

生薬スクリーニングに基づく、 漢方方剤服用による抗 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 (現 徳島大学大学院医歯学研究部口腔微生物学分野)	准教授 (現 教授)
所外共同研究者	田中 勇悦	琉球大学大学院医学研究科免疫学講座	教授
所内共同研究者	早川 芳弘	病態制御部門病態生化学分野	准教授 (現 教授)

■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、特に急性の 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でも抗 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を行った。昨年度の生薬スクリーニングの結果から、丁子、生姜、大黄に劇的な HTLV-I 活性化抑制効果が得られたことから、HTLV-I 感染阻止効果が得られるかを検討する価値が見いだせた一方、黄連のように LAT-27 のエピトープである gp46 の発現を上昇させる生薬も見いだせた。本年度は、LAT-27 のエピトープである gp46 の発現上昇をもたらす黄連を用いて、LAT-27 を投与する際に十全大補湯、補中益気湯を併用することにより、それぞれマクロファージ活性、および NK 活性を上昇させ、マクロファージによる抗体依存性細胞貪食活性 (ADCP)、および NK 細胞による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効果の増強を検討し、動物実験へ繋ぐ基礎データを収集した。

■結果・考察

ATL 患者由来の HTLV-I 産生 CD4⁺T 細胞株を IL-2(20U/ml)、10%FCS 添加の RPMI1640 培地で 37 度、5% CO₂ 環境下で gp46 の発現上昇をもたらす黄連及び gp46 発現抑制効果のある丁子を最終濃度 5 µg/ml で添加して 3 日間培養を行った。培養 3 日後の ATL 細胞を CFDA-SE (carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester) で染色し、これらの細胞に健常人の末梢血単核球を 1:1 の比率で加えて共培養を行い、さらにヒト化 LAT-27 抗体を加えて培養し、十全大補湯、補中益気湯の添加の有無に

よる ADCC および ADCP 活性を評価した。共培養 1 日後に propidium iodide (PI) を添加し、死細胞の核酸染色を行い、CFSE (CFDA の分解産物) 陽性細胞の PI 陽性率をフローサイトメータにて測定することで細胞傷害率を求めた。(図 1)

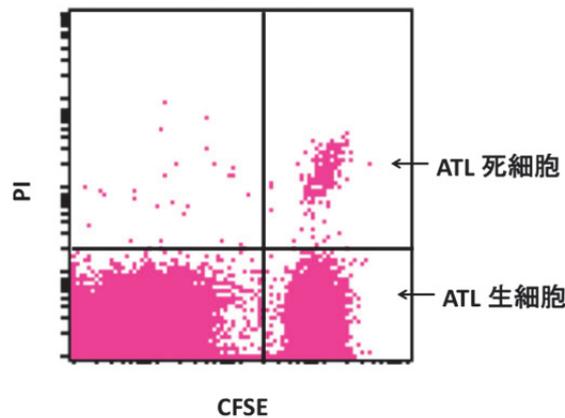


図 1 フローサイトメトリーによる細胞傷害の測定

ATL 細胞を CFDA-SE で染色し、健康人の末梢血単核球を 1:1 の比率で加えて共培養を行った。共培養 1 日後に PI を添加して死細胞の核酸染色を行い、CFSE (CFDA の分解産物) 陽性細胞の PI 陽性率をフローサイトメータにて測定した。

ATL 細胞株にヒト化 LAT-27 抗体を添加し、末梢血単核球を加える際に補中益気湯を加えることにより、補中益気湯の用量に依存して有意な ATL 細胞株の排除の増強が見られた。このことは、定常状態で発現している gp46 に LAT-27 抗体が結合しており、補中益気湯によって活性化した NK 細胞による ADCC 活性が増強したことによると考えられる。また十全大補湯を加えた際にも ATL 細胞株の排除増強が見られたが、十全大補湯の用量には依存していないため、LAT-27 を介したマクロファージによるベースとなる ADCP 活性の可能性もある (図 2)。

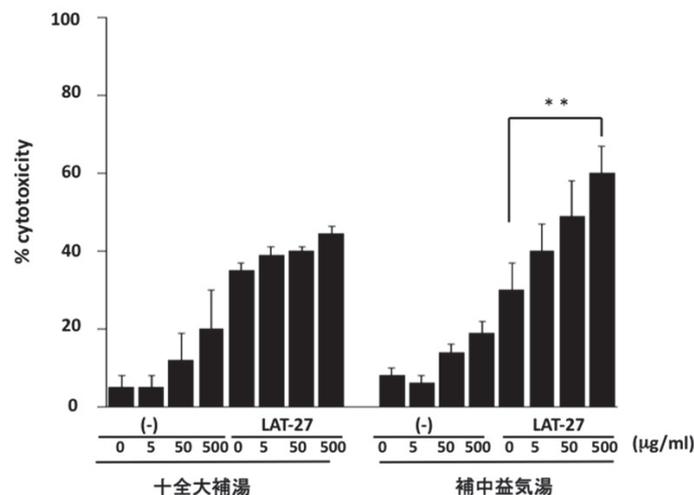


図 2 補中益気湯は定常状態の ATL 細胞に対しても LAT-27 を介した NK 細胞による ADCC 活性を増強させる。

ATL 細胞株にヒト化 LAT-27 抗体を添加し、末梢血単核球を加える際に十全大補湯、および補中益気湯を加えることにより細胞傷害活性を測定した。平均±標準誤差 (n=3). **: p < 0.01.

一方、ATL 細胞株を予めウイルス活性抑制が見られた丁子で 3 日間処理した後では、ATL 細胞株にヒト化 LAT-27 抗体を添加し、末梢血単核球を加える際に十全大補湯、あるいは補中益気湯、を加えても、ATL 細胞株の排除は見られなかった。このことは、定常状態で発現している gp46 が丁子

の作用により減弱することで、ATL 細胞株表面に LAT-27 抗体の結合が起こらなくなり、補中益気湯によって活性化した NK 細胞による ADCC 活性が作用しなかったことよると考えられる。また十全大補湯を加えた際にも活性化したマクロファージによる Fc 受容体を介した ADCP 活性が作用しなかったことよると考えられる (図 3)。

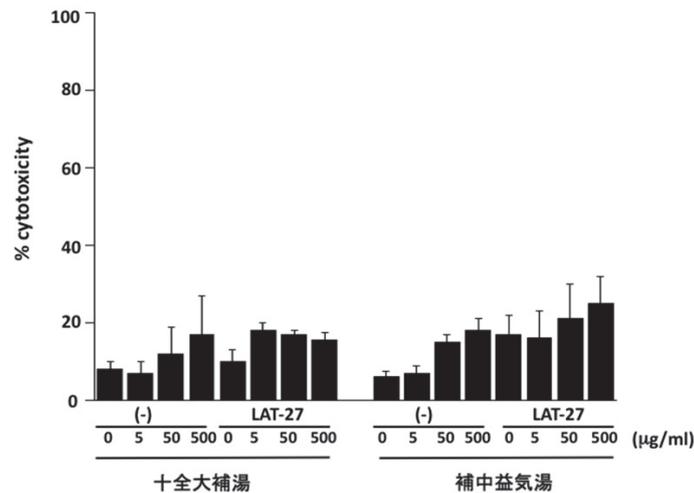


図 3 十全大補湯、補中益気湯共に、丁子で処理された ATL 細胞に対して細胞傷害活性を示さない。
ATL 細胞株にヒト化 LAT-27 抗体を添加し、末梢血単核球を加える際に十全大補湯、および補中益気湯を加えることにより細胞傷害活性を測定した。平均±標準誤差 (n=3). **, p < 0.01.

驚くことに、ATL 細胞株を予めウイルス活性増強が見られた黄連で 3 日間処理した後では、ATL 細胞株にヒト化 LAT-27 抗体を添加し、末梢血単核球を加える際に十全大補湯を加えると、用量依存的に ATL 細胞株の有意な排除の増強がみられた。さらに末梢血単核球を加える際に補中益気湯を加えると、用量依存的に ATL 細胞株の顕著な排除の増強が見られた。これらのことは、定常状態で発現している gp46 が黄連の作用により発現増強することで、ATL 細胞株表面に LAT-27 抗体の結合が増加し、補中益気湯によって活性化した NK 細胞による Fc 受容体を介した ADCC 活性も、十全大補湯によって活性化したマクロファージによる ADCP 活性増強したことよると考えられる (図 4)。

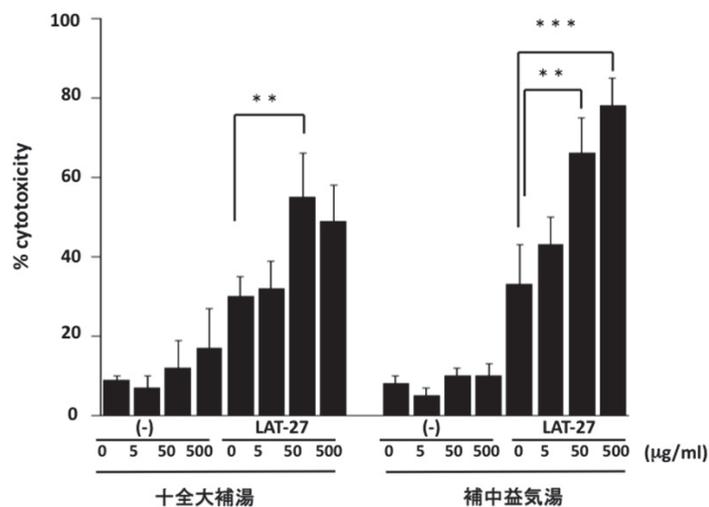


図 4 十全大補湯、補中益気湯共に、黄連で処理された ATL 細胞に対して強い細胞傷害活性を示す。
ATL 細胞株にヒト化 LAT-27 抗体を添加し、末梢血単核球を加える際に十全大補湯、および補中益気湯を加えることにより細胞傷害活性を測定した。平均±標準誤差 (n=3). **, p < 0.01, ***, p < 0.001.

以上の結果より、抗体による HTLV-I 感染細胞への ADCC および ADCP 活性を増強するには、gp46 抗原の発現亢進が決め手であり、一時的に抗原発現量を増強させうる黄連の作用は ATL 細胞排除に有効と考えられた。また、十全大補湯、補中益気湯の ADCC および ADCP 活性の増強は、抗体による HTLV-I 感染制御を助長する漢方方剤として期待される。

丁子等の HTLV-I の活性化抑制効果が得られる生薬は、HTLV-I 感染細胞の gp46 抗原をはじめとするウイルス関連タンパク発現を抑制して、新たな宿主体内でのウイルス感染を抑制する効果は期待できるものの、免疫細胞による感染細胞の排除までも抑制してしまう可能性が強く示唆された。対照的に黄連には強い HTLV-I 感染細胞のウイルス活性増強効果が得られ、宿主体内での新たな感染を増加させる懸念は残るものの、LAT-27 抗体が持つ感染中和及び ADCC 活性を最大限まで高める可能性が示唆された。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、ヒト化 LAT-27 抗体を用いた治療を視野に入れる場合、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を秘めていることが明らかとなった。

■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にしたことで、ヒト化 LAT-27 中和抗体を用いた HTLV-I 感染治療を視野に入れる際に、どのような生薬成分を含む漢方方剤を用いることが最善かを検討する価値が高まった。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。さらに今回の結果から、これらの生薬成分、あるいは生薬成分を含む漢方方剤を組み合わせることで、*in vivo* でのヒト化 LAT-27 抗体を用いた HTLV-I 感染治療モデルへの移行に大きな可能性が有ることが見いだされた。