

厚生労働科学研究費補助金  
こころの健康科学研究事業

HTLV-Iの生体内感染拡大機序  
の解明とその制御による  
HAM治療法の開発に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 出雲周二

平成21(2009)年3月

厚生労働科学研究費補助金  
こころの健康科学研究事業

HTLV-Iの生体内感染拡大機序の解明と  
その制御による  
HAM治療法の開発に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 出雲周二

平成21(2009)年 3月

## 目 次

I 総括研究報告	
HTLV-Iの生体内感染拡大機序の解明とその制御によるHAM治療法の開発に関する研究 ……	2
研究代表者	
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科附属 難治ウイルス病態制御研究センター	出雲周二
II 分担研究報告	
1. Cell free HTLV-Iの感染機構の解明 ……	12
群馬大学大学院 分子予防医学	星野洪郎 他
2. 膜融合に寄与するHTLV-I機能ドメインを標的とする分子の探索 ……	16
横浜薬科大学 生体防御学	白木 洋 他
3. HTLV-I関連脊髄症 (HAM/TSP) 患者末梢血単核球を用いた合胞体形成の検討 ……	21
鹿児島大学大学院 難治ウイルス病態制御研究センター	出雲周二 他
4. HAM/TSPにおけるHTLV-Iのcell to cell spreadに関与するsmall GTPasesの役割と polysulfateによる新規治療法開発へ向けた基礎的検討 ……	26
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 感染免疫学	中村龍文 他
5. HAM脊髄活動性炎症部に浸潤しているTリンパ球・マクロファージ/ミクログリアには IL-17が発現している ……	31
鹿児島大学医歯学総合研究科 神経病学	梅原藤雄 他
6. HAM患者末梢血中のHTLV-I感染細胞表面抗原の解析 ……	37
鹿児島大学大学院 難治ウイルス病態制御研究センター	久保田龍二 他
7. HTLV-I感染T細胞の機能異常をもたらす恒常的なBcl-3高発現機構の解析とその制御法 の検討 ……	43
琉球大学大学院医学研究科	齊藤峰輝
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ……	51

# I. 総括研究報告書

HTLV-1の生体内感染拡大機序の解明とその制御によるHAM治療法の開発

(H20-こころ-一般-020)

研究代表者 出雲 周二

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科付属  
難治ウイルス病態制御研究センター 教授

研究要旨: HTLV-1-associated myelopathy (HAM)はHTLV-1の慢性感染がひきおこす難治性神経疾患で、国内に約1500名の患者が慢性進行性の痙性対麻痺、膀胱直腸障害に苦しんでいる。既存の治療法は効果不十分で根治療法の確立は急務である。ウイルス量の増大はHAM発症および症状増悪の最大のリスクであり、より適切な治療及び発症予防には感染者のHTLV-1感染細胞を減少させることが重要である。HTLV-1は生体内では主にCD4陽性Tリンパ球に感染しており、幾つかの感染レセプター候補が報告されているが、決定的なレセプターは同定されていない。本研究では、感染細胞の表面形質を利用して、非感染細胞とのマイクロアレイ、レクチンアレイによる比較より、感染特異的細胞表面分子をスクリーニングし、感染レセプター分子群とHAM患者の感染細胞特異的分子群を同定することを目的とする。また、感染成立に関与するウイルス外被蛋白の特徴などウイルス側の要因の解析、感染細胞内でのウイルス産生と放出に関与する機序の解析により、感染者個体内でウイルス感染が拡大する全体像を明らかにするとともに、HAMの発症にかかわるHTLV-1遺伝子発現と生体の免疫応答の特徴を解析し、発症機序を解明することにより、病態に則した治療法の開発をめざした。本年度は解析の基礎となる感染効率の検定法や感染細胞の同定法について着実な成果を得ることができた。ウイルス側の特異性についても、HTLV-1 EnvからのSU離脱がウイルス粒子の感染性消失に関与していることや外被蛋白gp46のgp46-197領域が感染に重要であることが明らかとなった。また、感染細胞内でのsmall GTPaseの一つであるRap1の活性化により感染効率が有意に上昇すること、ペントサン多硫酸ナトリウムがgp46の標的細胞上のHSPGsへの接着を阻止し、強い感染阻害活性を持っていることが明らかにされた。発症病態の解析からはIL17の発現、Bcl-3、PI3キナーゼ-AKT経路の活性化が関与し発症にかかわっており、治療の標的分子となりうることを示された。HTLV-1の生体内での感染拡大阻止が治療の標的として有用であることが示された。

分担研究者

琉球大学大学院免疫学 准教授  
齊藤峰輝

群馬大学大学院分子予防医学 教授  
星野洪郎

横浜薬科大学生体防御学 教授  
白木 洋

長崎大学大学院感染免疫学 准教授  
中村龍文

鹿児島大学大学院神経病学 講師  
梅原藤雄

鹿児島大学大学院難治ウイルス研 准教授  
久保田龍二

A. 研究目的

HTLV-1-associated myelopathy (HAM) はHTLV-1の慢性感染がひきおこす難治性神経疾患で、国内に約1500名の患者が慢性進行性の痙性対麻痺、膀胱直腸障害に苦しんでいる。これまでの我々の研究からHAMではHTLV-1プロウイルス量が非常に高値であり、HAM発症抑制と治療には感染者体内のHTLV-1ウイルス量を軽減するこ

とが最も有効であると考えられる。生体内での細胞間のウイルスの感染拡大がウイルス増加に関与しているが、HTLV-1の感染には細胞間の接触が必要で、HTLV-1感染細胞が非感染細胞と接触するときに微小管構造を利用してウイルスシナプスを形成し、感染が広がっていくことが明らかにされた。しかし、その生体内での詳細は良くわかっていない。一方、レセプターそのものの研究では、近年グルコーストランスポーター1 (GLUT1) がその候補として報告された。しかし、その後の研究により、GLUT1は感染に関与しているがプライマリーなウイルスレセプターではなく、またヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) も感染に関与していることが証明された。これらの研究により幾つかの分子が感染に関与していることが示唆されているが、未だプライマリーな感染に関与する分子は同定されていない。近年、マイクロアレイの開発により様々な分子を網羅的に解析することが可能となり病態解明や創薬などに応用されている。また、産業技術総合研究所の糖鎖医工学研究センターで開発されたレクチンアレイは細胞間の相互作用やウイルスレセプターとして重要な細胞表面の糖鎖構造の網羅的解析を可能とした。本研究では、感染細胞の表面形質を利用して、非感染細胞とのマイクロアレイ、レクチンアレイによる比較より、感染特異的細胞表面分子をスクリーニングし、感染レセプター分子群とHAM患者の感染細胞特異的分子群を同定することを目的とする。また、感染成立に関与するウイルス外被蛋白の特徴などウイルス側の要因の解析、感染細胞内でのウイルス産生と放出に関与する機序の解析し、感染者個体内でウイルス感染が拡大する全体像を明らかにする。同時にHAMの発症にかかわるHTLV-1遺伝子発現と生体の免疫応答の特徴を解析し、発症機序を解明することにより、病態に則した治療法の開発をめざす。

## B. 研究方法

本研究の柱として、1) マイクロアレイ、レクチンアレイなどの網羅的解析法をもちいたウイルスシナプスの形成に関与する分子の同定、2) 感染に関与するウイルス分子の解析、3) 感染細胞でのウイルス産生放出機構の解析、4) HAM発症機序の解析、の研究テーマを設定し、分担研究をおこなった。

## (倫理面への配慮)

本研究は患者試料をもちいているが、各研究機関の承認を得ておこなわれた。臨床検体の提供に関しては、文書によるインフォームドコンセントにて許可を頂いた。検体は非連結化して使用した。結果の公表に当たっては個人が特定できないように配慮されている。

## C. 研究結果

出雲らは、ウイルスシナプスを介する感染拡大の指標として、HTLV-1感染細胞株と非感染細胞株の共培養により観察される合胞体形成という *in vitro* の現象が、生体外での感染細胞・非感染細胞の接着・結合のしやすさ、プロウイルス量の増加しやすさの簡便な指標となりうるかどうかを探索するため、感染細胞株とHAM患者由来末梢血単核球(PBMC)とで非感染細胞株との合胞体形成の起こりやすさを比較し、また、ポリカチオンの合胞体形成増強効果を検討した。さらに、それぞれの培養系でHTLV-1ウイルス遺伝子産物、接着分子の発現をリアルタイムPCRにより解析した。

細胞株同士の共培養では比較的大型な合胞体を1ウェル当たり数個～数十個認め、MT-2+Jurkat細胞株の組でDEAE-dextranよりもHexadimethrine bromide (Polybrene)の方が合胞体刺激効果が高い傾向が見られた。一方、HAM患者、無症候性キャリア(AC)のPBMCと非感染細胞株との共培養による合胞体は小型で、合胞体数も1ウェル当たり0または1個と極めて少数だった。また、ポリカチオンの効果に差はみられなかった。RT-PCRによるHTLV-1ウイルス遺伝子産物および接着分子の発現解析では、Gag-pol mRNAは培養前にHAMで有意に発現が高く、培養後もACよりも高発現の傾向がみられた。Tax mRNAも培養前では同様な傾向だったが有意ではなかった。Env mRNAでは逆に培養前後ともACで有意に高発現だった。3種類のmRNAとも72時間の培養では発現量の有意な変化はなかったが、env mRNAではと発現亢進傾向がみられた。今回、HAM患者、ACのPBMCを用いた培養系では非感染細胞株との合胞体形成はほとんどみられず、膜融合促進剤であるポリカチオンを添加した培養系でもその増強効果はみられなかった。HTLV-1のCell-to-cell contactによる感染性を簡便に評価する方法の開発のためには、抗体産生細胞を除去した培養系、接着分子などの処理を検討する必要がある。

一方ウイルス側の解析については、これまで、感染細胞から放出されたHTLV-1粒子の感染性は他のレトロウイルスと比べて非常に低いことが知られていたが、そのメカニズムは不明であった。星野らは、HTLV-1 ウイルス粒子の温度安定性について検討した。37°CにおけるHTLV-1の感染力価半減時間 ( $T_{1/2}$ ) は、0.4-0.8時間であった。この結果は、これまでに報告されている他のレトロウイルスでの37°Cにおける $T_{1/2}$ のおよそ1/10以下であった。さらに、0-25°CにおけるHTLV-1の $T_{1/2}$ は、0.6-1.2時間であり、低温処理に伴う37°Cからの顕著な感染性の回復は認められなかった。HTLV-1のエンベロープタンパク質 (Env)は、Surface (SU: gp46)とTransmembrane (TM: gp21)のヘテロダイマーで構成されておりSUとTMの間の結合は、ジスルフィド (S-S)による共有結合であることが知られているが、37°C処理に伴いHTLV-1のSUとTM間のS-S結合が切断され、ウイルス粒子からSUが離脱することを見いだした。従って、37°C処理によりSUを消失したHTLV-1は、細胞レセプターとの特異的結合が阻害されていることが推測された。実際、37°C処理後のHTLV-1の細胞への吸着と侵入量が顕著に減少した。これまでに知られているHTLV-1の特徴として、感染細胞から感染性ウイルス粒子の産生量が非常に少ないことがあるが、その詳細なメカニズムは不明であった。今回得られた結果は、HTLV-1 EnvからのSU離脱が、ウイルス粒子の感染性消失に関与していることを強く示唆している。

白木らは、HTLV-1の膜融合反応に寄与する機能領域の標的分子を探索し、その感染阻害機構の解析を行うことを目的に、感染阻害分子探索の標的とする膜融合反応に寄与する必須の機能ドメイン構造と特徴について研究した。これまでに外皮蛋白のgp46-111領域、gp46-197領域およびgp21-400領域がHTLV-1感染細胞と標的細胞の膜融合反応を介したウイルス移行に重要な役割を持つ機能領域を含むことを明らかにしていた。そこで、これらの領域に含まれる必須の機能ドメイン構造を解析するため、これらのペプチド領域を網羅し、かつそれぞれのペプチドの末端3アミノ酸残基長を重複させた16種の10mer~12merペプチドを調製し、シンシチア形成阻害活性を指標として、膜融合反応に寄与する必須のド

メイン構造を解析した。その結果、3箇所のペプチド領域にある膜融合反応に必須の機能構造はgp46表面蛋白の111Lysから116Cysの領域(Lys-Cys-Pro-Tyr-Leu-Gly-Cys)および197Aspから205Proの領域(Asp-His-Ile-Leu-Glu-Pro)、さらにgp21膜貫通蛋白の397Cysから406Thrの領域(Gln-Glu-Gln-Cys-Arg-Phe-Pro-Asn-Ile-Thr)であった。特に、gp46-197領域(197Aspから216Thr)は両親媒性の $\alpha$ helix構造をとり、その親水性側面が71Ka常在性熱ショック蛋白(HSC70)との強い結合性を持っていた。しかも、このHSC70との結合性とシンシチア形成阻害活性とはよく相関していた。gp21膜貫通蛋白の397Cysから406Thrの領域(QEQCRFPNIT)はウイルス外皮蛋白としてのgp46表面蛋白との会合のgp21膜貫通蛋白側の会合部位であり、しかもgp21膜貫通蛋白の高次構造を支えるcoiled-coil構造をとる領域にあった。さらに、健康者HTLV-1感染健康者の約2%、ATL患者およびHAM患者のほとんどの血清中に検出され、感染中和活性を持っている抗gp46-197抗体のエピトープについて、ファージペプチドライブラリーをもちいて解析し、本抗体がgp46-197ペプチド領域の205Proから209Lysの領域(Pro-Trp-Lys-Ser-Lys)を認識する感染中和抗体であることを確認した。

中村らはウイルスシナプスを構成するインテグリンおよびそのリガンドに注目し、HAM/TSP患者由来感染T細胞株の感染効率をAC由来感染T細胞株を対照として、H9/K30 luc細胞との混合培養系を用いて比較検討し、その要因としてのsmall GTPasesの活性化について解析した。その結果、HAM/TSP患者由来株では対照株に比較して、インテグリン/リガンドシグナルを活性化するsmall GTPaseの一つであるRap1の活性化と共に、有意に高い感染効率を持つことが明らかにされた。この事実よりHAM/TSP患者のHTLV-1感染細胞はインテグリン/リガンドシグナルの下流に存在するsmall GTPaseの活性化により、効率のいいHTLV-1のcell to cell spreadを惹起し得る可能性を持っていることが示唆された。

HTLV-1の細胞内侵入はエンベロープ蛋白であるglycoprotein46(gp46)の標的細胞上のheparan sulfate proteoglycans(HSPGs)への接着によって開始されるが、ヘパリンなどに代表されるpoly-sulfateはpolyanionとして働き、HTLV-1感染を阻害することが知られている。そこで、今回HAM/TSPに対する新規治療法の開発を目的として、種

々のpolysulfateによるHTLV-1感染阻害効果について、H9/K30 luc細胞との混合培養系を用いて比較検討した。その結果、ペントサン多硫酸ナトリウムは強い感染阻害活性を示し、HAM/TSPに対する新規治療薬となり得る可能性が示された。

発症機序の解析に関して、高いプロウイルス量を背景にしたHTLV-1遺伝子発現と生体の免疫応答の特異性はHAMの発症病態として重要で、梅原、久保田、齋藤らが研究を推進した。

近年、IL-17を産生する新たなCD4陽性T細胞Th17細胞が種々の自己免疫性疾患において重要な役割を果たしていることが報告され注目されている。梅原らはHAM脊髄病変におけるIL-17の発現についてHAM剖検脊髄標本を用いて免疫組織学的に検討した。その結果、HAM活動性炎症部位には多数のIL-17陽性細胞を脊髄内の血管周囲、脊髄実質に認めた。罹病期間が短く炎症細胞浸潤の高度な例ではIL-17陽性細胞数が多く、罹病期間の長い症例ではごく僅かに認めるのみであった。IL-17陽性細胞の性状を確認するために、種々の細胞マーカーとの二重染色を行い、定量的に評価した。活性化T細胞マーカーであるUCHL-1では60%、80%程度で陽性、マクロファージマーカーであるCD68では20%、30%程度がIL-17陽性で、炎症の活動性が高いほど、リンパ球、マクロファージにおけるIL-17陽性率が高いことが示された。また、IL-17陽性細胞数の中での各細胞マーカーの陽性率はT細胞が約60%前後、CD68陽性マクロファージ・ミクログリアが20-35%前後で、この両方でIL-17陽性細胞のほぼ90%程度を占めていた。さらに、炎症の活動性が高い病変ほど多くのIL-17陽性活性化Tリンパ球、マクロファージが浸潤していた。CD8陽性IL-17陽性細胞数が、UCHL-1の半数程度であることから、残りはCD4陽性IL-17陽性細胞、いわゆるTh17細胞である可能性が示唆された。以上より、IL-17はHAM発症機序において重要な役割を果たしている可能性が示唆され、IL-17を標的とする治療法はHAMにおいても有効である可能性がある。

HTLV-1感染細胞における生体でのウイルス抗原の発現はごく少量であるため感染細胞の同定は困難で、生体での感染細胞の動態解析の障害となっていたが、近年、PBMCを数時間培養することによりウイルス蛋白が発現し、感染細胞を同定することが可能となった。久保田らは生体内感染細胞に特異的な表面抗原を同定し、感染細胞の動態、感染様式の解析に資することを目的に研究をすす

めた。その結果、PBMC中のTax陽性細胞比率は3.06%で、その84%がCD4陽性細胞であり、0.32%がCD8陽性細胞であった。CD4およびCD8陽性細胞中のTax陽性細胞の割合はそれぞれ5.19%、1.30%でありCD8陽性細胞にも感染していた。Tax陽性CD4細胞の98%はCD45RA-CCR7-のエフェクター・メモリー細胞であった。Tax陰性CD4細胞中ならびにTax陽性CD4細胞中のCD28陽性細胞は、ほぼ同じ84%であったが、CD27陰性細胞は49%から84%に増加していた。ケモカインの検討では、Tax陽性CD4細胞およびTax陰性CD4細胞ではCCR7陰性細胞はそれぞれ98%、72%であり、CCR4陽性細胞はそれぞれ41%、20%であった。染色パターンからほとんどのTax陽性細胞がCCR4陽性側にシフトしており、検出感度をあげればほとんどの細胞がCCR4陽性となる可能性があると思われる。CD4陽性細胞中のCD25陽性細胞は5.2%でFOXP3陽性細胞は1.3%であった。CD4+CD25+FOXP3+制御性T細胞の19%がHTLV-1感染細胞であった。以上の結果より、HAM患者末梢血中HTLV-1感染細胞のほとんどがCD4+CD45RA-CD45RO+CCR7-CCR4+であり、CCR4の検出感度をあげれば、感染細胞同定の有効な表面抗原の組み合わせとなる可能性があることが明らかとなった。

HTLV-1 Tax蛋白は、細胞機能発現に重要な細胞性因子との相互作用により感染細胞に異常な遺伝子発現を誘導することで、T細胞の腫瘍化や機能異常を引き起こす。このことから、TaxはHTLV-1感染によるATL及びHAM発症に重要な役割を果たすと考えられている。齋藤らはTaxにより発現誘導される細胞遺伝子群をマイクロアレイ解析し、T細胞腫瘍化のみならず自己免疫疾患におけるT細胞機能異常にも関与するB cell leukemia-3 (Bcl-3)がHTLV-1 Taxにより発現誘導されることを見いだしている。本研究では、HTLV-1関連疾患の病態を制御可能な治療標的分子の候補としてのBcl-3の可能性を検索した。HTLV-1感染T細胞株では、Bcl-3遺伝子が恒常的に高発現しており、これはTaxによる転写活性化機構のみならず、PI3キナーゼ-AKT経路の活性化による蛋白分解抑制機構によっても維持されていた。また、TaxはHTLV-1感染細胞内でBcl-3蛋白と直接結合していた。shRNAによりBcl-3発現を抑制したHTLV-1感染T細胞の増殖効率は、親株及びコントロール細胞株と比較して50%以下に低下した。以上の結果より、Bcl-3やPI3キナーゼを治療標



の分子とすることで、ATL及びHAMにおける異常T細胞増殖と生体内感染拡大を抑制できる有望な治療法となる可能性が示された。

#### D. 考察

HTLV-1とヒトとの関わりは数万年前にさかのぼると考えられており、生涯にわたって感染者体内に潜在感染し、母乳保育や性交渉という種の保存に必須の行為を介して感染が維持され、ヒトと共存してきたウイルスである。これまでの研究により、HAMは生体内で感染が拡大し、HTLV-1プロウイルス量が非常に高値になることを背景として発症し、病態が進行することが明らかとなり、ウイルスの生体内での感染拡大を阻止することがHAMの治療法として相応しいと考えられる。本研究はこの点に的を絞って、HTLV-1の生体内での感染拡大機序をウイルス側、生体側から網羅的に検索し、感染の分子機構を明らかにすることを目的としている。本年度は解析の基礎となる感染効率の検定法や感染細胞の同定法について着実な成果を得ることができた。ウイルス側の特異性についても、HTLV-1 EnvからのSU離脱がウイルス粒子の感染性消失に関与していることや外被蛋白gp46のgp46-197領域が感染に重要であることが明らかとなった。また、感染細胞内でのsmall GTPaseの一つであるRap1の活性化により感染効率が有意に上昇すること、ペントサン多硫酸ナトリウムがgp46の標的細胞上のHSPGsへの接着を阻止し、強い感染阻害活性を持っていることが明らかにされた。発症病態の解析からはIL17の発現、Bcl-3、PI3キナーゼ-AKT経路の活性化が関与し発症にかかわっており、治療の標的分子となりうることを示された。

#### E. 結論

HTLV-1の生体内での感染拡大阻止が治療の標的として有用であることが示された。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

#### 出雲周二

1. Yukitake M, Sueoka E, Sueoka-Aragane N, Sato A, Ohashi H, Yakushiji Y, Saito M, Osame M, Izumo S, Kuroda Y. Significantly increased antibody response to heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients but not in patients with

human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurovirol.* 14(2):130-135, 2008.

2. Sabouri AH, Usuku K, Hayashi D, Izumo S, Ohara Y, Osame M, Saito M. Impaired function of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-specific CD8+ T cells in HTLV-1-associated neurologic disease. *Blood.* 112(6):2411-2420, 2008.
3. Xing HQ, Moritoyo T, Mori K, Sugimoto C, Ono F, Izumo S. Expression of proinflammatory cytokines and its relationship with virus infection in the brain of macaques inoculated with macrophage-tropic simian immunodeficiency virus. *Neuropathology.* 2009;29(1):13-19.
4. Xing HQ, Mori K, Sugimoto C, Ono F, Izumo K, Kuboda R, Izumo S. Impaired astrocytes and diffuse activation of microglia in the cerebral cortex in simian immunodeficiency virus-infected Macaques without simian immunodeficiency virus encephalitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 67(6):600-611, 2008.
5. Hayashi D, Kubota R, Takenouchi N, Tanaka Y, Hirano R, Takashima H, Osame M, Izumo S, Arimura K. Reduced Foxp3 expression with increased cytomegalovirus-specific CTL in HTLV-1-associated myelopathy. *J Neuroimmunol* 200(1-2):115-124, 2008.
6. Hayashi D, Kubota R, Takenouchi N, Nakamura T, Umehara F, Arimura K, Izumo S, Osame M. Accumulation of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-1)-infected cells in the cerebrospinal fluid during the exacerbation of HTLV-1-associated myelopathy. *J Neurovirol* 14(5):459-463, 2008.
7. Xing HQ, Hayakawa H, Gelpi E, Kubota R, Budka H, Izumo S. Reduced expression of excitatory amino acid transporter 2 and diffuse microglial activation in the cerebral cortex in AIDS cases with or without HIV encephalitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 68(2):199-209, 2009.
8. Xing HQ, Hayakawa H, Izumo K, Kubota R, Gelpi E, Budka H, Izumo S. In vivo expression of proinflammatory cytokines in HIV encephalitis: an analysis of 11 autopsy cases. *Neuropathology.* 2009; in press.
9. Matsuura E, Umehara F, Nose H, Higuchi I, Matsuoka E, Izumi K, Kubota R, Saito M, Izumo S, Arimura K, Osame M. Inclusion body myositis associated with human T-lymphotropic virus-type I infection: eleven patients from an endemic area in Japan. *J Neuropathol Exp Neurol* 67:41-49, 2008.

星野洪郎

1. Shimizu A, Tamura A, Abe M, Motegi S, Nagai Y, Ishikawa O, Nakatani Y, Yamamoto Y, Uezato H, Hoshino H. Detection of human papillomavirus type 56 in Bowen's disease involving the nail matrix. *Br. J. Dermatol.* 158: 1273-1279, 2008.
2. Shimizu, N., A. Tanaka, A. Oue, T. Mori, C. Apichartpiyakul and H. Hoshino. A short amino acid sequence containing tyrosine in the N-terminal region of G protein-coupled receptors is critical for their potential use as coreceptors for human and simian immunodeficiency viruses. *J. Gen. Virol.* 89:3126-3136, 2008.
3. Shimizu, N., A. Tanaka, T. Mori, T. Ohtsuki, A. Hoque, A. Jinno-Oue, C. Apichartpiyakul, S. Kusagawa, Y. Takebe, and H. Hoshino. 2008. A formylpeptide receptor, FPRL1, acts as an efficient coreceptor for primary isolates of human immunodeficiency virus. *Retrovirology* 25:5: 52 2008.
4. Xiao, P., O. Usami, Y. Suzuki, H. Ling, N. Shimizu, H. Hoshino, M. Zhuang, Y. Ashino, H. Gu, T. Hattori. Characterization of a CD4-independent clinical HIV-1 that can efficiently infect human hepatocytes through CXCR4. *AIDS* 22: 1749-1757, 2008.

中村龍文

- 1 Soyama A, Eguchi S, Takatsuki M, Ichikawa T, Moriuchi M, Moriuchi H, Nakamura T, Yamanouchi K, Hidaka M, Tokai H, Hamasaki K, Miyazaki K, Tajima Y, Kanematsu T. HTLV-I associated myelopathy following living-donor liver transplantation. *Liver Transplant* 14:647-650,2008.
- 2 Nakamura H, Takagi Y, Kawakami A, Ida H, Nakamura T, Nakamura T, Eguchi K. HTLV-I infection results in resistance toward salivary gland destruction of Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 26:653-655, 2008.
- 3 Fukushima N, Nakamura T, Nishiura Y, Ida H, Aramaki T, Eguchi K. HTLV-I production based on activation of integrin/ligand signaling in HTLV-I-infected T cell lines derived from HAM/TSP patients. *Intervirology* 51:123-129, 2008.
- 4 Nishiura Y, Nakamura T, Fukushima N, Nakamura H, Ida H, Aramaki T, Eguchi K. Disulfide-Mediated Apoptosis of HTLV-I-Infected Cells in Patients with HTLV-I-Associated Myelopathy / Tropical Spastic Paraparesis. *Antivir Ther.* 2009, in press.

5 Nakamura T, Nishiura Y, Eguchi K. Therapeutic strategies in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry* 2009; in press.

6 中村龍文. Triggerとしての感染症.(免疫性神経疾患Update.) *日本臨床* 66:1056-1064, 2008.

7. 片峰 茂, 中村龍文. プリオン病.(ノーベル賞の医療への貢献.) *総合臨床* 57:90-94, 2008.

梅原藤雄

1. 梅原藤雄. HTLV-Iに伴う神経障害 “薬局”2008年3月増刊号 病気と薬 パーフェクトガイド 2008 pp805-806

2. 梅原藤雄, 有村公良 『内科』101巻6号 (2008年6月増大号) 特集: 内科必携画像診断 ---Imaging Revolution HTLV-Iに伴う神経障害: HAM pp1509-1511

3. Matsuura E, Umehara F, Nose H, Higuchi I, Matsuoka E, Izumi K, Kubota R, Saito M, Izumo S, Arimura K, Osame M. Inclusion body myositis associated with human T-lymphotropic virus-type I infection: eleven patients from an endemic area in Japan. *J Neuropathol Exp Neurol* 67:41-49, 2008

4. Umehara F, Hagiwara T, Yoshimura M, Higashi K, Arimura K, Enlarged, multifocal upper limb neuropathy with HTLV-I associated myelopathy in a patient with chronic adult T-cell leukemia. *J Neurol Sci* 266:167-170, 2008

久保田龍二

1. Hayashi D, Kubota R, Takenouchi N, Tanaka Y, Hirano R, Takashima H, Osame M, Izumo S, Arimura K: Reduced Foxp3 expression with increased cytomegalovirus-specific CTL in HTLV-I-associated myelopathy. *J Neuroimmunol.* 200(1-2): 115-124, 2008
2. Hayashi D, Kubota R, Takenouchi N, Nakamura T, Umehara F, Arimura K, Izumo S, Osame M: Accumulation of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I)-infected cells in the cerebrospinal fluid during the exacerbation of HTLV-I-associated myelopathy. *J Neurovirol.*, 14(5): 459-63, 2008

齊藤峰輝

1. Matsuura E, Umehara F, Nose H, Higuchi I, Matsuoka E, Izumi K, Kubota R, Saito M, Izumo S, Arimura K, Osame M. Inclusion body myositis associated with human T-lymphotropic virus-type I infection: eleven patients from an endemic area in Japan. *J Neuropathol Exp Neurol* 67:41-49, 2008.

2. Saito M, Usuku K, Arimura K, Izumo S, Osame M, Ohara Y. Increased frequency of CD4+T cells expressing fractalkine receptor CX3CR1 in patients with HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP), but its AIDS susceptible polymorphisms are not associated with the disease. *J Neurol Sci.* 266(1-2): 13-19, 2008.
3. Yukitake M, Sueoka E, Sueoka-Aragane N, Sato A, Ohashi H, Yakushiji Y, Saito M, Osame M, Izumo S, Kuroda Y. Significantly increased antibody response to heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients but not in patients with human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurovirol.* 14(2):130-135, 2008.
4. Sabouri AH, Usuku K, Hayashi D, Izumo S, Ohara Y, Osame M, Saito M. Impaired function of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)- specific CD8+ T cells in HTLV-1-associated neurologic disease. *Blood.* 112(6):2411-2420, 2008.
5. Saito M, Matsuzaki T, Satou Y, Yasunaga J, Saito K, Arimura K, Matsuoka M, Ohara Y. In vivo expression of the HBZ gene of HTLV-1 correlates with proviral load, inflammatory markers and disease severity in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Retrovirology.* 6:19, 2009.

2. 学会発表

久保田龍二

- 1 Kubota R: Impact of degenerate TCR recognition of HTLV-1-specific CTL on the viral load in patients with HAM/TSP. *Summer Seminar in Neuroimmunology Branch, NIH.* Bethesda, USA, August 2008.
- 2 久保田龍二: HTLV-1関連脊髄症におけるCTLの動態. 第29回日本炎症・再生医学会. 2008年7月 東京。
- 3 久保田龍二、竹之内徳博、出雲周二: HTLV-1関連脊髄症のウイルス制御におけるCTLの役割. 第12回神経ウイルス学会. 2008年7月鹿児島。
- 4 久保田龍二、竹之内徳博、松崎敏男、古川良尚、有村公良、出雲周二: HLA-A24はHAMでは頻度が高いがウイルス量は低い. 第49回日本神経学会総会. 2008年5月 横浜
- 5 久保田龍二、竹之内徳博、松崎敏男、古川良尚、有村公良、出雲周二: HLA-A24はHTLV-1ウイルス量減少に関与するがHAM発症のリスクを

上げる. 第1回HTLV-I研究会. 2008年8月 東京

星野洪郎

1. 森隆久, 清水宣明, 大上厚志, 田中淳, 星野洪郎. シンシチウム形成におけるHTLV-I遺伝子産物Taxの作用. 第56回日本ウイルス学会学術集会, 2008, 岡山
2. 清水宣明, 大上厚志, 田中淳, 大槻貴博, 森隆久, Islam Salequl, 和田成一, 舟山知夫, 浜田信行, 小林泰彦, 星野洪郎. 重粒子線が細胞のHIV-1感染感受性におよぼす効果の解析. 第56回日本ウイルス学会学術集会, 2008, 岡山
3. Hoque SK Ariful, 大上厚志, 清水宣明, 田中淳, 大槻貴博, 星野洪郎. Incorporation of non-susceptible bystander cells into HIV-1 suncytia. 第22回日本エイズ学会学術集会, 2008, 大阪.
4. 品川雅彦, 大上厚志, 田中淳, 清水宣明, 星野洪郎. HTLV-I粒子は広範囲の温度において非常に不安定である. 第1回HTLV-I研究会, 2008, 東京.

中村龍文

1. 西浦義博, 中村龍文, 福田 卓, 佐藤克也, 辻野 彰, 本村政勝, 吉村俊朗, 中村英樹, 井田弘明, 江口勝美: HTLV-I関連脊髄症患者に対するプロスルチアミン治療の臨床試験(第2報)およびその機序の解析. 第20回日本神経免疫学会. 2008年4月. 新潟.
2. 松崎敏男, 中村龍文, 納 光弘, 出雲周二: HAM患者の生活実態調査の報告と対策. 第49回日本神経学会総会. 2008年5月. 横浜.
3. 中村龍文, 西浦義博, 江口勝美: HAMに対するHTLV-I感染細胞を標的とした新規治療法の開発に向けて. ワークショップ—HTLV-I関連脊髄症(HAM/TSP)—. 第12回日本神経ウイルス研究会. 2008年7月. 屋久島.

齊藤峰輝

1. 齊藤峰輝、斎藤孔介、有村公良、大原義朗: HTLV-1 マイナス鎖にコードされるHBZ遺伝子のHAM患者末梢血中における高発現. 第20回日本神経免疫学会学術集会 2008, 4. 新潟
2. 齊藤峰輝、斎藤孔介、有村公良、大原義朗: HTLV-1 マイナス鎖にコードされる新規遺伝子HBZの高発現とHAM/TSP. 第49回日本神経学会総会 2008, 5. 東京

3. 齊藤峰輝：シンポジウムー感染性脳症における分子病理学的基盤ー HTLV-1 関連脊髄症 (HAM/TSP) の病態と病因. 第 97 回日本病理学会総会 2008, 5. 金沢
  
4. 齊藤峰輝：シンポジウムーレトロウイルスと炎症・免疫. HTLV-1 関連脊髄症の免疫遺伝学. 第 29 回日本炎症・再生医学会 2008, 7. 東京
  
5. 齊藤峰輝、斎藤孔良、谷浦直子、大桑孝子、大原義朗：HTLV-1 マイナス鎖にコードされる新規遺伝子HBZの高発現とHAM/TSP. 第 12 回日本神経ウイルス研究会 2008, 7. 屋久島
  
6. 齊藤峰輝、松崎敏男、佐藤賢文、安永純一郎、斎藤孔良、松岡雅雄、大原義朗：HTLV-1 マイナス鎖にコードされるHBZの高発現とHAM/TSP. 第 1 回HTLV-1 研究会・合同班会議 2008, 8. 東京
  
7. 齊藤峰輝、佐藤賢文、斎藤孔良、松岡雅雄、大原義朗：HTLV-1 マイナス鎖にコードされるHBZの高発現とHAM/TSP. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008, 10. 岡山

---

## Ⅱ. 分 担 研 究 報 告 書

Cell free HTLV-Iの感染機構の解明

研究分担者 星野 洪郎 群馬大学大学院 教授

研究要旨

Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) ウイルス粒子の温度安定性について検討した。37°CにおけるHTLV-Iの感染力価半減時間 ( $T_{1/2}$ ) は、0.4-0.8時間であった。この結果は、これまでに報告されている他のレトロウイルスでの37°Cにおける $T_{1/2}$ のおよそ1/10以下であった。さらに、0-25°CにおけるHTLV-Iの $T_{1/2}$ は、0.6-1.2時間であり、低温処理に伴う37°Cからの顕著な感染性の回復は認められなかった。HTLV-Iのエンベロープタンパク質 (Env)は、Surface (SU: gp46)とTransmembrane (TM: gp21)のヘテロダイマーで構成されている。SUとTMの間の結合は、ジスルフィド (S-S)による共有結合であることが知られている。われわれは、37°C処理に伴いHTLV-IのSUとTM間のS-S結合が切断され、ウイルス粒子からSUが離脱することを見いだした。従って、37°C処理によりSUを消失したHTLV-Iは、細胞レセプターとの特異的結合が阻害されていることが推測された。実際、37°C処理後のHTLV-Iの細胞への吸着と侵入量が顕著に減少した。これまでに知られているHTLV-Iの特徴として、感染細胞から感染性ウイルス粒子の産生量が非常に少ないことがあるが、その詳細なメカニズムは不明であった。今回、われわれの得た結果は、HTLV-I EnvからのSU離脱が、ウイルス粒子の感染性消失に関与していることを強く示唆した。

A. 研究目的

HTLV-I感染細胞から放出されたウイルス粒子を温度処理し、感染性に及ぼす影響、およびウイルスタンパク質の質的变化を調べる。

B. 研究方法

HTLV-I粒子の感染性の定量は、(1) 感染細胞に誘導される多核巨細胞 (合胞体)の数を算定する方法 (2) 感染後細胞内で合成される逆転写産物量を定量的PCRで決定する方法 (3) HTLV-IのEnvを持つ水疱性口内炎ウイルス (Vesicular Stomatitis Virus: VSV)との pseudotypeウイルス感染試験で評価した。

細胞に吸着したHTLV-Iの量は以下のように検討した。4°Cで細胞に1時間ウイルスを吸着させた後、洗浄し未吸着ウイルスを除去した。次に、トータルRNAを抽出し、オリゴdTをプライマーとした逆転写反応によりcDNAを合成した。

このcDNAを鋳型として、ウイルスゲノム配列をプライマーとした定量的PCRでウイルスRNA量を求めた。細胞内に侵入したウイルス量については、4°Cで1時間吸着の後洗浄し、温度を37°Cにシフトし、2時間後、細胞内で逆転写されたウイルスcDNA量を定量的PCRで算定した。

HTLV-I タンパク質の解析は以下のように行った。ウイルス粒子を遠心濃縮し、SDSサンプルバッファーに溶解し、100°C処理した後SDS-PAGEにて分離した。次に、Western blotting法によりHTLV-IのEnv特異的抗体を用いて、検出した。SUとTMの結合 (S-S結合)を検出するために還元剤非存在下でサンプルを処理した。また、N-ethylmaleimide (NEM)は、SH基をアルキル化することで、S-S結合反応を阻害するチオール基反応性薬剤である。温度処理は、HTLV-IのSUとTM間のS-S結合にどのような影響を及ぼすかを、NEMを用いて検討した。

(倫理面への配慮)

本実験は、全て培養細胞を用いたものであり、倫理面での問題はない。

#### C. 研究結果

37°CにおけるHTLV-Iの感染力価半減時間 ( $T_{1/2}$ ) は、0.4-0.8時間であった。さらに、0-25°CにおけるHTLV-Iの $T_{1/2}$  は、0.6-1.2時間であり、低温処理に伴う37°Cからの顕著な感染性の回復は認められなかった。37°C処理後、HTLV-Iの細胞への吸着と侵入量が顕著に減少した。HTLV-Iタンパク質の変化については、Western blottingにより、EnvのSUが特異的にウイルス粒子から解離していることを見いだした。しかし、TMは、粒子に保持されていた。この結果より、SUとTM間のS-S結合が37°C処理により切断されることが推測された。そこで、SH基をアルキル化する薬剤NEM存在下でHTLV-Iを37°C処理すると、ウイルス粒子からのSU解離が明らかに抑制された。

#### D. 考察

これまで、感染細胞から放出されたHTLV-I粒子の感染性は、他のレトロウイルスと比べて非常に低いことが知られていたが、そのメカニズムは不明であった。今回、われわれは、通常の培養温度(37°C)においても、HTLV-IのEnvからSUが容易に離脱することを見いだした。このことが、ウイルス粒子の感染性消失に大きく関わっているものと考えられた。さらに詳細な解析の結果、このSU離脱には、SUとTMのS-S結合切断を伴っていることが、NEMを用いた試験により確認できた。SUを消失したウイルスは細胞表面のHTLV-I特異的レセプターと結合ができなくなり、感染性を失うものと推測できる。何故、HTLV-Iでは容易にSUの離脱が引き起こされるのか。またどのような細胞性因子あるいはウイルス性因子がSUとTM間のS-S結合切断に関与しているのか。これらの解析は、抗HTLV-I薬剤あるいは治療薬開発につながる可能性があり、

今後の検討課題である。

#### E. 結論

HTLV-IIは、広範囲の温度処理で容易に感染性を失った。37°C処理により、HTLV-I粒子はEnvのSUとTM間のS-S結合切断に伴うSUの離脱が生じることを明らかにした。

#### F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Shimizu A, Tamura A, Abe M, Motegi S, Nagai Y, Ishikawa O, Nakatani Y, Yamamoto Y, Uezato H, Hoshino H. Detection of human papillomavirus type 56 in Bowen's disease involving the nail matrix. *Br. J. Dermatol.* 158: 1273-1279. 2008.
2. Shimizu, N., A. Tanaka, A. Oue, T. Mori, C. Apichartpiyakul and H. Hoshino. A short amino acid sequence containing tyrosine in the N-terminal region of G protein-coupled receptors is critical for their potential use as coreceptors for human and simian immunodeficiency viruses. *J. Gen. Virol.* 89:3126-3136, 2008.
3. Shimizu, N., A. Tanaka, T. Mori, T. Ohtsuki, A. Hoque, A. Jinno-Oue, C. Apichartpiyakul, S. Kusagawa, Y. Takebe, and H. Hoshino. 2008. A formylpeptide receptor, FPRL1, acts as an efficient coreceptor for primary isolates of human immunodeficiency virus. *Retrovirology* 5: 52 2008.
4. Xiao, P., O. Usami, Y. Suzuki, H. Ling, N. Shimizu, H. Hoshino, M. Zhuang, Y. Ashino, H. Gu, T. Hattori. Characterization of a CD4-independent

clinical HIV-1 that can efficiently infect human hepatocytes through CXCR4. AIDS 22: 1749-1757, 2008.

## 2. 学会発表

1. 森隆久, 清水宣明, 大上厚志, 田中淳, 星野洪郎. シンシチウム形成における HTLV-I 遺伝子産物 Tax の作用. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会, 2008, 岡山

2. 清水宣明, 大上厚志, 田中淳, 大槻貴博, 森隆久, Islam Salequl, 和田成一, 舟山知夫, 浜田信行, 小林泰彦, 星野洪郎. 重粒子線が細胞の HIV-1 感染感受性におよぼす効果の解析. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会, 2008, 岡山

3. Hoque SK Ariful, 大上厚志, 清水宣明, 田中淳, 大槻貴博, 星野洪郎. Incorporation of non-susceptible bystander cells into HIV-1 syncytia. 第 22 回日本エイズ学会学術集会, 2008, 大阪.

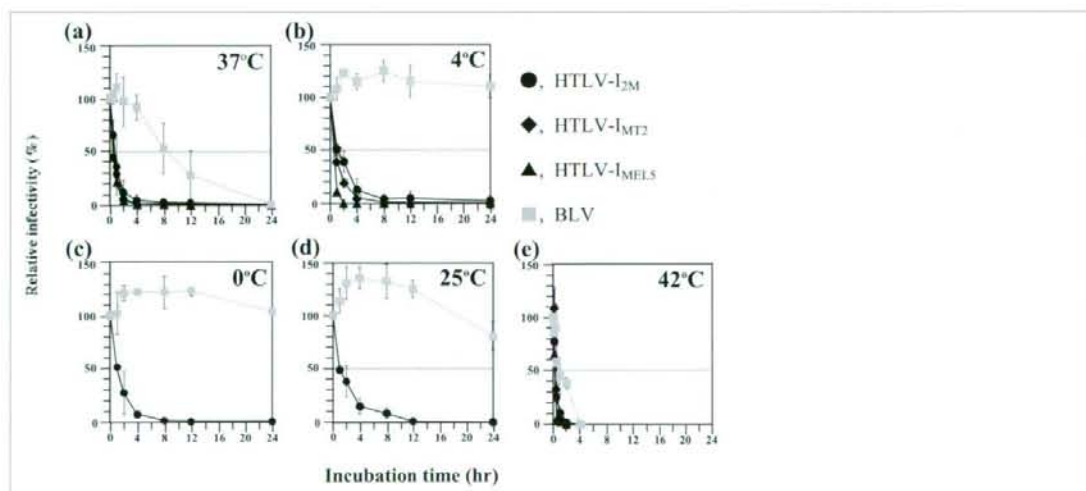
4. 品川雅彦, 大上厚志, 田中淳, 清水宣明, 星野洪郎. HTLV-I 粒子は広範囲の温度において非常に不安定である. 第 1 回 HTLV-I 研究会, 2008, 東京.  
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

表1. ウイルスとウイルス産生細胞の由来

ウイルス		産生細胞	
名前	由来	名前	由来
HTLV-I <sub>2M</sub>	日本人	8C/HTLV-I <sub>2M</sub>	ネコ腎細胞
HTLV-I <sub>MT2</sub>	日本人	PG-4/HTLV-I <sub>MT2</sub>	ネコグリア細胞
HTLV-I <sub>MEL5</sub>	メラネシア人	HOS/HTLV-I <sub>MEL5</sub>	ヒト骨肉腫細胞
HTLV-II	アメリカ人	Ton1	ヒト扁桃T細胞
BLV		FLK	ヒツジ腎細胞





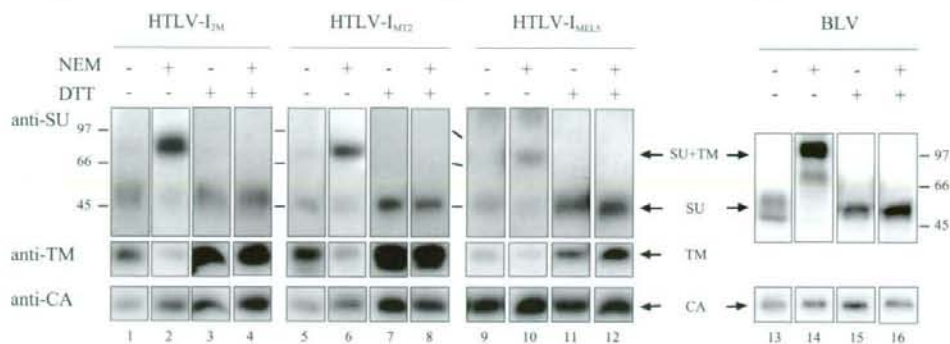


図2. HTLV-IとBLV粒子中におけるEnvのSU-TM間SS結合の検出

HTLV-IとBLVを遠心濃縮し、沈殿物をNEM (0 mM,- あるいは20 mM,+)およびDTT (0 mM,- あるいは100 mM,+)を含む溶解液に懸濁して100°Cで熱変性した。各サンプルについて、図内に示した抗体を使いウイルスタンパク質を検出した。

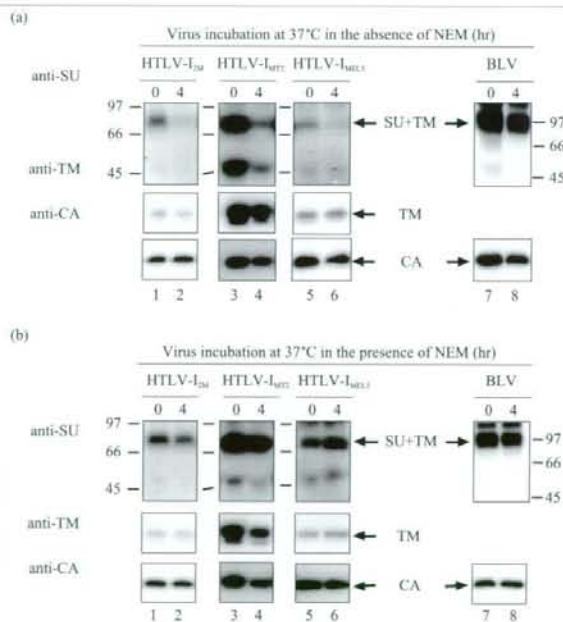


図3. NEMによるSU+TM複合体からのSUの解離の抑制

(a) HTLV-IとBLV粒子中のタンパク質の検出。HTLV-IとBLVサンプルを37°Cで0または4時間処理し、遠心濃縮した。沈殿物をNEM入りの溶液に溶かし、SDS-PAGEを行った。ウイルスタンパク質は、図内に示された抗体を使って検出した。(b) NEM存在下でのウイルスタンパク質の検出。

「HTLV-1 の生体内感染拡大機序の解明とその制御による HAM 治療法の開発」  
膜融合に寄与する HTLV-1 機能ドメインを標的とする分子の探索

分担研究者：白木 洋 (横浜薬大 生体防御)  
研究協力者：小嶋 英二郎 (福山大薬、分析化学)

研究要旨： HTLV-1 の細胞間感染における膜融合過程は HTLV-1 の細胞内侵入における重要な過程である。この HTLV-1 感染における膜融合反応に寄与するペプチド領域を標的とし、またフェージペプチドライブラリーを探索分子源として、感染を防止する新たな分子の探索を行う。

#### A. 研究目的

HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) は HTLV-1 の慢性感染によって引き起こされる難治性神経疾患で、その発症の最大の要因は感染者の高いウイルス量にあると考えられている。このため、感染細胞の体内から選択的に排除することは本疾患の有効な治療法の 1 つであると考えられるが、未だその治療法は確立されていない。

HTLV-1 感染は、murine leukemia virus (MLV) や HIV-1 と同様に、感染した細胞から膜融合反応を介して標的細胞へウイルスが移行することで成立する。この膜融合活性は HTLV-1 外皮膜貫通蛋白 gp21 上にあり、その反応は外皮表面蛋白 gp46 で制御されている。膜融合は外皮表面蛋白 N 末端領域に存在する感染受容体認識領域が標的細胞膜上の受容体と結合することから始まる。この結合はウイルス外皮蛋白を構成する表面蛋白と膜貫通蛋白の解離を促し、同時に膜貫通蛋白の構造変換を惹起する。この構造変換により膜貫通蛋白の N 末端にある fusion peptide 領域が標的細胞膜に接近し、そして挿入され、感染細胞膜と標的細胞膜の繋がり膜融合反応が始まるとされている。

筆者らは、これまで HTLV-1 の細胞-細胞

間感染の試験管内モデルであるシンシウム形成を指標とし、HTLV-1 外被蛋白の全領域を網羅する合成ペプチドを用いて、膜融合反応を介したウイルス侵入における HTLV-1 外被蛋白の役割とその機能構造の解析を行ってきた。その結果、HTLV-1 外被蛋白上に膜融合に寄与する機能領域として、少なくとも 3 箇所が存在することを明らかにした。それらは gp46 表面外皮蛋白の N 末端領域に相当する 111Lys-136Asp 領域 (gp46-111)、その上流の proline-rich 領域に位置し、しかも常在性熱ショック蛋白 HSC70 との強い結合性を持つ 197Asp-216Thr 領域 (gp46-197)、および gp21 膜貫通蛋白の coiled coil 構造領域近傍の 400Cys-429Leu 領域 (gp21-400) であった。ここで重要なことは、これらの外被蛋白の一部の領域に対応したペプチド断片にシンシチア形成を阻害する活性が見出されたことである。さらに、これらのペプチド領域の近傍は HTLV-1 外被蛋白上の感染中和抗体を産生する領域でもあった。これらは、HTLV-1 外皮蛋白上の 3 箇所のペプチド領域は膜融合を介した感染に重要な役割をもつこと、これらのペプチド領域と強い相互作用をもつ分子は感染を阻害する有用な分子となりうることを示唆していた。

そこで、筆者らは HTLV-1 の膜融合反応に寄与する機能領域の標的とする分子を探索し、その感染阻害機構の解析を行う、本報告では、感染阻害分子探索の標的とする膜融合反応に寄与する必須の機能ドメイン構造とその特徴、さらに分子探索に利用するファージペプチドライブラリーの特徴について述べる。

## B. 研究方法

**ペプチド合成** HTLV-1、HTLV-2 および近縁ウイルス由来のペプチドの合成は Applied 社製 Model 431A を用い、t-Boc 法にて行った。

**プレートへの担体の固相化** 蛋白または合成ペプチドのプラスチックプレート (Nunc 社製) への固相化は、10 mM 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.55) を用い、4 °C に 1 晩反応させ、作成した。

**シンシチウム形成試験** 感染細胞として KT252 および標的細胞として MOLT-4 を用いた。用いて行った。本試験では 5 個以上の核を含む巨大細胞をシンシチウムとして、顕微鏡下で計数した、

**ファージペプチドライブラリー** 12 アミノ酸残基のペプチドをファージ表面タンパク質上にランダムに発現するファージライブラリー (ライブラリーサイズ;  $1.77 \times 10^8$ ) を用いた。蛋白またはペプチド断片を固相化したプレートにファージクローン反応させ、反応物を回収する。回収したファージクローンのランダムペプチドを解析することによりエピトープを決め、確認はウエスタンブロットにて行った。

### (倫理面への配慮)

本研究は研究計画においては個人を限定するとか、特定する必要はないため、倫理的および科学的妥当性に問題はない

## C. 研究結果

外被蛋白上の膜融合に必須の機能ドメイン構造

外皮蛋白の gp46-111 領域、gp46-197 領域および gp21-400 領域が HTLV-1 感染細胞と標

的細胞の膜融合反応介したウイルス移行における重要な役割を持つ機能領域を含むことを明らかにしていた。そこで、これらの領域に含まれる必須の機能ドメイン構造を解析するため、これらのペプチド領域を網羅し、かつそれぞれのペプチドの末端 3 アミノ酸残基長を重複させた 16 種の 10mer~12mer ペプチドを調製し、シンシチウム形成阻害活性を指標として、膜融合反応に寄与する必須のドメイン構造を解析した。その結果、3 箇所 (箇所) のペプチド領域にある膜融合反応に必須の機能構造は gp46 表面蛋白の 111Lys から 116Cys の領域 (Lys-Cys-Pro-Tyr-Leu-Gly-Cys) および 197Asp から 205Pro の領域 (Asp-His-Ile-Leu-Glu-Pro)、さらに gp21 膜貫通蛋白の 397Cys から 406Thr の領域 (Gln-Glu-Gln-Cys-Arg-Phe-Pro-Asn-Ile-Thr) であった。特に、gp46-197 領域 (197Asp から 216Thr) は両親媒性の  $\alpha$  helix 構造をとり、その親水性側面が 71Ka 常在性熱ショック蛋白 (HSC70) との強い結合性を持っていた。しかも、この HSC70 との結合性とシンシチウム形成阻害活性とはよく相関していた。gp21 膜貫通蛋白の 397Cys から 406Thr の領域 (QEQRFPNIT) はウイルス外皮蛋白としての gp46 表面蛋白との会合の gp21 膜貫通蛋白側の会合部位であり、しかも gp21 膜貫通蛋白の高次構造を支える coiled-coil 構造をとる領域にあった。

ファージペプチドライブラリーによる抗 gp46-197 抗体のエピトープ解析

ペプチドライブラリーとしてのファージペプチドライブラリーの特性およびそれからのペプチドの回収法を確認するために、ペプチド断片 gp46 197-216 を抗原として認識する抗 gp46-197 抗体のエピトープ解析を行った。本抗体は健康者 HTLV-1 感染健康者の約 2%、ATL 患者および HAM 患者のほとんどの血清中に検出される抗体で、感染中和活性を持っている。最近筆者らは本抗体が HTLV-1 感染による病態の進展の連動した興味ある抗体でもある。この抗体を抗体陽性健康者血清より gp46-197 ペプチドを担体

としたアフィニティーカラムで精製、エビトープ解析に使用した。この抗体をプレートに固相化し、それに12アミノ酸残基のペプチドをファージ表面タンパク質上にランダムに発現するファージライブラリーを反応させた。標的蛋白に結合したファージクローンを回収し、そのペプチド構造を解析した。結果は、表1に示したように、本抗体が gp46-197 ペプチド領域の 205Pro から 209Lys の領域 (Pro-Trp-Lys-Ser-Lys) を認識する感染中和抗体であることを確認した。

#### D. 考察

感染ウイルス複製の主要な過程 (ウイルスの細胞内への侵入、ウイルス遺伝子の組み込みおよびウイルス粒子の形成) は抗ウイルス感染治療薬開発の標的となっている。特に、HIV-1 やインフルエンザウイルス感染での膜融合反応を介したウイルスの細胞内侵入機構が明らかになり、この侵入過程に寄与する分子は抗ウイルス薬開発のよい標的であると考えられている。HTLV-1 感染でも、HIV-1 や MLV でのそれらと同じように、HTLV-1 外皮蛋白を構成する gp46 表面蛋白および gp21 膜貫通蛋白は感染細胞と標的細胞の膜融合反応に重要な役割を果たしている。MLV 外皮蛋白の機能ドメイン構造と同じように、gp46 の N 末端領域の gp46-111 ペプチド領域は感染受容体結合ドメインに相当し、その上流の gp46-197 ペプチド領域は proline-rich 領域近傍の gp46-gp21 蛋白の構造変化・解離に機能する Disulfide isomerase 活性発現領域に相当し、さらに膜貫通蛋白上の gp21-400 ペプチド領域は gp46 と gp21 の会合部位に相当し、gp46 と gp21 の解離で惹起される gp21 蛋白の構造変化で中心的役割を果たす coiled-coil 構造領域に相当している。このように、今回明らかにされた HTLV-1 外皮蛋白上の膜融合反応に寄与する 3 つの機能ドメイン構造はそれ自体また近傍領域が膜融合反応で中心的役割を果たしているペプチド領域である。従って、このような領域に強い相互作用を示す分子は HTLV-1 感染を防止する分子として期

待できる。

ウイルスの細胞内侵入を阻害する分子の探索の 1 つの方法は多様なペプチド配列をもつペプチドライブラリーを分子ライブラリーとして用いることである。今回の検証に用いた 12 アミノ酸残基長からなるペプチドをファージ表面タンパク質上にランダムに発現するファージライブラリー (ライブラリーサイズ;  $1.77 \times 10^8$ ) は分子の長さおよび多様性においてウイルス侵入を阻害する分子探索のライブラリーとして充分であった。この検証において、分子探索のためのペプチド・蛋白分子の固定化、洗浄、回収および確認法、さらに標的となる外皮蛋白機能ドメインの確認ができた。これらの方法を用いて、HTLV-1 細胞内侵入を阻害する抗ウイルス分子の探索を実施する。

#### E. 結論

膜融合反応を介した HTLV-1 の細胞内侵入過程は抗ウイルス分子探索のよい標的因子である。ファージペプチドライブラリーを探索分子源として、HTLV-1 外皮蛋白上の gp46-111 領域、gp46-197 領域および gp21-400 領域ペプチドを標的分子として、ともに相互に強い作用を示す分子の探索に有用である。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 発表した関連論文

Sagara Y, Inoue Y, Ohshima K, Kojima E, Utsunomiya A, Tsujimura M, Shiraki H, Kashiwagi S. Antibody to the central region of human T-lymphotropic virus type 1 gp46 is associated with the progression of adult T-cell leukemia. *Cancer Sci.* 2007 Feb;98(2):240-5. Erratum in: *Cancer Sci.* 2007 Apr;98(4):620.

Sagara Y, Inoue Y, Tsujimura M, Kojima E, Shiraki H, Kashiwagi S. Novel biomarker