

# 漢方方剤併用による抗 HTLV-I 中和モノクローナル抗体を用いた HTLV-I 感染・発症阻止効果の増強の試み

申請代表者 藤猪 英樹 琉球大学大学院医学研究科免疫学講座  
所内共同研究者 早川 芳弘 病態生化学分野

准教授  
准教授

## 【報告セミナー要旨】

### 【目的】

ヒトT細胞白血病ウイルスI型 (human T-cell leukemia virus type-I, HTLV-I) はレトロウイルス科デルタレトロウイルスに属し、成人T細胞白血病 (adult T-cell leukemia, ATL) やHTLV-I関連脊髄症 (HTLV-I associated myelopathy, HAM)、ぶどう膜炎などの炎症性疾患をひき起こすことが知られている。HTLV-Iの感染は縄文時代に遡るといわれ、現在も我が国のHTLV-I感染者数は100万人以上と推定される。母子間の垂直感染が主な感染ルートであるが、麻薬乱用や性行為による大人間の水平感染も問題となっており、最近、大都市では感染者数の増加の傾向を示している。感染リンパ球はその後一生涯生体内で維持され、感染患者のうちの5%程度がATLを発症する。しかも発症後2年以内に100%近くが死亡するという極めて悪性度の高い疾患である。このような状況の中で、人為的にHTLV-I感染拡大を阻止するワクチンや医薬品を開発することは社会的に高い緊急性を持つと考えられる。HTLV-I感染症に対する抗体医薬の開発が急がれている中で、これまでに、我々が樹立したラット抗HTLV-I gp46 IgG単クローン抗体 (LAT-27: in vitroで感染中和及びADCC活性を持つ) がin vitroやヒト化した高度免疫不全マウスの体内においてHTLV-I感染を阻止することを報告してきた。

本研究では、LAT-27抗体が持つ感染中和及びADCC活性を最大限引き出す効果を漢方生薬成分に見出すことを目的として検討した。

### 【結果と考察】

120種の生薬エキスを患者由来ATL細胞に添加し、LAT-27抗体のエピトープである、ウイルスのエンベロープタンパクであるgp46の発現、および、ATL発症の責任調節遺伝子と考えられるtaxの発現をフローサイトメトリーで検討した。更にウイルス活性時に上昇することが知られている表面マーカーについても検討を行った。その結果、顕著なウイルス活性の変動が認められた生薬成分のうち、黄連 (オウレン)、生姜 (ショウキョウ)、丁子 (チョウジ) について感染性への関与を報告する。今後、これら生薬成分を含む漢方方剤を用いたin vivoの検討を行っていく。

## ■背景・目的

HTLV-Iは世界で初めてヒトの疾患との関連が見いだされたレトロウイルスであり、HTLV-I関連髄膜症（HAM）および成人T細胞白血病(ATL)の原因ウイルスである。我が国には、先進国で最多の110万人ものHTLV-I感染者が存在しており、特にATLにおいては、発症後の予後は極めて悪く、発症1年以内の死亡率が極めて高い深刻な現実がある。我が国でのATLでの死亡者数は年間で1000人を超える。しかしながら、今日HTLV-I関連疾患の有効な治療法はもとより、主な感染ルートである母子感染や大都市で見られる水平感染を防御するワクチンの開発もなされていない。

我々は*in vitro*において細胞間のHTLV-I感染を阻害する抗HTLV-I中和モノクローナル抗体(LAT-27: rat anti-gp46, IgG1)を樹立しており、本抗体の投与により中和活性を介したウイルス感染の体内伝播の阻止、並びに抗体依存性細胞傷害活性(ADCC)を介したウイルス感染細胞の排除することを目指している。

HTLV-I感染キャリア患者、及びATL/HAM発症患者のいずれの血液中にも抗HTLV-I抗体は確認されるが、しかしながら、その防御効果は十分でないと考えられており、その原因の一つとして、HTLV-I感染細胞上で抗体が認識するHTLV-I抗原の発現が減弱していることが知られている。

本研究では、この点を改善する目的で、LAT-27抗体が持つ感染中和及びADCC活性を最大限引き出す効果を漢方生薬成分に見出すことを目的として検討した。

## ■結果・考察

ATL細胞をIL-2(20U/ml)、10%FCS添加のRPMI1640培地で37度、5% CO<sub>2</sub>環境下で3日間培養を行った。その際に和漢医薬総合研究所所有の生薬ライブラリー120種類を添加して評価を行った。モノクローナル抗体LAT-27の抗原であるエンベロープタンパクであるgp46の細胞表面発現を、さらに、gp46をはじめとするウイルス遺伝子の発現を促進するHTLV-Iのがん蛋白Taxの発現の細胞内染色を行い、フローサイトメトリーで発現量を測定した(図1)。生薬サンプルは最終濃度5μg/mlで細胞増殖に影響の出なかったもの、かつ2種類の由来の異なるATL細胞株で同じ傾向が得られたものを評価対象とした(結果省略)。その結果、生姜、丁子、大黃にgp46, Taxの発現抑制作用が得られた。一方、黄連にはgp46, Taxに対する強い発現増強効果が認められた。これらのことは、これら生薬サンプルがATL細胞内のHTLV-Iプロウイルスの活性化を直接制御していることを示唆している。

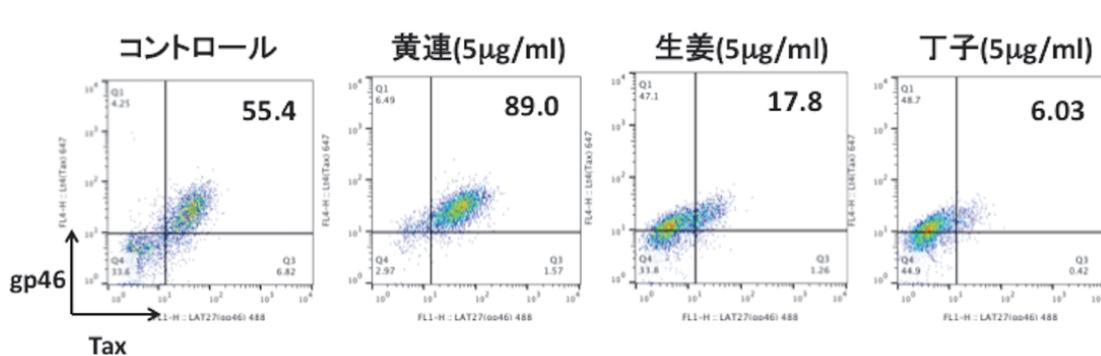


図1 生薬はATL細胞のHTLV-I gp46とTaxの発現を制御する

生薬抽出液を最終濃度5μg/mlでATL細胞の培養に添加し、3日後に細胞表面のgp46と細胞内のTaxの発現をフローサイトメトリーにて解析した。

生薬サンプルがATL細胞内のHTLV-Iプロウイルスの活性化を直接制御していることを示唆していることから、ウイルス粒子産生の指標となるウイルスgagタンパクであるp24の培養上清中への放出をELISAにて確認を行った(図2)。その結果、生姜、丁子は濃度依存的にp24の培養上清中への放出を抑制した。一方、黄連は増強傾向を示した。黄連の最終濃度50 $\mu\text{g/ml}$ での産生抑制は、強い細胞増殖抑制効果によるものと考えられる(結果省略)。

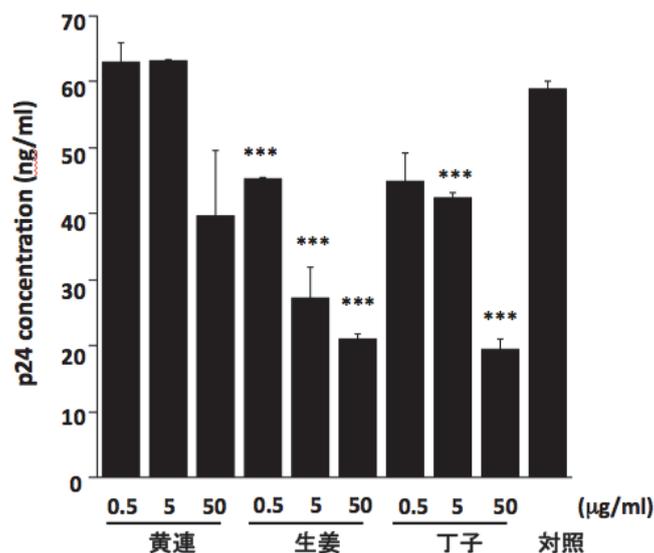


図2 生薬はATL細胞のHTLV-Iプロウイルス活性化を制御する

生薬抽出液を最終濃度5 $\mu\text{g/ml}$ でATL細胞の培養に添加し、2日後の培養上清中のp24の濃度をELISAにて測定した。平均 $\pm$ 標準誤差 (n=3)。

\*\*\*;  $p < 0.001$ (対照)。

HTLV-Iの感染様式は通常のウイルス感染とは異なり、フリーのウイルス粒子が直接正常細胞へ感染するのではなく、感染細胞と非感染細胞同士の接触によると考えられている。その際に使われる表

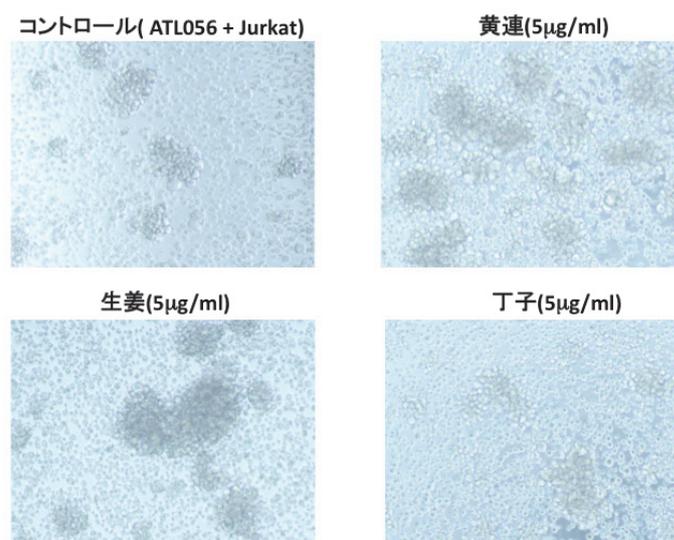


図3 生薬はATL細胞の感染性を制御する

生薬抽出液を最終濃度5 $\mu\text{g/ml}$ で添加し、ATL細胞株と非感染T細胞株Jurkatを1:1の比で1日混合培養し合胞体を形成させた。

面分子の一つがgp46であるため、生薬によってgp46発現が制御されることからATL細胞の感染性にも影響が及んでいるかを検討した。ATL細胞株と非感染T細胞株Jurkatを1:1の比で1日混合培養し合胞体を形成させ、その形成に対する効果を評価した(図3)。その結果、図1においてgp46の発現増強がみられた黄連では、おびただしい数の合胞体形成が見られた。一方、gp46の発現抑制がみられた生姜、丁子では合胞体形成はほとんど確認されなかった。

以上の結果から、生薬抽出液のうち生姜、丁子、大黄(結果省略)にHTLV-Iの活性化抑制効果が得られること、対照的に黄連には強い活性増強効果が得られることが明らかとなった。

HIV-1潜伏感染細胞であるU1細胞に麻黄湯、補中益気湯、十全大補湯、人参養栄湯で、p24発現細胞の増加が認められたという報告(Murakami T *et.al.* Biol Pharm Bull. 2008 Dec;31(12):2334-7.)もあり、レトロウイルスであるHTLV-Iへの生薬成分の直接作用も多岐にわたると考えられる。HTLV-I Taxの発現制御にはNF- $\kappa$ Bが関わっているとの知見(未発表)もあり、Murakamiらの報告とも一致する。HTLV-Iキャリアにはプロウイルス活性化抑制効果の高い生薬成分が有効と考えられるが、治療を視野にいれる場合、HTLV-I感染細胞の抗原性を上げる黄連は、LAT-27抗体の投与による抗体療法や細胞傷害活性に基づく免疫療法を行う際にはむしろ有効な手段となる可能性も秘めている。

## ■結論

これまで、HTLV-I感染細胞に生薬成分が直接作用する報告は殆ど無かった。今回、生姜、丁子、大黄、黄連といった生薬に強いHTLV-Iのプロウイルス活性を制御する作用が明らかとなった。今後はこれらの生薬成分がどのようにしてHTLV-Iプロウイルスの活性化を制御しているかの分子メカニズムを明らかにすることによって、今後の漢方方剤選択における基盤が形成されるものと考えられる。今回の結果から、これらの生薬成分、または生薬成分を含む漢方方剤の*in vivo*での解析をすることに大きな可能性が得られた。