

## 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 6月 4日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590515

研究課題名（和文）HTLV-1 感染ヒト化マウスを用いた ATL および HAM 発症機序の解明  
 研究課題名（英文）Study of mechanism for the development of ATL and HAM by using HTLV-1 infected humanized mouse model

研究代表者

藤澤 順一 (FUJISAWA JUN-ICHI)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：40181341

研究成果の概要(和文):ヒト造血幹細胞の NOG-SCID マウスへの骨髄内移植により作製したヒト化マウスに HTLV-1 を感染させることで感染 T 細胞の異常増殖、肝脾腫および花弁様分核を持ったリンパ球の出現等、ATL 様病態が再現された。感染マウスでは抗 HTLV-1 宿主免疫の誘導と特定の感染クローンの選択的増殖が観察され、その過程における HTLV-1 Tax 遺伝子の発現抑制と CD25 陰性から陽性への転換が示された。

研究成果の概要(英文):By infecting HTLV-1 to humanized NOG-SCID mouse established by the intra-bone-marrow transplantation of human hematopoietic stem cells we successfully recapitulated the ATL-like phenotypes such as overgrowth of infected T cells, hepatosplenomegaly and induction of T lymphocytes with flower-shaped nuclei. Host immune system against HTLV-1 was established and the outgrowth of limited number of infected T cell clones was observed. In the course of clonal selection of infected T cells the expression of HTLV-1 Tax became silenced and the infected CD25-negative T cells were changed to express CD25.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
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:HTLV-1, ヒト化マウス、マウスモデル、ATL, NOG-SCID

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまでに、ヒト臍帯血由来造血幹細胞を NOG-SCID (NOD-SCID / IL2R $\gamma$ -chain knock-out) マウスの骨髄内に移植することによりヒト造血系を個体内に再現したヒト化マウスを作製し、同マウス腹腔内に HTLV-1 感染ヒト細胞株 MT-2 を投与することでマウス体内のヒト T 細胞に HTLV-1 を感染させることに成功した。また、同感染マウスにおいて、感染 T 細胞の異常増殖を観察した。

HTLV-1 感染が原因で発症する成人 T 細胞白血病 (ATL) は発病までに感染後数十年の潜伏期間を有し、さらに生涯発症率は HTLV-1 感染者の数%にとどまるが、ひとたび発症すると有効な治療法はなく、平均余命 1 年以内の悪性の白血病であることから、治療法のみならず発症予防の取り組みは重要な課題である。そのため、我々が確立した HTLV-1 感染ヒト化マウスの系を用いて、ヒト感染個体では解析困難な潜伏期における感染細胞の動態および宿主免疫との相互作用を中心に ATL 発症機序の解析を試みた。

## 2. 研究の目的

### 3. 研究の方法

#### (1)ヒト化マウスの作製と HTLV-1 感染

ヒト化マウスは、ヒト臍帯血から磁気ビーズ法にて精製した CD133 陽性造血幹細胞( $5 \times 10^4$  個)を NOD-SCID/IL2R  $\gamma$ -chain knock-out (NOG-SCID)マウス骨髄内に移植することで作製した。移植 4~5 ヶ月において、末梢血に CD3 陽性ヒト T 細胞の発現を確認した後、 $\gamma$  線照射 (10Gy)MT-2 細胞( $2 \times 10^5$  個)を腹腔内に注入し HTLV-1 を感染させた。

#### (2)HTLV-1 感染細胞の動態解析

HTLV-1 感染後、経時的に末梢血を採取し、セルソーター(FACS CANTO II)を用いてヒト血球表面マーカー (CD45, CD3, CD4, CD8, CD25)の解析および細胞数測定ビーズ混入法による細胞数の測定を行った。感染マウスは体重減少を指標に供死し、脾臓、肝臓、リンパ節等、組織内リンパ球の表面抗原、プロウイルス、クローナリティの解析を行った。

#### (3)HTLV-1 感染およびプロウイルスの解析

HTLV-1pX 領域内に設定した PCR プライマーを用いて、末梢血および感染組織から分離した白血球より調整したゲノム DNA を鋳型に、TaqMann プローブ法にて定量的 PCR を行い、CD3 陽性ヒト T 細胞における感染細胞の割合 (provirus load)を算出した。内部標準としてヒト  $\beta$ -グロビン遺伝子を用い、pX 領域およびヒト  $\beta$ -グロビン遺伝子断片を同一プラスミドに組み込んだ DNA を定量的標準とした。

同様に、HTLV-1pol 領域内に設定した PCR プライマーを用いた定量的 PCR を同時に行い、pX/pol の比率から欠損ウイルスの検出・判定を行った。欠損ウイルスは、プライマー結合配列 (5')および pX 領域 (3')に設定した PCR プライマーを用い、感染細胞ゲノム DNA を鋳型に増幅し、プラスミドクローニングの後、塩基配列を決定した。

#### (4)感染細胞のクローナリティの解析

感染細胞ゲノム DNA を制限酵素 PstI で切断後、希釈条件下、T4-ligase で環状化し、これを鋳型に HTLV-1 LTR および pX 領域の DNA プライマーを用いてプロウイルス挿入ヒトゲノム部位の増幅を行った (inverse-long PCR, IL-PCR)。PCR 断片をアガロースゲル電気泳動で解析後、プラスミドにクローニングし塩基配列を決定した。決定されたプロウイルス挿入部位のヒトゲノム塩基配列を元に PCR プライマーを合成し、感染細胞ゲノム DNA を鋳型とした定量的 PCR を行うことで感染細胞集団内における特定の感染クローンの占有率を算出した。

#### (5)抗 HTLV-1 宿主免疫機能の解析

HTLV-1 感染ヒト化マウス末梢血における抗 HTLV-1 抗体は、抗 HTLV-1 Gag 抗体検出 ELISA キット(富士レビオ社製)を用いて定量した。また、抗ヒト IgG および抗ヒト IgM 抗体と磁気ビーズを用いた吸収実験を行い、血清中のヒト抗 Gag IgG 抗体の産生を検出した。抗 TaxCTL の

発現は、HLA-A24 拘束性 Tax テトラマー (Tax 301-309、MBL 社製)を用いて計測した。

### 4. 研究成果

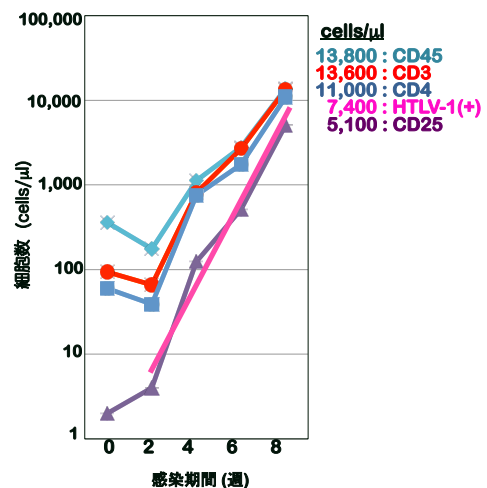
#### (1) HTLV-1 感染細胞の異常増殖

CD133 陽性造血幹細胞の NOG-SCID マウス骨髄内への移植で作製したヒト化マウスは、移植 3~4 ヶ月でヒト末梢血中と同等の B 細胞/T 細胞および CD4/CD8 の比率で末梢血中に 100~500 個/ $\mu$ l のヒト T 細胞を発現するようになり、その後一年近くこの状態を維持した。これまでの他研究グループによる CD34 陽性造血幹細胞の静脈投与で作製したヒト化マウスでは、比較的短期間でしかヒト血球系と同等な状態を維持できないことが報告されていることから、CD133 陽性造血幹細胞の骨髄内移植法により、よりヒトに近い状況が長期にわたって再現されたと考えられた。

移植 4 ヶ月のヒト化マウスに MT-2 細胞を腹腔内投与し HTLV-1 を感染させたところ、感染 2 週間から CD3 陽性ヒト T 細胞の異常増殖が観察されるようになり、感染 8~10 週で、一定値(数千~1万/ $\mu$ l)に達した(図 1)。増殖 CD3 陽性ヒト T 細胞の 90%以上は CD4 陽性細胞で占められ、またさらにその約半数が CD25 陽性を示していた(図 1)。

そこで、同ヒト T 細胞中の HTLV-1 感染細胞の割合 (provirus load)を測定したところ、約 50%が HTLV-1 陽性であった(図 1)。この事実は、HTLV-1 感染により感染細胞が増殖すると同時に非感染細胞も同様に増殖していることを示しており、感染個体内での T 細胞異常増殖におけるサイトカイン等液性因子の関与が強く示唆された。

図 1. HTLV-1 感染 T 細胞の異常増殖

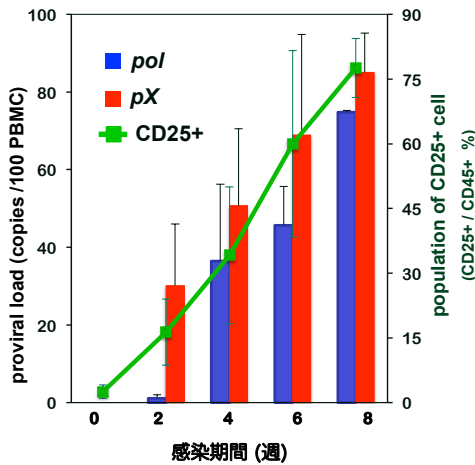


#### (2) HTLV-1 欠損ウイルスの感染

感染 T 細胞中の HTLV-1 プロウイルス量は HTLV-1 pX 領域に設定した PCR プライマーを用いた定量的 PCR 法にて定量したが、PCR プライマーとして pol 領域を設定した場合、感染 2 週においては、pX 領域で計測した場

合の 10%以下となり、この時期での感染は主に pol 領域を欠く欠損ウイルスによることが考えられた(図 2)。そこで、感染ゲノム DNA より PCR クローニングし塩基配列を決定したところ、MT-2 細胞で最も多く発現している gag-pX 型の欠損ウイルス DNA を導入した培養細胞においては、Tax 活性は検出されなかったが、HBZ mRNA の発現が検出された。これは、HBZ の作用が感染細胞の異常増殖に関与している可能性を示唆しているが、感染 1 ヶ月以降からは完全長プロウイルスを持つ感染細胞が優位となり、最終的にはほぼすべての増殖細胞が完全長 HTLV-1 に感染した状態となったことから、個体レベルでの感染細胞の選択的増殖には完全長 HTLV-1 が必要であると考えられた。

図 2. HTLV-1 欠損ウイルスの感染



(3) ATL 様病態の再現

ATL は CD25 陽性 CD4 T 細胞の異常増殖と花弁様分葉核を持つ T リンパ球の出現を特徴とする。そこで、CD4 T 細胞における CD25 の発現を経時的に解析したところ、HTLV-1 感染率の上昇と共に CD25 発現率が増加し、最終的に異常増殖する CD4 T 細胞の 80~90% が CD25 陽性であることが示された(図 2)。

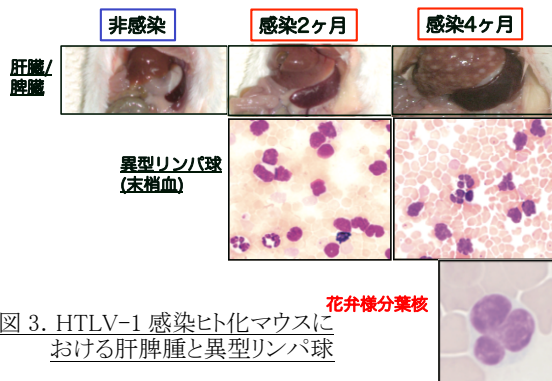


図 3. HTLV-1 感染ヒト化マウスにおける肝脾腫と異型リンパ球

次に末梢血リンパ球の形態を観察したところ、感染 2~3 ヶ月で多数の異型リンパ球が観察さ

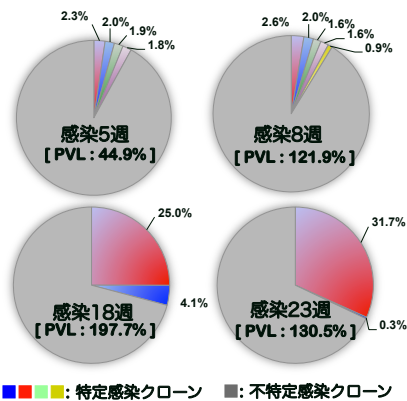
れ、感染 4 ヶ月以降のほぼすべての検体において、ATL 細胞に類似した花弁様分葉核を示すリンパ球の出現が見られた(図 3)。この結果は、ヒト化マウスへの MT-2 細胞導入によって、感染 4 ヶ月で ATL を再現できた可能性を強く示唆している。

(4) 感染細胞のクローナル増殖

ATL においては単一あるいは限られた数の感染クローンが選択的に増殖している。そこで、HTLV-1 感染ヒト化マウスにおける感染細胞のクローナリティを inverse-long PCR (IL-PCR) の手法で解析した。

PCR 産物の電気泳動解析からは、感染初期においてはポリクローナルな感染が示唆され、また感染が進むに従って特定の感染クローンが増殖している事実が示された。次に、アガロースゲルから回収した PCR 産物をプラスミドクローニング、塩基配列決定の後、プロウイルス挿入部位を指標にそれぞれの感染クローンの占有率を定量的 PCR で解析したところ、感染初期においては最大クローンで数%以下の占有率しか示さなかったのに対し、感染後期では特定の感染クローンの占有率が 30% に達していた(図 4)。この結果から、HTLV-1 感染ヒト化マウスにおいて、ATL と同様、特定の感染細胞のクローナル増殖が進んでいることが明らかとなった。

図 4. 感染クローン占有率の経時変化

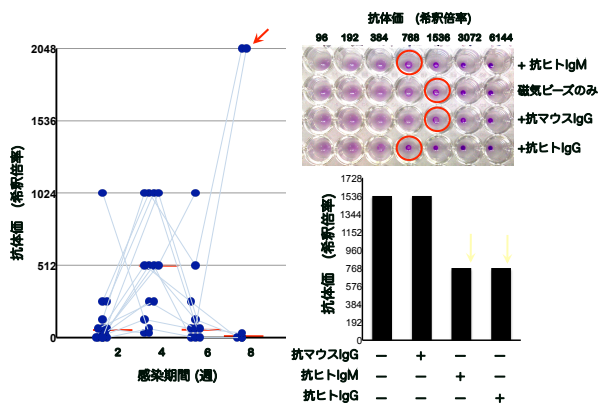


(5) 抗 HTLV-1 宿主免疫の発現

特定感染クローンの個体内選択過程において、宿主免疫機構の関与が想定されることから、HTLV-1 感染ヒト化マウス個体内における抗 HTLV-1 宿主免疫の発現を解析した。

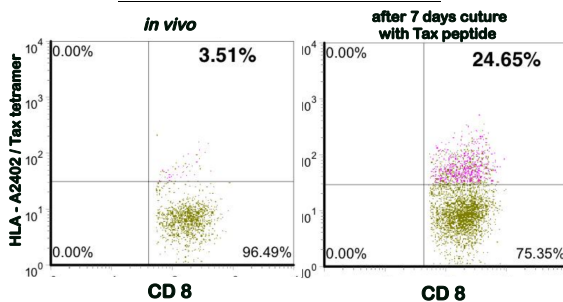
血清中の抗 HTLV-1Gag 抗体の存在を解析したところ、感染 4 週および 8 週をピークとする 2 峰性の抗 Gag 抗体の発現が観察され、感染 8 週の血清に関しては、ほぼ等量の IgM と IgG によって占められていることが分かった(図 5)。このことは、この時期に抗 Gag 抗体の IgM から IgG へのクラススイッチングが進行していることを示しており、ヘルパー機能を持つ抗 HTLV ヒト T 細胞の存在も支持された。

図 5. HTLV-1 感染ヒト化マウスにおける抗 HTLV-1 Gag 抗体の発現



HTLV-1 感染ヒト個体の抗 HTLV-1 宿主免疫において主要な役割を担うことが示されている抗 Tax 細胞障害性 T 細胞(CTL)の発現に関しては、蛍光標識 HLA 拘束性 Tax テトラマーを用いた脾臓内 CD8 T 細胞の FACS 解析を行った。その結果、1%前後のテトラマー陽性 CD8 T 細胞の存在が確認された(図 6)。さらに、同 CD8 細胞を脾臓由来抗原提示細胞存在下で1週間、標的 Tax 301-309 ペプチドと共培養したところ、その存在率が 25%にまで上昇し、機能的なテトラマー陽性細胞であることが確認された。

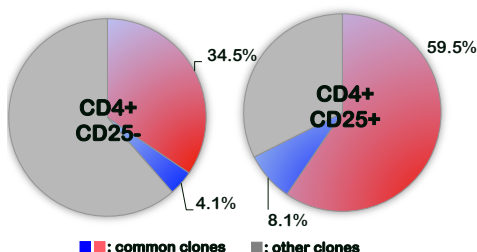
図 6. HTLV-1 感染ヒト化マウスにおける HLA 拘束性抗 Tax CTL の発現



(6) 感染細胞の分化・増殖とウイルスおよび宿主遺伝子の発現

感染後期の感染細胞内プロウイルス組み込み部位塩基配列をもとに、同一感染個体における感染クローンの動態を解析したところ、最大感染クローンは末梢血、リンパ節、肝臓転移部、脾臓すべてに検出され、脾臓内 CD25 陽性 CD4 T 細胞において最も高い占有率(約 60%)を占めていた(図 7)。

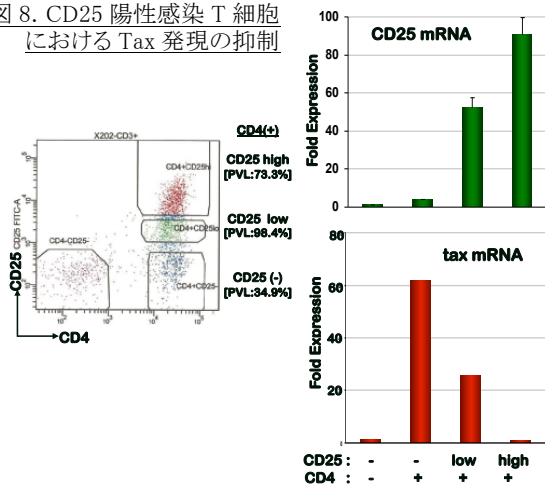
図 7. 同一脾臓内 CD25 陰性及び陽性 CD4 T 細胞における共通感染クローンの存在



感染初期においてはほとんどの感染細胞が CD25 陰性であり、また、同一脾臓内 CD25 陰性 CD4 T 細胞にも同一感染クローンの存在が観察された(約 35%)ことから、感染 CD25 陽性細胞は CD25 陰性細胞由来であると結論された。

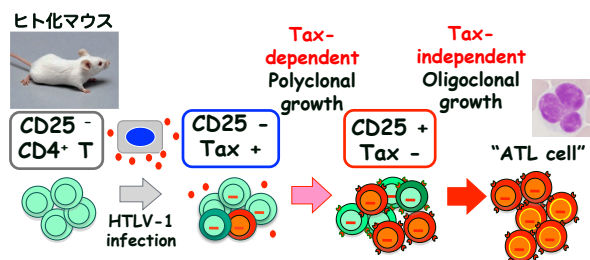
これまで T リンパ球細胞株への Tax 遺伝子の導入により CD25 遺伝子の活性化が報告されていることから、同一感染個体の CD25 陰性および陽性 CD4 T 細胞における Tax mRNA の発現を解析したところ、CD25 陰性細胞において有意な発現が観察されたものの、CD25 陽性細胞では抑制されていた(図 8)。この結果は、CD25 の発現は Tax 遺伝子の機能に依るものではなく、逆に、感染細胞側の宿主遺伝子発現の変化により増殖性を獲得すると同時に Tax の発現が抑制された可能性を強く示唆している(図 9)。

図 8. CD25 陽性感染 T 細胞における Tax 発現の抑制



感染 CD4 T 細胞における CD25 の発現と増殖性獲得に至る宿主遺伝子発現の変化を明らかにする目的で、CD25 陰性および陽性 CD4 T 細胞における細胞遺伝子の発現を cDNA microarray にて解析・比較したところ、チロシンキナーゼ Syk の発現において 20 倍近い上昇が見いだされ、今後、治療標的候補として注目される。

図 9. HTLV-1 感染ヒト化マウスにおける ATL 様病態発症機序



## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Tanaka M., Nitta T, Sun B, Fujisawa J., Miwa M. The route of primary HTLV-1 infection regulates HTLV-1 distribution in reservoir organs of infected mice. *Exp. Thr. Med.*, 査読有, vol.2, 2011, 89-94
- ② Tanaka M., Sun B, Tezuka K, Fujisawa J., Tanaka Y, Hoshino H, Miwa M, Neuraminidase enhances the initial steps of human T-cell leukemia virus type 1 replication. *Microbes and Infection*, 査読有, vol.12, 2010, 701-707
- ③ Tanaka, M., T. Nitta, T. Yoshida, T. Konishi, Y. Kawazu, J. Fujisawa and M. Miwa, Clonal proliferation of HTLV-1-infected cells is associated with spontaneous malignant tumor formation in mice. *Int J Oncol.*, 査読有, vol.35, 2009, 119-125
- ④ Jiang S, Inada T, Tanaka M., Furuta RA, Shingu K, Fujisawa J. Involvement of TORC2, a CREB co-activator, in the in vivo-specific transcriptional control of HTLV-1. *Retrovirology*, 査読有, vol.6, 2009, 73

[学会発表] (計 12 件)

- ① 手塚健太、上野孝治、荀潤澤、竹之内徳博、田中正和、藤澤順一: HTLV-1 感染ヒト化マウスにおける欠損型プロウイルスの解析、第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋、2011 年 10 月 5 日
- ② Masakazu Tanaka, Naoki Wada, Iwao Hashimoto, Sho Hasegawa, Hiroyuki Tsuda, Masanao Miwa, Jun-ichi Fujisawa: Anti-tumor effects of bovine lactoferrin to lymphoma cells expressing HTLV-1 Tax. 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋、2011 年 10 月 5 日
- ③ Kenta Tezuka, Runze Xun, Mami Tei, Takaharu Ueno, Masakazu Tanaka, Norihiro Takenouchi, Jun-ichi Fujisawa: Inverse correlation between tax and CD25 expressions in HTLV-1 infected CD4+ T-cells *in vivo*. The XV International Congress of Virology, 札幌, 2011 年 9 月 13 日
- ④ Takaharu Ueno, Kenta Tezuka, Runze Xun, Mami Tei, Masakazu Tanaka, Norihiro Takenouchi, Jun-ichi Fujisawa: Infection of defective virus correlated with the induction of CD25 positive CD4 T-cell during early phase of infection in humanized mouse model. The XV International Congress of Virology, 札幌, 2011 年 9 月 12 日
- ⑤ Jun-ichi Fujisawa, Kenta Tezuka, Runze Xun, Mami Tei, Norihiro Takenouchi, Masakazu Tanaka: ATL-like overgrowth and clonal expansion of HTLV-1 infected CD25+ CD4+

T-lymphocyte in humanized-NOG mouse model. 15<sup>th</sup> International conference on human retrovirology HTLV and related viruses, Leuven/Gembloux Belgium, 2011 年 6 月 5 日

- ⑥ Kenta Tezuka, Runze Xun, Mami Tei, Takaharu Ueno, Masakazu Tanaka, Norihiro Takenouchi, Jun-ichi Fujisawa: Inverse correlation between Tax and CD25 expressions in HTLV-1 infected CD4 T-cells in vivo. 15<sup>th</sup> International conference on human retrovirology HTLV and related viruses, Leuven/Gembloux Belgium, 2011 年 6 月 5 日
- ⑦ 田中正和, 荀潤澤, 手塚健太, 三輪正直, 竹之内徳博, 藤澤順一: HTLV-1 感染ヒト化マウスを用いた感染 T 細胞選択過程の解析、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月 8 日
- ⑧ Tanaka M, Hasegawa S, Hashimoto I, Adachi Y, Ikehara S, Miwa M, Fujisawa J: Immunotherapy for tumors using combination of allogenic intra-bone-marrow bone-marrow transplantation (IBM-BMT) and donor lymphocyte infusion (DLI) in EL4/Gax implanted mouse. 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、2010 年 9 月 22 日
- ⑨ 手塚健太, 荀潤澤, 田中正和, 三輪正直, 竹之内徳博, 藤澤順一: ヒト化マウスモデルにおける HTLV-1 感染 CD25+ T 細胞のクローナル増殖、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 27 日
- ⑩ 荀潤澤, 手塚健太, 田中正和, 三輪正直, 竹之内徳博, 藤澤順一: HTLV-1 感染ヒト化マウス T 細胞における CD25 の活性化、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 27 日
- ⑪ 長谷川翔, 橋本岩雄, 田中正和, 足立靖, 池原進, 三輪正直, 藤澤順一: マウスモデルを用いた骨髄移植/リンパ球輸注による抗 ATL 治療法の検討、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 26 日
- ⑫ 田中正和, 荀潤澤, 手塚健太, 巽理恵, 竹之内徳博, 三輪正直, 藤澤順一: ヒト化マウスモデルにおける HTLV-1 感染 CD4CD25 陽性 T 細胞のクローナル増殖性と Tax 特異的な CTL 検出について、第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月 2 日

[その他]

ホームページ等

<http://www3.kmu.ac.jp/microbiol/>

[http://www.kmu.ac.jp/graduate\\_school/2671t80000008f16.html](http://www.kmu.ac.jp/graduate_school/2671t80000008f16.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤澤 順一(FUJISAWA JUN-ICHI)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号:40181341

(2)研究分担者

竹之内 徳博(TAKUNOUCHI NORIHIRO)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号:20533235

田中 正和(TANAKA MASAKAZU)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号:20454613