

永田 幸 論文内容の要旨

主 論 文

Establishment of a novel human T-cell leukemia virus type 1
infection model using cell-free virus

セルフリーウイルスを用いたヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型の新規感染モデルの構築

永田 幸、手塚 健太、倉光 球、淵 直樹、長谷川 ゆり、濱口 功、三浦 清徳

(Journal of Virology • in Press)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
主任指導教員： 三浦 清徳教授

緒 言

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) は、成人 T 細胞白血病 (ATL) および HTLV-1 関連脊髄症/熱帯性瘧疾性対麻痺 (HAM/TSP) の病因となるヒトレトロウイルスである。

HTLV-1 キャリアの末梢血中には感染性ウイルス粒子がほとんど検出されないことから、HTLV-1 感染は主に感染リンパ球と標的細胞との直接接触、ウイルス学的シナプスの形成、感染細胞表面のバイオフィルム様構造に埋め込まれた膜結合型ウイルスの移動によって起こると考えられている。実際、*in vitro* で感染細胞が産生する HTLV-1 の感染力は非常に低いことが示されており、HTLV-1 の感染と T 細胞の形質転換に関する研究では、共培養法が用いられることが多い。しかし、これらの実験系は、(i) 標的感染細胞から放出される新たに合成された HTLV-1 産物と、ドナー感染細胞中に既に存在するウイルス産物との区別が難しい、(ii) 標的細胞感染後に、ドナー感染細胞の完全除去が困難である、(iii) ドナー感染細胞中のプロウイルスの構造と核酸配列が明らかでない、などの問題点がある。これに代わる方法として、本研究では、新たなセルフリー HTLV-1 感染モデルの確立を目指した。

対象と方法

HTLV-1 の感染性分子クローン (pX1 MT-M) をウイルス産生用細胞株 (Lenti-X 293T 細胞) に導入し、48 時間後にウイルス粒子を含有した培養上清を回収した。上清中のウイルス量は p19 ELISA 法で定量し、ウイルス粒子形態を透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察した。確立したセルフリー感染モデルを用いて初代培養細胞に感染させ、各細胞

における感染感受性を評価した。また、得られたウイルス粒子に対する感染抑制効果を HTLV-1 エンベロープ特異的中和モノクローナル抗体である LAT-27 を用いて評価した。

上清中のウイルスバイオフィルムの機能及び構造の評価を行う目的でフィルターや組換えコラゲナーゼの添加によって標的細胞への感染能を比較した。

HTLV-1 のウイルス的生活環を評価し、*in vitro* だけでなく、*in vivo* でのヒト細胞への感染能を評価する目的で、ヒト化マウスにセルフリーウイルス粒子を腹腔内投与した。

結 果

本研究で構築した新規感染モデルでは、ウイルス粒子を多量に含む培養上清を得ることに成功し、TEM でウイルス粒子構造を保持した像を得た。次に、細胞株へ HTLV-1 を含む培養上清を添加すると *de novo* 感染を誘導することが示唆された。さらに、LAT-27 の添加により標的細胞の感染阻害を認め、培養上清中のセルフリーのウイルス粒子はエンベロープ依存的に感染することが示唆された。

ウイルス培養上清のバイオフィルムの量が、濃度依存的に標的細胞への感染能に影響を与えることが示された。また、TEM 解析により、ウイルス粒子の間の細胞外マトリックス、バイオフィルム様構造体の内部に成熟したウイルス粒子集合体が観察された。コラーゲンに富んだ細胞外バイオフィルム様構造は、ヒト組み換えコラゲナーゼによりウイルス粒子の保護と接着を低下させ、感染性が部分的に低下することを示した。

感染標的細胞中で HTLV-1 プロウイルスのランダムインテグレーション、ウイルス特異的 mRNA の転写、およびウイルスタンパク質の翻訳という HTLV-1 のウイルス学的生活環をウイルス粒子は有していた。

最後に HTLV-1 のヒト化マウスモデルを用いて、培養上清中の HTLV-1 が *in vivo* でも濃度依存的にヒトリンパ球に感染し、感染 T 細胞の異常増殖を認めた。

考 察

本研究では、pX1 MT-M を用いた新たな HTLV-1 の感染モデルを構築した。このモデルでは、感染前にウイルス培養上清を濾過しないため、上清中にバイオフィルムが残存する。ウイルスバイオフィルムは、HTLV-1 エンベロープタンパク質を物理的に保護するだけでなく、細胞間接着に関与し、ウイルス粒子のレセプターへの効率的な結合を助ける可能性がある。ウイルスバイオフィルムは細胞外マトリックスに埋め込まれたウイルス粒子の凝集体であり、セルフリーのウイルス粒子よりもかなり感染力が強く、本研究で構築した新規感染モデルで精製されたウイルス培養上清の高感染力価に寄与していると考えられる。また、新規感染モデルのウイルス粒子は HTLV-1 のウイルス学的生活環を再現できており、従来の感染系では困難であった感染初期におけるウイルス複製と感染細胞のクローン動態の解析や、様々な初代培養細胞の HTLV-1 に対する感受性の評価が可能である。また本研究では *In vitro* だけでなく、ヒト化マウスモデルを用いて、セルフリーのウイルス粒子が生体内で感染性を有することを初めて証明でき、感染経路の解明に貢献することが期待される。