

of HTLV-1-associated disease: specific appearance of antibody recognizing the receptor-binding site on HTLV-1 envelope protein. *Cancer Sci.* 2004 Oct;95(10): 835-839.

Fujimori J, Nakashima I, Fujihara K, Feng J, Yamamoto M, Yamamoto N, Begum N, Sagara Y, Shiraki H, Shiga Y, Onodera J, Sato S, Takase S, Asano M, Endo M, Itoyama Y. Epitope analysis of the cerebrospinal fluid IgG in HTLV-1 associated myelopathy patients using phage display method. *J Neuroimmunol.* 2004 Jul;152(1-2):140-146

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

表 1

抗gp46-197抗体は
gp46 (Pro205-Lys209) 領域を認識する

DHILEPSIPWKS~~SKLL~~TLVQL

peptide gp46-197

GPWKRKPSNYDV
SVVWKS~~SKV~~RGRE
NVVEADLPWKGK
EELMVWREKNGG
EVEEHPKPWVKV
RENGGDVPWRRK
pWKS~~SKV~~RPDSALQ
PWKEKRAPLFNE
HSNSPWR~~SKI~~SP
EMPVPW~~KLR~~WD

HTLV-I関連脊髄症(HAM/TSP)患者末梢血単核球を用いた合胞体形成の検討

研究代表者 出雲 周二

共同研究者：久保田 龍二，児玉 大介（鹿児島大難治ウイルス病態制御研分子病理）

研究要旨：HTLV-I関連脊髄症(HAM/TSP)のプロウイルス量高値の原因と考えられているCell-to-cell contactによる感染のしやすさを簡便に評価する指標はまだない。我々は、以前から細胞株間では知られているイン・ビトロでの細胞融合現象である合胞体形成(Syncytium formation)を利用する方法を開発するため、HAM、無症候性キャリア(AC)由来の末梢血単核球と非感染細胞株との共培養を検討した。細胞融合を促進する効果を持つポリカチオンを添加する培養系で行ったが、細胞株同士の通常の合胞体形成が亢進するのに対しHAM、AC由来では合胞体形成がほとんどみられなかった。末梢血単核球から抗体産性細胞の除去、あるいは他の標的細胞の利用の検討がさらに必要と考えられた。

A. 研究目的

HTLV-I関連脊髄症(HAM/TSP, 以下HAM)では、CD4+メモリーT細胞が原因ウイルスHTLV-Iの主な感染宿主細胞である。HAM患者のプロウイルス量(Taxコピー数/末梢血単核球(PBMC) 10^4 個)はHAM患者では無症候性キャリアよりも有意に高値であり、さらにHAM患者の臨床的な運動障害度とプロウイルス量との間には相関があることが明らかになっている。プロウイルス量増加、すなわち感染細胞数拡大が脊髄への組織移行、HAM発症あるいは重症度増悪と関連する病態が想定される。プロウイルス量増加の機序はオリゴクローナルな感染細胞集団の拡大と考えられているが、その最初のイベントとして、実験的(in vitro)にはHTLV-I感染細胞と非感染細胞とのCell-to-cell contactの際に細胞間にウイルス・シナプスが形成され非感染細胞の感染が起こることが免疫組織学的、電子顕微鏡的に観察されている。しかし生体内(in vivo)や生体外(ex vivo)ではまだ確認されていない。一方in vitroでは、HTLV-I感染細胞株と非感染細胞株を共培養すると細胞融合する合胞体形成という類似した現象も知られている。そこで我々は、合胞体形成が生体外での感染細胞・非感染細胞の接着・結合のしやすさ、プロウイルス量の増加しやすさの簡便な指標としての可能性を探索するため、感染細胞株の代わりにHAM患者由来の末梢血単核球を用いて非感染細胞株との間で

合胞体形成が起こりうるのかどうかを検討した。

B. 研究方法

対象：細胞株としてHTLV-I感染性細胞MT-2、Hut-102、非感染性細胞株Jurkatを、また臨床検体としては、WHO診断基準により診断されたHAM患者でPBMCを液体窒素凍結保存している4例、および無症候性HTLV-Iキャリア4例を無作為に用いた。倫理面への配慮：患者および無症候性キャリア(以下AC)からの採血、検体保存は十分な説明と文書での同意を得て行った。本研究では患者と検体は非連結匿名化し、鹿児島大学倫理委員会の承諾を得て行われた。

プロウイルス量測定：ルーチンのTaqMan probeによるreal-time PCR法で測定した。

細胞培養：96ウェル平底蓋付きマイクロタイタープレート(IWAKI)を用いて、RPMI1640培地(Roswell Park Memorial Institute)に10%子ウシ血清(FBS)、抗生剤として終濃度ペニシリン100U/mL、ストレプトマイシン10mg/mLを添加した培地を用い、1ウェル200 μ L中に感染細胞、非感染細胞の2種類をほぼ同数で懸濁し37°C、CO₂5%条件下で培養した。培養に用いる細胞数(密度)と培養期間は予備実験で条件を決めた。

ポリカチオン：遺伝子導入実験にも用いられるDEAE-dextran(MP Biomedicals)、Hexadimethrine bromide(Polybrene)(Sigma Aldrich)の2種類の試薬

を用い合胞体形成の刺激効果を観察した。終濃度125~0.04 μ g/mLの5倍希釈系列となるように入れた。ポリカチオンの処理は37°C, 5%CO₂インキュベーター内で24時間培養後、培地を新鮮なものと交換した。ポリカチオンの合胞体形成効果はポリカチオン処理をしたウェルでの合法体数と処理しないウェルでの合胞体数の比をRelative number of syncytiaとして算定した。

ヘマトキシリン・エオジン染色と合胞体の判定: 共培養後に、スライドガラス上に培養液50 μ Lずつ1ウェル当り4枚に広げ3時間風乾し、中性緩衝ホルマリンで30分間固定後、通常のヘマトキシリン・エオジン染色を行った。合胞体の判定は顕微鏡下に胞体内に5核以上あるものを合胞体と判定し1ウェル当り4枚のスライドでの合法体数を合計し算定した。

1. HTLV-I感染細胞株Hut-102と非感染細胞株Jurkatとの共培養

①前者すなわち感染細胞、後者すなわち標的細胞とも 2.5×10^5 cells/100 μ L・wellで96well plateを用いて48時間培養後HE染色し合胞体形成を顕微鏡下に判定した。

②ポリカチオンの合胞体形成に関する増強効果を検討した。

2. HAM患者, AC由来の凍結保存末梢血単核球と非感染細胞株Jurkatとの共培養

①感染細胞・標的細胞(Jurkat)とも 5.0×10^5 cells/100 μ L・wellで培養し72時間後にHE染色し同様に合胞体形成を判定した。

②ポリカチオン(DEAE-dextran, 25 μ g/mL)の合胞体形成に関する増強効果を検討した。

3. RT-PCRによるHTLV-Iウイルス遺伝子産物の発現解析

HAM患者, AC由来の凍結保存末梢血単核球の単独培養前後で 5.0×10^5 個のほぼ同数の細胞からtotal RNAをRNeasy Mini Kit(QIAGEN)で抽出し、等量のRNAを鋳型としTaKaRa RNA PCR Kit (TaKaRa)で逆転写反応を行いcDNAを得た。ウイルス遺伝子産物としてHTLV-I mRNA (gag-pol, tax, env)のmRNAを表1に示すプライマーを用いてRT-PCR法により増幅し、内部対照として同量のRNAからの β -actin mRNA増幅産物に対する比として培養前後でのアガロース電気泳動を画像解析ソフトウェア[ImageJ]で解析した。

