

細胞であることが分かった。

## E. 結論

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。感染細胞の一部は CD25 や FOXP3 を発現しているが特異マーカーとはならない。

## 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): 459-63, 2008

### 2. 学会発表

- 1) Kubota R: Impact of degenerate TCR recognition of HTLV-I-specific CTL on the viral load in patients with HAM/TSP. *Summer Seminar in Neuroimmunology Branch, NIH.* Bethesda, USA, August 2008.
- 2) 久保田龍二: HTLV-I 関連脊髄症における CTL の動態。第 29 回日本炎症・再生医学会。2008 年 7 月 東京。
- 3) 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。
- 4) 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
- 5) 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. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

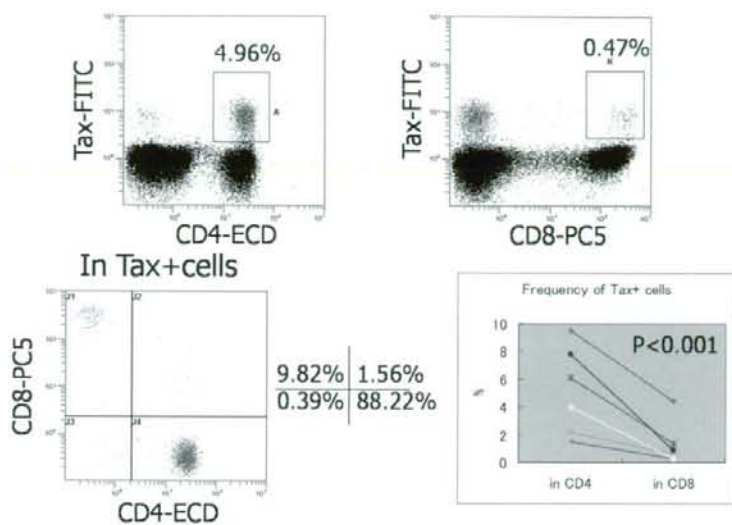


図1. HAM患者末梢血中のHTLV-I感染細胞の検出。感染細胞のほとんどはCD4陽性細胞であるが、一部CD8陽性細胞にも感染していた。

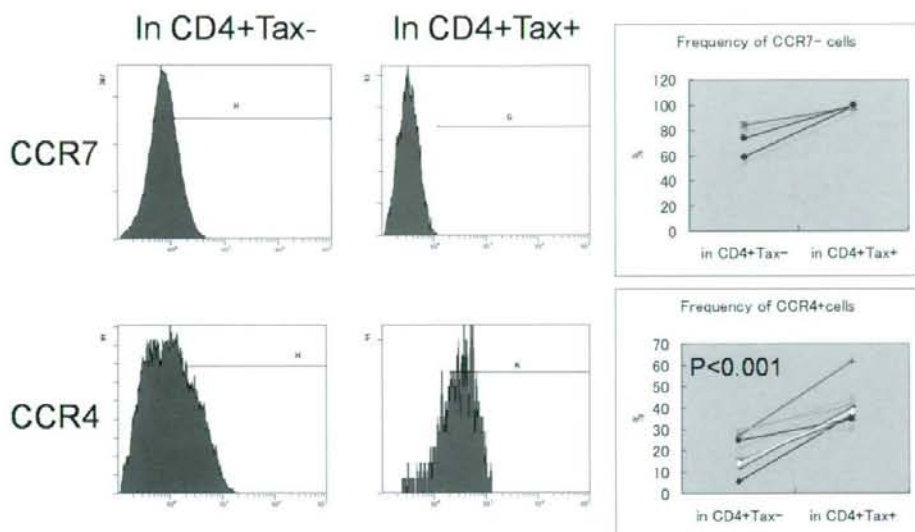


図2. HTLV-I 非感染 CD4 陽性細胞中の 20%CCR4 陽性であり、感染 CD4 陽性細胞中の CCR4 陽性率は 41%であった。感染 CD4 陽性細胞群の全てが CCR4 陽性側にシフトしており、検出感度を上げれば 100%陽性となる可能性がある。

HTLV-1 感染 T 細胞の機能異常をもたらす恒常的な Bcl-3 高発現機構の  
解析とその制御法の検討

分担研究者 齊藤峰輝 琉球大学大学院医学研究科 准教授

研究要旨: HTLV-1 Tax 蛋白は、細胞機能発現に重要な細胞性因子との相互作用により異常な遺伝子発現を誘導することで、T 細胞の腫瘍化や機能異常を引き起こす。我々は HTLV-1 関連疾患の病態を制御可能な治療標的分子の候補として、Tax により発現誘導される細胞遺伝子群をマイクロアレイ解析し、NF $\kappa$ B の活性を制御することで T 細胞腫瘍化のみならず自己免疫疾患における T 細胞機能異常にも関与することが報告されている B cell leukemia-3 (Bcl-3) が HTLV-1 Tax により発現誘導されることを見いだした。HTLV-1 感染 T 細胞では、Bcl-3 遺伝子が恒常的に高発現しており、これは Tax による転写活性化機構のみならず、PI3 キナーゼ-AKT 経路の活性化による蛋白分解抑制機構によっても維持されていた。また、Tax は HTLV-1 感染細胞内で Bcl-3 蛋白と直接結合していた。shRNA により Bcl-3 発現を抑制した HTLV-1 感染 T 細胞の増殖効率は、親株及びコントロール細胞株と比較して 50%以下に低下した。Bcl-3 を治療標的分子とすることで、ATL 及び HAM における異常 T 細胞増殖と生体内感染拡大を抑制できる可能性が示された。

A. 研究目的

HTLV-1 Tax 蛋白は、NF- $\kappa$ B 等の細胞機能発現に重要な因子との相互作用により、異常な細胞遺伝子発現を誘導することで、T 細胞の腫瘍化や機能異常を引き起こす。このことから、Tax は HTLV-1 感染による ATL 及び HAM 発症に重要な役割を果たすと考えられている。我々は HTLV-1 関連疾患病態を制御可能な治療標的分子を探索するために、Tax により発現誘導される細胞遺伝子群をマイクロアレイにより解析した。その結果、B cell leukemia-3 (Bcl-3)が Tax により発現誘導されることを見出した。Bcl-3 は多くの T 細胞系腫瘍で高発現しており、ノックアウトマウスを用いた解析から、その高発現は T 細胞機能異常をもたらす、自己免疫疾患の発症にも関与することが報告されている。よって、Bcl-3 は ATL における T 細胞腫瘍化及び HAM における異常 T 細胞による炎症反応形成を制御する治療標的分子となりうる事が期待される。本研究では、①Bcl-3 発現抑制による、HTLV-1 感染 T 細胞の増殖抑

制効果 ②HTLV-1 感染による Bcl-3 の恒常的な高発現維持の分子メカニズム ③Tax 蛋白と Bcl-3 蛋白間の結合の有無について解析した。

B. 研究方法

HTLV-1 感染及び非感染 T 細胞株における Bcl-3 mRNA 及び蛋白発現量を比較するために、RT-PCR 及び Western Blotting (WB) を行った。Bcl-3 発現抑制による細胞増殖抑制効果を検討するために、レンチウイルスによる short hairpin RNA (shRNA) 発現により、Bcl-3 発現を抑制した HTLV-1 感染 T 細胞株 HUT102 と、ネガティブコントロール shRNA を発現する細胞株を作製し、増殖効率を検討した。フォスファチジルイノシトール三リン酸リ酸化酵素 (PI3K)-Akt シグナル伝達経路の活性化が Bcl-3 蛋白分解を抑制することが報告されているため、HTLV-1 感染細胞株においてこの経路が活性化されているか否かを検討した。すなわち、HTLV-1 感染 T 細胞株 MT-2 を用いて、蛋白合成阻害剤シクロヘキシミド (CHX) 単独処理細胞と、CHX 及び PI3K-Akt 経路阻害剤



LY294002 の両薬剤で処理した細胞内における Bcl-3 蛋白量を WB で比較した。また、Tax 発現の有無が Bcl-3 蛋白分解抑制系に影響するかどうかを検討するため、Tax を発現しない MT-1 細胞株と Tax を発現する MT-4 細胞株とを、Bcl-3 蛋白分解を促進するキナーゼ (GSK-3 $\alpha$ , $\beta$ ) に対する阻害剤である塩化リチウム (LiCl) で処理後、経時的な Bcl-3 蛋白発現量の変化を、それぞれの細胞株において比較した。さらに、293T 細胞と HTLV-1 感染 T 細胞株 HUT102, MT-2, SLB-1 における Tax-Bcl-3 蛋白間結合について、免疫沈降法を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

患者検体を用いておらず、特に必要としない。

### C. 研究結果

Bcl-3 は HTLV-1 感染 T 細胞株全てにおいて、非感染 T 細胞株と比較して mRNA・蛋白ともに高発現していた (図 1)。shRNA により Bcl-3 発現を抑制した HUT102 の細胞増殖効率は、親株及びコントロール shRNA を発現した細胞株と比較して 50%以下に低下した (図 2)。LY294002 により PI3K-Akt シグナル伝達経路を阻害した MT-2 では、コントロールと比較して Bcl-3 蛋白量が有意に低下した (図 3A)。LiCl 処理により、MT-1 における Bcl-3 蛋白量は経時的に増加したが、MT-2 ではほとんど差が認められなかった (図 3B)。また、293T 細胞及び HTLV-1 感染 T 細胞株において Tax-Bcl-3 蛋白間結合を認めた (図 4)。

### D. 考察

Bcl-3は、HTLV-1感染T細胞株全てにおいて非感染T細胞株と比較してmRNA・蛋白ともに高発現しており、JPX9細胞を用いたマイクロアレイ解析でHTLV-1 Taxにより発現誘導されたことから、Taxによって恒常的に転写活性化されていることが考えられた。事実、最近の報告で、Bcl-3遺伝子がNF- $\kappa$ B経路を介してTaxにより転写活性化されることが証明されている (Kim YM et al. J Virol 2008 Dec;82(23):11939-47.)。今回、shRNA による Bcl-3 発現抑制により HTLV-1 感染 T 細胞の増

殖を抑えることができたことから、Bcl-3を治療標的分子とすることで、ATL及びHAMにおける異常T細胞増殖を抑制できる可能性が示された。また、Bcl-3の高発現はTaxによる転写活性化のみならず、PI3キナーゼ-AKT経路の活性化による蛋白分解抑制機構によっても維持されていること、TaxがBcl-3蛋白と直接結合することが明らかになり、Tax-Bcl-3蛋白間結合の阻害、PI3キナーゼ-AKT経路の抑制など、Bcl-3過剰発現を抑制するための複数のアプローチポイントを提示することができた。

### E. 結論

Bcl-3蛋白の高発現をshRNAで抑制することで、HTLV-1感染T細胞の異常増殖を制御可能であることを示した。また、恒常的なPI3K-Akt経路の活性化を阻害することによっても、Bcl-3蛋白の恒常的な高発現を抑制できることを示した。これらの方法は、将来ATL及びHAMにおける異常T細胞の増殖を抑制し、生体内感染拡大を抑制する有望な治療法となりうる可能性がある。今後は、Tax-Bcl-3蛋白間結合の異常T細胞増殖及び恒常的Bcl-3蛋白分解抑制における意義についても検討する予定である。

### F. 健康危険情報

特になし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

[1] Matsuura E, et al. Inclusion body myositis with human T-lymphotropic virus-type 1 infection: eleven patients from endemic area in Japan.

**J Neuropathol Exp Neurol. 2008. 67(1): 41-9.**

[2] Saito M, et al. Increased frequency of CD4+T cells expressing fractalkine receptor CX3CR1 in patients with HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP), but its AIDS susceptible polymorphisms are not associated with the disease.

**J Neurol Sci. 2008 266(1-2): 13-19.**

[3] Yukitake M, et al. Significantly increased

antibody response to heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients but not in patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurovirol.* 2008 14(2): 130-5.

[4] Sabouri AH, et al. Impaired function of human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) specific CD8+ T cells in HTLV-1-associated neurological disease.

*Blood.* 2008 112(6):2411-20.

[5] Saito M, et al. In vivo expression of the HBZ gene of HTLV-1 correlates with proviral load, inflammatory markers and disease severity in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP).

*Retrovirology.* 2009 6(1):19. [Epub ahead of print].

## 2. 学会発表

[1] [第 20 回日本神経免疫学会学術集会 2008, 4. 新潟]

齊藤峰輝、斎藤孔介、有村公良、大原義朗:  
HTLV-1 マイナス鎖にコードされる HBZ 遺伝子の HAM 患者末梢血中における高発現

[2] [第 49 回日本神経学会総会 2008, 5. 東京]

齊藤峰輝、斎藤孔介、有村公良、大原義朗:  
HTLV-1 マイナス鎖にコードされる新規遺伝子 HBZ の高発現と HAM/TSP

[3] [第 97 回日本病理学会総会 2008, 5. 金沢]

齊藤峰輝: シンポジウムー感染性脳症における分子病理学的基盤ー HTLV-1 関連脊髄症 (HAM/TSP) の病態と病因

[4] [第 29 回日本炎症・再生医学会 2008, 7. 東京]

齊藤峰輝: シンポジウムーレトロウイルスと炎症・免疫

HTLV-1 関連脊髄症の免疫遺伝学

[5] [第 12 回日本神経ウイルス研究会 2008, 7. 屋久島]

齊藤峰輝、斎藤孔良、谷浦直子、大桑孝子、大原義朗:

HTLV-1 マイナス鎖にコードされる新規遺伝子 HBZ の高発現と HAM/TSP

[6] [第 1 回 HTLV-1 研究会・合同班会議 2008, 8. 東京]

齊藤峰輝、松崎敏男、佐藤賢文、安永純一郎、斎藤孔良、松岡雅雄、大原義朗: HTLV-1 マイナス鎖にコードされる HBZ の高発現と HAM/TSP

[7] [第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008, 10. 岡山]

齊藤峰輝、佐藤賢文、斎藤孔良、松岡雅雄、大原義朗: HTLV-1 マイナス鎖にコードされる HBZ の高発現と HAM/TSP

H. 知的所有権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

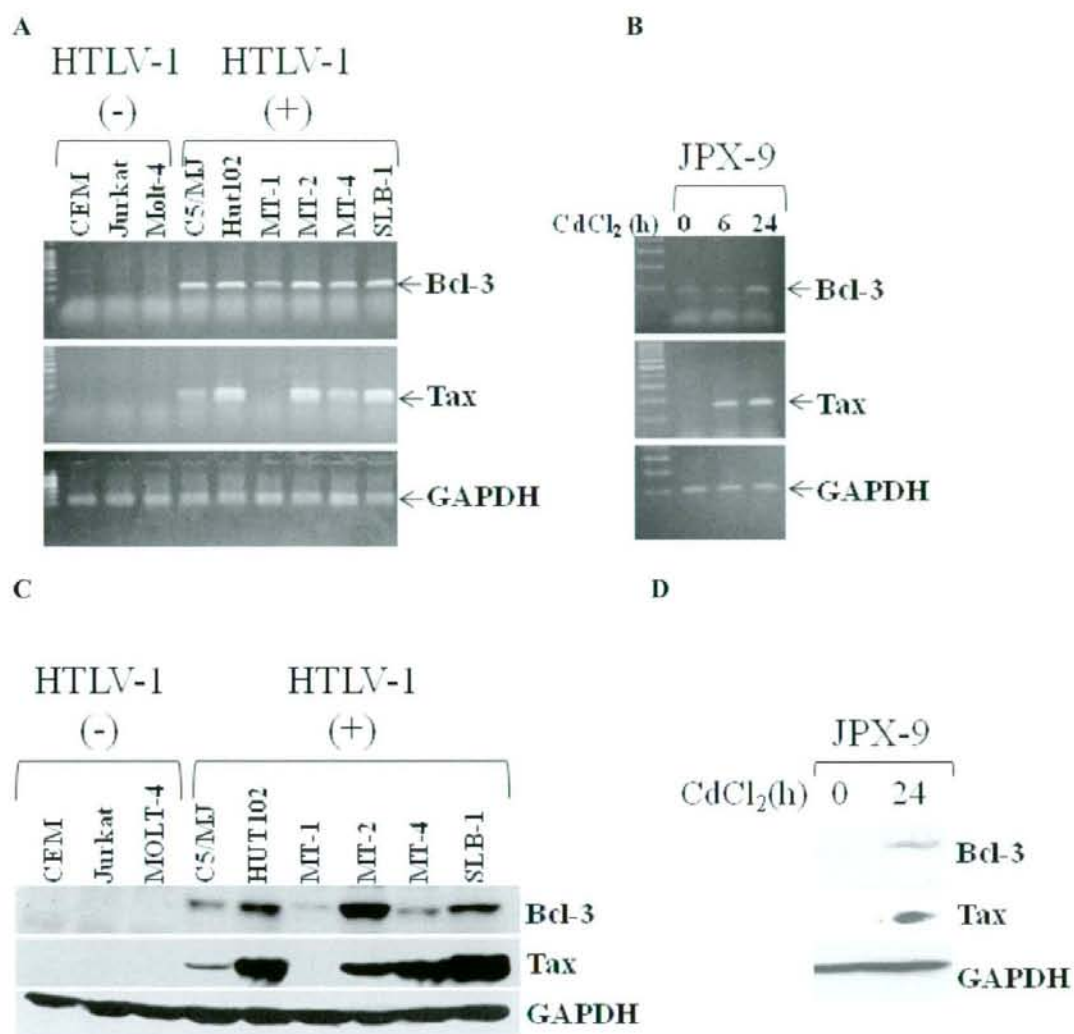
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図 1: HTLV-1 感染 T 細胞株における Bcl-3 の高発現



A: Bcl-3 mRNA は HTLV-1 感染 T 細胞株において高発現している。

B: CdCl<sub>2</sub> 添加により Tax を誘導可能な JPX-9 細胞株で Tax を発現誘導すると Bcl-3 mRNA が発現する。

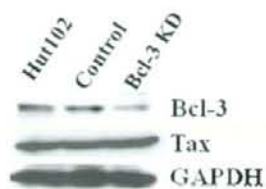
C: Bcl-3 蛋白も HTLV-1 感染 T 細胞株において高発現している。

