

なりうる可能性が示唆された。

一方、OX40がHTLV-1感染細胞株のみならず、実際の感染者のPBMCにおいてもTaxによって選択的に発現誘導されることも明らかになった。興味深いことに、OX40は未培養のHAM患者PBMCには発現が認められないにもかかわらず、脊髄病変局所浸潤細胞には高発現していた。近年、HAM患者では末梢からHTLV-1感染リンパ球とHTLV-1特異的CTLが脊髄に浸潤してHTLV-1特異的炎症反応を起こすという報告もあり、局所においてTaxの作用により誘導されたOX40がHAMの病態形成に積極的な役割を果たしている可能性がある。また、我々は以前HAM患者ではACと比較してHTLV-1特異的CTLの機能が低下していることを報告しており、この現象とOX40がTregの機能に及ぼす影響との関連についても興味を持たれる。本研究ではHAM患者のPBMCをin vitroで16時間培養することでHTLV-1感染細胞表面にOX40が発現誘導されることも示したが、この系に自家製の抗OX40モノクローナル抗体を添加するとHTLV-1感染細胞を選択的に除去可能であった。OX40がATL細胞上に発現しているという報告もあり、OX40はHTLV-1関連疾患(ATL, HAM)の有望な治療標的分子となりうる可能性がある。我々はすでに、抗OX40モノクローナル抗体が抗体依存性細胞傷害(ADCC)によりHTLV-1感染細胞を除去していることを示すpreliminaryな実験結果を得ており、その作用機序についても研究を進めている。

#### E. 結論

HTLV-1の転写活性化因子Taxの標的遺伝子を網羅的に抽出、解析して同定したBcl-3とOX40に着目し、HTLV-1感染細胞増殖やHAM病態への関与について解析した。いずれの分子もHTLV-1関連疾患の有望な治療標的となりうる可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報 特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- [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) oncoprotein 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 immunodeficiency 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  $\beta$ -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.

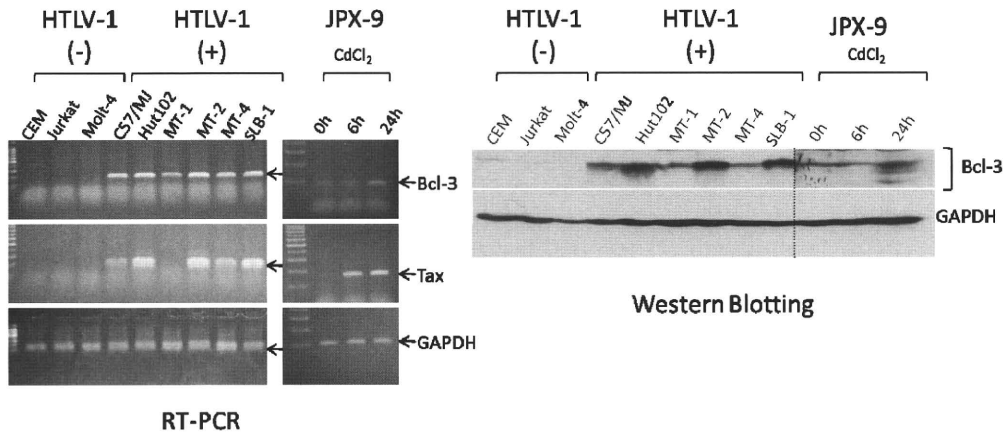
##### 2. 学会発表

- [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 NeuroVirology. 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

#### H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む。)

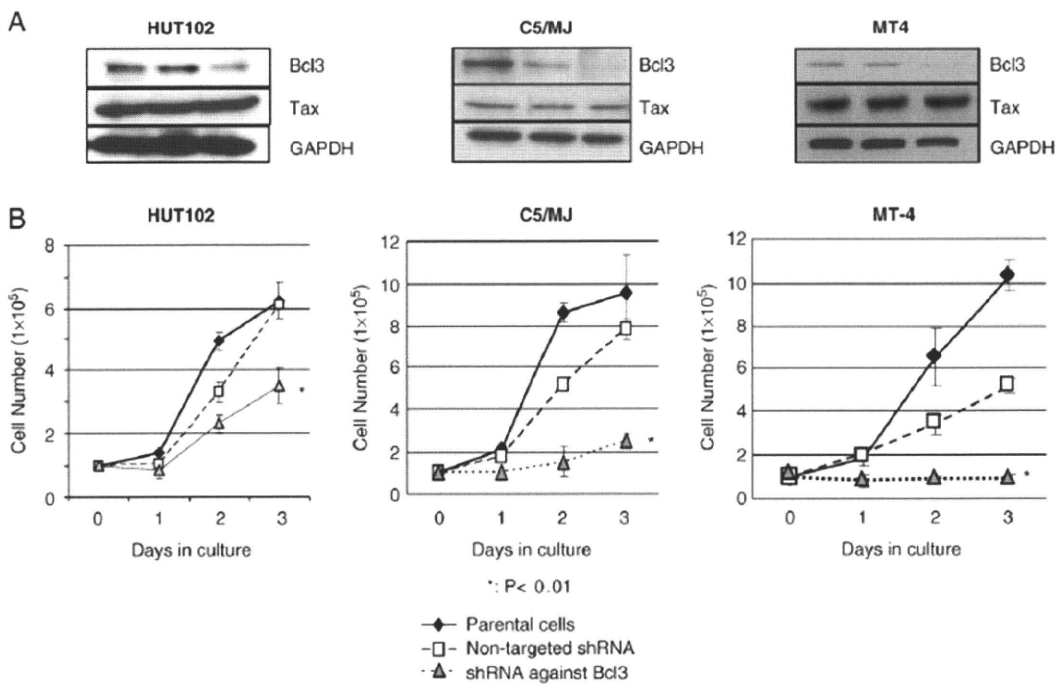
1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

図 1: HTLV-1 感染 T 細胞株における Bcl-3 mRNA および Bcl-3 蛋白の恒常的な高発現



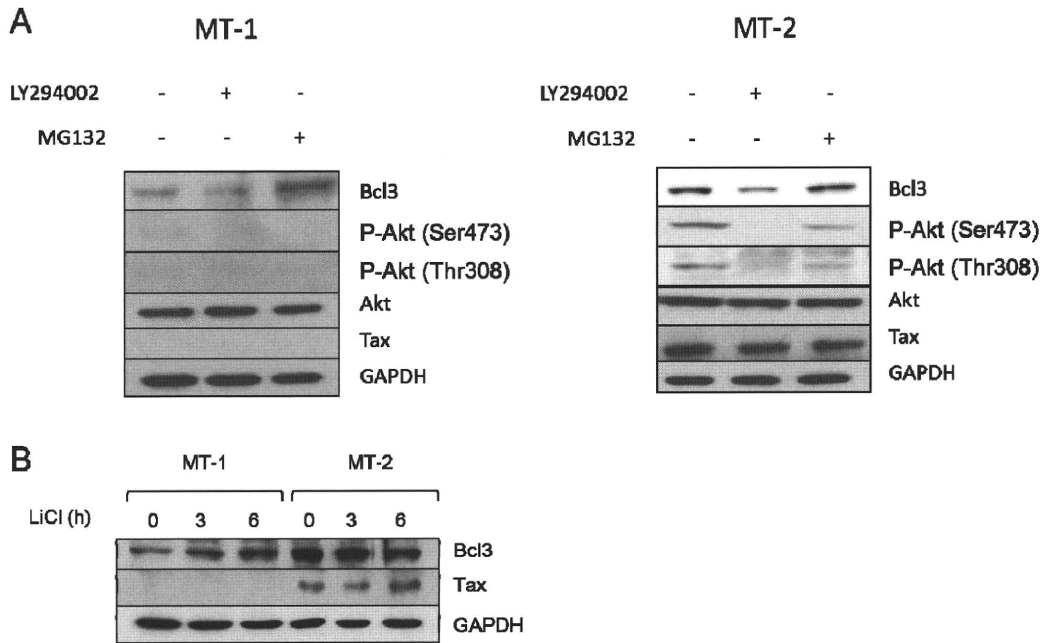
HTLV-1 感染及び非感染 T 細胞株における bcl-3 mRNA 及び蛋白発現量を RT-PCR 及び Western Blotting で比較した。Bcl-3 は検討した HTLV-1 感染 T 細胞株全てにおいて、非感染 T 細胞株と比較して mRNA・蛋白ともに恒常的に高発現していた。

図 2: HTLV-1 感染 T 細胞株における Bcl-3 高発現の細胞増殖への影響



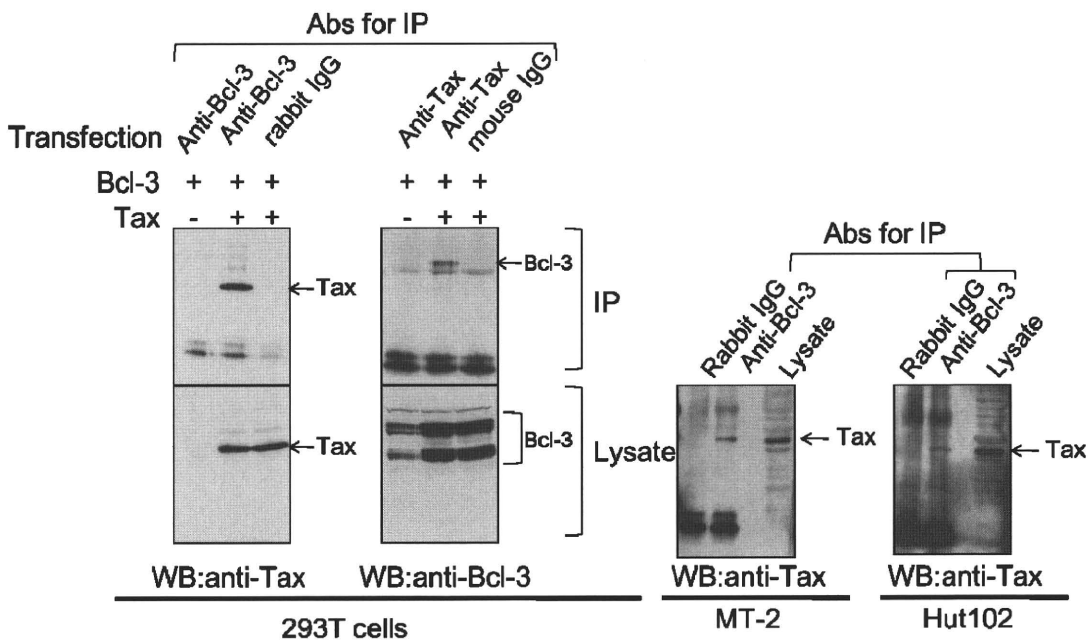
short hairpin RNA (shRNA)により、Bcl-3 蛋白発現を抑制した HTLV-1 感染 T 細胞株と、コントロール shRNA を発現する同じ T 細胞株間で増殖効率を比較した。shRNA により Bcl-3 発現を抑制した各 HTLV-1 感染 T 細胞の細胞増殖効率は、親株及びコントロール細胞株と比較して著明に低下した。

図 3: HTLV-1 感染 T 細胞株における Bcl-3 蛋白分解抑制機構の検討



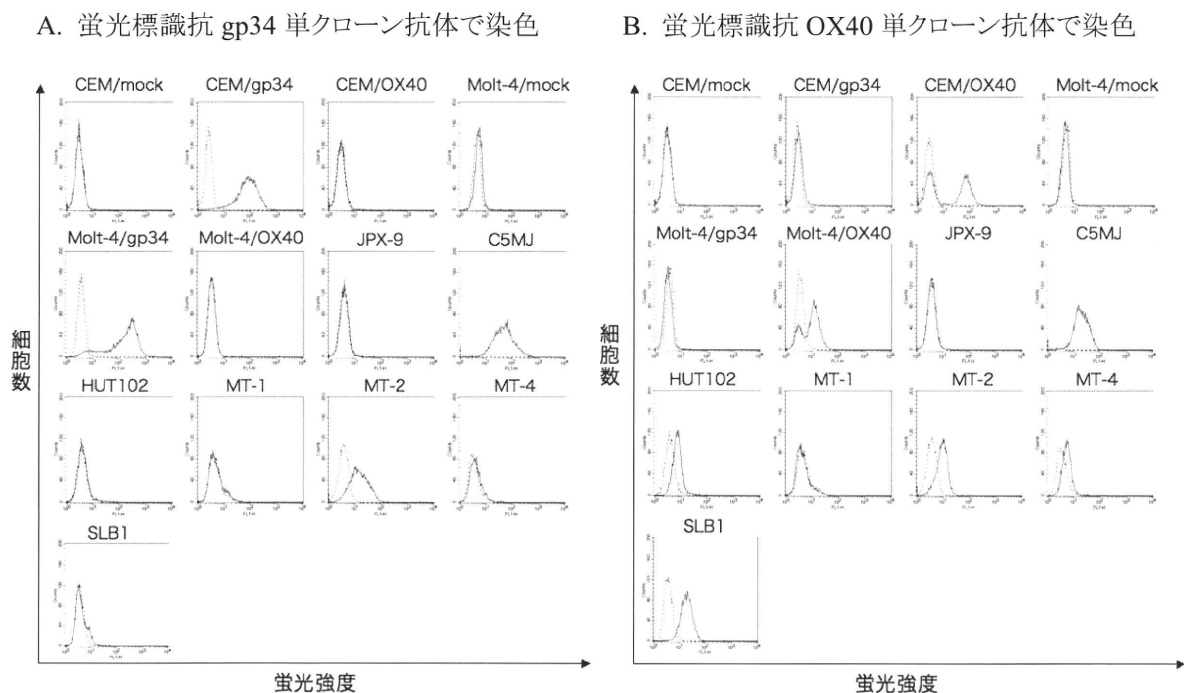
A: CHX と PI3K 阻害剤で処理した細胞では、CHX 単独処理の細胞と比較して Bcl-3 発現レベルが低下したことから、Bcl-3 蛋白分解抑制に PI3K-Akt 経路が関与していることが示唆された。Tax 蛋白を発現しない MT-1 細胞では PI3K 阻害剤による Bcl-3 の発現低下は認められなかった。B: 塩化リチウム(LiCl)により GSK-3 を直接阻害することで Bcl-3 蛋白分解を抑制し、Bcl-3 蛋白蓄積レベルを比較した。LiCl 処理によって Tax を発現していない MT-1 細胞では経時的に Bcl-3 蛋白が蓄積されたが、Tax を発現している MT-2 細胞ではほとんど変化がなかった。MT-2 細胞では PI3K-Akt 経路が恒常的に活性化されているため Bcl-3 蛋白が分解抑制されており、LiCl の効果が認められないためと考えられる。

図 4: HTLV-1 Tax と Bcl-3 蛋白との蛋白間結合



293T 細胞に Tax 及び Bcl-3 を共発現し、抗 Bcl-3 及び抗 Tax 抗体で免疫沈降したときのみ、Tax 及び Bcl-3 が検出できた。また、HTLV-1 感染細胞株 (MT-2, HUT102) においても同様に抗 Bcl-3 抗体による免疫沈降で Tax を検出できた。Bcl-3 と Tax 蛋白は細胞内で直接結合することが明らかになった。

図 5: HTLV-1 感染 T 細胞株における OX40 および OX40L (= gp34) の高発現

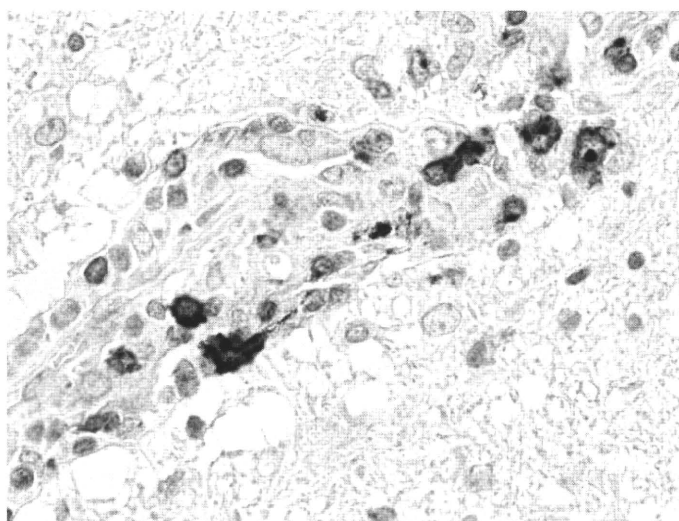


CEM/gp34, CEM/OX40, Molt-4/gp34, Molt-4/OX40: CEM または Molt-4 を親株とした gp34 または OX40 の安定発現細胞株 (stable transformant) - 陽性コントロールとして使用。

破線: Control 抗体 実線: 抗 OX40 or OX40L 抗体

OX40 は HTLV-1 感染細胞株のうち C5MJ, HUT102, MT-2, MT-4, SLB1 に、OX40L は C5MJ, MT-2 に高発現していた。

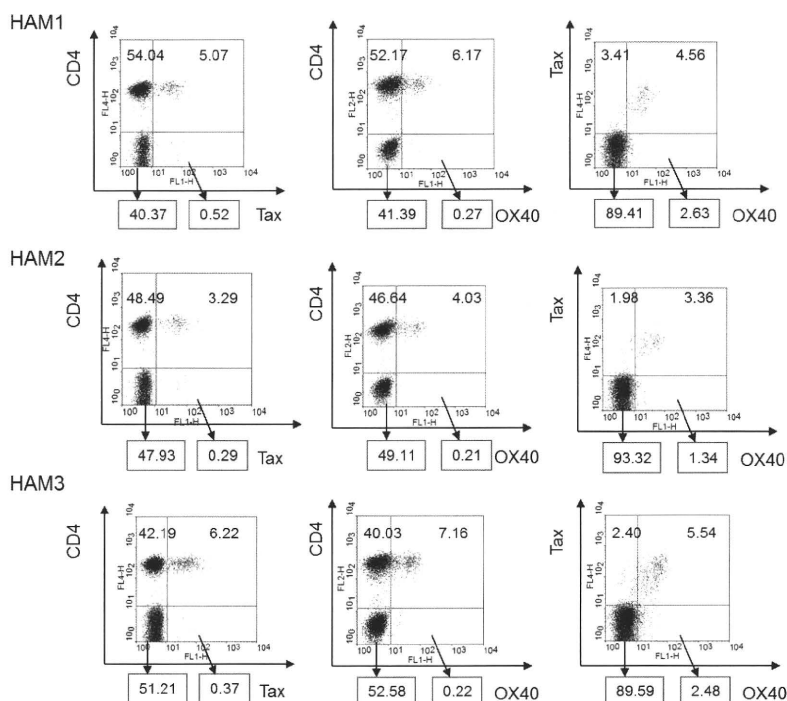
図 6: HAM 患者脊髄病変・血管周囲の浸潤細胞における OX40 の強発現



OX40 は未培養の HAM 患者 PBMC には発現が認められなかった (data not shown) が、HAM 患者剖検脊髄標本の免疫組織染色では病変局所浸潤細胞に強発現していた。

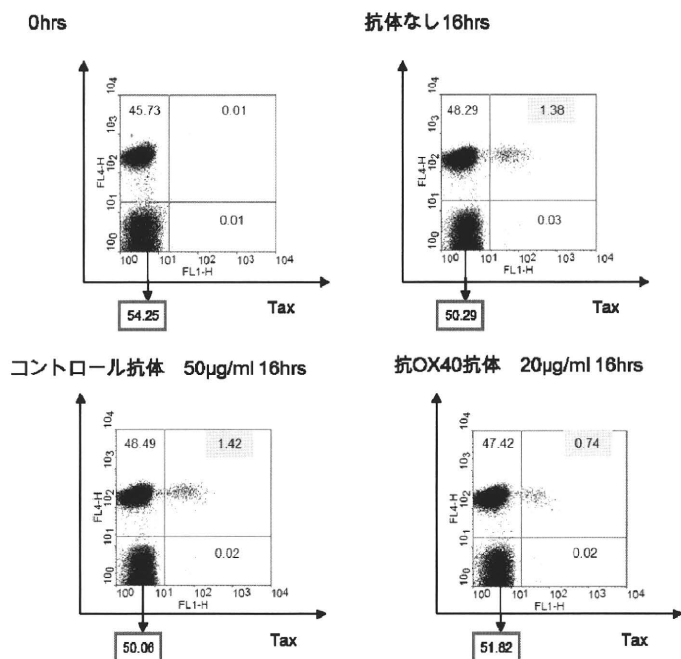


図 7: HTLV-1 感染 CD4 陽性 T 細胞における OX40 の発現誘導



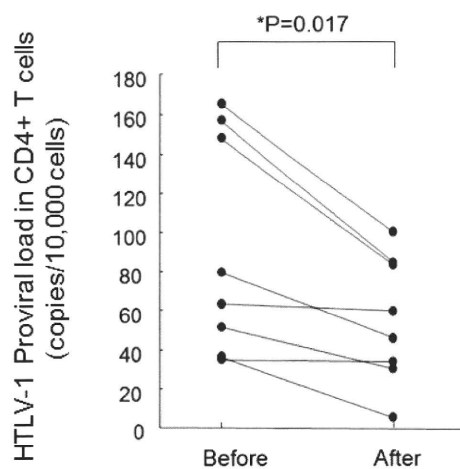
HAM 患者の新鮮 PBMC に OX40 および OX40L の発現は認められなかったが、in vitro で 16 時間培養して Tax 蛋白を発現誘導すると、OX40 は JPX9 細胞と同様に HAM 患者 PBMC の Tax 陽性細胞特異的に発現誘導された。

図 8: HAM 患者 PBMC 培養系における抗 OX40 抗体による Tax 発現細胞の減少



HAM 患者の PBMC を 16 時間培養すると、主に CD4 陽性 T リンパ球に Tax 蛋白発現が誘導される。この系に抗 OX40 モノクローナル抗体を添加すると、コントロール抗体 (抗 HIV-1 p24 抗体) と比較して CD4+Tax+細胞 (HTLV-1 感染細胞) が有意に減少した。

図 9: HAM 患者 PBMC 短時間培養系における抗 OX40 抗体による感染細胞数の減少



HAM 患者 PBMC を 16 時間培養し、その前後で CD4+T 細胞を分離して HTLV-1 プロウイルス量を Real Time PCR 法で定量した。\*: Wilcoxon signed-ranks test で検定。

## 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

研究分担者 高嶋 博 鹿児島大学医歯学総合研究科 神経内科・老年病学 教授

共同研究者 松浦英治、渡邊 修 (鹿児島大学医歯学総合研究科 神経内科・老年病学)

### 研究要旨

HTLV-I 関連脊髄症の神経病理では経過とともに浸潤する CD4 陽性細胞が減少するものの多数の CD8 陽性細胞が浸潤しつづけることが知られている。一方、活性化したマクロファージをはじめとする貪食系単核球細胞が HAM の病巣に多数浸潤していることも病理学的に指摘されてきたが、これら貪食系単核球細胞の HAM の病態への関与はいまだはっきりしていない。近年単球や樹上細胞などの貪食系単核球が生体内でも HTLV-I に一定割合感染していることが報告されてきている。今回われわれは HAM 患者の末梢血単核細胞を用いて、細胞障害性 T リンパ球が障害を与えている細胞の種類を同定することで CD14 陽性細胞が細胞障害性 T リンパ球のターゲットになっているか確認し、さらにその CD14 陽性細胞が HTLV-I 蛋白を発現しているか検討する。

### A. 研究目的

HTLV-I 関連脊髄症の神経病理では経過とともに浸潤する CD4 陽性細胞が減少するものの多数の CD8 陽性細胞が浸潤しつづけることが知られている。一方、活性化したマクロファージをはじめとする貪食系単核球細胞が HAM の病巣に多数浸潤していることも病理学的に指摘されてきたが、これら貪食系単核球細胞の HAM の病態への関与はいまだはっきりしていない。近年単球や樹上細胞などの貪食系単核球が生体内でも HTLV-I に一定割合感染していることが報告されてきている。今回われわれは HAM 患者の末梢血単核細胞を用いて、細胞障害性 T リンパ球が障害を与えている細胞の種類を同定し、HTLV-I 蛋白を発現している CD14 陽性細胞が細胞障害性 T リンパ球のターゲットになっているか検討する。

### B. 研究方法

HTLV-I に感染している患者から得られた

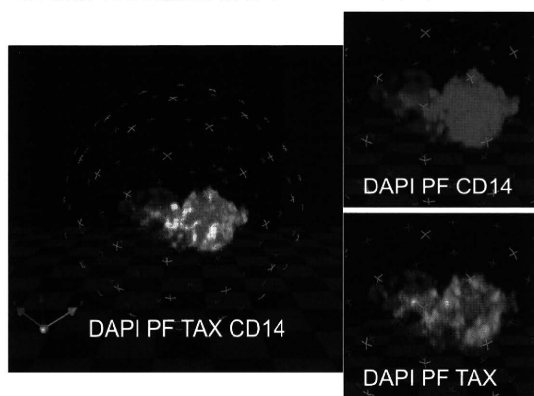
PBMC を短時間培養し、CTL がコンタクトしている細胞の種類を confocal laser scanning microscope を用いて決定した。CTL がコンタクトしている細胞の同定は、CTL がコンタクトしている細胞との接触面にパーフォリンを集積させている場合に、同細胞の phenotype を決定した。CTL とコンタクトしている 50 細胞を観察し、CD4 陽性細胞の割合と CD14 陽性細胞の割合を計測した。PBMC 中にたくさん存在する細胞は当然 CTL とコンタクトしやすいことを考慮するために、同じ条件で培養した PBMC 中の CD4 陽性細胞、CD14 陽性細胞の割合を同時にフローサイトメータ (FACS) で測定し、先に計測した割合をそれぞれ FACS で測定したそれぞれの PBMC 中の割合で除することにより、補正値を算出した。また、蛍光観察する際にコンタクトしている細胞の感染を確認するために HTLV-I tax での蛍光染色を同時に施

した。

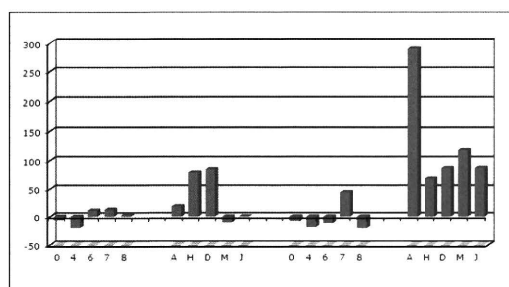
### C. 研究結果

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いることが明らかになった。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おり、同時に培養した PBMC 中の CD4 陽性あるいは CD14 陽性細胞の HTLV-I tax 陽性率と比べても著しく高いことは、CTL と細胞のコンタクトが合目的的（障害のターゲット）であることを示唆していた。

Tax 発現 CD14 陽性細胞と CTL のコンタクト



CTL が CD4+, CD14+ 細胞とコンタクトする割合



CD4(ND) CD4(HAM) CD14(ND) CD14(HAM)

### D. 考察

健常者では CTL のコンタクトしている CD4+細胞や CD14+細胞の割合は PBMC 中における同細胞の割合とかわらず、選択的にコンタクトしてはいないことが確認さ

れたのに対して HAM 患者においては CTL は CD4+細胞に対してより高頻度でコンタクトしていることが認められ、HTLV-I が CD4+細胞に感染する事実に相応する結果であった。しかし、HAM においてはわれわれが予想した以上に CD4+細胞よりも CD14+細胞と CTL は著しく高頻度にコンタクトしており、これらの細胞は HTLV-I Tax 蛋白を発現していた。培養後の CD14+細胞が減少していることから、CTL はこの CD14+細胞と interact するのみならずターゲットとしてコンタクトしている可能性も示唆され、HAM の発症機序に CD14+細胞の関与が示唆された。

### E. 結語

HAM の発症病理は、HTLV-I に感染した CD4 リンパ球に対する CTL の免疫反応が考えられてきたが、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。

### F. 文献

1. Jones KS, Petrow-Sadowski C et al. Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells. *Nature Medicine* 2008 Apr;14(4):429-36
2. Enose-Akahata Y, Oh U, Grant C, Jacobson S. Retrovirally induced CTL degranulation mediated by IL-15 expression and infection of mononuclear phagocytes in patients with HTLV-I-associated neurologic disease. *Blood* 2008 Sep 15;112(6):2400-10

### G. 研究発表

なし

### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## 研究要旨

Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I)へのヒト細胞の感受性を決定する因子としてヘパラン硫酸プロテオグリカン(HPG)を同定した。今後は、HTLV-I 感染におけるヘパラン硫酸の必要性や関与するヘパラン硫酸の特異的糖鎖構造についての検討が必要である。

### A. 研究目的

Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I)は、成人 T 細胞白血病の原因ウイルスであり、またこのウイルス感染により、中枢神経系の錐体路障害、痙性対麻痺などの神経症状 (HTLV-I-associated myelopathy (HAM), tropical spastic paraparesis (TSP)) が起こることが知られている。これまでに行われてきた HTLV-I の研究においては、その極端に低い安定性と感染性のために、他のウイルス研究で行われるような細胞を含まないウイルス材料、無細胞性ウイルスを用いた培養細胞感染実験が非常に困難であった。そのことが、受容体(レセプター)などの感染性に重要な役割を果たす因子の同定を困難にしていた。我々は HTLV-I の無細胞性ウイルス感染系として GFP (green fluorescent protein)遺伝子組み換えウシ水疱性口内炎ウイルス(VSV)と HTLV-I との間で HTLV-I の膜蛋白を持つ高力価のシュードタイプウイルス(VSVΔG\*(HTLV-I))を作製し、GFP 遺伝子の働きによって VSVΔG\*(HTLV-I) 感染細胞が緑色に発色し、HTLV-I の感染の程度を定量的に観察する事ができる系を確立した。これまで VSVΔG\*(HTLV-I) の感染実験系を用いて HTLV-I レセプターを含む、感染に必要な細胞性因子の同定し、その結果を応用して抗 HTLV 剤の開発を行うことを目的に研究を行ってきた。

VSVΔG\*(HTLV-I) を用いて、色々の細胞の HTLV-I 感受性を検討した結果、ヒト細胞では高感受性細胞と抵抗性細胞との間に約 10,000 倍の感受性の差が観察された。そこで HTLV-I 高感受性 U251MG 細胞株由来の cDNA を発現ベクター-pMX-puro に挿入し cDNA ライブラリー

を作製し、HTLV-I 低感受性マウス及びヒト細胞株に cDNA ライブラリーを導入した。これらの細胞を VSVΔG\*(HTLV-I) の感染を指標にしてスクリーニングしたところ、高い感受性を示す細胞クローンが得られた。この細胞クローンから U251MG 由来 cDNA を分離して再び HTLV-I 低感受性ヒト細胞株に導入したところ、VSVΔG\*(HTLV-I) に高感受性となった。以上のことから我々は HTLV-I 感染の感受性を促進させる細胞性因子をコードしていると思われる cDNA を得ることができた。この cDNA がコードしていた蛋白質は、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)のコアプロテインであった。これらの結果を元に種々の細胞のプロテオグリカン並びにプロテオグリカンの持つ糖鎖(硫酸化多糖)の発現とウイルス感染について調べてきた。その結果、硫酸化多糖が HTLV-I 感染において重要な役割を持つことを明らかにすることができた。

以上のこれまでの結果をもとに HTLV-I 感染におけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの作用機序の解明とヘパラン硫酸プロテオグリカンに関連した抗 HTLV-I 剤を探索し、HAM の新規治療法の開発を目的とする。

### B. 研究方法

#### 細胞

HTLV-I 産生細胞としては、HTLV-I(コスモポリタン株 2M、メラネシア株 Mel5)産生ネコ由来腎細胞 8C を用いた。ヘパラン硫酸プロテオグリカン(シンデカン-1、-2、-4並びにグリピカン-1)の ORF をレトロウイルスベクター、pMXpuro 並びに pCXbsr にクローニングし、種々の細胞に導入

することでヘパラン硫酸プロテオグリカン発現細胞を作製した。HTLV-I 感染の標的細胞としては、Fig. 1 にあげた細胞を主に用いた。

#### HTLV-I 感染の検出 (cell-free HTLV-I 並びに VSVΔG\*(HTLV-I) pseudotype virus)

a. cell free HTLV-I の作製。HTLV-I (コスモポリタン株 2M、メラネシア株 Mel5) 産生 8C 細胞の培養上清を回収し cell free HTLV-I とした。Cell-freeHTLV-I を段階希釈したものを標的細胞に感染させ 24-30 時間後、細胞の DNA 画分を調整し、HTLV-I 特異的な PCR primer を用いて、HTLV-I DNA を検出することで Cell-freeHTLV-I の感染性を検討した。

#### b. VSVΔG\*(HTLV-I) pseudotype virus の作製。

GFP 遺伝子組換え VSV である VSVΔG\*-G を HTLV-I(コスモポリタン株 2M、メラネシア株 Mel5) 産生 8C 細胞に感染させ、感染後 15-20hr の細胞培養上清を回収した。VSVΔG\*-G の感染によるバックグラウンドをなくすため抗 VSV ヤギ血清で処理した培養上清を標的細胞に接種すると $10^6$ /ml の感染価(IU)を有しており、またこの感染性は抗 HTLV-I 血清、HTLV-I の膜タンパク質に対するモノクローナル抗体 (LAT-27)により抑えられることから抗 VSV 血清で処理したこの培養上清を VSVΔG\*(HTLV-I) pseudotype virus とした。また同様にしてウシ白血病ウイルス Bovine leukemia virus (BLV) の pseudotype virus, VSVΔG\*(BLV) pseudotype virus を VSVΔG\*(HTLV-I) pseudotype virus との比較用に作製した。以上の pseudotype virus は標的細胞に接種したのち、24hr 後、蛍光顕微鏡下で GFP 発現細胞数を計測することで標的細胞への感染性を検討した。

#### 色々の細胞のプロテオグリカン発現の検出

HTLV-I 感染感受性の異なる色々の細胞株より mRNA を回収し、RT-PCR により種々のヘパラン硫酸プロテオグリカン (シンデカン並びにグリピカン) mRNA の発現を検討した。また細胞表面のシンデカン-1並びにヘパラン硫酸の発現量を抗シンデカン-1抗体、抗ヘパラン硫酸抗体を用いて検討した。

#### HTLV-I 感染におけるヘパラン硫酸分解酵素の影響

HTLV-I 感染感受性細胞をヘパラン硫酸分解酵素であるヘパリチナーゼ-1で前処理した後、VSVΔG\*(HTLV-I) pseudotype virus、並びに対

照として VSVΔG\*(BLV) pseudotype virus または VSVΔG\*-G を接種し、ヘパラン硫酸の減少の HTLV-I 感染に対する影響を検討した。

#### HTLV-I 感染におけるヘパラン硫酸結合性蛋白質の影響

HTLV-I 感染感受性細胞をヘパラン硫酸やヘパリンと結合活性のある線維芽細胞成長因子 (FGFs)、肝細胞成長因子 (HGF) などのタンパク質で前処理した後、VSVΔG\*(HTLV-I) pseudotype virus 並びに cell-freeHTLV-I を接種し、ヘパラン硫酸結合性成長因子の HTLV-I 感染に対する影響を検討した。

### C. 研究結果

#### 色々の細胞の HTLV-I 感染における感受性

VSVΔG\*(HTLV-I) pseudotype 感染での高感受性細胞と低感受性細胞との間に約 10,000 倍の感受性の差が観察された。また HTLV-I 産生細胞株と非産生細胞株との間で干渉現象が観察され HTLV-I 産生細胞株の VSVΔG\*(HTLV-I) pseudotype 感染感受性は極端に低下していた。高感受性細胞株にはヒト由来の 293T、C8166、U251MG、ネコ由来の 8C などであり、低感受性細胞株には、ヒト由来の K562/CD4 (K4R)、Molt4、マウス由来の NIH3T3 などの細胞株であった。今回検討した細胞株マウス骨髄腫細胞株 Ba/F3 は、HTLV-I 感染に極めて抵抗性であった (Fig. 1)。

#### HTLV-I 感染に関連する細胞性因子のクローニング

HTLV-I 高感受性ヒト細胞株 U251MG の cDNA library を HTLV-I 低感受性のヒト細胞株 K4R に導入し、VSVΔG\*(HTLV-I) pseudotype 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のクローニングを行い、細胞性因子をコードしていると思われる cDNA を 2 クローン得ることができた。これらの cDNA がコードしていた蛋白質は、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) のコアプロテインであった。この結果からヘパラン硫酸プロテオグリカンの ORF を再度 HTLV-I 低感受性ヒト細胞株で発現させたところ、VSVΔG\*(HTLV-I) pseudotype virus と cell-free HTLV-I に対する感染感受性が亢進した (Figs. 2, 3, 8)。この感染感受性の亢進は HTLV-I 感染で特異的に観察され、

VSVΔG\*(BLV) pseudotype virus や VSVΔG\*-G 感染においては HTLV-I 感染の場合のような感受性の亢進は観察されず、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの効果は HTLV-I 特異的であった。しかしこれらの遺伝子をマウス細胞株に導入しても HTLV-I 感染感受性の獲得、感染感受性の亢進は観察されなかった(Fig. 2)。

#### 色々の細胞のプロテオグリカン発現の検出

HTLV-I 感染感受性の異なる色々の細胞株の mRNA より種々のヘパラン硫酸プロテオグリカン(シンデカン-1~4 並びにグリピカン-1) mRNA の発現を検討した結果、調べた細胞すべてにおいて、シンデカン-1 mRNA の発現が認められ、また細胞表面プロテオグリカンとその同族分子の mRNA は、異なる構成比で種々の細胞株に発現していることが検出できた(Fig. 3)。また細胞表面のシンデカン-1並びにヘパラン硫酸の発現量を抗シンデカン-1抗体、抗ヘパラン硫酸抗体を用いて検討した結果、シンデカン並びにグリピカンのコアプロテインを導入した HTLV-I 低感受性ヒト細胞株(K4R 並びに Molt4)ではコアプロテインの導入に伴い、細胞膜表面のヘパラン硫酸発現量の増加が見られた。HTLV-I 低感受性マウス細胞株、NIH3T3、HTLV-I 抵抗性マウス細胞株、Ba/F3 では、コアプロテインの導入に伴う、細胞膜表面のヘパラン硫酸発現量の増加は観察されなかった。

細胞膜表面のヘパラン硫酸が多く検出されるが HTLV-I pseudotype の感染の感受性がわずかである細胞(NIH3T3)や、ヘパラン硫酸の検出が少ないながらも、感染の感受性が高い細胞(293T, U251MG)が存在し、細胞の細胞表面のヘパラン硫酸の発現量と HTLV-I pseudotype の感染の感受性との間には、必ずしも相関が認められないことが明らかとなった(Fig. 4)。

#### HTLV-I 感染におけるヘパラン硫酸分解酵素の影響

VSVΔG\*(HTLV-I) pseudotype virus の感染性は HTLV-I 感染感受性細胞をヘパラン硫酸分解酵素であるヘパリチナーゼ I で前処理した場合、未処理の時と比べ、30%にまで減少した。このヘパリチナーゼ I 処理の効果は VSVΔG\*(HTLV-I) pseudotype virus にのみ観察され VSVΔG\*(BLV) pseudotype virus 並びに VSVΔG\*-G 感染では観察されなかった (Fig. 5)。

#### HTLV-I 感染におけるヘパラン硫酸結合性蛋白

#### 質の影響

VSVΔG\*(HTLV-I) pseudotype virus の感染性は HTLV-I 感染感受性細胞をヘパラン硫酸やヘパリンと結合活性のある線維芽細胞成長因子の bFGF、で前処理した場合、VSVΔG\*(HTLV-I) pseudotype virus の感染性を未処理の時と比べ、10%以下にまで減少させた。また肝細胞成長因子の HGF 処理は VSVΔG\*(HTLV-I) pseudotype virus の感染性を処理前の 40%に減少させた。これらの作用は HTLV-I 感染に特異的に観察され、VSVΔG\*(BLV) pseudotype virus や VSVΔG\*-G 感染においては感染の抑制作用は観察されなかった。一方、bFGF と同様 HS やヘパリンと結合活性のある線維芽細胞成長因子の aFGF には VSVΔG\*(HTLV-I) pseudotype virus の感染抑制効果は全く見られなかった (Fig. 6)。

#### D. 考察

今回我々は HTLV-I 高感受性ヒト細胞株 U251MG の cDNA library を HTLV-I 低感受性のヒト細胞株(K4R)に導入し、VSVΔG\*(HTLV-I) pseudotype 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思われる cDNA を 2クローン得、それぞれの塩基配列を同定した結果、これらの cDNA がコードしていた蛋白質は、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)のコアプロテインであることを明らかにできたので、本研究ではヘパラン硫酸プロテオグリカンのコアプロテインの ORF を再度 HTLV-I 低感受性ヒト細胞株で発現させ、HTLV-I に対する感受性を亢進させるか検討したところ、HTLV-I 低感受性ヒト細胞株では、シンデカン並びにグリピカン遺伝子の導入に伴い、その感染感受性の亢進が観察されたがマウス細胞への導入においてはその効果は認められないようである。またヘパラン硫酸プロテオグリカンのコアプロテインの導入に伴いヒト細胞では細胞膜表面のヘパラン硫酸発現量の増加が見られるが、HTLV-I 低感受性並びに抵抗性マウス細胞株では、コアプロテインの導入に伴う細胞膜表面のヘパラン硫酸発現量の増加は観察されなかった。また今回行った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り HTLV-I の感染感受性の低下が観察されたことから細胞膜表面のヘパラン硫酸鎖が HTLV-I 感染に重要な



役割を持つと考えられた。しかし色々の細胞を調べた結果、細胞表面のヘパラン硫酸の発現量と HTLV-I pseudotype の感染の感受性との間には、必ずしも相関が認められないことも同時に明らかとなった。

以上のことより 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る。実際、ヘパラン硫酸においてはその糖骨格は、GlcA/IdoA-GlcNAc の繰り返しであるが、結合する硫酸基の位置、数によって、理論上は 1036 通りの分子があると計算されている。これ迄に、明らかにされた数例のリガンド結合最小糖鎖構造は、互いに微妙に異なり、結合特異性の存在が示唆されている。また多くのウイルスや寄生生物は標的細胞に感染するのに細胞表面にあるヘパラン硫酸を利用しており、I 型単純ヘルペスウイルス (HSV-1) 感染においては細胞表面受容体として IdoA(2S)  $\alpha$  1-4GlcN(3S)  $\alpha$  が同定されている。今回の研究においてもヘパラン硫酸結合性線維芽細胞成長因子の bFGF では HTLV-I 感染への阻害効果がみられるが aFGF にはみられないことから HTLV-I 感染に関与する特異的糖鎖構造が存在する可能性が考えられる。

#### E. 結論

ヘパラン硫酸プロテオグリカンの発現は色々の細胞においてその発現量、構成比は異なっており、このことが標的細胞の HTLV-I 感染感受性に影響を与えていると考えられる。このことは生体内での HTLV-I の拡散の様式、HTLV-I の主要な感染経路である母子感染における感染動態を考えていく上でも重要となる可能性がある。また今後は HTLV-I 感染に関与するヘパラン硫酸の特異的糖鎖構造についての検討が必要である。HTLV-I 感染における糖鎖の具体的な役割の解明と合わせて特異的糖鎖構造を明らかにすることで HTLV-I 感染を阻害できる抗 HTLV-I 剤を開発できる可能性がある。

#### F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

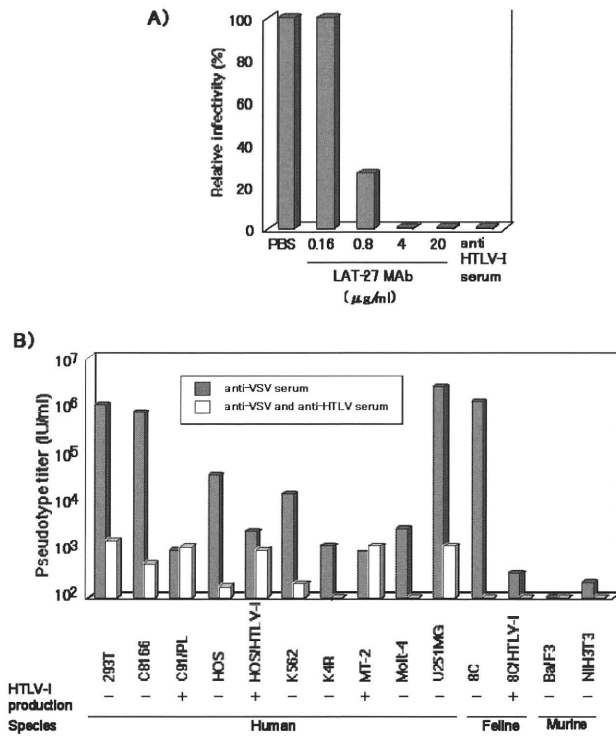


Fig. 1. Susceptibilities of various cell lines to the VSVΔG\* pseudotype.

A) Inhibitory effect of LAT-27 anti-HTLV-I MAb on HTLV-I pseudotype infection to C8166 cells. B) Titration of the VSVΔG\*(HTLV-I<sub>IMEL5</sub>) pseudotype using various cell lines.

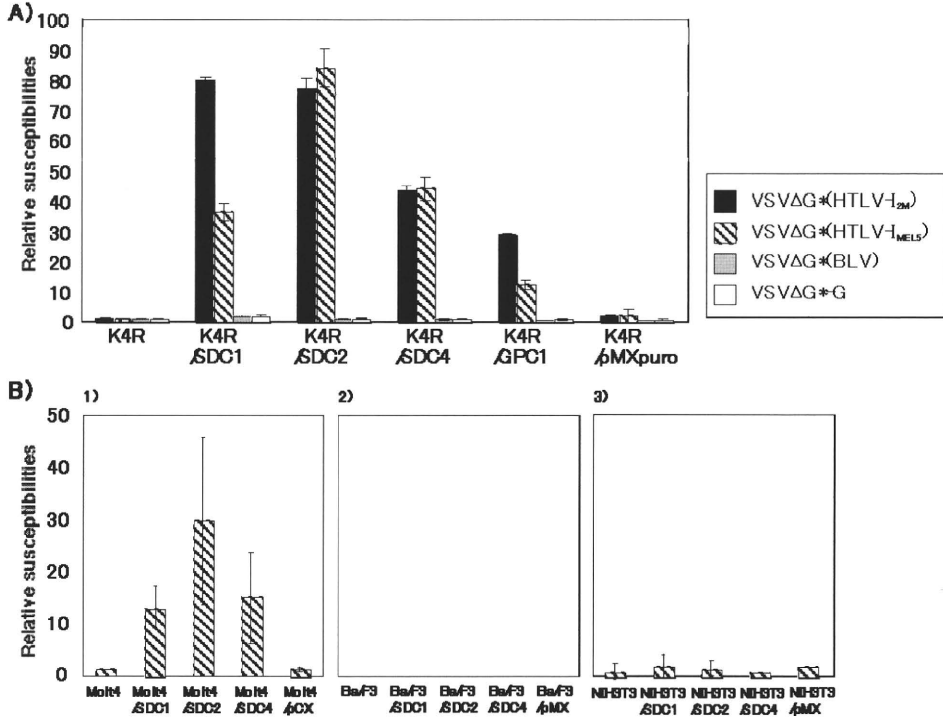


Fig. 2. VSVΔG\*(HTLV-I) pseudotypes infect SDC-transduced human cells efficiently.

A) Cells were infected with serially diluted VSVΔG\*(HTLV-I<sub>IM2M</sub>), VSVΔG\*(HTLV-I<sub>IMEL5</sub>), VSVΔG\*(BLV) or VSVΔG\*G pseudotype. B) Cells were infected with VSVΔG\*(HTLV-I<sub>IMEL5</sub>) pseudotype.

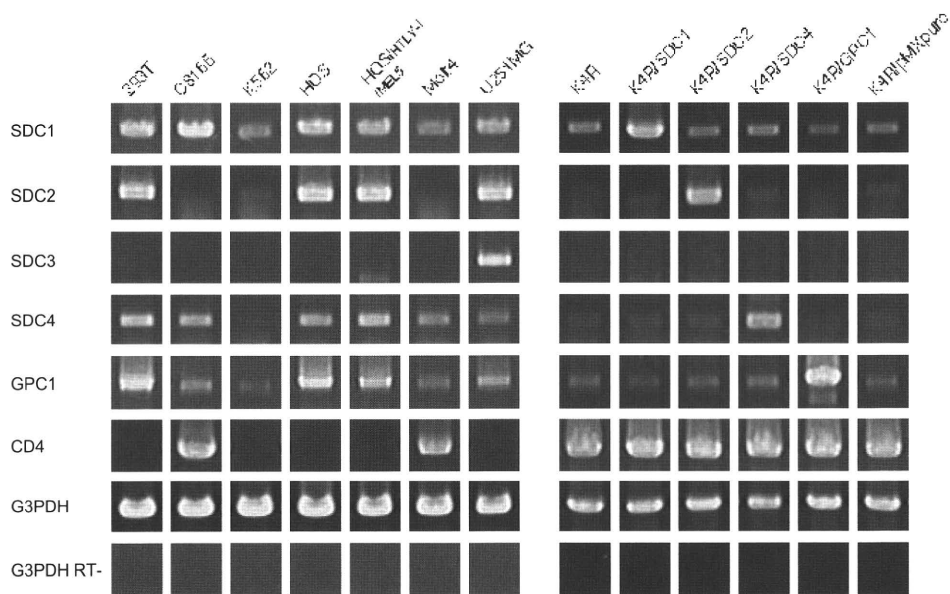


Fig. 3. Detection of SDC1, SDC2, SDC3, SDC4 and GPC1 mRNAs

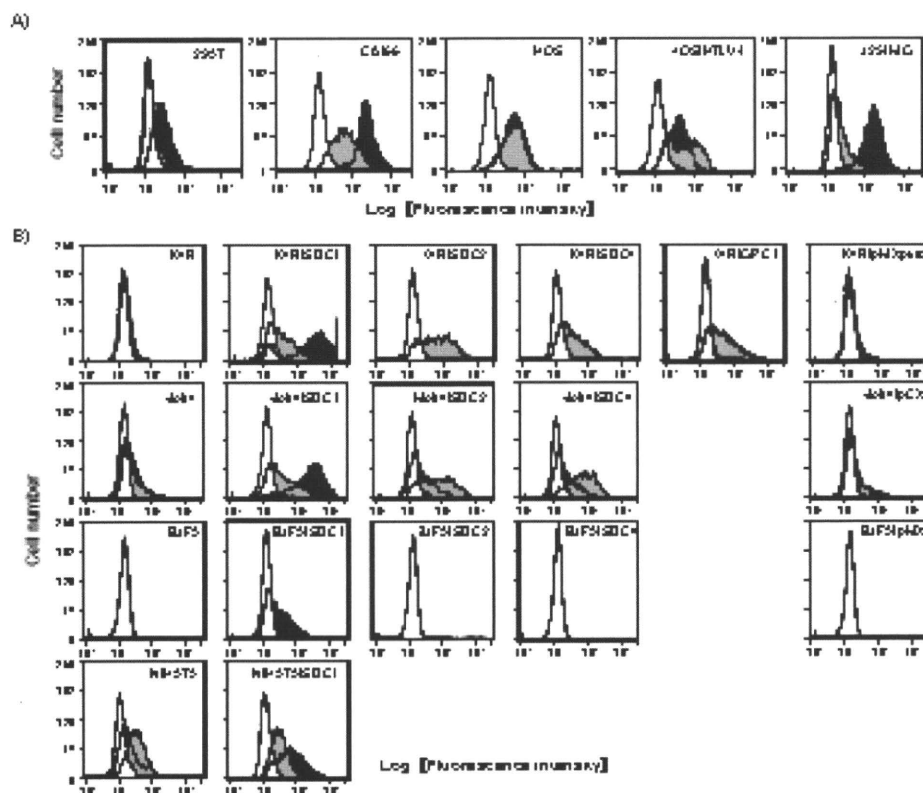
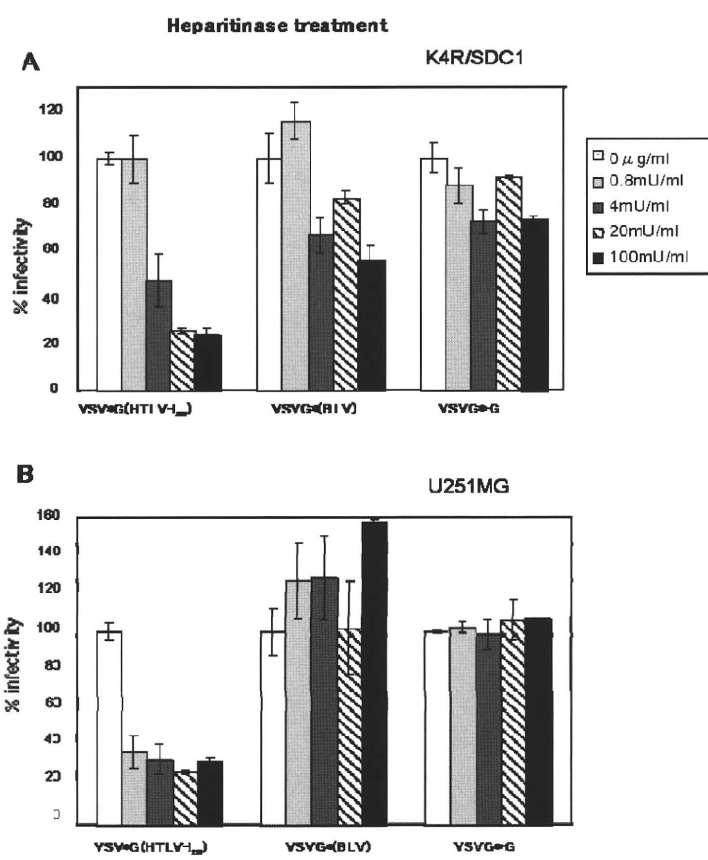
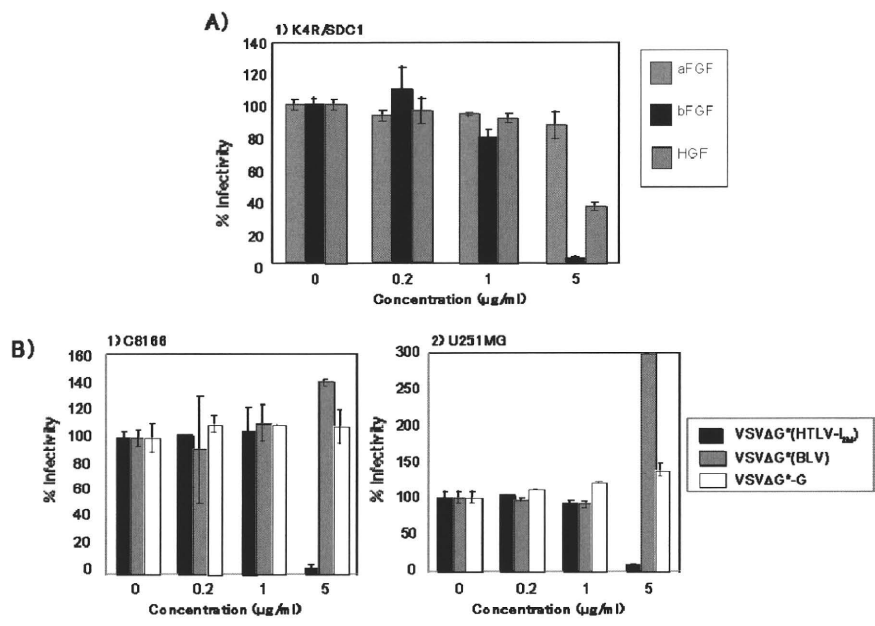


Fig. 4 Expression of cell surface SDC1 and HS in various cell lines.

