

図4 CSD、CSE、HepによるHTLV-I感染抑制

標的細胞: MOLT-4

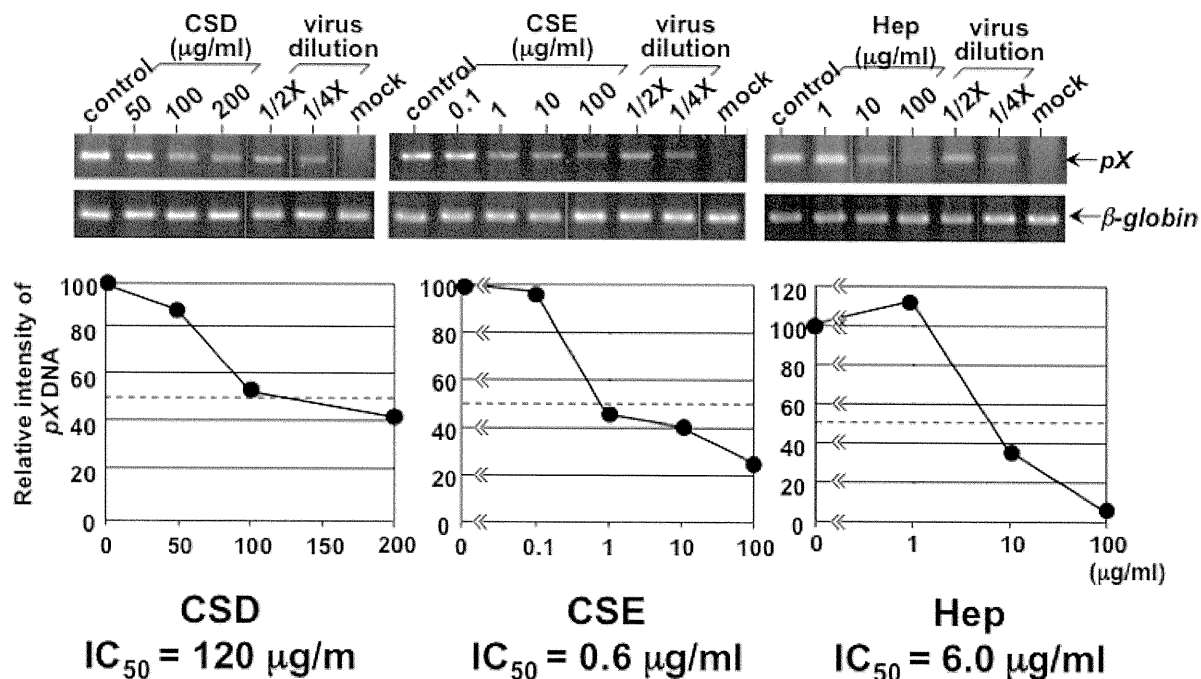
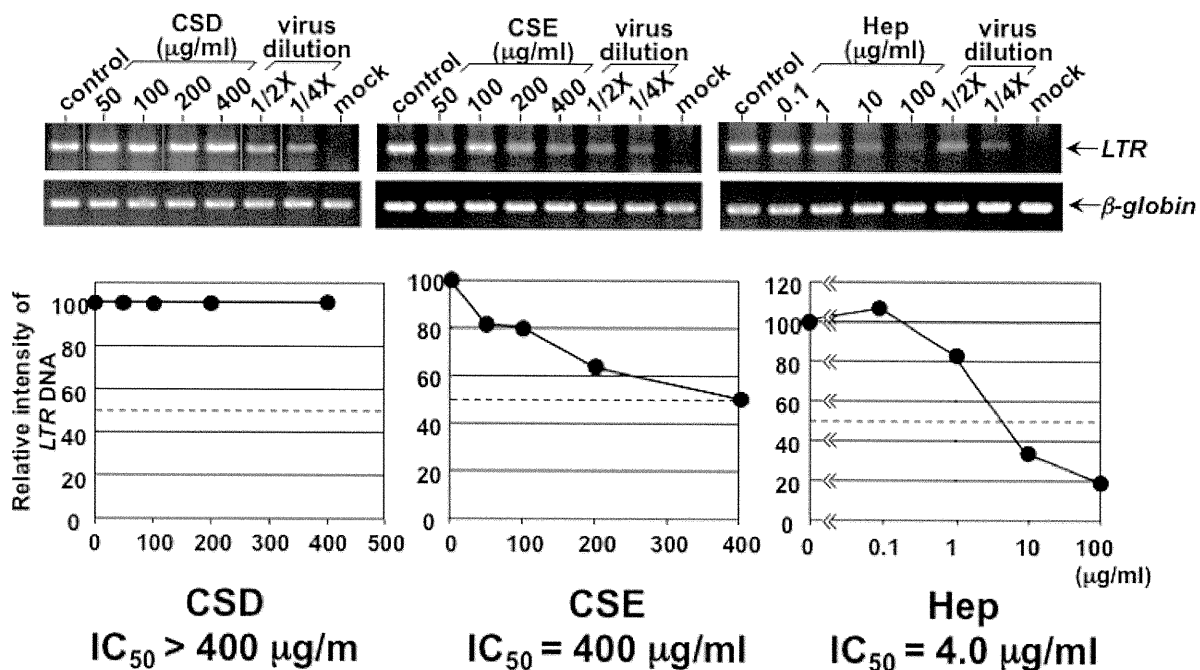


図5 CSD、CSE、HepによるHIV-1(IIIB株)感染への影響

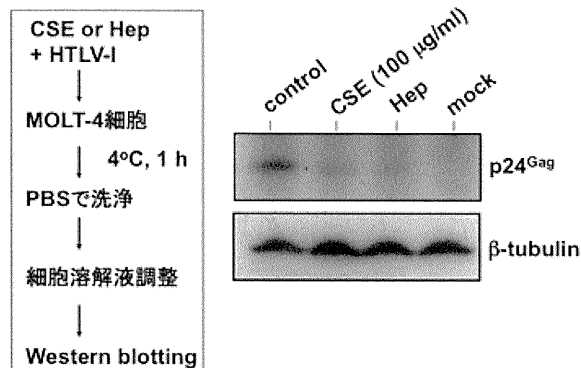
標的細胞: MOLT-4



5. CSE による HTLV-I の MOLT-4 細胞 への吸着への影響

HTLV-I と CSE あるいは heparin (100 μ g/ml) を 37 $^{\circ}$ C で反応させ、MOLT-4 細胞に 4 $^{\circ}$ C で 1 時間吸着させ、冷却 PBS 緩衝液で洗浄し、細胞を溶解し、細胞に吸着した HTLV-I の p24 を Western blot で検出した (図 6)。CSE および heparin は、いずれもウイルスの吸着を阻害した。

図6 CSEによるHTLV-IのMOLT-4細胞への吸着阻害

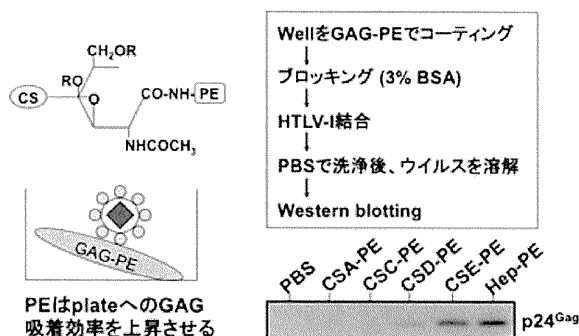


6. ホスファチジルエタノールアミン修飾硫酸化グリコサミノグリカンを用いた HTLV-I 結合試験

CS と HTLV-I が結合するか検討した。そのために CS を固層化するため、ホスファチジルエタノールアミン (PE) で修飾した硫酸化グリコサミノグリカン glycosaminoglycan (GAG) (GAG-PE) を作製した。GAG-PE をプレートに固層化しプレートをブロッキング後、HTLV-I と反応させ洗浄後、吸着した HTLV-I をその p24 を Western blot で検出した。CSE-PE あるいは heparin-PE (Hep-PE) には、HTLV-I が

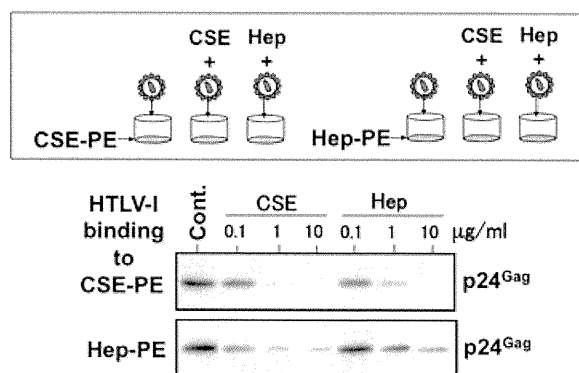
よく吸着し、CSD-PE にも少量結合した (図 7)。

図7 ホスファチジルエタノールアミン修飾硫酸化グリコサミノグリカン(GAG-PE)を用いたHTLV-I結合試験



次に、CSE-PE あるいは Hep-PE への HTLV-I 結合が CSE あるいは heparin (Hep) によって相互に阻害されるか、検討した (図 8)。まず、プレートの well に CSE-PE あるいは Hep-PE を上記のように結合させた。CSE-PE の結合した well に、CSE-PE と HTLV-I あるいは heparin と HTLV-I の混合物を加え、HTLV-I の well への吸着を CSE あるいは heparin が抑えるか Western blot で検討した (図 8)。10 μ g/ml の濃度では、相互に著明に結合を阻害した。

図8 GAG-PEへのHTLV-I結合は CSEあるいはHepによって相互に阻害される

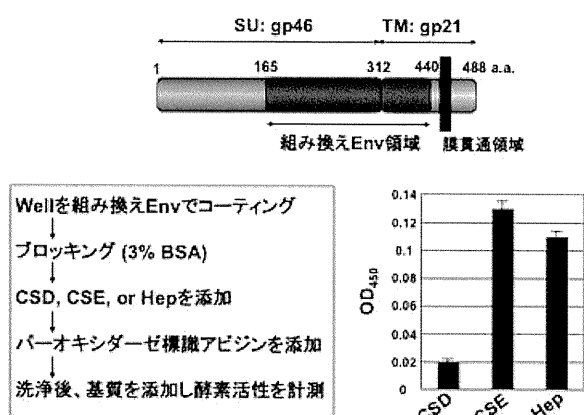


7. CSE と組み換え HTLV-I Env との結合

市販の組み換え HTLV-I の Env

(Env のアミノ酸 165 番から 440 番のペプチド) を用い、CS あるいは heparin と結合するか検討した。プレートに組み換え Env を固層化し、CSD, CSE あるいは heparin を加え、反応を洗浄した。さらにパーオキシダーゼ標識アビジンを添加し、結合した GAG 量を測定した (図 9)。Env には、CSE と heparin がよく結合した。

図9 CSEと組み換えHTLV-I Envとの結合



8. コンドロイチン硫酸 (CS) の HTLV-I によるシンシチウム形成に及ぼす影響

U251-MG 細胞と C91/PL 細胞を CS (100 μ g/ml 存在下) で混合培養し、シンシチウム形成への CS 影響を検討した (図 10)。CSA, CSC および CSD は、シンシチウム形成にほとんど影響を与えなかった。CSE は弱く抑制し、heparin は著明に抑制した。CSE の IC₅₀ は 200 μ g/ml であり、一方 heparin の IC₅₀ は 17 μ g/ml であった。

9. HTLV-I Env gp21 由来ペプチドと CSE のコンビネーションによる感染抑制効果

我々は、以前に Env の gp21 由来のペプチドが、HTLV-I 感染を抑制することを報告した (Jinno A ら、J Virol. 1999, 73, 9683-9689.)。このペプチド pep.(400-429):

CRFPNITNSHVPILQERPPLENRVLTGWGL は、HTLV-I の吸着後の過程を阻害する。今回の実験系でも、その抑制効果は PCR を用い確認でき (図 11 A)、その IC₅₀ は 10 μ g/ml 程度であった (図 11 B)。CSE 1 μ g/ml と gp21 pep. 20 μ g/ml を同時に処理すると、それぞれの単独より著明に HTLV-I 感染を抑制した (図 11 C, D)。

D. 考察

4 種のコンドロイチン硫酸 CSA, CSC, CSD および CSE について、heparin を対照として抗 HTLV-I 活性を検討した。CSE に著明な活性を認めた (表 1)。PCR を利用した cell-free HTLV-I の感染アッセイ系では、CSE および heparin (Hep) の IC₅₀ は、0.6 および 6.0 で、シンシチウム形成の抑制を指標としたアッセイ系では、200 および 17 であった。CSE については、cell free のウイルスには、低い濃度で効果があるが、シンシチウム形成は強くは抑制しなかった。この点で作用機構に違いがある可能性が考えられる。

4 種の CSA, CSC, CSD, CSE では、その硫酸基による修飾の位置が異なっている (図 1)。CSA は GalNAc の 4 位、

図10 コンドロイチン硫酸のシンシチウム形成に及ぼす影響について

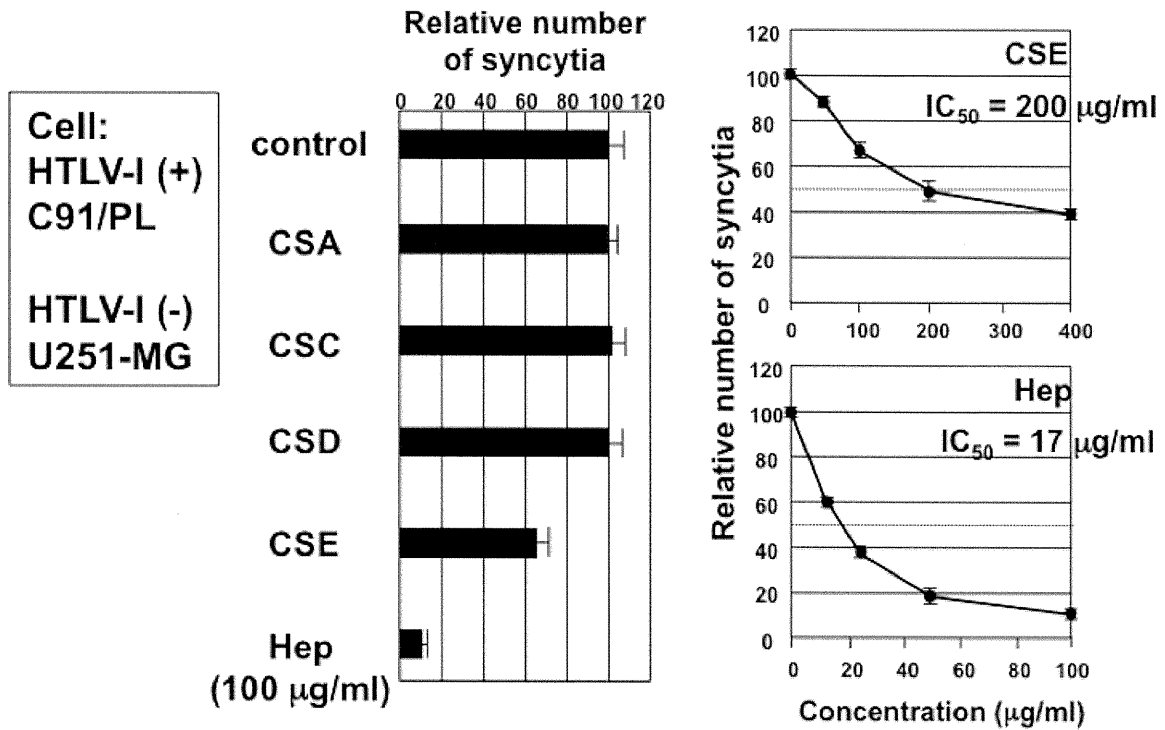
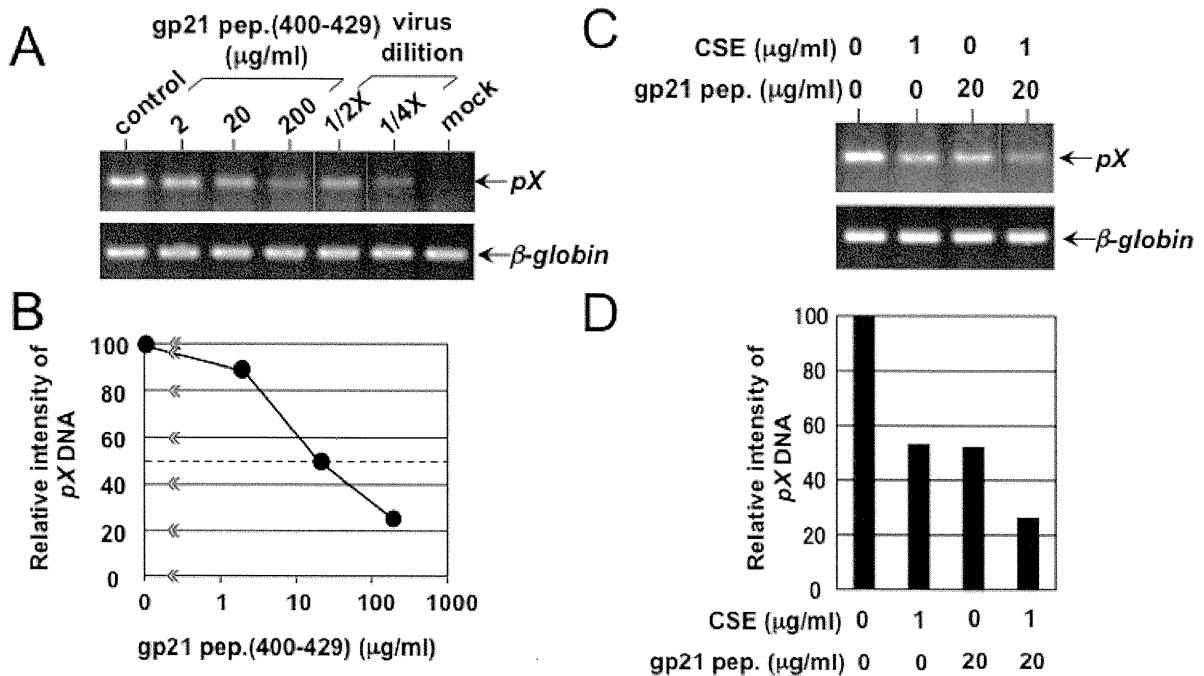


図11 HTLV-I Env gp21由来ペプチドとCSEのコンビネーションによる感染抑制効果の増強



gp21 pep.(400-429): CRFPNITNSHVPILQERPPLENRVLTGWGL

表1 コンドロイチン硫酸のHTLV-I感染に及ぼす影響

sulfated GAG	cell-free infection	syncytia form
CSA	>200	>100
CSC	>200	>100
CSD	120	>100
CSE	0.6	200
Hep	6	17

50% 抑制濃度 (µg/ml)

CSCはGalNAcの6位、CSDはGalNAcの6位とGlcAの2位、CSEはGalNAcの4位と6位が主に硫酸化されている。繰り

返し構造の中に硫酸基が多い方がHTLV-I活性を示しやく、またCSDとCSEのように2カ所あっても、その硫酸基の位置により、抗HTLV-I活性に大きな違いが見られた。

CSEもheparinもHTLV-Iの細胞への結合を抑制し(図6)、固層化したCSEあるいはheparinへのHTLV-Iの結合を相互に抑制し(図7)、組み換えEnvにいずれも結合した(図8)ので、CSEとheparinには抗HTLV-Iとして共通の作用機構があると考えられる。

一方、図4に示した濃度を変えた実験では、CSEはそのIC₅₀は0.6 µg/mlであったが100 µg/mlでも感染を80%しか阻害しなかった。一方、heparinはそのIC₅₀は6.0 µg/mlであったが100 µg/mlではHTLV-I感染を95%以上抑制した。すなわち、CSEは低い濃度でも感染を抑制するが、高い濃度でも感染を完

全には抑制しなかった。HTLV-Iによるシンシチウム形成の抑制実験でも(図10)、CSEは余り抑制しなかったが、heparinは比較的強く抑制した。また、HIV-1感染に対しては、CSEはほとんど抑制効果を示さないが、heparinではよく知られているように強い感染抑制効果が見られた(図5)。これらの点で、CSEとheparinの抗HTLV-I剤としての作用機構には違いがあり、CSEには新しいタイプの抗HTLV-I剤としての可能性があるのではないかと思われる。

E. 結論

コンドロイチン硫酸(chondroitin sulfate: CS)、CSA、CSC、CSD、CSEの中でCSD(サメ軟骨由来)とCSE(イカ軟骨由来)にHTLV-I感染抑制効果が認められた。感染を50%抑制するそれぞれの濃度は、CSDが120 µg/ml、CSEが0.6 µg/mlとCSEのほうが強い阻害効果を示した。CSA(クジラ軟骨由来)とCSC(サメ軟骨由来)には、抑制効果は認められなかった。CSEに特異的な硫酸基の位置と数がHTLV-I感染に対する強い阻害効果に重要であると考えられた。次に、CSEはHTLV-I粒子と結合することと、組み換えHTLV-Iエンベロープタンパク質に結合することを見いだした。さらに、ウイルスと細胞との結合試験により、CSEはHTLV-IのMOLT-4細胞への吸着ステップを阻害することが明らかとなった。以上の結果より、CSE構造を基本として、HTLV-Iの細胞への新規の感染阻害剤開発につながる可能性が考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ishioka T, Kimura H, Kita H, Obuchi M, Hoshino H, Noda M, Nishina A, Kozawa K, Kato M. Effects of respiratory syncytial virus infection and major basic protein derived from eosinophils in pulmonary alveolar epithelial cells (A549). *Cell Biol. Int.* 2011, 35, 467-74.

2) Shinagawa M, Jinno-Oue A, Shimizu N, Roy BB, Shimizu A, Hoque SA, Hoshino H. Human T-cell leukemia viruses are highly unstable over a wide range of temperatures. *J. Gen. Virol.* 2012, 93, 608-17.

3) Hoque SA, Ohtsuki T, Tatsumi M, Shimizu N, Islam S, Jinno-Oue A, Hoshino H. Lack of the trans-receptor mechanism of HIV-1 infection: CD4- and coreceptor-independent incorporation of HIV-1-resistant cells into syncytia induced by HIV-1. *Microbes Infect.* 2012, 14, 357-68.

4) Mori T, Shimizu N, Jinno-Oue A, Tanaka A, Shinagawa M, Tokizawa S, Akagi T, Hoshino H. Tax1-expressing feline 8C cells are useful to monitor the life cycle of human T-cell leukemia

virus type I. *J. Gen. Virol.* 2012, 93, 588-93.

5) Tanaka A, Jinno-Oue A, Shimizu N, Hoque A, Mori T, Islam S, Nakatani Y, Shinagawa M, Hoshino H. Entry of human T-cell leukemia virus type 1 is augmented by heparan sulfate proteoglycans bearing short heparin-like structures. *J. Virol.* 2012, 86, 2959-2969.

6) Nakamura K, Ohtsuki T, Mori H, Hoshino H, Hoque A, Oue A, Kano F, Sakagami H, Tanamoto K, Ushijima H, Kawasaki N, Akiyama H, Ogawa H. Novel anti-HIV-1 activity produced by conjugating unsulfated dextran with polyL-lysine. *Antiviral Research* 2012, 94, 89-97

7) Shimizu A, Tamura A, Nakatani Y, Shimizu N, Hoshino H, Ishikawa O. Pigmented plaque-type condyloma acuminatum associated with human papillomavirus type 6. *J. Dermatol.* 2012 (in press)

2. 学会発表 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

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

HAM 患者 HTLV-I 感染細胞における表面抗原および免疫反応の検討
に関する研究

研究分担者 久保田龍二 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 准教授

研究要旨：HAM においては、HTLV-I プロウイルス量が多いこと、すなわち HTLV-I 感染細胞が多いことが最大の発症リスクであるが、生体内における HTLV-I 感染細胞の性状についてはよくわかっていない。今回我々は、末梢血中の HTLV-I 感染細胞の表面抗原解析と、免疫機能について検討した。感染細胞の表面マーカーは CD2+CD4+CD5+CD26-CD45RO+CD45RA-CCR4+CCR7-であった。感染細胞では TCR および CD3 の発現が低下しており、HAM では正常コントロールと比べ、CD4+細胞の TCR シグナルは低下していた。同一患者の感染細胞は、非感染細胞より優位に TCR シグナルは低下していた。しかし、非感染 CD4+細胞も正常コントロール CD4+細胞より低下していた。以上の結果より、HAM の HTLV-I 感染細胞は TCR/CD3 の発現が低下しており、そのため TCR からのシグナル伝達が不十分となり、免疫能が低下していると考えられた。しかし、非感染 CD4+細胞も正常コントロールより TCR シグナルが低下しており、他のメカニズムによる広範囲の CD4+細胞における免疫不全も示唆された。

A. 研究目的

HAM においては、HTLV-I プロウイルス量が多いこと、すなわち HTLV-I 感染細胞が多いことが最大の発症リスクである。また HAM 症状の増悪時、ウイルス量の増大が認められる。しかし、生体内における HTLV-I 感染細胞の性状については、よくわかっていない。また、HTLV-I 感染症では、臨床的に免疫不全が指摘されているが、どのような機序で免疫低下が起こってい

るのかは、明らかでない。今回我々は、HAM 患者 PBMC 中の感染細胞を同定し、その表面抗原と T 細胞レセプター（TCR）に関する免疫機能を検討した。

B. 研究方法

HAM 患者の PBMC を短時間培養し、ウイルス蛋白が発現した後、Tax 蛋白を細胞内染色し感染細胞を同定した。同時に細胞表面を種々の抗体で染色し、表面マーカーを検討した。感染細

胞では TCR/CD3 の発現が低下していたため、TCR を中心として感染細胞の免疫機能を調べた。PBMC を短時間培養し、その後 CD3 抗体で刺激して、感染細胞を Lt-4 抗体で染色した後、TCR からのシグナル伝達分子である、Lck および ZAP70 のリン酸化を検討した。また、PBMC を CMV ペプチド存在下で短時間培養し、Tax 抗体陽性 CD4+細胞および陰性 CD4+細胞における、CMV 特異的 T 細胞の頻度と平均蛍光強度による IFN- γ 産生能を検討した。

(倫理面への配慮)

臨床検体採取にあたっては、インフォームドコンセントのもとに採血を行った。サンプルは匿名化して用いた。本研究は鹿児島大学倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

①生体内での HTLV-I 感染細胞は主に CD4+細胞であったが、CD8+細胞の一部も感染していた。単球系には感染はみられなかった。

②感染細胞の表面マーカーは CD2+CD4+CD5+CD26-CD45RO+CD45RA-CCR4+CCR7-であった(図 1、2)。CD25 の発現は、一部の感染細胞に認められた。

③感染細胞では TCR および CD3 の発現が低下していた。その他の T 細胞マーカーは保持されていた。CD3 は産生されていたが、表面への発現は低下していた(図 1、3)。

④HAM では正常コントロールと比べ、CD4+細胞での Lck および ZAP70 の TCR シグナルは低下していた。同一患者の感染細胞は、非感染細胞より優位に TCR シグナルは低下していた。しかし、非感染 CD4+細胞も正常コントロール CD4+細胞より低下していた(図 4、5)。

⑤2 例の HAM 患者での感染細胞中の CMV 特異的 CD4+T 細胞の IFN- γ 産生は、低下傾向であった。

D. 考察

HTLV-I 感染細胞の表面抗原は、CD2+CD4+CD5+CD26-CD45RO+CD45RA-CCR4+CCR7-であり、皮膚への指向性のあるメモリー CD4+ T 細胞であった。これらの一部は、既報と一致していた。

HTLV-I 感染者では、ウイルス感染や細菌感染が多いという疫学研究より、免疫機能の低下が推測されてきた。また、HTLV-I は主に CD4+細胞に感染するが、CD4+細胞は抗原提示を受けた後、B 細胞や CD8+細胞に病原体の情報を送る、いわば生体防御の司令塔である。CD4+細胞の免疫機能低下が起これば、生体は病原体に弱くなることが予想される。このような理由により、HTLV-I 感染 CD4+細胞は免疫機能が低下している可能性が考えられてきたが、その詳細は不明であった。本研究により、HTLV-I 感染細胞では TCR/CD3 の発現が低下しており、そのため TCR よりのシグナル伝達の低下を起こし、免疫機能の低下を起こし

ている可能性が明らかとなった。しかし、HTLV-I 感染者の非感染 CD4+細胞でも軽度の TCR 発現の低下が認められ、他のメカニズムによる広範囲の CD4+細胞の免疫低下も示唆された。今後さらなる検討が必要である。

E. 結論

①HAM の HTLV-I 感染細胞は、TCR および CD3 の発現が低下しており、そのため、TCR からのシグナル伝達が不十分となり免疫能が低下していると考えられた。

②しかし、非感染 CD4+細胞も正常コントロールより TCR シグナルが低下しており、他のメカニズムによる広範囲の CD4+細胞における免疫不全も示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

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

2. Abdelbary NH, Abdullah HM, Matsuzaki T, Hayashi D, Tanaka Y, Takashima H, Izumo S, Kubota R: Reduced Tim-3 expression on HTLV-I

Tax-specific cytotoxic T lymphocytes in HTLV-I infection. *J Infect Dis.* 203(7):948-59, 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. *Clin Exp Neuroimmunol.* 2: 12-7, 2011

4. Kozako T, Yoshimitsu M, Akimoto M, White Y, Matsushita K, Soeda S, Shimeno H, Kubota R, Izumo S, Arima N. Programmed death-1 (PD-1)/PD-1 ligand pathway-mediated immune responses against human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) in HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and carriers with autoimmune disorders. *Hum Immunol.* 72(11):1001-6, 2011

5. 久保田龍二：HAM スペクトラム。臨床神経学。51: 1044-6, 2011

2. 学会発表

1. Abdelbary NH, Abdullah HM, Matsuzaki T, Hayashi D, Tanaka Y,

- Takashima H, Izumo S, Kubota R:
Reduced Tim-3 expression on HTLV-I Tax-specific cytotoxic T lymphocytes in HTLV-I infection. *15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV & Related Viruses*, Leuven, Belgium, 2011
2. Kubota R, Takenouchi N, Matsuzaki T, Takashima H, Izumo S:
HLA-A24-restricted HTLV-I-specific CTL response reduces the HTLV-I proviral load but the HLA increases the risk of HAM/TSP. *15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV & Related Viruses*, Leuven, Belgium, 2011
3. 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
4. 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
5. 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
6. Matsuura E, Kubota R, Tanaka Y, Takashima H, Izumo S: Neural bystander damage by infiltrating virus-infected T cells and the cytotoxic lymphocytes in HTLV-I-associated neurological disease. *15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV & Related Viruses*, Leuven, Belgium, 2011
7. 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
8. 久保田龍二: HAM スペクトラム。第 52 回日本神経学会総会。2011 年 5 月 名古屋
9. 久保田龍二、Abdelbary NH、松崎敏男、林 大輔、高嶋 博、出雲周二: HAM の HTLV-I 特異的 CTL における T 細胞疲労関連分子の検討。第 52 回日本神経学会総会。2011 年 5 月 名古屋

10. 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
11. 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
12. 久保田龍二、竹之内徳博、松崎敏男、高嶋 博、出雲周二: HLA-A*24 拘束性 HTLV-I 特異的 CTL は HAM 発症リスクを下げるか? 第 23 回日本神経免疫学会。2011 年 9 月 東京
13. 久保田龍二、竹之内徳博、松崎敏男、高嶋 博、出雲周二: HLA-A24 拘束性 CTL はウイルス量を減少させるが HAM 発症リスクを上げる。第 4 回 HTLV-I 研究会。2011 年 9 月 東京
14. 児玉大介、久保田龍二、出雲周二: HTLV-I 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
15. 久保田龍二、Abdelbary NH、松崎敏男、林 大輔、高嶋 博、出雲周二: HAM における T 細胞疲労関連分子 Tim-3 発現の低下。第 16 回 日本神経感染症学会。2011 年 11 月 東京
- 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

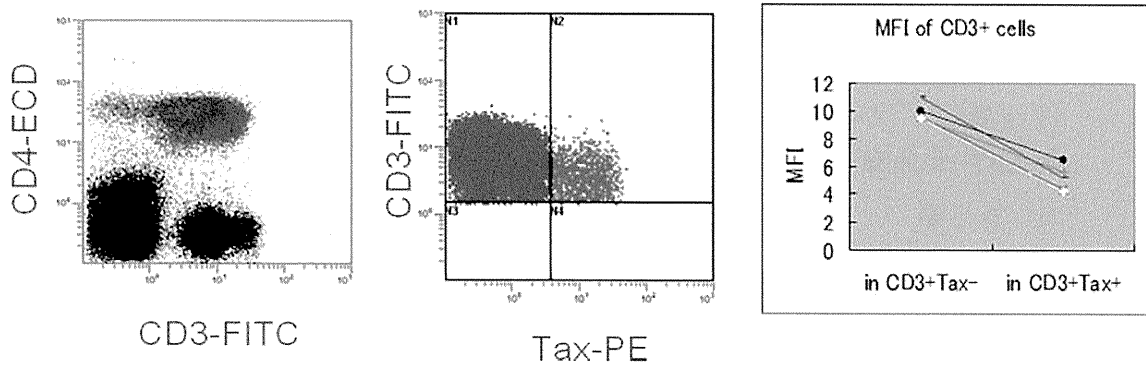


図 1. HAM 患者 PBMC 中の Tax 陽性細胞は CD3 の発現が低下している。左：リンパ球ゲート後の CD4 および CD3 染色。中：CD3 ゲートでの Tax 陽性および陰性細胞での CD3 の発現。右：6 例の HAM 患者 PBMC 中の Tax 陽性および陰性 CD3+細胞中の CD3 の平均蛍光強度の比較。

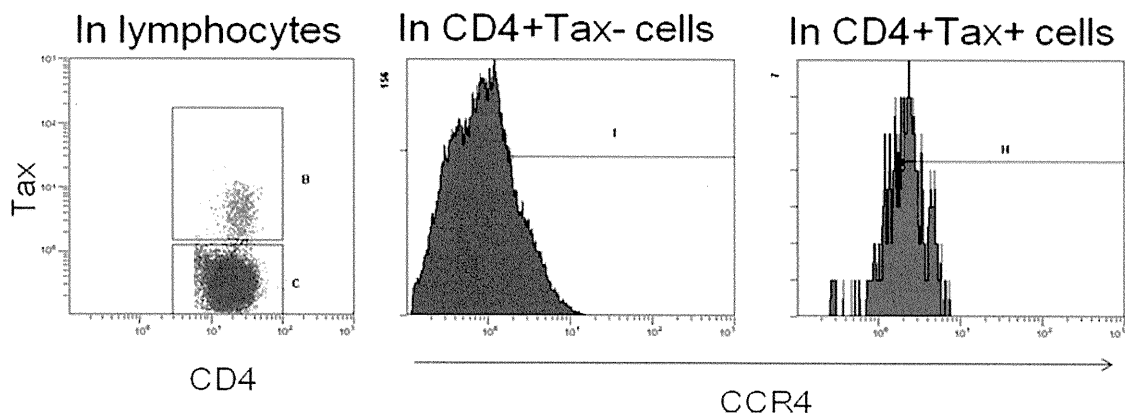


図 2. HAM 患者 CD4+陽性細胞中の Tax 陽性および陰性細胞における CCR4 発現。Tax 陽性細胞ではほとんどの細胞が CCR4 陽性である。

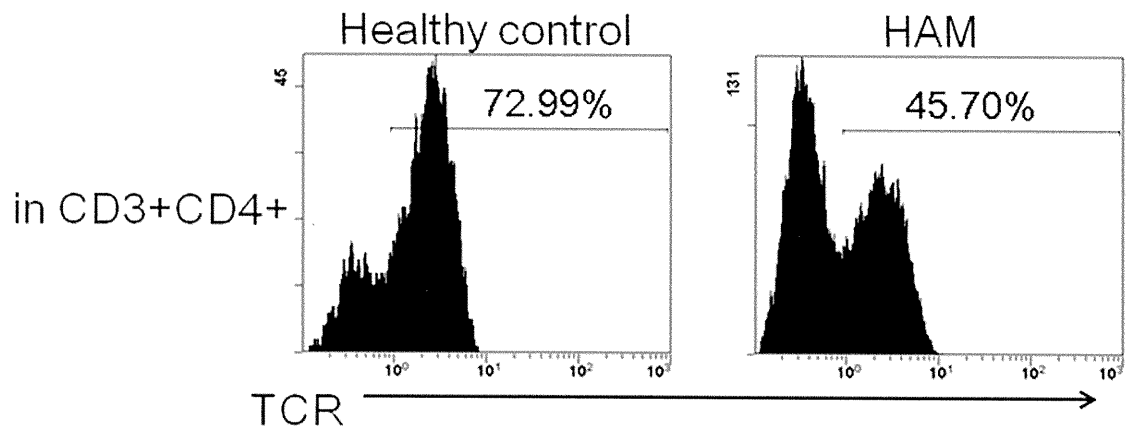


図 3. HAM の CD4+ T 細胞では TCR の発現が低下している。

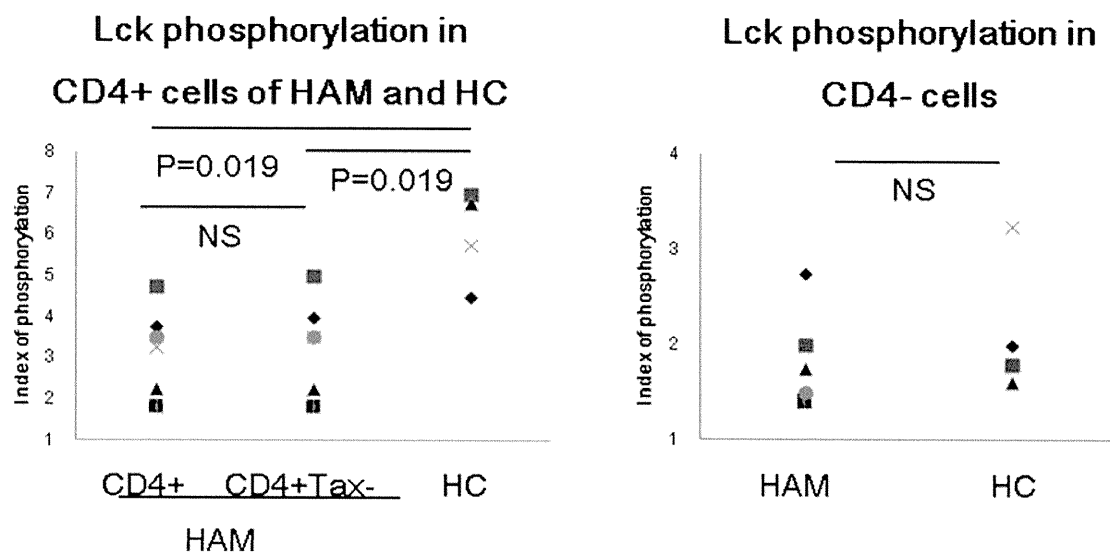


図 4. TCR 刺激による Lck リン酸化は、正常人の CD4+細胞 (HC) と比べ HAM の CD4+細胞および Tax 陰性 CD4+細胞で低下している。

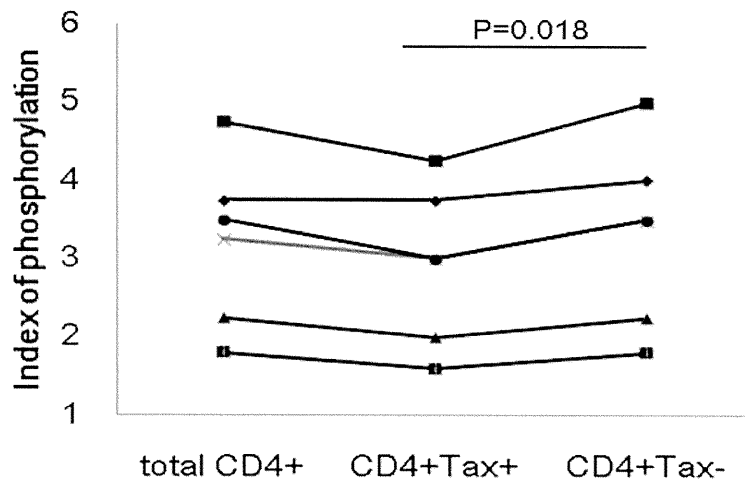


図 5. HAM 患者 CD4+細胞での Lck リン酸化の比較。Tax 陽性細胞では、Tax 陰性細胞よりリン酸化の低下を認める。

HTLV-1 関連脊髄症(HAM) 発症関連ウイルス遺伝子 HBZ の解析に関する研究

研究分担者 齊藤峰輝 琉球大学大学院医学研究科 准教授

研究要旨： HAM の発症機序解明と新規発症予防法・治療法の開発のため、昨年度は HTLV-1 の転写活性化因子 Tax の標的遺伝子を網羅的に解析し、Bcl-3 および OX40 が HTLV-1 関連疾患の新たな治療標的分子となりうることを報告した。今年度は、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、抗 HBZ モノクローナル抗体を作製し、HTLV-1 感染細胞中の HBZ 蛋白および患者血漿中の抗 HBZ 抗体の検出を試みた。また、HAM 患者末梢血単核球 (PBMC) を用いて HBZ, tax, FoxP3 mRNA 発現を定量し、HAM 疾患感受性を規定する 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、HBZ 蛋白発現が感染者の体内で強く抑制されていること、tax B HTLV-1 感染 HAM 患者の細胞あたりの HBZ mRNA 発現量が tax A 感染患者より有意に高いことを明らかにした。これらの結果は、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、細胞あたりの HBZ mRNA 発現量が疾患感受性を規定するウイルス型によって異なることを示しており、きわめて興味深い。

A. 研究目的

ヒト T 細胞白血病ウイルス1型 (HTLV-1) は、世界ではじめてヒト疾患との関連が見いだされたレトロウイルスであり、成人 T 細胞白血病 (ATL) および HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の原因ウイルスである。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。よって、HTLV-1 感染症の制圧は我が国の公衆衛生上・医療上の緊急の課題である。本研究の目的は、HAM の発症機序解明と新規発症予防法・治療法の開発のため、様々な免疫学的・分子生物学的手法を駆使して HTLV-1 感染細胞増殖や HAM 病態に関与する遺伝子群を単離・同定し、その制御法を開発することである。

B. 研究方法

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

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 蛋白、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 蛋白を蛍光抗体法 (図 1)、ウエスタンブロット (図 2)、フローサイトメリー (図 3A, B) により検出可能であったが、HAM 患者 PBMC 中の HBZ 蛋白は検出できなかった (図 3C)。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 蛋白、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 4)。

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

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、リンパ腫のみならず CD4 陽性リンパ球の皮膚、肺への浸潤も認められることが報告されており、HTLV-1 関連疾患の病態形成に極めて重要な遺伝子である (Yasunaga J, Matsuoka M. *Int J Hematol.* 94: 435-42, 2011)。我々も、これまでに HAM 患者の病態と HBZ 発現との関連を解析し、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る一方で、Tax mRNA 発現と病勢との有意な相関は見いだせないことを報告した (Saito et al. *Retrovirology*, 6:19, 2009)。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。

一方、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)。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

HTLV-1 tax subgroupの違いにより、感染者の生体内におけるHBZ遺伝子の発現動態が異なる可能性を指摘した。HBZは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がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

[1] 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)

[2] 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.

[3] 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

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

[1] 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

[2] 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 [3] 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

[4] 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

[5] 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. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

特になし

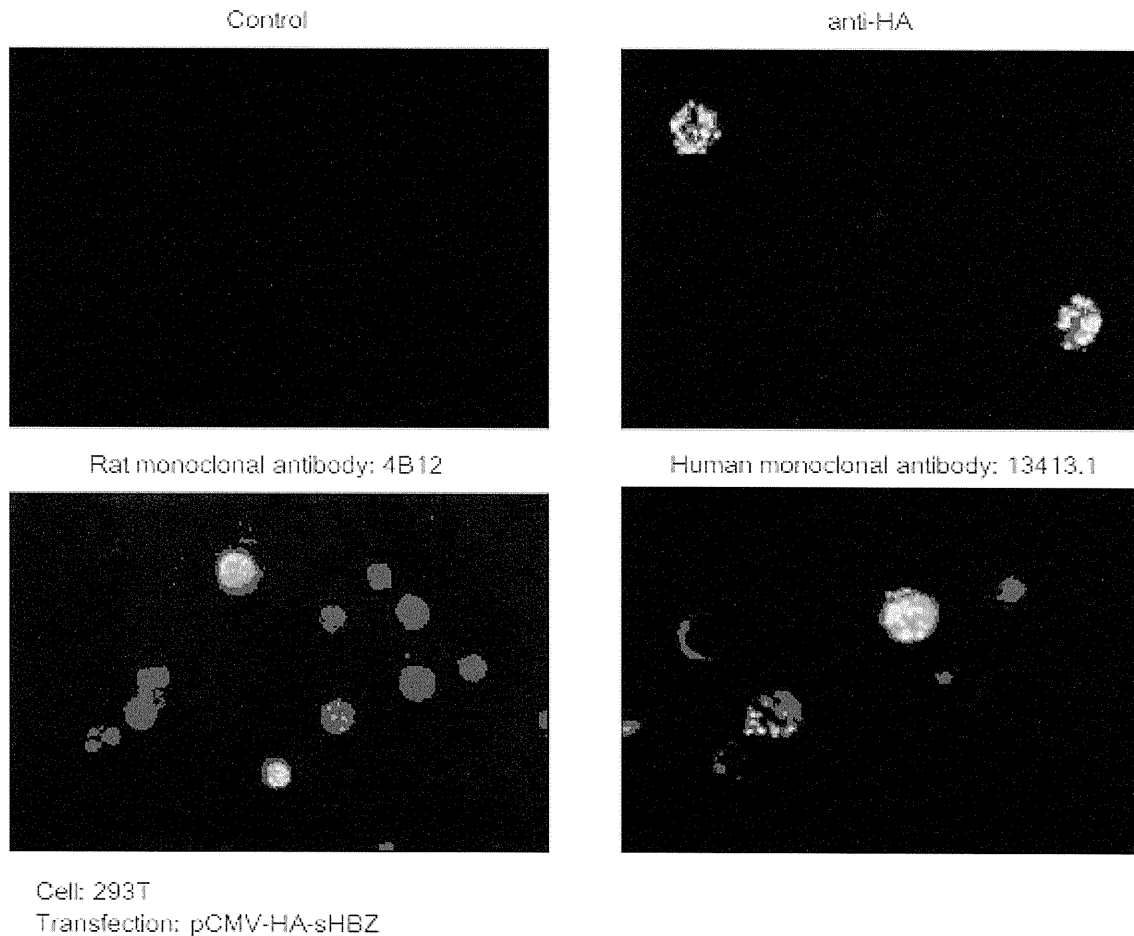
2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

図 1: 新規抗 HBZ モノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法による HBZ 蛋白質の検出

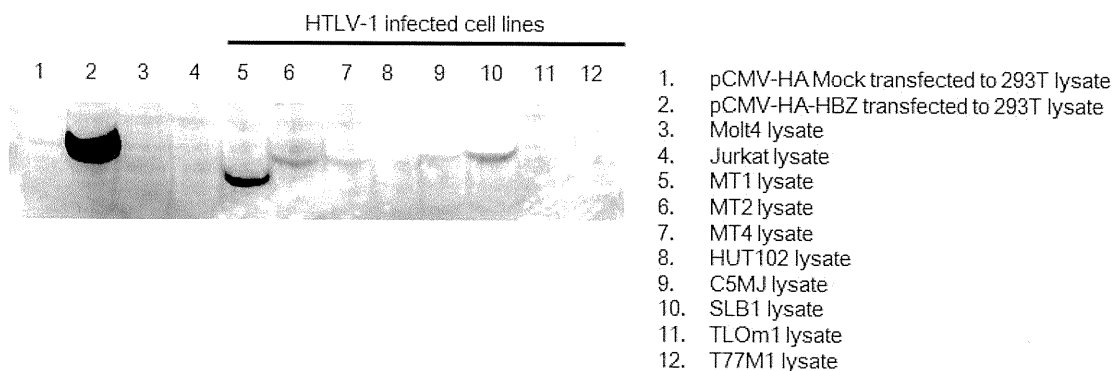


HBZ の C 末端ペプチド抗原 (HBZ 193-206 : CVNYWQGRLEAMWLQ) を WKA ラットに免疫し、通常のハイブリドーマ 法により HBZ 蛋白を特異的に検出可能なラット抗 HBZ モノクローナル抗体を作製した (clone:4B12, Rat IgG2b)。また、大腸菌で発現させ精製した recombinant HBZ (HBZ 96-206) を抗原として、ファージディスプレイ法により Myc-His タグ付き 2 価ヒト抗 HBZ Fab 抗体を得た。HA タグを付加した全長の spliced HBZ (sHBZ) *をコードする発現プラスミド (pCMV-HA-sHBZ) を 293T 細胞に導入して強制発現させ、ラット抗 HBZ モノクローナル抗体 (4B12) とヒト抗 HBZ Fab 抗体 (13413.1) を用いて間接蛍光抗体法により細胞内の HBZ 蛋白質を検出した。いずれのモノクローナル抗体においても、HBZ は既報の通り核小体に似た核内構造に一致して密度の高いスポットとして検出された。

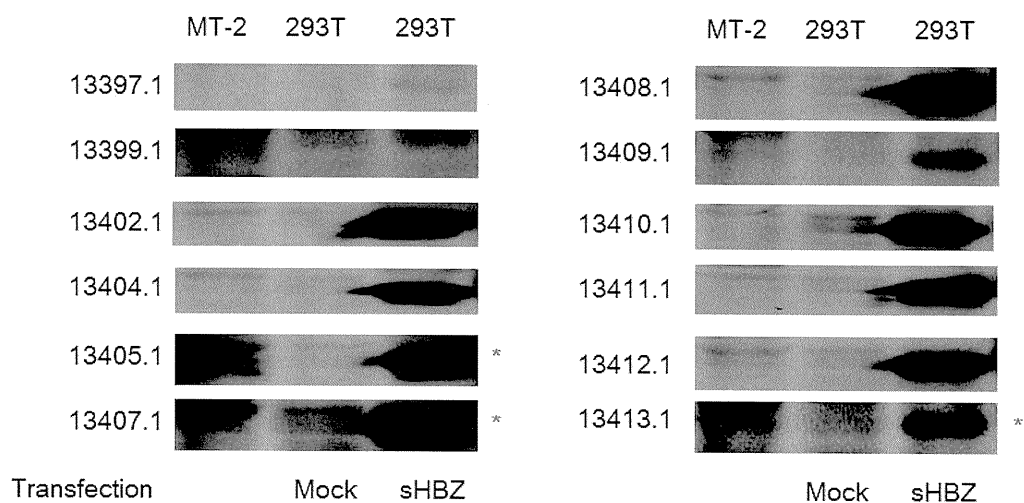
*: HBZ 遺伝子転写産物には spliced と unspliced HBZ が存在するが、spliced HBZ タンパク質は半減期が長く、発現量も多い。

図 2: 新規抗 HBZ モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロットによる HBZ 蛋白質の検出

Rat monoclonal antibody clone 4B12



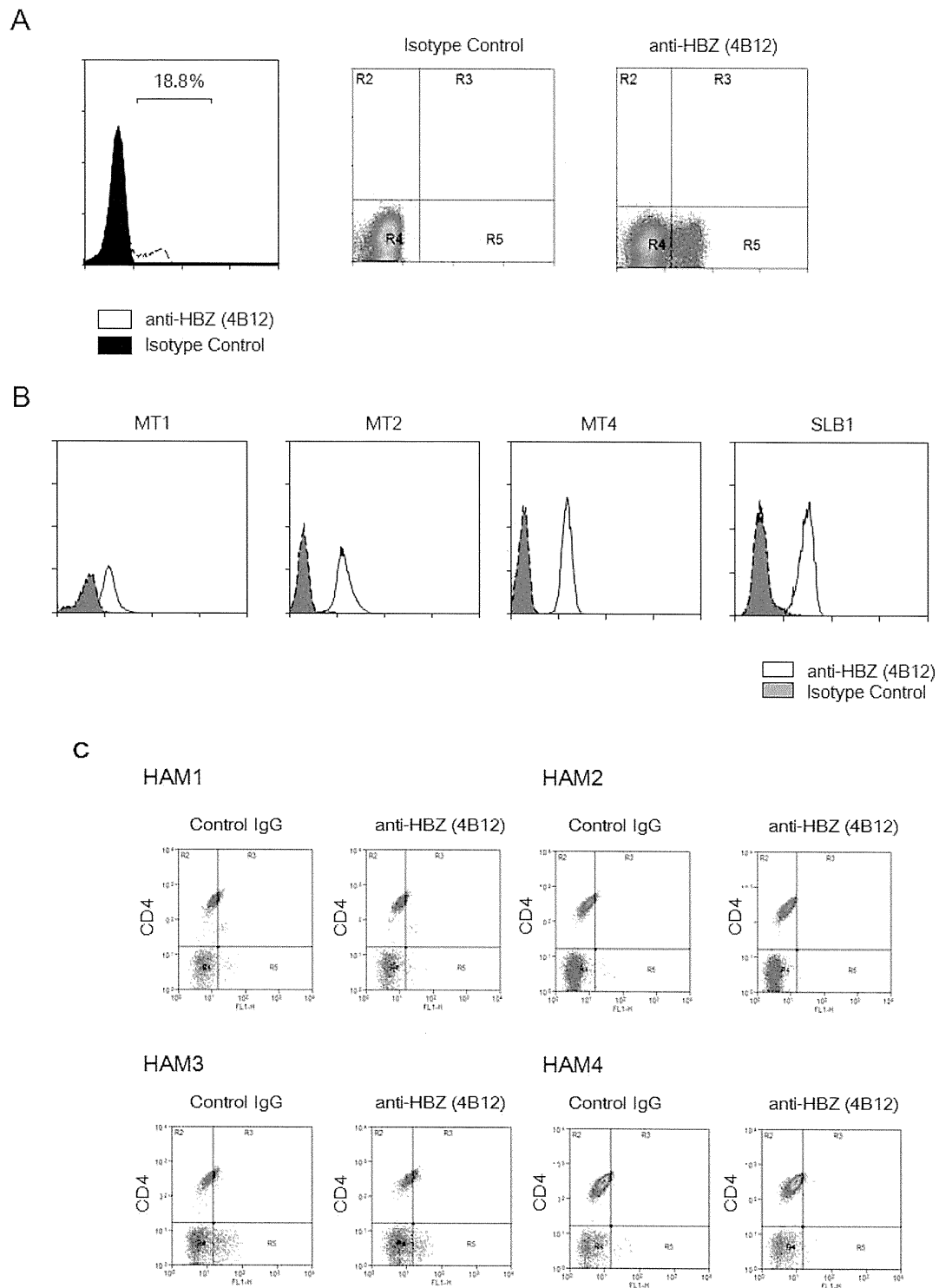
Human monoclonal antibodies - Human IgG F(ab)2 fragment



*: Detecting HBZ in MT2 cells

ラット抗 HBZ モノクローナル抗体 (clone:4B12, Rat IgG2b)、Myc-His タグ付き 2 価ヒト抗 HBZ Fab 抗体を用いて、ウエスタンブロット法により細胞内の HBZ 蛋白質を検出した。ラット抗 HBZ モノクローナル抗体は、HTLV-1 感染細胞株 MT-1, MT-2, MT-4, HUT102, C5MJ, SLB1 から調整した細胞抽出液に含まれる HBZ 蛋白質を検出可能であった。MT-1 細胞中の HBZ 蛋白質は、他の HTLV-1 感染細胞株由来のものと移動度が異なり、分子量の違いを反映している可能性が示唆された。ヒト抗 HBZ Fab 抗体のうち、13405.1, 13407.1, 13413.1 の 3 クローンは感染細胞株 MT-2 から調整した細胞抽出液に含まれる HBZ 蛋白質を検出可能であった。

図 3: 新規抗 HBZ モノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリーによる HBZ 蛋白質の検出



ラット抗 HBZ モノクローナル抗体は、HBZ を過剰発現させた 293T 細胞 (A) および HTLV-1 感染細胞株 (B) 中の HBZ 蛋白質をフローサイトメトリーにより検出可能であったが、HAM 患者 PBMC (C) 中の HBZ 蛋白質は検出できなかった。