

# 論文要旨

## Longer dinucleotide repeat polymorphism in matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene promoter which correlates with higher HTLV-I Tax mediated transcriptional activity influences the risk of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP)

HTLV-I Tax 媒介性転写高活性に関連するマトリックス・メタロプロテイナーゼ-9 (MMP-9) 遺伝子プロモーターにおける 2 塩基リピート多型は長いほど HAM/TSP のリスクを高める

兒玉大介

### 【序論および目的】

- (1) HTLV-I 関連脊髄症 (HAM) はヒト T リンパ球指向性ウイルス I 型 (HTLV-I) に感染した T リンパ球の中枢神経系への浸潤による慢性炎症性疾患である。HTLV-I 感染者の 1~2% のみが HAM を発症する。
- (2) 血液脳関門 (BBB) を構成する細胞外マトリックスの主な成分であるコラーゲン IV を基質とする蛋白分解酵素 Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) は白血球遊走や BBB 障害、炎症反応に関与することが知られている。
- (3) HAM の慢性活動炎症性脊髄病変では T リンパ球/マクロファージの浸潤を認め (Umehara ら 1993)、浸潤細胞上で MMP-2、MMP-9 の両方が発現し、血清・髄液中で MMP-9 は正常より高値であると報告されている (Umehara ら 1998; Giraudon ら 2000)。
- (4) 最近、HTLV-I 感染 T 細胞株では非感染性株に比べ MMP-9 レベルが高値であり、HTLV-I transactivator 蛋白 Tax が MMP-9 promoter を活性化していること (Mori ら 2002)、また MMP-9 promoter における 2 塩基リピート (以下 d(CA) リピート) の長短が転写活性に関係し、日本人集団でこのリピート多型が存在すると報告された (Shimajiri ら 1999)。
- (5) 我々は MMP-9 promoter d(CA) リピート多型と HAM 発症リスクが関連するかどうかを明らかにするため本研究を行った。

### 【材料および方法】

**患者:** 鹿児島県在住の日本人 HAM 患者および対照として HTLV-I 血清陽性無症候性キャリア (HC) 各 200 名。HAM の診断は WHO 診断基準 (Osame ら 1990) により行った。

#### 方法:

- (1) d(CA) リピート数の決定: 末梢血から密度勾配遠心沈殿法で末梢血単核球 (PBMC) を採取しゲノム DNA を抽出。MMP-9 promoter の d(CA) リピート領域を PCR で増幅し、oligonucleotide forward primer の一部に 6-FAM 蛍光標識したものを用いて PCR 産物のサイズ分析を GeneScan<sup>®</sup>ソフトウェア (PE-Applied Biosystems) で行った。

(2) HTLV-I プロウイルス量と抗 HTLV-I 抗体価の測定：プロウイルス量は定量的 PCR 法 (Nagai ら 1998) により内部コントロール  $\beta$ -actin に対し Tax コピー数/PBMC $10^4$  個として測定した。HAM 診断に必要な血清・髄液中抗体価は粒子凝集反応法 (Serodia-HTLV-I<sup>®</sup> (Fujirebio)) で測定した。

(3) ルシフェラーゼ・アッセイのレポータープラスミドのコンストラクション：MMP-9 promoter の d(CA)リピート長の Tax 転写への影響を観察するため、pGL2-Basic plasmid vector (Promega<sup>®</sup>) のルシフェラーゼ遺伝子上流に、23, 21, 18 d(CA)リピートを持つ患者から得たヒト MMP-9 promoter (-664~+20) を挿入した。Promoter フラグメントは *Xho I* と *Hind III* 制限酵素認識サイトを持つプライマーを用いて増幅し、PCR<sup>®</sup>-Blunt II-TOPO<sup>®</sup> vector (Invitrogen) の同酵素認識サイトに挿入、サブクローニングで配列を確認した。

(4) ルシフェラーゼ・アッセイ：発現ベクター pCG-Tax、対照ベクター pCG-BL は関西医科大学 Fujisawa 博士から供与された。pCG-Tax はヒト cytomegalovirus promoter を持ち、Tax cDNA を pCG-BL の *Xba I*-*Bam HI* サイトに挿入している (Fujisawa ら 1991)。ルシフェラーゼ・アッセイは、HTLV-I 非感染ヒト T 細胞株 Jurkat cell  $5 \times 10^5$  個にリポーター・プラスミド (MMP-9 dCA23 -Luc, MMP-9 dCA21-Luc または MMP-9 dCA18-Luc) 2 $\mu$ g, pCG-Tax か pCG-BL を 0.5 $\mu$ g を cotransfect させ、48 時間後に Dual Luciferase Assay System (Promega) を用いて測定された。

(5) 髄液中の MMP-9 および Neopterin の測定：MMP-9 は ELISA キット (Amersham)、Neopterin は high-performance liquid chromatography (Nomoto ら 1991) により測定された。

(6) 統計解析：MMP-9 promoter d(CA)リピート長の HAM、HC 群間比較は Mann-Whitney U 検定を行った。全アレルの分布の比較は  $2 \times 11$  分割表とカイ 2 乗検定を用いた。

## 【結 果】

(1) 対象の検査所見の特徴：年齢、抗体価、プロウイルス量、ネオプテリンなど以前の研究と合致していた。年齢、血清中抗体価、プロウイルス量は HAM で高かった。

(2) MMP-9 promoter d(CA)リピート長の群間比較：HAM、HC とも d(CA)21 リピートのアレルが多かったが、Mann-Whitney U 検定では HAM の方が有意に長いものが多い ( $p < 0.01$ ) と考えられた。

(3) HAM、HC における全アレル分布での比較：d(CA)23 リピート ( $p = 0.023$ )、d(CA)24 リピート ( $p = 0.003$ ) と長いアレルを持つ人が有意に HAM で多く、d(CA)20 リピート ( $p < 0.001$ ) と短いアレルを持つ人が HC で有意に多かった。

(4) ルシフェラーゼ・アッセイ：d(CA)23 リピート、d(CA)21 リピート、d(CA)18 リピートと長いものほどルシフェラーゼ活性が強く、MMP-9 の Tax 活性化が強いと考えられた。

## 【結論及び考察】

(1) MMP-9 promoter d(CA)リピートの長い多型を持つと MMP-9 発現の Tax による活性化がより強く、感染 T リンパ球の中核浸潤すなわち HAM 病態の基礎となり、HAM 発症リスクに関連するということが示唆された。

(2) MMP-9 は HAM 治療の良い標的かもしれない。

# 論文審査の要旨

報告番号	医論第 1413 号	氏名	兒玉大介
審査委員	主査	丸山征郎	
	副査	馬場昌範	有馬直道

## Longer dinucleotide repeat polymorphism in matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene promoter which correlates with higher HTLV-I Tax mediated transcriptional activity influences the risk of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP)

(HTLV-I Tax媒介性転写高活性に関連するマトリックス・

メタロプロテイナーゼ-9 (MMP-9) 遺伝子プロモーターにおける  
2塩基リピート多型は長いほど HAM/TSP のリスクを高める)

HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP)は、HTLV-I 感染 T リンパ球の中樞神経系(脊髄)への浸潤による慢性炎症性疾患である。血液脳関門 (BBB) を構成する細胞外マトリックスの主成分であるコラーゲンIVを基質とする蛋白分解酵素 Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) は白血球遊走や BBB 障害、炎症反応に関与することが知られている。HAM/TSP の慢性活動炎症性脊髄病変での T リンパ球/マクロファージの浸潤、浸潤細胞上での MMP-2、-9 発現、血清・髄液中での MMP-9 高値などが報告されている。最近 HTLV-I 感染 T 細胞株では MMP-9 が高値で、HTLV-I transactivator protein Tax が MMP-9 プロモーターを活性化していること、MMP-9 プロモーター領域には d (CA) リピート (2 塩基リピート) 多型が存在し、この長短が転写活性に関与すると報告された。我々は MMP-9 プロモーター-d(CA) リピート多型と HAM/TSP 発症リスクが関連するかについて本研究を行った。尚、鹿児島大学大学院医歯学総合研究科遺伝子解析倫理委員会の承認を受けた。【方法】鹿児島県在住の HAM/TSP 患者、HTLV-I 陽性無症候性キャリア (HCs) 各 200 例のゲノム DNA から MMP-9 プロモーター-d(CA) リピート領域を含む-210~-13 を増幅した PCR 産物を Cycle sequence、GeneScan で Allele および Genotype を決定した。次に Tax による MMP-9 プロモーター転写活性化に及ぼす d(CA) リピート数の影響を検討するため Luciferase assay を行った。MMP-9 プロモーター-d(CA) リピートおよび上流の NF- $\kappa$ B、SP-1 などの転写因子結合部位を含む-664~+20 を増幅したフラグメント (18, 21, 23 リピートの 3 種類) をルシフェラーゼ遺伝子を持つ pGL-2 Basic に挿入しレポーターコンストラクトとし、Tax cDNA を持つ Tax 発現プラスミド pCG-Tax、またはその対照 pCG-BL と共に HTLV-I 非感染 T 細胞株 Jurkat にコトランスフェクトさせ、48 時間後にハーベストしアッセイした。【結果】 Allele 分布では HAM/TSP の方が有意に長いリピート多型を持ち ( $p < 0.01$ , Mann-Whitney-U 検定)、またリピート数毎に 2 群間で分割表、 $\chi^2$  検定を用い比較すると、HAM/TSP では 24 および 23 リピートが HCs より多く (各々  $\chi^2=5.20$ ,  $p=0.023$ ;  $\chi^2=9.42$ ,  $p=0.002$ )、HCs では 20 リピートが多かった ( $\chi^2=19.58$ ,  $p=0.001$ )。Genotype をリピート数毎に Homozygote、Heterozygote に分け分割表、 $\chi^2$  検定を行うと HAM/TSP では 23 リピート ( $\chi^2=10.59$ ,  $p=0.05$ )、HCs では 20 リピート ( $\chi^2=23.34$ ,  $p=0.0001$ ) が多かった。以上 Allele、Genotype 共に HAM/TSP ではリピート数が長く、HCs では短かった。Luciferase assay では、18, 21, 23 リピートで pCG-BL に比し pCG-Tax をトランスフェクトした場合はそれぞれ約 5.8 倍、7.3 倍、9.7 倍亢進し、より長いリピートを持つ MMP-9 プロモーターの方が Tax によるトランス活性化を受けることが明らかとなった。d(CA) リピートは Z-DNA 構造をとりうるとされ転写活性化に寄与している可能性が考えられる。【考察】 MMP-9 はまた IL-15 や CD44 など他の分子との関連、HTLV-I 感染 CD4<sup>+</sup> T 細胞の遊走能が選択的 MMP 阻害薬により阻害されることも報告されている。【結論】 MMP-9 プロモーター領域 d(CA) リピート多型は HAM/TSP で有意に長く、長いほど Tax によるトランス活性化を強く受ける。長い d(CA) リピートは HAM/TSP 発症リスクのひとつである。

さらに治療標的としての研究など進展も期待され、本研究は博士 (医学) の学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 試験（学力確認）の結果の要旨

報告番号	医論第 <b>1413</b> 号	氏名	兒玉大介
審査委員	主査	丸山征郎	
	副査	馬場昌範	有馬直道

主査および副査の3名は、平成17年9月5日、学位請求者 兒玉 大介に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1. HAM/TSPの男女比が特に女性に多いのはなぜか？何が影響しているのか？

(回答) HAM/TSPについての一般的な知見としては、HAM/TSP、キャリア(HCs)集団とも元々女性に多い(九州8県の統計によるHAM/TSP発症者で男:女=29%:71%、推定キャリア数は男:女=32万人:47万4800人、JAIDS 1990, 3:1096-1101. 鹿児島県の213例のHAM/TSPで男:女=65例:148例、J Neurovirol 1995, 1:50-61)。なぜHAM/TSP患者が女性に多いのかは感染経路が女性で複数あることが可能性として考えられる。男性は主に母子感染、女性はその他に精液による水平感染もあるため感染機会が多いのかもしれない。また発症リスクとしてのHTLV-Iプロウイルス量は、HAM/TSP患者では採血時年齢とウイルス量との相関はないが、女性の方が多く(Mean±SEMで女849±60, 男678±91)、患者の性差の原因かもしれない。キャリアでは性差はない。本研究では性差は検討していないが、MMP-9関連の文献では、女性における不活性X染色体からのTissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1(TIMP-1)発現は加齢と共に増加傾向があり、MMP/TIMPバランスに影響し炎症の発症に関与するという報告がある(Hum Genet 2002, 110:271-278)。またHAM/TSP患者でTIMP-1レベルの性差があるかどうかは未検討である。

質問2. 一般的な質問だが、ウイルス量が高くなればHAM/TSP発症リスクが高まる機序について説明せよ。

(回答) ウイルス量とCTLなどの免疫のバランスで炎症性サイトカインの発現、さらにHAM/TSPの炎症の程度は決まると考えられる。根拠としては、末梢単核球中の感染細胞0.5%ごとにHAM/TSP発症数、HCs数を算出し、ROC(Receiver Operator Characteristic)曲線を統計的に描画後、cut off値を求め、これによりHAM群・HCs群を各々2群に分け宿主遺伝子のHAM/TSP発症への関与を算出すると、ウイルス量すなわち感染細胞が全体の2%で、感度80%以上、特異度80%以上でHAM/TSP群とHCs群を鑑別可能、つまりウイルス量すなわち感染細胞が全体の2%を越えるとHAM/TSPのリスクが等比級数的に増大しcriticalになるとわかっている。

質問3. HTLV-I Tax媒介性MMP-9遺伝子トランス活性化へのMMP-9 d(CA)リピート数の影響は、GenotypeではHomozygoteとHeterozygoteがあるが、Heterozygoteで長いもの短いものを持つと、長い方が効いているのか、それとも平均で効いてくるのか？

(回答) 本研究ではin vivoでGenotypeの分割表を用いて検討し、Homozygote, Heterozygoteとも23リピートのGenotypeはHAM/TSPに多く、20リピートのGenotypeはHCsに多かった。あるリピート数のHeterozygoteだとそのリピート数のAlleleと、それよりも長いまたは短いAlleleをともに持つが、HAM/TSPに多い23リピートのGenotype、特にHeterozygoteは例えば23/25リピート、23/19リピートなどを含んでいる。長いものとリピート数の平均とどちらが効くのかは、長いリピート、短いリピートの複数のコンストラクトをコ・トランスフェクトさせた細胞を集めルシフェラーゼアッセイを行うというような実験が必要だが、手技は未開発である。今後の検討課題と考える。

質問4. MMP-9プロモーターd(CA)リピートの長いAlleleまたはGenotypeを持つ人は早期発症傾向はないか？

(回答) MMP-9プロモーターd(CA)リピート多型と臨床的特徴との関連ということだが、本研究の臨床的データを解析する際、発症年齢、病期期間との関連を調べたが特に相関はみられなかった。

質問5. Fig 2 のルシフェラーゼ・アッセイで、pCG-BLのbarはpCG-Taxとの比活性を表示するため1だが、MMP-9 d(CA)リピートのみの転写活性化の効果を知るため、発現プラスミドpCG-BLとレポーターコンストラクトが18、21、23リピートの各コ・トランスフェクトの場合の活性化はどうだったのかを説明せよ。

(回答) MMP-9でもMMP-9以外の遺伝子でもd(CA)リピート数と転写活性化との関連を示した報告はいくつもあるが、本アッセイのデータ上差はなかった。

質問6. Taxが関与しない他の疾患での d(CA)リピート多型と他の遺伝子の転写活性化の機序もありうるのではと思われるが知見があれば示せ。

(回答) Mori Nら(Blood 2002, 99:1341-1349)はATLの組織浸潤性の機序を検討するためMMP-9プロモーター領域d(CA)リピートの上流にあるNF- $\kappa$ Bサイト、SP-1サイトを欠失したプラスミドを用いてこれらの転写因子結合部位がHTLV-I Tax媒介性のMMP-9転写活性化に必要なことを示した。またShimajiri Sら(FEBS Letters 1999, 455:70-74)は、大腸癌患者でこのリピートが短ければ癌浸潤に関与するMMP-9の発現が減弱することを示した。このようにMMP-9遺伝子ではTaxが関与する転写活性化、関与しない活性化、あるいは他の遺伝子のd(CA)リピートでは転写抑制の例としてAcetyl CoA carboxylase、Rat prolactin遺伝子などがある。MMP-9プロモーター領域d(CA)リピートの上流にはNF- $\kappa$ Bサイト、SP-1サイト以外にもAP-1結合サイト(12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate(TPA) responsive element(TRE))、TGF- $\beta$ 1 inhibitory element(TIF)などが存在する(J Biol Chem 1991, 266:16458-16490)。たとえばTNF- $\alpha$ によりこれらのサイトが共働し、MMP-9転写活性化をすることも知られている。一般に(sense・antisenseとも表示すると)d(CA・GT)リピートはd(CG・GC)リピート同様左巻きのZ-DNA構造をとりうること、不安定なことが知られている(Annu Rev Biochem 1984, 53:698-701)が、転写活性化するのか転写抑制するのかを予測するための知見はまだないようである。

質問7. HAM/TSP患者40名のサンプルで髄液中MMP-9濃度を測定して2名のみで高値であり、MMP-9プロモーターd(CA)リピートとは相関がみられないとしているが、以前の報告(J Neuropathol Exp Neurol 1998, 57:839-849)にあるように髄液中MMP-9濃度はHAM/TSPで高値だったとするデータからはどう解釈するか？

(回答) UmeharaらのデータでもHAM/TSP患者46サンプル中MMP-9が高値だったのは8サンプルと多くはないが、それらが高値を示したためHAM/TSPとHCsの2群間比較をすると全体で有意差が出たと考えている。本研究でも高値を示した2例は進行性病変、病勢を反映しているのかもしれない。HAM/TSPの多くの患者は慢性活動性病変よりも非活動性病変が多く、髄液中でさほど濃度が上がっていないのかもしれない。MMP-9は活性化Tリンパ球やマクロファージからproMMP-9として細胞上で分泌され、消化を受け活性型のMMP-9として細胞上局所的に機能を発現する酵素なので髄液中の濃度が上がってなくても血液脳関門を越えるのに十分な発現をしている可能性もある。

質問8. MMP-9発現が亢進したHTLV-I 感染CD4<sup>+</sup> T細胞は血液脳関門を越えて遊走しやすく、HAM/TSPの原因になるということを示すために血管内皮細胞やコラーゲンに浸潤することの実験例はあるか？

(回答) Matrigelという実験装置を用いてHTLV-I 感染CD4<sup>+</sup> T細胞の遊走能は検討され、亢進していることが示されている(J Neuroimmunol 2002, 127:134-138)。この遊走能は特異的MMP阻害剤N-Biphenyl sulfonyl-phenylalanine hydroxamic acid (BPHA)で阻害され、MMP-9は治療標的分子と考えられる。今後HAM/TSPの新たな治療につながる方向性が示されている。

質問9. MMPは細胞外マトリックスを溶解する能力を持つということは、HAM/TSPに限らずリウマチなど他の炎症性疾患にも関与するということもいえるか？

(回答) MMPは組織の破壊および再構成(remodeling)に関与するといわれ、腫瘍、炎症など多様な疾患に関与することが知られており総説も多数ある。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。