

200936063A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) 患者データベースと検体バンクの確立

による関東の研究拠点機関形成

平成 21 年度 総括研究報告書

研究代表者 山野 嘉久

平成 22 (2010) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) 患者データベースと検体バンクの確立  
による関東の研究拠点機関形成

平成 21 年度 総括研究報告書

研究代表者 山野 嘉久

平成 22 (2010) 年 3 月

# 目 次

## I. 総括研究報告

HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) 患者データベースと検体バンクの確立による関東の研究拠点機  
関形成

聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター 山野嘉久 ..... 1

## II. 分担研究報告

1. HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の生体試料バンクを用いた自然免疫系の異常に関する研究

聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター 佐藤知雄 ..... 8

2. HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の生体試料バンクを用いたウイルス感染  
CD4+CD25+CCR4+FoxP3low T 細胞の増加と機能異常の解析

聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター 新谷奈津美 ..... 10

3. 検体バンクを用いた HAM 患者 HTLV-I 感染細胞におけるケモカインおよび FoxP3 の解析

鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科 久保田龍二 ..... 13

4. HAM/TSP における p38 MAPK シグナリング活性化と HTLV-I 感染伝播効率の関係

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 中村龍文 ..... 18

5. 沖縄県における HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) 患者データベースと検体バンク確立の試み

琉球大学大学院 医学研究科 齊藤峰輝 ..... 22

6. 近畿地方における HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) 患者データベースと検体バンク確立の試み

関西医科大学 医学部 竹之内徳博 ..... 24

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表

..... 26

## IV. 研究成果の刊行物・別刷

..... 32

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
総括研究報告書

HTLV-1 関連脊髄症（HAM）患者データベースと検体バンクの確立  
による関東の研究拠点機関形成

主任研究者 山野嘉久

聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター分子医科学研究部門 部門長

研究要旨：HTLV-1 関連脊髄症（HAM）は、本邦での推定患者数が約 1500 人と稀な神経難病であり、患者は様々な医療機関に点在しているため情報が効率的に集約されず、病態・治療研究が進展しない大きな原因となっている。さらに最近、HTLV-1 の感染者は関東や近畿などの大都市圏で増加傾向にあり、研究を推進する為には全国的な取り組みの必要性が高くなってきている。本研究では、これまで HAM の研究拠点が整備されていなかった地域（関東、近畿、沖縄）や、これまでの主な HAM 研究拠点地域（鹿児島、長崎）などの全国各地において、HAM の専門研究者による拠点機関の整備と生体試料収集を支援してさらにそのネットワークを構築し、病態研究に必要不可欠である患者の臨床情報の蓄積、生体試料の効率的な収集・バンク化を可能とする体制を整備した。

本研究の実施により、今年度、HAM 患者総数約 1500 人のうち 233 例の臨床情報・生体試料を収集・保存することができ、それらの検体を用いて各分担研究者により様々な病態研究の進展も得られた。先進国で本疾患の頻度が高いのは日本のみであり、これだけ多数の検体が高い品質で保存されているのは世界でも類をみない、非常に貴重かつ重要な研究基盤である。今後は、何らかの形で本体制を維持継続して研究基盤を強化すると共に、国内外の研究機関に対して公平に生体試料を提供し共同研究を加速させる体制を整備していく必要性が高いと思われる。また本研究の実施により、これまで HAM 専門外来の存在しなかった地域において、①疾患の認知度が低く診断に時間を要している、②疾患活動性評価の為に検査が施行されていない症例が多く認められる、③疾患の重症度に応じた治療がなされていない、などの実態が明らかになった。この原因として、HAM の疾患活動性を評価する検査方法やその結果の解釈方法、治療方針決定方法に関する公的な情報が不足していることが考えられる。従って、これから全国的な HAM の診療レベル向上を実現していく為には、「疾患活動性の評価方法の確立とその重症度に応じた治療指針の作成」に関する研究の実施が急務であると考えられる。

以上のように、HAM 患者のデータベースと検体バンク体制の確立を基礎とした「専門家による拠点形成とその組織化」は、効率的な臨床情報・生体試料収集と研究推進を可能とすることが示された。

**分担研究者：**

佐藤 知雄	聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター 分子医科学研究部門 助教
新谷奈津美	聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター 分子医科学研究部門 助教
久保田龍二	鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科 准教授
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
齊藤 峰輝	琉球大学大学院医学研究科 准教授
竹之内徳博	関西医科大学医学部 准教授

**A. 研究目的**

HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) は、全国の患者数が推定で約 1500 人と稀な疾患であり、患者は様々な医療機関に点在しているため、患者の情報や生体試料が効率的に集約されず、病態・治療研究が進展しない大きな原因となっている。また近年、HTLV-1 の感染者が関東や近畿などの大都市圏で増加していることが判明してきている。そこで本研究は、これまで HAM の研究拠点が整備されていなかった地域 (関東、近畿、沖縄) や、これまでの主な HAM 研究拠点地域 (鹿児島、長崎) などの全国各地において、HAM の専門研究者を中心に拠点機関を整備してそのネットワークを構築し、全国的な HAM の専門的診療研究体制を展開することによって、HAM の病態研究の発展に必要な不可欠である患者の臨床情報の蓄積、生

体試料の効率的な収集・バンク化を可能とする体制を整備する。さらにその生体試料を公平に提供する体制を構築し、異分野との HAM に関する共同研究を加速させ、革新的研究の進展に資することを目的とする。

**B. 研究方法**

1) これまで HAM を専門的に診療する拠点機関の存在しなかった関東において HAM 専門外来を行うことにより、希少疾患である HAM 患者の診療の現状を把握し、臨床情報や生体試料が効率的に集約される体制を構築する。具体的には、詳細な臨床情報を蓄積するとともに、倫理委員会で承認済みの同意書を得て検体を収集し、末梢血単核球細胞 (PBMC)、血清、DNA 等を分離して保存・バンク化する。また、これらの検体を用いて病態・治療研究を行い、生体試料収集の有用性を示す。

2) 全国で HAM 専門外来を行っている研究分担者とネットワークを構築し、各研究者においても生体試料を収集・保存して、単年度でどれくらいの HAM 患者検体が収集可能であるか把握する。また、これらの検体を用いて病態・治療研究を行い、生体試料収集の有用性を示す。  
3) 生命倫理委員会の書類を改訂し、他の共同研究機関や国主導の難治性疾患研究資源バンクに生体試料を提供できる体制を整備する。  
(倫理面への配慮)

臨床検体の収集に際しては、本学の生命倫理委員会で承認された (承認番号：第 1262 号) 同意書を用いて、不利益や危険性の排除などに関するインフォームドコンセントを行った。また検体は、個人情報管理者が連結不可能匿名化により番号化する為、提供者を特定できない。さらに、共同研究機関や難治性疾患研究資源バンクなどの外部に提供する場合は、二重に連結不可能匿名化とし、患者の人権擁護に努めた。

### C. 研究結果

1) 関東での HAM 専門外来において、63 名の HAM 患者の臨床情報を得た。男性 15 例、女性 48 例、年齢は 35~78 歳（平均 61.2 歳）、発症年齢は 18 歳~73 歳（平均 47.5 歳）であり、発症から診断までに 0.5 年~29 年（平均 5.6 年）と長い期間を要していた。また、専門外来の初診時に治療なし 48 例、治療あり 15 例（プレドニゾロン 14 例、エリスマイシン 1 例）と、治療を受けていない症例が多い傾向が認められた。さらにほぼ全例において、疾患活動性評価の為の採血や髄液検査が施行されておらず、治療を受けていない症例の中には、髄液中の炎症レベルが高い症例も多く認められた。以上より、①疾患の認知度が低く診断に時間を要している、②重症度を評価するための検査が施行されていない症例が認められる、③疾患の重症度に応じた治療がなされていない、などの HAM の診療実態が明らかになった。また、HAM 専門外来において検体を経時的に収集し、PBMC、血清、DNA を分離して保存・バンク化した。これらの検体を用いて病態・治療研究を行い、HAM における病原性異常 T 細胞の同定 (PLoS One, 2009)、HAM における NKT 細胞の異常と発症予防法への応用 (Blood, 2009)、実際の診療で測定可能な HAM の疾患活動性マーカーとしての血清中可溶性 IL-2 受容体と IP-10 の有用性 (日本神経学会総会、神経免疫学会発表予定)、などの研究成果を得た。このように、診療と研究の拠点を形成して HAM 患者の検体を効率的に集約することは、研究の進展においても必要不可欠であることが示された。

2) 全国で HAM 専門外来を行っている研究分担者により生体試料の採取、保存を行うことにより、聖マリアンナ医科大学 63 症例、鹿児島

大学 51 症例、長崎大学 42 症例、琉球大学 43 症例、関西医科大学 34 症例、合計 233 症例の検体を得た。一般的にゲノム解析 (SNP 解析) による発症リスク遺伝子同定などでは、400 から 500 名以上の検体が必要とされるため、HAM のような希少疾患では、このように HAM 専門医らによる全国的な協力体制の構築が必要不可欠である。また、各分担研究者は集めた検体を用いて病態解明に関する研究を精力的に進め、成果を挙げており (各分担研究者の報告参照)、生体試料バンクに関する全国的な支援の重要性があらためて示された。

3) 国内外の共同研究機関や国主導の難治性疾患研究資源バンクに生体試料を提供できる体制を整備する為に、聖マリアンナ医科大学の生命倫理委員会へ改訂書類を申請し、臨床試験部会 (平成 21 年 12 月 9 日審議) にて審議され、新しく承認された (承認番号: 第 1646 号)。現在、難治性疾患研究資源バンクへ生体試料を提供する為の体制を整備する為に担当者話し合いを進めている。また、平成 21 年 12 月 22 日に班会議を開催し、全国で HAM 専門外来を行っている研究分担者に、国主導の難治性疾患研究資源バンクの内容や意義について説明した。

### D. 考察

今年度、全国的な HAM 専門研究者による研究組織を構築することにより、本邦における総 HAM 患者 (推定約 1500 人) のうち 233 名の生体試料を収集・保存することができた。このことは、全国の主要な地域において HAM 専門外来を実施し研究拠点機関を形成することにより、希少疾患であっても、患者の臨床情報や生体試料を効率的に集約する体制を構築することが可能であることを示唆している。今回、HAM 患者 233 名分の収集された臨床情報と生体試料は、本疾患の重要な研究基盤となる。先

進国で本疾患の頻度が高いのは日本のみであり、これだけ多数の検体が高い品質で保存されているのは世界でも類をみない、非常に貴重なものであると考えられる。今後は、国内外の研究機関からの共同研究の依頼に対応し、公平に生体試料を提供して HAM の共同研究を加速させる体制を整備していく必要性が高いと思われる。その一環として、国主導の難治性疾患研究資源バンクにも生体試料を提供し、その有用性について検証していきたい。

また、これまで HAM を専門的に診療する拠点機関の存在しなかった関東において HAM 専門外来を実施することにより、①疾患の認知度が低く診断に時間を要している、②重症度を評価するための検査が施行されていない、③疾患活動性の重症度に応じた治療がなされていない、などの実態が明らかとなった。この原因として、HAM の疾患活動性を正しく評価する検査方法やその結果の解釈方法、治療方針決定方法に関する情報が不足している点があげられる。従って、これから全国的な HAM の診療レベル向上を実現していく為には、「疾患活動性の評価方法の確立とその重症度に応じた治療指針の作成」に関する研究の実施が急務であると考えられる。本研究において、血清中の疾患活動性マーカー候補分子として可溶性 IL-2 受容体と IP-10 を同定したが、今後さらにこの課題に関して全国の HAM 研究者等で協力して研究体制を構築し、総力を挙げて取り組むことが重要である。

本研究における、関東での HAM 専門外来の実施と研究拠点の形成、およびその研究成果の発表は、HAM という希少難病疾患の社会における関心を高める効果が認められた。本疾患は認知度が低い為に診断が遅れるケースが多く、社会の関心が高まることは、本疾患の早期発見・早期治療に結びつくものと期待される。

## E. 結論

HAM などの難病は、その多くが稀な疾患であるため、患者は様々な医療機関に点在し、その情報が効率的に集約されにくく、研究進展の重要な阻害因子となっている。

本研究では、関東において HAM 専門外来を開設して研究拠点を形成することにより、点在している患者が集約し、臨床情報と生体試料が効率的に収集できることが示された。さらに、HAM など難病の専門的研究者は全国でも数が少ないため、それらの研究者によって研究チームを組織することで、さらに効率的な検体収集が可能となることが示された。これらの結果は、「専門家による拠点形成とその組織化」が、難病研究を飛躍的に推進するモデルのひとつになり得る可能性を示唆している。

また、関東における HAM 専門外来の実施により、現在の HAM 診療の実態が明らかとなった。この現状を打破し効率的に HAM の全国的な診療レベルを向上させる為には、「疾患活動性マーカーの同定と、重症度に応じた治療指針の作成」に関する研究の必要性が高く、その実現により HAM 患者の診療経験が少ない医師でも重症度に応じた適切な治療の実施が可能となり、全国での HAM 診療レベル向上に役立つものと考えられる。

## F. 健康危険情報

特記すべき事項はない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yamano Y., Araya N., Sato T., Utsunomiya A., Azakami K., Hasegawa D., Izumi T., Fujita H., Aratani S., Yagishita N., Fujii R., Nishioka K., Jacobson S., Nakajima T. Abnormally high levels of virus- infected IFN- $\gamma$ +CCR4+CD4+CD25+ T cells in a

- retrovirus-associated neuroinflammatory disorder. *PLoS One* 4 (8) e6517:1-14, 2009.
- 2) Azakami K., Sato T., Araya N., Utsunomiya A., Kubota R., Suzuki K., Hasegawa D., Izumi T., Fujita H., Aratani S., Fujii R., Yagishita N., Kamiyuku H., Kanekura T., Seino K., Nishioka K., Nakajima T., Yamano Y. Severe loss of invariant NKT cells exhibiting anti-HTLV-1 activity in patients with HTLV-1-associated disorders. *Blood* 114(15):3208-3215, 2009.
  - 3) 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 Neuropath Exp Neurol*. 68(2):199-209, 2009
  - 4) 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*. 29(4): 433-42, 2009
  - 5) 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.
  - 6) 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.
  - 7) 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.
  - 8) 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.
  - 9) 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.
  - 10) Saito M., Matsuzaki T., Satou Y., Yasunaga J., 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*. 2009 6:19.
  - 11) Saito M. Immunogenetics of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Inflammation and Regeneration*. 2009 29: 310-316.
2. 学会発表
    - 1) 山野嘉久、中村龍文、久保田龍二、齋藤峰輝 HAM 専門外来の有用性および検体バンクの確立による共同研究の推進 第2回 HTLV-1 研究会 2009年8月 東京
    - 2) 山野嘉久、佐藤知雄、新谷奈津美、長谷川大輔、高橋克典、西岡久寿樹 HAM における血中 sIL-2R の治療効果指標有効性とステロイドの長期予後改善効果 第50回日本神経学会総会 2009年5月 仙台
    - 3) 山野嘉久、新谷奈津美、佐藤知雄、宇都宮 興 HAM から同定された免疫性疾患を構

- 成する病原性 T 細胞 :
- IFN- $\gamma$ +FoxP3<sup>low</sup>CD4+CD25+CCR4+T 細胞  
第 2 回 HTLV-1 研究会 2009 年 8 月 東京
- 4) 山野嘉久、新谷奈津美、佐藤知雄、宇都宮  
與、西岡久寿樹、中島利博 HTLV-1 関連脊  
髄症患者におけるウイルス感染した  
IFN- $\gamma$ +CCR4+ CD4+CD25+ T 細胞の異常  
な増加 第 39 回日本免疫学会 2009 年 12  
月 大阪
  - 5) 佐藤知雄、新谷奈津美、山野嘉久 HAM の  
疾患活動性血中バイオマーカーの同定およ  
びステロイドの長期予後改善効果に関する  
検討 第 2 回 HTLV-1 研究会 2009 年 8 月  
東京
  - 6) 佐藤知雄、阿座上和子、新谷奈津美、宇都  
宮與、久保田龍二、山野嘉久 HTLV-1 関連  
疾患における invariant NKT 細胞の量的・  
機能的異常 第 2 回 HTLV-1 研究会 2009  
年 8 月 東京
  - 7) 高橋克典、佐藤知雄、新谷奈津美、中村龍  
文、森直樹、山野嘉久 HTLV-1 関連脊髄  
症(HAM)患者でのフコイダン療法によるウ  
イルス量の減少 2 回 HTLV-1 研究会  
2009 年 8 月 東京
  - 8) 佐藤知雄、阿座上和子、新谷奈津美、山野  
嘉久 HTLV-1 関連疾患患者では抗 HTLV-1  
活性を有する iNKT 細胞が有意に減少して  
いる 第 39 回日本免疫学会 2009 年 12 月  
大阪
  - 9) 新谷奈津美、佐藤知雄、山野嘉久 The  
molecular mechanism in the  
differentiation of IFN- $\gamma$ +CCR4+CD4+  
CD25+Fox3<sup>low</sup> T-cells through HTLV-1  
tax 第 39 回日本免疫学会 2009 年 12 月  
大阪
  - 10) 久保田龍二、松浦英治、有村公良、出雲周  
二:HAM 脊髄における HTLV-I 特異的 CTL  
とアポトーシス細胞の同定。第 21 回日本  
神経免疫学会。2009 年 4 月 大阪
  - 11) 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 仙台
  - 12) 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 仙台
  - 13) 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 仙台
  - 14) 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 東京
  - 15) 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 東京
  - 16) 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.
  - 17) 齊藤峰輝、田中礼子、田中勇悦 HTLV-1  
関連脊髄症 (HAM/TSP) における OX40  
陽性 T 細胞の意義 第 57 回日本ウイルス  
学会学術集会 2009 年 10 月、東京
  - 18) 齊藤峰輝、斎藤孔介、大原義朗 HAM,  
ATL 治療標的候補分子 Bcl-3 の HTLV-1 感  
染による高発現機構の解析と制御法の検討  
第 50 回日本神経学会総会 2009 年 5 月、  
仙台
  - 19) 齊藤峰輝 シンポジウム「ATL と HTLV-1

研究の最前線」HAM/TSP の病態 第 49 回 日本リンパ網内系学会 2009 年 7 月、淡路

20) 竹之内 徳博、藤澤 順一、日下 博文、中川 正法 近畿地方における HAM 診療と研究拠点形成の試み 第 2 回 HTLV-1 研究会 2009 年 8 月 東京

21) Yamano Y., Azakami K., Sato T., Araya N., Takahashi K., Utsunomiya A., Kubota R., Seino K., Nakajima T., Nishioka K. Invariant NKT cells have anti-human T-lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) activity and the frequency is significantly decreased in patients with HTLV-1 associated disorders. The 14th International Conference on Human Retrovirology: HTLV-I and Related Viruses. , 2009 July, Salvador, Brasil.