表1. RT-PCRによる発現解析に用いたプライマー

標的mRNA	プライマー配列(基準配列[GenBank Accession No.]での塩基番号)	増幅産物
内部対照のための β -actin	Sense: 222-AAGAGAGGCATCTCTACCT-239 Antisense: 439-TACATGGCTGGGGTGTGAA-420	(X00351) 218bp
HTLV-I 転写産物		(J02029)
gag-pol	Sense: 1411-GAGGAGGAGGACAAAGGTACTG-1391 Antisense: 1313-GGATCCTAGGGTGGGAACAG-1333	100bp
tax	Sense: 5096-ATCC CGTG GAGA CTC. TCAA-5111 Antisense: 5118-AACCGTAGACTGGGTATCC-5137	144bp
env	Sense: 5800-CTCGAGCCCTTATACCATG-5819 Antisense: 6127-GGATCCTAGGGTGGGAACAG-6107	328bp

統計: HAM患者群, AC群のプロフィールの項目はMann-Whitney's U検定を行った。細胞株同士の組み合わせ、またHAM患者または無症候性キャリアのPBMCと非感染細胞株との組み合わせにおける合胞体形成へのポリカチオンの増強効果は繰り返しの二元配置分散分析(Two-factor factorial ANOVA)で検定した。HAM, AC群間での抗原発現の差はMann-Whitney's U検定を、培養前・後でのHAMおよびAC各群内での比較はpaired t 検定で解析した。

(倫理面への配慮)

臨床検体の提供に関しては、文書によるインフォームドコンセントにて許可を頂いた。検体は非連結化して使用した。本研究は鹿児島大学倫理委員会の承諾を得て行った。

C. 研究結果

無作為抽出したHAM患者, 無症候性キャリア(AC)のプロフィールとして、性、年齢、プロウイルス量を比較した(表2)。HAM患者群がAC群で有意に高値であるが、一般の集団と同様である。

表2. HAM患者群, 無症候性キャリア群のプロフィール

	HAM患者群	無症候性キャリア群
年齢(歳 \pm SD)	55.75 \pm 6.5	54.25 \pm 9.1
性別(M:F)	1:3 (n=4)	0:4 (n=4)
プロウイルス量 (コピー/10 ⁴ PBMC \pm SD)	1899.5 \pm 2235.6	44.25 \pm 20.52

SD: standard deviation *p = 0.021, Mann-Whitney' U test

1. HTLV-I感染・非感染細胞株間での合胞体形成におけるポリカチオンの増強効果

図1にみられるような比較的大型な合胞体を1ウェル当り数個~数十個認めた。合胞体形成数の

比 (Relative number of syncytia) をポリカチオンの増強効果の指標とみなし図2にまとめた。

Hut102+Jurkat 細胞株の組み合わせと MT-2+Jurkat細胞株の組み合わせにおけるポリカチオン (DEAE-dextran, Hexadimethrine bromide (Polybrene)) の効果に差があるかどうかを繰り返しの二元配置分散分析 (Two-factor factorial ANOVA) で検定したところ2つの細胞株の組, また2つのポリカチオンで有意差はなかった。しかし MT-2+Jurkat 細胞株の組で DEAE-dextran よりも Hexadimethrine bromide (Polybrene) の方が合胞体刺激効果が高い傾向 ($P=0.0513$) が見られた。細胞株同士の通常の合胞体形成がみられる培養系であること, およびポリカチオンの細胞融合刺激効果が確かめられた。

図1. Hut-102とJurkat細胞株での合胞体形成

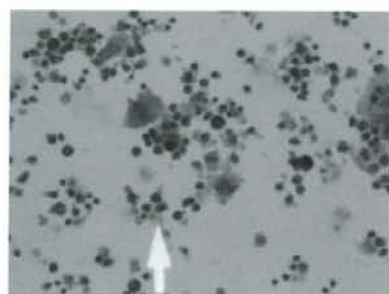
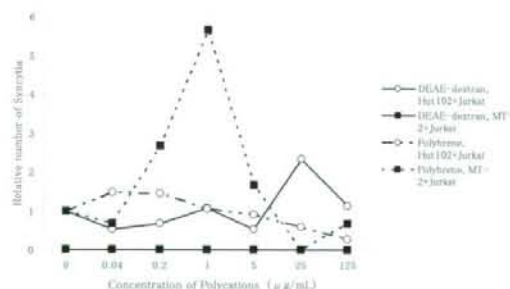


図2. HTLV-I感染細胞株・非感染細胞株間での合胞体形成におけるポリカチオンの増強効果



2. HAM患者, 無症候性キャリア由来の凍結保存PBMCと非感染性細胞株Jurkat間での合胞体形成におけるポリカチオンの増強効果

細胞株同士の実験1に比し合胞体は標的細胞が細胞株の細胞に比較して図3に示すように小型であった。合胞体数も1ウェル当り0または1個と極めて少

数だった(図4)。実験1と同様にHAM患者のPBMC, 無症候性キャリア(AC)のPBMCにおけるポリカチオンの効果に差があるかどうかを繰り返しの二元配置分散分析 (Two-factor factorial ANOVA) での検定でも差はなかった。

図3. HAM患者由来のPBMCとJurkat細胞株での合胞体形成

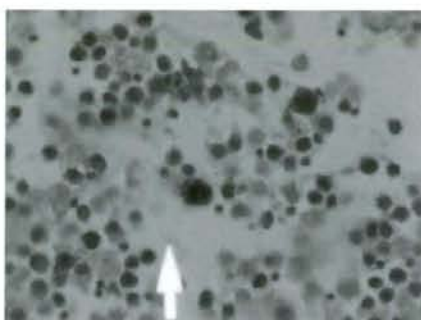
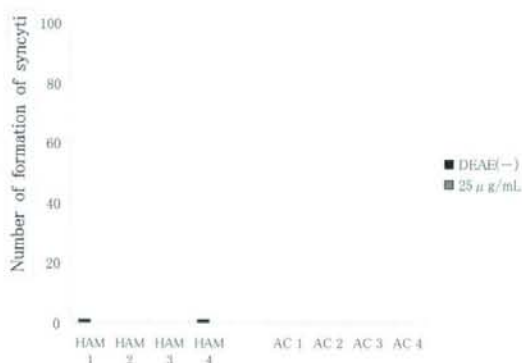


図4. HAM患者, ACのPBMCとJurkat細胞株の共培養による合胞体形成とポリカチオンの増強効果の検討



3. RT-PCRによるHTLV-Iウイルス遺伝子産物および接着分子の発現解析

HAM患者のPBMCではウイルス抗原が少ないことが知られている。凍結検体から培養しmRNA量の変化を調べた。

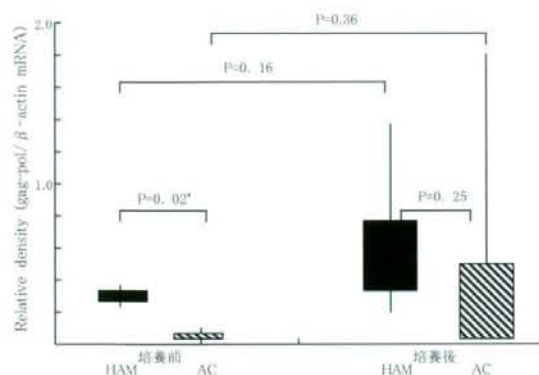
培養前後でのHAM, ACでのgag-pol mRNA, tax mRNA, env mRNAの発現の変化を各々図5A, B, Cに示した。

Gag-pol mRNAは培養前にHAMで有意に発現が高く, 培養後もACよりも高発現の傾向がみられた。Tax mRNAも培養前では同様な傾向だったが有意ではなかった。Env mRNAでは逆に培養前後ともAC

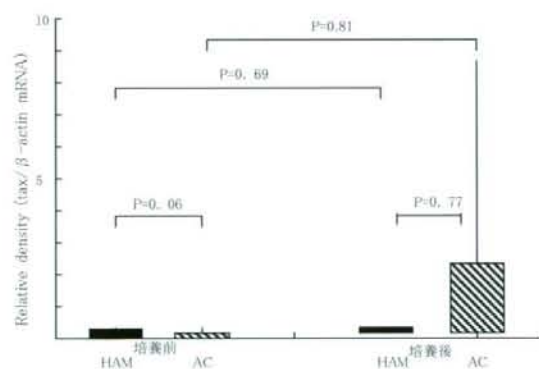
で有意に高発現だった。3種類のmRNAとも72時間の培養では発現量の有意な変化はなかったが、env mRNAでは $P=0.06\sim 0.07$ と発現亢進傾向がみられた。

図6. 培養前後でのHAM, ACでのmRNA発現の変化

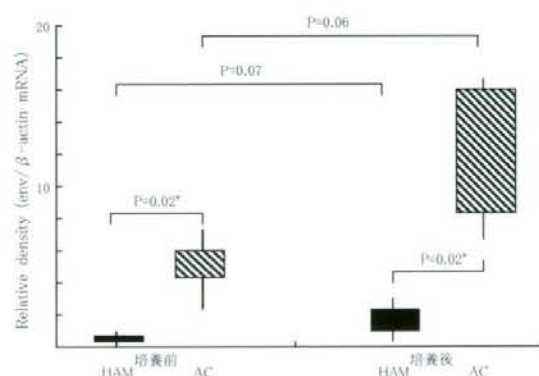
A. gag-pol mRNA



B. tax mRNA



C. env mRNA



D. 考察

合胞体形成はHTLV-I感染細胞上のenv遺伝子産物であるSU gp46と標的細胞(非感染細胞)上のgp46受容体との結合に続くイベントで起こると考えられており、通常のCell-to-cell contactによる感染に類似したイン・ビトロの現象である。

PBMC上での抗原発現、および培養後の発現亢進傾向、特に合胞体形成の前提条件であるenv mRNA発現亢進は前述の実験である程度は確認された。

HAM患者、ACのHTLV-I感染細胞を含む末梢血単核球(PBMC)を感染細胞として用いた非感染細胞株との合胞体形成は今回の培養条件ではほとんどみられなかった。この原因としては感染細胞上での抗原発現が合胞体形成をするには少ないこと、HTLV-I感染細胞株を用いた合胞体形成では培養系にHAM患者血清を加えると合胞体形成を強力に阻害する効果が知られているが、今回PBMCからは抗体産生細胞(B細胞、形質細胞など)除去せずに粗な状態のまま行ったことなどが考えられた。感染細胞への刺激は特に加えず、膜融合の促進剤としてのポリカチオンを添加してCell-to-cell contact時の細胞融合あるいはウイルス粒子と非感染細胞膜の融合を促進する効果を期待して添加する条件で検討したが、生体内ではなんらかの刺激が必要なかもしれない。また今回は未検討だったが合胞体形成には接着分子が数種類関与し、taxにより接着分子はトランス活性化を受けていることが知られている。これらの因子の関与の検討も必要と考えられた。さらに標的細胞については今回用いたTリンパ球系の細胞株のみでなく、合胞体を高率に形成する異種動物由来の細胞(ネコ8C細胞)や接着系細胞株などの検討も必要と考えられた。

E. 結論

HAM患者、ACの末梢単核球を用いた非感染細胞株との合胞体形成は膜融合促進剤であるポリカチオンを添加した培養系ではほとんどみられなかった。HTLV-IのCell-to-cell contactによる感染性を簡便に評価する方法の開発のため抗体産生細胞を除去した培養系、接着分子などの検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hayashi D, Kubota R, Takenouchi N, Tanaka Y, Hirano R, Takashima H, Osame M, Izumo S, Arimura K: Reduced Foxp3 expression with increased cytomegalovirus-specific CTL in HTLV-I-associated myelopathy. J Neuroimmunol. 200(1-2): 115-124, 2008
2. Hayashi D, Kubota R, Takenouchi N, Nakamura T, Umehara F, Arimura K, Izumo S, Osame M: Accumulation of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I)-infected cells in the cerebrospinal fluid during the exacerbation of HTLV-I-associated myelopathy. J Neurovirol., 14(5): 459-463, 2008
3. Sabouri AH, Usuku K, Hayashi D, Izumo S, Ohara Y, Osame M, Saito M. Impaired function of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-1)-specific CD8+ T cells in HTLV-1-associated neurologic disease. Blood. 112(6):2411-2420, 2008.
4. Yukitake M, Sueoka E, Sueoka-Aragane N, Sato A, Ohashi H, Yakushiji Y, Saito M, Osame M, Izumo S, Kuroda Y. Significantly increased antibody response to heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients but not in patients with human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. J Neurovirol. 14(2):130-135, 2008.

2. 学会発表

久保田龍二、竹之内徳博、出雲周二: HTLV-I関連脊髄症のウイルス制御におけるCTLの役割。第12回神経ウイルス学会。2008年7月 鹿児島。

久保田龍二、竹之内徳博、松崎敏男、古川良尚、有村公良、出雲周二: HLA-A24はHAMでは頻度が高いがウイルス量は低い。第49回日本神経学会総会。2008年5月 横浜

久保田龍二、竹之内徳博、松崎敏男、古川良尚、

有村公良、出雲周二: HLA-A24はHTLV-Iウイルス量減少に関与するがHAM発症のリスクを上げる。第1回HTLV-I研究会。2008年8月 東京

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

HAM/TSP における HTLV-I の cell to cell spread に関する small GTPases の役割と
polysulfate による新規治療法開発へ向けた基礎的検討

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，准教授

共同研究者 福島直美¹⁾，西浦義博¹⁾，井田弘明¹⁾，荒牧俊幸¹⁾，中村英樹¹⁾，
山崎浩則²⁾，足立昭夫³⁾，錫村明生⁴⁾，片岡泰文⁵⁾，江口勝美¹⁾

1) 長崎大学・院・展開医療科学，2) 長崎大学保健・医療推進センター，
3) 徳島大学・院・ヘルスバイオサイエンス研究部，4) 名古屋大学環境医学
研究所・神経免疫学，5) 福岡大学薬学部薬剤疾患管理学

研究要旨：

HTLV-I はインテグリンおよびそのリガンドによって構成される virological synapse を通して cell to cell spread の様式で感染していく。今回，HAM/TSP 患者由来 HTLV-I 感染 T 細胞株の感染効率を，HTLV-I キャリアー由来 HTLV-I 感染 T 細胞株を対照として，H9/K30 *luc* 細胞との混合培養系を用いて比較検討した。その結果，HAM/TSP 患者由来株では対照株に比較して，インテグリン/リガンドシグナルを活性化する small GTPase の一つである Rap1 の活性化と共に，有意に高い感染効率を持つことが明らかにされた。この事実より HAM/TSP 患者 HTLV-I 感染細胞はインテグリン/リガンドシグナルの下流に存在する small GTPase の活性化により，効率のいい HTLV-I の cell to cell spread を惹起し得る可能性を持っていることが示唆された。Polysulfate は HTLV-I 感染を阻害することが知られている。今回，種々の polysulfate の HTLV-I 感染阻害活性について，H9/K30 *luc* 細胞との混合培養系を用いて比較検討した。その結果，ペントサン多硫酸ナトリウムは強い感染阻害活性を示し，HAM/TSP に対する新規治療薬となり得る可能性が示された。

A. 研究目的

我々はHAM/TSP患者由来HTLV-I感染T細胞株においてはHTLV-Iの産生・細胞外放出にはインテグリン/リガンドシグナルが強く関与し，HAM/TSP患者HTLV-I感染細胞はこのことに起因して効率のいいHTLV-Iのcell to cell spreadを惹起している可能性を示してきた(Fukushima N., et al., 2008)。今回，混合培養系を用いて，実際にHAM/TSP患者由来HTLV-I感染T細胞株の感染効率を対照HTLV-I感染T細胞株と比較検討し，その要因としてのsmall GTPasesの活性化について解析した。一方，HTLV-Iの細胞内侵入はエンベロープ蛋白であるglycoprotein46(gp46)の標的細胞上のheparan sulfate proteoglycans (HSPGs)へのattachmentによって開始される。ヘパリンなどに代表されるpolysulf

ateはその骨格としてのglycosaminoglycanに多数の硫酸エステル基が結合した構造をとっているが，polyanionとして働き，HTLV-I感染を阻害することが知られている。そこで，今回HAM/TSPに対する新規治療法の開発を目的として，種々のpolysulfateによるHTLV-I感染阻害効果について基礎的検討を行った。

B. 研究方法

1) **細胞株**：HTLV-I 感染 T 細胞株として HCT-5 (HAM/TSP 患者由来)，TL-Su (HTLV-I キャリアー由来) を使用した。混合培養の標的細胞として H9/K30 *luc* 細胞 (リンパ球系細胞株である H9 細胞に HTLV-I LTR にレポーターとしてのルシフェラーゼ遺伝子を繋いだプラスミドを permanent transfection した細胞株) を使用し

た。

2) HTLV-I 感染効率の比較: H9/K30 *luc* 細胞 (3.5×10^5 /well) とそれぞれの HTLV-I 感染細胞株 (5×10^5 /well) と混合培養し、経時的に細胞を回収、その後ルシフェラーゼアッセイ (Promega) を行い、relative luc activity を算出した。

3) 活性化 small GTP ases の解析: 上記細胞株から蛋白を抽出後、Rho, Rac および Cdc42 については Cytoskeleton 社, Rap1 については Stressgen 社のキットを用い、GTP 結合型の small GTPases の検出のため、pull-down assay を施行した。

4) Polysulfate による HTLV-I 感染阻害実験: Polysulfate として、ヘパリン、低分子ヘパリン (ローモリン[®])、デキストラン硫酸ナトリウム (MDS ユー[®]) (デキストラン硫酸)、ペントサン多硫酸ナトリウム (ペントサン多硫酸) を使用し、各種濃度のそれぞれの薬剤で HCT-5 (5×10^5 /well) を 1 時間前処理後、H9/K30 *luc* 細胞 (3.5×10^5 /well) を加え、24 時間混合培養。培養後細胞を回収し、ルシフェラーゼアッセイを施行した。

(倫理面への配慮)

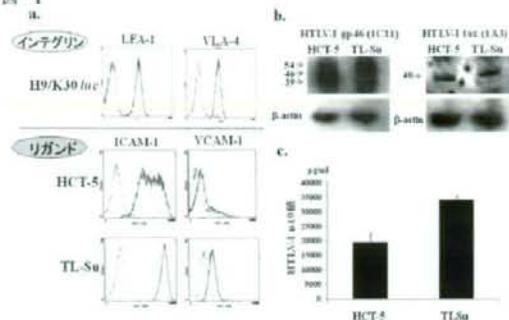
本研究は長崎大学の倫理規定を遵守して行った。

C. 研究結果

1) HTLV-I 感染 T 細胞株・H9/K30 *luc* 細胞におけるインテグリン/リガンド発現および HTLV-I 発現・産生量の比較: 感染効率を比較するにあたって、その基盤となる条件としてそれぞれの細胞株での virological synapse を構成するインテグリン/リガンド発現および HTLV-I 発現・産生量の比較検討は重要である。図 1a に示すように、H9/K30 *luc* 細胞においてはインテグリンである LFA-1 および VLA-4 の発現が確認された。HCT-5 および TL-Su において、リガンドである ICAM-1 および VCAM-1 が確認された。次に HCT-5 および TL-Su における HTLV-I 発現・産生量についての比較検討においては、抗 HTLV-I gp46 および tax 抗体によるウエスタンブロット解析でみた場合 (図 1b)、培養液中の p19 抗原量でみた場合 (図 1c)、ほぼ同等であった。以上のことより、HCT-5 および TL-Su 間での感染効率の比

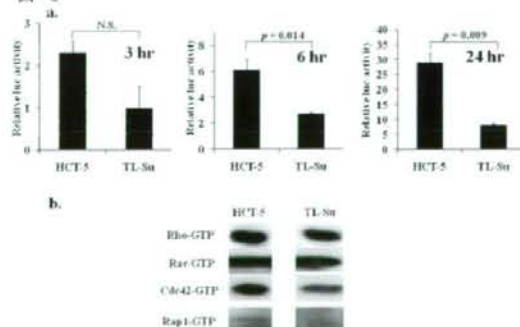
較は、インテグリン/リガンド発現および HTLV-I 発現・産生ともほぼ同一の条件で遂行できると考えられた。

図 1



2) HTLV-I 感染効率の比較: 図 2a に示すように HCT-5 においては TL-Su に比較して、H9/K30 *luc* 細胞との混合培養後 6 時間で約 2.3 倍、24 時間で約 3.6 倍の有意に高い relative luc activity を示した。また、混合培養後 3 時間においても有意差はなかったものの、約 2 倍の relative luc activity を示した。HCT-5 と TL-Su では HTLV-I の産生および発現はほぼ同等であるので、HCT-5 における有意に高い relative luc activity は HTLV-I の感染効率の良さを示していると考えられた。

図 2

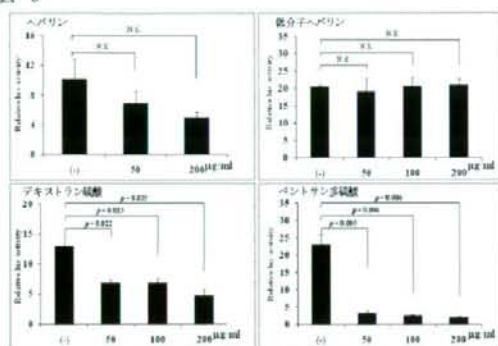


3) Pull down assay: 図 2b に示すように、Rho-, Rac-, Cdc42-GTP については HCT-5 および TL-Su の両細胞株で検出されたが、Rap1-GTP については HCT-5 でのみ検出され、TL-Su では検出されなかった。また、H9/K30 *luc* 細胞でも Rap1-GTP は検出されなかった (図省略)。以上のことより、HCT-5 においては Rap1 が活性化されていること

が明らかにされた。

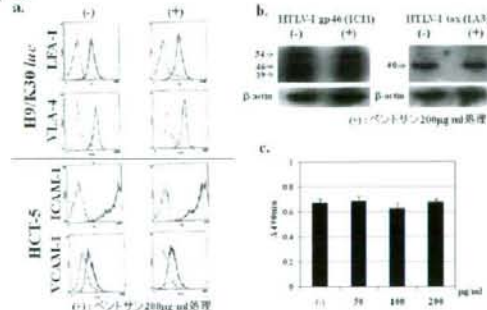
4) PolysulfateによるHTLV-I感染阻害実験: 図3に示すように、ヘパリンでは有意差は明らかではなかったものの、用量依存性に relative luc activityの低下が得られ、感染阻害効果を示した。低分子ヘパリンではその効果はみられなかった。デキストラン硫酸では用量依存性に感染阻害効果を示した。ペントサン多硫酸では、低濃度においても有意な relative luc activityの低下がみられ、最も強いHTLV-I感染阻害活性を示した。

図 3



200 µg/mlのペントサン多硫酸による処理においては、インテグリン/リガンド(図4a)およびHTLV-I gp46・tax発現量の変化(図4b)、さらに細胞傷害性は惹起されなかった(図4c)。すなわち、予測通りではあるが、ペントサン多硫酸によるHTLV-I感染阻害はvirological synapseを構成するインテグリン/リガンド発現およびHTLV-I発現の低下によるものではないことが明らかにされた。

図 4



D. 考察

今回、ほぼ同様のHTLV-I発現・産生能を持つHTLV-I感染T細胞株とH9/K30 luc細胞との混合培養系での検討で、HAM/TSP患者由来株ではHTLV-Iキャリアー由来株と比較して、明らかにHTLV-Iの感染効率が低いとの結果が得られた。これら2つの細胞株では、これまでも報告してきたように、インテグリン/リガンドシグナルの下流に存在するsmall GTPasesであるRho, Rac, Cdc42はほぼ同様に恒常的に活性化されている(Fukushima N., et al., 2008)。それでは何故、感染効率での差が生じるのか? 現時点、明確な要因は不明であるが、今回はインテグリンからそのリガンドへのinside-outシグナルとして働くsmall GTPaseであるRap1に着目した。すなわち、Rap1の活性化はインテグリンとそのリガンドの相互作用を強固にし、効率のよいシグナル伝達を惹起する。したがって、Rap1の活性化によって、より強固なvirological synapseが形成され、スムーズなHTLV-Iのcell to cell spreadが惹起されることが推測される。今回の結果ではHAM/TSP患者由来HTLV-I感染T細胞株のみに活性化されたRap1が検出された。したがって、HAM/TSP患者由来HTLV-I感染T細胞株ではHTLV-I感染細胞自身にはautocrine的に、相手側の非感染細胞にはparacrine的に作用するRap1活性化因子を発現している可能性がある。現在この因子について検討中である。

このように、HAM/TSPにおいては効率のよいHTLV-Iのcell to cell spreadが惹起され、そのことが、HAM/TSPの病態に強く関与している可能性がある。したがって、その生体内での感染伝播を阻害することは、HAM/TSPに対する治療戦略としてなり得る。今回、種々のpolysulfateを用いて検討を行った結果、ペントサン多硫酸に強いHTLV-I感染阻害効果があることが明らかにされた。

我々は以前に10名のHAM/TSP患者に対してヘパリン治療を施行し、3名で著効、4名で有効という治療効果を報告している(Nagasato K. et al., 1993)。その中で、本治療はHAM/TSP患者末梢血における最も特徴的な免疫学的異常の一つとされるspontaneous PBL proliferationを有意に低下させることを明

らかにしている。この spontaneous PBL proliferation の要因は未だ完全には解明されていないが、主は HTLV-I のプロウイルス量・発現量とそれらに対する HTLV-I 特異的細胞傷害性 T 細胞の活性によって規定されると報告されている。以前よりヘパリンの HTLV-I 感染阻害効果については、数多く報告されており、したがってヘパリン治療は末梢血 HTLV-I プロウイルス量を減少させていたことが推測される。今回の検討でペントサン多硫酸はヘパリンよりもさらに強い HTLV-I 感染阻害活性を示すことが明らかにされ、したがって、その臨床的效果はヘパリン治療を凌ぐ可能性が考えられる。ペントサン多硫酸は既に米国においては FDA(米国食品医薬品庁)の認可を受けた間質性膀胱炎の経口治療薬として市販されている薬剤であり、ヘパリンよりも安全性にも優れていると考えられ、HAM/TSP 患者における膀胱症状の一因をなしている間質性膀胱炎への治療も含めて、ペントサン多硫酸による治療は HAM/TSP に対する治療戦略の一つとなり得ることが期待される。

HAM/TSP は HTLV-I 感染症であり、HTLV-I を標的とする治療法の開発が強く望まれるところである。我々は最近、HTLV-I 感染細胞に対してアポトーシスを惹起するプロスルチアミン(アリナミン®)治療の HAM/TSP 患者に対する有効性を報告(Nishiura Y., et al., 2009;in press)しているが、ペントサン多硫酸による治療は、別の角度からの HTLV-I を標的とする治療法の開発を目指すものである。

E. 結論

HAM/TSP 患者 HTLV-I 感染細胞では small GTPase の一つである Rap1 の活性化を通して、効率のいい HTLV-I の cell to cell spread を惹起している可能性がある。また、polysulfate の一種であるペントサン多硫酸ナトリウムは HAM/TSP において HTLV-I を標的とする新規治療薬となり得る可能性がある。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Soyama A, Eguchi S, Takatsuki M, Ichikawa T, Moriuchi M, Moriuchi H, Nakamura T, Yamanouchi K, Hidaka M, Tokai H, Hamasaki K, Miyazaki K, Tajima Y, Kanematsu T. HTLV-I associated myelopathy following living-donor liver transplantation. Liver Transplant 14:647-650, 2008.

2) Nakamura H, Takagi Y, Kawakami A, Ida H, Nakamura T, Nakamura T, Eguchi K. HTLV-I infection results in resistance toward salivary gland destruction of Sjögren's syndrome. Clin Exp Rheumatol 26:653-655, 2008.

3) Fukushima N, Nakamura T, Nishiura Y, Ida H, Aramaki T, Eguchi K. HTLV-I production based on activation of integrin/ligand signaling in HTLV-I-infected T cell lines derived from HAM/TSP patients. Intervirology 51:123-129, 2008.

4) Nishiura Y, Nakamura T, Fukushima N, Nakamura H, Ida H, Aramaki T, Eguchi K. Disulfide-Mediated Apoptosis of HTLV-I-Infected Cells in Patients with HTLV-I-Associated Myelopathy / Tropical Spastic Paraparesis. Antivir Ther. 2009;in press.

5) Nakamura T, Nishiura Y, Eguchi K. Therapeutic strategies in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry 2009;in press.

6) 中村龍文. Triggerとしての感染症. (免疫性神経疾患Update.) 日本臨床 66:1056-1064, 2008.

7) 片峰 茂, 中村龍文. プリオン病. (ノーベル賞の医療への貢献.) 総合臨床 57:90-94, 2008.

2. 学会発表

1) 西浦義博, 中村龍文, 福田 卓, 佐藤克也, 辻野 彰, 本村政勝, 吉村俊朗, 中村英樹, 井田弘明, 江口勝美: HTLV-I 関連脊髄症患者に対するプロスルチアミン治療の臨床試験(第2報)およびその機序の解析. 第20回日本神経免疫学会. 2008年4月. 新潟.

2) 松崎敏男, 中村龍文, 納 光弘, 出雲周二 :
HAM患者の生活実態調査の報告と対策. 第49回
日本神経学会総会. 2008年5月. 横浜.

3) 中村龍文, 西浦義博, 江口勝美 : HAMに対す
る HTLV-I 感染細胞を標的とした新規治療法の
開発に向けて. ワークショップーHTLV-I 関連
脊髄症(HAM/TSP)-. 第12回日本神経ウイルス
研究会. 2008年7月. 屋久島.

H. 知的財産権の出願・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, 特開 2007-277223)。
2. 実用新案登録 : なし。
3. その他

HAM 脊髄活動性炎症部に浸潤している Tリンパ球・マクロファージ/ミクログリアには IL-17 が発現している

分担研究者：鹿児島大学医歯学総合研究科神経病学 ○梅原藤雄

研究協力者：鹿児島大学医歯学総合研究科神経病学・血管代謝病態解析*

白濱ゆう子、橋口 照人*

研究要旨

HAMおけるIL-17の役割を検討した。HAM 剖検脊髄標本を用いてIL-17の発現を免疫組織化学的に検討した。活動性炎症病変では血管周囲の炎症性細胞にIL-17が陽性であった。共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光二重染色でIL-17陽性細胞の性状について検討し、定量的検討を加えた。IL-17陽性細胞はTリンパ球(CD4, CD8), マクロファージ・ミクログリアであった。これらは、炎症の活動性が高いほど陽性率が高く、陽性細胞数も多かった。これらの結果は、IL-17がHAM脊髄炎症性病変の形成に重要な役割を果たしている可能性を示唆していた。

A. 研究目的

HAMは胸髄を中心に脊髄に広がる慢性炎症性疾患です。脊髄活動性炎症部位にはCD4⁺Tリンパ球、CD8⁺Tリンパ球、活性化マクロファージ・ミクログリアが浸潤している。一方、非活動性炎症部位では浸潤リンパ球数は減少していき、そこではCD4⁺リンパ球、活性化マクロファージ・ミクログリアは消退しCD8⁺T細胞が優位になっていく。これらの現象はHAM脊髄における炎症形成にはCD4⁺T細胞、CD8⁺Tリンパ球、マクロファージ・ミクログリアの3者が重要な役割を果たしていることを示唆している。現在までの研究で以下の点が明らかになっている。CD4リンパ球において

は、1)HTLV-I感染リンパ球が含まれており、2)そこではtaxの転写が起きていること、3)一部にはapoptosisが起きていること。CD8陽性リンパ球においては、1)TIA-1, perforinなどの細胞障害性蛋白陽性のCTLが含まれていること、2)一部にはHTLV-I特異的CTLが含まれていること。マクロファージ・ミクログリアは1)MRP-8, MRP-14などの活性化マーカーが陽性で、IL-1 β 、TNF- α などのproinflammatory cytokineを発現していることが報告されています。HAM脊髄病変の形成を考えるには、これらの3者の細胞のそれぞれの役割、相互関係を理解することが重要である。

従来CD4リンパ球にはIFN- γ を産

生するTh1, IL-4を産生するTh2の2つのサブタイプが存在し、両者はreciprocalに分化すると考えられており、そのTh1/Th2バランスの異常が自己免疫性疾患、アレルギーなどの発症に繋がると考えられていました。HAMにおいては、1)リンパ球内サイトカインバランスの検討ではIFN- γ /IL-4 \uparrow が上昇し、全体的にTh1優位であること、2)HAM患者末梢血中にはHTLV-1 Env and Tax 特異的 Th1-type CD4 $^+$ T cellsが高頻度に存在すること、3)HAM患者末梢血単核球のTh1-cytokine mRNAの発現が亢進していることが報告されており、Th1優位と推定されていました。CD8リンパ球においても同様にその産生サイトカインprofileによって、Tc1, Tc2の2つのサブタイプが存在すること、HAMではTc1優位であるとの報告があります。すなわち、HAMはTh1, Tc1優位の疾患であろうと考えられてきた。

2000年にInfante-Duarteらは、B. Burgdorferiでnaïve CD4陽性リンパ球を刺激するとIL-17を産生するサブセットに分化することを発見し、Th1, Th2のいずれとも異なることから、TH17と命名された。その後、Th17が種々の自己免疫性疾患、において重要な役割を果たしていることが相次いで報告された。中でも、中枢神経の自己免疫性炎症モデルであるExperimental autoimmune encephalomyelitis(EAE)はそれまでIFN- γ 産生を特徴とするTh1リンパ球がeffectorであると考えられていたが、ノックアウトマウスの研究から、実はIL-23

によって分化誘導されるTh17細胞こそがより重要であることが明らかになった。また、2004年にはDodonらは、HTLV-1 taxはIL-17をtransactivateすることが報告されており、HTLV-1関連疾患における役割も注目されるようになった。本研究では、HAMにおけるIL-17の役割を検討する。

B. 研究対象・方法

HAM脊髄病変におけるIL-17の発現：HAM剖検脊髄標本を用いて、IL-17の発現を免疫組織学的に検討した。用いた標本は過去に報告した標本を含む5症例である。抗IL-17抗体を用いてABC法にて染色した。脊髄横断面内のIL-17陽性細胞総数は光学顕微鏡下で計測した。さらにIL-17陽性細胞の性状を確認するために、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、IL-17及び各細胞マーカーとの蛍光二重染色(CD3, CD4, CD8, CD45RO, TIA-1, CD68)を行い、定量的評価を加えた。

(倫理面への配慮)

個人を特定する情報はなく、倫理的問題は無い。

C. 研究結果

HAM活動性炎症部位には多数のIL-17陽性細胞を脊髄内の血管周囲、脊髄実質に認めた。胸髄横断面に存在するIL-17陽性細胞数を顕微鏡下で計測した結果を示します。罹病期間2.5年で炎症細胞浸潤の最も高度な例では、IL-17陽性細胞数が多く、4.5年の例でもやや

減少しますが、罹病期間 8 年以上の症例 3-5 ではごく僅かに認めるのみであった。そこで、症例 1, 2 における IL-17 陽性細胞の性状を確認するために、二重染色を行いました。CD3 との二重染色を示します。IL-17 を AlexaFluor 488 で green に、CD3 を、AlexaFluor 594 で赤に発色し、blue の DAPI で核染色した。IL-17 陽性細胞を示します。IL-17 は cytoplasm に発現しています。これらは CD3 陽性で Tリンパ球であることを示す。活性化 T 細胞マーカーである抗 CD45RO 抗体 (UCHL-1) との二重染色では、IL-17 陽性細胞が血管周囲に浸潤している。同部位の UCHL-1 染色では、血管周囲には IL-17 陽性 CD45RO 陽性細胞と、IL-17 陰性 CD45RO 陽性細胞が存在している。CD4 との二重染色では、IL-17 陽性細胞を示します。DAPI image を加えますと、IL-17 陽性細胞の周辺には陰性細胞も混在しており、IL-17 は核周囲の cytoplasm に局在している。同部位の CD4 陽性細胞で、これらは IL-17 陽性である。血管周囲に多数の IL-17 陽性細胞が浸潤している。Merge image では、IL-17 陽性細胞の一部は CD8 が陽性である。この部位を強拡大してみますと、CD8 が細胞の最外層に位置し、その内部の cytoplasm に IL-17 が陽性であることを示しています。さらにこれらの CD8 陽性 IL-17 陽性細胞が細胞障害性 T 細胞であるかどうかを確認するために、cytotoxic granular protein の一つである TIA-1 との二重染色を行った。TIA-1

は以前報告したように、細胞質内に顆粒状に存在し、HAM 脊髄活動性炎症部位に浸潤している CTL に発現している。これは TIA-1 と IL-17 の二重染色を示す。TIA-1 は細胞質内に顆粒状に発現している。この細胞は IL-17 陽性である。IL-17 陽性 CTL が存在することを示している。次に

macrophage/microglia marker である CD68 との二重染色を示す。IL-17 が突起を有する microglia 様細胞に陽性である。同じ部位での CD68 染色では、この細胞、この細胞が陽性で、CD68 陽性 macrophage/microglia に IL-17 が陽性である。

以上の結果について、特に IL-17 陽性細胞の多かった症例 1, 2 において、定量的に評価した。UCHL-1, CD8, CD68 陽性細胞フラクションにおける IL-17 陽性率の平均値を示す。活性化 T 細胞マーカーである UCHL-1 では、症例 1 で 80%, 2 で 60% 程度で陽性、マクロファージマーカーである CD68 では、症例 1 で 30% 程度、症例 2 では 20% 程度で陽性で、炎症の活動性が高いほど、リンパ球、マクロファージにおける IL-17 陽性率が高いことを示している。ちなみに、Tzartos らの多発性硬化症 acute lesion では、浸潤 T 細胞の 79% で IL-17 が陽性であったとする報告と比較してみると、比較的類似した値であった。また、IL-17 陽性細胞数の中での各細胞マーカーの陽性率を見ても、症例 1, 2 とともに T 細胞が約 60% 前後、CD68 陽性マクロファージ・ミクログリアが

20-35%前後で、この両者でIL-17陽性細胞のほぼ90%程度を占めることになる。さらに、この比率を先に示した脊髄断面におけるIL-17陽性細胞数に、掛け合わせ、各マーカー陽性IL-17陽性細胞数を推定してみると、炎症の活動性が高い病変ほど、多くのIL-1陽性活性化Tリンパ球、マクロファージが浸潤していることを示している。CD8陽性IL-17陽性細胞数が、UCHL-1の半数程度であることから、残りはCD4陽性IL-17陽性細胞、いわゆるTh17細胞である可能性が示唆された。

D. 考察

今回、初めてHAM脊髄病変におけるIL-17の発現を報告した。IL-17がEA発症に重要であることが明らかになっていますが、多発性硬化症においても、MS活動性病変の血管周囲リンパ球・astrocyte・oligodendrocyteにIL-17が発現していること。IL-17⁺Tリンパ球数は、活動性病変で非活動性病変より有意に増加していること、CD4⁺、CD8⁺T cellの両方がIL-17陽性であることが報告されている。今回報告したHAMの結果と比較しますと、MSではglia細胞にもIL-17が発現し、一方macrophageでは陰性であった点が異なりますが、活動性病変の血管周囲CD4、CD8リンパ球にIL-17が発現し、その程度は炎症の活動性に関連しているという点は共通であった。

HTLV-IとIL-17の関連に関して、HTLV-I infected T cell lines (HUT-102)はIL-17を発現している。TaxとIL-17の発現は関連している。HTLV-I TaxはIL-17 mRNA

の発現をtransactivateする。HAM患者末梢血リンパ球のIL-17 mRNAの発現は、非感染者より亢進していることが報告されています。さらに、関節炎を発症するHTLV-I transgenic mouse modelでは、IL-17KOマウスを用いると関節炎が抑制されることも報告されています。

E. 結論

IL-17はHAM発症機序において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。IL-17を標的とする治療法はHAMにおいても有効である可能性がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 梅原藤雄, HTLV-Iに伴う神経障害“薬局”2008年3月増刊号 病氣と薬パーフェクトガイド 2008 pp805-806
2. 梅原藤雄、有村公良 『内科』101巻6号(2008年6月増大号) 特集：内科必携画像診断 ---Imaging Revolution HTLV-Iに伴う神経障害：HAM pp1509-1511
3. Matsuura E, Umehara F*, Nose H, Higuchi I, Matsuoka E, Izumi K, Kubota R, Saito M, Izumo S, Arimura K, Osame M. Inclusion body myositis associated with human T-lymphotropic virus-type I infection: eleven patients from an endemic area in Japan. J

