

# 実験的自己免疫性脳脊髄炎の発症機序における cyclooxygenases と 5-lipoxygenase の役割

分担研究者 高 昌星<sup>1)</sup>  
共同研究者 T. Shin<sup>2)</sup>

## 研究要旨

多発性硬化症 (MS) の動物実験モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の発症機序に炎症性メディエーターが関与していることが示唆されているが、その詳細な役割については不明である。我々は EAE 病変における cyclooxygenase (COX) -1、COX-2 および 5-lipoxygenase (5-LOX) の発現を観察するとともに、COX および 5-LOX の選択的阻害薬である phenidone を用いて EAE におけるその役割を検討した。COX-1、COX-2 および 5-LOX はともに EAE で有意に亢進した。EAE ラット脊髄中では COX-1 陽性アストロサイトが増加しており、マクロファージがみられた。一方、COX-2 は EAE ラット脊髄中ではさらに発現が増加していた。Phenidone 投与群は対照群に比し、発症率、臨床症状の重症度、麻痺の期間ともに低下していた。以上より、EAE の発症には COX-1、COX-2、および 5-LOX が炎症性メディエーターとして、重要な役割を果たしており、これらの選択的抑制薬は MS で代表される中枢神経系における炎症性疾患の制御に役立つことが示唆される

## 研究目的

多発性硬化症の動物実験モデルである、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の発症機序に NO やアラキドン酸代謝物をはじめとした炎症性メディエーターが関与していることが示唆されているが、その詳細な役割については不明である。Cyclooxygenases (COX) および lipoxygenases (LOX) はアラキドン酸代謝における重要な酵素であり、cyclooxygenases (COX) および lipoxygenases (LOX) の阻害薬は抗酸化作用により、カニン酸による神経細胞障害を防ぐことが明らかにされつつある。EAE では脊髄内のグリア細

胞や浸潤マクロファージにおける cyclooxygenase-1 (COX-1) と cyclooxygenase-2 (COX-2) の発現が亢進していることが知られているが、EAE の発症機序における、これらの役割については不明である。今回、我々は EAE 病変における COX-1、COX-2 および 5-lipoxygenase (5-LOX) の発現を経時的に観察するとともに、COX および 5-LOX の選択的阻害薬である phenidone を用いて EAE におけるその役割を検討した

## 研究方法

幼若ルイスラットをラット脊髄で Freund' s の完全アジュバントとともに後肢に感作し、EAE を作成した。感作後、毎日臨床症状を観察し、スコア化し、定量的に評価した。臨床症状がピークに達した日および完全回復した日にラットから脊髄を採取し、COX-1、COX-2、および 5-LOX を Western blot

1) 信州大学医学部保健学科

2) Department of Veterinary Medicine, Cheju National University, Republic of Korea

法および免疫組織学的に検討した。さらに感作7日前から感作前日まで COX および 5-LOX の選択的阻害薬である phenidone 200mg/kg を経口的に投与し、対照群と比較検討した。

### 研究結果および考察

Western Blot では COX-1 および COX-2 はともに臨床症状がピークに達した時点で有意に亢進し、回復期には低下した（図1、2）。5-LOX も同様に臨床症状のピーク時に増加していた（図3）。免疫組織学的には COX-1 は健常ラット脊髄中のアストロサイトにもみられたが、EAE ラット脊髄中ではさらに COX-1 陽性アストロサイトが増加しており、ED-1 陽性細胞がみられた。神経細胞と内皮細胞には COX-1 はみられなかった。一方、COX-2 は健常ラット脊髄中の神経細胞とアストロサイトの一部に発現がみられ、EAE ラット脊髄中ではさらに発現が増加していた。さらに COX-2 は EAE ラット脊髄の内皮細胞にも発現がみられた。5-LOX は COX-1、COX-2 と同様に健常ラット脊髄のアストロサイトに発現がみられ、EAE ラット脊髄ではさらに増加していた。Phenidone 投与群は対照群に比し、発症率、臨床症状の重症度、麻痺の期間ともに低下していた（表1）。以上より、EAE の発症には COX-1、COX-2、および 5-LOX が炎症性メディエーターとして、重要な役割を果たしており、これらの選択的抑制薬は EAE を抑制することが明かとなった。

### Western blot of COX-1 in EAE

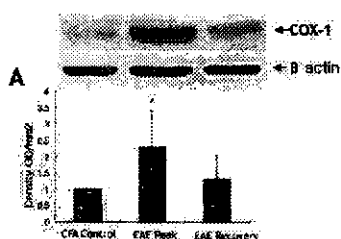


図1

### Western blot of COX-2 in EAE

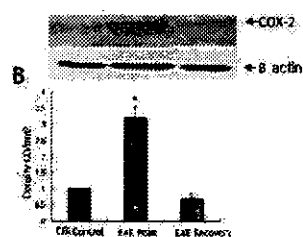


図2

### Western blot of 5-LOX in EAE

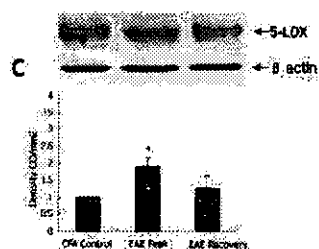


図3

### Effects of Phenidone on the Clinical Signs of EAE

Duration of phenidone treatment	EAE			
	Incidence	Day of onset	Maximum clinical score	Duration of paralysis
From day-7 to day-1				
Control	6/6	13.3±1.37	3.0±0.51	4.8±0.33
Phenidone	5/10 (50%)	13.8±0.58	1.3±0.47*	4.0±0.57*
From day+1 to day+7				
Control	10/10	14.3±1.70	2.1±1.07	2.9±0.60
Phenidone	4/11 (36%)	13.0±1.83	2.5±1.0	4.3±0.96

表1

## 結論

COX-1、COX-2、および5-LOXはEAEの発症において重要な炎症性メディエーターであり、これらの選択的抑制薬は多発性硬化症で代表される中枢神経系における炎症性疾患の制御に役立つことが示唆される。

## 健康危険情報

なし

## 知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

## アストロサイト由来の免疫抑制因子 (astrocyte-derived immune suppressor factor, AdIF)のリコンビナント蛋白精製とその作用

分担研究者 原 英夫<sup>1)</sup>

共同研究者 田平 武<sup>1)</sup>

研究要旨 我々は、これまで自己反応性T細胞にアポトーシスを誘導するアストロサイト由来の未知の因子のクローニングを行い、PLP 反応性T細胞にアポトーシスを誘導する因子として、SPARC/osteonectin と未知の遺伝子の astrocyte -derived immune suppressor factor, AdIF cDNA をクローニングした。昆虫細胞を用いた蛋白合成系を用いて AdIF recombinant protein を作成した。AdIF は PLP -reactive CD4+ T cell line に対して細胞増殖を抑制する効果を認めた。

### A. 研究目的

これまで我々は、マウス・アストロサイト細胞株 G26-24 を用いて、インターフェロンガンマ処理と未処理の各 cDNA より subtracted cDNA ライブラリーを作成し、PLP 反応性T細胞にアポトーシスを誘導する因子として、SPARC/osteonectin と未知の遺伝子の G-7 (astrocyte-derived immune suppressor factor, AdIF) cDNA をクローニングした。前回では、G-7(AdIF) 発現ミクログリアが、有意に EAE の発症の遅延と症状を改善することを報告した。今回は、AdIF recombinant protein を作成し、その機能を検索した。

### B. 研究方法

リコンビナント蛋白の作成には、昆

虫細胞を用いた蛋白合成系を採用し、DES (Drosophila expression system) を用いた。Schneider (S2) cells に G-7pMT/V5-His を transfection し、stable cell line を作成後、cell lysate を Probond His 蛋白精製キットを用いて AdIF/His fusion protein を精製した。精製した蛋白は、SDS-PAGE および western blot にて確認した。

細胞増殖能力は、代謝活性のある細胞が作り出すホルマザン色素を定量する WST-1 cell proliferation assay を用いて測定した。

Apoptosis の検出は、Annexin-V-FITC 染色を行った。

### C. 研究結果

AdIF は、未知の遺伝子で、長さは 726bp, 228 アミノ酸 (26Kda)、構造上、DUF143 (Domain of unknown function)モチーフを持つ。これに V5-His 蛋白を tag 蛋白とし

---

1. 国療中部病院長寿医療研究センター

て C 末側に発現する plasmid DNA (G-7pMT/V5-His)を作成した。

Schneider (S2) cells に G-7pMT/V5-His を transfection して作成した stable cell line の cell lysate からニッケルカラムで AdIF リコンビナント蛋白を精製した。SDS-PAGE gel および western blot にて、約 30kDa の1本のバンドを確認した。

PLP-reactive CD4+ T cell line に AdIF recombinant protein を加えて 24 時間培養し、細胞増殖抑制が起こるのを認めた。増殖抑制効果は、dose-dependent に認められた。Annexin-V-FITC 染色では、細胞膜が染色され apoptosis の所見を認めた。

#### D. 考察

我々は、これまで自己反応性T細胞にアポトーシスを誘導するアストロサイト由来の未知の因子のクローニングを行い、PLP 反応性T細胞にアポトーシスを誘導する因子として、SPARC/osteonectin と未知の遺伝子の G-7 (astrocyte-derived immune suppressor factor, AdIF) cDNA をクローニングした。さらに G-7(AdIF)発現レトロウイルスベクターを用いて microglia cell line に導入し、EAE の治療を試みた。G-7(AdIF)を発現する microglia cell line を腹腔投与し、B6 マウスにEAEを発症させると、有意にEAEの発症の遅延と症状の改善が認められたことを報告してきた。

今回は、昆虫細胞を用いた蛋白合成系

を用いて AdIF recombinant protein を作成した。AdIF は PLP-reactive CD4+ T cell line に対して細胞増殖を抑制する効果を認めた。

今後はさらに in vivo において EAE の治療効果について検索していく予定である。

#### E. 結論

自己反応性T細胞にアポトーシスを誘導するアストロサイト由来の未知の因子の astrocyte -derived immune suppressor factor, AdIF cDNA をクローニングした。昆虫細胞を用いた蛋白合成系を用いて AdIF recombinant protein を作成した。AdIF は PLP -reactive CD4+ T cell line に対して細胞増殖を抑制する効果を認めた。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得:なし。

実用新案登録:なし。

## インターフェロン $\beta$ のミクログリアに対する作用

分担研究者 錫村明生

共同研究者 川ノ口潤、加藤秀紀、満間典雅、水野哲也

### 研究要旨

IFN $\beta$ は多発性硬化症に有効であるが、作用機序には不明な点が多く、副作用としての感冒様症状の発現機序は不明である。そこで本研究では、C57B6J マウスから分離・培養した、ミクログリア、マクロファージのサイトカイン産生やNO産生に対するIFN $\beta$ の効果をRT-PCRおよびELISA法、グリース法を用いて検討した。また、抗原提示関連遺伝子発現に対する効果をRT-PCRで検討し、さらに、ミクログリアのMOG反応性T細胞のTh1への分化誘導に対する効果をIFN $\gamma$ を指標として検討した。IFN $\beta$ はミクログリアのIL-12産生を抑制したが、炎症性サイトカイン(TNF $\alpha$ 、IL1 $\beta$ 、IL6)や抗炎症性サイトカイン(IL10)、NO産生を増加させた。同様にマクロファージのTNF $\alpha$ 、IL1 $\beta$ 、IL6、NO産生を増加させた。また、抗原提示関連遺伝子であるclass II MHC、B7-1の発現は抑制し、MOG反応性T細胞のミクログリアによるTh1への分化誘導も抑制した。以上の結果により、IFN $\beta$ は抗原提示、Th1への分化は抑制するが、TNF $\alpha$ やNO等は増加させ、これが副作用としての感冒様症状を引き起こす可能性が示唆された。

### 研究目的

近年、多発性硬化症(Multiple Sclerosis, MS)の治療法開発がエネルギーシユに行われている。そのなかでもインターフェロン $\beta$ (IFN $\beta$ )は障害進行の抑制、再発率の減少といった臨床的有効性が証明されており、MSの長期予後を改善する治療薬の中心的薬剤として広く使われている。[1-2]しかしながら、IFN $\beta$ の作用機序には不明な点が多く、副作用として感冒様症状を引き起こすことが報告されているが、その機序も不明である。[3]そこで本研究では、ミクログリア、マクロファージ、T細胞に対するIFN $\beta$ の効果を検討した。

### 研究方法

C57B6J マウスから分離・培養した、ミクログリア、マクロファージのサイトカイン産生やNO産生に対するIFN $\beta$ の効果をRT-PCRおよび

ELISA法、グリース法を用いて検討した。また、抗原提示関連遺伝子発現に対する効果をRT-PCRで検討し、さらに、Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) 反応性T細胞のTh1への分化誘導に対する効果をIFN $\gamma$ を指標として検討した。

### 研究結果

IFN $\beta$ はミクログリアのIL-12産生を容量依存的に抑制したが(図1)、炎症性サイトカイン(TNF $\alpha$ 、IL1 $\beta$ 、IL6)や抗炎症性サイトカイン(IL10)、NO産生を容量依存的に増加させた。

(図2)同様にマクロファージのTNF $\alpha$ 、IL1 $\beta$ 、IL6、NO産生を容量依存的に増加させた。また、抗原提示関連遺伝子では、class II MHC、B7-1、VCAM-1の発現を容量依存的に抑制し、B7-2の発現を容量依存的に増強した。(図3)また、ミクログリアによるMOG反応性T細胞のTh1への分化誘導も容量依存的に抑制した。(図4)

名古屋大学環境医学研究所神経免疫分野

## 考察

IFN $\beta$ が、ミクログリアに対してIL-12の産生や抗原提示関連遺伝子の発現を抑制させるように作用し、それによりTh1への分化が抑制されることが、MSに対して有効な治療効果をもたらす可能性が示唆された。一方、IFN $\beta$ はミクログリアやマクロファージに対してTNF $\alpha$ やNO等を増加させた。TNF $\alpha$ やNOは脱髄のエフェクターとして重要視されており、従来の報告でもTNF $\alpha$ やNOを抑制する薬剤がMS治療に有効とされている。さらに、TNF $\alpha$ は全身投与により発熱、倦怠などを引き起こすことが示されており、これが副作用としての感冒様症状を引き起こす可能性が示唆された。他の抗TNF $\alpha$ 作用を持つ薬剤との併用がMS治療、副作用防止双方のために必要と考えられる。

## 結論

IFN $\beta$ はミクログリアに対して、抗原提示、Th1への分化は抑制するが、TNF $\alpha$ やNO等は増加させた。

## 文献

1) IFN $\beta$  Multiple Sclerosis Study Group, 1993, Interferon  $\beta$  1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis: 1. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* 43(4), 655-661.

