

Antivir Ther. 14:533-542, 2009)を踏まえ、長期治療を目指した経口プロスルチアミン療法による臨床試験を開始した。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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 transplantation. 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.

##### 2. 学会発表

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

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得：HTLV-I 関連脊髄症の予防・治療剤およびアポトーシス促進剤(特許出願中，特開 2007-277223)。
2. 実用新案登録：なし。
3. その他

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業） 分担研究報告書

## 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

研究分担者： 山野 嘉久 聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター 准教授

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を決定することが重要であるが、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てその特徴を明らかにし、また治療方針決定に資する疾患活動性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。

### A. 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、実際は数年以内で急速に悪化する例や、数十年の経過においてほとんど進行しない例などが存在し、その経過の個人差は大きい。HAM 患者に対する治療介入を考える上で、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 の経過に個人差が大きいこと、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」が急務であるとする。その為に、HAM における臨床病型を明らかにし、また疾患活動性マーカーを同定することを本研究の目的とした。

### B. 研究方法

（1）当院での HAM 専門外来初診時にステロイド及びインターフェロン・アルファ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、納の運動障害重症度を用いて、発症時から重症度のレベルが 1 段階悪化した年齢を調査し、得られた運動障害度の経時変化をプロットして、HAM 患者ごとの自然経過を明らかにした。

(2) 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)、各種サイトカイン、MMP-3、ケモカイン CXCR3 リガンド (CXCL9, CXCL10, 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、各種サイトカイン、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。

(3) 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ようにして、患者の人權擁護に努めた。

#### C. 研究結果

(1) 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。

(2) 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。

(3) 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。

#### D. 考察

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・長期予後と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るが、重症度との相関性の優劣に関する報告に乏しい。本研究ではこれらのマーカーのみならず、髄液や血清で上昇することが報告されているサイトカインやケモカインも含めて全て測定して重症度との相関性を検討し、HAM の疾患活動性マーカーとして髄液 CXCL10 が最も優れており、次いで髄液ネオプテリンが有用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、血液検査で測定可能な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。しかし本研究において、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。したがって以上の所見を総合すると、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好であること (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。

## E. 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 (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、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。

## F. 健康危険情報

特記すべき事項はありません。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 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. Fucoïdan 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-I 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 metalloproteinase 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.
2. 学会発表
- 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-1 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-1 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.

### 3. その他

なし

- 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.

## H. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

### 1. 特許取得

- 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-I 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

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

研究分担者 植田 幸嗣  
独立行政法人理化学研究所 バイオマーカー探索・開発チーム 研究員

**研究要旨：**

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。本研究では、HAM患者において高率でHTLV-1の感染が立証されているCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>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、他の正常組織や血球細胞での発現がない、もしくは非常に低いレベルであれば有望な創薬のターゲットにもなり得ると考えられる。

上記細胞総抽出液を使用した解析に加え、より治療標的分子を効率的に探索するために、IGEL法 (Isotopic Glycosidase Elution and labeling on Lectin column chromatography)を用いた細胞膜表面タンパク質の濃縮精製、プロファイリングのための予備検討実験を開始しており、今後はソーティングを行ったヒトT細胞臨床検体について本手法を適用し、HAM病因細胞の細胞膜サブプロテオームからバイオマーカー・創薬ターゲットの探索を行う予定である。

**A. 研究目的**

現在HAMの診断、治療において、患者の病態、重症度を正確に反映するバイオマーカーは発見されておらず、またHAM病因T細胞を特異的に標的とした根本的治療法も存在しない。そこで本研究では、患者由来末梢血細胞や血漿を用いて、HAMの診断、治療の新たなターゲットとなりうる分子を世界最先端の定量プロテオーム解析技術を駆使して同定することを目的とする。

本研究目的の達成により、HAMの重症度をバイオマーカー群の定量値として客観的に評価することが可能となり、より厳密なHAM治療指針作成の基礎となりうる。また、HAM細胞特異的な抗原が発見された場合は、画期的なHAM治療薬開発、発症予防法の開発に繋がると期待できる。

**B. 研究方法**

30症例由来の末梢血細胞サンプル（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）から、フローサイトメトリーを用いてCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>T細胞を抽出した（図1）。このステップにより、HAM患者において高率で（90%以上）HTLV-1に感染しているHAM病因細胞を濃縮、精製できる。

次に、精製したCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>T細胞を8M Ureaを含むバッファーで溶解させ、還元アルキル化、トリプシン消化を行った。消化ペプチドサンプルを逆相精製カートリッジにて脱塩した後、QSTAR-Elite Nano-LC/MS/MSシステム（AB Sciex社製）にて計30サンプルの質量分析を行った（フローチャート図2参照）。

Nano-flow HPLCには、DIONEX社 Ultimate3000 HPLC system、0.3×5 mm L-Trap トラップカラム（化学物質評価機構）、0.1×250 mm C18 L-column チップカラム（充填剤：化学物質評価機構、ESIチップ：GLサイエンス、カラム充

填：自作)を使用した。流速は200 nL/min、120分アセトニトリルグラジェントにて分析を行った。QSTAR-Elite 質量分析計の詳細な測定パラメーターは文献 [Ueda K. et al., Mol Cell Proteomics, 2010;9(9):1819-28] と同様のものを使用した。

