

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。

**HTLV-I pX**  
(sense 5'-ATCCCGTGGAGACTCCTCAA-3')  
antisense 5'-CCAAACACGTAGACTGGGTATCC-3')

**HTLV-I gag**  
(sense 5'-CCAATGCAAACAAAGAATGC-3',  
antisense 5'-AGCCCGCAACATATCTCCTA-3')

### 6) 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-I 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-I 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が、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。

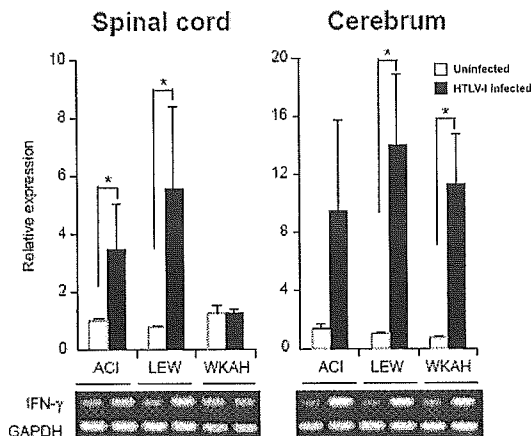


図 1

一方、大脳では全ての系統において感染による IFN- $\gamma$  mRNA の発現亢進を認めた(図 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 および LEW ラット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。さらに脊髄における 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。さらに感染後 3 ヶ月の脊髄において IFN- $\gamma$  mRNA の発現亢進は認められなかった。以上より HAM 抵抗性ラットでは HTLV-I 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-I 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-I 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-I 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 倍に増加していたが WKAH では感染による神経軸索伸長は認められなかった(図 2)。

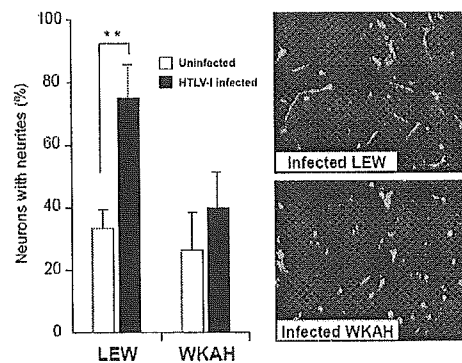


図 2

### 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、抗 IFN- $\gamma$  抗体との蛍光抗体二重染色法を行った。その結果、HTLV-I 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-I 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

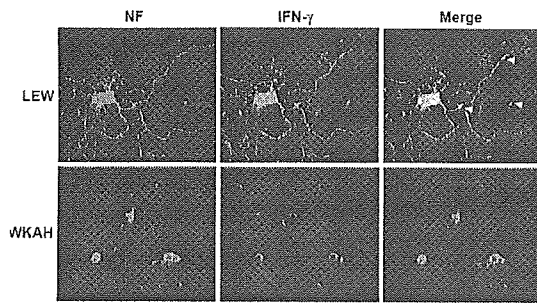


図 3

た軸索やシナプスボタンの IFN- $\gamma$  強陽性像により示されていた。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-I 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。さらに、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. IFN- $\gamma$ による HTLV-I 持続感染ラットリンパ球株のウイルス遺伝子への影響

IFN- $\gamma$  が実際に HTLV-I の *pX* 遺伝子を抑制するかどうかを確認するために、HTLV-I 持続感染リンパ球株である LEW S-1 細胞をリコンビナント IFN- $\gamma$  で 3 時間処理したときの *pX* mRNA の発現変化をリアルタイム PCR にて検討した。その結果 IFN- $\gamma$  処理することによって、ウイルス構造遺伝子 *gag* に対する *pX* の割合が有意な減少 ( $p < 0.001$ ) を認めた (図 4)。

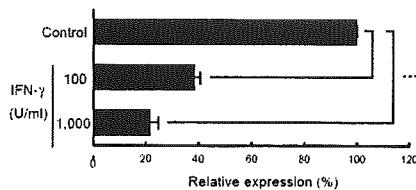


図 4

#### 5. HTLV-I 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

一般に、感染は 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。リアルタイム RT-PCR により、脊髄の IFN- $\gamma$  mRNA に見られた変化と同様に、HTLV-I 感染 7 ヶ月後の ACI, LEW において脊髄における IRF-1 mRNA 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。一方、IL-12p40 mRNA は感染によって HAM 感受性ラットにおける発現亢進に加え、WKAH においてもミクログリアに富んだ細胞集団において感染による発現亢進を認めた。

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

WKAH の脊髄において、感染によって IFN- $\gamma$  の発現誘導が起こらない原因として IL-12 のシグナル伝達異常を考え、非感染培養神経系細胞を 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 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 HAM 抵抗性ラット由

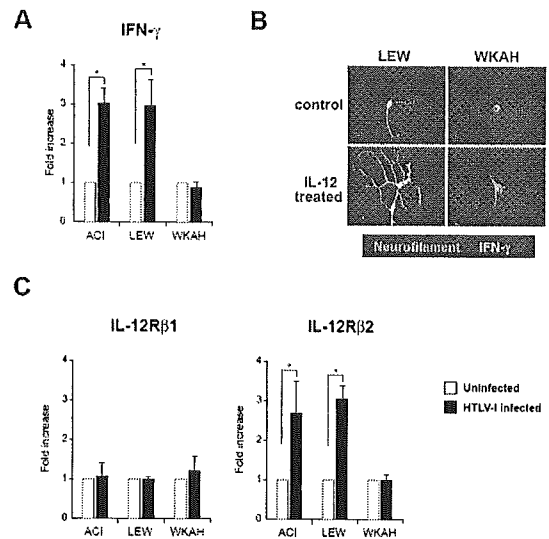


図 5

来の神経系細胞では IFN- $\gamma$  mRNA が 3 倍に亢進したが、非感染 WKAH では変化しなかった。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、LEW 由来のニューロンでは、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、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 鎖の発現について検討した結果、IL-12 の刺激によって LEW において IL-12R $\beta$ 2 mRNA の発現が 2.9 倍に増加したが、非感染 WKAH では変化しなかった。

## 6. HTLV-I 感染ラットの脊髓および大脳における IL-12Rβ2 の発現応答性の系統差

WKAH における IL-12 に対する IL-12Rβ2 の発現不応答性が HTLV-I 感染によっても起こり得るかどうかを *in vivo* にて感染した脊髓と大脳を対象にリアルタイム PCR にて検討した。

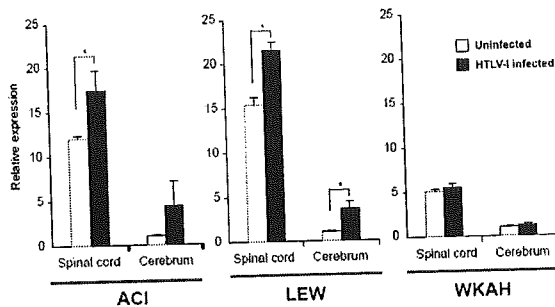


図 6

HAM 抵抗性ラットでは、大脳および脊髓ともに HTLV-I 感染によって発現が亢進したが、WKAH では、両者とも変化は認められなかった。この結果より、HAM 感受性の WKAH ラットでは IL-12Rβ2 遺伝子の発現機序に何らかの遺伝子学的変異が存在することが示唆された。

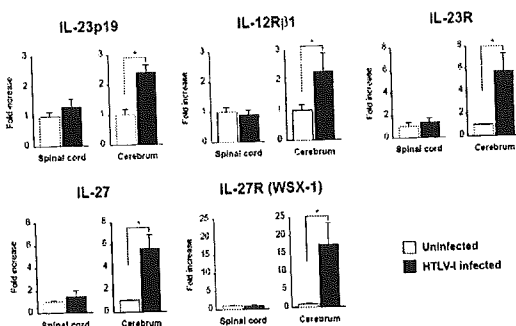


図 7

次に、どうして HTLV-I 感染7ヶ月の大脳において IFN-γ が誘導されたかを検討するために、IFN-γ を誘導すると知られる IL-23 と IL-27 に着目し、HTLV-I 感染によって発現の亢進が起こるかどうかをリアルタイム PCR で検討した。IL-23 は p19 と p40 のサブユニットからなり、p40 は IL-12 と共有する。IL-23R は IL-12Rβ1 と IL-23 特異的なサブユニットからなる。大脳においてのみ HTLV-I 感染によって IL-23p19, IL-12Rβ1, IL-23R, IL-27 および IL-27R の発現亢進が認められた。これらの結果から、WKAH ラットの

大脳における IFN-γ の誘導には IL-12 よりむしろ IL-23 または IL-27 を介した経路が関係することが示唆された。

## D. 考察

HTLV-I はラットに感染し WKAH ラットに限り脊髓症の発症を誘導する。昨年度までの解析結果から、HTLV-I 感染による WKAH ラット脊髓傷害機構としては感染後 7 ヶ月をピークとする脊髓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、脊髓症を発症すると考えられた。この現象は WKAH 系ラット脊髓に限局しており、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髓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 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 HAM 感受性 WKAH ラットの HTLV-I 感染後 7 ヶ月の脊髓に認める感染に対する IFN-γ の不応答性の原因遺伝子の解明を目的とし検討を行った。

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-γ 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-γ 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-γ 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-γ 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-γ 様免疫応答は以前から報告されていたが、この IFN-γ 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-γ の発現、さらにこの IFN-γ 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-I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-I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ラットにはこの現象は認められなかった。さらに、IFN- $\gamma$ の添加によりHTLV-I持続感染ラットリンパ球株の*pX* mRNAの発現抑制を確認した。MT-2と共培養された臍帯血由来単核球(CBMC)はIFN- $\gamma$ 添加によって、HTLV-I感染からCBMCを保護したと報告されている。*pX*の選択的発現増強と同時期にHAM感受性ラットの脊髄でのみ*pX*遺伝子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*pX*遺伝子の転写の抑制に関与し、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。

Neurofilament陽性で示されるニューロンは、明らかに、HTLV-I感染LEWラットにおいてHTLV-I感染WKAHラット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。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- $\gamma$  mRNAの発現の亢進が神経軸索伸長に作用し、HTLV-I感染LEWラット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。

脊髄から分離した培養神経系細胞でのIL-12添加実験の結果、HAM抵抗性LEWラットではIL-12によりIFN- $\gamma$ 産生が亢進するのに対し、HAM感受性WKAHラット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。*in vivo*の感染実験においてもHAM抵抗性ラットでは、大脳および脊髄ともにHTLV-I感染によって発現が亢進したが、WKAHラットでは両者とも変化は認められなかった。この結果より、HAM感受性のWKAHラットではIL-12R $\beta$ 2遺伝子の発現機序に何らかの遺伝子変異が存在する可能性が示唆された。

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の発現応答がおり、その刺激がニューロンに伝わりIFN- $\gamma$ の産生を誘導し、*pX*の発現を抑制していると考えられる。そして、このHTLV-Iに対する脊髄における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推測される。

ところで、IFN- $\gamma$ の発現を規定する因子は、IL-12を介した経路に限られたものではなく、IL-23やIL-27など様々な因子によって複雑に制御されている。本研究においても、感染WKAHラットの大脳において誘導されたIFN- $\gamma$  mRNAは、IL-12を介さずIL-23もしくはIL-27を介して誘導された可能性が示唆された。この大脳と脊髄におけるIFN- $\gamma$ の発現機構の違いが、HAMラット病の病変が大脳には起こらず脊髄にすることの要因の一つになり得る可能性がある。そして、WKAHラットに認める脊髄におけるIL-12に対するIL-12R $\beta$ 2鎖の発現不応答性の原因となる遺伝子変異を解明することが、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. HTLV-I感染後7ヶ月において、HAM抵抗性ラットでは脊髄でのIFN- $\gamma$ の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. HAM感受性ラットにおけるIL-12に対するIL-12R $\beta$ 2の発現不応答性がIFN- $\gamma$ の欠如に

関与していると考えられた。

4. HAM 感受性ラットの大脳で認めた IFN- $\gamma$ の発現誘導には IL-12 を介した経路のほかに IL-23 もしくは IL-27 を介した経路が関与している可能性が示唆された。

#### 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行っており、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, Yamano Y, Jacobson S. "HTLV-I infection and the Nervous system." *Clinical Neuroimmunology* 2<sup>nd</sup> edition, Oxford Medical Publications, 2005 285-99.
2. Miyatake Y, Ikeda Y, Akihiro Ishizu, Baba T, Ichihashi T, Suzuki A, Tomaru U, Kasahara M, Yoshiki T, Role of Neuronal IFN- $\gamma$  in the Development of Myelopathy in Rats Infected with Human T-cell Leukemia Virus Type 1. *Am J Pathol*, in press.
2. Prat E, Tomaru U, Sabater L, Park DM, Granger R, Kruse N, Ohayon JM, Bettinotti MP, Martin R. HLA-DRB5\*0101 and -DRB1\*1501 expression in the multiple sclerosis-associated HLA-DR15 haplotype. *J Neuroimmunol*. 2005 Oct;167(1-2):108-19.
3. Baba T, Ishizu A, Ikeda H, Miyatake Y, Tsuji T, Suzuki A, Tomaru U, Yoshiki T. Chronic graft-versus-host-disease-like autoimmune disorders spontaneously occurred in rats with neonatal thymus atrophy. *Eur J Immunol*. 2005 Jun;35(6):1731-40.
4. Hayase H, Ishizu A, Ikeda H, Miyatake Y, Baba T, Higuchi M, Abe A, Tomaru U, Yoshiki T, Aberrant gene expression by CD25+CD4+ immunoregulatory T cells in autoimmune-prone rats carrying the human T cell leukemia virus type-I gene. *Int Immunol*. 2005 Jun;17(6): 677-84.
5. Yamano Y, Takenouchi N, Li HC, Tomaru U, Yao K, Grant CW, Maric DA, Jacobson S. Virus-induced dysfunction of CD4+CD25+ T cells in patients with HTLV-I-associated neuroimmunological disease. *J Clin Invest*. 2005 May;115(5):1361-8.

