

## II. 分 担 研 究 報 告 書

HTLV-1関連脊髄症(HAM)患者末梢血CD4+T細胞におけるシグナル伝達の特徴と  
治療薬候補標的遺伝子の探索に関する研究

分担研究者 出雲 周二 鹿児島大学医歯学総合研究科 教授

共同研究者 児玉 大介、久保田龍二 鹿児島大学医歯学総合研究科

研究要旨：HTLV-1関連脊髄症(HAM)患者での主感染巣である末梢CD4+T細胞でのシグナル伝達は、ウイルスと免疫応答のため変容していると考えられる。昨年度我々が報告したマイクロアレイによるHAM特異的発現変動遺伝子間の相互作用を包括的に検討するため、パスウェイ解析を行ったところ、ある特定の遺伝子との関連が示唆された。またこれら遺伝子の上流の転写因子、多くの遺伝子ネットワークを連結するキーノード分子を推定したところ、炎症に関与するJAK-STAT系、転写因子CREBと関連が強いことが示唆された。HAM脊髄でのアポトーシスの病理を考慮すると、JAK-STAT系シグナルが亢進した感染CD4+T細胞が末梢から中枢浸潤し、bystander効果として神経細胞の障害に寄与していること、また逆に感染CD4+T細胞の病的シグナル伝達阻害によるHAM治療の可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

HTLV-1関連脊髄症(HAM)のHTLV-1ウイルスの主なリザーバーである末梢CD4+T細胞でのシグナル伝達は、ウイルスおよびそれに対する免疫応答のため正常な状態とは変容していると考えられる。このような病的シグナル伝達の特徴を包括的に抽出することは一般に困難である。しかしこのことを可能とするシグナルネットワークないしシグナル伝達経路(パスウェイ)の解析に供する有償・無償のソフトウェアや、シグナル伝達経路のデータベースが近年開発されている。我々はパスウェイ解析ソフトウェアでマイクロアレイの結果を解析し、HAMの治療標的遺伝子・分子の探索を試みた。

#### B. 研究方法

対象:WHO診断基準により臨床診断したHAM患者4例、無症候性HTLV-Iキャリア(AC)4例、HTLV-1陰性健康者対照(NC)4例を無作為に選んだ。

倫理面への配慮:採血、検体保存は十分な説明と文書での同意を得て行った。本研究では患者と検体は非連結匿名化し、鹿児島大学倫理委員会の承諾を得て取得した検体を用いた。

凍結PBMC検体からのCD4+T細胞セレクションとマイ

クロアレイ:

約 $2 \times 10^7$ 個のPBMCを含む凍結検体を用い、CD4+T細胞を回収、さらにtotalRNA抽出、cDNA、Cy3標識cRNAの合成と標識(Cy3-CTP, 633nm励起)、Cy3標識cRNA精製、DNAマイクロアレイ(1-color Whole Human Genome44k×4plex DNA microarray, 41,000 genes (Agilent Technologies))を用い、ハイブリダイズと洗浄を行った後、Agilent Microarray scannerで画像取得後、Feature Extraction Software Ver. 10.5で蛍光シグナル強度を数値化したRaw dataを取得した。さらにGeneSpring GX softwareで数値データ対数変換、正規化した。これらは昨年度報告した。

パスウェイ解析:

①特異的関連パスウェイの抽出:

NCに比べ2 fold change(up/down)以上の変動がありかつ3群間One-way ANOVA(一元配置分散分析)で $p < 0.01$ を満たす遺伝子を有意差発現遺伝子とした。HAMでの有意差発現遺伝子をパスウェイ解析ソフトウェアExPlainと文献情報から整備されたパスウェイデータベースTRANSPATH(いずれもBIOBASE GmbH., Wolfenbuettel, Germany)を用いて少なくとも2つ以上の遺伝子が含まれる(#Hits in groupが2個以上)パスウェイを有意( $P < 0.05$ )とした。

## ②上流解析:

1) 転写因子結合サイト検索: 転写因子結合サイト(エレメント)のデータベースTRANSPROを用い、有意差変動遺伝子のプロモーターウインドウ(-1000~100)を比較・検索し重み付きのコンセンサス配列を算出し、上流の転写因子を予想した。

変化のある遺伝子群(Yes-set): fold change  $\geq 2.0$  とし、

変化のない遺伝子群(No-set): fold change  $< 1.1$  であり、かつHAM, AC, NC群で共通して変動がない遺伝子群を探索するため、変動係数(Coefficient of variation (C.V.)), 標準偏差を算術平均で割り、相対的なばらつきを表す単位の無い数)が下位300個の遺伝子を採用した。

$$C.V. = \frac{\sqrt{\sigma^2}}{\bar{x}}$$

Yes/Noサイト頻度比  $> 1.5$ , Yes-set中の結合サイト存在数に対する偶然の確率( $P < 0.05$ ), Yes-set中のプロモーター数に対する偶然の確率( $p < 0.05$ )を満たすものを転写因子結合サイトとした。

2) キーノード(Key node)解析: Yes-setで発現/制御応答を含むエッジを最大6つまで遡るキーノードをFDR(False Discovery Rate)  $< 0.05$ で検索した。

3) キーノード遺伝子によるパスウェイ解析: 2つ以上のキーノードを持つ(#Hits in groupが2個以上)パスウェイをTRANSPATHデータベースから抽出した( $p < 0.05$ )。

## C. 研究結果

### 1. 有意差発現遺伝子によるパスウェイの特徴

HAMでは有意な( $p < 0.05$ )パスウェイは12個みられたが、TGF- $\beta$ /SMADに関与する1つを除いた11個すべてCaspaseによるアポトーシス制御に関与するものであり、さらにGene X(特許の可能性のため名称は秘す)が関与していた(表1)。

ACではCaspaseよりも上流にある細胞性ストレス関連のMAPK経路の遺伝子を含む2個の有意なパスウェイが抽出された(表2)。

HAM・ACで共通した有意な(2個以上の遺伝子がヒットする)パスウェイは認められなかった。

### 2. 上流解析

#### 1) 転写因子結合サイト検索:

HAM特異的遺伝子プロモーター領域、AC特異

的遺伝子プロモーター領域からコンセンサス配列を作成し、転写因子結合サイトのデータベースと照合しHAMでは56個、ACでは21個の転写因子が変動発現遺伝子上流に予想された。HTLV-1との関連をPubMedで検索すると、HAMではHTLV-1との関連が既知のもの(C/EBP, ATF2(CREB2), GATA1,3など)を除くとほとんど関連が知られていない転写因子であり、HAM, ACに共通したものが散見された(表は省略)。

#### 2) キーノード解析:

HAM特異的遺伝子群から予想したキーノード解析では、CREBのリン酸化キナーゼのひとつCaMK II, アポトーシス関連遺伝子(Fas, Daxx), TGF- $\beta$  R, Jak1・2, p38MAPK, HTLV-1との関連が知られているアダプター分子Crk, またインスリン受容体(InsR)など23個が抽出された。