測定が完了した LC/MS/MS の raw data を、Genedata 社 Expressionist プロテオームサーバーにロードし、定量解析、統計解析を行った。まず Expressionist Refiner MS モジュールを用いてノイズ除去、クロマトグラムアライメントなどのデータプロセッシングと、検出された全ペプチドに対するラベルフリー定量解析を行った。

Group	Sex	Age	Avr. Age	Virus <sup>1</sup>
ND <sup>2</sup>	F	39		0
ND	M	32		0
ND	M	27	35.0	0
ND	F	32		0
ND	M	39		0
ND	M	41		0
AC <sup>3</sup>	M	62		0.04
AC	F	43		13.87
AC	F	56	58.8	2.55
AC	M	61		21.98
AC	F	72		22.95
HAM	F	67		12.84
HAM	F	74		31.99
HAM	F	70		12.29
HAM	F	39		18.16
HAM	F	70	63.0	14.42
HAM	M	52		22.67
HAM	M	73		69.92
HAM	F	54		19.43
HAM	F	68		60.53
HAM	F	63		35.18
ATL	M	78		31.57
ATL	F	53		97.73
ATL	F	60		59.9
ATL	F	70		160.3
ATL	F	87	66.2	184.12
ATL	M	67		165.92
ATL	M	61		49.23
ATL	M	61		40.19
ATL	F	59		71.38

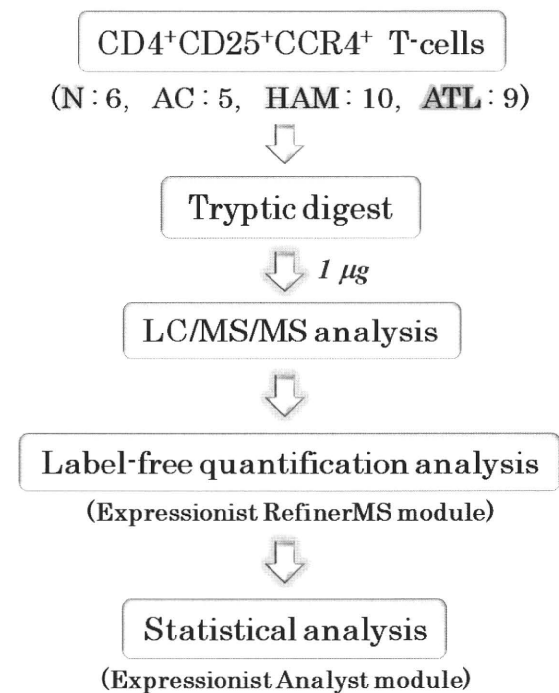
**図1**  
末梢血サンプルリスト

- ※1: HTLV-1 proviral DNA load (copies/100 cells)
- ※2: 非感染健常者
- ※3: HTLV-1感染無症候患者

次に、Expressionist Analyst モジュールを使用してデータの標準化、分散分析、主成分分析などを行い、バイオマーカー、創薬ターゲット候補の絞り込みを行った。ここで選出された候補ペプチドについて、LC/MS/MS 分析の結果に基づ

いた In-house MASCOT データベース検索により、ペプチド配列の同定を行った。

MASCOT データベース検索には以下のパラメーターを使用した。Taxonomy = Homo Sapiens, Enzyme = Trypsin, Miss cleavage = 2, Database = SwissProt 2011\_02 (525,207 sequences), Fixed modification = Carbamidomethyl (C), Variable modifications = Oxidation (M) + Acetyl (N-term) + Pyro-Glu/Gln (N-term), MS tolerance = 50 ppm, MS/MS tolerance = 0.1 Da, Peptide charge = +2 to +4, Instrument = ESI-QUAD-TOF。さらに、MASCOT Decoy Search アルゴリズムを使用し、False Discovery Rate を 0.05 に設定し、同定信頼性の基準とした。



**図2**  
定量プロテオーム解析を用いたHAMバイオマーカー、創薬ターゲット分子スクリーニングフローチャート

[倫理面への配慮]

聖マリアンナ医科大学から提供を受けた血球試料の収集に関しては、プライバシーに関する遵守事項、同意しない場合でも不利益を受けないこと、同意した場合でも随時これを撤回できること、被験者の人権保護など必要な事項について被験者に十分説明し患者本人からプロジェクトの趣旨や内容に十分な理解を得た上でインフォームドコンセントを文書で取得し、採血の手続きが行われた。

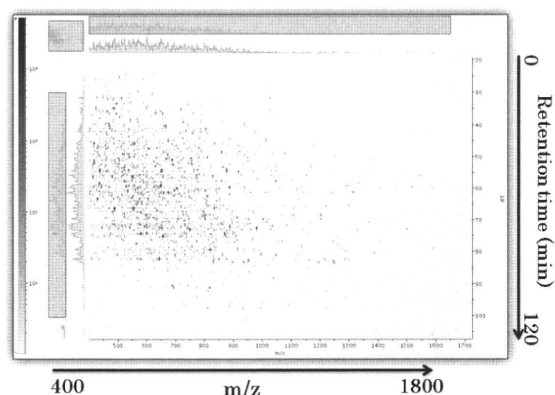
採血され、血球を分離、凍結したサンプルは



匿名化が行われ、個人情報（氏名、住所、生年月日）は同病院外には一切漏出しないよう管理されている。匿名化された試料は、臨床情報（年齢、性別、治療歴、各種バイオマーカーの値など）のみ付加された状態で提供され、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保管されている。これら臨床検体の提供、本研究への使用に関しては、聖マリアンナ医科大学、理化学研究所、双方の倫理審査委員会による承認を得た上で実施された。

