

200935043A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 **出雲周二**

平成22(2010)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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 出雲周二

平成22(2010)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
2. HTLV-1の細胞内侵入における細胞膜HSC70の役割について----- 17
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 CD4+T 細胞の網羅的遺伝子発現解析
(トランスクリプトーム) ----- 25
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 患者 HTLV-I 感染細胞の HTLV-I 感染伝播効率における p38 MAPK の関与----- 29
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. 抗 HTLV-I 抗体・抗 aquaporin-4 抗体共陽性脳幹脊髄炎の病態解析----- 33
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 神経病学 梅原藤雄 他
6. HAM 脊髄における HTLV-I 特異的 CTL の集積----- 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-1 関連脊髄症における OX40 陽性 T 細胞の強発現とその制御----- 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

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慢性進行性の難治性神経疾患で、根治療法確立は急務である。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は生体内で主にCD4陽性T細胞に感染しており、ウイルスシナプスを形成して感染拡大が生じると考えられているが、決定的な感染レセプター分子は同定されていない。本研究では、感染レセプターを同定し、生体内でのウイルス感染拡大の機序、発症機序を明らかにするとともに、その制御による治療法の開発をめざしている。本年度の成果として、網羅的遺伝子解析については、HAM患者の感染細胞に特異的に発現する分子の同定のために、ウイルスが感染している末梢血CD4陽性T細胞を分離し、HAM、無症候性キャリア、HTLV-1陰性対照の各4例でDNAマイクロアレイ解析し、HAMのみで発現が亢進する遺伝子群を177個抽出した。その中で、Cell-to-cell spreadに関連する遺伝子として、遺伝子産物が細胞膜上の膜蛋白8遺伝子、細胞最外側に位置し細胞増殖やシグナル伝達に関与する糖鎖あるいは蛋白の糖鎖修飾に関与する6遺伝子がリストアップされた。WWP1、MUC3A、KRT1など、糖鎖関連遺伝子が特異的に発現していることを受けて、産総研糖鎖医工学研究所との共同研究として、糖鎖関連遺伝子、細胞表面の糖鎖構造の網羅的解析を開始した。感染実験系の解析からは、HTLV-1感染を促進する細胞性因子として、インテグリン/リガンドシグナルと細胞内骨格の再構成の間に介在するp38 MAPKの活性化が関与していることが明らかとなった。また、HTLV-1の膜蛋白を持つ高力価のGFP組換えVSVシュードタイプウイルスの感染感受性の違いを発現クローニング法により解析し、感染を促進している分子はヘパラン硫酸プロテオグリカンのコア蛋白質であるシンデカン1とシンデカン2であることを見いだした。また、OX40がHTLV-1感染細胞に選択的に発現誘導され、脊髄の病変局所浸潤細胞に強発現していることを明らかにした。脊髄病巣の解析からは、HTLV-1特異的細胞傷害性T細胞が高度に集積していることを明らかにした。本年度の研究により、生体内でのHTLV-1感染拡大に関与し、治療の標的となりうる分子が複数みいだされた。特に細胞表面の糖鎖構造の特異性が感染効率に関与している可能性が高く、レクチンアレイや糖鎖関連遺伝子の網羅的な解析により、候補の絞り込みをすすめる。

分担研究者

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
琉球大学大学院免疫学 准教授
齊藤峰輝

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

HAMの発症リスクは末梢血PBMCでのHTLV-1プロウイルス量および、これと相関するいくつかの遺伝子が関与することがこれまでの研究で明らかとなっている。一方、遺伝子の網羅的発現解析は1990年代末にマイクロアレイが利用できるようになってから一般的な研究法となってきた。HTLV-1感染細胞の網羅的遺伝子発現解析の文献的報告は11編があり、いずれもATL細胞由来の感染細胞株またはプライマリーATL細胞に関するもので、HAMを対象としたものはまだない。

出雲らはHAMと無症候性HTLV-1キャリア (AC) との病態の違い、すなわち cell-to-cell spread に関与し、プロウイルス量高値となる病態に関与すると考えられる遺伝子を網羅的に明らかにするため、HTLV-1の主な感染宿主細胞であるCD4+T細胞からRNAを抽出し、ヒトDNAマイクロアレイを用いて網羅的に遺伝子発現を検討した。対象としてWHO診断基準により臨床診断したHAM患者4例、AC 4例、HTLV-1陰性健康者対照(NC) 4例を無作為に選んだ。凍結PBMC検体から陰性画分としてCD4+T細胞を回収し、total RNA抽出しcDNAを合成、41,000遺伝子の60merオリゴヌクレオチドを搭載する1-color Whole Human Genome 44k×4plex DNA microarray (Agilent Technologies) を用いDNAマイクロアレイをおこなった。得られた数値データをGeneSpring GX softwareで対数変換、正規化し、有意差比較解析、階層的クラスター解析をおこな

った。その結果をもとに HAM 発症機序関連候補遺伝子リストを作成し、文献検索をおこなった。

3 群間での One-way ANOVA 解析結果より、HAM 発症に最も重要な遺伝子を含む可能性のある、HAM のみで高発現している 177 遺伝子の中から、HTLV-1 の cell-to-cell spread に関連する遺伝子として、細胞膜蛋白遺伝子の 8 遺伝子、細胞最外側に位置し細胞増殖やシグナル伝達に関与する要因として、糖鎖あるいは蛋白の糖鎖修飾に関与するもの 6 遺伝子がリストアップされた。これらの遺伝子と HTLV-1 を表題に含む文献を検索すると、糖鎖関連遺伝子リスト中のユビキチンリガーゼ WWP1 について、HTLV-1 ウイルス粒子出芽に関連する 7 編の報告があった。関連する報告も増加中であり、HIV-1 など他のレトロウイルスでの研究でも注目される遺伝子である。その他の遺伝子は HTLV-1 との関連での報告はなく、すべて新規の遺伝子だった。HAM と AC の決定的な違いは出芽の差にあることが示唆され、WWP1 は治療標的分子となる可能性が考えられる。今後、WWP1 を含め、これらの遺伝子の HAM 発症病態、HTLV-1 の cell-to-cell spread への関与を評価するためさらなる検討が必要である。

HTLV-1 のウイルス学的性質の理解は HAM や ATL の発症メカニズムの解明や発症予防法の確立に重要である。しかし、ヒト細胞への感染性や増殖性が低いためにその解析は困難で、これまで、HTLV-1 産生細胞と非感染細胞を混合培養して解析する方法が用いられてきたが、この方法ではウイルスそのものの性質を知ることはできない。

星野らは、ネコ腎由来 S+L-CCC (8C) 細胞が HTLV-1 に対する感染感受性が高く、HTLV-1 の持続感染が起きることを報告しているが、8C 細胞に HTLV-1 の *tax 1* 遺伝子を導入し、ウイルス抗原の産生、合胞体の形成、子孫ウイルスの産生など、HTLV-1 の生活環を高感度に検出できる実験系の確立をめざした。HTLV-1 持続感染 T 細胞との混合培養で、ネコ由来の 8C と PG-4 細胞が HTLV-1 の感染性が高いことを見いたした。8C 細胞では、HTLV-1 感染に関係する転写経路がヒト細胞と比べて活性化していた。8C 細胞に *tax 1* 遺伝子を導入したところ、CREB/ATF 経路がさらに活性化され、HTLV-1 を感染させると、ウイルス mRNA の合成、ウイルス抗原の産生、合胞体の形成、および感染性の子孫ウイルスの産生の促進が観察された。

8C 細胞に *tax 1* 遺伝子を導入した 8C/TaxWT 細胞を用いることで、cell-free HTLV-1 の感染後、ウイルス抗原の産生、HTLV-1 による合胞体の形成、あるいは子孫ウイルスの産生など、ウイルス感染の後期過程を検出することが可能となった。

また、星野らは HTLV-1 の膜蛋白を持つ高力価の GFP 組換え VSV シュードタイプウイルス、VSVΔG*(HTLV-1) を作製し、色々のヒト由来細胞株の HTLV-1 感受性を検討した。その結果 HTLV-1 高感受性細胞株 (U251MG) と HTLV-1 低感受性細胞株 (K562/CD4 細胞のクローン K4R) との間で約 1,000 倍以上の違いが観察された。この HTLV-1 感受性の差の原因因子を同定するため、U251MG 細胞から cDNA ライブラリーを調整し、K4R 細胞で発現させ、HTLV-1 への感受性が上昇した細胞クローンを分離した。40 倍以上感受性の高まった 2 つの細胞クローンに導入されていた cDNA は、どちらも HSPG のコア蛋白質シンデカン 1 (SDC1) とシンデカン 2 (SDC2) であった。

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ている。これまでに HTLV-1 の細胞内侵入は、gp46 蛋白の Asp197 から Leu216 の領域 (gp46-197) と 71Ka 常在性熱ショック蛋白 (HSC70) が結合することで、細胞膜融合を惹起し、成立することを明らかにした。さらに、HTLV-1 感染者血清中の抗ウイルス抗体測定 ELISA の非特異的反応を防止するための血清の代わりに生物試料由来でないカゼインを保護剤とする ELISA を用いて、HTLV-1 感染者血清中の抗ウイルス抗体の測定を行った。この gp46-197 ペプチド領域に対する抗体が HTLV-1 感染による ATL や HAM の発症とともに患者血清中に出現し、しかもその発現頻度および抗体量が病態の進行と平行して増加することを見出した。また、抗体エピトープ構造は gp46 の Pro205 から Lys209 の領域で、そのアミノ酸配列中に Lys または Arg などの塩基性アミノ酸残基を含むことが特徴であった。このようなエピトープ構造はシャペロン分子としての HSC70 のペプチド結合部位が識別するペプチド断片のアミノ酸配列の特異性と良く一致する結果であった。これらの結果は、HSC70 分子と gp46-197 ペプチド領域との相互作用がウイルス

感染後のウイルス活動期に特徴的に機能しており、ウイルスの伝播、病態の発現と密接に関連していることを示していると考えられる。

HTLV-1の感染伝播 (cell to cell spread) はインテグリンとそのリガンドで構成される virological synapse を介して行われることは周知の事実である。中村らはこれまでにHAM/TSP患者HTLV-1感染T細胞はHTLV-1の効率のいい感染伝播を惹起しうるpotentialを持っている可能性を報告してきた。そこにはインテグリンとそのリガンドで構成される virological synapse の下流にある small GTPase の活性化が一つの因子として関与していることを昨年度報告した。そこに至るまでには actin や microtubules といった細胞内骨格の再構成が重要な役割を果たしている可能性がある。今回、インテグリン/リガンドから細胞内骨格の再構成に至るまでのシグナルがHTLV-1の感染伝播にどのように関与するのかを検討した。その結果、HTLV-1の感染伝播には microtubules の再構成が重要な役割を果たしていることが明らかになった。細胞内骨格の再構成には p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) シグナルの関与が報告されているが、本シグナル分子はインテグリン/リガンドシグナルの下流にも存在する。そこで、HAM患者HTLV-1感染T細胞におけるHTLV-1の効率のいい感染伝播の機序を解明するために、HTLV-1感染T細胞株を用いて、本シグナル分子に焦点をあて解析した。その結果、p38 MAPK シグナルの活性化がHAM/TSP患者HTLV-1感染細胞におけるHTLV-1の効率のいい感染伝播に関与する因子の一つとなっている可能性が示された。中村らはHAM患者末梢血HTLV-1感染細胞は組織浸潤能が亢進していることを報告している。細胞の組織浸潤にも細胞内骨格の再構成が強く関与しているが、HAM/TSP患者HTLV-1感染T細胞におけるp38 MAPKの活性化はこの点にも関与している可能性がある。さらに、HAM患者に特徴的に見られるTh1活性化はp38 MAPKシグナリングの活性化にIL-2シグナリングの活性化が加わることによって生じることが知られている。HAM患者のHTLV-1感染細胞にみられる特徴的な性格がp38 MAPKの活性化を介して生じており、HAMの発症と病態形成においてp38 MAPKは重要な役割を演じている可能性がある。

OX40はTNF受容体型分子群に属するT細胞活性化に必要な副シグナル分子であり、HTLV-1の転写制御因子Taxによって発現誘導されることが報告されている。そのため、HAM患者におけるリンパ球の異常活性化に関与している可能性が考えられるが、HTLV-1関連炎症性疾患の病態形成における意義は報告がなく不明である。齋藤らは、HTLV-1感染・非感染T細胞株、HAM患者末梢血単核球および剖検脊髄標本を用いてOX40陽性T細胞の発現を検討し、HAMの病態との関連について考察した。OX40は非感染T細胞株と比較してHTLV-1感染T細胞株においてmRNA、蛋白ともに高発現していた。また、OX40は未培養のHAM患者PBMCには発現が認められなかったが、HAM患者脊髄の病変局所浸潤細胞に高発現していた。HAM患者PBMCを短時間培養してHTLV-1の転写制御因子Taxを発現誘導すると、OX40はTax陽性細胞特異的に発現した。この系に自家製の抗OX40モノクローナル抗体を添加すると、Tax陽性HTLV-1感染細胞が減少した。以上より、OX40がTaxによりHTLV-1感染細胞に選択的に発現誘導され、HAM脊髄病変局所浸潤細胞に高発現していたことから、OX40陽性細胞がHAMの病態形成に積極的な役割を果たしていることが考えられる。また、抗OX40モノクローナル抗体によりHAM患者のHTLV-1感染細胞をin vitroで減少させることが可能であったことから、OX40はHAMを含むHTLV-1関連疾患の有望な治療標的分子となりうる可能性が示された。

