

- 3) Moriya M, Nakatsuji Y, Miyamoto K et al. Edaravone, a free radical scavenger, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurosci Lett* 440(3):323-326, 2008
- 健康危険情報
なし
- 知的財産権の出願・登録状況
特許出願:あり
実用新案登録:なし

抗炎症薬としての漢方薬投与による実験的自己免疫性脳脊髄炎治療効果の検証

班 員 松井 真¹⁾
共同研究者 荒谷信一¹⁾、帆足福子¹⁾、長山成美¹⁾

研究要旨

漢方薬の持つ薬理効果は短時間のうちに現れ、幾つかの製剤は抗炎症作用を有することが知られている。多発性硬化症の治療は分子標的薬の登場により更に免疫制御の方向へ進んでいるが、長期継続に難がある。漢方薬を補助治療手段とすることにより、より安全な治療オプションを確立することができる可能性を考慮し、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を用いて漢方薬投与の効果を検証することを試みた。その結果、柴苓湯治療群では、対照群に比して感作後 2 週の急性期から 5 週以降の慢性期における EAE スコアの改善を認めたが、桂枝湯では全く効果がなかった。2 つの漢方薬に共通あるいは異なった生薬成分を含む柴胡桂枝湯による効果の有無を検証することで、有効な生薬成分を絞り込める可能性が示唆された。

研究目的

漢方薬の持つ薬理効果は短時間のうちに現れ、幾つかの製剤は抗炎症作用を有することが知られている。多発性硬化症 (MS) の治療は分子標的薬の登場により更に免疫制御の方向へ進んでいるが、長期継続に難がある。漢方薬を補助治療手段とすることにより、より安全な治療オプションを確立することができる可能性を考慮し、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を用いて漢方薬投与の効果を検証することを試みた。

方法

抗炎症作用を持つ桂枝湯および柴苓湯について、2g の粉末薬剤に 20ml の蒸留水を加え、室温で 10~20 分間攪拌することにより均一な懸濁液に調整できることを確認した。次に、C57BL/6 マウスを MOG35-55 ペプチドで感作して EAE を作製し、ゾンデを用いて 100mg/kg、300mg/kg、1000mg/kg の薬量の各漢方薬を週 3 回確実に経口投与した。コントロールマウスは EAE のみを惹起した。各群 5 匹を設定し、感作後から連日 EAE ス

コアを観察した。

結果

- 1) 柴苓湯治療群では、対照群に比して感作後 2 週の急性期から 5 週以降の慢性期における EAE スコアの改善を認めた (図 1)。
- 2) 桂枝湯治療群では明らかな効果は認められなかった (図 2)。
- 3) 柴苓湯も桂枝湯製剤も、1000mg 投与群では経過の途中で死亡する個体が存在した。

考察と結論

- 1) 抗炎症作用を有する柴苓湯で EAE の発症が予防される可能性が示唆された。
- 2) 漢方薬は様々な生薬の複合体であるため、この効果がどの生薬に由来するのかは不明である。含有生薬に共通部分と相違のある柴胡桂枝湯の治療効果を検討すると有効な生薬や成分が明らかになる可能性がある。
- 3) 今後、至適投与量と期間の設定、さらに効果発現時の免疫状態を脾細胞や末

1) 金沢医科大学神経内科学

図 1 : 柴苓湯投与による EAE の経過

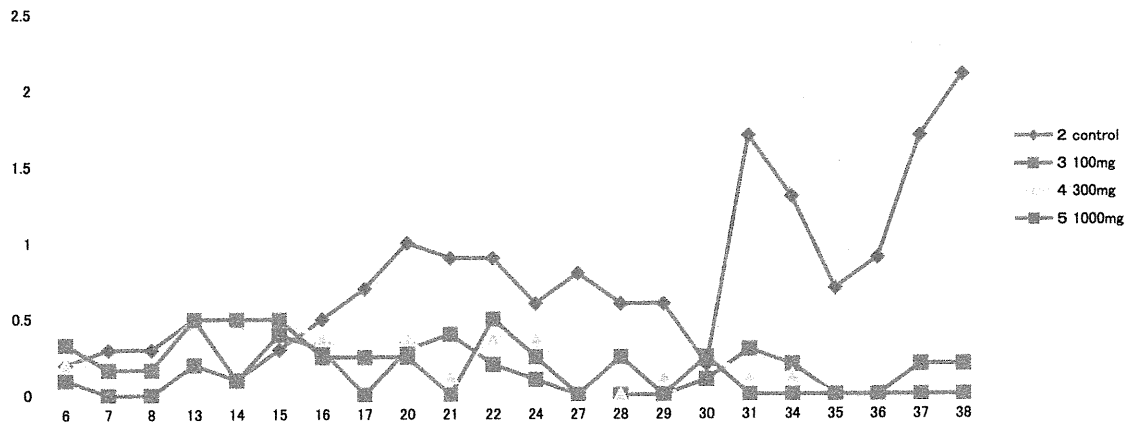
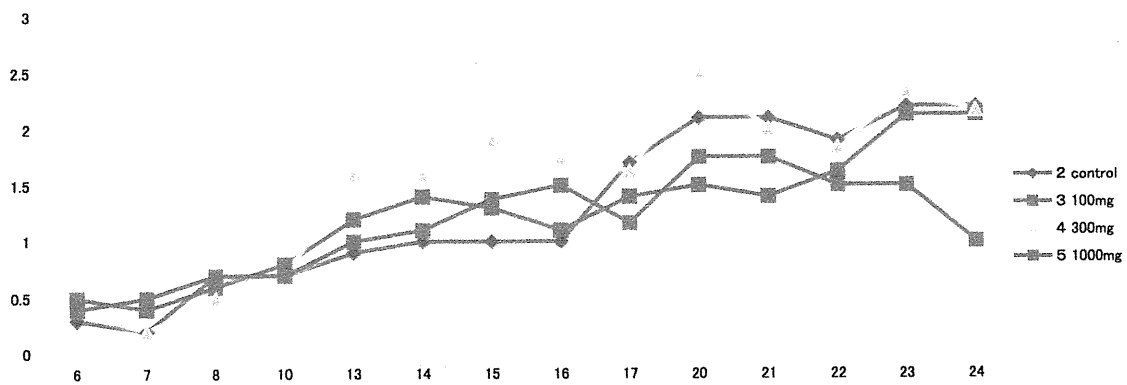


図 2 : 桂枝湯投与による EAE の経過



稍血を用いて解析することで、免疫調節作用の関与を追究する意義があると考えられた。

(倫理面への配慮)

