

## タイラーウイルス誘導脱髄疾患モデルにおける樹状細胞と免疫制御受容体の役割の検討(II)

研究分担者 大原 義朗<sup>1)</sup>

共同研究者 武田 和也<sup>2)</sup>、姫田 敏樹<sup>1)</sup>、中村 晃<sup>2)</sup>

### 研究要旨

タイラーマウス脳脊髄炎ウイルス (TMEV) 感染による脱髄疾患 (TMEV-IDD) は、多発性硬化症 (MS) のモデルである。MS 治療には、I 型インターフェロン (IFN) 療法が行われることから、主要な IFN 産生細胞である形質細胞様樹状細胞 (pDC) および、その機能を制御している免疫グロブリン様受容体 PIR-B に着目し、TMEV-IDD 発症におけるこれらの役割を明らかにすることを目的とした。今回、pDC において TMEV の増殖を検討した結果、ウイルス増殖は認められなかったことから、pDC は TMEV に感染せず、I 型 IFN 産生に寄与していないと考えられた。また pDC 細胞表面への TMEV の結合が認められないことから、TMEV 受容体は pDC に発現していないと想定し、DNA マイクロアレイ解析により、その候補遺伝子を選別した。さらに PIR-B が、マクロファージにおいて TMEV 感染後の IL-6 産生を抑制していたことから、TMEV-IDD の発症を PIR-B が制御している可能性が示唆された。

### 研究目的

多発性硬化症 (MS) の再発防止には、I 型インターフェロン (IFN) の投与が効果的である。代表的な MS の動物モデルであるタイラーマウス脳脊髄炎ウイルス (TMEV) による脱髄疾患 (TMEV-IDD) の発症には、TMEV の持続感染が必須であり、I 型 IFN をはじめ宿主の抗ウイルス反応の関与が考えられている。しかしながら、生体内において最も I 型 IFN 産生能が高い形質細胞様樹状細胞 (pDC) の役割については不明なままである。

一方、免疫制御受容体は様々な免疫応答を正や負に制御している。pDC においてもこれら受容体が数多く発現しており、我々は最近、ペア型免疫グロブリン様受容体 (PIR-B) が、pDC の I 型 IFN 産生を抑制していることを明らかにしている<sup>1)</sup>。また PIR-B は中枢神経系においても発現しており、神経軸索伸長阻害因子 Nogo や MAG 等に結合して、軸索

伸長を阻害していることが示唆されている<sup>2)</sup>。

昨年度、我々は pDC では TMEV 刺激による I 型 IFN 産生や細胞内での TMEV カプシドタンパク質 VP1 の発現、細胞表面への TMEV の結合が認められないことを報告した。そこで本年度は、pDC においてウイルス増殖の有無を検討した。また、これまで TMEV 受容体は同定されていないが、我々は TMEV が pDC に結合しないことに着目し、pDC と TMEV が結合する従来型樹状細胞 (cDC) において DNA マイクロアレイ解析による TMEV 受容体の探索を試みた。一方、TMEV 感染時の PIR-B の役割については、マクロファージにおいて検討した。以上の実験を通じて TMEV-IDD における pDC や免疫制御受容体 PIR-B の役割を明らかにすることにより、これらを標的とした新たな MS 治療法の可能性について追求することを目的とした。

### 研究方法

TMEV 感染の評価のため、pDC と cDC に TMEV (DA 株) を添加し、培養後プ

1 金沢医科大学 医学部 微生物学

2 金沢医科大学 医学部 免疫学

ラークアッセイ法によりウイルス力価を測定した。TMEV 受容体探索のため、pDC と cDC において DNA マイクロアレイ解析を行い、cDC と比較して pDC での発現が低い遺伝子を選別した。候補となる受容体遺伝子を絞り込む目的で、マクロファージ、好酸球、T 細胞において TMEV の細胞表面上への結合をフローサイトメーターにより検討した。また TMEV 受容体が膜会合分子に依存するものであるかどうかを検討するため、DAP12 および FcR $\gamma$  欠損マウスから採取した cDC において、TMEV の結合と VP1 発現について検討した。さらに PIR-B 欠損マクロファージにおいて TMEV 添加後の IL-6 産生を測定した。

## 研究結果

プラークアッセイの結果、cDC に比べて pDC ではウイルス力価が顕著に低かった。マイクロアレイ解析では、cDC で pDC の 2 倍以上の発現が見られる約 900 個の遺伝子が明らかになった。マクロファージや好酸球の細胞表面上への TMEV の結合は認められたが、CD8 T 細胞では認められなかった。また DAP12 および FcR $\gamma$  欠損細胞を用いた検討では、TMEV 結合や細胞内 VP1 発現に野生型との有意な差は認められなかった。これらの結果から、TMEV 受容体候補遺伝子を約 30 個まで絞り込んだ。一方、PIR-B 欠損マクロファージでは、TMEV 刺激による IL-6 産生が野生型に比べて亢進していた。

## 考察

本研究の結果から、pDC には TMEV

が感染しないことが明らかとなった。pDC が TMEV 感染を感知できないことにより、抗ウイルス反応が弱くなり、個体における持続感染につながる可能性が示唆された。今後、cDC に発現する TMEV 受容体候補遺伝子のノックダウン実験を行って受容体の同定を試みる予定である。さらに PIR-B が、マクロファージによる IL-6 産生を抑制していることから、中枢神経系細胞においてもサイトカイン産生を制御している可能性が考えられた。今後、PIR-B 欠損 SJL マウスを作製し、個体レベルでの PIR-B の役割について検討する予定である。

## 結論

TMEV 感染時の I 型 IFN 産生には、pDC は寄与していないと考えられた。また PIR-B がマクロファージの IL-6 産生を抑制していることから、TMEV-IDD の発症に関与している可能性が示唆された。

## 文献

- 1) Mitsuhashi Y, Nakamura A, Endo S, Takeda K, Yabe-Wada T, Nukiwa T, Takai T. *Blood*. 2012, 120(16):3256-9.
- 2) Atwal JK, Pinkston-Gosse J, Syken J, Stawicki S, Wu Y, Shatz C, Tessier-Lavigne M. *Science*. 2008, 322(5903):967-70.

## 健康危険情報

なし

## 知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

## フマル酸によるタイラーウイルス誘導性脱髄疾患の抑制

研究分担者 高 昌星<sup>1)</sup>

共同研究者 小林邦俊<sup>2)</sup>、富木大基<sup>2)</sup>、Byung S. Kim<sup>3)</sup>

### 研究要旨

【背景】最近、酸化ストレスが多発性硬化症(MS)の病態に重要な役割を担っている可能性が示唆されている。酸化ストレスに関与するフマル酸ジメチル(DMF)は、海外では、MS 経口治療薬として臨床的に使用されているが、その詳細な制御機構は未だ不明である。そこで今回我々は、MS の発生機序の解明に有用な動物実験モデルであるタイラー脳脊髄炎ウイルス(TMEV)誘導による免疫性脱髄疾患(TMEV-IDD)における DMF の効果及びその機序を検討した。

【対象・方法】SJL/J マウス雌 6 週齢の左大脳半球内に TMEV を接種し、TMEV-IDD マウスを作製した。DMF 100 mg/kg を 1 日に 1 回 TMEV 接種後 11 日目から 41 日目まで投与し、臨床症状をスコア化した。TMEV 接種 41 日後に CNS を採取し、CNS 浸潤細胞数を測定した。また CNS 浸潤細胞中のサイトカイン産生 CD4<sup>+</sup>T 細胞及び CD8<sup>+</sup>T 細胞数を Flow cytometry にて解析した。

【結果】DMF 投与群において、TMEV-IDD の臨床スコアが有意に抑制された( $p < 0.05$ )。また DMF 投与群において、CNS 浸潤細胞数が有意に減少した( $p < 0.05$ )。さらに、DMF 投与により、CNS 浸潤細胞中の IFN $\gamma$ 、IL-4、IL-10、IL-17 産生 CD4<sup>+</sup>T 細胞及び、IFN $\gamma$  産生 CD8<sup>+</sup>T 細胞数が有意に減少した( $p < 0.05$ )。

【結論】本研究において、DMF は、酸化ストレスを抑制するだけでなく、炎症性サイトカインを制御する事により TMEV-IDD を制御している事が示唆された。

### 研究目的

多発性硬化症 (multiple sclerosis : MS) はヒトにおける中枢神経系 (central nervous system : CNS) の炎症性脱髄疾患である。タイラー脳脊髄炎ウイルス (Theiler's murine encephalomyelitis virus : TMEV) 誘導による免疫性脱髄疾患 (TMEV-induced demyelinating disease : TMEV-IDD) は MS に類似した臨床症状及び病理組織像を呈し、

最近、酸化ストレスが MS の病態に重要な役割を担っている可能性が示唆されている。MS の発生機序の解明に有用な動物実験モデルとされている。フマル酸ジメチル (DMF) は、酸化ストレスに関与する Nrf2-Keap1 経路を阻害することにより、抗酸化遺伝子及びタンパクの発現を誘導し、抗炎症作用及び神経保護作用に関与する事が報告されている。DMF は、BG-12 として既に海外では臨床治験が終了し、臨床的にも使用されているが、その詳細な制御機構は未だ不明である。

今回我々は、TMEV-IDD における

1)信州大学医学部保健学科

2)信州大学大学院医学系研究科

3)ノースウェスタン大学医学部微生物-免疫学講座

Nrf2-Keap1 阻害剤である DMF の効果及びその機序を検討した。

## 研究方法

SJL/J マウス雌 6 週齢の左大脳半球内に TMEV BeAn 株を  $0.67 \times 10^6$  plaque forming unit (PFU) / $\mu$ l 接種し、TMEV-IDD マウスを作製した。TMEV-IDD マウスにおける DMF の効果を検討するため、DMF (100mg/kg) を経口投与する DMF 投与群と、positive control として Methocel を経口投与する Methocel 投与群に分け、TMEV 接種後 10 日目から 40 日目までそれぞれ 1 日 1 回 (計 31 回) 投与した。TMEV 接種後 41 日目に各群マウスを屠殺し、中枢神経系を採取した。

TMEV-IDD への HCA3551 投与による影響は以下の方法により評価した。

### 1. 麻痺症状のスコア化

TMEV-IDD の麻痺症状を 6 段階に分けてスコア化した。(0: 正常、1: 軽度の歩行障害、2: 中等度の歩行障害および後肢の麻痺、3: 重度の後肢麻痺、4: 重度の後肢麻痺および立ち直り反射の消失、5: 瀕死状態または死亡)

### 2. CNS 浸潤細胞数の計測

TMEV 接種後 41 日目に各群のマウスから採取した CNS をすりつぶし、Percoll 液によりリンパ球、単球層を分離・回収し、Bürker-Turk 計算盤にて細胞数を計測した。

### 3. CNS 浸潤細胞中の CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 細胞数、炎症性サイトカイン産生細胞数の解析

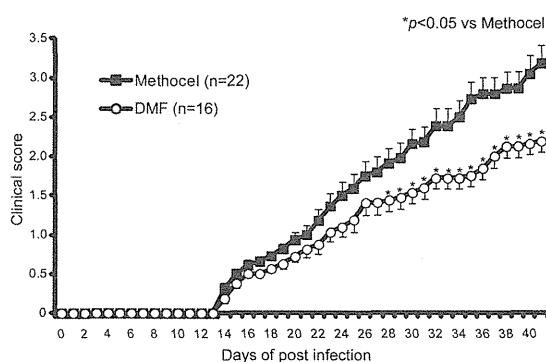
TMEV 接種後 41 日目に各群のマウスから CNS 浸潤細胞を回収し、TMEV 抗原を用いて細胞を刺激した後、CD4、CD8、IFN- $\gamma$ 、TNF、IL-4、IL-10、IL-17 を蛍光標識抗体にて常温・遮光条件で 30 分反応させた。その後、FACS Canto II Flow Cytometer を用いて CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 細胞数、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 細胞に

おける炎症性サイトカイン産生細胞数を解析した。

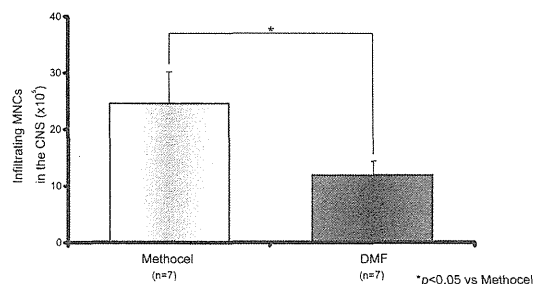
## 研究結果

DMF 投与群において、TMEV-IDD の臨床スコアが有意に抑制された ( $p < 0.05$ ) (図 1)。また DMF 投与群において、CNS 浸潤細胞数が有意に減少した ( $p < 0.05$ ) (図 2)。さらに、DMF 投与により、CNS 浸潤細胞中の IFN $\gamma$ 、IL-4、IL-10、IL-17 産生 CD4<sup>+</sup>T 細胞及び、IFN $\gamma$  産生 CD8<sup>+</sup>T 細胞数が有意に減少した ( $p < 0.05$ ) (図 3)。

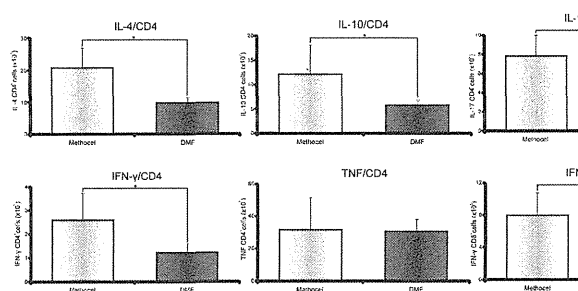
(図 1) 麻痺症状の経過



(図 2) CNS 浸潤細胞数



(図3) CNS浸潤細胞における炎症性サイトカイン産生細胞数



### 考察・結論

DMF は Nrf2-Keap1 経路を阻害することにより、樹状細胞やリンパ球上の炎症性サイトカインを抑制する事が報告されている。本研究において、DMF 投与により CNS への炎症性細胞の浸潤を抑えられ、また炎症性サイトカイン産生細胞が減少することにより、TMEV-IDD の麻痺症状が抑制されたと考えられる。以上の結果から、DMF は、酸化ストレスを抑制するだけでなく、炎症性サイトカインを制御する事により TMEV-IDD を制御している事が示唆された。

### 健康危険情報

なし

### 知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新薬登録：なし

## α4 インテグリン阻害薬 HCA3551 の経口投与による タイラー脳脊髄炎ウイルス誘導性免疫性脱髄疾患の抑制

研究分担者 高 昌星<sup>1)</sup>

共同研究者 富木大基<sup>2)</sup>、平野雄大<sup>1)</sup>、小林邦俊<sup>2)</sup>、Byung S. Kim<sup>3)</sup>

### 研究要旨

タイラー脳脊髄炎ウイルス (Theiler's murine encephalomyelitis virus : TMEV) 誘導による免疫性脱髄疾患 (TMEV-induced demyelinating disease : TMEV-IDD) は多発性硬化症 (multiple sclerosis : MS) に類似した脱髄病変を示すことから MS の病因解明や治療法開発に有用な動物実験モデルとされている。α4 integrin は α 鎖と β 鎖が 1 : 1 のヘテロ 2 量体を形成することにより機能し、炎症部位における白血球の接着・浸潤など、免疫機構において重要な役割を果たしている。現在、MS の治療薬として α4 integrin に対する抗体薬である Natalizumab が欧米で用いられているが、進行性多巣性白質脳症との関連が問題視されている。今回我々は、α4 integrin 阻害薬 HCA3551 の経口投与による TMEV-IDD の抑制効果を検討した。HCA3551 を TMEV-IDD マウスに投与することにより、麻痺症状が有意に抑制され、末梢血中リンパ球数と脾臓における α4 integrin 発現 CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>T 細胞が有意に増加した。また、その薬効を反映し、中枢神経系 (central nervous system : CNS) 浸潤細胞数及び CNS 浸潤 CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>T 細胞数が有意に減少すると共に、その CNS 浸潤細胞における TNF 産生 CD4<sup>+</sup>T 細胞と IFN-γ 産生 CD8<sup>+</sup>T 細胞が有意に減少した。以上の結果から、TMEV-IDD に HCA3551 を投与することにより、CNS への炎症性細胞浸潤が抑制され、TMEV-IDD が抑制されたと考えられる。従って本研究により、HCA3551 が MS の新規治療薬となりうる可能性が示唆された。

### 研究目的

多発性硬化症 (multiple sclerosis : MS) は、ヒトにおける中枢神経系の脱髄疾患である。発症機序には髄鞘に対する自己免疫反応が関与していると考えられているが、その反応を誘導する因子は未だ不明である。何らかのウイルス感染が MS 発症の引き金になると考えられており、その動物実験モデルとして、タイラー脳脊髄炎ウイルス (Theiler's murine encephalomyelitis

virus : TMEV) による免疫性脱髄疾患 (TMEV-induced demyelinating disease : TMEV-IDD) があり、この TMEV-IDD は MS に類似した脱髄病変を示すことから、MS の病因の解明、及び治療法の開発に有用であるとされている。最近 MS の治療において、自己免疫の中核を担う T 細胞の動態を制御し、脱髄進行を防ぐ薬剤である抗 α4 インテグリン抗体 (ナタリズマブ) が注目されており、海外では既に MS の治療薬として使用されている。今回我々は、α4 インテグリンに対する新規低分子化合物である HCA3551 を用い、HCA3551 の経口投与による TMEV-IDD 抑制効果の検討を行った。

1)信州大学医学部保健学科

2)信州大学大学院医学系研究科

3)ノースウェスタン大学医学部微生物-免疫学講座

## 研究方法

SJL/J マウス雌 6 週齢の左大脳半球内に TMEV BeAn 株を  $0.67 \times 10^6$  plaque forming unit (PFU) / $\mu$ l 接種し、TMEV-IDD マウスを作製した。TMEV-IDD マウスにおける HCA3551 の効果を検討するため、HCA3551 (100mg/kg) を経口投与する HCA3551 投与群と、positive control として Methocel を経口投与する Methocel 投与群に分け、TMEV 接種後 10 日目から 40 日目までそれぞれ 12 時間間隔で 1 日 2 回 (計 62 回) 投与した。TMEV 接種後 40, 41 日目に各群マウスを屠殺し、中枢神経系と脾臓を採取した。

TMEV-IDD への HCA3551 投与による影響は以下の方法により評価した。

### 1. 麻痺症状のスコア化

TMEV-IDD の麻痺症状を 6 段階に分けてスコア化した。(0 : 正常、1 : 軽度の歩行障害、2 : 中等度の歩行障害および後肢の麻痺、3 : 重度の後肢麻痺、4 : 重度の後肢麻痺および立ち直り反射の消失、5 : 瀕死状態または死亡)

### 2. 組織学的解析

各群のマウスから脊髄を採取し、ホルマリソ固定後、パラフィン包埋、薄切を行った。HE 染色と KB 染色により組織学的解析を行った。

### 3. 末梢血リンパ球数

TMEV 接種後 20, 30, 40 日目に、各群 7 匹ずつマウスの尾静脈から静脈血を採取し、0.5% EDTA-2K と混合し、自動血球分析装置 (XT-2000iV) にて末梢血リンパ球数を測定した。

### 4. 脾臓の CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>T 細胞の $\alpha 4$ integrin 発現解析

TMEV 接種後 40 日目の各群のマウスから脾臓細胞を回収し、CD4, CD8,  $\alpha 4$  integrin を蛍光標識抗体にて常温・遮光条件で 30 分反応さ

せた。その後、FACS Canto II Flow Cytometer を用いて脾臓中の CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>T 細胞における  $\alpha 4$  integrin 発現細胞数を解析した。

### 5. CNS 浸潤細胞数の計測

TMEV 接種後 41 日目に各群のマウスから採取した CNS をすりつぶし、Percoll 液によりリンパ球、単球層を分離・回収し、Bürker-Turk 計算盤にて細胞数を計測した。

### 6. CNS 浸潤細胞中の CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>T 細胞数、炎症性サイトカイン産生細胞数の解析

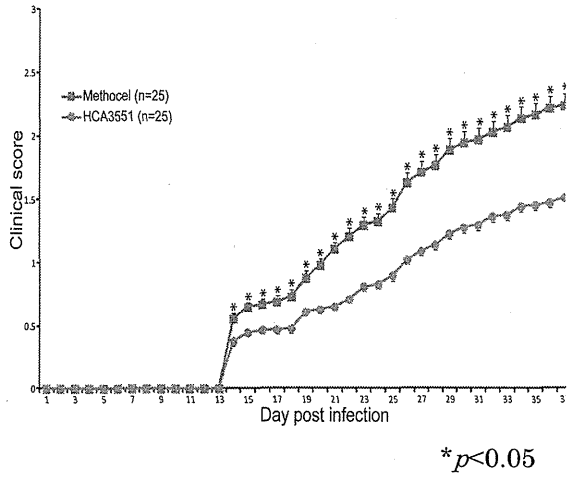
TMEV 接種後 41 日目に各群のマウスから CNS 浸潤細胞を回収し、TMEV 抗原を用いて細胞を刺激した後、CD4, CD8, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-4, IL-10, IL-17 を蛍光標識抗体にて常温・遮光条件で 30 分反応させた。その後、FACS Canto II Flow Cytometer を用いて CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>T 細胞数、CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>T 細胞における炎症性サイトカイン産生細胞数を解析した。

## 研究結果

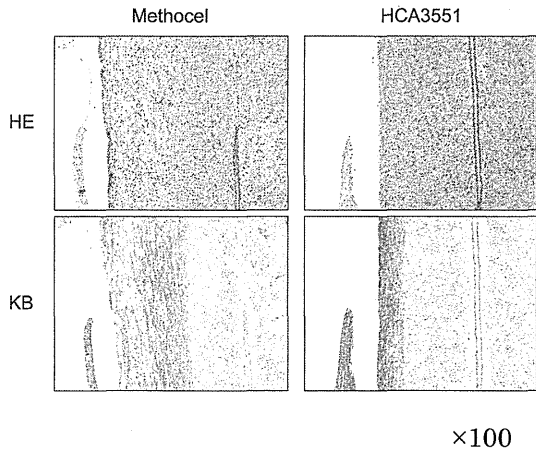
HCA3551 を TMEV-IDD に投与することにより、Methocel 投与群と比較して麻痺症状が有意に抑制された (図 1)。組織学的解析では、脱髄が抑制された (図 2)。また、末梢血リンパ球数の測定では、TMEV 接種後 20, 30, 40 日目の全ての測定において HCA3551 投与群の末梢血リンパ球数が有意に増加した (図 3)。脾臓細胞における FCM では、 $\alpha 4$  integrin 発現 CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>T 細胞数が HCA3551 投与群で有意に増加した (図 4)。また、HCA3551 投与群において CNS 浸潤細胞数が有意に減少した (図 5)。さらに、CNS 浸潤細胞の FCM では、CNS 浸潤 CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>T 細胞数が有意に減少すると共に (図 6)、その減少を反映して、TNF 産生 CD4<sup>+</sup>T 細胞数と IFN- $\gamma$  産生 CD8<sup>+</sup>T

細胞数が有意に減少した (図7)。

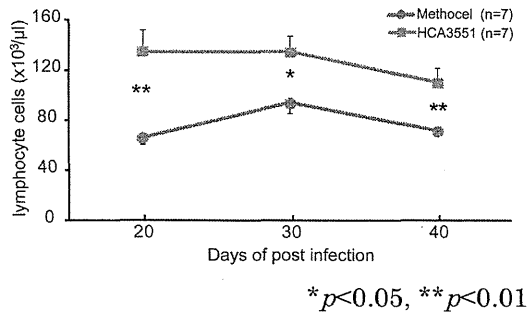
(図1) 麻痺症状の経過



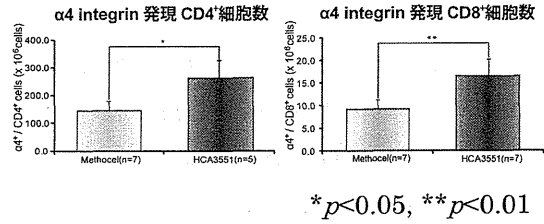
(図2) 組織学的解析



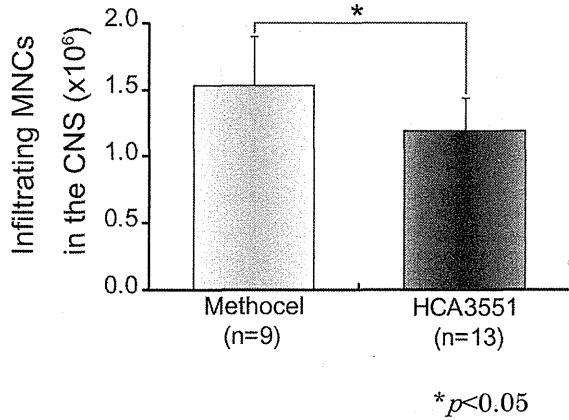
(図3) 末梢血リンパ球数推移



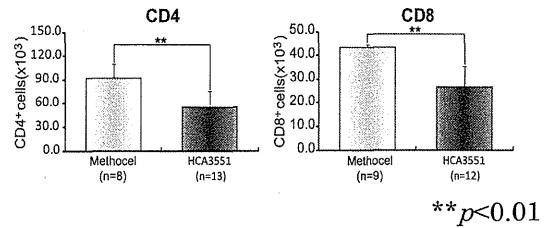
(図4) 脾細胞のα4 integrin発現CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>細胞数



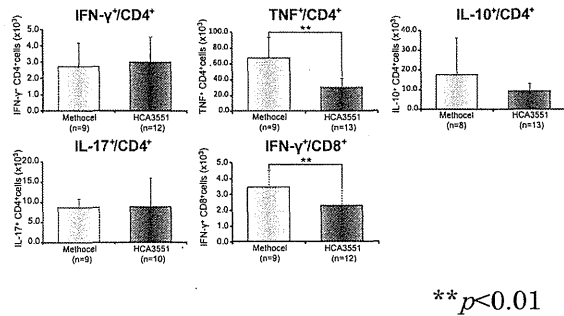
(図5) CNS浸潤細胞数



(図6) CNS浸潤CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>細胞数



(図7) CNS浸潤細胞における炎症性サイトカイン産生細胞数





## 考察・結論

$\alpha 4$  integrin はリンパ球や単球上に発現しており、血管内皮との結合を媒介し、炎症部位への炎症性細胞浸潤に関与している。今回の研究により、HCA3551 を TMEV-IDD に投与することにより、CNS への  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ T 細胞などの炎症性細胞浸潤が抑制されることが明らかとなった。その結果を反映し、末梢血中のリンパ球数や、脾臓における  $\alpha 4$  integrin 発現  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ T 細胞数が増加したと考えられる。以上の結果から、HCA3551 の経口投与により TMEV-IDD を抑制したと考えられる。従って、今回の研究により HCA3551 が MS の新規治療薬となりうる可能性が示唆された。

## 文献

- 1) Langer-Gould A *et al.* : Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient treated with natalizumab. N Engl J Med 2005 ; 353 : 375-381.
- 2) Sugiura T *et al.* : Oral treatment with a novel small molecule alpha 4 integrin antagonist, AJM300, prevents the development of experimental colitis in mice. Journal of Crohn's and Colitis 2013 ; 7 : e533-e542.

## 健康危険情報

なし

## 知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新薬登録：なし

## HAM 集積家系の検討

分担研究者 渡邊 修<sup>1)</sup>

共同研究者 ○松浦英治<sup>1)</sup>、野妻智嗣<sup>1)</sup>、高嶋 博<sup>1)</sup> 松崎敏男<sup>2)</sup>、久保田龍二<sup>2)</sup>、  
出雲周二<sup>2)</sup>

### 研究要旨

HAM を発症しやすい因子を持っていると思われる家系を調査することで HAM の病態解明を行った。1987 年から 2012 年までに鹿児島大学に登録された HAM784 患者から、家族内に複数例 HAM を発症した症例 (家族性 HAM) は 40 例 (5.1%) 存在し、罹患同胞相対危険率 ( $\lambda_s$ ) は 8.3 倍と想定された。この 40 例について孤発例 HAM124 例と比較することで家族性因子の HAM に対する影響を検討した。その結果、家族性 HAM の発症年齢は早く、ゆっくりと進行する例が多いことが明らかとなった。また、孤発例 HAM は家族例に比して発症早期から急速に進行する傾向が認められたため、急速に進行する例について解析したところ、家族例と孤発例の両群に於いて年齢とともにその割合が増加し、家族性であるかどうかとは別の因子で HAM の進行具合に影響を与えているものがあると推察された。また、発症から車いすとなるまでの期間は緩徐進行例はおよそ 15 年であるのに対して急速進行例は 1 年半と著しく短く、病勢の開きがあることも明らかとなった。このように臨床的に特徴付けられるサブグループが明らかとなったことで、遺伝子解析などの手法をあわせて用いることでさらに新しい HAM 発症、経過に関わる因子を明らかにすることが出来ると考えられる。

### 研究目的

HAM の発症には遺伝的背景が強く関係していることが知られており、現在までに HLA をはじめ様々な発症促進因子と発症抑制因子が報告されてきた。また、HAM 患者は、末梢血中 HTLV-1 プロウイルス量が無症候性キャリアに比べて高いことに加えその家族においてもプロウイルス量が優位に上昇していることが知られている。このことは、HAM を発症する家系にはプロウイルス量に影響を与える遺伝的背景があることを示唆している。そこで、今回われわれは、家族内に複数の HAM を発症している症例 (家族性 HAM) を調査し、臨床的解析を行った。

### 研究方法

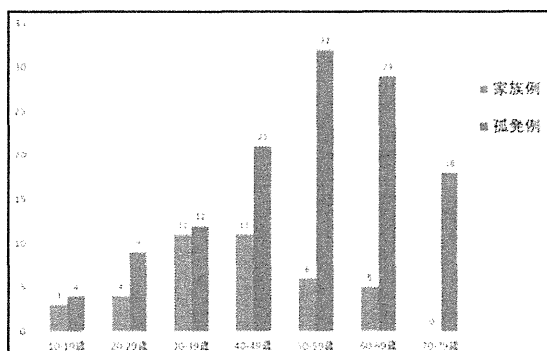
1987 年から 2012 年までに登録された HAM784 患者で、家族内に複数例 HAM を発症した症例について (家族性 HAM) について臨床症状・検査データを解析した。この家族性 HAM の臨床データを、2002 年から 2012 年までの 10 年間に入院した連続孤発例 HAM124 症例の解析結果と比較検討した。

### 研究結果

HAM784 例中に家族性 HAM は 40 例 (5.1%) 存在した。40 例の内訳は兄弟例が 67.5% で親子例が 25.0% であった。対照として検討する 10 年間の連続孤発性 HAM の症例は 124 人であった。

家族例では、孤発例と比較して、①発症年齢が低く (41.3 vs. 51.6 歳,  $p < 0.001$ )、

1) 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科神経内科・老年病学 2) 難治ウイルスセンター分子病理



②急速進行例が少なく (10.0% vs. 28.2%,  $p = 0.019$ )、③観察期間が長いにもかかわらず (14.3 vs. 10.2 年,  $p = 0.026$ ) 納の運動機能障害度 (OMDS) が低く (4.4 vs. 5.3,  $p = 0.040$ )、④発症から車いす使用に至った期間が長く (18.3 vs. 10.0 年,  $p = 0.025$ )、⑤髄液蛋白が優位に低かった (29.9 vs. 42.5 mg,  $p < 0.001$ )。一方、初発症状に差は無く、血清・髄液 HTLV-1 抗体価 (PA 法) や末梢血 HTLV-1 プロウイルス量、髄液細胞数・ネオプテリン値に優位差はなかった。

家族例 HAM の臨床症状が軽い傾向が明らかとなったが、結果的に車いす生活になっている方々の割合は両群でかわりなかったことを考えると発症から間もない早期の段階では家族性 HAM の症状が軽度であったことが推察された。逆に、孤発例 HAM では早期から症状が進行しやすい可能性が考えられた。この HAM の臨床症状の進行具合を比較するために観察期間 2 年の間に OMDS で 3 段階以上進行した症例を急速進行例としてその割合を比較した。この結果、急速に進行する HAM は年齢依存的に増加し、50 歳以上の発症例は家族

例、孤発例ともに5割前後以上が急速に進行することが明らかとなった(図表)。急速進行例と緩徐進行例は、炎症の違いを反映してか検査結果も有意な差を呈する項目が増えた(図表)。意外なことに急速進行例では緩徐進行例と比べて末梢血中のプロウイルス量が有意に低かった。

### 考察

我々は、本解析により家族内にHAMの集積する家系が5.1%あること、罹患同胞相対危険率( $\lambda_s$ )は8.3倍であることを明らかにし、家族内にHAM患者がいることがHAM発症のリスクであることを確認した。また家族性HAMは、孤発例と比較して、発症年齢がより若いが進行の速度は緩徐であるという臨床的特徴を明らかにしたが、その理由については今後の課題である。また、急速進行例が年齢に因って増加すること、急速進行例が発症から1.5年で車いすを必要とすることが明らかとなり、HAM患者の臨床経過が患者によって大きな開きがあることが明らかとなった。年齢とともにウイルスに対する免疫学的反応が変化することも考えられたが、我々のデータだけでは年齢とともに筋力低下を呈しやすくなっているのが筋骨格系の脆弱性に起因する可能性も否定できない。急速進行例で血中のプロウイルス量が低かったことに関しては、必ずしも患者の急速進行期の検査値ではないため結果の解釈には慎重を要するが、強い免疫反応の結果、免疫監視機構が強くなりプロウイルス量が一時的にも低下した可能性も考えられた。今後の更なる解析が必要である。

### 結語

今回の研究により家族内発症者がいることがHAM発症に関わる因子であることが明らかとなった。また、発症年齢がHAMの臨床経過に影響を与えることも明確となった。

### 文献

1. Nakagawa M, Izumo S, Ijichi S, Kubota H, Arimura K, Kawabata M, Osame M. HTLV-I-associated myelopathy: analysis of 213 patients based on clinical features and laboratory findings. *J Neurovirol.* 1995 Mar;1(1):50-61.
2. Satoshi Nozuma, Eiji Matsuura, Toshio Matsuzaki, Osamu Watanabe, Ryuji Kubota, Shuji Izumo, Hiroshi Takashima. Familial clusters of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *PLOS ONE* 2014 (in press)

	家族性(N=40)	孤発性(N=124)	P
急速進行群	4 (10.0%)	35 (28.2%)	0.039
発症から車いすまで (mean $\pm$ s.d., range)	18.3 $\pm$ 12.3 (7-50) (N=12)	10.0 $\pm$ 10.4 (1-45) (N=35)	0.025

	急速進行群(N=35)	緩徐進行群(N=89)	P
男性/女性	10/25	21/68	NS
年齢 (mean $\pm$ s.d., range)	65.4 $\pm$ 8.5	60.4 $\pm$ 13.6	0.048
発症年齢 (mean $\pm$ s.d., range)	62.3 $\pm$ 9.6	47.4 $\pm$ 15.9	<0.001
観察期間 (mean $\pm$ s.d., range)	3.0 $\pm$ 4.6	13.0 $\pm$ 9.6	<0.001

	急速進行群(N=35)	緩徐進行群(N=89)	P
納の運動機能障害度 (mean, median, range)	5.7, 5.0 (3-1)	5.1, 5.0 (0-11)	NS
Grade 6以上	13(37.1%)	25 (28.1%)	NS
観察期間 (mean $\pm$ s.d., range)	3.0 $\pm$ 4.6	13.0 $\pm$ 9.6	<0.001
発症から車いすまで (mean $\pm$ s.d., range)	1.5 $\pm$ 0.9 (N=13)	14.4 $\pm$ 10.4 (N=25)	<0.001

	急速進行群(N=35)	緩徐進行群(N=89)	P
HTLV-1抗体価(PA法)			
血清 (mean $\pm$ s.d., range)	31,894 $\pm$ 36,845 (N=34)	30,608 $\pm$ 35,965 (N=75)	NS
髄液 (mean $\pm$ s.d., range)	1,251 $\pm$ 1,800 (N=34)	416 $\pm$ 852 (N=77)	0.014
Proteus量 (copies/10 <sup>4</sup> PMCs) (mean $\pm$ s.d., range)	370 $\pm$ 327 (N=32)	1,245 $\pm$ 2,046 (N=69)	<0.001
髄液			
細胞数(/mm <sup>3</sup> ) (mean $\pm$ s.d., range)	11.6 $\pm$ 16.6 (N=34)	3.2 $\pm$ 3.5 (N=75)	<0.001
蛋白(mg/dl) (mean $\pm$ s.d., range)	55.3 $\pm$ 24.3 (N=34)	36.7 $\pm$ 13.0 (N=75)	<0.001
ネオフテリン(ng/ml) (mean $\pm$ s.d., range)	74.9 $\pm$ 107.9 (N=8)	27.4 $\pm$ 23.4 (N=27)	0.255

健康危険情報  
なし

知的財産権の出願・登録状況  
特許取得 なし  
実用新案登録なし

# HAM のポリ硫酸ペントサン治療における 血清 sVCAM-1 値の上昇と下肢運動機能改善の関係

分担研究者 中村龍文<sup>1)</sup>

共同研究者 佐藤克也<sup>1)</sup>、福田 卓<sup>2)</sup>、川上 純<sup>2)</sup>

## 研究要旨

HTLV-I 関連脊髄症 (HAM) 患者に対する新規治療としてポリ硫酸ペントサン (PPS) による治療を試み、その有効性を検討し、その有効性の機序について血清可溶性接着分子の血中濃度との関係において解析した。本治療によって痙縮の改善を基盤とした歩行時間および階段降時間の有意な短縮という下肢運動機能の改善がみられた。末梢血 HTLV-I プロウイルス量の有意な減少はなく、また血清ケモカイン (CXCL10 および CCL-2) でも有意な変化は得られなかったものの、血清可溶性 VCAM-1 (sVCAM-1) の有意な上昇と血清可溶性 ICAM-1 (sICAM-1) の上昇傾向が得られた。10m 歩行時間短縮率と血清 sVCAM-1 上昇率とは中等度の正の相関を示した。HAM に対する PPS 治療効果は上昇した血清 sVCAM-1 が生物学的アンタゴニストとして機能し、また PPS が元来持っている血流改善作用と相まって、HTLV-I 感染細胞の脊髄内浸潤の抑制に起因している可能性が考えられた。

## 研究目的

HTLV-I 関連脊髄症 (HAM) に対して現在主に施行されている副腎皮質ホルモン剤やインターフェロン- $\alpha$  といった免疫修飾療法には、その長期間に亘る使用において多くの問題点があり、それに代わる治療法の開発が切望されている。我々は以前に HAM 患者に対してポリ硫酸ペントサン (PPS) と同じポリサルフェートの一種であるヘパリン治療を試み、その有効性を報告してきた。しかし、長期間に亘る治療を必要としている HAM においては、その安全性において忍容性を持つかどうか不明である。そこで今回、50 年以上に亘り抗血栓薬および抗高脂血症薬としての有効性と安全性が確認されている PPS による治療を試み、その有効性と安全性を検討すると共に、その有効性の機序について血清可溶性接着分子の血中濃度と

の関係において解析した。

## 研究方法

1) 対象： HAM 患者 12 例 (女性 9 例：男性 3 例、年齢：49~77 歳 (平均：64.5 歳)、罹病期間：3~52 年 (平均：24 年、歩行可能な症例では約 21 年)、Osame による運動機能障害度 3~10 であった。既存の治療については投与方法を変更することなく併用した (表 1)。

### 2) 薬剤投与：

- ・薬剤；ポリ硫酸ペントサン注射剤 (PPS) 100 mg/ml/1A (ドイツ、ベーネ社より供与)
- ・投与方法；外来にて、皮下注射にて 1 週間に 1 回計 8 回投与 (初回 25 mg、2 回目 50 mg、3 回目以降 8 回目まで 100 mg)

3) 評価項目：以下の項目について投与前から継続的に投与終了後 5 週目まで評価を行った。

1) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染免疫学  
2) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科展開医療科学

## A) 神経内科学的評価

- a) Osame の運動機能障害度 b) 神経学的所見
- c) 歩行・階段降時間

## B) ウイルス学的・免疫学的評価

- a) 末梢血 HTLV-I プロウイルス量 b) 血清可溶性接着分子 (sVCAM-1、sICAM-1) 値 c) 血清ケモカイン (CXCL10、CCL2) 値

### (倫理面への配慮)

本臨床試験は本院倫理審査委員会の承認を得、UMIN 試験 ID (UMIN000004492) を取得し、臨床研究保険に加入し、文書によるインフォームド・コンセントを取得後、施行された。

## 研究結果

1) 下肢運動機能の改善: 表 1 に示すように、Osame の運動機能障害度で 1 段階改善を示したのは 1 例のみであったが、Modified Ashworth scale による下肢痙縮の評価では、投与前 9 例で認められた痙縮は 2 例で 2 段階、6 例で 1 段階の改善を示した。

表1. 症例のプロファイルと運動機能障害度及び痙縮の改善

症例	性	年齢(歳)	罹病期間(年)	併用薬剤	運動機能障害度		下肢痙縮	
					前	後	前	改善 (Modified Ashworth Scale(4-5)) (-) (1段階) (2段階)
1)	男性	57	51	フルドニゾン 5.75mg 毎日 及びオキサリタピン 300mg 毎日	6	5	(+)	●
2)	女性	62	28	(-)	10	10	(+)	●
3)	女性	61	30	(-)	5	5	(+)	●
4)	女性	49	29	(-)	5	5	(+)	●
5)	男性	64	11	フルドニゾン 4mg 毎日	5	5	(+)	●
6)	男性	76	23	(-)	6	6	(+)	●
7)	女性	63	15	(-)	4	4	(+)	●
8)	女性	67	3	(-)	3	3	(+)	●
9)	女性	77	17	(-)	5	5	(+)	●
10)	女性	62	12	フルドニゾン 4mg 毎日	4	4	(-)	
11)	女性	73	52	(-)	10	10	(-)	
12)	女性	63	19	(-)	4	4	(+)	●

2) 歩行/階段降時間の改善: 歩行/階段降時間短縮率 (投与前に比較しての投与終了後 1 週目および 5 週目における短縮率) で評価した: a) 10m 歩行; それぞれ  $-14.2 \pm 10.3\%$ 、 $-12.0 \pm 7.1\%$  であった ( $p=0.003$ 、 $p=0.015$ )。 b) 階段降 (10 段) 時間; それぞれ  $-15.4 \pm 10.1\%$ 、 $-10.8 \pm 8.2\%$  であった ( $p=0.003$ 、 $p=0.054$ ) (図 1)。

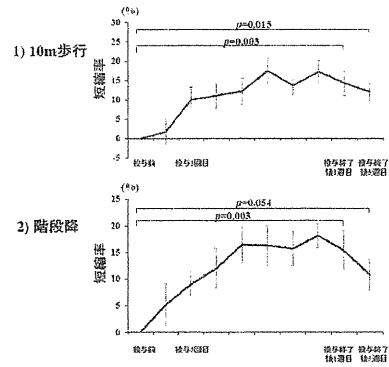


図1. 歩行・階段降時間の短縮

3) 末梢血 HTLV-I プロウイルス量の変化: 末梢血単核球 10000 個あたり投与前  $1268 \pm 646$  コピー、投与終了後 1 週目  $1153 \pm 611$  コピー、5 週目  $1241 \pm 694$  コピーであった。投与終了後 1 週目で平均約 9% の減少を示したが、統計学的には有意な減少は得られなかった (図 2)。

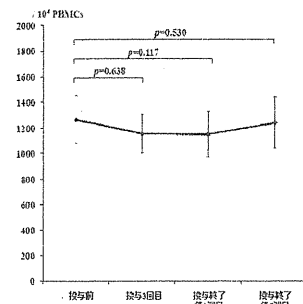


図2. 末梢血HTLV-Iプロウイルス量の変化

4) 血清可溶性接着分子および血清ケモカイン濃度の変化: sVCAM-1 値については投与前  $587 \pm 81.4$ 、投与終了後 1 週目  $762.2 \pm 118.6$ 、5 週目  $757 \pm 127.3$  ng/ml と有意な上昇を示した (投与終了後 1 週目  $p=0.002$ 、5 週目  $p=0.015$ ) (図 3)。sICAM-1 については 投与前に比較して、有意差はないも

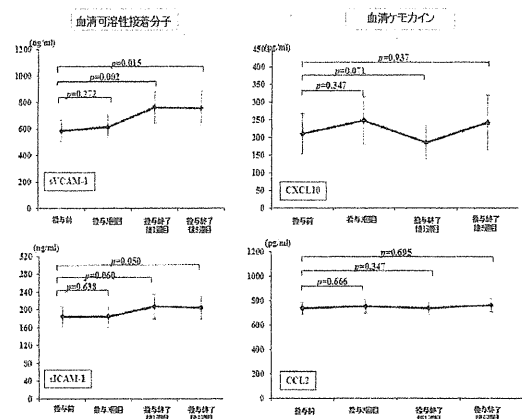


図3. 血清可溶性接着分子・ケモカインの変動

の、上昇傾向にあった (図 3)。血清ケモカイン値については CXCL10、CCL2 共に有意な変化はなかった (図 3)。

5) 10m 歩行時間短縮率と血清 sVCAM-1 上昇との関係：投与終了後 1 週目における両者の関係は中等度の正の相関を示した ( $r_s=0.648$ ,  $p=0.043$ ) (図 4)。

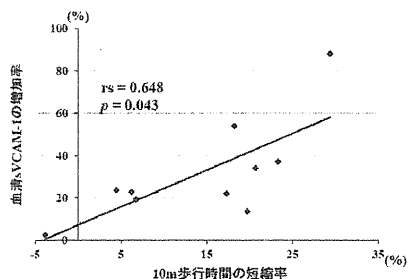


図4. 10m 歩行時間の短縮率と血清 sVCAM-1 の増加率との関係

6) 有害事象：APTT の一過性の軽度の延長のみであった。

## 考察

我々は以前に HAM に対してヘパリン治療の有効性を報告した (Nagasato K., et al. J Neurol Sci 1993)。しかし、HAM では長期に亘る治療を要し、より安全な治療法の開発が望まれるところである。ヘパリノイドの一種である PPS は、50 年以上にわたり欧州では抗血栓薬および抗高脂血症薬として、また米国とカナダでは間質性膀胱炎の治療薬として販売され、その安全性においてはほぼ確立している。そこで今回 HAM に対する PPS 治療を試み、その有効性と安全性について検討した。その結果、重篤な副作用の出現なしに、歩行可能な症例での平均罹病期間が約 21 年と長かったにもかかわらず、痙縮の軽減を基盤とした下肢運動機能の有意な改善が得られた。当初に期待した末梢血 HTLV-I プロウイルス量の有意な減少は得られなかったものの、血清 sVCAM-1 値の有意な上昇と血清 sICAM-1 値の上昇傾向が観察され、興味あ

ることに 10m 歩行時間短縮率と血清 sVCAM-1 上昇率とは中等度の正の相関を示した。これら可溶性接着分子の血中濃度が上昇した事実については PPS の新しい薬理作用として大変興味ある点であり、今後その機序についての解析を必要としているものの、以前、多発性硬化症における IFN- $\beta$  治療においても血清 sVCAM-1 の上昇とその治療効果との関係が報告されている。したがって、HAM に対する PPS 治療効果は上昇した血清 sVCAM-1 が生物学的アンタゴニストとして機能し、また PPS が元来持っている血流改善作用と相まって、HTLV-I 感染細胞の脊髄内浸潤の抑制に起因している可能性が考えられた。

## 結論

PPS は HAM に対する有望な治療薬となり得る可能性があり、今後多施設における臨床試験を実施する必要がある。

## 健康危険情報

なし。

## 知的所有権の出願・登録状況

特許取得：

- 1) HTLV-I 関連脊髄症の予防または治療剤 (特許出願中、特願 2011-226209、PCT/JP2012/076400)。
- 2) 排尿障害の予防・治療剤 (特許出願中、特願 2011-269262、PCT/JP2012/067984)。

実用新案登録：なし。

## HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の慢性炎症におけるアストロサイトの重要性に関する研究

研究協力者 山野嘉久<sup>1)</sup>  
共同研究者 佐藤知雄<sup>1)</sup>、安藤仁<sup>1)</sup>、新谷奈津美<sup>1)</sup>、山内淳司<sup>1)</sup>、國友康夫<sup>1)</sup>、  
高橋克典<sup>1)</sup>、八木下尚子<sup>1)</sup>

研究要旨：HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) は歩行障害や膀胱直腸障害によって、生涯にわたり QOL の低下を余儀なくされる神経難病である。主な病態は、HTLV-1 感染細胞に起因した脊髄の慢性炎症による神経組織傷害と考えられているが、HAM 患者脊髄における炎症の慢性化機構の詳細は不明である。これまでの我々の研究から、HAM 患者脊髄で産生される CXCL10 が CXCR3 陽性細胞を中枢神経系内へ遊走させ、脊髄の炎症を慢性化させている可能性が示唆された。そこで本研究では、これまで知られていない HAM 患者脊髄組織における CXCL10 産生細胞の同定と、その産生メカニズムについて検討し、HAM における炎症の慢性化機構の一端を明らかにすることを目的とした。

まず HAM 患者 (n = 4) および対照群 (n = 6) に由来する胸髄組織を用いて、抗 CXCL10 抗体による免疫組織化学を実施した。その結果、HAM 患者の胸髄組織中には CXCL10 産生細胞が有意に多く存在した ( $p = 0.0095$ )。また、免疫蛍光法により CXCL10 産生細胞はアストロサイトのマーカーである GFAP 陽性であることが判明した。次に、HAM 患者の主たる IFN- $\gamma$  産生細胞が CD4<sup>+</sup>細胞であることを同定し、この CD4<sup>+</sup>細胞とヒトアストロサイトマ細胞株である U251 を単独または組み合わせて培養し、U251 が産生する CXCL10 量を測定した。その結果、CD4<sup>+</sup>細胞数に応じて U251 からの CXCL10 産生が誘導された。また、この U251 から産生される CXCL10 は IFN- $\gamma$  中和抗体により、ほぼ完全に抑制することができた。

上記より、HAM 患者脊髄組織における CXCL10 の主たる産生細胞がアストロサイトであることが判明した。また、HAM 患者由来の感染細胞を含む CD4<sup>+</sup>細胞が産生する IFN- $\gamma$  が、アストロサイトからの CXCL10 産生を誘導した。したがって、感染細胞の脊髄への浸潤がアストロサイトからの CXCL10 産生を誘導し、一旦、CXCL10 が誘導されると CXCR3 陽性細胞 (IFN- $\gamma$  産生性の Th1 細胞や Tc1 細胞を含む) が脊髄中へ呼び込まれ、さらなる CXCL10 産生誘導が起こるという positive feedback loop が形成されている可能性が示唆された。したがって、この炎症ループを阻害することが HAM 脊髄における炎症の慢性化を阻止する新たな治療法になり得ると考えられる。

### 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り QOL の低下を余儀なくされている。このため、HAM 患者の疾患活動性の評価法および治療法の確立は非常に重要な厚生行政上の課題であるが、いまだに確立されていない。この原因の 1 つは HAM の疾患活動性を把握する、あるいは治療ターゲットを同定するための病態メカニズムの詳細が明らかになっていないこ

とによると考えられる。

HAM の主な病態は、HTLV-1 感染細胞に起因した脊髄の慢性炎症による神経組織傷害と考えられているが、このうち、HAM 患者脊髄における炎症の慢性化機構の詳細は不明である。近年、慢性炎症に認められるリンパ球の炎症部位への浸潤にケモカインが重要な役割をしていることが報告されており、我々はこのケモカインに着目して研究を進めた。その結果、これまでに HAM 患者のケモカイン CXCL10 濃度が血中よりも髄液中で有意に高く、この濃度勾配と一致して HAM 患者髄液細胞の約 90%が

1) 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター

CXCR3 陽性細胞によって占められていることを明らかにした。また、髄液 CXCL10 濃度が HAM の進行度とも相関していることを報告した<sup>1)</sup>。以上の点から、HAM 患者脊髄で産生される CXCL10 が CXCR3 陽性細胞を中枢神経系内へ遊走させ、脊髄の炎症を慢性化させている可能性が示唆された。そこで本研究では、これまで知られていない HAM 患者脊髄組織における CXCL10 産生細胞の同定と、その産生メカニズムについて検討し、HAM における炎症の慢性化機構の一端を明らかにすることを目的とした。

## 研究方法

本研究は HAM 患者 (n = 4) および対照群として脊髄に病変のない剖検例 (n = 6) に由来する胸髄組織を用いて、HE 染色、免疫組織化学および免疫蛍光法を実施した。抗 CXCL10 抗体を用いた免疫組織化学は DAB 染色により検出し、1mm<sup>2</sup> あたりの平均 CXCL10 陽性細胞数を鏡検により測定した。また免疫蛍光法は、1 次抗体に抗 CXCL10 抗体と抗 GFAP 抗体を使用し、それぞれ Alexa488、Alexa 594 で標識された 2 次抗体を用いて検出した。

次に、HAM 患者、無症候性キャリアおよび健常者の末梢血単核球 (PBMC) より CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、または CD14<sup>+</sup>細胞を分離培養し、無刺激で産生される培地中の IFN- $\gamma$  濃度を 0h、24h、48h、72h 後に測定した。ヒトアストロサイトーマ由来の細胞株である U251 と HAM 患者 CD4<sup>+</sup>細胞を単独または組み合わせて培養し、U251 が産生する CXCL10 量を測定した。さらに IFN- $\gamma$  や TNF- $\alpha$  の中和抗体の存在下で、U251 を HAM 患者 CD4<sup>+</sup>細胞の培養上清によって刺激培養し、産生される CXCL10 を測定し、中和抗体の阻害効果を検討した。統計学的解析として、平均 CXCL10 陽性細胞数の比較など 2 群間の比較には Mann-Whitney U test を用いた。

## (倫理面への配慮)

臨床検体の収集に際しては、本学の生命倫理委員会にて承認された(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、個人情報管理者に

より連結可能匿名化による番号化を行い、提供者を特定できないようにし、患者の人権擁護に努めた。

## 研究結果

HAM 患者の胸髄組織中には、対照群の胸髄と比較して CXCL10 産生細胞が有意に多く存在した ( $p = 0.0095$ )。また、同一 HAM 患者の延髄と比較しても、胸髄組織に CXCL10 産生細胞が多く認められた。この CXCL10 産生細胞は星状で、放射状に広がる細胞質突起を広範囲に伸ばしていることから活性化されたアストロサイトであることが示唆された。実際、この CXCL10 産生細胞はアストロサイトのマーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP) 陽性であった。

次に、CXCL10 が IFN- $\gamma$  で産生誘導されることが知られているため、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD14<sup>+</sup>細胞をそれぞれ分離培養して産生される IFN- $\gamma$  量を測定した。その結果、HAM 患者由来の CD4<sup>+</sup>細胞が最も多くの IFN- $\gamma$  を産生し、無症候性キャリア由来の CD4<sup>+</sup>細胞よりも有意に高値を示した ( $p = 0.0222$ )。この IFN- $\gamma$  産生能の高い HAM 患者由来の CD4<sup>+</sup>細胞をアストロサイト細胞株 U251 と共培養すると、CD4<sup>+</sup>細胞数に応じて U251 からの CXCL10 産生が誘導された。また、IFN- $\gamma$  中和抗体存在下では、HAM 患者由来 CD4<sup>+</sup>細胞の培養上清による U251 からの CXCL10 産生をほぼ完全に抑制することができた。

## 考察

上記の結果により、HAM 患者脊髄組織における CXCL10 の主たる産生細胞がアストロサイトであることが判明した。この CXCL10 を産生するアストロサイトが多く認められた部位は胸髄で、以前より HAM 脊髄における慢性炎症巣の中心と考えられていた部位と一致していた。また、HAM 患者由来の感染細胞を含む CD4<sup>+</sup>細胞が産生する IFN- $\gamma$  が、アストロサイトからの CXCL10 産生を誘導した。したがって、感染細胞の脊髄への浸潤がアストロサイトからの CXCL10 産生を誘導し、一旦、CXCL10 が誘導されると CXCR3 陽性細胞 (I



FN- $\gamma$ 産生性のTh1細胞や Tc1細胞を含む)が脊髄中へ呼び込まれ、さらなるCXCL10産生誘導が起こるというpositive feedback loopが形成されている可能性が示唆された。

#### 結論

本研究により、HAMの慢性炎症病巣形成においてアストロサイトは重要な役割を果たしていると考えられた。また、今回明らかとなったアストロサイトを介したCXCL10-CXCR3からなる炎症ループは、HAMの炎症慢性化の維持に非常に重要と考えられる。そのため、この炎症ループを阻害することがHAM脊髄における炎症の慢性化を阻止する新たな治療法になり得ると考えられる。

#### 文献

1) Sato T., Coler-Reilly A., Utsunomiya A.,

Araya N., Yagishita N., Ando H., Yamauchi J., Inoue E., Ueno T., Hasegawa Y., Nishioka K., Nakajima T., Jacobson S., Izumo S., Yamano Y. CSF CXCL10, CXCL9, and Neopterin as Candidate Prognostic Biomarkers for HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. PLoS Negl Trop Dis. 7(10) e2479, 2013

#### 健康危険情報

特記すべき事項はありません。

#### 知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

## HAM における HTLV-1 HBZ 特異的 CTL の検出

研究分担者 出雲周二<sup>1)</sup>

共同研究者 久保田龍二<sup>1)</sup>、松崎敏男<sup>2)</sup>、高嶋 博<sup>2)</sup>

### 研究要旨

近年、HTLV-1 のマイナス鎖にコードされる HBZ 遺伝子が同定されその機能解析等が進んでいるが、HBZ に対する免疫反応についてはよく分かっていない。今回、HAM における HBZ 蛋白に対する細胞性免疫である CTL について検討を行った。HLA-A\*0201 に拘束される HTLV-1 HBZ の CTL エピトープを同定するために、インターネット上の 4 種のエピトープ予測プログラムを用いて、6 個の候補ペプチドを抽出した。HAM および HTLV-1 キャリアの末梢血単核球を用い候補ペプチドを添加下で培養し、CD8 陽性細胞からのインターフェロン $\gamma$ 産生を指標にエピトープを検討したところ、2 個の CTL エピトープが同定された。これらのエピトープに対する反応を HAM およびキャリアで検討したところ、CTL の頻度は HTLV-1 キャリアと比べ HAM で有意に増加していた。今後 HBZ に対する CTL を用いた免疫療法の検討が必要である。

### 研究目的

HTLV-1 高ウイルス状態が、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。HTLV-1 Tax 特異的 CTL についてはよく検討されているが、HAM を含めた HTLV-1 感染者の末梢血単核球 (PBMC) で Tax 蛋白はほとんど発現していないため、これらの感染細胞は Tax 特異的 CTL から殺傷されない可能性がある。近年、HTLV-1 のマイナス鎖に HBZ 遺伝子が同定され、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、主要エピトープは同定されていない。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なった。さらに HAM と無症候性 HTLV-1 キャリアとで HBZ 特異的 CTL の比較を行った。

### 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 種のエピトープ予測プログラムを用いて、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 HTLV-1 キャリア 10 例の PBMC に、1  $\mu$ M で各ペプチドをパルスし 6 時間培養した。IFN- $\gamma$ を出力として、HBZ 抗原特異的 CD8+

---

1) 鹿児島大学難治ウイルス研

2) 鹿児島大学医学部神経内科

細胞をフローサイトメトリーで検出した。主要エピトープが同定された後、これらの HBZ エピトープを用いた HLA-A\*0201 テトラマーを合成し、HAM と HTLV-1 キャリアでの HBZ 特異的 CTL の頻度を比較検討した。

(倫理面への配慮)

臨床検体はインフォームドコンセントのもとに採取をおこない、無作為化して用いた。本研究は鹿児島大学倫理委員会の承認を得て行った。

## 研究結果

HAM および HTLV-1 キャリアでは 6 個の合成ペプチドのうち 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。これらのエピトープを結合したテトラマーによる解析では、HBZ1 特異的 CTL の頻度は、HTLV-1 キャリアと比べ HAM で有意に増加していた。HBZ6 特異的 CTL および HTLV-1 Tax11-19 特異的 CTL の頻度は、両者で差がなかった。また、Tax11-19 特異的 CTL の頻度は、HBZ1 特異的 CTL の頻度より有意に高かった。

## 考察

今回の検討で、HBZ 蛋白の CTL エピトープを 2 個同定した。HBZ 特異的 CTL 反応が HAM およびキャリア双方に観察され、CTL 頻度は HAM の方が高かった。HBZ 遺伝子に関しては臨床検体において mRNA は検出されるが、蛋白レベルでの発現は未だ適切な抗体がないためはっきりしていなかった。今回の HBZ 特異的 CTL の検出により、生体内で HBZ 蛋白が合成され、プロセ

スを受けて MHC クラス I 上に発現していることが明らかとなった。また、生体内では HTLV-1 感染細胞ではウイルス遺伝子の env、gag、tax の蛋白や mRNA はほとんど検出されないが、HBZ の mRNA は恒常的に検出されている。HAM では Tax 蛋白に対する CTL 反応が強いが、生体内のウイルス蛋白を発現しない感染細胞は、Tax 特異的 CTL からエスケープしていると考えられる。一方、HBZ 蛋白が生体内で発現しているのであれば、HBZ 特異的 CTL に排除される可能性が高い。今後 HTLV-1 感染細胞を減らす HAM の治療を考える上で HBZ に対する CTL を用いた免疫療法の検討が必要であろう。

## 結論

HAM およびキャリアで HBZ 特異的 CD8+細胞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 に関連すると思われる主要なエピトープが 2 つ検出され、このうち HBZ1 特異的 CTL の頻度は HAM で HTLV-1 キャリアより高値であった。今後、HBZ 特異的 CTL 細胞が、HAM 患者の PBMC 中の新鮮感染細胞を殺傷するかにつき検討が必要である。

## 健康危険情報

なし

## 知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

## HTLV-1 関連脊髄症 (HAM/TSP) における CD4+T 細胞表面の糖鎖修飾の特徴

研究分担者 出雲 周二<sup>1)</sup>

共同研究者 児玉 大介<sup>1)</sup>、出雲 公子<sup>1)</sup>、久保田 龍二<sup>1)</sup>、松崎 敏男<sup>2)</sup>、高嶋 博<sup>3)</sup>

### 研究要旨

最近 HTLV-1 関連脊髄症 (HAM/TSP、以下 HAM) 由来の検体を用いて感染細胞外側に O 型糖鎖や、糖鎖と結合するレクチンの一種で HTLV-1 Tax 誘導性の高発現分子 galectin-3 などが HTLV-1 p19Gag と共局在しており、ウイルスシナプスでは糖鎖関連分子が重要であることが示された。そこで我々は HTLV-1 感染病態で最も重要な糖鎖は何かを検討するため、HAM 由来の CD4+T 細胞を用いてレクチンアレイによる包括的糖鎖解析を少数例で行い、N 型糖鎖 N-acetyllactosamine が有意に発現しているという結果を得た。HAM 病態への関与が示唆される。

### 研究要旨

HAM 発症の最大の危険因子はプロウイルス量である。プロウイルス量拡大は、HTLV-1 感染 CD4+T 細胞と非感染 CD4+細胞の間にウイルスシナプスが形成され、cell-to-cell spread をきたすと考えられている。

最近 HAM 由来検体を用いて、糖鎖と結合するレクチンの一種で HTLV-1 Tax 誘導性に感染細胞に高発現する galectin-3<sup>1)</sup>や、O 型糖鎖など糖鎖関連分子が HTLV-1 p19Gag と共局在する Biofilm-like extracellular virus assemblies がウイルスシナプスの本態とされる<sup>2)</sup>。

我々は HAM 病態で最も重要な糖鎖を同定するため、網羅的糖鎖研究のツールとして開発されたレクチンアレイ<sup>3)</sup>を用いて検討した。

### 研究方法

対象：WHO 診断基準により診断した HAM 患者、無症候性 HTLV-I キャリア (AC)、HTLV-1 陰性健康者対照 (NC) 各 4 例を無作為に選んだ。倫理面への配慮：採血、検体保存は説明と文書での同意を得て行った。患者と検体は非連結匿名化し鹿児島大学倫理委員会の承諾を得た。

CD4+T 細胞の抽出：CD4+Tcell Isolation Kit

- 1) 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 難治ウイルス病態制御研究センター分子病理
- 2) 医療法人三州会 大勝病院神経内科
- 3) 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 神経内科・老年病学

II(ヒト)(Miltenyi)で CD4+T 細胞を回収した。

膜蛋白精製：CD4+T 細胞から TM-PEK Proteo Extract Transmembrane Extraction Kit Novagen (Merck)で膜蛋白を塩析し BCA 法で蛋白濃度を測定。

細胞溶解液の作製：CD4+T 細胞から RIPA buffer で作製し BCA 法で蛋白濃度を測定。

レクチンアレイ：膜蛋白を Cy3 標識し脱塩カラムで洗浄、45 種類の天然型レクチンを搭載した LecChip (GP Bioscience) のプロトコールに従った。GlycoStation Reader 1200 (GP Bioscience)で読取り、ArrayProAnalyzer (Media Cybernetics), GlycoStation Tools software (GP Bioscience)で数値化、規格化、解析を行った。統計解析は同蛋白濃度(250ng/mL)、規格化した信号強度で群内比較を行った。

MALDI-TOF MS による N-glycan profiling：HAM6 例の細胞膜蛋白に対して PNGase F で N-glycan を切断後、GlycoBlot (住友ベークライト)で標識し MALDI-TOF MS (Autoflex III smartbeam, Bruker Daltonics) を行った。SDS-PAGE、Coomassie Brilliant Blue(CBB)染色、Lectin blotting、PMF(Peptide Mass Fingerprinting)：HAM・NC 各 3 例の細胞溶解液を用いてでパラレルに泳動し、1 枚は CBB 染色しバンドを切り出し PMF を行い、他方はさらに転写後、ビオチン化 UDA、Streptavidin-HRP conjugate (Thermo scientific) で染色し Fluor Chem FC2 Imager (Alpha Innotech) で