

(Asp-His-Ile-Leu-Glu-Pro)で、しかもこの領域は両親媒性の α -ヘリックス構造をとる領域でもあった(図1)。そこで、両親媒性の α -ヘリックス構造の疎水性アミノ酸残基または親水性アミノ酸残基をそれぞれ親水性アミノ酸残基または疎水性アミノ酸残基に変換し、シンシチア形成阻害活性への効果を検討した。その結果は表1に示すように、 α -ヘリックス構造の親水性アミノ酸が保存されたペプチド(gp46-197-216S)ではシンシチア形成阻害活性は保存されていた。しかし、親水性アミノ酸を他のアミノ酸に置換したペプチド(gp46 194-214 および gp46 194-214S)はシンシチア形成阻害活性が消失した。これらの結果はペプチドN末端領域の親水性アミノ酸で構成された側面がHSC70との結合に寄与し、しかもこのペプチドによる感染細胞から標的細胞へのウイルス移行に寄与していることを示していた。

HAMおよびATLL患者でのgp46-197ペプチド領域に対する免疫応答:

最近、筆者らはこのgp46-197ペプチド領域とHSC70分子の相互作用がHTLV-1感染患者ウイルス活動期に細胞内で起こっていること示す結果を得た。一般に、ELISAプレートを用いて血液中の抗体を検出するとき、抗原を塗布したプレート上での非特異的反応を防止するために血清を用いて保護する操作がとられる。筆者らは、この血清の代わりに生物試料由来でないカゼインを保護剤とするELISAを用いて、HTLV-1感染者血清中の抗体の測定を行った。その結果は表2に示す。

HTLV-1感染健常者血清では、gp46-197ペプチド領域に対する抗体は稀にしか検出できない(2%または6%)。しかし、この改良測定法をATLLまたはHAM患者血清中の抗体の検出に応用すると、HAMまたはATLLと診断された患者血清中の抗体の出現頻度がほぼ100%にまで達した(表2)。さらに興味あることに、ATLL患者血清では、本抗体の出現頻度および抗体量が病態の進行とともに増加することを見出した(図2)。これらの結果はエンベロープのgp46-197領域とHSC70分子との相互作用を介したウイルスの細胞内移行が感染者体内で起こっていることを示すとともに、そのような免疫応答がウイルス活動の活発な時期に起っていることを示していた。

ファージペプチドライブラーによる抗体エピトープ解析:

次に、その抗体が認識するエピトープ構造をファージペプチドライブラーにて解析した。この目的のため、gp46-197ペプチド領域に対する抗体をgp46-197ペプチドを担体とするアフィニティーカラムにて感染健常者血清より精製した。その結果は図3に示す。抗体が認識する領域はgp46のPro205からLys209の領域であり、そのアミノ酸配列中にLysまたはArgなどの塩基性アミノ酸残基が含まることが重要であることを明らかにした。このエピトープ構造のアミノ酸配列特異性はシャペロン分子としてのHSC70のペプチド結合領域を認識するアミノ酸配列のそれに良く一致するものであった(Takenaka I.M. et al. J. Biol. Chem.,

1995; 270: 19839-19844)。これらの結果は gp46-197 ペプチド領域は HSC70 分子のペプチド結合部位をもつ 17kDa サブユニットと相互作用することが示唆された。

D. 考察

HTLV-I 感染による HTLV-I 関連脊髄症 (HAM) は難治性神経疾患で、その発症の最大の要因は感染者の高いウイルス量にあるとされている。このため、感染細胞でのウイルスの増殖を選択的に抑える薬剤の開発が望まれている。筆者らはエンベロープの gp46-197 ペプチド領域が分子シャペロン HSC70 分子のペプチド結合部位と相互作用することで、細胞膜融合を介したウイルスの細胞内移行に寄与することを示した。この結果は、gp46-197 ペプチド領域がエンベロープの機能ドメイン PRD 領域に位置していることを踏まえて、この相互作用はウイルスによる膜融合反応に必須のエンベロープ蛋白の構造変化に寄与していると考えられる。

HTLV-1 感染では、エンベロープ蛋白の構造変化は gp46 の受容体への結合で惹起される gp46-gp21 複合体の分子間 Disulfide 結合の解裂で始まる。この解裂を受けて解離された gp21 が構造変化を起こし、その蛋白 N 端の融合ペプチド領域を標的細胞膜に挿入、そして膜融合へと進展する。この gp46 と gp21 の分子間 S-S 結合の解裂には、gp46 蛋白 C 末端の CXXC モチーフと gp21 蛋白の CCX₆C モチーフが関与し、両モチーフ間の Thiol/Disulfide 交換反応を介して解離と構造変化へと進展する (Wallin M. et al., EMBO J. 2004; 23: 54-65)。また、

最近細胞内の HSC70 分子は単体または 2 量体として存在し、その制御に分子内 Thiol/Disulfide 交換反応が寄与していることが明らかになっている (Nemoto TK et al. J. Biochem. 2006; 139: 677-687)。従って、本研究の課題である gp46-197 ペプチド領域と HSC70 の相互作用の分子基盤の解析は HTLV-1 感染の防止に向けた薬剤の分子標的に関する重要な情報を提供している。

E. 結論

本研究で、筆者らは gp46-197 ペプチド領域に対する抗体の発現頻度および抗体量が HTLV-1 感染による病態の進行と密接に連動して増加してくることを示した。これらの結果はエンベロープの gp46-197 領域と HSC70 分子との相互作用を介したウイルスの細胞内移行が感染者体内で現実に行っていることを示すとともに、このような細胞間のウイルス移行がウイルス活動の活発な時期に集中的に起こっていることは興味あることである。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sagara Y, Inoue Y, Ohshima K, Kojima E, Utsunomiya A, Tsujimura M, Shiraki H, Kashiwagi S. Antibody to the central region of human T-lymphotropic virus type 1 gp46 is associated with the progression of adult T-cell leukemia. *Cancer Sci.* 2007 Feb;98(2):240-245.

Erratum in: Cancer Sci. 2007.

Apr;98(4):620.

2. Sagara Y, Inoue Y, Tsujimura M, Kojima E, Shiraki H, Kashiwagi S. Novel biomarker 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.

3. 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-I associated myelopathy patients using phage display method. J Neuroimmunol. 2004 Jul;152(1-2):140-146.

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。

図 1 gp46-197ペプチド構造(Chou-Fasman method)

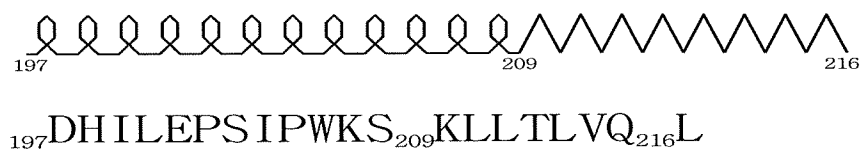


表1 gp46-197関連ペプチドのシンシチア形成阻害活性

合成ペプチド		シンシチア形成 阻害活性
HTLV-1 175-199	FLNTEPSQLPPTAPLLPHS NLDHI	-
197-216	DHILEPSIPWKS ₂₀₉ KLLTLVQ ₂₁₆ L	+
197-216S	DHLEPLPLKSKLLTLSS	+
194-205	SNLDHILEPSIP	+
197-208	DHILEPSIPWKS	+
200-211	LEPSIPWKS ₂₀₉ KLL	+
203-214	SIPWKS ₂₀₉ KLLTLV	-
206-217	WKS ₂₀₉ KLLTLVQ ₂₁₆ L	-
209-220	KLLTLVQ ₂₁₆ LTQS	-
213-236	LVQ ₂₁₆ LTQSTNYTCIVCIDRASLST	-
HTLV-2 171-196	FITSEPTQPPPTSPPLVHDS ₁₈₈ DLEHVL	-
194-214	EHVLT ₁₉₄ PSTSWTKILKFIQ ₂₁₄ L	-
194-214S	EHVLEPSISW ₁₉₄ TKILKFIQ ₂₁₄ L	-

図2 HTLV-1感染による病態と抗gp46-197抗体発現との関連

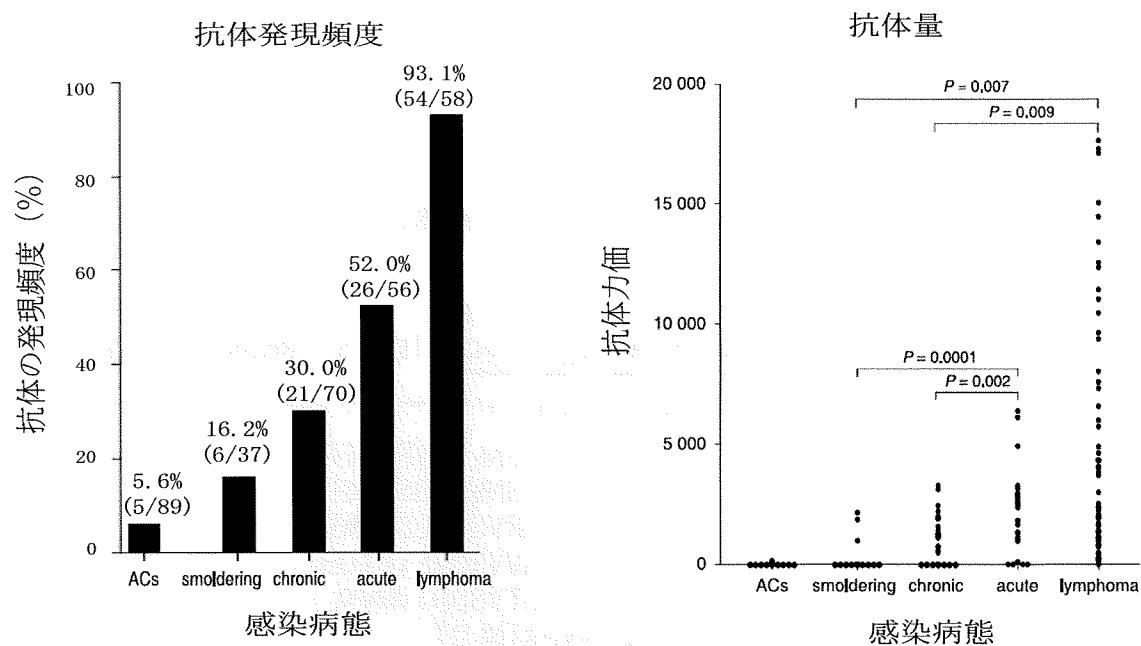
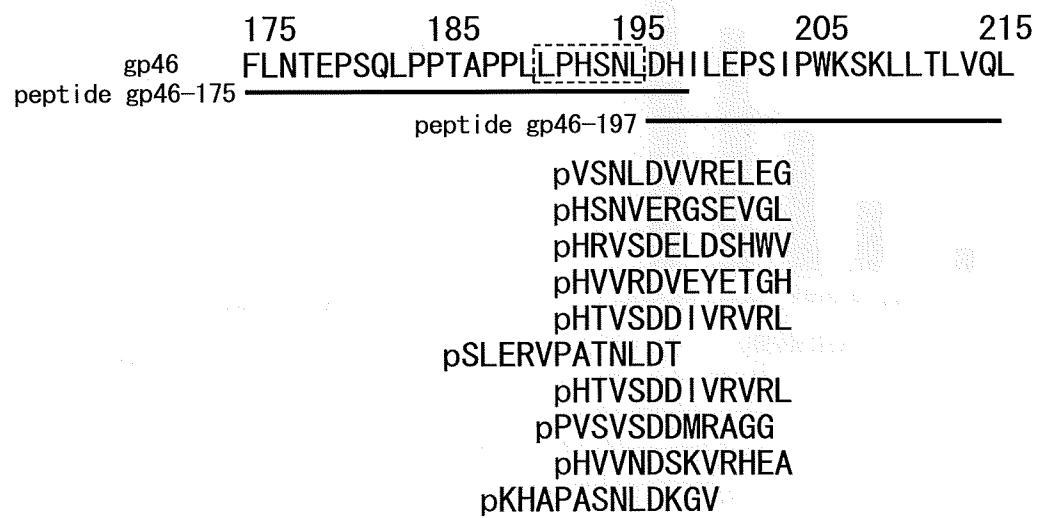


表2 ATLLおよびHAM患者血清中の抗gp46-197抗体の陽性頻度

種類 ブロッキング	固相化ペプチド					
	p19-100		gp46-175		gp46-197	
	有	無	有	無	有	無
無症候性キャリア (n=85)	100	100	91	89	2	6
ATLL罹患患者 (n=46)	100	100	72	75	0	98
HAM/TSP罹患患者 (n=14)	100	100	100	93	49	100

図3 ペプチドライブラリーによる抗gp46-197抗体のエピトープ解析



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-1 関連脊髄症(HAM/TSP)患者末梢血 CD4+T 細胞の網羅的遺伝子発現解析(トランスクリプトーム)

研究代表者 出雲 周二

共同研究者：児玉 大介（鹿児島大学プロジェクト研究員）

久保田龍二（鹿児島大難治ウイルス病態制御研分子病理）

研究要旨：HTLV-1 関連脊髄症(HAM)で Cell-to-cell infection(spread)に関与しプロウイルス量高値となる病態に関与すると考えられる遺伝子を網羅的に明らかにするため、主な感染宿主細胞である CD4+T 細胞から RNA を抽出しヒト DNA マイクロアレイを用いて検討した。有意差比較解析、クラスター解析、ベン図などを組み合わせたデータマイニングを行い、HAM 病態に最も重要な遺伝子として HAM のみで高発現する遺伝子群を抽出できた。さらにこの中から Cell-to-cell infection (spread)に関与する遺伝子を抽出するという目的のため、膜蛋白をコードする遺伝子、糖鎖関連遺伝子を抽出し遺伝子リストを作成した。文献検索したところウイルス粒子出芽との関連が報告されている1遺伝子を除き全て新規の遺伝子だった。

A. 研究目的

HTLV-1 関連脊髄症(HAM)の発症リスクは末梢血 PBMC での HTLV-1 プロウイルス量および、これと相関するいくつかの遺伝子に関与することがこれまでの研究で明らかとなっている。しかし網羅的遺伝子発現の検討はATLではなされているがHAMではまだない。

我々は HAM と AC との病態の違い、すなわち Cell-to-cell infection (spread)に関与しプロウイルス量高値となる病態に関与すると考えられる遺伝子を網羅的に明らかにするため、HTLV-1 の主な感染宿主細胞である CD4+T 細胞から RNA を抽出しヒト DNA マイクロアレイを用いて網羅的に遺伝子発現を検討した。

B. 研究方法

対象:WHO 診断基準により臨床診断した HAM 患者4例、無症候性 HTLV-1 キャリア(以下 AC)4例、HTLV-1 陰性健康者対照(以下 NC)4 例を無作為に選んだ。

倫理面への配慮: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った。

血清・髄液中抗 HTLV-1 抗体価:PA 法で測定した。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。

凍結 PBMC 検体からの CD4+T 細胞セレクション:

①凍結検体の融解・洗浄:約 2×10^7 個の PBMC を含む凍結検体を 37°C 湯浴で融解し、DNaseI (2U/mL) を含む PBS(-)で 2 回洗浄。

②CD4+T 細胞の回収:CD4+Tcell Isolation Kit II(ヒト)(Mylteni Biotech) の CD4+Tcell Biotin-Antibody カクテルと Anti-Biotin マイクロビーズで非 CD4+T 細胞を間接磁気標識後、MACS Separator 磁場内に置いたカラムに細胞懸濁液を通し陰性画分として CD4+T 細胞を回収した。

CD4+T 細胞からの total RNA 抽出:TRIzol 液 (Invitrogen)で CD4+T 細胞を溶解し Total RNA Isolation Mini kit(Agilent)で total RNA を抽出し、Agilent 2100 Bioanalyzer で RNA の Quality Control 解析, spectrophotometer で濃度測定を行った。

total RNA からの cDNA, Cy3 標識 cRNA の合成と測定:

①cDNA 合成と標識:Low RNA Input Linear Amplification Kit, PLUS, One-color(Agilent) の MMRV-RT で cDNA を合成し T7 RNA polymerase で Cy3-CTP (633nm で励起)標識した。

③Cy3 標識 cRNA 精製・濃度測定:RNeasy Mini Kit (Invitrogen) で精製後, ND-1000 UV-VIS Spectrophotometer (NanoDrop Technologies)で Cy3 濃度, cRNA 濃度を測定した。

DNA マイクロアレイ: 41,000 遺伝子の 60mer オリゴヌクレオチドを搭載する 1-color Whole Human Genome 44k×4plex DNA microarray (Agilent Technologies) を用い、Agilent の Hybridization

chamber, hybridization oven, One-color Microarray-Based Gene Expression Analysis-QuickAmp Labeling Ver5.7 でハイブリダイズと洗浄を行った後, Agilent Microarray scanner で画像取得. さらに Feature Extraction Software Ver.10.5 で蛍光シグナル強度を数値化した Raw data を取得した.

データ・マイニングと統計解析: GeneSpring GX software で数値データ対数変換, 正規化し, 以下検討した.

①有意差比較解析

1) 2 群間 Welch's t 検定 (HAM vs NC, AC vs NC, HAM vs AC)

2) 3 群間 One-way ANOVA (一元配置分散分析)

②階層的クラスター解析

③Venn 図と Welch's t 検定 (Fold Change), One-way ANOVA, クラスター解析結果を組み合わせた解析

④HAM 発症機序関連候補遺伝子リストの作成, 文献検索

C. 研究結果

1. 対象群・検体の比較

無作為抽出した HAM, AC, NC 各群と検体について, 性, 年齢, プロウイルス量 (コピー数 / 10^4 PBMC), 凍結保存期間を比較した (表1).

HAM, AC 間でプロウイルス量に差がある他, 凍結検体保存期間が AC で短かった.

表1. 対象群・検体の比較

	HAM	AC	NC
検体数	4	4	4
性(男:女)	2:2	1:3	2:2
年齢(平均±SE)(歳)	60.0±7.4	52.3±4.9	52±13.9
プロウイルス量	2066±403.0	325.8±155.3	-
保存期間(平均±SE)(年)	4.3±0.0	2.2±0.2**	5.1±1.1

* P=0.021(Mann-Whitney); ** P=0.030 (Kruskal-Wallis)

2. 有意差比較解析

①2群間の Welch's t 検定

2群間比較では, アレイ上の各遺伝子スポット毎に NC との比較では NC が対照に, HAM 対 AC では AC が対照に設定されている.

1) 2群間 (AC 対 NC, HAM 対 NC, HAM 対 AC) での検定で P 値 0.01 未満, 0.05 未満で有意差のあった遺伝子数を表2に示す.

表2. 2群間比較 Welch's t 検定で有意差のあった遺伝子数

P 値	AC 対 NC	HAM 対 NC	HAM 対 AC
P<0.01	159	244	196
P<0.05	930	1,655	2,241

2) 2倍以上の変化 (2×FC: fold change) がみられた遺伝子を1)における P 値 0.05 未満で有意差のあった遺伝子から抽出し, さらに高発現, 低発現のどちらであったかに分類し表3に示す.

表3. 2倍以上の変化がみられる遺伝子数

P<0.05	AC 対 NC	HAM 対 NC	HAM 対 AC
高発現	100	156	166
低発現	162	197	155

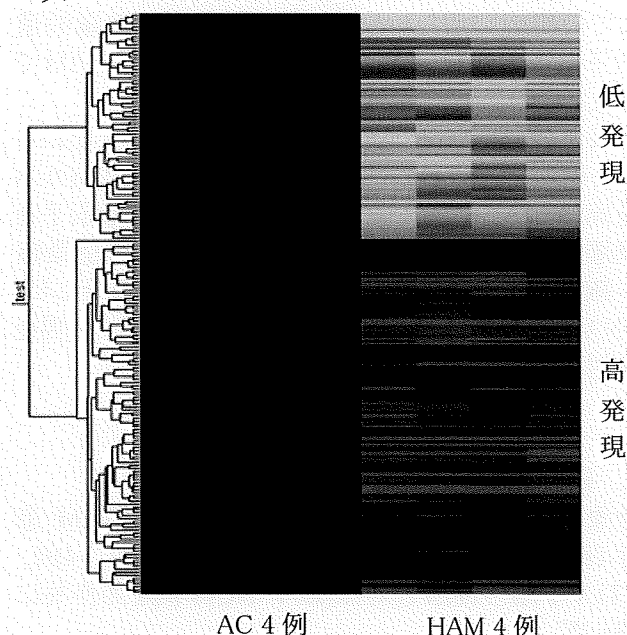
(注: 高発現の遺伝子を赤字で, 低発現の遺伝子を緑字で示す)

②3群間での One-way ANOVA (一元配置分散分析)

3. 階層的クラスター解析

Welch's t 解析結果, One-way ANOVA 結果とも, P 値毎に有意差のあった遺伝子群ごとに発現パターンの類似した遺伝子をまとめる, すなわち階層的クラスター解析を行うことができるが, 高発現か低発現か, また Fold change を用いる場合にはどの程度を高あるいは低発現とするかで何通りも可能であるが, 代表例として2群間比較 Welch's t 検定で有意差のあった遺伝子のうち, HAM 対 AC, P<0.01 の 196 遺伝子 (表2) について解析したものを示す.

