

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月22日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591234

研究課題名（和文）皮膚樹状細胞への成人T細胞性白血病リンパ腫ウイルス感染の同定と機能解析

研究課題名（英文）Detection and functional analysis of human T lymphotropic virus type 1 infection in the skin dendritic cells.

研究代表者

島内 隆寿（SHIMAUCHI TAKATOSHI）

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90399204

研究成果の概要（和文）：ヒトT細胞性白血病ウイルスによる樹状細胞-T細胞のウイルスシナプス形成が成人T細胞性白血病/リンパ腫発症に与える意義

研究成果の概要（英文）：The role of the dendritic cells - T-cells virological synapse in Human T lymphotropic virus type 1 infection with implications for the pathogenesis of adult T-cell leukemia / lymphoma

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：癌

キーワード：ウイルス、腫瘍免疫、癌

1. 研究開始当初の背景

成人T細胞性白血病/リンパ腫（adult T-cell leukemia/lymphoma; ATLL）はhuman T lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) 感染によって生じる予後不良な末梢性T細胞性白血病/リンパ腫である。予後不良の背景には、臨床分類に限らず他の白血病、リンパ腫患者に比較して細胞性免疫能の低下が挙げられる。予後良好群であるくすぶり型あるいはキャリアー患者においてすら、難治性尋常性痔瘻、汎発性白癬といった表在性皮膚感染症を合併することは、皮膚局所免疫能、特に自然免疫（immae immunity）の低下を示唆させる所見である。また、T細胞、B細胞を活性化させる獲得免疫についてもその最初のステップとして抗原提示細胞からの抗原提

示を必要とする。しかし、現在まで、ATLL患者における皮膚局所免疫能の低下のメカニズムについては証明されていない。従って我々は、皮膚局所免疫に大きな役割を果たす抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞、皮膚樹状細胞の機能異常に着目した。つまり、ランゲルハンス細胞、皮膚樹状細胞もCD4⁺T細胞と同様にHTLV-Iの感染によって、その機能が低下しているのではないかと推測した。

2. 研究の目的

本研究は、皮膚樹状細胞へのHTLV-1感染が機能異常をもたらし、患者皮膚局所免疫能の低下の一因となっている可能性を検討するものである。

3. 研究の方法

1) 皮膚樹状細胞への HTLV-1 感染の同定

患者皮膚病変の凍結切片を用いて、皮膚ランゲルハンス細胞を Langerin、HTLV-1 ウイルス関連蛋白 p24 で 2 重蛍光染色を行った。

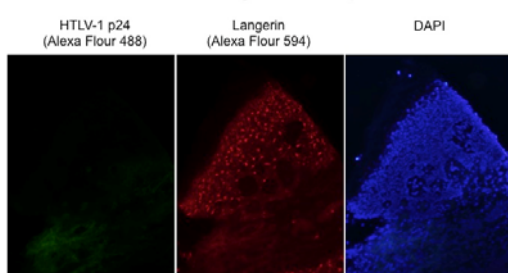
2) HTLV-1 感染樹状細胞の解析

ヒト CD14⁺ 単球細胞を免疫ビーズ法で分離し、IL-4、GM-CSF 存在下に 5 日間培養することで、非成熟単球由来樹状細胞 immature monocyte derived dendritic cells (iMoDCs) を作成。

次に、HTLV-1 産生細胞株 MT-2 と iMoDCs とを 4 日間共培養することで、iMoDCs 細胞内に HTLV-1 コア蛋白 p19、p24 の存在をフローサイトメトリー法で解析した。更に iMoDCs と MT-2 細胞との相互接触に伴う iMoDCs の形態学的変化を電子顕微鏡で観察した。

得られた HTLV-1 感染 iMoDCs を DC-SIGN 免疫ビーズで分離し、自己 CD4⁺ T 細胞と 1:5 の割合で IL-2 100 U/mL 存在下に共培養した。3 時間および 4 8 時間後の iMoDCs-T 細胞間

