

平成24年度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(難治性疾患克服研究事業)  
「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」

## 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

100

HTLV-1

HTLV-1

HAM

22

HTLV-1

HTLV-1

HAM

日時 11月23日(金.祝日)

9

9

16

場所 かごしま県民交流センター

100 )

講演「HAM研究のこれまでとこれから」

講演「HAMとはどのような病気なのか」

10

講演「HAM治療のこれから」

11

【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

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

分担研究:患者由来感染細胞の網羅的解析法を用いた病態解明、治療法開発の基礎研究:

研究代表者 出雲 周二 鹿児島大学難治ウイルス研 教授

### (1)HAM患者末梢血CD4+T細胞における糖鎖(平成22年度)

HAM患者末梢血CD4+T細胞由来膜蛋白上に特異的な糖鎖発現があるかどうかをレクチンアレイ(LecChip, GP Bioscience)で検討し、N型糖鎖の(Gal  $\beta$ 1-4GlcNc)n を認識するUDA (Urtica dioica agglutinin)、STL (Solanum Tuberosum (Potato)) 両レクチンでの特異的高信号を見出した(図1)。ウイルス粒子を放出させるため放射線照射したHTLV-1感染細胞株と非感染PBMCの共培養系にUDAを約1 $\mu$ M添加すると感染伝播が抑制されるという報告<sup>1)</sup>があり、Cell-to-cell spreadにUDAの認識する糖鎖の関与が示唆される。

### (2)HAM患者末梢血CD4+T細胞におけるシグナル伝達の特徴(平成23年度)

HAM、無症候性キャリア(AC)、陰性対照(NC)各4例の末梢血CD4+T細胞を用いたマイクロアレイ解析で、NCに比べ2 fold change(up/down)以上の変動がありかつ3群間One-way ANOVA(一元配置分散分析)で $p < 0.01$ の遺伝子を有意差発現遺伝子とした。またパスウェイ解析ソフトウェアExPlainと商用パスウェイTRANSPATHにより少なくとも2つ以上の遺伝子をマッピングされるものを有意( $p < 0.05$ )とした。HAMで有意な12個のパスウェイ中11個はすべてGene Xが関与する細胞性ストレスのパスウェイであった(表1)。

HAMの有意差変動遺伝子上流で働く転写因子を明らかにするため、上流領域をアライメントし、転写因子結合サイトのデータベースTRANSFACと照合しHAMで56個、ACで21個の転写因子が予想された。C/EBP、ATF2(CREB2)、GATA1,3など一部を除きHTLV-1との関連がPubMedで報告のない転写因子がほとんどだった。

パスウェイのシグナル伝達の集散が多いもの、すなわちキーノード遺伝子を用いたパスウェイ解析ではHAMではJAK-STAT系、p38MAPKのパスウェイが得られた。ACではJak3、Tyk2、SHP-1、-2、CAS、Crk Lなど比較的細胞膜近くのアダプター分子に関するパスウェイが有意だった。

### (3)HAM病態におけるGene Xのアッセイ方法開発と関連するアポトーシス促進性・抵抗性遺伝子の検討(平成24年度)

HAMにおけるパスウェイ解析で病態への関与が推測されたGene Xは一部の腫瘍や、基礎生物学での研究対象である。しかしHAMのような炎症における役割は知られておらず、アッセイ方法も樹立していない。

そこで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開発を試みた。Gene X阻害剤、刺激剤曝露による細胞濃度変化のセルカウンターTC-2(Bio-Rad)での評価、フローサイトメトリー、Cell Insight(Thermo scientific)・CellomicsによるGene Xの細胞内局在アッセイ(Subcellular localization assay)などの手法開発の他、SYBR Green法によるリアルタイムPCRでの薬剤曝露前後のGene Xおよび関連するアポトーシス促進性・抵抗性遺伝子(p73 $\alpha$ 、MUC1-C)の遺伝子発現解析などの少数例での検討を行った。Gene X阻害剤存在下では特に0.1、1 $\mu$ Mの低濃度で時間経過と共にHAM CD4+T細胞(図2)、CD4-PBMCの細胞減少効果が大きくなる傾向がみられた。Gene X、p73 $\alpha$ 、MUC1-Cとも阻害剤曝露前はHAMで高発現、曝露後はp73 $\alpha$ 以外の2遺伝子は発現抑制傾向がみられた(図3)。以上からGene XはMUC1-Cとの相互作用を介してアポトーシス抵抗性に働くことが示唆された。この相互作用が治療標的となりうると思われる。

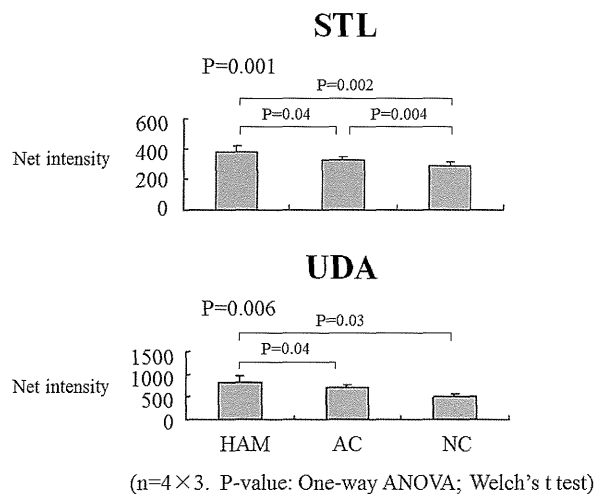


図1. HAM末梢血CD4+T細胞由来膜蛋白のレクチンアレイ解析ではSTL、UDAレクチンが高信号である

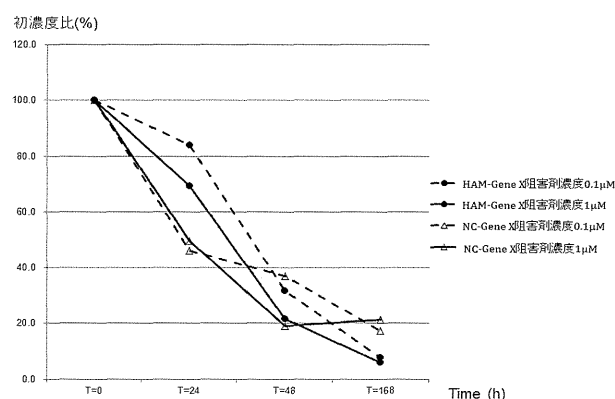


図2. Gene X阻害剤存在下でのHAM/NC CD4+T細胞の細胞濃度の変化

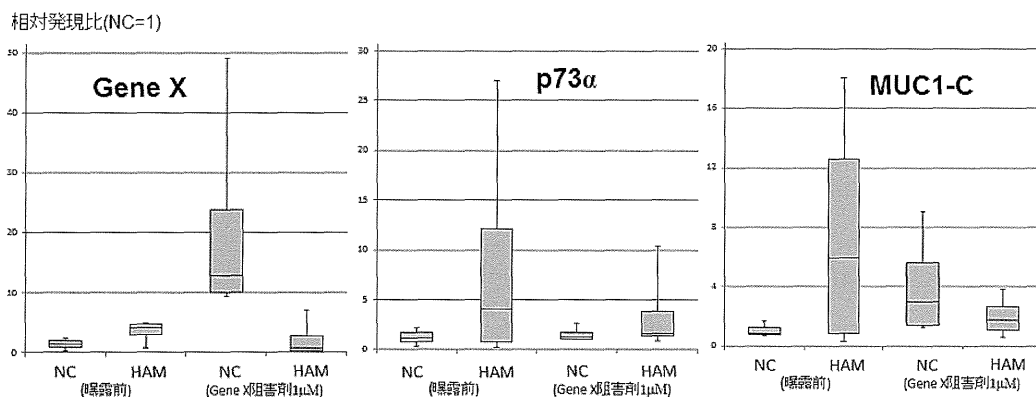


図3. Gene X阻害剤曝露(1μM、48時間)前後でのGene X、p73α、MUC1-C遺伝子のSYBR Green リアルタイムPCRによる発現解析(HAM4例、NC3例、内部対照GAPDH)

Pathway ID	Molecular name	Pathway name	#Hits in group	Group size	#Hits expected	P-value	
CH000003804	<b>Gene X</b>	TOPBP1	2	3	1	0.000213782	
CH000000870		Rad52	2	4	1	0.000425383	
CH000000972		Bcl-xL	2	4	1	0.000425383	
CH000003546		Caspase-9	2	4	1	0.000425383	
CH000000867		p73α	2	5	1	0.000705355	
CH000000908		Caspase-8	2	6	1	0.00105264	
CH000000997		Ubc9 → p73α	2	7	1	0.00146618	
CH000000895		Fas	2	10	1	0.00309403	
CH000000977		p53	2	11	1	0.00376233	
CH000000869		p73 pathway	2	24	1	0.0176695	
CH000000711		SMAD4, Ran, Smurf-1	TGFβ pathway	3	76	1	0.0260633
CH000000879			Caspase network	3	93	1	0.0439147

TOPBP1: DNA topoisomerase II binding protein 1; DNA repair protein RAD52 homolog (S. cerevisiae); p73α: tumor protein p73 isoform α; Ubc9: UBE21(ubiquitin-conjugating enzyme E2); Ran: GTP-binding Ran (ras-related nuclear protein); Smurf-1: E3 ubiquitin-protein ligase SMURF1; cIAP-2: BIRC3 (a member of IAP family that inhibit apoptosis by binding TRAF1 and 2);

表1. HAM末梢血CD4+T細胞における有意差変動遺伝子によるパスウェイ

## 分担研究課題：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

研究分担者 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター 山野 嘉久 准教授

## 研究目的

HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) は希少な神経難病で、患者は歩行障害や膀胱直腸障害によって生涯にわたる QOL の低下を余儀なくされている。また標準的な疾患活動性の評価法や治療法が確立していないため、全国的な HAM の診療レベルに格差があり、満足した治療が受けられていない場合が多い。さらに HAM は疾患活動性に個人差があり、患者毎の活動性に応じて治療方針を決定することが重要であるが、そうした問題点も広く認知されていない。こうした問題を克服し、全国的な HAM の診療レベル向上と標準化を実現するために、本研究では「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」に資する HAM の新規バイオマーカーを同定することを目的とした。

## 方法と結果

(1) ステロイドやインターフェロン等の治療を受けていなかった HAM 患者 53 例を対象とした。これら対象患者の自然経過を解析した結果、HAM の自然経過は、これまでの国外における報告と一致して、数年以内で急速に進行する例や、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。

(2) コントロール群 (HTLV-1 感染者) と比較して HAM 患者群で高値を示すマーカー候補分子を絞り込むために、まず対象 HAM 患者のうち 30 例を training set として、血液中および髄液中のケモカインやサイトカインを含む 28 種類の分子を測定し、ROC 解析等によりコントロール群との比較解析を実施した。その結果、HAM のマーカー候補分子として、3 つの血液マーカー (sIL-2 受容体、CXCL10、HTLV-1 プロウイルス量) と 5 つの髄液マーカー (CXCL10、CXCL9、ネオプテリン、細胞数、HTLV-1 抗体価) を決定した。

(3) 次に、(1) で得られた自然経過データを用いて、最近 4 年間で納の運動障害重症度が 3grade 以上進行した悪化例と 1grade 以下の進行にとどまる安定例を定義し、training set 中の両群について血液および髄液中のマーカー候補因子の値を比較し、HAM の「進行度との関連」を調べた。その結果、血液マーカーはすべて有意差を示さなかったのに対して、髄液マーカーはすべて有意差を示した (図1A)。なかでも髄液中の CXCL10、ネオプテリン、CXCL9、細胞数は悪化例と安定例を分別する能力に優れていた (AUC > 0.8, 図1B)。これらマーカーの HAM を検出する「感度」を調べると、髄液細胞数のみ著しく「感度」が低かった (図1C)。

(4) 上記の結果を検証するため、training set とは異なる HAM 患者 23 例を test set を用いて、validation を実施した。その結果、末梢血プロウイルス量よりも髄液マーカー (CXCL10、ネオプテリン、細胞数) が HAM の「進行度との関連」が強いことが確認された (図2A)。さらに感度についても test set を用いて調べると、training set の結果と同様に髄液細胞数のみ「感度」が低く、「髄液 CXCL10」および「髄液ネオプテリン」は「感度」が高いことが確認された (図2B)。

## 考察と結論

HAM の進行度と密接に関連するマーカー (prognostic biomarker) 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 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が日常診療で活用されるための取り組みを進める必要性が高い。

図1 マーカー候補分子の「進行度との関連」及び「感度」の比較 (training set を用いた解析)

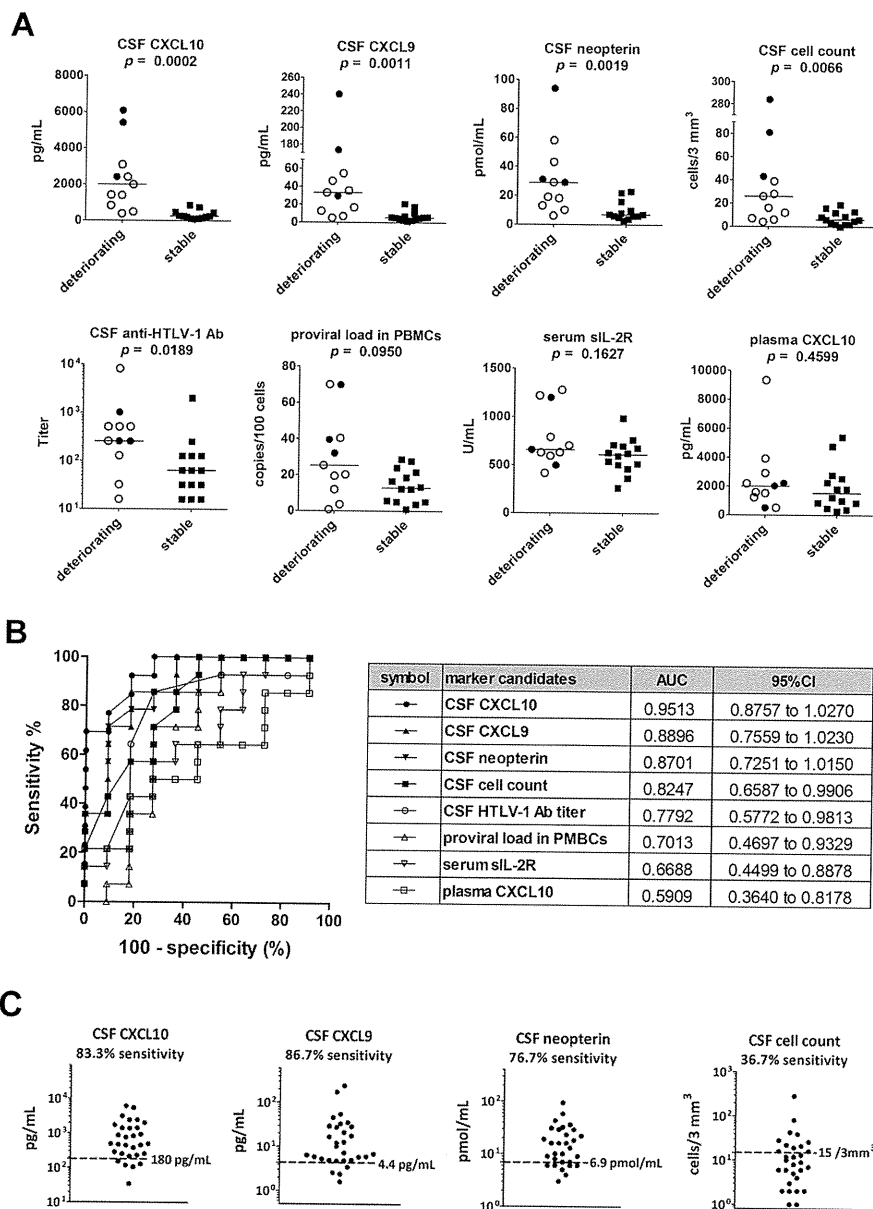
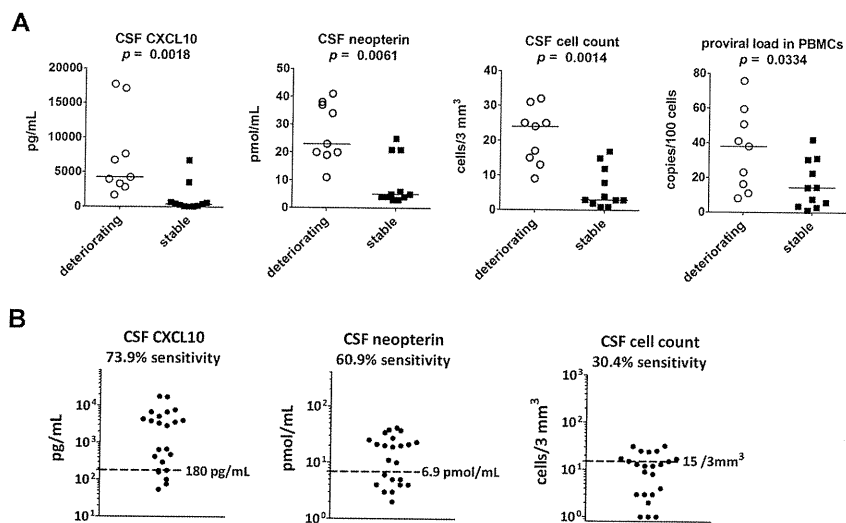


図2 マーカー候補分子の「進行度との関連」及び「感度」の比較 (test set を用いた validation)



分担研究課題：生体内 HTLV-1 感染拡大機序の解析と新規治療法の開発

中村龍文 長崎大学 准教授

(平成 22 年度)

#### HTLV-I 感染伝播効率に関与する細胞内骨格再構成シグナルの解析

HTLV-I は細胞接着分子で構成される virological synapse を介して cell to cell で感染していくが、その際細胞内骨格の再構成が関与している可能性がある。HTLV-I の細胞間感染伝播に関与する因子としての actin polymerization の役割について検討した結果、細胞内 cAMP 濃度によって制御される actin polymerization という細胞内骨格再構成は HTLV-I の感染伝播効率を規定する一因となっている可能性が示された。HAM 患者における末梢血 HTLV-I 感染細胞の増加の一因として、効率のいい HTLV-I の細胞間感染伝播の可能性が考えられているが、そこには HAM 患者 HTLV-I 感染細胞では細胞内 cAMP 濃度を低く設定し、vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) のリン酸化を制御することによって惹起される actin polymerization の関与が考えられた。このことは、HAM 患者 HTLV-I 感染細胞の高い組織浸潤能にも関与している可能性がある(図 1)。

(平成 23 - 24 年度)

#### HAM に対する経口プロスルチアミン療法

我々は HTLV-I 感染細胞のアポトーシスを惹起し得るプロスルチアミン(アリナミン®)(図 2)による HTLV-I 感染細胞を標的とした HTLV-I 関連脊髄症 (HAM) に対する新規治療法としての本薬剤による静注療法の有効性を報告してきた。しかし、HAM に対する治療法を考える場合、長期に亘る治療を必要とし、その場合経口投与による治療法の開発が望まれる所である。そこで、プロスルチアミンの経口療法(300mg/日、12 週間連日投与)による臨床試験を 24 例の HAM 患者に試み、その有効性と安全性を検証した。その結果、Osame による運動機能障害度において 3 例で 1 段階の改善がみられた。さらに、痙縮の改善を基盤とした歩行時間・階段降時間の短縮で示されるように下肢運動機能の明らかな改善がみられた。膀胱機能については、尿流動態検査における膀胱容量、排尿筋圧、および最大尿流率において著明な改善が得られたと共に、HAM で特徴的にみられる排尿筋括約筋協調不全および排尿筋過活動はそれぞれ 11 例中 5 例および 16 例中 11 例で消失した。末梢血では HTLV-I プロウイルス量は平均で約 15.4%有意に減少した(図 3)。重篤な副作用の出現は認められなかった。これらの事実よりプロスルチアミン経口薬は HAM に対する有望な新規治療薬となり得る可能性が示された。

図 1 HAM患者における HTLV-I感染細胞内cAMP濃度とactin polymerizationの関係

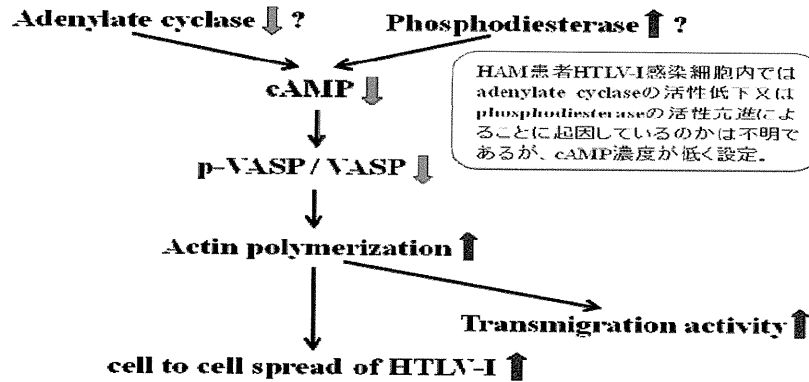


図 2 ProsultiamineによるHTLV-I感染細胞傷害性のメカニズム

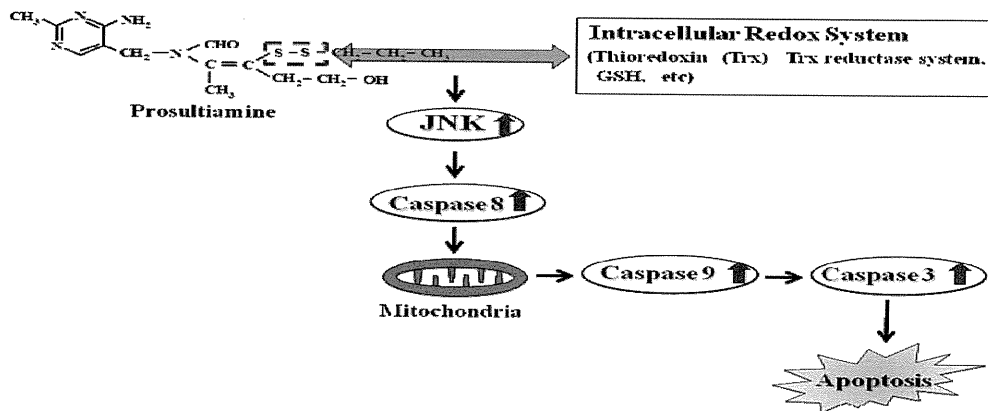


図 3 HAMに対する経口プロスルチアミン療法の有効性と安全性

- ・対象：24例のHAM患者
- ・薬剤投与：カプセル化プロスルチアミン(アリナミン®) 300mgを1日1回、12週間連日、経口投与

- 1) Osameによる運動機能障害度において3例で1段階の改善
- 2) 神経学的には痙縮の改善を基盤とした下肢運動機能の改善
- 3) 泌尿器科学的には、尿流動態検査における膀胱容量、排尿筋圧、および最大尿流率における著明な改善とDSDおよびDOのそれぞれ11例中5例および16例中11例での消失
- 4) 末梢血HTLV-Iプロウイルス量の約15.4%の有意な減少
- 5) 安全性：3例での軽度の上腹部不快感のみ

分担研究課題： Cell free HTLV-I の感染機構の解明による HAM の新規治療法の開発

研究分担者 星野洪郎 群馬大学 客員教授

我々は、一般的にウイルスの感染した T 細胞株より付着細胞の方が扱い易いという意識から、色々な T 細胞株から HTLV-1 を付着細胞株に伝搬させ、持続感染細胞を作る試みを長らくやってきた。HTLV-1 産生 T 細胞株と付着細胞を混合培養するとよく合胞体が形成される。しかし、この培養を続けても多くの場合、持続感染細胞株は得られない。我々の試した中では、ヒト細胞では HOS 細胞のみ稀に、またネコ由来のいくつかの細胞では比較的容易に、持続感染細胞が樹立できた。HTLV-1 の持続感染を許容する細胞の特徴が何なのか興味を持っているがまだ決められていない。

一方、持続感染を維持できる HTLV-1 株も限られている。HAM/TSP 患者由来と言われているメラネシア株 Mel5、ATL-2M 細胞の産生する 2M 株、MT-2 細胞の HTLV-1 が感染したラット由来の Ra-1 細胞の産生する MT-2 株、HAM 由来の HCT-5 細胞の産生する HTLV-1 株などである。限定された細胞株を用いた時に比較的容易に持続感染が成立するが、こうした HTLV-1 の分子生物学的特徴の解明も今後の課題として残った。

ネコ由来の付着細胞を用いると非常にタイトーの高い cell-free ウイルスを調整できた。また非常にタイトーの高い VSV pseudotype ウイルスもその利用で作製できた。新しい付着細胞に接種すると HTLV-1 感染を継続でき、一般のウイルスと似たような条件で感染実験、中和実験、薬剤スクリーニング実験などが可能であった。

混合培養による HTLV-I 持続産生細胞の樹立 (図 1)

HTLV-1 感染細胞とその感染ウイルス株 (括弧内に表示) としては、コスモポリタン株を産生する ATL-2M (2M 株)、Ra-1 (MT-2 株)、HCT-5 (HCT-5 株)、HOS/PL (PL 株)、またメラネシア株を産生する SI-5 (Mel5 株)、などを用いた。このほかのコスモポリタン株の HTLV-1 の感染細胞としては、HAM 由来の HCT-1、HCT-4 細胞株、コスモポリタン株感染ヒト細胞株 ATL-3I、ATL-5S、C91/PL、HUT102、KT-252、MT-2、MT-4、ラット由来細胞株 TARS-1、TART-1 などを用いた。一方、HTLV-1 感染の標的の付着細胞株として、ネコ由来細胞株 8C、8C/Tax、PG-4、G355-5、Fc2Lu、ヒト由来細胞株 HOS、U-251MG、HeLa、MOLT-4、Jurkat などを用いた。

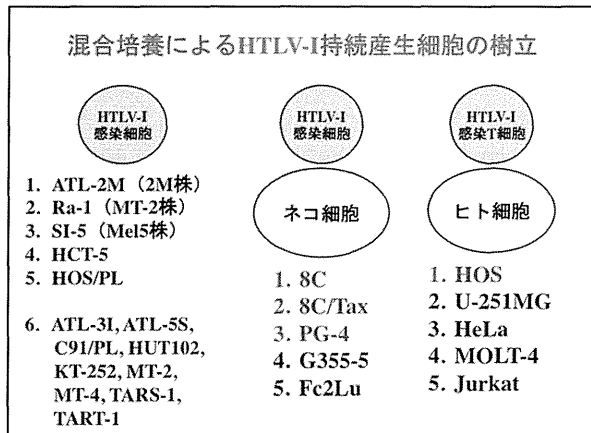
これらの細胞を用いた検討では、感染性の高い cell-free HTLV-1 株としては、2M 株、MT-2 株、Mel5 株が得られた。HTLV-1 の持続感染できる付着細胞としては、8C 細胞および HTLV-1 の Tax を発現させた 8C/Tax 細胞、ネコグリオーマ由来 PG-4 細胞 (すなわち S+L-G355-5 細胞)、ヒト骨肉腫由来 HOS 細胞を確認した。Cell-free HTLV-1 の感染標的細胞の中で最も Entry での感受性の高い細胞株は U251MG であったが、HTLV-1 の持続感染した U251MG 細胞株は得られなかった。一方、HOS 細胞は cell-free HTLV-1 への感受性は余り高くないが、HTLV-1 の持続感染した細胞株が得られた。HAM 由来の HTLV-1 では、HCT-5 細胞の産生する HTLV-1 は感染力が高かった (図 2)。

感染性の高い HTLV-1 株については、その遺伝子構造に特徴があるはずである。また、HTLV-1 の持続感染が成立し易い細胞株についてはその細胞表現型に特徴があるはずである。これらの特徴の解明は今後の課題であるが、こうした研究は、HTLV-1 の新たな生物学的特徴やその病原性の解明につながりうる研究であると考えている。

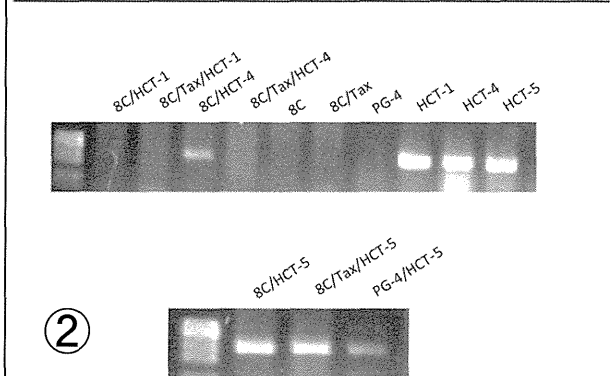
上記の系を応用し、HAM 患者血清中に高い HTLV-1 感染阻止抗体 (侵入阻止抗体といわゆる中和抗体) を検出できた (図 3)。色々な温度における HTLV-1 の感染性の半減期はおおむね 1 時間であった (図 4)。他のレトロウイルスと比べて HTLV-1 の不安定性は、その外被タンパク質の isomerization が起り易いためと推定している (図 5)。色々なヒト細胞株の HTLV-1 感受性は、heparan sulfate proteoglycan (HSPG) の発現、特に細胞あたりの発現数とグリカン鎖の長さ、で説明できた (図 6、7)。また、いくつかある Chondroitin sulfate で、特に E 型に HTLV-1 感染阻止活性を見いだした (図 8)。



①



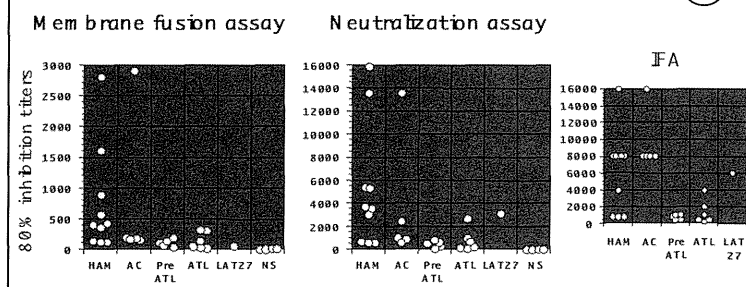
### HAM由来HTLV-Iのネコ由来細胞への混合培養での感染



②

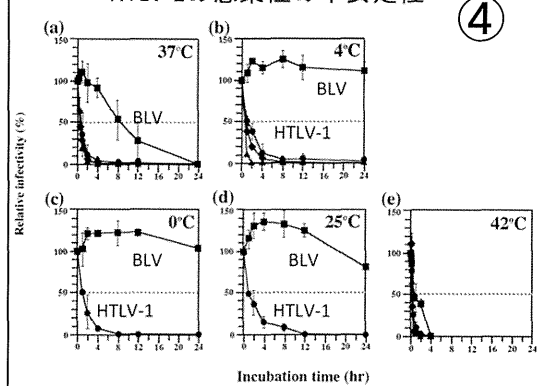
### Titration of human sera

③



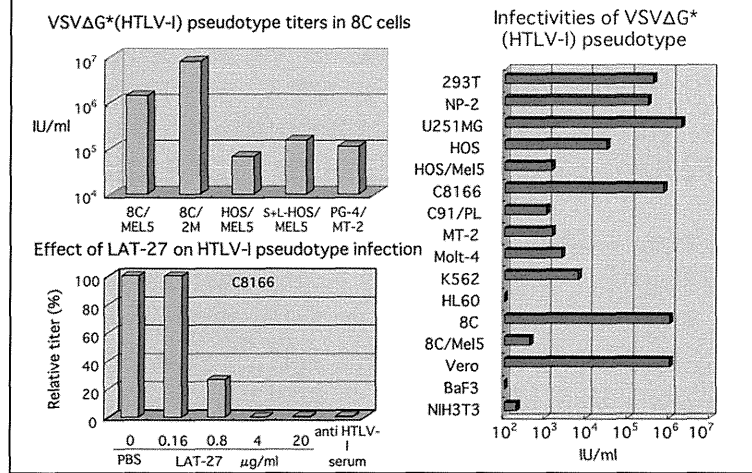
### HTLV-Iの感染性の不安定性

④

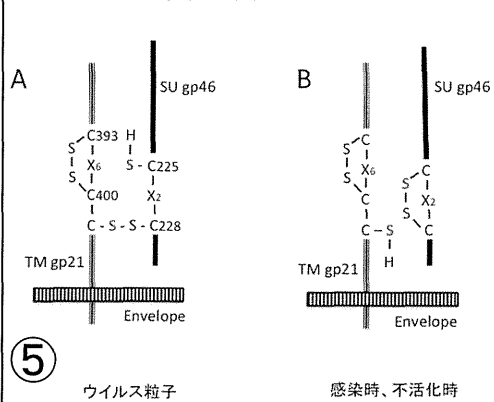


⑥

### VSV(HTLV-1) pseudotype の作成と各種細胞への感染



### HTLV-1 Envのisomerizationのシエーマ



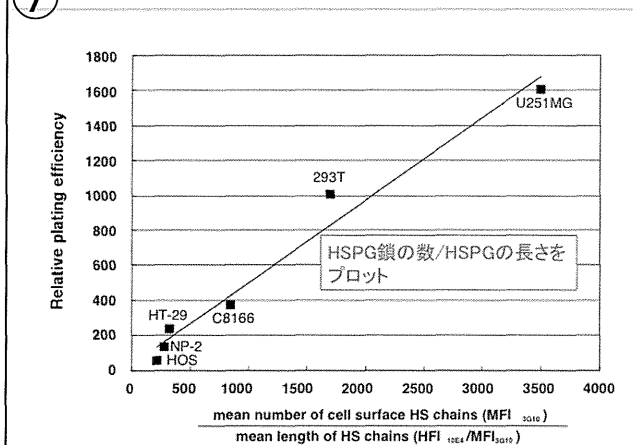
⑤

ウイルス粒子

感染時、不活化時

⑦

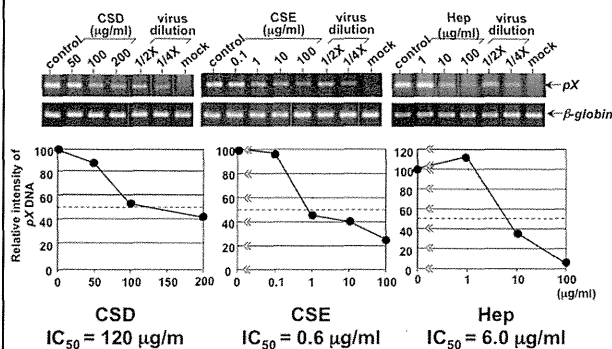
### 細胞株のHTLV-I感受性とHSPGの特徴との相関



### CSD、CSE、HepによるHTLV-I感染抑制

⑧

標的細胞: MOLT-4



分担研究課題：世界最先端のプロテオーム解析技術を駆使した HAM 重症度指針  
マーカーの分子の同定

研究分担者 氏名 植田 幸嗣 独立行政法人理化学研究所 上級研究員

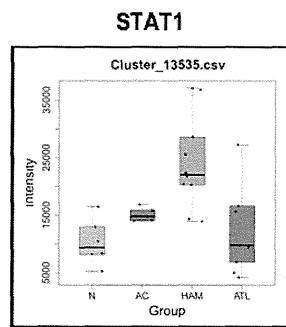
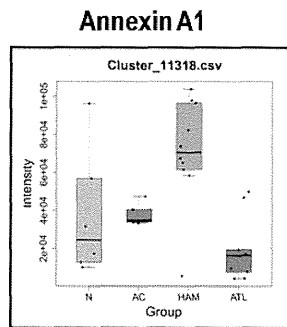
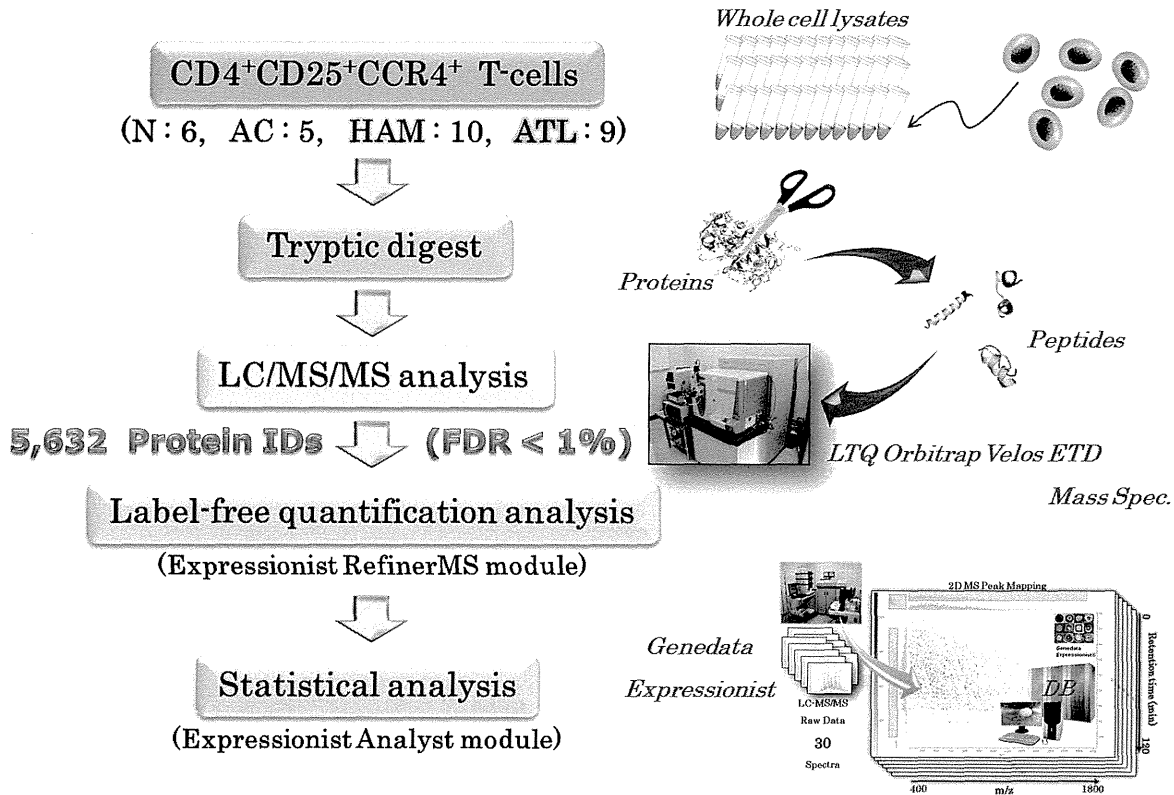
本研究では、HAM 重症度指針マーカーのターゲットとなりうる分子を世界最先端のプロテオーム解析技術を駆使して同定することを目的とし、患者由来末梢血細胞、脳脊髄液の網羅的分析を行った。

30 症例の CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>T 細胞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、4 病理群（非感染健常者、感染無症候患者、HAM 患者、ATL 患者）分類のためのこれまでに報告のない 17 種の新規決定因子同定に成功した。この結果は、HTLV-1 が優先的に感染する T 細胞のサブタイプのみならずフォーカスしたプロテオーム解析が、同ウイルスに起因する疾患のバイオマーカー探索に極めて有効であったことを示している。これら 17 分子は知財化の後、民間企業にて HAM、ATL 診断薬としての開発が進んでいる。

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では、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。

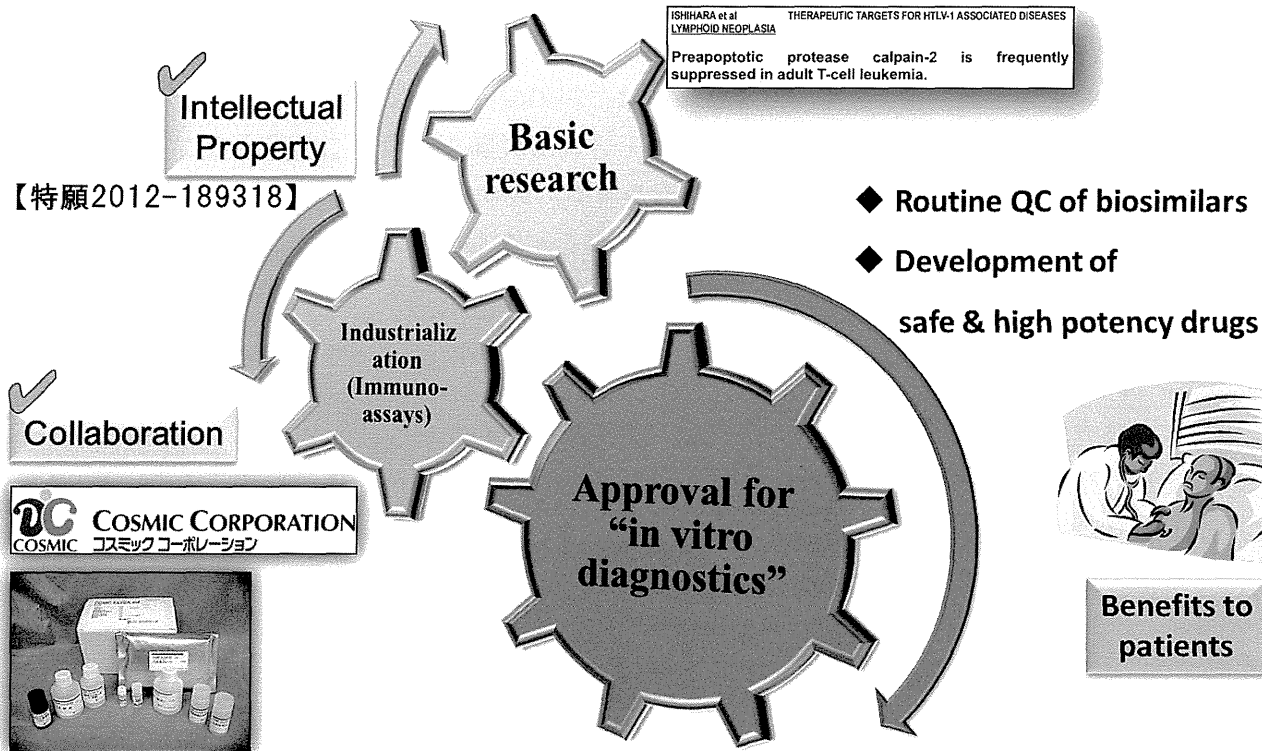
同 14 種類の同定タンパク質の中には、疾患の進行に伴って有意に減少傾向を示すものも多く発見されたが、これらのほとんどは神経の脱髄との関連が報告されている分子群であり、HAM の病態進行に伴って起きるとされる脱髄を客観的に示唆することができるバイオマーカーとなりうる。ELISA 系の構築に成功した候補タンパク質の中には HAM 患者血漿中においても重症度に依存して変動を示すものを確認することができ、現状の脳脊髄液診断法よりも安全で非侵襲的な重症度指針マーカーを開発することが出来ると考えられた。

本研究から同定されたバイオマーカー候補分子に対する定量的イムノアッセイを構築し、診断薬化することができれば、HAM の疾患活動性を客観的に定義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と期待される。



ISHIHARA et al  
LYMPHOID NEOPLASIA

Preapoptotic protease calpain-2 is frequently suppressed in adult T-cell leukemia.



分担研究課題： gp46 - 197 ペプチドのアミノ酸構造の特徴について

小嶋 英二郎（福山大 薬）、白木 洋（横浜薬大）

gp46 - 197 ペプチド領域は HTLV-1 gp46 蛋白上の Prolin-Rich 領域 (PRD) に存在し、70 kDa 常在性熱ショック蛋白 (HSC70) との特異的相互作用を介してウイルスの細胞内侵入に寄与している。近年、この PRD は膜融合を介した細胞感染において、ウイルスの感染受容体への接着後に惹起されるウイルス外被蛋白の構造変換、解離、さらに膜融合蛋白の活性化に重要であることが明らかにされ、HTLV-1 感染治療薬の新しい標的領域として期待されている。

HTLV-1 感染症の特徴の 1 つに、感染から病気の発症までに長い潜伏期間を有すること、しかも病気を発症するとその病態が急速に進展することが挙げられている。これまで、筆者らは無症候性感染者の gp46 - 197 ペプチド領域に対する抗体の発現は極めて稀であるが、ATLL 発症患者では高頻度で発現し、しかも発現頻度および抗体産生量は病態の悪化に伴って増加することを見出していた。gp46 - 197 ペプチド領域は HSC70 に対する特異的な結合部位であり、しかも HSC70 分子は免疫細胞に対する抗原提示能があることが知られている。これらの結果は gp46 - 197 ペプチド領域を介したウイルスの感染・伝播が、感染から病気発症に至る全感染期間のごく一部で限定的ではあるが作動していること、しかもそれが病態の進行に関連している可能性を示唆している。本研究では、このような視点に立ち、gp46 - 197 ペプチドによる HTLV-1 感染防止の分子機構を解析し、PRD 領域及び HSC70 を標的とした薬剤の開発、さらにその低分子化について基礎的検討を行った。

これまでに以下のような結果を得ている。1) ATLL 患者血清と同様に、HAM 患者血清中に抗 gp46-197 ペプチド抗体が高頻度に出現すること、2) gp46 - 197 ペプチドの HSC70 との結合には、197Asp から 209Lys の領域の塩基性アミノ酸の存在が重要であること、さらに 3) gp46-197 ペプチドは HSC70 の 25KDa 蛋白・ペプチド結合領域に結合していること等を明らかにした。これらの知見を踏まえて、4) ペプチドフェージライブラリーを用いて gp46 - 197 と HSC70 相互作用のアミノ酸構造の特徴を解析した。表 - 1 にそれぞれの分子間で相互作用を引き起こす構造的特徴を示す。この分子間相互作用発現において、gp46 - 197 ペプチド領域の N 端側イオン性アミノ酸部分が重要な役割を担っていることが示された。これにより HAM の発症および増悪を抑える可能性があるターゲット部位の特定ができた。

表-1 gp46-197 ペプチドとそのリガント間の相互作用での

gp46-197 ペプチドの  
構造的特徴

- ◇ gp46-197 ペプチド領域を介した HTLV-1 の感染は、201Glu とその周辺荷電領域が重要な役割を担っている。
- ◇ 201Glu とその周辺の荷電アミノ酸領域は、塩基性アミノ酸を適度に含む helix 構造と相互作用する。

リガントの構造的特徴

- ◇ gp46-197 ペプチドとの相互作用には、 $\beta$ -sheet 構造よりも  $\alpha$ -helix 構造の寄与が大きい
- ◇  $\alpha$ -helix 構造をとるような疎水性アミノ酸と親水性アミノ酸のバランスが重要
- ◇  $\alpha$ -helix 構造上の親水性アミノ酸領域に、イオン性のアミノ酸が適度に配置されている

分担研究課題：

- ① HTLV-1 感染細胞の性状を明らかにする
- ② HTLV-1 特異的 CTL の性状を明らかにする

鹿児島大学難治ウイルス研・久保田龍二

#### ①HTLV-1 感染細胞に関する研究

我々は、末梢血中の HTLV-I 感染細胞の表面抗原解析と、免疫機能について検討し、その表面マーカーは CD2+CD4+CD5+CD26-CD45RO+CD45RA-CCR4+CCR7-であった。感染細胞では TCR および CD3 の発現が低下しており、HAM では正常コントロールと比べ、CD4+細胞の TCR シグナルは低下していた。同一患者の感染細胞は、非感染細胞より有意に TCR シグナルは低下していた。以上の結果より、HAM の HTLV-I 感染細胞は TCR/CD3 の発現が低下しており、そのため TCR からのシグナル伝達が不十分となり、免疫能が低下していると考えられた。

#### ②HTLV-1 特異的 CTL に関する研究

HAM 患者では HLA-A\*24 頻度が優位に高く、HLA-A\*24 陽性 HAM 患者は陰性 HAM 患者より、優位にウイルス量が低く、また HTLV-I ウイルス量と HTLV-I 特異的 CTL の頻度は負の相関を示した。HLA-A\*02 陽性者では HTLV-I 特異的 CTL はウイルスを減らしながら、逆に HAM では頻度が低い。この差異が CTL のウイルス殺傷能の違いによるのかを明らかにするため、HLA-A\*02 および A\*24 に拘束された CTL の機能比較を行った。最大刺激でのサイトカインやケモカインの産生および CTL 活性は両者に差がなかったが、機能的 avidity は HLA-A\*24 拘束性 CTL では HLA-A\*02 拘束性 CTL の約 50 倍強かった。以上より、HLA-A\*24 特異的 CTL は HLA-A\*02 特異的 CTL よりも優位にウイルス排除を行う一方で、HLA-A\*24 は HAM 発症のリスクを高めることより、HLA-A\*24 拘束性 CTL はそれ自身で HAM 発症のリスクをあげる可能性がある。

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 に対する細胞性免疫反応を増強することで、HAM 免疫療法となる可能性がある。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。

図 1. HTLV-1 感染細胞での TCR の発現低下と免疫反応の低下。A: HAM 患者末梢血 HTLV-1 感染 CD4+細胞では、TCR の発現がほとんど消失している。B: HAM の感染細胞では、TCR からのシグナル伝達分子 Lck のリン酸化は低下している。

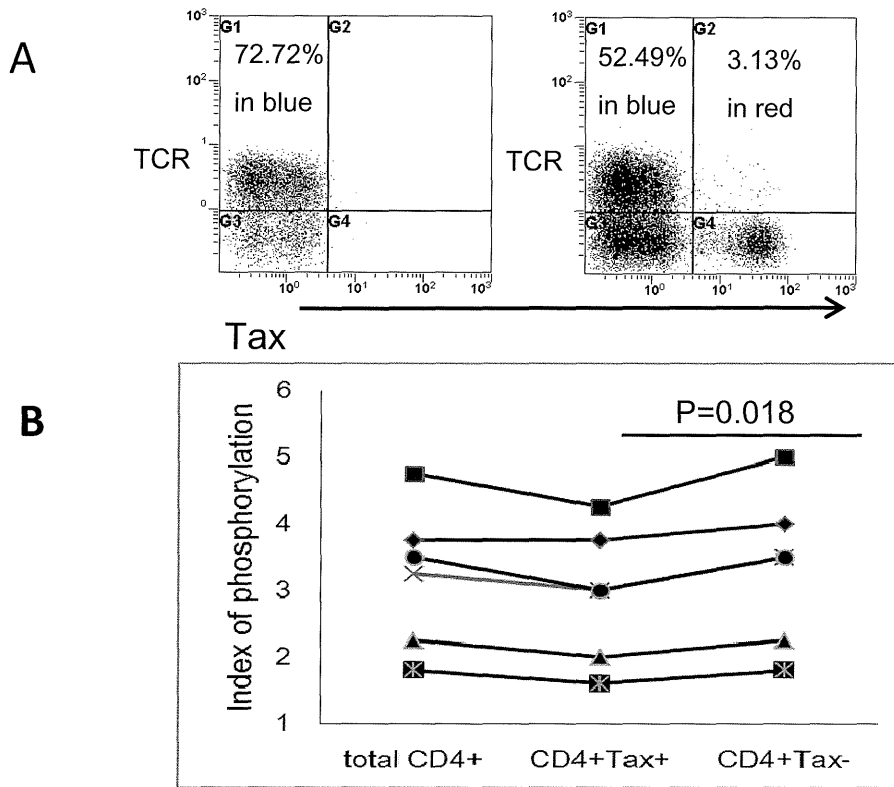
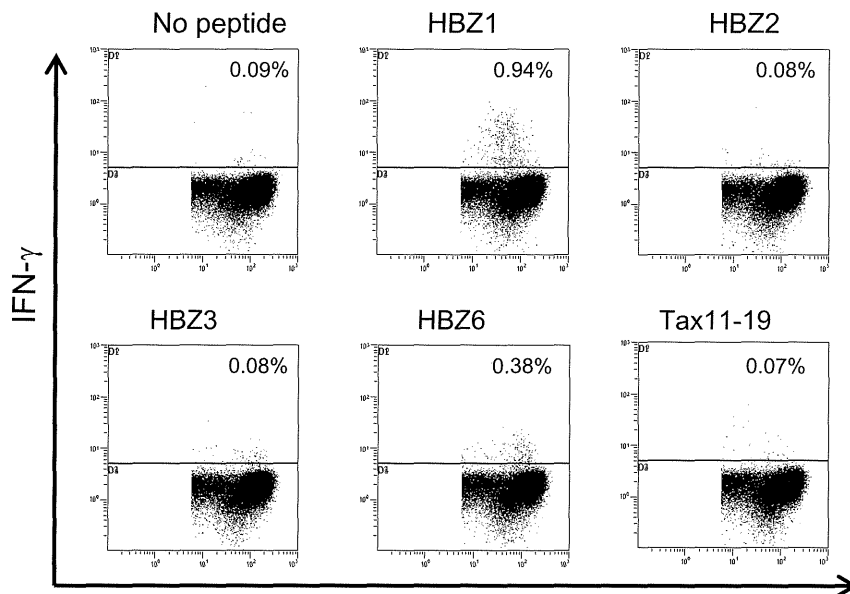


図 2. HLA-A\*0201 拘束性 HTLV-1 HBZ 特異的 CTL のエピトープ同定。CTL エピトープ予測プログラムで候補ペプチドを合成し、HAM 患者 PBMC 中の HTLV-1 HBZ 特異的 CTL を検出した。HBZ1 と HBZ6 がエピトープとして同定された。



分担研究課題：HAM の発症機序解明と新規発症予防法・治療法の開発をめざした  
「新規治療標的分子」の発見

齊藤峰輝（川崎医科大学微生物学 教授）

<平成 22 年度の成果>

HTLV-1 の転写活性化因子 Tax の標的遺伝子を cDNA マイクロアレイにより網羅的に抽出した。同定した Tax 標的遺伝子のうち Bcl-3 と OX40 に着目して、HTLV-1 感染細胞増殖や HAM 病態への関与を解析した結果、Bcl-3 が HTLV-1 感染細胞で恒常的に高発現しており、T 細胞増殖に関与していること、発現を shRNA でノックダウンすると異常増殖を抑制可能であることを見出した。一方、HAM 患者末梢血単核球（PBMC）に OX40 の発現は認められないが、剖検脊髄の病変局所浸潤細胞に強発現していること、新規自家製抗 OX40 モノクローナル抗体の添加により HTLV-1 感染細胞を排除可能であることを見出した。以上、Tax の標的遺伝子 Bcl-3 および OX40 が HAM の新たな治療標的分子となりうることを発見した。

<平成 23 年度の成果>

我々が過去に HAM 病勢と遺伝子発現量が相関することを報告した、HTLV-1 マイナス鎖にコードされるウイルス遺伝子 HBZ の HAM 病態における意義を解明するため、新規抗 HBZ モノクローナル抗体を複数取得し、HTLV-1 感染細胞中 HBZ 蛋白および患者血漿中抗 HBZ 抗体の検出系を作製した。これらの抗体は、HBZ を過剰発現させた 293T 細胞および HTLV-1 感染細胞株中の HBZ 蛋白を蛍光抗体法、ウエスタンブロット、フローサイトメトリーで検出可能であったが、HAM 患者 PBMC 中 HBZ 蛋白および血漿中抗 HBZ 抗体は検出できなかった。今後、検出系の改良が必要であるが、HAM 病態解析のためのきわめて有用なツールが得られた。

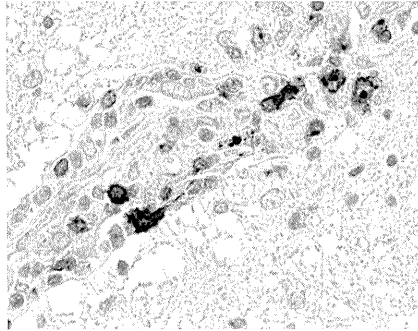
<平成 24 年度の成果>

HAM 患者末梢血単核球（PBMC）を用いて HBZ, Tax, FoxP3 mRNA 発現を定量し、HAM 疾患感受性を規定する HTLV-1 Tax サブタイプ（TaxA、TaxB）、HTLV-1 プロウイルス量との関連を検討した。その結果、TaxB 感染 HAM 患者（TaxB+ HAM）の感染細胞あたりの HBZ mRNA 発現量は TaxA+ 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たが、TaxA+ HAM では認められないことを見出した。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。

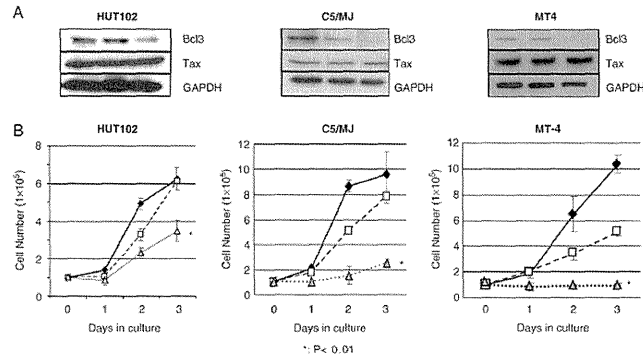
以上のように、HAM の新規治療標的分子を複数発見し、その検出系の開発や病態への関与の解明についても一定の成果をあげることができた。



# 新規HAM治療薬の分子標的候補 OX40、Bcl-3の発見

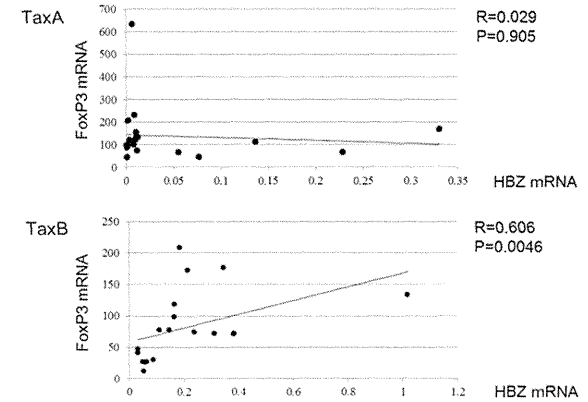


HAM脊髄でのOX40高発現

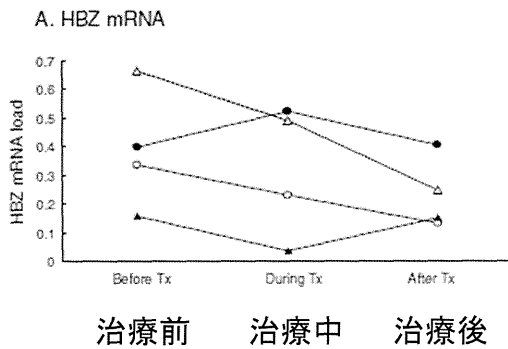


Bcl-3によるT細胞増殖促進とshRNAによる抑制

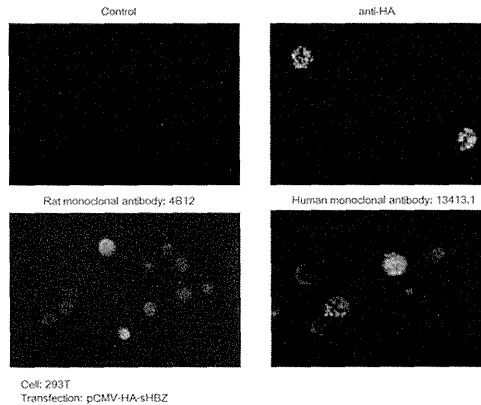
# HTLV-1ウイルス型がウイルスおよび細胞遺伝子制御に影響することを発見



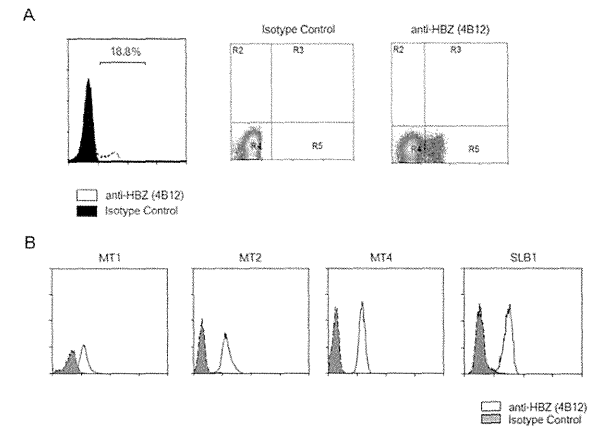
# HAM病勢に関連するHBZに対する新規モノクローナル抗体作製とHBZ蛋白・抗HBZ抗体検出系の開発



HAM重症度とHBZmRNA発現との関連



蛍光抗体法によるHBZ蛋白の検出



フローサイトメトリーによつてHBZ蛋白の検出

## 分担研究課題：HAM 疾患活動性バイオマーカーとしての TSLC1 の有用性の検討と高 HTLV-1 プロウイルス量発生機序の解明

分担研究者 竹之内 徳博 関西医科大学 准教授

【目的】HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) は症状軽減のために IFN $\alpha$  やステロイドが用いられるが、長期使用による副作用が問題となるため、至適な投薬時期の評価に有用な疾患活動性のバイオマーカーが必要となる。HAM 発症・進行の最大の risk factor として高 HTLV-1 プロウイルス量が知られており、このプロウイルス量は疾患活動性のバイオマーカーとしても用いられているが、残念ながら臨床症状と乖離する症例も少なくない。近年、ATL 患者の CD4 陽性 T 細胞において TSLC1 の特異的な発現亢進と疾患進行度との相関が報告されているので、本研究では新たなバイオマーカーの候補として、HAM の疾患活動性と PBMC における TSLC1 発現の関連について解析した。一方で、高プロウイルス量の発生機序としては、ウイルスの感染伝播やウイルス感染細胞のクローナルな増加が考えられているが、未だ結論は出ていない。感染伝播が主体であれば、HAM の治療において抗ウイルス剤が有効である可能性を示すため、発生機序の解明は重要である。よって本研究では、HAM 患者 PBMC での高プロウイルス量の発生機序について解明を行うとともに、抗ウイルス剤である IFN $\alpha$  の有効性についての検討も行った。

【方法】HAM 患者 (48 名)、無徴候性 HTLV-1 感染者 (25 名)、ATL 患者 (3 名)、HTLV-1 非感染者 (10 名) の PBMC を対象とし、FACS 解析 (抗ヒト CD4、抗ヒト CD8、抗ヒト CD25、抗ヒト CCR4、抗ヒト TSLC1)、HTLV-1 *pol* 及び *pX* (*tax/rex*) 領域を標的とした定量的 PCR、mRNA 発現 (HTLV-1 *pX*、HTLV-1 *hbz*、*tslc1*) 定量を行い、臨床症状と比較検討した。プロウイルス量は *pX* の測定値によって評価し、defective virus の比率は *pol* と *pX* の測定値の比によって算出した。感染細胞のクローナルな増殖の有無の評価は、ウイルスの挿入部位を検出する IL-PCR 法にて行った。また、経過観察中にプロウイルス量が大きく変動した HAM 患者 3 名において、任意の感染細胞クローンと同定し、このクローンの感染細胞全体に対する比率の変動を観察した。さらに、HTLV-1 感染ヒト化マウスを作製し、IFN $\alpha$  を投与した群と PBS を投与した群のプロウイルス量の推移を比較し、抗ウイルス剤の HTLV-1 抑制効果の検討を行った。

【結果】CD4 陽性 T 細胞において、HAM 患者では無徴候性 HTLV-1 感染者と比べて *tslc1* 発現量が高値であった。疾患活動性の高い HAM 患者ではこの傾向はより強かった (図 1)。TAX や HBZ は trans activator としても知られており、*tslc1* に直接の影響を与えている可能性があるため、*tslc1* と *tax* 或いは *hbz* 発現量との間に相関関係があるかどうかの検討を行ったが、いずれにおいても有意な相関は認められなかった (図 2)。TSLC1 の疾患活動性のバイオマーカーとしての有用性をさらに確かめるために、HAM 患者を経時的に観察し、同一個体における疾患活動性の高い時期と低い時期の *tslc1* の測定と FACS による細胞表面 TSLC1 分子の発現解析を行った。CD4 陽性 T 細胞において、*tslc1* も細胞表面 TSLC1 分子も共に疾患活動性の高い時期に上昇する傾向にあり、疾患活動性の低い時期は安定していた (図 3、図 4)。HAM 患者では全例で *pol* と *pX* の測定値はほぼ同値であり、全長 HTLV-1 の検出でも full length 以外の HTLV-1 はほとんど検出されず、defective virus は極めて少ないことが示唆された (図 5)。また IL-PCR 法では HAM 患者全例で明瞭なバンドが検出されず、感染細胞はポリクローナルであることが示された (図 6)。任意の感染細胞クローンの感染細胞全体に対する比率は、プロウイルス量の上昇に伴い低下する傾向にあった。プロウイルス量が大きく上昇した前後で感染細胞のクローナル性の解析を行ったが、全例で明瞭なバンドが検出されなかった (図 7)。マウスモデルにおいては、PBS 投与群に比べて INF $\alpha$  投与群で HTLV-1 プロウイルス量の上昇率が鈍化しており、INF $\alpha$  の感染細胞の増殖抑制効果が示唆された (図 8)。

【結論】*tslc1* 発現量の変化は *tax* 或いは *hbz* 発現量と独立しており、*tslc1* や TSLC1 の測定は HAM の疾患活動性のバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。HAM 患者の高プロウイルス量の原因としては、感染細胞のクローナルな増殖よりもウイルスの感染伝播が主因であることが疑われ、HAM の治療に抗ウイルス剤が有効であることが示唆された。

図1. CD4及びCD8陽性T細胞におけるTSLC1、HTLV-1 pX、HTLV-1 HBZ mRNAの発現解析

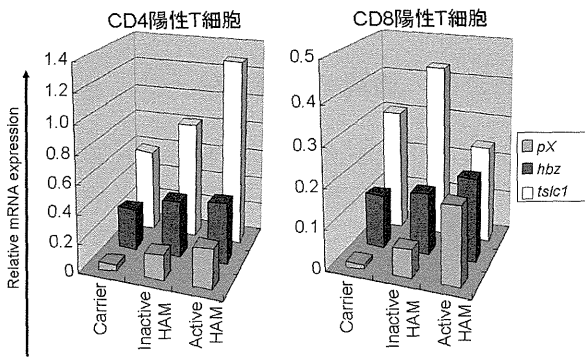


図5. PBMCでのdefective virusの検出

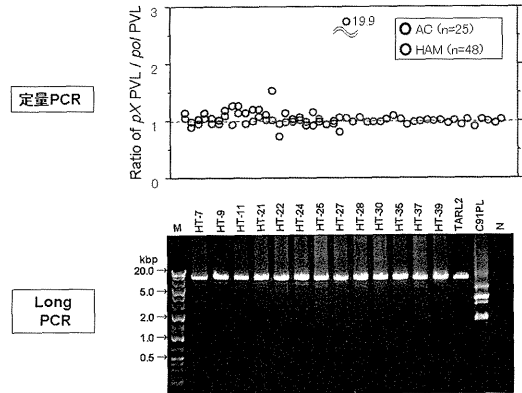


図2. HTLV-1感染者におけるtslc1発現量とtax及びhbzの発現量との相関

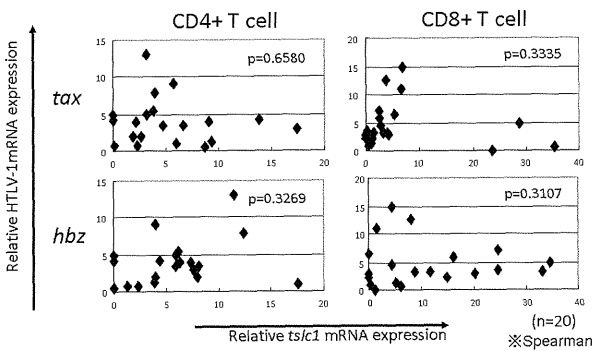


図6. HAM患者PBMCにおけるHTLV-1感染細胞のクロナリティ

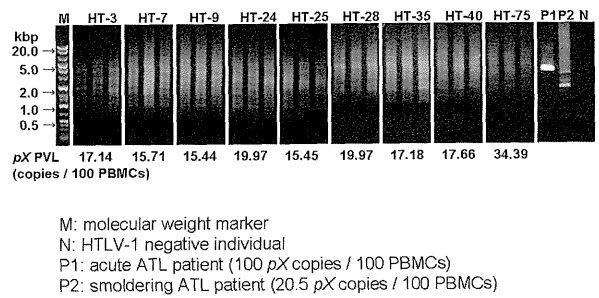


図3. HAM患者におけるプロウイルス量とtslc1発現量の経時的観察

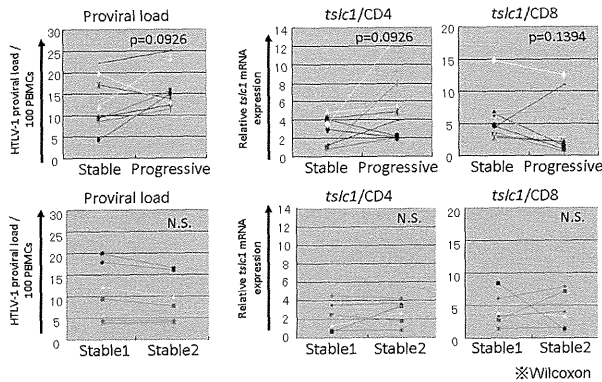


図7. 感染細胞のクロナリティと特定クローンの感染細胞全体における占拠率の推移

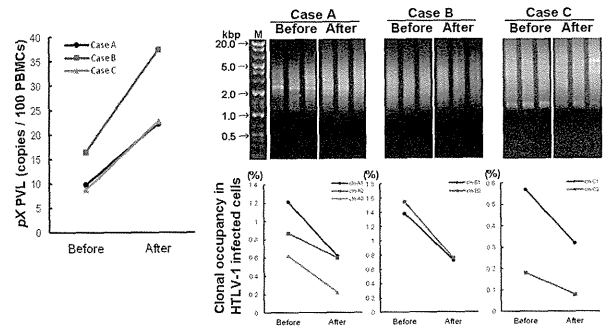


図4. 代表的なHAM患者における細胞表面TSLC1分子発現量の経時的観察

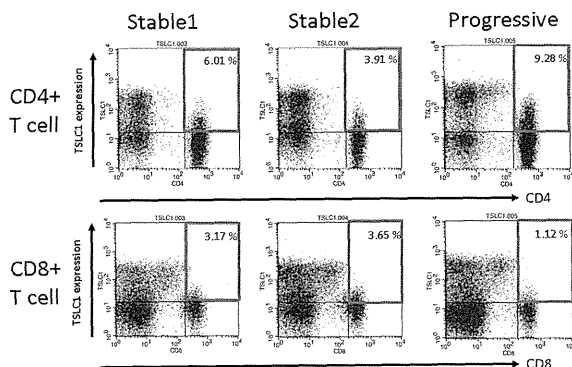
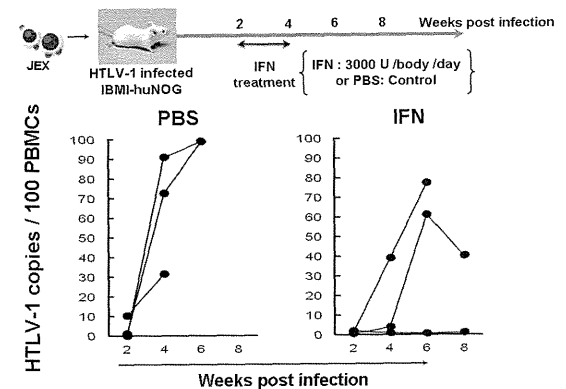


図8. マウスモデル(JEX)でのIFNの効果



分担研究課題：

1. HAMの病態におけるマクロファージ・ミクログリアの関与
2. HTLV-1キャリア脊髄への炎症細胞浸潤
3. HAMの家族例の検討

研究分担者 高嶋 博 鹿児島大学神経内科・教授

HAM の病態は、脊髄内における感染 CD4 陽性リンパ球と HTLV-1 に特異的な CD8 陽性細胞障害性 T 細胞による脊髄内での過剰免疫反応による炎症で脊髄機能障害が起こるものと考えられている。近年、様々な中枢性変性疾患や虚血性疾患、感染性疾患における microglia の関与が示唆されており、各種中枢性神経疾患に対する minocyclin の効果が検討されてきた。このような背景を鑑み、H22 年度はこの脊髄における炎症反応にリンパ球以外の細胞が関与している可能性、特にマクロファージや単球、一部のマイクログリアなど食食系単核球 (MPs) が関与している可能性があるかどうか、顕微鏡下に検討した。すなわち、それら MPs と CD8 陽性リンパ球との interaction について実際に顕微鏡を用いて観察した。その結果 CD14 陽性細胞と CD8 陽性細胞の顕著な interaction が認められ、MPs が CD8 の機能に対してなんらかの影響を与えている可能性が示唆された。この結果は、同時にフローサイトメータでも確認され、MPs が CD8 陽性細胞障害性 T 細胞を過剰に活性化させていることまで確認した。また、この MPs によるリンパ球活性化が minocyclin にて抑制されることを確認し、minocyclin が HAM の治療となりうることを明らかにした。(Retrovirology, 9 (16), 2012)

H23 年度は HAM の治療に当たり、感染者への早期の治療介入が意味があるのか明らかにするために HTLV-1 キャリアの脊髄における炎症を検討した。その結果、HTLV-1 特異的細胞障害性 T 細胞がキャリアの脊髄にも浸潤していることが明らかとなった。脊髄の炎症がキャリアのうちから徐々に起こっていることが明らかとなり、早期の脊髄炎症に対する治療介入の妥当性を確認することができた。また、鹿児島大学神経内科における HAM の治療プロトコールを策定した。

H24 年度は積極的早期治療介入すべきキャリア群、HAM 群が存在する可能性を考え、その遺伝背景・臨床的特徴を明らかにするべく、家族性に発症している HAM 患者の臨床解析を進めた。その結果家族性の HAM の頻度は孤発性の HAM 発症頻度よりも高く、しかしウイルス量は孤発例とかわらなかった。しかも発症年齢が平均で 10 歳も低いにもかかわらず、急速進行例がわずかに 10% と少ないために、比較的軽い障害度で長期にわたりゆっくりと進行することが明らかとなった。このことは家族性の HAM が、高いウイルス量に依存せずに発症促進する機序をもつという可能性を示唆しており、抗ウイルス療法以外の免疫調整作用をもつ薬剤により病態を遅らせる事が可能であることを明らかにした。