

201324144A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業

HTLV-1 関連炎症性希少疾患の病態解析と免疫療法開発研究
(H25-難治等 (難) 一般-028)

平成 25 年度 総括研究報告書

研究代表者 松岡 雅雄
(京都大学ウイルス研究所・教授)

平成 26 (2014 年) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

HTLV-1 関連炎症性希少疾患の病態解析と免疫療法開発研究

研究代表者・松岡 雅雄（京都大学ウイルス研究所・教授） 1

II. 分担研究報告

1. 安永 純一郎（京都大学ウイルス研究所・講師） 6

2. 中村 誠司（九州大学歯学研究院・教授） 10

3. 谷原 秀信（熊本大学大学院生命科学研究部・教授） 13

4. 尹 浩信（熊本大学大学院生命科学研究部・教授） 15

5. 齊藤 峰輝（川崎医科大学医学部・教授） 17

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・刊行物・別刷

1. 松岡 雅雄（京都大学ウイルス研究所・教授） 21
安永 純一郎（京都大学ウイルス研究所・講師）

2. 中村 誠司（九州大学歯学研究院・教授） 92

3. 谷原 秀信（熊本大学大学院生命科学研究部・教授） 115

4. 尹 浩信（熊本大学大学院生命科学研究部・教授） 122

5. 齊藤 峰輝（川崎医科大学医学部・教授） 149

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総括研究報告書

HTLV-1 関連炎症性希少疾患の病態解析と免疫療法開発研究

研究代表者：京都大学ウイルス研究所 教授 松岡雅雄

研究要旨

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1) は成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) および HTLV-1 関連脊髄症 (HTLV-1-associated myelopathy: HAM)、HTLV-1 ぶどう膜炎 (HTLV-1 uveitis: HU) の原因ウイルスであるが、臨床的にはシェーグレン症候群 (SS)、皮膚疾患 (魚鱗癬、紫斑病など) との関連も知られている。しかし、これらの病態や発症機序における HTLV-1 の役割は不明である。最近の研究から HTLV-1 bZIP factor (HBZ) が感染細胞の接着・遊走の亢進と組織浸潤を誘導し炎症を惹起することが明らかになりつつあり、HTLV-1 関連疾患の発症機構の解明と治療法開発への展開が期待されている。本研究班は HTLV-1 関連希少疾患の実態調査と、病態とウイルス動態に基づいた新しい治療戦略の構築を目的とした。HTLV-1 感染と SS、魚鱗癬、紫斑病、眼疾患との関連性に着目し症例の収集を行った。HTLV-1 陽性 SS は陰性症例と比較し、リンパ球浸潤や組織破壊が軽度であり、異なる病態であることが示唆された。他の関連疾患も含めてより詳細な病態の解析を進めている。HBZ による炎症誘導機構に関してマウスモデルを用いて解析し、HBZ による exFoxp3 T リンパ球の増加とそれに伴う IFN- γ の過剰産生が炎症に関与していることが示唆された。サルモデルを用いて、HBZ および Tax 発現ワクシニアウイルスが特異的免疫を誘導することを確認した。今後、未だ明らかとなっていない HTLV-1 病原性の理解と新規治療法・予防法の開発に繋がると考えられる。

分担研究者

九州大学 教授 中村 誠司
熊本大学 教授 谷原 秀信
熊本大学 教授 尹 浩信
川崎医科大学 教授 齊藤 峰輝
京都大学 講師 安永 純一朗

A. 研究目的

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1) は CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞の悪性腫瘍である成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) および HTLV-1 関連脊髄症 (HTLV-1-associated myelopathy: HAM) 等、炎症性疾患の原因ウイルスである。HTLV-1 に関連するその他の希少疾患として、ぶどう膜炎 (HTLV-1 uveitis: HU)、魚鱗癬、紫斑病、乾癬といった皮膚疾患、シェーグレン症候群 (SS) などが報告されているが、病態、臨床像には不明な点も多い。本研究班ではこれらの疾患と HTLV-1 感染の関連性に着目し、九州地方に潜在する HTLV-1 関連希少疾患患者の発掘と病態把握を目的とした。

HTLV-1 関連疾患の発症には、感染細胞の増加と炎症誘導が関与していると示唆されているが、その分子機構については未だ明らかでない。我々は HTLV-1 の病原性に重要な役割を果たすウイルス遺伝子として HTLV-1 bZIP factor

(HBZ) に注目し解析を進めてきた。我々が樹立した HBZ トランスジェニックマウス (HBZ-Tg) では T 細胞の浸潤により多臓器に炎症が起こり、約 4 割の頻度で T 細胞性リンパ腫を合併するため、HTLV-1 感染者の病態解析に極めて有用と考えられる。本課題では HTLV-1 関連疾患における HBZ の役割を、HBZ-Tg を用いて解析することを目的とした。さらには、HTLV-1 感染者と感染動態が類似するサル白血病ウイルス (simian T-cell leukemia virus type 1: STLV-1) 感染ニホンザルを用いて、ワクチンを用いた新規発症予防法の開発も目的とした。

B. 研究方法

① HTLV-1 関連炎症性疾患の分子機構解析とワクチン有効性評価 (松岡、安永)

1) HBZ-Tg を用いた炎症の分子機構解析と HTLV-1 感染者との比較解析

HBZ-Tg および HTLV-1 感染者由来のリンパ球に関して、T 細胞表面抗原マーカー、接着因子発現、増殖能・遊走能、網羅的発現解析を行い、疾患発症に関与するシグナル経路、分子の同定を試みた。

2) Tax および HBZ 搭載ワクシニアウイルスの有効性評価

HBZ 発現ワクシニアウイルス、Tax 発現ワ

クシニアウイルスを野生型マウスに接種し、免疫応答誘導能を評価した。さらに HTLV-1 感染サルにおける免疫誘導能と抗ウイルス効果を解析した。

②HTLV-1 関連疾患の実態調査および病態解析 (中村、谷原、尹)

1) 症例の収集

SS 20 例、HU 25 例、皮膚疾患 20 例を目標として、症例の収集を行った。

2) 臨床データの収集、解析

研究に同意が得られた患者の臨床データ (病態、重症度、治療抵抗性等の臨床像と血算、血清 LDH、抗 HTLV-1 抗体価、自己抗体、可溶性 IL2 受容体等の血液データ) を収集し、解析した。

3) 罹患組織・細胞の解析

組織像・形態の評価、免疫染色やフローサイトメトリーによる浸潤リンパ球サブセットの解析、定量 PCR による感染細胞率の測定等を行った。

③関連疾患患者の免疫学的解析 (齊藤)

1) HTLV-1 関連患者における HBZ 発現量検出法の構築

2 種類の HBZ ペプチドおよびコムギ無細胞タンパク発現系により作製した組換え HBZ タンパクを C57BL/6 マウスに 3 回免疫し、抗 HBZ モノクローナル抗体を作製した。各種 HTLV-1 感染細胞 (SLB1、MT-2、ILT-M1 など) や HBZ 強制発現細胞 (293T/HBZ-SI) を用いて (1) FACS (2) 免疫蛍光染色 (IF) (3) Western Blot (4) サンドイッチ ELISA を行い、抗体の有用性を評価した。

(倫理面への配慮)

京都大学倫理委員会にてヒト遺伝子解析研究に関する承認を得ている (課題名「HTLV-1 関連炎症性疾患患者における HTLV-1 感染動態と病態の解析」、課題番号 G602)。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。臨床情報と検体とは非連結匿名化した。動物実験は京都大学ウイルス研究所動物委員会の承認を得ている

(課題名「HTLV-I による発がんの分子メカニズムの解明」・承認番号 D13-02、課題名「霊長類を用いた HTLV-1、STLV-1 生体内感染動態の解析」・承認番号 R13-01)。

C. 研究結果

①HTLV-1 関連炎症性疾患の分子機構解析とワクチン有効性評価 (松岡、安永)

1) HBZ-Tg を用いた炎症の分子機構解析と HTLV-1 感染者との比較解析

HBZ-Tg では慢性炎症を高率に合併し皮膚、肺、腸にリンパ球の浸潤を認める。皮膚炎が重度の HBZ-Tg では唾液腺のリンパ球浸潤、ぶどう膜炎の合併を認めるケースもあり、HU や SS との関連も示唆された。HBZ-Tg では Foxp3 陽性 T 細胞および IFN- γ 産生 T リンパ球が増加しており、炎症の発症に関与していると考えられた。特に IFN- γ 産生 T リンパ球の増加は HAM 患者でも報告されていることから、その HBZ による IFN- γ 産生誘導の分子機構について解析を行った。HBZ-Tg における Foxp3 陽性細胞の解析により、naturally occurring Treg (nTreg) の表面抗原マーカーである Helios の発現が低いこと、また conserved non-coding DNA sequences (CNS) に CpG メチル化が認められることが明らかとなり、増加している細胞は末梢で誘導される inducible Treg (iTeg) であることが判明した。一方で HBZ-Tg 由来の Treg は Foxp3 の発現を失いやすく、IFN- γ を産生する Foxp3 陰性 T リンパ球 (exFoxp3 T リンパ球) へと変換されやすいことを見出した。HBZ-Tg の炎症局所において、IFN- γ 産生 T リンパ球の浸潤が認められることから、HBZ による exFoxp3 T リンパ球の増加とそれに伴う IFN- γ の過剰産生が炎症に関与していると考えられる。

2) Tax および HBZ 搭載ワクシニアウイルスの有効性評価

免疫原として HBZ と Tax を発現する組換えワクシニアウイルスを作成した。発現する抗原に関しては、HBZ は activation domain の LxxLL モチーフに点変異を導入した変異体、Tax は NF- κ B 活性化機能を欠損する M22 変異体を用い、共に病原性を欠失する変異体である。これらを野生型 C57BL/6 野生型マウスに接種したところ、ELISPOT にて HBZ および Tax のペプチドに反応する CD4 および CD8 陽性 T 細胞の出現を認め、これらの組換えワクシニアウイルスがワクチンとして免疫応答を誘導していることを確認した。

より詳細なワクチンの有効性評価には霊長類を動物モデルとして用いることが望まれるため、HTLV-1 感染者の動物モデルとして、STLV-1 感染ニホンザルの有用性を評価した。京都大学霊長類研究所にて飼育中のニホンザ

ルの STLV-1 感染のスクリーニングを行い、約 60%が STLV-1 に自然感染していることを見出した。STLV-1 は主に CD4 陽性 T 細胞に感染し、プロウイルス量は個体差が大きく（感染細胞率 0.001%～数十%）、感染細胞は生体内でクローナルに増殖していた。また 1 頭の STLV-1 感染ニホンザルが T 細胞性リンパ腫を発症し、その細胞では STLV-1 のクローナルな組み込みが証明されたことから STLV-1 は HTLV-1 と同様に T リンパ系腫瘍を発症させることが明らかとなった。STLV-1 がコードする Tax と STLV-1 bZIP factor (SBZ) は HTLV-1 Tax, HBZ と高いホモロジーを持ち、各々同様の機能を有していた。以上の結果から STLV-1 感染ニホンザルは HTLV-1 感染の優れた動物モデルであることが明らかとなった。ATL の新規治療法として抗 CCR4 抗体（モガムリズマブ）が臨床応用されている。STLV-1 感染ニホンザルにモガムリズマブを投与したところ、投与開始後速やかに感染細胞の減少を認めた。4 回の投与後、プロウイルス量は徐々に増加傾向となったが、投与開始前のレベルには戻らず、感染細胞率は約 50%程度で長期間維持された。ELISPOT にて、モガムリズマブ投与後では、投与前に比較して Tax および SBZ 特異的 CD4、CD8 陽性 T 細胞が増加していることが判明し、モガムリズマブによる Treg 抑制作用の関与が示唆された。

②HTLV-1 関連疾患の病態解析（中村、谷原、尹）

シェーグレン症候群(SS)を HTLV-1 感染の有無で SS-H(+)と SS-H(-)の 2 つに分けて両患者群の唾液腺について比較検討を行った。まず病理組織学的検討では、SS-H(+)は SS-H(-)と比べ、リンパ球浸潤がやや軽度であり、濾胞形成数が有意に少なく、腺上皮の障害も軽度であった。免疫学的検討では、SS-H(+)症例では TARC/CCR4 シグナルがリンパ球浸潤と病態形成に関与していることが示唆された。

HU 患者に関しては、現在血液および前房水の収集を進めている。

慢性皮膚疾患を有する患者の中で、HTLV-1 に感染していることが判明した症例に対して、同意の下で血液検体、皮膚生検検体を採取し、収集した。現在までに 13 例の HTLV-1 陽性皮膚疾患症例の検体を得ている。各検体における炎症性病変は慢性湿疹、紅皮症、脂漏性皮膚炎、痒疹、毛包炎、扁平苔癬、疥癬、慢性臀部膿皮症、尖圭コンジローマなど多岐にわたり、そのうち魚鱗癬様の皮疹と診断された症例を 4 例含んでいた。

③関連疾患患者の免疫学的解析（齊藤）

これまでに、HBZ ペプチドに対するモノクローナル抗体を 14 クローン樹立した。FACS 解析、IF 解析、Western Blot 解析では、293T/HBZ-SI 細胞中の HBZ タンパクの発現や一部の HTLV-1 感染細胞株で HBZ タンパクの発現を確認することができた。

D. 考察

HTLV-1 のマイナス鎖にコードされている HBZ は、HBZ が ATL 細胞に恒常的に発現している唯一のウイルス遺伝子であること、HBZ がヒト T 細胞の増殖を促進する機能を有すること、HBZ をノックダウンすると HTLV-1 感染細胞株、ATL 細胞株は細胞死を来すこと、HBZ-Tg が全身の慢性炎症と T 細胞性リンパ腫を発症すること等の事実から、HTLV-1 の病原性に必須の役割を果たすと考えられる。本研究から、HBZ が炎症を惹起する機序として、HBZ が Foxp3 の発現を誘導し iTreg を増やす一方で Treg としての機能は抑制されており、結果として IFN- γ を産生するエフェクター様の T 細胞を増やすことが一因であると考えられた。HBZ は HTLV-1 感染細胞に恒常的に発現するため、格好の治療標的である。本研究では HBZ 発現ワクシニアウイルスが特異的免疫応答を誘導しうることを確認した。非常に興味深い所見として、モガムリズマブを投与したニホンザルでは、投与前に比較し Tax および HBZ に対する免疫応答が増強していることが明らかとなった。CCR4 は Treg にも発現することが知られている。抗 CCR4 抗体投与により、感染細胞に対する免疫反応を抑制している Treg が減少し、各々の抗原に対応する特異的免疫細胞が増加したと考えられた。モガムリズマブとワクチンの併用効果評価は今後の課題である。一方、HBZ のモノクローナル抗体作成と抗 HBZ 抗体の定量法構築の研究により、HBZ に対する液性免疫の定量法確立が期待される。将来的には、患者由来検体（血清や HTLV-1 感染細胞）中の HBZ タンパク、抗 HBZ 抗体を検出・定量できる系を確立し、HTLV-1 感染症における新規疾患マーカーとなり得る。

E. 結論

本研究班による解析により以下の結果が得られた。

- 1) HBZ が炎症を引き起こす機序に、Foxp3 発現の不安定化と exFoxp3 細胞の増加による IFN- γ 産生亢進が関与する。
- 2) Tax および HBZ ワクチンは特異的免疫応答

を誘導する。

3) STLV-1 感染ニホンザルにおいて、抗 CCR4 抗体投与は STLV-1 感染細胞特異的免疫応答を賦活しうる。

4) HTLV-1 関連希少疾患（後天性魚鱗癬等の皮膚疾患、SS、HU など）症例の発掘と検体収集を行った。HTLV-1 関連 SS の病態は HTLV-1 陰性 SS と異なる可能性が示唆された。

5) HBZ のモノクローナル抗体を樹立した。

これらの所見は、HTLV-1 の病原性における HBZ の役割の解明に貢献するのみならず、新規免疫療法構築に有用な情報と考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka-Nakanishi A, Yasunaga J, Takai K, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP Factor Suppresses Apoptosis by Attenuating the Function of FoxO3a and Altering Its Localization. **Cancer Res**, 74; 188-200, 2014.
2. Zhao T, Coutts A, Xu L, Yu J, Ohshima K, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor supports proliferation of adult T cell leukemia cells through suppression of C/EBP α signaling. **Retrovirology**, 10: 159, 2013.
3. Miura M, Yasunaga J-I, Tanabe J, Sugata K, Zhao T, Ma G, Miyazato P, Ohshima K, Kaneko A, Watanabe A, Saito A, Akari H and Matsuoka M. Characterization of simian T-cell leukemia virus type 1 in naturally infected Japanese macaques as a model of HTLV-1 infection. **Retrovirology**, 10: 118, 2013.
4. Yamamoto-Taguchi N, Satou Y, Miyazato P, Ohshima K, Nakagawa M, Katagiri K, Kinashi T, and Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor induces inflammation through labile Foxp3 expression. **PLoS Pathogens**, 9: e1003630, 2013.
5. Matsuoka M and Yasunaga J-I. Human T-cell leukemia virus type 1: replication, proliferation and propagation by Tax and HTLV-1 bZIP factor. **Curr Opin Virol**, 3: 1-8, 2013.
6. Satou Y and Matsuoka M. Virological and immunological mechanisms in the pathogenesis of human T-cell leukemia virus type 1. **Rev Med Virol**, 23: 269-280 2013.

2. 学会発表

【海外】シンポジウム招待講演

1. Masao Matsuoka: State of the Art Lecture and Session Summary: 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses 2013, Holiday Inn Montreal-Midtown, Montreal, Canada, June26-30, 2013.
2. Masao Matsuoka: Molecular Pathogenesis by HTLV-1 bZIP Factor: The 15th Annual International Meeting of the Institute of Human Virology, Moscow, Russia, September 8-12, 2013.
3. Masao Matsuoka: How human T-cell leukemia virus type 1 induces diseases: FRONTIERS OF RETROVIROLOGY, Churchill College, Cambridge University, UK, September 16-18, 2013.
4. Masao Matsuoka: HTLV-1 bZIP factor determines cell tropism: The 3rd French Japanese Cancer Research Workshop, Hotel Mercure Toulouse Compans Caffarelli, November 20-23, 2013.

【海外】一般演題

5. Miura Michi, Junko Tanabe, Kenji Sugata, Tiejun Zhao, Guangyong Ma, Paola Miyazato, Jun-ichiro Yasunaga, Masao Matsuoka: STLV-1 infected Japanese macaque as a model of HTLV-1 infection: 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses 2013, Holiday Inn Montreal-Midtown, Montreal, Canada, June26-30, 2013.
6. Azusa Tanaka-Nakanishi, Jun-ichiro Yasunaga, Ken Takai, Masao Matsuoka: Molecular mechanisms of apoptosis suppression by HTLV-1 bZIP factor in HTLV-1 infected cells: 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses 2013, Holiday Inn Montreal-Midtown, Montreal, Canada, June26-30, 2013.
7. Guangyong Ma, Jun-ichiro Yasunaga, Jun fan, Shin-ichi Yanagawa, Masao Matsuoka: HTLV-1 mediated dysregulation of the Wnt pathways: Roles of Tax and HBZ: 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses 2013, Holiday Inn Montreal-Midtown, Montreal, Canada, June26-30, 2013.
8. Akihiro Kawatsuki, Jun-ichiro Yasunaga, Masao Matsuoka: HTLV-1 bZIP factor suppresses c-Fos transcription and impairs T cell activation: HTLV and Related Viruses 2013,

Holiday Inn Montreal-Midtown, Montreal, Canada, June26-30, 2013.

【国内】シンポジウム招待講演

9. 松岡雅雄：ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型による炎症と発がんの連環：H24 年度がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動公開シンポジウム、学術総合センター一橋講堂（東京）、2013 年 1 月 29-30 日
10. 松岡雅雄：ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型感染症研究と動物モデル：H24 年度個体レベルでのがん研究支援活動ワークショップ、琵琶湖ホテル（滋賀）、2013 年 2 月 6-7 日
11. 松岡雅雄：ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型の生き残り戦略と病原性：桜山学術セミナー、名古屋市立大学病院 10 階第 4 会議室、2013 年 4 月 26 日
12. Masao Matsuoka: How Human T-cell Leukemia Virus Type 1 induces leukemia: The 4th JSH International Symposium 2013, YAMATOYA-HONTEN, Ehime, Japan, May 24-25, 2013.
13. 松岡雅雄：ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型の病原性発現機構と治療戦略：第 17 回日本がん分子標的治療学会学術集会ランチョンセミナー-1、国立京都国際会館第 1 会場、2013 年 6 月 13 日
14. 松岡雅雄：ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型の病原性発現機構：第 37 回阿蘇シンポジウム、阿蘇リゾートグランヴィリオホテル（熊本）、2013 年 8 月 2-3 日
15. 松岡雅雄、安永純一朗：ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型による発がん：Tax と HBZ の拮抗と協調：第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場（兵庫県）、2013 年 11 月 10-12 日

【国内】一般演題

16. 田中梓、安永純一朗、高井健、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor (HBZ) は転写因子 FoxO3a の機能を阻害することによりアポトーシスを抑制する：第 6 回 HTLV-1 研究会・シンポジウム（東京医科学研究所講堂）、2013 年 8 月 25-26 日
17. Miyazato Paola、佐藤賢文、山口智之、大島孝一、大倉永也、中川正法、坂口志文、松岡雅雄：HTLV-1 impairs the function of regulatory T cells: 第 6 回 HTLV-1 研究会・シンポジウム（東京医科学研究所講堂）、2013 年 8 月 25-26 日
18. 田中梓、安永純一朗、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor suppresses intrinsic and extrinsic apoptotic pathways by targeting FoxO3a: 第 72

回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜（神奈川）、2013 年 10 月 3-5 日

19. 三浦未知、趙鉄軍、馬広勇、安永純一朗、松岡雅雄：Simian T-cell leukemia virus type 1-infected Japanese Macaques as a model for HTLV-1 research: 第 72 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜（神奈川）、2013 年 10 月 3-5 日
20. Jun-Ichiro Yasunaga, Guangyong Ma, Jun Fan, Shin-Ichi Yanagawa, Masao Matsuoka: Perturbation of the Wnt pathway by HTLV-1 is important in viral replication and cell proliferation: 第 75 回日本血液学会学術集会、ロイトン札幌・さっぽろ芸文館・札幌市教育文化会館（北海道）、2013 年 10 月 11-13 日
21. 菅田謙治、安永純一朗、三浦未知、明里宏文、小柳義夫、小原道法、松岡雅雄：組換えウイルスを用いた抗 HTLV-1 ワクチンの作製と Macaque 属での応用：第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場（兵庫県）、2013 年 11 月 10-12 日
22. 園直希、馬広勇、萩屋啓太、安永純一朗、松岡雅雄：FBXL11 は HTLV-1 bZIP factor と Tax の機能を共に増強し ATL 細胞の増殖を促進する：第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場（兵庫県）、2013 年 11 月 10-12 日
23. 紀ノ定明香、安永純一朗、伊豫田智典、稲葉カヨ、松岡雅雄：HBZ による CD4 陽性 T 細胞増殖促進の免疫学的機序：第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場（兵庫県）、2013 年 11 月 10-12 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

HTLV-1 関連炎症性希少疾患の病態解析と免疫療法開発研究

研究代表者：京都大学ウイルス研究所 教授 松岡雅雄
研究分担者：京都大学ウイルス研究所 講師 安永純一郎

研究要旨

HTLV-1 bZIP factor (HBZ)は HTLV-1 感染細胞にて恒常的に発現している唯一のウイルス遺伝子であり、HBZ トランスジェニックマウス (HBZ-Tg) が全身の炎症と T 細胞性リンパ腫を発症することから、HTLV-1 の病原性に必須の役割を果たすと考えられる。HBZ-Tg 由来の CD4 陽性 T 細胞は接着・遊走能が亢進し、組織浸潤性が高いことが示唆されている。本課題での解析から、HBZ-Tg では制御性 T リンパ球 (regulatory T-cell: Treg) が増加しているものの、Foxp3 の発現は不安定であり、exFoxp3 T リンパ球への転換とそれに伴う IFN- γ の過剰産生が炎症に関与していることが示唆された。一方、本課題ではサルモデルを用いて新しい免疫療法開発の基盤研究を行った。マウス、サルを用いて HBZ および Tax 発現ワクシニアウイルスが特異的免疫を誘導することを確認した。またサル白血病ウイルス (simian T-cell leukemia virus type 1: STLV-1) に自然感染しているニホンザルが HTLV-1 感染者と感染動態、病態がよく似ていることを見出し、ワクチン開発に極めて有用であることを見出した。今後の新規治療法・予防法の開発に繋がると考えられる。

A. 研究目的

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1) は成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) や HTLV-1 関連脊髄症 (HTLV-1-associated myelopathy: HAM) 等の炎症性疾患を惹起する。HTLV-1 関連疾患の発症機構には感染細胞の増加が関与しており、HTLV-1 のマイナス鎖にコードされる HTLV-1 bZIP factor (HBZ) が、感染細胞の増殖に重要な役割を果たしていると考えられている。我々が樹立した HBZ トランスジェニックマウス (HBZ-Tg) ではほぼ全例で肺、皮膚、腸管など多臓器に T 細胞浸潤による炎症が起り、約 4 割の頻度で T 細胞性リンパ腫を合併する。また、末梢血中のエフェクターメモリー T 細胞および制御性 T リンパ球 (regulatory T-cell: Treg) の増加を認め、これらの表現型は HTLV-1 感染者と類似していることから、HTLV-1 関連疾患の病態解析に極めて有用と考えられる。本課題では HTLV-1 関連疾患における HBZ の役割を、HBZ-Tg を用いて解析することを目的とした。さらには、HTLV-1 感染者と感染動態が類似するサル白血病ウイルス (simian T-cell leukemia virus type 1: STLV-1) 感染ニホンザルを用いて、Tax および HBZ ワクチンの有効性評価を行い、新規発症予防法開発の基盤研究を行った。

B. 研究方法

HTLV-1 関連炎症性疾患の分子機構解析とワ

クチン有効性評価

1) HBZ-Tg を用いた炎症の分子機構解析と HTLV-1 感染者との比較解析

HBZ-Tg および HTLV-1 感染者由来のリンパ球に関して、T 細胞表面抗原マーカー、接着因子発現、増殖能・遊走能、網羅的発現解析を行い、疾患発症に関与するシグナル経路、分子の同定を試みた。

2) Tax および HBZ 搭載ワクシニアウイルスの有効性評価

HBZ 発現ワクシニアウイルス、Tax 発現ワクシニアウイルスを野生型マウスに接種し、免疫応答誘導能を評価した。さらに HTLV-1 感染サルにおける免疫誘導能と抗ウイルス効果を解析した。

(倫理面への配慮)

京都大学倫理委員会にてヒト遺伝子解析研究に関する承認を得ている (課題名「HTLV-1 関連炎症性疾患患者における HTLV-1 感染動態と病態の解析」、課題番号 G602)。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。臨床情報と検体とは非連結匿名化した。動物実験は京都大学ウイルス研究所動物委員会の承認を得ている

(課題名「HTLV-I による発がんの分子メカニズムの解明」・承認番号 D13-02、課題名「霊長類を用いた HTLV-1、STLV-1 生体内感染動態の

解析」・承認番号 R13-01)。

C. 研究結果

HTLV-1 関連炎症性疾患の分子機構解析とワクチン有効性評価 (松岡、安永)

1) HBZ-Tg を用いた炎症の分子機構解析と HTLV-1 感染者との比較解析

HBZ-Tg では皮膚、肺、腸に T リンパ球の浸潤を認める。本課題遂行中に組織解析を行った重度の皮膚炎を有する HBZ-Tg の中には、唾液腺のリンパ球浸潤、ぶどう膜炎の合併を認めるケースもあり、HU や SS との関連も示唆された。HBZ-Tg では IFN- γ を産生する T リンパ球が増加しており、炎症の発症に関与していると考えられた。HAM 患者でも同様の IFN- γ 産生 T リンパ球が増加していることから、HBZ による IFN- γ 産生誘導の分子機構について解析を行った。フローサイトメトリーにより、HBZ-Tg にて増加している Treg は naturally occurring Treg (nTreg) の表面抗原マーカー Helios の発現が低いことから、末梢で誘導される inducible Treg (iTreg) であることが判明した。一方で HBZ-Tg 由来の Treg は ex vivo での培養により Foxp3 の発現を失いやすく、IFN- γ を産生する Foxp3 陰性 T リンパ球 (exFoxp3 T リンパ球) へと変換されることを見出した。さらに T リンパ球の遊走に関わるケモカインレセプター Cxcr3 の発現が亢進しており、この点も HAM 患者由来の T リンパ球と同じであった。HBZ-Tg の炎症局所において、IFN- γ 産生 T リンパ球の浸潤が認められることから、HBZ による exFoxp3 T リンパ球の増加とそれに伴う IFN- γ の過剰産生が炎症に関与していると考えられた。

2) Tax および HBZ 搭載ワクシニアウイルスの有効性評価

免疫原として HBZ と Tax を発現する組換えワクシニアウイルスを作成した。各々の病原性欠失変異体を抗原として発現させ、HBZ は LxxLLモチーフに点変異を導入した変異体、Tax は NF- κ B 活性化機能を欠損する M22 変異体を用いた。これらを野生型 C57BL/6 野生型マウスに接種したところ、ELISPOT にて HBZ および Tax のペプチドに反応する CD4 および CD8 陽性 T 細胞の出現を認め、反復接種にて増加した。これらの組換えワクシニアウイルスがワクチンとして免疫応答を誘導しうることを確認した。HTLV-1 感染者の動物モデルとして、STLV-1 感染ニホンザルの有用性を評価した。京都大学霊長類研究所にて飼育中のニホンザルの約 60% が STLV-1 に自然感染していた。これらの

末梢血を解析し、CD4 陽性 T リンパ球優位に STLV-1 が感染していること、プロウイルス量には大きな個体差があること (0.001% から 53%) が判明した。次世代シーケンサーを用いた感染細胞クローナリティの解析により、プロウイルス量が高い個体では感染細胞のクローナルな増殖が認められた。研究期間中 1 頭の STLV-1 感染ニホンザルが T 細胞性リンパ腫を発症し、その細胞では STLV-1 のクローナルな組み込みが証明されたことから STLV-1 は HTLV-1 と同様に T リンパ系腫瘍の原因となることが明らかとなった。STLV-1 由来の Tax および STLV-1 bZIP factor (SBZ) は HTLV-1 の Tax、HBZ と同等の機能を有しており、STLV-1 感染ニホンザルは HTLV-1 感染者と病態が類似する有用な霊長類モデルであると考えられた。ATL の治療法として臨床応用されている抗 CCR4 抗体 (モガムリズマブ) を STLV-1 感染ニホンザルに投与したところ、投与開始後速やかに感染細胞の減少を認めた。ELISPOT にて、モガムリズマブ投与後では、投与前に比較して Tax および SBZ 特異的 CD4、CD8 陽性 T 細胞が増加していることが判明し、モガムリズマブが STLV-1 に対する免疫機能を活性化させた可能性が示唆され、実際投与終了後も長期間にわたりプロウイルス量は投与前よりも低く維持された。

D. 考察

本研究結果から、HBZ が炎症を惹起する機序として、HBZ が Foxp3 の発現を誘導し iTreg を増やす一方で Treg としての機能は抑制されており、結果として IFN- γ を産生するエフェクター様の T 細胞を増やすことが一因であると考えられた。Tax は免疫原性が高いことが知られており、本研究でも Tax ワクチンにより高い免疫応答が獲得できた。一方 HBZ は HTLV-1 感染細胞に恒常的に発現するため、格好の治療標的となり得る。本研究では HBZ 発現ワクシニアウイルスが特異的免疫応答を誘導しうることを確認した。今後より有効なワクチンの開発に応用可能である。興味深い所見として、抗 CCR4 抗体投与後のニホンザルでは、投与前に比較し STLV-1 に対する免疫応答が増強していることが明らかとなった。その機序として抗 CCR4 抗体投与により CCR4 を発現する Treg が減少し、各々の抗原に対応する特異的免疫細胞が活性化されたと考えられた。モガムリズマブとワクチンの併用効果が期待できる。

E. 結論

1) HBZ が炎症を引き起こす機序に、Foxp3 発現

の不安定化と exFoxp3 細胞の増加による IFN- γ 産生亢進が関与する。

2) Tax および HBZ ワクチンは特異的免疫応答を誘導する。

3) STLV-1 感染ニホンザルは HTLV-1 感染者の有用な動物モデルであり、抗 CCR4 抗体投与によりウイルス特異的免疫応答を賦活しうる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka-Nakanishi A, Yasunaga J, Takai K, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP Factor Suppresses Apoptosis by Attenuating the Function of FoxO3a and Altering Its Localization. **Cancer Res**, 74; 188-200, 2014.
2. Miura M, Yasunaga J, Tanabe J, Sugata K, Zhao T, Ma G, Miyazato P, Ohshima K, Kaneko A, Watanabe A, Saito A, Akari H, Matsuoka M. Characterization of simian T-cell leukemia virus type 1 in naturally infected Japanese macaques as a model of HTLV-1 infection. **Retrovirology**, 10; 118, 2013.
3. Matsuoka M and Yasunaga J. Human T-cell leukemia virus type 1: replication, proliferation and propagation by Tax and HTLV-1 bZIP factor. **Curr Opin Virol**, 3; 684-691, 2013.

2. 学会発表

1. Miura Michi, Junko Tanabe, Kenji Sugata, Tiejun Zhao, Guangyong Ma, Paola Miyazato, Jun-ichiro Yasunaga, Masao Matsuoka: STLV-1 infected Japanese macaque as a model of HTLV-1 infection: 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses 2013, Holiday Inn Montreal-Midtown, Montreal, Canada, June26-30, 2013.
2. Azusa Tanaka-Nakanishi, Jun-ichirou Yasunaga, Ken Takai, Masao Matsuoka: Molecular mechanisms of apoptosis suppression by HTLV-1 bZIP factor in HTLV-1 infected cells: 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses 2013, Holiday Inn Montreal-Midtown, Montreal, Canada, June26-30, 2013.
3. Guanyong Ma, Jun-ichiro Yasunaga, Jun fan, Shin-ichi Yanagawa, Masao Matsuoka: HTLV-1 mediated dysregulation of the Wnt

pathways: Roles of Tax and HBZ: 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses 2013, Holiday Inn Montreal-Midtown, Montreal, Canada, June26-30, 2013.

4. Akihiro Kawatsuki, Jun-ichiro Yasunaga, Masao Matsuoka: HTLV-1 bZIP factor suppresses c-Fos transcription and impairs T cell activation: HTLV and Related Viruses 2013, Holiday Inn Montreal-Midtown, Montreal, Canada, June26-30, 2013.
5. 松岡雅雄、安永純一郎: ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型による発がん: Tax と HBZ の拮抗と協調: 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場 (兵庫県)、2013 年 11 月 10-12 日
6. 安永純一郎: ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型による病原性発現メカニズム: 第 4 回ナノバイオ創薬研究シンポジウム、京都大学杉浦ホール、2013 年 3 月 9 日
7. 安永純一郎: HTLV-1 がコードする二つのがん遺伝子 tax と HTLV-1 bZIP: 第 15 回白馬シンポジウム in 名古屋、(独) 国立病院機構名古屋医療センター (愛知)、2013 年 7 月 19-20 日
8. 田中梓、安永純一郎、高井健、松岡雅雄: HTLV-1 bZIP factor(HBZ)は転写因子 FoxO3a の機能を阻害することによりアポトーシスを抑制する: 第 6 回 HTLV-1 研究会・シンポジウム (東京医科学研究所講堂)、2013 年 8 月 25-26 日
9. 田中梓、安永純一郎、松岡雅雄: HTLV-1 bZIP factor suppresses intrinsic and extrinsic apoptotic pathways by targeting FoxO3a: 第 72 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜 (神奈川)、2013 年 10 月 3-5 日
10. 三浦未知、趙鉄軍、馬広勇、安永純一郎、松岡雅雄: Simian T-cell leukemia virus type 1-infected Japanese Macaques as a model for HTLV-1 research: 第 72 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜 (神奈川)、2013 年 10 月 3-5 日
11. Jun-Ichiro Yasunaga, Guangyong Ma, Jun Fan, Shin-Ichi Yanagawa, Masao Matsuoka: Perturbation of the Wnt pathway by HTLV-1 is important in viral replication and cell proliferation: 第 75 回日本血液学会学術集会、ロイトン札幌・さっぽろ芸文館・札幌市教育文化会館 (北海道)、2013 年 10 月 11-13 日
12. 菅田謙治、安永純一郎、三浦未知、明里宏

文、小柳義夫、小原道法、松岡雅雄：組換えウイルスを用いた抗 HTLV-1 ワクチンの作製と Macaque 属での応用：第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場（兵庫県）、2013 年 11 月 10-12 日

13. 園直希、馬広勇、萩屋啓太、安永純一郎、松岡雅雄：FBXL11 は HTLV-1 bZIP factor と Tax の機能を共に増強し ATL 細胞の増殖を促進する：第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場（兵庫県）、2013 年 11 月 10-12 日

14. 紀ノ定明香、安永純一郎、伊豫田智典、稲葉カヨ、松岡雅雄：HBZ による CD4 陽性 T 細胞増殖促進の免疫学的機序：第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場（兵庫県）、2013 年 11 月 10-12 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：シェーグレン症候群の病態形成における HTLV-1 の関与
研究代表者：京都大学ウイルス研究所 教授 松岡 雅雄
研究分担者：九州大学大学院歯学研究院 教授 中村 誠司

研究要旨 HTLV-1 はシェーグレン症候群 (SS) の約 3 割がキャリアであり、以前より SS の発症に関与していることが示唆されていたが、その詳細についてはいまだ不明である。近年では HTLV-1 のケモカインを介した細胞依存性感染が注目されていることから、本研究では、抗 HTLV-1 抗体陽性 SS 患者と陰性 SS 患者の臨床像および免疫学的所見について比較検討を行った。その結果、HTLV-1 が TARC/CCR4 シグナルを介して SS の病態形成に関与していることが示唆され、非感染 SS 患者と全く異なった機序で発症する可能性も考えられた。

A. 研究目的

シェーグレン症候群 (SS) は、ドライマウスやドライアイを主症状とし、唾液腺や涙腺などの外分泌腺が障害を受ける臓器特異的自己免疫疾患である。病態が進展すると、高ガンマグロブリン血症や悪性リンパ腫などの腺外症状が出現することから、リンパ増殖性病変とも称されている。その病因、発症機序については不明な点が多いが、遺伝的要因、免疫異常、女性ホルモンの影響、そしてウイルス感染などの環境要因が考えられている。その中でも HTLV-1 は SS 患者の約 3 割が感染していることも報告されており、以前より SS の病態成立に HTLV-1 感染が関わっていることが推察されるが、その発症機序については、いまだ明らかにされていない。そこで本研究では抗 HTLV-1 抗体陽性 SS 患者と陰性 SS 患者の臨床像および免疫学的所見について比較検討を行った。

B. 研究方法

2000 年から 2013 年までに当科を受診した SS 患者 155 例を対象とし、そのうち、抗 HTLV-1 抗体陽性患者 20 例、陰性患者 135 例に分けて検討を行った。まず臨床所見(平均年齢、性別、唾液分泌量、画像所見、血清学的所見、病理所見)について比較検討を行った。さらに病理組織を用いて、近年 HTLV-1 と関連が指摘されているケモカイン (MDC、TARC) とケモカインレセプター (CCR4) の発現と局在について検索した。

(倫理面への配慮)

本研究は生体材料を使用するため、主治医が説明文書を使用して患者に説明し、患

者及び家族から書面で同意書を得る。解析結果の論文などでの公表に際しては、患者の個人を識別できる情報は公表しない。個人情報保護のため、検体は符号により匿名化し、符号を結びつける対応表および個人情報情報は実験責任者が厳重に保管する。

C. 研究結果

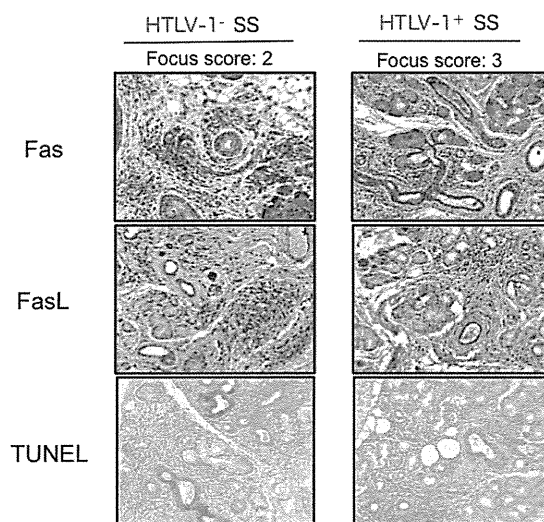
抗 HTLV-1 抗体陽性 SS 患者は陰性患者と比較して、平均年齢、男女比に有意な差はなく、唾液分泌量はやや多かった。唾液腺造影では進行例が多く、口唇腺組織でもリンパ球浸潤は強かった。血清学的所見では、リウマチ因子や抗核抗体、抗 SS-A 抗体の陽性率に有意な差はなかったが、抗 SS-B 抗体は優位に低かった (下図参照)。

	HTLV-1 陰性 SS (n=135)	HTLV-1 陽性 SS (n=20)
年齢 (歳)	56.0 ± 18.5	58.9 ± 12.1
性別 (男:女)	1:13.3	0:20
唾液分泌量検査 (ml)	10.92 ± 9.33	8.94 ± 7.21
唾液腺造影検査 (Rubin & Holt 分類)		
stage I (%)	58	55
stage II (%)	24	45
stage III (%)	13	5
stage IV (%)	5	0
リンパ球の浸潤程度 (石川・小守分類)		
± (%)	0	5
+	60	55
2+ (%)	25	40
3+ (%)	15	0
胚中心形成 (%)	21	0
自己抗体陽性率		
IgG (%)	74.0	85.0
IgA (%)	31.8	40.0
IgM (%)	34.0	15.0
RF (%)	62.2	40.0
ANA (%)	88.1	85.0
抗 SS-A 抗体 (%)	74.8	85.0
抗 SS-B 抗体 (%)	43.0	15.0*

*P < 0.05 x²検定

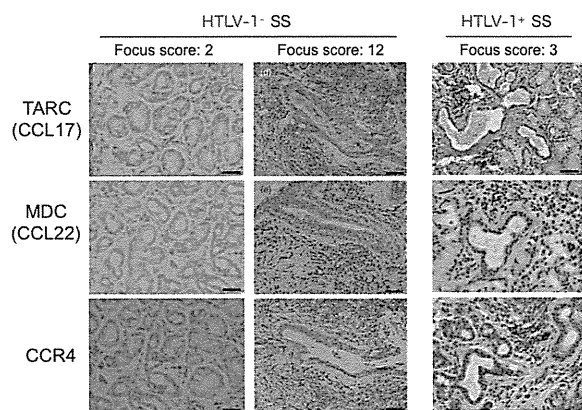
D. 考察

また、口唇腺組織を用いて、まずアポトーシスの有無 (Fas、FasL、TUNEL) について両者を比較してみると、抗 HTLV-1 抗体陽性 SS 患者は陰性患者と比較して、SS でよく認められる導管内のアポトーシス関連の分子の亢進は認めなかった(下図参照)。



口唇腺におけるアポトーシス関連因子の発現

さらに、HTLV-1 がコードする Tax の作用により、ICAM-1 が細胞膜上に強く発現し、MDC が大量に産生分泌され、CCR4 陽性 T 細胞が選択的に遊走される。遊走してきた CCR4 陽性 T 細胞は ICAM-1 を介して HTLV-1 感染 T 細胞と強固に結合するとされている。そのため、MDC、TARC、CCR4 についてもその発現と局在を検索した。



その結果、抗 HTLV-1 抗体陰性 SS 患者では、TARC および MDC は導管内とその周囲に、CCR4 は導管周囲のリンパ球に発現を認めた。一方、抗 HTLV-1 抗体陽性 SS 患者では、リンパ球の浸潤が軽度であるにもかかわらず、TARC および CCR4 は導管

周囲のリンパ球に発現を認めたが、MDC はほとんど発現していなかった。

D. 考察

これらの結果より、HTLV-1 はリンパ球に感染することで、TARC の分泌を誘導し、そのレセプターである CCR4 陽性細胞を遊走させ、Cell-Cell contact の感染を引き起こさせ、SS の病態形成に関与していることが示唆された。しかし、過去の報告で示唆されている MDC の発現は認められず、寛容は低いと考えられる。

E. 結論

近年、HTLV-1 のケモカインを介した細胞依存性感染が注目されているが、本研究でも HTLV-1 が TARC/CCR4 シグナルを介して SS の病態形成に関与していることが示唆され、非感染 SS 患者と全く異なった機序で発症する可能性も考えられた

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Moriyama M, Tanaka A, Maehara T, Furukawa S, Nakashima H, **Nakamura S**. T helper subsets in Sjögren's syndrome and IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis: A critical review. J Autoimmun. in press, 2013. 査読あり
- Tsuboi H, Asashima H, Takai C, Hagiwara S, Yokosawa M, Hirota T, Umehara H, Kawakami A, Nakamura H, Sano H, Tsubota K, Ogawa Y, Takamura E, Saito I, Inoue H, **Nakamura S**, (他 8 名). Primary and secondary surveys on epidemiology of Sjögren's syndrome in Japan. Mod Rheumatol. in press, 2013. 査読あり
- Tsuboi H, Hagiwara S, Asashima H, Umehara H, Kawakami A, Nakamura H, Sano H, Tsubota K, Ogawa Y, Takamura E, Saito I, Inoue H, **Nakamura S**, (他 7 名). Validation of different sets of criteria for the diagnosis of Sjögren's syndrome in Japanese patients. Mod Rheumatol. 23(2):219-25, 2013. 査読あり

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. 森山雅文、中村誠司 「シェーグレン症候群：最新の知見」、シェーグレン症候群の発症と病態進展における Th サブセットの関与 111-118 頁、先端医学社、炎症と免疫 9月号、2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：HTLV-1 関連炎症性希少疾患の病態解析と免疫療法開発研究
研究代表者：京都大学ウイルス研究所 教授 松岡 雅雄
研究分担者：熊本大学 教授 谷原 秀信

研究要旨

HTLV-1 関連疾患の基盤として感染細胞の増加と炎症が指摘されているが、実態と病態に関しては不明な点が多い。HTLV-1 ぶどう膜炎の病態解明を目的として、採血及び前房水を採取し、HTLV-1 感染細胞の解析（組織像・形態、浸潤リンパ球サブセット、感染細胞率等）を行う。現在、サンプル採取と解析を進行中である。

A. 研究目的

HTLV-1 は CD4 陽性 T 細胞の悪性腫瘍である成人 T 細胞白血病や炎症性疾患である HTLV-1 関連脊髄症や HTLV-1 ぶどう膜炎の原因ウイルスである。これら以外にも、臨床的には紫斑病や魚鱗癬といった皮膚疾患の発症に HTLV-1 感染が影響を与えることが示唆されているが、未だ結論に至っていない。HTLV-1 によるがんや炎症性疾患の病態には感染細胞のクローナルな増殖が重要であると考えられている。本研究では、希少疾患である HTLV-1 関連疾患の中で、HTLV-1 ぶどう膜炎患者の病態解明を目的とする。

B. 研究方法

HTLV-1 ぶどう膜炎の確定患者または疑い患者の各5-10名を対象とする。

当施設において対象患者の静脈血採取（10-20ml）及び前房水採取（約100 μ l）を行い、採取サンプルを京都大学ウイルス研究所に送付し、以下の解析が行われる。

1) 臨床検体の採取：被験者由来の末梢血単核球、前房水から感染細胞もしくは組織を採取し、ゲノムDNA、RNA、蛋白を抽出する。

2) HTLV-1感染細胞のクローナリティ解析：Inverse PCR法によりHTLV-1組み込み部位のゲノム配列を増幅し、高速シーケンサーでクローナリティのパターンを解析する。

3) HTLV-1プロウイルスの解析：プロウイルス配列を増幅し、プロウイルス内の欠損や変異の有無を解析する。

4) HTLV-1感染細胞のトランスクリプトーム解析：感染細胞・組織由来のRNAから

cDNAを合成し、マイクロアレイやRealtime PCRにて遺伝子発現解析を行う。

5) HTLV-1感染細胞の免疫学的解析：感染細胞における表現抗原やサイトカイン産生能をフローサイトメトリー、免疫組織染色、ウェスタンブロット、ELISAなどで解析する。

（倫理面への配慮）

本研究計画は当院のヒトゲノム・遺伝子解析倫理委員会にて審議され、承認を得ている。試料は治療の一環として実施される検査の過程で採取された検体（血液および前房水）の一部を利用するものであるため、本研究に協力することで患者自身に新たに侵襲が及ぶことはない。インフォームドコンセントは十分に行い、同意を得た上でサンプル採取を行う。

C. 研究結果

当院の倫理委員会にて承認を得た後に、対象患者のサンプル採取を行っているところであり、現在5名のサンプル採取を行い、解析を進行中である。今後も引き続きサンプル採取を行っていく予定である。

D. 考察

まだサンプル数が少なく、解析が進行中であるため、現時点での考察は困難である。

E. 結論

引き続きサンプル採取と解析を続けていく。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

Inoue T, Kawaji T, Tanihara H. Elevated levels of multiple biomarkers of Alzheimer's disease in the aqueous humor of eyes with open-angle glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci. 54(9):5353-8, 2013.

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

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））研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：HTLV-1 関連炎症性希少疾患の病態解析と免疫療法開発研究
研究分担者：尹 浩信 熊本大学大学院皮膚病態治療再建学分野 教授
研究協力者：城野剛充 熊本大学医学部附属病院形成再建科 診療助手

研究要旨

魚鱗癬を含めた、ATL の皮疹やその他の炎症性皮膚疾患と HTLV-1 の関連を HBZ 蛋白の分布や HTLV-1 proviral DNA の組み込みのあるリンパ球の分布様式を調べる事でその関連を検討する。

A. 研究目的

末梢血中抗 HTLV-1 抗体陽性の皮膚炎症性疾患(魚鱗癬等)における HTLV-1 との関連を調べる事で、ATL の発症のメカニズムの一端としての皮膚における炎症の位置づけを検討し、ATL の予後予測、検査、治療の発展に貢献する。

B. 研究方法

皮疹を有する ATL の皮膚病変や、ATL と関連は不明な末梢血抗 HTLV-1 抗体陽性の皮膚炎症性疾患において、末梢血や病変部皮膚生検組織を採取し、検体内での HTLV-1 proviral DNA の組み込みの有無や、HBZ 蛋白の病変内での分布様式等を検討する。また、それらの結果をそれぞれの症例の炎症性病変のプロフィールと関連を検討する。

(倫理面への配慮)

熊本大学大学院生命科学研究部倫理委員会で審議され、承認された研究である。

熊本大学大学院生命科学研究部等ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会で承認された文書を用いて説明し、同意を得た。

末梢血の採取や皮膚生検については採取の際に診断目的での採取に加え、採取した検体を研究目的で使用することの説明と同意を書面と口頭で行った。

C. 研究結果

当科および協力施設を含め熊本からは末梢血中抗 HTLV-1 抗体陽性症例で同意いただいた 13 名の方の末梢血を採取し、検体とした。皮膚生検組織については 3 症例を検体とした。

各検体における炎症性病変のプロフィール

ルとしては慢性湿疹、紅皮症、脂漏性皮膚炎、痒疹、毛包炎、扁平苔癬、疥癬、慢性臀部膿皮症、尖圭コンジローマなど多岐にわたり、そのうち魚鱗癬様の皮疹と診断された症例を 4 例含んでいた。

現時点ですべての検体での結果は出ていないが、少なくとも 2 検体で末梢血での HTLV-1 proviral DNA の組み込みを認めた。

炎症性病変との関連性については現時点では一定の傾向は認められていない。

D. 考察

元来 ATL を含む lymphoma が疑われる症例においては、積極的に末梢血抗 HTLV-1 抗体検査を保険適応として施行してきたが、lymphoma を疑わない炎症性疾患については保険適応外であるため検体検査は施行されず、炎症性疾患患者における末梢血抗 HTLV-1 抗体陽性患者がどの程度おられるのかは未だ不明である。今回の調査では新規の lymphoma が疑われた症例では末梢血抗 HTLV-1 抗体検査を施行し、陽性症例を見いだせたが、皮膚科領域で最も common disease である炎症性疾患のみの患者における末梢血抗 HTLV-1 抗体検査に関しては研究目的での採血となり、必ずしも採血や皮膚生検を行わない事から同意、採取には一定の期間が必要であり、検体の集積には継続的な活動が必要になると考えられた。

HTLV-1 関連炎症性疾患は症例数が必ずしも多くない疾患群であるため、その研究に関してはまず症例を集積することが最大の課題であり、短期間での検体採取は困難であることが改めてわかった。また、積極的に lymphoma を疑わない皮膚炎症性疾患において末梢血抗 HTLV-1 抗体検査を行う

事に関して、患者家族における感染を疑う結果となる事もしばしばであるため、検体採取を拒否される症例もあり、丁寧な説明に基づく同意の後の検査が重要である事に改めて気づかされた。いずれにせよ、今後とも長期的な症例の集積が必要であり、今回得られた症例についてのさらなる検討を行っていききたい。

炎症性皮膚疾患と HTLV-1 の関連性については臨床的に ATL の皮膚病変が多岐にわたる事もあり、その検討については皆無といっても良い。しかしながら、臨床的に炎症性皮膚疾患の精査中に lymphoma が疑われ診断に至る症例もあり、その関連性については長年にわたる懸案であった。今回の研究でその部分について検討が行われる事は ATL と皮膚病変の関連について今後の見地を深め、その診断の精度の向上や新たな治療の開発にも貢献できる可能性を秘めており、今後も継続的な活動を行う事が期待される。

最後に、ATL が積極的に疑われる lymphoma 症例においても、HTLV-1 proviral DNA の組み込みが認められる症例とそうでない症例とあり、前者が最終的に ATL と診断され、後者との予後の違いが明らかとなっているが、現状では同検査は保険適応外検査である。今回の研究で ATL の確定診断となった症例もあり、今後早期の保険収載が望まれる。

E. 結論

現時点では炎症性皮膚疾患と HTLV-1 の関連について有意な所見は得られておらず、今後のさらなる症例の集積は喫緊の課題である。臨床的に炎症が引き金になり ATL が発症するあるいは細胞増殖の因子となっている事を示唆する所見は少しずつ集積されており、その病理学的生物化学的な検討をすすめていく必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：HTLV-1 関連炎症性希少疾患の病態解析と免疫療法開発研究
研究代表者：京都大学ウイルス研究所 教授 松岡 雅雄
研究分担者：川崎医科大学 微生物学 教授 齊藤 峰輝

研究要旨

HTLV-1 basic leucine zipper factor (HBZ) は、その発現量が HTLV-1 関連脊髄症患者のプロウイルス量・運動障害度・髄液中炎症マーカー濃度と有意な正の相関を示すこと、HBZ トランスジェニックマウスが CD3, 4 陽性細胞の皮膚・肺への浸潤、サイトカイン産生異常を示すことから、HTLV-1 感染症における慢性持続性炎症形成の原因遺伝子であると考えられている。これまでは HBZ 蛋白質に対する優れた抗体がなかったため、研究の進展に影響を及ぼしてきた。本研究では、HBZ 蛋白質に対する複数のモノクローナル抗体を作製し、HBZ の検出系と定量系を確立した。これらは、今後 HTLV-1 関連炎症性希少疾患の病態を解明するうえで有用なツールとなりうる。

A. 研究目的

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (human T-cell leukemia virus type 1 :HTLV-1) は、世界ではじめてヒトの疾患との関連が見いだされたレトロウイルスであり、HTLV-1 関連脊髄症 (HTLV-1-associated myelopathy: HAM) および成人 T 細胞白血病 (Adult T-cell leukemia : ATL) の原因ウイルスである。一方、HTLV-1 感染者の一部に慢性炎症性肺疾患、ぶどう膜炎、多発性筋炎、シェーグレン症候群、リウマチ様関節炎など自己免疫疾患類似の慢性炎症性疾患が発症することが報告されている。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として経過するとはいえ、現在わが国には 100 万人を超える多数の HTLV-1 感染者が存在するため、一刻も早い HTLV-1 関連疾患の病態解明と発症予防法・新規治療法の開発が待たれている。特に、HTLV-1 感染者に発症する自己免疫疾患類似の慢性炎症性希少疾患については、発症頻度、病態を含めその実態がほとんど明らかにされていない。よって、HTLV-1 関連炎症性希少疾患の病態解明はわが国の HTLV-1 対策上きわめて重要である。

HTLV-1 basic leucine zipper factor (HBZ) は、HTLV-1 プロウイルスのマイナス鎖にコードされる遺伝子であるが、その発現量が HAM 患者のプロウイルス量・運動障害度・髄液中炎症マーカー濃度と有意な正の相関を示すこと、HBZ トランスジェニックマウスが CD3, 4 陽性細胞の皮膚・肺への浸潤、サイトカイン産生異常を示すことか

ら、HTLV-1 感染症における慢性持続性炎症形成の原因遺伝子であると考えられている。しかしながら、これまで HBZ 蛋白質に対する優れた抗体がなかったため、研究の進展に影響を及ぼしてきた。本研究の目的は、HBZ 蛋白質に対するモノクローナル抗体を作製し、HBZ の検出系と定量系を確立することで、HTLV-1 関連炎症性希少疾患の病態解明のために有用なツールを提供することである。

B. 研究方法

2 種類の HBZ ペプチドおよびコムギ無細胞蛋白発現系により作製した組換え HBZ 蛋白質を C57BL/6 マウスに 3 回免疫した後、脾細胞とミエローマ細胞 (SP2/0) をポリエチレングリコールで融合した。HAT 選択後にハイブリドーマの培養上清を用いてスクリーニングを行った。陽性コロニーは限界希釈法によりクローニングした。陽性ハイブリドーマ細胞をマウス腹腔に接種して腹水化させ、ゲル濾過法で IgG を精製した。現在までに以下に示す合計 14 クローンを取得した。

peptide #1 配列 (LRRGPPGEKAPPRGETHRD) 認識抗体

- ・ pep#1 P6-A7 (Mouse, IgG2b)
- ・ pep#1 P4-E12 (Mouse, IgG2b)

peptide #2 配列 (KAKQHSARKEKMQELGIDG) 認識抗体

- ・ pep#2 #20-H12 (Mouse, IgG1)
- ・ pep#2 #62-B9 (Mouse, IgG2b)
- ・ pep#2 #39-F2 (Mouse, IgG1)

組換え HBZ 蛋白質認識抗体

- ・ α コムギ HBZ #1-1 (Mouse, IgG2a)
- ・ α コムギ HBZ #2-1 (Mouse, IgM)
- ・ α コムギ HBZ #5-1 (Mouse, IgM)
- ・ α コムギ HBZ #6-1 (Mouse, IgG1)
- ・ α コムギ HBZ #7-1 (Mouse, IgG2b)
- ・ α コムギ HBZ #8-1 (Mouse, IgM)
- ・ α コムギ HBZ #10-1 (Mouse, IgM)
- ・ α コムギ HBZ #12-1 (Mouse, IgM)
- ・ α コムギ HBZ #14-1 (Mouse, IgM)

これら 14 クローンに加え、すでに取得済みのラット抗体 (下記) を以降の実験に用いた。

peptide #3 (VNYWQGRLEAMWLQ) 配列認識抗体
・ 4B12 (Rat, IgG2b)

作製した抗 HBZ モノクローナル抗体と各種 HTLV-1 感染細胞 (SLB1、MT-2、ILT-M1 など) や HBZ 強制発現細胞 (293T/HBZ-SI) を用いて (1) フローサイトメトリー (2) 蛍光免疫染色 (間接法) (3) ウェスタンブロットティング (4) サンドイッチ ELISA を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、動物の福祉を考慮して、無駄な苦痛を与えず、かつ与えざるを得ない苦痛であっても最低限とし、使用する匹数を減らして必要最低限の匹数で実験を行うべく十分に計画した上で実験計画書を作成し、川崎医科大学動物実験委員会の承認を得た上で施行した。

C. 研究結果

取得した新規抗 HBZ モノクローナル抗体を用いてウェスタンブロットティング、フローサイトメトリー、蛍光免疫染色 (間接法) により、HBZ 発現ベクターを強制発現した 293T 細胞のみならず、各種 HTLV-1 感染細胞株で HBZ 蛋白質の発現を確認することができた (図 1)。

抗 HBZ モノクローナル抗体を用いてサンドイッチ ELISA 系を構築し、HBZ 蛋白質を定量的に検出した (図 2)。

D. 考察

HBZ 蛋白質を特異的に検出可能な複数の抗 HBZ モノクローナル抗体を新規に取得した。現在までのところ HBZ 蛋白質の検出や定量の感度が十分に高いとはいえないため、

より検出感度の高い方法の検討や、より反応性の強いモノクローナル抗体の取得を続ける必要がある。最終的に、患者由来検体 (血清や HTLV-1 感染細胞) 中の HBZ 蛋白質、抗 HBZ 抗体を定量的に検出可能な系を確立し、HTLV-1 感染症における慢性持続性炎症形成メカニズムにおける HBZ の関与を解明したい。

E. 結論

HBZ 蛋白質を特異的に検出可能な複数の抗 HBZ モノクローナル抗体を新規に取得した。これらの抗体を用いて HBZ 蛋白質を定量的に検出可能なサンドイッチ ELISA 系を構築した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Saito M. (textbook) HTLV-1. *Encyclopedia of Genetics 2nd Edition*. Stanley Maloy, Kelly Hughes ed. Elsevier, Oxford, UK, 543-545, 2013.
2. Saito M, Tanaka R, Arishima S, Matsuzaki T, Ishihara S, Tokashiki T, Ohya Y, Takashima H, Umehara F, Izumo S, Tanaka Y. Increased expression of OX40 is associated with progressive disease in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Retrovirology*. 10:51, 2013.
3. Kodama A, Tanaka R, Saito M, Ansari AA, Tanaka Y. A novel and simple method for generation of human dendritic cells from unfractionated peripheral blood mononuclear cells within 2 days: its application for induction of HIV-1-reactive CD4(+) T cells in the hu-PBL SCID mice. *Front Microbiol*. 4:292, 2013.
4. Saito M. (Review) Neuroimmunological aspects of human T cell leukemia virus type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurovirol*. 20:164-174, 2014.
5. Tanaka Y, Takahashi Y, Tanaka R, Kodama A, Fujii H, Hasegawa A, Kannagi