

厚生省  
平成11年度  
研究報告書

HIVの感染発症阻止方法開発のためのウイルス  
増殖と細胞反応の分子機構に関する研究班

平成12年3月

主任研究者 武部 豊

(国立感染症研究所エイズ研究センター室長)



HIVの感染発症阻止方法開発のためのウイルス  
増殖と細胞反応の分子機構に関する研究班

研究者名	分 担	所 属	職 名
武部 豊	班 長	国立感染症研究所 エイズ研究センター	室 長
田代 真人	班 員	国立 感染症研究所 ウイルス製剤部	部 長
木戸 博	班 員	徳島大学 分子酵素学研究センター	教 授
原田 信志	班 員	熊本大医学部 感染防御学講座	教 授
松田 道行	班 員	国立国際医療センター研究所 臨床病理研究部	部 長
岡本 尚	班 員	名古屋市立大学医学部 分子遺伝学	教 授
志田 壽利	班 員	北海道大学 免疫科学研究所	教 授
星野 洪郎	班 員	群馬大学医学部 衛生学教室	教 授
小林 信之	班 員	長崎大学薬学部 医療薬剤学講座	教 授
牧野 正彦	班 員	鹿児島大医学部 難治性ウイルス疾患研究センタ-	助教授
足立 昭夫	研究協力者	徳島大学医学部 ウイルス学教室	教 授
義江 修	研究協力者	近畿大医学部 細菌学教室	教 授
木村 富紀	研究協力者	関西医科大 微生物学講座	助教授
増田 貴夫	研究協力者	東京医科歯科大 大学院医学系研究科	助教授
森川 裕子	研究協力者	北里研究所 基礎研ウイルス第2研究室	室 長
保富 康宏	研究協力者	三重大医学部 生体防御医学講座	助教授
中島 秀喜	研究協力者	鹿児島大学歯学部 口腔細菌学	教 授
阪井 弘治	研究協力者	国立感染症研究所 エイズ研究センター	主任研究官
水落 利明	研究協力者	国立感染症研究所 細菌・血液製剤部	室 長
渡邊 俊樹	研究協力者	東京大学 医科学研究所 病理学研究部	助教授
森内 浩幸	研究協力者	長崎大学 医学部 小児科学	教 授



目次

I. 総括研究報告書

- HIVの感染発症阻止方法開発のためのウイルス増殖と細胞反応の分子機構に関する研究班・・・ 1  
主任研究者：武部 豊（国立感染症研究所 エイズ研究センター室長）

II. 分担研究報告書

1. 「ミャンマー中部で同定された新しいタイプのHIV-1インターサブタイプ組換え体に関する解析・・・ 7  
分担研究者：武部 豊（国立感染症研究所エイズ研究センター）  
共同研究者：本村 和嗣, 草川 茂, 加藤 佳代子（国立感染症研究所エイズ研究センター）
2. エイズ発症遅延に関わるCCR-5遺伝子多型と末梢血単核球のサイトカイン産生能の検討・・・ 11  
分担研究者：田代 真人（国立感染症研究所ウイルス製剤部）  
共同研究者：照沼 裕（山梨医科大学微生物学講座）  
岡田 晴恵（国立感染症研究所ウイルス製剤部）
3. HIVの感染と複製に関与する細胞性プロテアーゼ群の機能解析・・・ 14  
分担研究者：木戸 博（徳島大学分子酵素学研究センター）  
共同研究者：矢野 仁康, 若林 英樹, 楊 兵（徳島大学分子酵素学研究センター）
4. 糖脂質によるHIV-1感染増強機構の解析・・・ 20  
分担研究者：原田 信志（熊本大学医学部感染防御学講座）
5. HIVの病原性遺伝子Nefの機能を制御する宿主及びウイルス側因子の解析・・・ 25  
分担研究者：松田 道行（国立国際医療センター研究所臨床病理研究部）  
共同研究者：飛梅 実, 望月 直樹（国立国際医療センター研究所臨床病理研究部）  
巽 正志（国立感染症研究所獣医科学部）
6. HIVプロウイルスからの転写制御・・・ 27  
分担研究者：岡本 尚（名古屋市立大学医学部分子医学研究所）  
共同研究所：楊 建平, 三田 貴臣, 朝光 かおり, 手塚 俊文  
（名古屋市立大学医学部分子医学研究所）
7. Revと関連因子・・・ 35  
分担研究者：志田 壽利（京都大学ウイルス研究所）
8. CXCR5/BLR1 のHIV-2のコレセプターとしての研究・・・ 40  
分担研究者：星野 洪郎（群馬大学医学部衛生学）
9. HIV転写制御剤の開発のための細胞性転写制御因子の解析・・・ 46  
分担研究者：小林 信之（長崎大学薬学部）

10.	クリプティック分化抗原を用いたHIV感染細胞のアポトーシス誘導に関する研究	53
	分担研究者：牧野 正彦（鹿児島大学医学部難治性ウイルス疾患研究センター）	
	共同研究者：河村 正輝，馬場 昌範（鹿児島大学医学部難治性ウイルス疾患研究センター）	
11.	HIV-1 Nefに関する分子遺伝学的研究	63
	協力研究者：足立 昭夫（徳島大学医学部ウイルス学教室）	
12.	リンパ節で構成的に発現するケモカインのHIV感染における役割	71
	協力研究者：義江 修（近畿大医学部細菌学教室）	
13.	HIV-1 Rev 蛋白によるウイルスmRNA 核外輸送の分子機作の解析	79
	協力研究者：木村 富紀（関西医科大微生物学講座）	
14.	インテグラーゼを標的としたHIV-1 阻害剤の開発に関する研究	83
	協力研究者：増田 貴夫（東京医科歯科大大学院医学系研究科）	
15.	HIV Gag 粒子の形態発生と出芽に関する研究	87
	協力研究者：森川 裕子（北里研究所基礎研ウイルス2研究室）	
	共同研究者：櫻木 小百合（北里研究所基礎研ウイルス2研究室）	
	後藤 俊幸（大阪医科大微生物学教室）	
16.	ヘルパーT細胞活性化によるHIVワクチンの開発	91
	協力研究者：保富 康宏（三重大学医学部生体防御医学講座）	
17.	CXCR 4 のアンタゴニスト及びその類似物質によるR5 HIV-1感染性の増強作用	96
	協力研究者：中島 秀喜（鹿児島大歯学部口腔細菌学）	
18.	カニクイザルに病原性を示すSHIVの解析	101
	協力研究者：阪井 弘治（国立感染症研究所エイズ研究センター）	
19.	HIV-1 Tat 蛋白によるマクロファージのアポトーシス死細胞貧食処理の抑制	106
	協力研究者：水落 利明（国立感染症研究所細菌血液製剤部）	
	共同研究者：小高 千加子（国立感染症研究所細菌血液製剤部）	
20.	CpGメチル化によるHIVの潜伏感染と再活性化制御の解析	111
	協力研究者：渡邊 俊樹（東京大学医科学研究所病理学研究部）	
21.	微生物感染とHIV	114
	協力研究者：森内 浩幸（長崎大学医学部小児科）	
	共同研究者：森内 昌子（長崎大学医学部小児科）	
<b>III.</b>	<b>総合研究報告書</b>	<b>119</b>

# I. 総括研究報告





「HIVの感染発症阻止方法開発のためのウイルス増殖と細胞反応の分子機構」に関する研究

主任研究者 武部 豊 (国立感染症研究所・エイズ研究センター室長)

研究要旨：本研究班は、HIVの感染成立機構、複製増殖機構および感染に対する細胞反応などエイズ発症機序の分子レベルにおける研究、アジア型HIV-1 サブタイプに関する研究を進め、HIVの感染および発症阻止技術・薬剤の開発を目標とするものであり、本年度各班員によって推進された研究の中から、特に次に述べるような特色ある成果が得られた。1) 二次リンパ組織で高度に発現しているケモカインSLCがHIV-1の増殖を促進することを示し、このケモカインが、in vivoでのHIV-1のリンパ節での急速なターンオーバーに関与している可能性を示唆した。この知見は、また抗HIV剤開発の新たな標的を同定するものでありその発見の意義は大きい(義江班員)。2) HIV転写制御に関する宿主因子NF- $\kappa$ Bを抑制する新たな宿主因子RAI (RelA-associated inhibitor) を同定し、RAIを用いた新たなHIV感染発症阻止技術開発への可能性を拓いた(岡本班員)。3) HIV-1 Revの作用機構の理解が進み、RevがRNAを搬出するためには、多量体化することが必要であるが、その過程にhCRM1が関与していること(志田班員)。またイントロンを含むRev依存性RRE RNAは単純拡散によらず、核内F-actinを介した能動輸送によることが明らかになった(木村協力研究者)。4) HIV transgenic mouseでの各臓器におけるウイルス遺伝子発現レベルとLTR U3領域のCpGメチル化レベルが相関すること。in vitroでCpGメチル化されたHIV LTRは基礎転写活性のみならず、TNF- $\alpha$ , tatによる活性化に対して反応性が低下することを示し、HIVの潜在感染と再活性化におけるメチル化の意義を示唆した(渡辺協力研究者)。5) タイに次ぐ東南アジア第2のHIV流行地であるミャンマー中部に分布する流行ウイルス株の構造解析を行い、その結果、この地域にサブタイプE, B', Cの3種のサブタイプがco-circulateしており、それらサブタイプ間の組換え体が存在することを初めて明らかにした(武部班員)。6) CD8陽性CTLが極めて特異性の高い殺細胞効果をもつものに対し、CD4陽性CTLがより広範な標的に対して効果を示すこと。またBCGに見られる強力なTヘルパー・エピートープとHIV-1のCTLエピートープとのリンケージ・ペプチドをワクチンとして用いることによって、BCGに感作されたマウスに強力なCTLを誘導できることを示し、ワクチン開発上新規のアイデアを示した(保富班員)。これらに代表されるようなHIV感染・エイズ発症の分子機構の解明や新規診断・治療技術の開発に関わる多角的な基礎研究が進展した。

[分担研究者]

田代 真人 (国立感染症研 部長)  
木戸 博 (徳島大酵素研 教授)  
原田 信志 (熊本大医学部 教授)  
松田 道行 (国立国際医療センター 部長)  
岡本 尚 (名古屋市立大学医学部 教授)  
志田 壽利 (京都大学ウイルス研 助教授)  
星野 洪郎 (群馬大学医学部 教授)  
小林 信之 (長崎大学薬学部 教授)  
牧野 正彦 (鹿児島大学医学部 助教授)

[協力研究者]

足立 昭夫 (徳島大医学部 教授)  
義江 修 (近畿大医学部 教授)  
木村 富紀 (関西医科大 助教授)  
増田 貴夫 (東京医科歯科大 助教授)  
森川 裕子 (北里研究所 室長)  
保富 康宏 (三重大医学部 助教授)  
中島 秀喜 (鹿児島大歯学部 教授)  
阪井 弘治 (国立感染症研 主任研究官)  
水落 利明 (国立感染症研 室長)  
渡邊 俊樹 (東大医科研 助教授)  
森内 浩幸 (長崎大医学部 教授)

## A. 研究目的

本研究班は、HIVの感染および発症を阻止する薬剤や治療法の開発を目的として、これらの開発に必須となる

(I) HIVの感染成立機構

(II) 複製増殖機構 および

(III) 感染に対する細胞反応などエイズ発症機序の分子レベルにおける解明を行う。また、これらの基礎研究に基づき、ウイルス感染防御・発症阻止に関する新規の技術・戦略の開発といったエイズに対する具体的な保健医療への貢献を目標に研究を進める。

また(IV)世界の流行全体の中で日増しにその重要性が高まりつつあるアジア型HIV-1ヴァリアントの構造と機能に関する研究を進め、アジアにおける特色ある研究の展開を目指す。

## B. 研究方法

HIVの感染成立およびウイルス増殖機構について分子ウイルス学的手法を用いて解明する。更にこれらに要求される宿主因子群の同定とその機能およびHIV特異的因子との相互作用について、コレセプター、情報伝達、プロテアーゼ等から検討する。またHIV感染細胞に起こる細胞死の分子機構及び非感染細胞死の分子機序を解明する。さらに、HIV-1サブタイプEやCなどアジアにおける急激な流行に関わるウイルス株の構造的・機能的特性を明らかにする。また感染性分子クローンの構築や各種HIV蛋白質の大量発現を通じて、単クローン抗体の作出などサブタイプ特異的試薬の整備や血清学的サブタイピング法の開発への応用など、アジアにおけるエイズ制圧に向けた基礎研究を進める。

## C/D. 研究結果の概略とその考察

本研究班の研究は次の示すいくつかの柱を中心に推進され、次のような成果があった。

### (I) HIV感染成立機構とHIVコレセプターに関する研究

義江ら(研究協力者)は、リンパ節で構成的に発現するケモカインのHIV感染における役割について解析し、2次リンパ組織で構成的に発現するCCケモカインであるSLCとELCがHIV-1増殖促進作用をもつこと。またその作用がCCR7を介した細胞内シグナルによることを明らかにし、これらケモカインが*in vivo*で観察されている一日当たり $10^{9-10}$ に及ぶウイルスの急速な代謝回転に関与している可能性を示唆した。この発見は、抗HIV剤開発の新たな標的を同定するものである。

星野班員は、様々なケモカイン受容体を導入した細胞株を樹立し、それらを用いた実験の結果、CXCR5/BCR1がHIV-2のコレセプターとして働くことを示した。また腎メサンギウム細胞がGPR1/CD4を発現していることを示し、これがHIV-1-associated nephropathyと関連する可能性を示した。

原田班員は、カプシノサイドGがX4型HIV-1の感染を増強すること。またCD4とCXCR4の発現増強と共集合を選択的に誘導することを見出した。

木戸班員は、tryptase TL2 translation調節因子mTORと結合し、T細胞の活性化に関与すること。gp160 processing proteaseはmicroplasmに類似したproteaseであり、その阻害剤の投与によって細胞内のgp160のプロセッシングと感染細胞の合体形成が抑制されることを明らかにした。

中島ら(協力研究者)は、CXCR4のnatural ligandのSDF-1およびantagonistのT134,T140, ALX40-4Cを高濃度投与するとCCR発現のupregulationがおり、R5型HIV-1の感染性を増強することを見出した。

### (II) HIVの複製増殖とその制御機構に関する研究

志田班員は、Rev/Rex作用に関与する細胞内コファクターの解析を行い、Rev/RexがRNAを搬出するためには、多量体化することが必要であるが、その過程にhCRM1が関与していることを明らかにした。

また、木村ら(研究協力者)は、F-actin重合阻害剤(Latrunculin B)を用いた実験などによって、イントロンを含むRev依存性RRE RNAは単純拡散によらず、核内F-actinを介した能動輸送によることを示した。

岡本班員はHIV転写制御に関する宿主因子NF- $\kappa$ Bを抑制する新たな宿主因子RAI (RelA-associated inhibitor)を同定し、その抑制機序がSp1のLTRへの結合阻害によることを明らかにした。RAIを用いた新たなHIV感染発症阻止戦略の開発が期待される。

増田ら(研究協力者)は、HIV integrase (IN)の様々な変異体を作製し、その性質を解析した結果、INがウイルス遺伝子組み込み以外に、逆転、核移行にも関与していることを明らかにした(J. Virol. 2000)。また変異体の中にtransdominant negative効果を示すものを同定した。

松田班員はウイルス株による細胞侵入効率のnef依存性の差異が、env領域によって規定されることを示した。また、同様に、足立ら(研究協力者)はnefが感染初期のウイルス侵入およびウイルスDNA合成に関与することを示した。

渡辺ら(研究協力者)は、HIV transgenic mouseでの各臓器におけるウイルス遺伝子発現レベルとLTR U3領域のCpGメチル化レベルが相関すること。in

in vitroでCpGメチル化されたHIV LTRは基礎転写活性のみならず、TNF- $\alpha$ , tatによる活性化に対して反応性が低下することを示し、HIVの潜在感染と再活性化におけるメチル化の意義を示唆した。

森川ら（協力研究者）は酵母ではGag蛋白質は形質膜にtargetするが、粒子出芽は起こらないが、細胞壁を除去するとGag粒子の出芽・放出がおこることを見出した。このことは、酵母がGag VLP形成に必須な宿主因子をすべて備えていることを意味する。

阪井ら（協力研究者）は、カニクイザルに病原性を示す病原性SIV-HIVキメラ (SHIV) の構造解析を行い、env遺伝子C2およびV3領域に、SHIV-HXBc2 P3.2と同様な変異を見出した。病原性獲得の責任領域の解析が進行中である。

### (III) 感染に対する細胞反応などエイズ発症機序の分子レベルにおける解明

保富ら（研究協力者）は、CD8陽性CTLが極めて特異性の高い殺細胞効果をもつものに対し、CD4陽性CTLがより広範な標的に対して効果を示すこと。またBCGに見られる強力なTヘルパー・エピトープとHIV-1のCTLエピトープとのリンケージ・ペプチドをワクチンとして用いることによって、BCGに感作されたマウスにHIV-1のあるエピトープに対する強力なCTLが誘導できることを示し、CD4<sup>+</sup>HLA<sup>-</sup>T細胞の活性化による新たな免疫療法の可能性を示した。

田代（照沼）班員は日本のHIV感染長期未発症者 (LTNP) でのCCR5遺伝子多型と末梢血単核球のサイトカイン産生能の検討を行い、CCR5調節領域の59653番目の塩基がホモあるいはヘテロでthymidine (T) である割合がLTNPで高い割合で見られること。また細胞性免疫能を高めると考えられるIL-12やIFN- $\gamma$ の産生能が高いことを見出し、これらがエイズ発症遅延に関わっている可能性を示唆した。

牧野班員は、ウイルス感染や癌化に伴い発現する宿主由来の自己抗原 (クリプテック抗原) に対する抗クリプテック抗体の一つ3F5-23はHIV-1持続感染細胞OM10. 1を認識し、アポトーシスを誘導することを示し、新たな免疫療法の可能性を示唆した。

森内ら（研究協力者）はHTLV感染細胞から分泌される液性因子、また同様にHSV感染マクロファージが分泌する液性因子によってプロウイルスHIVの活性化が起こることを示し、他の微生物感染がHIV活性化さらにエイズ発症の引き金となりうることを示唆した。

小林班員は、先に見出したHIV-LTR enhancer領域上流に存在するenhancer活性制御領域UREに結合するURE結合質がヒト細胞株に存在することを確認し、その部分精製を行った。

水落ら（協力研究者）は、マクロファージのアポトーシス死細胞の貪食処理がHIV-1 tatにより抑制されること。この作用が、Tat RGD配列のマクロファージ死細胞認識の抑制によることを見出した。

### (IV) アジア型HIV-1サブタイプに関する研究

武部班員は、タイに次ぐ東南アジア第2のHIV流行地であるミャンマー中部に分布する流行ウイルス株の構造解析を行い、その結果、この地域にサブタイプE, B', Cの3種のサブタイプがco-circulateしており、それらサブタイプ間の組換え体が存在することを初めて明らかにした。

### E. 結論

本研究班では、HIVの感染成立機構、複製増殖機構や感染に対する細胞反応などエイズ発症機序の分子レベルにおける解析など多角的研究が推進され、新たなHIV感染阻止・発症防御技術、診断技術等の開発のための基盤的基礎研究が進展した。

### F. 研究発表（原著論文のみ 1999-2000）

1. Toriyoshi, H. and **Takebe, Y.** et al. (1999). Sendai virus based production of HIV-1 subtype B and subtype E gp120 antigens and their use for highly sensitive detection of subtype-specific serum antibodies. AIDS Research and Human Retroviruses. submitted.
2. Kusagawa, S., Sato, H., **Takebe, Y.** et al. (1998). Genetic and serologic characterization of HIV type 1 prevailing in Myanmar (Burma). AIDS Research & Human Retroviruses **14**: 1379-1385.
3. Kusagawa, S., and **Takebe, Y.** et al. (1999). HIV-1 env subtype E in Cambodia. AIDS Research & Human Retroviruses. **15**: 91-94.
4. Sato, H., and **Takebe, Y.** et al. (1999). Evolution and biological characterization of human immunodeficiency virus type 1 subtype E gp120 V3 sequences following horizontal and vertical virus transmission in a single family. J. Virol. **73**: 3551-3559.
5. Sato, H., Kato, K., and **Takebe, Y.** (1999). Functional complementation of the envelope hypervariable V3 loop of human immunodeficiency virus type 1 subtype B by subtype E V3 loop. Virology. **257**: 491-501.
6. Kato, K., and **Takebe, Y.** et al. (1999). Role of naturally-occurring basic amino acid substitutions on viral coreceptor usage and cell tropism in the immunodeficiency virus type 1 subtype E envelope V3 loop. J. Virol. **73**: 5520-5526.

7. Shiino, T. and **Takebe, Y.** et al. (2000). A group of V3 sequences of human immunodeficiency virus type subtype E nonsyncytium-inducing, CCR-using variants are resistant to positive selection pressure. *J. Virol.* **74**: 1069-1078.
8. **Kido, H.**, et al. (1999). Cellular proteinase and viral infection; influenza virus, Sendai virus and HIV-1. Academic Press. *Proteases of infectious agents* (Ben M. Dun ed.) p.205-217.
9. **Harada, S.**, et al. (1999). Chemically induced infection of CD4-negative HeLa cells with HIV-1. *Microbiol. Immunol.* **43**, 1077-1086
10. Maeda, Y., **Harada, S.**, et al. (2000). Involvement of both the V2 and V3 regions of the CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 envelope in reduced sensitivity to macrophage inflammatory protein 1  $\alpha$ . *J. Virol.*, **74**: 1787-1793.
11. Mochizuki, N., **Matsuda, M.**, et al. (1999). An infectious DNA clone of HIV-1 subtype C. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **15**:1321-1324.
12. Tokunaga, K., **Matsuda, M.**, et al. (1999). The cellular kinase binding motifs (PxxP and RR) in human immunodeficiency virus type 1 Nef protein are dispensable for producer cell-dependent enhancement of viral entry. *Virology* **257**: 285-289.
13. **Okamoto, M.**, Okamoto, T., et al. (1999). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by combination of transcription inhibitor K-12 and other antiretroviral agents in acutely and chronically infected cells. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **43**: 492-497
14. Yang, J.P., **Okamoto, T.**, et al. (1999). Identification of a novel inhibitor of nuclear Factor- $\kappa$ B, RelA-associated inhibitor. *J. Biol. Chem.* **274**:15662-15670.
15. Asamitsu, K., Morishima, T., **Okamoto, T.**, et al. (1999). Conservation of the central proline-rich immunodeficiency virus type 1 Nef protein during the disease progression (PxxP) motifs of human in two hemophilic patients. *FEBS Lett.* **459**: 399-404.
16. Kanazawa, S., **Okamoto, T.**, et al. (2000). Tat competes with CIITA for the binding to P-TEFb and blocks the expression of MHC class II genes in HIV infection. *Immunity*, **12**: 61-70.
17. Ibuki, K., **Shida, H.**, et al. (1999). Protective effects to simian immunodeficiency virus agm (SIV agm) infection in cynomolgus monkeys immunized with a recombinant vaccinia virus expressing the SIV agm envelope gene. *Vaccine* **18**: 511-516.
18. Suzuki, Y., **Shida, H.**, et al. (1999). Type 1 helper cell (Th1) and Th2 preference of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **73**: 316-324.
19. Murakami, T., **Shida, H.**, et al. (1999). Inhibitory mechanism of the CXCR4 antagonist T22 against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection. *J. Virol.* **73**: 7489-7496.
20. Xiao, Y., **Shida, H.**, et al. (2000). Dox-dependent SIV mac with tetracycline inducible promoter in the U3 promoter region. *Virology* (in press.)
21. Shimizu, N., **Hoshino, H.**, et al. (2000). A putative G protein-coupled receptor, RDC1, is a novel coreceptor for human and simian immunodeficiency viruses. *J. Virol.* **74**:619-626.
22. Haraguchi, Y., **Hoshino, H.**, et al. (1999). Inhibition of HIV-1 infection by zinc group metal compounds. *Antiviral Research.* **43**:123-133.
23. Kanbe, K., **Hoshino, H.**, et al. (1999). A CXC chemokine receptor, CXCR5/BLR1, is a novel and specific coreceptor for human immunodeficiency virus type 2. *Virology* **265**: 264-273.
24. **Makino, M.**, Shimokubo, S., et al. (1999). The role of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I)-infected dendritic cells in the development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J. Virol.* **73**:4574-4581.
25. Wakamatsu, S., **Makino, M.**, et al. (1999). Monocytes driven activation induced apoptotic cell death of HTLV-I-infected T cells. *J. Immunol.* **163**: 3914-3919.
26. Shimano, R., **Adachi, A.**, et al. (1999). Inhibition of HIV/SIV replication by dominant negative gag mutants. *Virus Genes* **18**:197-201.
27. **Adachi, A.**, et al. (1999). Cell-dependent replication potentials of HIV-1 gag mutants. *Microbes and Infection.* **1**: 671-676.
28. Akari, H., Uchiyama, T., **Adachi, A.**, et al. (1999). Pseudotyping HIV-1 by vesicular stomatitis virus G protein does not reduce the cell-dependent requirement of Vif for optimal infectivity: functional difference between Vif and Nef. *Journal of General Virology* **80**: 2945-2949.
29. **Adati, A.**, Yosie, O., et al. (1999). Small amino acid changes in the V3 loop of human immunodeficiency virus type 2 determine the coreceptor usage for CXCR4 and CCR5. *Virology* **264**: 237-243.
30. Akari, H., **Adachi, A.**, et al. (2000). Nef-induced major histocompatibility complex class I down-regulation is functionally dissociated from its virion incorporation, enhancement of viral infectivity, and CD4 down-regulation. *J. Virology* (in press.)
31. **Nakajima, H.**, et al. (1999). T134 a small molecule CXCR4 inhibitor, has no cross drug-resistance with the

different class of CXCR4 antagonist AMD3100. *J. Virol.* **73**

32. **Kimura, T.**, Hashimoto, I., et al. (2000). Rev-dependent association of the intron-containing HIV-1 *gag* mRNA with the nuclear actin bundles and the inhibition of its nucleocytoplasmic transport by latrunculin B. *Genes Cells* . (In press.)
33. **Morikawa, Y.**, Jones, I., et al. (2000). Roles of matrix ,P2 and N-terminal myristoylation in human immunodeficiency virus type 1 *gag* assembly. *J. Virol.* **74**: 16-23.
34. **Morikawa, Y.**, Sano, K., et al. (1999). In vitro assembly of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. *J. Biol. Chem.* **274**: 277997-28002.
35. Sakai, K., et al. (1999). Mutational analysis of human immunodeficiency virus type 1 *vit* gene. *Virus Genes.* **18**(2): 179-181.
36. Shinohara, K., **Sakai, K.**, et al. (1999). A highly pathogenic simian/human immunodeficiency virus with genetic changes in cynomolgus monkey. *J. General Virology*, **80**(Pt5):1231-1240.
36. Okada, C., **Mizuochi, T.** (1999). Role of macrophage lysosomal enzymes in the degradation of nucleosomes of apoptotic cells. *J. Immunology* **162**: 5346-5352.



## II. 分担研究報告





## 分担研究報告書

### 1. 「ミャンマー中部で同定された新しいタイプのHIV-1インターサブタイプ 組換え体に関する解析」

班員 武部 豊 (国立感染症研究所エイズ研究センター)

研究協力者 本村和嗣, 草川 茂, 加藤佳代子  
(国立予防衛生研究所 エイズ研究センター)  
Hla Htut Lwin, Min Thwe, Kim Yee Oo, Soe Lwin, Ohn Kyaw, Myint Zaw  
(ミャンマー保健省 AIDS 予防対策プログラム)

研究要旨 血清学的な手法 (V3ペプチドEIA) を用いた解析によって、われわれは、ミャンマー中部・東北部地域に、隣接するタイに由来すると考えられるHIV-1サブタイプEとB' (タイB-クラスター, サブタイプBに属する東南アジア型ヴァリエント) の他に、第3のサブタイプが存在する可能性を示唆する結果を得ていた [Kusagawa et al. AIDS Res. Hum. Retro. 14: 1379-1385 (1998)]。この可能性を検討するために、ミャンマー中部マンダレーから収集した血清検体 (25検体) を解析した。その結果、新たにHIV-1サブタイプCを5検体 (20%) に検出した。さらに興味深いことに、約1/5の検体 (6検体) でgag (p17)とenv (C2/V3)サブタイプの帰属にdiscrepancyが見い出されることを見出した。Similarity plotおよびbootstrap plotを用いた解析により、少なくともうち3検体が、vif-vpu領域にサブタイプC/B'およびC/B'E間の組換え点をもつことを明らかにした。

これらの知見は、東南アジア地域でもとりわけ高い感染率が見られるミャンマー北中部およびその周辺地域において、複数のサブタイプの多重感染その結果として、組換え体生成が起こっている可能性を示唆するものである。

#### A. 研究目的と背景

本研究班の最終年度の研究では、これまで未解析であったミャンマー中部に分布するウイルスの構造的特性に関して研究をおこなった。

われわれは、これまでに、分子疫学的手法と血清学的手法を併用した研究の結果、ミャンマーでの流行が次の3つのパターンに分類できることを明らかにした [Kusagawa et al. Genetic and serologic characterization of HIV type 1 prevailing in Myanmar (Burma). AIDS Res. Hum. Retro. 14: 1379-1385 (1998)]。

①首都ヤンゴンでは、タイに分布するものと同一のサブタイプB'とEの2種のウイルスが分布するが、タイとは異なり、サブタイプB'がIDUだけでなく、性的接触による感染者 (CSW, STD) の間に分布する最も主要なサブタイプであること。②タイの国境に近いタチレーク、コートングなどの都市では、異性間性接触による感染拡大がその主体で、サブタイプEが最も主要なサブタイプとして分布しているこ

と。さらに③ミャンマー中部と中国国境に近い東北部では、サブタイプEとB'が、IDUと異性間性感染者の間に混在して分布しており、リスク因子によるサブタイプの分布に有意の差異は見出されなかった。しかし、この地域の検体に関しては、血清学的なサブタイピングが不能 (non-reactiveあるいはdual reactive) の検体が全体の20-30%を占め、他のサブタイプの存在が疑われた。

そこで、われわれは、ミャンマー中部・東北部に流布するHIV株の構造的特徴を明らかにするために、ミャンマー第2の都市マンダレーから血清検体を収集し、その構造解析を行った。

#### B. 研究方法

(1) 1997年11月から1999年5月の間に、ミャンマー中部のマンダレーにおいて、注射薬物乱用者 (IDU)、売春婦 (CSW)、異性間感染者からHIV感染者血清を25検体を収集した。

(2) V3 peptide EIA 法 (Pau et al. AIDS 7: 337-340.

1993) およびセンダイウイルスで発現した組換え gp120を用いたEIA法(5)を用いて血清学的HIV-1サブタイピングを行い、タイにおいて流布している HIV-1サブタイプとの関連性を検討した。

(3) 感染者血清中のウイルスRNAを鋳型として、*gag* (p17) および *env* (C2/V3) 領域の塩基配列を、RT-PCR法で増幅後、ABI 310 autosequencerを用いた direct sequence 法によって決定した。またサブタイプ間組換えが疑われる検体については、さらに *vif-vpu* 部分の塩基配列決定を行った。

(4) Clustal Wプログラムによるアラインメントの後、近隣結合法によって系統樹を作成し、得られた塩基配列の系統関係を解析した。系統樹の各分岐点の信頼性はbootstrap法(100回反復)によって検定した。

(5) Recombination breakpoint identification programの一つである Simplot programを用いて、Similarity plot および Bootstrap plotを行い、組換え点を検索した。

#### C. 研究成果

(1) ミャンマー中部のマンドレーに由来する25検体のうち、10検体(40%)がサブタイプE(正確にはインターサブタイプA/E組換え体)、4検体(16%)がサブタイプB'であった。さらにこれら既知のタイ型サブタイプに加え、新たにサブタイプCが5検体(20%)に見い出された(図1, 図2)。

(2) さらに興味ふかいことには、残り6検体(24%)は、*gag* (p17) および *env* (C2/V3) サブタイプの帰属に discordance があることが明らかになった(図1, 図2)。

(3) このような discordance が複数サブタイプの重感染によるのか、サブタイプ間組換え体であるのかを明らかにするため、さらに *vif* から *vpu* 遺伝子にかけての約1.4 kbの領域の塩基配列決定したところ、IDUに由来する3検体で、それぞれサブタイプCとB'間(mIDU2, mIDU10) およびサブタイプC/B/E間(mIDU18)での組換え点を同定した(図3)。なおT/Aクローニングによる解析結果によれば、このような組換え点をもつウイルスが各感染者の末梢血中の主要なspeciesであることが示唆された。

#### D. 考察

マンドレーの1998年のサベランス・データによれば、IDUの感染率は85%、CSWが30%と極めて高率でる。ミャンマー中部・東北部地域は、東南アジア地域(さらに世界)の中でもとりわけ感染率が高い地域と考えられる。

本研究によるマンドレーにおける解析結果は、このような高い感染率が見られるこれら地域において、複数のサブタイプの多重感染がおり、その結果として、組換え体が生成していることを示唆するものである。

ただ現時点では、このような組換え体が、現在ミャンマー中部で生成しつつあるのか、あるいは他地域で生成した組換え体がこの地域に2次的に持ち込まれたのかは明らかではない。

#### E. 今後の展望

われわれは、これまでに蓄積してきた知見を手掛かりとして、今後中国・東インドを含む東南アジア・南アジア諸国全域でのHIV流行の全容解明を目指したいと考える。またこの地域の流行を形成しているウイルス株の性質のさらに詳細な解析を進め、ワクチンを含む新規の感染防御・発症阻止技術の開発に向けた基礎研究を展開していきたいと考える。

#### F. 研究発表(1999-2000)

[欧文原著論文]

1. Kusagawa, S., Sato, H., Kato, K., Nohtomi, K., Shiino, T., Samrith, C., Leng, H.B., Phalla, T., Heng M. B., and **Takebe, Y.** (1999). HIV-1 *env* subtype E in Cambodia. *AIDS Research & Human Retroviruses*. **15**: 91-94.
2. Sato, H., Shiino, T., Kodaka, N., Taniguchi, K., Tomita, Y., Kato, K., Miyakuni, T., and **Takebe, Y.** (1999). Evolution and biological characterization of human immunodeficiency virus type 1 subtype E gp120 V3 sequences following horizontal and vertical virus transmission in a single family. *J. Virol.* **73**: 3551-3559.
3. Sato, H., Kato, K., and **Takebe, Y.** (1999). Functional complementation of the envelope hypervariable V3 loop of human immunodeficiency virus type 1 subtype B by subtype E V3 loop. *Virology*. **257**: 491-501.
4. Kato, K. and Sato, H., and **Takebe, Y.** (1999). Role of naturally-occurring basic amino acid substitutions on viral coreceptor usage and cell tropism in the immunodeficiency virus type 1 subtype E envelope V3 loop. *J. Virol.* **73**: 5520-5526.
5. Toriyoshi, H., Shioda, T., Sato, H., Sakaguchi, M., Eda, Y., Tokiyoshi, S., Kato, K., Nohtomi, K., Kusagawa, S., Taniguchi, K., Shiino, T., Kato, A., Foongladda, S., Linkanonsakul, S., Oka, S., Iwamoto, I., Wasi, C., Nagai, Y., and **Takebe, Y.** (1999). Sendai virus based production of HIV-1 subtype B and subtype E

gp120 antigens and their use for highly sensitive detection of subtype-specific serum antibodies. *AIDS Research and Human Retroviruses*. **15**: 1109-1120.

6. Kato, K., Shiino, T., Kusagawa, S., Sato, H., Nohtomi, K., Shibamura, K., Nguyen, H. T., Chi, P. K., Lien, T. X., Anh, M. H., Long, H. T., Bunyaraksyotin, G., Fukushima, Y., Honda, M., Wasi, C., Yamazaki, S., Nagai, Y., and **Takebe, Y.** (1999). Genetic similarity of HIV-1 subtype E in a recent outbreak among IDUs in northern Vietnam to strains in Guangxi province of southern China. *AIDS Research and Human Retroviruses* **15**: 1157-1168.

7. Mochizuki, N., Otsuka, N., Matsuo, K., Shiino, T., Kojima, A., Kurata, T., Sakai, K., Yamamoto, N., Isomura, S., Dhole, TN., **Takebe, Y.**, Matsuda, M., and Tatsumi, M. (1999). An infectious DNA clone of HIV type 1 subtype C. *AIDS Research and Human Retroviruses* **14**: 1321-1324.

8. Shiino, T, Kato, K., Kodaka, N., Miyakuni, T., **Takebe, Y.**, and Sato, H. (2000). A group of V3 sequences of human immunodeficiency virus type 1 subtype E nonsyncytium-inducing, CCR-using variants are resistant to positive selection pressure. *J. Virol.* **74** (3): 1069-1078.

9. Sato, H., T, Tomita, Y., Shibamura, K., Shiino, T. Miyakuni, T., and **Takebe, Y.** (2000). Convergent evolution of reverse transcriptase (RT) gene between human immunodeficiency virus type 1 subtypes E and B following nucleoside analogue RT inhibitor therapies. *J. Virol.* (in press).

10. Kato, K., Kusagawa, S., Motomura, K., Nohtomi, K., Shiino, T., Sato, H., Shibamura, K., Hien, N. T., Chi, P. K., Thang, P. H., Thang, D. C., Quoc, N. C., Thang, B. D., Long, H. T., Yamazaki, S., Nagai, Y., and **Takebe, Y.** (2000). Cross-border spread of closely-related HIV-1 subtype E variant among injecting drug users in Chino-Vietnam boundary. in submission (JAIDS).

11. Motomura, K., Kusagawa, S., Kato, K., Lwin, H. H., Tun, K. M., Thwe, M., Oo, K. Y., Kyaw, O., Zaw, M., Nagai, Y., and **Takebe, Y.** (2000). Emergence of new forms of human immunodeficiency virus type 1 intersubtype recombinants in Central Myanmar. in submission (*J. Virology*).

[和文総説・公刊図書]

11. 加藤佳代子, 納富香子, 椎野禎一郎, 佐藤裕徳, **武部 豊** (1999). HIVコレセプターとしてのケモカ

イン受容体. *組織培養工学* **24**: 13-17.

12. **武部 豊** (1999). ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染症. 「エマージング・ディジーズ」 (竹田美文、五十嵐章、小島荘明編集). pp. 198-204. 近代出版 1999.4.20.

13. **武部 豊** (1999). 後天性免疫不全症候群 (エイズ) の分子予防医学. 「分子予防医学」各論 2) 感染症 (松島綱治編集). 1999年7月. 医学書院.

14. **武部 豊** (1999). 東南アジア地域における HIV流行の分子疫学—アジアにおけるエイズ流行はいかにして形成されたか (上田恵介編集). 生物科学.

15. **武部 豊** (1999). ケモカインとHIV感染 (連載講座「サイトカインと病気のかかわり」) 炎症と免疫: 1999年11月号. 先端医学社.

16. **武部 豊**, 義江 修, 塩田達雄, 永井美之 (2000). エイズとケモカイン/ケモカイン受容体 「ケモカインと疾患—その基礎と臨床」 (荻原順一編集). 医薬ジャーナル.

- [ 特許 (出願準備中を含む) ]
1. 「(SeV用途) センダイウイルスベクターを用いたワクチンおよびワクチンタンパク」 (特願平 11-060918号, 平成 11年 (1999年) 3月 15日): センダイウイルス発現系によって産生された組み換え蛋白質を用いたワクチンおよびHIV-1の高感度サブタイピング・システムの開発 [東京大学医科学研究所 永井美之、加藤篤 (共に現国立感染研)、塩田達雄博士らとの共同出願]
2. 「ワクチン増強強化をもたらすBCG  $\alpha$  抗原DNAの利用」 (三重大学医学部 保富康宏, JST 松尾和浩と共同出願準備中)

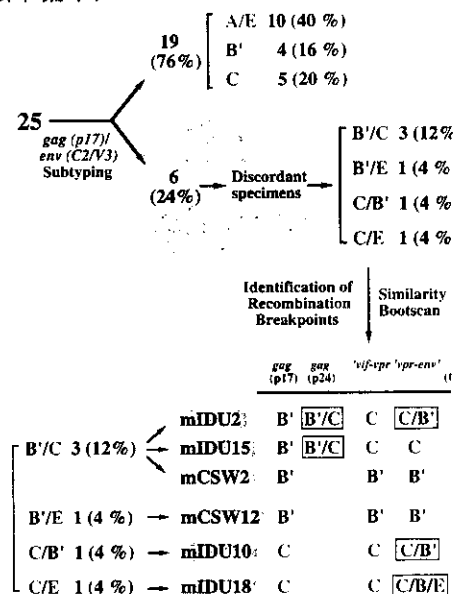


図 1. マンダレー (ミャンマー中部) に分布するHIV-1サブタイプ [gag (p17)/env (C2/V3)サブタイプ]

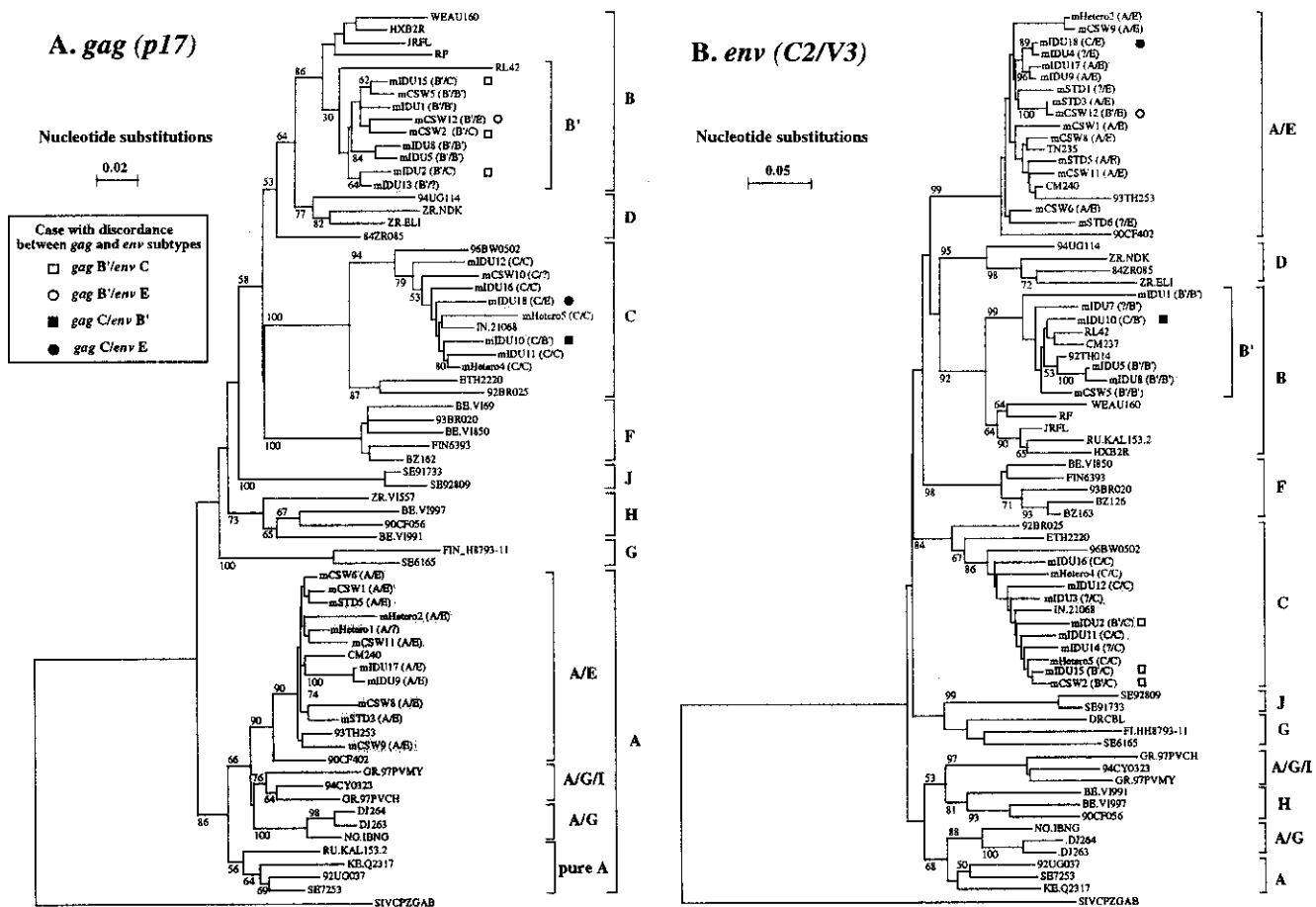


図2. マンダレー（ミャンマー中部）に分布するHIV-1株の系統樹解析。(A) gag (p17) tree. (B) env (C2/V3) tree. サブタイプ帰属に discordance のある検体コード名の後に、凡例内に示した各シンボルを記載した。

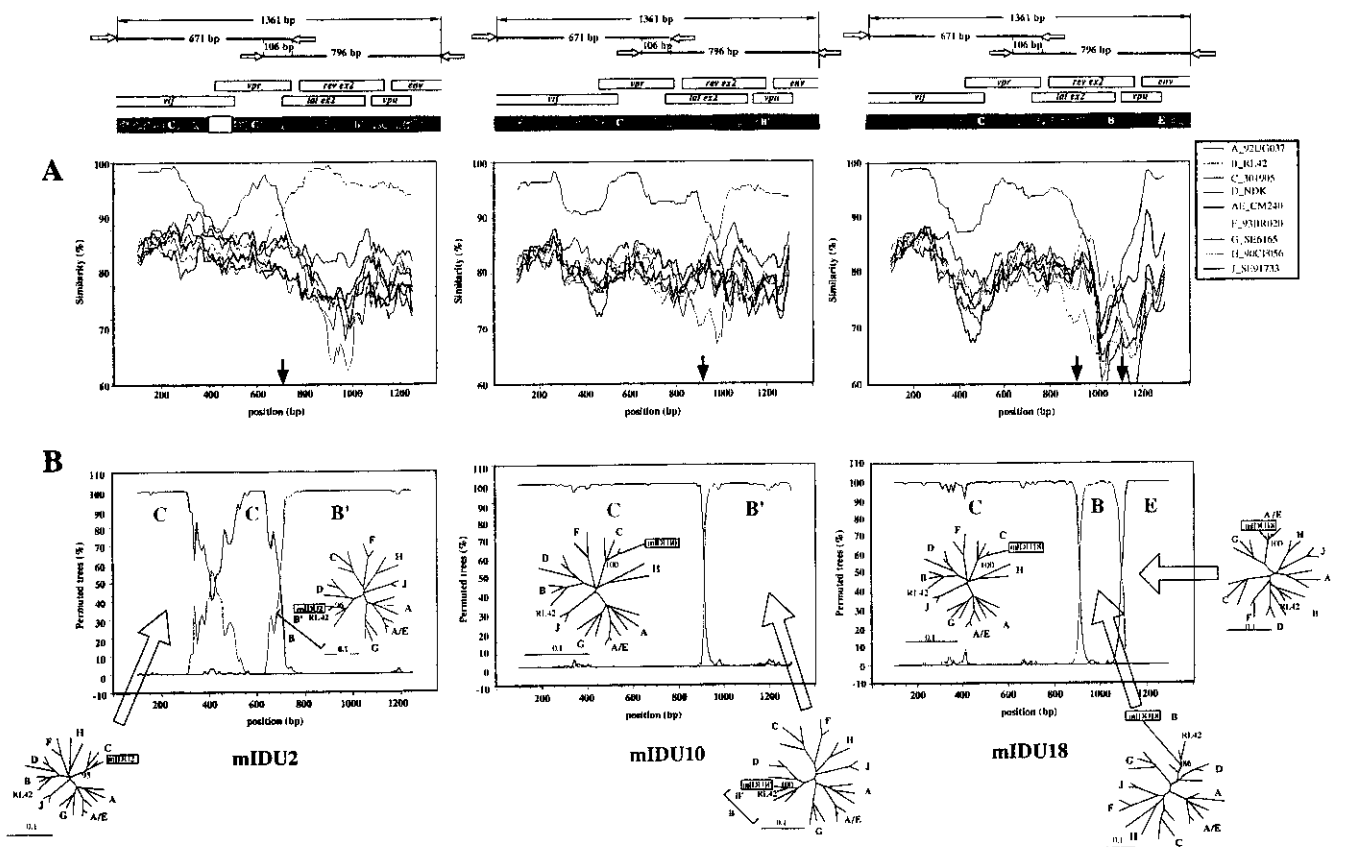


図3. Similarity plot (A) およびBootstrap plot (B)による組換え点（Recombination breakpoints）の同定