種が分離された。
- ② 分離した菌のうち、*S. aureus* を C57BL/6 および BALB/c 背景の Tax-Tg マウスに接種したところ、対照マウスと比較し、明らかな膿瘍を形成した。
- ③ 細菌排除能の低下は、Treg 上昇による免疫不全による可能性が示唆された。
- ④ 細菌排除能の低下したマウスについて長期観察をおこなったが、T 細胞白血病との関連は見いだせなかった。

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 10 件)

- ① 大杉剛生: 成人 T 細胞白血病 (ATL) 治療の最前線—抗 CCR4 抗体の憂鬱—。日本ウイルス学会北海道支部報、46: 2-6、2015。
- ② Ohsugi T.: Stevens–Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis-like disease in human T-cell leukemia virus type 1 Tax transgenic mice. *Curr. Trends Immunol.*, 15:43-46, 2014.
- ③ Ohsugi T., Wakamiya M, Morikawa S, Matsuura K, Kumasaka T, Yamaguchi K: HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP)-like disease and toxic epidermal necrolysis (TEN)-like disease in HTLV-1 Tax transgenic mice. *Retrovirology*, 11:P40, 2014.
- ④ Ohsugi T.,* Ito, T., Li, S., Nakamura, N., Morikawa, S., Wakamiya, M., Kumar, J.M., and Urano, T.: Isolation of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* from laboratory animals. *Trends in Comparative Biochemistry & Physiology*, 17: 101-110, 2013.
- ⑤ Ohsugi, T., Ishida, T., Shimasaki, T., Okada, S. and Umezawa, K.: p53

dysfunction precedes the activation of nuclear factor- κ B during disease progression in mice expressing Tax, a human T-cell leukemia virus type 1 oncoprotein. *Carcinogenesis* 34: 2129-2136, 2013.

- ⑥ Nakano, K., Ando, T., Yamagishi, M., Yokoyama, K., Ishida, T., Ohsugi, T., Tanaka, Y., Brighty, D. W. and Watanabe, T.: Viral interference with host mRNA surveillance, the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) pathway, through a new function of HTLV-1 Rex: implications for retroviral replication. *Microbes and Infection* 15: 491-505, 2013.
- ⑦ Ohsugi, T., Wakamiya, M., Morikawa, S., Matsuura, K., Kumar, J. M., Kumasaka, T. and Yamaguchi, K.: Invasion of Histiocytic Sarcoma into the Spinal Cord of HTLV-1 Tax Transgenic Mice with HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis-Like Disease. *Oncology Research* 20: 403-410, 2013.
- ⑧ Ohsugi, T. A transgenic mouse model of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1)-associated diseases. *Front. Microbiol.*, 4: 49. doi: 10.3389/fmicb.2013.00049, 2013.
- ⑨ Ohsugi, T., Matsuura, K., Kawabe, S., Nakamura, N., Kumar, J. M., Wakamiya, M., Morikawa, S. and Urano, T.: Natural infection of murine norovirus in conventional and specific pathogen-free laboratory mice. *Front. Microbiol.* 4:12. doi: 10.3389/fmicb.2013.00012, 2013.
- ⑩ Kumar, J. M., Shivakumar, P., Nagarajan, P., Subramaniam, T., Jose, J., Ganapathy, H. S. and Ohsugi, T.: Tamoxifen resistant, ER positive MAC 51 cell line with high metastatic potential developed from spontaneous breast cancer mouse model. *Cell Tissue Res.* 350: 347-360, 2012.

