

厚生科学研究費補助金 (エイズ対策研究事業)
分担研究報告書

HIV 感染に関わる免疫応答の研究

分担研究者 横田 恭子 国立感染症研究所・免疫部・感染免疫室長

研究要旨

有効な抗HIV免疫反応を決定する要因とそれを強化誘導する手段を探ることを目的として、非感染者の末梢血T細胞で種々のHIV抗原に対する反応性について解析した。非感染者の中にもHIV抗原に何らかの反応をするT細胞が存在し、DCを介した刺激を3回くり返すことにより、HIV特異的ヘルパーT細胞の反応が誘導可能であることが示唆された。しかしながら、病気の進行を左右するといわれるCTLの分化成熟に関してはまだ不明な点も多く、末梢を循環するHIV特異的なT細胞のperforin発現率は、HIV感染者で指摘されているようなCTLの機能障害を説明できないことが今回の結果から示唆された。CTLの機能障害がヘルパーT細胞の減少だけに依存しているのかどうか、何を指標にすれば感染者の免疫機能と病態の関係を理解できるのかは、今後の研究で明らかにする必要がある。

A. 研究目的

HIV感染者の一部(5-7%)に、感染しても長期に未発症の人(LTNP)が存在している。これらの感染者では細胞傷害性T細胞(CTL)の活性が高いことが知られているが、それ以外の詳細な機構は全く不明である。一方強力な抗ウイルス剤(HAART)の開発により、進行患者での血中ウイルス量は検出限界以下にまで低下させることが可能となったが、これらの患者での免疫機構は完全に回復しておらず、微量に存在するウイルスの増殖が薬剤投与中断によって再び誘導されると、それを阻止することはできない。近年、意図的に薬剤を中断することによって少しずつ免疫機能を強化できる可能性が指摘され、患者の治療に応用されているが、HAART療法を完全に中止することが可能になるとは考えにくい。長期投薬による副作用や薬剤耐性ウイルスの出現等の問題点を解決するためには、個人が本来有する免疫機能を高めてウイルスの増殖を阻止するのが理想的である。本研究では、非感染者のHIV抗原に対する反

応性を解析する系を確立し、HIV感染者の免疫病態と比較検討することによって有効な抗HIV免疫反応を決定する要因とそれを強化誘導する手段を探ることを目的とした。

B. 材料と方法

1. 細胞

健康人由来末梢血単核細胞をファイコールで分離しPBMCを得た。一部は抗CD14標識磁気ビーズを用いてMACSで単球を分画し、CD14陰性細胞をさらにnegatIve selectIonし、T細胞を純化した(95-98%)。単球はGM-CSFとIL4の存在下に7-8日培養して樹状細胞(DC)を分化誘導した。HIV感染者のLTNPのPBMCは、フランスのパリ大学教授・Brigitte Autran博士を中心とするコホートより選択し、共同で解析した。

2. HIV-1 Gag抗原

組み換えp24蛋白は大腸菌の溶解液より抗p24単クローン抗体アフィニティーカラムで精製した(大

腸菌および抗体は感染病理部、小島朝人博士および佐多徹太郎博士より供与いただいた)。Gag/Pol 発現アデノウイルスは医科研・岩本愛吉教授、Gag 発現センダイウイルスは永井美之エイズセンター長よりそれぞれ供与いただいた。イースト由来 Gag 粒子は北里大学・森川裕子教授より供与いただいた。細胞表面抗原に対する蛍光標識抗体および PE 標識 Gag p17-MHC class I tetramer はコールター社の製品である。蛍光標識抗 perforin 抗体はファーミンジェン社より購入した。

3. FACS 解析

凍結 PBMC は 0.5% BSA/PBS、0.01% NaN_3 (SB) に浮遊させ、細胞表面抗原を染色した後 4% paraformaldehyde で固定し、0.5% サポニン含有 SB で permeabilize した。更に細胞内染色抗体を反応させ、FACS Calibur で解析した。

4. T細胞活性化の測定

DC と T細胞を抗原存在下に培養し、3日後の培養上清を採取した。上清中の $\text{IFN-}\gamma$ および $\text{TNF-}\alpha$ 量はエライザキットを用いて測定した。

(倫理面への配慮)

HIV 非感染者 (健常人) の PBMC は、同意のもとに研究室内の数人より供与をうけた。これらは匿名でコード化し、遺伝子解析はおこなわない。

C. 研究結果

1. HIV-1 Gag 抗原に対する免疫応答

HIV 抗原として、不活化 HIV 粒子、アデノウイルス、センダイウイルス、イースト由来 Gag 様粒子 (VLP)、組換え p24 蛋白を用意した。これらの抗原を非感染者の DC と T細胞の共培養系に加え、誘導される T細胞の増殖や $\text{IFN-}\gamma$ の産生を指標に *in vitro* のプライミングの方法について検討した。現時点では、低い MOI (2) で Gag 発現センダイウイルスを感染させ、更に p24 抗原で DC による刺激を 2 回、合計で 3 回刺激を繰り返すことにより、健常人において p24 抗原に反応して $\text{IFN}\gamma$ を産生する細胞の増殖を誘導可能であることが示唆された (図 1)。この時、DC でなく Macrophage に p24 抗原を提示させた群では

$\text{IFN}\gamma$ の産生量が低かった。DC のみの培養では $\text{IFN}\gamma$ の産生量のごくわずかであった。従って、HIV 特異的な T細胞を *in vitro* で誘導するための抗原提示細胞としてはやはり DC が最適であると思われた。しかしながら、この時主として増殖してくるのは CD4 陽性 T細胞であり、CD8 陽性 T細胞がこの様な系で分化して CTL 活性を発現しうるかどうかは更に検討を要する。

2. 末梢血を循環する CD8 陽性 T細胞のパーフォリン産生と病態に関する解析

抗 HIV 免疫反応の重要な鍵を握る CTL の分化成熟に関し、最近、細胞内 perforin 量と CTL 機能の関係が注目されている。そこで、末梢を循環している CD8 陽性 T細胞の perforin 量が HIV 感染者で低下していることが病態の進行に関与しているのかどうかを明らかにするために、フランスで確立されている長期未発症コホート (発症遅延者を含む) のうちの HLA-A2 陽性の 10 人における末梢血 CD8 陽性 T細胞の細胞内 perforin 陽性率および HIV あるいは EBV 特異的 CD8 陽性 T細胞の細胞内 perforin 陽性率について比較解析した。その結果、表 1 に示すように、ほとんどの個体で CD8 陽性 T細胞の perforin 陽性率は低く、LTNP の血中ウイルス量と CD8 陽性 T細胞の perforin 陽性率との関係は認められなかった。しかしながら、CD8 陽性 T細胞の perforin 発現が高い人 (症例 4071) は、HIV 特異的および EBV 特異的 CD8 陽性 T細胞でもほとんどが perforin 陽性であった。この症例では 4 年間にわたり血中にウイルスが 5000-9000 コピー存在するにもかかわらず、CD4 陽性 T細胞数は一定に保たれている。従って HIV 感染者では HIV 特異的な T細胞の perforin 発現が低下しており、それが感染者の CTL 機能不全を反映している可能性は低いと思われた。

D. 考察

HIV 感染者の免疫病態は現在行われている臨床的検査でどの程度正しく把握されうるのか疑問である。今回の解析から、末梢血中で perforin を発現してい

る CD8 陽性 T 細胞は通常それほど多くはないと思われた。この様な perforin 陽性 CD8 陽性 T 細胞が HIV を産生する感染細胞が多く存在するリンパ組織で重要な働きをする CTL であるのかどうかは現時点では不明である。むしろ、いったんリンパ組織で活性化されて perforin を産生し、CTL の機能を発揮する前に血中へ流出した細胞集団である可能性もある。いずれにしても CTL の分化成熟と体内循環に関する基本的知識が必要である。非感染者において HIV 抗原に対する初期の個体の反応を解析する in vitro の系を確立し、感染者のそれと比較することによって、感染者の病態進行をある程度予測することが可能となれば、発症予防や治療にも有用であろう。

E. 結論

健常人においても HIV 抗原に何らかの反応をする個体もあり、DC を介した刺激を 3 回くり返すことにより、HIV 特異的ヘルパー T 細胞の反応が誘導可能であると思われた。しかしながら、病気の進行を左右するといわれる CTL の分化成熟に関してはまだ不明な点も多く、HIV 感染者で指摘されているような CTL の機能障害が末梢を循環する HIV 特異的な T 細胞の perforin 発現量だけで説明することはできないことが今回の結果から示唆された。CTL の機能障害がヘルパー T 細胞の減少だけに依存しているのかどうか、何を指標にすれば感染者の免疫機能と病態の関係を理解できるのかは、今後の研究で明らかにする必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Tsunetsugu-Yokota, Y., Kato, T., Yasuda, S., Matsuda, Z., Suzuki, Y., Koyanagi, Y., Yamamoto, N., Akagawa, K., Cho, M.W. and Takemori, T. : Transcriptional regulation of HIV-1 LTR during antigen-dependent activation of primary T cells by dendritic cells J. Leukocyte Biol., 67:432-440, 2000.

(2) Izumi Yoshizawa, Yoko Soda, Toshiaki Mizuochi, Sachiko Yasuda, Tuguo Mizuochi, Tahir A. Rizvi, Toshitada Takemori and Yasuko Tsunetsugu-Yokota: Mucosal Immune response against HIV-1 gag enhanced by DNA immunization, Vaccine, 2001, in press.

2. 学会発表

- 1) 横田恭子。樹状細胞と HIV 感染。第 40 回日本リンパ網内系学会、浜松、平成 12 年 8 月。
- 2) 吉澤いづみ、水落利明、竹森利忠、横田 (恒次) 恭子。HIV-1 Gag 蛋白に対する粘膜免疫応答。第 30 回日本免疫学会総会、仙台、平成 12 年 11 月。
- 3) 横田恭子、橘美紀子、本多三男、竹森利忠。BCG 感作 T 細胞活性に関する解析。第 30 回日本免疫学会総会、仙台、平成 12 年 11 月。
- 4) 小室巖、保田幸子、横田恭子、岩本愛吉、赤川清子。ヒト単球マクロファージにおけるマクロファージ指向性 HIV の増殖応答の解析 (2)。第 30 回日本免疫学会総会、仙台、平成 12 年 11 月。

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

表 1. 長期未発症者の CD8 陽性 T 細胞における perforin 発現

LTNP#	CD4 (/mm ³)	viral load (copies)	viability (%)	inCD3 ⁺ % CD8 ⁺	% in CD8 ⁺ lymphocytes			
					Gag	Pol	EBV	perforin
4030	715	36	83%	41	-	-	0.15	4
4034.1	559	20	90%<	46	-	-	0.03	20
4034.4	634	150	70%		-	-	nd	8
4053	604	1980	90%	68	1.7	-	0.19	3
4071	364	8800	80%	40	1.5	nd	0.30	50
12001	604	6200	90%		-	-	0.10	3.3
4008	320	1000000	5%	nd				
4044	776	110000	87%	33	0.84	-	0.32	3.5
4016	278	520000	70%	62	-	-	nd	10
4062	471	34000	92%	50	0.12	-	nd	9
9013.1	893	7800	50%	37	0.03	-	nd	0
9013.3	670	27938	10%	31	-	nd	nd	0

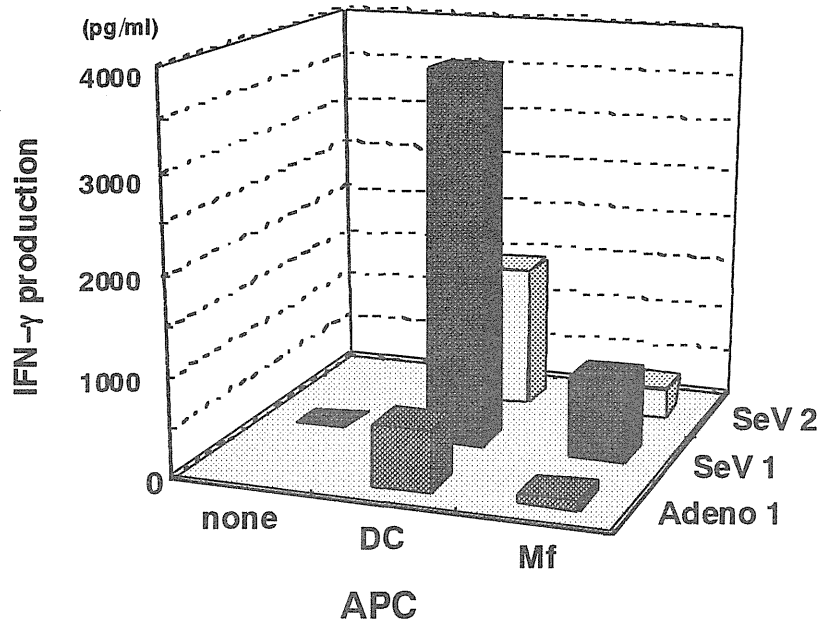


図1. 樹状細胞(DC)を介した抗原刺激に特異的に反応するT細胞の誘導
 HIV非感染者の末梢血T細胞をHIV-1 Gagを発現するセンダイウイルス(SeV)あるいはアデノウイルス(Adeno)に感染させたDCを抗原提示細胞として1回あるいは2回刺激し、その後組み換えp24蛋白で2回あるいは1回、合計3回刺激したT細胞をDCあるいはマクロファージ(Mf)とp24蛋白で再刺激して3日後の培養上清中のIFN- γ をエライザで測定した。

HIV 感染症の病態と宿主の免疫応答の研究

分担研究者 松下修三 熊本大学エイズ学研究センター 教授

研究要旨 強力な抗ウイルス剤の多剤併用療法 (Highly active antiretroviral therapy; HAART) でウイルス血症の十分な抑制が得られている臨床経過中に HIV-RNA のリバウンドがみられる場合がある。HAART 開始時に得られた自己の分離株に対して中和抗体活性が認められ、HAART にて血中ウイルス量が長期にわたり測定感度以下に抑えられた症例のうち、経過中にリバウンドの認められた症例が 3 例あった。HAART 開始時とリバウンド時のクワシスピーシスの関係を系統樹解析すると、3 症例ともリバウンドウイルスは HAART 開始時のクワシスピーシスの中から選択されて増殖してきた集団と考えられた。症例 1 についてはリコンビナントウイルスを作成し、血漿 IgG に対する中和感受性/抵抗性を調べた。HAART 開始時のウイルスは中和感受性であったが、リバウンドウイルスは抵抗性であった。さらに詳細なリコンビナントウイルスを作製したところ、C3 の変化がリバウンドウイルスの中和抵抗性に関与していると考えられた。

A. 研究目的

HIV は生体内ではお互いに似ているが遺伝子配列の少しずつ異なる集団（準種；クワシスピーシス）から成り立っている。一方、自己由来のウイルスに対して中和抗体をもつ症例が少数ながら存在しているが、このような症例においても、HAART でウイルス血症の十分な抑制が得られている経過中、様々な理由で HIV-RNA のリバウンドがみられる場合がある。これらのリバウンドウイルスと血漿中の中和抗体の関係を調べることにより、生体内での中和抗体の役割とその免疫学的選択にかかわるエピトープを明らかにできると考えた。またこの研究は中和抗体を用いた治療法の開発や中和抗体の誘導を目指した治療ワクチン開発に重要な示唆を与えるものである。

B. 研究方法

HAART 開始時及びリバウンド時の血漿より RT-PCR にて HIV-gp120 を増幅し、多クローン解析にてアミノ酸配列を決定し系統樹解析を行った。リバウンド前後の gp120 のアミノ酸配列をもつ組み換えウイルスを複数作成し患者血漿から精製した IgG を用いて、MAGI-CCR5 細胞の系でそれぞれのウイルスの中和活性を測定した。

（倫理面への配慮）

本研究を行うに当たり各症例には研究の概要を説明し同意を得た上で採血し、解析し

た。

C. 研究結果

HAART 開始時に得られた自己の分離株に対して中和抗体活性が認められ、HAART により血中ウイルス量を測定感度以下に抑えることのできた症例のうち、臨床経過中にリバウンドの認められた症例が 3 例あった。3 例とも HAART は有効であったが、長期間のウイルスの増殖抑制後にリバウンドが認められた。症例 1 ではリバウンド RNA 量のレベルは高かったが他の 2 例は低かった。いずれの症例も薬剤耐性変異の獲得はなく、リバウンド前と同様の regimen にて再び測定感度以下となっている。HAART 開始時とリバウンド時のクワシスピーシスの関係を系統樹解析すると 3 症例ともリバウンドウイルスは HAART 開始時のクワシスピーシスの中から選択されて増殖してきた集団と考えられた。このような選択圧のひとつとして中和抗体の重要性を調べるために、症例 1 については HAART 開始時とリバウンド時の代表株の envelope の V1 から V5 までをクローニングし、SF162 を back ground としたベクターに組込み、リコンビナントウイルスを作成し、中和感受性/抵抗性を調べた。HAART 開始時のウイルスは 200 μ g/ml の serum IgG を用いると 71% の抑制が得られたのに対し、リバウンドウイルスでは 28% と抵抗性であった。さらに詳細なリコンビナントウイルスを作製し中和感受性/抵抗

性を調べた。R1-2 は V1-V2 の変異を含むがその中和感受性は pMOK-10 と同等であった。一方、V3 とその周辺を含む R3 は rMOK10 と同等の中和抵抗性を示した。R3 は V3 と C3 の一部がリバウンドウイルス由来であり、C3 (outside V3) のみリバウンド型の R3cga は中和抵抗性であった。V3 のみリバウンド型の RC3 も作製しているが、プレリミナリーなデータでは中和感受性であった。以上の結果を総合すると C3 の変化がリバウンドウイルスを中和抵抗性に行っていると考えられた。

D. 考察

今回得られた結果から、*in vivo* において中和抗体存在下では HAART 開始時のクワシスपीシスの一部からリバウンドウイルスが増殖してくると考えられた。また、症例 1 でリバウンドしてきたウイルスは血漿中の自己のウイルスに対する中和抗体の選択圧をまぬがれたであろうと考えられ、その中和抵抗性は C3 の変異に関連していた。今後は、この中和抗体が C3 に直接作用するためなのか C3 の変化によって 2 次的に V3 などの立体構造の変化が起こったためなのかを明らかにしたい。また他の症例についても同様の解析を行い、生体内における中和抗体による選択圧の標的を明らかにしていきたいと考えている。

E. 結論

この研究は実際の感染症例で中和抗体の選択圧に対して HIV がどのように変異しているのかを明らかにするものである。症例 1 は V3 の近傍 C3 の変化が中和抵抗性に関連していた。これらの観察は中和抗体を用いた治療法の開発や中和抗体の誘導を目指した治療ワクチンの開発などに重要な示唆を与えるものである。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Y. Maeda, Foda M., S. Matsushita, S.

Harada: Involvement of both V2 and V3 region of CCR5-tropic human immunodeficiency virus type-1 envelope for reduced sensitivity to macrophage inflammatory protein α . J. Virol. 74(4), 1787-1793. (2000)

- 2) S. Matsushita: Current status and future issues in the treatment of HIV infection. Int. J. Hematol. 20-27, 2000
- 3) Tugarinov V, Zvi A, Levy R, Hayek Y, Matsushita S, Anglister J: NMR structure of an anti gp-120 antibody complex with a V3-peptide reveals a surface important for co-receptor binding. Structure 8, 385-395, 2000.
- 4) Ikegawa M, Matsumoto K, Herrmann S, Iwamoto A, Nakamura T, Matsushita S, Nakamura T, Honjo T, Tashiro K: Elevated plasma SDF-1 protein level in the progression of HIV-1 infection/AIDS. AIDS Res. Hum. Retrov. (in press)

2. 学会発表

- 1) Tetsuya Kimura, Shuzo Matsushita, et al: Autologous isolate neutralizing antibodies in plasma from HIV-1 infected patients on highly active antiretroviral therapy. XIII International AIDS Conference. 2000.7.9-14, Durban, South Africa.
- 2) 小糸厚、重兼弘法、松下修三: マウス細胞における HIV-1 増殖抑制機構の解析. 第 48 回日本ウイルス学会学術集会. 1999.10.12-14.
- 3) 木村哲也、吉村和久、前田洋助、小糸厚、松下修三: HAART 療法前後の抗 HIV-1 中和抗体. 第 14 回日本エイズ学会総会. 1999.11.28-30.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

厚生科学研究費補助金（厚生科学エイズ対策研究「発症阻止」）
（分担）研究報告書

HIV の増殖と病原性に関与する宿主因子の解析
(1) 免疫補刺激分子 OX40 リガンド(gp34)による HIV-1 増殖制御

（分担）研究者 田中勇悦 琉球大学医学部教授

研究要旨

gp34(OX40L)による OX40 を介する T 細胞刺激システムが、HIV-1 の感染増殖に及ぼす影響を試験管内 HIV-1 感染実験で調べたところ、M ϕ 親和性 HIV-1 株の増殖が強力に抑制された。その機序として β ケモカインの産生増強が示唆された。gp34(OX40L)による T 細胞刺激が、HIV-1 感染を制御する免疫補刺激システムの一つであることが明らかにされた。

A. 研究目的

TNF ファミリーの OX40 ligand (OX40L) (別名 gp34) 分子は、樹上細胞、活性化 B 細胞や血管内皮細胞等に局限して発現する細胞表面分子で、活性化 CD4+T 細胞が発現するレセプター分子 (OX40) と結合することにより種々の免疫応答を補助的に刺激する。本研究の目的は、HIV-1 の増殖と病原性に関与する宿主因子の解析というテーマにおいて、宿主 gp34 による T 細胞の補刺激が HIV-1 の *in vitro* の増殖と病原性にどのような影響を及ぼすのかを免疫学的に解明し HIV-1 感染病態をより深く理解し、その制御に寄与することである。

B. 研究方法

OX40L トランスフェクタント (SVT2/gp34 細胞) 共存下で T 細胞を刺激し、活性化させた後に HIV-1 を感染させた。HIV-1 の増殖を p24 ELISA で測定した。 β ケモカインは ELISA で測定した。
(倫理面への配慮)

PBMC の健常人ドナーには、実験の目的を十分に説明し理解を得た。

C. 研究結果

OX40L で刺激した PBMC では、M ϕ 親和性 HIV-1JR-CSF 株の増殖が強力に抑制された。T 細胞株親和性 HIV-1NL4-3 株の増殖抑制は見られなかった。長期間培養した抗原刺激 CD4+T 細胞系では gp34 補刺激による HIV-1JR-CSF の抑制が見られる系と見られない系があったが、HIV-1NL4-3 の増殖は促進された。HIV-1 感染 PBMC 培養系での CD4+T 細胞の枯渇は、HIV-1JR-CSF 感染系では gp34 刺激によって抑制されたが、HIV-1NL4-3 感染ではやや促進された。OX40L-OX40 の刺激システムを阻害する anti-gp34 単クローン抗体を添加することにより HIV-1 増殖に対する制御効果が有為に阻止された。gp34 (OX40L) 刺激により活性化 PBMC 培養では、コントロールと比較して 2 倍以上の RANTES、MIP-1 α/β の産生増強があった。興味あることに、gp34 (OX40L) は、細胞間移動により T 細胞にも機能的分子として表現されることが分かった。

D. 考察

OX40LによるOX40を介するT細胞刺激システムは、HIV-1の感染増殖を制御する重要な免疫補刺激システムの一つであり、RANTES、MIP-1 α/β の産生増強がM ϕ 親和性HIV-1の増殖抑制の一因であることが示唆された

E. 結論

gp34(OX40L)によるOX40を介するT細胞刺激システムが、HIV-1の感染増殖を制御する免疫補刺激システムの一つであることが明らかにされた。

G. 研究発表

1. 投稿中

2. 学会発表

学会発表：田中礼子、高橋良明、山本直樹、田中勇悦：免疫補刺激分子OX40リガンド(gp34)によるHIV-1増殖抑制制御、日本エイズ学会誌 vol.2 (4)447,2000. 京都、2000.11.28-30

厚生科学研究費補助金エイズ対策研究事業
「エイズ発症阻止に関する研究」班 平成 12 年度分担研究報告書

HIV 感染症における細胞性免疫不全成立機序の解析

分担研究者 小柳津 直樹 東京大学医科学研究所助教授

研究要旨

HIV-1 gp120 による CD4 分子との相関を介する機能的 CD4T 細胞アポトーシス誘導の系でケモカインレセプター CXCR-4, CCR5 を介するシグナルのアポトーシス制御に対する関与を検討、解析した。正常人末梢血単核球(PBMC)を抗 CXCR4 あるいは抗 CCR5 抗体で前処置後 gp120 あるいは抗 CD4 抗体を用いて CD4 分子の架橋形成 (CD4XL) をもたらし誘導される T 細胞アポトーシスをフローサイトメトリーにより解析した。結果は gp120 を用いた CD4XL の際のみ CXCR4 抗体による前処置は有意なアポトーシス抑制効果をもたらした。いずれの前処置にても抗 CD4 抗体による CD4XL 誘導性 T 細胞アポトーシスは影響を受けなかった。この CXCR4 抗体によるアポトーシス抑制効果は CD4XL による Fas リガンド mRNA 誘導抑制と相関していた。抗 CD4 抗体を用いた結果から CXCR4、CCR5 を介するシグナルはそれ自体では CD4XL 誘導性 T 細胞アポトーシスに影響を与えないと結論した。Gp120 の作用に対する CXCR4 抗体の抑制作用は、抗体があらかじめ CXCR4 を占拠することにより gp120 の標的細胞への吸着を部分的に阻害しもって CD4 シグナルを減弱させていると考察した。

A. 研究目的：

HIV 感染症における CD4T 細胞減少機序を説明する機序として *in vitro* における CD4 架橋形成(CD4XL)誘導性 CD4T 細胞アポトーシスの系を開発してきた。しかしこのシステムにおけるケモカインレセプターの関与は未検討であった。またこの *in vitro* で得られた知見が実際に患者リンパ節の *in situ* で展開されているかの検討もされていなかった。

そこでこの両者を明らかにするため、

- a) CD4XL 誘導性 CD4T 細胞アポトーシスシステムにおけるケモカインレセプター CCR5, CXCR4 を介したシグナルによる修飾効果の解析

- b) AIDS リンパ節 *in situ* におけるアポトーシスの解析

の 2 点を具体的研究課題として設定しその解析を試みた。

B. 研究方法

(1)

- a) 細胞および CD4 架橋形成：正常人より Ficoll で分離した PBMC を 1) 無処置、2) anti-CXCR4 mAb (12G5, 10 μ g/1x10⁶ cells), 3) anti-CCR5 mAb(2D7, 5 μ g/1x10⁶ cells) の存在下で 4 $^{\circ}$ C, 40 分それぞれ前処置した。この前処置後以下の方法で CD4 架橋形成をもたらした。A) gp120 (HTLV-III451 感染細胞培養上澄みより精製、10 μ g/1x10⁶ cells)、4 $^{\circ}$ C, 1 時間処置後、

抗 gp120 を固層化したプレート上へあるいは B) 抗 CD4 抗体 (Leu3a, 5µg/1x10⁶ cells) 4 ° C, 30 分処置後、goat anti-mouse Ig (GAM) を固層化したプレート上へ細胞を移し 37 ° C にて培養した。

解析：回収細胞につき以下の方法でアポトーシスの同定および定量を試みた。1) エタノール固定後 propidium iodide (PI) にて染色、2) Annexin V binding assay (R&D 社の apoptosis detection kit) を使用。後者については CD8 染色を併用し CD4 T 細胞、CD8 T 細胞のアポトーシスをそれぞれの分画において定量した。染色細胞はいずれもフローサイトメトリーにより解析した。また一部の実験においては RNA を抽出し

RT-PCR にて FasL mRNA 発現を解析した。用いたプライマーは 5'-sense

CTGGTCGCTCTGGTTGGAAT、3'-antisense

GTTTAGGGGCTGGTTGTTGC である。
b) 東大医科研 AIDS 剖検症例よりそのリンパ節組織切片に対し抗 p24、FasL、CD3、CD68 抗体を用いて定法により免疫組織染色を行った。また同組織切片に対し TUNEL 法によるアポトーシス解析も行った。一部の切片に対しては p24/TUNEL、CD3/TUNEL、FasL/CD68、FasL/CD3 の組み合わせで 2 重染色を試みた。

(2) 「倫理面への配慮」：当該研究ではボランティアから採取された末梢血および病理解剖組織切片を材料として細胞機能、免疫組織化学的解析を加えた研究であり倫理面で抵触する要素はない。

C. 研究結果：

分担研究者はこれまでに HIVgp120 あるいは抗 CD4 抗体を用いた CD4XL による Fas/Fas ligand 相関、マクロファージ接

触依存性に CD4T 細胞アポトーシスを誘導する *in vitro* のシステムを開発してきた。

不明であった点はこのシステムにおける CCR5、CXCR4 の関与であった。この点を明らかにすべく抗 CXCR4、抗 CCR5 抗体を CD4XL 先だてに加えその CD4T 細胞アポトーシス誘導に対する効果を解析した。

実験に先立ち使用した細胞のケモカインレセプター発現を解析したところ CD4 T 細胞における CXCR4 発現は 73%、CCR5 は 54%、CD8 T 細胞における CXCR4 は 46%、CCR5 は 55% であり十分なレセプター発現を有していることを確認した。結果は gp120 を用いた CD4XL 時に抗 CXCR4

抗体を用いた時のみこの前処置は CD4T 細胞アポトーシス誘導を有意に阻害した。統計的有意差はなかったが抗 CCR5 前処置でも gp120 による CD4 T 細胞のアポトーシスは軽度抑制された。しかしながら抗 CD4 抗体 Leu3a を用いた際の CD4XL 誘導性 CD4 T 細胞アポトーシスはこれらの前処置でまったく影響を受けなかった。また抗 CXCR4、CCR5 抗体処置のみでは CD4 T 細胞、CD8 T 細胞ともにアポトーシスはまったく誘導されなかった。この効果は FasL mRNA 誘導阻害と相関していた。

すなわち gp120、Leu3a を用いた CD4XL にて FasL mRNA が誘導されたがこの誘導効果は抗 CXCR4 抗体前処置にて gp120 による CD4XL 時のみ FasL mRNA 誘導が阻害されこの Leu3a を用いた CD4XL 場合はまったく影響を受けなかった。最後に抗ケモカインレセプター抗体前処置が gp120 および Leu3a の CD4 分子への結合阻害効果を有しているかを検討するため

CXCR4/CCR5/gp120/Leu3a をそれぞれの組み合わせで処置後 OKT4A、OKT4 抗体を用いて CD4 分子の発現状態を検討した。そ

の結果は CXCR4 抗体処理後 gp120 の CD4 分子への結合が軽度阻害されている結果であった。

AIDS 組織材料を用いた免疫組織学的解析ではリンパ節有核細胞の半数以上が TUNEL にてラベルされその多くが CD3 陽性 T 細胞であった。また CD3 陰性細胞も少なからず TUNEL 陽性を示し非 T 細胞のアポトーシスも観察された。FasL 発現は CD68 陽性マクロファージおよび CD3 陽性 T 細胞の両者に観察されたのに加え樹状細胞の形態を示す細胞にも明らかな陽性所見を認めた。P24 陽性細胞は極少数の樹状細胞の形態をとる細胞（恐らく FDC）に陽性所見を認めたのみであった。

D. 考察

Gp120 を介した非感染 CD4T 細胞の機能的細胞死誘導についてはこれまでに蓄積された研究がある。これまでに gp120 が CD4 分子を介してシグナルを送り CD4 T 細胞には Fas が誘導されまたマクロファージでは FasL 発現が誘導され CD4 T 細胞とマクロファージの接触のもとに Fas・FasL 相関依存性の CD4 T 細胞アポトーシスが誘導されるとのコンセンサスに至っている。しかしながらこの系における CXCR4, CCR5 の役割については未検討であった。今回の解析で Leu3a を用いた CD4XL では CD4 T 細胞アポトーシス誘導について抗 CXCR4, CCR5 抗体前処置はまったく影響を及ぼさなかった。従って CXCR4/CCR5 はアポトーシス制御シグナルを送っている可能性については否定的であった。しかしながら CXCR4 抗体前処置は gp120 による CD4 T 細胞アポトーシスを有意に抑制した。またその抑制効果は同抗体前処置による FasL mRNA 発現抑制と相関していた。

これらの観察結果は用いた gp120 が T-tropic, R4-type strain 由来の精製タンパクであるため恐らく抗 CXCR4 抗体の存在がこの gp120 の標的細胞への結合を減弱させその結果 CD4 分子を介したシグナルが減弱し FasL mRNA の発現低下、アポトーシスの抑制につながったと推論した。CXCR4 抗体処理後 gp120 の CD4 分子への結合が軽度阻害されたとの観察結果はこの考えを支持するものである。

上述した *in vitro* の知見が実際に患者個体で展開されているかを検討するため AIDS 患者リンパ節組織標本を用い *in situ* にて解析した。結果の項で記した通りリンパ節局所において著しく増加した T 細胞アポトーシスの同定、FasL 陽性マクロファージの増加等有意な知見を得た。更に FasL 陽性の樹状細胞の同定など新規知見も得た。しかしながらその細胞の詳細な同定については今後の解析を待つことになった。また抗 p24 抗体を用いた免疫染色のみでは感染細胞同定に関する検出感度が非常に低く *in situ hybridization* 等のより高感度の検出手技の導入によるより厳密に感染、非感染細胞を区別した上で解析の必要性があると考える。

E. 結論

HIV-1 gp120 による CD4 分子との相関を介する機能的 CD4T 細胞アポトーシス誘導の系でケモカインレセプター CXCR-4, CCR5 を介するシグナルのアポトーシス制御に対する関与を検討、解析した。今回の解析結果から CXCR4, CCR5 を介するシグナルは CD4XL 誘導性 T 細胞アポトーシスに影響を与えないと結論した。CXCR4 抗体による抑制作用は gp120 の標的細胞への吸着を部分的に阻害しもって CD4 シグナ

ルを減弱させていると解釈した。CD4T 細胞減少・細胞死誘導の機序解析は AIDS 発症病理の基幹をなす問いでありその機序の詳細にさらにせまる成果を挙げ得たと考える。

F. 健康危険情報

材料は健康人末梢血およびホルマリン固定 AIDS 症例病理組織標本でありバイオハザードの面から問題となる要素はない。

G. 研究発表

1.論文発表

- ① Tatiana M. **Oyaizu** N. McCloskey TW. Than S. Pahwa S. CD4 T lymphocytes are primed to express Fas ligand by CD4 cross-linking and to contribute to CD8 T-cell apoptosis via Fas/FasL death signaling pathway. *Blood*. 96:195-202, 2000

- ② Hosaka N. **Oyaizu** N. Than S. Pahwa S. Correlation of loss of

CD4 T cells with plasma levels of both soluble form Fas (CD95) Fas ligand (FasL) in HIV-infected infants. *Clinical Immunology*. 95:20-5, 2000

- ③ Shinohara H. Yagita H. Ikawa Y. **Oyaizu** N. Fas drives cell cycle progression in glioma cells via extracellular signal-regulated kinase activation. *Cancer Research*. 60:1766-72, 2000

- ④ Tomimori Y. Ikawa Y. **Oyaizu** N. Ultraviolet-irradiated apoptotic lymphocytes produce interleukin-10 by themselves. *Immunology Letters*. 71:49-54, 2000

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし。

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

発症防止ワクチン開発のための基礎研究

分担研究者 志田壽利（北海道大学遺伝子病研究所）

研究要旨 SIVmac239 感染猿を逆転写酵素阻害剤である PMPA で治療しつつ、ワクチンを接種して、PMPA 投与中止後の体内 SIV 量を追跡した。gag-pol 領域と rev-env 領域を発現するオーダーメイド DNA ワクチンを作製して用いた。先ず、PMPA によって体内 SIV 量は検出限界以下にまで下がった。PMPA 中止後は一過性に SIV の rebound がみられたが、再度抑制された。現在のところ、ワクチン接種群と非接種群間で差はみられていない。

A. 研究目的

HIV 感染者への HAART 療法は著効を示し、ウイルス増殖を抑制して症状を改善させた。しかし、体内 HIV は駆逐されず、耐性の獲得や副作用のために HAART 療法にも限界があり、かつ使用期限があるとされている。そこで、我々は HAART 療法被治験者へのワクチン接種によって HAART 中止後もウイルスを抑え続けることができるかどうかを検討することを目的とした。まずサルと SIV の系で研究を立ち上げ、ヒトへ応用するための前提とする。

HIV (SIV) のワクチン開発の難しさは、抗原多様性への対応法にある。類似の HIV が感染しても、体内での免疫系からの回避の結果、個々人によって異なった抗原性を有する HIV (SIV) が生じる。従って、感染者個々人に適したオーダーメイドワクチンを作製する必要がある。そのために、感染者 (HAART 療法開始直前の) 体内に存在する HIV (SIV) ゲノム群を PCR によって取り出し、そのまま発現ベクターに連結するオーダーメイド DNA ワクチンを本研究において試みる。

B. 研究方法

プラズミドと細胞：我々が作製したサイトメガロウイルスのプロモーターを持つ pJW322, SIV ゲノムの全長を有する pSIVmac239 を用いた。HeLa 細胞は RPMI1640, 10% FCS 中で培養した。

SIV 感染猿：SIVmac239 を蟹喰いザルに感染させて P3 の条件で飼育した。感染後の各時期に血液を採取して、クエン酸をもちいて血漿を調製した。採血に際しては、麻酔を施した。

発現ライブラリーの構築：SIV 感染 4 週間後の猿の血漿から QIAGEN の viral RNA isolation kit を用いて SIV の RNA ゲノムを抽出した。ランダムプライマーを用いて逆転写反応を行った後で nested-PCR (1st プライマー：seoutf2: GGGAGCAGGAGAACTCATTAGAATCC と seoutr1: GAGAAGTCGACCCAAAGAGGT ACCTCA 2nd プライマー：seinfl: GCGAATTGCTATTGTAAAAAGTGTGCTACCATTGCC seinrl: CGCCTAGGACAGGGAGT GTTCTCTCACTCGAGTTCGGG) によって rev-env 領域を増幅した。EcoRI と BamHI で切断後、pJW322 に組み込んだ。

Gag と Pol 蛋白を効率よく発現するためにまず、

PJW322 に Rev 発現カセットを組み込みかつ RFP gene を CMV プロモーターに下流に挿入したプラズミドを作製した。gag-pol 領域を増幅するために、1stPCR 用 プライマーとして Fwd: AAGGCAGTAAGGGCGGCAGGAACCAA Rev: TCTGGTGGTGAATCTTGTAATCCG を用い、2ndPCR のためにプライマーとして Fwd: GCGAATTCGTGGGAGATGGGCGTGAGAACTCCG Rev: Rev: ACCCCGGGTTCTGTTCTGATTGGACCTCCACGTG を用いた。増幅後、ApaI と EcoRI で切断後、上記のプラズミドに組み込んだ。

SIV 蛋白質の検出：rev-env または gag-pol 発現プラズミドを HeLa 細胞にトランスフェクションして、細胞破碎液を SDS-PAGE で分離後、ニトロセルロース膜に転写し、SIV 感染猿の血清を用いたウエスタンブロッティング法によって Env, Gag, Pol 蛋白質を検出した。

SIV 感染猿の PMPA 処理：蟹喰い猿に SIV を 300 monkey infectious dose 接種した。4 週間後に、30mg/Kg/day の PMPA を 1 日 1 回 4 週間、20mg/Kg/day をさらに 4 週間皮下接種した。

ワクチン接種：感染 7, 10, 14 週間後にそれぞれの発現ライブラリーを 500ug ずつ筋肉注射した。ワクチン非接種群として pJW322 を注射した。

体内ウイルス量の定量：感染猿の血漿からゲノム RNA を抽出し、ABI PRISM7700 を用いて Taqman PCR 法によってウイルスのコピー数を測定した。検出限界は 500 コピー/ml であった。

C. 研究結果

1. 実験のアウトライン

蟹喰い猿 4 匹に SIVMac239 を感染させて 4 週間後に、逆転写阻害剤である PMPA を 1 日 1 回毎日投与し始め、感染 12 週間後までの 8 週間続けた。また、投与開始直前に採血した血漿から SIV ゲノムを抽出して、PCR 法によって gag-pol 領域と rev-env 領域を増幅した。そして CMV promoter の

下流に連結して発現ライブラリーを作製した。この発現ライブラリーをプラズマ採取猿に、感染 7, 10, 14 週間後に筋注した。Taqman PCR 法によって血漿中のウイルス RNA 量を定量した。

2. ライブラリーワクチンの作製

rev-env 領域と gag-pol 領域をそれぞれ発現するライブラリーを作製した。コンストラクト上では、Nef と Tat の C 末端以外の全ての SIV 蛋白質を発現できる。猿血漿中から抽出した SIV ゲノム RNA を鋳型にして RT-PCR 法によって、rev-env 領域または gag-pol 領域を増幅して pJW322 に組み込んだ。

rev-env 領域を含む発現ライブラリーの場合、ライゲーション後 ApI で切断することにより SIV ゲノムを含まない pJW322 を排除した。その結果 90%以上が rev-env 領域を含む約 1 万個の独立したクローンよりなる発現ライブラリーを得た。Env 蛋白質を発現することを調べるために、HeLa 細胞にトランスフェクションして Western blotting によって調べた。SIV の全ゲノムを含む pSIVmac239 と比較したところ、ほぼ同量の Env 蛋白質を生産することが分かった。

Gag-pol を効率よく発現させるために、まず Rev の発現カセットを pJW322 に組み込み、続いて増幅した gag-pol 領域を組み込んだ。ベクターとのライゲーション後、NotI で切断することによって、SIV ゲノムを含まないベクターを除いた。90%以上が gag-pol 領域を含む 10^3 - 10^4 個の独立したクローンよりなる発現ライブラリーを得た。トランスフェクションして Western blotting によって調べたところ、Gag と Pol 蛋白質が効率よく生産されることが分かった。 10^5 コピー/ml の SIV 量があれば発現ライブラリーを作製できることが分かった。これらの発現ライブラリーを DNA ワクチンとして、血漿を採取した猿に接種した。

3. 体内ウイルス量

感染 2 週間後にウイルス量はピークになり、 2×10^5 - 5×10^6 コピー/ml の値を示した。PMPA 投与後

ウイルス量は速やかに減少し、3週間後には全ての猿からウイルスが検出できなくなった。感染7, 10週間後のワクチン接種によってウイルスの増加は見られなかった。PMPA投与の中止2週間後には全ての猿でウイルスの rebound が見られ、 10^3 - 2×10^4 コピー/ml の値を示した。しかし、中止4週間後には全ての猿でウイルス量の大幅な減少が見られた。上述のウイルス量の体内変化にワクチン接種群と皮接種群間で差は見られなかった。

D. 考察

我々は種々の工夫により、SIV感染猿の血漿から rev-env, gag-pol 領域を効率よく発現するライブラリーDNAワクチンをコンスタントに作製できるようになった。このコンストラクトはSIVの全ゲノムを発現するプラズミドと同等の発現効率を有していた。以前に env 中に存在する V1 領域を sequence することにより、この方法で作成したライブラリーが体内ウイルスポピュレーションを反映していることを示したので、今回作製した発現ライブラリーも同様に体内ウイルスポピュレーションを反映していると期待できる。

PMPA 単独投与で非常に効果的に SIV の増殖を抑制した。最近発表された Nature Medicine の論文では、PMPA と共に d4T と DDI が使われているが、SIV の抑制が十分でない割合が高い。その論文の場合には PMPA の使用量が我々よりも少ないことが原因であると考えられる。

PMPA 投与の中止後ウイルスは一旦 rebound したが、再度抑制された。この現象は HIV 感染者の HAART 療法中断後に観察された HIV の抑制を、SIV-猿の系で再現したものであると考えられる。ワクチン接種群と非接種群間で差がみられなかったことから、ワクチンの効果ではないと考えられる。以前に得られた我々の経験から推定すると、今後体内ウイルス量は数ヶ月から1年の間に徐々に上昇してくると予想される。ワクチンを打ち続ける

ことによって今後のウイルス量の上昇を抑えられるかどうかを追跡したい。また、抗 SIV CTL や抗体価を測定することは重要であり、現在検討中である。

E. 結論

1. rev-env と gag-pol を効率よく発現するライブラリーワクチンを作製できるようになった。
2. PMPA は単独投与で効果的に SIV の増殖を抑制した。
3. ワクチンの投与に関係なく PMPA 中止後、ウイルスは一過性に増殖した後で、再度抑えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

Xiao, Y., Kuwata, T., Miura, T., Hayami, M., Shida, H. (2000): Dox-dependent SIVmac with tetracycline inducible promoter in the U3 promoter region. Virology 269: 268-275.

H. 知的財産権

なし

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

（分担） 研究報告書

コレセプターを介した感染阻害の研究

分担研究者 山本 直樹 東京医科歯科大学

研究要旨

低分子でしかも非ペプチド性の新規 CXCR4 阻害物質、KRH-1120 およびその誘導体を見出した。これらの物質には X4 タイプウイルスの感染は効率よく抑制したが R5 タイプウイルスには全く作用しなかった。さらに KRH-1120 は SDF-1 の CXCR4 への結合とそれによる Ca^{2+} インフラックスも特異的に抑制した。KRH-1120 は十二指腸から血中に効率よく移行することから内服可能な抗 HIV 薬となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

HAART で使用されている逆転写酵素阻害剤 (RTI)、プロテアーゼ阻害剤 (PI) に続いて第3の薬剤が期待されているが、中でもコレセプターを介した感染阻害薬はその最大の候補といえる。これまで CXCR4 antagonist としては T22、AMD3100 などが、一方 CCR5 antagonist としては TAK703 などが報告されているが、化合物の持つ化学的性状からいずれも内服にはたえない。そこで本研究では内服可能なコレセプター阻害剤の開発を目的として研究を行った。

B. 研究方法

KRH-1120 とその誘導体:

化学合成を行った。

細胞とウイルス:

正常末梢リンパ球は RPMI-1640 プラス 20%FCS で、また MT-4, Molt-4, Molt-4/HIV, 種々のコレセプターを発現する HOS 細胞は RPMI-1640 プラス 10%FCS で培養した。ウイルスは X4 タイプとして HTLV-III_B, NL-4-3, YU-6, YU-7, R5タイ

プとして YU-1 を用いた。

抗ウイルスアッセイ:

MT-4 細胞を用いた MTT アッセイによる。

リガンド結合試験と Ca^{2+} インフラックス:

HOS 細胞に発現させた各種コレセプターに対し、¹²⁵I ラベルリガンドを用いることでその結合を検討した。また Ca^{2+} インフラックスは FuraPE3-AM を HOS/CXCR4 細胞に加えることにより測定した。

動物実験:

Wistar ラットに経十二指腸的に薬物を投与し、経時的に血中薬物量を測定した。

(倫理面への配慮)

試験管内の実験が主であること、すでに樹立され実験にも頻用されている細胞株を用いていること、また動物実験もワシントン条約を遵守していることから、特に倫理的に問題となるような内容は含まれていないと考えられる。

C. 研究結果

KRH-1120 とその誘導体は T 細胞株と正常末

稍リンパ球を用いたX4タイプ HIV-1 感染に対し、強い抗 HIV-1 活性を示した。その選択活性は1万倍以上であった。しかし R5 タイプ HIV-1 感染にはまったく無効であった。化合物は HOS 細胞に発現させた CXCR4 への SDF-1 の結合とその結果起こる Ca^{2+} インフラックスを濃度依存的に抑制した。KRH-1120 による CXCR4 に対する効果は、これらの化合物が CCR5, CCR3, CCR4 などには全く作用しないことから特異的と考えられた。

一方、KRH-1120 を経十二指腸的に投与すると、薬物は効率よく吸収されて血中に移行することが血清の抗 HIV-1 活性から証明された。

D. 考察

RTIとPIはきわめて有効であるが、これらがウイルス側を標的にしているため、HIV-1 の易変異性に対し、弱点を有する。そのことから細胞側の因子であるコレセプターを介した感染阻害薬の開発は今後の HIV 感染者の治療において大きな意味を持つと考える。さらに今後は既感染者の発症予防がますます重要となることは明らかである。そのためには長期間の薬剤投与が必要となるが、その意味からも内服可能な新しい作用機作を有する新規抗 HIV 薬の開発は重要である。

E. 結論

現在、AMD3100 や T22、TAK703 などの臨床応用が進められており、新しい作用機序の抗 HIV-1 薬として期待されている。とくに AMD3100 では米国でフェーズ2まで進んでおり、その結果が注目されている。本研究はこれをさらに一歩進めて、内服可能な CXCR4 antagonist としての候補物質を見いだしたものでその意義は大きい。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

Momoi Y, Ichiyama K, Chowdhury IH, Koyanagi Y, Yamamoto N: Pertussis toxin enhances human immunodeficiency virus type 1 replication. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.*, 16:373-9, 2000

Ryo A, Suzuki Y, Arai M, Kondoh N, Wakatsuki T, Hada A, Shuda M, Tanaka K, Sato C, Yamamoto M, Yamamoto N.: Identification and characterization of differentially expressed mRNAs in HIV type 1-infected human T cells. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 16:995-1005, 2000

Takahashi K, Baba S, Hayashi Y, Koyanagi Y, Yamamoto N, Takaku H, Kawai G.: NMR analysis of intra- and inter-molecular stems in the dimerization initiation site of the HIV-1 genome. *J. Biochem.*, 127:681-6, 2000

Tsurutani N, Kubo M, Maeda Y, Ohashi T, Yamamoto N, Kannagi M, Masuda T: Identification of critical amino acid residues in human immunodeficiency virus type 1 IN required for efficient proviral DNA formation at steps prior to integration in dividing and nondividing cells. *J. Virol.* 74:4795-806, 2000

Park WS, Miyano-Kurosaki N, Abe T, Takai K, Yamamoto N, Takaku H: Inhibition of HIV-1 replication by a new type of circular dumbbell RNA/DNA chimeric oligonucleotides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270:953-60, 2000

Takahashi KI, Baba S, Chattopadhyay P, Koyanagi Y, Yamamoto N, Takaku H, Kawai G.: Structural requirement for the two-step dimerization of human immunodeficiency virus type 1 genome. *RNA* 6:96-102, 2000

Premanathan M, Rajendran S, Ramanathan T, Kathiresan K, Nakashima H, Yamamoto N.: A survey of some Indian medicinal plants for anti-human immunodeficiency virus (HIV) activity. *Indian J. Med. Res.*, 112:73-7, 2000

Tsunetsugu-Yokota Y, Kato T, Yasuda S, Matsuda Z, Suzuki Y, Koyanagi Y, Yamamoto N, Akagawa K, Cho MW, Takemori T. Transcriptional regulation of HIV-1 LTR during antigen-dependent activation of primary T cells by dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.*, 67:432-40, 2000

Tamamura H, Omagari A, Oishi S, Kanamoto T, Yamamoto N, Peiper SC, Nakashima H, Otaka A, Fujii N. Pharmacophore identification of a specific CXCR4 inhibitor, T140, leads to development of effective anti-HIV agents with very high selectivity indexes. *Bioorg Med Chem Lett.* ;10(23):2633-7,2000.

Fujii M, Iwai K, Oie M, Fukushi M, Yamamoto N, Kannagi M, Mori N.: Activation of oncogenic transcription factor AP-1 in T cells infected with human T cell leukemia virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.*, 16:1603-6, 2000

Mori N, Fujii M, Iwai K, Ikeda S, Yamasaki Y, Hata T, Yamada Y, Tanaka Y, Tomonaga M, Yamamoto N.: Constitutive activation of transcription factor AP-1 in primary adult T-cell leukemia cells. *Blood.*, 95:3915-21, 2000

Mori N, Wada A, Hirayama T, Parks TP, Stratowa C, Yamamoto N.: Activation of intercellular adhesion molecule 1 expression by *Helicobacter pylori* is regulated by NF-kappaB in gastric epithelial cancer cells. *Infect. Immun.* 68:1806-14, 2000

Mori N, Wada A, Hirayama T, Parks TP, Stratowa C, Yamamoto N: Activation of intercellular adhesion molecule 1 expression by *Helicobacter pylori* is regulated by NF-kappaB in gastric epithelial cancer cells. *Infect. Immun.* 68:1806-14, 2000

Mori N, Ueda A, Ikeda S, Yamasaki Y, Yamada Y, Tomonaga M, Morikawa S, Geleziunas R, Yoshimura T, Yamamoto N.: Human T-cell leukemia virus type I tax activates transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene through two nuclear factor-kappaB sites. *Cancer Res.*, 60: 4939-45, 2000

Shuda M, Kondoh N, Tanaka K, Ryo A, Wakatsuki T, Hada A, Goseki N, Igari T, Hatsuse K, Aihara T, Horiuchi S, Shichita M, Yamamoto N, Yamamoto M.: Enhanced expression of translation factor mRNAs in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res.* 20:2489-94, 2000

Yamamoto N, Takizawa T, Iwanaga Y, Shimizu N, Yamamoto N.: Malignant transformation of B lymphoma cell line BJAB by Epstein-Barr virus-encoded small RNAs. *FEBS Lett.* 484:153-8. 2000

Ryo A, Kondoh N, Wakatsuki T, Hada A, Yamamoto A, Yamamoto N: A Modified Serial Analysis of Gene Expression That Generates Longer Sequence Tags by Nonpalindromic Cohesive Linker Ligation. *Anal. Biochem.*, 277:160-162, 2000

Hodohara K, Fujii N, Yamamoto N and Kaushansky K : Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) acts together with thrombopoietin to enhance the development of megakaryocyte progenitor cells (CFU-MK). *Blood*, 95:769-775, 2000.

Matsuda K, Li JL, Ichinose S, Harasawa R, Saito M, Yamamoto N.: Monoclonal antibody against *Mycoplasma fermentans*-specific aminoglycoglycerolipid. *Microbiol. Immunol.* 44:695-702, 2000

Yoshida T, Miyagawa E, Yamaguchi K, Kobayashi S, Takahashi Y, Yamashita A, Miura H, Yamamoto N.: IL-2 independent transformation of a unique human T cell line, TY8-3 and its subclones by HTLV-I and -II. *Int.J.Cancer*,91:99108,2001.

Kusagawa S, Takebe Y, Yang R, Motomura K, Ampofo W, Brandful J, Koyanagi Y, Yamamoto N, Sata T, Ishikawa K, Nagai Y, Tatsumi M.: Isolation and characterization of Full-length molecular DNA clone of Ghanaian HIV-1 intersubtype A/G Recombinant (CRF02-AG) which is replication-competent in restricted host-range. *AIDS Res. Hum. Retrov.*, in press.

Owada T, Motomura T, Miyashita-Ogawa Y, Kawada-Homma M, Onishi M, Matando P, Terunuma H, Numazaki Y, Yamashita S, Yamamoto N.: Antibody masking renders HIV-1 resistant to the cationic membrane filtration through alteration of its electrostatic character. *J. Immunol. Meth.*, in press

Murakami T, Yamamoto N.: Roles of chemokines and chemokine receptors in HIV-1 infection.: Roles of chemokines and chemokine receptors in HIV-1 infection. *Int. J. Hematol.*, in press.

Tamamura H, Sugioka M, Odagaki Y, Omagari A, Kan Y, Oishi S, Nakashima H, Yamamoto N, Peiper SC, Hamanaka N, Otaka A, Fujii N.: Conformational study of a highly specific CXCR4 inhibitor, T140, disclosing the close proximity of its intrinsic pharmacophores associated with strong anti-HIV activity. *Chem. Pharm. Bull.*, in press.

Mori N, Morishita M, Tsukazaki T, Giam CZ, Kumatori A, Tanaka Y, Yamamoto N.: The human T-cell leukemia virus type-I oncoprotein Tax represses smad-dependent transforming growth factor b signaling via interaction with

CREB binding protein/p300. *Blood*, in press.

Mori N, Ueda A, Geleziunas R, Wada A, Hirayama T, Yoshimura T, Yamamoto N.: Induction of monocyte chemoattractant protein-1 by helicobacter polori involves NF-kB. *Infect. Immun.*, in press.

Iwai K, Mori N, Oie M, Yamamoto N, Fujii M.: Human T-cell leukemia virus type I Tax protein activates transcription through AP-1 site by inducing DNA binding activity in T cells. *Virology*, in press.

Nitta T, Igarashi K, Yamashita A, Yamamoto M, Yamamoto N.: Involvement of polyamines in B cell receptor-mediated apoptosis: Spermine functions as a negative modulator. *Exp. Cell Res.*, in press.

Jones SA, Horiuchi S, Yamamoto N, Fuller GM: The Soluble interleukin-6 receptor : Mechanisms of production and implications in disease. *FASEB J.*, in press.

2. 学会発表

第14回日本エイズ学会学術集会、2000年11月、京都、N.Yamamoto et al. KRH-1120, a small nonpeptide CXCR4 antagonist represents highly potent and selective anti-HIV activity.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし