

令和 3 年 7 月 1 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07155

研究課題名(和文)細胞膜ナノチューブによるHTLV-1感染伝播メカニズムの解明と治療への応用

研究課題名(英文)The elucidation of mechanism by which membrane nanotubes transmit HTLV-1

研究代表者

日吉 真照 (Hiyoshi, Masateru)

国立感染症研究所・血液・安全性研究部・主任研究官

研究者番号：40448519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：正常T細胞では発現しないM-SecはHTLV-1感染によって、HTLV-1がコードするTaxがM-Secの異所性発現を誘導することでナノチューブが形成されることがわかった。さらに、感染実験によって、HTLV-1感染細胞でM-Secが形成誘導するナノチューブはHTLV-1感染伝播に関与することを明らかにした。一方、独自に同定しているM-Sec機能阻害剤(NPD3064)はHTLV-1の感染伝播を抑制することがわかった。これらの結果から、HTLV-1感染の治療戦略としてナノチューブ機能阻害は有効である可能性があり、NPD30647は抗HTLV-1剤の候補として期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HTLV-1ウイルスは潜伏期間に健康上問題は生じないが、成人T細胞白血病を発症する可能性がある。しかし、HTLV-1ウイルスを体内から排除する治療法は現在存在しない。そのため、常にATL発症の不安がぬくえない。HTLV-1ウイルスを体内から排除する治療法の確立が望まれている。

本研究によって、細胞内分子M-Secが関与するHTLV-1感染メカニズムの新しい知見を得ることができた。さらに、独自に同定しているM-Secの阻害剤はHTLV-1治療薬になる可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：It is known that M-Sec is not expressed in T cells. We found that HTLV-1 Tax ectopically induce M-Sec expression in infected T cells and M-Sec can induce formation of nanotubes. Furthermore, infection experiments revealed that nanotubes induced by M-Sec in HTLV-1-infected T cells are involved in the transmission of HTLV-1 infection. On the other hand, it was found that the independently identified M-Sec inhibitor (NPD3064) suppresses the transmission of HTLV-1 infection. Therefore, the inhibition of nanotube formation may be effective as a therapeutic strategy for HTLV-1 infection, and NPD30647 is expected to be a candidate for anti-HTLV-1 agents.

研究分野：ウイルス学

キーワード：細胞間感染 細胞膜ナノチューブ 薬剤耐性

### 1. 研究開始当初の背景

ウイルスの感染伝播では、感染細胞が標的細胞と直接接触して感染する cell-to-cell transmission (細胞間伝播) が大きな役割を担っていることが報告されている。細胞間伝播は、細胞同士が物理的に接触してウイルス粒子を受け渡すため、抗体や抗ウイルス剤の影響を受けづらく、ウイルスの潜伏化や慢性感染維持に重要な役割を果たしていると考えられている。

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) は主に細胞間伝播によって感染することがわかっている。感染者は、数十年の潜伏期の後、その数%は成人 T 細胞白血病 (ATL) 等を発症する。この長期間潜伏は、免疫から逃避した持続的な感染伝播によって維持されると考えられるが、そのメカニズムの詳細は不明である。

近年、遠隔の細胞同士を直接つなぐパイプ状構造体であるナノチューブが同定され、細胞間情報伝達やウイルスの細胞間感染伝播における役割に注目されている。申請者は、独自に同定したナノチューブ形成阻害剤 NPD3064 によって HTLV-1 感染伝播が抑制できることを明らかにし、HTLV-1 はナノチューブによって免疫から逃避して感染伝播する可能性を見いだした。

本研究は、新規の HTLV-1 感染メカニズム解明および治療薬候補の探索を目的とし、ナノチューブによる HTLV-1 感染伝播メカニズムについてヒト化マウスを用いた *in vivo* 解析で明らかにする。さらに、ナノチューブ阻害剤 NPD3064 の治療薬としての可能性を検証する。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) ナノチューブを介した HTLV-1 感染伝播メカニズムの解明、(2) ナノチューブを標的とした抗 HTLV-1 剤 (NPD3064 等) の候補探索である。

申請者は既に、HTLV-1 感染伝播にナノチューブが関与することを示唆する知見をいくつか得ている。このような知見は他では報告されていない。本研究において HTLV-1 感染とナノチューブの関係を詳細に明らかにすることは、未だ不明である HTLV-1 長期潜伏感染メカニズムを解明するためのブレイクスルーとなり得る。

また、本研究で明らかにするナノチューブによる HTLV-1 感染伝播の分子メカニズムから、ナノチューブ関連分子を標的とした抗 HTLV-1 剤の探索を行う。このような薬剤は新しい作用機序であり、既存の薬剤と併用するなど有用性が高い。申請者は、独自に同定したナノチューブ形成阻害剤 NPD3064 が *in vitro* 解析で HTLV-1 感染伝播を抑制することを見出している。本研究において、さらに *in vivo* 解析で NPD3064 の有効性を実証することは重要である。

### 3. 研究の方法

本研究では、以下のことを達成する。

- (1) HTLV-1 感染伝播におけるナノチューブの重要性の明確化 (*in vivo* 解析)
- (2) HTLV-1 によるナノチューブ形成亢進の分子メカニズムの解明
- (3) ナノチューブ形成を標的にした HTLV-1 感染抑制剤の探索 (NPD3064 等)

#### <(1)の研究方法>

申請者はこれまでに、HTLV-1 感染ヒト化マウスを用いた研究を行ってきた (Hiyoshi *et al.* *Retrovirology*, 2015)。この実験系を用いる。すなわち、ヒト化マウスに HTLV-1 感染 T 細胞株 MT-2 もしくはナノチューブ形成を阻害した MT-2 (M-Sec ノックダウン MT-2) を移植する。その後、ヒト化マウスの組織 (末梢血、脾臓、肝臓及び骨髄) を経時的に摘出し、HTLV-1 プロウイルスを PCR で確認して比較検証する。さらに、組織のナノチューブをファロイジン-アクチン染色等で染色し、共焦点レーザー顕微鏡もしくは 2 光子顕微鏡で観察する。

一方、HTLV-1 感染者検体の末梢血中の感染 T 細胞において、M-Sec が異所性発現することを既に確認しているが、さらに、*ex vivo* におけるナノチューブ形成能について解析する。

#### <(2)の研究方法>

ナノチューブ形成因子である M-Sec は、正常 T 細胞には発現しないが、HTLV-1 感染によって異所性発現する。まず、この分子メカニズムを解明するために、T 細胞に HTLV-1 ウイルスタンパク質 (Tax や HBZ など) をそれぞれ単独で発現させたときの M-Sec の発現の有無を検証する。さらに、M-Sec の下流でナノチューブ形成に関与する細胞内タンパク質 (RaiA、Cdc42、Rac1 等) について、HTLV-1 が誘導するナノチューブ形成への関与を検証する。そのために、これらをノックダウンした T 細胞株に HTLV-1 を感染させたときのナノチューブ形成能の違いについて共焦点レーザー顕微鏡で検証する。さらに、上記タンパク質の機能阻害剤 (BQU57、ZCL278、NSC23766 等) を T 細胞に添加して同様に検証する。

#### <(3)の研究方法>

既に申請者は、T 細胞株 Jurkat と MT-2 の共培養系を用いた *in vitro* 解析において、NPD3064 が HTLV-1 感染伝播を抑制することを見出している。本研究では *in vivo* 解析を行い、NPD3064 のさらなる有効性を検証する。すなわち、HTLV-1 感染ヒト化マウスに NPD3064 を投与した後、ヒト化マウスの組織 (末梢血、脾臓、肝臓および骨髄) を経時的に摘出し、HTLV-1 プロウイルスを測定して NPD3064 の *in vivo* における効果を検証する。さらに、HTLV-1 感染者検体由来の

CD4+T 細胞を感染源とした感染実験を同様にいい検証する。

一方、NPD3064 以外の薬剤候補も探索する。上記の計画にある細胞内タンパク質( RalA、Cdc42、Rac1 等) の阻害剤 (BQU57、ZCL278、NSC23766) についても、Jurkat-MT-2 共培養系 (in vitro 解析) および HTLV-1 感染ヒト化マウス (in vivo 解析) によって有効性を検証する。

#### 4 . 研究成果

どのようにして HTLV-1 感染 T 細胞においてナノチューブ形成が誘導されるか分子メカニズムを詳細に解析した。その結果、HTLV-1 がコードする Tax タンパク質が細胞内の NF B シグナル経路を活性化して M-Sec の異所性発現を誘導することがわかった。

一方、M-Sec によるナノチューブ形成に關与する細胞内因子についても詳細に解析した。我々が HIV-1 感染マクロファージにおいて M-Sec 下流分子として着目している細胞内因子 RalA、Cdc42、Rac1 について、これらの阻害剤を用いた in vitro 解析を行ったところ、HTLV-1 感染においては RalA が T 細胞におけるナノチューブ形成に關与することがわかった。

また、HTLV-1 感染 T 細胞で異所性発現した M-Sec によって形成されたナノチューブについて、HTLV-1 感染伝播への關与を明確にするために、M-Sec を発現抑制した T 細胞株 MT-2 を用いたマウス感染実験を行ったところ、M-Sec 発現抑制によって HTLV-1 の細胞間感染伝播を抑制することがわかった。

このような分子メカニズム解析の知見から、独自に同定している M-Sec 機能阻害剤 (NPD3064) について、HTLV-1 感染伝播の抑制活性を細胞株による共培養実験系で検討した。その結果、NPD3064 は HTLV-1 感染細胞株から非感染細胞への感染伝播を抑制することがわかった。

さらに、臨床応用に近づけるために、ヒト由来の血液細胞を用いた検討も行った。まず、M-Sec 阻害剤の細胞毒性について調べた。ヒト由来のプライマリ血液細胞に様々な濃度で M-Sec 阻害剤を添加して培養した後、細胞生存率を調べたところ、顕著な細胞毒性が見られない M-Sec 阻害剤の濃度を明らかにすることができた。この細胞毒性を示さない M-Sec 阻害剤の濃度はヒト由来の血液細胞において M-Sec 機能阻害に十分な活性を示すかを確認したところ、これまでの in vitro における M-Sec の発現抑制実験で観察されていた結果と同様のナノチューブ形成阻害が確認できた。また、細胞毒性を示さない M-Sec 阻害剤の濃度において HTLV-1 キャリア末梢血由来の CD4+ T 細胞を用いた in vitro 感染実験を行い、M-Sec 阻害剤の HTLV-1 感染抑制活性を調べた。すなわち、感染源の細胞として HTLV-1 キャリア末梢血から CD4+ CADM1+ T 細胞を精製し、健常人末梢血から精製した CD4+ T 細胞を標的細胞として M-Sec 阻害剤の存在下で共培養した。その結果、有意に HTLV-1 感染を抑制することがわかった。

このことから、HTLV-1 感染の治療戦略としてナノチューブ機能阻害は有効である可能性があり、NPD3064 は抗 HTLV-1 剤の候補として期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Lotfi Sameh, Nasser Hesham, Noyori Osamu, Hiyoshi Masateru, Takeuchi Hiroaki, Koyanagi Yoshio, Suzu Shinya	4. 巻 17
2. 論文標題 M-Sec facilitates intercellular transmission of HIV-1 through multiple mechanisms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Retrovirology	6. 最初と最後の頁 20-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12977-020-00528-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------