

令和元年6月11日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09701

研究課題名(和文)HAM病態形成におけるウイルス感染細胞起因の炎症ループ機構に関する時空間的解明

研究課題名(英文)Study of inflammatory loop mechanism caused by virus-infected cells in HAM pathogenesis.

研究代表者

新谷 奈津美 (Araya, Natsumi)

聖マリアンナ医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：80440353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：最近、我々はHTLV-1関連脊髄症(HAM)の脊髄病巣の形成・維持には、HTLV-1感染細胞と脊髄中アストロサイトから産生されるCXCL10とのクロストークが重要となることを予想する結果を得た。本研究では、中枢神経特異的にCXCL10を発現する多重免疫不全マウスにHAM-PBMCを移植することでHAMモデルマウスを作製し、本仮説の検証を試みた。その結果、中枢神経系へのリンパ球や感染細胞の浸潤が検出された。今後、さらなる詳細な解析を進めることにより、作製したマウスとHAM病態との類似性を明らかにすることによりHAM病態解析モデルとしての有用性を証明したいと考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HAMは先進国の中でその患者が多いのは日本のみであるため、HAMの病態や発症予防法・治療法に関する我が国での研究成果は世界中から期待されておりその責任は重い。未だHAMには有効な治療法が無く、新規治療薬開発が強く要望されている。HAM治療法の開発には、ヒトのHAM病態を忠実に再現した動物モデルの必要性が高い。これまでに感染T細胞の細胞浸潤に起因する脊髄障害をきたすHAM病態を再現した動物は得られていない。本研究では、世界初のヒト免疫系を再現したHAMモデルマウスの作製を目指し、HAM病態機序の解明、疾患の診断、予防、治療法の発展に寄与したいと考える。

研究成果の概要(英文)：From recent our studies, we suggested that the cross-talk between HTLV-1-infected cells and CXCL10 produced from astrocytes in the spinal cord is important for the formation and maintenance of HTLV-1-related myelopathy (HAM). In this study, to test this hypothesis, I analyzed the HAM model mice which were created by implanting HAM-PBMC into the most highly immunodeficient mice that express CXCL10 specifically in the central nervous system (HAM-PBMC-NSG/GFAP-CXCL10 mice). As results, I proved the infiltration of lymphocytes and infected cells into the central nervous system in HAM-PBMC-NSG/GFAP-CXCL10 mice. In the future, we intend to prove the usefulness as a HAM disease state analysis model by establishing the similarities between the mouse and the HAM disease state by detailed analysis.

研究分野：分子細胞免疫学

キーワード：HTLV-1 HAM CXCL10 CXCR3 炎症

1. 研究開始当初の背景

ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) の感染者は本邦で約 108 万人存在し、その一部に発症する HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) は、進行性の痙性対麻痺を特徴とする免疫性神経疾患である。HAM は、未だ有効な治療法が確立していない難治性疾患であることから、病態解明に基づく革新的な治療法開発が急務である。その病態の特徴は、HTLV-1 感染細胞に起因した過剰な免疫応答による脊髄の慢性炎症とそれによる神経組織障害と考えられているが、HTLV-1 がこのような免疫恒常性の破綻を引き起こし、病態を成立させる機構の詳細については不明な点が多く、その解明は HAM の発症機構の理解及びその制御に必須である。

我々は、これまで感染細胞に着目した解析を行い、HTLV-1 が主に制御性 T 細胞 (Treg) から構成される CD4+CCR4+ T 細胞に優位に感染していることを明らかにした (PLoS ONE 2009)。Treg は、過剰な免疫応答を抑制することで免疫寛容と免疫恒常性の維持に必須の役割を担っている。従来、その分化は不可逆的であるとされていたが、最近、一部の Treg は異なる Th 細胞へ変化する分化可塑性を有することが示され、変化した異常 Treg 細胞は様々な自己免疫や免疫性疾患での過剰免疫応答の病原的役割を果たしていることが示唆されている (Zhou Nat. Immunol. 2009, Miyara Immunity 2009)。そこで、我々は HAM の HTLV-1 感染 CD4+CCR4+ T 細胞機能解析から、HTLV-1 が Th1 細胞のマスター転写因子 T-bet の転写を直接活性化し、炎症性サイトカイン IFN γ の産生を誘導することにより感染 CD4+CCR4+T 細胞を Th1 様異常細胞へ変化させ得ることを明らかにした (図 1-①)。また、HAM 患者脊髄病変組織に Th1 特異的ケモカイン受容体 CXCR3 を発現する CD4+CCR4+細胞が大多数局在することを示し (図 1-②)、Th1 様に変化した異常感染 T 細胞が HAM 病態形成に関与することが示唆された (J. Clin. Invest. 2014)。

また、これまでの HAM の病態解析から、その病態の成立と維持には、脊髄における HTLV-1

感染細胞に起因する慢性炎症の形成が重要となることが明らかである。最近、我々の臨床的解析から HAM の脊髄病変部では、浸潤した感染 T 細胞より産生される IFN γ がアストロサイトから CXCR3 のリガンドである CXCL10 産生を刺激し、その CXCL10 は CXCR3 陽性細胞 (感染 CD4+ T 細胞、Th1 細胞や CD8+ T 細胞など) の脊髄への遊走を促し、浸潤したそれらの細胞が IFN γ を産生して更なるアストロサイトからの CXCL10 産生を刺激するという、IFN γ -CXCL10-CXCR3 炎症のポジティブフィードバックループ (HAM 炎症ループ) を形成することが炎症の慢性化の主軸となり、HAM の脊髄病巣の形成・維持に重要な役割を果たしているという仮説を提唱した (Brain 2013) (図 1-③)。

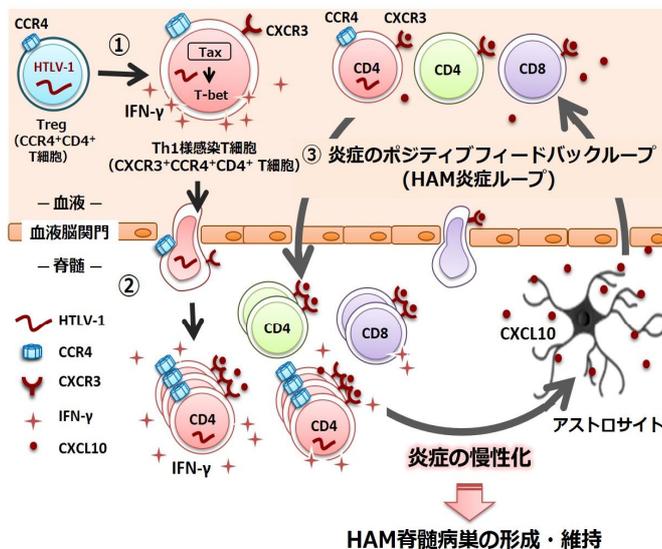


図 1 Th1様HTLV-1感染T細胞を起因とした炎症のポジティブフィードバックループ (HAM炎症ループ) によるHAMの病態形成

2. 研究の目的

本研究では、HTLV-1 感染細胞により惹起される HAM 炎症ループの形成が HAM における炎症の慢性化と病態形成・維持に重要な役割を果たしていることを時空間的に検証することを目的とし、HAM 炎症ループを再現するモデルマウスを作成する。HAM 患者に特徴的な脊髄中アストロサイトにおける CXCL10 高発現を再現するため、アストロサイト特異的 CXCL10 発現トランスジェニック (Tg) 多重免疫不全マウスを作製する。作製された Tg 多重免疫不全マウスにヒト免疫系を再構築し、HTLV-1 感染を成立させることにより、HTLV-1 感染により Th1 様に変化した HTLV-1 感染細胞や炎症細胞はアストロサイトから発現する CXCL10 により脊髄中へ能動的にリクルートされ、HAM 炎症ループ (図 1) を人工的に再構築するモデルマウスとなり得るか検討する。

3. 研究の方法

アストロサイト特異的 CXCL10 発現多重免疫不全マウスの作製

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

アストロサイト特異的に発現する Glial fibrillary acidic protein (GFAP) 遺伝子上流のプロモーター領域下流にヒト CXCL10 cDNA をつないだベクターを作製し、多重免疫不全マウス NOD/SCID/IL2rgKO (NSG マウス) へ導入することによりアストロサイト特異的ヒト CXCL10 発現多重免疫不全マウス (NSG/GFAP-hCXCL10 マウス) を作製した。作製したトランスジェニックマウスにおける導入遺伝子数はサザンブロットにより計測した。また、中枢神経における CXCL10 のタンパク質の発現確認するため、脳および脊髄内組織を採取し細胞抽出液を回収した。

PBMC 導入 NSG/GFAP-hCXCL10 マウスの作製

4-6 週齢の NSG/GFAP-hCXCL10 マウスに健常者または HAM 患者由来の末梢血単核球 (PBMC) を PBS 200 μ L に懸濁し尾静脈より注入し生着させた。

HTLV-1 プロウイルス量 (HTLV-1 provirus load: PVL) 測定

全血および脾臓細胞の PVL は、各々より分離した単核球から抽出した DNA を用いた。また、脳の PVL 測定には、脳組織より抽出した DNA を用いた。DNA 濃度を調製後、HTLV-1 pX および β -actin に特異的な 2 種類の蛍光標識オリゴヌクレオチドプローブを用いたリアルタイム遺伝子定量装置により測定した。

CXCL10 の測定

Treg 特異的 Tax 発現マウスおよびコントロールマウスの全血より分離した血漿、または、脳および脊髄内組織を採取し抽出した細胞抽出液における CXCL10 濃度を Cytokine beads array 法を用いて測定した。

病理組織学的解析

健常者または HAM-PBMC を投与した NSG/GFAP-hCXCL10 マウスより採取した脳または脊髄/脊髄の組織をヘマトキシリン・エオジン染色し観察を行った。

4. 研究成果

(1) アストロサイト特異的 CXCL10 発現多重免疫不全マウスの作製

HAM 炎症ループを再現するモデルマウスを作製するため、まず、アストロサイト特異的発現遺伝子 GFAP のプロモーター下流にヒト CXCL10 cDNA を連結したベクターを多重免疫不全マウス NOD/SCID/IL2rgKO (NSG マウス) に導入し、アストロサイト特異的 hCXCL10 発現 NSG マウスの作製を行った。作製されたマウスについて、目的遺伝子の導入数をサザンブロットで確認した。また、作製マウスの各組織タンパク質を抽出し、Cytokine Beads Array 法を用いて導入遺伝子 hCXCL10 のタンパク質発現について解析を行った結果、GFAP プロモーターが発現する組織である脳、脊髄特異的に hCXCL10 のタンパク質発現が確認された。従って、モデルマウス作製に必要なアストロサイト特異的 hCXCL10 発現 NSG マウス (NSG/GFAP-CXCL10 マウス) を取得することができた。

(2) NSG/GFAP-CXCL10 マウスの解析

樹立した NSG/GFAP-CXCL10 マウスに HAM 患者末梢血単核球 (PBMC) を移植し、HAM 患者由来の免疫細胞および HTLV-1 感染細胞を生着させたマウスの表現型解析を行った。行動・形態異常、体重変化、末梢血および中枢神経における HTLV-1 プロウイルス量変化とヒト CXCL10 濃度変化について定期的に解析を行った結果、野生型マウスに HAM-PBMC を移植したコントロールマウスに比べ HAM-PBMC 移植 NSG/GFAP-CXCL10 マウスの中枢神経 (脳) においては高い HTLV-1 感染率が確認された。HTLV-1 は神経組織への感染は行わないことから、患者由来の感染細胞の脳での浸潤または増殖によるものと予想される。また、脊髄の病理学的解析から、脊髄の血管周囲および実質組織にリンパ球細胞浸潤を認める所見を得た。その他の解析項目においては目立った変化は認められなかった。その後、HAM-PBMC 移植後最長 12 週間の形態および行動観察においても、四肢の腫れ、歩行障害や麻痺などの HAM 様の形態・行動異常は認められなかった。

以上の結果から、中枢神経における CXCL10 の発現が中枢神経内における HTLV-1 感染細胞の集積、感染拡大または増殖が促し、それに伴う脊髄への浸潤と破壊に寄与する可能性が考えられた。研究の立案において予想した HAM 様の行動や形態的な表現型を得ることはできなかったが、さらなる詳細な解析を進めることにより、作製したマウスと HAM 病態との類似性を明らかにすることにより HAM 病態解析モデルとしての有用性を証明したいと考える。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Sato T, Yagishita N, Tamaki K, Inoue E, Hasegawa D, Nagasaka M, Suzuki H, Araya N, Coler-Reilly AL, Hasegawa Y, Tsuboi Y, Takata A, Yamano Y. Proposal of Classification Criteria for HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic

Paraparesis Disease Activity. *Front Microbiol*, 査読有, 9:1651, Published online 2018. doi:10.3389/fmicb.2018.01651

2. 山野嘉久, 山内淳司, 新谷奈津美, 八木下尚子, 佐藤知雄. HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の病態・診断・治療. *神経内科*, 査読無, 89(3):297-303, 2018.
3. Sato T, Coler-Reilly ALG, Yagishita N, Araya N, Inoue E, Furuta R, Watanabe T, Uchimaru K, Matsuoka M, Matsumoto N, Hasegawa Y, Yamano Y. Mogamulizumab (Anti-CCR4) in HTLV-1-Associated Myelopathy. *N Engl J Med*, 査読有, 378(6):529-538, 2018. doi: 10.1056/NEJMoa1704827.
4. Coler-Reilly ALG, Sato T, Matsuzaki T, Nakagawa M, Niino M, Nagai M, Nakamura T, Takenouchi N, Araya N, Yagishita N, Inoue E, Yamano Y. Effectiveness of Daily Prednisolone to Slow Progression of HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis: A Multi-Center Retrospective Cohort Study. *Neurotherapeutics*, 査読有, 14(4):1084-1094, 2017. doi: 10.1007/s13311-017-0533-z.
5. 新谷奈津美, 山野嘉久. HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の分子病態と治療. *血液内科*, 査読無, 74(3):373-379, 2017.
6. Coler-Reilly ALG, Yagishita N, Suzuki H, Sato T, Araya N, Inoue E, Takata A, Yamano Y. Nation-wide epidemiological study of Japanese patients with rare viral myelopathy using novel registration system (HAM-net). *Orphanet J Rare Dis*, 査読有, 11(1):69, 2016. doi: 10.1186/s13023-016-0451-x.
7. 新谷奈津美, 佐藤知雄, アリエラ・コラライリー, 八木下尚子, 山野嘉久. HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の分子病態解明による治療薬開発の新展開. *Jpn J Clin Immunol*, 査読無, 39(3):207-212, 2016. doi: 10.2177/jsci.39.207.

[学会発表] (計 21 件)

1. 佐藤知雄, 八木下尚子, 新谷奈津美, 井上永介, 古田梨愛, 渡邊俊樹, 内丸薫, 松岡雅雄, 松本直樹, 長谷川泰弘, 山野嘉久. HAM 治療薬としての抗 CCR4 抗体製剤 (モガムリズマブ). 第 23 回日本神経感染症学会総会・学術大会, 2018 年.
2. 山内淳司, 山野嘉久, 佐藤知雄, 八木下尚子, 新谷奈津美, 松岡雅雄, 市丸直嗣, 錦戸雅春, 柴垣有吾, 杉谷 篤, 中村信之, 三重野牧子, 湯沢賢治. 腎移植患者の HTLV-1 関連疾患発症に関する全国調査. 第 23 回日本神経感染症学会総会・学術大会, 2018 年.
3. 山内淳司, 山野嘉久, 佐藤知雄, 八木下尚子, 新谷奈津美, 松岡雅雄, 市丸直嗣, 錦戸雅春, 柴垣有吾, 杉谷 篤, 中村信之, 三重野牧子, 湯沢賢治. HTLV-1 陽性臓器移植患者レジストリの構築. 第 54 回日本移植学会, 2018 年.
4. 佐藤知雄, 八木下尚子, 新谷奈津美, 井上永介, 古田梨愛, 渡邊俊樹, 内丸薫, 松岡雅雄, 松本直樹, 長谷川泰弘, 山野嘉久. HAM 患者に対する抗 CCR4 抗体製剤 (モガムリズマブ) の安全性と有効性. 第 5 回日本 HTLV-1 学会学術集会, 2018 年.
5. 山内淳司, 山野嘉久, 佐藤知雄, 八木下尚子, 新谷奈津美, 松岡雅雄, 市丸直嗣, 錦戸雅春, 柴垣有吾, 杉谷 篤, 中村信之, 三重野牧子, 湯沢賢治. 腎移植における HTLV-1 感染症の危険性. 第 5 回日本 HTLV-1 学会学術集会, 2018 年.
6. 佐藤知雄, 八木下尚子, 新谷奈津美, 井上永介, 古田梨愛, 渡邊俊樹, 内丸薫, 松岡雅雄, 松本直樹, 長谷川泰弘, 山野嘉久. HTLV-1 関連脊髄症に対する抗 CCR4 抗体製剤 (モガムリズマブ) の医師主導治験. 第 30 回日本神経免疫学会, 2018 年.
7. Yamano Y, Sato T, A. Coler-Reilly, Yanagisawa N, Araya N, Inoue E, Furuta R, Watanabe T, Uchimaru K, Matsuoka M, Matsumoto N, Hasegawa Y. Phase 1/2a study of Mogamulizumab, an anti-CCR4 monoclonal antibody, in patients with HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). XXIII World Congress of Neurology, 2017.
8. 佐藤知雄, 井上永介, 八木下尚子, 新谷奈津美, 長谷川大輔, 高田礼子, 山野嘉久. HAM 患者レジストリを活用した低用量経口ブレドニゾロン維持療法の有効性と安全性に関する検討. 第 4 回日本 HTLV - 1 学会学術集会, 2017 年.
9. 八木下尚子, 佐藤知雄, 長谷川大輔, 新谷奈津美, 井上永介, 高田礼子, 山野嘉久. HTLV - 1 関連脊髄症 (HAM) の新たな運動障害重症度評価指標の提案. 第 4 回日本 HTLV - 1 学会学術集会, 2017 年.
10. 長谷川大輔, 八木下尚子, 井上永介, 新谷奈津美, 高田 礼子, 長谷川泰弘, 佐藤知雄, 山野嘉久. 臨床経過とバイオマーカーに基づく HAM の疾患活動性分類基準の提案. 第 4 回日本 HTLV - 1 学会学術集会, 2017 年.
11. Araya N, Sato T, Yagishita N, Coler-Reilly A, Uchimaru K, Yamano Y. Prevalence, Incidence, and Evidence of High ATL Risk among HAM/TSP Patients. 18th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, 2017.
12. Coler-Reilly A, Sato T, Matsuzaki T, Nakagawa M, Niino M, Nagai M, Nakamura T, Takenouchi N, Araya N, Yagishita N, Yamano Y. Daily Prednisolone Slows the Progression of HAM/TSP. 18th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

Viruses, 2017.

13. Sato T, Inoue E, Yagishita N, Araya N, Takata A, Yamano Y. Effectiveness of Low-Dose Oral Prednisolone to Treat and Slow Progression of HAM/TSP: A Nationwide Prospective Cohort Study. 18th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, 2017.
14. Inoue E, Coler-Reilly A, Araya N, Yagishita N, Sato T, Takata A, Yamano Y. Progression Patterns of Osame's Motor Disability Score for HAM/TSP Patients. 18th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, 2017.
15. Yamagishi M, Nakano K, Fujikawa D, Kobayashi S, Araya N, Sato T, Yagishita N, Iwanaga M, Utsunomiya A, Tanaka Y, Yamano Y, Watanabe T, Uchimaru K. Comparative Transcriptome Analysis of HTLV-1-infected Cells and ATL Cells. 18th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, 2017.
16. Suzuki H, Sato K, Kikuchi T, Kimura M, Arifuku H, Komita M, Shimada K, Seki K, Tachibana M, Yagishita N, Coler-Reilly A, Sato T, Araya N, Ishikawa M, Koike M, Saito Y, Takata A, Yamano Y. Patient Satisfaction Survey for HAM-net Registrants. 18th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, 2017.
17. Yamakawa N, Amano S, Kawakami H, Yamashita H, Yagishita N, Araya N, Sato T, Takata A, Matsuo T, Yamano Y. A New Index Describing Urinary Dysfunction in Patients with Human T-lymphotropic Virus Type 1-associated Myelopathy. 18th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, 2017.
18. Higashikuse Y, Nagai G, Araya N, Yagishita N, Sato T, Yamano Y. Development of a New Assay for Quantification of HTLV-1 Proviral DNA. 18th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, 2017.
19. 新谷奈津美、佐藤知雄、八木下尚子、高橋克典、内丸薫、山野嘉久. HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) における HAS-Flow 法を用いた ATL 発症高危険度患者の予測, 第 3 回日本 HTLV-1 学会学術集会, 2016 年.
20. 佐藤知雄、Ariella Coler-Reilly、新谷奈津美、八木下尚子、中村龍文、永井将弘、新野正明、竹ノ内徳博、中川正法、松崎敏男、山野嘉久. HAM 患者に対する経口ステロイド維持療法の長期的効果, 第 3 回日本 HTLV-1 学会学術集会, 2016 年.
21. 井上永介、Ariella Coler-Reilly、新谷奈津美、八木下尚子、佐藤知雄、高田礼子、山野嘉久. HAM 発症から診断までの期間における納の運動障害重症度の経時推移の解析, 第 3 回日本 HTLV-1 学会学術集会, 2016 年.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://nanchiken.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者：なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：高橋 克典

ローマ字氏名：(Katsunori, Takahashi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。