

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591280

研究課題名(和文) 樹状細胞を介したHTLV-1感染モデルの構築と薬剤スクリーニングへの応用

研究課題名(英文) Establishment of HTLV-1 infection model via dendritic cells and the use to screening of medicines.

研究代表者

竹之内 徳博 (Takenouchi, Norihiro)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20533235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：HTLV-1関連脊髄症(HAM)は、治療薬のスクリーニングに資する至的な感染モデルが存在しない。よって本研究では、HTLV-1感染モデルを構築し、HAMの治療候補薬のスクリーニングに資することを目的とした。ウイルスリザーバーの作製は、分化樹状細胞へウイルス発現ベクターを形質導入することで行った。標的細胞へのウイルス感染の評価法も、新たな指標細胞を作製することで確立した。この系でブロッキング抗体を添加することで、ウイルス感染効率が低下することも確認された。樹状細胞を介したT細胞系へのHTLV-1感染モデルが樹立出来たと考えられたので、今後はこの系を薬剤のスクリーニングに応用していく。

研究成果の概要(英文)：In HTLV-1 associated myelopathy (HAM), the infection model that is useful for screening of the medicine does not exist. Therefore, in this study, we tried to establish HTLV-1 infection model and be intended to use it for the screening of therapeutic drugs of HAM. At first, we manufactured a virus reservoir by transducing a virus expression vector to differentiation dendritic cells. Then, we established a rating system of the viral infection to a target cell by making a new index cell. It was confirmed that efficiency of the viral infection decreased by adding a blocking antibody in this system. Because it was thought that HTLV-1 infection model to the T cell via the dendritic cell was established, we will apply this system to the screening of drugs in further study.

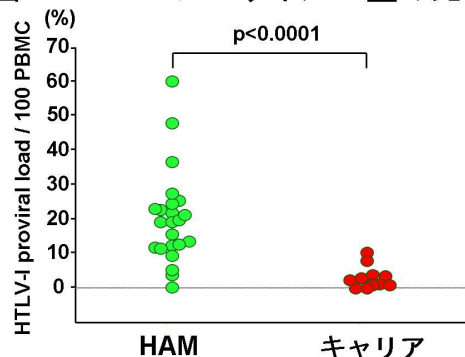
研究分野：神経内科学、神経ウイルス学

キーワード：HTLV-1 感染モデル 樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

成人T細胞白血病ウイルス(Human T cell leukemia virus type 1)は慢性難治性の神経疾患である HTLV-1 関連脊髄症 (HTLV-1-associated myelopathy: HAM)の原因ウイルスである。HTLV-1 感染者は国内に約 110 万人と推定されているが、HAM の根治療法は未だ確立されていない。HAM 発症の病態としては、HTLV-1 に感染した CD4 陽性 T リンパ球の脊髄実質への浸潤と、それに応答する細胞障害性 T 細胞(CTL)との間の激しい免疫反応が脊髄で炎症を引き起こすことが主因と考えられている。研究代表者らは、HAM 患者では無症候性 HTLV-1 感染者(キャリア)と比べて HTLV-1 感染細胞が増加しウイルス量が高値となっていることや、疾患の活動性が高い時期にウイルス量が高値となることを報告した(Takenouchi, J Neurovirol 2003; Nagai, J Neurovirol 1998) (図 1)。現在ではこの高ウイルス量が HAM 発症・進行の最大の risk factor と考えられている。故に HAM 発症・進行予防のためには感染者個体内でのウイルス量の低減が重要であるが、治療薬のスクリーニングに有用な感染動物モデルは現在まで確立されておらず、新規の治療薬の開発は困難であるため有効な予防策を採ることが出来ていない。

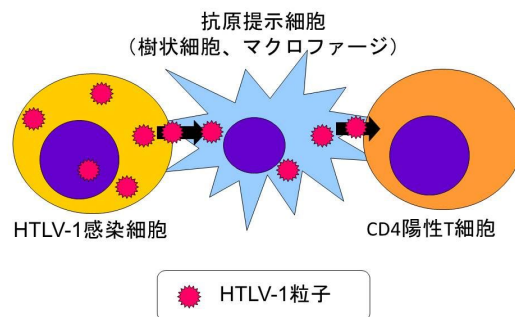
図1. HTLV-1プロウイルス量の比較



感染モデルの確立において、ウイルス感染動態の解明は重要である。代表研究者らは、HTLV-1 は生体内では主に CD4 陽性 T リンパ球に感染していることを報告し (Matsuoka, Acta Neuropathol 1998)、ウイルス粒子に対するレセプターとして、グルコース輸送蛋白である GLUT-1 や細胞外マトリックス構成蛋白である HSPGs などが相乗的に働いていることを示した (Takenouchi, J Virol 2007)。一方で、HTLV-1 産生細胞株を用いた *in vitro* での感染実験系では、種々の培養細胞株への感染が確認されているものの、ヒト CD4 陽性 T リンパ球への感染は困難であるのが現状であり、加えて、HTLV-1 はヒト細胞への指向性が極めて強いため、従来はマウスなど異種での動物モデルの作製も困難であった。

近年我々は、免疫不全マウスにヒト臍帯血を移入することでヒト免疫系を構築したヒト化マウス (hu-NOG) の系で、高率にヒト CD4 陽性 T リンパ球へ HTLV-1 を感染させることに成功しており、このモデルにおいて、末梢血での炎症性サイトカインの発現パターンや HTLV-1 感染細胞のフェノタイプがヒトの HAM の病態 (Yamano, PLOS One 2009) に類似性が高く、HTLV-1 特異的 CTL や抗 HTLV-1 抗体も誘導されていることを既に確認している。しかしながら、同マウスは HTLV-1 産生細胞株を直接移入する系であるため、本来の標的である T リンパ球以外の細胞も感染標的となり得、ウイルス感染動態の再現には問題もある。実際、同感染モデルでは HTLV-1 産生細胞株移入後のウイルス量の上昇が著しく (感染 8 週間後で 70 ~ 80 copy/100 PBMC まで増加)、HAM (5 ~ 20 copy/100 PBMC で安定) やキャリア (1 ~ 2 copy/100 PBMC で安定) と比べてウイルス量が高く、短時間で白血病様の細胞が出現するなど病態の相違もある。

図 2. 抗原提示細胞を介した感染の模式図



同じレトロウイルスである HIV-1 は、抗原提示細胞である樹状細胞がウイルスリザーバーとして働き、標的である CD4 陽性 T リンパ球へ感染すると考えられている。近年、HTLV-1 においても樹状細胞やマクロファージが、ウイルスリザーバーとして働いている可能性が報告された (Jones, Nat Med 2008; Akahata, blood 2008)。抗原提示細胞は、T リンパ球に抗原提示をする際に密接に接触するため、*in vivo*における HTLV-1 の T リンパ球への厳密な感染指向性も合理的に説明出来る事となる (図 2)。このことは、抗原提示細胞を感染源として用いれば、本来の標的である T リンパ球に特異的に HTLV-1 を持続的に感染させることが可能で、故に、ウイルス量の動態及び感染 T リンパ球のサブセットがヒトに近い持続感染系が作製出来る可能性を示している。

2. 研究の目的

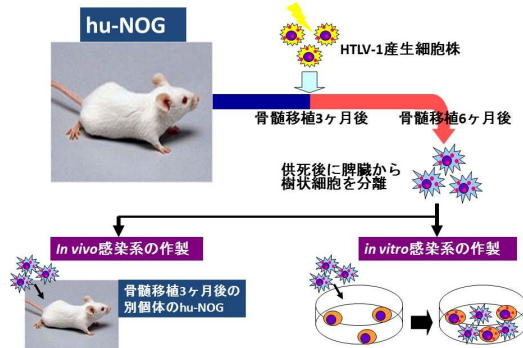
HAM は未だ根治的な治療がないため、発症予防と症状の進行防止が重要である。故に、感染者個体内での HTLV-1 感染拡大の

抑制が必要であるが、ウイルスの感染病態は不明な点が多く、有用な感染モデルも確立されていない。よって本研究では、抗原提示細胞を介した HTLV-1 感染モデルの構築を行い、従来のモデルよりもよりヒトの感染動態に近いウイルス持続感染モデルの作製を試みた。作製されたモデルを HTLV-1 の感染阻止実験に応用し、HAM の治療や予防に有用な薬剤のスクリーニングに資することを目的とした。

3. 研究の方法

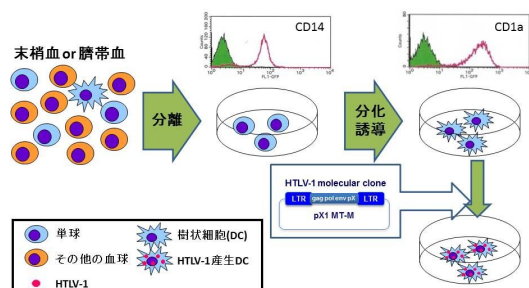
HTLV-1 感染細胞は以下の二通りで作成した。まず、NOG マウスへヒト臍帯血由来造血幹細胞を移植しヒト化マウスを作製後、HTLV-1 産生細胞株を接種することで HTLV-1 を感染させた。作製された HTLV-1 感染マウス脾臓より HTLV-1 感染樹状細胞 (HTLVDC1) を抽出した (図 3)。

図 3. HTLV-1 産生樹状細胞の作製



これとは別に、ヒト臍帯血より単球を分離し、サイトカインを添加培養し樹状細胞へ分化させた後、HTLV-1 molecular clone を electroporation することで HTLV-1 産生樹状細胞 (HTLVDC2) を作製した (図 4)。

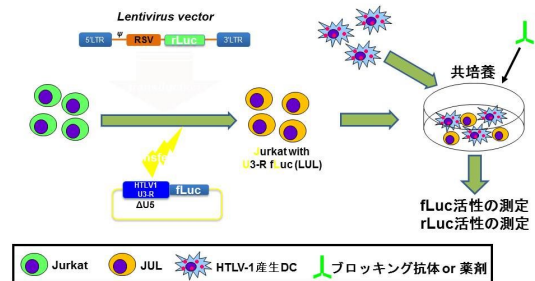
図 4. HTLV-1 産生樹状細胞の作製



作製された HTLVDC1 or HTLVDC2 と HTLV-1 LTR(U3)-Luc を安定的に組み込んだ Jurkat 細胞 (JUL) を共培養し、ルシフェラーゼ活性

を測定することで HTLVDC から JUL への HTLV-1 感染の評価を行った (図 5)。

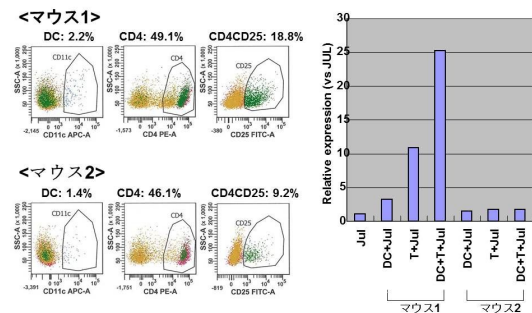
図 5. JULの作製と感染の評価



さらに、各種抗体 (抗 CD4 抗体、抗 TSLC1 抗体) を共培養へ添加し、感染阻止実験も行った (図 7)。

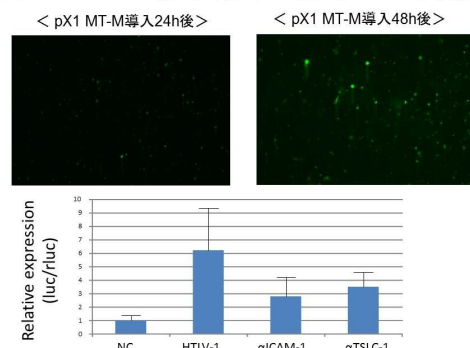
4. 研究成果

図 6. HTLV-1 感染効率



HTLV-1 感染ヒト化マウス脾臓における樹状細胞は 1.4~2.2%であった。HTLV-1 の主要な感染細胞である CD4 陽性 T 細胞は 46.1~49.1%であり、CD4CD25 陽性 T 細胞は 9.2~18.8%であった。この系から樹立された、HTLVDC1 を用いた感染実験では、一匹ではルシフェラーゼ活性は陰性対照に比べて、3~20 倍へ上昇していたが、もう一匹はほとんど差がなかった (図 6)。

図 7. HTLV-1 感染効率と感染阻止実験



Electroporation の系では樹状細胞への HTLV-1 導入効率は導入 24 時間後で 10~20% 程度であった。この系で樹立された HTLVDC2 を用いた感染実験では、ルシフェラーゼ活性は陰性対照に比べて、3~5 倍と上昇していた。この系を応用した感染阻止実験においては、抗 CD4 抗体、抗 TSLC1 抗体のいずれを用いた系でも、ルシフェラーゼ活性の上昇率の抑制が認められた(図 7)。ルシフェラーゼ活性の上昇は、HTLVDC から JUL への HTLV-1 感染を示しており、樹状細胞を介した T 細胞系への HTLV-1 感染モデルが樹立出来たと考えられた。マウスモデルを用いた系では、Electroporation の系より、より自然に近い感染樹状細胞が作製されることが予想されたため、このモデルを優先的に樹立する予定であったが、HTLV-1 感染効率の高いマウスの脾臓における樹状細胞は減少しており、逆に樹状細胞の多いマウスは HTLV-1 感染効率が低かった (data not shown)。HTLV-1 感染効率の高いマウスの脾臓はリンパ球が主体となっており、これは生体内における主要な感染細胞がリンパ球であり、それが活発に増殖していることが原因と思われる。よって、感染阻止実験に応用するために十分量の感染樹状細胞を確保するのが難しいと予想された。一方で、Electroporation の系では、単球からの樹状細胞への分化は問題なく行えており、分化された樹状細胞への HTLV-1 molecular clone の導入効率は 10~20% 程度であった。ヒト生体内における樹状細胞の比率からすると、導入効率 10~20% は感染阻止実験に応用するのに十分と考えている。

HTLV-1 は cell to cell 感染を起こすときにウイルスシナプスを構成することが示されている。この構成要素と思われる接着分子や免疫シナプス構成要素をブロックすることで、感染効率が低減することが考えられるが、Electroporation の系を用いた感染阻止実験では予想通り感染効率の低減が認められた。このことは、今回樹立した系が、薬剤スクリーニングを行うための感染阻止実験へ応用することが可能であることを示唆している。一方で、薬剤による感染低減効果を有意差を持って図るためには、ルシフェラーゼ活性の上昇率がまだ不十分であることが考えられたので、今後はさらなる系の最適化を図りつつ、薬剤のスクリーニングに応用していく予定である。

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 2 件)

1. Tezuka K, Xun R, Tei M, Ueno T, Tanaka M, Takenouchi N, Fujisawa JI. An animal model of adult T-cell

leukemia-humanized mice with HTLV-1 specific immunity. *Blood*. 2014. 123(3): 346-55.

2. 田中正和, 和田直樹, 橋本岩雄, 竹之内徳博, 津田洋幸, 藤澤順一, 三輪正直. HTLV-1 の Tax 発現リンパ腫のウシラクトフェリンによる腫瘍増殖抑制効果. *ラクトフェリン* 2013. 2013. 43-50.

