

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

平成14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 15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)

## 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…………… 2

### 分担研究報告書

1. HAM におけるウイルスと CTL の相互作用

鹿児島大学医学部 内科学第三 久保田龍二、他…………… 12

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

鹿児島大学医学部 内科学第三 納 光弘、他…………… 14

3. HAM/TSP発症の遺伝的背景と修飾因子

鹿児島大学医学部医療情報管理学 宇宿功市郎、他…………… 17

4. 細胞接着因子を介した HTLV-I 発現増強の検討

長崎大学大学院医学研究科 中村龍文、他…………… 19

5. 疾患発症モデルの作製、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…………… 21

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…………… 24

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…………… 28

8. 研究成果の刊行に関する一覧表

…………… 32

# 総括研究報告書

## 厚生労働科学研究費補助金(こころの健康科学研究事業)

### 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: 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  
鹿児島大学助手 久保田龍二  
鹿児島大学助教授 宇宿功市郎

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、これまでにない新たな 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なぞであり、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未だに数多く、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 ウイルス量を的確に制

#### B. 研究方法及び成果

##### 1) HAM におけるウイルスと CTL の相互作用

納は、久保田とともに、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いる事実をもとに、CTL が生体内でウイルス排除に働いているかどうかの不明な点の解析を行った。このために HTLV-I プロウイルス量とウイルス核酸の変異、CTL の頻度、CTL の認識の程度、変異ウイルスに対する CTL の変化を検討した。結果、ウイルスが増加した時には、CTL も増加し、またその認識パターンは緩くなっていた。この認識パターンの変化は、変異ウイルスの出現には抑制的に働いている可能性がある。また、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。慢性感染症である HTLV-I 感染において、ウイルスは完全に除去されないものの、ウイルスが増殖した時にウイルス排除に

働いている事が示された。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、HTLV-I 感染症撲滅のために有用であろうと考えられる。

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

納らは、HAM の神経病理像、即ち下部胸髄を中心とした炎症性病巣を示していることから、炎症組織の脆弱性に着目して病態の解明を行った。このために近年、神経線維の支持組織として重要性が認識されている細胞外基質のうち特に脊髄に豊富に存在する aggrecan の HAM への関与について検討を加えた。具体的には aggrecan 分子に存在する遺伝子多型と血清・髄液中の aggrecan 抗原値の検討を行った。この結果、HAM 患者ではキャリアに比べアリル 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。今回、多型の検討では HAM 患者ではキャリアよりもアリル 28(1630bp)が有意に多かったわけであるが、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、このアリ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。また髄液中 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加える予定である。

## 3) HAM/TSP 発症の遺伝的背景と修飾因子

宇宿らは、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。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 CA 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。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明らかにした。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が HTLV-I 感染の予後に影響することを示唆していると考えている。また IL-10 -592A の HAM 発症危険率を下げるると同時に、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じであり、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。また、関節軟骨基質や中枢神経系に豊富に存

在する細胞外基質構成成分のひとつである aggrecan VNTR 1630bp アリルが HAM において高頻度であったことは、HAM における炎症の場である脊髄 matrix を構成する蛋白の多型が HAM 発症に関与すること示しており、これも今後その意義について検討を要する。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基盤ができたと考えている。

#### 4) 細胞接着因子を介した HTLV-I 発現増強の検討

中村らは、HTLV-I 発現亢進における細胞接着因子の関与を検討しているが、今回はローリングに関与する接着因子であるセレクチンリガンドに注目し、検討を行なっている。その結果、本接着因子への刺激において、HTLV-I tax の発現亢進が明らかにしている。昨年度の結果と併せて考えれば、リンパ球の血管内皮への接着の最初の段階において重要な役割を果たす二つの接着因子が HAM 患者末梢血における高 HTLV-I proviral load の形成に関与している可能性を考えている。現在までは HAM 患者由来の HTLV-I 感染 T 細胞株のみでの検討であるので、これらの現象が HAM 患者での HTLV-I 感染細胞だけに特異的なことであるのかどうか、HTLV-I キャリアー由来の HTLV-I 感染細胞株および末梢血 CD4 陽性 T 細胞を用いて比較検討を現在施行中である。

さて、今回の検討においてにおいても一つ特筆すべきことは HTLV-I 感染細胞ではセレクチンリガンドへの刺激において、T-bet、IL-12R  $\beta$ 2 および SOCS-1 という Th1 関連因子の mRNA の発現亢進も明らかにされたことである。ただ、GATA-3 mRNA 発現も亢進していた理由は不明である。しかし、SOCS-1 の mRNA の発現亢進と共に SOCS-3 の mRNA 発現の低下がみられたという事実は HTLV-I 感染細胞内での Th1 シグナリングと Th2 シグナリングのバランスを考える上で興味深い。この点について、シグナル間のクロストークの観点から現在解析中である。

以上より、HTLV-I 感染細胞はセレクチンリガンドを

介しての刺激において HTLV-I tax 発現の亢進を基盤として Th1 機能が up-regulate される可能性があることを示し、加えて、インターロイキン-12 受容体、SOCS-1 および Th1 特異的転写因子である T-bet の発現亢進も確認し、これらの事実より HTLV-I 感染細胞に発現しているセレクチンリガンドの activation は HTLV-I の発現亢進を基盤として、Th1 機能の活性化にも関与することが明らかにしている。

#### 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、成人 T 細胞白血病ウイルス (HTLV-I) 関連ミエロパチー (HAM) の病態解明や治療実験を目的に、独自に開発した HTLV-I 感染脊髄症発症ラットをモデルとして疾患発症機構の解析を行い、WKAH 系ラットの特異的に発症することやウイルス遺伝子以外に TNF- $\alpha$  や Bcl-2 など感染宿主遺伝子の脊髄局所での発現変化がオリゴデンドロサイトのアポトーシスに関連し、疾患発症に深く関わっていることを示している。今年度は、より網羅的に宿主遺伝子の発現の変化を明らかにすべく、アポトーシスや細胞周期および免疫関連遺伝子を中心とした独自にラット専用の cDNA アレイを作製し、このアレイを使用して、非感染ラットと感染ラットの宿主遺伝子発現の比較を行い、その一部の遺伝子については定量的リアルタイム RT-PCR によって確認している。このアレイ解析は病態の解明のみならず、治療実験にも有用であると報告している。具体的には、アポトーシス関連や細胞周期、免疫関連遺伝子を中心に GenBank に登録されているラット遺伝子 193 種と未登録のラット遺伝子 77 種および HTLV-I、HIV-1 遺伝子 11 種の計 281 遺伝子のそれぞれ約 500bp 断片を RT-PCR によりクローニングしている。クローニングした遺伝子断片をナイロン膜へスポットすることで 281 遺伝子のラット専用 cDNA アレイフィルターを完成したわけである。これを使用し、感染後 7 ヶ月の WKAH ラットを解析し、感染ラット脊髄で増加を示した遺伝子に内、TRADD 遺伝子の発現増強を定量的リアルタイム RT-PCR で確認している。このことは、

TRADD が TNF- $\alpha$  刺激によりアポトーシスを誘導する重要な遺伝子であることを考えると、昨年度までの結果を支持するものであると結論している。

#### 6) HTLV-I 感染価評価システム

足立らは、HTLV-I の迅速感染価定量システムを確立しウイルス複製阻害剤スクリーニングに資するため、レポーターT細胞株(H9細胞)を樹立している。これらのレポーターH9細胞株はHTLV-I Taxに反応してルシフェラーゼを産生するが、他の細胞株より顕著に感度が良い H9/K30-Luc1 株をこのアッセイシステムの標準株として使用し、MT2細胞由来HTLV-Iを用いた解析から、このレポーターシステムは、HTLV-Iの細胞融合能を測定するものであることが強く示唆している。即ち、HTLV-Iの完全長分子クローンK30を用い遺伝子工学的手法によりTaxに反応してルシフェラーゼを産生するレポータークローン(K30 LTR-Luc)を作製し、エレクトロポレーションによりK30 LTR-Lucをneo遺伝子発現ベクターとともにH9細胞に導入後、G418耐性クローンを選択した(H9/K30-Luc細胞)わけである。感染性のあるHTLV-Iを産生するMT2細胞をウイルス材料としてH9/K30-Luc細胞に感染させ、2日後の細胞内ルシフェラーゼ活性を定量することで、H9細胞(HTLV遺伝子陰性)、MT4細胞(HTLV tax遺伝子陽性、ウイルス産生陰性)、およびM8166細胞(HTLV tax遺伝子陽性、ウイルス産生陰性)をMT2細胞のコントロールとして用いたのである。この結果、開発したシステムは、MT2細胞からレポーター細胞へ細胞融合を介して移行したHTLV-I Taxを見ている可能性が強い。HIV-1の場合、ウイルスプロテアーゼが機能しなければ細胞融合も起こらないと考えられているので、このシステムでHTLV-Iプロテアーゼ阻害剤のスクリーニングは可能と報告している。

#### 7) HTLV-I プロテアーゼ阻害剤の開発

木曾らは、HTLV-Iの増殖阻害薬を目指して、HTLV-I固有のプロテアーゼの阻害剤の創製を試み

ている。今年度の検討ではin vitroの阻害剤評価系を用い、これまでにあるプロテアーゼ阻害剤ライブラリのスクリーニングを行ってリード化合物となる阻害剤を見いだしている。一方、HTLV-Iプロテアーゼの基質のアミノ酸配列に基づいてデザイン・合成した化合物は強い酵素阻害活性を示しており、この化合物をもとに構造変換を行い、低分子化と活性上昇を実現した化合物をも得ている。即ち、今回スクリーニングにより見いだした活性化合物は、それぞれ特徴的な構造を有し、HTLV-Iプロテアーゼはその結合部位付近ではHIV-1プロテアーゼに極めて近い構造をしており、基質のアミノ酸配列もP3-P3'においてはほぼ同一のプリファレンスを示すものの、HIVプロテアーゼに最適化した阻害剤は、HTLV-Iプロテアーゼを強く阻害することはなかったわけである。今回見いだした化合物の構造は、HIVとHTLV-Iのプロテアーゼの違いを理解するうえで貴重な情報で、HTLV-Iプロテアーゼに対してより強い阻害剤のデザインに役立つものと考えており、さらに多様なライブラリの中からスクリーニングすれば、有益な情報が得られることを期待できるとしている。また基質のアミノ酸配列中にHMCイノスターを導入することにより、強い阻害活性を持つKNI-10159を創製することに成功し、HMCはHTLV-Iプロテアーゼの場合でも、遷移状態概念誘導体として有効に機能することを証明している。これを基に低分子化し、アミノ酸置換により活性を増強させたKNI-10166はヘキサペプチドでありながらオクタペプチドのKNI-10159やKNI-10161より強い活性を示し、アミノ酸置換で異常アミノ酸に置換することでより高活性な化合物に誘導できるもの、生体の酵素に対する安定性や膜透過に関しても有利になると考えられると結論している。

#### 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、昨年度の臨床的側面からの解析に加えて、生体内での防御機転がど

のようになっているかを検討し、慢性感染症である HTLV-I 感染において、ウイルスは完全に除去されないものの、ウイルスが増殖した時にはウイルス排除に働いている事が示された。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、HTLV-I 感染症撲滅のために有用であろうと考えられる。

また、HAM の炎症組織である脊髄においてその構造そのものが発症の関連因子になる可能性が示され、かつ早期進行例で脊髄構成分子の破壊が強いことが示されたことは、発症後の治療選択に有用な情報を与えるものと考えている。これまで HAM 関連宿主主要因は免疫応答に絡む分子ということで HLA を中心とした解析を行っていたが、今年度までに non-HLA 分子の解析も行ない、これらの因子中 HLA-A、-C、SDF-1、TNF- $\alpha$  863 及び年齢、性、ウイルス量を勘案すると、HAM 患者と HC を 88% の確率で判別を可能となっている。更に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より詳細に解明している。即ち、HAM 疾患モデルでの発症機序の詳細をより詳しく検討できる DNA アレイシステムの構築に成功し、これを試用しての解析でも昨年度までの結果を支持する結論を得ているわけである。

HTLV-I プロテアーゼ阻害剤の開発の研究では、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において極めて有用な物質がみいだされたことが報告され、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 プロウイルス量制御のための新しい薬剤、プロテアーゼ阻害剤の開発が、HIV プロテアーゼの特徴とその差を利用した化学合成の系でおこなえることが可能となり、そのためのウイルス感染価評価システムが構築できた。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に成功し、その発症病態解明のための DNA アレイシ

テムが構築できた。加えて、HAM 患者個体内での感染防御システムの特徴をあきらかにし、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できたと考えている。

