

養した。この細胞におけるウイルス持続感染を証明するために、ウイルス抗原 VP1 の保有を免疫染色により確認し、さらに、感染性ウイルス粒子の産生をプラークアッセイにより解析した。また、細胞生存率をトリパンブルー染色により解析し、持続感染細胞の性状についても検証した。

そして、PDAJ (P-10/70 days) の培養上清中に分泌されるサイトカインの変動をサイトカイン抗体アレイにより解析した。比較対象には、TV-DA 急性感染後 18 時間、TV-GDVII 急性感染後 16 時間、および、非感染 J774 細胞の培養上清を用いた。

研究結果

PDAJ におけるウイルス抗原 VP1 の保有率は常に 40 % 程度であり、細胞生存率は 40 ~ 60 % 程度で推移した。また、感染性ウイルス粒子の産生も、 $2.3 \times 10^5 \sim 1.6 \times 10^6$ pfu/ml を維持していた。このことから、J774.1 における DA の持続感染成立が確認された。サイトカイン抗体アレイによる解析からは、GDVII, DA 急性感染、および、DA 持続感染すべてにおいて発現増加 3 種 (RANTES 他)、DA 急性感染、および、DA 持続感染で増加 12 種 (うち DA 持続感染における増加が著しかったサイトカイン 1 種 / IL-10)、DA 急性感染でのみ増加 4 種 (IFN- γ 他)、そして、DA 持続感染でのみ増加 2 種 (G-CSF, BLC/CXCL13)、減少 1 種 (IFN- γ) のサイトカインの発現変動が認められた。GDVII 急性感染でのみ発現変動するサイトカインは認められなかった。

考察・結論

PDAJ は、感染性ウイルス粒子を 0.6 ~ 5 pfu/cell 程度常に産生しており、さらに、ウイルス抗原保有率と細胞生存率が一定のバランスで維持されていたことから、維持型持続感染が成立していることが示唆された。

サイトカイン抗体アレイによる解析から明

らかとなった、GDVII 急性感染、DA 急性感染、DA 持続感染の全てで増加した 3 種、DA 急性感染および DA 持続感染で増加した 12 種、DA 急性感染でのみ増加した 4 種のサイトカインは、ウイルス感染に対する免疫応答としての炎症に関与している可能性が考えられた。そして、DA 持続感染で認められた IFN- γ の減少と IL-10 の顕著な増加からは、それぞれ、アポトーシスの誘導低下、および、ウイルス抗原特異的 CTL の誘導抑制が考えられ、持続感染への関与が強く示唆された。また、DA 持続感染でのみ増加した G-CSF および BLC/CXCL13 は、ともに MS 患者において高値に発現していることが報告されていることに加え、G-CSF 投与による MS の悪化と、抗 BLC 抗体投与による EAE の改善が報告されていることから、G-CSF および BLC/CXCL13 が、ウイルス性脱髄の悪化に関与している可能性が強く示唆された。

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

TNF- α は GM-CSF 刺激によるミクログリアの樹状細胞への分化を促進する

分担研究者 錫村 明生¹⁾

共同研究者 李花¹⁾、藺部 佳史¹⁾、竹内 英之¹⁾、水野 哲也¹⁾

研究要旨

本研究では、ミクログリアが樹状細胞へ分化するかについて検討した。マウスの初代培養から取ったミクログリアが GM-CSF、TNF- α および LPS の刺激による表現型の変化と機能の変化を骨髄由来の樹状細胞(BM-DC)と比較して検討した。その結果、ミクログリアは刺激によって樹状細胞表面マーカーである CD11c、DeC205、MHC class II、CD80、CD86、CD83、CD209 を発現した。また、ミクログリアは刺激によって機能的にも成熟樹状細胞へ分化していることが明らかになった。すなわち、刺激によりミクログリアは貪食作用は減少しながら、抗原提示作用は増加して、サイトカインの産生を誘導した。これらの結果から、中枢神経系(CNS)の炎症場面でミクログリアは樹状細胞へ分化する可能性が示され、多発性硬化症(MS)の活動性病変部で出現する樹状細胞(DC)は CNS 局在のミクログリアから分化する可能性が示唆された。

研究目的

MS は CNS の炎症性脱髄と神経変性疾患を特徴とする。その動物モデルとして実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)マウスがよく使われている。また、DC は末梢における最も重要な抗原提示細胞として機能することが知られている。最近の研究によると、MS と EAE の活動性病変部で成熟樹状細胞が出現することが示されている。その起源として、血管内からの浸潤、または、CNS 内の細胞からの分化が考えられるが、その詳細は不明である。これまで、我々はミクログリアが CNS における最も重要な抗原提示細胞として機能することを示してきた。また、先行研究により活性化ミク

グリアは MS と EAE の活動性病変部で出現することが分っていた。しかしながら、MS と EAE の活動性病変部でのミクログリアの機能はまだ十分に解明されていない。そこで、本研究ではミクログリアが成熟 DC へ分化するか否かについて検討した。

研究方法

本研究では、ミクログリアの分化について BM-DC と比較しながら検討した。マウスの初代培養から得られたミクログリアを GM-CSF もしくは GM-CSF、TNF- α 及び LPS で刺激して DC 表面マーカーの発現について RT-PCR 法とフローサイトメトリーで検討した。BM-DC はマウスの骨髄細胞を GM-CSF の存在下で 6 日間培養したものを用いた。ミクログリ

1)名古屋大学環境医学研究所神経免疫分野

アの貪食作用は、蛍光マイクロビーズを貪食させ、蛍光強度でミクログリアの貪食作用をあらわした。抗原提示作用の検討は、ミクログリアをMOG感作により作成したEAEマウスから採取したCD4⁺T細胞と共培養してMOGで再刺激した。3日間培養後、BrdUアッセイでT細胞の増殖を測定した。刺激によるミクログリアのサイトカイン産生についてはRT-PCR法及びELISAで検討した。

研究結果

無刺激のミクログリアはDC表面マーカーのCD11c、DeC205、MHC class IIを発現していないが、GM-CSFの刺激によってBM-DCと同じレベルに発現した。また、DC表面マーカーのCD80とCD86の発現はGM-CSFの刺激によって増加した。ミクログリアをGM-CSFとTNF- α で刺激するとDC表面マーカーの発現が増加し、さらにLPSで刺激して成熟状態になるとDC表面マーカーの発現がより増加した(図1)。このように、GM-CSF、TNF- α 及びLPSの刺激によって成熟DCへ分化したミクログリアは成熟DCマーカーのCD83の発現を増加していたが、成熟DCへ分化するにつれて未成熟DCマーカーのCD209の発現は減少した。また、成熟DCへ分化したミクログリアは貪食作用が減少し、抗原提示作用は増加し、IL-12、IL-6などのサイトカインの産生が誘導された。

