

Soul, Korea.

(国内学会)

- (1) 伊田幸、上迫努、江藤智生、佐々木正史、伊藤守. NOG マウス由来 ES 細胞を用いた遺伝子改変による NOG マウスの改良. 第 59 回日本実験動物学会総会、平成 24 年 5 月 24～26 日、別府.
- (2) 片野いくみ、伊藤亮治、上迫努、小倉智幸、末水洋志、日置恭司、高橋武司、伊藤守. ヒト IL-2 遺伝子導入 NOG マウスで分化したヒト造血幹細胞由来 NK 細胞の特性. 第 59 回日本実験動物学会総会、平成 24 年 5 月 24～26 日、別府.
- (3) 伊藤亮治、片野いくみ、高橋武司、川井健司、上迫努、布村聡、相磯貞和、伊藤守. ヒト IL-3/GM-CSF トランスジェニック NOG マウスにおけるヒトミエロイド系細胞の分化亢進. 第 59 回日本実験動物学会総会、平成 24 年 5 月 24～26 日、別府.
- (4) Katano, I., Ito R., Takahashi, K. and Ito, M. Characteristics of NK cells developed from hematopoietic stem cell in human interleukin-2 transgenic NOG mice. 第 41 回日本免疫学会総会、平成 24 年 12 月 5～7 日、神戸.
- (5) Ito R, Takahashi K, Katano I, Kawai K, Nunomura S, Ra C, Kamisako T, Aiso S and Ito M. Functional maturation of human myeloid cells in NOG transgenic humanized mouse strain expressing human IL-3 and GM-CSF. 第 41 回日本免疫学会総会、平成 24 年 12 月 5～7 日、神戸.
- (6) 伊藤亮治、高橋武司、片野いくみ、川井健司、上迫努、布村聡、羅智靖、相磯貞和、伊藤守. ヒト IL-3/GM-CSF トランスジェニック NOG マウスを用いたヒトアレルギーモデルの確立. 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会、平成 24 年 11 月 29 日～12 月 1 日、大阪.

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

HTLV-I 感染阻止ワクチンの研究

新川 武 琉球大学熱帯生物圏研究センター 准教授
松崎 吾朗 琉球大学熱帯生物圏研究センター 教授

要旨：三部構成免疫賦活複合体（TIPS）は、抗原、コイルドコイルコア、標的リガンドの三部から構成されるワクチンプラットフォームである。今回、HTLV-1 gp46 ペプチド(P180-204)を搭載したTIPSをBALB/cおよびC57BL/6マウスヘアラムアジュバントを添加して皮下接種したが、抗ペプチド抗体の産生は認められなかった。現在、ペプチド自体の高分子量化や他のキャリアタンパク質との融合化を進めることで、gp46ペプチドワクチンの効率化を図っている。

A. 研究目的

本研究課題では、HTLV-1 中和抗体を誘導するための新たな免疫法を確立することを目的に研究を進めている。すなわち、HTLV-1 の中和エピトープとして機能することが知られている gp46 由来のペプチド鎖（pep180 - 204:PSQLPPTAPPLLPHSNLDHILEPSI; Tanaka et al., 1994）に対する特異抗体の誘導を可能にする系の確立を目指す。まず始めに、近年我々が開発した「三部構成免疫賦活システム（TIPS）」を利用することにした。また、陽性対象として OVA をペプチドのキャリアタンパク質として用いた。

B. 研究方法

HTLV-1 gp46 epitope (180-204) を TIPS 分子のひとつ、Z-COMP と融合させ、Z-COMP-gp46₁₈₀₋₂₀₄ を構築した（以下、TIPS/gp46₁₈₀₋₂₀₄）。本融合分子はこれまでの研究成果（Miyata et al., 2011）から 5 量体を形成すると推察されるため、大腸菌発現させた TIPS/gp46 pep をニッケルアフィニティーならびにゲル濾過精製し、BALB/c および C57BL/6 マウスへ免疫した。その後、抗ペプチド抗体を ELISA 法で確認した。また、陽性対象として OVA と融合したペプチド（OVA/gp46₁₈₀₋₂₀₄）、さらに、陰性対象としてペプチド単独（gp46₁₈₀₋₂₀₄）投与群も設けた。

C. 研究結果

TIPS/gp46₁₈₀₋₂₀₄ が大腸菌から 5 量体として分泌発現することが確認された。また、Z の抗体結合機能があることも確認した。この融合分子を BALB/c および C57BL/6 マウスヘアラムアジュバントを添加して皮下接種した結果、OVA/gp46₁₈₀₋₂₀₄ は以前の報告どおり（Tanaka et al., 1994）、ペプチド特異的抗体を誘導した。しかし、TIPS/gp46₁₈₀₋₂₀₄ では抗体応答が全く確認できなかった。

D. 考察

これまで、マラリア原虫および日本脳炎ウイルス由来の抗原に対する TIPS の効果は確認されてきた。しかし、今回 TIPS/gp46₁₈₀₋₂₀₄ の免疫では期待される抗体応答が確認できなかった。その可能性はいくつか考えられる。まず、(1) 純粋な 5 量体分子だけでは低分子のペプチドに対する免疫誘導能が不十分である、(2) Z の標的化機能では低分子のペプチドに対する免疫誘導能が不十分である、(3) ペプチドならびに Z-COMP 分子の両者には十分な数の T 細胞エピトープ配列が含まれていない、などの可能性である。以上のことは、OVA/gp46₁₈₀₋₂₀₄ が機能したことから推察されることである。

よって、現在、上記 (1) ~ (3) の可能性のうち (1) と (3) を検証するため、ペプチドのセルフクロスリンク化による高分子量化と無毒性変異ジフテリア毒素 CRM197 との融合化

を進めている。さらに、高分子量化したペプチドを CRM197 と融合させることも検討している。CRM197 は小児用肺炎球菌ワクチンとしても臨床応用されているトキシイドであるため、臨床的な応用面でも信頼性の高いキャリアタンパク質であると考えている。

E. 結論

HTLV-1 gp46₁₈₀₋₂₀₄ を認識する抗 gp46₁₈₀₋₂₀₄ 抗体は、HTLV-1 の細胞間伝染を阻止する機能があり、ウイルス中和抗体として機能するため、ウイルス感染ならびに発症予防に対して極めて重要である。よって、HTLV-1 の中和抗体を効率よく誘導できるペプチドワクチンの開発は、本症への対策にとって極めて重要であると考えられる。そのためには低分子ペプチドの免疫原性を向上させるワクチンプラットフォームの開発が重要だと考えている。

F. 健康危険情報

特記すべき情報なし

G. 論文発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

細胞内 HTLV-I 感染抵抗性因子の研究と応用

樋口雅也 新潟大学医歯学系・ウイルス学 准教授

要旨：HTLV-1 の癌蛋白 Tax1 感染 T 細胞の不死化、潜伏感染および病原性発揮において重要な役割を果たしている。我々は Tax1 に結合する宿主因子の一つである USP10 がストレス顆粒の形成因子であること、Tax1 は USP10 の機能を阻害することにより活性酸素種（ROS）産生を促すことを明らかにした。また HTLV-1 感染細胞は、亜硫酸によるストレス顆粒形成能が低下しており、亜硫酸によるアポトーシスが亢進していた。亜硫酸は成人 T 細胞白血病（ATL）治療薬として有望であるが、本研究はその作用機構の一端を明らかにするものである。

A. 研究目的

細胞はウイルスに対して様々な感染抵抗性因子を有しており、ある種の自然免疫システムを備えている。一方でウイルス側は自らコードするウイルス蛋白により、それらの因子の機能を阻害し、ウイルスの複製を完遂する。HTLV-1 の癌蛋白 Tax1 は感染 T 細胞の不死化、ウイルス遺伝子の発現を促進する、HTLV-1 感染成立における重要因子である。我々は Tax1 が結合する細胞内因子として Ubiquitin Specific Protease 10 (USP10) を同定した。本研究では、USP10 の感染抵抗性因子としての機能を明らかにし、USP10 活性化の手段の開発と HTLV-1 感染阻止への応用を目指す。また USP10 の機能に基づいた ATL 治療薬の可能性についても検討する。

B. 研究方法

In vitro の解析には、HTLV-1 感染細胞株その他の各種細胞株を用いた。ストレス顆粒形成には亜硫酸による刺激を用い、免疫蛍光染色によりストレス顆粒形成能を定量化した。アポトーシスの定量には PI 染色とフローサイトメーター解析を用いた。細胞株における USP10 ノックダウンは shRNA 発現レンチウイルスを感染させることにより行った。また in vivo における USP10 の機能を明らかにするため Usp10 ノックアウトマウスを作製した。ノックアウトマウス

より Mouse Embryonic Fibroblast (MEF) を作製し in vitro の解析を行った。本研究は新潟大学動物実験倫理委員会、遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

(1) USP10 の機能解析：USP10 結合蛋白を網羅的に同定したところ、G3BP1 が同定された。G3BP1 はストレス顆粒 (Stress Granule) の形成因子として知られている分子である。ストレス顆粒とは細胞が様々なストレスに曝された際に形成される細胞内顆粒で、細胞のストレス応答反応の一種である。ノックアウトマウスから樹立した MEF 細胞を、酸化ストレス誘導剤である亜硫酸で処理したところ、野生型 MEF 細胞では速やかにストレス顆粒が形成されたが、ノックアウト MEF ではその形成能が顕著に低下していた (図 1)。このことから USP10 は細胞内ストレス顆粒形成に必須に分子であることが明らかとなった。さらに亜硫酸刺激後の ROS の量を定量したところ、ノックアウト MEF では野生型に比べ ROS の量が顕著に増加しており (図 2)、ノックアウト MEF は ROS の増大に伴いアポトーシスに陥った。以上の結果より、USP10 によるストレス顆粒形成は細胞内 ROS を低下させ、細胞死を抑制していることが明らかとなった。

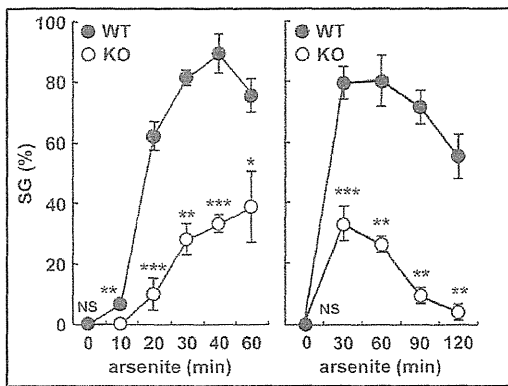


図1 Usp10 ノックアウト MEF 細胞におけるストレス顆粒形成能の低下

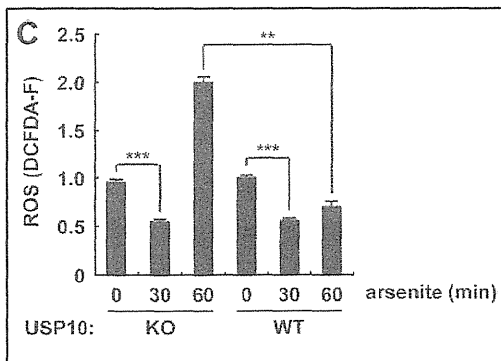


図2 Usp10 ノックアウト細胞における ROS の増加

一方 Usp10 ノックアウトマウスは極度の貧血に陥り生後 6 ヶ月以内に死亡した。ノックアウトマウスでは重度の骨髄不全の病理組織像が認められ、生後 1 週以内で骨髄の血液幹細胞が激減していた (図 3)。以上より、Usp10 はストレス顆粒形成を介して、血液幹細胞 (HSC) の維持に関わっていることが示唆された。

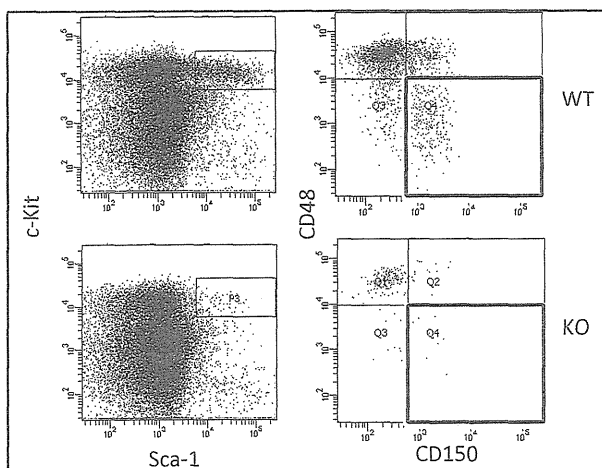


図3 Usp10 ノックアウトマウスにおける HSC の消失

(2) Tax1 による USP10 の機能阻害 : Tax1 は USP10 と結合する。Tax1 の各種変異体を用いて

USP10 との結合を調べたところ、62-353 変異体 (N 末端 61 アミノ酸欠失変異体)、SH1 変異体 (Pro58→Ser)、SH2 変異体 (Leu205→Ala) で、USP10 との結合が認められなかった。次に 293T 細胞に Tax1 を発現させ、亜硫酸によるストレス顆粒形成能を観察したところ、Tax1 発現細胞ではストレス顆粒形成がほとんど見られなかった (図 4)。上記 Tax1 変異体のストレス顆粒抑制作用は顕著に低下していたことから、Tax1 は USP10 に結合することで、ストレス顆粒形成を阻害することが明らかとなった。

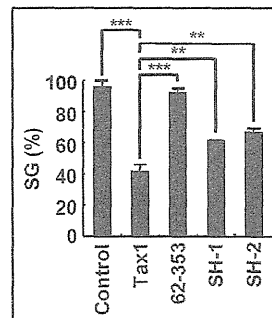


図4 Tax1 によるストレス顆粒形成阻害

次にヒト T 細胞株である Jurkat で USP10 をノックダウンところ、コントロールに比べ細胞内 ROS 量が増加した (図 5 左図)。したがって、USP10 は定常状態においても細胞内 ROS の量を制御していることがわかった。また Jurkat 細胞に Tax1 を発現させると ROS の増加がみられたが、USP10 と結合しない Tax1 変異体では ROS の増加は認められなかった。さらに USP10 ノックダウン細胞では Tax1 を発現させても ROS の増加はみられなかった (図 5 右図)。以上より Tax1 による ROS の増加は USP10 の機能を阻害することによっていることが示された。

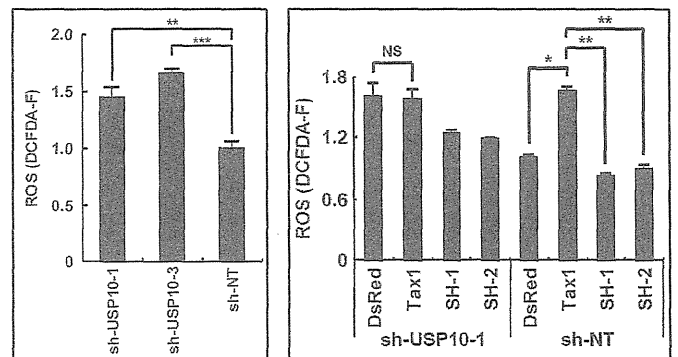


図5 USP10 による細胞内 ROS 量の制御

(3) HTLV-1 感染細胞の亜硫酸感受性亢進：次に HTLV-1 感染 T 細胞株 SLB1、MT4、非感染細胞株 Jurkat、MOLT4 を亜硫酸で処理し、ストレス顆粒形成能とアポトーシスに関して検討した。HTLV-1 感染細胞株では非感染細胞株にくらべ亜硫酸によるストレス顆粒形成能が顕著に低下していた。それに伴い感染細胞ではアポトーシスが増加し、ストレス顆粒形成能と逆相関を示した (図 6)。HTLV-1 感染細胞において Tax1 は USP10 を阻害することで、ストレス顆粒形成を抑制するが、この作用は亜硫酸による ROS の異常な亢進を招き、アポトーシスを誘導することが示された。

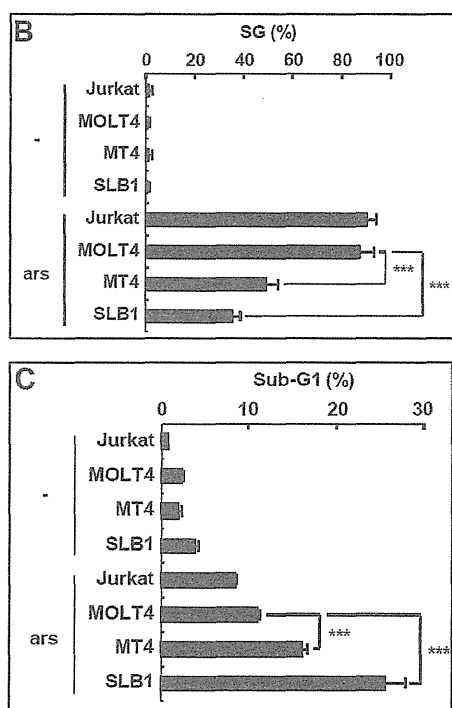


図 6 HTLV-1 感染細胞のストレス顆粒形成能低下と亜硫酸感受性の亢進

D. 考察

本研究で我々は、HTLV-1 Tax1 結合蛋白 USP10 の *in vitro* および *in vivo* 解析を通じてその機能を明らかにした。USP10 は細胞のストレス応答の際に、細胞内ストレス顆粒形成を促進し、ストレス暴露時の細胞内 ROS の上昇を抑制する分子である。HTLV-1 Tax1 は USP10 に結合しその機能を阻害することにより、ストレス顆粒形成を抑制する。その結果、細胞内 ROS が Tax1 発現細胞では上昇する。ストレス顆粒はウイルス感染の際にも形成され、ウイルス蛋白の合成を抑えられている。Tax1 は HTLV-1 感

染細胞でのストレス顆粒形成を阻害することで、ウイルス感染の成立およびウイルス産生に寄与していると考えられる。またストレス顆粒形成阻害による ROS の上昇は、ウイルスゲノムの転写活性の上昇を促し、ウイルス産生の増大をもたらすはずである。一方で HTLV-1 感染細胞におけるストレス顆粒阻害および ROS の上昇は、亜硫酸に対する高い感受性を招くことが明らかとなった。近年、亜硫酸を含む混合剤が一部の ATL に対して著効を示すことが臨床研究により報告されている。したがって、ストレス顆粒による HTLV-1 感染の制御機構の解析を通して、ATL 治療薬の作用機構の解明が期待される。

E. 結論

HTLV-1 Tax1 結合蛋白 USP10 は細胞内ストレス顆粒形成に必須の分子であり、細胞内 ROS の制御因子として機能する。Tax1 は USP10 と結合しストレス顆粒形成を抑えることでウイルス感染成立に寄与する。また HTLV-1 感染細胞は亜硫酸に対して高い感受性を示すが、この現象は感染細胞におけるストレス顆粒形成不全に由来することが示唆された。

F. 健康危険情報

特記すべき情報なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takahashi M, Higuchi M, Matsuki H, Yoshita M, Ohsawa T, Oie M, Fujii M. Stress granules inhibit apoptosis by reducing ROS production. *Mol. Cell Biol.* 2013 Feb; 33(4):815-29.
- 2) Matsuki H, Takahashi M, Higuchi M, Makokha GN, Oie M, Fujii M. Both G3BP1 and G3BP2 contribute to stress granule formation. *Genes Cells.* 2013 Feb; 18(2):135-46.
- 3) Imai M, Higuchi M, Kawamura H, Yoshita M, Takahashi M, Oie M, Matsuki H, Tanaka Y, Aoyagi Y, Fujii M. Human T cell leukemia virus type 2 (HTLV-2) Tax2 has a dominant activity over HTLV-1 Tax1 to immortalize human CD4(+) T cells. *Virus Genes.* 2013 Feb; 46(1):39-46.

2. 学会発表

(国内発表)

- 1) 高橋雅彦, 樋口雅也, 藤井雅寛. ストレス顆粒は ROS 産生を抑制することによりアポトーシスを阻害するが、これを HTLV-1 の Tax1 は解除する. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012.9.19-21:札幌市教育分化会館, 北海道.

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

皮膚病変組織に浸潤する HTLV-I 感染細胞培養株の樹立と野生型 HTLV-I の分離

宮城拓也 琉球大学医学部皮膚科 助教
上里 博 琉球大学医学部皮膚科 教授

要旨：HTLV-1 感染者は九州・沖縄地方に多いことは周知のことである。今回の研究班のなかで私どもに与えられた課題は「皮膚病変組織に浸潤する HTLV-1 感染細胞培養株の樹立と野生型 HTLV-1 の分離」であるが、沖縄県における HTLV-1 の感染状況とその発病率とその動向を改めて再度把握した上で、抗 HTLV-1 抗体陽性者における臨床像について調査することとした。2003 年から 2012 年までに琉球大学医学部附属病院受診患者の抗 HTLV-1 抗体の有無を調査した。その結果は、琉球大学医学部附属病院受診患者 14,317 人中 1,815 人（12.67%）が抗体陽性者であり、抗体陽性者のうち 187 人（10.3%）が成人 T 細胞白血病・リンパ腫（ATLL）を発症していた。また 2011 年に抗 HTLV-1 抗体の有無について調査した対象は 1297 人で抗体陽性者は 66 人（5.09%）と 2003～2011 年までの 7 年間の陽性率（14.43%）と比べ低値であった。また、抗 HTLV-1 抗体陽性者で見られた皮膚疾患のうち、皮膚悪性腫瘍が多くみられ、その内訳は基底細胞癌、有棘細胞癌、悪性黒色腫の順で多く、それぞれ 33 人（2.27 名/1 千人・年）、30 名（1.93 名/1 千人・年）、10 名（0.69 名/1 千人・年）であった。

A. 研究目的

今回、私どもに与えられた課題は「皮膚病変組織に浸潤する HTLV-1 感染細胞培養株の樹立と野生型 HTLV-1 の分離」を目的としている。しかし、その課題に入る前に、ATLL 患者の背景にある沖縄県での HTLV-1 感染状況を具体的に示した上でどのような疾患を有するかを調べることにした。

B. 研究方法

対象：2003 年から 2011 年までの 8 年間に琉球大学医学部附属病院を受診し、抗 HTLV-1 抗体検査を施行された患者を対象とした。

方法：抗 HTLV-1 抗体はルミパルスプレスト HTLV-1（富士レビオ株式会社）のヒト T 細胞白血病ウイルス 1 抗体キットを使用し、患者血清から抗 HTLV-1 抗体を検出した。

本研究は、琉球大学医学部倫理委員会の承認を得て行い、被検査者である患者の利益ならびに人権保護の取り扱いに十分配慮した。

C. 研究結果

抗 HTLV-1 抗体の有無の検査を受けた患者は

2003 年から 2011 年までの 8 年間で 14,317 名、そのうち抗体の陽性者は 1815 人（12.67%）であり、成人 T 細胞白血病・リンパ腫（ATLL）の発症例は 187 人（10.3%）であった。またその中で 2011 年に検査で抗 HTLV-1 抗体の検査を受けたのは 1297 名で、そのうち抗体の陽性者は 66 名（5.09%）とこれまでの陽性率と比べ低い値を示した。

抗 HTLV-1 抗体陽性者の皮膚疾患のうち、皮膚悪性腫瘍は基底細胞癌、有棘細胞癌、悪性黒色腫の順で多く、それぞれ 33 名（2.27 名/1 千人・年）、30 名（1.93 名/1 千人・年）、10 名（0.69 名/1 千人・年）であった。これまで基底死亡癌は 5 名/10 万人・年、有棘細胞癌は 2.5 名/10 万人・年、悪性黒色腫は 1～1.5 名/10 万人・年という発生率が報告されており、それらと比べ高率となっていた。また皮膚感染症に関しては白癬、帯状疱疹、単純ヘルペス感染症の順で多くそれぞれ 89 人（6.13 人/1 千人・年）、30 人（2.06 人/1 千人・年）、13 人（0.90 人/1 千人・年）であった。これまでの報告されている帯状疱疹（4.6 人/1 千人・年）の発生率と比べ低率であった。さらに自己免疫疾患は乾癬 16 人（1.10 人/1 千人・年）、全身性強皮症 9 人（0.61 人/1 千人・年）、水疱性類天疱瘡 7 人（0.48 人/1 千人・年）であった。

年)の順で多く、これまでで報告されている乾癬の罹患率(1人/1千人・年)とほぼ同等であった。

D. 考察

沖縄県の抗HTLV-1抗体陽性者においてみられた皮膚疾患のうち、皮膚悪性腫瘍が全国の統計データと比べ高率であった。しかし、この発生率の差は、紫外線の曝露量による影響で生じた可能性を否定できない。そのため、HTLV-1と皮膚悪性腫瘍発症との関連を明らかにするためには、今後、沖縄における全体の皮膚悪性腫瘍の疫学を明らかにした上で、抗HTLV-1抗体の陽性者と陰性者の比較が必要である。また、宿主の免疫によって発病が左右される帯状疱疹の罹患率において、抗HTLV-1抗体陽性者は過去の報告を下回った。従来、ATLL(成人T細胞白血病・リンパ腫)を発症すると細胞性免疫が低下することにより、日和見感染症を生じることが知られている。そのことを踏まえると、ATLL発症前の抗HTLV-1抗体陽性者は免疫機能が保たれていることが予想される。また、抗HTLV-1抗体陽性者が帯状疱疹を発病した場合、それがATLLの発症を予測するための指標となりうるかもしれない。しかし、その検証のためには、帯状疱疹を発症したにも抗HTLV-1抗体陽性者を前向きに検討することが今後必要である。

また、HTLV-1はHTLV-1関連脊髄症(HAM)やぶどう膜炎(HU)といったHTLV-1関連疾患のみならず自己免疫疾患との関連が指摘されているが、今回の結果では関連を示唆する十分な所見は得られなかった。

E. 結論

琉球大学医学部附属病院受診患者 14,317 名、そのうち抗体の陽性者は 1815 人(12.67%)であり、成人 T 細胞白血病・リンパ腫(ATLL)の発症例は 187 人(10.3%)であった。

沖縄県の抗 HTLV-1 抗体陽性者においてみられた皮膚疾患のうち、皮膚悪性腫瘍がこれまでの報告と比べ多くみられたが、HTLV-1 との関連は追加の検討を要する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Malta TM, Silva IT, Pinheiro DG, Dos Santos AR, Pinto MT, Panepucci RA, Takayanagui OM, Tanaka Y, Covas DT, Kashima S.	Altered expression of degranulation-related genes in CD8 ⁺ T cells in HTLV-1 infection.	AIDS Res Hum Retroviruses.	28	in press	2013
Makokha GN, Takahashi M, Higuchi M, Saito S, Tanaka Y, Fujii M.	Human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein interacts with and mislocalizes the PDZ domain protein MAGI-1.	Cancer Sci.	104(3)	313-320	2013
Imai M, Higuchi M, Kawamura H, Yoshita M, Takahashi M, Oie M, Matsuki H, Tanaka Y, Aoyagi Y, Fujii M.	Human T cell leukemia virus type 2 (HTLV-2) Tax2 has a dominant activity over HTLV-1 Tax1 to immortalize human CD4 ⁺ T cells.	Virus Genes.	46(1)	39-46	2013
Shibata Y, Oyama M, Kozuka-Hata H, Han X, Tanaka Y, Gohda J, Inoue J.	p47 negatively regulates IKK activation by inducing the lysosomal degradation of polyubiquitinated NEMO.	Nat Commun.	3	1061	2012
Suzuki S, Masaki A, Ishida T, Ito A, Mori F, Sato F, Narita T, Ri M, Kusumoto S, Komatsu H, Fukumori Y, Nishikawa H, Tanaka Y, Niimi A, Inagaki H, Iida S, Ueda R.	Tax is a potential molecular target for immunotherapy of adult T-cell leukemia/lymphoma.	Cancer Sci.	103 (10)	1764-1773	2012
Nicolete LD, Nicolete R, Haddad R, Azevedo R, Castro FA, Tanaka Y, Takayanagui OM, Covas DT, Kashima S.	Upregulation of hsa-miR-125b in HTLV-1 asymptomatic carriers and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients.	Mem Inst Oswaldo Cruz.	107(6)	824-827	2012

Hasui K, Wang J, Tanaka Y, Izumo S, Eizuru Y, Matsuyama T.	Development of ultra-super sensitive immunohistochemistry and its application to the etiological study of adult T-cell leukemia/lymphoma.	Acta Histochem Cytochem.	45(2)	83-106	2012
Lee SJ, Lee JS, Shin MG, Tanaka Y, Park DJ, Kim TJ, Park YW, Lee SS.	Detection of HTLV-1 in the Labial Salivary Glands of Patients with Sjogren's Syndrome: A Distinct Clinical Subgroup?	J Rheumatol.	39(4)	809-815	2012
Tamai Y, Hasegawa A, Takamori A, Sasada A, Tanosaki R, Choi I, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Eto T, Koh K-R, Nakamae H, Suehiro Y, Kato K, Takemoto S, Okamura J, Uike N, Kannagi M.	Potential contribution of a novel Tax epitope-specific CD4 ⁺ T cells to graft-versus-Tax effect in adult T-cell leukemia patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.	J Immunol.	190 (8)	in press	2013
Kannagi M, Hasegawa A, Takamori A, Kinpara S, Utsunomiya A.	The roles of acquired and innate immunity in human T-cell leukemia virus type 1-mediated diseases.	Front Microbiol.	3	323	2012
Mehra S, Golden NA, Stuckey K, Didier PJ, Doyle LA, Russell-Lodrigue KE, Sugimoto C, Hasegawa A, Sivasubramani SK, Roy CJ, Alvarez X, Kuroda MJ, Blanchard JL, Lackner AA, Kaushal D.	The Mycobacterium tuberculosis stress response factor SigH is required for bacterial burden as well as immunopathology in primate lungs.	J Infect Dis.	205 (8)	1203-1213	2012
Yamaji O, Nagaishi T, Totsuka T, Onizawa M, Suzuki M, Tsuge N, Hasegawa A, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Arase H, Kanai T, Watanabe M.	The development of colitogenic CD4 ⁺ T cells is regulated by IL-7 in collaboration with NK cell function in a murine model of colitis.	J Immunol.	188(6)	2524-2536	2012
Ito R, Takahashi T, Katano I, and Ito M.	Current advances in humanized mouse models.	Cell Mol Immunol.	9	208-214	2012

Sato K, Misawa N, Fukuhara M, Iwami S, An D.S, Ito M, and Koyanagi Y.	Vpu augments the initial burst phase of HIV-1 propagation and downregulates BST2 and CD4 in humanized mice.	J Virol.	86	5000-5013	2012
Suzuki M, Takahashi T, Katano I, Ito R, Ito M, Harigae H, Ishii N, and Sugamura K.	Induction of human humoral immune responses in a novel HLA-DR-expressing transgenic NOD/Shi-scid/gammacnull mouse.	Int Immunol.	24	243-252	2012
Ito R, Katano I, Ida-Tanaka M, Kamisako T, Kawai K, Suemizu H, Aiso S, and Ito M.	Efficient Xenoengraftment in Severe Immunodeficient NOD/Shi-scid IL2rgammanull Mice Is Attributed to a Lack of CD11c+B220+CD122+ Cells.	J Immunol.	189	4313-4320	2012
Ito R, Negishi N, Irie N, Matsuo K, Suzuki D, Katano I, Hayakawa E, Kawai K, Kamisako T, Eto T, Ogura T, Hozumi K, Ando K, Aiso S, Tamaoki N, Habu S, and Ito M.	Osteosclerosis and inhibition of human hematopoiesis in NOG mice expressing human Delta-like 1 in osteoblasts.	Exp Hematol.	40	953-963	2012
Takahashi M, Higuchi M, Matsuki H, Yoshita M, Ohsawa T, Oie M, Fujii M.	Stress granules inhibit apoptosis by reducing ROS production.	Mol. Cell Biol.	33(4)	815-829	2013
Matsuki H, Takahashi M, Higuchi M, Makokha GN, Oie M, Fujii M.	Both G3BP1 and G3BP2 contribute to stress granule formation.	Genes Cells.	18(2)	135-146	2013

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Altered Expression of Degranulation-Related Genes in CD8⁺ T Cells in Human T Lymphotropic Virus Type I Infection

Tathiane M. Malta,^{1,2} Israel T. Silva,¹ Daniel G. Pinheiro,¹ Anemarie R.D. Santos,¹ Mariana T. Pinto,^{1,2}
Rodrigo A. Panepucci,^{1,3} Osvaldo M. Takayanagui,³ Yuetsu Tanaka,⁴
Dimas T. Covas,^{1,3} and Simone Kashima^{1,2}

Abstract

Human T lymphotropic virus type I (HTLV-1) is the etiological agent of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). CD8⁺ T cells may contribute to the protection or development of HAM/TSP. In this study we used SAGE methodology to screen for differentially expressed genes in CD8⁺ T cells isolated from HTLV-1 asymptomatic carriers (HAC) and from HAM/TSP patients to identify genes involved in HAM/TSP development. SAGE analysis was conducted by pooling samples according to clinical status. The comparison of gene expression profiles between HAC and HAM/TSP libraries identified 285 differentially expressed tags. We focus on cytotoxicity and cytokine-related genes due to their potential biological role in HTLV-1 infection. Our results showed that patients with HAM/TSP have high expression levels of degranulation-related genes, namely GZMH and PRF1, and of the cytoskeletal adaptor PXN. We found that GZMB and ZAP70 were overexpressed in HTLV-1-infected patients compared to the noninfected group. We also detected that CCL5 was higher in the HAM/TSP group compared to the HAC and CT groups. Our findings showed that CD8⁺ T cells of HAM/TSP patients have an inflammatory and active profile. PXN and ZAP70 overexpression in HTLV-1-infected patients was described for the first time here and reinforces this concept. However, although active and abundant, CD8⁺ T cells are not able to completely eliminate infected cells and prevent the development of HAM/TSP and, moreover, these cells might contribute to the pathogenesis of the disease by migrating to the central nervous system (CNS). These results should be further tested with biological functional assays to increase our understanding on the role of these molecules in the development of HTLV-1-related diseases.

Introduction

IT IS ESTIMATED THAT 20 MILLION people worldwide are infected with human T lymphotropic virus type I (HTLV-1),¹ the etiological agent of adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL),^{2,3} HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP),^{4,5} and several inflammatory diseases.⁶⁻⁸ However, only 2-5% of infected individuals will develop ATLL or HAM/TSP, while most will remain asymptomatic throughout life.^{9,10} The mechanisms that lead to the development of disease are not fully understood.

HAM/TSP is characterized by chronic and progressive inflammation of the central nervous system (CNS) in which

the immune response appears to play an important role during disease development. Immune response is one of the factors that determine proviral load (PVL) and hence the risk of developing HAM/TSP.¹¹ Most genotypic studies on HTLV-1 show no association between genetic variants of the virus and the risk of developing HAM/TSP.^{12,13} However, studies on the polymorphisms in genes related to the production of inflammatory interleukins and DC-sign receptors,¹³⁻¹⁵ done in HTLV-1-infected individuals, have found an association between disease susceptibility and/or development. Additionally, the high PVL, the invasion of infected cells to other compartments, and the low efficiency of the host immune response are factors also related to HAM/TSP development.^{12,16}

¹National Institute of Science and Technology in Stem Cell and Cell Therapy, Center for Cell Therapy and Regional Blood Center, Blood Center of Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

²Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

³Faculty of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

⁴Department of Immunology, Graduate School of Medicine, University of the Ryukyus, Nishihara, Okinawa, Japan.

In fact, during HTLV-1 infection immune cells are strongly activated, mainly CD4⁺ and CD8⁺ T cells.^{17,18} This increased immune response may contribute to tissue damage, as observed in the CNS of subjects who develop HAM/TSP.¹⁹ It is unclear whether HTLV-1-specific CD8⁺ T cells are responsible for protecting against HAM/TSP by controlling PVL or they are the cause of the inflammatory disease themselves.²⁰ Nevertheless, these two mechanisms are not mutually exclusive.

As the immune response against HTLV-1 is regulated by many genes, differences in gene expression profiles of CD8⁺ T cells may contribute to the protection or development of HAM/TSP. Here we looked for differentially expressed genes in CD8⁺ T cells isolated from asymptomatic HTLV-1-infected individuals and individuals with HAM/TSP, in an attempt to identify genes involved in the development of HAM/TSP. A better knowledge of the molecular mechanisms involved in HTLV-1 infection may provide a better understanding of the regulatory network related to HTLV-1-associated diseases.

Materials and Methods

Patients and controls

HTLV-1 patients belong to the positive serology profile of blood donors of the Regional Blood Center of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil and of patients from the Neurology Department of the Clinical Hospital of the Faculty of Medicine of the University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil. The diagnosis of HTLV-1 was established by antibody screening of serum/plasma samples using an enzyme immunoassay (rp21e-enhanced EIA; Cambridge Biotech), followed by in house polymerase chain reaction (PCR) confirmation for *tax* and LTR.²¹ The study was approved by the Institutional Ethics Committee (process number 3083/2007) and all patients signed an informed consent before enrollment. A total of 40 ml of peripheral blood was obtained from HTLV-1 patients and healthy volunteers. A total of 83 samples were collected. The subjects were divided into three groups: (1) the control group (CT) composed by 40 non-HTLV-1-infected individuals; (2) the asymptomatic group (HAC) composed of 24 HTLV-1-asymptomatic carriers; (3) and the HAM/TSP group (HAM/TSP) with 19 patients. All HTLV-1-seropositive individuals were evaluated for clinical status according to the criteria previously described for ATLL and HAM/TSP.²² None of the HTLV-1-seropositive individuals showed positive serology for other relevant blood-borne pathogens including hepatitis B virus, hepatitis C virus, human immunodeficiency virus, HTLV-2, Chagas disease, and syphilis. Individuals included in the control group who were blood donors also showed negative serology for these pathogens. Individuals who were not blood donors were screened for HTLV-1 infection and we applied an oral questionnaire in order to search for other infections and for any drug treatment. The individuals who reported any infection or anti-inflammatory treatment were excluded from the study. All individuals were evaluated for white blood cell (WBC) count and CD4⁺ and CD8⁺ T cell counts. The mean age was around 42.0 (range from 20 to 71) and 55.0 (range from 34 to 75) years old for the HAC and HAM/TSP groups, respectively. Of the HAM/TSP group 84.2% was composed of infected females, whereas 54.2% of the HAC group was composed of females. Of the CT group 75% was composed of women and the mean

age was 43.2 years old (range from 22 to 76). The sex and age distribution of the sample groups are shown in Table 1.

Proviral load

The white cell layer was isolated by centrifugation at 900 × g for 10 min at 4°C and transferred to sterile 15-ml polypropylene tubes. DNA was extracted from the buffy coat using a Super Quick Gene DNA Isolation kit (Analytical Genetic Testing Center, Denver, CO). After extraction, HTLV-1 PVL was determined by the quantitative PCR method using ABI Prism 7500 (Applied Biosystems) with 200 ng genomic DNA (roughly equivalent to 10⁵ cells).

The reaction mixture was prepared using TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) technology to amplify HTLV-1 *tax* and human actin beta (ACTB) genes. The primer set for the HTLV-1 *tax* region was 5'-CGG ATA CCC IGT CTA CGT GTT T-3' and 5'-CTG AGC IGA IAA CGC GTC CA-3' and the TaqMan fluorescent probe for the *tax* gene was 5'-ATC ACC TGG GAC CCC ATC GAT GGA-3'.²³ To amplify the ACTB region we used the TaqMan Gene Expression Assays-Hs03023880_g1 (Applied Biosystems). The PCR conditions for *tax* amplification were 6.25 μl of the TaqMan Universal PCR Master Mix, 5 μM of each primer, and 5 μM of probe (Applied Biosystems). For ACTB amplification the reaction conditions were 5.0 μl of TaqMan Universal PCR Master Mix and 0.5 μl of probe. The thermal cycler settings were 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, and 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. DNA standards were extracted from the MT-2 cell line to make a standard curve. Based on the standard curve created by six concentrations of template (10¹ to 10⁶ copies), the concentrations of unknown samples were determined. The amount of HTLV-1 proviral DNA was calculated by the following formula: copy number of HTLV-1 *tax* per 1 × 10⁵ PBMCs = [(copy number of *tax*) / (copy number of ACTB)] × 2 × 10⁵. All samples were duplicated.

