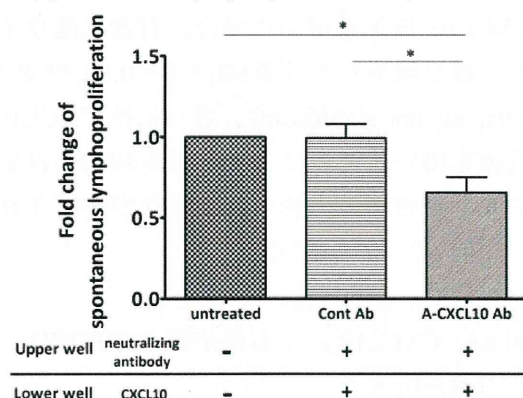


図 6C: 遊走阻害後のリンパ球自発的増殖応答(spontaneous lymphoproliferation)



#### D. 考案

HTLV-1 は CD4T 細胞 (ヘルパーT 細胞) に持続感染する。HAM の脊髄にはこの感染 T 細胞や HTLV-1 特異的細胞傷害性 T 細胞などが浸潤していることが知られている。本研究ではこうした HAM の脊髄病変を形成する主軸となるケモカインを同定するために HAM 患者髄液中の炎症性ケモカインの解析を行った。その結果、主に Th17 に発現する CCR6 のリガンド (CCL20) や、Th2, Treg に発現する CCR4 のリガンド (CCL17, CCL22) は検出されず、Th1 に発現する CXCR3 リガンド (CXCL9, CXCL10, CXCL11) と CCR5 リガンド (CCL3, CCL4, CCL5) は、その中の CXCL9, CXCL10 および CCL5 が選択的に高い濃度を示すことが判明した。この内、CXCL10 のみが血清中よりも髄液中で濃度が高く、その濃度勾配は CSF 細胞数と正の相関を示した。また、HAM 患者 CSF 細胞の大部分が CXCR3 陽性であり、この CXCR3 陽性細胞が脊髄組織に浸潤していることも確認できた。さらに脊髄組織における CXCL10 産生細胞はアストロサイトであることも判明した。これらの結果から、HAM 患者では脊髄組織中のアストロサイトが CXCL10 を過剰に産生し、CXCR3 陽性細胞を選択的に脊髄へリクル

ートされていることが強く示唆され、HAM の慢性炎症病巣の形成にケモカイン CXCL10 が極めて重要な役割を果たしていると考えられた。

これまでに CXCR3 陽性細胞である Th1 細胞や Tc1 細胞は interferon- $\gamma$ を産生し、CXCL10 は interferon- $\gamma$ により発現誘導されることが知られている。こうした知見からも、HAM 患者の脊髄アストロサイトにおける CXCL10 産生とそれによる CXCR3 陽性細胞の脊髄への遊走、浸潤した細胞による interferon- $\gamma$ の産生による更なる CXCL10 の発現誘導という CXCL10-CXCR3 を軸とする炎症ループの形成が示唆された。

さらに、抗 CXCL10 抗体によって HAM 患者 PBMC の細胞遊走阻害効果が示され、遊走細胞の総ウイルス量を減少させることが示されたことは、抗 CXCL10 抗体の使用により、脊髄への炎症細胞や HTLV-1 感染細胞の遊走を抑制できる可能性があると考えられた。また、抗 CXCL10 抗体を用いることで遊走細胞が減少する結果、HAM 患者 PBMC にみられる spontaneous proliferation も抑制されることが示された。以上の結果より、HAM の病態に極めて重要なケモカイン CXCL10 を制御することにより HAM の進行抑制が期待される結果が得られた。

#### E. 結論

HAM の主病態である脊髄の炎症の慢性化に CXCL10 が極めて重要であると考えられた。また、抗 CXCL10 抗体が HAM の病態における炎症ループを特異的かつ効率的に遮断し、炎症の遷延化を抑制する分子標的治療法に結びつく成果であると考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Sato T., Araya N., Yagishita N., Ando H., Yamano Y. Host Immune System

- Abnormalities Among Patients with Human T-Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1)-Associated Disorders. **T-Cell Leukemia**, 65-80/234, InTech, 2011.
- 2) Araya N., Sato T., Yagishita N., Ando H., Utsunomiya A., Jacobson S., Yamano Y. Human T-Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) and Regulatory T Cells in HTLV-1-Associated Neuroinflammatory Disease. **Viruses**, 3: 1532-1548, 2011.
  - 3) Yamano Y., Sato T. Clinical pathophysiology of human T-lymphotropic virus-type1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Frontiers in Virology**, 3: 1-10, 2012.
  - 4) 山野嘉久、佐藤知雄、新谷奈津美、安藤仁、八木下尚子 HAM 専門外来の取り組み **神経内科**, 75 (4) 387-392, 2011.
  - 5) 安藤仁、八木下尚子、新谷奈津美、佐藤知雄、山野嘉久 HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の病態と治療 **医療と検査機器・試薬** 34 (4) 別冊 機器・試薬 34 (4) : 472-477, 2011.
  - 6) 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.
  - 7) 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.
  - 8) 佐藤知雄、山野嘉久. 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**, 71 (5) : in press, 2013.
2. 学会発表
- 国際会議
- 1) Yamano Y., Sato T., Araya N., Yagishita N., Shimizu Y., Ando H., Utsunomiya A., Izumo S., Jacobson S., Suzuki N. Clinical subtype of HAM/TSP based on clinical course and laboratory findings. 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. June 2011, Leuven, Belgium.
  - 2) Sato T., Muto M., Araya N., Maekawa R., Suzuki N., Utsunomiya A., Seino K., Yamano Y. Possibility of  $\gamma\delta$ T cell immunotherapy for HTLV-1-infected individuals. 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. June 2011, Leuven, Belgium.
  - 3) Araya N., Sato T., Utsunomiya A., Ando H., Yagishita N., Kannagi M., Nakamura T., Tanaka Y., Jacobson S., Yamano Y. The plasticity of HTLV-1 infected CD4+CD25+CCR4+ T-cells through HTLV-1 tax in HAM/TSP. 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. June 2011, Leuven, Belgium.
- 国内会議
- 1) 山野嘉久、新谷奈津美、佐藤知雄、中村龍文、森直樹、鈴木登 HTLV-1 関連脊髄症(HAM)患者でのフコイダン

