

## 主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

安藤 仁

専攻分野：難治性疾患病態制御学

コース：

指導教授：遊道 和雄

主論文の題目：

Positive Feedback Loop via Astrocytes Causes Chronic Inflammation in Virus-Associated Myelopathy

(アストロサイトを介したポジティブフィードバックループがウイルス関連脊髄症における慢性炎症を引き起こす)

共著者：

Tomoo Sato, Utano Tomaru, Mari Yoshida, Atae Utsunomiya, Junji Yamauchi, Natsumi Araya, Naoko Yagishita, Ariella Coler-Reilly, Yukiko Shimizu, Kazuo Yudoh, Yasuhiro Hasegawa, Kusuki Nishioka, Toshihiro Nakajima, Steven Jacobson, Yoshihisa Yamano

緒言

ヒトT細胞好性ウイルス1型(HTLV-1)によって引き起こされるHTLV-1関連脊髄症(HAM)は、難治性神経疾患であり分子病態解明に基づいた新規治療薬の開発が求められている。これまで、HTLV-1は主にCD4<sup>+</sup>T細胞に感染して脊髄へ浸潤、interferon(IFN)- $\gamma$ などの炎症性サイトカインの産生を通じ炎症を惹起することでHAMが発症するとされている。しかし、炎症の維持がどのように引き起こされるか未だ解明されていない。これまでに我々は、HAM患者の髄液(CSF)においてCD4<sup>+</sup>T細胞の主な4つのchemokine受容体(CXCR3、CCR4、CCR5、CCR6)に対する9つのchemokine濃度を網羅的に調べ、CXCL10、CXCL9、CCL5濃度がHTLV-1感染無症候性キャリア(AC)や成人T細胞白血病(ATL)患者に比べ有意に高いことを報告した。そこで今回我々は、HAM脊髄における炎症に

は細胞遊走に関与する chemokine が重要であり、chemokine を軸とする炎症ループにより炎症が慢性化するという仮説を立てた。それを元に、HAM における脊髄の炎症の慢性化機構を明らかにし、病態に即した新規治療法の可能性を検討した。

## 方法・対象

対象は、HTLV-1 非感染健常者 (HD、 $n = 26$ )、AC ( $n = 29$ )、ATL ( $n = 17$ )、HAM 患者 ( $n = 58$ )。Chemokines、IFN- $\gamma$ 、interleukin (IL)-17 濃度は cytometric bead array 法を用いて測定した。細胞培養には、末梢血単核球細胞 (PBMC)、ならびに PBMC から magnetic beads で分離した CD4<sup>+</sup>T 細胞、CD8<sup>+</sup>T 細胞及び CD14<sup>+</sup>細胞、またヒトアストロサイトーマ細胞株 U251 を用いた。HTLV-1 感染 CD4<sup>+</sup>T 細胞によるアストロサイトからの CXCL10 産生誘導を調べる為に、U251 と HAM 患者または HD 由来 CD4<sup>+</sup>T 細胞の共培養実験を行った。細胞表面抗原解析には flow cytometer を用い、HTLV-1 プロウイルス量の測定には real time PCR 法を用いた。さらに、剖検例脊髄を用いて免疫組織学的解析を行った。また chemotaxis chamber、CXCL10 及び CXCR3 中和抗体を用いて細胞遊走・阻害実験を行った。細胞増殖試験には、<sup>3</sup>H thymidine を用いた。統計解析は、2 群比較では t-test、Mann-Whitney U test、paired t-test を行い、多群比較では one-way ANOVA、Friedman test を行なった。相関解析は、Spearman's test を用いた。本研究は、全ての患者から聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会 (1646 号) の承認を得た書面による同意を取得して実施した。

## 結果

まず、HAM 患者 CSF における 4 つの chemokines (CXCL9、CXCL10、CCL5 及びコントロールとして CCL4) 濃度と細胞数の相関解析を行ったところ、CXCL10、CXCL9 濃度が有意に細胞数と相関した ( $P = 0.0047$ 、 $P =$

0.049)。次に、同一患者の血清と CSF における chemokine 濃度を比較したところ、CXCL10 のみが血清よりも CSF で有意に高い濃度勾配を示した ( $P < 0.0001$ )。CXCL10 の受容体である CXCR3 の発現細胞解析では、HAM 患者における CSF 細胞の  $92.4 \pm 7.0\%$  が CXCR3 陽性細胞であり、PBMC に占める CXCR3 陽性率 ( $9.9 \pm 8.2\%$ ) に比べ有意に高かった ( $P < 0.001$ )。また、末梢血中の CXCR3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞の一部に HTLV-1 感染を認めた。さらに免疫組織学的解析では、HAM 患者由来脊髄で軟膜の小血管周囲に多数の CXCR3 陽性細胞の浸潤を認めた。脊髄病変部における CXCL10 陽性細胞の解析では、HTLV-1 非感染者由来脊髄に比べ HAM 患者脊髄で有意に多く存在した ( $P = 0.0095$ )。またこれらの CXCL10 陽性細胞は、アストロサイトマーカーである GFAP 陽性細胞と一致した。HD の CD4<sup>+</sup>T 細胞は U251 からの CXCL10 産生を誘導しなかったのに対し、HAM/TSP 患者由来の CD4<sup>+</sup>T 細胞は CD4<sup>+</sup>T 細胞数依存的に U251 からの CXCL10 産生を誘導した。またこの CXCL10 産生は、抗 TNF- $\alpha$  中和抗体では抑制されなかったが、抗 IFN- $\gamma$  中和抗体により有意に抑制された ( $P < 0.01$ )。最後に、細胞遊走の阻害実験では、抗 CXCL10 抗体のみ有意に細胞遊走を阻害した ( $P < 0.001$ )。また抗 CXCL10 抗体は、遊走細胞におけるプロウイルス絶対量や自発的リンパ増殖応答を有意に低下させた ( $P < 0.05$ )。

## 考察

これまでの研究において、HAM 患者の脊髄では感染細胞の浸潤や炎症性サイトカインの産生が示され、脊髄で慢性炎症が起こっていることが明らかにされていたが、炎症の形成及び慢性化機序に関しては不明であった。

今回、HAM 患者脊髄の炎症は chemokine によるポジティブフィードバックループにより慢性化するという仮説を立て、その検討を行った。その結果、これまで HAM の病態への関与が不明瞭であった chemokine CXCL10 とアストロサイトが炎症の慢性化に極めて重要な働きをするこ

とが明らかになった。すなわち、HTLV-1 感染 CD4<sup>+</sup>T 細胞が産生する IFN- $\gamma$  が脊髄のアストロサイトからの CXCL10 産生を誘導し、その結果、末梢血から脊髄へ HTLV-1 感染細胞を含む CXCR3 陽性細胞を遊走させる。さらに、その遊走細胞が IFN- $\gamma$  を産生しアストロサイトが CXCL10 を産生するという、ポジティブフィードバックループ (IFN- $\gamma$ -CXCL10-CXCR3 炎症ループ) の存在を証明した。また、抗 CXCL10 阻害抗体が細胞遊走を有意に阻害し、遊走した細胞でのウイルス量や自発的リンパ増殖応答を有意に低下させたことから、抗 CXCL10 抗体療法は HAM において脊髄への感染細胞や炎症細胞の遊走を低下させ得ることが示唆された。

#### 結語

HAM の脊髄炎症病変は、HTLV-1 感染細胞に起因したポジティブフィードバックループ (IFN- $\gamma$ -CXCL10-CXCR3 炎症ループ) により、形成・維持されることを明らかにした。また、この炎症ループを特異的かつ効率的に阻害する抗 CXCL10 抗体療法が、HAM の病態に則した新規の分子標的治療法になり得ることを示した。