

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591271

研究課題名(和文)HAM動物モデルの作製と新規治療法開発

研究課題名(英文)An attempt to develop an animal model of HAM/TSP

研究代表者

久保田 龍二(Kubota, Ryuji)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：70336337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：HTLV-1感染CD4陽性細胞とHTLV-1特異的細胞傷害性Tリンパ球(CTL)が脊髄に浸潤し、HAMが発症すると考えられている。我々はHAM動物モデルを作成することを目的とした。HLA-A2+A24+のHAM患者末梢血リンパ球より樹立したHTLV-1感染CD4陽性細胞株を、NOD/SCID/JAK3欠損マウスに腹腔内投与した。同一患者より樹立したHTLV-1 Tax11-19またはTax301-309特異的CTL株を投与し、感染細胞株だけのマウス、それぞれのCTLも追加投与したマウスの3群に分けた。しかし神経症状は発現しなかった。今後、細胞数、移入ルート等の改善が必要である。

研究成果の概要(英文)：HTLV-1-infected CD4+ T cells and HTLV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) accumulate in the spinal cords of HAM/TSP patients. It is suggested that the both cells induce HTLV-1-specific inflammation, causing HAM/TSP. We attempted to develop an animal model of the disease. We established an HTLV-1-infected CD4+ T cell line and CD8+ CTL lines specific for either HTLV-1 Tax11-19 or Tax301-309 from an HLA-A2+A24+ HAM/TSP patient. NOD/SCID/JAK3-deficient mouse were inoculated with these cells and were divided into three groups; mouse with the infected cells, mouse with the infected cells and Tax11-19 CTLs, and mouse with the infected cells and Tax301-309 CTLs. However, no mouse showed neurological symptoms. Further consideration of inoculation cell number and its route would be needed.

研究分野：神経免疫学

キーワード：HTLV-1 HAM 細胞傷害性Tリンパ球 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

HTLV-I 関連脊髄症(HAM)は、HTLV-I 感染者に発症する痙性対麻痺、膀胱直腸障害を主症状とする慢性進行性神経疾患である。全国に約 3600 人の HAM 患者がいるが、根治治療が未だないため脊髄障害で苦しんでいる。HAM は鹿児島大学で発見され、本研究機関は HAM の臨床・研究面において世界でも突出した立場にあり、治療法の開発が期待されている。我々は HAM では HTLV-I キャリアと比較して末梢血中の HTLV-I プロウイルスおよび HTLV-I 特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) が非常に多いこと、また剖検脊髄組織の検討から、HTLV-I 感染 CD4 陽性細胞が浸潤し、HTLV-I 特異的 CD8 陽性 CTL が集ぞくし炎症を起こしていることを明らかにしてきた。また、この CTL が TNF- α などの細胞傷害性サイトカインを産生することを報告した。現在まで副腎皮質ホルモン療法、インターフェロン(IFN)- α 療法が確立されているが根治療法には至らず、新たな治療法の開発が急務である。そのためには HAM の病態にもとづく適切な動物モデルの作製が必要である。

2. 研究の目的

現在までに HAM の動物モデルとして、HTLV-1 tax 遺伝子のトランスジェニックラットが作成されたが、この方法では HTLV-1 ウイルスは免疫学的に非自己とはならないため、HAM で特徴的である中枢神経系への炎症細胞の浸潤は起こっていない。またラットにヒト HTLV-1 感染細胞株を投与した例でも、脊髄での炎症を惹起できておらず、また仮に炎症が起こったとしても、宿主にとっては異種の細胞株であるため、HTLV-1 に対する炎症が異種抗原に対する炎症かの判断は困難である。この様に HAM の病態にもとづく動物モデルは未だ確立されていない。

近年、重度複合不全の NOG マウスが開発され、拒絶反応がほとんどないためヒトの細胞を保持できるヒト化マウスが可能になった。さらに高度免疫不全マウスである NOD/SCID/JAK3 欠損マウス (NOJ マウス) が開発された。本研究では、この NOJ マウスにヒトの HTLV-1 感染細胞と HTLV-1 特異的 CTL を移入して脊髄の炎症を惹起し、HAM の動物モデルを開発し、病態解明および新地治療法開発のツールとすることを目的とした。