2) Jacobs, L.D., Cookfair, D.L., Rudick, R.A., Herndon, R.M., Richert, J.R., Salazar, A.M., Fischer, J.S., Goodkin, D.E., Granger, C.V., Simon, J.H., Alam, J.J., Bartoszak, D.M., Burdette, D.N., Braiman, J., Brownschidle, C.M., Coats, M.E., Cohan, S.L., Dougherty, D.S., Kinkel, R.P., Mass, M.K., Munschauer, III, F.E., Rriore, R.L.,

Pullicino, P.M., Scherokman, B.J., Whitham, R.H., 1996. Intramuscular interferon  $\beta$ -1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborate Research Group (MSCRG). *Ann. Neurol.* 39(3), 285-904

3) Rice, G.P., Ebers, G.C., Lublin, F.D., Knobler, R.L., 1999. Ibuprofen treatment versus gradual introduction of interferon beta-1b in patients with MS. *Neurology.*

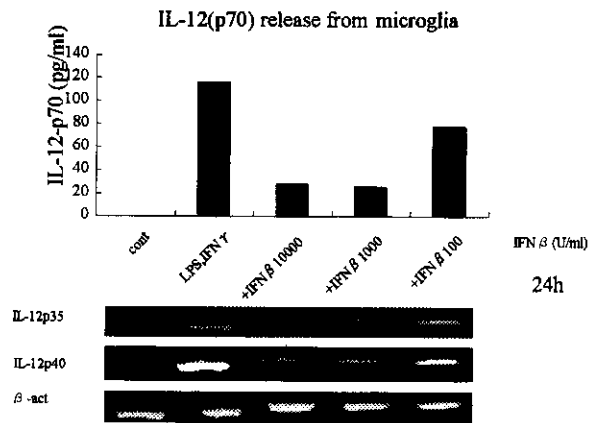


図1. IFN $\beta$ がミクログリアのサイトカイン産生(IL-12)に与える作用

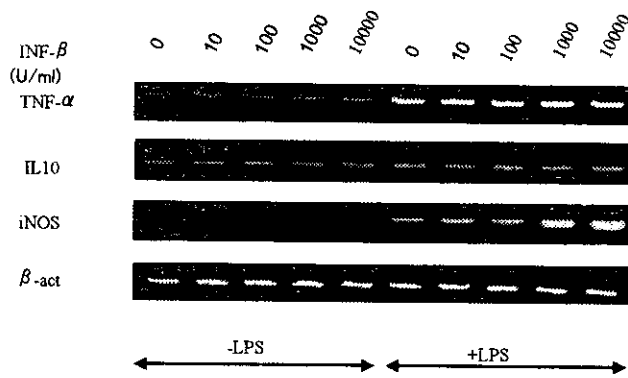


図2. ミクログリアがサイトカイン(TNF- $\alpha$ , IL10) iNOSの発現に与える作用

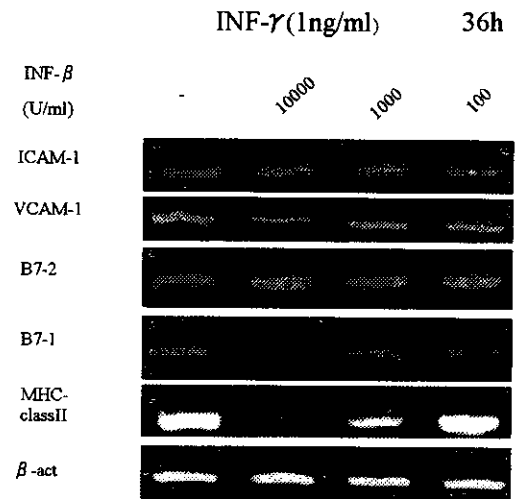


図3. IFN  $\beta$  がミクログリアの抗原提示関連遺伝子発現に与える作用

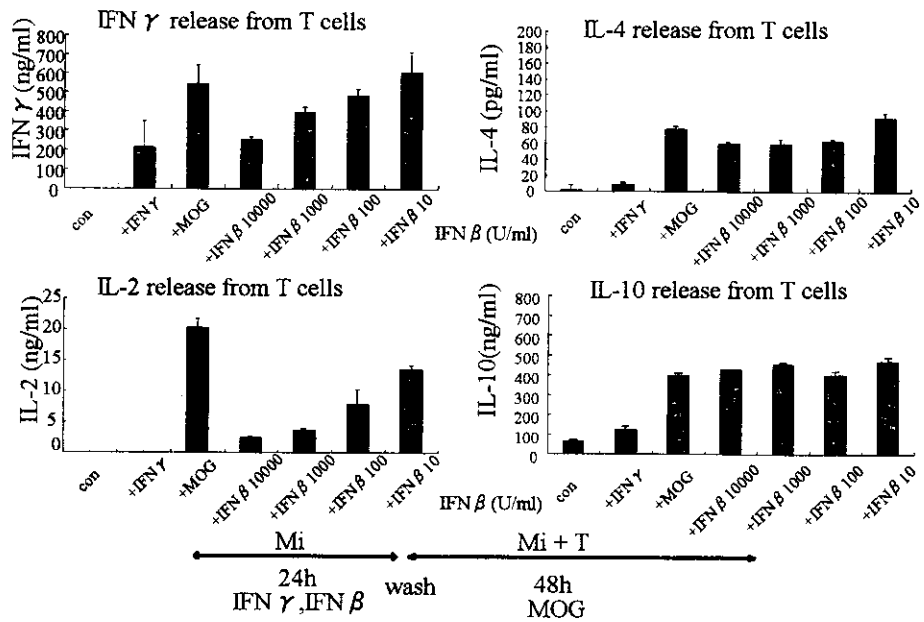


図4. ミクログリアによるTh1への分化誘導に対してIFN  $\beta$  が与える作用



## ウイルス性脱髄モデルからみたMS発症機序に関する考察

分担研究者 大原義朗

共同研究者 朝倉邦彦, 姫田敏樹

### 研究要旨

Theilerウイルスによる脱髄モデルを用いて脱髄をきたす株でのみ産生されるL\*蛋白の発現を解析した。解析を容易にするためL\*蛋白にエピトープ・タグを組み込んだ組み換えウイルスを作製した。このウイルスはBHK細胞では野生株と同様の増殖を示したが、IFN反応性のL929細胞では増殖が抑制された。急性期in vivoでは、マウスの脱髄感受性にかかわらずL\*蛋白の脳内での発現が認められたことから、L\*蛋白の発現そのものが脱髄感受性を規定するものではないことが示唆された。さらにL蛋白のzinc-binding motifを変化させることなくL\*蛋白に3xFLAGエピトープ・タグを組み込んだウイルスは、BHK細胞、L929細胞のいずれでも野生株と同じ増殖パターンを示し、持続感染をきたすことから、このmotifが持続感染・脱髄に重要であり、その機構にIFN抑制が関与していることが示唆された。

### 研究目的

多発性硬化症 (MS) の原因の一つとしてウイルス感染が永きに渡って論じられてきたが、いまだ明確な結論は得られていない。とくにHHV-6やE-Bウイルスなどヘルペスウイルス属との関連を示唆する報告が多い。ヘルペスウイルス属はゲノムが120~250kbと非常に長く、コードされるタンパク質も数十以上あり、機能の不明なものも多いためその解析は容易ではない。我々はこれまで、Theilerウイルスを用いたMS実験モデルにおいてその病態の解明と治療法の開発について取り組んできた。Theilerウイルスは全長約8 kbの一本鎖RNAウイルスで解析が比較的容易であり、DA株はマウス脊髄に持続感染し脱髄を引き起こし、MSの動物モデルとして用いられている。脱髄の機序はいまだ不明であるが、脱髄をきたす株でのみ17kDaのout of frameの小さな蛋白、L\*蛋白が合成され、ウイルス持続感染および脱髄に重要な役割を持つと考えられている。今回このL\*蛋白を3xFLAGエピトープ・タグを用いてin vitro, in vivoで解析し、加えてL\*蛋白の上流にあるLeader Peptide (L蛋白)のzinc-binding motifの持続感染・脱髄における重要性を検討した。

### 研究方法

図に示すように、L\*蛋白の開始コドン直下に3xFLAGエピトープ・タグを組み込んだ組み換えウイルス (DA/3xFLAGL\* ; -C-H-C-C- zinc-binding motifの間にエピトープ・タグが組み込まれている) を作製し、このウイルスをBHK細胞やL929細胞に感染させin vitroでの発現を検討した。また、マウス (SJL/JとC57BL/6) の脳内に接種し、in vivoでのL\*蛋白の発現を解析した。L蛋白の開始コドンの直下に3xFLAGエピトープ・タグを組み込んだ組み換えウイルス (DA/3xFLAGLD) も作製し、このウイルスをBHK細胞やL929細胞に感染させin vitroでの発現をWestern blottingで解析し、マウスの脳内に接種して持続感染・脱髄について検討した。さらに、zinc-binding motifを変化させることなく3xFLAGエピトープ・タグを組み込むために、L\*蛋白の開始コドンをACGに置換し、その上流に新たな開始コドンと3xFLAGエピトープ・タグを組み込んだ組み換えウイルス (DA/3xFLAGL\*4) を作製した。このウイルスをBHK細胞やL929細胞に感染させin vitroでの発現をWestern blottingで解析し、マウスの脳内に接種し持続感染・脱髄について検討した。

### 研究結果

L\*蛋白にエピトープ・タグを組み込んだDA/3xFLAGL\*は、BHK細胞では野生株と同様の増

殖を示したが、IFN 反応性の L929 細胞では増殖が抑制された。マウスの脳内に接種した結果、L\* 蛋白は急性期に神経細胞に選択的に発現するが、持続感染や脱髄はきたさなかった。また、急性期にはマウスの系統にかかわらず（脱髄感受性にかかわらず）発現が認められた。L 蛋白にエピトープ・タグを組み込んだ DA/3xFLAGLD は、in vitro, in vivo とも野生株とまったく同様の結果が得られた。zinc-binding motif を変化させることなく L\* 蛋白に 3xFLAG エピトープ・タグを組み込んだ DA/3xFLAGL\*4 は、in vitro では BHK 細胞、L929 細胞のいずれでも野生株と同様の増殖パターンを示した。

#### 考察・結論

L\* 蛋白は脱髄感受性の有無にかかわらず急性期脳内の神経細胞で発現が認められたことから、L\* 蛋白の発現そのものが脱髄感受性を規定するも

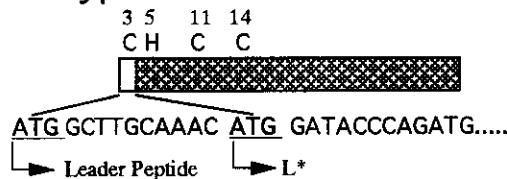
のではないことが明らかとなった。また、zinc-binding motif 内にタグを挿入した組み換えウイルスは、IFN 反応性の L929 細胞で増殖せず、持続感染・脱髄も起こさないことから、この motif が持続感染・脱髄に非常に重要であり、その機構に IFN 抑制が関与していることが示唆された。今後 L 蛋白や L\* 蛋白の標的分子を同定することにより、脱髄発症の病態解明や H-2 遺伝子に拘束される機構が明らかになるのではないかと考えられる。さらに、MS との関連が示唆されているウイルスで同様の機能を持つ蛋白が見出されれば、MS におけるウイルスの果たす役割を明らかにする一助となるであろう。

#### 知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし  
 実用新案登録：なし

図 本研究で用いた野生株と組み換えウイルス

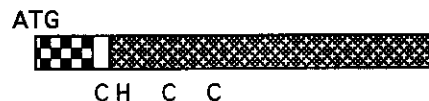
#### 1. Wild-type DA



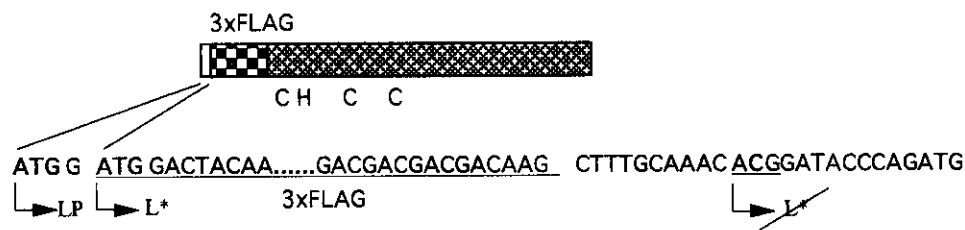
#### 2. DA/3xFLAGL\*



#### 3. DA/3xFLAGLD



#### 4. DA/3xFLAGL\*4



# HAM/TSP 発症に関与する宿主因子、とくに non-HLA 因子と HTLV-I プロウイルス量

分担研究者 納 光弘<sup>1)</sup>

共同研究者 齊藤 峰輝<sup>1)</sup>、宇宿 功市郎<sup>2)</sup>、児玉 大介<sup>1)</sup>、松元 渉<sup>1)</sup>、  
Amir H. Sabouri<sup>1)</sup>、榮樂 信隆<sup>1)</sup>、Alison M. Vine<sup>3)</sup>、出雲 周二<sup>4)</sup>、  
Charles R.M. Bangham<sup>3)</sup>

## 研究要旨

HAM がごく一部の無症候性キャリアー (HC) に発症し、患者の生体内で高プロウイルス量を維持するメカニズムを解明するため、HAM 群、HC 群における非 HLA 候補遺伝子多型のアリル頻度を解析し HTLV-I ウイルス量と対比した結果、HAM 発症に関連する複数の遺伝子多型を同定した。遺伝子多型の中には HTLV-I ウイルス量がより低い群で関連するもの、より高い群で関連するものが存在した。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。

## 研究目的

HAM は HTLV-I 感染がその発症に深く関わっている慢性進行性の脊髄炎症性疾患であるが、HTLV-I 感染者の大半は生涯にわたって無症候性キャリアー (HC) として経過し、HAM 発症に至るのは感染者のごく一部である。HAM が一部の感染者にのみ発症するメカニズムを解明し、感染者の発症予測、適切な治療時期の選択を可能にすることを最終目標に研究を行なった。我々のこれまでの検討から、HAM は HTLV-I 感染者の 1%前後に発症し、個体内の HTLV-I ウイルス量は無症候性キャリアー (HC) の 7~16 倍に増加していること、ウイルス量は HAM 発症者家族の HC においても家族歴のない HC より高いこと、感染ウイルス量が末梢血リンパ球の 1%以上になると HAM 発症の危険率が等比級数的に上昇することがわかっている[1]。また、HAM 群、HC 群における HLA の頻度を比較検討し、既に報告している[2,3]。今回は、さらに対象を非 HLA 候補

