

2000/034 ~ 1050

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

平成12年度

# エイズ医薬品等開発研究

## 研究報告書

財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

平成12年度

# エイズ医薬品等開発研究

## 研究報告書

# 目 次

課題番号

## 第1分野 抗エイズウイルス薬、エイズ不随症状に対する治療薬の開発に関する研究

10101	国内未承認エイズ治療薬等を用いたHIV感染症治療薬及びHIV感染症至適治療法の開発に係る応用研究	福武 勝幸	……	1
10102	エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究	棚元 憲一	……	13
10103	HIV第二受容体拮抗剤を基盤分子とする戦略的抗エイズ剤の創製と実用化	藤井 信孝	……	16
10104	HIVインテグラーゼおよび複製を制御する蛋白質を標的とする抗ウイルス剤の開発	藤原 民雄	……	22
10105	アポトーシス抑制作用を有する新規抗エイズ薬の開発	吉野公一郎	……	28
10106	細胞性因子を標的にした抗HIV薬の開発研究	金岡 昌治	……	35
10107	カリニ肺炎のゲノム創薬研究	西村 暹	……	46
10108	逆転写酵素阻害剤の併用療法に関する研究	湯浅 聡	……	51
10109	難薬剤耐性且つ多機能を指向した抗エイズ薬の開発及び抗CCR5-CXCR4キメラ環状テトラデカペプチド抗体による感染防御	加藤 英夫	……	61
10110	遺伝子発現制御機能を持つ亜鉛サイクレン錯体による抗エイズ薬の研究	山本 直彦	……	72
10111	HIV-1の細胞侵入機構の解析による抗エイズウイルス薬の開発	鈴木 達夫	……	77
10113	新規クロニング翻訳調節蛋白やIL-15、IL-16、CD26阻害剤によるエイズおよびエイズ付随症状の治療・診断研究	岩倉洋一郎	……	88

## 第2分野 エイズワクチン等エイズ発症防止薬の開発に関する研究

10201	HIV日本人株及び東南アジア株に対するワクチンの開発とAIDS予防法に関する研究	小室 勝利	……	99
10202	HIV-1vpr遺伝子を用いたHIV感染細胞のアポトーシスによる排除技術の開発	森田 裕	……	115
10204	HIVによる免疫機能不全を治療・予防する新規ワクチンの開発	金子有太郎	……	121

## 第3分野 抗エイズ薬開発のための基盤技術の開発等に関する研究

10301	エイズ治療薬開発のための評価スクリーニング系の開発	永井 美之	……	133
10303	HIVの病原性遺伝子Nefを標的とした抗AIDS薬開発のための基盤研究	松田 道行	……	144

