

HTLV-1 関連脊髄症（HAM）発症関連因子としてのウイルス型の解析に関する研究

研究分担者 齊藤峰輝 川崎医科大学医学部 教授

研究要旨： HTLV-1 には転写調節因子 Tax の遺伝子配列に 2 つのサブタイプが存在し、サブタイプ A (TaxA) を持つ感染者はサブタイプ B (TaxB) を持つ感染者と比較して、HLA の影響とは独立して HAM 発症の Odds が約 2 倍高いことが報告されている。ウイルスサブタイプの HAM 発症における病因的意義解明のため以下の検討を行った。HAM 患者の末梢血単核球 (PBMC) からゲノム DNA と cDNA を抽出し、PBMC 中のプロウイルス量 (PVL)、Tax, HBZ mRNA 発現量と HTLV-1 標的遺伝子である FoxP3 mRNA 発現量を測定した。TaxA、TaxB 感染 HAM 患者 (TaxA+, TaxB+ HAM) いずれの群においても、PBMC 中の HBZ mRNA 発現量と PVL に有意な正の相関が認められた。TaxB+ HAM の感染細胞あたりの HBZ mRNA 発現量は TaxA+ HAM より有意に高かった。TaxB+ HAM では、PBMC 中の HBZ mRNA 発現量と FoxP3 mRNA 発現量との間に有意な正の相関関係が認められたが、TaxA+ HAM では認められなかった。HTLV-1 Tax サブタイプが異なる感染者において、ウイルス遺伝子、細胞遺伝子の制御が異なり、HAM 発症に関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) は、世界ではじめてヒト疾患との関連が見いだされたレトロウイルスであり、成人 T 細胞白血病 (ATL) および HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の原因ウイルスである。ほとんどの HTLV-1 感染者が生涯にわたって未発症の無症候性キャリアー (asymptomatic healthy carrier: AC) として経過し、HAM を発症するのは感染者全体のごく一部ではあるものの、HAM 患者では約 40% が経過中に歩行不能となり生活の質が著しく障害されるため、その発症を規定する因子と病態への関与を解明することは重要である。本研究の目的は、HAM の発症機序解明と新規発症予防法・治療法の開発のため、様々な免疫学的・分子生物学的手法を駆使して HTLV-1 感染細胞増殖や HAM 病態に関与する遺伝子群を同定し、その制御法を開発することである。

従来、HTLV-1 ウイルス型と関連疾患 (ATL, HAM) との間に疾患特異的な対応はないとされていたが、HAM 発症に関しては、鹿児島県内の HTLV-1 感染者の解析から、HTLV-1 の転写調節因子 Tax の遺伝子配列に 2 つのサブタイプが存在し、そのうちサブタイプ A (TaxA) を持つ感染者はサブタイプ

B (TaxB) を持つ感染者と比較して、HLA の影響とは独立して HAM 発症の Odds が約 2 倍高いことが報告されている。また、TaxA と同じ塩基置換を持つ HTLV-1 の流行地であるジャマイカでは、本邦に比較して HAM 発症率が約 6 倍高いことが知られている。これらの事実から、特定のウイルス型と宿主の感染細胞数、さらには疾患感受性との間に一定の関連があることは明らかと考えられる。興味深いことに、TaxA、TaxB に特異的な塩基置換は、p12, p30, env, HBZ の各 ORF のアミノ酸置換を伴う塩基置換、ならびに HBZ のプロモーターとして重要な U5 の 300bp を含む LTR の塩基置換と対応している。今回は、TaxA、TaxB 感染者における末梢血単核球中の Tax, HBZ mRNA 発現量と HTLV-1 標的宿主因子 mRNA 発現量との関連を解析した。

B. 研究方法

これまでに、HTLV-1 には転写調節因子 Tax の遺伝子配列に 2 つのサブタイプが存在し、サブタイプ A (TaxA) を持つ感染者はサブタイプ B (TaxB) を持つ感染者と比較して、HLA の影響とは独立して HAM 発症の Odds が約 2 倍高いことが報告されている (Furukawa Y et al. J Infect Dis. 182:1343-9,

2000)。ウイルスサブタイプの HAM 発症における病因的意義解明のため以下の実験を行った。

- ① HAM 患者の末梢血単核球 (PBMC) をフィコールコンレイ比重遠心法で分離し、ゲノム DNA および total RNA を抽出した。total RNA から cDNA を作製した。
- ② 合計 77 例の HAM 患者について PCR-RFLP 法でサブタイプを決定した。
- ③ 各症例の PBMC 1 個あたりの HBZ、Tax および FoxP3 mRNA 発現を定量し、サブタイプ、HTLV-1 プロウイルス量 (Proviral load: PVL) との関連を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は倫理委員会の承諾を得た後に施行した。本研究に用いられたすべての患者検体は、十分な説明と書面による同意を得て採取された。採取された検体はコード化された番号を割り振り連結不可能匿名化した。臨床情報と検体とは非連結匿名化した。

C. 研究結果

- ① 合計 77 例の HAM 患者についてウイルス型を決定した。沖縄県の症例では TaxA が 17 例 (63%)、TaxB が 10 例 (37%)、鹿児島県の症例では TaxA が 11 例 (22%)、TaxB が 39 例 (78%) と、沖縄県の症例に HAM 発症リスクが高い TaxA 感染者 (TaxA+) が有意に多いことが明らかになった。
- ② ウイルス型を決定した合計 77 例の HAM 患者について、各症例の PBMC 1 個あたりの HBZ、Tax および FoxP3 mRNA 発現を定量し、ウイルス型、HTLV-1 プロウイルス量 (PVL) との関連を解析した。TaxA、TaxB 感染 HAM 患者 (TaxA+、TaxB+ HAM) いずれの群においても、PBMC 中の HBZ mRNA 発現量と PVL に有意な正の相関が認められた。TaxB+ HAM の感染細胞あたりの HBZ mRNA 発現量は TaxA+ HAM より有意に高かった (図 1)。TaxB+ HAM では、PBMC 中の HBZ mRNA 発現量と FoxP3 mRNA 発現量との間に有意な正の相関関係が認められたが、TaxA+ HAM ではこの相関が認められなかった (図 2)。

D. 考察

HAM 発見当初、同一のウイルスが慢性炎症性疾患 (HAM) と悪性腫瘍 (ATL) 双方の原

因となることから、疾患特異的な株の存在が疑われ検証されたが、否定的な結論が大勢であった。2000 年になって、鹿児島県の HAM 患者、AC、ATL 患者の解析から、HTLV-1 の転写調節因子 Tax の遺伝子配列に 2 つのサブタイプが存在し、そのうちのサブタイプ A (TaxA) を持つ感染者はサブタイプ B (TaxB) を持つ感染者と比較して、HAM 発症の Odds が約 2 倍高いことが報告された (1)。一方、沖縄県には、この HAM 発症率が高い TaxA の感染者が本土に比較して多いとされていたが、多数例での検討はなされていなかった。本研究により、沖縄県の HAM 患者では、本土 (鹿児島県) の HAM 患者より、発症リスクが高い TaxA 感染者が有意に多いことが明らかになった。一方、ウイルス型を決定した合計 77 例の HAM 患者について、各症例の PBMC 1 個あたりの HBZ、Tax および FoxP3 mRNA 発現を定量し、ウイルス型、PVL との関連を解析した結果、TaxB 感染 HAM 患者 (TaxB+ HAM) の感染細胞あたりの HBZ mRNA 発現量は TaxA 感染 HAM 患者 (TaxA+ HAM) より有意に高いこと、TaxB+ HAM では、PBMC 中の HBZ mRNA 発現量と FoxP3 mRNA 発現量との間に有意な正の相関関係が認められるが、TaxA+ HAM ではこの相関が認められないことが明らかになった。これらの結果は、ウイルス型が感染者の生体内におけるウイルス遺伝子、細胞遺伝子の制御に影響することで、最終的な疾患感受性にかかわる可能性を示唆している。興味深いことに、TaxA と同じ変異を持つウイルスに感染しているジャマイカにおいては、HAM の発症率が日本 (本土) の約 6 倍も高いことが報告されている (2)。このことは、沖縄県の HAM 発症率が本土と比較して高い可能性を示唆しており、今後の重要な検討課題である。

<引用文献>

1. Furukawa Y, Yamashita M, Usuku K, Izumo S, Nakagawa M, Osame M: Phylogenetic subtypes of human T cell lymphotropic virus (HTLV) type I in the tax gene and their association with different risks for HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis* 2000, 182:1343-1349. doi: 10.1086/315897.
2. Saito M, Bangham CR: Immunopathogenesis of Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): Recent perspectives. *Leuk Res Treatment* 2012, 259045. doi: 10.1155/2012/259045.

E. 結論

HTLV-1ウイルス型（サブタイプ）の違いにより、感染者の生体内におけるウイルス遺伝子、宿主遺伝子の発現動態が異なる可能性を指摘した。

G. 研究発表

1. 論文発表

齊藤峰輝

HTLV-1 関連脊髄症の病因と病態

神経感染症 17 巻 1 号 p122-131、2012 年

2. 学会発表

（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

国際会議

[1] 11th International Symposium on Neurovirology. New York, USA. 2012.6.1.

Saito M, Tanaka R, Kodama A, Tanaka Y :

Complete prevention of HTLV-1 infection in humanized mice by a neutralizing monoclonal antibody to envelope gp46.

国内会議

[1] 第 53 回日本神経学会学術大会 東京 2012.5.24. 齊藤峰輝、田中礼子、児玉 晃、田中勇悦：抗 HTLV-1gp46 中和抗体による HTLV-1 関連脊髄症に対する新規治療法開発の試み

[2] 第 24 回日本神経免疫学会学術集会 軽井沢 2012.9.20. 齊藤峰輝、田中礼子、田中勇悦：HTLV-1 関連脊髄症発症関連ウイルス多型と HBZ、FoxP3 遺伝子発現の解析

H. 知的所有権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

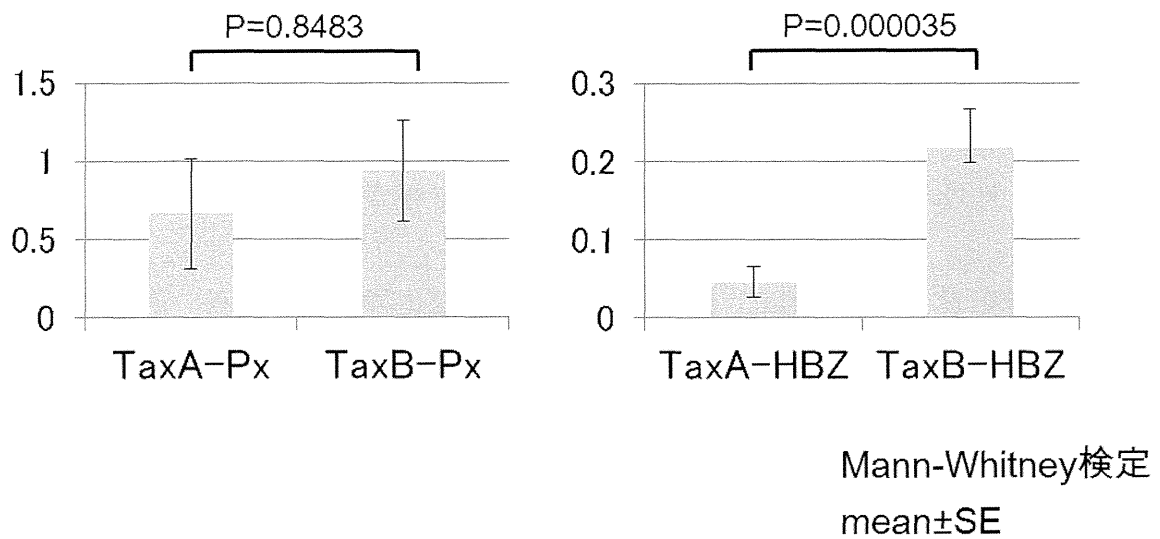
患者、家族、患者会や一般市民への情報提供

齊藤峰輝

「なぜ一部の感染者だけ病気になるのか？ - ATL の発症予防・治療法開発に向けた基礎医学研究の現状と問題点について」

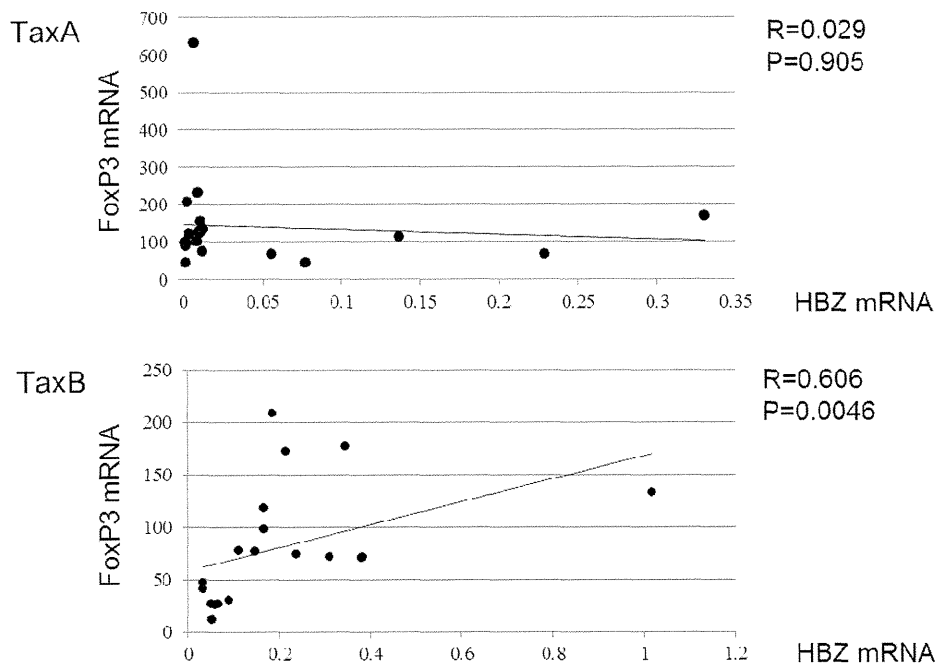
ATL シンポジウム in 沖縄 2013 ~あなたにも知ってもらいたい! 成人 T 細胞白血病 (ATL) 研究の最前線 ~ 沖縄産業支援センター 2013.2.3.

図1：HTLV-1 ウイルス型と HAM 患者の感染細胞あたりの HBZ mRNA 発現量



Tax サブタイプ B (TaxB) に感染している HAM 患者 (TaxB+ HAM) の感染細胞 1 個あたりの HBZ mRNA 発現量は、TaxA に感染している HAM 患者 (TaxA+ HAM) より有意に高い。一方、Tax mRNA 発現量については両群間に有意差を認めない。

図2：HTLV-1 ウイルス型と HAM 患者の感染細胞あたりの HBZ mRNA 発現量



TaxB+ HAM では、PBMC 中の HBZ mRNA 発現量と FoxP3 mRNA 発現量との間に有意な正の相関関係が認められたが、TaxA+ HAM ではこの相関が認められない。

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）

分担研究報告書

HTLV-1 HBZ 特異的 CTL のエピトープ検索に関する研究

研究分担者 久保田龍二 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 准教授

研究要旨：HAM においては、HTLV-1 プロウイルス量が高く、発症の最大のリスクと考えられている。ウイルス感染症においては細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) がウイルス排除に働いており、HTLV-1 感染においては HTLV-1 Tax 蛋白に対する CTL が研究されてきた。近年、HTLV-1 のマイナス鎖にコードされる新たなウイルス蛋白である HBZ が報告され、その mRNA は *tax* より恒常的に生体内で発現していることが報告された。HBZ の生体内での蛋白の発現はよくわかっていないが、発現していればそれに対する細胞性免疫があると推測され、将来の免疫療法の対象となり得る。治療法確立のためにはエピトープの同定および解析が必要であるが、ほとんどわかっていない。そのため、本研究ではエピトープの同定を試みた。インターネット上のエピトープを予測するプログラムを用いて、エピトープ候補を探索し、HAM 患者の末梢血リンパ球を用いてエピトープ候補に反応する CD8 陽性細胞を検出した。結果、HLA-A*0201 に拘束される 2 つの CTL エピトープを同定した。

A. 研究目的

高プロウイルス状態が、HAM 発症に関して最大のリスクと考えられている。一方、ウイルス感染症においてウイルスの排除には、ウイルス特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) が主要な働きをする。近年、HTLV-1 のマイナス鎖に HBZ 遺伝子が同定され、その蛋白質の発現についてはよくわかっていないが、感染細胞内で *HBZ* mRNA は *tax* mRNA より恒常的に発現していることが報告された。HBZ

特異的 CTL については 2, 3 の報告があるのみで、同定されたエピトープは 1 つのみである。CTL を用いた免疫療法を検討するには、主要なエピトープが分かっていることが重要であるため、HBZ 特異的 CTL のエピトープ検索を行った。

B. 研究方法

HLA クラス I の内、アリル頻度が日本人の 5%以上の HLA を選択した。インターネット上の 4 種のメタサーバ

ー (NetMHC、NetCTL、BIMAS、SYFPEITHI) を用いて、HBZ の全アミノ酸配列の内、それぞれの HLA クラス I アリルに高い親和性を持つ 9 個のアミノ酸配列をインシリコで抽出し、ペプチドを合成した。

今回は HLA-A*0201 のエピトープにつき実験を行った。HLA-A*0201 に関して 6 個の 9-mer ペプチドを合成した。HLA-A*0201 陽性の HAM 患者 11 例および無症候性 HTLV-1 キャリア (AC) 10 例の末梢血単核球 (PBMC) に、1 μ M で各ペプチドをパルスし 6 時間培養した。細胞回収後 IFN- γ を指標として、HBZ 抗原特異的 CD8+細胞をフローサイトメトリーで検出した。

次に、IFN- γ の実験で同定された 2 つのエピトープを、HBZ1 と HBZ6 と命名し、このエピトープと HLA-A*0201 のテトラマー合成を行った。これらのエピトープで IFN- γ を産生した HLA-A*0201 陽性 HAM 患者の PBMC をテトラマーで染色し、フローサイトメトリーで確認実験を行った。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

6 個の合成ペプチドのうち、HAM では 4 個のペプチドに対する反応が認

められ、キャリアでは 3 個に対する反応が認められた。HAM では 6 個のペプチドのうち 2 個のペプチド (HBZ1 と HBZ6) が優位に認識され、主要なエピトープと考えられた。11 例の HAM 患者中、3 例で HBZ1 特異的 CD8+細胞が HTLV-1 Tax11-19 特異的 CD8+細胞より高頻度に、1 例で HBZ6 特異的 CD8+細胞が高頻度に検出された。既に報告されている HLA-A*0201 拘束性エピトープである HBZ26-34 に対する免疫反応は、検出できなかった。

さらに、HLA-A*0201/HBZ1 または HBZ6 エピトープのテトラマーで、HBZ 特異的 CD8+細胞が同程度に検出され、HLA 拘束性とエピトープが確認された。

D. 考察

HTLV-1 HBZ に対する細胞性免疫の研究には、Hilburn らの報告がある。20-mer のペプチドプールを用いた研究であり、HTLV-1 HBZ 特異的 CD4+細胞、CD8+細胞を検出しているが、エピトープの同定はおこなっていない。また、Suemori らは、HTLV-1 キャリアの PBMC を用いて候補ペプチドで刺激することで、HLA-A*0201 拘束性エピトープ HBZ26-34 (GLLSLEEEL) 特異的な CTL 株を樹立している。しかし、この細胞株は、感染細胞 killing することはできなかった。本研究では、HAM 患者の PBMC 中には HBZ26-34 ペプチド特異的 CTL は検出できなかった。しかし、

HLA-A*0201 拘束性の新たな HBZ エピトープを2つ同定した。これらのエピトープ特異的 CTL は、HAM の PBMC 中に存在することが示された。このことより、HBZ 蛋白は生体内で発現していることが間接的に証明された。HTLV-1 HBZ の mRNA は恒常的に発現していることが報告されており、本研究で蛋白も発現していることより、これらのエピトープをターゲットとした免疫療法の可能性が考えられた。

本研究では、インターネット上のプログラムを用いることにより、インシリコで候補エピトープを抽出した。4つのプログラムでは、候補エピトープの序列はそれぞれ異なっていたが、共通して認められるアミノ酸配列を候補とすることで、効率的にエピトープを同定することが可能であった。今後、これらの CTL エピトープ予測プログラムが進化することにより、より容易にエピトープが同定されると考えられる。

E. 結論

HAM およびキャリアで HBZ 特異的 CD8+CTL が検出されたことより、HBZ 蛋白は生体内で発現し、抗原提示されていると考えられた。また、HLA-A*0201 に関連する主要なエピトープ候補を2つ同定した。今後、細胞傷害能力につき検討するため、HBZ 特異的 CTL 細胞株を作製中である。また、これらの CD8+CTL が、HAM 患者の PBMC 中の感染細胞を ex vivo

で殺傷するかにつき検討が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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): 1120-7, 2012

2. 久保田龍二: HAM スペクトラム。神経内科。77: 283-8, 2012

2. 学会発表

1. Matsuura E, Watanabe O, Takashima H, Kubota R, Izumo S: HTLV-1-specific cytotoxic T cell migration in the cerebrum of the patients with HAM/TSP. *13th Asian Oceanian Congress of Neurology.* Melbourne, Austria, 2012

2. 久保田龍二、有島志保、松崎敏男、高嶋 博、出雲周二: HAM とキャリアにおける HTLV-I 特異的 CTL 機能の比較検討。第 53 回日本神経学会総会。2012 年 5 月 東京

3. 松崎敏男、久保田龍二、斎藤峰輝、高嶋 博、出雲周二: 早期 HAM の診断基準提唱と臨床。第 53 回日本神経学会総会。2012 年 5 月 東京

4.松浦英治、久保田龍二、高嶋 博：
HTLV-1 キャリアーの脊髄に
HTLV-1 特異的細胞障害性 T 細胞は
浸潤している。第 53 回日本神経学会
総会。2012 年 5 月 東京

5 久保田龍二、有島志保、松崎敏男、
高嶋 博、出雲周二：HAM とキャリ
アにおける HTLV-I 特異的 CTL 機能
の比較。第 5 回 HTLV-I 研究会。2012
年 8 月 東京

6.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

7.松浦英治、久保田龍二、高嶋 博：
HAM および HTLV-1 キャリアの中樞
神経における HTLV-1 特異的細胞障
害性 T 細胞の分布。第 5 回 HTLV-I
研究会。2012 年 8 月 東京

8.久保田龍二、竹之内徳博、松崎敏男、
高嶋 博、出雲周二：HLA-A*24 拘束
性 HTLV-I 特異的 CTL は HAM 発症
リスクを下げるか？第 21 回日本組織
適合性学会大会。2012 年 9 月 東京

9.久保田龍二、有島志保、松崎敏男、
高嶋 博、出雲周二：HTLV-I 特異
的 CTL 機能は HAM とキャリアで異
なるのか？第 24 回日本神経免疫学会。
2012 年 9 月 長野

10.松浦英治、久保田龍二、高嶋 博：
HTLV-1 特異的細胞障害性 T 細胞が
関与する病態に関する検討（HAM 患
者の大脳・HTLV-1 carrier の脊髄の
検討）。第 24 回日本神経免疫学会。
2012 年 9 月 長野

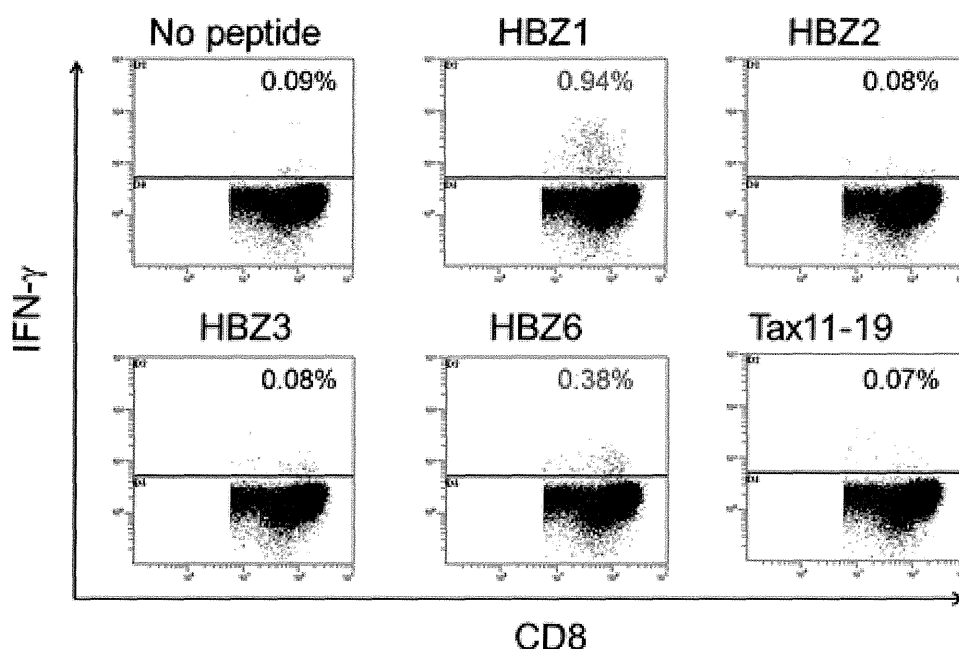
11.久保田龍二、高嶋 博、出雲周二：
HAM 患者 HTLV-1 感染細胞における
免疫反応低下。第 17 回日本神経感染
症学会総会。2012 年 10 月 京都

12.松浦英治、久保田龍二、出雲周二、
高嶋 博：HAM/TSP 患者脊髄・大脳
および HTLV-1 キャリア脊髄におけ
る HTLV-1 ウイルス特異的細胞障害
性 T 細胞の検出。第 17 回日本神経感
染症学会総会。2012 年 10 月 京都

13.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. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし



ズ1. HAMカンジャ#9ノPBMCニソレゾレノペプチドヲ1・Mデテンカシ、brefeldin Aソンザイカデ6時間培養した。細胞を回収後、細胞内IFN- γ と細胞表面のCD8を染色し、フローサイトメトリーで細胞を検出した。図はCD8リンパ球にゲートをかけた細胞中のIFN- γ 陽性細胞を示し、%はその陽性率を示す。HBZ1およびHBZ6に対する反応が認められた。

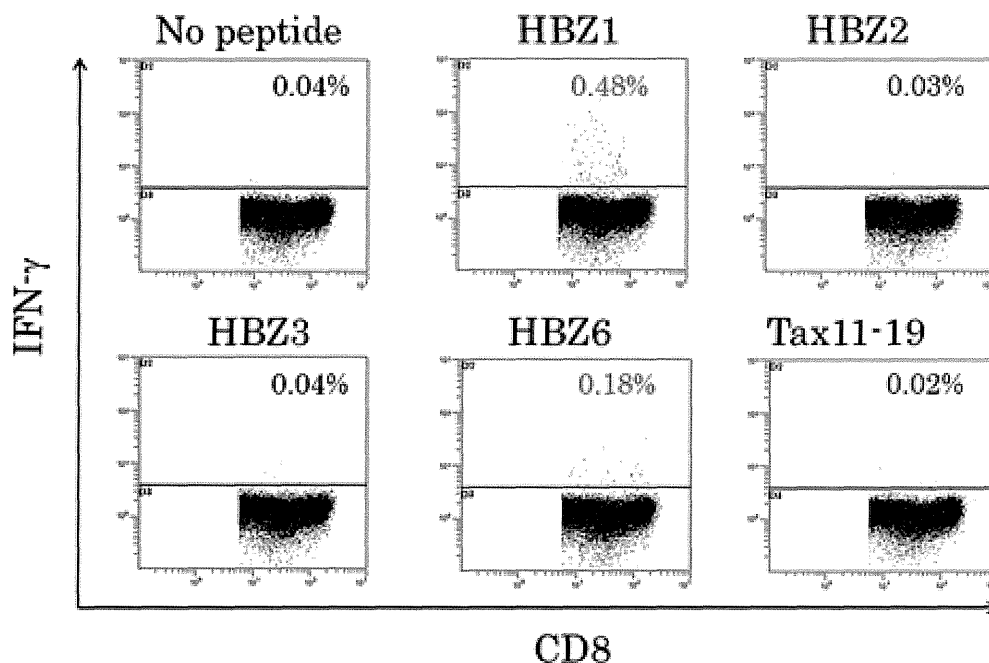


図2. 無症候性HTLV-1キャリア#2の、CD8陽性細胞中のIFN- γ 陽性細胞を示す。HBZ1およびHBZ6に対する反応が認められた。

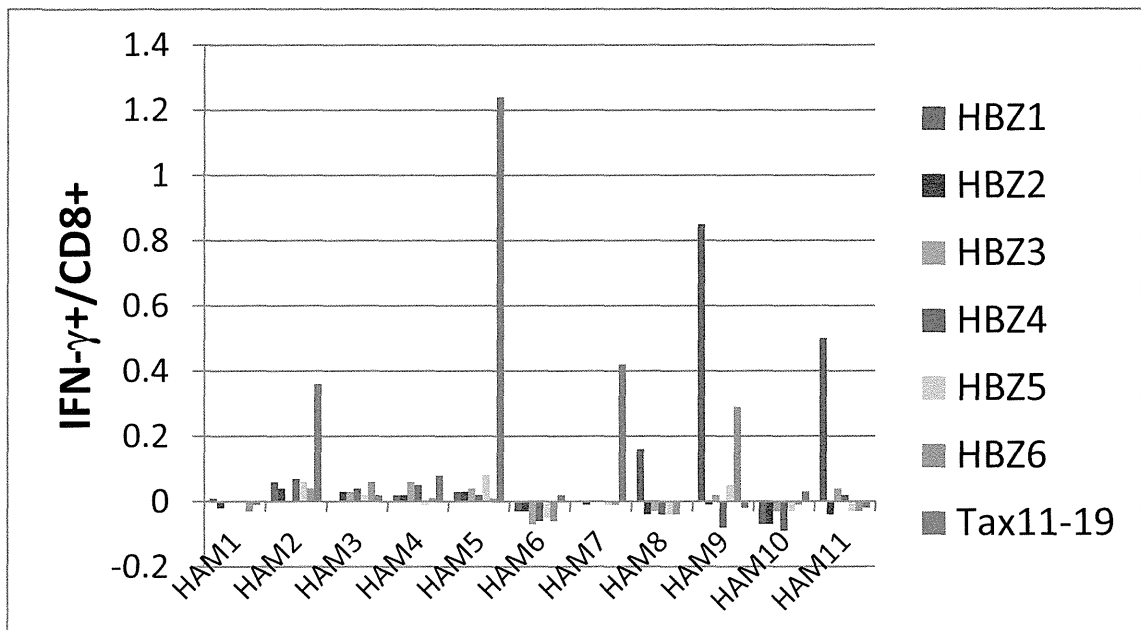


図 3. ペプチド無添加の場合のバックグラウンドで補正した、HAM 患者の末梢血 CD8 リンパ球中の IFN- γ 陽性細胞を示す。HAM8、9、および 11 で、HBZ1 または HBZ6 に特異的 CTL が検出された。

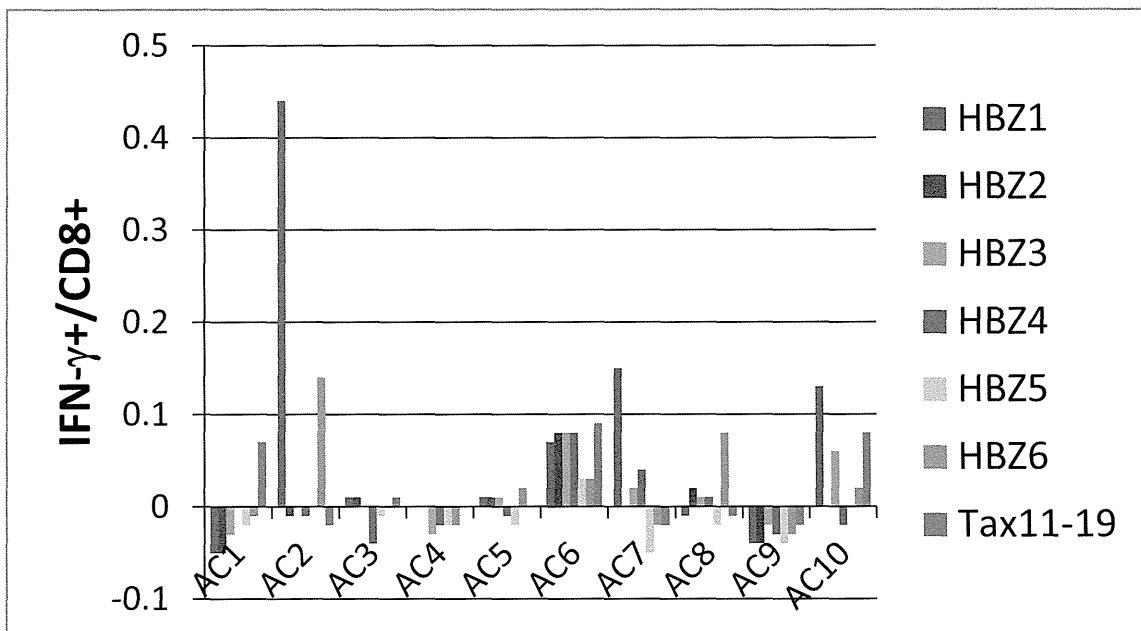


図 4. ペプチド無添加の場合のバックグラウンドで補正した、無症候性 HTLV-1 キャリアの末梢血 CD8 リンパ球中の IFN- γ 陽性細胞を示す。AC2、7、8、および 10 で、HBZ1 または HBZ6 に特異的 CTL が検出された。

HAM 患者髄液のアストロサイトへの影響；microarray 解析に関する研究

研究分担者 原英夫 佐賀大学医学部 教授

研究要旨

HAM 患者髄液中の蛋白がアストロサイトに対してどのような影響を与えているか、網羅的に解析する目的で、アストロサイトを HAM 患者、HTLV-I キャリアー、コントロール髄液とともに培養し、細胞から RNA 抽出後に遺伝子発現にどのような変化が起こるのか GeneChip による遺伝子発現解析を行った。HAM 群とコントロール群の平均値の解析結果では細胞増殖に関連する遺伝子の発現増加が認められた。

A.研究目的

前回、我々は HAM 患者髄液中の蛋白がアストロサイトに対してどのような影響を与えているか、アストロサイトから分泌されるサイトカイン 23 種類の解析を行った。その結果、HAM 患者髄液刺激により MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1)と MIP-1 β がアストロサイトの培養上清中に有意に増加していた。今回は、さらに HAM 患者髄液刺激によりアストロサイトの遺伝子発現にどのような変化が起こるのか GeneChip による網羅的な遺伝子発現解析を行った。

B.研究方法

対象は HAM 患者 2 例、HTLV-I キャリアー 2 例、コントロールとして脊髄炎患者 2 例の髄液をヒトアストロサイト細胞株 NHA-Astrocyte(Clonetics 社)の培養液中に 10%の割合で加え 48 時間培養後、アストロサイト細胞株を PBS で 2 回洗浄し、細胞を cell scraper で機械的にはがし Total RNA を精製した (RNeasy Mini kit, QIAGEN 社)。GeneChip による遺伝子発現解析 : GeneChip は超高密度で数十万種類にわたる多種類の

プローブを搭載した Affymetrix Gene Array(Human Gene 1.0 ST Array)を用いた。ラベル化 cRNA を合成し Array とハイブリダイゼーション後、スキャンし数値化と解析を行った。

(倫理面への配慮)

症例は匿名化され、個人を特定できない状態で検査を行った。

C.研究結果

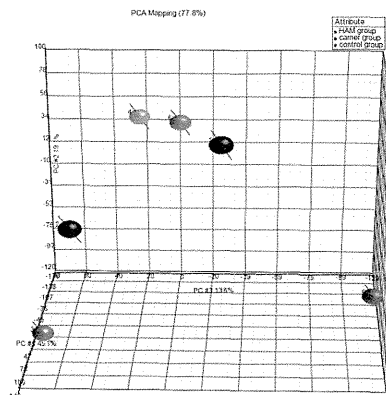
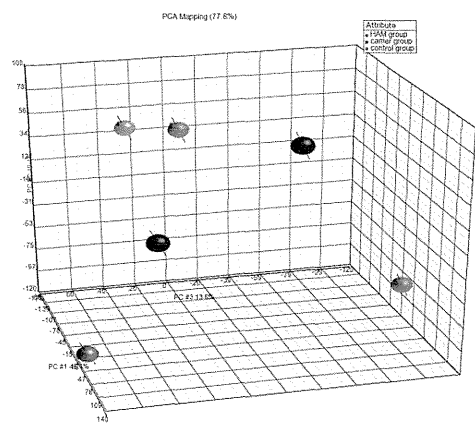
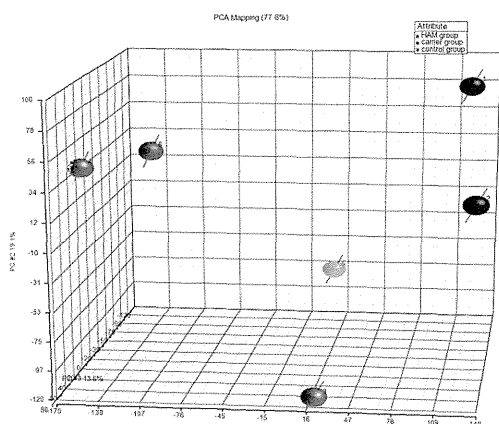
Fold change を ± 1.5 に設定し、p 値を 0.2 以下に設定し解析した。

キャリアー群とコントロール群の平均値の解析結果では、cell division, mitosis, cell cycle, phosphatidylinositol- mediated signaling など生物学的プロセスに関与する遺伝子や kinetochore, spindle pole などの細胞器官などに関連する遺伝子が有意さを示した。一方、HAM 群とコントロール群の平均値の解析結果をみると、Fold change +1.5 では cell division, chromosome, M phase of mitotic cell cycle などの遺伝子が増加し、Fold change -1.5 では BMP receptor binding,

positive regulation of endothelial cell differentiation, SMAD protein signal transduction, endochondral ossification などと関連ある遺伝子発現が減少していた。

D. 考察

今回、患者髄液添加によるアストロサイトでの遺伝子発現の変動を microarray を用いて解析した。通常では p 値を 0.05 に設定するが、今回は例数が少ないため条件を緩和して 0.2 で解析した。



HAM 群とコントロール群の比較では、細胞分裂や細胞器官に関連する遺伝子発現が増加し、一方細胞分化やシグナル伝達に関連する遺伝子の発現低下が認められた。今後は解析数を増やすか、real time PCR を用いた実験を考慮する必要がある。

E. 結論

HAM 患者髄液中の蛋白がアストロサイトに対してどのような影響を与えているか、アストロサイトの培養に HAM 患者髄液を加えて刺激し、遺伝子発現の変化を網羅的に解析した。アストロサイトでは細胞分裂や細胞器官に関連する遺伝子発現が増加していた。

G. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

なし。

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

Carrier vs Control; FC1.5以上発現増加

unknown
IgA-inducing protein
homolog
unknown

Carrier vs Control; 1.5以上発現低下

centrosomal protein 55kDa
non-SMC condensin I complex, subunit G
NDC80 kinetochore complex component
homolog
centromere protein F, 350/400kDa
(mitosin)
Rho GTPase activating protein 11A
protein regulator of cytokinesis 1
centromere protein I
denticleless E3 ubiquitin protein ligase
homolog
histone cluster 1,
sperm associated antigen 5
cytochrome P450, family 24, subfamily A
Rac GTPase activating protein 1
sprouty homolog 4
topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa
microtubule-associated, homolog
growth arrest-specific 2 like 3
centromere protein E, 312kDa
MIS18 binding protein 1
cell division cycle 20 homolog
thyroid hormone receptor interactor 13
PDZ binding kinase
cyclin B2
cysteine-rich secretory protein LCCL
domain containing 2
cancer susceptibility candidate 5
KIAA0101
nei endonuclease VIII-like 3
histone cluster 1, H3i
WD repeat domain 76
myocyte enhancer factor 2C
epithelial cell transforming sequence 2
oncogene
budding uninhibited by benzimidazoles 1
homolog

HAM vs Carrier; Fold change 1.5以上発現増加

function
cell division
chromosome
mitotic prometaphase
M phase of mitotic cell cycle
mitosis
mitotic cell cycle
condensed chromosome kinetochore
spindle organization
cell cycle
kinetochore
chromosome segregation
mitotic cell cycle spindle assembly checkpoint
spindle pole
mitotic spindle organization
protein binding
Ndc80 complex
spindle
chromosome, centromeric region
condensed chromosome outer kinetochore
nucleosome assembly
nucleus
cytoskeleton
CenH3-containing nucleosome assembly at centromere
spindle assembly checkpoint
midbody
cytosol
phosphatidylinositol-mediated signaling
attachment of spindle microtubules to kinetochore
cleavage furrow
kinetochore assembly
regulation of attachment of spindle microtubules to kinetochore
mitotic spindle
cardiac ventricle formation
regulation of G2/M transition of mitotic cell cycle

cornea development in camera-type eye
cell cycle cytokinesis
positive regulation of cell cycle cytokinesis
mitotic cell cycle checkpoint
outflow tract morphogenesis
cellular response to calcium ion
neuron differentiation
protein kinase binding
activation of protein kinase activity
anaphase-promoting complex
chondrocyte differentiation
microtubule-based movement
spindle microtubule
RNA polymerase II core promoter proximal region
sequence-specific DNA binding transcription factor activity
involved in positive regulation of transcription
microtubule
nucleoplasm
cell cycle checkpoint
centrosome
acrosomal vesicle
positive regulation of osteoblast differentiation
ATP binding
osteoblast differentiation
centriole
DNA replication
cell proliferation
negative regulation of gene expression
protein C-terminus binding
positive regulation of neuron differentiation
positive regulation of cell proliferation
regulation of small GTPase mediated signal transduction
cytokinesis
histone deacetylase binding

HAM vs Carrier; Fold change 1.5以上発現減少

function

BMP receptor binding
positive regulation of endothelial cell differentiation
SMAD protein signal transduction
endochondral ossification
male genitalia development
positive regulation of pathway-restricted SMAD protein phosphorylation
eye development
positive regulation of bone mineralization
growth
positive regulation of osteoblast differentiation
osteoblast differentiation
positive regulation of endothelial cell proliferation
BMP signaling pathway
positive regulation of neuron differentiation
cartilage development
kidney development
skeletal system development
cytokine activity
growth factor activity
inflammatory response
protein heterodimerization activity
immune response
positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
calcium ion binding
extracellular space
multicellular organismal development
extracellular region

家族性 HAM の臨床的特徴に関する研究

研究分担者 高嶋博 鹿児島大学医学部医歯学総合研究科 教授
研究協力者 松浦英治、渡邊修 鹿児島大学医学部医歯学総合研究科

研究要旨:HAM 患者では末梢血中の HTLV-1 プロウイルス量が HTLV-1 キャリアに比して優位に高いが、その患者の家族においてもプロウイルス量が優位に高いことが知られている。また、いくつかの HLA の違いや遺伝子多型が HAM の発症因子や抑制因子として知られており、これらのことは HAM の発症には遺伝的背景があることを示唆している。しかし、このように HAM を発症しやすい遺伝的背景を持つ家系の存在が推定されてきたにも関わらず、現在まで家族性に発症した HAM 症例(家族性 HAM)のみを集めて解析した報告はない。今回われわれは家族内に複数の HAM を発症した家系を調査し、それら家系内の HAM 症例(家族性 HAM)を集め臨床的解析を行った。家族性 HAM の臨床的特徴は、当院に入院した連続 124 症例と比較した。その結果、家族性の HAM は HAM 患者全体の 5.1%を占め、発症年齢がおよそ 10 年ほど早く、発症後も進行が遅い傾向が明らかとなった。急速進行する例の割合が低かったこともその要因として考えられた。プロウイルス量は孤発例と差がなかったことから、家族内発症を促進する因子はプロウイルス量以外であると考えられた。

A. 研究目的

HAM 患者では末梢血中の HTLV-1 プロウイルス量が HTLV-1 キャリアに比して優位に高いが、その患者の家族においてもプロウイルス量が優位に高いことが知られている。いくつかの HLA の違いや遺伝子多型が HAM の発症因子や抑制因子として知られており、これらのことは HAM の発症には遺伝的背景があることを示唆している。しかし、このように HAM を発症しやすい遺伝的背景を持つ家系の存在が推定されてきたにも関わらず、現在まで家族性に発症した HAM 症例(家族性 HAM)のみを集めて解析した報告はない。今回われわれは家族性 HAM の血液サンプルを用いて、次世代シーケンサーによる遺伝子解析を行い、家族性 HAM の遺伝的特徴を明らかにすることで HAM 発症のメカニズムを探る。加えて家

族性 HAM の臨床的特徴を明らかにするために、鹿児島大学病院に入院した連続 124 症例の臨床特徴と比較した。

B. 研究方法

1987 年から 2012 年 6 月までに鹿児島大学に登録された全ての HAM 患者のうち、家族内にはほかにも HAM を発症していた症例(家族性 HAM)を抽出し、包括的同意の得られている患者からの血液を用意した。これらのサンプルを次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析し、家族性 HAM 特異的な変異および多型を探索する。家族性 HAM の特徴を明らかにするために、2002 年から 2012 年まで鹿児島大学病院に入院した包括的同意の得られている連続孤発例 124 例の特徴を臨床記録を用いて検討比較した。

(倫理面への配慮)

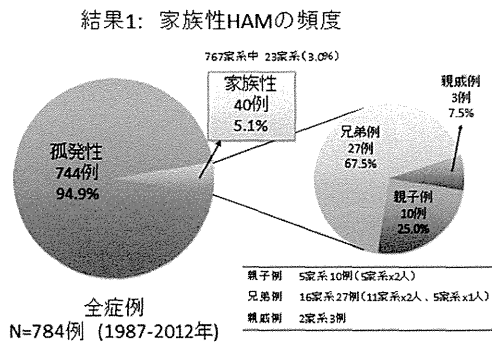
患者情報は連結可能匿名化されたものを用いて解析しているほか、患者情報はこの研究専用に用意されたコンピューターで解析された。

なお、本研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)と「疫学研究に関する倫理指針」(平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号)を遵守し、当大学の両倫理審査委員会による審査を受けている。

C.研究結果

家族性 HAM の割合

データベースを解析した結果、鹿児島大学で登録されている HAM 症例 784 人のうち、家族内に HAM を複数人発症している家系は 23 家系存在し、その家系内 HAM は 40 人(5.1%)であった。



家族性 HAM の臨床的特徴を明らかにするために対象とした鹿児島大学に入院した連続 HAM 患者 124 症例と比較した。

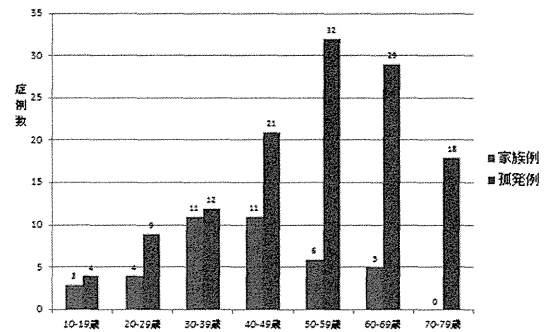
家族性 HAM は孤発性 HAM と比べて、平均年齢がおおよそ6歳ほど若く、発症年齢もおおよそ10年はいことが明らかとなった。(下表)

結果2: 患者背景の違い

	家族性 (N=40)	孤発性 (N=124)	P
性別:男性/女性	7/33	31/93	NS
年齢 (mean ± s.d., range)	55.6 ± 13.0 (23-79)	61.8 ± 12.5 (15-83)	0.008
発症年齢 (mean ± s.d., range)	41.3 ± 13.9 (14-65)	51.6 ± 15.9 (13-78)	<0.001
観察期間 (mean ± s.d., range)	14.0 ± 11.4 (1-49)	10.2 ± 9.6 (0-45)	0.026

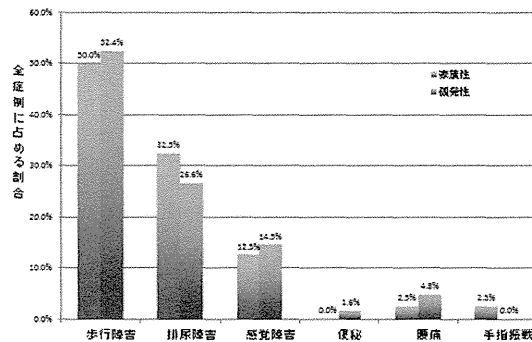
発症年齢別にグラフ化したところその違いはいつそう顕著となった。(下図)

結果3: 家族性HAMは発症年齢が早い



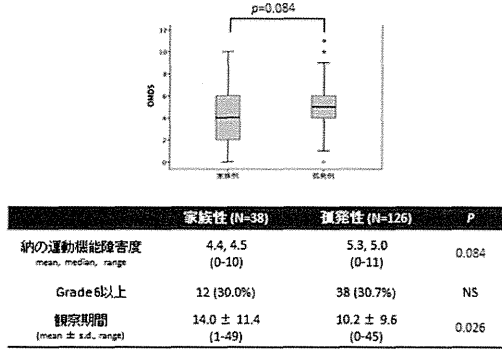
初発症状を検討したところ、どちらの群も歩行障害で発症しており、次いで排尿障害、感覚障害が続き、両群に大きな違いはなかった。

結果4: 初発症状の検討



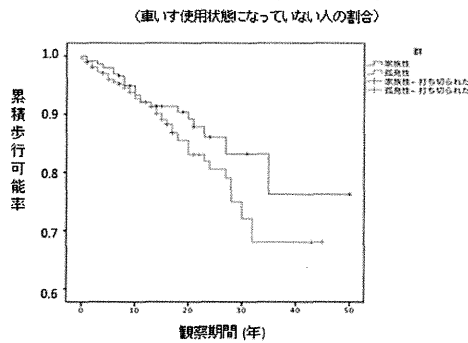
家族性 HAM のそのほかの特徴として、発症年齢が低いのみならず、全体の運動障害度 (OMDS) も家族性 HAM が軽い傾向であった。

結果5: 納の運動障害度(OMDS)



また、発症して車いすになるまでの期間を検討したところ家族性 HAM の方が車いすに至るまでの期間が長いことが判明した。このことが全体として家族性 HAM の障害度が軽いことを反映していると思われた。

結果6: 歩行可能率(杖使用可)



この症状が全体にゆっくりであることに着目し、急速に進行する時期があるか調べたところ、予想通り家族性 HAM が急速に進行する割合が低かった。

結果7: 急速進行例の割合

	家族性 (N=38)	孤発性 (N=126)	P
急速進行群	4 (10.0%)	35 (28.2%)	0.019
発症から車イスまで (mean ± s.d., range)	18.3 ± 12.3 (7-50) (N=12)	10.0 ± 10.4 (1-45) (N=38)	0.025

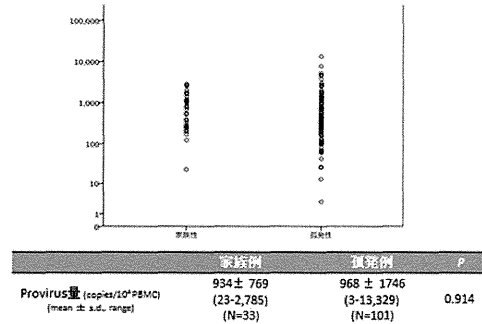
急速進行例: 観察期間2年の間にOMDSで3段階以上進行した症例

家族性の HAM と孤発性 HAM で HTLV-1 抗

体価に違いがあるか調べたが血清抗体価も髄液抗体価も優位な差はなかった。また髄液所見にも両群での差はなかった。

早期に発症する家族性の HAM の HTLV-1 プロウイルス量が高い可能性が考えられたが、検討の結果、両群に差は認められなかった。

結果8: プロウイルス量



D. 考察

家族性 HAM の臨床的特徴は、初発症状は孤発性 HAM と同じで、プロウイルス量に差はないものの、発症が孤発例に比べて焼く 10 年早く、車いすに至る期間も孤発例よりも長い傾向が認められた。急速進行例が少ないことがこの結果に影響をしていると考えられ、脊髄内炎症の程度が異なると考えられ、免疫学的反応に質的相違がある可能性も考えられた。

E. 結論

家族性 HAM には孤発性 HAM と異なる脊髄炎症の病態の存在が示唆され、ウイルス量以外の免疫学的相違がある可能性が示唆された。

G. 研究発表

論文発表

- 1 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

2 Brian Yao, Francesca Bagnato, Eiji Matsuura, Hellmut Merkle, Peter van Gelderen, Frederic K. Cantor, Jeff H. Duyn: Chronic Multiple Sclerosis Lesions: Characterization with High-Field-Strength MR imaging. Radiology, 262(1):206-15, 2012

3 Yoshimi Enose-Akahata, Eiji Matsuura, Yuetsu Tanaka, Unsong Oh, Steven Jacobson: Minocycline modulates antigen-specific CTL activity through inactivation of mononuclear phagocytes in patients with HTLV-I associated neurologic disease, Retrovirology, 9(16) 2012.

4 HTLV-1 と筋炎 松浦英治 久保田龍二 樋口逸郎: Clinical neuroscience. 30(3):322-333, 2012

学会発表

1. HTLV-1 キャリアーの脊髄に HTLV-I 特異的細胞障害性 T 細胞は浸潤している 松浦英治 久保田龍二 高嶋博 2012 年 5 月 第 53 回日本神経学会 (2012.5.東京)

2. HTLV-1 specific cytotoxic T cell migration in the cerebrum of the patient with HAM/TSP. Eiji Matsuura Ryuji Kubota, Hiroshi Takashima. 13th Asian Oceanian Congress of Neurology. Melbourne, 4-8 June 2012

3. HTLV-I 関連脊髄症 (HAM/TSP) 患者大脳、及び、HTLV-1 キャリア脊髄への HTLV-1 特異的細胞障害性 T 細胞の浸潤 松浦英治 高嶋博 久保田龍二 出雲周二 第 53 回日本神経病理学会総会学術研究会 平成 24 年 6 月 30 日 (土) 於新潟

4. HAM および HTLV-1 キャリアの中樞神経における HTLV-1 特異的細胞障害性 T 細胞の分布 松浦英治 久保田龍二 出雲周二 高嶋博 第 5 回 HTLV-1 研究会 平成 24 年 8 月 26 日 (日) 於東京

5. HTLV-1 特異的細胞障害性 T 細胞が関与する病態に関する検討 (HAM 患者の大脳・HTLV-1 carrier の脊髄の検討) 松浦英治 久保田隆二 高嶋博 第 24 回日本神経免疫学会学術集会 平成 24 年 9 月 20 日 (木) 於軽井沢

6. HAM/TSP 患者脊髄・大脳および HTLV-1 キャリア脊髄における HTLV-1 ウイルス特異的細胞障害性 T 細胞の検出 松浦英治 久保龍二 出雲周二 高嶋博 第 17 回日本神経感染症学会 平成 24 年 10 月 20 日 (土) 於京都

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

京都府立医科大学神経内科における HAM 患者の受診状況と治療状況-2012 年-
に関する研究

研究分担者 中川正法 京都府立医科大学大学院 教授

研究要旨

2012 年 1 月から 12 月までに当院を受診した HAM 患者は 37 例（男 18 例、女 19 例）で新規発症者は 8 例（男 1 例、女 7 例）、HTLV-1 キャリアは 2 名（男女各 1 名）であった。HAM リハビリ入院は 4 例に行った。急速進行例は男女各 1 名であった。1 例は頸髄 MRI にて異常信号を認めた。2 例ともにメチルプレドニゾロンの点滴投与が有効であった。ITB 療法を男性 HAM 患者 3 例に行った。3 例ともに下肢痙性および歩行の改善を認めた。HAM 患者の PBMC では、HTLV-1 は FoxP3+CD4+T 細胞に高頻度で感染していた。FoxP3+CD4+T 細胞の割合が増加していたが、健常人の FoxP3+CD4+T 細胞に比べ、GITR と CTLA-4 の発現が有意に低下していた。最近の疫学調査で近畿地区における HAM 患者の増加が指摘されているが、当科でも毎年 5 例以上の新規 HAM 患者を診察している。急性進行例も HAM 患者の 5%程度存在すると推定される。短期集中リハビリテーション、ITB 療法、HAL[®]などを行うことにより歩行の改善がみられており、HAM の治療には薬物療法と継続的なりハビリの併用が重要であることを強調したい。

A. 研究目的

当院における HAM 患者の受診状況、治療状況および末梢血中 CD4+T 細胞の質的、量的異常について報告する。

の前後で比較した。

B. 研究方法

【対象】

受診状況：2012 年 1 月から 12 月までに当院を受診した HAM 患者および HTLV-1 キャリア。

末梢血中 CD4+T 細胞の検討：HAM10 例の末梢血単核球を分離しフローサイトメーターを用いて行った。また、短期間培養を行い Tax の発現を検討した。

HTLV-1 プロウイルス量：関西医科大学微生物学講座にて測定した。

バクロフェン髄注療法（ITB 療法）：ITB 療法のスクリーニングにて有効性が認められた HAM 患者 3 例（58 歳 納の運動障害重症度（OMDS）7 度、34 歳 OMDS 4 度、47 歳 OMDS 5 度の男性患者）。

（倫理面への配慮）

本研究は「臨床研究に関する倫理指針」を遵守して行っている。バクロフェン髄注療法、HTLV-1 プロウイルス量測定は京都府立医科大学倫理委員会での研究実施の承認を受けて実施し、対象者全員からインフォームドコンセントを得た。

【方法】

HAM の急性進行例：発症 2 年以内に両杖歩行レベル以上に悪化、または 3～6 ヶ月以内に OMDS が 1 段階以上の悪化を示す HAM を急性進行例とした。

C. 研究結果

受診状況：2012 年 1 月から 12 月までに当院を受診した HAM 患者は 37 例（男 18 例、女 19 例）で新規発症者は 8 例（男 1 例、女 7 例）、HTLV-1 キャリアは 2 名（男女各 1 名）であった。HAM リハビリ入院は 4 例に行った。

ITB 療法：バクロフェン髄注療法用ポンプの埋め込み術を行い、その後、継続的なりハビリを施行した。三次元動作解析装置（VICOM MX）を用いて、歩行中の計測空間に対する骨盤角度、左右の下肢の各関節角度を計測し、更に歩幅、ケイデンス、歩行速度を ITB 療法

HAM の急性進行例：急速進行例は男女各 1 名であった。56 歳男性例は発症後 2 年以内に OMDS4 度に進行し、48 歳女性例は発症後 1 年以内に

OMDS4度となっていた。1例は頸髄MRIにて異常信号を認めた。2例ともにメチルプレドニゾロンの点滴投与が有効であった。

ITB療法：58歳例は現在バクロフェン 42μg/日、34歳例は60μg/日（下腿にボツリヌストキシン注併用）、47歳例は42μgを投与中である。3例ともに下肢痙性および歩行の改善を認めている。リハビリを併用している。

末梢血中 CD4+T細胞の検討：HAM患者のPBMCではFoxP3+CD4+T細胞の割合が増加していたが、健常人のFoxP3+CD4+T細胞に比べ、GITRとCTLA-4の発現が有意に低下していた。HTLV-1はFoxP3+CD4+T細胞に高頻度で感染していた。

表1. 2012年1月～2012年12月末までのHAM患者受診状況

	HAM 確診例	新規 HAM例	急速 進行 例	HTLV-1 キャリア
男性	18	1	1	1
女性	19	7	1	1
合計	37	8	2	2

D. 考察

HAM患者の受診状況

第3次HAM全国調査で登録されたHAM患者790名の地域分布をみると九州について、関西、関東の順となっている。当科においても毎年5名程度の新規HAM発症者があり、しばらくは同様の傾向が続くのではないかと考える。HAM患者の多くは両親のいずれかが九州・沖縄の出身者であったが、約1割は関西南部のある地域の出身者であった。この地域に以前よりHTLV-1感染者が多いことが推測される。

ITB療法

ITB療法をHAM患者2例に施行し、その安全性と有用性が示された。ITB療法は、下肢筋力がある程度保持されているHAM患者に対して考慮すべき治療法と考える。

末梢血中CD4+T細胞の検討

HAM患者のPBMCではFoxP3+CD4+T細胞の割合

が増加していたが、健常人のFoxP3+CD4+T細胞に比べ、GITRとCTLA-4の発現が有意に低下していた。したがって、HAM患者で増加しているFoxP3+CD4+T細胞は、抑制性機能が低下している事が示唆された。

E. 結論

当科でも毎年5例以上の新規HAM患者を診察している。急性進行例もHAM患者の5%程度存在すると推定される。短期集中リハビリテーション、ITB療法、HAL[®]などを行うことにより歩行の改善がみられており、HAMの治療には薬物療法と継続的なリハビリの併用が重要であることを強調したい。

HAM患者で増加しているFoxP3+CD4+T細胞は、抑制性機能が低下している事が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

中川正法. ウイルス感染と神経疾患. 医学と薬学 68(3):385-392, 2012

Satou Y, Utsunomiya A, Tanabe J, Nakagawa M, Nosaka K, Matsuoka M. HTLV-1 modulates the frequency and phenotype of FoxP3+CD4+ T cells in virus-infected individuals. *Retrovirology*. 2012 May 30;9:46.

2. 学会発表

第85回日本整形外科学会学術総会.
教育研修講演36「日常診療の要点」
中川正法. 「整形外科医が知っておくべき神経内科疾患」
平成24年5月19日（土） 京都

第17回日本神経感染症学会総会学術集会. 会長講演
中川正法. 「レトロウイルスと神経疾患」
2012年10月19日 京都

第53回日本神経学会学術集会.
中川正法、池田 巧、奥田求己、武澤信夫、久保俊一. 「HAM患者に対するバクロフェン髄注療法 (ITB療法) の安全性、有用性の検討」
平成24年5月25日（金） 東京

第49回日本リハビリテーション医学会学術集会.
池田 巧、堀井基行、森原 徹、白石裕一、板東秀樹、近藤正樹、武澤信夫、中川正法、久保俊一. 「重度痙縮に対しITB療法が有効であったHAM (HTLV-I associated