CD8⁺ T cell separation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated from whole blood using the Ficoll-Paque PLUS density gradient (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) and stored in fetal bovine serum (FBS) containing 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) at N₂ for posterior stained and flow cytometry analysis. CD8⁺ T cells were isolated using anti-CD8 Ab-coated microbeads by passing PBMCs through a magnetic cell separation system (MACS; Miltenyi Biotec, Bergish Glabach, Germany) with column type LS. The positively selected cells were confirmed as being CD8⁺ T cells by flow cytometry analysis (FACSCalibur, Becton & Dickinson, San Jose, CA).

Tax expression

PBMCs isolated from 14 HAC and 11 HAM/TSP patients were stained with anti-Tax and analyzed by flow cytometry to quantify the amount of cells that are capable of expressing Tax. PBMCs were cultured in RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% of FBS, 2 mmol/liter glutamine, 100 IU/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, and 20 nmol/liter concanamycin A (CMA) (Sigma-Aldrich) for 14 h. Harvested cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and stained with antihuman-CD4-phycoerythrin

TABLE 1. DESCRIPTIVE CHARACTERISTICS OF THE CONTROL GROUP, HUMAN T LYMPHOTROPIC VIRUS TYPE I-ASYMPTOMATIC CARRIERS, AND HUMAN T LYMPHOTROPIC VIRUS TYPE I-ASSOCIATED MYELOPATHY/TROPICAL SPASTIC PARAPARESIS PATIENTS ACCORDING TO CLINICAL STATUS, AGE, GENDER, PROVIRAL LOAD, WHITE BLOOD CELL COUNT, AND CD4/CD8 RATIO

	Mean age	Gender (%)		Proviral load mean (copy number/10 ⁵ cells)	White blood cell count (cells/mm ³)	CD4/CD8 ratio (mean values)
		F	M			
CT (n=40)	43.2	75.0	25.0	—	7,291	2.06
HAC (n=24)	42.0	54.2	45.8	173.5	6,782	1.95
HAM/TSP (n=19)	55.0	84.2	15.8	1,075.1	7,272	2.34

F, female; M, male; CT, control group; HAC, HTLV-1-asymptomatic carriers; HAM/TSP, HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis.

(PE), antihuman-CD8-PE, and anti-human-CD3-Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP) (Becton & Dickinson). Cells were fixed in PBS 1× containing 4% (v/v) paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) for 20 min and resuspended in PBS. Fixed cells were washed with PBS containing 4% normal goat serum (Sigma-Aldrich) and permeabilized with PBS containing 0.1% (v/v) Triton X-100 (Sigma-Aldrich) for 7 min at room temperature. Permeabilized cells were washed, resuspended in PBS/4% normal goat serum containing an anti-Tax MAb (Lt-4),²⁴ and incubated for 30 min. After washing, Alexa Fluor 488-conjugated antimouse IgG3 serum (Invitrogen, Carlsbad, CA) was used as the second antibody for labeling anti-Tax. Finally, the cells were washed twice, analyzed by flow cytometry (FACSCalibur, Becton & Dickinson), and the proportion of CD8⁺ T cells positive for Tax protein was estimated, indicating the number of CD8⁺ T cells infected by HTLV-1 capable of expressing the Tax protein.

SAGE procedure

Analysis of the SAGE global gene expression profile was conducted by pooling samples according to clinical status into the HAC and HAM/TSP groups. Each pool was composed by equal amounts of RNA of four individuals whose CD8⁺ T cells purity was above 80%. Thus, the HAC group was composed of HAC 01, HAC 09, HAC 10, and HAC 11 samples. The HAM/TSP group was composed of HAM/TSP 01,

HAM/TSP 05, HAM/TSP 08, and HAM/TSP 09 (Table 2). Total RNA was isolated from CD8⁺ T cells using TRIzol LS Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Twenty-five micrograms of total RNA was used for the SAGE procedure carrying out the I-SAGE Kit (Invitrogen) based on the original SAGE.²⁵ Amplified inserts were sequenced with forward M13 primer in a MegaBACE 1000 sequencer and the DYEnamic ET Dye Terminator Sequencing Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

SAGE analysis

HAC and HAM/TSP SAGE tags were extracted from concatamer sequences and analyzed by SAGE 2000 software, version 4.5 (www.sagenet.org), using default parameters. Tag-to-gene assignments were performed based on the CGAP SAGE Genie database ("Hs_short.best_gene" at <http://cgap.nci.nih.gov/SAGE>). SAGE libraries from the HAC and HAM/TSP groups can be found at the NCBI GEO database numbers GSM641893 and GSM641894, respectively. To compare the gene expression among libraries, the number of tags was normalized to a total count of 300,000 tags. Tags identified as contaminants or technical artifacts were filtered using S3T analysis.²⁶ The Audic and Claverie significance test²⁷ and a Fold-Change (FC) criterion were used to identify differently expressed genes (DEG) between libraries (*p* value <0.01 and FC>2). We also estimated the false discovery

TABLE 2. DESCRIPTIVE CHARACTERISTICS OF HUMAN T LYMPHOTROPIC VIRUS TYPE I-ASYMPTOMATIC CARRIERS AND HUMAN T LYMPHOTROPIC VIRUS TYPE I-ASSOCIATED MYELOPATHY/TROPICAL SPASTIC PARAPARESIS PATIENTS INCLUDED IN SAGE LIBRARIES, ACCORDING TO CLINICAL STATUS, GENDER, AGE, PROVIRAL LOAD, WHITE BLOOD CELL COUNT, CD4/CD8 RATIO, AND PURITY OF CD8⁺ T CELLS

Clinical status	Gender	Age (years)	Proviral load (copy number/10 ⁵ cells)	White blood cell count (cells/mm ³)	CD4/CD8 (ratio)	Purity CD8 ⁺
HAC 01	F	52	17.7	7,400	1,224/697 (1.76)	82.26%
HAC 09	F	47	50.4	5,900	676/512 (1.32)	90.57%
HAC 10	F	21	15.3	7,100	875/529 (1.65)	91.19%
HAC 11	M	38	321.6	6,400	1,299/538 (2.41)	90.99%
Mean		39.5	101.2	6,700	(1.79)	
HAM/TSP 01	F	34	300.8	7,600	717/378 (1.90)	87.93%
HAM/TSP 05	F	53	888.1	7,100	2,497/1,001 (2.49)	84.56%
HAM/TSP 08	M	55	1,091.4	8,200	ND	98.90%
HAM/TSP 09	M	55	995.3	3,700	468/355 (1.32)	89.86%
Mean		49.3	818.9	6,650	(1.90)	

F, female; M, male; HAC, HTLV-1-asymptomatic carriers; HAM/TSP, HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis; ND, not determined.

rate (FDR) in order to evaluate the genes with differential expression.²⁸ The set of DEG was selected for functional analysis, using annotation databases from Gene Ontology, KEGG, and BioCarta, providing, respectively, the identification of biological processes and interactions of genes into pathways. The DEG was also submitted to Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Ingenuity Systems, www.ingenuity.com). For gene expression analysis, we also used public SAGE libraries from leukocytes obtained from venous blood of normal healthy volunteers²⁹ (accession number GSE5833).

Real-time quantitative PCR

For qRT-PCR analysis, we studied a total of 55 samples, including the eight samples used to prepare SAGE libraries. Of the total, 24 were CT individuals, 17 were HAC, and 14 had HAM/TSP.