図1
ATL 患者皮膚病変部における Langerin、HTLV-1 p24 での二重蛍光染色



Langerhans 細胞および皮膚浸潤 ATL 腫瘍細胞での HTLV-1 p24 の同定は困難

の形態学的変化を透過型、走査型電子顕微鏡を用いて観察した。

4. 研究成果

1) 皮膚樹状細胞 (ランゲルハンス細胞) への HTLV-1 感染の同定

患者皮膚病変における表皮内のランゲルハンス細胞は同定できたが、HTLV-1 コア蛋白の発現を同定することは出来なかった (図 1)。その原因としては、培養条件下においてのみ、ウイルス蛋白が発現する可能性があると考えた。

2) HTLV-1 感染樹状細胞の解析

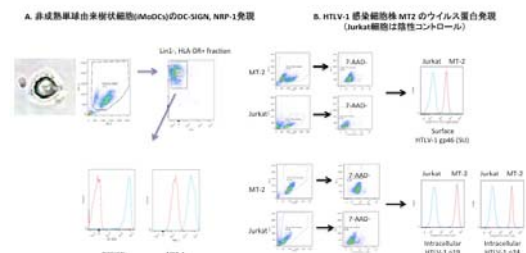
上記の結果から、我々は樹状細胞 dendritic cells (DC) への HTLV-1 感染、ならびに T 細胞への樹状細胞を介した感染という一連の過程を in vitro で再現することで DC、T 細胞の形態学的、免疫学的変化を解析した。

<HTLV-1 感染細胞株から iMoDCs へのウイルス感染>

DC の HTLV-1 感染レセプターは DC-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Nonintegrin (DC-SIGN)、Glucose Transporter 1 (GLUT1)、Neuropilin-1 (NRP-1)、Heparan Sulfate Proteoglycans (HSPG) である。

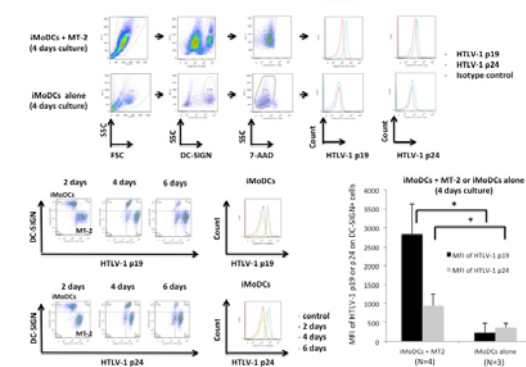
我々が作成した iMoDCs は DC-SIGN と NRP-1 を強く発現していることを確認した (図 2A)。

図2



次に、HTLV-1 産生細胞株 MT-2 (図 2B) と iMoDCs とを 4 日間共培養することで、iMoDCs 細胞質内に HTLV-1 コア蛋白 p19、p24 が最も強く発現されることを確認した (図 3)。

図3 iMoDCsのHTLV-1感染



<HTLV-1 感染細胞株と iMoDCs によるウイルスシナプス形成>

DC へのウイルス感染において、Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) も同様に DC-SIGN を介して DC へ感染することができる。その際、細胞骨格関連シグナルが変化し、DC の膜突起の延長を引き起こし、DC-CD4⁺ T 細胞間にウイルスシナプスを形成する。このウイルスシナプス形成は宿主の細胞障害性 T 細胞からの免疫回避、感染効率の向上といったウイルス側の利点がある。一方、ウイルスシナプス形成は HTLV-1 感染 T 細胞

では同定されているが、HTLV-1 感染 DC におけるウイルスシナプス形成のメカニズムについてはほとんど解明されていない。

そこで、我々は、iMoDCs と MT-2 細胞間におけるウイルスシナプス形成の同定を透過型、走査電子顕微鏡で試みた。図 4 にしめすように、MT-2 細胞と iMoDCs は共培養 4 日間後において、強い結合を示し、いわゆるウイルスシナプスを形成していた。さらに、非感染 iMoDCs に比較して、HTLV-1 感染 iMoDCs では偽足の減少を同定することができた (図 5)。免疫電顕により、このウイルスシナプス間の裂隙にウイルスコア蛋白 p19 を同定した (図 6)。

図4 HTLV-1 感染細胞株 MT-2 と iMoDCs とによるウイルスシナプス形成

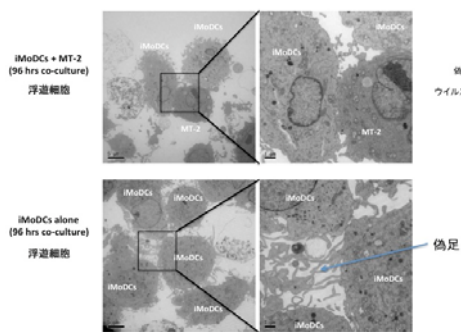


図5 HTLV-1 感染細胞株 MT-2 と iMoDCs とによるウイルスシナプス形成

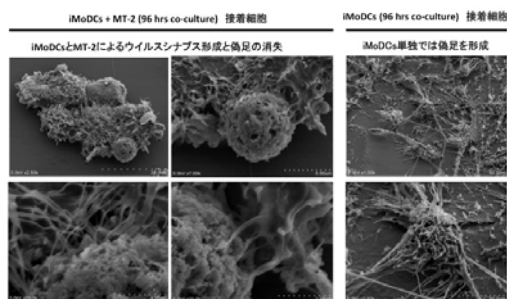
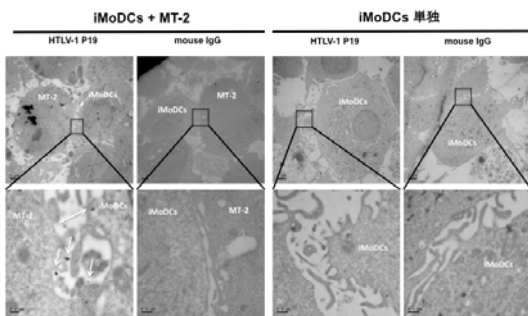


図6 ウイルスシナプス内の HTLV-1 関連蛋白の同定 (免疫電顕)



<HTLV-1 感染 iMoDCs と CD4⁺ T 細胞との接触、相互作用>

こうして得られた HTLV-1 感染 iMoDCs を分離し、自己 CD4⁺ T 細胞と 1:5 の割合で共培養した。3 時間および 48 時間後の iMoDCs-CD4⁺ T 細胞間の形態学的変化を透過型、走査型電子顕微鏡を用いて観察した。培養 48 時間後の観察では HTLV-1 感染 iMoDCs は、偽足の減少は継続しつつも、自己 CD4⁺ T 細胞とは偽足によって結合しており、ウイルスシナプス形成が観察された (図 7、8)。一方、非感染 iMoDCs では T 細胞間の結合は認められなかった (図 7、8)。

図7 HTLV-1 感染 iMoDCs の偽足消失と自己 CD4⁺ T 細胞との接触 (ウイルスシナプス形成)

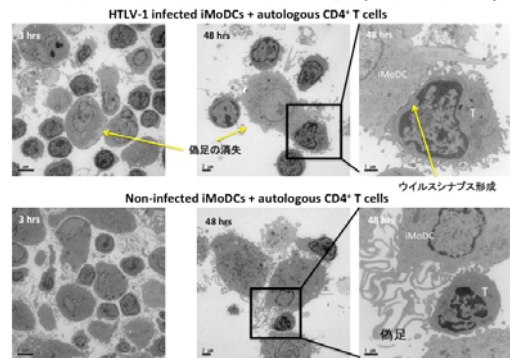
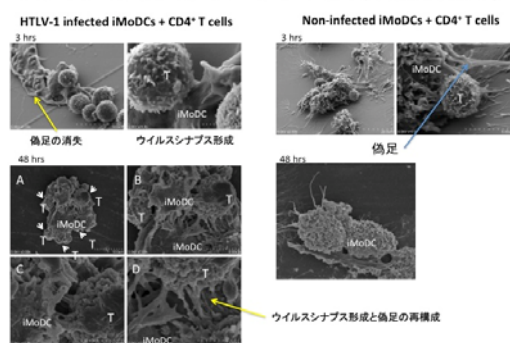


図8 HTLV-1 感染 iMoDCs の偽足消失と自己 CD4⁺ T 細胞との接触 (ウイルスシナプス形成)



HTLV-1 感染 iMoDCs - T 細胞間のウイルスシナプス形成および細胞表面の偽足の減少といった形態学的変化がどのような細胞骨格関連シグナルで生じるか、また HTLV-1 感染 iMoDCs が免疫学的機能不全に陥っているかどうかの確認が今後の検討課題となった。

HTLV-1 の主な感染経路は母子感染 (垂直感染)、性感染 (水平感染) と考えられている。両者の感染経路において、重要な役割を果たすのが DC と考えられている。HTLV-1 はまず DC へ感染し、その後 HTLV-1 感染 DC が CD4⁺ T 細胞へウイルスを伝播させ、腫瘍化に至ると我々は推測する。また感染 DC そのものが機能不全に陥り、宿主の免疫不全に関与することも考えられる。しかし、HTLV-1 感染 DC が CD4⁺ T 細胞へウイルスを伝播させる際、どのよう

な分子生物学的、免疫学的変化が生じるかについては明らかにされていない。この機序の解明は、HTLV-1 感染 DC から CD4⁺ T 細胞へのウイルス伝播を特異的に阻害する創薬への寄与が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Sawada Y, Shimauchi T, Yamaguchi T, Okura R, Hama-Yamamoto K, Fueki-Yoshioka H, Ohmori S, Yamada S, Yoshizawa M, Hiromasa K, Tajiri M, Kabashima-Kubo R, Yoshioka M, Sugita K, Yoshiki R, Hino R, Kobayashi M, Izu K, Nakamura M, Tokura Y: Combination of skin-directed therapy and oral etoposide for smoldering adult T-cell leukemia/lymphoma with skin involvement. *Leuk Lymphoma*. 2013 Mar;54(3):520-7.
2. Sugaya M, Hamada T, Kawai K, Yonekura K, Ohtsuka M, Shimauchi T, Tokura Y, Nozaki K, Izutsu K, Suzuki R, Setoyama M, Nagatani T, Koga H, Tani M, Iwatsuki K: Guidelines for the management of cutaneous lymphomas (2011): A consensus statement by the Japanese Skin Cancer Society-Lymphoma Study Group. *J Dermatol*. 2013 Jan;40(1):2-14.
3. McGill H-K, Vyas J, Shimauchi T, Tokura Y, Piguet V: HTLV-1 Associated Infective Dermatitis: Updates on the Pathogenesis. *Exp Dermatol*. 2012 Nov;21(11): 815-21.
4. Sawada Y, Namakura M, Kabashima-Kubo R, Shimauchi T, Kobayashi M, Tokura Y: Defective epidermal innate immunity

and resultant superficial dermatophytosis in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2012 Jul 15;18(14):3772-9.

[学会発表] (計 1 件)

Shimauchi T: Adult T-cell Leukemia/Lymphoma: HTLV-1 infection and abnormal immune system. 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, JSID-Asia-Oceania-Forum, Okinawa, December 6-9, 2012.

[図書] (計 1 件)

1. 島内隆寿/戸倉新樹: 第 2 章 女性に特有の皮膚疾患 13 母乳でうつる皮膚疾患にはどんなものがあるか? 女性の皮膚トラブル FAQ 診断と治療社 147-150, 2012.

[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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島内 隆寿 (SHIMAUCHI TAKATOSHI)
浜松医科大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 90399204

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし