

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 16 年度～18 年度 総合研究報告書

主任研究者 納 光弘

平成 19(2007)年 3 月

目 次

	頁
I. 総合研究報告	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	9
1. HAM の治療、発症関連因子および中枢神経傷害機序に関する研究 鹿児島大学大学院 納 光弘	11
2. HTLV-I プロテアーゼ阻害剤の開発・合成に関する研究 京都薬科大学 木曾良明	19
3. HTLV-I 複製阻害剤評価システムの開発に関する研究 徳島大学大学院 足立昭夫	33
4. HAM 動物モデルの開発とそれを用いた発症素因に関する研究 北海道大学大学院 外丸詩野	44
5. アリシンおよびプロスルチアミンによる新規 HAM 治療法の開発に関する研究 長崎大学大学院 中村龍文	66
6. HTLV-I 関連疾患の病態解明に関する研究 鹿児島大学大学院 梅原藤雄	74
7. HAM における CTL とウイルス変異および免疫不全に関する研究 鹿児島大学大学院 久保田龍二	76
8. HAM 発症関連ウイルス・宿主因子と発症予測に関する研究 金沢医科大学医学部 齊藤峰輝	83
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	93
IV. 研究成果の刊行物・別冊	109

I. 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
総合研究報告書

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)の新治療法開発を目指して、HTLV-I 特異的プロテアーゼ阻害剤の開発研究、新薬効果判定のための in vitro 実験システムの開発、HAM 動物モデル開発、HAM 病態解明および発症予測システムの開発研究を行った。3年間の研究により HTLV-I プロテアーゼ阻害剤開発はさらに進展した。特に HTLV-I プロテアーゼの結晶構造と開発化合物の分子モデリングによって、生体内で作用しうる低濃度で十分に酵素活性阻害効果を持つ化合物を得ることができた。阻害剤開発はほぼ目標に達したが、今後も膜透過性等の改善が必要である。ウイルス阻害活性測定系および動物モデルの開発はほぼ達成された。発症予防、発症予測および治療開始時期決定のための HAM 発症関連ウイルス要因、宿主要因研究は 7 割方達成されたが、さらなる詳細な要因の研究が必要である。HAM の病態解明は確実に進歩したが、今後も更なる研究が必要である。

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

梅原藤雄・鹿児島大学大学院医歯学総合研究科神経内科・老年病学 講師

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

斎藤峰輝・金沢医科大学学生態感染防御学 助教授

1. 研究目的

成人 T 細胞白血病ウイルス関連ミエロパチー(HTLV-I-associated myelopathy : HAM)は、主任研究者により発見された HTLV-I が発症に関わる慢性難治性神経疾患であり、痙性対麻痺、膀胱直腸障害を引き起こす。国内には現在でも約 1500 名の患者が存在し、その根治療法の確立が待たれている。本研究では HAM の治療法ならびに発症予防法を確立する。そのため発症の原因である HTLV-I ウイルスの

プロテアーゼを標的とした新規抗ウイルス剤の開発と、HAM 発症機序の解明および HAM 発症予防の研究を行う。

2. 研究方法

(1) HTLV-I特異的プロテアーゼ阻害剤の開発

アスパラギン酸プロテアーゼ阻害化合物から抗 HTLV-I プロテアーゼ活性をスクリーニングし、ウイルス増殖抑制効果の高い阻害剤を創製していく。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。平成 18 年度は我々がすでに開発している化合物と、2005 年に完成された HTLV-I プロテアーゼ結晶構造との分子モデリングにより、化合物の構造変換を強力に押し進める。

(2) HTLV-Iウイルス感染価定量法の開発

HTLV-I プロテアーゼ阻害剤の酵素阻害活性の評価のためにウイルス感染価定量法の開発を行う。特に無細胞ウイルスによる影響ではなく、感染細胞での感染価測定を正確に行うという系を樹立する。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

生体内でどのように HTLV-I の感染拡大が起こっているのかを明らかにする。HAM 脊髄を用いて、神経傷害機構を明らかにする。ウイルス排除に働く細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) のウイルス排除に有用な因子を明らかにする。また、HAM の発症機序にもとづいた治療法を開発する。

(5) HAM発症関連宿主遺伝子の同定並びに発症予防

HAM は HTLV-I 感染者の一部に発症する。HAM 発症に関与するウイルス因子ならびに宿主因子を明らかにし、発症促進因子、抑制因子を同定する。これにより HTLV-I キャリアのうち HAM 発症の高リスク群を抽出する。

(倫理面への配慮)

インフォームドコンセントの得られた HAM 患者から臨床検体の供与を受ける。検体は匿名化して用いる。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。各研究については各所属機関の倫理委員会の承認を得て行う。

3. 研究結果および考察

(1) HTLV-I特異的プロテアーゼ阻害剤の開発

- ① アスパラギン酸化合物より、抗プロテアーゼ阻害活性をスクリーニングし、活性の高い KNI-10252, KNI-10455 を得た。
- ② これらをリード化合物として、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。さらに膜透過性の高い化合物 KNI-10496, KNI-10516 を得た。
- ③ HTLV-I プロテアーゼ結晶構造との分子モデリングにより、KNI-10455 の N 末端アセチル基が阻害作用に重要であることが判明し、これを構造変換することで生体内で安定で、物性の優れた新規化合物 KNI-10584, KNI-10605 を、さらにより強い酵素阻害活性をもつ KNI-10562, KNI-10573, KNI-10617 を得た。

(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することができた。

(3) HAM疾患モデルの開発・解析

- ① 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、主にニューロンに IFN- α の発現亢進が認められた。
- ② HAM 発症ラットの IFN- γ 産生低下は IL-12R β 2 遺伝子の発現低下に関連していた。

(4) HAM病態の解明、治療法の開発

- ① HTLV-I 感染細胞は微小管構造を利用して、非感染細胞と接触面でシナプスを作り、ウイルスが生体内で水平感染することを明らかにし、ウイルスシナプスと命名した。
- ② HAM 脊髄では、HTLV-I 感染 CD4 細胞と HTLV-I 特異的 CTL が浸潤し、その炎症過程で周囲の神経細胞が障害を受け (bystander damage)、神経症状が発症することを明らかにした。
- ③ 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認識しウイルスを効率よく排除することを明らかにした。
- ④ アリシンおよびそ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を発生し、ウイルス量を低下させることが明らかとなった。プロスルチアミンを投与した HAM 患者の臨床試験では末梢血中のウイルス減少を認めた。
- ⑤ *Lactobacillus casei* Shirota 株を HAM 患者に投与し、HAM の神経症状の改善および NK 活性の上昇を認めた。

(5) HAM発症関連宿主遺伝子の同定並びに発症予防

- ① 多数の HAM 発症促進因子・抑制因子より HAM 発症リスク計算式を樹立し、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。
- ② このリスク計算式を用いて鹿児島のカリヤを検討し、オッズ値が 0.78 以上で軽度神経症状を認めた。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わかった。
- ③ IL-10 のプロモーター領域の多型性およびメタロプロテイナーゼ 9 のプロモーターの CA リピート長が、HAM 発症に関与

する因子であることを明らかにした。

- ④ 日本人の HAM とイラン人の HAM 発症因子を比較検討し、両民族に共通する発症促進因子 HLA-DRB1*0101 を同定した。
- ⑤ HAM では発症促進因子 HLA-DRB1*0101 に拘束された HTLV-I env 特異的 CD4 陽性 T 細胞が、増加していることを明らかにした。

4. 評価 (研究成果)

1) 達成度について

(1) HTLV-I 特異的プロテアーゼ阻害剤の開発
達成度：95%

HTLV-I プロテアーゼの結晶構造をもとに分子モデリングを行った結果、現在得られた化合物の主骨格は変更の必要がなく、今回新たに側鎖の構造変換を行い、安定で物性の高い化合物を得ることができた。本年はこの様に HTLV-I 減少に有望な化合物が得られているが、未だ動物実験がなされておらず、生体内での有効性および毒性については今後の検討を要するためもう一步のところである。

(2) HTLV-I ウイルス感染価定量法の開発
達成度：100%

HTLV-I ウイルス蛋白が産生された時のみ、感染価を測定する系を確立し、プロテアーゼ阻害剤のスクリーニングには有用であった。

(3) HAM 疾患モデルの開発・解析
達成度：90%

HAM ラットは確立されたが、HAM 発症感受性ラットと非感受性ラットとの比較による、HAM 発症機序の解析は今後も必要である。

(4) HAM 病態の解明、治療法の開発
達成度：80%

生体内での HTLV-I 感染の核となる、ウイルスシナプスの存在を明らかにしたが、その詳細な解析は今後も必要である。特に、このウイルスシナプスの構成分子のいずれかが HTLV-I 感染レセプターの候補である可能性があるが、今後の検討を要する。そのことで新たな感染拡大によるウイルス量増大を阻止する治療法開発の糸口となる可能性がある。HAM の発症機序に関しても中心となる発症機序は明らかになったが、なぜ感染細胞および HTLV-I 特異的 CTL が中枢神経に浸潤しやすいのか、およびどのような分子が関与しているのかを治療の開発のためにも明らかにする必要がある。

(5) HAM 発症関連宿主遺伝子の同定並びに発症予防

達成度：70%

HAM 発症リスク計算式は、特異度、感度ともに高く、実際のキャリアから軽度神経症状を示す群を抽出することが可能となった。しかし予防的介入をするためにはより一層感度、特異度の高い予測が必要であり、そのためには、さらなる発症促進因子・抑制因子の同定が必要である。

2) 研究成果の学術的意義について

ウイルスシナプスの発見：免疫細胞が他の細胞と情報交換を行う際に、免疫学的シナプスを形成し、特異なシグナル伝達を行うことは知られていたが、ウイルスが細胞間に水平感染するとき、類似のシナプスを形成することを始めて明らかにした。この発見は、ウイルスの感染に留まらず、細胞間での蛋白等の輸送に関しても新知見を与えるものである。今後の研究の発展により、このシステムを発展させ、特定の細胞に効率的に物質の輸送が可能となると考えられる。さらに、このウイルスシナプス部位に多数の分子が集合しているが、その中に HTLV-I 感染レセプター分子も含まれている可能性があり、感染レセプター分子の同定に有用であろうと考えられる。抗ウイルス剤開発に関しては、特に標的分子の結晶構造解析と候補化合物を分子モデリングにより検討することにより、薬剤開発が加速することが明らかになった。HAM 発症リスク計算式は、多数の発症促進因子・抑制因子により発症予測が可能となることを実証し、今後他の多因子疾患に関してのモデルとなりえる。

3) 研究成果の行政的意義について

本研究の結果、HTLV-I ウイルスを減少ないし撲滅するためのプロテアーゼ阻害剤の開発はもう一步のところまで進めることができた。HAM は発症すると進行性で、重症化すると車椅子あるいはベッド上生活を患者に強いることとなる。本化合物が HAM の治療に使用可能となれば、病気に苦しんでいる患者の治療に有用である。本研究により HTLV-I キャリアから HAM 発症高リスク群を抽出することが可能となった。薬剤が完成し、これらの高リスク群の HAM 発症を予防できれば、全国に数万ともいわれる HTLV-I キャリアからの新規患者の発生を予防し、ひいては保健行政に資するところ大である。また、日本のみならず、世界中に HTLV-I 感染者は存在し、治

療法および予防法の確立は世界の医療全体にも寄与することができる。

4) その他の特記すべき事項について

全国で数万人いるとされる HTLV-I キャリアからの HAM の新規発症は持続すると考えられ、今後も HAM 発症機序の解明、治療法の開発、予防法の開発は是非必要と考えられる。

5. 結論

新規 HTLV-I プロテアーゼ阻害剤の開発は、HTLV-I プロテアーゼ結晶構造との分子モデリング後の側鎖構造変換によりほぼ完成したと言える。ウイルス感染価測定系および HAM 動物モデルも完成した。また、HAM の発症機序に関してはかなりのところまで解明されたが、まだ課題を残している。HTLV-I キャリアからの HAM 発症高リスク群の抽出はかなりのレベルまでできるようになったが、発症予防を完全に行えるには至らず、まだ課題を残している。

6. 研究発表

口頭発表:92 件

原著論文による発表: 81 件

それ以外 (レビュー等) の発表: 4 件

そのうち主なもの

論文発表

- 1) H. Maegawa, T. Kimura, Y. Arii, Y. Matsui, S. Kasai, Y. Hayashi, Y. Kiso: Identification of peptidomimetic HTLV-1 protease inhibitors containing hydroxymethylcarbonyl (HMC) isostere as the transition-state mimic. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14 (23), 5925-5929 (2004).
- 2) Sabouri AH, Saito M, Lloyd AL, Vine AM, Witkover AW, Furukawa Y, Izumo S, Arimura K, Marshall SE, Usuku K, Bangham CR, Osame M. Polymorphism in the interleukin-10 promoter affects both provirus load and the risk of human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis.* 190(7):1279-85. 2004
- 3) Kodama D, Saito M, Matsumoto W, Sabouri AH, Izumo S, Arimura K, Usuku K, Bangham CR, Osame M. Longer dinucleotide repeat polymorphism in matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene promoter which correlates with higher HTLV-I Tax mediated transcriptional activity influences the risk of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *J Neuroimmunol.* 156(1-2):188-94. 2004
- 4) 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.
- 5) 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
- 6) Nose H, Saito M, Usuku K, Sabouri AH, Matsuzaki T, Kubota R, Eiraku N, Furukawa Y, Izumo S, Arimura K, Osame M. Clinical symptoms and the odds of human T-cell lymphotropic virus type 1-associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in healthy virus carriers: application of best-fit logistic regression equation based on host genotype, age, and provirus load. *J Neurovirol.* 2006 Jun;12(3):171-7.
- 7) Nobuhara Y, Usuku K, Saito M, Izumo S, Arimura K, Bangham CR, Osame M. Genetic variability in the extracellular matrix protein as a determinant of risk for developing HTLV-I-associated neurological disease. *Immunogenetics.* 2006 Jan;57(12):944-52.
- 8) Miyatake Y, Ikeda Y, Akihiro Ishizu, Baba T, Ichihashi T, Suzuki A, Tomaru U, Kasahara M, Yoshiki T, Role of Neuronal IFN- γ in the Development of Myelopathy in Rats Infected with Human T-cell Leukemia Virus Type 1. *Am J Pathol* 2006 169(1):189-199.

学会発表

- 1) K. Hidaka, T. Kimura, A. Kiso, Y. Tsuchiya, H. Maegawa, K. Nishiyama, Y. Hayashi, A. Nezami, E. Freire, Y. Kiso: Usefulness of allophenylnorstatine-dimethylthioprolin scaffold to aspartic protease inhibitors. 3rd International and 28th European Peptide Symposium: Bridges Between Disciplines (Prague, Czech Republic), 2004.9.
- 2) 木村徹, 前川彦一郎, 西山啓史, 日高興士, 板見綾子, 有井康博, 林良雄, 木曾良明: 基質構造に基づいた HTLV-1 プロテアーゼ阻

- 害剤の設計と合成. 難治性疾患の克服をめざした創薬科学研究発表会 (京都) 2005.2.
- 3) Hirohisa Nose, Mineki Saito, Koichiro Usuku, Toshio Matsuzaki, Shuji Izumo, Ryuji Kubota, Yoshitaka Furukawa, Kimiyoshi Arimura and Mitsuhiko 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
 - 4) Koichiro Usuku, Mineki Saito, Amir H. Sabouri, Hirohisa Nose, Yoshitaka Furukawa, Shuji Izumo, Reza Farid, Charles R.M. Bangham and Mitsuhiko 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
 - 5) 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.
 - 6) Hayashi D, Kubota R, Nose H, Arimura K, Izumo S, Osame M. Increased CTL responses to CMV in HAM/TSP patients: A relation of FOXP3 regulatory T cells. 8th International Congress of Neuroimmunology (Nagoya, Japan) 2006.Oct.
 - 7) Matsuura E, Kubota R, Saito M, Suehara M, Matsuzaki T, Arimura K, Osame M, Izumo S. Visualization of HTLV-I Tax-specific cytotoxic T lymphocytes in the central nervous system of HTLV-I-associated myelopathy. 8th International Congress of Neuroimmunology (Nagoya, Japan) 2006.Oct.
7. 知的財産権の出題・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 患者に対する *Lactobacillus casei shirota* 株の治療効果

主任研究者 納 光弘 鹿児島大学教授

共同研究者: 松崎敏男、齊藤峰輝、能勢裕久、有村公良、宇宿功市郎、出雲周二

研究要旨: HAM ではNK 活性が低く、*Lactobacillus casei* Shirota 株にNK 活性を増加させる作用があるため、HAM に対する治療効果を検討した。HAM 10 例につき *Lactobacillus casei* Shirota 株 400 億個を含む乳製品を2本/日、4週間飲用し、投与前後で臨床及び検査所見を比較検討した。HAM に関し、HTLV-I プロウイルス量及び抗HTLV-I 抗体価、リンパ球サブセット、NK 活性を投与前後で検査した。HAM10 例中全例排尿障害スコアが改善($p=0.0085$)、5 例で運動障害度の改善を認め、そのほか瘻性の改善も認めた。抗HTLV-I 抗体価、HTLV-I プロウイルス量、リンパ球サブセットに有意な変化はなかったが、NK 活性が有意に増加($p=0.015$)した。*Lactobacillus casei* Shirota 株はHAM に対し治療効果があるものと考えられた。

A. 研究目的

HAM に対する治療はステロイド療法、 α インターフェロン療法、ビタミンC大量療法など種々施行されてきたが^{1,2,3}、根治治療はなく、慢性期における治療法に苦慮している。HTLV-I 感染細胞はHTLV-I 特異的細胞障害性Tリンパ球(CTL)とNK細胞で抑制される。HAM患者の83%はNK活性が低い事が報告されている^{4,5,6}。*Lactobacillus casei* Shirota 株(LcS)にNK活性を増加させる作用があるため⁷、HAM に対する治療効果を検討した。

B. 研究方法

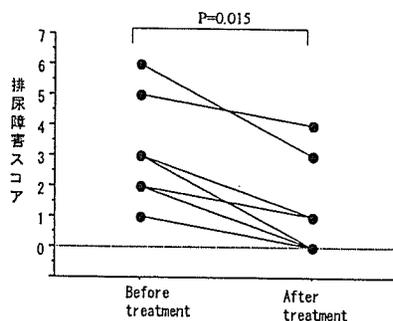
対象はHAM患者10名(男3名、女7名)で、年齢 49.7 ± 8.8 歳、罹病期間 15.4 ± 4.8 (10-20年)である。現行の治療を変更しない状態でヤクルト400(LcS 400億個含有)を2本/日を飲用させた。飲用前、飲用4週後、神経学的診察をし、臨床所見及び検査所見を比較検討した。運動障害スコアは納の運動障害度13段階を用い、排尿障害スコアは頻尿、残尿、尿失禁について0:正常、1:わずかに存在、2:明らかに存在、3:著明に存在を用い、その合計点数を示した。HAM に関し、血清抗HTLV-I抗体価(PA法)、リンパ球サブセット(CD4、CD8、CXCR3⁺、NK細胞、 $\gamma \delta$ T、NKG2A⁺、CD56)、NK活性、HTLV-Iプロウイルス量の測定を施行した。HTLV-Iプロウイルス量は末梢血リンパ球からDNAを抽出し、multiplex PCR法を用い、ABIprism7700で測定した。臨床試験は鹿児島大学臨床倫理委員会の認可をうけ、全例インフォームドコンセントを行った。統計解析はWilcoxonラン

クテストを用いた。(倫理面への配慮)

臨床検体を扱うため、患者よりの採血に関しては十分なインフォームドコンセントのもと、書面による研究協力承諾書を頂いた。本研究は鹿児島大学倫理委員会の承諾を得た。また、患者とサンプルの非連結匿名化を行った。

C. 研究結果

HAM10 例中全例で排尿障害スコアが改善し($p=0.0085$) (図1)、5 例で運動障害スコアが改善した(表1)。瘻性スコアは8例が改善した($p=0.021$)。全体の運動機能、排尿障害、神経学的所見の評価は有効から著効が7例に認めた(表2)。



Lactobacillus casei Shirota 株投与前後の排尿障害スコアの変化

図1 LcS 投与前後の排尿障害スコアの変化

Patient	Age years	Sex	Disease duration years	HTLV-I antibody titer	Provirus load Tx	Provirus load After Tx a	OMDS Before Tx	OMDS After Tx	UDS Before Tx	UDS After Tx	Overall evaluation of efficacy b
HAM1	34	F	19	x 131072	1757	1297	4	3	2	0	good
HAM2	82	M	14	x 32768	634	777	6	6	3	0	good
HAM3	50	F	7	x 2048	907	779	5	4	3	0	good
HAM4	45	F	15	x 16384	2342	471	5	3	6	3	excellent
HAM5	80	F	7	x 8192	204	184	4	4	1	0	fair
HAM6	47	M	18	x 2048	716	649	6	6	5	4	fair
HAM7	46	F	24	x 16384	278	361	4	3	2	0	good
HAM8	55	F	10	x 65536	2882	524	4	3	6	3	good
HAM9	41	F	17	x 65536	1073	1263	2	2	3	1	good
HAM10	57	F	13	x 32768	245	387	4	4	2	1	fair

LcS: *Lactobacillus casei* Shirota, OMDS: Osame's motor disability score UDS: urinary disturbance score

Tx: therapy

A: LcS投与後のHTLV-I proviral loadの変化 p=0.401 Wilcoxon signed rank test

B: 評価は神経内科医が診察して運動機能、排尿障害、神経学的所見において主に改善したことを基にしている

表 1 HAM10 例に対する LcS の臨床効果

検査所見では抗 HTLV-I 抗体価、リンパ球サブセット、HTLV-I プロウイルス量に有意な変化はなかった。NK 活性が有意に増加(p=0.015)した(表 2)。

cell type	before treatment		after treatment		p
	Absolute count cells x 10 ⁵ /mm ²	Frequency %	Absolute count cells x 10 ⁵ /mm ²	Frequency %	
CD4 ⁺	5.79±4.54	26.38±12.71	5.96±3.16	27.13±11.09	0.674
CD8 ⁺ Mem ⁺	3.89±1.61	20.47±6.93	4.72±2.02	22.60±9.01	0.208
naïve in CD8 ⁺ Mem ⁺	1.13±1.71	5.24±7.11	0.91±1.05	4.25±4.08	1.000
memory in CD8 ⁺ Mem ⁺	4.84±2.60	24.05±6.44	5.25±2.13	24.47±7.37	0.401
effector in CD8 ⁺ Mem ⁺	7.56±4.46	37.35±10.81	7.57±2.56	36.10±9.93	1.000
effector/memory in CD8 ⁺ Mem ⁺	5.99±2.36	33.36±14.54	7.21±3.47	34.07±13.78	0.263
CXCR3 ⁺	4.38±2.38	21.07±4.28	3.93±1.16	18.78±6.57	0.735
CXCR3 ⁺ in CD4 ⁺	2.03±2.13	8.26±5.06	1.60±0.75	7.46±3.28	0.866
γδ T ⁺	0.40±0.25	2.28±1.46	0.47±0.34	2.35±1.83	0.208
NKG2A ⁺	0.72±0.43	3.68±1.84	0.74±0.37	3.84±2.39	0.674
CD58 ⁺	3.14±1.32	16.63±11.33	3.38±1.73	16.13±8.81	0.575
NK cell activity (%)	28.54±16.13		38.43±16.48		0.015
HTLV-I provirus load	867.38±874.82		641.75±343.12		0.401

