

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 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：2013～2015
課題番号：25461293
研究課題名(和文) HTLV-1 関連脊髄症で同定した制御性 T 細胞由来異常 T 細胞の病原性に関する研究

研究課題名(英文) Pathogenicity of Treg-derived Th1-like cells identified in patients with HTLV-1-associated myelopathy

研究代表者
佐藤 知雄 (Sato, Tomoo)

聖マリアンナ医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30387063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000 円

研究成果の概要(和文)：最近、我々は HTLV-1 関連脊髄症患者において HTLV-1 Tax の作用により Treg が可塑的に変化し、たとえられる新規の異常 T 細胞を発見した。そこで本研究は、Treg 特異的 Tax 発現マウスを用いて、この異常 T 細胞の病原性について個体レベルで検討することを目的とした。Foxp3 発現細胞すべてに Tax を発現するマウスは 6 週齢以内に死亡し、一部の Foxp3 発現細胞で Tax を発現するマウスは、増悪と寛解を繰り返す耳介の皮膚炎と尾の潰瘍を認めた。したがって、免疫を制御する働きを有する Foxp3 発現細胞が Tax を発現することにより、個体レベルで炎症病態を惹起する病原性を発揮することが判明した。

研究成果の概要(英文)：Recently, we reported that HTLV-1 induces Treg-derived Th1-like cells via the viral protein Tax in patients with HTLV-1-associated myelopathy. However, the pathogenicity of the Treg-derived Th1-like cells induced by Tax remains unclear. In order to investigate the pathogenicity of the cells, we established mice that expressed Tax specifically in Treg (Foxp3+ cells). All the mice that expressed Tax in all of the Foxp3+ cells died in 6 weeks, and almost all the mice that expressed Tax in some of the Foxp3+ cells showed chronic ear skin inflammation and chronic tail skin ulcer. These results suggest that HTLV-1 tax may modulate Treg function of the Foxp3+ cells and Tax-expressing Foxp3+ cells induce chronic inflammatory conditions in mice.

研究分野：神経病態免疫学

キーワード：HTLV-1 Tax 制御性 T 細胞 HTLV-1 関連脊髄症

1. 研究開始当初の背景

近年、免疫疾患の病態形成において「制御性 T 細胞 (Treg) の可塑性」の重要性が注目されている¹⁾。これは一部の Treg が置かれた環境により Foxp3 発現や抑制機能を失い、他のヘルパー T 細胞へ "分化転換" することを意味するが、この「Treg の可塑性」がどのような原因によって生じるかという点については、いまだ不明である。HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) は、ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) 感染者の一部に発症する脊髄の慢性炎症性疾患であるが、最近、我々は HAM 患者において HTLV-1 の機能分子 Tax の作用によって Treg が可塑的に変化したと考えられる新規の異常 T 細胞を発見した。

2. 研究の目的

本研究では、Foxp3 を発現する Treg だけに HTLV-1 Tax を発現させた "Treg 特異的 Tax 発現マウス" を用いることで、HAM 患者において見出された Treg 由来異常 T 細胞の発生病態や病原性について個体レベルで検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Treg 特異的 Tax 発現マウス表現型解析

得られた産仔の尾組織を用いて PCR 法により遺伝子型を同定し、Foxp3 発現細胞特異的 Tax 発現マウス (ROSA26<RFP/Tax>/Foxp3<GFPCre>) およびコントロールマウス (ROSA26<RFP/+>/Foxp3<GFPCre>) を得た。この両マウスについて肉眼のおよび病理学的解析を実施した。病理学的解析は、麻酔後解剖し、主要臓器を 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定し、パラフィン包埋、HE 染色、鏡検により実施した。

(2) Treg 特異的 Tax 発現マウス免疫学的解析

Foxp3 発現細胞特異的 Tax 発現マウスおよびコントロールマウスより、脾細胞、胸腺細胞を単離し、無刺激または PMA+Ca イオノフォア刺激下で培養上清中に産生されるサイトカイン量を mouse Th1/Th2/Th17 CBA kit (BD バイオサイエンス) にて測定した。

(3) 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 発現マウス表現型解析

我々が独自に作製した "Treg 特異的 Tax 発現マウス" のうち、Foxp3 発現細胞すべてに Tax を発現するマウスは、6 週齢以内に 16 例全例死亡している。一方、Foxp3 発現細胞の一部でのみ Tax を発現したマウスは、18 週齢頃より増悪と寛解を繰り返す両耳介の皮膚炎と尾の皮膚潰瘍 (図 1A) が認められた。さらに進行すると両耳介の壊疽 (図 1B) を生じるといった一定の表現型が認められた。病理学的には、潰瘍部の非特異的な炎症像の他に、神経周囲の浮腫や線維化が認められた。

このように、本来 Treg として免疫を制御する働きを有する Foxp3 発現細胞が Tax を発現することによって、個体レベルで炎症病態を惹起するような病原性が発揮されることが判明した。

図 1A Tax 発現マウスの尾部潰瘍 (左: Tax 発現マウス、右: コントロールマウス)



図 1B Tax 発現マウス耳介の壊死部 (左: Tax 発現マウス、右: コントロールマウス)



(2) Treg 特異的 Tax 発現マウス免疫学的解析

Tax 発現マウスの脾細胞はコントロールマウスと比較して、無刺激培養下における Th1 サイトカイン (TNF- α 、IFN γ) の産生亢進が認められた (図 2)。この傾向は PMA+Ca イオノフォア刺激下においても同様であった (図 3)。一方、胸腺細胞は無刺激培養下では対象とした 7 つのサイトカインすべて検出感度以下で、PMA+Ca イオノフォア刺激下では両者に差を認めなかった。

図 2 Tax 発現マウス脾細胞の無刺激培養下におけるサイトカイン産生能(上:TNF- α 、下; IFN γ)

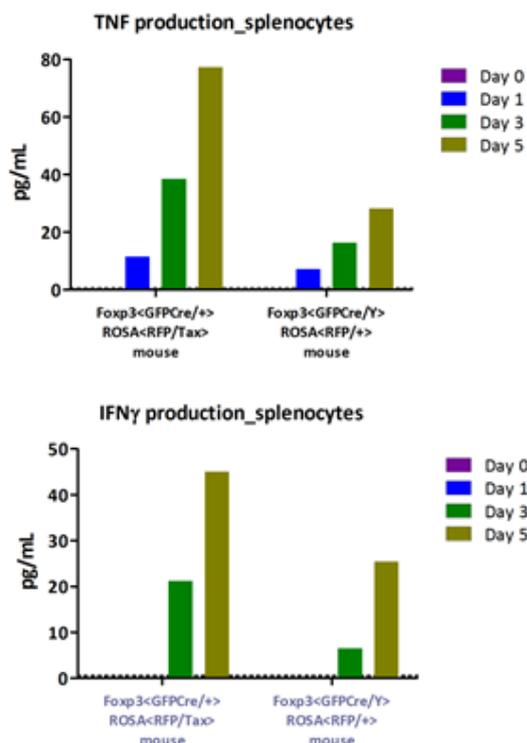
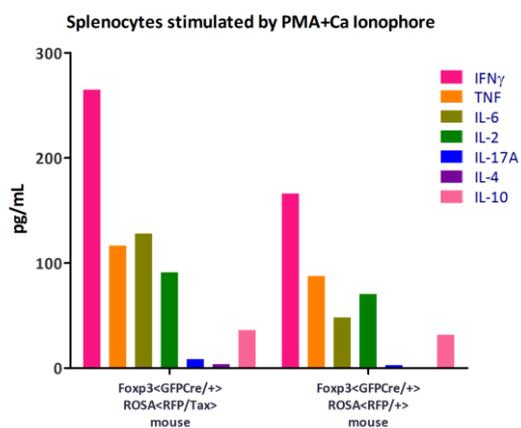


図 3 Tax 発現マウス脾細胞の PMA+Ca イオノフォア刺激培養下におけるサイトカイン産生能 (day 3)



(3) 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。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) Zhou X, Bailey-Bucktrout SL, Jeker LT, Penaranda C, Martínez-Llordella M, Ashby M, Nakayama M, Rosenthal W, Bluestone JA. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat Immunol*,10(9):1000-1007, 2009. DOI: 10.1038/ni.1774.

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 13 件)

1. Kuramitsu M, Okuma K, Yamochi T, Sato T, et al.(38 人中 4 番目) Standardization of Quantitative PCR for Human T-cell Leukemia Virus Type 1 in Japan: A Collaborative Study. *J Clin Microbiol*, 53(11):3485-3491, 2015. 査読有 DOI: 10.1128/JCM.01628-15.
2. Fujita H, Yagishita N, Aratani S, et al.(27 人中 16 番目) The E3 ligase synoviolin controls body weight and mitochondrial biogenesis through negative regulation of PGC-1 β . *EMBO J*, 34(8):1042-1055, 2015. 査読有 doi: 10.15252/embj.201489897.
3. 山野嘉久、新谷奈津美、八木下尚子、佐藤知雄. 免疫性神経疾患—基礎・臨床研究の最新知見—. *日本臨牀*, 73 (7) : 546-553, 2015. 査読無
4. Yamauchi J, Coler-Reilly A, Sato T, et al.(16 人中 3 番目) Mogamulizumab, an anti-CCR4 antibody, targets human T-lymphotropic virus type 1-infected CD8+ and CD4+ T cells to treat associated myelopathy. *J Infect Dis*, 211(2):238-248, 2015. 査読有 doi: 10.1093/infdis/jiu438
5. Ishihara M, Araya N, Sato T, Saichi N, Fujii R, Yamano Y, Sugano S, Ueda K. A plasma diagnostic model of human T-cell leukemia virus-1 associated myelopathy. *Ann Clin Transl Neurol*, 2(3):231-240, 2015. 査読有 doi: 10.1002/acn3.169
6. Araya N, Sato T, Ando H, et al.(19 人中 2 番目) HTLV-1 induces a Th1-like state in CD4+CCR4+ T cells. *J Clin Invest*, 124(8):3431-3442, 2014. 査読有 doi: 10.1172/JCI75250

7. Sato T, Yamano Y, Tomaru U, et al.(13人中1番目) Serum level of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 as a biomarker of disease activity in relapsing polychondritis. *Mod Rheumatol*, 24(1): 129-136, 2014. 査読有 doi: 10.3109/14397595.2013.852854
 8. Sato T, Coler-Reilly A, Utsunomiya A, et al.(15人中1番目) CSF CXCL10, CXCL9, and Neopterin as Candidate Prognostic Biomarkers for HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. *PLoS Negl Trop Dis.*, 7(10): e2479, 2013. 査読有 doi: 10.1371/journal.pntd.0002479
 9. Ando H, Sato T, Tomaru U, et al.(16人中2番目) Positive feedback loop via astrocytes causes chronic inflammation in virus-associated myelopathy. *Brain*, 136(9) : 2876-2887, 2013. 査読有 doi: 10.1093/brain/awt183
 10. Ishihara M, Araya N, Sato T, et al.(10人中3番目) Preapoptotic protease calpain-2 is frequently suppressed in adult T-cell leukemia. *Blood*, 121(21): 4340-4347, 2013. 査読有 doi: 10.1182/blood-2012-08-446922
 11. 山内淳司、八木下尚子、安藤仁、佐藤知雄, et al.(14人中4番目) Human T-lymphotropic virus type 1 感染者における腎移植の影響. *日本臨床腎移植学会雑誌* 1(1), 55-60, 2013. 査読有.
 12. 山野嘉久、佐藤知雄、宇都宮與. 白血病非定型白血病および特殊型 HTLV-1 関連脊髄症 (HAM). *別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ 血液症候群 (第2版)*, 23(III) : 195-199, 2013. 査読無.
 13. 山野嘉久、佐藤知雄 HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の病態・治療とバイオマーカー *日本臨床*, 71 (5) :870-875, 2013. 査読無.
- [学会発表] (計 38 件)
1. 石原誠人, 新谷奈津美, 佐藤知雄, et al.(8人中3番目) 定量膜プロテオーム解析による成人 T 細胞性白血病に対する治療標的の探索, 第74回日本癌学会学術集会, 2015年10月9日, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)
 2. Ishihara M, Araya N, Sato T, Saichi N, Fujii R, Yamano Y, Ueda K. Membrane Proteome Profiling to Discover Therapeutic Targets for HTLV-1 Associated Myelopathy: 14th Human Proteome Organization 27-30 September 2015, Vancouver, BC, Canada
 3. 佐藤知雄, 安藤仁, 高橋克典, et al.(8人中1番目) HTLV-1 関連脊髄症(HAM)における髄液細胞のケモカイン受容体解析. 第2回日本 HTLV-1 学会学術集会, 2015年8月22日~23日, 東京大学医科学研究所 (東京都港区)
 4. 山内淳司, 佐藤知雄, 八木下尚子, et al.(10人中2番目) HTLV-1 陽性ドナーから陰性レシピエントへの生体腎移植による HAM の特徴. 第2回日本 HTLV-1 学会学術集会, 2015年8月22日~23日, 東京大学医科学研究所 (東京都港区)
 5. 石原誠人, 新谷奈津美, 佐藤知雄, et al.(8人中3番目) 末梢血 CD4 陽性 T 細胞を用いた膜プロテオーム解析による HTLV-1 関連疾患に対する新規治療標的の探索. 第2回日本 HTLV-1 学会学術集会, 2015年8月22日~23日, 東京大学医科学研究所 (東京都港区)
 6. 石原誠人, 新谷奈津美, 佐藤知雄, et al.(8人中3番目) 定量膜プロテオーム解析によるヒト T 細胞性白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) 関連疾患に対する新規治療標的の探索. *日本プロテオーム学会 2015 年会 (JHUPRO 第13会大会)*, 2015年7月23日~24日, くまもと森都心プラザ (熊本県熊本市)
 7. 山内淳司, 柴垣有吾, 佐藤知雄, 八木下尚子, 新谷奈津美, 山野嘉久, 力石辰也. HTLV-1 陽性ドナーからの生体腎移植によりレシピエントに発症する HAM の特徴. 第60回日本透析医学会学術集会・総会, 2015年6月26日~28日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
 8. Araya N, Sato T, Tomaru U, et al.(16人中2番目) HTLV-1 Tax induces Th1 master regulator Tbet and thus IFN- γ in CD4+CCR4+ T-cells of virus-associated myelopathy patients. 17th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, 18-21 June 2015, Trois-Ilets, Martinique, French West Indies (FWI).
 9. Yamano Y, Yamauchi J, Coler-Reilly A,

- Sato T, et al.(11人中4番目)
Humanized anti-CCR4 antibody KW0761 targets HTLV-1-infected CD4+CCR4+ and CD8+CCR4+ T-cells to treat HAM/TSP. 17th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, 18-21 June 2015, Trois-Ilets, Martinique, French West Indies (FWI).
10. Ishihara M, Araya N, Sato T, Saichi N, Fujii R, Yamano Y, Ueda K. A three-factor plasma diagnostic model of human T-cell leukemia virus-1 associated myelopathy: 17th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, 18-21 June 2015, Trois-Ilets, Martinique, French West Indies (FWI).
 11. Kikuchi T, Sawabe A, Negishi Y, et al.(12人中11番目) Evaluation of clinical outcome measures for HAM/TSP. 17th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, 18-21 June 2015, Trois-Ilets, Martinique, French West Indies (FWI).
 12. Kimura M, Yamauchi J, Taisho H, Sato T, et al.(12人中4番目) Characteristics of HAM/TSP after kidney transplantation from HTLV-1 positive living donors. 17th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, 18-21 June 2015, Trois-Ilets, Martinique, French West Indies (FWI).
 13. Coler-Reilly A, Yagishita N, Sato T, et al.(10人中3番目) HAM-net national patient registration system reveals details of how Japanese patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis progress over time. 17th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, 18-21 June 2015, Trois-Ilets, Martinique, French West Indies (FWI).
 14. Yamauchi J, Sato T, Yagishita N, Araya N, Chikaraishi T, Shibagaki Y, Yamano Y. HTLV-1-Associated Myelopathy in Preoperatively HTLV-1 Negative Recipients after Kidney Transplantation from HTLV-1 Positive Donors. 52nd ERA-EDTA Congress, 28-31 May 2015, London, United Kingdom.
 15. 沢辺愛加, 根岸由衣, 野田和里, et al.(9人中8番目) 希少難病HAMの臨床的有効性評価指標の検討. 第56回日本神経学会学術大会, 2015年5月20日~23日, 朱鷺メッセ(新潟県新潟市)
 16. 山野嘉久, 山内淳司, 大勝秀樹, 佐藤知雄, et al.(9人中4番目) HTLV-1陽性ドナーからの生体腎移植によるHAMの発症率と特徴. [High incidence of HAM after Kidney transplantation from HTLV-1 positive donors.], 第56回日本神経学会学術大会, 2015年5月20日~23日, 2015年5月20日~23日, 2015年5月20日~23日, 朱鷺メッセ(新潟県新潟市)
 17. 佐藤知雄, 新谷奈津美, 安藤仁, et al.(10人中1番目) HAMにおけるTh1様異常T細胞の発生機構および病態への関与, 第19回日本神経感染症学会総会学術集会・第26回日本神経免疫学会学術集会合同学術集会, 2014年9月4日~6日, 金沢歌劇座(石川県金沢市)
 18. 山内淳司, 新谷奈津美, 安藤仁, et al.(10人中8番目) HAMにおける抗CCR4抗体療法の有用性およびCCR4+CD8+T細胞の異常に関する検討. 第19回日本神経感染症学会総会学術集会・第26回日本神経免疫学会学術集会合同学術集会, 2014年9月4日~6日, 金沢歌劇座(石川県金沢市)
 19. 佐藤知雄, 井上永介, 新谷奈津美, et al.(9人中1番目) HTLV-1関連脊髄症(HAM)の臨床的評価指標の有用性に関する検討. 第1回日本HTLV-1学会学術集会, 2014年8月22日~24日, 東京大学医科学研究所(東京都港区)
 20. 新谷奈津美, 佐藤知雄, 安藤仁, et al.(12人中2番目) HTLV-1によるHTLV-1関連脊髄症(HAM)病原性T細胞の発生機構の解析. 第1回日本HTLV-1学会学術集会, 2014年8月22日~24日, 東京大学医科学研究所(東京都港区)
 21. 山内淳司, 新谷奈津美, 安藤仁, et al.(10人中8番目) HAMにおける抗CCR4抗体療法の有用性およびCCR4+CD8+T細胞の異常に関する検討. 第1回日本HTLV-1学会学術集会, 2014年8月22日~24日, 東京大学医科学研究所(東京都港区)
 22. 石原誠人, 新谷奈津美, 佐藤知雄, et al.(9人中3番目) CD4陽性T細胞を用いた膜プロテオーム解析によるHTLV-1関

連脊髄症に対する新規治療標的分子の探索. 第1回日本 HTLV-1 学会学術集会, 2014年8月22日~24日, 東京大学医科学研究所 (東京都港区)

23. Ishihara M, Araya N, Sato T, et al.(9人中3番目) Quantitative membrane proteome profiling to discover therapeutic targets for adult T-cell leukemia (ATL). AACR Annual Meeting 2014, 5-9 April, 2014, San Diego, USA.
24. 山野嘉久, Ariella Coler-Reilly, 八木下尚子, 佐藤知雄, et al.(8人中4番目) HAM患者登録システム (HAM ネット) の構築による疫学調査と満足度調査の概要報告, 第34回日本臨床薬理学会学術総会, 2013年12月4~6日, 東京国際フォーラム (東京都千代田区)
25. 山野嘉久, 山内淳司, 新谷奈津美, et al.(8人中8番目) HAMにおける抗CCR4抗体製剤の有用性に関する検討, 第25回日本神経免疫学会学術集会, 2013年11月27~29日, 海峡メッセ下関 (山口県下関市)
26. 石原誠人, 新谷奈津美, 佐藤知雄, 宇都宮典, 中川英刀, 山野嘉久, 植田幸嗣. 成人T細胞白血病ウイルス関連疾患における新規治療標的の同定を目的とした定量膜プロテオームプロファイリング. 第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月3~5日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
27. Ishihara M, Araya N, Sato T, et al.(9人中3番目) Label free quantitative proteome analysis on cerebrospinal fluid to discover severity grade markers for Human T-cell leukemia virus type 1 associated myelopathy/tropic spastic paraparesis (HAM/TSP). HUPO 2013 12th Annual World Congress, 17 Sep, 2013, パシフィコ横浜 (Yokohama, Kanagawa)
28. 佐藤知雄, 新谷奈津美, 安藤仁, et al.(7人中1番目) HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の治療標的としての CCR4+CD4+T 細胞. 第6回 HTLV-1 研究会・シンポジウム, 2013年8月23~25日, 東京大学医科学研究所 (東京都港区)
29. Coler-Reilly A.L.G., Hashimoto M, Yagishita N, Sato T, et al.(10人中4番目) The "HAM-net" HAM/TSP Patient Registration System and its Applications: A Sampling of

Epidemiological Findings in Japan. 第6回 HTLV-1 研究会・シンポジウム, 2013年8月23~25日, 東京大学医科学研究所 (東京都港区)

30. Sato T, Ando H, Tomaru U, et al.(11人中1番目) Virus-induced CXCL10-CXCR3 positive feedback loop via astrocytes is critical for maintaining chronic inflammatory lesions in HAM/TSP. The 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, 26-30 June, 2013, Montréal, Canada.
31. Yamano Y, Sato T, Coler-Reilly A, et al.(10人中2番目) CXCL10, CXCL9 and Neopterin in cerebrospinal fluid as Candidate Prognostic Biomarkers for HAM/TSP. The 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, 26-30 June, 2013, Montréal, Canada.
32. Coler-Reilly A, Hashimoto M, Yagishita N, Sato T, et al.(10人中4番目) Nation-wide epidemiological study in Japan on HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis using HAM-net, a novel patient registration system. The 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, 26-30 June, 2013, Montréal, Canada.

[図書] (計 0 件)
該当なし

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)
該当なし
○取得状況 (計 0 件)
該当なし

[その他]
ホームページ等 <http://nanchiken.jp/>

6. 研究組織
- (1)研究代表者
佐藤 知雄 (SATO, Tomoo)
聖マリアンナ医科大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・講師
研究者番号: 30387063
- (2)研究分担者
該当なし
- (3)連携研究者
該当なし