

## 1. 論文発表

- (1) Akari, H., Fujita, M., Kao, S., Khan, M.A., Shehu-Xhilaga, M., Adachi, A., and Strebel, K. 2004. High level expression of Human Immunodeficiency Virus type-1 Vif inhibits viral infectivity by modulating proteolytic processing of the Gag precursor at the p2/NC processing site. *Journal of Biological Chemistry* 279: 12355-12362.
- (2) Sugahara, F., Uchiyama, T., Watanabe, H., Shimazu, Y., Kuwayama, M., Fujii, Y., Kiyotani, K., Adachi, A., Kohno, N., Yoshida, T., and Sakaguchi, T. 2004. Paramyxovirus Sendai virus-like particle formation by expression of multiple viral proteins and acceleration of its release by C protein. *Virology* 325: 1-10.
- (3) Fujita, M., Akari, H., Sakurai, A., Yoshida, A., Chiba, T., Tanaka, K., Strebel, K., and Adachi, A. 2004. Expression of HIV-1 accessory protein Vif is controlled uniquely to be low and optimal by proteasome-degradation. *Microbes and Infection* 6: 791-798.
- (4) Sakurai, A., Jere, A., Yoshida, A., Yamada, T., Iwamoto, A., Adachi, A., and Fujita, M. 2004. Functional analysis of HIV-1 *vif* genes derived from Japanese long-term nonprogressors and progressors for AIDS. *Microbes and Infection* 6: 799-805.
- (5) Piroozmand, A., Koyama, A.H., Shimada, Y., Fujita, M., Arakawa, T., and Adachi, A. 2004. Role of Us3 gene of herpes simplex virus type 1 for resistance to interferon. *International Journal of Molecular Medicine* 14: 641-645.
- (6) Nagao, T., Yoshida, A., Sakurai, A., Piroozmand, A., Jere, A., Fujita, M., Uchiyama, T., and Adachi, A. 2004. Determination of HIV-1 infectivity by lymphocytic cell lines with integrated luciferase gene. *International Journal of Molecular Medicine* 14: 1073-1076.

- (7) Jere, A., Piroozmand, A., Tripathy, S., Paranjape, R., Sakurai, A., Fujita, M., and Adachi, A. 2004. Generation and characterization of HIV-1 clones chimeric for subtypes B and C *nef*. *International Journal of Molecular Medicine* 14: 1087-1090.
- (8) Wang, H., Sakurai, A., Khamsri, B., Uchiyama, T., Gu, H., Adachi, A., and Fujita, M. Unique characteristics of HIV-1 Vif expression. *Microbes and Infection*, in press.
- (9) Yoshida, A., Piroozmand, A., Sakurai, A., Fujita, M., Uchiyama, T., Kimura, T., Hayashi, Y., Kiso, Y., and Adachi, A. Establishment of biological assay system for human retroviral protease activity. *Microbes and Infection*, in press.

## 2. 学会発表

- (1) Akari, H., Fujita, M., Kao, S., Khan, M.A., Shehu-Xhilaga, M., Lee, Y.-J., Adachi, A., and Strebel, K. (2004) High-level expression of HIV-1 Vif inhibits viral infectivity by modulating proteolytic processing of the Gag precursor at the P2/NC processing site. The 2004 Cold Spring Harbor meeting on retroviruses, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- (2) Fujita, M., Akari, H., Sakurai, A., Yoshida, A., Chiba, T., Tanaka, K., Strebel, K., and Adachi, A. (2004) Profile of the proteasome-degradation of HIV-1 Vif. The 2004 Cold Spring Harbor meeting on retroviruses, Cold Spring Harbor, NY, USA.

- |   |   |
|---|---|
| <p>(3) Fujita, M., Khamsri, B., Sakurai, A., Yoshida, A., Chiba, T., Tanaka, K., Akari, H., Strebel, K., and Adachi, A. (2004) Proteasome-degradation of HIV-1 Vif and its biological significance. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Hyogo, Japan.</p> <p>(4) Adachi, A. (2004) Functional and structural analysis of HIV accessory proteins which are essential for viral replication and pathogenesis. AIDS Seminar in Kumamoto, Kumamoto, Japan.</p> <p>(5) Khamsri, B., Sakurai, A., Jere, A., Uchiyama, T., Adachi, A., and Fujita, M. (2004) Construction and characterization of the arginine mutants of HIV-1 Vif. 第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜.</p> <p>(6) Jere, A., Sakurai, A., Yoshida, A., Fujita, M., and Adachi, A. (2004) Generation and characterization of HIV-1 Nef point mutants. 第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜.</p> <p>(7) 藤田美歌子、カムセー ブンルアン、櫻井明子、アブハイ ジェレ、内山恒夫、足立昭夫 (2004) HIV-2 Vpx および Vpr の発現量の解析. 第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜.</p> <p>(8) 足立昭夫 (2004) Structural and functional analysis of accessory proteins essential for HIV replication. 第18回日本エイズ学会学術集会シンポジウム、静岡.</p> <p>(9) 藤田美歌子、足立昭夫 (2004) HIV-1 Vif: アルギニン変異体の作製およびその性質. 第18回日本エイズ学会学術集会、静岡.</p> | <p>1. 特許取得<br/>なし。</p> <p>2. 実用新案登録<br/>なし。</p> <p>3. その他<br/>なし。</p> |
|---|---|

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

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 外丸 詩野 北海道大学講師

研究要旨 成人T細胞白血病ウイルス (HTLV-1) 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-1 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ってきた。これまでの検討では、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-1 感染による TNF- $\alpha$  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、疾患感受性の WKAH 系ラットと疾患非感受性の他系統ラットにおける宿主遺伝子の発現、特に IFN- $\gamma$  の発現や応答性の差異について検討を行なった。

#### A. 研究目的

成人T細胞白血病ウイルス (HTLV-1) 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-1 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) 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) について新たな疾患発症に関連する宿主因子の同定を行なうために、疾患感受性の WKAH 系ラットと疾患非感受性の他系統ラットにおける宿主遺伝子の発現、特に IFN- $\gamma$  の発現や応答性の差異について検討を行なった。

#### B. 研究方法

##### 1) 感染モデルの作製と脊髄サンプルの調整

HAM 感受性ラット系統として近交系 WKAH ラットを、HAM 抵抗性ラット系統として近交系 ACI および LEW ラットを使用した。なお、全ての近交系ラットは北海道大学大学院医学研究科付属動物実験施設から購入した。各ラットは HTLV-1 産生ヒト T 細胞株 (MT-2)  $1 \times 10^7$  個を生後 24 時間以内の新生仔期に腹腔内接種することによって HTLV-1 に感染させ、以後、北海道大学大学院医学研究科付

属動物実験施設内の感染実験室 (P3 レベル) にて飼育、観察した、陰性対照として同月齢、同系統の非感染ラットを使用した。これらのラットは 3, 7, 14 ヶ月齢時に、ペントバルビタールで麻酔後、500 ml の 4°C 生理食塩水で全身灌流し、脊髄を採取した。採取した脊髄は液体窒素で急速冷凍後、使用まで -80°C で保存した。

##### 2) 定量的リアルタイム RT-PCR

Total RNA を ISOGEN (Nippon GeneTokyo, Japan) にて粗抽出後、RNeasy MINI Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて RNA を精製、Super Script III™ First-Strand Synthesis system for RT-PCR (Invitrogen, CA, USA) を使用して cDNA を作製した。これを鋳型として SYBR green PCR Master mix (QIAGEN) を用いて、ABI Sequence Detection System (Applied Biosystems, CA, USA) にて IFN- $\gamma$ , Interleukin-12 p40 (IL-12 p40), IFN regulatory factor-1 (IRF-1) について定量的 PCR を行った。各遺伝子の発現は、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を内部標準遺伝子とし、 $\Delta\Delta Ct$  法にて解析し、各々のラット系統について非感染時の遺伝子発現量を 1 とした時の感染時の相対値を実験結果とした。解析した各遺伝子に特異的なプライマー配列は以下の通りである。  
IFN- $\gamma$  (sense: 5'-GATCCAGCACAAAGCTGTCA-3', antisense: 5'-GACTCCTTTTCCGCTTCCTT-3'),  
IL-12 p40 (sense: 5'-AGGTGCGTTCCTCGTAGAGA-3', antisense: 5'-CCATTTGCTGCATGATGAAT-3'),  
IL-12R $\beta$ 1 (sense: 5'-AGGTGCAGATTTCCCGTTTA-3', antisense: 5'-CAGCCCTGTTTAAGCCAATG-3'),  
IL-12R $\beta$ 2 (sense: 5'-TGCCACCAATCCACAACTA-3', antisense: 5'-CCTGCTTCCTAGCACCTTGT-3'),

IRF-1 (sense: 5'-TGAAGCTGCAACAGATGAGG-3', antisense: 5'-AGCAAGTATCCCTTGCCATC-3'), GAPDH (sense: 5'-ATGGGAGTTGCTGTTGAAGTCA-3', antisense: 5'-CCGAGGGCCCACTAAAGG-3').