The RNA was reverse transcribed using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Real-time quantitative PCR was conducted in the cDNA of 55 individuals (unpooled) and was performed in 7,500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) as recommended by the manufacturer. Primers (Applied Biosystems) for the following functionally diverse set of genes were used: perforin 1 (PRF1) (Hs00169473_m1), granzyme B (GZMB) (Hs0018051_m1), granzyme H (GZMH) (Hs00277212_m1), chemokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5) (Hs00174575_m1), zeta-chain (TCR)-associated protein kinase 70 kDa (ZAP70) (Hs00896347_m1), and paxillin (PXN) (Hs01104424_m1). The amount of mRNA for each sample was normalized using the geometric average of the two housekeeping genes GAPDH (4310884-E) and RPL13A (185720330-7).³⁰ All the reactions were duplicated and PCR amplification efficiency was established for all genes and ranged from 0.9 to 1.1. The relative expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method³¹ and the median of the CT group was used as the calibrator.

Quantitative flow cytometry analysis

PBMCs were analyzed by quantitative flow cytometry for PRF1 and GZMB. Frozen PBMCs were used for intracellular staining of PRF1 and GZMB. A total of nine uninfected individuals, 15 and 14 patients from the HAC and HAM/TSP groups, respectively, were analyzed. Samples were thawed and washed with PBS and stained with antihuman-CD8-FITC or antihuman-CD8-PE, and with antihuman-CD3-PerCP (Becton & Dickinson). Cells were fixed in PBS containing 4% (v/v) paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) and permeabilized with PBS containing 0.1% (v/v) Triton X-100 (Sigma-Aldrich). After washing, the cells were incubated with antihuman-PRF1-clone δ G9 anti-PRF1-PE or anti-GZMB-FITC (Becton & Dickinson). Finally, the cells were washed and analyzed by flow cytometry (FACSCalibur, Becton & Dickinson). The mean fluorescence intensity (MFI) was determined, indicating the protein expression level.

Statistical analyses

The statistical analyses to compare the differences in PVL between the HAC and HAM/TSP groups were performed using the Mann-Whitney test. The Mann-Whitney test was also used to evaluate the differences in gene expression

quantification between the two groups. Data related to expression levels among three groups were compared by ANOVA followed by Tukey post hoc analyses. To draw correlations between PVL and gene expression we used the nonparametric Spearman test. The statistical analyses were performed using SPSS software version 14. Values of p lower than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Epidemiological and clinical features of HTLV-1-infected patients

A total of 83 individuals were tested; of them, 40 were CT individuals, 24 were HAC, and 19 had HAM/TSP. The values of WBC ranged from 2,800 to 12,500 cells/mm³ but the mean value was similar among groups (Table 1). Nine samples (CT 03, CT 07, CT 08, CT 17, HAC 20, HAM/TSP 03, HAM/TSP 06, HAM/TSP 09, and HAM/TSP 15) showed a WBC count below the reference value whereas five samples (CT 05, CT 22, CT 39, HAM/TSP 12, and HAM/TSP 17) had higher values. For CD4⁺ and CD8⁺ count, the values were similar among groups (Table 1), ranging from 1.02 to 4.94. Three individuals (CT 16, HAC 15, and HAM/TSP 11) showed a CD4⁺/CD8⁺ ratio below 1.2. The PVL in the HAM/TSP group was six times higher (mean 1,075.1 copy number/10⁵ cells) than in the HAC group (mean 173.5 copy number/10⁵ cells) ($p < 0.05$) (Table 1).

The proportion of CD8⁺ T cells infected by HTLV-1, evidenced by the Tax protein expression, was 2.2 times higher in

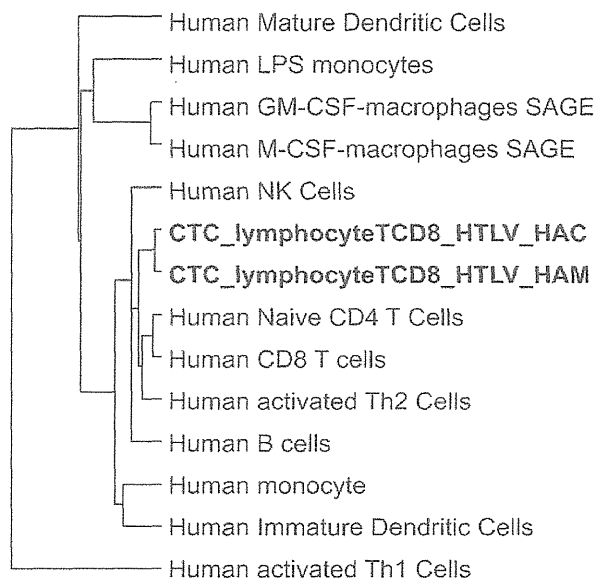


FIG. 1. Hierarchical clustering of leukocytes, dendritic cells, macrophages, and CD8⁺ T cells isolated from human T lymphotropic virus type I (HTLV-1)-infected individuals. Briefly, a dendrogram was generated by pairwise average linkage (Euclidean distance) using Cluster 3.0 software. Myeloid and lymphoid cells were differentially clustering. CD8⁺ T cell libraries derived from HTLV-1-infected individuals were grouped together in the lymphoid cluster.

the HAM/TSP group (1.607% mean value) compared to the HAC group (0.731% mean value) ($p=0.0294$).

SAGE library analysis

To access the identity of CD8⁺ T cell libraries, we used hierarchical cluster analysis to compare the gene expression profile of our libraries with data from libraries of different leukocyte types. The dendrogram revealed that lymphoid and myeloid cells clustered separately. Notably, CD8⁺ T cell libraries derived from HTLV-1-infected individuals were grouped together in the lymphoid cluster as shown in Fig. 1, indicating similarity in the gene expression patterns with lymphoid cells. HAC and HAM/TSP libraries also showed a tight correspondence, branching together.

A total of 62,432 and 60,620 tags were sequenced from HAC and HAM/TSP libraries, respectively. These tags yielded 12,262 and 13,025 unique tags mapped to known genes. Most identified and mapped tags (60%) appeared only once. Both libraries showed a large number of ribosomal protein tags. Supplementary Tables S1 and S2 (Supplementary Data are available online at www.liebertpub.com/aid) list the 50 most abundant tags (ribosomal tags were excluded) found in the HAC and HAM/TSP libraries, respectively. The most abundant tag identified in HAC and HAM/TSP libraries was the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 pseudogene 5 (HNRPA1P5).

Gene expression patterns observed in HAC versus HAM/TSP groups

We used SAGE libraries of pooled HAC and HAM/TSP CD8⁺ T cells to screen for differentially expressed pathways involved in HAM/TSP development. Comparison of gene expression profiles between the HAC and HAM/TSP groups showed 285 differentially expressed tags. Tables 3 and 4 show the top 20 increased tag-associated transcripts in the HAC and in the HAM/TSP libraries, respectively. Of the 285 deregulated tags observed between HAC and HAM/TSP, 174 were overexpressed in the HAM/TSP group. To investigate the role of those differentially expressed tag-associated genes they were classified according to their biological function. We performed Ingenuity Pathways Analysis, which resulted in the annotation of the following most represented functional categories: apoptosis, cytolysis, cytotoxicity, cellular development, growth and proliferation, immunological and neurological diseases, inflammatory response, and diseases and infection. Additionally, we classified the differentially expressed genes into a number of functional categories according to Gene Ontology terms of interest (Table 5) to search for genes involved in HAM/TSP development. We found molecules related to immune response, such as zeta-chain (TCR)-associated protein kinase 70 kDa (ZAP70), leukocystatin (CST7), and linker for activation of T cells (LAT); apoptosis,

TABLE 3. TOP 20 INCREASED TRANSCRIPTS EXPRESSED IN THE HUMAN T LYMPHOTROPIC VIRUS TYPE I-ASYMPTOMATIC CARRIERS LIBRARY

Tag	Symbol	Description	Normalized frequencies			P value ≤ 0.05	FDR
			HAM/TSP	HAC	FC		
CTGATCTGTG	HLA-B	Major histocompatibility complex, class I, B	0	54	54.0	Yes	0.00
AGCTGCAATC	EEF1G	Eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	1	17	17.0	Yes	0.00
AATCCAGGAG	DDOST	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase	1	16	16.0	Yes	0.00
CTGGCGCGAG	ARHGDI B	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	4	57	14.3	Yes	0.00
CTGAGACGAA	BTF3	Basic transcription factor 3	0	14	14.0	Yes	0.00
TGTGGGAACC	SMAP1L	Stromal membrane-associated protein 1-like	0	12	12.0	Yes	0.00
ATCCGCAAGA	ACO1	Aconitase 1, soluble	1	12	12.0	Yes	0.00
GAATTTGTGT	EFCAB5	EF-hand calcium binding domain 5	1	12	12.0	Yes	0.00
GAGCAGGAGC	DIS3L2	DIS3 mitotic control homolog (<i>S. cerevisiae</i>)-like 2	1	12	12.0	Yes	0.00
GCCAAGGGGC	OGDH	Oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide)	1	12	12.0	Yes	0.00
TAGAAAAATA	GPI	Glucose phosphate isomerase	1	12	12.0	Yes	0.00
TGTTCCACTC	ENTPD6	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 6 (putative function)	1	12	12.0	Yes	0.00
TTGAGCCAGC	KHSRP	KH-type splicing regulatory protein (FUSE binding protein 2)	1	12	12.0	Yes	0.00
GGGCCCGCA	PMPCA	Peptidase (mitochondrial processing) alpha	0	11	11.0	Yes	0.00
GTGGTGACG	RBM3	RNA binding motif (RNP1, RRM) protein 3	1	11	11.0	Yes	0.00
GTTCTCCAC	SEC61A1	Sec61 alpha 1 subunit (<i>S. cerevisiae</i>)	1	11	11.0	Yes	0.00
TGGGCTGGGG	ADFP	Adipose differentiation-related protein	1	11	11.0	Yes	0.00
AAGATCAAGA	ACTA1	Actin, alpha 1, skeletal muscle	1	11	11.0	Yes	0.00
CTGCCTGAA	BIN1	Bridging integrator 1	3	27	9.0	Yes	0.00
GGGCTGGGG	EGLN2	Egl nine homolog 2 (<i>C. elegans</i>)	4	35	8.8	Yes	0.00
CTGACTGTG	HLA-B	Major histocompatibility complex, class I, B	21	156	7.4	Yes	0.00

HAC, HTLV-1-asymptomatic carriers; HAM/TSP, HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis; FC, fold change; FDR, false discovery rate. The tag sequence represents the 10-bp SAGE tag. Normalized frequencies were obtained using SAGE software by calculating the total number of 300,000.

TABLE 4. TOP 20 INCREASED TRANSCRIPTS EXPRESSED IN THE HUMAN T LYMPHOTROPIC VIRUS TYPE I-ASSOCIATED MYELOPATHY/TROPICAL SPASTIC PARAPARESIS LIBRARY

Tag	Symbol	Description	Normalized frequencies			P value ≤ 0.05	FDR
			HAM/TSP	HAC	FC		
CGAGGGGCCA	ACTN4	Actinin, alpha 4	18	1	18.0	Yes	0.00
GAAGCAATAA	ST3GAL3	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 3	16	0	16.0	Yes	0.00
AGTCGGGAGC	HNRPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	14	1	14.0	Yes	0.00
CGGCCTCACC	TTYH2	Tweety homolog 2 (<i>Drosophila</i>)	14	0	14.0	Yes	0.00
GCAGGGTACA	KIAA1949	KIAA1949	14	0	14.0	Yes	0.00
TCTGAAGTCA	ID2	Inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein	14	0	14.0	Yes	0.00
TGTAAGTCTG	KHDRBS1	KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 1	14	0	14.0	Yes	0.00
CAAAAAAAAA	OCIAD1	OCIA domain containing 1	13	1	13.0	Yes	0.00
GGCCAGCAAT	GLIPR1	GLI pathogenesis-related 1 (glioma)	13	1	13.0	Yes	0.00
GCGTCCTGCC	LAT	Linker for activation of T cells	13	0	13.0	Yes	0.00
GCTAAAAAAAA	FBF1	Fas (TNFRSF6) binding factor 1	13	0	13.0	Yes	0.00
TCTGCTAAAG	HMGB1	High-mobility group box 1	13	0	13.0	Yes	0.00
AATGCTGGCA	DNAJB6	Dnaj (Hsp40) homolog, subfamily B, member 6	11	1	11.0	Yes	0.00
ACCCTCTTCC	HLA-A	Major histocompatibility complex, class I, A	11	1	11.0	Yes	0.00
CTGGCCATCG	EHBP1L1	EH domain binding protein 1-like 1	11	1	11.0	Yes	0.00
GAGCGGGATC	SFRS1	Splicing factor, arginine/serine-rich 1 (splicing factor 2, alternate splicing factor)	11	1	11.0	Yes	0.00
GGGGGCCCCG	YIF1A	Yip1 interacting factor homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)	11	1	11.0	Yes	0.00
AGATGAGATG	KLF6	Kruppel-like factor 6	11	0	11.0	Yes	0.00
GGGAATCAAA	CNO	Cappuccino homolog (mouse)	11	0	11.0	Yes	0.00
GTAGCAGGTG	M6PRBP1	Mannose-6-phosphate receptor binding protein 1	11	0	11.0	Yes	0.00

HAC, HTLV-1-asymptomatic carriers; HAM/TSP, HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis; FC, fold change; FDR, false discovery rate. The tag sequence represents the 10-bp SAGE tag. Normalized frequencies were obtained using SAGE software by calculating the total number of 300,000.

such as granzyme H (GZMH), integrin beta 2 (ITGB2), and programmed cell death 4 (PDCD4); and inflammatory response, such as chemokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5) and natural cytotoxicity triggering receptor 3 (NCR3), among others (Table 5).

Gene expression patterns observed in CT versus HTLV-1-infected groups (HAC or HAM/TSP)

We searched for differentially expressed tags between a public library of CD8⁺ T cells from normal healthy volunteers (CT) and HAC and also between CT and HAM/TSP in order to identify genes deregulated in HTLV-1 infection. Although this comparison has some drawbacks due to methodological and ethnical differences among samples, we could identify 899 differentially expressed tags from the comparison between CT and HAC, whereas CT and HAM/TSP revealed 855. From these tags we determined that many cytokine-related genes including chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4), interleukin 8 (IL-8), chemokine (C-C motif) ligand 20 (CCL20), and chemokine (C-C motif) receptor 7 (CCR7) were decreased in HTLV-1-infected groups (HAC and HAM/TSP), whereas IL-23, alpha (IL23A), lymphotoxin beta (LTB), IL-24, and CCL5 expressions were increased, when compared to the CT library.

Genes related to cytotoxicity were also identified as differentially expressed between CT and HTLV-1-infected libraries. For example, GZMH and granzyme A (GZMA) have a higher expression in HTLV-1-infected individuals than in the CT group.

Expression levels of cytotoxicity and cytokines genes were different between HAC and HAM/TSP patients

To further investigate the involvement of specific genes in HTLV-1 infection based on fold change in SAGE libraries and on their biological function, we selected the CCL5, GZMH, and ZAP70 genes to assess their gene expression levels by real time PCR in 55 samples. We also tested the cytolytic genes granzyme B (GZMB) and PRF1 and the cytoskeletal adaptor paxillin (PXN) to better explore their associated pathways.

In SAGE libraries, CCL5 was 3.5 times higher, GZMH was 2 times higher, and ZAP70 was 5.8 times higher in the HAM/TSP group than in HAC (Table 5). When we compared the expression levels of GZMB, PRF1, and PXN between the HAC and HAM/TSP libraries, we found an expression ratio lower than 2.0.

Relative quantification of CCL5 and GZMH by qRT-PCR corroborated SAGE data showing that their expression levels were significantly higher in the HAM/TSP than in the HAC group and also than in the CT group (Fig. 2A and B). When we tested ZAP70 by qRT-PCR we found a different result from SAGE, since no difference was observed between the HAC and HAM/TSP groups. Interestingly, we found that all infected patients (HAC + HAM/TSP) showed a significantly higher expression level of ZAP70 than the CT group (Fig. 2E). Expression of the cytotoxicity gene PRF1 was significantly higher in the HAM/TSP group than in the CT group (Fig. 2C). Analyzing gene expression of PXN by qRT-PCR, we found a significant increase in the HAM/TSP group compared to the CT group and also compared to the HAC groups (Fig. 2D).