

F 研究発表

1 論文発表

- 1 10 Baba M SJ-3366 *Curr Opin Investg Drugs* **3**. 1146-1148 (2002)
- 2 Kawamura M, Naito T, Ueno M, Akagi T, Hiraishi K, Takai I, Makino M, Serizawa T, Sugimura K, Akashi M, Baba M Induction of mucosal IgA following intravaginal administration of inactivated HIV-1-capturing nanospheres in mice *J Med Virol* **66**:291-298 (2002)
- 3 Wang X, Miyake H, Okamoto M, Saito M, Fujiwara J, Tanaka Y, Izumo S, Baba M Inhibition of the Tax-dependent human T-lymphotropic virus type I replication in persistently infected cells by the fluoroquinolone derivative K-37 *Mol Pharmacol* **61** 1359-1365 (2002)
- 4 Yamataka K, Wang X, Baba M Long-term culture of HIV-1-infected cells with the transcription inhibitor K-37 *Antiviral Res* **56**:85-92 (2002)
- 5 Shimokubo S, Wakamatsu S, Maeda Y, Baba M, Makino M Fusion of mature dendritic cells and human T-lymphotropic virus type I-infected T cells its efficiency as an antigen-presenting cell *Virology* **301**:13-20 (2002)
- 6 Wang X, Okamoto M, Kawamura M, Izumo S, Baba M Inhibition of human T-lymphotropic virus type I gene expression by the *Streptomyces*-derived substance EM2487 *Antiviral Chem Chemother* **13**:177-183 (2002)
- 7 Wang X, Furukawa T, Nitanda T, Okamoto M, Sugimoto Y, Akiyama S, Baba M Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) induces cellular resistance to HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors *Mol Pharmacol* **63**:65-72 (2003)
- 8 Akagi T, Kawamura M, Ueno M, Hiraishi K, Adachi M, Serizawa T, Akashi M, Baba M Mucosal immunization with inactivated HIV-1-capturing nanospheres induces a significant HIV-1-specific vaginal antibody response in mice *J Med Virol* **69**:163-172 (2003)
- 9 Okamoto M, Wang X, Debyser Z, De Clercq E, Baba M Establishment of an in vitro assay system mimicking human immunodeficiency virus type 1-induced neural cell death and evaluation of inhibitors thereof *J Virol Methods* in press
- 10 Sato K, Yamashita N, Baba M, Matsuyama T Modified myeloid dendritic cells act as regulatory dendritic cells to induce anergic and regulatory T cells *Blood* in press
- 11 Sato K, Yamashita N, Yamashita N, Baba M, Matsuyama T Regulatory dendritic cells protect mice from murine acute graft-versus-host disease and leukemia relapse *Immunity* in press
- 12 Baba M Inhibitors of HIV-1 gene expression and transcription *Curr Topics Med Chem* in press

2 学会発表（招待講演・シンポジウムのみ）

- 1 馬場昌範 抗 HIV 薬基礎研究の現状と新しい標的を求めて 文部科学省特定領域研究「エイズ制御のための基礎研究」公開シンポジウム 京都（2002）
- 2 馬場昌範 若手研究者による抗 HIV 研究の新展開 オーバービュー 第 12 回抗ウイルス化学療法研究会シンポジウム 東京（2002）
- 3 馬場昌範 セファランチンの抗 HIV-1 作用とその応用 第 28 回アルカロイド研究会 大阪（2002）
- 4 馬場昌範 抗ウイルス化学療法の過去 現在・未来 第 50 回日本ウイルス学会総会（ワークショップ）札幌（2002）
- 5 馬場昌範 エイズとの闘い 予防・治療法の現状と将来展望 新適塾「21 世紀の薬箱」第 50 回・新しい治療戦略 エイズの予防と治療の最前線 大阪（2002）
- 6 馬場昌範 エイズとの闘い 予防・治療法の現状と将来展望 新適塾「21 世紀の薬箱」第 50 回・新しい治療戦略 エイズの予防と治療の最前線 大阪（2002）

- 7 馬場昌範 HIV の転写機構と潜伏感染 治療標的としての展望 第 16 回日本エイズ学会学術集会シンポジウム 名古屋（2002）
- 8 馬場昌範 エイズ脳症の新しい展開 培養細胞株を用いた HIV による神経細胞死モデルの構築と薬剤のアノセイ 第 16 回日本エイズ学会学術集会サテライトシンポジウム 名古屋（2002）
- 9 Baba M HIV-1 gene expression and transcription Is it a possible target indeed for antiretroviral chemotherapy? *2nd Symposium of High Technology Research Center Chiba* (2003)

G 知的所有権の取得状況

- 1 高島勝典, 飯澤祐史, 白石 充, 杉原芳博, 馬場昌範 CCR (CC ケモカイン受容体) 拮抗作用を有する化合物を含有する輸血時および血液製剤使用時における HIV 感染症予防剤 出願人 武田薬品工業株式会社, 特願 2002-118055, 平成 14 年 4 月 19 日出願

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

HAM/TSP 発症の遺伝的背景の解析と修飾因子

分担研究者 宇宿功市郎 鹿児島大学医学部助教授 医療情報管理学
研究協力者 斉藤峰輝、延原康幸、Amir H Sabouri、児玉大介、松元 渉、
納 光弘 同・第3内科
出雲周二 同・難治性ウイルス疾患研・分子病理

Alison M Vine, Charles RM Bangham Dept Immunol, Imperial College

研究要旨 HAM 発症に関わる遺伝的背景とその修飾因子を明らかにするため、HAM 患者、無症候性キャリアー（HC）の HLA、non-HLA 遺伝子多型頻度を比較した。HLA、non-HLA 因子双方で HAM 発症抑制、HAM 発症促進に関連している複数の遺伝子を同定した。また、感度 80%以上、特異度 80%以上で HAM 群と HC 群を区別できる HTLV-I ウイルス量（末梢血リンパ球中の感染細胞比率 2%）を求めて、宿主遺伝子型の HAM 発症への関与を検討し、HAM 発症に対して HTLV-I ウイルス量かより低い群で関連する因子、より高い群で関連する因子の存在を示した。non-HLA 因子については、MMP-9 promoter、IL-10 promoter か HTLV-I Tax により転写活性化され、各遺伝子多型か転写活性に影響することによって HAM 発症感受性を規定している可能性を示した。HLA 因子については、HLA-DRB1*0101 か HTLV-I env gp21 を抗原提示しやすいこと、HTLV-I Tax に対する CTL の dominant epitope (Tax 11-19) か HLA-A2 拘束性であることから、遺伝的に規定された、生体内における対ウイルス免疫応答の効率か HTLV-I 感染の予後に影響することか考えられた。

A. 研究目的

HAM は中年女性に多く発症する緩徐進行性の痙性脊髄麻痺で、排尿障害を伴うものである。これまでの臨床的検討から HAM では発病後に数年から十数年の経過で歩行不能となる患者が約 40%ほど見られている。治療法として副腎皮質ステロイド療法、インターフェロン α 療法が確立され、特にインターフェロン α は、国内で行われた多施設二重盲検比較試験で有効性を

確認し、HAM 治療薬としての保険適応を受けている。しかしながら治療効果、副作用の点で十分とはいえない現状であり、HAM 発症機序解明と発症予測を目標として研究を進めることは極めて重要であると考えている。HAM の発症に関わる遺伝的背景とその修飾因子を解析することを目的に研究を行なった。

B 研究方法

HAM224 例、無症候性キャリアー

(HC) 202 例の宿主遺伝子多型の頻度を比較検討した。加えて、ABI Prism 7700™ sequence detector を用いて HTLV-I ウイルス量を定量的 PCR 法により測定した。免疫応答関連因子として HLA の解析を、non-HLA 因子に関しては、候補遺伝子解析を行なった。これまでに 63 部位 (loci) 91 多型 (SNPs、VNTR or CAn repeat) の遺伝子多型解析を行い、HTLV-I ウイルス量と対比した。解析は 100 例ごとに行い、有意差が認められた場合に症例数を増して解析した。解析した多型には接着因子、細胞外基質関連遺伝子も含めた。

C. 研究結果

HLA の解析からは、HLA-A*02、Cw*08 が HAM 発症抑制に、HLA-DRB1*0101、B*5401 が発症促進に関連していることが明らかになった。non-HLA 解析では 77 多型か 100 例ごとの解析で有意差がないことが判明し、14 多型か全例解析 (HAM, HC 各 200 例) まで行われた。この中では MMP-9 promoter d(CA)_n repeat の延長、aggrecan VNTR 1630bp アリルおよび TNF- α -863A 多型が HAM 発症の危険率を上げ、TNF- α -863A の効果は HTLV-I ウイルス量が高い患者群でより強いことが判明した。また SDF-1-801A 3'UTR、IL-10 -592A、vitamin D receptor exon 9 ApaI 多型が HAM 発症の危険率を下げ、IL-15 191C は、HTLV-I ウイルス量が低下している群に多いことが示された。これらの

因子中 HLA-A、C、SDF-1、TNF- α -863 及び年齢、性、ウイルス量を勘案すると、HAM 患者と HC を 88% の確率で判別できた。

IL-10 -592A は、HAM 発症危険率を下げると同時に、HC においてプロウイルス量を下げること効果が明らかになり、これは HLA-A*02、Cw*08 で認められた現象と同じであり極めて興味深い。一方、これらの因子の作用機序についても検討し、MMP-9 promoter、IL-10 promoter が HTLV-I Tax により転写活性化され、各遺伝子多型が転写活性に影響することを明らかにした。さらに HAM と HC を区別できる可能性のある HTLV-I ウイルス量について検討するため、末梢血リンパ球中の感染細胞比率 0.5% ごとに HAM 発症数、HC 数を算出し、ROC 曲線を描画後に cut off 値を算出した。その値で HAM 群、HC 群を各々 2 群に分け、宿主遺伝子型の HAM 発症への関与を検討した。ROC 曲線からは、HTLV-I ウイルス量 2% の時、感度 80% 以上、特異度 80% 以上で HAM 群と HC 群を区別できることがわかった。また、HLA、non-HLA の双方で HTLV-I ウイルス量がより低い群に関連する因子、より高い群に関連する因子の存在が示された (表 1)。

D 考察

HLA-DRB1*0101 が HTLV-I env gp21 を抗原提示しやすいこと、HTLV-I Tax に対する CTL の dominant epitope (Tax 11-19) が HLA-A2 拘束性

であることを考慮すれば、今回の結果は、生体内におけるウイルスに対する遺伝的に規定された免疫応答の効率か HTLV-I 感染の予後に影響することを示唆していると考えられる。また IL-10 -592A の、HAM 発症危険率を下げると同時に HC においてプロウイルス量を下げるという効果は、HLA-A*02、Cw*08 で認められた現象と同一であり、この遺伝子多型が宿主の免疫細胞機能に影響を与えるか等、機能面での解析が必要と考えている。

E. 結論

HAM 発症に関連する複数の HLA、non-HLA 宿主要因を明らかにし、HAM 発症予側が可能であるデータの蓄積が出来たことか、今回の研究の最大の成果である。さらに解析を続け、精度の高い HAM 発症予側と治療時期の選択を可能にしたい。

F 健康危険情報

特にない。

G. 研究発表

1 論文発表

- 1) Saito M, Braud VM, Goon P, Hanon E, Taylor GP, Saito A, Eiraku N, Tanaka Y, Usuku K, Weber JN, Osame M, Bangham CRM Low frequency of CD94/NKG2A-positive T lymphocytes in HTLV-1 associated myelopathy /tropical spastic paraparesis patients but not in asymptomatic carriers Blood 2003 in press
- 2) Furukawa Y, Saito M, Matsumoto W, Usuku K, Tanaka Y, Izumo S, Osame M Different cytokine production in Tax expressing cells between HTLV-I associated myelopathy /tropical spastic paraparesis patients and asymptomatic HTLV-I carriers J Infect Dis 2003 in press
- 3) Saito M, Higuchi I, Saito A, Izumo S, Usuku K, Bangham CRM, Osame M Molecular analysis of T cell clonotypes in muscle-infiltrating lymphocytes from patients with human T lymphotropic virus type 1 polymyositis J Infect Dis 2002 86(9) 1231-41
- 4) Vine AM, Witkover AD, Lloyd AL, Jeffery KJ, Siddiqui A, Marshall SE, Bunce M, Eiraku N, Izumo S, Usuku K, Osame M, Bangham CR Polygenic control of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis J Infect Dis 2002 186(7) 932-9
- 5) Kitze B, Usuku K HTLV-1-mediated immunopathological CNS disease Curr Top Microbiol Immunol 2002,265 197-211
- 6) 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

7) 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

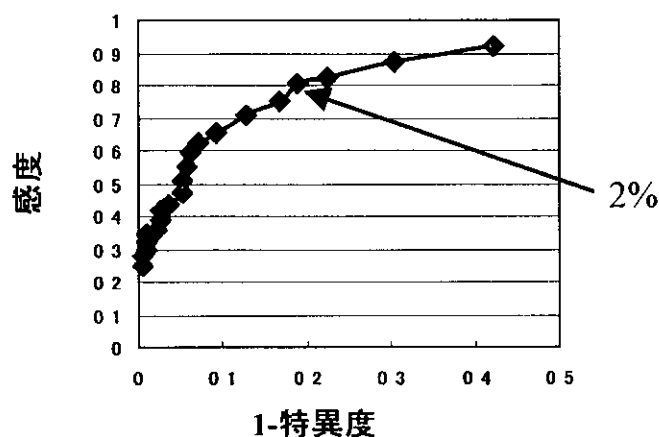
H 知的所有権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1 特許取得
特にない。

2 実用新案登録
特にない。

3 その他
特にない。

図1 HTLV-I プロウイルス量 ROC 曲線



HTLV-I プロウイルス量 0.5%毎の HAM 患者である感度と特異度より曲線を描いた。

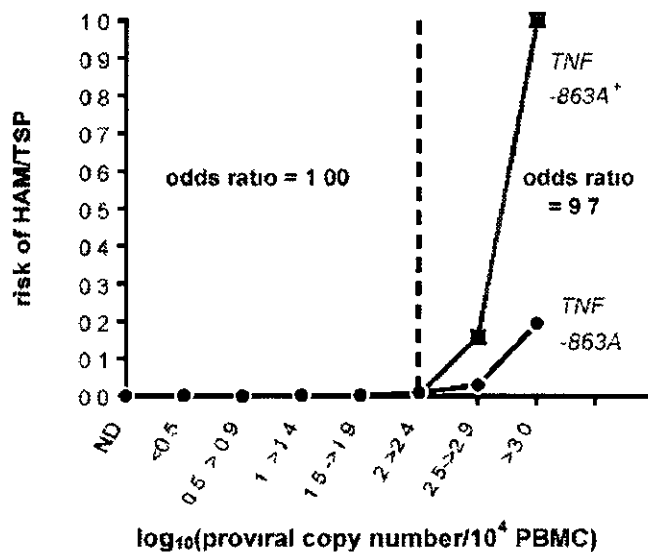
表1 HTLV-I プロウイルス量が低いときに HAM 発症に関与する因子 (HAM 群 vs HC 群)

HLA-DRB1*0101				
	χ^2	Odds ratio	95%C.I.	p
Total	4.45	1.80	1.04-3.11	0.03
Viral Load < 2%	4.18	2.4	1.02-5.67	0.04
≥ 2%	0.32	1.34	0.48-3.17	0.74
HLA-A*02				
	χ^2	Odds ratio	95%C.I.	p
Total	17.12	0.44	0.29-0.65	3x10 ⁻⁵
Viral Load < 2%	6.73	0.39	0.19-0.81	0.008
≥ 2%	2.24	0.58	0.48-3.17	0.13

表2 HTLV-I プロウイルス量が高いときに HAM 発症に関与する因子

HLA-B*54				
	χ^2	Odds ratio	95%C.I.	p
Total	12.46	2.43	1.47-4.00	0.0004
Viral Load < 2%	0.012	1.06	0.43-2.64	0.91
≥ 2%	8.45	7.5	1.74-32.30	0.003

図2 TNF- α promoter -893A/C 多型と HAM/TSP 発症リスク



末梢血リンパ球中の感染細胞比率が2%を超えると HAM 発症の危険度が増加する。

表3 重回帰分析

	回帰係数	標準誤差	t値	P値	95%下限	95%上限
定数項	-0.70587	0.090514	-7.79852	5.04357E-14	-0.88379	-0.52795
Sex	-0.14201	0.083242	-1.70596	0.088758672	-0.30563	0.021618
TaxSquare	0.043319	0.003023	14.32805	3.67559E-38	0.037376	0.049261
DR1	0.26867	0.110956	2.421422	0.015884715	0.05057	0.486771
TaxSubtype	0.352466	0.136216	2.587544	0.010002803	0.084712	0.62022
A2	-0.16283	0.08441	-1.92908	0.054397087	-0.32876	0.003087
B54	0.146665	0.099938	1.467551	0.142978199	-0.04978	0.343109
Cw8	-0.05793	0.111578	-0.51923	0.603876524	-0.27726	0.16139

HAM 発症の予測が可能なかを解析した。要因の有無をタミー変数に置き換え、重回帰分析を行った。

下記の結果が得られている。これにより、今回の集団の 80%において、HAM もしくはキャリアの予想が可能であった (HAM 75%、carrier 87%)。

(TaxSquare HTLV-I プロウイルス量の平方根、Tax Subtype HTLV-I tax のサブタイプ。)

図3 HTLV-I Tax による IL-10 promoter の活性化と IL-10-592A/C 多型の影響

IL-10 promoter は HTLV-I Tax により転写活性化され、C allele のほうが A allele より転写活性が強い。

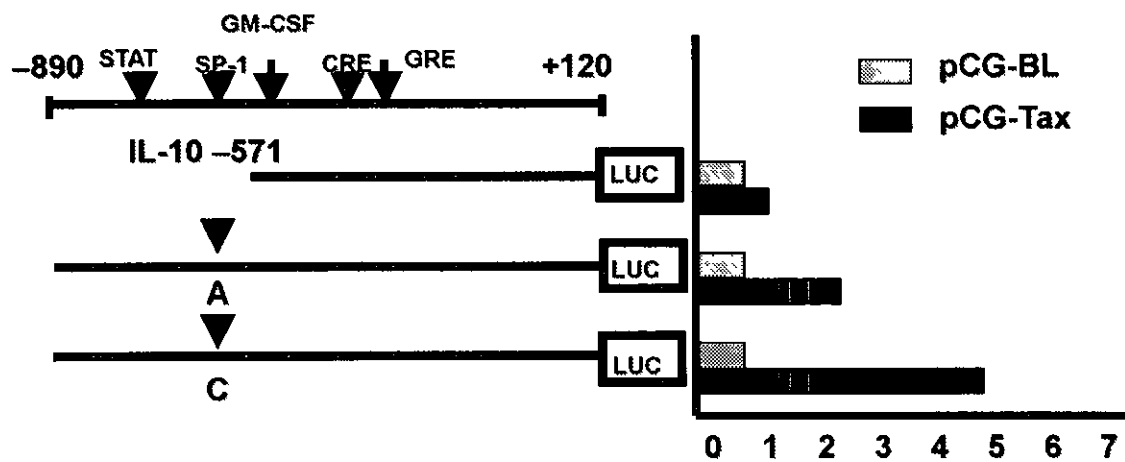
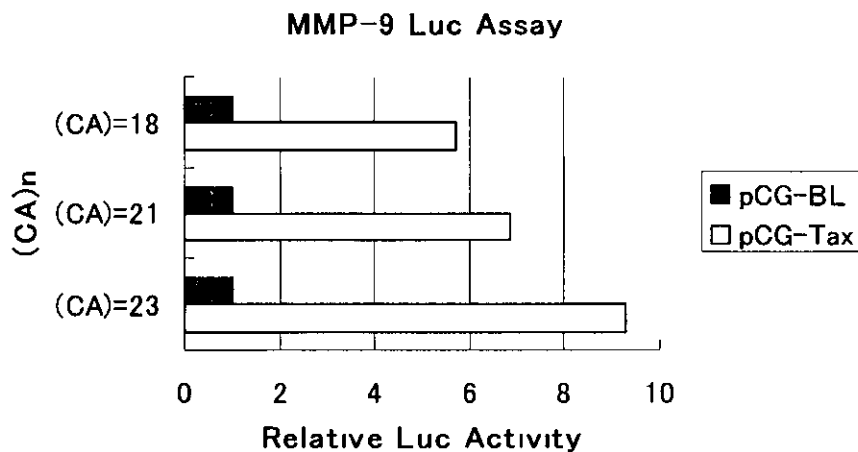


図4 HTLV-I Tax による MMP-9 promoter の活性化と (CA)_n 多型の影響

MMP-9 promoter は HTLV-I Tax により転写活性化され、CA repeat が長いほうが転写活性が強い。



HTLV I 感染者の aggrecan 遺伝子多型と髄液中 aggrecan 値の検討

分担研究者 鹿児島大学医学部第三内科 納 光弘教授
研究協力者 延原康幸、斉藤峰輝 宇宿功市郎（同医療情報管理学）

研究要旨 HAM は下部胸髄を中心とした炎症性病巣を示している。近年、神経線維の支持組織としての細胞外基質に対する重要性が認識されてきており、細胞外基質のうち特に脊髄に豊富に存在する aggrecan の HAM への関与について遺伝子多型と血清 髄液中の抗原値の検討を行った。HAM 患者ではキャリアに比へアレル 28(1630bp)の保有が高かった。血清中の aggrecan 値は HAM 群とキャリア群では有意な差はなかった。髄液中では HAM 患者の中でも急速進行増悪例に於いて緩徐進行例よりも高値を示していた。aggrecan は HAM 疾患感受性遺伝子の一つと考えられ、脊髄炎症の指標となり、進行度を反映していることが判明した。

A 研究目的

細胞外基質 aggrecan は 2200KDa の大型の細胞外基質でその構造を形成 維持し、働きは関節軟骨組織の支持、細胞外の保水性に関わっている。加えて中枢神経組織においても神経発生の段階のみならず、神経細胞体、神経線維の支持組織として重要な働きをしていることが近年明らかにされつつある。また aggrecan のコア蛋白の遺伝子多型は関節リウマチ、変形性関節症で疾患感受性に関連しているとの報告も見られてきている。特にこのコア蛋白の遺伝子多型と疾患関連は若年関節リウマチ患者で詳しく見られており、関節軟骨組織の脆弱性かその発症に関わることか推察されている。このことは中枢神経組織においても組織構造の安定性か aggrecan 分子によっている可能性、更には疾患感受性に関わることを示唆しているとも考えられる。今回新たな疾患感受性遺伝子として HAM 患者で aggrecan の多型を解析し、その意義を検討するために HAM における aggrecan 分子の血清 髄液中の抗原値について検討した。

B 研究方法

- (1)HAM200 例、HTLV I キャリア 200 例で aggrecan 遺伝子多型アレルを検討した。
- (2)HAM29 例とキャリア 11 例にて血清中 aggrecan を ELISA kit を用いて測定した。
- (3)HAM55 例の髄液 aggrecan を ELISA kit を用いて測定した。

C 研究結果

- (1)HAM 群、キャリア群全体で 13 個のアレルが認められた。この頻度は一般集団で報告されてい

るものと同様だった。1630bp のアレルが HAM109 例、キャリア 68 例認められ、 $\chi^2=12.19$ で有意差があった($p=0.0004$)。

- (2)血清中の aggrecan 値は HAM 群(33 例)とキャリア群(11 例)では有意な差は見られなかった。
- (3)髄液中 aggrecan は HAM 急速進行例(発症後 3 年以内に自力歩行不能例)18 例中 12 例、HAM 緩徐進行例 34 例中 10 例で陽性であった($\chi^2=6.11$ 、 $p=0.013$)。髄液中 aggrecan 陽性例、高値例と遺伝子多型アレル 28(1630bp)との間に相関は見られなかった。

D 考察

今回、多型の検討では HAM 患者ではキャリアよりもアレル 28(1630bp)が有意に多かった。これまでに報告のある HAM の疾患感受性因子、抑制因子についての HLA 遺伝子多型や血清中 HTLV 1 プロウイルス量との関連は、このアレルを保有する患者個々について検討をおこなった範囲では認められなかった。このことは、この多型が新たな疾患感受性因子になる可能性を示唆しているものと考えている。