### 3) ELISA 法

脊髄での IFN- $\gamma$  蛋白の発現の確認には, Rat IFN- $\gamma$  ELISA Kit (BioSorce International, Inc., CA, USA) を使用した. 全身灌流したラットより摘出した脊髄に, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, 0.1M phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を含んだリン酸緩衝液 (PBS) を 1 ml 加えてピストン式ホモゲナイザーを用いて氷上で破碎後, 10000 回転, 15 分間遠心して得られた上清を脊髄蛋白質抽出液とした. Duplicate で 100  $\mu$ l のスタンダード, 脊髄蛋白質抽出液をキット付属の ELISA プレートに加え, 37°C で 2 時間静置, 洗浄後, ピオチン標識ポリクローナル抗ラット IFN- $\gamma$  抗体を加えてさらに 37°C で 2 時間静置した. 洗浄後, ストレプトアビジン-HRP 溶液を加え 30 分間, 室温で静置後, 付属の反応停止液を加え 450 nm で吸光度を測定した. なお, 用いた ELISA の検出限界は 13 pg/ml であった.

### 4) 脊髄由来ニューロン-グリア細胞の共培養

少なくとも 3 匹の全身灌流したラットより脊髄を摘出し混合したものを細断後, 3% collagenase II (Worthington Biochemical, NJ, USA) と 700 U DNase I (TAKARA BIO INC., Otsu, Japan) を含んだ無血清 RPMI 1640 に混和し酵素処理を 37°C で 30 分行った. 遠心分離後, Hanks 緩衝液 (Invitrogen, CA, USA) で希釈した 30% Percoll (Sigma-Aldrich, MO, USA) に沈査を混和し, 70% Percoll 上に静かに重層, 3500 回転で 40 分間遠心分離した. 上層のミエリン残層を除去後, 23% Percoll 層を採取し得られた細胞を BIOCOAT® poly-D-Lysine/Laminin Coverslips (Becton Dickinson, NJ, USA) 上で培養したものをニューロン-グリア共培養系とした. 培養液は 10% の牛胎児血清 (FBS) と 50 ng/ml の Nerve Growth Factor 2.5S (NGF2.5S; Invitrogen) を含んだ Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12 medium (DMEM/F12) 培地 (Invitrogen) を使用し, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下にて培養した.

### 4) 蛍光抗体法

中枢神経系における IFN- $\gamma$  の局在を調べるために, ニューロン-グリア共培養系において 5 日間培養した細胞を蛍光抗体法に用いた. 4% パラホルムアルデヒドで 15 分間固定後, PBS で洗浄, 0.1% Triton-X100 を含んだ 0.05% 牛血清アルブミン (BSA) 添加 PBS に 4 分間浸透させた. さらに冷 70% メタノールで 4 分間固定後, 0.05% BSA 添加 PBS (以下 0.05% PBT) で 1000 倍に希釈した正常ヤギ血清 (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) を加え 10 分間室温で反応させ, 0.05% PBT で洗

浄, 一次抗体として, マウス抗ラット IFN- $\gamma$  モノクローナル抗体 (DB-1; 1:400; PBL Biomedical Laboratories, NJ, USA), および, ニューロンを標識するためにウサギ抗ウシ Neurofilament 150 kD ポリクローナル抗体 (AB1981; CHEMICON International, Inc. CA, USA), また, アストロサイトを標識するためにウサギ抗ウシ Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) ポリクローナル抗体 (DakoCytomation) を加えて 60 分間室温で反応させた. 0.05% PBT で洗浄後, 二次抗体として, Alexa Fluor® 488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体および Alexa Fluor® 568 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (1:300; Molecular Probes, OR, USA) を各々加え室温で 45 分間反応させた. PBS で洗浄後, スライドガラス上にマウントし, 共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (BIO-RAD MRC-1024; Bio-Rad Laboratories, CA, USA) で観察した.

### 5) IL-12 による脊髄由来神経系細胞への影響の検討

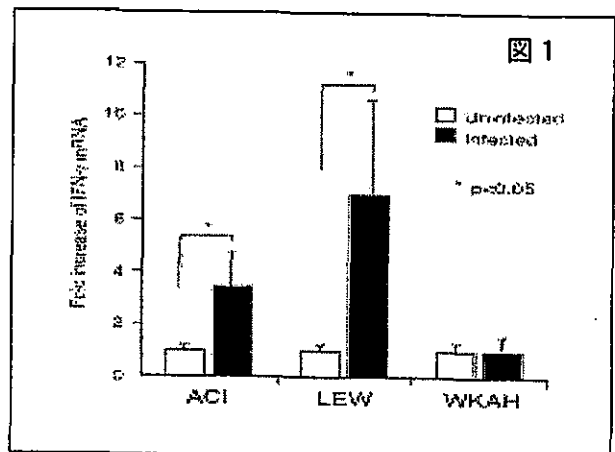
ラットに交差反応することが確認されているリコンビナントマウス IL-12 (R&D System, Inc., MN, USA) を 100 ng/ml になるように添加した培養液でニューロン-グリア共培養系細胞を 18 時間培養し, 付着した細胞群を回収, RNA を抽出, リアルタイム PCR にて IFN- $\gamma$ , IL-12 のレセプターである IL-12R $\beta$ 1 および IL-12R $\beta$ 2 mRNA の発現を調べた. 同様に IL-12 (100 ng/ml) 存在下でニューロン-グリア共培養系細胞を 5 日間培養し, 抗 IFN- $\gamma$  抗体と各神経系細胞を認識する抗体で蛍光二重染色し, 共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した.

(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.

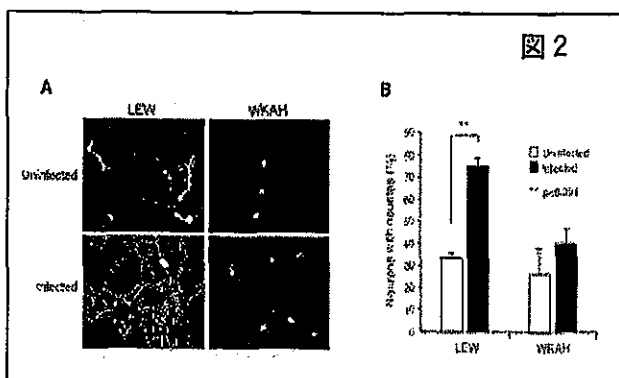
## C. 研究結果

### 1. HTLV-1 感染ラットの脊髄における IFN- $\gamma$ 発現の系統差



リアルタイム RT-PCR 解析により、HTLV-1 に感染してから7ヵ月後の HAM 抵抗性ラットである ACI および LEW の脊髄において、非感染時に比較して IFN- $\gamma$  mRNA の有意な発現亢進が認められた (図 1)。IFN- $\alpha$  および IFN- $\beta$  の発現は、感染の有無によらず差が見られなかった。HAM 感受性ラットである WKAH では、同時期に IFN- $\gamma$  mRNA 発現の亢進は認められなかった。感染後3ヶ月、14ヶ月での脊髄ではこれら3系統いずれにおいても IFN- $\gamma$  発現の亢進は認められなかった。さらに、末梢においても同様の変化が起きているかを調べるために、HTLV-1 感染後7ヶ月における末梢血単核球 (PBMC) および脾臓での IFN- $\gamma$  mRNA の発現を調べたが、ACI、LEW の脊髄で見られたような有意な発現亢進はどの系統にも認められなかった。IFN- $\gamma$  の蛋白レベルでの発現を確認するために、脊髄蛋白抽出液を用いて ELISA 法を行った結果、mRNA の発現で見られた変化と同様な抵抗性ラットでの IFN- $\gamma$  高発現の傾向が認められた。Repeated measure ANOVA 法によって HAM 抵抗性ラットと感受性ラットの間には、HTLV-1 感染による IFN- $\gamma$  の発現に有意な差 ( $p < 0.05$ ) が認められた。以上より、HAM 抵抗性ラットでは HTLV-1 感染後7ヶ月の脊髄において選択的に IFN- $\gamma$  が産生亢進されるのに対し、HAM 感受性ラットではその現象が観察されないことが明らかとなった。

## 2. HTLV-1 感染 HAM 抵抗性ラットに認められた神経軸索伸長の亢進



HTLV-1 感染7ヶ月後のラット脊髄より分離したニューロン-グリア共培養系細胞を5日間培養し、抗 Neurofilament 抗体で蛍光染色し共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した結果、HTLV-1 感染 LEW において明らかな神経軸索伸長の亢進が観察された (図 2A)。Neurofilament 陽性細胞のうち 300  $\mu$ m 以上の神経軸索伸長を示した細胞の割合 (%) を算定した結果、HTLV-1 感染 LEW では非感染 LEW に比較して神経軸索伸長を示した割合が 2.25 倍に増加していた (図 2B)。このような変化は HAM 感受性である WKAH には認められなかった。

## 3. 脊髄における IFN- $\gamma$ 産生細胞の同定

ラット脊髄での IFN- $\gamma$  産生細胞の同定のために、本研究では、IFN- $\gamma$  を産生するとの報告があるニューロンとアストロサイトに注目して、抗 IFN- $\gamma$  抗体との蛍光抗体二重染色法を行った。ニューロンに対しては抗 Neurofilament 抗体、アストロサイトに対しては抗 GFAP 抗体を使用した。その結果、HTLV-1 非感染のラットにおいて、HAM 抵抗性、感受性に関わらず、Neurofilament 陽性ニューロンのうちの約 20%、GFAP 陽性アストロサイトのうちの約 10% が IFN- $\gamma$  陽性であった。一方、HTLV-1 感染 LEW においては、Neurofilament 陽性ニューロンの 60.8% が IFN- $\gamma$  陽性像を示した。感染により陽性率が増加したばかりでなく、非感染時に見られたよりも強い陽性像が認められた。それは、ニューロンの胞体の細胞質部分のみならず、伸長した軸索やシナプスポタンクの IFN- $\gamma$  強陽性像により示されていた。ニューロン細胞塊でも IFN- $\gamma$  の強陽性像が観察された。一方で、GFAP 陽性アストロサイトにはニューロンで見られたような感染による IFN- $\gamma$  陽性細胞の増加、強陽性像は観察されなかった。以上より、HTLV-1 感染後7ヶ月の HAM 抵抗性ラット脊髄における IFN- $\gamma$  の主要な産生細胞はニューロンであることが明らかとなった。HAM 感受性の WKAH では LEW で見られたような感染によるニューロンでの IFN- $\gamma$  産生亢進は確認されなかった。

## 4. HTLV-1 感染ラットの脊髄における IFN- $\gamma$ 関連遺伝子の発現の系統差

末梢血においては、IL-12 の誘導により IFN- $\gamma$  の発現増強がおこるといわれている。一方、IRF-1 は、IFN- $\gamma$  によって強力に誘導される。そこで、HTLV-1 感染7ヶ月後での HAM 抵抗性ラットで認められた IFN- $\gamma$  の発現に IL-12 および IRF-1 遺伝子が関与しているかをリアルタイム RT-PCR により検討した。その結果、IFN- $\gamma$  に見られた変化と同様に、HTLV-1 感染7ヶ月後の ACI、LEW において脊髄における IL-12 および IRF-1 の発現に有意な亢進 ( $p < 0.05$ ) を認めた。しかしながら、HAM 感受性の WKAH ではこのような変化は認められなかった。

## 5. IL-12 刺激による神経系細胞の IFN- $\gamma$ 産生への影響

中枢神経系において IL-12 の産生はミクログリアが担当しているといわれている。また、IL-12 はニューロンの神経軸索伸長を亢進させるとの報告は存在するが、IL-12 によってニューロンの IFN- $\gamma$  の発現が亢進するとの報告はない。WKAH の脊髄で IFN- $\gamma$  が発現しない原因として IL-12 の低発現を考え、培養神経系細胞をリコンビナント IL-12 で刺激し、IFN- $\gamma$  の産生が誘導されるか検討した。生後7ヶ月のラットからニューロンのみを分離することが困難であったため、脊髄より分離したニューロン-グリア共培養系細胞群をラット

と交差反応することが確認されているリコンビナントマウス IL-12 (100 ng/ml) で 18 時間刺激後、RNA を抽出し、IFN- $\gamma$ 、IL-12R $\beta$ 1 鎖および IL-12R $\beta$ 2 鎖の mRNA の変化をリアルタイム PCR にて解析した。IL-12 の刺激によって非感染 LEW の神経系細胞で IFN- $\gamma$  mRNA が 3.9 倍に増加したが、非感染 WKAH では変化しなかった。一方、HTLV-1 感染 LEW では、刺激前から IFN- $\gamma$  mRNA は非感染時に対して 2.1 倍に増加しており、IL-12 の刺激を加えても有意な変化は認めなかった。HTLV-1 感染 WKAH では IFN- $\gamma$  は非感染時の 0.43 倍と発現量の低下を認め、IL-12 の刺激に対しても変化しなかった。さらに、IL-12 刺激下でニューロン-グリア共培養系細胞群を蛍光二重染色した結果、非感染 LEW のニューロンでは、神経軸索伸長が亢進し、IFN- $\gamma$  陽性像は胞体のみならず軸索部分にまで及んでいた。一方、非感染 WKAH では、IL-12 の刺激による神経軸索伸長は見られず、IFN- $\gamma$  陽性像の増強も観察されなかった。また、IL-12 のレセプターである IL-12R $\beta$ 1 鎖および IL-12R $\beta$ 2 鎖の発現についても検討した結果、IL-12 の刺激によって非感染 LEW において IL-12R $\beta$ 2 mRNA の発現が 3.0 倍に増加したが、非感染 WKAH では変化しなかった。一方、HTLV-1 感染 LEW では、刺激前から IL-12R $\beta$ 2 mRNA は非感染時に対して 2.6 倍に増加しており、感染 WKAH においては変化が認められなかった。

#### 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- $\alpha$  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 系ラット脊髄に限局しており、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。これまでの検討では、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してきたが、今年度はさらに新たな疾患発症に関連する宿主因子の同定を行なうために、疾患感受性の WKAH 系ラットと疾患非感受性の他系統ラットにおける宿主遺伝子の発現、特に IFN- $\gamma$  の発現や応答性の差異について検討を行なった。

