

ikawa K, Seishima M.
Circulation, in press

3. Mechanism of increases in L-kynurenine and quinolinic acid in renal insufficiency

Saito K, Fujigaki S, Heyes M P, Shibata K, Takemura M, Fujii H, Wada H, Noma A, Seishima M.

Am J Physiol (Renal Physiol), 279 (3) :F565-572, 2000-9

4. Neurobehavioral alterations in mice with a targeted deletion of the tumor necrosis factor- α gene: implications for emotional behavior

Yamada K, Iida R, Miyamoto Y, Saito K, Sekikawa K, Seishima M, Nabeshima T.

J Neuroimmunol, 111 (1-2) : 131-138, 2000-11

5. 3-Hydroxyanthranilic acid, A L-Tryptophan metabolite, induces apoptosis in monocyte-derived cell stimulated by interferon- γ

Morita T, Saito K, Takemura M, Maekawa N, Fujigaki S, Fujii H, Wada H, Takeuchi S, Noma A, Seishima M.

Ann Clin Biochem, in press

3. TNF欠損が他の cytokine 産生におよぼす影響
—TNF α knockoutマウスを用いての検討—

竹村正男, 齊藤邦明, 藤垣朱和子, 前川尚也, 和田久泰, 関川賢二, 清島 満.

第47回日本臨床病理学会総会, 郡山市, 2000. 11. 2-4

4. Suppression of increased brain indoleamine 2, 3-dioxygenase activity in interferon gamma-deficient mice infected by toxoplasma.

Fujigaki S, Saito K, Takemura M, Maekawa N, Wada H, Seishima M.

Society for Neuroscience 30th Annual Meeting, New Orleans, LA., USA, 2000. 11. 5

5. Myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor- α (TNF- α)

Maekawa N, Wada H, Saito K, Fujii H, Niwa T, Fujigaki S, Kirii H, Takatsu H, Sekikawa K, Seishima M.

American Heart Association 73rd Scientific Sessions, New Orleans, Louisiana, USA, 2000. 11. 12-15

2. 学会発表

1. Suppression of neurocognitive damage in LP-BM5 infected mice with a targeted deletion of the TNF- α gene

Iida R, Yamada K, Saito K, Seishima M, Nabeshima T.

第73回日本薬理学会年会, 横浜, 2000. 3. 23-25

2. Tumor necrosis factor (TNF- α) ノックアウトマウス (TNF- α KO) を用いた心筋虚血再灌流障害の検討

前川尚也, 和田久泰, 齊藤邦明, 清島 満, 鷹津久登, 藤原久義.

第64回日本循環器学会総会, 大阪, 2000. 4. 1-3

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業） 分担研究報告書

HIV 等のレトロウイルスによる痴呆や神経障害の病態と治療に関する研究：
HIV-1 感染による中枢神経障害の治療薬の開発

分担研究者 馬場昌範 鹿児島大学医学部教授

研究要旨：HIV-1 感染による中枢神経障害の機序を解明し、それに基づいて有効な予防・治療薬の開発研究を行うために、種々の物質が培養神経細胞の細胞死に与える影響について検討したところ、抗酸化剤の N-acetylcysteine (NAC) や抗炎症アルカロイドである cepharanthine (CEP) に TNF- α や gp120 により誘導される細胞死を抑制する効果を認めた。また CEP は培養マクロファージおよび単球系細胞株において、各種の刺激によるサイトカインやケモカインなどの産生を抑制することが分かった。

A. 研究目的

異なる作用機序を有する複数の抗 HIV-1 剤、すなわち逆転写酵素阻害剤とプロテアーゼ阻害剤を併用する、いわゆる highly active antiretroviral therapy (HAART) の進歩によって、AIDS 患者の予後は著しく改善した。しかし一方で、薬剤耐性ウイルスの問題と並んで、HIV-1 感染時の重篤な合併症である中枢神経障害をどのようにして予防あるいは治療するかということが今後の大きな課題の一つである。HAART は確かに AIDS 脳症など、HIV-1 による中枢神経障害の発生頻度を大幅に低下させると報告されているが、これら既存の薬剤の大部分（特にプロテアーゼ阻害剤）は blood-brain barrier の通過性がきわめて悪く、また HIV-1 による中枢神経障害の発症機構から考えて、予防・治療には現在の HAART では不十分であり、新しい薬剤の開発が必要であると思われる。そこで本研究においては、未だ詳細には明らかにされていない

HIV-1 感染による中枢神経障害の発症機序を解明し、それに基づいて予防・治療薬の開発を行うことを目的とする。

B. 研究方法

ヒトの神経細胞の primary culture を用いることは倫理的に困難であるので、ヒト神経芽種 (neuroblastoma) 由来で、分化誘導処理によって神経細胞様に分化する SK-N-MC 細胞を用いて、各種サイトカインや HIV-1 由来のタンパク質が、細胞死に与える影響を測定できるようなアッセイ系を構築し、それを用いて各種薬剤の神経細胞死抑制効果について検討した。SK-N-MC 細胞を 5 μ M のレチノイン酸（全トランス型）で 4 日間処理して神経細胞に分化させた後、1% 牛胎児血清 (FCS) の存在下において TNF- α (1 および 10 ng/ml) またはリコンビナント gp120 (1 nM) で刺激し、さらに 48 時間培養した。この時、500 μ M (81.6 μ g/ml) の NAC、あるいは種々の濃度の CEP

にて細胞を2時間前処理し、刺激後さらに同じ濃度の薬剤存在下で培養を続けた。培養後、細胞の生存率を trypan blue 染色法にて測定した。各実験は3回行い各々の平均値を求めるとともに、各値の有意性について t 検定を行い検討した。また、CEP の細胞死阻止に対するメカニズムを解明するため、FACScan™ を用いて細胞死の解析を行った。

また脳内ミクログリアから産生される炎症性サイトカインおよびケモカインに対する CEP の効果を調べるため、前単球由来の培養細胞株 U937 細胞、および末梢血より単球を分離精製し、マクロファージに分化させたものを用意した。これらに各種の刺激を加え、上清に放出されるサイトカインやケモカインなどを定量するとともに、この系に種々の濃度の CEP を加え、サイトカインなどの産生に与える影響について検討した。具体的には、それぞれの細胞を CEP で2時間前処理するとともに、U937 細胞は 10 ng/ml の phorbtor 12-myristate 13-acetate (PMA)、培養マクロファージは 10 μg/ml の lipopolysaccharide (LPS) で刺激し、24 時間後に培養上清中のサイトカインおよびケモカインの濃度を ELISA 法にて定量した。またこの時の生細胞数は 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 法にて測定した。

(倫理面への配慮について)

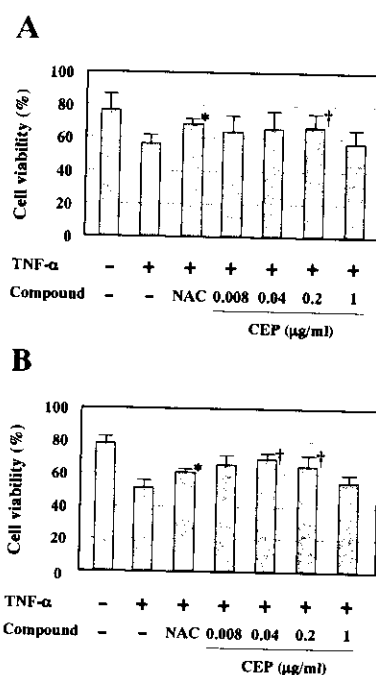
今回の研究では、健康成人より採血することにより、実験用のマクロファージを得ているが、ドナー(供血者)に対しては、予め本実験の目的と内容を説明の上、同意を得てから採血を施

行した。また動物実験は行っていない。

C. 研究結果

レチノイン酸によって神経細胞に分化した SK-N-MC 細胞の生存率は、TNF-α 未処理時 (NC) においては約 80% であったが、1 および 10 ng/ml の TNF-α で刺激すると (PC), それぞれ 56.6 および 51.6% に低下した (Fig. 1)。この時、500 μM の NAC が存在すると SK-N-MC 細胞の生存率が 68.8 および 61.2% にまで回復した。同じ条件下において、0.04 および 0.2 μg/ml の CEP は、SK-N-MC 細胞の生存率に対して、500 μM の NAC に匹敵する効果を有していることが分かった。同様に 1 nM のリコンビナント gp120 刺激で誘導された SK-N-MC 細胞の細胞死に対しても、0.2 μg/ml の CEP は 500 μM の NAC と同様に抑制的に作用することが明らかとなった (data not shown)。

Fig. 1. Suppression of TNF-α-induced



neural cell death by cepharanthine. SK-N-MC cells (5×10^4 cells/ml) were grown and differentiated, as described in Materials and Methods. The cells were untreated (-) or treated with 81.6 $\mu\text{g/ml}$ NAC, 0.008, 0.04, 0.2 or 1.0 $\mu\text{g/ml}$ CEP. The cells were then unstimulated (-) or stimulated (+) with 1 ng/ml (A) or 10 ng/ml (B) TNF- α . After a 2-day incubation, the cell viability was determined by trypan blue exclusion. Data represent mean values \pm standard deviations of at least three separate experiments. Statistical significance between PC and each compound-treated sample was determined by the *t* test. * $P < 0.05$, † $P < 0.01$.

また propidium iodide (PI) で蛍光染色したサンプルを FACSscan で解析した結果, 神経細胞に分化した SK-N-MC 細胞は TNF- α 未処理時においてアポトーシス細胞の割合は 31% であったが, 10 ng/ml の TNF- α で刺激すると 41% に増加した。それに対して 500 μM の NAC あるいは 0.2 $\mu\text{g/ml}$ の CEP が存在すると, アポトーシス細胞の割合はそれぞれ 34% および 31% にまで減少した (data not shown)。

次に U937 細胞を PMA で刺激すると, IL-6 を除き, 上清中に TNF- α , IL-1 β , IL-8 などの炎症性サイトカインやケモカインを産生するが, CEP は細胞の増殖や生存率には全く影響を与えない 0.1-1 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で, これらの物質の産生を濃度依存性に抑制した (Table 1)。一方, 培養マクロファージを LPS で刺激すると, 上清中に TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 などを大量に産生するが, CEP は同じく 0.1-1 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で, これらの物質の産生を抑制する効果を有していた (Fig. 2)。

Table 1. Inhibitory effect of CEP on cytokine and chemokine production in U937 cells

	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Cytokine or Chemokine (pg/ml)
TNF- α		
NC	0	5 ± 1
PMA	0	850 ± 170
	0.01	740 ± 220
	0.1	$510 \pm 160^\dagger$
	1	$410 \pm 200^*$
IL-1 β		
NC	0	1.0 ± 0.8
PMA	0	5.1 ± 0.8
	0.01	4.8 ± 0.5
	0.1	3.1 ± 0.6
	1	2.5 ± 0.9
IL-8		
NC	0	1400 ± 300
PMA	0	27000 ± 4000
	0.01	25000 ± 5000
	0.1	$14000 \pm 4000^\dagger$
	1	$11000 \pm 3000^\dagger$

U937 cells were incubated in the absence or presence of the compound for 2 h, unstimulated (NC) or stimulated with PMA (10 ng/ml), and further incubated. After a 24-h incubation, cytokine or chemokine levels and cell viability were determined by ELISA and the MTT method, respectively. Data are mean values \pm standard deviations of at least three separate experiments. Statistical significance between the control (PMA-treated but compound-untreated) sample and each compound-treated sample was determined by the *t* test. * $P < 0.05$, † $P < 0.01$. ND: not determined.

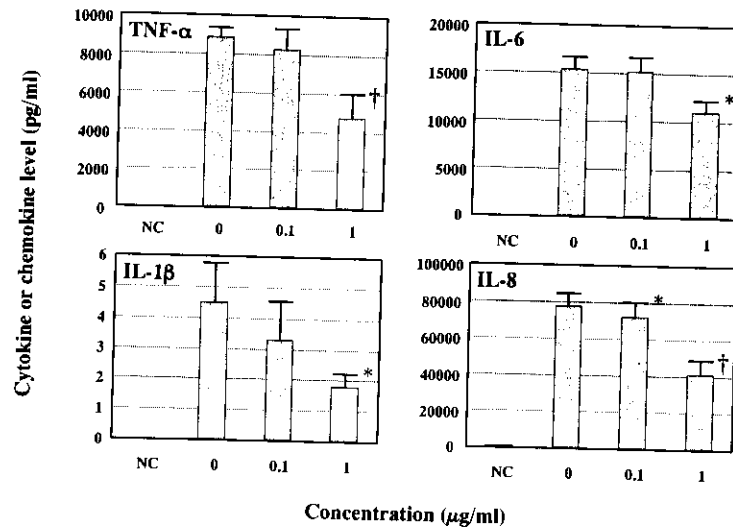


Fig. 2. Inhibitory effect of cepharanthine on cytokine and chemokine production in monocyte/macrophages (M/Ms). Human primary M/Ms were incubated in the absence or presence of the compound for 2 h, unstimulated (NC) or stimulated with LPS (10 $\mu\text{g/ml}$), and further incubated. After a 24-h incubation, the levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-8 were determined by ELISA. Data are mean values \pm standard deviations of triplicate experiments. Statistical significance between the control (LPS-treated but compound-untreated) sample and each compound-treated sample was determined by the *t* test. * $P < 0.05$, † $P < 0.01$.

D. 考察

我々はこれまでの研究において、抗炎症アルカロイドの CEP が慢性感染単球系細胞株からの HIV-1 増殖を選択的に抑制することを明らかにした (Okamoto *et al.*, *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **14**:1239-1245, 1998)。HIV-1 感染において産生されるウイルスのほとんどは、CD4⁺ T リンパ球への HIV-1 急性感染によってもたらされるが、一方で AIDS の発症とその進行には、CD4⁺ T リンパ球以外に単球・マクロファージも重要な役割を演じていると考えられている。特に HIV-1 感染に伴う中枢神経細胞の死滅には、HIV-1 に慢性感染したミクログリアやマクロファージがウイルス抗原や炎

症性サイトカインなどを産生し、その近傍にある神経細胞に障害をもたらすことが、その原因の一つである考えられている。またマクロファージから産生される TNF- α のような炎症性サイトカインの中には、感染細胞からのウイルス産生を著しく増加させる作用を持つものもある。今回、CEP は活性化されたマクロファージからの炎症性サイトカインやケモカインの産生を抑制し、一方で神経細胞に対してはこれらの物質によって誘導される細胞死から保護する作用を有することが分かった。従って CEP ような薬剤は、既存の抗 AIDS 薬と併用することにより、HIV-1 による中枢神経障害の有効な予防・治療薬になる可能性が高い。

CEP を最大含有成分として含むセファランチン 製剤は、臨床の現場において抗アレルギー薬として幅広く使われており、重篤な副作用も報告されていないことから、CEP そのものもすぐに臨床応用できる可能性が高い。しかしさらに活性が強く毒性が低い誘導体を得ることができれば、その臨床効果がより一層期待できると思われる。現在、われわれは次の段階として、種々の CEP 誘導体について、抗 HIV-1 効果を検討中である。

E. 結論

HIV-1 による中枢神経障害の発生機序として、HIV-1 感染マクロファージから産生されるサイトカインや HIV-1 由来のタンパク質が最も重要な役割を果たしていると考えられているが、今年度の研究において、CEP は活性化されたマクロファージからのサイトカインの産生を抑制し、一方で神経細胞に対してはこれらの物質によって誘導される細胞死を抑制する作用を有することが明らかとなった。これまでにわれわれは、単球由来の HIV-1 潜伏感染細胞である U1 において、CEP は各種刺激による HIV-1 の遺伝子発現を抑制する効果を見いだしており、以上のことからこの薬剤が HIV-1 感染による中枢神経障害の予防・治療薬となる可能性が高いと考えている。

今後は確立したアッセイ系を用いて、さらに有望な薬剤（CEP 誘導体を含む）を探索するとともに、神経細胞死の誘因や機序について、詳細に検討する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Baba M, Miyake H, Okamoto M, Iizawa Y, Okonogi K. 2000. Establishment of a CCR5-expressing T-lymphoblastoid cell line highly susceptible to R5 HIV-1. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **16**:935-941.

Shiraishi M, Aramaki Y, Seto M, Imoto H, Nishikawa Y, Kanzaki N, Okamoto M, Sawada H, Nishimura O, Baba M, Fujino M. 2000. Discovery of novel, potent and selective small molecule CCR5 antagonists as anti-HIV-1 agents: synthesis and biological evaluation of anilide derivatives with a quaternary ammonium moiety. *J. Med. Chem.* **43**:2049-2063.

Okamoto H, Cujec TP, Okamoto M, Peterlin BM, Baba M, Okamoto T. 2000. Inhibition of the RNA-dependent transactivation and replication of human immunodeficiency virus type 1 by a fluoroquinoline derivative K-37. *Virology* **272**:402-408.

Makino M, Wakamatsu S, Shimokubo S, Arima N, Baba M. 2000. Production of functionally deficient dendritic cells from HTLV-I-infected monocytes: implication for the dendritic cell defect in adult T cell leukemia. *Virology* **274**: 140-148.

Sawada H, Tamada D, Kawase T, Hayakawa Y, Lee K, Kyokane J, Baba M. 2001. Synthesis and properties of novel fluoroalkyl end-capped oligomers containing phosphorous segments. *J. Appl. Polym. Sci.* **79**:228-245.

Kanzaki N, Shiraishi Y, Iizawa Y, Baba M, Nishimura O, Fujino M. 2000. TAK-779. *Drugs of the Future* 25: 252-258.

Akashi M, Ueno M, Niikawa T, Takehara S, Serizawa T, Kawamura M, Hayakawa T, Okamoto M, Baba M. 2000. Capture of HIV-1 gp120 and virions by lectin-immobilized polystyrene nanospheres. In: Park KD, Kwon IC, Yui N, Jeong SY, Park K (Eds), *Biomaterials and Drug Delivery toward New Millenium*, pp. 633-640, Han Rim Won Publishing Co., Seoul, Korea.

Fujii R, Okamoto M, Aratani S, Oishi T, Ohshima T, Taira K, Baba M, Fukamizu A, Nakajima T. 2001. A role of RNA helicase A in TAR-mediated transcriptional regulation of human immunodeficiency virus type 1. *J. Biol. Chem.* in press.

Okamoto M, Ono M, Baba M. 2001. Suppression of cytokine production and neural cell death by the anti-inflammatory alkaloid cepharanthine: a potential agent against HIV-1 encephalopathy. *Biochem. Pharmacol.* in press.

Baba M. 2001. Cellular factors as targets for anti-human immunodeficiency virus therapy. In: De Clercq E (Ed), *Antiviral Therapy*, ASM Press, Wasington, DC. in press.

2. 学会発表 (招待講演・シンポジウムのみ)

Baba M. 2000. Small-molecule inhibitors of HIV-1 replication targeting chemokine and viral gene expression.

2nd International Conference of the Mór Kaposi Research Foundation. Budapest, Hungary.

馬場昌範. 2000. HIV-1 感染による中枢神経障害の予防・治療薬. 第3回白馬シンポジウム. 白馬.

馬場昌範. 2000. 薬剤耐性発現への基本的アプローチ: 解析法とその限界. 第14回日本エイズ学会学術集会シンポジウム. 京都.

G. 知的所有権の取得状況

三宅 洋, 飯澤祐史, 馬場昌範. HIV 産生細胞株およびその用途. 出願人: 武田薬品工業株式会社, 特願 2000-143416, 平成12年5月11日出願.

馬場昌範, 明石 満, 足立正一. エイズワクチン. 出願人: 馬場昌範, 明石満, 特願 2000-151487, 平成12年5月23日出願.

馬場昌範, 北島 勲. 抗 HIV 薬. 出願人: バイエル・アクチエンゲゼルシャフト, 特願 2000-203681, 平成12年7月5日出願.

一川隆史, 杉原芳博, 神崎直之, 西村紀, 馬場昌範. ピペリジン化合物, その製造法および用途. 出願人: 武田薬品工業株式会社, 特願 2000-328851, 平成12年4月27日出願.

三宅 洋, 飯澤祐史, 馬場昌範. T細胞株およびその用途. 出願人: 武田薬品工業株式会社, 特願 2000-350685, 平成12年11月17日出願.

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

HIV 等レトロウイルスによる痴呆や神経障害の病態と治療に関する研究

分担研究者 高宗暢暁 熊本大学薬学部助手

研究要旨

本研究はウイルス性因子である細胞外 Tat および HIV-1 envelope を介した神経細胞障害を、Tat および CXCR4 を標的とした薬剤で制御することを目的とした。

分担研究者らは、Tat と直接結合しその活性を阻害する抗 Tat 薬の開発を行うにあたり、Tat の zinc finger 形成に必須であるチオール基に着目し、このチオール基と結合すると考えられる生体内・天然に存在するジスルフィド化合物を検索し、抗 HIV 活性及び抗 Tat 活性を検討した。その結果、thiamine の前駆体として化学合成された thiamine disulfide (TDS)誘導体の1つ *o,o'*-bismyristoyl thiamine disulfide (BMT)が、各種 HIV-1 株に対して抗 HIV 活性を示し、また Tat の転写活性を阻害することを見いだした。さらに、質量分析により BMT が Tat に直接結合することを確認した。以上の結果から、BMT は、細胞内で Tat に直接結合し、その阻害活性を発揮すると考えられた。細胞外に放出された Tat は神経細胞を直接的または間接的に障害することが示唆されており、BMT が細胞外 Tat に直接結合しその機能を阻害することが期待される。

また、分担研究者らは、環状構造の zinc dithiocarbamate 誘導体、3,6,9,12-tetraazatetradecane-1,14-diylbis (zinc dithiocarbamate)-S,S'-dioxide, (Z-8) が抗 HIV 活性を示すことを見だし、その作用機構を検討した。その結果、Z-8 は、CXCR4 をセカンドレセプターとして利用する HIV-1 株の感染、複製を特異的に阻害し、さらに CXCR4 のリガンド SDF-1 α の活性及び抗 CXCR4 抗体 12G5 の結合を阻害したことから、Z-8 が、CXCR4 のアンタゴニストとして機能し抗 HIV 活性を示すことが明らかとなった。HIV-1X4(CXCR4 を利用して感染するウイルス)による神経細胞障害は、env と CXCR4 の相互作用を介して誘導することが報告されており、CXCR4 のアンタゴニストである Z-8 が、ウイルスによる神経細胞障害を抑制する効果を示すことが期待される。

以上のことから、Tat を標的とする BMT および CXCR4 を標的とする Z-8 は、HIV-1 複製を抑制するとともに、HIV-1 複製に伴う細胞外 Tat 及び HIV-1 envelope を介した神経障害を制御できると予測され、今後その詳細について検討する予定である。

A. 研究目的

Highly active anti-retroviral therapy (HAART)の導入により、著しい成果を収めている HIV 感染症治療において表面化しつつある多剤耐性ウイルス出現の問題は、痴呆症・運動障害等を引き起こす HIV 脳症の発症者の増加を予測させ、近い将来、社会的に大きな問題を引き起こすと考えられる。HIV 脳症に適應される

治療薬が存在しない現在、この疾病の発症機構解明とその治療薬開発は緊急性を有する課題であり社会的義務である。

分担研究者らは、HIV 脳症治療薬開発を行うにあたり、ウイルス複製阻害と HIV 脳症発症阻害の両方に適應可能な治療薬への展開を指向するため、HIV-1 の複製に必須のウイルス性タンパク質であり、HIV 脳症発症に関与することが報告

されている Tat と HIV-1X4 envelope に注目した。Tat は HIV-1 遺伝子の転写活性化因子として機能するのみならず、細胞外にリリースされ HIV 感染症の症状悪化を促進する多様な生物活性を持つことが報告され、特に HIV 脳症関係では、細胞外 Tat が神経細胞に対し直接および間接的に障害を与えることが示唆されている。このような背景から、細胞内外に存在する Tat に直接結合し、その活性を制御することを目的として、Tat の zinc finger のチオール基をターゲットとする薬剤開発を行った。また、CXCR4 を利用する HIV-1 X4 の envelope は、特に神経細胞障害活性が高い傾向があることから、HIV-1 複製阻害及びウイルス誘導神経細胞障害の抑制を目的として、CXCR4 をターゲットとする薬剤の開発を行った。

B. 研究方法

BMT の抗 HIV 活性の測定

Laboratory isolates である IIIB, MN, JRFL, SIVmac251 および primary isolates である KMT, KMO 株に対する BMT(Fig.1)の抗 HIV 活性を、ターゲット細胞として MT-4, Hut78, 及び PBMC を用いて、p24 抗原量の定量及びウイルス感染価を Behrens-Karber 法により定量することで測定した。

