

厚生労働科学研究費補助金(こころの健康科学研究事業)
分担研究報告書

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-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ってきた。これまでの検討では、(1)感染後約 7 ヶ月の脊髄に認める HTLV-I pX の発現亢進が HAM ラット病発症の引き金となること、(2)同時期における HAM 抵抗性ラットの脊髄に IFN- γ の著明な発現亢進を認める一方で WKAH ラットではこの IFN- γ の産生亢進がおこらないこと、を示してきた。今年度は WKAH ラットにおける HTLV-I 感染に対する IFN- γ の発現不応答性に関わる遺伝子の解明について検討を行い、疾患発症における宿主因子の解析を詳細に行なった。

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) 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 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の系統差、特に HAM 感受性 WKAH ラットの HTLV-I 感染後 7 ヶ月の脊髄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。

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-I 産生ヒト T 細胞株 (MT-2) 1×10^7 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-I 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、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-γ

(sense:5'-GATCCAGCACAAAGCTGTCA-3',
antisense:5'-GACTCCTTTTCCGCTTCCTT-3')

Interferon regulatory factor 1 (IRF-1)

(sense:5'-TGAAGCTGCAACAGATGAGG-3',
antisense:5'-AGCAAGTATCCCTTGCCATC-3')

IL-12p40

(sense:5'-AGGTGCGTTCCTCGTAGAGA-3',
antisense:5'-CCATTTGCTGCATGATGAAT-3')

IL-12 receptor β1 (IL-12Rβ1)

(sense:5'-AGGTGCGATTTCCTCGTTTA-3',
antisense:5'-CAGCCCTGTTTAAGCCAATG-3')

IL-12 receptor β2 (IL-12Rβ2)

(sense:5'-TGCCACCAATCCACAACTA-3',
antisense:5'-CCTGCTTCTAGCACCTTGT-3')

IL-23p19

(sense:5'-CACCCTGGGAGACTCAACA-3',
antisense:5'-AGGATCTTGGAAACGGAGAAGA-3')

IL-23 receptor (IL-23R)

(sense:5'-TTGATGAATTGTGCCTCGTT-3',
antisense:5'-GTCTGCGCTGGGATAGTTTC-3')

IL-27

(sense:5'-ACTCTGCTTCTCGCTACCA-3',
antisense:5'-GGAGATCCAGCCTCATTGC-3')

IL-27 receptor (IL-27R, WSX-1)

(sense:5'-AGCCCAGGGATAAAGGTGAC-3',
antisense:5'-AGACGGGTCCAGTTGAGCTT-3')

GAPDH

(sense:5'-ATGGGAGTTGCTGTTGAAGTCA-3',
antisense:5'-CCGAGGGCCCACTAAAGG-3')

3) ELISA 法

脊髄での IFN-γ 蛋白の発現の確認には, Rat IFN-γ 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 μg/ml aprotinin, 1μg/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 μl 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, ビオチン標識ポリクローナル抗ラット IFN-γ 抗体を加えてさらに 37°C で 2 時間静置した. 洗浄後, スレプトアビジン-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 Dullbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12 medium (DMEM/F12) 培地 (Invitrogen) を使用し, 37°C, 5% CO₂ 下に培養した.

5) 蛍光抗体法

中枢神経系における IFN-γ 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-γ 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. 神経軸索伸長の測定は, Neurofilament 陽性細胞のうち 300 μm 以上の軸索伸長を示した細胞の割合 (%) で算定した.

6) HTLV-I 遺伝子発現への IFN- γ の影響

HTLV-I 持続感染ラット Tリンパ球株である LEW S-1 細胞株にリコンビナントラット IFN- γ を 100 もしくは 1000 U/ml 添加した培養液で 3 時間培養後、HTLV-I gag 遺伝子に対する pX 遺伝子の相対値をリアルタイム PCR 法で解析した。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。

HTLV-I pX

(sense 5'-ATCCCGTGGAGACTCCTCAA-3')
antisense 5'-CCAAACACGTAGACTGGGTATCC-3')

HTLV-I gag

(sense 5'-CCAATGCAAACAAAGAATGC-3',
antisense 5'-AGCCCACAACATATCTCCTA-3')

7) L-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- γ 、IL-12 のレセプターである IL-12R β 1 および IL-12R β 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- γ 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。

8) ラット IL-12R β 2 遺伝子プロモーター領域の塩基配列の決定

ACI, LEW および WKAH ラットの尾部より DNeasy tissue kit (Qiagen) を使用して DNA を抽出後、Nested PCR (outer primers, 5'-ACCACACCTCTTGCCATTTT-3' and 5'-CGAATCGGAGTACTACTGCTG-3'; inner primers, 5'-CCCAGAGGCACTTTAAGCA-3' and 5'-ACCGATGGACAATGGGTATC-3') によって増幅、精製し、IL-12R β 2 遺伝子 5'-UTR 上流領域の遺伝子断片 (1.8 kb) を得た。これを鋳型として、CEQ 2000XL DNA analysis system (Beckman-Coulter, Fullerton, CA) を使用してダイレクトシーケンスを施行した。塩基配列の解析結果は、オンライン online ClustalW サービス (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/clustalw-j.html>) を用いてアライメントした。また、転写因子結合部位の検索には、Transfec データベース ([http:// motif.genome.jp/](http://motif.genome.jp/)) を使用した。

(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- γ 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 ヶ月後の 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- γ 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- γ mRNA 発現の亢進は認められなかった。

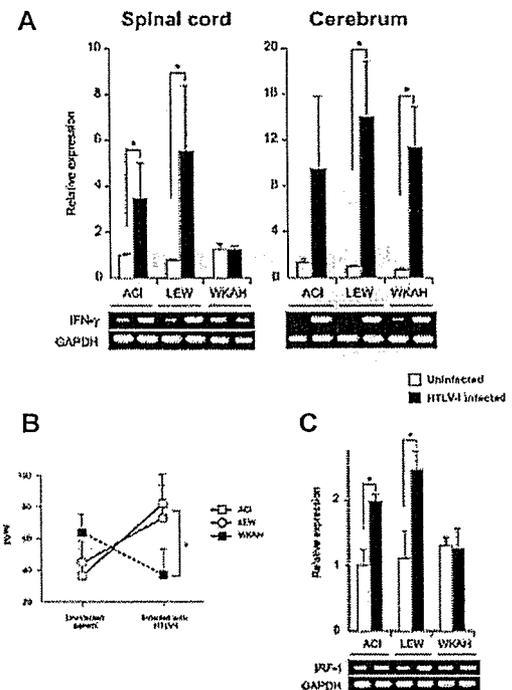


図 1

一方、脳では全ての系統において感染による IFN- γ mRNA の発現亢進を認めた (図 1A)。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- γ 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ほどの系統にも認められなかった。さらに脊髄における IFN- γ 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- γ 高発現の傾向が認められた (図 1B)。さらに感染後 3 ヶ月の脊髄において IFN- γ 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- γ 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。さらに、IFN- γ によって誘導される IRF-1 の発現を検討したとこ

る, IFN- γ の結果と同様に, HAM 抵抗性ラットの脊髄において, 非感染時に比較して IRF-1 mRNA の有意な発現亢進 ($p < 0.05$) が認められたが, WKAH では発現亢進は認められなかった (図 1C). これらの結果より, HAM 抵抗性ラットの脊髄においてのみ, HTLV-I 感染によって IFN- γ が誘導されることが強く示唆された.

2. IFN- γ 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- γ 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- γ 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- γ 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 2).

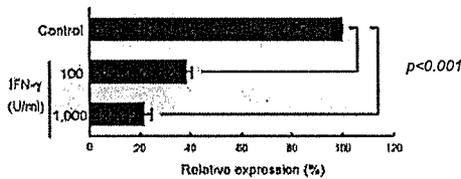


図 2

3. 脊髄における IFN- γ 産生細胞の同定

ラット脊髄での IFN- γ 産生細胞の同定のために, 抗 IFN- γ 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- γ 陽性であった (図 3A, B).

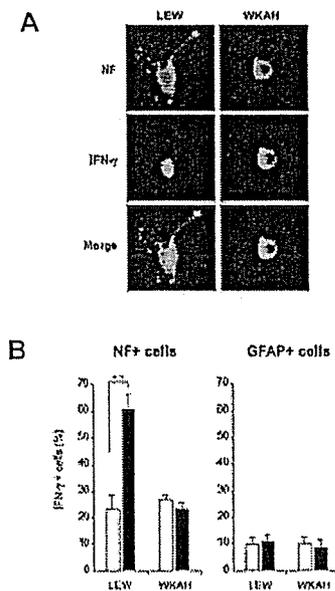


図 3

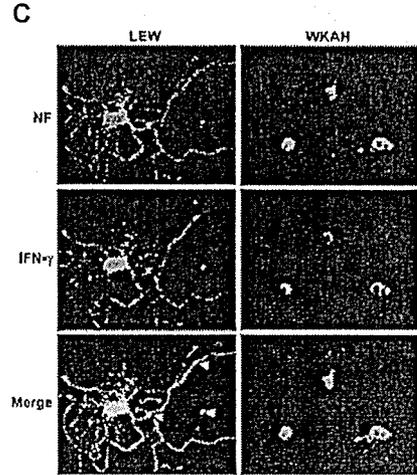


図 3

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- γ 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部分の IFN- γ 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- γ 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- γ 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- γ 産生亢進は確認されなかった (図 3B, C).

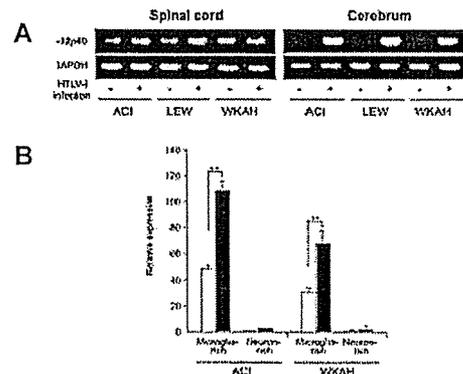


図 4

5. HTLV-I 感染ラットの脊髄における IL-12 遺伝子の発現の検討

感染では, 主に IL-12 を介して IFN- γ が誘導されることが一般に知られている. RT-PCR によって, HTLV-I 感染によって ACI, LEW だけではなく WKAH の大脳においても IL-12p40 の発現誘導が確認された (図 4A). 一方, WKAH の

脊髄では、明確な IL-12p40 mRNA の誘導が確認できなかったが、脊髄における細胞を、ミクログリアに富む細胞集団とニューロンを多く含む細胞集団に分離してリアルタイム-PCR を施行した結果、WKAH においてもミクログリアに富む細胞集団において感染による IL-12 の発現誘導が起こっていることが明らかとなった(図 4B)。それゆえ、WKAH の脊髄での HTLV-I 感染に対する IFN- γ 発現不応答性は、IL-12 の発現誘導がなされなかったことが原因ではないと結論づけた。

5. IL-12 刺激による神経系細胞の IFN- γ 産生への影響

WKAH の脊髄において、感染によって IFN- γ 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- γ 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- γ 、IL-12R β 1 鎖および IL-12R β 2 鎖の mRNA の変化をリアルタイム PCR にて解析した。

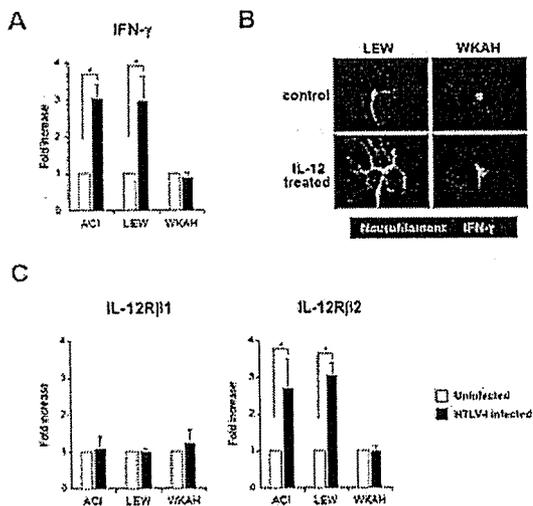


図 5

IL-12 の刺激によって HAM 抵抗性ラット由来の神経系細胞では IFN- γ mRNA が 3 倍に亢進したが、非感染 WKAH では変化しなかった(図 5A)。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- γ 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- γ 陽性像の増強も観察されなかった(図 5B)。また、IL-12 のレセプターである IL-12R β 1 鎖お

よび IL-12R β 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 β 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(図 5C)。

6. HTLV-I 感染ラットの脊髄および大脳における IL-12R β 2 の発現応答性の系統差

WKAH における IL-12 に対する IL-12R β 2 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* にて感染した脊髄と大脳を対象にリアルタイム PCR にて検討した。

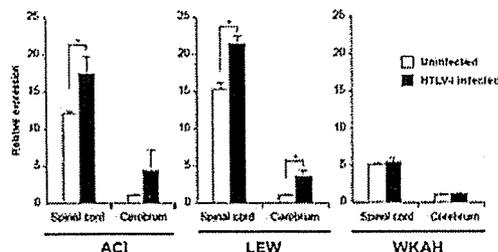


図 6

HAM 抵抗性ラットでは、大脳および脊髄ともに 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(図 6)。この結果より、HAM 感受性の WKAH ラットでは IL-12R β 2 遺伝子の発現機序に何らかの遺伝子的変異が存在することが示唆された。

7. WKAH ラット IL-12R β 2 プロモーター領域における遺伝子多型の解析

WKAH における IL-12R β 2 遺伝子自体の発現誘導に問題があるかどうかを検討するために、IL-12R β 2 遺伝子プロモーター領域と推測される IL-12R β 2 5'UTR の上流およそ 1000 bp のゲノム塩基配列の決定を行い、ACI、LEW および WKAH の塩基配列を比較した。塩基配列 -1 から -1079 の領域で、ACI と LEW 間における塩基配列の相違は認められなかった。一方、WKAH では、ACI および LEW と比較した場合、同領域において 5 箇所の一塩基多型を認めた。さらに、この領域における転写因子結合部位を、Transfec データベースを用いて検索した。ところで、転写因子 SP-1 は IL12R β 2 の発現誘導に、GATA-3 は IL-12R β 2 の発現を抑制するとの報告がなされている。そこで本研究では、IL-12R β 2 遺伝子の発現に対して相反する作用を持つこれら 2 つの転写因子に着目して検討を行った。その結果、SP-1 結合部位と推測される塩基配列上には、HAM 抵抗性および感受性によって塩基配列の置換は認められなかった。一方、WKAH の -239 の A が C になることによって、ACI および LEW には存在しない GATA-3 結

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. アストロサイトに關しても, IFN- γ 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- γ 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- γ 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- γ 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- γ 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- γ が *pX* 遺伝子の転写の抑制に關し, 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- γ 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- γ 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關連については今後の検討課題である.

IFN- γ の神経細胞への保護作用は, 様々な中枢神経系障害に關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- γ 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- γ 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- γ を産生し, おそらくニューロン自身が IFN- γ 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- γ 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 β 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 β 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. そこで, WKAH ラットにおける IL-12 に対する IL-12R β 2 の発現不応答性の原因が, IL-12R β 2 遺伝子自体に何らかの問題が存在するためではないかと考え, IL-12R β 2 遺伝子のプロモーター領域における塩基配列の多型が HAM 抵抗性ラットと HAM 感受性ラットの間に存在するかどうかを検討した. その結果, ACI および LEW と比較した場合, WKAH には5箇所の一塩基多型が存在した. また WKAH の -239 の A が C に置換することによって, ACI および LEW には存在しない GATA-3 結合部位が生じ, この一塩基多型が WKAH における IL-12R β 2 の IL-12 に対する発現不応答性に何らかの影響を及ぼしているのではないかと推測された.

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- γ 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- γ 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- γ 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- γ 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- γ 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 β 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.

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- γ 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- γ の発現亢進を認めしたが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- γ 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 β 2の発現不応性がIFN- γ の欠如に関与していると考えられた。

4. HAM抵抗性ラットと比較した場合、WKAHにおけるIL-12R β 2プロモーター領域での5箇所の一塩基多型を認めた。

5. HAM感受性ラットの大脳で認めたIFN- γ 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。

E. 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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kajikawa M, Baba T, Tomaru U, Watanabe Y, Koganei S, Tsuji-Kawahara S, Matsumoto N, Yamamoto K, Miyazawa M, Maenaka K, Ishizu A, Kasahara M. MHC class I-like MILL molecules are beta2-microglobulin-associated, GPI-anchored glycoproteins that do not require TAP for cell surface expression. *J Immunol* 2006 177(5):3108-15.

2. Miyatake Y, Ikeda Y, Akihiro Ishizu, Baba T, Ichihashi T, Suzuki A, Tomaru U, Kasahara M, Yoshiki T, Role of Neuronal IFN- γ in the Development of Myelopathy in Rats Infected with Human T-cell Leukemia Virus Type 1. *Am J Pathol* 2006 169(1):189-199.

3. Baba T, Ishizu A, Iwasaki S, Suzuki A, Tomaru U, Ikeda H, Yoshiki T, Kasahara M. CD4+/CD8+ macrophages infiltrating at inflammatory sites: a population of monocytes/macrophages with a cytotoxic phenotype. *Blood* 2006 107(5):2004-12.

4. Chen J, Zhao X, Lai Y, Suzuki A, Tomaru U, Ishizu A, Takada A, Ikeda H, Kasahara M, Yoshiki T. Enhanced production of p24 Gag protein in HIV-1-infected rat cells fused with uninfected human cells. *Exp Mol Pathol* (in press)

2. 学会発表

1. Mizuho, K., Tomohisa, B., Utano, T., Katsumi, M., Akihiro, I., Masanori, K. (2006). MHC Class I-like MILL molecules are β 2-microglobulin-associated, GP I-anchored glycoproteins that do not require TAP for cell surface expression. 第36回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪国際会議場, 第36回日本免疫学会総会・学術集会プログラム).

2. Tomohisa, B., Sari, I., Kazunori, K., Utano, T., Masanori, K., Akihiro, I. (2006). CD4/CD8 double-positive monocytes/macrophages: a subpopulation of the macrophage/dendritic cell lineage with a cytotoxic phenotype. 第36回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪国際会議場, 第36回日本免疫学会総会・学術集会プログラム).

3. 丸岡尊子, 外丸詩野, 笠原正典 (2006). 有袋類オポッサムにおけるNKG2Dリガンド様遺伝子の解析. Paper presented at: 第36回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪国際会議場, 第36回日本免疫学会総会・学術集会プログラム).

4. 富居一範, 吉田繁, 宮武由甲子, 宮武由甲子, 鈴木昭, 石津明洋, 外丸詩野, 笠原正典 (2006). 新たなマウスNKG2D ligand様分子の同定とその機能に関する解析. 第36回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪国際会議場, 第36回日本免疫学会総会・学術集会プログラム).

5. 宮武由甲子, 石津明洋, 池田仁, 馬場智久, 鈴木昭, 外丸詩野, 笠原正典, 吉木敬 (2006). HTLV-I持続感染ラットの脊髄症発症におけるNeuronal IFN- γ の役割. Paper presented at: 第95回日本病理学会総会 (東京, 日本病理学会誌).

6. 佐々木直美, 石津明洋, 外丸詩野, 鈴木昭, 笠原正典, 吉木敬 (2006). 血管炎惹起性ラッ

トT細胞の樹立と解析. 第95回日本病理学会総会 (東京, 日本病理学会誌).

7. 三次有奈, 浅野拓行, 石津明洋, 外丸詩野, 鈴木昭, 池田仁, 笠原正典 (2006). リバビリン併用インターフェロン療法開始後、急速に肝不全をきたして死亡した HCV と HIV の重複感染例. 第95回日本病理学会総会 (東京, 日本病理学会誌).

8. 石井生, 久田敦史, 鈴木昭, 近藤信夫, 外丸詩野, 石津明洋, 笠原正典 (2006). Granulomatous slack skin の一例. 第95回日本病理学会総会 (東京, 日本病理学会誌).

9. 道又理恵, 尾川直樹, 石津明洋, 外丸詩野, 鈴木昭, 笠原正典, 吉木敬 (2006). 子宮頸部病理検体において検出される HPV ジェノタイプと臨床病理学的因子の関連. 第95回日本病理学会総会 (東京, 日本病理学会誌).

10. 馬場智久, 岩崎沙理, 石津明洋, 鈴木昭, 外丸詩野, 池田仁, 吉木敬, 笠原正典 (2006). CD4/CD8 double positive マクロファージの抗腫瘍活性の検討. 第95回日本病理学会総会 (東京, 日本病理学会誌).

11. 石津明洋, 佐々木直美, 外丸詩野, 笠原正典, 吉木敬 (2006). 血管炎惹起性ラットT細胞の樹立と解析. 第50回日本リウマチ学会総会・学術集会, 第15回国際リウマチシンポジウム (長崎).

12. 馬場智久, 岩崎沙理, 石津明洋, 外丸詩野, 鈴木昭, 池田仁, 吉木敬, 笠原正典 (2006). CD4/CD8 double positive マクロファージの抗腫瘍メカニズムの検討. 第65回日本癌学会学術総会 (パシフィコ横浜).

G. 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 関連脊髄症(HAM)患者に対するプロスルチアミン治療の臨床試験

分担研究者 中村龍文（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染免疫学，助教授）

共同研究者 西浦義博（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科展開医療科学，客員研究員）

福島直美（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染免疫学，大学院生）

研究要旨：我々は昨年度本班会議において、プロスルチアミン(アリナミン®)が HAM 患者末梢血 HTLV-I 感染細胞に対してアポトーシスを惹起しうる可能性を報告した。この結果を踏まえ、今回 HAM 患者 4 例に対してプロスルチアミン治療(投与量および方法；40 mg/日，点滴静注，投与期間；14 日，連日)を試み、臨床効果と末梢血 HTLV-I プロウイルス量の変化を検討した。その結果、4 例とも運動機能障害度自体には変化はみられなかったものの、個々の症例においては、歩行時間の短縮、痙縮の改善、立位保持不能から可能になるなどの効果が得られた。しかし、興味あることに末梢血 HTLV-I プロウイルス量は約 30%から 50%位にまで減少した。以上の結果より、プロスルチアミンは HTLV-I 感染細胞に対して抗ウイルス薬として作用し、今後 HAM に対する治療薬と成り得る可能性を持っている薬剤と考えられた。

A. 研究目的

現在までに、HAM に対する治療として種々の治療法が報告されている。その中で現在、主流をなしているのが、副腎皮質ホルモン療法、インターフェロン- α 療法といった免疫修飾療法である。しかし、現時点では HAM に対する根本的な治療法は未だ確立されていない。HAM に対する理想的な治療を考えた場合、HTLV-I 感染細胞の体内からの選択的除去にあると考えられる。

我々は昨年度本班会議において、HAM 患者末梢血 HTLV-I 感染細胞に対してプロスルチアミン(アリナミン®)が *in vitro*において、比較的選択的にアポトーシスを惹起しうる可能性を報告した。そこで今回、HAM 患者に対するプロスルチアミン治療の臨床試験を開始した。

B. 研究方法

対象：4 例の HAM 患者(女性 2 例，男性 2 例，年齢；51-73 歳，罹病期間；13-46 年)(表 1)。元来投与されている併用薬剤は中止せず，用量・用法を変えずそのまま継続した(表 1)。

試験方法：プロスルチアミン 40 mg を生理食塩水 50 ml で希釈し，14 日間連日点滴静注した。

検査項目：治療前，治療開始 1 週目，2 週目，治療終了 1 週目で神経学的所見，運動機能障害度，歩行時間の変化などをチェックした。同時に上記ポイントでの，末梢血単核球中の HTLV-I プロウイルス量の変化を解析した。また，治療前および治療 2 週目でリンパ球幼若化反応の変化も検討した。

(倫理面への配慮)

本臨床試験は本学倫理委員会の承認を受け，また，施行時には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・コンセントを得て行なった。

C. 研究結果

表 2 に臨床所見の変化とリンパ球幼若化反応の変化を示す。各症例とも運動機能障害度は治療前後で変化はみられなかったが，個々の症例でみると，歩行時間の短縮，長年の車椅子生活で全く立位保持不能であった症例で数秒ではあるが支え立ちが可能となり，二本杖歩行から一本杖歩行が可能になり，痙縮の改善がみられた。リンパ球幼若化反応では spontaneous PBL proliferation の著明な改善はみれなかった。しかし，非常に興味あることに末梢血 HTLV-I プロウイルス量は治療後の最小プロウイルス量でみた場合，治療前に比較して約 30%から 50%位にまで減少した(表 3)。出現した有害事象としては点滴時の軽い血管痛のみであった。

D. 考察

今回，HAM 患者末梢血からの HTLV-I 感染細胞の選択的除去を基盤とした HAM 患者に対する根治治療を目指し，プロスルチアミンによる治療を試みた。臨床的効果としては全体的には著明な効果は得られなかったにもかかわらず，個々の症例をよく解析すると，やはり改善傾向は得られたものと考えられる。著明な効果が得られなかった理由の一つとして，今回はすべて比較的罹病期間の長い症例を対象としていたことが考えられる。ただ，今回の臨床試験で特筆すべきことは，プロスルチアミンの短期間の投与でも末梢血 HTLV-I プロウイルス量が著明に減少したことである。おそらくこのことは HAM 患者末梢血 HTLV-I 感染細胞のアポトーシスによるものと考えられるが，今後更なる解析が必要である。いずれにせよ，今後は症例の積み重ねが必要であり，何よりも長期的な治療の必要性を考える場合，プロスルチアミ

ンの経口薬の再生産が望まれるところである。

E. 結論

プロスルチアミンは HTLV-I 感染細胞に対して抗ウイルス薬として作用し、今後 HAM に対する治療薬と成り得る可能性を持っている。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakamura T, Nishiura Y, Fukushima N, Furuya T. The role of HTLV-I-infected CD4⁺ T cells as activated Th1 cells in the immunopathogenesis of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. Neuroimmunology Research Focus, edited by Broglio PV., Nova Science Publishers, 2007, in press.

2. 中村龍文. 神経系感染症が疑われたとき。ベッドサイドで役立つ微生物検査ガイド。編者：河野茂ら，文光堂，2006，41-49.

3. Fukushima N, Nishiura Y, Nakamura T, Kohno S, Eguchi K. Blockade of IL-2 receptor suppresses HTLV-I and IFN- γ expression in patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. Intern Med, 2006, in press.

2. 学会発表

1. 福島直美、中村龍文、西浦義博、井田弘明、山田恭暉、江口勝美。HAM患者由来HTLV-I感染T細胞株におけるHTLV-I産生に対する抗インテグリン・ブロッキング抗体の抑制効果。第18回日本神経免疫学会 2006年3月2日(木)～3日(金) 名古屋

2. 西浦義博、江口勝美、中村龍文、福島直美。プロスルチアミンによるHTLV-I感染T細胞に対する障害性の検討。第47回日本神経学会総会 2006年5月11日(木)～13日(土) 東京

3. 福島直美、中村龍文、西浦義博、江口勝美。HTLV-I 関連脊髄症におけるステロイド・パルス療法の試み。第47回日本神経学会総会 2006年5月11日(木)～13日(土) 東京

4. Yoshihiro Nishiura, Tatsufumi Nakamura,

Naomi, Fukushima, Hiroaki Ida, Katsumi Eguchi. Allicin and its derivative induce apoptosis of HTLV-I-infected cells derived from patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). The 8th International Congress of Neuroimmunology October 15~19, 2006 The 8th International Congress of Neuroimmunology October 15~19, 2006, Nagoya

5. Naomi Fukushima, Tatsufumi Nakamura, Yoshihiro Nishiura, Hiroaki Ida, Yasuaki Yamada, Shigeru Kohno, Katsumi Eguchi. The down-regulation of HTLV-I production by anti-integrin blocking antibodies in HTLV-I-infected T cell lines derived from patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis(HAM/TSP). The 8th International Congress of Neuroimmunology October 15~19, 2006, Nagoya

H. 知的財産権の出題・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

HTLV-I 関連脊髄症の予防・治療剤およびアポトーシス促進剤（特許出願中）

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

表 1. 症例のプロファイル

症例	年齢・性	罹病期間	合併症	併用療法
1. M. T.	58 歳、女性	24 年	ぶどう膜炎	ビタミンC療法
2. K. M.	51 歳、男性	13 年	なし	なし
3. T. N.	52 歳、男性	46 年	なし	IFN- α 療法 (300 万単位/回、週 3) プレドニゾン内服 (7.5・5.0 mg/日、隔日)
4. K. T.	73 歳、女性	13 年	なし	なし

表 2. 臨床所見と spontaneous PBL proliferation の変化

症例	運動機能障害度		spontaneous PBL proliferation		備考
	前	後	前	後 (cpm)	
1. M. T.	4	4	ND	ND	歩行時間の短縮傾向あり
2. K. M.	8	8	34447	26114	数秒の支え立ちが可能になる
3. T. N.	4	4	4777	4214	膝が曲げやすくなる 二本から一本杖歩行になる
4. K. T.	4	4	3453	2956	痙縮の軽減

表 3. 末梢血 HTLV-I プロウイルス量の変化 (PBMC 10000 個あたりのコピー数)

症例	治療前	治療後の最小プロウイルス量
1. M. T.	279	144 (投与 1 週後)
2. K. M.	520	170 (投与終了 1 週後)
3. T. N.	307	169 (投与終了 1 週後)
4. K. T.	305	134 (投与終了 1 週後)

HTLV-I 感染に伴う封入体筋炎の病態解明

分担研究者：梅原藤雄 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 神経内科・老年病学 講師

共同研究者：能勢裕久¹、松浦英治¹、樋口逸郎¹、斉藤峰輝²、久保田龍二²、有村公良¹、納 光弘¹

1. 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 神経内科・老年病学

2. 鹿児島大学大学院難治性ウイルス疾患研究センター

3. 金沢医科大学 微生物学

研究要旨

HTLV-I 感染に伴う IBM の自験5症例について、その臨床像を明らかにし、HTLV-I 感染の意義について検討した。結果：これらの症例は末梢血単核球での HTLV-I プロウイルス量が高く、筋線維への HTLV-I 特異的細胞障害性 T 細胞の浸潤を認めた。結論：HTLV-I 感染に伴う IBM の一群が存在し、HAM と類似の免疫学的機序が関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

封入体筋炎 (Inclusion body myositis, IBM) は 50 歳以上で発症する筋疾患としては最も頻度が高く、一般にステロイド剤に対する反応は不良な難治性疾患である。IBM の原因は不明であるが、一部には HTLV-I との関連が指摘されている。今回、HTLV-I 感染に伴う IBM の自験5症例について、その臨床像を明らかにし、HTLV-I 感染の意義について検討した。

B. 研究方法 (倫理面への配慮)

自験 5 例 (66-69 歳、男性 3 例、女性 2 例) について臨床症状、筋病理、ウイルス学的検討を加えた。研究内容は、鹿児島大学倫理委員会の認定を受け、各患者にはそれに従い文書で同意を得た。

C. 研究結果

1. 臨床像

全例中年以後に発症し緩徐進行性の四肢筋萎縮、筋力低下を呈していた。副腎皮質ホルモン剤に対する反応は不良で、多くの例で重篤な筋萎縮・筋力低下による四肢麻痺の状態に至っていた。深部腱反射の亢進、病的反射などの錐体路障害を示唆する神経学的所見を呈した症例はなかった。

2. 筋病理

全例で炎症細胞浸潤、rimmed vacuole を認め IBM と診断した。浸潤細胞は CD4⁺リンパ球、CD8⁺リンパ球、マクロファージで、ほとんどの筋線維膜上に MHC-class I の発現を認めた。電顕では、glycogen,

membranous structure, myeloid bodies. を含んだ vacuole, 18nm filament の集積を認め、典型的 IBM に矛盾しない所見であった。

3. ウイルス学的検討

全例で血清抗 HTLV-I 抗体が陽性で、2 例では髄液でも陽性であった。血中 HTLV-I プロウイルス量は高く、計算式から算出した HAM 発症リスクは HAM と同程度の高値を示し、無症状キャリアーとは異なっていた。HTLV-I 特異的 pentamer を用いた検索で、HLA-A2 陽性患者筋組織に HTLV-I 特異的 CTL の浸潤を認めた。

D. 考察

今回示した 5 症例は、臨床症状、筋病理学的には典型的 IBM に矛盾しない所見であった。末梢血単核球中の HTLV-I プロウイルス量は高く、すでに報告されている HAM 発症リスクの計算式では、HAM 患者と同程度の HAM 発症リスクを有していた。HLA-A2 陽性患者筋標本を用いた検討では、筋線維周囲への HTLV-I 特異的 CD8⁺細胞の浸潤を確認した。以上の結果から、これらの症例では高い HTLV-I プロウイルス量を有し、それに対する免疫応答が筋組織において持続し、IBM に至っている可能性が示唆された。

E. 結論

HTLV-I 感染に伴う IBM の一群が存在し、HAM と類似の免疫学的機序が関与している可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Fujio Umehara, Hiroyasu Tokunaga, Yoichi Hokezu, Ei Hokonohara, Koichi Yoshishige, Tadafumi Shiraishi, Ryuichi Okubo, Mitsuhiro Osame. Relapsing cervical cord lesions on MRI in patients with HTLV-I-associated myelopathy. *Neurology* 66 : 289, 2006

梅原藤雄 MRIで頸髄に異常信号を示し、血清・髄液中抗HTLV-I抗体陽性のミエロパチー：variant HAM 臨床神経学 45:916-918,2005

Fujio Umehara, Hideki Ookatsu, Daisuke Hayashi, Akifumi Uchida, Yukari Douchi, H. Kawabata, Rina Goto, Akihiro Hashiguchi, Eiji Matsuura, Ryuichi Okubo, Itsuro Higuchi, Kimiyoshi Arimura, Y. Nawa, Mitsuhiro Osame. MRI studies of spinal visceral larva migrans syndrome. *J Neurol Sci* 249:7-12, 2006

2. 学会発表

Fujio Umehara HTLV-I associated myelopathy. MS Forum, pan Asian Conference 2005年11月, Sydney, Australia

梅原藤雄, 能勢裕久, 齋藤峰輝, 納 光弘.
脊髄MRI異常信号を示す血清・髄液中抗HTLV-I抗体陽性ミエロパチー症例の解析 第47回日本神経学会総会 2006年5月 東京

F.Umehara, M.Saito, H.Nose, M.Osame,
Chronic progressive cervical
myelopathy:variant form of HAM/TSP?
The 8th International Congress of
Neuroimmunology 2006 10月 名古屋

G. 知的財産権の出題・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

HTLV-I 感染細胞では TCR/CD3 発現と TCR シグナルが低下している

分担研究者 久保田龍二 鹿児島大学助教授

研究要旨：生体内での HTLV-I 感染細胞の同定が近年可能となり、感染細胞の表面抗原の詳細な解析ならびに免疫学的特徴を検討した。感染細胞は主に CD4 細胞に認められたが、CD 8 細胞にも感染していた。CD4 感染細胞の表面抗原は CD4+CD2+CD5+CCR7-CD45RA-CD26-CCR4+であり、MHC クラス I, II とも経度発現は亢進していた。一方 CD3 と TCR の発現は低下し、CD3 刺激による TCR からの細胞内シグナル経路の活性化を示す ZAP70、Lck のリン酸化は低下していた。HTLV-I 感染 CD4 細胞では、TCR を介した免疫機能が低下し、免疫不全に関与している可能性が考えられた。また、制御性 Foxp3 陽性 T 細胞にも、HTLV-I は高率に感染しており、免疫反応の制御を変化させている可能性が考えられた。

A. 研究目的

HAM では HTLV-I ウイルス量が高値であることがウイルス学的特徴であり、HAM 発症の最大のリスクである。現在まで HTLV-I 感染細胞株を用いての研究は多数報告されているが、生体内に存在する HTLV-I 感染細胞の性状についてはほとんど研究されていない。HTLV-I 感染細胞を同定する適当な表面マーカーがなかったためと、感染細胞がほとんどウイルス蛋白を発現していないためであるが、近年 HTLV-I 感染細胞を 8 時間ほど短時間培養後細胞内ウイルス蛋白を染色することで生体内感染細胞の同定が可能となった。本研究では、HTLV-I 感染細胞の詳細な表面抗原の解析を行い、感染したリンパ球の免疫機能にどのような影響があるかを検討した。

B. 研究方法

①感染細胞検出法の最適条件の決定

HAM 患者末梢血リンパ球 (PBMC) を種々の試薬の存在下、非存在下に短時間培養し、感染細胞が最も検出される条件を決定した。短時間培養後、表面抗原の染色を行い、固定後細胞膜に穴をあけ、細胞内 HTLV-I Tax 蛋白を抗体にて染色しフローサイトメトリーにて検出した。

②各種表面抗原の同定

表面抗原である、CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD25, CD26, CD27, CD28, CD45RA, CCR4, CCR7, CLA, TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$, MHC class I, class II で染色

した。感染細胞の同定には Lt-4 抗体を用い、CD4 陽性感染細胞と CD4 陽性非感染細胞とにゲートをかけて比較した。細胞内 CD3 ζ も検出した。

③制御性 T 細胞への感染の検討

制御性 T 細胞のマスター遺伝子産物である Foxp3 と Tax 蛋白を細胞内染色し、あわせて、CD4 および CD25 の表面分子を染色した。

④TCR シグナル経路リン酸化の測定

HAM 患者および非感染者の PBMC を OKT3 抗体で刺激後、ZAP70 および Lck のリン酸化部位を検出する特異抗体で染色し、フローサイトメトリーで測定した。

(倫理面への配慮)

臨床検体を扱うため患者よりの採血に際しては十分は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

①HTLV-I 感染細胞検出最適条件の設定

培養時間の検討では、検出率は 8-10 時間でピークとなり、この間 HTLV-I ウイルス量の変化はみられなかった。LTR を刺激する試薬の投与でも最大検出は変わらなかった。Brefeldin A の添加で 2-6 倍検出感度は増強した。抗体の検討では gag 蛋白に対する GIN-7 抗体より Tax 蛋白に対する Lt-4 抗体が約 1.5 倍検出感度が高かった。定量的 PCR

による HTLV-I ウイルス量を測定し、感染細胞当たり 1 コピー感染していると仮定すると、感染細胞の検出感度は約 50%であった。また、本実験より Tax 蛋白は Golgi に輸送されるという報告と一致した。以後の実験は Brefeldin A 存在下、8-10 時間培養で行い、Lt-4 抗体で染色した。

②感染細胞の表面抗原の同定

感染している細胞は主に CD4 細胞であったが、ウイルス量が多い患者では CD8 細胞にも明らかに感染していた。感染細胞では CD3 および TCR $\alpha\beta$ の発現が低下していた。TCR $\gamma\delta$ 細胞には検出されなかった。感染 CD4 陽性細胞で CD3 が発現低下していたため、汎 T 細胞マーカーである CD2, CD5, CD7 で染色したが、CD7 の発現は軽度低下していたが全て陽性であり T 細胞と同定された。TCR/CD3 コンプレックスの細胞内コンポーネントである CD3 ζ の発現は正常であった。感染細胞はほぼ 100%CCR7 陰性 CCR4 陽性であり、リンパ節を離れ、皮膚などの末梢組織にホーミングしやすいケモカインを発現していた。分化度の検討では 95%以上が CD45RA-CCR7- であり effector memory 細胞であった。CD27/CD28 の解析では、70%以上が inmediate の分化状態であった。ほとんどの感染細胞の表面抗原は CD2+CD3 $_{low}$ CD4+CD26-CD45RA-CCR7-CCR4+であった。MHC class I および class II の発現は軽度亢進していた。

③制御性 T 細胞への感染

HTLV-I 感染細胞の約 10%が CD25 陽性であり、既報と異なり必ずしも陽性ではなかった。感染細胞の約 5%が Foxp3 陽性であった。CD4+CD25+Foxp3+細胞中の 19%が Tax 陽性であり、一方 CD4+細胞中の Tax 陽性細胞は 6.6%であった。このことより HTLV-I は制御性 T 細胞に優位に感染しているか、あるいは HTLV-I が感染した制御性 T 細胞は増殖している可能性が考えられた。

④感染細胞での TCR/CD3 の発現低下と機能不全
感染細胞では細胞表面の TCR $\alpha\beta$ および CD3 ϵ の発現は低下していたが、CD3 ζ の細胞内発現は正常であった。また CD3 ϵ の細胞内の発現は正常であった。このことより、感染細胞内で CD3 は合成されているが、細胞表面への発現が低下していると推測された。TCR/CD3 の発現低下が、TCR/CD3 からの細胞内シグナルの低下につながっているかを、ZAP70 および Lck のリン酸化を指標として検討したところ、感染者の PBMC では非感染者に比べてリン酸化の程度が低下していた。

D. 考察

以上の結果より、生体内で HTLV-I は成熟した CD4 細胞に感染しており、その表現型はメモリー細胞であり、組織に移行しやすい CCR4 を発現していた。CCR4 の発現は ATL ではすでに報告されているが、腫瘍化する以前から感染細胞にこの分子が発現していることは感染細胞の組織浸潤を考える上で重要と考えられた。HTLV-I 感染によって HAM, HAU, HAAP 等の炎症性疾患を発症するが、それぞれの疾患部位で感染リンパ球の浸潤が認められ、浸潤感染細胞と HTLV-I 特異的免疫細胞との炎症過程が各組織傷害に関係していると考えられている。感染細胞の CCR4 の発現、および MHC class II の発現で示唆されるリンパ球活性化は組織浸潤のしやすさに関係している可能性がある。また、HTLV-I 感染者では日和見感染などの免疫不全を示唆する臨床所見があるが、その原因は良く分かっていない。本研究では生体内感染細胞の TCR/CD3 発現が低下し、その機能が低下していた。CD4 陽性細胞は免疫反応の中心的細胞であることから、この現象が免疫不全の一部に関与している可能性が考えられた。今後のさらなる研究が必要である。

E. 結論

感染細胞の表現型は CD2+CD3 $_{low}$ CD4+CD26-CD45RA-CCR7-CCR4+であった。HTLV-I 感染細胞は TCR/CD3 の発現が低下し、免疫細胞としての機能が低下している可能性が考えられた。また感染した Foxp3 陽性制御性 T 細胞が増加していた。以上より、HTLV-I が主要な免疫細胞である CD4 細胞および制御性 CD4 細胞に感染し、免疫不全に関与していると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Nose H, Saito M, Usuku K, Sabouri AH, Matsuzaki T, Kubota R, Eiraku N, Furukawa Y, Izumo S, Arimura K, Osame M: Clinical symptoms and the odds of human T-cell lymphotropic virus type 1-associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in healthy virus carriers: Application of best-fit logistic regression equation based on host genotype, age, and provirus load. J Neurovirol. 12(3):171-7, 2006

2. 学会発表

(1) Kubota R, Arimura K, Osame M, Izumo S: HTLV-I-specific CTL with high TCR degeneracy efficiently recognize naturally occurring mutant viruses in patients with HAM/TSP. *8th International Conference of Neuroimmunology*. Nagoya, Japan, 2006

(2) Hayashi D, Kubota R, Nose H, Arimura K, Izumo S, Osame M: Increased CTL responses to CMV in HAM/TSP: a relation of FOXP3+ regulatory T cells. *8th International Conference of Neuroimmunology*. Nagoya, Japan, 2006

(3) Matsuura E, Kubota R, Saito M, Suehara M, Matsuzaki T, Arimura K, Osame M, Izumo S: Visualization of HTLV-I Tax-specific cytotoxic T lymphocytes in the central nervous system of HTLV-I-associated myelopathy. *8th International Conference of Neuroimmunology*. Nagoya, Japan, 2006

(4) 久保田龍二、林 大輔、有村公良、納 光弘、出雲周二: HAM 患者末梢血中 HTLV-I 感染リンパ球の解析。第 47 回日本神経学会総会。2006 年 5 月 東京

G. 知的財産権の出題・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

高い HAM 発症率を示すイラン型 HTLV-1 Tax/Rex 変異体の機能解析

分担研究者 齊藤 峰輝 金沢医科大学 医学部 助教授 生体感染防御学

共同研究者： 巽 理恵、藤澤 順一（関西医大 微生物学）、
Amir H. Sabouri、納 光弘（鹿児島大 神経内科・老年病学）
出雲周二（鹿児島大 難治ウイルス病態制御研 分子病理）
大原 義朗（金沢医大 生体感染防御学）

研究要旨

日本株より低いプロウイルス量で発症するイラン株 HTLV-1 に注目し、Tax/Rex の構造と機能を解析した。イラン株 pX 領域には、ATK-1 株と比較して 10 塩基の共通した変異が存在し、Tax アミノ酸配列は、日本株 Tax-A（HAM 発症率が高い株）および Tax-B（ATK-1 株）とは、それぞれ 4 および 6 残基異なっていたが、イラン型 Tax（Tax Ir）は NF- κ B 転写活性化能に対する LTR 転写活性化能の比率（LTR/NF- κ B）が有意に高かった。イラン株 Rex は、ATK-1 株 rex における翻訳停止コドン（TGA）が TGG に変異することで、カルボキシル末端が 20 アミノ酸延長されていたが、非スプライス型 RNA の核外輸送能を測定したところ、ATK-1 株 Rex より活性が低下していた。低スプライシング調節能が HAM 発症リスクに及ぼす影響について興味をもたれた。

A. 研究目的

HTLV-1 はその塩基配列から、日本株では大きく A および B の 2 つのサブタイプに分類されるが、鹿児島におけるコホート解析からは、サブタイプ A の HTLV-1 感染者は、サブタイプ B（ATK-1 株）感染者と比較して HAM 罹患危険度が高いことが報告されている。一方、HAM 患者が多く存在するイラン北東部における HTLV-1 の pX 領域の塩基配列を解析したところ、サブタイプ A および B とは異なる塩基置換を伴う新たなサブタイプ（サブタイプ Ir）の存在が明らかとなった（Sabouri et al, J Gen Virol 86:773-81, 2005）。そこで、それぞれのサブタイプにおける Tax および Rex の機能に注目し、その転写活性化能および非スプライス RNA 核外輸送能を比較・解析し、感染者末梢血中プロウイルス量および HAM 発症率との関連を検討することで、HAM 発症の病態について新たな知見が得られるものと考え、以下の研究を行なった。

研究方法

イラン人 HAM 患者から HTLV-1 プロウイルス DNA pX 領域の塩基配列を増幅して Tax および Rex の発現ベクターを作成した。HTLV-1 LTR、NF- κ B 結合部位のレポータープラスミドを用いた

ルシフェラーゼアッセイにより、Tax の活性を比較した。一方、欠損型 HTLV-1 provirus DNA 発現ベクター-pGAGdm（吉田光昭・東大教授より供与）およびルシフェラーゼ遺伝子をスプライスアウトされる部位の間に挟んだベクターを用いて、Rex の活性を測定した。

（倫理面への配慮）

十分なインフォームド・コンセントのもと採血された検体を用いた。本研究はマシャド大学（イラン）、鹿児島大学および金沢医科大学倫理委員会の承諾を得た。

B. 研究結果

イラン株 pX 領域には、ATK-1 株と比較して 10 塩基の共通した変異が存在するため、Tax アミノ酸配列は日本株 Tax-A（HAM 発症率が高い株）および Tax-B（ATK-1 株）とは、それぞれ 4 および 6 残基異なっており、Rex アミノ酸配列は、ATK-1 株 rex における翻訳停止コドン（TGA）が TGG に変異することで、カルボキシル末端が 20 アミノ酸延長されていた。Tax/Rex の機能解析の結果、

- ① Tax の転写活性化能に関しては、イラン型 Tax（Tax Ir）は NF- κ B 活性化能に対する LTR 活性化能の比率（LTR/NF- κ B）が高かった。
- ② Rex Ir の機能（非スプライス型 RNA の核外

輸送能)は、ATK-1株 Rexと比較して低下していた。

C. 考察

イラン株 pX 領域に存在する 10 塩基の置換は、HAM 発症率が日本人の約 8 倍近く高いと報告されているジャマイカ株 HTLV-1 にも観察され、イランにおける低プロウイルス量での HAM 発症との関連が示唆される。イラン型 Rex では、日本株 Rex と比較して、spliced form/unsliced form 比の上昇⇒ Tax mRNA/genomic RNA 比の上昇 ⇒ 細胞当たりの Tax 量の上昇をもたらす可能性があり、その結果として、

- ① 感染細胞のクローナルな増殖の活性化を介した無症候性キャリアーにおけるプロウイルス量の増加
- ② 抗 Tax CTL の誘導とその異常な活性化を介した HAM 発症への関与が示唆される。

D. 結論

イラン型 Rex は、日本株と比較して非スプライス型 RNA の核外輸送能が低下していた。この低スプライシング調節能が HAM 発症リスクに及ぼす影響について興味もたれた。

E. 研究発表

1. 論文発表

[1] Nobuhara Y, Saito M, Goto R, et al. Chronic progressive sensory ataxic neuropathy associated with limited systemic sclerosis.
J Neurol Sci. 2006 241(1-2):103-6.

[2] Nobuhara Y, Usuku K, Saito M, et al. Genetic variability in the extracellular matrix protein as a determinant of risk for developing HTLV-I associated neurological disease.
Immunogenetics. 2006 57 (12): 944-952.

[3] Ward V, Hennig BJ, Hirai K, et al. Geographical distribution and disease associations of the CD45 exon 6 138G variant.
Immunogenetics. 2006 58(2-3):235-9.

[4] Saito M, Nose H, Usuku K, et al. Flow cytometry evaluation of the T-cell receptor Vβ 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. 2006 246(1-2):37-43.

[5] Nose H, Saito M, Usuku K, et al. Clinical

symptoms and the odds of human T-cell lymphotropic virus type 1-associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in healthy virus carriers: application of best-fit logistic regression equation based on host genotype, age, and provirus load.
J Neurovirol. 2006 12(3):171-7.

2. 学会発表

[第 18 回日本神経免疫学会 2006 年 4 月 名古屋]
齊藤峰輝, Amir H. Sabouri, 宇宿功市郎、能勢裕久、出雲周二、有村公良、納 光弘
イラン北東部と鹿児島における HAM/TSP 発症感受性因子と病態への作用機構の比較

[第 47 回日本神経学会総会 2006 年 5 月 東京]
齊藤峰輝, Amir H Sabouri、能勢裕久、出雲周二、宇宿功市郎、有村公良、納 光弘
HTLV-1 感染者 T リンパ球における共刺激分子発現の変化と HAM 発症への関与

[第 10 回神経ウイルス研究会 2006 年 6 月 石川]
齊藤峰輝, 大原義朗
HAM/TSP 発症を規定するウイルス因子・宿主因子と HTLV-1 に対する免疫応答

[第 43 回日本細菌学会中部支部総会 2006 年 10 月 岐阜]
齊藤峰輝, 大原義朗、松崎敏男、納 光弘
HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) 患者に対する *Lactobacillus casei* shirota 株の治療効果

[第 54 回日本ウイルス学会 2006 年 11 月 名古屋]
齊藤峰輝, 大原義朗
HTLV-1 感染者 T リンパ球における共刺激分子発現の変化と HAM 発症への関与

[The 7th International Symposium on NeuroVirology, May 2006, Philadelphia, USA]
Saito M, Usuku K, Izumo S, Osame M, Ohara Y
Virus-host interactions and its implication in the development of HAM/TSP

[The 8th International Congress of Neuroimmunology October 2006, Nagoya, Japan]
Saito M, Usuku K, Nose H, Sabouri AH, Arimura K, Izumo S, Osame M, Ohara Y
Virus-Host Interactions and its Implication in the Development of HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP).

知的財産権の出題・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

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表