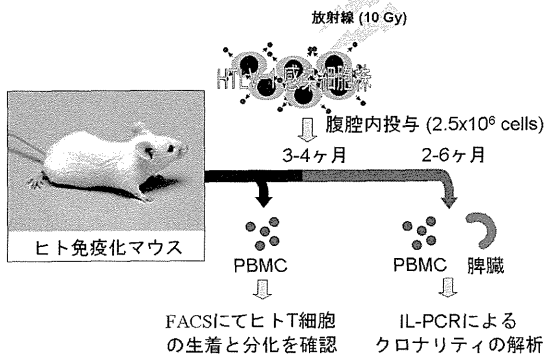


の定着を確認しヒト化マウスを作製した。さらに3ヶ月後（骨髄移植4ヶ月後）に、作製したヒト化マウス腹腔内へ HTLV-1 感染細胞である MT-2 細胞を放射線処理後接種し、マウス体内に定着したヒトリンパ球へ HTLV-1 の感染を行った。HTLV-1 を感染させた後一定期間において、その感染ヒト化マウスより末梢血や脾臓を採取し、PBMC を密度勾配遠心法にて分離した（図1）。

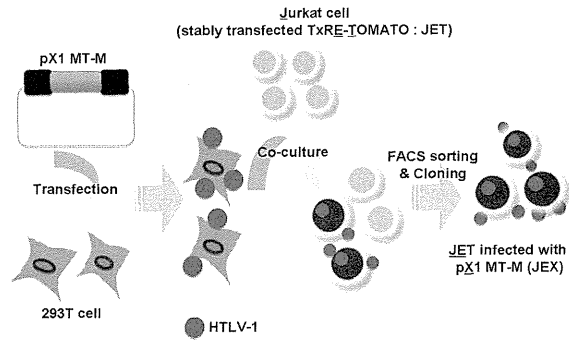
図1. ヒト免疫化マウスへのHTLV-1感染



3) HTLV-1 細胞株 (JEX) の作製

抗ウイルス剤 (IFN α) の効果を検証する際に、MT-2 細胞は defective virus を多数含み且つ HTLV-1 の感染効率が極めて高いことが問題となったため (data not shown)、defective virus を含まず感染能も比較的 mild な HTLV-1 感染細胞株 (JEX) の樹立を行った。まず、HTLV-1 非感染細胞株である 293T 細胞に pX1 MT-M (HTLV-1 molecular clone) を Transfection し intact な HTLV-1 を産生する HTLV-1 産生 293T 細胞を作製した。次に、Jurkat 細胞に TxRE-TOMATO plasmid を Transfection し、TxRE-TOMATO を定常発現する cell line (JET) を作製し、先に作製した HTLV-1 産生 293T 細胞と共培養した。共培養にて JET に HTLV-1 を感染させ、HTLV-1 感染 JET (JEX) を作製し、FACS にて sorting した後、limiting dilution にてクローンを樹立した (図2)。樹立されたクローンを FACS 及び PCR にて screening し、HTLV-1 を single clone 含み感染効率の高い株を選定し、以後の実験に用いた。

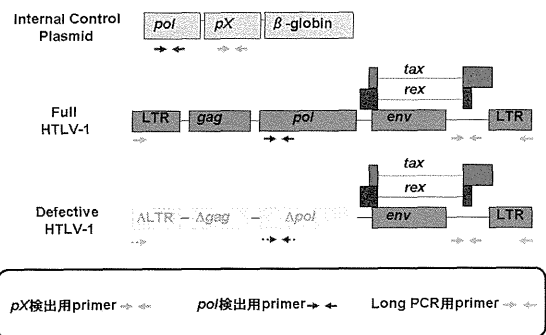
図2. HTLV-1細胞株 (JEX)の作製



4) 定量的 PCR

分離された PBMC からはゲノム DNA をカラム法 (PureLink Genomic DNA Mini Kit: Invitrogen) にて分離し、HTLV-1 tax/rex 領域を標的とした TaMan Probe 法による定量的 PCR (MyiQ®: Bio-Rad) を行った。Internal Control として human β -globin を標的とした定量的 PCR も行い、PBMC における HTLV-1 プロウイルスの定量を行った。Defective virus の比率の算出に際しては、HTLV-1 pol 領域を標的とした定量的 PCR も行った。定量 PCR の standard としては、HTLV-1 tax/rex 領域と pol 領域及び β -globin が 1 copy ずつ直列に配列した plasmid を新たに作製し用いた。昨年は、defective virus 算出用の primer を pol 領域の下流にセットしており、頻度が高いとされるより上流域 (gag-pol 領域) での欠損は検証できなかったため、primer をより上流へセットしなおした。さらに、LTR 領域にも新たに内向きに primer をセットし全長の HTLV-1 の検出を行い、defective virus の有無を多角的に検証した (図3)。

図3. Defective Virus検出のPrimer Setting



5) 定量的 RT-PCR

磁気ビーズ (CD4⁺ T cell Isolation Kit II、CD8⁺ T cell Isolation Kit II: MACS) を用いて

ヒト PBMC より CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を分離し、カラム法 (RNeasy Mini Kit: QIAGEN) にて total RNA を抽出した。Random hexamer を用いて Total RNA から cDNA を作成した後、HTLV-1 *tax/rex*、HTLV-1 *hbz*、*dnam-1*、*lfa-1* 及び *tslc1* を標的とした SYBR Green 法 (SsoFast EvaGreen Supermix: Bio-Rad) による定量的 RT-PCR (MyiQ®: Bio-Rad) を行った。Internal Control として *hprt* を標的とした定量的 RT-PCR も行い、各細胞分画における HTLV-1 *tax/rex*、HTLV-1 *hbz*、*dnam-1*、*lfa-1* 及び *tslc1* mRNA の発現量を測定した。

6) IL-PCR によるクロナリティの解析

抽出 DNA を制限酵素 Pst1 にて切断し、self ligation の後、制限酵素 Mlu1 にて処理した。その後、HTLV-1 LTR より外向きに primer をセットして PCR を行い、電気泳動にて感染細胞のクロナリティを評価した。また、電気泳動にて特に濃いバンドが検出された部位よりゲルを切り出し、同部位の PCR product を精製した後に TA cloning を行い、HTLV-1 挿入部位の sequence を解析した。解析された sequence を基に primer を設計し、定量 PCR を行いメジャークローンの占拠率の算出を行った。

7) FACS

蛍光標識された各種抗体 (抗ヒト CD4、抗ヒト CD8、抗ヒト CD25、抗ヒト CCR4、抗ヒト TSLC1) を用いてフローサイトメトリー (BD FACSCanto™ II: BD) を行い、PBMC のフェノタイプを解析した。

8) 動物モデルへの INF α 投与

作製されたモデルマウスに対して、HTLV-1 感染開始 2 週もしくは 3 週後から、皮下注にて 3000U の INF α (スミフェロン: 大日本住友製薬) を 2 週間連日投与した。INF α 投与前、投与終了直後、投与終了 2 週間後、及び投与終了 4 週後にマウス尾静脈より末梢血を採取しサンプルとして用いた。対照群については同量の PBS を投与し、同様の実験を行った。

(倫理面への配慮)

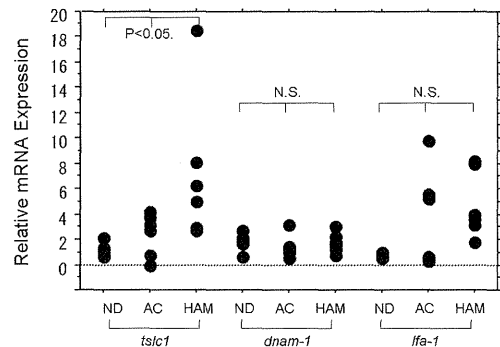
HAM 患者、無徴候性 HTLV-1 感染者、ATL 患者よりの臨床検体採取は、関西医科大学医学倫理委員会のガイドラインに則り十分なインフォームドコンセントのもとに行われ

た。同意取得に当たっては、本学及び診療機関における倫理委員会の承認 (関医倫第 0708 号「HTLV-1 関連脊髄症のリスクファクター及び病態解明に関する研究」) を受けた同意説明文書を用いて、担当医師から研究の目的、方法、プライバシーに関する遵守事項、被験者の人権保護など必要な事項について十分に説明し、被験者の自由意思による同意を文書で得た。提供された検体は、連結可能匿名化を行い被験者のプライバシー保護を厳重に図られた。動物実験については、関西医科大学動物実験委員会に実験計画を申請し、審査の後承認を受けた (承認番号 20-014)。

C. 研究結果

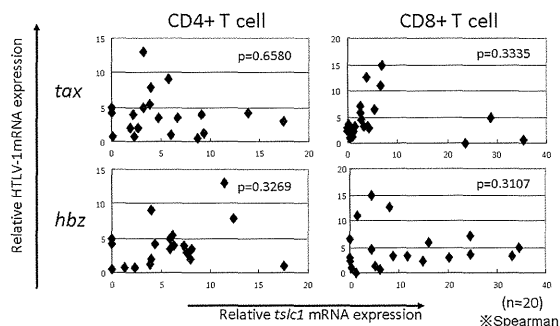
① TSLC1 の解析

図4. CD4陽性T細胞における *tslc1*, *dnam-1*, *lfa-1* 発現量の群間比較



CD4 陽性 T 細胞においては、HAM 患者では無徴候性 HTLV-1 感染者 (Asymptomatic carrier: AC) や非感染者 (Normal Donor: ND) と比べて *tslc1* が高値であった。*lfa-1* は感染者群 (HAM 及び AC) で ND と比べて発現亢進が認められたが、感染者群間では有意差がなかった。一方 *dnam-1* は 3 群間で有意差が認められなかった (図 4)。

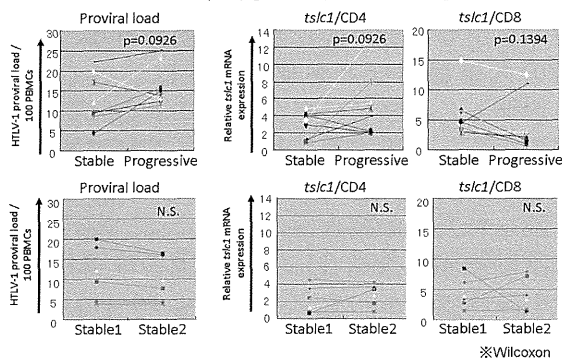
図5. HTLV-1 感染者における *tslc1* 発現量と *tax* 及び *hbz* の発現量との相関



CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞のいずれにおいても、*tslc1* と HTLV-1 *hbz* 或いは

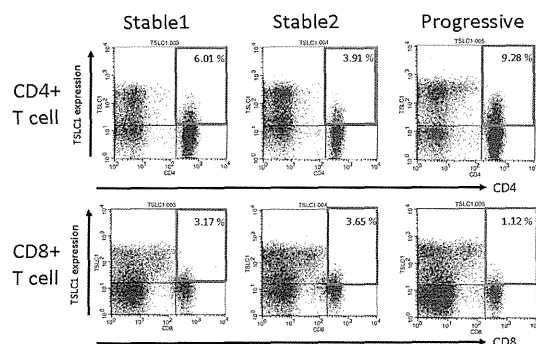
tslc1 と HTLV-1 *pX(tax/rex)* 発現量に有意な相関は認められなかった (図 5)。

図6. HAM患者におけるプロウイルス量と *tslc1* 発現量の経時的観察



TSLC1 の疾患活動性のバイオマーカーとしての有用性をさらに確かめるために、同一患者の疾患活動性の高い時期と低い時期の *tslc1* の発現を測定し、同時にプロウイルス量も測定し比較検討を行った。プロウイルス量は疾患活動性の高い時期に上昇していたが (10 名中 8 名)、*tslc1* については、CD4 陽性 T 細胞では上昇傾向にある一方で (10 名中 7 名)、CD8 陽性 T 細胞では低下傾向が認められた (10 名中 7 名) (図 6 上段)。症状が安定している時期はいずれの発現も安定しており一定の傾向は認められなかった (図 6 下段)。

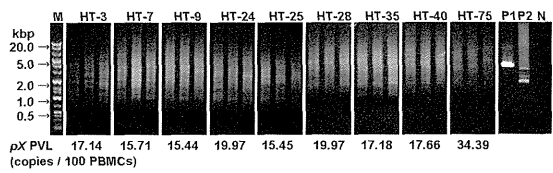
図7. 代表的なHAM患者における細胞表面 TSLC1分子発現量の経時的観察



TSLC1 は細胞表面に発現する接着分子であるため、蛋白レベルでの動態を確かめるため FACS での解析も行った。結果としては mRNA の解析と同様で、疾患活動性の高い時期に、CD4 陽性 T 細胞では発現が上昇傾向にある一方で、CD8 陽性 T 細胞では低下傾向が認められた (図 7)。

②HTLV-1 高プロウイルス量発現病態の解析と INF α の有効性の検討

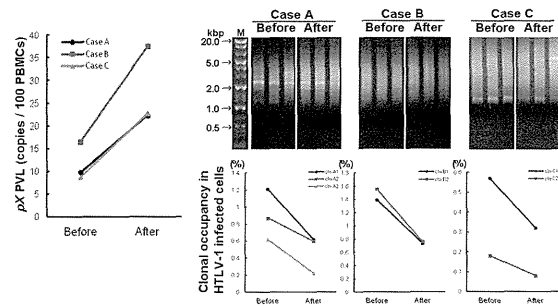
図8. HAM患者PBMCにおけるHTLV-1感染細胞のクロナリティ



M: molecular weight marker
N: HTLV-1 negative individual
P1: acute ATL patient (100 pX copies / 100 PBMCs)
P2: smoldering ATL patient (20.5 pX copies / 100 PBMCs)

プロウイルス量が 15% を超える HAM 患者について、PBMC における感染細胞のクロナリティの解析を行った。ATL 患者検体では明瞭なバンドが検出され感染細胞のオリゴクローナルな増殖が確認されたが、HAM 患者では全例で明瞭なバンドが検出されず、感染細胞はポリクローナルな集団であることが示された (図 8)。

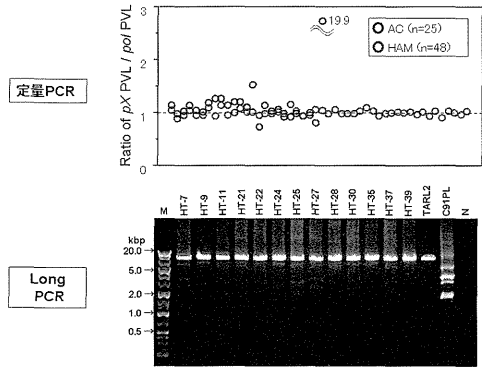
図9. 感染細胞のクロナリティと特定クローンの感染細胞全体における占拠率の推移



follow up 中に HTLV-1 プロウイルス量が大きく上昇した 3 症例について、IL-PCR を応用した定量 PCR にて、メジャークローンの感染細胞全体に対する占拠率の推移について解析した。3 例全例において、メジャークローンの占拠率は、プロウイルス量の上昇時に逆に低下しており、プロウイルス量の上昇の原因はメジャークローン以外の感染細胞の増加であることが示された (図 9 下段)。一方、プロウイルス量が大きく上昇した前後で感染細胞のクロナリティの解析を行ったが、全例で明瞭なバンドが検出されなかった。これは、プロウイルス量の上昇時に特定のクローンの増殖が主因であることを否定していると思われた (図 9 上段)。以上の結果から、プロウイルス量の上昇の機序として de

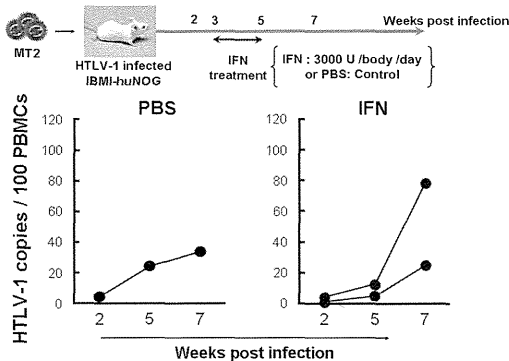
novo 感染が疑われた。

図10. PBMCでのdefective virusの検出



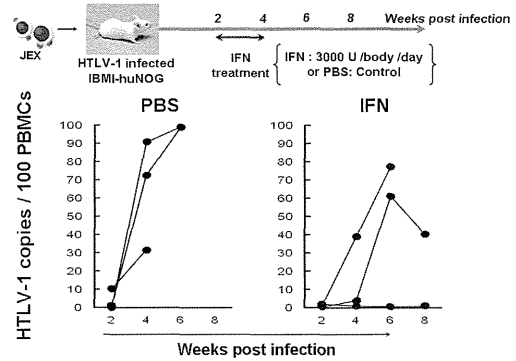
プロウイルス量が5%を超える感染者について、defective virusの検出を行った。一部の無徴候性 HTLV-1 感染者(AC)では pX/poL 比が大きく1を超えており(25名中2名)、defective virusの存在が確認された。一方で HAM 患者では今回測定した全例(48名中48名)で poL と pX の測定値はほぼ同値であった(図10上段)。プロウイルス量が15%を超える HAM 患者について、全長 HTLV-1 の検出を行ったが、全例で full length 以外の HTLV-1 はほとんど検出されず(図10下段)、HAM 患者では defective virus がほとんど存在しないことが示唆された。

図11. マウスモデル(MT2)でのIFNの効果



MT-2 細胞を用いたマウスモデルにおいて、INF α 投与群と PBS 投与群間で HTLV-1 プロウイルス量の推移の差はほとんど認められなかった(図11)

図12. マウスモデル(JEX)でのIFNの効果



JEX 細胞を用いたマウスモデルにおいては、PBS 投与群に比べて INF α 投与群で HTLV-1 プロウイルス量の上昇率が鈍化しており、INF α の感染細胞の増殖抑制効果が示唆された(図12)。

D. 考察

CD4 陽性 T 細胞においては HAM 患者で *tslc1* の発現亢進が認められ、疾患活動性の高い時期により上昇する傾向にあった(図4、図6)。プロウイルス量も同様に全体では上昇傾向にあったが(図6)、個別の患者を観察すると、プロウイルス量の低下している症例で *tslc1* の発現亢進が認められたり、逆にプロウイルス量の上昇している症例で *tslc1* の発現低下が認められたりする症例もあり(図6)、必ずしもプロウイルス量と同期はしていなかった。この事実は *tslc1* の発現はプロウイルス量とは独立していることを示唆していると思われる。

LFA-1 は TSLC1 と同じく接着分子の1つで、HTLV-1 感染細胞株での発現上昇が知られているため、対照として *lfa-1* の発現解析を行ったが、感染者間では有意差が認められなかった(図4)。また、DNAM-1 は LFA-1 の共役分子として知られており、炎症性の自己免疫性疾患である SLE の疾患活動性の指標となるとの報告があったため、*dnam-1* についても解析したが、有意差は認められなかった(図4)。これらより、*tslc1* の発現亢進は疾患特異的であることが予想された。HTLV-1 *tax* や HTLV-1 *hbz* は trans activator としても知られており、*tslc1* の発現に直接の影響を与えている可能性があるため、*tslc1* の発現量と HTLV-1 *tax/rex* 或いは HTLV-1 *hbz* 発現量との間に相関関係があるかどうかの検討を行ったが、CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞のいずれにおいても有意な相関は

認められなかった(図5)。このことから、*tslc1* の発現量の変化はウイルス発現と独立していることが示唆された。これらの事実は *tslc1* が HAM の疾患活動性のバイオマーカーとして有用である可能性を示唆しているものと思われた。FACS による蛋白分子の解析でも同様の結果であり(図7)、TSLC1 分子の FACS 解析も有用であることが予想された。

Defective virus の検出・算出の実験では、HAM 患者では全例で *pol* と *tax* の測定値はほぼ同値であり、defective virus は極めて少ないことが示唆された(図10)。また、IL-PCR 法では明瞭なバンドが検出されず、感染細胞はポリクローナルであることが示された(図8)。一部の無徴候性 HTLV-1 感染者や ATL 患者では、クローナルな増殖をきたした HTLV-1 感染細胞で defective virus が検出されており、HAM 患者との相違点が認められた。defective virus は構造的に感染能を持たないと思われるため、感染細胞の増加にはクローナルな増殖が必要となる。故に、感染細胞のクローナルな増殖が認められる無徴候性 HTLV-1 感染者や ATL 患者で defective virus が検出されることは合理的と思われる。一方で、HAM 患者においては defective virus がほとんど検出されず、これは HAM では full length の virus が主体であることを示し、感染細胞がウイルスの産生・感染能を持つことを意味している。これらのことから、HAM 患者における高プロウイルス量の原因としてはウイルスの感染伝播が主体であることが疑われた。しかしながら、IL-PCR 法のみではポリクローナルな増殖を完全には否定できず、より精度の高い方法で検証するため、IL-PCR 法を応用した定量 PCR で感染細胞のクロナリティの変化を追跡した。メジャークロンの占拠率は、プロウイルス量の上昇と逆相関しており、プロウイルス量上昇時にも新たなバンドが検出されなかった(=オリゴクローナルな増殖は無い)ことから(図9)、前述と同様にプロウイルス量の上昇の機序としては de novo 感染が疑われた。

HTLV-1 プロウイルス量の上昇が de novo 感染によるものであれば、HAM の治療薬として抗ウイルス剤が有効であることを示唆するため、HTLV-1 感染モデルマウスにて INF α の有効性の評価を行うこととした。まず、MT-2 細胞を用いたマウスモデルにおいて投薬実験を行ったが、プロウイルスの低減効果

は得られなかった(図11)。その理由としてモデルの作製法に問題点が挙げられたため、新たに JEX 細胞を樹立しそれを用いたマウスモデルを作製した。この系では、PBS 投与群に比べて INF α 投与群で HTLV-1 プロウイルス量の低減効果が認められ(図12)、HAM 治療薬として抗ウイルス剤が有効である可能性が示された。

今回行った IL-PCR 法を応用した定量 PCR は一部のメジャークロンを解析したのみであるため、クロナリティ解析については未だ不十分であると考えられる。よって今後は次世代シーケンサーを用い大規模な解析を行い、高プロウイルス量の発生機序について詳細を詰めていく予定である。一方、動物モデルにおいても、INF α の抗ウイルス効果は感染細胞の増殖鈍化レベルであり、有効性の検証は不十分であったと思われる。よって今後は、よりウイルス増殖が mild なマウスモデルを作製し、再度検証を行う予定である。

E. 結論

TSLC1 の測定は HAM の疾患活動性の指標として有用である可能性が示唆された。

HAM 患者に認められる高プロウイルス量は、ウイルスの感染伝播が主体であることが疑われ、HAM の治療に抗ウイルス剤が有効であることが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表
特になし。

2. 学会発表
国内会議

1. 竹之内徳博、手塚健太、上野孝治、鄭 真美、中川正法、日下博文、藤澤順一: HAM 患者 PBMC における高 HTLV-1 プロウイルス量の発生機序についての検討: 第 53 回日本神経学会学術大会、2012,5,24 東京

2. 柘植彩子、和手麗香、金子鋭、隠岐光彬、長島正人、朝山真哉、藤田賢吾、齋藤朱美、竹之内徳博、日下博文: パーキンソン病、進行性核上性麻痺、多系統萎縮症における体重変化の検討: 第 53 回日本神経学会学術大会、2012,5,24 東京

3. 手塚健太、上野孝治、鄭 真美、荀潤澤、

- 田中正和、竹之内徳博、藤澤順一：IBMI-ヒト化マウスを用いた HTLV-1 感染マウスモデル：第 1 回 ATL シンポジウム、第 5 回 HTLV-1 研究会/シンポジウム、2012,8,25 東京
3. その他
特にない。
4. 竹之内徳博、佐藤輝明、手塚健太、中川正法、日下博文、藤澤順一：HAM 患者 PBMC における TSLC1 mRNA 発現と疾患活動性の関連：第 5 回 HTLV-1 研究会/シンポジウム、2012,8,26 東京
5. 齊藤祐美、高田礼子、菊池誠志、藤原一男、中川正法、竹之内徳博、永井将弘、吉良潤一、中村龍文、高嶋博、齊藤峰輝、渡嘉敷崇、法化図陽一、松崎敏男、出雲周二、山野嘉久：HAM 患者登録システム（HAM ねっと）の構築：第 5 回 HTLV-1 研究会/シンポジウム、2012,8,26 東京
6. 竹之内徳博、手塚健太、上野孝治、鄭 真美、中川正法、日下博文、藤澤順一：HAM 患者における高 HTLV-1 プロウイルス量の発生機序の解明：第 17 回日本神経感染症学会総会、2012,10,20 京都
7. 手塚健太、上野孝治、鄭 真美、荀潤澤、竹之内徳博、藤澤順一：HTLV-1 感染ヒト化マウスを用いた抗 ATL 治療法の評価：第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012,11,14 大阪
8. Teruaki Sato, Kenta Tezuka, Junichi Fujisawa, Masanao Miwa, Norihiro Takenouchi: Usefulness of Measurement of TSLC1 mRNA expression as a Biomarker for HTLV-1-associated Myelopathy.: HAM のバイオマーカーとしての TSLC1 mRNA 発現測定の有用性の検討：佐藤輝明、手塚健太、藤澤順一、三輪正直、竹之内徳博：第 35 回日本分子生物学会年会、2012,12,12 福岡

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。

Cell free HTLV-I の感染機構の解明による HAM の新規治療法の開発に関する研究

研究分担者 星野洪郎 群馬大学 客員教授

研究要旨

HAM 患者の末梢血の細胞は高率に HTLV-1 に感染している。このことが HAM 患者由来の HTLV-1 のウイルス学的な特徴で説明できるか、cell-free のウイルスを用いて検討した。すなわち、(1) HAM 患者由来の T 細胞株を用いてその HTLV-1 の感染性について検討した。細胞株により産生されるウイルスに感染性に差が見られた。(2) HTLV-1 の cell-free ウイルスとしての温度不安定性の機構について解析を行った。HTLV-1 の外被タンパク質は低温でも体温の温度でも、構造変化を起こし易く、失活し易く、HAM 由来のウイルスでも同様と考えられた。(3) HAM 患者の血清中の抗 HTLV-1 抗体について、他の病態のヒト (asymptomatic carrier や ATL) の抗体と比べ、HTLV-1 の感染を抑制する活性が弱いのか検討した。HAM 患者の血清は、HTLV-1 の侵入を抑制する抗体価や中和抗体価が高かった。HAM では他の病態と比べ抗 HTLV-1 抗体の中で感染抑制抗体の割合が少ないか検討したが差はなかった。以上の解析からは、HAM 関連の HTLV-1 の感染性や HAM 患者の血清の感染抑制効果について、HAM に特徴的な性質は認められなかった。

A. 研究目的

HAM の患者の末梢血単核球では、その 10-30%が HTLV-1 に感染していることもまれではない。このことは、1) HAM 患者に感染している HTLV-1 は、感染力が強いのか、あるいは 2) 患者体内でのウイルス伝搬を抑制する活性が弱いことが原因である可能性がある。すなわち、このような高い感染率がどうして生じているか、ウイルス学的に検討し、ウイルスの病原性の解明に繋げることが本研究の目的である。具体的には、次の 2 項目について検討する。(1) HAM 患者の脊髄液由来の T 細胞株に保持されているウイルスの感染性(感染力)を検討する。HAM 由来の HTLV-1 は、cell-free ウイルスとしての感染力、あるいは cell-to-cell の感染での感染力が強いのか、検討する。また、HTLV-1 は非常に脆弱なウイルスで短時間の低温での保温でも感染力を失う。HAM 患者由来の HTLV-1 にもそのような不安定性があるか検討する。一方、(2) HTLV-1 感染者の体内には、HTLV-1 の中和抗体が存在し、cell-free ウイルスの感染や cell-to-cell の HTLV-1 感染を阻害することが培養系で、さらに実際の生体内でのウイルスの伝搬を阻害することが動物実験で確かめられている。

