

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15177

研究課題名(和文) HTLV-1持続感染霊長類の確立と免疫制御による病態変化に関する研究

研究課題名(英文) Establishment of HTLV-1 infected non-human primate model and analysis of pathological changes by immune regulation

研究代表者

浦野 恵美子 (Urano, Emiko)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター・研究員

研究者番号：40794988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、感染確率の低さからモデル動物として確立されていなかったHTLV-1感染霊長類モデルの検討をカニクイザルを用いて行い、新規HTLV-1感染細胞を感染源とすることで100%の確率で感染が成立することを見出した。さらに、長期的な解析により慢性感染を確認し、HTLV-1感染霊長類モデルとして確立することに成功した。この確立したサルモデルを基とし、病態進展を目的とした投与方法や免疫制御の検討をプロウイルス量等を指標に解析を行ったところ、高プロウイルスを示す条件を見出し、今後、病態解明や医薬品開発に大きな貢献ができると期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HTLV-1が発見から40年経つが、HTLV-1感染に対する治療、発症および感染予防法等の開発は遅れている。その大きな理由としてヒトでの感染を反映する適切な動物感染モデルが無いことが挙げられる。本研究にてHTLV-1感染霊長類モデルを確立したことにより、生体内における病態変化やウイルス動態の解析を行うことが可能となった。発症メカニズムの解明や創薬研究など、侵淫国である日本が率先してやらなければならない課題である臨床応用に発展するHTLV-1感染症研究に大きく寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：HTLV-1 infected non-human primate model has not been established as an animal model for HTLV-1 research due to the low success rate of infection. This study demonstrated that using a newly isolated HTLV-1 cell line as an inoculum establishes HTLV-1 infection with 100% probability in the cynomolgus monkey. Provirus and anti-HTLV-1 antibody titer were maintained during the research period, indicating that chronic HTLV-1 infection was established in this model. The infection routes and immune regulation were examined to monitor the changes in the proviral load since the high proviral load is one high-risk factor of disease development. The disease symptoms related to HTLV-1 infection were not observed; however, the levels of proviral load were changed by the route of infection. HTLV-1 infected cynomolgus monkey model established in this study will be useful to elucidate HTLV-1 infection and its associated disease development and to develop a prophylactic vaccine and a novel therapy.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HTLV-1 霊長類モデル 免疫制御 病態変化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国ではヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) の感染者(キャリア)数は未だに多く、100 万人以上と推定され、さらに世界中の感染者の約 1 割が日本国内に存在する。これらのことから本疾患は我が国が先進的に取り組まなければならない重要課題であると考えられる。HTLV-1 感染者のおよそ 5% が悪性の成人 T 細胞白血病 (ATL) や HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) を発症するリスクを背負っているが、その発症機序に関しては不明な点が多く、特に宿主免疫反応からの発症機構の解明は予防・治療等の面からも極めて重要である。HTLV-1 感染細胞株を用いた HTLV-1 感染霊長類モデルの報告は 1980-1990 年代に僅かにあるが、樹立確率が極めて低く、モデル動物として確立はされていない。そのため、近縁ウイルスであるサル T 細胞白血病ウイルス 1 型 (STLV-1) を用いた霊長類モデル、STLV-1 自然感染霊長類を用いることが主流となっているが、STLV-1 研究は HTLV-1 との遺伝的・機能的相同性の解析研究も多く、感染や発症予防法の開発の観点からも HTLV-1 感染モデルの必要性は高い。このように、霊長類 HTLV-1 感染モデルの有用性は高く、病態解明・感染予防、治療薬の開発に必須であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では HTLV-1 感染霊長類モデル確立に向けた HTLV-1 感染カニクイザルの解析を基盤研究とし、HTLV-1 感染カニクイザル生体内における持続感染・発症に寄与するファクターの解明を目指し、免疫制御因子による病態変化への影響を明らかにすることを目的とする。申請者の所属する施設は、医科学研究に最適である特定の感染病原体を持たない SPF カニクイザルを自家繁殖し、維持している世界で唯一の機関である。さらに、感染実験・研究を行う高度設備を備えた世界最大の霊長類感染施設を保有している。カニクイザルは胎盤構造がヒトと同じで単胎妊娠であること、通年繁殖性で約 28 日の性周期があること等、他の実験動物種にないヒトに近い特徴を持つ。

研究代表者はキャリアまたは ATL 発症患者から作出された HTLV-1 持続感染細胞株 (Viruses, 2016) を用いることにより HTLV-1 感染カニクイザルを容易に作製出来ることを確認した。そこで、本研究では、新規 HTLV-1 持続感染細胞株を感染源とする手法によるカニクイザル感染モデルの確立を行い、この HTLV-1 感染カニクイザルを用い、病態解明や発症の可能性を検討するため、免疫制御因子による病態変化を目指す。一方、HAM の診断には髄液中の抗 HTLV-1 抗体の検出が必須である。HAM の発症が脊髄に移行する感染細胞の確率に依存するのかが検討を行う。以上のように霊長類モデルを用いた研究の推進により、将来発症予防への応用を強力にサポートする実証データを提供することが期待される。

3. 研究の方法

HTLV-1 感染カニクイザルモデルの確立：キャリアまたは ATL 発症患者から作出された HTLV-1 持続感染細胞株を用いることにより HTLV-1 感染カニクイザルを容易に作製出来ることを確認した。感染モデルとして確立するため、感染源として使用する細胞株、投与方法の検討を行う。さらに、カニクイザルにおけるプロウイルスの定量法を確立し、プロウイルス量と PA 法による HTLV-1 抗体の長期的なモニターにより持続感染の成立を検証する。

HTLV-1 感染カニクイザルモデルを用いた病態変化の解析：HTLV-1 感染においてはサイトカイン抑制シグナル (SOCS) の過剰発現が病態に関与するという報告がある (Tohoku JEM.2004, PLoS Pathog.2010)。このことから免疫制御因子として SOCS1、SOCS3 を用いる。免疫制御因子を HTLV-1 感染カニクイザルに DNA ワクチンとして投与し HTLV-1 感染細胞と生体内における病態変化との関連を精査する。また、HAM の発症が脊髄に移行する感染細胞の確率に依存するのかが検討を行う。

4. 研究成果

(1) *in vitro* において高い形質転換能力を有する HTLV-1 持続感染細胞株 2 種を混合し静脈接種したカニクイザル 2 頭の末梢血を用いて、感染の有無を検証した。接種後 2 週に抗 HTLV-1 抗体が陽転しプロウイルスが検出された。カニクイザルにおけるプロウイルス量を定量するため、Semi-Nested qPCR 法を確立しプロウイルスを測定したところ、微量ではあるが末梢血中のプロウイルス量のモニタリングが可能であった (表 1)。

表 1 HTLV-1 感染カニクイザルの末梢血中プロウイルス量 (copy/100,000 cells)

	Mix 001	Mix 002
0 週	N/D*	N/D
2 週	2.12	N/D
20 週	1.76	2.85

*not detected

(2) 次に混合した2種類の HTLV-1 持続感染細胞それぞれをカニクイザルに接種し、感染の有無を検討したところ、感染細胞接種後両者で抗 HTLV-1 抗体が検出されたが、プロウイルス量のモニタリングが可能だったのはATL-040を感染源としたカニクイザルのみであった(表2)。また、感染後長期に渡り抗 HTLV-1 抗体およびプロウイルスが維持され、持続感染の成立が認められた。

(3) マイトマイシン処理したそれぞれの HTLV-1 持続感染細胞をカニクイザル PBMC と共培養したところ、2種類の細胞株間で、カニクイザル PBMC の細胞増殖性に大きな差は認められなかったが、増殖した細胞の Tax 発現はATL-040の方が高く(図1)、これまでの結果を総合して、ATL-040 細胞を感染源として用いる手法が最適であると考えられた。

(4) 免疫制御因子 SOCS1 および SOCS3 による病態変化を解析するため、カニクイザル SOCS1 (mfSOCS1) およびmfSOCS3 遺伝子を DNA ワクチンとして使用するプラスミドベクターにクローニングし、293FT 細胞にて発現を確認した(図2)。mfSOCS1 を DNA ワクチンとして(1)で作製した HTLV-1 持続感染カニクイザルに20 mg/頭で4回静脈内投与を行った。継続的に採血を行い、プロウイルス量および抗体価を測定したが、DNA ワクチン投与前後で変化は見られなかった。DNA ワクチンのデリバリー効率が不十分であった可能性、HTLV-1 持続感染カニクイザルの HTLV-1 感染細胞数が低いため変化が観察されなかった可能性が考えられ、検討が必要である。

(5) HAM の発症が脊髄に移行する感染細胞の確率に依存するのか検討を行うため、ATL-040 細胞の脊髄内接種を行った。カニクイザル2頭で検討を行ったが、HAM 様症状は観察されなかった。一方で、プロウイルス量を(1)や(2)で作製した HTLV-1 感染カニクイザルと比較すると高値を示し(表3)、今後の経過観察が重要である。

表2 HTLV-1感染カニクイザルの末梢血中プロウイルス量II (copy/100,000 cells)

	ATL-040	ATL-056i
0週	N/D	N/D
2週	5.65	N/D
24週	11.44	N/D
72週	8.45	N/D

* not detected

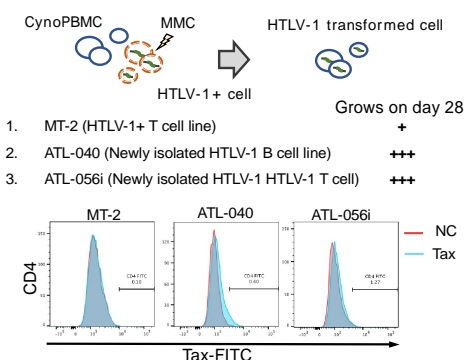


図1 HTLV-1持続感染細胞株のカニクイザルPBMCにおける形質転換能とウイルスタンパク質発現

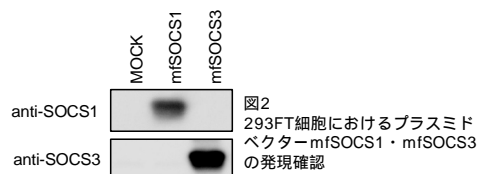


図2 293FT細胞におけるプラスミドベクターmfSOCS1・mfSOCS3の発現確認

表3 HTLV-1感染カニクイザルの末梢血中プロウイルス量III (copy/100,000 cells)

	IT 001	IT 002
0週	N/D*	N/D
2週	244.8	8.0
20週	104.7	71.0

* not detected

参考文献

1. M. Kunihiro et al., Viruses, 2016.
2. Y. Nishiura et al., Tohoku J Exp Med, 2004.
3. S. Oliere et al., PLoS Pathog, 2010.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 浦野恵美子, 田中勇悦, 保富康宏
2. 発表標題 Analysis of HTLV-1 infected cynomolgus macaques establishing a non-human primate model.
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浦野恵美子, 田中勇悦, 保富康宏
2. 発表標題 HTLV-1感染霊長類モデルの確立
3. 学会等名 第5日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Emiko Urano, Yuetsu Tanaka, Yasuhiro Yasutomi.
2. 発表標題 Establishment of HTLV-1 infected non-human primate model; towards the mechanistic insights into infection and disease development.
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Emiko Urano, Yuetsu Tanaka, Yasuhiro Yasutomi.
2. 発表標題 Establishment of HTLV-1 Infected Non-Human Primate Model; Towards the Mechanistic Insights into Infection and Disease Development.
3. 学会等名 American Society for Virology, 37th Annual Meeting. (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------	---------