

HTLV-1 関連脊髄症（HAM）における抗 CCR4 抗体免疫療法の検証

研究協力者 新谷奈津美

聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター 助教

研究要旨： ヒト T 細胞白血病ウイルス（HTLV-1）の感染者は全国で約 108 万人存在し、感染者の一部に脊髄の慢性炎症性疾患である HTLV-1 関連脊髄症（HAM）あるいは成人 T 細胞白血病（ATL）を発症する。HAM は難治性の神経疾患で、未だ HAM 患者の機能予後は極めて不良であり、新規治療薬の開発と治療法の確立が急務である。これまで HAM 病態の主要因である感染細胞を標的とした根治的な治療薬は存在しなかったが、我々は先行研究において HAM における感染細胞の多くが ATL 同様に C-C ケモカイン受容体 4（C-C chemokine receptor 4 ; CCR4）を高発現していることを明らかにしたことから、HAM の治験薬候補として、ATL の治療薬として既承認の抗 CCR4 抗体の有効性を予想し、本研究においてその検証を行った。その結果、HAM における本薬剤の強力な抗感染細胞活性と抗炎症活性を明らかとし、抗 CCR4 抗体が HAM の有用な新規治療薬となる可能性が示された。

A. 研究目的

HTLV-1 の感染者は全国で約 108 万人存在し、感染者の一部に脊髄の慢性炎症性疾患である HAM あるいは ATL を発症することから、その対策は厚生行政の上でも重要課題である。HAM の主な病態は、HTLV-1 感染細胞に起因した脊髄の慢性炎症による神経組織障害と考えられているが、HAM は、発症者数が大変少ない希少疾患であるため、病因解明および治療薬開発のための研究が困難なものとなっている。現在、HAM に対する有効な治療法は確立されておらず、一刻も早い治療法の開発が切望されている。

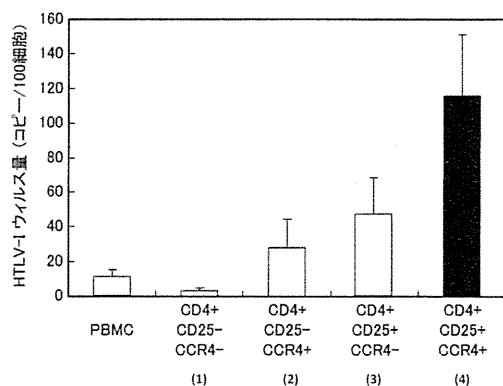
これまでの HAM の治療として、過剰免

疫応答の沈静化を実現するためにステロイドやインターフェロンなどが用いられてきた。しかし、これらの治療方法は、短期的な効果は発揮するものの長期的には副作用等が認められ、治療を継続しても病気が進行し、また病気の主原因である感染細胞の減少効果に乏しいという重大な問題点を抱えている。さらに、HTLV-1 はウイルス遺伝子の発現量が少ないため、逆転写酵素阻害剤またはプロテアーゼ阻害剤による治療効果も乏しい。これらの問題点を解決する治療法として、HTLV-1 感染細胞を排除するために感染細胞を特異的に攻撃して死滅させる抗体療法が考えられる。

先行研究において、我々は HAM におけ

る HTLV-1 感染細胞の同定を行うため、図 1 に示す各細胞集団についてのプロウイルスのコピー数を測定し、(4) CD4⁺CD25⁺CCR4⁺T 細胞に感染している HTLV-1 の数は、(3) CD4⁺CD25⁺CCR4⁻T 細胞に感染している HTLV-1 の数に比べて有意に多く、また、(2) CD4⁺CD25⁻CCR4⁺T 細胞に感染している HTLV-1 の数も、(1) CD4⁺CD25⁻CCR4⁻T 細胞に感染している HTLV-1 の数に比べて有意に多いことを明らかにしている (図 1)。従って、HAM 患者 PBMC 中の HTLV-1 感染細胞において CCR4 が高発現していることが確認された (PLoS ONE 2009)。

図 1 HAM 各細胞群における HTLV-1 プロウイルス量



HAM 患者ではさらに、本来は炎症抑制的な細胞でアル CD4⁺CCR4⁺細胞が炎症性サイトカインである IFN- γ を産生する炎症促進的な細胞に変化していることを見いだしており、CCR4⁺細胞を標的とした免疫療法は、HAM の病態形成の原因である HTLV-1 感染細胞と脊髄での慢性炎症を根絶し、HAM に根治をもたらす可能性のある治療法であることが期待された。

近年、ATL 患者においても CCR4 が ATL 細胞 (HTLV-1 感染+) で高発現していることが報告されている。これに伴い、ATL に対する抗体療法に用いることができる抗

CCR4 抗体が我が国で開発され、抗 CCR4 抗体治療薬は、2012 年 3 月 30 日に ATL の新しい治療薬として製造販売承認されている。よって、HAM における抗 CCR4 抗体を用いた抗体療法が適用可能であると考えられた。そこで、我々は、これまでに ATL の治療薬として既承認の抗 CCR4 抗体 (KM0761) と同一抗原を認識するマウス抗ヒト CCR4 抗体 (KM2160) を用いて、HAM に対する抗 CCR4 抗体の有効性について検討し、KM2160 には抗感染細胞活性があり、有用な治療薬となる可能性が期待される結果を得て 2008 年に特許出願している (特願 2008-274514)。

本研究では、抗 CCR4 抗体を用いた HAM 免疫療法の臨床応用を目指し、更なる有効性を検討するため ATL 治療薬 KM0761 と同様に抗体依存性細胞傷害 (antibody dependent cellular cytotoxicity; ADCC) 活性を有するマウス-ヒトキメラ抗 CCR4 抗体 (KM2760) を用いて検討を行った。

B. 研究方法

(1) HAM 患者髄液細胞における CCR4⁺細胞率の解析

多くの感染細胞を含む CCR4⁺細胞の HAM 病変部における局在は、HAM 病態形成への関与を示唆するものである。そこで、HAM 病変部である脊髄中に浸潤している細胞中への CCR4⁺細胞の有無を確認し、その細胞比率を健常者 (HD)、HTLV-1 キャリアー (AC) および HAM 患者の PBMC における CCR4⁺細胞比率と比較解析するため、各 PBMC (健常者 (14 例)、AC (7 例)、HAM 患者 PBMC (15 例)) および HAM 患者髄液細胞 (6 例) を抗 CD4 および CCR4 抗体で染色し、FACS により解析を行った。

