

## 115. ウイルス感染細胞に起因する HAM 病態形成機構の解析

新谷 奈津美

聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター 病因・病態解析部門

Key words : HTLV-1, HTLV-1 関連脊髄症 (HAM), Tax, Th1, CCR4

### 緒言

ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) の感染者は我が国に 100 万人以上存在し、その一部に発症する HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) や成人 T 細胞白血病 (ATL) は、有効な治療法に乏しい予後不良の深刻な病気である。HAM の病態の特徴は、HTLV-1 感染細胞に起因した過剰な免疫応答による脊髄炎症と考えられているが、その発症機構には不明な点が多い。従って、感染細胞に着目した解析は HAM 発症機構の理解及びその制御に必須である。HTLV-1 は免疫の司令塔である CD4<sup>+</sup>ヘルパー T 細胞 (Th) に持続感染する。Th は Th1、Th2、Th17、制御性 T 細胞 (Treg) などのサブセットから構成され、通常はバランスを保って存在するが、そのバランス破綻は宿主に免疫異常を引き起こす<sup>1)</sup>。我々は、HAM において主に Treg、Th2 から構成される CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> T 細胞に HTLV-1 の優位な感染を明らかにし、この感染細胞が炎症性サイトカイン IFN- $\gamma$  を異常産生する Th1 様細胞に変化し増加し、疾患活動性や過剰免疫応答と相関していることを報告した<sup>2)</sup>。よって、HAM 病態形成におけるこの細胞群の病原性 T 細胞としての重要性を予想し、本研究では、その発生機構を明らかにし病態への関与を解析した。

### 方法および結果

#### 1. HTLV-1 による病原性 T 細胞発生の分子機構の解析

HTLV-1 は宿主細胞の遺伝子発現に作用する機能性因子 Tax を発現する。その発現は HAM 感染細胞特異的に上昇し、HAM の免疫応答と相関することを報告している<sup>2,3)</sup>。従って、本研究では、HAM における持続的な炎症を特徴付けているウイルス因子として Tax に着目し、解析を進めた。まず、塩化カドミウム依存的に Tax を発現する細胞株 (JPX-9 細胞) を用いた検討により、Tax 発現誘導 3 日後から IFN- $\gamma$  の発現上昇を観察した (図 1A)。よって、Tax が間接的に IFN- $\gamma$  の発現誘導に関与し得ることが予想された。そこで、Tax による IFN- $\gamma$  誘導を仲介し得る分子を探索するため、DNA マイクロアレイ法を用いた健常者 (HD)、HAM、ATL の CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> T 細胞における網羅的遺伝子発現比較解析を行った。その結果、HAM 特異的に発現上昇する遺伝子群より T-bet を同定した。T-bet は、Th1 分化を決定するマスター因子であり、IFN- $\gamma$  発現を直接誘導する転写因子である。JPX-9 細胞を用いた検討において、塩化カドミウムを添加して Tax 発現の誘導開始から 6 時間という早期の段階から T-bet/Tbx21 の発現上昇が観察されたことから、Tax による直接的な T-bet の誘導作用が予想された (図 1B)。複数例の HD と HAM 患者由来 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> T 細胞における T-bet/Tbx21 の発現比較では、HD よりも HAM 由来細胞における T-bet/Tbx21 発現の方が高値を示し (図 1C)、その T-bet/Tbx21 発現は、Tax siRNA の導入による Tax 発現阻害により抑制された (図 1D)。また、HAM 患者由来 CD4<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>細胞では培養することにより Tax タンパク質の発現上昇認められるが、その Tax 発現に伴い T-bet、IFN- $\gamma$  タンパク質レベルでの発現が順次誘導されることが明らかとなった (図 1E、F)。従って、HTLV-1 感染細胞において Tax は T-bet を介して IFN- $\gamma$  を誘導していることが示唆された。

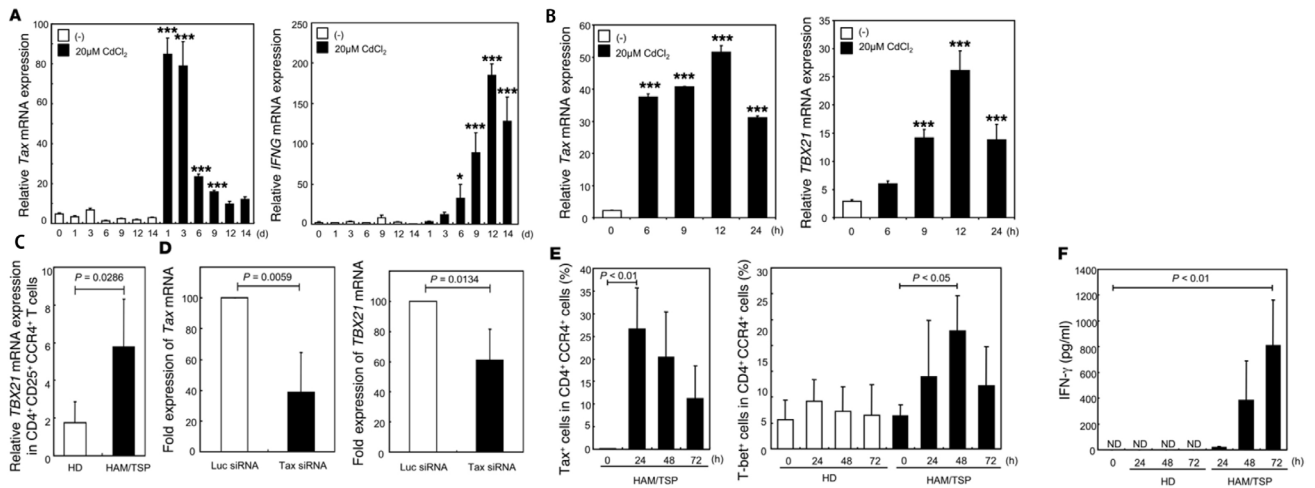


図1. TaxはTbetを介してIFN- $\gamma$ を誘導する

(A) JPY9細胞に20  $\mu$ M塩化カドミウムを添加し、図に示す培養時間毎のTaxおよびIFN- $\gamma$  mRNA発現変化を解析した。(B) JPY9細胞に20  $\mu$ M塩化カドミウムを添加し、図に示す培養時間毎のTaxおよびTbet/Tbx21 mRNA発現変化を解析した。(C) 健常者(HD: 4例)およびHAM患者(4例)のCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>T細胞におけるTbet/Tbx21 mRNA発現比較。(D) HAM患者のCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>T細胞(5例)へLuciferase(Luc)またはTaxに対するsiRNAをトランスフェクションし、24時間培養後のTaxおよびTbet/Tbx21 mRNA発現変化を解析した。(E、F) HDまたはHAM患者CD4<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>細胞(各4例)を24、48、72時間培養後のTax、Tbetの発現変化をFACSで解析した(E)。また、培養上清中のIFN- $\gamma$ 濃度変化をCytokine Beads Array(CBA)法により測定した(F)。Error bar:  $\pm$ SD。P値は、(A、B) 1-Way Anova、(C) Mann-Whitney *U* test、(D) paired *t* test、(E、F) Friedman testにより算出した。\**P* < 0.05, \*\*\**P* < 0.001。

そこで、Tbet/Tbx21の遺伝子発現におけるTaxの作用機構を解析した。その結果、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(図2A)、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ChIP assayにより示した(図2B)。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/Tbetプロモーターを活性化し得ることを明らかにした(図2C)。よって、TaxはSp1と相互作用し、Sp1依存的にTbx21/Tbetのプロモーターを活性化する転写コアクチベーターとして作用することを明らかとした。

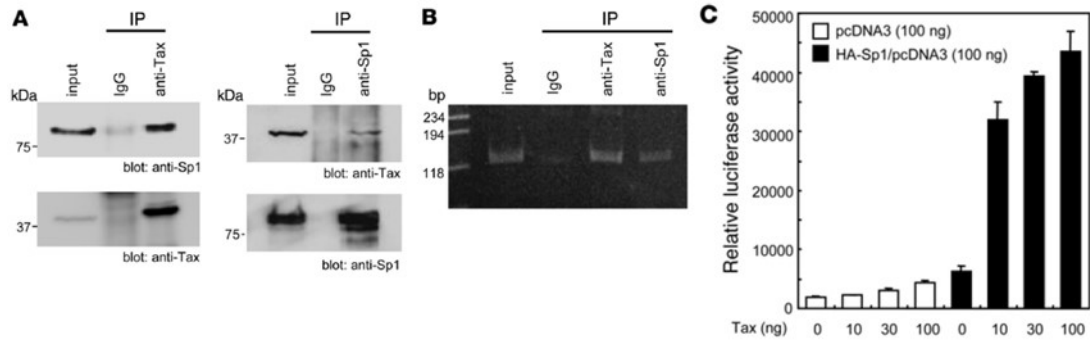


図2. Tax は Sp1 と協調的に T-bet/Tbx21 の転写を活性化する

(A) HTLV-1 感染細胞株 MT-2 核抽出液を用いた抗 Tax 抗体 (左) および抗 Sp1 抗体 (右) による免疫沈降。Tax と Sp1 は核内で相互作用することを示した。(B) MT-2 細胞を用いて T-bet/Tbx21 プロモーター領域 (-179~-59) に Tax および Sp1 が相互作用することを ChIP assay により検証した。(C) T-bet/Tbx21 プロモーター領域 (-179~-59) にルシフェラーゼ遺伝子をつないだものをレポーターとして、HEK293 細胞を用いてレポーターアッセイを行い、Tax が Sp1 依存的に T-bet/Tbx21 プロモーターを活性化することを示した。Error bar:  $\pm$ SD。

## 2. HAM 病変部における CCR4<sup>+</sup>Th1 様異常細胞の局在

次に、HAM 患者病変部における浸潤細胞の解析を行った。まず、HAM 患者脊髄組織を用いた蛍光抗体染色による解析から、脊髄組織の血管周辺部に多数の CCR4 発現細胞が存在し、それら細胞の大部分に T-bet、IFN- $\gamma$  及び Th1 特異的受容体 CXCR3 の共発現が認められた (図 3A)。また、HAM 患者髄液中の CCR4 発現細胞における HTLV-1 感染も確認された (図 3B)。さらに、髄液中の CD4<sup>+</sup>細胞における CCR4 と CXCR3 の発現解析から、CCR4<sup>+</sup>細胞の大多数が CXCR3 を共発現し (図 3C)、この CCR4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>異常 T 細胞は髄液 CD4<sup>+</sup>細胞中の 73.9 % を占めていることが示された (図 3D)。よって、HAM 病変部には、多数の Th1 様に変化した異常 CCR4<sup>+</sup>細胞の集積が認められ、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。

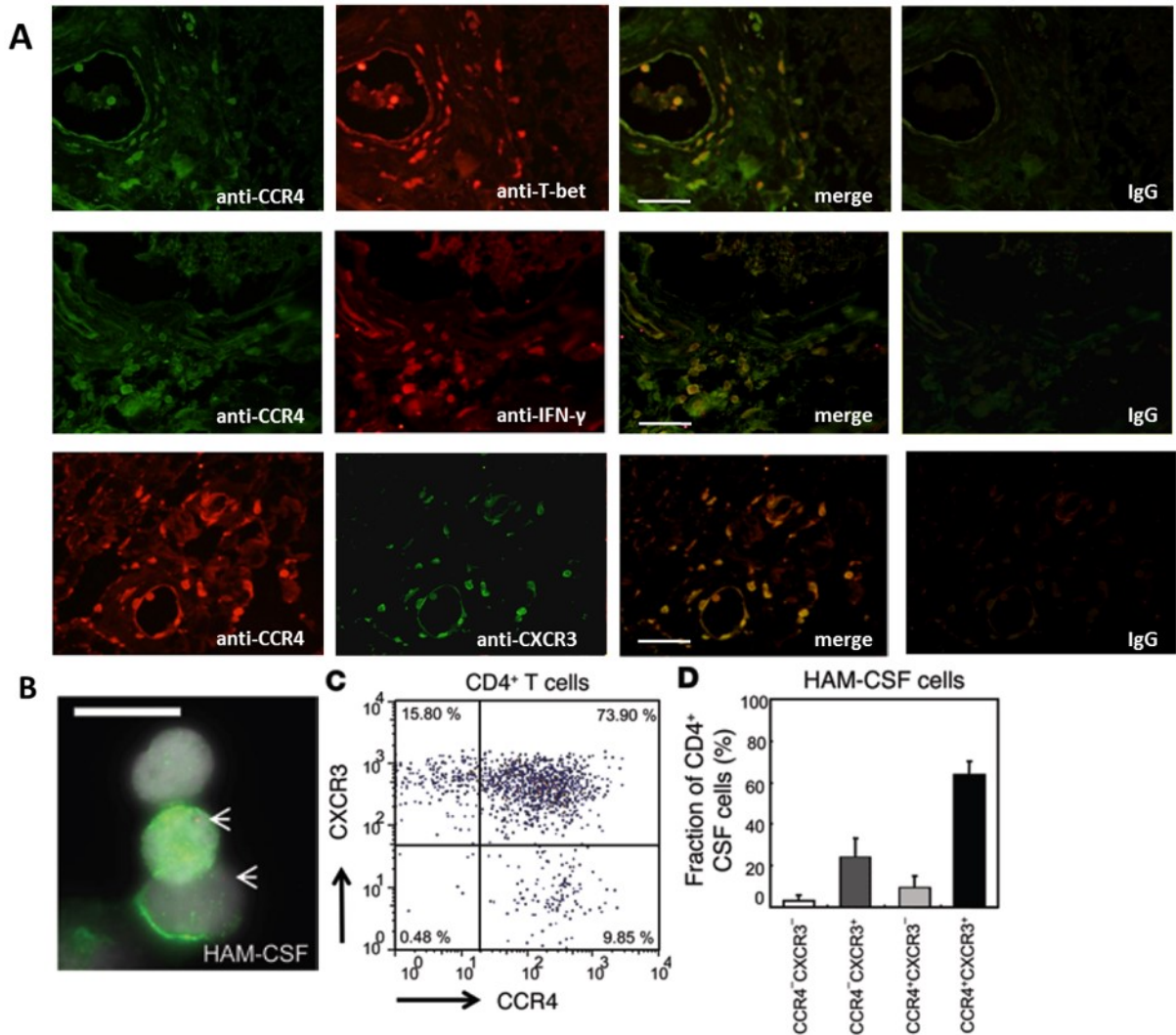


図3. HAM 患者病変部には CCR4<sup>+</sup>Th1 様異常細胞が集積している

(A) HAM 患者脊髄病理組織中の CCR4 発現細胞が T-bet、IFN- $\gamma$  または CXCR3 を共発現していることを蛍光免疫染色により解析した。(B) HAM 患者髄液細胞中の CCR4 発現細胞における HTLV-1 感染を蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションにより検出した (緑: CCR4、赤: HTLV-1)。(C、D) HAM 患者髄液 CD4<sup>+</sup>T 細胞における CCR4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>細胞の割合。Scale bars: 20  $\mu$ m。

### 3. HAM に対する抗 CCR4 抗体療法の有用性の検討

ATL の治療薬として既承認である抗 CCR4 抗体製剤<sup>4)</sup> の HAM に対する有用性を検討するため、HAM 患者由来 PBMC へ細胞障害活性 (ADCC 活性) を有する抗 CCR4 抗体 (KW-0761 または KM2760: 10.0  $\mu$ g/ml からの 10 倍段階希釈) あるいはコントロールとして Prednisolone (PSL) 1.0  $\mu$ g/ml を添加し 7 日間培養後、細胞の HTLV-1 プロウイルス量、増殖応答および培養上清中の各種サイトカイン (IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-6、TNF $\alpha$ ) 濃度を測定した。HAM 患者 PBMC は、無刺激条件下での培養において自発的に増殖し、HTLV-1 の感染拡大を示す特徴を有しており、この自発的増殖応答は HAM の過剰免疫応答を反映するものである。結果、抗 CCR4 抗体は濃度依存的にプロウイルス量 (図 4A)、自発的細胞増殖応答 (図 4B) および各種サイトカイン産生 (図 4C) を有意に抑制した。

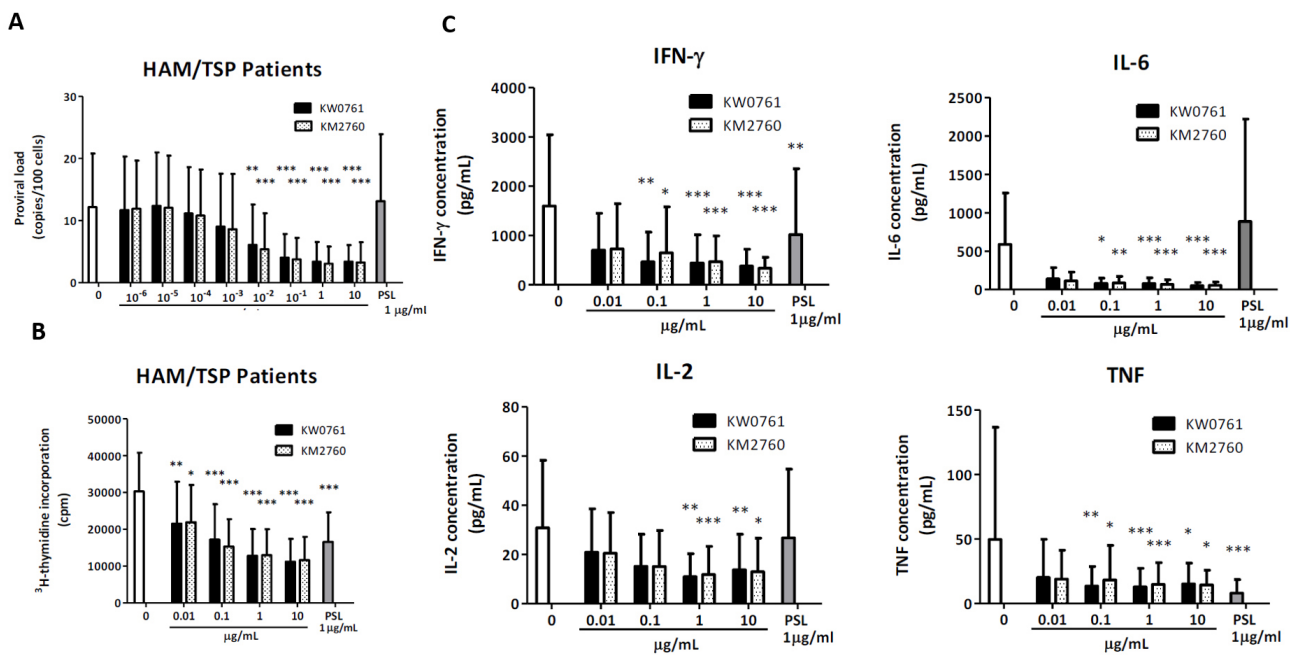


図4. 抗CCR4抗体はHAM患者PBMCに対して抗感染細胞活性、抗炎症活性作用を示す

HAM患者由来PBMC(11例)にADCC活性を有する抗CCR4抗体(KW0761、KM2760)またはprednisolone(PSL)を添加し7日間培養後、real-time PCR法により細胞のHTLV-1プロウイルス量(A)、<sup>3</sup>H-Thymidine uptakeにより増殖応答測定(B)およびCBA法により培養上清中の各種サイトカイン濃度(IFN- $\gamma$ 、IL-6、IL-2、TNF $\alpha$ )(C)を測定した。Error bar:  $\pm$ SD。P値は、(A、B) Repeated measures ANOVA、(C) Friedman testにより算出した。\*P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\*P < 0.001。

## 考 察

以上の結果から、HAM感染細胞におけるTaxの発現は、Sp1と協調的にT-betの転写を活性化し、炎症促進的なIFN- $\gamma$ 産生Th1様細胞への分化転換を誘導し、その結果、質的量的に宿主のTh細胞バランスに異常をきたすと共に、このような異常細胞の脊髄への浸潤・蓄積がHAM病態形成において重要な役割を果たすことが示唆された。また、CCR4<sup>+</sup>T細胞を破壊する抗CCR4抗体が、HAM患者由来の細胞に対して、抗感染細胞活性、抗炎症活性を示すことから、CCR4<sup>+</sup>細胞がHAM病態における病因的役割を担う細胞群で有り、CCR4<sup>+</sup>細胞はHAMの有用な治療標的分子であり、抗CCR4抗体療法は、これまで実現しなかったHAMの感染細胞を標的とした根本的な治療になり得ると考えられた。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、聖マリアンナ医科大学難病治療研究センターの山野嘉久、佐藤知雄、安藤仁、山内淳司、北海道大学大学院医学研究科分子病理学分野の外丸詩野、東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科免疫治療学分野の神奈木真理、長谷川温彦、琉球大学大学院免疫学講座の田中勇悦、公益財団法人慈愛会今村病院分院の宇都宮興である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

## 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.* 2009; 10(9):1000-7. doi: 10.1038/ni.1774. PubMed PMID: 19633673
- 2) Yamano Y, Araya N, Sato T, Utsunomiya A, Azakami K, Hasegawa D, Izumi T, Fujita H, Aratani S, Yagishita N, Fujii R, Nishioka K, Jacobson S, Nakajima T. Abnormally high levels of virus-infected IFN-

- gamma+ CCR4+ CD4+ CD25+ T cells in a retrovirus-associated neuroinflammatory disorder. PLoS One. 2009;4(8):e6517. doi: 10.1371/journal.pone.0006517. PubMed PMID: 19654865
- 3) 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*. 2011;3(9):1532-48. doi: 10.3390/v3091532. PubMed PMID: 21994794
  - 4) Ishida T, Joh T, Uike N, Yamamoto K, Utsunomiya A, Yoshida S, Saburi Y, Miyamoto T, Takemoto S, Suzushima H, Tsukasaki K, Nosaka K, Fujiwara H, Ishitsuka K, Inagaki H, Ogura M, Akinaga S, Tomonaga M, Tobinai K, Ueda R. Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody (KW-0761) for relapsed adult T-cell leukemia-lymphoma: a multicenter phase II study. *J Clin Oncol*. 2012;30(8):837-42. doi: 10.1200/JCO. PubMed PMID: 22312108