

令和 4 年 4 月 11 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07999

研究課題名(和文) HTLV-1感染細胞を標的としたHAMの新規治療法開発

研究課題名(英文) Development of a new treatment for HAM/TSP targeting HTLV-1-infected cells

研究代表者

久保田 龍二 (Kubota, Ryuji)

鹿児島大学・総合科学域総合研究学系・教授

研究者番号：70336337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：HAM患者末梢血リンパ球(PBMC)中のCADM1+CD4+HTLV-1感染細胞のマイクロアレイ解析を行い、発現亢進がある分子のうち、CREBの細胞内シグナルに関連する酵素分子に注目した。この酵素分子に対する阻害剤物質3つを、HTLV-1感染細胞を含有するHAMのPBMCおよび正常者のPBMCに添加し、HTLV-1感染細胞であるCADM1陽性細胞に注目してフローサイトメトリー解析を行った。9例のHAM患者PBMCでは3つの阻害剤のうち1つのみが、1μMで平均20%、5μMで平均40%の有意な感染細胞の減少を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HAMではHTLV-1感染細胞が多いことが特徴で、発症及び進行に関与しており、感染細胞を排除することが治療のために重要と考えられている。しかしながら適切な治療法は見つかっていない。本研究ではHTLV-1感染細胞に特異的に発現し、その細胞の生存に重要と思われる分子に注目し、阻害剤の探索を行った。その結果1種類の化合物が試験管内でHAMの感染細胞を特異的に減少させることを見出した。今後さらに確認作業等が必要である。

研究成果の概要(英文)：Microarray analysis of CADM1+CD4+HTLV-1 infected cells in peripheral blood lymphocytes (PBMCs) from HTLV-1-associated myelopathy (HAM) patients was performed and identified the differentially expressed genes. We focused on an enzymatic molecule among them, which involved in cellular signaling of CREB. Three inhibitor substances for this enzymatic molecule were added to PBMCs from HAM patients and normal control subjects. We performed a flow cytometric analysis focusing on CADM1+HTLV-1-infected cells and found that, in PBMCs from nine HAM patients, one of the inhibitors showed a significant reduction in infected cells with 20% and 40% in average at 1μM and 5μM, respectively.

研究分野：神経免疫学

キーワード：HTLV-1 HAM infected cell

## 1. 研究開始当初の背景

HTLV-1 はヒトのレトロウイルスであり、主に母乳により垂直感染し CD4+T リンパ球に感染する。日本には約 108 万人の感染者がいると推測されている。HTLV-1 は生体内ではリンパ球に潜伏し、感染すると生涯感染は持続し、感染者の一部に成人 T 細胞白血病 (ATL) や HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) などの疾患を引き起こす。HAM は、痙性対麻痺、膀胱直腸障害を起こす慢性進行性神経疾患であり、全国で約 3600 人の HAM 患者が神経障害で苦しんでいる。しかし、抗ウイルス剤をはじめ HAM に対する根治療法は開発されていない。HAM では HTLV-1 ウイルス量が高く、また高ウイルス状態が発症の最大リスクであることが指摘されている。従って HAM の発症予防および症状改善のためには、HTLV-1 感染細胞を減らす、または根絶することが必要である。しかし、HTLV-1 は生体内ではほとんどウイルス粒子を形成せず、さらに生体内ではほとんどウイルス蛋白を発現していないため、HTLV-1 そのものを標的とする治療法は困難であった。近年、HTLV-1 感染細胞上に高頻度に発現する CCR4 を標的とした抗 CCR4 抗体 (モガリズマブ) による HAM の臨床治験が行われているが、CCR4 は全ての感染細胞に発現しているわけではなく、またウイルス減少効果は約 6 割であることから、HTLV-1 感染細胞を根絶する治療法の確立が必要である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、今までなかった方法で生体内の HTLV-1 感染細胞に特異的に発現している分子を同定し、感染細胞の生存に重要な分子を阻害することで HTLV-1 感染細胞を特異的に殺傷し、感染細胞を生体内から根絶する HAM の治療法を開発することである。現在まで ATL 細胞株や HTLV-1 感染細胞株を使った研究はあるが、生体内の HTLV-1 感染細胞とは性状が異なるため、生体内の感染細胞に特異性の高い分子の同定はほとんど行われていない。本研究は HTLV-1 が感染している HAM 患者の末梢血リンパ球を使用して網羅的解析を行い生体内 HTLV-1 感染細胞に特異性の高い標的分子を同定することで、選択的に HTLV-1 感染細胞を除去する治療法確立を目指す。

## 3. 研究の方法

### 生体内 HTLV-1 感染細胞特異的分子の同定

HAM 患者の末梢血リンパ球を分離後 DNA を抽出し、HTLV-1 ウイルスの定量的 PCR を行い、ウイルス量が多い患者を選別する。HAM 患者 4 名の末梢血リンパ球を CD4、CADM1 に対する抗体で染色し、セルソーターにて感染細胞が多い CD4+CADM1+細胞を分取する。コントロールとして非感染正常者 4 名の CD3+CD4+細胞をセルソーターで分取する。それぞれ RNA を抽出し、mRNA のマイクロアレイを行う。HAM 患者で有意に発現している分子のうち、正常細胞にはほとんど発現がなく感染細胞で 10 倍以上発現が亢進している細胞内機能分子、および表面分子を検出し HTLV-1 感染細胞特異的分子を抽出する。次にインターネット上のヒト組織での mRNA 発現データベースを利用して、他の組織で発現の少ない細胞内機能分子および表面分子を絞り込む。合わせてマイクロアレイ結果のパスウェイ解析も行い、重要な細胞内機能分子を選別する。候補標的分子を絞った後、再度 HAM 患者末梢血リンパ球より CD4+CADM1+細胞を、非感染正常者末梢血リンパ球より CD3+CD4+T 細胞を分取後、RNA を抽出し、上記で同定した表面分子、細胞内機能分子の候補に関して RT-PCR を行い、発現亢進の再確認を行う。また感染細胞の蛋白のウエスタンブロットを行い、発現亢進しているか検討する。

### HTLV-1 感染細胞特異的機能分子に対する既存化合物の探索

上記で決定した HTLV-1 感染細胞に特異的な機能分子に対する抑制物質を、既存化合物の中から検索する。まず HTLV-1 感染細胞株を用いて、細胞毒性試験ならびに細胞増殖抑制あるいは細胞死を誘導する化合物のスクリーニングを行い、候補化合物を選択する。次に HAM 患者末梢血リンパ球を用いて、細胞毒性試験ならびに HTLV-1 感染細胞に特異的に細胞死を誘導する化合物を同定する。感染細胞の特異的減少を評価する実験系に関しては、末梢血リンパ球中に感染細胞が存在し同定が困難だったため、さらに非感染細胞と混ざっていたため、通常リンパ球中のウイルス量の定量的 PCR で行っていた。フローサイトメトリーを用いて添加物質が特異的に HTLV-1 感染細胞を減少させるかを評価する新たな実験系を確立し、これも併用して感染細胞減少を評価する。また、申請者は、ウイルス活性化時の HAM 患者 HTLV-1 感染細胞のマイクロアレイも行っており、今回の生体 HTLV-1 感染細胞のマイクロアレイデータとの発現比較を行い、さらにパスウェイ解析等も加えて、HTLV-1 感染細胞が活性化する時に重要な分子を同定する。これらの機能分子に対する抑制物質も既存化合物の中より検索する。

## 4. 研究成果

HAM 患者末梢血リンパ球 (PBMC)より CADM1+CD4+リンパ球をソートし、HTLV-1 感染細胞を濃縮した。HTLV-1 非感染者の CD3+CD4+細胞をソートし (コントロール)、これらの細胞から mRNA を抽出してマイクロアレイを行った。正常コントロール細胞では発現が低く、感染細胞で 20 倍以上発現亢進している遺伝子群を抽出した。このリストの内、正常細胞の 100 倍以上の発現亢進があり、細胞の表面分子、代謝、シグナルに関係している分子を抽出した (図 1 の赤丸)。

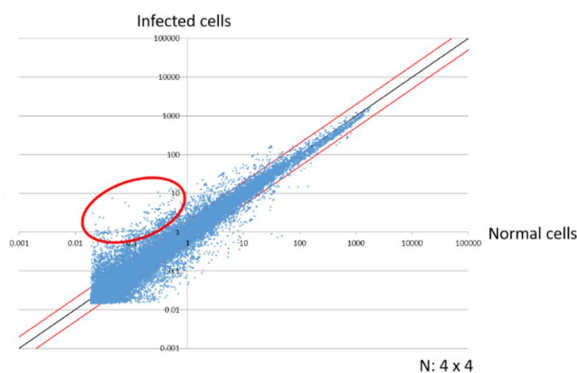
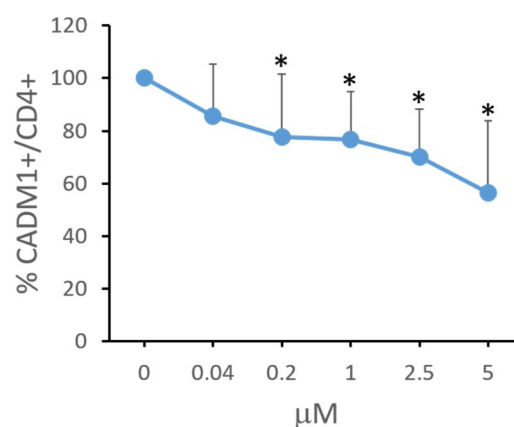


図1. マイクロアレイ解析

これらの分子のうち CREB の活性化につながる細胞内シグナルに關与する酵素分子に注目し、RT-PCR およびウエスタンブロットにより感染細胞株および非感染細胞株での発現を確かめたところ、本分子は mRNA レベルおよびタンパクレベルで感染細胞株に強く発現していることを確認した。

この酵素分子に対する阻害剤物質 3 つを用い、HTLV-1 感染細胞株および非感染細胞株をもちいて、細胞毒性試験を行った。これらの阻害物質を添加し短時間培養したところ、HTLV-1 感染の有無による特異的抑制効果は認めなかった。次に HTLV-1 感染細胞を含有する HAM 患者の PBMC、および正常者の PBMC に添加し HTLV-1 感染細胞である CADM1 陽性細胞に注目してフローサイトメトリー解析を行った。9 例の HAM 患者 PBMC では 3 つの阻害物質のうち 1 つのみが、有意に 1 $\mu$ M で平均 20%、5 $\mu$ M で平均 40%の感染細胞の減少を認めた (図 2)。次に同様な阻害試験を行い、PBMC 中の HTLV-1 ウイルス量を通常定量 PCR で測定したが有意な変化を認めなかった。培養中のリンパ球では通常定量 PCR では死細胞の DNA も増幅することが知られているため、生存細胞をソートして定量 PCR 測定を行っているところである。



\*:  $P < 0.05$  by Wilcoxon rank sum test, when compared the value at 0  $\mu$ M. N=9

図2. 阻害剤による感染細胞減少

以上の結果より、HTLV-1 感染細胞特異的に発現する分子の内、本研究で注目した酵素分子の阻害で、HTLV-1 感染細胞を減少させる可能性が考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takenouchi Norihiro, Tanaka Masakazu, Sato Teruaki, Yao Jinchun, Fujisawa Jun-ichi, Izumo Shuji, Kubota Ryuji, Matsuura Eiji	4. 巻 26
2. 論文標題 Expression of TSLC1 in patients with HAM/TSP	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of NeuroVirology	6. 最初と最後の頁 404 ~ 414
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13365-020-00838-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kodama Daisuke, Tanaka Masakazu, Matsuzaki Toshio, Izumo Kimiko, Nakano Nobuaki, Matsuura Eiji, Saito Mineki, Nagai Masahiro, Horiuchi Masahisa, Utsunomiya Atae, Takashima Hiroshi, Kubota Ryuji, Izumo Shuji	4. 巻 14
2. 論文標題 Inhibition of ABL1 tyrosine kinase reduces HTLV-1 proviral loads in peripheral blood mononuclear cells from patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Neglected Tropical Diseases	6. 最初と最後の頁 e0008361
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pntd.0008361	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kazu Okuma, Madoka Kuramitsu, Toshihiro Niwa, Tomokuni Taniguchi, Yumiko Masaki, Gohzoh Ueda, Chieko Matsumoto, Rieko Sobata, Yasuko Sagara, Hitomi Nakamura, Ryuji Kubota, et al.	4. 巻 17
2. 論文標題 Establishment of a novel diagnostic test algorithm for human T-cell leukemia virus type 1 infection with line immunoassay replacement of western blotting: a collaborative study for performance evaluation of diagnostic assays in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Retrovirology	6. 最初と最後の頁 26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12977-020-00534-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kodama Daisuke, Tanaka Masakazu, Matsuzaki Toshio, Nozuma Satoshi, Matsuura Eiji, Takashima Hiroshi, Izumo Shuji, Kubota Ryuji	4. 巻 -
2. 論文標題 Anti-human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) antibody assays in cerebrospinal fluid for the diagnosis of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JCM.03230-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nozuma Satoshi, Kubota Ryuji, Jacobson Steven	4. 巻 26
2. 論文標題 Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and cellular immune response in HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of NeuroVirology	6. 最初と最後の頁 652 ~ 663
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13365-020-00881-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 J. Yao, M. Tanaka, N. Takenouchi, Y. Ren, Sl. Lee, JI. Fujisawa.	4. 巻 17
2. 論文標題 Induction of APOBEC3B cytidine deaminase in HTLV-1-infected humanized mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Exp Ther Med.	6. 最初と最後の頁 3701-3708
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/etm.2019.7375.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 M. Tanaka, K. Tanaka, C. Ida, A. Oue, S. Yamashita, J. Yao, N. Takenouchi, M. Miwa.	4. 巻 270
2. 論文標題 Conflicting effects of poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor on cell-mediated and virion-mediated HTLV-1 infection.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virus Res.	6. 最初と最後の頁 197653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virusres.2019.197653.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 M. Tanaka, Y. Kawazu, T. Yoshida, T. Konishi, N. Takenouchi, M. Miwa.	4. 巻 60
2. 論文標題 Effects of radiation based on whole-body irradiation in HTLV-1-infected mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Radiat Res.	6. 最初と最後の頁 710-713
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jrr/rrz050.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 野妻智嗣、松浦英治、田中正和、久保田龍二、Steven Jacobson、高嶋博
2. 発表標題 Immunopathogenic CSF TCR repertoire signatures in virus-induced neurologic disease
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久保田龍二、野妻智嗣、田中正和、松浦英治、高嶋博
2. 発表標題 Integrated mRNA and microRNA analysis of HTLV-1-infected cells from HAM patients
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹之内徳博、田中正和、松浦英治、久保田龍二、中嶋伸介、大高時文、上野孝治、大隈和
2. 発表標題 HAM疾患活動性バイオマーカーとしてのCADM1の検討
3. 学会等名 第7回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 児玉大介、田中正和、松崎敏男、野妻智嗣、松浦英治、高嶋博、出雲周二、久保田龍二
2. 発表標題 髄液中抗HTLV-1抗体検査とHAM診断
3. 学会等名 第7回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久保田龍二、田中正和、児玉大介、野妻智嗣、松浦英治、田中勇悦、高嶋博
2. 発表標題 HAM患者HTLV-1感染CD4+T細胞におけるTCRシグナルの低下
3. 学会等名 第7回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野妻智嗣、松浦英治、田中正和、松崎敏男、久保田龍二、高嶋博
2. 発表標題 HTLV-1感染細胞を標的としたTCRレパトア解析によるHAMの病勢指標となるバイオマーカーの探索
3. 学会等名 第7回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久保田龍二、田中正和、松浦英治、高嶋 博
2. 発表標題 Retrieval of therapeutic target molecules for HAM by microarray analysis of HTLV-1-infected cells.
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 児玉大介、田中正和、松崎敏男、野妻智嗣、松浦英治、高嶋 博、出雲周二、久保田龍二
2. 発表標題 High reactivity to anti-HERV-K10 in HTLV-1-infected individuals.
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野妻智嗣、松浦英治、田中正和、松崎敏男、久保田龍二、Steven Jacobson、高嶋 博
2. 発表標題 Immunopathogenic CSF TCR repertoire signatures in virus-associated neurologic disease.
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 児玉大介、田中正和、出雲公子、松崎敏男、松浦英治、高嶋博、出雲周二、久保田龍二
2. 発表標題 N-acetyllactosamine impacts on the infectivity of HTLV-1.
3. 学会等名 第32回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 R. Kubota, M. Tanaka, D. Kodama, E. Matsuura, H. Takashima.
2. 発表標題 Microarray analysis reveals down-regulation of Toll-like receptor genes in activated HTLV-1-infected cells from HAM/TSP patients.
3. 学会等名 19th International Conference on Human Retrovirology: HTLV & Related Viruses, Lima, Peru. (国際学会)
4. 発表年 2019年



1 . 発表者名 D. Kodama, M. Tanaka, T. Matsuzaki, H. Takashima, S. Izumo, R. Kubota.
2 . 発表標題 Inhibition of ABL1 induces decrease of proviral load HTLV-1 infected CD4+ T cell of HAM/TSP.
3 . 学会等名 19th International Conference on Human Retrovirology: HTLV & Related Viruses,Lima, Peru. (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 M. Tanaka, D. Kodama, E. Matsuura, H. Takashima, S. Izumo, R. Kubota.
2 . 発表標題 Effect of neuraminidase inhibitors on HTLV-1 infection and lymphocyte chemotaxis in HAM/TSP.
3 . 学会等名 19th International Conference on Human Retrovirology: HTLV & Related Viruses,Lima, Peru. (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 E. Matsuura, Y. Tashiro, K. Kodama, Y. Hiramatsu, M. Ando, S. Nozuma, Y. Higuchi, Y. Sakiyama, T. Nakamura, M. Yoshimura, H. Arata,
2 . 発表標題 Open label clinical trial of oral high dose L-arginine for the patients with HAM/TSP.
3 . 学会等名 19th International Conference on Human Retrovirology: HTLV & Related Viruses,Lima, Peru. (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 R. Kubota, M. Tanaka, D. Kodama, E. Matsuura, H. Takashima.
2 . 発表標題 Microarray analysis reveals down-regulation of Toll-like receptor genes in activated HTLV-1-infected cells from patients with HTLV-1-associated neurological disease.
3 . 学会等名 52th Annual Meeting of the Society for Leukocyte Biology. Boston. (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Tanaka, N. Takenouchi, H. Tsuda, M. Miwa.
2. 発表標題 Suppression of HTLV-1 infection by lactoferrin.
3. 学会等名 52th Annual Meeting of the Society for Leukocyte Biology. Boston. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保田龍二、田中正和、春口志門、児玉大介、松浦英治、高嶋 博
2. 発表標題 HAM患者HTLV-1感染細胞のマイクロアレイ解析による治療標的分子の探索
3. 学会等名 第6回日本HTLV-1学会,宮崎
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松崎敏男、池上真弓、久保田龍二
2. 発表標題 鹿児島県霧島市でのキャリアママの会カラニコエがごしまによるHTLV 1 キャリア相談事業
3. 学会等名 第6回日本HTLV-1学会,宮崎
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 R. Kubota
2. 発表標題 HAM: the inflammatory neurological disease caused by HTLV-1
3. 学会等名 4th Precision Medicine Conference in Fujian, China. (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	田中 正和  (Tanaka Masakazu)  (20454613)	鹿児島大学・総合科学域総合研究学系・准教授   (17701)	
研究 分担者	松浦 英治  (Matsuura Eiji)  (30598800)	鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授   (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------