髄液中 aggrecan 値において、HAM 患者群のなかで発症後 3 年以内に自力歩行不能に至った急速進行例において有意に高値であった。脊髄中の aggrecan は脊髄組織の炎症・崩壊が進行することにより組織内の aggrecan が脊髄液中に流出したものを測定したと考えられる。aggrecan 値が高値である例では、HTLV 1 感染細胞浸潤による直接の基質の変性、破壊、それにひきつづき生じるさまざまな炎症性サイトカインの上昇によるさらなる炎症の波及により組織基質の障害が強いために髄液中へと流出する aggrecan が多いと考え

られる、そのような状況にある例では神経線維の脱落も大きいために臨床的には重症かつ急速な進行症状を呈するものと考えられる。

以上のように髄液中の aggrecan 値は組織障害の直接的な指標のひとつと考えられる。また、髄液中 aggrecan 高値の症例とアリル 28(1630bp) の関与はなかった。

今後はさらに、症例の継続的な測定や炎症性サイトカインの関与についての検討を必要とすると考ええる。

E 結論

- (1)aggrecan アリル 28(1630bp)の保有かキャリアに比へ HAM にて高値であった($\chi^2=12.19$ 、 $p=0.0004$)。
- (2)aggrecan 遺伝子は HAM におけるあらたな疾患感受性遺伝子としての可能性が示唆された。
- (3)急速進行 HAM において髄液中 aggrecan 値が緩徐進行例より高値であった($\chi^2=6.11$ 、 $p=0.013$)。
- (4)髄液中 aggrecan 値は脊髄炎症の一つの指標と考えられる。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

1 論文発表

- 1) Osame M Pathological mechanisms of human T cell lymphotropic virus type I associated myelopathy (HAM/TSP) J Neurovirol 2002 8(5) 359-364
- 2) Yamano Y, Nagai M, Brennan M, Mora CA, Soldan SS, Tomaru U, Takenouchi N, Izumo S, Osame M, Jacobson S Correlation of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV 1) mRNA with proviral DNA load virus specific CD8(+) T cells, and disease severity in HTLV 1 associated myelopathy (HAM/TSP) Blood 2002 99(1) 88-94
- 3) Hashiguchi T, Tara M, Nuna K, Higuchi I, Arimura K, Osame M, Maruyama I Adult T cell leukemia (ATL) cells which express neural cell adhesion molecule (NCAM) and infiltrate into the central nervous system Inter Med 2002 41(1) 34-38
- 4) Umehara F, Itoh K, Michizono K, Abe M, Izumo S, Osame M Involvement of Fas/Fas ligand system in the spinal cords of HTLV I associated myelopathy Acta Neuropathol(Berl) 2002 103(4) 384-390
- 5) Ikegami M, Umehara F, Ikegami N, Mackawa R, Osame M Selective matrix metalloproteinase inhibitor, N-biphenyl sulfonyl phenylalanine hydroxamic acid, inhibits the migration of CD4+ T lymphocytes in patients with HTLV I associated myelopathy J Neuroimmunol 2002 127(1-2) 134-138
- 6) Vine AM, Witkovver AD, Lloyd AL, Jeffery KJ, Siddiqui A, Marshall SE, Bunce M, Eiraku N, Izumo S, Usuku K, Osame M, Bangham CR Polygenic control of human T lymphotropic virus type I (HTLV I) provirus load and the risk of HTLV I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis J Infect Dis 2002 186(7) 932-939
- 7) Nagai M, Utsunomiya T, Takenouchi N, Izumo S, Osame M Failure to detect HTLV type 1 DNA from HTLV type 1 seronegative patients with chronic progressive spastic paraparesis in Kagoshima AIDS Res Hum Retroviruses 2002 18(14) 1089-1090
- 8) Saito M, Higuchi I, Saito A, Izumo S, Usuku K, Bangham CR, Osame M Molecular analysis of T cell clonotypes in muscle infiltrating lymphocytes from patients with human T lymphotropic virus type 1 polymyositis J Infect Dis 2002 186(9) 1231-1241
- 9) Yoshida Y, Machigashira N, Wang SY, Osame M A patient with acute onset HAM/TSP after blood transfusion complicated with pseudopseudohypoparathyroidism Intern Med 2002 41(10) 899-900
- 10) Kiwaki T, Umehara F, Arimura Y, Izumo S, Arimura K, Itoh K, Osame M The clinical and pathological features of peripheral neuropathy accompanied with HTLV I associated myelopathy J Neurol Sci 2003 206(1) 17-21
- 11) Takenouchi N, Yamano Y, Usuku K, Osame M, Izumo S Usefulness of proviral load measurement for monitoring of disease activity in individual patients with human T lymphotropic virus type I associated

- myelopathy / tropical spastic paraparesis J Neurovirol 2003 9(1) 29 35
- 12)Furukawa Y, Saito M, Matsumoto W, Usuku K, Tanaka Y, Izumo S, Osame M Different cytokine production in Tax expressing cells between HTLV I associated myelopathy / tropical spastic paraparesis patients and asymptomatic HTLV I carriers J Infect Dis 2003 in press
- 13)Saito M, Braud VM, Goon P, Hanon E, Taylor GP, Saito A, Eiraku N, Tanaka Y, Usuku K, Weber JN, Osame M, Bangham CR Kitze B, Usuku K Low frequency of CD94/NKG2A positive T lymphocytes in HTLV 1 associated myelopathy / tropical spastic paraparesis patients but not in asymptomatic carriers Blood 2003 in press
- 14)Igakura T, Stinchcombe JC, Goon PK, Taylor GP, Weber JN, Griffiths GM, Tanaka Y, Osame M, Bangham CR Spread of HTLV-I Between Lymphocytes by Virus Induced Polarization of the Cytoskeleton Science 2003 299(14) 1713 1716
- H 知的所有権の出願・登録状況
(予定を含む。)
- 1 特許取得
特にない。
- 2 実用新案登録
特にない。
- 3 その他
特にない。

HIV 脳症、HAM/TSP 患者髄液におけるサイトカインの測定

分担研究者 田平 武 長寿医療研究センターセンター長

研究要旨

ルミネックスを用いて HAM/TSP 患者、HIV 脳症患者髄液のサイトカインパターンを対照炎症性疾患と比較した。HAM/TSP では IL-10 の特異的増加があることか分かった。HIV 感染があり合併症のない群と HIV 脳症の間に MIP 1 α 、MIP 1 β 、RANTES の差を認めなかった。

