

学位論文題名

Establishment of novel animal model for
Human T-cell Leukemia Virus Type 1 infection
using human CRM1 transgenic rats(ヒト CRM1トランスジェニックラットを用いた
新規ヒト白血病ウイルス I 型感染動物モデルの樹立)

学位論文内容の要旨

ヒト白血病ウイルス 1 型 (Human T-cell leukemia virus type 1:HTLV-1) は成人 T 細胞白血病 (ATL) や HTLV-1 関連脊髄症 (HAM/TSP) の原因となるレトロウイルスである。全世界でおよそ 2000 万人の感染者がいると推定されており、日本においても 120 万人が感染している。HTLV-1 の感染経路は主に母乳を介する母子感染であり、他にも精液を介する水平感染や輸血による感染が知られている。HTLV-1 感染者の 2-3% が 50-60 年という長い潜伏期間を経て ATL を発症するが、その機序は不明である。また、ATL は高カルシウム血症や免疫不全を併発し、既存の抗癌剤に対して抵抗性であるため予後が不良となる場合が多い。現在、ATL の発症機序を解明し、治療法を開発するために HTLV-1 感染動物モデルの構築が望まれている。ラットは飼育が容易で遺伝子操作が可能であることから HTLV-1 感染動物モデルの有力な候補である。本研究では HTLV-1 感染ラットモデルの構築を目的として以下に示す 3 つのテーマについて取り組んだ。

(1) ヒト CRM1 トランスジェニック (Tg) ラットにおける HTLV-1 増殖の解析

【目的と意義】ラットにおける HTLV-1 の増殖はヒトに比べて著しく悪い。本研究室ではこの原因がヒト CRM1 (hCRM1) の持つ env/gag mRNA の核外輸送能をラット CRM1 (rCRM1) が欠くことにあることを示してきた。そこで、HTLV-1 感染小動物モデルの構築を目的として、hCRM1 Tg ラットを作製し、T 細胞における HTLV-1 の増殖を *ex vivo* で検討した。

【材料と方法】Tg ラットにおける hCRM1 の発現はウエスタンブロット法により調べた。Tg 及び野生型 (Wt) ラットの T 細胞に HTLV-1 を感染させ不死化させることにより IL-2 依存的な増殖を示す 15 の細胞株 (Wt:6, Tg:9) が得られ、このうち 10 細胞株 (Wt:3, Tg:7) については IL-2 非依存的に培養した。各細胞株における HTLV-1 の増殖は ELISA 法を用いた培養上清中の p19 gag の定量、及び HTLV-1 Gag 及び Env 特異的抗体を用いた FACS 解析により評価した。

【結果】hCRM1 を発現する Tg ラットにおいて、hCRM1 は内在性の rCRM1 と同様の発現パターンを示した。FACS 解析の結果、全ての hCRM1 Tg 細胞株において p19Gag の産生を認めただけに対し、全ての Wt 細胞株では Gag の生産は認められなかった。一部の Tg ラット由来の細胞では gp46 Env の発現も見られた。また、Tg 細胞株は Wt のもの compared to 培養上清中に 100-1000 倍の p19 を生産した。

【結論と考察】hCRM1 を発現させることにより、ラット T 細胞における HTLV-1 の複製が亢進した。Tax や Rex の産生はどの細胞株においても有意な差が見られないのに対し、

細胞内及び培養上清中の Gag 産生が Tg ラット細胞株において有意に上昇していることから、hCRM1 が unspliced form の mRNA 輸送に機能し HTLV-1 の複製に寄与しているものと考えられる。本研究により hCRM1 Tg ラットが HTLV-1 感染小動物モデルになりうる可能性が高いことが示された。

(2) Foxp3 及び CTLA-4 発現 HTLV-1 感染ラット細胞の機能解析

【目的と意義】制御性 T 細胞は転写因子である Foxp3 の発現を特徴とする T 細胞の亜集団である。これらの T 細胞は免疫抑制機能を有しており、免疫寛容の維持に機能している。近年、ATL 細胞における制御性 T 細胞の関連分子である Foxp3 や CTLA-4 の発現亢進が報告されており、病態との関わりが示唆されている。本研究では HTLV-1 感染ラット細胞株を用いて制御性 T 細胞関連分子の発現と免疫抑制機能との関連を検討した。

【材料と方法】IL-2 依存性及び非依存性の増殖を示す 9 及び 13 種類の HTLV-1 感染ラット細胞株を用いた。Foxp3 の発現は RT-PCR 法及びウエスタンブロット法により確認した。各細胞株の抑制機能を評価するため、CFSE ラベルしたラット脾臓 T 細胞と共培養し、抗 CD3 抗体による増殖刺激後 3 日における CFSE 強度を FACS 解析により測定した。

【結果】解析に用いた 22 細胞株のうちそれぞれ 10 細胞株において Foxp3 及び CTLA-4 の発現を認めた。Foxp3 発現は IL-2 依存性の細胞株において非依存性の状態よりも高かった。Foxp3 および CTLA-4 発現細胞株において T 細胞の増殖抑制機能が確認された。

【結論と考察】本研究により制御性 T 細胞関連分子である Foxp3 及び CTLA-4 発現と HTLV-1 感染細胞株による免疫抑制機能との関連が示唆された。このことはヒトとラット HTLV-1 感染モデルの相同性をさらに示している。今後の研究により生体内における ATL の発症や病態と制御性 T 細胞関連分子の発現との関連が明らかになる事が期待される。

(3) ラットにおける HTLV-1 母子感染の解析

【目的と意義】母乳を介する母子感染は HTLV-1 の主要な感染経路である。日本では断乳による新生児への感染防止が試みられ成果を上げているが、完全には感染を防止出来ない。又、母乳育児には多くの利点があり、断乳は多くの問題を抱えている。動物モデルを用いて HTLV-1 の母児感染を再現することが可能となれば、新たな感染防御法の開発につながる事が期待される。本研究ではラットモデルを用いて母子間の HTLV-1 感染を明らかにする事を試みた。

【材料と方法】妊娠前、又は妊娠中のラットに対し HTLV-1 感染ラット細胞株を経口若しくは経腹腔で接種した。さらに、感染ラットより生まれた F1 世代を交配し F2 世代を作出した。これらの感染ラットより乳汁の採取を行った。HTLV-1 感染を評価するためラット血漿中の p19Gag を ELISA 法にて、末梢血及び乳汁 DNA 中のプロウイルスを Nested PCR 法にて検出した。乳汁中の HTLV-1 特異的抗体の検出には PA 法を用いた。Cell-free HTLV-1 感染系を用いてウイルス感染に対する乳汁の影響を評価した。

【結果】感染ラットより生まれた、又は授乳を受けた同腹子群のラットにおいて p19 Gag 及び HTLV-1 プロウイルスが検出された。HTLV-1 感染は F2 世代においても確認された。経腹腔で HTLV-1 感染ラット細胞株を接種したラットより得られた乳汁中において HTLV-1 プロウイルスを検出した。これらの乳汁中には HTLV-1 特異的抗体も検出され、抗体を含む乳汁は量依存的に cell-free ウイルスの感染を阻害した。

【結論と考察】本研究によりラットにおいても母子感染が HTLV-1 の自然な伝播経路である事、母乳を介する感染が起こっている可能性が示唆された。また、乳汁中への移行抗体がウイルスの感染防御に関与している可能性が示唆された。今後ラットにおける HTLV-1 母子感染の詳細を明らかにする事により、新たな母子感染の防御法の発展につながる事が期待される

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 志 田 壽 利

副 査 教 授 高 田 賢 藏

副 査 教 授 今 村 雅 寛

学 位 論 文 題 名

Establishment of novel animal model for Human T-cell Leukemia Virus Type 1 infection using human CRM1 transgenic rats

(ヒト CRM1トランスジェニックラットを用いた
新規ヒト白血病ウイルス I 型感染動物モデルの樹立)

本論文ではヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-1) の増殖を促進するヒトの因子である human CRM1 (hCRM1) を発現するトランスジェニックラット (Tg ラット) を用いた種々の HTLV-1 感染モデルを樹立する事を目的として、3つのテーマについて研究を行った。

