

201118004B

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合研究事業

ヒトT細胞白血病ウイルス1型関連疾患における感受性遺伝子多型の同定と  
発症危険群へのアプローチ  
(H21-3次対がん一般-004)

平成21-23年度 総合研究報告書

研究代表者 松岡 雅雄  
(京都大学ウイルス研究所・教授)

平成24 (2012) 年 3月



## 目 次

### I. 総合研究報告

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型関連疾患における感受性遺伝子多型の  
同定と発症危険群へのアプローチ

研究代表者・松岡 雅雄（京都大学ウイルス研究所・教授） ----- 1

### II. 分担研究報告

1. 松田 文彦（京都大学医学研究科・教授） ----- 6

2. 齊藤 峰輝（琉球大学医学部・准教授） ----- 9

3. 野坂 生郷（熊本大学医学部附属病院・講師） ----- 23

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表・刊行物・別刷

1. 松岡 雅雄（京都大学ウイルス研究所・教授） ----- 25

2. 松田 文彦（京都大学医学研究科・教授） ----- 105

3. 齊藤 峰輝（琉球大学医学部・准教授） ----- 167

4. 野坂 生郷（熊本大学医学部附属病院・講師） ----- 213

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型関連疾患における感受性遺伝子多型の同定と  
発症危険群へのアプローチ

研究代表者：京都大学ウイルス研究所 教授 松岡 雅雄

**研究要旨**

HTLV-1 感染者は全世界で約 2000 万人存在し約 108 万人の感染者が居る日本は最大の蔓延国である。ATL は家族内発生が多いことでも知られており発症への遺伝的要因の関連が推定されている。本研究では全ゲノム関連解析 (GWAS) にて、ATL および HAM 感受性 SNP の探索を行った。ATL 415 検体、HAM 429 検体と無症候性 HTLV-1 感染者 308 検体を用いて、アリル頻度、ジェノタイプ分布を統計解析した結果、ATL に関しては、 $p < 1 \times 10^{-5}$  の SNP を 4 個、HAM に関しては  $p < 1 \times 10^{-5}$  の SNP を 15 個同定した。さらに ATL 発症のリスクファクターである高プロウイルス量に関連する遺伝子座を 1 番染色体に見出した。これらの SNP の解析は HTLV-1 関連疾患発症の高危険群同定に繋がるのみならず、HTLV-1 病原性発現機序、HTLV-1 感染制御の分子基盤の理解にも貢献すると予想される。

**A. 研究目的**

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1) は一部の感染者に成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL)、HTLV-1 関連脊髄症 (HTLV-1 associated myelopathy: HAM) を引き起こす。ATL の発症には長い潜伏期間が必要であり、家族内発症も多い。このことは、ウイルス感染以外の宿主側因子が発症に関与することを意味している。本邦における HTLV-1 感染者数は約 108 万人と推定され世界最大の蔓延地域であり、年間約 1000 名のキャリアが ATL を発症している。ATL は予後不良であり HAM も有効な治療法が無い。ATL では家族内発症が高頻度に認められ、その発症に遺伝的背景が密接に関連していることが明らかであるが、その詳細に関しては不明であった。本研究班に属する研究者は以前から、HTLV-1 関連疾患発症における宿主因子の重要性および病原体感受性に関連する宿主遺伝子多型に注目して解析を進めてきた。松岡・野坂は宿主遺伝子の発現異常やプロウイルスマイナス鎖にコードされる *HBZ* 遺伝子が ATL 発症に重要であることを明らかにした (Cancer Res, 2000; PNAS, 2006)。松田は様々な病原体と疾患感受性遺伝子について解析を進め HIV-1 感染者における遺伝子多型と AIDS への進行との関連 (J Infect Dis 2006; PNAS, 2007)、デングウイルスレセプ

ターである DCSIGN-1 プロモーター多型とデング熱重症度の関連を報告した (Nat Genet 2005)。齊藤は HLA ハプロタイプや IL-10 などが HAM 発症に関与することを報告した。これまで ATL 感受性遺伝子多型に関する報告は少なく、HAM の発症機序に関しても限られた情報しかない。本研究では、全ゲノムを対象とした大規模な網羅的 SNP ジェノタイピングを多数の症例を用いて遂行し、ATL および HAM 感受性 SNP を同定する。さらには各々の発症危険群の特定を試み、これら難治性疾患の発症予測、予防法確立を目指す。

**B. 研究方法**

1) 臨床検体の収集、管理

ATL 患者、HAM 患者、無症候性 HTLV-1 感染者由来の検体を収集する。1 次スクリーニングおよび 2 次スクリーニングには、それぞれ熊本県・鹿児島県由来検体もしくは長崎県・鹿児島県・東京都・沖縄県由来検体を用いる。

2) 全ゲノム関連解析 (GWAS)

イルミナ社の Human610k-Quad BeadChip を用いて全ゲノム関連解析 (GWAS) をおこなう。1 次スクリーニングおよび別の検体群を用いた 2 次スクリーニングを経て、疾患感受性多型を特定する。

3) HTLV-1 プロウイルス量関連 SNP の探索  
プロウイルス量による QTL 解析を行う。プ

ロウウイルス量情報と GWAS 結果が揃っている検体に絞り、プロウイルス量と関連する遺伝子座の有無を調べる。

### (倫理面への配慮)

本研究は国の倫理指針に基づいた京都大学倫理委員会の承認を得て遂行している。検体は全て匿名化する。

## C. 研究結果

### 1) 検体の収集、管理

1次および2次スクリーニングに使用した検体数および由来は以下の通りである。

#### 1次スクリーニング

ATL 患者 258 検体 (熊本県)

無症候性 HTLV-1 感染者 182 検体 (熊本県)

HAM 患者 296 検体 (鹿児島県)

無症候性 HTLV-1 感染者 100 検体 (鹿児島県)

#### 2次スクリーニング

ATL 患者 200 検体 (長崎県)

HAM 患者 13 検体 (長崎県)

HAM 患者 82 検体 (鹿児島県)

HAM 患者 61 検体 (東京都)

無症候性 HTLV-1 感染者 42 検体 (東京都)

HAM 患者 8 検体 (沖縄県)

### 2) 全ゲノム関連解析 (GWAS)

上記の検体を用いてゲノムスキャンを行った。タイピングにはタイピング結果の品質管理として患者、対照群両群に関してアッセイ成功率が90%以上、マイナーアレル頻度が0.01以上、対照群のジェノタイプ分布がハーディー・ワインバーグ平衡に達しているもの ( $p > 10^{-7}$ ) を選んだ。サンプルの品質管理としてはタイピング成功率が90%以上、近縁度が高いペアの片方を除外した。

1次と2次スクリーニングの結果を合わせ、ATL 患者 415 検体、HAM 患者 429 検体と無症候性 HTLV-1 感染者 308 検体を用いて、患者と対照群の間で、アレル頻度、ジェノタイプ分布を統計解析した。その結果、ATL に関しては、 $p < 1 \times 10^{-5}$  の SNP が 4 個、HAM に関しては  $p < 1 \times 10^{-5}$  の SNP が 15 個得られた。

3) HTLV-1 プロウイルス量関連 SNP の探索患者と感染者の単純な全体比較のみならず、患者を病態で分類した複数のサブグループ間での比較解析に着手した。まずはプロウイルス量と関連するローカスの有無を調べ

た。その結果、有意差を示すローカスが 1 番染色体に確認された ( $p = 2.68 \times 10^{-8}$ )。この SNP は HAM では関連が認められなかった。

## D. 考察

ATL および HAM の発症に関わる遺伝子群の同定はこれら難治性疾患の発症予測、早期治療を可能にし、治療成績を向上させると期待される。また、感染の分子基盤における宿主遺伝子の役割を考える上で、従来の分子生物学的、細胞生物学的方法で関与が示唆される宿主遺伝子に加え、遺伝学的見地から新たな関連遺伝子を提示することが可能である。本課題で遂行した多数例の ATL、HAM を対象とした全ゲノムの網羅的解析は現在までに報告が無く、新規の疾患感受性多型も今回の解析により同定されているため、非常に貴重なデータを得る事ができたと考える。加えて、我々は ATL 発症の危険因子である高プロウイルス量と関連する遺伝子座も見出した。本プロジェクトで明らかにされた疾患特異的多型、疾患の進行と関連する多型の情報は ATL の診断、予後の予測、あるいは治療に大いに貢献すると考えられる。

今後の方針として、今回の解析で得られた候補 SNP の再現性検証を行うと同時に、次世代遺伝子解析装置を用いて HTLV-1 感染者及び ATL、HAM 患者における全エクソン配列を決定し、疾患発症の感受性に関与する遺伝子のさらなる検出を試みる。

また、得られたデータをウェブ上で公開し、同様の解析を同一の疾患で他人種に対し試みることのみならず、異なる疾患で行う研究者の利用に供する予定である。

## E. 結論

本研究班による大規模な GWAS 解析により、ATL に関しては、 $p < 1 \times 10^{-5}$  の SNP が 4 個、HAM に関しては  $p < 1 \times 10^{-5}$  の SNP が 15 個得られた。さらに HTLV-1 高プロウイルス量に有意に相関する遺伝子座を 1 番染色体に見出した。

## F. 健康危険情報

該当事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Zhao T, Yasunaga J-I, Satou Y, Nakao M, Takahashi M, Fujii M, Matsuoka M.

- Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF- $\kappa$ B. *Blood* 113: 2755-2764, 2009.
2. Takahata M, Inoue Y, Tsuda H, Imoto I, Koinuma D, Hayashi M, Ichikura T, Yamori T, Nagasaki K, Yoshida M, Matsuoka M, Morishita K, Yuki K, Hanyu A, Miyazawa K, Inazawa J, Miyazono K, Imamura T. SKI and MEL1 cooperate to inhibit transforming growth factor- $\beta$  signal in gastric cancer cells. *J Biol Chem* 284: 3334-3344, 2009.
  3. Saito M, Matsuzaki T, Satou Y, Yasunaga J-I, Saito K, Arimura K, Matsuoka M, Ohara Y. In vivo expression of the HBZ gene of HTLV-1 correlates with proviral load, inflammatory markers and disease severity in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Retrovirology* 6:19, 2009.
  4. Suemori K, Fujiwara H, Ochi T, Ogawa T, Matsuoka M, Matsumoto T, Mesnard JM, Yasukawa M. HBZ is an immunogenic protein, but not a target antigen for human T-cell leukemia virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Gen Virol*, 90:1806-1811, 2009.
  5. Sato H, Oka T, Shinnou Y, Kondo T, Washio K, Takano M, Takata K, Morito T, Huang X, Tamura M, Kitamura Y, Ohara N, Ouchida M, Ohshima K, Shimizu K, Tanimoto M, Takahashi K, Matsuoka M, Utsunomiya A, Yoshino T. Multi-step aberrant CpG island hyper-methylation is associated with the progression of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL). *Am J Pathol* 176: 402-415, 2010.
  6. Fan J, Ma G, Nosaka K, Tanabe J, Satou Y, Koito A, Wain-Hobson S, Vartanian JP, Matsuoka M. APOBEC3G generates nonsense mutations in HTLV-1 proviral genomes *in vivo*. *J Virol*, 84: 7278-7287, 2010.
  7. Satou Y, Matsuoka M. HTLV-1 and the host immune system: How the virus disrupts immune regulation, leading to HTLV-1 associated diseases. *J Clin Exp Hematop*, 50:1-8, 2010.
  8. Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor gene: its roles in HTLV-1 pathogenesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 31: 359-66, 2010.
  9. Satou Y, Yasunaga J, Zhao T, Yoshida M, Miyazato P, Takai K, Shimizu K, Ohshima K, Green PL, Ohkura N, Yamaguchi T, Ono M, Sakaguchi S, Matsuoka M. *HTLV-1 bZIP factor* induces T-cell lymphoma and systemic inflammation *in vivo*. *PLoS Pathog*, 7: e1001274, 2011.
  10. Sugata K, Satou Y, Yasunaga JI, Hara H, Ohshima K, Utsunomiya A, Mitsuyama M, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor impairs cell-mediated immunity by suppressing production of Th1 cytokines. *Blood* 119(2):434-444, 2011.
  11. Douceron E, Kaidarova Z, Miyazato P, Matsuoka M, Murphy EL, Mahieux R. HTLV-2 APH-2 Expression Is Correlated With Proviral Load but APH-2 Does Not Promote Lymphocytosis. *J Infect Dis* 2011 Nov 7. [Epub ahead of print]
  12. Yasunaga J and Matsuoka M. Molecular mechanisms of HTLV-1 infection and pathogenesis. *Int. J. Hematol* 94: 435-442, 2011.
  13. Zhao T, Satou Y, Sugata K, Miyazato P, Green PL, Imamura T, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor enhances TGF- $\beta$  signaling through p300 coactivator. *Blood* 118; 1865-1876, 2011.
  14. Shimizu-Kohno K, Satou Y, Arakawa F, Kiyasu J, Kimura Y, Niino D, Sugita Y, Ishikawa F, Matsuoka M, Ohshima K. Detection of HTLV-1 by means of HBZ gene in situ hybridization in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Cancer Sci* 102; 1432-1436, 2011.
  15. Hagiya K, Yasunaga JI, Satou Y, Ohshima K, Matsuoka M. ATF3, an HTLV-1 bZip factor binding protein, promotes proliferation of adult T-cell leukemia cells. *Retrovirology* 8; 19, 2011.
  16. Matsuoka M and Jeang KT. Human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and leukemic transformation: viral infectivity, Tax, HBZ, and therapy. *Oncogene* 30:1379-1389,2011.
- ## 2. 学会発表
1. Matsuoka M. The Roles of HTLV-1 bZIP Factor Gene in Oncogenesis. The 14<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology:HTLV and related retroviruses. Salvador, Brazil, July 1-4,2009.

2. Zhao T, Yasunaga J, Fuji M, Matuoka M, Nakao M. HTLV-1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF- $\kappa$ B. The 16<sup>th</sup> East Asia Joint Conference on Biomedical Research. Kyoto, Japan. September, 13-14, 2009.
3. 松岡雅雄：ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型の病原性発現機構：第 49 回日本リンパ網内系学会総会、淡路、2009 年 7 月 9-11 日
4. 松岡雅雄：ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型による病原性発現機構：第 76 回発生工学・疾患モデル研究会例会、東京、2009 年 9 月 17 日
5. 松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor 遺伝子による発がん機構：第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月 1-3 日
6. 萩屋啓太、佐藤賢文、安永純一朗、松岡雅雄：ATF3 は HTLV-1 bZIP factor と相互作用し、ATL 細胞の増殖に寄与する：第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月 1-3 日
7. 松岡雅雄：ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型による発がん：第 14 回遺伝子実験施設セミナー、熊本、2009 年 10 月 16 日
8. 佐藤賢文、安永純一朗、吉田美香、宮里パオラ、趙鉄軍、高井健、清水桂、大島孝一、山口智之、小野昌弘、坂口志文、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP Factor(HBZ) 遺伝子トランスジェニックマウスは慢性炎症疾患、T 細胞リンパ腫を発症する：第 71 回日本血液学会学術集会、京都、2009 年 10 月 23-25 日
9. 櫻井康晃、小松賢志、上松一永、松岡雅雄：レトロウイルス感染における DNA 修復酵素の新たな役割：第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日
10. 菅田謙治、佐藤賢文、原英樹、光山正雄、松岡雅雄：CD4 陽性 T 細胞での HBZ 発現は IFN- $\gamma$  産生を抑制し、Listeria monocytogenes 感染に対する細胞性免疫を障害する：第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日
11. 田口奈々絵、佐藤賢文、Paola Miyazato、片桐晃子、木梨達雄、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor トランスジェニックマウスにおける炎症性疾患の解析：第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日
12. 佐藤賢文、MIYAZATO Paola、山口智之、小野昌弘、坂口志文、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP Factor(HBZ) 遺伝子トランスジェニックマウスは Foxp3+ 制御性 T 細胞の機能及びホメオスタシスの異常を示し、慢性炎症疾患、T 細胞リンパ腫を発症する：第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、2009 年 12 月 2 日-4 日
13. 趙鉄軍、佐藤賢文、今村健志、松岡雅雄：Human T-cell Leukemia virus Type 1 bZIP factor enhances TGF-beta signaling through p300/CBP coactivators：第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、2010 年 9 月 22-24 日
14. 中西梓、佐藤賢文、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor inhibits expression of a proapoptotic factor, Bim: implication in leukemogenesis：第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、2010 年 9 月 22-24 日
15. 佐藤賢文、安永純一朗、趙鉄軍、大島孝一、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP Factor transgenic mice induce chronic inflammations and T-cell lymphoma：第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、2010 年 9 月 22-24 日
16. 松岡雅雄：The HTLV-1 bZIP factor gene is responsible for leukemogenesis of adult T-cell leukemia：第 72 回日本血液学会学術集会、横浜、2010 年 9 月 24-26 日
17. 佐藤賢文、Jun Fan、Guangyong Ma、野坂生郷、田邊順子、松岡雅雄：APOBEC3G generates nonsense mutations in HTLV-1 proviral genomes in vivo：第 72 回日本血液学会学術集会、横浜、2010 年 9 月 24-26 日
18. 菅田謙治、佐藤賢文、原英樹、光山正雄、松岡雅雄：HBZ gene expression in CD4+T cells impairs cell-mediated immunity against Listeria monocytogenes：第 72 回日本血液学会学術集会、横浜、2010 年 9 月 24-26 日
19. 松岡雅雄：HTLV-1 アクセサリー遺伝子 HBZ の機能と意義：第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月 7-9 日
20. 菅田謙治、佐藤賢文、松岡雅雄：HBZ 発現は IFN- $\gamma$  産生を抑制し、HSV-2 感染に対する細胞性免疫を障害する：第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月 7-9 日
21. 田口奈々絵、佐藤賢文、Miyazato Paola、吉田美香、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor による慢性炎症惹起機構：第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月 7-9 日
22. 馬広勇、Fan Jun、柳川伸一、松岡雅雄：DAPLE, a novel HBZ-binding protein, regulates Wnt signaling pathway in ATL cells：第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年 11 月 7-9 日
23. Masao Matsuoka. Pathogenesis and therapeutic strategies of human retroviruses: HTLV-1 and HIV. Mahidol-Kyoto Universities International Symposium 2010.