### C. 研究結果

30 症例由来の LC/MS/MS スペクトルは、Expressionist サーバー上で図 3 に示すような質量と HPLC 保持時間を軸とした二次元マップに変換され、ここでは 30 症例間の重複を除いて 37,143 のペプチドを含む分子種が検出された。さらに、これら検出シグナル全てについて図 4 で示すように精密なアライメントを行い、質量分析計でのシグナル強度に基づいた 30 症例間の定量比較値を得た。



**図3**

Expressionist RefinerMSモジュール上での LC/MS/MS二次元マップ表示の一例。  
x軸: 質量電荷比、y軸: Nano-HPLC保持時間。

エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) では通常、トリプシン消化後のペプチドは 2 価以上の多価イオンとして検出されるため、Expressionist Analyst モジュールにて電荷 +2 ~ +10 を持つ 14,064 のペプチドシグナルを抽出し、次の統計解析に供した。

検出された 14,064 ペプチドから、非感染健康者 (ND)、感染無症候患者 (AC)、HAM 患者 (HAM)、ATL 患者 (ATL) の 4 群を特異的に分類するためのファクターを選出するため、これら 4 群間で分散分析 (ANOVA) を行った。その

結果から、4 群の分類に最も寄与すると考えられる 100 ペプチドを、ANOVA p-value に基づいて抽出した (図 5)。

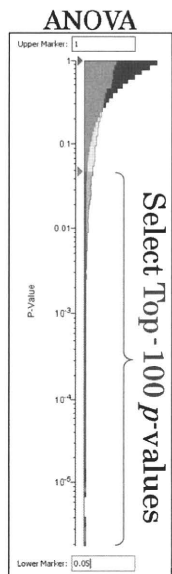
これら 100 ペプチドが 4 群の識別に十分かどうか、また、各ペプチドが 4 群の分類に対してどの程度の重み (ロード) を持つかを評価するため、主成分分析を行った結果を図 6 に示す。第一 ~ 第三主成分を用いた 3D プロットより、この 100 ペプチドの定量値を用いると、4 病群が明確に分類可能であることが分かった。すなわち、これらのペプチドには HAM や ATL 特異的に発現の増減を示すバイオマーカー、創薬ターゲット候補が含まれることを示唆している。

続いてスクリーニング時に自動的に取得した LC/MS/MS データの MASCOT データベース検索により、これら 100 ペプチドの配列決定、タンパク質帰属を行った。その結果、27 ペプチドの配列決定に成功した (False discovery rate < 0.05)。同定されたペプチドの一部を、30 症例における発現量のバーグラフと共に図 7 に示す。ここで同定できなかったペプチドに関しては、新たに QSTAR-Elite 質量分析計にて Inclusion List を作成し、ターゲットを絞り込んだ MS/MS 分析を行うことによって、同定を行う予定である。

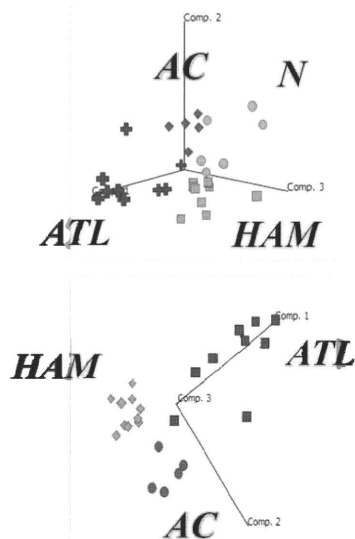


**図4**

30症例由来LC/MS/MS二次元マップのアライメント結果。下段は代表的なマップ一部の拡大図。



**図5**  
14,064ペプチドを用いた4群分散分析の結果におけるp-value分布



**図6**  
バイオマーカー候補ペプチド100種を用いた主成分分析の結果。第一～第三主成分を使用した3Dプロットにて、(上)全症例の分類、(下)N以外の3群の分類をそれぞれ図示。N: 非感染健常者、AC: 感染無症候患者、HAM: HAM患者、ATL: ATL患者。

さらに、治療標的分子としてより望ましい細胞膜表面タンパク質にターゲットを絞ったスクリーニングを行うための予備実験を開始した。図8に示すIGEL法によって末梢血単核球(PBMC)から糖タンパク質由来ペプチドのみを精製、LC/MS/MS分析した結果から、CD抗原22種類を含む586の血球細胞膜タンパク質が有意に同定され、定量可能であることが分かった。細胞膜タンパク質の約9割は糖タンパク質であることから、本IGEL法を用いた濃縮精製技術は細胞膜サブプロテオームの解析に非常に有効であると言える。この結果は、ハイマンノース型糖鎖を認識するConAレクチン、及び $\alpha 2,6$ 結合シアル酸を認識するSSAレクチンを用いて得られた結果であり、今後使用するレクチンの種類を増加させることにより、さらに多くの膜表面タンパク質が同定、定量可能となると考えられる。

また、次年度以降、本技術を使用したバイオマーカー、創薬ターゲットスクリーニング、およびバリデーション実験をより大規模な臨床検体を用いて行うため、末梢血臨床検体の収集も

進行中であり、現在までに約200症例弱の血球分離、保管を完了している。

#### D. 考察

30症例の $CD4^+CD25^+CCR4^+$  T細胞を用いた質量分析に基づくラベルフリー定量解析により、これまでに報告のない4病理群(非感染健常者、感染無症候患者、HAM患者、ATL患者)分類のための決定因子同定に成功した。この結果は、HTLV-1が優先的に感染するT細胞のサブタイプのみをフォーカスしたプロテオーム解析が、同ウイルスに起因する疾患のバイオマーカー探索に極めて有効であったことを示している。

特に、図6下パネルに示すとおり、感染無症候患者からHAMを発症する原因になる因子、ATLを発症する原因になる因子が別々に存在する可能性が示唆されたことは重要である。今後、本研究で同定された100種類のペプチド、タンパク質を詳細に解析することにより、HTLV-1感染者のごく一部がHAMやATLを発症するメカニズムの解明に繋がる可能性がある。また、そのような分子を標的にした診断や治療法を開発することにより、HAM、ATLの分子標的治療だけではなく、発症の予防までもが可能になると期待される。

今後の戦略として次年度以降は、細胞膜サブプロテオームに特化したスクリーニングを行うと同時に、本年度に得られた結果をより大規模な臨床検体と、独立した手法(Western blotting, ELISAなど)を用いて検証する必要がある。その段階で可能な限りHAM患者臨床検体の数を増やし、同定されたバイオマーカーがHAM重症度に依存した変化を示すかどうかなど、より詳細な臨床情報との相関関係についても検証を行う予定である。

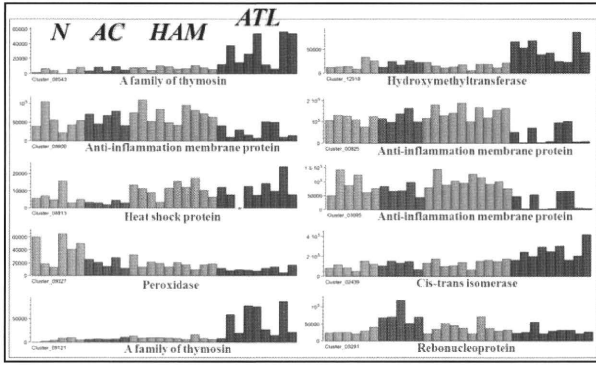


図7

タンパク質同定まで完了したバイオマーカー候補ペプチドのうち、代表的な101種についてCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>T細胞中における発現パターンをバーグラフで表示した。

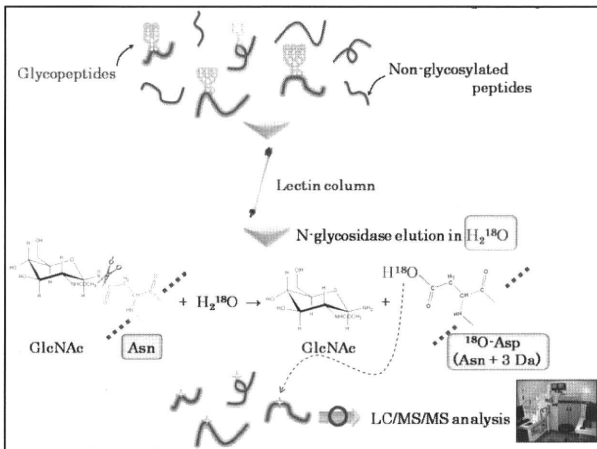


図8

IGEL法の原理。タンパク質のトリプシン消化物から、糖ペプチドのみを選択的に捕捉し、糖鎖結合部位を安定同位体で標識しつつ、質量分析可能な非糖ペプチドの状態で溶出させる。

## E. 結論

LC/MS/MS を用いたラベルフリー定量解析により、ヒト T 細胞総抽出液から 100 ペプチドの HAM 診断マーカー、創薬ターゲット候補を見出すことに成功した。血中 T 細胞全体を対象とするのではなく、本研究のように最もよく病態を反映すると考えられる T 細胞のサブフラクションだけを解析対象とする「疾患の分子生物学的特性を活かしたフォーカスドプロテオミクス」は、複雑なプロテオームサンプルから効率よく疾患特異的マーカー分子を同定するのに非常に有効な手段であると言える。

次年度以降行う予定の「細胞膜サブプロテオームに特化したフォーカスドプロテオミクス」も、抗体医薬など創薬を見据えたターゲット探索に効果的なアプローチであると考えられる。

一方で、これらスクリーニングによって同定されたバイオマーカー、創薬ターゲット候補を

ハイスループットに多検体を用いてバリデーションを行える系を構築してゆく必要性がある。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし。

### 2. 学会発表

Comprehensive proteome profiling to identify potential therapeutic targets for Human T-lymphotropic 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

## H. 知的財産権の出願・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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

HLA-A\*02 および A\*24 拘束性 HTLV-I 特異的 CTL の相違

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：われわれの以前の研究では、HAM 患者では HLA-A\*24 頻度が優位に高く、HLA-A\*24 陽性 HAM 患者は陰性 HAM 患者より、優位にウイルス量が低く、また HTLV-I ウイルス量と HTLV-I 特異的 CTL の頻度は負の相関を示した。HLA-A\*02 陽性者では HTLV-I 特異的 CTL はウイルスを減らしながら、逆に HAM では頻度が低い。今回、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。

A. 研究目的

HLA-A\*02 は HTLV-I キャリアと比べ HAM 患者に少なく、キャリアにおいては HLA-A\*02 陽性者は陰性者とくらべてウイルス量が少ないことが報告されている。一方我々の検討では、HAM 患者では HLA-A\*24 は多く(表 1)、HLA-A\*24 陽性 HAM 患者では、陰性者と比べ優位にウイルス量の低下が認められた(表 2)。さらに、HAM およびキャリアともに HLA-A\*24 拘束性 HTLV-I 特異的 CTL 頻度とウイルス量は逆相関を認めている(図 1、表 3)。

しかし、HLA-A\*02 拘束性 CTL 頻度とウイルス量には相関を認めなかった。これらの差は、HLA-A\*02 拘束性 HTLV-I 特異的 CTL より HLA-A\*24 拘束性 CTL の方がウイルス殺傷能力が高いためかを検討した。

B. 研究方法

HLA-A\*02 および HLA-A\*24 陽性の HAM 患者それぞれ 8 例の PBMC を用いた。HLA-A\*02 拘束性のエピトープ Tax11-19 および、HLA-A\*24 拘束性のエピトープ Tax301-309 に特異的な

CTL の PBMC 中の頻度を、テトラマーを用いて測定した。各抗原ペプチドを  $1\mu\text{M}$  で添加して PBMC を培養し、抗原特異的 CTL のサイトカインおよびケモカイン産生能につき、 $\text{IFN-}\gamma$ 、 $\text{MIP-1}\beta$ 産生細胞を細胞内蛋白染色で測定した。細胞傷害能については、 $\text{CD107a}$  膜表面発現により陽性細胞を測定した。 $\text{CD8+}$ 細胞中の各陽性細胞頻度を、 $\text{CD8+}$ 細胞中のテトラマーで測定した CTL 頻度で除して、 $\text{HTLV-I}$  特異的 CTL 中の各陽性細胞頻度を算出した。また、各抗原の希釈系列を用い  $\text{IFN-}\gamma$  を出力系として、CTL の機能的 avidity を測定した。

(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。臨床検体の研究使用に関しては、インフォームドコンセントを得て行った。

### C. 研究結果

テトラマーで測定した  $\text{HLA-A*02}$  および  $\text{HLA-A*24}$  拘束性  $\text{HTLV-I}$  特異的 CTL 中の  $\text{IFN-}\gamma$ 、 $\text{MIP-1}\beta$ 産生細胞の頻度の割合は差がなかった。また陽性細胞の平均信号強度 (MFI) も 2 群で差を認めなかった(図 2、3)。テトラマー陽性 CTL 中の  $\text{CD107a}$  陽性細胞の頻度も 2 群で差はなかった。NetCTL プログラムによる  $\text{HLA/}$ 抗原結合能予測値は、 $\text{Tax11-19/HLA-A*02}$  は 1.47、 $\text{Tax301-309/HLA-A*24}$  は 1.89 とより高値であった(表 4)。機能的 avidity 測定では、 $\text{HLA-A*02}$  拘束性 CTL に 50% 反応を起こす抗原濃度は  $31\text{nM}$  で、

$\text{HLA-A*24}$  拘束性 CTL では  $0.6\text{nM}$  であり、 $\text{HLA-A*24}$  拘束性 CTL の方が約 50 倍低い濃度で抗原を認識した(図 4)。

### D. 考察

HAM と  $\text{HTLV-I}$  キャリアの最大の違いは、HAM では  $\text{HTLV-I}$  ウイルス量が高いことであり、ウイルス量の増大は HAM 発症の最大の危険因子と考えられてきた。しかし、以前のわれわれの検討では、 $\text{HLA-A*24}$  陽性 HAM 患者は陰性 HAM 患者より優位にウイルス量が低く、 $\text{HTLV-I}$  特異的 CTL はウイルス排除に働いているにもかかわらず、 $\text{HLA-A*24}$  が HAM 発症の促進因子であることが示された。以上より  $\text{HLA-A*24}$  陽性 HAM 患者では  $\text{HTLV-I}$  特異的 CTL が働いてウイルス量を減らす一方で、HAM 発症のリスクとなっており、 $\text{HTLV-I}$  特異的 CTL はウイルス量とは別の HAM 発症のリスクである可能性が考えられた。 $\text{HLA-A*02}$  は逆に  $\text{HTLV-I}$  特異的 CTL はウイルスを減らすが、HAM では頻度が低い。今回、同じウイルスに対する CTL を持ちながら、 $\text{HLA-A*24}$  は HAM 発症促進的に、 $\text{HLA-A*02}$  は発症抑制的に働くことより、それぞれの  $\text{HTLV-I}$  特異的 CTL の機能の比較検討を行った。結果、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、 $\text{HLA-A*24}$  特異的 CTL は、 $\text{HLA-A*02}$  特異的 CTL よりも機能的 avidity が約 50 倍強かった。生体内でウイルス蛋白が少量産生される場合には、