ラットにおける HTLV-1 の増殖がヒトに比べて悪い原因として、hCRM1 の持つ env/gag mRNA の核外輸送能をラット CRM1 (rCRM1) が欠いている事が明らかとなっている。この知見を元に HTLV-1 感染小動物モデルの改良を目的として hCRM1 Tg ラットが樹立された。hCRM1 Tg ラットにおける CRM1 の発現をウエスタンブロット法により解析したところ、hCRM1 の発現は内在性の rCRM1 と同様であった。次に hCRM1 Tg ラット T 細胞における HTLV-1 の増殖を解析するために、Tg 及び Wt ラット由来の T 細胞を HTLV-1 により不死化し、HTLV-1 感染ラット細胞株の樹立に成功した。これらの細胞株における HTLV-1 Gag 産生を ELISA 法及び FACS 解析により測定したところ、hCRM1 Tg ラット由来の細胞株においては Wt ラット由来のものに比べ有意に高い Gag 発現が認められた。

制御性 T 細胞は免疫抑制機能を有する T 細胞の亜集団である。近年、ATL 細胞において制御性 T 細胞の関連分子である Foxp3 や CTLA-4 の発現が報告されており、機能的な相関が示唆されている。HTLV-1 感染ラット細胞株における制御性 T 細胞関連分子の発現を調べたところ Foxp3 は 18 細胞株中 9 細胞株において、CTLA-4 は 19 細胞株中 10 細胞株において発現が確認された。次に各細胞株の T 細胞増殖抑制機能を評価したところ、解析に用いた Foxp3+/CTLA-4+ である 3 細胞株の全て、Foxp3 または CTLA-4 を発現している 6 細胞株中 3 細胞株において T 細胞の増殖抑制機能が確認された。一方解析に用いた Foxp3-/CTLA-4- である 3 細胞株においては T 細胞の増殖を抑制しなかった。これらの結果より制御性 T 細胞関連分子である Foxp3 及び CTLA-4 発現と HTLV-1 感染細胞株による免疫抑制機能との関連が示唆された。

母乳を介する母子感染は HTLV-1 の主要な感染経路であり、動物モデルを用いて HTLV-1 の母児

感染を再現することが可能となれば、新たな感染防御法の開発につながる事が期待される。そこで、本論文ではラットモデルを用いて母子間の HTLV-1 感染を明らかにする事を試みた。HTLV-1 感染ラットより生まれた、又は授乳を受けた同腹子群のラットに対して HTLV-1 の検出を試みた結果、各群内のラットにおいて血漿中 p19 Gag 及び HTLV-1 プロウイルスが検出される事を確認した。さらに、経腹腔で HTLV-1 感染ラット細胞株を接種したラットより得られた乳汁中において HTLV-1 プロウイルスを検出した。これらの乳汁中には HTLV-1 特異的抗体も検出され、抗体を含む乳汁は量依存的に cell-free ウイルスの感染を阻害した。これによりラットにおいても母子感染が HTLV-1 の自然な伝播経路である事、母乳を介する感染が起こっている可能性が示唆された。また、乳汁中への移行抗体がウイルスの感染防御に関与している可能性が示唆された。

発表後、高田賢三教授よりラット細胞に対する HTLV-1 の侵入効率や T 細胞抑制機能を示したラット細胞株とヒト制御性 T 細胞との比較についての質問があった。また、今村雅寛教授よりヒトでは稀な例である HTLV-1 経胎盤感染がラットにおいて多く見られる理由と、中和抗体を含む乳汁を授乳された同腹子においても HTLV-1 感染が見られた理由についての質問があった。最後に志田壽利教授より HTLV-1 感染ラットモデルの現状と展望についての質問があった。申請者はそれぞれの質問に対し現在までに得られている実験結果をふまえ自身の考えと今後の展望を述べた。質疑に対する応答は概ね妥当だった。

この論文は hCRM1 Tg ラットの HTLV-1 感染動物モデルとしての有用性を示した点、またヒトの場合で報告されている HTLV-1 感染細胞と制御性 T 細胞との機能的な相関や母乳中におけるプロウイルス及び移行抗体の存在をラットモデルにおいても示した点が高く評価され、今後ラットモデルが治療と予防法開発や、生体内における ATL の病態や HTLV-1 感染機構の解明に役立つことが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。