遺伝子に広げ解析した。

## 研究方法

HAM 患者、HC のゲノム DNA を用いて、63 部位 (loci) 91 種類の non-HLA 遺伝子多型 (SNPs, VNTR or CAn repeat) を解析し、HTLV-I ウイルス量と対比した。解析は 100 例ごとに行い、この段階で有意差が認められた場合に症例数を増して解析した (各 200 例まで)。77 多型が 100 例ごとの解析で有意差がないことが判明し、14 多型が全例解析まで行われた。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。以上の検討に加え、これらの宿主要因を用いて重回帰分析を行い、HAM 発症予測の

<sup>1)</sup> 鹿児島大学医学部 第三内科

<sup>2)</sup> 鹿児島大学医学部 医療情報管理学

<sup>3)</sup> Dept. Immunology, Imperial College, UK

<sup>4)</sup> 鹿児島大学医学部 難治ウイルス研・分子病理

可能性を検討した。

## 研究結果

非 HLA 要因の解析から、MMP-9 promoter d(CA)<sub>n</sub> repeat の延長、Aggrecan VNTR 1630bp アリルおよび TNF- $\alpha$ -863A 多型が HAM 発症の危険率を上げることが判明した。また SDF-1-801A 3' UTR、IL-10 -592A、Vitamin D receptor exon 9 Apal 多型が HAM 発症の危険率を下げ、IL-15 191C は、HTLV-I ウイルス量の低下している群に多いことが示された。特に 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。ROC 曲線からは、HTLV-I ウイルス量 2%で、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-A\*02、HLA-DRB1\*0101 はウイルス量 2%未満で、HLA-B\*5401、TNF- $\alpha$ -863A は 2%以上で HAM 発症に対する効果があることが明らかになった。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 Tax により転写活性化され、各多型が転写活性に影響することを明らかにした。

## 考察

HAM 発症に関連する複数の HLA、non-HLA 宿主要因を明らかにした。特に、ウイルス量と HAM 発症の関連を詳しく解析し、HAM 発症予測が可能であるデータの蓄積が出来たことが今回の研究の最大の成果である。これらの因子の作用機序についても、免疫応答の段階で関与するものか、連鎖する他の要因に関与しているものかを明らかにするためさらに解析を進めている。引き続き HAM 発症に関連する宿主因子とその作用機序を明らかにすることで、精度の高い HAM 発症予測と適切な治療時期の選択を可能にしたいと考えている。

## 結論

HAM 発症に関連する HLA、non-HLA 複数の遺伝子多型を同定し、HTLV-I ウイルス量が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明らかにした。

## 文献

- [1] Nagai M, Usuku K, Matsumoto W, Kodama D, Takenouchi N, Moritoyo T, Hashiguchi S, Ichinose M, Bangham CR, Izumo S, Osame M. Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. *J Neurovirol.* 1998;4(6):586-93.
- [2] Jeffery KJ, Usuku K, Hall SE, Matsumoto W, Taylor GP, Procter J, Bunce M, Ogg GS, Welsh KI, Weber JN, Lloyd AL, Nowak MA, Nagai M, Kodama D, Izumo S, Osame M, Bangham CR. HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(7):3848-53.
- [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.* 2000;165(12):7278-84.

## 健康危険情報

なし

## 知的財産権の出願・登録情報

特許取得・なし

実用新案登録・なし

# INTERLEUKIN-10 PROMOTER GENE SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM DETERMINES BOTH PROVIRAL LOAD OF HTLV-I IN ASYMPTOMATIC CARRIERS AND THE RISK OF HAM/TSP

分担研究者 出雲 周二<sup>1)</sup>

共同研究者 Amir H Sabouri<sup>1,4)</sup>、斉藤 峰輝<sup>1,4)</sup>、Alison M Vine<sup>2)</sup>、  
宇宿 功市郎<sup>3)</sup>、Charles RM Bangham<sup>2)</sup>、納 光弘<sup>4)</sup>、

## Summary

HAM/TSP is neurological disease that occur approximately 1-2% of infected people whereas vast majority remains healthy throughout life. To investigate additional non-HLA candidate gene that influence the outcome of HTLV-I infection, we analyzed 6 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the interleukin-10 (IL-10) promoter region by using a population association study from HTLV-I endemic area Kagoshima, Japan. The IL-10 -592A/C SNP showed significant difference in allele frequency between 231 cases of HAM/TSP and 224 HCs, whereas there were no significant differences in 5 other SNPs. Surprisingly, IL-10 -592A/C SNP was also associated with both a significant reduction in proviral load in HCs ( $p=0.0032$ , Mann-Whitney test) and a significant reduction in the risk of HAM/TSP (two-tailed P value is 0.01). Using luciferase reporter gene constructs, we demonstrated that HTLV-I Tax transactivates IL-10 promoter in the human T-cell line Jurkat and this was higher in IL-10 -592 C allele than A allele. We further demonstrated that serum IL-10 was elevated in HAM/TSP patients and this was also significantly higher in patients with CC genotype than that of AA or AC. This is the first report to show the association of non-HLA gene polymorphism, viral load and the risk of disease in human virus infection.

## Aim

We previously reported that HLA-A\*02, Cw\*08, DRB1\*0101 and B\*5401 is associated with the risk of developing HAM/TSP. However, these HLA did not account for all the observed difference in the risk of HAM/TSP. To investigate non-HLA candidate genes that influence the outcome of HTLV-I infection, we focused on IL-10 and analyzed 6 single nucleotide polymorphisms (SNP) in the IL-10 promoter by using a population associated study from HTLV-I endemic

area Kagoshima, Japan.

## Materials and methods

Two hundred and thirty-one cases of HAM/TSP were compared with 224 randomly selected HTLV-I seropositive asymptomatic carriers (HCs) by PCR-RFLP analysis. Of these, 148 HAM patients and 167 HCs were overlapped with our previous population based study therefore used for the logistic regression analysis. The HTLV-I proviral load in

<sup>1</sup> 鹿児島大学医学部 難治ウイルス研・分子病理

<sup>2</sup> Dept. Immunology, Imperial College, UK

<sup>3</sup> 鹿児島大学医学部 医療情報管理学

<sup>4</sup> 鹿児島大学医学部 第三内科

peripheral blood mononuclear cells was measured at one time point in all HAM/TSP patients and HCs by using an ABI 7700 sequence detector. To test whether IL-10 promoter is transactivated by HTLV-I Tax and -592 A/C SNP affect this transactivation,  $5 \times 10^5$  Jurkat cells were cotransfected with a reporter plasmid (IL-10 -592 AA-Luc or IL-10 -592 CC-Luc) and pCG-Tax or pCG-BL expression plasmid for luciferase assay. Serum IL-10 level was measured by ELISA in 39 HAM/TSP patients (13AA, 13AC and 13CC).

### Results

The IL-10 -592A/C SNP showed significant difference in allele frequency between 231 cases of HAM/TSP and 224 HCs, whereas there were no significant differences in 5 other SNPs. Surprisingly, IL-10 -592A/C SNP was also associated with both a significant reduction in proviral load in HCs ( $p=0.0032$ , Mann-Whitney test) and a significant reduction in the risk of HAM/TSP (two-tailed P value is 0.01). Luciferase assay demonstrated that HTLV-I Tax transactivates IL-10 promoter in the human T-cell line Jurkat and this was higher in IL-10 -592 C allele than that of A allele. Serum IL-10 level was significantly higher in HAM/TSP patients with CC genotype than AA or AC.

Table 1. Genotype frequency of IL-10 -592A/C SNP

	HAM		
	Observed	Expected	Genotype frequency
CC	44	34.5	0.19
AC/AA	187	196.5	0.81
total	231		1.00
	HC		
	Observed	Expected	Genotype frequency
CC	24	33.5	0.11
AC/AA	200	190.5	0.89
total	224		1.00

$p=0.0127$

$\chi^2$  on genotype,  $\chi^2=6.21$

Table 2. IL-10 -592A/C SNP genotype and proviral load.

	AA	AC	CC
HAM	639.95±603.78	747.11±629.68	716.78 ±736.33
HC	77.70±140.45	131.03±176.30	269.92±515.70

AA-CC :  $p^{KW}=0.0004$       AC-CC :  $p^{KW}=0.019$

$p^{KW}$  : by Kruskal-Wallis test and Sheffe's F

### Discussion

Our results indicate that IL-10 -592A/C SNP affects both proviral load and the risk of developing disease in HTLV-I infected individuals by regulating IL-10 levels *in vivo*. Association with both a significant reduction in proviral load in HCs and a significant reduction in the risk of HAM/TSP is exactly analogous to the argument with HLA-A\*02 and Cw\*08, suggesting significance and the reality of the effect. Further functional studies are necessary to clarify the role of IL-10 in HTLV-I infection.

### Conclusion

IL-10 -592A/C SNP determines both proviral load in HCs and the risk of HAM/TSP.

### 健康危険情報

なし

### 知的財産権の出願・登録情報

特許取得・なし

実用新案登録・なし

## HAM 患者における HTLV-I 変異ウイルスと変異ウイルス特異的 CTL の解析

分担研究者 納 光弘<sup>1)</sup>

共同研究者 久保田龍二<sup>1)</sup>、有村公良<sup>1)</sup>、古川良尚<sup>2)</sup>、宇宿功市郎<sup>3)</sup>、出雲周二<sup>4)</sup>

### 研究要旨

HTLV-I 関連脊髄症（以下 HAM）は、多発性硬化症（以下 MS）と多くの類似点を有し、HAM の病態解明および治療法の確立は、MS の治療に有用であると考えられる。HTLV-I 持続感染で発症する HAM において、細胞傷害性 T リンパ球（CTL）が多いにもかかわらず、HTLV-I ウイルス量が多いことが知られており、HIV 感染の様に CTL から逸脱した変異ウイルスが増殖している可能性が考えられた。我々は HAM 患者の臨床経過中のウイルス変異、および変異ウイルスに対する CTL の変化を検討した。結果は 1) 3 例の経過中 HTLV-I Tax 11-19 抗原の変異率は 0-20% で、優位になる変異ウイルスはなかった。2) 変異ウイルス抗原特異的 CTL は種々の頻度で認められたが、優位になる CTL はなかった。以上より、変異ウイルスが CTL から逸脱して増殖し、変異ウイルス集団になる現象は認められず、将来 CTL ワクチン導入は有用であると考えられた。

### 研究目的

HTLV-I 関連脊髄症（以下 HAM）は、脊髄型の多発性硬化症（以下 MS）と類似の症状を示し、病理学的にも中枢神経系に脱髄所見が認められている。また、MS では、その発症に自己免疫説とウイルス説が考えられており、HTLV-I 感染で発症する HAM の病態解明および治療法の確立は、MS の治療に有用であると考えられる。HAM 患者では、無症候性 HTLV-I キャリアとくらべ HTLV-I ウイルスと、HTLV-I 特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) の増加が特徴的である。また、HAM 患者の末梢血中には、単一の HTLV-I ウイルスだけではなく、雑多な変異ウイルスが混ざったウイルス集団を形成していることが報告されている。レトロウイルスである HIV による慢性感染症においては、臨床経過中に HIV の変異ウイルスが出現し、HLA と結合力の弱い変異ウイルスが宿主の免疫系より逸脱することが観察され CTL ワクチン開発の障害となっている。さらに逸脱した HIV 変異ウイルスが増殖し、プロトタイプと置き換わっていく現象が報告されている。しかし、HTLV-I 感染によって発症する HAM 患者において、上記の変化が認められるのかは不明である。我々は HAM 患者の経

過中に変異ウイルスが出現し、生体内のウイルス集団が変異ウイルスに置き換わっていくのかにつき検討した。

### 研究方法

HLA-A2+ の HAM 患者では HTLV-I Tax 11-19 が主な CTL エピトープであることがわかっている。3 例の HLA-A2+ HAM 患者の臨床経過中、5-8 年にわたり 4-5 ポイントでウイルス量を測定し、各症例でウイルス量が多い 1 ポイント、および少ない 2 ポイント、合計 3 ポイントを選択した。それぞれのポイントにつき CTL エピトープである HTLV-I Tax 11-19 ペプチドをコードする tax 遺伝子をサブクローニングし、約 50 クローンずつシーケンスを行った。HTLV-I Tax 11-19 に変異を認められたペプチドを合成し、それぞれの変異ペプチドに対する末梢血中の CTL の頻度を測定した。これには IFN- $\gamma$  を標的とした細胞内サイトカイン染色を行い、フローサイトメトリーで測定した。変異ペプチド特異的 CTL の頻度の、HTLV-I Tax 11-19 特異的 CTL の頻度に対する比率を計算し、変異ペプチド特異的 CTL の比率が変動しているのかを観察した。

（倫理面への配慮）

研究計画は、鹿児島大学医学部倫理委員会の許可を受けた。インフォームドコンセントのもとに、患者より末梢血採取に協力を頂いた。

- 1) 鹿児島大学医学部第三内科
- 2) 鹿児島大学附属病院輸血部
- 3) 鹿児島大学医学部医療情報管理学
- 4) 鹿児島大学医学部難治ウイルス研

## 研究結果

- 1) 3例の経過中 HTLV-I Tax 11-19 抗原の変異率は 0-20%で、平均 5.7%であった。
- 2) エピトープのアミノ酸置換は、HLA 結合部位よりも、T 細胞レセプター結合部位に優位に認められた。
- 3) アミノ酸置換による変異ペプチドの、計算にて予測される HLA 結合力は、Tax 11-19 の HLA 結合力とほぼ同じものが多かった。
- 4) 変異ウイルス抗原特異的 CTL は種々の頻度で認められたが、優位になる CTL はなかった。
- 5) 変異ウイルスの出現と、変異ウイルス抗原特異的 CTL の出現・増加とは特に関連はなかった。
- 6) 抗原の HLA 結合力が弱い変異ウイルスや、変異抗原特異的 CTL が存在しない変異ウイルスも認められたが、優位になることはなかった。

## 考察

HTLV-I 感染症では HIV 感染症の様に CTL から逸脱した変異ウイルスが主体となっていくような変化は認めず、プロトタイプが安定であった。CTL に認識されない変異ウイルスも認められたが、増殖をみとめなかった。これらの変異はウイルスの trans-activation に変化を与えウイルス増殖に負に働くために、結果的にこれらの変異ウイルスが増殖できない可能性が考えられた。HAM ではプ

ロトタイプが安定なため、CTL ワクチンの開発導入は有用である可能性がある。

## 結論

- 1) 変異ウイルスの出現が高い症例があり、生体内でウイルスが増殖・変異していることが推察された。
- 2) CTL に認識されない変異ウイルスが優位にならないのは、変異ウイルス特異的 CTL の出現・増加によるのではなく、ウイルス自体の増殖能の低下による可能性が考えられた。
- 3) 3例の検討では、生体内において HTLV-I ウイルスは亜種も存在するが、プロトタイプは安定であり、免疫系より逸脱した変異ウイルスが主体となることはなかった。今後 CTL ワクチンの開発や、CTL より逸脱するウイルスのメカニズムの解明は、HAM の治療のために有用であろうと考えられる。

## 健康危険情報

なし。

## 知的所有権の出願・登録状況

特許取得：なし。

実用新案登録：なし。



# HAM 患者末梢血単核球におけるサイトカインシグナル伝達系の解析

分担研究者 中村龍文<sup>1)</sup>

共同研究者 西浦義博<sup>2)</sup>, 江口勝美<sup>2)</sup>, 森内良三<sup>1)</sup>, 片峰茂<sup>1)</sup>

## 研究要旨

HTLV-I-associated myelopathy(HAM)患者における免疫異常の分子メカニズムを明らかにするために、末梢血単核球でのサイトカインシグナル伝達に関する因子の mRNA 発現量を解析し、対照患者と比較検討した。その結果、HAM 患者では Th1/Th2 特異的転写因子である T-bet/GATA-3 発現が亢進していた。さらに、HAM 患者では SOCS1 および SOCS3 の発現パターンは IFN- $\gamma$ シグナリングの亢進と IL-4 シグナリングの低下を示し、また IL-12 受容体 $\beta$ 2(IL-12R $\beta$ 2)の発現も亢進していた。これらの事実は HTLV-I キャリアーでもほぼ同様にみられた現象であったが、HAM 患者では HTLV-I tax 発現と IL-12R $\beta$ 2 発現が強い相関を示し、HAM 患者では HTLV-I tax 発現を基盤とした IL-12R/STAT4 シグナリングの異常による Th1 の活性化が生じていることが示唆された。

## A. 研究目的

我々はこれまでに HTLV-I associated myelopathy (HAM)患者では末梢血リンパ球の血管内皮への接着能の亢進・IFN- $\gamma$ の産生亢進など Th1 系が activation されている可能性を報告してきた。この現象の分子機構の解明は HAM に対する新しい治療薬の開発に繋がるものと考えられる。最近、Th1/Th2 の分化においてサイトカインシグナル伝達系が果たす役割の重要性が明らかになってきている。その中で Th1/Th2 特異的転写因子である T-bet/GATA-3 は中心的な役割を果たす master switch と考えられているが、サイトカイン受容体の下流域に存在する JAK/STAT ファミリーおよびその negative regulator である SOCS ファミリーの関与も重要であることが明らかになってきた。今回、HAM 患者における Th1 activation の mechanism を明らかにするために、末梢血単核球をサイトカインシグナル伝達系の角度から解析した。

## B. 研究方法

1) 対象：HAM 患者 28 名を対象とし、抗 HTLV-I 抗体陽性キャリアー(HTLV-I キャリアー)9 名、他の神経疾患(OND)患者 22 名を対照患者とした。  
2) 方法：HAM 患者および対照患者末梢血より Ficoll-Paque にて分離した末梢血単核球から RNA を抽出し、Dnase で処理後、cDNA を合成。 $\beta$ 2-microglobulin を内部コントロールとし、T-bet、GATA-3、SOCS1、SOCS3、IL-12R $\beta$ 2 および HAM 患者・HTLV-I キャリアーについては HTLV-I tax も含め、SYBR Green I を用いて LightCycler (Roche

Diagnostics)にて半定量 RT-PCR を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は十分に研究の内容を説明した上で文書によるインフォームド・コンセントが得られた対象でのみ施行された。

## C. 研究結果

- 1) T-bet, GATA-3, SOCS1 の mRNA 発現は HAM 患者、HTLV-I キャリアー、OND 患者の順に高値を示した。逆に SOCS3 の mRNA 発現は HAM 患者、HTLV-I キャリアー、OND 患者の順に低値を示した(表 1)。しかし、これらは統計学的には HAM 患者と OND 患者の間では有意差があったものの、HAM 患者と HTLV-I キャリアーの間では有意差が得られなかった(表 1)。
- 2) T-bet と GATA-3 の mRNA 発現の相関に関しては HTLV-I キャリアーでは相関がみられたが、HAM 患者では相関がみられなかった(図 1)。
- 3) T-bet と HTLV-I tax の mRNA 発現の相関に関しては HAM 患者および HTLV-I キャリアー共に相関がみられなかった(図 2)。
- 4) IL-12 R $\beta$ 2 の mRNA 発現に関しては、HAM 患者では HTLV-I キャリアーと比較して統計学的には有意差は得られなかったものの、OND 患者とは有意差をもって高値を示した(表 1)。しかし、HTLV-I tax と IL-12 R $\beta$ 2 の mRNA 発現の相関をみると、HAM 患者では HTLV-I キャリアーと比較してより強い相関がみられた(図 3)。

## D. 考察

今回、末梢血単核球におけるサイトカインシグナル分子の mRNA 発現に関する解析において HAM 患者および HTLV-I キャリアーでは OND 患者に比較して SOCS1 の発現が亢進し、逆に

1) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染分子病態学

2) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科病態解析制御学

SOCS3 の発現は低下していた。この事実は HAM を含めた HTLV-I 感染者では IFN- $\gamma$  シグナリングの亢進と IL-4 シグナリングの低下があり、さらに IL-12 R $\beta$ 2 発現亢進を併せて考えると Th1 細胞の増加を基盤として Th1 の up-regulation に加えて Th2 の down-regulation が生じていて、その傾向は HAM でより強かった。一方で、Th1/Th2 分化の master switch である T-bet/GATA-3 発現に眼を向けてみると HAM 患者および HTLV-I キャリアー共に OND 患者に比較して有意に発現が亢進していた。HTLV-I 感染者では Th1 が activation されているにもかかわらず GATA-3 発現も亢進している事実はこの master switch のレベルで代償機構が働いているものと思われる。しかし、HTLV-I キャリアーでは両者の転写因子発現には相関がみられたが、より Th1 細胞が増加していると考えられる HAM 患者では相関がみられなかった。

次に、HTLV-I tax 発現との関係で T-bet と IL-12 R $\beta$ 2 発現をみてみると、T-bet に関しては HAM 患者、HTLV-I キャリアー共に HTLV-I tax 発現とまったく相関がみられなかったにもかかわらず、IL-12 R $\beta$ 2 に関しては HTLV-I キャリアーに比較して、HAM 患者では強い相関がみられた。

以上の事実より、HAM 患者では HTLV-I tax 発現を基盤とした IL-12R/STAT4 シグナリングの異常による Th1 の活性化が生じていることが示唆された。

#### E. 結論

- 1) HTLV-I 感染者では IFN- $\gamma$  シグナリングの亢進および IL-4 シグナリングの低下があり、IL-12 R $\beta$ 2 の発現亢進と併せて考えれば、Th1 の up-regulation に加えて Th2 の down-regulation があり、その傾向は HAM 患者で高かった。
- 2) しかし、Th1/Th2 の master switch である T-bet/GATA-3 の mRNA 発現のバランスは HTLV-I キャリアーではとれていたが、HAM 患者ではとれていなかった。
- 3) その一つの機序として、HAM 患者では HTLV-I tax 発現が関与した IL-12R/STAT4 シグナリングの異常がある可能性が示唆された。

表 1. T-bet, GATA-3, SOCS1, SOCS3, IL-12 R $\beta$ 2, mRNA 発現の比較 (mean  $\pm$  SD)

