

平成21年 5月 8日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591015
 研究課題名（和文） HTLV-1 関連脊髄症における新規な分子標的治療法の開発に関する研究
 研究課題名（英文） The development of a novel molecular targeting therapeutic intervention in HTLV-1-associated myelopathy (HAM)
 研究代表者 山野 嘉久 (YAMANO YOSHIHISA)
 聖マリアンナ医科大学・難病治療研究センター・准教授
 研究者番号：80445882

研究成果の概要：HTLV-1 関連脊髄症（HAM）は、HTLV-1 感染細胞に起因した過剰な免疫応答がその主病態である。しかし、感染細胞の中でどのT細胞サブセットがその主原因細胞であるかまだ明らかにされていない。本研究では、HAM の新規な分子標的治療法を開発するために、感染細胞に着目して研究を進め、HAM の過剰な免疫応答を誘発している主病因細胞を同定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経病態免疫学

1. 研究開始当初の背景

HTLV-1 関連脊髄症（HAM）は、HTLV-1 の感染が原因となって引き起こされた脊髄の慢性炎症を特徴とする神経難病であり、いまだ有効な治療法は確立されていない。これまでの研究により、HAM の主病態は HTLV-1 感染細胞に起因する過剰な免疫応答であると考えられている。

研究者はこれまで、HTLV-1 が CD4+CD25+T 細胞に優位に感染しており、免疫系を過剰に刺激していることを証明した (J. Exp. Med. 2004)。さらに、HAM の CD4+CD25+T 細胞において制御性 T 細胞の量的機能的減少が生じ

ていることを報告した (J. Clin. Invest. 2005)。

これらの結果は、HAM 患者において CD4+CD25+T 細胞が HTLV-1 の感染細胞であると共に、過剰な免疫応答を誘発し亢進させている主原因となっている病因 T 細胞を含んでいることを示唆しており、その病因細胞を同定し、細胞特異的分子の同定および制御方法の開発は、有効な治療法に結びつくと思われた。しかしながら、CD4+CD25+感染 T 細胞の中で、どの T 細胞サブセットが過剰な免疫応答を誘発している主病因細胞であるかはいまだ不明である。

そこで本研究では HAM 患者における

CD4+CD25+T細胞に着目して研究を進め、過剰な免疫応答を誘発し亢進させているT細胞サブセットの同定に関する研究を行った。

2. 研究の目的

HTLV-I 関連脊髄症 (HAM) の主病態は、HTLV-I 感染細胞に起因した過剰な免疫応答である。我々は、この感染細胞の中に、過剰免疫応答を誘発し病態の主原因となっているHAM病因細胞が存在し、その細胞の同定は根本的な治療法を開発する為に重要であると考へた。これまで、我々は感染細胞に着目して研究を進め、CD4+CD25+T細胞が主な感染細胞で、免疫応答を刺激していることを報告した。ところが、このCD4+CD25+T細胞は、健常者においては、過剰な免疫応答の抑制作用を有するT細胞集団(制御性T細胞:Treg)を含んでいることが知られている。近年我々は、HAM患者のCD4+CD25+T細胞において、Tregの量的機能的減少が存在していることを報告した。これらの研究成果を踏まえて、我々はHAM患者のHTLV-I感染T細胞において、過剰な免疫応答を誘発しているHAM病因細胞は、CD4+CD25+T細胞の中でも、Treg以外のT細胞集団に存在する可能性が高いと着想し、本研究では、その仮説を検証するために本細胞に着目して詳細な解析を行った。

3. 研究の方法

(1) HTLV-I 感染細胞の選択的な細胞表面マーカーの同定

HAMにおける感染細胞の詳細な解析を進めるにあたり、感染細胞特異的な細胞表面マーカーを同定することがまず重要であると考へた。近年、成人T細胞白血病(ATL)において、ケモカイン受容体であるCCR4陽性T細胞へのHTLV-I選択的感染が報告されている。HAM患者においてCCR4がさらなる感染細胞のマーカーとして有用であるか検討するために、HAM患者由来の末梢血単核球(PBMC)におけるCD4+T細胞を、CD25+CCR4+、CD25+CCR4-、CD25-CCR4+、CD25-CCR4-の4群にFACSソーティングにより分離し、それぞれの分画におけるウイルス感染率を定量的PCR法にて測定した。

(2) CD4+CD25+CCR4+T細胞におけるFoxp3の発現解析

CCR4は、健常者においてTh2細胞やTreg細胞に優位に発現していることが報告されており、Th2やTregが少ないと報告されているHAMの感染細胞においてCCR4の発現が高いのは矛盾がある。そこで、健常者、ATL、HAM患者の末梢CD4+CD25+CCR4+T細胞における、TregのマーカーであるFoxp3の発現を

FACSにて解析し、Foxp3陽性細胞と陰性細胞の割合を各群間で比較した。

(3) CD4+CD25+CCR4+T細胞中のFoxp3陽性細胞と陰性細胞における炎症性サイトカインの発現解析

(2)で明らかとなった、HAMで異常に増加しているCD4+CD25+CCR4+FoxP3陰性T細胞の、HAMの炎症性病態における重要性について検証するために、HAM、ATL、健常者由来のCD4+CD25+CCR4+FoxP3陰性T細胞におけるIL-2、IFN- γ 、IL-17の炎症性サイトカイン産生能について調べた。マグネティックビーズでnegative selectionしたCD4+T細胞をPMA&ionomycinで5時間刺激培養し、CD25、CCR4、Foxp3と各種炎症性サイトカイン(IL-2、IL-17、IFN- γ)に対する抗体で染色してFACSにて解析した。さらに、FACSにおける蛋白レベルの結果をmRNAレベルで検証するために、健常者、HAM患者、ATL患者からそれぞれCD4+CD25+CCR4+T細胞をFACSソーティングにて分離し、各炎症性サイトカインのmRNA発現量をreal-time RT-PCR法にて定量的に解析した。

(4) HAMにおけるIFN- γ 産生CD4+CD25+CCR4+T細胞の頻度と、臨床的重症度および疾患活動性との相関関係に関する検証

(3)において明らかとなった、HAM患者のHTLV-1感染CD4+CD25+CCR4+T細胞におけるIFN- γ の過剰産生細胞が、HAMの病態において重要な役割を果たしているか検証するために、HAM患者のPBMC中におけるIFN- γ 産生CD4+CD25+CCR4+T細胞の頻度を測定し、その頻度と臨床的重症度、および疾患活動性のマーカーである髄液中のネオプテリン濃度との相関性について統計学的に検証した。

(5) HAM患者におけるCD4+CD25+CCR4+T細胞の炎症促進性作用の有無に関する検証

HAM患者のPBMCは、特に抗原刺激を加えなくても自発的に増殖する作用(自発的増殖応答)を有することが知られており、HAMにおける過剰な免疫応答を反映している現象であると考えられている。HAM患者におけるCD4+CD25+CCR4+T細胞が、過剰な免疫応答という病態において促進的に作用しているか検証するために、健常者およびHAM患者において、CD4+CD25+CCR4+T細胞をPBMCから除去することにより、PBMCの自発的増殖応答が減弱するか検証した。

4. 研究成果

(1) HAM 患者において、HTLV-1 は CD4+CD25+CCR4+ T 細胞に統計学的に有意に感染していた ($p=0.0017$) (図 1)。

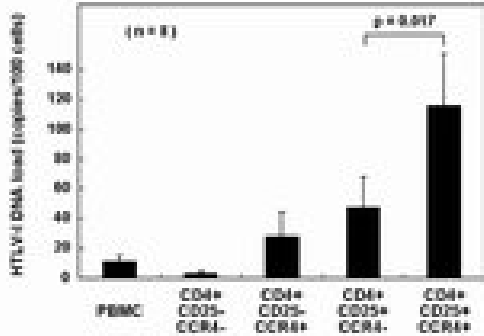


図 1

(2) HAM 患者において CD4+CD25+CCR4+Foxp3^{high} T 細胞 (Treg) の頻度は健常者 (HD) に比較して増加していなかったが、CD4+CD25+CCR4+ Foxp3 陰性 T 細胞の頻度が異常に増加していることが判明した ($p=0.002$) (図 2)。

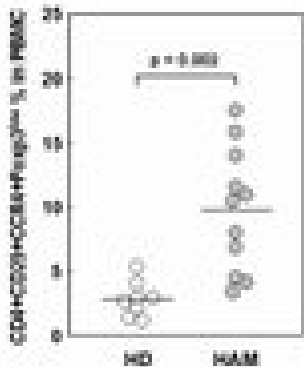


図 2

(3) 健常者において、CD4+CD25+CCR4+ T 細胞のうち、Foxp3 陽性細胞は炎症性サイトカインを産生せず、Foxp3 陰性細胞は炎症性サイトカインを産生することが判明した。この結果は、Foxp3 の発現が細胞内におけるサイトカイン産生の制御に重要であることを示唆している。

さらに、HAM 患者における CD4+CD25+CCR4+ T 細胞 (HTLV-1 感染細胞) の Foxp3 陰性細胞集団において、IFN- γ 産生が異常に亢進し、IL-17 産生はむしろ低下していることが、蛋白レベル (図 3A)、および mRNA レベル (図 3B) において証明された。

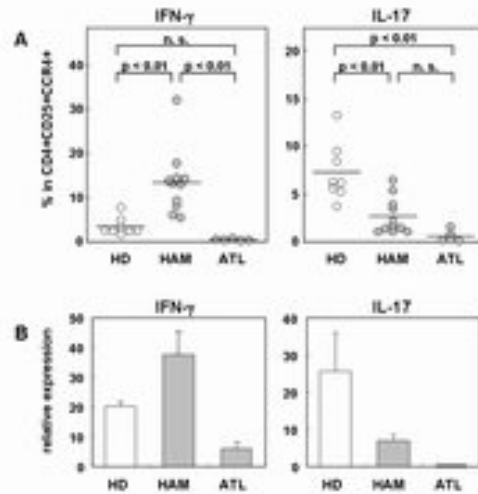


図 3

(4) HAM 患者において PBMC 中の IFN- γ 産生 CD4+CD25+CCR4+ T 細胞の頻度は、疾患特異的に異常に増加していた (図 4A)。さらに重要なことに、その頻度と臨床重症度 (図 4B) および疾患活動性を反映する髄液中ネオプテリン濃度 (図 4C) と統計学的に有意な相関関係が認められた。

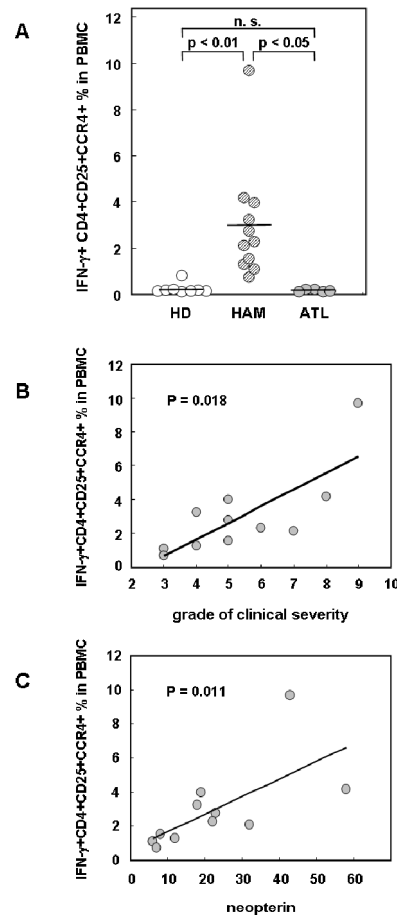


図 4

(5) HAM 患者において CD4+CD25+CCR4+ T 細胞を PBMC から除去して残りの細胞を培養すると、増殖応答は減弱化し (p=0.008)、HAM において CD4+CD25+CCR4+ T 細胞が自発的増殖応答という過剰免疫応答の重要な構成因子であることが示された。

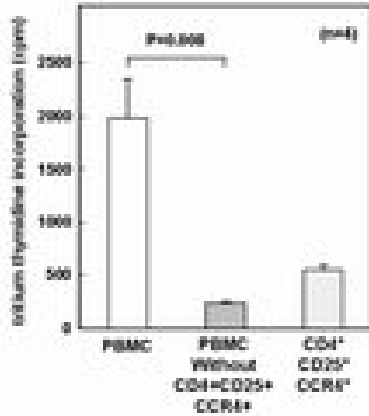


図 5

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 Izumi T., Fujii R., Izumi T., Nakazawa M., Yagishita N., Tsuchimochi K., Yamano Y., et al (員数: 23、7 番目)、Activation of Synovial Promoter in Rheumatoid Synovial Cells by a Novel Transcription Complex of Interleukin Enhancer Binding Factor 3 and GA Binding Protein.、Arthritis Rheum、60(1):63-72、2009、査読有
- ② Shimizu Y., Takamori A., Utsunomiya A., Kurimura M., Yamano Y., et al (員数: 14、5 番目)、Impaired Tax-specific T-cell responses with insufficient control of HTLV-1 in a subgroup of individuals at asymptomatic and smoldering stages.、Cancer Sci、100(3): 481-489、2009、査読有
- ③ Grant C., Oh U., Yao K., Yamano Y., Jacobson S.、Dysregulation of TGF-beta signaling and regulatory and effector T cell function in virus-induced neuroinflammatory disease.、Blood、111(12): 5601-5609、2008、査読有
- ④ Omurzakova N.A., Yamano Y., Sato T., Izumi T., Azakami K., et al (員数:

10、2 番目)、Increased prevalence of group A α -hemolytic streptococcus among an ethnic population in Kyrgyzstan detected by the rapid antigen detection test.、Molecular Medicine Reports、1: 869-874、2008、査読有

[学会発表] (計 18 件)

- ① 山野嘉久、他、HAM におけるウイルス感染 CD4+CD25+CCR4+FoxP3^{low} T 細胞の増加と機能異常、第 21 回日本神経免疫学会学術集会、2009 年 3 月 13 日、大阪
- ② 山野嘉久、他、IFN- γ producing CD4+CD25+CCR4+FoxP3^{low} T cells are increased and correlated with disease severity in HTLV-I associated neuroimmunological disease、第 38 回日本免疫学会総会・学術大会、2008 年 12 月 1 日、京都
- ③ 阿座上和子、山野嘉久他、Deficiency of innate immunity in HTLV-1 associated neuroimmunological disorder、第 38 回日本免疫学会総会・学術大会、2008 年 12 月 1 日、京都
- ④ Yamano Y., et al、Systemic Myotonic Pain Syndrome: A New Clinical Entity Found From Fibromyalgia.、13th Congress of the Asia Pacific League of association for Rheumatology、2008、September 24~27、横浜
- ⑤ Omurzakova N.A., Yamano Y. et al、Increased Prevalence Of Group A α -hemolytic Streptococcus Among Ethnic Population In Kyrgyzstan Defined By Rapid Antigen Detection Test.、13th Congress of the Asia Pacific League of association for Rheumatology、2008、September 24~27、横浜
- ⑥ Yamano Y., et al、Detection of Immuno-Pathogenic T cells In HTLV-I Associated Neuroimmunological Disease: Discovery of A New T Cell Population.、13th Congress of the Asia Pacific League of association for Rheumatology、2008、September 24~27、横浜
- ⑦ Azakami K., Yamano Y. et al、Deficiency of innate immunity in HTLV-1 associated neuroimmunological disease.、13th Congress of the Asia Pacific League of association for Rheumatology、2008、September 24~27、横浜
- ⑧ 佐藤知雄、山野嘉久、他、HTLV-I 関連脊髄症 (HAM) における Natural killer T

(NKT)細胞および樹状細胞の異常、第1回 HTLV-I 研究会、2008年8月23・24日、東京

- ⑨ 山野嘉久、他、HTLV-I 関連脊髄症 (HAM) 患者における IFN- γ 産生 CD4+CD25+ CCR4+FoxP3^{low} 異常 T 細胞の増加、第1回 HTLV-I 研究会、2008年8月24日、東京
- ⑩ 神奈木真理、山野嘉久、他、ATL およびその前段階における Tax 特異的 T 細胞の低応答性：免疫学的 ATL 危険因子とその回避、第1回 HTLV-I 研究会、2008年8月24日、東京
- ⑪ 佐藤知雄、山野嘉久、他、HTLV-I 関連脊髄症 (HAM) における自然免疫系の異常、第12回日本神経ウイルス研究会学術集会、2008年7月18日、鹿児島
- ⑫ 新谷奈津美、山野嘉久、他、HTLV-1 tax による RhoGTPase を介した細胞運動機能への作用、第12回日本神経ウイルス研究会学術集会、2008年7月18日、鹿児島
- ⑬ 山野嘉久、他、全身性筋緊張性疼痛症候群：線維筋痛症から見出された新しい疾患概念、第29回日本炎症・再生医学会、2008年7月10日、東京
- ⑭ 阿座上和子、山野嘉久、他、HAM (HTLV-I 関連脊髄症) における NKT 細胞 第29回日本炎症・再生医学会、2008年7月9日、東京
- ⑮ 山野嘉久、他、HTLV-I 関連脊髄症 (HAM) 患者における CD4+CD25+FoxP3^{low} 異常 T 細胞の増加、第49回日本神経学会総会、2008年5月15~17日、横浜
- ⑯ 清水由紀子、山野嘉久、他、無症候性キャリアーにおける T 細胞の低応答性、第55回日本ウイルス学術集会、2007年10月21日、札幌
- ⑰ 山野嘉久、他、線維筋痛症における筋不随意運動、第1回線維筋痛症研究会、2007年9月24日、東京
- ⑱ Yamano Y., et al, High expression of CD28 co-stimulatory molecules and low expression of CTLA-4 inhibitory molecule on CD4+CD25+ T cells in HTLV-I associated myelopathy (HAM/TSP).、The 13th International conference on Human Retrovirology: HTLV-I and Related Viruses、2007、May 23、箱根

[図書] (計 2 件)

- ① 菅付加代子、他、特定非営利活動法人日本から HTLV ウイルスをなくす会、教えて! HTLV-1 のこと「HTLV-1 ウイルスと免疫の関係」、2008年、169-181
- ② 石毛直道 編、はる書房、世界の発酵乳

「現代キルギスの健康問題の一側面」、2008年、84-91

[産業財産権]
○出願状況 (計 2 件)

名称：HTLV-I 関連脊髄症を治療または予防するための医薬、および HTLV-I 関連脊髄症の患者に対する抗体療法の効果を予測する方法
発明者：山野嘉久、新谷奈津美
権利者：聖マリアンナ医科大学
種類：特願
番号：2008-274514
出願年月日：2008年10月24日
国内外の別：国内

名称：自己免疫疾患の病因細胞の分離方法および自己免疫疾患の診断補助方法
発明者：山野嘉久
権利者：聖マリアンナ医科大学
種類：特願
番号：2008-180580
出願年月日：2008年7月10日
国内外の別：国内

[その他]

山野嘉久、「HAM の最前線」HAM 患者会全国大会にて講演 2008年4月20日、横浜

HAM 患者会「アトムの会」関東支部 顧問、

NPO 法人「日本から HTLV-1 ウイルスをなくす会」 顧問

6. 研究組織

(1) 研究代表者
山野 嘉久 (YAMANO YOSHIHISA)
聖マリアンナ医科大学・
難病治療研究センター・准教授
研究者番号：80445882

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし