

抗 VGKC 抗体陽性辺縁系脳炎の臨床像～傍腫瘍性と自己免疫性との比較検討～

分担研究者 梅原藤雄¹⁾

共同研究者 渡邊 修¹⁾、有村公良¹⁾

研究要旨

非ヘルペス性辺縁系脳炎(NHLE)症例から抗 VGKC 抗体>400 pM の高力価を呈する 18 症例を抗 VGKC 抗体陽性辺縁系脳炎 (VGKC-LE) として抽出し、自己免疫性と傍腫瘍性の二群に分けて臨床像について解析した。抗 VGKC 抗体の測定は、¹²⁵I-alpha-dendrotoxin を用いた RIA 法でおこなった。9 例の傍腫瘍群の腫瘍の内訳は、7 例が胸腺腫で、その他、悪性リンパ腫と肺癌が各 1 例ずつであった。男女比、平均年齢に差異は認められなかった。発症から入院までの期間は、傍腫瘍群で短い傾向だった。経過中の中核症状に差はなかったが、傍腫瘍群の半数例で初発症状として四肢のじんじん感が認められた。抗 VGKC 抗体価については自己免疫群で若干高い傾向にあった。傍腫瘍群において再燃・再燃症例および治療抵抗性を呈する症例が認められた。病初期、自己免疫性と考えられる VGKC-LE 症例でも繰り返し腫瘍のサーベイを行う必要がある。

研究目的

VGKC-LE は、①亜急性の経過をとる、②壮年期発症、③高頻度に低ナトリウム血症を合併、④髄液所見は、通常正常、⑤自己免疫性の側面と傍腫瘍性の側面を併せ持つなどの特徴を有し、免疫療法によく反応する、予後良好の疾患であることが明らかになった。しかしながら、VGKC-LE は、非ヘルペス性辺縁系脳炎の中で、自己免疫性にも、傍腫瘍性にも分類されており、混乱が生じている。今回、VGKC-LE を自己免疫性と傍腫瘍性群の二群に分けて、両群間の異同を明らかにした。

研究対象および方法

対象は、NHLE の臨床診断で、平成 17-20 年に当科に血清が送付された 213 症例。定法の¹²⁵I-alpha-dendrotoxin を用いた免疫沈降により抗 VGKC 抗体を測定して、>400 pM の高力

価を呈する 18 例を抽出した。便宜的に観察期間 (最長 4 年、最短 6 ヶ月) 内に腫瘍の存在を指摘できなかった症例を自己免疫群に割り当てた。

本研究は、鹿児島大学の倫理規定を遵守して行った。患者さんからは、各施設の主治医よりインフォームド・コンセントを得、同意を得られた場合にのみ対象とした。

研究結果

経過中、腫瘍の存在が明らかになったのは 18 例中 9 例であった。腫瘍の内訳は、胸腺腫 7 例 (うち浸潤性胸腺腫 5 例)、悪性リンパ腫、肺癌 (組織型不明) 各 1 例であった。平均年齢は、全体で 55.4 歳。自己免疫群 56.8 歳、傍腫瘍群 54.0 歳で差が認められなかった。男女比はいずれの群も 4:5 であった。発症から入院までの期間の平均は、全体で 90.5 日と亜急性の経過を示していた。自己免疫群 111.9 日、傍腫瘍群 61.2 日と傍腫瘍群で短い傾向だ

1) 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

神経病学・老年病学

った。髄液所見は、両群間に明らかな差は認められなかった。てんかん発作の様式、SIADHによる低ナトリウム血症の合併頻度に大差は認められなかった。傍腫瘍群においてのみ3例で繰り返し施行した頭部MRIで異常が検出されなかった。

Figure 1. Initial symptom

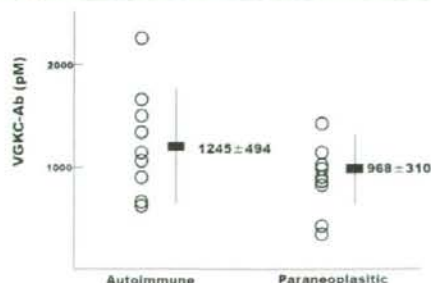


再発・再燃例が3例存在したが、いずれも浸潤性胸腺腫を合併していた。経過中の中核症状に差異は認められなかったが、傍腫瘍群では、半数例で四肢のじんじん感を病初期に訴えていることが明らかになった(図1)。

また、図2に示すように、抗体価は傍腫瘍群で若干低値を示す傾向にあった。

自己免疫群では、免疫治療に速やかに反応を呈したが、傍腫瘍群では、免疫療法のみでは症状の改善や抗体の減少は認められず、治療期間が長期におよぶ傾向にあった。

Figure 2. Anti-VGKC Abs



考察

今回の検討では、観察期間が十分でないために、自己免疫群の中に傍腫瘍性の症例が紛れている可能性は残る。抗体価が傍腫瘍群において若干低い理由は明らかではないが、傍腫瘍群において、半数例で初発症状として四肢のじんじん感を呈しているのは興味深い。抗VGKC抗体以外の自己抗体の存在も含めて検討する必要がある。

いずれにしても病初期に腫瘍を検出できない場合でも、再発・再燃症例や四肢のじんじん感を呈する症例、あるいは、ステロイドなどの免疫療法に抵抗する治療経過を呈する場合は、改めて、積極的に腫瘍のサーベイを行う必要があると考えられる。

結論

壮年期発症で、亜急性の臨床経過をたどり、SIADHを合併するNHLEの場合は、VGKC-LEを積極的に疑う必要がある。病初期に腫瘍が検出されなくても、四肢のじんじん感を呈したり、再発再燃したり、治療抵抗性を呈する症例については引き続き、定期的に腫瘍のサーベイを行う必要がある。

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

多数例による橋本脳症の臨床・免疫学的解析（続報）

研究協力者 米田 誠¹⁾

共同研究者 松永晶子¹⁾、藤井明弘¹⁾、横山広美¹⁾、井川正道¹⁾、栗山 勝¹⁾

研究要旨

橋本脳症は、橋本甲状腺炎にともなう自己免疫性脳症であり、抗甲状腺抗体の存在と免疫療法（主にステロイド）に対する良好な反応性を特徴とする。我々は、橋本脳症患者血清中に、 α -enolase の NH₂ 末端に対する自己抗体（抗 NAE 抗体）が特異的に存在することを見出し、血清診断を可能にした。全国多施設より、抗 NAE 抗体の解析依頼があり、それをもとに 88 例の橋本脳症例における臨床・免疫学的検討を行った。また、抗 NAE 抗体の力価も検討した。その結果、抗 NAE 抗体は、43%の橋本脳症患者で陽性であった。年齢は、二峰性分布を示した。臨床徴候としては意識障害、認知症が多く、検査・画像所見としては脳波異常や SPECT における血流低下が高頻度で認められた反面、MRI 異常の頻度は低く、診断上、重要と考えられた。抗 NAE 抗体は高力価群と低力価群が存在し、免疫学的に異なる背景の存在が示唆された。

研究目的

我々は、橋本甲状腺炎に伴う自己免疫性脳症（橋本脳症）において、プロテオーム解析を用いて NH₂ 末端側 α -enolase (NAE) に対する自己抗体が特異的に存在することを明らかにし、本症の血清診断を可能にした。昨年度の報告に加え、更に全国多施設から症例が集積された。現在までに抗 NAE 抗体の解析依頼があった 88 症例を検討し、橋本脳症の臨床免疫学的特徴を明らかにする。

研究方法

(1) 対象症例

精神・神経症状の存在、抗甲状腺抗体の存在、免疫療法（主にステロイド）反応性を充たし、臨床情報が十分得られ、他の原因が除外された 88 名の患者を対象とした。

対象症例の年齢・性、自己免疫性甲状腺疾患の既往、甲状腺機能、抗甲状腺抗体の存在、再燃の有無、免疫療法反応性、臨床徴候（意識障害、認知症、精神症状、けいれん、不随意運動、小脳失調）、脳波、頭部 MRI、脳血流 SPECT、髄液蛋白/IgG 上昇を比較検討した。また、臨床病型を急性脳症型（辺縁系脳炎含む）、慢性・亜急性精神徴候型、その他（純粋小脳失調、CJD 様）に分類し検討した。

(2) 免疫プロット

NH₂ 末端側の α -enolase (NAE) (1-157 アミノ酸) cDNA をヒト由来培養細胞に導入し組み換え蛋白として精製、免疫プロットにより血清中の自己抗体の有無を検討した。

(3) 抗 NAE 抗体力価の検討

血清の倍々希釈によって検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は福井大学の倫理委員会において承認を受け、患者本人への十分な説明を行い、

¹⁾ 福井大学医学部第二内科（神経内科）

文書での同意を得ている。個人の情報の保護に留意し、プライバシー保護には十分に配慮した。

研究結果

1. 臨床・検査画像所見の解析

- ・88例中38例で抗NAE抗体陽性(43%)。
- ・年齢・性(以下NAE陽性/NAE陰性):平均年齢58歳[28-85歳]/58歳[19-87歳]、ともに二峰性のピークを認めた。男:女比:10:28/19:31
- ・甲状腺疾患既往:橋本病 14%/26%、バセドウ病 13%/2%
- ・甲状腺:機能 正常 80%/69%、低下 3%/31%、亢進 18%/0%、抗Tg+抗TPO 63%/64%、抗TPO 13%/16%、抗Tg 21%/18%、抗TSH-Rのみ 3%/0%
- ・再燃あり 14%/2%
- ・臨床病型:急性脳症型(辺縁系脳炎) 66%(5%)/58%(10%)、精神徴候型 24%/26%、その他 10%/18%(純粋小脳失調/CJD様含む)
- ・免疫療法反応性:著効 47%/52%、中等度 24%/36%、軽度 24%/12%、自然治癒 5%/0%
- ・臨床徴候:意識障害 81%/66%、精神症状 63%/48%、認知症 47%/32%、けいれん 42%/34%、不随意運動 34%/36%、小脳失調 15%/20%
- ・検査・画像:脳波異常(基礎波徐波化、鋭波):89%/77%、頭部MRI異常:36%/39%、髄液蛋白/IgG上昇:57%/53%、頭部SPECT:11例で検討し、7例で脳血流低下(64%)

2. 抗NAE抗体力価の検討:

抗NAE抗体の力価は、高力価群(5120倍~20480倍)と低力価群(320倍~2560倍)が存在し、正常とのカットオフは320倍以下と考えられた。

考察

1. 血清の抗NAE抗体は、橋本脳症の43%で陽性であった。
2. 年齢分布は二峰性を示した。
3. 甲状腺疾患の既往者は2割程度であり、甲状腺機能正常が大部分を占めた。
4. 橋本脳症では、脳波異常とSPECTでの血流低下を高率に認める反面、MRIでの異常所見に乏しく、本症を疑う上で重要と考えられた。
5. 抗NAE抗体の力価は、高力価と低力価の2郡の存在が示唆された。

結論

1. 橋本脳症の診断には、臨床徴候や検査・画像所見の特徴を知る必要があり、抗NAE抗体は特異的診断に重要である。
2. 年齢分布や抗NAE抗体の力価から、橋本脳症は異なる臨床・免疫学的背景が存在することが示唆された。

(謝辞) 橋本脳症患者の抗体の解析の機会を頂き、臨床徴候の情報提供を頂いた多施設の先生方に深謝致します。

文献

なし

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得:なし

実用新案登録:なし

研究分担者 水澤英洋¹⁾

共同研究者 三苫博²⁾、橋本浩二³⁾、南里和紀⁴⁾、狩野方伸²⁾、

研究要旨

免疫性小脳疾患では、様々な抗体が出現するが、その意義については明らかになっていない。gluten ataxia は抗グリアジン抗体が陽性の小脳失調症であるが、近年、この抗体がシナプス伝達を阻害して小脳失調の原因となっているという仮説が提唱されている。今回私たちは、gluten ataxia の患者髄液のシナプス伝達に対する作用を、スライス標本を用いたパッチクランプ法で検討した。プルキンエ細胞からパッチクランプ方で記録を行い、平行線維を刺激して興奮性シナプス電流を誘発した。100 倍に希釈した髄液を灌流液に投与したところ、シナプス電流の振幅や、放出確率に有意な差は認められなかった。この結果は、髄液がシナプス伝達に対する作用は示さないことを示唆しており、抗体が pathogenic であるという説とは一致しなかった。

研究目的

免疫性小脳疾患においては、様々な抗体が出現する。これらの抗体の意義については、2つの可能性がある。一つは、抗体が神経細胞を直接障害している可能性であり、もう一つは細胞性免疫によって細胞障害が起こり、抗体は付随して出現している可能性である。この点を明確にするには、抗体の生理作用を一つ一つ検討していく必要がある。

興味深いことに、免疫性小脳疾患では抗体は、シナプス伝達に関与する蛋白を認識することが多い点の特徴である。そこで、私たちは「スライス標本を用いたパッチクランプ法」を用いて、抗体の作用を検討してきた。この

方法が極めて有効であった例として、抗 GAD 抗体陽性小脳失調症が挙げられる。GAD は抑制性伝達物質 GABA の合成酵素であるが、GAD に対する抗体は、抑制性シナプス伝達のみを選択的に抑制した。私たちはこのことから、抗 GAD 抗体が pathogenic な作用を持つことを提唱してきた¹⁻⁷⁾ が、一昨年、フランスのグループによって passive transfer の実験が行われ、これが確認された。そこで、今回はこの方法を用いて、gluten ataxia における抗グリアジン抗体の作用を検討した。

グリアジンは小麦粉に含まれる蛋白質で、粘りと弾性を与えるグルテンを構成する。1998年に抗グリアジン抗体の神経疾患における出現頻度が、英国のグループによって詳細に検討された。その結果、抗グリアジン抗体は特発性孤発性の小脳失調症では41%に出現したのに対して、家族性、MSA-C、正常対照者

1) 東京医科歯科大学大学院 脳神経病態学
2) 東京医科大学 医学教育学
3) 東京大学大学院 医学系研究科 神経生理学
4) 東京医科大学八王子医療センター 神経内科

においては10数%しか出現せず、この両者で有意な差があったことから、一つの疾患単位として gluten ataxia が提唱された。

さらに最近では、passive transfer の実験で失調症が再現出来たことが報告され、また、この抗体がシナプス小胞の放出に必須の蛋白質である synapsin I を認識することも明らかになった。これらの知見をもとに、抗グリアジン抗体はシナプス終末の synapsin I を認識してシナプス伝達を障害し、pathogenic な作用を示すという仮説が提唱されるようになった。そこで、この仮説を検証する目的で、髄液のシナプス伝達に対する作用を検証した。

研究方法

対象になった患者は、51歳の男性で6年の経過で失調性歩行を示していた。血清に IgA 抗グリアジン抗体が陽性 (32.6EU (<20))。IVIg が有効で、失調性歩行と小脳血流が改善した⁸⁾。

マウス小脳からスライス標本作製し、灌流液で維持しながら、プルキンエ細胞からパッチクランプ法で記録を行った。平行線維を刺激し興奮性シナプス電流 (EPSC) を誘発し、100倍に希釈した髄液を灌流液中に投与し、その作用を検討した。

(倫理面への配慮) 被験者からインフォームドコンセントを得た上で、東京医科大学八王子医療センターの倫理委員会の承認を得た。

研究結果

髄液を投与しても EPSC の振幅に有意な変化は認められなかった。さらに、Paired-pulse

ratio (S2/S1) を測定し、伝達物質の放出確率を検討したが、髄液を投与しても有意な差は起きなかった。

考察

我々の経験した gluten ataxia の症例では、少なくとも急性実験においては、患者髄液の小脳シナプスに対する作用は認められなかった。この結果は、抗グリアジン抗体がシナプス伝達を阻害し pathogenic な作用を示すという考えを支持するものではなかったが、一方で、抗グリアジン抗体が作用の点から多様である可能性も示唆される。たとえば、本邦における gluten ataxia は欧米例と臨床像が異なる可能性などを含めて、今後さらに症例を重ねる必要がある。

結論

1. gluten ataxia の症例を経験し、その髄液の作用をスライス標本を用いたパッチクランプ法で検討した。

2. 髄液はプルキンエ細胞へのシナプス伝達に作用を示さなかった。

3. この結果は、抗グリアジン抗体が pathogenic であるという仮説を支持しない。

文献

- 1) Ishida K, et al. Ann Neurol 1999;46:263-7.
- 2) Mitoma H, et al. J Neurol Sci 2000;175:40-4.
- 3) Takenoshita H, et al. J Neurol Neurosurgery Psychiatry 2001; 70: 386-9.
- 4) Mitoma et al. J Neurol Sci 2003; 208: 51-6.
- 5) Ishida K, et al. J Neurol Neurosurgery

Psychiatry 2007; 78:190-192.

- 6) Isida K, Mitoma H, Mizusawa H. J Neurol Sci 2008; 271: 186-190.
- 7) Nanri K, et al. Internal Med, in press.
- 8) 南里和紀、他. 臨床神経 2009; 49:37-42.

業績

- 1) Ishida K, Mitoma H, Mizusawa H. Reversibility of cerebellar GABAergic synapse impairment induced anti-glutamic acid decarboxylase

autoantibodies. J Neurol Sci 2008 ; 271 : 186-190.

- 2) Irioka T, Akaza M, Nakao K, Kanouti T, Yokota T, Mizusawa H. Chiasmal optic neuritis following mumps parotitis. J Neurol 2008;255:773-774.

健康危険情報：なし

知的財産権の出願・登録状況：なし

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 大原 義朗¹⁾

共同研究者 齊藤 峰輝²⁾、斎藤 孔介¹⁾、大桑 孝子¹⁾、谷浦 直子¹⁾

研究要旨

HTLV-1 Tax 蛋白は、異常な宿主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とから、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、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、B cell leukemia-3 (Bcl-3) を見出した。Bcl-3 は HTLV-1 感染 T 細胞株において、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が、この高発現は Tax による bcl-3 遺伝子の転写活性化のみならず、PI3 キナーゼ-AKT 経路の恒常的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を明らかにした。さらに、293T 細胞及び HTLV-1 感染 T 細胞株において Tax-Bcl-3 蛋白間結合を確認し、bcl-3 mRNA 発現を shRNA で抑制することで HTLV-1 感染 T 細胞株の増殖を抑制可能であることを示した。Bcl-3 は HTLV-1 感染細胞の異常増殖にかかわる分子であり、その発現抑制は HTLV-1 感染細胞の増殖を抑制することから、ATL 及び HAM に対する新規治療法の標的分子となりうると思われる。

研究目的

HTLV-1 Tax 蛋白は、NF- κ B 等の細胞機能発現に重要な転写因子との相互作用により、特定の細胞遺伝子発現を誘導または抑制することで T 細胞の腫瘍化や機能異常を引き起こすため、Tax により発現制御される宿主細胞遺伝子群は、ATL 及び HAM の病態を制御可能な治療標的分子の候補となりうると思われる。我々は以前、Tax により発現誘導・発現抑制される細胞遺伝子群をマイクロアレイにより網羅的に解析し、B cell leukemia-3 (Bcl-3) が Tax によって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し、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。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、Bcl-3 が ATL 及び HAM における異常 T 細胞増殖を抑制する治療標的分子となりうるかどうかについて基礎的検討を行った。

研究方法

HTLV-1 感染 T 細胞株 6 株 (MT1, MT2, MT4, HUT102, SLB1, C5MJ) 及び非感染 T 細胞株 3 株 (CEM, Jurkat, Molt-4) 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

¹⁾ 金沢医科大学 医学部 生体感染防御学部門

²⁾ 琉球大学大学院 医学研究科 免疫学

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ナーゼ酵素 (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[1] 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 β) 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。

研究結果

- ① 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)。
- 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2A)。
- ③ 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2B)。
- ④ 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細胞株と比較して50%以下に低下した(図3)。
- ⑤ 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)。

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。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蛋白間結合の阻害およびPI3キナーゼ-AKT経路の抑制という、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。

結論

Bcl-3の恒常的な発現を抑制することは、将来ATL及びHAMにおける異常なT細胞増殖を抑制する有望な治療法となる可能性がある。

文献

- [1] Kim YM, Sharma N, Nyborg JK. The proto-oncogene Bcl3, induced by Tax, represses Tax-mediated transcription via p300 displacement from the human T-cell leukemia virus type 1 promoter. *J Virol*. 2008 Dec;82(23):11939-47.

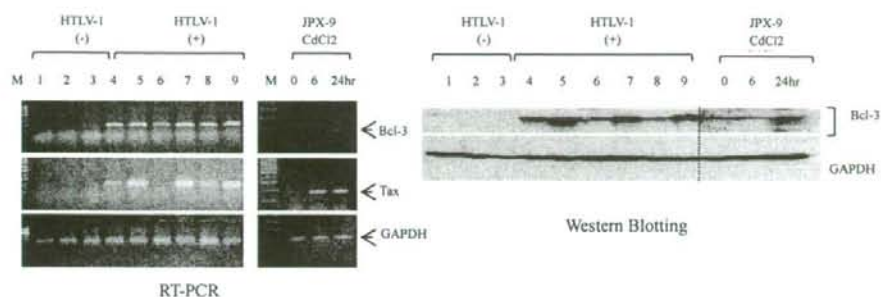
健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録情報

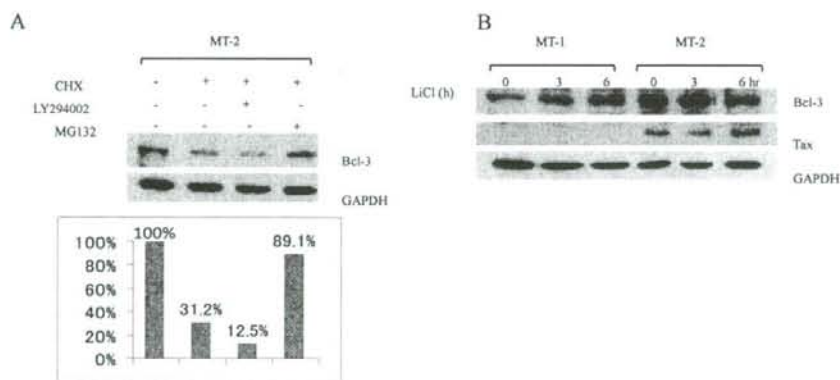
特許取得・なし 実用新案登録・なし

図1: HTLV-1 感染 T 細胞株における bcl-3 mRNA 及び Bcl-3 蛋白の恒常的高発現



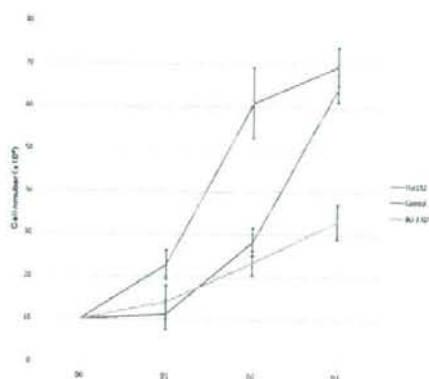
1. CEM 2. Jurkat 3. Molt4 4. C5MJ 5. HUT102 6. MT1 7. MT2 8. MT4 9. SLB1

図2: HTLV-1 感染 T 細胞株における Bcl-3 蛋白分解抑制機構



- 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 LY294002、CHX と 20S プロテアソーム阻害剤 MG132 をそれぞれ添加し、0, 3, 6 時間経過後の Bcl-3 蛋白発現量を比較した。CHX と PI3K 阻害剤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。未処理の細胞における Bcl-3 発現量を 100%として、ウェスタンブロットティングのバンドの濃さを定量した。
- 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した。LiCl 処理によって、Tax を発現していない MT-1 細胞では GSK-3 β の阻害による Bcl-3 蛋白の分解抑制が起こり、経時的に Bcl-3 蛋白の蓄積が確認されたが、Tax を発現している MT-2 細胞では、Tax により転写レベルでの Bcl-3 発現誘導が起こるため、LiCl の効果が認められなかった。

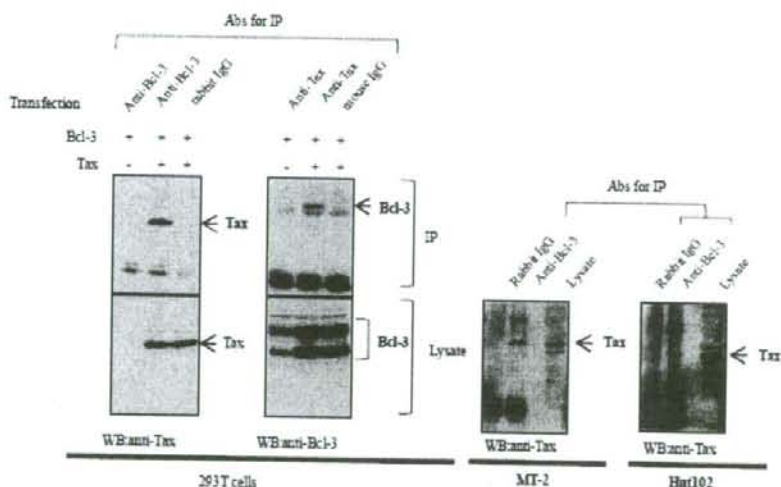
図 3 : HTLV-1 感染 T 細胞株における Bcl-3 高発現の細胞増殖への影響



青線 : shRNA (-) 赤線 : control shRNA (-) 緑線 : bcl-3 shRNA

HUT102 に bcl-3 shRNA を発現させると、control shRNA を発現させた場合、shRNA を発現させなかった場合と比較して、細胞増殖速度が約 1/2 以下に低下した。

図 4 : HTLV-1 Tax と Bcl-3 蛋白との蛋白間結合



293T 細胞に発現プラスミドを用いて Tax 及び Bcl-3 を共発現し、それぞれ抗 Bcl-3 及び抗 Tax 抗体で免疫沈降したときのみ、Tax 及び Bcl-3 蛋白を検出した。また、HTLV-1 感染細胞においても同様に、抗 Bcl-3 抗体による免疫沈降で Tax 蛋白を検出できた。従って、Bcl-3 と Tax 蛋白は細胞内で直接結合することが明らかになった。

HAM/TSP における HTLV-I 細胞伝播の効率と polysulfate による HTLV-I 感染阻害の基礎的検討

分担研究者 中村龍文¹⁾

共同研究者 福島直美²⁾, 西浦義博²⁾, 井田弘明²⁾, 荒牧俊幸²⁾, 中村英樹²⁾,
山崎浩則³⁾, 足立昭夫⁴⁾, 錫村明生⁵⁾, 片岡泰文⁶⁾, 江口勝美²⁾

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、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 を用いて、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。

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 の活性化について検討した。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。したがって、ヘパリンなどの polysulfate は 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。

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 HTLV-I 感染 T 細胞株)、TL-Su (HTLV-I キャリアー由来) を使用した。これらの細胞株の HTLV-I 産生量については、培養液中の p19 抗原量でみた場合および抗 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、ほぼ

1) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染免疫学
2) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科展開医療科学
3) 長崎大学保健・医療推進センター
4) 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
5) 名古屋大学環境医学研究所・神経免疫学
6) 福岡大学薬学部薬剤疾患管理学

同等であった。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) Small GTP ases pull-down assay: 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、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- γ ®)(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、各種濃度のこれら薬剤で 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。

研究結果

1) HTLV-I 感染効率の比較: 図 1a)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。

2) Pull down assay: 図 1b)に示すようにでは、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 でのみ検出された。

3) Polysulfate による HTLV-I 感染阻害実験: 図 2 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。ペントサン多硫酸による処理においては、インテグリン/リガンドおよび HTLV-I gp46-tax 発現量の変化、さらに細胞傷害性は惹起されなかった。

考察

今回、ほぼ同様の HTLV-I 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 HTLV-I 感染 T 細胞株では対照株に比較して、明らかに HTLV-I の感染効率がい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., Intervirology 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。今回の結果ではHAM/TSP患者由来 HTLV-I 感染 T 細胞株にのみ活性化された 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 Rap1 の活性化に対して 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 においては効率のいい HTLV-I の細胞伝播が惹起され、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。ペントサン多硫酸は既に米国において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、HAM/TSP 患者における膀胱症状の要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と考えられた。

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 の感染伝播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 に対する新規治療薬となり得る可能性がある。

健康危険情報

なし。

知的所有権の出願・登録状況

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)

実用新案登録：なし。

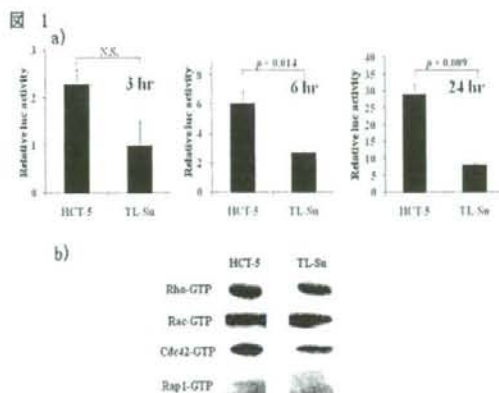
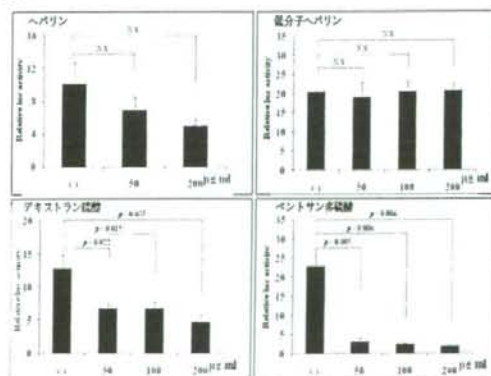


図 2



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

班 員:梅原藤雄¹⁾

共同研究者:白濱ゆう子¹⁾、橋口 照人²⁾

【研究要旨】

HAM 脊髄病変の形成を考えるには、CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞、活性化マクロファージ/ミクログリアの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。近年 IL-17 は種々の自己免疫疾患や中枢神経炎症において重要な役割を果たしていることが指摘されている。本研究では、HAM における IL-17 の意義を検討した。HAM 剖検脊髄では、活動性炎症部に浸潤している CD4⁺、CD8⁺ 活性化 T 細胞、活性化マクロファージ/ミクログリアに IL-17 の発現を認めた。この結果は、HAM 中枢神経組織における炎症形成には IL-17 が関与している可能性を示唆していた。

【目的】

HAM 脊髄活動性炎症部位には CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞、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リンパ球数は減少し、そこでは CD4⁺ T 細胞、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 細胞、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。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⁺ T 細胞に関して、HAM においては Th1 優位と推定されていた。2000 年に IL-17 を産生する新しいサブセットが発見され、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 は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、EAE はそれまで 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 がより重要であることが報告された。2004 年に HTLV-I tax は IL-17 gene を transactivate することが報告された。さらに、関節炎を自然発症する HTLV-I tax transgenic mouse 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おり、HTLV-I 関連疾患における IL-17 の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。

【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。

1)鹿児島大学医歯学総合研究科神経病学 2)血管代謝病態解析学*

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を行い、定量的評価を加えた。

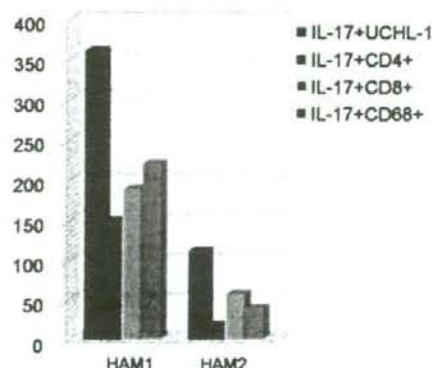
【倫理面への配慮】

倫理的問題は含んでいない。

【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。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するが、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。活性化 T 細胞マーカーである CD45RO は、症例 1 で 80%、2 では 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。IL-17 陽性細胞数の中での各細胞マーカーの陽性率は、症例 1, 2 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、この比率から脊髄断面における各マーカー陽性 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-17 陽性活性化 T 細胞、マクロファ

ージが浸潤している。特に、最も炎症の活動性の高い病変では CD4 陽性 IL-17 陽性細胞、いわゆる Th17 細胞が浸潤していることが示された。



脊髄断面における浸潤細胞数

【考察と結論】

今回、初めて HAM 脊髄病変における IL-17 の発現を報告した。この結果は、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 は HAM の治療においても重要な標的分子である可能性があるのをさらに検討を加え、新たな治療法開発に繋げていきたい。

【健康危険情報】

なし

【知的財産権の出願・登録状況】

特許取得：なし

実用新案登録：なし

HTLV-1 キャリア外来の現状と HAM 患者の動向について

研究分担者 出雲周二¹⁾

共同研究者 松崎敏男²⁾、久保田龍二¹⁾、有村公良²⁾

研究要旨

1999年より施行した鹿児島大学病院 HTLV-1 キャリア外来を通じて、HAM 患者の発生、キャリアの実情について検討した。1999年より2008年まで HTLV-1 キャリア外来を受診した318人を対象に神経学的診察、HTLV-1 プロウイルス量、HTLV-1 抗体価、リンパ球サブセット、インターロイキン2受容体を検査した。HTLV-1 キャリア数は304人で平均年齢46.8歳、HTLV-1 プロウイルス量 279 ± 428 コピー/ 10^4 PBMC、HTLV-I 抗体価(PA) $2^5 - 2^{11}$ 倍であった。キャリア外来にて早期 HAM が4例あり、運動障害 0.1 で排尿障害主体であった。キャリア外来への再来者66人について最初と最終のウイルス量を比較すると有意に増加した。ウイルス量1000コピー以上は11人で、家族に HAM がいたのは2人であった。HTLV-1 キャリア外来にて早期の HAM を発見でき、ウイルス量高値のキャリアは予防的治療を検討する必要がある。

研究目的

HTLV-1 抗体陽性者に対する鹿児島大学病院 HTLV-1 キャリア外来を1999年より開始した。キャリア外来を通じて、HAM 患者の発生、キャリアの実情について検討した。

(倫理面への配慮)

臨床検体の供与にあたっては、書面によるインフォームドコンセントを得た。また、本研究は鹿児島大学倫理委員会の承諾を得て行った。

研究方法

1999年より2008年まで鹿児島大学病院 HTLV-1 キャリア外来を受診した318人を対象にリンパ節腫脹や皮膚病変の有無や神経学的診察、HTLV-1 プロウイルス量、HTLV-1 抗体価、リンパ球サブセット、インターロイキン2受容体を検査した。

研究結果

HTLV-1 キャリア数は304人で平均年齢 46.8 ± 13.0 歳、HTLV-1 プロウイルス量 279 ± 428 コピー/ 10^4 PBMC(中央値105)、HTLV-I 抗体価(PA) 3843 ± 7773 倍(32-65536) 倍であった。また、異常リンパ球数は $0.45 \pm 0.95(0-7)$ 、CD4+リンパ球 $43.3 \pm 7.9\%$ 、IL2 受容体(n=63) $433.2 \pm 219.0(195-1730 \text{ U/ml})$ 、MMP-3(n=7) $47.1 \pm 21.3(11.2-81 \text{ ng/ml})$ であった。感染経路について、水平感染疑いは33家族

1) 鹿児島大学難治ウイルス研分子病理

2) 鹿児島大学神経内科・老年病学

で12家族陽性(36.4%)で、母子感染は45家族で35家族(77.8%)であった。異性感染疑いが2例あった。水平感染のうち、HAM—キャリアは5例含まれ、男性がキャリアで女性がHAMだった例は2例、男性がキャリアで女性がATLになった例は1例であった。HAM—キャリアの母子感染は13家族14例で、家族性HAMが2例であった。また、母子感染で母がATLで子供が慢性型ATLであった例が1例あった(表1)。キャリアの出産について、2例しかないが、家族にHAMをもつキャリアでは、家族歴のないキャリアと比べ、出産後HTLV-1プロウイルス量が出産前898コピーから1835コピーに増加した。キャリア外来にて早期HAMが4例見られた。年齢は56歳の男(症例1)、46(症例2)、20(症例3)、52歳(症例4)の女性であった。運動障害度は0.1/13と神経所見にて下肢の痙性を認めたが、全例走ることは可能であった。排尿障害のない1例を除いて頻尿・残尿主体であった。髄液HTLV-1抗体価(PA法)は46歳女性を除き、55歳128倍、20歳512倍、52歳128倍であった。ウイルス量が高値で 694 ± 414 コピー/ 10^4 PBMCであった。家族性HAMが2例、ブドウ膜炎合併例が2例であった。症例3と4の2例はHLA-A2陰性であった。また、HAMリスクのオッズ比(0.78以上)(1)は症例3の母が205.1で、症例3が1.478と高かったが、症例4は0.608と低かった。キャリア外来への再来者75人のうち66例についてウイルス量の経時変化で中央値105以上で増加したのは25人(28%)であった。また、3回以上受診したキャリア28例についてウイルス量の経時変化をみると、ウイルス量高値の群がみられた。66人について最初と最終のウイ

ルス量を比較すると、最初のウイルス量 276.4 ± 406.4 コピーが最終ウイルス量 380.7 ± 583.4 コピーへ有意にウイルス量は増加した($p=0.015$)。自覚症状がないにもかかわらず、HTLV-1プロウイルス量が1000コピー以上高値を認めたのは11例で、そのうちHAM家系は2例のみ(3.6%)であった。家族歴がなくてもウイルス量高値を示す例があった。

考察

鹿児島大学病院神経内科に登録された592人のHAMのうち初発が排尿障害のみの例は、88例(14.9%)で、運動障害のみが372例(62.8%)であった。運動障害と排尿障害の両者が初発の例は72例(12.2%)であった。排尿障害のみのHAMは自覚が乏しく、早期の状態であり早期治療を見逃さないようにする必要がある。HAM患者会(アトム)の会)が平成16年に施行したHAM患者における生活実態調査の全国アンケート調査で第二子出産後、HAMが発症した例が43.3%あり、出産後HTLV-1プロウイルス量が増加した例は、定期的に検診をする必要があると考えられた。通常、家系にHAMがある場合、キャリアもウイルス量が高い(2)。家系にHAMがないキャリアでも高値を示す例があるため、年1回の検診が必要であると考えられた。HTLV-1キャリア外来にて早期のHAMを発見でき、ウイルス量高値や経時的にみて増加傾向を示すHTLV-1キャリアは予防的治療を検討する必要がある。また、HTLV-1キャリアの出産後のウイルス量チェックの必要性があると考えられた。

文献

1. Nose H, Saito M, Usuku K, et al:
Clinical symptoms and the odds of
human T-cell lymphotropic virus type
1-associated myelopathy / tropical
spastic paraparesis (HAM/TSP)
in healthy virus carriers: Application of
best-fit logistic regression equation
based on host genotype, age, and
provirus load. *J Neurovirol* 12: 171-177,
2006
2. Nagai M, Usuku K, Matsumoto W, et
al: Analysis of HTLV-1 proviral load in
202 HAM/TSP patients and 243
asymptomatic HTLV-1 carriers: High
proviral load strongly predisposes to
HAM/TSP. *J Neurovirol* 4: 586-593,
1998

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

特権取得：なし

実用新案登録なし

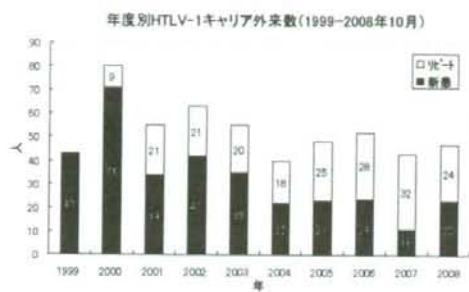


図1 年度別キャリア外来受診数

NO	1	2	3	4
血清				
HTLV-1抗体 (PA法)倍	16384	16384	32768	32768
髄液				
HTLV-1抗体 (PA法)倍	128	-	512	128
末血HTLV-1 プロウイルス量 (コピー/10 ⁴ PBMC)				
1304	363	540	579	
異常				
リンパ球(N)	4	3	0	5
CD4+				
絶対数	469	533	808	616
(N)	41	37	43	51
CD8+				
絶対数	229	490	808	230
(N)	20	34	43	19
NK細胞数				
(N)	23	17	41	2
IL2R	-	-	930	-

表1 感染経路

母子感染			水平感染		
No	母	子供	No	男性	女性
1	HAM	キャリア	9	1	HAM
2	HAM	HAM	2	2	キャリア
3	ATL	キャリア	10	3	キャリア
4	ATL	慢性型ATL	1	4	キャリア
5	キャリア	HAM	2		
35/45家族 (77.8%)			12/33家族 (36.4%)		
異性感染疑い2例					

表2 早期HAM患者の臨床所見

NO	1	2	3	4
年齢	56	48	20	52
性別	男	女	女	女
発症年齢	52	48	19	52
家族歴	母HAM	無	無	母HAM
ブドウ膜炎	有	有	無	無
運動障害	0	1	0	0
排尿障害	有	有	有	無
皮膚障害	有	有	有	有
パピルスキー反射	陽性	陽性	陽性	陽性
発汗障害	両大腿以下	頸部以下	両下腿以下	Th12以下

表3 早期HAM患者の検査所見

HTLV-1プロウイルス量

コピー/10⁴PBMC

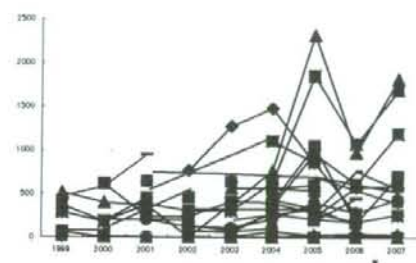


図2 3回以上来院した28名に関するHTLV-1プロウイルス量の経時変化