D: JPX-9 細胞株で Tax を発現誘導すると Bcl-3 蛋白が発現する。

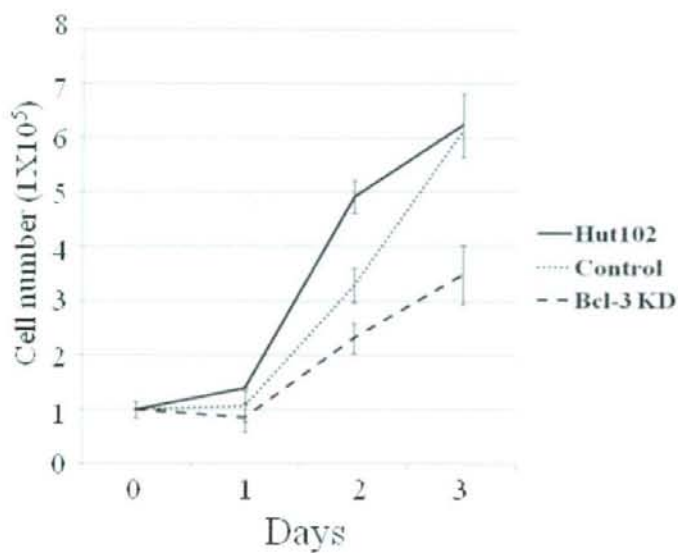


図 2: Bcl-3 を発現抑制すると HTLV-1 感染 T 細胞株 HUT102 の増殖速度は抑制される

A



B

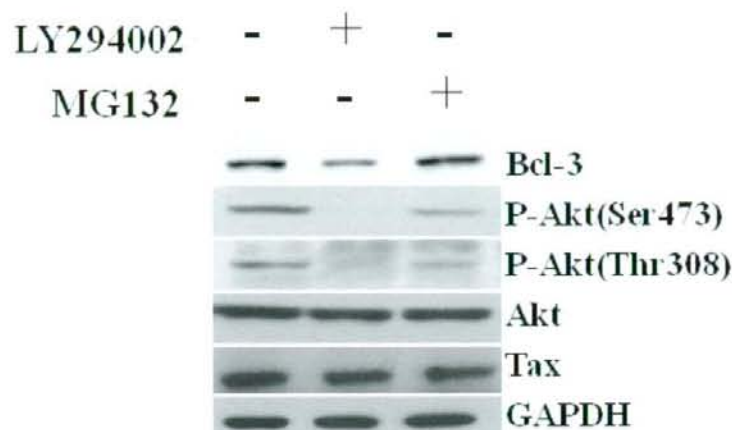


A: shRNA により Bcl-3 発現を抑制した (抗 Bcl-3 抗体による Western Blot)。

B: shRNA により Bcl-3 発現を抑制した HUT102 の細胞増殖効率、親株及びコントロール shRNA 発現細胞株と比較して 50%以下に低下した。

図 3: HTLV-1 感染 T 細胞株における PI3K-Akt 経路の恒常的活性化による Bcl-3 蛋白分解抑制

A



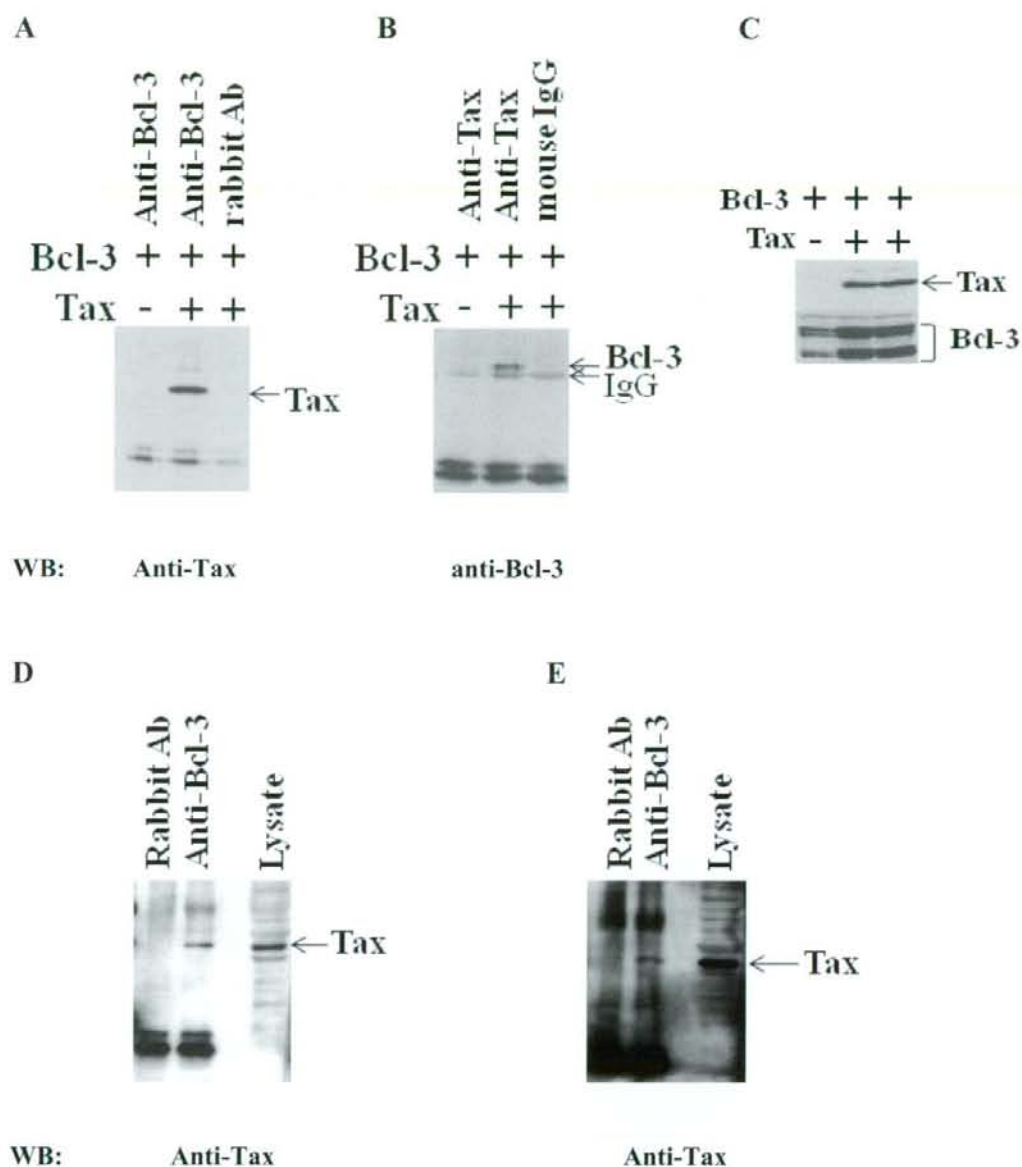
B



A: PI3K-Akt 経路活性化による Bcl-3 蛋白分解抑制の有無を検討するため、MT-2 に CHX 単独、CHX と PI3K 阻害剤 LY294002、CHX と 20S プロテアソーム阻害剤 MG132 をそれぞれ添加し、6 時間経過後の Bcl-3 蛋白発現量を比較した。CHX と LY294002 で処理した細胞では、CHX 単独処理の細胞と比較して、Bcl-3 発現レベルが低下した。その時、Bcl-3 のリン酸化部位の脱リン酸化が起こっていた。従って、Bcl-3 蛋白分解抑制に PI3K-Akt 経路が関与していることが示唆された。

B: HTLV-1 感染 T 細胞株における Tax 発現の有無により、Bcl-3 蛋白分解抑制レベルに差が見られるか否かを検討するために、塩化リチウム(LiCl)により Bcl-3 蛋白分解を促進する分子である GSK-3 を直接阻害することで Bcl-3 蛋白分解を抑制し、Bcl-3 蛋白蓄積レベルを比較した。LiCl 処理によって、Tax を発現していない MT-1 細胞では経時的に Bcl-3 蛋白が蓄積されたが、Tax を発現している MT-2 細胞ではほとんど差はなく、MT-2 細胞では PI3K-Akt 経路が Tax により恒常的に活性化されているため、すでに Bcl-3 蛋白が分解抑制されており、LiCl の効果が認められないことが示唆された。