しかし、HAM 患者由来の血清中の抗 HTLV-1 抗体にはウイルスの伝搬を阻害する活性が弱い可能性が考えられるので、この点を検討する。

B. 研究方法

1. 細胞および HTLV-1

HAM 患者の脊髄液 (CSF) 由来の T 細胞株由来として、HCT-1、HCT-4、HCT-5 を用いた。これら細胞株由来の HTLV-1 が持続感染した付着性細胞株を作成するため、ヒト由来の HOS、U251MG 細胞、ネコ由来の 8C (S+L-CCC kidney)、8C/Tax、PG-4 (S+L-G355-5 glioma)などを標的細胞として用いた。HTLV-1 の感染は、HCT-1、HCT-4、HCT-5 細胞との混合培養や HCT-1、HCT-4、HCT-5 細胞の培養上清の接種により検討した。

2. HTLV-1 遺伝子の検出

細胞内の HTLV-1 遺伝子の存在は、HAM 患者由来細胞株、cell-free HTLV-1 を接種し 1 日培養した細胞、あるいは HAM 由来 T 細胞株と混合培養した付着細胞株など、について検討した。これらの細胞を感染後などの適切な時期に溶解し、その DNA を用いて、

HTLV-1 の pX 領域を標的とした PCR を行い、検討した。

3. HTLV-1 外被タンパク質の構造変化の検出

HTLV-1 あるいは bovine leukemia virus (BLV) 感染細胞の培養上清は、 -80°C に保存し、実験に使用した。これらの培養液を $0-37^{\circ}\text{C}$ で、0-4 時間保温し、ウイルスを遠心により回収し、HTLV-1 の gp46 あるいは gp21 のモノクロナル抗体を用いた Western blot を行い、外被タンパク質の構造の変化を検出した。実験によりウイルス液を、SH 基をブロックする N-ethylmaleimide (NEM) で処理してから解析に用いた。

4. Pseudotype ウイルスを用いた抗 HTLV-1 抗体価の測定

HTLV-1 の細胞への侵入の程度は、HTLV-1 の外被の性質を持つ vesicular stomatitis virus (VSV) の pseudotype を用いて行った。すなわち、HTLV-1 産生 8C 細胞に VSV ΔG^* [VSV の G タンパク質遺伝子のところに green fluorescent protein (GFP) 遺伝子を導入した欠損型 VSV] を感染させ、VSV(HTLV-1) pseudotype ウイルスを 2010 年度分担研究報告書に記載した方法により作製した。この VSV 遺伝子が細胞内に入ると 1 日後には細胞が GFP 陽性となり、容易に蛍光顕微鏡で感染細胞を同定できる。このウイルス感染価を 80% 減少させるヒト血清の希釈を求め、その逆数を抗体価とした。HTLV-1 全般に対する抗体価は、HTLV-1 産生ヒト T 細胞株 C91/PL 細胞のスミアをアセトン固定し、段階希釈したヒト血清を反応させ、陽性反応の end-point を求め、その逆数を IFA 抗体価とした。

(倫理面への配慮)

研究に用いた材料は、多くの研究者が用いている物で、倫理面での配慮は特に問題ない。

C. 研究結果

1. HAM 患者脊髄液由来 T 細胞株の産生する HTLV-1 の感染性

HCT-1、HCT-4、HCT-5 細胞の培養上清の感染性について、接種後に逆転写された HTLV-1 DNA を PCR で検出することにより検討した。この系では、HCT-5 細

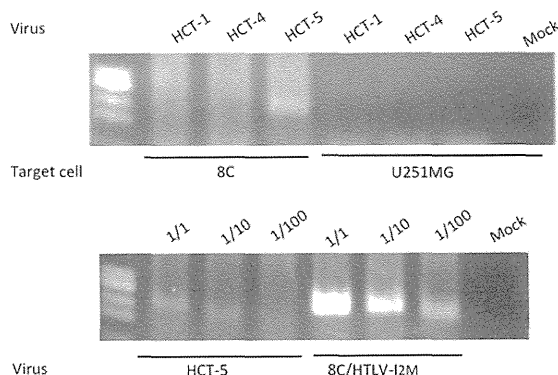
胞の培養上清のみ 8C 細胞で陽性であった。さらに混合培養による HTLV-1 の 1 持続感染した付着性細胞株の樹立を試みた。これら 3 種の細胞は、短期間の 8C 細胞との混合培養により多くの合胞体を形成した。その合胞体形成力は HCT-5、HCT-1、HCT-4 の順に強かった。長期間培養し HTLV-1 持続感染細胞の樹立を試みたが、HCT-1 細胞を用いた時にはできなかった。HCT-4 細胞を用いた時には 8C 細胞でまれに分離できた。一方、HCT-5 細胞を用いた時には、8C、8C/Tax、PG-4 細胞で比較的容易に可能であった。ATL 患者由来の HTLV-1 産生 T 細胞株を用いた場合にも細胞株、ウイルス株による違いが見られている。

(1) HAM 患者由来 T 細胞株の産生した cell-free HTLV-1 の感染性

HCT-1 HCT-4 HCT-5 細胞の培養上清を用いその感染性を検討した (図 1)。感染の標的細胞としては、8C 細胞および U251MG 細胞 (我々の検討では cell-free HTLV-1 に最も感受性が高いヒト由来の付着細胞株) を用いた。HTLV-1 感染の翌日細胞の DNA を抽出し HTLV-1 DNA の存在を検討した。HCT-5 細胞の上清を感染した時のみに、8C 細胞で HTLV-1 DNA が検出できた。HCT-5 細胞および対照として HTLV-1 をよく産生する 8C/HTLV-1_{2M} 細胞を用いた。HCT-5 細胞の上清は、10 倍希釈しても薄いバンドが検出できた。一方、8C/HTLV-1_{2M} の上清は、100 倍希釈して感染してもはっきりと HTLV-1 の DNA バンドが検出できた。以上の結果は、HCT-5 細胞からはこの計で検出

できるレベルの HTLV-1 が産生されているが、HCT-1

図1 Cell free ウイルスでの感染



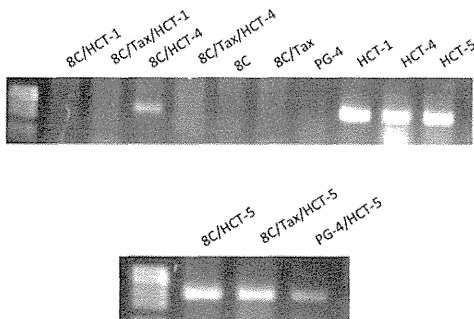
や HCT-4 細胞の上清には、検出レベル以下の量しか HTLV-1 は存在しないと判定された。

(2) HAM 由来 HTLV-I のネコ由来細胞への混合培養での感染

次に 8C および 8C/Tax 細胞と、HCT-1、HCT-4、HCT-5 の T 細胞株を色々な割合 (1:0.3、1:1、1:3、1:10 など) で混合培養し、継代培養した。T 細胞株は、IL-2 依存性に増殖するので、8C あるいは 8C/Tax 細胞を培養する条件では増殖しない。T 細胞が認識できなくなると、新しい T 細胞株を加えた。2 月以上継代培養をしたところで細胞の DNA を抽出し、HTLV-1 の DNA を検出する PCR を行った (図 2)。混合培養していない細胞 (8C、8C/Tax、PG-4、HCT-1、HCT-4、HCT-5) からも DNA を抽出した。HCT-1 HCT-4 HCT-5 細胞の DNA では、HTLV-1 が期待通りに検出できた。HCT-5 細胞と培養した 8C 8C/Tax PG-4 細胞からは、HTLV-1 の DNA が検出できた。しかし、HCT-1 細胞と混合培養した時には、いずれの細胞からも DNA が検出できなかった。HCT-4 細胞と混合培養した細胞では、ほとんど HTLV-1 の DNA は、検出できなかった。何度か試みたところ 8C/HCT-4 細胞では、まれに HTLV-1 の DNA が検出できた。以上の結果は、HCT-5 細胞からは、付着細胞へ感染し易い HTLV-1 が産生されていると判定した。

図 2

HAM 由来 HTLV-I のネコ由来細胞への混合培養での感染



2. 各温度における HTLV-1 と BLV の half-life (hr)

HTLV-1 の色々な温度に置ける安定性を

その感染価の変化 (half-life 半減期: 感染価の 50% 減少) で測定した。その結果、以前に HTLV-1 の半減期は、0°C から 37°C の広い範囲で極めて短く 1 時間前後であることを報告した。一方、近縁のウイルスである BLV は、以前に報告のあるレトロウイルスと同じような結果が得られた。すなわち、0°C での半減期は 4 日以上で、37°C では 8 時間くらいであった。そこでこの理由を本年度に検討した。

表 1

各温度における HTLV-1 と BLV の half-life (hr)

ウイルス株	保温温度 (°C)				
	0	4	25	37	42
HTLV-I2M	1.1±0.2	1.1±0.2	1.2±0.4	0.8±0.4	0.4±0.1
HTLV-IMT-2	N.D.	0.8±0.0	N.D.	0.4±0.0	0.4±0.0
HTLV-IMEL5	N.D.	0.6±0.0	N.D.	0.4±0.2	0.2±0.1
BLVFLK	>96	>96	>24	8.5±3.2	0.9±0.7

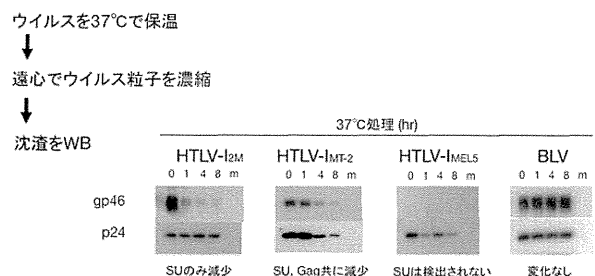
0~37°C の広い範囲にわたり、HTLV-I は不安定である。

(1) 37°C での保温によりウイルス粒子から gp46 の遊離

-80°C に保存してあった HTLV-1 の 2M、MT-2、MEL5 株を含む培養液を 37°C で 0-8 時間保温し、ウイルス粒子を回収し、Western blot (WB) でウイルスの表面外被タンパク質 gp46 SU および内部構造タンパク質 p24 CA を検出した (図 3)。2M 株では、0-8 時間の保温で p24 の量にはあまり変化はないが gp46 は保温 1 時間後には著明に減少していた。MT-2 株でも同様な傾向が見られた。一方、BLV では保温により両タンパク質の

量に大きな変化が見られなかった。以上の結果は、HTLV-1 では 37°C での保温で、ウイ

図 3 37°C での保温によりウイルス粒子から gp46 の遊離



HTLV-I では、gp46 SU が著明に減少した。
そこで Env の isomerization の可能性を検討。

ルス表面にある外被タンパク質 gp46 が遊離し易いことを示している。HTLV-1 の SU は isomerization により遊離する可能性があることが報告されている。そこで外被タンパク質の isomerization が起っているか検討した。

(2) HTLV-1 の外被タンパク質の構造変化に対する NEM の影響

色々の温度での保温で HTLV-1 は短時間で失活し、37°C の保温で外被タンパク質の gp46 SU が遊離することが見いだしたが、これが外被タンパク質の isomerization による可能性を検討した。

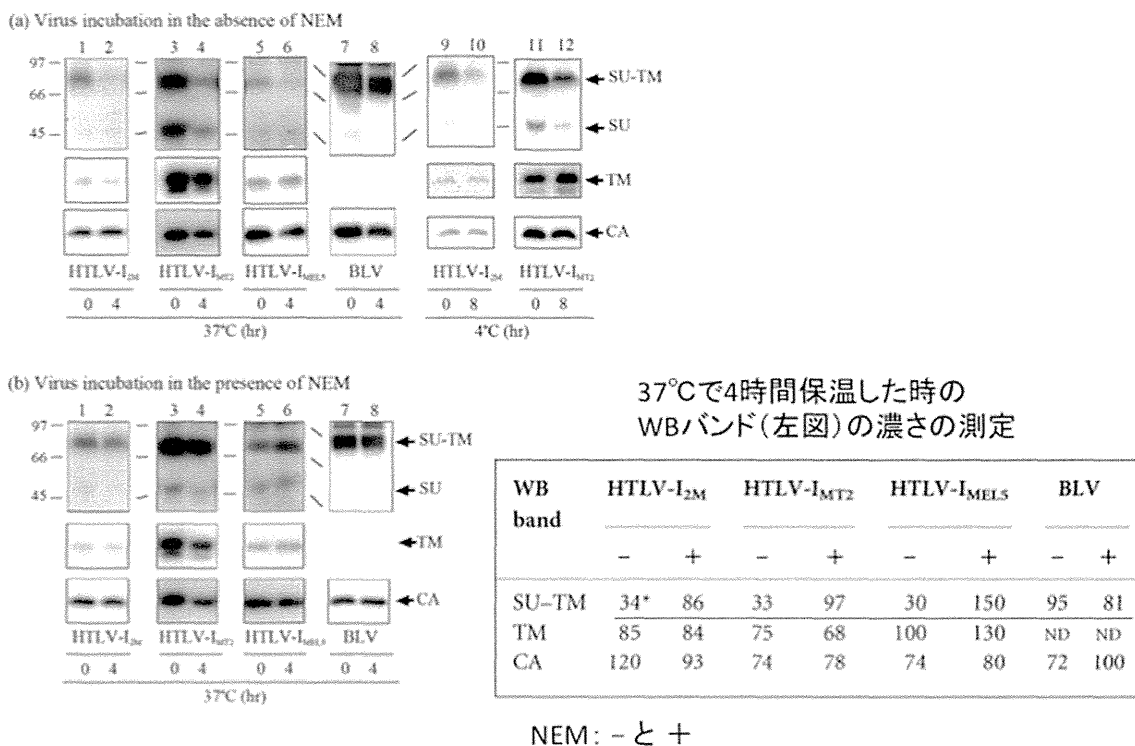
HTLV-1 の外被タンパク質には、図に示すように isomerization の関連するアミノ酸の配列 (モチーフ) が存在する。NEM (N-ethylmaleimide) は、システインの SH 基をブロックするので、外被タンパク質内での SS 結合の付け替え (isomerization) を阻害することが期待される。HTLV-1 および対照として BLV (isomerization のモチーフがないウイルス) を NEM の非存在下あるいは存在下で 0、4、8 時間保温し、HTLV-1 および BLV の外被タンパク質の SU (gp46)、TM (gp21)、元の SU-TM、および内部構造タン

パク質 CA (p24) の量の変化を検討した (図 4)。NEM 非存在下の 4 時間の保温で、HTLV-1

の SU-TM および SU の量は減少したが、TM および CA の量には大きな変化は見られなかった。一方、NEM で処理したウイルスを同様に保温した場合には、著明な変化を認めなかった。以上の結果は、HTLV-1 では 0-37°C の温度で保温することにより HTLV-1 の外被タンパク質の isomerization が起ることを示唆している。

Isomerization は、マウス白血病ウイルスなどでは SU が細胞のウイルスレセプターに結合した際に起こり、SS 結合の付け替えが TM を活性化し、ウイルス粒子と細胞膜の膜融合を誘導すると考えられている。Isomerization がレセプターとの結合の前に行われれば、ウイルスは感染性を失うので、HTLV-1 の広い温度範囲での不安定性はこのためと推量している。それでは HTLV-1 では isomerization があたかも自発的に起るが、そのメカニズムは何なのかは、今後の検討課題である。

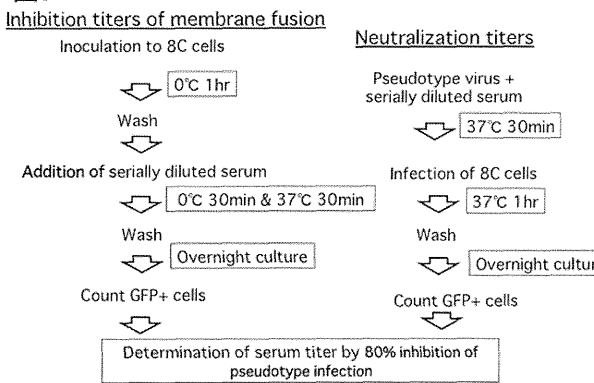
図4 NEM処理によるSUの遊離の抑制



3. HTLV-1 感染者の HTLV-1 感染抑制抗体の定量

HTLV-1 感染者の HTLV-1 感染抑制抗体の定量は、HTLV-1 の外被を持ち、中に VSV と GFP (green fluorescent protein) の遺伝子 (VSV の外被遺伝子を GFP 遺伝子置き換えた遺伝子) を持つ pseudotype を用いた。すなわち、この遺伝子が細胞内に侵入すると GFP を発現し、これにより HTLV-1 の侵入過程を定量的にアッセイできる系を用いた。アッセイは二つの方法で行った。すなわち、(1) 従来の方法による HTLV-1 侵入の抑制を見る方法と、(2) HTLV-1 を 0°C で 30 分細胞に吸着させ、0°C で 1 時間ヒト血清で処理し、さらに培養温度を 37°C にして 1 時間培養し、接種液を除き一度洗い 1 日培養して侵入過程の阻害程度を判定する方法とで行った (図 5)。

図5 HTLV-1 感染者のHTLV-1感染抑制抗体の定量

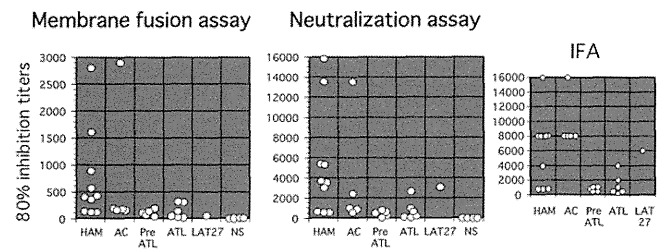


(1) Membrane fusion assay および Neutralization assay による感染抑制抗体価の測定

HTLV-1 感染者の末梢血中には、HTLV-1 の構造蛋白質に対する抗体があり、以下の活性があることが報告されている。すなわち、(1) cell-free HTLV-1 の培養系での感染の抑制、(2) HTLV-1 産生細胞と感受性細胞の混合培養系での合胞体形成の阻害、(3) 動物への HTLV-1 産生細胞の接種による感染での感染抑制。こうした抗体が存在するために HTLV-1 感染者の体内では、HTLV-1 が伝搬し難いと考えられる。一方、HAM 患者では、末梢単核球に高頻度に HTLV-1 が感染していると報告されている。このことは、HAM 患者には HTLV-1 の感染を抑制する抗体が少ない可能性を示唆する。そこで、HTLV-1 の侵入 (Membrane fusion) を抑制

する抗体価を測定した。図 6 に示すように、多くの HAM 患者では侵入阻止抗体価はむしろ高かった。また、asymptomatic carriers (AC) や ATL 患者でも侵入阻止抗体が検出できた。通常の方法で中和抗体を測定した結果もほぼ同様の抗体価の分布を示した。比較のため、HTLV-1 感染細胞を標的として間接蛍光抗体法で抗体価を測定したが、HAM で抗体価が高く、ほぼ感染阻止抗体価の分布とほぼ同様な抗体価の分布が得られた。一方、ラットのモノクロナル抗体 LAT27 は、HTLV-1 の侵入過程は阻害しなかったが十分な中和抗体価を示した。LAT27 は期待されるような抗体活性を示したので、我々のアッセイ系は期待通りの抗体活性を測定していると考えられる。

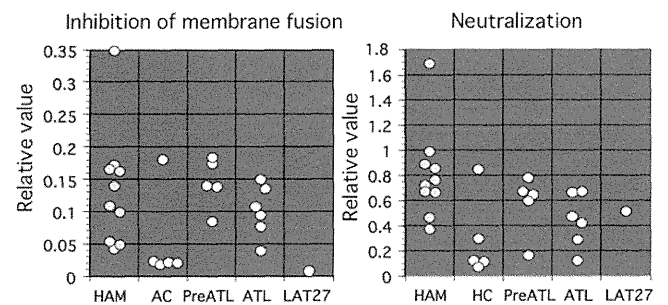
図6 ヒト血清の抗体価の測定



(2) 感染抑制抗体価の相対的な割合の検討

HAM 患者では、HTLV-1 の侵入阻止抗体価および中和抗体価が高く、また HTLV-1 感染細胞を標的として間接蛍光抗体法 (IFA) による抗体価も高かった。そこでウイルス全体に対する抗体の中で感染抑制に対する抗体の割合が HAM 患者で高いか検討するため、感染阻止抗体価と IFA による抗体価の比を取り比較した (図 7)。こうすると HAM、PreATL、ATL のいずれでもほぼ同様な相対的な抗体分布の傾向を示した。AC/HC では、

図7 感染抑制抗体価の相対的な割合の検討



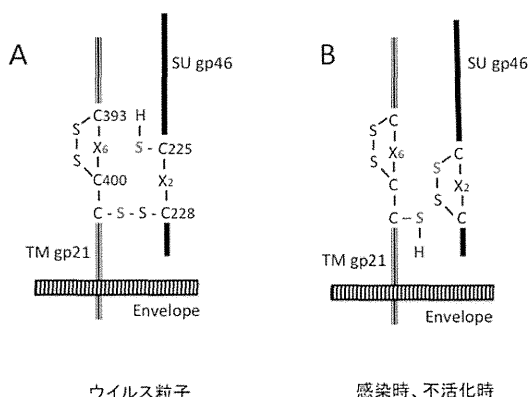
Relative value = serum titer of 80% inhibition / IFA titer

感染を阻止する抗体の割合が低い傾向が見られた。今回の解析は症例数が多くないので、今後さらに症例を増やし検討する必要がある。

D. 考察

HAM 患者由来の 3 種類の T 細胞株の産生する cell-free HTLV-1 の感染性は余り高くなく、また混合培養法で cell-to-cell の感染力を見ても余り強くなかった。ATL 患者由来のウイルスと同様の感染性の結果であった。HAM 患者の体内では、他の病態のヒトと比べ HTLV-1 感染が活発に行われていると推定されるが、培養細胞系では HAM 由来 HTLV-1 に特に強い感染性は確認できなかった。この感染力の低さは、ほかの病態のヒト由来の HTLV-1 と同様に、低温から体温までの広い温度範囲でウイルスが失活しやすいことも一因であるかもしれない。色々な温度での HTLV-1 の不安定性は、ウイルスの外被タンパク質の isomerization が関与していると考えているが、HAM 由来の HTLV-1 にも isomerization に関連するシステインの保存された配列が認められる (図 8)。

図8 HTLV-1 Envのisomerizationのシエーマ



HTLV-1 の外被タンパク質 SU gp46 と TM gp21 はウイルス粒子中では、SS 結合で結ばれていると考えられる。ATL あるいは HAM 患者由来の HTLV-1 の外被タンパク質の 225、228、393、400 および 441 番目のアミノ酸はシステインで、この相対的な位置関係は ATL あるいは HAM 患者で見いだされる HTLV-1 で保存されている。この保存されたシステイン配置は、マウス白血病ウイルス (MuLV) やトリ肉腫ウイルスにも認められ

るが BLV には存在しない。Gp46 と gp21 は、228 番目と 401 番目のシステインの間で SS 結合をしていると考えられる。MuLV では、SU がウイルスレセプターと結合すると SU-TM 間の SS 結合が解離し、SU 内での SS 結合が新たにでき、SU がウイルス粒子から遊離し感染過程が進む。我々の解析は、HTLV-1 が細胞のレセプターに結合しなくてもこの反応が進行することを示している。SU が遊離したウイルスは感染性を失う。HTLV-1 では、どうしてこの反応が自発的に進行するのか、今後解析する必要がある。

HAM 患者の体内では、HTLV-1 の伝搬を抑制する抗体価が低いか検討したが、むしろ他の病態の感染者より高かった。HAM 患者の体内のリンパ球などでは、どのようなメカニズムで HTLV-1 の感染が多く細胞に広がり、リンパ球での高い HTLV-1 保持率が維持されているか、さらに検討する必要がある。

E. 結論

HAM あるいは ATL 由来の一部の HTLV-1 が付着細胞株に持続感染した。一方、ネコ由来のいくつかの細胞株、および極一部のヒト細胞株でのみ HTLV-1 の持続感染が成立した。特にネコ由来の持続感染細胞からは、感染性の高いウイルスが産生された。HTLV-1 は他のレトロウイルスと比べ、紫外線や温度に感受性の不安定なウイルスである。HTLV-1 では外被タンパク質の isomerization が容易に起こる。HTLV-1 感染者には、いわゆる中和抗体の中に HTLV-1 の侵入を阻害する抗体もある。HAM 患者では、細胞侵入抑制抗体価および中和抗体価が高かった。HAM 患者の体内では HTLV-1 の感染が活発起っていると推定されるが、HAM 関連の HTLV-1 の感染性や HAM 患者の血清の感染抑制効果について HAM に特徴的な性質は認められなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hoshino H. Cellular factors involved in HTLV-1 entry and pathogenicity. Martin G. Klotz eds. Frontier in Microbiology, Frontiers Head Office, Lausanne, Switzerland 2012, 222 (1-12)

2) Shinagawa M, Jinno-Oue A, Shimizu N, Roy BB, Shimizu A, Hoque SA, Hoshino H. Human T-cell leukemia viruses are highly unstable over a wide range of temperatures. *J Gen Virol* 93, 608-617, 2012

3) Hoque SA, Ohtsuki T, Tatsumi M, Shimizu N, Islam S, Jinno-Oue A, Hoshino H. Lack of the trans-receptor mechanism of HIV-1 infection: CD4- and coreceptor-independent incorporation of HIV-1-resistant cells into syncytia induced by HIV-1. *Microbes Infect* 14, 357-368, 2012

4) Mori T, Shimizu N, Jinno-Oue A, Tanaka A, Shinagawa M, Tokizawa S, Akagi T, Hoshino H. Tax1-expressing feline 8C cells are useful to monitor the life cycle of human T-cell leukemia virus type I. *J Gen Virol*, 93, 588-593, 2012

5) Tanaka A, Jinno-Oue A, Shimizu N, Hoque A, Mori T, Islam S, Nakatani Y, Shinagawa M, Hoshino H. Entry of human T-cell leukemia virus type 1 is augmented by heparan sulfate proteoglycans bearing short heparin-like structures. *J Virol*, 86, 2959-2969, 2012

6) Nakamura K, Ohtsuki T, Mori H, Hoshino H, Hoque A, Oue A, Kano F, Sakagami H, Tanamoto K, Ushijima H, Kawasaki N, Akiyama H, Ogawa H. Novel anti-HIV-1 activity produced by conjugating unsulfated dextran with polyL-lysine. *Antiviral Res*, 94, 89-97, 2012

7) Shimizu A, Tamura A, Abe M, Amano H, Motegi S, Nakatani Y, Hoshino H, Ishikawa O. Human papillomavirus type 56-associated Bowen disease. *Br J Dermatol*, 167, 1161-1164, 2012

8) Hoque SA, Hoshino H, Anwar K S, Tanaka A, Shinagawa M, Hayakawa Y, Okitsu S, Wada Y, Ushijima H. Transient heating of expressed breast milk up to 65°C inactivates HIV-1 in milk: A simple,

rapid, and cost-effective method to prevent postnatal transmission. *J Med Virol* 85, 187-193, 2013

9) Jinno-Oue A, Tanaka A., Shimizu N, Mori T, Sugiura N, Kimata K, Isomura H, Hoshino H. Inhibitory effect of E type of chondroitin sulfate on the binding step of human T-cell leukemia virus type 1 *AIDS Res Human Retro* 29, 621-629, 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患等克服研究事業)
分担研究報告書

HTLV-1 gp46 エンベロープタンパク質上の gp46-197 ペプチド領域における相互作用
に必要なアミノ酸モチーフの探索に関する研究

研究分担者	小嶋英二郎	福山大学 准教授
共同研究者	白木洋	横浜薬科大学 教授
	山野嘉久	聖マリアンナ医科大学 准教授

研究要旨

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) の細胞間感染において、エンベロープ蛋白 gp46 を介した膜融合による経路が存在することが合成ペプチド (gp46-197) を用いた阻害実験で明らかになっている。本研究では、gp46-197 との相互作用に特徴的なアミノ酸モチーフの探索を目的に、gp46-197 をターゲット分子とし、ペプチドライブラリーを用いてスクリーニングをおこなった。gp46-197 を用いた抑制試験によって評価したところ、gp46-197 と何らかの相互作用を示すと考えられる 26 個のファージクローンを得た。それぞれのアミノ酸組成および推定二次構造の解析から、gp46-197 N 末端親水性領域に位置するアミノ酸とのイオン性相互作用が gp46-197 ペプチド領域を介する標的細胞へのエントリーに関与している可能性が示された。これにより HTLV-1 の生体内における感染拡大阻止を図る上で、標的になりうる部位の特定と構造上の特徴に関する知見を得た。