P: Wilcoxon signed rank test

表 2 LcS4 週間投与前後の末梢血リンパ球の細胞分画、HTLV-I プロウイルス量

D. 考察

臨床的に痙性、排便障害、頻尿、筋力増強に有効で、運動障害(5/10)及び、排尿障害スコアの改善(10/10)を認め、同時にNK活性を有意に増加させた。特にNK活性が低い症例ほど増加の変化は大きかった。今回の結果はLcSがNK活性を増加させる作用があることを支持している。LcSには細胞障害性T細胞⁹⁾やマクロファージ⁹⁾を活性化したり、単純ヘルペスウイルス¹⁰⁾やインフルエンザウイルス¹¹⁾に対する抑制効果が知られている。HAMに対するLcSの作用メカニズムは不明だが、LcSのNK活性増加が細胞障害性分子を調節した可能性がある。LcSがHAMに対し治療効果があったことは、今後、副作用のない治療薬として、慢性期のHAMで使える可能性がある。今回、オープン試験のため、今後、二重盲検試験で更に効能を検討し、メカニズムについての検討が必要であると考えられた。

E. 結論

Lactobacillus casei Shirota 株は HAM に対し治療効果があるものと考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Saito M, Usuku K, Nobuhara Y, Matsumoto W, Kodama D, Sabouri AH, Izumo S, Arimura K, Osame M.

Serum concentration and genetic polymorphism in the 5'-untranslated region of VEGF is not associated with susceptibility to HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in HTLV-I infected individuals.

J Neurol Sci. 219(1-2):157-61. 2004 Apr 15

2. Sabouri AH, Saito M, Lloyd AL, Vine AM, Witkover AW, Furukawa Y, Izumo S, Arimura K, Marshall SE, Usuku K, Bangham CR, Osame M.

Polymorphism in the interleukin-10 promoter affects both provirus load and the risk of human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis.

J Infect Dis. 190(7):1279-85. 2004 Oct 1

3. Kodama D, Saito M, Matsumoto W, Sabouri AH, Izumo S, Arimura K, Usuku K, Bangham CR, Osame M.

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

J Neuroimmunol. 156(1-2):188-94. 2004 Nov

4. Umehara F, Nagatomo S, Yoshishige K, Saito M, Furukawa Y, Usuku K, Osame M.

Chronic progressive cervical myelopathy with HTLV-I infection: Variant form of HAM/TSP? Neurology. 63(7):1276-80. 2004 Oct 12

5. Furukawa Y, Usuku K, Izumo S, Osame M.

Human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) p12I is dispensable for HTLV-I transmission and maintenance of infection in vivo.

AIDS Res Hum Retroviruses. 20(10):1092-9. 2004 Oct

2. 学会発表

1. 古川良尚, 納 光弘. HTLV-I p12 遺伝子の変異と HTLV-I 関連疾患. 第 45 回日本神経学

- 会総会 2004. 5. 東京
2. 久保田龍二, 古川良尚, 出雲周二, 納 光弘。HAM における CTL による正の選択圧とウイルスの安定性。第 45 回日本神経学会総会 2004. 5. 東京
 3. 松崎敏男, 齊藤峰輝, 早川 仁, 納 光弘, Xing Huiqin, 宇宿功市郎, 出雲周二。HAM における EB ウイルスの慢性活動性持続感染の影響。第 45 回日本神経学会総会 2004. 5. 東京
 4. 齊藤峰輝, 宇宿功市郎, 久保田龍二, 出雲周二, 有村公良, 納 光弘。HAM/TSP の IFN- α 治療に伴う末梢血 T 細胞サブセット・HTLV-I ウイルス量の変動と臨床症状。第 45 回日本神経学会総会 2004. 5. 東京
 5. 児玉大介, 齊藤峰輝, 池上眞由美, 梅原藤雄, 出雲周二, 宇宿功市郎, 納 光弘。HAM 患者における MMP-9 (Matrix metalloproteinase-9) promoter 領域 d(CA)n repeat 長と CD4+T 細胞遊走能。第 45 回日本神経学会総会 2004. 5. 東京
 6. 延原康幸, 齊藤峰輝, Amir H. Sabouri, 出雲周二, 有村公良, 宇宿功市郎, 納 光弘。HAM における VEGF promoter 634C/G 多型の検討。第 45 回日本神経学会総会 2004. 5. 東京
- 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。

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

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. *Apal* 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。

HTLV-I 特異的 CTL の浸潤による HAM 脊髄の bystander damage

主任研究者 納 光弘 鹿児島大学教授

共同研究者：松浦英治¹、久保田龍二²、齋藤峰輝³、松崎敏男¹、末原雅人⁴、有村公良¹、出雲周二²
¹鹿児島大学神経内科・老年病学、²鹿児島大学難治ウイルス研、
³金沢医科大学学生体感染防御学、⁴国立療養所沖縄病院神経内科

研究要旨:HAMの発症にHTLV-1特異的CTLが関与しているかよくわかっていない。HAM患者の脊髄にHTLV-1特異的CTLが浸潤しているかを検討した。HLA-A2陽性のHAM患者の剖検脊髄2例をTax11-19/HLA-A*02五量体を用いて免疫染色を行った。脊髄内に浸潤している細胞は主にCD8が陽性であり、その多くがTax11-19特異的CTLであった。アポトーシス細胞は浸潤細胞の多い血管周囲の、主に希突起膠細胞に認められた。我々は既にHAM脊髄のHTLV-I陽性細胞は浸潤CD4+細胞であることを報告しており、本研究の結果とあわせて、HTLV-I感染CD4+細胞とHTLV-I特異的CD8+CTLの中樞神経系への浸潤による炎症と、それに続く神経系細胞のbystander damageがHAMの発症機序と考えられた。

A. 研究目的

HAM患者末梢血中ではHTLV-IプロウイルスとHTLV-I特異的細胞傷害性Tリンパ球(CTL)が増加し、HTLV-I特異的CTLは抗原特異的にIFN- γ やTNF- α などのサイトカインを産生することが報告されている。また剖検脊髄ではHTLV-I感染CD4陽性T細胞と長期に渡り浸潤し続けるCD8陽性T細胞が認められている。これらのことからHAMの中樞神経系において、HTLV-I感染CD4+細胞とHTLV-I特異的CD8+CTLの免疫反応がHAM発症に深く関与していると類推されている。我々はすでに中樞神経系におけるHTLV-I感染細胞は浸潤CD4+細胞であることを報告しているが、HAM脊髄にHTLV-I特異的CTLが浸潤しているのかは未だ不明である。今回我々は中樞神経系でのHTLV-I特異的CTLのHAM発症への関与を明らかにするために、HAM脊髄をもちいて免疫組織学的にHTLV-I特異的CTLの同定を試みた。

B. 研究方法

HLA-A2陽性のHAM患者においては、主要なウイルスエピトープはTax11-19(LLFGYPVYV)であることが報告されている。剖検9例の脊髄よりDNAを抽出し、PCRにてHLA-A2を同定した。HLA-A2陽性であった2例の凍結脊髄を用いて検討した。Tax11-19ペプチド/HLA-A*02五量体を用いて免疫染色を行い、HTLV-I Tax11-19特異的CTLを同定した。陽性細胞はCD8と二重染色

を行った。CD4+細胞、CD8+細胞、Tax11-19特異的CTLの浸潤細胞数を比較検討した。あわせて細胞傷害性分子であるperforin、granzyme Bを、増殖関連分子であるKi-67を染色した。さらに脊髄内のアポトーシス細胞を活性型caspase 3で同定し、神経系細胞マーカーと二重染色した。

C. 研究結果

胸髄に炎症細胞浸潤が強く、脊髄内の血管周囲を中心としてCD4陽性細胞およびCD8陽性細胞の浸潤を認めた。脊髄内に浸潤している細胞は主にCD8が陽性であり、CD4陽性細胞とCD8陽性細胞の比はおおよそ1:6であった。脊髄内に同定されたTax11-19特異的CTLは、二重染色でCD8陽性であり、CD8陽性細胞のうちTax11-19特異的CTLは約20%であった。浸潤しているHTLV-I特異的CTLはgranzyme Bを発現し、一部はKi-67を発現していた。アポトーシス細胞は細胞浸潤が著明な血管周囲に見られ、主に希突起膠細胞であった。

D. 考察

HAM患者においては末梢血中のHTLV-I特異的CTLの解析によりCTLが病態に関与していることが考えられてきたが、HTLV-I特異的CTLが中樞神経内に存在するかわかっていなかった。今回の研究により実際に中樞神経系に浸潤しており、加えてその割合は非常に高いことが明らかとなった。HAMにおい

て HTLV-1 特異的 CTL が末梢血中に出現する割合は数%であり、今回の結果は、HTLV-1 特異的 CTL が HAM 患者の中樞神経系に集積していることを示唆し、この細胞が HAM の病態に深く関わっていると考えられた。またアポトーシスは、細胞浸潤の著明な血管周囲の、主に希突起膠細胞におこっていた。我々は既に中樞神経系での HTLV-1 感染細胞は浸潤 CD4 陽性細胞であることを報告しており、本研究の結果とあわせて、HAM の脊髄では HTLV-1 感染 CD4+細胞と HTLV-1 特異的 CTL の浸潤が血管周囲におこり、その周囲の神経系細胞の bystander damage がおこることによって神経障害が起こっていると考えられた。

E. 結論

HAM 患者脊髄内に HTLV-1 特異的 CTL が多数浸潤していることを組織学的に証明した。HTLV-1 感染 CD4+細胞と HTLV-1 特異的 CD8+CTL の中樞神経系への浸潤による炎症と、それに続く神経系細胞の bystander damage が HAM の発症機序と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1: Taylor GP, Goon P, Furukawa Y, Green H, Barfield A, Mosley A, Nose H, Babiker A, Rudge P, Usuku K, Osame M, Bangham CR, Weber JN. Zidovudine plus lamivudine in Human T-Lymphotropic Virus type-I-associated myelopathy: a randomised trial. *Retrovirology*. 2006 Sep 19;3:63.
2. Nose H, Saito M, Usuku K, Sabouri AH, Matsuzaki T, Kubota R, Eiraku N, Furukawa Y, Izumo S, Arimura K, Osame M. Clinical symptoms and the odds of human T-cell lymphotropic virus type1-associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in healthy virus carriers: application of best-fit logistic regression equation based on hostgenotype, age, and provirus load. *J Neurovirol*. 2006 Jun;12(3):171-7.
3. Nobuhara Y, Usuku K, Saito M, Izumo S, Arimura K, Bangham CR, Osame M. Genetic variability in the extracellular matrix protein as a determinant of risk for developing HTLV-I-associated neurological disease. *Immunogenetics*. 2006 Jan;57(12):944-52.

2. 学会発表

1. Hayashi D, Kubota R, Nose H, Arimura K, Izumo S, Osame M. Increased CTL responses to CMV in HAM/TSP patients: A relation of FOXP3 regulatory Tcells. 8th International Congress of Neuroimmunology (Nagoya, Japan) 2006.Oct.
2. Nose H, Saito M, Sabouri AH, Usuku K, Kubota R, Izumo S, Arimura K, Osame M. In vivo selection of T-cell receptor junction region sequences by HLA-DRB1-0101 human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) envelope gp21 peptide complexes in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis(HAM/TSP) 8th International Congress of Neuroimmunology (Nagoya, Japan) 2006.Oct.
3. Matsuura E, Kubota R, Saito M, Suehara M, Matsuzaki T, Arimura K, Osame M, Izumo S. Visualization of HTLV-I Tax-specific cytotoxic T lymphocytes in the central nervous system of HTLV-I-associated myelopathy. 8th International Congress of Neuroimmunology (Nagoya, Japan) 2006.Oct.

G. 知的財産権の出題・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

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固有のプロテアーゼの阻害剤創製を試みている。我々は既に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・合成した阻害剤を低分子化することによりテトラペプチド型阻害剤KNI-10252を見いだしている。今回P3, P2, P2', P3'の各々の部位の構造変換を行った結果、テトラペプチド型阻害剤でKNI-10252より分子量が小さく活性の強い化合物KNI-10455を見いだすことができた。

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をリード化合物として、さらなる低分子化および非ペプチド化の検討を行い、活性の増強と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

我々が既に構築したin vitroの阻害剤評価系を用いて、今回デザイン・合成した阻害剤の活性を測定する。

阻害剤評価

酵素としては組み替え型HTLV-Iプロテアーゼあるいはケミカルリゲーションを用いて合成したHTLV-Iプロテアーゼ誘導体を用い、基質にはHTLV-Iプロテアーゼが切断する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)を用いた。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、HPLCにて切断された基質断片の定量を行うものとし、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することで阻害剤の評価を行った。

阻害剤のデザインと合成

我々は既にMA/CA部位のアミノ酸配列(-Pro-Gln-Val-Leu*Pro-Val-Met-His-)に基づいた阻害剤の設計を行い、強い酵素阻害活性を有するヘキサペプチド型阻害剤KNI-10166を見いだしている。その際、基質遷移状態概念誘導体にはHIVプロテアーゼ阻害剤で実績のある、ヒドロキシメチルカルボニル(HMC)イソスターを有するallophenyl-norstatine (Apons)を用いた。本化合物を基に低分子化、非天然アミノ酸の導入、非ペプチド化を行った結果、テトラペプチド型阻害剤KNI-10252を見いだした。KNI-10252はペンタあるいはヘキサペプチド型阻害剤に比べると若干活性が弱い、ペプチド結合の数が少なく、分子量も比較的小さめであるため、リード化合物として適当であると判断し、主にP2'の構造活性相関研究の基本骨格として用いた。またトリペプチド型の阻害剤KNI-10267は活性は強いとはいえないが、合成および活性評価の点で便利である為、P3, P2の構造活性相関のリード化合物として用いることにした。

各ポジションの構造変換は、酵素との相互作用を維持しながらペプチド結合の数を減らすことを主たる目標とした。また活性を維持できる範囲で分子サイズを小型化することにも重点を置いた。

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

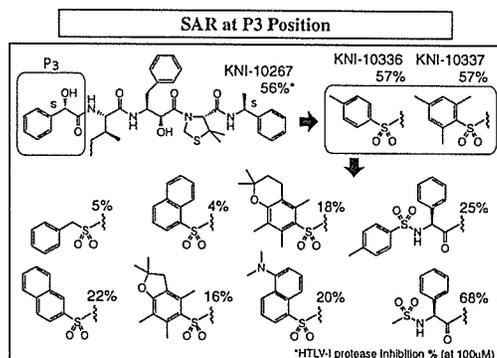
(倫理面への配慮)

特に必要としない。

C. 研究結果

1) P3位を変換したトリペプチド型阻害剤の合成
トリペプチド型阻害剤KNI-10267のP3位マン

デル酸ユニットを他の置換基に変換した化合物を合成した。ベンゼンスルホン酸誘導体に置換した化合物KNI-10336やKNI-10337がマンデル酸と同等の活性を有していることから、他のスルホン化合物を導入し、P3の最適化を試みた。ペプチド結合をスルホンアミドに変換することで、生体内安定性の向上した阻害剤を得ることができると考えたが、今回KNI-10267を上回る活性を持つものを見いだすことはできなかった。この結果からP3位には比較的小さめのアロマチックな官能基が望ましいと考えられ、これに続く構造変換の指針が示された。一方P3位をメタンスルホニルフェニルグリシンに置換したものはリード化合物より若干優れた活性を示した。



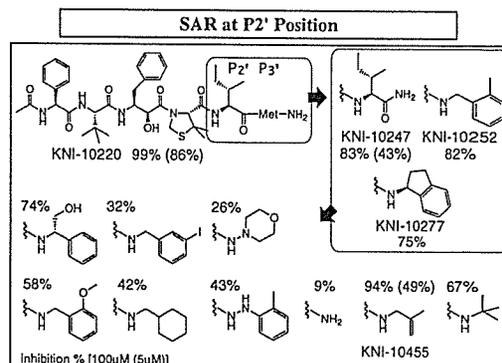
2) P2位にD型アミノ酸を有する阻害剤の合成

我々は既にP2位がD-フェニルアラニンで置換された化合物に、KNI-10267に匹敵する阻害活性を有するものがあることを見いだしている。D型アミノ酸を導入したペプチド性化合物は生体の酵素に対する安定性が優れたものになるため、医薬品として適用する際有利に働くことが期待できる。そこでD-フェニルアラニンやD-ロイシン、D-tert-ロイシン等を導入した化合物を合成した。結果としてリード化合物より優れたものは見いだせなかったが、これらは弱いながらも活性を維持しており、構造最適化による活性強化の可能性が分かっていた。

3) テトラペプチド型阻害剤を用いたP2'位の構造活性相関

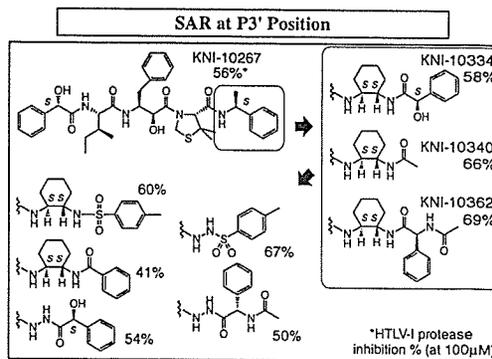
テトラペプチド型阻害剤KNI-10252は分子サイズが小さめで、比較的強い活性を有する化合物である。この化合物のP2'位は2-メチルベンジルアミンが導入されており、これを他の官能基に置換することで更なる活性の上昇を目指した。P2'位での疎水結合を維持したうえで、分子サイズの縮小、新たな特異的相互作用基の導入、代謝安定性等を考慮し阻害剤をデザイン・合成した。その結果、P2'位は比較的小型の疎水性官能基でも相互作用を維持できることが分かり、 β -メタリルアミンを導入した化合物KNI-10455

が、分子量を低減した上でより強い酵素阻害活性を有していることを見いだした。本化合物を見いだせたことは更なる低分子化の為にリード化合物創出として、非常に高い価値のあるものと考えられる。



4) P3'位を導入した阻害剤の合成

トリペプチド型の阻害剤KNI-10267のC末側を延長し、新たにP3'位を導入した化合物の合成を行った。このようなデザインは分子量の増大を招き、医薬品化合物としては不利にならざるを得ないが、相互作用部位の増加による親和性上昇、すなわち活性強化が期待できる。種々の官能基を含む阻害剤の合成を行ったところ、シクロヘキサンジアミンあるいはヒドラジン等を有し、末端の窒素原子をアシル化、スルホニル化したものが、リード化合物より強い活性を有していることが確認できた。今回合成した化合物では、活性の上昇は期待したほどではなく、分子量増加に伴うデメリットを上回るほどではなかったと考えられるが、さらに構造変換を行うことで活性の上昇が期待できることが分かった。



D. 考察

トリペプチド型阻害剤KNI-10267をリードとしたP3位の構造活性相関から、HTLV-IプロテアーゼのP3位には比較的小さめのアロマチック環が望ましいことが分かった。このことは酵素のS3ポケットがHIVプロテアーゼと比べると小さめであるが、性質は似ていることを示唆する。S3ポケットが小さくなった原因はS3を構成するアミノ酸がHTLV-IではValからTrpに変化していることが原

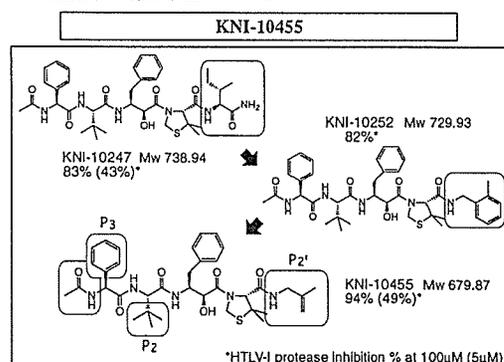
因であろうと考えられる。この結果よりP3位には単環のアロマチック基を持つ阻害剤が有望であり、さらに今後はヘテロ原子を有する様な化合物をデザイン・合成したい。

一方、P2'位の構造活性相関研究では、 β -メタリルアミンを導入した化合物KNI-10455が強い酵素阻害活性を有することを見いだすことができた。この化合物は分子サイズの縮小、代謝安定性の面でも高く評価できると考えており、本物質類似の官能基をサーチすることでより有用な化合物が創製できると期待する。また比較的合成容易な本化合物は、P3、P2の構造活性相関研究のリード化合物としても有用である。さらに本化合物の有するアリル型構造は特徴的であり、レトロウイルスのプロテアーゼがC2対称であることを考慮すると、P2位のデザインにも応用することができると思われる。

今後は上記2点を考慮した上で、膜透過性等の動態学的パラメーターも改善した阻害剤の設計・合成を進めていきたい。

E. 結論

HTLV-1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・合成した阻害剤を基に、低分子化した化合物KNI-10252, KNI-10267をリードとし、構造活性相関研究を行った。P3, P2, P2', P3'の各々の部位の構造変換を行った結果、リード化合物KNI-10252より分子量が小さく活性の強いテトラペプチド型阻害剤KNI-10455を見いだすことができた。本化合物は、今後の阻害剤設計のリードとなるだけでなく、デザイン上の重要な指針を与えた。



F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) T. Kotake, S. Rajesh, Y. Hayashi, Y. Mukai, M. Ueda, T. Kimura, Y. Kiso: A new polymer-supported Evans-type chiral auxiliary derived from α -hydroxy- β -amino

acid, phenylnorstatine: Synthesis and application in solid-phase asymmetric alkylation reactions. *Tetrahedron Letters*, 45 (18), 3651-3654 (2004).

- 2) S. Vega, L.-W. Kang, A. Velazquez-Campoy, Y. Kiso, M. Amzel, E. Freire: A structural and thermodynamic escape mechanism from a drug resistant mutation of the HIV-1 protease. *Proteins: Str., Funct. & Bioinformatics*, 55 (3), 594-602 (2004).
- 3) Y. Sohma, M. Sasaki, Y. Hayashi, T. Kimura, Y. Kiso: Design and synthesis of a novel water-soluble A β 1-42 isopeptide: an efficient strategy for the preparation of Alzheimer's disease-related peptide, A β 1-42, via O-N intramolecular acyl migration reaction. *Tetrahedron Letters*, 45 (31), 5965-5968 (2004).
- 4) M. Doi, T. Kimura, T. Ishida, Y. Kiso: Rigid backbone moiety of KNI-272, a highly selective HIV protease inhibitor: methanol, acetone and dimethylsulfoxide solvated forms of 3-[3-benzyl-2-hydroxy-9-(isoquinolin-5-yl oxy)-6-methylsulfanylmethyl-5,8-dioxo-4,7-diazanonanoyl]-N-tert-butyl-1,3-thiazolidine-4-carboxamide. *Acta Crystallographica Sect. B*, B60 (4), 433-437 (2004).
- 5) Y. Sohma, Y. Hayashi, M. Skwarczynski, Y. Hamada, M. Sasaki, T. Kimura, Y. Kiso: O-N Intramolecular acyl migration reaction in the development of prodrugs and the synthesis of difficult sequence-containing bioactive peptides. *Biopolymers Peptide Science*, 76 (4), 344-356 (2004).
- 6) H. Maegawa, T. Kimura, Y. Arii, Y. Matsui, S. Kasai, Y. Hayashi, Y. Kiso: Identification of peptidomimetic HTLV-1 protease inhibitors containing hydroxymethylcarbonyl (HMC) isostere as the transition-state mimic. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14 (23), 5925-5929 (2004).
- 7) A. Kiso, K. Hidaka, T. Kimura, Y. Hayashi, A. Nezami, E. Freire, Y. Kiso: Search for substrate-based inhibitors fitting the S2' space of malarial aspartic protease plasmepsin II. *J. Peptide Sci.*, 10 (11), 641-647 (2004)
- 8) H. M. Abdel-Rahman, T. Kimura, K. Hidaka, A. Kiso, A. Nezami, E. Freire, Y. Hayashi, Y. Kiso: Design of inhibitors against HIV, HTLV-I, and *Plasmodium falciparum*