本研究は、金沢医科大学実験動物委員会の承認を得て行われた。

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

HAMとHTLV-IキャリアにおけるCTL機能の比較検討

研究分担者 出雲周二¹⁾

共同研究者 久保田龍二¹⁾、有島志保¹⁾、松崎敏男²⁾、高嶋 博²⁾

研究要旨

HAMと無症候性HTLV-Iキャリアの比較検討より、HTLV-Iプロウイルス量が高いことが、最大のHAM発症リスクと考えられている。HAMでは、HTLV-I特異的細胞傷害性Tリンパ球(CTL)の機能がキャリアより低いために、その結果プロウイルス量が高くなっているのではないかと、との指摘もある。しかし、HAMのCTL機能がキャリアより低下しているのかは不明である。今回我々は、HLA-A24拘束性HTLV-I特異的CTLの機能をHAMとキャリアで比較検討した。CTLの頻度はHAMで高かったが、抗原刺激によるIFN- γ 産生、MIP-1 β 産生および、細胞傷害性顆粒の脱顆粒を表すCD107a発現には、両者で差を認めなかった。これらのことより、サイトカイン産生、ケモカイン産生、脱顆粒能については2群で差がないことが分かった。今後さらに両群CTLのT細胞avidity、細胞傷害活性、増殖能等につき検討が必要である。

研究目的

細胞傷害性Tリンパ球(CTL)は、ウイルス感染細胞除去に重要な細胞であり、HAMの治療にはHTLV-I感染細胞の減少が重要である。HAMにおいてHTLV-I特異的CTLが多いにもかかわらずウイルス量が高いことより、無症候性キャリアと比べHTLV-I特異的CTLの機能低下の可能性を指摘する報告もある。しかし、HAMとキャリアにおいて、HTLV-I特異的CTLに質的相違があるのかについてはよくわかっていない。今回我々は、CTLの機能には大きな違いがないのではないかと仮定のもとに、HAMとキャリアにおける

HTLV-I特異的CTLの機能について解析した。

研究方法

HLA-A24陽性の44例のHAM患者、35例のHTLV-IキャリアよりのPBMCを用いて、フローサイトメトリーにて以下の実験を行った。

①CD8分画における、HLA-A24拘束性Tax301-309特異的CTLのTetramerによる頻度の比較。

②Tax301-309特異的CTL頻度が同程度の7例のHAMと10例のキャリアを選択し、以下の実験を行った。Tax301-309ペプチド抗原を1 μ Mで添加し、5時間培養後のTax301-309抗原特異的サイトカイン(IFN- γ)産生細胞のTetramer陽性細胞に

1) 鹿児島大学難治ウイルス研

2) 鹿児島大学医学部神経内科

対する頻度と、サイトカイン陽性細胞の MFI の比較。

③ Tax301-309 抗原特異的ケモカイン (MIP-1 β) 産生細胞の頻度と、MFI の比較。

④ Tax301-309 抗原特異的脱顆粒細胞 (CD107a 発現) の頻度の比較。

(倫理面への配慮)

臨床検体はインフォームドコンセントのもとに採取をおこない、無作為化して用いた。本研究は鹿児島大学倫理委員会の承認を得て行った。

研究結果

以下の結果が得られた。

① Tetramer による HTLV-I Tax301-309 特異的 CTL の頻度は、HAM では平均 7.5%、キャリアでは 3.4%であり、HAM で有意に高かった。

② HTLV-I 特異的 CTL 中の抗原特異的 IFN- γ 産生細胞の頻度は、HAM では平均 39.9%、キャリアでは 44.1%で差はなかった。また、MFI も差がなかった。

③ HTLV-I 特異的 CTL 中の抗原特異的 MIP-1 β 産生細胞の頻度は、HAM では平均 22.0%、キャリアでは 33.3%で差はなかった。また、MFI も差がなかった。

④ HTLV-I 特異的 CTL 中の抗原特異的 CD107a 陽性細胞の頻度は、HAM では平均 27.4%、キャリアでは 41.5%で差はなかった。

考察

HAM とキャリアの CTL 機能比較については、現在までに 2、3 の報告があるの

みで、結論はついていない。Sabouri らは、抗原刺激による CTL の脱顆粒につき CD107a の発現を指標に CTL の機能検査を行い、HAM では、Tetramer 陽性細胞中の CD107a 陽性細胞の比率がキャリアより低いと報告している¹⁾。今回我々も同様に検討も行っているが、両群に差を認めなかった。抗原刺激を行った場合 TCR/CD3 の発現が低下するので、その後 Tetramer 染色を行うと、CTL である Tetramer 陽性細胞が減少する現象が見られる。そのため今回我々は、抗原刺激を行わない状態での Tetramer 陽性細胞の割合に対する、抗原刺激を行った後の CD107a 陽性細胞の割合の比率を検討した。Sabouri らの研究では、Tetramer 測定と CD107a 測定を同時に行っており、この測定方法の違いが、実験結果の違いに影響を与えている可能性が考えられた。我々の今回の CTL の比較検討では、最大抗原刺激による CTL 中のサイトカイン産生、ケモカイン産生および CD107a 発現細胞の頻度および MFI には差を認めなかった。近年 Bangham らは、HAM とキャリアの末梢血リンパ球を培養して、HTLV-I 蛋白陽性細胞の減少率を CTL の頻度で標準化して両者の CTL 機能を新たな方法で示しているが、その報告でも両者には差を認めていない²⁾。今回の研究結果は、これと矛盾しないと考えられた。

結論

今回の検討では、サイトカイン、ケモカイン、および抗原特異的脱顆粒について、HAM とキャリアの HTLV-I 特異的 CTL の機能には差がなかった。今後、T

細胞 avidity、細胞増殖能、CTL 活性、表面抗原発現等につき検討が必要である。

文献

1. Sabouri et al. Impaired function of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-specific CD8+ T cells in HTLV-1-associated neurologic disease. Blood 112(6) 2411-20, 2008
2. Asquith et al. A functional CD8+ cell assay reveals individual variation in CD8+ cell antiviral efficacy and explains differences in human T-lymphotropic virus type 1 proviral load. J Gen Virol 86:1515-23, 2005

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

HTLV-1 関連脊髄症 (HAM/TSP) 患者の脳における HTLV-1 特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL) の検討

研究分担者 鹿児島大学 神経内科 渡邊 修
共同研究者 鹿児島大学難治ウイルスセンター 久保田龍二 出雲周二
鹿児島大学 神経内科 ○松浦英治、高嶋 博

研究要旨

MRI 検査では HTLV-1 関連脊髄症 (HAM/TSP) 患者の半分以上に大脳病変が指摘される。この病変が HAM/TSP の脊髄炎と同じ機序によって形成されたものであるかはっきりしてない。近年我々は HTLV-1 Tax 特異的細胞障害性 T リンパ球 (CTL) を免疫組織学的に検出する方法を確立し、HAM/TSP 患者の脊髄に多数の HTLV-1 特異的 CTL が浸潤していることを明らかにした。この技術を用いて HAM/TSP 患者の大脳病変に HTLV-1 特異的な細胞障害性 T 細胞 (CTL) が存在するのか検討を行った。その結果、HAM/TSP の脊髄に認められた所見と同様に、CD4 陽性リンパ球と CD8 陽性リンパ球を大脳白質の血管周囲に認め、加えて HTLV-1 特異的 CTL の浸潤も検出した。HTLV-1 キャリアーの脊髄を同様に検討したところ同様な結果を得た。加えてキャリアーの脊髄における炎症細胞は下部胸髄においてもっとも顕著であり、HAM/TSP における細胞浸潤の分布と同じであった。このことはキャリアーにおいても、すでに HAM/TSP と同様な機序に基づく炎症が起こっていることを示唆している。

【目的】

HTLV-1 ウイルスの関連する病態には脊髄の障害される HAM をはじめぶどう膜炎 (HU) や肺障害、筋障害、関節炎、皮膚障害などが報告されており、HTLV-1 感染患者は全身のさまざまな症状を訴える。一方、無症状ではあるが、HAM 患者の頭部 MRI 検査では、大脳深部白質に異常信号がよく認められる。近年、これらの病変は炎症性細胞の浸潤であるとする病理学的報告がなされた。しかしながらこの炎症が HTLV-1 感染に反応して惹起された炎症であるのかどうか詳細は不明である。そこで我々は HAM 患者の脳を用いてリンパ球の浸潤している病変部に HTLV-1 特異的な細胞障害性リンパ球が存在するか検討を行った。

1) 鹿児島大学神経内科

【対象・方法】

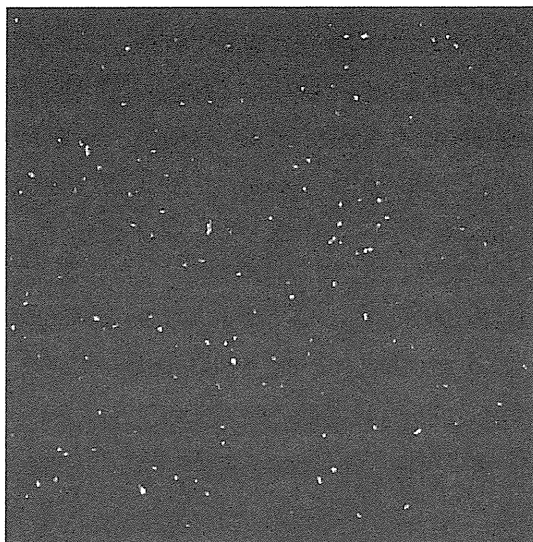
HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の剖検症例で新鮮凍結された大脳白質を保存している症例の HLA-A2 あるいは A24 陽性を調べ、陽性患者の大脳白質を免疫染色した。CD8 陽性リンパ球が浸潤している部分について HTLV-1 Tax11-19-HLA-A2(あるいは A24) peptide complex テトラマーを用いて Tax11-19 特異的な細胞障害性 T 細胞 (HTLV-1-specific CTL) の検出を行った。評価には共焦点レーザー顕微鏡を用いた。

【結果】

1. 大脳皮質および大脳白質の新鮮凍結されたケースで A2 あるいは A24 陽性のサンプルは 1 例のみであった。
2. 同患者は A2 および A24 どちらも有してした。大脳サンプルの検討では大脳皮質には浸潤細胞はそれほど認められ

なかったが脳白質には炎症細胞の浸潤がより多く認められた。

3. CD8 陽性細胞は血管周囲に多数認められたほか、脳実質内にも浸潤が認められた。CD4 陽性細胞も少数ながら確認された。



CD8+ cells in the brain

4. HTLV-1 特異的な CTL は、A2 テトラマーでも A24 テトラマーでも検出された。脳白質の血管周囲腔および脳実質内のどちらにも認められた。



HTLV-1 Tax-specific T cells in the brain

5. 4 人のキャリアー患者の脊髄を同じように評価したとき CD8 陽性細胞浸潤が 4 人全員に認められた。そのうち一例では脊髄内の CD8 陽性細胞浸潤が、頸髄<上部胸髄<下部胸髄に認められ HAM/TSP の病理像と同じ分布であることが分かった。
6. キャリアー患者の脊髄における CD8 陽性細胞浸潤は軽度であったが HTLV-1 特異的 CTL の浸潤が多数確認された。

【結語】

HAM 患者の脳のみならずキャリアー患者の脊髄においても HTLV-1 特異的 CTL の関与した炎症を確認した。HTLV-1 特異的 CTL の関与した炎症が、HAM/TSP 患者の脊髄以外にも非特異的に起こっている可能性が示唆された。

文献

1. Nakagawa et al. HTLV-I-associated myelopathy: analysis of 213 patients based on clinical features and laboratory findings J Neurovirol. 1995 Mar; 1(1):50-61
2. Moe Moe Aye et al. 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):245-252

健康危険情報なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし 実用新案登録：なし

HTLV-I の細胞間感染伝播における CXCR4 シグナルの関与

分担研究者 中村龍文¹⁾

共同研究者 山崎聡士²⁾, 中村英樹²⁾, 佐藤克也¹⁾

研究要旨

Stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α)のレセプターである CXCR4 シグナルと HTLV-I の感染効率の関係について、HTLV-I 感染 T 細胞株として HAM/TSP 患者由来;HCT-5 および HTLV-I キャリアー由来;TL-Su を用いて、H9/K30 *luc* 細胞との混合培養系にて検討した。その結果、1)HCT-5 は TL-Su に比較して有意に感染効率が高かった。2) H9/K30 *luc* 細胞に対する SDF-1 α 刺激は TL-Su の感染効率を有意に上昇させた。2)抗 CXCR4 ブロッキング抗体存在下における混合培養系において、その感染効率は TL-Su では影響を受けなかったものの、HCT-5 では有意に低下した。3)HCT-5 および TL-Su の culture supernatant 中の SDF-1 α は検出感度以下であった。4) TL-Su と H9/K30 *luc* 細胞の混合培養系において、HCT-5 由来の方が、TL-Su 由来の condition media 存在下培養に比較して、有意に高い HTLV-I 感染効率を示した。以上より、CXCR4 シグナルの活性化は HTLV-I の感染効率に関与している可能性があることが示されたと共に、HCT-5 の culture supernatant 中には CXCR4 に結合し、そのシグナルを活性化させ感染効率を増加させる SDF-1 α 以外の因子が存在する可能性が示された。

研究目的

HTLV-Iはインテグリンとそのリガンドで構成されるvirological synapseを介してcell to cell spreadで感染伝播していく。CXCR4はケモカインの一つであるstromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α)のレセプターであるが、その活性化によってsmall GTPaseの一つであるRap1が活性化され、その活性化はインテグリンからそのリガンドへinside-outシグナルとして働き、その相互作用を強固にする。すなわち、HTLV-Iのcell to cell spreadの際に非感染細胞側にCXCR4シグナルの活性化が生じれば、HTLV-Iの感染効率、がよくなることが推測される。我々はこれまでにHTLV-Iの感染効率に関与する因子を報告してきたが、今回HTLV-Iの感染効率におけるCXCR4シグ

ナルの関与を検討した。

研究方法

1) 細胞株 : HTLV-I感染T細胞株として HCT-5 (HAM/TSP 患者由来 HTLV-I 感染 T 細胞株), TL-Su (HTLV-I キャリアー由来 HTLV-I 感染 T 細胞株)を使用した。混合培養の標的細胞として H9/K30 *luc* 細胞(リンパ球系細胞株である H9 細胞に HTLV-I LTR にレポーターとしてのルシフェラーゼ遺伝子を繋いだプラスミドを permanent transfection した細胞株)を使用した。解析の前に H9/K30 *luc* 細胞での CXCR4・LFA-1 発現と HCT-5 および TL-Su での CXCR4・ICAM-1 発現は、フローサイトメトリーにて確認した。

2) HTLV-I 感染効率の比較 : H9/K30 *luc* 細胞(3.5 x 10⁵ 個)とそれぞれの HTLV-I 感染細胞株

1)長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染免疫学
2)長崎大学大学院医歯薬学総合研究科展開医療科学

(5×10^5 個)と混合培養し、24 時間後に細胞を回収。cell lysate を作成し、ルシフェラーゼアッセイを行い、relative luc activity を算出した。

3) TL-Su の HTLV-I 感染効率に対する SDF-1

α の影響 : SDF-1 α (400 ng/ml)を H9/K30 *luc* 細胞と TL-Su の混合培養系に加えて培養。その後 2) を施行した。

4) HTLV-I 感染効率に及ぼす抗 CXCR4 ブロッキング抗体処理の影響 : H9/K30 *luc* 細胞を抗 CXCR4 ブロッキング抗体またはコントロール抗体で 1 時間前処理し、HCT-5 または TL-Su と混合培養。その後 2) を施行した。

5) HTLV-I 細胞株の condition media が HTLV-I 感染効率に及ぼす影響 : HCT-5 または TL-Su をそれぞれ 5×10^5 /ml で、6 時間培養。培養後 culture supernatant を回収。この culture supernatant を condition media として、TL-Su と H9/K30 *luc* 細胞の混合培養系に加え培養。その後 2) を施行した。同時にこの系において 4) を施行した。

6) SDF-1 α の測定 : HCT-5、TL-Su、H9/K30 *luc* 細胞をそれぞれ 5×10^5 /ml で 24 時間培養。培養後 culture supernatant を回収し、culture supernatant 中の SDF-1 α を RayBio 社の SDF-1 α ELISA kit を用いて測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は長崎大学の倫理規定を遵守して行った。

研究結果

1) HTLV-I 感染効率の比較 : HCT-5 においては TL-Su に比較して、HTLV-I tax および gp46 の発現量には大きな差はなかったものの、H9/K30 *luc* 細胞との混合培養系において明らかに高い relative luc activity を示し、このことは感染

効率の良さを示していた(図 1)。

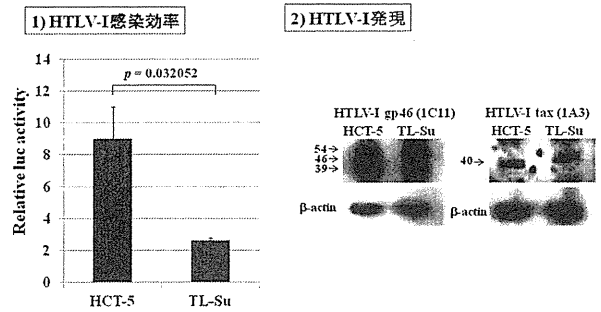


図1. HCT-5とTL-Suの比較

2) TL-Su の HTLV-I 感染効率に対する SDF-1 α の影響 : TL-Su と H9/K30 *luc* 細胞の培養系に SDF-1 α を加えた場合、HTLV-I の感染効率が有意に増加した(図 2)。

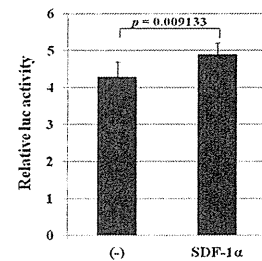


図2. TL-SuのHTLV-I感染効率に及ぼすSDF-1 α の効果

3) HTLV-I 感染効率に及ぼす抗 CXCR4 ブロッキング抗体処理の影響 : 抗 CXCR4 ブロッキング抗体処理 H9/K30 *luc* 細胞と TL-Su または HCT-5 の混合培養系においては、HTLV-I の感染効率は TL-Su では影響を受けなかったものの、HCT-5 では有意に低下した(図 3)。

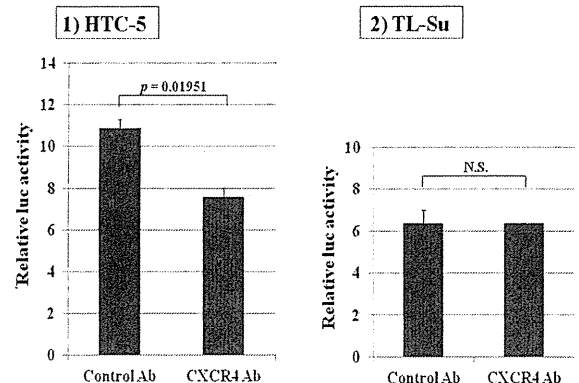


図3. HTLV-I感染効率に対する抗CXCR4 blocking抗体処理の効果

4) HTLV-I 細胞株の condition media が HTLV-I の感染効率に及ぼす影響 : HCT-5 由来の方が、TL-Su 由来の condition media 存在下に比較して、

TL-Su と H9/K30 *Iuc* 細胞の混合培養系において、有意に高い HTLV-I 感染効率を示した(図 4)。さらにこの実験系で、HCT-5 由来の condition media 存在下の培養系において、3)と同様に H9/K30 *Iuc* 細胞をあらかじめ抗 CXCR4 ブロッキング抗体処理しておいた場合、その感染効率は低下した(図 4)。

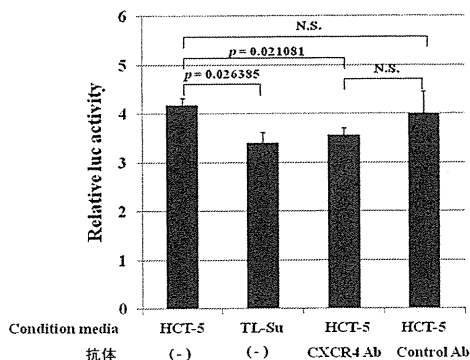


図4. TL-SuのHTLV-I感染効率に及ぼすcondition mediaの影響と抗CXCR4 blocking抗体の阻害効果

5) SDF-1 α 濃度 : HCT-5、TL-Su、H9/K30 *Iuc* 細胞のいずれの culture supernatant でも SDF-1 α は検出感度以下であった。

考察

今回の検討において、H9/K30 *Iuc* 細胞に対する CXCR4 シグナル阻害によって HTLV-I 感染効率は TL-Su では影響を受けなかったが、HCT-5 では有意に抑制された。逆に TL-Su と H9/K30 *Iuc* 細胞との混合培養系では SDF-1 α による活性化によって HTLV-I の感染効率が促進された。すなわち、CXCR4 の下流に存在する Rap1 の活性化が非感染細胞側のインテグリンから感染細胞側のリガンドに対して inside-out シグナルとして機能し、HTLV-I の感染効率に関与している可能性がある。したがって、HCT-5 と TL-Su との HTLV-I の感染効率の差には culture supernatant 中の SDF-1 α 濃度が関与している可能性が考えられた。しかし、驚いたことに両者における SDF-1 α 濃度はいずれも検出感度以下であった。そこで、両者の細胞株の culture

supernatant を condition media として TL-Su と H9/K30 *Iuc* 細胞との混合培養系に加え検討を行ったところ、HCT-5 の culture supernatant を condition media として加えた培養系の方が、TL-Su の culture supernatant を condition media として加えた培養系に比較して、感染効率が有意に高かった。これらの事実より HCT-5 の culture supernatant 中には、CXCR4 シグナルを活性化する SDF-1 α 以外の因子が存在している可能性が考えられた。

結論

CXCR4 シグナルの活性化は HTLV-I の細胞間伝播の効率に関与している可能性がある。HTLV-I キャリアー由来の TL-Su に比較して HTLV-I の細胞間伝播効率がいい HCT-5 では CXCR4 に結合し、CXCR4 シグナルを活性化する SDF-1 α 以外の因子を発現している可能性が考えられた。

健康危険情報

なし。

知的所有権の出願・登録状況

特許取得 :

- 1) HTLV-I 関連脊髄症の予防・治療剤およびアポトーシス促進剤(特許出願中, 特開 2007-277223) ,
- 2) HTLV-I 関連脊髄症の予防または治療剤(特許出願中、特願 2011-226209)。
- 3) 排尿障害の予防・治療剤(特許出願中、特願 2011-269262)。

実用新案登録 : なし。

HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) における HBZ 高発現の病因的意義

研究分担者 大原 義朗¹⁾
共同研究者 齊藤 峰輝²⁾、田中 礼子²⁾、田中 勇悦²⁾

研究要旨

近年、HTLV-1 ゲノム 3' 側のマイナス鎖にコードされる HBZ (HTLV-1 bZIP factor) 遺伝子が癌化・炎症形成に重要な HTLV-1 関連疾患の原因遺伝子であると考えられるようになった。HBZ の HAM 病態形成における意義を明らかにするために、HAM 患者末梢血単核球 (PBMC)、血漿を用いて HBZ 発現を定量し、各種検査所見、病勢との関連を検討した。炎症反応が強い進行期の HAM 患者では、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相関が認められたが、Tax mRNA 発現との相関は見いだせなかった。特に脊髄と大脳深部白質に多巣性病変を認めた重症例において、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。PBMC 中の HBZ 蛋白質、血漿中の抗 HBZ 抗体も検出感度以下であった。HBZ トランスジェニックマウスでは、HBZ が T 細胞増殖促進作用と皮膚・肺胞への CD4 陽性 T リンパ球浸潤に関与することが報告されているが、HAM 患者においても HBZ 遺伝子が病態形成に重要であることが示唆された。

研究目的

HTLV-1 は世界ではじめてヒトの疾患との関連が見いだされたレトロウイルスであり、HAM および成人 T 細胞白血病 (ATL) の原因ウイルスである。我が国には、先進国で最多の約 108 万人もの HTLV-1 感染者が存在しており、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。しかしながら、HTLV-1 関連疾患の有効な治療法は未だ確立されていない。従来は、HTLV-1 の転写制御因子である tax 遺伝子が HTLV-1 関連疾患発症の原因であると考えられてきたが、tax 遺伝子の発現が一部の症例に限られていたことが大きな謎であった。近年、HTLV-1 ゲノム 3' 側のマイナス鎖にコードされる HBZ (HTLV-1 bZIP factor) 遺伝子が全ての ATL 細胞に発現していること

が報告された。我々も、検索した全ての HAM 患者、無症候性キャリアー (Asymptomatic carrier: AC) の PBMC に HBZ mRNA が発現していることを報告した。さらに、HBZ 遺伝子を HTLV-1 の感染標的細胞である CD4 陽性 T 細胞に発現するトランスジェニックマウスにおいて、ATL 類似のリンパ腫のみならず、肺と皮膚に炎症も認められることが報告され、tax に加えて HBZ も癌化・炎症形成に重要な HTLV-1 関連疾患の原因遺伝子であると考えられるようになった。本研究では、HTLV-1 マイナス鎖にコードされる新規遺伝子 HBZ の HAM 病態形成における意義を明らかにすることを目的に以下の検討を行った。

研究方法

1) HBZ の C 末端ペプチド抗原を用いてウサ

¹⁾ 金沢医科大学 医学部 微生物学部門

²⁾ 琉球大学大学院医学研究科 感染制御医科学専攻 免疫学講座

ギ抗HBZポリクローナル抗体およびラット抗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) HAM患者とACのPBMCにおけるtaxおよびHBZ mRNA・蛋白の発現量を、RT-PCR・ELISA・フローサイトメトリーで比較した。HAM患者およびACの血漿中の抗HBZ抗体をELISA・Western Blot法で解析した。HTLV-1プロウイルス量をReal Time PCR法で定量した。得られたデータと各種検査所見、病勢との関連を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は関連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血した検体のみを用い、完全に匿名化した後に行った。

研究結果

HBZ蛋白を特異的に検出可能な複数の抗体を得た。これらを用いてHBZ抗原、抗HBZ抗体を特異的に検出するELISA系を確立した。Real Time PCR 解析から、HPRT遺伝子の発現量で補正した細胞あたりのHBZ mRNAの発現量はtax mRNAより1,000倍以上高く、HTLV-1感染T細胞株に匹敵するほどであった。また、ATL患者、HAM患者におけるHBZ mRNAの発現量は無症候性キャリアーより有意に高く、プロウイルス量、HAM患者の運動障害度・髄液中ネオプテリン濃度と有意な正の相関を示した。炎症反応が強い進行期のHAM患者では、慢性期の患者と比較してHBZ mRNAが高発現しており、病勢との相関が認められた。一方、Tax発現と病勢との相関は見いだせなかった。特に脊髄と大脳深部白質に多巣性病変を認めた重症例において、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。PBMC中のHBZ蛋白質、血漿中の抗HBZ抗体は、検索したすべての検体で陰性であった。

考 察

HBZ トランスジェニックマウスの解析により、HBZ が *in vivo* において T 細胞増殖促進作用と皮膚・肺胞への CD4 陽性 T リンパ球浸潤作用を示すことが報告されている。HBZ mRNA の発現量が、HTLV-1 プロウイルス量のみならず HAM 患者の運動障害度・髄液中ネオプテリン濃度の双方と有意な正の相関を示すという結果から、実際の HAM 患者においても HBZ 遺伝子の高発現が病態形成に極めて重要であることが示唆された。HBZ 蛋白に対する特異的 CD4, CD8 細胞が検出されたとする最近の報告がある一方で、我々の方法では HBZ 蛋白質の PBMC 中における発現、血漿中抗 HBZ 抗体ともに検出感度以下であったことから、HBZ 蛋白質の *in vivo* における発現は極めて微量であるか、特定の臓器・組織に限局している可能性が考えられる。今後、我々が確立した HTLV-1 感染ヒト化マウスモデル系など新規の実験系を用いて、HAM の病態に HBZ が関与するメカニズムを解明し、HBZ 遺伝子を標的としたワクチン・薬剤の開発を進めることで HTLV-1 関連疾患の治療・予防法を確立したい。

結 論

実際の HAM 患者においても HBZ 遺伝子が病態形成に極めて重要であることが示唆された。

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録情報

特許取得 : なし

実用新案登録 : なし

HTLV-1 関連脊髄症（HAM）の疾患活動性バイオマーカーに関する解析

研究協力者 山野嘉久
聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター
准教授

共同研究者 佐藤知雄¹⁾、新谷奈津美¹⁾、安藤仁¹⁾、清水由紀子¹⁾、
宇都宮與²⁾、長谷川泰弘³⁾、出雲周二⁴⁾、鈴木登¹⁾

研究要旨：

HTLV-1 関連脊髄症（HAM）の患者に適切な治療を提供する上で、HAM の臨床経過に関する情報および疾患活動性を判定するマーカーの同定は非常に重要であると思われるが、これらの情報は乏しいのが現状である。そこで本研究では、HAM 患者の自然経過を解析し、また疾患活動性を反映するバイオマーカーを同定することとした。特に、マーカーの同定のために、納の運動障害重症度が過去 5 年で 3 grade 以上悪化した例を活動性、1 以下にとどまる例を非活動性として分類し、両群における各候補因子の値を比較解析した。その結果、HAM 患者の自然経過には個人差があることが分かり、さらに髄液中の細胞数、ネオプテリン濃度、CXCL9 及び CXCL10 濃度は疾患活動性マーカーとして有用である可能性が示唆された。以上の結果から、HAM 患者は大きく「活動性」と「非活動性」に分類され、活動性群は「1. 急速進行群」と「2-A：緩徐進行群」、非活動性群は「2-B：進行停滞群」と「3. 軽症群」から構成される可能性が示唆された。今後は本研究より有用性が示唆されたマーカーに基づいた病型分類に関する prospective な解析による検証が必要であると考え

研究目的

HTLV-1 関連脊髄症（HAM）の経過や疾患活動性は個人差が大きく、治療はその状態に応じて決定することが重要と考えられる。また HAM 患者において血中プロウイルス

- 1) 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター
- 2) 慈愛会今村病院分院 血液内科
- 3) 聖マリアンナ医科大学 神経内科
- 4) 鹿児島大学 難治ウイルス研

量、血清や髄液中の複数のサイトカイン・ケモカイン濃度の高いことは報告されており、これらは HAM の疾患活動性を評価するバイオマーカーの候補と考えられるが、疾患活動性を判定する上でどの因子が最も適切で臨床的に有用であるかについて、まとまった解析報告がない。そこで我々は、HAM の自然経過を調査し、さらに HAM の疾患活動性を反映するバイオマーカーの同

定を試みた。

研究方法

HAM の自然経過を調査するために、ステロイドやインターフェロン α 治療継続歴のない HAM 患者 28 例（男性 6 例、女性 22 例）を対象として、納の運動障害重症度（OMDS）の経時的な変化をアンケート形式で retrospective に情報収集した。次に、上記 28 例と無症候性キャリアー 28 例（男性 8 例、女性 20 例）を対象として、末梢血単核球中のプロウイルス量、血清中の可溶性 IL-2 受容体、MMP-3、ケモカイン（CXCL9, CXCL10 および CXCL11, CCL5）の各濃度を測定した。また、髄液中のネオプテリン、可溶性 IL-2 受容体および代表的なケモカイン（CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL3, CCL4, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22）の濃度を測定した。次に、これらの中で HAM 患者において有意に上昇が認められた因子をバイオマーカー候補因子として選択し、HAM の疾患活動性を反映するバイオマーカーを同定する目的で、OMDS が過去 5 年で 3 grade 以上悪化した例を活動性、1 以下にとどまる例を非活動性として分類し、両群における各候補因子の値を比較解析した。

（倫理面への配慮）

臨床検体の収集に際しては、本学の生命倫理委員会で承認された（承認番号：第 1646 号）同意書を用いて、不利益や危険性の排除などに関するインフォームドコンセントを行った。また検体は、個人情報管理者により連結不可能匿名化による番号化を行い、提供者を特定できないようにし、患者の人

権擁護に努めた。

研究結果

HAM 患者の自然経過の解析から、発症後数年以内に車椅子レベルに進行する群「1. 急速進行群」、発症後徐々に進行する群「2. 緩徐進行群」、発症後 15 年以上経過しても杖なしで歩行できる「3. 軽症群」に大きく分類された。また「2. 緩徐進行群」の中には、「2-A：進行が継続する群」と「2-B：経過途中から進行が停滞する群」に分類された。

また、HAM 患者において有意に上昇していたバイオマーカーについて活動性と非活動性の群間で比較解析した結果、髄液中の細胞数、ネオプテリン濃度、CXCL9 濃度、CXCL10 濃度が、有意に活動性群で高く、疾患活動性マーカーとして有用である可能性が示唆された。

さらに、これらのバイオマーカーの濃度は、「1. 急速進行群」や「2-A：進行が継続する群」などの症状が進行する患者群において高く、「2-B：経過途中から進行が停滞する群」や「3. 軽症群」などの症状の進行が緩やかな患者群において低いため、前者は疾患活動性が高く、後者は低いことが示唆された。

考察

HAM 患者において、髄液中の細胞数、ネオプテリン濃度、CXCL9 及び CXCL10 濃度は、疾患活動性マーカーとして有用である可能性が示唆された。また、これらのバイオマーカー濃度により HAM 患者は大きく「活動性」と「非活動性」に分類され、活動性群は「1. 急速進行群」と「2-A：緩

徐進行群」、非活動性群は「2-B：進行停滞群」と「3. 軽症群」から構成される可能性が示唆された。

結論

本研究により、HAM 患者の診療において髄液の詳細な解析による疾患活動性評価の有用性が示され、治療方針を決定する上でも重要である可能性が示唆された。今後は、prospective な解析による検証が必要であると考えられる。

文献

特に引用文献はありません。

健康危険情報

特記すべき事項はありません。

知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

- 1) 特願 2011-268019、発明者：山野嘉久、安藤仁、佐藤知雄、出願年月日（2011年12月7日）、HTLV-1 関連脊髄症を治療または予防するための医薬および前記医薬を用いた抗体療法の治療効果の確認方法

HTLV-1 関連脊髄症（HAM）の慢性炎症における CXCL10 の重要性に関する解析

研究協力者 山野嘉久

聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター
准教授

共同研究者 安藤仁、佐藤知雄、新谷奈津美、山内淳司、八木下尚子

聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター

研究要旨： HAMの主病態はHTLV-1感染細胞に起因する脊髄の慢性炎症と考えられているが、その詳細は未だ不明な点が多い。我々は HAM 脊髄の炎症の慢性化において非生理的なサイトカイン/ケモカイン産生と脊髄への炎症細胞の持続的な遊走という炎症ループが起こっていると考え、細胞遊走に極めて重要なケモカインの同定を試みた。その結果、CXCL10 が脳脊髄液で極めて高値を示し、さらに血清中に比較し脳脊髄液で有意に高いことが明らかになった。更に、細胞遊走実験では抗 CXCL10 抗体で CXCL10 を阻害することにより細胞遊走が減少し、遊走細胞に占める総ウイルス量も減少することが判明した。以上より、CXCL10 が HAM の炎症の慢性化において極めて重要なケモカインであることを明らかにし、また抗 CXCL10 抗体が HAM の病態に則した分子標的治療薬となり得ることを明らかにした。

研究目的

HAM 脊髄の炎症の慢性化に重要なケモカインの同定とケモカイン中和抗体による新規治療法開発の検討。

研究方法

29 例の HAM 患者と 8 例の HAM 未発症 HTLV-1 感染者の脳脊髄液（CSF）中における主な T 細胞ケモカイン受容体に対するケモカイン（CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, CCL17/TRAC, CCL20/MIP-3 α ）の濃度を cytometric bead array 法、ELISA 法を用いて定量測定し、HAM 患者の CSF で有意に高

いケモカインを絞り込んだ。次に、HAM 患者の CSF と血清とのケモカイン濃度勾配を調べるため同日採取した CSF 及び血清を用いて濃度測定し、CSF > 血清の濃度勾配を形成しているケモカインを同定した。また、ケモタキシスチャンバーを用いて血液-CSF 環境を模した細胞遊走実験系を作り、中和抗体の細胞遊走阻害作用について検討した。統計学的解析は、CSF 中ケモカイン濃度比較では Mann-Whitney U test、濃度勾配比較では paired T-test、遊走実験では Kruskal-Wallis test、Dunns test を用いた。

研究結果

HAM 患者の CSF では、HAM 非発症者に比べ有意に CXCL9 ($p < 0.0001$), CXCL10 ($p < 0.0001$), CCL5 ($p = 0.0131$) の濃度が高かった。これら 3 つのケモカインに関し、CSF と血清間の濃度勾配について調べたところ、CXCL10 のみが血液中よりも CSF 中で高い濃度勾配を形成していた。細胞遊走実験では、CXCL10 の濃度勾配形成により HAM 患者 PBMC の細胞遊走亢進が認められ、中和抗体である抗 CXCL10 抗体、抗 CXCR3 抗体を用いた遊走阻害実験では、抗 CXCL10 抗体のみが HAM 患者 PBMC の細胞遊走を有意に抑制した。また、抗 CXCL10 抗体により遊走細胞中の総ウイルス量の有意な減少、並びに遊走細胞の自発的リンパ球増殖応答の抑制傾向が確認された。

考案

HAM 患者髄液中の炎症性ケモカインの解析において、主に Th17 に発現する CCR6 のリガンド (CCL20) や、Th2, Treg に発現する CCR4 のリガンド (CCL17, CCL22) は検出されず、Th1 に発現する CXCR3 のリガンド (CXCL9, CXCL10, CXCL11) と CCR5 のリガンド (CCL3, CCL4, CCL5) の中でも、CXCL9 と CXCL10 が選択的に高い濃度を示すことが判明した。この内、CXCL10 のみが血清中よりも髄液中で濃度が高く、HAM の慢性炎症病巣の形成に CXCL10 が極めて重要な役割を果たしていると考えられた。更に、抗 CXCL10 抗体によって HAM 患者 PBMC の細胞遊走阻害効果が示され、遊走細胞の総ウイルス量を減少させることが示されたことは、抗 CXCL10 抗体の使用により、脊髄への炎症細胞や HTLV-1 感染細胞の遊走を抑制でき

る可能性があると考えられた。

結論

HAM の病態である炎症の慢性化には CXCL10 が極めて重要であると考えられた。また、抗 CXCL10 抗体が HAM の病態における炎症ループを特異的かつ効率的に遮断し、炎症の遷延化を抑制する分子標的治療法に結びつく成果であると考えられた。

健康危険情報

なし

文献

なし

知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

- 1) 特願 2011-268019、発明者：山野嘉久、安藤仁、佐藤知雄、出願年月日 (2011 年 12 月 7 日)、HTLV-1 関連脊髄症を治療または予防するための医薬および前記医薬を用いた抗体療法の治療効果の確認方法

GBS 疫学調査：本邦における脱髄型、軸索型の頻度および臨床的特徴 –prospective study の結果から–

班 員 楠 進¹

共同研究者 ○三井良之¹，有村公良²，梶 龍児³，神田 隆⁴，桑原 聡⁵，園生雅弘⁶

GBS 疫学調査研究グループ

近畿大学医学部神経内科¹，大勝病院神経内科²，徳島大学医学部神経内科³，山口大学医学部神経内科⁴，千葉大学医学部神経内科⁵，帝京大学医学部神経内科⁶

【研究要旨】 Guillain-Barré 症候群(GBS)における脱髄型と軸索型の頻度について，電気生理学的基準 (Ho 基準，Hadden 基準) を用いて，prospective study を行い，全国の協力施設から得られた症例報告をもとに検討した。欧米からの報告と比べると軸索型の頻度が高く，北部中国からの報告と比べると脱髄型の頻度が高いことが明らかとなった。軸索型と脱髄型では，感覚障害の有無，脳神経症状の合併率などの臨床症状に有意な差はなかったが，Hadden 基準の axonal 型では，最終 follow 時の Hughes grade が有意に高い傾向にあった。また，抗糖脂質抗体では，Ho 基準における AMAN，Hadden 基準による axonal 型で，有意に GM1 抗体陽性率が高いことが示された。また，Fisher 症候群 (FS) の発症頻度は FS を含む GBS 全症例を母数とすると，FS 79 例，GBS 222 例であり，26%の頻度であった。

【目的】 Guillain-Barré 症候群(GBS)における脱髄型と軸索型の頻度は，わが国では欧米と比べて軸索型の頻度が高いとされてきた。一方，北部中国では軸索型の頻度が極めて高いことも報告されている。本研究班で実施された平成 18 年度の retrospective 調査では，Hadden らの欧米例の報告に比べて優位に軸索型の頻度が高いことが確認された。この結果を受けて，さらに prospective study を行い，全国の協力施設から得られた症例報告をもとに Ho の診断基準および Hadden の診断基準に基づいて検討した。また，Fisher 症候群 (FS) の発症頻度を検討した

【研究対象・方法】 診断基準

本研究班のワーキンググループおよび協力施設 (GBS 疫学調査研究グループ) における 2007 年 8 月から 2010 年 7 月の GBS と診断されたすべての患者のうち，臨床情報を研究に用いることに同意を得られた全例を対象とした。

発症から 15 日以内に施行された末梢神経伝

導検査所見により Ho の基準²⁾に基づく分類 (AIDP, AMAN, unclassified) と Hadden の基準に基づく分類 (demyelinating, axonal, equivocal, normal, inexcitable) を行った。各症例について，先行感染，脳神経障害，感覚障害，腱反射，運動失調などの臨床症状と抗糖脂質抗体の結果，さらに情報の得られた症例では，臨床経過中の Hughes grade を用いた重症度と電気生理データについても解析した。また，Fisher 症候群 (FS) の発症頻度を検討するために今回の研究期間中において，協力施設でカウントできたすべての GBS 症例に対する FS 症例数も検討した。統計学的検討では，多群間比較には，mxn chi-square 検定を用いた。重症度判定に用いた Hughes grade の比較には，two-tailed ANOVA を用い，さらに群間比較は post hoc analysis として Bonferroni 法にて検討した。

(倫理面への配慮)

この調査は、近畿大学医学部をはじめ、ワーキンググループおよび協力施設の施設内倫理委員会の承認を得て行った。

【結果】

全国の参加施設から得られた症例情報のうち、電気生理学的検査が確実に得られた 188 例を解析の対象とした。

1) 患者背景

男性 117 例, 女性 71 例, 平均年齢は 45.6 ± 18.4 歳であった。呼吸器装着例は 25 例 (13.3%), 死亡例は 2 例 (1.1%) であった。

2) 電気生理診断基準による分類と海外報告との比較

Ho の診断基準では, AIDP 79 例 (42%), AMAN 34 例 (18%), unclassified 75 例 (40%) であった (表 1)。AMAN の頻度を北部中国の症例を対照とした Ho らの報告と比較すると, 有意に低かった ($p=0.00001$)。一方, Hadden の基準では, demyelinating は 86 例 (53%), axonal は 19 例 (15%), equivocal 69 例 (26%), normal 14 例 (6%), inexcitable 0 例であった (表 2)。axonal の頻度を欧米の症例を対照とした Hadden らの報告と比較すると, 有意に高かった ($p=0.0002$)

3) 臨床症状と病型の比較.

臨床症状と病型との比較については, Ho の基準による分類では, 感覚障害・深部感覚障害・運動失調・脳神経症状の有無, 先行感染の種類, 重症度との関連については, いずれも有意な差は認められなかった。抗糖脂質抗体との関連では, AMAN で抗 GM1IgG 抗体陽性率が他の病型にくらべて有意に高かったが

($p=0.00004$), Hadden の基準による分類では, 感覚障害・深部感覚障害・運動失調・脳神経症状の有無, 先行感染の種類については病型ごとに明らかな有意差はなかった。抗糖脂質抗体との関連では, axonal で抗 GM1IgG 抗体陽性率が他の病型にくらべて有意に高かった ($p=0.007941$)。

4) 重症度と病型の比較

重症度について Ho の基準による分類では, 有意な差は認められなかった。Hadden の基準による分類では, 最終評価時の重症度が axonal において高い傾向にあった ($p=0.0333$)。

5) Ho 基準と Hadden 基準の比較

AIDP(Ho)と demyelinating(Hadden)は, 99%の一致率であったが, AMAN (Ho) と診断された症例の 41%のみが axonal(Hadden)と判定され, Hadden 基準では, 軸索障害型と判定されにくい傾向にあった。

6) FS の GBS に対する頻度

電気生理検査のデータを得られなかった例も含む全 GBS 症例数は, 222 例であり, FS は 79 例であった。FS に GBS を加えたものを母数として, 頻度を算出すると 26%であった。

【考察】

Hadden の基準に基づいて検討すると, 本邦の GBS では axonal の頻度が欧米より高いことが確認された。一方, Ho の基準に基づいて分類すると本邦では, 北部中国よりも AMAN の頻度が低い傾向にあった。しかし, 異なる診断基準を用いての検討であり, 海外との比較検討を行う場合, 統一した診断基準による検討が必要である。また, 臨床症状と病型の比較では, 有意な差異は見いだせなかった。抗糖脂質抗体との関連では, AMAN (Ho), axonal (Hadden) の何れでも GM1 抗体の陽性例が多く, 従来から指摘されている結果と一致した。重症度は, Hadden の基準を用いて分類した場合のみ, axonal のほうが, 重症度が高い傾向を認めた。両診断基準を比較すると, Ho 基準のほうが, Hadden 基準よりも軸索障害と判定する率が高い傾向が高い。

【結論】

1) Hadden 基準で分類すると, 本邦の GBS では軸索型の頻度が欧米より高いことが確認された。