

様式 C-19

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月16日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590512

研究課題名（和文） 新規ヒト化マウスを用いた HTLV-1 感染症に対する免疫療法の基礎研究

研究課題名（英文） The use of novel humanized mouse model for the study of immunotherapy against HTLV-1 infection

研究代表者

齊藤 峰輝 (SAITO MINEKI)

琉球大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：40398285

研究成果の概要（和文）：本研究により、免疫不全マウス（NOD/SCID/ γ Cnull：NOG）に脾臓直接接種法を用いて HTLV-1 非感染ヒト末梢血単核球（PBMC）とマイトマイシン処理した HTLV-1 感染 T 細胞株（HAM 患者由来 ILT-M1 株）を同時移植し、定着させることで *in vivo* において HTLV-1 を感染させる系を確立した。今後、HTLV-1 感染、免疫応答、病態形成の解析に有用なツールになるものと思われる。

研究成果の概要（英文）： In this study, HTLV-1-negative normal human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were transplanted directly into the spleens of NOD/SCID/ γ Cnull (NOG) mice together with mitomycin treated HTLV-1-infected cell line. We demonstrated that the both human CD4 and CD8 positive T cells were infected with HTLV-1, and that Tax expression was induced by short time (6hrs) *in vitro* cultivation, as observed in naturally infected T-cells. Moreover, viral gene expression was also very similar to those observed in naturally infected T-cells. Our method provides a simple, rapid and effective approach for assessment of HTLV-1 infection *in vivo*; it is therefore useful in the study of infection, pathogenesis and immunotherapies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：感染防御、ワクチン、ヒト化マウス、HTLV-1

1. 研究開始当初の背景

ヒト T 細胞白血病ウイルス (Human T cell leukemia virus type 1: HTLV-1) は、世界ではじめて発見されたヒトレトロウイルスであり、HTLV-1 関連脊髄症 (HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: HAM) および成人 T 細胞白血病 (Adult T cell leukemia: ATL) の原因ウイルスである。HTLV-1 感染においては、ほとんどの感染者が生涯にわたって未発症の無症候性キャリアー (Asymptomatic Carrier: AC) として経過し、HAM や ATL を発症するのは感染者全体のわずかに 2-3%であるものの、我が国には先進国で最多の約 108 万人もの HTLV-1 感染者が存在しており、最も予後不良の白血病の一つである ATL は死亡者数が年間 1000 人を超え、HAM 患者では、約 40%が経過中に歩行不能となり生活の質が著しく障害される。すなわち、HTLV-1 感染症の制圧は我が国の公衆衛生上・医療上の緊急の課題である。我々はこれまでに、HTLV-1 感染に対する宿主の免疫応答の違いが疾患発症に深くかかわっていることを報告してきた。このことは、抗 HTLV-1 免疫応答を人為的に制御することによる疾患の発症予防、治療の可能性を示唆するものである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これまでに報告がなかった HTLV-1 の感染病態とヒト免疫応答を個体レベルで解析するヒト化マウス実験系を構築した上で、HTLV-1 感染細胞に対する免疫応答を人為的に制御する方法を探索し、将来の HAM および ATL に対する発症予防・免疫治療の臨床応用に向けた方法論の基盤を確立することである。

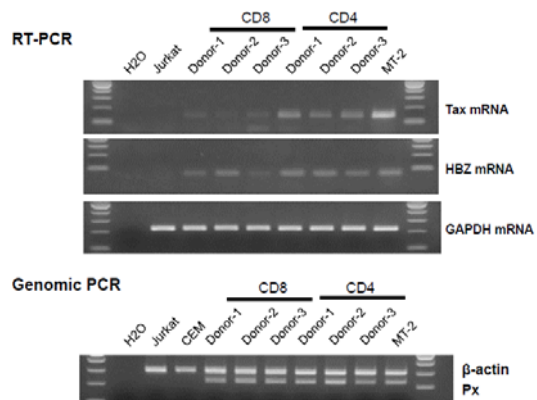
3. 研究の方法

HTLV-1 非感染健常者から末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells: PBMC) を密度勾配遠心法で分離した。PBMC とマイトマイシン処理した HTLV-1 感染 T 細胞株 (ILT-M1) を 1×10^6 個ずつ混合し、高度免疫不全マウス (NOD/SCID/ γ Cnull : NOG) の脾臓内に移植した (ヒトリンパ球移植免疫不全マウス: hu-PBL-SCID)。移植 2 週間後にマウスから脾臓細胞を回収した。磁気ビーズ (Miltenyi Biotec) を用いてヒト CD4 および CD8 陽性 T 細胞を分離した。分離後、ゲノム DNA と全 RNA を AllPrep™ DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて同時に抽出し、さらに全 RNA から PrimeScript RT reagent Kit (Takara) を用いて逆転写反応を行い鋳型 cDNA を合成した。HTLV-1 Tax、HBZ mRNA の発現は Real Time PCR で、Tax 蛋白の発現はフローサイトメトリーで解析した。HTLV-1 プ

ロウイルス量は Real Time PCR で定量した。細胞のフェノタイプ、Tax 発現はフローサイトメトリーで解析した。

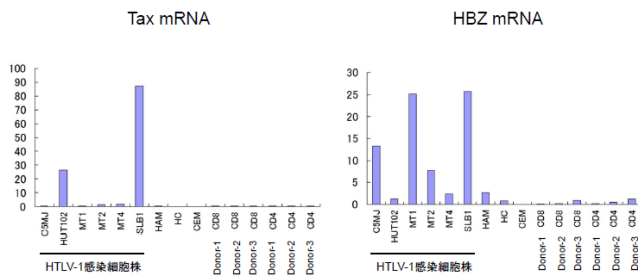
4. 研究成果

- (1) マウスの脾臓から分離したヒト CD4、CD8 陽性 T 細胞双方から HTLV-1 プロウイルス、HTLV-1 Tax および HBZ mRNA が検出された。



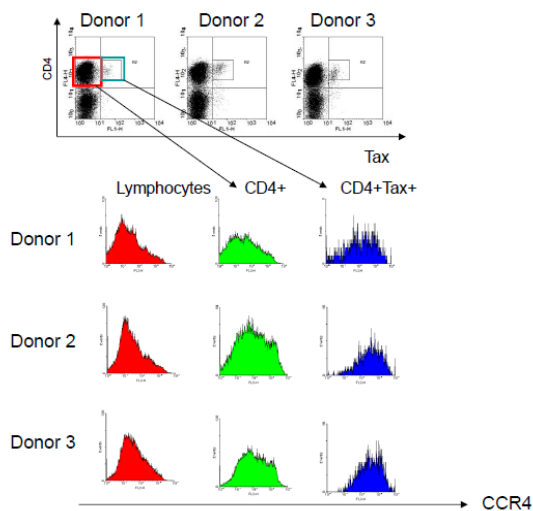
- (2) 細胞あたりの HBZ mRNA 発現量は HAM 患者や無症候性ウイルスキャリアーと同程度であったが、Tax mRNA 発現量は HTLV-1 感染者の PBMC 同様極めて低かった。

Cell line	HBZ mRNA	tax mRNA
C5/MJ	13.3	0.062
HUT102	1.2	26.35
MT1	25.2	0.011
MT2	7.8	1.24
MT4	2.4	1.71
SLB1	25.8	87.4
CEM	0	0
HAM/TSP	2.69	0.00087
HCs	0.78	0.000011
Donor 1-CD4	0.21	0.0041
Donor 2-CD4	0.55	0.0070
Donor 3-CD4	1.28	0.0023
Donor 1-CD8	0.092	0.0031
Donor 2-CD8	0.23	0.0028
Donor 3-CD8	0.94	0.0013



HTLV-1 HBZ mRNA= value of HBZ/value of HPRT
 HTLV-1 tax mRNA= value of tax/value of HPRT

- (3) HTLV-1 感染者の PBMC と同様に、マウスから回収したヒト PBMC に Tax 蛋白の発現は認められなかったが、短時間培養すると CD4 陽性 CCR4 陽性 T 細胞分画に選択的に発現誘導された。



考察

HTLV-1 はヒト CD4 陽性 T リンパ球を主要な感染標的細胞とするウイルスであり、マウスの T 細胞には感染しない。そのため、HTLV-1 感染症の病態・防御免疫機構を取扱いの容易な小型動物を用いて個体レベルで解析するため、高度免疫不全マウス (NOD/SCID/ γ Cnull : NOG) の脾臓内にヒト PBMC とマイトマイシン処理した HTLV-1 感染 T 細胞株を同時移植するヒト化法 (hu-PBL-SCID) を用いた。この方法は、マウスの脾臓内に直接細胞を移植することで、移植する PBMC の数を腹腔内投与を用いた場合の約 1/10 にまで減らすことが可能であり、多くのマウスを一度に処理できる利点がある。今回の検討により、

マウス生体内で感染させたヒト CD4、CD8 陽性 T 細胞内の HTLV-1 は、HAM 患者や無症候性キャリアー (AC) に感染している HTLV-1 と同じ動態を示すことが明らかになった。すなわち、CD4 陽性 T 細胞優位に感染し (HTLV-1 プロウイルスが検出され)、未培養では検出できない Tax 蛋白が、短時間の培養によって CD4 陽性 CCR4 陽性 T 細胞分画に選択的に発現誘導された。また、Tax および HBZ mRNA の細胞あたりの発現量も HTLV-1 感染者 (HAM、HC) 由来の感染細胞とほぼ同程度であった。これらの結果は、比較的簡便に作製可能なこの系によって、ヒト生体内の HTLV-1 感染をマウス体内で再現できることを示している。今後、この系を用いて HTLV-1 感染者 (HAM 患者、HC) から分離した IgG 分画、HTLV-1 中和活性のある抗 gp46 モノクローナル抗体、HTLV-1 抗原で感作した免疫細胞 (成熟 DC、CTL 等)、各種薬剤等による HTLV-1 感染予防効果の検討が可能である。

結論

簡便に作製可能な方法により、生体内での HTLV-1 感染を再現するヒト化マウスモデル系を確立した。今後はこのマウスモデルを用いて、最も効率の良い HTLV-1 感染防御法・治療法の開発を進めていきたい。

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 7 件)

- Saito M., Bangham CR. Immunopathogenesis of Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): Recent perspectives. **Leukemia Research and Treatment.** doi:10.1155/2012/123637, 2012. 査読あり
- Adachi T, Tanaka R, Kodama A, Saito M., Takahashi Y, Ansari AA, Tanaka Y. Identification of an unique CXCR4 epitope whose ligation inhibits infection by both CXCR4 and CCR5 tropic human immunodeficiency type-I viruses. **Retrovirology.** 8:84, 2012. 査読あり
- Saito M. Immunogenetics and the pathological mechanisms of human T-cell leukemia virus type 1- (HTLV-1)-associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **Interdisciplinary Perspectives on**

Infectious Diseases.

doi:10.1155/2010/478461, 2010.

査読あり

4. Saito K, Saito M, Taniura N, Okuwa T, Ohara Y. Activation of the PI3K-Akt pathway by human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) oncoprotein Tax increases Bcl3 expression, which is associated with enhanced growth of HTLV-1-infected T cells. **Virology**. 403:173-180, 2010. 査読あり
5. 齊藤峰輝 HAM/TSP 病態研究の最近の進歩 **血液・腫瘍科** 60:642-650, 2010. 査読なし
6. Saito M, Matsuzaki T, Satou Y, Yasunaga J, Saito K, Arimura K, Matsuoka M, Ohara Y. In vivo expression of the HBZ gene of HTLV-1 correlates with proviral load, inflammatory markers and disease severity in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **Retrovirology**. 6:19, 2009. 査読あり
7. 齊藤峰輝 HAM/TSP の病態に関する最近の考え方 **血液・腫瘍科** 58:600-606, 2009. 査読なし

[学会発表] (計 5 件)

1. 齊藤峰輝、田中礼子、児玉 晃、田中勇悦：ヒトリンパ球移植免疫不全マウス (hu-PBL-SCID) を用いた新規 HTLV-1 感染動物モデル作製の試み
第 4 回 HTLV-1 研究会 2011 年 9 月 19 日 東京
2. 齊藤峰輝、田中礼子、児玉 晃、松崎敏男、田中勇悦：HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) における HBZ 遺伝子発現の意義。
第 23 回日本神経免疫学会学術集会
2011 年 9 月 15 日 東京
3. 齊藤峰輝、田中礼子、児玉 晃、田中勇悦：HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) における OX40 陽性細胞の解析と HTLV-1 感染ヒト化マウス作製の試み
第 64 回日本細菌学会九州支部総会・第 48 回日本ウイルス学会九州支部総会
2011 年 8 月 26 日 北九州市
4. Saito M, Tanaka R, Matsuzaki T, Umehara F, Tanaka Y: Enhanced expression of

OX40 by HTLV-1 Tax and its roles in the pathogenesis of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP).

The 10th International Symposium on NeuroVirology.
2010.10.13. Milan, Italy.

5. Saito M, Tanaka R, Kodama A, Matsuzaki T, Suehara M, Tanaka Y: Successful development of novel monoclonal antibodies against HTLV-1 bZIP factor and their applications in studying the pathogenesis of HAM/TSP.
15th International Conference on Human Retroviruses: HTLV and Related Viruses.
2010.6.6. Leuven, Belgium.

[図書] (計 1 件)

1. Saito M. Elsevier, HTLV-1. Encyclopedia of Genetics 2nd Edition. 2012, in press.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 峰輝 (SAITO MINEKI)

琉球大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：40398285

(2) 研究分担者

田中 勇悦 (YUETSU TANAKA)

琉球大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30163585

(3) 連携研究者

なし