3. 研究の方法

HAM 患者では CTL 反応が強く CTL も高頻度に認められるが、HLA-A2 陽性患者ではそのほとんどが Tax11-19 エピトープを認識し、HLA-A24 陽性患者では Tax301-309 エピト-

プを認識している。そのため HAM 患者末梢血リンパ球より DNA を抽出し、PCR にて HLA-A2 および HLA-A24 の HLA タイピングを行う。HLA-A2 陽性または HLA-A24 陽性の HAM 患者末梢血リンパ球より、HTLV-I 陽性 CD4 細胞株と HTLV-I 特異的 CD8 陽性 CTL 株を樹立し、両細胞を培養にて増殖させた後、NOJ マウスに腹腔内投与する。この際 HAM 患者からのヒトの細胞を移入するため、宿主動物での拒絶反応が起こらないようにするために高度免疫不全の NOJ マウスを用いる必要がある。コントロール細胞として、HTLV-I 陽性 CD4 細胞株に対し同じ HLA の HTLV-I 陰性 CD4 陽性細胞株を、HTLV-I 特異的 CTL 株に対し同じ HLA 拘束性サイトメガロウイルス(CMV)特異的 CD8 陽性 CTL 株を樹立し、大量培養する。これらの細胞を組み合わせマウスに投与し、痙性対麻痺等の神経症状の観察を行う。症状発現が軽微な場合は、投与する細胞数を増やしたり、細胞を活性化して用いる。また、投与方法を検討する。

4. 研究成果

HLA-A2 または HLA-A24 陽性の HAM 患者の末梢血リンパ球を用いて、HTLV-1 感染 CD4 陽性細胞株および HTLV-1 Tax 特異的 CD8 陽性 CTL 株の樹立を試みた。末梢血リンパ球より CD4 陽性細胞をマグネットビーズを用いて分離し、IL-2 存在下で長期培養した。5 株の HTLV-1 感染 CD4 陽性細胞株がえられた。確認は、CD3、CD4 および HTLV-1 Env 抗体を用いて行った (図 1)。

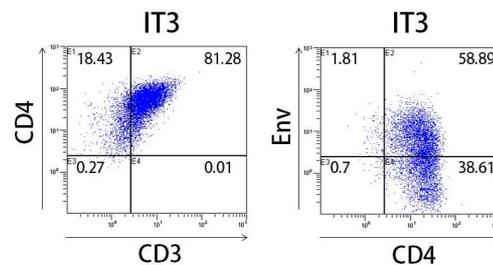


図 1. HTLV-1 感染 CD4 陽性 T 細胞株 IT3 の同定。CD3、CD4 および HTLV-1 Env 蛋白抗体で染色。

HTLV-1 特異的 CTL 株については、同一患者の末梢血リンパ球より CD8 陽性細胞をマグネットビーズで分離した。CTL の誘導に抗原提示細胞が大量に必要であり、HLA を一致させた末梢血リンパ球だけでは供給困難なため、HLA-A2+A24+の HTLV-1 非感染者の B リンパ球を EBV で不死化して細胞株を作成した。この細胞株は MHC クラス I および CD80 を発現していた。放射線放射あるいはマイトマイシン C 処理後の抗原提示細胞に

HTLV-1 Tax11-19 および Tax301-309 のペプチドを添加後洗浄した。上記の CD8 陽性細胞に添加後、IL-2 存在下で混合培養した。以下同様の刺激を 5-6 回繰り返して、3 株の HTLV-1 特異的 CD8 陽性 CTL 株がえられた。確認は CD8 抗体およびそれぞれのテトラマーで行った(図 2)。

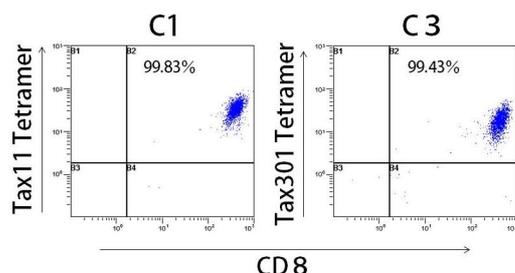


図 2. テトラマーによる HTLV-1 Tax 特異的 CTL の同定。C1 は Tax11-19 特異的 CTL 細胞株、C3 は Tax301-309 特異的 CTL 細胞株。

HLA-A2 陽性の同一 HAM 患者よりえられた HTLV-1 感染細胞株、HTLV-1 Tax11-19 および Tax301-309 特異的 CTL 株を用いて以下の実験を行った。高度免疫不全マウス(NOD/SCID/JAK3 欠損マウス:NOJ マウス)に感染細胞株を腹腔内投与した。3 日後に CTL を投与し、何も投与しないマウス、Tax11-19 特異的 CTL を投与したマウス、および Tax301-309 特異的 CTL を投与したマウスの 3 群に分けた。現在、感染細胞と CTL を投与したマウスに下肢麻痺等が現れないか経過観察中であるが、神経症状は現れていない。今後、投与細胞数の増加や活性化、または脳内接種等の投与ルートの検討が必要と考えられた。

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 3 件)

1. Matsuura E, Kubota R, Tanaka Y, Takashima H, Izumo S: Visualization of HTLV-1-specific cytotoxic T lymphocytes in the spinal cords of patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neuropath Exp Neurol*.74(1): 2-14, 2015 [査読有] doi: 10.1097/NEN.0000000000000141.
2. Matsuura E, Yoshimura A, Nozuma S, Higuchi I, Kubota R, Takashima H: Clinical presentation of axial myopathy in two siblings with HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *BMC Neurol*. 15(1): 18, 2015

[査読有]doi: 10.1186/s12883-015-0275-7.

3. Nozuma S, Matsuura E, Matsuzaki T, Watanabe O, Kubota R, Izumo S, Takashima H: Familial clusters of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *PLoS One*. 9(5): e86144, 2014 [査読有] doi: 10.1371/journal.pone.0086144.

[学会発表](計 6 件)

1. 久保田龍二、松崎敏男、高嶋 博、出雲周二: HTLV-1 HBZ 特異的 CTL のエピトープ同定と HAM における検出。第 19 回日本神経感染症学会学術集会。2014 年 9 月、金沢
2. 久保田龍二、齊藤峰輝、高嶋 博、出雲周二: HAM における HTLV-1 抗原遺伝子変異と CTL 認識。第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会。2014 年 8 月、東京
3. 久保田龍二、松崎敏男、高嶋 博、出雲周二: HAM における HTLV-1 HBZ 特異的 CTL の検出。第 55 回日本神経学会学術大会。2014 年 5 月 福岡
4. 久保田龍二、高嶋 博、出雲周二: HTLV-1 HBZ 特異的 CTL エピトープの探索。第 6 回 HTLV-1 研究会。2013 年 8 月 東京
5. Kubota R, Takashima H, Izumo S: Impaired T cell receptor signaling in HTLV-1-infected CD4+ cells from HAM/TSP patients. *16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV & Related Viruses*, Montreal, Canada, 2013
6. 久保田龍二、高嶋 博、出雲周二: HAM 患者 HTLV-1 感染 CD4+T 細胞における免疫能低下。第 54 回日本神経学会総会。2013 年 5 月 東京

[図書](計 3 件)

1. 久保田龍二: ヒト T リンパ球向性ウイルス脊髄症 (HAM)。神経疾患 最新の治療 2015-2017。南江堂。小林祥泰/水澤英洋/山口修平 編集。pp205-207, 2015
2. 久保田龍二、出雲周二: HTLV-1 関連脊髄症(HAM)。免疫性神経疾患ハンドブック。南江堂。楠 進 編集。pp206-220, 2013
3. 久保田龍二: HTLV-1。神経症候群 I。日本臨床社。水澤英洋 編集。pp641-645, 2013

[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://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~bunshi/>

6．研究組織

(1)研究代表者

久保田 龍二 (RYUJI KUBOTA)
鹿児島大学 医歯学総合研究科・准教授
研究者番号：70336337

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし