

C. 研究結果

1. 本システムの2種類のレポーター細胞株により、サキナビルの抗ウイルス効果が確認された。
2. 候補薬剤9種類の抗HTLV-I効果は検出できなかった。
3. 候補薬剤9種類のうち4種類に抗HIV-1効果が認められたが、サキナビルほどの効果はなかった。

D. 考察

本システムは、HIV-1 Gag 蛋白質のプロテアーゼによる開裂成熟が HIV-1 の細胞融合活性に必須であるとの知見に基づいている。サキナビルの実験結果はこれとよく合致する。したがって、本システムはプロテアーゼ阻害剤の効果検証のみならず細胞融合活性阻害剤のスクリーニングにも使用可能である。

E. 結論

これまでの研究で、本システムによる解析の分子メカニズムと有効性が明らかになった。今後は、本システムを活用することで多数の候補薬剤（プロテアーゼ阻害剤、細胞融合活性阻害剤）をスクリーニングし、有効な抗 HTLV-I 薬剤の開発に努力したい。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Fujita, M., Sakurai, A., Yoshida, A., Miyaura, M., Koyama, A. H., Sakai, K., and Adachi, A. 2003. 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.
- (2) Nishimura, M., Maeda, M., Yasunaga, J., Kawakami, H., Kaji, R., Adachi, A., Uchiyama, T., and Matsuoka, M. 2003. 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* 64: 453-457.
- (3) Fujita, M., Yoshida, A., Sakurai, A., Tatsuki, J., Ueno, F., Akari, H., and Adachi, A. 2003. Susceptibility of HVS-immortalized lymphocytic HSC-F cells to various strains and mutants of HIV/SIV. *International Journal of Molecular Medicine* 11: 641-644.
- (4) Koyama, A., Irie, H., Kato, A.,

Nagai, Y., and Adachi, A. 2003. Virus multiplication and induction of apoptosis by Sendai virus: role of the C proteins. *Microbes and Infection* 5: 373-378.

- (5) Ueno, F., Shiota, H., Miyaura, M., Yoshida, A., Sakurai, A., Tatsuki, J., Koyama, A. H., Akari, H., Adachi, A., and Fujita, M. 2003. Vpx and Vpr proteins of HIV-2 up-regulate the viral infectivity by a distinct mechanism in lymphocytic cells. *Microbes and Infection* 5: 387-395.
- (6) Koyama, A. H., Adachi, A., and Irie, H. 2003. Physiological significance of apoptosis during animal virus infection. *International Reviews of Immunology* 22: 341-359.
- (7) 足立昭夫、上野史子、藤田美歌子 2003. HIV-1, 2. 新世紀の感染症学, 日本臨床社 (下巻) 497-502.

2. 学会発表

- (1) Fujita, M., Sakurai, A., Yoshida, A., Akari, H., and Adachi, A. (2003) Proteasome-degradation of HIV-1 Vif: mutational analysis. The 2003 Cold Spring Harbor meeting on retroviruses, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- (2) Sakaguchi, T., Uchiyama, T., Sugahara, F., Watanabe, H., Adachi, A., and Yoshida, T. (2003) Systematic study of virus-like particle formation by Sendai virus proteins: acceleration of release by

C protein and possible involvement of host factors. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Hyogo.

- (3) 小山一、Piroozmand Ahmad、藤田美歌子、足立昭夫、會田浄、入江宏 (2003) 単純ヘルペスウイルス感染細胞における HMGB1 蛋白の挙動. 第 51 回日本ウイルス学会学術集会、京都.
- (4) 菅原文博、坂口剛正、内山恒夫、足立昭夫、吉田哲也 (2003) ウイルス様粒子を用いたセンダイウイルス出芽の解析. 第 51 回日本ウイルス学会学術集会、京都.
- (5) 藤田美歌子、櫻井明子、吉田亜希子、Jere Abhay Jagdish、Ahmad Piroozmand、小山一、明里宏文、足立昭夫 (2003) HIV-1 Vif 蛋白質はプロテアソーム分解に高感受性である. 第 51 回日本ウイルス学会学術集会、京都.
- (6) 磯貝まや、藤井陽一、藤田美歌子、足立昭夫、竹森利忠、横田 (恒次) 恭子 (2003) HIV-1 Nef 発現が樹状細胞機能に及ぼす影響の解析. 第 51 回日本ウイルス学会学術集会、京都.
- (7) 藤田美歌子、吉田亜希子、櫻井明子、Jere Abhay Jagdish、Ahmad Piroozmand、小山一、足立昭夫 (2003) HIV-2 Vpx は逆転写反応に関与する. 第 51 回日本ウイルス学会学術集会、京都.
- (8) 藤田美歌子、櫻井明子、吉田亜希子、Jere Abhay Jagdish、Ahmad Piroozmand、小山一、明里宏文、千葉智樹、田中啓二、足立昭夫 (2003) HIV-1 Vif 蛋白

質のプロテアソーム分解とその生物学的意義. 第26回日本分子生物学会年会、神戸.

- (9) 小山一、島田佳子、Ahmad Piroozmand、藤田美歌子、入江宏、足立昭夫 (2003) ウイルス感染細胞におけるアポトーシスの誘導と HMGB1 蛋白の挙動. 第26回日本分子生物学会年会、神戸.

H. 知的財産権の出願・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。

成人T細胞白血病ウイルス関連ミエロパチーの病態解明及び治療法の開発に関する研究
疾患発症モデルの作製、解析とそれを用いた治療実験

分担研究者 吉木 敬 北海道大学教授

研究要旨 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オリゴデントロサイトのアポトーシスで始まるこの疾患の感染宿主遺伝子の脊髄局所での発現変化を経時的、定量的さらには cDNA アレイを用いて網羅的に検討し、HTLV-I 感染による TNF- α や Bcl-2、TRADD の発現の変化が疾患発症に深く関わっていることを示してきた。今年度は、昨年度の感染・非感染 WKAH ラットの網羅的宿主遺伝子発現解析の結果を受けて、さらにいくつかのアポトーシス関連遺伝子の定量的リアルタイム RT-PCR を WKAH 系のみならず、非発症系感染・非感染ラット脊髄も含め検討し、SOCS-1 や IFN- γ さらには IGF-2 も疾患発症に関与する可能性を明らかにした。一方、HTLV-I 遺伝子導入ラット細胞を標的とした遺伝子治療実験も行った。

A. 研究目的

成人T細胞白血病ウイルス (HTLV-I) 関連ミエロパチー (HAM) の病態解明及び治療法の開発を推進して行くためには、感染から疾患発症までの宿主とウイルスの相互作用を理解し、感染成立後どの段階でどのようなウイルスの制御が疾患発症の抑制や治療に効果的かを検定して行く必要がある。したがって、適切な疾患モデルの開発はこの宿主とウイルスの相互作用を理解し、治療実験を進める上で有効な手段である。これを受けて、分担研究者は分担研究項目に従い、以下の具体的な目的達成に向けて研究を行う。1) 今までに開発した HTLV-I 感染脊髄症発症ラットモデル (HAM ラット) を用いた疾患発症機構解明を推進する。2) さらにヒトに近いウイルス産生能が期待されるヒト CRM1 (Chromosomal Region Maintenance 1) 遺伝子導入ラットを作製し、HTLV-I 感染を行い、より適切なヒト HAM モデルを樹立、解析する。3) 上記モデルを用いて、新たに開発された治療薬の効果判定などの治療実験を行う。本年度はこの内、1) については新たな疾患発症関連宿主遺伝子の同定、2) については invitro での実験も追加し、継続、3) に HTLV-I 遺伝子導入ラット細胞を用いた遺伝子治療実験を試みた。

B. 研究方法

1. HAM ラットの疾患発症機構解明

1) 感染モデルの作製と脊髄サンプルの調整

HAM 発症系 WKAH ならびに非発症系 ACI および LEW 新生仔ラットに 1×10^7 の MT-2 細胞を腹腔内注射し、1ヶ月後に末梢血の PCR で感染を確認した7ヶ月齢のラットを用いた。対照としては同月齢

の無処置同系ラットを用いた。WKAH は6頭ずつ、ACI と LEW はそれぞれ3頭ずつを用いた。感染後7ヶ月あるいは17ヶ月齢のラットは sodium pentobarbital 麻酔下で約300mlのice-cold PBSで全身を還流後素早く脊髄を採取し、液体窒素で冷凍後-80°Cで保存した。

2) 定量的リアルタイム RT-PCR

HTLV-I 感染・非感染ラットや非感染3系統ラットの cDNA アレイの結果を受けて、アポトーシスに関連する遺伝子 SOCS-1、IFN- γ 、IGF-2 などに特異的 primer を作製し、それを用いて random primer で逆転写した脊髄 cDNA サンプルを template として QuantiTect SYBR Green Master Mix (QIAGEN) による PCR を行った。PCR 反応は ABI PRISM 7900 Sequence Detection system (Applied biosystems) にて行い、その蛍光強度をリアルタイムに測定した。結果は GAPDH の値を基準とする比率で示した。

2. HTLV-I 不死化ラットリンパ球へのヒト CRM1 遺伝子導入

1) 以前我々が樹立した HTLV-I 感染不死化ラット CD4 T 細胞株 (TARS-1) に CMV プロモーターで発現するヒト CRM1 cDNA 遺伝子を導入した。導入ヒト CRM1 の発現は RT-PCR で確認して用いた。

2) 上記トランスフェクタントを BrdUrd で刺激後その gag 遺伝子発現を定量的リアルタイム RT-PCR で確認し、その細胞培養上清と細胞溶解物の p19 蛋白を ELISA によって測定した。

3. HTLV-I 遺伝子導入ラット細胞を用いた遺伝子治療実験

1) HTLV-I Tax 遺伝子活性化作用の標的である自身の LTR プロモーターやその疾患の発症に関わ

る可能性のあるサイトカイン遺伝子のプロモーターへの CREB/ATF-1 結合を阻害する目的で、CREB との結合性は維持されているものの、DNA 配列との結合能を失わせた ATF-1DN 遺伝子を Sinbis ウイルスベクターに組み込み、pX を発現し IL-6 を分泌する LTR-env-pX 遺伝子導入ラット関節炎滑膜細胞に ATF-1DN 遺伝子を導入した。対照として lacZ 遺伝子を導入した滑膜細胞を用いた。

2) 遺伝子導入後 ATF-1DN 遺伝子発現を確認した滑膜細胞について、pX 遺伝子発現は定量的 RT-PCR によって、IL-6 の産生については培養上清の ELISA によって測定し、対照と比較した。

(倫理面への配慮)

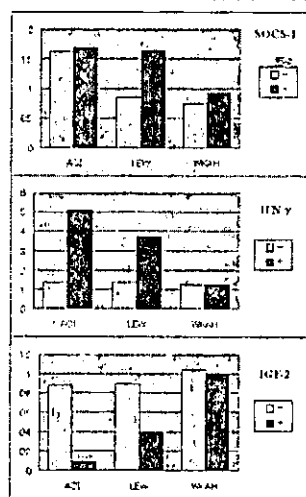
動物の使用にあたっては北海道大学大学院医学研究科動物実験施設の「動物実験に関する指針」を遵守し、実験に供した。

C. 研究結果

1. HAM ラットの疾患発症機構解明

これまでの研究で HAM 発症系 WKAH ラットの脊髄では HTLV-1 感染後約 7 ヶ月にピークを見るプロウイルスの増殖や pX の発現、7 ヶ月頃より始まる Bcl-2 の強い発現抑制、そしてその後漸増するアポトーシス細胞の出現から考えて、潜伏期であるこの時期に脊髄症発症に関わる重要なウイルスと宿主の相互作用が存在すると考えられる。したがって、この時期での宿主遺伝子の発現変化を見るため、昨年度は HTLV-1 感染 WKAH ラットと非感染同系ラット脊髄および非発症系である ACI および LEW の脊髄について cDNA アレイ解析を行った。本年度はその

中で抽出したアポトーシスに関連する遺伝子 SOCS-1、IFN- γ 、IGF-2 について、各感染、非感染ラット 7 ヶ月齢の脊髄での発現を定量的 RT-PCR により解析した。その結果を右図に示す。SOCS-1 は非感染ラットでは



は ACI で LEW や WKAH に比較して約 2 倍の発現があった。感染ラットでは ACI と WKAH では非感染ラットと同程度であったが LEW でのみ感染ラットで約 2 倍に増加し、ACI と同レベルになった。IFN- γ は非感染ラットでは 3 系統ともほぼ同レベルであったが、感染ラットでは ACI では約 4 倍、LEW で約 2.5 倍とどちらのラットでも増加した。しかし、

WKAH では全く増加していなかった。一方、PGF-2 の発現は非感染ラットでは系統差はほとんど見ないものの感染ラットで、ACI で約 1/8、LEW で約 1/2 と INF- γ とは逆相関するように減少したが、WKAH では全く変化がなかった。

2. HTLV-1 不死化ラットリンパ球へのヒト CRM1 遺伝子導入

ヒト CRM1 を遺伝子導入することで、TARS-1 の細胞溶解物内に p19gag の蛋白量が約 2 倍弱増加したが、BrdUrd で刺激後でももとの蛋白発現量自体が少なく、細胞上清では感度以下であった。

3. HTLV-1 遺伝子導入ラット細胞を用いた遺伝子治療実験

ATF-1DN 遺伝子を導入した LTR-env-pX 遺伝子導入ラット関節炎滑膜細胞では、対照と比較して pX 遺伝子の発現量が約 40% 減少したほか、IL-6 分泌量が約 60% 強減少した。

D. 考察

HTLV-1 はラットに感染し、WKAH 系ラットに限り脊髄症の発症を誘導する。昨年度までの解析結果から、HTLV-1 感染による WKAH 系ラット脊髄傷害機構としては感染後 7 ヶ月をピークとする脊髄局所でのウイルスの増殖とそれに伴う pX 発現増強が TNF- α の発現を増加させる一方、この感染後 7 から 12 ヶ月にかけて bcl-2 の発現が抑制されたオリゴデンドロサイトにアポトーシスを誘導し、その結果髄鞘の破壊を招き、脊髄症を発症すると考えられた。この現象は WKAH 系ラット脊髄に局限しており、ほかの臓器や他系統のラットでは見られない現象である。実際、ヒトの HAM/TSP も感染者の一部にしか発症しないことから考えても、感染宿主の臓器特異的な宿主遺伝子発現が脊髄症発症に重要な働きをしていると考えられる。さらに昨年度はこの宿主特異的 HAM 発症に関わる宿主遺伝子発現を明らかにするため、ラット専用の cDNA アレイを作製し、TNF- α 刺激によりアポトーシスを誘導する重要な遺伝子 TRADD も発症に関与している可能性を示唆した。今年度はこれに加え、非発症系である ACI や LEW を含め、感染後 7 ヶ月の脊髄での昨年度の cDNA アレイ解析から抽出したアポトーシス関連遺伝子の発現を定量的リアルタイム RT-PCR で検討し、そのうち SOCS-1、IFN- γ 、IGF-2 について発症系と非発症系で HTLV-1 感染によって発現パターンが異なることを示した。特に IFN- γ の発現は発症系と非発症系で大きく異なり、IFN- γ によって発現誘導される TNF- α の受容体 (TNFR1) からのシグナルをブロックする SOCS-1 も注目された。SOCS-1 の発現を見ると ACI ではもともと LEW や WKAH の約 2 倍の発現を認め、感染に関係なく TNFR1 からのシグナルをブロックしやすい状態のラットすなわち TNF- α に対して抵抗性

が高い系統であると考えられる。一方、LEWはWKAHと同じレベルしかSOCS-1を発現していないが、HTLV-1感染によりACIレベルまで発現増加を示した。このことはHTLV-1感染を伴って、全く発現増強を示さないWKAHとは異なり、TNF- α に対しての抵抗性が増している可能性が考えられる。一般的に考えて、INF- γ の発現は免疫系の賦活化を想像させるが、いずれの感染ラット脊髄にもリンパ球の存在を確認できていないことから考えて、発症系と非発症系でのHTLV-1感染による脊髄でのこの発現の違いの由来については、現在検討中である。また、INF- γ によって発現が抑制されることが知られており、今回の検討でもINF- γ とは逆相関関係にあったPGF-2は、オリゴデンドロサイトのアポトーシスに対して抑制的に働くとの報告があり、非発症系感染ラットでPGF-2の発現が抑制されている意義は今後の検討課題である。今回の検討結果では、まだこの感染7ヶ月のHAM発症系でのみ観察されるウイルスの増殖、発現増強に直接的に関わる宿主要因は明らかとはなっておらず、cDNAアレイによる網羅的遺伝子発現解析を含め、今後は感染7ヶ月以前を含めた検討が必要である。一方、今回の結果を含めいままに我々が指摘したHAM発症系で特徴的動きを示す遺伝子を指標とすることによって、我々のモデルはin vivo治療効果の判定に有用であると考えられる。

ヒトCRM1遺伝子を利用したHTLV-1高発現系ラットモデルの開発のため、ヒトCRM1遺伝子の有効性についてHTLV-1感染ラット不死化細胞株を用いて検討した。その結果、全長タイプのmRNAからしか翻訳されないp19gagが増加傾向にあるものの、もともとのラット細胞でのウイルス発現が極めて低く、ヒトに近いウイルス発現を得るにはCRM1以外にもヒトの遺伝子が必要になる可能性がある。

治療実験ではATF-1DNの導入はHTLV-1遺伝子の発現を抑制することが証明された。今後はHTLV-1モデル動物個体内で発現させての検討が必要である。

E. 結論

1. HAM発症系と非発症系の間で比較した宿主遺伝子発現解析の結果、新たにアポトーシスに関連する遺伝子としてSOCS-1、INF- γ 、IGF-2がHTLV-1感染に伴ってHAM発症に重要な働きをしている可能性があることを明らかにした。

2. HTLV-1高発現系ラットの作製にはヒトCRM1遺伝子以外にもヒトの遺伝子が必要となる可能性が示唆された。

3. ATF-1DNはHTLV-1の発現を抑制するのに有用な治療法となる可能性がある。

F. 健康危険情報

HTLV-1の動物への感染実験を行うに当たっては、その管理、安全性を確保するため北海道大学大学院医学研究科動物実験施設のP3感染動物実験施設を使用しており、国民の生命や健康に重大な影響を及ぼす可能性はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tomaru, U., Ikeda, H., Jiang, X., Ohya, O. and Yoshiki, T.: Provirus expansion and deregulation of apoptosis-regulated genes in the spinal cord of a rat model for human T lymphocyte virus type I-associated myeloneuropathy. *J Neurovirol* 9, 530-538, 2003.
- 2) Ishizu, A., Tsuji, T., Abe, A., Saito, S., Takahashi, T., Ikeda, H., Meruelo, D. and Yoshiki, T.: Transduction of dominant negative ATF-1 suppresses the pX gene expression in joint fibroblastic cells derived from HTLV-1 transgenic rats. *Exp Mol Pathol* 74:309-313, 2003.
- 3) Higuchi, M., Ishizu, A., Ikeda, H., Hayase, H., Fugo, K., Tsuji, M., Abe, A., Sugaya, T., Suzuki, A., Takahashi, T., Koike, T. and Yoshiki, T.: Functional alteration of peripheral CD25+CD4+immunoregulatory T cells in a transgenic rat model of autoimmune diseases. *J Autoimmun* 20, 43-49, 2003.

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（こころの研究事業）
（総括・分担） 研究報告書

細胞接着分子を介した HTLV-I および IFN- γ 発現増強の検討

分担研究者 中村龍文 長崎大学大学院感染分子病態学助教授
共同研究者 西浦義博 長崎大学第一内科
福島直美 長崎大学大学院感染分子病態学

研究要旨

我々は、本学会議で細胞接着分子を介した HTLV-I 発現増強について検討してきた。今回、CD44 に対するモノクローナル抗体 (NIH44-1) による刺激の系および CD44 の生理的リガンドであるヒアルロナン (HA) による刺激の系を用いて、HAM 患者由来と ATL 患者由来の HTLV-I 感染 T 細胞株において HTLV-I p19 および IFN- γ 発現に及ぼす影響を比較検討した。その結果、NIH44-1 による CD44 に対する刺激は、両者由来の HTLV-I 感染 T 細胞株すべてにおいて HTLV-I p19 の発現を亢進させた。さらに、HAM 患者由来 HTLV-I 感染 T 細胞株 HCT-4 では、低分子ヒアルロナン、中でも 6.9 kDa HA による刺激で HTLV-I p19 の発現亢進のみならず IFN- γ の発現亢進も認められた。これらの結果は HAM 患者 HTLV-I 感染 T 細胞においては CD44 を介して炎症の場における血管内皮細胞との接着あるいは炎症の場の中で HTLV-I 発現亢進と Th1 の活性化が生じている可能性を示していると考えられる。

A. 研究目的

HTLV-I 関連脊髄症 (HAM) 発症に HTLV-I の high proviral load が重要な役割を果たすと考えられているが、その詳細な機序は不明である。これまでに我々は、HAM 患者末梢血 CD4 陽性 T 細胞の血管内皮細胞への付着・浸潤能の亢進を指摘してきたが、この HAM 特異的な現象が HTLV-I の増殖に及ぼす影響を調べる目的で、本学会議で細胞接着分子を介した HTLV-I 発現増強について検討してきた。一昨年、CD44 に対するモノクローナル抗体 (NIH44-1) を用いたクロスリンクにより HCT-1 (HAM 患者髄液由来 T 細胞株) の mRNA の発現亢進を報告した。今回、NIH44-1 による刺激の系および CD44 の生理的リガンドであるヒアルロナン (HA) による刺激の系を用いて、HAM 患者由来と ATL 患者由来の HTLV-I 感染 T 細胞株において HTLV-I および IFN- γ 発現に及ぼす影響を比較検討した。

B. 研究方法

HTLV-I 感染細胞株として、HCT-4 および HCT-1 (HAM 患者髄液由来 T 細胞株)、および KK1 および S04 (ATL 患者末梢血由来 T 細胞株) を用い、CD44 の刺激には、NIH44-1 (モノクローナル抗体)、低分子 HA (1.7 kDa、

6.9 kDa、40 kDa)、高分子 HA (約 200 kDa) を用いた。細胞を 1×10^5 cells/ml で培養、48 時間後に CD44 を刺激し、その 24 時間後に培養液を回収。一部は、細胞も回収し、RNA を抽出した。培養上清は、HTLV-I/II p19 Antigen ELISA (ZeptoMetric) を用い培養上清中 p19 濃度を、IFN- γ EASIA (BIOSOURCE) を用い培養上清中 IFN- γ 濃度を測定した。RNA は DNase で処理後、Light Cycler (Roche Diagnostics) による定量化 RT-PCR での HTLV-I tax の mRNA を評価した。

C. 研究結果

1) NIH44-1 による刺激において、HCT-4 では HTLV-I tax の mRNA 発現亢進および p19 産生亢進に加えて、IFN- γ の産生亢進が認められた。しかし、HCT-1、KK1 および S04 においては p19 の産生亢進はみられたものの、IFN- γ の産生亢進は認められなかった。
2) HCT-4 を様々な分子量の HA (10 μ g/ml) で刺激したところ、低分子、中でも 1.7 kDa および 6.9 kDa に反応して p19 の産生亢進が認められたため、1、5、10、20 μ g/ml の濃度の 1.7 kDa および 6.9 kDa の HA で HCT-4 を刺激した。培養上清中 p19 濃度は、1.7 kDa HA の場合 5 μ g/ml でピークを示したのに対し、6.9 kDa HA は濃度依存性に産

生が亢進し、かつ、1.7 kDa HA よりも高値を示した。また、培養上清中 IFN- γ 濃度は、1 μ g/ml の 6.9 kDa HA の刺激ですでに高値を示し、かつ 1.7 kDa よりも高かった。

3) 各種 HTLV-I 感染細胞株での 1.7 kDa HA、6.9 kDa HA に対する反応性を検討したところ、p19 および IFN- γ 産生亢進共に HCT-4 以外の反応性は不良であった。

D. 考察

今回、NIH44-1 および HA による刺激による HAM 患者由来 HTLV-I 感染 T 細胞株での HTLV-I p19 および IFN- γ 発現増強に及ぼす影響を ATL 患者由来 HTLV-I 感染 T 細胞株と比較検討した。その結果、NIH44-1 ではすべての株において p19 の産生亢進がみられ、CD44 に対する刺激は何らかの形で HTLV-I 感染 T 細胞株における HTLV-I の発現を亢進させることが明らかになった。HA による刺激の系では、HCT-4 のみが低分子 HA、なかでも 6.9 kDa HA に反応して p19 の産生が亢進していた。一方で IFN- γ 産生に眼を向けると NIH44-1 による刺激では ATL 患者由来 HTLV-I 感染 T 細胞株では p19 の産生亢進がみられたにもかかわらず、IFN- γ の産生亢進はみられなかった。しかし、興味あることに HAM 患者由来 HTLV-I 感染 T 細胞株である HCT-4 のみでの結果であるが NIH44-1 による刺激のみならず、低分子量 6.9 kDa HA によく反応して IFN- γ の産生亢進を認めた。HA は、細胞外マトリックス、extracellular signaling molecules、intracellular hyaluronan などの機能が知られ、その大きさにより異なる機能を果たすと考えられているが、6.9 kDa HA は、HA の中でも炎症の場で重要な役割を果たすと報告されている。HAM の病態機序を考える上で、6.9 kDa HA を介した CD44 の刺激は興味深いものと思われる。

E. 結論

CD44 に対する刺激は HTLV-I 感染 T 細胞株における HTLV-I の発現を亢進させた。さらに、HAM 患者由来 HTLV-I 感染 T 細胞株では、低分子ヒアルロン酸、中でも 6.9 kDa HA による刺激で HTLV-I の発現亢進のみならず IFN- γ の発現亢進も認められた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ken-ichi Mori, Mitsuru Noguchi, Manabu Matsuo, Koichiro Nomata, Tatsufumi Nakamura, Hiroshi Kanetake. Natural course of voiding function in patients with human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy. J Neurol Sci 2003, in press.

2. Koto Nakashima, Atsushi Kawakami, Ayumi Hida, Satoshi Yamasaki, Hideki Nakamura, Makoto Kamachi, Taiichiro Miyashita, Fumiko Tanaka, Yasumori Izumi, Mami Tamai, Hiroaki Ida, Masako Furuyama, Takehiro Koji, Tatsufumi Nakamura, Kiyoshi Migita, Tomoki Origuchi, Katsumi Eguchi. Examination of anti-apoptogenic property of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) tax: possible role of Bcl-XL to protect mitochondrial pretrubation. J Lab Clin Med 2003, in press.

2. 学会発表

1. 西浦義博, 中村龍文, 江口勝美. セレクチンリガンド・クロスリンクによる HTLV-I 感染細胞における Th1/Th2 関連因子の変化と HTLV-I tax 発現の亢進. 第 15 回 日本神経免疫学会 2003 年 3 月 12 日 (水) ? 14 日 (金) 長崎

2. 西浦義博, 中村龍文, 江口勝美, 森内良三, 片峰茂. サイトカインシグナル伝達系からみた HAM 患者末梢血単核球における免疫異常の解析. 第 44 回 日本神経学会総会 2003 年 5 月 15 日 (木) ? 17 日 (土) 横浜

H. 知的財産権の出願・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

HAM/TSP における CTL による正の淘汰圧とウイルスの安定性

分担研究者 久保田龍二 鹿児島大学大学院神経病学講座 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。また、HIV 感染症のように CTL から認識されない変異ウイルスが出現し、主要なウイルス集団になっていく現象が HTLV-I 感染症でもみられるのかは不明である。我々はウイルスの変異と CTL の選択圧の検出、および変異ウイルス特異的 CTL につき検討した。HTLV-I Tax 領域の報告された 6 個の CTL エピトープのうち、3 個に正の選択圧を検出した。この正の選択圧部位での変異エピトープの集積は認めなかった。また、変異エピトープ特異的 T 細胞の増加も認めなかった。CTL から認識されなくなる変異エピトープもみられたが、この変異をもった変異ウイルスの増殖は認めず、Tax の変異自体がウイルスそのものの増殖に不利に働いている可能性が考えられた。以上の結果より、CTL は生体内でウイルス排除にはたらいっており、主要なウイルスは安定しているため、これらのエピトープは CTL ワクチンのターゲットとなりえると考えられた。

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。また、HIV 感染症では CTL から認識されない変異ウイルスが出現し、主要なウイルス集団になっていく現象が認められ、有効なワクチン開発の妨げとなっている。この免疫学的逸脱が HTLV-I 感染症でもみられるのかは不明であり、ワクチン開発のために重要な問題となる。このことを明かにするために、3 例の HAM 患者において経時的にウイルスの変異と CTL 反応を検討した。

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 HLA-A2 HAM/TSP 患者を選んだ。各患者について経時的に、3 ポイントを選び、各々のサンプルで約 50 クローンの HTLV-I Tax をサブクローンシークエンスした。また、このデータをもとに、ウイルス遺伝子の同義置換および非同義置換を CTL エピトープと非エピトープで計算し、正の選択圧が起こっているのかを検討した。さらに、アミノ酸毎の同義置換と非同義置換を計算し、どのアミノ酸部位で正の選択圧が起こっているのかを検討した。また、観察された変異エピトープを合成し、変異エピトープを認識する T 細胞の頻度を測定した。

(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) 正の選択圧は、報告されている 6 個の CTL エピトープのうち、3 個に認められた。
- 2) この 3 個のうち 1 個の Tax11-19 は強力な CTL エピトープとして報告されており、もう 1 個は CTL エピトープと B 細胞エピトープが重複した場所であった。
- 3) 変異 CTL エピトープを持つ変異ウイルスの集積は、3-8 年の経過中認めなかった。
- 4) 変異ウイルスを認識する CTL の出現や、頻度の増加は経過中認めなかった。
- 5) CTL に認識されない変異 CTL エピトープをもつ変異ウイルスも、増殖は認めず、変異ウイルスのウイルス交代現象は認めなかった。

D. 考察

HTLV-I Tax 領域に正の選択圧が検出され、CTL エピトープと一致していたことより、CTL は生体内でウイルス排除にはたらいしていることが示された。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たが、増殖を認めなかった。このことより、ある変異ウイルスが出現し、それに対する特異的 CTL が出現し、変異ウイルスの増殖を抑えている可能性は否定的である。HTLV-I Tax 蛋白は、Trans-activation 作用があり、ウイルスの LTR や IL-2R を up-regulation して、ウイルス自

身の増殖を活性化する作用が特徴的である。Tax 蛋白に変異を起これば、trans-activation 能に変化を起し、HTLV-I の増殖に変化をきたす可能性がある。生体内で自然発生した tax 遺伝子のほとんどは、HTLV-I の trans-activation 能の低下を起し、ウイルスの増殖に不利に働くことが指摘されている。したがって、Tax 蛋白の CTL エピトープに起こった変異は CTL から逃れることがあっても、それ自身増殖できずに、変異ウイルスの増加、ひいては免疫学的逸脱を起こした変異ウイルス集団にならないのではないかと考えられた。以上より、CTL を生体内で誘導し、実際に正の選択圧を起こし、その一方で、変異ウイルスの集積を起こさないこれらの CTL エピトープは、HTLV-I のワクチン開発のための標的となりうると考えられた。

E. 結論

CTL は生体内でウイルス排除にはたらいっており、主要なウイルスは安定しているので、これらのエピトープは CTL ワクチンのターゲットとなりえると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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* 2003; 101:3074-81

2) Furukawa Y, Kubota R, Eiraku N, Nakagawa M, Usuku K, Izumo S, Osame M. Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-related clinical and laboratory findings for HTLV-I-infected blood donors. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; 32: 328-34.

H. 知的所有権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

HAM/TSP 発症を規定するウイルス因子、宿主因子と病態への作用機構

分担研究者 鹿児島大学 宇宿 功市郎 助教授

研究要旨: HAM 発症に関わる宿主の遺伝的背景とその病態への作用機構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、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、末梢血リンパ球中のプロウイルス量、プロウイルス塩基配列におよぼす宿主遺伝子型の影響を分子進化学的に解析した。HAM 患者と HC で遺伝子多型頻度が異なる遺伝子については、その作用機構についても検討し、多型が HTLV-I Tax による転写活性化や血清中サイトカインの量に影響することを示した。HTLV-I 感染に対する宿主の応答効率の差が HAM 発症にかかわっている可能性が考えられた。

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。また、HAM は HTLV-I 感染者のごく一部に発症し、大部分の感染者は生涯にわたって無症候性キャリアー(HC)として経過する。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、治療薬としての保険適応を受けているものの、治療効果、副作用の点で十分ではなく、発病後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。より根治的治療につながる HAM 発症機序の解明と、無症候性キャリアーからの発症阻止を最終目標に以下の研究を行なった。

B. 研究方法

HAM224 例、HC202 例の宿主遺伝子多型の頻度を比較検討した。加えて、ABI Prism 7700TM 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、non-HLA 遺伝子の候補遺伝子解析(SNPs、VNTR or CAn repeat など)を行い、HTLV-I ウイルス量と対比した。また、HAM 発症抑制因子である HLA-A2 の有無とプロウイルス量で HAM 患者、HC 計 32 例を 8 群に分け、変異ウイルスの分子進化学的解析を行った。

(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 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る一方で、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る事が明らかになった。IL-15 191C は、HTLV-I ウイルス量が低下している群に多かった。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あり、これは HLA-A*02、Cw*08 で認められた現象と同じであった。また、HLA、non-HLA 因子の双方で 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。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 はともに HTLV-I Tax により転写活性化されること、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。変異ウイルスの分子進化学的解析からは、HC では高ウイルス量群、低ウイルス量群共に HAM 患者より HLA-A2 陽性群で約 5 倍、陰性群で約 1.5 倍 dN/dS 比(非同義アミノ酸置換/同義アミノ酸置換比)が高く、HTLV-I に対する生体内における高い選択圧を示唆しており、これが HAM と HC の CTL 機能の差を反映している可能性が示唆された。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も検討し、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 数を算出して作成した ROC 曲線から、HTLV-I ウイルス量 2% を cut off 値としたときに、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を示した。

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 拘束性であることから、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が考えられ、変異ウイルスの分子進化学的解析の結果もこの仮説を支持するものであった。遺伝子多型解析において HAM と HC で有意差があった non-HLA 遺伝子についても、各々 HTLV-I Tax の標的遺伝子である、特定の多型がサイトカインの発現効率に影響する等、HTLV-I 感染に対する宿主遺伝子の応答効率に影響を及ぼすことで疾患感受性にかかわっている可能性が考えられた。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 発症に関連することを示唆しておりきわめて興味深い。

E. 結論

HAM 発症に関連する複数の HLA、non-HLA 宿主要因の解析、変異プロウイルスの分子進化学的解析など一連の解析から、HTLV-I 感染に対する宿主の応答効率の差が HAM 発症に密接に関連していることが示唆された。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

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sabouri AH, Saito M, Matsumoto W, Kodama D, Farid R, Izumo S, Usuku K, Osame M. A C77G point mutation in CD45 exon 4, which is associated with the development of multiple sclerosis and increased susceptibility to HIV-1 infection, is undetectable in Japanese population. *Eur J Neurol*. 10: 737-739. 2003.
- 2) Furukawa Y, Saito M, Matsumoto W, Usuku K, Tanaka Y, Izumo S, Osame M. Different cytokine production in tax-expressing cells between patients with human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and asymptomatic HTLV-I carriers. *J Infect Dis*. 187: 1116-1125. 2003.
- 3) Furukawa Y, Kubota R, Eiraku N, Nakagawa M, Usuku K, Izumo S, Osame M. Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-related clinical and laboratory findings for HTLV-I-infected blood donors. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 32: 328-334. 2003.

- 4) 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: 29-35. 2003.
- 5) 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+ T lymphocytes in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, but not in asymptomatic carriers. *Blood*. 102: 577-584. 2003.
- 6) Kubota R, Furukawa Y, Izumo S, Usuku K, Osame M. Degenerate specificity of HTLV-1-specific CD8+ T cells during viral replication in patients with HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). *Blood*. 101: 3074-3081. 2003.

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
特になし。
2. 実用新案登録
特になし。
3. その他
特になし。

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
足立昭夫 上野史子 藤田美歌子	HIV-1, 2		新世紀の感染症学(下巻)	日本臨床社		2003	497-502

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
Yoshitaka Furukawa, Ryuji Kubota, Nobutaka Eiraku, Masanori Nakagawa, Koichiro Usuku, Shuji Izumo, Mitsuhiro Osame.	Human T-Cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-related clinical and laboratory findings for HTLV-I-infected blood donors.	J Acquir Immune Defic Syndr	32	328-334	2003
Yoshitaka Furukawa, Mineki Saito, Wataru Matsumoto, Koichiro Usuku, Yuetsu Tanaka, Shuji Izumo, Mitsuhiro Osame.	Different cytokine production in Tax-expressing cells between patients with human T cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and asymptomatic HTLV-I carriers.	J Infect Dis	187	1116-1125	2003
Yoshio Hamada, Hikaru Matsumoto, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso	Effect of the acyl groups on O→N acyl migration in the water-soluble prodrugs of HIV-1 protease inhibitor.	Biorg. Med. Chem. Lett.	13 (16)	2727-2730	2003

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoshio Hamada, Hikaru Matsumoto, Satoshi Yamaguchi, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso	Water-soluble prodrugs of dipeptide HIV protease inhibitors based on O-N intramolecular acyl migration: design, synthesis and kinetic study.	Bioorg. Med. Chem.,	12(1)	159-70	2004
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	64	453-457	2003
Tomaru, U., Ikeda, H., Jiang, X., Ohya, O., Yoshiki, T.	Provirus expansion and deregulation of apoptosis-regulated genes in the spinal cord of a rat model for human T lymphocyte virus type I-associated myeloneuropathy.	Journal of Neurovirology	9	530-538	2003
Ishizu, A., Tsuji, T., Abe, A., Saito, S., Takahashi, T., Ikeda, H., Meruelo, D., Yoshiki, T.	Transduction of dominant negative ATF-1 suppresses the pX gene expression in joint fibroblastic cells derived from HTLV-I transgenic rats.	Experimental Molecular Pathology	74	309-313	2003
Ken-ichi Mori, Mitsuru Noguchi, Manabu Matsuo, Koichiro Nomata, Tatsufumi Nakamura, Hiroshi Kanetake.	Natural course of voiding function in patients with human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy.	J Neurol Sci	217	3-6.	2004
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	101(8)	3074-81	2003
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	29-35.	2003
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+ T lymphocytes in patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, but not in asymptomatic carriers.	Blood.	102	577-584.	2003

20030759

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。