

分担研究報告書

HAM 発症関連宿主要因と HTLV-I ウイルス量との相関について

分担者研究者 宇宿功市郎 鹿児島大学医学部医療情報管理学
研究協力者 斉藤峰輝、古川良尚、松元 渉、児玉大介、納 光弘 同 第3内科
竹之内徳博、出雲周二 同 難治性ウイルス疾患研・分子病理

研究要旨：HAM 発症に関わる宿主要因の HLA-A*02、Cw*08 が発症抑制に、HLA-DRB1*0101、B*5401 が発症促進に作用しているが、ROC 曲線からは、HTLV-I ウイルス量 2%で、感度 80%以上、特異度 80%以上で HAM 群とキャリア群を区別できることが明らかとなり、HTLV-I ウイルス量がより低い群で関連する因子(HLA-A*02、DRB1*0101)、より高い群で関連する因子(HLA- B*5401)が存在することを示した。重回帰分析から今回の集団の 80%において、HAMもしくはキャリアの予想が可能であった。

A. 研究目的

我々のこれまでの検討から、HAM は HTLV-I 感染者の 1%前後に発症し、個体内の HTLV-I ウイルス量は HTLV-I 感染未発症者(キャリア)の 7~16倍に増加していること、このウイルス量は HAM 発症者家族のキャリアにおいても家族歴のないキャリアより高いこと、感染ウイルス量が末梢血リンパ球の1%以上になると HAM 発症の危険率が等比級数的に上昇することがわかってきている。これらに加えて HAM 発症には宿主側の要因として、HLA-A*02、Cw*08、HLA-DRB1*0101、B*5401 が明らかとなり、前2者は発症抑制に、後2者は発症促進に作用している。今回は HTLV-I ウイルス量と、これら因子と HAM 発症の関連について検討を行った。あわせて HTLV-I ウイルス量から見た HAM 発症の危険因子についての検討を加え発症予測がどの程度可能かについても検討した。

B. 研究方法

HAM 224 例、HTLV-I キャリア 202 名を対象として、HTLV-I プロウイルス定量を行った。ウイルス定量は、既報の Prism7700 を用いた定量的 PCR 法により行っている。宿主要因としては、HLA タイピングを行い、これまでに報告されてい

る DNA タイピング法で行った。これらの宿主要因の解析と平行して、ウイルス側の要因としては、HTLV-I Tax のサブタイプを解析した。

また HAM 発症の危険率はこれまでの検討から HTLV-I ウイルス量で異なっているが、HAM とキャリアを区別できる可能性のある HTLV-I ウイルス量についてはこれまでに検討はあまりみられていない。このことを解決するために、0.5%ごとに HAM 発症数、HTLV-I キャリア数を算出し、ROC 曲線を描画後に、cut off 値を算出した。その値で HAM 群、キャリア群を各々 2 群に分け、前記の要因の HAM 発症への関与を検討した。以上の検討に加えてこれらの要因を使い、重回帰分析を行い、HAM 発症予測の可能性を検討した。

C. 研究結果

ROC 曲線からは、HTLV-I ウイルス量 2%で、感度 80%以上、特異度 80%以上で HAM 群とキャリア群を区別できることが明らかとなった(図)。HLA-DRB1*0101 は、HAM 群でキャリア群より高頻度に見られた($\chi^2=4.45$, Odds ratio 1.80 95% C.I. 1.04-3.11, $p=0.03$)が、この傾向は、HTLV-I ウイルス量 2%以下の HAM 群で強く見られ($\chi^2=4.18$, Odds ratio 2.4 95% C.I. 1.02-5.67, $p=0.04$)、2%以上群では認められなかった(表 1a)。

HLA-A*02は、HAM群でキャリア群より有意に頻度が低く($\chi^2=17.12$, Odds ratio 0.44 95% C.I. 0.29-0.65, $p=3 \times 10^{-5}$)、これは HTLV-I ウイルス量 2%以下群で顕著であった($\chi^2=6.73$, Odds ratio 0.39 95% C.I. 0.19-0.81, $p=0.008$)。2%以上群ではこの関係は認められなかった(表 1b)。

HLA-B*54では、HAM群で有意に頻度が高く($\chi^2=12.46$, Odds ratio 2.43 95% C.I. 1.47-2.00, $p=0.0004$)、この傾向は、HTLV-I ウイルス量 2%以上の HAM群で強く見られ($\chi^2=8.45$, Odds ratio 7.5 95% C.I. 1.74-32.30, $p=0.003$)、2%以下群では認められなかった(表 1c)。また、HAM発症の予測が可能かを解析したわけであるが、要因の有無をダミー変数に置き換え、重回帰分析を行った。これにより、今回の集団の 80%において、HAMもしくはキャリアの予想が可能であった(表 2)。

D. 考察

今回の検討では、HTLV-I ウイルス量がより低い群で関連する因子(HLA-A*02, DRB1*0101)、より高い群で関連する因子(HLA-B*5401)が存在することが示されたわけであるが、免疫応答の段階で関与するものか、連鎖する他の要因に関与しているものか、今後の更なる解析の必要性が指摘された。また、要因の有無をダミー変数に置き換えた重回帰分析では、今回の集団の 80%において予測が可能であったわけで、HLA以外の宿主因子の解析を加え、より精度の高い予測が出来るものと考えられた。

E. 結論

以上のように HTLV-I 感染後の状態は、宿主の要因、ウイルス側の要因によるわけであるが、今回よりウイルス量の高い群で、発症に関連する危険因子が明らかとなったことは極めて興味深い。このことは HAM 発症に関する HTLV-I ウイルス量に閾値があることを示唆しており、これまでの末梢血リンパ球の 1%以上に HTLV-I ウイルスが感染すると等比級数的に HAM 発症の危険率が増すことに

