

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-535293

(P2007-535293A)

(43) 公表日 平成19年12月6日(2007.12.6)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
<b>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/02	4 B O 6 3
<b>A 6 1 K 38/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/02	4 C O 8 4
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	4 H O 4 5
<b>A 6 1 P 29/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 29/00	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 33 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2006-505346 (P2006-505346)  
 (86) (22) 出願日 平成16年4月30日 (2004.4.30)  
 (85) 翻訳文提出日 平成17年12月28日 (2005.12.28)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2004/004624  
 (87) 国際公開番号 W02004/096841  
 (87) 国際公開日 平成16年11月11日 (2004.11.11)  
 (31) 優先権主張番号 03291067.1  
 (32) 優先日 平成15年5月2日 (2003.5.2)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 505409247  
 サントル ナショナル ドゥ ラ ルシェ  
 ルシェ シアンティフィク  
 CENTRE NATIONAL DE  
 LA RECHERCHE SCIENT  
 IFIQUE  
 フランス国, エフ-75794 パリ セ  
 デックス 16, リュ ミシェル-アンジ  
 ュ, 3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HTLVエンベロップのレセプターとしてのGLUT1及びその使用

## (57) 【要約】

本発明は、脊椎動物に偏在するグルコース輸送担体又はそれ由来のフラグメント若しくは配列の使用であって、腫瘍マーカーとして使用される場合は、癌の試験管内での使用のため、又はPTLVに感染した個体に関連した病態、若しくは細胞表面上のGLUT1の過剰発現に関連した病態の予防、若しくは治療のための薬剤の調製のために有用な化合物のスクリーニング、又は細胞表面上のGLUT1の試験管内での検出のための、使用に関する。また、本発明は、GLUT1又はそれ由来のフラグメント若しくは配列を含む医薬組成物、及びその使用、例えばPTLVに感染した個体に関連する病態の予防又は治療の範囲内の使用に関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

P T L V のエンベロープタンパク質に相当するポリペプチド、又はそれ由来のフラグメント若しくは配列の使用、あるいは前記ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の使用であって（ここで、前記ポリペプチドは、脊椎動物に偏在する配列番号 2 のグルコーストランスポーター G L U T 1 に特異的に結合するそれらの能力で選択されるものとする）

細胞表面上の G L U T 1 の過剰発現に関連した病態の予防又は治療の薬剤の調製への前記使用、及び前記病態の試験管内での診断への前記使用。

## 【請求項 2】

以下の G L U T 1 のフラグメント少なくとも 1 つと結合することのできるポリペプチドの、請求項 1 に記載の使用：

- 配列番号 25 : N A P Q K V I E E F Y
- 配列番号 26 : N Q T W V H R Y G E S I L P T T L T T L W S
- 配列番号 27 : K S F E M L I L G R
- 配列番号 28 : D S I M G N K D L
- 配列番号 29 : Y S T S I F E K A G V Q Q P
- 配列番号 30 : E Q L P W M S Y L S
- 配列番号 31 : Q Y V E Q L C
- 配列番号 32 : I V G M C F Q Y V E Q L C

## 【請求項 3】

少なくとも以下の G L U T 1 のフラグメントと結合することのできるポリペプチドの、請求項 1 又は 2 に記載の使用：

- 配列番号 32 : I V G M C F Q Y V E Q L C

## 【請求項 4】

以下の中から選ばれる G L U T 1 結合性ポリペプチドの、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の使用：

- 配列番号 4 に相当する H T L V<sub>1</sub>、又は配列番号 6 に相当する H T L V<sub>2</sub>、又は配列番号 8 に相当する S T L V<sub>1</sub>、又は配列番号 10 に相当する S T L V<sub>2</sub>、又は配列番号 12 に相当する S T L V<sub>3</sub> のエンベロープタンパク質、

- P T L V の前記エンベロープタンパク質のフラグメント、ここで、前記フラグメントは、P T L V の前記エンベロープタンパク質（例えば、配列番号 4、6、8、10、12）の、N 末端の 1 ~ 90 の位置、又は 75 ~ 90 に位置するアミノ酸によって、及び C 末端の 135 ~ 245 の位置、又は 135 ~ 150 に位置するアミノ酸によって特定されるポリペプチドに相当する、

- P T L V のエンベロープタンパク質のフラグメント、ここで、前記フラグメントは、以下のポリペプチドに相当するものとする：

\* 配列番号 4 に相当する H T L V<sub>1</sub> の M T - 2 株のエンベロープタンパク質の、N 末端の 83 ~ 89 に位置するアミノ酸、及び C 末端の 139 ~ 145 に位置するアミノ酸によって特定されるポリペプチド、

\* 配列番号 6 に相当する H T L V<sub>2</sub> の N R A 株のエンベロープタンパク質の、N 末端の 79 ~ 85 に位置するアミノ酸、及び C 末端の 135 ~ 141 に位置するアミノ酸によって特定されるポリペプチド、

\* 配列番号 8 に相当する S T L V<sub>1</sub> のエンベロープタンパク質の、N 末端の 83 ~ 89 に位置するアミノ酸、及び C 末端の 139 ~ 145 に位置するアミノ酸によって特定されるポリペプチド、

\* 配列番号 10 に相当する S T L V<sub>2</sub> のエンベロープタンパク質の、N 末端の 79 ~ 85 に位置するアミノ酸、及び C 末端の 135 ~ 141 に位置するアミノ酸によって特定されるポリペプチド、

\* 配列番号 12 に相当する S T L V<sub>3</sub> のエンベロープタンパク質の、N 末端の 8

10

20

30

40

50

2 ~ 88 に位置するアミノ酸、及び C 末端の 138 ~ 144 に位置するアミノ酸によって特定されるポリペプチド、

\* 以下の配列番号 14 の配列を有する、HTLV-1 の変異株のエンベロープタンパク質に相当するポリペプチド、

```
I K K P N P N G G G Y Y L A S Y S D
P C S L K C P Y L G C Q S W T C P Y
T G A V S S P Y W K F Q Q D V
```

\* 以下の配列番号 16 の配列を有する、HTLV-1 の変異株のエンベロープタンパク質に相当するポリペプチド、

```
V K K P N R N G G G Y Y L A S Y S D
P C S L K C P Y L G C Q S W T C P Y
T G A V S S P Y W K F Q Q D V
```

10

\* 以下の配列番号 18 の配列を有する、HTLV-1 の変異株のエンベロープタンパク質に相当するポリペプチド、

```
I K K P N R N G G G Y Y L A S Y S D
P C S L K C P Y L G C Q S W T C P Y
T G A V S S P Y W K F Q Q D V
```

\* 以下の配列番号 20 の配列を有する HTLV-1 の変異株のエンベロープタンパク質に相当するポリペプチド、

```
I K K P N R N G G G Y Y L A S Y S D
P C S L K C P Y L G C Q S W T C P Y
T G P V S S P Y W K F Q Q D V
```

20

\* 以下の配列番号 22 の配列を有する HTLV-1 の変異株のエンベロープタンパク質に相当するポリペプチド、

```
I K K P N R N G G G Y H S A S Y S D P
C S L K C P Y L G C Q S W T C P Y A G
A V S S P Y W K F Q Q D V N F T Q E V
```

\* 以下の配列番号 24 の配列を有する HTLV-2 の変異株のエンベロープタンパク質に相当するポリペプチド、

```
I R K P N R Q G L G Y Y S P S Y N D
P C S L Q C P Y L G S Q S W T C P Y
T A P V S T P S W N F H S D V
```

30

#### 【請求項 5】

前記病態が、以下の病態であることを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の GLUT1 結合性ポリペプチドの使用：

- 固形腫瘍、例えば、脳腫瘍、扁平上皮癌、下咽頭癌、乳癌、頸癌、卵巣癌、膵癌、インスリノーマ、

- 炎症状態、例えば、多発性硬化症、関節リウマチ、

- 免疫病又は自己免疫病、例えば、自己免疫性心筋炎、又は CD28T 細胞活性化のフレームの免疫病又は自己免疫病、又は免疫調節のフレームの免疫病又は自己免疫病、又は全身性紅斑性狼瘡、

40

- 中枢神経の障害、例えば、進行性グルコース輸送担体タンパク 1 型 (GLUT 1) 欠乏症候群。

#### 【請求項 6】

細胞表面上の GLUT1 の過剰発現に関連した病態、例えば、請求項 5 で定義した病態の、試験管内での診断方法のフレームの細胞表面上の GLUT1 の試験管内での検出のための GLUT1 結合性ポリペプチドの使用であって、前記方法が以下の工程を含む請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の使用：

- 個体からの生体サンプルを GLUT1 結合性ポリペプチドと接触させる工程であって、前記 GLUT1 結合性ポリペプチドが、場合により標識され、又は標識分子によ

50

って認識されることができるとしてある工程

- 生体サンプルに含まれる細胞に結合した前記 G L U T 1 結合性ポリペプチドの濃度を決定し、そして健常人の生体サンプルに含まれる細胞に対する前記 G L U T 1 結合性ポリペプチドの結合の濃度と比較する工程。

【請求項 7】

前記ポリペプチドをその表面に含む薬剤ベクターの調製への請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の G L U T 1 結合性ポリペプチド又は前記ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の使用であって、前記ベクターが細胞表面上の G L U T 1 の過剰発現に関連した病態の予防又は治療のための G L U T 1 の過剰発現細胞を標的とするために有用であり、前記ベクターが前記病態に対する分子活性を含むか、又はそれらの病態の遺伝子治療のフレームの遺伝子を含む、使用。

10

【請求項 8】

G L U T 1 結合性ポリペプチドをその表面に含む薬剤ベクターの調製への請求項 7 に記載の使用であって、請求項 5 に記載の病態の予防及び治療のための使用であって、前記ベクターが G L U T 1 過剰発現腫瘍細胞、又は炎症機構に係わる細胞、又は免疫システムの活性化細胞、又は中枢神経の細胞を標的とするために有用である使用。

【請求項 9】

前記病態に対する分子活性が、抗腫瘍分子、あるいは炎症状態、免疫病若しくは自己免疫病、又は中枢神経の障害に対する分子である、請求項 7 又は 8 に記載の使用。

【請求項 10】

細胞表面上の G L U T 1 の過剰発現に関連した病態、例えば請求項 5 で定義した病態での、G L U T 1 の過剰発現細胞を標的とするために有用な治療用ベクターであって、前記ベクターが請求項 1 ~ 4 のいずれか一項で定義した G L U T 1 結合性ポリペプチドの中から選ばれたポリペプチドをその表面に含み、及び前記病態に対する請求項 9 で定義した分子活性、又は遺伝子治療に含まれる遺伝子を含む、治療用ベクター。

20

【請求項 11】

医薬上許容可能な担体と共に、請求項 10 に記載の治療用ベクターとを含む医薬組成物。

【請求項 12】

細胞表面上の G L U T 1 の過剰発現に関連した病態の予防又は治療、及び前記病態の試験管内での診断のために有用な化合物のスクリーニング方法であって、

30

- 配列番号 2 で表される G L U T 1、又は請求項 2 で定義されたフラグメント、又はそれ由来の配列であって、前記フラグメント又は由来配列が霊長類 T 細胞白血病ウイルス ( P T L V ) 又は G L U T 1 発現細胞のエンベロープタンパク質に結合することのできるフラグメント又は由来配列であり、それらを試験される化合物と共に接触させる工程、

- G L U T 1 又はフラグメント又はそれ由来の配列に特異的に結合することのできる化合物を選択する工程、を含むスクリーニング方法。

【請求項 13】

40

細胞表面上の G L U T 1 の過剰発現に関連した病態の、試験管内での診断方法であって、

- 個体からの生体サンプルを、G L U T 1 に特異的に結合することによって選択されたポリペプチドであって、前記ポリペプチドが場合によって標識され、又は標識分子によって認識されることができるとしてあるポリペプチドと接触させる工程、

- 生体サンプルに含まれる細胞に結合する前記ポリペプチドの濃度を決定し、そして健常人の生体サンプルに含まれる細胞に結合する前記ポリペプチドの濃度と比較する工程、

を含むことを特徴とする診断方法。

【請求項 14】

50

請求項 5 で定義された病態の試験管内での診断のための、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

請求項 1 ~ 4 で定義され、場合により標識化されている G L U T 1 結合性ポリペプチドと、必要により、生物学的検体の細胞表面上に最初に存在している G L U T 1 に対するポリペプチドの結合を検出するための試薬とを含むキットであって、細胞表面上の G L U T 1 の過剰発現に関連した病態の試験管内での、請求項 1 3 又は 1 4 に記載の方法による診断用の前記キット。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、偏在する脊椎動物の、配列番号 2 によって表わされるグルコース輸送担体 G L U T 1、又はそれ由来のフラグメント若しくは配列の使用であって、腫瘍マーカーとして使用される場合は、癌の試験管内での診断のため、又は P T L V に感染した個体に関連した病態、若しくは細胞表面上の G L U T 1 の過剰発現に関連した病態の予防、若しくは治療のための薬剤の調製のために有用な化合物のスクリーニング、又は細胞表面上の G L U T 1 の試験管内での検出のための、使用に関する。また、本発明は、G L U T 1 又はそれ由来のフラグメント若しくは配列を含む医薬組成物、及びその使用、例えば P T L V に感染した個体に関連する病態の予防又は治療のフレームの ( i n t h e f r a m e o f ) 使用に関する。

10

【0002】

ヒト T 細胞白血病ウイルス ( H T L V ) は、白血病及び神経症候群に関連している。H T L V の生理病理学におけるウイルスエンベロープの役割は、明らかでなく、そしてすべての脊椎動物の細胞株に見られる、エンベロープレセプターは同定されていない。

20

【0003】

H T L V エンベロープ糖タンパク質は、試験管内でシンシチウム形成を誘導するが、その生理病理学的な効果は不明である。H T L V エンベロープ介在性のシンシチウム形成に対して耐性の細胞も含め、すべての脊椎動物の細胞株は、機能的な H T L V エンベロープレセプターを発現している。我々は、H T L V レセプター結合ドメインの発現が、グルコースの消費を減少させることにより、乳酸産生を減少させるが、一方、結合欠損エンベロープ変異体はグルコース代謝を変化させないことを見出した。グルコース欠乏は、H T L V のレセプターの発現を増加させるが、栄養感受性反応を連想させる。従って、偏在する脊椎動物のグルコース輸送担体、G L U T 1 の過剰発現は、H T L V エンベロープ結合及び H T L V エンベロープと同じ場所に局在する G L U T - 1 を特異的に増加させる。更に、H T L V エンベロープの結合は、ヒト赤血球で最も高いが、ヒト赤血球では、G L U T 1 を強く発現しており、そしてそれが、唯一のグルコース輸送担体イソフォームである。これらの結果は、G L U T - 1 が H T L V エンベロープのレセプターであり、このリガンド/レセプター相互作用が、H T L V 感染の免疫及び神経障害に参与していることを示している。

30

【0004】

従って、本発明は、配列番号 2 で表わされる偏在する脊椎動物のグルコース輸送担体 G L U T 1、又は霊長類 T 細胞白血病ウイルス ( P T L V ) のエンベロープタンパク質に結合することのできる、それ由来のフラグメント若しくは配列の使用、あるいは G L U T 1 の発現細胞の以下のための使用であって、

40

- G L U T 1 に対する特異的な結合できることにより選択される有効な化合物の以下のためのスクリーニングであり、

\* 個体の P T L V 感染に関連する病態の予防又は治療のための化合物の調製、

\* 細胞表面上の G L U T 1 の過剰発現に関連した病態の予防又は治療のための化合物の調製、

\* 細胞表面の G L U T 1 の試験管内での検出、

- P T L V 若しくはその変異体、又は P T L V エンベロープタンパク質若しくは

50

そのフラグメントの検出、濃縮、及び/又は精製、であり

- P T L V、例えば、H T L V - 1、H T L V - 2、S T L V - 1、S T L V - 2、S T L V - 3、又はその変異株による個体又は動物感染に関連する病態、あるいは P T L V S U - 関連配列の個体又は動物での存在に関連する病態の、予防又は治療のための薬剤の調製、

- 腫瘍マーカーとして使用される場合の、試験管内での癌の診断、のための使用である。

【0005】

説明の目的のために、G L U T 1 に結合可能な前記化合物の一例として、G L U T 1 に結合可能な P T L V の R B D ( r e c e p t o r b i n d i n g d o m a i n ) 由来の E G F P - タグのついた G L U T 1 結合化合物を用いた以下の方法に従って、前記スクリーニングされた化合物は、前記 G L U T 1 又は G L U T 1 のフラグメントとの特異的結合能によって選択される。

10

【0006】

P T L V の R B D ( r e c e p t o r b i n d i n g d o m a i n ) 由来の E G F P - タグのついた G L U T 1 結合化合物を、生の、又は固定された、浮遊性又は付着性の細胞にと接触させる。適当なバッファーで洗浄後、細胞を30分、室温でインキュベートし洗浄する。そして蛍光顕微鏡用の適当な担体に付着させるか、又は蛍光分析細胞選別装置で個別の細胞を浮遊させた状態で、解析又は定量する。あるいは、P T L V R B D 由来の非蛍光 G L U T - 1 結合成分を、前記のように細胞と接触させ、二次蛍光色素結合試薬、例えば、P T L V R B D、又は前記 P T L V R B D 成分に付着している非蛍光色素タグに結合する蛍光色素結合二次抗体で、検出される。

20

【0007】

本発明は、より具体的には、前記定義された、以下から選ばれる G L U T 1 のフラグメントの使用に関する。

- 配列番号 25 : N A P Q K V I E E F Y
- 配列番号 26 : N Q T W V H R Y G E S I L P T T L T T L W S
- 配列番号 27 : K S F E M L I L G R
- 配列番号 28 : D S I M G N K D L
- 配列番号 29 : Y S T S I F E K A G V Q Q P
- 配列番号 30 : E Q L P W M S Y L S
- 配列番号 31 : Q Y V E Q L C
- 配列番号 32 : I V G M C F Q Y V E Q L C

30

【0008】

これらの G L U T 1 フラグメントは、Mueckler と Makepeace ( Mueckler, M., and C. Makepeace. 1997. Identification of an amino acid residue that lies between the exofacial vestibule and exofacial substrate-binding site of the GLUT1 sugar permeation pathway. J Biol Chem. 272(48):30141-6. ) によって記載された、ヒト G L U T 1 の推定上の細胞外ループに相当する。

40

【0009】

また、本発明は、前記定義された G L U T 1 に対する特異的結合能によって選択された化合物であって、個体の P T L V 感染に関連する病態、例えば、成人 T 細胞白血病に対応する病態である、H T L V I 関連脊髄症 / 熱帯性痙攣性不全対麻痺 ( H A M / T P S )、及び他の H T L V 関連症候群、例えば、大型顆粒リンパ球 ( L G L ) 白血病 ( Loughran, T. P., K. G. Hadlock, R. Perzova, T. C. Gentile, Q. Yang, S. K. Fong, and B. J. Poiesz. 1998. Epitope mapping of

50

HTLV envelope seroreactivity in LGL leukemia. *Br J Haematol.* 101(2):318-24.)、ブドウ膜炎 (Mochizuki, M., A. Ono, E. Ikeda, N. Hikita, T. Watanabe, K. Yamaguchi, K. Sagawa, and K. Ito. 1996. HTLV-I uveitis. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirology.* 13 Suppl 1:S50-6.)、感染性皮膚炎 (La Grenade, L., R. A. Schwartz, and C. K. Janniger. 1996. Childhood dermatitis in the tropics: with special emphasis on infective dermatitis, a marker for infection with human T-cell leukemia virus-I. *Cutis.* 58(2):115-8.)、関節症 (Nishioka, K., T. Sumida, and T. Hasunuma. 1996. Human T lymphotropic virus type I in arthropathy and autoimmune disorders. *Arthritis Rheum.* 39(8):1410-8.)、皮膚T細胞リンパ腫 (菌状息肉腫) (Hall, W. W., C. R. Liu, O. Schneewind, H. Takahashi, M. H. Kaplan, G. Roupe, and A. Vahlne. 1991. Deleted HTLV-I provirus in blood and cutaneous lesions of patients with mycosis fungoides. *Science.* 253(5017):317-20. 2. Zucker-Franklin, D., B. A. Pancake, M. Marmor, and P. M. Legler. 1997. Reexamination of human T cell lymphotropic virus (HTLV-I/II) prevalence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(12):6403-7)、多発性筋炎 (Saito M, Higuchi I, Saito A, Izumo S, Usuku K, Bangham CR, Osame M. Molecular analysis of T cell clonotypes in muscle-infiltrating lymphocytes from patients with human T lymphotropic virus type 1 polymyositis. *J Infect Dis.* 2002 Nov 1;186(9):1231-41)、及びPTLV又はPTLVの配列が有している、潜在的な他の突発性疾患の、予防又は治療の薬剤としての、前記定義されたGLUT1に対する特異的結合能によって選択される化合物の使用に関する。

#### 【0010】

本発明は、より具体的には、個体のPTLV感染に関連する病態の予防又は治療の薬剤の調製のための以下から選択される化合物であって、

- アンドロゲン性ステロイド (36: May JM, Danzo BJ. Photolabeling of the human erythrocyte glucose carrier with androgenic steroids. *Biochim Biophys Acta.* 1988 Aug 18;943(2):199-210)、

- サイトカラシンB (cytochalasin B)、フォルスコリン (forskolin) ジピリダモール (dipyridamole)、イソブチルメチルキサンチン (isobutylmethylxanthine) (20: Hellwig B, Joost HG. Differentiation of erythrocyte- (GLUT1), liver- (GLUT2), and adipocyte-type (GLUT4) glucose transporters by b

inding of the inhibitory ligands cytochalasin B, forskolin, dipyrindamole, and isobutylmethylxanthine. Mol Pharmacol. 1991 Sep; 40(3): 383-9)、

- エタノール (Krauss SW, Diamond I, Gordon AS. Selective inhibition by ethanol of the type 1 facilitative glucose transporter (GLUT1). Mol Pharmacol. 1994 Jun; 45(6): 1281-6)、

- ゲニステイン (genistein) (Vera JC, Reyes AM, Carcamo JG, Velasquez FV, Rivas CI, Zhang RH, Strobel P, Iribarren R, Scher HI, Slebe JC, et al. Genistein is a natural inhibitor of hexose and dehydroascorbic acid transport through the glucose transporter, GLUT1. J Biol Chem. 1996 Apr 12; 271(15): 8719-24)、 10

- カドミウム (Lachaal M, Liu H, Kim S, Spangler RA, Jung CY. Cadmium increases GLUT1 substrate binding affinity in vitro while reducing its cytochalasin B binding affinity. Biochemistry. 1996 Nov 26; 35(47): 14958-62)、 20

- バルビツレート (el-Barbary A, Fenstermacher JD, Haspel HC. Barbiturate inhibition of GLUT-1 mediated hexose transport in human erythrocytes exhibits substrate dependence for equilibrium exchange but not unidirectional sugar flux. Biochemistry. 1996 Dec 3; 35(48): 15222-7)、 30

- デヒドロアスコルビン酸 (dehydroascorbic acid) (Rumsey SC, Kwon O, Xu GW, Burant CF, Simpson I, Levine M. Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid. J Biol Chem. 1997 Jul 25; 272(30): 18982-9)、

- トリサイクリック抗うつ剤 (tricyclic antidepressants) (Pinkofsky HB, Dwyer DS, Bradley RJ. The inhibition of GLUT1 glucose transport and cytochalasin B binding activity by tricyclic antidepressants. Life Sci. 2000; 66(3): 271-8. )、 40

- エストラジオール (oestradiol)、ゲニステイン (genistein) 及び抗エストロゲン (the anti-oestrogens)、ファスロデックス (faslodex: ICI 182780)、タモキシフェン (tamoxifen) (Afzal I, Cunningham P, Naftalin RJ. Interactions of ATP, oestradiol, genistein and the anti-oestrogens, faslodex (ICI 182780) and tamoxifen, with the human erythrocyte glucose transporter, GLUT1. Bio 50

chem J. 2002 Aug 1; 365 (Pt 3): 707-19)、

- ペルオキシソームプロリフェレーター活性レセプターのガンマアゴニスト (gamma agonists of peroxisome proliferator-activated receptors: PPAR)、例えば、チアゾリジンジオン (thiazolidinedione) [トログリタゾン (troglitazone)、ピオグリタゾン (pioglitazone) 又はシグリタゾン (siglitazone)] ("TZDs modify astrocyte metabolism and mitochondrial function, which could be beneficial in neurological conditions where glucose availability is reduced" from Dello Russo C, Gavriljuk V, Weinberg G, Almeida A, Bolanos JP, Palmer J, Pelligrino D, Galea E, Feinstein DL. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma thiazolidinedione agonists increase glucose metabolism in astrocytes. J Biol Chem. 2003 Feb 21; 278 (8): 5828-36) の化合物の使用に関する。 10

【0011】

また、本発明は、細胞表面上の GLUT 1 過剰発現に関連する病態の、予防又は治療の薬剤調製のための、前記定義した GLUT 1 に対する特異的結合能によって選択された化合物の使用であって、前記病態が、例えば、 20

- 癌、例えば：

. 扁平上皮癌 (Kunkel M, Reichert TE, Benz P, Lehr HA, Jeong JH, Wieand S, Bartenstein P, Wagner W, Whiteside TL. Cancer. 2003 Feb 15; 97 (4): 1015-24)

. 下咽頭癌 (Mineta H, Miura K, Takebayashi S, Misawa K, Araki K, Misawa Y, Ueda Y. Anticancer Res. 2002 Nov-Dec; 22 (6B): 3489-94)、 30

. 乳癌 (Brown RS, Wahl RL. Overexpression of Glut-1 glucose transporter in human breast cancer. An immunohistochemical study. Cancer. 1993 Nov 15; 72 (10): 2979-85)、

. 子宮頸癌 (cervical carcinoma) (Mendez LE, Mancini N, Cantuaria G, Gomez-Marin O, Penalver M, Braunschweiger P, Nadji M. Expression of glucose transporter-1 in cervical cancer and its precursors. Gynecol Oncol. 2002 Aug; 86 (2): 138-43)、 40

. 卵巣癌 (Cantuaria G, Fagotti A, Ferrandina G, Magalhaes A, Nadji M, Angioli R, Penalver M, Mancuso S, Scambia G. GLUT-1 expression in ovarian carcinoma: association with survival and response to chemotherapy. Cancer. 2001 Sep 1; 92 (5): 1144-50)、

. 肺癌 (Ito T, Noguchi Y, Satoh S, Ha 50

yashi H, Inayama Y, Kitamura H. Expression of facilitative glucose transporter isoforms in lung carcinomas: its relation to histologic type, differentiation grade, and tumor stage. *Mod Pathol.* 1998 May; 11(5): 437-43. Younes M, Brown RW, Stephenson M, Gondo M, Cagle PT. Overexpression of Glut1 and Glut3 in stage I nonsmall cell lung carcinoma is associated with poor survival. *Cancer.* 1997 Sep 15; 80(6): 1046-51)、

. 膵癌 (Reske SN, Grillenberger KG, Glatting G, Port M, Hildebrandt M, Gansauge F, Beger HG. Overexpression of glucose transporter 1 and increased FDG uptake in pancreatic carcinoma. *J Nucl Med.* 1997 Sep; 38(9): 1344-8)、

. インスリノーマ (1: Boden G, Murer E, Mozzoli M. Glucose transporter proteins in human insulinoma. *Ann Intern Med.* 1994 Jul 15; 121(2): 109-12、

- 炎症性状態

- 免疫病又は自己免疫病、例えば、

. 自己免疫性心筋炎 (Tokita N, Hasegawa S, Tsujimura E, Yutani K, Izumi T, Nishimura T. Serial changes in 14C-deoxyglucose and 201Tl uptake in autoimmune myocarditis in rats. *J Nucl Med.* 2001 Feb; 42(2): 285-91)、

. CD28T細胞活性化のフレームの (in the frame of) 免疫病又は自己免疫病 (Frauwirth KA, Riley JL, Harris MH, Parry RV, Rathmell JC, Plas DR, Elstrom RL, June CH, Thompson CB. The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity.* 2002 Jun; 16(6): 769-77)、

. 免疫調節のフレーム (in the frame of) の免疫病又は自己免疫病 (Moriguchi S, Kato M, Sakai K, Yamamoto S, Shimizu E. Decreased mitogen response of splenic lymphocytes in obese Zucker rats is associated with the decreased expression of glucose transporter 1 (GLUT-1). *Am J Clin Nutr.* 1998 Jun; 67(6): 1124-9)、

- 中枢神経系の障害、例えば、進行性グルコース輸送担体タンパク1型 (GLUT1) 欠乏症候群 (review in Klepper J, Voit T. *Eur J Pediatr.* 2002 Jun; 161(6): 295-304.) である、化合物の使用に関する。

【0012】

本発明は、より具体的には、細胞表面のGLUT1の過剰発現に関連する、病態の予防

10

20

30

40

50

又は治療の薬剤の調製のための、以下の中から選択される化合物の使用であって、

- P T L Vのエンベロープタンパク質に相当するポリペプチド又はG L U T 1に結合することができるフラグメント若しくはそれ由来の配列、

- グルコース又は誘導体、例えば、ガラクトース、2 - フッ化デオキシグルコース、2 - デオキシグルコース、3 - O - メチルグルコース、

- 前記アンドロゲン性ステロイド、サイトケラシンB ( c y t o c h a l a s i n B )、フォルスコリン ( f o r s k o l i n )、ジピリダモール ( d i p y r i d a m o l e )、イソブチルメチルキサンチン ( i s o b u t y l m e t h y l x a n t h i n e ) エタノール、ゲニステイン ( g e n i s t e i n )、カドミウム、バルビツレート ( b a r b i t u r a t e ) デヒドロアスコルビン酸 ( d e h y d r o a s c o r b i c a c i d )、トリサイクリック抗うつ剤 ( t r i c y c l i c a n t i d e p r e s s a n t s ) エストラジオール ( o e s t r a d i o l ) 抗エストゲン ( a n t i - o e s t r o g e n s ) ファスロデックス ( f a s l o d e x : I C I 1 8 2 7 8 0 )、タモキシフェン ( t a m o x i f e n )、ペルオキシソームプロリフレーター活性レセプターのガンマアゴニスト ( g a m m a a g o n i s t s o f p e r o x i s o m e p r o l i f e r a t o r - a c t i v a t e d r e c e p t o r s : P P A R )、例えば、チアゾリジンジオン ( t h i a z o l i d i n e d i o n e )、トログリタゾン ( t r o g l i t a z o n e )、ピオグリタゾン ( p i o g l i t a z o n e ) 又はシグリタゾン ( s i g l i t a z o n e ) である、化合物の使用に関する。

【0013】

本発明は、より具体的には、病態の予防又は治療の薬剤の調製のため、及び前記病態の試験管内での診断のための、配列番号2で表される、脊椎動物に偏在するグルコーストランスポート-G L U T 1への特異的な結合能で選択される、P T L Vのエンベロープタンパク質に相当するポリペプチド、又はそれ由来のフラグメント、若しくは配列の使用、あるいは細胞表面上のG L U T 1の過剰発現に関連した前記ポリペプチドをコードしている、ヌクレオチド配列の使用に関する。

【0014】

本発明は、より具体的には、前記定義された、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32に相当する前記G L U T 1のフラグメントの少なくとも1つと結合することのできるポリペプチドの使用に関する。

【0015】

本発明は、より具体的には、前記定義された、少なくとも配列番号32に相当するG L U T 1のフラグメントと結合することのできるポリペプチドの使用に関する。

【0016】

本発明は、より具体的には、前記で定義された、以下から選択される前記G L U T 1結合性ポリペプチドの使用に関する。

- 配列番号4に対応するH T L V 1、又は配列番号6に対応するH T L V 2、又は配列番号8に対応するS T L V 1、又は配列番号10に対応するS T L V 2、又は配列番号12に対応するS T L V 3のエンベロープタンパク質、

- 前記P T L Vのエンベロープタンパク質、例えば、配列番号4、6、8、10、12の、N末端の1~90の位置、又は75~90の位置に位置するアミノ酸によって、及びC末端の135~245の位置、又は135~150の位置に位置するアミノ酸によって区切られるポリペプチドに対応するP T L Vのエンベロープタンパク質のフラグメント、

- 以下のポリペプチドに対応する、P T L Vのエンベロープタンパク質のフラグメント：

\* 配列番号4に対応するH T L V - 1のM T - 2株のエンベロープタンパク質の、N末端の83~89に位置するアミノ酸によって、及びC末端の139~145に位置するアミノ酸によって区切られる前記ポリペプチド、

10

20

30

40

50

\* 配列番号 6 に対応する H T L V - 2 の N R A 株のエンベロープタンパク質の、N 末端の 7 9 ~ 8 5 に位置するアミノ酸によって、及び C 末端の 1 3 5 ~ 1 4 1 に位置するアミノ酸によって区切られる前記ポリペプチド、

\* 配列番号 8 に対応する S T L V - 1 のエンベロープタンパク質の、N 末端の 8 3 ~ 8 9 に位置するアミノ酸によって、及び C 末端の 1 3 9 ~ 1 4 5 に位置するアミノ酸によって区切られる前記ポリペプチド、

\* 配列番号 1 0 に対応する S T L V - 2 のエンベロープタンパク質の、N 末端の 7 9 ~ 8 5 に位置するアミノ酸によって、及び C 末端の 1 3 5 ~ 1 4 1 に位置するアミノ酸によって区切られる前記ポリペプチド、

\* 配列番号 1 2 に対応する S T L V - 3 のエンベロープタンパク質の、N 末端の 8 2 ~ 8 8 に位置するアミノ酸によって、及び C 末端の 1 3 8 ~ 1 4 4 に位置するアミノ酸によって区切られる前記ポリペプチド、

\* 以下の配列番号 1 4 の配列を有する、H T L V - 1 の変異株のエンベロープタンパク質に対応するポリペプチド、

```
I K K P N P N G G G Y Y L A S Y S D
P C S L K C P Y L G C Q S W T C P Y
T G A V S S P Y W K F Q Q D V
```

\* 以下の配列番号 1 6 の配列を有する、H T L V - 1 の変異株のエンベロープタンパク質に対応するポリペプチド、

```
V K K P N R N G G G Y Y L A S Y S D
P C S L K C P Y L G C Q S W T C P Y
T G A V S S P Y W K F Q Q D V
```

\* 以下の配列番号 1 8 の配列を有する、H T L V - 1 の変異株のエンベロープタンパク質に対応するポリペプチド、

```
I K K P N R N G G G Y Y L A S Y S D
P C S L K C P Y L G C Q S W T C P Y
T G A V S S P Y W K F Q Q D V
```

\* 以下の配列番号 2 0 の配列を有する H T L V - 1 の変異株のエンベロープタンパク質に対応するポリペプチド、

```
I K K P N R N G G G Y Y L A S Y S D
P C S L K C P Y L G C Q S W T C P Y
T G P V S S P Y W K F Q Q D V
```

\* 以下の配列番号 2 2 の配列を有する H T L V - 1 の変異株のエンベロープタンパク質に対応するポリペプチド、

```
I K K P N R N G G G Y H S A S Y S D P
C S L K C P Y L G C Q S W T C P Y A G
A V S S P Y W K F Q Q D V N F T Q E V
```

\* 以下の配列番号 2 4 の配列を有する H T L V - 2 の変異株のエンベロープタンパク質に対応するポリペプチド、

```
I R K P N R Q G L G Y Y S P S Y N D
P C S L Q C P Y L G S Q S W T C P Y
T A P V S T P S W N F H S D V。
```

#### 【 0 0 1 7 】

本発明は、より具体的には、以下の病態の治療又は検出を特徴とする、前記 G L U T 1 結合性ポリペプチドの使用であって、病態が

- 固形腫瘍、例えば、脳腫瘍、扁平上皮癌、下咽頭癌、乳癌、頸癌、卵巣癌、膵癌、インスリノーマ、

- 炎症状態、例えば、多発性硬化症、関節リウマチ、

- 免疫病又は自己免疫病、例えば、自己免疫性心筋炎、又は C D 2 8 T 細胞活性化のフレームの ( i n t h e f r a m e o f ) 免疫病又は自己免疫病、又は免疫調

10

20

30

40

50

節のフレームの (in the frame of) 免疫病又は自己免疫病、又は全身性紅斑性狼瘡、

- 中枢神経の障害、例えば、進行性グルコース輸送担体タンパク1型 (GLUT 1) 欠乏症候群、

である前記 GLUT 1 結合ポリペプチドの使用に関する。

【0018】

本発明は、具体的には、前記 GLUT 1 に対する特異的結合能によって選択された化合物、及びより具体的には、前記定義された GLUT 1 結合性ポリペプチドの使用であって、その使用が細胞表面の GLUT 1 過剰発現に関連する病態の、試験管内での診断方法のフレームの (in the frame of)、細胞表面上の GLUT 1 の試験管内での検出のためであり、前記の方法が以下の工程を含む、使用に関する。

10

- 個体からの生物学的検体 (例えば、腫瘍バイオプシー検体、又は細胞、又は組織検体、又は疑似異常 GLUT 1 発現プロファイルを有する検体) を化合物、そしてより具体的には前記定義された GLUT 1 結合性ポリペプチドと接触させる工程であって、前記化合物又は GLUT 1 結合性ポリペプチドが場合により標識され、又は標識分子によって認識されることができものである、工程

- 生物学的な検体に含まれる細胞に結合した前記化合物、又は GLUT 1 結合性ポリペプチドの濃度を決定し、そして健常人からの生物学的な検体に含まれる細胞に対する前記化合物、又は前記 GLUT 1 結合性ポリペプチドの結合の濃度と比較する工程。

【0019】

20

本発明は、より具体的には、使用される化合物が、GLUT 1 に対する特異的結合能によって選択される前記化合物から選ばれることを特徴とする、癌の試験管内の診断のための、前記定義された化合物の使用に関する。

【0020】

本発明は、より具体的には、前記ポリペプチドをその表面に含む薬剤ベクターの調製のための、前記定義された GLUT 1 結合性ポリペプチド又は前記ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の使用に関し、前記ベクターは細胞表面の GLUT 1 の過剰発現に関連した病態の予防又は治療のために、GLUT 1 過剰発現細胞を標的とするのに有用であり、前記病態に対する活性分子を含むか、又はそれらの病態の遺伝子治療のフレームの (in the frame of) 遺伝子を含むものである。

30

【0021】

本発明は、より具体的には、前記定義された関連病態の予防又は治療のために、GLUT 1 結合性ポリペプチドをそれらの表面に含む薬剤ベクターを調整するための、前記定義された GLUT 1 結合性ポリペプチド又は前記ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の使用に関し、前記ベクターは、GLUT 1 過剰発現腫瘍細胞、又は炎症機構に関連する細胞、又は免疫システムの活性化細胞、又は中枢神経系の細胞を標的とするために有用である。

【0022】

本発明は、より具体的には、前記定義された薬剤ベクターの調整のための、GLUT 1 結合性ポリペプチド、又は前記ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の使用に関し、前記病態に対する活性分子は抗腫瘍分子、あるいは炎症状態、免疫病若しくは自己免疫病、又は中枢神経の障害に対する分子である。

40

【0023】

本発明は、前記定義された GLUT 1 に対する特異的な結合能によって選択されたポリペプチド化合物、例えば、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、又はそのフラグメント、をコードするヌクレオチド配列の使用に関し、前記ヌクレオチド配列の一個又は数個の置換によって、GLUT 1 に対する結合能ができない、変異ポリペプチドをコードしている変異ヌクレオチド配列の調整のための、ヌクレオチド配列の使用に関する。

【0024】

本発明は、また、前記定義された、GLUT 1 に対する結合能のない変異ポリペプチド

50

であって、

- 非変異ポリペプチドに特異的に結合することのできる化合物のスクリーニングのフレームの (in the frame of) 陰性対照として、そのため、PTLV の個体の感染に関連する病態の予防又は治療のための薬剤の調製のフレームで (in the frame of) 信頼され使用されるものであり、

- 個体の PTLV 感染に関連する病態の予防又は治療のための薬剤の調製のための、変異ポリペプチドの使用に関する。

【0025】

本発明は、より具体的には、前記定義されたポリペプチドに相当する変異ポリペプチドであって、

- 配列番号 4 に対応する HTLV - 1 のエンベロープタンパク質の中の 106 の位置の D、及び / 又は 114 の位置の Y、

- 配列番号 6 に対応する HTLV - 2 のエンベロープタンパク質の中の 102 の位置の D、及び / 又は 110 の位置の Y、

- 配列番号 8 に対応する STLV - 1 のエンベロープタンパク質の中の 106 の位置の D、及び / 又は 114 の位置の Y、

- 配列番号 10 に対応する STLV - 2 のエンベロープタンパク質の中の 102 の位置の D、及び / 又は 110 の位置の Y、

- 配列番号 12 に対応する STLV - 3 のエンベロープタンパク質の中の 105 の位置の D、及び / 又は 113 の位置の Y、

- 配列番号 14、16、18、20、22、及び 24 に対応するポリペプチドの 18 の位置の D、及び / 又は 26 の位置の Y、

が、野生型又は野生型でない他のアミノ酸、例えば、前記の D 及び / 又は A 残基が A に置換された前記ポリペプチドに相当する変異ポリペプチドの使用に関する。

【0026】

本発明は、また、前記変異ポリペプチドを発現したトランスジェニック哺乳類細胞の調製のための、前記定義された GLUT 1 に対する結合能のない変異ポリペプチド相当をコードする変異ヌクレオチドの使用に関し、前記細胞は PTLV に関して陰性のトランスドミナントな効果を有し、そのため、生物において感染及びその後の伝播を防ぐ細胞である。

【0027】

本発明は、また、医薬的に許容可能な担体とともに、配列番号 2 で表わされる GLUT 1 又はそれ由来のフラグメント若しくは配列を含む医薬組成物に関し、前記フラグメント又は由来配列は、霊長類 T 細胞白血病ウイルス (PTLV) のエンベロープタンパク質に結合できるものである医薬組成物に関する。

【0028】

本発明は、より具体的には、医薬的に許容可能な担体とともに、前記定義されたポリペプチドに相当する変異ポリペプチドであって、

- 配列番号 4 に対応する HTLV - 1 のエンベロープタンパク質の中の 106 の位置の D、及び / 又は 114 の位置の Y、

- 配列番号 6 に対応する HTLV - 2 のエンベロープタンパク質の中の 102 の位置の D、及び / 又は 110 の位置の Y、

- 配列番号 12 に対応する STLV - 3 のエンベロープタンパク質の中の 105 の位置の D、及び / 又は 113 の位置の Y、

- 配列番号 14、16、18、20、22、及び 24 に対応するポリペプチドの 18 の位置の D、及び / 又は 26 の位置の Y、

が、野生型の又は野生型でない他のアミノ酸、例えば、前記の D 及び / 又は A 残基が A に置換された、前記ポリペプチドに相当する変異ポリペプチドを含む医薬組成物に関する。

【0029】

また、本発明は、前記で定義された GLUT 1 に結合できない変異ポリペプチドを発現したトランスジェニック哺乳動物細胞であって、前記細胞が、PTLV に関する陰性トラ

10

20

30

40

50

ンスドミナント効果を有し、そのため、生物において感染及びその後の伝播を防ぐトランスジェニック哺乳動物細胞に関する。

【0030】

本発明は、より具体的には、医薬的に許容可能な担体とともに、前記で定義されたトランスジェニック (transgenic) 哺乳類細胞を含む医薬組成物に関する。

【0031】

また、本発明は、細胞表面上の GLUT 1 の過剰発現に関連する病態において GLUT 1 過剰発現細胞を標的とする有用な、例えば、前記定義した治療用ベクターであって、前記ベクターは、前記定義されたポリペプチドの中から選ばれた GLUT 1 結合性ポリペプチドをその表面に含み、及び前記定義された前記病態に対する活性分子、又は遺伝子治療のフレームの (in the frame of) 遺伝子を含むベクターに関する。

10

【0032】

本発明は、より具体的には、医薬的に許容可能な担体とともに、前記定義された治療用ベクターを含む医薬組成物に関する。

【0033】

また、本発明は、化合物のスクリーニング方法であって、

\* 個体の P T L V 感染に関連する病態の予防又は治療のための薬剤の調製

、

\* 細胞表面の GLUT 1 の過剰発現に関連する病態の予防又は治療のための薬剤の調製、

20

\* 細胞表面の GLUT 1 の試験管内での検出、

のためであって、前記方法が：

- 配列番号 2 で表わされる GLUT 1、又はそれ由来のフラグメント、若しくは配列であって、前記フラグメント又は由来配列が霊長類 T 細胞白血病ウイルス (P T L V) のエンベロープタンパク質と結合可能なフラグメント又は由来配列、と接触させる工程

- GLUT 1 又はそれ由来のフラグメント若しくは配列に特異的に結合可能な化合物を、例えば、前期方法に従って、選択する工程を含む化合物のスクリーニング方法に関する。

【0034】

本発明は、より具体的には、細胞表面の GLUT 1 の過剰発現に関連する病態の予防又は治療、及び前記病態の試験管内での診断に有用な化合物のスクリーニング方法であって、前記工程を含むスクリーニング方法に関する。

30

【0035】

また、本発明は、細胞表面の GLUT 1 の過剰発現に関連する病態の試験管内の診断方法であって、

- 個体からの、生物学的検体 (例えば、生検材料、又は細胞、又は組織検体、又は擬似異常 GLUT 1 発現を示す検体) 及び化合物、又はより具体的には前記で定義された GLUT 1 に対する特異的な結合によって選択されたポリペプチドであって、前記化合物又はポリペプチドが、場合により標識されるか、又は標識分子に認識されることができるとを、接触させる工程、

40

- 生物学的検体に含まれる細胞に結合した前記化合物又はポリペプチドの濃度を決定し、そして、健常人からの生物学的検体に含まれる細胞に対して結合している前記化合物の濃度と比較する工程、を含むことを特徴とする診断方法。

【0036】

本発明は、より具体的には、前記病態の試験管内での診断のための、前記定義された、方法に関する。

【0037】

また、本発明は、前記の細胞表面の GLUT 1 の過剰発現に関連する病態の試験管内の診断キットであって、化合物、及びより具体的には、前記で定義された GLUT 1 に対す

50

る特異的な結合能によって選択されたポリペプチドであって、前記化合物又はポリペプチドが場合により標識されるか、及び所望により、生物学的検体の細胞表面に最初に存在している、GLUT1に結合している化合物又はポリペプチドの検出のための試薬を含んでいるキットに関する。

#### 【0038】

本発明を、これ以後、PTLV RBDの特異的レセプターとしてのGLUT1の同定の詳細な記載とともに、更に説明する。

#### 【0039】

ヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV)タイプ1及び2は、風土病又は散発性の感染因子として、世界中のすべての地域に存在している[Slattey, 1999]。成人T細胞白血病及びHTLV-1関連脊髄症/熱帯性痙攣性不全対麻痺(TPS/HAM)におけるHTLV-1の病因学的な関与が解明されてきた[Poiesz, 1980; Yoshida, 1982; Gessain, 1985; Osame, 1986]。感染患者のT細胞に対して、HTLVが明らかに限定した親和性を示すことは[Cavrois, 1996; Hanon, 2000]、ウイルスのコードしているエンベロタンパク質(ENV)が試験管内で検査されたすべての脊椎動物細胞に対して結合及び侵入する能力を有していることと対照的である[Sutton, 1996; Trejo, 2000; Kim, 2003]。レトロウイルス感染は、ENVと細胞のレセプターの間期の相互作用に依存している。他のレトロウイルスの、細胞のレセプター及び共レセプターの同定は、生物及び集団内でのレトロウイルスの伝播や蔓延と共に、レトロウイルスの生理病理学的な側面を解明に寄与してきた[Berger, 1999; Clapham, 2001; Weiss, 2002]。しかしながら、HTLV-ENV及びHTLV関連疾患の関係は、明らかではなく、HTLV-1及びHTLV-2 ENVのレセプターの同定は、未解明のままであった。

#### 【0040】

多くの、細胞表面成分が、HTLV-ENV介在性シンシチウム形成に関与していることが示されてきている[Niyogi, 2001; Daenke, 1999; Hildreth, 1997]。それにもかかわらず、HTLV-ENV依存性膜融合及びシンシチウム形成は、レセプターの結合それ自体とは、明らかに異なっている[Denesvre, 1996; Daenke, 2000; Kim, 2000; Kim, 2003]。HTLV-ENVレセプターの研究にとって、レセプターの偏在性が、ひとつの障害となっていた[Sutton, 1996; Trejo, 2000; Jassal, 2001; Kim, 2003]。加えて、細胞培養において、HTLV-ENVが発現すると激しいシンシチウム形成が起きることが、効率的で永続的なENVの発現を妨げてきた。HTLVのアミノ末端のドメインは、ストライキング構造(striking structure)及びマウス白血病ウイルスのENVと機能的な相同性を共用しているという我々の知見に基づいて、我々は、HTLV-ENVレセプター結合ドメイン(RBD)を同定し、そしてシンシチウム形成の問題を解決する、HTLV-ENVを基礎とする手段を獲得した[Kim, 2000; Kim, 2003]。このようにして、我々は、ENV-RBD及びHTLVレセプター間の特異的相互作用を、解明することができるようになった。これらの手段を利用し、我々は、既にHTLVレセプターが、T細胞レセプターが活性化された後においてのみ、生体内での主要なHTLVの感染源である、Tリンパ球の表面上に発現していることを示してきた[Manel, 2003]。

#### 【0041】

ここで、我々は、HTLVレセプター結合ドメインと同様にHTLVエンベロプが細胞培養中で発現した後は、急激な代謝の変化があることを示した。これらの変化は、乳酸(Lactate)産生の減少、並びにグルコース消費及び摂取の減少により、細胞培養液の酸性化が起こらないことを特徴としている。複数の膜spanning輸送担体(multiple-membrane-spanning transporters)

のファミリーに属している、MLV及び多くのガンマレトロウイルスに関連したENVレセプターで知られているだけでなく[Overbaugh, 2001]、これらの発見は、我々に、偏在する乳酸(lactate)及びグルコース輸送関連分子がHTLVのレセプターであることを調べさせた。我々は、すべての脊椎動物に存在し、偏在しているGLUT-1グルコース輸送担体がHTLVのレセプターの成分に必須で、特異的なことを示した。更に、不完全なHTLV-1及びHTLV-2RBDだけでなく、全長のHTLV-1及びHTLV-2エンベロ-プ及びGLUT-1との相互作用が、グルコース代謝を変化させている。

#### 【0042】

《HTLVエンベロ-プは乳酸(lactate)代謝を変化させる》

通常、培養液中の細胞増殖は、培地pH指示薬のフェノールレッドが存在下するために、赤から黄色への色調の変化で示される環境の酸性化を伴って起こる。高度にシンシチウムを形成するHTLV-1及びHTLV-2のエンベロ-プ又はMLV ENVにHTLV-1 RBDを組み入れたシンシチウム形成を起こさないキメラエンベロ-プ(H<sub>183</sub> FENV)のいずれのトランスフェクションによっても、培養液は容易には酸性化せず、トランスフェクション後、数日間赤の色調を保っていた(図1a)。更に、またGFP、HAタグ又はrFcタグとの不完全な可溶性HTLV RBD融合タンパク質の発現も、培地の酸性化を阻害した。対照的に、HTLV RBDを有さない、VSV-G及びエボラ糖タンパク質はもちろんであるが、異なるMLVグループ、ネコ、ブタ、レンチウイルス、及びジャグジエクト(Jaagsiekte)レトロウイルスEnvSのエンベロ-プを含むエンベロ-プ構築物は、この効果を示さなかった。(i)シンシチウムを形成する広い宿主域を有するMLV ENV(Rペプチドを欠失しているA-MLV)(図1a)を発現している細胞では、培地の酸性化が、観察されたが、(ii)HTLV ENV介在性のシンシチウム形成に抵抗性の細胞(NIH3T3 TK<sup>-</sup>細胞)でHTLV ENVを発現させた場合は、培地の酸性化が、阻害されることから[Kim, 2003]、HTLV-1又はHTLV-2 ENV発現に関連して酸性化が起こらないのは、それらのシンシチウム活性の間接的な関与ではなかった。

#### 【0043】

細胞培養液のpHの低下は、まず第一に、乳酸の細胞外への蓄積によって起こる[Warburg, 1956]。乳酸は、試験管内での嫌気性解糖の主な副産物であり、そしてH<sup>+</sup>/lactate symporterによって、排出される[Halestrap, 1999]。我々は、様々なレトロウイルスのエンベロ-プ及びRBDをトランスフェクションした後、培養上清中の乳酸含有量をモニターした。乳酸の蓄積は、対照又はMLV ENVをトランスフェクトされた細胞より、H<sub>183</sub> FENV-及びHTLV RBDをトランスフェクトした細胞では、平均して3倍低かった(図1b)。この細胞外でのHTLV RBDトランスフェクション後の乳酸蓄積の減少は、DNAの濃度に依存していた。更に、我々は、HTLV RBDトランスフェクション後の乳酸の蓄積の減少が、新鮮な培地の添加後、早くも4時間後には見られることがわかった。(図1c)

#### 【0044】

《リセプター結合及び乳酸代謝》

HTLVエンベロ-プレセプターの結合及び細胞外の酸性化の低下及び乳酸蓄積の間に直接的な関連が存在するかを調べるために、我々は、レセプター結合能機能が正常でないHTLV-1 RBD(H<sub>1RBD</sub>)変異株の作成を試みた。この目的のために、霊長類Tリンパ球向性ウイルスで高度に保存されたH<sub>1RBD</sub>の2つの異なる位置、D106及びY114に、一個のアラニンの置換が導入された変異株を得た。D106A及びY114AのRBDのいずれの変異株ともに、野生株H<sub>1RBD</sub>と同じように効率的に発現され分泌されたけれども(図2a)、FACS解析による検出では、それらのHTLVレセプターに対する結合は、著しく減少(D106A)又は検出できなかった(Y114A)。更に、結合能のないY114A RBD変異体を発現している細胞では、HTLVレセプ

10

20

30

40

50

ターに関連している乳酸代謝の変化である、乳酸蓄積は減少せず、D106 RBDを含んでいる細胞では最小の減少であった(図2c)。同じ対立遺伝子を持つ、H2<sub>RBD</sub>で、同じような結果が見られた。このような結果は、乳酸関連代謝の変化及びHTLV Env NVレセプター結合の直接的に関連していることを支持している。

#### 【0045】

MCT1モノカルボキシレート輸送担体(monocarboxylate transporter)が、細胞膜へ乳酸を輸送することによって、細胞培養において、細胞外に乳酸が蓄積する[Garcia, 1994]。HTLV及びMLVは細胞外エンベロープの共通の機構を共有していること[Kim, 2000]、及びMLV Envのためのレセプターがマルチスパンニング(multispanning)代謝輸送担体であるために、我々は、HTLV RBDがMCT1に結合しているかどうかを評価した。更に、T細胞でのHTLVレセプターの発現に関する我々のデータと同じように[Manell, 2003]、MCT1シャペロンCD147の発現が[Kirk, 2000]T細胞が活性化される間増加する[Kasinerk, 1992]。しかしながら、HTLV Envのレセプターとしての、MCT1とCD147分子の役割について考えると、MCT1及びCD147の単独又は組み合わせた過剰発現は、H1RBD結合の増加は起こさなかった。

#### 【0046】

##### 《HTLVレセプター及びグルコース代謝》

細胞外乳酸蓄積の減少に加えて、HTLV RBDの発現は、乳酸輸送の上流の代謝変化である細胞内の乳酸濃度の減少も引き起こす。細胞培養における乳酸の蓄積は、嫌氣的解糖によるグルコースの分解に由来している。そのため、我々は、HTLV RBDの発現において観察される乳酸蓄積の減少が、グルコース代謝と関連するかどうかを評価した。我々は、細胞タンパク質の濃度で補正したグルコース消費を測定した。H<sub>183</sub>FE<sub>nv</sub>全長エンベロープ又はH1<sub>RBD</sub>のようなHTLV RBDが発現している細胞のグルコース消費は、対照細胞と比較すると顕著に減少しており(図3a)、そしてこの減少は、早くもトランスフェクション8時間後には検出可能であった。グルコース消費の減少が、細胞表面へのグルコース輸送の減少によるものであるかを調べるために、我々は、対照細胞及びHTLV RBDを発現している細胞の、2-デオキシグルコース及びフルクトースの摂取を測定した(図3b)。我々は、HTLV-1又はHTLV-2 RBDのいずれかを発現していることにより、約4倍の2-デオキシグルコースの減少が観察されたが、A-MLV RBDは軽微な影響のみであった。グルコース摂取の阻害剤である、サイトケラシンB及びフロテリン(pherolitin)もまた、グルコースの摂取を阻害した。これらの結果は、3-O-メチルグルコースの輸送ともあてはまる。HTLV-1、又はHTLV-2 RBDの存在している、同じ細胞でのフルクトースの摂取は、変化は見られなかったが、A-MLV RBDでは、わずかな減少を示した。次に、我々は、付着性のヒト293細胞及び浮遊性のジャーカット(Jurkat)T細胞両方において、HTLVレセプターを利用する上において、グルコース欠乏の効果を調べた。グルコース欠乏下で細胞を一昼夜培養することによって、H1<sub>RBD</sub>の結合は、いずれの細胞でも確実に2倍に増加した。このグルコース欠乏の効果は、HTLVに特異的であって、広指向性nMLV RBD(A<sub>RBD</sub>)の結合は、わずかに影響を受けたのみであった(図3c)。この現象は、一般的な代謝物の輸送のフィードバック機構、基質が欠乏することにより細胞表面上の利用可能な輸送担体が増加することを思い出させる[Martineau, 1972]。

#### 【0047】

##### 《HTLV-1エンベロープはグルコース輸送担体1に結合する》

HTLVエンベロープがグルコース輸送担体に直接、結合することによって、グルコースの消費を阻害するという単純なモデルにより、前記の代謝の効果を説明することが可能である。異なるグルコース輸送担体候補の評価によって、GLUT-1が、HTLVレセプターのすべての公知の性質を網羅している唯一のもののようなものである。確かに、GLUT

10

20

30

40

50

- 1の発現は、グルコース欠乏によって増加し、そしてすべての脊椎動物細胞でグルコースの輸送担体である [ Mueckler, 1985 ]。一方で、フルクトースは GLUT - 5 によって、輸送される。更に、GLUT - 1は休止期のプライマリーT細胞には発現しておらず、そしてその発現は、T細胞の活性化によって誘導されるが [ Rathmel, 2000; Chakrabarti, 1994 ]、その動態は、我々がHTLVレセプターで報告した動態と非常に似ている [ Manel, 2003 ]。ヒトの赤血球は、マウスと異なり、高いGLUT - 1を発現していることが報告されているため [ Mueckler, 1994 ]、我々は、新鮮な分離赤血球における、HTLVレセプターの利用について評価を行なった。ヒト赤血球へのH1<sub>RBD</sub>の結合は、非常に効率的であり、他の調べた細胞で観察されたものより高いレベルであったが、一方、A<sub>RBD</sub>の結合は、最小限に止まっていた (図4a)。そして、マウス及びヒトの赤血球でのA<sub>RBD</sub>の結合は同じレベルにもかかわらず、マウスの赤血球では、高いH1<sub>RBD</sub>結合は、確認できなかった。加えて、プライマリーヒト肝細胞はGLUT - 1を発現しておらず、従って、我々はA<sub>RBD</sub>のプライマリーヒト肝細胞での結合を容易に確認できたが、H1<sub>RBD</sub>結合については、確認できなかった。

10

## 【0048】

GLUT - 1に対するHTLVエンベロープの結合能を、直接的に調べるために、我々はタグの付いたGLUT - 1発現ベクターを作製し、HeLa細胞にこのタンパク質を過剰発現させた。GLUT - 1の過剰発現で、H1<sub>RBD</sub>及びH2<sub>RBD</sub>の結合が、いずれも劇的に増加した (図4b)。この相互作用は、GLUT - 1に結合しないHTLV - 1のカウンターパート、D106A、と同様に、HTLV - 2結合欠損変異体D102Aにおいて特異的であった (図4b)。更に、広い宿主域を持ち、MLVエンベロープレセプターである無機リン酸塩の輸送担体であるPit2 [ Miller, 1994 ]の過剰発現に対して、H1<sub>RBD</sub>及びH2<sub>RBD</sub>の結合は、バックグラウンドレベルであった。対照的にA<sub>RBD</sub>の結合は、GLUT - 1の過剰発現後には増加しなかったが、期待通りに、この結合の相互作用は、Pit2のトランスフェクションによって増加した (図4b)。GLUT - 3は、GLUT - 1に非常に近縁のアイソフォームであり、GLUT - 1と同様の動態により、グルコースを輸送している。そのため、我々は、タグ付きのGLUT - 3発現ベクターを作製した。293T細胞において、GLUT - 1及びGLUT - 3を同じように過剰発現させたが、GLUT - 3はH1<sub>RBD</sub>の結合を全く誘導しなかった。このことは、GLUT - 1過剰発現細胞におけるH1<sub>RBD</sub>の結合の増加は、グルコース摂取の増加による間接的な結果ではないことを示唆している。GLUT - 1をトランスフェクトした細胞が、H1<sub>RBD</sub>結合の増加に、直接的に関与しているかを確認するために、我々は、蛍光タグを付けたGLUT - 1及びGLUT - 3を作製し、FACS解析により、GLUT過剰発現細胞を独自に (unique vocally) に同定した。この結果として、GLUT - 1 - DsRed2の過剰発現細胞のみが、H1<sub>RBD</sub>結合の顕著な増加を示したが、GLUT - 3 - DsRed2の過剰発現は、H1<sub>RBD</sub>結合に影響しなかった (図4d)。そのため、我々は、HTLV糖タンパク質がGLUT - 1タンパク質と直接作用しているかについて実験した。この目的のために、H1<sub>RBD</sub>が、GLUT - 1を免疫沈降できるかについて評価した。図4eに示すように、GLUT - 1はH1<sub>RBD</sub>と共発現している場合は、抗ウサギFcビーズの免疫沈降で容易に検出できたが、単独での発現及びH1<sub>RBD</sub> Y114A変異体との共発現の場合は、検出できなかった。更に、蛍光顕微鏡の解析では、GFP - タグHTLV - 2RBDはGLUT - 1と同じ場所に局在したが、Pit2とは局在しなかった。従って、GLUT - 1輸送担体は、HTLVエンベロープレセプターの必須な成分である。

20

30

40

## 【0049】

GLUT - 1とそのリガンドであるサイトカラシンBの相互作用は、グルコースの輸送を阻害している [ Kasahara, 1977 ]。我々は、GLUT - 1に対するHTLVエンベロープの結合は、グルコース消費及び摂取を阻害することを示したので、サイトカラシンBが、HTLV RBDの結合を阻害するかどうかについて確かめた。確かに

50

、ジャーカット (Jurkat) T細胞をサイトカラシンB処理すると、 $H1_{RBD}$ の結合を劇的に阻害するが、一方、 $A_{RBD}$ の結合は影響を受けなかった (図5a)。このように、HTLVエンベロープの結合と同様に、GLUT-1の直接のグルコース輸送は、サイトカラシンBリガンドによっても同じように阻害される。要するに、これらのデータは、GLUT-1が、HTLVエンベロープのレセプターであることを示している。

#### 【0050】

ウイルスレセプターは、進入及びその後の感染を可能にしている。現在、GLUT-1発現の欠如している細胞システムは、存在していない。そのため、我々は、HTLV感染が、エンベロープレセプターのレベルで特異的に阻害される系を開発した。この系において、HTLV-2 RBDの過剰発現はHTLV粒子の侵入の感染を妨害し、少なくとも  $2 \log$  のHTLV量を特異的に減少させたが、一方、対照のA-MLVのウイルス量に、影響はなかった。GLUT-1が、HTLVの侵入レセプターであるかどうかを決定するために、我々は、阻害する $H2_{RBD}$ に加えて、GLUT-1、GLUT-3、又はPit2を過剰発現させた。Pit2及びGLUT-3は、HTLV量に影響を与えなかったが、GLUT-1は、 $H2_{RBD}$ によって引き起こされる感染に対する妨害を軽減した (図5b)。驚くべきことに、Pit2と異なり、GLUT-1及びGLUT-3は共に、HTLV RBDによって誘導されるグルコース代謝の変化を軽減している。このように、GLUT-1は、HTLVの侵入レセプターである。

#### 【0051】

##### 《考察》

ここで、我々は、HTLV-1及びHTLV-2のエンベロープが、それらのレセプター結合ドメインを介して、GLUT-1と相互作用していることを示した。この相互作用は、グルコースの消費及びグルコースの摂取を強く阻害しており、乳酸産生の減少及び細胞外環境の酸性化の防止につながっている。レセプター結合部位を特異的に変異させたHTLV-1及びHTLV-2のいずれの変異株においても、グルコース消費の阻害は解除され、このことは、HTLVエンベロープのレセプター結合部位及びグルコース輸送の間の直接的な関係を示している。グルコースの枯渇は、HTLVエンベロープの結合が増加することによって、速やかに進行し、グルコースの利用と細胞表面のHTLVレセプターの発現の間の、栄養感受性ネガティブフィードバックが強く起こる。更に、GLUT-1をレセプターであるとする証拠が、蓄積してきており、GLUT-1の過剰発現でHTLV RBDの結合が増加するが、GLUT-3では増加しないこと、 $H1_{RBD}$ によって、GLUT-1が免疫沈降されるが、レセプター結合変異体である $H1_{RBD}Y114A$ では免疫沈降されないこと、GLUT-1が主要なグルコース輸送担体アイソフォームであるヒト赤血球でHTLV RBDは強く結合するが、GLUT-1がほとんど発現していないヒト初代肝細胞やマウス赤血球では、HTLV RBDは結合しない。最後に、GLUT-1はHTLV RBDによって誘導される感染の妨害を特異的に回避できた。GLUT-1は、HTLV-1のレセプターとして知られている他のすべての特徴に一致している。確かに、GLUT2-4のアイソフォームでなく、以前レセプターとして証明された [Manel, 2003]、GLUT-1は、休止期のTリンパ球には発現しておらず [Chakrabarti, 1994; Korgun, 2002]、免疫的 [Frauwirth, 2002; Yu, 2003] 又は薬剤 [Chakrabarti, 1994] による活性化によって誘導される。更に、GLUT-1のオルソログ (orthologues) は、脊椎動物では高度に保存されているが、脊椎動物と昆虫の間では、かなりの違いがある [Escher, 1999]。

#### 【0052】

GLUT-1は、このように、レトロウイルスエンベロープのレセプターとして知られていた、マルチメンブラン-スパンニング (multimembrane spanning) 代謝輸送担体の新しいメンバーの1つである。驚くべきことに、現在までのこのようなレセプターを認識している、すべてのエンベロープは、いわゆる単一の遺伝的構成のレトロウイルス、例えば、MLV、猫白血病ウイルス、豚内在性レトロウイルス及びギボ

10

20

30

40

50

ンアペ白血病ウイルス (gibbon ape leukemia virus) [Overbaugh, 2001] によってコードされていた。ところが一方、HTLVは、いくつかの制御遺伝子を更にコードしている、いわゆる複合レトロウイルスである。しかしながら、そのゲノムRNAの系統発生学上ではかなりの違いを有するのとは対照的に、HTLV及びMLVのエンベロープは、それぞれのレセプター結合ドメインの、高度に保存された、いくつかのアミノ酸モチーフを用い、類似のモジュール機構を利用している [Kim, 2000]。

#### 【0053】

HTLVの伝搬には細胞と細胞の接触が必要であることがわかっており、そして細胞骨格が、この伝搬過程に重要な役割を果たしていることがわかっている [Igakura, 2003]。確かに、我々は、HTLVレセプターは、細胞全体にわたって発現しているが、特異的に移動膜領域 (mobile membrane region) 及び細胞と細胞の接触部位に集中していることを観察していた。そのため、HTLVレセプターは、細胞骨格に結びついていることが予想されていた。重要なことであるが、GLUT-1の細胞質内での結合相手である、PDZドメインを有しているGLUT1CBPは、細胞骨格でGLUT-1と関連していることが報告されてきている [Bunn, 1999]。そのため、HTLVのエンベロープ、その細胞骨格に連係した細胞内分子、例えば、GLUT-1、GLUT1CBP、及びそれらと中間で相互作用する細胞成分、それぞれの役割を評価することが注目されてきている。

10

#### 【0054】

HTLVレセプターの発現は、グルコースの枯渇によって誘導されるため、局所的にグルコースが不足している細胞、例えば、リンパ節のリンパ球において、HTLVの伝搬はより効率的に起こる [Yu, 2003]。更に、ここで示したように、HTLVを保持する能力のある循環赤血球は、そのような組織にHTLVを運搬する手段として提供される。

20

#### 【0055】

HTLVエンベロープのレセプターとしてのGLUT-1が同定されたことによって、試験管内の細胞株でレセプターが普遍的に発現していること、及びそれと逆説的な、生体内での限定的なHTLVのTリンパ球へのトロピズムに関して何らかの糸口を提供している。グルコース消費の遮断に伴う迅速で、劇的な代謝の変化は、感染初期の生体内でのHTLVエンベロープの発現によって起こるようである。そのため、初期にはHTLVの広範なトロピズムのために、HTLVの感染は広がるが、感染後の早い時期に、GLUT-1活性に高度に依存している細胞の大部分は急速に除去されると、我々は考えている。一方対照的に、非常に低い代謝率であり、更にグルコース摂取に依存していない休止期のTリンパ球は、この影響を受けないため生体内で維持される。更に、HTLV感染後の、局所的グルコースへの接触の不均衡が、特異的な病理生理学的変化を誘導することがある [Akaoaka, 2001]。この点において、HTLV関連神経病原性、及びGLUT-1介在性グルコース消費における神経細胞の特異的な依存性、の間の潜在的な関連の研究に関心が集まっている [Siegel, 1998]。

30

#### 【0056】

##### 《方法》

##### [細胞培養]

293Tヒト胚性腎細胞及びHeLa子宮頸癌細胞は、高濃度のグルコース (4.5 g/L) のDulbecco's modified Eagle medium (DMEM) に、ジャーカット (Jurkat) T細胞は、RPMIに、それぞれ10%ウシ胎児血清 (FBS) を添加し、37、5%CO<sub>2</sub>-95%空気雰囲気下で培養した。グルコース枯渇実験は、細胞を、グルコースを除いたDMEM (Life Technologies) 又はグルコースを除いたRPMI (Dutscher) に10%の滅菌ウシ胎児血清 (Life Technologies) を添加して培養し、そして実験時に、グルコース (1 g/L) を添加した。

40

50

## 【0057】

## [発現ベクター]

HTLV-1の全長発現ベクター(pCEL/2 [Denesvre, 1995])及びフレンド狭宿主性MLVの全長発現ベクター(pCEL/F [Denesvre, 1995])は、以前に報告している。HTLV-2のエンベロープは、tax、rex及びenv遺伝子及び3'LTRを含んでいるHTE2 [Rosenberg, 1998]からのフラグメントを、pCISベクター[Battini, 1999]に組み込んだ(pCSIX.H2)。広宿主性MLVのエンベロープ全長発現ベクター(pCSI.A)、又はそのRペプチドの欠失体(pCSI.A.R)、及びF-MLVエンベロープに、HTLV-1レセプター結合ドメインのN末端183アミノ酸を含んだH<sub>183</sub>FEnv、同様に、pCSI由来の不完全なエンベロープ発現ベクター、HTLV-1SUの最初の215残基(H<sub>1RBD</sub>)、HTLV-2SUの最初の178残基(H<sub>2RBD</sub>)、又は広宿主性マウス白血病ウイルス(MLV)SUの最初の397残基(A<sub>RBD</sub>)、ウサギIgGのC末のFcタグ(rFc)又はEGFP(H<sub>2RBD</sub>-EGFP)に結合させたものを作製した。HTLV-1及び2RBDの構築のすべての点変異は、quickchange site-directed mutagenesis法を用いて導入し、変異は配列を決定することで確認した。ヒトGlut-1及びGlut-3のcDNAは、pLib HeLa cDNAライブラリー((Clontech)から、PCRによって増幅し、pCSIベクターの改良ベクターである、pCHIXに組み込んだ。pCHIXはファクターXa切断部位、2コピーのヘマグルチニン(HA)タグ及びヒスチジンタグを有している。得られた構築物(pCHIX.hGLUT1)は、C末にHA-Hisタグを有するGLUT-1をコードしている。また、GLUT-1及びGLUT-3も、DsRed2のC末タグを有しているpCSIの改良ベクターに挿入した。同様に、ヒトCD147は293T細胞の全RNAからRT-PCRで増幅し、HA-Hisタグを有するpCHIXベクターに組み込んだ。

## 【0058】

## [エンベロープ発現と代謝測定]

改良されたカルシウムリン酸変法を用いて、293T細胞に、種々のエンベロープ発現ベクターをトランスフェクトした。トランスフェクション後、一昼夜おいて、細胞をリン酸塩バッファー(PBS)で洗浄し、新鮮な培地を加えた。培地は、指示時間のポイントで回収し、0.45µmのポアサイズのフィルターを通し、乳酸とグルコースを酵素診断キット(Sigma)で測定した。測定値は、溶解バッファー(50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 1.0% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholate)で細胞を可溶化し、遠心した後に、ブラッドフォード法を用いて細胞タンパク量を測定し、標準化した。

## 【0059】

## [ヘキソース(hexose)摂取試験]

2-デオキシ-D[1-<sup>3</sup>H]グルコース、D[U-<sup>14</sup>C]フルクトース及び3-O-[<sup>14</sup>C]メチル-D-グルコースは、アマシャムから購入した。ヘキソースの摂取試験は、Harrison(REF HARRISON 1991)らの方法に従った。トランスフェクション後、ウエルあたり約250,000細胞を24ウェルプレートで培養した。次の日、細胞をPBSで2回洗浄し、血清を含まないDMEMで培養し、血清およびグルコースを含まないDMEMで1回洗浄し、そして500µLの血清及びグルコースを含まないDMEMに阻害物質(20 µM cytochalasin B, 300 µM phloretin; SIGMA)を加えて、20分培養した。摂取は、標識されたヘキソース(2 µCi/ml for 2-2-deoxy-D[1-<sup>3</sup>H]glucose and 0, 2 µCi/ml for D[U-<sup>14</sup>C]fructose and 3-O-[<sup>14</sup>C]methyl-D-glucose)を最終濃度0.1mMの濃度で添加することにより開始し、細胞を更に5分間培養する。それから、細

胞を500  $\mu$ Lの血清およびグルコースを含まないDMEMに再懸濁し、1回血清およびグルコースを含まないDMEMで洗浄し、400  $\mu$ Lの0.1% SDSで可溶化する。3  $\mu$ Lを使い、ブラッドフォード法でタンパク量を標準化し、残りを、<sup>3</sup>H又は<sup>14</sup>Cをベックマンカウンターの液体シンチレーターで、検出に使用した。

#### 【0060】

##### [ウエスタンブロット]

野生型又は変異型HTLV-1 RBDs、及び/又はGLUT-1又はGLUT-2を発現している、293T細胞からの培養液(10  $\mu$ L)をSDS-15%アクリルアミドゲルで電気泳動し、ニトロセルロース(Protran; Schleicher & Schuell)に転写し、5%粉ミルク及び0.5% Tween 20を含むPBSでブロッキングし、1:5000倍に希釈した西洋わさびペルオキシダーゼ標識抗ウサギ免疫グロブリン、又は1:2000倍に希釈した抗HA 12CAS (Roche)モノクローナル抗体に続き、1:5000倍に希釈した西洋わさびペルオキシダーゼ標識抗マウス免疫グロブリンを結合させ、高感度化学発光キット(アマシャム)を用い、可視化した。

10

#### 【0061】

##### [結合試験]

結合試験は、以前に報告した方法[Manel, 2003]に従って、行なった。簡単には、5  $\times$  10<sup>5</sup>細胞(293T、HeLa、Jurkat 又は新しく分離したヒト赤血球)を、500  $\mu$ LのH1<sub>RBD</sub>、H2<sub>RBD</sub>又はARBDの上清と37、30分間培養し、PBA(1% BSA, 0.1% sodium azide in PBS)で洗浄し、そしてフルオレセインイソシアネートで標識したヒツジ抗ウサギIgG抗体(Sigma)とインキュベートした。測定のため、サイトカラシンB(20 mM; Sigma)を測定1時間前に添加した。結合は、FACSCalibur (Becton Dickinson)で解析し、データ解析は、CellQuest (Becton Dickinson)及びWinMDI (Scripps)ソフトウェアを用いた。

20

#### 【0062】

##### [感染]

293T細胞は、6ウエルプレートでトランスフェクトし、一日後に、フルクトース(5  $\mu$ /L)及び非必須アミノ酸を添加した高グルコースDMEMに替えた。次の日、HTLV-2又はA-MLVいずれかのエンベロープを有するシュードタイプのMLV粒子を含む上清を添加することにより、感染を開始させた。翌日、新鮮な培地を加え、そして、24時間後に細胞を固定し、アルカリ性フォスファターゼ活性で染色し、暗い感染フォーカスを測定した。pLAPSN, pGag Poule 及びpCSIX.H2 又はpCSI.Aのいずれかを293T細胞にトランスフェクトすることによって、ウイルス粒子が得られ、24時間後に0.45  $\mu$ mフィルターによって上清を回収した。

30

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0063】

【図1】HTLVレセプター結合ドメインの発現が細胞の代謝を変化させる。a、対照DNA又はシンチウム形成能のある野生型HTLV-1 Env及びHTLV-2 Envを含むEnv発現ベクター、シンチウム形成能のないキメラH<sub>183</sub> FEnv、及びシンチウム形成能のあるA-MLV R Envによるトランスフェクション一日後の293T細胞の、培地の酸性化及びシンチウム形成。b、無関係のDNA(対照)、F-MLV Env、H<sub>183</sub> FEnv、HTLV-1 RBD(H1<sub>RBD</sub>)、又は広宿主性MLV RBD(A<sub>RBD</sub>)発現ベクターをトランスフェクション後2日の、293T細胞培養液中の細胞外乳酸及びグルコースを測定した。乳酸とグルコースの濃度は、細胞タンパク量で補正した。c、無関係のDNA(対照)、H1<sub>RBD</sub>、H2<sub>RBD</sub>、又はA<sub>RBD</sub>発現ベクターを293T細胞へのトランスフェクション後の2-デオキシグルコース及びフルクトースの摂取。また対照細胞はグルコース輸送担体阻害物質である、サイ

40

50

トカラシン及びフロレチンとインキュベートした。データは3つの測定の平均であり、2回又は3回の独立した実験の代表例である。d、グルコース存在下又は非存在下で一昼夜培養した、293T(1)及びジャーカット(Jurkat)T細胞(2)上のHTLV及び広宿主性のMLVレセプターの発現をH1<sub>RBD</sub>及びA<sub>RBD</sub>の結合でそれぞれ測定した。

【図2】HTLVレセプターの特徴は、GLUT1の特徴に関連する。a、ヒト初代肝細胞と、ヒト及びマウス赤血球の表面のHTLV及び広宿主性MLVレセプターの発現。b、Glut-1阻害剤サイトカラシンBの非存在下及び存在下でのジャーカット細胞へのH1<sub>RBD</sub>及びH2<sub>RBD</sub>結合。

【図3】HTLVレセプター結合は、変化した乳酸代謝と関連する。a、293T細胞に、H1<sub>RBD</sub>及び誘導変異体D106A若しくはY114Aをトランスフェクションした後、それぞれの発現を上清のウエスタンブロットによって測定した。b、HeLa細胞での、HTLVレセプターに対する、H1<sub>RBD</sub>及びD106A若しくはY114A変異体の結合。c：無関係のDNA(対照)、H1<sub>RBD</sub>又はD106A及びY114A変異体をトランスフェクション一日後の、293T細胞の培地中の細胞外乳酸。データは3つの独立した試験の代表例である。

【図4】GLUT-1は、HTLVエンベロープのレセプターである。a、対照293T細胞、GLUT-1又はPit2のいずれかを過剰発現した、293T細胞に対する、H1<sub>RBD</sub>、H2<sub>RBD</sub>、H2<sub>RBD</sub>D102A変異体、及びA<sub>RBD</sub>の結合。b、GLUT-1HA又はGLUT-3-HAを過剰発現した細胞に対するH2<sub>RBD</sub>-EGFPの結合、及び対応する抗HA抗体を使用したイムノブロット。c、無関係の構築物、GLUT-1単独、H1<sub>RBD</sub>単独、H1<sub>RBD</sub>Y114A単独、GLUT-1にH1<sub>RBD</sub>又はGLUT-1にH1<sub>RBD</sub>Y114A発現ベクターのいずれかをトランスフェクトした293T細胞からのGLUT-1-HAの免疫沈降。免疫沈降は、抗ウサギFcビーズ及び抗HA抗体のプロープで行なった。全細胞の抽出物は、抗ウサギFc又は抗HA抗体でブロットした。

【図5】GLUT-1はHTLVの侵入レセプターである。無関係の、又は妨害するH2<sub>RBD</sub>発現ベクター単独、あるいはGLUT-1、GLUT-3若しくはPit2発現ベクターを追加してトランスフェクションした後の293T細胞のHTLV-2又はA-MLVエンベロープを有するシュードタイプMLV粒子の感染タイター。参照文献1.

Slattey, J. P., Franchini, G. & Gessain, A. Genomic evolution, patterns of global dissemination, and interspecies transmission of human and simian T-cell leukemia/lymphotropic viruses. *GenomeRes* 9,525-40. (1999).2. Poiesz, B. J. et al.

Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U SA* 77, 7415-9. (1980).3. Yoshida, M., Miyoshi, I. & Hinuma, Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc Natl Acad Sci U SA* 79, 2031-5. (1982).4.

Gessain, A. et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 2, 407-10. (1985).5. Osame, M. et al.

HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* 1, 1031-2. (1986).6. Cavrois, M., Gessain, A., Wain-Hobson, S. & Wattel, E. Proliferation of HTLV-1 infected circulating cells in vivo in all asymptomatic carriers and patients with TSP/HAM. *Oncogene* 12, 2419-23. (1996).7. Hanon, E. et al. Fratricide among CD8(+) T lymphocytes naturally infected with human T cell lymphotropic virus type I. *Immunity* 13, 657-64. (2000).8. Sutton, R. E. & Littman, D.R. Broad host range of human T-cell leukemia virus type 1 demonstrated with an improved pseudotyping system. *J Virol* 70, 7322-6. (1996).9. Trejo, S. R. & Ratner, L. The HTLV receptor is a widely expressed protein. *Virology* 268, 41-8. (2000).10. Kim, F. J., Manel, N., Boublik, Y., Battini, J.L. & Sitbon, M. Human T-cell leukemia

virus type 1 receptor is a widely expressed protein. *Virology* 268, 41-8. (2000).10. Kim, F. J., Manel, N., Boublik, Y., Battini, J.L. & Sitbon, M. Human T-cell leukemia

virus type 1 receptor is a widely expressed protein. *Virology* 268, 41-8. (2000).10. Kim, F. J., Manel, N., Boublik, Y., Battini, J.L. & Sitbon, M. Human T-cell leukemia

virus type 1 receptor is a widely expressed protein. *Virology* 268, 41-8. (2000).10. Kim, F. J., Manel, N., Boublik, Y., Battini, J.L. & Sitbon, M. Human T-cell leukemia

10

20

30

40

50

a virus type 1 envelope-mediated syncytium formation can be activated in resistant mammalian cell lines by a carboxy-terminal truncation of the envelope cytoplasmic domain. *J Virol* 77, 963-9. (2003).11. Berger, E. A., Murphy, P. M. & Farber, J.M. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 17, 657-700 (1999).12. Clapham, P. R. & McKnight, A. HIV-1 receptors and cell tropism. *Br Med Bull* 58, 43-59 (2001).13. Weiss, R. A. HIV receptors and cellular tropism. *IUBMB Life* 53, 201-5. (2002).14. Niyogi, K. & Hildreth, J. E. Characterization of new syncytium-inhibiting monoclonal antibodies implicates lipid rafts in human T-cell leukemia virus type 1 syncytium formation. *J Virol* 75, 7351-61. (2001).15. Daenke, S., McCracken, S. A. & Booth, S. Human T-cell leukaemia/lymphoma virus type 1 syncytium formation is regulated in a cell-specific manner by ICAM-1, ICAM-3 and VCAM-1 and can be inhibited by antibodies to integrin beta2 or beta7. *J Gen Virol* 80, 1429-36. (1999).16. Hildreth, J. E., Subramaniam, A. & Hampton, R. A. Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-induced syncytium formation mediated by vascular cell adhesion molecule-1: evidence for involvement of cell adhesion molecules in HTLV-1 biology. *J Virol* 71, 1173-80. (1997).17. Denesvre, C. et al. TM domain swapping of murine leukemia virus and human T-cell leukemia virus envelopes confers different infectious abilities despite similar incorporation into virions. *J Virol* 70, 4380-6. (1996).18. Daenke, S. & Booth, S. HTLV-1-induced cell fusion is limited at two distinct steps in the fusion pathway after receptor binding. *J Cell Sci* 113, 37-44 (2000).19. Kim, F. J. et al. Definition of an amino-terminal domain of the human T-cell leukemia virus type 1 envelope surface unit that extends the fusogenic range of an ecotropic murine leukemia virus. *J Biol Chem* 275, 23417-20. (2000).20. Jassal, S. R., Pohler, R. G. & Brighty, D. W. Human T-cell leukemia virus type 1 receptor expression among syncytium-resistant cell lines revealed by a novel surface glycoprotein-immuno-adhesin. *J Virol* 75, 8317-28. (2001).21. Hoshino, H., Shimoyama, M., Miwa, M. & Sugimura, T. Detection of lymphocytes producing a human retrovirus associated with adult T-cell leukemia by syncytium induction assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 7337-41. (1983).22. Nagy, K., Clapham, P., Cheingsong-Popov, R. & Weiss, R. A. Human T-cell leukemia virus type I: induction of syncytia and inhibition by patients' sera. *Int J Cancer* 32, 321-8. (1983).23. Kim, F. J., Manel, N., Garrido, E., Sitbon, M. & Battini, J. L. Truncated domains of the human T-cell leukemia virus envelope SU with receptor binding activity. In preparation (2003).24. Manel, N. et al. The HTLV receptor is an early T-cell activation marker whose expression requires de novo protein synthesis. *Blood* 101, 1913-8. (2003).25. Overbaugh, J., Miller, A. D. & Eiden, M. V. Receptors and entry cofactors for retroviruses include single and multiple transmembrane-spanning proteins as well as newly described glycoposphatidylinositol-anchored and secreted proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 65, 371-89, table of contents. (2001).26. Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309-14. (1956).27. Halestrap, A. P. & Price, N. T. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J* 343 Pt 2, 281-99. (1999).28. Garcia, C. K., Goldstein, J. L., Pathak, R. K., Anderson, R. G. & Brown, M. S. Molecular characterization of a membrane transporter for lactate, pyruvate, and other monocarboxylates: implications for the Cori cycle. *Cell* 76, 865-73. (1994).29. Kirk, P. et al. CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *Embo J* 19, 3896-904. (2000).30. Kasinrerk, W. et al. Human leukocyte activation antigen M6, a member of the Ig superfamily, is the species

homologue of rat OX-47, mouse basigin, and chicken HT7 molecule. *J Immunol* 149, 847-54. (1992).31. Martineau, R., Kohlbacher, M., Shaw, S. N. & Amos, H. Enhancement of hexose entry into chick fibroblasts by starvation: differential effect on galactose and glucose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69, 3407-11. (1972).32. Mueckler, M. et al. Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* 229, 941-5. (1985).33. Rathmell, J. C., Vander Heiden, M. G., Harris, M. H., Frauwirth, K. A. & Thompson, C. B. In the absence of extrinsic signals, nutrient utilization by lymphocytes is insufficient to maintain either cell size or viability. *Mol Cell* 6, 683-92. (2000).34. Chakrabarti, R., Jung, C. Y., Lee, T. P., Liu, H. & Mookerjee, B. K. Changes in glucose transport and transporter isoforms during the activation of human peripheral blood lymphocytes by phytohemagglutinin. *J Immunol* 152, 2660-8. (1994).35. Mueckler, M. Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem* 219, 713-25. (1994).36. Miller, D. G., Edwards, R. H. & Miller, A. D. Cloning of the cellular receptor for amphotropic murine retroviruses reveals homology to that for gibbon ape leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 78-82. (1994).37. Kasahara, M. & Hinkle, P. C. Reconstitution and purification of the D-glucose transporter from human erythrocytes. *J Biol Chem* 252, 7384-90. (1977).38. Joost, H. G. & Thorens, B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol* 18, 247-56. (2001).39. Korgun, E. T. et al. Sustained hypoglycemia affects glucose transporter expression of human blood leukocytes. *Blood Cells Mol Dis* 28, 152-9. (2002).40. Frauwirth, K. A. et al. The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity* 16, 769-77. (2002).41. Yu, Q., Erman, B., Bhandoola, A., Sharrow, S. O. & Singer, A. In vitro evidence that cytokine receptor signals are required for differentiation of double positive thymocytes into functionally mature CD8(+) T cells. *J Exp Med* 197, 475-87. (2003).42. Escher, S. A. & Rasmussen-Lestander, A. The *Drosophila* glucose transporter gene: cDNA sequence, phylogenetic comparisons, analysis of functional sites and secondary structures. *Hereditas* 130, 95-103 (1999).43. Igakura, T. et al. Spread of HTLV-I Between Lymphocytes by Virus-Induced Polarization of the Cytoskeleton. *Science* 299, 1713-1716 (2003).44. Bunn, R. C., Jensen, M. A. & Reed, B. C. Protein interactions with the glucose transporter binding protein GLUT1CBP that provide a link between GLUT1 and the cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 10, 819-32. (1999).45. Akaoka, H. et al. Functional changes in astrocytes by human T-lymphotropic virus type-1 T-lymphocytes. *Virus Res* 78, 57-66. (2001).46. Siegel, G. J., Agranoff, B. W., Wayne Albers, W., Fisher, S. K. & Uhler, M. D. *Circulation and Energy Metabolism of the Brain. Basic Neurochemistry*, Chapter 5-31 (1998).47. Denesvre, C., Sonigo, P., Corbin, A., Ellerbrok, H. & Sitbon, M. Influence of transmembrane domains on the fusogenic abilities of human and murine leukemia retrovirus envelopes. *J Virol* 69, 4149-57. (1995).48. Rosenberg, A. R., Delamarre, L., Pereira, A. & Dokhelar, M. C. Analysis of functional conservation in the surface and transmembrane glycoprotein subunits of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. *J Virol* 72, 7609-14. (1998).49. Battini, J. L., Rasko, J. E. & Miller, A. D. A human cell-surface receptor for xenotropic and polytropic murine leukemia viruses: possible role in G protein-coupled signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1385-90. (1999). 50. Rodrigues, P. & Heard, J. M. Modulation of phosphate uptake and amphotropic murine leukemia virus entry by posttranslational modifications of PIT-2. *J Virol* 73, 3789-99. (1999).

【 図 1 】

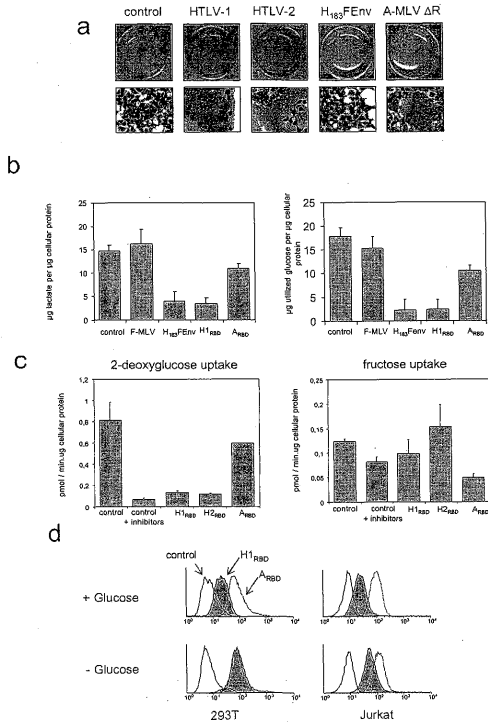


Figure 1

【 図 3 】

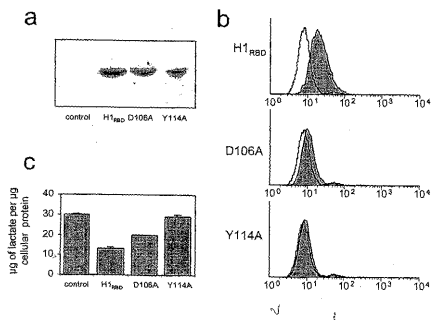


Figure 3

【 図 2 】

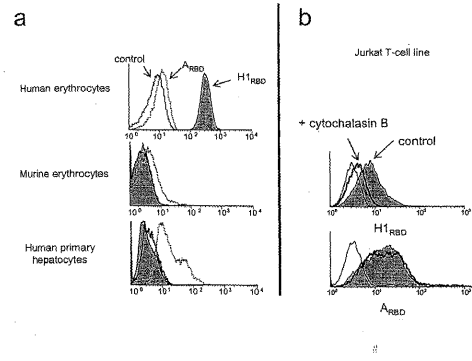


Figure 2

【 図 4 】

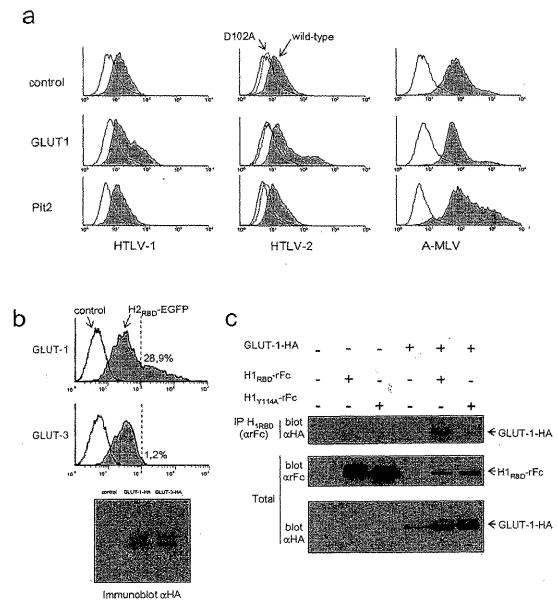


Figure 4

【 図 5 】

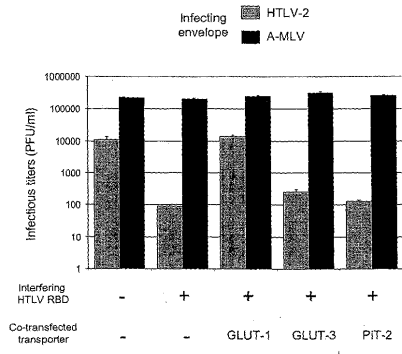


Figure 5

【 配列表 】

2007535293000001.xml

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP2004/004624
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C07K14/15 C07K14/47 A61K38/16 G01N33/574		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, PAJ, CHEM ABS Data, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HARRIS D S ET AL: "POLARIZED DISTRIBUTION OF GLUCOSE TRANSPORTER ISOFORMS IN CACO-2 CELLS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 89, no. 16, 1992, pages 7556-7560, XP002254293 1992 ISSN: 0027-8424 page 7557, column 1, line 4 - line 11 page 7557, column 2, paragraph 2; figures 1,3A page 7559, column 2, last paragraph ----- -/--	12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents :		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
19 August 2004	10/09/2004	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Pilat, D	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/EP2004/004624

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MENDEZ LUIS E ET AL: "Expression of glucose transporter-1 in cervical cancer and its precursors." GYNECOLOGIC ONCOLOGY, vol. 86, no. 2, August 2002 (2002-08), pages 138-143, XP002254294 August, 2002 ISSN: 0090-8258 cited in the application page 140, column 2, line 7 - page 141, column 1, line 2; table 3 page 142, column 1, paragraph 1	12
X	WO 96/41193 A (SINAI SCHOOL MEDICINE ;BURSTEIN DAVID E (US); HABER RICHARD S (US)) 19 December 1996 (1996-12-19) claims	12
A	WO 98/03197 A (UNIV ROCKEFELLER) 29 January 1998 (1998-01-29) page 4, line 34 - page 7, line 2; claims	10,11
A	WO 92/13946 A (GENELABS INC) 20 August 1992 (1992-08-20) page 26 - page 28	10,11
X	LAIRMORE M D ET AL: "CHARACTERIZATION OF A B-CELL IMMUNODOMINANT EPITOPE OF HUMAN T-LYMPHOTROPIC VIRUS TYPE 1 (HTLV-I) ENVELOPE GP46" CANCER LETTERS, NEW YORK, NY, US, vol. 66, 14 September 1992 (1992-09-14), pages 11-20, XP000940582 ISSN: 0304-3835 abstract	12
X	TALLET B ET AL: "Sequence variations in the amino- and carboxy-terminal parts of the surface envelope glycoprotein of HTLV type 1 induce specific neutralizing antibodies." AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES. UNITED STATES 1 MAR 2001, vol. 17, no. 4, 1 March 2001 (2001-03-01), pages 337-348, XP002254296 ISSN: 0889-2229 page 346, column 2, last paragraph abstract	12

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2004/004624

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MUECKLER MIKE ET AL: "Identification of an amino acid residue that lies between the exofacial vestibule and exofacial substrate-binding site of the Glut1 sugar permeation pathway." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 48, 28 November 1997 (1997-11-28), pages 30141-30146, XP002254295 ISSN: 0021-9258 cited in the application figure 1	
P,X	----- MANEL NICOLAS ET AL: "'GLUT-1 is the receptor of retrovirus HTLV!'" MEDECINE SCIENCES : M/S. MAR 2004, vol. 20, no. 3, March 2004 (2004-03), pages 277-279, XP002293056 ISSN: 0767-0974 the whole document	1-15
P,X	----- MANEL NICOLAS ET AL: "The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV." CELL, vol. 115, no. 4, 14 November 2003 (2003-11-14), pages 449-459, XP002293058 ISSN: 0092-8674 the whole document -----	1-15

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/004624

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9641193 A	19-12-1996	US 5698410 A	16-12-1997
		AU 5990096 A	30-12-1996
		CA 2223010 A1	19-12-1996
		EP 0834077 A1	08-04-1998
		JP 11511245 T	28-09-1999
		WO 9641193 A1	19-12-1996
		US 5897991 A	27-04-1999
WO 9803197 A	29-01-1998	AU 3807397 A	10-02-1998
		BR 9711809 A	06-11-2001
		CA 2262007 A1	29-01-1998
		EP 0942748 A1	22-09-1999
		JP 2002513381 T	08-05-2002
		WO 9803197 A1	29-01-1998
WO 9213946 A	20-08-1992	US 5614366 A	25-03-1997
		AU 667189 B2	14-03-1996
		AU 1564492 A	07-09-1992
		CA 2100586 A1	09-08-1992
		EP 0570509 A1	24-11-1993
		JP 3439208 B2	25-08-2003
		JP 6508503 T	29-09-1994
		KR 242596 B1	01-02-2000
		SG 49843 A1	15-06-1998
		US 5643714 A	01-07-1997
		WO 9213946 A1	20-08-1992
		US 5928861 A	27-07-1999
		US 5814441 A	29-09-1998
		US 5871933 A	16-02-1999
		US 5763572 A	09-06-1998

## フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	1 0 1
C 0 7 K 14/15 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
	G 0 1 N 33/53	D
	C 0 7 K 14/15	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(71) 出願人 505409258  
ユニヴェルシテ モンペリエ ドゥー  
UNIVERSITE MONTPELLIER I I  
フランス国, エフ - 3 4 0 9 5 モンペリエ セデックス 5, プラス ウジェーヌ バタイヨン

(74) 代理人 100090251  
弁理士 森田 憲一

(74) 代理人 100139594  
弁理士 山口 健次郎

(72) 発明者 バッティーニ ジャン - リュック ジョルジュ ローラン  
フランス国, エフ - 3 4 0 9 0 モンペリエ, リュ デュ ピオク ドゥ プトネ, 1 6 1, パテ  
イマン セ, ヴィラ ジョセフィーヌ

(72) 発明者 マネル ニコラ ガブリエル アルベール  
フランス国, エフ - 3 4 0 7 0 モンペリエ, リュ ロベール デノス, 1 1

(72) 発明者 キム フェリックス ジンヒュン  
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 2 1 3 1, サン ディエゴ, 1 1 4 5 3 ラーマイア サ  
ークル

(72) 発明者 キネ サンドリナ  
フランス国, エフ - 3 4 5 7 0 モンタルノ, リュ デュ シャトー

(72) 発明者 テイラー ナオミ  
フランス国, エフ - 3 4 0 0 0 モンペリエ, リュ ドゥ ルーヴァン, 1 7

(72) 発明者 シットボン マルク  
フランス国, エフ - 3 4 0 0 0 モンペリエ, リュ ドゥ ルーヴァン, 1 7

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA32 CA04 DA05 EA04 FA02 GA11 HA01 HA03  
HA11  
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ79 QR48 QR66 QS11 QS36 QX02  
4C084 AA02 AA13 BA01 DC50 NA14 ZA021 ZA961 ZB071 ZB081 ZB151  
ZB261  
4H045 AA20 AA30 BA10 CA04 DA86 EA20 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	GLUT 1作为HTLV包膜的受体及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2007535293A</a>	公开(公告)日	2007-12-06
申请号	JP2006505346	申请日	2004-04-30
[标]申请(专利权)人(译)	法国国家科学研究中心 单威赛引用蒙彼利埃斗 UNIV蒙彼利埃II		
申请(专利权)人(译)	全国中心德拉Rusherushe Shiantifiku 蒙彼利埃大学斗		
[标]发明人	バッテリーニジャンリュックジョルジュローラン マネルニコラガブリエルアルペール キムフェリックスジンヒユン キネサンドリナ テイラーナオミ シットボンマルク		
发明人	バッテリーニジャン-リュック ジョルジュ ローラン マネル ニコラ ガブリエル アルペール キム フェリックス ジンヒユン キネ サンドリナ テイラー ナオミ シットボン マルク		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/02 A61K38/00 A61P35/00 A61P29/00 A61P25/00 A61P19/02 A61P37/06 A61P37/02 A61K48/00 G01N33/53 C07K14/15 A61K38/16 A61K38/28 C07K14/62 C07K14/705 G01N33/566		
CPC分类号	A61K38/162 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 C07K14/005 C07K14/62 C07K14/705 C12N2740/15022 C12N2740/15045 C12N2810/6054 G01N33/566		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12Q1/02 A61K37/02 A61P35/00 A61P29/00 A61P25/00 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P37/06 A61P37/02 A61P25/00.101 A61K48/00 G01N33/53.D C07K14/15		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA32 4B024/CA04 4B024/DA05 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA03 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR66 4B063/QS11 4B063/QS36 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA021 4C084/ZA961 4C084/ZB071 4C084/ZB081 4C084/ZB151 4C084/ZB261 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA04 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	森田健一 山口健次郎		
优先权	2003291067 2003-05-02 EP		
其他公开文献	JP5612239B2 JP2007535293A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		
摘要(译)			

本发明涉及普遍存在的脊椎动物葡萄糖转运蛋白GLUT1或其衍生的片段或序列在用作肿瘤标志物时用于体外诊断癌症或用于筛选可用于制备药物的化合物的用途。预防或治疗与患有PTLV的个体感染相关的病理，或与细胞表面上GLUT1过表达相关的病理，或细胞表面上GLUT1的体外检测。本发明还涉及含有GLUT1或其衍生的片段或序列的药物组合物，以及它们的用途，例如在预防或治疗与PTLV感染个体相关的病理的框架中。

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード		
<b>C12N</b>	<b>15/00</b>	<b>(2006.01)</b>	C12N	15/00	ZNAA	4B024
<b>C12Q</b>	<b>1/02</b>	<b>(2006.01)</b>	C12Q	1/02		4B063
<b>A61K</b>	<b>39/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A61K	37/02		4C084
<b>A61P</b>	<b>35/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A61P	35/00		4H045
<b>A61P</b>	<b>29/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A61P	29/00		
			審査請求 有 予備審査請求 未請求		(全 33 頁)	頁

(21) 出願番号	特願2006-505346 (P2006-505346)	(71) 出願人	505409247
(86) (22) 出願日	平成16年4月30日 (2004.4.30)		サントル ナショナル ドゥ
(85) 翻訳文提出日	平成17年12月28日 (2005.12.28)		ルシェ シアンティフィック
(86) 国際出願番号	PCT/EP2004/004624		CENTRE NATIONAL
(87) 国際公開番号	W02004/096841		LA RECHERCHE SC
(87) 国際公開日	平成16年11月11日 (2004.11.11)		IFIQUE
(31) 優先権主張番号	03291067.1		フランス国, エフー75794
(32) 優先日	平成15年5月2日 (2003.5.2)		デックス 16, リュ ミシェ
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		ユ, 3