(3) KM2760 処理による HAM 患者 PBMC 中 CCR4⁺細胞数の変化

以前、我々は ADCC 活性を持たない抗 CCR4 抗体である KM2160 を用いた解析により、この抗体が標的とする CCR4⁺T 細胞が HAM 患者 PBMC 中の大多数の HTLV-1 感染細胞を含有し、また、KM2160 標的細胞の除去が炎症反応の抑制効果があることを示している (特願 2008-274514)。そこで、本研究では、抗 CCR4 抗体の HAM に対するさらなる臨床応用への効果を検討するため、低フコース処理し ADCC 活性を有するマウスヒトキメラ抗 CCR4 抗体である KM2760 を用いて HAM に対する免疫療法の有効性について検討をおこなった。まず、KM2760 処理により HAM 患者 PBMC 中より CCR4⁺細胞群が除去さることを確認するため、10 例の HAM 患者 PBMC を 1 μ g/ml KM2760 処理または未処理の条件下において 7 日間培養し、その後、抗 CD4 および抗 CCR4 抗体により染色し、CD4⁺細胞群中の CCR4⁺細胞率を FACS により解析し、CD4⁺細胞中における CCR4⁺細胞率の変化を比較した。

(3) HAM 患者 PBMC における HTLV-1 感染率に対する KM2760 の作用検討

HAM 患者 PBMC における KM2760 処理による CCR4⁺細胞の除去が、HTLV-1 感染率を減少させ得るか検討するため、10 例の HAM 患者 PBMC へ KM2760 を添加し、7 日間培養後、各細胞群の HTLV-1 感染率の変化を real time PCR 法により 100 細胞当たりのプロウイルスのコピー数を測定した。KM2760 の検討濃度は、ATL の phase II 治験における抗 CCR4 抗体投与時の血中濃度である 10 μ g/ml を最高値として 0.01 μ g/ml までの濃度範囲とした。この際、炎症抑制作用を目的として HAM 治療にお

いて用いられるプレドニゾロン (PSL) 1 μ g/ml (PSL60mg 内服の血中濃度に相当) 添加時の PBMC を比較対照とした。

(5) HAM 患者 PBMC の spontaneous proliferation 活性に対する KM2760 の作用検討

HAM 患者 PBMC は、無刺激条件下の *in vitro* 培養において自発的増殖活性 (spontaneous proliferation (SP 活性)) を示すことが知られている。この HAM 患者 PBMC の SP 活性は、HTLV-1 感染細胞の増殖と HTLV-1 感染細胞により引き起こされる過剰免疫応答を反映しているものと考えられており、その抑制活性は HAM の治療薬として重要であると考えられている。そこで、SP 活性を指標に抗 CCR4 抗体の有効性を検討するため、10 例の HAM 患者 PBMC に 0.01~10 μ g/ml KM2760 を添加し、6 日間培養後に ³H-thymidine を加え 16 時間取り込ませた各細胞群の増殖活性を測定した。この際、HAM 患者 PBMC に 1 μ g/ml PSL を添加し培養したものをコントロールとした。

(倫理面への配慮)

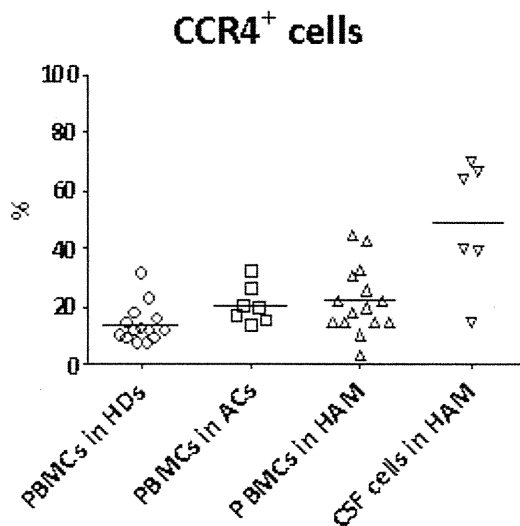
臨床検体の収集に際しては、本学の生命倫理委員会で承認された (承認番号: 第 1646 号) 同意書を用いて、不利益や危険性の排除などに関するインフォームドコンセントを行った。また検体は、個人情報管理者が連結可能匿名化により番号化する為、提供者を特定できないようにして、患者の人権擁護に努めた。

C. 研究結果

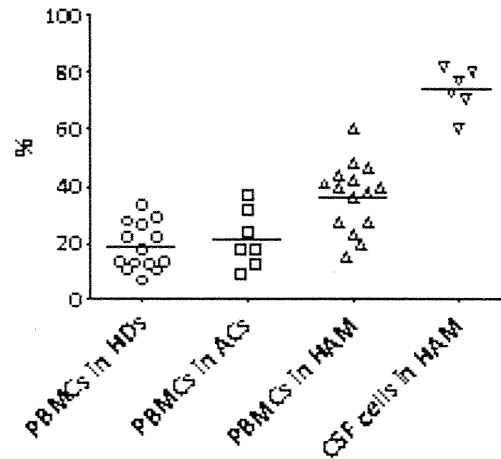
(1)HAM 患者髄液細胞における CCR4+細胞率の解析

健常者 (14 例)、AC (7 例)、HAM 患者 PBMC (15 例)、HAM 患者髄液細胞 (6 例) 中の CCR4+細胞率の解析を行った結果、その平均値は健常者-PBMC : 14.20%、AC-PBMC : 20.98%、HAM-PBMC : 22.16%、HAM 髄液細胞 : 49.02%を示した。また、CD4+細胞中における CCR4+細胞率の平均値は、健常者 -PBMC : 18.69%、AC-PBMC : 21.45%、HAM-PBMC : 36.63%、HAM 髄液細胞 : 73.55%を示した (図 2)。よって、HAM 患者の髄液には CCR4+細胞が髄液細胞全体の約 50%、特に CD4 陽性細胞では約 70%を占めており、極めて多く存在していることが明らかとなった。

図 2 HD-PBMC、AC-PBMC、HAM-PBMC、HAM 髄液細胞中における CCR4+細胞率



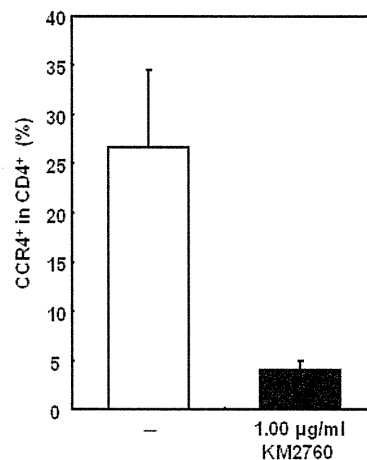
CCR4⁺ cells in CD4⁺ T cells



(2)KM2760 処理による HAM 患者 PBMC 中 CCR4+細胞数の変化

HAM 患者 PBMC に 1ug/ml KM2760 を添加または未添加条件下で 7 日間培養した後の各細胞群における CD4+細胞中における CCR4+細胞率は、KM2760 未添加群では平均 26.6%、添加群では平均 4.0%を示した。よって、KM2760 は HAM 患者 PBMC において CCR4+細胞を除去する活性を有することが確認された。

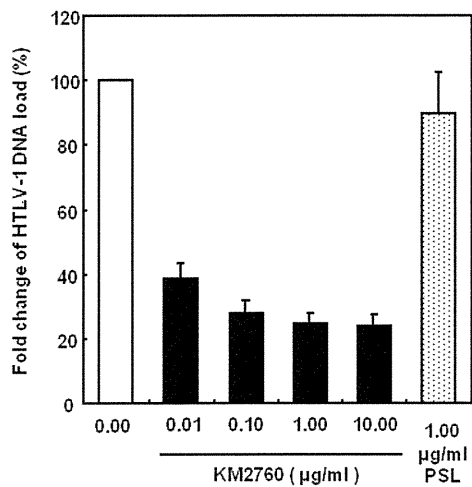
図 3 KM2760 による HAM 患者 CCR4+細胞の減少



(3) HAM 患者 PBMC における HTLV-1 感染率に対する KM2760 の作用検討

HAM 患者 PBMC に KM2760 を添加して 7 日間培養した後の各細胞群の HTLV-1 感染率の変化を解析した結果、KM2760 濃度依存的に HTLV-1 感染率の低下が観察された。この際、PSL 添加では、HTLV-1 感染率の減少作用は観察されず、PSL は感染細胞の減少効果が乏しいことが確認された。

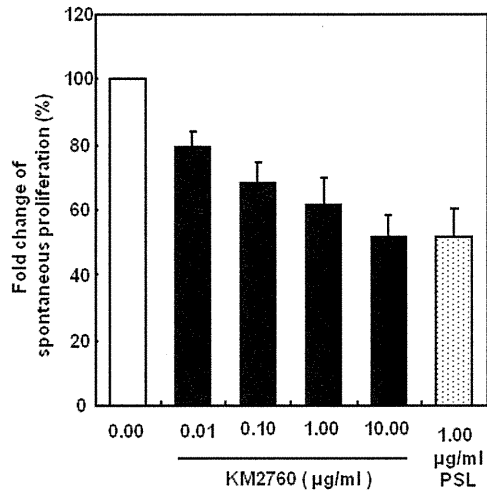
図 4 KM2760 による HAM 患者 PBMC の HTLV-1 感染率の抑制



(5) HAM 患者 PBMC の SP 活性に対する KM2760 の作用検討

HAM 患者 PBMC に KM2760 を添加培養し、SP 活性変化を解析した結果、KM2760 は濃度依存的に HAM 患者 PBMC の SP 活性を抑制した。10µg/ml KM2760 添加で得られた抑制作用は、抗炎症薬として用いられる PSL 1µg/ml (PSL60mg 内服の血中濃度に相当) 添加時の抑制作用とほぼ同程度の活性を示した。

図 5 KM2760 による HAM 患者 PBMC の SP 活性の抑制



D. 考案

本研究では、主な HTLV-1 感染細胞である CCR4+細胞が HAM 患者の髄液細胞中に極めて多く存在することを明らかにした。また、HAM 脊髄病変部においても多くの CCR4+細胞の浸潤が確認されている(分担研究者:外丸の報告参照)。よって、HAM 病変部において HTLV-1 感染細胞である CCR4+細胞が多数存在することは、このような細胞が HAM 患者脊髄中において炎症起因性細胞として作用し HAM 病態形成において重要な役割を果たしていることが示唆された。また、ADCC 活性を有する抗 CCR4 抗体である KM2760 を用いた HAM に対する有効性の検討を行った結果、KM2760 が HAM 患者 PBMC より CCR4+細胞を除去し、HTLV-1 感染率および SP 活性を低下させることが明らかとなった。従って、抗 CCR4 抗体は、HAM 患者よりその病態形成の原因である HTLV-1 感染細胞と脊髄での炎症起因性細胞を除去し、HAM の根治的な治療薬となることが示唆された。今後、HAM 患者 PBMC より特徴的に産生されるサイトカインの生産能に対する KM2760 の作用について解析を行い HAM に対する

KM2760 の有効性に関するさらなる詳細な作用解析を行っていく。

E. 結論

これまで HAM 病態の主要因である感染細胞を標的とした有効な治療薬は存在しなかったが、本研究において、HAM における抗 CCR4 抗体の強力な抗感染細胞活性ならびに抗炎症活性が証明され、その有効性が明らかとなったことから、本薬剤が HAM の有用な治療薬となる可能性が期待された。今後、本研究班において HAM の治験薬候補として治験の実施につき企業と連携して検討を行い、医師主導治験に向けたプロトコール作成など準備を進める予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sato T., Araya N., Yagishita N., Ando H., Yamano Y. Host Immune System Abnormalities Among Patients with Human T-Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1)-Associated Disorders. **T-Cell Leukemia**, 65-80/234, InTech, 2011.
- 2) Araya N., Sato T., Yagishita N., Ando H., Utsunomiya A., Jacobson S., Yamano Y. Human T-Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) and Regulatory T Cells in HTLV-1-Associated Neuroinflammatory Disease. **Viruses**, 3: 1532-1548, 2011.
- 3) Kitazono T., Araya N., Yamano Y., Yamada Y., Nakamura T., Tanaka Y., Inoue M., Ozaki S. Corresponding Author: Okazaki T. Advantage of higher-avidity CTL specific for Tax against human T-lymphotropic virus-1

infected cells and tumors. **Cell Immunol**, 272(1):11-17, 2011.

- 4) Sato T., Fujii R., Konomi K., Yagishita N., Aratani S., Araya N., Aono H., Yudoh K., Suzuki N., Beppu M., Yamano Y., Nishioka K., Nakajima T. Overexpression of SPACIA1/SAAL1, a new gene that is involved in synovocyte proliferation, accelerates the progression of synovitis in mice and humans. **Arthritis Rheum**, 63(12): 3833-3842, 2011.
- 5) 山野嘉久、佐藤知雄、安藤仁、新谷奈津美、八木下尚子 HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の治療法を確立していくために—その現状と展望— **日本臨牀**, 70(4); 705-713, 2012.
- 6) 山野嘉久、佐藤知雄、新谷奈津美、安藤仁、八木下尚子 HAM 専門外来の取り組み **神経内科**, 75 (4) 387-392, 2011.
- 7) 安藤仁、八木下尚子、新谷奈津美、佐藤知雄、山野嘉久 HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の病態と治療 **医療と検査機器・試薬** 34 (4) 別冊 機器・試薬 34 (4) : 472-477, 2011.

2. 学会発表

国際会議

- 1) Yamano Y., Sato T., Araya N., Yagishita N., Shimizu Y., Ando H., Utsunomiya A., Izumo S., Jacobson S., Suzuki N. Clinical subtype of HAM/TSP based on clinical course and laboratory findings. 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related

Viruses. June 2011, Leuven, Belgium.

