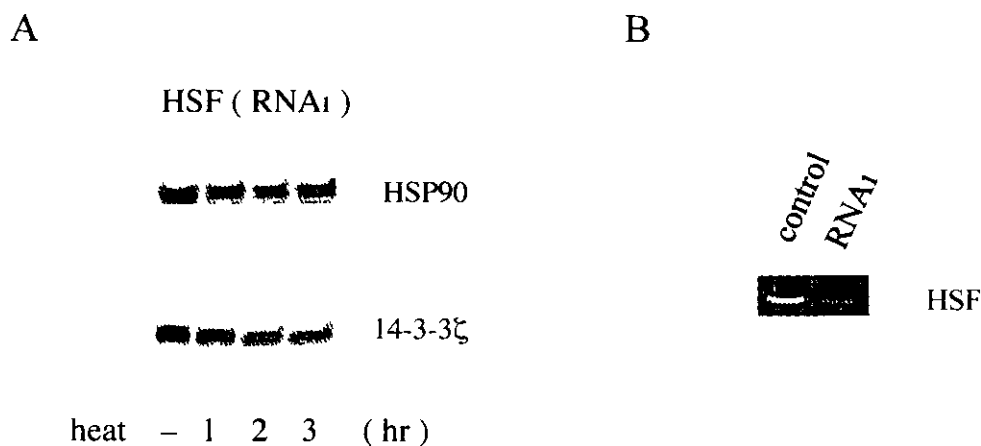


を集めて cell lysate を調整し 14-3-3 ζ, Hsp 90 の発現をウェスタンブロッティングで解析した。アクチノマイシン D 処理細胞では、14-3-3 ζ, Hsp 90 発現の熱誘導は認められなかった。

B, drosophila S2 cell の 14-3-3 ζ は転写開始領域上流 (プロモーター) に heat response element を有する。黒色下線と星印の部分が応答エレメントのコンセンサス配列を示す。矢印は転写開始点を示し、その上流 70 塩基付近に、典型的な CAAT box を有する。heat response element の存在は、14-3-3 蛋白が heat shock protein として機能し、14-3-3 蛋白発現の熱誘導が HSF によって調節されている可能性を示唆する。

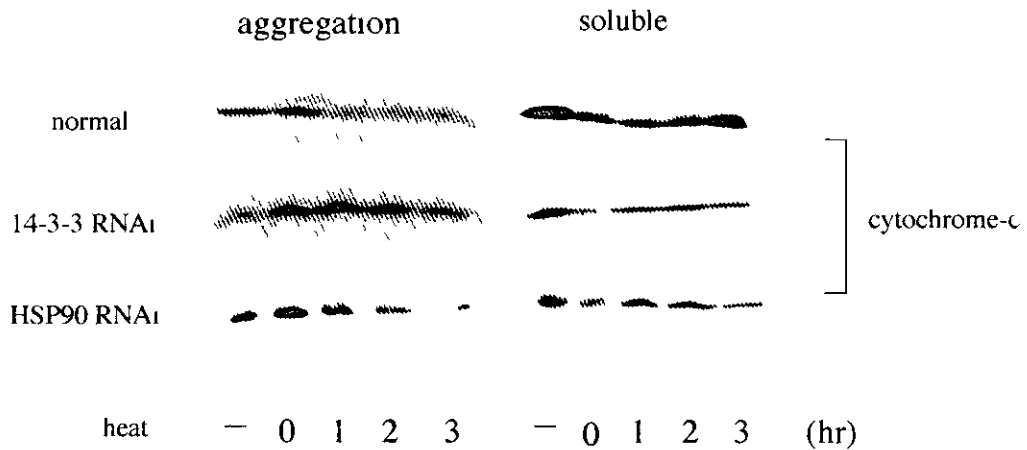
図 3. 熱ショックによる 14-3-3 蛋白発現誘導は、HSF によって調節されている。



A, HSF ノックダウン (RNAi) 細胞では、14-3-3 ζ, Hsp 90 発現の熱誘導は認められない。S2 cell を dsRNA (HSF) 72 時間処理後、37°C, 1 時間の熱ショックを行った。終了後、27°C に戻して 1, 2, 3 時間後、各々の細胞を集めて cell lysate を調整し 14-3-3 ζ, Hsp 90 の発現をウェスタンブロッティングで解析した。

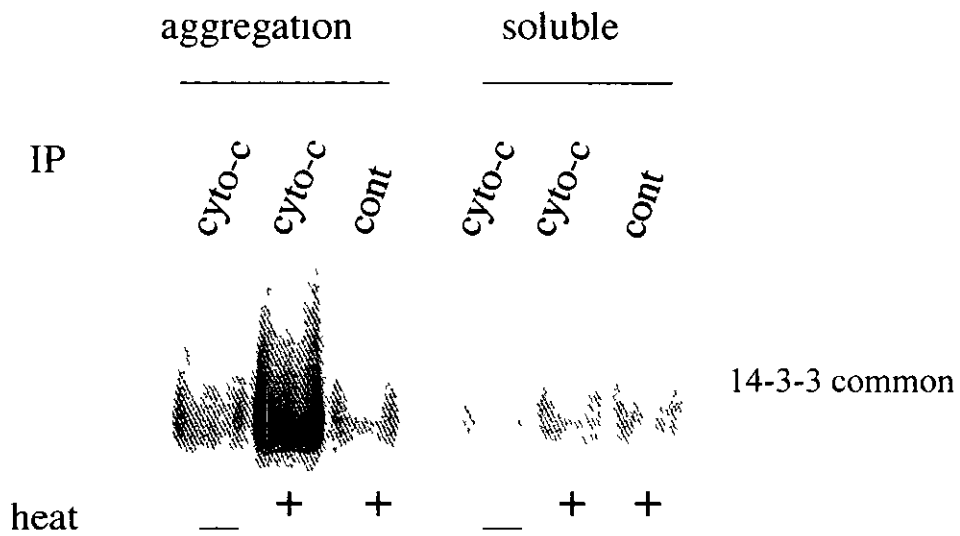
B, HSF RNAi 細胞における mRNA 発現を RT-PCR にて解析した。HSF RNAi 細胞では 10~20 % までその発現レベルが抑えられている事が確認された。

図4 14-3-3 ζ は熱変性 cytochrome-c に対して disaggregation 機能を有する。



Normal 及び 14-3-3 ζ or Hsp 90 RNAi S2 cell を 37°C, 1 時間の熱ショック後、27°C に戻して 0, 1, 2, 3 時間後、各々の細胞を insoluble (aggregation) と soluble fraction に分離した。細胞は先ず、15 % sucrose を含む (detergent なし) の Lysis buffer で resuspend 後、sonication を行った。2000g で 7 分遠心を行い未破碎細胞を除去後、上清をさらに 15 000 g で 20 分遠心、上清を soluble fraction として回収した。ppt を 1 % NP40, 0.5 % SDS を含む緩衝液で resuspend 後、氷中で 1 時間処理して 15 000 g で 20 分遠心を行った。上清を insoluble (aggregation) fraction として回収した。sample buffer で処理後、cytochrome-c 凝集体形成を cytochrome-c に対する抗体を用いてウェスタンブロッティングにて解析した。その結果、14-3-3 ζ RNAi 細胞内では normal 及び Hsp90 RNAi 細胞と比べて、変性 cytochrome-c 凝集体形成抑制が阻害されていることがわかった。これらの結果は、14-3-3 ζ が熱変性 cytochrome-c を認識して結合し、その凝集体形成を抑制する機能を有する事を示している。

図 5. 14-3-3 蛋白が熱変性 cytochrome-c と結合している事を免疫沈降法にて解析した。



細胞内で 14-3-3 は熱変性 cytochrome-c と結合するが、native cytochrome-c を認識することはできない。Fig 5 で得られた normal S2 細胞の insoluble (aggregation) 及び soluble fraction に anti-cytochrome-c 抗体か non-immune IgG (control) を加え proteinG-sepharose で沈降後、14-3-3 common の抗体を用いて (14-3-3 と抗体は mouse のため light chain が検出に不適) ウェスタンブロッティングを行った。熱変性 cytochrome-c と比べて native cytochrome-c は 14-3-3 蛋白とほとんど結合できていない。

厚生労働科学研究費補助金（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
—培養細胞を用いた HIV-1 が関与する神経細胞誘導因子に関する研究—

分担研究者 高宗暢暁 熊本大学・薬学部・生化学 助手

研究協力者 三隅将吾 熊本大学・薬学部・生化学 助教授

研究協力者 庄司省三 熊本大学・薬学部・生化学 教授

研究要旨 より効果的な HIV 脳症治療薬スクリーニングを行う目的で、ウイルス液を添加することで誘導される神経細胞死の *in vitro* 系を構築した。本系における細胞死誘導と関連するタンパク質を探索するために、神経細胞のプロテオーム解析を行ったところ、ウイルス液添加により manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) の発現が著しく亢進することか明らかとなった。この Mn-SOD の発現は、ウイルス液による神経細胞死と密接な関係があることが示唆された。

A 研究目的

HIV-1 の複製を強力に抑制する多剤併用療法 (HAART) の導入により、HIV-1 感染症/AIDS に対する治療効果が著しく向上し、それに伴い HIV 脳症発症率の低下も認められるようになった。しかしながら、生涯続けなければならぬと考えられている現行の HAART によって、今後、長期的にみて、この HIV 脳症発症率低下が持続されるかは全く不明である。一方、世界に目を向ければ、十分な HAART を享受できない発展途上国を中心に、HIV 感染者が爆発的に増加している現状である。このような状況から、現在、新たな HIV-1 複製阻害薬の開発と共に、HIV 脳症の発

症予防薬・治療薬の開発は必要不可欠であると考えられる。

本研究の目的は、HIV 脳症の治療薬開発を行うにあたり、発症機序に基づいた *in vitro* モデルを構築すること、及びその *in vitro* モデルを利用し治療薬の分子標的となりうる細胞死誘導に関連する新たなタンパク質因子を検索することである。さらに、新たに得られた知見をもとに、効率的な治療薬検索のためのハイスループットアッセイの構築を行うことである。

HIV 脳症の発症には非常に多くの因子の関与が考えられており、HIV-1 によって感染、刺激を受けたマクロファージ、マイクログリアが産生するニューロトキシン、

TNF、活性酸素等によるインタイレクトな神経障害、及び gp120, gp41, Tat, Nef, Vpr などウイルス性タンパク質によるインタイレクトな神経障害が知られている。昨年度までに、我々は、主としてウイルス性因子によるインタイレクトな神経細胞障害に着目し、HIV-1 感染細胞の培養上清によって、HIV-1 感染細胞依存的に誘導される神経細胞死誘導の *in vitro* モデルの構築を行ってきた。本研究では、この系における細胞死に関連する神経細胞側のタンパク質の探索を行い、細胞死との関連について考察した。

B 研究方法

細胞

ヒト神経芽細胞種 SK-N-SH 細胞に 5 μ M の all trans retinoic acid を処理し分化誘導して得られた神経細胞を標的細胞として使用した。

ウイルス液

CXCR4 を利用する HIV-1 X4 (LAV-1) が持続感染している CEM/LAV-1 細胞の培養上清を回収しウイルス液とした。

MTT assay

ウイルス処理した神経細胞の viability の評価を MTT assay にて行った。

二次元電気泳動法

ウイルス液を処理し数日培養した神経細胞をセルスクレーパーで回収し、二次元電気泳動、または SDS-PAGE 用サンプルとした。

二次元電気泳動は、一次元目を固定化 pH ケル(pH 4-11)で、二次元目をアクリルアミトケル (12%, or 4-20%) で行い、Sypro Ruby で染色した。

Peptide mass fingerprint (PMF) 及びタンパク質の同定

最終的にタンパク質の同定は、トリプシンによる酵素処理、MALDI TOF-MS による質量分析、データーベース検索により行った。

(倫理面への配慮)

本研究においては、動物実験を行わず、株化培養細胞を使用していることから、倫理面の問題は無いと考えられる。

C 研究結果

ウイルス液を処理し 3~4 日後の神経細胞を回収し、二次元電気泳動を行い、Sypro Ruby 染色を行った結果、ウイルス液処理によりその発現量に変化を呈したいくつかのタンパク質スポットが見いだされた。その中で、等電点 6.8、分子量 25 kDa のタンパク質スポットが、ウイルス液処理により、著しい発現の上昇が再現よく観察され

ることか判った (図 1 B)。このタンパク質スポットに注目し、その同定を PMF 法および post source decay (PSD) 法により質量分析的に行い、本スポットか、manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) であることを明らかにした。また、抗 Mn-SOD 抗体による western blot 分析を行ったところ、スポットか Mn-SOD であることが確認された (図 1D)。TNF α を神経細胞に処理し Mn-SOD の誘導を検討したところ、このスポットの発現上昇が観察された (図 1C)。種々の細胞株の培養上精 (ウイルス液、CEM 培養上精、U937 培養上精、THP-1 培養上精) および TNF α を用いて、この神経細胞における Mn-SOD 誘導の刺激後 72 時間内におけるカイネティクスの比較を行った。TNF α の濃度は神経細胞に対して細胞死を誘導する 10 ng/ml あるいは細胞死を誘導しない濃度 1 ng/ml の濃度で刺激した。各 Mn-SOD の発現量は β -actin の発現量で補正して比較検討した。その結果、検討した中で、THP-1 培養上精以外の刺激によって Mn-SOD の誘導がかかることか判明し、特に細胞死を誘導するウイルス液において著しい発現の亢進が観察された。また細胞死を誘導する TNF α (10 ng/ml) においても高い発現誘導が観察された。細胞死の誘導活性が低いその他の培養上精によっても Mn-SOD の発現誘導は認められたか、その発現レベルはウイルス液および TNF α (10 ng/ml) よりも低い結果であった (図 2)。

加熱処理 (60 $^{\circ}$ C、30分) したウイルス液、またはウイルス液を抗酸化剤である N-acetylcysteine または CXCR4 アンタゴニスト (Z-8) 存在下神経細胞に処理し、Mn-SOD 発現誘導を western blot 分析により調べた結果、ウイルス液の加熱処理によって Mn-SOD の発現誘導は抑制されたが、N-acetylcysteine、Z-8 の処理によって、Mn-SOD の発現誘導は抑制されなかった (図 3A)。

N-acetylcysteine のウイルス液による細胞死の抑制効果を検討したところ、最大で 2 mM 濃度の処理によっても細胞死の誘導に対する抑制効果は著しく低い結果であった (図 3B)。

図 1 神経細胞におけるウイルス液処理による発現変動タンパク質の探索

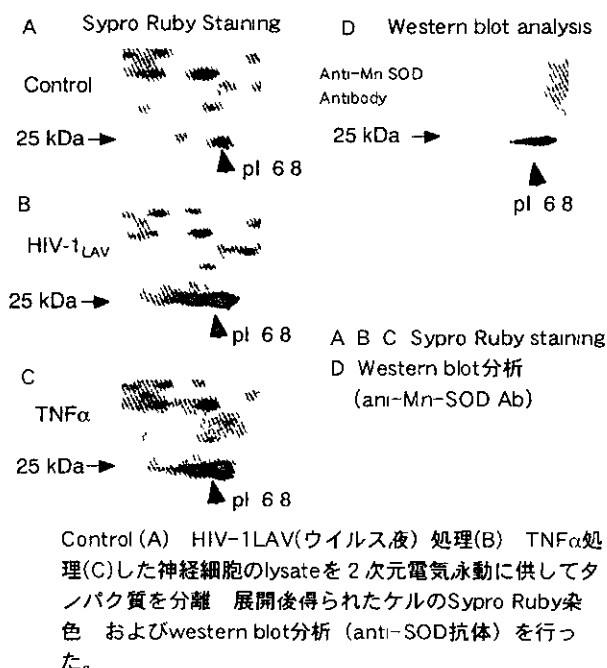


図2 神経細胞における各種添加液による Mn-SOD発現誘導の比較

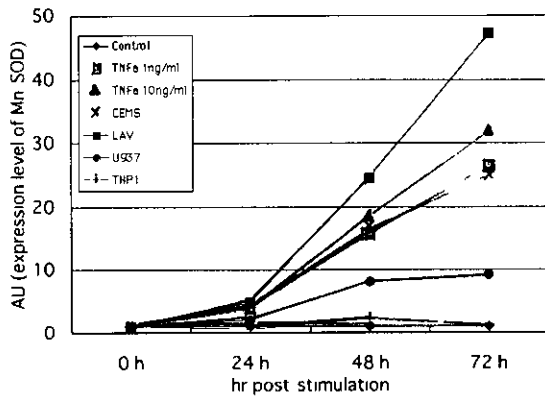
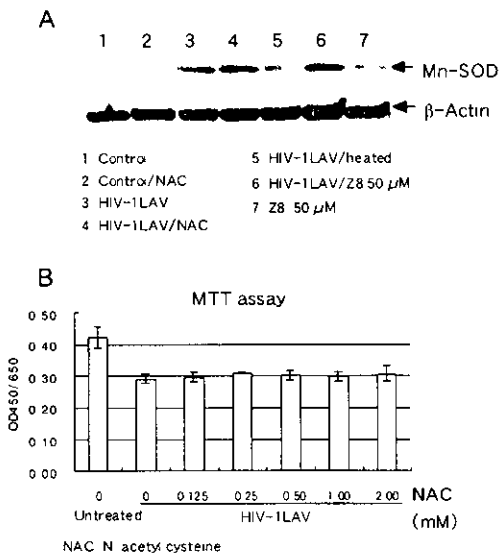


図3 ウイルス液誘導神経細胞死におけるN-Acetyl cysteineのMn-SOD発現誘導及び細胞生存に与える効果



D 考察

昨年度までの研究で、神経芽細胞種 SK-N-SH 細胞をレチノイン酸処理で分化誘導した神経細胞に対し、HIV-1 LAV(X4 virus)を産生する CEM/LAV の培養上精(ウイルス液)を添加すると細胞死を誘導する *in vitro* 系を構築した。この *in vitro* 系

における神経細胞死が、既に報告されているウイルスエンベロープタンパク質 gp120 とケモカインレセプター CXCR4 との相互作用が起因となって誘導されるのみでなく、その他の誘導因子もまた存在する可能性が示唆された。我々は、ウイルス粒子が有する病原性には gp120 を含むウイルス性タンパク質以外に宿主性タンパク質もまた密接に関与していると考え、ウイルス粒子のプロテオーム解析を行うことでその関連タンパク質の検索を行っている。本研究では、ウイルス側でなく、本ウイルス液によって細胞死を誘導する神経細胞側に着目し、プロテオーム解析による細胞死関連タンパク質の検索を行い HIV-1 依存的な神経細胞死の誘導機構に関する考察を行った。

ウイルス液を処理し3~4日後の神経細胞のプロテオーム解析を行ったところ、タンパク質発現に変化が認められるいくつかのスポットを見出した。特に著しく発現の亢進が観察された等電点 6.8、分子量 25 kDa のタンパク質の同定を質量分析的、免疫学的に行ったところ、Mn-SOD であることが判明した。

SOD はスーパーオキシドアニオンを H_2O_2 と O_2 に不均化する酵素であり、Mn-SOD は3種類存在すると考えられている SOD の isozyme の1つで、ミトコンドリアに局在する誘導型のタンパク質であり、 $TNF\alpha$ 等の刺激によって誘導されることが知られている。実際に、本神経細胞に対して $TNF\alpha$ を処理すると Mn-SOD の発現誘

導が観察された (図 1C)。Mn-SOD は酸化ストレスによっても誘導され、抗酸化酵素として機能することから、本系における神経細胞死との関連性が考えられた。そこで、ウイルス液による Mn-SOD の発現誘導と神経細胞死との関連性について検討した。その結果、1) ウイルス液、種々細胞 (CEM, THP-1, および U937) の培養細胞上精及び TNF α (1 ng/ml 及び 10 ng/ml)による Mn-SOD の発現誘導を調べたところ、特に細胞死を誘導するウイルス液、および TNF α (10 ng/ml)処理では、著しい Mn-SOD の発現誘導が観察された。2) ウイルス液を加熱処理すると、神経細胞死の誘導活性は消失するか、同時に Mn-SOD の発現誘導活性も消失した。3) 本系で CXCR4 のアンタゴニスト処理は、ウイルス液による細胞死の抑制は部分的な効果にとどまるか、Mn-SOD 誘導に対してその発現誘導阻害効果は観察されなかった。4) 抗酸化剤 N-acetylcysteine によって、本神経細胞死の誘導抑制効果は低いものであるか、Mn-SOD 発現誘導に対して阻害効果を示さなかった。以上の結果から、神経細胞死の誘導には必ず Mn-SOD の発現誘導を伴っていることから、これら二つのイベントが密接に関係していることが強く示唆された。

Mn-SOD の誘導には、酸化ストレスが関与することか既に報告されている。また、HIV 脳症発症の原因因子にスーパーオキシドアニオンをはじめとした活性酸素の関

与も考えられており、実際、HIV 脳症患者由来の脳組織中に、活性酸素が存在した証拠を示す多くの報告がある。従って、本 *in vitro* におけるウイルス液による神経細胞死においても活性酸素による酸化ストレスの関与が考えられる。抗酸化剤として知られる N-acetylcysteine の処理により細胞死の顕著な抑制効果、及び Mn-SOD 発現誘導の抑制効果が示されなかったことは、本 *in vitro* 系が単純に抗酸化剤では抑制されない特異な系である可能性があり興味深い。

本細胞死の詳細な誘導機構を明らかにし、阻害薬の分子標的を明確にすれば、HIV 脳症治療薬・予防薬開発に貢献できると考えられる。

E 結論

HIV-1 感染細胞の培養上精 (ウイルス液) によって誘導される神経細胞死には、Mn-SOD の著しい発現誘導を伴うことが明らかとなり、これらが密接な関連を持つことが示唆された。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

I 論文発表

論文発表

- 1 Shogo Misumi, Takashi Fuchigami, Nobutoki Takamune, Ichiro Takahashi, Michiho Takama, and Shozo Shoji, *J Virol* 76,10000-10008 2002
- 2 Takashi Fuchigami, Shogo Misumi, Nobutoki Takamune, Ichiro Takahashi, Michiho Takama, and Shozo Shoji Acid-labile formylation of amino terminal proline of human immunodeficiency virus type 1 p24gag was found by proteomics using two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of flight mass spectrometry, *Biochem Biophys Res Commun* 293,1107-1113,2002
- 3 Nobutoki Takamune, Hirotoishi Hamada, Hideki Sugawara, Shogo Misumi, and Shozo Shoji Development of enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of activity of myristoyl Coenzyme A protein N-myristoyl transferase, *Anal Biochem* 309,137-142, 2002
- 4 Nobutoki Takamune, Hirotoishi Hamada, Shogo Misumi, and Shozo Shoji, Novel strategy for anti-HIV-1 action selective cytotoxic effect of N-myristoyl transferase inhibitor on HIV-1-infected cells *FEBS Lett* 527,138-142, 2002

II 学会発表

- 1 西牟田いくえ、三隅 将吾、高橋 一郎、高間 みちほ、高宗 暢暁、庄司 省三 HIV-1 粒子のプロテオーム解析による p24 アミノ末端ホルミル化の検出 第 16 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集 317 (2002)
- 2 三隅 将吾、西牟田いくえ、高橋 一郎、高間 みちほ、高宗 暢暁、庄司 省三 プロテオーム解析による 3 つの HIV-1 関連 cyclophilin A isoform の同定 第 16 回日本エイズ学会学術集会 総会抄録集 316 (2002)
- 3 西牟田 いくえ、三隅 将吾、高宗 暢暁、庄司 省三 HIV-1 p24 アミノ末端のホルミル化の発見 第 75 回日本生化学会大会発表抄録集 746 (2002)
- 4 三隅 将吾、西牟田 いくえ、高宗 暢暁、庄司 省三 HIV-1 ライフサイクルに関与する 3 つの cyclophilin A isoform の同定 第 75 回日本生化学会大会発表抄録集 746 (2002)

H 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

HIV-1 転写阻害薬 K-37 と EM2487 の選択的な HTLV-1 増殖抑制効果
HAM/TSP 治療薬としての可能性

分担研究者 馬場昌範 鹿児島大学医学部教授
研究協力者 岡本実佳 鹿児島大学医学部講師
王 欣 鹿児島大学大学院医学研究科

HAM/TSP の患者では、PBMC 中の HTLV-1 プロウイルス量が高く、体内における感染の持続がこの原因と考えられている。そこで本研究では、種々の薬剤について HTLV-1 増殖抑制効果を検討した。調べた薬剤の中で、フルオロキノリン誘導体 K-37 と、土壌細菌由来の *Streptomyces* 属から分離された物質 EM2487 が、HTLV-1 持続感染細胞株および HAM/TSP 患者から分離した末梢単核細胞において、選択的に HTLV-1 の増殖を抑制した。それらの作用機序について検討したところ、この 2 つの薬剤は HTLV-1 持続感染細胞における HTLV-1 mRNA 量を濃度依存性に減少させ、ウイルス遺伝子の転写を抑制していることが分かった。K-37 は Tax 依存性のレポーター遺伝子の発現を抑制し、さらに感染細胞内の内因性 Tax の産生を減少させたか、EM2487 にはこのような効果は認められなかった。以上のことから、今後これらの物質の標的分子の同定と、毒性の軽減が可能であれば、HAM/TSP 治療薬の候補者になると思われる。

A 研究目的

鹿児島を中心とする南九州地方は、ヒトレトロウイルスである HTLV-1 感染の epidemic area であり、HTLV-1 によって引き起こされる中枢神経障害である HAM/TSP は感染者の 1% 前後に発症することか知られている。また HAM/TSP 患者における体内のプロウイルス量は HTLV-1 キャリア（未発症者）のそれと比較して有意に高く、体内における感染の持続が発症の原因として考えられている。従って、HTLV-1 感染細胞においてウイルスの

増殖を抑制する薬剤が存在すれば、体内においてプロウイルス量を減らすことかでき、これは HAM/TSP に対する有望な予防・治療薬となる可能性がある。

われわれの研究グループではこれまでに、種々の薬剤に関し、それらの抗 HIV-1 効果を調べ、有効な薬剤について幾つか報告してきた。また、昨年度の本研究においては、HIV-1 感染個体における神経細胞死の誘導機序に基づいた *in vitro* アッセイシステムを構築し、それをを用いて薬剤の HIV-1 に

よる神経細胞死に対する抑制効果について報告した。一方、HTLV-1 感染に対して有効な薬剤はこれまでにほとんど報告されていない。そこで、今年度の研究においては、HTLV-1 持続感染細胞を用いて、種々の薬剤の抗ウイルス効果について検討し、有効な薬剤を発見することによって、将来的に HAM/TSP の発症予防および治療薬としての可能性を有するものを同定することを目的とした。

B 研究方法

(1) 細胞 HTLV-1 持続感染細胞として MT-2 および MT-4 細胞を用いた。HTLV-1 非感染細胞としては Jarkat 細胞を用いた。これらの細胞は 10% ウシ胎仔血清および抗生物質添加 RPMI 1640 メシウムを用いて継代維持した。一方、HAM/TSP 患者からの末梢単核細胞 (PBMCs) を分離した後、20% 添加 RPMI 1640 メシウムにて培養した。

(2) 薬剤 今回、抗 HTLV-1 効果を検討した薬剤は、フルオロキノロン誘導体 K-37 (図 1) および levofloxacin (LVFX), 土壌細菌 *Streptomyces* より単離された物質 EM2487 (図 1), HIV-1 Tat 阻害薬 Ro24-7429, nuclear factor κ B (NF- κ B) 阻害薬 cepharranthine, HIV-1 逆転写酵素阻害薬 zidovudine (AZT) および lamivudine (3TC), そして HIV-1 プロテアーゼ阻害薬 indinavir (IDV) および nelfinavir (NFV) の 9 種類である。全ての薬剤は DMSO (dimethyl sulfoxide) の毒性の影響を除くため、10 mM かそれ以上の濃度に融解した

あと、メシウムを用いて適切な濃度に調整した。

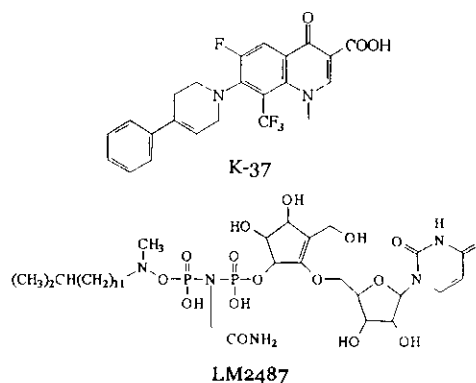


Fig. 1 Chemical structures of K-37 and EM2487.

(3) 抗ウイルスアッセイ 薬剤の HTLV-1 効果は、持続感染細胞からの培養上清中への p19 抗原産生の抑制により測定した。すなわち、MT-2 もしくは MT-4 細胞を 1×10^5 cells/mL に調整し、種々の濃度の薬剤とともに 3 日間培養し、その後上清を採取し p19 抗原量を ELISA 法により定量した。一方、薬剤の細胞毒性は培養 3 日目に生細胞数を MTT 法にて測定することにより求めた。薬剤の抗 HTLV-1 効果は、上記の持続感染細胞株に加えて、HAM/TSP 患者より分離した PBMCs を用いて同様に行った。この場合は、分離した PBMCs を 6 日間培養した後、上清中の p19 量と生細胞数を測定した。

(4) リアルタイム定量 RT-PCR 法 MT-2 細胞 (2×10^5 cells/mL) を種々の濃度の薬剤とともに 2 日間培養した。その後、細胞より RNA を抽出し、リ

アルタイム RT-PCR 装置を用いて、HTLV-1 mRNA の定量を行った。用い

たプライマーおよびプローブの認識部位を図 2 に示す。

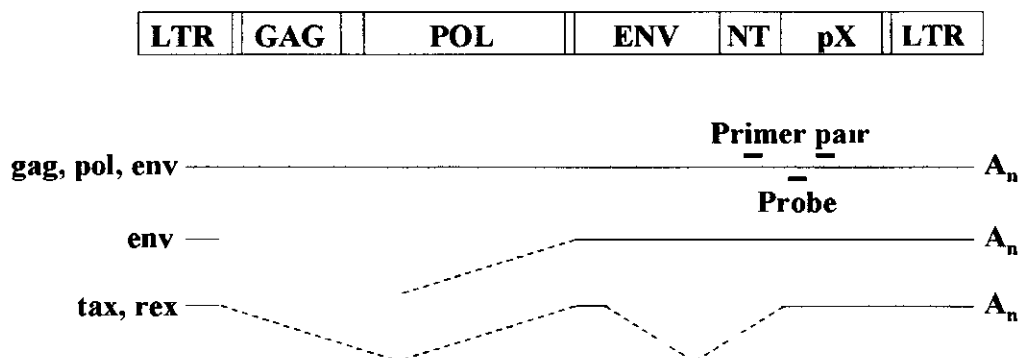


Fig. 2. Primer pair and probe used for real-time RT PCR. The primer pair and probe for HTLV-1 incompletely spliced mRNA were 7141F (5'-CAAACCGTCAAGCACAGCTT-3', amino acid position 7140-7159), 7363R (5'-TCTCCAAACACGTAGACTGGGT-3', amino acid position 7341-7362) and 7308T (5'-TTCCCAGGGTTTGGACAGAGTCTTCT-3', amino acid position 7307-7332) Nonspecific inhibition of host cellular mRNA synthesis by K-37 was determined with a GAPDH (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase) control kit

(4) トランスフェクションアッセイ 薬剤の作用機序を探るため、種々のエンハンサー領域を有し、ルシフェラーゼをレポーターとする発現プラスミドを用意した (図3)。また、Tat 発現プラスミドも用いた。MT-2 細胞を 2×10^6 cells に調整し、 $2 \mu\text{g}$ の各種

プラスミドをトランスフェクションした。また HTLV-1 非感染の Jarkat 細胞にはこれと同時に Tat 発現プラスミドもコトランスフェクションした。トランスフェクション後 24 時間細胞を培養したあと、ルシフェラーゼの活性をルミノメーターにて定量した。

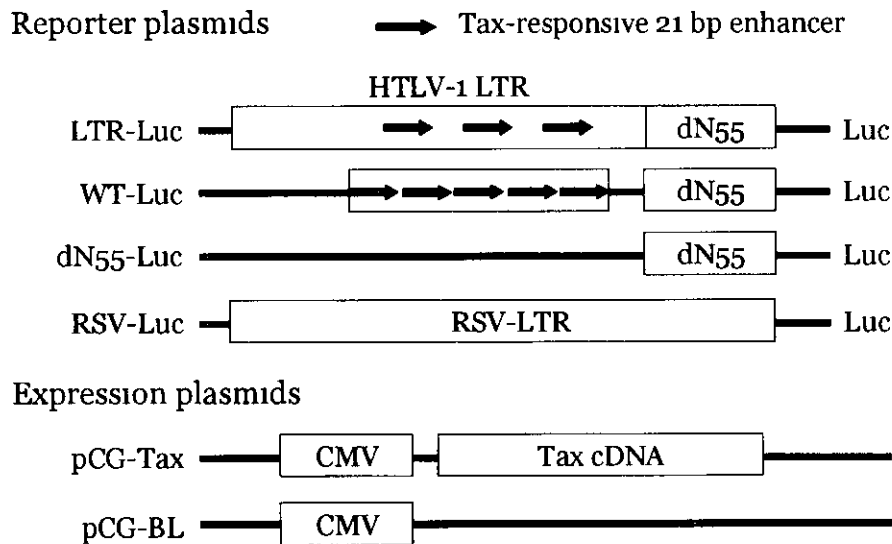


Fig. 3. Constructs of Reporter and Tat-expression plasmids. pCG-Tax was constructed by inserting tax cDNA into pCG-BL, and the expression of Tax is regulated by a human cytomegalovirus promoter. WT-Luc contained 5 tandem repeats of the 21-bp enhancer and HTLV-1 promoter. dN55-Luc was an enhancer-deleted control reporter. The LTR sequences of HTLV-1 and Rous sarcoma virus (RSV) were placed at the upstream of luciferase gene, and the generated plasmids were referred as LTR-Luc and RSV-Luc, respectively.

(5) ウェスタンブロット法 MT-2 細胞を 2×10^6 cells/mL に調整し、種々の濃度の薬剤存在下において2日間培養した。その後、細胞を溶解し、SDS ポリアクリルアミドを用いて電気泳動とメンブレンにブロットを行ったのち、抗 HTLV-1 p40 Tax 単クローン抗体を用いて抗原を検出した。

(倫理面への配慮について)

HAM/TSP 患者より PBMCs を供与されるに当たり、本研究の目的（遺伝

子検査をしないことなど）を説明し、同意を得た上で実験を行った。

C 研究結果

(1) HTLV-1 持続感染細胞における抗ウイルス効果 9 種類の薬剤について、MT-2 細胞における抗 HTLV-1 効果を調べたところ、図4に示すように、K-37 および EM2487 の2薬剤が、生細胞数に影響を与えない濃度において、上清中の p19 抗原量を選択的に減少させた。

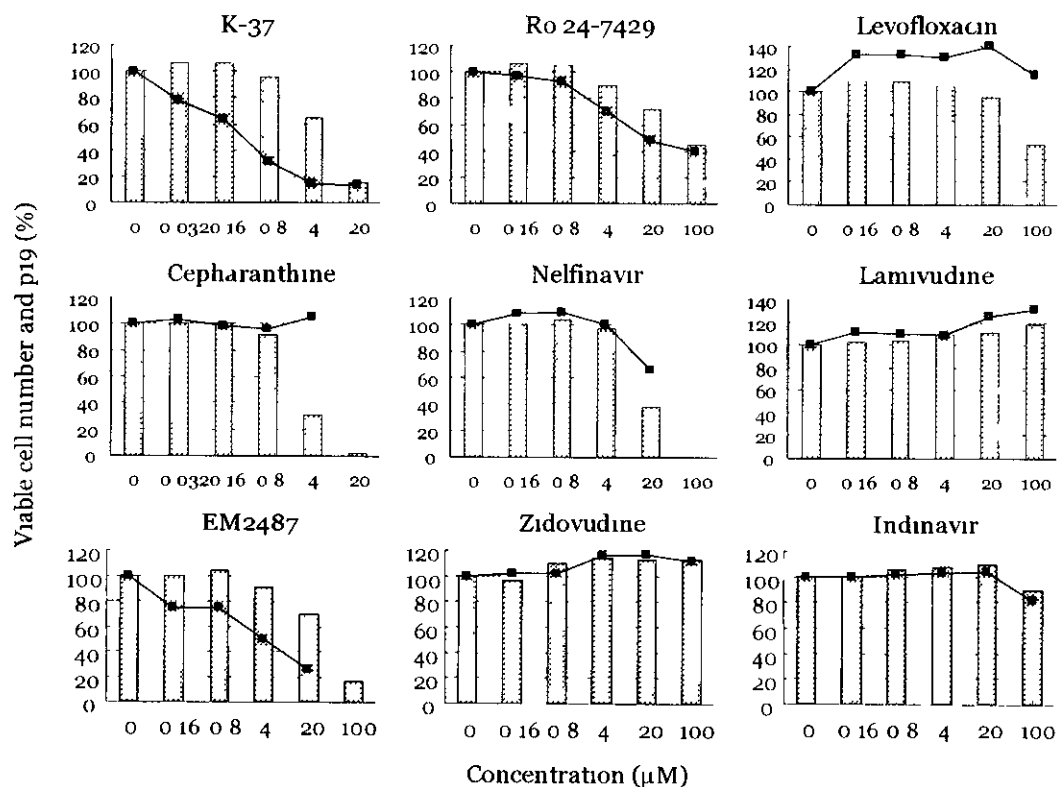


Fig. 4. Inhibitory effects of selected compounds on HTLV-1 replication in MT-2 cells. MT-2 cells were cultured in the presence of various concentrations of the test compounds. After a 3-day incubation, the culture supernatants were collected and examined for their p19 antigen levels (lines). The viable cell number was determined by the MTT method (columns). All experiments were carried out in duplicate, and mean values are shown.

このK-37およびEM2487の抗HTLV-1効果は、他のHTLV-1持続感染細胞であるMT-4細胞においても確認された。表1に調べた薬剤のMT-2とMT-4細胞における抗HTLV-1効果を50%有効濃度(EC_{50})と50%細胞毒性濃度(CC_{50})で示す。K37のMT-2およびMT-4細胞における EC_{50} 値はそれぞれ0.44および0.24 μ Mであった。一方、 CC_{50} 値はそれぞれ5.7および1.1 μ Mであり、K-37はMT-4に対してより高い細胞毒性を示したか、何れの場合にお

いても選択係数(CC_{50}/EC_{50})は1.0以上の値を示しており、K-37の抗HTLV-1効果は細胞毒性によるものではないことが分かった。一方、EM2487のMT-2およびMT-4細胞における EC_{50} 値はそれぞれ3.6および1.2 μ Mであり、K-37よりもやや弱い活性を示した。しかしながら、EM2487の細胞毒性もK-37よりは弱く、従ってK-37とほぼ同等の選択係数を示したことから、この薬剤も選択的な抗HTLV-1効果を示すことが分かった。

Table 1. Anti-HTLV-1 activity in T-cell lines

Compound	Cell	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	SI
K-37	MT-2	0.44 ± 0.13	5.7 ± 1.0	13.0
	MT-4	0.24 ± 0.14	1.1 ± 0.2	4.6
Ro 24-7429	MT-2	17 ± 1	72 ± 3	4.2
	MT-4	> 24	24 ± 4	< 1
Cepharanthine	MT-2	> 3.0	3.0 ± 0.4	< 1
	MT-4	> 1.3	1.3 ± 0.5	< 1
EM2487	MT-2	3.6 ± 0.6	30.6 ± 3.5	8.5
	MT-4	1.2 ± 0.3	5.7 ± 1.8	4.8
Zidovudine	MT-2	> 100	> 100	< 1
	MT-4	93 ± 2	85 ± 3	< 1
Lamivudine	MT-2	> 100	> 100	< 1
	MT-4	> 100	> 100	< 1
Nelfinavir	MT-2	> 16	16 ± 2	< 1
	MT-4	> 7.1	7.1 ± 1.9	< 1
Indinavir	MT-2	> 100	> 100	< 1
	MT-4	> 100	> 100	< 1

SI selectivity index (CC₅₀/EC₅₀)

(2) HAM/TSP 患者由来の PBMCs における抗 HTLV-1 効果 K-37 および EM2487 の抗 HTLV-1 効果をさらに検証するため、2名の HAM/TSP 患者よりインフォームトコンセントを得た上で、PBMCs を分離し、薬剤存在下で培養することにより、HTLV-1 産生に対する作用を検討した。その結果、K-37 および EM2487 何れの薬剤も患者由来の PBMCs において、選択的な抗 HTLV-1 効果を示すことが明らかとなった (図5)。興味あることに、K-37 および EM2487 のどちらも、患者1から分離した PBMCs において、患者2より分離した PBMCs においてよりも明らかに強い抗 HTLV-1 効果を示した。すなわち、K-37 の患者1および2の PBMCs における EC₅₀ 値はそれぞれ

0.04 および 1.1 μM であり、EM2487 のそれは 0.3 および 1.4 μM であった。また、抗 HIV-1 薬の lamivudine および nelfinavir も PBMCs において効果を検討したか、いずれの薬剤も選択的な抗 HTLV-1 効果を全く示さなかった (data not shown)。

(3) K-37 および EM2487 の HTLV-1 mRNA 産生に与える影響 K-37 と EM2487 は何れも HIV-1 遺伝子の転写段階に作用し、ウイルス mRNA の産生を選択的に抑制することか知られている。そこで、これらの薬剤が HTLV-1 持続感染細胞においてもウイルス mRNA の産生を選択的に抑制し、抗ウイルス効果を発揮しているかどうかを、リアルタイム RT-PCR 法を用いて検討した。

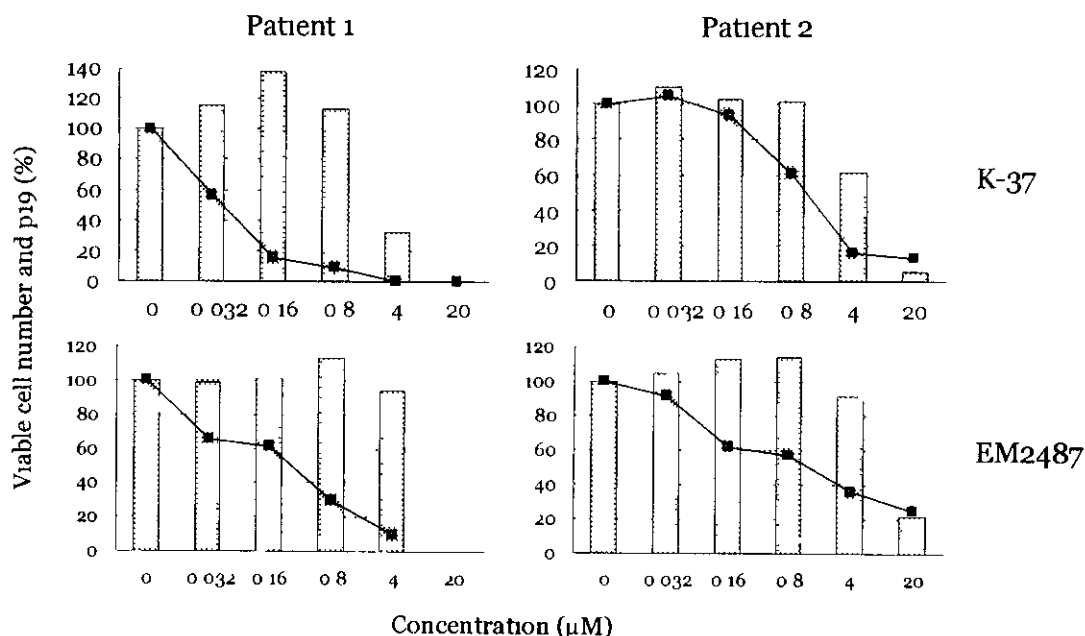


Fig. 5. Inhibitory effects of K-37 and EM2487 on HTLV-1 replication in PBMCs from HAM/TSP patients. PBMCs were obtained from 2 different patients of HAM/TSP (A and B) and cultured in the presence of various concentrations of the compounds. After a 6-day incubation, the culture supernatants were collected and examined for their p19 antigen levels (lines). The viable cell number was determined by the MTT method (columns). All experiments were carried out in duplicate, and mean values are shown.

その結果、図6に示すように K-37 および EM2487 は濃度依存的に MT-2 細胞における HTLV-1 mRNA の量を減少させることが分かった。特に K-37 および EM2487 はそれぞれ 0.8 および 4 μM の濃度において、宿主細胞遺伝子の転写産物である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (DAPDH) mRNA の産生に影響を与えずに、HTLV-1 mRNA の量を顕著に減少させ

ることから、これらの薬剤は HIV-1 の時と同様に、HTLV-1 遺伝子の発現と転写の段階に作用し、抗ウイルス効果を発揮していると考えられた。これとは対照的に、宿主転写調整因子 NF-κB に対する抑制効果を有し、ある種の HIV-1 潜伏感染細胞からのウイルス遺伝子の発現を抑制する cepharanthine は HTLV-1 の遺伝子発現に対しては全く効果を示さなかった。

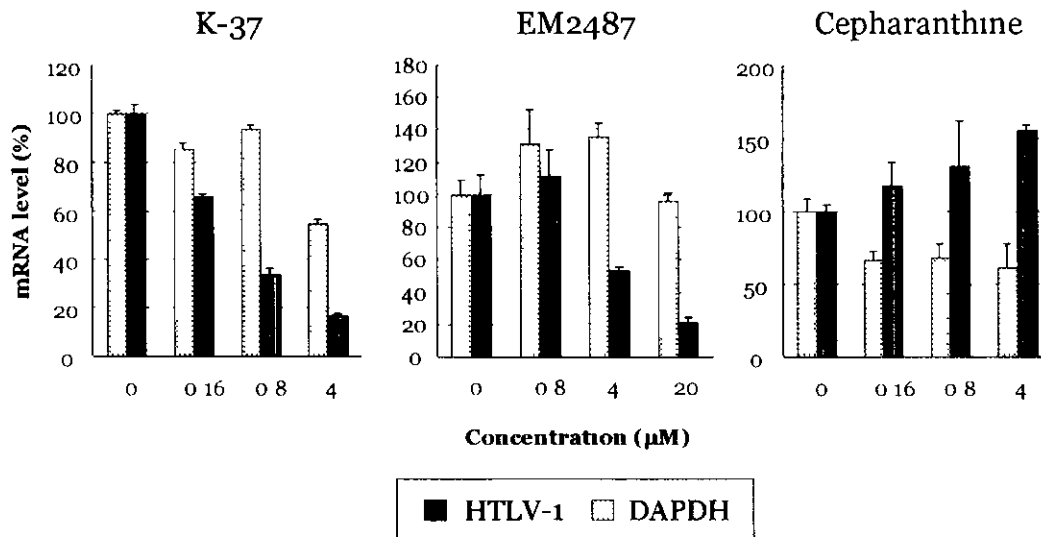


Fig 6. Inhibitory effects of K-37, EM2487, and cepharanthine on HTLV-1 mRNA synthesis in MT-2 cells. The cells were incubated with the compounds for 2 days. Total RNA was extracted from the cells, and quantitative RT-PCR for HTLV-1 mRNA was performed. The cytotoxic effects of the test compounds on host cellular mRNA synthesis were determined by quantitative RT-PCR for GAPDH mRNA. Representative results for two independent experiments are shown.

(4) K-37 および EM2487 の HTLV-1 Tax により誘導される遺伝子発現に対する効果。MT-2 細胞に図 3 で示したような、種々のエンハンサー領域を有し、ルシフェラーゼをレポーターとする発現プラスミドをトランスフェクションしたところ、K-37 は HTLV-1 long terminal repeat (LTR) および 21-bp エンハンサーが関与するレポーター遺伝子の発現を濃度依存性に抑制した。しかしながら、RSV LTR が関与するレポーター遺伝子の発現には全く影響を与えず、また dN55-Luc のトラ

ンスフェクションによって得られる basal transcription のレベルにも影響を与えなかった。興味あることに、K-37 は、HTLV-1 非感染の Jarakat 細胞に LTR-Luc と Tat 発現プラスミドをコトランスフェクションして得られる (外来性 Tax による) レポーター遺伝子の発現を全く抑制しなかった。以前に K-37 は cytomegalovirus (CMV) プロモーターによる遺伝子発現に全く影響を与えないことが明らかにされており、これらの結果から、K-37 は MT-2 細胞内の内因性 Tax のレベルに

何らかの影響を与え、その結果として持続感染細胞からの HTLV-1 の産生を減少させていると思われた。一方、K-37 とは対照的に、EM2487 は MT-2

細胞において、HTLV-1 LTR および 21-bp エンハンサーが関与するレポーター遺伝子の発現に全く影響を与えないことが分かった。

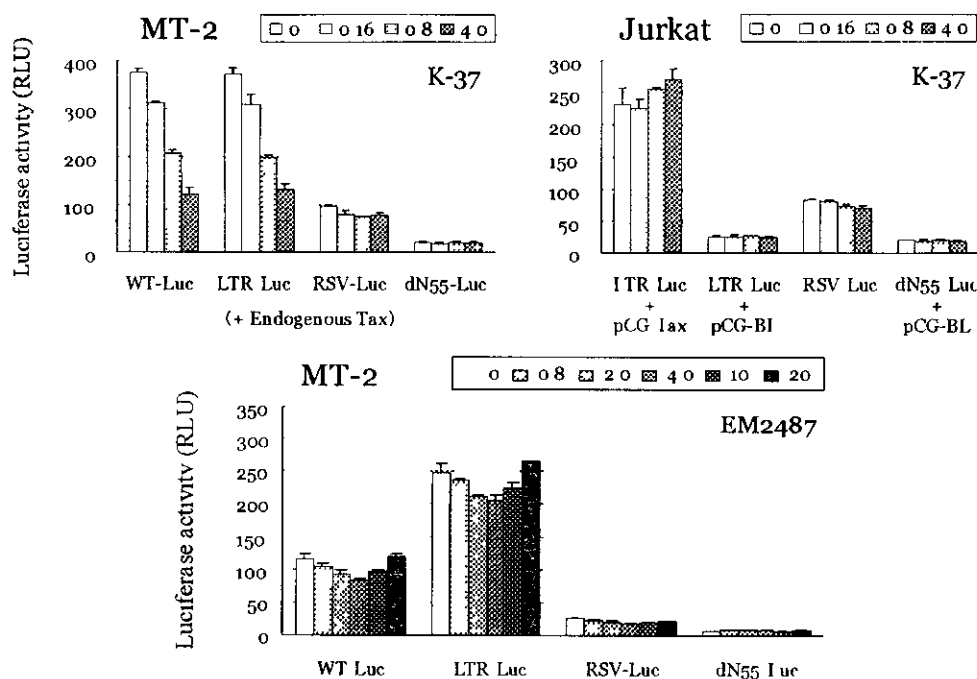


Fig. 7. Inhibitory effects of K-37 and EM2487 on HTLV-1 Tax-mediated transactivation. For Tax-mediated transactivation in HTLV-1 infected cells, MT-2 cells were transfected with 2 μ g of the reporter plasmids (WT-Luc, LTR-Luc, RSV-Luc, or dN55-Luc), incubated for 2-h, and subcultured in the presence of various concentrations of K-37 or EM2487. For Tax-mediated transactivation in uninfected cells, Jurkat cells were cotransfected with 2 μ g of the reporter plasmids (LTR-Luc, RSV-Luc or dN55-Luc) with or without 1 μ g of pCG-Tax or pCG-BL, incubated for 2 h, and subcultured in the presence of various concentrations of K-37. After a 24-h incubation, the transfected cells were collected and examined for their luciferase activity. The activity was expressed as relative light unit (RLU). At the same time, the number of viable cells was determined by the MTT method. All experiments were carried out in triplicate, mean values and standard derivations are shown. The results are representative of two independent experiments.

(5) K-37 および EM2487 の内因性 Tax 発現に与える影響。上記のレポーター遺伝子発現実験において、K-37 は HTLV-1 持続感染細胞における内因

性 Tax の発現に影響を与える可能性が示唆されたため、ウエスタンブロット法により、K-37 存在下における MT-2 細胞内の Tax の発現について調べた。

その結果、やはり K-37 は濃度依存性に細胞内の p68 Env-pX 融合蛋白と p40 Tax 蛋白を減少させることが明らかとなった (図 8)。これに対し、コントロールとして用いた cepharanthine に

はこのような効果は全く認められなかった。一方、EM2487 は K-37 と異なり、内因性 Tax のレベルには全く影響を与えず、この結果はレポーター遺伝子発現実験の結果と良く一致した。

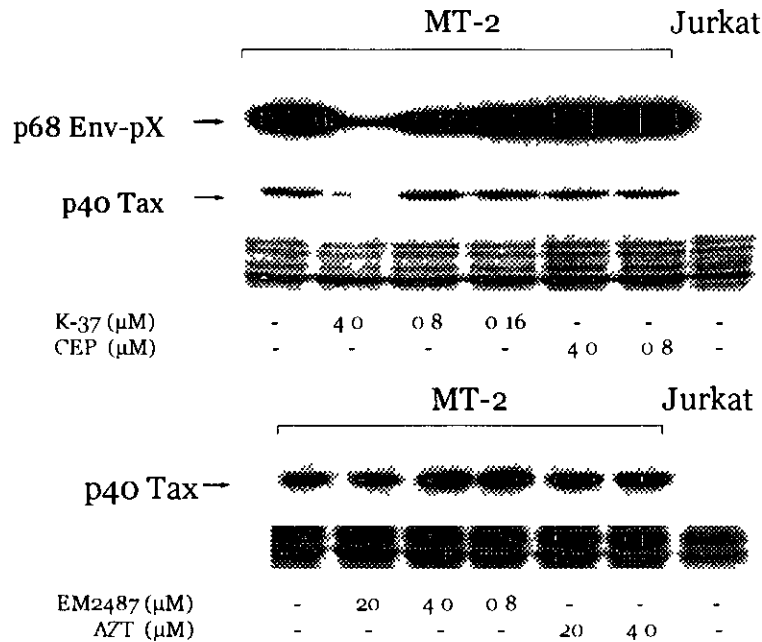


Fig 8. Inhibitory effects of K-37 and EM2487 on Tax expression in MT-2 cells. MT-2 cells were incubated in the presence of various concentrations of the test compounds for 2 days. Total cell lysate (100 μg of protein) was electrophoresed and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane. The membrane was immunoblotted with the anti-HTLV-1 p40 Tax mAb Lt-4, followed by treatment with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG. The antigen expression was quantified with the software NIH image 1.60 and expressed as percent conversion. Coomassie Brilliant Blue staining of the membrane was also performed to confirm the equal amount of protein loaded for Western blot analysis.

D 考察

HTLV-1 は HIV-1 と異なり、cell-free の状態では感染効率が非常に悪く、これまで薬剤の有効なアッセイシステムが確立されていない。そこで本研究

においては、HAM/TSP に対する有効な予防・治療薬を探索する目的で、HTLV-1 持続感染細胞を用いて種々の薬剤の抗 HTLV-1 効果を検討し、その中で 2 種類の薬剤、K-37 と EM2487

に選択的な抗ウイルス効果を見いだした。K-37はフルオロキノリン誘導体の1つであり、構造的には抗菌剤として知られている levofloxacin などに近い構造をしている。しかしながら、K-37は抗菌作用を有さず、一方で選択的な抗 HIV-1 効果を有することか証明されている。反対に levofloxacin は抗 HIV-1 効果を有さず、今回の研究において、抗 HTLV-1 効果も持たないことか分かった。K-37の作用機序については、感染細胞における内因性 Tax のレベルを減少させることにより、間接的に HTLV-1 の転写を抑制することか本研究により明らかとなった。しかし、その詳細な標的分子は未だに不明であり、ウイルス遺伝子の転写に関わる何らかの宿主細胞因子であろうと推測される。

これとは対照的に、土壌細菌の1種である *Streptomyces* 属由来の EM2487 は、内因性 Tax の産生を抑制することなしに、持続感染細胞からの HTLV-1 の産生を抑制し、このことから、その標的分子は K-37 とは異なる宿主細胞因子であると思われる。一般的に、ウイルス由来の分子を標的とせず、宿主細胞因子を標的とする抗ウイルス薬は細胞毒性が強くなることか多く、また HTLV-1 の転写機構もその詳細か解明されていないため、K-37 および EM2487 をすくに臨床的に用いるのは難しい。実際、両薬剤は抗 HIV-1 薬として開発するため、動物を用いた毒性

試験に供されたか、かなりの毒性を示したため、現在は開発か中断されている。

今年度の本研究では、抗 HTLV-1 薬のリードとなるへき2種類の物資とを見いだしたか、今後はこれらの誘導体を合成し、抗ウイルス効果を維持（あるいは向上させ）したまま、毒性を軽減することか出来れば、HAM/TSP の新しい予防・治療薬となりうる可能性か出てくると思われる。また同時に、HTLV-1 感染による神経細胞死誘導の *in vitro* モデルを樹立し、これらの神経細胞死に対する効果を検証する必要もあり、現在、その研究か進行中である。

E 結論

1 HTLV-1 持続感染細胞および HAM/TSP 患者由来の PBMCs より HTLV-1 の産生を選択的に抑制する薬剤 K-37 と EM2487 を見いだした。

2 これらの薬剤は HTLV-1 遺伝子の転写レベルで抗ウイルス効果を発揮していることか分かった。

3 K-37は感染細胞の内因性 Tax のレベルを減少させることにより、HTLV-1 の産生を抑制するか、EM2487 はこのような効果はなかつた。

4 両薬剤とも毒性の点から、すくに臨床応用は難しいか、今後詳細な標的分子の解明とともに、毒性の軽減か可能であれば、HAM/TSP 治療薬の候補者になると思われた。