

201024069A

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

**重症度別治療指針作成に資す  
HAMの新規バイオマーカー同定と  
病因細胞を標的とする新規治療法の開発  
に関する研究**

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 **出雲周二**

平成23(2011)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

重症度別治療指針作成に資す  
HAM の新規バイオマーカー同定と  
病因細胞を標的とする新規治療法の開発  
に関する研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 出雲 周二

平成 23 (2011) 年 3 月

## 目 次

I	総括研究報告 重症度別治療指針作成に資すHAMの新規バイオマーカー同定と 病因細胞を標的とする新規治療法の開発 -----2 研究代表者 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科難治ウイルス病態制御研究センター 出雲周二																												
II	分担研究報告 -----12 <ol style="list-style-type: none"> <tr> <td style="vertical-align: top;">1.</td> <td style="vertical-align: top;">                             HTLV-I関連脊髄症(HAM)患者末梢血CD4+T細胞における糖鎖解析(グライコームとグライコゲノム)                              鹿児島大学大学院 難治ウイルス病態制御研究センター 出雲周二 他                         </td> </tr> <tr> <td style="vertical-align: top;">2.</td> <td style="vertical-align: top;">                             HTLV-I感染伝播効率に関与する細胞内骨格再構成シグナルの解析 -----16                              長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 感染免疫学 中村龍文 他                         </td> </tr> <tr> <td style="vertical-align: top;">3.</td> <td style="vertical-align: top;">                             HAMの重症度別治療指針作成に資する臨床病型分類と疾患活動性マーカーの同定 -----20                              聖マリアンナ医科大学難病治療研 山野嘉久                         </td> </tr> <tr> <td style="vertical-align: top;">4.</td> <td style="vertical-align: top;">                             定量プロテオームプロファイリングによるHAMバイオマーカー、創薬ターゲットの探索 -----25                              独立行政法人理化学研究所 植田幸嗣                         </td> </tr> <tr> <td style="vertical-align: top;">5.</td> <td style="vertical-align: top;">                             HLA-A*02およびA*24拘束性HTLV-I特異的CTLの相違 -----30                              鹿児島大学大学院 難治ウイルス病態制御研究センター 久保田龍二                         </td> </tr> <tr> <td style="vertical-align: top;">6.</td> <td style="vertical-align: top;">                             HTLV-1関連脊髄症(HAM)発症関連遺伝子の解析 -----37                              琉球大学大学院医学研究科 齊藤峰輝                         </td> </tr> <tr> <td style="vertical-align: top;">7.</td> <td style="vertical-align: top;">                             HTLV-I 関連脊髄症患者血中の細胞障害性T細胞はCD4陽性細胞よりも                              CD14陽性細胞に対してより選択的に障害を与えている -----45                              鹿児島大学医歯学総合研究科神経内科・老年病学 高嶋 博 他                         </td> </tr> <tr> <td style="vertical-align: top;">8.</td> <td style="vertical-align: top;">                             Cell free HTLV-Iの感染機構の解明によるHAMの新規治療法の開発 -----47                              群馬大学大学院 分子予防医学 星野洪郎                         </td> </tr> <tr> <td style="vertical-align: top;">9.</td> <td style="vertical-align: top;">                             HAM患者末梢血T細胞におけるTSLC1発現の解析 -----54                              関西医科大学医学部微生物学 竹之内徳博                         </td> </tr> <tr> <td style="vertical-align: top;">10.</td> <td style="vertical-align: top;">                             HSC70とgp46-197ペプチド間相互作用の分子構造 -----59                              横浜薬科大学 生体防御学 白木 洋 他                         </td> </tr> <tr> <td style="vertical-align: top;">11.</td> <td style="vertical-align: top;">                             京都府立医科大学神経内科におけるHAM患者の受診状況と治療状況 -----64                              京都府立医科大学大学院神経内科学 中川正法                         </td> </tr> <tr> <td style="vertical-align: top;">12.</td> <td style="vertical-align: top;">                             HAM患者アストロサイトの機能解析 -----68                              佐賀大学医学部神経 内科学 原 英夫                         </td> </tr> <tr> <td style="vertical-align: top;">13.</td> <td style="vertical-align: top;">                             HAM患者末梢血リンパ球P糖蛋白質発現から、臨床特徴・治療戦略を検討する -----70                              佐賀大学医学部神経内科学 原 英夫 他                         </td> </tr> <tr> <td style="vertical-align: top;">14.</td> <td style="vertical-align: top;">                             患者およびHTLV-1陽性者を対象とした解説パンフレット -----72                         </td> </tr> </ol>	1.	HTLV-I関連脊髄症(HAM)患者末梢血CD4+T細胞における糖鎖解析(グライコームとグライコゲノム) 鹿児島大学大学院 難治ウイルス病態制御研究センター 出雲周二 他	2.	HTLV-I感染伝播効率に関与する細胞内骨格再構成シグナルの解析 -----16 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 感染免疫学 中村龍文 他	3.	HAMの重症度別治療指針作成に資する臨床病型分類と疾患活動性マーカーの同定 -----20 聖マリアンナ医科大学難病治療研 山野嘉久	4.	定量プロテオームプロファイリングによるHAMバイオマーカー、創薬ターゲットの探索 -----25 独立行政法人理化学研究所 植田幸嗣	5.	HLA-A*02およびA*24拘束性HTLV-I特異的CTLの相違 -----30 鹿児島大学大学院 難治ウイルス病態制御研究センター 久保田龍二	6.	HTLV-1関連脊髄症(HAM)発症関連遺伝子の解析 -----37 琉球大学大学院医学研究科 齊藤峰輝	7.	HTLV-I 関連脊髄症患者血中の細胞障害性T細胞はCD4陽性細胞よりも CD14陽性細胞に対してより選択的に障害を与えている -----45 鹿児島大学医歯学総合研究科神経内科・老年病学 高嶋 博 他	8.	Cell free HTLV-Iの感染機構の解明によるHAMの新規治療法の開発 -----47 群馬大学大学院 分子予防医学 星野洪郎	9.	HAM患者末梢血T細胞におけるTSLC1発現の解析 -----54 関西医科大学医学部微生物学 竹之内徳博	10.	HSC70とgp46-197ペプチド間相互作用の分子構造 -----59 横浜薬科大学 生体防御学 白木 洋 他	11.	京都府立医科大学神経内科におけるHAM患者の受診状況と治療状況 -----64 京都府立医科大学大学院神経内科学 中川正法	12.	HAM患者アストロサイトの機能解析 -----68 佐賀大学医学部神経 内科学 原 英夫	13.	HAM患者末梢血リンパ球P糖蛋白質発現から、臨床特徴・治療戦略を検討する -----70 佐賀大学医学部神経内科学 原 英夫 他	14.	患者およびHTLV-1陽性者を対象とした解説パンフレット -----72
1.	HTLV-I関連脊髄症(HAM)患者末梢血CD4+T細胞における糖鎖解析(グライコームとグライコゲノム) 鹿児島大学大学院 難治ウイルス病態制御研究センター 出雲周二 他																												
2.	HTLV-I感染伝播効率に関与する細胞内骨格再構成シグナルの解析 -----16 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 感染免疫学 中村龍文 他																												
3.	HAMの重症度別治療指針作成に資する臨床病型分類と疾患活動性マーカーの同定 -----20 聖マリアンナ医科大学難病治療研 山野嘉久																												
4.	定量プロテオームプロファイリングによるHAMバイオマーカー、創薬ターゲットの探索 -----25 独立行政法人理化学研究所 植田幸嗣																												
5.	HLA-A*02およびA*24拘束性HTLV-I特異的CTLの相違 -----30 鹿児島大学大学院 難治ウイルス病態制御研究センター 久保田龍二																												
6.	HTLV-1関連脊髄症(HAM)発症関連遺伝子の解析 -----37 琉球大学大学院医学研究科 齊藤峰輝																												
7.	HTLV-I 関連脊髄症患者血中の細胞障害性T細胞はCD4陽性細胞よりも CD14陽性細胞に対してより選択的に障害を与えている -----45 鹿児島大学医歯学総合研究科神経内科・老年病学 高嶋 博 他																												
8.	Cell free HTLV-Iの感染機構の解明によるHAMの新規治療法の開発 -----47 群馬大学大学院 分子予防医学 星野洪郎																												
9.	HAM患者末梢血T細胞におけるTSLC1発現の解析 -----54 関西医科大学医学部微生物学 竹之内徳博																												
10.	HSC70とgp46-197ペプチド間相互作用の分子構造 -----59 横浜薬科大学 生体防御学 白木 洋 他																												
11.	京都府立医科大学神経内科におけるHAM患者の受診状況と治療状況 -----64 京都府立医科大学大学院神経内科学 中川正法																												
12.	HAM患者アストロサイトの機能解析 -----68 佐賀大学医学部神経 内科学 原 英夫																												
13.	HAM患者末梢血リンパ球P糖蛋白質発現から、臨床特徴・治療戦略を検討する -----70 佐賀大学医学部神経内科学 原 英夫 他																												
14.	患者およびHTLV-1陽性者を対象とした解説パンフレット -----72																												
III	研究成果の刊行に関する一覧表 -----80																												

# I. 總 括 研 究 報 告 書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
総括研究報告書

重症度別治療指針作成に資すHAMの新規バイオマーカー同定と  
病因細胞を標的とする新規治療法の開発

研究代表者 出雲 周二

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科付属  
難治ウイルス病態制御研究センター 教授

研究要旨：

HAMはHTLV-1感染者のごく一部に発症する稀な難治性疾患である。最近の疫学調査で感染者数は20年前に比し減少しておらず、関東や関西などの大都市圏ではむしろ増加し、全国に拡散していることが判明した。その為、今後大都市圏で患者が増加することが予想される。しかし、大都市圏の疾患認知度は低く、HAMの診療・治療指針に関するエビデンスの普及が不足しており、患者の診療に混乱が生じる恐れがあり、認知度を高めるための啓発活動が急がれる。また、疾患の希少性ゆえに病態研究や根本的な治療薬の開発研究は不十分で、患者の機能予後は極めて不良であり、重症度に応じた治療指針の作成や根本的治療法の開発研究が急務である。

本研究では、HAMの主な発症リスクであるプロウイルス量増大、すなわち生体内での感染拡大の機序や発症病態の解明、プロテオミクス、グライコミクスをもちいた新規治療標的分子探査などの基礎的研究とともに、臨床的研究として、HAM患者に関する臨床・ウイルス・免疫学的情報のデータベースを構築し、疾患活動性評価や予後予測、治療効果判定に有用なバイオマーカーを検索し、「早期診断、疾患活動性・重症度重症度別治療指針」の作成、新規治療法の有効性検討、全国的にHAMの認知度を高める施策など、具体的な目的を掲げた。

本年度の研究成果として複数の診断マーカー、治療標的分子の候補が見いだされた。さらに網羅的解析手法による候補分子の絞り込みが進んでいる。また、プロスルチアミンについては医師主導の臨床試験が開始された。また、新規に難治性疾患克服研究事業の対象疾患に指定されたHAMの広報活動として患者及びHTLV-1陽性者を対象とした解説パンフレットを作成し配布した。本研究組織の特性を生かし、臨床の現場に有用な成果を目指したい。

研究分担者

群馬大学大学院分子予防医学 教授  
星野洪郎  
横浜薬科大学学生体防御学 教授  
白木 洋  
京都府立医科大学大学院 教授  
中川 正法  
長崎大学大学院感染免疫学 准教授  
中村龍文  
鹿児島大学大学院 教授  
高嶋 博  
佐賀大学医学部准教授  
原 英夫  
鹿児島大学大学院難治ウイルス研 准教授  
久保田龍二

琉球大学大学院免疫学 准教授  
齊藤 峰輝  
聖マリアンナ医科大学 准教授  
山野 嘉久  
関西医科大学 准教授  
竹之内徳博  
独立行政法人理化学研究所 研究員  
植田 幸嗣

研究協力者

国立保健医療科学院人材育成部 室長  
児玉 知子  
鹿児島大学大学院 講師  
渡邊 修

## A. 研究目的

HAMはHTLV-1感染者のごく一部に発症する稀な難治性疾患である。最近の疫学調査で感染者数は20年前に比し減少しておらず、関東や関西などの大都市圏ではむしろ増加し、全国に拡散していることが判明した。その為、今後大都市圏で患者が増加することが予想される。しかし、大都市圏の疾患認知度は低く、HAMの診療・治療指針に関するエビデンスの普及が不足しており、患者の診療に混乱が生じる恐れがあり、認知度を高めるための啓発活動が急がれる。また、疾患の希少性ゆえに病態研究や根本的な治療薬の開発研究は不十分で、患者の機能予後は極めて不良であり、重症度に応じた治療指針の作成や根本的な治療法の開発研究が急務である。

本研究では、HAMの主な発症リスクであるプロウイルス量増大、すなわち生体内での感染拡大の機序や発症病態の解明、プロテオミクス、グライコミクスをもちいた新規治療標的分子探索などの基礎的研究とともに、臨床的研究として、HAM患者に関する臨床・ウイルス・免疫学的情報のデータベースを構築し、疾患活動性評価や予後予測、治療効果判定に有用なバイオマーカーを検索し、「早期診断、疾患活動性・重症度重症度別治療指針」の作成、新規治療法の有効性検討、全国的にHAMの認知度を高める施策など、具体的な目的を掲げた。

## B. 研究方法

九州地区と関東関西の大都市圏で専門外来を持つ診療施設と、HAMの臨床病態の研究に実績を有する研究者、プロテオミクスによるバイオマーカー探索の実績を有し世界トップレベルの質量分析装置を備えている研究チーム、統計学的解析に精通した難病疫学研究者により研究組織を構成した。

全国的なHAM患者外来を有する専門医によるチームを組織し各々の情報を集約して共有できるデータベースを作成し研究基盤を確立するとともに、分担して臨床研究を進めた。また、HAMの認知度を高める広報活動として小冊子、Webページを作成した。

感染拡大機序の研究、臨床に応用できるバイオマーカーの探索には、定量プロテオミクスやレクチンアレイ法などの網羅的解析法をもちいて患者試料を解析した。また、治療法開発に向けて、有効性に関する臨床試験を実施した。すでに新規治療薬の候補薬剤プロスルチアミンについては医師主導の多施設無作為化した臨床試験を開始した。

(倫理面への配慮)

本研究は患者試料をもちいているが、各研究機関の承認を得ておこなわれた。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。結果の公

表に当たっては個人が特定できないように配慮されている。

## C. 研究結果

出雲らは、HAMでCell-to-cell spreadにより、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翻訳後修飾因子としての糖鎖、およびその原因遺伝子である糖鎖転移酵素遺伝子の発現を明らかにするため、主な感染宿主細胞であるCD4+T細胞を用いたレクチンアレイによる解析、半定量的RT-PCR、免疫蛍光抗体染色などを検討した。O型糖鎖では、DNAマイクロアレイでER、ゴルジ体でムチン生合成の最初の段階でSer/Thr残基にGalNAc $\alpha$ 1-O-を転移するGALNT11がHAMで有意に高発現であったが、O型糖鎖関連が疑われたMUC3Aは免疫蛍光染色では有意の差を見いだせなかった。N型糖鎖ではポリラクタサミンを認識するSTL、UDAがHAMで有意に高シグナルだった。今後これらの糖鎖とHAMの病態との関連のさらなる検討が必要である。

中村は、HTLV-Iがvirological synapseを介して細胞間で感染していく際に細胞内骨格microtubulesの再構成が関与していることを報告している。今回、HTLV-Iの細胞間感染伝播に関与する因子としてのactin polymerizationの役割についてHTLV-I感染T細胞株を用いて検討した。その結果、Latrunculin B処理によりHTLV-Iの細胞間伝播が阻害されること、細胞内cAMPの増加はvasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)のリン酸化を通して、細胞間伝播効率を低下させること、HAM/TSP患者由来感染細胞株では細胞内cAMP濃度を低く設定し、VASPのリン酸化を制御することによって惹起されるactin polymerizationが効率のいいHTLV-Iの感染伝播の一因となっていることを明らかにし、細胞内cAMP濃度によって制御されるactin polymerizationという細胞内骨格再構成はHTLV-Iの感染伝播効率を規定する一因となっている可能性を示した。

山野らは、HAMの臨床経過や疾患活動性の個人差に応じて治療方針を決定することが重要であると考え、HAM患者の自然経過を解析してHAMの臨床病型を分類しその特徴を明らかにするとともに、治療方針決定に資する疾患活動性マーカーの同定を試みた。その結果、HAMはその経過と疾患活動性から、急速進行型、-A慢性進行型・活動性、-B慢性進行型・非活動性、慢性軽症型、の大きく4つのグループに分類された。さらに、HAMの疾患活動性を反映するマーカーとして髄液CXCL10、次いで髄液ネオプテリンの測定が優れていることが判明した。また血清中のマーカーとしては、可溶性IL-2受容体、CXCL10が有用である可能性が示唆された。

植田はHTLV-1感染T細胞に発現しているHAM特異的バイオマーカー、治療標的分子を探索する目的で、臨床検体30例（非感染者6例、HTLV-1感染無症

候患者5例、HAM患者10例、ATL患者9例)のプロテオームプロファイリングを行った。HAM患者において高率でHTLV-1の感染が立証されているCD4+CD25+CCR4+細胞をソーティングし、そのタンパク質総抽出液を使用した。その結果、14,064ペプチドの定量プロファイルが得られ、このうち分散分析を用いて選出した(p < 0.0017)100ペプチドの定量データを用いると、主成分分析により上記4病理群を明確に分類できることが分かった。さらに上記ペプチドにのみターゲットを絞り込んだ高精度LC/MS/MS分析により、これら100ペプチドの同定を行った。これらの分子はHAM、ATL発症メカニズムの解明や病態を正確に把握しうるバイオマーカーになる可能性があるだけでなく、有望な創薬のターゲットにもなり得ると考えられる。

久保田らはHAM患者のHLAの違いによるHTLV-1特異的細胞傷害性T細胞(CTL)の機能とHAM発症リスクとの関連を検索した。同じウイルスに対するCTLを持ちながら、A\*24はHAM発症促進的に、A\*02は発症抑制的に働く差異はそれぞれのCTLのウイルス殺傷能の違いによるのかを明らかにするため、HLA-A\*02およびA\*24に拘束されたCTLの機能比較を行った。最大刺激でのサイトカインやケモカインの産生およびCTL活性は両者に差がなかったが、機能的avidityはHLA-A\*24拘束性CTLではHLA-A\*02拘束性CTLの約50倍強かった。以上より、HLA-A\*24特異的CTLはHLA-A\*02特異的CTLよりも優位にウイルス排除を行う一方で、HLA-A\*24はHAM発症のリスクを高めることより、HLA-A\*24拘束性CTLはそれ自身でHAM発症のリスクをあげる可能性がある。

齋藤らはHTLV-1の転写活性化因子Taxの標的遺伝子を網羅的に抽出し、そのうち、Bcl-3とOX40に着目してHTLV-1感染細胞増殖やHAM病態への関与について解析した。HTLV-1感染T細胞株ではBcl-3が恒常的に高発現しており、Taxによる転写活性化とPI3K-Aktシグナル伝達系活性化による分解抑制という2つの分子機構によって維持されていた。TaxはBcl-3蛋白と細胞内で直接結合しており、Bcl-3発現をshRNAでknock downするとHTLV-1感染T細胞株の異常増殖が抑制された。HAM患者末梢血単核球(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は強発現していた。HAM患者PBMCの培養によりTax蛋白の発現を誘導するとOX40はTax陽性細胞特異的に発現し、自家製抗OX40モノクローナル抗体の添加でTax陽性細胞が減少した。以上より、Taxの標的遺伝子であるBcl-3およびOX40はHTLV-1関連疾患の新たな治療標的分子となりうるということが明らかになった。

高嶋らは、近年単球や樹状細胞などの食食系単核球が生体内でもHTLV-IIに一定割合感染しているこ

とが報告されていることから、これら食食系単核球細胞のHAMの病態への関与を探るために、HAM患者PBMC中での、細胞障害性T細胞のターゲットになっている細胞の種類を共焦点レーザー顕微鏡にて同定した。HAM患者のCTLはCD4陽性細胞よりも高い頻度でCD14陽性細胞とコンタクトとしており、このCTLとコンタクトしているCD4陽性細胞あるいはCD14陽性細胞はHTLV-I taxを高い割合で発現していた。HTLV-I Taxを発現しているCD14陽性細胞との免疫反応も発症病理に関与している可能性がある。

星野らはこれまでの研究でHTLV-Iの膜蛋白を持つ高力価のpseudotypeウイルス(VSVΔG\*(HTLV-I))をもちいてHTLV-Iの感染を定量的に観察する系を確立し、感染を指標にした発現クローニングによりHTLV-I感染に必要な細胞性因子として、細胞膜表面に発現するヘパラン硫酸プロテオグリカン(シンデカン-1並びにシンデカン-2)のコアプロテインを見いだした。本年度は、コアプロテイン遺伝子の低感受性細胞株への導入発現によりHTLV-Iに対する感受性亢進、ヘパラン硫酸分解酵素やヘパラン硫酸結合性蛋白質での標的細胞の前処理によるHTLV-Iの感染感受性の低下が観察された。しかし、細胞の種類により細胞表面のヘパラン硫酸の発現量とVSVΔG\*(HTLV-I)の感染感受性との間には必ずしも相関が認められないことから、HTLV-I感染には細胞表面のヘパラン硫酸の発現量に加えて発現しているヘパラン硫酸鎖の糖鎖構造が深く関与している可能性が考えられた。

竹之内らは、ATLで近年報告された患者末梢血CD4陽性T細胞でのTSLC1の発現亢進がHAMの疾患活動性を評価するための新規バイオマーカーとなりうるかどうかの検証を行った。HAM患者末梢血CD4陽性T細胞でのTSLC1発現は、未発症キャリアの場合と比較して優位に高く、末梢血でのプロウイルス量と正の相関を示した。また、有意にTSLC1 mRNAの発現も亢進していた。TSLC1はHAMのバイオマーカーとしての有用性が示唆された。

白木らはHTLV-1の細胞内侵入に重要なHSC70とgp46-197ペプチド間相互作用の分子機構を解析した。その結果、gp46-197ペプチドのHSC70との結合に必須のペプチド構造は205Proから209Lysの領域(Pro-Trp-Lys-Ser-Lys)であること、特に結合には207Lysおよび209Lysの2つの塩基性アミノ酸の存在が重要であった。また種々のHSPs阻害剤を用いたペプチド結合実験で、gp46-197ペプチドはHSC70の25KDa蛋白・ペプチド結合領域に結合していることを明らかにした。

中川らは、関西地域のHAM患者の動向および自院におけるHAM患者の受診状況、治療状況を検討した。2010年の外来受診HAM患者は33名で、過去

を含めると総計60名を超えた。短期集中入院リハビリをHAM患者15名に行い、入院リハビリ実施前後でFIM総得点の有意な改善を示し、OMDSにおいても改善する傾向を示した。3次元動作解析システムによる歩行解析では、健常者と比較してHAM患者において骨盤の回旋と歩幅に著しい差を認めた。また、バクロフェン髄注療法による歩行の改善、プレガバリン投与による下肢の強い疼痛・しびれ感の改善が見られた。今後、在宅でのリハビリだけではその改善を維持することが出来ず、継続的なリハビリの工夫が課題である。

原らはHAMにおけるアストロサイトの機能異常に着目し、HAM患者とキャリアの髄液中アストロサイトが産生するGFAP、S100b、グルタチオン(GSH)をELISA法で測定し、髄液HTLV-1抗体価との相関を解析した。GFAPはHAM患者で低下しており、S100bとGSHに両群で差はみられなかったが、HAMではGSHと抗HTLV-1抗体価正の相関が見られた。また、薬剤耐性に関与するP糖蛋白質の末梢血リンパ球における発現を未治療HAM患者とHTLV-1キャリア、ステロイド非使用の他の神経疾患患者で比較した。検索したHAM5例中2例(40%)が高値で、キャリア0%、他の神経疾患8.3%よりも高頻度であった。多数例での検討が必要であるが、P糖蛋白質がHAMの病態や治療抵抗性に関与している可能性が示唆される。

#### D. 考察

本研究では本邦で見いだされた難治性疾患HAMについて、臨床に直結する診断マーカーや治療の標的分子を見いだすことを目的として、これまでにHAMの診療と発症病態研究に実績のある研究者がそれぞれの患者情報を有機的に連携し、研究を促進する体制を構築した。本年度の研究成果として複数の診断マーカー、治療標的分子の候補が見いだされた。さらに網羅的解析手法による候補分子の絞り込みが進んでいる。また、プロスルチアミンについては医師主導の臨床試験が開始された。

本年度は、また、新規に難治性疾患克服研究事業の対象疾患に指定されたHAMの広報活動として患者及びHTLV-1陽性者を対象とした解説パンフレットを作成し配布した。本研究組織の特性を生かし、臨床の現場に有用な成果を目指したい。

#### E. 結論

HAMの病態に関与する、あるいは病態を反映する複数の分子が見いだされた。また、治療の標的分子の絞り込みが進んでいる。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

出雲周二

[1] Abdelbary NH, Abdullah HM, Matsuzaki T, Hayashi D, Tanaka Y, Takashima H, Izumo S, Kubota R. Reduced Tim-3 Expression on Human T-lymphotropic Virus Type I (HTLV-I) Tax-specific Cytotoxic T Lymphocytes in HTLV-I Infection. *J Infect Dis.* 2011 Apr;203(7):948-59.

[2] Abdullah HM, Higuchi I, Kubota R, Matsuura E, Hashiguchi A, Abdelbary NH, Inamori Y, Takashima H, Izumo S. Histopathological differences between human T-lymphotropic virus type 1-positive and human T-lymphotropic virus type 1-negative polymyositis. *Clin Exp Neuroimmunol* 2 (2011) 12–24

[3] Kozako T, Akimoto M, Toji S, White Y, Suzuki S, Arima T, Suruga Y, Matsushita K, Shimeno H, Soeda S, Kubota R, Izumo S, Uozumi K, Arima N. Target epitopes of HTLV-1 recognized by class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocytes in patients with myelopathy and spastic paraparesis and infected patients with autoimmune disorders. *J Med Virol.* 2011 Mar;83(3):501-9.

[4] Kamihira S, Yamano Y, Iwanaga M, Sasaki D, Satake M, Okayama A, Umeki K, Kubota R, Izumo S, Yamaguchi K, Watanabe T. Intra- and inter-laboratory variability in human T-cell leukemia virus type-1 proviral load quantification using real-time polymerase chain reaction assays: a multi-center study. *Cancer Sci.* 2010 Nov;101(11):2361-7.

[5] Izumo S. Neuropathology of HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). *Neuropathology.* 2010 Oct; 30(5):480-485.

中村龍文

[1] Nakamura H, Ichikawa T, Nakamura T, Kawakami A, Iwamoto N, Matsuzaki T, Miyaaki H, Yamasaki S, Ida H, Eguchi S, Hayashi T, Nakao K, Kanematsu T, Eguchi K. Macrophage-dominant sialadenitis in human T-cell leukemia virus type I-associated myelopathy after living-donor liver trans-plantation. *Transplant Proc.* 2010;42:2797-2799.

[2] Araya N, Takahashi K, Sato T, Nakamura T, Sawa C, Hasegawa D, Ando H, Aratani S, Yagishita N, Fujii R, Oka H, Nishioka K, Nakajima T, Mori N, Yamano Y. Fucoidan therapy decreases the proviral load in patients with human T-lymphotropic virus type-1-associated neurological disease. *Antivir Ther.* 2011;16:89-98.

山野嘉久

[1] Kamihira S, Yamano Y, Iwanaga M, Sasaki D, Satake M, Okayama A, Umeki K, Kubota R, Izumo S, Yamaguchi K, Watanabe T : Inter-and intra-laboratory



Variability in HTLV-1 Proviral Load Quantification Using Real-Time Polymerase Chain Reaction Assays: A Multi-Center Study. *Cancer Sci* 2010;101(11):2361-2367.

[2] Araya N, Takahashi K, Sato T, Nakamura T, Sawa C, Hasegawa D, Ando H, Aratani S, Yagishita N, Fujii R, Oka H, Nishioka K, Nakajima T, Mori N, Yamano Y. Fucoidan therapy decreases the proviral load in patients with human T-lymphotropic virus type 1-associated neurological disease. *Antiviral Therapy* 2011; 16(1): 89-98.

[3] Yamano Y and Nishioka K : The contribution of Asian researchers to the field of rheumatology. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6(2):106-111.

[4] Matsuura E, Yamano Y, Jacobson S : Neuroimmunity of HTLV-1 Infection. *J Neuroimmune Pharmacol* 2010;5(3): 310-325.

[5] Sato T, Konomi K, Fujii R, Aono H, Aratani S, Yagishita N, Araya N, Yudoh K, Beppu M, Yamano Y, Nishioka K, Nakajima T : Prostaglandin EP2 receptor signalling inhibits the expression of matrix metallo-proteinase 13 in human osteoarthritic chondrocytes. *Ann Rheum Dis* 2011;70(1):221-226.

[6] Sato T, Azakami K, Ando H, Araya N, Yamano Y : Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and innate immunity. *Inflammation and Regeneration* 2010; in press.

[7] Yamano Y and Jacobson S : HTLV-1 infected CD4+CD25+CCR4+ T-cells disregulate balance of inflammation and tolerance in HTLV-1 associated neuroinflammatory disease. *Immunologic Signatures of Rejection*, Springer 2010:189-198.

久保田龍二

[1] Kamihira S, Yamano Y, Iwanaga M, Sasaki D, Satake M, Okayama A, Umeki K, Kubota R, Izumo S, Yamaguchi K, Watanabe T: Intra- and inter-laboratory variability in human T-cell leukemia virus type-1 proviral load quantification using real-time polymerase chain reaction assays: a multi-center study. *Cancer Sci*. 101(11): 2361-7, 2010

齊藤峰輝

[1] Saito M. Immunogenetics and the pathological mechanisms of human T-cell leukemia virus type 1-(HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 4784619 (2010). (Online Journalのため論文番号のみ)

[2] Saito K, Saito M, Taniura N, Okuwa T, Ohara Y. Activation of the PI3K-Akt pathway by human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) onco-protein Tax increases Bcl3 expression, which is associated with

enhanced growth of HTLV-1-infected T cells. *Virology*. 403: 173-180, 2010.

[3] Kodama A, Tanaka R, Zhang LF, Adachi T, Saito M, Ansari AA, Tanaka Y. Impairment of in vitro generation of monocyte-derived human dendritic cells by inactivated human immune-deficiency virus-1: Involvement of type I interferon produced from plasmacytoid dendritic cells. *Human Immunology*. 71: 541-550, 2010.

[4] Okuwa T, Taniura N, Saito M, Himeda T, Ohara Y. The opposite effects of two nonstructural proteins of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) regulates apoptotic cell death in BHK-21 cells. *Microbiology and Immunology*. 54: 639-643, 2010.

[5] Tanaka R, Takahashi Y, Kodama A, Saito M, Ansari AA, Tanaka Y. Suppression of CCR5-Tropic HIV Type 1 Infection by OX40 Stimulation via Enhanced Production of -Chemokines. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 26:1147-1154, 2010.

[6] 齊藤峰輝. HAM/TSP病態研究の最近の進歩. *血液・腫瘍科* 60: 642-650, 2010.  
星野洪郎

[1] Effects of respiratory syncytial virus infection and major basic protein derived from eosinophils in pulmonary alveolar epithelial cells (A549) T Ishioka, H Kimura, H Kita, M Obuchi, H Hoshino, M Noda, A Nishina, K Kozawa, and M Kato *Cell Biol Int* (in press)

[2] Irradiation with carbon ion beams induces apoptosis, autophagy, and cellular senescence in a human glioma-derived cell line. Jinno-Oue A, Shimizu N, Hamada S, Wada A, Tanaka A, Shinagawa M, Ohtsuki T, Mori T, Saha M N, Hoque A S, Islam S, K. Kogure K, Funayama T, Kobayashi Y and Hoshino H. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010 76: 229-241.

[3] Identification of the conformational requirement for the specificities of coreceptors for human and simian immunodeficiency viruses Shimizu N, Tanaka A, Jinno-Oue A, Mori T, Ohtsuki T and Hoshino H. *AIDS Res Human Retroviruses* 2010, 26: 321-328

[4] Neuraminidase enhances the initial steps of human T-cell leukemia virus type 1 replication. Tanaka M, Sun B, Tezuka K, Fujisawa J, Tanaka Y, Hoshino H, and Miwa M. *Microbes Infect* 2010; 12 (2): 119-125.

[5] CADM1 interacts with Tiam1 and promotes invasive phenotype of human T-cell leukemia virus type I-transformed cells and adult T-cell leukemia cells M Masuda, T Maruyama, T Ohta, A Ito, T Hayashi, K Tsukasaki, S Kamihira, S Yamaoka, H Hoshino, T Yoshida, T Watanabe, EJ Stanbridge Y, and Murakami *J Biol Chem* 2010; 285; 15511-15522

白木 洋

- [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.* 98(No. 2) 240-245. 2007
- [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.* 95(No.10) 835-839 2004
- [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.* 152 140-146 2004

中川正法

- [1] Taki M, Nin F, Hasegawa T, Sakaguchi H, Suzuki T, Hisa Y, Azuma Y, Nakagawa M. A case report of HTLV-I associated myelopathy presenting with cerebellar ataxia and nystagmus. *Auris Nasus Larynx.* 2010 Oct 27. [Epub ahead of print]
- [2] 武澤信夫、工藤有里子、中川正法。HAM (HTLV-1 associated myelopathy)患者に対するリハビリテーションの有効性。 *Jpn J Rehabil Med* 47:239-244, 2010.
- [3] 奥田求己、栗山長門、瀬尾和弥、増田隆司、武澤信夫、中川正法、長谷齊。HTLV-1 associated myelopathy(HAM)患者に対する短期集中リハビリテーションのADL効果。 *理学療法科学* 25巻4号 573-578, 2010.

## 2. 学会発表

出雲周二

- [1] 児玉大介、久保田龍二、出雲周二 第3回 HTLV-1研究会・合同班会議 20108月 東京
- [2] 出雲周二. 特別講演: HAM (HTLV-1による神経疾患) の発見とその後. 第83回日本ハンセン病学 2010年5月29日 鹿児島
- [3] 出雲周二. 特別講演: HTLV-1関連脊髄症 (HAM) の臨床と病理. 衛生微生物技術協議会第31回研究会 2010年5月25日 鹿児島
- [4] Kubota R, Matsuura E, Izumo S: Neural bystander damage by infiltrating virus-infected T cells and the cytotoxic lymphocytes in HTLV-I-associated neurological disease. 17th International Congress of Neuropathology. Salzburg, Austria, 2010
- [5] Abdullah HM, Higuchi I, Kubota R, Matsuura E, Hashiguchi A, Abdelbary NH, Inamori Y, Izumo S:

HTLV-I associated polymyositis: a trial to unfold the story. 17th International Congress of Neuropathology. Salzburg, Austria, 2010

中村龍文

- [1] Nakamura T. : New therapeutic approach aimed at targeting HTLV-I-infected cells by prosultiamine in HAM/TSP. BIT's 1<sup>st</sup> World Congress of Virus and Infections 2010, Busan, Korea. 2010

山野嘉久

- [1] 山野嘉久、佐藤知雄、新谷奈津美、鈴木登: HAMにおける血中sIL-2RとIP-10のバイオマーカーとしての有用性. 第22回日本神経免疫学会, 東京, 2010
- [2] 山野嘉久、佐藤知雄、新谷奈津美、鈴木登: HAMにおけるinvariant NKT細胞の量的・機能的異常. 第22回日本神経免疫学会, 東京, 2010
- [3] 山野嘉久、佐藤知雄、新谷奈津美、鈴木登: HAMにおける血中sIL-2RとIP-10のバイオマーカーとしての有用性. 第51回日本神経学会, 東京, 2010
- [4] 北菌貴子、岡崎貴裕、新谷奈津美、山野嘉久、山田恭暉、田中勇悦、井上誠、尾崎承一: HLA-A2トランスジェニックマウスをもちいたTax特異的細胞障害性T細胞の解析. 第3回HTLV-1研究会, 東京, 2010
- [5] 山野嘉久、佐藤知雄、新谷奈津美、安藤仁、神奈木真理、田中勇悦、宇都宮與: HAMにおけるIFN- $\gamma$ + CD4+CD25+ CCR4+病源性T細胞の発生機構とその脊髄炎症病巣へのリクルート機構に関する解析. 第3回HTLV-1研究会, 東京, 2010
- [6] 佐藤知雄、新谷奈津美、安藤仁、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3回HTLV-1研究会, 東京, 2010
- [7] 新谷奈津美、佐藤知雄、神奈木真理、田中勇悦、宇都宮與、山野嘉久: HTLV-関連脊髄症 (HAM)におけるHTLV-1 taxを介したIFN- $\gamma$ + CD4+CD25+ CCR4+病源性T細胞発生機構の解析. 第3回HTLV-1研究会, 東京, 2010
- [8] 新谷奈津美、佐藤知雄、安藤仁、宇都宮與、山野嘉久: HTLV-関連脊髄症 (HAM)におけるIFN- $\gamma$ + CD4+ CD25+CCR4+病源性T細胞発生の分子機構解析. 第33回日本分子生物学会年会, 神戸, 2010
- [9] 山野嘉久: HAMにおけるHTLV-1 TaxによるヘルパーCD4+ T細胞の可塑的变化とその慢性炎症病変形成への関与. 平成22年度免疫性神経疾患に関する調査研究班班会議, 東京, 2011
- [10] 山野嘉久: HAMの重症度別治療指針に資する疾患活動性バイオマーカーの有用性とステロイド治療による反応性. 平成22年度免疫性神経疾患に関する調査研究班班会議, 東京, 2011
- [11] 山野嘉久: HTLV-1感染細胞を標的とした治療法の開発. 厚生労働省科学研究費補助金研究事業

2010年度HTLV-1関連合同班会議,東京,2011

[12] Yamano Y : Noble advance in rheumatology by Asian rheumatologist—Current novel achievement in rheumatology. 14th Congress of Asia Pacific League of Associations for Rheumatology. Hong Kong, CHINA. 2010.

