

厚生科学研究費補助金

脳科学研究事業

平成13年度研究報告書

研究課題:

成人T細胞白血病ウイルス関連ミエロパチーの  
病態の解明及び治療法の開発に関する研究

平成14年3月

主任研究者 納 光弘

(鹿児島大学医学部 内科学第三講座 教授)

## 厚生科学研究費補助金研究報告書概要

研究費の名称:厚生科学研究費

研究事業名:脳科学研究事業

研究課題名: 成人T細胞白血病ウィルス関連ミエロパチーの病態の解明及び

治療法の開発に関する研究

H13-36

国庫補助金精算所要額(円): 30,000,000 円

研究期間:2001年～2003年

研究年度:2001年度

主任研究者: 納 光弘 鹿児島大学医学部 内科学第三講座 教授

分担研究者: 吉木 敬 北海道大学 教授

木曾良明 京都薬科大学 教授

足立良昭 徳島大学 教授

中村龍文 長崎大学 助教授

中川正法 鹿児島大学 講師

宇宿功市郎 鹿児島大学 助教授

## 目 次

### 総括研究報告書

成人T細胞白血病ウイルス関連ミエロパチーの病態の解明及び治療法の開発に関する研究

主任研究者： 鹿児島大学医学部 内科学第三講座 納 光弘……………ページ2

### 分担研究報告書

#### 1. HAM418 例の予後調査

鹿児島大学医学部 内科学第三 中川正法、他……………ページ 9

#### 2. HAM の発症機序:HAM と ATL の発症と関連した HTLV-I tax の変異

鹿児島大学医学部 内科学第三 納 光弘、他……………ページ11

#### 3. HAM 発症関連宿主要因とHTLV-I ウイルス量との相関について

鹿児島大学医学部医療情報管理学 宇宿功市郎、他……………ページ18

#### 4. 接着分子を介しての HTLV-I 発現亢進の検討

長崎大学大学院医学研究科 中村龍文、他……………ページ22

#### 5. 疾患発症モデルの作成、解析とそれを用いた治療実験

北海道大学医学部 吉木 敬、他……………ページ23

#### 6. HTLV-I 感染価及び HTLV-I 複製阻害剤評価システムの研究

徳島大学医学部ウイルス学 足立昭夫、他……………ページ26

#### 7. HTLV-I プロテアーゼ阻害剤の分子設計・合成に関する研究

京都薬科大学 木曾良明、他……………ページ29

#### 8. 研究成果の刊行に関する一覧表

……………ページ33

# 総括研究報告書

## 厚生科学研究費補助金(脳科学研究事業)

### 総括研究報告書

研究課題名:成人T細胞白血病ウイルス関連マイクロパチーの病態の解明及び治療法の開発に関する研究

主任研究者: 納 光弘 鹿児島大学医学部 内科学第三講座 教授

分担研究者:北海道大学教授 吉木 敬  
京都薬科大学教授 木曾良明  
徳島大学教授 足立昭夫  
長崎大学助教授 中村龍文  
鹿児島大学講師 中川正法  
鹿児島大学助教授 宇宿功市郎

を的確に制御することが極めて有効であることがわかってきている。本研究ではこれまでのこのような知見を踏まえて、これまでになかった新たな HTLV-I ウイルス増殖の制御を行いうる薬剤の開発を第一の目標に掲げ、さらにこの薬剤の有効性を実験室的、動物実験的、臨床的に検証するためのシステム構築、運用、運用のための基礎データの収集を行うことを目的としている。

#### A. 研究目的

HAM はその発見、即ちレトロウイルスの1つである HTLV-I ウイルス感染により引き起こされる慢性の炎症性脊髄疾患であると判明してから 15 年が過ぎ、病態の解明ならびに治療法の開発とかなりの面で研究が進んできている。またこのウイルスはもう1つ重要な疾患、成人T細胞性白血病、を起こすことが知られており、何故同じウイルスが2つの病気を起こすのかは大きな謎であり、かつ両疾患ともに難治であるが故にその治療、発症予測、予防をおこなうことは緊急の課題と考えられる。この一環として HTLV-I ウイルスの感染様式の解明の後には、感染防止のための試みも行われてきている。その中でも中心的な対策は母児間の感染を防止するものであるが、この対策が開始されたのは約10年ほど前であり現在中学生以下はその対策の恩恵を受けているが、それ以上の年代では未だに感染未発症者は数多く存在し、感染者の多い地域では重要な公衆衛生上の問題となっている。即ち発症予防の対策が不十分となっている感染者集団が示だに数多く、おおよそ数百万人単位で存在するものと考えられ、HAM、ATL とともに未だに毎年新たな患者が発生しており、これまで以上に有効な治療法の開発が待たれている。本研究以前の研究から、HAM の発症を遅らせ、より有効に治療を継続していくには感染個体内の HTLV-I ウイルス量

#### B. 研究方法及び成果

##### 1)HAM の臨床経過の検討

納は、東、中川らとともに HAM 症例 418 例の経過、ならびに HTLV-I ウイルス量の変動を解析することから、HAM は緩徐進行性の疾患であるが、悪性腫瘍等の重篤な合併症も比較的高率であるために定期的な経過観察が必要なことを明らかにし、HTLV-I ウイルス量の軽減が長期予後をよくしていくことに重要であることを示した。また HAM 患者さん方のアンケート調査から、患者情報と HAM の病態解明の到達点を踏まえて、HAM 患者ケアのための指針の作成が必要なことを明らかとした。今後の HAM 患者さん方の療養環境の整備に資する情報と考えている。

##### 2)HAM 発症と HTLV-I の関連(ウイルス要因)

納は、古川らとともに HAM、ATL 発症のすべてではないが何らかの形でこれらに関係する HTLV-I ウイルスの変異を見出している。特に HAM で今回観察された HTLV-I tax のタイプわけは、HAM 発症の危険率の上昇、低下に関係しており極めて興味を持たれた。今回の研究のポイントは typeA が HAM 発