- 2) Sato T., Muto M., Araya N., Maekawa R., Suzuki N., Utsunomiya A., Seino K., Yamano Y. Possibility of $\gamma\delta$ T cell immunotherapy for HTLV-1-infected individuals. 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. June 2011, Leuven, Belgium.
- 3) Araya N., Sato T., Utsunomiya A., Ando H., Yagishita N., Kannagi M., Nakamura T., Tanaka Y., Jacobson S., Yamano Y. The plasticity of HTLV-1 infected CD4+CD25+CCR4+ T-cells through HTLV-1 tax in HAM/TSP. 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. June 2011, Leuven, Belgium.

国内会議

- 1) 山野嘉久、新谷奈津美、佐藤知雄、中村龍文、森直樹、鈴木登 HTLV-1 関連脊髄症(HAM)患者でのフコイダン療法によるウイルス量の減少 第 52 回日本神経学会学術大会 2011 年 5 月 20 日 名古屋
- 2) 佐藤知雄、武藤真人、新谷奈津美、八木下尚子、前川隆司、宇都宮與、神奈木真理、清野研一郎、山野嘉久 HTLV-1 感染者に適用可能なガンマデルタ T 細胞療法の開発 第 4 回 HTLV-1 研究会・合同班会議 2011 年 9 月 19 日 東京
- 3) 山野嘉久、佐藤知雄、新谷奈津美、八木下尚子、安藤仁、宇都宮與、出雲周二 HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の臨

床病型: 臨床経過と検査所見に基づいた分類 第 4 回 HTLV-1 研究会・合同班会議 2011 年 9 月 19 日 東京

- 4) 新谷奈津美、佐藤知雄、安藤仁、八木下尚子、神奈木真理、田中勇悦、宇都宮與、山野嘉久 HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) における HTLV-1 を介した病原性 T 細胞発生機構の解析 第 4 回 HTLV-1 研究会・合同班会議 2011 年 9 月 19 日 東京
- 5) Sato T., Muto M., Araya N., Kojo S., Maekawa R., Utsunomiya A., Seino K., Yamano Y. Frequency and functional significance of $\gamma\delta$ T cells in HTLV-1-infected individuals. (HTLV-1 感染者におけるガンマデルタ T 細胞の頻度および機能的重要性) . 第 40 回日本免疫学会学術集会 2011 年 11 月 27 日 千葉
- 6) Araya N., Sato T., Utsunomiya A., Ando H., Yagishita N., Kannagi M., Tanaka Y., Yamano Y. The molecular mechanism in the plasticity of HTLV-1 infected CD4+CD25+CCR4+ T-cells through HTLV-1 in HAM/TSP. 第 40 回日本免疫学会学術集会 2011 年 11 月 27 日 千葉
- 7) 佐藤知雄、安藤仁、新谷奈津美、山内淳司、八木下尚子、出雲周二、山野嘉久 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 平成 23 年度厚生労働省科学研究費補助金 難知性疾患克服研究事業 「免疫性神経疾患に関する調査研究」班会議 2012 年 1 月 26 日 東京

- 8) 安藤仁、佐藤知雄、新谷奈津美、山内淳司、八木下尚子、山野嘉久 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
平成 23 年度厚生労働省科学研究費補助金 難知性疾患克服研究事業 「免疫性神経疾患に関する調査研究」班会議 2012 年 1 月 26 日 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特願 2008-274514、発明者:山野嘉久、新谷奈津美、HTLV-I 関連脊髄症を治療または予防するための医薬、および HTLV-I 関連脊髄症の患者に対する抗体療法の効果を予測する方法

HAM の脊髄病変における治療標的分子の病理学的検討

研究分担者 外丸 詩野 北海道大学大学院医学研究科・講師

研究要旨：

HTLV-1 関連脊髄症 (HTLV-1 associated myelopathy:HAM) は長い潜伏期の後に、HTLV-I 感染キャリアーの一部に慢性の痙性脊髄麻痺を発症する疾患で、病態には脊髄に浸潤する T 細胞による過剰な細胞傷害やサイトカインの産生等が関わっていると推定されている。本研究課題は、HAM の新規治療法を開発することを目的に研究を進めているが、新規治療法の開発には HAM 病態において重要な役割を有する疾患惹起性 T 細胞の免疫応答を制御することが課題の 1 つと考えられている。

本年は HAM の病態解明を進める目的で、患者脊髄に浸潤している T 細胞に関して、免疫組織染色による詳細な検討を行った。その結果、HAM 患者脊髄には CCR4、CXCR3、T-bet、IFN- γ 陽性所見を示す T 細胞が浸潤していることが明らかとなり、ケモカイン/ケモカインレセプターを介する中枢神経系への T 細胞の浸潤を抑制するような治療法が HAM の新たな治療戦略になり得る可能性が示唆された。

A. 研究目的

HTLV-1 関連脊髄症 (HTLV-1 associated myelopathy:HAM) の新規治療法を開発することを目的に、HAM の病態に重要な役割を果たしている脊髄浸潤 T 細胞に関する検討を行った。

Anti-CCR4 抗体、anti-CXCR3 抗体、anti-IFN- γ 抗体 (いずれも Abcam)、anti-T-bet 抗体 (Santa cruz)、および対応するアイソタイプコントロールを用いた。二次抗体は Alexa 488-conjugated、Alexa 594-conjugated の anti-rabbit あるいは mouse IgG (Invitrogen) を用いた。

B. 研究方法

1. サンプル

HAM 患者の剖検により採取された脊髄標本 4 例、および他疾患により病理解剖され、脊髄には異常を認めない標本 6 例を正常コントロールとして用いた。

3. 蛍光染色

脊髄のパラフィンブロックより作製した 4 μ m 切片を、脱パラの後に serum-free blocking medium (DAKO) で 15 分ブロッキングし、1 次抗体を 4°C で一晩反応させた。1 次抗体の反応後、標本を PBS で 10 分 2 回洗浄したのち、二次抗体 (300 倍

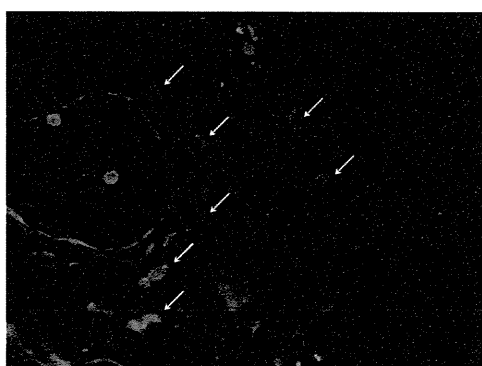
希釈)に30分反応させた。反応後標本をPBSで10分2回洗浄し、mounting medium(DAKO)で封入後、蛍光顕微鏡で観察した。

(倫理面への配慮)

実験は北海道大学の倫理委員会承認に基づいて行った。

C. 研究結果

HAM患者剖検脊髄では、脊髄軟膜部血管周囲や間質、および脊髄実質内の血管周囲に単核球浸潤を認め、浸潤細胞の多くがCCR4、CXCR3、T-bet、IFN- γ を発現する細胞であった(図①~④)。また、正常コントロールには浸潤細胞は観察されなかった。



①CCR4の発現



②CXCR3の発現



③T-betの発現



④IFN- γ の発現

図 HAM脊髄内浸潤T細胞の検討

D. 考察

HAMの病態には脊髄に浸潤するT細胞による過剰な細胞傷害やサイトカインの産生等が関わっていると推定されている。

HAMの病態解明を進める目的で、患者脊髄に浸潤しているT細胞に関して、免疫組織染色による詳細な検討を行った。その結果、HAM患者脊髄にはCCR4、CXCR3、T-bet、IFN- γ 陽性所見を示すT細胞が浸潤していることが明らかとなった。以上の結果より、ケモカイン/ケモカインレセプターを介する中枢神経系へのT細胞の浸潤を抑制するような治療法がHAMの新たな治療戦略になり得る可能性が示唆された。

E. 結論

HAM 患者脊髄には CCR4、CXCR3、T-bet、IFN- γ 陽性所見を示す T 細胞が浸潤していることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwasaki S., Masuda S., Baba T., Tomaru U., Katsumata K., Kasahara M., Ishizu A. Plasma-dependent, antibody- and Fc γ receptor-mediated translocation of CD8 molecules from T cells to monocytes. **Cytometry A**, 79(1): 46-56, 2011.
- 2) Tomaru U., Takahashi S., Ishizu A., Miyatake Y., Gohda A., Suzuki S., Ono A., Ohara J., Baba T., Murata S., Tanaka K., Kasahara M. Decreased proteasomal activity causes age-related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities. **Am J Pathol** (in press)

2. 学会発表

- 1) 外丸詩野、山田洋介、木内隆之、丸川活司、松野吉宏、黒田徹、石津明洋、笠原正典 プロテアソームサブユニット $\beta 5t$ の胸腺腫における発現 第 57 回日本病理学会秋期特別総会 2011 年 東京
- 2) 石津明洋、外丸詩野、吉木敬 自己血管内皮細胞反応性 T 細胞による血管

炎発症モデル 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2011 年 神戸

- 3) 山口まどか、一條加奈、飯沼千景、脇雅、川上愛、佐々木直美、外丸詩野、笠原正典、石津明洋 自己血管内皮細胞反応性血管炎惹起性 T 細胞の認識分子の同定 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会、2011 年 千葉
- 4) 山田洋介、大塚紀幸、大平洋、辻野一三、深谷進司、外丸詩野、石津明洋 Pulmonary veno-occlusive disease (PVOD) の一剖検例 第 16 回血管病理研究会 2011 年 神戸

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願
該当なし。

2. 実用新案登録
該当なし。

3. その他
該当なし。

CXCL10 の HAM 炎症の慢性化における重要性と 新規治療標的分子としての有用性に関する研究

研究協力者 佐藤知雄

聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター 講師

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。そこで我々は HAM 患者脊髄における炎症の慢性化が脊髄局所での病的なケモカイン産生とそれによる炎症細胞の脊髄への遊走、さらなるケモカイン産生という炎症ループに起因するという仮説を立て、HAM の病態の主軸となるケモカインの同定を試みた。その結果、CXCL10 が脳脊髄液（CSF）で極めて高値を示し、同一症例の血清と比較しても有意に高いことを明らかにした。この仮説を裏付けるように HAM 患者の CSF 細胞には CXCL10 の受容体である CXCR3 を発現する細胞が多数を占めることが明らかになった。また HAM 患者末梢血リンパ球を用いた CXCL10 による細胞遊走実験では抗 CXCL10 阻害抗体により遊走細胞数が減少し、結果的に遊走細胞中のウイルス感染細胞数が減少すること、更に遊走された HAM リンパ球による自発的増殖応答を抑制できることが判明した。以上より、CXCL10 が HAM の主病態である脊髄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 阻害抗体が 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。

A. 研究目的

HTLV-1 関連脊髄症（HAM）は、HTLV-1（ヒト T 細胞白血病ウイルス）感染を背景に、持続する炎症が脊髄組織を変性し、歩行障害や膀胱直腸障害を来す難治性の慢性神経疾患である。その主病態は、HTLV-1 感染細胞に起因する慢性炎症と考えられているが、炎症の慢性化メカニズムに関して未だ不明な点が多い。我々は、HAM 患者脊髄における炎症の慢性化には、サイトカインやケモカインの過剰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形成されていると仮説を立てた。一般的に、

細胞遊走にはケモカインが重要であり、ケモカイン受容体を発現する細胞が特異的に遊走することが知られている。HAM 患者脊髄病理解析では、interferon- γ , tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β といった炎症性サイトカインが検出されることが報告されており、それらサイトカインにより刺激を受けた中枢神経内に存在する細胞が何らかのケモカインを産生することが示唆される。

今回、我々は HAM 脊髄の炎症の慢性化に重要なケモカインの同定を試み、さらにそのケモカインを中和抗体により阻害する

という HAM の病態に即した分子標的療法を開発することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 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), CCL22 (MDC)) 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。

(2) (1) で絞り込んだ 3 つのケモカインについて、HAM 患者の CSF-血清間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 (n = 34)。さらに、ケモカイン濃度勾配と遊走細胞の関係を証明するために、濃度勾配と CSF 細胞数における相関解析を行い、両者で正の相関を示すケモカインを同定した (n = 30)。

(3) 上記 (2) で同定したケモカインによりケモカイン受容体陽性細胞が遊走しているかどうか調べるために、HAM 患者 CSF 細胞を Flow cytometer を用いて解析を行った (n = 6)。

(4) 最後に、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、ケモカイン及びケモカイン受容体に対する中和抗体の細胞遊走阻害作用を解析した (n = 30)。遊走能は以下の計算により chemotactic index として表示した。

chemotactic index

= [CXCL10 による遊走細胞数]/[メEDIUM 単独による遊走細胞数 (NTC: negative control)]

また、遊走阻害後のプロウイルス量の変化

を real time PCR 法で測定し、プロウイルス量と遊走細胞数の積で算出した総ウイルス量の比較解析を行った (n = 4)。さらに遊走阻害後の HAM 患者末梢血単核球細胞 (PBMC) にみられるリンパ球自発増殖応答 (spontaneous lymphoproliferation) (n = 6) への影響について、遊走細胞を 6 日間培養後 ³[H] thymidine を培地中に添加し 16 時間後に cell harvester により回収し、マイクロベータを用いてカウントの測定を行った。

統計学的解析は、D'Agostino-Pearson omnibus test にて解析した後、2 グループ間の比較では t test または Mann-Whitney U test を用いた。多群間比較では、one-way ANOVA または Kruskal-Wallis test を用い、事後テストとしてそれぞれ Tukey test または Dunn test を行った。相関解析では、Spearman's correlation test を用いた。 $P < 0.05$ を統計学的有意とした。グラフ表示は全て平均±標準偏差を用いた。

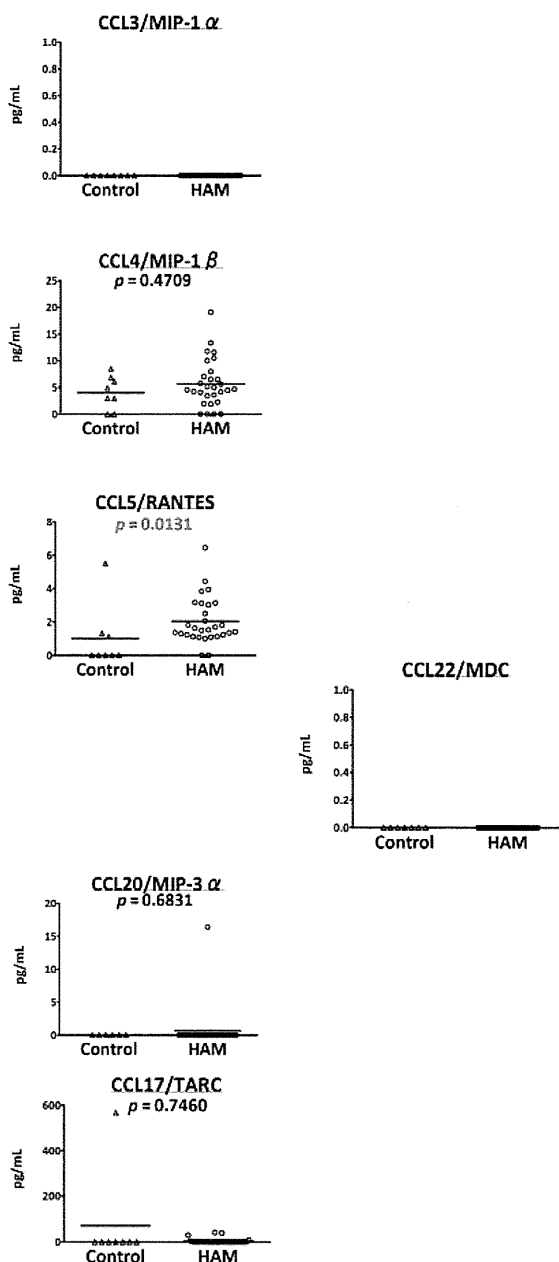
(倫理面への配慮)

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、個人情報管理者が連結可能匿名化により番号化する為、提供者を特定できないようにして、患者の人権擁護に努めた。

C. 研究結果

(1) HAM 患者の CSF では、HAM 未発症 HTLV-1 感染者 (Control) の CSF 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 (図 1)。

図 1: CSF ケモカイン濃度解析



(2) 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のみが血清中よりもCSF中で有意に高い濃度勾配を形成し (* $P < 0.0001$)、それ以外のケモカイン (コントロールとしてCCL4) は全てCSFよりも血清中で有意に高い濃度を示した (* $P < 0.0001$) (図 2A)。

次に、濃度勾配とCSF細胞数の相関を見ると、CXCL10の濃度勾配のみがCSF細胞数と正の相関を認めた ($r = 0.5281, P = 0.0027$) (図 2B)。これらは、CXCL10の濃度勾配が高いほどCSF細胞数が多いことを示しており、CXCL10が細胞遊走に重要な役割を果たしている可能性を示唆する結果であった。

図 2A: CSF-血清間のケモカイン濃度勾配

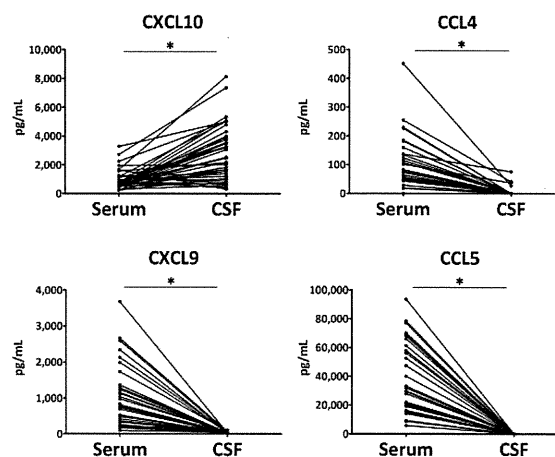
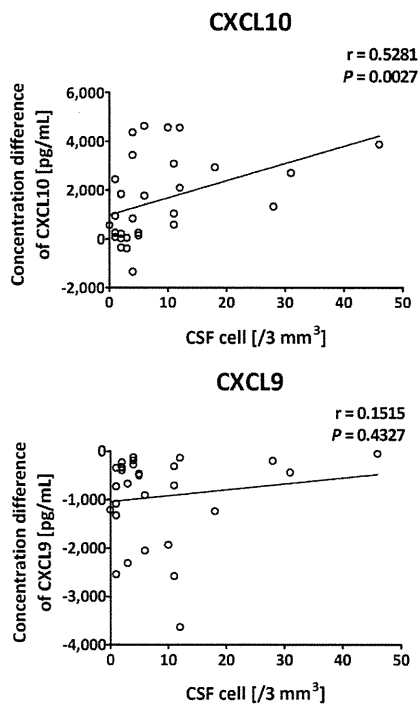
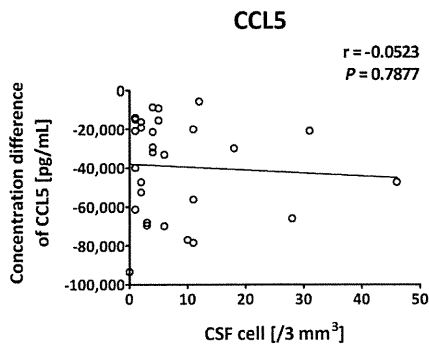


図 2B: ケモカイン濃度勾配とCSF細胞数における相関関係





(3) CXCL10 の機能の1つとして、CXCR3 陽性細胞を遊走させる機能が知られており、我々はHAM 患者CSF 細胞の表現型を flow cytometer を用いて調べた。HAM 患者CSF 細胞の90%以上がCD3 陽性T細胞であり (図3A: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)、さらにCD3 陽性T細胞の90%以上がCXCR3 陽性細胞であることが分かった (図3B)。

図3A:CSF 細胞の表現型解析

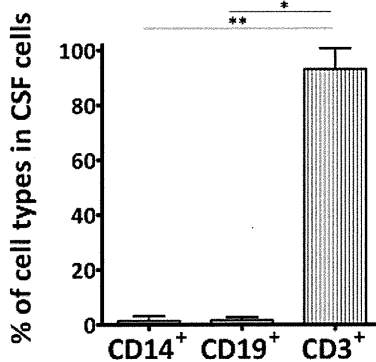
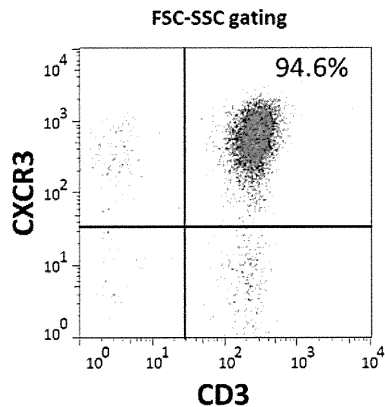
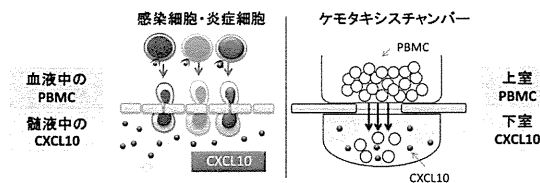


図3B: CSF CD3 陽性T細胞の代表的なフローサイトメトリー解析例



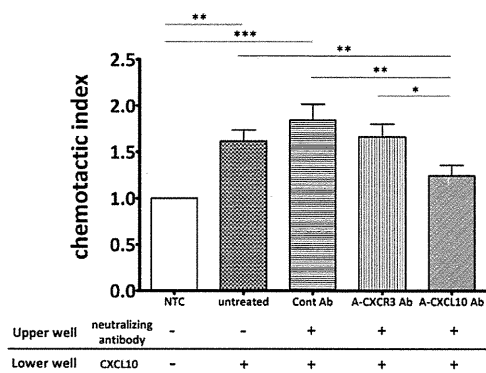
(4) 次に、ケモタキシスチャンバー (MBA96, NeuroProbe, USA) を用いて図4に示す細胞遊走実験系を作製し、CXCL10 による細胞遊走とCXCL10 及びその受容体CXCR3 に対する中和抗体を用いて遊走が阻害されるかどうか調べた。

図4: 血液-CSF の環境を模した細胞遊走実験系



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 (図5A: *** $P < 0.0001$, ** $P < 0.001$, * $P < 0.05$)。

図 5A: CXCL10 による遊走能と中和抗体による遊走阻害



また、遊走阻害後の遊走細胞中の総ウイルス量を調べたところ、抗 CXCL10 抗体を用いた場合、有意に総ウイルス量が減少した (図 5B: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ns: not significant)。さらに抗 CXCL10 抗体を用いることにより、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 (図 5C: * $P < 0.05$)。

図 5B: 遊走阻害後の総ウイルス量

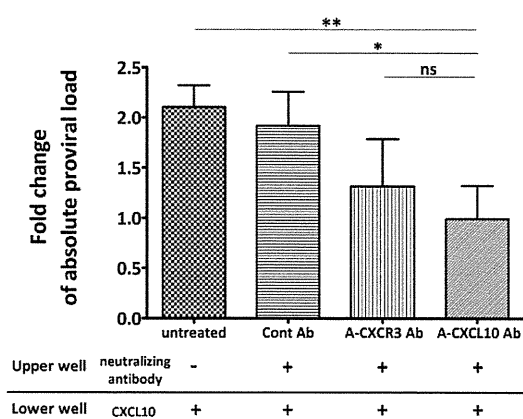
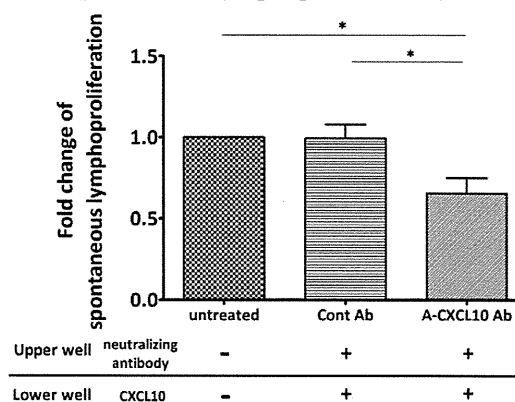


図 5C: 遊走阻害後のリンパ球自発的増殖応答(spontaneous lymphoproliferation)



D. 考案

HTLV-1 は CD4T 細胞 (ヘルパーT 細胞) に持続感染する。HAM の脊髄にはこの感染 T 細胞や HTLV-1 特異的細胞傷害性 T 細胞などが浸潤していることが知られている。本研究ではこうした HAM の脊髄病変を形成する主軸となるケモカインを同定するために HAM 患者髄液中の炎症性ケモカインの解析を行った。その結果、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 リガンド (CXCL9, CXCL10, CXCL11) と CCR5 リガンド (CCL3, CCL4, CCL5) は、その中の CXCL9, CXCL10 および CCL5 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、さらにその濃度勾配は CSF 細胞数と正の相関を示した。また、HAM 患者 CSF 細胞の解析では、CXCR3 陽性 CD3 陽性 T 細胞が大部分を占めており、CXCL10 により CXCR3 陽性細胞が選択的に遊走していることが示された。これらの結果から、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。

これまでに CXCR3 陽性細胞である Th1 細胞や Tc1 細胞は interferon- γ を産生し、

CXCL10 は interferon- γ により発現誘導されることが知られる。こうした知見からも、HAM 患者の脊髄局所における CXCL10 産生とそれによる CXCR3 陽性細胞の脊髄への遊走、浸潤した細胞による interferon- γ の産生による更なる CXCL10 の発現誘導という CXCL10-CXCR3 を軸とする炎症ループの形成が示唆された。

さらに、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。また、抗 CXCL10 抗体を用いることで遊走細胞が減少する結果、HAM 患者 PBMC にみられる spontaneous proliferation も抑制されることが示された。以上の結果より、HAM の病態に極めて重要なケモカイン CXCL10 の制御により HAM の進行抑制が期待される結果が得られた。

E. 結論

HAM の主病態である脊髄の炎症の慢性化に 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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sato T., Araya N., Yagishita N., Ando H., Yamano Y. Host Immune System Abnormalities Among Patients with Human T-Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1)-Associated Disorders. **T-Cell Leukemia**, 65-80/234, InTech, 2011.

- 2) Araya N., Sato T., Yagishita N., Ando H., Utsunomiya A., Jacobson S., Yamano Y. Human T-Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) and Regulatory T Cells in HTLV-1-Associated Neuroinflammatory Disease. **Viruses**, 3: 1532-1548, 2011.

- 3) Sato T., Fujii R., Konomi K., Yagishita N., Aratani S., Araya N., Aono H., Yudoh K., Suzuki N., Beppu M., Yamano Y., Nishioka K., Nakajima T. Overexpression of SPACIA1/SAAL1, a new gene that is involved in synoviocyte proliferation, accelerates the progression of synovitis in mice and humans. **Arthritis Rheum**, 63(12): 3833-3842, 2011.

- 4) 山野嘉久、佐藤知雄、安藤仁、新谷奈津美、八木下尚子 HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の治療法を確立していくために—その現状と展望— **日本臨牀**, 70(4); 705-713, 2012.

- 5) 山野嘉久、佐藤知雄、新谷奈津美、安藤仁、八木下尚子 HAM 専門外来の取り組み **神経内科**, 75 (4) 387-392, 2011.

- 6) 安藤仁、八木下尚子、新谷奈津美、佐藤知雄、山野嘉久 HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の病態と治療 **医療と検査機器・試薬** 34 (4) 別冊 機器・試薬 34 (4) : 472-477, 2011.

2. 学会発表

国際会議

- 1) Yamano Y., Sato T., Araya N., Yagishita

- N., Shimizu Y., Ando H., Utsunomiya A., Izumo S., Jacobson S., Suzuki N. Clinical subtype of HAM/TSP based on clinical course and laboratory findings. 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. June 2011, Leuven, Belgium.
- 2) Sato T., Muto M., Araya N., Maekawa R., Suzuki N., Utsunomiya A., Seino K., Yamano Y. Possibility of $\gamma\delta$ T cell immunotherapy for HTLV-1-infected individuals. 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. June 2011, Leuven, Belgium.
- 3) Araya N., Sato T., Utsunomiya A., Ando H., Yagishita N., Kannagi M., Nakamura T., Tanaka Y., Jacobson S., Yamano Y. The plasticity of HTLV-1 infected CD4+CD25+CCR4+ T-cells through HTLV-1 tax in HAM/TSP. 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. June 2011, Leuven, Belgium.
- ルタ T 細胞療法の開発 第 4 回 HTLV-1 研究会・合同班会議 2011 年 9 月 19 日 東京
- 3) 山野嘉久、佐藤知雄、新谷奈津美、八木下尚子、安藤仁、宇都宮與、出雲周二 HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の臨床病型: 臨床経過と検査所見に基づいた分類 第 4 回 HTLV-1 研究会・合同班会議 2011 年 9 月 19 日 東京
- 4) 新谷奈津美、佐藤知雄、安藤仁、八木下尚子、神奈木真理、田中勇悦、宇都宮與、山野嘉久 HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) における HTLV-1 を介した病原性 T 細胞発生機構の解析 第 4 回 HTLV-1 研究会・合同班会議 2011 年 9 月 19 日 東京
- 5) Sato T., Muto M., Araya N., Kojo S., Maekawa R., Utsunomiya A., Seino K., Yamano Y. Frequency and functional significance of $\gamma\delta$ T cells in HTLV-1-infected individuals. (HTLV-1 感染者におけるガンマデルタ T 細胞の頻度および機能的な重要性) . 第 40 回日本免疫学会学術集会 2011 年 11 月 27 日 千葉

国内会議

- 1) 山野嘉久、新谷奈津美、佐藤知雄、中村龍文、森直樹、鈴木登 HTLV-1 関連脊髄症(HAM)患者でのフコイダン療法によるウイルス量の減少 第 52 回日本神経学会学術大会 2011 年 5 月 20 日 名古屋
- 2) 佐藤知雄、武藤真人、新谷奈津美、八木下尚子、前川隆司、宇都宮與、神奈木真理、清野研一郎、山野嘉久 HTLV-1 感染者に適用可能なガンマデ
- 6) Araya N., Sato T., Utsunomiya A., Ando H., Yagishita N., Kannagi M., Tanaka Y., Yamano Y. The molecular mechanism in the plasticity of HTLV-1 infected CD4+CD25+CCR4+ T-cells through HTLV-1 in HAM/TSP. 第 40 回日本免疫学会学術集会 2011 年 11 月 27 日 千葉
- 7) 佐藤知雄、安藤仁、新谷奈津美、山内淳司、八木下尚子、出雲周二、山野嘉

久 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 平成 23 年度厚生労働省科学研究費補助金 難知性疾患克服研究事業 「免疫性神経疾患に関する調査研究」班会議 2012 年 1 月 26 日 東京

- 8) 安藤仁、佐藤知雄、新谷奈津美、山内淳司、八木下尚子、山野嘉久 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 平成 23 年度厚生労働省科学研究費補助金 難知性疾患克服研究事業 「免疫性神経疾患に関する調査研究」班会議 2012 年 1 月 26 日 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

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）の新規医薬品開発に関するプロテオーム研究

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

研究協力者 石原誠人 独立行政法人理化学研究所 特別研究員

研究要旨：

HTLV-1 感染 T 細胞に発現している HAM 特異的治療標的分子を探索する目的で、臨床検体 30 例（非感染者 6 例、HTLV-1 感染無症候患者 5 例、HAM 患者 10 例、ATL 患者 9 例）のプロテオームプロファイリングを行った。本研究では、HAM 患者において高率で HTLV-1 の感染が立証されている CD4⁺CD25⁺CCR4⁺細胞をソーティングし、そのタンパク質総抽出液を使用した。

その結果、14,064 ペプチドの定量プロファイルが得られ、このうち分散分析、交差検定を用いた二段階抽出により選出した 17 タンパク質の定量データを用いると、Leave one out cross validation test により上記 4 病理群を有意に分類できることが分かった。これらの分子は HAM、および ATL 発症メカニズムの解明や病態を正確に把握しうるバイオマーカーになる可能性があるだけでなく、他の正常組織や血球細胞での発現がない、もしくは非常に低いレベルであれば有望な創薬のターゲットになり得る。

上記細胞総抽出液を使用した解析に加え、より治療標的分子を効率的に探索するために、IGEL 法 (Isotopic Glycosidase Elution and labeling on Lectin column chromatography) を用いた細胞膜表面タンパク質の濃縮精製、プロファイリングのための予備検討実験を開始しており、今後はソーティングを行ったヒト T 細胞臨床検体について本手法を適用し、HAM 病因細胞の細胞膜サブプロテオームからバイオマーカー・創薬ターゲットの探索を行う予定である。

A. 研究目的

現在 HAM の治療において、HAM 病因 T 細胞、またはそれに起因する炎症反応を特異的に標的とした分子標的治療薬は存在しない。そこで本研究では、患者由来末

梢血細胞を用いて、HAM 治療の新たなターゲットとなりうる分子を世界最先端の定量プロテオーム解析技術を駆使して同定することを目的とする。