ACのキーノード解析では、IFN- $\alpha$ 1, IL-4R, IL-10 R, IL-22Rなどサイトカインと受容体, Jak3, TykなどJak/Tykキナーゼなど47個が抽出された。

#### 3) キーノード遺伝子によるパスウェイ解析:

キーノード分子を含む有意なパスウェイがHAMでは66個、ACでは65個抽出された。HAMではインスリン受容体からリン酸化シグナルに関するパスウェイ, Jak-STAT系, p38MAPKのパスウェイが、ACではインスリン受容体からリン酸化シグナルに関するパスウェイの他, Jak3, Tyk2, SHP-1, -2, CAS, CrkLなど比較的細胞膜近くの分子に関するパスウェイが有意だった(表は省略)。

## D. 考察

平成23(2011)年度末現在でマイクロアレイまたはGenechipを用いHTLV-1を検討した文献は24編あるが、HAM由来検体の文献はなかった。平成24(2012)年1月にTattermusch S.らはHAMで初めてアレイデータを検討した<sup>1)</sup>。HAMでは末梢血白血球でIFN誘導性遺伝子(STAT1および2, TAP1, CXCL10(IP-10), IFI35など)の過剰発現が特徴であり単球, 好中球でも同様と報告している。著者らはパスウェイ解析の事実上の標準的ソフトウェアであるIngenuity(Ingenuity Systems Inc., CA, USA)を用いているがこれは上流解析はできない。我々が用いたExplain(TRANSPATH, TRANSFACデータベース含む)<sup>2)</sup>は上流解析ができる。また我々は末梢

白血球全体でなくHTLV-1の主な感染源であるCD4+T細胞を濃縮し検討するなど方法が異なり、結果、結論も違いがみられた。

HAM特異的変動遺伝子によるパスウェイでは、Gene Xの関与したCaspase関連のアポトーシスおよび、上流のストレス応答関連パスウェイが特徴的である。実際のHAM脊髄の病理でCaspaseが観察されることと矛盾しない結果と考えられた。

これに対しACではMAPKシグナル経路上流のMEKK2 (MAPK kinase kinase 2)などストレス応答のパスウェイが特徴的でHAMと異なりアポトーシスに陥っていないことが示唆された。

上流解析のうち転写因子結合サイト検索では、HAM, ACともHTLV-1との関連が文献的に知られていない転写因子が多く、HTLV-1の病的なシグナル伝達経路が十分検討されていないと考えられた。

HAMのキーノード解析では、HAM・ACのキーノードから4ノード以内の接続する遺伝子(connecting gene)中に、転写因子CREBは含まれたが、ATLのシグナル伝達で重要なNF- $\kappa$ Bは含まれておらず、HAMは炎症やサイトカインの下流であるJAK-STAT系に関与するCREBとの関係が、ATLは細胞増殖に関連するNF- $\kappa$ Bとの関係がそれぞれシグナル伝達上で深いことを反映していると思われる。これは特異的変動遺伝子による特異的パスウェイでも同様だった。

キーノード分子を用いた上流のパスウェイでinsulin受容体からのシグナルがHAM, AC共に抽出されたが、これは一般的にリン酸化シグナルのかなり上流にありエネルギーを供与するとされている。

今回、末梢血CD4+T細胞でHAM脊髄と同様なCaspaseなどのアポトーシス経路のパスウェイに関する遺伝子の過剰発現が有意にみられたことから、従来のHAM脊髄での病理学的変化は、アポトーシス関連遺伝子が過剰発現したHTLV-1に感染した末梢血CD4+T細胞が脊髄へ移行・浸潤し、bystander効果としてもたらずものではないかと推測される。そこで非常に関与が深いと思われる先述のGene Xや、さらにその上流の遺伝子を阻害標的とするHAMの遺伝子あるいは分子標的治療法となる可能性が考えられる。

今後、蛋白レベルでの検討、機能的解析が必要である。

## E. 結論

HAM末梢血CD4+T細胞を用いたアレイデータから抽出した有意差発現変動遺伝子をシグナル伝達データベースへマッピングと統計解析を行い、HAM, ACにそれぞれ特徴的なパスウェイのリストを得た。

HAMに特徴的なパスウェイのリスト上位はCaspaseカスケードのGene Xを高率に含み、Caspaseが関与するアポトーシスが、一方ACではアポトーシスには陥っていないがCaspase上流のMAPK経路の細胞性ストレスが病態の特徴と考えられた。

上流の転写因子としてはHAMではCREBが、ATLにおけるNF- $\kappa$ Bと対比して重要である可能性が示唆された。

HAM脊髄の病態と同様に末梢血CD4+T細胞でアポトーシスシグナルがみられることから、HAM脊髄でのアポトーシスは末梢から中枢への浸潤感染リンパ球に起因することが示唆された。

HAMに特徴的なパスウェイに関与が深いGene Xを標的にしたHAMの治療法が考えられる。HAM病態でのGene Xの役割を検証するため、今後機能的解析が必要である。

アレイデータを用いたパスウェイ解析はまだ確立しておらずヒト疾患の病態解析は端緒についたばかりであるが、上流解析を含むパスウェイ解析は臨床病態の解析に有用であることが示唆された。

## 参考文献

- 1) Tattermusch S, Skinner JA, Bangham CR. et al. PLoS Pathog. 2012 Jan;8(1):e1002480. Systems biology approaches reveal a specific interferon-inducible signature in HTLV-1 associated myelopathy.
- 2) Kel A., Voss N., Wingender E., et al. BMC Bioinformatics. 2006, 7(Suppl 2):S13. Beyond microarrays: Finding key transcription factors controlling signal transduction pathways.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- [1] Abdelbary NH, Abdullah HM, Matsuzaki T, Hayashi D, Tanaka Y, Takashima H, Izumo S, Kubota R. Reduced Tim-3 Expression on Human T-lymphotropic Virus Type I (HTLV-I)

Tax-specific Cytotoxic T Lymphocytes in HTLV-I Infection. J Infect Dis. 2011 Apr;203(7):948-59.

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

[3] 出雲周二, 松崎敏男, 久保田龍二. HAM の新しい展開. 神経内科 75(4):369-373, 2011.

## 2. 学会発表

[1] Matsuzaki T, Kodama T, Kubota R, Izumo S: Recent epidemiologic trends of HAM/TSP in Japan. 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV & Related Viruses, Leuven, Belgium, 2011

[2] Kodama D, Kubota R, Izumo S: Gene expression and glycan profiling of CD4+ T cells in HAM/TSP. 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV & Related Viruses, Leuven, Belgium, 2011

[3] Abdullah HM, Higuchi I, Kubota R, Matsuura E, Hashiguchi A, Abdelbary NH, Inamori Y, Takashima H, Izumo S: Histopathologic differences between human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)- positive and HTLV-1-negative polymyositis. 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV & Related Viruses, Leuven, Belgium, 2011

[4] Kodama D, Kubota R, Izumo S. Pathway analysis of HAM/TSP. 25th Symposium of the International Association for Comparative Research on Leukemia and Related Diseases, Tokyo, Japan, 2011

[5] 出雲周二. 特別講演: HAM の最新の話。第 16 回日本神経感染症学会、2011 年 11 月, 東京

[6] 児玉大介、久保田龍二、出雲周二: HTLV-I 関連脊髄症(HAM)における糖鎖グライコミクス解析。第 52 回日本神経学会総会。2011 年 5 月 名古屋

[7] 松崎敏男、久保田龍二、出雲周二: HAM 患者の全国疫学調査。第 52 回日本神経学会総会。2011 年 5 月 名古屋

[8] 児玉大介、久保田龍二、出雲周二: HTLV-1 関連脊髄症 (HAM/TSP) のパスウェイ解析。第 4 回 HTLV-I 研究会。2011 年 9 月 東京

[9] 第3回HTLV-1研究会・合同班会議  
平成22年(2010)8月27~29日 東京

G. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

[1] 「Gene Xを標的としたHTLV-1関連脊髄症の治療法」申請準備中

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし

Pathway ID	Molecular name	Pathway name	#Hits in group	Group size	#Hits expected	P-value
CH000003804	Gene X	> TOPBP1	2	3	1	0.000213782
CH000000870		→ Rad52	2	4	1	0.000425383
CH000000972		→ Bcl-xL	2	4	1	0.000425383
CH000003546		> Caspase-9	2	4	1	0.000425383
CH000000887		→ p73α	2	5	1	0.000705355
CH000000908		Caspase-8 →	2	6	1	0.00105264
CH000000997		Ubc9 →/ p73α	2	7	1	0.00146818
CH000000895		Fas →	2	10	1	0.00309403
CH000000977		→ p53	2	11	1	0.00376233
CH000000889		p73 pathway	2	24	1	0.0176695
CH000000711	SMAD4, Ran, Smurf-1	TGFβ pathway	3	76	1	0.0280633
CH000000879	cIAP-2	Caspase network	3	93	1	0.0439147

TOPBP1: DNA topoisomerase II binding protein 1; DNA repair protein RAD52 homolog (S. cerevisiae); p73α: tumor protein p73 isoform α; Ubc9: UBE21(ubiquitin-conjugating enzyme E21); Ran: GTP-binding Ran (ras-related nuclear protein); Smurf-1: E3 ubiquitin-protein ligase SMURF1; cIAP-2: BARC3 (a member of IAP family that inhibit apoptosis by binding TRAF1 and 2);

Name withheld.

表1. 有意差発現遺伝子によるHAMに特徴的なパスウェイ

Pathway ID	Molecular name	Pathway name	#Hits in group	Group size	#Hits expected	P-value
CH000000851	MEKK2, TBP7	JNK pathway	2	82	1	0.0112111
CH000000758	MEKK2, TBP7	stress-associated pathway	2	121	1	0.0237994

MEKK2 : MAPK kinase kinase 9. TBP7 (Tat-binding protein 7) : PSC4 (proteasome (prosome, macropath) 26S subunit, ATPase, 4)

表2. 有意差発現遺伝子によるACに特徴的なパスウェイ

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

HTLV-I 特異的細胞障害性 T 細胞が関与する臓器障害に関する研究

分担研究者 高嶋 博 鹿児島大学医歯学総合研究科 教授  
共同研究者 松浦英治、渡邊 修

**研究要旨**

HTLV-1 ウイルスの関連する炎症性の病態としては、脊髄障害を主症状とする HAM 以外にもぶどう膜炎 (HU)、筋炎、肺炎、関節炎、皮膚炎などがあるが、以前より HAM 患者は、無症候性の脳白質病変が MRI で高率に検出されることが指摘されてきた。今回われわれはこの脳病変が HTLV-1 感染に関連した炎症性病変であることを確認するために、HTLV-1 特異的 CTL が同部位に浸潤しているかどうか免疫組織学的に検討した。その結果 HAM の脳において HTLV-1 特異的細胞障害性 T 細胞が多数検出され、HTLV-1 の感染による免疫反応が脊髄のみならず脳にも及んでいることが明らかとなった。さらに我々はこの無症候性の中枢神経系病変を鑑み、HTLV-1 キャリアーの患者脊髄においても HTLV-1 特異的細胞障害性 T 細胞が存在するかどうか検討を行った。その結果、キャリアー3例のすべての脊髄においても HAM 脊髄の炎症細胞浸潤の分布と同様な細胞浸潤の分布を認めた。すべてのキャリアー脊髄において HTLV-1 への免疫反応が認められたことは HAM の病態が HAM 発症よりもかなりはやい時期から始まっている可能性を示唆している。このことは HAM の発症以前の早期の治療介入が有効である可能性を示唆し、HAM の発症予防につながる可能性が示唆された。

**A. 研究目的**

HTLV-1 ウイルスの関連する病態としては、HAM 以外にもさまざまな炎症性疾患、ぶどう膜炎 (HU)、筋炎、肺炎、関節炎、皮膚炎などが報告されてきた。また、HAM 患者の頭部 MRI 検査でも高率に脳白質の異常信号が指摘され、この脳病変も HTLV-1 との関連が推測されてきた。今回われわれはこの脳病変が HTLV-1 感染に関連した炎症性病変であることを確認するために、HTLV-1 特異的 CTL が同部位に浸潤しているかどうか免疫組織学的に検討した。また、HAM 患者の脊髄にみられる HTLV-1 特異的 CTL の集簇が HTLV-1 キャリアーの脊髄において HTLV-1 特異的 CTL が認められるかどうかについても検

討した。

**B. 研究方法**

鹿児島大学の脳が新鮮凍結されている HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の剖検症例について患者の HLA が A2 あるいは A24 である症例を調べたところ 1 例が該当した。この 1 例について脳における CD8 陽性リンパ球の浸潤を検討した。また、HTLV-1 キャリアーの剖検脊髄で A2 あるいは A24 が陽性であった 3 例 (1 例は A2、A24 ともに陽性、1 例は A2 陽性、1 例は A24 陽性) についても CD8 陽性リンパ球の浸潤を検討した。CD8 陽性リンパ球の浸潤していた炎症サイトについて HTLV-1 Tax11-19-HLA-A2 (あるいは A24) peptide complex tetramer を用いて

Tax11-19 特異的な細胞障害性 T 細胞 (HTLV-1-specific CTL) の検出を行った。観察には共焦点レーザー顕微鏡を用いた。

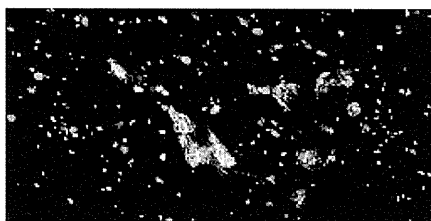
### C. 研究結果

1. HAM 患者の脳(前頭葉)の検討では、脳皮質には CD8 陽性細胞はほとんど認められなかったが脳白質には多く認められた。特に血管周囲腔に多数認められたが脳実質にも CD8 陽性細胞は散在して認められた。同様に HTLV-1 特異的 CTL も脳白質に多数観察された。

HAM 患者の脳に浸潤するリンパ球

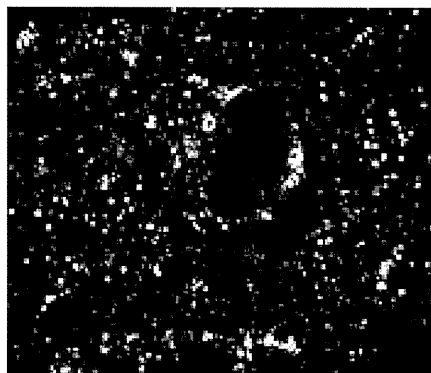
6315 HAM	浸潤CD8陽性リンパ球	HTLV-1特異的CTL
前頭葉皮質	+-	-
前頭葉白質	+++	+

HAM 患者の脳深部白質に認めた CD8 陽性細胞



血管周囲に浸潤が認められる

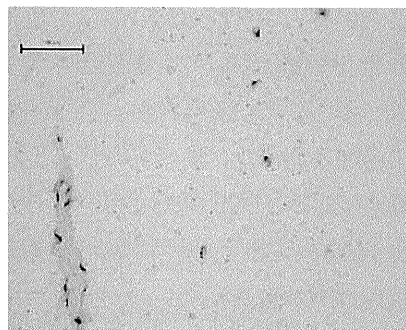
HAM 患者の脳内 HTLV-1 特異的 CD8 陽性細胞



CD8 陽性細胞が多数検出された

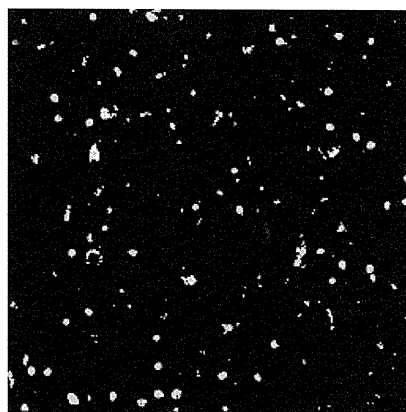
2. HTLV-1 キャリアー3 人の剖検脊髄の検討をおこなった。2 例では特に髄膜に CD8 陽性細胞の浸潤が多く認められ、脳内にも細胞浸潤が認められた。脳内での細胞浸潤の程度は軽度であったがそのなかに HTLV-1 特異的 CTL を検出することができた。炎症細胞の多くが血管周囲に存在した。1 例では髄膜と脳内に CD8 陽性細胞の浸潤は同じ程度認められた。この症例も HTLV-1 特異的 CTL の浸潤を脳実質内に確認した。

キャリアーの脊髄における CD8 陽性細胞



血管周囲を中心として CD8 陽性の細胞浸潤が認められる

キャリアーの脊髄における HTLV-1 特異的 CTL



キャリアー脊髄内の CD8 陽性細胞は決して多くはなかったが HTLV-1 特異的 CTL を検出した。



キャリア患者の脊髄における細胞浸潤の程度

	7038 56M meninges	parenchyma	7099 64F Meninges	parenchyma	7339 85M meninges	parenchyma
CD8陽性細胞浸潤	++	+	++	++	+	+
Tax specific CTL (HLA-A2)	+/-	+	+/-	+		
Tax specific CTL (HLA-A24)	+/-	+			+/-	+

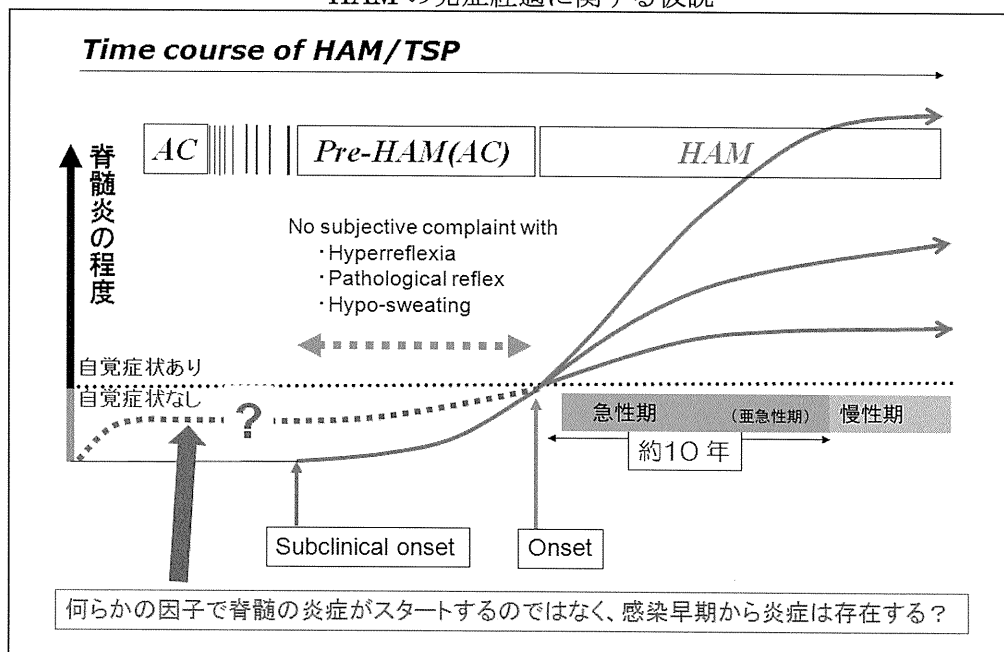
D. 考察

HAM 発見当初から指摘されてきた大脳 MRI 検査での異常信号は、近年、炎症細胞の浸潤を伴った病変であることが報告されている。我々はこの病変が HTLV-1 感染に関連する炎症であるかどうか確認するために HTLV-1 特異的 CTL の免疫組織学的検出を行った。

我々の検討では大脳白質の主に血管周囲に CD8 陽性細胞浸潤を容易に確認できたが、顕著な集簇を認めた訳ではなかった。そのなかで HTLV-1 特異的 CTL をも多数認めたことは大脳白質に浸潤する炎症細胞における HTLV-1 特異的 CTL の関与がおおきいことを示唆している。先の病理学的検討の報告も

併せてわれわれは HAM においては HTLV-1 特異的 CTL をふくめた炎症細胞浸潤が大脳でも起こっていると考えているが、画像上の異常信号を呈した部分を直接検討したわけではない。今回の炎症細胞浸潤の程度は軽度であり、虚血性変化に関する検討を行っていないため、画像上の変化を来す原因としていいかどうか確実ではない。また、大脳においてこのような炎症性変化が MRI で検出されるにもかかわらず脊 HAM の脊髄においては逆に画像変化がほとんどない理由も疑問である。今後の検討が必要である。

HAM の発症経過に関する仮説



われわれは HAM を発症していない患者 3 人の脊髄において炎症細胞の浸潤を調べ、大脳と同じように炎症細胞浸潤を軟膜および脊髄内に確認した。また、大脳と同様に HTLV-1 特異的 CTL の細胞浸潤も確認した。特筆すべき点として、キャリアーの脊髄における炎症細胞浸潤の分布は下部胸髄を中心としており、これは HAM における細胞浸潤の分布と一致する。キャリアー脊髄 3 例ともに炎症細胞浸潤が認められたことから、HAM の発症がある時期に何かを契機に炎症細胞の脊髄浸潤が始めるというわけではなく、脊髄への炎症細胞浸潤は HAM 発症以前より徐々に集積してある時期から症状が出現するという病態である可能性も示唆すると考えられ、HAM の発症病態を考えるにおいて大変重要な知見であると思われる。

#### E. 結語

HTLV-1 特異的 CTL は HTLV-1 キャリアーの脊髄に浸潤し HAM の発症に寄与し、発症後も脊髄以外の臓器にも炎症を引き起こしている可能性が示唆された。同じようにキャリアーの脊髄にも HTLV-1 特異的 CTL は認められ、HAM 発症に先立って炎症細胞がすでに長期にわたり浸潤しているということは HAM の発症機序を考えるにおいて大変重要な知見であるとともに、HAM のきわめて早い段階での治療、あるいは発症前早期治療の可能性を示唆している。

#### F. 文献

1. Nakagawa M, Izumo S, Ijichi S, Kubota H, Arimura K, Kawabata M, Osame M. HTLV-I-associated myelopathy: analysis of 213 patients based on clinical features and laboratory findings. *J Neurovirol.* 1995

Mar;1(1):50-61.

2. Aye MM, Matsuoka E, Moritoyo T, Umehara F, Suehara M, Hokezu Y, Yamanaka H, Isashiki Y, Osame M, Izumo S. Histopathological analysis of four autopsy cases of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: inflammatory changes occur simultaneously in the entire central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2000 Sep;100(3):245-52.
3. Morgan DJ, Caskey MF, Abbehussen C, Oliveira-Filho J, Araujo C, Porto AF, Santos SB, Orge GO, Joia MJ, Muniz AL, Siqueira I, Glesby MJ, Carvalho E. Brain magnetic resonance imaging white matter lesions are frequent in HTLV-I carriers and do not discriminate from HAM/TSP. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2007 Dec;23(12):1499-504.

#### G. 研究発表

なし

#### 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

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

研究分担者 植田 幸嗣 独立行政法人 理化学研究所 上級研究員

研究要旨： HAM の活動性（重症度）を正確に反映し、治療効果判定マーカーともなりうるバイオマーカー分子を同定する目的で、HTLV-1 感染無症候患者 5 例、HAM 患者 50 例（重症度 1～11）由来髄液の定量プロテオームプロファイリングを行った。全 55 症例の LC/MS/MS 分析により 635 種類の髄液タンパク質が False discovery rate < 1% の有意基準をもって同定され、さらに同質量分析データを Expressionist プロテオームサーバーシステムにて定量化、統計解析によるバイオマーカー同定を行った。

本解析では、HAM 重症度を 1～4、5～6、7～11 の 3 群に分けた時に、各群の分類決定因子となりうる候補タンパク質を ANOVA 法によって抽出すると同時に、中等度以上の重症度で特異的に上昇が見られるバイオマーカーを同定する目的で、2 群 Absent-Present search 解析を行った。最終的に得られたバイオマーカー候補を交差検定などにより検証し、既存の重症度依存マーカーとされる髄液ネオプテリン、sIL2R、IP10 のそれぞれとの相関解析も行い、重症度指針マーカーとしての有効性を評価した。

A. 研究目的

現在 HAM の診断において、種々の臨床所見によって規定される納の運動機能障害度が広く用いられている。しかし、本指標は分子生物学的客観性に乏しく、そのみで重症度別の治療指針を一律に定められるほどのエビデンスを持たない。そこで本研

究では、患者体液中の特定タンパク質量値から正確に HAM の重症度、特に診断時の疾患進行速度を推定できる診断薬の開発を目的とする。

本研究目的の達成により、治療戦略に直結する新たなエビデンスに基づいた HAM 病理群分類が可能となり、患者個々人の病

気に応じたより適切な治療、ケアが可能になる。さらに、これまで判断が困難であった HAM の疾患活動状態を把握できるバイオマーカーが同定されれば、緩徐進行期か、急性進行期かを見極められる重要な基準となり、迅速で有効な治療介入を行うことが出来るようになる」と期待される。

## B. 研究方法

上記研究目的に即したバイオマーカーを同定するため、55 症例由来の髄液サンプル (HTLV-1 感染無症候患者 5 例、HAM 患者 55 例) に含まれる全タンパク質の網羅的定量プロファイリングを行った。(図 1)

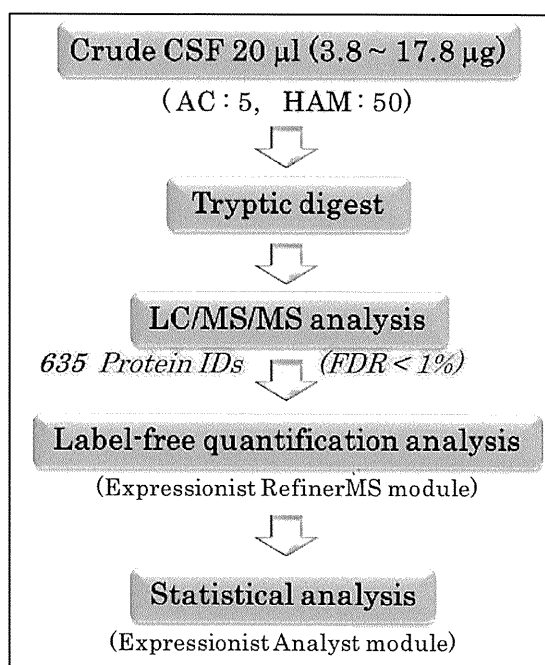


図 1 HAM 髄液バイオマーカー探索のための実験フローチャート

初回凍結融解品の髄液サンプル 20 µl 相当を 8M Urea を含む変性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。消化後ペプチドサンプルを逆相精製プレートにて脱塩、濃縮乾燥した後、LTQ-Orbitrap-Velos 質量分析計 (Thermo

Scientific 社製) にて計 55 サンプルの Nano-LC/MS/MS 分析を行った。

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。LTQ-Orbitrap-Velos 質量分析計の詳細な測定パラメーターは文献 [Ueda K. et al., PLoS ONE, 2011, 12;6(4):e18567] と同じものを使用した。

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。

次に、Expressionist Analyst モジュールを使用してデータの標準化を行った後、4 群 ANOVA 検定による重症度評価マーカー候補分子抽出を行った。ここでは  $p$  値が最も小さかったペプチドから上位 100 ペプチド ( $p < 7.2 \times 10^{-4}$ ) を、HTLV-1 感染無症候患者 ( $n = 5$ )、および HAM 重症度 1~4 ( $n = 15$ )、5~6 ( $n = 25$ )、7~11 ( $n = 10$ ) の 4 病理群それぞれで特異的に発現しているバイオマーカー分子として選出した。また、特に中等度以上の重症度において有意に高値、低値を示すバイオマーカータンパク質を抽出する目的で、(HTLV-1 感染無症候患者 + HAM 重症度 1~4 患者) vs. (HAM 重症度 5~11 患者)間において 2 群 t-test と Absent/Present search を行った。t-test

においては上記 4 群 ANOVA 検定同様、ここでも  $p$  値上位 100 ペプチドを今後の検証実験の候補分子とした ( $p < 3.2 \times 10^{-3}$ )。Absent/Present search では、(HTLV-1 感染無症候患者 + HAM 重症度 1~4 患者)群での検出率が 0%、(HAM 重症度 5~11 患者)群での検出率が 25%以上を示していたペプチドを HAM 中等度以上重症例特異的に発現しているバイオマーカー候補として選出した。

最終的に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\_12 (525,207 sequences), Fixed modification = Carbamidomethyl (C), Variable modifications = Oxidation (M), MS tolerance = 3 ppm, MS/MS tolerance = 0.8 Da, Peptide charge = +2 to +4, Instrument = ESI-TRAP。さらに、MASCOT Decoy Search アルゴリズムを使用し、False Discovery Rate を 0.01 に設定し、同定信頼性の基準とした。

#### [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髄液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、採取の手続きが行われた。

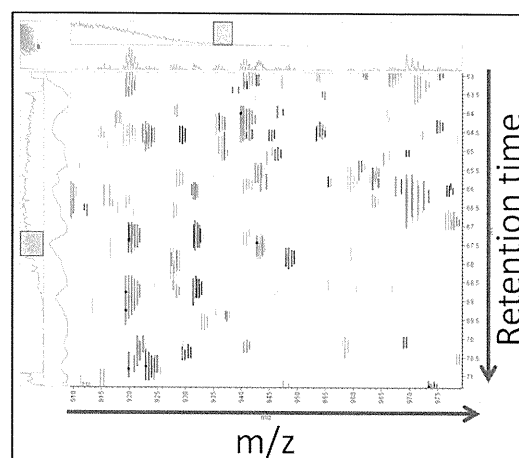
採取、凍結したサンプルは匿名化が行

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

55 症例由来の LC/MS/MS スペクトルは、Expressionist サーバー上で図 2 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 55 症例間の重複を除いた 56,986 ペプチドが検出された。(図 3) さらに、これら検出シグナル全てについて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 55 症例間の定量比較値を得た。

これら 56,986 ペプチドの中から、HTLV-1 感染無症候患者、および HAM 重症度 1~4、5~6、7~11、の 4 群それぞれで特異的に発現しているペプチドを選出するため ANOVA 検定を行い、100 ペプチドを  $p < 7.2 \times 10^{-4}$  の有意水準を満たす因子として抽出した (図 4)。





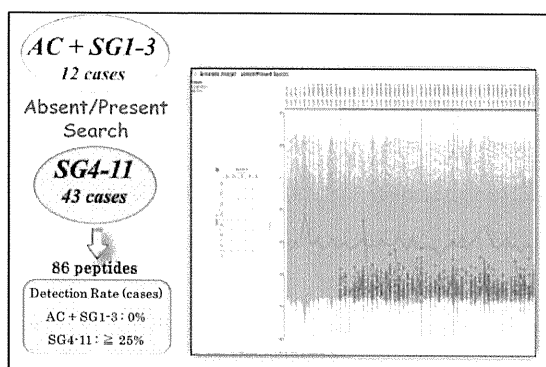


図7 Absent/Present searchによるバイオマーカー選定。

この解析からは、図8に示した代表的な8ペプチドの定量結果にある通り、HTLV-1感染無症候患者や軽度のHAM患者髄液では全く発現が確認されず、より重症度の高いHAM患者においてのみ検出されるバイオマーカー候補分子が抽出された。

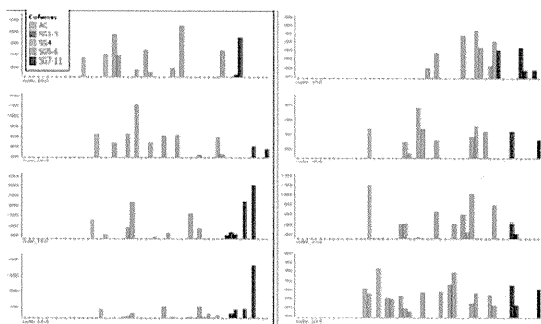


図8 Absent/Present searchによって同定された86バイオマーカー候補のうち、代表的な8ペプチドの質量分析定量結果。

#### D. 考案

55症例の髄液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、HAMの重症度分類のためのこれまでに報告のない新規決定因子同定に成功した。図6に示すように、すでにタンパク質同定まで完了している候補の中にも、感染無症候の状態から重症度が進行するに従って髄液中濃度が相関して上昇するバイオマーカーも複数確認

できている。これは、患者髄液を対象にした本網羅的プロテオームプロファイリングが疾患の進行に伴う変化を示すバイオマーカーを発見するのに極めて有効であったことを示唆している。

本統計解析の結果は、既存の重症度指標である納の運動障害度スコアに基づいて行われたが、特に図8の解析では、比較的重症度の高いHAM患者特異的に検出されるタンパク質であっても、その定量値が必ずしも納の運動障害度と相関しないものも多岐にわたることが分かった。これらのタンパク質の髄液中発現プロファイルをウイルス量や詳細な臨床情報、患者の予後などと大規模な相関試験を行うことが出来れば、同運動障害度スコアよりもさらに鋭敏にHAM患者の臨床病態を反映し、かつ疾患の活動性を評価しうる新たなバイオマーカーとなりうる可能性を持つ。

また、今後本研究で同定されたバイオマーカー候補タンパク質が、なぜHAMの重症度に依存して髄液中に増加してくるのか、また、その因子が増加することとHAMの臨床病態にどのような関連があるのか、などの機能解析を詳細に行うことで、HAMの代表的な症状である脊髄の慢性炎症を抑制する新しい治療薬の開発にも繋がる可能性がある。HAMの発症を防ぐには、HTLV-1感染細胞を体内から排除することが最も根治的な方法であるが、そのような技術がない現段階においては、本解析から得られたタンパク質の機能を阻害する薬剤、またはワクチンの投与等によってHAMの発症自体を予防することが可能になるかもしれない。

今後の戦略として、当該年度の研究で得られた髄液バイオマーカーを実用化するにあたり、侵襲性の問題をクリアする必要

がある。定期検査で毎回髄液を採取することは患者に大変な負担を強いることになるので、血液で診断が可能であれば実用化が加速し、適応症例も拡大するのは自明である。従って次年度は、同定された髄液バイオマーカーの ELISA 系を構築、または購入し、血清サンプルからも髄液と同様の定量プロファイルが得られるか、検体数を追加して検証する。

## E. 結論

LC/MS/MS を用いたラベルフリー定量解析により、ヒト髄液から HAM 重症度指針マーカーターゲット候補タンパク質を見出すことに成功した。HAM の病態を最もよく反映する体液と考えられる髄液を解析対象とする高感度プロテオームスクリーニングは過去に実施例がなかったが、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マテリアル、手段であったと言える。

次年度以降行う予定の血清サンプルを用いたバリデーション試験では、これら本年度の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検証し、いち早く臨床での実用化を目指す。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

• C12orf48, termed PARP-1 binding protein, enhances poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) activity and protects pancreatic cancer cells from DNA damage.

Piao, L., H. Nakagawa, K. Ueda, S. Chung, K. Kashiwaya, H. Eguchi, H. Ohigashi, O. Ishikawa, Y. Daigo, K. Matsuda, and Y. Nakamura.

(2011) Genes Chromosomes Cancer 50:13-24.

• Regulation of histone modification and chromatin structure by the p53-PADI4 pathway.

Tanikawa, C., M. Espinosa, A. Suzuki, K. Masuda, K. Yamamoto, E. Tsuchiya, K. Ueda, Y. Daigo, Y. Nakamura, and K. Matsuda.

(2012) Nature communications 3:676.

• Deglycosylation and label-free quantitative LC-MALDI MS applied to efficient serum biomarker discovery of lung cancer.

Toyama, A., H. Nakagawa, K. Matsuda, N. Ishikawa, N. Kohno, Y. Daigo, T. A. Sato, Y. Nakamura, and K. Ueda.

(2011) Proteome Sci 9:18.

• A comprehensive peptidome profiling technology for the identification of early detection biomarkers for lung adenocarcinoma.

Ueda, K., N. Saichi, S. Takami, D. Kang, A. Toyama, Y. Daigo, N. Ishikawa, N. Kohno, K. Tamura, T. Shuin, M. Nakayama, T. A. Sato, Y. Nakamura, and H. Nakagawa. (2011) PLoS One 6:e18567.

### 2. 学会発表

#### 国際会議

• Proteomic profiling of HTLV-1 infected T-cells for the Identification of



potential biomarkers and therapeutic targets for HTLV-1 associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis and adult T-cell leukemia.

Ueda, K., Ishihara, M., Ohsawa, A., Senkoji, N., Araya, N., Sato, T., Utsunomiya, A., Yamano, Y., Nakamura, Y., and Nakagawa, H.

The 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, June, 2011, Leuven, Belgium.

• Quantitative proteome profiling of CD4+CD25+CCR4+ T-cells to identify potential therapeutic targets for Human T-lymphotropic virus type-1 associated myelopathy (HAM) and adult T-cell leukemia.

Ishihara, M., Araya, N., Sato, T., Utsunomiya, A., Yamano, Y., Nakamura, Y., Nakagawa, H., and Ueda, K.

HUPO 2011, 10th World Congress, Sep, 2011, Geneva, Swiss.

「HAM/TSP、ATL 診断のための T 細胞タンパク質バイオマーカー群」申請準備中

#### 国内会議

• Quantitative proteome profiling to identify biomarkers for Human T-lymphotropic virus type-1 associated disease.

Ishihara, M., Araya, N., Sato, T., Utsunomiya, A., Yamano, Y., Nakamura, Y., Nakagawa, H., and Ueda, K.

第 70 回日本癌学会学術総会, Oct, 2011, Nagoya, Japan

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

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

HTLV-I の新規感染阻害剤、コンドロイチン硫酸(タイプ E)の研究に関する研究

研究分担者 星野 洪郎 群馬大学大学院医学系研究科 客員教授

研究要旨

ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (Human T-cell Leukemia Virus Type I: HTLV-I) の感染初期過程において、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (heparan sulfate proteoglycan: HSPG) が重要な役割を果たしている。PG を構成する硫酸化グリコサミノグリカンには、コンドロイチン硫酸 (chondroitin sulfate: CS) が結合したコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) も存在する。今回、硫酸基の位置や数の異なる 4 つの CS タイプ (CSA, CSC, CSD, CSE) について、HTLV-I 感染への影響について検討を行い、CSE に強い抗 HTLV-I 活性を見出し、その作用機構を heparin を対照として用い解析した。

A. 研究目的

HTLV-I は、ATL や HAM の原因ウイルスである。感染初期過程において、HTLV-I 粒子が利用する細胞表面分子の一つとしてヘパラン硫酸プロテオグリカン (heparan sulfate proteoglycan: HSPG) が存在する。プロテオグリカンを構成する硫酸化グリコサミノグリカンにはヘパラン硫酸 (HS) だけでなく、コンドロイチン硫酸 (chondroitin sulfate: CS) が結合したコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) も存在する。可溶性の硫酸化グリコサミノグリカンによる感染への影響としては、HS と構造の類似した heparin が HTLV-I をはじめとする多くのウイルスの感染を阻害することが知られている。硫酸基の位置や数の異なる 4 つの CS タイプ

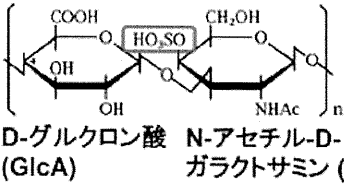
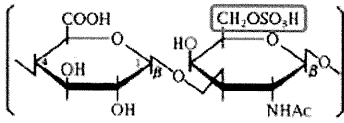
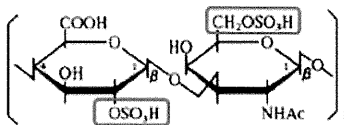
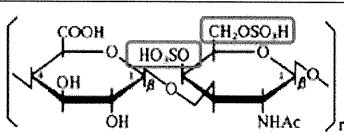
(CSA, CSC, CSD, CSE) について、これらの HTLV-I 感染への影響について検討し、新規の HTLV-I 感染阻害剤として、HAM の病因細胞を標的とする新規治療法の開発につながる可能性を検討する。

B. 研究方法

1. コンドロイチン硫酸 (CS)

愛知医科大学分子医科学研究 所杉浦 信夫、木全 弘治らの精製した図1 に示す4つのタイプの CS、すなわちコンドロイチン A (CSA) (クジラ軟骨由来で主にコンドロイチン 4 硫酸を含む)、コンドロイチン C (CSC) (サメ軟骨由来で主にコンドロイチン 6 硫酸を含む)、コンドロイチン D (CSD) (サメ軟骨由来)、コンドロイチン E (CSE)

図1 コンドロイチン硫酸の構造

<b>CSA</b>	<b>GlcA-GalNAc(4S)</b> (コンドロイチン4硫酸)		クジラ軟骨 20 kDa
<b>CSC</b>	<b>GlcA-GalNAc(6S)</b> (コンドロイチン6硫酸)		サメ軟骨 20 kDa
<b>CSD</b>	<b>GlcA(2S)-GalNAc(6S)</b>		サメ軟骨 20 kDa
<b>CSE</b>	<b>GlcA-GalNAc(4S, 6S)</b>		イカ軟骨 60 kDa

(イカ軟骨由来で主にコンドロイチン 4,6 硫酸を含む)を用いた。

## 2. HTLV-I 感染のアッセイ系

HTLV-I の産生細胞として、HTLV-I の持続感染したネコ腎由来細胞株 S+L-CCC (8C) [8C/HTLV-I 細胞のクローン c77] を用い、その培養上清を分注し、凍結保存 (-80℃) したものを用いた。HTLV-I 感染の程度を評価するアッセイ系の標的細胞としてヒト T 細胞由来株 MOLT-4 細胞用い、8C 細胞の培養上清の cell-free HTLV-I を接種し、20 時間後に細胞内で逆転写されたウイルス DNA を PCR 法で検出する系を用いた。PCR バンドの濃さを薬剤処理のない対照と比較し、判定した。

## 3. シンシチウム形成試験

HTLV-I の感染していないヒト astrocytoma 由来細胞株 U251-MG をプレートに接種し、翌日 HTLV-I の持続感染ヒト T 細胞株 C91/PL を上層した。更に2日培養後、固定しギムザ染色し、シンシチウム形成した細胞数を顕微鏡下で数えた。C91/PL 細胞を上層する際に、薬剤を加え、薬剤のシンシチウム形成への影響を検討した。

(倫理面への配慮)

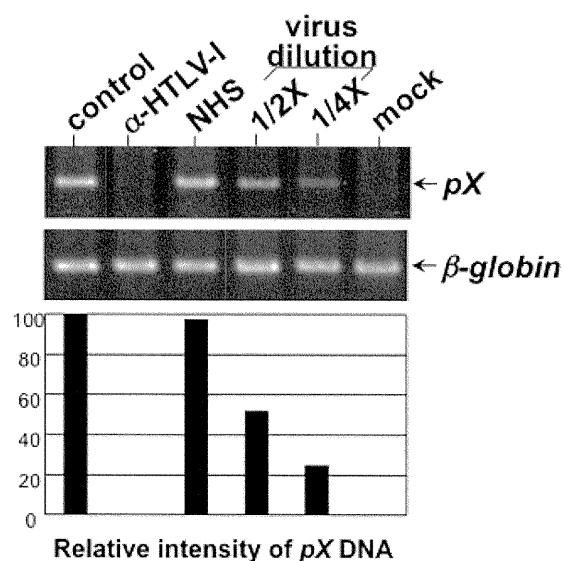
研究に用いた材料は、主に動物由来の物で、ヒト由来の細胞株も数十年前に樹立され、多くの研究者が用いている物で、倫理面での配慮は特に問題ない。

## C. 研究結果

### 1. MOLT-4 細胞への cell-free HTLV-I 感染と PCR 法による細胞内逆転写産物の検出

Cell-free HTLV-I を MOLT-4 細胞に感染し、PCR で HTLV-I DNA を検出した(図 2)。検出された DNA バンドの濃さは、ウイルスの希釈(control, 1/2, 1/4)に比例し、 $\alpha$  HTLV-I(ヒト血清)完全に抑制され、このアッセイ系が HTLV-I 感染評価系として適当であることが分かった。

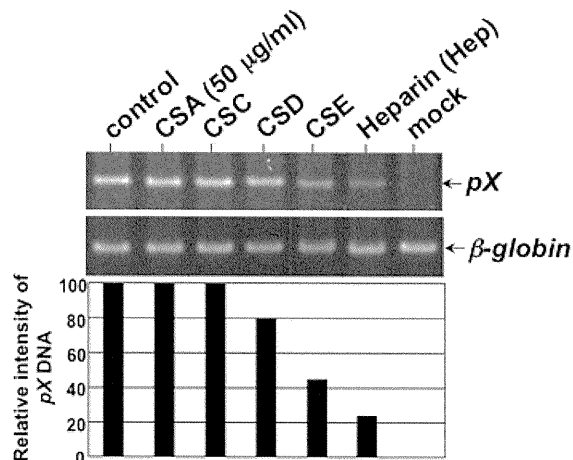
図2 MOLT-4細胞へのcell-free HTLV-I感染と PCR法による細胞内逆転写産物の検出



### 2. Cell-free HTLV-I 感染に及ぼすコンドロイチン硫酸の影響

ウイルスを CSA, CSC, CSD, CSE(50  $\mu$ g/ml)あるいは heparin で処理し上記の方法で、形成された HTLV-I DNA を検出した(図 3)。CSA と CSC では、検出されたバンドの濃さは対照とおなじであったが、CSD では弱く、CSE と heparin では強く抑制された。

図3 Cell-free HTLV-I感染に及ぼすコンドロイチン硫酸の影響



### 3. CSD、CSE、Hep による HTLV-I 感染抑制

CS の濃度を変えて HTLV-I を処理し、MOLT-4 細胞に感染し、各薬剤の 50% 感染抑制濃度(50% inhibitory concentration:  $IC_{50}$ )を求めた。CSD の  $IC_{50}$  は 120  $\mu$ g/ml、CSE の  $IC_{50}$  は 0.6  $\mu$ g/ml heparin の  $IC_{50}$  は 6.0  $\mu$ g/ml であった(図 4)。

### 4. CSD、CSE、heparin による HIV-1(IIIB 株)の感染への影響

CS には HTLV-I 感染の抑制効果が見られたので、この感染抑制効果が特異的な物か、HTLV-I と同じレトロウイルスである human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)を用いて検討した。HIV-1 の IIIB 株に対する CSD の  $IC_{50}$  は  $> 400 \mu$ g/ml CSE の  $IC_{50}$  は 400 $\mu$ g/ml であり、一方 heparin の  $IC_{50}$  は 4.0 $\mu$ g/ml であった(図 5)。Heparin は既に報告されているように著明は抗 HIV-1 効果を示したが、HTLV-I 感染に対してはほとんど影響を与えなかった。