

D. 考察

本研究で HTLV-1 感染を効率良く検出するインジケータ細胞株 H9/K30*luc* を樹立した (Microbes Infect. 7: 820-824, 2005)。H9/K30*luc* は HTLV-1 の無細胞サンプルに対しては感受性がなく、MT-2 等のような HTLV-1 産生細胞との混合培養によってのみ高レベルのルシフェラーゼを産生する。H9/K30*luc* 細胞のこの活性化は、MT-2 細胞表面に存在する開裂型 HTLV-1 Gag/Env を介した細胞融合によって、MT-2 細胞から H9/K30*luc* 細胞へ移行した HTLV-1 Tax によって起こると考えられる。本研究では、また、HIV-1 に関しても H9/K30*luc* vs. MT-2 と同様の H9/H1*luc* vs. H9/NL432 システムを構築した (Int. J. Mol. Med. 14: 1073-1076, 2004; Microbes Infect. 7: 820-824, 2005)。これらのシステムは細胞融合に関わる種々の薬剤や因子の評価に適していると考えられる。しかし、現在までに検討・検索した範囲内では、有効な HIV-1 阻害剤は容易に見出されるものの、有意の HTLV-1 プロテアーゼ阻害効果を示す薬剤は見つかっていない。ごく最近、HTLV-1 プロテアーゼの立体構造が決定された (Li, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 18332-18337, 2005)。これから得られる情報に基づいて新しくデザイン・合成された様々な HTLV-1 プロテアーゼ阻害候補薬剤を本研究で確立されたシステムで検証する必要がある。また、全ての KNI 化合物の HIV-1 プロテアーゼ阻害効果についても細胞レベルで詳細に検証し、HTLV-1 プロテアーゼ阻害効果と比較対照して考察する必要があると思われる。

E. 結論

HTLV-1 感染価を検出する簡便で迅速な定量法を確立したとの報告は未だない。また、HIV-1 プロテアーゼに顕著な阻害効果を示す抗 HIV-1 薬は HTLV-1 プロテアーゼには効果がない。したがって、インジケータ細胞 H9/K30*luc* と MT-2 等のウイルス産生細胞との混合培養による HTLV-1 プロテアーゼ阻害剤の検索システムは極めて重要であると考えられ、さらに研究を進めていく必要があると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kamada, K., Igarashi, T., Martin M.A., Khamsri, B., Hatcho, K., Yamashita, T., Fujita, M., Uchiyama, T., and Adachi, A. Generation of HIV-1 derivatives that productively infect macaque monkey lymphoid cells. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 103: 16959-16964, 2006.
- 2) Khamsri, B., Fujita, M., Kamada, K., Piroozmand, A., Yamashita, T., Uchiyama, T., and Adachi, A. Effects of lysine to arginine mutations in HIV-1 Vif on its expression and viral infectivity. International Journal of Molecular Medicine 18: 679-683, 2006.
- 3) Piroozmand, A., Khamsri, B., Fujita, M., Adachi, A., and Uchiyama, T. Morphological study on biologically distinct *vpx/vpr* mutants of HIV-2. Journal of Medical Investigation 53: 271-276, 2006.
- 4) Kamada, K., Yoshida, A., Khamsri, B., Piroozmand, A., Yamashita, T., Uchiyama, T., Fujita, M., and Adachi, A.

Construction of *gag*-chimeric viruses between HIV-1 and SIVmac that are capable of productive multi-cycle infection. *Microbes and Infection* 8: 1075-1081, 2006.

2006 年、東京、日本エイズ学会誌 8: 397, 2006.

- 5) Khamsri, B., Murao, F., Yoshida, A., Sakurai, A., Uchiyama, T., Shirai, H., Matsuo, Y., Fujita, M., and Adachi, A. Comparative study on the structure and cytopathogenic activity of HIV Vpx/Vpr proteins. *Microbes and Infection* 8: 10-15, 2006.

G. 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。

2. 学会発表

- 1) 山下知輝、鎌田和弥、Boonruang Khamsri、八町和樹、藤田美歌子、内山恒夫、足立昭夫. HIV-1 Vif と宿主因子 APOBEC3G との結合機能部位の解析. 日本ウイルス学会、2006 年、名古屋、第 54 回日本ウイルス学会学術集会プログラム・抄録集、162、2006.
- 2) 藤田美歌子、Boonruang Khamsri、山下知輝、鎌田和弥、Ahmad Piroozmand、長尾多美子、土肥直哉、足立昭夫. マクロファージでのゲノム逆転写/核移行過程における HIV-1 Vpr と HIV-2 Vpx の役割の相違. 日本ウイルス学会、2006 年、名古屋、第 54 回日本ウイルス学会学術集会プログラム・抄録集、178、2006.
- 3) Boonruang Khamsri、山下知輝、藤田美歌子、鎌田和弥、内山恒夫、足立昭夫. The Vpu 124 D and RK30AA mutations impair virus release from infected macrophages. 日本ウイルス学会、2006 年、名古屋、第 54 回日本ウイルス学会学術集会プログラム・抄録集、274、2006.
- 4) 藤田美歌子、長尾多美子、足立昭夫. HIV-2 Vpx の機能領域解析. 日本エイズ学会、

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、宿主遺伝子の脊髄局所での発現変化を経時的、定量的さらにはcDNAアレイを用いて網羅的に検討し、HTLV-I感染によるTNF- α やBcl-2, TRADDの発現の変化が疾患発症に深く関わっていることを示してきた。今年度は、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- γ 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-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- γ 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-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IFN- γ , 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- γ (sense: 5'-GATCCAGCACAAAGCTGTCA-3', antisense: 5'-GACTCCTTTTCCGTTCTCTT-3'),
IL-12 p40 (sense: 5'-AGGTGCGTTCCTCGTAGAGA-3', antisense: 5'-CCATTTGCTGCATGATGAAT-3'),
IL-12R β 1 (sense: 5'-AGGTGCGATTTCCCGTTTA-3', antisense: 5'-CAGCCCTGTTTAAGCCAATG-3'),
IL-12R β 2 (sense: 5'-TGCCACCAATCCAGAACTA-3', antisense: 5'-CCTGCTTCTAGCACCTTGT-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- 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 μ g/ml aprotinin, 1 μ 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 μ 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, 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% CO₂ 下にて培養した.

4) 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.

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- 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.

(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

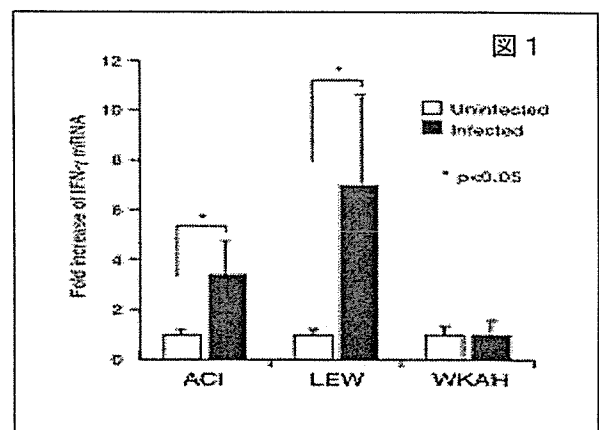
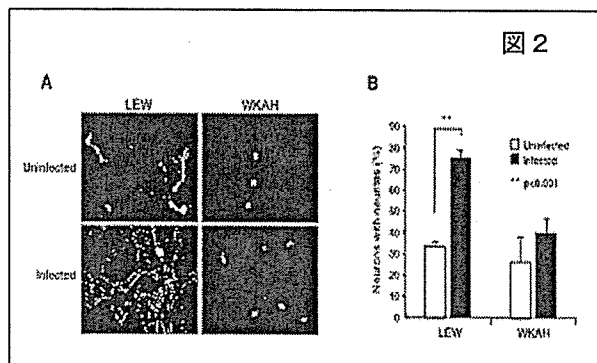


図 1

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- γ mRNA の有意な発現亢進が認められた (図 1)。IFN- α および IFN- β 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- γ 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- γ 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-I 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、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- 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。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-I 感染による IFN- γ 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-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。

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 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 μ 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-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 (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- 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、本研究では、IFN- γ 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- γ 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-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。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ポタンクの IFN- γ 強陽性像により示されていた。ニューロン細胞塊でも IFN- γ 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- 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。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。

4. HTLV-I 感染ラットの脊髄における IFN- γ 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- γ の発現増強がおこるといわれている。一方、IRF-1 は、IFN- γ によって強力に誘導される。そこで、HTLV-I 感染7ヶ月後の HAM 抵抗性ラットで認められた IFN- γ 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- γ 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 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- γ 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- γ の発現が亢進するとの報告はない。WKAH の脊髄で IFN- γ 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- 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- 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。IL-12 の刺激によって非感染 LEW の神経系細胞で IFN- γ 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-I 感染 LEW では、刺激前から IFN- γ 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-I 感染 WKAH では IFN- γ 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- 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、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- γ 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 β 1 鎖および IL-12R β 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 β 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-I 感染 LEW では、刺激前から IL-12R β 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-I 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-I 感染による WKAH 系ラット脊髄傷害機構としては感染後 7 ヶ月をピークとする脊髄局所でのウイルスの増殖とそれに伴う pX 発現増強が TNF- α の発現を増加させる一方、この感染後 7 から 12 ヶ月にかけて bcl-2 の発現が抑制されたオリゴデンドロサイトにアポトーシスを誘導し、その結果髄鞘の破壊を招き、脊髄症を発症すると考えられた。この現象は WKAH 系ラット脊髄に限局しており、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- γ 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- 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- 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 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-I 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- γ が HTLV-I 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- γ (100 IU/ml) 処理によって、その後 4 週間に渡り HTLV-I 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- γ 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- γ 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-I 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- γ 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-I 感染 LEW において HTLV-I 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- γ 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- γ 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- γ 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- 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。

末梢血において IFN- γ 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- γ 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- γ 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- γ 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 β 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- γ 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- γ 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- 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- γ 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- γ 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- 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. HAM 抵抗性ラットにおいて脊髄での IFN- γ 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- γ 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- γ 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- γ 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

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

究科附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附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 Gene Tokyo, 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- γ , 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, $\Delta\Delta C_t$ 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'-GACTCCTTTCCGCTTCCTT-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 β 1 (IL-12R β 1)
(sense:5'-AGGTGAGATTTCCCGTTTA-3',
antisense:5'-CAGCCCTGTTTAAGCCAATG-3')

IL-12 receptor β 2 (IL-12R β 2)
(sense:5'-TGCCACCAATCCACAACTA-3',
antisense:5'-CCTGCTTCTAGCACCTTGT-3')

IL-23p19
(sense:5'-CACCCTGGGAGACTCAACA-3',
antisense:5'-AGGATCTTGAACGGAGAAGA-3')

IL-23 receptor (IL-23R)
(sense:5'-TTGATGAATTGTGCCTCGTT-3',
antisense:5'-GTCTGCGCTGGGATAGTTTC-3')

IL-27
(sense:5'-ACTCTGCTTCCTCGTACCA-3',
antisense:5'-GGAGATCCAGCCTCATTGC-3')

IL-27 receptor (IL-27R, WSX-1)
(sense:5'-AGCCAGGGATAAAGGTGAC-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 μ g/ml aprotinin, 1 μ 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 μ 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, 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 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.

4) 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 μ m 以上の軸索伸長を示した細胞の割合 (%) で算定した.

5) 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'-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- 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。

(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。

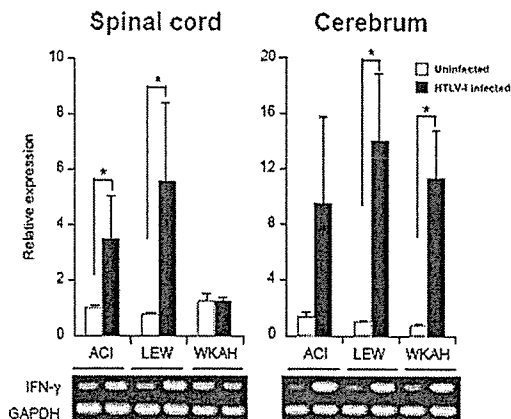


図 1

一方、大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 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- 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- 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。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。

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)。

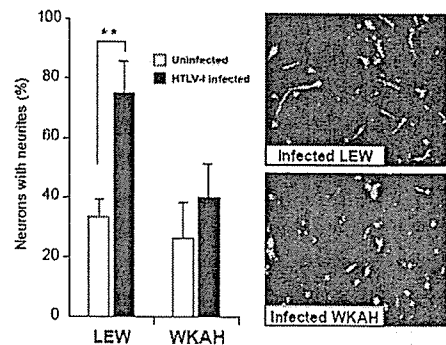


図 2

3. 脊髄における IFN- 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。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

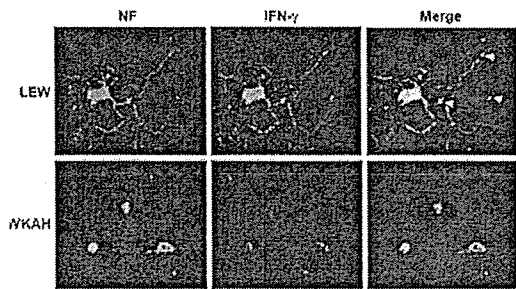


図 3

た軸索やシナプスボタンの 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。

4. 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 4)。

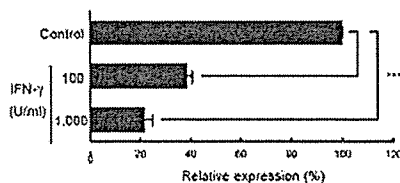


図 4

5. HTLV-I 感染ラットの脊髄における IFN- γ 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- γ の発現増強がおこるといわれている。一方、IRF-1 は、IFN- γ 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- γ 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- 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。IL-12 の刺激によって HAM 抵抗性ラット由

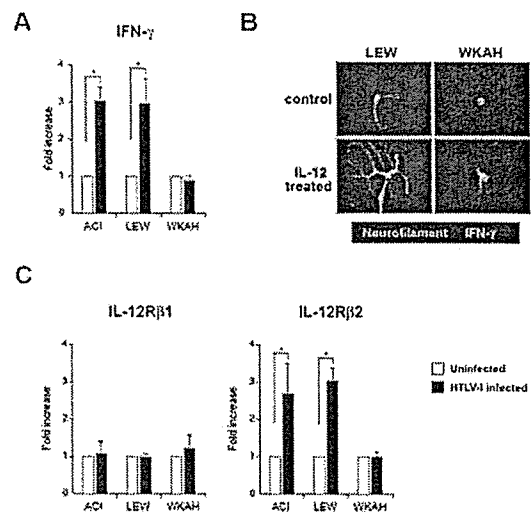


図 5

来の神経系細胞では IFN- γ 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- 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。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。

6. HTLV-I 感染ラットの脊髄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。

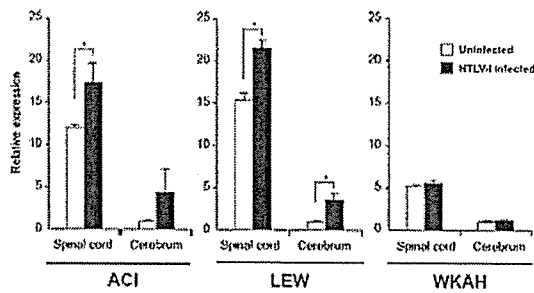


図 6

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。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。

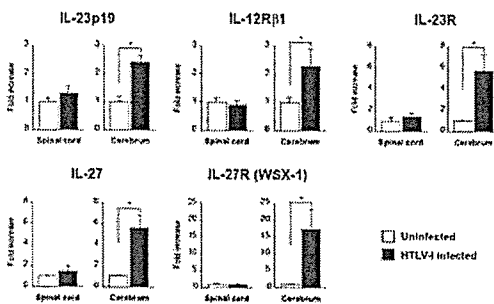


図 7

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 ラットに限り脊髄症の発症を誘導する。昨年度までの解析結果から、TLV-I 感染による WKAH ラット脊髄傷害機構としては感染後 7 ヶ月をピークとする脊髄局所でのウイルスの増殖とそれに伴う *pX* 発現増強が TNF-α の発現を増加させる一方、この感染後 7 から 12 ヶ月にかけて *bcl-2* の発現が抑制されたオリゴデンドロサイトにアポトーシスを誘導し、その結果髄鞘の破壊を招き、脊髄症を発症すると考えられた。この現象は WKAH 系ラット脊髄に限局しており、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 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。

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- 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- 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関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- 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。

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。

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- 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の発現不応答性がIFN- γ 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- 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。

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. Tomaru U, Yamano Y, Jacobson S. "HTLV-I infection and the Nervous system." *Clinical Neuroimmunology* 2nd 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- γ 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- γ 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- γ 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- γ 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

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'-GACTCCTTTTCCGCTTCTT-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 β 1 (IL-12R β 1)

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

IL-12 receptor β 2 (IL-12R β 2)

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

IL-23p19

(sense:5'-CACCACTGGGAGACTCAACA-3',
antisense:5'-AGGATCTTGAACGGAGAAGA-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'-AGCCAGGGATAAAGGTGAC-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 μ g/ml aprotinin, 1 μ 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 μ 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、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 Dullbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12 medium (DMEM/F12) 培地 (Invitrogen) を使用し、37°C、5% CO₂ 下にて培養した。

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 μ m 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'-CCAATGCCAAACAAAGAATGC-3',
antisense 5'-AGCCCGCAACATATCTCCTA-3')

7) 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- 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'-CGAATCGGAGTACACTGCTG-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 テータベース ([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- 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。

