

令和元年6月7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：16K09702

研究課題名(和文)HAMで同定した制御性T細胞由来異常T細胞のウイルス因子による発生機構の解明

研究課題名(英文)Developmental mechanism of regulatory T cell-derived abnormal T cells identified by HAM

研究代表者

佐藤 知雄 (Sato, Tomoo)

聖マリアンナ医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：30387063

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)：HTLV-1 関連脊髄症(HAM)の病態には、HTLV-1 Taxによる制御性T細胞(Treg)のTh1様細胞への分化転換が重要であるが、個体レベルの病原性は明らかではなかった。そこで我々はこれまでのTax発現マウスと異なり、Tax発現がTregに限定され、1細胞あたり1コピーのTaxしか発現しないマウスを作成した。本マウスはホモでTaxを発現すると28匹中28匹(100%)6週令以内に死亡し、ヘテロでTaxを発現したマウスはすべて20週齢頃より尾と耳介に皮膚炎や潰瘍を生じた。こうして、TaxがTreg特異的に発現することの個体レベルの病原性が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、HTLV-1 Taxが発現する感染細胞の病原性が個体レベルにおいても重要であることが判明した。また、われわれが実施したHAM患者を対象とした抗CCR4抗体の早期臨床試験より、HTLV-1感染細胞を破壊することが、脊髄の炎症レベルを改善するだけでなく、臨床症状まで改善させる可能性が高く、これらを考え合わせると、HTLV-1感染細胞がHAMの病態に継続的に関与していることが明確となった。

研究成果の概要(英文)：Transdifferentiation of regulatory T cells (Treg) into Th1-like cells by HTLV-1 Tax is important for the pathogenesis of HTLV-1-associated myelopathy (HAM). However, the in vivo pathogenicity has not been clarified. Therefore, unlike previous Tax-expressing mice, we generated mice in which Tax expression was restricted to Treg and only one copy of Tax was expressed per cell. When expressed Tax homotypically, 28 of 28 mice (100%) died by 6 week-old, and all mice which expressed Tax heterogeneously had dermatitis and ulcers on the tail and pinna by 20 week-old. Thus, the in vivo pathogenicity of Treg-specific Tax expression was revealed.

研究分野：神経免疫学

キーワード：HTLV-1 Tax 制御性T細胞 HTLV-1関連脊髄症

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

### 1. 研究開始当初の背景

HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の病態は、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、それによる脊髄組織の破壊と変性であると考えられている<sup>1)</sup>。しかし、HTLV-1 感染細胞が HAM の病態に継続的に関与していることを直接証明した例はなく、その証明は今後の HAM 新薬開発の 1 つの方向性を示す点で非常に重要である。これまで研究代表者は、HTLV-1 が高頻度に CCR4 陽性の制御性 T 細胞 (Treg) に感染していること、またこの Treg が HTLV-1 の機能分子 Tax の作用によって炎症促進的な異常 T 細胞へ変化し、HAM の脊髄病変部に集積していることを発見し<sup>2)</sup>、HAM の病態における HTLV-1 感染細胞の継続的な関与が重要であると仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、HAM 患者で見出された Treg 由来異常 T 細胞の病原性を解明するために、研究代表者らが独自に作製した“Treg 特異的 Tax 発現マウス”を用いて、Foxp3 特異的 Tax 発現細胞の解析を実施した。また、この細胞の個体レベルの病原性を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1) Treg 特異的 Tax 発現マウスの解析

われわれは Treg 特異的 Tax 発現ノックインマウス (ノックインシステムによって高頻度な HTLV-1 感染が観察されている Treg に限定して Tax 発現を可能としたマウス) を作成した。本マウスはこれまでの Tax トランスジェニックマウスと異なり、Tax 発現細胞は Treg に限定され、しかも 1 細胞あたり 1 コピーの Tax しか発現していない。本研究において、本マウスの経過を観察すると共に、本マウスおよびコントロールマウスより脾臓細胞を採取し、フローサイトメトリーにて GFP と RFP の発現状態を解析した。

#### 2) Treg 特異的 Tax 発現マウスへの EAE (実験的自己免疫性脳脊髄炎) モデルの適用

Treg 特異的 Tax 発現マウスを用いて、HAM 患者で認められる脊髄病変部における Th1 様細胞の集積を再現するため、MOG35-55 ペプチドを免疫する実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) モデルを適用した。Tax 発現マウスにおける EAE の増悪を検出するため、抗原エマルジョンおよび百日咳毒の投与量を通常の半量投与とした。両マウスにつき、免疫 1 週間後より 1 ヶ月程度、体重および臨床症状スコアの経時的変化を評価した。

### 4. 研究成果

#### 1) Treg 特異的 Tax 発現マウスの解析

本研究期間中、ホモで Tax を発現すると 28 匹中 28 匹 (100%) 生後 6 週以内に死亡し、ヘテロで Tax を発現したマウスはすべて 20 週齢頃より尾と耳介に慢性的な皮膚炎および皮膚潰瘍を生じた。Tax 発現マウスの脾臓はコントロールと比較して腫脹していたため、脾臓に病因細胞が存在する考えた (写真)。そこで、Foxp3 遺伝子座に GFPcre、ROSA 遺伝子座に RFP 遺伝子のみを有するコントロールマウスの脾臓に GFP/RFP 発現細胞を確認し、Tax 発現細胞を RFP 発現細胞として検出する系を確立した。しかしながら、目的とする Tax 発現マウスの脾臓細胞において Tax 発現細胞 (RFP 発現細胞) を確認することができなかった。本マウスの Tax 発現は Foxp3 発現時に行われることから nTreg 分化が行われる胸腺で生じている可能性が考えられる。したがって、Tax 発現 Treg 細胞 (RFP 発現細胞) の探索には、週令の異なるマウスの胸腺を中心に実施することが必要と考えられた。



#### 2) Treg 特異的 Tax 発現マウスへの EAE (実験的自己免疫性脳脊髄炎) モデルの適用

慢性炎症症状出現前の 12 週齢マウス (n = 2) を使用した場合には、本マウスはコントロールマウス (n = 2) と同様の臨床経過を示し、早期発症、重症化、慢性化を認めなかった。これは MOG ペプチド刺激で中枢神経にリクルートされる細胞の中に Tax 発現異常 T 細胞がほとんど含まれていなかった可能性が考えられる。したがって、本研究により、今後、異常 T 細胞が確実に中枢神経にリクルートされるように、Treg 特異的 Tax 発現マウスを 2D2 マウス (全身の T 細胞が MOG を認識する T 細胞受容体を持つトランスジェニックマウス) と交配させ、HAM 発症モデルの確立を目指すという今後の方向性が明らかとなった。一方、31 週齢の Tax 発現マウス (n = 2) は感作 2 日後に死亡した。さらなる検討が必要なものの Tax 発現マウスは週齢によって EAE に対する感受性が異なる可能性が示唆された。

### < 引用文献 >

- 1) Yamano Y, Sato T. Clinical pathophysiology of human T-lymphotropic virus-type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Front Microbiol*, 9(3): 389, 2012. doi: 10.3389/fmicb.2012.00389.

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

- 2) Araya N, Sato T, Ando H, Tomaru U, Yoshida M, Coler-Reilly A, Yagishita N, Yamauchi J, Hasegawa A, Kannagi M, Hasegawa Y, Takahashi K, Kunitomo Y, Tanaka Y, Nakajima T, Nishioka K, Utsunomiya A, Jacobson S, Yamano Y. HTLV-1 induces a Th1-like state in CD4+CCR4+ T cells. *J Clin Invest*. 124(8):3431-42, 2014 doi: 10.1172/JCI75250.

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

1. Sato T, Yamano Y. Targeting human T lymphotropic virus type 1 infected cells with an anti C C chemokine receptor 4 antibody in T lymphotropic virus type 1 associated myelopathy. *Clin Exp Neuroimmunol*, 査読有, 9(3): 153-154, 2018. doi: 10.1111/cen3.12467
2. 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
3. 佐藤知雄. HAM の疾患活動性分類と治療. *医学のあゆみ*, 査読無, 267(10):756-760, 2018.
4. 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.
5. Kuramitsu M, Okuma K, Nakashima M, Sato T, Sasaki D, Hasegawa H, Umeki K, Kubota R, Sasada K, Sobata R, Matsumoto C, Kaneko N, Tezuka K, Matsuoka S, Utsunomiya A, Koh KR, Ogata M, Ishitsuka K, Taki M, Nosaka K, Uchimaruk, Iwanaga M, Sagara Y, Yamano Y, Okayama A, Miura K, Satake M, Saito S, Watanabe T, Hamaguchi I. Development of reference material with assigned value for human T-cell leukemia virus type 1 quantitative PCR in Japan. *Microbiol Immunol*, 査読有, 62(10):673-676, 2018. doi: 10.1111/1348-0421.12644.
6. Sato T, Coler-Reilly ALG, Yagishita N, Araya N, Inoue E, Furuta R, Watanabe T, Uchimaruk, 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.
7. Sawada L, Nagano Y, Hasegawa A, Kanai H, Nogami K, Ito S, Sato T, Yamano Y, Tanaka Y, Masuda T, Kannagi M. IL-10-mediated signals act as a switch for lymphoproliferation in Human T-cell leukemia virus type-1 infection by activating the STAT3 and IRF4 pathways. *PLoS Pathog*. 査読有, 13(9):e1006597, 2017. doi: 10.1371/journal.ppat.1006597.
8. Kuramitsu M, Sekizuka T, Yamochi T, Firouzi S, Sato T, Umeki K, Sasaki D, Hasegawa H, Kubota R, Sobata R, Matsumoto C, Kaneko N, Momose H, Araki K, Saito M, Nosaka K, Utsunomiya A, Koh K, Ogata M, Uchimaruk, Iwanaga M, Sagara Y, Yamano Y, Okayama A, Miura K, Satake M, Saito S, Itabashi K, Yamaguchi K, Kuroda M, Watanabe T, Okuma K, and Hamaguchi I. Proviral features of human T cell leukemia virus type 1 in carriers with indeterminate western blot analysis results. *J Clin Microbiol*, 査読有, 55(9):2838-2849, 2017. doi: 10.1128/JCM.00659-17.
9. 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.
10. 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.
11. 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 30 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、

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

- 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. 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.
  5. 八木下尚子、山内淳司、佐藤知雄、山野嘉久. 希少疾患 HAM に対する患者レジストリの活用. 第 30 回日本神経免疫学会, 2018 年.
  6. 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. 腎移植後 HTLV-1 関連疾患の発症に関する全国調査. 第 30 回日本神経免疫学会, 2018 年.
  7. 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.
  8. 八木下尚子、高橋克典、山内淳司、佐藤知雄、山野嘉久. HAM 患者レジストリ「HAM ネット」の運営. 第 5 回日本 HTLV-1 学会学術集会, 2018 年.
  9. 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.
  10. Yamano Y, Sato T, A. Coler-Reilly, Yanagisawa N, Araya N, Inoue E, Furuta R, Watanabe T, Uchimarū 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.
  11. 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.
  12. 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.
  13. Sawada L, Nagano Y, Hasegawa A, Ito S, Sato T, Yamano Y, Tanaka Y, Masuda T, Kannagi M. Potential contribution of IL-10-mediated STAT3 signals to push HTLV-1-infected cells towards proliferation by enhancing survivin and IRF4 expression. 第 4 回日本 HTLV - 1 学会学術集会, 2017 年.
  14. 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.
  15. 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.
  16. Araya N, Sato T, Yagishita N, Coler-Reilly A, Uchimarū 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.
  17. 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 Viruses, 2017.
  18. 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.
  19. Yamagishi M, Nakano K, Fujikawa D, Kobayashi S, Araya N, Sato T, Yagishita N, Iwanaga M, Utsunomiya A, Tanaka Y, Yamano Y, Watanabe T, Uchimarū K. Comparative Transcriptome Analysis of HTLV-1-infected Cells and ATL Cells. 18th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, 2017.
  20. 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

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

- International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, 2017.
21. 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.
  22. Tamaki K, Sato T, Coler-Reilly A, Inoue E, Tsugawa J, Yamano Y, Tsuboi Y. Biomarkers for Predicting Treatment Response in Patients with HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP). 18th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, 2017.
  23. Sawada L, Nagano Y, Hasegawa A, Ito S, Sato T, Yamano Y, Tanaka Y, Masuda T, Kannagi M. IL-10-mediated Signals as a Switch to Proliferation in HTLV-1-infected T Cells. 18th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, 2017.
  24. Tada M, Yamano Y, Sato T, Sasaki M, Sakate R, Hinomura A, Hirata M, Tanaka H, Kojima H, Kohara A, Matsuyama A. Investigation of Human Leukocyte Antigen on Human T-Lymphotropic Virus Type-1 Associated Myelopathy (HAM) by the Rare Disease Bank. 18th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, 2017.
  25. 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.
  26. Sawada L, 永野佳子, 長谷川温彦, 金井光, 佐藤知雄, 山野嘉久, 田中勇悦, 神奈木真理. IL-10 は survivin と IRF4 の誘導を介して HTLV-1 感染細胞の増殖を促進する. 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年.
  27. 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.
  28. 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.
  29. 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.
  30. 玉木慶子, 佐藤知雄, 津川潤, 山野嘉久, 坪井義夫. HAM 患者における治療効果を予測するバイオマーカーの検討, 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:

ローマ字氏名:

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。