考察

これまでの研究で、病的条件で、GM-CSFはアストロサイト、オリゴデンド

ロサイト、血管内皮細胞等のCNS細胞から分泌され、TNF- α は主に活性化ミクログリアから分泌されることが分かっている。本研究から、GM-CSF、TNF- α 及びLPSの刺激によってミクログリアは表現型と機能的に有効な成熟DCへ分化することを示された。このことから、MSとEAE病変部のDCはCNS局在のミクログリアから分化する可能性が示唆された。

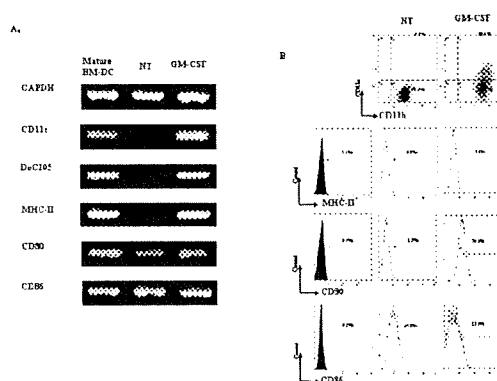


図1. ミクログリアのDC細胞への分化

結論

TNF- α はGM-CSF刺激によるミクログリアがDCへ分化するのを促進し、MSとEAEの活動性病変部で出現するDCはCNS局在のミクログリアから分化する可能性が示唆された。

健康危険情報：なし

知的財産権の出願・登録状況：なし

実用新案登録：なし

制御性樹状細胞に対するミッドカインの役割

分担研究者 錫村 明生¹⁾

共同研究者 菌部 佳史¹⁾、李 花¹⁾、竹内 英之¹⁾、水野 哲也¹⁾

研究要旨

本研究では、ミッドカイン阻害による実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE) の抑制メカニズムを解明することを目的として研究を行った。ミッドカインは IL-12 の誘導を介して制御性樹状細胞による制御性 T 細胞 (Regulatory T cells: Treg) の分化を有意に抑制した。また、ミッドカインによる制御性樹状細胞における IL-12 の誘導機序には、脱リン酸化酵素である Src homology phosphatase-2 (SHP-2) が関与していることも明らかとなった。さらに、ミッドカインで刺激された制御性樹状細胞は未刺激の制御性樹状細胞と比較して有意に EAE を悪化させた。したがって、抗ミッドカイン RNA アプタマーによる EAE の抑制機序として、制御性樹状細胞の誘導を介した Treg の上昇が関与することが示唆された。

研究目的

我々は、先行研究において、細胞外のタンパク質の機能を阻害することができる人工合成核酸物質である RNA アプタマーを用いて、成長因子であるミッドカインを阻害することにより CD4+CD25+Foxp3+ 制御性 T 細胞 (Regulatory T cell: Treg) の割合を増加させ、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE) を抑制することを見出した¹⁾。しかしながら、その詳細なメカニズムについては不明である。本年度は、Treg を誘導する樹状細胞である制御性樹状細胞に着目し、ミッドカインの効果、ミッドカイン抑制の効果を検討し、ミッドカイン抑制による自己免疫抑制機序の解明を試みた。

研究方法

樹状細胞及び制御性樹状細胞はマウス骨髄細胞をそれぞれ 10 ng/ml GM-CSF 及び 10 ng/ml GM-CSF、20 ng/ml IL-10、20 ng/ml TGF-beta と共に 6 日間培養することにより誘導された。その後、LPS で 24 時間刺激することにより成熟樹状細胞を得た。サイトカインの産生に関しては ELISA 法、細胞表面抗原の発現、細胞内サイトカイン及び Foxp3 の発現に関してはフローサイトメトリーにより解析した。また、C57BL/6 由来樹状細胞を Balb/c 由来 CD4+CD25-T 細胞と共培養することによりアロ抗原反応を引き起こし、抗原提示能及び Treg 誘導能について評価した。細胞内転写因子の発現に関しては、Western blotting により評価した。in vivo における樹状細胞の役割については EAE を用いて検討した。

1) 名古屋大学環境医学研究所神経免疫分野

(倫理面への配慮) 全ての動物実験は名古屋

大学動物実験委員会の承認のもとに、その指針に則って行われた。

研究結果

ミッドカインで刺激された制御性樹状細胞 (DCreg+MK) は、未刺激の制御性樹状細胞 (DCreg) と比較して、Treg の分化誘導能が有意に抑制された。この結果と一致して、これらの樹状細胞を EAE に移入したところ、DCreg と比較して、DCreg+MK では EAE の臨床症状が有意に悪化し、Treg が有意に減少した。さらに、抗ミッドカイン RNA アプタマーを投与した EAE の脾臓及びリンパ節においては、PBS 投与群と比較して、有意に制御性樹状細胞 (DCreg) の割合が増加していた。それぞれの樹状細胞における抗原提示関連分子及びサイトカインの産生について検討したところ、DCreg+MK における IL-12 の産生量が DCreg と比較して有意に増加していた。さらに、抗 IL-12 中和抗体及びリコンビナント IL-12 を用いた実験により、ミッドカインによる制御性樹状細胞の Treg 分化抑制効果については IL-12 が関わっていることが明らかとなった。また、ミッドカインによる制御性樹状細胞における IL-12 誘導機序について検討したところ、ミッドカインは制御性樹状細胞において Src homology phosphatase-2 (SHP-2) を誘導した。ミッドカインは IL-10 により誘導されたリン酸化 STAT3 を脱リン酸化し、その効果は SHP-2 阻害剤を加えることにより阻止された。ミッドカインによる樹状細胞を介した Treg の分化抑制効果も、SHP-2 阻害剤によ

り阻止された。

考察

本研究により、ミッドカインが制御性樹状細胞による Treg 分化誘導能を抑制することが明らかとなった。前述のように、制御性樹状細胞はナイーブ T 細胞を Treg へと分化させる能力をもつので、多発性硬化症を治療するに際して制御性樹状細胞を増加させることは、いわば Treg 分化のメカニズムの根幹を制御することを示しており、直接的に Treg を増加させることよりも効果的であると考えられる。したがって、抗ミッドカイン RNA アプタマーは多発性硬化症の治療法として有効であることがさらに示された。

結論

ミッドカインを抑制することにより、制御性樹状細胞の誘導を介して Treg が上昇し、EAE が抑制される。

文献

1) Wang et al. Inhibition of midkine alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis through the expansion of regulatory T cell population, **Proc Natl Acad Sci USA** 105: 3915-3920 2008.

健康危険情報：なし

知的財産権の出願・登録状況：なし

実用新案登録：なし

免疫性神経疾患の高感度自己抗体プロファイル

研究協力者 三木哲郎

班 員 吉良潤一

共同研究者 河野祐治

愛媛大学大学院医学系研究科加齢制御内科学

九州大学大学院医学研究院神経内科学

研究要旨

【目的】本研究では、多発性硬化症(MS)と慢性炎症性脱髄性多発根神経炎(CIDP)の病態解明、バイオマーカー開発、再発・予後予測を目的とする。具体的には自己抗体プロファイルと新規自己抗体の検索を行う。【方法】無細胞タンパク質合成系で作製された蛋白ライブラリとアルファスクリーンを用いた。最初のスクリーニングでは典型的なMS患者の再発期の血清を用いた。【結果】これまでのところ 1092 蛋白を用いて、MS 3 検体、健常者 3 検体を行った。MS 患者に多い自己抗原、健常者に多い自己抗原が分類できた。【考察・結論】スクリーニング系が確立された。ミエリンや炎症関連抗原に限定せずに広く抗原を検討することにより、非ミエリン抗原や、病的状態でのみ発現するような抗原に対する自己抗体が検出できると想定される。

研究目的

本研究では、多発性硬化症(MS)と慢性炎症性脱髄性多発根神経炎(CIDP)の病態解明、バイオマーカー開発、再発・予後予測を目的とする。具体的には自己抗体プロファイルと新規自己抗体の検索を行う。

MS, CIDP 共に患者間での再発頻度や再発の場所、寛解再発型、慢性進行型などの臨床型や組織学的にも多様性が大きく、単一疾患ではないと考えられてきた。これまでに MS では抗 Aquaporin-4 (AQP4)抗体が、日本では視神経脊髄型 MS とされてきた病型の多数で証明され、補体依存性の astrocyte の脱落に伴った間接的脱髄機序が推定されている。一方 CIDP からも抗 MAG 抗体、IgM 抗 GM1 抗体などを持つ特有の病態が分離され、自己抗体の検討は病型分類、病態機序の解明に有効と考えられる。先行研究としては Quintana らが、わずかに 362 の、ミエリンと炎症に関連した抗原のみで自己抗体プロファイルを検討している。しかし前述の AQP4 はミエリン関連抗原ではなく、抗原を最初から限定する方法では数多くの重要な抗原を見落としている可能性が高い。

そこで網羅的に抗原を検索することとした。

研究方法

小麦胚芽を用いた無細胞タンパク質合成系で作製された蛋白ライブラリとアルファスクリーンにより自己抗体プロファイルの作成と新規自己抗体の検索を行う。将来的にはヒトの全 cDNA を用いて蛋白ライブラリを作製し、検討を行うが、現在は約 2000 蛋白が利用できる状態にあるため、まずその 2000 蛋白で研究を開始した。今回用いるアルファスクリーンは、分離・洗浄ステップの必要が無く、1 日で約 6000 の蛋白-血清の組み合わせでのスクリーニングが可能である。

MS 患者 5 名、CIDP 患者 5 名、健常者 5 名の血清を用いて蛋白ライブラリに対する自己抗体をスクリーニングする。このスクリーニングでは MS 患者血清は、画像的に Barkhof の MRI 診断基準をみたす典型的な寛解再発型の再発期のみとした、CIDP も典型例のみとした。そこで患者と健常者にて抗体価に差の見られた抗原を 100 から 200 選択する。次に症例を増やし、典型例、非典型例の再発期と寛解期、慢性進行型、その他の炎症性、非炎症性神経疾患、での検討を行う。

(倫理面への配慮)本研究は個人の情報は決して表に出ることが内容に最新の注意を払い、プライバシーの保護には十分に配慮した。

研究結果

これまでのところ1092蛋白を用いて、MS 3検体、健常者3検体行っている。MS患者に多い自己抗原としてACSL6, GPR172A, PXMP4, ALG3, GRAMD1Cなどが、健常者に多い自己抗原としてACAT2, DUSP12, POLR3GL, TPM3, ACP1などが得られた。今後、残りの蛋白ライブラリでのスクリーニングを行い、後期スクリーニングのための標的蛋白の選定を行う。

考察

現行の無細胞タンパク質合成系で合成される蛋白質は、特に膜蛋白の場合に技術的な問題があるなど、問題も多い。しかしミエリンや炎症関連抗原に限定せずに広く抗

原を検討することにより、前述のAQP4のような非ミエリン抗原や、病的状態でのみ発現するような抗原に対する自己抗体が検出できると想定され、各病型、寛解期、再発期における詳細な自己抗体プロファイルの作製、および新規自己抗体の検出あるいはバイオマーカーとしての利用が可能となる。それは診断精度の向上と最適な治療法開発、選択につながると想定される。

結論

蛋白ライブラリのスクリーニング系が確立でき、MS患者に多い自己抗原、健常者に多い自己抗原が分類できた。

健康危険情報

なし

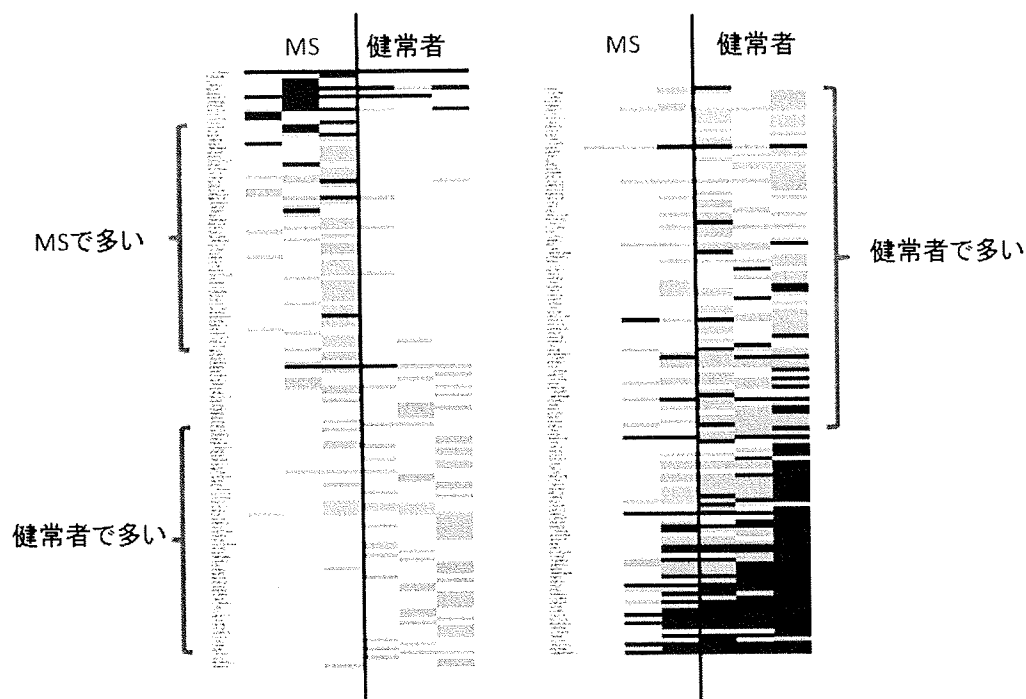
知的財産権の出願・登録状況

特許取得:なし

実用新案登録:なし

免疫性神経疾患の高感度自己抗体プロファイル

結果(1092蛋白までの途中経過)



解説

1. 多発性硬化症(MS)と慢性炎症性脱髄性多発根神経炎(CIDP)の病態解明, バイオマーカー開発, 再発・予後予測を目的とする
2. 自己抗体プロファイルと新規自己抗体の検索を行った
3. 典型的なMS患者の再発期の血清でのスクリーニングを開始した
4. MS患者に多い自己抗原, 健康者に多い自己抗原が分類できた

髄液 BCA-1 は、Intravascular large B-cell lymphoma (IVL) の疾患マーカーとなりうるか？

分担研究者 梅原藤雄¹⁾

共同研究者 ・田良治¹⁾、渡邊 修¹⁾、有村公良¹⁾、・嶋 博¹⁾

研究要旨

髄液 B cell attracting factor (BCA)-1 に関して、Intravascular large B-cell lymphoma (IVL) における疾患マーカーとしての可能性について検討した。BCA-1 の測定は、ELISA で行った。中枢神経系悪性リンパ腫や NMO では 100pg/ml 程度とわずかに上昇するが、400pg/mL を超えた症例は IVL の 3 例のみであり、IVL 群では髄液 BCA-1 値の著明な上昇を認めることが明らかとなった。併せて行った血清 BCA-1 については、各群間に差異を認めなかった。IVL 症例では、Asian variant, Classical type の病型を問わず髄液 BCA-1 が著明に上昇しており、他の髄液パラメータに比してかなり鋭敏に臨床経過を反映していた。髄液 BCA-1 は IVL スクリーニングに有用である可能性がある。

研究目的

Intravascular large B-cell lymphoma (IVL) は、悪性リンパ腫の中で、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) の一亜種であり、リンパ腫細胞が主に全身の小・中血管内でのみ増殖する比較的まれなリンパ腫とされる。浸潤臓器の虚血症状を主体とする多彩な臨床症状を呈するため、早期診断が困難で、予後不良とされていた。

一方、B cell attracting factor (BCA)-1 は、CXC ケモカインの一つで、生理的条件下では樹状細胞により産生される B 細胞の活性化因子と理解されており、B 細胞悪性リンパ腫では、腫瘍細胞が自己分泌していることが免疫病理学的に証明されている。

今回、IVL 群と他の疾患群に分けて血清および髄液 BCA-1 を検討し、両群間の差異を明らかにする。さらに、IVL 群 1 症例については BCA-1 の経時変化を追った。

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

研究対象および方法

最終的に病理学的に確診された IVL 3 症例 (うち 1 例は長崎大学症例) について検討した。また、対照疾患群として B 細胞型の中枢神経系悪性リンパ腫 (CNS ML) 5 症例、視神経脊髄炎 (NMO) 14 症例、多発性硬化症 (MS) 6 症例、慢性炎症性脱髄性多発根神経炎 (CIDP) 11 症例、他の神経疾患 (OND) 15 症例を抽出した。

血清および髄液 BCA-1 の測定は、ELISA にて測定した。

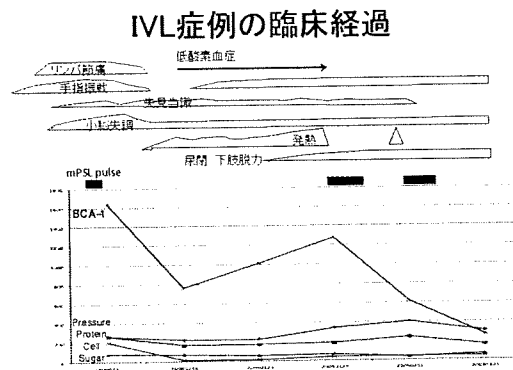
本研究は、鹿児島大学の倫理規定を遵守して行った。

研究結果

1. 髄液中 BCA-1 は、中枢神経系悪性リンパ腫や NMO では 100pg/ml 程度とわずかに上昇するが、400pg/mL を超えた症例は IVL の 3 例のみであった。併せて行った血清 BCA-1 については、各群間に差異を認めなかった。

2. IVL 症例では、Asian variant, Classical typeの病型を問わず髄液BCA-1が著明に上昇しており、他の髄液パラメータに比してかなり鋭敏に臨床経過を反映していた(下図)。血清については他群と差異はなかった。

Group	CSF BCA-1 (pg/mL)
IVL case 1	1638
IVL case 2	737
IVL case 3	458.8
CNS ML (n=5)	115.3 ± 109.3
NMO (n=14)	100.3 ± 108.9
MS (n=6)	27.3 ± 26.3
CIDP (n=11)	<7.8
OND (n=15)	<7.8



症例提示

Case 1は53歳男性。入院3ヶ月前より認知障害、1ヶ月前より小脳失調出現した。その後全身倦怠感や失音失聴出現するなど進行性の経過を認め、LDH 769 U/l、sIL-2R 2150 U/mlと高値を示した。ランダム皮膚生検施行直後よりR-CHOPを開始、後に皮膚深層血管内にCD20陽性異型リンパ球の集簇を認め、IVLと確診した。経過中血球貪食症候群を呈したAsian Variant IVLと考えられた。Case 2は68歳男性。入院4ヶ月前より失調性歩行、1ヶ月前より認知障害出現した。LDH 269 U/l、sIL-2R 1386 U/mlと上昇認め、脳MRIにて深部白質にびまん

性T2高信号域を認めたため脳生検施行。血管内にCD20陽性異型リンパ球の集簇(下図)を認めたためClassical IVLと診断した。

考察

IVLは多彩な臨床症状を呈するため、早期診断が困難とされてきたが、今回の我々の検討により、発症早期より髄液BCA-1の上昇を認めることが明らかとなった。髄液BCA-1の測定は、IVLスクリーニングの一助となり、ランダム皮膚生検などの病理学的検索が積極的に行われることで、早期治療介入による予後改善も期待される。また、髄液BCA-1は、IVLにおける臨床経過を反映する可能性があり、治療効果判定の指標にもなり得る。

結論

IVL群では髄液BCA-1値の著明な上昇を認めた。症例が少なく断定は出来ないが、髄液BCA-1はIVLスクリーニングに有用である可能性がある。

文献

1. Masaki Y, Dong L, Nakajima A, et al. Intravascular large B cell lymphoma: proposed of the strategy for early diagnosis and treatment of patients with rapid deteriorating condition. *Int J Hematol.* 2009;89:600-610.
2. Fischer L, Korfel A, Pfeiffer S, et al. CXCL13 and CXCL12 in central nervous system lymphoma patients. *Clin Cancer Res.* 2009;15:5968-5973.

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

HAM 患者の全国疫学予備調査の報告

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⁾

研究要旨

1987年HAM全国疫学調査ははじまり、1993年-1994年の二次調査を施行したときHAM確実例1103例が報告された。1995年の三次調査以降、HAMの全国疫学調査が行なわれていなかったため、今回2009年HAM全国疫学予備調査を施行した。2007年から2008年に通院、入院したことのあるHAM患者を対象に、施設にアンケート調査を施行した。内部コントロールとして筋萎縮性側索硬化症(ALS)を用いた。年齢、発症時年齢、性別、診断日、初診時と現在の運動障害度、髄液検査の有無について、無記名で調査した。調査はインフォームドコンセントをとった。回収率は32.9%(273/829施設)であった。HAM患者は749人、ALSは955人であった。HAM患者の分布は九州の49.7%について関東18.7%、近畿14.6%と都市圏でも多く認められた。診断年度では2004年が71人と多かった。HAMの発症年齢は49.4±15.4歳とALSより若く、男女比は1:2.5で、推定有病率は10万人あたりおよそ3人であった。HAMの運動障害は初診時、平均4.2がその後6.1と悪化し、57.5%が進行していた。今後も回収率をあげて、調査結果をまとめる予定である。

研究目的

第1回HAM全国調査は1987年から1988年に施行され、710例報告された。1993年から1994年の二次調査でHAM確実例1103例が報告された。1995年HAM全国疫学調査の三次調査を施行して以来、1998年のHTLV-1国際会議で1422名の報告があった以外、全国疫学調査がなく、今回2009年山口研究班でHAM全国疫学調査が行なわれたので、そのデータをもとに予備調査を施行した。

研究方法

2007年より2008年にかけて、通院あるいは入院したことのあるHAM患者を対象に全国の神経内科専門病院、HAM患者会の情報を基に現在通院中の施設にアンケート調査を施行した。内部コントロールとしてALSを

用いた。調査内容は、年齢、性別、診断確定年月日、発症時年齢、初診時と現在の運動障害度(13段階)、髄液HTLV-1抗体陽性の有無である。患者名は無記名とした。統計処理はstatviewソフトを用い、記述統計、mann-whitney検定、paired T検定、Wilcoxon符号検定を施行した。

(倫理面への配慮)

本研究は国立感染症研究所倫理委員会の承諾を得て行った。

研究結果

2009年12月31日時点でのアンケート回収率は32.9%(273/829施設)であった。HAM患者は749人で、ALSは995人であった(表1)。75施設で症例報告は、HAM、ALSともなかった。HAM患者749人の分布は九州49.7%(372人)、四国2.5%(18人)、中国3.4%(27

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

人)、近畿 14.6%(109人)、中部 3.6%(26人)、北陸 0.5%(4人)、関東 18.7%(140人)、東北 3.2%(24人)、北海道 3.9%(29人)で、九州について、首都圏、近畿でも多く認められた(図1)。HAMの診断確定年度は、ピークが2004年の71名であった(図2)。HAMとALSを比較すると、年齢はHAM 63.0±11.9歳、ALS、66.3±11.0歳であった。男性：女性比はHAMが1：2.5、で女性が多く、ALSは1：0.8であった。発症時年齢はHAM 49.4±15.4歳、ALS 63.1±11.4歳で、HAMのほうが若かった(Mann-Whitney検定 $p<0.0001$)。髄液陰性のHAMは3人登録されていた。

HAMの初診時運動障害度は4.2±2.5、現在の運動障害度は6.1±3.0で約2段階進行した(Willcoxon符号検定 $p<0.0001$ 、図3)。HAM患者の57.5%(386/671例)が悪化した。不変は35%(235例/671例)、改善7.6%(50/671例)であった。

HAMの有病率は人口10万人あたり(平成19年10月1日総人口126,085,000人参照)0.59人でALSは0.79人で、ALSより頻度は低かった。ALS有病率は世界的に人口10万人あたりおよそ4人であると仮定すると、HAMの推定有病率は10万人あたり3人となった。

考察

鹿児島大学病院神経内科1施設でのHAM患者登録数は1986年から2009年11月まで、608例で鹿児島県外登録が135例、死亡例108例(県外14例)であった。神経内科専門の病院を受診していないか、実際病院受診していないケースがある可能性がある。まだ、回収率は低く、前回1994年の三次調査に参加した施設から未回答であるため、今

後の回答を待つ最終報告とする予定である。有病率についてはALSを10万人あたり4で推定すると、ALSが約4900人に対し、HAMは約3600人いるものと考えられた。診断年度については、HAM疾患概念が確立し、認知されたときの患者、すなわち1986年—1994年までに診断された患者が150名で、その後585人あり、最初の150人を除くと、435人が新患で、しかも増加傾向にあった。高齢発症が増えたのか、地区ごと(特に都市部)の患者が増えたのか、検討する必要がある。近畿、関東地区でもHAM患者が多数おり、都市圏でHTLV-1キャリアが関東地区で17.3%、近畿で20.3%と増えている報告との関連が考えられた(5)。運動障害は初診時と比べ、進行している事が多く、HAMはやはり進行性の疾患であることが伺われた。

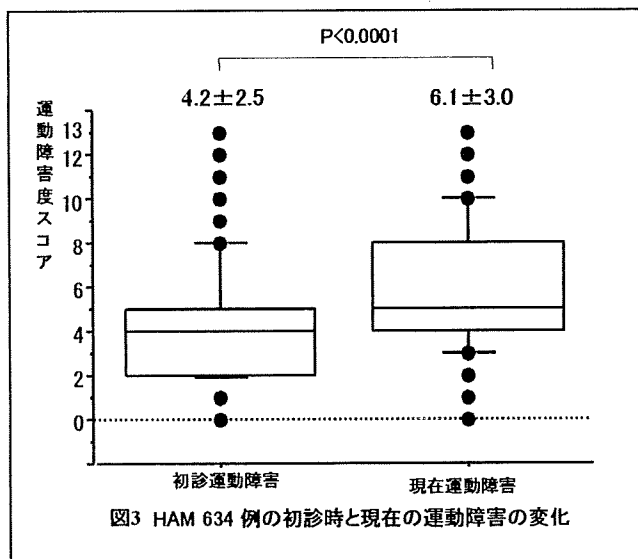
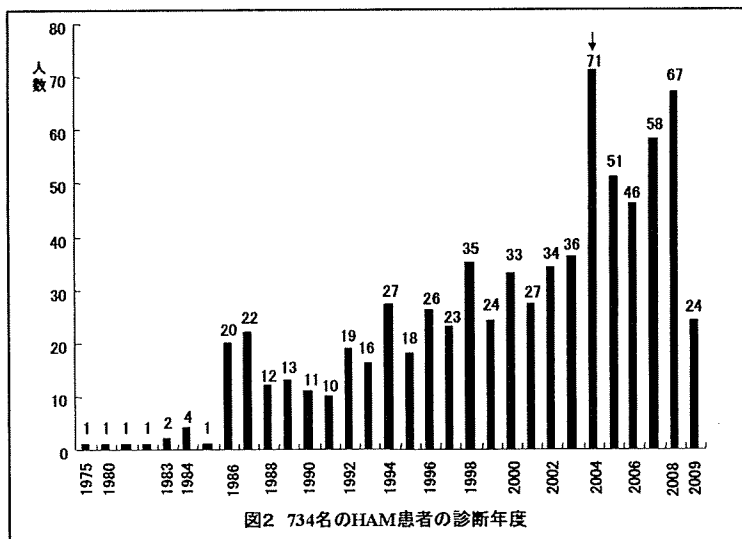
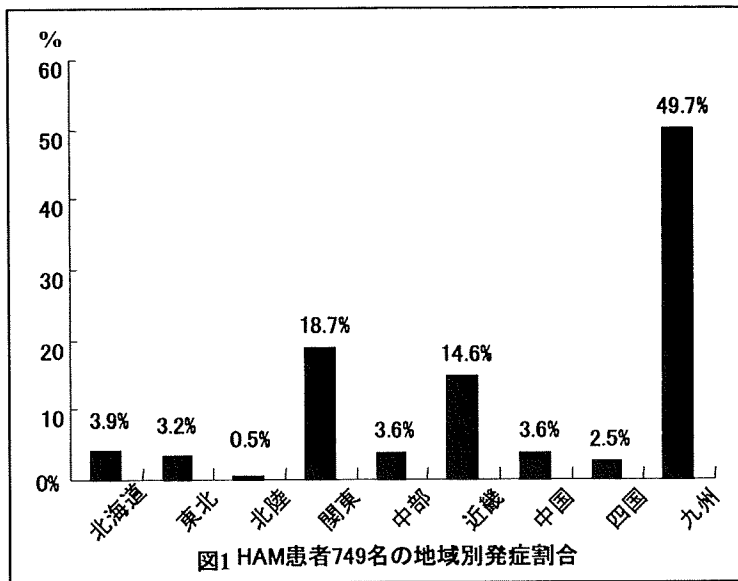
結論

HAM全国疫学調査の予備調査を施行した。HAM患者は九州以外で都市圏でも多く認められた。

文献

1. 納 光弘、井形昭弘、久保田裕章、西谷裕：HTLV-1-associated myelopathy (HAM)の全国疫学調査。免疫性神経疾患調査研究班 昭和62年度研究報告書：357-379, 1988
2. 中川正法、久保田裕章、納 光弘、高守正治：HTLV-1-associated myelopathy (HAM)の全国疫学調査結果報告。免疫性神経疾患調査研究班 平成6年度研究報告書：11-13, 1994
3. 納 光弘、中川正法、久保田裕章、納 光弘、高守正治：HTLV-1-associated myelopathy (HAM)の全国疫学調査結果報

- | | |
|--|-------------------------------|
| 告(2)。免疫性神経疾患調査研究班 平成7年度研究報告書 22-24, 1995 | 総合対策研究報告書, 10, 2009
健康危険情報 |
| 4. 松崎敏男、斎藤峰輝、納 光弘: HAMの診断と治療の進歩. 臨床検査 49(4) :409-414, 2005 | なし
知的財産権の出願・登録状況 |
| 5. 山口一成: 平成20年度本邦における HTLV-1 感染及び関連疾患の実態調査と | 特権取得: なし
実用新案登録: なし |



HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) 発症に關与する細胞性因子の網羅的解析

分担研究者 大原 義朗¹⁾

共同研究者 齊藤 峰輝²⁾

研究要旨

HAM 発症危険群の同定と新規治療標的分子の検索のため、HTLV-1 の転写制御因子 Tax の標的遺伝子をハイスループットな方法で網羅的に解析し、同時に候補遺伝子アプローチによる疾患感受性遺伝子の同定を試みた。その結果、Tax 発現誘導に伴って変化する 1145 個の遺伝子を同定し、約 50 の細胞内シグナル伝達経路が Tax により変化していることを明らかにした。そのうちの一部の遺伝子産物は、HAM 患者の末梢血リンパ球においても Tax 発現誘導に伴って HTLV-1 感染細胞に発現していた。一方、免疫関連遺伝子約 200 個に存在する 1536 個のタグ SNP について HAM 患者ゲノム DNA、無症候性ウイルスキャリアーゲノム DNA を用いて、イルミナ社のカスタムアレイを用いてタイピングを行った結果 $p < 0.01$ ($p = 0.003 \sim 0.006$) を示す SNP が存在する遺伝子を複数個同定した。

研究目的

HTLV-1 は世界ではじめてヒトの疾患との関連が見いだされたレトロウイルスであり、HAM および ATL の原因ウイルスである。我が国には、いまだに先進国で最多の約 108 万人もの HTLV-1 感染者が存在しており、ATL は死亡者数が年間 1000 人を超え、HAM 患者では約 40% が経過中に歩行不能となり生活の質が著しく障害される。HTLV-1 感染においては、ほとんどの感染者が生涯にわたって未発症の無症候性キャリアーとして経過するが、感染者のわずか 2-3% に自己免疫疾患様の慢性炎症性神経疾患である HAM を発症する。これまでに HAM の発症、進行や予後に複数の宿主遺伝子多型の関与が推測されてきたが、その遺伝因子は未だ不明である。本研究の目的は、HAM の発症機序解明と発症予防法・治療法の開発のために、これまでに明らかになっていない HAM 発症関連遺伝子を網羅的に探索することで、より精度の高い HAM 発症危険群を抽出し、発症早期の、または発症予防のための治療介入

を可能にすることである。

研究方法

まず、HTLV-1 の転写制御因子 Tax の標的遺伝子をハイスループットな方法で網羅的に解析、抽出するために、メタロチオネインプロモーターの下流に Tax 遺伝子を導入したヒト白血病細胞株 Jurkat 由来の stable transformant である JPX9 細胞を用いて、培地への CdCl_2 添加により Tax を発現誘導し、その前後で変動する遺伝子群をマイクロアレイ解析した。マイクロアレイのデータを元に、細胞内シグナル伝達経路への影響を詳細に解析するソフトウェアである IPA5.0 を用いて、Tax により変化する細胞内シグナル伝達経路を予想した。さらに、変動する遺伝子の一部について、HAM 患者リンパ球における発現と T 細胞機能との関連について解析した。一方、詳細な臨床情報を伴う HAM 患者、無症候性ウイルスキャリアーの DNA 検体を用いて、候補遺伝子アプローチによる疾患感受性遺伝子の同定も試みた。す

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

なわち、最新の知見を基に免疫関連遺伝子約 200 個を選択し、日本人の健常者検体を用い SNP 同定を行った。そして連鎖不平衡やハプロタイプを考慮して最小数のマーカーセットを選び、HAM 患者ゲノム DNA、無症候性ウイルスキャリアーゲノム DNA を用いて、イルミナ社のカスタムアレイを用いてタイピングを行った。

倫理面への配慮

本研究は関連各施設の倫理委員会の承諾を得た後に施行した。十分な説明と同意のもと、書面による研究協力承諾書が得られた被験者から採血した検体のみを用い、完全に匿名化した後に行った。

研究結果

JPX9 細胞のマイクロアレイ解析から、Tax 発現誘導に伴って変化する 1145 個の遺伝子を同定した。そのうちの一部の遺伝子産物が、HAM 患者の末梢血リンパ球においても Tax 発現誘導に伴って HTLV-1 感染細胞に発現することを確認した。マイクロアレイデータを IPA5.0 により解析することで、約 50 の細胞内シグナル伝達経路が Tax により変化していることを明らかにした。HAM 感受性遺伝子解析については、免疫関連遺伝子約 200 個に存在する SNP に HapMap 計画で得られた情報を加え、1536 個のタグ SNP を抽出し、Goldengate 法によりマーカーパネルを作成した。相関解析は段階的におこなうこととし、まず患者約 100 人、無症候性キャリアー約 100 人でタイピングを行った。タイピング結果をもとに個別 SNP のアレル頻度で統計解析を行い、 $p < 0.001$ のマーカーに対応する遺伝子領域から網羅的に 2 次スクリーニングに用いるマーカーを選択し、患者約 200 人、無症候性キャリアー約 200 人を用いて 2 次スクリーニングを実施した。その結果 $p < 0.01$ ($p = 0.003 \sim 0.006$) を示す SNP が存在する遺伝子を複数個同定した。

考 察

Tax は、多彩な細胞遺伝子群や細胞内シグナル伝達経路を調節することで感染細胞の活性化、がん化に関わっていると考えられる。今後は、新規に見いだした標的遺伝子及びシグナル伝達経路の Tax による制御機構と細胞機能に与える影響を、各種ヒト培養 T 細胞株や患者 T 細胞を用いて解析する予定である。一方、ゲノム中から複数の HAM 発症関連遺伝子候補領域を同定した。今後は、2 次スクリーニングで再現性のあった SNP に関して、遺伝子領域内全 SNP のタイピングを行って疾患関連 SNP を同定し、同定した遺伝子の HAM 発症における役割を解析する予定である。これら一連の研究を進めることで、HAM 発症関連因子群がどのようなメカニズムで病態に関与するのかを解明し、その制御法を開発し、HAM 発症危険群に対して発症早期の、または発症予防のための治療介入を行うことを可能にしたい。

結 論

Tax の新規標的遺伝子及びシグナル伝達経路を同定した。また、複数の HAM 発症関連遺伝子候補領域を同定した。

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

HAM の CTL 抗原認識特異度とウイルス淘汰圧の検討

研究分担者 出雲周二¹⁾
共同研究者 久保田龍二¹⁾、有村公良²⁾

研究要旨

HTLV-I ウイルス量が高いことが、HAM 発症および増悪の最大のリスクであり、治療のためにはこのウイルスを根絶することが重要である。ウイルス感染細胞の排除に CTL は重要な細胞である。今回、ウイルス排除により有効な HTLV-I 特異的 CTL 側の要因の検討を行った。結果は、抗原認識特異度の低い CTL の方が認識特異度の高い CTL より、CTL 頻度が低いにもかかわらず、HTLV-I に対するウイルス淘汰圧が高く、HTLV-I ウイルス量が低かった。抗原認識特異度の低い CTL は、変異抗原ウイルスを効率よく認識することで、ウイルス排除により有効に働く可能性が考えられた。これらの結果は、CTL ワクチンなどで CTL を増強して、生体内の HTLV-I 感染細胞を除去する治療を考える時、単一の CTL クローンを刺激するより、多様な CTL を刺激することがより有効である可能性を示している。

研究目的

HTLV-I 高ウイルス状態は HAM の発症および増悪のリスクであり、HTLV-I ウイルスを減少させることが HAM の治療には重要である。CTL はウイルス排除に重要な役割をはたすが、ウイルス排除における CTL 側の因子についてはよくわかっていない。今回、HTLV-I 特異的 CTL の頻度、avidity、抗原認識の特異性等の因子が HTLV-I 排除に与える影響について検討を行った。

研究方法

24 名の HLA-A2 陽性 HAM 患者の末梢

- 1) 鹿児島大学難治ウイルス研
- 2) 鹿児島大学神経内科

血リンパ球を用いた。HLA-A2 での immunodominant CTL エピトープは Tax11-19 であり、細胞内 IFN- γ 陽性細胞を検出して CTL を同定した。このエピトープの TCR 結合部位の人工変異抗原を用いて HTLV-I Tax 特異的 CTL の抗原認識の特異度を測定した (TCR finger printing 法)。ウイルス量は定量的 PCR にて測定した。CTL のエピトープ部位のシーケンスにより、自然発生変異抗原を検出した。患者を抗原認識特異度の高い群と低い群とに分けて、ウイルス抗原遺伝子の非同義置換部位数および同義置換部位数と非同義置換/同義置換比 (dN/dS ratio) を計測することにより、CTL のウイルスへの淘汰圧を検討した。さらに自然発生変異抗原の CTL 認識と、CTL 抗原認識特

異度との関連を検討した。

(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。臨床検体はインフォームドコンセントを得たのち、提供頂いた。

研究結果

CTL の抗原認識特異度が低いほどウイルス量は低く (図 1)、また CTL 頻度も低かった (図 2)。抗原認識特異度が低い群は高い群と比べ、CTL エピトープ部位での非同義置換数が有意に高く (表 1)、dN/dS ratio の解析では正の淘汰圧が高かった (図 3)。また、CTL の抗原特異度が低いほど自然発生変異抗原をよく認識した (図 4)。CTL 頻度とウイルス量は相関を示さなかった。CTL の avidity は抗原認識特異度が低い例、高い例でほぼ同じであった。

考 察

現在までの研究により、HTLV-I ウイルス量が高いことが、HAM 発症および増悪の最大のリスクであり、治療のためにはこのウイルスを根絶することが重要である。HTLV-I は生体内ではフリーウイルスは存在せず、リンパ球の中にプロウイルスで存在する。HTLV-I 感染症においては、ウイルスの排除はウイルス感染細胞を排

除することであり、そのためには CTL は重要な細胞である。今回の検討により、ウイルス減少に関連する CTL 側の要因としては、一般的に想定される CTL 頻度ではウイルス量と負の相関は示さず、CTL の抗原特異度が負の相関を示した。これらの結果は、CTL ワクチンなどで CTL を増強して、生体内の HTLV-I 感染細胞を除去する治療を考える時、単一の CTL クローンを刺激するより、多様な CTL を刺激することがより有効である可能性を示している。

結 論

抗原認識特異度の低い CTL の方が認識特異度の高い CTL より、CTL 頻度が低いにもかかわらず、HTLV-I に対するウイルス淘汰圧が高く、HTLV-I ウイルス量が低かった。抗原認識特異度の低い CTL は、変異抗原ウイルスを効率よく認識することで、ウイルス排除により有効に働く可能性が考えられた。

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

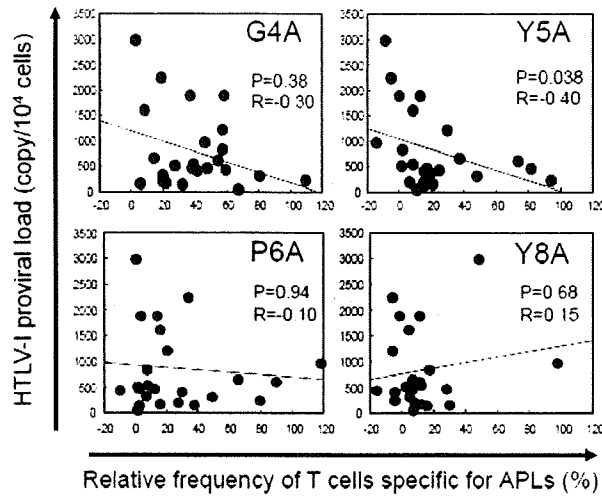


図1. HTLV-I 特異的 CTL の TCR の抗原認識特異度とウイルス量の関係。X軸およびY軸は、それぞれ抗原認識特異度、ウイルス量を表す。抗原認識特異度は右方ほど低い。Y5A の認識において、抗原認識特異度が低いほど、ウイルス量は低い。(Spearman rank correlation)

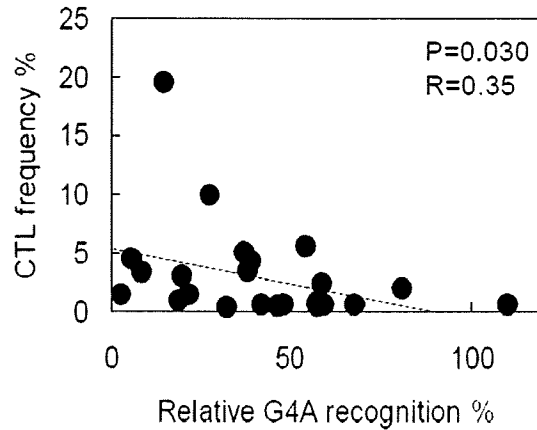


図2. 抗原特異度と CTL 頻度との関係。抗原特異度が低いほど (X 軸の右方ほど)、CTL 頻度は低い。(Spearman rank correlation)

	非同義置換数	同義置換数
抗原認識特異度が低い群	43	6
抗原認識特異度が高い群	29	14

表1. CTL エピトープでの非同義置換および同義置換と抗原認識特異度。抗原認識特異度が低い群で非同義置換 (アミノ酸置換) が多い。(chi-square test: P=0.018)

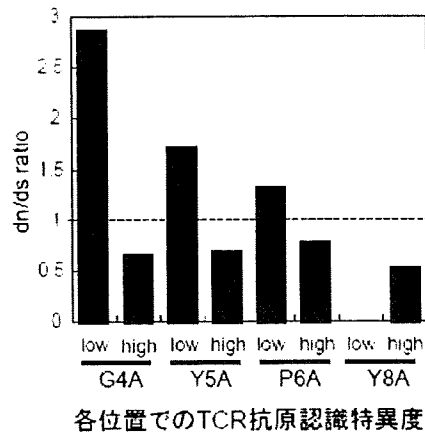


図3. 各アミノ酸の位置での TCR 抗原認識特異度と dn/ds ratio。dn/ds ratio は tree analysis による。(N=18)。G4A, Y5A, P6A で抗原認識特異度が低い群では dn/ds ratio が 1 以上であった。

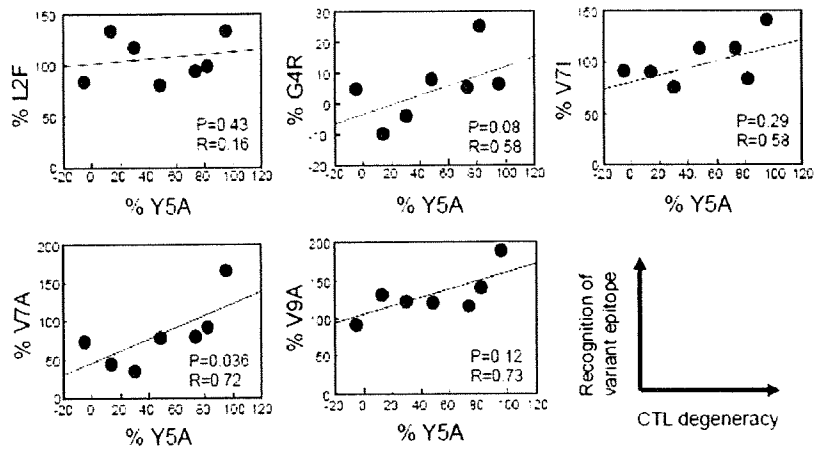


図4. TCR 抗原認識特異度と自然発生変異ウイルスの認識の関係。抗原認識特異度が低いほど、自然発生変異ウイルスをよく認識した。(Spearman rank correlation)