症により関係していることを明らかにしたことであるが、これは鹿児島であるからこそ解明できた点をまず強調しておきたい。従来、HTLV-I ウイルスはその両端のLTRの塩基配列から大きく分けて4種類すなわちA、B、C、Dに分類されておりかつ地域ごとに浸淫しているウイルスタイプが異なっていることが判明していた。しかしながら同一地域で2種類のウイルスタイプが浸淫している地域はあまりなく、ウイルスの亜型すなわちタイプわけと病態の発症の関連を詳しく解析することは可能ではなかった。鹿児島地域ではこれまでもHTLV-IのA型とB型の浸淫地域であることが知られており、今回のHTLV-I taxタイプ分類とHAM発症の関連を精査するのに最適の場所であったと思われる。またATL発症に関連する変異では、ある段階まで経るとHTLV-Iを発現しないまたはエピトープに変異があるほうがATLの発症に都合がよい症例が存在することを明らかにした。これはATL発症の過程を推論する際の重要な一ステップを示しているものと考えている。

### 3)HAM発症とHTLV-Iの関連(宿主要因)

宇宿らは、これまでの宿主要因の解析をHTLV-Iウイルス量から更なる検討を加え、HAMとHTLV-Iキャリアを区別できるHTLV-Iウイルス量を明らかにした。これは各ウイルス量でのHAM、HTLV-Iキャリアの数を数え、その量での感度、特異度を算出し、ROC曲線を描きcut off値を決めている。末梢血リンパ球の2%でHAMとHTLV-Iキャリアを感度、特異度共に80%以上で判別できることを明らかとしている。更にこの値を使ってHAM群とHTLV-Iキャリア群共に高ウイルス量と低ウイルス量の群に分け、宿主要因のHAM発症影響を検討している。HLA-A\*02、DRB1\*0101は低ウイルス量群でHAMの発症抑制または促進に関連していることHLA-B\*54は、高ウイルス量群でHAM発症により関係することを示した。更に多変量解析の技術を用いた検討からは、HAMとHTLV-Iキャリアを80%の確率で区別しうる方法を樹立している。今後より精度の高い判別方法を開発し、HAM発症の予測、発症予防を行いうる治療的介

入への道筋をつけられるものと期待されている。

### 4)HAM発症とHTLV-Iの関連(接着因子の検討)

中村らは、HAM発症の過程で患者末梢血中のHTLV-I感染CD4細胞が血管内皮細胞への接着、浸潤する際にHTLV-Iそのものの発現亢進が起きるのではないかと考え、その過程で重要な役割を果たすCD44分子の役割について検討を加えている。CD44分子のクロスリンクでHTLV-Iの発現亢進が起きることを確認し、HAM患者での高HTLV-Iウイルス量の一因を担っているものとしている。

### 5)疾患発症モデルの作成、解析とそれを用いた治療実験

吉木らは、HAMの病態解明や治療実験を目的に、以前から取り組んでいるHTLV-I感染脊髄症発症ラットモデルでの疾患発症機構の解析を行い、疾患発症には感染初期の脊髄局所に特異的なウイルスの増殖とウイルス遺伝子特にpX遺伝子の発現がその後の髄鞘形成細胞傷害を誘導し、脊髄症を発症させることを明らかにした。その中でHTLV-I感染によるWKAH系ラット脊髄傷害機構としては、1)感染後3ヶ月頃から脊髄での感染細胞が確認され、2)その後7ヶ月をピークに脊髄に限ってウイルスの増殖とそれに伴うpX発現増強が起こる、このpXの発現はその後TNF- $\alpha$ の発現を増加させ、3)この感染後7から12ヶ月にかけてオリゴデンドロサイトのbcl-2の発現が抑制され、TNF- $\alpha$ に対する感受性が増加し、オリゴデンドロサイトのアポトーシスが誘導される、4)このアポトーシスは髄鞘の破壊を招き、その処理にミクログリアが活性化、増殖する、5)これがさらに髄鞘の破壊を促進し、感染15ヶ月以降から脊髄症を発症し始める。したがって、脊髄症発症の引き金となるのは感染後7ヶ月の脊髄局所でのウイルスの増殖にあることを明らかにしている。更によりヒトに近い状態での感染モデル作製のために、HTLV-Iの発現に深く関与するヒトCRM1(Chromosomal Region Maintenance 1)遺伝子導入ラットの作製を行っている。

## 6) HTLV-I 感染価評価システム

足立らは、感染価を迅速に定量するシステムがないため、HTLV-1 のウイルス学的解析は極めて困難である状況を打破するために、本研究で HTLV-1 の迅速感染価定量システムの確立を目指している。今年度は、K30LTR-Luc を Tax 発現ベクター pCG-Tax(X/B)とともに 293T 細胞に導入すると約 50 倍のルシフェラーゼの発現増強が認められること、K30LTR-Luc を neo 遺伝子発現ベクター pRVSVneo とともに H9 細胞に導入し G418 耐性の 6 細胞クローンを得た (H9/K30-Luc1 から H9/K30-Luc6 まで) こと、H9/K30-Luc1、2、5 は MT2 細胞由来のウイルスに感染させるとルシフェラーゼ産生量が有意に増加することを明らかにし、特に H9/K30-Luc1 はルシフェラーゼ量が数 10 万 RLU (Relative Light Unit)、H9/K30-Luc1 と MT2 細胞を co-culture するとルシフェラーゼ産生量の増加が 2000 万 RLU 以上に達することを示した。以上のように本年度の研究で HTLV-1 感染価の迅速測定法がほぼ完成し、特に cell-free virus のアッセイが可能となった。このことは大変重要であり、今後このシステムと MT2 細胞等のウイルス産生細胞を用いてプロテアーゼ阻害剤の効果の検証を行なうことが可能となっている。

## 7) HTLV-I プロテアーゼ阻害剤の開発

木曾らは、HTLV-I 阻害薬を目指して、HTLV-I プロテアーゼ(PR)を阻害する薬物の創製を試み、初年度として組換え型および化学合成 HTLV-I プロテアーゼを調製することに成功、次いで、本プロテアーゼを用いた HTLV-I PR 阻害剤の *in vitro* 評価系を確立している。具体的には、大腸菌発現系を用いて組換え HTLV-I PR を発現させ、そこから酵素活性を有するプロテアーゼを調製後、本プロテアーゼと合成基質を用いた HTLV-I PR 阻害活性測定法を確立し、更にこれを用い HTLV-I

PR 阻害剤開発に必要なリード化合物の探索のため、基質遷移状態アナログに基づいて開発された HIV-1 PR 阻害剤の HTLV-I PR 阻害活性を測定したのである。確立できた阻害活性アッセイ系は阻害剤を開発するために、十分なシステムであると考えている。加えて、木曾らの研究室で開発した 5 種類の HIV-1 プロテアーゼ阻害剤の HTLV-I PR 阻害能を調べ、KNI-727 に顕著な阻害活性が見られたことをしめしている。また HTLV-I PR 阻害剤の開発では標準的な HTLV-I PR が必要であるが、このためにケミカルライゲーション法を用いて酵素活性を有する HTLV-I PR の化学合成を試みている。これは HTLV-I PR はアミノ酸 125 残基よりなるアスパラギン酸プロテアーゼであり、ホモダイマーを形成して酵素活性を発現するのであるが、このサイズのタンパク質は通常の固相ペプチド合成法にて合成した場合、高純度の目的物を得ることは困難であるためとしている。この方法はタンパクを二つのセグメントに分割しそれぞれ別々に合成を行い、アミノ酸側鎖官能基が存在する中、化学的に選択的な反応を用いて二つのペプチドセグメントを結合させる方法となっている。この研究からは、HTLV-I PR 誘導体の合成に成功し、透析法によりフォールディングを行うことで、合成基質 APQVL\*NphVMHPL の切断活性を示したとしている。

## C. 考察

HAM の病態の解明と共に、HAM の発症を予防し、発症後の予後を改善するためには HTLV-I ウイルス量を制御することが極めて重要であることがわかってきている。今年度の研究では、臨床的側面からの解析でこれまで以上にきめ細かに HAM 症例を経過観察することの必要性、HTLV-I ウイルスそのものにも HAM 発症に関連する部位が存在すること、HAM 関連宿主要因がより複雑に HAM 発症に関連していること、接着分子の機能亢進そのものが HTLV-I ウイルス発現を引き起こしていること、HAM 疾患モデルでの発症機序の詳細がより明らかになっ

たこと、HTLV-I ウイルス感染価を評価するシステムが出来上がったこと、HTLV-I プロテアーゼ阻害剤開発が開始できたことが報告され、次年度以降の研究への展開ができたと考えている。

#### D. 結論

HTLV-I ウイルス量制御のための新しい薬剤の開発が可能となり、そのためのウイルス感染価評価システムを構築し、さらには投与実験を行うための実験動物システムの基盤となる動物モデルの開発を行った。また臨床情報の解析を行うシステムを再整備し、また発症予防・発症予測に繋がる解析を行い、感染個体内でのウイルスの変異を明らかにすること、ウイルス発現増強の要因を明らかにすることで、開発された薬剤の効果発現を説明する基盤を整備した。

#### E. 研究発表(誌上発表のみ掲載)

1. Matsuzaki T, Nakagawa M, Nagai M, Usuku K, Higuchi I, Arimura K, Kubota H, Izumo S, Akiba S, Osame M. HTLV-I proviral load correlates with progression of motor disability in HAM/TSP: analysis of 239 HAM/TSP patients including 64 patients followed up for 10 years. *J Neurovirol.* 2001 7(3):228-34.
2. Wodarz D, Hall SE, Usuku K, Osame M, Ogg GS, McMichael AJ, Nowak MA, Bangham CR. Cytotoxic T-cell abundance and virus load in human immunodeficiency virus type 1 and human T-cell leukaemia virus type 1. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 2001 268(1473):1215-21.
3. Furukawa Y, Kubota R, Tara M, Izumo S, Osame M. Existence of escape mutant in HTLV-I tax during the development of adult T-cell leukemia. *Blood.* 2001 97(4):987-93.
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.* 2001 75(2):1065-71.
5. Furukawa Y, Yamashita M, Usuku K, Izumo S, Nakagawa M, Osame M. Phylogenetic subgroups of human T cell lymphotropic virus (HTLV) type I in the tax gene and their association with different risks for HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis.* 2000 182(5):1343-9.
6. Furukawa Y, Bangham CR, Taylor GP, Weber JN, Osame M. Frequent reversible membrane damage in peripheral blood B cells in human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Clin Exp Immunol.* 2000 120(2):307-16.
7. Hamasaki S, Nakamura T, Furuya T, Kawakami A, Ichinose K, Nakashima T, Nishiura Y, Shirabe S, Eguchi K. Resistance of CD4-positive T lymphocytes to etoposide-induced apoptosis mediated by upregulation of Bcl-xL expression in patients with HTLV-I-associated myelopathy. *J Neuroimmunol.* 2001 117(1-2):143-8.
8. Nakamura T. Immunopathogenesis of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Ann Med.* 2000 32(9):600-7.
9. Nakamura H, Kawakami A, Yamasaki S, Nakashima T, Kamachi M, Migita K, Kawabe Y, Nakamura T, Koji T, Hayashi Y, Eguchi K. Expression and function of X chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein in Sjogren's syndrome. *Lab Invest.*



- 2000 80(9):1421-7.
10. Nakane S, Shirabe S, Moriuchi R, Mizokami A, Furuya T, Nishiura Y, Okazaki S, Yoshizuka N, Suzuki Y, Nakamura T, Katamine S, Gojobori T, Eguchi K. Comparative molecular analysis of HTLV-I proviral DNA in HTLV-I infected members of a family with a discordant HTLV-I-associated myelopathy in monozygotic twins. *J Neurovirol.* 2000 6(4):275-83.
  11. Nakamura T, Furuya T, Nishiura Y, Ichinose K, Shirabe S, Eguchi K. Importance of immune deviation toward Th1 in the early immunopathogenesis of human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy. *Med Hypotheses.* 2000 54(5):777-82.
  12. Sugaya T, Ishizu A, Ikeda H, Nakamaru Y, Fugo K, Higuchi M, Yamazaki H, Imai K, Yoshiki T. Clonotypic analysis of T cells accumulating at arthritic lesions in HTLV-I env-pX transgenic rats. *Exp Mol Pathol.* 2002 72(1):56-61.
  13. Nakamaru Y, Ishizu A, Ikeda H, Sugaya T, Fugo K, Higuchi M, Yamazaki H, Yoshiki T. Immunological hyperresponsiveness in HTLV-I LTR-env-pX transgenic rats: a prototype animal model for collagen vascular and HTLV-I-related inflammatory diseases. *Pathobiology.* 2001 69(1):11-8.
  14. Kannagi M, Ohashi T, Hanabuchi S, Kato H, Koya Y, Hasegawa A, Masuda T, Yoshiki T. Immunological aspects of rat models of HTLV type I-infected T lymphoproliferative disease. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2000 16(16):1737-40.
  15. Ohya O, Ikeda H, Tomaru U, Yamashita I, Kasai T, Morita K, Wakisaka A, Yoshiki T. Human T-lymphocyte virus type I (HTLV-I)-induced myeloneuropathy in rats: oligodendrocytes undergo apoptosis in the presence of HTLV-I. *APMIS.* 2000 108(6):459-66.
  16. Jiang X, Ikeda H, Tomaru U, Morita K, Tanaka Y, Yoshiki T. A rat model for human T lymphocyte virus type I-associated myeloneuropathy. down-regulation of bcl-2 expression and increase in sensitivity to TNF-alpha of the spinal oligodendrocytes. *J Neuroimmunol.* 2000 106(1-2):105-13.
  17. Adachi A, Miyaura M, Sakurai A, Yoshida A, Koyama AH, Fujita M. Growth characteristics of SHIV without the vpu gene. *Int J Mol Med.* 2001 8(6):641-4.
  18. Fujita M, Sakurai A, Doi N, Miyaura M, Yoshida A, Sakai K, Adachi A. Analysis of the cell-dependent replication potentials of human immunodeficiency virus type 1 vif mutants. *Microbes Infect.* 2001 3(13):1093-9.
  19. Akari H, Bour S, Kao S, Adachi A, Strebel K. The human immunodeficiency virus type 1 accessory protein Vpu induces apoptosis by suppressing the nuclear factor kappaB-dependent expression of antiapoptotic factors. *J Exp Med.* 2001 194(9):1299-311.
  20. Fujita M, Yoshida A, Miyaura M, Sakurai A, Akari H, Koyama AH, Adachi A. Cyclophilin A-independent replication of a human immunodeficiency virus type 1 isolate carrying a small portion of the simian immunodeficiency virus SIV(MAC) gag capsid region. *J Virol.* 2001 75(21):10527-31.
  21. Isaka Y, Miki S, Kawauchi S, Suyama A, Sugimoto H, Adachi A, Miura T, Hayami M, Yoshie O, Fujiwara T, Sato A. A single amino acid change at Leu-188 in the

reverse transcriptase of HIV-2 and SIV renders them sensitive to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Arch Virol.* 2001;146(4):743-55.

22. Doi M, Ishida T, Katsuya Y, Sasaki M, Taniguchi T, Hasegawa H, Mimoto T, Kiso Y. KNI-272, a highly selective and potent peptidic HIV protease inhibitor. *Acta Crystallogr C.* 2001 57(Pt 11):1333-5.
23. Song M, Rajesh S, Hayashi Y, Kiso Y. Design and synthesis of new inhibitors of HIV-1 protease dimerization with conformationally constrained templates. *Bioorg Med Chem Lett.* 2001 11(18):2465-8.
24. Hayashi Y, Kinoshita Y, Hidaka K, Kiso A, Uchibori H, Kimura T, Kiso Y. Analysis of amide bond formation with an alpha-hydroxy-beta-amino acid derivative, 3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoic acid, as an acyl component: byproduction of homobislactone. *J Org Chem.* 2001 66(16):5537-44.
25. Matsumoto H, Kimura T, Hamawaki T, Kumagai A, Goto T, Sano K, Hayashi Y, Kiso Y. Design, synthesis, and biological evaluation of anti-HIV double-drugs. conjugates of HIV protease inhibitors with a reverse transcriptase inhibitor through spontaneously cleavable linkers. *Bioorg Med Chem.* 2001 9(6):1589-600.

# 分担研究報告書

厚生科学研究費補助金(脳科学研究事業)  
分担研究報告書

HAM418 例の予後調査

分担研究者 中川正法 鹿児島大学医学部第三内科  
協力研究者 東 桂子 松崎敏男 中川正法 納 光弘

研究要旨 HAM は緩徐進行性の疾患であるが、悪性腫瘍等の重篤な合併症も比較的高率であるため定期的な follow up が必要である。日常生活における ADL の低下、膀胱直腸障害による不眠、合併症の併発など病状に対する不安や HAM に関する情報不足との意見が多々聞かれた。今回得られた患者情報と HAM の病態解明の到達点を踏まえ HAM 患者ケアのための指針を作成し、情報提供や患者間・医療者間の連携がうまくいくように役立てたい。

A. 研究目的

HAM 患者の現状、発症からの臨床経過、患者の要望を把握し、HAM 患者ケアの指針を作成する。

B. 研究方法

当科を受診した HAM418 例(疑い例を含む)中、死亡 21 例を除く住所判明者 397 例にアンケート用紙を郵送した。アンケート内容については現在の歩行状況・排泄状態等について行い、今回は死亡例の状況把握もおこなった。

C. 研究結果

HAM 確実例は、307 例で生存例 231 例、死亡例 76 例が判明した。生存者の現在年齢は  $64.6 \pm 12.1$  歳、罹病年数とは  $20.2 \pm 12.7$  年、膀胱直腸障害は約 90% に認めた。運動障害度としては  $5.8 \pm 2.3$  (5; 片手による伝い歩き、6; 両手による伝い歩き、7; 歩行不能・いざりまたは四つ這い移動可) のレベルであった。HTLV-I 感染経路は非輸血成人発症が 79% を占め、輸血後発症 15%、若年発症 7% であった。死因の最多は悪性腫瘍 15 例(19.7%)、なかでも ATL が 4 例と多かった。その他、自殺者が 4 例であった。HTLV-I 感染経路における死亡者数との関連では、有意差ははっきりしなかった。

HAM 発見当時(1986 年)から 2001 年まで 15 年間経過観察できた例が 36 例(うち生存者 30 例)あったが、運動障害度は  $4.3 \pm 1.6$  から  $6.4 \pm 2.2$  と 2 段階の step up を認め、 $p < 0.0001$  と有意差を認めた。なお膀胱直腸障害も 90% 以上で、導尿施行 11 人(36.7%)、便秘薬内服 20 人(66.7%)と高度であった。

患者からの生の声としては、疾患についての認識・情報不足、痛み・痺れの軽減に対する治療の検討、膀胱直腸障害による不眠、同じ疾患の方との交流の場の提供希望、特定疾患としての対応希望、相談の窓口の設置、一般者むけの情報の公開などが聞かれた。

D. 考察

HAM は緩徐進行性の疾患であるが、悪性腫瘍等の重篤な合併症も比較的高率であるため定期的な follow up が必要である。

日常生活における ADL の低下、膀胱直腸障害による不眠、合併症の併発など病状に対する不安や HAM に関する情報不足との意見が多々聞かれた。

今回得られた患者情報と HAM の病態解明の到達点を踏まえ HAM 患者ケアのための指針を作成し、情報提供や患者間・医療者間の連携がうまくいくように役立てたい。

E. 健康危険情報

特にない。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsuzaki T, Nakagawa M, Nagai M, Usuku K, Higuchi I, Arimura K, Kubota H, Izumo S, Akiba S, Osame M. HTLV-I proviral load correlates with progression of motor disability in HAM/TSP: analysis of 239 HAM/TSP patients including 64 patients followed up for 10 years. J Neurovirol. 2001 Jun;7(3):228-34.
- 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. 2000 Dec;6(6):544-8.

- G. 知的所有権の出願・登録状況  
(予定を含む。)
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

厚生科学研究費(脳科学研究事業)  
分担研究報告書

HAM の発症機序: HAM と ATL の発症と関連した HTLV-I *tax* の変異

分担研究者 納 光弘 鹿児島大学第3内科  
共同研究者 古川 良尚 鹿児島大学第3内科

研究要旨 HAM・ATL の発症に関して宿主側の要因だけではなく、ウイルス側の要因がないかを HTLV-I *tax* の領域について調べ、HTLV-I の *tax* 領域にも subgroup が存在し、*tax* A の有無による HAM の odds 比が 2.46 で有意に高く、ウイルス側の要因で HAM 発症リスクが異なる事、ATL では発症過程で CTL から escape したクローンが選択されていることを見いだした。また ATL 発症には免疫機構から escape し、更に癌抑制遺伝子などの変異も付け加わる事が重要と考えられた。

#### A. 研究目的

これまで HAM・ATL の発症に関して宿主側の因子である HLA のタイプと疾患との関連が議論され、例えば急性型の ATL では HLA-A26 が多い事、HAM では HLA-A\*02 の頻度が少ない事が報告されている。しかしながら、HTLV-I ウイルスそのものには、疾患特異的な変異はこれまで報告されていない。HTLV-I の Tax 蛋白はウイルス自身の転写活性化のみならず、宿主細胞の遺伝子にも作用し、HTLV-I 感染細胞を増殖させたり、サイトカインの産生を活性化する。一方、Tax は HTLV-I 感染細胞に対する CTL の主な標的であり、HTLV-I 感染細胞に対する CTL は感染細胞の減少や、炎症を引き起こす可能性があり、Tax の変異と疾患との関係について興味もたれる。一方 ATL 発症の立場から考えると、HTLV-I 感染細胞は初期には Tax 発現により、ウイルスのエンハンサーや、IL-2, IL-2R のエンハンサーまた c-fos の enhancer に働きかけて、その発現を亢進することにより、感染細胞の増殖に対してメリットを与えると考えられる。一方で Tax は HTLV-I に対する CTL の主な標的であるので、Tax を発現することは CTL による排除を受ける為に感染細胞の増殖にとってはデメリットである。ATL 発症の途中では Tax を発現することによるメリットとデメリットが拮抗する段階が存在すると考えられそのような段階では HTLV-I 感染細胞

に対する CTL から逃れられるような細胞が選択されている可能性がある。このことを調べるために HTLV-I *tax* 遺伝子の塩基配列を調べた。

#### B. 研究対象・方法

鹿児島在住の 61 人の HAM, 62 人の健康なキャリアー、55 人の ATL 患者について *tax* の sequence (ATK の 7295-8356 番目の塩基に相当する部分)を行った。また宿主側の因子で HTLV-I ウイルス量を減らすように働くとされている HLA-A\*02 の有無との関係も調べた。HAM 発症のリスクとして HTLV-I *tax* の subgroup 分類を RFLP を追加して合計 HAM192 名、キャリアー200 名について行った。ATL においては観察された変異のある Tax が本来の Tax に対する CTL に認識されるかどうかを調べた。

#### C. 研究結果

##### A. HAM について

1. HTLV-I *tax* における subgroup の存在。  
*tax* にはいくつかの塩基置換が見られたが、7897, 7959, 8208, 8344 が常に同時に置換している HTLV-I のサブグループがあることに気づき(表 1)、このことは分子系統解析によって確かめられた(図 1)。この 4 つの特別な塩基置換を伴っ

てものを *tax* A と名づけた。またこの4つの特別な部位の塩基がコンセンサスの配列であるものを *tax* B と名づけた。また LTR の sequence を行うと、*tax* A subgroup および *tax* B subgroup はそれぞれ LTR での分類での Cosmopolitan A および Cosmopolitan B に相当する事が分かった。(図 2)

## 2. Subgroup A は HAM において有意に高率に見られる。

シークエンスによる検討で *tax* A は HAM で 61 名中 10 名、HC で 62 名中 5 名、ATL で 55 名中 5 名と HAM に高頻度に見られる傾向が見られた。この事を確かめる為に、HAM192 名および HC200 例についてサブタイプ分類を行った。*tax* A subgroup では ACC II 制限酵素部位が生じる事を利用して、RFLP 解析を行った結果 *tax* A は HAM では 192 例中 30 名 15.6% にみられ、健康なキャリアーでは 200 人中 14 名、7% にしか *tax* A タイプはみられず、*tax* A は有意に HAM に多く見られる事が分かった。*tax* A の有無による HAM 発症に対する Odds 比は 2.46 で HAM になりやすい事が判明した(表 2)。

## 3. Subgroup の HAM 発症に対するリスクは HLA-A\*02 とは独立である。

強い CTL 反応を起こしウイルスを減らすとされる HLA-A\*02 の有無と、Subgroup A の有無について、ロジスティック回帰解析を行った。*tax* A を持つことでの HAM 発症に対するオッズ比は 2.99 で、*tax* A は独立した因子である事が分かった。(表 3)

## B. ATL について

### 1. HTLV-I を発現できなくなる Stop Codon の存在、および Tax の epitope の変化。

subgroup を規定する部位を除いた塩基の変化をまとめた(図 3)。ATL には *tax* のかなり 5' 側での stop codon の出現を 4 例に認めた。また ATL に特徴的な *tax* の変異として見られた 7337 番目の塩基置換は Tax アミノ酸の 14 番目のアミノ酸置換をおこし、HLA-A\*02 での Tax エピトープの変化を起こしていた(表 4)。他にも *tax* の広範な欠失を 2 例に HTLV-I の広範な欠失を判別法にて 5 例に認めた。(図 4)

### 2. Stop Codon は ATL 患者において新たに生じたものであり、かなり早期に生じている。

*tax* に塩基置換のあった HAM 患者およびその家族のキャリアーを調べると殆どの塩基置換は Transmittable であることがわかった(表 5)。例えば HAM9 の息子は同じ *tax* の変異をもち、母親からこの変異を持ったウイルスが感染したことが分かった。しかし Stop Codon 以外に *tax* の塩基置換が 2ヶ所存在している ATL36 患者の姉および母親の *tax* を調べると、stop codon 以外の 2つの塩基置換は全く同じものが見られ、患者も姉も母親からの感染と考えられた。しかし stop codon は ATL36 患者にしか見られず、stop codon は ATL 発症の途中で新たに生じた変異と考えられた。またこの stop codon は患者の Consensus sequence としては ATL にしか見られないが、subclone としてはキャリアー 2 例中 2 例に、また HAM5 例中 3 例に見られ腫瘍化していない人にも見られるので ATL 発症の早期に生じていると考えられた。

### 3. Epitope に変異の見られた Tax peptide は CTL から認識されなくなる。

Tax ペプチド 11-19 には ATL3 症例に Tax アミノ酸の 14 番目が Glycine から Arginine に変化していた。このうち 2 症例は HLA-A2\*02(+) であった。HLA-A\*02 だけを発現させるようにした Hmy-A2 cell に本来の Tax11-19 ペプチドとこの 14 番目が Glycine から Arginine に変化していたペプチド(G4R)を pulse しておいて、本来のペプチドを認識する CTL によって killing が起こるかを調べたところ、本来の Tax 11-19 ペプチドは良く溶解されるのに、Tax の 14 番目がグリシンからアルギニンに変わったペプチド(G4R)の場合は全く killing が起こらない事が分かった。エピトープに変異をもつ細胞は CTL による除去をうけにくい事が示唆された(図 5)。

### 4. Tax に stop codon を持つ急性型 ATL でも 癌抑制遺伝子 Cyclin-Dependent Kinase 4 Inhibitor Genes p15, p16 の欠損例が存在する。

ATL 発症の過程で HTLV-I Tax に対する宿主の免疫機構から逸脱するだけで ATL 発症に十分であるか調べる目的で HTLV-I *tax* に stop codon が入っていた症例およびそうでない症例について、検討可能であった 23 例の急性型 ATL について癌

抑制遺伝子である Cyclin-Dependent Kinase 4 Inhibitor Genes p15, p16, p18, p19 の欠損を調べた。HTLV-I tax に stop codon が入っていた 1 症例においても p15, p16 の欠損を認めた (図 6)。

#### D. 考察

1. HAM に関して; HTLV-I はこれまで、LTR の部位の変異を元にして分子系統的に分類されている。tax 領域については変異が少ないために、これまで十分な分子系統解析がなされていなかった。しかし Tax 蛋白はウイルス自体の転写を亢進したり、感染細胞を増殖させたり、また炎症性のサイトカインの産生を活性化し、更に Tax は HTLV-I 感染細胞に対する CTL の主な標的であることから、tax の変異と疾患との関係について興味をもち今回解析したところ、HTLV-I の tax 領域にも従来の LTR での分類に相当する Subgroup が存在することがわかった。今回我々は tax A のほうが B よりも HAM 発症のリスクが高い事を示した。しかし現時点では tax の Subgroup そのものが HAM 発症のリスクを上げているという事は証明できていない。tax の Subgroup と LTR での Subgroup が密接に link しているので、tax 以外の部位の影響、あるいは HTLV-I の分類と関係するほかの未知の因子が原因である可能性もある。Tax の違い自体が原因であるかどうか、異なる tax による CTL 反応の違いや、サイトカイン遺伝子に対する transactivation 能の違いなどを現在調べている。

2. ATL に関して。ATL の発症過程では初期には HTLV-I tax は増殖の advantage を与えるが、一方で Tax を発現すると Tax に対する CTL により免疫的に排除されるので、Tax を発現することは不利である。そこである段階まで経て、例えば感染細胞が不死化したあとでは、Tax を発現しない、またはエピトープに変異があり、Tax をターゲットにした免疫機構から逸脱のできる細胞のほうがその後の ATL の発症には有利であると考えられる。このような Tax を発現できなくなっている Tax の変異や、CTL が認識できない Tax の変異をもった ATL 症例が見られた事は実際に ATL の発症過程ではこのような免疫学的な排除機構からの逸脱が ATL の発症過程に重要な役割を果たしていること

を意味している。しかしながら tax に stop codon をもつ急性型 ATL にも p15, p16 などの癌抑制遺伝子の欠損がみられた事は、免疫学的な排除機構から逃れただけでは急性型 ATL 発症には十分ではない、もしくはそのような癌抑制遺伝子に変異が加わった細胞のほうが増殖にさらに有利であるために選択されるものと考えられる。

#### E. 結論

1. tax A HTLV-I は tax B HTV-I よりも HAM 発症のリスクが高く、HAM 発症のリスクに宿主側の素因だけでなく、ウイルスのタイプあるいはそれと関連した因子も影響していることがわかった。
2. ATL 中にはある段階まで経ると、HTLV-I を発現しない、またはエピトープに変異がある方が ATL の発症に都合が良い症例が存在することを示し、ATL 発症過程に tax をターゲットにした免疫機構からの逸脱も重要な役割を持っている事を示唆している。以上より ATL の発症過程を次のように推測した。

Tax は感染細胞の増殖に関わる因子であり、ATL 発症の早期段階では重要な役割を果たしていると考えられる。一方 Tax は CTL の標的でもありその発現は感染細胞の増殖には不利である。そこで不死化が起こった細胞では Tax を発現出来ないようなあるいは CTL から逃れられるような tax の変異を来した細胞のほうが増殖に有利となり選択される。このような細胞は更に p15 や p16 等の遺伝子の変異が蓄積し、より悪性度の高い急性型 ATL へと進展すると考えられた。

#### F. 研究発表

##### 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 (HTLV) type I in the tax gene and their association with different risks for HTLV-I-associated Myelopathy/Tropical spastic paraparesis. J Infect Dis 2000;182(5):1343-1349
2. Furukawa Y, Kubota R, Tara M, Izumo S, Osame M  
Existence of escape mutant in HTLV-I tax during the development of adult T-cell leukemia. Blood 2001; 97(4): 987-993



学会発表

1. 第41回日本神経学会総会 2000年5月  
古川良尚、納光弘  
Tax領域におけるHTLV-I subtypeの存在  
とHAM発症のリスクについて
2. 第62回日本血液学会 2001年4月  
古川良尚、久保田龍二、納光弘、  
早川仁、太良光利、  
ATL発症過程におけるHTLV-I tax  
escape mutantの存在
3. 10<sup>th</sup> International conference on Human  
Retrovirology: 2001, 6, Dublin  
Furukawa Y, Ymashita M, Usyku K,  
Izumo S, Nakgawa M, Osame M  
Phylogenetic subgroups of human T cell  
lymphotropic virus (HTLV) type I in the tax  
gene and their association with different risk  
sfors for HTLV-I-associated Myelopathy/Tropicalsp  
astic paraparesis
4. 10<sup>th</sup> International conference on Human  
Retrovirology: 2001, 6, Dublin  
Furukawa Y, Kubota R, Tara M, IzumoS,  
Osame M:  
Existence of escape mutant in HTLV-I tax  
during the development of adult T-cell  
leukemia.

表 1. HTLV-I tax での subgroup を分ける 4 つの特異的な塩基置換

	7897 <sup>§</sup>	7959 <sup>§</sup>	8208 <sup>§</sup>	8344 <sup>§</sup>
amino acid change in Tax A <sup>¶</sup>	N	A→V	S→N	N
ATK	C	C	G	A
Tax B (n=158)	C	C	G	A
Tax A (n=20)	T	T	A	C

§ 塩基番号は ATKstrain の相当番号。

¶ 塩基の変化によるアミノ酸の変化。N, no change

表 2. tax A HTLV-I は HAM で HCs より高頻度にみられる。

Analysis	HAM/TSP, No.		HCs, No.		ATL, No.		Odds of HAM/TSP by tax A		
	tax A	tax B	tax A	tax B	tax A	tax B	$\chi^2$	P	Odds 比 CI, 95%
Sequence	10	51	5	57	5	50			
+ RFLP	30	162	14	186	N.D.	N.D.	6.47	0.014	2.46 1.26-4.80

tax A と tax B は tax の Subgroup. sequencing により 61 例の HAM, 62 例の無症候性キャリアー (HCs)、55 例の ATL について tax の subgroup を解析した。更に RFLP による解析を行い、合計 192 例の HAM 200 例の HCs について subgroup 分類を行った。

表 3. HLA-A\*02 陽性/陰性、HTLV-I tax A 陽性/陰性の 2 つの要素と HAM 発症のロジスティック回帰

	$\chi^2$	P	Odds 比	CI, 95%
HLA-A*02	16.79	<0.0001	0.40	0.26-0.62
tax A	9.56	0.0020	2.99	1.49-5.98

CI; confidence interval.

表 4. HLA-A02 の存在と 7337、7464 番目の塩基置換のまとめ。

No.	HLA-A*02	Nucleotide substitution at position	
		7337 (G to R)*	7464 (W to Stop)*
ATL 55	21 (38.2%)	3 (2)†	4 (1)
HAM 61	16 (26.2%)	0	0
HC 62	27 (43.5%)	1 (1)‡	0

P; Fisher's test (1 tailed)

\*; 塩基置換に伴うアミノ酸の変化

†; HLA-A\*02 陽性者数を括弧内に示す。

‡; 一例の HC では G と R の混在であった。

表 5. 家系内における HTLV-I tax sequence の比較

	Sex	Nucleotide change at position									
		7464	7496	7743	7934	7942	7953	8140	8283	8294	8368
ATK-1		G (W)	G (A)	G (G)	T (L)	C (T)	A (C)	T (F)	A (N)	C (P)	G
HAM 9	F						G (F)				
Son of HAM 9	M						G (F)				
HAM 10	F								G (S)		
Son of HAM 10	M								G (S)		
HAM 19	M										A
Wife of HAM 19	F										A
HAM 24	F				C (L)			C (F)			
Sister of HAM 24	F				C (L)			C (F)			
HAM 34	F		A (T)								
Sister of HAM 34 (1)	F		A (T)								
Sister of HAM 34 (2)	F		A (T)								
HAM 39	F					T (T)					
Husband of HAM 39	M					T (T)					
ATL 36	M	A (STOP)		A (D)						T (S)	
Mother of ATL 36	F	No change		A (D)						T (S)	
Sister of ATL 36	F	No change		A (D)						T (S)	

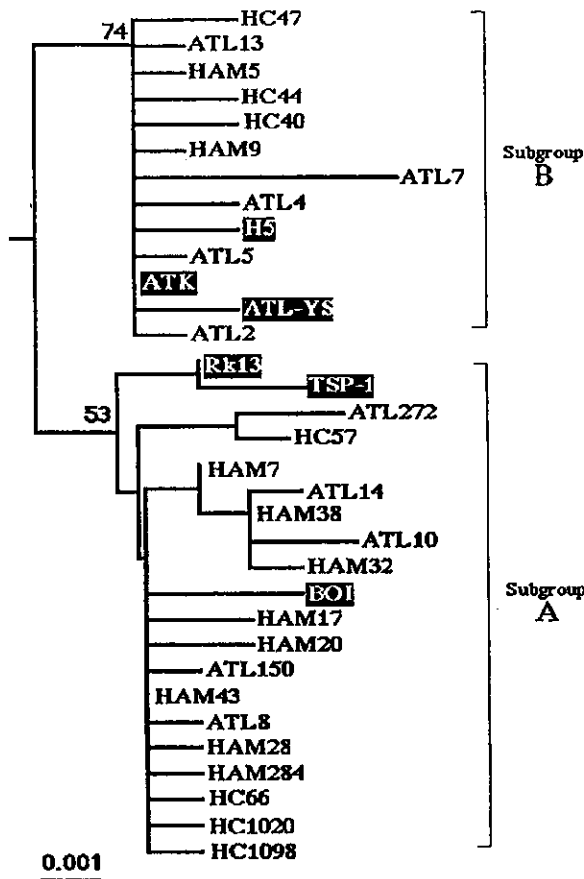


図 1. HTLV-I *tax* (ATK の 7295-8356 に相当する部分) の分子系統樹

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。

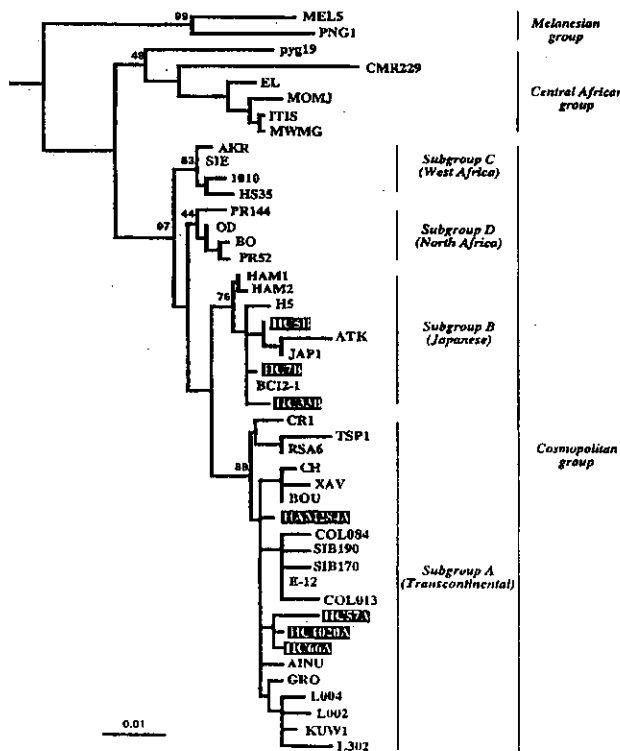


図 2. HTLV-I LTR (ATK の 144-650 に相当する部分) の分子系統樹

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。

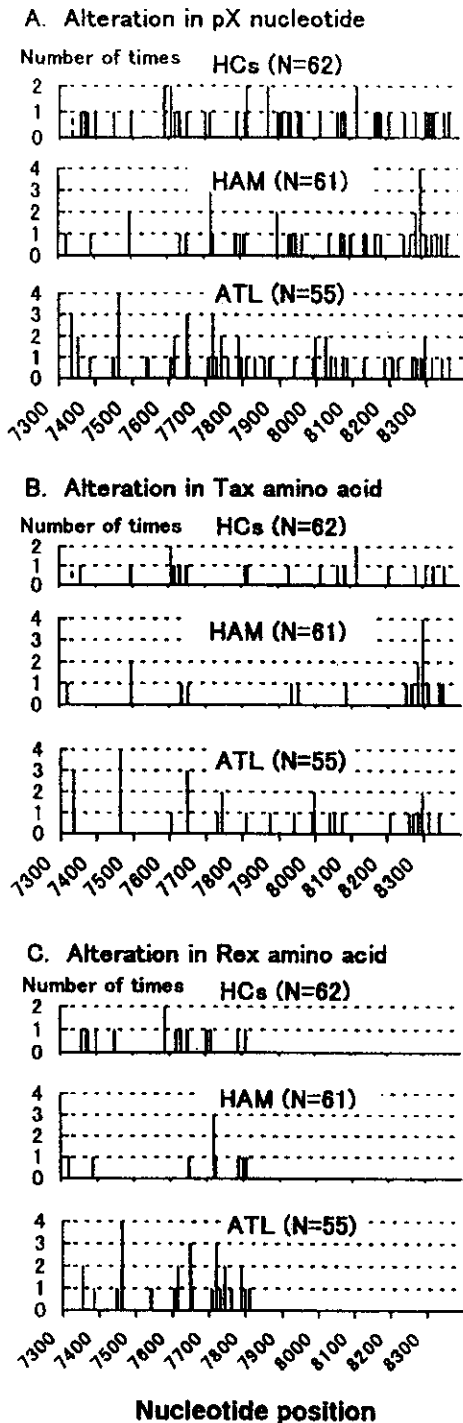


図3. HTLV-I pX塩基置換のまとめ。  
 A; 全塩基置換。  
 B; Taxアミノ酸に変化をきたす塩基置換。  
 C; Rexアミノ酸に変化をきたす塩基置換。  
 横軸はHTLV-Iの塩基位置(ATKでの相当位置)。  
 縦軸は出現回数。

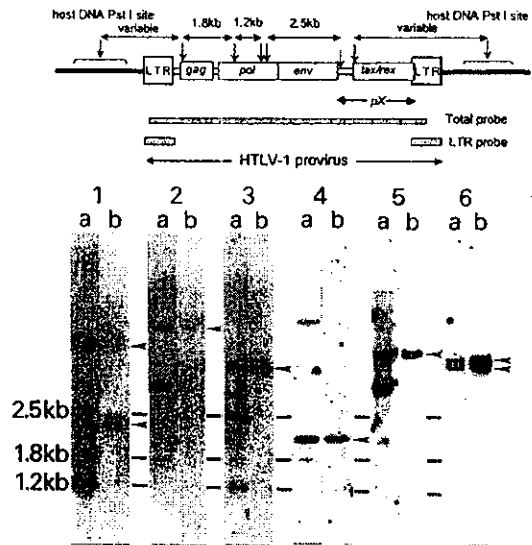


図4. 末梢血リンパ球HTLV-IプロウイルスのDNAプロット解析。

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。

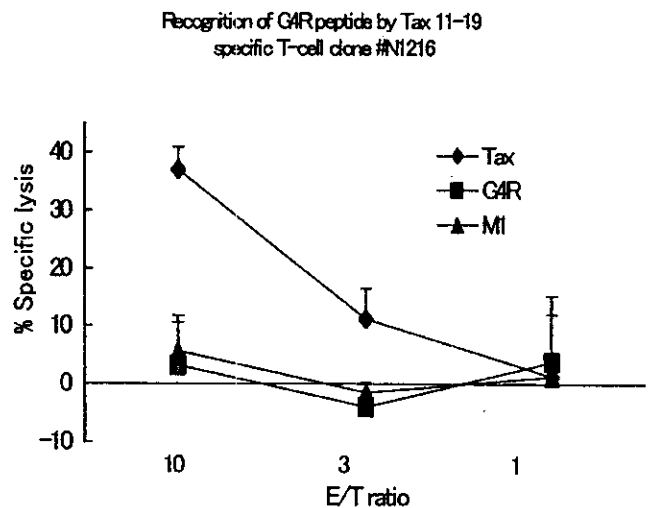


図5. Tax 11-19特異的なCTLによるWild TypeのTax11-19ペプチド(◆)と変異を伴うTax11-19ペプチド(G4R■)の認識の違い。横軸はEffectorとTargetの比を示し、縦軸は特異的な細胞障害を示す。G4RはコントロールのMIペプチド(▲)同様認識されない。