

厚生労働科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

HTLV-I プロテアーゼ阻害剤による HAM 治療法
の開発ならびに HAM 発症予防に関する研究

平成 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 納 光弘

平成 18(2006)年 3 月

目 次

	頁
I. 総括研究報告	1
HTLV-I プロテアーゼ阻害剤による HAM 治療法の開発ならびに HAM 発症予防に関する研究 主任研究者：鹿児島大学大学院 納 光弘	3
II. 分担研究報告	7
1. HAM/TSP 発症を規定するウイルス因子・宿主因子と HTLV-1 に対する免疫応答 鹿児島大学大学院 納 光弘	9
2. 基質遷移状態アナログとしてアロフェニルノルスタチンを含む HTLV-I プロテアーゼ阻害剤の合成 京都薬科大学 木曾良明	13
3. HTLV-I 感染価及び HTLV-I 複製阻害剤評価システムの研究 徳島大学大学院 足立昭夫	17
4. 疾患発症モデルの作製解析とそれを用いた治療実験 北海道大学大学院 外丸詩野	21
5. アリシンおよびプロスルチアミンによる HAM 患者由来 HTLV-I 感染 T 細胞株に対する 障害性の検討 長崎大学大学院 中村龍文	29
6. HTLV-I 特異的細胞傷害性 Tリンパ球の認識の多様性と変異ウイルス 鹿児島大学大学院 久保田龍二	31
7. 臨床徴候及び臨床検査から見たHTLV-IキャリアーにおけるHTLV-I関連脊髄症(HAM/TSP) 発症リスク計算式の有用性の検討 鹿児島大学大学院 宇宿功市郎	33
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	37
IV. 研究成果の刊行物・別冊	43

I. 総括研究報告書

HTLV-I プロテアーゼ阻害剤による HAM 治療法の開発ならびに HAM 発症予防に関する研究

主任研究者 納 光弘

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科先端治療学専攻神経病学講座 教授

研究要旨: 成人 T 細胞白血病ウイルス関連ミエロパチー(HAM)の HTLV-I 特異的プロテアーゼ阻害剤の開発に取り組み、また HAM 発症予防のための研究を行なった。平成 17年度の研究で開発されたプロテアーゼ阻害剤の基本骨格を基に非ペプチド化、膜透過性向上を目指し側鎖の詳細な検討を行った結果、プロテアーゼ阻害作用を保ったまま合成が容易で膜透過性の優れた化合物を得た。新規薬剤の抗ウイルス効果判定のための、ウイルス複製に対する阻害活性測定系を確立した。治験実験のためのモデル動物を確立し、HAM 発症抵抗性に脊髄内での IFN- γ の産生低下が関与し、その原因に IL-2R β 2 遺伝子の発現低下が関与していることを明らかにした。また、HAM 発症リスク計算式が、未発症者から HAM 発症の予測に有用であることを明らかにした。プロスルチアミンが HTLV-I 感染細胞を減少させることを見出した。本年度の研究で HTLV-I プロテアーゼ阻害剤の薬剤開発を進展させることができた。またごく最近 HTLV-I プロテアーゼの結晶構造が明らかとなり、より効果的な薬剤の設計補正が可能となった。

分担研究者:

木曾 良明・京都薬科大学薬品化学教室・創薬科学フロンティア研究センター 教授

足立 昭夫・徳島大学大学院医学研究科ウイルス病原学分野 教授

外丸 詩野・北海道大学大学院医学研究科病態制御学専攻病態解析学講座 講師

中村 龍文・長崎大学大学院医学研究科感染分子病態学・神経免疫学/神経内科 助教授

久保田龍二・鹿児島大学大学院医歯学総合研究科難治ウイルス病態制御研究センター 助教授

宇宿功市郎・鹿児島大学大学院医歯学総合研究科健康科学専攻人間環境学講座 助教授

A. 研究目的

慢性難治性神経疾患、成人 T 細胞白血病ウイルス (HTLV-I) 関連ミエロパチー (HTLV-I-associated myelopathy: HAM) は HTLV-I 感染により発症し、痙性対麻痺および膀胱直腸障害を引き起こす。HAM 患者では HTLV-I プロウイルス DNA 量が HTLV-I 感染未発症者の約 16 倍と顕著に増加しているのが特徴である。しかしながら、HTLV-I プロウイルス量を特異的に減少させる治療法は確立されていない。本研究ではこれを可能にする HTLV-I ウイルス特異的プロ

テアーゼ阻害剤の開発を目指す。また、患者個人々人に対してより適切な治療時期を選択し、HTLV-I 感染者からの HAM 発症を予防するための、詳細な HAM の病態解明と発症予測に関する研究も行う。

B. 研究方法

(1) HTLV-I 特異的プロテアーゼ阻害剤の開発

HTLV-I プロテアーゼのアミノ酸配列に基づいて現在までに得られた合成阻害剤をさらに生体に投与可能となるために、非ペプチド化、膜透過性向上を目指して側鎖の置換を行い、活性の増強および薬物として適当な物性を有する化合物の創成を目指す。

(2) HTLV-I ウイルス感染価定量法の開発

HTLV-I の感染力価を測定する測定法は確立されていなかったが、HTLV-I プロテアーゼ阻害剤の酵素阻害活性の評価のためのウイルス感染価定量法の開発を行い感染細胞より放出されたウイルス蛋白を測定する系を既に確立した。この系を用いて合成した化合物の活性測定を行う。

(3) HAM 疾患モデルの開発、解析

HTLV-I 感染による脊髄症発症ラット (WKAH 系) の発症機構を、脊髄症発症抵抗性ラットと比較することにより、発症に関与する宿主遺伝子の発現を解析する。

(4) HAM 病態の解明、治療法の開発

昨年度の研究でアリシンが HTLV-I 感染細胞を減少させることを明らかにしたが、本年度はその類似構造体であるプロスルチアミン (アリナミン)

の感染細胞に対する効果を明らかにする。またウイルス排除に重要な細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) の詳細な解析を行い、変異ウイルスに対してウイルス排除に有用な CTL 因子を明らかにする。

(5) HAM 発症関連宿主遺伝子の同定並びに発症予測システムの開発

現在まで HAM 発症に関与する宿主因子・ウイルス因子を明らかにしてきたが、これらの因子が HTLV-I に対する免疫反応に与える影響につき検討する。また、多数の HAM 発症促進因子・抑制因子をもとに作成した HAM 発症リスク計算式を未発症 HTLV-I キャリアに応用し、神経症状や臨床パラメーターとの関連の解析を行う。

(倫理面への配慮)

今回の研究で開発された新薬剤は学内倫理委員会の承認を得たのち、インフォームドコンセントの得られた HAM 患者で、新治療薬の効果判定を行う予定である。動物の使用にあたっては感染動物実験施設で行い、各研究施設の「動物実験に関する指針」を遵守する。発症要因解析については学内倫理委員会の承認を得て行う。

C. 研究結果

(1) HTLV-I 特異的プロテアーゼ阻害剤の開発

- ① 既に得られた化合物 KNI-10252, KNI-10455 をリード化合物として、側鎖の P3, P2, P1, P2' の置換を検討し、P3 部位の置換体でプロテアーゼ阻害作用はほぼ同等で生体内安定性の高い KNI-10497、KNI-10511 を得た。
- ② 同様に P2' 部位の置換体として、強い阻害活性を持ち、合成が容易で、さらに膜透過性の高い化合物 KNI-10496, KNI-10516 を得た。
- ③ これらの構造の特徴を生かし、組み合わせたプロテアーゼ阻害剤をデザインすることで、より高活性で効果的な HTLV-I 特異的プロテアーゼ阻害剤を創製できる。

(2) HTLV-I ウイルス感染価定量法の開発

- ① HTLV-I 蛋白が添加した細胞で産生されたときにのみルシフェラーゼを産生する細胞培養システムを樹立した。
- ② この細胞株は感染細胞内でのプロテアーゼ阻害活性測定に適している。
- ③ このシステムを用いて現在までに合成した化合物のいくつかを細胞毒性のない低濃度で効果判定したところ、この条件下では強い活性を示すものは認めなかった。