The cell lines were treated with mouse MAb against SDC1 (black profile) or mouse MAb against heparan sulfate (gray profile), and then treated with FITC-conjugated anti-mouse immunoglobulin. As controls, these cells treated only with FITC-conjugated anti-mouse immunoglobulin were analyzed (white profile).



**Fig. 5 Cell surface heparansulfates were necessary for VSVΔG\*(HTLV-I<sub>2m</sub>) pseudotype entry to the target cells.**



**Fig. 6 Effect of heparan sulfate-binding growth factors on infection of the pseudotype viruses.**

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 患者末梢血 T 細胞における TSLC1 発現の解析

研究分担者 竹之内 徳博 関西医科大学 准教授

研究要旨：HAMの発症予測や疾患活動性のバイオマーカーとしては髄液ネオプテリン濃度やプロウイルス定量が現在用いられているが、臨床症状と乖離する症例もあり疾患活動性の把握は今なお困難な状況にある。近年、同じHTLV-1感染が原因であるATLにおいて、患者末梢血CD4陽性T細胞でのTSLC1の発現亢進が報告された。これを基に今回の研究では、このTSLC1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。これらのことから、TSLC1はHAMのバイオマーカーとして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 感染が原因となって引き起こされる慢性進行性脊髄疾患であるが、病態は未だ不明な点も多い。根治的な治療法はないため、発症予防と進行防止が重要であるが、一方で、感染者の大多数 (90%以上) は生涯を通じて無症状であり発症予測は極めて困難である。また、発症者の症状軽減のために用いられる INF $\alpha$  やステロイドは副作用のため長期使用が問題となっている。疾患の発症予測や活動性の評価に有用なバイオマーカーとして、現在は髄液ネオプテリン濃度や末梢血プロウイルス定量、血清 sIL-2R 濃度の測定が用いられているが、臨床症状と乖離する症例もあり度々問題となっている。故に、疾患の発症予測や活動性の評価に有用な新たなバイオマーカーの同定が求められている。

HTLV-1 は T 細胞指向性に感染するとされているが、なかでも特に CD4 陽性 T 細胞に感染することが知られている。近年、成人 T 細胞白血病 (ATL) 患者の CD4 陽性 T 細胞において、接着分子の一つである TSLC1 や、T 細胞の制御機能に関わるケモカイン受容体である CCR4 の特異的な発現亢進が報告され、ウイルス伝播や細胞の浸潤能との関連が示唆されている。ATL は HAM と同じく HTLV-1 感染が原因となって引き起こされる疾患であるため、これらの分子の発現亢進がウイルス特異的なものであるならば、

HAM においても有用なバイオマーカーとなることが期待される。よって今回の研究では、HAM 患者でもこれらの分子、特に TSLC1 についての評価を試みることにした。

B. 研究方法

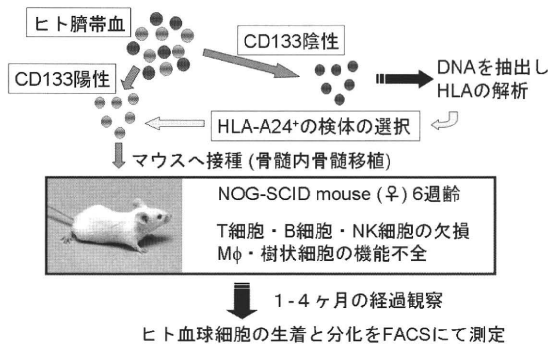
1) 血液検体

関西医科大学神経内科および京都府立医科大学神経内科の協力のもと、両病院に来院し十分な説明と書面による同意を得た HAM 患者、無徴候性 HTLV-1 感染者 (キャリア)、ATL 患者、HTLV-1 非感染者 (対照群) を対象に、臨床情報と末梢血を収集した。末梢血より血漿と末梢血単核球 (PBMC) を密度勾配遠心法にて分離し、細胞保存液 (セルバンカー: 日本全薬工業) へ懸濁し液体窒素に保存した。保存 PBMC は用い鑑み解凍・使用された。

2) 動物モデル

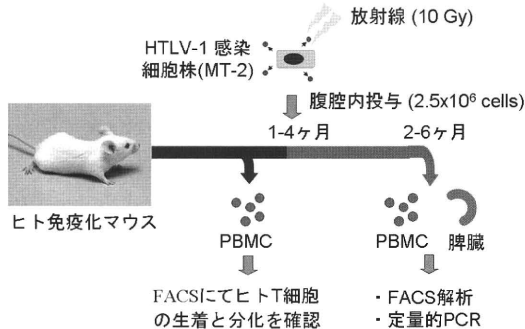
京阪臍帯血バンクより申請・審査の後提供された研究用臍帯血から、CD133 陽性細胞分離磁気ビーズを用いて造血幹細胞 (CD133 陽性細胞) を分離し、細胞保存液へ懸濁し液体窒素に保存した。CD133 陰性細胞からは DNA を抽出し、HLA の解析に用いた。精製し保存された CD133 陽性細胞の中から HLA-A24<sup>+</sup> の検体を選んで解凍し、7 週齢の NOG-SCID マウス大腿骨髄内へ移植し、1 ヶ月後に FACS にて CD45 陽性ヒト骨髄細胞の定着を確認しヒト化マウスを作製した (図 1)。

図1 ヒト免疫化マウスの作成方法



さらに3ヶ月後(骨髄移植4ヶ月後)に、作製したヒト化マウス腹腔内へ HTLV-1 感染細胞である MT-2 細胞を放射線処理後接種し、マウス体内に定着したヒトリンパ球へ HTLV-1 の感染を行った。HTLV-1 を感染させた後一定期間をおいて、その感染ヒト化マウスより末梢血や脾臓を採取し、PBMC を密度勾配遠心法にて分離した(図2)。

図2 ヒト免疫化マウスへのHTLV-1感染



### 3) 定量的 PCR

分離された PBMC からはゲノム DNA をカラム法 (PureLink Genomic DNA Mini Kit: Invitrogen) にて分離し、HTLV-1 *tax* を標的とした TaMan Probe 法による定量的 PCR (MyiQ®: Bio-Rad) を行った。Internal Control として human  $\beta$ -globin を標的とした定量的 PCR も行い、PBMC における HTLV-1 プロウイルスの定量を行った。

### 4) 定量的 RT-PCR

磁気ビーズ (CD4<sup>+</sup> T cell Isolation Kit II: MACS) を用いてヒト PBMC より CD4 陽性 T 細胞を分離し、カラム法 (RNeasy Mini Kit: QIAGEN) にて total RNA を抽出した。マウス PBMC については、CD4 陽性 T 細胞をさらに CD25 陽性細胞と陰性細胞に分離し、

カラム法にて total RNA を各々の分画から抽出した。Random hexamer を用いて Total RNA から cDNA を作成した後、HTLV-1 *tax* と *TSLC1* を標的としたサイバークリーン法 (SsoFast EvaGreen Supermix: Bio-Rad) による定量的 RT-PCR (MyiQ®: Bio-Rad) を行った。Internal Control として *HPRT* を標的とした定量的 RT-PCR も行い、各細胞分画における HTLV-1 *tax* mRNA 及び *TSLC1* mRNA の発現量を測定した。

### 5) FACS

蛍光標識された各種抗体 (抗ヒト CD4、抗ヒト CD8、抗ヒト CD25、抗ヒト CCR4、抗ヒト TSLC1) を用いてフローサイトメトリー (BD FACSCanto™ II: BD) を行い、PBMC のフェノタイプを解析した。

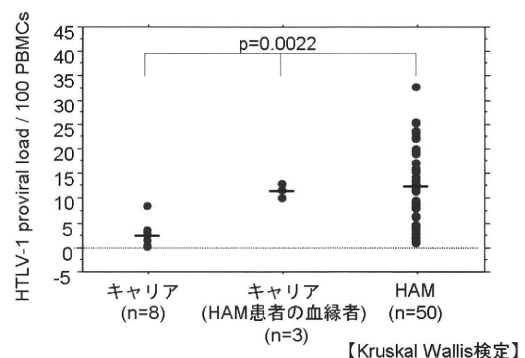
(倫理面への配慮)