Neuropathol Exp Neurol

2008;67:41-49

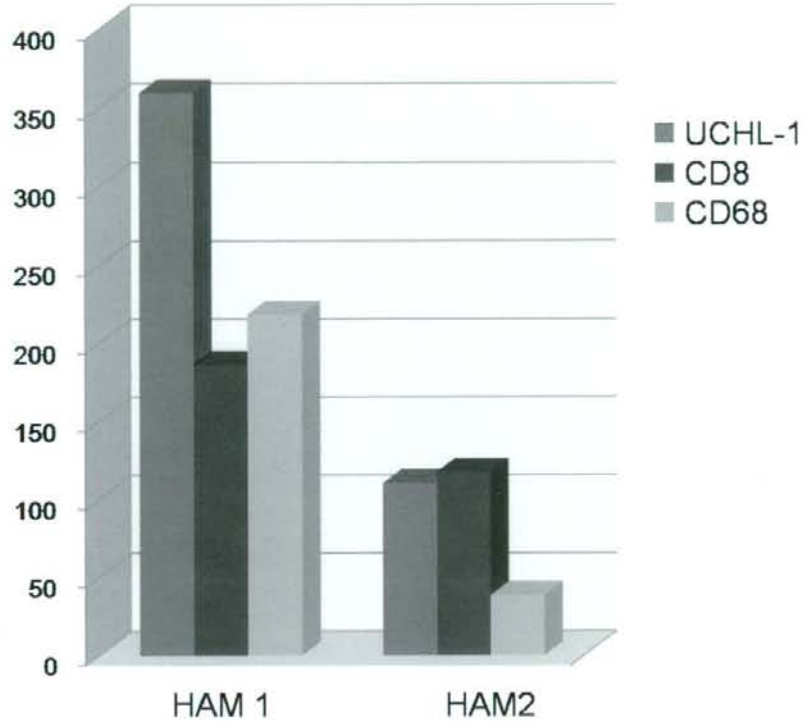
4. Umehara, F*, Hagiwara, T., Yoshimura, M., Higashi, K., Arimura, K. Enlarged, multifocal upper limb neuropathy with HTLV-I associated myelopathy in a patient with chronic adult T-cell leukemia. J Neurol Sci 2008;266:167-170

2. 学会発表:なし

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

The number of IL-17⁺ cells in the spinal cord section



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

HAM 患者末梢血中の HTLV-I 感染細胞表面抗原の解析

研究分担者 久保田龍二 鹿児島大学難治ウイルス病態制御研究センター
共同研究者 有村公良 鹿児島大学医歯学総合研究科神経病学講座

研究要旨: HTLV-I ウイルス量が高いことが HAM 発症の最大のリスクである。生体内の HTLV-I 感染細胞の解析は HAM の病態解明に重要と考えられるが、末梢血中の感染リンパ球を同定することはウイルス蛋白の発現が低く困難であった。近年数時間培養後ウイルス蛋白が発現し、感染細胞を同定することが可能となった。今回我々は HAM 患者末梢血単核球 (PBMC) 中の HTLV-I 感染細胞を抗 HTLV-I Tax 抗体を用いて同定し、生体内感染細胞の表面抗原の同定により、感染細胞の動態、感染様式の解析に資することを目的として本研究を行った。感染細胞の種々の表面抗原の同定により、生体内での HTLV-I 感染細胞は高度な分化段階の成熟 T リンパ球と考えられた。また、ケモカインの CCR7 陰性 CCR4 陽性より皮膚などの組織移行性の高い細胞であることが分かった。HAM 患者末梢血中 HTLV-I 感染細胞のほとんどが CD4+CD45RA-CD45RO+CCR7-CCR4+ であり、CCR4 の検出感度をあげれば感染細胞同定の有効な表面抗原の組み合わせとなる可能性がある。

A. 研究目的

HTLV-I 感染細胞における生体でのウイルスタンパクの発現はごく少量であるため、感染細胞の同定は困難であった。近年、末梢血単核球(PBMC)を数時間培養することによりウイルスタンパクの発現が認められ、感染細胞を同定することが可能となった。生体内感染細胞の表面抗原の同定によ

り、感染細胞の動態、感染様式の解析に資することを目的とした。

B. 研究方法

HAM 患者 10 例の PBMC を 10 時間培養後、細胞を回収した。表面抗原に対する各種抗体 (CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD25、CD26、CD27、CD28、CD45RA、CD45RO、

CD158k/KIR3DL2、CCR4、CCR7、tumor suppressor in lung cancer 1 (TSLC1)、TCR、HLA-ABC および DR) で染色した。固定後、HTLV-I Tax および FOXP3 に対する抗体で細胞内染色し、フローサイトメトリーで解析した。HTLV-I ウイルス量は定量的 PCR で測定した。

(倫理面への配慮)

臨床検体の提供に関しては、文書によるインフォームドコンセントにて許可を頂いた。検体は非連結化して使用した。本研究は鹿児島大学倫理委員会の承諾を得て行った。

C. 研究結果

- 1) Tax 陽性細胞の検出時、細胞内蛋白をトラップする brefeldin A の培養液中添加で陽性率が向上した。検出には、培養後 8-10 時間が指摘時間と考えられた。
- 2) PBMC 中の Tax 陽性細胞比率は 3.06%で、その 84%が CD4 陽性細胞であり、0.32%が CD8 陽性細胞であった。CD4 および CD8 陽性細胞中の Tax 陽性細胞の割合はそれぞれ 5.19%、1.30%であり CD8 陽性細胞にも感染していた。
- 3) Tax 陽性 CD4 細胞の 98%は CD45RA-CCR7-のエフェクター・メモリー細胞であった。Tax 陰性 CD4 細胞中ならびに Tax 陽性 CD4 細胞

中の CD28 陽性細胞は、ほぼ同じ 84%であったが、CD27 陰性細胞は 49%から 84%に増加していた。

- 4) ケモカインの検討では、Tax 陽性 CD4 細胞および Tax 陰性 CD4 細胞では CCR7 陰性細胞はそれぞれ 98%、72%であり、CCR4 陽性細胞はそれぞれ 41%、20%であった。染色パターンからほとんどの Tax 陽性細胞が CCR4 陽性側にシフトしており、検出感度をあげればほとんどの細胞が CCR4 陽性となる可能性がある。
- 5) CD4 陽性細胞中の CD25 陽性細胞は 5.2%で FOXP3 陽性細胞は 1.3%であった。CD4+CD25+FOXP3+制御性 T 細胞の 19%が HTLV-I 感染細胞であった。

D. 考察

HTLV-I 感染細胞は、ほぼ 100% CD2, CD4, CD5, CCR4, CD45RO 陽性であった。部分的に CD25, FoxP3, TSLC1 を発現していた。また、ほぼ 100% CD45RA, CCR7, CD26, CD158k 陰性であった。副刺激分子である CD27 の発現は低く、CD28 は高発現していた。これらのことより、生体内での HTLV-I 感染細胞は、高度な分化段階の成熟 T リンパ球と考えられた。また、ケモカインの CCR7 陰性 CCR4 陽性より皮膚などの組織移行性の高い