

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- $\gamma$  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 純一郎

**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**

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。

HTLV-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。

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-1 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- $\gamma$  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- $\gamma$  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- $\gamma$  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- $\gamma$  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- $\gamma$  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- $\gamma$  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- $\kappa$ 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。

HTLV-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。

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- $\gamma$  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応答を抑制している 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- $\gamma$  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 $\alpha$  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: 16<sup>th</sup> 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 15<sup>th</sup> 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 3<sup>rd</sup> 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: 16<sup>th</sup> 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: 16<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses 2013, Holiday Inn Montreal-Midtown, Montreal, Canada, June26-30, 2013.
7. 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: 16<sup>th</sup> 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 4<sup>th</sup> 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
- 【国内】一般演題
16. 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
  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
  19. 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
  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
  22. 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
  23. 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