## 第3分野

抗エイズ薬開発のための基盤技術の  
開発等に関する研究

## HIVの病原性遺伝子Nefを標的とした抗AIDS薬開発 のための基盤研究

所 属 国立国際医療センター研究所臨床病理研究部  
主任研究者 松田 道行

### 要 旨

HIVは遺伝子変異により常に進化していくウイルスであり、現存する逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤に対する耐性ウイルスは早晩出現すると考えられており、それに対抗する新しい薬剤が切望されている。Nefは個体レベルでのHIVの病原性を規定する遺伝子であり、抗HIV薬の有望な標的分子である。本研究班では、Nefの病原性の分子機構の解明と平行して、抗Nef作用を有する薬剤のスクリーニング系を構築した。HIV-1のアクセサリー蛋白Nefは、個体レベルでのHIV-1の病原性を決定しているが、試験管内でのHIV-1の増殖には、Nefは必須ではないとされている。本研究班では、Nefを欠損したウイルスが試験管内で感染性が低下していることに着目して研究を進めている。まず、昨年度の研究にさらに改良を加え、Nefの生物学的活性をより感度よく測定する細胞株MAGNEFを樹立した。この細胞株を使って、これまで、差が認められていなかったAIDS患者のNefと長期未発症者のHIV感染患者のNefとの機能的差異を検出することに成功した。さらに、サブタイプCの感染性クローンIndie-C1のNef欠損型を作成し、その影響を調べたところ、NL4-3に比較すると弱いながら、やはりNefが感染性を増強していることがわかった。一方、Nefはウイルスの増殖及び感染効率の上昇に働くだけでなく感染リンパ球においてCD4分子及びMHC-class I分子の細胞表面への発現低下を引き起こすことが知られている。このうちMHC-class I分子の発現低下は宿主体内における特異的キラーT細胞 (CTL)からの感染細胞の認識を妨げその結果、宿主免疫監視機構からエスケープしている可能性が示唆されている。感染者のウイルス量のコントロールにはCTLが重要な役割を果たしていることなどからNefタンパクによるMHC-class I分子の発現低下機構を解明することはHIV-1感染症の病態を考える上で重要である。このような機能に影響を及ぼすようなウイルス変異が感染個体内でも起こっているのかを明らかにするためHIV-1感染・長期未発症者7名とAIDS発症者7名のプロウイルスnef遺伝子をシーケンシ解析したがいずれも変異は確認されなかった。最後に、新しい標的を持つ抗AIDS薬を探索するため、HIVのアクセサリー蛋白のひとつNefと細胞内チロシンキナーゼHckとの結合を阻害する物質のスクリーニング系を樹立した。系は哺乳動物細胞における two- hybrid systemを用いてNefとHckの結合をルシフェラーゼ活性で検出できる簡便なものをつくり、これを用いてスクリーニングを行い、いくつかの陽性物質を得た。この系で結合阻害を確認できることは示されたので、一次スクリーニングと共にこれを用いて他の機構をもったNef-Hckの結合阻害物質を探すべくスクリーニングを続けている。

### 1. 研究組織

- |                    |      |               |
|--------------------|------|---------------|
| (1) 国立国際医療センター研究所  | 松田道行 | 臨床病理研究部長      |
| (2) 三共株式会社 第二生物研究所 | 山下 誠 | 研究第五室 室長      |
| (3) 国立感染症研究所       | 村上裕子 | 生物活性物質部 主任研究官 |
| (4) 東京大学医科学研究所     | 岩本愛吉 | 感染症研究部 教授     |

### 2. 研究目的

本研究班の目的であるNefを標的とした治療薬開発のためには、Nefのウイルス学的機能を感じ度よくかつ再現性よく測定する必要がある。これまで用いられている感染性ウイルスを用いての実験では、Nef欠損ウイルスは通常、野生型に比較すると約30%程度の感染性に低下するが、実際には実験誤差も大きく、安定した結果をえるのは難しかったのが実情である。本年度は、これまで



の研究のまとめとして、Nefの生物学的機能をもっとも安定して効率よく測定する細胞株を確立し、この細胞株を用いて、これまで患者のNefの機能の差異と病態との相関を調べることを第一の目的とした。一方、Nefの大事な機能の一つであるMHC-class I分子の発現低下メカニズムについては依然不明な点が多く、またHIV-1感染症の病態との関わりについてもまだ明確にはされていない。そこでまず我々はMHC-class I分子の発現低下に重要な部位を決定し、その部位を切り口として宿主因子との相互作用について解析を行いNefタンパクとHIV-1感染症の病態との関係を明らかにすることを目的とした。最後に、これまでいろいろな抗AIDS薬が開発されてきたが、ウイルスの生存増殖に必須なウイルス分子を標的にすると、即座に耐性ウイルスが出現する。この教訓を踏まえ、ウイルスの病原性や増殖性の増強という機能をもちウイルスの生存増殖には不可欠でないNefを標的にした新しい抗AIDS薬を探すことが目的である。Nefは、病原性やウイルス増殖性の増強などの機能を持ち、宿主の細胞内の分子と結合してこれらの機能を果たしていると考えられる。Nefは細胞内チロシンキナーゼHckと結合するが、このNefの結合サイトは、ウイルス増殖の増強に必要であると考えられるので、このふたつの蛋白質の結合を阻害するような物質を探索すれば抗AIDS薬になる可能性がある。そこで、これを標的としたスクリーニング系をつくりスクリーニングを行う。

### 3. 研究方法

**MAGNEF細胞の樹立：** HeLa-CD4-LTR-bGAL (MAGI)細胞由来のMAGIC5細胞は国立感染症研究所の巽博士に供与いただいた。細胞は5%ウシ胎児血清を含むダルベッコMEMで培養した。この細胞株を96ウェル細胞培養皿に、1ウェルあたり、約0.2個になるように限界希釈し、3日に一度培地交換しながら2週間継代し、複数のクローンを樹立した。これらをトリプシン-EDTAで24ウェルプレートに巻きなおし、さらに増やした。次に、 $5 \times 10^5$ 個の細胞を、1%ウシ胎児血清と過剰量の抗CD4抗体 (OKT4, Ortho-immune社)を含むリン酸緩衝液と4度で30分反応させ、リン酸緩衝液で5回洗浄した。その後、FITC結合抗マウスヒツジIgG (DAKO社)と反応させた後に、FACSCalibur (ベクトンディッキンソン)にて、CD4の発現量を解析した。CD4の発現量の低いものを選んで、以下に示す方法で野生型NL4-3ウイルスとそのNef欠損型ウイルスを感染させ、最もNef要求性の強い細胞株をMAGNEF細胞と命名し、実験に供した。

**Nef発現ベクター：** NL432株は、徳島大学足立昭夫教授より供与いただいた。このNefの部位にPCRを用いた方法で制限酵素切断部位発現ベクターSalIおよびNotIを挿入しpNL-Notと命名した。一方、昨年度に報告したサブタイプCの感染性DNAクローンpIndie-C1のNefにフレームシフト変異を入れ、Nefを発現しないウイルスを作成し、Indie-C1-DNefと命名した。

**Nef遺伝子：** AIDS患者、HIV-1感染後長期未発症患者、およびAC期のHIV-1感染患者のPBMCより得たNef遺伝子を研究班員の岩本から供与を受けた。これらのDNAおよびpNL432を鋳型としてPCRでDNAを増幅し、pNL-Notおよび哺乳細胞発現ベクターpCAGGSに挿入した。

**感染性ウイルスの作成：** 感染性DNAを293T細胞にリン酸カルシウム法を用いて導入した。48時間後に、上清を回収し0.45 mmのフィルターに通した後、ウイルス量を、p24gagに対するELISA法にて定量した。

**ウイルスの感染性の測定：** 得られたウイルス液を、階段希釈した後に、96ウェル細胞培養皿上に付着させた40000個のMAGNEF細胞に感染させる。48時間後にホルマリン固定した後、X-galで染色して感染細胞数を測定した。感染細胞を計測する際には、陽性細胞数がおおよそ50個程度のウェルを選んで数え、ウイルスの感染価を決めた。この範囲がもっともウイルス希釈と感染細胞数に直線性が保たれることをあらかじめ確認してある。

**Nef変異体の作成：** 我々はNefタンパクによるMHC-class Iの発現低下に重要であることが以前報告されたPxxモチーフが4個からなるプロリンリッチドメインに焦点を当て、この部位をより詳細に調べるためプロリンをアラニンに変える遺伝子変異を入れた。変異nef遺伝子の作製はHIV-1株の1つであるNL43プロウイルスプラスミド(pNL43.14877bp)をもとにプライマーにより変異を導入した。

**組み換えセンダイウイルスによるNefタンパクの発現：** Nefタンパク発現・組み換えセンダイウイルスベクターの作製は定法に従った。作製したセンダイウイルスのTリンパ球への感染は15ml tube 内でウイルス液に細胞を浮遊させ37°C1時間インキュベートした。その後1度PBSで洗浄し、10% FCS

RPMI培地に浮遊させ24時間培養した後、標識抗体で細胞表面を染色してフローサイトメトリー(FACS Calibur)にて解析を行った。

**変異 nef HIV-1のCEM-GFP細胞への感染：** HIV-1感染細胞における変異Nefタンパクの機能を調べるためにNL43プロウイルスプラスミドをもとに作製したpNL43-nef(mutant)をHeLa細胞に遺伝子導入試薬FuGENE 6 (ベーリンガー)を用いてトランスフェクションによりウイルスを作製した。さらに感染細胞での観察を可能にするためCEM細胞にプロモーターであるLTRに連結したGFP遺伝子を組み込んだCEM-GFP細胞をターゲット細胞に用いた。この細胞はHIV-1の感染により産生されるTatタンパクによりLTRが活性化し、GFP遺伝子が転写されるため、GFPの発現によって感染細胞を観察することができる。効果的にCEM-GFP細胞へのウイルス感染を可能にするため、トランスフェクションしたHeLa細胞を共培養することにより感染を行った。

**HIV-1感染者におけるプロウイルスnef遺伝子の解析：** HIV-1感染者の血液より末梢血リンパ球を分離し、プロウイルスをシーケンス解析した。

**Nefと標的蛋白の結合を阻害する薬剤のスクリーニング：** 動物哺乳細胞を用いたスクリーニング系でかかったサンプルの評価をするためにもうひとつIn vivoの系をつくった。Kinaseも含めた全長のHckをplasmid(下流にGFPをもつIRESをもったベクター)に組み込んだ。また、Nefを単独で組み込んだplasmidをこのHckのPlasmidとともに、同じ293T細胞に一時共発現させた。Hckの自己リン酸化を検出するため、この細胞の溶解液を抗リン酸化チロシン抗体でイミノブロットングした。また、HckやNefの蛋白量を調べるため同じフィルターを用いてそれぞれの抗体でイミノブロットングした。この細胞にサンプルを添加し、二次スクリーニングの系として用いることにした。

#### 4. 研究成果

**MAGNEF細胞の樹立：** 昨年度までの研究で、レポーター細胞のCD4量を減らすことでHIV-1感染におけるNef要求性を増加させることができる事を明らかにした。昨年、実験に供したMAGIC5細胞にはCD4発現の高いものと低いものが混在していたので、このうちNef発現量の低い細胞株の樹立を目指して、細胞の限界希釈を行った。複数の細胞株のうちFACS解析によりCD4の量が低く、20代以上継代してもCD4の量が安定している細胞株を樹立し、MEGNEF細胞と命名した。

**MAGNEF細胞を用いたHIV-1感染実験：** MAGNEF細胞およびコントロールとしてMAGIC5細胞およびCD4発現量の高いMAGIC5E細胞とを用いた。これらの細胞にNL4-3株およびNef欠損NL4-3株ウイルスを感染させたところ、MAGNEF細胞ではNef欠損体は野生型に比較して5%以下の感染性しか示さなかった。MAGIC5細胞およびMAGIC5E細胞ではNef欠損体は野生型の10%から20%くらいの感染力であった。

**サブタイプCのNef要求性：** HIV-1のサブタイプCの唯一の感染性クローンであるIndie-C1のNef欠損体Indie-C1-DNefを作り感染性を比較した。その結果、サブタイプBであるNL4-3と比較すると弱いながらやはりNefが感染性増強を示していることがわかった。

**患者由来のNef：** 患者由来のNefを組み込んだウイルスを作成した。これらのウイルスはいずれも、ほぼ予想される大きさのNefを発現していることがイミノブロットングで確認された。つぎに、これらのウイルスの感染性を比較したところ、長期未発症HIV-1感染患者由来のNefは、野生型と比較して明らかに感染性増強能が低いことがわかった。

**NefによるCD4とMHC-class Iの低下：** 組み換えセンダイウイルスによりTリンパ球にNefタンパクを発現させた結果、CD4分子及びMHC-class I分子とも発現の低下が確認された。しかしカポジ肉腫関連ウイルス(KSHV)のK3及びK5タンパクに比べMHC-class Iの発現低下の程度は弱かった。Nef遺伝子に変異を入れたところ、プロリンリッチドメインの4個のプロリンを全てアラニンに変えた変異ではMHC-class Iの発現低下が完全に抑制されており、さらに4個のプロリンのうち1個に変異を入れた解析から4番目のプロリンの変異が最も発現低下を抑制していることが分かった。また4番目のプロリンから順に変異を入れた結果、3番目と4番目のプロリンをアラニンに変換するとほぼ完全に発現低下を抑制できることが分かった。解析した細胞のNefタンパクの発現をウェスタンブロットングで確認したところ発現量に大きな差は見られなかった。さらにCEM-GFP細胞を用いて

HIV-1感染細胞についても解析したところ、組み換えセンダイウイルスと同様に、4番目のプロリンをアラニンに変えたとき最もMHC-class Iの発現低下が抑制されており、さらに3番目と4番目のプロリンの変異でほぼ完全に発現低下が抑制されていた。HIV-1感染者のプロウイルスをシークエンス解析したところ4番目のプロリンの変異は14名の感染者・56クローンでは1例も見られなかった。

**Nefの機能を阻害する薬剤スクリーニングのアッセイ系の確立：** 全長HckとNefを別々に組み込んで293T細胞に発現させて、抗リン酸化チロシン抗体でイミノブロットングするとHckの自己リン酸化が検出できた。Nefのplasmidを添加すると、Nefをいれずに別の発現ベクターをいれた場合に比べHckのリン酸化はNefのplasmid量に依存して上昇した。Nefとの結合による活性化と考えられるので、この活性上昇をもとのレベルまで下げる物質はNef-Hckの結合を阻害しているといえる。

**薬剤スクリーニング：** 上記のアッセイ系を利用して昨年度の一次スクリーニングでかかった物質について、293T細胞にHckとNefの発現plasmidを共発現させた後に添加して20時間後、その細胞溶解液を抗リン酸化抗体でイミノブロットングで検出する系で検討した。一次で1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でも阻害活性のあった13サンプルのうち、Hckのリン酸化活性を下げるものが5つ見いだされた。顕著な阻害作用のあった2つの化合物について詳しく調べたところ、これらはNefがないときのHckの自己リン酸化も抑制していて、Nefとの結合による活性化上昇を抑えているのではなかった。抗Hck抗体によりHckの蛋白量を調べたところHck蛋白が減少していた。Nefの蛋白量はこのとき減少していなかった。Hckと同じmRNAで発現するGFPは減少していた。このうちの3つは抗癌抗生物質アドリアマイシンの誘導体であり、アドリアマイシンもHckを減少させた。アドリアマイシンはほかのいくつかのendogenousな蛋白(MAP kinase, Jun kinase)は減少させなかったが、U937細胞のendogenousなHckの蛋白量も減少させた。このときU937細胞においてMAP kinaseは減少していなかった。一次スクリーニングに用いたHckはN末からSH3までのものでVP16と融合した蛋白であったが、この蛋白も293T細胞に発現させて調べるとアドリアマイシンでやはり減少していた。これまで行ったスクリーニングで、Hckのリン酸化活性を下げた5つの物質はすべてHckの蛋白量を減少させていた。これまでのところ、Nef-Hckの直接の結合阻害を示していると思われるものは見つからなかった。

## 5. 考 察

Nefの病原性に多くの研究者の注目を集めており、CD4の細胞表面への発現抑制など、多くの研究がある。しかし、Nefの多彩な機能のうちのどれがNefの病原性ともっとも密接な関係があるかについての研究はあまり多くない。試験管内では、single round infectionの系によるNefの影響を調べる系が、もっとも個体レベルでのNefの病原性を調べる系に近いと思われるが、その効果が著しく弱いため、あまり研究が進んでいないのが現状であった。本年は、この問題に対する解決としてCD4の量を抑えた発現細胞株MANGEF細胞を樹立した。

MAGNEF細胞を用いて、これまで難しかったNefのHIV-1感染増強能を定量的に解析することが可能となり、いくつかの未解決の問題を調べることができた。ひとつは、現在、もっとも広範に広がりつつあるサブタイプCのHIV-1においても、サブタイプBで言われてきたのと同じことが言えるか、という問題を明らかにできたことである。サブタイプCの感染性クローンは、われわれが報告したIndie-C1しかないが、これにNefの変異を導入することで、NefがサブタイプBのみならず、サブタイプCでもやはり、HIV-1の感染増強を行うことがわかった。しかしIndie-C1においてはNefの効果はNL4-3より明らかに低く、Nef依存性にはサブタイプ間の差があるのかもしれない。しかし、このテーマは、今後数多くのサブタイプCの感染性クローンが樹立されて初めて調べることができるようになるものである。

もう一つの重要な発見は、HIV-1感染長期末発症者におけるNefの機能低下を示したことである。HIV-1感染長期末発症者の中にはNefを欠損したウイルスを有している例が知られ、Nefの機能低下がHIV-1感染からAIDS発症への道筋を阻害しているらしいことが示唆されていた。しかし、大部分のHIV-1感染長期末発症者ではNefは遺伝子的には完全であり、Hoらが1995年に発表した報告によれば、HIV-1感染増強能も下がってはいなかった。われわれは、この以前の報告が、感度のもっとも悪い系を用いていた点に注目した。すなわち、Nef依存性の低いNL4-3株にNefを導入し、CD4を高発現したNL4-3細胞を用いていたのである。今回、われわれの系で検討してみると、



HIV-1感染長期未発症者のNefの機能は低下しているということが明らかになった。

NefタンパクはMHC-class I分子のA, B locusには発現低下を引き起こすが、C locusには発現低下を起こさないことが以前より報告されている。本実験では、MHC-class I分子の染色にA, BおよびC locusの全てを認識する抗体を用いた。このことがK3, K5タンパクに比べ発現低下機能が弱い原因であると考えられる。プロリンリッチドメインの4つのプロリンを全てアラニンに変えた場合にCD4分子の発現低下にも弱冠異常が見られたが、これはNefタンパクとCD4分子の結合部位がプロリンリッチドメインの近傍上流に存在するため、影響が及んだためと推測される。またHIV-1感染者のプロウイルスの解析から、MHC-class I分子の発現低下に最も重要である78番目のプロリンは非常に保存性が高く、感染細胞の維持にこの部位が重要な意味を持つと考えられる。最終的にNefタンパクと宿主細胞内因子との相互作用を解析するために、我々はMHC-class I分子の発現低下異常を伴ったNefタンパクと野生型のNefタンパクでそれぞれ結合タンパクをスクリーニングし目的のタンパクを同定することが必要であると考えている。

アドリアマイシンはDNAに作用点をもち、RNA合成を阻害するといわれている。アドリアマイシンがある程度特異性をもってHckを減少させたことから、Hckはhalf lifeが短く、RNA合成により生合成をとめられると他の蛋白に比べ速く減少してしまうのではないかと考えられた。そのために、アドリアマイシンと同様に非特異的にRNA合成阻害をするアクチノマイシンDや蛋白合成を阻害するシクロヘキシミドのような物質も一次スクリーニングでpositiveにでるのではないかと考えられた。一次スクリーニングのヒット率が高い原因であろう。このような物質はHckをある程度特異的に減少させるが、非特異的な作用であればもちろん、特異的にHckを阻害する物質があったとしても、宿主側の分子を標的にするのは細胞毒性がでる可能性が高く薬剤としてはむずかしいと思われる。これまでのところ有望なものは見つかっていないが、ここで用いた二次の解析により阻害物質の標的をある程度判別できるので、一次と二次の組み合わせを行うことによりHck-Nefの直接の阻害物質を見出すことも可能である。

## 6. 結 論

1. 病原性遺伝子Nefの感染に及ぼす影響を感度よく調べる細胞株を樹立しMAGNEFと命名した。
2. MAGNEF細胞を用いて、サブタイプCのHIVもまた感染性増強にNefが必要であることを初めて示した。
3. MAGNEF細胞を用いて長期未発症者のNefの機能低下を示した。
4. MHC-class I分子の発現低下に、プロリンリッチドメインの4個のプロリンのうち78番目のプロリンが最も重要であることが分かった。
5. 長期未発症者7名とAIDS発症者7名の感染プロウイルスnef遺伝子には、78番目プロリンの変異は1例も見られなかった。このことは、病態に関わらずプロウイルスNefタンパクの78番目のプロリンがよく保存されており、宿主内での感染細胞の維持には MHC-class I分子の発現低下が重要であることも示唆された。
6. 哺乳動物細胞のTwo-hybrid systemを利用した一次スクリーニングでpositiveになったものを評価するために、Hck-Nefの結合阻害を確認するin vivoの二次のスクリーニング法を確立した。この方法によって一次でpositiveにでたものからHckの蛋白量を減少させる物質が見つかった。

## 7. 研究発表

### 1) 論文発表

- ① Kobayashi, S., T. Shirai, E. Kiyokawa, N. Mochizuki, M. Matsuda, and Y. Fukui. Membrane recruitment of DOCK180 by binding to PtdIns(3,4,5)<sub>P3</sub> Biochem.J., in press. Yamada, T., and Iwamoto, A. Comparison of proviral accessory genes between long-term non-progressors and progressors of human immunodeficiency virus type 1 infection. Arch. Virol. 145:1021-1027, 2000.

- ② Taguchi, H., Yamada, T., Takahashi, T., Gotoh, M., Nakamura, T., and Iwamoto, A. Seroprevalence of parvovirus B19 among HIV-1-positives in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 53:21, 2000.
- ③ Nakayama, E.E., Hoshino, Y., Xin, X., Liu, H., Goto, M., Watanabe, N., Taguchi, H., Hitani, A., Kawana-Tachikawa, A., Fukushima, M., Yamada, K., Sugiura, W., Oka, S., Sato, H., Takebe, Ajisawa, A., Y., Nakamura, T., Nagai, Y., Iwamoto, A., and Shioda, T. Polymorphism in the IL-4 promoter affects acquisition of HIV-1 syncytium inducing (SI) phenotype. *J. Virol.* 74:5452-5459, 2000.
- ④ Hosoya, N., Takahashi, T., Wada, M., Endo, T., Nakamura, T., Sakashita, H., Kimura, K., Ohnishi, K., Nakamura, Y., Mizuochi, T., and Iwamoto, A. Genotyping of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* isolates in Japan based on nucleotide sequence variations in internal transcribed spacer regions of rRNA genes. *Microbiol. Immunol.* 44:591-596, 2000.
- ⑤ Takahashi, T., Hosoya, N., Endo, T., Nakamura, T., Sakashita, H., Kimura, K., Ohnishi, K., Nakamura, Y., and Iwamoto, A. Relationship between mutations in dihydropteroate synthase of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* isolates in Japan and resistance to sulfonamide therapy. *J. Clin. Microbiol.* 38:3161-3164, 2000.
- ⑥ Tobiume, M., Tokunaga, K., Kiyokawa, E., Takahoko, M., Mochizuki, N., Tatsumi, M., and Matsuda, M. Requirement of Nef for HIV-1 infectivity is biased by the expression levels of Env in the virus-producing cells and CD4 in the target cells. *Arch. Virol.* 2001.(in press)
- ⑦ Takahashi, T., Nakamura, Y., and Iwamoto, A. Desensitization to fluconazole in an AIDS patient. *Annals Pharmacotherapy.* in press.
- ⑧ Koibuchi, T., Hitani, A., Nakamura, T., Nojiri, N., Nakajima, K., Jyuji, T., and Iwamoto, A. Predominance fo genotype A HBV in HBV-HIV-1 dually positive population as compared to HIV-1-negative counterpart in Japan. *J. Med. Virol.* in press.

## 2) 学会発表

- ① 飛梅実、徳永研三、望月直樹、巽正志、松田道行：HIV-1のアクセサリー蛋白 Nefのウイルス感染性増強作用の解析。第48回日本ウイルス学会学術集会，津，平成12年10月。
- ② Shioda, T., Nakayama, E.E., Tanaka, Y., Xin, X., Liu, H., Kawana-Tachikawa, A., Kato, A., Sakai, Y., Nagai, Y., and Iwamoto, A. A Naturally occurring deletional mutation in the C-terminal cytoplasmic tail of CCR5 affects intracellular transport of CCR5. 2000 International Meeting of the Institute of Human Virology. Baltimore, Maryland, U.S.A. September 10-15, 2000.
- ③ Koibuchi, T., Nakamura, T., Nojiri, N., Nakajima, K., Juji, T., and Iwamoto, A. Shifting in genotype trends of hepatitis B virus in Japan. IDSA2000. New Orleans, LA, U.S.A. September 7-10, 2000.
- ④ 山田武司、加治直俊、北村義浩、岩本愛吉。HIV-1 NefタンパクによるMHC-class I down-regulationの解析。日本免疫学会，平成12年11月。

---

平成12年度

エイズ医薬品等開発研究  
研究報告書

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社