- 療法によるウイルス量の減少 第 52 回日本神経学会学術大会 2011年5月20日 名古屋
- 2) 佐藤知雄、武藤真人、新谷奈津美、八木下尚子、前川隆司、宇都宮與、神奈木真理、清野研一郎、山野嘉久 HTLV-1 感染者に適用可能なガンマデルタ T 細胞療法の開発 第 4 回 HTLV-1 研究会・合同班会議 2011年9月19日 東京
  - 3) 山野嘉久、佐藤知雄、新谷奈津美、八木下尚子、安藤仁、宇都宮與、出雲周二 HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の臨床病型：臨床経過と検査所見に基づいた分類 第 4 回 HTLV-1 研究会・合同班会議 2011年9月19日 東京
  - 4) 新谷奈津美、佐藤知雄、安藤仁、八木下尚子、神奈木真理、田中勇悦、宇都宮與、山野嘉久 HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) における HTLV-1 を介した病原性 T 細胞発生機構の解析 第 4 回 HTLV-1 研究会・合同班会議 2011年9月19日 東京
  - 5) Sato T., Muto M., Araya N., Kojo S., Maekawa R., Utsunomiya A., Seino K., Yamano Y. Frequency and functional significance of  $\gamma\delta$ T cells in HTLV-1-infected individuals. (HTLV-1 感染者におけるガンマデルタ T 細胞の頻度および機能的な重要性) . 第 40 回日本免疫学会学術集会 2011年11月27日 千葉
  - 6) Araya N., Sato T., Utsunomiya A., Ando H., Yagishita N., Kannagi M., Tanaka Y., Yamano Y. The molecular mechanism in the plasticity of HTLV-1 infected CD4+CD25+CCR4+ T-cells through HTLV-1 in HAM/TSP. 第 40 回日本免疫学会学術集会 2011年11月27日 千葉
  - 7) 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) の疾患活動性バイオマーカーに関する解析 平成 23 年度厚生労働省科学研究費補助金 難知性疾患克服研究事業 「免疫性神経疾患に関する調査研究」班会議 2012年1月26日 東京
  - 8) 安藤仁、佐藤知雄、新谷奈津美、山内淳司、八木下尚子、山野嘉久 HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の慢性炎症における CXCL10 の重要性に関する解析 平成 23 年度厚生労働省科学研究費補助金 難知性疾患克服研究事業 「免疫性神経疾患に関する調査研究」班会議 2012年1月26日 東京
  - 9) 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.
  - 10) 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.

京.

- 11) 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.
- 12) 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, 長野.
- 13) 高田礼子、橋本充代、佐藤知雄、新谷奈津美、八木下尚子、山野嘉久. HAM 患者登録システム (HAM ねっと) の構築および登録患者の調査概要報告. 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)「免疫性神経疾患に関する調査研究」班平成 24 年度班会議, 2013 年 1 月 23・24 日, 東京.
- 14) 佐藤知雄、新谷奈津美、安藤仁、山内淳司、八木下尚子、山野嘉久. HAM における CCR4+CD4+T 細胞の異常. 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)「免疫性神経疾患に関する調査研究」班平成 24 年度班会議, 2013 年 1 月 23・24 日, 東京.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特願 2011-268019、発明者：山野嘉久、安藤仁、佐藤知雄、出願年月日 (2011 年 12 月 7 日)、HTLV-1 関連脊髄症を治療または予防するための医薬および前記医薬を用いた抗体療法の治療効果の確認方法

## HTLV-1 関連脊髄症（HAM）の新規医薬品開発のための 治療薬候補リード化合物のスクリーニング

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：現在、HTLV-1 関連脊髄症（HAM）の治療にはステロイドやインターフェロンが一般的に用いられているが、その効果は限定的で、いまだに HAM 患者は生涯にわたる歩行障害や膀胱直腸障害による QOL の低下を余儀なくされているのが現状で、HAM の新規治療薬開発は喫緊の課題である。HAM の主な病態は“HTLV-1 感染細胞に対する過剰な免疫応答”であると考えられているため、治療には「感染細胞の制御」と「過剰な免疫応答の是正」という 2 つの側面を考えなければならない。本研究では、HAM の新規治療薬候補分子を同定することを目的として、「感染細胞の制御」に対しては「感染細胞株に対する細胞傷害活性」を指標にして、「過剰な免疫応答」に対しては「HAM 患者末梢血リンパ球で認められる spontaneous proliferation」という現象を指標として、456 種類の化合物ライブラリーのスクリーニングを実施した。その結果、プレドニゾロン 1  $\mu\text{g/ml}$  よりも spontaneous proliferation を強く抑制する化合物を 68 種類、その中で非感染細胞株よりも感染細胞株に対する細胞傷害活性が高い化合物を 10 種類同定することができた。今後はこの候補化合物の誘導体を含めて、HAM に対して、より有効性および安全性の高い薬剤を探索していく必要がある。

### A. 研究目的

HTLV-1 関連脊髄症（HAM）は、“HTLV-1 感染細胞に対する過剰な免疫応答”が主な病態と考えられている。したがって、治療には「感染細胞の制御」と「過剰な免疫応答の是正」という 2 つの側面を考えなければならない。現在、HAM の治療にはステロイドが臨床的に用いられているが、この薬剤は非特異的に「過剰な免疫応答を是正」するが、「感染細胞の制御」効果に乏しい。また代謝に与える影響のため、長期使用に

おいて高血圧、糖尿病、骨粗鬆症などの副作用が問題となる。したがって、これからの HAM の治療にはウイルス感染細胞を減少させ、それによって、あるいは、それと同時に過剰な免疫応答を抑制する、副作用の少ない薬剤が求められる。このような薬剤を開発することを目的に、既知の化合物 80 種と未知の化合物 376 種、合わせて 456 種よりなる化合物ライブラリーを用いて HAM の新規治療薬となりうるリード化合物を探索することにした。

スクリーニングには Spontaneous proliferation という現象を利用する。Spontaneous proliferation とは、HTLV-1 感染者の末梢血リンパ球を培養するとマイトジェンや IL-2 などの刺激なしに自律的に効率よく増殖する反応のことをいう。この反応は HAM 患者のリンパ球において未発病感染者や ATL 患者のリンパ球と比較して有意に強いことが報告され (Usuku ら Ann Neurol 1988, Itoyama ら Neurology 1988)、HAM の病態である“HTLV-1 感染細胞に対する過剰な免疫応答”を反映した現象であると考えられている。したがって、HAM 患者の spontaneous proliferation を阻害する化合物の中に、過剰免疫応答の抑制効果とウイルス感染細胞の減少効果も有する物質が含まれていると考えられる。

## B. 研究方法

理化学研究所より購入した 80 種の既存の化合物よりなる標準ライブラリーと 376 種の未知の化合物よりなるパイロットライブラリーの 2 つの化合物ライブラリーを用いた。化合物はすべて DMSO により 10mg/ml で溶解されていた。この化合物ライブラリーを spontaneous proliferation によるアッセイ系 (図 1) と cell counting kit-8 (dojindo) による細胞毒性を調べるアッセイ系 (図 2) の 2 つのアッセイ系でスクリーニングを実施した。

図 1: spontaneous proliferation によるアッセイ系

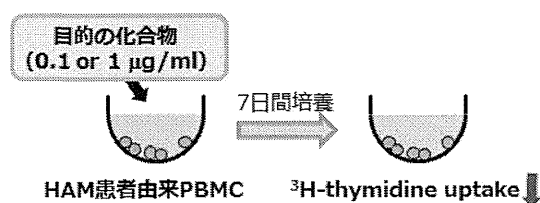
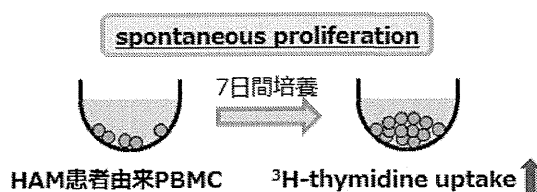
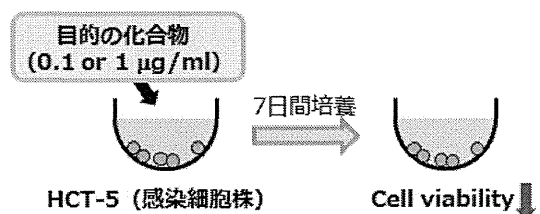
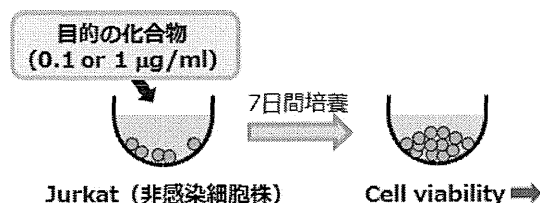


図 2: cell counting kit-8 による細胞毒性を調べるアッセイ系



<spontaneous proliferation の系>

ポジティブコントロールとしてプレドニゾン (PSL) 1 $\mu$ g/ml を使用した。

- 1) HAM 患者由来末梢血単核球 (PBMC) を 37 $^{\circ}$ C で溶解してを U 底 96 well plate に  $5 \times 10^4$  cells/100 $\mu$ l/well で播種した。
- 2) 化合物はまず DMSO で 0.5mg/ml にした後、培地で 2 $\mu$ g/ml と 0.2 $\mu$ g/ml に希釈した。
- 3) 化合物の希釈液を各 well に 100 $\mu$ l/well 加え、最終濃度を 1 $\mu$ g/ml と 0.1 $\mu$ g/ml として培養した。
- 4) 4 日目に  $^3$ H-thymidine を各 well に 11 $\mu$ l ずつ添加し、その 16 時間後にカウントした。

<細胞毒性を調べる系>

使用した細胞株

- ① Jurkat (ヒト急性 T 細胞白血病細胞株)
- ② HCT-5 (HAM 患者由来 HTLV-1 感染細胞株)

- 1) Jurkat, HCT-5 を平底 96well plate に  $2 \times 10^4$  cells/100 $\mu$ l/well ずつ播種した。
- 2) 各化合物を終濃度が 1 $\mu$ g/ml および 0.1 $\mu$ g/ml になるように加えて培養した。
- 3) 48 時間後に cell counting kit-8 を各 10  $\mu$ l 加えて 4 時間後に OD 450nm を測定した。

上記の結果を基に、

- ① PSL 1 $\mu$ g/ml より強い spontaneous proliferation 抑制作用を示す
- ②非感染細胞株 (Jurkat) の生存率を維持し (生存率 80%以上)、HTLV-1 感染細胞株

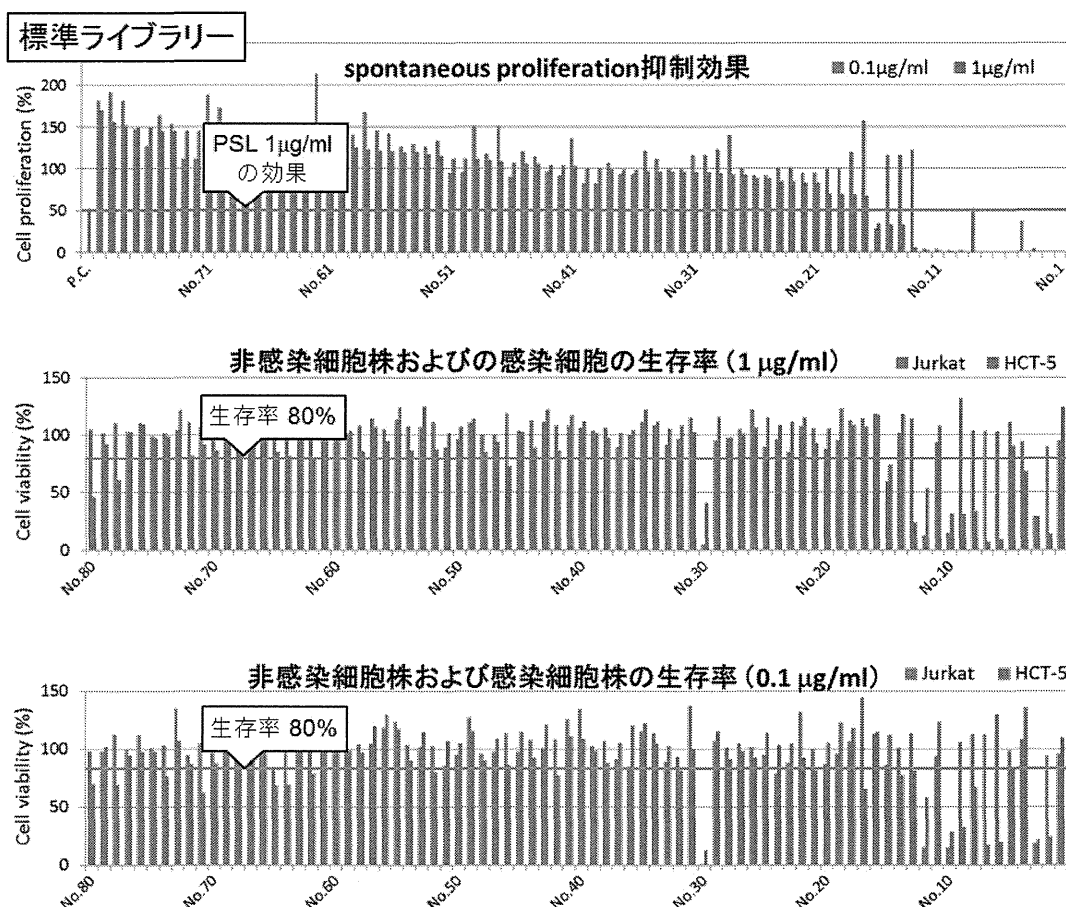
(HCT-5) の生存率を低下させる (生存率 80%以下)

という基準を満たす化合物を選択した。

(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。

図 3: 標準ライブラリーを用いたスクリーニング結果



### C. 研究結果

PSL 1 $\mu$ g/ml は使用した HAM 患者の PBMC の spontaneous proliferation ( $^3$ H-thymidine の uptake) を平均で 53% に低下させた。

その結果を基にして、選択基準①「PSL 1 $\mu$ g/ml より強い spontaneous proliferation 抑制作用を示す」を満たす化合物は、

標準ライブラリー (図 3)

16 種 (ステロイド : 1 種、強心配糖体 : 2 種、抗がん剤 : 5 種、抗生物質 : 4 種、抗コリン薬 : 1 種、その他 : 3 種)

パイロットライブラリー (data not shown)

52 種

の計 68 種であった。

次に選択基準①および②「非感染細胞株 (Jurkat) の生存率を維持し (生存率 80% 以上)、HTLV-1 感染細胞株 (HCT-5) の生存率を低下させる (生存率 80%以下)」の両者を満たす化合物は、

標準ライブラリー (図 3)

7 種 (強心配糖体 : 1 種、抗がん剤 : 3 種、抗生物質 : 3 種)

パイロットライブラリー (data not shown)

3 種

の計 10 種であった。

### D. 考案

本研究により、選択基準①「PSL 1 $\mu$ g/ml より強い spontaneous proliferation 抑制作用を示す」を満たす化合物が 68 種類同定された。過去の報告から、健常者に対する PSL 40mg 単回投与後の最高血中濃度が 0.66  $\mu$ g/ml なので、今回使用したポジティブコントロールである PSL 1  $\mu$ g/ml は、それ以上の量のステロイドを内服したときの血中濃度と同等と考えられる。つまり今回、同定された 68 種類の化合物はその量のス

テロイドよりも spontaneous proliferation を強く抑制することのできる化合物である。得られた化合物の 1 つに PSL よりも糖質コルチコイド作用が約 7 倍強いベタメタゾンが含まれている。このことは、本スクリーニングの結果の信頼度を高めていると考えられる。

さらに選択基準①に加えて、非感染細胞株よりも感染細胞株に対する細胞傷害活性が高いという選択基準②も同時に満たす化合物を 10 種類同定することができた。この中には感染細胞を傷害し、その増殖を抑制することのできる化合物が含まれている可能性がある。このような化合物は HAM の治療に重要な「感染細胞の制御」と「過剰な免疫応答の是正」という両者を兼ね備えた理想的な薬剤であると考えている。

### E. 結論

本研究により、HAM の新規治療薬候補分子が複数同定された。今後はこれらの候補化合物の誘導体を含めて、HAM に対して、より有効性および安全性の高い薬剤を探索していく必要がある。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Sato T., Araya N., Yagishita N., Ando H., Yamano Y. Host Immune System Abnormalities Among Patients with Human T-Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1)-Associated Disorders. **T-Cell Leukemia**, 65-80/234, InTech, 2011.
- 2) Araya N., Sato T., Yagishita N., Ando H., Utsunomiya A., Jacobson S., Yamano Y. Human T-Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) and Regulatory T Cells in HTLV-1-Associated Neuroinflammatory



