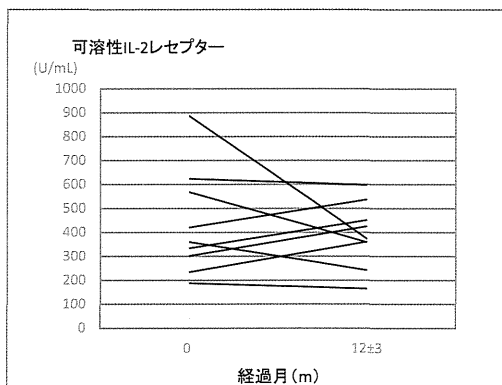
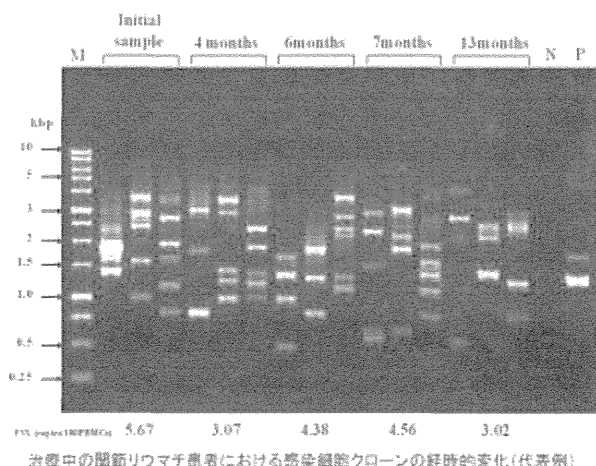


3) 可溶性 IL-2 レセプター：血清中の可溶性 IL-2 レセプターの中央値は初回検体が 360IU/L、12 ヶ月後が 372IU/L であり、有意の変化を示さなかった。



4) HTLV-1 感染細胞クローナリティの解析：メトトレキサートや生物学的製剤により治療中の患者 3 例において、経時的な HTLV-1 感染細胞クローンの変化を 1~2 年間にわたって観察したが、各個体においてのウイルス量は低下傾向であり、また ATL 発症時に認められるようなクローンの集束傾向は認められなかった。



5) 症例検討会:平成 27 年 1 月 24 日に長崎市において長崎大学、宮崎大学及び関連病院の医師による症例検討会を開催し、宮崎フィールド、長崎フィールドにおける HTLV-1 陽性関節リウマチ患者の臨床的特徴に関する解析を行った。この中で今後の長崎、宮崎共通プロトコールによる患者レジストリシステム構築についての議論を行った。

#### D. 考察

HTLV-1 陽性関節リウマチ患者におけるウイルスマーカー（抗体価、プロウイルス量）及び T 細胞活性化マーカーである可溶性 IL-2 レセプターの約 12 カ月での変化について検討した。抗体価は有意な低下を示したが、プロウイルス量および可溶性 IL-2 レセプターには変化は見られなかった。対象となった関節リウマチ患者はメトトレキサートを含む抗リウマチ薬や TNF 阻害薬を主とした生物学的製剤で治療中の患者であったため、抗体価の低下は治療による影響である可能性が考えられた。しかしながら HTLV-1 に特異的な現象である可能性も否定はできずこの点は同時に免疫グロブリン量の測定を行うなどでさらに検討する必要がある。ATL の発症危険因子である可能性が想定されているプロウイルス量については 12 カ月の観察期間では有意な変化がなかった。（1 例ではあるが、プロウイルス量の最も多い患者において上昇傾向が見られたことについては今後同用の症例が見られないかどうか観察の必要があるとおもわれた）ATL 患者で増加することが知られている可溶性 IL-2 レセプターについては有意の変化は見られなかった。また感染細胞クローナリティの経時的サンプルにおける解析でもポリクローナル無状態が続いており、著変はなかった。今回の対象となった症例においては臨床的にも ATL 発症を疑わせる所見はなかった。今後さらに症例数を増やして検討を続ける予定である。

#### E. 結論

HTLV-1 陽性関節リウマチ患者において抗体価、プロウイルス量及び可溶性 IL-2 レセプターの約 12 カ月での変化および感染細胞クローナリティの変化について検討した。抗体価は低下傾向を示したが、プロウイルス量、可溶性 IL-2 レセプター、感染細胞クローナリティには変化はなく、治療中の HTLV-1 陽性関節リウマチ患者において ATL 発症の危険性が增大していることを示唆する所見を見いださなかった。このことは現在一般的に関節リウマチに対して行われている治療が HTLV-1 陽性患

者における ATL リスクを、少なくとも短期的には増加させていないことを意味するかもしれない。しかし、結論を得るためには今後、患者レジストリシステム構築も含めて、さらに症例数と観察期間を増加させてエビデンスを積み重ねる必要がある。

F. 健康危険情報  
なし。

G. 研究発表

【論文】

- 1) 岡山昭彦. HTLV-1 感染と自己免疫疾患における clinical questions. 臨床免疫・アレルギー科. 2014; 62(6): 686-91.
- 2) Umekita K, Hidaka T, Miyauchi S, Ueno S, Kubo K, Takajo I, Hashiba Y, Kai Y, Nagatomo Y, Okayama A. Treatment with anti-tumor necrosis factor biologics agents in human T-lymphotropic virus type 1 positive patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Care Res. 2014; 66: 788-92.
- 3) Nakamura H, Takahashi Y, Yamamoto-Fukuda T, Horai Y, Nakashima Y, Arima K, Nakamura T, Koji T, Kawakami A. Direct infection of primary salivary gland epithelial cells by HTLV-1 that induces the niche of the salivary glands of Sjögren's syndrome patients. Arthritis Rheumatol. 2015. in press.
- 4) Tsuboi H, Matsumoto I, Hagiwara S, Hirota T, Takahashi H, Ebe H, Yokosawa M, Hagiya C, Asashima H, Takai C, Miki H, Umeda N, Kondo Y, Ogishima H, Suzuki T, Hirata S, Saito K, Tanaka Y, Horai Y, Nakamura H, Kawakami A, Sumida T. Efficacy and safety of abatacept for patients with Sjögren's syndrome associated with rheumatoid arthritis: Rheumatoid Arthritis with Orencia Trial toward Sjögren's syndrome Endocrinopathy (ROSE) trial-an open-label, one-year, prospective study-Interim analysis of 32 patients for 24 weeks. Mod Rheumatol. 2014; 11: 1-7. [Epub ahead of print]

5) Takagi Y, Sumi M, Nakamura H, Iwamoto N, Horai Y, Kawakami A, Nakamura T. Ultrasonography as an additional item in the American College of Rheumatology classification of Sjögren's syndrome. Rheumatology (Oxford). 2014; 53(11): 1977-83.

6) 岩本直樹, 川上 純. 【自己免疫性血液疾患:診断と治療の進歩】病態の基礎 自己抗体の産生機序. 日本内科学会雑誌. 2014; 103(7): 1564-9.

7) 一瀬邦弘, 川上 純. 最新関節リウマチ学 — 寛解・治癒を目指した研究と最新治療— III. 関節リウマチの発症要因と発症メカニズム Th17 細胞. 日本臨牀. 2014; 72(3): 53-8.

【学会発表】

- 1) 梅木一美, 橋倉悠輝, 山本成郎, 岡山昭彦. 高感度 PCR 法および Line Immunoassay による HTLV-1 抗体陽性の確認. 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会. 2014.
- 2) 橋倉悠輝, 梅木一美, 山本成郎, 長谷川寛雄, 柳原克紀, 岡山昭彦. MT-2 細胞株の HTLV-1 プロウイルスの組み込み部位および内部構造の多様性. 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会. 2014.
- 3) Okayama A, Iwanaga M, Sagara Y, Hidaka T, Umekita K, Nakano K, Watanabe T, Yamano Y, Horai Y, Nakamura H, Kawakami A. Human T-Lymphotropic Virus Type 1 Biomarkers in Patients with Rheumatoid Arthritis. 2014 ACR/ARHP ANNUAL MEETING. 2014.
- 4) 梅木一美, 橋倉悠輝, 山本成郎, 岡山昭彦. HTLV-1 抗体確認試験としての Line Immunoassay の有用性. 第 61 回日本臨床検査医学会学術集会. 2014.
- 5) Okayama A. HTLV-1 infection and associated diseases. Seminar in Department of Immunology and Infectious Diseases, HSPH. 2014.

6) 岡山昭彦. HTLV-1 感染症と慢性炎症性疾患. 京都大学ウイルス研究所セミナー. 2014.

7) 寶來吉朗, 中村英樹, 中島好一, 林 徳眞吉, 川上 純. シェーグレン症候群の TLR 3 誘導性アポトーシスにおける下流分子及び生存因子の関与について. 第 23 回日本シェーグレン症候群学会学術総会. 2014.

8) 向野晃弘, 中根俊成, 樋口 理, 中村英樹, 川上 純, 松尾秀徳, Tsokos, G. C. シェーグレン症候群における抗 gAChR 抗体陽性例陰性例の比較検討. 第 19 回日本神経感染症学会総会学術集会 第 26 回 日本神経免疫学会学術集会合同学術集会. 2014.

9) Horai Y, Takatani A, Nishino A, Nakashima Y, Suzuki T, Fujikawa K, Tsukada T, Tsuboi M, Matsuoka N, Migita K, Aramaki T, Ueki Y, Kawashiri SY, Iwamoto N, Ichinose K, Tamai M, Nakamura H, Origuchi T, Kawakami A. Abatacept is a suitable biologic disease modifying anti-rheumatic drugs in patients with anti-ss-a antibodies-positive rheumatoid arthritis Final Acceptance Medical or Research. Annual European Congress of Rheumatology. 2014.

10) 岩本直樹, 玉井慎美, 川尻真也, 西野文子, 高谷亜由子, 中島好一, 鈴木貴久, 寶來吉朗, 一瀬邦弘, 中村英樹, 折口智樹, 上谷雅孝, 川上 純. 多角的画像診断によるシェーグレン症候群関節症の検討 —関節リウマチとの鑑別のために—. 第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2014.

11) 中村英樹, 高橋良子, 寶來吉朗, 福田智美, 中村龍文, 小路武彦, 川上 純. シェーグレン症候群唾液腺上皮細胞に対する HTLV-I 感染の in vitro での影響について. 第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2014.

12) 鈴木貴久, 高谷亜由子, 西野文子, 中島好一, 寶來吉朗, 川尻真也, 岩本直樹, 一瀬邦弘, 玉井慎美, 有馬和彦, 中村英樹, 折口智樹, 川上 純. 抗

HTLV-I 抗体陽性関節リウマチ患者における抗 TNF 療法への反応性の検討. 第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況なし。

## HTLV-1 陽性難治性疾患の診療の質を高めるためのエビデンス構築

### 1. HTLV-1 陽性難治性疾患の診療ガイドラインに資する質の高いエビデンス作成を目指した研究

#### a. HTLV-1 陽性難治性疾患の病態解析研究 (2) HTLV-1 感染による炎症病態への影響の解析

担当責任者：岡山昭彦 宮崎大学医学部内科学講座免疫感染病態学分野・教授

研究協力者：梅北邦彦 宮崎大学医学部内科学講座免疫感染病態学分野

研究要旨：これまでの研究から HTLV-1 陽性関節リウマチ患者では生物学的製剤治療前の炎症所見が陰性者に比して強いことが示された。HTLV-1 感染が関節リウマチなど慢性炎症性疾患の病態を修飾する可能性があると考え、HTLV-1 感染細胞株と非感染細胞株の産生するサイトカインの違いや、HTLV-1 感染細胞株における転写調節因子の活性化機構及び免疫抑制剤の影響などについて *in vitro* の検討を行った。その結果、HTLV-1 感染細胞株は IL-6 や IFN $\gamma$  など様々な炎症性サイトカインを産生していた。また代表的な転写因子である NF- $\kappa$ B と NFAT1 の細胞内局在を検討したところ、HTLV-1 感染細胞株ではこれら転写因子の発現、活性化、核移行の亢進を認めた。また NF- $\kappa$ B 阻害剤によるアポトーシスの誘導や炎症性サイトカイン mRNA の発現の抑制が認められたものの、NFAT 阻害剤である FK では同様の効果が認められなかった。HTLV-1 感染細胞における転写因子の常態的活性化は様々なサイトカインの産生を誘導しており、特に IL-6 や IFN $\gamma$  などのサイトカインは慢性炎症性疾患の病態を修飾する可能性があると考えられた。今後、HTLV-1 感染による転写因子活性化の制御について、免疫抑制剤や抗サイトカイン製剤などを用いた *in vitro* の検討を進める方針である。

#### A. 研究目的

我々は、HTLV-1 陽性関節リウマチ患者では生物学的製剤治療前の炎症所見が陰性者に比して強いことを見いだした。このため T 細胞に感染した HTLV-1 が関節リウマチなど慢性炎症性疾患の病態を修飾する可能性があるのではないかという作業仮説を立てた。本研究では、この仮説に関連して、HTLV-1 感染細胞株と非感染細胞株の産生するサイトカインの違いや、HTLV-1 感染細胞株における転写調節因子の活性化機構及び免疫抑制剤の影響などについて *in vitro* の検討を行った。

#### B. 研究方法

HTLV-1 感染細胞株 (MT2B, MT2J, Hut102) と非感染細胞株 (Jurkat, Molt4) の産生するサイトカインの違いや、HTLV-1 感染細胞株における転写調節因子の活性化機構などについて以下の様な検討を行った。

- ①HTLV-1 感染細胞株 (MT2B, MT2J, Hut102) および非感染細胞株 (Jurkat, Molt4) を 72 時間培養後、培養上清中の 25 項目のサイトカインをサイトカイン多項目同時測定機 (Multi Cytokine assay MAGPIX, Luminex 社) で網羅的に測定した。
- ②HTLV-1 感染細胞株における主な転写調節因子について、細胞内局在やリン酸化、阻害剤によ

る炎症性サイトカインの mRNA 発現やアポトーシス細胞の割合について検討した。転写因子の細胞内局在は、cytoplasmic/nuclear protein separate extraction 法によって細胞質および核タンパクを分離・精製し、ウエスタンブロット法により解析した。

NF- $\kappa$ B の活性阻害剤として、IKK 複合体の阻害剤 (BMS345541, 以下 BMS) とプロテアソーム阻害剤 (MG132, 以下 MG) の 2 種類を用いた。NFAT 阻害剤としてタクロリムス (以下 FK) を用いた。各々の試薬の最終濃度は BMS と MG は 10  $\mu$ M、FK は 50ng/ml とした。HTLV-1 感染細胞株である MT2B 細胞を 24 時間処理した後のアポトーシス細胞の割合を Muse assay system で解析した。また、BMS345541 (10  $\mu$ M) で処理した MT2B 細胞の IFN- $\gamma$ 、IL-6、Tax、HBZ mRNA 発現を 10、30、60、120 min と経時的に解析した。Real-time PCR には Light Cycler (Roche) を用いた。サンプル DNA は 1 反応あたり 1  $\mu$ g を使用した。GAPDH の mRNA 発現を内部標準遺伝子として用い、 $\Delta\Delta$ Ct 法による相対的遺伝子発現量の定量を行った。

### C. 研究結果

① HTLV-1 感染細胞株 (MT2B, MT2J, Hut102) および非感染細胞株 (Jurkat, Molt4) を 72 時間培養した培養上清中のサイトカインプロファイルを示した (表 1)。HTLV-1 感染細胞株は、非感染細胞株と比較して IL-6、IFN- $\gamma$ 、TNF などの炎症性サイトカインを産生していた。HTLV-1 感染細胞株は Tax タンパクの発現を介して、NF- $\kappa$ B などの核内転写調節因子を活性化することが報告されている。IL-6、IFN- $\gamma$ 、TNF の発現は NF- $\kappa$ B の転写活性によって調節されることが知られているため、HTLV-1 感染細胞においてもこれらのサイトカインの産生が亢進していることが考えられた。

サイトカイン	MT2B	MT2J	Hut102	Jurkat	Molt4
IL-6	1.2E+01	1.5E+01	1.8E+01	1.0E+00	1.0E+00
IFN- $\gamma$	1.5E+01	1.8E+01	2.0E+01	1.0E+00	1.0E+00
TNF- $\alpha$	1.8E+01	2.0E+01	2.2E+01	1.0E+00	1.0E+00
IL-1 $\beta$	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-17A	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-17F	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-21	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-22	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-23	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-27	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-28A	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-28B	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-30	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-31	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-32	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-33	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-34	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-35	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-36	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-37	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-38	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-39	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-40	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-41	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-42	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-43	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-44	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-45	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-46	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-47	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-48	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-49	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-50	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-51	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-52	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-53	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-54	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-55	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-56	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-57	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-58	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-59	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-60	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-61	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-62	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-63	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-64	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-65	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-66	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-67	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-68	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-69	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-70	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-71	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-72	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-73	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-74	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-75	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-76	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-77	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-78	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-79	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-80	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-81	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-82	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-83	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-84	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-85	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-86	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-87	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-88	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-89	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-90	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-91	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-92	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-93	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-94	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-95	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-96	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-97	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-98	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-99	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00
IL-100	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00	1.0E+00

表 1. HTLV-1 感染細胞株 (MT-2B、MT2-J、Hut102) および HTLV-1 非感染細胞株 (Molt-4、Jurkat) の培養上清中のサイトカインプロファイル。感染細胞株で顕著な増加を認めたサイトカインを黄色で示した。

② 次に HTLV-1 感染細胞株 (MT2B と Hut102) における主な転写調節因子 (NF- $\kappa$ B や NFAT1) について、細胞内局在やリン酸化を検討した。MT2B や Hut102 におけるリン酸化 p65 (NF- $\kappa$ B) や NFAT1 の発現は、非感染細胞株である Jurkat 細胞や Molt4 細胞に比べて亢進しており、核内への局在が顕著であった (図 1)。抗 NFAT1 抗体が認識する 2 本のバンドは、それぞれリン酸化 (上) および脱リン酸化 (下) NFAT1 を示していると考えられ、HTLV-1 感染細胞株では活性化型である脱リン酸化 NFAT1 が核へ多く移行していることが示された。HTLV-1 感染細胞株ではこれらの転写因子が常態的に活性化しており、HTLV-1 感染が免疫機能異常の誘引となる可能性を示唆するものと考えられた。

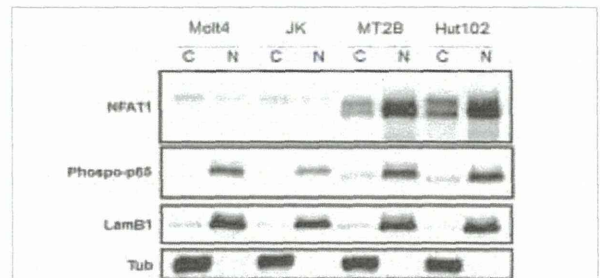


図 1. HTLV-1 感染細胞株 (MT-2B、Hut102) および HTLV-1 非感染細胞株 (Molt-4、Jurkat) における転写因子の発現と局在。C: 細胞質、N: 核

更に、作用機序の異なる2種類のNF- $\kappa$ B阻害剤(BMSとMG)処理によって、MT2B細胞のアポトーシスが誘導された(図2)。NF- $\kappa$ Bの活性化は、IKK複合体の活性化およびI $\kappa$ Bのプロテアソームによる分解によって誘導される。BMSとMGは其々の経路を阻害する低分子化合物である。この阻害剤による24時間、48時間処理によってMT2B細胞のアポトーシスが誘導された。一方、メチルプレドニゾン(mPSL)はMAPKの活性化を阻害することでアポトーシスを誘導すると報告されるが、MT2B細胞においてはmPSL 10 $\mu$ Mによるアポトーシスの誘導は確認できなかった。この結果は、活性化NF- $\kappa$ BはHTLV-1感染細胞の細胞増殖に重要であることを示唆した。

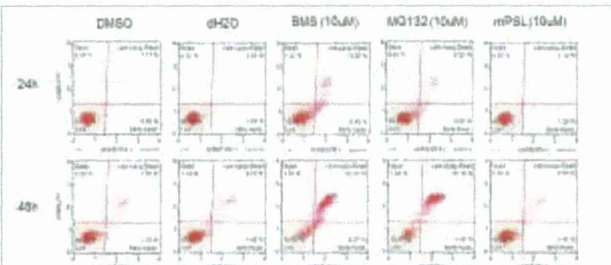


図2. HTLV-1感染細胞株MT-2Bのアポトーシス細胞の解析例。BMSおよびMG132で処理により第1象限の細胞集団(アポトーシス細胞)の増加を認めた。上段: 24時間処理、下段48時間処理

BMS処理したMT2B細胞のIFN- $\gamma$ 、IL-6、Tax、HBZ mRNA発現を10、30、60、120 minと経時的に解析したところ、DMSO処理に比べてこれら遺伝子の発現は減少する傾向であった(図3)。HTLV-1感染によって産生されるTaxタンパク質はIKK複合体を直接活性化することでNF- $\kappa$ Bを活性化すると報告される。また、TaxやHBZの発現調節機構は明らかになっていないが、IKK阻害によるNF- $\kappa$ B活性化の阻害によってこれら遺伝子の発現も減少したことから、TaxやHBZの発現についてもNF- $\kappa$ Bが関与している可能性が考えられた。

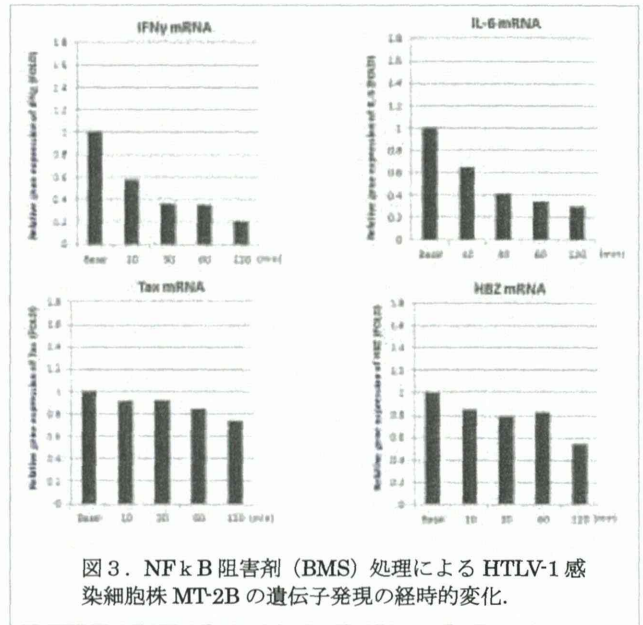


図3. NF- $\kappa$ B阻害剤(BMS)処理によるHTLV-1感染細胞株MT-2Bの遺伝子発現の経時的変化。

本研究では、HTLV-1感染細胞株においてNF- $\kappa$ Bだけでなく、NFATの核内移行も認められた(図3)。このため、HTLV-1感染細胞におけるNFATの機能について検討を行った。NFATの活性阻害を目的にFKを用いてMT2B細胞のIFN $\gamma$ とIL-6のmRNA発現を解析した。FKの至適濃度を検討するため、T細胞株であるJK細胞をFKで処理し、PMA/Ionomycinで刺激した際のIFN $\gamma$  mRNAの発現を測定し、FK 50ng/mlを最終濃度として実験を行った(図4)。活性化JKにおけるIFN $\gamma$  mRNAの発現はFKによって著明に抑制されることを確認した(図4A)。予備実験の結果から、MT2に対するFK処理濃度を50ng/mLと固定し2時間培養を行った。その結果、FKはMT2B細胞におけるIFN $\gamma$ およびIL-6のmRNA発現を抑制しなかった(図4BとC)。IKK阻害剤によるNF- $\kappa$ B活性の阻害においては、2時間後の処理でこれら遺伝子の発現は顕著に低下していたが、NFAT活性阻害剤であるFKでは同様の効果を認めなかった。

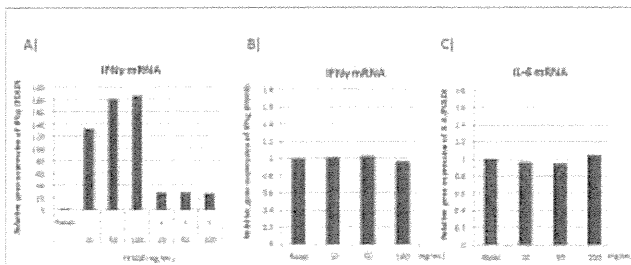


図4. NFAT活性化阻害剤FK処理によるHTLV-1感染細胞株MT2Bの遺伝子発現の経時的変化. PMA/Ionomycinで刺激したT細胞株Jurkat細胞のIFN $\gamma$  mRNA転写はFKで抑制された(A). HTLV-1感染細胞株MT2BのIFN $\gamma$ およびIL-6 mRNA転写はFK処理(50ng/ml)による抑制を認めなかった(BおよびC).

#### D. 考察

HTLV-1感染細胞株が産生するサイトカインに特徴がないか網羅的解析を行った。HTLV-1感染細胞株はIL-6やIFN $\gamma$ など様々な炎症性サイトカインを産生しており、HTLV-1感染によるこれらのサイトカインの産生亢進が慢性炎症性疾患の病態を修飾する可能性が考えられた。HTLV-1感染細胞株においてサイトカインの産生が亢進する機序を検討するため、代表的な転写因子であるNF- $\kappa$ BとNFAT1の細胞内局在を検討した。HTLV-1感染細胞株ではこれら転写因子の発現、活性化、核移行の亢進を認めた。HTLV-1プロウイルスがコードするpX領域から転写・翻訳されるTaxタンパクは直接あるいは間接的にNF- $\kappa$ Bを活性化することが報告されているが、本研究でも感染細胞において同様の結果が認められた。HTLV-1感染細胞株におけるNFATに関する報告は少ないが、NFATは主に活性化T細胞の転写調節因子として同定されたタンパクであり、T細胞の増殖、分化に重要と報告される。T細胞を感染の標的とするHTLV-1によるNFATの活性化機構を明らかにすることは、HTLV-1感染に起因する慢性炎症性疾患の病態修飾のメカニズムを解明するために重要と考えられた。しかしながら、本研究ではNF- $\kappa$ B阻害剤によるアポトーシスの誘導や炎症性サイトカインmRNAの発現の抑制が認められたものの、NFAT阻害剤であるFKでは同様の効果が認められなかった。FKはNFATの脱リン酸化を誘導するカルシ

ニューリン(CN)阻害剤であり、HTLV-1感染細胞においてはCNを介さないNFAT活性化経路が存在する可能性を示唆する所見と考えられた。HTLV-1感染細胞で発現するp12タンパクがNFATの活性化に重要であると報告があり、NFATの活性化に関してもHTLV-1感染の影響は少なからず存在すると考えられ今後検討する予定である。

#### E. 結論

HTLV-1感染細胞における転写因子の常態的活性化は様々なサイトカインの産生を誘導しており、特にIL-6やIFN $\gamma$ などのサイトカインは慢性炎症性疾患の病態を修飾する可能性のあるサイトカインであると考えられた。今後、HTLV-1感染による転写因子活性化の制御について、免疫抑制薬や抗サイトカイン製剤などを用いたin vitroの検討を進める方針である。

#### F. 健康危険情報 なし。

#### G. 研究発表

##### 【論文】

- 1) 岡山昭彦. HTLV-1感染と自己免疫疾患におけるclinical questions. 臨床免疫・アレルギー科. 2014; 62(6): 686-91.
- 2) Umekita K, Hidaka T, Miyauchi S, Ueno S, Kubo K, Takajo I, Hashiba Y, Kai Y, Nagatomo Y, Okayama A. Treatment with anti-tumor necrosis factor biologics agents in human T-lymphotropic virus type 1 positive patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Care Res. 2014; 66: 788-92.

##### 【学会発表】

- 1) 梅木一美, 橋倉悠輝, 山本成郎, 岡山昭彦. 高感度PCR法およびLine ImmunoassyによるHTLV-1抗体陽性の確認. 第1回日本HTLV-1学会学術集会. 2014.

- 2) 橋倉悠輝, 梅木一美, 山本成郎, 長谷川寛雄, 柳原克紀, 岡山昭彦. MT-2 細胞株の HTLV-1 プロウイルスの組み込み部位および内部構造の多様性. 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会. 2014.
- 3) Okayama A, Iwanaga M, Sagara Y, Hidaka T, Umekita K, Nakano K, Watanabe T, Yamano Y, Horai Y, Nakamura H, Kawakami A. Human T-Lymphotropic Virus Type 1 Biomarkers in Patients with Rheumatoid Arthritis. 2014 ACR/ARHP ANNUAL MEETING. 2014.
- 4) 梅木一美, 橋倉悠輝, 山本成郎, 岡山昭彦. HTLV-1 抗体確認試験としての Line Immunoassay の有用性. 第 61 回日本臨床検査医学会学術集会. 2014.
- 5) Okayama A. HTLV-1 infection and associated diseases. Seminar in Department of Immunology and Infectious Diseases, HSPH. 2014.
- 6) 岡山昭彦. HTLV-1 感染症と慢性炎症性疾患. 京都大学ウイルス研究所セミナー. 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし。



## HTLV-1 陽性難治性疾患の診療の質を高めるためのエビデンス構築

### 1. HTLV-1 陽性難治性疾患の診療ガイドラインに資する質の高いエビデンス作成を目指した研究

#### a. HTLV-1 陽性難治性疾患の病態解析研究

#### (3) シェーグレン症候群小唾液腺細胞への HTLV-1 感染について

担当責任者：川上 純<sup>1</sup>

研究協力者：寶来吉朗<sup>1</sup>、高橋良子<sup>1</sup>、中島好一<sup>1</sup>、福田智美<sup>2</sup>、小路武彦<sup>2</sup>、中村龍文<sup>3</sup>、中村英樹<sup>1</sup>

1. 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科展開医療科学講座リウマチ・膠原病内科学分野（第一内科）
2. 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科組織細胞生物学分野
3. 長崎国際大学人間社会学部社会福祉学科

研究要旨： HTLV-I がシェーグレン症候群（SS）を誘発する機序を、HTLV-I の唾液腺細胞への感染の観点から解析した。HCT-5 を HTLV-I 産生細胞として用い[HTLV-I 関連脊髄症(HAM)患者から樹立された CD4 陽性 T 細胞株]、唾液腺細胞は SS 患者口唇小唾液腺から単離した初代培養唾液腺細胞 (salivary gland epithelial cells : SGECs) を用いての混合培養において、HTLV-I の SGECs への感染を認めた。この感染は混合培養された SGECs での HTLV-I 関連蛋白発現と HTLV-I pX 領域での in situ PCR で確認され、96 時間後の混合培養では、SGECs の 7.8% に HTLV-I 関連蛋白の発現を認めた。HTLV-I との混合培養により、SGECs における炎症性サイトカイン、副刺激分子、アポトーシス関連分子の発現は増強したが、アポトーシスは検出されなかった。これらの唾液腺細胞の機能変化は、SS 患者唾液腺組織においても観察されており、HTLV-I は唾液腺細胞に観戦することで、これら細胞を pro-inflammatory な形質に変化させ、SS の発症および進展に寄与すると考えられた。

#### A. 研究目的

HTLV-I 高浸淫地域において、SS と関節リウマチ (RA) の発症および進展には HTLV-I 感染が考えられている。しかしながらその機序の詳細は不明な点が多く、今回、私たちは、HTLV-I が SS を誘発する機序を、HTLV-I の唾液腺細胞への感染の観点から解析した。

#### B. 研究方法

HTLV-I 感染細胞は、HTLV-I 関連脊髄症 (HAM) 患者から樹立された CD4 陽性 T 細胞株である

HCT-5 を用いた。唾液腺細胞は SS 患者口唇小唾液腺から単離した初代培養唾液腺細胞 (salivary gland epithelial cells : SGECs : cytokeratin 8/18 陽性) を用いた。これらを混合培養し (〜96 時間)、SGECs における HTLV-I 感染を、HTLV-I 関連蛋白の発現と TLV-I pX 領域での in situ PCR で評価した。混合培養における SGECs の機能分子発現変化はドットブロットアレイ、ELISA、免疫蛍光染色で評価した。混合培養における SGECs のアポトーシスは、TUNEL 法で解析した。

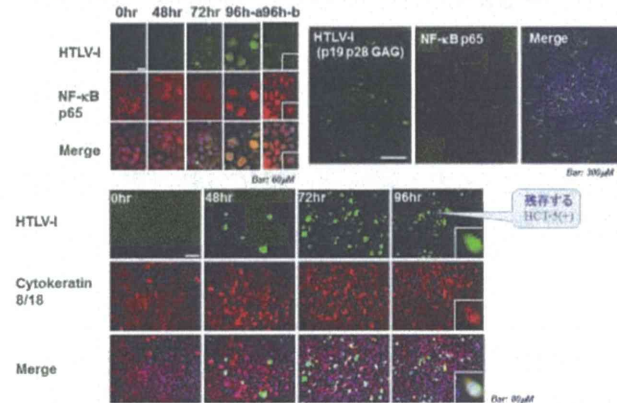
(倫理面への配慮)

上記の研究は長崎大学病院臨床研究倫理委員会の承認および文書での研究への同意を得ている。

### C. 研究結果

HCT-5 と SGECs の混合培養の経過を図 1 に示す。

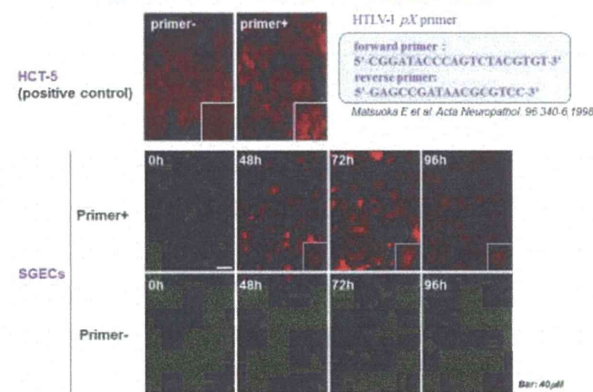
図1. HCT-5との混合培養時のSGECsへのHTLV-I感染



混合培養72-96hでSGECsにHTLV-I蛋白発現が観察され(n=4)、7.8±1.3%のSGECsにHTLV-I蛋白発現が見られた。

時間経過とともに、SGECs には HTLV-I 関連蛋白と NF-kappaB 核内移行を認めた。Cytokeratin 8/18 と HTLV-I 関連蛋白との double staining では、96 時間後の感染効率は 7.8% で、SGECs における HTLV-I の発現は、HTLV-I pX 領域での in situ PCR で確認された (図 2)。

図2. In situ PCRによるHTLV-I感染の評価

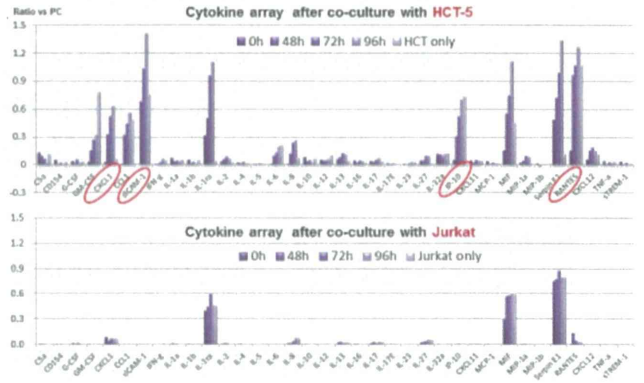


HTLV-I tax primer-条件では、共培養48-96hでSGECsのHTLV-Iシグナル増強が確認された(n=2)。

図 3 (サイトカインドットプロットアレイ) と図 4 (アポトーシス関連分子ドットプロットアレイ) に示すように、Jurkat をコントロールとすると、HCT-5 との混合培養により、SGECs からの炎症性サイトカインとアポトーシス関連分子の発現の増

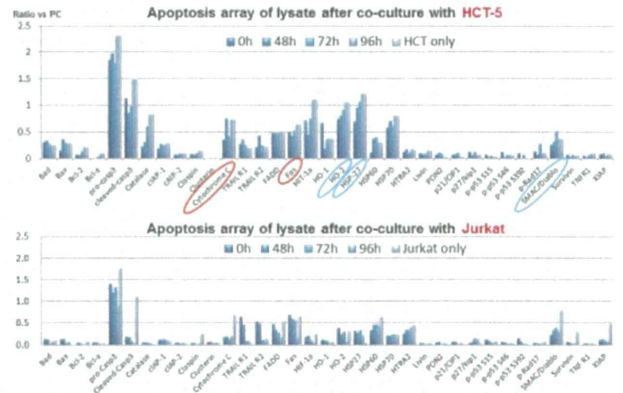
強を認め、これは ELISA と免疫蛍光染色で確認された。しかしながら混合培養により、SGECs のアポトーシスは誘導されなかった (図 5)。

図3. 混合培養でのサイトカインドットプロットアレイ time course分析



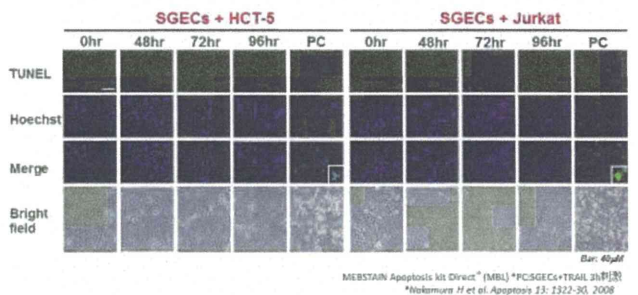
Jurkatと比較して、HCT-5との混合培養では、副刺激分子、遊走能因子やIP-10(CXCL-10)の時間経過による発現増加が観察された(n=2)。

図4. 混合培養でのアポトーシスドットプロットアレイ time course分析



HCT-5との混合培養により、Fas, cytochrome Cなど pro-apoptotic な分子とともに、反対にHO-2, HSP-27, SMACなど anti-apoptotic な分子の発現も増強していた(n=2)。

図5. HCT-5/JurkatとSGECs混合培養でのアポトーシスのTUNEL法による確認



陽性コントロール(TRAIL 刺激)との比較で、HCT-5/Jurkatとの混合培養では有意なアポトーシスは観察されなかった(n=2)。

#### D. 考察

HTLV-I は唾液腺細胞に感染し、NF-kappaB を活性化し、唾液腺細胞における炎症性サイトカインおよびアポトーシス関連分子の発現を増強した。この小唾液腺細胞の機能変化は、HTLV-I による SS の発症および進展に関連すると考えられた。唾液腺細胞にアポトーシスが誘導されなかったのは、アポトーシス誘導分子 (Fas など) に加え、抗アポトーシス分子 (HO-2 など) の発現も増強したためと考えられた。

#### E. 結論

今回の検討により、HTLV-I 高浸淫地域における SS の発症および進展機序の一つとして、HTLV-I の唾液腺細胞への感染を介しての、これら細胞の機能変化が考えられた。今後は他 lineage への HTLV-I 感染などを評価し、HTLV-I の SS への関与の詳細を検討したい。

F. 健康危険情報  
なし。

#### G. 研究発表

##### 【論文】

- 1) Nakamura H, Takahashi Y, Yamamoto-Fukuda T, Horai Y, Nakashima Y, Arima K, Nakamura T, Koji T, Kawakami A. Direct infection of primary salivary gland epithelial cells by HTLV- I that induces the niche of the saliv ary glands of Sjögren's syndrome patients. Arthritis Rheumatol. 2015. in press.
- 2) Tsuboi H, Matsumoto I, Hagiwara S, Hirota T, Takahashi H, Ebe H, Yokosawa M, Hagiya C, Asashima H, Takai C, Miki H, Umeda N, Kondo Y, Ogishima H, Suzuki T, Hirata S, Saito K, Tanaka Y, Horai Y, Nakamura H,

Kawakami A, Sumida T. Efficacy and safety of abatacept for patients with Sjögren's syndrome associated with rheumatoid arthritis: Rheumatoid Arthritis with Oencia Trial toward Sjögren's syndrome Endocrinopathy (ROSE) trial-an open-label, one-year, prospective study-Interim analysis of 32 patients for 24 weeks. Mod Rheumatol. 2014; 11: 1-7. [Epub ahead of print]

- 3) Takagi Y, Sumi M, Nakamura H, Iwamoto N, Horai Y, Kawakami A, Nakamura T. Ultrasonography as an additional item in the American College of Rheumatology classification of Sjögren's syndrome. Rheumatology (Oxford). 2014; 53(11): 1977-83.

- 4) 岩本直樹, 川上 純. 【自己免疫性血液疾患:診断と治療の進歩】 病態の基礎 自己抗体の産生機序. 日本内科学会雑誌. 2014; 103(7): 1564-9.

- 5) 一瀬邦弘, 川上 純. 最新関節リウマチ学 一寛解・治癒を目指した研究と最新治療— III. 関節リウマチの発症要因と発症メカニズム Th17 細胞. 日本臨牀. 2014; 72(3): 53-8.

##### 【学会発表】

- 1) 寶來吉朗, 中村英樹, 中島好一, 林 徳眞吉, 川上 純. シェーグレン症候群の TLR 3 誘導性アポトーシスにおける下流分子及び生存因子の関与について.第 23 回日本シェーグレン症候群学会学術総会. 2014.
- 2) 向野晃弘, 中根俊成, 樋口 理, 中村英樹, 川上 純, 松尾秀徳, Tsokos, G. C. シェーグレン症候群における抗 gAChR 抗体陽性例陰性例の比較検討.第 19 回日本神経感染症学会総会学術集会 第 26 回 日本神経免

疫学会学術集会合同学術集会. 2014.

3) Horai Y, Takatani A, Nishino A, Nakashima Y, Suzuki T, Fujikawa K, Tsukada T, Tsuboi M, Matsuoka N, Migita K, Aramaki T, Ueki Y, Kawashiri SY, Iwamoto N, Ichinose K, Tamai M, Nakamura H, Origuchi T, Kawakami A. Abatacept is a suitable biologic disease modifying anti-rheumatic drugs in patients with anti-ss-a antibodies-positive rheumatoid arthritis Final Acceptance Medical or Research. Annual European Congress of Rheumatology. 2014.

4) 岩本直樹, 玉井慎美, 川尻真也, 西野文子, 高谷亜由子, 中島好一, 鈴木貴久, 寶來吉朗, 一瀬邦弘, 中村英樹, 折口智樹, 上谷雅孝, 川上 純. 多角的画像診断によるシェーグレン症候群関節症の検討 — 関節リウマチとの鑑別のために—. 第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2014.

5) 中村英樹, 高橋良子, 寶來吉朗, 福田智美, 中村龍文, 小路武彦, 川上 純. シェーグレン症候群唾液腺上皮細胞に対する HTLV-I 感染の *in vitro* での影響について. 第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2014.

6) 鈴木貴久, 高谷亜由子, 西野文子, 中島好一, 寶來吉朗, 川尻真也, 岩本直樹, 一瀬邦弘, 玉井慎美, 有馬和彦, 中村英樹, 折口智樹, 川上 純. 抗HTLV-1 抗体陽性関節リウマチ患者における抗TNF療法への反応性の検討. 第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)  
なし。

## HTLV-1 陽性難治性疾患の診療の質を高めるためのエビデンス構築

### 1. HTLV-1 陽性難治性疾患の診療ガイドラインに資する質の高いエビデンス作成を目指した研究

#### a. HTLV-1 陽性難治性疾患の病態解析研究

#### (4) HTLV-1 感染による眼炎症発症メカニズムの研究

担当責任者：鴨居功樹 東京医科歯科大学眼科・講師

研究要旨： HTLV-1 関連眼疾患において、眼内に炎症が起きるメカニズムは、未だ詳細には明らかになっていない。HTLV-1 が眼内組織、特に血液眼関門を構成する網膜色素上皮細胞に感染することで生じる炎症性変化について解析し、今後の治療の標的となる重要な分子を明らかにする。

#### A. 研究目的

HTLV-1 関連眼疾患における診療の質を高めるためのエビデンスを構築するため、HTLV-1 関連眼疾患の病態解析研究を行う。HTLV-1 が眼内組織に感染することで眼内に及ぼす影響を基礎実験によって明らかにする。

#### B. 研究方法

眼内組織に HTLV-1 感染が及ぼす影響を調べた。HTLV-1 感染細胞株と網膜色素上皮細胞を共培養し HTLV-1 が網膜色素上皮細胞に接触することで惹起される炎症性変化について培養上清を回収して炎症性サイトカインおよびケモカイン産生を Cytometric Bead Array を用いて測定した。

#### C. 研究結果

網膜色素上皮細胞は、HTLV-1 感染細胞と直接・間接接触することで、炎症性サイトカイン IL-6、IL-8 の産生は著しく上昇する一方、IL-10、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-12p70 には変化がみられなかった。またケモカインでは、直接・間接接触において MCP-1、

RANTES の著明な産生がみられた。一方、IP-10 は直接接触でのみ産生されることが明らかになった。

#### D. 考察

HTLV-1 の眼内感染で IL-6 IL-8 という特定の炎症性サイトカインの上昇が炎症惹起に重要であると考えられた。一方、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  の上昇はみられないなど、眼内炎症機序の重要な分子一端が明らかになった。

#### E. 結論

HTLV-1 陽性関節リウマチ患者において抗体価、プロウイルス量及び可溶性 IL-2 レセプターの約 12 カ月での変化および感染細胞クローナリティの変化について検討した。抗体価は低下傾向を示したが、プロウイルス量、可溶性 IL-2 レセプター、感染細胞クローナリティには変化はなく、治療中の HTLV-1 陽性関節リウマチ患者において ATL 発症の危険性が増大していることを示唆する所見を見いださなかった。このことは現在一般的に関節リウマチに対して行われている治療が HTLV-1 陽性患者における ATL リスクを、少なくとも短期的には

増加させていないことを意味するかもしれない。しかし、結論を得るためには今後、患者レジストリシステム構築も含めて、さらに症例数と観察期間を増加させてエビデンスを積み重ねる必要がある。

F. 健康危険情報  
なし。

G. 研究発表

【論文】

1) Kamoi K, Mochizuki M. Pre-surround division technique: Precise cracks surrounding the posterior opacity prior to phacoemulsification in posterior polar cataract surgery. *J Cataract Refract Surg.* 2014; 40 (11): 1764-7.

2) Kaburaki T, Namba K, Sonoda K, Takeshi Kezuka T, Keino H, Fukuhara T, Kamoi K, Nakai K, Mizuki N, Ohguro N. Behçet's disease ocular attack score 24: evaluation of ocular disease activity before and after initiation of infliximab. *Jpn. J. Ophthalmol.* 2014; 58(2): 120-30.

3) Kawaguchi T, Kawazoe Y, Kamoi K, Miyanaga M, Takase H, Sugita S, Mochizuki M. Clinical course of patients with Behçet's uveitis following discontinuation of infliximab therapy. *Jpn. J. Ophthalmol.* 2014; 58(1): 75-80.

4) Takase H, Kubono R, Yukiko Terada Y, Imai A, Fukuda S, Tomita M, Miyanaga M, Kamoi K, Sugita S, Miyata K, Mochizuki M. Comparison of the ocular characteristics of anterior uveitis caused by herpes simplex virus, varicella-zoster virus, and cytomegalovirus. *Jpn. J. Ophthalmol.* 2014; 58(6): 473-82.

【学会発表】

1) Kamoi K, Terada Y, Miyata K, Mochizuki M. Association of HTLV-1 uveitis with systemic inflammatory diseases and adult T cell leukemia. The

Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting. 2014.

2) 川口龍史, 尾碇憲子, 村上喜三雄, 鴨居功樹, 高瀬博, 杉田直. 造血器悪性疾患に合併した眼底病変に対する前房水を用いた包括的感染症 PCR の有用性. 第 68 回日本臨床眼科学会. 2014.

3) 寺田裕紀子, 鴨居功樹, 山野ちなみ, 山野嘉久. HTLV-1 キャリアに合併した関節リウマチにおける生物学的製剤の使用で HTLV-1 ぶどう膜炎と HTLV-1 関連脊髄症が悪化した 1 例. 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会. 2014.

4) 鴨居功樹, 寺田裕紀子, 宮田和典, 望月學. HTLV-1 ぶどう膜炎の臨床像. 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会. 2014.

5) 軽部央子, 鴨居功樹, 堀江真太郎, 高瀬博, 大野京子, 望月學. アダリムマブ導入でベーチェット病のぶどう膜炎を抑制できた一例. 第48回日本眼炎症学会. 2014.

6) 福地麗, 宮永将, 高瀬博, 鴨居功樹, 横田眞子, 赤尾信明, 望月學. 東京医科歯科大学における眼トキソカラ症の検討. 第25回日本臨床寄生虫学会. 2014.

7) 鈴木さやか, 鴨居功樹, 高瀬博, 大野京子, 富澤大輔. Myeloid/NK cell precursor acute leukemia の経過中に眼内浸潤がみられた 1 例. 第 118 回日本眼科学会総会. 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし。

HTLV-1 陽性難治性疾患の診療の質を高めるためのエビデンス構築

1. HTLV-1 陽性難治性疾患の診療ガイドラインに資する質の高いエビデンス作成を目指した研究

a. HTLV-1 陽性難治性疾患の病態解析研究

(5) HTLV-1 関連脊髄症の重症度分類マーカーに関する解析

担当責任者：山野嘉久 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター・准教授

井上永介 国立成育医療研究センター生物統計室・室長

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： HTLV-1 関連脊髄症（HAM）は、発症様式や経過の異なる集団から構成されており、進行性の経過を示す活動性の高い患者群と、長期間にわたりほとんど進行しない活動性の低い患者群（非進行群）に分類される。さらに活動性の高い患者は、急速に進行する患者群（急速進行群）と、緩徐な進行を示す患者群（緩徐進行群）が存在する。本来、HAM に対する治療内容は、これら疾患活動性の程度（重症度）によって異なるべきであるが、重症度を分類するバイオマーカーが確立しておらず、HAM における診療の質の低下の要因となっている。そのため本研究班では、世界の HAM 研究者と協力し、進行度予測因子の前向き検証を含んだ、重症度別ステロイド治療に関する国際共同臨床試験のプロトコールを作成し、医師主導治験として実施するための準備を進めている。

これまで、HAM の進行度と相関するバイオマーカーとして、末梢血 HTLV-1 プロウイルス量、髄液 CXCL10 濃度、髄液ネオプテリン濃度が後ろ向き研究で報告されているが、本研究では、医師主導治験におけるこれらマーカーの有望性について基礎的解析を行った。その結果、24 か月フォローした HAM 患者（n = 54）の末梢血 HTLV-1 プロウイルス量に関する経時推移のデータの統計学的な解析から、末梢血 HTLV-1 プロウイルス量には経時的変化はほとんどないことが判明した。また、治療歴のない HAM 患者 53 例の髄液を用いた解析により、髄液 CXCL10 濃度と髄液ネオプテリン濃度は、急速進行群と緩徐進行群/非進行群とを分類する感度・特異度に優れており、進行度を反映するバイオマーカーとしての有用性が示唆された。

このように後ろ向き検体を用いて進行度予測因子の解析が可能であることが示されたことから、本研究班で実施予定の、進行度予測因子に関する前向き研究を含む重症度別ステロイド治療に関する医師主導治験において、進行度予測因子（重症度分類マーカー）の解析が十分に可能であることが示唆された。

## A. 研究目的

これまでの研究により、HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) は、発症様式や経過により重症度が異なり、(A) 急速進行群 (発症して 2 年以内に杖歩行レベルに進行)、(B) 緩徐進行群、(C) 非活動群 (非進行群) の 3 つに大きく分類されることが判明してきている。HAM に対する治療内容は、これら疾患活動性の程度によって異なるべきであるが、重症度別の治療に関するエビデンスが存在しない。

そのため本研究班では、HAM に対するステロイドの重症度別治療に関する国際共同臨床試験を実施し、また本試験において、病型や予後と関連する因子 (バイオマーカー) に関する前向き研究も並行して実施する。

そこで今年度は、上記医師主導治験で検討を行う予定のバイオマーカーに関する情報を出来る限り収集する。具体的には HTLV-1 プロウイルス量の経時変化に関する解析と、急速進行群と緩徐進行/非活動群を分ける髄液ネオプテリン濃度および髄液 CXCL10 濃度のカットオフ値に関する解析を実施する。

## B. 研究方法

### 1) ウイルス量の経時変化に関する解析

24 か月フォローした HAM 患者 54 例 (ステロイドやインターフェロン治療例を含む) の末梢血中プロウイルス量を定量 PCR により測定した。経時推移のデータの統計学的な解析では、目的変数を対数変換したウイルス量、患者を变量効果、時点(月数)と対数変換したウイルス量ベースライン値を固定効果とした混合効果モデルをあてはめた場合の、時点のパラメータ推定値を算出した。

### 2) 急速進行群と緩徐進行/非活動群を分けるマーカーのカットオフ値に関する解析

治療歴のない HAM 患者 53 例の髄液中の CXCL10 を cytometric bead array 法により、ネオプテリン濃度を HPLC により測定する。この症例のうち、直近の 4 年間で納の運動障害度が 3 grade 以上増悪した症例を急速進行群 (deteriorating cases,

n=20)、1grade 以下に留まる症例を緩徐進行/非活動群 (stable cases, n=25) として、両群を分けるカットオフ値を決定し、その条件における感度、特異度を算出する。

### (倫理面への配慮)

臨床検体の収集に際しては、本学の生命倫理委員会で承認された (承認番号: 第 1646 号) 同意書を用いて、不利益や危険性の排除などに関するインフォームドコンセントを行った。また検体は、個人情報管理者が連結可能匿名化により番号化する為、提供者を特定できないようにして、患者の人権擁護に努めた。

## C. 研究結果

### 1) ウイルス量の経時変化に関する解析

24 か月フォローした HAM 患者 (n = 54) の経時推移のデータの統計学的な解析からは、時点のパラメータ推定値として 0.0006(95%信頼区間: -0.0030 to 0.0042)が得られた。したがって、経時的な変化はほとんどないことが判明した(図 1 参照)。これは以前の報告と合致しており、HAM 患者の末梢血中プロウイルス量は評価期間中、多少の変動はあるものの一定の増加傾向あるいは減少傾向を示さない。すなわち、プロウイルス量が高い人は高いまま、低い人は低いままであることが示された。

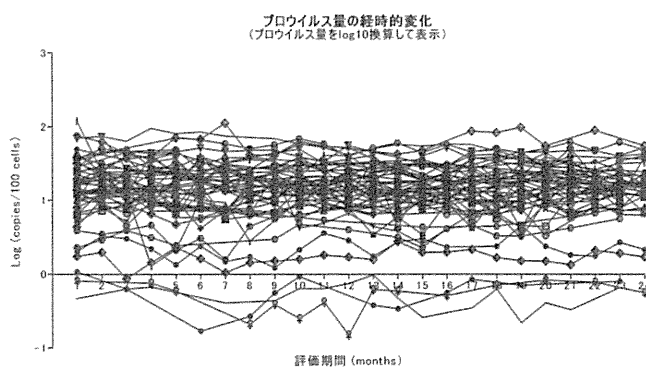


図 1: HAM 患者におけるプロウイルス量の経時推移



## 2) 急速進行群と緩徐進行/非活動群を分けるマーカーのカットオフ値に関する解析

急速進行群 (deteriorating cases, n=20) における髄液 CXCL10 濃度は緩徐進行/非活動群 (stable cases, n=25) と比較して有意差をもって高値を示した (図 2A,  $p < 0.0001$ )。髄液ネオプテリン濃度も同様であった (図 2A,  $p < 0.0001$ )。

また、ROC 解析により両患者群を分ける髄液 CXCL10 濃度のカットオフ値を 800 pg/mL とした場合、急速進行群を検出するための感度が 90%、特異度は 87.5%であった (図 2B: 図中のサイズの大きな黒丸部分)。同様に、髄液ネオプテリン濃度のカットオフ値を 17 pmol/mL とした場合、感度 80%、特異度 80%であった (図 2B: 図中のサイズの大きな黒三角部分)。このように両指標の感度、特異度は十分に高く、予後を反映するバイオマーカーとしての有用性が示唆された。

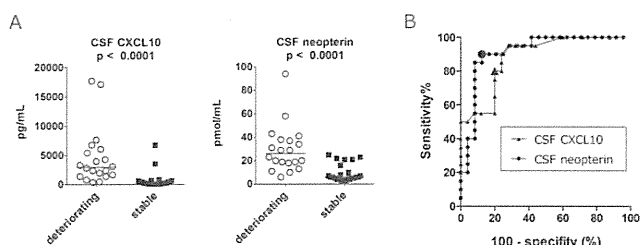


図 2: 急速進行群と緩徐進行/非活動群を分けるマーカー

## D. 考察

本治験の大きな特徴は、HAM において世界で初めて「重症度別の治療」に関する臨床試験を実施する点である。登録時に患者検体 (血液、髄液) を採取して保存し、その後はステロイド介入まで経過を観察、その経過によって重症度を分類し、介入による治療効果について、臨床的並びに薬力学的な客観的評価指標により重症度別に有効性を評価する試験デザインとなっている。平成 26 年度は、重症度予測マーカー候補である末梢血プロウイルス量、髄液ネオプテリン濃度、髄液 CXCL10 濃度について後ろ向きの検体を用いて解析し、髄液ネオプテリン濃度と CXCL10 濃度が、有望な候補であることを示し、前向き研究での検証が求められる。今回計画した臨床試験のプロトコールで

は、予後や重症度の予測因子 (バイオマーカー) を前向き研究で明らかとし、さらに重症度毎のステロイド治療に関するエビデンスを得ることが出来る。HAM は進行性の疾患であるため、出来るだけ早期の段階で予後を予測し、疾患活動性の高い症例に対しては、より早期の治療介入を実現することが、HAM 患者全体の予後を改善するために必要であると考えられる。本試験の結果は、このような「客観的指標に基づく治療指針」の作成につながるエビデンスとなる可能性が高く、その成功は、HAM の診療の質を大きく高めるであろう。

## E. 結論

本研究によって、髄液ネオプテリン濃度、髄液 CXCL10 濃度が、HAM の予後や重症度予測マーカーとして有望な候補であることが示された。HAM の進行度は個人差が大きいため、進行度 (重症度) に応じた適切な治療の実施が求められるが、その背景を考慮した試験デザインによる臨床試験はこれまで実施されてこなかった。本研究で企画した国際共同臨床試験は、これらの問題を解決するためにデザインされたものであり、今後本試験を医師主導治験として実施することにより、HAM の重症度予測マーカーの同定と、重症度に応じた層別化治療法の確立に結びつくエビデンスが構築されることが期待される。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 【論文】

- 1) Ishihara M, Araya N, Sato T, Saichi N, Fujii R, Yamano Y, Sugano S, Ueda K. A plasma diagnostic model of human T cell leukemia virus-1 associated myelopathy Running head: Novel severity grade markers for HAM/TS. *Annals of Clinical and Translational Neurology*. 2015. in press.

- 2) Araya N, Sato T, Ando H, Tomaru U, Yoshida M, Coler-Reilly A, Yagishita N, Yamauchi J, Hasegawa A, Kannagi M, Hasegawa Y, Takahashi K, Kunitomo Y, Tanaka Y, Nakajima T, Nishioka K, Utsunomiya A, Jacobson S, Yamano Y. HLVL-1 induces a Th1-like state in CD4+CCR4+ T cells. *J Clin Invest*. 2014; 124(8): 3431-42.
- 3) Yamauchi J, Coler-Reilly A, Sato T, Araya N, Yagishita N, Ando H, Kunitomo Y, Takahashi K, Tanaka Y, Shibagaki Y, Nishioka K, Nakajima T, Hasegawa Y, Utsunomiya A, Kimura K, Yamano Y. Mogamulizumab, an Anti-CCR4 Antibody, Targets Human T-Lymphotropic Virus Type 1-infected CD8+ and CD4+ T Cells to Treat Associated Myelopathy. *J Infect Dis*. 2015; 211(2): 238-48.
- 4) Coler-Reilly A, Ando H, Yamano Y. Positive feedback loop via astrocytes causes chronic inflammation in human T lymphotropic virus type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*. 2014; 5: 108-9.
- 5) Kawamata T, Ohno N, Sato K, Kobayashi M, Jo N, Yuji K, Tanosaki R, Yamano Y, Tojo A, Uchimaru K. A case of post-transplant adult T-cell leukemia/lymphoma presenting myelopathy similar to but distinct from human T-cell leukemia virus type I (HTLV- I)-associated myelopathy. *SpringerPlus*. 2014; 3: 581.
- 6) 山野嘉久. HTLV-1 関連脊髄症(HAM). 別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ 神経症候群(第 2 版). 2014; 30: 153-6.
- 7) 山野嘉久. HTLV-1 の神経障害. *内科*. 2014; 113(6): 1431.
- 8) 山野嘉久. HTLV-1 関連脊髄症(HAM)の分子病態に基づく治療戦略. *細胞*. 2014; 46(6): 258-61.
- 9) 山野嘉久. ヒト細胞白血病ウイルス I 型関連脊髄症. *神経関連感染症 最新医学 別冊*. 2014; 200-5.
- 10) 新谷奈津美, 山野嘉久. HTLV-1 関連脊髄症 (HAM)に対する分子標的治療薬開発の現状と将来. *血液内科*. 2014; 68(1): 30-5.
- 11) 山野嘉久. 希少な慢性進行性の神経難病 HAM における治療有効性評価モデルの探索. *臨床評価別冊*. 2014; 41(3): 504-8.
- 【学会発表】
- 1) Ishihara M, Araya N, Sato T, Fujii R, Tatsuguchi A, Saichi N, Nakagawa H, Yamano Y, Ueda K. Quantitative membrane proteome profiling to discover therapeutic targets for adult T-cell leukemia (ATL). *AACR Annual Meeting 2014*. 2014.
- 2) 冨田まや子, 平田誠, 佐々木光穂, 樋野村亜希子, 前畑みどり, 高橋一朗, 増井徹, 山野嘉久, 吉良潤一, 米田悦啓, 坂手龍一. 難病研究資源バンクにおける収集試料の HLA タイピング実施による難病研究の推進. 第 23 回日本組織適合性学会大会. 2014.
- 3) 余郷麻希子, 大本周作, 向井泰司, 安部宏, 相澤良夫, 高橋利幸, 山野嘉久, 鈴木正彦. 慢性 C 型肝炎に対するインターフェロン療法後に、抗アクアポリン 4 抗体及び抗 HTLV-1 抗体陽性の脊髄長大病変を呈した 49 歳女性例. 第 210 回日本神経学会関東・甲信越地方会. 2014.
- 4) 佐藤知雄, 新谷奈津美, 安藤仁, 山内淳司, 國友康夫, 高橋克典, 斎藤祐美, 石川美穂, 八木下尚子, 山野嘉久. HAM における Th1 様異常 T 細胞の発生機構および病態への関与. 第 19 回日本神経感染症学会総会学術集会 第 26 回日本神経免疫学会学術集会合同学術集会. 2014.

- 5) 山内淳司, 新谷奈津美, 安藤仁, Ariella Coler-Reilly, 國友康夫, 高橋克典, 八木下尚子, 佐藤知雄, 宇都宮與, 山野嘉久. HAM における抗 CCR4 抗体療法の有用性および CCR4+CD8+T 細胞の異常に関する検討. 第 19 回日本神経感染症学会総会学術集会 第 26 回日本神経免疫学会学術集会合同学術集会. 2014.
- 6) 山野嘉久, 木村美也子, 八木下尚子, 鈴木弘子, 石川美穂, 小池美佳子, 齊藤 祐美, 新谷奈津美, 佐藤知雄, 高田礼子. HAM 患者登録システム「HAM ねっと」を用いた疫学的解析. 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会. 2014.
- 7) 佐藤知雄, 井上永介, 新谷奈津美, 高橋克典, 國友康夫, Ariella Coler-Reilly, 山内淳司, 八木下尚子, 山野嘉久. HTLV-1 関連脊髄症(HAM)の臨床的評価指標の有用性に関する検討. 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会. 2014.
- 8) 新谷奈津美, 佐藤知雄, 安藤仁, 外丸詩野, Ariella Coler-Reilly, 八木下尚子, 山内淳司, 長谷川温彦, 神奈木真理, 田中勇悦, 宇都宮與, 山野嘉久. HTLV-1 による HTLV-1 関連脊髄症(HAM)病原性 T 細胞の発生機構の解析. 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会. 2014.
- 9) 八木下尚子, 有福厚孝, 菊池崇之, 木村未祐奈, 佐藤健太郎, 石川美穂, 鈴木弘子, 小池美佳子, 齊藤祐美, 新谷奈津美, 佐藤知雄, 木村美也子, 高田礼子, 山野嘉久. HTLV-1 関連脊髄症(HAM)患者登録システム「HAM ねっと」の患者満足度調査. 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会. 2014.
- 10) 山内淳司, 新谷奈津美, 安藤仁, 國友康夫, 高橋克典, Ariella Coler-Reilly, 八木下尚子, 佐藤知雄, 宇都宮與, 山野嘉久. HAM における抗 CCR4 抗体療法の有用性および CCR4+CD8+T 細胞の異常に関する検討. 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会. 2014.
- 11) 遠藤寿子, 中島孝, 池田哲彦, 大田健太郎, 會田泉, 米持洋介, 山野嘉久. HAM の歩行不安定症に対する歩行改善プログラムに関する検討. 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会. 2014.
- 12) 寺田裕紀子, 鴨居功樹, 山野ちなみ, 山野嘉久. HTLV-1 キャリアに合併した関節リウマチに対する生物学的製剤の使用で HTLV-1 ぶどう膜炎と HTLV-1 関連脊髄症が悪化した 1 例. 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会. 2014.
- 13) 石原誠人, 新谷奈津美, 佐藤知雄, 藤井理沙, 最知直美, 宇都宮與, 山野嘉久, 菅野純夫, 植田幸嗣. CD4 陽性 T 細胞を用いた膜プロテオーム解析による HTLV-1 関連脊髄症に対する新規治療標的分子の探索. 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会. 2014.
- 14) 山野嘉久. HAM の炎症慢性化における astrocyte を介した炎症悪性ループの重要性. 第 55 回日本神経学会学術大会. 2014.
- 15) 菊池崇之, 有福厚孝, 木村未祐奈, 佐藤健太郎, 本橋隆子, 木村美也子, 網中雅仁, 高田礼子, 八木下尚子, 山野嘉久. 患者 QOL の改善に向けた患者レジストリの満足度調査. 第 55 回日本神経学会学術大会. 2014.
- 16) 佐藤知雄, 井上永介, 新谷奈津美, 高橋克典, 國友康夫, Ariella Coler-Reilly, 山内淳司, 八木下尚子, 山野嘉久. HTLV-1 関連脊髄症(HAM)の臨床的評価指標の有用性に関する検討. 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会. 2014.
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし。

HTLV-1 陽性難治性疾患の診療の質を高めるためのエビデンス構築

1. HTLV-1 陽性難治性疾患の診療ガイドラインに資する質の高いエビデンス作成を目指した研究  
b. 無症候性キャリアとの比較検討  
(1) 自己免疫性疾患を罹患した HTLV-1 キャリアの HTLV-1 ウイルス量の特性

担当責任者：岩永正子 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授  
渡邊俊樹 東京大学大学院新領域創成科学研究科・教授

研究要旨： 自己免疫性疾患に罹患している HTLV-1 キャリアのプロウイルス量を病気の既往のない HTLV-1 キャリアと比較するために JSPFAD に登録された HTLV-1 キャリアデータベースを用いて検討した。HTLV-1 キャリア中、膠原病関連疾患 35 例、甲状腺関連疾患 40 例、その他の自己免疫疾患 17 例の計 92 例の罹患者が存在した。HTLV-1 プロウイルス量は、男性の自己免疫疾患群のほうが病気の既往のない群より有意に高値であったが、女性では有意な差は認めなかった。既存の疫学データベースから得られる情報には限界があるため、より確実な情報が得られる研究デザイン設計が必要である。

A. 研究目的

HTLV-1 は、難治性悪性腫瘍である成人 T 細胞白血病 (ATL)、難治性神経難病である HTLV-1 関連脊髄症 (HAM)、HTLV-1 関連ぶどう膜炎 (HU) の原因ウイルスとして知られているが、他にも、関節炎、一部の膠原病、肺病変、皮膚疾患など種々の慢性炎症疾患との関連も以前から示唆されてきた。さらに近年、HTLV-1 キャリアで難治性の慢性炎症性疾患に罹患した患者が、免疫抑制剤や抗サイトカインバイオ製剤の治療後に ATL へ進展したという症例報告も目立つようになってきた。

一方、全国 HTLV-1 感染者コホート研究グループ (JSPFAD: Joint Study on Predisposing Factors of ATL Development) の疫学解析によって、HTLV-1 プロウイルス量が高いことが HTLV-1 キャリアからの ATL 進展へのリスク因子の 1 つであることや、入院治療中に発見された HTLV-1 キャリアは、治療歴のない HTLV-1 キャリアよりも ATL 発症リスクが高いことが報告されている。

これらの報告は、HTLV-1 陽性の慢性炎症性疾患

患者の ATL 進展リスク、治療によるリスク上昇の有無、HTLV-1 プロウイルス量との関連、などを明らかにし、ATL 進展の予防につなげる必要性を提起している。しかし、HTLV-1 陽性の慢性炎症性疾患患者の実態や ATL 進展については疫学的にも臨床的にもよくわかっていない。

そこで、本厚生労働研究班では、HTLV-1 感染と種々の慢性炎症疾患の病態との関連を疫学のおよび臨床的に明らかにする為に、多角的方面から多施設共同研究体制で研究を行っている。

本年度の分担研究では、HTLV-1 キャリアが、どの程度慢性炎症性疾患を罹患しているのか、その実態を把握し本厚生労働研究全体への基礎情報として資するために、JSPFAD に登録された HTLV-1 キャリアの併発症として自己免疫性疾患の既往あるいは治療中の情報のあるキャリアについて HTLV-1 プロウイルス量を検討した。