

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591267

研究課題名(和文) HTLV-I 関連脊髄症発症に関与する細胞内骨格再構成シグナル伝達機構の解明

研究課題名(英文) The elucidation of the signalings of cytoskeletal reorganization involved in the development of HTLV-I-associated myelopathy

研究代表者

中村 龍文 (NAKAMURA, Tatsufumi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：00198219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000 円

研究成果の概要(和文)：細胞内骨格再構成シグナル伝達の角度からHTLV-I関連脊髄症(HAM)発症に関わる因子についてHTLV-I感染細胞株とHTLV-I非感染細胞株との混合培養によるHTLV-I感染伝播効率を指標として検索を行った。得られた結果からHAM患者HTLV-I感染細胞では1) actin polymerizationを抑制する細胞内cAMP濃度を低く設定することによって細胞内骨格再構成が活性化していること 2) 細胞内骨格再構成の活性化と共にRap1活性化を誘導するCXCR4シグナルの活性化が起こり、これらがHTLV-I感染細胞の高い組織浸潤能に関与する一因となっている可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the factors involved in the development of HTLV-I-associated Myelopathy(HAM) from the point of view of cytoskeletal reorganization using the efficiency of intercellular transmission of HTLV-I by co-cultivation with HTLV-I-infected T cell lines and H9/K30 luc reporter cells as an indicator. From our data, it was suggested as follows: 1) activation of cytoskeletal reorganization by down-regulated intracellular cAMP level in HTLV-I-infected cells in HAM patients. 2) activation of CXCR4 signaling leading to Rap1 activation with activation of cytoskeleton reorganization involved in the heightened transmigration activity to the tissues in HTLV-I-infected cells in HAM patients.

研究分野：神経病態免疫学

キーワード：HTLV-I関連脊髄症 HTLV-I 細胞内骨格再構成 細胞内シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

細胞の遊走能や浸潤能には細胞内骨格再構成が関与し、その中でactin polymerizationは最も重要な役割を果たしている。申請者はHTLV-I関連脊髄症(HAM)患者末梢血HTLV-I感染CD4陽性T細胞は血管基底膜透過能が亢進していることを報告し(Furuya T., et al., P Assc Am Physician 1997)、さらにHAM患者由来HTLV-I感染T細胞株では組織浸潤におけるcritical moleculeであり、actin polymerizationの上流に位置するsmall GTPaseが強く活性化されていることを明らかにした(Fukushima N. et al., Intervirology 2008)。これらの事実はHAM患者HTLV-I感染細胞では強いactin polymerizationを基盤として細胞内骨格再構成が生じていることを示唆している。

HAMの原因ウイルスであるHTLV-Iは細胞接着分子によって構成されるvirological synapseを通してcell to cellで伝播していくが(Igakura T. et al., Science 2003, Barnard AL. et al., Blood 2005)、この場合にも細胞内骨格再構成の重要性が指摘されている(Nejmeddine M. et al., J Biol Chem 2005)。以上の事実より、HAM患者におけるHTLV-I感染細胞にみられる強い組織浸潤能を惹起する分子機構は同時にHTLV-Iの効率のいい細胞間伝播をも誘導している可能性が考えられる。これらの事実を背景として、細胞骨格再構成シグナルの角度から、HAM患者HTLV-I感染細胞の解析を行った。

2. 研究の目的

HAM患者末梢血では、組織浸潤能が亢進したHTLV-I感染細胞群の増加があり、この増加がHAM発症においてcriticalな役割を演じている。この異常に関与する分子機構が明らかになれば、それを標的とした治療法開発が可能となる。組織浸潤能の亢進とHTLV-Iの効率のいい細胞間伝播の両者には細胞内骨格再構成のシグナル異常が共通して関与している可能性がある。本研究では細胞内骨格再構成シグナルの観点から、HAM患者HTLV-I感染細胞を解析し、この両者に共通する可能性のある分子機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究ではHTLV-I感染細胞株(HAM患者由来またはHTLV-Iキャリアー由来)とH9/K30 *luc*細胞との混合培養系を用いて解析を行った。

(1) 混合培養系: HTLV-I感染T細胞株としてHCT-5(HAM患者由来HTLV-I感染T細胞株)またはTL-Su(HTLV-Iキャリアー由来)を使用した。混合培養の標的細胞としてH9/K30 *luc*細胞(リンパ球系細胞株であるH9細胞にHTLV-I LTRにレポーターとしてのルシフェラーゼ遺伝子を繋いだプラスミドをpermanent transfectionした細胞株)を使用した。解析

の前にH9/K30 *luc*細胞でのCXCR4・LFA-1発現とHCT-5およびTL-SuでのCXCR4・ICAM-1発現は、フローサイトメリーにて確認した。(2) HTLV-I感染伝播効率の解析: HCT-5またはTL-Su(5×10^5 /well)とH9/K30 *luc*細胞(3.5×10^5 /well)と混合培養後、細胞を回収し、ルシフェラーゼアッセイを行いrelative luc activityを算出した。

(3) 各種薬剤のHTLV-I感染伝播効率に及ぼす影響の解析: Latrunculin B(actin depolymerizer)またはForskolin(adenylate cyclase活性化剤)またはSQ22536(adenylate cyclase阻害剤)、cAMPまたはcGMPまたはH89(PKA阻害剤)またはpentoxifyllineまたはcilostazolまたはrolipramまたはpentoxifylline + cilostazolまたはpentoxifylline + rolipramまたはticlopidine処理HCT-5またはTL-SuをH9/K30 *luc*細胞と混合培養後、上記2)による解析を行った。

(4) CXCR4シグナルのHTLV-I感染伝播効率に及ぼす影響の解析: 抗CXCR4ブロッキング抗体存在下にHCT-5またはTL-SuとH9/K30 *luc*細胞と混合培養後、上記(2)による解析を行った。

(5) ウエスタンブロット解析: HCT-5をLatrunculin BまたはForskolinにて処理し、経時的に細胞を回収後、cell lysateを作成し、ウエスタンブロット解析を行った。また、HCT-5またはTL-Suを培養し、経時的に細胞を回収後、cell lysateを作成し、ウエスタンブロット解析を行った。

(6) 細胞内cAMP・cGMP濃度の測定: HCT-5またはTL-Suを培養後、細胞を回収し、cell lysateを作成。細胞内cAMP・cGMP濃度をELISA法にて測定した。

(7) Rap1活性化の解析: Rap1 pull down assayキットを用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 細胞内cAMPはvasodilator-stimulated phosphoprotein(VASP)のリン酸化を抑制し、細胞内骨格再構成で重要な役割を果たしているactin polymerizationを通してHTLV-I感染効率を規定する(下記雑誌論文)。

actin depolymerizer, Latrunculin B処理HCT-5では感染効率が抑制された(図1)。

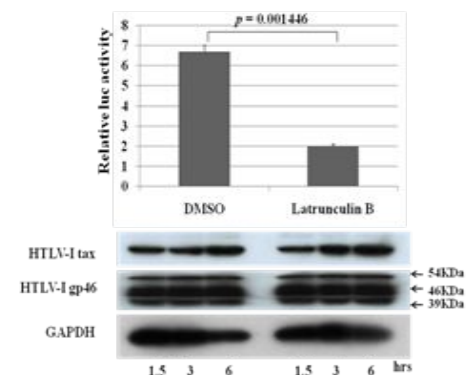


図1. Latrunculin B処理HCT-5におけるHTLV-I感染伝播抑制効果

Forskolin 処理による細胞内 cAMP 濃度の増加は VASP のリン酸化を介して actin polymerization を抑制し、その結果 HCT-5 での HTLV-I の感染伝播効率が低下した(図 2)。

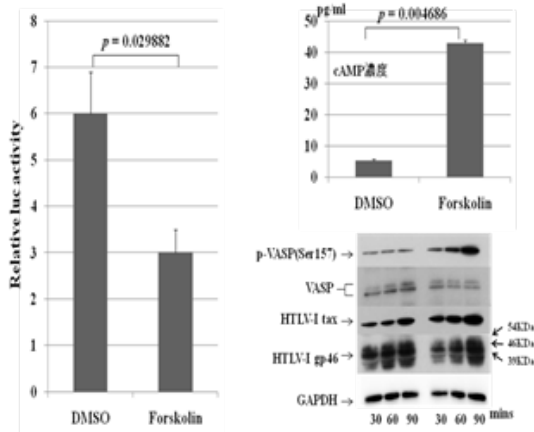


図2. Forskolin処理HCT-5における細胞内cAMP濃度およびVASPリン酸化とHTLV-I感染伝播抑制効果との関係

HCT-5 と TL-Su における細胞内 cAMP 濃度および VASP リン酸化の比較では、後者では前者に比較して細胞内 cAMP 濃度は有意に高く、VASP はより強くリン酸化されていた(図 3)。細胞内 cGMP 濃度は両者の株で有意差はなかった(図省略)。さらに、両株での HTLV-I 感染伝播効率の比較では前者で有意に高い感染伝播効率を示した(図 4)。

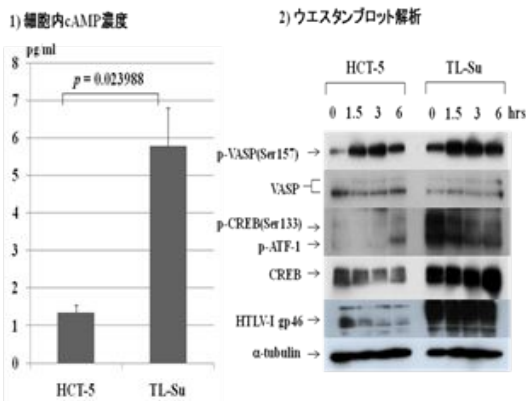


図3. HCT-5とTL-Suにおける細胞内cAMP濃度の比較とウエスタンブロット解析

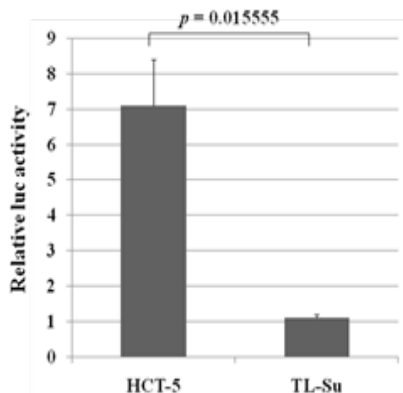


図4. HCT-5とTL-SuのHTLV-I感染伝播効率の比較

ここまでの解析によって、細胞内 cAMP 濃度は VASP のリン酸化を通して、actin polymerization を制御し、そのことによって HTLV-I 感染伝播効率を規定する一因となっている可能性が示された。そこで、感染効率のいい HCT-5 を直接 cAMP または cGMP で処理後、混合培養を行い、感染効率の変化を解析したところ、cAMP 処理では有意に低下を示したが cGMP 処理では有意な差を示さなかった(図 5)。

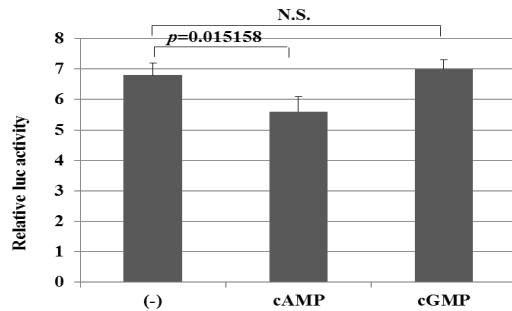


図5. cAMP処理HCT-5におけるHTLV-I感染伝播効率の変化

以上より、1) actin polymerization は HTLV-I 感染伝播において重要な役割を果たしている。2) 細胞内 cAMP は actin polymerization のリン酸化を制御し、HTLV-I の感染伝播効率に関与することが明らかになった。興味あることに、HAM 患者由来 HCT-5 は HTLV-I キャリアー由来 TL-Su に比較して HTLV-I 感染伝播効率が有意に高いのであるが、その一因として細胞内 cAMP 濃度が低く設定されているためと考えられる。したがって、HAM 患者では HTLV-I 感染細胞の組織浸潤能亢進にはその細胞内で低く設定された cAMP 濃度による細胞内骨格再構成シグナルの活性化が関与している可能性が考えられた。

細胞内 cAMP 濃度を变化させうる薬剤での検討:a. 減少させる薬剤;SQ22536 にて TL-Su を処理後、混合培養を行ったが、有意な変化は得られなかった。さらに、VASP のリン酸化を抑制する薬剤 H89 で処理された TL-Su でも有意な変化は得られなかった。b. 増加させる薬剤;cAMP を標的とした HAM に対する治療法開発の可能性を考え、phosphodiesterase 阻害剤 (pentoxifylline、cilostazol、rolipram) または adenylate cyclase 活性化剤 (ticlopidine) で HCT-5 を処理後、混合培養を行ったが、有意な変化は得られなかった。(2) CXCR4 シグナルの活性化は HTLV-I 感染伝播効率に関与する。

CXCR4 シグナルは細胞内骨格再構成の活性化の上流にある Rap1 を活性化させる。そこで、抗 CXCR4 ブロッキング抗体存在下に HCT-5 あるいは TL-Su と H9/K30 luc 細胞を混合培養し、その感染効率を比較した。その結果、HCT-5 ではその感染効率は有意に低下したにもかかわらず、TL-Su では変化は見られなかった(図 6)。Rap1 は TL-Su に比較して、HCT-5

において明らかに活性化されていた(図 7)。

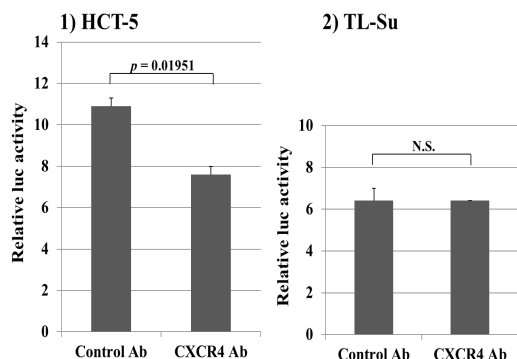


図6. HTLV-I感染効率に対する抗CXCR4 blocking抗体処理の効果

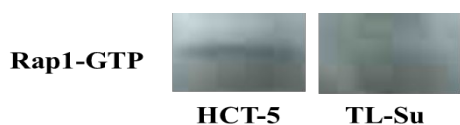


図7. HCT-5におけるRap1の活性化

これらの事実は HCT-5 での HTLV-I の感染伝播には CXCR4 シグナルも重要な役割を果たしている可能性を示している。さらに、HCT-5 が CXCR4 を発現していることを併せて考えればそのシグナルの下流にある細胞内骨格再構成の活性化が HCT-5 で起こっていることが示唆された。

(結論)

本研究において HAM 患者 HTLV-I 感染細胞では細胞内骨格再構成シグナルが活性化され、その因子として細胞内 cAMP 濃度を低く設定していること、また CXCR4 シグナルの活性化が関与している可能性が示された。これらのシグナルの活性化が HAM 患者 HTLV-I 感染細胞の高い組織浸潤能を維持している可能性がある。以上より、HTLV-I 感染細胞に対して細胞内 cAMP 濃度を増加させる薬剤あるいは CXCR4 シグナル活性化を抑制させる薬剤は、HAM に対する新規治療法となる可能性が考えられた。

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 8 件)

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 human T lymphotropic virus type I in patients with Sjögren's syndrome, *Arthritis Rheumatol*, 査読有, 67, 2015, 1096-1106
DOI:10.1002/art.39009

中村龍文. HTLV-I 関連脊髄症に対する新しい治療戦略の開発に向けて, 査読無, *Neuroinfection*, 20, 2015, 13-17, 2015
Nakamura T, Satoh K, Nakamura H,

Yamasaki H. Intracellular cAMP regulates the efficiency of intercellular transmission of human T-lymphotropic virus type I, *Clin Exp Neuroimmunol*, 査読有, 5, 2014, 209-215

DOI: 10.1111/cen3.12097

Nakamura T, Satoh K, Fukuda T, Kinoshita I, Nishiura Y, Nagasato K, Yamauchi A, Kataoka Y, Nakamura T, Sasaki H, Kumagai K, Niwa M, Noguchi M, Nakamura H, Nishida N, Kawakami A.

Pentosan polysulfate treatment ameliorates motor function with increased serum soluble vascular cell adhesion molecule-1 in HTLV-1 associated neurologic disease, *J Neurovirol*, 査読有, 20, 2014, 269-277
DOI:10.1007/s13365-014-0244-8

Nakamura H, Horai Y, Tokuyama A, Yoshimura S, Nakajima H, Ichinose K, Yamasaki S, Nakamura T, Hayashi T, Kawakami A. HTLV-I virological and histopathological analysis in two cases of anti-centromere antibody-seropositive Sjögren's syndrome, *Mod Rheumatol*, 査読有, 23, 2013, 133-139

DOI: 10.1007/s10165-012-0641-x

Takamori M, Nakamura T, Motomura M. Antibodies against Wnt receptor of muscle-specific tyrosine kinase in myasthenia gravis. *J Neuroimmunol*, 査読有, 254, 2013, 183-186

DOI: 10.1016/j.jneuroim.2012.09.001

Nakamura T, Matsuo T, Fukuda T, Yamato S, Yamaguchi K, Kinoshita I, Matsuzaki T, Nishiura Y, Nagasato K, Narita-Masuda T, Nakamura H, Satoh K, Sasaki H, Sakai H, Kawakami A. Efficacy of prosultiamine treatment in patients with HTLV-I-associated

myelopathy/tropical spastic paraparesis: results from an open-label clinical trial, *BMC Med*, 査読有, 11, 2013, 182

DOI: 10.1186/1741-7015-11-182

Nakamura T. Prosultiamine treatment as new therapeutic strategy in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, *Clin Exp Neuroimmunol*, 査読有, 4, 2013, 259-260

DOI: 10.1111/cen3.12063

【学会発表】(計 11 件)

(国内学会) 中村龍文. HTLV-I 関連脊髄症に対する新しい治療戦略の開発に向けて、合同シンポジウム「感染と神経免疫」、第 19 回日本神経感染症学会/第 26 回日本神経免疫学会合同学術集会、2014 年 9 月 4 日、

金沢歌劇座（石川県金沢市）.
松尾朋博、中村龍文、大庭康司郎、望月保志、宮田康好、酒井英樹、プロスルチアミン経口薬により HTLV-1 関連脊髄症に随伴した過活動膀胱患者の症状は軽快し、尿中バイオマーカーも低下した。第 21 回日本排尿機能学会、2014 年 9 月 19 日、岡山コンベンションセンター（岡山県岡山市）。

中村龍文、松尾朋博、福田 卓、酒井英樹、佐藤克也、川上純、HTLV-1 関連脊髄症(HAM)に対する経口プロスルチアミン療法の有効性、第 54 回日本神経学会学術集会、2013 年 5 月 29 日、東京国際フォーラム（東京都千代田区）。

中村龍文、佐藤克也、福田 卓、川上 純、ポリ硫酸ペントサン治療による HAM 患者下肢運動機能改善と血清 sVCAM-1 値の関係、第 25 回日本神経免疫学会学術集会、2013 年 11 月 27 日、海峡メッセ下関（山口県下関市）。

中村龍文、HTLV-1 関連脊髄症(HAM) の治療剤の開発、BIO tech 2012 第 11 回国際バイオテクノロジー展/技術会議、2012 年 4 月 6 日、東京ビッグサイト(東京都江東区)。

中村龍文、福田 卓、木下郁夫、栢田智子、長郷国彦、西浦義博、佐藤克也、川上 純、HTLV-1 関連脊髄症(HAM)に対するポリ硫酸ペントサンによる治療成績、第 53 回日本神経学会学術大会、2012 年 5 月 23 日、東京国際フォーラム（東京都千代田区）。

中村龍文、松尾朋博、福田 卓、山口健太郎、佐々木 均、酒井英樹、川上 純、HAM に対する経口プロスルチアミン療法の有効性、第 5 回 HTLV-1 研究会、2012 年 8 月 25 日、東京大学医科学研究所 講堂、（東京都港区）。

中村龍文、松尾朋博、福田 卓、山口健太郎、佐々木 均、酒井英樹、川上 純、HAM に対する新規治療法ー経口プロスルチアミン療法の有効性ー、シンポジウム 3ー新薬開発シンポジウム、第 24 回日本神経免疫学会学術集会、2012 年 9 月 20 日、軽井沢プリンスホテル（長野県軽井沢市）。

（国際学会）

Nakamura T, Perspectives of HAM/TSP treatment, XII International Symposium of HTLV-1 in Brazil, Dec1-5, 2014, Reboucas Convention Center(São Paulo, Brazil).

Matsuo T, Nakamura T, Miyata Y, Ohba K, Sakai H, Oral administration of prosultiamine improved the symptoms in patients with overactive bladder associated with HTLV-1-related myelopathy/tropical spastic paraparesis, and also reduced urinary

biomarkers, International Continence Society 2014, Oct20-24, 2014, Centro de Convenções SulAmérica (Rio de Janeiro, Brazil).

Matsuo T, Nakamura T, Ohba K, Miyata Y, Sakai H, Oral administration of prosultiamine results in symptom improvement in patients with overactive bladder due to HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, XII International Symposium of HTLV in Brasil, Dec1-5, 2014, Reboucas Convention Center(São Paulo, Brazil).

【図書】(計 3 件)

中村龍文、医学書院、痙性対麻痺（HAM を含む）、今日の治療指針、2015、1973(897-899)

中村龍文、医学書院、HTLV-1 関連脊髄症、今日の神経疾患治療指針（第 2 版）、2013、1100(415-418)

辻野 彰、中村龍文、南江堂、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 2012-2014、2012、436(271-273)

【産業財産権】

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

【その他】

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 龍文 (NAKAMURA, Tatsufumi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・客員研究員
研究者番号：00198219

(2) 研究分担者

中村 英樹 (NAKAMURA, Hideki)
長崎大学・病院 (医学系)・講師
研究者番号：10437832

(3) 連携研究者

(なし)

研究者番号：