- Disease. **Viruses**, 3: 1532-1548, 2011.
- 3) Yamano Y., Sato T. Clinical pathophysiology of human T-lymphotropic virus-type1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Frontiers in Virology**, 3: 1-10, 2012.
  - 4) 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.
  - 5) 佐藤知雄、山野嘉久. 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, 71 (5) : in press, 2013.
  - 6) 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.
  - 7) 山野嘉久、佐藤知雄、新谷奈津美、安藤仁、八木下尚子 HAM 専門外来の取り組み 神経内科, 75 (4) 387-392, 2011.
  - 8) 安藤仁、八木下尚子、新谷奈津美、佐藤知雄、山野嘉久 HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の病態と治療 医療と検査機器・試薬 34 (4) 別冊 機器・試薬 34 (4) : 472-477, 2011.
2. 学会発表
- 国際会議
- 1) Yamano Y., Sato T., Araya N., Yagishita N., Shimizu Y., Ando H., Utsunomiya A., Izumo S., Jacobson S., Suzuki N. Clinical subtype of HAM/TSP based on clinical course and laboratory findings. 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. June 2011, Leuven, Belgium.
  - 2) Sato T., Muto M., Araya N., Maekawa R., Suzuki N., Utsunomiya A., Seino K., Yamano Y. Possibility of  $\gamma\delta$ T cell immunotherapy for HTLV-1-infected individuals. 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. June 2011, Leuven, Belgium.
  - 3) Araya N., Sato T., Utsunomiya A., Ando H., Yagishita N., Kannagi M., Nakamura T., Tanaka Y., Jacobson S., Yamano Y. The plasticity of HTLV-1 infected CD4+CD25+CCR4+ T-cells through HTLV-1 tax in HAM/TSP. 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. June 2011, Leuven, Belgium.
- 国内会議
- 1) 山野嘉久、新谷奈津美、佐藤知雄、中村龍文、森直樹、鈴木登 HTLV-1 関連脊髄症(HAM)患者でのフコイダン療法によるウイルス量の減少 第 52 回日本神経学会学術大会 2011 年 5 月 20 日 名古屋
  - 2) 佐藤知雄、武藤真人、新谷奈津美、八木下尚子、前川隆司、宇都宮與、神奈木真理、清野研一郎、山野嘉久 HTLV-1 感染者に適用可能なガンマデルタ T 細胞療法の開発 第 4 回 HTLV-1 研究会・合同班会議 2011 年 9 月 19 日 東京
  - 3) 山野嘉久、佐藤知雄、新谷奈津美、八木下尚子、安藤仁、宇都宮與、出雲周二 HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の臨床病型: 臨床経過と検査所見に基づいた分類 第 4 回 HTLV-1 研究会・合同班会議 2011 年 9 月 19 日 東京
  - 4) 新谷奈津美、佐藤知雄、安藤仁、八木下尚子、神奈木真理、田中勇悦、宇都宮與、山野嘉久 HTLV-1 関連脊髄症

- (HAM) における HTLV-1 を介した病原性 T 細胞発生機構の解析 第 4 回 HTLV-1 研究会・合同班会議 2011 年 9 月 19 日 東京
- 5) Sato T., Muto M., Araya N., Kojo S., Maekawa R., Utsunomiya A., Seino K., Yamano Y. Frequency and functional significance of  $\gamma\delta$ T cells in HTLV-1-infected individuals. (HTLV-1 感染者におけるガンマデルタ T 細胞の頻度および機能的な重要性) . 第 40 回日本免疫学会学術集会 2011 年 11 月 27 日 千葉
  - 6) Araya N., Sato T., Utsunomiya A., Ando H., Yagishita N., Kannagi M., Tanaka Y., Yamano Y. The molecular mechanism in the plasticity of HTLV-1 infected CD4+CD25+CCR4+ T-cells through HTLV-1 in HAM/TSP. 第 40 回日本免疫学会学術集会 2011 年 11 月 27 日 千葉
  - 7) 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) の疾患活動性バイオマーカーに関する解析 平成 23 年度厚生労働省科学研究費補助金 難知性疾患克服研究事業 「免疫性神経疾患に関する調査研究」班会議 2012 年 1 月 26 日 東京
  - 8) 安藤仁, 佐藤知雄, 新谷奈津美, 山内淳司, 八木下尚子, 山野嘉久 HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の慢性炎症における CXCL10 の重要性に関する解析 平成 23 年度厚生労働省科学研究費補助金 難知性疾患克服研究事業 「免疫性神経疾患に関する調査研究」班会議 2012 年 1 月 26 日 東京
  - 9) 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.
  - 10) 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.
  - 11) 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.
  - 12) 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, 長野.
  - 13) 高田礼子, 橋本充代, 佐藤知雄, 新谷奈津美, 八木下尚子, 山野嘉久. HAM 患者登録システム (HAM ねっと) の構築および登録患者の調査概要報告. 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) 「免疫性神経疾患に関する調査研究」班平成 24 年度班会議, 2013 年 1 月 23・24 日, 東京.
  - 14) 佐藤知雄, 新谷奈津美, 安藤仁, 山内淳司, 八木下尚子, 山野嘉久. HAM における CCR4+CD4+T 細胞の異常. 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)「免疫性神経疾患に関する調査研究」班平成 24 年度班会議, 2013 年 1 月 23・24 日, 東京.

**G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)**

特願 2011-268019、発明者: 山野嘉久、安藤仁、佐藤知雄、出願年月日 (2011 年 12 月 7 日)、HTLV-1 関連脊髄症を治療または予防するための医薬および前記医薬を用いた抗体療法の治療効果の確認方法

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

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

氏名 植田 幸嗣

所属 独立行政法人 理化学研究所

役職 上級研究員

研究協力者

氏名 石原 誠人

所属 独立行政法人 理化学研究所

役職 特別研究員

研究要旨： HTLV-1 関連脊髄症（HAM）特異的治療標的分子を探索する目的で、 $CD4^+CD25^+CCR4^+$  T 細胞 30 例（非感染者 6 例、HTLV-1 感染無症候患者 5 例、HAM 患者 10 例、ATL 患者 9 例）、および脳脊髄液 57 例（HTLV-1 感染無症候患者 6 例、HAM 患者 51 例）のプロテオーム解析を行った。

平成 23 年度、高率で HTLV-1 の感染が立証されている  $CD4^+CD25^+CCR4^+$  細胞のタンパク質総抽出液を使用し、14,064 ペプチドの定量プロファイルを得た。分散分析、交差検定を用いた二段階抽出により 17 タンパク質を HAM、ATL 治療・診断薬標的候補分子として同定した。

平成 24 年度は HTLV-1 感染者由来脳脊髄液の全タンパク質定量解析を行った。HTLV-1 感染無症候患者 6 例、HAM 患者 51 例の脳脊髄液を LC/MS/MS 質量分析にて解析した結果、1,873 脳脊髄液タンパク質が同定された。これらの中から HAM の疾患重症度と脳脊髄液中濃度が統計学的有意に相関して変動する 14 タンパク質を選出した。

本研究で同定されたこれらのタンパク質は、HAM 特有の慢性炎症、痙性麻痺などに対する有効な治療標的分子となり得る。

## A. 研究目的

現在 HAM の治療において、HAM 病因 T 細胞、または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治療薬は存在しない。そこで本研究では、患者由来末梢血細胞、脳脊髄液サンプルを用いて、HAM 治療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 病因 T 細胞が特異的に発現する抗原を発見できれば、副作用が少なく、効果の高い HAM 治療薬の開発や、さらには発症予防法の開発に繋がると期待できる。

## B. 研究方法

### ・末梢血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> T 細胞の解析

30 症例由来の末梢血細胞サンプル（非感染者 6 例、HTLV-1 感染無症候患者 5 例、HAM 患者 10 例、ATL 患者 9 例）から、フローサイトメトリーを用いて CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> T 細胞を抽出した。このステップにより、HAM 患者において高率で HTLV-1 に感染している HAM 病因細胞を濃縮、精製できる。

次に、精製した CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> T 細胞を 8M Urea を含む変性バッファーで溶解させ、還元アルキル化、トリプシン消化を行った。消化後ペプチドサンプルを逆相精製カートリッジにて脱塩した後、QSTAR-Elite 質量分析計（AB Sciex 社製）にて計 30 サンプルの Nano-LC/MS/MS 分析を行った。

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）、0.1 × 250 mm C18 L-column チップカ

ラム（充填剤：化学物質評価機構、ESI チップ：GL サイエンス、カラム充填：自作）を使用した。流速は 200 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。QSTAR-Elite 質量分析計の詳細な測定パラメーターは文献 [Ueda K. et al., Mol Cell Proteomics, 2010;9(9):1819-28] と同様のものを使用した。

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<sup>®</sup>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<sup>®</sup>モジュールを使用してデータの標準化を行った後、4 群 Kruskal-Wallis 検定による一次治療標的分子抽出を行った。ここでは  $p < 0.01$  を有意水準として設定し、4 病理群それぞれで特異的に発現している分子を選出した。引き続き Expressionist Analyst モジュールに搭載されている Ranking 法を用いて、交差検定に基づく治療薬候補分子の二次選定を行った。設定パラメータとして分類器に Support vector machine (Penalty = 10, Kernel: Gaussian [sigma = 5])、選定法に Recursive feature elimination 法、サンプリング法に Leave one out cross validation test を使用し、最も 4 群分類の False discovery rate が小さくなるペプチドの組み合わせを絞り込んだ。最終的に選出された候補ペプチドについて、LC/MS/MS 分析の結果に基づいた In-house MASCOT データベース検索により、ペプチド配列の同定を行った。

MASCOT 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 2011\_02 (525,207 sequences), Fixed modification = Carbamidomethyl (C), Variable modifications = Oxidation (M) + Acetyl (N-term) + Pyro-Glu/Gln (N-term), MS tolerance = 50 ppm, MS/MS tolerance = 0.1 Da, Peptide charge = +2 to +4, Instrument = ESI-QUAD-TOF。さらに、MASCOT Decoy Search アルゴリズムを使用し、False Discovery Rate を 0.05 に設定し、同定信頼性の基準とした。

#### ・脳脊髄液のプロテオーム解析

57 症例由来の CSF サンプルについて、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、 $0.3 \times 5$  mm L-Trap トラップカラム (化学物質評価機構)、 $0.075 \times 150$  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。

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<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> 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 ペプチドを治療・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。

#### C. 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血球、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。

凍結した血球、脳脊髄液、血漿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。

#### D. 研究結果

##### ・末梢血 $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{CCR4}^+$ T細胞の解析

30 症例由来の LC/MS/MS スペクトルは、Expressionist サーバー上で図 1 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 30 症例間の重複を除いた 14,064 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 30 症例間の定量比較値を得た。

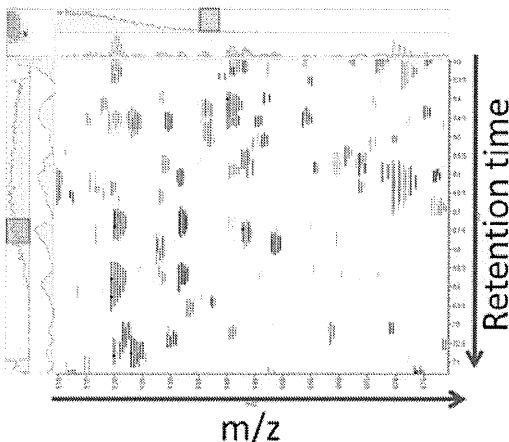


図 1 Expressionist プロテオームサーバー上での二次元定量クロマトグラム

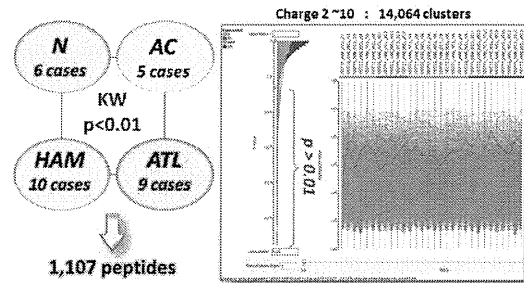


図 2 Kruskal-Wallis 検定による一次検定

エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) では通常、トリプシン消化後のペプチドは 2 価以上の多価イオンとして検出されるため、Expressionist Analyst モジュールにて電荷  $+2 \sim +10$  を持つ 14,064 のペプチドシグナルを抽出し、次の統計解析に供した。

非感染健常者 (ND)、感染無症候患者 (AC)、HAM 患者 (HAM)、ATL 患者 (ATL) の 4 群それぞれで特異的に発現しているペプチドを選出するため Kruskal-Wallis 検定を行い、1,071 ペプチドを  $p < 0.01$  の有意水準を満たす因子として抽出した (図 2)。

これら 1,071 ペプチドから、さらに 4 病理群分類への寄与率が高い分子を絞り込むため、Ranking 法による二次選定を行った。その結果、91 種類のペプチドが 4 群分類の False discovery rate を最小にできる必要十分な組み合わせであることが分かった (図 3)。すなわち、これらのペプチドには HAM や ATL 特異的に発現量の増減を示すバイオマーカー、創薬ターゲット候補が含まれることを示唆している。

続いてスクリーニング時に自動的に取得した LC/MS/MS データの MASCOT データベース検索により、これら 91 ペプチドの配列

決定、タンパク質帰属を行った。その結果、17 タンパク質の同定に成功した (False discovery rate < 0.05)。同定されたタンパク質を、30 症例間の定量プロファイルと共に図 4 に示す。

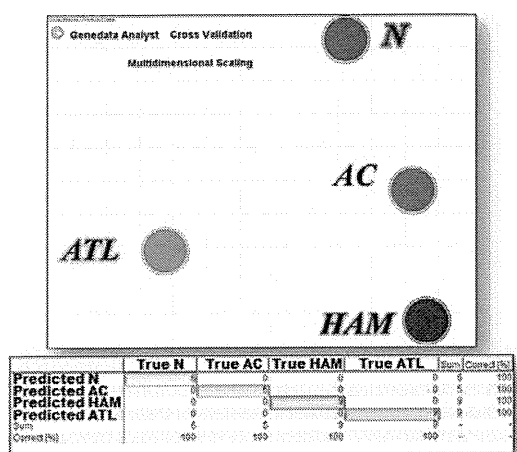


図 3 二次検定により抽出された 91 ペプチドを用いた 4 群交差検定の結果

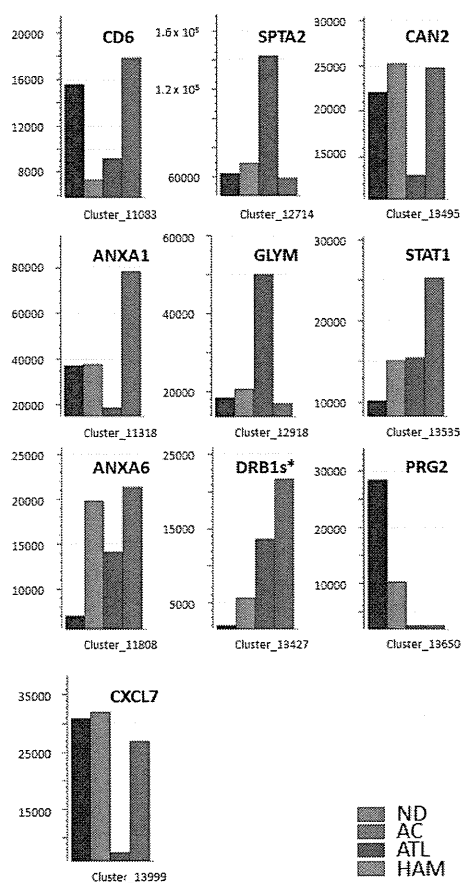
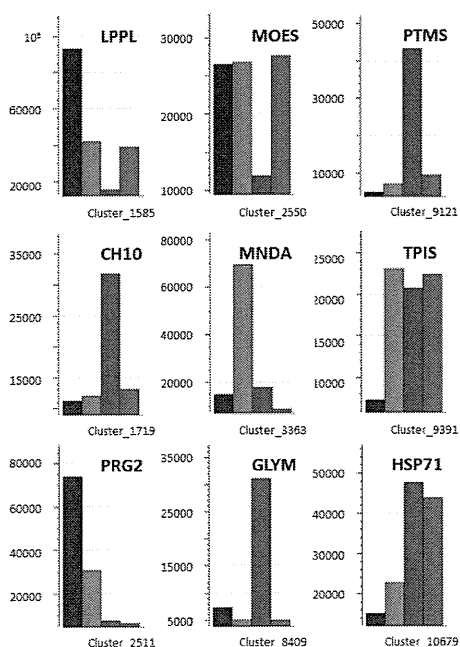


図 4 17 治療標的分子候補



### ・脳脊髄液のプロテオーム解析

57 症例由来の LC/MS/MS スペクトルを Expressionist サーバー上でデータプロセッシング、定量を行い、重複を除いた 68,077 ペプチドを検出した。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。



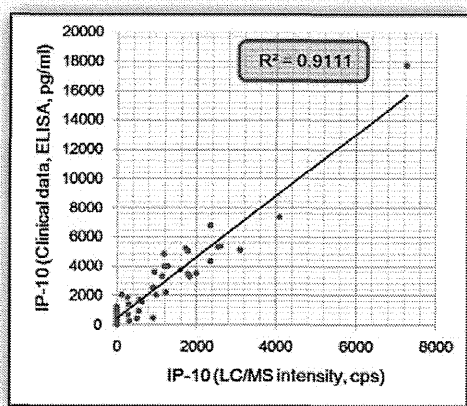
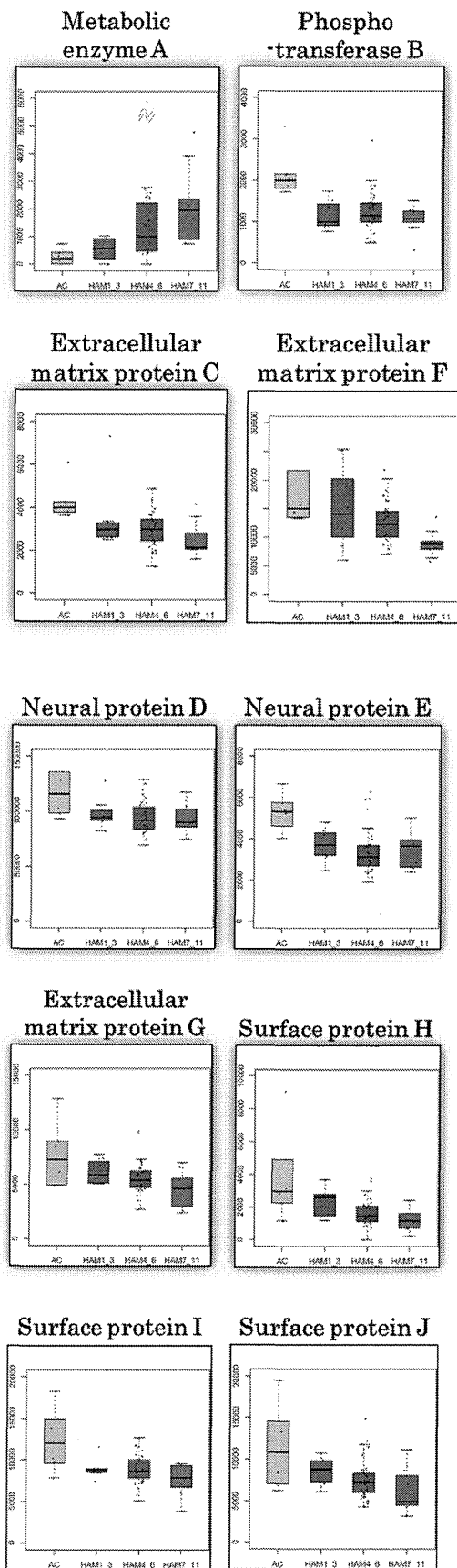


図5 脳脊髄液中 IP-10 の臨床情報と LC/MS/MS 定量値の比較。

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5) 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、pg/ml ~ ng/ml の低濃度領域においても信頼性の高いタンパク質定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 ペプチドを治療・診断標的候補タンパク質として選出した。



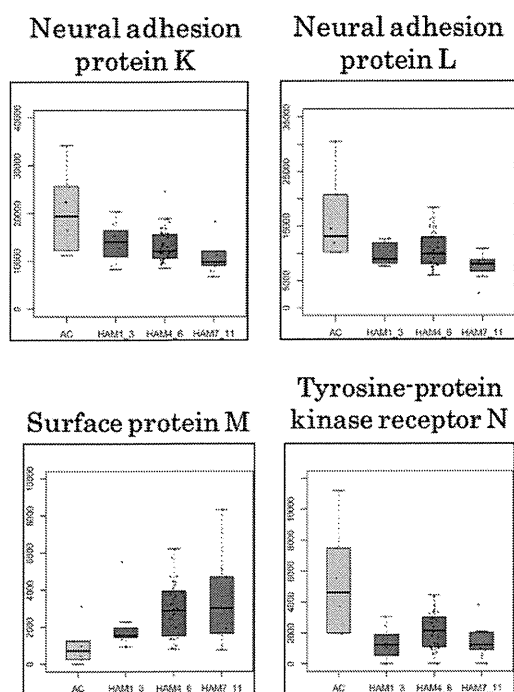


図6 HAM治療・診断薬標の候補タンパク質14種の定量ボックスプロット

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6である。この中でも特に分泌型ヌクレオチド代謝酵素A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が示唆された。

### E. 考案

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にも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。

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。

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はなく、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

うになると期待できる。

## F. 結論

遺伝子解析、細胞生物学的解析だけではなく、疾患の要因細胞や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治療標的タンパク質も、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、希少疾患由来の臨床検体を多数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。

## F. 研究成果の公表

### 1. 学術雑誌等での発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

該当なし

### 2. 学会等での講演、発表

国際会議

・Proteomic profiling of HTLV-1 infected T-cells for the Identification of potential biomarkers and therapeutic targets for HTLV-1 associated myelopathy/ tropical spastic

paraparesis and adult T-cell leukemia. Ueda, K., Ishihara, M., Ohsawa, A., Senkoji, N., Araya, N., Sato, T., Utsunomiya, A., Yamano, Y., Nakamura, Y., and Nakagawa, H.

The 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, June, 2011, Leuven, Belgium.

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

Ishihara, M., Araya, N., Sato, T., Utsunomiya, A., Yamano, Y., Nakamura, Y., Nakagawa, H., and Ueda, K.

HUPO 2011, 10th World Congress, Sep, 2011, Geneva, Swiss.

・ 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 70 回日本癌学会学術総会, Oct, 2011,  
Nagoya, Japan

・ 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

3. その他  
特になし

4. 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