

## 市民公開講演会

### 「新しい展開・HTLV-1 関連脊髄症」

解明されつつあるHAMの病態と新しい治療法について

**参加費無料・申し込み不要・定員 100名**

南九州に多いHTLV-1 ウイルスがひきおこすHTLV-1 関連脊髄症 (HAM; ハム) は鹿児島大学で発見されて四半世紀が過ぎますが現在も多くの方がこの病気と闘っています。平成22年の政府・厚生労働省による「HTLV-1 総合対策」の発足を契機にHTLV-1 関連脊髄症の研究が一段と進むことが期待されています。この総合対策の一環である当研究班の研究成果を踏まえ、これまでにわかってきたHAMの病態と今後期待される新しい治療法についてわかりやすく説明いたします。

**日時 11月23日(金祝日)** 開場 9時・開演 9時半～16時終了

**場所 かごしま県民交流センター** 4階 大研修室第3 (定員 100名)

講演「HAM研究のこれまでとこれから」 9時半より

出雲周二 研究代表者・鹿児島大学 難治ウイルス研 教授

講演「HAMとはどのような病気なのか」 10時より

久保田龍二 鹿児島大学 難治ウイルス研 准教授

講演「HAM治療のこれから」 11時より

中村龍文 長崎大学 感染免疫学講座 准教授

【お昼休み 12:00～13:30】

交流会 「言いたい!聞きたい!HAMについて」 13時半～

ブースに分けてテーマを決め患者さんや関係者、一般参加者、研究者との意見交換会  
アンケートによる患者さん方の疑問についてもお答えします

協賛: スアトム会の会「全国HAM患者友の会」・スマイルリボン「日本からHTLVウイルスをなくす会」

問合せ先: 鹿児島大学 医歯学総合研究科 難治ウイルス病態制御研究センター 分子病理病態研究分野  
研究代表者 出雲周二 事務担当 富田有島 TEL:099-275-5941 FAX:099-275-5942

## II. 分 担 研 究 報 告 書

HTLV-I関連脊髄症(HAM)患者末梢血CD4+T細胞でのGene Xと関連するプロ・アポトーシス遺伝子変化の検討  
とアッセイ法の開発

分担研究者 出雲 周二 鹿児島大難治ウイルス研分子病理 教授

共同研究者: 児玉 大介(鹿児島大難治ウイルス研分子病理), 出雲 公子(同)、Moe Moe Aye(同)、松崎 敏男  
(同、三洲会大勝病院)、久保田龍二(同)

研究要旨:

HAMの発症に強く関与し、治療の標的となる末梢血中プロウイルス量の増大機序に関与すると考えられるHAM特異的な遺伝子発現、翻訳後修飾因子としての糖鎖の特徴を明らかにするために、マイクロアレイやレクチンアレーなどの網羅的解析法を用いて、主な感染宿主細胞であるCD4+T細胞の特徴について解析をすすめてきた。マイクロアレイ解析のデータを用いて、HAMに特異的に発現している遺伝子群のパスウェイ解析でHAM特異的パスウェイ12個が見いだされ、そのうち11個にGene Xが関与していることを平成23年度に報告した。Gene Xは核・細胞質を往来する蛋白であり、機能的には結合する相手によりアポトーシス促進性およびアポトーシス抵抗性両側面を持つなど複雑であり、HAMのような炎症病態でのGene X機能のアッセイ法は確立していない。Gene Xのアッセイ方法の開発をすすめるとともに、Gene Xが実際にHAM病態に関与しているかどうかを確認するため、1) 薬剤曝露による細胞濃度への効果、2)リアルタイムPCRによるGene Xおよび関連するアポトーシス促進(プロ・アポトーシス)性およびアポトーシス抵抗性遺伝子の発現解析 3)免疫蛍光染色によるGene X産物の局在解析、4)フローサイトメトリーによる発現細胞の同定をおこなった。少数例での検討でいずれのアッセイ系も測定可能であることが明らかとなり、多数検体での検討を開始した。

A. 研究目的

平成23年度に我々はHAM特異的有意差発現遺伝子を用い、商用パスウェイデータベースTRANSPATHにマッピングするとHAMで有意な( $p < 0.05$ )パスウェイ12個中11個にGene X(特許の可能性のため名称は秘す)が関与することを報告した。

Gene Xは臨床的にはある種の腫瘍で病態への関与が知られているが炎症での関与は知られていない。生物学的には核・細胞質を往来する蛋白であること、核に局在すると細胞性ストレスにつながることで、結合する相手あるいは結合座位によりアポトーシス促進(プロ・アポトーシス)性およびアポトーシス抵抗性両側面を持つことなどが知られている。現時点では炎症性疾患におけるGene Xの役割を評価するアッセイ法はまだ確立していない。

今回我々は炎症性疾患としてのHAMにおけるGene Xの役割を検討するため、種々のアッセイ法の可能性の検討を少数例でパイロット的に行いアッセイ法の開発を試みた。

B. 研究方法

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

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

凍結PBMC検体からのCD4+T細胞セレクション:

①凍結検体の融解・洗浄: 約 $2 \times 10^7$ 個のPBMCを含む凍結検体を $37^\circ\text{C}$ 湯浴で融解し、DNaseI(2U/mL)を含むPBS(-)で2回洗浄した。

②CD4+T細胞の回収: CD4+Tcell Isolation Kit II(ヒト)(Miltenyi Biotech)のCD4+Tcell Biotin-AntibodyカクテルとAnti-Biotinマイクロビーズで非CD4+T細胞(CD4-PBMC)を間接磁気標識後、MACS Separator磁場内に置いたカラムに細胞懸濁液を通し陰性画分としてCD4+T細胞を、陽性画分としてCD4-PBMCをそれぞれ回収した。

Total RNA抽出: PureLink RNA Mini kit(Invitrogen)でtotal RNAを抽出した。

薬剤曝露による細胞濃度への効果: 凍結保存PBMCを2回洗浄後、マイクロビーズ法でセレクションしたCD4+T細胞/CD4-PBMC、細胞株(Jurkat, Hut102)を6 well plateに細胞濃度約 $5 \times 10^5$  cells/mL RPMI1640/wellで撒き、Gene X阻害剤、Gene X刺激剤を終濃度 $5 \mu\text{M}$ で曝露し、曝露前後の細胞濃度をTC-20(Bio-Rad)で算定した。

リアルタイムPCR: HAM6例、AC6例、NC5例のCD4+T

細胞から抽出したRNAを鋳型とし、QuantiTect Whole Transcriptome Kit (QIAGEN) でcDNAを合成およびトランスクリプトームを前増幅し、100 ngのcDNAとRoche Assay Design CenterでデザインしたSYBR Green 法 real-time PCR用のプライマーを用いGene X、p73 $\alpha$ 、MUC1-C遺伝子発現解析を行った。内部対照はGAPDH遺伝子を用い $\Delta\Delta C_t$ 法で発現を検討、さらにNC曝露前由来RNAでの発現量を1とし、相対発現量で表示した。

表1. リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析で用いた Oligonucleotide primer

遺伝子	mRNA参照配列(GenBank)	位置	Amplicon(bp)	Tm(°C)
Gene X	(略)			
Gene X-F	GCCT... (途中略) ...TATC	略	110	60
Gene X-R	ATGC... (途中略) ...TGAA			60
P73 $\alpha$	NM_001126240.2			
P73 $\alpha$ -F	CTGGAGCTGATGGAGTTGG	1210-1228	94	59
P73 $\alpha$ -R	ACGGGGCTGTAGGTGAC	1286-1303		60
MUC1-C	NM_002456.5			
MUC1-C-F	TGGAGACACAGTTCATCAGTA	476-501	95	59
MUC1-C-R	GAAAGGAAATGGCACATCACT	550-570		59
GAPDH	NM_00125679			
GAPDH-F	GACTAACCTGCGCTCCCTG	109-127	136	60
GAPDH-R	GCCCAATACGACCAATCAG	225-244		60

免疫蛍光染色によるGene X産物(Protein X)の局在解析: HAM患者およびNCのPBMをGene X阻害剤1 $\mu$ M存在下に48時間培養後、4%パラホルムアミド(PFA)で30分間固定し、一次抗体(mouse IgG3抗Tax抗体(Lt-3)、rabbit polyclonal 抗Protein X抗体)、二次抗体(Goat anti-mouse IgG3-FITC、Alexa Fluor 633 Goat anti-Rabbit IgG(H+L)-RPE)、DAPIで染色した。L-Lysine coated 96 well microplateへ移し、Cell Insight (Thermo Scientific)で撮影、CellomicsソフトウェアでSubcellular localization assayの樹立を試みた。  
フローサイトメトリー: Cell Insightと同様な染色でPBMCを薬剤曝露しCD4/CD8のカウントの他、mouse IgG3抗Tax抗体(Lt-4)陽性細胞と抗Protein X抗体陽性細胞のカウント方法の樹立を試みた。

### C. 研究結果

#### 1. 薬剤曝露による細胞濃度への効果

Gene X阻害剤、刺激剤曝露(5 $\mu$ M)による細胞濃度への効果をそれぞれ図1、2に示す。

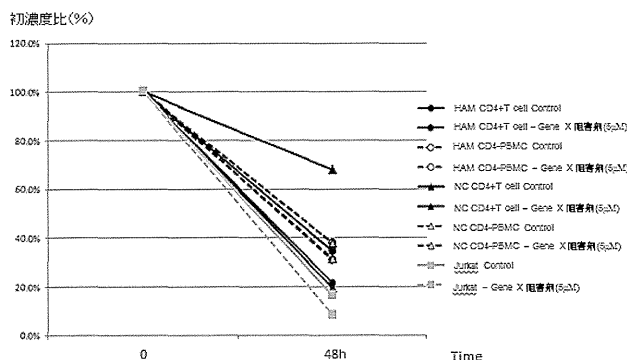


図1. Gene X阻害剤(5 $\mu$ M)の細胞濃度に対する効果

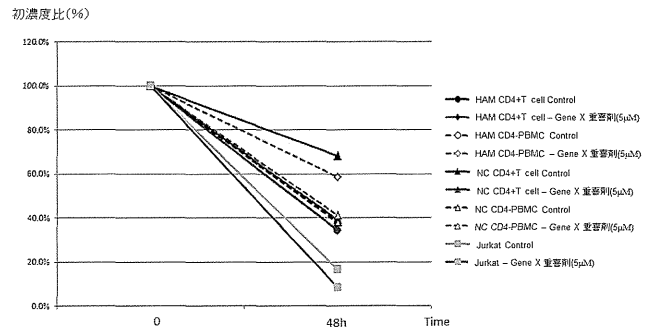


図2. Gene X刺激剤(5 $\mu$ M)の細胞濃度に対する効果

5 $\mu$ MのGene X阻害剤、刺激剤ともにJurkat細胞に対する減少効果が最大であるが、阻害剤ではHAMおよびNCのCD4+T細胞、刺激剤ではHAM CD4+T細胞、HAM CD4-PBMCで最大の減少効果を認めた。

0.1、1 $\mu$ Mの低濃度でのGene X阻害剤では時間経過と共にHAM CD4+T細胞、CD4-PBMCの細胞減少効果が大きくなる傾向がみられた。

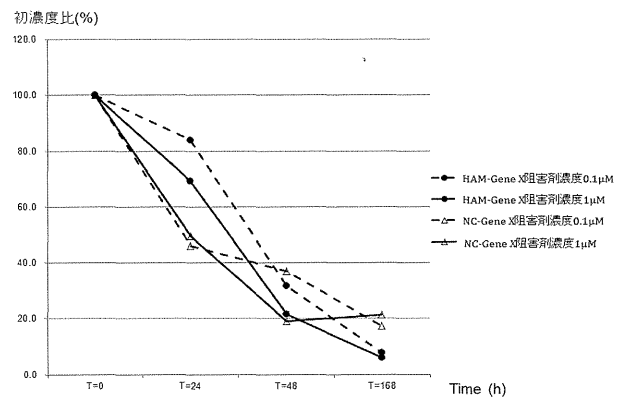


図3. Gene X阻害剤(0.1、1 $\mu$ M)の細胞濃度に対する効果

#### 2. リアルタイムPCRによるGene Xおよび関連するアポトーシス促進(プロ・アポトーシス)性およびアポトーシス抵抗性遺伝子の発現解析

Gene Xの発現、関連遺伝子のうちアポトーシス促進的に働くとされる細胞ストレス経路の遺伝子p73 $\alpha$ 、および抑制性遺伝子MUC1-Cについて、Gene X阻害剤1 $\mu$ M曝露前・後での変化をSYBR Green法リアルタイムPCRでHAM4例、NC3例で検討した結果を図4~6に示す縦軸はNC曝露前を対照1とした発現比を示す。

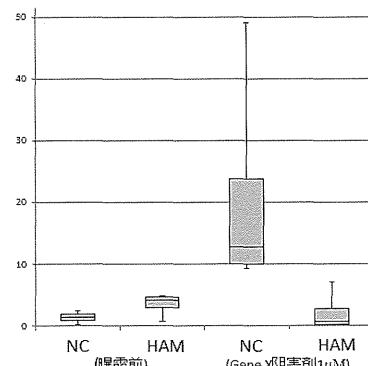


図4. CD4+T細胞におけるGene Xの発現変化

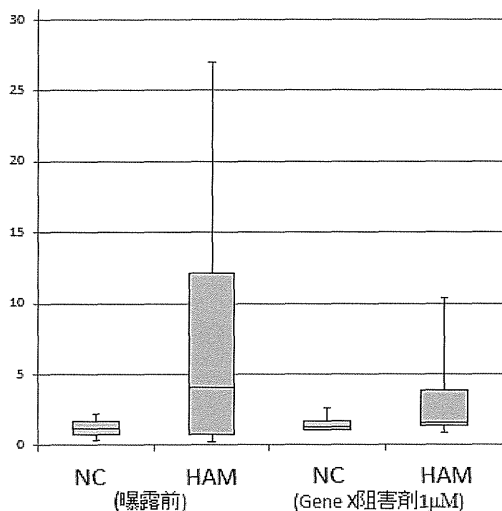


図5. Gene X阻害剤曝露前・後のp73αの発現変化

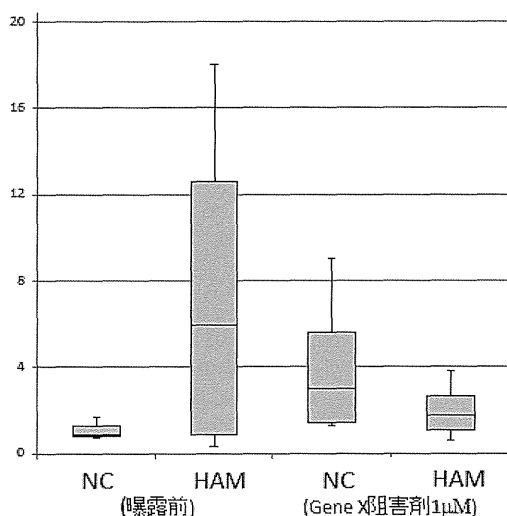


図6. Gene X阻害剤曝露前・後のMUC1-Cの発現変化

### 3. 免疫蛍光染色によるGene X産物(Protein X)の局在解析 (Subcellular localization assay)

Cell Insight により癌細胞、細胞株などの付着細胞を用いて核内・外を往来するNF-κBなどの細胞内局在を定量化するSubcellular localization assayは手法が確立している。リンパ球のような浮遊系細胞はZ軸方向の焦点が合わせにくく技術的な工夫が必要であるので細胞をマイクロプレート底面に遠沈、密着させ液相をほとんどデカンタすることにより浮遊系細胞でもアッセイ可能と判明した(詳細は省略)。

この手法でHTLV-1陽性細胞すなわちLt-4陽性細胞におけるGene Xとp73αあるいはMUC1-Cとの関係性のアッセイが可能となった。

### 4. フローサイトメリー

TC-20 (Bio-Rad) のようなセルカウンターは変動係数が大きいためフローサイトメリー法でのカウント法を検討した。Cell Insightは細胞内局在を検討するのに有用であるのに対し、Protein X発現陽性細胞数の正確な算定のための方法として有用であった。

薬剤曝露前後でのCD4/8比の検討では、Gene X阻

害剤曝露ではCD8+T細胞(%)の減少が、刺激剤曝露ではCD4+T細胞(%)の減少傾向がみられた(詳細は省略)。

### D. 考察

Gene Xは主に腫瘍における役割の検討がなされているが、炎症疾患における役割についてのアッセイ方法は確立していない。主に細胞生物学分野の文献の知見を応用し、臨床的検体の評価に資するようなアッセイ方法の検討・開発を行った。

Gene X阻害剤曝露による細胞数減少効果はHAMのみならずNCのCD4+T細胞、HAMのCD4-PBMCでも強くみられ、感染細胞のみで減少効果が表れるわけではなかった。

p73αのSYBR Green法のcriteriaを満たすいくつかのプライマー配列では良好な増幅が得られずp73αの検討は完了していないが、Gene X機能を阻害すると細胞数が減少することからHAMのCD4+T細胞でのGene Xはアポトーシス促進性というよりは抑制性に働くことが示唆された。

Gene Xの発現についてはCD4+T細胞でNCに対し約2~3倍程度高発現、Gene X阻害剤曝露するとHAMで抑制されるが、NCでは20倍程度に高発現となった。アポトーシス抑制性関連遺伝子MUC1-C発現はHAMで高く、Gene X阻害剤曝露で抑制された。細胞数減少効果はMUC1-Cとの相互作用を介したものであることも考えられる。

Gene Xが実際にHAM病態に関与しているかどうかを検討するにはこれらのアッセイ法を用いて、感染の有無、あるいはウイルス量とGene Xの発現の程度、細胞内局在、Gene Xが相互作用する関連遺伝子発現などを知る必要がある。

### E. 結論

HAMの発症機序への関与が遺伝子発現解析とパスイ解析で疑われたGene Xについてのアッセイ方法の開発を行い、少数例で検討した

症例数を統計解析可能な数にスケールアップし検討中である。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

[1]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.

[2]Kawabata T, Higashimoto I, Takashima H, Izumo S, Kubota R. Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I)-specific CD8+ cells accumulate in the lungs of patients infected with HTLV-I with pulmonary involvement. J Med Virol. 84(7): 1120-1127, 2012.

[3]出雲周二. HTLV-1感染症で起こる疾患—白血病・HAMなど. HTLV-1母児感染予防のための基礎知識. 特集 クローズアップ感染症. 小児内科 44: 973-977 (2012).

[4]出雲周二. HAMの最新の話題. Neuroinfection. 17: 6-10 (2012)

## 2. 学会発表

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

松崎敏男, 久保田龍二, 斎藤峰輝, 吉村 玲, 高嶋 博, 出雲周二. HAMからみたATLの臨床. 第5回HTLV-I研究会. 2012年8月 東京

松崎敏男, 久保田龍二, 斎藤峰輝, 吉村 玲, 高嶋 博, 出雲周二. HAMからみたATLの臨床. 第5回HTLV-I研究会. 2012年8月 東京

児玉大介, 久保田龍二, 出雲周二. オミクス解析手法を用いたHAM病態の検討と治療標的候補遺伝子の探索. 第17回日本神経感染症学会総会. 2012年10月 京都

## H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む.)

### 1. 特許取得

出雲周二

[1]Gene X標的薬によるHAMの新規治療法。  
特許出願予定

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

## 重症度別治療指針作成に資す HAM の新規バイオマーカーの同定に関する研究

研究分担者 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

研究要旨： HTLV-1 関連脊髄症（HAM）は希少な難治性疾患で、全国的な HAM の診療レベル向上と標準化の実現を達成することが急務であるため、「HAM の疾患活動性の評価方法の確立とその重症度に応じた治療指針」を作成することが求められている。そこで本研究では、いまだ確立していない HAM の活動性を評価するために有用なバイオマーカーの同定に着手した。昨年度までに、HAM 患者 30 例（training set）において、髄液の CXCL10 濃度、ネオプテリン濃度、細胞数が、HAM の進行度と相関することを示した。今年度は、異なる HAM 患者 23 例（test set）において、これまでに抽出された有望なマーカーについて「進行度との相関」および「感度」について検討した。その結果、HAM の進行度と密接に関連するマーカー（prognostic marker）として、「髄液 CXCL10」および「髄液ネオプテリン」が有用であることが test set においても示された。これまで HAM の prognostic marker に関して異なる集団で cross validation されたものはなく、本研究結果は、よりエビデンスレベルの高い情報を提供するものである。今後は、全国の HAM の診療レベル向上をはかるためにも、多施設の前向き臨床試験による検証を実施し、さらにエビデンスレベルを高め、これら有用なマーカーの保険承認に向けた取り組みを進めることの必要性が高い。

### 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疾患である。HAM は一般に緩徐進行性で慢性に経過するとされているが、昨年度われわれが報告した HAM の自然経過は、国外の研究者の報告と一致して、数年以内で急速に悪化する例や、数十年の経過においてほとんど進行しない例が存在し、その経過に個人差があった。HAM 患者に対する治療介入を考える上で、このような経過に個人差が存在することから、発症後出来るだけ早期に患者毎に疾患活動性を把握し、それに応じた適切な治療方針を計画し、またその効果を判定しながら治療を実施することが重要と考えられる。そのためには、HAM 患者の疾患活動性や長期的な予後を反映するバイオマーカー、さらには治療効果を反映するバイオマーカーを同定し、日常診療で活用していくことが求められる。しかし、こうしたバイオマーカーに関して、末梢血プロウイルス量、血清可溶性 IL-2 受容体濃度や髄液ネオプテリン値など個々に報告されている候補分子はあるが、その中で、どの分子が優れているかを比較検討した報告はないのが現状である。

そこで本研究は、HAM 患者の自然経過の情報を基に、これまで挙げられてきた HAM のマーカー候補分子の中から特に HAM の進行度に関連するマーカーを同定することを目的とし、その結果を基に「HAM の疾患活動性の評価方法の確立とその重症度に応じた治療指針」を作成し、全国的な HAM の診療レベル向上と標準化に貢献することを目標とする。

### B. 研究方法

(1) 昨年度までに我々は、ステロイドやインターフェロンなどの治療を受けていなかった HAM 患者 30 例（training set）を対象として、HAM の進行に関連するバイオマーカーとして髄液中の CXCL10、CXCL9、ネオプテリンおよび細胞数を見出している（H23 年度分担研究報告書参照）。本研究では、まずこれらのマーカーの HAM 患者を検出する感度について比較した。細胞数は既知の基準値である  $15/3 \text{ mm}^3$  をカットオフとし、基準値のない他のマーカーは control 群の平均+3SD をカットオフに用いた。

(2) 次に同定された髄液マーカー（髄液 CXCL10、髄液ネオプテリンおよび髄液細胞数）\*および末梢血プロウイルス量に関して、上記 30 例とは異なる

HAM 患者 23 例 (test set) を用いて、HAM の「進行度との関連」および「感度」について validation を実施した。HAM の進行度については training set で用いた方法と同様に、最近 4 年間で納の運動障害重症度が 3 grade 以上進行した例を悪化群 (deteriorating cases)、1grade 以下の進行にとどまる例を安定群 (stable cases) として、両群間で上記の項目を比較した。検定には Mann-Whitney U test を用いた。感度については、上記 (1) と同様のカットオフを用いて、validation を実施した。

\* 髄液 CXCL9 については検体量の不足のため、解析することができなかった。

(3) Olindoらによって、HAMの長期予後を反映するマーカーとして報告されている末梢血プロウイルス量と、われわれの同定した髄液マーカー (髄液CXCL10, 髄液ネオプテリンおよび髄液細胞数) の相関関係について、Spearman's rank correlation testを用いて解析した。

(4) 低用量プレドニゾロン (PSL) による長期内服療法によって受ける髄液マーカーの影響を調べるために、すでにPSL治療で有意に低下することが報告されている髄液ネオプテリン値について、本研究の対象HAM患者53例中 (training set 30例+test set 23例)、PSL治療を受け、その検体を採取できた26例に対して、PSL治療前後の髄液ネオプテリン値を比較した。治療期間は6か月 (中央値)、経口PSLの平均投与量は4.0 mg/日であった。比較解析にはWilcoxon signed-rank testを用いた。

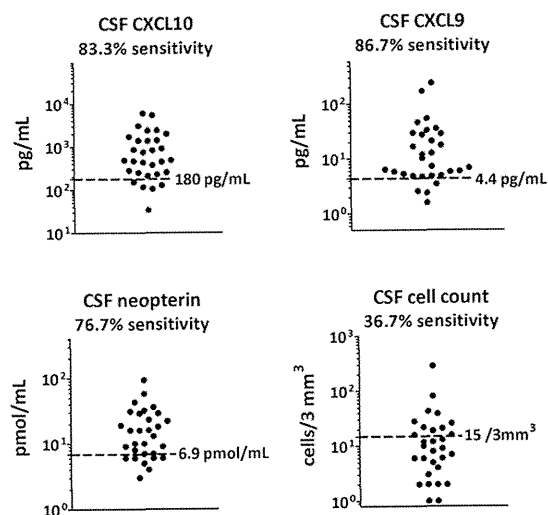
### (倫理面への配慮)

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) 髄液中のCXCL10濃度、CXCL9濃度、ネオプテリン濃度および髄液細胞数の感度は、それぞれ83.3%、86.7%、76.7%および36.7%で、これらのバイオマーカーのなかで髄液細胞数のみ、感度が著しく低かった (図1)。

図1 髄液マーカーの感度比較 (n = 30)



(2) HAM患者の進行度と関連することが示唆された髄液マーカー (髄液CXCL10, 髄液ネオプテリンおよび髄液細胞数) および末梢血プロウイルス量について、test setを用いて悪化例 (deteriorating cases) と安定例 (stable cases) の2群間で比較した。その結果、末梢血プロウイルス量よりも他の3つの髄液マーカーが両群をより強く分別する能力を有することが確認された (図2)。さらに、test setを用いて感度を調べると髄液中のCXCL10濃度、ネオプテリン濃度および髄液細胞数の感度は、それぞれ73.9%、60.9%および30.4%で、training setにおける結果と同様に髄液細胞数のみ著しく感度が低いことが確認された (図3)。

図2 HAM 悪化例および安定例が示す髄液マーカーの2群間比較の validation (悪化例 deteriorating : n = 9, 安定例 stable : n = 11)

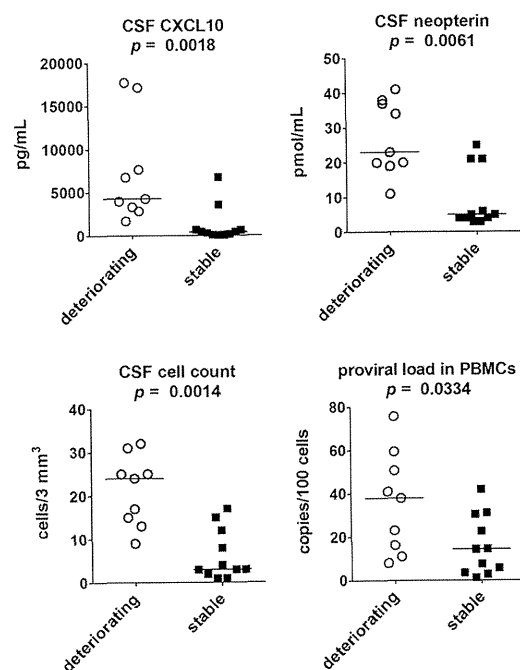
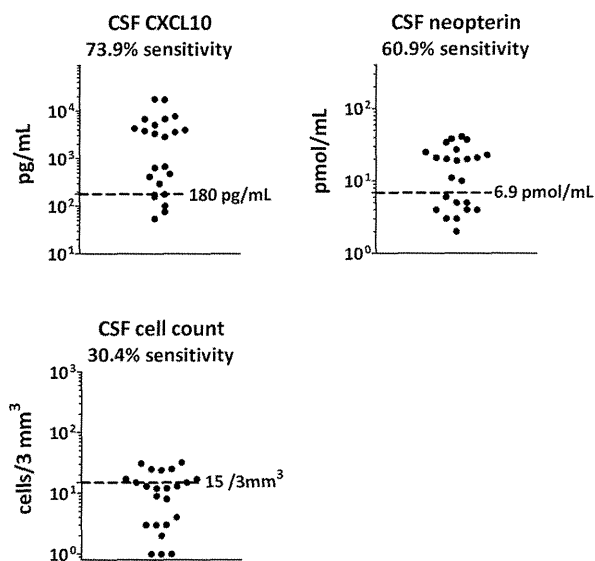


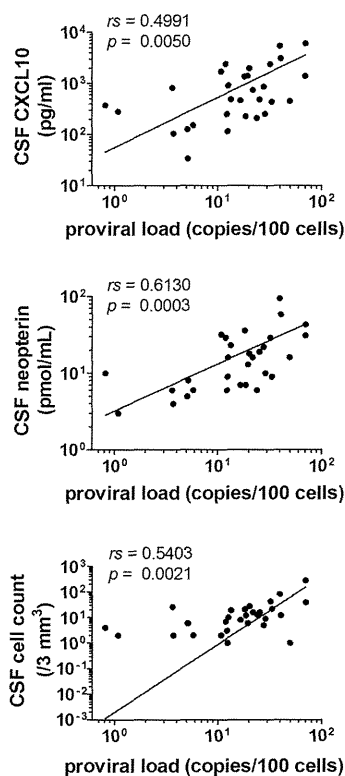


図3 HAMの進行度と関連した髄液マーカーの感度比較に関する validation (n = 23)



(3) 我々の同定した髄液マーカー（髄液CXCL10, 髄液ネオプテリンおよび髄液細胞数）はすべて、末梢血プロウイルス量と正の相関を認めた（図4）。

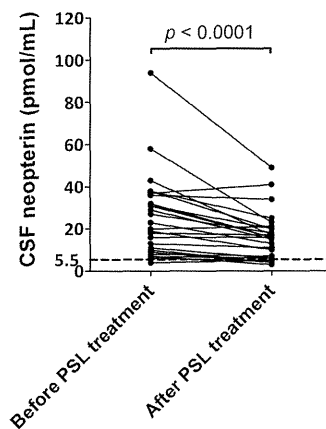
図4 末梢血プロウイルス量と HAMの進行度に関連する髄液マーカーとの相関 (n = 30)



(4) これまでの報告と一致して、低用量PSLの内服治療によって髄液ネオプテリン値は有意に低下した ( $p < 0.0001$ )。しかし、われわれのデータから、髄

液ネオプテリン値 5.5 pmol/mL未満であれば100%安定例に含まれることが判明したが、PSL治療後にこの5.5 pmol/mL未満に低下した例は19.2%にすぎず、残り80.8%は5.5 pmol/mL以上であった（図5）

図5 プレドニゾン長期内服療法による髄液ネオプテリン値の変化 (n = 26)



#### D. 考察

昨年度、最近4年間のHAMの臨床的進行度をもとに定義した2群間を比較することによって、髄液CXCL10をはじめとする髄液マーカーがHAMの進行度と関連することを報告した。今年度は、昨年度までに検証済みの30例 (training set) とは異なるHAM患者23例をtest setとし、有望なマーカーに関して「進行度との関連」について検証 (validation) した。その結果、「進行度との関連」については、末梢血プロウイルス量よりも髄液CXCL10, 髄液ネオプテリンおよび髄液細胞数が、より進行度と関連が強いという、training setで得られた結果をtest setでも再現することができ、これら髄液のマーカーがHAMのprognostic markerとして有望であることを示した。これまで、HAMの進行度と相関するbiomarkerについて異なる集団でcross validationした報告はなく、よりエビデンスレベルの高い情報を提供できたと考えられる。さらにエビデンスレベルを高めるためには、多施設の前向き臨床試験が必要と考えられる。

また、これらマーカーの「感度」について解析し、髄液CXCL10およびネオプテリン濃度は、髄液細胞数と比較して、HAMの弛緩活動を把握するうえで、感度がより高い検査であることが確認できた。この結果は、髄液での細胞数増加はHAM患者の約3-4割で認められるというこれまでの報告と一致しており、現在の保険診療の範囲内で測定可能な検査（細胞数を含む）では、HAMの疾患活動を十分に評価できないことを示している。したがって、HAMの診療レベルを向上させるためには、これら感度の高い検査（髄液CXCL10およびネオプテリン濃度）の保

険承認を目指すなど、全国レベルで測定できる環境を整備する必要性が高いと考えられた。希少疾患では企業の関与が困難であるため、臨床的に重要なバイオマーカーを全国レベルで測定できる環境整備に関して、国レベルでの取り組みが必要であると考えられる。

このように、本研究では HAM の prognostic marker を同定するため、様々なウイルス学的免疫学的マーカーについて検討し、HAM の進行度と密接に関連するマーカー (prognostic marker) として、髄液 CXCL10 および髄液ネオプテリンを同定、cross validate した。このことは、脊髄局所の炎症レベルを低く抑えた状態を維持することが HAM の進行を阻止するために極めて重要であることを示唆している。本研究ではさらに重要なことに、良好な予後と相関する髄液ネオプテリン濃度のレベルを示すことが出来た。すなわち、髄液ネオプテリンが 5.5 pmol/mL 未満の症例は全例において経過が安定していることを示すことが出来、この値は 1 つの治療目標となる可能性が期待される。さらに、PSL の内服療法では、この治療目標を達成する割合は低いことが示され、PSL 内服療法のみでは HAM の進行を阻止できないというこれまでの治療実態を反映しているものと考えられる。よって HAM では、この治療目標を達成することを可能とする新たな治療薬開発の必要性が高いと考える。

興味深いことに、HAM の進行に関連した髄液マーカー (CXCL10、髄液ネオプテリンおよび髄液細胞数) は末梢血プロウイルス量と正の相関を示した。これは脊髄における炎症の強さが、ある程度 HTLV-1 感染細胞の量に関連することを示唆する。それを証明するためには、HTLV-1 プロウイルス量を低下させる治療介入が、髄液マーカーの低下を導くかどうかに関する、今後の検討が必要であろう。

## E. 結論

昨年度までに、HAM 患者 30 例 (training set) において、髄液の CXCL10 濃度、ネオプテリン濃度、細胞数が、HAM の進行度と相関することを示したが、今年度は、異なる HAM 患者 23 例 (test set) において検討し、HAM の進行度と密接に関連するマーカー (prognostic marker) として、「髄液 CXCL10」および「髄液ネオプテリン」が有用であることを test set においても示した。これまで HAM の prognostic marker に関して異なる集団で cross validation されたものはなく、本研究結果は、よりエビデンスレベルの高い情報を提供するものである。今後は、全国の HAM の診療レベル向上をはかるためにも、多施設の前向き臨床試験による検証を実施し、さらにエビデンスレベルを高め、これら有用なマーカーの保険承認に向けた取り組みを進めることの必要性が高い。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yamano Y., Sato T.  
Clinical pathophysiology of human T-lymphotropic virus-type1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis.  
**Frontiers in Virology**, 3(389):1-10, 2012.
- 2) 山野嘉久、佐藤知雄.  
HTLV-1関連脊髄症 (HAM) の病態・治療とバイオマーカー  
日本臨牀, in press 2013.
- 3) 山野嘉久、佐藤知雄、宇都宮與.  
HTLV-1関連脊髄症 (HAM)  
日本臨牀, in press 2013.
- 4) 山野嘉久.  
HAM (HTLV-1関連脊髄症)  
すべての内科医が知っておきたい神経疾患の診かた、考え方とその対応, 279-281, 2013.
- 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.

### 2. 学会発表

- 1) Yamano Y. Search for a model of drug efficacy for a rare chronic progressive neurological disease HAM/TSP, The 3rd International Symposium of Early Stage Clinical Trial, February 2, 2013, Yokohama, Japan.
- 2) 山野嘉久 HAM の新規バイオマーカー候補分子髄液 CXCL10 の病態における重要性, 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患克服研究事業) 出雲班班会議「重症度別治療指針作成に資す HAM の新規バイオマーカー同定と病因細胞を標的とする新規治療法の開発」, 平成 24 年度第 2 回班会議, 2012 年 11 月 22 日, 鹿児島
- 3) 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) の進行度に関連するバイオマーカーの同定, 第 17 回日本神経感染症学会, 2012 年 10 月 20 日, 京都.
- 4) 山野嘉久、安藤仁、佐藤知雄、外丸詩野、新谷奈津美、山内淳司、八木下尚子、吉田眞理、宇都宮與. HAM における CXCL10 の炎症慢性化機構における重要性と治療標的としての可能性, 第 24 回日本神経免疫学会学術集会, 2012 年 9 月 21 日, 軽井沢.
- 5) 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) の進行度に関連する新規バイオマーカーとしての髄液 CXCL10 の重要性, 第 5 回 HTLV-1 研究会・第 1 回 ATL シンポジウム・HTLV-1 国際シンポジウム, 2012 年 8 月 26 日, 東京.
- 6) 齊藤祐美 高田礼子、菊地誠志、藤原一男、中川正法、竹之内徳博、永井将弘、吉良潤一、中村龍文、高嶋博、齊藤峰輝、渡嘉敷崇、法化岡陽一、松崎敏男、出雲周二、山野嘉久. HAM 患者登録システム (HAM ねっと) の構築, 第 5 回 HTLV-1 研究会・第 1 回 ATL シンポジウム・HTLV-1 国際シンポジウム, 2012 年 8 月 26 日, 東京.
- 7) 安藤仁、佐藤知雄、新谷奈津美、八木下尚子、山内淳司、山野嘉久. HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の炎症慢性化に果たす CXCL10 の役割と治療応用への解析, 第 5 回 HTLV-1 研究会・第 1 回 ATL シンポジウム・HTLV-1 国際シンポジウム, 2012 年 8 月 26 日, 東京.
- 8) 石原誠人、新谷奈津美、佐藤知雄、山野嘉久、中村祐輔、中川英刀、植田幸嗣. 脳脊髄液プロテオームプロファイリングによる HAM/TSP 重症度指針マーカーの同定, 第 5 回 HTLV-1 研究会・第 1 回 ATL シンポジウム・HTLV-1 国際シンポジウム, 2012 年 8 月 26 日, 東京.
- 9) 山内淳司、安藤仁、新谷奈津美、佐藤知雄、八木下尚子、山野嘉久. ステロイドの血中 HTLV-1 プロウイルス量に対する影響と免疫抑制による HTLV-1 関連疾患発症リスクに関する検討, 第 5 回 HTLV-1 研究会・第 1 回 ATL シンポジウム・HTLV-1 国際シンポジウム, 2012 年 8 月 26 日, 東京.
- 10) 長谷川温彦、高森絢子、宇都宮與、前田裕弘、山野嘉久、増田昌人、清水由紀子、玉井洋太郎、笹田亜麻子、崔日承、鵜池直邦、岡村純、渡邊俊樹、神奈木真理. HTLV-1 感染者における Tax 特異的 T 細胞応答および ATL 発症予防, 第 5 回 HTLV-1 研究会・第 1 回 ATL シンポジウム・HTLV-1 国際シンポジウム, 2012 年 8 月 25 日, 東京.
- 11) 山野嘉久. HAM における HTLV-1 感染 T 細胞の異常, 第 5 回 HTLV-1 研究会・第 1 回 ATL シンポジウム・HTLV-1 国際シンポジウム, 2012 年 8 月 25 日, 東京.
- 12) 山野嘉久. HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の臨床経過と関連する疾患活動性マーカーの同定, 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012 年 5 月 24 日, 東京.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許出願
- 1) US61/668,686、Yoshihisa Yamano, 2012.7.6, A Therapeutic Method And Medicament For HTLV-1 Associated Myelopathy(HAM)
- 2) 特願2012-189318、植田幸嗣、石原誠人、山野嘉久、2012.8.29, ヒト T リンパ球向性ウイルス I 型関連疾患検出用ポリペプチドとその利用
2. 実用新案登録
- 該当なし
- 3.その他

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）

分担研究報告書

HTLV-1 関連脊髄症（HAM）の新規医薬品開発に関する研究

研究分担者 植田幸嗣 独立行政法人理化学研究所 上級研究員  
研究協力者 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 関連脊髄症（HAM）に対する重症度指針マーカー開発を目的とし、HTLV-1 感染者由来脳脊髄液の定量的全タンパク質プロファイリングを行った。HTLV-1 感染無症候患者 6 例、HAM 患者 51 例の CSF サンプルをトリプシン消化し、LC/MS/MS 質量分析にて分析した結果、14, 541 ペプチド（1, 873 タンパク質、False discovery rate < 1%）の同定と定量に成功した。

これらの母集団からピアソンの相関係数に基づき、HAM の疾患重症度（納の運動障害度）と最もよく脳脊髄液中濃度が相関する 14 タンパク質（16 ペプチド）を選出した。さらに検証試験として、独立した 57 症例の脳脊髄液と、105 症例の血漿を用いて上記バイオマーカー候補分子の測定を行った。その結果、血漿においても HAM 重症度に依存して有意に段階的変動が観測される細胞外マトリクスタンパク質 F が確認された。これらの分子は HAM 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、HAM に対する分子標的治療薬のターゲットにもなり得る。

特に本研究で同定された分泌型ヌクレオチド代謝酵素は、その酵素活性とは無関係にサイトカイン様の働きを持ち、T 細胞の増殖活性化を惹起することから、その活性阻害が HAM 特有の慢性炎症に対する有効な治療薬となり得る可能性も示唆された。

A. 研究目的

現在 HAM の診断において、HAM 病因 T 細胞や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バイオマーカーは存在しない。そこで本研究では、患者由来脳脊髄液サンプルを用いて、HAM 病態診断の新たなターゲットとなりうるタンパク質分子を同定することを目的とする。本目的の達成により HAM 重症度、疾患活動性を分子生