##### 2. 学会発表

1. 宮武由甲子, 池田 仁, 石津明洋, 外丸詩野, 鈴木 昭, 吉木 敬, 笠原正典. HTLV-1 感染ラットにおける脊髄症の発症にはニューロンでの IL-12 を介した INF- $\gamma$ の産生不応答が関与する. 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会, 2005, 横浜, 日本免疫学会.

2. 宮武由甲子, 池田 仁, 馬場智久, 道又理恵, 鈴木 昭, 外丸詩野, 石津明洋, 吉木 敬, 笠原正典. HTLV-1 感染による HAM ラット病の発症はニューロンにおける IL-12 を介した IFN- $\gamma$ の反応性に依存する. 第 64 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2005, 第 64 回日本癌学会学術総会プログラム.

3. 宮武由甲子, 池田 仁, 馬場智久, 市橋 徹, 鈴木 昭, 外丸詩野, 石津明洋, 吉木 敬, 笠原正典. HTLV-I 感染ラットにおける脊髄症の発症にはニューロンにおける IL-12 を介した IFN- $\gamma$ の反応性が関与する. 第 2 回日本病理学会カンファレンス, 道後, 日本病理学会.

4. 外丸詩野, 鈴木 昭, 石津明洋, 吉木 敬, 笠原正典. 日本病理学会, 第 94 回日本病理学会総会, 2004, 横浜, 日本病理学会会誌.

5. 外丸詩野. T細胞による抗原提示. 第 2 回日本病理学会カンファレンス, 道後, 日本病理学会.

#### 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



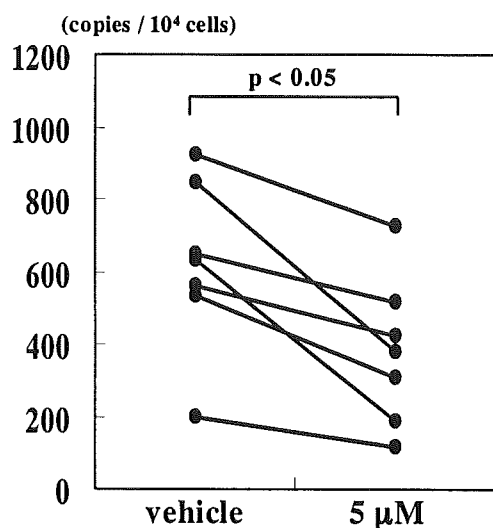


図 4. プロスルチアミン処理による HAM 患者培養 CD4 陽性 T 細胞中の HTLV-I プロウイルス量の変化

また、プロスルチアミンの細胞傷害性は z-VAD-fmk 処理により抑制された。ウエスタンブロットによる検討で、プロスルチアミンは HCT-1 の caspase-3 の活性を増強し、活性化 p38 MAPK の発現を低下させた。7 例の HAM 患者末梢血 CD4 陽性 T 細胞を低濃度のプロスルチアミン存在下で培養したところ、プロウイルス量の減少が認められた(図 4)。

#### D. 考察

プロスルチアミンもアリシン同様、HTLV-I 感染細胞を選択的に除去する可能性が示されたが、アリシンと類似構造を持たないフルスルチアミンにその効果はなく、その類似構造が HTLV-I 感染 T 細胞株に対する傷害性を規定するものと思われた。また、その傷害の機序として caspase 依存性のアポトーシスが考えられ、活性化 p38 MAPK の抑制をもたらすことも示された。さらに、プロスルチアミン処理で培養された末梢血 CD4 陽性 T 細胞の HTLV-I プロウイルス量は有意に減少し、HAM 患者末梢血中の HTLV-I 感染細胞を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

プロスルチアミンは HAM 患者由来 HTLV-I 感染 T 細胞株に対して 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、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、選択的に HTLV-I 感染 T 細胞を除去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. 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. Hideki Nakamura, Atsushi Kawakami, Masahiro Izumi, Tomoki Nakashima, Yukinori Takagi, Hiroaki Ida, Tatsufumi Nakamura, Takashi Nakamura and Katsumi Eguchi

Detection of soluble form of Fas ligand (sFasL) and sFas in the saliva from patients with Sjögren's syndrome. Clin Exp Rheumatol 23(6):915,2005

##### 2. 学会発表

1. 中村龍文. TH1 の活性化からみた HAM/TSP の病態. 第 17 回日本神経免疫学会 2005 年 3 月 3 日(木)~4 日(金) 福岡

2. 西浦義博、中村龍文、福島直美、江口勝美. アリシンによる HTLV-I 感染 T 細胞に対する障害性の検討. 第 46 回日本神経学会総会 2005 年 5 月 25 日(水)~27 日(金) 鹿児島

3. 福島直美、中村龍文、西浦義博、江口勝美. HAM での IFN- $\gamma$  産生亢進における IL-2 シグナリングの解析. 第 46 回日本神経学会総会 2005 年 5 月 25 日(水)~27 日(金) 鹿児島

#### 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

HTLV-I 特異的細胞傷害性 Tリンパ球の認識の多様性と変異ウイルス

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、ウイルス排除に関与するCTL側の因子はよくわかっていない。昨年度の研究においてHTLV-Iウイルス量はCTLの機能的多様性と逆相関を示し、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すことを報告した。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、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。本年度の研究においては生体内で実際に発生した変異ウイルスの排除にCTLの認識の多様性が有利に働いているかを検討した。HAMの末梢血CTL集団の機能的多様性の程度と変異ウイルスの認識の強さは正の相関を認めた。このことより、機能的多様性の高いCTL集団の方が、有利に生体内で発生した変異ウイルスを認識し排除している可能性が考えられた。

A. 研究目的

HAMではHTLV-Iウイルス量が多く、このことがHAM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、ウイルスの完全排除にはいたらず、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。昨年度までの研究においてHAMではポリクローナルなHTLV-I特異的CTL集団の認識の機能的多様性の高さがHTLV-Iプロウイルス量と逆相関をすること、すなわち機能的多様性の高いCTL集団の方が有利にウイルス排除を行っている可能性を指摘した。本年度の研究においては、実際に生体内で発生したHTLV-I変異ウイルスの認識に関して、機能的多様性が高いCTL集団がより有利に認識しうるのかを検討した。また同時にCTLの認識の機能的多様性とHAM患者の臨床パラメーターとの関連を検討した。

B. 研究方法

HLA-A2 HAM患者ではTax11-19が主要なエピトープであり、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HAM患者末梢血リンパ球(PBMC)をTax11-19抗原をパルスした抗原提示細胞と混合培養し、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アラニンに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。変異ウイルスについては各HAM患者末梢血リンパ球より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、Tax11-19領域のアミノ酸の変異を検出した。自然発生変異ウイルスに対するCTLの機能的多様性の影響を検討するために、HLA-A2拘束性のTax11-19の変異エピトープを合成し、HLA-A2陽性抗原提示細胞にパルス後、HAM患者PBMCと混合培養を行い、IFN- $\gamma$ 産生細胞をフローサイトメトリーで検出した。本来のエピトープであるTax11-19特異的CTLの頻度で除して、変異エピトープの相対的認識を数値化した。先に求めたCTLの機能的多様性の程度と変異エピトープの認識の度合いとの関係をプロットして検討した。また、臨床マーカーとCTLの機能的多様性との関連に関して、運動障害度、罹病期間、血清抗HTLV-I抗体価、髄液抗HTLV-I抗体価等を検討した。

(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 Consent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陽性18例のHAM患者のプロウイルスのサブクローニングによるシークエンスの結果、Tax11-19領域にアミノ酸変異を認めたクローンは818クローン中17クローンであった。これらのTax11-19変異エピトープを合成し、HLA-A2を発現した細胞株に添加し患者末梢血と混合培養した。変異エピトープの認識の度合いを測定した。変異エピトープの認識の度合いは、変異エピトープを認識する細胞の比率をワイルドタイプのエピトープを認識する細胞の比率で除して標準化した。昨年度測定した機能的多様性の程度と、変異エピトープの認識の度合いをプロットしたところ、7番目のValineがAlanineに変異したエピトープに関して正の相関を認めた。また、機能的多様性の程度と種々の臨床パラメーターとの相関を検討したが、優位な相関は認められなかった。

### D. 考察

昨年度の研究では、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。本年度の研究により、HAM患者の生体内で自然発生した変異ウイルスに対するCTL反応を検討したところ、機能的多様性が高いCTL集団の方が効率よくに変異ウイルスを認識することが分かった。また、機能的多様性が高いCTL集団を持ったHAM患者では、変異ウイルスの出現頻度が低い傾向が認められた。変異ウイルスの発生は生体ではウイルスのポリメラーゼのミスリーディングにより一定の割合で起こっており、その一部が複製能を持っていると考えられる。検出される変異ウイルスが少ないということは、発生した変異ウイルスがCTLに排除されていることを示すと考えられる。これらのことより、HAMの生体内において機能的多様性が高いCTLは、ワイルドタイプのHTLV-Iウイルスのみならず、自然発生する変異ウイルスを有利に認識して排除する可能性が考えられた。慢性ウイルス感染症において変異ウイルスによる、宿主の免疫系よりの逸脱が問題になる。HAMに対するCTLによる免疫療法を検討する場合には、特定のCTLクローンを増やすよりは、機能的多様性の高いCTL全体を増強するほうが、有効である可能性がある。

### 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、実際にHAM患者の生体内で自然発生した変異ウイルスをより効率的に認識した。多様性が高

いCTL集団の方が低いCTL集団より、変異ウイルスの発生をおさえ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  
なし。

#### 2. 学会発表

1) Kubota R, Osame M, Izumo S: Degeneracy of HTLV-I-specific CTL inversely correlates with proviral load in patients with HAM/TSP. *12th International Conference on Human Retrovirology: HTLV. & Related Viruses* Montego Bay, Jamaica, June 2005

2) Nose H, Saito M, Usuku K, Matsuzaki T, Izumo S, Kubota R, Furukawa Y, Arimura K, Osame M. Comparison of clinical symptoms and the odds for predicting HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in healthy virus carriers: application of best-fit logistic regression equation based on the genotype, age, and provirus load. *12th International Conference on Human Retrovirology: HTLV & Related Viruses*, Montego Bay, Jamaica, 2005

3) 久保田龍二、斎藤峰輝、納光弘、出雲周二:HAMにおけるCTLの多様性とHTLV-Iウイルス量およびウイルス変異の検討。第46回日本神経学会総会。2005年5月 鹿児島

4) 久保田龍二、納光弘、出雲周二:HAMにおけるHTLV-IウイルスとCTLの相互作用。第10回日本神経感染症学会、2005年10月 東京

5) 林大輔、久保田龍二、能勢裕久、有村公良、出雲周二、納光弘:HAMにおける慢性ウイルス感染に対するCTL反応。第18回日本神経免疫学会。2006年3月 名古屋

### 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。

分担研究報告書

臨床徴候及び臨床検査から見た HTLV-I キャリアーにおける  
HTLV-I 関連脊髄症(HAM/TSP)発症リスク計算式の有用性の検討

分担研究者 宇宿 功市郎(元 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 医療システム情報学)  
(現 熊本大学医学部附属病院 医療情報経営企画部)  
共同研究者 能勢 裕久、斉藤 峰輝、松崎 敏男、有村 公良、納 光弘  
(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 神経内科・老年病学)  
古川 良尚 (鹿児島大学病院 輸血部)  
久保田 龍二、出雲 周二 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科  
附属難治ウイルス病態制御研究センター 分子病理)

研究要旨:

我々はこれまでに HAM 発症に関連する複数の HLA、非 HLA 宿主遺伝子多型と HTLV-I ウイルスサブタイプの変量解析から、HAM 発症リスクを計算する式を示し報告している。実際の臨床での発症リスク計算式の有用性を検討する為、鹿児島大学病院 HTLV-I キャリアー外来に来院した患者の検体を利用し、Odds of HAM を算出し、臨床症状及び臨床検査の結果と対比した。Odds of HAM の高い群(0.78 以上)において、下肢深部腱反射が亢進しており、異常リンパ球数及びその割合も高かった。これは、我々が日常臨床の中で抱いていた HAM の初期臨床像と Odds 比の高い群とが概ね一致するもので、この発症リスク計算式の有用性が確かめられた。

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あるが、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。我々はこれまでに HAM 発症に関連する複数の HLA、非 HLA 宿主遺伝子多型と HTLV-I ウイルスサブタイプの変量解析から、HAM 発症リスクを計算する式を示し報告した(Journal of Infectious Diseases 2002; 186:932)。この式の有用性の検討のため、以下の検討を行った。

B. 研究方法

2004 年 11 月までに鹿児島大学病院 HTLV-I キャリアー外来に来院し、協力の得られた 181 名を対象とした。末梢血単核球からゲノム DNA を抽出し、HTLV-I プロウイルス量を定量的 PCR 法により測定する一方で、TNF- $\alpha$ -863A/C、SDF-1-801A/G、HLA-A\*02、HLA-Cw\*08 の各遺伝子多型および HTLV-I Tax サブタイプを決定した。得られたデータを前出論文掲載の計算式に適用して Odds of HAM を算出、臨床症状と比較した。検討項目は、性別、輸血歴、血液疾患及び HAM の家族歴、下肢腱反射亢進、腹壁反射の消失、痙性(クローヌス及び病的反射)、1 日排尿回数、夜間尿回数、表在リンパ節腫脹、皮膚病変とした。また、臨床検査よ

り、LDH 及び白血球数、その分画であるリンパ球、異型リンパ球、異常リンパ球、CD4+、CD8+、CD4+CD3+、CD8+CD3+、CD16+CD56+CD3-、CD16+CD56+CD3+ に関してはその実数及びパーセンテージについて、Mann-Whitney's U test を用い、統計学的解析を行なった。

(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て行った。

C. 研究結果

対象患者の年齢は、46.5 $\pm$ 12.8 歳。男性 95 名、女性 86 名の計 181 名。抗 HTLV-I 抗体価(中央値): 1024 倍。HTLV-I プロウイルス量(中央値): 82Copy/10<sup>4</sup>PBMC。(Table1 参照)

各検査の結果は、Table2 に示すとおりで、既に報告済みのデータと比べ、大きな差を認めなかった。Table3 に示す計算式を用いて、Odds of HAM を計算した。本対象患者の Odds of HAM(中央値)は、0.359 であった。Odds of HAM の有用性とカットオフ値を決めるべく、Receiver Operating Characteristic curve(ROC 曲線)を描いた。ROC 曲線の下面積(Area under the curve of the ROC)を用い、その正確

度(accuracy)を検討した結果、Fig.1 に示す如く、HTLV-I 抗体価(点線; 0.86)、HTLV-I プロウイルス量(破線; 0.88)、Odds of HAM(実線; 0.95)となり、Odds of HAM の有用性は明らかであった ( $p < 0.001$ )。

感度を出来るだけ上げ、疑陽性率を出来るだけ下げるポイントを求め、Odds of HAM 0.78 をもってカットオフとした。この時、感度 92.1%、特異度 85.6%となった。

Odds of HAM が 0.78 以上の群において、下肢深部腱反射が亢進していた (OR: 2.18, 95%CI; 1.11-4.31,  $p=0.036$ )。臨床検査においては、Odds of HAM が 0.78 以上の群に、異常リンパ球数 ( $p=0.011$ )と異常リンパ球の割合 ( $p=0.010$ )の多いことが分った。

さらに 95%以上の特異度を持つ Odds of HAM 3 以上と未満の群に分けて、検討を行なうと、下肢腱反射亢進 ( $P=0.0059$ )、腹壁反射の消失 ( $P=0.042$ )、痙性 ( $P=0.008$ )の 3 つにおいて、有意差が認められた。CD4+及び CD4+CD3+の割合(%)が、Odds 比が 3 未満 ( $47.09 \pm 7.24$  及び  $43.17 \pm 7.84$ )の群に比較し、3 以上の群 ( $51.64 \pm 6.70$  及び  $48.14 \pm 6.25$ )に高い傾向が認められた ( $p=0.0373$  及び  $p=0.0029$ )。

#### D. 考察

下肢腱反射亢進、腹壁反射の消失、痙性は、脊髄病変を反映すると考えられる。特に下肢腱反射亢進は、ごく早期の症状として、注目すべき臨床病態であると考えられた。我々が日常臨床の中で抱いていた HAM の初期臨床像と Odds of HAM の高い群とが概ね一致することが分った。

異常リンパ球の増加は、成人 T 細胞白血病 (ATL) の経過観察の際にも注目されるが、HC 及び HAM においても、注目すべきである。Hisada らの報告によれば、HC において、異常リンパ球の割合と HTLV-I プロウイルス量は、相関するという。また、Odds of HAM も、HTLV-I プロウイルス量の影響を受けており、多くの抗原暴露の結果として、クローナルな増殖が起こり、異常リンパ球が出現する。Odds of HAM の高い群に異常リンパ球が多いことは、理解しやすく、また、臨床検査において、より良いマーカーとなりうる。

詳細は今後の検討が必要であるが、CD4 陽性リンパ球の割合の増加も初期の病態に関与している可能性があり、注目に値する。

#### E. 結論

我々の計算式は HTLV-I キャリアーの経過観察、HAM 早期発見に有用である。

#### F. 健康危険情報

特記すべきものはない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

[1] Sabouri AH, et al. Differences in viral and host genetics risk factors for development of HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) between Iranian and Japanese HTLV-1 infected individuals. *J Gen. Virol.* 2005 86: 773-781.

[2] Saito M, et al. *Apal* polymorphism of vitamin D receptor gene is associated with susceptibility to HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in HTLV-1 infected individuals. *J Neurol Sci.* 2005 232(1-2): 29-35.

[3] Matsuzaki T, et al. A prospective uncontrolled trial of fermented milk drink containing viable *Lactobacillus casei* strain Shirota in the treatment of HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurol Sci.* 2005 237(1-2): 75-81.

[4] Nobuhara Y, et al. Genetic variability in the extracellular matrix protein as a determinant of risk for developing HTLV-I-associated neurological disease. *Immunogenetics.* 57(12): 944-52.

[5] Saito M, et al. Flow cytometry evaluation of the T-cell receptor VB repertoire among human T-cell lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) infected individuals: effect of interferon alpha therapy in HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *J Neurol Sci.* in press.

#### 2. 学会発表

[第 46 回日本神経学会総会 2005 年 5 月. 鹿児島]

[1] 齊藤峰輝、能勢裕久、宇宿功市郎、出雲周二、有村公良、納 光弘、HAM 発症における HTLV-1 envb gp21 特異的 CD4+ T 細胞の病因的意義

[2] 児玉大介、齊藤峰輝、宇宿功市郎、出雲周二、有村公良、納 光弘 HTLV-1 感染者における Sonic hedgehog, Gli2, CD44v6 分子の解析

[3] 松崎敏男、齊藤峰輝、宇宿功市郎、能勢裕久、出雲周二、有村公良、納 光弘 HAM 患者に対する *Lactobacillus casei* Shirota 株の治療効果

[4] 宇宿功市郎、齊藤峰輝、能勢裕久、納 光弘 HAM 発症関連宿主因子と RA の宿主要因の関連

[5] 能勢裕久、齊藤峰輝、宇宿功市郎、松崎 敏男、久保田 龍二、古川 良尚、有村 公良、納 光弘 HTLV-1 キャリアーにおける HTLV-1 関連脊髄症 (HAM/TSP) 発症リスク計算式の有用性の検討

[The 12th International Conference on Human Retrovirology: HTLV 2004, 6, Montego Bay, Jamaica]

[1] Mineki Saito, Hirohisa Nose, Koichiro Usuku, Amir H. Sabouri, Shuji Izumo, Peter K. Goon, Nilufer P. Seth, Kai W. Wucherpfennig, Charles R.M. Bangham and Mitsuhiro Osame  
Ex vivo analysis of human T cell lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) env gp21-specific CD4+ T cells using MHC class II tetramers.

[2] Hirohisa Nose, Mineki Saito, Koichiro Usuku, Toshio Matsuzaki, Shuji Izumo, Ryuji Kubota, Yoshitaka Furukawa, Kimiyoshi Arimura and Mitsuhiro Osame  
Comparison of clinical symptoms and the odds for predicting HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in healthy virus carriers: application of best-fit logistic regression equation based on the genotype, age, and provirus load.

[3] Koichiro Usuku, Mineki Saito, Amir H. Sabouri, Hirohisa Nose, Yoshitaka Furukawa, Shuji Izumo, Reza Farid, Charles R.M. Bangham and Mitsuhiro Osame  
Viral and host genetic factors that determine the development of HAM/TSP.

[4] Fujio Umehara, Mineki Saito, Yoshitaka Furukawa, Koichiro Usuku and Mitsuhiro Osame  
Chronic progressive cervical myelopathy with HTLV-1 infection: Variant form of HAM/TSP?

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

Figure 1

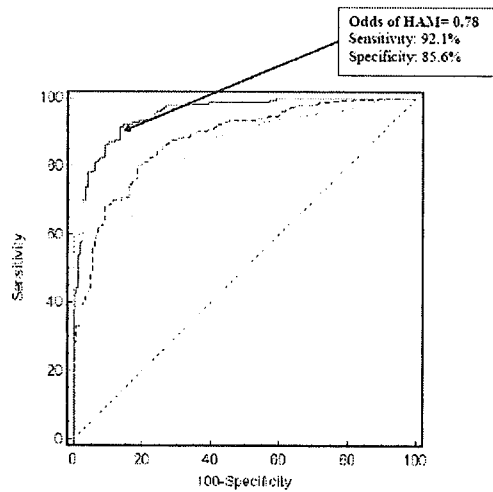


Table 1: Characteristics of 181 asymptomatic HTLV-1 carriers participated in the study.

	HCs (n=181)
Age	46.5 ± 12.7
Sex	
Male	95
Female	86
*Serum anti-HTLV-I antibody titer (mean ± SD)	×2932.6 ± 6447.4
(median)	~1024
**HTLV-I provirus load in PBMCs (mean ± SD)	240.8 ± 361.4
(median)	82

\*Anti-HTLV-1 antibodies were titrated by the particle agglutination method.

\*\*HTLV-1 Tax copy number per 1×10<sup>6</sup> PBMCs.

Table 2: Frequencies of genotypes and alleles for the different polymorphisms of HAM/TSP associated genes in 181 asymptomatic HTLV-1 carriers participated in the study.

Genes	Allele	Number of HCs	Genotype	Number of HCs
TNF-α-863	A	80 (32.1)*	AA	18 (9.9)
	C	182 (77.9)	AC	43 (23.9)
	total	362	CC	120 (66.3)
SDF-1-801	G	141 (66.6)	GG	80 (44.2)
	A	121 (33.4)	GA	31 (44.8)
	total	362	AA	20 (11.0)
HLA-Cw*08	positive	27 (14.9)		181
	negative	154 (85.1)		
	total	181		
HLA-A*02	positive	64 (35.4)		181
	negative	117 (64.6)		
	total	181		
Tax subgroup	subgroup A	17 (9.4)		181
	subgroup B	164 (90.6)		
	total	181		

\*Numbers in parentheses are percentage.

Table 3: Best-fit logistic regression equation for the risk of HAM/TSP in the Kagoshima HTLV-1 infected cohort (n=402) (Vine et al, 2002).

Factor, condition	ln(odds of HAM/TSP)	Odds ratio (P)
Constant	-1.716	
Age	-(0.145×age)+(0.003×age <sup>2</sup> )	
Provirus load	-(0.460×load)+(0.487×load <sup>2</sup> )	
TNF-α-863A <sup>-</sup>	-3.057-(4.616×load)+(1.476×load <sup>2</sup> )	
SDF-1 +801GA	-0.808	0.45 (0.042)
SDF-1 -801AA	-1.689	0.18 (0.003)
HLA-A*02 <sup>+</sup>	-0.638	0.53 (0.043)
HLA-Cw*08 <sup>+</sup>	-0.894	0.41 (0.046)
HTLV-1 subgroup B	-1.587	0.20 (0.017)

Worked example: an HTLV-1-infected individual in Kagoshima, 60 years old, with a log<sub>10</sub> (provirus load) of 2.5 with the genotype TNF-α-863A<sup>-</sup>, SDF-1 -801AA, HLA-A\*02<sup>+</sup>, HLA-Cw\*08<sup>+</sup>. HTLV-1 subgroup B has a predicted ln odds of HAM/TSP of -1.716-(0.145×60)-(0.003×60<sup>2</sup>)+(0.46×2.5)+(0.487×2.5<sup>2</sup>)+3.057-(4.616×2.5)+(1.476×2.5<sup>2</sup>)-1.689-0.894-1.587=-1.14975. That is, this HTLV-1-infected individual's odds of developing HAM/TSP =exp(1.14975)=3.157403

Table 4: Comparison between the odds of HAM and clinical findings

	n=181	High odds (≥0.78)	Low odds (<0.78)	P Value	OR	95% CI
Age (Years)		n=69	n=112			
Sex (Male:Female)		53.4 ± 10.8	41.3 ± 12.1	<0.001	N/A	N/A
Anti-HTLV-1 antibodies*		33/36	62/50	0.41	N/A	N/A
HTLV-1 provirus load**		5133.7 ± 9495.7	1558.1 ± 2585.7	<0.001	N/A	N/A
Brisk parietal tendon reflexes		24/45	22/90	0.034	2.18	1.11-4.31
Absent superficial abdominal reflexes		29/40	32/80	0.089	1.81	0.97-3.4
Increased urinary frequency (≥10 times/day)		17/51	17/95	0.15	1.86	0.85-3.96
Increased nocturia (≥2 times/night)		10/55	12/100	0.58	1.44	0.55-3.53
Skin lesion		6/63	9/103	0.90	1.09	0.37-3.21
Superficial lymph nodes swelling		6/63	6/104	0.93	1.24	0.41-3.73
History of blood transfusion		2/67	5/107	0.60	0.64	0.12-3.39
Family history of HAM/TSP or ATL		14/51	25/82	0.93	0.90	0.43-1.89

N/A: not applicable. The values are shown as the mean ± SD

\*Anti-HTLV-1 antibodies were titrated by the particle agglutination method.

\*\*HTLV-1 tax copy number per 1×10<sup>6</sup> PBMCs.

Table 5: Comparison between the odds of HAM and laboratory findings

Odds of HAM/TSP	≥ 0.78	< 0.78	P Value
Counts of Blood Cells	n=68	n=110	
WBC	5430.9 ± 1491.4	5560.9 ± 1333.7	0.36
Lymphocyte	1640.1 ± 708.1	1721.5 ± 537.0	0.39
(%)	30.4 ± 9.8	31.8 ± 8.6	0.27
Abnormal Lymphocyte*	51.7 ± 79.0	19.0 ± 39.4	0.011
(%)	0.88 ± 1.23	0.36 ± 0.77	0.010
Atypical Lymphocyte**	32.6 ± 53.2	36.8 ± 63.2	0.66
(%)	0.65 ± 1.02	0.65 ± 1.23	1.00
Cluster of Differentiation	n=65	n=104	
CD4 <sup>+</sup>	820.0 ± 410.3	820.1 ± 266.7	0.34
(%)	49.1 ± 8.0	47.3 ± 6.9	0.29
CD8 <sup>+</sup>	497.3 ± 233.7	532.0 ± 191.2	0.12
(%)	30.5 ± 7.1	30.8 ± 7.3	0.71
CD4:8	1.73 ± 0.62	1.65 ± 0.56	0.71
	n=59	n=101	
CD4 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>	797.7 ± 428.8	753.0 ± 249.7	0.59
(%)	45.4 ± 7.9	43.3 ± 7.7	0.21
CD8 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>	411.1 ± 241.4	427.1 ± 168.2	0.95
(%)	23.8 ± 6.5	24.5 ± 6.5	0.82
CD4:8	2.13 ± 0.89	1.92 ± 0.70	0.20
CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>	228.7 ± 117.7	257.6 ± 166.3	0.64
(%)	15.1 ± 7.7	14.7 ± 6.9	0.64
CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup>	35.8 ± 44.7	47.3 ± 57.8	0.56
(%)	2.25 ± 2.83	2.80 ± 3.39	0.42
Blood Chemistry	n=66	n=109	
LDH	363.2 ± 114.9	349.8 ± 92.4	0.25

\* Abnormal Lymphocyte: flower cell (ATL cell)-like lymphocytes (Kondo et al, 1985).

\*\* Atypical Lymphocyte: a reactive lymphocyte due to antigenic stimulation with increased size and presence of active DNA synthesis, i.e. lobulated or indented nucleus with slightly finer chromatin, and the cytoplasm vary in color being basophilic, dark blue, plasmacytic to pale gray.

### 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
Tomaru U, Yamano Y, Jacobson S.	HTLV-I infection and the Nervous system	Antel J	Clinical Neuroimmunology 2 <sup>nd</sup> edition	Oxford University Press	US	2005	285-99
木曾良明	アミロイド生成阻害薬開発の展望.	井原康夫	第19回「大学と科学」公開シンポジウム講演収録集: アルツハイマー病: 治療の可能性を探る,	クバプロ	東京	2005	pp160-172

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
Mori S, Mizoguchi A, Kawabata M, Fukunaga H, Usuku K, Maruyama I, Osame M.	Bronchoalveolar lymphocytosis correlates with human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) proviral DNA load in HTLV-I carriers.	Thorax.	60(2)	138-43.	2005
Sabouri AH, Saito M, Usuku K, Naghibzadeh Bajestan S, Mahmoudi M, Forughipour M, Sabouri Z, Abbaspour Z, Goharjoo ME, Khayami E, Hasani A, Izumo S, Arimura K, Farid R, Osame M.	Differences in viral and host genetics risk factors for development of HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) between Iranian and Japanese HTLV-1 infected individuals.	J Gen Virol.	86(3)	773-81.	2005
Saito M, Eiraku N, Usuku K, Nobuhara Y, Matsumoto W, Kodama D, Sabouri AH, Izumo S, Arimura K, Osame M	<i>ApaI</i> polymorphism of vitamin D receptor gene is associated with susceptibility to HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in HTLV-1 infected individuals.	J Neurol Sci.	232(1-2)	29-35.	2005
Matsuzaki T, Saito M, Usuku K, Nose H, Izumo S, Arimura K, Osame M.	A prospective uncontrolled trial of fermented milk drink containing viable <i>Lactobacillus casei</i> strain Shirota in the treatment of HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis.	J Neurol Sci.	237(1-2)	75-81.	2005

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Matsuda T, Tomita M, Uchihara JN, Okudaira T, Ohshiro K, Tomoyose T, Ikema T, Masuda M, Saito M, Osame M, Takasu N, Ohta T, Mori N.	Human T cell leukemia virus type I-infected patients with Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease.	J Clin Endocrinol Metab.	90(10)	5704-10.	2005
Bangham CR, Osame M.	Cellular immune response to HTLV-1.	Oncogene.	24(39)	6035-46.	2006
Umehara F, Tokunaga N, Hokezu Y, Hokonohara E, Yoshishige K, Shiraishi T, Okubo R, Osame M.	Relapsing cervical cord lesions on MRI in patients with HTLV-I-associated myelopathy.	Neurology.	66(2)	289.	2006
Furukawa Y, Tara M, Izumo S, Arimura K, Osame M.	HTLV-I viral escape and host genetic changes in the development of adult T cell leukemia.	Int J Cancer.	118(2)	381-7.	2006
Nobuhara Y, Usuku K, Saito M, Izumo S, Arimura K, Bangham CR, Osame M.	Genetic variability in the extracellular matrix protein as a determinant of risk for developing HTLV-I-associated neurological disease.	Immunogenetics.	57(12)	944-52	2006
松崎敏男、 斉藤峰輝、納 光弘	HAMの診断と治療の進歩	臨床検査	第 49 卷 第4号	409-414	2005
Tomoya Kotake, Yoshio Hayashi, S. Rajesh, Yoshie Mukai, Yuka Takiguchi, Tooru Kimrua, Yoshiaki Kiso	Design and synthesis of a new polymer-supported Evans-type oxazolidinone: an efficient chiral auxiliary in the solid-phase asymmetric alkylation reactions.	Tetrahedron	61 (15)	3819-3833	2005
林良雄, 木曾良明	$\alpha$ -ヒドロキシ- $\beta$ -アミノ酸を基盤とした有機化学・創薬化学研究.	有機合成化学協会誌	63(6)	640-651	2005
Mariusz Skwarczynski, Youhei Sohma, Mayo Noguchi, Maiko Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshio Hamada, Tooru Kimura, Yoshiaki Kiso	No auxiliary, no byproduct strategy for water-soluble prodrugs of taxoids: scope and limitation of O-N intramolecular acyl and acyloxy migration reaction.	J. Med. Chem.	48 (7)	2655-2666	2005



発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Akiko Yoshida, Ahmad Piroozmand, Akiko sakurai, Mikako Fujita, Tsuneo Uchiyama, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso, Akio Adachi	Establishment of a biological assay system for human retroviral protease activity.	Microbes and Infection	7(5/6)	820-824	2005
Yohei Sohma, Yoshio Hayashi, Maiko Kimura, Yousuke Chiyomori, Atsuhiko Taniguchi, Masato Sasaki, Tooru Kimura, Yoshiaki Kiso	The 'O-acyl isopeptide method' for the synthesis of difficult sequence-containing peptides: application to the synthesis of Alzheimer's disease-related amyloid $\beta$ -peptide (A $\beta$ ) 1-42.	J. Peptide Sci.	11(8)	441-451	2005
Youhei Sohma, Yousuke Chiyomori, Maiko Kimura, Fukue Fukao, Atsuhiko Taniguchi, Yoshio Hayashi, Tooru Kimura and Yoshiaki Kiso	"O-Acyl isopeptide method" for the efficient preparation of amyloid $\beta$ peptide (A $\beta$ ) 1-42 mutants.	Bioorg. Med. Chem.	13 (22)	6167-6174	2005
Adam J. Ruben, Yoshiaki Kiso, Ernesto Freire	Overcoming roadblocks in lead optimization: a thermodynamic perspective.	Chem. Biol. Drug. Des.	67 (1)	2-4	2006
Yoshida, A., Piroozmand, A., Sakurai, A., Fujita, M., Uchiyama, T., Kimura, T., Hayashi, Y., Kiso, Y., and Adachi, A.	Establishment of a biological assay system for human retroviral protease activity	Microbes Infect.	7	820-824	2005
Wang, H., Sakurai, A., Khamsri, B., Uchiyama, T., Gu, H., Adachi, A., and Fujita, M.	Unique characteristics of HIV-1 Vif expression	Microbes Infect.	7	385-390	2005
足立昭夫	HIV感染症	日本臨床	63 増刊号 12	342-346	2005
Prat E, Tomaru U, Sabater L, Park DM, Granger R, Kruse N, Ohayon JM, Bettinotti MP, Martin R.	HLA-DRB5*0101 and -DRB1*1501 expression in the multiple sclerosis-associated HLA-DR15 haplotype.	J Neuroimmunol	167(1-2)	108-19	2005
Baba T, Ishizu A, Ikeda H, Miyatake Y, Tsuji T, Suzuki A, Tomaru U, Yoshiki T.	Chronic graft-versus-hostdisease-like autoimmune disorders spontaneously occurred in rats with neonatal thymus atrophy.	Eur J Immunol.	35(6)	1731-40	2005

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hayase H, Ishizu A, Ikeda H, Miyatake Y, Baba T, Higuchi M, Abe A, Tomaru U, Yoshiki T.	Aberrant gene expression by CD25+CD4+ immunoregulatory T cells in autoimmune-prone rats carrying the human T cell leukemia virus type-I gene.	Int Immunol.	17(6)	677-84	2005
Yamano Y, Takenouchi N, Li HC, Tomaru U, Yao K, Grant CW, Maric DA, Jacobson S.	Virus-induced dysfunction of CD4+CD25+ T cells in patients with HTLV-I-associated neuroimmunological disease.	J Clin Invest.	115(5)	1361-8	2005
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
Hideki Nakamura, Atsushi Kawakami, Masahiro Izumi, Tomoki Nakashima, Yukinori Takagi, Hiroaki Ida, Tatsufumi Nakamura, Takashi Nakamura and Katsumi Eguchi	Detection of soluble form of Fas ligand (sFasL) and sFas in the saliva from patients with Sjögren's syndrome.	Clin Exp Rheumatol	23(6)	915	2005

#### IV. 研究成果の刊行物・別冊

# 23 HTLV-I infection and the nervous system

*Utano Tomaru, Yoshihisa Yamano, and Steven Jacobson*

## Introduction

The human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is an exogenous human retrovirus that infects 10–20 million people worldwide (Poiesz *et al.*, 1980; de The and Bomford, 1993). This virus has been demonstrated to be the etiologic agent in adult T-cell leukemia (ATL), a progressive neurological disease called HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP), and other inflammatory diseases including uveitis, arthritis, myositis, and alveolitis (Uchiyama *et al.*, 1977; Gessain *et al.*, 1985; Osame *et al.*, 1986b; Sugimoto *et al.*, 1987; Vernant *et al.*, 1988; Sasaki *et al.*, 1989; Ohba *et al.*, 1989; Nishioka *et al.*, 1989; Morgan *et al.*, 1989; Sato *et al.*, 1991; Mochizuki *et al.*, 1992; Higuchi *et al.*, 1993; Leon-Monzon *et al.*, 1994; Terada *et al.*, 1994). While HTLV-I persists throughout life, fewer than 5% of individuals infected with HTLV-I develop ATL or HAM/TSP, and the vast majority remains as asymptomatic carriers (Uchiyama, 1997). For nearly two decades, HTLV-I has been studied because of its association with a broad spectrum of virus-related diseases including hematological malignancies and inflammatory disorders;

however, it is still unclear how HTLV-I infection induces these different diseases in a subset of infected individuals.

This chapter will review the biology of HTLV-I and current approaches for understanding the immunopathogenesis of HTLV-I-associated neurological disease. Based on recent studies, virus–host immunological interactions, specifically cellular immune responses of HTLV-I-specific CD8+ T cells, have been suggested to play an important role in the pathogenesis of HAM/TSP. A more complete understanding of HTLV-I and host immune responses will allow for the development of immunotherapeutic strategies for the treatment of this chronic progressive neurologic disease.

## Biology of HTLV-I

### Genetic structure of HTLV-I

HTLV-I was the first retrovirus known to be associated with human disease. HTLV-I belongs to the *Oncoviridae* subfamily of retroviruses, which

## Provirus

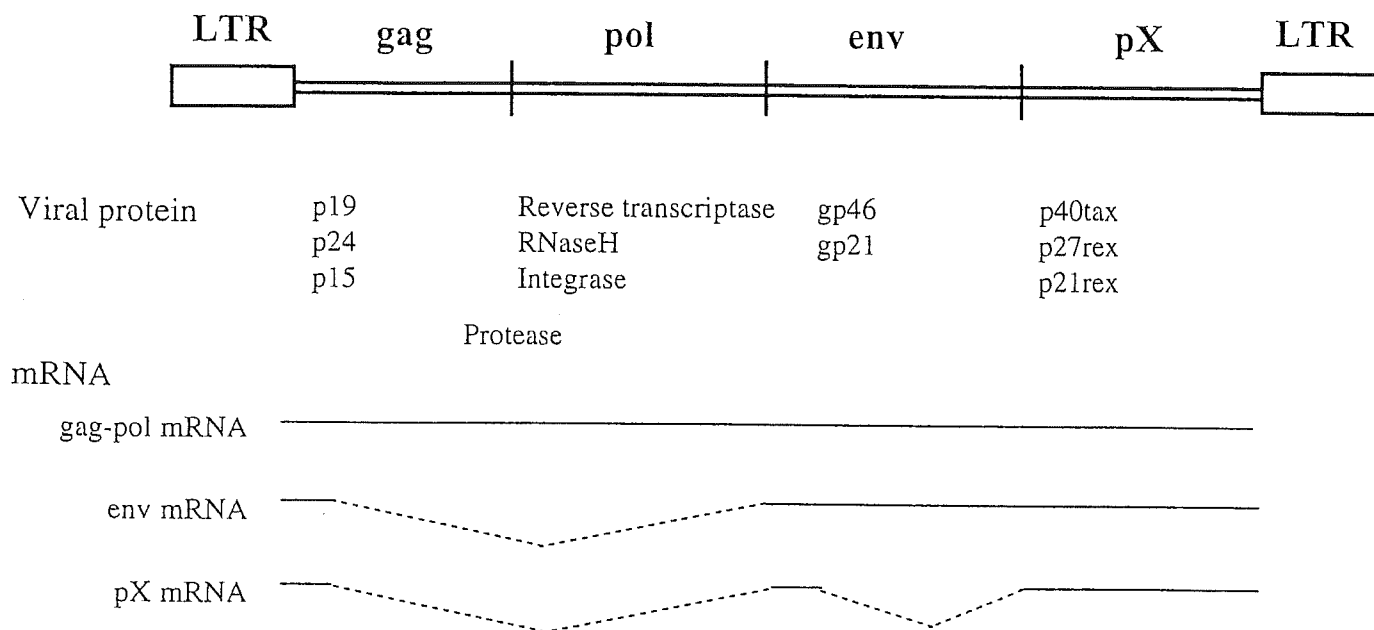


Fig. 23.1 Structure of HTLV-I. The HTLV-I proviral genome has the *gag*, *pol*, and *env* genes, flanked by long terminal repeat (LTR) sequences on both sides. A unique structure is found between *env* and the 3'-LTR, which is named the *pX* gene and encodes the regulatory proteins p40tax, p27rex, and p21rex. Three major mRNA species have been identified for HTLV-I; full-length mRNA is utilized for synthesis of *gag* and *pol* gene products and is also the genomic RNA packaged into virions. A single-spliced subgenomic mRNA encodes the *env* gene product. A second subgenomic mRNA has two introns removed (doubly spliced or completely spliced) and encodes the tax and rex gene products.