HAMの病態に関連して、HAM患者ではHTLV-1ウイルス量が高いこと、HTLV-1に対する免疫反応が高いことが知られている。また、HAMの脊髄炎症部位では、血管周囲にCD4陽性およびCD8陽性の単核球浸潤が強いこと、病巣のHTLV-1感染細胞は浸潤しているCD4陽性リンパ球であり、神経系細胞には感染していないことが報告されている。しかしながら、HTLV-1特異的な免疫反応が起こっているかは、まだよくわかっていない。近年、抗原/HLA多量体 (tetramer) が開発され、flow cytometryを用いて抗原特異的T細胞の検出が容易に行われるようになり、さらにtetramerを用いて、HIV感染症において組織内に浸潤している抗原特異的T細胞を同定する試みが、Haaseらによって報告された。久保田らは、

in situ tetramer法を改善し、HAMの脊髄病変部位でHTLV-1特異的CTLの検出を試み、また併せてこれらCTLのエフェクター分子の同定を行い、HTLV-1特異的炎症が起こっているのかを明らかにしようとした。

HLA-A2陽性、HLA-A24陽性、HLA-A2/A24陽性のHAM患者3例の凍結剖検脊髄を用いた。In situ tetramer染色法を改善し、脊髄におけるA2拘束性Tax11-19特異的CTL、およびA24拘束性Tax301-309特異的CTLを免疫組織化学法にて検出した。Tetramerは、CD8またはgranzyme Bと共染色し共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。A2陽性HAM患者脊髄ではCTLは血管周囲に認められ、CD8と共染色された。CD8中のCTL頻度は22.1%であった。A24陽性患者ではCD8中のCTL頻度は31.1%であった。A2A24陽性例はほとんど細胞浸潤を認めなかった。CTLの一部はgranzyme Bで染まった。HAMにおける末梢血CD8中のCTLの頻度は平均4-5%であり、脊髄にHTLV-1特異的CTLが高度に集積していた。これらの細胞は細胞傷害能をもっていること示唆された。以上より、末梢からHTLV-1感染リンパ球とHTLV-1特異的CTLが脊髄に浸潤して、HAMの脊髄炎症が起こっていると考えられた。

多発性硬化症のサブグループと考えられていた視神経脊髄炎Neuromyelitis optica (NMO)が、抗aquaporin 4(AQP4)抗体の出現を特徴とする独立した疾患として新たに分類され、注目されているが、一方で、梅原らはHAMにも頸髄や脳幹に病変の広がり示すvariant HAMの概念を提唱している。近年、抗AQP4抗体と抗HTLV-1抗体がともに陽性の脳幹脊髄炎が報告され、HAMとの異同が問題となっている。梅原は抗HTLV-1抗体・抗AQP4抗体共陽性脳幹脊髄炎の自験4例を報告し、既報の2例と合わせて、この病態の位置付けについて検討した。

その結果、HTLV-1陽性AQP4抗体陽性脳幹脊髄炎は女性に多いこと、血清及び髄液中抗HTLV-1抗体は両群とも陽性であること、HTLV-1陽性AQP4抗体陽性脳幹脊髄炎では視神経炎や難知性吃逆を高率に認めること、HTLV-1陽性AQP4抗体陽性脳幹脊髄炎は時間から日の単位で症状が完成することを示した。以上より、HTLV-1陽性AQP4抗体陽性脳幹脊髄炎は臨床的にはNMOであり、HAMとは異なる病態であると結論づけた。

症状の経過、視神経炎・難知性吃逆など、HAMにはなくNMOに特徴的な症状・病歴の有無に注意することで、鑑別は可能であることを示した。

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主な目的としている。本年度の患者試料のDNAマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現の検討により、WWP1、MUC3A、KRT1など、糖鎖関連遺伝子が特異的に発現し、生体内での感染拡大に関与する遺伝子の候補となること、一方、細胞株を用いたウイルス学的手法による検索により、糖鎖分子HSPGのコア蛋白SDC1、SDC2が効率的な感染に関与していることが明らかとなった。細胞表面の糖鎖構造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働きを持っており、異なる手法から同様に糖鎖関連分子がリストアップされた意義は大きい。細胞表面の糖鎖構造の網羅的解析を進めていきたい。また、HAM発症病態に強く関連する分子としてP38MAPK、OX40分子が同定された。これらも治療の標的分子として期待される。

E. 結論

生体内でのHTLV-1感染拡大に関与し、治療の標的となりうる分子が複数みだされた。特に細胞表面の糖鎖構造の特異性が感染効率に関与している可能性が高く、レクチンアレイや糖鎖関連遺伝子の網羅的な解析により、候補の絞り込みをすすめる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

出雲周二

1. Aye MM, Kasai T, Tashiro Y, Xing HQ, Shirahama H, Mitsuda M, Suetsugu T, Tanaka K, Osame M, Izumo S. CD8 positive T-cell infiltration in the dentate nucleus of paraneoplastic cerebellar degeneration. *J Neuroimmunol.* 2009; 208(1-2):136-140.
2. 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.
3. 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; 29(4):433-42.
4. 出雲周二. HAM : HTLV-1 associated myelopathy. 山口 徹, 北原光夫, 福井次矢 (総編集), 今日の治療指針 2010 年版「私はこうして治療している」 pp768-770, 医学書院 (2010).
5. 中川正法, 上平朝子, 橋本里奈, 岸田修二, 三浦義治, 邢 惠琴, 出雲周二. HAART と NeuroAIDS. *日本エイズ学会誌* 11: 81-91 (2009).

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* 5: 52 2008.

4. Xiao, P., O. Usami, Y. Suzuki, H. Ling, N. Shimizu, H. Hoshino, M. Zhuang, Y. Ashino, H. Gu, and T. Hattori. Characterization of a CD4-independent clinical HIV-1 that can efficiently infect human hepatocytes through CXCR4. *AIDS* 22: 1749-1757, 2008.
5. Shimizu, N., A. Tanaka, A. Oue, T. Mori, T. Ohtsuki, C. Apichartpiyakul, H. Uchiumi, Y. Nojima, and H. Hoshino. (2009). Broad usage spectrum of G protein-coupled receptors as coreceptors by primary isolates of human immunodeficiency virus Article type. *AIDS* 23:761-769.
6. Nedellec, R., M. Coetzer, N. Shimizu, H. Hoshino, V. R. Polonis, L. Morris, U.E. Mårtensson, J. Binley, J. Overbaugh, and D.E. Mosier. (2009) Virus entry via the alternative coreceptors CCR3 and FPRL1 differs by human immunodeficiency virus type 1 subtype. *J. Virol.* 83:8353-8363.
7. Jinno-Oue, A., N. Shimizu, S. Hamada, A. Wada, A. Tanaka, Shinagawa, T. Ohtsuki, T. Mori, M. Saha, A. S. Hoque, S. Islam, K. Kogure, T. Funayama, Y. Kobayashi, and H. Hoshino. (2009) Irradiation with carbon ion beams induces apoptosis, autophagy, and cellular senescence in a human glioma-derived cell line. *Int.J. Rad. Oncol.* In press.
8. Shimizu, N., A. Tanaka, A. Jinno-Oue, T. Mori, T. Ohtsuki, and H. Hoshino. (2009) Identification of the conformational requirement for the specificities of coreceptors for human and simian immunodeficiency viruses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* In press.

