

## 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 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790833

研究課題名（和文） HTLV-1 関連脊髄症（HAM）における新規病原性 T 細胞の発生機構に関する研究

研究課題名（英文） The molecular mechanism in the development of pathogenic T-cell through HTLV-1 in HTLV-1-associated myelopathy (HAM)

研究代表者

新谷 奈津美 (ARAYA NATSUMI)

聖マリアンナ医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：80440353

研究成果の概要（和文）：

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炎症と考えられている。本研究では、我々が以前同定した HTLV-1 の主な感染細胞である CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> T 細胞が、HAM においては HTLV-1 ウイルス依存的に炎症性サイトカインである IFN- $\gamma$  を異常産生する HAM 病因細胞へと可塑的に変化する分子メカニズムについて解析を行った。その結果、HAM 患者の HTLV-1 感染細胞における Tax の発現が、IFN- $\gamma$  の発現を直接誘導する転写因子 T-bet の転写活性化を介して IFN- $\gamma$  の発現を誘導することにより、炎症促進的な IFN- $\gamma$  産生細胞への可塑的変化をもたらし、HAM 病態形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In HTLV-1 associated myelopathy (HAM), the pathogenesis is known as HTLV-1 infected CD4<sup>+</sup> T-cells triggered hyper immune response, which leads to chronic inflammation of the central nervous system. In this study, it was demonstrated that HTLV-1 Tax induced the inflammatory cytokine IFN- $\gamma$  production through the transcriptional activation of T-bet in HTLV-1 infected CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> T-cells. These results suggested that HTLV-1 infection-induced IFN-g producing cells resulting in plasticity of infected cells may play an important role in the development and pathogenesis of HAM.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：HTLV-1・HAM・Tax・IFN- $\gamma$

## 1. 研究開始当初の背景

HTLV-1 は T 細胞に持続感染し、感染者の一部に脊髄の慢性炎症性疾患である HAM、別の一部に、成人 T 細胞白血病 (ATL) を発症する。両疾患において、HTLV-1 感染細胞は病因的な役割を果たしているため、感染細胞の詳細な解析は疾患発症機構の理解およびその制御に必須である。

最近、我々は、 $CD4^+CD25^+CCR4^+$  T 細胞が両疾患において HTLV-1 の共通の感染細胞であり、病因的な役割を果たしていることを報告した。この T 細胞群は、健常者では主に自己免疫疾患の発症抑制に重要な制御性 T 細胞 (Treg) と、免疫抑制的な T helper type 2 細胞 (Th2) から構成されている。興味深いことに、この  $CD4^+CD25^+CCR4^+$  T 細胞は、ATL では Treg が腫瘍性に増殖しており、一方、HAM では Treg、Th2 が減少し、Treg 機能を特徴付ける *Foxp3* 遺伝子の発現が低下し、本来産生されない炎症性サイトカイン IFN- $\gamma$  を産生する異常な T 細胞が増加していることを証明した。さらに、 $CD4^+CD25^+CCR4^+$  T 細胞において HTLV-1 機能遺伝子である *Tax* が HAM 特異的に高発現していた (*PLoS ONE* 2009)。これらの結果から、HTLV-1 は Treg に感染すると、ATL ではその Treg が腫瘍化して増殖するのに対し、HAM では細胞内での *Tax* 発現により、感染 T 細胞が『免疫抑制的な *Foxp3*<sup>high</sup> Treg』から『炎症促進的な IFN- $\gamma$  産生 *Foxp3*<sup>low</sup> 病原性 T 細胞』へと変化し、その病態形成に重要な役割を果たすという仮説を着想した。また最近、マウスを用いた研究で、*Foxp3*<sup>high</sup> Treg 細胞から炎症性サイトカイン産生性 *Foxp3*<sup>low</sup> T 細胞へと変化した細胞が、自己免疫性糖尿病を引き起こすことが報告された (Zhou X.ら *Nat. Immun.* 2009)。よって、Treg から誘導された異常 T 細胞は免疫性疾患での過剰免疫応答において病原的な役割を果たしていることが示唆される。しかしながら、Treg から病原性 T 細胞への誘導機構は未だ不明である。そこで申請者は、健常者と HAM 患者から  $CD4^+CD25^+CCR4^+$  T 細胞を分離して DNA マイクロアレイにより遺伝子発現比較を行い、HAM 特異的に発現している分子をリストアップした中から、本研究では IFN- $\gamma$  遺伝子発現を直接誘導する転写因子『Tbet』に着目し解析を行った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) によって引き起こされる HAM において、我々が新規に同定した炎症性サイトカイン IFN- $\gamma$  を異常産生し HAM 免疫病態

を引き起こす原因細胞と想定される HAM 病原性 T 細胞の HTLV-1 依存的な発症機構を明らかにし、HAM 病態の理解に貢献すること。

## 3. 研究の方法

### (1) 健常者 Treg への *Tax* 発現による病原性 T 細胞誘導の検証

Treg を主に含む非感染  $CD4^+CD25^+CCR4^+$  T 細胞を健常者から FACS ソートにより分離採取し、*Tax* 遺伝子を発現するレンチウイルスベクターを感染させ、*Tax* 発現細胞が病原性 T 細胞に特徴的な変化を示すか解析した。

### (2) *Tax* による Treg から病原性 T 細胞誘導の分子機序の解析

これまでに Treg の多い健常者由来  $CD4^+CD25^+CCR4^+$  T 細胞と病原性 T 細胞の多い HAM 患者由来の  $CD4^+CD25^+CCR4^+$  T 細胞を分離し、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現比較を行い、HAM 由来の細胞において *Ifn- $\gamma$*  遺伝子発現を直接誘導する転写因子 Tbet の発現亢進を見出していた。そこで、*Tax* による Treg から病原性 T 細胞への誘導における Tbet の関与を解析した。

- ① 多数例の健常者および HAM 患者  $CD4^+CD25^+CCR4^+$  T 細胞を分離し、HAM 由来細胞における特異的な Tbet の発現上昇を FACS、Real-time RT-PCR 法により解析した。
- ② 薬剤誘導 *Tax* 発現細胞株 JPX-9 を用いて、*Tax* 発現による Tbet および IFN- $\gamma$  の継時的な発現上昇変化を Real-time RT-PCR 法により解析した。
- ③ クロマチン免疫沈降法により Tbet 転写制御領域への *Tax* の相互作用の有無の検討および *Tax* の相互作用領域の決定を行った。

### (3) HAM 病変部における HAM 病原細胞の検出

- ① HAM 患者脊髄標本における  $CCR4^+$  発現細胞中の Tbet、IFN- $\gamma$ 、CXCR3 (Th1 マーカー受容体) の発現を免疫染色法により解析した。
- ② HAM 患者髄液細胞における  $CD4^+CCR4^+CXCR3^+$  細胞を FACS により解析した。
- ③ HAM 患者髄液細胞中  $CD4^+CCR4^+CXCR3^+$  における  $CD25$  発現率を解析した。

## 4. 研究成果

本研究において、IFN- $\gamma$  の発現を直接誘導する Th1 マスター転写因子 Tbet が JPX-9 細胞または HAM 由来  $CD4^+CD25^+CCR4^+$  T 細胞において *Tax* 依存的に発現誘導されることを見出した。また、Tbet の遺伝子発現における *Tax* の作用機構の解析により、HTLV-1 感染細胞株 MT-2 細胞を用いた免疫沈降実験から内在性 *Tax* と Sp1 の相互作用を確認し、*Tax* および Sp1 が Tbet プロモーターにリクルートされていることを示した。また、Tbx21/Tbet プ

ロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイから Tax が Sp1 依存的に Tbx21/T-bet プロモーター活性化し得ることを明らかにした。さらに、健常者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>T 細胞への Tax 導入により、Treg の抑制機能の減弱を明らかにした。以上の結果から、HAM の HTLV-1 感染細胞における Tax の発現は、T-bet の転写活性化を介して IFN- $\gamma$  の発現を誘導することにより、炎症促進的な IFN- $\gamma$  産生 Th1 様細胞への可塑的变化をもたらし、HAM 病態形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。また、HAM 病変部である脊髄病理および髄液細胞における解析より、HAM 病変部には HTLV-1 感染細胞株の指標となる CCR4<sup>+</sup>細胞が多数存在し、それらの細胞の多くが T-bet、IFN- $\gamma$  および Th1 マーカーである CXCR3 を共発現していることを観察した。加えて、髄液細胞中に多数存在する CD4<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>細胞の 70%は CD25<sup>+</sup>細胞であることを確認した。よって、HAM 病変部において実際に可塑的变化した HAM 病変細胞の存在を確認し、HAM 病態形成に重要な役割を担っていることを示唆する結果を得た。

#### 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 10 件)

1. 山野嘉久、佐藤知雄、安藤仁、新谷奈津美、八木下尚子 HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の治療法を確立していくために—その現状と展望— **日本臨牀**, 査読無, 70(4); 705-713, 2012.
2. Sato T., Fujii R., Konomi K., Yagishita N., Aratani S., Araya N., Aono H., Yudoh K., Suzuki N., Beppu M., Yamano Y., Nishioka K., Nakajima T. Overexpression of SPACIA1/SAAL1, a new gene that is involved in synovocyte proliferation, accelerates the progression of synovitis in mice and humans. **Arthritis Rheum**, 査読有, 63(12): 3833-3842, 2011. DOI:10.1002/art.30617.
3. Kitazono T., Araya N., Yamano Y., Yamada Y., Nakamura T., Tanaka Y., Inoue M., Ozaki S. Corresponding Author: Okazaki T. Advantage of higher-avidity CTL specific for Tax against human T-lymphotropic virus-1 infected cells and tumors. **Cell Immunol**, 査読有, 272(1):11-17, 2011. DOI:10.1016/j.cellimm.2011.10.002
4. Araya N., Sato T., Yagishita N., Ando H., Utsunomiya A., Jacobson S., Yamano Y. Human T-Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) and Regulatory T Cells in HTLV-1-Associated Neuroinflammatory Disease. **Viruses**, 査読有, 3: 1532-1548, 2011. DOI:10.3390/v3091532
5. Sato T., Azakami K., Ando H., Araya N., Yamano Y. Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and innate immunity. **Inflammation and Regeneration**, 査読有, 31(1): 110-115, 2011. DOI: org/10.2492/inflammregen.31.110
6. Araya N., Takahashi K., Sato T., Nakamura T., Sawa C., Hasegawa D., Ando H., Aratani S., Yagishita N., Fujii R., Oka H., Nishioka K., Nakajima T., Mori N., Yamano Y. Fucoidan therapy decreases the proviral load in patients with human T-lymphotropic virus type 1-associated neurological disease. **Antivir Ther**, 査読有, 16(1):89-98, 2011.
7. Sato T., Konomi K., Fujii R., Aono H., Aratani S., Yagishita N., Araya N., Yudoh K., Beppu M., Yamano Y., Nishioka K., Nakajima T. Prostaglandin EP2 receptor signalling inhibits the expression of matrix metalloproteinase 13 in human osteoarthritic chondrocytes. **Ann Rheum Dis**, 査読有, 70(1): 221-226, 2011. DOI: 10.1136/ard.2009.118620
8. 安藤仁、八木下尚子、新谷奈津美、佐藤知雄、山野嘉久 HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の病態と治療 **医療と検査機器・試薬 34 (4) 別冊 機器・試薬**, 査読無, 34 (4) : 472-477, 2011.
9. 山野嘉久、佐藤知雄、新谷奈津美、安藤仁、八木下尚子 HAM 専門外来の取り組み **神経内科**, 査読無, 75 (4) 387-392, 2011.
10. Hasegawa D., Fujii R., Yagishita N., Matsumoto N., Aratani S., Izumi T., Azakami K., Nakazawa M., Fujita H., Sato T., Araya N., Koike J., Tadokoro M., Suzuki N., Nagata K., Senoo H., Friedman S. L., Nishioka K., Yamano Y., Itoh F., Nakajima T. E3 Ubiquitin Ligase Synoviolin Is Involved in Liver Fibrogenesis. **PLoS One**, 査読有, 5(10):e13590, 2010.

[学会発表] (計 17 件)

1. Araya N., Sato T., Utsunomiya A., Ando H., Yagishita N., Kannagi M., Tanaka Y., Yamano Y. The molecular mechanism in the plasticity of HTLV-1 infected CD4+CD25+CCR4+ T-cells through HTLV-1 in HAM/TSP. 第 40 回日本免疫学会学術集会 2011 年 11 月 27 日 千葉県千葉市 (幕張メッセ)
2. Sato T., Muto M., Araya N., Kojo S., Maekawa R., Utsunomiya A., Seino K., Yamano Y. Frequency and functional significance of  $\gamma \delta$  T cells in HTLV-1-infected individuals. (HTLV-1 感染者におけるガンマデルタ T 細胞の頻度および機能的な重要性). 第 40 回日本免疫学会学術集会 2011 年 11 月 27 日 千葉県千葉市 (幕張メッセ)
3. 新谷奈津美, 佐藤知雄, 安藤仁, 八木下尚子, 神奈木真理, 田中勇悦, 宇都宮與, 山野嘉久 HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) における HTLV-1 を介した病原性 T 細胞発生機構の解析 第 4 回 HTLV-1 研究会・合同班会議 2011 年 9 月 19 日 東京都 (東京大学弥生講堂)
4. 山野嘉久, 佐藤知雄, 新谷奈津美, 八木下尚子, 安藤仁, 宇都宮與, 出雲周二 HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の臨床病型: 臨床経過と検査所見に基づいた分類 第 4 回 HTLV-1 研究会 2011 年 9 月 19 日 東京都 (東京大学弥生講堂)
5. 佐藤知雄, 武藤真人, 新谷奈津美, 八木下尚子, 前川隆司, 宇都宮與, 神奈木真理, 清野研一郎, 山野嘉久 HTLV-1 感染者に適用可能なガンマデルタ T 細胞療法の開発 第 4 回 HTLV-1 研究会 2011 年 9 月 19 日 東京都 (東京大学弥生講堂)
6. Araya N., Sato T., Utsunomiya A., Ando H., Yagishita N., Kannagi M., Nakamura T., Tanaka Y., Jacobson S., Yamano Y. The plasticity of HTLV-1 infected CD4+CD25+CCR4+ T-cells through HTLV-1 tax in HAM/TSP. 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. 5 June 2011, Leuven, Belgium (Aula Pieter De Somer) .
7. Sato T., Muto M., Araya N., Maekawa R., Suzuki N., Utsunomiya A., Seino K., Yamano Y. Possibility of  $\gamma \delta$  T cell immunotherapy for HTLV-1-infected individuals. 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. 5 June 2011, Leuven, Belgium (Aula Pieter De Somer) .
8. Yamano Y., Sato T., Araya N., Yagishita N., Shimizu Y., Ando H., Utsunomiya A., Izumo S., Jacobson S., Suzuki N. Clinical subtype of HAM/TSP based on clinical course and laboratory findings. 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. 5 June 2011, Leuven, Belgium (Aula Pieter De Somer) .
9. 山野嘉久, 新谷奈津美, 佐藤知雄, 中村龍文, 森直樹, 鈴木登 HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) 患者でのフコイダン療法によるウイルス量の減少 第 52 回日本神経学会学術大会 2011 年 5 月 20 日 愛知県名古屋市 (名古屋国際会議場)
10. 新谷奈津美, 佐藤知雄, 安藤仁, 宇都宮與, 山野嘉久 HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) における IFN- $\gamma$  + CD4+CD25+CCR4+ 病原性 T 細胞発生の分子機構解析 第 33 回日本分子生物学会年会 2010 年 12 月 8 日 兵庫県神戸市 (神戸国際会議場)
11. Araya N., Sato T., Utsunomiya A., Jacobson S., Yamano Y. HTLV-1 promotes the plasticity of HTLV-1 infected T-cells through the regulation of T-bet transcriptional activation in HAM/TSP. Viruses, Genes and Cancer 2010, 1 October 2010, Venezia, Italy (Palazzo Cavalli Franchetti)
12. Sato T., Araya N., Suzuki N., Yamano Y. The plasma levels of soluble IL-2 receptor and CXCL10 are useful indicators for disease activity in patients with HAM/TSP. Viruses, Genes and Cancer 2010, 1 October 2010, Venezia, Italy (Palazzo Cavalli Franchetti)
13. 新谷奈津美, 佐藤知雄, 神奈木真理, 田中勇悦, 宇都宮與, 山野嘉久 HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) における HTLV-1 tax を介した IFN- $\gamma$  + CD4+CD25+CCR4+ 病原性 T 細胞発生機構の解析 第 3 回 HTLV-1 研究会・合同班会議 2010 年 8

月 東京（東京大学医科学研究所）

14. 佐藤知雄、新谷奈津美、安藤仁、山野嘉久  
HAM の疾患活動性血中バイオマーカー  
の同定およびステロイドの長期予後改善  
効果に関する検討 第 3 回 HTLV-1 研究  
会・合同班会議 2010 年 8 月 29 日 東  
京（東京大学医科学研究所）
15. 山野嘉久、佐藤知雄、新谷奈津美、安藤仁、  
神奈木真理、田中勇悦、宇都宮與 HAM  
における IFN- $\gamma$  + CD4+CD25+CCR4+病  
原性 T 細胞の発生機構とその脊髄炎症病  
巣へのリクルート機構に関する解析 第  
3 回 HTLV-1 研究会・合同班会議 2010  
年 8 月 29 日 東京（東京大学医科学研  
究所）
16. 北菌貴子、岡崎貴裕、新谷奈津美、山野嘉  
久、山田恭暉、田中勇悦、井上誠、尾崎承  
一 HLA-A2 トランスジェニックマウ  
スをもちいた Tax 特異的細胞障害性 T 細  
胞の解析 第 3 回 HTLV-1 研究会・合同  
班会議 2010 年 8 月 29 日 東京（東京  
大学医科学研究所）
17. 山野嘉久、佐藤知雄、新谷奈津美、鈴木登  
HAM における血中 sIL-2R と IP-10 のバイ  
オマーカーとしての有用性 第 5 1 回日  
本神経学会 2010 年 5 月 21 日 東京（東  
京国際フォーラム）

〔図書〕（計 1 件）

1. Sato T., Araya N., Yagishita N., Ando H.,  
Yamano Y. Host Immune System  
Abnormalities Among Patients with  
Human T-Lymphotropic Virus Type 1  
(HTLV-1)- Associated Disorders. T-Cell  
Leukemia, 65-80/234, InTech, 2011.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：HTLV-I 関連脊髄症の予防及び／又は治  
療のための医薬

発明者：山野嘉久、佐藤知雄、新谷奈津美

権利者：聖マリアンナ医科大学

種類：特願

番号：2010-94641

出願年月日：2010 年 4 月 16 日

国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ

<http://nanchiken.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新谷 奈津美 (ARAYA NATSUMI)

聖マリアンナ医科大学・医学（系）研究科  
（研究院）・助教

研究者番号：80440353

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし