

論 文 要 旨

Dimethyl fumarate as a promising therapeutic candidate for
virus-associated myelopathyジメチルフマル酸はウイルス関連脊髄症に対する
有望な治療薬候補となり得る

吉田 崇志

【序論及び目的】

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) は世界で推定 500 万-1000 万人が感染しているレトロウイルスで、感染者の多くは無症候性キャリアとして経過するが、約 2-5% が成人 T 細胞白血病リンパ腫を、0.25-3.8% が HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) を発症する。HAM は痙性対麻痺、排尿障害、下肢感覚障害などを呈する進行性の神経炎症性疾患で、車椅子依存や寝たきりに至ることもある重篤な疾患である。HAM の病態は、HTLV-1 に感染した CD4+ T 細胞が持続的に増殖して中枢神経系に浸潤し、これを標的とする HTLV-1 特異的 CD8+ T 細胞が過剰に活性化することで、炎症性サイトカイン産生が亢進し、bystander 機序により神経組織に傷害が生じ、症状が進行すると考えられている。現在、治療としてグルココルチコイドやインターフェロン(IFN)- α などが用いられているが、副作用や長期的有効性の面で限界があり、未だ確立した治療法は存在しない。そのため、新規治療薬の開発が強く求められている。ジメチルフマル酸 (DMF) は多発性硬化症の経口治療薬として臨床応用されており、転写因子 NrF2 を活性化して抗酸化作用を発揮するとともに、NF- κ B 経路を抑制することで T 細胞応答や炎症性サイトカイン産生を抑える作用機序を有する。これらの作用から、DMF は HAM における神経炎症の制御に寄与する可能性が示唆される。本研究では、HAM 患者由来の末梢血単核細胞 (PBMC) を用いた *ex vivo* 解析により、DMF が細胞生存率、リンパ球増殖、炎症性サイトカイン産生、HTLV-1 プロウイルス量 (PVL) に及ぼす影響を評価し、治療薬としての可能性を検討した。

【材料及び方法】

本研究では、HAM 患者 16 例および健常対照 (HC) 5 例から採取した PBMC を用いて、DMF の免疫調節作用を評価した。PBMC は Ficoll-Hypaque 法で分離後、解析時まで凍結保存し、解凍後に RPMI 1640 培地 (+ 10% FBS, penicillin, streptomycin) 中で 1.0×10^6 /mL となるよう 96 well-plate に播種し、DMF (0-100 μ M) を添加して 37°C, 5% CO₂ 下で最大 6 日間培養した。最初に DMF の細胞毒性の有無を確認するため、HAM 6 例と HC 5 例の PBMC を DMF 各濃度で培養し、Trypan blue 色素排除法で生存率を測定した。HAM では HTLV-1 感染 CD4+ T 細胞が外的刺激なしに自発的増殖を示すことが知られており、その抑制は治療評価の重要な指標となる。そこで HAM 10 例の PBMC を DMF 各濃度で 72 時間培養し、XTT 法で吸光度を測定して自発的増殖に対する抑制効果を評価した。次にリンパ球サブセットごとの増殖動態を評価するため、HAM 10 例の PBMC を CellTrace Violet (CTV) で標識し、DMF 各濃度で 6 日間培養後、CD3, CD4, CD8, CADM1, 7-AAD 抗体で染色し、CTV 蛍光の減衰に基づき各細胞の分裂回数をフローサイトメトリーで解析した。CADM1 は HTLV-1 感染細胞の指標とした。さらに、DMF の CD4+ T 細胞への直接作用を検証するため、HAM 8 例の PBMC から SH800 セルソーターを用いて CD4+ T 細胞を分離し、同条件下で CTV による増殖解析を行った。最後に、DMF 各濃度で 6 日間培養した HAM 10 例の PBMC 上清から IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α を Luminex

MAGPIX で測定し、同時に回収した PBMC から抽出した DNA を用いて HTLV-1 PVL を real-time PCR で定量した。統計解析は Friedman 検定および Dunn 検定を用い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意と判定した。

【結果】

Trypan blue 色素排除法による毒性評価では、HC 由来 PBMC において DMF 0-50 μM で生存率の低下は認められず、100 μM でのみ中央値 19.5%の軽度低下を認めた。XTT 法では、HAM 由来 PBMC の自発的増殖に対して DMF が濃度依存的な抑制効果を示し、非添加条件と比較した抑制率の中央値は 10, 25, 50, 100 μM でそれぞれ 42.1%, 56.3%, 60.6%, 69.9%であった。CTV を用いたリンパ球サブセットごとの解析では、CD8+ T 細胞, CD4+ T 細胞, および HTLV-1 感染細胞の指標である CADM1+CD4+ T 細胞のいずれの増殖も、DMF 添加により濃度依存的な抑制を受けることが示された。非添加条件と比較した抑制率の中央値は、増殖能の高い CD8+T 細胞で 19.3% (10 μM) から 93.0% (100 μM) , CD4+T 細胞で 48.8%から 92.0%, CADM1+CD4+T 細胞で 33.0%から 92.4%であった。HAM 患者由来 PBMC の培養下では、ウイルス蛋白 Tax を発現する CD4+ T 細胞が HTLV-1 特異的 CD8+ T 細胞の標的となる。そこで、CD8+ T 細胞による細胞傷害の影響を除外するため、分離した CD4+ T 細胞を単独で培養したところ、CD4+ T 細胞および CADM1+CD4+ T 細胞の増殖は DMF により濃度依存的に抑制され、50 μM 以上ではほぼ完全に抑制された。このことから、DMF による増殖抑制効果は CD8+ T 細胞を介した細胞傷害とは独立していることが示唆された。さらに、HAM の病態に重要な炎症性サイトカイン産生に対する DMF の影響を検討した。DMF 非添加条件下で 6 日間培養したところ、HAM 由来 PBMC からは IL-6, IFN- γ , TNF- α などが高値を示したが、 $\geq 25 \mu\text{M}$ の DMF 添加で IL-6, TNF- α が有意に低下し、IFN- γ も 100 μM で有意に減少した。最後に、DMF の PVL 抑制効果を検討したところ、全症例を対象とした解析では有意差は認められなかったが、DMF 非存在下で PVL が 20%以上増加する高いウイルス増殖活性を示す群では、 $\geq 25 \mu\text{M}$ の DMF 添加により PVL が顕著に低下した。

【結論及び考察】

本研究では、DMF が HAM 由来 PBMC における自発的増殖を有意に抑制し、特に病態の中心を担う CD8+ T 細胞, CD4+ T 細胞, および HTLV-1 感染細胞に対して明確な抑制効果を示すことを明らかにした。また、分離 CD4+ T 細胞を用いた解析により、この増殖抑制作用は CD8+ T 細胞による細胞傷害とは独立した、HTLV-1 感染 CD4+ T 細胞に対する直接的な抗増殖作用であることが示唆された。さらに、DMF は増殖細胞から放出される炎症性サイトカインの産生を濃度依存的に減少させた。DMF は多発性硬化症の治療薬として既に臨床応用されており、T 細胞アポトーシス誘導、GSH 枯渇を介した抗酸化経路活性化、Keap1-Nrf2 経路活性化、NF- κB 経路阻害など、多彩な免疫調節作用を有する。一方、HTLV-1 の転写因子 Tax は感染細胞の生存・増殖を促進し、NF- κB 経路を恒常的に活性化して炎症およびウイルス複製の持続に寄与する。本研究で観察された増殖抑制効果は、DMF の NF- κB 経路阻害作用に関連する可能性があり、これにより HTLV-1 感染細胞の増殖抑制、ウイルス特異的 CTL 活性の制御、さらには炎症性サイトカイン産生の減弱を通じて、神経組織への bystander 傷害を軽減し得ると考えられる。特に、CD8+ T 細胞が主に産生する IFN- γ や TNF- α の減少は、中枢神経系における慢性炎症の緩和に寄与する重要な所見である。PVL については、全体解析では有意な低下は認められなかったものの、ウイルス増殖活性が高い一部の症例では DMF 添加により PVL の減少が観察され、患者による治療反応性の違いが示唆された。

以上の結果から、DMF は HTLV-1 感染細胞および過剰に活性化したリンパ球の増殖抑制と炎症性サイトカイン産生抑制を通じて、HAM の病態に対し多面的に作用し得ることが示唆された。本研究の結果は、DMF が HAM に対する有望な治療薬候補となり得ることを支持するものであり、今後の臨床応用への展開を推進する上で重要な知見となる。