

図1. HTLV-I *tax* (ATKの7295-8356に相当する部分)の分子系統樹

7897、7959、8208、8344番目がATKと違う *tax* を持つ例 (HAM7, HAM17, HAM20, HAM28, HAM32, HAM38, HAM43, HAM64, HAM66, HAM284, ATL8, ATL10, ATL14, ATL150, ATL272, HC57, HC66, HC70, HC1020, HC1098)は *tax* Aに分類され、そうでないATKと同じ例(代表して21例を表示HAM1, HAM3, HAM4, HAM5, HAM6, HAM8, HAM9, ATL2, ATL4, ATL5, ATL7, ATL9, ATL13, ATL15, HC5, HC7, HC29, HC33, HC40, HC44, HC47)は *tax* Bに分類された。

これまでに full sequence が分かっている LTR での分類でコスモポリタンBに分類されている ATK, ATL-YS, H5 (黒い四角の中に白抜き文字で表示)の *tax* は *tax* Bに分類され、LTR の分類でコスモポリタンAに分類されている Rk13, TSP-1, BOI の *tax* は *tax* Aに分類された。

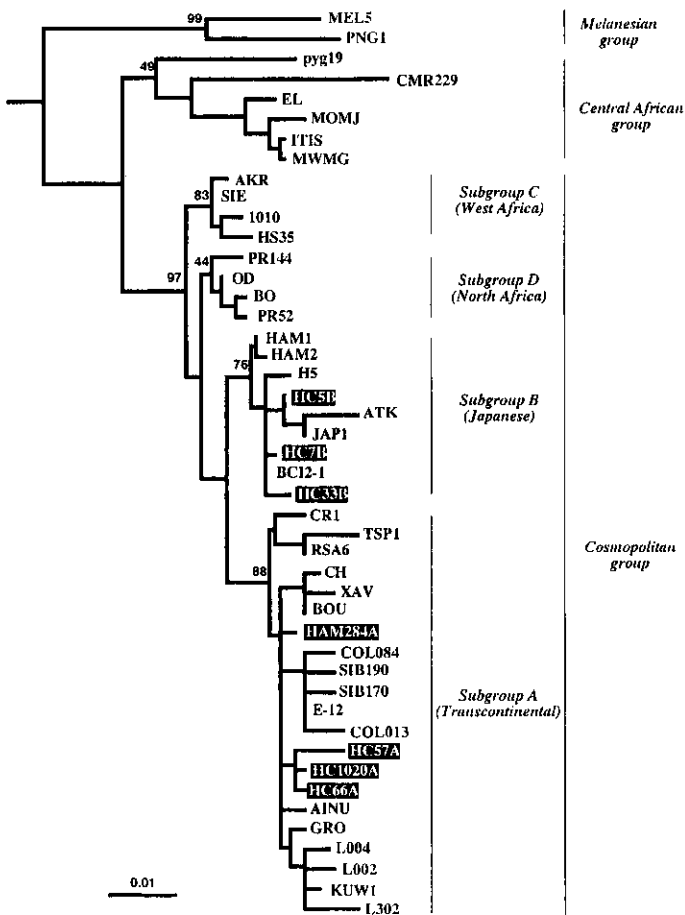


図2. HTLV-I LTR (ATKの144-650に相当する部分)の分子系統樹

これまで既に報告されている sequence に今回我々が *tax* 領域を sequence し、*tax*Aに分類された例 (HAM264A, HC57A, HC1020A, HC66A)の LTR 及び、*tax* Bに分類された例 (HC5B, HC7B, HC33B)の LTR の sequence を加えて、分子系統樹を書いた。

LTR での分類と *tax* での分類には密接な関係があることがわかる。

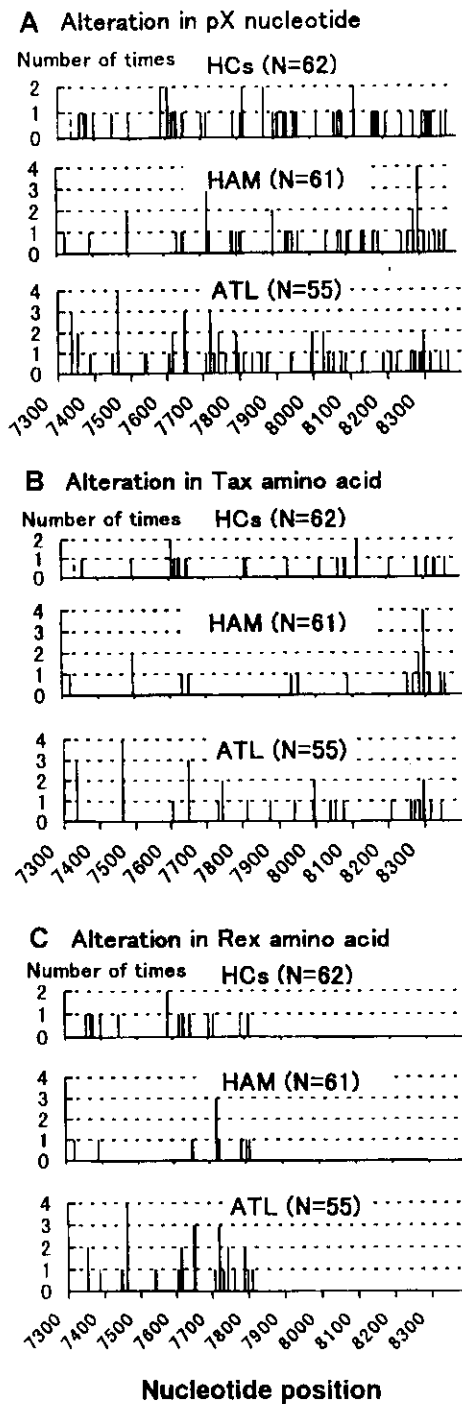


図3. HTLV-I pX塩基置換のまとめ。
 A; 全塩基置換。
 B; Taxアミノ酸に変化をきたす塩基置換。
 C; Rexアミノ酸に変化をきたす塩基置換。
 横軸はHTLV-Iの塩基位置(ATKでの相当位置)。縦軸は出現回数。

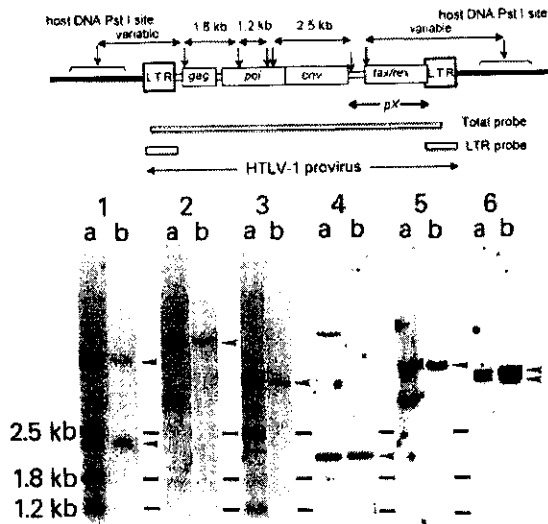


図4. 末梢血リンパ球HTLV-IプロウイルスのDNAプロット解析。
 a. HTLV-I total probeでのプロット解析。
 b. HTLV-I LTR probeでのプロット解析。
 Lane1; 欠損のないATLでのプロットパターン。
 Lane2-6; 欠損プロウイルスを持つATL。

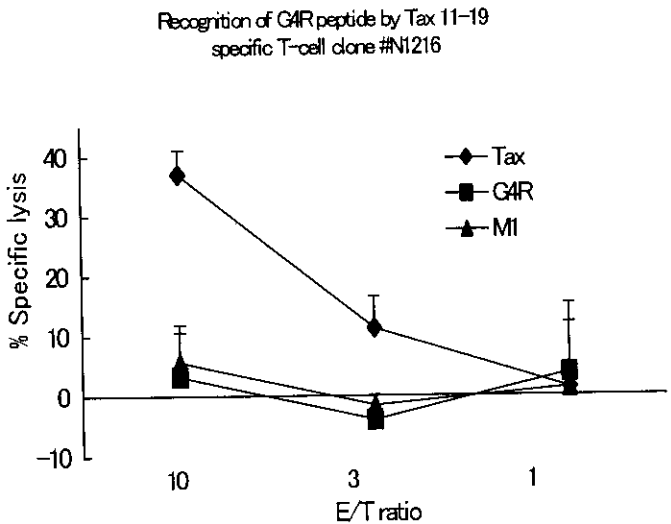


図5. Tax 11-19特異的なCTLによるWild TypeのTax11-19ペプチド(◆)と変異を伴うTax11-19ペプチド(G4R■)の認識の違い。横軸はEffectorとTargetの比を示し、縦軸は特異的な細胞障害を示す。G4RはコントロールのM1ペプチド(▲)同様認識されない。

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

HTLV-I感染者PBMCを用いたTax発現誘導に伴う感染細胞，HTLV-I
特異的CTLの表面抗原，サイトカイン動態の解析

分担研究者 宇宿 功市郎 鹿児島大学医学部・医療情報管理学
研究協力者 齊藤 峰輝，古川 良尚，納 光弘 同 第三内科
出雲 周二 同 難治性ウイルス疾患研・分子病理

研究要旨 HAM/TSP患者，無症候性キャリアーのPBMCを短時間培養することで，Tax蛋白の発現をフローサイトメーターで検出する系を確立した．抗Tax抗体と，各種細胞表面抗原，サイトカインの抗体で多重染色し，系時的にHTLV-I感染細胞，非感染細胞における複数の細胞マーカーの動態を観察した．HAM/TSP患者，無症候性キャリアーのPBMCでは，CD25等の活性化マーカーがTax発現に伴って感染細胞内のみならず，非感染細胞にも誘導された．また，HTLV-I感染細胞はTh1 typeのサイトカインを誘導した．この系を用いることで，HAM/TSP患者において報告されている現象が，Taxの作用によることを個々の細胞レベルで証明することが可能であった．

A. 研究目的

HTLV-Iは，ATLやHAM/TSPの原因ウイルスであるが，特にHTLV-Iに特異的な転写活性化因子Taxは，転写因子をはじめとする様々な細胞性因子と相互作用することによって，宿主細胞遺伝子の転写活性化だけでなく，転写の抑制や細胞周期調節など多面的に作用し，細胞のがん化や炎症反応の形成に寄与していることが推定され，ATLやHAM/TSPの発症に密接に関与しているものと考えられている¹⁾．しかし，実際のHTLV-I感染者の生体内ではウイルスの発現が抑制されているため，培養細胞系を用いて明らかにされた様々な現象が実際にin vivoで起こっているかどうかを検証することは容易ではない．すなわち，Tax蛋白の発現と，それに伴う細胞性因子の発現を同時に，また系時的に検出可能な系があれば，培養細胞系

を用いて明らかにされてきた様々な現象について，実際の感染者から得られた臨床検体を用いて直接解析することが可能となる．よって，報告されているTaxの各種細胞性因子に対する効果を，例えばATL，HAM/TSP患者と無症候性キャリアーとで直接比較する等の検討により，HTLV-I関連疾患の病態形成に関するきわめて有用な情報が得られるものと期待される．そこで今回我々は，HTLV-I感染者の末梢血リンパ球を短時間培養することでTaxの発現をフローサイトメーターで検出する系を確立し，この系を用いてex vivoにおけるTaxの誘導に伴う細胞性因子の動態を解析した．

B. 研究対象・方法

3例のHAM/TSP患者，2例の無症候性HTLV-Iキャリアー及び1例の非感染者コントロールの末梢血

より分離したリンパ球 (PBMC) を用いて以下の実験を行った。

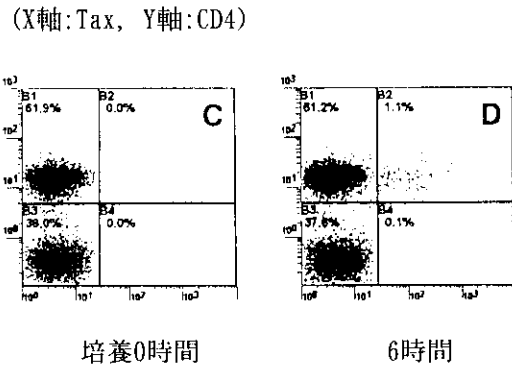
1. リンパ球を, RPMI1640-10%FCSで6時間培養後, 2%Paraformaldehydeを用いて室温で20分間固定した。
 2. 洗浄後, 各種細胞表面マーカーの抗体で染色した。
 3. 洗浄後, 0.1% のTriton X-100を含んだPBSに suspendし, 室温で10分間細胞膜表面を処理した。
 4. 洗浄後, 抗Tax monoclonal抗体Lt-4およびFITCラベルした2次抗体で細胞内Tax蛋白を染色した。また, 各種細胞内サイトカインの抗体で染色した。
 5. 洗浄後, フローサイトメーターで解析した。
- 今回, 細胞表面マーカーは, T細胞活性化マーカーであるCD25, CD69, CD71について, 細胞内サイトカインは, Th1 type サイトカインはIFN- γ 及びTNF- α , Th2 typeサイトカインはIL-4について検討した。

C. 研究結果

1. HTLV-I感染者のPBMCを短時間培養することによって, Tax蛋白の発現をフローサイトメーターで検出することが可能であった(図1)。このTaxの発現は, 培養開始後6時間でピークとなり, 以後時間とともに減少し, 48時間後には検出されなかった。また, RT-PCRによりmRNAの発現も同様の変化をすることを確認した (data not shown)。
2. この系を用いて, Tax発現誘導に伴う各種細胞活性化マーカーの動態を検討した。CD25, CD69, CD71の3種の活性化マーカーがTax発現に伴って感染細胞内に誘導されるのみならず, 非感染細胞にも誘導された (図2)。
3. Tax発現誘導に伴う各種細胞内サイトカインの動態を検討した。IFN- γ がTax発現後, Tax発現細胞内に誘導されることを直接示すこと

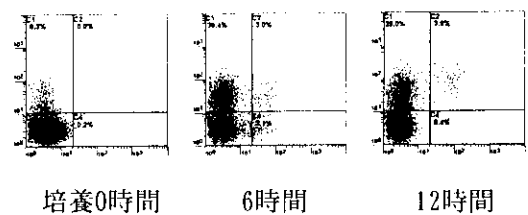
ができた (図3)。TNF- α も同様の発現動態を示したが, Th2 typeのサイトカインであるIL-4はTax発現細胞内には誘導されなかった (data not shown)。

図1. フローサイトメーターによるTax蛋白の検出



6時間の培養後, 一部のCD4陽性細胞にTax蛋白の発現が認められる。

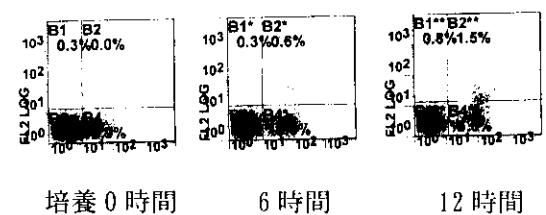
図2. Tax発現に伴う細胞活性化マーカーの発現誘導 (X軸:Tax, Y軸:CD69)



CD25, CD71も同様の発現パターンを示した。

図3. Tax発現に伴う細胞内サイトカインの発現誘導

X軸:Tax, Y軸:IFN- γ



D. 考察

HTLV-IはHAM/TSPおよびATLの原因遺伝子であり、これまでのin vitroの実験系を用いた解析から、HTLV-Iにコードされる特異的な転写制御因子Taxが、炎症反応や、細胞がん化の鍵をにぎる遺伝子産物であることが明らかになっている¹⁾。通常、ヒトの疾患においては、発症後の結果を解析することはできても、発症までさかのぼって解析することは困難であるため、ウイルス感染という原因が明らかなHTLV-I感染症は、ヒトの自己免疫性炎症性疾患や、がんの研究のモデルとして適している。今回われわれが報告した実験系は、HTLV-I Taxと各種細胞性因子を個々の細胞レベルで同時に、また簡便に検出できるため、今後多数の症例において過去に報告された事実を網羅的に解析することが可能であり、非常に有用である。

実際に、図1に示すように、6時間の培養後にTax蛋白の発現をHTLV-Iのhost cellであるCD4細胞内に確認することができた。また、Tax蛋白の発現に伴ってCD25（低親和性IL-2レセプター）、CD69、CD71（トランスフェリンレセプター）といったT細胞活性化因子が、Tax発現細胞内に発現誘導されることが直接示された。これらの活性化因子の出現頻度はHTLV-I感染者において非感染者コントロールより明らかに高く、とくにHAM/TSP患者において最大であった（data not shown）。このことは、過去に報告されたHAM/TSP患者におけるいわゆるspontaneous proliferation^{2) 3)}を反映しているものと考えられる。

一方、細胞内サイトカインとの二重染色のデータからは、Tax蛋白発現細胞自身がTh1 typeのサイトカインを産生することが直接証明された。このことも、過去に報告された、

HAM/TSP患者ではCD4+ T cellにおけるIFN- γ 陽性細胞とIL-4陽性細胞の比（IFN- γ IL-4 ratio）が高く、免疫状態がTh1優位になっているとの所見⁴⁾と矛盾しない。今回の我々の結果は、さらにこのHAM/TSPにおけるTh1優位な免疫状態が、TaxによるTh1 type サイトカインの発現誘導を通じてもたらされる、つまりHTLV-I感染による直接の効果である可能性を示している。

E. 結論

HAM/TSP患者、無症候性キャリアーのPBMCを短時間培養することで、Tax蛋白の発現をフローサイトメーターで検出する系を確立した。この系を用いることで、HAM/TSP患者において報告されている現象が、Taxの作用によることを個々の細胞レベルで証明することが可能であった。今後も、今回確立した実験系を用いて細胞内HTLV-I Tax発現と各種細胞表面抗原・サイトカインの発現動態を詳細に解析する事で、HTLV-I感染からHAM/TSP発症にいたる経過の解明、病態進行の抑制、新治療法開発に向けた研究が推進できるものとする。

文 献

- 1) Yoshida M: Multiple targets of HTLV-I for dysregulation of host cells. *Seminars in Virology* 7: 349-360, 1996.
- 2) Eiraku N et al: Cell surface phenotype of in vitro proliferation lymphocytes in HTLV-I associated myelopathy (HAM/TSP). *J Neuroimmunol* 37: 223-228, 1992
- 3) Itoyama Y et al: Spontaneous proliferation of peripheral blood lymphocytes increased in patients with HTLV-I associated myelopathy.

Neurology 38: 1302-1307, 1988.

4) Horiuchi I et al: Th1 dominance in HAM/TSP and the optico-spinal form of multiple sclerosis versus Th2 dominance in mite antigen-specific IgE myelitis.

J Neurol Sci 172: 17-24, 2000.

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Furukawa Y, Yamashita M, Usuku K, Izumo S, Nakagawa M, Osame M: Phylogenetic subgroups of human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) in the *tax* gene and their association with different risks for HTLV-I-associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis.

J Infect Dis 182(5): 1343-49, 2000

2) Matsuzaki T, Nakagawa M, Nagai M, Nobuhara Y, Usuku K, Higuchi I, Takahashi K, Moritoyo T, Arimura K, Izumo S, Akiba S, Osame M: HTLV-I-associated myelopathy (HAM)/tropical spastic paraparesis (TSP) with amyotrophic lateral sclerosis-like manifestations.

J Neurovirol 6(6): 544-548, 2000

3) Jeffery KJ, Siddiqui AA, Bunce M, Lloyd AL, Vine AM, Witkover AD, Izumo S, Usuku K, Welsh KI, Osame M, Bangham CR: The influence of HLA class I alleles and heterozygosity on the outcome of human T cell lymphotropic virus type I infection.

J Immunol 165(12):7278-84, 2000

4) Saito M, Taylor GP, Saito A, Furukawa Y, Usuku K, Weber JN, Osame M, Bangham CR: In vivo selection of T-cell receptor junctional region sequences by HLA-A2 human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax11-19 peptide complexes. J Virol 75(2):1065-71, 2001

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

「HIV等のレトロウイルスによる痴呆や神経障害の病態と治療に関する研究」

—平成12年度班会議プログラム—

日時： 平成13年1月11日（木） 13:00～17:10

場所： 鹿児島大学医学部鶴陵会館 小会議室

（鹿児島大学医学部構内 TEL：099-275-6881）

あいさつ 班員紹介 13:00～13:10

1) 納 光弘（鹿児島大 3内科）13:10～13:35

HAMとATLの発症に関連したHTLV-I taxの変異

2) 宇宿功市郎（鹿児島大 医療情報）13:35～14:00

HTLV-I感染者PBMCを用いたTax発現誘導に伴う感染細胞、HTLV-I特異的CTLの表面抗原、サイトカイン動態の解析

3) 出雲周二（鹿児島大 難治研分子病理）14:00～14:25

HAM研究からみたエイズ脳症の病態機序

4) 岸田修二（都立駒込病院 内科）14:25～14:50

抗ウイルス療法による髄液HIV RNA量の検討、AIDS関連PMLの病巣拡大とウイルス変異

5) 木戸 博（徳島大 分子酵素研）14:50～15:15

HIV感染に伴う中枢神経障害の程度と脳脊髄液中の14-3-3蛋白質についての考察

————— 休 憩 —————

6) 斉藤邦明（岐阜大 臨床検査）15:30～15:55

エイズ痴呆におよぼす炎症性サイトカインの影響

—サイトカイン遺伝子欠損動物を用いた解析—

7) 高宗暢暁（熊本大 薬学部）15:55～16:20

細胞外Tatの機能抑制によるHIV脳症の克服

8) 馬場昌範（鹿児島大 難治研ヒトレトロ）16:20～16:45

HIV-1感染による中枢神経障害に対する予防・治療薬の探索

9) 田平 武（国立精神・神経センター 疾病第6部）16:45～17:10

ウイルスの持続感染と神経障害に関する研究

「HIV等のレトロウイルスによる痴呆や神経障害の病態と治療に関する研究」研究班」

班長 出雲 周二

（鹿児島大学難治ウイルス研 分子病理・遺伝子疫学）TEL 099-275-5940