中枢神経系は免疫学的特権部位と呼ばれ、免疫監視を受けない特異な部位と考えられてきた。しかし、免疫系のサイトカインが神経系の細胞の増

殖や分化の誘導に働くことが報告されている。IFN- $\gamma$  は免疫インターフェロンとも呼ばれ、主に活性化した T 細胞、NK 細胞で産生され、MHC クラス I およびクラス II 分子の発現を増加することによって抗ウイルス応答を増強したり、マクロファージや NK 細胞などを活性化する。しかし、IFN- $\gamma$  の働きはリンパ球を介した免疫応答に限らない。炎症性サイトカインとしての機能の他に、神経系の細胞の生存や分化にも IFN- $\gamma$  が関与しているとの報告がある。例えば、クロム親和性細胞腫株の PC12 において、IFN- $\gamma$  は NGF で誘導された神経細胞の分化を促進する。また、Embryonic septal nuclei 由来のニューロンのコリン作用性分化を促進する。後根神経節の IFN- $\gamma$  様免疫応答は以前から報告されていたが、この IFN- $\gamma$  様蛋白はリンパ球由来の生物学的活性と関連付けて考えられてきた。Neumann らは、正常ラットにおける後根神経節のニューロンの細胞質での IFN- $\gamma$  の発現、さらにこの IFN- $\gamma$  がニューロン自身にオートクリンに作用することを明らかにした。アストロサイトに関しても、IFN- $\gamma$  の産生の報告が存在するが、今回、HTLV-1 に感染した HAM 抵抗性ラットの脊髄における IFN- $\gamma$  の発現は、アストロサイトよりもニューロンによって優位に誘導されることが明らかとなった。

本研究では、HTLV-1 感染 7 ヶ月後の HAM 抵抗性ラット系統である ACI、LEW において脊髄における IFN- $\gamma$  mRNA の発現亢進を確認した。一方、HAM 感受性ラット系統である WKAH には、この現象は認められなかった。同時期に HAM 感受性ラットの脊髄でのみ HTLV-1 pX の選択的発現が認められることから、HAM 抵抗性ラットでは脊髄における IFN- $\gamma$  が HTLV-1 pX 遺伝子の発現の抑制に関与し、HAM 発症からの回避の一助になっていることが推測された。実際、MT-2 と共培養された臍帯血由来単核球 (CBMC) では、一週間の IFN- $\gamma$  (100 IU/ml) 処理によって、その後 4 週間に渡り HTLV-1 p19 蛋白の陽性率低下がもたらされたことが報告されている。この時、IFN- $\gamma$  は CBMC のプロウイルス DNA 量を減少させなかった。また、MT-2 においても、IFN- $\gamma$  は pX の転写を抑制したとのことである。これまでの研究において、HAM 感受性と抵抗性ラット間に HTLV-1 プロウイルス DNA 量の差は pX 遺伝子の発現の増強ほど大きな系統差は認めない。このことから、脊髄における IFN- $\gamma$  発現がウイルス遺伝子の転写の抑制に関わっているのではないかということが推測される。

Neurofilament 陽性で示されるニューロンは、明らかに、HTLV-1 感染 LEW において HTLV-1 感染 WKAH に比較して神経軸索伸長が亢進していた。ラット胎児の海馬由来のニューロンにおいて IFN- $\gamma$  は神経軸索伸長を亢進することが示されている。IL-12 は、マウスの交感神経の上頸神経節にお

るニューロンの軸索を伸長する。これらの報告からも、HTLV-I に感染したHAM 抵抗性ラットの脊髄で認められた IFN- $\gamma$  および IL-12 mRNA の発現の亢進が神経軸索伸長に直接または間接的に作用し、HTLV-I 感染 LEW のニューロンの分化誘導の要因となっているのではないかと考えられる。神経軸索伸長がおこることとHAM ラット病の発症が抑制されることとの関連については今後の検討課題である。

IFN- $\gamma$  の神経細胞への保護作用は、様々な中枢神経系障害に関連するウイルスにおいて報告されている。例えば、*in vitro* において麻疹ウイルスに感染したマウス海馬由来初代培養ニューロンはリコンビナントマウス IFN- $\gamma$  によって、ニューロン死せずにウイルスの増殖を阻止する。また、IFN- $\gamma$  は Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1) によるニューロン死を回避する。今回の結果より、HAM 抵抗性ラットでは HTLV-I 感染によって脊髄におけるニューロンが IFN- $\gamma$  を産生し、おそらくニューロン自身が IFN- $\gamma$  の保護作用によってウイルスによる障害を回避している可能性が考えられる。

末梢血において IFN- $\gamma$  の発現の強力な誘導には IL-12 が関与し、中枢神経系において IL-12 はミクログリアが産生しているとされている。WKAH の脊髄で IFN- $\gamma$  が発現しない原因として IL-12 の低発現を考え、培養神経系細胞をリコンビナント IL-12 で刺激し、IFN- $\gamma$  の産生が誘導されるか検討した結果、HAM 抵抗性 LEW ラットでは IL-12 の添加または HTLV-I の感染により IFN- $\gamma$  産生が亢進するのに対し、HAM 感受性 WKAH ではその応答がないことが明らかとなった。さらに、その原因として IL-12 のシグナル伝達に重要な IL-12R $\beta$ 2 鎖の発現不応答性が確認された。したがって、HAM 感受性 WKAH の脊髄における IFN- $\gamma$  の低発現には IL-12 の低産生のみならず、IL-12 とそのレセプターを介したシグナル伝達系の異常が関与していることが示唆された。

HAM 感受性ラットの脊髄における HTLV-I 感染細胞は主にミクログリアであり、pX 遺伝子を発現していることが明らかとなっている。HAM 抵抗性ラットでは、ウイルスがミクログリアへ感染することにより、ミクログリアからウイルスに対する防衛作用として IL-12 の発現応答がおこり、その刺激がニューロンに伝わり IFN- $\gamma$  の産生を誘導し、抗ウイルス作用やニューロン保護作用を発揮すると考えられる。そして、この HTLV-I に対する IL-12 -IFN- $\gamma$  産生系反応の系統差が HAM 感受性または抵抗性を規定していると考えている。HTLV-I 感染により IL-12 が産生されるメカニズムの詳細については、なぜ7ヶ月目にピークとなるかも含めて今後の検討課題である。また、HAM 感受性ラットに認められた脊髄における HTLV-I に

対する IFN- $\gamma$  の反応性の欠如が HTLV-I 特異的なものなのか、他のウイルス感染時にも共通して認められるものなのかを確認する必要がある。そして、WKAH ラットに認める IL-12 を介した IFN- $\gamma$  シグナル伝達系の分子機構に存在すると思われる何らかの障害をさらなる検討によって解明することが、ヒト HAM/TSP に対しても病因解明の一助になることと考える。

## E. 結論

HTLV-I 感染によって HAM 感受性ラット系統にのみ認める pX の急激な発現亢進が起こる感染後7ヶ月目の脊髄に着目し、HTLV-I 感染に対する IFN- $\gamma$  の関与を HAM 感受性ラットと HAM 抵抗性ラットとを比較することによって検討し、以下の結果を得た。

1. HAM 抵抗性ラットにおいて脊髄での IFN- $\gamma$  発現亢進を認めたが HAM 感受性ラットでは認めなかった。
2. HAM 抵抗性ラットにおいて HTLV-I 感染により脊髄で IFN- $\gamma$  産生が誘導される細胞は主にニューロンであった。
3. WKAH には IL-12 を介した IFN- $\gamma$  シグナル伝達系の分子機構に何らかの障害が存在し、これが HAM 感受性の一因となっていることが示唆された。
4. ヒト HAM/TSP 発症に関しても HTLV-I 感染者の脊髄局所での抗ウイルス性 IFN- $\gamma$  発現応答の個体間差が発症に関わる重要な因子になっている可能性が考えられた。

## F. 健康危険情報

HTLV-I 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) Miyatake Y, Ikeda H, Michimata R, Koizumi S, Ishizu A, Nishimura N, Yoshiki T. : Differential modulation of gene expression among rat tissues with warm ischemia.  
Exp Mol Pathol. 2004 Dec;77(3):222-30.
- 2) Abe A, Ishizu A, Ikeda H, Hayase H, Tsuji T, Miyatake Y, Tsuji M, Fugo K, Sugaya T, Higuchi M, Matsuno T, Yoshiki T. : Bone marrow cells carrying the env-pX transgene play a role in the severity but not prolongation of arthritis in human T-cell leukaemia virus type-I transgenic rats: a possible role of articular tissues carrying the transgene in the prolongation of arthritis.  
Int J Exp Pathol. 2004 Oct;85(4):191-200.
- 3) Tsuchikawa T, Ikeda H, Kikuchi K, Tsuji T, Baba T, Ishizu A, Tanaka Y, Kato H, Yoshiki T. : Hematopoietic progenitor cells as possible origins of epithelial thymoma in a human T lymphocyte virus type I pX gene transgenic rat model.  
Lab Invest. 2004 Feb;84(2):245-52.

### 2. 学会発表

1. 早瀬広子, 石津明洋, 宮武由甲子, 外丸詩野, 池田 仁, 吉木 敬 : リウマチ性疾患を発症する HTLV-I 遺伝子導入ラットにおける免疫制御性 CD25+4+T 細胞の解析  
第 48 回日本リウマチ学会総会、2004、岡山。  
日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 172, 2004.
2. 早瀬広子, 石津明洋, 宮武由甲子, 外丸詩野, 池田 仁, 吉木 敬 : HTLV-I トランスジェニックラットにおける CD4+CD25+regulatory T cell の解析  
第 93 回日本病理学会総会、2004、札幌。  
日本病理学会会誌 93: 294, 2004.
3. 宮武由甲子, 外丸詩野, 石津明洋, 池田 仁, 吉木 敬 : HTLV-I 感染による HAM 感受性ラット及び抵抗性ラットの脊髄における遺伝子発現の解析  
第 93 回日本病理学会総会、2004、札幌。  
日本病理学会会誌 93: 249, 2004.
4. 馬場智久, 石津明洋, 宮武由甲子, 外丸詩野, 池田 仁, 吉木 敬 : HTLV-I pX トランスジェニックラットと正常 Wistar ラットの交配種における全身性炎症性疾患の発症  
第 93 回日本病理学会総会、2004、札幌。  
日本病理学会会誌 93: 240, 2004.

5. 外丸詩野, 山野嘉久, 石津明洋, 池田 仁, 吉木 敬 : ペプチド/HLA 複合体の抗原特異的 T 細胞による獲得 抗原提示の新しい増幅メカニズム  
第 93 回日本病理学会総会、2004、札幌。  
日本病理学会会誌 93: 239, 2004.
6. 石津明洋, 早瀬広子, 宮武由甲子, 富居一範, 樋口正人, 阿部麻美, 外丸詩野, 池田 仁, 吉木 敬 : 免疫の多様性 自己免疫疾患モデルとしての HTLV-I env-pX 遺伝子導入ラット  
第 93 回日本病理学会総会、2004、札幌。  
日本病理学会会誌 93: 163, 2004.
7. 外丸詩野, 山野嘉久, 石津明洋, 池田 仁, 吉木 敬 : T 細胞による抗原提示と免疫制御機構  
第 34 回日本免疫学会総会、2004、札幌。  
日本免疫学会総会記録 34: 100, 2004.

## 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



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, 井田弘明 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

Garlic(*Allium sativum*)から抽出された allicin(diallyl-thiosulfinate)は多彩な生物学的作用を持っていることが知られている。今回、この compound による HAM 患者由来 HTLV-I 感染 T 細胞株に対する障害性を他の HTLV-I 感染・非感染 T 細胞株と比較検討した。その結果、HAM 患者由来 HTLV-I 感染 T 細胞株は比較的低濃度の allicin 処理によって障害を受けることが明らかにされた。その障害性のメカニズムはミトコンドリア膜電位の低下と z-VAD-fmk 処理により回復するという事実から caspase 依存性のアポトーシスが考えられた。また、HAM 患者由来 HTLV-I 感染 T 細胞株に対する allicin 処理は活性化 p38MAPK を著明に down-regulate した。さらに、HAM 患者末梢血 CD4 陽性 T 細胞を allicin で処理することによって CD4 陽性 T 細胞群中での HTLV-I provirus 量が有意に減少した。これらの事実より allicin は HAM 患者における HTLV-I 感染細胞を比較的选择的に除去できる可能性を持っていることが明らかにされた。

## A. 研究目的

Allicin は garlic(*Allium sativum*)から抽出された organosulfur compound である。以前よりこの compound は抗腫瘍効果、抗細菌・真菌効果、抗血栓効果など多彩な作用を持つことが報告されていたことに加えて、最近ではある種の白血病細胞に対してもアポトーシスを誘導することによって、抗腫瘍効果を発揮することが明らかになってきた。今回、HAM に対する治療法開発の基礎的検討という観点から、HAM 患者由来 HTLV-I 感染 T 細胞株に対する障害性を種々の HTLV-I 感染および非感染 T 細胞株と比較検討すると共に、そのメカニズムについて解析した。加えて、HAM 患者培養末梢血 CD4 陽性 T 細胞中の HTLV-I 感染細胞に対する除去効果についても HTLV-I provirus 量を目安に検討した。

## B. 研究方法

1)対象:HTLV-I感染T細胞株としてHAM患者由来HCT-1, HCT-4, ATL患者由来KOB, 臍帯血由来MT-1, MT-2を使用し, HTLV-I非感染T細胞株としてJurkat細胞を使用した。また, 末梢血での検討では, HAM患者8名(女性:6名, 男性:2名)の末梢血CD4陽性T細胞を使用した。

2)各種細胞株障害性におけるallicinの効果: 各種細胞株を $2 \times 10^5$  cells/mlの濃度で, 種々の濃度のallicin存在下で24時間培養後, MTS assay(Promega)を行なった。細胞障害性の評価は% cell viability(allicin処理時のOD値/allicin非処理時のOD値の平均値)で行なった。

3)細胞障害性の評価:①ミトコンドリア膜電位の低下:HCT-1およびHCT-4を20  $\mu$ M allicinまたはvehicle存在下で24時間培養後, potential sensitive fluorescent dye DiOC<sub>6</sub>(3)で染色し, flow cytometryで解析した。②z-VAD-fmk処理によるcell viabilityの変化:HCT-1を100  $\mu$ M z-VAD-fmkで前処理後, 10  $\mu$ M allicin存在下で24時間培養。培養後, MTS assayにおいてcell viabilityの変化を検討した。

4)p38 MAPKのウエスタンブロット解析:HCT-1を20  $\mu$ M allicinまたはvehicle存在下に1時間および3時間培養。cell lysateを作成し, p38 MAPKのウエスタンブロット解析を行なった。

5)allicin 処理による HAM 患者末梢血 CD4 陽性 T 細胞中の HTLV-I provirus 量の変化: 末梢血 CD4 陽性 T 細胞での MTS assay において細胞障害性が生じない 5 および 10  $\mu$ M

allicin 存在下または vehicle 存在下に、末梢血 CD4 陽性 T 細胞を  $1 \times 10^6$  cells/ml の濃度で 24 時間培養。細胞回収後、アポトーシス細胞を除去するためにあらかじめ HTLV-1 感染・非感染細胞株での基礎的検討において設定された条件での遠心分離(1500G/10 分/2 回, 60G/5 分/1 回)を施行。その後、cell pellet から DNA を抽出し、LightCycler による quantitative PCR(primer: HTLV-I tax,  $\beta$ -actin)を施行し、standard として用いた MT-2 中の HTLV-I provirus 量を 1 細胞あたり 2.2 コピーとして、CD4 陽性 T 細胞  $10^4$  個あたりの provirus 量を算出した。

#### (倫理面への配慮)

患者末梢血を使用する場合には、すべて研究の内容を十分に説明した上で文書によるインフォームド・コンセントを得て採取した。

### C. 研究結果

1)各種細胞株障害性におけるallicinの効果: 細胞障害性をLD<sub>50</sub>で表した場合、それぞれのallicin濃度はHCT-1 : 7.0, HCT-4 : 7.5, KOB : 11.5, MT-1 : 12.5, MT-2 : 44.6, Jurkat : 22.2  $\mu$ Mであり、HAM患者由来HTLV-I感染T細胞株(HCT-1, HCT-4)で低値を示し、両者の細胞株は20  $\mu$ Mのallicin処理で、ほぼ完全に死滅した。

2)細胞障害性の評価:HCT-1, HCT-4共に20  $\mu$ M allicinの処理によってほとんどの細胞でミトコンドリア膜電位の低下がみられ、細胞障害はアポトーシスによることが明らかにされた。そのアポトーシスがcaspase依存性か非依存性を解析するために行なったpan-caspase阻害剤z-VAD-fmkによる前処理によって、10  $\mu$ M allicin処理によるHCT-1のviabilityが有意に上昇した。

3)p38 MAPKのウエスタンブロット解析: HCT-1のphosphorylated-p38 MAPKは20  $\mu$ M allicin処理によって著明にdown-regulateされた。

4)allicin処理によるHAM患者末梢血CD4陽性T細胞中のHTLV-I provirus量の変化:8例のHAM患者全例の末梢血CD4陽性T細胞においてvehicle処理に比較して、5  $\mu$ M allicin処理によってHTLV-I provirus量は24.6 - 73.1 %(平均:54.8 %)にまで減少し、10  $\mu$ M

allicin処理でもHTLV-I provirus量は28.5 - 92.8 %(平均:61 %)にまで減少した。

### D. 考察

今回、garlic(*Allium sativum*)から抽出された organosulfur compound である allicin による各種 HTLV-I 感染 T 細胞株に対する障害性を検討した。その結果、HAM 患者由来 HTLV-I 感染 T 細胞株は比較的低濃度の allicin 処理によって障害性を受けることが明らかにされた。その障害性は、allicin 処理によってミトコンドリア膜電位の低下がもたらされること、z-VAD-fmk の前処理によって障害性が rescue されることより caspase 依存性のアポトーシスによる機序が考えられた。さらに HAM 患者由来 HTLV-I 感染 T 細胞株に対する allicin 処理は活性化 p38 MAPK の強い down-regulation を惹起した。活性化 p38 MAPK の down-regulation とアポトーシスの関係は不明であるが、少なくとも allicin は何らかの kinase inhibitor としての機能を持っている可能性が考えられた。これらの現象を踏まえて、HAM 患者末梢血 CD4 陽性 T 細胞中の HTLV-I 感染 T 細胞にもアポトーシスを惹起し得る可能性を考えた。末梢血 CD4 陽性 T 細胞を allicin にて処理したところ、全体の細胞には障害性を与えない濃度で、HTLV-I provirus 量が有意に減少した。このことは、allicin は末梢血中の HTLV-I 感染細胞を比較的選択的に除去し得る可能性を持っていると考えられた。

### E. 結論

Allicin は HAM 患者由来 HTLV-I 感染 T 細胞株に対して p38 MAPK 系の down-regulation を惹起し、caspase 依存性にアポトーシスを引き起こすことが明らかにされた。さらに、allicin は HAM 患者培養末梢血 CD4 陽性 T 細胞中の HTLV-I 感染 T 細胞に対してもアポトーシスを誘導し得る可能性を持っていることが示された。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

## 1. 論文発表

1. Yoshihiro Nishiura, Tatsufumi Nakamura, Naomi Fukushima, Ryozo Moriuchi, Shigeru Katamine, Katsumi Eguchi. Increased mRNA expression of Th1-cytokine signaling molecules in patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Tohoku J Exp Med* 204: 289-298, 2004.

2. Naomi Fukushima, Yoshihiro Nishiura, Tatsufumi Nakamura, Yasuaki Yamada, Shigeru Kohno, Katsumi Eguchi. Involvement of p38 MAPK signaling pathway in IFN- $\gamma$  and HTLV-I expression in patients with HTLV-I-associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis. *J Neuroimmunol* 159: 196-202, 2005.

## 2. 学会発表

1. 西浦義博, 中村龍文, 福島直美, 江口勝美. CD44刺激によるHTLV-I感染細胞のHTLV-I tax 発現およびIFN- $\gamma$  産生の検討. 第16回日本神経免疫学会 2004年1月30日(金)~31日(土)東京

2. 西浦義博, 中村龍文, 福島直美, 江口勝美. HAM患者末梢血単核球のサイトカインシグナル伝達系からみたIFN- $\alpha$  療法の検討. 第45回日本神経学会総会 2004年5月11日(火)~14日(金)東京

3. 福島直美, 中村龍文, 西浦義博, 山田恭暉, 江口勝美. HTLV-I関連脊髄症でのIFN- $\gamma$  発現亢進におけるp38MAP kinase 系の関与. 第45回日本神経学会総会 2004年5月11日(火)~14日(金)東京

## 4. Tatsufumi Nakamura.

Clinical experience with HAM/TSP-Our approach for the elucidation of the pathogenesis and the establishment of the therapeutics-

Therapeutics in HTLV-I Associated Neurologic Disease Workshop. May 19~22, 2004 Montego Bay

## 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



HTLV-I 特異的細胞傷害性 Tリンパ球の多様性が HTLV-I 感染におよぼす影響

分担研究者 久保田龍二 鹿児島大学助教授

研究要旨:HAM は HTLV-I ウイルスの慢性感染状態であり、ウイルス特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) が高いにもかかわらずウイルス量が多い。ウイルス感染のコントロールには CTL が重要であるが、ウイルス排除に与える CTL 側の因子はよくわかっていない。本研究では、HAM 患者における Tax 特異的 CTL の頻度、機能的多様性、構造的多様性、アビディティーと HTLV-I ウイルス量およびウイルス変異について包括的に検討し、ウイルス排除に重要な CTL の因子の同定を行った。HTLV-I ウイルス量は CTL の頻度とは相関しなかったが、CTL の機能的多様性と逆相関を示し、構造的多様性と逆相関傾向を認めた。また、CTL の機能的多様性が高いほうが変異ウイルスの頻度が少ない傾向にあった。さらに CTL の機能的多様性と CTL の頻度は逆相関を示した。以上より、機能的多様性が高い CTL 集団の方が低い集団より、変異ウイルスの増殖抑制も含めて、生体内で有利にウイルス排除に働いている可能性が示された。CTL ワクチンの開発には機能的多様性を保ったままで CTL を増強することが重要と考えられた。

A. 研究目的

HAM では HTLV-I ウイルス量が多く、発症および神経症状増悪の最大の因子である。HAM では流血中に HTLV-I 特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) が高頻度に観察されるが、ウイルスの排除にはいたらず、慢性感染の状態である。ウイルス排除には細胞性免疫、特にウイルス特異的 CTL の働きが重要である。現在までに、T 細胞クローンのレベルにおける細胞傷害活性やサイトカイン産生能などが試験管内での感染細胞除去の因子として知られているが、生体内におけるウイルスを排除しようとする CTL 側の因子についての解析は十分に行われていない。HAM 患者のプロウイルス量と CTL の機能的多様性、構造的多様性、頻度等を検討し、ウイルス排除に重要な因子の解明を目標とした。

B. 研究方法

HLA-A2 HAM 患者では Tax11-19 が主要なエпитープであり、Tax11-19 特異的 CTL の頻度が高いため、24 例の HLA-A2 HAM 患者を対象とした。HTLV-I プロウイルス量は TaqMan システムによる定量的 PCR で測定した。HTLV-I Tax11-19 特異的 CTL は Tax11-19 抗原をパルスした抗原提示細胞との混合培養下での IFN- $\gamma$  産生細胞を細胞内サイトカイン染色し、フローサイトメトリーで検出した。CTL の機能的多様性の解析は Tax11-19 エピトープの T 細胞レセプター (TCR) 結合部位のアミノ酸を置換した人工変異ペプチドを作成し、人工変異エピトープを認識する CTL の頻度を測定し、Tax11-19 特異的 CTL の頻度で除して標準化した。CTL の構造的多

様性は HLA-A2/Tax 11-19 複合体テトラマーおよび磁気ビーズを用いて Tax11-19 特異的 CTL をポジティブセレクションし、mRNA 抽出後 cDNA を合成して TCR VB 特異的プライマーを用いて RT-PCR を行った。PCR 産物を TCR の相補性決定部位 3 の長さによってスペクトラタイピングを行い、VB 毎のピーク数を合計し TCR の構造的多様性を評価した。CTL のアビディティーについては、抗原提示細胞への Tax11-19 ペプチドの希釈系列でのパルスを行い、Tax11-19 特異的 CTL の頻度および IFN- $\gamma$  の蛍光強度をフローサイトメトリーで測定した。変異ウイルスについては各 HAM 患者より DNA を抽出後 tax 領域を PCR にて増幅し、ベクターにサブクローニングしてシークエンスを行い、アミノ酸の変異を検討した。  
(倫理面への配慮)

臨床検体を扱うため、患者よりの採血に関しては十分なインフォームドコンセントのもと、書面による研究協力承諾書を頂いた。本研究は鹿児島大学倫理委員会の承諾を得た。また、患者とサンプルの非連結匿名化を行った。

C. 研究結果

HLA-A2 HAM 患者の HTLV-I プロウイルス量は HTLV-I Tax 11-19 特異的 CTL の機能的多様性と逆相関し、構造的多様性と逆相関傾向を認めた。CTL の頻度とウイルス量は相関は認めなかった。また、CTL の機能的多様性と CTL 頻度は逆相関を示した。患者間で CTL のアビディティーは差がなかったことよりこれらの機能的多様性は CTL と感染細胞との結合強度の差によるものではないと考えられた。

変異ウイルスの検討では、CTL の機能的多様性が高いほうが変異ウイルスの頻度は低い傾向にあった。変異ウイルスの頻度とプロウイルス量は相関を示さなかった。

#### D. 考察

HTLV-I 特異的 CTL の機能的多様性が HTLV-I ウイルス量と逆相関した。また、CTL の機能的多様性と CTL 頻度は逆相関した。以上より機能的多様性が高い CTL 集団の方が低い CTL 集団より、ウイルス排除に有利である可能性が考えられた。さらに、CTL の機能的多様性が高いほうが HTLV-I 変異ウイルスの頻度が低いことより、機能的多様性が高い CTL のほうが変異ウイルスをも認識して排除する可能性が考えられた。現在までウイルス特異的 CTL がウイルスを排除するとき重要な因子は、細胞傷害活性やパーフォリンの量、またはサイトカインの産生能などが報告されてきた。これらのほとんどは CTL 細胞株または CTL クローンを用いての検討の結果であり、クローナルな CTL からみた因子といえる。今回 HAM 患者生体内のポリクローナルな CTL 集団の解析により、多様性が高い CTL 集団の方が低い CTL 集団より生体内ではより有効にウイルス排除に働く可能性が示された。HAM では高 HTLV-I ウイルス状態が発症および症状増悪の最大のリスクであり、ウイルス量を軽減ないしはウイルス除去が HAM の治療上最も重要と考えられる。ウイルス感染症では CTL がウイルス排除に中心的働きをしており、HTLV-I 特異的 CTL による HAM 治療法を考えると、ある単独の HTLV-I 特異的 CTL を増やすのではなく、多様な集団としての CTL を増やすほうがウイルス排除に有効であろうと考えられた。

#### E. 結論

HAM 患者では HTLV-I 特異的 CTL の機能的多様性が高いほうが HTLV-I プロウイルス量は低く、変異ウイルスの頻度は低かった。多様性が高い CTL 集団の方が低い CTL 集団より、より有利にウイルスを排除する可能性がある。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Saito M, Nakagawa M, Kaseda S, Matsuzaki T, Jonosono M, Eiraku N, Kubota R, Takenouchi N, Nagai M, Furukawa Y, Usuku K, Izumo S, Osame M: Decreased human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus load and alteration in T cell phenotype after interferon-alpha therapy for HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis.* 189(1): 29-40, 2004

##### 2. 学会発表

Kubota R, Izumo S, Osame M: Immunopathogenesis of HAM/TSP. In Therapeutics in HTLV-I Associated Neurologic Disease Workshop. Montego Bay, Jamaica, May 2004

Kubota R, Saito M, Ijichi S, Nakagawa M, Izumo S, Osame M: Interferon-alpha treatment for HAM/TSP. In Therapeutics in HTLV-I Associated Neurologic Disease Workshop. Montego Bay, Jamaica, May 2004

久保田龍二、古川良尚、出雲周二、納光弘：HAM における CTL による正の選択圧とウイルスの安定性。第 45 回日本神経学会総会。2004 年 5 月 東京

#### 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。

HAM/TSP 発症を規定するウイルス因子・宿主因子の異なる民族間での比較検討  
—イランと鹿児島における解析—

分担研究者 宇宿 功市郎

共同研究者 斉藤 峰輝、Amir H. Sabouri、能勢 裕久、出雲 周二、有村 公良、Reza Farid、納 光弘

研究要旨:

我々は鹿児島のコホートにおいて HAM を発症しやすい特定の HTLV-I のサブタイプが存在すること、HAM 発症に関連する複数の宿主遺伝子が存在することを報告したが、これらの因子が民族的背景が異なる他の感染地域においてもあてはまるかどうかを検討するため、イラン北東部の感染者について、HAM 発症にかかわる宿主因子、ウイルス因子を解析し鹿児島のコホートのデータと比較した。イランのコホートでは、HLA-A\*02、Cw\*08 の HAM 発症抑制効果が認められない一方、HLA-DRB1\*0101 の HAM 発症促進効果は鹿児島と同様に認められた。イラン株の HTLV-1 Tax の塩基配列は、鹿児島のコホートで HAM になりやすい株として報告した Tax subgroup A と共通の4つの塩基置換(2アミノ酸変異を伴う)に加え、さらに6つの塩基置換(4アミノ酸変異を伴う)を伴っていた。ウイルス因子と宿主因子の複雑な相互作用が最終的な HTLV-1 感染の予後を規定することが示唆された。

I. 研究目的

鹿児島における我々のこれまでの研究から、HAM 患者では HTLV-I 感染無症候性キャリアー (Healthy carriers: HC) に比べ、プロウイルス量が 10 倍以上に増加し最大の発症危険因子であること<sup>1)</sup>、HAM を発症しやすい特定の HTLV-I のサブタイプが存在すること<sup>2)</sup>、HAM 発症に関連する複数の宿主遺伝子が存在すること<sup>3-7)</sup>が明らかになっている。これらの結果が民族的背景が異なる他の感染地域においてもあてはまるかどうかを検討し、普遍的な HAM 感受性因子、地域特異的な HAM 感受性因子を同定して HAM 発症メカニズム解明の一助とすることを目的に研究を行った。イラン、マシャディ大学医学部との共同研究により、HTLV-I 高侵淫地域であるイラン北東部の HTLV-1 感染者 (HAM 患者、HC) を対象に、鹿児島のコホートにおいて HAM 発症との関連が明らかになった HTLV-1 ウイルス型 (Tax subgroup)、宿主因子を解析し、そのデータを鹿児島の結果と比較、解析した。

J. 研究方法

鹿児島とイラン北東部マシャディ地区の HTLV-1 感染者 (鹿児島: HAM 222 例、HC 184 例 イラン: HAM 58 例、HC 74 例) について、鹿児島のコホートにおいて HAM 発症に関与することが明らかになった HLA 宿主遺伝子 (HLA-A\*02、Cw\*08、B\*5401、DRB1\*0101) の頻度を比較した。また、ABI Prism 7700™ sequence detector を用いて HTLV-I プロウイルス量を定量的 PCR 法により測定した。鹿児島、イラン双方

の HTLV-1 ウイルス型を決定するため、各 10 症例以上の HAM 患者、HC に感染している HTLV-I プロウイルスの LTR および Tax 領域の塩基配列を決定し比較した。

(倫理面への配慮)

本研究は学内倫理委員会の承認を得て行われたものであり、検体の採取においては十分な情報の説明のちに同意を得て行われ、完全に匿名化された後に研究に使用している。

K. 研究結果

我々が報告した鹿児島における 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、HLA-A\*02、Cw\*08 を持つ感染者は持たない感染者と比較して末梢血リンパ球中のプロウイルス量が少ないことが示された<sup>4)</sup>が、HLA-A\*02、Cw\*08 の HAM 発症抑制効果はイランのコホートにおいては認められなかった (Table 1, 2)。また、HLA-B\*5401 陽性者はイラン人集団には見出せなかった。一方、HLA-DRB1\*0101 陽性者は鹿児島、イランの双方において HC より HAM 患者において高頻度であり、2つの地域で共通した HAM 発症促進因子であった (Table 3)。イランの HTLV-1 Tax の塩基配列は、われわれが以前に HAM になりやすい株として報告した鹿児島のコホートの Tax subgroup A と共通の4つの塩基置換(2アミノ酸変異を伴う)を持ち、さらに6つの塩基置換(4アミノ酸変異を伴う)を伴っていたが、HLA-A\*02 拘束性の

HTLV-I Tax に対する CTL の dominant epitope (Tax 11-19)の配列は鹿児島株 (Tax subgroup A および B)とイラン株でまったく同じであった (Table 4)。一方、LTR および NFκB プロモーターに対する Tax の転写活性化能も、イラン株の Tax は鹿児島の Tax subgroup A, B と比較して同等であった。興味深いことに、HAM 発症抑制に対する HLA-A\*02, Cw\*08 の効果は、鹿児島のコホートにおいては Tax subgroup B の感染者においてのみ認められ、イラン株と共通の4塩基置換を持つ Tax subgroup A の感染者には認められなかった (Table 5)。

#### L. 考察

今回のイランと鹿児島における HLA 宿主遺伝子の解析から、両地域に共通の感受性因子、地域特異的な感受性因子があることが明らかになった。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-A\*02 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るが、イランにおいて HLA-A\*02, Cw\*08 の効果が認められない一方で HLA-DRB1\*0101 の効果が鹿児島とイラン共通に認められたことは、HLA-DRB1\*0101を介する HTLV-I 特異的 CD4 細胞の HAM 発症における重要性を示唆しており、今後その詳細な機能解析を行うことで病態機序の解明をさらに進めていく必要がある。また、ウイルスの型 (Tax subgroup A または B) が変わると同じ遺伝背景を持つ集団 (鹿児島) においてさえも HLA (HLA-A\*02, Cw\*08) の効果が異なることが明らかになり、ウイルス因子と宿主因子の複雑な相互作用が最終的な HTLV-1 感染の予後を規定することが示唆された。

#### M. 結論

HAM 発症に関連する HLA 宿主要因の異なる民族間における比較から、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再確認されたのみならず、ウイルス因子もその効果に大きな影響を及ぼすことが示唆された。さらに解析を続け、精度の高い HAM 発症予測と治療時期の選択を可能にしたい。

#### N. 健康危険情報

なし

#### O. 研究発表

##### 1. 論文発表

[1] Nagai M, et al. Analysis of HTLV-1 proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-1

carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. *J Neurovirol.* 1998 4(6):586-93.

[2] Furukawa Y, et al. Phylogenetic subgroups of human T cell lymphotropic virus (HTLV) type I in the tax gene and their association with different risks for HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis.* 2000 182(5):1343-9.

[3] Vine AM, et al. Polygenic control of human T lymphotropic virus type I (HTLV-1) provirus load and the risk of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis.* 2002 186(7):932-9.

[4] Jeffery KJ, et al. HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-1) proviral load and the risk of HTLV-1-associated myelopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 96(7):3848-53.

[5] Jeffery KJ, et al. 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.

[6] Sabouri AH, et al. Polymorphism in the interleukin-10 promoter affects both provirus load and the risk of human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy /tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis.* 2004 190(7):1279-85.

[7] Kodama D, et al. Longer dinucleotide repeat polymorphism in matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene promoter which correlates with higher HTLV-1 Tax mediated transcriptional activity influences the risk of HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *J Neuroimmunol.* 2004 156(1-2):188-94.

[8] Sabouri AH, et al. Differences in viral and host genetic risk factors for development of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis between Iranian and Japanese HTLV-1-infected individuals. *J Gen Virol.* 2005 86(3):773-81.

#### P. 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



**Table 1: HLA-A\*02 and HLA-Cw\*08 are not associated with a lower risk of HAM/TSP in Iranian HTLV-1 infected individuals.**

Population (N: HAM/HCs)	HLA-A*02	HAM/TSP	HC	$\chi^2$	P	OR	CI, 95%
Iranian (58/74)	positive	21(36.2%)	20(27.0%)	0.887	0.346	1.53	0.73-3.22
	negative	37(63.8%)	54(73.0%)				
Japanese (222/184)	positive	67(30.2%)	87(47.3%)	11.784	0.0006	0.48	0.32-0.72
	negative	155(69.8%)	97(52.7%)				
	HLA-Cw*08	HAM/TSP	HCs	$\chi^2$	P	OR	CI, 95%
Iranian (58/74)	positive	9(15.5%)	10(13.5%)	0.006	0.940	1.18	0.44-3.11
	negative	49(84.5%)	64(86.5%)				
Japanese (222/184)	positive	24(10.8%)	36(19.6%)	5.45	0.0196	0.50	0.29-0.87
	negative	198(89.2%)	148(80.4%)				

**Table 4: Nucleotide variations specific to Iranian HTLV-1.**

Subgroup (n)	Nucleotide variation, by position and amino acid change in <i>taxA</i> <sup>a</sup>									
	7622	7811	7855	7897	7959	7991	8208	8313	8314	8344
ATK-1 (= <i>tax B</i> )	M? V	I? V	N	N	A? V	N? H	S? N	G? E	N	N
<i>tax A</i>	A	A	T	C	C	A	G	G	C	A
Iranian <i>tax</i>	G	G	C	T	T	C	A	A	G	C

<sup>a</sup> Nucleotide position corresponds to that of prototypic strain ATK-1. Amino acid change results from nucleotide substitution, N: no change.

**Table 2: HLA-A\*02 and HLA-Cw\*08 are not associated with a lower provirus load in Iranian HTLV-1 infected individuals.**

	HLA-A*02	Provirus load (Mean±SE)	Provirus load (Median)	No. of subjects	P <sup>a</sup>
		Iranian	positive		
	negative	209.6±24.9	120.0	91	
Japanese	positive	366.8±43.4	118.5	156	0.0003
	negative	525.6±41.5	266.8	250	
	HLA-Cw*08	Provirus load (Mean±SE)	Provirus load (Median)	No. of subjects	P <sup>a</sup>
Iranian	positive	198.2±42.8	131.0		
	negative	233.6±22.9	147.0	113	
Japanese	positive	300.7±56.4	120.0	60	0.009
	negative	492.0±34.5	234.0	346	

HTLV-1 provirus load: HTLV-1 *tax* copy number per  $1 \times 10^4$  PBMCs for Japanese samples and  $1 \times 10^4$  nucleated cells for Iranian samples by quantitative PCR.

<sup>a</sup> Two-tailed Mann-Whitney U test.

**Table 5: HLA-A\*02 was associated with a lower risk of HAM/TSP only in the *tax* subgroup B subjects in Kagoshima.**

<i>tax</i> subgroup	HLA-A*02	HAM/TSP	HC	$\chi^2$ <sup>a</sup>	P	OR	CI, 95%
<i>tax A</i>	positive	16 (57%)	6 (60%)	0.047	0.829	0.89	0.20-3.87
	negative	12 (43%)	4 (40%)				
<i>tax B</i>	positive	51 (26%)	81 (47%)	15.5	<0.0001	0.41	0.26-0.63
	negative	143 (74%)	93 (53%)				

**Table 3: HLA-DRB1\*0101 increases the odds of HAM/TSP in Japanese and Iranian A\*02 negative but not in A\*02 positive HTLV-1 infected individuals.**

Subjects	HAM/TSP (No.)		HC (No.)		$\chi^2$	P	OR	CI, 95%
	DRB1+	DRB1-	DRB1+	DRB1-				
Iranian All	18	40	12	62	3.3	0.035	2.33	1.01-5.34
A*02?	13	24	9	45	3.1	0.038	2.71	1.01-7.24
A*02+	5	16	3	17	0.1	0.376	1.77	0.36-8.65
Japanese All	34	161	20	163	2.8	0.049	1.72	0.95-3.12
A*02?	27	107	10	83	2.9	0.044	2.09	0.96-4.57
A*02+	7	54	10	80	0.005	0.47	1.03	0.37-2.89



### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

