

合部位が生じ、ACIおよびLEWのGATA-3結合部位と推測される塩基配列が2箇所なのに対して、WKAHでは3箇所のGATA-3結合部位が存在することを確認した(図7)。この-239における一塩基多型性がWKAHのIL-12Rβ2のIL-12に対する発現不応答性に何らかの関係があるのではないかと推測された。

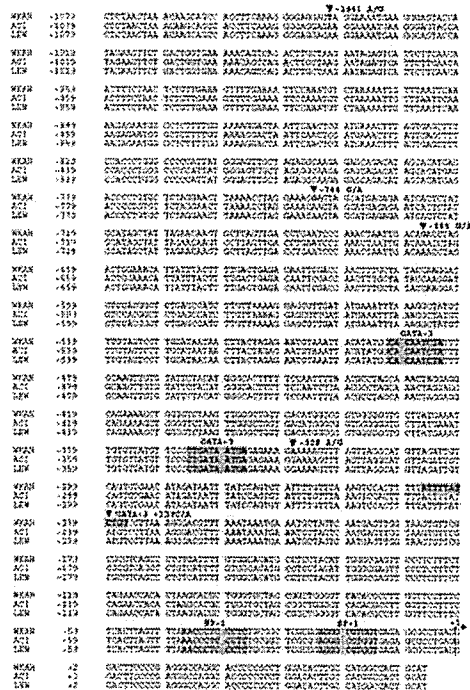


図 7

6. HTLV-I 感染ラットの脊髄および脳における IL-12Rβ2 の発現応答性の系統差

次に、どうしてHTLV-I感染7ヶ月の脳において 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。

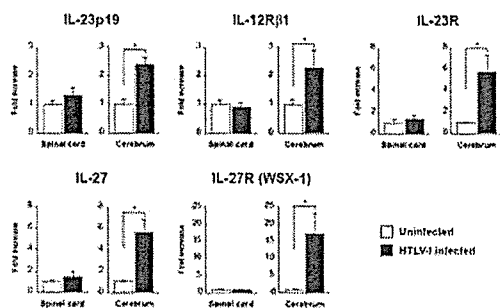


図 8

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(図 8)。これらの結果から、WKAH ラットの脳における 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、HTLV-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 系ラット脊髄に局限しており、ほかの臓器や他系統のラットでは見られない現象である。実際、ヒトの HAM/TSP も感染者の一部にしか発症しないことから考えても、感染宿主の臓器特異的な宿主遺伝子発現が脊髄症発症に重要な働きをしていると考えられる。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 $IFN-\gamma$ 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 $IFN-\gamma$ 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 β 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 $IFN-\gamma$ 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, GPI-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 $IFN-\gamma$ 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

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
Allicin による HAM 患者由来 HTLV-I 感染 T 細胞株に対する障害性の検討

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

研究要旨

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

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

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

3)細胞障害性の評価:①ミトコンドリア膜電位の低下:HCT-1およびHCT-4を20 μ M allicinまたはvehicle存在下で24時間培養後, potential sensitive fluorescent dye DiOC₆(3)で染色し, flow cytometryで解析した。②z-VAD-fmk処理によるcell viabilityの変化:HCT-1を100 μ M z-VAD-fmkで前処理後, 10 μ M allicin存在下で24時間培養。培養後, MTS assayにおいてcell viabilityの変化を検討した。

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

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

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

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1)各種細胞株障害性におけるallicinの効果:細胞障害性をLD₅₀で表した場合、それぞれのallicin濃度はHCT-1 : 7.0, HCT-4 : 7.5, KOB : 11.5, MT-1 : 12.5, MT-2 : 44.6, Jurkat : 22.2 μ Mであり、HAM患者由来HTLV-I感染T細胞株(HCT-1, HCT-4)で低値を示し、両者の細胞株は20 μ Mのallicin処理で、ほぼ完全に死滅した。

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

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

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

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

D. 考察

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

E. 結論

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

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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

2. 学会発表

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

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

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

4. Tatsufumi Nakamura.

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

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

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

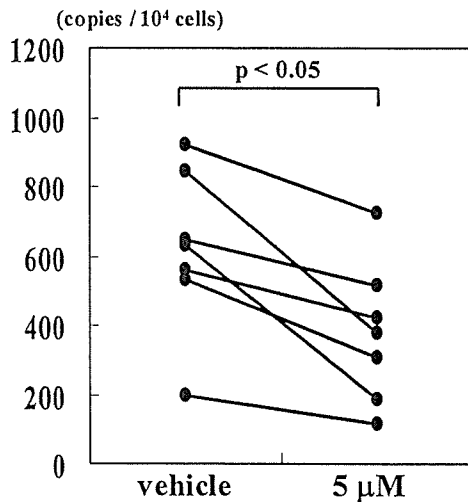


図 4. プロスルチアミン処理による HAM 患者培養 CD4 陽性 T 細胞中の HTLV-I プロウイルス量の変化

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る。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- γ 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- γ 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 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 の著明な改善はみられなかった。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。臨床的效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) プレドニゾロン内服 (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、齊藤峰輝³、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 プロウイルス量が大きく、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。

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

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

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

分担研究者 久保田龍二 鹿児島大学助教授

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

HLA-A2 HAM 患者では Tax11-19 が主要なエピトープであり、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 Tax11-19 抗原をパルスした抗原提示細胞との混合培養下での IFN- γ 産生細胞を細胞内サイトカイン染色し、フローサイトメトリーで検出した。CTL の機能的多様性の解析は Tax11-19 エピトープの T 細胞レセプター (TCR) 結合部位のアミノ酸を置換した人工変異ペプチドを作成し、人工変異エピトープを認識す

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

(倫理面への配慮)

臨床検体を扱うため、患者よりの採血に関しては十分なインフォームド 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 HAM 患者の HTLV-I プロウイルス量は HTLV-I Tax 11-19 特異的 CTL の機能的多様性と逆相関し、構造的多様性と逆相関傾向を認めた。CTL の頻度とウイルス量は相関は認めなかった。また、CTL の機能的多様性と CTL 頻度

は逆相関を示した。患者間で CTL のアビディティは差がなかったことよりこれらの機能的多様性は CTL と感染細胞との結合強度の差によるものではないと考えられた。変異ウイルスの検討では、CTL の機能的多様性が高いほうが変異ウイルスの頻度は低い傾向にあった。変異ウイルスの頻度とプロウイルス量は相関を示さなかった。

D. 考察

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

E. 結論

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

F. 健康危険情報
なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

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

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

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

H. 知的所有権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

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

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- γ 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- γ 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コンセントのもと、書面による研究協力承諾書を頂いた。本研究は鹿児島大学倫理委員会の承諾を得た。また、患者とサンプルの非連結匿名化を行った。

C. 研究結果

HLA-A2 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ケンスの結果、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、優れた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。

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

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、CD8 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 intermediate 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