研究協力者

原 英夫 国立療養所中部病院
長寿医療研究センター
齋藤峰輝 鹿児島大学医学部
第3内科
延原康幸 ”
納 光弘 ”
出雲周二 鹿児島大学医学部難治
ウイルス研究所
宇宿功市郎 鹿児島大学医学部医療
情報学
高瀬貞夫 広南病院
岸田修二 東京都立駒込病院

イトカインを測定し比較した研究はない。本研究は、ルミネックスを用いて多数のサイトカインを同時に測定し、それぞれの病態に特徴的なサイトカインパターンを明らかにすることを目的とする。

B 研究方法

髄液は診断の為に採取され、残りか-20℃以下で保存されていた検体を用いた。サイトカインの測定はルミネックス（日立ソフトウェア）を用いた。対象は HAM/TSP 80 例、多発性硬化症（急性期）18 例、HIV 感染症 27 例、対症として無菌性髄膜炎 5 例、多発性硬化症（寛解期）1 例、慢性再発性脱髄性多発神経炎 2 例、キラン・ハレー症候群 1 例である。HIV 感染症の内訳は合併症なし 9 例、HIV 脳症 6 例、PML 2 例、サイトメガロウイルス脳症 3 例、ヘルペス髄膜炎 2 例、トキシプラズマ症 2 例、クリプトコッカス症 3 例であった。

A 研究目的

HIV 脳症、HAM/TSP はレトロウイルス感染細胞が中枢神経系に侵入し、その感染細胞が産生するサイトカインあるいは二次的に産生されたサイトカインが病態形成に関与すると考えられている。しかし、これまで多くのサイトカインが単発的に測定されてきたか、同じ検体を用いて多数のサ

(倫理面への配慮)

最近の検体は病態の研究の為に使用することかあることを明記した説明書を用いてインフォームトコンセントをとって採取されている。ここに用いた検体は、症例数が多くない疾患である為に昔採取した検体も含まれている。このような古い検体については必ずしもインフォームトコンセントかとられていないか、対象とする疾患の病態かまたよく分かっていないものであるところから、病態診断の一環として行われたものであり、倫理的に問題とはならない。

C 研究結果

1 HAM/TSP の結果

IL-2、IFN γ は急性期 MS 程ではないか、他の炎症性疾患に比し高値を示した (図 1,2)。IL-4、IL-6、IL-8 は他の炎症性疾患と差がなかった。IL-1 β は MS、他の炎症性疾患より低値を示した (図 3)。IL-10 は HAM/TSP で最も高く、急性期 MS より高値を示した (図 4)。GM-CSF は他疾患と同等であった。IL 5 は急性期 MS を除いていずれも低値であった。TNF- α は他疾患では測定可能で、急性期 MS が高値を示したが、HAM/TSP ではいずれも測定限界以下であった (図 5)。

2 HIV 感染症の結果

今回は MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES についてのみ検討した。HIV 脳症と何ら合併症のない HIV 感染症を比較した場合、これらのサ

イトカインには差を認めなかった (図 6-8)。

D 考察

今回 HAM/TSP、HIV 脳症においてルミネックスを用いた新しいサイトカイン測定法を導入した。ルミネックスの原理は 100 種類のヒースに 100 種類のサイトカイン抗体を固定し、それを髄液と混合し、それぞれのサイトカインに特異的な蛍光標識二次抗体を用いて測定するものである。測定器はフローサイトメーターのような原理で、ヒースのフローを第 1 蛍光でそのヒースの種類を検出し、第 2 蛍光で抗体と結合した各サイトカインの反応強度をみるものである。この方法ではわずか 50 μ l という少量の髄液で理論的には 100 種類のサイトカインが同時に測定できることになる。現在は人手でできるキット (Biosource International) に限界があり、また価格の面からも測定できるサイトカインには限界がある。その感度は ELISA とほぼ同等であるか、低い値は ELISA と同様に不正確となる。

今回の結果で HAM/TSP では IL-2 や IFN- γ が急性期 MS に匹敵する程高値を示し、本症が炎症性疾患であることを改めて確認する結果となった。最も興味深い結果は IL-10 が他のどの疾患よりも高値を示したことである。最近、宇宿らは IL-10 のプロモーター領域の遺伝的多型と HAM/TSP の相関を見出し、HAM 型では IL 10 の発現高値が予想され、本研究結果と非常

によく合う。今後、キャリアーとの比較、ATL との比較を行うことで診断にも応用できるものと期待される。

今回の検討で HAM/TSP では TNF- α が全く検出されなかった。TNF- α が本当に低いのか、検査上の手技に問題があったか、あるいは冷凍保存中に分解されたかを明らかにする必要がある。

HIV 感染症は 3 つのケモカインについてのみ行った。調べた範囲では、HIV 感染があり、脳症も合併症もない群と HIV 脳症との間に差を見つけることはできなかった。今後更に多くのサイトカインについて検討し、HIV 脳症に特異的なパターンを見出すつもりである。

E 結論

HAM/TSP 患者髄液では IL-10 が特異的に高値を示す。

F 研究発表

1 論文発表

1) Toko Shimizu, Toyojiro Matsuishi, Ryo Iwamoto, Kazuyo Handa, Hiroshi Yoshioka, Hirohisa Kato, Shigeharu Ueda, Hideo Hara, Takeshi Tabira, Eisuke Mekada Elevated levels of anti CD9 antibodies in the cerebrospinal fluid of patients with subacute sclerosing panencephalitis The Journal of Infectious Diseases 185 1346 50, 2002