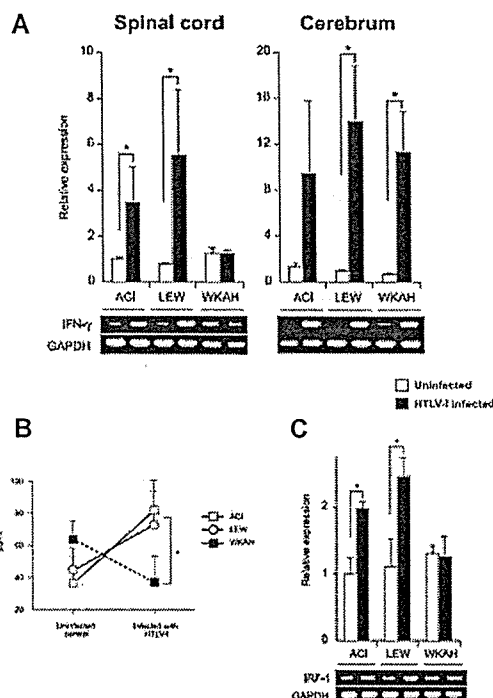


図 1

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- 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).

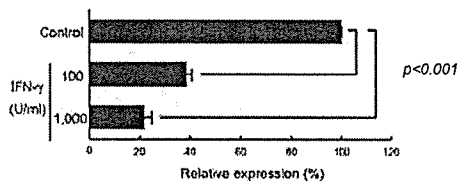


図 2

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中の約 10% が IFN- γ 陽性であった (図 3A, B).

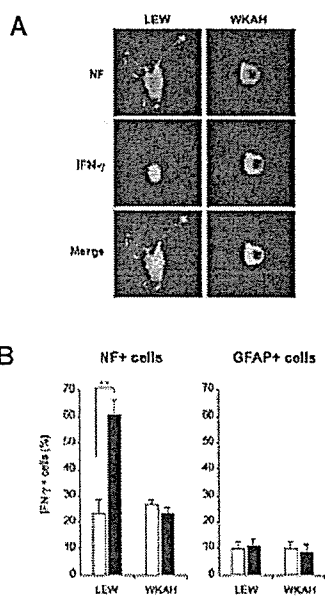


図 3

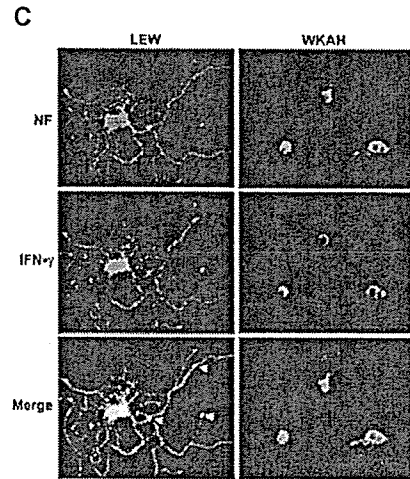


図 3

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ソタンの 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).

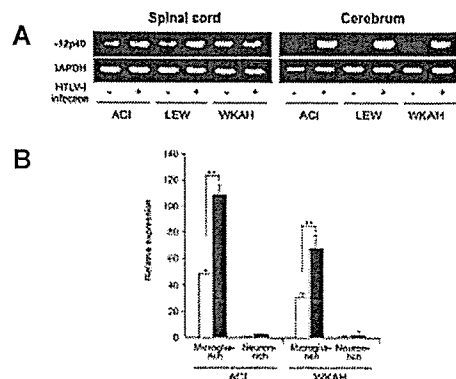


図 4

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。

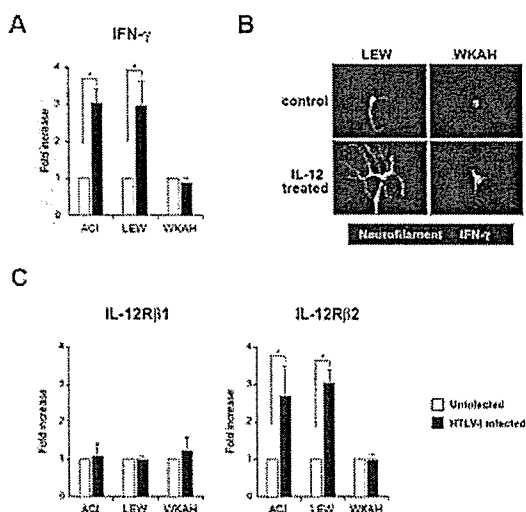


図 5

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

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。

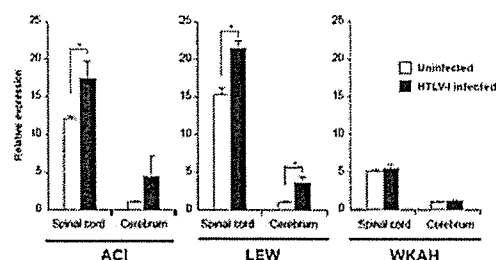


図 6

HAM 抵抗性ラットでは、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学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 IL-12R 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