[学会発表](計 9 件)

1. 竹之内徳博, 上野孝治, 荀潤澤, 田中正和, 藤澤順一: 樹状細胞を介した HTLV-1 感染モデルの構築と薬剤スクリーニングへの応用: 第 19 回日本神経感染症学会総会学術集会 第 26 回日本神経免疫学会学術集会, 2014.9.6 金沢歌劇座(石川県・金沢市)(口演)(第 19 回日本神経感染症学会総会学術集会 第 26 回日本神経免疫学会学術集会 合同学術集会 合同プログラム集 p38)
2. 竹之内徳博, 上野孝治, 手塚健太, 田中正和, 藤澤順一: 樹状細胞を介した HTLV-1 感染モデルの構築: 第 55 回日本神経学会学術大会, 2014.5.23 福岡国際会議場(福岡県・博多市)(口演)(第 55 回日本神経学会学術大会プログラム・抄録集 p519)
3. 竹之内徳博, 上野孝治, 手塚健太, 田中正和, 藤澤順一: 樹状細胞を介した in vitro HTLV-1 感染モデルの構築: 第 25 回日本神経免疫学会集会, 2013.11.29 海峡メッセ下関(山口県・下関市)(口演)(第 25 回日本神経免疫学会集会・抄録集 p118)
4. 竹之内徳博, 藤澤順一, 中川正法, 日下博文: 関西地方における HAM 患者のインターフェロン及びステロイド治療有効性に関する後ろ向き研究: 第 18 回日本神経感染症学会総会, 2013.10.11 シーガイアコンベンションセンター(宮崎県・宮崎市)(口演)(第 18 回日本神経感染症学会総会・学術集会抄録集 p159)
5. 竹之内徳博, 藤澤順一, 中川正法, 日下博文: HAM 患者における IFN 及びステロイド治療の有効性に関する後ろ向き研究: 第 6 回 HTLV-1 研究会/シンポジウム, 2013.8.24 東京大学医科学研究所講堂(東京)(ポスター)(第 6 回 HTLV-1 研究会/シンポジウム プログラム・抄録集 p53)
6. 竹之内徳博, 佐藤輝明, 手塚健太, 森下和広, 中川正法, 日下博文, 藤澤順一: HAM の疾患活動性バイオマーカーとしての TSLC1 の検討: 第 54 回日本神経学会学術

大会、2013,5,30 東京国際フォーラム
(東京)(口演)(第54回日本神経学会学
術大会プログラム・抄録集 p113)

7. 竹之内徳博、手塚健太、上野孝治、鄭 真美、中川正法、日下博文、藤澤順一: HAM患者 PBMC における高 HTLV-1 プロウイルス量の発生機序についての検討: 第53回日本神経学会学術大会、2012,5,24 東京国際フォーラム(東京)(ポスター)(第53回日本神経学会学術大会プログラム・抄録集 p360)
8. 竹之内徳博、佐藤輝明、手塚健太、中川正法、日下博文、藤澤順一: HAM患者 PBMC における TSLC1mRNA 発現と疾患活動性の関連: 第5回 HTLV-1 研究会/シンポジウム、2012,8,26 東京大学医科学研究所講堂(東京)(口演)(第5回 HTLV-1 研究会/シンポジウム プログラム・抄録集 p34)
9. 竹之内徳博、手塚健太、上野孝治、鄭 真美、中川正法、日下博文、藤澤順一: HAM患者における高 HTLV-1 プロウイルス量の発生機序の解明: 第17回日本神経感染症学会総会、2012,10,20 ホテルルビノ京都堀川(京都府・京都市)(口演)(第17回日本神経感染症学会総会・学術集会抄録集 p218)

〔図書〕(計 件)
該当なし

〔産業財産権〕
該当なし

〔その他〕
ホームページ等
<http://www3.kmu.ac.jp/microbiol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹之内 徳博 (Takenouchi Norihiro)
関西医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 20533235

(2) 研究分担者

田中 正和 (Tanaka Masakazu)
関西医科大学・医学部・助教
研究者番号: 20454613