物学的に定義できれば、患者 QOL 改善に繋がる適切な治療指針策定や、HAM 発症予防までが可能になると期待される。

B. 研究方法

57 症例由来の CSF サンプル（図 1）について、変性、還元、アルキル化、そしてトリプシン消化からなる質量分析前処理を

96 連同時処理装置にて行った。得られた消化ペプチドサンプルを個々に LTQ-Orbitrap-Velos 質量分析計 (Thermo Scientific 社製) で分析した。Nano-flow HPLC には、DIONEX 社 Ultimate3000 HPLC system、0.3×5 mm L-Trap トラップカラム (化学物質評価機構)、0.075 × 150 mm C18 チップカラム (Dr. Meisch) を使用した。流速は 250 nL/min、120 分アセトニトリルグラジェントにて分析を行った。

図 2 に示す解析手順に従って、測定が完了した LC/MS/MS の raw data を Genedata 社 Expressionist プロテオームサーバーにロードし、定量解析、統計解析を行った。まず Expressionist Refiner MS®モジュールを用いてノイズ除去、クロマトグラムアライメントなどのデータプロセッシングと、検出された全ペプチドに対するラベルフリー定量解析を行った。

次に、Expressionist Analyst®モジュールを使用して、検出された 68,077 ペプチドデータの標準化を行った後、AC (n=6)、HAM 重症度 1~3 (n=7)、HAM 重症度 4~6 (n=35)、HAM 重症度 7~11 (n=9) の 4 群に対して Similarity search を行った。本解析では HAM 重症度に依存した髄液中濃度上昇、または減少を示すタンパク質を抽出するため、Pearson の相関解析における p 値が最も低い 100 ペプチドを診断標的候補タンパク質として選出した。

これら 100 候補ペプチドについて、LC/MS/MS 分析の結果に基づいた Sequest (Thermo Scientific 社製) データベース検索により、ペプチド配列の同定を行った。Sequest データベース検索には以下のパラメーターを使用した。Taxonomy = Homo Sapiens, Enzyme = Trypsin, Miss cleavage

= 2, Database = SwissProt 2012\_12 (525,207 sequences), Static modification = Carbamidomethyl (C), Dynamic modifications = Oxidation (M) + Deamidation (N or Q), MS tolerance = 3 ppm, MS/MS tolerance = 0.8 Da, Peptide charge = +2 to +4, Instrument = ESI-TRAP。さらに、Peptide Validator アルゴリズムを使用し、False Discovery Rate < 1%を同定信頼性の基準とした。

	M	F	Total
AC	4	2	6
HAM SG1 ~ 3	3	4	7
HAM SG4 ~ 7	11	25	36
HAM SG8 ~ 11	1	7	8
Total	19	38	57

図 1 治療標的探索に用いた脳脊髄液症例数リスト。AC:HTLV-1 感染無症候患者、SG: 納の運動障害度

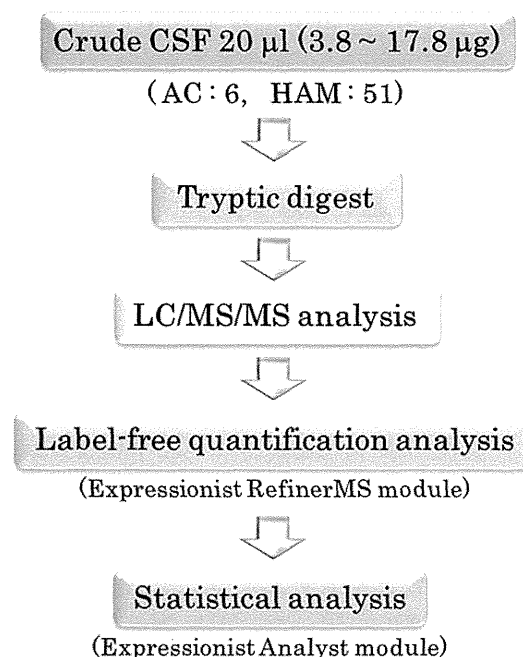


図 2 HAM 治療標的分子スクリーニングのための解析フローチャート

### [倫理面への配慮]

聖マリアンナ医科大学から提供を受けた脳脊髄液、血漿試料の収集に関しては、プライバシーに関する遵守事項、同意しない場合でも不利益を受けないこと、同意した場合でも随時これを撤回できること、被験者の人権保護など必要な事項について被験者に十分説明し患者本人からプロジェクトの趣旨や内容に十分な理解を得た上でインフォームドコンセントを文書で取得し、採血の手続きが行われた。

採取、凍結したサンプルは匿名化が行われ、個人情報（氏名、住所、生年月日）は同病院外には一切漏出しないよう管理されている。匿名化された試料は、臨床情報（年齢、性別、治療歴、各種バイオマーカーの値など）のみ付加された状態で提供され、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保管されている。これら臨床検体の提供、本研究への使用に関しては、聖マリアンナ医科大学、理化学研究所、双方の倫理審査委員会による承認を得た上で実施された。

### C. 研究結果

57 症例由来の LC/MS/MS スペクトルは、Expressionist サーバー上で図 3 に示すような質量と HPLC 保持時間を軸とした二次元マップに変換され、ここでは 57 症例間の重複を除いた 68,077 ペプチドが検出された。さらに、これら検出シグナル全てについて精密なアライメントを行い、質量分析計でのシグナル強度に基づいた 57 症例間の定量比較値を得た。

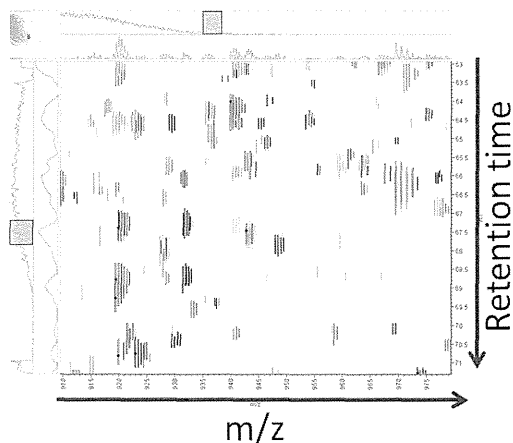


図 3 Expressionist プロテオームサーバー上での二次元定量クロマトグラム

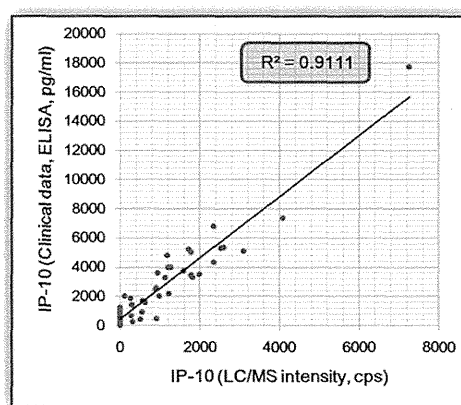


図 4 脳脊髄液中 IP-10 の臨床情報と LC/MS/MS 定量値の比較。

本解析から得られた LC/MS/MS に基づく全タンパク質プロファイルの定量信頼性を評価するため、既存の HAM 疾患活動性マーカーである IP-10 の臨床における測定値と LC/MS/MS における測定値の相関を調べた。(図 4) その結果、57 症例の質量分析に基づく IP-10 値は  $R^2 = 0.9111$  の非常に高い相関を以て臨床情報と一致した。これにより、 $\text{pg/ml} \sim \text{ng/ml}$  の低濃度領域においても信頼性の高いタンパク質量プロファイルが得られたことが証明できた。

この脳脊髄液定量プロテオームデータから HAM 重症度に依存した髄液中濃度上昇、または減少を示すタンパク質を抽出するた

め、AC (n = 6)、HAM 重症度 1~3 (n = 7)、HAM 重症度 4~6 (n = 35)、HAM 重症度 7~11 (n = 9) の 4 群に対して Similarity search 解析を行った。Pearson の相関解析における p 値が最も低い 100 ペプチドを診断標的候補タンパク質として選出した。

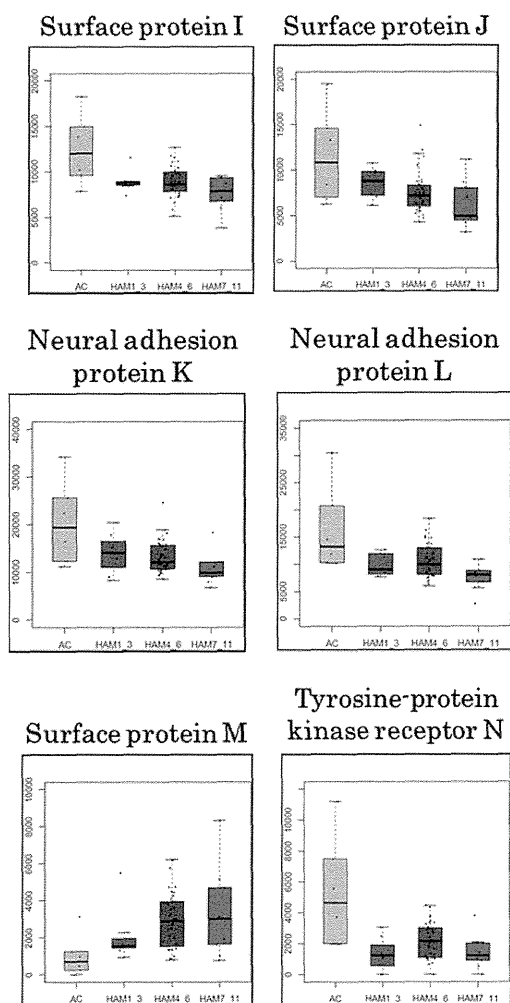
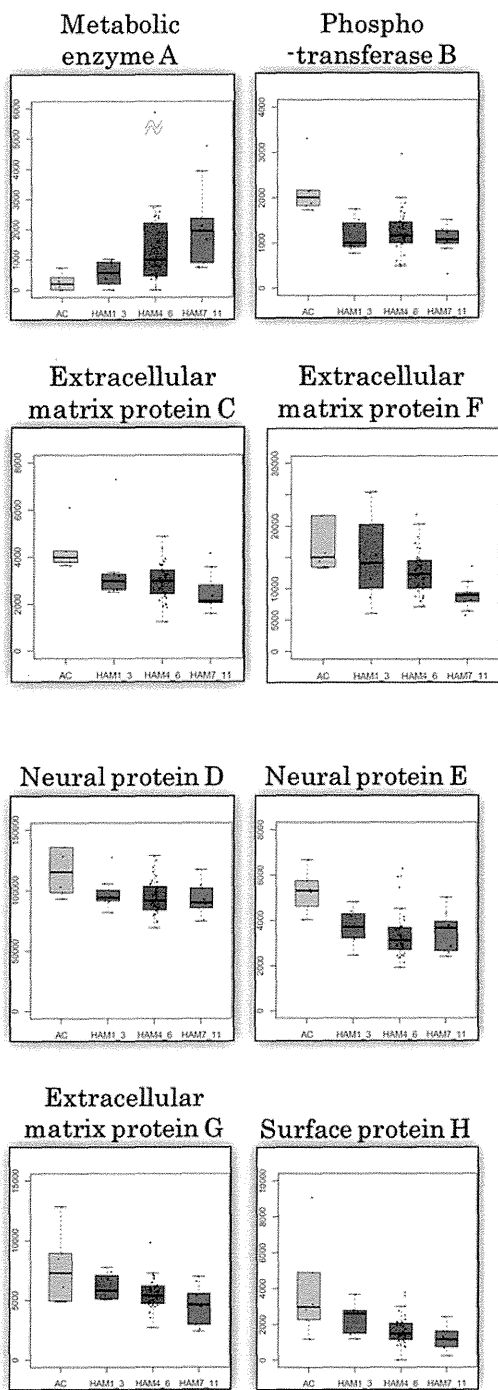


図 5 HAM 治療・診断薬標的候補タンパク質 14 種の定量ボックスプロット

これらに対して 2D-LC/MS/MS 分析を用いてタンパク質同定を行ったところ、16 ペプチド(14 タンパク質)の同定に成功した。この 14 タンパク質の髄液中濃度をボックスプロットで表したのが図 5 である。

得られた 14 種の診断薬標的候補タンパク質について、ELISA キットが市販で入手可能なものについては新たな脳脊髄液サンプル、および血漿サンプルを用いて検証試験を行った。細胞外マトリクスタンパク質 F の脳脊髄液中濃度を AC (n = 6)、HAM 重症度 1~3 (n = 4)、HAM 重症度 4~6 (n = 34)、HAM 重症度 7~11 (n = 7) について ELISA 法で測定した結果が図 6 である。図に示し

た 4 病理群に従って、スピアマンの順位相関係数  $r_s = -0.3471$  ( $p = 1.25 \times 10^{-2}$ ) の高い相関を以て脳脊髄液中のタンパク質 F 濃度は低下を示す結果が得られた。これは前述のスクリーニング結果と一致する結果であり、別の症例セット、実験手法を用いた場合でも再現性があることを証明できた。

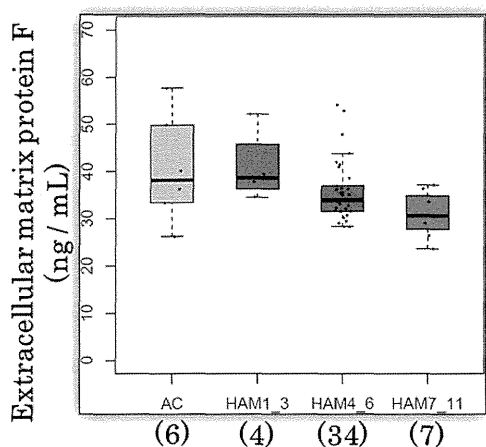


図 6 細胞外マトリクスタンパク質 F に対する ELISA 法を用いた脳脊髄液検証試験の結果

さらに、より体外診断に好ましい低侵襲試料である血漿においても同様の診断が可能かどうかを調べた。AC ( $n = 55$ )、HAM 重症度 1~3 ( $n = 6$ )、HAM 重症度 4~6 ( $n = 29$ )、HAM 重症度 7~11 ( $n = 15$ ) の血漿について細胞外マトリクスタンパク質 F を ELISA 法で測定した結果が図 7 である。

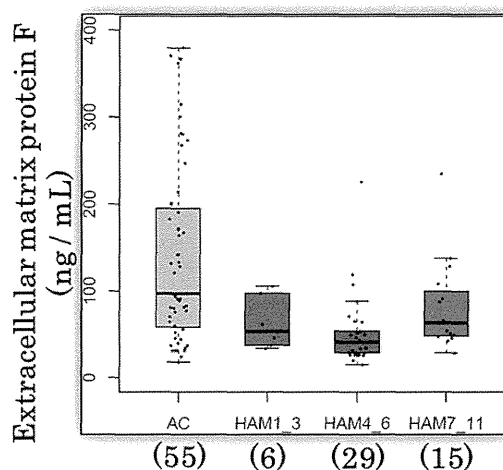


図 7 細胞外マトリクスタンパク質 F に対する ELISA 法を用いた EDTA 血漿検証試験の結果

図に示した 4 病理群に従って、スピアマンの順位相関係数  $r_s = -0.3653$  ( $p = 1.27 \times 10^{-4}$ ) の高い相関を以て血漿中のタンパク質 F 濃度は低下を示す結果が得られた。

#### D. 考案

57 症例の脳脊髄液サンプルを用いた質量分析に基づくラベルフリー定量解析により、HAM の病態進行に伴って脳脊髄液中濃度が有意に増加、または減少する分子群の同定に成功した。これまで HTLV-1 関連疾患に対する治療や診断を目的とした基礎研究において、脳脊髄液プロテオームを 1,873 タンパク質もの網羅性を持って、かつ多症例でプロファイリングした報告はなく、ヒト脳脊髄液の定量的分子構成の解明にも大変重要な基盤データベースが得られた。

今後、本研究で同定された分泌型ヌクレオチド代謝酵素 A を含む 14 種類のタンパク質を詳細に機能解析することにより、HTLV-1 感染から HAM 発症に至る分子メカニズムの解明に繋がる可能性がある。また、



そのような分子を標的にした治療法を開発することにより、HAM の分子標的治療だけでなく、発症の予防までもが可能になると期待できる。

同 14 種類の同定タンパク質の中には、疾患の進行に伴って有意に減少傾向を示すものも多く発見されたが、これらのほとんどは神経の脱髄との関連が報告されている分子群であり、HAM の病態進行に伴って起きるとされる脱髄を客観的に示唆することができるバイオマーカーとなりうる。こうしたタンパク質の変動を髄液や血液から検出することができれば、HAM の疾患活動性を診断することが可能となり、適切な治療介入、投薬量の決定、ひいては HAM 病態進行を有意に遅延、抑制することができるようになることを期待できる。

## E. 結論

遺伝子解析、細胞生物学的解析だけではなく、ある疾患の発症母地で実際にどのような分子生物学的変化が起きているかを網羅的に俯瞰することができる最先端プロテオーム解析は、直接創薬のターゲットとなり得るタンパク質を決定することができる強力な研究技法の一つと言える。実際に本研究で同定された 14 タンパク質も、機能不明のものを除いて全てが HAM の病態と深く関わる機能を担っている分子であった。

また、個人差の激しい臨床検体から統計学的有意差を示す分子を同定するために、希少な脳脊髄液サンプルを 108 症例も使用可能であったことは、本治療標的分子探索研究の成功に大きく寄与したファクターである。こうした面でも、HAM 臨床の代表的機関がネットワークを組んだ本研究班の意義は大変に大きかったと考察する。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Chung, S., Suzuki, H., Miyamoto, T., Takamatsu, N., Tatsuguchi, A., Ueda, K., Kijima, K., Nakamura, Y., and Matsuo, Y. (2012) Development of an orally-administrative MELK-targeting inhibitor that suppresses the growth of various types of human cancer. *Oncotarget*.

2. Fujitomo, T., Daigo, Y., Matsuda, K., Ueda, K., and Nakamura, Y. (2012) Critical function for nuclear envelope protein TMEM209 in human pulmonary carcinogenesis. *Cancer research* 72, 4110-4118.

3. Takawa, M., Cho, H. S., Hayami, S., Toyokawa, G., Kogure, M., Yamane, Y., Iwai, Y., Maejima, K., Ueda, K., Masuda, A., Dohmae, N., Field, H. I., Tsunoda, T., Kobayashi, T., Akasu, T., Sugiyama, M., Ohnuma, S., Atomi, Y., Ponder, B. A., Nakamura, Y., and Hamamoto, R. (2012) Histone lysine methyltransferase SETD8 promotes carcinogenesis by deregulating PCNA expression. *Cancer research* 72, 3217-3227.

4. Tanikawa, C., Espinosa, M., Suzuki, A., Masuda, K., Yamamoto, K., Tsuchiya, E., Ueda, K., Daigo, Y., Nakamura, Y., and Matsuda, K. (2012) Regulation of histone modification and chromatin structure by the p53-PAD14

pathway. *Nature communications* 3, 676.

5. Toyama, A., Nakagawa, H., Matsuda, K., Sato, T. A., Nakamura, Y., and Ueda, K. (2012) Quantitative structural characterization of local N-glycan microheterogeneity in therapeutic antibodies by energy-resolved oxonium ion monitoring. *Analytical chemistry* 84, 9655-9662.

6. Unoki, M., Masuda, A., Dohmae, N., Arita, K., Yoshimatsu, M., Iwai, Y., Fukui, Y., Ueda, K., Hamamoto, R., Shirakawa, M., Sasaki, H., and Nakamura, Y. (2013) Lysyl 5-Hydroxylation, a Novel Histone Modification, by Jumonji Domain Containing 6 (JMJD6). *The Journal of biological chemistry*.

## 2. 学会発表 国際会議

• Quantitative proteome profiling of cerebrospinal fluid to identify potential diagnostic markers for human T-cell leukemia virus type 1 associated myelopathy.

Makoto Ishihara, Natsumi Araya, Tomoo Sato, Yoshihisa Yamano, Yusuke Nakamura, Hidewaki Nakagawa, Koji Ueda. HUPO 11<sup>th</sup> Annual Meeting, Sep, 2012, Boston, MA.

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

N., Sato, T., Utsunomiya, A., Yamano, Y., Nakamura, Y., Nakagawa, H., and Ueda, K. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2012, Apr, 2012, Chicago, IL.

## 国内会議

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

Ishihara, M., Araya, N., Sato, T., Utsunomiya, A., Yamano, Y., Nakamura, Y., Nakagawa, H., and Ueda, K. 第71回日本癌学会学術総会, Oct, 2012, Sapporo, Japan

• 最先端プロテオミクスによる HTLV-1 関連疾患バイオマーカーの探索  
植田幸嗣

第33回日本臨床薬理学会学術総会、2012年11月31日、沖縄

• 脳脊髄液プロテオームプロファイリングによる HAM/TSP 重症度指針マーカーの同定  
石原誠人、新谷奈津美、佐藤知雄、山野嘉久、中村祐輔、中川英刀、植田幸嗣  
HTLV-1 研究会、2012年8月26日、東京

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

### 特許

発明の名称：ヒトTリンパ球向性ウイルス I 型関連疾患検出用ポリペプチドとその利用

出願番号：特願 2012-189318

出願日：2012/08/29

## HAM 疾患活動性バイオマーカーとしての TSLC1 の有用性 および HAM 治療薬としての抗ウイルス剤の有効性の検討

研究分担者 竹之内徳博 関西医科大学 准教授

研究要旨：①昨年引き続き、HTLV-1 関連脊髄症（HAM）の新規バイオマーカー候補である TSLC1 の解析を行なった。HAM 患者 CD4 陽性 T 細胞においては、疾患活動性の高い時期に *tslc1* mRNA 及び TSLC1 蛋白分子の発現亢進が認められたが、症状安定期には相対的に安定しており、TSLC1 の測定は HAM の疾患活動性を評価するバイオマーカーとして有用である可能性が示された。②HAM 疾患活動性の指標として HTLV-1 プロウイルス量の高値が知られている。前回までにこのプロウイルス量上昇の原因として、ウイルスの感染伝播の可能性が示された。これは HAM の治療に抗ウイルス剤が有効であることを示唆しているため、さらなる機序の解析を行うと共に抗ウイルス剤である INF $\alpha$  の効果を検証した。

### A. 研究目的

①HTLV-1 関連脊髄症（HAM）は HTLV-1 感染が原因となって引き起こされる慢性進行性脊髄疾患であるが、病態は不明な点も多く、未だ根治的な治療法はない。故に、発症予防と進行防止が重要であるが、発症者の症状軽減のために用いられる INF $\alpha$  やステロイドは副作用のため長期使用が問題となっており、適切な投薬時期の判断のために、疾患の発症予測や活動性の評価に有用なバイオマーカーが必要とされている。昨年までに、この候補として TSLC1 が挙げられたため、今回はこの分子のさらなる解析を行なった。

②HAM 疾患活動性の指標として HTLV-1 プロウイルス量の高値が知られている。その発生機序として感染細胞のクローナルな増殖が考えられているが、無症候性 HTLV-1 感染者において、*pol* 領域の欠損した defective virus が感染した細胞は短期的にクローナルな増殖を起こしプロウイルス量の増加に関与しているとの報告があり、defective virus の検出がクローナル増殖の一つの指標となることが示唆されている。よって昨年は、HAM 患者における defective virus の検出を試みたが、ほとんど検出されなかった。今回はこれを確認するために異なる primer set を用いてさらに多角的に解析を行った。一方で、高プロウイルス量の発生機序としてウイルスの感染伝播が主体である可能性が示唆さ

れた。この場合は、抗ウイルス剤がプロウイルス量の上昇を抑えるのに有効であることが期待されるため、高プロウイルス量発生機序のさらなる解析と抗ウイルス剤である INF $\alpha$  の有効性の検討を行うこととした。

### B. 研究方法

#### 1) 血液検体

関西医科大学神経内科および京都府立医科大学神経内科の協力のもと、両病院に来院し十分な説明と書面による同意を得た HAM 患者、無徴候性 HTLV-1 感染者、ATL 患者、HTLV-1 非感染者（対照群）を対象に、臨床情報と末梢血を収集した。末梢血より血漿と末梢血単核球（PBMC）を密度勾配遠心法にて分離し、細胞保存液（セルバンカー：日本全薬工業）へ懸濁し液体窒素に保存した。保存 PBMC は用に鑑み解凍・使用された。

#### 2) 動物モデル

京阪臍帯血バンクより申請・審査の後提供された研究用臍帯血から、CD133 陽性細胞分離磁気ビーズを用いて造血幹細胞（CD133 陽性細胞）を分離し、細胞保存液へ懸濁し液体窒素に保存した。CD133 陰性細胞からは DNA を抽出し、HLA の解析に用いた。精製し保存された CD133 陽性細胞の中から HLA-A24<sup>+</sup> の検体を選んで解凍し、7 週齢の NOG-SCID マウス大腿骨髄内へ移植し、1 ヶ月後に FACS にて CD45 陽性ヒト骨髄細胞