- Bangkok, Thailand. December, 16-17, 2010.
24. Nanae Taguchi, Yorifumi Satou, Koichi Ohshima, Masao Matsuoka. HTLV-1 bZIP factor induces systemic inflammations in vivo: 15<sup>th</sup> International Conference ON HUMAN RETROVIROLOGY HTLV AND RELATED VIRUSES. Leuven, Belgium. June 4-8, 2011.
  25. Kenji Sugata, Yorifumi Satou, Jun-ichiro Yasunaga, Kisato Nosaka, Masao Matsuoka. HTLV-1 bZIP factor perturbs immune response to the pathogens in vivo by inhibiting IFN-gamma production: 15<sup>th</sup> INTERNATIONAL CONFERENCE ON HUMAN RETROVIROLOGY HTLV AND RELATED VIRUSES. Leuven, Belgium. June 4-8, 2011.
  26. Tiejun Zhao, Yorifumi Satou, Kenji Sugata, Patrick L Green, Takeshi Imamura, Masao Matsuoka. HTLV-1 bZIP factor enhances TGF-beta signaling through p300 coactivator: 15<sup>th</sup> INTERNATIONAL CONFERENCE ON HUMAN RETROVIROLOGY HTLV AND RELATED VIRUSES. Leuven, Belgium. June 4-8, 2011.
  27. Paola Miyazato, Yorifumi Satou, Tomoyuki Yamaguchi, Shimon Sakaguchi, Kouichi Ohshima, Masao Matsuoka. HTLV-1 bZIP factor-mediated dysfunction of regulatory T cells in vivo: 15<sup>th</sup> INTERNATIONAL CONFERENCE ON HUMAN RETROVIROLOGY HTLV AND RELATED VIRUSES. Leuven, Belgium. June 4-8, 2011.
  28. Masao Matsuoka. Molecular mechanisms of pathogenesis by human T-cell leukemia virus type 1: 2011 ASBMB Special Symposia Series. Guangzhou, China. July 24-26, 2011.
  29. Tiejun Zhao, Yorifumi Satou, Kenji Sugata, Patrick L Green, Takeshi Imamura, Masao Matsuoka. HTLV-1 bZIP FACTOR ENHANCES TGF-BETA SIGNALING THROUGH P300 COACTIVATOR: International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo, Japan. September 11-16, 2011.
  30. Paola Miyazato, Yorifumi Satou, Tomoyuki Yamaguchi, Shimon Sakaguchi, Kouichi Ohshima, Masao Matsuoka. IMPAIRED FUNCTION OF REGULATORY T CELLS BY HTLV-1 bZIP FACTOR(HBZ): International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo, Japan. September 11-16, 2011.
  31. Masao Matsuoka. Molecular mechanisms of pathogenesis by HTLV-1: The XXX Symposium of the International Association for Comparative Research on Leukemia and Related Diseases. Tokyo, Japan. September 15-17, 2011.
  32. 松岡雅雄: How HTLV-1 causes diseases?: 第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月3-5日
  33. 松岡雅雄: ヒトT細胞白血病ウイルス1型プロウイルスの意味と意義: 第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月3-5日
  34. 安永純一郎、趙鉄軍、Miyazato Paola、佐藤賢文、松岡雅雄: HTLV-1 bZIP factor (HBZ) induces functionally impaired regulatory T-cells in vivo: 第73回日本血液学会学術集会、名古屋、2011年10月14-16日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
該当事項なし
2. 実用新案登録  
該当事項なし
3. その他  
該当事項なし

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型関連疾患における感受性遺伝子多型の同定と発症危険群へのアプローチ

研究分担者：京都大学医学研究科附属ゲノム医学センター 松田 文彦

### 研究要旨

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) 感染により惹起される成人 T 細胞白血病 (ATL)、HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の感受性遺伝子多型の同定を、SNP を用いた全ゲノム関連解析 (GWAS) を用いて試みた。その結果、それぞれの疾患に関して、候補遺伝子多型を複数個同定した。

### A. 研究目的

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) 感染により惹起される成人 T 細胞白血病 (ATL)、HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の感受性遺伝子多型を解析し発症危険群の同定を目的とする。

### B. 研究方法

SNP を用いた全ゲノム関連解析を行い、疾患関連 SNP を同定する。さらに、疾患関連 SNP の生物学的活性の解析：同定された疾患感受性 SNP が発症を促進する機序を明らかにするため、SNP がその分子に付与する機能について解析する。

### (倫理面への配慮)

本研究は全て国の倫理指針に基づいた倫理委員会での審議、許可を得ている。また、検体は全て匿名化する。

### C. 研究結果

平成 21、22 年度は、イルミナ社の Human610k アレイを用いて、1 次スクリーニングとして熊本で収集された ATL 患者 258 検体と無症候性 HTLV-1 感染者 182 検体、鹿児島で収集された HAM 患者 296 検体と HTLV-1 感染者 100 検体のゲノムスキャンを実施した。2 次スクリーニングとして、長崎県の ATL 患者 200 検体と HAM 患者 13 検体、鹿児島県の HAM 患者 82 検体、東京都の HAM 患者 61 検体と HTLV-1 感染者 42 検体、沖縄県の HAM 患者 8 検体のゲノムスキャンを実施した。タイピング結果の品質管理として患者、対照群両群に関してアッセイ成功率が 90% 以上、マイナーアレル頻度が 0.01 以上、対照群のジェノタイプ分布がハーディー・ワインバーグ平衡に達しているもの ( $p > 10^{-7}$ ) を選んだ。サンプルの品質管理としてはタイピング成功率が 90% 以上、近縁度が高いペアの片方を除外した。

1・2 次スクリーニングの結果を合わせ、ATL 患者 415 検体、HAM 患者 429 検体と無症候性 HTLV-1 感染者 308 検体を用いて、患者と対照群の間で、アレル頻度、ジェノタイプ分布を統計解析した。その結果、ATL に関しては、 $p < 1 \times 10^{-5}$  の SNP が 4 個、HAM に関しては  $p < 1 \times 10^{-5}$  の SNP が 15 個得られた。

平成 23 年度は、患者と対照群をいくつかのサブグループに分け、アレル頻度、ジェノタイプ分布を統計解析した。まずグループ 1：ATL 患者と HTLV-1 感染者間には  $p < 1 \times 10^{-7}$  の SNP が 6 個、グループ 2：ATL 患者と HTLV-1 感染者・HAM 患者間には  $p < 1 \times 10^{-7}$  の SNP が 5 個得られた。グループ 1、2 に共通して  $p < 1 \times 10^{-7}$  を示す SNP が 3 個存在した。次にグループ 3：HAM 患者と HTLV-1 感染者間には  $p < 1 \times 10^{-7}$  の SNP が 10 個、グループ 4：HAM 患者と HTLV-1 感染者・ATL 患者間には  $p < 1 \times 10^{-7}$  の SNP が 12 個得られた。グループ 3 と 4 両方で  $p < 1 \times 10^{-7}$  の SNP は 6 個存在した。

さらに申請者らはプロウイルス量による QTL 解析を 3 セットで行った。プロウイルス量情報と GWAS 結果が揃っている検体に絞り、セット 1 は HAM 患者と HTLV-1 感染者計 686 人、セット 2 は HAM 患者のみ 400 人、3 は HTLV-1 感染者のみ 286 人とし、プロウイルス量と関連する遺伝子座の有無を調べた。その結果、セット 2 内に有意差を示す遺伝子座が 1 番染色体に確認された ( $p = 2.13 \times 10^{-8}$ )。再現性を確認するため、現在 GWAS 未実施の HTLV-1 感染者検体のタイピングを Taqman 法により調べている。HTLV-1 感染者でもプロウイルス量が多い群と少ない群が存在する。我々は次に HAM とプロウイルス量が多い HTLV-1 感染者群、または HAM とプロウイルス量が少ない HTLV-1 感染者群を比較した。有意水準を超えるマーカーが数個確認されたが QC 条件を満たすマーカーはなかった。プロウイルス量が多い HTLV-1 感染者群と少ない HTLV-1 感染者群との比較は現在確認中である。



## D. 考察

ATL・HAM それぞれの疾患感受性と関連するゲノム上の多型の候補が複数個同定された。しかしこれらの多型は、疾患感受性遺伝子の候補となるものであるが、独立した集団の検体を用いた再現性検証が必須である。今後の計画として、次世代遺伝子解析装置を用いて無症候性 HTLV-1 感染者及び HAM 患者における全エクソン配列を決定し、遺伝子に直接的な影響を与える多型や変異についても評価し、発症リスク群の特定を試みる。

## E. 結論

平成 21・22 年度合わせて、ATL 患者 415 検体、HAM 患者 429 検体と無症候性 HTLV-1 感染者 308 検体分の GWAS 結果が得られた。患者と対照群の間で、アリル頻度、ジェノタイプ分布を統計解析した結果、ATL に関しては、 $p < 1 \times 10^{-5}$  の SNP が 4 個、HAM に関しては  $p < 1 \times 10^{-5}$  の SNP が 15 個得られた。平成 23 年度は、患者／対照群の単純な全体比較のみならず、患者を病態で分類した比較解析に着手した。さらにプロウイルス量による QTL 解析を 3 セットで実施し、プロウイルス量と関連する遺伝子座の有無を調べた。HAM 患者のみに絞ったセット内に有意差を示す遺伝子座が 1 番染色体に確認された ( $p = 2.13 \times 10^{-8}$ )。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 平成 21 年度

1. Limou, S., Le Clerc, S., Coulonges, C., Carpentier, W., Dina, C., Delaneau, O., Labib, T., Taing, L., Sladek, R., Deveau, C., Ratsimandresy, R., Montes, M., Spadoni, J.L., Lelièvre, J.D., Lévy, Y., Therwath, A., Schächter, F., Matsuda, F., Gut, I., Froguel, P., Delfraissy, J.F., Hercberg, S. and Zagury, J.F. ANRS Genomic Group. Genomewide association study of an AIDS-nonprogression cohort emphasizes the role played by HLA genes (ANRS Genomewide Association Study 02). *J. Infect. Dis.* **199**, 419-426, 2009.
2. Wahlberg, K., Jiang, J., Rooks, H., Jawaid, K., Matsuda, F., Yamaguchi, M., Lathrop, M., Thein, S.L. and Best, S. The HBS1L-MYB intergenic interval associated with elevated HbF levels shows characteristics of a distal regulatory region in erythroid cells. *Blood*. **6**, 1254-1262, 2009.
3. Le Clerc, S., Limou, S., Coulonges, C., Carpentier, W., Dina, C., Taing, L., Delaneau, O., Labib, T., Sladek, R.; ANRS Genomic

Group, Deveau, C., Guillemain, H., Ratsimandresy, R., Montes, M., Spadoni, J. L., Therwath, A., Schächter, F., Matsuda, F., Gut, I., Lelièvre, J. D., Lévy, Y., Froguel, P., Delfraissy, J. F., Hercberg, S. and Zagury, J. F. Genomewide association study of a rapid progression cohort identifies new susceptibility alleles for AIDS (ANRS Genomewide Association Study 03). *J. Infect. Dis.* **200**, 1194-1201, 2009.

4. Nakanishi, H., Yamada, R., Gotoh, N., Hayashi, H., Yamashiro, K., Shimada, N., Ohno-Matsui, K., Mochizuki, M., Saito, M., Iida, T., Matsuo, K., Tajima, K., Yoshimura, N. and \*Matsuda, F. A Genome-Wide Association Analysis Identified a Novel Susceptible Locus for Pathological Myopia at 11q24.1. *PLoS Genetics* **5**, e1000660., 2009.

#### 平成 22 年度

1. Takahashi, M., Saenko, V. A., Rogounovitch T. I., Kawaguchi, T., Drozd, V. M., Takigawa-Imamura, H., Natallia M. Akulevich, N. M., Ratanajaraya, C., Mitsutake, N., Takamura, N., Danilova, L. I., Lushchik, M. L., Demidchik, Y. E., Heath, S., Yamada, R., Lathrop, M., \*Matsuda, F. and Yamashita, S. The *FOXO1* locus is a major genetic determinant for radiation-related thyroid carcinoma in Chernobyl. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 2516-2523, 2010.
2. Kochi, Y., Okada, Y., Suzuki, A., Ikari, K., Terao, C., Takahashi, A., Yamazaki, K., Hosono, N., Myouzen, K., Tsunoda, T., Kamatani, N., Furuichi, T., Ikegawa, S., Ohmura, K., Mimori, T., Matsuda, F., Iwamoto, T., Momohara, S., Yamanaka, H., Yamada, R., Kubo, M., Nakamura, Y. and Yamamoto, K. A regulatory variant in CCR6 is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Nat. Genet.* **42**, 515-519, 2010.
3. Nalpas, B., Laviaille-Meziani, R., Plancoulaine, S., Jouanguy, E., Nalpas, A., Munteanu, M., Charlotte, F., Ranque, B., Patin, E., Heath, S., Fontaine, H., Vallet-Pichard, A., Pontoire, D., Bourlière, M., Casanova, J. L., Lathrop, M., Bréchet, C., Poynard, T., Matsuda, F., Pol, S. and Abel, L. Interferon- $\gamma$  receptor 2 gene variants are associated with liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C infection. *Gut*. **59**, 1120-1126, 2010.
4. Terao, C., Yamada, R., Ohmura, K., Takahashi, M., Kawaguchi, T., Kochi, Y., Human Disease Genomics Working Group, RA Clinical and Genetic Study Consortium, Okada, Y., Nakamura, Y., Yamamoto, K., Melchers, I., Lathrop, M., Mimori, T. and \*Matsuda, F. The human *AIRE* gene at chromosome 21q22 is a genetic determinant for the predisposition to rheumatoid arthritis in Japanese population. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 2680-2685, 2011.

## 平成 23 年度

1. Nakata, I., Yamashiro, K., Yamada, R., Gotoh, N., Nakanishi, H., Hayashi, H., Tsujikawa, A., Otani, A., Saito, M., Iida, T., Oishi, A., Matsuo, K., Tajima, K., Matsuda, F. and Yoshimura, N. Association between the *SERPING1* Gene and Age-Related Macular Degeneration and Polypoidal Choroidal Vasculopathy in Japanese. *PLoS One*. **6**, e19108, 2011.
2. Terao, C., Ohmura, K., Katayama, M., Takahashi, M., Kokubo, M., Diop, G., Toda, T., Yamamoto, N., Human Disease Genomics Working Group, RA Clinical and Genetic Study Consortium, Shinkura, R., Shimizu, M., Gut, I., Heath, S., Melchers, I., Manabe, T., Lathrop, M., Mimori, T., Yamada, R. and Matsuda, F. Myelin basic protein as a novel genetic risk factor in rheumatoid arthritis - A genome-wide study combined with immunological analyses. *PLoS One*. **6**, e20457, 2011.
3. Toyoda, H., Kumada, T., Tada, T., Hayashi, K., Honda, T., Katano, Y., Goto, H., Kawaguchi, T., Murakami, Y. and Matsuda, F. Predictive value of early viral dynamics during peginterferon and ribavirin combination therapy based on genetic polymorphisms near the *IL28B* gene in patients infected with HCV genotype 1b. *J. Med. Virol.* **84**, 61-70, 2012.
4. Kato, L., Beguma, N. A., Burroughs, M., Doi, T., Kawai, J., Daub, C. O., Kawaguchi, T., Matsuda, F., Hayashizaki, Y. and Honjo, T. Nonimmunoglobulin target loci of activation-induced cytidine deaminase (AID) share unique features with immunoglobulin genes. *Proc. Natl., Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 2479-2484, 2012.
5. Okada, Y., Terao, C., Ikari, K., Kochi, Y., Ohmura, K., Suzuki, A., Kawaguchi, T., Stahl, E. A., Kurreeman, F. A., Nishida, N., Ohmiya, H., Myouzen, K., Takahashi, M., Sawada, T., Nishioka, Y., Yukioka, M., Matsubara, T., Wakitani, S., Teshima, R., Tohma, S., Takasugi, K., Shimada, K., Murasawa, A., Honjo, S., Matsuo, K., Tanaka, H., Tajima, K., Suzuki, T., Iwamoto, T., Kawamura, Y., Tani, H., Okazaki, Y., Sasaki, T., Gregersen, P. K., Padyukov, L., Worthington, J., Siminovitch, K. A., Lathrop, M., Taniguchi, A., Takahashi, A., Tokunaga, K., Kubo, M., Nakamura, Y., Kamatani, N., Mimori, T., Plenge, R. M., Yamanaka, H., Momohara, S., Yamada, R., Matsuda, F. and Yamamoto, K. Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Nat. Genet.* Mar 25. doi: 10.1038/ng.2231. [Epub ahead of print], 2012.

## 2. 学会発表

特になし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
分担研究報告書

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型関連疾患における感受性遺伝子多型の同定と  
発症危険群へのアプローチ

研究分担者：琉球大学大学院医学研究科 准教授 齊藤峰輝

**研究要旨：** HAM 患者の疾患感受性遺伝子多型解析に用いる検体を可能な限り多く確保し、多型同定後の病態における役割の解明に資するため、臨床情報と検体バンクを整備した。一方、HTLV-1 感染症治療標的候補遺伝子を網羅的に抽出、解析することを通じて、今後明らかにされる新規 HAM 疾患感受性遺伝子と病態との関連を解析する方法の確立を試みた。具体的には、HTLV-1 Tax 標的遺伝子のうち OX40 に着目して HAM 病態への関与について検討した。一方、HTLV-1 マイナス鎖にコードされるウイルス遺伝子 HBZ の HAM 病態における意義を明らかにするため、HAM 患者末梢血単核球 (PBMC) を用いて HBZ, tax, FoxP3 mRNA 発現を定量し、HTLV-1 tax subgroup、HTLV-1 プロウイルス量 (PVL) との関連を検討した。その結果、OX40 が HAM 剖検脊髄の病変局所浸潤細胞に強発現しており、患者 PBMC を培養すると HTLV-1 感染細胞特異的に発現誘導されること、HAM 患者 PBMC における HBZ mRNA の発現量が病勢と有意に相関し、細胞あたりの HBZ mRNA 発現量が HAM 疾患感受性を規定する HTLV-1 tax subgroup によって異なることを明らかにした。これらの結果と解析方法は、今後明らかにされる新規 HAM 疾患感受性遺伝子の HAM 病態における役割の解明に有用であると考えられる。

#### A. 研究目的

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (Human T-cell leukemia virus type 1: 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、HTLV-1 関連脊髄症 (HTLV-1-associated myelopathy: HAM) および成人 T 細胞白血病 (Adult T-cell leukemia: ATL) の原因ウイルスである。平成 20 年度に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。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 healthy carrier: HC) として経過し、HAM や ATL を発症するのは感染者全体の 5% 前後ではあるものの、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。すなわち、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る。本研究の目的は、HAM 患者の疾患感受性遺伝子多型解析に用いる検体を可能な限り多く確保し、多型同定後、その病態における役割の解明に資するための研究資源

と病態解析法を整備することである。

#### B. 研究方法

鹿児島大学病院脳神経センター神経内科、琉球大学病院神経内科の協力のもと、HAM 患者の臨床情報を匿名で収集した。同時に、十分な説明と書面による同意を得たのちに末梢血を採取し、血漿、末梢血単核球 (PBMC)、ゲノム DNA、cDNA を分離・保存した。PBMC は密度勾配遠心法にて分離し、AllPrep™ DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN) を使用してゲノム DNA と total RNA を同時に抽出した。さらに PrimeScript RT reagent Kit (Takara) を用いて逆転写反応を行い、鋳型 cDNA を合成した。

一方、HTLV-1 感染症治療標的候補遺伝子を網羅的に抽出、解析することを通じて、今後明らかにされる新規 HAM 疾患感受性遺伝子と病態との関連を解析する方法を確立する目的で、以下の実験を行った。

[1] HTLV-1 Tax 蛋白発現により転写活性化あるいは抑制される細胞遺伝子を HTLV-1 感染症治療標的候補遺伝子として網羅的に解析する目的で、塩化カドミウム添加により Tax 蛋白発現を誘導できる JPX9 細胞株を用いて Tax 発現誘導前後の全 RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。Tax

標的遺伝子の中から TNF 受容体スーパーファミリーに属し、T 細胞活性化の初期段階に誘導される分子である OX40 (CD134) を選び解析した。

① HTLV-1 感染ヒト T 細胞株 (MT-1, MT-2, MT-4, C5MJ, HUT102, SLB1)、非感染ヒト T 細胞株 (CEM, Molt-4, Jurkat) および HAM 患者末梢血単核球 (PBMC) における OX40, OX40L mRNA・蛋白の発現量を ELISA・フローサイトメトリーで比較した。

②メタロチオネインプロモーター下流に Tax 遺伝子を導入した JPX9 細胞に CdCl<sub>2</sub> を添加して Tax を発現誘導し、その前後で OX40 が Tax 発現に伴って発現誘導されるかどうか検討した。

③ HAM 患者の PBMC を短時間培養して Tax 蛋白を発現誘導する系を用いて、HTLV-1 感染細胞への OX40 発現誘導の有無と自家製抗 OX40 モノクローナル抗体の HTLV-1 感染細胞に対する効果について検討した。

④ HAM 患者の病変局所浸潤細胞に OX40 が発現しているかどうかについて、剖検脊髄組織を用いて免疫組織化学的に検討した。  
[2] HTLV-1 マイナス鎖にコードされるウイルス遺伝子 HTLV-1 bZIP factor (HBZ) の HAM 病態形成における意義を明らかにするため以下の実験を行った。

① HBZ の C 末端ペプチド抗原を用いてウサギ抗 HBZ ポリクローナル抗体とラット抗 HBZ モノクローナル抗体を作製した。

② 大腸菌で発現させ精製した HBZ を抗原として、ファージディスプレイ法によりヒト抗 HBZ モノクローナル抗体を作製した。

③ 56 例の HAM 患者末梢血単核球、血漿を用いて HBZ mRNA・蛋白の発現を定量し、各種検査所見、病勢との関連を解析した。

④ HTLV-1 tax には LTR での cosmopolitan A, B 分類に対応した 2 つの subgroup (tax A, tax B) があり、tax A HTLV-1 感染者の方が HAM 発症リスクが高いことが報告されている (Furukawa et al. J Infect Dis. 182:1343-9, 2000.)。合計 77 例の HAM 患者について、PCR-RFLP 法で tax subgroup を決定した。

⑤ 各症例の PBMC 1 個あたりの HBZ、Tax および FoxP3 mRNA 発現を定量し、HTLV-1 subgroup、HTLV-1 プロウイルス量 (Proviral load: PVL) との関連を検討した。

#### (倫理面への配慮)

本研究は参加各施設の倫理委員会の承諾を

得た後に施行した。十分な説明と同意のもと、書面による研究協力承諾書が得られた被験者から採取した検体のみを用い、完全に匿名化した後に行った。臨床情報と検体とは非連結匿名化した。

#### C. 研究結果

計 77 症例の HAM 患者から主治医の協力のもと匿名で臨床情報を収集した。同時に各患者から末梢血を採取した後に、血漿、リンパ球、ゲノム DNA、cDNA を分離して保存した。リンパ球は viable stock とした。また、各種臨床検査所見・免疫学的検査所見などを含めた臨床情報データベースを作成した。

一方で、今後明らかにされる新規 HAM 疾患感受性遺伝子と病態との関連を解析する方法を確立する目的で行った実験については、以下の結果を得た。

[1] HAM 患者における OX40 (CD134) の解析から以下のことを明らかにした。

① フローサイトメトリーによる解析では、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 1)。

② JPX9 細胞では、フローサイトメトリー解析で Tax 発現に伴って Tax 陽性細胞特異的に OX40 の発現誘導が認められた (図 2)。ELISA の結果から OX40 は Tax 発現に伴って細胞表面に発現誘導されるのみならず、細胞外にも soluble form として放出されることが明らかになった (図 3)。

③ HAM 患者の PBMC を短時間培養して Tax 蛋白を発現誘導したところ、JPX9 細胞同様に、OX40 は HAM 患者 PBMC においても HTLV-1 感染細胞特異的に発現誘導が認められた (図 4)。HAM 患者の PBMC 短時間培養系における Tax 蛋白発現誘導に対する抗 OX40 モノクローナル抗体の効果を検討したところ、コントロール抗体と比較して CD4+Tax+細胞の頻度 (図 5) と CD4+細胞中 HTLV-1 プロウイルス量の減少を認めた (図 6)。

④ OX40 は未培養の HAM 患者 PBMC には発現が認められなかったが (data not shown)、HAM 患者脊髄の病変局所浸潤細胞に強発現していた (図 7)。

[2] HBZ の HAM 病態形成における意義を明らかにするために行った実験について、以下の結果を得た。

① HBZ の C 末端ペプチド抗原 (HBZ



193-206 : CVNYWQGRLEAMWLQ) を用いてウサギを免疫し、HBZ 蛋白を特異的に検出可能な抗 HBZ ポリクローナル抗体を得た。また、同じペプチド抗原を WKA ラットに免疫し、通常のハイブリドーマ法により HBZ 蛋白を特異的に検出可能なラット抗 HBZ モノクローナル抗体を作製した (clone:4B12, Rat IgG2b)。

②大腸菌で発現させ精製した recombinant HBZ (HBZ 96-206) を抗原として、ファージディスプレイ法により Myc-His タグ付き 2 価ヒト抗 HBZ Fab 抗体 17 クローンを得た。また、これらの抗 HBZ 抗体を用いて HBZ 抗原、抗 HBZ 抗体を検出する ELISA 系を確立した。

③ 得られた抗 HBZ モノクローナル抗体は、HBZ を過剰発現させた 293T 細胞および HTLV-1 感染細胞株中の HBZ を蛍光抗体法 (図 8)、Western blot (図 9)、フローサイトメトリー (図 10A, B) により検出可能であったが、HAM 患者 PBMC 中の HBZ は検出できなかった (図 10C)。また、HBZ 蛋白、抗 HBZ 抗体を検出する ELISA 系を作成したが、患者 PBMC 中の HBZ、患者血漿中の抗 HBZ 抗体ともに検出できなかった (data not shown)。HAM 患者の病態と HBZ 発現との関連解析の結果、炎症反応が強い進行期の HAM 患者は、慢性期の患者と比較して HBZ mRNA が高発現しており、病勢との有意な相関が認められたが、Tax mRNA 発現と病勢との有意な相関は見いだせなかった。特に、脊髄に多巣性病変を認め、発症後 1 か月以内に歩行不能に至った重症例において、ATL 患者レベルの極めて高い HBZ mRNA 発現を認めたが、Tax mRNA は検出感度以下であった。(図 11)。

④ ゲノム DNA を用いて沖縄県の HAM 症例 27 例、鹿児島県の HAM 症例 50 例、合計 77 例の HAM 患者について PCR-RFLP 法で tax subgroup を決定した。沖縄県の症例では tax A が 17 例 (63%)、tax B が 10 例 (37%)、鹿児島県の症例では tax A が 11 例 (22%)、tax B が 39 例 (78%) と、沖縄県の症例に tax A が有意に多かった ( $\chi^2=11.0$ ,  $p=0.0009$ , Odds Ratio=6.03, CI 95%: 2.15-16.86.)。

⑤ tax A HTLV-1 感染 HAM 患者、tax B HTLV-1 感染 HAM 患者いずれの群においても、PBMC 中の HBZ mRNA 発現量と PVL との間に有意な正の相関関係が認められた。tax B HTLV-1 感染 HAM 患者の細胞あたり

の HBZ mRNA 発現量は、tax A HTLV-1 感染 HAM 患者より有意に高かった ( $p=0.00012$ )。また、tax B HTLV-1 感染 HAM 患者では、PBMC 中の HBZ mRNA 発現量と FoxP3 mRNA 発現量との間に有意な正の相関関係が認められたが ( $p=0.0277$ )、tax A HTLV-1 感染 HAM 患者ではこの相関が認められなかった ( $p=0.533$ )。

#### D. 考察

OX40 は TNF 受容体スーパーファミリーに属し、T 細胞活性化の初期段階に誘導される分子である。T 細胞上に発現した OX40 は、抗原提示細胞上の OX40L (gp34) と結合することで T 細胞と抗原提示細胞間の共刺激分子として機能しており、活性化 T 細胞の effector 機能発現、memory T 細胞誘導等に働いていると考えられている。近年、過剰な OX40-OX40L 結合が 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ており、自己免疫疾患様の慢性炎症性疾患である HAM の病態形成への関与が推測される。今回、OX40 が Tax により HTLV-1 感染細胞に選択的に発現誘導され、HAM 脊髄病変局所浸潤細胞に高発現していたことから、OX40 陽性細胞が HAM の病態形成に積極的な役割を果たしていることが考えられる。また、抗 OX40 モノクローナル抗体により HAM 患者の HTLV-1 感染細胞を *in vitro* で減少させることが可能であったことから、OX40 は HAM を含む HTLV-1 関連疾患の有望な治療標的分子となりうる可能性が示された。

一方、HBZ 遺伝子は、全ての ATL 症例で発現していること、HBZ 遺伝子の発現抑制により ATL 細胞の増殖が抑制されること、HBZ 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスにおいて、T リンパ腫のみならず CD4 陽性 T リンパ球の皮膚、肺への浸潤も認められることが報告されており、HBZ は HTLV-1 関連疾患の病態形成に極めて重要な遺伝子である。今回の結果は、HBZ 遺伝子が ATL のみならず HAM の病態形成においても極めて重要であることを示している。作製した抗 HBZ 抗体によって HAM 患者 PBMC 中の HBZ 蛋白が検出できず、血漿中の抗 HBZ 抗体も感度以下であったことは、HBZ 蛋白発現が感染者の体内で強く抑制されている、限られた局所でのみ発現する、HBZ が主に RNA として機能する等の可能性を示唆している。いずれにせよ、

HBZ は宿主の免疫応答から巧みに逃避して機能していることを示しており、きわめて興味深い。

過去の研究から、HTLV-1 の転写調節因子をコードする tax 遺伝子には、LTR での cosmopolitan A, B 分類に対応した subgroup が存在し、そのうち tax subgroup A (tax A) に感染した個体が HAM に罹患しやすいことが明らかになっている (Furukawa Y et al. *J Infect Dis.* 182:1343-9, 2000) が、今回の検討で、沖縄の HAM 症例は、鹿児島 (本土) の症例と比較して tax A の感染者が有意に高いことが明らかになった。tax A は、HAM の発症率が日本と比較して約 7 倍程度高いジャマイカなど、カリブ海諸国の HAM 患者が持つウイルス型と高い相同性があることが報告されている。また、ジャマイカと日本の HTLV-1 感染者の比較解析から、HTLV-1 に対する宿主免疫応答に差がみられるとの報告もなされている (Birmann BM et al. *Int J Cancer.* 124: 614-21, 2009)。

近年、HBZ が Foxp3 遺伝子の転写を誘導することで、感染リンパ球を制御性 T リンパ球へ変換して発がん・炎症に関与する可能性が指摘されている (Satou Y et al. *PLoS Pathogens* 2011:e1001274.)。本研究で明らかになった、tax B HTLV-1 感染 HAM 患者においてのみ PBMC 中の HBZ mRNA 発現量と FoxP3 mRNA 発現量が正の相関関係を示すという事実が、どのような生物学的意味を持つのかについて興味を持たれる。今後、tax subgroup が異なる HTLV-1 感染者間 (HAM, ATL, HC) で臨床的・免疫学的特徴を比較検討し、その特徴を明らかにすることは、HTLV-1 関連疾患の病態解明のために有用であると考えられる。

## E. 結論

HAM 患者の疾患感受性遺伝子多型解析に用いる検体を可能な限り多く確保し、多型同定後、その病態における役割の解明に資するための研究資源と病態解析法を整備した。すなわち、HAM 患者から末梢血を採取して各種生体試料を保存するとともに、臨床情報と各種検査結果を網羅したデータベースを作成した。一方、OX40 および HBZ が HAM の病態形成に積極的な役割を果たしており、HAM の有望な治療標的分子となりうる可能性を示した。

## F. 健康危険情報

特にない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

[1] Saito M, Matsuzaki T, Satou Y, Yasunaga J, Saito K, Arimura K, Matsuoka M, Ohara Y. In vivo expression of the HBZ gene of HTLV-1 correlates with proviral load, inflammatory markers and disease severity in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Retrovirology.* 6: 19, 2009.

[2] Saito M. Immunogenetics of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Inflammation and Regeneration.* 29: 310-316, 2009.

[3] 齊藤峰輝 HAM/TSP の病態に関する最近の考え方 *血液・腫瘍科* 58: 600-606, 2009.

[4] Taniura N, Saito M, Okuwa T, Saito K, Ohara Y. Different subcellular localization of Theiler's murine encephalomyelitis virus leader proteins of GDVII and DA strains in BHK-21 cells. *J Virol.* 83:6624-6630, 2009.

[5] 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.* 2010 Article ID 478461.

[6] 齊藤峰輝 HAM/TSP 病態研究の最近の進歩 *血液・腫瘍科* 60(5): 642-650, 2010.

[7] 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.

[8] Okuwa T, Taniura N, Saito M, Himeda T, Ohara Y. Opposite effects of two nonstructural proteins of Theiler's murine encephalomyelitis virus regulates apoptotic cell death in BHK-21 cells. *Microbiol Immunol* 54:639-643, 2010.

[9] 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 Res Hum Retroviruses**. 26:1147-1154, 2010.

[10] 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.

**Hum Immunol**. 71:541-550, 2010.

[11] Adachi T, Tanaka R, Kodama A, Saito M, Takahashi Y, Ansari AA, Tanaka Y.

Identification of a unique CXCR4 epitope whose ligation inhibits infection by both CXCR4 and CCR5 tropic human immunodeficiency type-I viruses.

**Retrovirology**. 8: 84, 2012.

[12] Saito M, Bangham CR.

Immunopathogenesis of Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): Recent perspectives. **Leukemia Research and Treatment**. 259045, 2012. (Online Journal のため論文番号のみ)

[13] Saito M. HTLV-1. **Encyclopedia of Genetics 2nd Edition**. Stanley Maloy, Kelly Hughes ed. Elsevier, Oxford, UK, in press, 2012.

## 2. 学会発表

[1] 第50回日本神経学会総会 2009, 5. 仙台 齊藤峰輝、斎藤孔良、大原義朗: HAM, ATL 治療標的候補分子 Bcl-3 の HTLV-1 感染による高発現機構の解析と制御法の検討

[2] 第49回日本リンパ網内系学会総会 2009, 7. 淡路 齊藤峰輝: シンポジウム「ATL と HTLV-1 研究の最前線」HAM/TSP の病態 日本リンパ網内系学会会誌 58:57, 2009.

[3] 第2回 HTLV-1 研究会・合同班会議 2009, 8. 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 (HAM) における OX40 陽性 T 細胞の意義. プログラム・抄録集 p31

[4] 第57回日本ウイルス学会学術集会 2009, 10. 東京 齊藤峰輝、田中礼子、田中勇悦: HTLV-1 関連脊髄症 (HAM/TSP) における OX40 陽性 T 細胞の意義.

[5] 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.

[6] 第3回 HTLV-1 研究会・合同班会議 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. プログラム・抄録集 p33

[7] 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.

[8] 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).

[9] 第52回日本神経学会学術大会, 2011, 5. 名古屋 齊藤峰輝、田中礼子、松崎敏男、末原雅人、田中勇悦: HTLV-1 マイナス鎖にコードされる HBZ の HTLV-1 関連脊髄症における病因的意義. プログラム・抄録集 p272

[10] 15th International Conference on Human Retroviruses: HTLV and Related Viruses. 2010, 6. Leuven, Belgium.

Saito M, Tanaka R, Kodama A, Matsuzaki T, Suehara M, Tanaka Y: Successful development of novel monoclonal antibodies against HTLV-1 bZIP factor and their applications in studying the pathogenesis of HAM/TSP. Proceeding: p81

[11] 第64回日本細菌学会九州支部総会・第48回日本ウイルス学会九州支部総会, 2011, 8. 北九州 齊藤峰輝、田中礼子、児玉晃、田中勇悦: HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) における OX40 陽性細胞の解析と HTLV-1 感染ヒト化マウス作製の試み. プログラム・抄録集 p28

[12] 第4回 HTLV-1 研究会, 2011, 9. 東京 齊藤峰輝、田中礼子、児玉晃、田中勇悦: ヒトリンパ球移植免疫不全マウス (hu-PBL-SCID) を用いた新規 HTLV-1 感染動物モデル作製の試み. プログラム・抄録集 p37

[13] 第23回日本神経免疫学会学術集会, 2011, 9. 東京 齊藤峰輝、田中礼子、田中勇悦: HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) における HBZ 遺伝子発現の意義. プログラム・抄録

集 p70

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特になし

### 2. 実用新案登録

特になし

### 3. その他

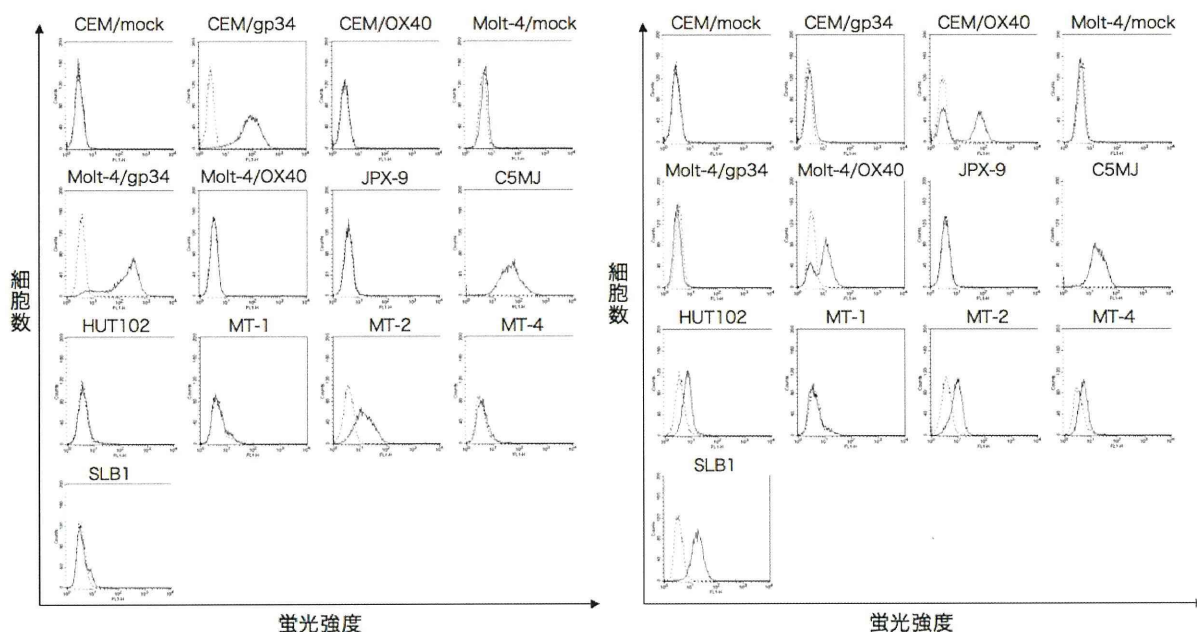
特になし



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

A. 蛍光標識抗 gp34 単クローン抗体で染色

B. 蛍光標識抗 OX40 単クローン抗体で染色

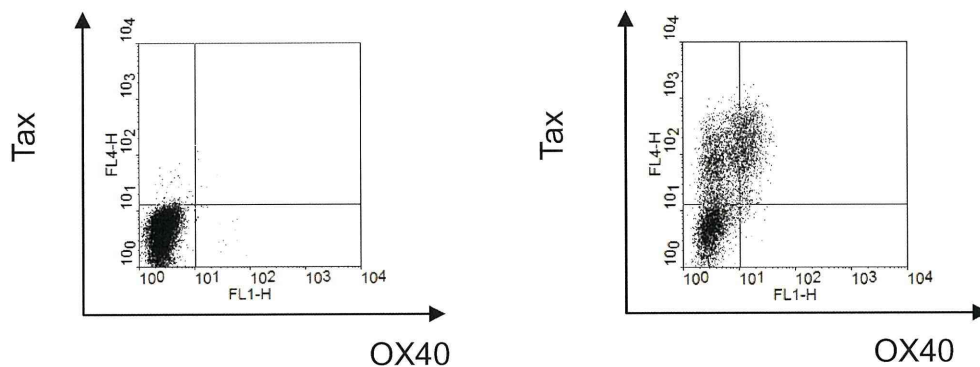


CEM/gp34, CEM/OX40, Molt-4/gp34, Molt-4/OX40: CEM または Molt-4 を親株とした gp34 または OX40 の安定発現細胞株 (stable transformant) - 陽性コントロールとして使用。

破線: Control 抗体 実線: 抗 OX40 or OX40L (gp34) 抗体

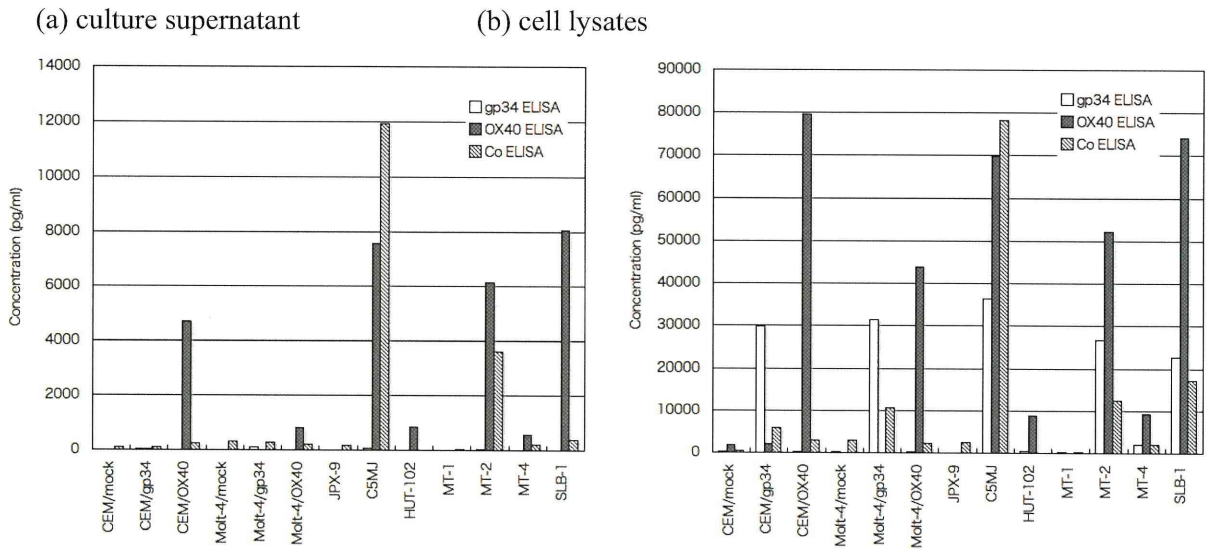
OX40 は HTLV-1 感染細胞株のうち C5MJ, HUT102, MT-2, MT-4, SLB1 に、OX40L (gp34) は C5MJ, MT-2 に高発現していた。

図 2: JPX9 細胞株における OX40 の発現



メタロチオネインプロモーター下流にウイルスの転写制御因子 Tax 遺伝子を導入した JPX9 細胞に CdCl<sub>2</sub> を添加して Tax を発現誘導し、その前後で OX40 が Tax 発現に伴って発現誘導されるかどうかについて検討した。JPX9 細胞では、Tax 発現に伴って Tax 陽性細胞特異的に OX40 の発現誘導が認められた。

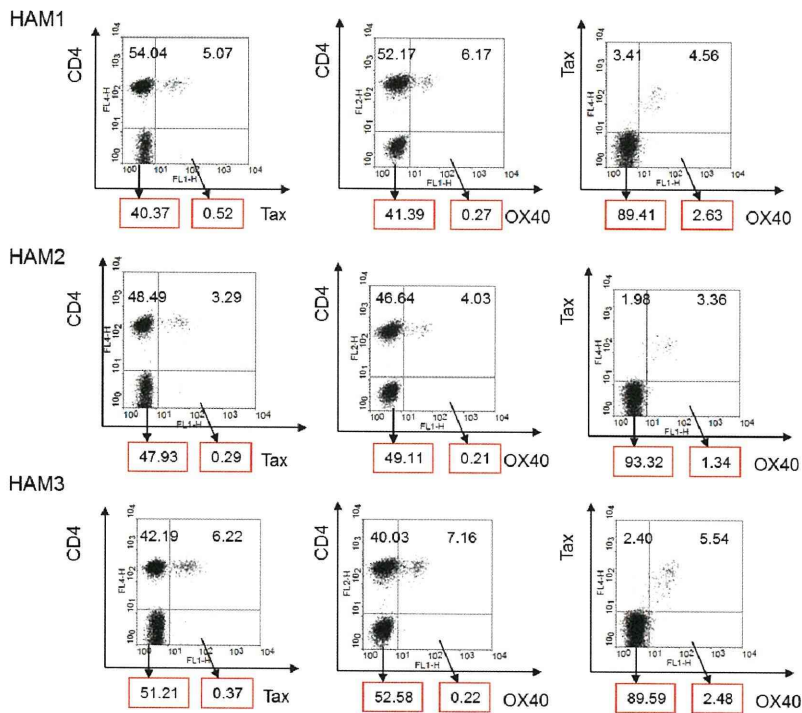
図 3: 各種 T 細胞株における OX40 の発現 (ELISA)



Co ELISA: OX40-OX40L (gp34) complex ELISA (複合体を検出)

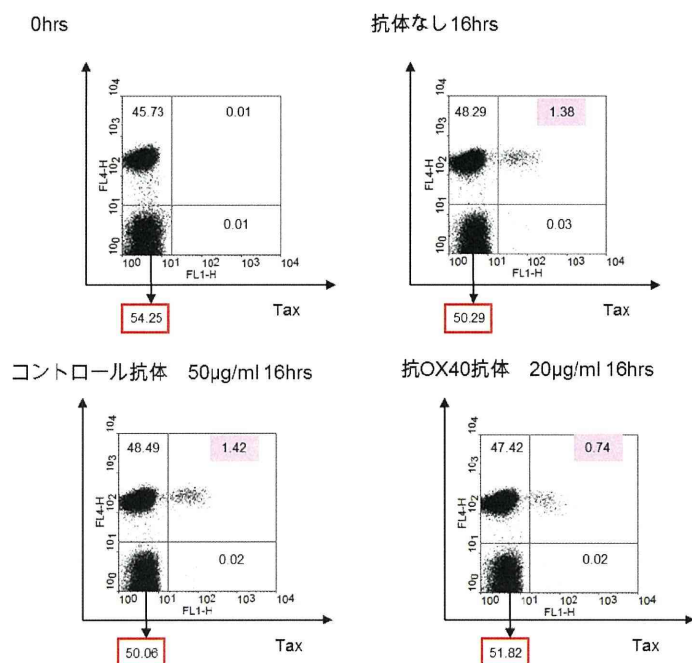
OX40 は Tax 発現に伴って誘導され細胞表面に発現するのみならず、細胞外(培養上清中)に soluble form として放出される。一方、OX40L (gp34) は細胞外(培養上清中)にはほとんど放出されない。

図 4: HTLV-1 感染 CD4 陽性 T 細胞における OX40 の発現誘導



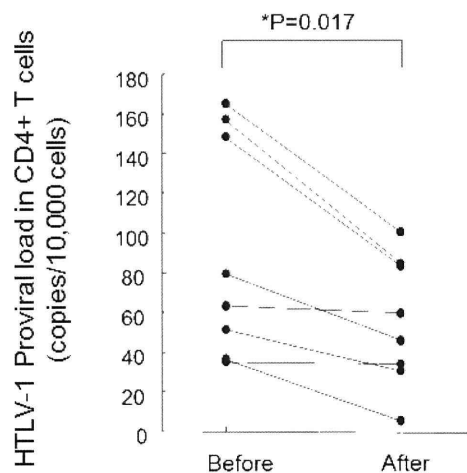
HAM 患者の新鮮 PBMC に OX40 および OX40L の発現は認められなかった (data not shown) が、in vitro で 16 時間培養して Tax 蛋白を発現誘導すると、OX40 は JPX9 細胞と同様に HAM 患者 PBMC 中の Tax 陽性細胞特異的に発現誘導された。

図 5: 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



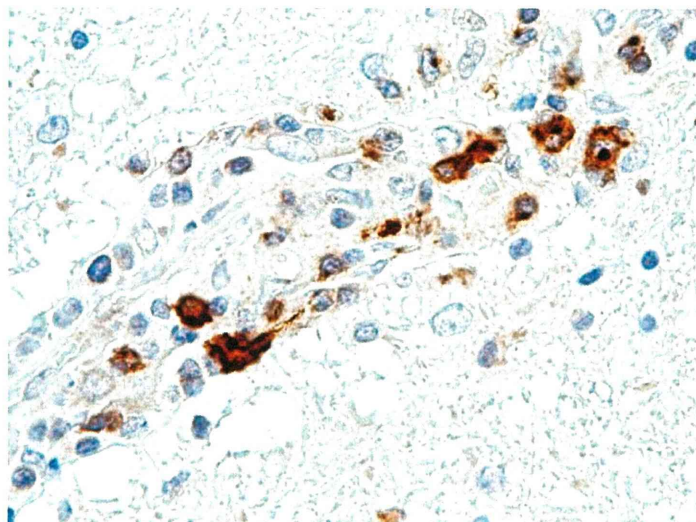
HAM 患者の PBMC を 16 時間培養すると、主に CD4 陽性 T リンパ球に Tax 蛋白発現が誘導される。この系に抗 OX40 モノクローナル抗体を添加すると、コントロール抗体 (抗 HIV-1 p24 抗体) と比較して CD4+Tax+細胞 (HTLV-1 感染細胞) が減少した。

図 6: 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 陽性 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。

図 7: 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。