2) Pal Endre, Tabira T Autonomic regulation of experimental autoimmune

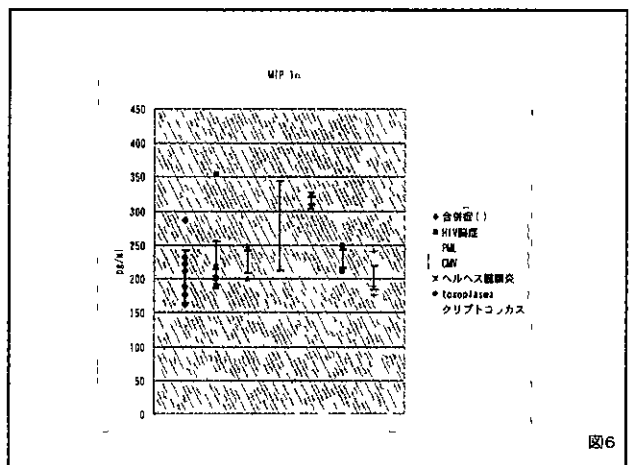
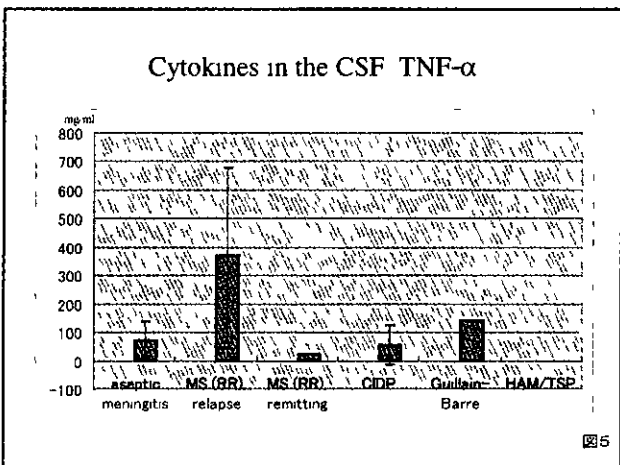
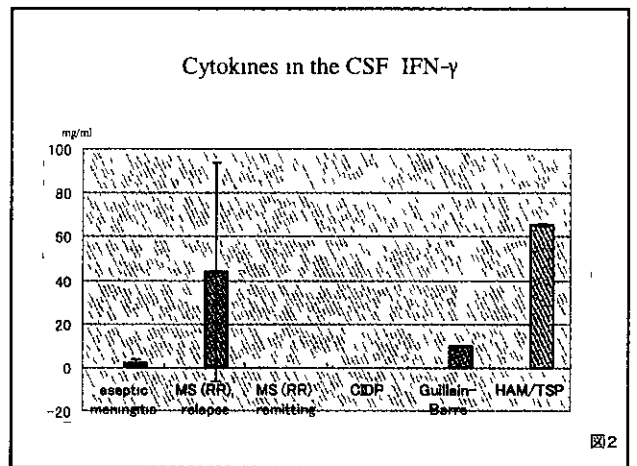
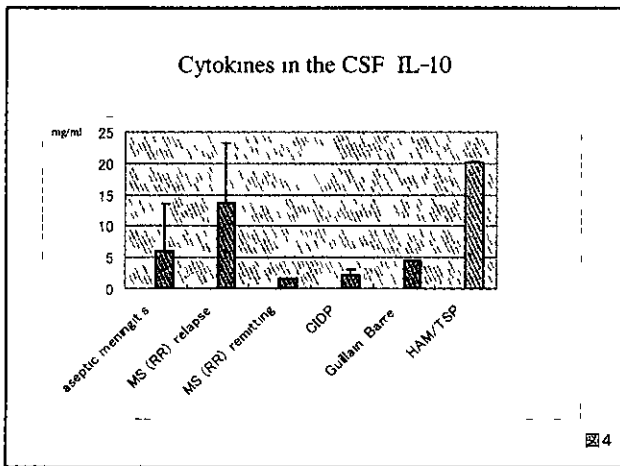
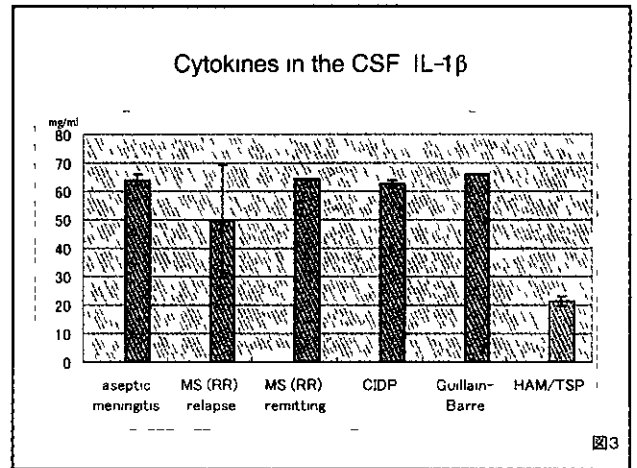
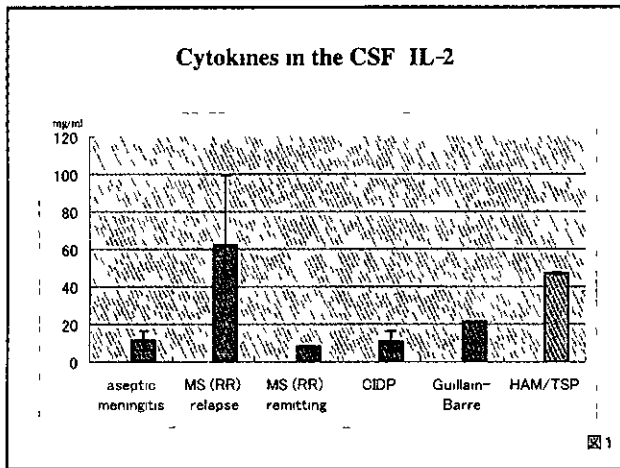
encephalomyelitis The role of interferon- γ Neuroimmunomodulation 3, 10 80 84, 2002

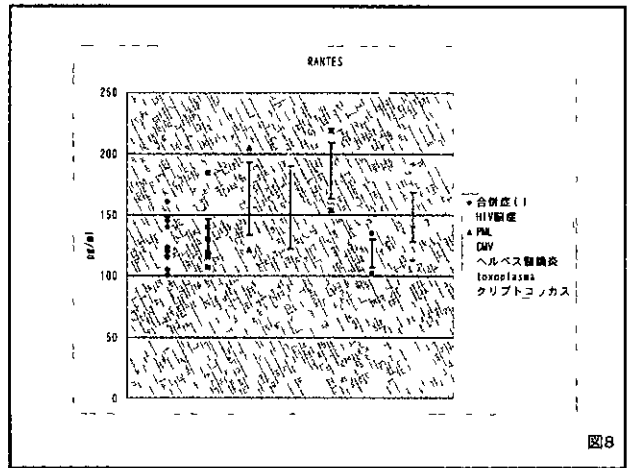
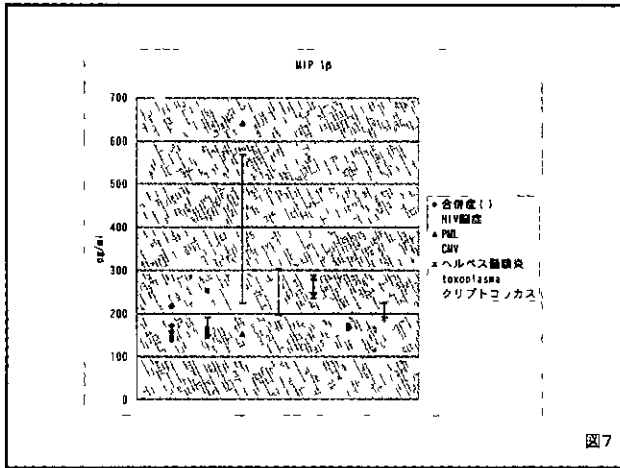
2 学会発表

1) 清水透子、原英夫、田平武、松石豊次郎 亜急性硬化性全脳炎における髄液中抗 CD9 抗体の病的意義の検討、第 43 回日本神経学会総会 2002 年 5 月 28 日 札幌

G 知的所有権の取得状況

- | | |
|----------|----|
| 1 特許取得 | なし |
| 2 実用新案登録 | なし |
| 3 その他 | なし |





研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Xing HQ, Moritoyo T, Mori K, Tadakuma K, Sugimoto C, Ono F, Hayakawa H, Izumo S	Simian immunodeficiency virus encephalitis in the white matter and degeneration of the cerebral cortex occur independently in simian immunodeficiency virus infected monkey	J Neurovirol (in press)			2003
Sugimoto C, Tadakuma K, Otani I, Moritoyo T, Akari H, Ono F, Yoshikawa Y, Sata T, Izumo S, Mori K	Nef gene is required for robust productive infection of Simian Immunodeficiency Virus in T cell rich paracortex in lymph node	J Virol (in press)			2003
Takenouchi N, Yamano Y, Usuku K, Osame M, Izumo S	Long term follow up of HTLV I proviral load in patients with HAM/TSP	J Neurovirol	9 (1)	29 35	2003
Furukawa Y, Saito M, Matsumoto W, Usuku K, Tanaka Y, Izumo S, Osame M	Different cytokine production in Tax expressing cells between HTLV I associated myelopathy /tropical spastic paraparesis patients and asymptomatic HTLV I carriers	J Infect Dis (in press)			2003
Kubota R, Furukawa Y, Izumo S, Usuku K, Osame M	Degenerate specificity of HTLV I specific CD8+ T cells during viral replication in patients with HTLV I associated myelopathy (HAM/TSP)	Blood (in press)			2002
Saito M, Higuchi I, Saito A, Izumo S, Usuku K, Bangham CRM, Osame M	Molecular analysis of T cell clonotypes in muscle infiltrating lymphocytes from patients with human T lymphotropic virus type 1 polymyositis	J Infect Dis	86 (9)	1231 41	2002
Yamano Y, Nagai M, Brennan M, Mora CA, Soldan SS, Tomaru U, Takenouchi N, Izumo S, Osame M, Jacobson S	Correlation of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV 1) mRNA with proviral DNA load, virus specific CD8(+) T cells, and disease severity in HTLV 1 associated myelopathy (HAM/TSP)	Blood	99 (1)	88 94	2002
Kiwaki T, Umehara F, Arimura Y, Izumo S, Arimura K, Itoh K, Osame M	The clinical and pathological features of peripheral neuropathy accompanied with HTLV I associated myelopathy	J Neurol Sci	206 (1)	17 21	2003
Nagai M, Utsunomiya T, Takenouchi N, Izumo S, Osame M	Failure to detect HTLV type 1 DNA from HTLV type 1 seronegative patients with chronic progressive spastic paraparesis in Kagoshima	AIDS Res Hum Retroviruses	18 (14)	1089 90	2002

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Marin O, Hasui K, Remondegui C, Sato E, Aye MM, Takenouchi N, Izumo S, Tajima K	Adult T cell leukemia/lymphoma in Jujuy, north west Argentina	Pathol Int	52 (5 6)	348 57	2002
Umehara F, Itoh K, Michizono K, Abe M, Izumo S, Osame M	Involvement of Fas/Fas ligand system in the spinal cords of HTLV I associated myelopathy	Acta Neuropathol (Berl)	103 (4)	384 90	2002
Saito M, Braud VM, Goon P, Hanon E, Taylor GP, Saito A, Eiraku N, Tanaka Y, Usuku K, Weber JN, Osame M, Bangham CRM	Low frequency of CD94/NKG2A positive T lymphocytes in HTLV 1 associated myelopathy /tropical spastic paraparesis patients but not in asymptomatic carriers	Blood (in press)			2003
Vine AM, Witkover AD, Lloyd AL, Jeffery KJ, Siddiqui A, Marshall SE, Bunce M, Eiraku N, Izumo S, Usuku K, Osame M, Bangham CR	Polygenic control of human T lymphotropic virus type I (HTLV I) provirus load and the risk of HTLV I associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis	J Infect Dis	186 (7)	932 9	2002
Kitze B, Usuku K	HTLV 1 mediated immunopathological CNS disease	Curr Top Microbiol Immunol	265	197 211	2002
Osame M	Pathological mechanisms of human T cell lymphotropic virus type I associated myelopathy (HAM/TSP)	J Neurovirol	8 (5)	359 64	2002
Hashiguchi T, Tara M, Nuna K, Higuchi I, Arimura K, Osame M, Maruyama I	Adult T cell leukemia (ATL) cells which express neural cell adhesion molecule (NCAM) and infiltrate into the central nervous system	Inter Med	41 (1)	34 38	2002
Ikegami M, Umehara F, Ikegami N, Maekawa R, Osame M	Selective matrix metalloproteinase inhibitor, N biphenyl sulfonyl phenylalanine hydroxamic acid, inhibits the migration of CD4+ T lymphocytes in patients with HTLV I associated myelopathy	J Neuroimmunol	127 (1 2)	134 38	2002
Yoshida Y, Machigashira N, Wang SY, Osame M	A patient with acute onset HAM/TSP after blood transfusion complicated with pseudopseudohypoparathyroidism	Intern Med	41 (10)	899 900	2002