

令和 6 年 7 月 1 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K08357

研究課題名(和文) ヒト化マウスによる胎生期HTLV-1感染モデルの構築と胎盤を介した感染機構の解明

研究課題名(英文) X

研究代表者

野島 清子 (Nojima, Kiyoko)

国立感染症研究所・次世代生物学的製剤研究センター・主任研究官

研究者番号：60370970

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)：HTLV-1の母子感染は完全人工栄養乳でも3-5%認められ、経胎盤・経産道感染の可能性が示唆され、感染機序の解明に資するモデル動物開発が望まれた。本研究でNOGマウスにヒト末梢血移植した妊娠ヒト化マウスにHTLV-1感染させ母子感染モデルを構築した。妊娠母マウス胎盤、胎仔肝臓由来ゲノムのクローン解析で全組織に共通クローンがわずかに存在していた。育児中の感染母マウスの血液、母乳、新生児マウス肝臓ゲノムでも共通クローンはわずかで、de novo感染の可能性が示唆された。本研究はHTLV-1母子感染を模し、治療薬開発に有用と示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトT細胞白血病ウイルス (HTLV-1) は完全人工栄養乳に切り替えても、3-5%程度の母子感染が認められることから、経胎盤感染あるいは経産道感染の可能性が示唆されてきたが、感染機序の解明にはHTLV-1キャリアの出産後の胎盤や臍帯などの調査だけでは難しく、母子感染動物モデルの開発が望まれていた。我々は、妊娠初期のNOGマウスにヒト末梢血を移植しヒト化することで妊娠ヒト化マウスを作成後、HTLV-1感染細胞を移植することにより、母子感染モデルを構築し実験に用いた。本感染モデルは、胎生期におけるHTLV-1感染細胞の動態および感染機構の解明や治療薬開発等に役立てられると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Mother-to-child transmission of HTLV-1 occurs in 3-5% of cases even when switching to exclusive formula feeding, suggesting the possibility of transplacental or intrapartum transmission. There was a need for animal models to help elucidate the mechanism of mother-to-child transmission. In this study, we developed a mother-to-child infection model by HTLV-1 infected pregnant humanized mice, created by transplanting human peripheral blood into NOG mice. Clonal analysis of genomes derived from the placenta of pregnant mother mice and fetal liver revealed the presence of small number of common clones across all tissues. Small numbers of common clones were also in the blood and breast milk of infected nursing mother mice, as well as in the liver genomes of newborn mice, suggesting the possibility of de novo infection. This study mimics HTLV-1 mother-to-child transmission and is suggested to be useful for future therapeutic drug development.

研究分野：ウイルス学、品質管理

キーワード：HTLV-1 母子感染 クローン解析

1. 研究開始当初の背景

ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) は輸血・母子感染・水平感染で感染し、感染者の 5% に難病である成人 T 細胞白血病 (ATL) ,0.03% に HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) を発症する。ATL に関しては、若年齢では造血幹細胞移植、または近年開発された CCR4 抗体治療が一部奏功しているが、治療薬選択が少ないのが現状である。一方、HAM に関しても CCR4 抗体の有効性の検討が開始されてはいるが、治療薬が無い状況である。ATL や HAM の患者の治療対策とともに、新規感染者を減らす必要がある。輸血に関しては、1980 年代に導入された 献血抗体スクリーニングで、母子感染に関しては母乳が主な感染ルートであったことから、完全人工栄養への移行がガイドラインにも記載され、新規の感染者の減少が期待されている。その一方で、完全人工栄養乳に切り替えても、3-5% 程度の感染が認められるという報告から、経胎盤感染あるいは経産道感染の可能性が示唆されてきた。HTLV-1 の経胎盤および経産道感染がどのような機序で起こっているかは、HTLV-1 キャリアの出産後の胎盤や臍帯などの調査だけでは難しく、モデル動物の開発等が望まれていた。

我々のグループでは、HTLV-1 の感染動態の解明を目指し、ヒト化マウスを用いた HTLV-1 感染モデルの構築を行ってきた (J Virol. 2018, Retrovirology.2015)。超免疫不全マウスである NOG マウスを用い、ヒト PBMC を移植する hu-PBL や臍帯血由来 CD133 造血幹細胞を新生児 NOG マウス肝臓に接種することで、90% 以上のキメリズムを持つヒト化マウスを作成し、HTLV-1 の感染細胞である MT-2 細胞 (マイトマイシン C 処理済) を移植することで、末梢血中のウイルス量 (PVL) が 100 以上となる HTLV-1 感染モデルの構築に成功してきた。しかし、妊娠中の胎児 NOG マウスをヒト化することが困難なことから、HTLV-1 感染妊娠モデルの開発は難しいと考えられてきた。また母子感染に関しても、母乳中に含まれる感染細胞量などの経時的变化に関する情報が少なく、強制的に大量の感染細胞を給餌させる方法しかなく、より自然な状態での HTLV-1 母子感染モデルの確率は困難であった。

我々はこれらの問題を克服し HTLV-1 母子感染モデルを構築することを目指し、妊娠初期の NOG マウスにヒト末梢血を移植しヒト化することで、妊娠ヒト化マウスを作成し、ヒト細胞が胎児期の NOG マウスに移行するのか? さらにその後、HTLV-1 感染細胞を移植し、胎生期において感染が成立するか予備的検討をした。その結果、生まれてきた全ての新生児マウスの肝臓においてヒト遺伝子および HTLV-1 プロウイルスゲノムが検出され、一部の個体では末梢血中にも HTLV-1 ゲノムが検出され、我々のプロトコールで胎生期あるいは経産道感染を再現する可能性が見えてきた。更に、このモデルで母乳を採材すると、極めて高頻度に感染細胞が母乳中に含まれていることを発見した。

2. 研究の目的

本研究課題において、本モデルの条件設定を詳細に行い、母子感染モデルを構築した上で、詳細に解析することで、HTLV-1 感染細胞が胎盤へ移行するのか? 胎盤からバリアを突破して感染細胞が胎児側へ移動するのか? あるいはウイルスのみ移行するのか検証することができると考えている。またどこで感染が起こり、感染細胞が潜伏するのかを長期的にモニターすることで、母子感染の機構を明らかにするとともに、母体-胎児間での血液細胞の移行、とくに免疫系細胞の移行の機構を明らかにすることができる。また、母乳中に含まれる感染細胞が新生児の血液に移行する機序についても同様に検討し、これらの自然感染モデルで ATL や HAM のような症状が発生するのかを長期的にモニターし、検証する。

胎生期における HTLV-1 感染細胞の動態およびヒト正常血液細胞の動態を明らかにすることで、胎生期における造血および感染機構を明らかにすることができれば、その他の感染症等への応用も可能となると考えられる。

3. 研究の方法

実験 1: 造血系ヒト化胎児マウスの構築と HTLV-1 感染モデルの構築

超免疫不全マウスである NOG マウスを交配し、胎子の器官原器形成が安定化する妊娠初期 (10 日目-14 日) にヒト PBMCs を妊娠 NOG マウス (pNOG) へ腹腔 (i.p) 移植する。ヒト PBMCs 移植 2 日後にマイトマイシン C 処理した MT-2 細胞を pNOG へ腹腔 (i.p) 移植し、新生児における感染の有無を PCR 及び組織学レベルで検証する。また、出生後、経母乳感染もある状態で 21 日間飼育させ、離乳後のマウスの感染の有無を PCR レベル及び組織学レベルで検証し、新生児期のマウスと母乳育児後のマウスにおける感染動態を比較することで、経胎盤感染の重要性について検証する。

実験 2: 造血系ヒト化胎児マウスにおける HTLV-1 感染動態の解析

出産前の妊娠 17 日目-18 日目に胎児マウスを取り出し、母体血の混入を抑えつつ、実体顕

微鏡下で羊水，胎盤，胎仔は胎仔肝臓 (FL)，胎仔脳 (FB)，胎仔胸腺 (FT)，胎仔脾臓 (FSPL)，胎仔骨髄 (FBM)に分けて，それぞれ DNA 解析用と組織解析用に分けて HTLV-1 ウイルスの存在場所およびヒト細胞の局在を明らかにする。

HTLV-1 ゲノムの検出には pX 領域の高感度 q-PCR を，ヒト細胞の局在解析にはヒトの house keeping 遺伝子である ribonuclease P (RNase P) のゲノム高感度 q-PCR によって行う。すでに予備実験の結果から，出産後の新生児マウスの末梢血ではヒトゲノム，HTLV-1 陰性，肝臓においてのみヒトゲノム，HTLV-1 とともに陽性であったので，胎生期でも同様に，他の造血リンパ系の組織や胎盤ではどうかを詳細に明らかにする。MT-2 を接種しないヒト化胎仔マウスも同様に解析し，ヒト血液細胞が胎盤のバリアを通過できるのかを明らかにする。PCR レベルで胎仔 NOG マウスにおいてヒト細胞および感染細胞が認められた場合は，組織学的に解析し，ヒト抗体 (hCD45, hCD3, hCD4, hCD5, hCD7, hCD8, hCD20, CD25, CD30, CD56, CD79a, CCR4, Ki67/MIB-1, TIA-1, perforin, granzyme B, すべて条件設定済み) 及びすでに我々が確立している in situ Hybridization 法を用い，PX, TAX, HBZ の mRNA 発現細胞の局在と免疫細胞の種類を組織学的に明らかにする。

4. 研究成果

結果 1: 造血系ヒト化胎仔マウスの構築と HTLV-1 感染モデルの構築

超免疫不全マウスである NOG マウスを交配し，胎仔の器官原器形成が安定化する妊娠初期(10 日目-14 日) にヒト PBMCs を妊娠 NOG マウス(pNOG) へ腹腔 (i.p) 移植する。ヒト PBMCs 移植 2 日後にマイトマイシン C 処理した MT-2 細胞を pNOG へ腹腔 (i.p) 移植し，新生児における感染の有無を PCR 及び組織学レベルで検証した。その結果，出生後 7 日目以降，PCR 陽性例が確認された。特に，末梢血，肝臓においては高いコピー数のゲノムが検出された。一方，Flowcytometry によるヒト T 細胞の局在に関しては，肝臓では 7 日目以降，21 日まで検出されるにもかかわらず，末梢血では極めて minor な集団として検出できず，またそれも一部の個体のみであった。以上の結果より，本モデルでは，非常に高効率で感染細胞が新生仔マウスに移行・検出されることが明らかとなった。

結果 2: 造血系ヒト化胎仔マウスにおける HTLV-1 感染動態の解析

本モデルにおいて，感染細胞が経胎盤で胎仔に移行しているかについて検証する目的で，出産前の妊娠 17 日目-18 日目に胎仔マウスを取り出し，胎盤，胎仔は胎仔肝臓 (FL)，胎仔脳 (FB)，胎仔胸腺 (FT)，胎仔脾臓 (FSPL)，胎仔骨髄 (FBM)に分けて，それぞれ DNA 解析用と組織解析用に分けて HTLV-1 ウイルスの存在場所およびヒト細胞の局在を明らかにした。その結果，すでに胎齢 17 日目において胎盤やマウスの胎仔肝臓内にヒト T 細胞が組織学レベル，分子生物学的に確認され，胎盤経由で感染細胞が移行することが示唆された。また，ヒト化胎仔マウスもヒト血液細胞が胎盤のバリアを通過できることを明らかにした。ゲノムインテグレーションサイトによるクローン解析の結果，キャリア母マウス，胎盤，胎仔肝臓で共通するクローンは極めて少なく，本モデルにおいては，de novo の感染が起こっていることを示唆した。

考察

未感染ヒト化妊娠マウスでは，正常ヒト細胞の移行が認められる場合と認められない場合，HTLV-1 感染ヒト化妊娠マウスで正常ヒト細胞と HTLV-1 感染細胞ともに胎盤，胎仔組織に移行している可能性と，正常ヒト細胞は移行しないが，感染細胞のみ移行する場合の可能性が考えられたが，HTLV-1 感染妊娠マウスでは胎盤の微小環境がなんらかの変化を起こし，感染細胞が移行すると予測された。また，その微小環境の変化が，正常ヒト細胞の移行も起こす可能性がある。あるいは，HTLV-1 感染細胞のみが特別な能力を獲得し，移行する可能性がある。

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 2件）

1. 発表者名 水上 拓郎, 野島清子, 関洋平, 石井美枝子, 今井恵子, 森内浩幸, 内丸薫, 明里宏文, 蕎麦田理英子, 佐竹正博, 浜口功
2. 発表標題 ヒト化マウスを用いた HTLV-1 母子感染モデルにおける感染クローン解析
3. 学会等名 第8回日本HTLV-1学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mizukami T, Nojima K, Sato Y, Furuhashi K, Sasaki E, Matsuoka S, Okuma K, Moriuchi H, Uchimaru K, Akari H, Satake M, Hamaguchi I:
2. 発表標題 Development of humanized mouse model for studying mother to child HTLV-1 transmission and prevention with HTLV-1 antibody treatment.
3. 学会等名 24th Congress of European Hematology Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水上拓郎, 野島清子, 佐藤結子, 古畑啓子, 松岡佐保子, 大隈和, 森内浩幸, 内丸薫, 明里宏文, 蕎麦田理英子, 佐竹正博, 浜口功
2. 発表標題 ヒト化マウスを用いたHTLV-1母子感染モデルの構築の試み
3. 学会等名 第6回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kiyoko Nojima, Takuo Mizukami, Rieko Sobata, Kenta Tezuka, Madoka Kuramitsu, Sahoko Matsuoka, Kazu Okuma, Masahiro Satake, and Isao Hamaguchi
2. 発表標題 Viral Safety Assessment In The development Of HTLV-1 Hyperimmune Globulin
3. 学会等名 30th Regional Congress of the ISbT (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究協力者	水上 拓郎 (Mizukami Takuo)		

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
---------	---------