	HAM	HTLV-I carrier	OND
T-bet	0.26 $\pm$ 0.23	0.24 $\pm$ 0.30 <i>P</i> < 0.01	0.11 $\pm$ 0.13
GATA-3	0.17 $\pm$ 0.21	0.12 $\pm$ 0.15 <i>P</i> < 0.00001	0.02 $\pm$ 0.02
SOCS1	0.34 $\pm$ 0.33	0.15 $\pm$ 0.11 <i>P</i> < 0.00001	0.03 $\pm$ 0.03
SOCS3	4.86 $\pm$ 4.33	6.71 $\pm$ 4.40 <i>P</i> < 0.02	13.13 $\pm$ 6.49
IL-12R $\beta$ 2	0.32 $\pm$ 0.66	0.29 $\pm$ 0.31	0.11 $\pm$ 0.11

図 1. T-bet/GATA-3 mRNA 発現の相関

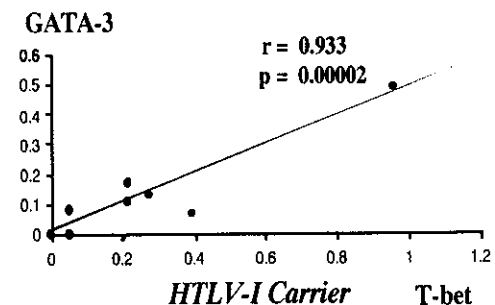
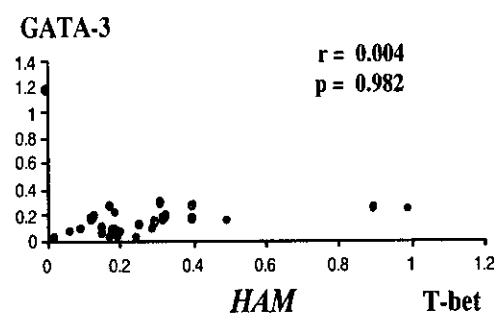


図 2. T-bet と HTLV-I tax mRNA 発現の相関

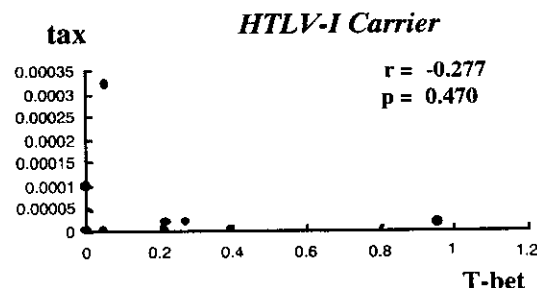
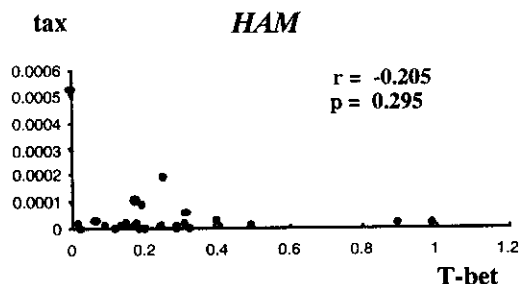
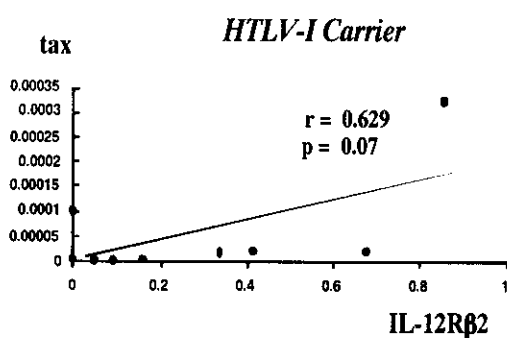
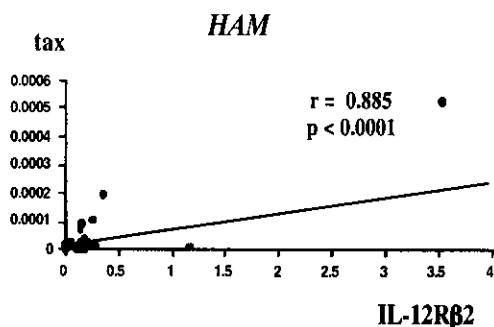


図 3. IL-12 Rβ2 と HTLV-I tax mRNA 発現の相関

3. その他  
なし。



F. 健康危険情報  
なし。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1) Fujimoto T, Nakamura T, Nishiura Y, Ichinose K, Furuya T, Shirabe S, Eguchi K. Up-regulation of interleukin-12 receptor expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurol Sci* 2002;196:21-26.

2) Kambara C, Nakamura T, Furuya T, Nishiura Y, Kawakami A, Ichinose K, Shirabe S, Eguchi K. Increased sialyl Lewis<sup>x</sup> antigen-positive cells mediated by HTLV-I infection in peripheral blood CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in patients with HTLV-I-associated myelopathy. *J Neuroimmunol* 2002;125:179-184.

H. 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。

## HAM 発症に関わる接着分子の分子病理学的解析

分担研究者 出雲周二<sup>1)</sup>

共同研究者 竹之内徳博<sup>1)</sup>、Xing Hui qin<sup>1)</sup>、斉藤峰輝<sup>2)</sup>、宇宿功市郎<sup>3)</sup>、  
納 光弘<sup>2)</sup>

### 研究要旨

HAM 脊髄病変形成において VLA-4 と VCAM-1 の接着が重要な役割を担っていると示唆されている。VLA-4 は活性化された T-cell において cleavage されるとの報告がある。VCAM-1 は2つのアイソフォームがあり VLA-4 との結合能の差が報告されている。そこで HAM 患者及び carrier の PBMC を免疫染色し VLA-4 の cleavage についての検討と、剖検胸髄を前索・側索・後索に分け RT-PCR による VCAM-1 発現パターンについての検討を行った。免疫染色では両方で陽性細胞数の有意差は認められなかったが Western blot の結果と併せると、HAM 患者の PBMC では各細胞における cleavage を受ける VLA-4 の程度が亢進していると考えられた。VCAM-1 の解析では部位による差が認められ、HAM の脊髄病変の局在に VCAM-1 の発現パターンの差が関与している可能性が示唆された。

### 研究目的

HAM 脊髄病変形成の初期過程において HTLV-I 感染細胞の脊髄血管内皮細胞への接着、血管外への遊走・浸潤が重要であると考えられている。我々はこれまでに HTLV-I 感染細胞の脊髄血管内皮細胞への接着・浸潤に関与する分子として、HAM 患者 PBMC における CD44 v6 variant の特徴、VLA-4 の cleavage の亢進、Rho family 蛋白質である Rac2 の発現亢進について報告した。

VLA-4 は integrin family に属し、 $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖を持っている。 $\alpha$  鎖は VLA-4 を特徴づける分子で通常 150kDa の分

子であるが、活性化された T-cell においてこの  $\alpha$  鎖の多くは 80kDa と 70kDa の分子に切断される (cleavage) との報告がある。この分子の主要な ligand はフィブロネクチンと VCAM-1 であることが知られているが、HAM 患者脊髄血管内皮においてはこの VCAM-1 の発現が亢進しているとの報告もあり、HAM 脊髄病変形成に VLA-4 と VCAM-1 の接着が重要な役割を担っている可能性が示唆されている。VCAM-1 は免疫グロブリンスーパーファミリーに属し 6 個の免疫グロブリン領域 (6D) と 7 個の免疫グロブリン領域 (7D) を持つものが知

<sup>1)</sup> 鹿児島大学医学部難治性ウイルス疾患研究センター

<sup>2)</sup> 鹿児島大学医学部第三内科

<sup>3)</sup> 鹿児島大学医学部医療情報管理学