中村龍文

1. 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;14:533-542.
2. Nakamura H, Kawakami A, Hayashi T, Nakamura T, Iwamoto N, Yamasaki S, Ida H, Eguchi K. Low prevalence of ectopic germinal center formation in patients with HTLV-I-associated Sjögren's syndrome. *Rheumatology.* 2009;48:854-855.
3. Nakamura T, Nishiura Y, Eguchi K. Therapeutic strategies in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* 2009;9:137-149.

4. Nakamura T. HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): the role of HTLV-I-infected Th1 cells in the pathogenesis, and therapeutic strategy. *Folia Neuropathol.* 2009; 47:182-194.
5. Fukuda T, Shiraishi H, Nakamura T, Tanaka K, Nakamura H, Tsujino A, Nishiura Y, Yoshimura T, Motomura M, Eguchi K. Efficacy of Tacrolimus in Sjögren's Syndrome Associated CNS Disease with Aquaporin-4 Autoantibodies. *J Neurol.* 2009;256:1762-1764.

久保田龍二

1. 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 Neuro-path Exp Neurol.* 68(2):199-209, 2009
2. 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; 29(4):433-42.
3. Azakami K, Sato T, Araya N, Utsunomiya A, Kubota R, Suzuki K, Hasegawa D, Izumi T, Fujita H, Aratani S, Fujii R, Yagishita N, Kamijuku H, Kanekura T, Seno KI, Nishioka K, Nakajima T, Yamano Y: Severe loss of invariant NKT cells exhibiting anti-HTLV-1 activity in patients with HTLV-1-associated disorders. *Blood.* 114(15):3208-15, 2009

齊藤峰輝

1. 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.* 2009 6:19.
2. Saito M. Immunogenetics of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Inflammation and Regeneration.* 2009 29: 310-316.
3. Taniura N, Saito M, Okuwa T, Saito K, Ohara Y.: Different subcellular localization of Theiler's murine encephalomyelitis virus leader proteins of

GDVII and DA strains in BHK-21 cells. *Journal of Virology.* 2009 83 (13): 6624-6630.

4. Saito M. Immunogenetics and the pathological mechanisms of human T-cell leukemia virus type 1- (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases.* 2010: 1-8.
5. 齊藤峰輝 HAM/TSP の病態に関する最近の考え方血液・腫瘍科 2009 58 (5) 600-606.

2. 学会発表

出雲周二

1. 久保田龍二, 松浦英治, 有村公良, 出雲周二: 抗原認識特異度の低いHTLV-I 特異的CTLはウイルス淘汰圧が高い. 第50回日本神経学会総会, 2009年5月20日, 仙台.
2. 松崎敏男, 久保田龍二, 有村公良, 出雲周二. HTLV-I キャリア外来の現状とHAM患者の動向について. 第50回日本神経学会総会, 2009年5月21日, 仙台.
3. 児玉大介, 久保田龍二, 出雲周二. 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. 第50回日本神経学会総会. 2009年5月20日, 仙台.
4. 吉満 誠, 小迫知弘, 鈴木伸介, 松下格司, 魚住公治, 久保田龍二, 出雲周二, 有馬直道. HTLV-I 感染者における免疫抑制性受容体の発現. 第2回HTLV-I 研究会. 2009年8月29日, 東京.
5. 児玉大介, 久保田龍二, 出雲周二. HTLV-I 関連脊髄症 (HAM/TSP) におけるRNAマイクロアレイ解析による検討. 第2回HTLV-I 研究会. 2009年8月29日, 東京.
6. Abdelbary N, Kubota R, Usuki F, Abdulah H, Izumo S: Possible effect of HTLV-I on hUPF1 expression and phosphorylation. 第2回HTLV-I 研究会. 2009年8月29日, 東京.
7. Abdulah H, Higuchi I, Kubota R, Matsuura E, Hashiguchi A, Adbelbary N, Izumo S. HTLV-I associated polymyositis: a trial to unfold the story. 第2回HTLV-I 研究会. 2009年8月30日, 東京.

久保田龍二

1. 久保田龍二、松浦英治、有村公良、

出雲周二：HAM脊髄におけるHTLV-I特異的CTLとアポトーシス細胞の同定。第21回日本神経免疫学会。2009年4月 大阪

- 久保田龍二、松浦英治、有村公良、出雲周二：抗原認識特異度の低いHTLV-I特異的CTLはウイルス淘汰圧が高い。第50回日本神経学会総会。2009年5月 仙台
- 松崎敏男、久保田龍二、有村公良、出雲周二：HTLV-Iキャリア外来の現状とHAM患者の動向について。第50回日本神経学会総会。2009年5月 仙台
- 児玉大介、久保田龍二、出雲周二：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。第50回日本神経学会総会。2009年5月 仙台
- Abdulah H, Higuchi I, Kubota R, Matsuura E, Hashiguchi A, Adbelbary N, Izumo S. HTLV-I associated polymyositis: a trial to unfold the story. 第2回 HTLV-I 研究会。2009年8月 東京
- 吉満誠、小迫知弘、鈴木伸介、松下格司、魚住公治、久保田龍二、出雲周二、有馬直道：HTLV-I 感染者における免疫抑制性受容体の発現。第2回 HTLV-I 研究会。2009年8月 東京
- 佐藤知雄、阿座上和子、新谷奈津美、高橋克典、宇都宮與、久保田龍二、山野嘉久：HTLV-I 関連疾患における invariant NKT 細胞の量的・機能的異常。第2回 HTLV-I 研究会。2009年8月 東京
- 児玉大介、久保田龍二、出雲周二：HTLV-I 関連脊髄症 (HAM/TSP) における RNA マイクロアレイ解析による検討。第2回 HTLV-I 研究会。2009年8月 東京

星野洪郎

- 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
- 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

- 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.
- 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.
- 清水宣明, 大上厚志, 田中淳, 森隆久, Islam Salequl, 星野洪郎. HIV コレセプター活性を持つ G タンパク質共役受容体の分子系統関係の特徴. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 2009, 東京
- 森隆久, 清水宣明, 大上厚志, 田中淳, 星野洪郎. HTLV-I の cell-free 感染を高感度に検出する実験系の確立. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 2009, 東京

中村龍文

- 中村龍文. HTLV-I 関連脊髄症における新規治療法—アポトーシスによる HTLV-I 感染細胞標的治療の試み—. シンポジウム (1) 炎症・自己免疫・臓器障害とアポトーシス. 第18回日本アポトーシス研究会学術集会. 2009年8月. 長崎.

齊藤峰輝

- 第50回日本神経学会総会 2009, 5. 仙台 齊藤峰輝、斎藤孔良、大原義朗：HAM, ATL 治療標的候補分子 Bc1-3 の HTLV-1 感染による高発現機構の解析と制御法の検討
- 第49回日本リンパ網内系学会総会 2009, 7. 淡路 齊藤峰輝：シンポジウム「ATL と HTLV-1 研究の最前線」HAM/TSP の病態
- 第2回 HTLV-1 研究会・合同班会議 2009, 8. 東京 齊藤峰輝、田中礼子、松崎敏男、梅原藤雄、田中勇悦：HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) における OX40 陽性 T 細胞の意義
- 第57回日本ウイルス学会学術集会 2009, 10. 東京 齊藤峰輝、田中礼子、田中勇悦：HTLV-1 関連脊髄症 (HAM/TSP) における OX40 陽性 T 細胞の意義

II. 分 担 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）
（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

ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (human T-cell leukemia virus type-I: HTLV-I) の感染性は非常に低く、HTLV-I 粒子 (cell-free HTLV-I) を用いた感度のよい感染実験系がないので、その確立を目指した。ネコ由来の 8C と PG-4 細胞が産生する HTLV-I の感染性が高いことを見つけた。8C 細胞では、HTLV-I 感染の関係する転写経路がヒト細胞と比べて活性化していた。8C 細胞に *tax1* 遺伝子を導入したところ、CREB/ATF 経路がさらに活性化され、HTLV-I を感染させると、ウイルス mRNA の合成、ウイルス抗原の産生、合胞体の形成、および感染性の子孫ウイルスの産生の促進が観察された。*tax1* 遺伝子を導入した 8C 細胞は、HTLV-I のウイルス学的性質を解析するために有用である。

A. 研究目的

HTLV-I は、成人 T 細胞白血病 (adult T-cells leukemia: ATL) や HTLV-I 関連脊髄症/熱帯性痙性対麻痺 (HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: HAM/TSP) の原因ウイルスである。HTLV-I のウイルス学的性質の理解は、ATL や HAM/TSP の発症メカニズムの解明や発症予防法の確立に重要だが、ヒト細胞への感染性や増殖性が低いために困難である。そのため、HTLV-I 産生細胞と非感染細胞を混合培養して解析する方法が用いられてきた。しかし、この方法ではウイルスそのものの性質を知ることはできない。

我々は、ネコ腎由来 S+L-CCC (8C) 細胞が HTLV-I に対する感染感受性が高く、HTLV-I の持続感染が起きることを報告した。本研究では、HTLV-I の *tax 1* 遺伝子を 8C 細胞に導入し、ウイルス抗原の産生、合胞体の形成、子孫ウイルスの産生など、HTLV-I の生活環を高感度に検出できる実験系の確立することを目的とした。

B. 研究方法

ネコ由来 (8C、PG-4、G355-5) やヒト由来 (HOS、U-251MG、MOLT-4、Jurkat) 細胞を HTLV-I 感染標的細胞とした。8C/Mel5 細胞、8C/2M 細胞、および PG-4/MT-2 細胞を HTLV-I 産生細胞とした。HTLV-I 産生細胞の

培養上清をウイルスサンプルとして用いた。培養上清中の HTLV-I については、ELISA 法で Gag p19 タンパク質を定量した。

310 と 311 番目のアミノ酸に置換を持つ変異型 Tax1 (Tax410) と、130 と 131 番目のアミノ酸に置換を持つ TaxM22 を 8C 細胞に導入した。細胞における転写因子 CREB/ATF、NF- κ B、および SRF 依存転写活性は、p21x5-Luc、pNF- κ Bx4-Luc、および pCarG-Luc レポータープラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイで定量した。

8C 細胞 (5 万個) をシャーレ (35 mm) にシードして 24 時間後に HTLV-I を曝露し、2、4、および 6 日後に HTLV-I 感受性を解析した。細胞の HTLV-I 感染感受性や子孫ウイルスの産生、および HTLV-I の mRNA 発現は、形成された合胞体数の算定、間接蛍光抗体法による細胞の HTLV-I 抗原発現検出、あるいは PCR 法による gag 遺伝子 DNA の増幅などで調べた。HTLV-I 感染に対する抗ウイルス剤 (AZT) や HTLV-I キャリア血清の影響を調べた。

C. 研究結果

HTLV-I 持続感染 T 細胞との混合培養で、8C、PG-4、および HOS 細胞で持続感染が成立した。8C 細胞の CREB/ATF、NF- κ B、および SRF に依存した転写活性は、HOS や U-251MG 細胞より数十から数百倍高かった

(図 1A)。Tax1 の発現量をウエスタンブロット法で検討すると、ほぼ同量が検出された (図 1B)。

8C/TaxWT と 8C/TaxM22 細胞の CREB/ATF 依存転写活性は、親細胞 8C と 8C/Tax410 細胞よりも高かった (図 1C)。NF- κ B と SRF 経路依存の転写活性は、8C と 8C/TaxTW 細胞とで差はなかった。

8C、8C/TaxWT、8C/TaxM410、および 8C/TaxM22 細胞に Mel5、2M、あるいは MT-2 株の HTLV-I を曝露すると、8C/TaxWT と 8C/TaxM22 細胞では 8C と 8C/Tax410 細胞よりも多くの合胞体が 6 日後に形成された (図 2A)。2M や MT-2 株が感染した細胞では、Mel5 株よりも大きな合胞体が形成された (図 2B)。2M や MT-2 株が感染した細胞では 10 核以上の合胞体が多く形成されたのに対し、Mel5 株が感染した細胞では 10 核以下が多かった (図 2C)。上清中のウイルス量に差はなかった (図 3)。

8C/TaxWT 細胞を AZT で処理後に HTLV-I を感染すると、0.01 μ g/ml でプラック数が減少しはじめ、1 μ g/ml でプラック形成は完全に阻止された (図 4A)。また、8C/TaxWT 細胞を HTLV-I 感染者血清で処理すると、0.004% でプラック数が減少し、0.5% でプラック形成は完全に中和された (図 4B)。

HTLV-I を感染させると、8C/TaxWT や 8C/TaxM22 細胞では、8C や 8C/Tax410 細胞よりも多くのウイルス抗原陽性細胞が IFA 法で検出された。Mel5 感染後のウイルス抗原陽性細胞の占める割合は、6 日後に 8C/TaxWT あるいは 8C/TaxM22 細胞で約 30%、8C と 8C/Tax410 細胞で 5% 以下であった (図 5A と 5B)。

8C と 8C/TaxWT 細胞に HTLV-I を曝露した後に培養上清を回収し、再び 8C 細胞に曝露すると、8C/TaxWT 細胞では、8C 細胞よりも多くのウイルス DNA が検出された (図 5C)。

8C、8C/TaxWT、8C/Tax410、および 8C/TaxM22 細胞に連続 5 倍希釈した HTLV-I を感染し翌日、形成されたウイルス DNA を PCR 法で検出すると、ほぼ一定量のウイルス DNA が検出された (図 6A)。

8C と 8C/TaxWT 細胞に Mel5 株の HTLV-I

を曝露し、48 時間後の env 遺伝子発現を RT-PCR 法で検出したところ、8C/TaxWT 細胞では 8C 細胞よりも 5-25 倍高かった (図 6B)。

D. 考察

8C や PG-4 細胞では、がん遺伝子の v-mos があるため、HTLV-I 感染による細胞増殖の抑制がかからないので、持続感染が成立しやすいのかもしれない。8C/TaxWT や 8C/TaxM22 細胞では HTLV-I LTR の CREB/ATF に依存した転写経路が活性化しているため、HTLV-I の侵入後に、効率よくウイルス RNA が転写される可能性が考えられた。

HTLV-I の感染実験を効果的に行なうためには、高い感染性のウイルス粒子を産生する HTLV-I 持続産生細胞を準備する必要がある。8C 細胞の産生する HTLV-I は、ヒト由来の細胞より感染性が高かった。ヒト細胞ではウイルス産生が二次的に抑制されている可能性がある。

Tax1 を発現させた 8C 細胞では効率よく合胞体が形成されたことから、HTLV-I が感染した 8C/TaxWT や 8C/TaxM22 細胞では、効率よくウイルス RNA が転写され、ウイルス抗原発現も増加したと考えられる。8C と 8C/TaxWT 細胞で合胞体形成に顕著な差はなかったため、8C/Tax 細胞での合胞体形成の促進は、HTLV-I 外被タンパク質の発現亢進によると考えられる。

今回、8C/Mel5、8C/2M、PG-4/MT-2 細胞を 3 株の HTLV-I 産生細胞として用いたが、Mel5 株は感染性は強いが小さな合胞体しか誘導できず、MT-2 株は感染力は強くないが大きな合胞体誘導能を示した。この違いは、HTLV-I 株間での外被タンパク質の性質の違いに依存するものと考えられる。これらの結果は、HTLV-I 株間でウイルス学的性質に差があることを示している。

E. 結論

8C 細胞に tax1 遺伝子を導入した 8C/TaxWT 細胞を用いることで、cell-free HTLV-I の感染後、ウイルス抗原の産生、HTLV-I による合胞体の形成、あるいは子孫

ウイルスの産生など、ウイルス感染の後期過程を検出することが可能となった。また、HTLV-I 感染者から容易に HTLV-I が分離でき、色々の HTLV-I のウイルス学的性質や病原性の解明がしやすくなる可能性があると考えている。

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, and T. Hattori. Characterization of a CD4-independent clinical HIV-1 that can efficiently infect human hepatocytes through CXCR4. *AIDS* 22: 1749-1757, 2008.
5. Shimizu, N., A. Tanaka, A. Oue, T. Mori, T. Ohtsuki, C. Apichartpiyakul, H. Uchiyama, Y. Nojima, and H. Hoshino. (2009). Broad usage spectrum of G protein-coupled receptors as coreceptors by primary isolates

of human immunodeficiency virus Article type. *AIDS* 23:761-769..

6. Nedellec, R., M. Coetzer, N. Shimizu, H. Hoshino, V. R. Polonis, L. Morris, U.E. Mårtensson, J. Binley, J. Overbaugh, and D.E. Mosier. (2009) Virus entry via the alternative coreceptors CCR3 and FPRL1 differs by human immunodeficiency virus type 1 subtype. *J. Virol.* 83:8353-8363.
 7. Jinno-Oue, A., N. Shimizu, S. Hamada, A. Wada, A. Tanaka, Shinagawa, T. Ohtsuki, T. Mori, M. Saha, A. S. Hoque, S. Islam, K. Kogure, T. Funayama, Y. Kobayashi, and H. Hoshino. (2009) Irradiation with carbon ion beams induces apoptosis, autophagy, and cellular senescence in a human glioma-derived cell line. *Int.J. Rad. Oncol.* In press.
 8. Shimizu, N., A. Tanaka, A. Jinno-Oue, T. Mori, T. Ohtsuki, and H. Hoshino. (2009) Identification of the conformational requirement for the specificities of coreceptors for human and simian immunodeficiency viruses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. In press.
- ##### 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 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.

- 清水宣明, 大上厚志, 田中淳, 森隆久, Islam Salequl, 星野洪郎. HIV コレセプター活性を持つGタンパク質共役受容体の分子系統関係の特徴. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 2009, 東京
- 森隆久, 清水宣明, 大上厚志, 田中淳, 星野洪郎. HTLV-I の cell-free 感染を高感度に検出する実験系の確立. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 2009, 東京

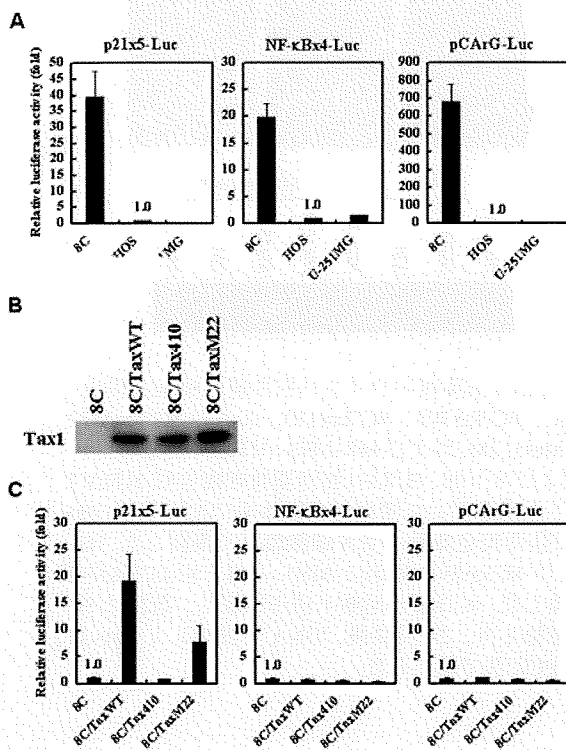


図1. ネコおよびヒト細胞のHTLV-I LTR 関連の転写活性. (A) 8C, HOS および U-251MG 細胞における CREB/ATF, NF-κB および SRF 依存転写活性を、p21x5-Luc, pNF-κBx4-Luc, および pCARg-Luc プラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイで定量した。細胞にそれぞれのプラスミドを導入して 24 時間後のルシフェラーゼ活性を測定し、HOS 細胞との相対値で表した。(B) Tax1 の発現を抗 Tax1 モノクローナル抗体を用いたウェスタンブロット法で検出した。(C) CREB/ATF, NF-κB および SRF 依存転写活性を、p21x5-Luc, pNF-κBx4-Luc, および pCARg-Luc プラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイで定量した。プラスミドを導入して 24 時間後のルシフェラーゼ活性を測定し、8C 細胞に対する相対値で表した。

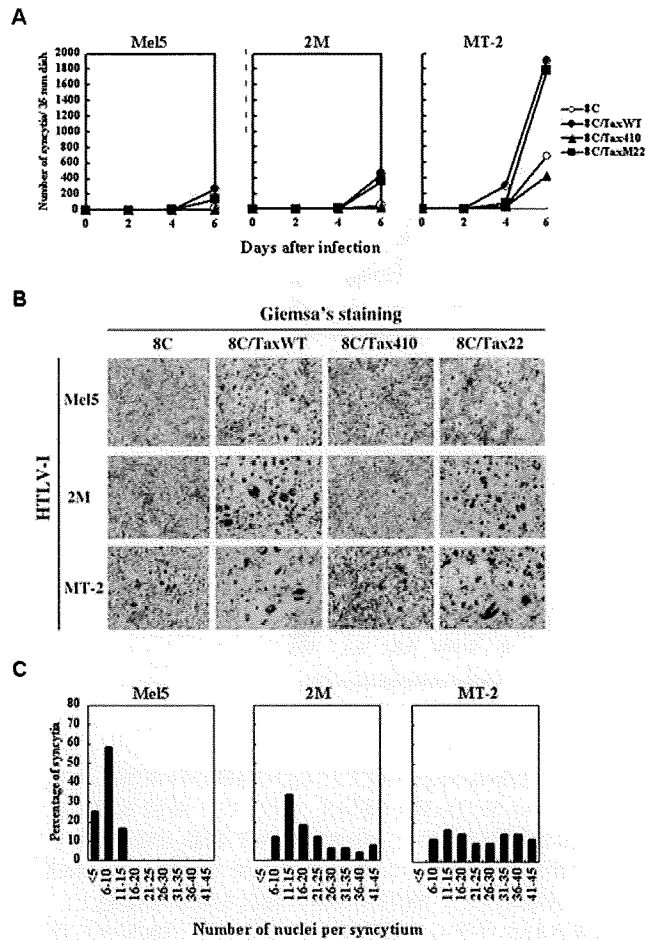


図3. HTLV-I 感染後の合胞体形成. 8C, 8C/TaxWT, 8C/TaxM22, および 8C/TaxM10 細胞に Mel5, 2M, および MT-2 株の HTLV-I を感染し、2, 4, および 6 日後にメタノール固定してギムザ染色した。(A) 10 以上の核をもつ合胞体を算定した。(B) 感染 6 日後に染色細胞を光学顕微鏡で撮影した。(C) 各合胞体中の核数のヒストグラムを作成した。

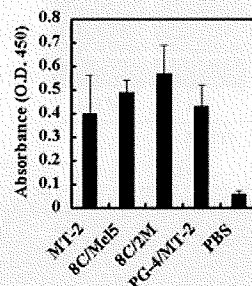


図2. HTLV-I 持続感染細胞の培養上清中の HTLV-I 抗原. MT-2, 8C/Mel5, 8C/2M, および PG-4/MT-2 細胞を日間培養し、上清中のウイルス抗原を抗 Gag p19 モ

ノクローナル抗体を用いた ELISA 法で検出した。

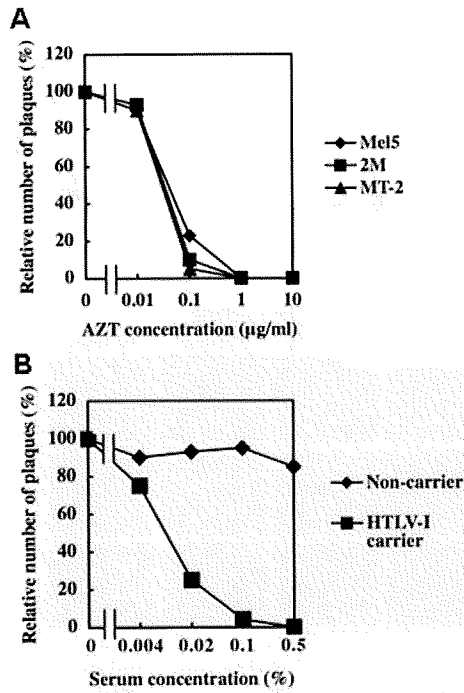


図4. 合胞体形成のAZTおよび抗HTLV-I血清による抑制。(A) 8C/TaxWT 細胞をAZTで3時間処理後にHTLV-Iを感染させた。(B) 8C/TaxWT細胞HTLV-Iキャリア血清あるいはノンキャリア血清で処理してMel5株を感染させた。感染6日後、細胞をギムザ染色し、形成されたブラック数をコントロールを100%とした相対値で表した。

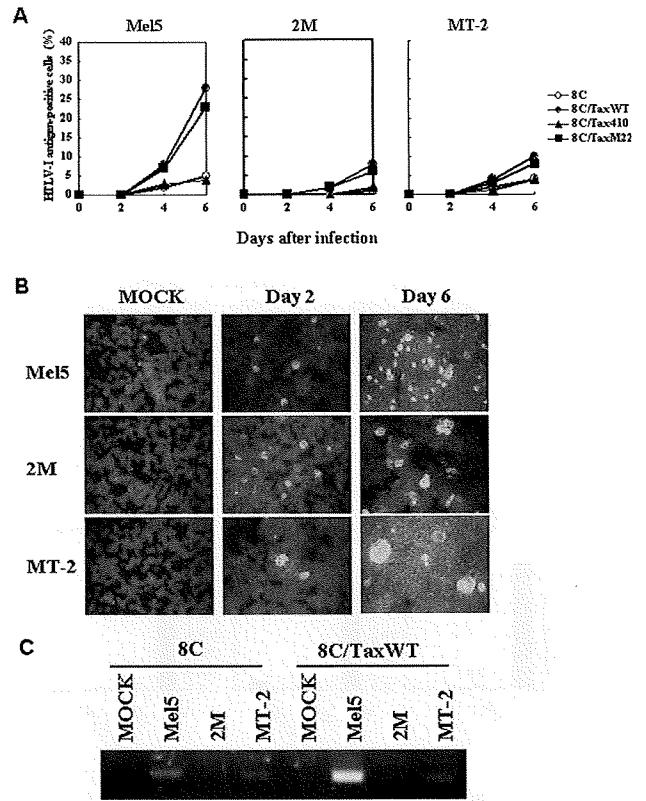


図5. HTLV-I感染後のウイルス抗原陽性細胞の検出 (A) 8C、8C/TaxWT、8C/Tax410、および8C/TaxM22細胞にMel5、2M、およびMT-2株のHTLV-Iを感染し、2、4、および6日後、HTLV-I抗原陽性細胞を抗-HTLV-I陽性ヒト血清を用いた間接蛍光抗体法で検出した。(B) 感染6日後の染色細胞を蛍光顕微鏡下で撮影した。(C) 8Cおよび8C/TaxWT細胞にMel5、2M、およびMT-2株を感染した。6日後の培養上清を回収し、新たに8C細胞に感染した。24時間後、DNAを抽出してgag遺伝子をPCR法で検出した。

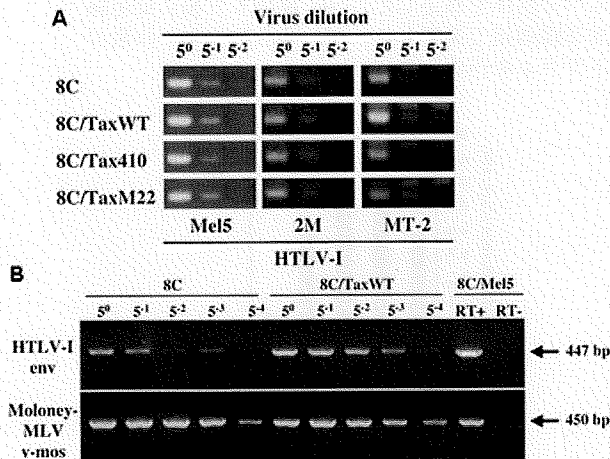


図6. HTLV-I感染後のウイルスDNAおよびmRNAの産生 (A) 8C、8C/TaxWT、8C/Tax410、および8C/TaxM22細胞にMel5、2M、およびMT-2株のHTLV-Iを感染し、24時間後に細胞を溶解してgag遺伝子DNAをPCR法で検出した。(B) 8Cおよび8C/TaxWT細胞にMel5株を感染し、48時間後も細胞RNAを抽出してRT-PCRによりenv遺伝子を検出した。8C/Mel5細胞のRNAおよび8C細胞に含まれるMoloney MSVのv-mos遺伝子をコントロールとした。RT(+), 逆転写あり; RT(-), 逆転写なし。

厚生労働省科学研究費補助金（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」
分担研究報告書

HTLV-1 の細胞内侵入における細胞膜 HSC70 の役割について

研究分担者 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 の細胞内侵入は、gp46 蛋白の Asp197 から Leu216 の領域（gp46-197）と 71Ka 常在性熱ショック蛋白（HSC70）が結合することで、細胞膜融合を惹起し、成立する。筆者らは、この gp46-197 ペプチド領域に対する抗体が HTLV-1 感染による ATLL や HAM の発症ともに、患者血清中に出現し、しかもその発現頻度および抗体量が病態の進行と平行して増加することを見出した。また抗体エピトープ構造は gp46 の Pro205 から Lys209 の領域で、そのアミノ酸配列中に Lys または Arg などの塩基性アミノ酸残基を含むことが特徴であった。このようなエピトープ構造はシャペロン分子としての HSC70 のペプチド結合部位が識別するペプチド断片のアミノ酸配列の特異性と良く一致する結果であった。これらの結果は、HSC70 分子と gp46-197 ペプチド領域との相互作用がウイルス感染後のウイルス活動期に特徴的に機能し、ウイルスの伝播、病態の発現と密接に関連していることを示していた。

A. 研究目的

エンベロープを持つウイルスは、標的とする細胞膜上の受容体と結合し、それで誘導される細胞膜融合を介して、細胞内に侵入する。この膜融合過程は大きく 2 つのクラスに分類されている、1 つは pH 非依存的な膜融合過程であり、他は酸性 pH 依存的な膜融合過程である。HTLV-1 の細胞内侵入は前者の過程を経る。いずれの膜融合過程であっても、受容体結合後に惹起されるエンベロープにある膜貫通型の膜融合蛋白の構造変化は必須の過程である。これまでに報告された膜融合蛋白の大半は受容体結合能を具有し

ており、単独で吸着と膜融合を媒介している。近年、この膜融合蛋白の構造変化は個々のウイルスに特有の過程を経ることが明らかになり、この膜融合蛋白の構造変換過程が新たな抗ウイルス感染症治療薬開発の重要な分子標的として注目を集めている。

これまで、筆者らは HTLV-1 外皮蛋白上による膜融合を介したウイルスの細胞内侵入に寄与する 3 箇所のペプチド領域（gp46-111, gp46-197 および gp21-400）を明らかにしている。このうち、gp46-197 ペプチド領域（gp46 の Asp197 から Leu216 の領域）はエンベロープ蛋白の重

要な機能ドメイン proline-rich domain (PRD) に存在し、ウイルスの標的細胞膜受容体への吸着後に起こる膜融合蛋白の構造変化に関与すると考えられていた。さらに、この領域は標的細胞膜上の 71Ka 常在性熱ショック蛋白 (HSC70) と相互作用する領域でもあった。これらのことは、gp46-197 ペプチド領域と HSC70 との相互作用がウイルスの細胞内侵入に必須の膜融合蛋白の構造変化に寄与している可能性を示していた。

そこで、本研究では、gp46-197 領域と HSC70 との相互作用の分子基盤を解析し、HSC70 分子のウイルス感染における役割について述べる。

B. 研究方法

ペプチド合成 HTLV-I、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; 1.77×10^8) 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、その反応物を回収した。

ファージペプチド配列の解析 回収したファージクローンの DNA を抽出し、それを用いてエピトープを解析した。その確認はウエスタンブロットにて行った。DNA 解析には ABI PRISM 3100Genetic Analyzer (Applied Biosystem) を用いた。

倫理面等への配慮

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と考える。

C. 研究結果

gp46-197 ペプチド領域の蛋白化学的特徴:

gp46-197 ペプチド

(DHILEPSIPWKSLLTLVQL) はエンベロープ蛋白の PRD の C 末端に位置し、標的細胞膜の HSC70 分子と相互作用することで、HTLV-1 の感染細胞からの標的細胞への移行に寄与している。そこで、gp46-197 ペプチドと HSC70 の相互作用の分子基盤を探るため、筆者らはペプチドの全領域を網羅し、さらにそれぞれのペプチド末端の 3 アミノ酸残基長を重複させた 16 種の 10mer~12mer ペプチドを用いて、このペプチドによるシンシチア形成阻害活性に必須のペプチド構造を解析した。

その結果は表 1 に示す。ウイルスの細胞内移行に関与する構造はペプチド N 末端の 197Asp から 205Pro の領域