#### E. 研究発表(誌上発表のみ掲載)

1. 納 光弘、中枢神経系の感染性疾患の特徴、島田馨編、内科学書、中山出版、東京、2002、pp2151-2166
2. 納 光弘、血液疾患に伴う神経系障害、杉本恒明・小俣政男・水野美邦 総編集、内科学第 8 版、朝倉書店、東京、2003、pp2083-2084
3. 納 光弘、悪性腫瘍に伴う神経系障害、杉本恒明・小俣政男・水野美邦 総編集、内科学第 8 版、朝倉書店、東京、2003、pp2084-2086
4. 納 光弘、内科疾患に伴う神経系障害 1) ビタミン欠乏症、杉本恒明・小俣政男・水野美邦 総編集、内科学第 8 版、朝倉書店、東京、2003、pp2073-2074
5. 納 光弘、HTLV-I-associated myelopathy (HAM)、日本内科学会雑誌 創立 100 周年記念号 91:2308-2311, 2002
6. Osame M. Pathological mechanisms of human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy (HAM/TSP). *J Neurovirol* 8(5):359-364, 2002
7. 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
8. Hashiguchi T, Tara M, Niina 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. *Intern Med* 41(1):34-38, 2002
9. 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):384-390, 2002
  10. 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):134-138, 2002
  11. Itoh K, Umehara F, Osame M. Multifocal relapsing-remitting myelitis in a patient with atopic dermatitis: multiple sclerosis or atopic myelitis? *Intern Med* 41(6):495-497, 2002
  12. 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):932-939, 2002
  13. 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):1089-1090, 2002
  14. 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* 186(9):1231-1241, 2002
  15. Yoshida Y, Machigashira N, Wang SY, Osame M. A patient with acute-onset HAM/TSP after blood transfusion complicated with pseudohypoparathyroidism. *Intern Med* 41(10):899-900, 2002
  16. 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
  17. 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* 9(1):29-35, 2003
  18. 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
  19. 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 2003
  20. Saito M, Braud VM, Goon P, Hanon E, Taylor GP, Saito A, Eiraku N, Tanaka Y, Usuku K, Weber JN, Osame M, Bangham CR. 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
21. 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* in press 2003
  22. Fugo, K., Ishizu, A., Ikeda, H., Hayase, H., Sugaya, T., Higuchi, M., Tsuji, M., Abe, A., Suzuki, A., Shibata, M., Takahashi, T., Yoshiki, T. The role of the thymus in development of necrotizing arteritis in transgenic rats carrying the env-pX gene of human T-cell leukemia virus type-I. *American Journal of Pathology* 161(3):755-761, 2002
  23. Kenichi Akaji and Yoshiaki Kiso. Synthesis of cystine peptide. Ed by Murray Goodman, *Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*, Georg Thieme Verlag, Germany 2002, pp101-141
  24. Ei'ichi Ami, S. Rajesh, Jung Wang, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso. Synthesis of novel amino acid. L-bis-tetrahydrofuranylglycines. *Tetrahedron Letters* 43 (16) 2931-2934, 2002
  25. 木曾良明, 相馬洋平. 新しい HIV プロテアーゼ阻害剤. —大量投与や薬剤耐性などの問題克服をめざして. *医学のあゆみ* 201(4)231-235, 2002
  26. Yoshio Hamada, Jun Ohtake, Youhei Sohma, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso. New water-soluble prodrug of HIV protease inhibitors based on O-N intramolecular acyl migration. *Bioorg. Med. Chem.* 10 (12) 4155-4167, 2002
  27. S. Rajesh, Ei'ichi Ami, Tomoya Kotake, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso. An expedient synthesis of Na-protected-L-tetrahydrofuranylglycine and its application in the synthesis of novel substrate based inhibitors of HIV-1 protease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12 (24) 3615-3617, 2002
  28. H.M.Abdel-Rahman, G.S.Alkaramany, N. A. El-Koussi, A. F. Youssef, Y. Kiso. HIV protease inhibitors: Peptidomimetic drugs and future perspectives. *Curr. Med. Chem.* 9(21) 1905-1922, 2002
  29. Koushi Hidaka, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Keith F. McDaniel, Tatyana Dekhtyar, Lynn Colletti, Yoshiaki Kiso. Design and synthesis of pseudo-symmetric HIV protease inhibitors containing a novel hydroxymethylcarbonyl (HMC)-hydrazide isostere. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13(1) 93-96, 2003
  30. 足立昭夫、ケモカイン、今西二郎編「感染症の宿主防御機構—理論と実際」医薬ジャーナル社、2002, pp112-121
  31. 足立昭夫、上野史子、藤田美歌子. HIV-1, 2「新世紀の感染症学」日本臨床社、2003、印刷中
  32. Fujita, M., Sakurai, A., Yoshida, A., Matsumoto, S., Miyaura, M., and Adachi, A. Subtle mutations in the cysteine region of HIV-1 Vif drastically alter the viral replication phenotype. *Microbes and Infection.* 4:621-624, 2002
  33. Tomiyama, H., Akari, H., Adachi, A., and Takiguchi, M. Different effects of Nef-mediated HLA class I down-regulation on human immunodeficiency virus type 1-specific CD8<sup>+</sup>-T cell cytolytic activity and cytokine production. *Journal of Virology* 76: 7535-7543, 2002
  34. Nishimura, M., Matsuoka, M., Maeda, M., Mizuta, I., Mita, S., Uchino, M., Matsui, M., Kuroda, Y., Kawakami, H., Kaji, R., Adachi, A., and Uchiyama, T. Association between interleukin-6 gene polymorphism and

- human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I)-associated myelopathy. *Human Immunology* 63:696-700, 2002
35. Fujita, M., Matsumoto, S., Sakurai, A., Doi, N., Miyaura, M., Yoshida, A., and Adachi, A. Apparent lack of trans-dominant negative effects of various *vif* mutants on the replication of HIV-1. *Microbes and Infection* 4: 1203-1207, 2002
36. Fujita, M., Sakurai, A., Yoshida, A., Miyaura, M., Koyama, A.H., Sakai, K., and Adachi, A. Amino acid residues 88 and 89 in the central hydrophilic region of human immunodeficiency virus type 1 Vif are critical for viral infectivity by enhancing the steady-state expression of Vif. *Journal of Virology* 77: 1626-1632, 2003
37. Adachi, A., and Fujita, M. HIV-1 Vif and AIDS. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 2003, in press
38. Ueno, F., Shiota, H., Miyaura, M., Yoshida, A., Sakurai, A., Tatsuki, J., Koyama, A.H., Akari, H., Adachi, A., and Fujita, M. Vpx and Vpr proteins of HIV-2 up-regulate the viral infectivity by a distinct mechanism in lymphocytic cells. *Microbes and Infection* 2003, in press
39. Nishimura, M., Maeda, M., Yasunaga, J., Kawakami, H., Kaji, R., Adachi, A., Uchiyama, T., and Matsuoka, M. Influence of cytokine and mannose binding protein gene polymorphisms on human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) provirus load in HTLV-I asymptomatic carriers. *Human Immunology* 2003, in press
40. Fujita, M., Yoshida, A., Sakurai, A., Tatsuki, J., Ueno, F., Akari, H., and Adachi, A. Susceptibility of HVS-immortalized lymphocytic HSC-F cells to various strains and mutants of HIV/SIV. *International Journal of Molecular Medicine* 2003, in press
41. Koyama, A.H., Adachi, A., and Irie, H. Apoptosis in animal virus infection. *International Reviews of Immunology*. 2003, in press
42. 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* 196:21-26, 2002
43. 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* 125:179-184, 2002
44. Kubota R, Furukawa Y, Izumo S, Usuku K, Osame M. HTLV-I-specific CD8<sup>+</sup> T cells during viral replication in patients with HTLV-I-associated myelopathy (HAM/TSP). *Blood*, in press 2003
45. Kubota R, Soldan SS, Martin R, Jacobson S. Selected cytotoxic T lymphocytes with high specificity for HTLV-I in cerebrospinal fluid from a HAM/TSP patient. *J Neurovirol* 8(1):53-7, 2002
46. 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* 97(4):987-993, 2001
47. Kitze B, Usuku K. HTLV-1-mediated immunopathological CNS disease. *Curr Top Microbiol Immunol*. 265:197-211, 2002
48. 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.* 7:228-234, 2001

49. 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* 268:1215-1221, 2001

# 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
分担研究報告書

HAMにおけるウイルスとCTLの相互作用

分担研究者 久保田龍二 鹿児島大学医学部第三内科 助手

研究要旨：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、CTL が生体内でウイルス排除に働いているかは不明である。我々はウイルス量とウイルス変異、CTL の頻度、CTL の認識の程度、変異ウイルスに対する CTL の変化を検討した。結果、ウイルス量が増える時に、CTL は増加し、認識パターンも変動していた。また、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なかった。CTL は生体内でウイルス増加に対して抑制的に働いており、将来 CTL ワクチンは有用であると考えられた。

A. 研究目的

HAM 患者において、CTL が多いにもかかわらず、ウイルス量が持続高値をしめすことより、生体内で CTL がウイルス増殖に対して抑制的に働いているか疑問である。このことを明らかにするために、3 例の HAM 患者において経時的にウイルスと CTL の動態について検討した。

B. 研究方法

経時的に末梢血リンパ球を保存してある 3 例の HAM 患者を選んだ。各患者について経時的に、定量的 PCR 法によるウイルス量測定、細胞内サイトカイン染色法によるウイルス特異的 CTL の頻度の測定、人工変異ペプチドによるウイルス特異的 CTL の認識パターンの変化、DNA シークエンスによる変異ウイルスの検出と変化、および生体内変異ウイルスペプチドに対する CTL の変化を検討した。

(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。

C. 研究結果

- 1) ウイルス量の変動と CTL 頻度の変化はよく相関した。
- 2) ウイルス量増加時に CTL の認識は緩くなっていた。
- 3) ウイルス量は CTL の多様性と逆相関した。
- 4) 3 例の経過中ウイルス抗原の変異率は 0-20% で、平均 5.7% であった。
- 5) 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。
- 6) 変異ペプチドの、計算にて予測される HLA 結合

力は、もとのペプチドの HLA 結合力とほぼ同じものが多かった。

7) 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。

8) 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。

9) 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。

D. 考察

ウイルスが増加した時には、CTL も増加し、またその認識パターンは緩くなっていた。この認識パターンの変化は、変異ウイルスの出現には抑制的に働いている可能性がある。また、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。

E. 結論

慢性感染症である HTLV-I 感染において、ウイルスは完全に除去されないものの、ウイルスが増殖した時にウイルス排除に働いている事が示された。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、HTLV-I 感染症撲滅のために有用であろうと考えられる。

F. 健康危険情報

生体内で CTL 作用を増強することは慢性ウイルス感染の治療に有用と考えられる。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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 2002 Dec 12; [epub ahead of print] in press
- 2) Kubota R, Soldan SS, Martin R, Jacobson S. Selected cytotoxic T lymphocytes with high specificity for HTLV-I in cerebrospinal fluid from a HAM/TSP patient. J Neurovirol 8(1)53-7, 2002

## 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。
3. その他  
なし。

厚生労働科学研究費補助金(こころの健康科学研究事業)  
分担研究報告書

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 納 光弘 鹿児島大学医学部第三内科 教授  
研究協力者 延原康幸、斉藤峰輝(同第三内科)、  
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べアレル 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がその発症に関わることが推察されている。このことは中枢神経組織においても組織構造の安定性が 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) HAM 200 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) HAM 29 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) HAM 55 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 HAM 109 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考える。

#### E. 結論

- (1)aggrecan アリル 28(1630bp)の保有がキャリアに比べ 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, Niina 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, 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 2002 127(1-2):134-138.
  - 6) 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):932-939.
  - 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。

## HAM/TSP 発症の遺伝的背景と修飾因子

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 助教授  
研究協力者 斉藤峰輝、延原康幸 鹿児島大学医学部第三内科

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明らかにした。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、宿主遺伝子型の HAM 発症への関与を検討したところ、HAM 発症に対して 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が示された。

### 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 $\alpha$ 療法が確立され、特にインターフェロン $\alpha$ 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。今回は 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。  
(倫理面への配慮)

### 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(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- $\alpha$ -863A 多型が HAM 発症の危険率を上げ、TNF- $\alpha$ -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- $\alpha$  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%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、non-HLA の双方で 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が示された。

### 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が HTLV-I 感染の予後に影響することを示唆していると考えている。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じであり、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。また、関節軟骨基質や中枢神経系に豊富に存在する細胞外基質構成成分のひとつである aggrecan VNTR 1630bp アリルが HAM において高頻度であったことは、HAM における炎症の場である脊髄 matrix を構成する蛋白の多型が HAM 発症に関与すること示しており、これも今後その意義について検討を要する。

#### E. 結論

HAM 発症に関連する複数の HLA、non-HLA 宿主主要因を明らかにした。さらに解析を続け、精度の高い HAM 発症予測と治療時期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 Nov 1;186(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 Oct 1;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 Jun;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 Jun 22;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。