図1. HAM 対 AC で有意差のあった遺伝子群 196 遺伝子 (2群間比較 Welch's t 検定, P<0.01) のヒートマップ



4. 他の解析とベン図 (Venn diagram) を組み合わせた解析

Cell-to-cell infection に伴い感染 CD4+T 細胞集団が体内で拡大 (Cell-to-cell spread) したとすると, 発現している遺伝子も結果的に発現量が亢進すると考えられる. 3群の CD4+T 細胞における遺伝子の発

ウイルス粒子出芽(budding)に関連する7編の報告があった。関連する報告も増加中であり、HIV-1 などのレトロウイルスでの研究でも注目される遺伝子である。その他の遺伝子は HTLV-1 との関連ではすべて新規の遺伝子だった。

E. 結論

HAM と AC の決定的な違いは出芽の差にあることが示唆され、WWP1 は治療標的分子となる可能性が考えられる。

今後、WWP1 を含め、これらの遺伝子の HAM 病態、HTLV-I の Cell-to-cell infection (spread) への関与を評価するためさらなる検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Aye MM, Kasai T, Tashiro Y, Xing HQ, Shirahama H, Mitsuda M, Suetsugu T, Tanaka K, Osame M, Izumo S. CD8 positive T-cell infiltration in the dentate nucleus of paraneoplastic cerebellar degeneration. J Neuroimmunol. 2009; 208(1-2):136-140.
2. Xing HQ, Hayakawa H, Gelpi E, Kubota R, Budka H, Izumo S. Reduced expression of excitatory amino acid transporter 2 and diffuse microglial activation in the cerebral cortex in AIDS cases with or without HIV encephalitis. J Neuropathol Exp Neurol 68(2):199-209, 2009.
3. Xing HQ, Hayakawa H, Izumo K, Kubota R, Gelpi E, Budka H, Izumo S. In vivo expression of proinflammatory cytokines in HIV encephalitis: an analysis of 11 autopsy cases. Neuropathology. 2009; 29(4):433-42.
4. 出雲周二. HAM : HTLV-1 associated myelopathy. 山口 徹, 北原光夫, 福井次矢(総編集), 今日の治療指針 2010 年版「私はこうして治療している」pp768-770, 医学書院(2010).
5. 中川正法, 上平朝子, 橋本里奈, 岸田修二, 三浦義治, 邢 惠琴, 出雲周二. HAART と NeuroAIDS. 日本エイズ学会誌 11: 81-91 (2009).

2. 学会発表

1. 久保田龍二, 松浦英治, 有村公良, 出雲周二: 抗原認識特異度の低い HTLV-I 特異的 CTL はウイルス淘汰圧が高い. 第 50 回日本神経学

会総会, 2009 年 5 月 20 日, 仙台.

2. 松崎敏男, 久保田龍二, 有村公良, 出雲周二. HTLV-I キャリア外来の現状と HAM 患者の動向について. 第 50 回日本神経学会総会, 2009 年 5 月 21 日, 仙台.
3. 児玉大介, 久保田龍二, 出雲周二. 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. 第 50 回日本神経学会総会. 2009 年 5 月 20 日, 仙台.
4. 吉満 誠, 小迫知弘, 鈴木伸介, 松下格司, 魚住公治, 久保田龍二, 出雲周二, 有馬直道. HTLV-I 感染者における免疫抑制性受容体の発現. 第 2 回 HTLV-I 研究会. 2009 年 8 月 29 日, 東京.
5. 児玉大介, 久保田龍二, 出雲周二. HTLV-I 関連脊髄症 (HAM/TSP) における RNA マイクロアレイ解析による検討. 第 2 回 HTLV-I 研究会. 2009 年 8 月 29 日, 東京.
6. Abdelbary N, Kubota R, Usuki F, Abdulah H, Izumo S: Possible effect of HTLV-I on hUPF1 expression and phosphorylation. 第 2 回 HTLV-I 研究会. 2009 年 8 月 29 日, 東京.
7. Abdulah H, Higuchi I, Kubota R, Matsuura E, Hashiguchi A, Abdelbary N, Izumo S. HTLV-I associated polymyositis: a trail to unfold the story. 第 2 回 HTLV-I 研究会. 2009 年 8 月 30 日, 東京.

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

HAM/TSP 患者 HTLV-I 感染細胞の HTLV-I 感染伝播効率における p38 MAPK の関与

研究分担者 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 井田弘明，中村英樹，山崎聡士，江口勝美 長崎大学・院・展開医療科学

研究要旨：

HTLV-Iの感染伝播 (cell to cell spread) はインテグリンとそのリガンドで構成されるvirological synapseを介して行われることは周知の事実であるが，そこに至るまでにはactinやmicrotubulesといった細胞内骨格の再構成が重要な役割を果たしている可能性がある。今回，インテグリン/リガンドから細胞内骨格の再構成に至るまでのシグナルがHTLV-Iの感染伝播にどのように関与するのかを検討した。その結果，HTLV-Iの感染伝播にはmicrotubulesの再構成が重要な役割を果たしていることが明らかになった。細胞内骨格の再構成にはp38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) シグナルの関与が報告されているが，本シグナル分子はインテグリン/リガンドシグナルの下流にも存在する。そこで，我々がこれまでに報告しているHAM/TSP患者HTLV-I感染T細胞におけるHTLV-Iの効率のいい感染伝播の機序を解明するために，HTLV-I感染T細胞株を用いて，本シグナル分子に焦点をあて解析した。その結果，p38 MAPKシグナルの活性化がHAM/TSP患者HTLV-I感染細胞におけるHTLV-Iの効率のいい感染伝播に関与する因子の一つとなっている可能性が示された。

A. 研究目的

HTLV-Iの感染伝播 (cell to cell spread) はインテグリンとそのリガンドで構成されるvirological synapseを介して行われる。HAM/TSPの発症・病態を考える場合，HTLV-Iの生体内での感染伝播の効率は非常に重要な問題である。我々はこれまでにHAM/TSP患者HTLV-I感染T細胞はHTLV-Iの効率のいい感染伝播を惹起するpotentialを持っている可能性を報告してきた。そこにはインテグリンとそのリガンドで構成されるvirological synapseの下流にあるsmall GTPaseの活性化が一つの因子として関与していると考えられるが，詳細な機序については未だ不明である。HTLV-Iの感染伝播は上述のvirological synapseを介して行われるが，actinやmicrotubulesをはじめとする細胞内骨格の再構成に至るシグナルが重要な役割を果たしていると考えられる。そこで今回，HAM/TSP患者HTLV-I感染細胞における効率のいいHTLV

-I感染伝播に関与する因子を解明する目的で，HTLV-Iの感染伝播における細胞内骨格の再構成の役割と，インテグリン/リガンドシグナルと細胞内骨格の再構成の間に介在するシグナルの一つであるp38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) シグナルに焦点をあて，HTLV-I感染T細胞株を用いて解析を行った。

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 *Iuc* 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，徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 足立昭夫教授より供与) を使用した。

2) **HTLV-I 感染効率の比較**：H9/K30 *Iuc* 細 (3.5x

10⁵/well) とそれぞれの HTLV-I 感染細胞株 (5 x 10⁵/well) と混合培養し、6 時間後に細胞を回収、その後ルシフェラーゼアッセイを行い、relative luc activity を算出した。

3) HTLV-I 感染伝播に関する因子の解析:

HCT-5 を各種濃度の microtubules 破壊剤 Nocodazole または p38 MAPK 特異的阻害剤 SB203580 にて 1.5 時間処理後、ウエスタンブロット解析を行うと共に、H9/K30 *Luc* 細胞と混合培養し、HTLV-I 感染伝播効率の変化を検討した。さらに各種濃度の抗インテグリン (CD11a/LFA-1 および $\alpha 4$ /CD49d) ブロッキング抗体にて H9/K30 *Luc* 細胞を 30 分処理後、HCT-5 との混合培養を行い、インテグリン/リガンド遮断による HTLV-I 感染伝播効率の変化を検討した。

4) ウエスタンブロット解析:p38 MAPK とその

下流にある MAP kinase-activated protein kinase-2 (MAPKAPK-2), および HTLV-I tax と gp46 発現について検討した。

(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) Microtubules 破壊剤 Nocodazole が HTLV-I 感染伝播に与える効果: 図 1a に示すように、Nocodazole 処理 HCT-5 において、2.5 μ M という低濃度においてもほぼ完全に HTLV-I 感染が阻害された。この場合、p38 MAPK の下流にある MAPKAPK-2 の活性化には影響を与えず、このことは microtubules は MAPKAPK-2 の下流にあることを示している。また、Nocodazole 処理は HCT-5 中の HTLV-I tax および gp46 発現にも影響を与えなかった (図 1b)。さらに、Nocodazole 処理は virological synapse の感染細胞側接着分子である ICAM-1 の発現にも影響を与えなかった (図省略)。

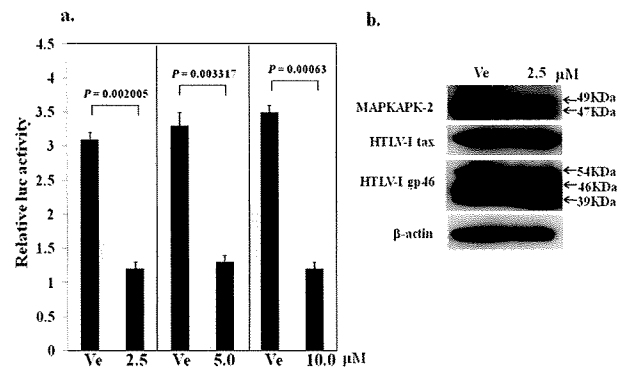


図1. Nocodazole処理HCT-5におけるHTLV-I感染伝播抑制効果

2) HCT-5 と TL-Su の感染伝播効率と p38 MAPK シグナル活性化の関係:

1) に示した事実より HTLV-I の感染伝播には細胞内骨格の再構成が強く関与していることを示している。細胞内骨格の再構成に、p38 MAPK シグナルの活性化が関与していることが報告されている。そこで、HTLV-I 感染伝播効率と p38 MAPK シグナル活性化の関係を解析した。図 2ab に示すように、HCT-5 は TL-Su に比較して、経時的にみても HTLV-I tax および gp46 の発現は低いにもかかわらず、明らかに効率のいい HTLV-I 感染伝播能を持っていた。そこで、経時的に p38 MAPK シグナルの活性化について、ウエスタンブロット解析を行った結果、HCT-5 においては TL-Su に比較して、p38 MAPK の活性化が明らかにされた (図 2b)。さらに、p38 MAPK のすぐ下流にある MAPKAPK-2 はリン酸化を受け活性化されると 49KDa のバンドが検出されるが、HCT-5 では TL-Su に比較して、明らかに MAPKAPK-2 も活性化されていた (図 2b)。

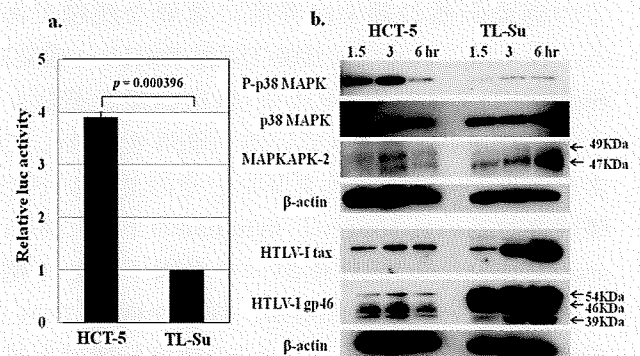


図2. HTLV-I感染伝播効率とp38 MAPKシグナリングの関係

3) p38 MAPK 特異的阻害剤 SB203580 が HTLV-I 感染伝播に与える効果: そこで p38 MAPK の阻害が HTLV-I 感染伝播に及ぼす影響を、その

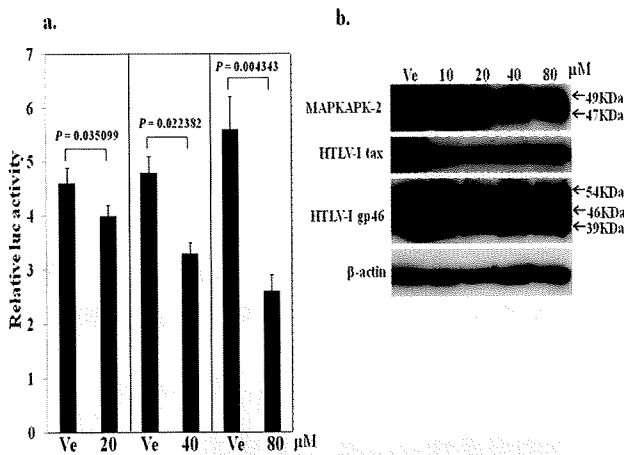


図3. SB203580処理HCT-5におけるHTLV-I感染伝播抑制効果

阻害薬である SB203580 にて HCT-5 を処理して検討した。その結果、図 3a に示すように、SB203580 濃度依存性に HTLV-I 感染を阻害した。ウエスタンブロット解析においてその下流である MAPKAPK-2 活性化の down-regulation は最大の HTLV-I 感染阻害効果を示す point (80μM) で顕著であった(図 3b)。SB203580 処理は ICAM-1 の発現には影響を与えなかった(図省略)。

4) インテグリン阻害が HTLV-I 感染伝播に与える効果: 図 4a に示すように、H9/K30 *Luc* 細胞に対する抗インテグリン(CD11a/LFA-1 および α4/CD49d)ブロッキング抗体による前処理は HCT-5 からの HTLV-I 感染伝播を約 20%低下させた。しかし、図 4b に示すように、抗インテグリンブロッキング抗体量を 2 倍に増やしても、その低下率に変化を与えなかった。

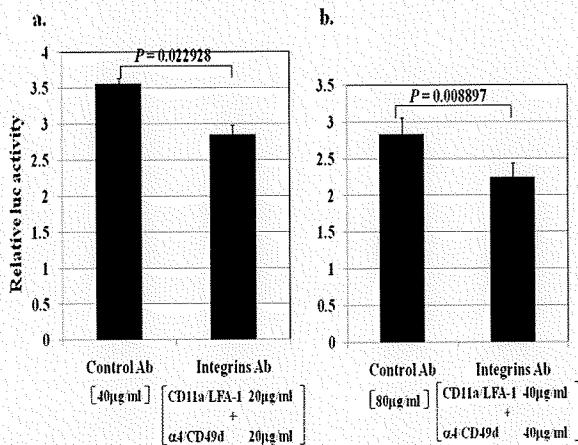


図4. 抗インテグリンブロッキング抗体処理によるHTLV-I感染伝播抑制効果

D. 考察

今回の検討によって、HTLV-I の感染伝播には細胞内骨格である microtubules の再構成が重

要な役割を果たしていることが、実際の HTLV-I の感染系で明らかにされた。Microtubules や actin などの細胞内骨格の再構成には、種々のシグナルが関与しているが、その中の一つに p38 MAPK シグナルがある。したがって、p38 MAPK シグナルの活性化が効率のいい HTLV-I の感染伝播を惹起できる可能性がある。なるほど、HTLV-I の感染伝播効率のいい HCT-5 は効率の悪い TL-Su に比較して、明らかに p38 MAPK シグナルが活性化されていた。そして、この活性化が HTLV-I の感染伝播効率に関与しているという事実は p38 MAPK シグナルの阻害実験によって明らかにされた。MAPKAPK-2 の下流には heat shock protein 27 があり、その活性化を通して、actin の再構成が誘導されるが、今回示された HCT-5 における MAPKAPK-2 の活性化はこの細胞株では細胞内骨格の再構成が活発に生じていることを強く示唆している。したがって、HCT-5 における HTLV-I の効率のいい感染伝播能は p38 MAPK シグナル活性化に起因している可能性が十分に考えられると共に、p38 MAPK は HTLV-I の感染伝播を regulate する分子の一つである可能性がある。

さて、これまでに HTLV-I の感染伝播は virological synapse を介して行われることが報告されているが、インテグリン阻害実験の結果からは、高々20%位の抑制効果しか得られず、少なくともこの混合培養系においては、他の感染伝播経路が存在することが示唆された。さらに、HCT-5 における p38 MAPK シグナルの活性化は、単純にインテグリン/リガンドシグナルから small GTPase の活性化にのみ起因するのではなく、他の因子の関与も考えられた。

我々は HAM/TSP 患者末梢血 HTLV-I 感染細胞は組織浸潤能が亢進していることを報告している。細胞の組織浸潤にも細胞内骨格の再構成が強く関与しているが、HAM/TSP 患者 HTLV-I 感染 T 細胞における p38 MAPK の活性化はこの点にも関与している可能性がある。さらに、我々は HAM/TSP 患者 HTLV-I 感染細胞における Th1 の活性化は p38 MAPK シグナリングの活性化に IL-2 シグナリングの活性化が加わることによって生ずることを報告している。このように、HAM/TSP 患者 HTLV-I 感染細胞における p38 MAPK

の活性化はHAM/TSPの発症と病態形成において重要な役割を演じている可能性がある。

E. 結論

p38 MAPKの活性化は、HAM/TSP患者HTLV-I感染T細胞におけるHTLV-I感染伝播において重要な役割を果たしている細胞内骨格の再構成に関与し、HTLV-Iの効率のいい感染伝播を惹起する一因となっている可能性がある。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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;14:533-542.
- 2) 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;48:854-855.
- 3) Nakamura T, Nishiura Y, Eguchi K. Therapeutic strategies in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* 2009;9:137-149.
- 4) Nakamura T. HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): the role of HTLV-I-infected Th1 cells in the pathogenesis, and therapeutic strategy. *Folia Neuropathol.* 2009; 47:182-194.
- 5) Fukuda T, Shiraishi H, Nakamura T, Tanaka K, Nakamura H, Tsujino A, Nishiura Y, Yoshimura T, Motomura M, Eguchi K. Efficacy of Tacrolimus in Sjögren's Syndrome Associated CNS Disease with Aquaporin-4

Autoantibodies. *J Neurol.* 2009;256:1762-1764.

2. 学会発表

- 1) 中村龍文. HTLV-I関連脊髄症における新規治療法—アポトーシスによるHTLV-I感染細胞標的治療の試み—. シンポジウム(1) 炎症・自己免疫・臓器障害とアポトーシス. 第18回日本アポトーシス研究会学術集会. 2009年8月. 長崎.

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

抗 HTLV-I 抗体・抗 aquaporin-4 抗体共陽性脳幹脊髄炎の病態解析

研究分担者：梅原 藤雄 鹿児島大学医歯学総合研究科神経病学

共同研究者：鹿児島大学神経内科：道園久美子、林 大輔、森山 宏遠

鹿児島大学眼科：中尾久美子

佐賀大学医学部神経内科：岡田竜一郎、原 英夫

琉球大学医学部免疫学：齊藤峰輝

東北大学医学部神経内科：高橋利幸

研究要旨

抗 HTLV-I 抗体・抗 aquaporin-4 抗体共陽性脳幹脊髄炎の自験例を中心に、この病態の位置付けについて検討した。HTLV-I 陽性 AQP-4 抗体陽性脳幹脊髄炎は女性に多い。血清及び髄液中抗 HTLV-I 抗体は両群とも陽性である。HTLV-I 陽性 AQP-4 抗体陽性脳幹脊髄炎では視神経炎や難知性吃逆は、高率に認める。HTLV-I 陽性 AQP-4 抗体陽性脳幹脊髄炎は時間から日の単位で症状が完成する。HTLV-I 陽性 AQP-4 抗体陽性脳幹脊髄炎は臨床的には Neuromyelitis optica であり、HAM とは異なる。

A. 研究目的

抗 HTLV-I 抗体・抗 aquaporin-4 抗体共陽性脳幹脊髄炎の臨床的病態を明らかにする。

B. 研究方法

自験例を中心に、この病態の位置付けについて検討した。抗 HTLV-I 抗体・抗 aquaporin-4 抗体共陽性脳幹脊髄炎の自験例を中心に、この病態の位置付けについて検討した。

倫理面への配慮：個人情報保護に努めた。

C. 研究成果

症例1：77 歳 女性

主訴：視力低下・両足麻痺

現病歴：70 歳：急に右眼の視力が低下したが 1 ヶ月程で自然軽快した。71 歳：

急に両足筋力低下出現。横断性脊髄炎の診断でステロイド療法を受けて症状は改善し、3か月で退院。73 歳：両眼の視力低下、ステロイド治療で改善した。77 歳：3 月転倒し脊椎圧迫骨折 Interferon- β 療法開始 6 月中止。7 月 両足脱力悪化 ステロイド療法で改善。8 月 再度両足脱力悪化 ステロイド療法で改善 独歩可能になった。9 月、再度両足脱力・視力悪化したため、ステロイド療法を受け下肢筋力は改善したが、視力低下は残存した。

既往歴：55 歳 フィラリア症のため腎手術

家族歴：特記事項なし。

神経学的所見：

右眼：視力低下、対光反射 sluggish

運動系：上肢：筋力は正常、巧緻運動

正常、下肢近位部に中度の筋力低下、
感覚系：両そけい部以下の触覚、下肢
振動覚低下、Romberg 徴候 陽性。

腱反射は、上下肢ともに中程度亢進、
両側 Babinski 反射が陽性。抗 HTLV-I
抗体 (PA)：血清 2048 倍、髄液 64 倍。
末梢血：HTLV-I プロウイルス量 80
copies/ 10^4 MNC, 髄液：細胞 $1/\text{mm}^3$,
蛋白 71mg/dl。

VEP: 左眼視 P100 109msec, 右眼視
P100 107 msec

脊髄 MRI: Th6-8 T2 高信号域、Gd 造
影効果を認めている。メチルプレドニゾ
ロンパルス療法後、ステロイド経口療法
を継続し、下肢の麻痺は徐々に改善し
た。その後、経口プレドニゾロンの減量
に伴い、視神経炎、脊髄炎による
paraplegia を再発し、その度にステロイド
パルス療法で症状は改善するものの、
徐々に視力障害、両下肢麻痺が進行し
ていった。その後、AQP4 抗体陽性であ
ることが判明した。

症例2: 75 歳女性例。

主訴: 両上下肢の麻痺

既往歴: 75 歳 肛門周囲膿瘍の手術を
受け、人工肛門。

現病歴: 74 歳: 歩行時のふらつき出現。
右手の震え、右肩-上腕の痛み出現、
徐々に悪化。75 歳: 1 月 25 日から、排尿
障害出現。1 月 26 日から歩行時に膝に
力が入りにくくなる。某病院にて、脊髄梗
塞の診断を受けた。7 月 26 日から、急
に左手の脱力出現、その後右手の筋力
も低下。10 月当科入院。

現症: 身長 147cm、体重 38kg、血压

80/50mmHg。

神経学的所見: 意識清明、脳神経 異常
なし、運動系 筋力 上肢 3/5 下肢 1/5
起立・歩行不能。

検査: 抗 HTLV-I 抗体 血清 x512 髄液
x16。髄液 細胞 $3/\text{mm}^3$, 蛋白 59mg/dl
糖 IgG index 0.85, MBP 272ng/ml。

MRI: C5-6, Th3-6 に T2 高信号域があり、
一部には Gd 造影効果を認めた。Axial
image では脊髄中心部に T2 高信号域が
広がっていました。この例はステロイド
パルス療法により、上肢の筋力は軽度
改善したことから、多発性硬化症疑い
という診断で経過をみた。後に AQP-4 抗
体が陽性であることが判明した。

症例3: 51 歳 女性

主訴: 両上下肢の痛み、しびれ

既往歴: 38 歳頃 左顔面神経麻痺

現病歴: 49 歳: 嘔吐、食欲不振あり、1 週
間ほどで自然軽快した。頭部 MRI では
異常なし。50 歳: 嘔吐、食欲不振、吃
逆が 1 週間続いたが自然軽快した。51
歳: 嘔吐、食欲不振が出現。頸部前屈
時の放散痛と四肢のしびれ、吃逆が出
現。さらに四肢の灼熱感と激痛が増強
するため、当院入院。

神経学的所見

意識清明、脳神経: 視力低下なし、運
動系: 筋力 上肢 3/5 下肢 1/5、起立・
歩行不能

感覚系: 下肢振動覚低下、左上肢しび
れ、両下肢感覚低下 Lhermitte sign(+)

検査: 抗 HTLV-I 抗体 血清 x2048 髄
液 x16

髄液: 細胞 $19/\text{mm}^3$, VEP 両側 P100 延

長 (Rt 110 msec, Lt 119 msec)

MRI:C2-6 レベルにかけて脊髄腫脹、T2 高信号域があり、加えて延髄に DWI で高信号を示す病変と、大脳白質に多発性高信号域が多発性に見られた。ステロイドパルス療法により、四肢の疼痛は軽減し、MRI 異常も縮小傾向を示した。この例も抗 AQP-4 抗体が陽性であった。

症例4:46 歳の女性。主訴は最初嘔吐・嘔気を生じ、さらに歩行困難を生じて来院した。家族歴・既往歴に特記事項なし。現病歴:2月1日に嘔気・嘔吐を生じ、食思不振に陥った。数日して吃逆が出現した。近医に入院し、胃内視鏡検査など消化器系の精査で異常を認めなかった。吃逆が収まってきたので退院したが、嘔気・嘔吐は持続し、うつ病と診断され、別のクリニックで抗うつ剤が処方された。一ヶ月以上経って、最初は歩行時に浮動感を感じ、徐々に歩行が困難になった。10日ほどで、複視と、湯の温度が感じられなくなるなどの感覚の異常を自覚し、当院に入院した。

入院時現症:一般身体所見では、2ヶ月で7kgの体重減少を認めた。神経学的所見:脳神経では右眼球の外転・下転障害、嚙下障害を認めた。運動系では両上肢のMMT4の筋力低下、体幹失調を認めた。感覚系ではTh10レベル以下の全感覚低下を認めた。腱反射は両側の膝蓋腱とアキレス腱で亢進を認めた。両側の腹壁反射は消失していた。病的反射では、両側でバビンスキー反射が陽性。排尿困難を認めた。白血球で、

3%の異常リンパ球を認めた。抗核抗体と抗 AQP4抗体が陽性。抗 HTLV-1 抗体は、血清で4096倍、髄液で64倍であった。髄液検査では、細胞数増多、髄液タンパク・IgG が上昇し、ミエリン塩基性タンパクも上昇していた。オリゴクローナルバンドは陰性。VEPでは異常を認めなかった。

頭部 MRI:T2 強調画像では、延髄最下部から上部頸髄に高信号病変を認めた。同部ガドリニウム造影 T1 強調画像では淡い増強効果を認めた。胸髄での T2 強調画像では、第7胸髄および第8胸髄レベルに、矢状断像で縦に長い高信号病変を認め、横断像では、左側に優位に位置していた。ガドリニウム造影 T1 強調画像では、淡く造影効果を認めた。橋・中脳・大脳半球に病変は認めなかった。臨床経過:入院第1病日からメチルプレドニゾロン1gで3日間のパルス療法を行い、4日目からプレドニゾロン45mgの内服に変更した。プレドニゾロンは漸減し、1日量20mgを維持量として退院した。症状は嘔吐が急速に改善し、5日目から摂食良好となった。歩行障害、複視も2週間で消失した。感覚低下は改善傾向であったが、退院時も温痛覚鈍麻が残った。退院前の髄液検査は細胞数・タンパク・IgG は所見の改善を認めた。EDSS は入院時4.0、退院時は1.0になっていた。

D.考察

自験4例、文献2例、計6例は、女性5例、男性1例、発症年齢は51-75歳。MRIでは頸髄、胸髄、2例では延髄、大脳にも病変が見られている。最も重要な

点は、脊髄炎・脳幹炎の発症経過である。これらの症例に共通するのは、発症が突然または数時間から数日の経過で立ち上がっていることである。これは、まさに acute の経過と言える。2006 年に Wingerchuk らが発表した *Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica* において、主要徴候として視神経炎と acute myelitis が挙げられている。一方、variant HAM または急速進行型 HAM は、ほとんどいずれも数カ月の単位で進行しており、chronic である。

さて、もうひとつの重要な点は、視神経炎と難治性吃逆の合併である。HTLV-I 陽性 NMO の例では、6 例中 5 例で視神経炎または VEP の異常が見られます。また難治性吃逆も 2 例で見られる。一方、HAM では、HAM 患者眼疾患の調査で視神経炎合併例は 0/175 例、2002-2009 年 鹿児島大学神経内科入院 HAM 連続症例 HAM における視神経炎の合併 0/100 例である。基本的には HAM に視神経炎が合併することはほとんどない。HAM 患者の VEP の検討でも通常正常範囲である。また、難治性吃逆が NMO の特徴的な症状であることは報告されているが、2002-2009 年鹿児島大学神経内科入院 HAM 連続症例で HAM における intractable hiccup の頻度は 0/100 例、難治性吃逆も HAM で起きることはほとんどない。さらに、variant HAM においても然りで、視神経炎や難治性吃逆の合併は 1 例もなく、これらは NMO とは歴然とした違いがある。

Variant HAM と HTLV-I 陽性 AQP-4 抗

体陽性脳幹脊髄炎の比較である。発症年齢には大きな差はない。HTLV-I 陽性 AQP-4 抗体陽性脳幹脊髄炎は女性に多く、これは NMO と同じである。血清及び髄液中抗 HTLV-I 抗体は両群とも陽性である。一方、抗 AQP-4 抗体は variant HAM で陰性である。視神経炎や難治性吃逆は、典型的 HAM と同様に Variant HAM では 1 例もなく、一方 HTLV-I 陽性 AQP-4 抗体陽性脳幹脊髄炎では高率に認める。発症経過は variant HAM, rapidly progressive HAM では週から月の単位で進行するのに対し、HTLV-I 陽性 AQP-4 抗体陽性脳幹脊髄炎は時間から日の単位で症状が完成する。

E. 結論

Variant HAM は HAM であり、HTLV-I 陽性 AQP-4 抗体陽性脳幹脊髄炎は NMO である。この両者は異なる病態であり、鑑別は症状の経過、視神経炎・難治性吃逆など、HAM になく NMO に特徴的な症状・病歴の有無に注意することで、可能である。

G. 研究発表

論文発表なし
学会発表なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

厚生労働省科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

HAM 脊髄における HTLV-I 特異的 CTL の集積

分担研究者 久保田龍二 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科准教授
研究協力者 松浦 英治 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科研究員

研究要旨：HAM 脊髄では血管周囲の単核球浸潤が著明であり、HTLV-I 感染リンパ球の浸潤が報告されているが、HTLV-I 特異的 CTL の浸潤は不明である。HAM 脊髄を用いて、tetramer にて HTLV-I 特異的 CTL を検出し、HTLV-I 特異的炎症が起こっているのかを明らかにした。HLA-A2 陽性、HLA-A24 陽性、HLA-A2/A24 陽性の HAM 患者 3 例の凍結剖検脊髄を用いた。In situ tetramer 染色法を改善し、脊髄における A2 拘束性 Tax11-19 特異的 CTL、および A24 拘束性 Tax301-309 特異的 CTL を免疫組織化学法にて検出した。Tetramer は、CD8 または granzyme B と共染色し共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。A2 陽性 HAM 患者脊髄では CTL は血管周囲に認められ、CD8 と共染色された。CD8 中の CTL 頻度は 22.1%であった。A24 陽性患者では CD8 中の CTL 頻度は 31.1%であった。A2A24 陽性例はほとんど細胞浸潤を認めなかった。CTL の一部は granzyme B で染まった。HAM における末梢血 CD8 中の CTL の頻度は平均 4-5%であり、脊髄に HTLV-I 特異的 CTL が高度に集積していた。これらの細胞は細胞傷害能をもっていると示唆された。以上より、末梢から HTLV-I 感染リンパ球と HTLV-I 特異的 CTL が脊髄に浸潤して、HAM の脊髄炎症が起こっていると考えられた。

A. 研究目的

HTLV-I 関連脊髄症（HAM）は、HTLV-I 感染者の一部に発症する。我々は、HAM 患者では無症候性 HTLV-I キャリアと比べて、HTLV-I ウイルス量が高いこと、HTLV-I に対する免疫反応が高いことを、末梢血リンパ球を用いた研究を行い報告して

きた。また、HAM の神経症状を引き起こす脊髄の炎症部位では、血管周囲に CD4 陽性および CD8 陽性の単核球浸潤が強いこと、炎症の程度は罹病期間とともに減少すること、さらに in situ hybridization 法および in situ PCR 法により、脊髄では HTLV-I 感染細胞は浸潤している CD4 陽性リンパ

球であり、神経系細胞には感染していないことを報告してきた。しかしながら、HTLV-I 特異的な免疫反応が起こっているかは、まだよくわかっていない。近年、抗原/HLA 多量体 (tetramer) が開発され、flow cytometry を用いて抗原特異的 T 細胞の検出が容易に行われるようになった。さらにこの tetramer を用いて、HIV 感染症において組織内に浸潤している抗原特異的 T 細胞を同定する試みが、Haase らによって報告された。今回我々は、in situ tetramer 法を改善し、HAM の脊髄病変部位で HTLV-I 特異的 CTL の検出を試み、また併せてこれら CTL のエフェクター分子の同定を行い、HTLV-I 特異的炎症が起こっているのかを明らかにしようとした。

B. 研究方法

HTLV-I 感染症において、HTLV-I 特異的 CTL のほとんどは HTLV-I Tax に対するものであり、HLA-A2 および HLA-A24 陽性患者では、それぞれ Tax11-19 および Tax301-309 が強力な immunodominant epitope であることが知られている。当研究室で凍結保存してある 9 例の HAM 患者剖検脊髄の内、HLA-A2 または A24 が陽性の症例は 3 例認められ、対象とした。PE 標識 Tax11-19/HLA-A*0201 tetramer および Tax301-309/HLA-A*2402 tetramer を合成した。これらの tetramer を用いて、凍結脊髄を免疫組織化学法にて染色し、光顕で観

察した。また tetramer は CD8 や granzyme B などと蛍光二重染色し、共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。HTLV-I 感染細胞は、抗 HTLV-I Tax および Env 抗体で検出した。Apoptosis 細胞の検出には active Caspase 3 抗体を用い、CD4 および神経系細胞特異的抗体と二重染色を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は鹿児島大学倫理委員会の承諾を得て行った。剖検組織の研究使用に関しては解剖の際に、インフォームドコンセントを得て行った。

C. 研究結果

HAM の脊髄の髄膜および実質の、特に血管周囲に、HTLV-I 特異的 CTL を多数検出した (図 1)。二重染色では、tetramer 陽性 CTL は全て CD8 陽性細胞であり、CD8 細胞中の HTLV-I 特異的 CTL の頻度を計測したところ、計測可能な 2 例において 20% 以上であり、CTL は高度に脊髄に集積していた (表 1)。これらの症例では末梢血中のリンパ球は保存されておらず、患者本人の末梢血中の CTL の頻度と比べることはできなかったが、通常 HAM 患者末梢血中 CD8 細胞中の CTL の頻度は平均 4-5% であることから、これらの症例で、HTLV-I 特異的 CTL は、末梢から選択的に脊髄に浸潤していることが示唆された。

また、HTLV-I 陽性細胞も主に脊髄の血管周囲に認められ、tetramer 陽