[学会発表] (計 12件)

- ① 大杉剛生、若宮 誠、森川沙樹、中村直子、川辺正等美、藤田美歌子。HTLV-1

感染細胞株およびHTLV-1 TaxトランスジェニックマウスにおけるDok-1, 2および3の発現 2014年11月10日~12日 パシフィコ横浜

- ② 坂本 亘、中村直子、川辺正等美、大杉剛生、浦野 徹：アイソレーターを用いた検疫体制。第33回日本実験動物技術者協会九州支部研究発表会 11.16-17、2013、山鹿
- ③ 川辺正等美、松浦公美、中村直子、大杉剛生、浦野 徹：Helicobacter hepaticusの摘発とその後の対応による統御 第33回日本実験動物技術者協会九州支部研究発表会 11.16-17、2013、山鹿
- ④ 中村直子、川辺正等美、古島志伸、坂本亘、佐藤有紀、大杉剛生、浦野 徹：米国からの実験用ウズラ輸入の経験。第31回九州実験動物研究会総会 11.16-17、2013、山鹿
- ⑤ 大杉剛生、若宮 誠、森川沙樹、梅澤一夫：HTLV-1感染細胞およびマウスモデル由来脾臓細胞における新規合成DTCM-Gのp53活性化作用。第61回日本ウイルス学会学術集会 11.10-12、2013、神戸
- ⑥ 大杉剛生、若宮 誠、森川沙樹、熊坂利夫、山口一成：Taxトランスジェニックマウスに観察されたHAM様マウスと中毒性皮膚壊死症(TEN)様疾患。第6回HTLV-1研究会・シンポジウム 8.23-25、2013、東京
- ⑦ Takeo Ohsugi, Makoto Wakamiya, Saki Morikawa, Kumi Matsuura, Toshio Kumasaka, Kazunari Yamaguchi: HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP)-like disease and toxic epidermal necrolysis (TEN)-like disease in HTLV-1 Tax transgenic mice. 16th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, June26-30,2013 Montreal Canada
- ⑧ 中村直子、伊藤輝代、松浦公美、川辺正等美、若宮 誠、大杉剛生、浦野 徹：動物実験施設における黄色ブドウ球菌の分離と薬剤耐性。第154回日本獣医学会学術集会、2012.9.14-16、岩手。

- ⑨ 大杉剛生、島崎達也、石田尚臣、岡田誠治、梅澤一夫：HTLV-1 Tax による p53 不活化機構。第 5 回 HTLV-1 研究会 8.25-26、2012、東京
- ⑩ 坂本 亘、古島志伸、野口和浩、崎尾 昇、小糸 厚、大杉剛生、浦野 徹：実験用フェレットの飼育管理経験。日本実験動物科学・技術 九州 2012、5.21-26、大分。
- ⑪ 崎尾 昇、中村直子、坂本 亘、古島志伸、河津明友、上羽 進、大杉剛生、浦野 徹：熊本大学動物資源開発研究施設本館の空調機改修工事および新規マウスラックの導入。日本実験動物科学・技術 九州 2012、5.21-26、大分。
- ⑫ 古島志伸、永利 圭、崎尾 昇、中村直子、大杉剛生、浦野 徹、佐藤有紀：ウズラの飼育経験。日本実験動物科学・技術 九州 2012、5.21-26、大分。

〔図書〕(計 3 件)

- ① 大杉剛生：九州で多発する白血病－成人 T 細胞白血病－『熊薬ものがたり熊本大学薬学部の研究と教育』pp117-120 熊本日日新聞社 2014.3.27
- ② 大杉剛生、山口一成：第 2 章 がん、第 5 節 造血系、遺伝子改変モデル、第 7 項 HTLV-1 pp524-530、『モデル動物利用マニュアル』中村卓郎編、(株)エル・アイ・シー 2012。
- ③ Ohsugi, T. and Koito, A.: Human T-cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) and Antiviral Enzyme APOBEC3. pp83-118, Encyclopedia of Virology Research, Andrew P. Gatto and Benjamin S. Leon (eds), NOVA Scientific publishers, 2012.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：

国内外の別：

○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]
 ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

大杉 剛生 (OHSUGI, Takeo)
 酪農学園大学・獣医学群・教授
 研究者番号：00211102

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：