

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06465

研究課題名(和文) HTLV-1ハイリスクキャリアの発症予防・治療薬創製とサル感染モデルを用いた評価

研究課題名(英文) Development of preventive/therapeutic drugs for HTLV-1 high-risk carriers and evaluation using a monkey infection model

研究代表者

大隈 和 (OKUMA, Kazu)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：80315085

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)：ヒトT細胞白血病ウイルス1型(HTLV-1)関連疾患の発症リスクの高いハイリスクキャリアに対する発症予防・治療薬の開発を目的とした。HTLV-1に近縁のサルT細胞白血病ウイルス1型(STLV-1)のエンベロープタンパク質(Env)を発現するSTLV-1感染細胞を標的化して、この細胞を選択的に死滅させるSTLV-1受容体発現組換え水疱性口内炎ウイルス(VSV)を作成した。この組換えVSVは、in vitroにおいてニホンザルSTLV-1のEnv強制発現細胞に特異的な感染殺細胞効果を発揮したが、ニホンザルSTLV-1感染細胞に対する明らかな治療効果は確認されなかったため、更なる検証が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HTLV-1は感染後長期の潜伏期間を経て、感染者(キャリア)の一部から重篤で難治性の成人T細胞白血病(ATL)等の関連疾患を発症させる。しかし、発症前に検査でキャリアと診断されても治療法がないため、キャリアに対し積極的な治療ができない。そのため、発症リスクの高いハイリスクキャリアに対する発症予防・治療薬の開発が重要であり、急務である。HTLV-1プロウイルス量(PVL)が高いために発症リスクが高いハイリスクキャリアに対し、プロウイルスが潜む感染細胞を死滅させることにより、PVLを減少させて発症リスクを低減化する、本研究における細胞溶解性ウイルスのVSVを用いた治療薬の開発や成果は意義がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop preventive and therapeutic drugs for high-risk carriers who are at high risk of developing human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-related diseases. Because simian T-cell leukemia virus type 1 (STLV-1) is closely related to HTLV-1, a recombinant vesicular stomatitis virus (VSV) expressing the STLV-1 receptor that targets and selectively kills STLV-1-infected cells expressing the STLV-1 envelope protein (Env) was generated. This recombinant VSV exerted a specific cell-killing effect on Japanese macaque STLV-1 Env-expressing cells in vitro, but no clear therapeutic effect on Japanese macaque STLV-1-infected cells was confirmed in vitro. Therefore, further verification is required.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HTLV-1 STLV-1 VSV ハイリスクキャリア 治療法 ニホンザル

1. 研究開始当初の背景

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) は、ヒトに感染すると排除されずに長期的に潜伏持続感染した後、無症候性キャリアから ATL、HAM 等の HTLV-1 感染症を引き起こすウイルスである。現在キャリアは減少傾向にはあるものの約 80 万人存在し、水平感染による新規感染も年間 4,000 人以上発生している。ATL はキャリアの 2~5% に生涯発症し、HAM は 1% 未満である。ATL は血液悪性腫瘍の中でも悪性度が高く、化学療法等に対して治療抵抗性を示し予後不良であり、治療後の再発も多い。このように発症後は完治することに困難が伴うため、発症前の長期潜伏感染期間中に感染制御・治療し発症を予防することが最善と考えられ切望されているが、まだ対処できていない。また、最近の検査診断技術の進歩により高感度で特異性の高い抗体検査法が次々と開発され、HTLV-1 感染のより正確な診断が可能になってきた。しかし、陽性と判定されキャリアと診断されても感染そのものに対する治療法がないため、キャリアに対する心身のケアに非常に苦慮している。

近年 JSPFAD (HTLV-1 感染者コホート共同研究班) の疫学研究から、ATL は HTLV-1 の PVL が 4% 以上のキャリア (キャリア全体の 20~25%) から集中的に発症すること等が分かり、発症リスク因子が明らかになってきた。また、フローサイトメトリーを用いた HTLV-1 感染細胞のフェノタイプ解析法 (HAS-Flow 法) が開発され、当該感染細胞の同定・分類に基づいた病態の進行度予測を行うことにより、ATL 発症リスクの高いキャリア集団の早期推定や将来治療した際の評価が可能になりつつある。

以上の背景から、キャリアに対する積極的な治療戦略として、治療の対象者の選別や目標設定ができるようになった。そこで、PVL が 4% 以上の「ハイリスクキャリア」にターゲットを絞り、PVL を 4% 未満に下げて発症リスクを低減させる「感染治療・発症予防薬の開発整備」を目標とすることにした。

2. 研究の目的

HTLV-1 関連疾患の一部は発症すると完治困難であり、発症前にキャリアと診断されても感染自体に有効な薬剤や治療法がないことからその後の十分なフォローができない。そのためプロウイルス量 (PVL) 4% 以上のハイリスクキャリアに対しては、長期の潜伏感染期間にただ経過観察するのではなく、積極的に感染治療・発症予防することにより PVL を 4% 未満まで減少させて関連疾患の発症リスクを低減させることが最善である。

我々はこれまで、HTLV-1 の PVL が高いために発症リスクが高いハイリスクキャリアに対し、プロウイルスが潜む感染細胞を死滅させることにより、PVL を減少させて発症リスクが低減可能な感染治療・発症予防薬の開発を進めてきた。薬剤候補として、細胞溶解性ウイルスとして知られている水疱性口内炎ウイルス (VSV) を用いて、HTLV-1 感染細胞に特異的に感染後死滅させる「組換え VSV (rVSV)」を創製し、細胞株・マウスモデルにおいて殺細胞効果による PVL 減少 (治療効果) 等を確認した。

そこで本研究では、HTLV-1 に近縁のサル T 細胞白血病ウイルス 1 型 (STLV-1) に着目し、霊長類感染モデル・薬剤評価系を STLV-1 自然感染ニホンザルを用いて構築し、この系において、従来開発してきた rVSV のニホンザル STLV-1 感染に対する有効性や安全性を検証評価して、ハイリスクキャリアの PVL を減少させる感染治療・発症予防薬の前臨床試験として成功させることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、(1)ニホンザル STLV-1 受容体を発現する rVSV の作製とこの rVSV の *in vitro* 検証実験、(2)STLV-1 感染ニホンザルを用いた霊長類感染モデル・薬剤評価系の構築とこのモデルを用いた rVSV の *in vivo* 検証実験 (前臨床試験) を行い、「rVSV の有用性」を明らかにすることを目指す。

具体的には、ニホンザル STLV-1 エンベロープ蛋白質 (Env) 発現細胞に対する rVSV の薬効評価：HTLV-1 受容体 (ヒト GLUT1 或いは NRP1) を発現する rVSV がニホンザル STLV-1 Env 発現細胞に感染することは既に確認済みであるので、次の段階としてニホンザル STLV-1 受容体候補 (ニホンザル GLUT1 或いは NRP1) をニホンザル細胞からクローニングし、この分子を発現する rVSV を本研究の薬剤候補として作製した。この rVSV が *in vitro* においてニホンザル STLV-1 Env 発現 (感染) 細胞に対して特異的な感染や殺細胞効果を示すか等を、各々蛍光抗体法や生細胞数測定等により検証した。STLV-1 感染ニホンザルの解析と薬剤評価に適した感染ザル個体の選別：京都大学霊長類研究所の実験用ニホンザルについて、STLV-1 抗体価を粒子凝集法により解析し、STLV-1 感染ニホンザルが既に同定されている。このニホンザル十頭程を用いて、rVSV の標的となる STLV-1 の潜伏組織・リザーバー確認のために、各種臓器 (リンパ系臓器、骨髄、末梢血等) における定量 PCR による PVL 測定や遺伝子・蛋白質レベルでの Env の発現解析等を行い、基礎データを収集することも計画した。そのデータを基に、rVSV の評価等に適した感染ザル個体を選別することを目指す。

4. 研究成果

(1) STLV-1 は HTLV-1 と近縁であり、STLV-1 が自然感染したニホンザルは HTLV-1 感染代理モデルとして注目されている。そこでこのモデルでの組換え VSV の薬効評価を可能にするために、STLV-1 受容体サル GLUT1 をニホンザル細胞からクローニングし、ニホンザル GLUT1 発現組換え VSV (VSVΔG-jmGL) を作製した。また AcGFP を追加発現する組換え VSV (VSVΔG-jmGL-AcGFP) も作製した (図 1)。これらの組換え VSV の、ニホンザル STLV-1 (Si-2 株) の Env を強制発現させた Vero 細胞等に対する感染性や特異性を蛍光抗体法等により解析し、殺傷効果を接種後の経時的な生細胞数測定により評価した。その結果、VSVΔG-jmGL と VSVΔG-jmGL-AcGFP は、STLV-1 Env 発現細胞に対して感染性を示し、一部に合胞体形成も見られた。この感染性は HTLV-1 中和抗体 LAT-27 により明らかに抑制されたため、受容体-Env 相互作用による感染特異性が確認された。VSVΔG-jmGL-AcGFP の同細胞に対する感染力価は、観察期間中経時的に上昇し、本組換え VSV の複製・感染増殖能を示した。そこで、VSVΔG-jmGL-AcGFP の同細胞に対する殺傷能を調べたところ、コントロールと比較して顕著な細胞殺傷効果 (接種 5 日後に約 70% 減少) を示した (図 2)。以上から、STLV-1 受容体を発現した組換え VSV は *in vitro* において STLV-1 Env 発現細胞を標的化し殺傷することができ治療効果を示したため、HTLV-1 感染に対するウイルス療法の開発に向けて、STLV-1 感染ニホンザルでの本組換え VSV の薬効評価が可能であることが示唆された。

次に、本組換え VSV の *in vitro* でのニホンザル STLV-1 感染細胞 (Si-2 細胞等) に対する効果を検討したが、Si-2 細胞は Env を細胞表面に発現していたものの発現レベルは比較的低く、これらの細胞に対し本組換え VSV の明らかな治療効果は確認されなかった。そのため、*in vivo* 実験に入る前に、*in vitro* 実験においてさらに検証を進める必要がある。

(2) STLV-1 感染ニホンザルの解析と薬剤評価に適した感染ザル個体の選別を行うことも計画した。実験用ニホンザルについて、STLV-1 抗体価を粒子凝集法により解析し、STLV-1 感染ニホンザルが既に同定された。そこで、当該 rVSV の標的となる STLV-1 の潜伏組織・リザーバー確認のために、各種臓器 (リンパ系臓器、骨髄、末梢血等) における定量 PCR によるプロウイルス量 (PVL) 測定や遺伝子・タンパク質レベルでの Env の発現解析等を行い、基礎データを収集している。そのデータを基に、当該 rVSV の評価等に適した感染ザル個体を選別する。上記の *in vitro* における当該 rVSV の有効性を確認後、選別された感染ザル個体等を用いて *in vivo* 実験に移行し、当該 rVSV の有用性を最終的に評価する。その場合、健常ニホンザル数頭も用いて、安全性及び薬物動態試験を指標にした当該 rVSV の至適投与量の決定等を行う必要がある。その後、薬剤評価用に選別された STLV-1 感染ニホンザル数頭を用いて、適当な臓器における当該 rVSV の治療効果等を、STLV-1 の PVL や感染細胞数等を指標にそれぞれ定量 PCR やフローサイトメトリー解析等により (経時的に) 検証評価し、当該 rVSV の有用性を明らかにすることを検討している。

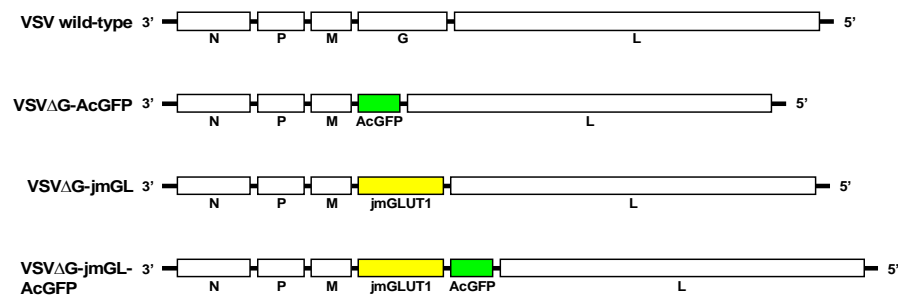


図 1 STLV-1 受容体分子およびレポータータンパク質として AcGFP1 を発現する rVSV の構造を示す概略図

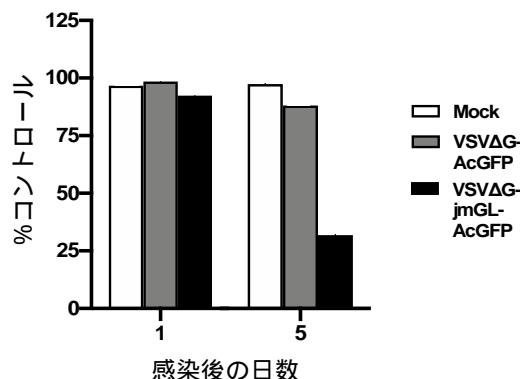


図 2 rVSV の Si-2 Env 発現細胞に対する経時的な殺傷能評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Seki Y, Kitamura T, Tezuka K, Murata M, Akari H, Hamaguchi I, Okuma K.	4. 巻 14
2. 論文標題 Cytolytic Recombinant Vesicular Stomatitis Viruses Expressing STLV-1 Receptor Specifically Eliminate STLV-1 Env-Expressing Cells in an HTLV-1 Surrogate Model In Vitro	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 740
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/v14040740	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 HTLV-1感染に対する細胞溶解性組換えVSVのSTLV-1感染非ヒト霊長類モデルにおける薬効評価に向けた検討
2. 発表標題 大隈 和、関 洋平、村田めぐみ、Kidiga Maureen、明里宏文、浜口 功
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

関西医科大学医学部 微生物学講座 http://www3.kmu.ac.jp/microbiol/

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