[13] Kannagi M, Kinpara S, Hasegawa A, Shimizu Y, Oiki H, Masuda T, Yamano Y, Utsunomiya A : Double control of viral expression by innate and acquired immunity in Human T-cell leukemia virus type-I infection. 14th International Congress of Immunology. Kobe, JAPAN. 2010.

[14] Kitazono T, Okazaki T, Yamano Y, Yamada Y, Inoue M, Ozaki S : Both qualitative increase of TCR-binding capacity and quantitative increase of the TCRs on the cell surface define the higher avidity of Tax-specific CTL in HLA-A2 transgenic mice. 14th International Congress of Immunology. Kobe, JAPAN. 2010.

[15] Yamano Y : HTLV-1 infected CD4+CD25+CCR4+ T-cells disregulate balance of inflammation and tolerance in HTLV-1 associated neuroinflammatory disease. Viruses, Genes and Cancer 2010. Venezia, ITALY. 2010.

[16] Sato T, Araya N, Suzuki N, Yamano Y : The plasma levels of soluble IL-2 receptor and CXCL10 are useful indicators for disease activity in patients with HAM/TSP. Viruses, Genes and Cancer 2010. Venezia, ITALY. 2010.

[17] Araya N, Sato T, Utsunomiya A, Jacobson S, Yamano Y : HTLV-1 promotes the plasticity of HTLV-1 infected T-cells through the regulation of T-bet transcriptional activation in HAM/TSP. Viruses, Genes and Cancer 2010. Venezia, ITALY. 2010.

植田幸嗣

[1] Comprehensive proteome profiling to identify potential therapeutic targets for Human Tlymphotropic virus type-1 (HTLV-1)-associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis and adult T-cell leukemia.; Koji Ueda, Keiko Iwasa, Naomi Senkoji, Natsumi Araya, Tomoo Sato, Atae Utsunomiya, Yoshihisa Yamano, Hidewaki Nakagawa; International Viruses, Genes, and Cancer 2010; September, 2010; Venice, Italy  
久保田龍二

[1] Kubota R, Matsuura E, Izumo S: Neural bystander damage by infiltrating virus-infected T cells and the cytotoxic lymphocytes in HTLV-I-associated neurological disease. 17th International Congress of Neuropathology. Salzburg, Austria, 2010

[2] Abdullah HM, Higuchi I, Kubota R, Matsuura E, Hashiguchi A, Abdelbary NH, Inamori Y, Izumo S:

HTLV-I associated polymyositis: a trial to unfold the story. 17th International Congress of Neuropathology. Salzburg, Austria, 2010

[3] Izumo S, Xing H, Hayakawa H, Mori K, Arishima S, Kubota R, Gelpi E, Budka H: A role of astrocyte dysfunction in pathogenesis of AIDS encephalopathy. 17th International Congress of Neuropathology. Salzburg, Austria, 2010

[4] 久保田龍二、松浦英治、出雲周二 : HAM脊髄におけるHTLV-I特異的CTLの集積。第51回日本神経学会総会。2010年5月 東京

[5] Abdelbary N、Abdullah H、松崎敏男、林大輔、田中勇悦、高嶋博、出雲周二、久保田龍二 : Reduced Tim-3 expression on HTLV-I Tax-specific CTL in HTLV-I infection. 第3回HTLV-I研究会。2010年8月 東京

[6] 久保田龍二、松浦英治、田中勇悦、高嶋博、出雲周二 : HTLV-I感染リンパ球とCTLの浸潤による neural bystander damage。第3回HTLV-I研究会。2010年8月 東京

[7] 川端隆史、東元一晃、高嶋博、出雲周二、久保田龍二 : HTLV-I関連肺疾患における肺胞洗浄液・肺生検組織でのHTLV-I特異的CTLの集積。第3回HTLV-I研究会。2010年8月 東京

[8] 児玉大介、久保田龍二、出雲周二 : HAMのCD4+T細胞における遺伝子発現解析と糖鎖解析による感染細胞の特徴。第3回HTLV-I研究会。2010年8月 東京

[9] 松崎敏男、久保田龍二、出雲周二 : HAM患者の全国疫学調査。第3回HTLV-I研究会。2010年8月 東京

[10] 小迫知弘、吉満誠、秋元正樹、久保田龍二、出雲周二、添田泰司、占野廣司、松下格司、魚住公治、有馬直道 : HTLV-I感染者におけるHTLV-I特異的CTLの発現の多様性。第3回HTLV-I研究会。2010年8月 東京  
齊藤峰輝

[1] 第51回日本神経学会総会, 2010, 5. 東京  
齊藤峰輝, 田中礼子, 松崎敏男, 梅原藤雄, 田中勇悦 : HTLV-1関連脊髄症におけるOX40陽性T細胞の意義.

[2] 第3回HTLV-1研究会, 2010, 8. 東京  
齊藤峰輝, 田中礼子, 樋口雄二郎, 末原雅人, 田中勇悦 : HTLV-1 bZIP Factor (HBZ) に対する抗体作製とHAM臨床検体を用いた解析

[3] The 10th International Symposium on Neuro Virology. 2010, 10. Milan, Italy. Saito M, Tanaka R, Matsuzaki T, Umehara F, Tanaka Y : Enhanced expression of OX40 by HTLV-1 Tax and its roles in the pathogenesis of HTLV-1-associated myelopathy /tropical spastic paraparesis (HAM/TSP).

[4] 第58回日本ウイルス学会学術集会, 2010, 11. 徳島齊藤峰輝, 田中礼子, 田中勇悦. 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

竹之内徳博

[1] 第51回日本神経学会総会、2010年5月20日~22日（東京）、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

[2] 第3回HTLV-1研究会・合同班会議、2010年8月27日~29日（東京）、竹之内徳博、恩額日楽、手塚健太、森下和広、鶴飼由範、黒澤仁、中川正法、日下博文、藤澤順一、HAM患者PBMCにおけるTSLC-1発現の解析

[3] 第3回HTLV-1研究会・合同班会議、2010年8月27日~29日（東京）、手塚健太、田中正和、上野孝治、竹之内徳博、藤澤順一、HTLV-1感染ヒト化マウスモデルにおける欠損型プロウイルスの感染動態

[4] 第3回HTLV-1研究会・合同班会議、2010年8月27日~29日（東京）、田中正和、筈潤澤、手塚健太、三輪正直、竹之内徳博、藤澤順一、HTLV-1感染ヒト化マウスモデルにおける感染T細胞選択過程の解析

[5] 第15回日本神経感染症学会学術集会、2010年10月8日~9日（福島）、竹之内徳博、恩額日楽、中川正法、手塚健太、森下和広、鶴飼由範、黒澤仁、日下博文、藤澤順一、HAM患者PBMCにおける新規バイオマーカー発現の検討

[6] 第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日~9日（徳島）、竹之内徳博、恩額日楽、手塚健太、森下和広、鶴飼由範、黒澤仁、中川正法、日下博文、藤澤順一、HAM患者CD8陽性T細胞におけるTSLC-1発現の抑制

[7] 第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日~9日（徳島）、手塚健太、田中正和、三輪正直、竹之内徳博、藤澤順一、HTLV-1感染T細胞の浸潤能に与えるシアリダーゼの影響

[8] 第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日~9日（徳島）、田中正和、筈潤澤、手塚健太、三輪正直、竹之内徳博、藤澤順一、HTLV-1感染ヒト化マウスを用いた感染T細胞選択過程の解析

[9] 第63回日本細菌学会関西支部総会・学術講演会、2010年11月20日（大阪）、手塚健太、筈潤澤、田中正和、竹之内徳博、藤澤順一、ヒト化マウスを用いたHTLV-1感染生体応答の解析

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

中村龍文

[1] HTLV-1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)。

山野嘉久

[1] 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-1関連脊髄症の予防及び／又は治療のための医薬

[2] 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

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし



## Ⅱ. 分 担 研 究 報 告 書

HTLV-1関連脊髄症(HAM)患者末梢血CD4+T細胞における糖鎖解析(グリコームとグリコゲノム)

研究分担者 出雲 周二（鹿児島大難治ウイルス病態制御研 教授）

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), 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翻訳後修飾因子としての糖鎖, およびその原因遺伝子である糖鎖転移酵素遺伝子の発現を明らかにするため, 主な感染宿主細胞であるCD4+T細胞を用いたレクチンアレイによる解析, 半定量的RT-PCR, 免疫蛍光抗体染色などを検討した。O型糖鎖ではER, ゴルジ体でムチン生合成の最初の段階でSer/Thr残基にGalNAc  $\alpha$  1-O-を転移するGALNT11がDNAマイクロアレイでHAMで有意に高発現であったが, O型糖鎖関連が疑われたMUC3Aは免疫蛍光染色では有意ではなかった。N型糖鎖ではポリラクトサミンを認識するSTL, UDAでHAMで有意に高シグナルだった。今後これらと病態との関連のさらなる検討が必要である。

#### A. 研究目的

細胞最外側に存在する糖鎖は遺伝子に規定されていない翻訳後修飾因子の大きな部分を占めているが, 細胞認識, 細胞死, 免疫などへ関与すると近年解明されつつある。最近の研究でHAM患者末梢血由来のCD4+T細胞, HTLV-1感染細胞株でO-グリカンであるThomsen-Friedenreich 抗原(Gal-GalNAc)を認識するピーナツレクチン(PNA)染色陽性であることが指摘された(Pais-Correia AM. Nat Med 2010)。しかしHTLV-1感染細胞拡大機序Cell-to-cell spreadへの糖鎖の関与はよくわかっていない。

今回我々はレクチンアレイにより包括的な糖鎖発現(グリコーム)の検討を行い, 昨年度行ったマイクロアレイの結果から遺伝子に規定される糖鎖転移酵素遺伝子発現結果(グリコゲノム)を抽出し, 比較・考察した。

#### 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-I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取得した検体を用いた。

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 $2 \times 10^7$ 個のPBMCを含む凍結検体を $37^\circ\text{C}$ 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)(Myten 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。

膜蛋白の抽出: 平成21年度報告でマイクロアレイで検討したのと同じ個体由来のPBMCからCD4+T細胞分離, さらにRNAを前述のように抽出する一方, 他方では約 $1 \times 10^7$ 個のPBMCからCD4+T細胞抽出, さらにTM-PEK 膜タンパク質抽出キット(Merck)を用いた塩析法で膜蛋白を抽出した。検体の蛋白濃度をND-1000(Thermo scientific)を用いmicro BCA法で行った。

レクチンアレイ: 蛋白検体をCy3 Mono-Reactive dye(GE Healthcare)で標識し脱塩カラムで洗浄(Zeba desalt Spin Columns, Thermo scientific), 45種類の天然型レクチンを搭載したLecChip (GP Bioscience)のプロトコールに従い検体と $20^\circ\text{C}$ , 15時間反応させ, GlycoStation Reader 1200 (GP Bioscience)で読取り, ArrayProAnalyzer (Media Cybernetics), GlycoStation Tools software (GP Bioscience)で数値化, 規格化, 解析を行った。統計解析は同蛋白濃度(250ng/mL), 規格化した信号強度での群内比較, 後者での群間比較を行った。

糖鎖転移酵素遺伝子の発現(グリコゲノム): 昨年度のマイクロアレイの結果(トランスクリプトーム)から, 糖鎖関連遺伝子データベース(GGDB: GlycoGene database)([http://riodb.ibase.aist.go.jp/rcmg/ggdb/index?doc\\_no=4](http://riodb.ibase.aist.go.jp/rcmg/ggdb/index?doc_no=4))に登録されている191遺伝子の発現結果を確認し, その中で有意差(2群間でのt検定, One-way ANOVA)のある遺伝子を抽出した。

半定量的RT-PCR: DNAマイクロアレイで有意差のみ見られた糖鎖転移酵素に加え, 昨年度のDNAマイクロアレイで高発現だったO-グリコシル化部位を持つMUC3Aも, 前述のPais-Correia AMらが指摘したHAM患者CD4+T細胞でのO型糖鎖を認識するPNA染色陽性所見から関与が疑われ検討した。HAM6例, AC6例, NC5例のCD4+T細胞から抽出したRNAからcDNAを合成し(PrimeScript II 1

st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)), 表1のprimerを用い、95°C10分、40サイクルの94°C30秒、アニーリング温度(Tm)1分、および72°C10分のプログラムで増幅後、2%アガロースゲルで電気泳動し、臭化エチジウム染色後の取得した画像のデンストグラムをImageJで解析し、各遺伝子の対照のβ-actinとのデンストグラムの比を統計解析(一元配置分散分析)した。

表1. 糖鎖転移酵素遺伝子発現解析のためのmRNA用oligonucleotide primer

遺伝子 Primer名	mRNA参照配列(GenBank) Primer配列(5'→3')	位置	Ampli- con (bp)	Tm (°C)	文献
POFUT2	BC011044.1				
POFUT2-F	CTGGGAGTCCACCTGAGAAG	338-357	200	58	Dong S. 2005
POFUT2-R	GTGGGTTCAAACCTCACCAT	518-537			
B4GALT1	BC045773.1				
B4GALT1-F	AACTTGACCTCGGTCCCAGTGC	524-545	160	62	Garcia-Valle J. 2005
B4GALT1-R	GGCCGCCATCTTCACATTG	663-683			
GALNT11	NM_022087.2				
GALNT11-F	AACTTGACCTCGGTCCCAGTGC	393-412	999	58	Cheng L. 2004
GALNT11-R	GGCCGCCATCTTCACATTG	1372-1391			
B4GALNT1	NM_001478.3				
B4GALNT1-F	GACAAGCCAGAGCGCGTGA	1375-1393	99	60	Cheung I 2001
B4GALNT1-R	TACTTGAGACACGGCCAGGTT	1453-1473			
EXTL3	NM_001440.2				
EXTL3-F	CGCTCATCGCCCACTATTACC	724-774	183	62	Busse M. 2007
EXTL3-R	TGTTCAAGCTCTTGGCGCTT	888-906			
MUC3A	NM_001440.2				
MUC3A-F	AGGTGGGCATGGGAAGTGCT	3557-3576	73	54	Leroy X. 2003
MUC3A-R	CTGTAGGCCCTGGGAAGTGTG	3608-3629			
β-actin (control)	NM_001101.3				
β-actin-F	AAGAGAGGCATCCTCACCT	265-282	218	54	Kahn K 2007
β-actin-R	TACATGGCTGGGGTGTGAA	463-482			

免疫蛍光染色:HAM患者由来の凍結PBMC約 $1.0 \times 10^7$ 個を48時間培養後、マイクロビーズでCD4+T細胞、非CD4+細胞に分離。各々をスライドガラス塗抹標本を4%パラホルムアミド(PFA)で30分間固定した。抗MUC3 mouse IgG MAb とGoat anti-mouse IgG MAb (Alexa Fluor 488 (Green)), 抗Thomsen-Friedreich Antigen mouse IgM MAb とGoat anti-mouse IgM MAb(Alexa Fluor 647 (Magenta))で染色。共焦点顕微鏡またはレーザースキャニング顕微鏡で検鏡した。

## C. 研究結果

### 1. 糖転移酵素遺伝子の発現(グライコゲノム)

昨年度のDNAマイクロアレイで有意差がみられた遺伝子群中の糖転移酵素遺伝子を表2に要約した。3群間一元配置分散分析で有意差を認めたHAMのみで高発現の遺伝子群(177遺伝子)の中に含まれるもの、すなわちHAM発症機序への関連が疑われるものとしてPOFUT2 (Protein O-fucosyltransferase), GALNT11 (UDP-NAcβ-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 11)がみられた。2群間のWelch's t 検定でもPOFUT2はHAMではAC, NCより高発現, GALNT11ではACでNCよりも高発現だった。他の遺伝子としてはB4GALT1が2群間比較でHAMでACより高発現, B4GALNT1, EXTL3が2群間比較でACでNCより高発現だった。

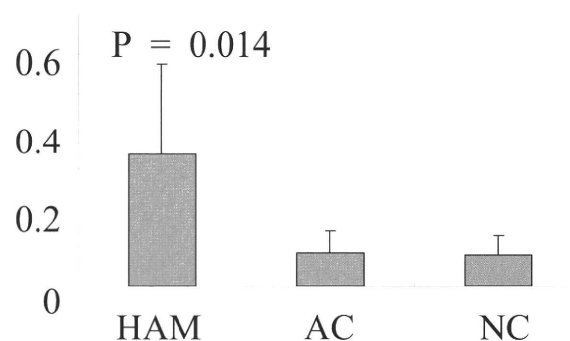
表2. HAM, AC, NCにおけるDNAマイクロアレイ結果(平成21年度)から抽出した糖鎖転移関連遺伝子(グライコゲノム)

有意差のみられた酵素名	Gene ID	2群間Welch's t 検定			3群間One-wayANOVA	
		HAM vsAC	AC vsNC	HAM vsNC	HAMのみ高(177genes)	HAM・ACで高(56genes)
Fucosyltransferases						
POFUT2 (Protein O-fucosyltransferase)	23275	+	-	+	+	-
Galactosyltransferases						
B4GALT1(UDP-Gal:β-GlcNAcβ-1,4-galactosyltransferase, polypeptide 1)	2683	+	-	-	-	-
N-Acetylgalactosaminyltransferases						
GALNT11 (UDP-NAcβ-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 11)	63917	-	+	-	+	-
B4GALNT1 (β-1,4-N-acetylgalactosaminyl transferase 1)	2583	-	+	-	-	-
GAG N-acetylglucosaminyltransferases						
EXTL3 (exostoses (multinle)-like)	2137	-	+	-	-	-

(+: significant (P<0.05); -: not significant. HAM vs AC, HAM vs NCではAC, NCが, AC vs NCではNCが対照。)

確認のため半定量的RT-PCRで表2の5遺伝子およびMUC3Aの計6遺伝子を検討し、GALNT11は有意にHAMで高発現だった(図1)。POFUT2 (P=1.56), BGALT1(同2.05), ETL3(同0.79)ではHAMで高発現の傾向があったが有意ではなかった。他の遺伝子では発現の分散に差はなかった。

図1. GALNT11 の発現



### 2. 糖鎖発現のレクチンアレイによる解析(グライコーム)

#### ①HAM・AC・NC全体について

同蛋白濃度(250ng/dL)ではNCで全体的に高信号の傾向があった。規格化した信号強度ではNCでSNA, SSA, TJA-1, ACG, DBAなど複数のレクチンで高信号の傾向があった。

#### ②個々の群について

HAM, ACの群ではいずれも同蛋白濃度, 規格化した信号強度の両方で検体間でパターンは類似していたが, NCでは同蛋白濃度, 規格化信号強度の両方で検体間でパターンが異なる傾向がみられた。

#### ③2群間比較

HAM・ACの比較では, 同蛋白濃度, 規格化信号強度とも同パターンで特徴的な差はみられなかった。

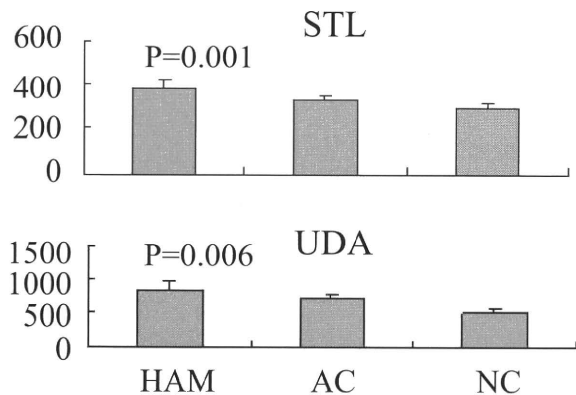
HAM・NCの比較ではNeuAcα2-6Galを認識するSNA, SSA, TJA-I, および(Galβ1-3Gal)n, NeuAcα2-3Galを認識するACGでHAMでNCより有意に低信号, (Galβ1-4GlcAc)nを認識するSTL, UDAでHAMで有意に高信号, GalNAcを認識するDBA, disialyl-T抗原を認識するMAHでHAMで低信号の傾向だった。

AC・NCの比較ではSNA, SSA, TJA-I, ACGでACで有意に低, STLでACで有意に高, DBAでACで低信号の傾向がみられ, HAM・NC間比較とほぼ同様だった。

#### ④3群間比較

2群間比較でHAM, ACでNCより高信号のSTL, UDAについて3群間一元配置分散分析で規格化シグナルを比較すると, 図2のようにSTL (P=0.001), UDA (P=0.006)ともHAMで有意に高信号だった。

図2. STL, UDAの規格化シグナルの3群間一元配置分散分析



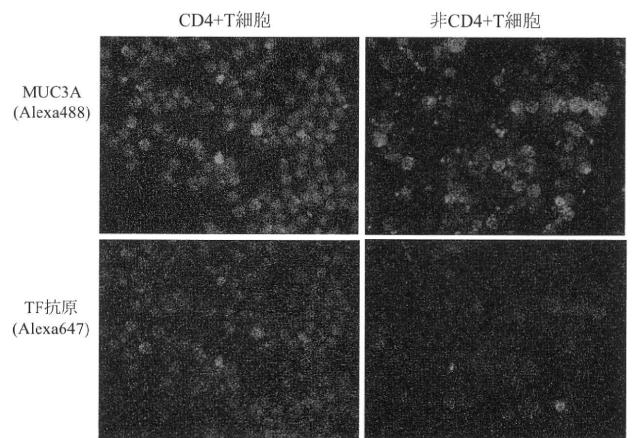
#### ⑤糖鎖の種類からみたグライコームの特徴

1) HAM・AC:N型糖鎖ではSTL, HAMではさらにUDAでも高信号でN-アセチルガラクトサミン, ポリラクタサミン構造は高発現, ConA, LCA低信号でマンノース型糖鎖は低発現, SNA, SSAなど低信号でシアル酸低発現が示唆された。O型糖鎖ではJacalin, ACA信号がNCと差がなく, Thomsen-Friedenreich抗原(T抗原, Gal β 1-3GalNAc α 1-Ser/Thr残基), Tn抗原, sialyl-T抗原の発現は差がなく, MAH, DBA低信号でdisialyl-T抗原低発現が示唆された。

2) NC:N型糖鎖ではNCではSTLではHAM, ACよりも, UDAではHAMよりも低信号だった。GNA, HHL低信号でマンノース型糖鎖は低発現, SNA, SSAなどはHAM, ACよりは高信号でシアル酸は高発現が示唆された。O型糖鎖ではMAHはHAM, ACより高, DBAはACより高信号でdisialyl T抗原は高発現が示唆された。LTL, TJA-IIはHAM, ACと有意差なくFコース付加構造は差がないことが示唆された。

(4)免疫染色ではHAM患者PBMC由来の非CD4+T細胞を対照に, CD4+T細胞上でのMUC3A, TF抗原の発現を検討したが, 明らかな差は認めなかった。しかしMUC3AはCD4+T細胞では高発現でsaturateした細胞が散見され, TF抗原では高発現の細胞が多い傾向がみられた。

図3. HAM患者PBMC中CD4+T細胞の抗MUC3A, 抗TF抗原抗体による免疫蛍光抗体染色



#### D. 考察

HAMの発症機序への関与が疑われた糖鎖転移酵素遺伝子は, DNAマイクロアレイでの3群間比較でHAMのみ高発現のものが2つみられた。POFUT2は小胞体(ER)でEGF様リピート, トロンボスポンジン1型リピートなどcysteine-knot motifsをO-フコシル化する酵素である。GALNT11はER, ゴルジ体でムチン生合成の最初の段階でSer/T残基にGalNAc α 1-O-を転移する。

2群間比較で有意差がみられた遺伝子としては, POFUT2と同様な機能を持つB4GALT1の他, GM2, GD2などの糖脂質合成酵素であるB4GALNT1, プロテオグリカンコア蛋白に付加されるグリコサミノグリカン(GAG)鎖のうちヘパラン硫酸(HS)鎖を付加する酵素であるEXTLE3がみられた。

B4GALNT1はHTLV-1感染細胞株では糖脂質GM2, GD2はTaxによるトランス活性化され高発現であることが知られているが(Furukawa K. 1993), 感染細胞株ではB4GALNT1が高発現かもしれない。EXTLE3に関連する知見としてはヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)はHTLV-1の結合・侵入時の受容体複合体の一部と考えられていることが挙げられる(Ghez D. 2010)。

糖鎖の上では一般にNCの方が高信号のレクチンが多く, HAM, ACの方が低信号のものが多かったが, これはHTLV-1感染により正常の糖鎖にみられる微少不均一性が障害されているかもしれないことを示唆しているのかもしれない。例外的にHAM, ACで高信号のSTL, UDAについては, UDAについては, ビトロでCell-to-cell 感染を阻害する効果が近年報告されている(Balestrieri E. 2008)。今後これらのレクチンを用いて, ポリラクタサミン型糖鎖(Galβ1-4GlcNAc)nで修飾された荷体蛋白を同定することがHAMの病態解析に必要と考えられる。

#### E. 結論

高発現の糖鎖転移酵素は既知の知見との関連がみられるものがあつた。半定量RT-PCRでもHAMでムチン生合成初段階に関わるGALNT11は有意に高発現であり, 今回免疫蛍光染色で病態との関連が明らかでなかったMUC3Aは別な方法での検討の必要があるかもしれない。

糖鎖では規格化した信号強度ではHAMとAC間の違いはあまりなく, NCとはSTL, UDAの発現がHAM, ACでより高いという特徴があつた。これらのレクチンの認識する糖鎖を担う蛋白には病態での意義があるかもしれない。



#### E. 健康危険情報

HTLV-Iの関与した実験を行うにあたっては、鹿児島大学・大学院難治ウイルス病態制御センター分子病理のP3感染実験室で適切に行っており、国民の生命や健康に重大な影響を及ぼす恐れはない。

#### F. 研究発表

1. 論文発表           なし
2. 学会発表

第3回HTLV-1研究会・合同班会議

平成22年(2010)8月27～29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

HTLV-I 感染伝播効率に関与する細胞内骨格再構成シグナルの解析

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 中村英樹<sup>1)</sup>，佐藤克也<sup>2)</sup>，山崎聡士<sup>1)</sup>，福田 卓<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>長崎大学・院・展開医療科学，<sup>2)</sup>長崎大学・院・感染免疫学

**研究要旨：**

HTLV-Iは細胞接着分子で構成されるvirological synapseを介してcell to cellで感染していくが，その際細胞内骨格の再構成が関与している可能性がある。我々は昨年度，HTLV-Iの細胞間感染伝播におけるmicrotubulesのreorganizationの関与を報告した。今回，HTLV-Iの細胞間感染伝播に関与する因子としてのactin polymerizationの役割についてHTLV-I感染T細胞株を用いて検討した。その結果，1) Latrunculin B処理HTLV-I感染細胞ではHTLV-Iの細胞間伝播が阻害され，actin polymerizationがHTLV-Iの感染伝播効率を規定する一因となっている可能性が示された。2) HTLV-I感染細胞における細胞内cAMPの増加はvasodilator-stimulated phosphoprotein(VASP)のリン酸化を通して，HTLV-Iの細胞間伝播効率を低下させた。3) HAM/TSP患者由来HTLV-I感染細胞株では細胞内cAMP濃度を低く設定し，VASPのリン酸化を制御することによって惹起されるactin polymerizationが効率のいいHTLV-Iの感染伝播の一因となっている可能性が示された。以上の事実より，細胞内cAMP濃度によって制御されるactin polymerizationという細胞内骨格再構成はHTLV-Iの感染伝播効率を規定する一因となっている可能性が示された。

**A. 研究目的**

細胞内骨格再構成は多くのウイルスのassemblyや，buddingすなわち細胞外放出において重要な役割を演じている。Cell to cellで感染を伝播していくHTLV-Iでも細胞内骨格再構成が同様の役割を演じている可能性がある。我々は昨年度の本班会議において，細胞内骨格の一つであるmicrotubulesの破壊はHTLV-Iの細胞間感染伝播を著明に抑制することを報告した。この事実はHTLV-Iの細胞間感染伝播には細胞内骨格の再構成が重要な役割を果たしていることを強く示唆している。

そこで，今年度は細胞内骨格再構成において中心的な役割を果たしているactin polymerizationに焦点をあて，検討を行った。Vasodilator-stimulated phosphoprotein(VASP)はactin polymerizationを制御する重要なアダプター蛋白である。VASPはcAMP-dependent protein kinase A(PKA)の基質であり，細胞内cAMP濃度の増加によって惹起される本アダプター蛋白のリン酸化はactin polymerizationを負に制御している。今回，

actin polymerizationに関与するVASPシグナルとHTLV-I感染伝播効率との関係について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 *luc*細胞(リンパ球系細胞株であるH9細胞にHTLV-I LTRにレポーターとしてのルシフェラーゼ遺伝子を繋いだプラスミドをpermanent transfectionした細胞株，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感染伝播効率の比較：HCT-5またはTL-Su( $5 \times 10^5$ /well)と，あるいは1.25 $\mu$ M latrunculin B(actin depolymerizer)または15 $\mu$ M forskolin(adenylate cyclase 活性化剤)処理HCT-5をH9/K30 *luc*細胞( $3.5 \times 10^5$ /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) ウェスタンブロット解析：HCT-5を1.25 $\mu$ M latrunculin Bまたは15 $\mu$ M forskolinにて処理し、経時的に細胞を回収後、cell lysateを作成し、ウェスタンブロット解析を行った。また、HCT-5またはTL-Suを培養し、経時的に細胞を回収後、cell lysateを作成し、ウェスタンブロット解析を行った。

4) 細胞内 cAMP 濃度の測定：15 $\mu$ M forskolin 処理 HCT-5 を 1.5 時間培養後、細胞を回収し、cell lysate を作成。また、HCT-5 または TL-Su を 1.5 時間培養後、細胞を回収し、cell lysate を作成。cyclic AMP complete (Stressgen 社) を用いて、細胞内 cAMP 濃度を ELISA 法にて測定した。

(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) Actin polymerization の破壊は HTLV-I 感染伝播効率を低下させる： 図 1 に示すように actin depolymerizer である latrunculin B(1.25 $\mu$ M) 処理 HCT-5 では経時的にみても HTLV-I tax および gp46 の発現に変化はなかったにもかかわらず、有意に HTLV-I の感染伝播が抑制された。この事実は HTLV-I の cell to cell spread には actin polymerization が重要な役割を果たしていることを示している。

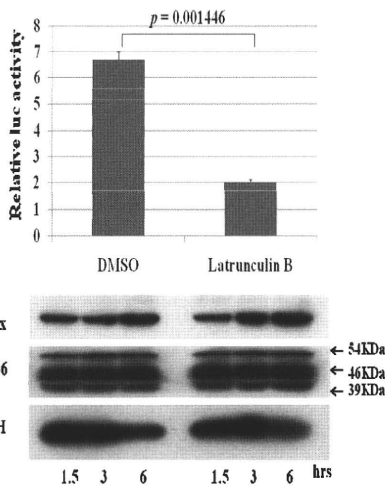


図1. Latrunculin B処理HCT-5におけるHTLV-I感染伝播抑制効果

2) 細胞内 cAMP 濃度の上昇は VASP のリン酸化を通して HTLV-I 感染伝播効率を低下させる： Actin polymerization は VASP によって促進さ

れ、逆に VASP がリン酸化(p-VASP)されると阻害される。VASP のリン酸化は cAMP-dependent PKAによって惹起されることより細胞内 cAMP 濃度が actin polymerization を制御していることになる。cAMP は ATP から adenylylase によって産生されるが、図 2 に示すように adenylylase 活性化剤である forskolin

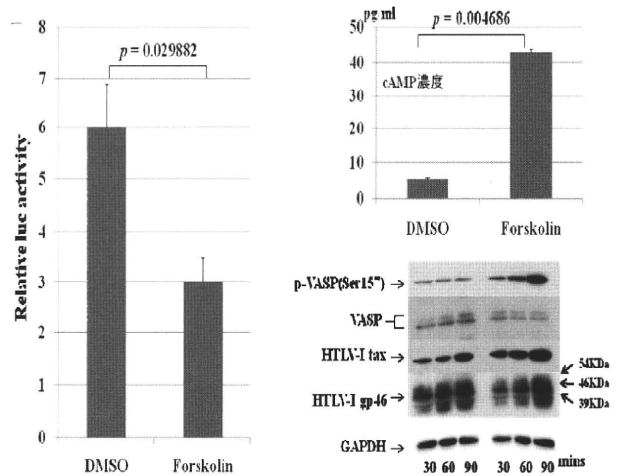


図2. Forskolin処理HCT-5における細胞内cAMP濃度およびVASPリン酸化とHTLV-I感染伝播抑制効果との関係

(15 $\mu$ M)にて処理された HC-5 では、細胞内 cAMP 濃度の上昇と共に、時間経過とともに VASP のリン酸化が惹起され、このことによって、図 2 左欄に示すように HTLV-I の感染伝播が有意に抑制された。

3) HCT-5 (HAM/TSP 患者由来株)は TL-Su (HTLV-I キャリアー由来株)に比較して HTLV-I 感染伝播効率が高い： 上記の事実を踏まえ、HAM/TSP 患者由来 HTLV-I 感染 T 細胞株である HCT-5 と HTLV-I キャリアー由来 HTLV-I 感染 T 細胞株である TL-Su で比較検討を行った。その結果、図 3 に示すように TL-Su では HCT-5 に比較して、細胞内 cAMP 濃度は有意に高値を示した。また、TL-Su においては経時的にみても cAMP-dependent PKA によってリン酸化される CREB に加え、VASP も HCT-5 に比較して強くリン酸化されていた。そこで、両株の HTLV-I の感染伝播効率を比較検討した。その結果、

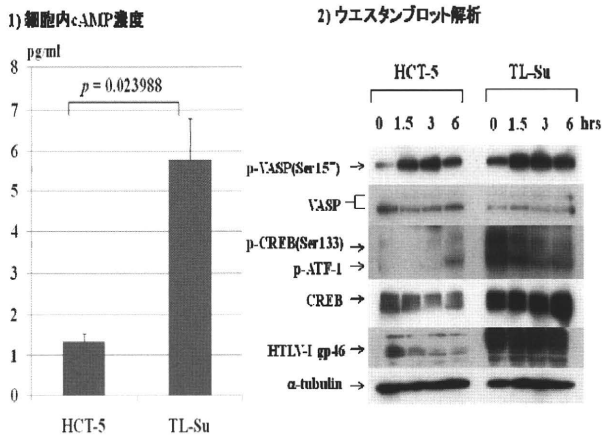


図3. HCT-5とTL-Suにおける細胞内cAMP濃度の比較とウエスタンブロット解析

HTLV-I gp46 の発現で見ると、HCT-5 では TL-Su に比較して低いにもかかわらず (図 3), 有意に高い HTLV-I の感染伝播効率を示した (図 4)。

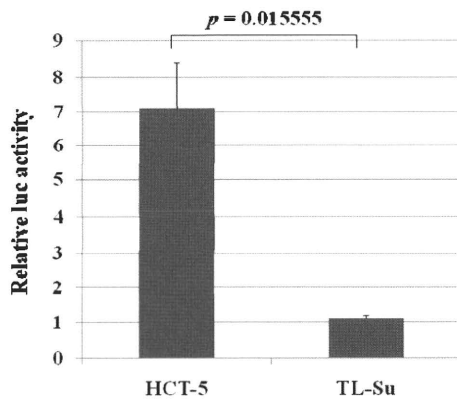


図4. HCT-5とTL-SuのHTLV-I感染伝播効率の比較

#### D. 考察

細胞内骨格再構成は多くのウイルスの assemblyや, buddingすなわち細胞外放出において重要な役割を演じている。今回, HTLV-I感染においても同様の可能性を考え, 細胞内骨格再構成において中心的な役割を果たしている actin polymerizationとHTLV-Iの感染効率との関係についてHTLV-I感染T細胞株を用いて検討した。その結果, 1) Actin polymerizationの破壊によってHTLV-Iの細胞間伝播が阻害され, actin polymerizationはHTLV-Iの感染伝播効率を規定する一因となっている可能性が示された。2) HTLV-I感染細胞における細胞内cAMPの増加はVASPのリン酸化を通して, HTLV-Iの細胞間伝播効率を低下させた。3)

HAM/TSP患者由来HTLV-I感染細胞株では細胞内cAMP濃度を低く設定し, VASPのリン酸化を制御することによって惹起される actin polymerizationが効率のいいHTLV-Iの感染伝播の一因となっている可能性が示された。

Actin polymerizationは細胞の遊走能にも強く関与している。我々は以前よりHAM/TSP患者HTLV-I感染細胞は強い組織浸潤能を持っていることを報告している。今回は細胞株での検討であるが, HAM/TSP患者由来の細胞株であるHCT-5ではHTLV-Iキャリアー由来株であるTL-Suに比較して, Actin polymerizationが強く起こっているであろう事実は細胞の組織浸潤能の亢進にも関与している可能性があり, この点においても興味深い。

今回の結果から, actin polymerizationの程度がHTLV-Iの感染伝播効率に強く関与している一因となっていると考えられるが, それは結局, 細胞内cAMP濃度によって規定されていることを示している。細胞内cAMP濃度は, ATPからcAMPに変換させる酵素であるadenylate cyclase活性とcAMPからAMPに変換させる酵素であるphosphodiesterase活性とのバランスによって制御されている。HCT-5における細胞内cAMP濃度の低さはadenylate cyclaseの活性低下によるものか, あるいは逆にphosphodiesteraseの活性亢進に起因しているのか不明であるが, HAM/TSP患者HTLV-I感染細胞におけるHTLV-I感染伝播効率を考える上で重要であり, 今後解析が必要である。

#### E. 結論

細胞内骨格再構成において中心的な役割を果たしている actin polymerizationはHTLV-Iの感染伝播効率を規定する一因となっている可能性がある。HAM/TSP患者由来HTLV-I感染細胞株における効率のいいHTLV-I感染伝播の一因として細胞内cAMP濃度を低く設定し, VASPのリン酸化を制御することによって惹起される actin polymerizationの関与が考えられた。

#### (捕捉)

HAM/TSP患者に対するHTLV-I感染細胞を標的とした静注プロスルチアミン療法による短期治療の有効性の成績(Nishiura Y., et al.