A. 研究の目的

HTLV-1 の膜融合反応を介した細胞内エントリーには、ウイルスの標的細胞受容体への結合とそれに続くウイルス細胞と標的細胞間の膜融合反応を必要とする。白木らは、ATLL 患者由来の細胞株を用いて、gp46 外被タンパク質のある領域 (D197 - L216: gp46-197 ペプチド領域) が細胞間感染を阻害すること、gp46 と gp21 膜貫通タンパク質が複合体を形成していることを明らかにしてきた。一方、gp46-197 ペプチド領域は、Proline-rich 領域 (PRD) の C 末端に位置している。PRD は gp46-gp21 複合体の構

造変化による gp21 の解離と活性化の過程に関与すると考えられている。gp46-197 ペプチド領域に対応する合成ペプチド (gp46-197; 20 アミノ酸残基) を用いた感染阻害試験からは、HTLV-1 の細胞間感染の際、常在性熱ショックタンパク質 (HSC70) との相互作用が重要な役割を担っていることがわかっている。これらのことを考慮し、次に示す HSC70 および gp46-gp21 複合体を介する HTLV-1 の標的細胞へのエントリーシステムを構築した。即ち、1) gp46 の標的細胞の感染受容体への結合、2) 受容体結合後に惹起される gp46-gp21 複合体

の構造変化による gp21 の解離と活性化、
3) 活性化された gp21 の標的細胞膜への挿入による膜融合反応の開始の、少なくとも、3つの過程を経て細胞間感染が成立すると考えられている。

gp46-197 ペプチド領域に対する抗体は、無症候性キャリア血清中では陽性率が極めて低いこと、ATLL または HAM を発症した患者血清中には高頻度に出現することがわかっている。これは、gp46-197 ペプチド領域と HSC70 の相互作用を介した HTLV-1 の細胞間感染機構が病態進行と並行して活発に作動している可能性を示唆していた。即ち PRD を介したウイルスの細胞内進入過程をブロックすることは、HTLV-1 細胞間感染拡大を阻止する新しい分子標的となる可能性が期待できた。そこで、本研究では、HTLV-1 の HSC70 を標的とするエンターを阻害する可能性のあるペプチド分子を探索する目的で、gp46-197 をターゲット分子とし、ランダムファージペプチドライブラリーを用いたスクリーニングをおこなった。

B. 研究方法

ランダムファージペプチドライブラリーを用いたスクリーニング

gp46-197 を 10 mM 炭酸ナトリウム塩緩衝液 (pH 9.55) 中でマイクロタイタープレート (Nunc 社製) に固相化した。PBST (0.1 % Tween 20, 10 mM PBS, pH 7.4) で洗浄後、2.5 % 牛血清アルブミン (BSA) を含む PBST でブロッキングをおこなった後、ランダムファージペプチドライブラリー (Ph.D.-12™ phage Display Libraries, NEB) と反応させた。PBST 洗浄後、ファージクローンをグリシン-塩酸緩衝液 (pH 2.0) で溶出し、速やかに中和した。上記の操作を 3~4 回

繰り返した後、個々のファージクローンを精製し、gp46-197 固相化 ELISA および抑制試験、ランダムペプチド部分のアミノ酸配列解析等をおこなった。

gp46-197 固相化 ELISA および抑制試験
スクリーニング時と同様、マイクロタイタープレートに gp46-197 を固相化後、個々の精製したファージクローンを反応させた。抗 M13 マウス抗体、HRP 標識抗マウス抗体と順次反応させた後、TMB で発色し 450 nm の吸光度を測定した。また、抑制試験は固相化に使用した量の 5 倍量の gp46-197 を精製ファージクローンとあらかじめ反応させた後、上記 ELISA と同様に操作した。

$$\text{抑制率 (IR)} = \left[\frac{\text{検体の吸光度} - \text{抑制検体の吸光度}}{\text{検体の吸光度}} \right] \times 100 (\%)$$

推定アミノ酸配列の解析

精製ファージクローンから M13 ssDNA を抽出し、常法に従ってランダムペプチド部分に相当する DNA 塩基配列を決定した。得られた DNA 情報をもとに、アミノ酸一次構造を推定するとともに二次構造についても解析した。

使用機器: ABI 3100 Genetic Analyzer

プライマー:

5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3'

遺伝情報処理ソフトウェア: GENETYX

倫理面等への配慮

本研究は、個人を限定するとか、特定することは必要ないため、倫理的および科学的妥当性に問題はないと考える。

C. 研究成果

gp46-197 をターゲット分子としたスクリーニング

総計で 106 個のファージクローンを採取・精製した。そのうち吸光度 A₄₅₀ > 0.1 を示

したクローンは 37 個だった。さらに IR > 5 % を示したクローンは 26 個だった。37 個のファージクローンを、G1: 11 clones; $A_{450} > 1.0$, IR > 5.0 %, G2: 15 clones; $0.1 < A_{450} < 1.0$, IR > 5.0 %、G3: 10 clones; $A_{450} > 1.0$, IR < 5.0 %、の 3 グループに分類した。G1 および G2 は gp46-197 と相互作用すると考えられ、G3 はブロッキングに使用した BSA と相互作用するクローンと考えられるため、G3 を対照として、これら 3 グループのアミノ酸配列における相違点を検討した(図 1-4)。G1-G3 それぞれのグループ内およびグループ間に抗体エпитープのような特徴的なアミノ酸配列はみられなかった。これは gp46-197 との相互作用に、アミノ酸配列で規定されるような厳密な構造的特徴は必要ない可能性が示唆されていた。そこでそれぞれのグループ間でのアミノ酸組成を比較した。G3 と比較して、G1 および G2 では疎水性アミノ酸の割合が減っていた。さらに G1 および G2 を比較すると親水性アミノ酸と中性アミノ酸の構成比がほぼ逆転していた (Table 1)。両グループに共通することとして、疎水性アミノ酸が一定の間隔で並んでいる傾向が見受けられた (Table 2, 3)。一方、G3 では疎水性アミノ酸が集中している傾向がみられた (Table 4)。3 つのグループに共通して塩基性アミノ酸が多く含まれていた。

gp46-197 およびファージクローンの二次構造解析

gp46-197 およびファージクローンのランダムペプチド部分の推定二次構造を Chou-Fasman 法でおこなった。gp46-197 の推定二次構造を示す (Fig. 5)。N 端から 3/4 が α -helix で C 端部分の 1/4 が β -sheet 構造をとっていた。一方、ファージクローンでは、G1 には α -helix 構造をとるも

のと β -sheet 構造をとるものが混在しており、G2 はほぼ α -helix 構造をとるクローンだった。G3 は主に β -sheet 構造をとっていた。特に、抑制率が約 20 % 以上を示すファージクローンはほぼ α -helix 構造をとっていた。次に、得られたファージクローンは塩基性アミノ酸を高頻度で含んでいることから、gp46-197 との選択的相互作用にはイオン性相互作用の寄与が大きいのではないかと考え、helix 上の立体配置について Edmundson Wheel plot 法を用いて解析した。ファージクローンの代表として 4TE7 も用いて gp46-197 と比較した (Fig. 6)。4TE7 の 4 位のリシンと 8 位のアルギニンが 4 アミノ酸残基の空間をあけて隣接するように配置しており、gp46-197 の 1 位のアスパラギン酸と 5 位のグルタミン酸に対応していた。その他のクローンも、多くが、gp46-197 の N 末端親水性領域の空間配置に対応する配置をとっていた。

以上のことから、gp46-197 との選択的相互作用のためには、 α -helix 構造をとるような疎水性アミノ酸と親水性アミノ酸の組成バランスであること、親水性アミノ酸領域に塩基性アミノ酸が適度に配置されていることが必要であることが推測された。

D. 考察

HTLV-1 感染症は感染成立後から病気の発症までに長い潜伏期間を経ることが特徴であり、無症候性キャリアとして生涯を終える人がほとんどである。残念なことに ATLL を発症した場合、その病態は急速に進展する。そして抗 gp46-197 抗体の産生量は ATLL の病態の進行度と密接に関係していることがわかっている。一方、HAM の場合は、山野らにより、発症後のタイプが急速進行型、緩徐進行型、非進行型の 3 つに分

類されることが報告されている。両疾患の病態進展の相違から、gp46-197 の関与の程度に違いがある懸念があった。しかし、平成 23 年度の研究報告書で示したように、gp46-197 は HAM 患者由来細胞に対しても、①細胞間感染は gp46-197 濃度依存的に阻害作用を示す、②感染・非感染細胞に対する毒性は少なく、クローナルな増殖に対する抑制作用はないということがわかっている。抗 gp46-197 抗体に関しても、病態の進行度との関連は見られなかったが、HAM 患者血清中に高頻度に出現していた。これらのことは、ATLL 同様、HAM に関しても、病態発現に際して、gp46-197 ペプチド領域を介する感染機構が活発に活動することによって、gp46-197 ペプチド領域が抗原提示される頻度が上昇したと推測された。

gp46-197 関連ペプチドを用いたシンシチア形成阻害試験の結果、gp46-197 の N 端側 6 アミノ酸残基 (DHILEP)、特に LEP 部分が標的細胞へのエントリーに必須であることがわかっている。今回、gp46-197 と選択的に相互作用をすると考えられるファージクローンは、gp46-197 の親水性アミノ酸領域とイオン性相互作用していると考えられた。このことは DHILEP 部分の荷電領域が標的細胞と結合する場合の鍵となる部分と考えると、シンシチア阻害試験の結果と矛盾しない。即ち、DHILEP の E とその周辺の荷電領域が、細胞間接触感染において重要な部位であることを示唆していた。HAM の病態を考えると、クローナルな増殖とともに接触感染による増殖も大きなファクターを占めると考えられる。接触感染を押さえ込むことは、HAM の発症を防ぎ、無症候性キャリアとして生涯をおくる一助となる可能性がある。本研究において、HTLV-1 細胞間感染を阻害するためのターゲット部位を

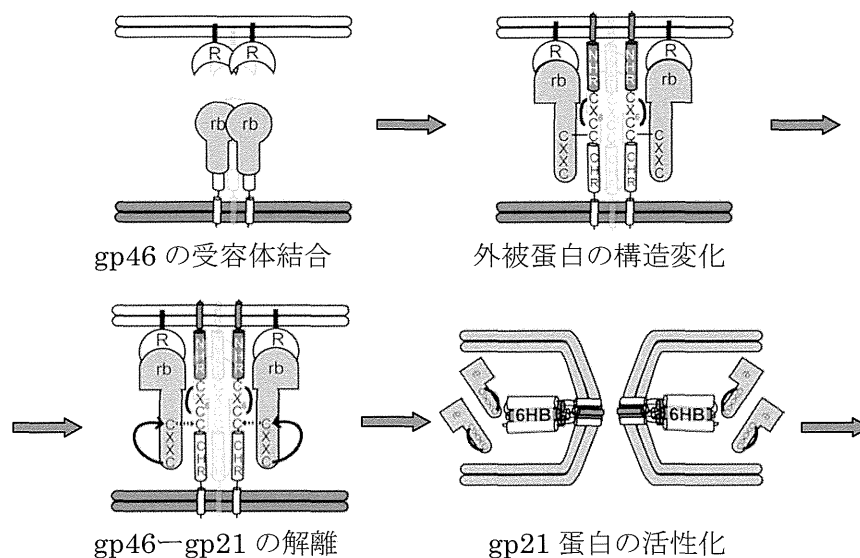
絞り込めたことによって、HAM 治療を指向した薬剤設計において有力な情報を提供できたと思われる。

一方、helix の比較的近接部位にイオン性相互作用を起こしうるアミノ酸が配置している構造を認識している抗体の出現が、HAM の病態と関係している懸念も生じた。つまり、N 端側 DHILEP 周辺の親水性部分をエpitep とする抗体、特に立体構造を認識する抗体は交差反応性を示す可能性がある。HAM 患者の脳脊髄液中で抗 HTLV-1 抗体の力価が上昇していること、その中から交差反応性を示す抗体が見つかったことは興味深い。

E. 結論

HTLV-1 の gp46-197 ペプチド領域を介した細胞間接触感染は、E201 とその周辺の荷電領域が重要な役割を担っていると考えられた。したがって、この領域をターゲットとする薬剤の開発は HAM の発症および憎悪を抑える可能性が考えられた。

また、helix 構造上の E201 とその周辺のイオン性アミノ酸領域は、生体中の機能性領域を模倣していることも考えられた。したがって、E201 とその周辺の構造を認識する抗体の出現が HAM の病態と関係していることも考えられた。



Scheme 1 HTLV-1 gp46-gp21 複合体を介するウイルスエンタリーシ

Table 1 Classification and amino acid frequency of phage clones

group	classification	clones	Hydrophobic	Neutral	Hydrophilic
G1	A450nm>1.0, IR>5 %	11	46.2%	31.8%	22.0%
G2	0.1<A450nm<1.0, IR>5 %	15	45.0%	22.2%	32.8%
G3	A450nm>1.0, IR<5 %	10	52.4%	20.6%	27.0%

* アミノ酸の分類は GENETYX[®] の分類による

Table 2 Amino acid sequence and frequency of phage clones (G1)

Clone	sequence	A (450 nm)		IR (%)	hydrophobic		neutral		hydrophilic		
		Normal	Inhibition		count	%	count	%	count	%	
4TE6	NFMKSLPRLGMH	1.03	0.68	33.7	7	58.3	2	16.7	3	25	
3EA7	SHEFSWLHTLTA	1.05	0.83	21.1	5	41.7	4	33.3	3	25	
3EE9	MVHNHAQQTSM5	1.48	1.19	19.8	4	33.3	6	50	2	16.7	
3YE2	WPWNHWMTYNNY	1.19	0.97	18.2	5	41.7	4	33.3	3	25	
3EA21	SHWSWFYRTVDS	1.49	1.25	16.2	4	33.3	4	33.3	4	33.3	
3TE29	WHWRVPQKLDPS	2.2	1.92	12.7	6	50	2	16.7	4	33.3	
4EE11	HLWYSIPAWQNN	1.98	1.74	12.2	6	50	4	33.3	2	16.7	
3EA8	GPWWNMYTGRLN	2.64	2.33	11.5	7	58.3	3	25	2	16.7	
4TE2	FHKTWWT AATVS	2.52	2.24	11.1	6	50	4	33.3	2	16.7	
4TE8	FHKTWWT AALSR	2.46	2.23	9.2	6	50	3	25	3	25	
3TE5	WHWNAWNWSSQQ	2.4	2.27	5.6	5	41.7	6	50	1	8.3	
		average				5.5	46.2	3.8	31.8	2.6	22.0

G1: A450nm>1.0, Inhibition Ratio (IR)>5 %

Table 3 Amino acid sequence and frequency of phage clones (G2)

Clone	sequence	A (450 nm)		IR (%)	hydrophobic		neutral		hydrophilic		
		Normal	Inhibition		count	%	count	%	count	%	
3EE16	EDNTMALNWPEI	0.54	0.31	42.3	6	50	3	25	3	25	
4TE2	NFMESLPRLGMH	0.38	0.28	26.7	7	58.3	2	16.7	3	25	
4TE7	NFMKSLPRLGMH	0.35	0.27	23.8	7	58.3	2	16.7	3	25	
4YE1	SSKHWYLDLAKP	0.69	0.53	23.4	5	41.7	2	16.7	5	41.7	
3EE10	MVHNHAQQTSMSS	0.73	0.57	22.5	4	33.3	6	50	2	16.7	
4EE5	MHSHYGRPQQG	0.46	0.37	20.6	5	41.7	3	25	4	33.3	
3TE7	WHRHWQGYEMYK	0.83	0.66	20.1	4	33.3	1	8.3	7	58.3	
4TE20	LANKHVNRFPHH	0.79	0.64	19.5	5	41.7	2	16.7	5	41.7	
3EA2	THFAYAPLDTKH	0.59	0.49	16.8	5	41.7	2	16.7	5	41.7	
3EA5	NLHWPNAVDDCA	0.34	0.29	16.1	5	41.7	3	25	4	33.3	
4YE3	GPLWDLHQFYHS	0.35	0.3	12.9	6	50	2	16.7	4	33.3	
3EE28	WHSRLPPMTVAF	0.41	0.37	11.1	8	66.7	2	16.7	2	16.7	
3EA5	AETTKHNPKSWW	0.52	0.46	10.5	4	33.3	4	33.3	4	33.3	
3EA2	QSMLPHKPSPTN	0.5	0.46	8.8	5	41.7	5	41.7	2	16.7	
4YE6	HHKHMSWYPYM	0.72	0.66	8	5	41.7	1	8.3	6	50	
		average				5.4	45.0	2.7	22.2	3.9	32.8

G2: 0.1<A450nm<1.0, Inhibition Ratio (IR)>5 %

Table 4 Amino acid sequence and frequency of phage clones (G3)

Clone	sequence	A (450 nm)		IR (%)	hydrophobic		neutral		hydrophilic		
		Normal	Inhibition		count	%	count	%	count	%	
4TE3	WHRTWWPNSITN	3.28	3.16	3.9	5	41.7	5	41.7	2	16.7	
3YE2	HHMAFQHWYKLP	1.47	1.44	1.7	6	50	1	8.3	5	41.7	
3TE37	WHWSTGFFWTPT	3.24	3.2	1.3	7	58.3	4	33.3	1	8.3	
3TE44	WHKTWYATPRVW	3.12	3.1	0.6	6	50	2	16.7	4	33.3	
3TE40	FHKTWMTAALSR	3.3	3.3	-0.1	6	50	3	25	3	25	
3TE42	WHFNWLGPKQI	2.92	2.94	-0.7	8	66.7	2	16.7	2	16.7	
4EE1	HSMWRFPWHWNH	2.92	2.95	-1	6	50	2	16.7	4	33.3	
3TE39	FHWKWRGYEHQY	3.18	3.22	-1.5	4	33.3	1	8.3	7	58.3	
4TE4	NFMESLPRLGMH	2.87	2.92	-1.8	7	58.3	2	16.7	3	25	
3TE41	WHWVPKNIPSPL	1.69	1.74	-3.2	8	66.7	2	16.7	2	16.7	
		average				6.3	52.5	2.4	20.0	3.3	27.5

G3: A450nm>1.0, Inhibition Ratio (IR)<5 %

