

Yoshimi Enose-Akahata, Eiji Matsuura,
Yuetsu Tanaka, Unsong Oh, Steven
Jacobson, *Retrovirology*, 2012, Vol.9,
No.16

3. HTLV-1 と筋炎 松浦英治 久保田龍二
樋口逸郎 *Clinical neuroscience* 30(3)
2012 p322-333

学会等での講演、発表

国際会議

1. 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

国内会議

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 第
53 回日本神経学会 平成 24 年 5 月於東

京

2. HAM および HTLV-1 キャリアの中
枢神経における 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 日於東京
3. 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 日於軽井沢
4. 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 久保田龍二 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 日於京都

その他、知的財産権の出願・登録状況・情
宣活動など

なし

沖縄県における HTLV-1 関連脊髄症（HAM）患者の実態および治療に関する検討

研究分担者 氏名 : 渡嘉敷 崇
所属機関 : 琉球大学大学院医学研究科
循環器・腎臓・神経内科学
職名 : 助教

研究要旨：1992年1月より2013年1月20日までに当科で診断治療をしたHAM患者は21例(男性9例，女性12例)で，そのうち現在も通院中の症例は14例である．14例の内訳は男性6例，女性8例で発症時年齢は 47.2 ± 10.6 歳ある．初診時における納の運動障害重症度は 4.7 ± 1.9 であった．治療ではステロイドを使用した症例が多く，14例中12例で経口プレドニゾロンが使用され，5例はステロイドパルス療法を施行していた．運動機能や感覚障害の改善など治療が有効と判断された症例は9例であった．しかしながら，運動機能に関して納の運動障害重症度で1ランク以上の改善を得られた例はなかった．ステロイド治療およびインターフェロン療法，アリナミン療法の適応選択，治療効果判定などに今後の課題があった．

A. 研究目的

1986年，納らによりHAMの疾患概念が提唱され，以降HAMの病態は明らかにされつつある．しかしながら根本的治療や治療方針に関しては未だ確立されていない．

南九州や沖縄県でHTLV-1感染者数が多い事が知られており，現在の沖縄県におけるHAMの患者数を把握し，県内各医療機関を縦断したネットワークを構築する事が今後の治療法の確立に向けて必要な時期にきていると考えられる．

また，近年では関東や近畿地方など元来HTLV-1感染者数が比較的少ないと言われていた地域での新規発症のHAM患者が報告されるようになり，その数は増加傾向に

あると思われる．HAMのみならずHTLV-1感染に関連する成人T細胞性白血病の新規発症を抑制する意味からもHTLV-1感染の拡大を予防する必要性は高いものと考えられる．今後の感染拡大予防の対策を検討する意味でも神経内科のみならず産婦人科医や血液内科医と連携し現在問題点を明らかにすることが喫緊の課題と考えられる．

平成23年から24年度にかけて，当科で診断・治療を行ったHAM患者の実態をまとめ，これまでの治療法を検討する．

B. 研究方法

①実態調査：現在および過去の診療患者数と当科における過去5年間におけるHAM新

規発症(診断)者数、年齢、性別、合併症、罹病期間、経過、重症度、検査データ、治療内容について調査する。

②当科における HAM 治療法について

当科でこれまでに行った HAM に対する治療の内、主な以下の治療法について検討する。

ア. ステロイド治療

イ. アリナミン静注療法

ウ. インターフェロン療法

エ. 下肢痙縮に対するボツリヌス治療

C. 倫理面への配慮

現在当科への通院がなく、カルテ検索が可能な症例についてはカルテのみを参照とし発症時年齢、重症度、治療内容および効果について検索した。現在通院中の症例については治療選択にあたって本人からの同意を得て、治療を行った。

D. 研究結果

カルテ検索が可能な1992年1月より2013年1月20日現在までに当科で診断、治療を行った症例は21例(男性9例、女性12例)であった。そのうち現在も当科へ通院・入院などの治療継続中の症例は14例である。過去5年間(2007年4月1日から2013年1月20日)で新たにHAMと診断した症例は6例(内、現在通院中は5例)であった。

以下、現在当科通院中の14例について性別、発症時年齢、重症度、治療内容および治療効果について述べる。

14例の内訳は男性6例、女性8例で発症時年齢は 47.2 ± 10.6 歳ある。初診時における納の運動障害重症度は 4.7 ± 1.9 であった。

<治療について>

14例中12例で経口プレドニゾロンが使用され、5例はステロイドパルス療法を施行された。運動機能や感覚障害の改善など治

療が有効と判断された症例は9例であった。しかしながら、運動機能に関して納の運動障害重症度で1ランク以上の改善を得られた例はなかった。インターフェロン療法については14例中2例に治療歴があり、1例は現在も継続中である。当科受診1年以内の2症例についてはアリナミン静注療法を施行した。運動機能に関して納の運動障害重症度でgrade 1以上の改善は得られていないが、自覚的に「足が軽く感じる」、感覚障害の軽減などが得られた。

補助的な治療としてビタミンC、塩酸チザニジン、芍薬甘草湯、イブジラストなどを使用している。

また、罹病期間20年で杖歩行可能であるが下肢痙縮により歩行バランス悪化を認めた症例に対しボツリヌス療法を実施した(1例のみ)。股関節および膝関節の屈曲が歩行バランスの悪化に影響していると考え腸腰筋および大腿二頭筋短頭にボツリヌス100単位/回を計3回施注した。結果は痙縮の軽減を認め、歩容の改善が得られた。

E. 考案

1994年の旧厚生省研究班の調査では沖縄県でHAM確診例は80例であった。

過去5年間で当科だけでも6例の新規発症患者がおり県全体の患者数は増加している可能性がある。当科での治療例についてはステロイドが主流で14例中12例に経口プレドニゾロンが使用され、5例はステロイドパルス療法を施行された。ステロイド治療による何らかの効果は8例に認めたが、運動機能に関しては納の運動障害重症度で1ランク以上の改善は得られていない。納の運動障害重症度で4ないし5のランクの患者では改善点はそのランクを超えない事が多く、治療効果判定には別の評価尺度が必要と思われる。

インターフェロン療法に関しては現在も

継続中のものは1例であった。プロウイルス量が高く、比較的運動障害度の低～中等度の症例に関しては適応と考えられる症例もいるが、通院で長期にわたる治療になるため、通院自体の負担や副作用、高額な医療費負担などの問題があり、適応と考えられる全ての症例への導入は困難な側面がある。

アリナミン静注療法は長崎大学中村らにより提唱されている治療法である。当科では2例に実施したが異常感覚の軽減や足の動きが軽く感じられるなどの効果が得られた。特記すべき副作用はなく安全に実施できる治療法として今後当科でも実施症例を重ねていきその効果および適応症例について検討していきたい。

HAM 患者の慢性期の運動機能障害として下肢痙縮の問題がある。これに対し、2010年10月に上下肢痙縮の治療適応が追加されたボツリヌス療法を1例に実施した。下肢痙縮では1回あたり合計300単位まで保険適応とされている。国内臨床試験では脳卒中後の痙縮患者が対象でHAM患者における下肢痙縮への治療指針は確立していない。今回の症例では股関節および膝関節の屈曲が歩行バランスの悪化に影響としていると考え腸腰筋および大腿二頭筋短頭にボツリヌス100単位/回を計3回施注した。結果は痙縮の軽減を認め、歩容の改善が得られた。診察所見や筋電図検査などで治療目的および対象筋を絞りリハビリテーションを行う事で比較的少ない量で治療効果が得られる可能性があった。保険適応ではあるが高額な治療であり比較的少量の使用量でも効果が得られれば対象となる症例の選択も増えるものと思われる。今後、適応症例を検討し実施していきたいと考えている。

F. 結論

本年度は当科のHAM患者の実態を調査し治療内容を検討した。

カルテ検索が可能な1992年1月より2013年1月20日現在までに当科で診断、治療を行った症例は21例(男性9例、女性12例)であった。そのうち現在も当科へ通院・入院などの治療継続中の症例は14例で、過去5年間(2007年4月1日から2013年1月20日)で新たにHAMと診断した症例は6例(内、現在通院中は5例)であった。

現在通院中の14例について経口ステロイドおよびパルス療法はほぼ全例で実施されていた。効果については運動機能に関して納の運動障害重症度でgrade1以上の改善を得られた例はなかったが、自覚的な運動障害や感覚障害などに対する効果はあり、治療効果判定の評価スケールが必要と考えられた。

インターフェロン療法については長期にわたる治療となるため対員や費用など患者負担の点を考え、より積極的な適応となる症例を決定していく必要がある。

アリナミン静注療法は副作用の懸念が少ないと考えられ今後症例の蓄積により効果についての検討を重ねたい。

痙縮に対する治療としてボツリヌス療法を実施した。現在のところ1例のみであり今後適応症例およびボツリヌス施注の対象となる筋の選択および治療効果の評価法について検討を進める。

上記以外の今後の課題として、HTLV-1感染の拡大を予防する必要性は高いものと考えられ、今後の感染拡大予防の対策を検討する意味でも神経内科のみならず産婦人科医や血液内科医と連携し沖縄県内の実態について調査を進める必要があると考えた。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

国際会議

なし

国内会議

なし

3. その他

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

表. 当科におけるHAM患者の内訳(2013年1月20日現在通院中の症例)

性別	男性 6例 女性 8例
発症時年齢	47.2 ± 10.6 歳
初診時運動障害度*	4.7 ± 1.9
治療内容	経口ステロイド 12例 ステロイドパルス療法 5例 インターフェロン療法 2例 アリナミン静注療法 2例 その他：ボツリヌス療法, ビタミンC, 塩酸チザニジン, 芍薬甘草湯, イブジラストなど

初診時運動障害度* : 納の運動障害重症度で評価した.

沖縄県における感染者 HTLV-1 の分子疫学的解析と
HAM 患者データベース・検体バンク確立の試み

分担研究者 齊藤 峰輝 川崎医科大学 微生物学 教授

研究要旨：沖縄県は HTLV-1 の高侵淫地域であり、HTLV-1 関連脊髄症（HAM）の患者数も多い。沖縄地方の HAM 患者の臨床情報データベースと検体バンクを整備することは、HAM の病態と発症機序を明らかにする上で重要である。本研究では、琉球大学病院関連診療科の協力のもと、検体保存、臨床データベース作成のための体制を構築した。一方、沖縄県の HAM 症例では鹿児島県の症例と比較して、HAM 発症の Odds が約 2 倍高いことが報告されている Tax サブタイプ A (TaxA) 感染者が有意に多いことを明らかにした。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、各遺伝子型に対応する HTLV-1 の転写制御因子（Tax および HBZ）の発現ベクターを作製し、標的遺伝子プロモーターに対する活性を比較したが、HTLV-1 のサブタイプは Tax および HBZ の転写制御因子としての活性には影響を与えなかった。TaxA, TaxB に特異的な塩基置換は、p12, p30, env のアミノ酸置換を伴う塩基置換とも対応しているため、これら構造遺伝子、アクセサリ遺伝子の機能変化が発症感受性に関連している可能性も考えられた。

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。平成 20 年度に国立感染症研究所から報告された約 20 年ぶりの全国調査によると、我が国にはいまだに先進国で最多の約 108 万人もの HTLV-1 感染者が存在しており、従来多かった九州・沖縄では減少しているものの、都市部では増加していることが明らかになっている。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: HC) として経過し、HAM や ATL を発症するのは感染者全体の 5% 前後ではあるものの、最も予後不良の白血病の一つである ATL は死亡者数

が年間 1000 人を超え、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。本研究の目的は、沖縄地方の HAM 患者について、臨床情報データベース・検体バンクを整備して、その臨床的特徴を明らかにするとともに、臨床検体を用いた免疫学的、ウイルス学的解析を行い、HAM の発症機序解明に資することである。

B. 研究方法

琉球大学病院第 2 内科（骨髄移植センター）、第 3 内科（神経内科）、皮膚科の協力のもと、合計 43 例の沖縄県出身 HAM 患者の臨床情報を収集した。同時に、十分な説明と書面による同意を得たのちに末梢血を採取し、血漿、リンパ球 (viable stock)、ゲノム DNA、cDNA を分離して保存した。

リンパ球は Histopaque (Sigma)を用いて密度勾配遠心法にて分離し、AllPrep™ DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN) を使用してゲノム DNA と total RNA を同時に抽出した。さらに PrimeScript RT reagent Kit (Takara) を用いて逆転写反応を行い、鋳型 cDNA を合成した。抽出したゲノム DNA を用いて、PCR-RFLP 法 (Furukawa Y et al. J Infect Dis. 182:1343-9, 2000) により HTLV-1 サブタイプ解析を行った。また、PBMC 中のプロウイルス量 (PVL)、Tax、HBZ mRNA 発現量と HTLV-1 標的宿主因子である FoxP3 mRNA 発現量を測定した。さらに、Tax または HBZ の標的配列を持つプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結した各種レポーターベクターとともに Tax または HBZ の発現ベクターを培養細胞に共導入し、ルシフェラーゼ活性を比較した。

C. 倫理面への配慮

本研究は、バイオハザード委員会、遺伝子組換え生物等使用実験安全委員会、臨床試験倫理委員会の承認を得て行った。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。

D. 研究結果

沖縄県出身の HAM 患者から主治医の協力のもと匿名で臨床情報を収集した。同時に各患者から末梢血を採取した後に、血漿、血清、リンパ球、ゲノム DNA、cDNA を分離・保存した。リンパ球は viable stock とした。収集した臨床情報のデータベースには、年齢、性別、罹病期間、運動障害重症度 (Osame's motor disability score: OMDS)、排尿障害スコア、瘻性スコア (Modified Ashworth Scale: MAS)、血清および髄液抗 HTLV-1 抗体価、HTLV-1 プロウイルス量、

血清 sIL-2R 値、合併症、血算、血液像 (白血球分画)、一般生化学、自己抗体等を記録した。

ゲノム DNA を用いて HTLV-1 プロウイルスのサブタイプ解析を行ったところ、63%が TaxA であった。一方、同時に解析した鹿児島県の検体では、22%が TaxA であり、沖縄県の症例と比較して有意に低かった ($\chi^2=11.0$, $p=0.0009$, Odds Ratio=6.03, CI 95%: 2.15-16.86.)。

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。レポーターアッセイでは、Tax および HBZ の活性に両株間で有意差は認められなかった。

E. 考察

沖縄県は HTLV-1 の高侵淫地域であり、HAM 患者数も多い。過去の報告から、HTLV-1 の転写調節因子をコードする Tax 遺伝子には、LTR でのコスモポリタン A、B 分類に対応したサブタイプが存在し、そのうち Tax サブタイプ A (TaxA) に感染した個体が HAM に罹患しやすいことが明らかになっている (Furukawa Y et al. J Infect Dis. 182:1343-9, 2000)。また、このウイルス型は、HAM の発症率が日本と比較して約 6 倍程度高いジャマイカなど、カリブ海諸国の HAM 患者が持つウイルス型と高い相同性があることも報告されている。今回の検討で、沖縄県の HAM 症例は、鹿児島県 (本土) の症例と比較して TaxA の感染者が有意に高いことが明らかになった。最近、ジャマイカと日本の HTLV-1 感染者の解析が

ら、HTLV-1 に対する宿主免疫応答に差がみられるとの報告もなされており (Birmann BM et al. *Int J Cancer*. 124: 614-21, 2009) 、沖縄県における HAM の発症率が本土と比較して高いのかどうか、HTLV-1 に対する免疫応答に差があるのかどうかについて興味を持たれる。今後の検討課題である。

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ことから、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考えられた。これを検証するため、各遺伝子型に対応する HTLV-1 の転写制御因子 (Tax および HBZ) の発現ベクターを作製し、標的遺伝子プロモーターに対する活性を比較したが、予想に反して HTLV-1 のサブタイプは Tax および HBZ の転写制御因子としての活性には影響を与えないことが明らかになった。TaxA、TaxB に特異的な塩基置換は、p12、p30、env のアミノ酸置換を伴う塩基置換とも対応しているため、これら構造遺伝子、アクセサリ遺伝子の機能変化が発症感受性に関連している可能性も考えられた。

今後とも、沖縄県と本土の HAM 患者の臨床的・免疫学的特徴を明らかにすることは HAM の病態解明に有用である。引き続き症例データベース・検体バンクを充実させる必要がある。

F. 結論

沖縄県内の HAM 患者について、臨床情報データベース・検体バンクを整備した。沖縄県の HAM 症例は鹿児島県 (本土) の症例と比較して、TaxA の感染者が有意に高いことを明らかにした。HAM 発症の Odds が約 2 倍高いことが報告されている HTLV-1 サブタイプは、Tax および HBZ の転写制御

因子としての活性には影響を与えないことを明らかにした。

G. 研究成果の公表

1. 学術雑誌等での発表

- [1] Saito M, Bangham CR. Immunopathogenesis of Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) -associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): Recent perspectives. **Leukemia Research and Treatment**. 259045, 2012. (Online Journal のため論文番号のみ)
- [2] Adachi T, Tanaka R, Kodama A, Saito M, Takahashi Y, Ansari AA, Tanaka Y. Identification of an unique CXCR4 epitope whose ligation inhibits infection by both CXCR4 and CCR5 tropic human immunodeficiency type-I viruses. **Retrovirology**. 8: 84, 2012.

- [3] Saito M. HTLV-1. **Encyclopedia of Genetics 2nd Edition**. Stanley Maloy, Kelly Hughes ed. Elsevier, Oxford, UK, in press, 2013.

[4] 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. 学会等での講演、発表

国際会議

- [1] 15th International Conference on Human Retroviruses: HTLV and Related Viruses. 2010.6. Leuven, Belgium.

Saito M, Tanaka R, Kodama A, Matsuzaki T, Suehara M, Tanaka Y : Successful development of novel monoclonal antibodies against HTLV-1 bZIP factor and their applications in studying the pathogenesis of HAM/TSP.

- [2] 11th International Symposium on

Neurovirology. 2012.6. New York, USA.

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 52 回日本神経学会学術大会 2011.5.
名古屋 齊藤峰輝, 田中礼子, 松崎敏男, 末原雅人, 田中勇悦: HTLV-1 マイナス鎖にコードされる HBZ の HTLV-1 関連脊髄症における病因的意義

[2] 第 64 回日本細菌学会九州支部総会・第 48 回日本ウイルス学会九州支部総会 2011.8.
北九州 齊藤峰輝, 田中礼子, 児玉 晃, 田中勇悦: HTLV-1 関連脊髄症(HAM)における OX40 陽性細胞の解析と HTLV-1 感染ヒト化マウス作製の試み

[3] 第 4 回 HTLV-1 研究会 2011. 9. 東京
齊藤峰輝, 田中礼子, 児玉 晃, 田中勇悦:
ヒトリンパ球移植免疫不全マウス (hu-PBL-SCID)を用いた新規 HTLV-1 感染動物モデル作製の試み.

[4] 第 23 回日本神経免疫学会学術集会 2011.9. 東京 齊藤峰輝, 田中礼子, 田中勇悦: HTLV-1 関連脊髄症(HAM)における HBZ 遺伝子発現の意義

[5] 第 53 回日本神経学会学術大会 2012.5.
東京 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

[6] 第 24 回日本神経免疫学会学術集会 2012.9. 軽井沢 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

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.

4. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

該当なし

HAM の脊髄病変における治療標的分子の病理学的検討

研究分担者 外丸 詩野 北海道大学大学院医学研究科・准教授

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

平成 23 年度は HAM の病態解明を進める目的で、患者脊髄に浸潤している T 細胞に関して、免疫組織染色による詳細な検討を行った。その結果、HAM 患者脊髄には CCR4、CXCR3、T-bet、IFN- γ 陽性所見を示す T 細胞が浸潤していることが明らかとなった。

平成 24 年度は患者脊髄サンプルおよび健常コントロールを用いて、ケモカインの発現解析を行った。その結果、HAM 患者脊髄には IP-10 発現グリア細胞が増加していることが明らかとなり、CXCR3/IP-10 を介する脊髄への炎症細胞浸潤が病態に関連している可能性が示唆された。今後は CXCR3/IP-10 をブロックするような治療法が HAM の新たな治療戦略になり得る可能性が示唆された。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

1. サンプル

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

2. 抗体

Anti-CCR4 抗体、anti-CXCR3 抗体、anti-IFN- γ 抗体 (Abcam)、anti-T-bet 抗体、anti-IP-10 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、および対応するアイソタ

イプコントロールを用いた。二次抗体には Alexa 488-conjugated、594-conjugated の

anti-rabbit 又は mouse IgG (Invitrogen) を用いた。

3. 蛍光染色

脊髄のパラフィンブロックより作製した 4 μ m 切片を、脱パラの後に serum-free blocking medium (DAKO) で 15 分ブロッキングし、1 次抗体を 4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。1 次抗体の反応後、標本を PBS で 10 分 2 回洗浄したのち、二次抗体 (300 倍希釈) に 30 分反応させた。反応後標本を PBS で 10 分 2 回洗浄し、mounting medium (DAKO) で封入後、蛍光顕微鏡で観察した。

4. 免疫組織化学染色

免疫組織化学染色については、定法の DAB 染色を行い、1mm 平方当りの陽性細胞数を

算出した。

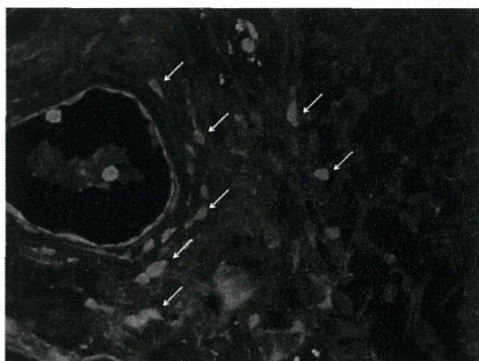
C. 倫理面への配慮

実験は北海道大学の倫理委員会承認に基づいて行った。

D. 研究結果

1. 脊髄浸潤 T 細胞の解析

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



①CCR4 の発現



②CXCR3 の発現



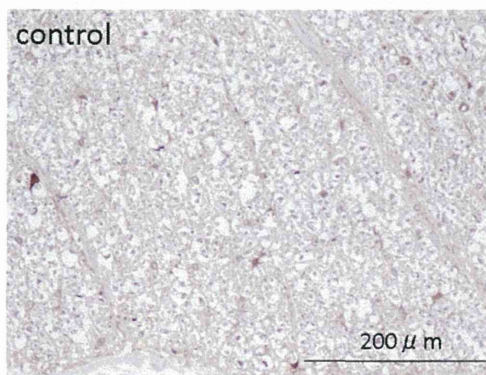
③T-bet の発現



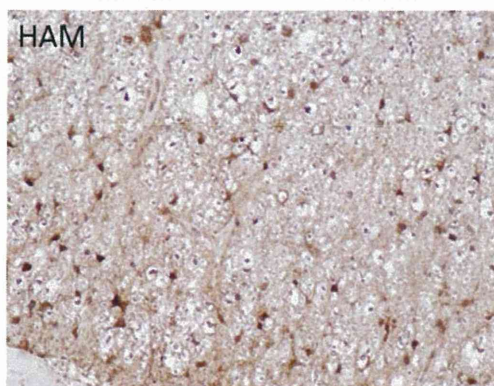
④IFN- γ の発現

2. 脊髄における IP-10 陽性細胞の分布

HAM 患者では、脊髄内に多数の IP-10 陽性細胞が認められ (図⑤、⑥)、陽性細胞の多くは星芒状の形態を示す活性化グリア細胞であった。1mm 平方当りの IP-10 陽性細胞を算出した結果、HAM 患者脊髄では健康コントロールに比して有意に陽性細胞数が増加していた (表 1)。



⑤健康コントロールにおける IP-10 発現



⑥HAM 脊髄における IP-10 発現

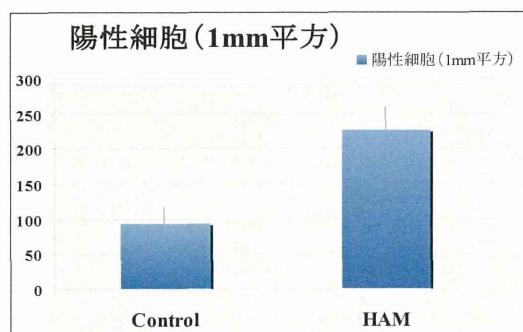


表1 コントロールおよび HAM 患者脊髄における IP-10 陽性細胞

E. 考案

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

HAM の病態解明を進める目的で、患者脊髄に浸潤している T 細胞に関して、免疫組織染色による詳細な検討を行った。その結果、HAM 患者脊髄には CCR4、CXCR3、T-bet、IFN- γ 陽性所見を示す T 細胞が浸潤していることが明らかとなった。また、患者脊髄におけるケモカインの発現解析を行った結果、HAM 患者脊髄では IP-10 発現グリア細胞が増加していることが明らかとなった。

本結果より、CXCR3/IP-10 を介する脊髄への炎症細胞浸潤が病態に関連している可能性が示唆された。今後は CXCR3/IP-10 をブロックするような治療法が HAM の新たな治療戦略になり得る可能性が示唆された。

F. 結論

HAM 患者脊髄には CCR4、CXCR3、T-bet、IFN- γ 陽性所見を示す T 細胞が浸潤していることが明らかとなった。また、HAM 患者脊髄には IP-10 陽性細胞が多数認められた。

G. 研究成果の研究発表

1. 学術雑誌等での発表
該当なし
2. 学会等での講演、発表
国際会議 該当なし

国内会議

- 1) 脇 雅、桜沢貴代、飯沼千景、山口まどか、外丸詩野、石津明洋：自己血管内皮細胞反応性 T 細胞による血管炎発症モデル 第 100 回日本病理学会総会、東京、2011
- 2) 中沢大悟、長谷川梨沙、一條加奈、西尾妙織、外丸詩野、石津明洋：プロピルチルウラシル (PTU) 投与による MPO-ANCA 関連血管炎のモデル開発と病態解析 第 100 回日本病理学会総会、東京、2011
- 3) 益田紗季子、岩崎沙理、佐藤樹里、外丸詩野、笠原正典、石津明洋：Fc γ 受容体を介した trogocytosis の意義と制御機構の解析 第 100 回日本病理学会総会、東京、2011
- 4) 山田洋介、外丸詩野、木内隆之、高橋里実、石津明洋、松野吉宏、笠原正典：プロテアソーム機能の低下と喫煙負荷をもたらす老化関連呼吸器系疾患の病態解明 第 100 回日本病理学会総会、東京、2011
- 5) 高橋里実、外丸詩野、合田 文、小野綾子、小原次郎、宮武由甲子、村田茂穂、田中啓二、石津明洋、笠原正典：プロテアソームの機能異常による病理作用：脂質代謝や脂肪肝との関連性について 第 100 回日本病理学会総会、東京、2011
- 6) 松井由希、深谷進司、外丸詩野、渥美達也、笠原正典、石津明洋：TNF α 変換酵素の過剰発現による炎症・線維化病態への影響 第 100 回日本病理学会総会、東京、2011
- 7) 木内隆之、高田明生、池田 仁、外丸詩野、石津明洋：von Recklinghausen 病による動脈破裂の病理組織学的検討(第二報) 第 100 回日本病理学会総会、東京、2011
- 8) 小原次郎、外丸詩野、鈴木小百合、高橋

- 里実、宮武由甲子、村田茂穂、田中啓二、石津明洋、笠原正典：胸腺プロテアソームの異所性発現による T 細胞分化の異常 第 100 回日本病理学会総会、東京、2011
- 9) 外丸詩野、山田洋介、木内隆之、丸川活司、松野吉宏、黒田 徹、石津明洋、笠原正典：プロテアソームサブユニット β 5t の胸腺腫における発現 第 57 回日本病理学会秋期特別総会、東京、2011
- 10) 石津明洋、外丸詩野、吉木 敬：自己血管内皮細胞反応性 T 細胞による血管炎発症モデル 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会、神戸、2011
- 11) 山口まどか、一條加奈、飯沼千景、脇雅、川上 愛、佐々木直美、外丸詩野、笠原正典、石津明洋：自己血管内皮細胞反応性血管炎惹起性 T 細胞の認識分子の同定 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会、千葉、2011
- 12) 山田洋介、大塚紀幸、大平 洋、辻野一三、深谷進司、外丸詩野、石津明洋：Pulmonary veno-occlusive disease (PVOD) の一部検例 第 16 回血管病理研究会、神戸、2011
- 13) 山田洋介、外丸詩野、木内隆之、石津明洋、松野吉宏、笠原正典：プロテアソーム機能の低下と COPD に対する病理作用 第 101 回日本病理学会総会、東京、2012
- 14) 小野綾子、外丸詩野、石津明洋、小原次郎、紺野沙織、笠原正典：プロテアソーム活性の低下が腫瘍微小環境に与える影響 第 101 回日本病理学会総会、東京、2012
- 15) 宮武由甲子、外丸詩野、Noreen Sheehy、石津明洋、William W. Hall、笠原正典：成人 T 細胞白血病 (ATL) の病態における上皮細胞の役割の検討 第 101 回日本病理学会総会、東京、2012
- 16) 松井由希、深谷進司、外丸詩野、渥美達也、笠原正典、石津明洋：TNF α 変換酵素 (TACE) の過剰発現が糖および脂質代謝へ及ぼす影響 第 101 回日本病理学会総会、東京、2012
- 17) 小原次郎、外丸詩野、鈴木小百合、紺野沙織、村田茂穂、田中啓二、石津明洋、笠原正典：胸腺プロテアソームの発現異常が T 細胞分化に与える影響について 第 101 回日本病理学会総会、東京、2012
- 18) 今本鉄平、大塚紀幸、山田洋介、外丸詩野、高階太一、石津明洋、笠原正典：肺腺癌に伴うトルソー症候群により肺高血圧症を合併した一部検例 第 101 回日本病理学会総会、東京、2012
- 19) 外丸詩野：プロテアソームの機能異常とその病理作用 第 92 回北海道医学大会病理分科会・第 45 回北海道病理談話会、札幌、2012
- 20) Ohara J, Tomaru U, Ishizu A, Konno S, Suzuki S, Murata S, Tanaka K, Kasahara M : Skewed T cell development in mice with aberrant expression of thymoproteasome. 第 41 回日本免疫学会学術集会、神戸、2012
- 21) Nakazawa D, Tomaru U, Nishio S, Atsumi T, Kasahara M, Ishizu A : Abnormal conformation and impaired degradation of neutrophil extracellular traps (NETs) induced by propylthiouracil (PTU) : Implication of disordered NETs in

MPO-ANCA-associated vasculitis

(MPO-AAV). 第41回日本免疫学会学術集会、神戸、2012

3. その他、
該当なし

22) Miyatake Y, Tomaru U, William W. Hall, Kasahara M : Contact with epithelial cells induces cancer stem cell-like properties in adult T-cell leukemia/lymphoma cells. 第41回日本免疫学会学術集会、神戸、2012

5. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む） 該当なし

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）
平成 23～24 度 総合研究報告書

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

研究協力者 佐藤知雄
聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター 講師

研究要旨： HAM の主病態は HTLV-1 感染細胞に起因する脊髄の慢性炎症と考えられているが、その詳細は未だ不明な点が多い。そこで我々は HAM 患者脊髄における炎症の慢性化が脊髄局所での病的なケモカイン産生とそれによる炎症細胞の脊髄への遊走、さらなるケモカイン産生という炎症ループに起因するという仮説を立て、HAM の病態の主軸となるケモカインの同定を試みた。その結果、CXCL10 が脳脊髄液（CSF）中で極めて高い値を示し、同一症例の血清と比較して有意に高値であった。CXCL10 が上記仮説の中心となるケモカインであることを裏付けるように、HAM 患者の髄液細胞は CXCL10 の受容体 CXCR3 を発現した細胞が多数を占め、これらの細胞は脊髄組織にも浸潤していた。また HAM 患者脊髄ではアストロサイトが主な CXCL10 産生細胞であることも判明した。次に HAM 患者末梢血リンパ球を用いた CXCL10 による細胞遊走実験では抗 CXCL10 阻害抗体により遊走細胞数が減少し、結果的に遊走細胞中のウイルス感染細胞数が減少すること、更に遊走された HAM リンパ球による自発的増殖応答を抑制できることが判明した。以上より、CXCL10 が HAM の主病態である脊髄の炎症の慢性化において極めて重要なケモカインであることを明らかにすると共に、抗 CXCL10 阻害抗体が HAM の病態に則した分子標的治療薬になる可能性を示すことができた。

A. 研究目的

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

細胞の持続的な遊走という炎症ループが形成されていると仮説を立てた。一般的に、細胞遊走にはケモカインが重要であり、ケモカイン受容体を発現する細胞が特異的に遊走することが知られている。HAM 患者脊髄病理解析では、interferon- γ , tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β といった炎症性サイトカインが検出されることが報告されており、それらサイトカインにより刺激を受けた中枢神経内に存在する細胞が何らかのケモカインを産生することが示唆される。

今回、我々は HAM 脊髄の炎症の慢性化に重要なケモカインの同定を試み、さらにそのケモカインを中和抗体により阻害するという HAM の病態に即した分子標的療法を開発することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 29 例の HAM 患者と 8 例の HAM 未発症 HTLV-1 感染者の脳脊髄液 (CSF) 中における主な T 細胞ケモカイン受容体に対するケモカイン (CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10), CXCL11 (I-TAC), CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CCL5 (RANTES), CCL17 (TRAC), CCL20 (MIP-3 α), CCL22 (MDC)) の濃度を cytometric bead array 法、ELISA 法を用いて定量測定し、HAM 患者の CSF で有意に高いケモカインを絞り込んだ。

(2) (1) で絞り込んだ 3 つのケモカインについて、HAM 患者の CSF-血清間のケモカイン濃度勾配を調べるため同日採取した CSF 及び血清を用いて濃度測定し、CSF > 血清の濃度勾配を形成しているケモカインを同定した (n = 34)。さらに、ケモカイン濃度勾配と遊走細胞の関係を証明するために、濃度勾配と CSF 細胞数における相関解析を行い、両者で正の相関を示すケモカインを同定した (n = 30)。

(3) 上記 (2) で同定されたケモカイン CXCL10 が、その受容体 CXCR3 を発現した細胞を CSF 中へ遊走しているかどうか検証するために、HAM 患者 CSF 細胞の表現型を Flow cytometer を用いて解析した (n = 6)。また、CXCR3 陽性細胞が脊髄組織へ浸潤している可能性を検証するため、抗 CXCR3 抗体と Alexa488 標識二次抗体を用いて HAM 患者およびコントロールの脊髄組織に対して蛍光組織染色を実施した。

(4) 脊髄組織における CXCL10 産生細胞を同定するため、HAM 患者 (n = 4) およびコントロール (n = 6) の脊髄組織標本を抗

CXCL10 抗体により免疫組織化学を実施した。さらに、抗 CXCL10 抗体およびアストロサイトのマーカー Glia Fibrillary Acidic Protein (GFAP) 抗体を用いて、蛍光組織染色を実施した。

(5) 最後に、ケモタキシスチャンバーを用いて血液-CSF 環境を模した細胞遊走実験系を作り、ケモカイン及びケモカイン受容体に対する中和抗体の細胞遊走阻害作用を解析した (n = 30)。遊走能は以下の計算により chemotactic index として表示した。

chemotactic index

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

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

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

(倫理面への配慮)

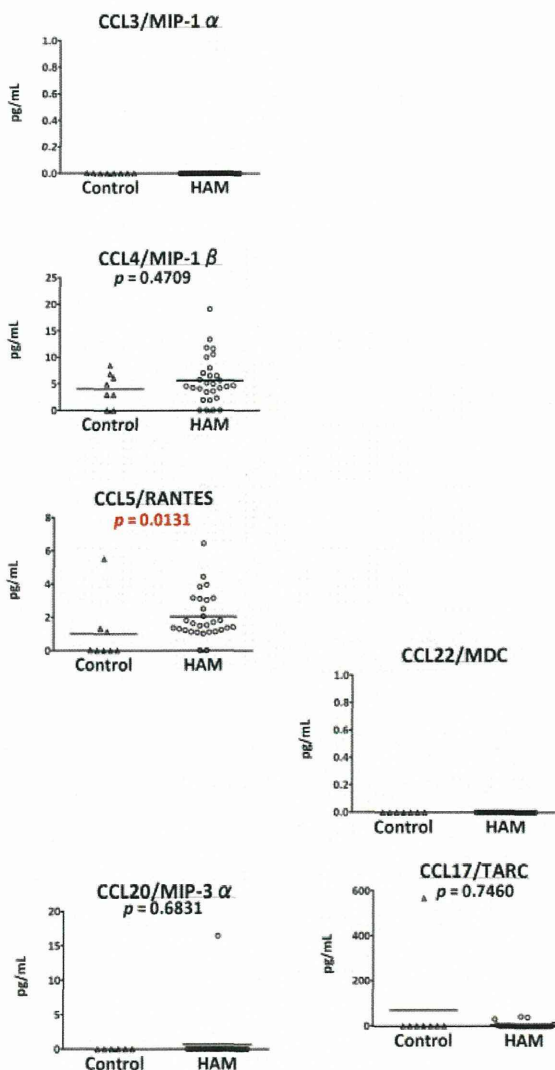
臨床検体の収集に際しては、本学の生命倫理委員会で承認された (承認番号: 第 1646

号) 同意書を用いて、不利益や危険性の排除などに関するインフォームドコンセントを行った。また検体は、個人情報管理者が連結可能匿名化により番号化する為、提供者を特定できないようにして、患者の人権擁護に努めた。

C. 研究結果

(1) HAM 患者の CSF では、HAM 未発症 HTLV-1 感染者 (Control) の CSF に比べ有意に CXCL9 ($P < 0.0001$), CXCL10 ($P < 0.0001$), CCL5 ($P = 0.0131$)の濃度が高かった (図 1)。

図 1: CSF ケモカイン濃度解析



(2) これら 3つのケモカインに関し、CSF と血清間の濃度勾配について調べたところ、CXCL10 のみが血清中よりも CSF 中で有意に高い濃度勾配を形成し ($*P < 0.0001$)、それ以外のケモカイン (コントロールとして CCL4) は全て CSF よりも血清中で有意に高い濃度を示した ($*P < 0.0001$) (図 2A)。次に、濃度勾配と CSF 細胞数の相関を見ると、CXCL10 の濃度勾配のみが CSF 細胞数と正の相関を認めた ($r = 0.5281, P = 0.0027$) (図 2B)。これらは、CXCL10 の濃度勾配が高いほど CSF 細胞数が多いことを示しており、CXCL10 が細胞遊走に重要な役割を果たしている可能性を示唆する結果であった。

図 2A: CSF-血清間のケモカイン濃度勾配

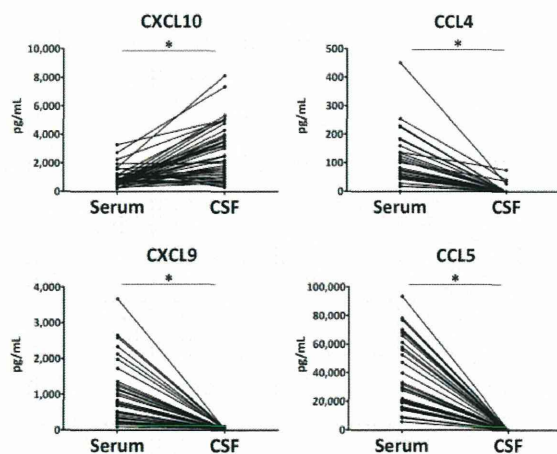


図 2B: ケモカイン濃度勾配と CSF 細胞数における相関関係

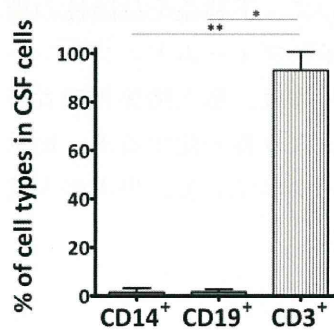
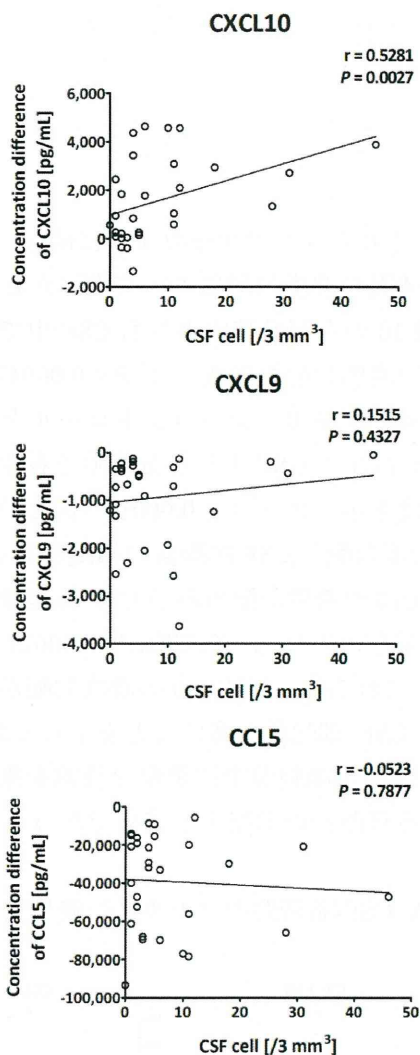


図 3B: CSF CD3 陽性 T 細胞の代表的なフローサイトメトリ解析例

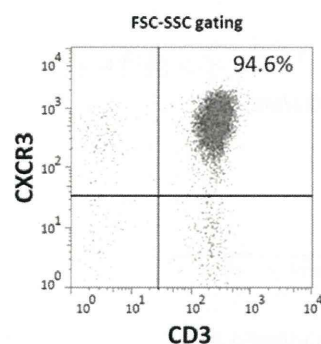
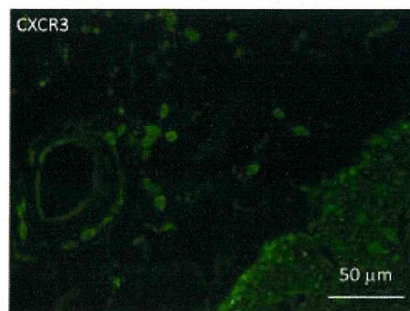


図 3C: CXCR3 陽性細胞の脊髄への浸潤



(3) CXCL10 の機能の 1 つとして、CXCR3 陽性細胞を遊走させる機能が知られており、我々は HAM 患者 CSF 細胞の表現型を flow cytometer を用いて調べた。HAM 患者 CSF 細胞の 90%以上が CD3 陽性 T 細胞であり (図 3A: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)、さらに CD3 陽性 T 細胞の 90%以上が CXCR3 陽性細胞であることが分かった (図 3B)。また、蛍光組織染色の結果、CXCR3 陽性細胞が脊髄軟膜の特に血管周囲に浸潤していることが明らかとなった (図 3C)。

図 3A:CSF 細胞の表現型解析

(4) 免疫組織化学により、HAM 患者の脊髄実質に多数の CXCL10 産生細胞を認めた (図 4A)。この大きさ、形態および GFAP 陽性といった点から、HAM 患者脊髄の主な CXCL10 産生細胞はアストロサイトであると判明した (図 4B)。

図 4A: HAM 患者脊髄における CXCL10 産生細胞の局在

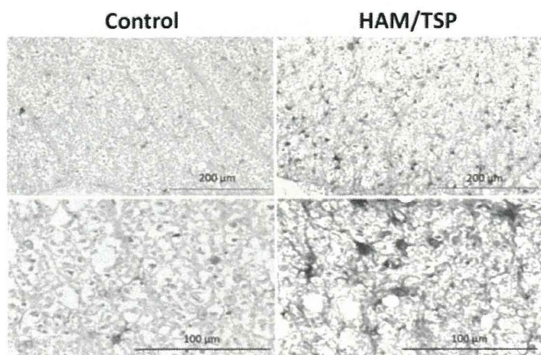
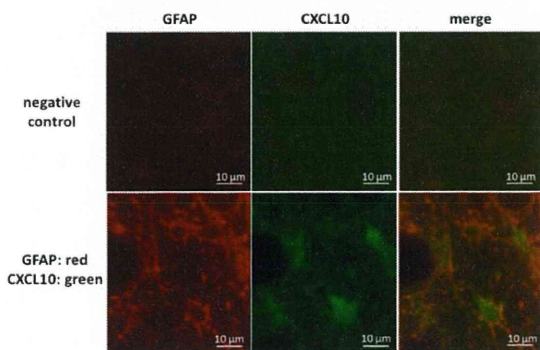
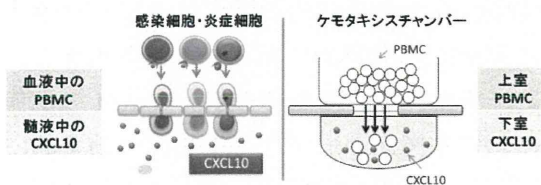


図 4B: CXCL10 産生細胞の同定



(5) 次に、ケモタキシスチャンパー (MBA96, NeuroProbe, USA) を用いて図 5 に示す細胞遊走実験系を作製し、CXCL10 による細胞遊走と CXCL10 及びその受容体 CXCR3 に対する中和抗体を用いて遊走が阻害されるかどうか調べた。

図 5: 血液-CSF の環境を模した細胞遊走実験系



CXCL10 の濃度勾配形成により HAM 患者 PBMC の細胞遊走亢進が認められ、中和抗体である抗 CXCL10 抗体、抗 CXCR3 抗体を用いた遊走阻害実験では、抗 CXCL10 抗体のみが HAM 患者 PBMC の細胞遊走を有

意に抑制した (図 6A: *** $P < 0.0001$, ** $P < 0.001$, * $P < 0.05$)。また、遊走阻害後の遊走細胞中の総ウイルス量を調べたところ、抗 CXCL10 抗体を用いた場合、有意に総ウイルス量が減少した (図 6B: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ns: not significant)。さらに抗 CXCL10 抗体を用いることにより、遊走細胞の自発的リンパ球増殖応答の抑制傾向が確認された (図 6C: * $P < 0.05$)。

図 6A: CXCL10 による遊走能と中和抗体による遊走阻害

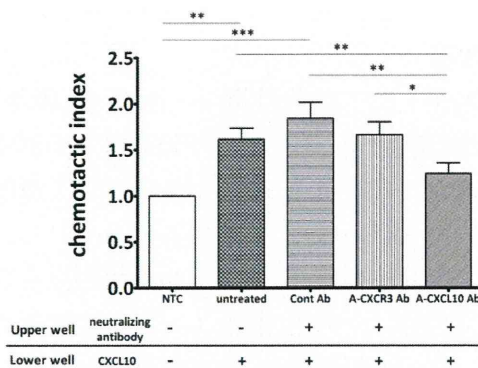


図 6B: 遊走阻害後の総ウイルス量