HIV-1 Tat 転写活性測定(SeAP assay)

分泌型アルカリフォスファターゼ (SeAP) を組込んだプラスミド pBC12/HIV/SeAP 及び Tat gene を組込んだ pBC12/HIV/TAT を COS-7 細胞に両プラスミドを co-transfection して、Tat のトランス活性化作用を細胞外に分泌してくる SeAP の酵素活性を p-ニトロフェニルホスフェートを基質として酵素反応により遊離してくる p-ニトロフェノールを測定し求める。

Thiamine 誘導体の Tat 結合活性

組換え Tat を BMT で処理後、Tat の分子量を質量分析装置(MALDI-TOF MS)により分析した。

Z-8 の抗 HIV 活性測定

ウイルスとして X4 (LAV,HXB2),R5 (JRFL,SIVmac251)及び R5X4 (89.6,KMT) を用い、ターゲット細胞として MAGI(CXCR4 発現), 及び MAGIC-5 細胞(CXCR4,CCR5 発現)を用い Z-8(Fig.1)の抗 HIV 活性を測定した。

細胞内 Ca²⁺flux 測定

Ca²⁺ 蛍光指示薬 fluo3AM を処理した Molt4#8 細胞を SDF-1 α 刺激し、細胞の蛍光強度をフローサイトメーターで測定した。

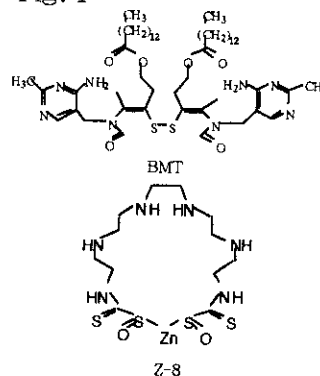
競合実験

Z-8 を前処理した Molt4#8 細胞に抗 CXCR4 抗体 12G5 を反応させ、2 次抗体として FITC 標識 anti-mouse IgG を用い、細胞の蛍光強度をフローサイトメーターで測定した。

(倫理面への配慮)

実験動物に対する動物愛護上の配慮は、必ず熊本大学実験動物倫理会の規則に従い、動物愛護上の諸問題に配慮して行う。平成 12 年度においては、動物実験を行っておらず、倫理面の問題は無いと判断した。

Fig. 1



C. 研究結果及び考察

チオール基に結合すると考えられる生体内・天然に存在するジスルフィド化合物を検索し、抗 HIV 活性を検討した。その結果、thiamine の前駆体として化学合成された TDS 誘導体の1つ BMT が、各種 HIV-1 株に対して抗 HIV 活性を示した。BMT は primary isolates 及び laboratory isolates HIV-1 に対し、1~25 μM の濃度範囲で著しいウイルス複製阻害を示した (Table I)。

Table I Anti-HIV-1 Activity of BMT to Laboratory Isolates and Primary Isolates

Biological phenotype	Patient isolate code	Targeting cell	Syncytium formation	Minimal effective dose (μM)	p24 antigen (IC_{50} (μM))
			m.o.i.		
			Infection dose (pg/ml)		
Primary isolates					
R5	KMO (slow low)	PBMC	—	—	67 N.D. ^{a)}
X4	KMT (X4R5?)	PBMC	0.1	25 μM	N.D. ^{b)} N.D. ^{b)}
			0.5	25 μM	N.D. ^{b)} N.D. ^{b)}
Laboratory isolates					
X4	MN	PBMC	0.1	12.5 μM	N.D. ^{b)} N.D. ^{b)}
			1.5	12.5 μM	N.D. ^{b)} N.D. ^{b)}
X4	HTLV-IIIB	CEM	0.01	1 μM	— N.D. ^{b)}
X4	SIVmac251	Hu78	0.01	1 μM	— N.D. ^{b)} (p27)
X4	SIVmac251	CEM174	—	—	— 26.4 μM (p27)
R5	JRFL	PBMC	—	—	667 14.7 μM

a) m.o.i., multiplicity of infection
b) N.D., not determined

Fig. 2 Effect of BMT on HIV-1 Tat activity

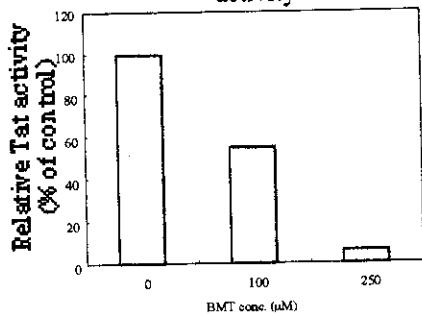
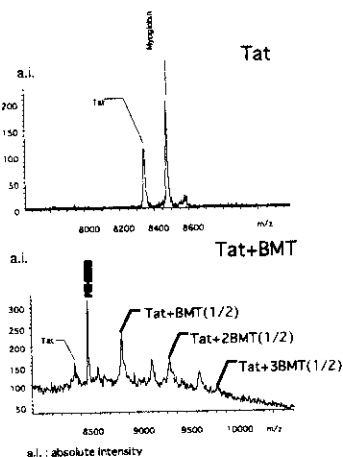


Fig. 3 Binding of BMT to Recombinant HIV-1 Tat



また、BMT の Tat 転写活性に対する阻害効果を SeAP assay により調べた結果、BMT の濃度依存的な Tat 転写活性の抑制が認められた (Fig. 2)。

組換え Tat に BMT を処理後、その Tat の分子量を質量分析装置 (MALDI-TOF MS) で測定した結果、1/2 分子量の BMT が 1~3 分子結合した分子量の Tat が検出され、BMT の Tat への直接的な結合が確認された (Fig. 3)。これは、BMT が S-S 交換反応により、Tat の zinc finger 領域のシステインのチオール基に結合したためと予想される。このように、BMT が Tat に直接結合すると、その転写機能に重要であると考えられる zinc-finger の立体構造の破壊が起こることが推察され、また BMT のミリストイル基によって、Tat の正常な細胞内局在の破壊が惹起されると予想される。このような機序で、BMT は、Tat に直接結合することで、Tat による HIV-1 遺伝子の転写活性化を阻害し、抗 HIV 活性を発揮すると考えられる。

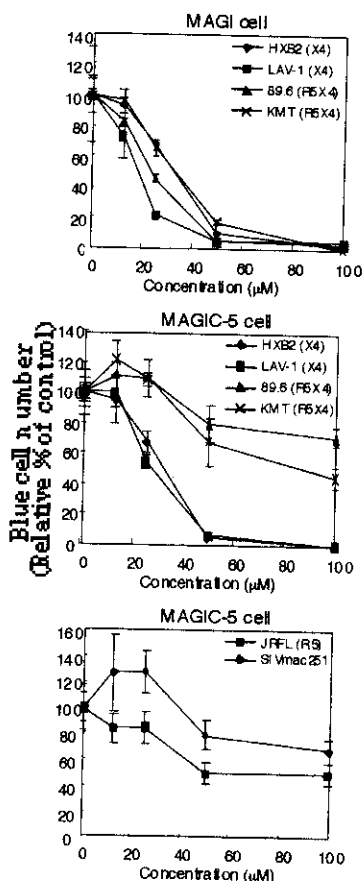
このように、直接結合することによって Tat 機能阻害の発現すると考えられる BMT は、細胞外に存在する Tat の機能も阻害することが予想される。近年になって、HIV-1 遺伝子転写活性化因子として発見された Tat は、細胞外に放出され、カポジ肉腫における血管形成の促進、T 細胞のアポトーシス誘導、そして神経細胞に対する直接的、間接的な障害の誘導等、細胞外で AIDS 進行を促進する多様な生物活性を持つことが報告されており、BMT は細胞内、外に存在する Tat の機能を制御できると期待される。

分担研究者らは、抗 HIV 活性を示す環状構造の zinc dithiocarbamate 誘導体、Z-8 (Fig. 1) が抗 HIV 活性を示すことを見だし、その作用機構解明を行った。ま

ず、Z-8 の X4 (LAV, HXB2), R5 (JRFL, SIVmac251) R5X4 (89.6, KMT) に対する抗 HIV 効果を、ターゲット細胞として MAGI(CXCR4 発現), 及び MAGIC-5(CXCR4,CCR5 発現)を用いて検討した。その結果、Z-8 は、MAGI 細胞において X4,R5X4 の複製をほぼ完全に阻害し、一方 MAGIC-5 細胞において、X4 の複製は阻害したが R5X4, R5 の複製を阻害しなかった (Fig. 4)。これらの結果から、Z-8 が、CXCR4 をセカンドレセプターとして利用する HIV-1 株の感染、複製を特異的に阻害することが示された。

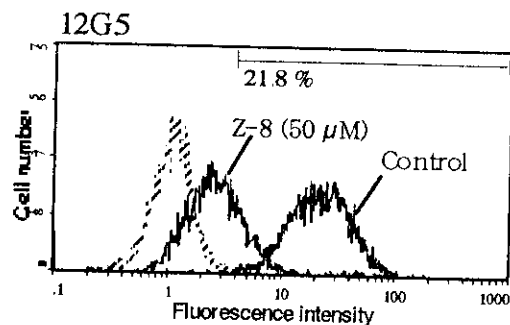
Z-8 の CXCR4 への関与が示唆された

Fig. 4 Effect of the Compound on Replication of the HIV-1 Variants



ことから、CXCR4 に対する Z-8 の影響を検討した。その結果、CXCR4 の特異的リガンド SDF-1 α 刺激することで誘導

Fig. 5 Competition assay



される Molt4#8 細胞内 Ca²⁺flux の誘導が、Z-8 によって阻害された (data not shown)。さらに、CXCR4 に対するモノクローナル抗体 12G5 の細胞表面発現 CXCR4 への結合を Z-8 が阻害した (Fig. 5)。以上の結果から、Z-8 が、CXCR4 のアンタゴニストとして機能し抗 HIV 活性を示すことが明らかとなった。

HIV-1X4(CXCR4 を利用して感染)による神経細胞障害は、env と CXCR4 の相互作用を介して誘導されることが報告されており、CXCR4 のアンタゴニストである Z-8 が、ウイルスによる神経細胞障害を抑制する効果を示すことが期待される。

D. 結論

本研究では、TDS 誘導体である BMT が Tat と直接結合することによってその転写活性を阻害し、抗 HIV 活性を有することが示唆された。今後、BMT の Tat 結合部位の同定、および神経障害作用を含む種々の細胞外 Tat 作用に対する BMT の影響を検討し、さらに、より高い抗ウイルス活性、抗 Tat 活性を有する BMT 誘導体の開発を行う予定である。

また本研究で、zinc dithiocarbamate 誘導体である Z-8 が CXCR4 のアンタゴニストとして作用し、抗 HIV 活性を発揮ことが明らかとなった。今後、これまで得られた知見を基にさらに活性の高い CXCR4 のアンタゴニストの開発を行い、さらに

HIV-1 (X4 株)によって誘導される神経細胞障害に対する抑制効果を検討していく予定である。

CXCR4 や Tat は HIV-1 複製のための必須の因子であるが, HIV-1 感染症における神経障害への関与もまた強く示唆されている。これらの分子の機能を制御する化合物は, HIV-1 複製および HIV-1 による神経障害の阻害を可能し, HIV 感染症に対する適応範囲の広い治療薬に発展・展開すると期待される。

E. 研究発表

論文発表

Cyclic Zinc-Dithiocarbamate-S,S'-Dioxide Blocks CXCR4-mediated HIV-1 Infection.

N. Takamune, S. Misumi, and S. Shoj, Biochem. Biophys. Res. Commun. 272: 351-356 (2000)

学会発表

1. Cyclic zinc dithiocarbamate derivatives の抗 HIV 活性とその作用機構

高宗暢暁, 瀧上貴司, 林辰一郎, 三隅将吾, 庄司省三, 日本生化学会九州支部例会プログラム抄録集, 54 (2000)

2. HIV-1 coreceptor CXCR4 に作用する新規化合物

高宗暢暁, 三隅将吾, 庄司省三, 第 1 回熊本エイズセミナープログラム抄録集, 21 (2000)

3. Cyclic zinc dithiocarbamate 誘導体の抗 HIV 活性と CXCR4 に対する作用

高宗暢暁, 三隅将吾, 庄司省三, 第 48 回日本ウイルス学会学術集会・総会抄録集, 96 (2000)

4. HIV-1 protease suicide inhibitor, HIV-1 p2 の mimicking のための生化学的基礎研究

三隅将吾, 高宗暢暁, 庄司省三, 第 48 回日本ウイルス学会学術集会・総会抄録集, 292 (2000)

5. 抗 HIV 活性を示す cyclic zinc dithiocarbamate derivatives の CXCR4 に対する作用

高宗暢暁, 三隅将吾, 庄司省三, 生化学, 72, 1059 (2000)

6. Chemokine receptor, CCR5, の合成環状 dodecapeptide に対する特異的単クローン抗体の調製及び本抗体による HIV-1 感染中和活性の検討

中島玲奈, 三隅将吾, 高宗暢暁, 庄司省三, 生化学, 72, 1059 (2000)

7. HIV-1 coreceptor, CXCR4 の特異的部位に対する単クローン抗体の調製

遠藤昌史, 三隅将吾, 林辰一郎, 高宗暢暁, 庄司省三, 生化学, 72, 1059 (2000)

8. HIV-1 Tat Zn-finger domain を標的とした抗 HIV 薬の作用機構の検討

鱒口和也, 山口雅典, 三隅将吾, 高宗暢暁, 橋岡臣, 庄司省三, 生化学, 72, 1060 (2000)

9. HIV-1 coreceptor-based vaccine の開発のための基礎研究

林辰一郎, 向井鎌三郎, 橋岡臣, 猪井俊敬, 本田徹朗, 高宗暢暁, 三隅将吾, 庄司省三, 生化学, 72, 1060 (2000)

10. HIV-1 protease の自殺阻害様式

森川雪美, 三隅将吾, 朝長充則, 大隈浩一, 高宗暢暁, 庄司省三, 生化学, 72, 830 (2000)

11. CCR5 由来合成環状 dodeca peptide に対する特異的単クローン抗体の調製及びウイルス感染防御.

中島玲奈, 三隅将吾, 高宗暢暁, 庄司省三, 日本エイズ学会誌, vol.2 No.4 p305 (2000)

12. CXCR4 の特異的部位を mimic した環状ペプチドに対する単クローン抗体の調製及び性質

遠藤昌史, 三隅将吾, 林辰一郎, 高宗暢暁, 庄司省三, 日本エイズ学会誌, vol.2 No.4 p394 (2000)

13. 精製 HIV-1 粒子のプロテオーム解析

瀧上貴司, 三隅将吾, 高宗暢暁, 庄司省三, 日本エイズ学会誌, vol.2 No.4 p449 (2000)

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

HAM 患者の HTLV-I プロウイルス量と臨床症状の検討

主任研究者 出雲 周二¹

研究協力者 竹之内 徳博¹、山野 嘉久²、宇宿 功市郎³、納 光弘²

鹿児島大学 1) 難治性ウイルス疾患研究センター、2) 第三内科、

3) 医療情報管理学

研究要旨 HAM 患者の末梢血及び髄液中のプロウイルス量を測定し臨床症状との相関について比較検討した。長期追跡患者において末梢血中のプロウイルス量は変動しており、プロウイルス量の上昇と臨床症状の増悪との相関が示唆された。また髄液中のプロウイルス量の推移は末梢血プロウイルス量の推移と比べて、より HAM の病態を反映していることが予想された。

A. 研究目的

HAM 患者の運動障害度は、急性、亜急性、緩徐進行性の様々な経過をたどりながら、長期的には固定化していく。しかしながら、長期に運動障害度が安定している患者においても一時的に亜急性にそれが悪化する時期がある。また HAM 患者ではウイルス抗原の発現が脊髄病巣・髄液・末梢血などのリンパ球で検出されており、HTLV-I プロウイルス量や抗原発現量が HAM の発症や病勢に深く関わっていることが疑われている。これまで、HAM 患者の PBMC 中の HTLV-I プロウイルス量は変動していることが報告されており、また HAM 患者の PBMC 中プロウイルス量は無症候性キャリアーのそれと比べて高値を示す傾向にあると報告されている。これより我々は、プロウイルス量の変動と臨床症状の変動には相関関係があるのではないかとの仮説を立て、HAM 患者の運動障害度の重症度・進行度と PBMC 中 HTLV-I プロウイルス量が相関関係にあるかを長期追跡患者にて比較検討した。

また HAM 患者髄液においてウイルス抗原陽性細胞の比率は末梢血のそれと比較して上昇しているという報告がある。一方で炎症のマーカーの一つであるネオプテリンは HAM の病勢を反映すると考えられており、末梢血中のものと比べて髄液中のものが HAM の病勢と強く相関していると報告されている。これらのことから髄液はより HAM の病態を反映していると考え、髄液中 HTLV-I プロウイルス量と HAM の病態が相関関係にあるかを末梢血中プロウイルス量と併せて比較検討した。

B. 研究対象・方法

研究 1：対象は長期経過を追跡できた HAM 患者 23 名（男 8 名、女 15 名）。患者の経時的に凍結保存した末梢血リンパ球より DNA を抽出し、HTLV-I の pX 領域を標的として定量的 PCR を行った。同様に β actin を標的に定量的 PCR を行い、これらの結果から患者の PBMC におけるプロウイルス陽性

細胞率を算出した。さらに患者の経時的な運動障害度を評価し両者を比較検討した。

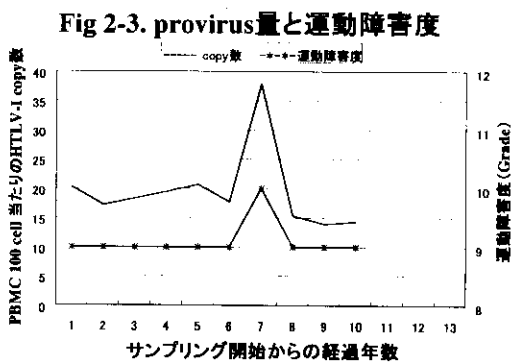
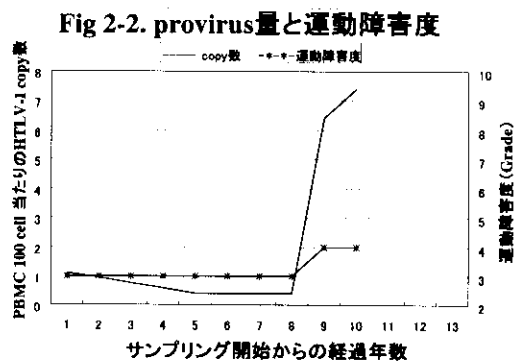
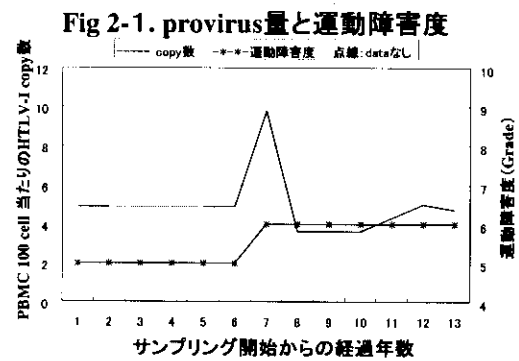
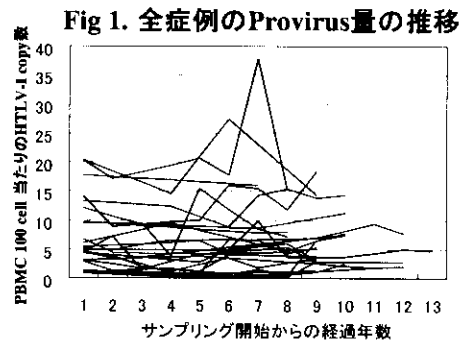
研究2：対象はHAM患者10名(男1名、女9名)。髄液と血液を同時採取した後、各々よりDNAを抽出し研究1と同様に定量的PCRを行った。これらの結果から患者の髄液及びPBMCにおけるプロウイルス陽性細胞率を算出した。さらに患者の運動障害度と発症後経過年数を評価しこれらを比較検討した。

今回の検討はHAM患者、HTLV-Iキャリアの方からHAM病態解析のために提供、保存された末梢血リンパ球を、各集団として分類したものを使用した

C. 研究結果

研究1：プロウイルス量の分布は0.3~37.8 copy/100 PBMCと広範囲にあった。個々の症例では、プロウイルス高値の患者は高値のまま、低値の患者は低値のまま推移した。しかしながら、一時的に2倍以上のプロウイルス量の変動があった患者が23名中15名に認められた。プロウイルス量の有意な変動はプロウイルス量高値の患者のみならず低値の患者にも認められた(Fig 1)。運動障害度とプロウイルス量との間に明らかな相関関係は認められなかった。経過中に納の運動障害度スコアで1度以上の悪化のみられた患者は23名中9名であり、その時点でプロウイルス量の有意な変化を示した者は8名(例 Fig 2-1、2-2)、有意な変化のなかった者は1名であった。運動障害度の悪化時に治療目的でステロイドを投与された患者2名において、運動障害度の軽快と共にプロウイルス量の減少が認められた(例 Fig 2-3)。運動障害度の変化のな

かった患者14名中7名にもプロウイルス量の一時的な変動が認められた。



研究2: 髄液とPBMCの全てのサンプルからプロウイルスが検出された。末梢血単核球のプロウイルス陽性細胞率と比べて髄液単核球のプロウイルス陽性細胞率は10名中8名で有意に高く最大で約8倍となっていた。感染率の明らかな差でなかった2名はいずれも発症後25年以上を経過しており、明らかな差のた8名はいずれも発症後15年以下であった(Fig 3)。明らかな症状増悪を認める症例では、髄液と末梢血のプロウイルス陽性細胞率の比が上昇している傾向にあった(Fig 4)。運動障害度については血中と髄液中のいずれにおいてもプロウイルス量と明らかな相関関係は認められなかった(Fig 5)。

D. 考察

血中PBMC中のプロウイルス量の変動はほとんどの場合測定誤差範囲内にあり、このことから各個人において基本的にはプロウイルス量は安定しており長期的な変動は小さいと考えられた。しかしながら、そのレベルが各個人で異なる理由について明確な答えはない。その理由としてはウイルス側の要因、宿主側の要因、環境因子などが考えられるが結論はでていない。免疫学的に同等であるはずの一卵性双生児においてウイルス量の著しく異なる例の報告や、HTLV-I tax領域の subgroup でHAMの発症率が異なるとの報告があり、このことからウイルス側の要因が示唆されている。一方で、HLAとの関連についても報告されており、このことから宿主側の要因が示唆されている。環境因子との関連については今のところ明確な報告はない。

Fig 3 プロウイルス感染率と罹病期間(年)

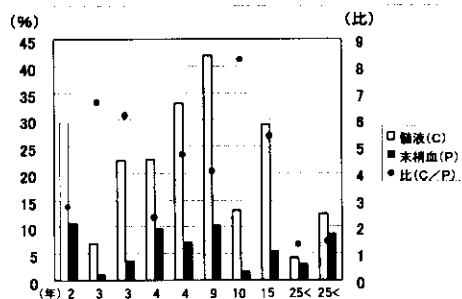


Fig 4 プロウイルス感染率と進行度

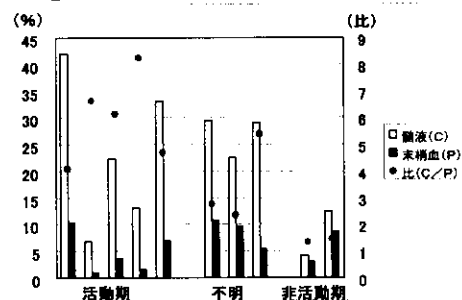
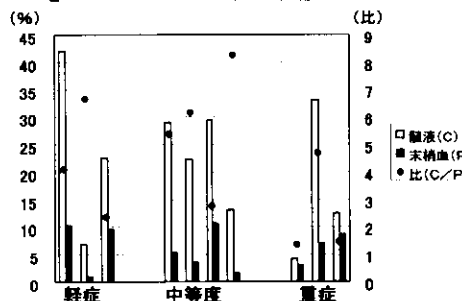


Fig 5 プロウイルス感染率と重症度



運動障害度とプロウイルス量との間に明らかな相関関係は認められなかった。プロウイルス量とHAMの罹患率との相関関係は報告されているが、HAMとなった以降の運動障害度とプロウイルス量とは基本的には相関しないことが示唆された。運動障害の程度は、罹病期間や治療の状況、宿主側の免疫応答の強さ、年齢や性別、さらにはその人本来の運動能力とも関連が予想されるので、単純にはプロウイルス量に相関しないと考えられる。

運動障害度の悪化が認められた患者の多くは、その時期に一致してプロウイルス量の上昇が認められた。これによりプロウイルス量の一時的な上昇は臨床症状の進行との関連が予想された。今のところプロウイルス量上昇の原因ははっきりしていない。一方で、運動障害度の変化のなかった患者にも半数にプロウイルス量の明らかな変動が認められた。これについてはスコア上に現れない程度の症状の変化をきたしている可能性もあるため、さらに詳細な臨床症状のスコアリングと解析が必要と思われる。

末梢血と髄液中のプロウイルス量の比較から HAM の病態として病巣におけるプロウイルス量の上昇が存在することが確認された。しかしながら今回の研究では検体が微量であったため、リンパ球サブタイプについての検討はなされておらず、この感染率の上昇も感染細胞が髄液に移行しやすいために生じたものなのか、単にリンパ球サブタイプの構成が変化したために起こったものなのかは確認の必要がある。発症後経過年数や症状の進行度との比較からプロウイルス量の上昇は発症時・発症初期もしくは症状増悪期に認められ、その後長期間をかけて沈静化していくことが予想された。しかしながらこれについては、今回は症例が少なく特に、発症後長期間経過例においてかつサンプル採取時点での活動性を認めた症例がなかったため、今後症例を増やして検討する必要があると思われる。運動障害度と髄液プロウイルス量との間に明らかな相関関係は認められなかった。PBMC 中プロウイルス量との比較の時と同様、運動障害の程度は様々な要因との関連が予想されるので、単純にプロウイルス量に相関しない

と考えられた。

E. 結論

HAM 症状の一過性の増悪は可逆性のこともあるが、その状態が長期にわたると脊髄の実質障害が完成してしまい治療は困難なものとなる。進行を抑えるためには増悪の早期において的確に治療を行うことが必要であるが、症状が明らかな場合を除いてその時期をとらえるのは困難である。今回の研究で、HAM 患者においてプロウイルス量の一過性の増加は臨床症状の悪化との相関が示唆された。プロウイルス量の経時的な測定は HAM の病勢を把握する客観的指標となり、さらに治療を行う上でも有用であると思われる。

髄液におけるプロウイルス陽性細胞率の有意な上昇は、感染細胞の易浸潤性やリンパ球サブタイプの構成の変化以外にも髄腔内における感染細胞の増殖の可能性も示唆している。髄液中プロウイルス量の測定は PBMC 中プロウイルス量の経時的な測定と同様に HAM の病態把握に有用であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

未定

2. 学会発表

第 41 回日本神経学会総会 2000 年 5 月
竹之内徳博、出雲周二、松崎敏男、中川正法、宇宿功市郎、納 光弘
HAM 患者における HTLV-I プロウイルス量の長期追跡

厚生科学研究費補助金 (エイズ対策研究事業)
分担研究報告書

HAMとATLの発症と関連したHTLV-I *tax*の変異

分担研究者 納 光弘 鹿児島大学第3内科
共同研究者 古川 良尚 鹿児島大学第3内科

研究要旨 HAM・ATLの発症に関して宿主側の要因だけではなく、ウイルス側の要因がないかをHTLV-I *tax*の領域について調べ、HTLV-Iの*tax*領域にも subgroupが存在し、*tax* Aの有無によるHAMのodds比が2.46で有意に高い事、ATLでは発症過程でCTLからescapeしたクローンが選択されていることを見いだした。

A. 研究目的

これまでHAM・ATLの発症に関して宿主側の因子であるHLAのタイプと疾患との関連が議論され、例えば急性型のATLではHLA-A26が多い事、HAMではHLA-A*02の頻度が少ない事が報告されている。しかしながら、HTLV-Iウイルスそのものには、疾患特異的な変異はこれまで報告されていない。HTLV-IのTax蛋白はウイルス自身の転写活性化のみならず、宿主細胞の遺伝子にも作用し、HTLV-I感染細胞を増殖させたり、サイトカインの産生を活性化する。一方、TaxはHTLV-I感染細胞に対するCTLの主な標的であり、HTLV-I感染細胞に対するCTLは感染細胞の減少や、炎症を引き起こす可能性があり、Taxの変異と疾患との関係について興味もたれる。一方ATL発症の立場から考えると、HTLV-I感染細胞は初期にはTax発現により、ウイルスのエンハンサーや、IL-2、IL-2Rのエンハンサーまたc-fosのenhancerに働きかけて、その発現を亢進することにより、感染細胞の増殖に対してメリットを与えると考えられる。一方でTaxはHTLV-Iに対するCTLの主な標的であるので、Taxを発現することはCTLによる排除を受ける為に感染細胞の増殖にとってはデメリットである。ATL発症の途中ではTaxを発現することによるメリットとデメ

リットが拮抗する段階が存在すると考えられそのような段階ではHTLV-I感染細胞に対するCTLから逃れられるような細胞が選択されている可能性がある。このことを調べるためにHTLV-I *tax* 遺伝子の塩基配列を調べた。

B. 研究対象・方法

鹿児島在住の61人のHAM、62人の健康なキャリアー、55人のATL患者について*tax*のsequence(ATKの7295-8356番目の塩基に相当する部分)を行った。また宿主側の因子でHTLV-Iウイルス量を減らすように働くとされているHLA-A*02の有無との関係も調べた。HAM発症のリスクとしてHTLV-I *tax*のsubgroup分類をRFLPを追加して合計HAM192名、キャリアー200名について行った。ATLにおいては観察された変異のあるTaxが本来のTaxに対するCTLに認識されるかどうかを調べた。

C. 研究結果

A. HAMについて

1. HTLV-I *tax*におけるsubgroupの存在。
*tax*にはいくつかの塩基置換が見られたが、7897, 7959, 8208, 8344が常に同時に置換

している HTLV-I のサブグループがあることに気づき(表 1)、このことは分子系統解析によって確かめられた(図 1)。この 4 つの特別な塩基置換を伴ってものを *tax A* と名づけた。またこの 4 つの特別な部位の塩基がコンセンサスの配列であるものを *tax B* と名づけた。また LTR の sequence を行うと、*tax A* subgroup および *tax B* subgroup はそれぞれ LTR での分類での Cosmopolitan A および Cosmopolitan B に相当する事が分かった。(図 2)

2. Subgroup A は HAM において有意に高率に見られる。

シークエンスによる検討で *tax A* は HAM で 61 名中 10 名、HC で 62 名中 5 名、ATL で 55 名中 5 名と HAM に高頻度に見られる傾向が見られた。この事を確かめる為に、HAM 192 名および HC 200 例についてサブタイプ分類を行った。*Tax A* subgroup では ACC 11 制限酵素部位が生じる事を利用して、RFLP 解析を行った結果 *tax A* は HAM では 192 例中 30 名 15.6% にみられ、健康なキャリアーでは 200 人中 14 名、7% にしか *tax A* タイプはみられず、*tax A* は有意に HAM に多く見られる事が分かった。*tax A* の有無による HAM 発症に対する Odds 比は 2.46 で HAM になりやすい事が判明した(表 2)。

3. Subgroup の HAM 発症に対するリスクは HLA-A*02 とは独立である。

強い CTL 反応を起こしウイルスを減らすとされる HLA-A*02 の有無と、Subgroup A の有無について、ロジスティック回帰解析を行った。*tax A* を持つことでの HAM 発症に対するオッズ比は 2.99 で、*tax A* は独立した因子である事がわかった。(表 3)

B. ATL について

1. HTLV-I を発現できなくなる Stop Codon の存在、および Tax の epitope の変化。

subgroup を規定する部位を除いた塩基の変化をまとめた(図 3)。ATL には *tax* のかなり 5' 側での stop codon の出現を 4 例に認めた。また ATL に特徴的な *tax* の変異としてして見られた 7337 番目の塩基置換は Tax

アミノ酸の 14 番目のアミノ酸置換をおこし、HLA-A*02 での Tax エピトープの変化を起こしていた(表 4)。他にも *tax* の広範な欠失を 2 例に HTLV-I の広範な欠失をザン法にて 5 例に認めた。(図 4)

2. Stop Codon は ATL 患者において新たに生じたものであり、かなり早期に生じている。

tax に塩基置換のあった HAM 患者およびその家族のキャリアーを調べると殆どの塩基置換は Transmittable であることがわかった(表 5)。例えば HAM9 の息子は同じ *tax* の変異をもち、母親からこの変異を持ったウイルスが感染したことが分かった。しかし Stop Codon 以外に *tax* の塩基置換が 2ヶ所存在している ATL36 患者の姉および母親の *tax* を調べると、stop codon 以外の 2 つの塩基置換は全く同じものが見られ、患者も姉も母親からの感染と考えられた。しかし stop codon は ATL36 患者にしか見られず、stop codon は ATL 発症の途中で新たに生じた変異と考えられた。またこの stop codon は患者の Consensus sequence としては ATL にしか見られないが、subclone としてはキャリアー 2 例中 2 例に、また HAM5 例中 3 例に見られ腫瘍化していない人にも見られるので ATL 発症の早期に生じていると考えられた。

3. Epitope に変異の見られた Tax peptide は CTL から認識されなくなる。

Tax ペプチド 11-19 には ATL3 症例に Tax アミノ酸の 14 番目が Glycine から Arginine に変化していた。このうち 2 症例は HLA-A2*02(+) であった。HLA-A*02 だけを発現させるようにした Hmy-A2 cell に本来の Tax 11-19 ペプチドとこの 14 番目が Glycine から Arginine に変化していたペプチド (G4R) を pulse しておいて、本来のペプチドを認識する CTL によって killing が起こるかを調べたところ、本来の Tax 11-19 ペプチドは良く溶解されるのに、Tax の 14 番目がグリシンからアルギニンに変わったペプチド (G4R) の場合は全く killing が起こらない事が分かった。エピトープに変異をもつ細胞は CTL による除去をうけにくい事が示唆された(図 5)。

D. 考察

1. HAM に関して; HTLV-I はこれまで、LTR の部位の変異を元にして分子系統的に分類されている。tax 領域については変異が少ないために、これまで十分な分子系統解析がなされていなかった。しかし tax 蛋白はウイルス自体の転写を亢進したり、感染細胞を増殖させたり、また炎症性のサイトカインの産生を活性化し、更に tax は HTLV-I 感染細胞に対する CTL の主な標的であることから、tax の変異と疾患との関係について興味をもち今回解析したところ、HTLV-I の tax 領域にも従来の LTR での分類に相当する Subgroup が存在することがわかった。今回我々は tax A のほうが B よりも HAM 発症のリスクが高い事を示した。しかし現時点では tax の Subgroup そのものが HAM 発症のリスクを上げているという事は証明できていない。tax の Subgroup と LTR での Subgroup が密接に link しているので、tax 以外の部位の影響、あるいは HTLV-I の分類と関係するほかの未知の因子が原因である可能性もある。Tax の違い自体が原因であるかどうか、異なる tax による CTL 反応の違いや、サイトカイン遺伝子に対する transactivation 能の違いなどを現在調べている。

2. ATL に関して。ATL の発症過程では初期には HTLV-I tax は増殖の advantage を与えるが、一方で Tax を発現すると Tax に対する CTL により免疫的に排除されるので、Tax を発現することは不利である。そこである段階まで経て、例えば感染細胞が不死化したあとでは、Tax を発現しない、またはエピトープに変異があり、Tax をターゲットにした免疫機構から逸脱のできる細胞のほうがその後の ATL の発症には有利であると考えられる。このような Tax を発現できなくなっている Tax の変異や、CTL が認識できない Tax の変異をもった ATL 症例が見られた事は実際に ATL の発症過程ではこのような免疫学的な排除機構からの逸脱が ATL の発症過程に重要な役割を果たしていることを意味している。

E. 結論

1. tax A HTLV-I は tax B HTLV-I よりも HAM 発症のリスクが高く、HAM 発症のリスクに宿主側の素因だけでなく、ウイルスのタイプあるいはそれと関連した因子も影響していることがわかった。

2. ATL の中にはある段階まで経ると、HTLV-I を発現しない、またはエピトープに変異がある方が ATL の発症に都合が良い症例が存在することを示し、ATL 発症過程に tax をターゲットにした免疫機構からの逸脱も重要な役割を持っている事を示唆している。以上より ATL の発症過程を次のように推測した。

Tax は感染細胞の増殖に関わる因子であり、ATL 発症の早期段階では重要な役割を果たしていると考えられる。一方 Tax は CTL の標的でもありその発現は感染細胞の増殖には不利である。そこで不死化が起こった細胞では Tax を発現出来ないようなあるいは CTL から逃れられるような tax の変異を来した細胞のほうが増殖に有利となり選択される。このような細胞は更に p15 や p16 等の遺伝子の変異が蓄積し、より悪性度の高い急性型 ATL へと進展すると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Furukawa Y, Yamashita M, Usuku K, Izumo S, Nakagawa M, Osame M

Phylogenetic subgroups of human T cell lymphotropic virus (HTLV) type I in the tax gene and their association with different risks for HTLV-I-associated Myelopathy/Tropical spastic paraparesis. J Infect Dis 2000 Nov;182(5):1343-1349

2. 学会発表

1. 第 41 回日本神経学会総会 2000 年 5 月

古川 良尚、納 光弘

Tax 領域における HTLV-I subtype の存在と HAM 発症のリスクについて

2. 南九州腫瘍研究会 2000 年 12 月 12 日

古川良尚、久保田 龍二、納光弘、早川 仁、太良光利

ATL 発症過程における HTLV-I tax escape mutant の存在

表 1. HTLV-I tax での subgroup を分ける 4 つの特異的な塩基置換

	7897 [§]	7959 [§]	8208 [§]	8344 [§]
amino acid change in Tax A [¶]	N	A→V	S→N	N
ATK	C	C	G	A
Tax B (n=158)	C	C	G	A
Tax A (n=20)	T	T	A	C

§ 塩基番号は ATKstrain の相当番号。

¶ 塩基の変化によるアミノ酸の変化。N, no change

表 2. tax A HTLV-I は HAM で HCs より高頻度にみられる。

Analysis	HAM/TSP, No.		HCs, No.		ATL, No.		Odds of HAM/TSP by tax A		
	tax A	tax B	tax A	tax B	tax A	tax B	χ^2	P	Odds 比 CI, 95%
Sequence	10	51	5	57	5	50			
+ RFLP	30	162	14	186	N.D.	N.D.	6.47	0.014	2.46 1.26-4.80

tax A と tax B は tax の Subgroup。sequencing により 61 例の HAM, 62 例の無症候性キャリアー (HCs)、55 例の ATL について tax の subgroup を解析した。更に RFLP による解析を行い、合計 192 例の HAM 200 例の HCs について subgroup 分類を行った。

表 3. HLA-A*02 陽性/陰性、HTLV-I tax A 陽性/陰性の 2 つの要素と HAM 発症のロジスティック回帰

	χ^2	P	Odds 比	CI, 95%
HLA-A*02	16.79	<0.0001	0.40	0.26-0.62
tax A	9.56	0.0020	2.99	1.49-5.98

CI; confidence interval.

表 4. HLA-A02 の存在と 7337、7464 番目の塩基置換のまとめ。

No.	HLA-A*02	Nucleotide substitution at position	
		7337 (G to R)*	7464 (W to Stop)*
ATL 55	21 (38.2%)	3 (2)†	4 (1)
HAM 61	16 (26.2%)	0	0
HC 62	27 (43.5%)	1 (1)‡	0

P; Fisher's test (1 tailed)

*; 塩基置換に伴うアミノ酸の変化

†; HLA-A*02 陽性者数を括弧内に示す。

‡; 一例の HC では G と R の混在であった。

表 5. 家系内における HTLV-I tax sequence の比較

	Sex	Nucleotide change at position									
		7464	7496	7743	7934	7942	7953	8140	8283	8294	8368
ATK-1		G (W)	G (A)	G (G)	T (L)	C (T)	A (Q)	T (F)	A (N)	C (P)	G
HAM 9	F						G (R)				
Son of HAM 9	M						G (R)				
HAM 10	F								G (S)		
Son of HAM 10	M								G (S)		
HAM 19	M										A
Wife of HAM 19	F										A
HAM 24	F				C (L)			C (F)			
Sister of HAM 24	F				C (L)			C (F)			
HAM 34	F		A (T)								
Sister of HAM 34 (1)	F		A (T)								
Sister of HAM 34 (2)	F		A (T)								
HAM 39	F					T (T)					
Husband of HAM 39	M					T (T)					
ATL 36	M	A (STOP)		A (D)						T (S)	
Mother of ATL 36	F	No change		A (D)						T (S)	
Sister of ATL 36	F	No change		A (D)						T (S)	