(3) HAM 疾患モデルの開発・解析

- ① HTLV-I 感染による WKAH 系ラットの脊髄傷害機構の原因を HAM 発症抵抗性ラットの

脊髄と比較した。

- ② HAM 疾患抵抗性を示すラットの脊髄内と疾患感受性ラットとを比べ、IFN- γ の発現亢進が認められた。この IFN- γ 産生細胞は HAM 発症ラットでは主にニューロンであった。
- ③ このニューロンによる IFN- γ 産生は通常 IL-12 刺激で増強するが、HAM 発症ラットでは産生増強に乏しく、IL-12R β 2 遺伝子の発現低下が観察された。

(4) HAM 病態の解明、治療法の開発

- ① アリシンの類似構造体であるプロスルチアミンにより、HTLV-I 感染細胞株に細胞傷害が認められ、これは caspase を介したアポトーシスによると考えられた。また HAM 患者末梢血中 CD4 陽性 T リンパ球中の HTLV-I ウイルス量を優位に低下させた。プロスルチアミンは HTLV-I 感染細胞を選択的に減少させる可能性が示された。
- ② HTLV-I 特異的 CTL の機能的多様性が高いほど、生体内で発生する変異ウイルスをより効率よく認識し排除する可能性が示された。HAM の免疫細胞治療開発への基礎となりえたと考えられた。

(5) HAM 発症関連宿主遺伝子の同定並びに発症予測システムの開発

- ① HAM では発症促進に関与する HLA アリル、HLA-DRB1*0101 に拘束された HTLV-I env 特異的 CD4 陽性 T 細胞が、キャリアと比べ高頻度に検出された。HAM 発症を規定する宿主因子に関与した免疫反応の変化が HAM 発症に関連していることが示された。また、HAM では CD8 陽性細胞中の共刺激分子である CD28 分子の発現低下が観察され、発症に関与している可能性が示された。
- ② HAM 発症リスク計算式でオッズ値を 0.78 に設定することで、感度 92.1%、特異度 85.6% の高感度で HAM 発症を予測できることが分かった。また、このリスク計算式を用いて鹿児島県のキャリアを検討したところ、オッズ値が 0.78 以上のキャリアにおいて、それ以下のキャリアと比べ、優位に脊髄神経症状を示唆する下肢深部腱反射の亢進と、末梢血中の異常リンパ球数の増加を認めた。この HAM 発症リスク計算式がキャリアからの HAM 発症予測に有用であることが示された。

D. 考察

HTLV-I 感染者の一部に HAM は発症し、その発症および症状増悪には HTLV-I ウイルスの増加が最大のリスクである。そのため HAM 発症予防ないし症状軽減にはウイルス量の減少ないしはウイルス除去が最も重要である。本研究では HTLV-I 特異的プロテアーゼ阻害剤の開発を中

心に研究を行っている。本年度は昨年度までの研究により得られたプロテアーゼ阻害化合物をリード化合物として、非ペプチド化、膜透過性の向上を目指してさらに側鎖の詳細な検討を行い、高力価で合成が容易で、膜透過性の高い化合物を得た。薬剤開発目標のもう一步のところまで到達したと思われる。さらに2005年12月に米国の研究グループより、HTLV-I プロテアーゼの結晶構造が明らかにされた。我々はこの研究グループと共同研究を始めており、現在までに得られたプロテアーゼ阻害剤の詳細な設計補正が可能になった。今後の研究により、高力価で人体投与可能な薬剤の開発が、いっそう加速されるものと思われる。

さらに、細胞系を用いた HTLV-I ウイルス増殖の適切な測定系が現在まではなかったが、本研究により、感度の高い *in vitro* の実験系が確立された。本測定系は無細胞ウイルスによる影響は受けないことより、感染細胞内のウイルス活性を測定できることを明らかにした。

HAM 感受性動物モデルは前年度までの研究によりすでに確立されているが、本年度は発症ラットと発症抵抗性ラットの詳細な比較検討を行い、HAM 発症抵抗性に脊髄内での IFN- γ の産生低下が関与し、その原因に IL-2R β 2 遺伝子の発現低下が関与していることを明らかにした。今後ヒトの HAM 脊髄においても、同様な機序が HAM 発症に関与しているのかの検討が必要である。

昨年度は HAM 治療のための試みとして、garlic の抽出成分である allicin が、HTLV-I 感染細胞のウイルスを減少させることを報告した。本年度は allicin と構造類似体であるプロスルチアミン(アリナミン)の HTLV-I 感染細胞に対する効果を検討し、HAM 患者末梢血中のウイルス量を減少させることが明らかとなった。プロスルチアミンはすでに、薬剤として使用されている化合物であり、HAM への新たな治療法の一つになる可能性がある。また、CTL の詳細な検討により、機能的多様性の高い CTL は、単純に HTLV-I ウイルスを減らすのみでなく、変異ウイルスも効率よく認識することが明らかとなった。変異ウイルスの逸脱現象を抑えた免疫療法の確立には、CTL の多様性を保つ必要性が指摘された。

HAM は一部の HTLV-I 感染者に主に成人期以降に発症するため、その発症因子を明らかにし、発症予測により治療介入を行うことが HAM 発症予防に重要である。我々は現在までに多数の HAM 発症促進・抑制する宿主因子とウイルス因子を同定してきたが、これらをもとに HAM 発症リスク計算式を作成し報告した。本年度は本リスク計算式を用いて、HTLV-I 感染未発症者のオッズを検討し、カットオフ値の前後で神経症状や末梢血中の異常リンパ球数に優位な差を認めた。

本 HAM 発症リスク計算式は HAM 発症の予測として有用であると考えられた。HTLV-I 感染未発症者からの HAM 発症の予測とともに、適切な時期での治療介入に応用できるものとする。また、HAM 発症促進に関与する HLA アリルに拘束された HTLV-I env 特異的 CD4 陽性 T 細胞が、未発症者と比べ高頻度に検出されたことより、HAM 発症を規定する宿主因子に関連した免疫反応の変化が HAM 発症に関与していることが示された。

E. 結論

平成 17年度の研究により、HTLV-I プロテアーゼ阻害剤の開発は、より効果的で生体投与に耐える化合物の合成を目指し、さらに進展した。薬剤検定のための細胞株を用いた実験系の整備とモデル動物の HAM 発症に関与する因子の詳細な解析も行われた。発症予防、発症予測、治療開始時期選定のための HAM の病態解明、HAM 発症関連ウイルス要因、宿主要因研究も進展した。HTLV-I プロテアーゼの結晶構造も明らかにされ、生体に投与可能な新規プロテアーゼ阻害剤の開発は、さらに加速するものと期待される。今回の研究を今後さらに発展させることで、当初の目標が達成できるところまで来ている。

F. 健康危険情報

特記すべきものはない。

G. 研究発表

主たるものを記載する。

1. 論文発表

- 1) Sabouri AH, Saito M, Usuku K, Naghibzadeh Bajestan S, Mahmoudi M, Foroughipour M, Sabouri Z, Abbaspour Z, Goharjoo ME, Khayami E, Hasani A, Izumo S, Arimura K, Farid R, Osame M. Differences in viral and host genetics risk factors for development of HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) between Iranian and Japanese HTLV-1 infected individuals. *J Gen Virol.* 86(3) 773-81. 2005
- 2) Tomoya Kotake, Yoshio Hayashi, S. Rajesh, Yoshie Mukai, Yuka Takiguchi, Tooru Kimrua, Yoshiaki Kiso Design and synthesis of a new polymer-supported Evans-type oxazolidinone: an efficient chiral auxiliary in the solid-phase asymmetric alkylation reactions. *Tetrahedron* 61 (15), 3819-3833, 2005
- 3) Yoshida, A., Piroozmand, A., Sakurai, A., Fujita, M., Uchiyama, T., Kimura, T., Hayashi, Y., Kiso, Y., and Adachi, A.

Establishment of a biological assay system for human retroviral protease activity. *Microbes and Infection* 7: 820-824, 2005.

- 4) Yamano Y, Takenouchi N, Li HC, Tomaru U, Yao K, Grant CW, Maric DA, Jacobson S. Virus-induced dysfunction of CD4+CD25+ T cells in patients with HTLV-I-associated neuroimmunological disease. *J Clin Invest.* 115(5):1361-8. 2005
- 5) Naomi Fukushima, Yoshihiro Nishiura, Tatsufumi Nakamura, Yasuaki Yamada, Shigeru Kohno, Katsumi Eguchi
Involvement of p38 MAPK signaling pathway in IFN- γ and HTLV-I expression in patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neuroimmunol* 159:196-202, 2005

2. 学会発表

- 1) Hirohisa Nose, Mineki Saito, Koichiro Usuku, Toshio Matsuzaki, Shuji Izumo, Ryuji Kubota, Yoshitaka Furukawa, Kimiyoshi Arimura and Mitsuhiro Osame
Comparison of clinical symptoms and the odds for predicting HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in healthy virus carriers: application of best-fit logistic regression equation based on the genotype, age, and provirus load. The 12th International Conference on Human Retrovirology: HTLV 2004, 6, Montego Bay, Jamaica
- 2) Koichiro Usuku, Mineki Saito, Amir H. Sabouri, Hirohisa Nose, Yoshitaka Furukawa, Shuji Izumo, Reza Farid, Charles R.M. Bangham and Mitsuhiro Osame
Viral and host genetic factors that determine the development of HAM/TSP. The 12th International Conference on Human Retrovirology: HTLV 2004, 6, Montego Bay, Jamaica
- 3) Ayako Itami, Hikoichiro Maegawa, Keiji Nishiyama, Koushi Hidaka, Yasuhiro Arii, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso: Evaluation of peptidomimetic HTLV-1 protease inhibitors containing hydroxymethyl carbonyl as a transition-state isostere. 42nd Japanese Peptide Symposium (Toyonaka) 2005.10.

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。

Ⅱ. 分担研究報告書

HAM/TSP 発症を規定するウイルス因子・宿主因子と HTLV-1 に対する免疫応答

主任研究者 納 光弘 鹿児島大学教授

共同研究者: 斉藤峰輝、能勢裕久、Amir H. Sabouri、宇宿功市郎、有村公良、出雲周二

研究要旨: 我々は鹿児島のコホートにおいて HAM を発症しやすい特定の HTLV-1 サブタイプと HAM 発症に関連する複数の宿主遺伝子が存在することを見だし、これをもとに HAM 発症リスク計算式を作成してその有用性を報告してきた。今回は、それぞれの HAM 発症関連因子がどのようなメカニズムで発症に関与するのかについて、分子生物学的・免疫学的検討を行った。その結果、HTLV-1 LTR および NFkB プロモーターに対する HTLV-1Tax サブタイプの転写活性化能に有意な差が認められないこと、HAM 患者ではプロウイルス量が同じ HTLV-1 感染無症候性キャリアーと比較して末梢血リンパ球中の HTLV-1 env 特異的 CD4+ T 細胞が高頻度に検出されること、CD8 陽性 T 細胞上に発現する共刺激分子群の発現が HTLV-1 感染者では低下しており、特に CD8+CD28-細胞は HAM 患者で HC より有意に低いことを明らかにした。

A. 研究目的

我々はこれまでに、鹿児島の HAM 患者では HTLV-1 感染無症候性キャリアー (Healthy carriers: HC) に比べ、プロウイルス量が 10 倍以上に増加し最大の発症危険因子であること、HAM を発症しやすい特定の HTLV-1 Tax サブタイプが存在すること、HAM 発症に関連する複数の宿主遺伝子が存在することを見だし、これをもとに HAM 発症リスク計算式を作成してその有用性を報告してきた。一方、HLA-DRB1*0101 が鹿児島とイラン北東部に共通する HAM 発症感受性因子であることを報告した。このように、HAM 発症に関与する因子については次第に明らかになってきたものの、感受性がある個体が発症にいたる機序については未だ解明の途上である。今回は、それぞれの HAM 発症関連因子がどのようなメカニズムで病態に関与するのかについて、分子生物学的・免疫学的な検討を行った。

B. 研究方法

鹿児島のコホートにおいて HAM を発症しやすい HTLV-1Tax サブタイプ A (TaxA)、発症しにくい Tax サブタイプ B (TaxB)、イラン型 Tax サブタイプ (サブタイプ I: TaxI) の、HTLV-1 LTR および NFkB プロモーターに対する転写活性化能をルシフェラーゼアッセイにより比較した。また、鹿児島、イラン共通に HAM 発症促進効果が認められた HLA-DRB1*0101 については、HLA-DRB1*0101 拘束性 env gp21 特異的 CD4+T 細胞を直接 ex vivo で解析するために、DRB1*0101/env tetramer を作成し、HAM、HC の

末梢血単核球中における陽性細胞の頻度、フェノタイプを解析した。一方、その遺伝子多型が、HAM 発症と HC におけるプロウイルス量の双方に関連する IL-10 によって影響をうける、T 細胞上に発現する共刺激分子群について、年齢補正を行った HAM 患者、HC、非感染健康常人 (NC) 各 20 例の末梢血単核球中の CD28, CD80, CD86, CD152 陽性細胞の頻度、フェノタイプをフローサイトメトリーにより解析した。

(倫理面への配慮)

本研究に用いられたすべての患者検体は、説明と書面による同意を得て採取された。また、採取された検体はコード化された番号を割り振られ、匿名化された状態で解析された。

C. 研究結果

イラン株の HTLV-1 Tax の塩基配列は、HAM になりやすい株として報告した鹿児島の Tax サブタイプ A と共通の 4 つの塩基置換 (2 アミノ酸変異を伴う) を持ち、さらに 6 つの塩基置換 (4 アミノ酸変異を伴う) を伴っているが、HTLV-1 LTR および NFkB プロモーターに対する HTLV-1Tax サブタイプ A (鹿児島株: TaxA)、サブタイプ B (鹿児島株: TaxB)、サブタイプ I (イラン株: TaxI) の転写活性化能に有意な差は認められなかった。一方、HAM 患者では、プロウイルス量が同じ HC と比較して、末梢血リンパ球中の DRB1*0101/env tetramer 陽性 CD4+ T 細胞が高頻度に検出された。また、HTLV-1 感染者では CD8 陽性 T 細胞における共刺激分子の発現が低下しており、特に CD8+CD28-細胞の割合は HAM 患者において HC より有意に低かった ($p=0.037$)。

D. 考察

HTLV-1 LTR および NFκB プロモーターに対する Tax の転写活性化能に関して、イラン株 Tax (サブタイプ I) と鹿児島株 Tax (サブタイプ A, B) との間に差が認められなかったことから、Tax による標的遺伝子の活性化能の差が、両地域の HAM 患者のプロウイルス量および発症率に直接関連している可能性は低いと考えられた。興味深いことに、より上流の塩基配列の比較から、イラン株 Rex フレームの終止コドン部位 7811 の A が G に置換することにより、終止コドン (TGA) が Trp をコードする TGG となり、以降フレームがずれて C 末に 20 アミノ酸長い Rex をコードすることが明らかになった。Rex の機能の差が病態に関与する可能性を検討するため、現在イラン株 Rex と鹿児島株 Rex の機能の相違について解析中である。

末梢血リンパ球中の DRB1*0101/env tetramer 陽性 CD4+ T 細胞が、HAM 患者において HC より高頻度に検出されたことから、HLA-DRB1*0101 は HTLV-1 ウイルスを効率よく認識し、HTLV-1 特異的 CD4+T 細胞を誘導することで HAM の発症に促進的に作用するものと考えられる。EAE や NOD などの臓器特異的自己免疫疾患モデルにおいて、Th1 が発症や疾患の促進に重要で、逆に Th2 が抑制的役割を示すこと、active な炎症が見られる時期の HAM の脊髄組織所見で、これらの動物モデルと同様に CD4+ T 細胞とマクロファージを主体とした細胞浸潤が認められることなどから、今後 HTLV-1 感染が自己抗原に対する免疫応答を増強することで HAM 発症に関与する可能性についても追求していきたい。

HTLV-1 感染者では CD8 陽性 T 細胞における共刺激分子の発現が低下しており、特に CD8+CD28- 細胞の割合が HAM 患者で HC より有意に低かったことから、共刺激分子の発現が減弱すること、そのような細胞の population が増加することが、CD8+T 細胞のシグナル伝達や CTL 活性に影響を与え、HAM 発症に関与する可能性が示唆された。

E. 結論

HTLV-1 感染に対する遺伝的に規定された宿主の応答効率の差が、HAM 発症に密接に関連していることが確認されたのみならず、ウイルス因子もその効果に影響を及ぼす可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- [1] Mori S, et al. Bronchoalveolar lymphocytosis correlates with human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) proviral DNA load in HTLV-I carriers. *Thorax*. 2005 60(2): 138-43.
- [2] Sabouri AH, et al. Differences in viral and host genetics risk factors for development of HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) between Iranian and Japanese HTLV-1 infected individuals. *J Gen. Virol.* 2005 86: 773-781.
- [3] Saito M, et al. *ApaI* polymorphism of vitamin D receptor gene is associated with susceptibility to HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in HTLV-1 infected individuals. *J Neurol Sci.* 2005 232(1-2): 29-35.
- [4] Matsuzaki T, et al. A prospective uncontrolled trial of fermented milk drink containing viable *Lactobacillus casei* strain Shirota in the treatment of HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurol Sci.* 2005 237(1-2): 75-81.
- [5] Matsuda T, et al. Human T cell leukemia virus type I-infected patients with Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 90(10): 5704-10.
- [6] Bangham CR and Osame M. Cellular immune response to HTLV-1. *Oncogene.* 2006 24(39): 6035-46.
- [7] Umehara F, et al. Relapsing cervical cord lesions on MRI in patients with HTLV-I-associated myelopathy. *Neurology.* 2006 66(2): 289.
- [8] Furukawa Y, et al. HTLV-I viral escape and host genetic changes in the development of adult T cell leukemia. *Int J Cancer.* 118(2): 381-7.
- [9] Nobuhara Y, et al. Genetic variability in the extracellular matrix protein as a determinant of risk for developing HTLV-I-associated neurological disease. *Immunogenetics.* 57(12): 944-52.
- [10] Saito M, et al. Flow cytometry evaluation of the T-cell receptor Vβ repertoire among human T-cell lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) infected individuals: effect of interferon alpha therapy in HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *J Neurol Sci.* in press.

2. 学会発表

[第 46 回日本神経学会総会 2005, 5. 鹿児島]

- [1] 齊藤峰輝、能勢裕久、宇宿功市郎、出雲周二、有村公良、納 光弘、
HAM 発症における HTLV-1 envb gp21 特異的 CD4+ T 細胞の病因的意義
- [2] 児玉大介、齊藤峰輝、宇宿功市郎、出雲周二、有村公良、納 光弘
HTLV-1 感染者における Sonic hedgehog, Gli2, CD44v6 分子の解析
- [3] 松崎敏男、齊藤峰輝、宇宿功市郎、能勢裕久、出雲周二、有村公良、納 光弘
HAM 患者に対する *Lactobacillus casei* Shirota 株の治療効果

[4] 宇宿功市郎、齊藤峰輝、能勢裕久、納 光弘
HAM 発症関連宿主因子と RA の宿主要因の関連

[5] 能勢裕久、齊藤峰輝、宇宿功市郎、松崎 敏男、久
保田 龍二、古川 良尚、有村 公良、納 光弘
HTLV-1 キャリアーにおける HTLV-1 関連脊髄症
(HAM/TSP)発症リスク計算式の有用性の検討

[The 12th International Conference on Human
Retrovirology: HTLV 2004, 6, Montego Bay, Jamaica]

[1] Mineki Saito, Hirohisa Nose, Koichiro Usuku, Amir H.
Sabouri, Shuji Izumo, Peter K. Goon, Nilufer P. Seth, Kai
W. Wucherpfennig, Charles R.M. Bangham and Mitsuhiro
Osame
Ex vivo analysis of human T cell lymphotropic virus
type-1 (HTLV-1) env gp21-specific CD4+ T cells using
MHC class II tetramers.

[2] Hirohisa Nose, Mineki Saito, Koichiro Usuku, Toshio
Matsuzaki, Shuji Izumo, Ryuji Kubota, Yoshitaka
Furukawa, Kimiyoshi Arimura and Mitsuhiro Osame
Comparison of clinical symptoms and the odds for
predicting HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic
paraparesis (HAM/TSP) in healthy virus carriers:
application of best-fit logistic regression equation based on
the genotype, age, and provirus load.

[3] Koichiro Usuku, Mineki Saito, Amir H. Sabouri,
Hirohisa Nose, Yoshitaka Furukawa, Shuji Izumo, Reza
Farid, Charles R.M. Bangham and Mitsuhiro Osame
Viral and host genetic factors that determine the
development of HAM/TSP.

[4] Fujio Umehara, Mineki Saito, Yoshitaka Furukawa,
Koichiro Usuku and Mitsuhiro Osame
Chronic progressive cervical myelopathy with HTLV-1
infection: Variant form of HAM/TSP?

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
特にない。

2. 実用新案登録
特にない。

3. その他
特にない。

基質遷移状態アナログとしてアロフェニルノルスタチンを含む HTLV-I プロテアーゼ阻害剤の合成

分担研究者 木曾良明 京都薬科大学教授

研究要旨:我々は HTLV-I の増殖阻害薬を目指して, HTLV-I 固有プロテアーゼの阻害剤創製を試みている. 我々は既に基質構造に基づく論理的な阻害剤デザイン, 合成の結果, 強力な酵素阻害活性を有し低分子のテトラペプチド型阻害剤 KNI-10252, KNI-10455 を見い出している. 今回 KNI-10252, KNI-10455 をリードとし P3, P2, P1, P2' の各々の部位で構造活性相関研究を行った結果, KNI-10455 と同等の活性を有し, 生体内安定性が高く細胞透過性を改善できると考えられる化合物を得た.

A. 研究目的

我々は HAM 治療あるいは発症予防を目的とした, HTLV-I の増殖抑制効果を有する化学療法剤の創製を目指す. 化学療法のターゲットとして HTLV-I が自ら産生しその増殖に必須な HTLV-I プロテアーゼに着目し, その阻害剤創製を試みている. 本年度は HTLV-I プロテアーゼの基質のアミノ酸配列に基づいてデザイン・合成した阻害剤をさらに低分子化したテトラペプチド型阻害剤 KNI-10252, KNI-10455 をリード化合物として, 非ペプチド化, 膜透過性向上を目指した物性の改善について検討を行い, 活性の増強および薬物として適当な物性を有する化合物の創成をめざす.

B. 研究方法

本年度も我々が既に構築した *in vitro* の阻害剤評価系を用いて, 新規にデザイン・合成した阻害剤の活性を測定する.

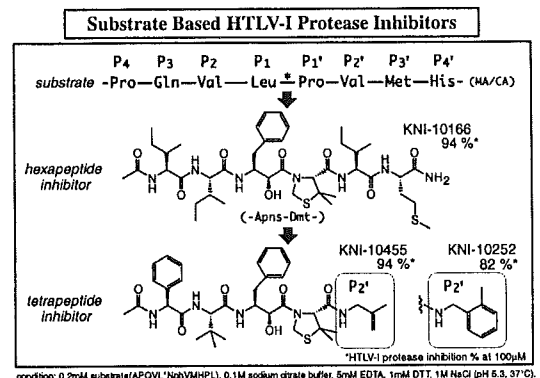
阻害剤評価

酵素として組み替え型 HTLV-I プロテアーゼを, 基質には MA/CA 部位のアミノ酸配列に基づく合成基質 (Ala-Pro-Gln-Val-Leu**Nph*-Val-Met-His-Pro-Leu, 0.2 mM) を用い, 1 mM DTT, 1 M NaCl, 5mM EDTA, 0.1 M citrate buffer (pH 5.3) 中で 6h インキュベートし, RP-HPLC にて切断された基質断片の定量を行った. 上記のアッセイ系に 0.1 mM あるいは 0.005 mM の阻害剤を添加し, 基質の切断量の低下を測定し阻害活性を測定した.

阻害剤のデザインと合成

我々は基質遷移状態概念誘導体としてヒドロキシメチルカルボニル (HMC) イソスターを用いたアスパラギン酸プロテアーゼの阻害剤設計およびその合成を行ってきており, HMC イソスターを有する非天然アミノ酸誘導体としてアロフェニルノルスタチン (A_{pn}s) を用いた化合物は, 極めて高活性な HIV プロテアーゼ阻害剤や, マラリア原虫プロテアーゼ (プラスメプシン) の阻害剤合成に成功した実績がある.

我々は既に MA/CA 部位のアミノ酸配列 (-Pro-Gln-Val-Leu*Pro-Val-Met-His-) と A_{pn}s を組み合わせた阻害剤の設計, 合成を行い, 強い酵素阻害活性を有するヘキサペプチド型阻害剤を見いだしている. さらに本化合物を低分子化, 非天然アミノ酸の導入, 非ペプチド化等を行って, テトラペプチド型阻害剤 KNI-10252, KNI-10455 を見いだした. これらはヘキサペプチド型阻害剤と比べても見劣りしない強い酵素阻害活性を有していた.



今回阻害剤の設計に際し、KNI-10455 はペプチド結合の数が少なく、分子量も小さいため、リード化合物として適当であると判断し、各ポジションの構造活性相関研究に利用しようとした。しかし KNI-10455 は合成途中や不安定であるという性質を有していることが分かったので、合成容易な KNI-10252 を、リード化合物として主に用いた。

各ポジションの構造変換は、酵素との相互作用の質を高めつつ細胞膜透過性向上に寄与することに重点を置いてデザインすることとした。

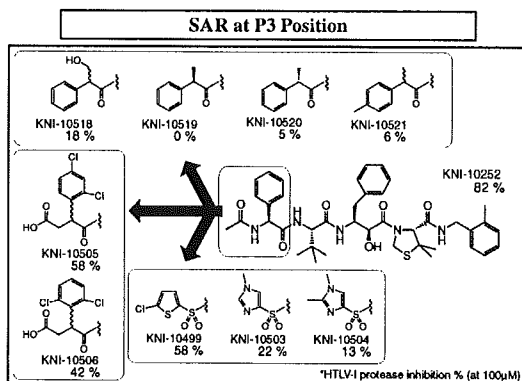
化合物の合成は、Boc 基を一時的アミノ保護基に用いる一般的な液相法にて行い、すべて逆相 HPLC にて精製を行った後、活性の評価に用いた。

(倫理面への配慮)

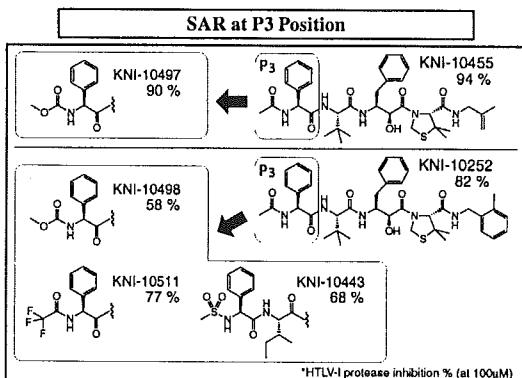
特に必要としない。

C. 研究結果

1) P3 位構造活性相関 (アセチルフェニルグリシンの置換)

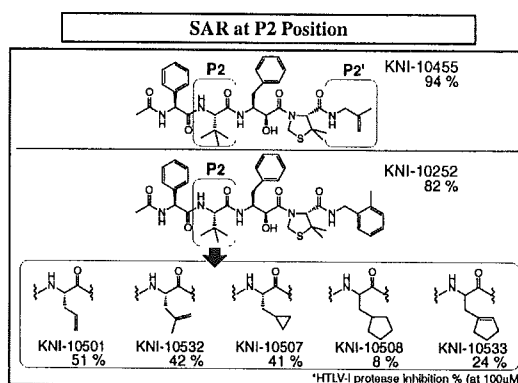


テトラペプチド型阻害剤 KNI-10252, KNI-10455 の P3 位はいずれもアセチルフェニルグリシンであるが、このアセトアミド部位は薬物として安定性や膜透過の点で不利であると考えられる。そこで P3 位を構造類似性のある、フェニル酢酸誘導体、フェニルコハク酸誘導体およびアリアルスルホンアミド誘導体に置換した化合物を合成した。



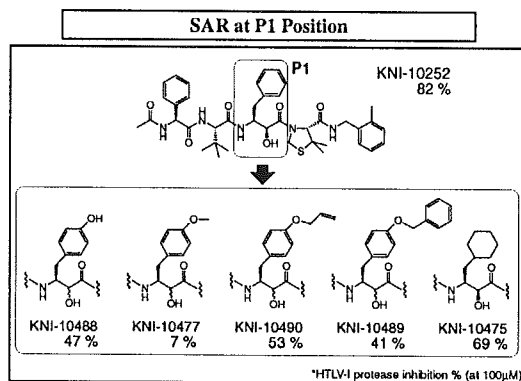
しかし残念ながらこれら化合物は弱い活性しか示さず、アセトアミド部分が酵素と強い相互作用をしていることが示唆された。そこでアセトアミド部位のペプチド結合を残したまま、より望ましい物性を有すると考えられるウレタンやトリフルオロアセトアミドに変換したところ、ほぼ同等の活性を有する化合物 KNI-10497 および KNI-10511 を見いだすことができた。

2) P2 位構造活性相関 (tert-ロイシン側鎖の置換)



KNI-10252 の P2 位 tert-ロイシンを、アミノ酸類似構造を側鎖に有するアミノ酸に置換した。HTLV-I プロテアーゼは C2 対称性を有しているため、阻害剤の P2 と P2' が配位するポケットは基本的に同一の構造である。そこで P2' 位での構造活性相関研究の結果、良好な活性を有していた β-メタリルアミンに着目し、これら類似の構造を P2 位に導入した阻害剤を設計、合成した。しかし結果として、リード化合物である KNI-10252 より優れた活性を有するものは見いだせなかった。

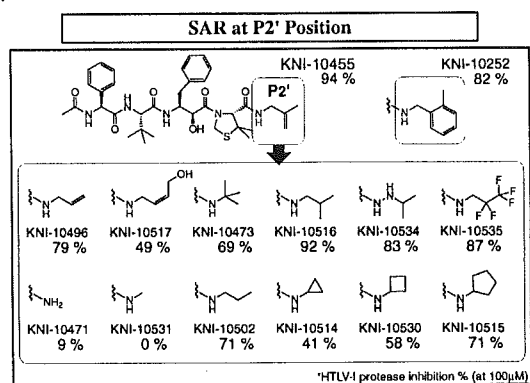
3) P1 位構造活性相関 (アロフェニルルスタチンのベンゼン環上の置換基導入)



HTLV-I プロテアーゼと HIV プロテアーゼは非常に類似した酵素であるが、HIV プロテアーゼ阻害剤には P1 位を P3 位に近い位置まで延長した化合物 (アタザナビル, インジナビル等) が高い阻害活性を有することが報告

されている。そこで今回、P1 位のアロフェニルノルスタチンのベンゼン環に置換基を導入した阻害剤の合成を行った。ベンゼン環パラ位にアリルオキシまたはベンジルオキシ基を導入した化合物を合成したが、活性は高いものではなかった。しかしこれら化合物は HIV-1 プロテアーゼに対しては非常に強い阻害活性を有していた。

4) P2'位構造活性相関 (ベンジルアミン, β -メタリルアミンからの置換)



KNI-10252, KNI-10455 は P2'位にそれぞれベンジルアミン, β -メタリルアミンを有している。これらを比較的構造類似の低分子有機アミンで置換した化合物の合成を行った。その結果強い阻害活性を有する KNI-10496, KNI-10516 を見いだした。特に KNI-10516 は KNI-10455 に匹敵する阻害活性を有し、合成途中で不安定さを伴わない合成容易な化合物であった。また KNI-10534, KNI-10535 は同等の強い阻害活性を示すだけでなく、分子内に塩基性窒素を有している、あるいは細胞膜と親和性が高く疎水性のフルオロカーボン有しているといった特徴を持っている。これらは膜透過性の高い薬物としての阻害剤を設計するうえで、極めて有用な知見といえる。

D. 考察

P3 位構造活性相関からアセチルフェニルグリシンのアセトアミド部分が非常に重要な相互作用をもたらしていることが分かった。この部分のカルボニル酸素とアミド水素は両方とも酵素と水素結合を形成するものと考えられる。アセトアミドの様な構造は生体内安定性、膜透過性の点でも望ましいとは言えないので、この様な構造を持たない阻害剤としたいが、単純に除去すると著しく活性が低下した。幸いにもペプチド結合は残存するものの物性の良好と思われるウレタン構造やトリフルオロアセトアミドに置換しても良好な活性を示すことが見いだせた。

P2 と P2'が配位するポケット S2, S2'は基本的に同一の構造であるが、P2'位で良好な結果を示した β -メタリルアミンを P2 位に導入した化合物は優れた活性を示さなかった。これは阻害剤が非対称のため P2 と P2'では同じ官能基を導入しても、位置と方向を完全に同一のものとするのができないためと考えられる。今後は長さの異なる側鎖を持つ誘導体の合成が必要かもしれないが、もし短い側鎖が望ましいのであれば KNI-10455 が有する tert-ブチルが最良である可能性も高い。

P1 位を延長した化合物は HIV プロテアーゼに対しては強い阻害活性を有するが、HTLV-I プロテアーゼには有利に働かないことが分かった。HTLV-I プロテアーゼは HIV プロテアーゼと非常に類似した酵素であるが、一般的な HIV プロテアーゼ阻害剤ではほとんど阻害を受けない。両者の P1 から P3 にかけての構造が大きく異なっている可能性が強く示唆される。

P2'位の構造活性相関から KNI-10455 に匹敵する阻害活性を有し、合成容易な化合物 KNI-10516 を見いだした。これは薬物としてより優れた性質を有しているというだけでなく、今後の構造活性相関研究のリードとしても有用である。

また KNI-10534, KNI-10535 の様に強い酵素阻害活性を有するとともに、塩基性窒素や疎水性フルオロカーボンの様に特徴ある構造を有した阻害剤を見いだすことができた。これらの構造は薬物として有用な阻害剤を設計するうえで、非常に役に立つ部分構造であるといえる。

上記結果を組み合わせることで、生体内安定性、細胞膜透過性に優れた HTLV-I プロテアーゼ阻害剤を創出できるものと期待する。

E. 結論

テトラペプチド型 HTLV-I プロテアーゼ阻害剤 KNI-10252, KNI-10455 をリード化合物として、生体内安定性、膜透過性向上を目指した阻害剤の設計、合成を試みた。その結果として、P3 部位, P2'部位でリード化合物より安定性や物性の点で進歩した部分構造をもち、同等の酵素阻害活性を有する阻害剤を見いだした。これらは今後薬物としてより有用な阻害剤を設計するうえでの重要な指針となる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tomoya Kotake, Yoshio Hayashi, S. Rajesh, Yoshie Mukai, Yuka Takiguchi, Tooru Kimura, Yoshiaki Kiso: Design and synthesis of a new polymer-supported Evans-type oxazolidinone: an efficient chiral auxiliary in the solid-phase asymmetric alkylation reactions. *Tetrahedron*, **61** (15) 3819-3833 (2005).
 - 2) 林良雄, 木曾良明: α -ヒドロキシ- β -アミノ酸を基盤とした有機化学・創薬化学研究. *有機合成化学協会誌*, **63**(6), 640-651 (2005).
 - 3) Mariusz Skwarczynski, Youhei Sohma, Mayo Noguchi, Maiko Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshio Hamada, Tooru Kimura, Yoshiaki Kiso: No auxiliary, no byproduct strategy for water-soluble prodrugs of taxoids: scope and limitation of O-N intramolecular acyl and acyloxy migration reaction. *J. Med. Chem.* **48** (7), 2655-2666 (2005).
 - 4) Akiko Yoshida, Ahmad Piroozmand, Akiko sakurai, Mikako Fujita, Tsuneo Uchiyama, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso, Akio Adachi: Establishment of a biological assay system for human retroviral protease activity. *Microbes and Infection*, **7**(5/6), 820-824 (2005).
 - 5) Yohei Sohma, Yoshio Hayashi, Maiko Kimura, Yousuke Chiyomori, Atsuhiko Taniguchi, Masato Sasaki, Tooru Kimura, Yoshiaki Kiso: The 'O-acyl isopeptide method' for the synthesis of difficult sequence-containing peptides: application to the synthesis of Alzheimer's disease-related amyloid β -peptide (A β) 1-42. *J. Peptide Sci.*, **11**(8), 441-451 (2005).
 - 6) Youhei Sohma, Yousuke Chiyomori, Maiko Kimura, Fukue Fukao, Atsuhiko Taniguchi, Yoshio Hayashi, Tooru Kimura and Yoshiaki Kiso: 'O-Acyl isopeptide method' for the efficient preparation of amyloid β peptide (A β) 1-42 mutants. *Bioorg. Med. Chem.*, **13** (22), 6167-6174 (2005).
 - 7) Adam J. Ruben, Yoshiaki Kiso, Ernesto Freire: Overcoming roadblocks in lead optimization: a thermodynamic perspective. *Chem. Biol. Drug. Des.*, **67** (1) 2-4 (2006)
 - 8) Ayako Itami, Hikoichiro Maegawa, Keiji Nishiyama, Koushi Hidaka, Yasuhiro Arie, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso Evaluation of peptidomimetic HTLV-1 protease inhibitors containing hydroxymethyl-carbonyl as a transition-state isostere. *Peptide Science 2005, in press* (2006)
2. 学会発表
 - 1) 木曾良明: 治療薬としての酵素阻害剤の開発. 第 79 回日本感染症学会総会(名古屋), 2005.4.
 - 2) 板見綾子, 前川彦一郎, 西山啓史, 日高興士, 有井康博, 木村徹, 林良雄, 木曾良明: 基質遷移状態概念に基づいた HTLV-1 プロテアーゼ阻害剤の構造活性相関研究. 第 10 回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究会(福岡)2005.8.
 - 3) Yoshiaki Kiso: Protease inhibitors and prodrug forms targeting intractable diseases. International Symposium: New Developments in Synthetic Organic Chemistry of Natural Products and Medicines (Kyoto) 2005.9.
 - 4) Ayako Itami, Hikoichiro Maegawa, Keiji Nishiyama, Koushi Hidaka, Yasuhiro Arie, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso: Evaluation of peptidomimetic HTLV-1 protease inhibitors containing hydroxymethyl carbonyl as a transition-state isostere. 42nd Japanese Peptide Symposium (Toyonaka) 2005.10.
 - 5) 板見綾子, 前川彦一郎, 西山啓史, 日高興士, 有井康博, 濱田貴司, 木村徹, 木曾良明: Hydroxymethylcarbonyl (HMC) 含有 HTLV-1 プロテアーゼ阻害剤における構造活性相関研究. 第 24 回メディスナルケミストリーシンポジウム(大阪)2005.11.
 - 6) Y. Kiso: Adaptive space search: Design of peptidomimetic inhibitors and prodrugs of aspartic proteases targeting intractable diseases. 2005 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2005) (Honolulu, U.S.A.) 2005.12.

H. 知的所有権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

- 1) 木曾良明: 水溶性プロドラッグ. 出願番号 2003-273589, 出願日 2003/7/11, 公開番号 2005-29543, 公開日 2005/2/3

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

HTLV-1 感染価及び HTLV-1 複製阻害剤評価システムの研究

分担研究者 足立昭夫(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部ウイルス病原学分野)

研究要旨 HTLV-1 感染に対するインジケータ細胞として樹立したヒトリンパ球株化細胞 H9/K30 *luc* を用いて、HTLV-1 プロテアーゼ阻害剤のスクリーニングを行なった。H9/K30 *luc* 細胞はゲノム内に HTLV-1 LTR の支配下におかれたルシフェラーゼ遺伝子を持ち、MT-2 細胞等の HTLV-1 産生細胞と混合培養すると大量のルシフェラーゼを産生する。候補薬剤存在下で H9/K30 *luc* 細胞と MT-2 細胞とを混合培養し、2 日後に細胞中で産生されるルシフェラーゼ量を測定した。試験管内で抗ヒトレトロウイルスプロテアーゼ阻害能を持つ候補薬剤 (KNI 化合物) は京都薬科大学の木曾良明教授の研究室でデザイン・合成され、当研究室に提供された。調べた全ての KNI 化合物 (KNI-272、-279、-727、-764、-1167、-1276、-1432、-1595b、-10162、-10166、-10220、-10221、-10252、-10270、-10277、-10340、-10375、-10388、-10455b、-10478、-10491、-10496、-10512 および-10516) は細胞毒性の無い薬剤濃度 (5 μ M) で顕著な抗 HTLV-1 活性を示さなかった。なお、上記と同様の HIV-1 評価細胞システムを用いて行なったコントロール実験で、SQV および KNI-764 はこの濃度でほぼ完全に HIV-1 プロテアーゼ活性を阻害した。HTLV-1 プロテアーゼの立体構造に基づいて新しくデザイン・合成された候補薬剤を用いさらにスクリーニングを続ける必要がある。

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った。本研究では、HAM の制御のために、ウイルス複製を指標にした複製阻害剤の開発を目指し、適切な細胞評価系 (H9/K30 *luc*-MT2) を確立した。

B. 研究方法

- (1) 細胞 細胞株は H9/K30 *luc* (HTLV-1 インジケータ細胞)、H9/H1 *luc* (HIV-1 インジケータ細胞)、MT-2 (HTLV-1 産生細胞)、および H9/NL432 (HIV-1 産生細胞) を使用した。
- (2) ルシフェラーゼ活性の測定 ルシフェラーゼ活性は Luciferase Assay System (プロメガ社、USA) で測定した。
- (3) DNA クローン HTLV-1 完全長クローン pK30 は NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (カタログ番号 2817) によ

り入手した。HIV-1 完全長クローンは pNL432 を使用した。ルシフェラーゼクローンは GL3 Basic Vector(プロメガ社)を使用した。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒトと動物を用いた研究は行なっていない。

C. 研究結果

HTLV-1 感染に対するインジケーター細胞として樹立したヒトリンパ球株化細胞 H9/K30 *luc* を用いて、HTLV-1 プロテアーゼ阻害剤のスクリーニングを行なった。H9/K30 *luc* 細胞はゲノム内に HTLV-1 LTR の支配下におかれたルシフェラーゼ遺伝子を持ち、MT-2 細胞等の HTLV-1 産生細胞と混合培養すると大量のルシフェラーゼを産生する。候補薬剤存在下で H9/K30 *luc* 細胞と MT-2 細胞とを混合培養し、2 日後に細胞中で産生されるルシフェラーゼ量を測定した。試験管内で抗ヒトレトロウイルスプロテアーゼ阻害能を持つ候補薬剤 (KNI 化合物) は京都薬科大学の木曾良明教授の研究室でデザイン・合成され、当研究室に提供された。調べた全ての KNI 化合物 (KNI-272、-279、-727、-764、-1167、-1276、-1432、-1595b、-10162、-10166、-10220、-10221、-10252、-10270、-10277、-10340、-10375、-10388、-10455b、-10478、-10491、-10496、-10512 および -10516) は細胞毒性の無い薬剤濃度 (5 μ M) で顕著な抗 HTLV-1 活性を示さなかった。なお、上記と同様の HIV-1 評価細胞システムを用いて行なったコントロール実験で、SQV および KNI-764 はこの濃度でほぼ完全に HIV-1 プロテアーゼ活性を阻害した。

D. 考察

本研究で HTLV-1 感染を効率良く検出するインジケーター細胞株 H9/K30 *luc* を樹立した。H9/K30 *luc* は無細胞ウイルスに対しては感受性がなく、ウイルス産生細胞 MT-2 との混合培養によって高レベルのルシフェラーゼを産生する。インジケーター細胞のこの活性化は、開裂型 Gag/Env を介した細胞融合によって移行した Tax によって起こると考えられる。本研究では、また、HIV-1 に関しても H9/K30 *luc*- MT-2 と同様の H9/H1 *luc*- H9/NL432 システムを構築した。これらのシステムは細胞融合に関わる種々の薬剤や因子の評価に適している。しかし、今のところ有効な抗 HTLV-1 プロテアーゼ阻害剤は見出されていない。昨年、HTLV-1 プロテアーゼの立体構造が決定された。これから得られる情報に基づき、新しく抗 HTLV-1 プロテアーゼ阻害候補薬剤をデザイン・合成し、本研究で確立されたシステムでその有効性を検証する必要がある。

E. 結論

HTLV-1 感染価を検出する迅速定量法は未だ報告されていない。また、HIV-1 プロテアーゼ阻害剤は HTLV-1 プロテアーゼには効果がない。したがって、H9/K30 *luc* - MT-2 システムによる HTLV-1 プロテアーゼ阻害剤のスクリーニングは極めて重要であると思われる。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wang, H., Sakurai, A., Khamsri B., Uchiyama, T., Gu, H., Adachi, A., and Fujita, M. Unique characteristics of HIV-1 Vif expression. *Microbes and Infection* 7: 385-390, 2005.
- 2) Yoshida, A., Piroozmand, A., Sakurai, A., Fujita, M., Uchiyama, T., Kimura, T., Hayashi, Y., Kiso, Y., and Adachi, A. Establishment of a biological assay system for human retroviral protease activity. *Microbes and Infection* 7: 820-824, 2005.
- 3) Khamsri, B., Murao, F., Yoshida, A., Sakurai, A., Uchiyama, T., Shirai, H., Matsuo, Y., Fujita, M., and Adachi, A. Comparative study on the structure and cytopathogenic activity of HIV Vpx/Vpr proteins. *Microbes and Infection*, in press.
- 4) Kamada, K., Yoshida, A., Khamsri, B., Piroozmand, A., Yamashita, T., Uchiyama, T., Fujita, M., and Adachi, A. Construction of *gag*-chimeric viruses between HIV-1 and SIVmac that are capable of productive multi-cycle infection. *Microbes and Infection*, in press.
- 5) 足立昭夫 HIV 感染症. *日本臨床*, 63 巻増刊号 12, 342-346, 2005.

2. 学会発表

- 1) 鎌田和弥、内山恒夫、山下知輝、Ahmad Piroozmand、Boonruang Khamsri、長尾多美子、藤田美歌子、足立昭夫. サル細胞に感

染する HIV-1 DT の構築. 日本ウイルス学会、2005 年、横浜.

- 2) 藤田美歌子、長尾多美子、足立昭夫. HIV-2 Vpx は細胞増殖抑制効果を示す. 日本エイズ学会、2005 年、熊本.

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。

成人 T 細胞白血病ウイルス関連ミク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 外丸 詩野 北海道大学講師

研究要旨: 成人 T 細胞白血病ウイルス(HTLV-I) 関連ミクロパチー (HAM) の病態解明や治療実験を目的に, 独自に開発した HTLV-I 感染脊髄症発症ラットをモデルとして疾患発症機構の解析を行ってきた。これまでの検討では, (1)感染後約 7 ヶ月の脊髄に認める HTLV-I pX の発現亢進が HAM ラット病発症の引き金となること, (2)同時期における HAM 抵抗性ラットの脊髄に IFN- γ の著明な発現亢進を認める一方で WKAH ラットではこの IFN- γ の産生亢進がおこらないこと, を示してきた。今年度は WKAH ラットにおける HTLV-I 感染に対する IFN- γ の発現不応答性に関わる遺伝子の解明について検討を行い, 疾患発症における宿主因子の解析を詳細に行なった。

A. 研究目的

成人 T 細胞白血病ウイルス(HTLV-I) 関連ミクロパチー (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-I 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) 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) について新たな疾患発症に関連する宿主因子の同定を行なうために, 疾患感受性の WKAH ラットと疾患非感受性の他系統ラットにおける宿主遺伝子の発現の系統差, 特に HAM 感受性 WKAH ラットの HTLV-I 感染後 7 ヶ月の脊髄に認める感染に対する IFN- γ の不応答性の原因遺伝子の解明を目的とし検討を行った。

B. 研究方法

1) 感染モデルの作製と脊髄サンプルの調整
HAM 感受性ラット系統として近交系

WKAH ラットを, HAM 抵抗性ラット系統として近交系 ACI および LEW ラットを使用した。なお, 全ての近交系ラットは北海道大学大学院医学

研究科付属動物実験施設から購入した。各ラットは HTLV-I 産生ヒト T 細胞株(MT-2) 1×10^7 個を生後 24 時間以内の新生仔期に腹腔内接種することによって HTLV-I に感染させ, 以後, 北海道大学大学院医学研究科付属動物実験施設内の感染実験室(P3 レベル)にて飼育, 観察した, 陰性対照として同月齢, 同系統の非感染ラットを使用した。これらのラットは 3, 7, 14 ヶ月齢時に, ペントバルビタールで麻酔後, 500 ml の 4°C 生理食塩水で全身灌流し, 脊髄を採取した。採取した脊髄は液体窒素で急速冷凍後, 使用まで -80°C で保存した。

2) 定量的リアルタイム RT-PCR

Total RNA を ISOGEN (Nippon GeneTokyo, Japan) にて粗抽出後, RNeasy MINI Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて RNA を精製, Super Script III™ First-Strand Synthesis system for RT-PCR (Invitrogen, CA, USA) を使用して cDNA を作製した。これを鋳型として SYBR green PCR Master mix (QIAGEN) を用いて, ABI Sequence Detection System (Applied Biosystems, CA, USA) にて IFN- γ , Interleukin-12 p40 (IL-12 p40), IFN regulatory factor-1 (IRF-1) について定量的 PCR を行った。各遺伝子の発現は, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を内部標準遺伝子とし, $\Delta\Delta Ct$ 法にて解析し, 各々のラット系統について非感染時の遺伝子発現量を 1 とした時の感染時の相対値を実験結果とした。解析した各遺伝子に特異的なプライマー配列は以下の通りである。

IFN- γ

(sense: 5'-GATCCAGCACAAAGCTGTCA-3',
antisense: 5'-GACTCCTTTTCCGCTTCCTT-3')

Interferon regulatory factor 1 (IRF-1)
(sense:5'-TGAAGCTGCAACAGATGAGG-3',
antisense:5'-AGCAAGTATCCCTTGCCATC-3')

IL-12p40
(sense:5'-AGGTGCGTTCCTCGTAGAGA-3',
antisense:5'-CCATTTGCTGCATGATGAAT-3')

IL-12 receptor β 1 (IL-12R β 1)
(sense:5'-AGGTGCAGATTTCCCGTTTA-3',
antisense:5'-CAGCCCTGTTTAAGCCAATG-3')

IL-12 receptor β 2 (IL-12R β 2)
(sense:5'-TGCCACCAATCCACAACTA-3',
antisense:5'-CCTGCTTCCTAGCACCTTGT-3')

IL-23p19
(sense:5'-CACCCTGGGAGACTCAACA-3',
antisense:5'-AGGATCTTGAACGGAGAAGA-3')

IL-23 receptor (IL-23R)
(sense:5'-TTGATGAATTGTGCCTCGTT-3',
antisense:5'-GTCTGCGCTGGGATAGTTTC-3')

IL-27
(sense:5'-ACTCTGCTTCCTCGCTACCA-3',
antisense:5'-GGAGATCCAGCCTCATTCG-3')

IL-27 receptor (IL-27R, WSX-1)
(sense:5'-AGCCCAGGGATAAAGGTGAC-3',
antisense:5'-AGACGGGTCCAGTTGAGCTT-3')

GAPDH
(sense:5'-ATGGGAGTTGCTGTTGAAGTCA-3',
antisense:5'-CCGAGGGCCCACTAAAGG-3')

3) ELISA 法

脊髄での IFN- γ 蛋白の発現の確認には, Rat IFN- γ ELISA Kit (BioSorce International, Inc., CA, USA) を使用した。全身灌流したラットより摘出した脊髄に, 10 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 0.1M phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) を含んだリン酸緩衝液 (PBS) を 1 ml 加えてピストン式ホモゲナイザーを用いて氷上で破碎後, 10000 回転, 15 分間遠心して得られた上清を脊髄蛋白質抽出液とした。Duplicate で 100 μ l のスタンダード, 脊髄蛋白質抽出液をキット付属の ELISA プレートに加え, 37°C で 2 時間静置, 洗浄後, ビオチン標識ポリクローナル抗ラット IFN- γ 抗体を加えてさらに 37°C で 2 時間静置した。洗浄後, スレプトアビジン-HRP 溶液を加え 30 分間, 室温で静置後, 付属の反応停止液を加え 450 nm で吸光度を測定した。なお, 用いた ELISA の検出限界は 13 pg/ml であった。

4) 脊髄由来ニューロン-グリア細胞の共培養
少なくとも 3 匹の全身灌流したラットより脊髄を摘出し混合したものを細断後, 3% collagenase II (Worthington Biochemical, NJ, USA) と 700 U DNase I (TAKARA BIO INC., Otsu, Japan) を含んだ無血清 RPMI 1640 に混和し酵素処理

を 37°C で 30 分行った。遠心分離後, Hanks 緩衝液 (Invitrogen, CA, USA) で希釈した 30% Percoll (Sigma-Aldrich, MO, USA) に沈査を混和し, 70% Percoll 上に静かに重層, 3500 回転で 40 分間遠心分離した。上層のミエリン残層を除去後 23% Percoll 層を採取し得られた細胞を BIOCOAT[®] poly-D-Lysine/Laminin Coverslips (Becton Dickinson, NJ, USA) 上で培養したものをニューロン-グリア共培養系とした。培養液は 10% の牛胎児血清 (FBS) と 50 ng/ml の Nerve Growth Factor 2.5S (NGF2.5S; Invitrogen) を含んだ Dullbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12 medium (DMEM/F12) 培地 (Invitrogen) を使用し, 37°C, 5% CO₂ 下にて培養した。

4) 蛍光抗体法

中枢神経系における IFN- γ の局在を調べるために, ニューロン-グリア共培養系において 5 日間培養した細胞を蛍光抗体法に用いた。4% パラホルムアルデヒドで 15 分間固定後, PBS で洗浄, 0.1% Triton-X100 を含んだ 0.05% 牛血清アルブミン (BSA) 添加 PBS に 4 分間浸透させた。さらに冷 70% メタノールで 4 分間固定後, 0.05% BSA 添加 PBS (以下 0.05% PBT) で 1000 倍に希釈した正常ヤギ血清 (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) を加え 10 分間室温で反応させ, 0.05% PBT で洗浄, 一次抗体として, マウス抗ラット IFN- γ モノクローナル抗体 (DB-1; 1:400; PBL Biomedical Laboratories, NJ, USA), および, ニューロンを標識するためにウサギ抗ウシ Neurofilament 150 kD ポリクローナル抗体 (AB1981; CHEMICON International, Inc. CA, USA), また, アストロサイトを標識するためにウサギ抗ウシ Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) ポリクローナル抗体 (DakoCytomation) を加えて 60 分間室温で反応させた。0.05% PBT で洗浄後, 二次抗体として, Alexa Fluor[®] 488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体および Alexa Fluor[®] 568 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (1:300; Molecular Probes, OR, USA) を各々加え室温で 45 分間反応させた。PBS で洗浄後, スライドガラス上にマウントし, 共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (BIO-RAD MRC-1024; Bio-Rad Laboratories, CA, USA) で観察した。神経軸索伸長の測定は, Neurofilament 陽性細胞のうち 300 μ m 以上の軸索伸長を示した細胞の割合 (%) で算定した。

5) HTLV-I 遺伝子発現への IFN- γ の影響

HTLV-I 持続感染ラット Tリンパ球株である LEW S-1 細胞株にリコンビナントラット IFN- γ を 100 もしくは 1000 U/ml 添加した培養液で 3 時間培養後, HTLV-I *gag* 遺伝子に対する *pX* 遺伝子の相対値をリアルタイム PCR 法で解析した。解析