

た遊走因子が T-HAM 細胞をさらに呼び込み炎症を増幅する「炎症のサイクル」により、T-HAM 細胞が脊髄で慢性炎症病変を形成するものと予想されることから、その「炎症のサイクル」形成機構の解析を試みた。

研究方法

(1) T-HAM 細胞の HTLV-1 依存的な発現機構の解析

はじめに、薬剤誘導性 Tax 発現細胞株 JPX-9 細胞を用いた解析から、Tax 発現誘導による IFN- γ の間接的な発現上昇を観察した。そこで、Tax による IFN- γ 誘導を仲介し得る分子を探索するため、健常者、HAM、ATL の CD4⁺CD25⁺CCR4⁺ T 細胞における発現遺伝子の網羅的な比較解析を DNA マイクロアレイ解析により行い、IFN- γ の発現誘導に関与する HAM 特異的転写因子を同定した。同定分子について、細胞株および生体由来細胞における Tax 依存的な発現を検討し、その分子機構の詳細な解析を行った。また、Tax による可塑的な細胞変化を検討するため、健常者 CD4⁺CD25⁺CCR4⁺ T 細胞に Tax を導入し、Treg における活性 T 細胞抑制機能の変化について観察を行った。

(2) HAM 脊髄における炎症サイクル形成機構の解析

HAM 脊髄病変への T-HAM 細胞を呼び込む「炎症サイクル」形成機構を明らかにする為に、無症候性キャリアー28例（男性8例、女性20例）、HAM 専門外来初診時にステロイド治療を受けていなかった HAM 患

者30例（男性6例、女性24例）を対象として、髄液中における代表的なケモカインリガンド(CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL3, CCL4, CCL5, CCL17, CCL22, CCL20)の濃度を測定した。これらの項目で HAM 患者において有意に上昇が認められたものを T-HAM 細胞誘導に作用し得る候補因子として同定した。候補因子について、納の運動障害重症度と相関性を評価した。

(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1646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。

研究結果

(1) T-HAM 細胞の HTLV-1 依存的な発現機構の解析

健常者、HAM、ATL の CD4⁺CD25⁺CCR4⁺ T 細胞における発現遺伝子の網羅的な比較解析から HAM 特異的転写因子として T-bet を同定した。T-bet は、生体においては IFN- γ の遺伝子発現を直接活性化し、Th1 のマスター転写因子として機能している因子である。JPX-9 細胞を用いた検討から、Tax の発現誘導に伴った T-bet の発現上昇を観察した。また、健常者に比較して HAM 患者

CD4⁺CD25⁺CCR4⁺ T細胞における T-bet の発現亢進が観察された。また、その発現は Tax siRNA を用いた Tax 発現阻害実験により抑制することを示した。よって、HAM 患者由来 CD4⁺CD25⁺CCR4⁺ T細胞では Tax 依存的に T-bet の発現上昇が誘導されていることが明らかとなった。次に、T-bet の遺伝子発現における Tax の作用機構の解析において、HAM 患者由来細胞株 HCT5 の核抽出液を用いた免疫沈降実験により tax と Sp1 の相互作用を示した。また、Tbx21/T-bet プロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイにより Tax が Sp1 依存的に Tbx21/T-bet プロモーターを活性化し得ることを明らかにした。さらに、健常者 CD4⁺CD25⁺CCR4⁺ T細胞へのレンチウイルスによる Tax 導入により、Treg の活性化 T細胞抑制機能の減弱を明らかにした。

(2) HAM 脊髄における炎症サイクル形成機構の解析

HAM 患者および無症候性キャリアーの髄液中におけるケモカインノ濃度測定を行った結果、無症候性キャリアー群に比較して HAM 患者群では IP-10/CXCL10 の特異的な上昇が観察された。また、IP-10/CXCL10 の髄液中濃度は、納の運動障害重症度と正の相関が得られ、その相関係数はこれまで脊髄炎症を反映したバイオマーカーとして用いられている髄液ネオプテリンに比較しても高い値が得られた。(CXCL10: $p = 0.0002$, $r = 0.6621$, ネオプテリン: $p = 0.0006$, $r = 0.5898$)

考察

本研究結果から、HTLV-1 感染細胞において Tax は Sp1 と相互作用し、Tbx21/T-bet のプロモーターに対して Sp1 を介して転写コアクチベーターとして作用し、T-bet の転写を活性化することが示唆された。また、健常者 CD4⁺CD25⁺CCR4⁺ T細胞への Tax 発現がその Treg 活性を抑制することから、HTLV-1 感染細胞における Tax の発現は正常 CD4⁺CD25⁺CCR4⁺ T細胞から Treg 活性を消失した IFN- γ ⁺CD4⁺CD25⁺CCR4⁺ T (T-HAM) 細胞へと可塑的な変化をもたらし、HAM の病因細胞を誘導することが予想された。また、HAM 患者髄液中において、HAM 病態に 관련된 IP-10/CXCL10 の発現上昇が観察された。CXCL10 は IFN- γ の刺激によってマクロファージやアストロサイトから産生され、その受容体である CXCR3 を介して単球や T細胞の遊走を誘導する。従って、脊髄に浸潤した T-HAM 細胞から産生された IFN- γ によって、周辺の実質細胞や間質細胞より過剰産生された IP-10 が炎症細胞をさらに呼び込み炎症を増幅するといった“炎症サイクル”の形成が、HAM の慢性炎症病態の主軸でとなっていることが予想された。

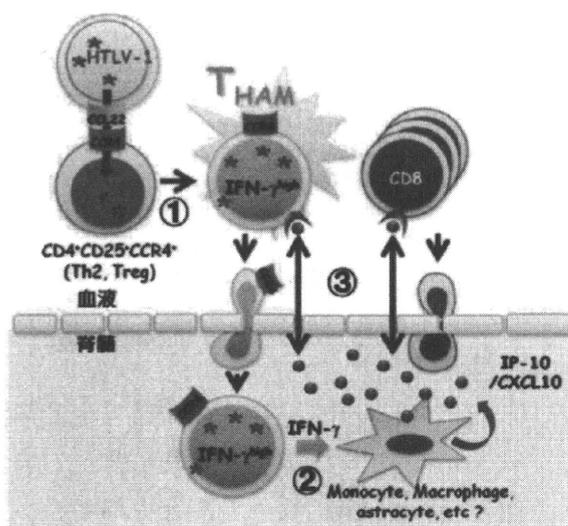
結論

よって、HAM 患者の HTLV-1 感染 CD4⁺CD25⁺CCR4⁺ T細胞では、Tax の発現が Th1 細胞のマスター転写因子である T-bet の転写活性化を介して異常な IFN- γ の発現を引き起こし、感染 T細胞の Treg から炎症促進的な T-HAM 細胞を誘導することが示唆された (図-□)。また、この T-HAM 細胞が脊髄に浸潤して炎症を惹起し (図-②)、

その炎症の場で過剰産生された IP-10/CXCL10 が炎症細胞をさらに呼び込み炎症を増幅する(図 4-③)といった、“炎症のサイクル”を形成することにより脊髄において慢性炎症病変が成立することが予想された。

今後、この「T-HAM 細胞と IP-10/CXCL10 依存的な慢性炎症病変の形成機構」についての詳細な解析を行い、HAM の慢性炎症機構を明らかにする。

T-HAM 細胞と IP-10/CXCL10 依存的な慢性炎症病変の形成機構



文献

特に引用文献はありません。

健康危険情報

特記すべき事項はありません。

知的財産権の出願・登録状況

特許取得：4 件

特願 2010-94641、発明者：山野嘉久、佐

藤知雄、新谷奈津美、出願年月日：2010 年 4 月 16 日、HTLV-I 関連脊髄症の予防及び/又は治療のための医薬

特願 2010-126487、発明者：山野嘉久、鈴木登、出願年月日：2010 年 6 月 2 日、再発性多発軟骨炎の検査方法およびそれに用いられる検査キット

特願 2010-240868、発明者：山野嘉久、清野研一郎、出願年月日：2010 年 10 月 27 日、 $\gamma\delta$ T 細胞の製造方法および医薬

61/391,094. Yoshihisa Yamano, Kusuki Nishioka. Diagnostic Agent for Fibromyalgia, Method For Diagnosing fibromyalgia and Medicament for Fibromyalgia. 8 Oct 2010

実用新

登録：なし

HAM の HTLV-I 特異的 CTL における T 細胞疲労関連分子 Tim-3 の発現低下

研究分担者 出雲周二¹⁾

共同研究者 久保田龍二¹⁾、Abdelbary NH¹⁾、高嶋 博²⁾

研究要旨

近年、免疫疲労関連分子である Tim-3 および PD-1 が同定され、HIV や HCV などの慢性ウイルス感染症における長期の抗原刺激の結果、CTL などの免疫細胞が疲弊し、ウイルス排除が上手く行えないことが指摘されている。我々は、HAM およびキャリアを含めた HTLV-I 感染者において、HTLV-I 特異的 CTL が免疫疲労しているのか、また HAM の CTL はキャリアより疲労しているのかについて検討を行った。本研究により以下の知見が明らかになった。1) HAM および HTLV-I キャリア両群における Tim-3 の発現は、正常者と比べて、リンパ球全体ならびに HTLV-I Tax 特異的 CTL において低下していた。2) HAM とキャリアでは、HTLV-I 特異的 CTL での Tim-3 陽性細胞率および CD107a 発現には差がなかった。以上の結果より、HTLV-I 感染症では他の慢性ウイルス感染症と異なり、ウイルス特異的 CTL を含む免疫細胞は疲弊していないことを示された。さらに、HAM とキャリアでは、HTLV-I 特異的 CTL あたりの CTL 活性には差がないことより、HAM におけるウイルス量の増大は他の原因による可能性が示された。

研究目的

細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) は、ウイルス感染細胞除去に重要な細胞であり、HAM の治療には HTLV-I 感染細胞の減少が重要である。HAM において HTLV-I 特異的 CTL が多いにもかかわらずウイルス量が高いことより、HTLV-I 特異的 CTL の機能低下の可能性を指摘する報告もある。近年 T 細胞疲労関連分子 T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing molecule-3 (Tim-3) および programmed cell death-1 (PD-1) が報告

され、HIV や HCV 等の慢性ウイルス感染症ではこれらの分子の発現亢進が認められ、CTL の機能低下が報告されている。HAM において HTLV-I 特異的 CTL の機能低下があるかにつき、T 細胞疲労関連分子である Tim-3 と PD-1 の末梢血中 CTL での発現および機能を検討した。

研究方法

32 例の HAM 患者、31 例の HTLV-I キャリア、および 11 例の正常コントロールよりの PBMC を用い、flow cytometry にて以下の実験を行った。

- 1) 鹿児島大学難治ウイルス研
- 2) 鹿児島大学神経内科

①CD4⁺、CD8⁺T 細胞および HTLV-I 特異的 CTL での Tim-3 および PD-1 の発現。

②Tim-3+/-および PD-1+/- HTLV-I 特異的 CTL での IFN- γ 産生能。

③Tim-3+/-および PD-1+/- HTLV-I 特異的 CTL での抗原刺激後 CD107a 発現 (細胞傷害性因子の放出能)。

また、定量的 PCR 法による HTLV-I プロウイルス量測定および、罹病期間、抗 HTLV-I 抗体価、重症度等の臨床パラメーターと PD-1 または Tim-3 発現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

以下の結果が得られた。

①CD4+、CD8+T細胞での Tim-3 の発現は、HAM およびキャリアで低下していた(図 1)。

②HTLV-I 特異的 CTL での Tim-3 の発現は、CMV 特異的 CTL と比べ低下していた(図 2)。

③CD4+、CD8+T細胞で PD-1 の発現は、HAM、キャリア、正常コントロールで差が見られなかった。

④HTLV-I 特異的 CTL での PD-1 の発現は、CMV 特異的 CTL と比べ増加していた。

⑤HTLV-I 特異的 CTL での IFN- γ の産生および CD107a の発現は、Tim-3 陽性細胞で減少していた。一方、PD-1 陽性細胞では増加していた(図 3)。

⑥HTLV-I 特異的 CTL での CD107a の発現は、HAM およびキャリアで差が認められなかった(図 4)。

⑦Tim-3 または PD-1 陽性 HTLV-I 特異的 CTL の頻度は、HTLV-I ウイルス量や罹病期間、重症度、年齢、HTLV-I 抗体価とは相関は認めなかった。

考 察

HAM および HTLV-I キャリアを含む HTLV-I 感染症においては、Tim-3 の発現低下が認められ、HCV や HIV 等の他の慢性ウイルス感染症と大きく異なっていた。Tim-3 の発現が低下していたことより、HTLV-I 感染症においては Tim-3 を介する Th1/Tc1 系の免疫抑制は起こっていないことが強く示唆された。CD8+細胞および HTLV-I 特異的 CTL において、PD-1 陽性細胞は陰性細胞と比べて IFN- γ 産生能および CD107a 発現で示される細胞傷害能は亢進しており、一方 Tim-3 陽性細胞は陰性細胞と比べて IFN- γ 産生能および CD107a 発現は低下しており、対照的であった。このことより、免疫疲労関連分子 PD-1 と Tim-3 は、免疫制御に関して異なった作用があると考えられた。また、CD107a の発現は、HAM および HTLV-I キャリアの HTLV-I 特異的 CTL で差がなかったことより、両者の細胞傷害能に関しては質的差がないことが示された。以上より HAM で特に CTL が疲労しており、ウイルス排除能が低下している可能性は低いと考えられた。

結 論

HAM およびキャリアで Tim-3 の発現は低下しており、他の慢性ウイルス感染症とは異なっていた。Tim-3 または PD-1 陽性細胞の IFN- γ 産生および CD107a 発現は

異なっており、同じ T 細胞疲労関連分子であるがその働きは異なっていた。Tim-3 の発現は HAM とキャリアで差がなく、さらに CD107a の発現も差がなかった。HTLV-I 感染では HTLV-I 特異的 CTL はあまり疲労状態ではなく、ウイルス感染細胞除去に働いていると考えられた。

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

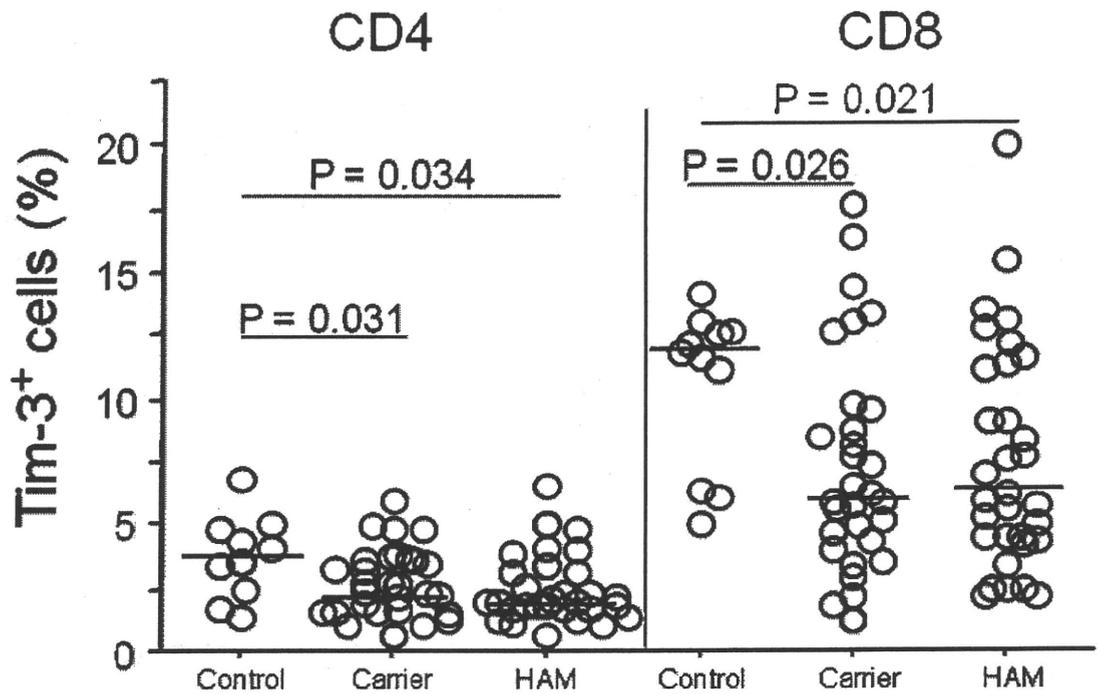


図1. HAMおよびHTLV-IキャリアのCD4+およびCD8+細胞におけるTim-3の発現低下。

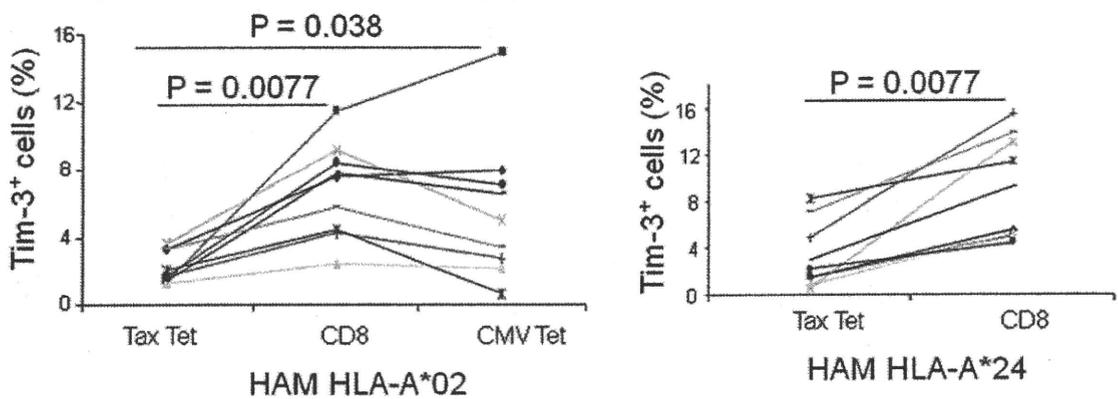


図2. HAM患者HTLV-I特異的CTL(Tax Tet)におけるTim-3発現低下。

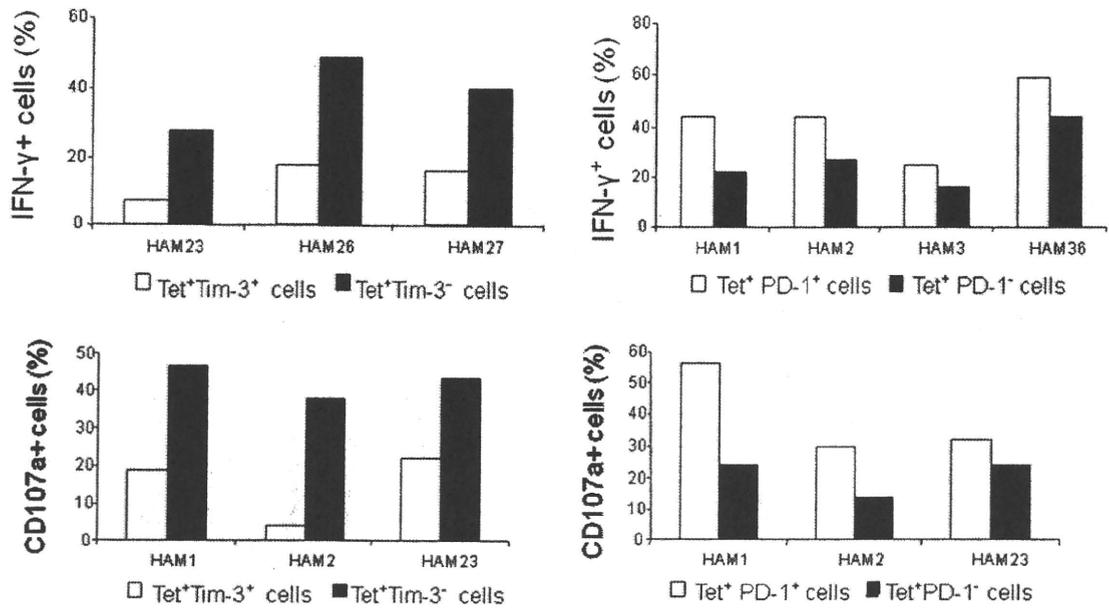


図3. HAM患者HTLV-I特異的CTL (Tet+)における、Tim-3+/-およびPD-1+/-細胞でのIFN- γ 産生能および、CD107a発現による細胞傷害能。

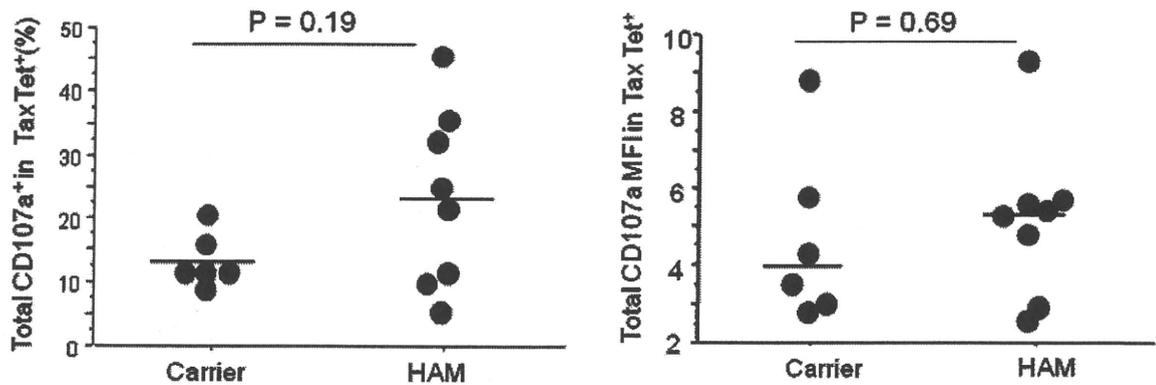


図4. HAMおよびHTLV-IキャリアのHTLV-I特異的CTL (Tax Tet+)におけるCD107aの発現。

HTLV-1 関連脊髄症における OX40 陽性細胞の病因的意義とその制御

研究分担者 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 の標的遺伝子を網羅的に解析した結果、Tax 発現誘導に伴って変化する遺伝子として OX40 (CD134) を同定した。OX40 は HTLV-1 非感染 T 細胞株と比較して感染 T 細胞株において mRNA・蛋白ともに高発現していた。一方、HAM 患者末梢血単核球 (PBMC) 表面に OX40 の発現は認められなかったが、剖検脊髄の病変局所浸潤細胞に強発現していた。HAM 患者の PBMC を短時間培養して Tax 蛋白を発現誘導すると OX40 は Tax 陽性細胞特異的に発現誘導されたが、この系に自家製抗 OX40 モノクローナル抗体を添加するとコントロール抗体と比較して有意に Tax 陽性細胞が減少した。以上の結果から、OX40 は HAM の病態形成に重要な役割を果たしている分子であり、HTLV-1 関連疾患の治療標的分子となりうる可能性が示唆された。

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。本研究の目的は HAM の発症機序解明と新規発症予防法・治療法の開発である。昨年度までに HTLV-1 の転写制御因子 Tax の標的遺伝子網羅的にを網羅的に

た結果、Tax 発現誘導に伴って変化する遺伝子として OX40 (CD134) を同定した。OX40 は TNF 受容体型分子群に属し T 細胞活性化に必要な副シグナル分子であり、HTLV-1 の転写制御因子 Tax によって発現誘導される。本年度は HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) 患者の末梢血単核球と剖検脊髄標本を用いて OX40 陽性 T 細胞と病態との関連について、また OX40 が HAM の治療標的分子となりうるかどうかについて検討した。

研究方法

昨年度までに、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 JPX9 を用いて、培地への CdCl₂ 添加により Tax を発現誘導し、前後で変動する遺伝子群をマイクロアレイ

¹⁾ 金沢医科大学 医学部 微生物学部門

²⁾ 琉球大学大学院医学研究科 感染制御医科学専攻 免疫学講座

解析した結果、Taxによって発現誘導される標的遺伝子としてOX40を同定した。各種ヒトT細胞株、HAM患者末梢血単核球（PBMC）におけるOX40, OX40L (=gp34) mRNA・蛋白の発現量を、RT-PCR・ELISA・フローサイトメトリーで比較した。HTLV-1プロウイルス量はReal Time PCR法で定量した。HAM患者剖検脊髄組織を自家製抗OX40モノクローナル抗体で免疫染色した。HAM患者のPBMCを短時間培養してTaxおよびOX40を発現誘導し、自家製抗OX40モノクローナル抗体のHTLV-1感染細胞に対する効果とその作用機序を調べた。

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

OX40は既報の通りHTLV-1非感染T細胞株と比較して感染T細胞株においてmRNA・蛋白ともに高発現していた。HAM患者PBMCにOX40の発現は認められなかったが、剖検脊髄の病変局所浸潤細胞に強発現していた。HAM患者のPBMCを短時間培養してTax蛋白を発現誘導するとOX40はTax陽性細胞特異的に発現した。この培養系に自家製抗OX40モノクローナル抗体を添加するとコントロール抗体と比較して有意にTax陽性細胞が減少した。この効果は抗体が持つOX40へのリガンド（OX40L）結合阻止能との関連はなく、培養系からNK細胞を除去すると減弱した。また、病勢が強い患者ほど感染細胞あたりのOX40発現量が強い傾向がみられた。

考 察

HTLV-1の転写制御因子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。OX40は活性化T細胞のeffector機能発現、memory T細胞誘導等に働いているとされている分子である。OX40がHTLV-1 Taxにより感染細胞に選択的に発現誘導されること、HAM脊髄病変局所浸潤細胞に高発現していたことから、OX40陽性細胞がHAMの病態形成に重要な役割を果たしていることが考えられる。また、抗OX40モノクローナル抗体によりHAM患者のHTLV-1感染細胞をin vitroで減少させることが可能であったことから、OX40はHTLV-1関連疾患の治療標的分子となりうる可能性も示唆された。今後は将来の臨床応用に向けて抗OX40モノクローナル抗体の作用機序の詳細な検討、HTLV-1感染細胞に対する効果増強法の開発、ヒト化抗体の作製を進めていきたい。

結 論

HAMの新規治療標的分子候補としてOX40を同定し、抗OX40モノクローナル抗体がHTLV-1感染細胞をin vitroで減少させることを明らかにした。

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 の臨床病型および病型判定に資するバイオマーカーの検討

研究協力者：山野 嘉久¹⁾

共同研究者：佐藤知雄¹⁾、新谷奈津美¹⁾、安藤仁¹⁾、清水由紀子¹⁾、宇都宮與²⁾、長谷川泰弘³⁾、出雲周二⁴⁾、鈴木登¹⁾

研究要旨

HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) は、その経過や疾患活動性の個人差が大きく、それぞれの特徴に応じて治療方針も異なるが、その点が広く認知されていないという問題点がある。その問題を解決するためには HAM の臨床病型を明確化することが重要であると考え、本研究では、HAM 患者の自然経過を解析し、また病型判定に資するバイオマーカーを同定することとした。その結果、HAM はその経過と疾患活動性から、① 急速進行型、②-A 慢性進行型・活動性、②-B 慢性進行型・非活動性、③ 慢性軽症型、の大きく 4 つの臨床病型に分けることができた。さらに、HAM の疾患活動性を反映する脊髄での炎症の程度を評価するには髄液 CXCL10、次いで髄液ネオプテリンの測定が最も優れていることが判明した。今後、HAM の臨床病型別および重症度別の治療ガイドラインの作成を目指すため、多施設において、この臨床病型および疾患活動性マーカーの有用性について評価が行われ、エビデンスレベルを上げる努力が必要である。

研究目的

HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) は、HTLV-1 感染を背景に脊髄における炎症の持続から脊髄組織が変性し、歩行障害や膀胱直腸障害を来す疾患である。HAM は一般に緩徐進行性で慢性に経過するとされているが、実際は数年で急速に悪化する例やほとんど進行しない例などバリエーションが大きい。HAM 患者に対する治療介入を考える上で、

- 1) 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター
- 2) 慈愛会今村病院分院 血液内科
- 3) 聖マリアンナ医科大学 神経内科
- 4) 鹿児島大学 難治ウイルス研

このような経過に個人差が存在することから、発症後出来るだけ早期に疾患活動性を把握し、それに応じた適切な治療方針を計画し、またその効果を判定しながら実施することが重要と考えられる。しかし、HAM が希少疾患であるために、一般の医療機関では重症度を評価するための検査が施行されていない、疾患活動性の重症度に応じた治療がなされていない、などの実態も明らかとなっている。これらの原因として、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。

そこで我々は、全国的な HAM の診療レベル向上と標準化の実現を目標として、「HAM の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」が急務であると考え。その為に、HAM における臨床病型を明らかにし、その病型判定に資するバイオマーカーを同定することを本研究の目的とした。

研究方法

(1) 昨年度の厚生労働省 難治性疾患克服研究事業の「HTLV-I 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」を引き続き進める形で研究基盤の充実を図った。具体的には臨床情報および患者由来の検体(末梢血単核細胞、DNA、血清、血漿、髄液)の収集・保存を行った。以下の研究はこの研究基盤を元に実施された。そのなかで、独立行政法人医薬基盤研究所の難病研究資源バンクへの生体試料を提供する為の体制を整備した。

(2) HAM 専門外来初診時にステロイド治療を受けていなかった HAM 患者 30 例(男性 6 例、女性 24 例)の協力を得て、これまでの年齢とそのときの運動障害度の調査を実施した。得られた運動障害度の経時変化をプロットし、自然経過を調べた。

(3) 上記 30 例と無症候性キャリアー 28 例(男性 8 例、女性 20 例)を対象として、末梢血単核球中のプロウイルス量、血清中の可溶性 IL-2 受容体 (sIL-2R)、MMP-3、ケモカイン CXCR3 リガンド (CXCL9, CXCL10 および CXCL11)、CCR5 リガ

ンド (CCL5) の各濃度を測定した。さらに、髄液中のネオプテリン、sIL-2R および代表的なケモカインリガンド (CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL3, CCL4, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22) の濃度を測定した。これらの項目で HAM 患者において有意に上昇が認められたバイオマーカー候補因子について、臨床重症度との相関性を評価した。

(4) ステロイド内服治療の HAM 患者に対する有用性を調べるために、治療前後の臨床重症度、プロウイルス量、および同定されたバイオマーカーの測定を行い、その影響を prospective に検討した。また、ステロイドの長期予後改善効果について検証するために、ステロイド長期内服群とステロイド非内服群の予後に関して、retrospective な解析を行った。

(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 1646 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。

研究結果

(1) 関東での HAM 専門外来を実施することにより、昨年度 63 名だった当施設での HAM 患者の臨床情報が 84 名に増え、生体試料 (PBMC、DNA、血清、血漿、髄液)

の採取、保存例も 84 例となった。そのなかで、難病研究資源バンクへ血清 56 例（うち HAM45 例、キャリアー 11 名）、ゲノム DNA118 例（うち HAM68 例、キャリアー 50 例）を提供することができた。

(2) HAM の自然経過は、①数年以内に車椅子レベルになる急速に進行する群（急速進行型）、②緩徐に慢性に進行する群（慢性進行型）、③発病から 20 年以上経過しても杖なしで歩けるほど軽症な群（慢性軽症型）の、大きく 3 つに分けられた。さらに、②慢性進行型の群に関しては、本研究により同定されたバイオマーカーである髄液 CXCL10 および髄液ネオプテリンの両者が高値を示す「②-A：活動性」と両者が低値である「②-B：非活動性」の 2 群に分けられた。

(3) HAM 患者において臨床重症度と最も高い相関を示したのは髄液中の CXCL10 濃度で、次いで髄液ネオプテリン濃度であった（CXCL10: $p = 0.0002$, $r = 0.6621$, ネオプテリン: $p = 0.0006$, $r = 0.5898$ ）。続いて、血清中の CXCL10 と sIL-2R の濃度も臨床重症度に対し有意な相関を示した（CXCL10: $p = 0.0347$, $r = 0.406$, sIL-2R: $p = 0.0449$, $r = 0.379$ ）。血清バイオマーカー候補因子の中では、sIL-2R がキャリアーと HAM 患者を分別する感度および特異度において最も優れていた。

(4) 血清バイオマーカー候補である sIL-2R と CXCL10 は髄液ネオプテリンの値とも相関を示し、約 2 ヶ月間のステロイド内服治療により、いずれも減少した。また、長期ステロイド内服治療を受けていた患者では髄液ネオプテリン、血清 sIL-2R が

有意に低値を示し、かつ臨床重症度も低く保たれていたという結果が得られた。

考 察

HAM を含め多くの難病は、「患者数が少ない為に研究が進展しにくい」という問題点をかかえており、その解決の為に、難病患者の生体試料を収集、保存、提供する基盤整備が必要不可欠である。我々は、本研究の実施により HAM に関する研究室レベルおよび国レベル（難病バンク）での基盤整備を進めることができた。

また本研究での解析により、HAM はその経過と疾患活動性から、①:急速進行型、②-A:慢性進行型・活動性、②-B:慢性進行型・非活動性、③:慢性軽症型の大きく 4 つの臨床病型に分けることができた。この 4 つの臨床病型に分けることの意義として、1) HAM の経過や疾患活動性に個人差が大きいことを広く認知する効果、2) 治療方針決定の参考・指針となる点、などが挙げられる。例えば、①:急速進行型や②-A:慢性進行型活動性の患者にはステロイド療法やインターフェロン治療により早期に炎症の鎮静化を図る必要性が高く、その投与量や種類も病型を考慮する必要性がある。また、②-B:慢性進行型非活動性や③:慢性軽症型の患者にはステロイド療法やインターフェロン治療の必要性は低いであろう。本研究ではこの仮説を、病型の判別に有用なバイオマーカーの同定と、ステロイド治療によるその改善効果・長期予後の相関を証明することにより、裏付けることができた。

これまで HAM の疾患活動性を評価する方法として、プロウイルス量や髄液ネオプテリンなどが知られていたが、他に髄液や血清で上昇することが知られるサイトカインやケモカインも含めて、HAM の疾患活動性である脊髄における炎症の程度を評価するには髄液 CXCL10、次いで髄液ネオプテリンが適切であることが分かった。ただし髄液検査は侵襲性が高く、頻繁に検査することは困難であるため、血液検査で分かるバイオマーカーも求められている。その意味では脊髄の炎症を反映し、重症度とも相関が認められた sIL-2R および CXCL10 が、血清バイオマーカーとして有用であると思われる。しかしながら、重症度との相関の強さや、病型の判別においては、髄液中のマーカー (CXCL10、ネオプテリン) が血清中のマーカーよりも明らかに優れていることが判明したので、HAM 患者の診療においては、まず髄液中マーカーの値と経過により病型と疾患活動性を評価して治療方針を決定し、採血検査で簡便に測定できる血清マーカーの値は治療効果の判定指標として参考にし、治療効果が十分であるかに関しては、やはり髄液検査で確認するという方法が望ましいと考えられる。

また興味深いことに、本研究において、ステロイドの内服治療によりこれら重症度と相関するバイオマーカー値が有意に低下すること (prospective study)、およびステロイド長期内服群において長期予後が有意に良いこと (retrospective study)、が証明された。これらの結果、および髄液中バイオマーカー値の低い患者 (慢性軽症型) の長期予後が良いことから、ステロイドなどの治療により脊髄の炎症を低い状態に維持することは、

HAM の進行を遅らせる、すなわち長期予後の改善に重要であると考えられる。

結論

本研究により HAM の自然経過の特徴を明らかにし、4つの臨床病型に分けることができた。この病型毎に疾患活動性が異なっており、髄液 CXCL10 および髄液ネオプテリンがその指標となることがわかった。今後、HAM の臨床病型別の治療ガイドラインの作成を目指すため、多施設において、この臨床病型および疾患活動性マーカーの有用性、およびその治療効果との相関性などについて評価し、エビデンスレベルを上げる努力が必要であると考えられる。

文献

特に引用文献はありません。

健康危険情報

特記すべき事項はありません。

知的財産権の出願・登録状況

特許取得：4件

特願 2010-94641、発明者：山野嘉久、佐藤知雄、新谷奈津美、出願年月日：2010年4月16日、HTLV-I 関連脊髄症の予防及び/又は治療のための医薬

特願 2010-126487、発明者：山野嘉久、鈴木登、出願年月日：2010年6月2日、再発性多発軟骨炎の検査方法およびそれ

に用いられる検査キット

特願 2010-240868、発明者：山野嘉久、
清野研一郎、出願年月日：2010 年 10 月
27 日、 γ δ T細胞の製造方法および医薬

61/391,094. Yoshihisa Yamano, Kusuki
Nishioka. Diagnostic Agent for
Fibromyalgia, Method For
Diagnosing fibromyalgia and
Medicament for Fibromyalgia. 8 Oct
2010

実用新案登録：なし

新規病因自己抗体, Lrp4 抗体陽性重症筋無力症の発見

研究分担者 本村 政勝¹⁾

共同研究者 栢田智子¹⁾、徳田昌紘¹⁾、福田 卓¹⁾、中田るか¹⁾、辻野 彰¹⁾、川上 純¹⁾、吉村俊朗²⁾、森 雅裕³⁾、樋口 理⁴⁾、山梨裕司⁴⁾

研究要旨

我々は、アセチルコリン受容体 (AChR) 抗体陰性重症筋無力症 (MG) 患者から、新たな自己抗体 Low-density lipoprotein receptor-related 4 protein (Lrp4) 抗体を有する 9 症例を報告した¹⁾。対象として、当研究室に保存されている MG/LEMS 患者の血清を用いた。Lrp4 抗体測定法は、*Gaussia luciferase* (GL) で標識した細胞外領域 Lrp4 (Lrp4-GL) を抗原として用いる Luciferase reporter Immunoprecipitation assay を開発した。さらに、Lrp4-GL と FLAG-Agrin との受容体結合実験系に患者血清を加え、競合阻害を観察した。結果として、1) 正常者 100 例の平均+4SD、0.015 nM を正常上限値とすると、AChR 抗体陰性 MG 患者 300 例中 9 例が Lrp4 抗体陽性で、抗体価は 0.019~2.07 nM、平均 0.65 nM であった。疾患コントロールとして、AChR 抗体陽性 MG 患者 100 例はすべて陰性、P/Q 型 LEMS 患者 101 例中 1 例が弱陽性であった。2) 臨床像は、男女比 4 対 5、発症平均年齢 57 歳、全例が全身型で、胸腺腫合併は無かった。3) 受容体結合実験で、Agrin と Lrp4 の結合を Lrp4 抗体陽性患者血清が用量依存性に阻害した。以上より、Agrin の受容体である Lrp4 に対する自己抗体は、AChR/MuSK 抗体に次ぐ、第 3 番目の MG 病因自己抗体になる可能性が示された。

研究目的

近年、アセチルコリン受容体 (acetylcholine receptor; AChR) の集中的な発現 (clustering) に関わる蛋白が続々と発見されている。従来から、神経・筋接合部の形成は神経終末から分泌される糖タンパク質 agrin が筋側に作用することによって起きるといふ「agrin 仮説」が提唱されていたが、agrin と筋側の MuSK の間にギャップがあり、その間に仮想分子の存在が予想されていた。2006 年、神経筋接合部のプロテオームの解析より、Dok7 や Lrp4 蛋白が発見され、その解析がなされた。これらの遺伝子欠損マウスでは神経・筋接合部の形成が起きなくなると報告された。2008 年、Agrin の受容体が Lrp4 蛋白であるということが証明された^{2,3)}。つまり、この Lrp4 分子が、長年にわたって探し求められてきた仮想分子そのものであること

が判明した。現在、Agrin-Lrp4/MuSK-Dok7 仮説のもと、幾つかの蛋白が関わり、神経筋接合部の AChR が集中的に局在し、そのシナプス機能を果たしていると考えられている。これらの基礎研究に基づき、今回、MG 患者さんから新たな病因自己抗体、Lrp4 自己抗体の発見に至った¹⁾。

研究方法

1) 対象: 当研究室で保存されている抗 AChR 抗体陰性 MG 患者 300 例、抗 AChR 抗体陽性 MG 患者 100 例、抗 P/Q 型 VGCC 抗体陽性 LEMS 患者 101 例、そして、正常者 (HC) 100 例の保存血清を用いた。

2) Lrp4 抗体測定法: Lrp4-Luciferase reporter Immunoprecipitation, LUCIP assay を開発した。具体的には、Lrp4-*Gaussia luciferase* (GL) protein にヒト血清を加え反応させる。その後、Protein G-sepharose で免疫沈降させ、洗浄後、GL activities をルミノメーターで計測する。抗体価は、nM で表示する。同じ LUCIP assay を用い、MuSK 抗体を測定した。

¹⁾長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

²⁾長崎大保健学科

³⁾千葉大学医学部神経内科

⁴⁾東京大学医科学研究所

(倫理面への配慮)

対象検体は、長崎大学大学院医学研究科医学部倫理委員会の規定に従って同意が得られたものを用いた。

結果

1) Lrp4 抗体価の正常上限値としては、正常者 100 例の平均 + 4SD の 0.015 nM を用いた。抗 AChR 抗体陰性 MG 患者 300 例中 9 例が Lrp4 抗体陽性で、抗体価は 0.019~2.07 nM、平均 0.65 nM であることが判明した。疾患コントロールとしては、抗 AChR 抗体陽性 MG 患者 100 例はすべて陰性、抗 P/Q 型 VGCC 抗体陽性 LEMS 患者 101 例中 1 例が弱陽性であった。
2) Lrp4 抗体陽性 (9 症例) の臨床像は、男女比 4 対 5、発症平均年齢 57 歳、全例が全身型で、胸腺腫合併は無かった。興味深いことに、9 例中 3 例が MuSK 抗体も陽性であった。
3) 受容体結合実験で、Agrin と Lrp4 の結合を高力価の Lrp4 抗体陽性患者血清 (n=3) が用量依存性に阻害した。
4) Lrp4 抗体 (n=4) のサブクラス解析では、そのほとんどが IgG1 サブクラスであった。
5) 症例数 # 1 の神経筋接合部生検は、運動終板に免疫グロブリン・補体の沈着は無く、電顕でも運動終板の破壊像は無かった。

考察

本邦の現時点での有病率は、10 万人に対して 11.8 人 (全国で約 15,000 人) と推定さ

れている。その約 80% の症例では、アセチルコリン受容体に対する自己抗体が検出されるが、アセチルコリン受容体に対する抗体が認められない症例の一部 (全体の数%) に神経筋接合部の形成と維持に不可欠の MuSK タンパク質に対する自己抗体が報告された。今回の我々の研究成果は、これらの抗体に続く、第 3 の病原性自己抗体の発見の可能性が高い。我々の推計では、MG 全体の 1% 弱と少数ではあるが、自己抗体不明の MG の診断に役立つ成果と思われる。

結論

今後は、Lrp4 抗体陽性の症例数を増やし、その臨床像を確立し、さらには、神経筋接合部の病態を解明すべきと考えられた。

文献

- 1) Higuchi et al Ann Neurol. 2011 in press
- 2) Kim et al, Cell 135:1-9, 2008
- 3) Zhang et al. Neuron 60:285-97, 2008

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

Table 1. Clinical features of Lrp4 antibody-positive patients with generalized MG.

Index case	Lrp4 antibody ^a (nM)	MuSK antibody ^b (nM)	Sex	Age examined	Thymoma	MGFA classification ^c	Ocular muscle weakness	Oropharyngeal muscle weakness	Limb muscle weakness
#1	2.07	0.02	Female	44	no	3b	+	+	+
#2	1.79	0.001	Male	26	no	3a	-	+	+
#3	1.42	0.003	Female	72	no	3a	-	-	+
#4	0.27	0.006	Female	70	no	5	+	+	+
#5	0.097	0.004	Female	68	no	2a	+	+	+
#6	0.091	11.38	Male	74	no	5	+	+	-
#7	0.031	0.005	Female	28	no	3b	+	+	+
#8	0.027	6.25	Male	58	no	2b	+	+	-
#9	0.019	10.59	Male	72	no	5	+	+	+

^aData from the Lrp4-LUCIP assay, ^bData from the MuSK-RIA assay. ^cDisease severity had been graded according to the Myasthenia Gravis Foundation of America (MGFA) classification as described elsewhere²⁶. Cut off value < 0.015 n

重症筋無力症における AChR MIR 抗体の臨床的意義：治療前後の MIR 抗体価の変動について

研究分担者 本村 政勝¹⁾

共同研究者 柘田 智子¹⁾、中田 るか¹⁾、徳田 昌紘¹⁾、福田 卓¹⁾、吉村 俊朗²⁾、川上 純¹⁾

研究要旨

重症筋無力症(MG)は、その多くが眼症状で発症する。抗 AChR 抗体は MG の重症度を反映しないといわれており、症状が眼症状に限局するのか、全身型に移行するかを早期に判断することは困難である。ここでは、MG 自験例 について AChR MIR 抗体価を治療前後で測定し、その臨床的特徴について検討した。結果は 1)MIR 抗体価は、正常者 73 例の mean+3SD、20.2%を cut-off 値とすると、眼筋型 21 例中 3 例(14.3%)、全身型 40 例中 35 例(87.5%)が陽性であった。MIR 抗体価を眼筋型と全身型に分けて解析したところ、眼筋型の mean±SD は 15.2±8.2%、全身型は 46.4±20.4%で有意な差がみられた(p<0.001)。2)MIR 抗体価陰性眼筋型は、治療経過を通して基準値以下であった。3)MIR 抗体価が上昇傾向である群は、寛解は 13 例中 4 例、低下が 10%未満の群では 14 例中 4 例、低下が 10~20%の群では 13 例中 5 例、20%以上低下した群では、10 例中 8 例であった。以上より、MIR 抗体価は臨床経過やステロイド必要量などを決定する上で有用である可能性が示唆された。

研究目的

昨年、我々は、アセチルコリンの α 67-76 部分に結合するモノクロナル抗体を用いて、main immunogenic region (MIR) に対する阻害抗体測定を検討した^{1,2)}。その結果、発症早期に測定することで眼筋型か全身型かを予想できる指標になる可能性を示した。今回は、MG 自験例 について治療前後で AChR MIR 抗体価を経時的に測定し、その臨床的特徴について検討した。

研究方法

MG 患者 55 例について、MIR 抗体価を経時的に観察した。MIR 抗体は、ラットモノクロナル抗体 mAb35 との阻害抗体で測定した。治療前、治療後で MIR 抗体価を測定し、両者を比較した。治療前と治療後の抗体価の差をとり、上昇傾向である群、低下が 10%未満の群、10~20%の低下群、20%以上低下している群の 4 群にわけて検討した。治療後の臨床症状の評価方法としては、MGFA postintervention status を用いた。

¹長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

²長崎大保健学科

(倫理面への配慮)

対象検体は、長崎大学大学院医学研究科医学部倫理委員会の規定に従って同意が得られたものを用いた。

結果

1)MIR 抗体価は、正常者 73 例の mean+3SD、20.2%を cut-off 値とすると、眼筋型 21 例中 3 例(14.3%)、全身型 40 例中 35 例(87.5%)が陽性であった。MIR 抗体価を眼筋型と全身型に分けて解析したところ、眼筋型の mean±SD は 15.2±8.2%、全身型は 46.4±20.4%で有意な差がみられた(p<0.001)。2)MIR 抗体価陰性眼筋型は、治療経過を通して基準値以下であった。

3) MIR 抗体価が上昇傾向である群は、寛解は 13 例中 4 例(結果 1 a)、低下が 10%未満の群では 14 例中 4 例(同 b)、低下が 10~20%の群では 13 例中 5 例(同 c)、20%以上低下した群では 10 例中 8 例(同 d)であった。また、寛解群、MM 群で比較したところ、治療前の MIR 抗体価は差はなかったが、寛解群では治療後に抗体価の低下が見られた(結果 2)。

考案

治療が奏功した MG 例では、MIR 抗体価は経

過と共に低下傾向を示した。また、再発を繰り返す難治例においては、MIR 抗体価は変動しない傾向がみられた。経過を通じて眼症状のみの症例では、MIR 抗体価は一貫して基準値以下であった。また、再発を繰り返す難治例では、MIR 抗体価は低下傾向が見られなかった。また、一部で臨床経過とともに MIR 抗体価が臨床症状とともに変動する群があり、いずれも播種性胸腺腫の症例であった。臨床像との関連についてさらなる検討が必要と思われる。

結論

AChR main immunogenic region (MIR) に対する阻害抗体は、従来の結合抗体より MG の重症度や臨床経過を追跡するより良い指標になる

ことが示唆された。

文献

- 1) Tzartos et.al. J Immunol. 1985 134:2343-9.
- 2) Tzartos et.al, Natl. Acad. Sci. 1982 79:188-192

健康危険情報

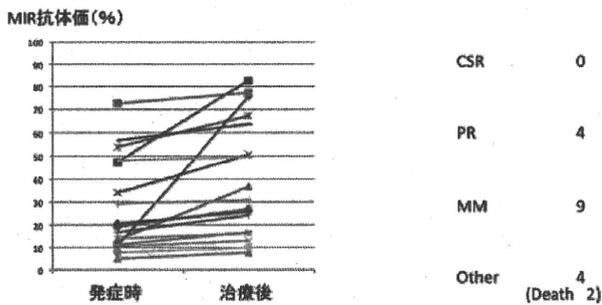
なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

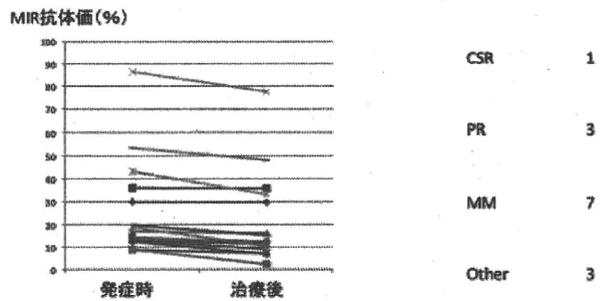
実用新案登録：なし

Fig 1



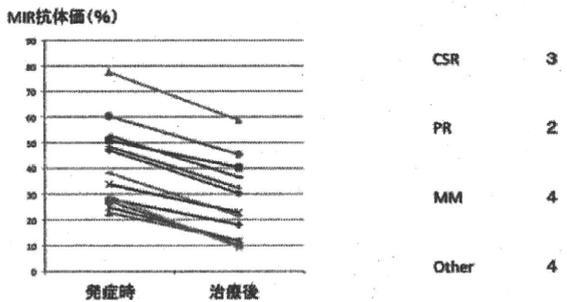
前値と比較し、上昇傾向である群 (n=13)

Fig 2



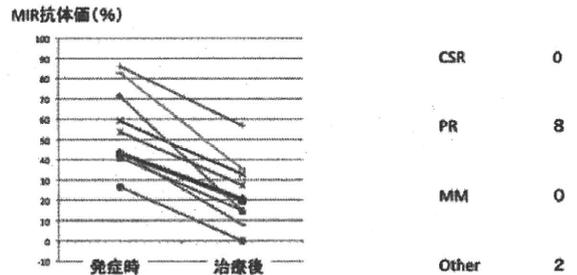
前値と比較し、低下が10%未満の群 (n=14)

Fig 3



前値と比較し、10~20%の低下群 (n=13)

Fig 4



前値と比較し、20%以上低下している群 (n=10)

重症筋無力症(MG)における甲状腺エコー検査の有用性について

班員 菊地誠志 (国立病院機構 北海道医療センター)

共同研究者 南尚哉¹⁾ 丸山恵理²⁾ 水本由子²⁾ 新野正明³⁾

藤木直人¹⁾ 土井静樹¹⁾ 渡邊幹夫⁴⁾ 伊藤美夫⁵⁾ 島功二⁶⁾

【研究要旨】

162例のMGにおける甲状腺エコー有所見率、甲状腺悪性腫瘍の有病率について検討を行った。また、悪性腫瘍に関しては同時期8年間に摘除したMGを合併していない甲状腺悪性腫瘍(乳頭癌)30例と比較検討を行なった。162例中125例の77.2%に異常所見を認め結節性病変、のう胞性病変が多かった。162例中6例の4.8%に乳頭癌が見つかり、検診での発見率、「がん統計」による罹患率は高く見積もっても1%に留まり、それに比べて明らかに高率であった。10mm以下の微小癌は経過観察で良いとされており、MG非合併例ではStage Iに止まるものが半数であったが、MGに合併した症例では悪性度が高く看過できないものばかりであった。MGに対する甲状腺エコー検査は有所見率が高く、また悪性腫瘍の合併も指摘しうるため、有用な検査である。

【目的】

重症筋無力症(以下MG)では胸腺腫の合併を呈することが多いが、我々はこれまでの経験からMGに甲状腺癌も併発する例が多いのではないかと注目してきた。そこで、今回我々は、MG患者に甲状腺エコー検査を行い、悪性所見が否定できない症例では穿刺吸引細胞診を行った。エコー所見と病理所見から、MGにおける甲状腺悪性腫瘍の有病率を検討する。

また、MGでの甲状腺エコー有所見率について検討を行った。

【方法・対象】

2002年-2009年の8年間に当院(旧国立札幌南病院)を受診したMG 162例(男性58例 女性104例、平均発症年齢49.8歳 15-90歳、平均罹病期間;6.2年、眼筋型/全身型;17.0%/80.9%、抗AChR抗体陽性率;84.6%、胸腺腫合併;31.5%、ステロイド剤内服率;80.8%)に甲状腺エコー検査を行なった。悪性所見を疑われた症例には吸引細胞診を実施した。異常所見や悪性腫瘍の頻度とMGの臨床症状(病型、抗AChR抗体の陽性率、胸腺腫の有無、ステロイド剤の使用の有無)についても検討した。また、甲状腺悪性腫瘍を認めた症例においては、当院(旧札幌西病院)で同時期8年間に摘除したMGを合併していない甲状腺悪性腫瘍(乳頭癌)25例との比較検討

1) 国立病院機構北海道医療センター 神経内科 2) 同検査科 3) 同臨床研究部 4) 同呼吸器外科 5) 同外科
6) さっぽろ神経内科クリニック