対応していると考えられた。

F. 健康危険情報

特に該当しない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsuzaki T, Nakagawa M, Nagai M, Usuku K, Higuchi I, Arimura K, Kubota H, Izumo S, Akiba S, Osame M. HTLV-I proviral load correlates with progression of motor disability in HAM/TSP: analysis of 239 HAM/TSP patients including 64 patients followed up for 10 years. *J Neurovirol.* 2001 7(3):228-234.
- 2) Wodarz D, Hall SE, Usuku K, Osame M, Ogg GS, McMichael AJ, Nowak MA, Bangham CR. Cytotoxic T-cell abundance and virus load in human immunodeficiency virus type 1 and human T-cell leukaemia virus type 1. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 2001 268(1473):1215-1221.
- 3) Saito M, Taylor GP, Saito A, Furukawa Y, Usuku K, Weber JN, Osame M, Bangham CR. In vivo selection of T-cell receptor junctional region sequences by HLA-A2 human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax11-19 peptide complexes. *J Virol.* 2001 75(2):1065-1071

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

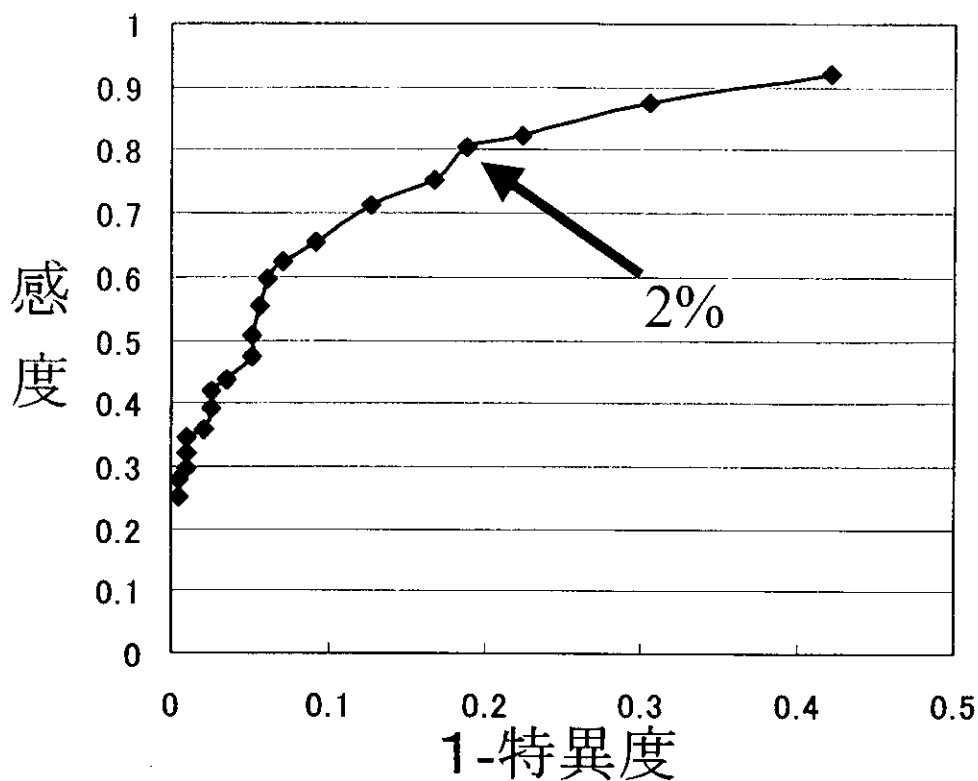


図. : HTLV-I プロウイルス量 ROC 曲線
HTLV-I プロウイルス量 0.5%毎の HAM 患者である感度と特異度より曲線を描いた。

表 1a.

HLA-DRB1*0101

| HAM 群 vs キャリア群; | χ^2 | Odds ratio | 95% C.I. | p |
|-----------------|----------|------------|-----------|------|
| Total | 4.45 | 1.80 | 1.04-3.11 | 0.03 |
| Viral Load < 2% | 4.18 | 2.4 | 1.02-5.67 | 0.04 |
| ≥ 2% | 0.32 | 1.34 | 0.48-3.17 | 0.74 |

表 1b.

HLA-A*02

| HAM 群 vs キャリア群; | χ^2 | Odds ratio | 95% C.I. | p |
|-----------------|----------|------------|-----------|--------------------|
| Total | 17.12 | 0.44 | 0.29-0.65 | 3×10^{-5} |
| Viral Load < 2% | 6.73 | 0.39 | 0.19-0.81 | 0.008 |
| ≥ 2% | 2.24 | 0.58 | 0.48-3.17 | 0.13 |

表 1c.

HLA-B*54

| HAM 群 vs キャリア群; | χ^2 | Odds ratio | 95% C.I. | p |
|-----------------|----------|------------|------------|--------|
| Total | 12.46 | 2.43 | 1.47-4.00 | 0.0004 |
| Viral Load < 2% | 0.012 | 1.06 | 0.43-2.64 | 0.91 |
| ≥ 2% | 8.45 | 7.5 | 1.74-32.30 | 0.003 |

表 2.

HAM 発症の予測が可能かを解析した。要因の有無をダミー変数に置き換え、重回帰分析を行った。下記の結果が得られている。これにより、今回の集団の 80%において、HAMもしくはキャリアの予想が可能であった (HAM 75%、carrier 87%)。

| | 回帰係数 | 標準誤差 | t値 | P値 | 95%下限 | 95%上限 |
|------------|----------|----------|----------|-------------|----------|----------|
| 定数項 | -0.70587 | 0.090514 | -7.79852 | 5.04357E-14 | -0.88379 | -0.52795 |
| Sex | -0.14201 | 0.083242 | -1.70596 | 0.088758672 | -0.30563 | 0.021618 |
| TaxSquare | 0.043319 | 0.003023 | 14.32805 | 3.67559E-38 | 0.037376 | 0.049261 |
| DR1 | 0.26867 | 0.110956 | 2.421422 | 0.015884715 | 0.05057 | 0.486771 |
| TaxSubtype | 0.352466 | 0.136216 | 2.587544 | 0.010002803 | 0.084712 | 0.62022 |
| A2 | -0.16283 | 0.08441 | -1.92908 | 0.054397087 | -0.32876 | 0.003087 |
| B54 | 0.146665 | 0.099938 | 1.467551 | 0.142978199 | -0.04978 | 0.343109 |
| Cw8 | -0.05793 | 0.111578 | -0.51923 | 0.603876524 | -0.27726 | 0.16139 |

(TaxSquare:HTLV-I プロウイルス量の平方根、TaxSubtype:HTLV-Itax のサブタイプ。)

接着因子を介してのHTLV-I発現亢進の検討

（分担）研究者 中村龍文 長崎大学大学院医学研究科感染分子病態学

研究要旨 CD44 クロスリンクによりHTLV-I感染細胞株であるHCT-1, およびHAM患者末梢血由来リンパ球でHTLV-Iの発現亢進が認められた。

A. 研究目的

HTLV-I関連脊髄症 (HAM) 発症には末梢血中に存在するHTLV-Iのhigh proviral loadが最も重大な要因を成している。これまでに、high HTLV-I proviral loadを規定する因子として、HAM患者におけるHLA haplotypeとの関連でのcytotoxic T cellのactivityの低下が報告されている。一方、我々はこれまでにHAM患者末梢血CD4陽性T細胞、中でもHTLV-I感染細胞は血管内皮細胞への接着能および浸潤能が著明に亢進していることを明らかにしてきたが、その現象自体がHTLV-I発現亢進に関与する一因であると仮定した。すなわち、接着因子に刺激が入ることで、CRE binding protein (CREB) のactivityが亢進し、HTLV-I増殖に関与するという機序を考えた。本研究の目的は細胞接着因子刺激を介したHTLV-I増殖機構を解明することによって、この角度からのHAMの治療の開発にある。

B. 研究方法

CD44は、接着におけるローリングに大事な役割をはたしているが、加えて、近年CREB, AP-1等の活性化も報告されている。そこで、CD44に注目し、一次抗体としてNIH44-1（抗ヒトCD44抗体, hybridoma supernatant）で刺激し、さらにヤギ抗マウスIgG抗体でクロスリンクを行った。HTLV-I感染細胞として、HCT-1（HAM患者髄液由来Tリンパ球細胞株）およびひとりのHAM患者末梢血由来リンパ球を用い、HTLV-I mRNAの発現の検討はそれぞれノーザンブロッティングおよびRT-PCR（半定量化）にて行った。

（倫理面への配慮）

患者末梢血採取にあたっては、あらかじめ使用

用途を説明し、十分なインフォームド・コンセントのもと行った。

C. 研究結果

ノーザンブロッティングによりHCT-1のHTLV-I mRNAの発現を検討したところ、CD44クロスリンクにより明らかに発現亢進が認められ、NIH44-1の刺激のみでも軽度の発現亢進が認められた。HAM患者末梢血由来リンパ球でもCD44クロスリンクによりHTLV-I mRNAの発現亢進がRT-PCR（半定量化）により認められた。

D. 考察

今回、血管内皮細胞との接着における初期段階のローリングにおいて重要な役割をはたすとされている接着因子CD44への刺激によって、HTLV-I mRNAの発現亢進が惹起されることが示された。この事実は、我々がこれまでに報告してきたHAM患者末梢血CD4陽性Tリンパ球の亢進した血管内皮細胞への接着、そのこと自体がHAM患者末梢血でのHTLV-Iのhigh proviral loadの、少なくとも、維持には関与していることを示唆していると考えられる。

E. 結論

HTLV-I感染細胞は、CD44クロスリンクによりHTLV-I mRNAの発現亢進が認められ、HAMにおけるHTLV-I high proviral loadの一因を担っているものと考えられた。

成人T細胞白血病ウイルス関連ミエロパチーの病態解明及び治療法の開発に関する研究
疾患発症モデルの作製、解析とそれを用いた治療実験

分担研究者 吉木 敬 北海道大学教授

研究要旨 成人T細胞白血病ウイルス（HTLV-1）関連ミエロパチー（HAM）の病態解明や治療実験を目的に、以前に作製したHTLV-1感染脊髄症発症ラットモデルでの疾患発症機構の解析を行い、疾患発症には感染初期の脊髄局所に特異的なウイルスの増殖とウイルス遺伝子特にpX 遺伝子の発現がその後の髄鞘形成細胞傷害を誘導し、脊髄症を発症させることを明らかにした。また、よりヒトに近い状態での感染モデル作製のために、HTLV-1の発現に深く関与するヒトCRM1遺伝子導入ラットの作製も行っている。

A. 研究目的

成人T細胞白血病ウイルス（HTLV-1）関連ミエロパチー（HAM）の病態解明及び治療法の開発を推進して行くためには、感染から疾患発症までの宿主とウイルスの相互作用を理解し、感染成立後どの段階でどのようなウイルスの制御が疾患発症の抑制や治療に効果的かを検定して行く必要がある。したがって、適切な疾患モデルの開発はこの宿主とウイルスの相互作用を理解し、治療実験を進める上で有効な手段である。これを受けて、分担研究者は分担研究項目に従い、以下の具体的な目的達成に向けて研究を行う。1) 今までに開発したHTLV-1感染脊髄症発症ラットモデル（HAMラット）を用いた疾患発症機構解明を推進する。2) この研究成果を背景に、さらにヒトに近いウイルス産生能が期待されるヒトCRM1遺伝子導入ラットを作製し、HTLV-1感染を行い、より適切なヒトHAMモデルを樹立、解析する。3) 上記モデルを用いて、新たに開発された治療薬の効果判定などの治療実験を行う。本年度はこの内、1) および2)の研究を行った。

B. 研究方法

以前に樹立した方法に則り、新生仔ラットへのHTLV-1高産生感染ヒトT細胞株MT-2細胞を腹腔内へ接種してHTLV-1感染ラットを作製した。ラットの系統として、HAM発症系であるWKAH系および非発症系であるACIおよびLEW系ラットを使用した。感染の成立はMT-2接種後約1ヶ月目に末梢血単核球を採取し、PCR法によってプロウイルス遺伝子の一部を増幅して確認した。それぞれの感染ラットはMT-2接種後3ヶ月目から経時的に犠牲死させ、全身を十分量のPBSで灌流後、脊髄ほか主要臓器を採取した。コントロールとしては同月齢の非感染ラットを用いた。採取した各臓器は3分割し、DNAやRNA抽出および組織学的解析

を行った。プロウイルスDNA量やウイルスの発現量はそれぞれ競合的PCRあるいは競合的RT-PCR法にて定量した。また、疾患発症に関連すると考えられる宿主因子のTNF- α をはじめアポトーシス関連遺伝子（bcl-2、bax、p53）の発現量についても競合的RT-PCRにより定量化した。脊髄については、オリゴデンドロサイトおよびミクログリアをin vitroで分離し、bcl-2 mRNA発現量定量およびTNF- α の産生能や感受性について、HTLV-1感染ラットと非感染ラット間での比較を行った。一方、ヒトCRM1遺伝子導入ラットの作製にあたっては、H-2Kdプロモーター下流にヒトCRM1遺伝子（北大遺伝子病制御研究所、志田博士より供与）を導入した発現コンストラクトを作製した。WKAH系ラット受精卵へのCRM1発現コンストラクトの導入にはマイクロインジェクション法によって行う。

（倫理面への配慮）

動物の使用にあたっては北海道大学大学院医学研究科動物実験施設の「動物実験に関する指針」に遵守し、行う。

C. 研究結果

HTLV-1感染WKAHラット脊髄の経時的解析では、感染後3ヶ月頃からプロウイルスDNAが確認された。その後7ヶ月をピークにプロウイルスDNAが増加し、その後減弱するも観察した感染後25ヶ月頃までピーク時の約半分まで推移した。疾患発症に深く関わるHTLV-1ウイルスのpX mRNAはこのプロウイルスDNA量の増加に一致して発現増強し、その後は徐々に減少した。一方、宿主因子であるTNF- α の発現は感染7ヶ月頃より徐々に増加し、15ヶ月頃よりほぼ一定量で持続した。bcl-2 mRNA発現は感染後7から12ヶ月にかけて強く抑制されていた。Baxの発現はほぼbcl-2と同様な動態を示した。以上の変化は非感染WKAHラット

や感染非発症系ラットの脊髄では観察されなかった。また感染ラット脊髄での p53 の発現は検索した期間中非感染ラットに比較して高値を示した。感染後 7 ヶ月でのプロウイルスの増加は脊髄以外ではみられず、その発現量は感染非発症系ラットと同レベルであった。組織学的所見は以前に明らかにしたと同様でまず感染後 7 ヶ月以降からオリゴデンドロサイトのアポトーシス細胞の増加が最初の変化で、15 ヶ月からの活性化ミクログリア/マクrophage 数の、さらに 20 ヶ月前後からの活性化アストロサイト数の急激な増加を見た。一方、分離した脊髄細胞では感染の主体はミクログリアで、pX mRNA を強く発現していた。bcl-2 の発現抑制は感染後 7~12 か月の分離オリゴデンドロサイトで確認されたが、ミクログリアでは発現の抑制は見られなかった。感染 WKAH ラットからの培養ミクログリアは非感染ラットのそれより TNF- α 産生能が高く、感染 WKAH ラットのオリゴデンドロサイトは TNF- α に対する感受性が高く、アポトーシスによる細胞死をおこした。

遺伝子導入用ヒト CRM1 発現コンストラクトを作製し、培養ラット細胞を用いたトランスフェクション実験で発現の確認をした。この発現コンストラクトを WKAH 系ラット受精卵へマイクロインジェクションし、一頭の founder を確認したが、導入遺伝子の発現を確認できず、新たにヒト CRM1 遺伝子導入ラットを作製中である。

D. 考察

HTLV-1 はラットに感染し、WKAH 系ラットに限り脊髄症の発症を誘導する。この HTLV-1 感染ラットをモデルとして経時的組織病理学および分子生物学的解析を行った、その結果から HTLV-1 感染による WKAH 系ラット脊髄傷害機構としては、以下の機序が考えられる。まず感染後 3 ヶ月頃から脊髄での感染細胞が確認され、その後 7 ヶ月をピークに脊髄に限ってウイルスの増殖とそれに伴う pX 発現増強が起こる。この pX の発現はその後 TNF- α の発現を増加させる。一方、この感染後 7 から 12 ヶ月にかけてオリゴデンドロサイトの bcl-2 の発現が抑制されており、TNF- α に対する感受性が増加し、オリゴデンドロサイトのアポトーシスが誘導される。このアポトーシスは髄鞘の破壊を招き、その処理にミクログリアが活性化、増殖する。これがさらに髄鞘の破壊を促進し、感染 15 ヶ月以降から脊髄症を発症し始める。したがって、脊髄症発症の引き金となるのは感染後 7 ヶ月の脊髄局所でのウイルスの増殖にある。実際、脊髄症を発症しない他系統ラットでは WKAH 系同様に感染は成立するが、感染後 7 ヶ月でのウイルスの増殖はみられない。また、WKAH ラットでも脊髄以外ではこの時期にウイルスの増殖は見られない。これらの結果から、この時期の脊髄でのウイ

ルス増殖を抑制することが疾患発症の予防につながると考えられる。

一方、HTLV-1 ウイルスの増殖に必要な全長のウイルス RNA の核一細胞質間輸送には CRM1 (Chromosomal Region Maintenance 1) と言われる輸送蛋白が必要であるが、近年ヒト CRM1 と異なりラット CRM1 は十分に機能できないことが示された。したがって、よりヒトの条件に近い HTLV-1 感染モデルを作製する目的でヒト CRM1 遺伝子導入ラットの作製を行っている。この遺伝子導入ラットを樹立し、HTLV-1 感染を行うことによりウイルス高発現が期待され、よりヒトに近い HTLV-1 感染症モデルとなる可能性が高い。

E. 結論

1. HTLV-1 感染モデルラットでの脊髄症 (HAM) 発症機構として、感染後 7 ヶ月での脊髄局所でのウイルスの増殖、pX 遺伝子の発現増強とそれに伴う宿主のアポトーシス関連遺伝子の発現異常がオリゴデンドロサイトのアポトーシスに始まる脊髄症の発症を誘導すると考えられた。
2. よりヒトの条件に近い HTLV-1 感染ラットモデルの樹立を目指し、遺伝子導入用ヒト CRM1 発現コンストラクトを作製した。現在、ヒト CRM1 遺伝子導入ラットを作製中である

F. 健康危険情報

HTLV-1 の動物への感染実験を行うに当たっては、その管理、安全性を確保するため北海道大学大学院医学研究科動物実験施設の P3 感染動物実験施設を使用する。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakamaru Y, Ishizu A, Ikeda H, Sugaya T, Fugo K, Higuchi M, Yamazaki H, Yoshiki T.: Immunological hyperresponsiveness in HTLV-1 LTR-env-pX transgenic rats: A prototype animal model for collagen vascular and HTLV-1-related inflammatory diseases. *Pathobiology* 69:11-18, 2001.
- 2) Sugaya T, Ishizu A, Ikeda H, Nakamaru Y, Fugo K, Higuchi M, Yamazaki H, Imai K, Yoshiki T.: Clonotypic Analysis of T Cells Accumulating at Arthritic Lesions in HTLV-1 env-pX Transgenic Rats. *Experimental and Molecular Pathology* 72:56-61, 2002

2. 学会発表

- 1) Yoshiki T.: Rat Models for HTLV-1 Infection. 10th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related viruses, Dublin, Ireland, 2001. *AIDS Research and*

Human Retroviruses 17:S-14, 2001.

2) Ikeda H, Tomaru U, Jiang X, Ohya O, Yoshiki T.: Deregulation of Apoptosis-Related Genes in the Spinal Cord of a Rat Model for HTLV-I-Associated Myeloneuropathy. 11th International Congress of Immunology, Stockholm, Sweden, 2001. Scandinavian Journal of Immunology 54(suppl 1):(Mon)110, 2001.

3) Suzuki A, Ikeda H, Yoshiki T.: Development of Microglia/Macrophage Encephalomyelopathy in Transgenic Rats Carrying HTLV-I LTR-env-pX gene. 11th International Congress of Immunology, Stockholm, Sweden, 2001. Scandinavian Journal of Immunology 54(suppl 1):(Mon)111, 2001.

4) 吉木 敬: レトロウイルス感染と免疫疾患
日本学術会議 免疫・感染症研究連絡委員会
シンポジウム「感染・免疫・アレルギーの接点
を求めて—難病の解明と治療へ向けての展望—」、H13.11.15、東京、2001.

5) 吉木 敬: 教育講演「ヒトレトロウイルス感染症のラットモデル」 第49回日本ウイルス学会学術集会・総会、大阪、2001. 日本ウイルス学会第49回学術集会・総会プログラム:5, 2001.

H. 知的所有権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

HTLV-I 感染価及び HTLV-I 複製阻害剤評価システムの研究

分担研究者 足立昭夫（徳島大学医学部ウイルス学教室）

研究要旨 HTLV-1 の迅速感染価定量システムを確立しウイルス複製阻害剤スクリーニングに資するため、レポーターT細胞株の樹立を試みた。ホタルルシフェラーゼレポーターベクターに HTLV-1 LTR 領域を挿入し、HTLV-1 Tax に反応してルシフェラーゼを産生し得る DNA クローンを構築した。このレポータークローンを *neo* 遺伝子発現ベクターとともに細胞に導入することで Tax に反応してルシフェラーゼを産生し得る H9 細胞株を樹立した。MT2 細胞由来 cell-free HTLV-1 に反応してルシフェラーゼを産生する 3 株の H9 細胞クローンが得られた。

A. 研究目的

感染価を迅速に定量するシステムがないため、HTLV-1 のウイルス学的解析は極めて困難である。HAM の制御のためにはウイルス複製を指標にした複製阻害剤の開発が必要であるが、適当な評価系は未だ報告されていない。本研究では HTLV-1 の迅速感染価定量システムの確立を目指した。

B. 研究方法

HTLV-1 の分子クローン K30 を用い遺伝子工学的手法により Tax に反応してルシフェラーゼを産生するレポータークローン (K30LTR-Luc) を作製した。エレクトロポレーションにより K30LTR-Luc を H9 細胞 (T細胞株) に導入し、細胞クローンは G418 耐性で選択した。感染性のある HTLV-1 を産生する MT2 細胞から cell-free virus を調整

し、これらの H9 クローンに感染させ、翌日細胞内のルシフェラーゼ量を定量した。

C. 研究結果

1. K30LTR-Luc を Tax 発現ベクター pCG-Tax(X/B) とともに 293T 細胞に導入すると約 50 倍のルシフェラーゼの発現増強が認められた。
2. K30LTR-Luc を *neo* 遺伝子発現ベクター pRVSVneo とともに H9 細胞に導入し G418 耐性の 6 細胞クローンを得た (H9/K30-Luc1 から H9/K30-Luc6 まで)。
3. H9/K30-Luc1、2、5 は MT2 細胞由来のウイルスに感染させるとルシフェラーゼ産生量が有意に増加した。特に H9/K30-Luc1 はルシフェラーゼ量が数 10 万 RLU (Relative Light Unit) も増加した。
4. H9/K30-Luc1 と MT2 細胞を co-culture す

るとルシフェラーゼ産生量の増加が2000万 RLU 以上に達した。

D. 考察

本年度の研究で HTLV-1 感染価の迅速測定法がほぼ完成した。特に cell-free virus のアッセイが可能となったことが大きい。改良を加え、さらに良いシステムの確立を目指す。

E. 結論

HTLV-1 の感染価が迅速に測定できるようになったので、今後はこのシステムと MT2 細胞等のウイルス産生細胞を用いてプロテアーゼ阻害剤の効果の検証を行なう。我々は HIV でも同様のシステムを構築しているので、比較研究も可能である。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Isaka, Y., Miki, S., Kawauchi, S., Suyama, A., Sugimoto, H., Adachi, A., Miura, T., Hayami, M., Yoshie, O., Fujiwara, T., and Sato, A. 2001. A single amino acid change at Leu-188 in the reverse transcriptase of HIV-2 and SIV renders them sensitive to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Archives of Virology* 146: 743-755.
- (2) Akari, H., Bour, S., Kao S., Adachi, A., and Strebel, K. 2001. The human immunodeficiency virus type 1 accessory protein Vpu induces apoptosis by suppressing the nuclear factor κ B-dependent expression of anti-apoptotic factors. *Journal of Experimental Medicine*

194: 1299-1312.

- (3) Fujita, M., Yoshida, A., Miyaura, M., Sakurai, A., Akari, H., Koyama, A.H., and Adachi, A. 2001. Cyclophilin A-independent replication of a human immunodeficiency virus type 1 isolate carrying a small portion of the simian immunodeficiency virus SIV_{MAC} gag capsid region. *Journal of Virology* 75: 10527-10531.
 - (4) Fujita, M., Sakurai, A., Doi, N., Miyaura, M., Yoshida, A., Sakai K., and Adachi, A. 2001. Analysis of the cell-dependent replication potentials of human immunodeficiency virus type 1 *vif* mutants. *Microbes and Infection* 3: 1093-1099.
 - (5) Adachi, A., Miyaura, M., Sakurai, A., Yoshida, A., Koyama, A.H., and Fujita, M. 2001. Growth characteristics of SHIV without the *vpu* gene. *International Journal of Molecular Medicine* 8: 641-644.
 - (6) 足立昭夫. 2001. AIDS のウイルス学. *組織培養工学* 27:294-297.
 - (7) 足立昭夫. 2001. 抗 HIV 療法の現状. *四国医学雑誌* 57:160-165.
 - (8) Fujita, M., Sakurai, A., Yoshida, A., Matsumoto, S., Miyaura, M., and Adachi, A. Subtle mutations in the cysteine region of HIV-1 Vif drastically alter the viral replication phenotype. *Microbes and Infection*, in press.
 - (9) 足立昭夫. HIV とその遺伝子機能. ヒトレトロウイルス研究の最前線 (シュプリンガーフェアラーク社) 印刷中.
- ##### 2. 学会発表
- (1) 富山宏子、明里宏文、足立昭夫、滝口雅文 (2001) Nef 蛋白による HLA-Class I 特異的 CTL の抗原認識に与える影響 (液性因子産生能への影響). 第 49 回日本ウイルス学会学術集会、大阪.

- (2) Hirofumi Akari, Akio Adachi, Klaus Strebel (2001) The HIV-1 Vpu as an inducer of apoptosis: implication of the role of NF-kB. 第49回日本ウイルス学会学術集会、大阪.
- (3) 藤田美歌子、宮浦麻記、吉田亜希子、櫻井明子、足立昭夫 (2001) T細胞株における HIV-2 Vpx と Vpr の機能解析. 第49回日本ウイルス学会学術集会、大阪.
- (4) 藤田美歌子、櫻井明子、宮浦麻記、吉田亜希子、足立昭夫 (2001) 増殖性の異なる HIV-1 Vif 点変異体の系統的な作製. 第49回日本ウイルス学会学術集会、大阪.
- (5) 藤田美歌子、吉田亜希子、宮浦麻記、櫻井明子、足立昭夫 (2001) SIV Gag CA の一部を持つハイブリッド HIV-1 の構築. 第49回日本ウイルス学会学術集会、大阪.
- (6) 藤田美歌子、櫻井明子、宮浦麻記、吉田亜希子、足立昭夫 (2001) 増殖性の異なる HIV-1 Vif 変異体の系統的な作製. 第15回日本エイズ学会学術集会、東京.
- (7) 藤田美歌子、宮浦麻記、吉田亜希子、櫻井明子、足立昭夫 (2001) T細胞株における HIV-2 Vpx と Vpr の機能解析. 第15回日本エイズ学会学術集会、東京.
- (8) 藤田美歌子、吉田亜希子、宮浦麻記、櫻井明子、足立昭夫 (2001) SIV Gag CA の一部を持つハイブリッド HIV-1 の構築. 第15回日本エイズ学会学術集会、東京.
- (9) 富山宏子、明里宏文、足立昭夫、滝口雅文 (2001) Nef 蛋白による HLA-Class I 分子の発現低下が HIV-1 特異的 CD8T

細胞の抗原認識に与える影響. 第15回日本エイズ学会学術集会、東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
ヒトレトロウイルスの複製阻害剤評価システム (出願予定)。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

（総括・分担） 研究報告書

HTLV-I プロテアーゼ阻害剤の分子設計・合成に関する研究

（主任又は分担者） 研究者 木曾良明 京都薬科大学教授

研究要旨：我々は、HTLV-I 阻害薬を目指して、HTLV-I プロテアーゼ(PR)を阻害する薬物の創製を試みている。初年度として組換え型および化学合成 HTLV-I プロテアーゼを調製することに成功し、次いで、本プロテアーゼを用いた HTLV-I PR 阻害剤の *in vitro* 評価系を確立した。当研究室で開発された 5 種類の HIV-1 プロテアーゼ阻害剤の HTLV-I PR 阻害能を調べた結果、KNI-727 に顕著な阻害活性が見られた。

A. 研究目的

我々は HTLV-I 増殖阻害薬を目指して、HTLV-I 固有のプロテアーゼ(PR)を阻害する薬物の創製を試みている。その際、阻害剤の評価を行うために HTLV-I PR の評価系を構築することが必要となる。そこで今回、分子生物学的および合成化学的アプローチにより酵素活性を有する HTLV-I PR の調製を行い、さらに阻害剤創製に必須な *in vitro* 評価系の確立を目指した。

B. 研究方法

1) 分子生物学的アプローチ

大腸菌発現系を用いて組換え HTLV-I PR を発現させ、そこから酵素活性を有するプロテアーゼを調製後、本プロテアーゼと合成基質を用いた HTLV-I PR 阻害活性測定法を確立する。これを用い HTLV-I PR 阻害剤開発に必要なリード化合物の探索のため、基質遷移状態アナログに基づいて開発された HIV-1 PR 阻害剤の HTLV-I PR 阻害活性を測定する。

2) 合成化学的アプローチ

ケミカルライゲーション法を用いて酵素活性を有する HTLV-I PR の化学合成を試みる。

C. 研究結果

1) 分子生物学的アプローチ

【組換え型 HTLV-I PR 発現系構築】：大腸菌発現用ベクターである pET19b の T7 promoter に続く His-tag コード領域の下流に HTLV-I PR の構造遺伝子を挿入した発現ベクター(pET/HTLV-IPR)を作製した。この発現ベクターを用いて、大腸菌 BL21(DE3)を形質転換した後、得られたコロニーについて M9ZB 培養液中で IPTG による発現誘導を試みた。発現タンパク質は 1 L 培養液当たり約 80 mg の発現が確認され、封入体として局在した。そこで、8M 尿素を含む緩衝液を用いてマイルドな条件下で全菌体を破碎し、発現タンパク質の抽出を試みた。組換え型 HTLV-I PR を含む破碎液からニッケルカラムを用いて単離精製を試み、SDS-

PAGE を行った結果、CBB 染色で単一なバンドとして確認でき、精度の良い精製が行えたことが確認できた。単離された組換え体は変性状態であるので、活性回復の為に 200 倍以上の 10% glycerol、0.1 mM EDTA、および 1 mM dithiothreitol (DTT)を含む citrate buffer (pH 5.3)に対して一晩の透析を行った。

【酵素活性測定】：得られた溶液の酵素活性測定は 1 mM DTT、1 M NaCl、および 5mM EDTA を含む 100 mM citrate buffer (pH 5.3) 中で 0.2 mM 基質(Ala-Pro-Glu-Leu/Nph-Val-Met-His-Pro-Leu) に対して 6 μ M protease を反応させ、経時的なトリクロロ酢酸の添加により反応を停止し、反応を停止したサンプルの逆相クロマトグラムを行い、切断断片の有無を検出することで確認した。この結果、上記の方法で活性回復を行った組換え体は HTLV-I PR 活性を示した。

【阻害活性評価系の確立】：上記の反応条件で反応時間 6 時間が阻害剤の阻害活性を測定する為に最適な条件と考え、最終濃度 0.1 mM の阻害剤を添加することにより阻害活性の有無を調べた。今回、用いた阻害剤は当研究室が合成した HIV-1 PR 阻害剤の中から選択した KNI-272, 577, 727, 764, 840 の 5 種類である。KNI-272 はトリペプチド型化合物で、P3-P2'まで5つの subsite に結合するようにアザインされ、活性中心には基質遷移状態をミミックした hydroxymethylcarbonyl isostere を有する アミノ酸 allophenylnorstatine をコアに有している。KNI-272 は非常に強い HIV PR 阻害活性を有しており、選択性・毒性の点でも非

常に望ましい性質を持っている。KNI-577 は KNI-272 の P3 を除去したジペプチド型阻害剤で、P2 に hydroxymethylbenzoyl を有し、P1'を dimethylthiazolidinecarboxylic acid に置換した化合物である。KNI-727 は KNI-577 の P2 を dimethylphenoxyacetyl にした化合物、KNI-764 は KNI-577 の P2' の tert-butyl を methylbenzyl に置換した化合物で、これら 5 種類の化合物の中で最も強い HIV-1 プロテアーゼ阻害活性を示し、プロテアーゼ耐性ウイルスにも活性を示し、臨床が行われている。KNI-840 は KNI-727 の P2'を methylbenzyl に置換した化合物である。今回、阻害活性を測定した 5 種類の化合物の内、KNI-727 が最も強い HTLV-I PR 阻害活性を示し、40 %以上の阻害活性であった。

これらの結果は、阻害活性を測定できるアッセイ系の確立と共に、より高い阻害剤の開発に必要なリード化合物が発見できたことを意味している。

2) 合成化学的アプローチ

HTLV-I PR はアミノ酸 125 残基よりなるアスパラギン酸プロテアーゼであり、ホモダイマーを形成して酵素活性を発現する。このサイズのタンパク質は通常の固相ペプチド合成法にて合成した場合、高純度の目的物を得ることは困難である。そこでケミカルリゲーションを用いたプロテアーゼ誘導体の合成を行うことにした。この方法はタンパクを二つのセグメントに分割しそれぞれ別々に合成を行い、アミノ酸側鎖官能基が存在する中、化学的に選択的な反応を用いて二つのペプチ

ドセグメントを結合させる方法である。我々は本法を用いて HIV プロテアーゼ誘導体の合成にも既に成功しており、合成したプロテアーゼ誘導体が wild type プロテアーゼとほぼ同様の酵素活性を有していたことも見いだしている。今回は我々が既に方法論を確立しているチオエーテル形成反応を用いるケミカルリグレーション法を採用した。HTLV-I PR を 60 位-61 位の Gly-Gly 部分でリグレーションを行うものとし、HTLV-I PR (1-59)-NHCH₂CH₂SH と BrCH₂CO-[Ala^{90,109}]-HTLV-I PR (62-125)との二つのセグメントに分割して合成した。また C 末側セグメントに含まれる 90 位, 109 位の Cys 残基は合成の都合上 Ala に置換した。N 末側セグメントの合成は、出発原料として還元によりチオールを再生する AEDI 樹脂を用い、Fmoc 基を用いる固相ペプチド合成法の標準的プロトコルに従い、自動ペプチドシンセサイザーにて行った。次いで HF-Me₂S-m-cresol にて脱保護を行い、DTT にて還元し目的のペプチドセグメントを得た。C 末側セグメントは同様に自動ペプチドシンセサイザーにてペプチド鎖を構築した後、N 末をブロムアセチル化し、HF-m-cresol にて脱保護を行い目的物を得た。合成した二つのセグメントを用いて、6M HBr·Gn, 0.2M Tris (pH8.5)中にてリグレーション反応を行った。反応は約三時間ではほぼ完結し、ゲル濾過により目的の [NHCH₂-CH₂SCH₂CO,⁶⁰⁻⁶¹Ala^{90,109}]-HTLV-I PR を得ることが出来た。

合成した HTLV-I PR 誘導体は、透析法によりフォールディングを行うことにより、合成基質 APQVL*NphVMHPL の

切断活性を示した。

D. 考察

確立できた阻害活性アッセイ系は阻害剤を開発するために、十分なシステムであると考えられる。しかし、上記に示した活性回復条件は、必ずしも 100%の活性回復を行える条件とは考えられず、更に良い活性回復の可能な条件も検討する必要がある。一方、阻害活性を測定した 5 つの化合物の内、KNI-727 が高い HTLV-I PR 阻害活性を有していることが分り、リード化合物として役立つと考えている。他の 4 種類の阻害剤も合せて、これらの阻害剤から得られる情報は今後の分子設計に役立つ情報であり、この情報を基に更に高い阻害活性を持つ阻害剤の開発する必要がある。

E. 結論

今回確立できた阻害活性アッセイ系は、HTLV-I PR 阻害剤の分子設計と合成を行う上で有効なシステムである。また、大量に組換え型 HTLV-I PR を単離できる培養系の確立は、X 線結晶構造解析への展開を可能にし、原子レベルで HTLV-I PR の構造を見ることができれば、阻害剤の分子設計に有効な情報が得られるであろう。一方、阻害能を測定した 5 つの阻害剤から得られた情報は、より高い阻害活性を持つ HTLV-I PR 阻害剤の開発に多いに役立つことができる。

F. 健康危険情報

特に該当しない。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書籍名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|------|--|-----------|-------------------------|----------------|-----|-------------|---------|
| 足立昭夫 | HIVとその遺伝子機能 | 山本直樹 | ヒトレトロウイルス研究の最前線 | シュプリンガーフェアラーク社 | 東京 | 2002 印刷中 | |
| 中村龍文 | HAM発症の免疫学的機序－慢性脊髄炎の病態形成に關与するCD4陽性Tリンパ球の機能－ | 田中正美、湯浅龍彦 | 別冊・医学のあゆみ、21世紀の神経免疫学－展望 | 医歯薬出版 | 東京 | 2001 | 115-118 |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|---|-----------------------------|------------|---------|------|
| Matsuzaki T, Nakagawa M, Nagai M, Usuku K, Higuchi I, Arimura K, Kubota H, Izumo S, Akiba S, Osame M. | HTLV-I proviral load correlates with progression of motor disability in HAM/TSP: analysis of 239 HAM/TSP patients including 64 patients followed up for 10 years. | J Neurovirol. | 7(3) | 228-34 | 2001 |
| Wodarz D, Hall SE, Usuku K, Osame M, Ogg GS, McMichael AJ, Nowak MA, Bangham CR | Cytotoxic T-cell abundance and virus load in human immunodeficiency virus type 1 and human T-cell leukaemia virus type 1. | Proc R Soc Lond B Biol Sci. | 268 (1473) | 1215-21 | 2001 |
| Furukawa Y, Kubota R, Tara M, Izumo S, Osame M. | Existence of escape mutant in HTLV-I tax during the development of adult T-cell leukemia. | Blood. | 97(4) | 987-93 | 2001 |
| Saito M, Taylor GP, Saito A, Furukawa Y, Usuku K, Weber JN, Osame M, Bangham CR. | In vivo selection of T-cell receptor junctional region sequences by HLA-A2 human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax11-19 peptide complexes. | J Virol. | 75(2) | 1065-71 | 2001 |
| 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. | 182(5) | 1343-9 | 2000 |
| Furukawa Y, Bangham CR, Taylor GP, Weber JN, Osame M. | Frequent reversible membrane damage in peripheral blood B cells in human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). | Clin Exp Immunol. | 120(2) | 307-16 | 2000 |
| Hamasaki S, Nakamura T, Furuya T, Kawakami A, Ichinose K, Nakashima T, Nishiura Y, Shirabe S, Eguchi K. | Resistance of CD4-positive T lymphocytes to etoposide-induced apoptosis mediated by upregulation of Bcl-xL expression in patients with HTLV-I-associated myelopathy. | J Neuroimmunol. | 117 (1-2) | 143-8 | 2001 |

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|--|---|-------|-----------------|------|
| 中村龍文 | インターフェロナルファ (NAMALWA) | 臨床と薬物治療 | 20(4) | 410-411 | 2001 |
| Nakamaru Y, Ishizu A, Ikeda H, Sugaya T, Fugo K, Higuchi M, Yamazaki H, Yoshiki T. | Immunological hyperresponsiveness in HTLV-I LTR-env-pX transgenic rats: A prototype animal model for collagen vascular and HTLV-I- related inflammatory diseases. | Pathobiology | 69 | 11-18 | 2001 |
| Sugaya T, Ishizu A, Ikeda H, Nakamaru Y, Fugo K, Higuchi M, Yamazaki H, Imai K, Yoshiki T. | Clonotypic Analysis of T Cells Accumulating at Arthritic Lesions in HTLV-I env-pX Transgenic Rats. | Experimental and Molecular Pathology | 72 | 56-61 | 2002 |
| Isaka, Y., Miki, S., Kawauchi, S., Suyama, A., Sugimoto, H., Adachi, A., Miura, T., Hayami, M., Yoshie, O., Fujiwara, T., and Sato, A. | A single amino acid change at Leu-188 in the reverse transcriptase of HIV-2 and SIV renders them sensitive to non- nucleoside reverse transcriptase inhibitors | Archives of Virology | 146 | 743-755 | 2001 |
| Akari, H., Bour, S., Kao S., Adachi, A., and Strebel, K. | The human immunodeficiency virus type 1 accessory protein Vpu induces apoptosis by suppressing the nuclear factor κ B-dependent expression of anti- apoptotic factors | Journal of Experimental Medicine | 194 | 1299- 1312 | 2001 |
| Fujita, M., Yoshida, A., Miyaura, M., Sakurai, A., Akari, H., Koyama, A.H., and Adachi, A. | Cyclophilin A-independent replication of a human immunodeficiency virus type 1 isolate carrying a small portion of the simian immunodeficiency virus SIV _{MAC} gag capsid region | Journal of Virology | 75 | 10527- 10531 | 2001 |
| Fujita, M., Sakurai, A., Doi, N., Miyaura, M., Yoshida, A., Sakai K., and Adachi, A. | Analysis of the cell-dependent replication potentials of human immunodeficiency virus type 1 <i>vif</i> mutants | Microbes and Infection | 3 | 1093- 1099 | 2001 |
| Adachi, A., Miyaura, M., Sakurai, A., Yoshida, A., Koyama, A.H., and Fujita, M. | Growth characteristics of SHIV without the <i>vpu</i> gene | International Journal of Molecular Medicine | 8 | 641-644 | 2001 |
| 足立昭夫 | AIDSのウイルス学 | 組織培養工学 | 27 | 294-297 | 2001 |
| 足立昭夫 | 抗HIV療法の現状 | 四国医学雑誌 | 57 | 160-165 | 2001 |

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|---|---------------------------|----|-----|------------------|
| Fujita, M., Sakurai, A., Yoshida, A., Matsumoto, S., Miyaura, M., and Adachi, A | Subtle mutations in the cysteine region of HIV-1 Vif drastically alter the viral replication phenotype | Microbes and Infection | | | 2002 in press |