HLA-A\*24 拘束性 CTL の方が有効にウイルス排除に働くと考えられた。以上より、HLA-A\*24 拘束性 CTL の方が HLA-A\*02 特異的 CTL よりも優位に感染者の生体内で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、すなわち CTL がウイルスを減らす一方でホストに傷害性に働く可能性が考えられた。

#### E. 結論

○ HLA-A\*02 および A\*24 拘束性 HTLV-I 特異的 CTL のサイトカイン、ケモカイン産生能および細胞傷害能は、抗原が高濃度では差がなかったが、抗原が低濃度の条件では HLA-A\*24 拘束性 CTL の方が HLA-A\*02 拘束性 CTL より優位に抗原認識をした。HTLV-I 感染細胞がウイルス蛋白を少量産生する時は、HLA-A\*02 拘束性 CTL より HLA-A\*24 拘束性 CTL の方が優位に感染細胞を認識する可能性がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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

##### 2. 学会発表

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
- H. 知的財産権の出願・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

	A*24+	A*24-
HAM (N=152)	110 (72%)	42 (28%)
AC (N=155)	91 (59%)	64 (41%)

(p=0.0165 by chi-square test, Odds ratio=1.84)

表 1. HAM およびキャリア (AC) における HLA-A\*24 アリル頻度

Patient		Proviral load (copy/100 PBMC)	P value*
HAM A*24 (+)	n=110	325±422 SD	0.009
HAM A*24 (-)	n=42	550±506 SD	
AC A*24 (+)	n=91	142±206 SD	NS (0.148)
AC A*24 (-)	n=64	198±255 SD	

(\*by Mann-Whitney U- test, two-tailed)

表 2. HAM および AC での HLA-A\*24 陽性者および陰性者での HTLV-I プロウイルス量

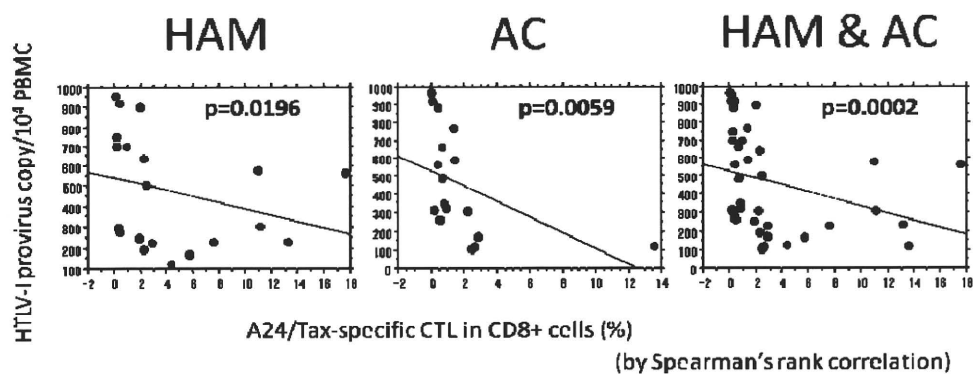


図 1. HAM および AC におけるプロウイルス量と HLA-A\*24/Tax301-309 特異的 CTL との関係



	HLA-A2	HLA-A24
Frequency in HAM compared to AC	Low	High
HTLV-I proviral load	Reduced (in AC)	Reduced (in HAM)
Immunodominant CTL epitope	Tax11-19 (LLFGYPVYV)	Tax301-309 (SFHSLHLLF)
Correlation between PVL and CTL frequency	Positive or zero correlation	Negative correlation

表 3. HLA-A\*02 または A\*24 拘束性 HTLV-I 特異的 CTL の比較

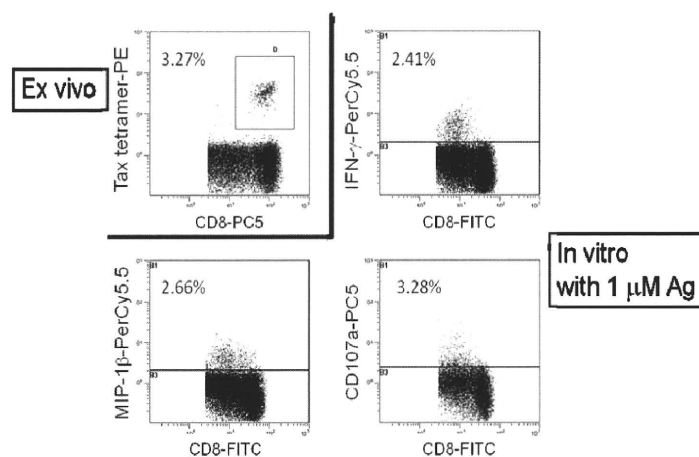


図 2. 抗原刺激後の HTLV-I 特異的 CTL よりの IFN- $\gamma$ および MIP-1 $\beta$ 産生と、CD107a 発現

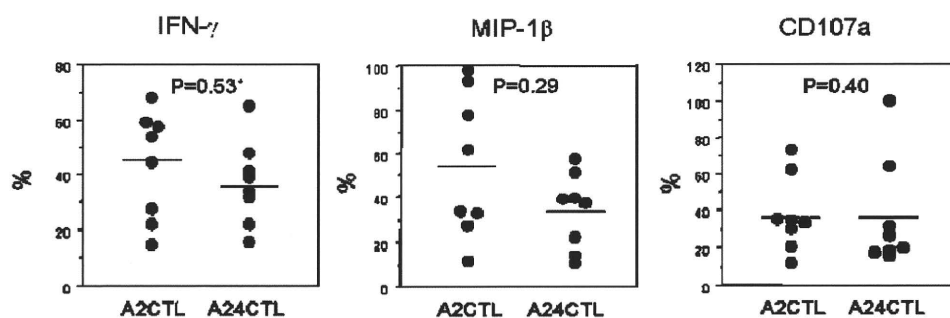


図 3. HLA-A\*02 および A\*24 拘束性 HTLV-I 特異的 CTL からの IFN- $\gamma$ および MIP-1 $\beta$ 産生と、CD107a 発現の比較

Program	NetMHC (prediction score)	NetCTL (prediction score)
Tax11-19/HLA-A2	0.826	1.47
Tax301-309/HLA-A24	0.612	1.89

表 4. インターネットプログラムによる HTLV-I Tax 抗原/HLA 結合能予測

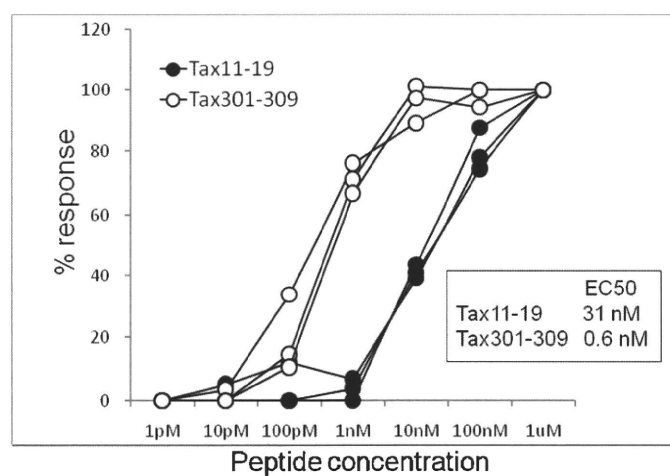


図 4. HLA-A\*02 および A\*24 拘束性 HTLV-I 特異的 CTL における機能的 avidity

## HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) 発症関連遺伝子の解析

研究分担者 齊藤峰輝 琉球大学大学院医学研究科 准教授

研究要旨: HAM の発症機序解明と新規発症予防法・治療法の開発のため、HTLV-1 の転写活性化因子 Tax の標的遺伝子を網羅的に抽出、解析した。同定した Tax 標的遺伝子のうち、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 患者の PBMC を培養して 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 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。

### A. 研究目的

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) は世界ではじめてヒト疾患との関連が見いだされたレトロウイルスであり、成人 T 細胞白血病 (ATL) および HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の原因ウイルスである。HTLV-1 感染者の分布には地理的な偏在が認められ、日本、アフリカ、カリブ海諸国、南アメリカ等に集積している。一昨年国立感染症研究所から報告された約 20 年ぶりの全国調査によると、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、従来多かった九州・沖縄では減少しているものの、都市部では逆に増加していることが明らかになっている。ほとんどの HTLV-1 感染者が生涯にわたって未発症の無症候性キャリアー (asymptomatic carrier: AC) として経過し、HAM や ATL を発症するのは感染者全体の 5% 前後ではあるが、最も予後不良の白血病の一つである 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。よって、HTLV-1 感染症の制圧は我が国の公衆衛生上・医療上の緊急の課題であり、昨年 9 月には政府内に HTLV-1 感染症に対する総合的対策を行うための特命チームが設置された。

B-cell leukemia 3 (Bcl-3) は I $\kappa$ B ファミリーに属する蛋白質であり、NF- $\kappa$ B と直接結合することでその転写活性化を調節し細胞機能を制御することが明らかになっている。最近数年間の研究報告で、Bcl-3 の恒常的発現により p53 を介するアポトーシスに対する抵抗性が誘導されること、Bcl-3 が細胞周期の G1 期から S 期への移行を促進するサイクリン D1 の発現を誘導すること、NF- $\kappa$ B の活

性化により炎症性サイトカイン産生を制御することなど、Bcl-3 が細胞の癌化と炎症形成の双方に密接に関与していることが次々に明らかになった。このことは、HTLV-1 感染細胞内において Bcl-3 による適切な NF- $\kappa$ B の活性制御が破綻することにより、T 細胞の癌化促進による ATL の発症や、免疫細胞の異常な活性化による HAM の発症が誘導される可能性を示唆している。

一方、OX40 は TNF 受容体型分子群に属する 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ことが報告されている。興味深いことに近年マウスの系で、過剰な OX40-OX40L 結合が制御性 T 細胞 (Treg) の抑制機能を破綻させることで自己免疫疾患を惹起することが報告された。実際に様々な自己免疫疾患のモデルマウスにおいて、OX40-OX40L 結合の遮断により発症抑制、病勢の軽減が認められている。脳神経系の自己免疫疾患である多発性硬化症の動物モデルである実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) においても、OX40L 欠損マウスでは EAE の発症が抑制されること、発症時の脊髄病変部位において OX40 がミエリン塩基性蛋白質特異的 T 細胞に強発現していることが報告されている。これらのことは、HTLV-1 感染者の一部に発症する自己免疫疾患様慢性炎症性疾患である HAM の病態形成にも OX40 が関与する可能性を示している。実際、同じ HTLV-1 関連疾患である ATL においては、ATL 細胞のほとんどが OX40 陽性であること、ATL 細胞上の OX40 と血管内皮細胞上に発現した OX40L が接着分子として機能して ATL 細胞の血管内皮細胞への接着、血管外への浸潤に関

与することが報告されている。このことは、OX40がHAM患者においてもリンパ球の異常活性化や炎症細胞の脊髄浸潤に関与する可能性を示唆しているが、OX40のHTLV-1関連炎症性疾患の病態形成における意義を解析した報告は過去にない。

本研究では、HTLV-1の転写活性化因子Taxの標的遺伝子を網羅的に抽出、解析することで同定したTax標的遺伝子のうち、特にBcl-3とOX40に着目してHTLV-1感染細胞増殖やHAM病態との関連について解析した。

## B. 研究方法

HTLV-1感染及び非感染T細胞株におけるBcl-3 mRNA及び蛋白発現量をRT-PCR及びWestern Blottingで比較した。short hairpin RNA (shRNA)により、Bcl-3蛋白発現を抑制したHTLV-1感染T細胞株と、コントロールshRNAを発現する同じT細胞株間で細胞増殖効率を比較した。フォスファチジルイノシトール三リン酸リン酸化酵素(PI3K)-Aktシグナル伝達経路の活性化がBcl-3蛋白分解を抑制することが報告されているため、PI3キナーゼ阻害剤LY294002と蛋白合成阻害剤シクロヘキシミド(CHX)で処理したHTLV-1感染細胞株MT-2と、CHX単独で処理したMT-2との間でBcl-3蛋白発現量を比較して、この経路が活性化されているか否かを検討した。また、Tax発現の有無がBcl-3蛋白分解抑制系に影響するかどうかを検討するため、Taxを発現しないMT-1細胞株とTaxを発現するMT-2細胞株とを、Bcl-3蛋白分解を促進するキナーゼ(GSK-3 $\alpha$ , $\beta$ )に対する阻害剤である塩化リチウム(LiCl)で処理後、経時的なBcl-3蛋白発現量の変化を比較した。さらに、免疫沈降法を用いてTax-Bcl-3蛋白間結合の有無を検討した。

一方、HTLV-1感染、非感染T細胞株におけるOX40, OX40L(=gp34)蛋白の発現量を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を培養系に添加してHTLV-1感染細胞に対する効果を調べた。

(倫理面への配慮)

本研究は検体を提供して頂く各施設および琉球大学医学部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取した検体のみを用い、完全に匿名化した後に行った。

## C. 研究結果

Bcl-3は検討したHTLV-1感染T細胞株全て

において、非感染T細胞株と比較してmRNA・蛋白ともに恒常的に高発現していた(図1)。shRNAによりBcl-3発現を抑制したHTLV-1感染T細胞の細胞増殖効率は、親株及びコントロール細胞株と比較して著明に低下した(図2)。PI3K-Akt経路活性化によるBcl-3蛋白分解抑制の有無を検討するため、HTLV-1感染T細胞MT-2にCHX単独、CHXとPI3K阻害剤LY294002、CHXと20Sプロテアソーム阻害剤MG132をそれぞれ添加培養し、6時間経過後のBcl-3蛋白発現量を比較したところ、CHXとPI3K阻害剤で処理した細胞では、CHX単独処理の細胞と比較してBcl-3蛋白発現レベルが有意に低下した(図3A)。この作用がTaxの有無により変化するかどうかを検討するため、MT-2とTaxを発現しないHTLV-1感染T細胞であるMT-1において、LiClによりGSK-3を直接阻害することでBcl-3蛋白分解を抑制し、Bcl-3蛋白蓄積レベルを比較した。LiCl処理によって、Taxを発現していないMT-1細胞では経時的にBcl-3蛋白が蓄積されたが、Taxを発現しているMT-2細胞ではほとんど変化がなかった(図3B)。免疫沈降法により、TaxがBcl-3蛋白と細胞内で直接結合していることが明らかになった(図4)。

OX40は既報の通りTaxを発現するHTLV-1感染T細胞株に高発現していた(図5)。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(図6)。HAM患者のPBMCを16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(図7)。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、コントロール抗体を添加した場合と比較して有意にTax陽性細胞が減少した(図8)。培養前後でCD4陽性T細胞を分離してゲノムDNAを抽出しHTLV-1プロウイルス量を測定したところ培養後に有意な低下が認められた。(図9)。

## D. 考察

PI3K-Aktシグナル伝達経路を阻害したHTLV-1感染T細胞株でBcl-3蛋白量が有意に低下したことから、Bcl-3の高発現は既報のTaxによるBcl-3の転写活性化だけでなく、PI3K-Akt経路の活性化によるBcl-3蛋白の分解抑制機構によっても維持されていることが明らかになった。また、この経路の活性化をPI3K阻害剤により阻害することでHTLV-1感染T細胞株における恒常的なBcl-3の高発現を抑制できることが可能であったこと、shRNAによりBcl-3蛋白の高発現を抑制することによってもHTLV-1感染T細胞の異常増殖を制御可能であったことから、Bcl-3を標的としたこれらの方法が、将来ATL及びHAMにおけるHTLV-1感染細胞の異常増殖を抑制する有望な治療法と