22) Yamano Y., Araya N., Sato T., Utsunomiya A., Nakajima T., Jacobson S., Nishioka K. Virus-infected IFN- $\gamma$  producing CD4+CD25+CCR4+Foxp3low T-cells are abnormally increased and proinflammatory in HAM/TSP. The 14th International Conference on Human Retrovirology: HTLV-I and Related Viruses. , 2009 July, Salvador, Brasil.

23) Araya N., Sato T., Takahashi K., Utsunomiya A., Nishioka K., Yamano Y. The molecular mechanism in the differentiation of HTLV-1 infected CD4+CD25+CCR4+ T-cells through HTLV-1 tax. The 14th International Conference on Human Retrovirology: HTLV-I and Related Viruses. , 2009 July, Salvador, Brasil.

24) Sato T., Araya N., Takahashi K., Nishioka K., Yamano Y. The plasma level of CXCL10 and soluble IL-2 receptor are useful biomarkers and decreased in HAM/TSP patients with the long-term corticosteroid therapy. The 14th International Conference on Human

Retrovirology: HTLV-I and Related Viruses. , 2009 July, Salvador, Brasil.

25) Takahashi K., Sato T., Araya N., Mori N., Yamano Y. Oral administration of polysaccharide fucoidan can induce a significant decrease of proviral DNA load in patients with HAM/TSP. The 14th International Conference on Human Retrovirology: HTLV-I and Related Viruses. , 2009 July, Salvador, Brasil.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 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)

HTLV-1 関連脊髄症（HAM）の生体試料バンクを用いた自然免疫系の異常に関する研究

分担研究者 佐藤 知雄 聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター 助教

研究要旨： HTLV-1 関連脊髄症はウイルス感染細胞の制御破綻により生じると考えられる。本研究では生体試料バンクを活用して HTLV-1 感染者の生体内で自然免疫系に参与する細胞群（NKT 細胞、NK 細胞および樹状細胞）の特徴を調べた。その結果、HAM や ATL 患者の末梢血リンパ球中において、これらの細胞群すべての頻度が低下していることを見出した。中でも NKT 細胞の頻度は、感染者のプロウイルス量と逆相関し、かつ NKT 細胞を刺激するとキャリアー検体では NKT 細胞が増殖すると共にウイルス量が有意に低下した。このことから HAM や ATL における NKT 細胞の量的・質的な異常が両疾患の病態に寄与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

HTLV-1 関連脊髄症（HAM）はレトロウイルスである HTLV-1 を原因ウイルスとする神経免疫難病である。平成 20 年度の全国調査によると、我が国には現在約 108 万人もの HTLV-1 感染者が存在している。そのほとんどが生涯にわたって発症することのない無症候性キャリアーとして経過するが、感染者の 0.25-3% は下肢の痙性対麻痺や膀胱直腸障害を来す HAM を発症する。この HAM の発症には HTLV-1 感染細胞の免疫系による制御が関与していると考えられ、これまで獲得免疫、特に細胞障害性 T 細胞（CTL）を中心に研究されてきた。しかし、ウイルス量のコントロールが不十分な HAM 患者で逆に CTL が多いという報告があり、CTL だけでは説明がつかないことが分かってきた。そこで本研究ではこれまであまり研究されてこなかったウイルス感染細胞の制御に関わる自然免疫系に属する細胞群の性状について、生体試料バンクに保存された臨床検体を用いて調べることが目的とした。

B. 研究方法

検体バンクにストックされた 13 例の HAM 患者、12 例の無症候性キャリアー（AC）、12 例の健常者の末梢血リンパ球と研究協力機関より提供して頂いた 11 例の ATL 患者の末梢血リンパ球を用いた。ナチュラルキラー T 細胞（NKT）、ナチュラルキラー細胞（NK）、形質細胞様樹状細胞（pDC）、骨髄系樹状細胞（mDC）の頻度をフローサイトメトリーで解析し、各群間で比較検定した。HAM 患者と AC のウイルス量と各細胞群の頻度との相関を調べた。AC、

HAM、ATL 患者由来の末梢血リンパ球を  $\alpha$ -galactosylceramide（GalCer）刺激下で培養し、経時的な NKT 細胞数の変化と day14 におけるウイルス量を測定した。NKT 細胞中のパーフォリン量を決定するために細胞内染色で FACS による解析を行った。NKT 細胞の感染率を調べるためにソーティング後にゲノム DNA を抽出し、リアルタイム PCR にてウイルス量を定量化した。

（倫理面への配慮）

本研究は当大学および研究協力機関の倫理委員会で承認を得ている。本研究に用いられたすべての患者検体は、十分な説明と書面による同意を得て採取された。

C. 研究結果

NKT 細胞の頻度は健常者のみならず AC と比較しても HAM、ATL で有意に減少していた。NK 細胞も健常者と比較すると HAM、ATL で有意な減少を認めた。pDC および mDC も健常者と比較して HAM、ATL で有意に減少し、ATL 患者の mDC は AC や HAM よりも有意に低下していた。次にこれらの細胞群の頻度と HTLV-1 感染者のウイルス量との関連を調べると NKT 細胞の頻度のみ、ウイルス量と逆相関することがわかった。 $\alpha$ -GalCer 刺激下の培養により AC 検体で NKT 細胞の増殖が認められ、ウイルス量が有意に減少した。一方、HAM および ATL の NKT 細胞で増殖能低下を認めた。また NKT 細胞中のパーフォリン量も健常者と比較して HTLV-1 感染者では低下しており、NKT 細胞の量的・質的な低下を認めた。NKT 細胞は通常の CD3 陽性リンパ球と同程度の感染率であった。HTLV-1 感染者で残存して

いる NKT 細胞中の CD4<sup>+</sup>細胞の割合が減少していた。

#### D. 考察

NKT 細胞の頻度とウイルス量の逆相関を示したことから  $\alpha$ -GalCer 刺激で NKT 細胞が増加した AC 検体でウイルス量の減少を認めたことから、NKT 細胞が HTLV-1 感染細胞の制御に関与している可能性が示唆された。HTLV 感染者でなぜ NKT 細胞の頻度が低下したかというメカニズムに関しては HTLV-1 の感染しやすい CD4<sup>+</sup>NKT 細胞よりも CD4<sup>+</sup> NKT 細胞が減っていたことから少なくとも直接 NKT 細胞へ HTLV-1 が感染することによって減少したのではないことが判明した。

#### E. 結論

HAM 患者の循環血液中の NKT 細胞は量的・質的な異常を呈していることが分かった。

#### F. 健康危険情報

特にない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

[1] Azakami K, Sato T, Araya N, Utsunomiya A, Kubota R, Suzuki K, Hasegawa D, Izumi T, Fujita H, Aratani S, Fujii R, Yagishita N, Kamijyuku H, Kanekura T, Seino K, Nishioka K, Nakajima T, Yamano Y

Severe loss of invariant NKT cells exhibiting anti-HTLV-1 activity in patients with HTLV-1-associated disorders.

**Blood.** 2009 114:3208-3215.

##### 2. 学会発表

[1] 14th International conference on human retrovirology: HTLV and related retroviruses 2009, 7. Brazil

Sato T, Araya N, Takahashi K, Nishioka K, Yamano Y

The plasma level of CXCL10 and soluble IL-2 receptor are useful biomarkers and decreased in HAM/TSP patients with the long-term corticosteroid therapy.

[2] 第 2 回 HTLV-I 研究会 2009, 8. 東京

佐藤知雄, 阿座上和子, 新谷奈津美, 高橋克典, 宇都宮與, 久保田龍二, 山野嘉久

HTLV-1 関連疾患における invariant NKT 細胞の量的・機能的異常

[3] 第 2 回 HTLV-I 研究会 2009, 8. 東京

佐藤知雄, 新谷奈津美, 山野嘉久

HAM の疾患活動性血中バイオマーカーの同定およびステロイドの長期予後改善効果に関する検討

[4] 第 39 回日本免疫学会総会 2009, 12. 大阪  
佐藤知雄, 阿座上和子, 新谷奈津美, 山野嘉久  
The frequency of invariant NKT cells manifesting anti-HTLV-I activity is significantly decreased in patients with HTLV-I-associated disorders (HTLV- I 関連疾患患者では抗 HTLV- I 活性を有する iNKT 細胞が有意に減少している)

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

特にない。

##### 2. 実用新案登録

特にない。

##### 3. その他

特にない。

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

HTLV-1 関連脊髄症（HAM）の生体試料バンクを用いたウイルス感染  
CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>FoxP3<sup>low</sup> T 細胞の増加と機能異常の解析

分担研究者 新谷奈津美 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター 助教

研究要旨： HTLV-1 関連脊髄症（HAM）の病態の特徴は過剰な免疫応答であるが、それを誘発する病原性細胞は未だ不明であり、その同定は病態の理解と新規治療法の開発に重要である。本研究では生体試料バンクを活用して、HAM における HTLV-1 感染細胞の解析を行い、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>T 細胞が主な感染細胞であることを明らかにした。さらに、この細胞群における Foxp3 と炎症性サイトカインの発現解析から、Foxp3 の発現が低い（Foxp3<sup>low</sup>）細胞集団は普遍的に炎症性サイトカイン産生能を有していた。また、HAM 患者の CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>T 細胞は、健常者ではほとんど認められない IFN- $\gamma$  産生 Foxp3<sup>low</sup>T 細胞が異常に増加していた。さらに、HAM 患者において、この異常 T 細胞は、疾患活動性や過剰免疫応答と関連していた。また、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> T 細胞において HTLV-1 機能遺伝子である *tax* が HAM 特異的に高発現していた。よって、HAM では CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>T 細胞に感染した HTLV-1 の発現がその細胞の増殖や分化に影響を与え、感染 T 細胞が炎症促進的な細胞へと変化し、その病態形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

#### A. 研究目的

HTLV-1 は T 細胞に持続感染し、感染者の一部に脊髄の慢性炎症性疾患である HAM、別の一部に、成人 T 細胞白血病（ATL）を発症する。HAM の主病態は、HTLV-I 感染細胞に起因した過剰な免疫応答である。我々は、この感染細胞の中に、過剰免疫応答を誘発し病態の主原因となっている HAM 病因細胞が存在し、根本的な治療法開発の標的になると考えた。これまでの感染細胞に着目した研究から、HTLV-1 は免疫細胞の増殖抑制作用を有する制御性 T 細胞（Treg）を含んでいる CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞へ主に感染し、HAM 患者においては Treg の量的機能的減少変化が認められている。また、HTLV-1 と Treg との関係性については、HTLV-1 機能遺伝子 *tax* の発現による Treg 特異的マーカー Foxp3 の発現抑制作用が明らかとなっている。そこで、本研究では、生体試料バンクに保存された臨床検体を用いて、HAM 患者の CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞における HAM 病因細胞の同定と細胞機能の

解析を目的として解析を行った。

#### B. 研究方法

検体バンクにストックされた 11 例の HAM 患者、8 例の健常者の末梢血リンパ球と研究協力機関より提供して頂いた 5 例の ATL 患者の末梢血リンパ球を用いた。

まず、HTLV-I 感染細胞のより選択的なマーカーの同定を行うため、HAM 患者由来の末梢血単核球（PBMC）におけるケモカイン受容体である CCR4 発現率を FACS 解析にて測定した。また、HAM における CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を FACS ソーティングにて CCR4 陰性および陽性細胞に分離し、定量的 PCR 法にて各細胞群の HTLV-1 感染率を測定した。

次に、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>T 細胞は Treg を含んでいることから、HTLV-1 と Treg との関係について解析するため、Treg 特異的マーカー Foxp3 の発現を健常者、ATL、HAM 患者の CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>T

細胞において解析した。また、その結果より、HAM に特徴的な異常増殖が観察された CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> FoxP3<sup>low</sup> T 細胞における IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-17 の炎症性サイトカイン産生能について FACS にて解析した。更に、その細胞群と疾患活動性を反映する髄液中ネオプテリン濃度および臨床重症度の相関関係について調べた。また、HAM および ATL 患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> T 細胞を FACS ソーティングにより分離し、HTLV-1 感染率および HTLV-1 *tax* 遺伝子の発現の差を比較した。更に、HAM 患者の PBMC は無刺激状態においても自発的な増殖活性を有することから、その自発的増殖応答における CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>T 細胞の作用を検討するため、FACS ソーティングにより HAM 患者 PBMC から CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>T 細胞を除去した細胞を培養し、増殖応答変化を解析した。(倫理面への配慮)

本研究は当大学および研究協力機関の倫理委員会で承認を得ている。本研究に用いられたすべての患者検体は、十分な説明と書面による同意を得て採取された。

### C. 研究結果

#### 1) HTLV-I 感染細胞のより選択的なマーカーの同定

近年、ATL において、CCR4 陽性 T 細胞への HTLV-1 選択的感染が報告されていることから、HAM における HTLV-1 感染 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の CCR4 発現率の測定を行った結果、HAM 患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞においても CCR4 が高発現しており、また、HTLV-1 は CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>T 細胞群に優位に感染していることが明らかとなった ( $p=0.017$ )。

#### 2) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>Foxp3<sup>low</sup> T 細胞頻度と *in vivo* 増殖能の解析

健常者、ATL、HAM 患者の CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>T 細胞における Foxp3 発現解析から、Foxp3 の発現は HAM の

細胞群では低下していた。また、その様な CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> Foxp3<sup>low</sup> T 細胞群は HAM において特異的に異常増加していることが観察された ( $p=0.002$ )。

#### 3) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>FoxP3<sup>low</sup> T 細胞の炎症性サイトカイン産生能と疾患活動性との関わり

HAM、ATL、健常者の

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>FoxP3<sup>low</sup> T 細胞における炎症性サイトカイン産生能の比較解析を行い、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>FoxP3<sup>low</sup> T 細胞は健常者においても多彩な炎症性サイトカイン産生能を有するが、HAM では IFN- $\gamma$  産生が異常亢進し、IL-17 産生が低下していることが明らかとなった

( $p<0.01$ )。重要なことに、HAM 患者の PBMC 中における IFN- $\gamma$  産生

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>FoxP3<sup>low</sup> T 細胞の頻度は、疾患特異的に異常増加し ( $p=0.007$ )、その頻度と髄液中ネオプテリン濃度

( $p=0.011$ ) および臨床重症度 ( $p=0.018$ ) と有意な相関関係が認められた。

#### 4) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> T 細胞における HTLV-1 *tax* 遺伝子の発現解析

HAM および ATL 患者の CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>T 細胞において、HTLV-1 感染率は HAM および ATL 間で大きな違いはないが、HTLV-1 *tax* の発現は、ATL に比べ HAM で非常に高発現していることが明らかとなった。

#### 5) HAM 患者 PBMC の自発的増殖応答における CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>T 細胞の作用検討

HAM 患者の PBMC より CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> T 細胞を除去した細胞群では、HAM 患者 PBMC において観察される自発的増殖応答の減弱化が認められ ( $p=0.008$ )、HAM において CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>T 細胞が自発的増殖応答という過剰免疫応答の重要な構成因子であることが示された。

#### D. 考察

以上の結果から、HTLV-1 が CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>T 細胞に優位に感染し、その細胞の増殖や分化に作用し、通常はほとんど存在しない IFN- $\gamma$  を過剰産生するとともに Foxp3 発現が低下した異常な細胞が増加し、HAM 病態に見られるような過剰な免疫応答を誘導する病因細胞となり、その病態形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。また、HAM の CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>T 細胞における HTLV-1 発現がこのような異常な細胞機能の誘導に関与していることが予想された。

#### E. 結論

検体バンクを用いて、HAM 病因細胞の同定を目指した解析を行い、健常者においても多彩な炎症性サイトカイン産生能を有する新しい T 細胞集団 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>FoxP3<sup>low</sup> T 細胞) を発見し、HAM では本細胞が HTLV-1 に感染し、IFN- $\gamma$  を過剰産生する状態となり、疾患重症度と相関していることを明らかにした。これは、世界に先駆けて CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>low</sup>T 細胞の機能異常が免疫性疾患の病因となることを証明したものである。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Yamano Y., Araya N., Sato T., Utsunomiya A., Azakami K., Hasegawa D., Izumi T., Fujita H., Aratani S., Yagishita N., Fujii R., Nishioka K., Jacobson S., Nakajima T. Abnormally high levels of virus-infected

IFN- $\gamma$ +CCR4+CD4+CD25+ T cells in a retrovirus-associated neuroinflammatory disorder. *PLoS One* 4 (8) e6517:1-14, 2009.

##### 2. 学会発表

1) Araya N., Sato T., Takahashi K., Utsunomiya A., Nishioka K., Yamano Y. The molecular mechanism in the differentiation of HTLV-1 infected CD4+CD25+CCR4+ T-cells through HTLV-1 tax. The 14th International Conference on Human Retrovirology: HTLV-I and Related Viruses. , 2009 July, Salvador, Brasil.

2) 新谷奈津美、佐藤知雄、山野嘉久 The molecular mechanism in the differentiation of IFN- $\gamma$  + CCR4 + CD4 + CD25 + Fox3<sup>low</sup> T-cells through HTLV-1 tax 第 39 回日本免疫学会 2009 年 12 月 大阪

3) 新谷奈津美、佐藤知雄、山野嘉久 The reprogramming of CD4+CD25+ CCR4+Foxp3<sup>high</sup> regulatory T-cells by HTLV-1 tax 第 32 回日本分子生物学会 2009 年 12 月 横浜

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

特になし。

##### 2. 実用新案登録

特になし。

##### 3. その他

特になし。

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

検体バンクを用いた HAM 患者 HTLV-I 感染細胞におけるケモカインおよび  
FoxP3 の解析

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

研究要旨：今年度は 51 名の HAM 患者末梢血リンパ球の凍結保存を行い、検体バンクを用いて以下の研究を行った。HAM は HTLV-I 感染によって発症し、HTLV-I ウイルス量が高いことが発症および症状増悪の最大のリスクファクターであるが、その表面抗原および性質についてはよくわかっていない。また、近年 HTLV-I は制御性 T 細胞 (Treg) に感染しているとの報告もあるが、詳細はわかっていない。今回感染細胞を同定し、ケモカイン等の表面抗原および FoxP3 の発現を検討した。HTLV-I は末梢血リンパ球の CD4+CCR4+細胞に優位に感染しており、組織移行しやすいフェノタイプを示した。CCR4 陽性細胞は、フローサイトメトリー上でのカットオフでは、感染細胞中の 40.6%であったが、感染細胞では全ての細胞で CCR4 の発現が上がっており、検出感度があがれば感染細胞の比較的特異度の高い表面マーカーとなる可能性がある。感染細胞中の FoxP3 陽性細胞は 3%以下であり、Treg はごく一部であった。一方、Treg 中では Tax 陽性率が高く、HTLV-I は Treg の一部に感染して増殖している可能性が考えられた。以上の様に検体バンクの生体試料を用いることにより、有用な研究結果がえられた。今後も HAM 検体バンクの充実が望まれる。

#### A. 研究目的

HTLV-I 感染細胞の解析は、HAM の病態解明、治療法開発のために重要である。HTLV-I 感染 cell line 等を用いた研究はなされてきたが、生体内での感染細胞の性状については、よくわかっていない。今回、検体バンクに 51 例の HAM 患者末梢血リンパ球を凍結保存し、これらを用いて HTLV-I 感染細胞の研究を行った。HAM は HTLV-I 感染によって発症し、HTLV-I ウイルス量が高いことが、発症お

および症状増悪の最大のリスクファクターである。HTLV-I プロウイルス量測定の結果からは、HAM 患者末梢血中には HTLV-I 感染細胞が高頻度に存在するが、生体内の感染細胞は、ほとんどウイルス蛋白を発現しておらず、感染細胞の同定は困難であった。近年、HTLV-I 感染者の末梢血を短時間培養し感染細胞内で発現したウイルス蛋白を染色することで、感染細胞の同定が可能となった。今回、この方法を用いて感染細胞を同定し、ケモ

カイン等の表面抗原等を共染色し、感染細胞の表面抗原による同定が可能か検討した。また、近年 HTLV-I は制御性 T 細胞 (Treg) に感染しているとの報告もあるが、詳細はわかっていない。感染細胞をウイルス特異抗体で染色し、同時に Treg の特異的マーカーである FoxP3 の発現を検討した。

## B. 研究方法

検体バンクにストックされた 10 例の HAM 患者の末梢血リンパ球を用いた。Brefeldin A 存在下に 8 時間リンパ球培養を行い、HTLV-I Tax に対する特異抗体で細胞内染色を行い、感染細胞を同定した。同時にケモカイン (CCR4, CCR7) や CD3, CD4, CD25, CD27, CD28, CD45RA, CD45RO 等の細胞表面分子を抗体で染色し、ウイルス感染細胞と非感染細胞での発現を検討した。FoxP3 は特異抗体で細胞内蛋白染色を行い、感染細胞および非感染細胞での発現をフローサイトメトリーで検出した。統計は paired t-test を用いた。

### (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) 末梢血リンパ球当たりの感染細胞は、 $3.06 \pm 2.03\%$ であった。
- 2) 感染細胞は主に、CD4 リンパ球分画に

認められたが、少数の CD8 リンパ球にも検出された(図 1)。また、CD4+CD8+細胞にも感染が認められた。CD4 リンパ球中、および CD8 リンパ球中の感染細胞の比率は、それぞれ 5.19% および 1.30% であった (図 2,  $P=0.0074$ )。感染細胞中の CD4 および CD8 リンパ球の比率は、それぞれ 83% および 17% であった ( $P=0.0093$ )。単球系の細胞には感染は認めなかった。

3) CD4+Tax+細胞および CD4+Tax-細胞中の CCR4 陽性細胞の比率は、それぞれ 40.6% および 20.3% であった (図 3,  $P=0.0001$ )。また、CCR7 陽性細胞は、それぞれ 1.9% および 28.5% であった ( $P=0.0016$ )。CD4+Tax+細胞中の CD45RA-または CCR7-細胞は、それぞれ、97.4% および 98.1% であり、CD45RA-CCR7-細胞は 95.9% であった。また、CD4+Tax+細胞および CD4+Tax-細胞中の CD25 陽性細胞は、それぞれ 13.7% および 4.6% であった ( $P=0.0039$ )。4) CD4+Tax+細胞および CD4+Tax-細胞中の FoxP3 陽性細胞は、それぞれ 2.7% および 1.3% であり、Treg が感染細胞で軽度上昇していたが、有意差はなかった (図 4,  $P=0.11$ )。しかしながら、CD4+細胞中の Tax+細胞は 6.6% であり、CD4+CD25+FoxP3+ Treg 細胞中の Tax+細胞は 19.0% であり、有意差を認めた (図 5,  $P=0.010$ )。

## D. 考察

今まで生体内リンパ球を用いた HTLV-I 感染細胞の同定には、リンパ球を表面マーカーで分画した後に、サザーンプロット法または PCR を用いて、どの分

面にウイルスが多いかという方法で研究がされてきたが、本方法で簡便に感染細胞を同定することが可能となった。HTLV-I は *in vitro* の実験では、リンパ球だけでなく、血管細胞や神経細胞を含む多様な細胞に感染しうることを示されてきたが、*in vivo* ではごく限られた細胞群に感染が確認されている。当初の報告では、CD4 細胞がほとんど感染細胞のソースであり、特に CD4+CD25+細胞が主な感染細胞といわれてきた。近年は、CD8 リンパ球および単球系細胞にも、感染しているとの報告が散見されている。今回の検討では、CD8 細胞のごく一部にも感染が確認されたが、単球系細胞にはウイルス蛋白は同定されなかった。しかしながら、ほとんどの感染細胞はやはり CD4 細胞であった。また、感染細胞の CD25 の陽性率は 13.7%とそれほど高くなく、CD4+CD25+細胞に効率よく感染している可能性は残るが、CD25 陰性の感染細胞が 80%以上いることがわかった。CCR4 は感染細胞の 40.6%が陽性であったが、フローサイトメトリー上で全細胞の輝度が右にシフトしていることから、検出感度を上げれば全細胞が発現している可能性がある。FoxP3 は感染細胞での発現が高い傾向はあったが、有意ではなかった。また感染細胞の 2.7%と、ごく一部に検出されたことより、HTLV-I が多くの Treg に感染して、Treg の機能を通して免疫抑制をしているとは考えにくいと思われた。しかし、感染細胞の比率は、CD4 リンパ球中より CD4+CD25+ FoxP3+の Treg 細胞中で有意に高く、Treg の一部に感染して増殖している可能

性が考えられた。以上の様に臨床検体を用いることにより、cell line 等とは異なった HAM の生体内感染細胞の性状を検討することが可能となった。したがって HAM の検体バンクの確立は重要である。

## E. 結論

HTLV-I は末梢血リンパ球の CD4+CCR4+細胞に優位に感染しており、組織移行しやすいフェノタイプを示した。感染細胞中の FoxP3 陽性細胞は 3%以下であり、Treg はごく一部であった。検体バンクをもちいた HAM 研究は有用であり、今後も充実が望まれる。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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 Neuropath Exp Neurol.* 68(2):199-209, 2009
2. 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.* 29(4): 433-42, 2009
3. Azakami K, Sato T, Araya N, Utsunomiya A, Kubota R, Suzuki K, Hasegawa D, Izumi T, Fujita H, Aratani S, Fujii R, Yagishita N, Kamijuku H, Kanekura T, Seino KI, Nishioka K, Nakajima T, Yamano Y: Severe loss of invariant NKT cells exhibiting

anti-HTLV-1 activity in patients with HTLV-1-associated disorders. *Blood*. 114(15):3208-15, 2009

2. 学会発表

1. 久保田龍二、松浦英治、有村公良、出雲周二:HAM 脊髄における HTLV-I 特異的 CTL とアポトーシス細胞の同定。第 21 回日本神経免疫学会。2009 年 4 月 大阪
2. 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 仙台
3. 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 仙台
4. 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 仙台
5. Abdulah H, Higuchi I, Kubota R, Matsuura E, Hashiguchi A, Adbelbary 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 東京

6. 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 東京
7. 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 東京
8. 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 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。

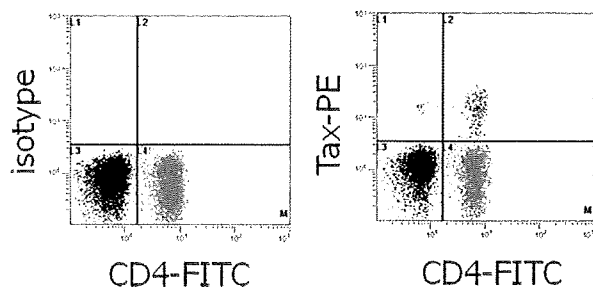


図 1. Tax 陽性感染細胞の検出。

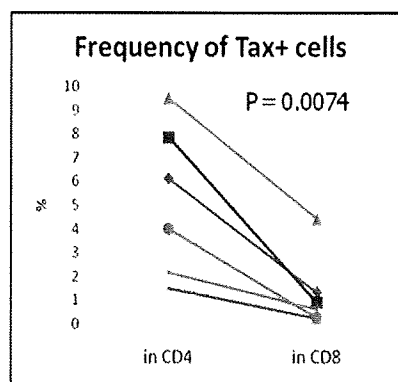


図 2. CD4、CD8 陽性細胞中の感染細胞の陽性率

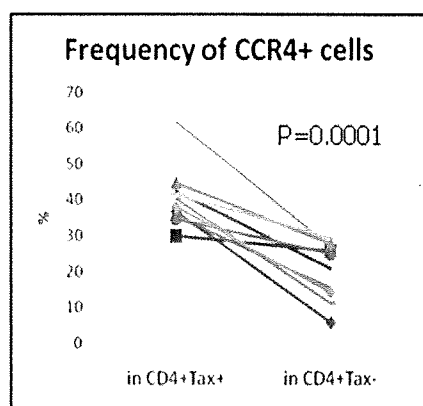


図 3. 感染細胞、非感染細胞での CCR4 細胞の陽性率

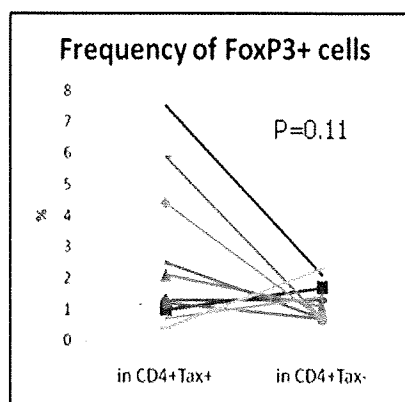


図 4. 感染細胞、非感染細胞での FoxP3 細胞の陽性率

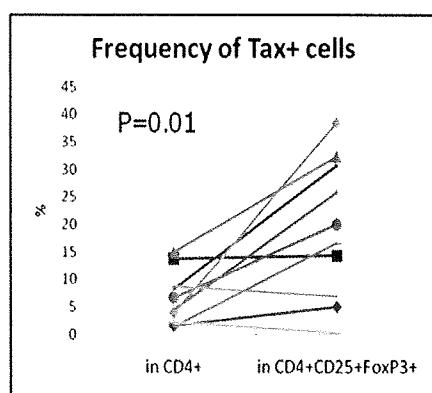


図 5. CD4 細胞および Treg 中の感染細胞の陽性率