HAM 患者及び HTLV-1 キャリアよりの臨床検体採取は、関西医科大学医学倫理委員会のガイドラインに則り十分なインフォームドコンセントのもとに行われた。同意取得に当たっては、本学及び診療機関における倫理委員会の承認を受けた同意説明文書を用いて、担当医師から研究の目的、方法、プライバシーに関する遵守事項、被験者の人権保護など必要な事項について十分に説明し、被験者の自由意思による同意を文書で得た。提供された検体は、連結可能匿名化を行い被験者のプライバシー保護を厳重に図られた。動物実験については、関西医科大学動物実験委員会に実験計画を申請し、審査の後承認うけた。

### C. 研究結果

HAM 患者ではキャリアと比べて、HTLV-1 プロウイルス量は有意に高値であった(図3)。

図3 PBMCでのHTLV-1プロウイルス量



HAM 患者 CD4 陽性 T 細胞及び CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞における CCR4 と TSLC1 の陽性率は、HTLV-1 プロウイルス量と有意な正の相関を示した (図 4-5)。一方で、HAM 患者において、CCR4 は大部分の CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞で陽性 (42±14%) であったが、TSLC1 は一部の CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞でのみ陽性 (17±9%) であった (図 5-6)。

図 4 CD4陽性T細胞におけるTSLC1陽性率とHTLV-1プロウイルス量

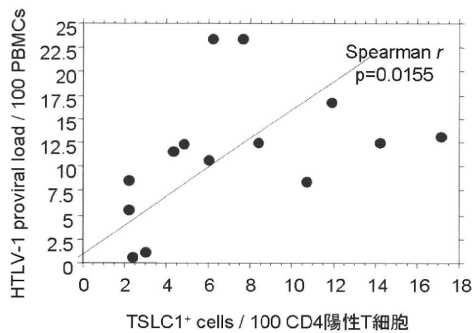


図 5 CD4陽性CD25陽性T細胞におけるTSLC1陽性率とHTLV-1プロウイルス量

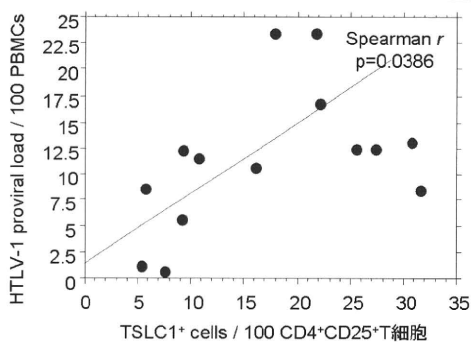
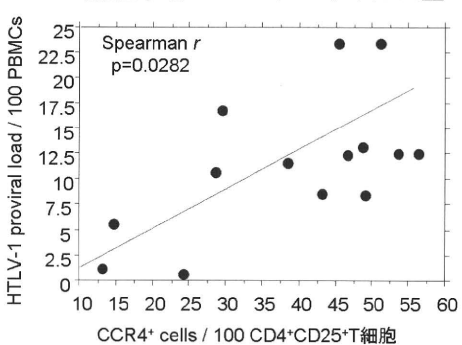


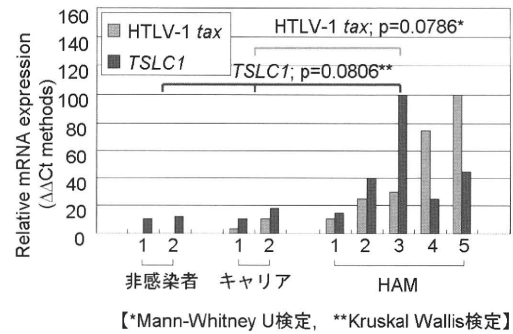
図 6 CD4陽性CD25陽性T細胞におけるCCR4陽性率とHTLV-1プロウイルス量



HAM 患者 CD4 陽性 T 細胞では、TSLC1 mRNA 及び HTLV-1 tax mRNA の発現量は共に高い傾向にあった。一方で、TSLC1 と

tax mRNA の発現量と間には直接的な相関は無かった (図 7)。

図 7 CD4陽性T細胞におけるTSLC1及びHTLV-1 tax mRNA発現量



マウス PBMC においては、他の分画に比べて CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞の HTLV-1 感染率 (プロウイルス量) が最も高く、TSLC1 mRNA 発現も高かった (図 8-9)。一方で、HTLV-1 tax mRNA の発現量は CD4 陽性 CD25 陰性 T 細胞で最も高く (図 10)、TSLC1 mRNA と tax mRNA の発現量と間には直接的な相関は無かった。

図 8 モデルマウスPBMCの各分画におけるHTLV-1プロウイルス量

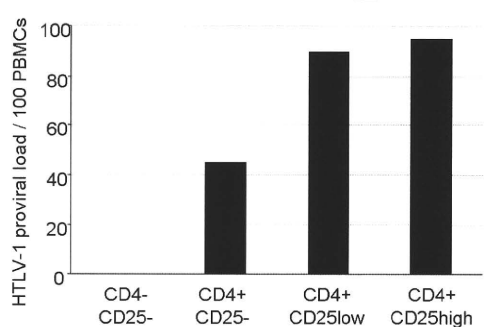


図 9 モデルマウスPBMCの各分画におけるTSLC1 mRNA発現量

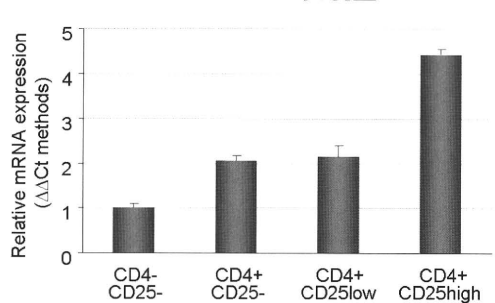
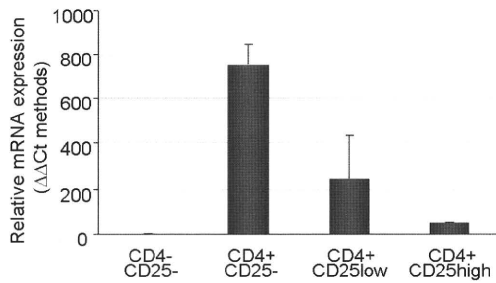


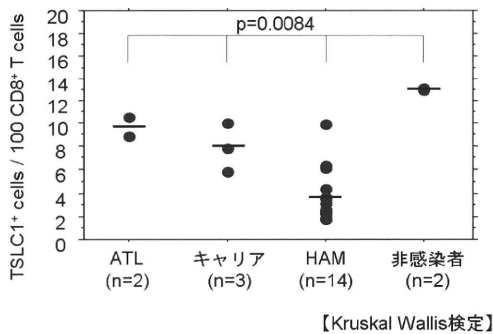


図 10 モデルマウスPBMCの各分画における HTLV-1 *tax* mRNA発現量



CD8 陽性 T 細胞においては、CCR4 の陽性細胞率は各群において有意差はなかったが (data not shown)、TSLC1 の陽性細胞率は HTLV-1 非感染者 ( $13 \pm 0.9\%$ ) やキャリア ( $7.9 \pm 2.1\%$ )、ATL 患者 ( $9.7 \pm 0.8\%$ ) と比較して HAM 患者 ( $3.8 \pm 2.4\%$ ) では有意に低値であった (図 11)。

図 11 CD8陽性T細胞におけるTSLC1陽性率



#### D. 考察

FACS によるフェノタイプ解析とプロウイルス量との比較から、CCR4 はほとんどの感染細胞で陽性であることが推定されたが、TSLC1 は一部の感染細胞でのみ陽性となっていることが示唆された。この TSLC1 の発現量は末梢血での CD25 陽性率とも有意な正の相関を認めており、これらのことは TSLC1 の発現亢進は HTLV-1 に感染するだけではなく T 細胞の活性化も関与していることを示唆していると考えられた。HTLV-1 の主要なウイルス蛋白である *tax* は様々な trans activator としての機能を有していることが知られている。よって、*tax* の発現は T 細胞の活性化を促している事が予想されるため、TSLC1 mRNA と *tax* mRNA の発現量を測定し比較を行った。しかしながら、こ

れらの分子の間に直接的な相関関係は認められなかったため、今後は *tax* 以外のウイルス蛋白 (ex. HBZ) の発現量と TSLC1 発現量との関連についての比較検討を行っていく予定である。

一方で HAM 患者では、CD8 陽性 T 細胞において有意に TSLC1 の発現量が減少しており、特定の接着分子の発現抑制もしくは接着分子高発現細胞の細胞死が予想された。CD8 陽性細胞 (特に CTL) はウイルス感染において細胞性免疫を司る細胞群であるが、HAM 患者においてはウイルス特異的 CTL の機能不全が報告されている。接着分子は免疫シナプスの構成成分であり、発現の多寡は免疫機能への影響が予想される。故に、今後は CD8 陽性 T 細胞における他の接着分子の発現や、TSLC1 の発現動態と CTL 機能との関連についても解析する予定である。

#### E. 結論

TSLC1 の測定は HAM のバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。また、HAM 患者 CD8 陽性 T 細胞においては、TSLC1 の発現抑制もしくは高発現細胞の細胞死が予想された。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
特になし。

#### 2. 学会発表

[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、筍潤澤、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、筍潤澤、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、筍潤澤、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. 知的所有権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得  
特にない。

2. 実用新案登録  
特にない。

3. その他  
特にない。