図 4: HTLV-1 感染 T 細胞株における Tax と Bcl-3 との結合



Tax と Bcl-3 が直接結合するか否かを、免疫沈降で検討した。293T 細胞に Tax 及び Bcl-3 を共発現し、抗 Bcl-3 抗体による免疫沈降で Tax が検出されるか否か、抗 Tax 抗体による免疫沈降で Bcl-3 が検出できるか否かを検討した。Tax 及び Bcl-3 を共発現し、抗 Bcl-3 (A) 及び抗 Tax 抗体 (B) で免疫沈降したときのみ、Tax (A) 及び Bcl-3 (B) を検出できた (C は、input した蛋白を示す)。

また、HTLV-1 感染 T 細胞株 MT2 (D) および HUT102 (E) において、抗 Bcl-3 抗体による免疫沈降で Tax 蛋白が共沈した。よって、Bcl-3 と Tax 蛋白が HTLV-1 感染 T 細胞内で直接結合することが明らかになった。

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表



## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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)	459-63	2008
Shimizu A, Tamura A, Abe M, Motegi S, Nagai Y, Ishikawa O, Nakatani Y, Yamamoto Y, Uezato H, Hoshino H.	Detection of human papillomavirus type 56 in Bowen's disease involving the nail matrix.	Br. J. Dermatol.	158	1273-1279	2008
Shimizu, N., A. Tanaka, A. Oue, T. Mori, C. Apichartpiyakul and H. Hoshino.	A short amino acid sequence containing tyrosine in the N-terminal region of G protein-coupled receptors is critical for their potential use as coreceptors for human and simian immunodeficiency viruses.	J. Gen. Virol.	89	3126-3136	2008
Shimizu, N., A. Tanaka, T. Mori, T. Ohtsuki, A. Hoque, A. Jinno-Oue, C. Apichartpiyakul, S. Kusagawa, Y. Takebe, and H. Hoshino.	A formylpeptide receptor, FPRL1, acts as an efficient coreceptor for primary isolates of human immunodeficiency virus.	Retrovirology	25	5-52	2008
Xiao, P., O. Usami, Y. Suzuki, H. Ling, N. Shimizu, H. Hoshino, M. Zhuang, Y. Ashino, H. Gu, T. Hattori.	Characterization of a CD4-independent clinical HIV-1 that can efficiently infect human hepatocytes through CXCR4.	AIDS	22	1749-1757	2008

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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
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.	Intervirolgy	51	123-129	2008
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.
Nakamura H, Kawakami A, Hayashi T, Nakamura T, Iwamoto N, Yamasaki S, Ida H, Eguchi K.	Low prevalence of ectopic germinal center formation in patients with HTLV-I-associated Sjögren's syndrome.	Rheumatology			2009; in press.
Nakamura T, Nishiura Y, Eguchi K.	Disulfide-Mediated Apoptosis of HTLV-I-Infected Cells in Patients with HTLV-I-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. (HAM/TSP).	Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry			2009; in press.
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
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
梅原藤雄	HTLV-Iに伴う神経障害	薬局	3	805-806	2008
梅原藤雄, 有村公良	HTLV-1に伴う神経障害 : HAM	内科	101 (6) 6	1509-1511	2008

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	67	41-49	2008
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	266	167-170	2008
Saito M, Usuku K, Arimura K, Izumo S, Osame M, Ohara Y.	Increased frequency of CD4+T cells expressing fractalkine receptor CX3CR1 in patients with HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP), but its AIDS susceptible polymorphisms are not associated with the disease.	J Neurol Sci.	266 (1-2)	13-19	2008
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 HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis	J Neurovirol.	14 (2)	130-5	2008
Sabouri AH, Usuku K, Hayashi D, Izumo S, Ohara Y, Osame M, Saito M.	Impaired function of human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) specific CD8+ T cells in HTLV-1-associated neurological disease.	Blood.	112 (6)	2411-20	2008
Saito M, Matsuzaki T, Satou Y, Yasunaga JI, Saito K, Arimura K, Matsuoka M, Ohara Y.	In vivo expression of the HBZ gene of HTLV-1 correlates with proviral load, inflammatory markers and disease severity in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP).	Retrovirology.	6(1)	19	2009

