

- H, Daar ES, Yoshio Koyanagi Y, Isolation and characterization of an infectious HIV-1 molecular clone from a patient with primary infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18 1127-1133, 2002
- ② Harada T, Tsunetsugu-Yokota Y, Koyanagi Y, Sata T, Kurata T, Kojima A Role of nucleotide Sequences in the V3 Region in efficient replication of CCR5-utilizing human immunodeficiency virus type 1 in macrophages *Virology* 299 192-203, 2002
- ③ Alfonso M, Blanc D, Troadec C, Huerre M, Eliazewicz M, Gonzalez G, Koyanagi Y, Scott-Algara D Temporary restoration of immune response against *Toxoplasma gondii* in HIV-infected individuals after HAART, as studied in the hu-PBMC-SCID mouse model *Clin Exp Immunol* 129 411-419, 2002
- ④ Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, Ueyama Y, Koyanagi Y, Sugamura K, Tsuji K, Heike T, Nakahata T NOD/SCID/ γ^{null} mouse An excellent recipient mouse model for engraftment of human cells *Blood* 100 3175-3182, 2002
- ⑤ Miura Y, Koyanagi Y, and Mizusawa H TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces neuronal apoptosis in HIV-encephalopathy *J Med Dental Sci*, in press
- ⑥ Miura Y, Misawa N, Kawano Y, Okada H, Inagaki Y, Yamamoto N, Ito M, Yagita H, Okumura K, Mizusawa H, Koyanagi Y TNF-related apoptosis-inducing ligand induces neuronal death in a murine model of HIV-CNS infection *Proc Natl Acad Sci USA*, in press
- ⑦ Zahidunnai D M, Terashima K, Taruishi M, Hasegawa H, Ito M, Tanaka Y, Mori N, Sata T, Koyanagi Y, Okayama A, Fujii M, Yamamoto N Rapid tumor formation of HTLV-I-infected cell line in novel NOD/SCID/ γ^{null} (NOG) mice Suppression by an inhibitor against NF- κ B *J Virol*, in press
- ⑧ Sato Y, Terada Y, Utsunomiya H, Koyanagi Y, Ito M, Miyoshi I, Suzuki T, Sasano H, Murakami T, Yaegashi N, Okamura K. Immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes in human follicle following xenotransplantation of the human ovarian cortex into NOD-SCID mice *Mol Reproduc Develop*, in press
- 2 学会発表
- ① Y Koyanagi Y, Miura Y Apoptosis signal to CD4⁺ T cells in HIV-1 infected hu-PBL-SCID mice 9th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infection. Seattle, 2002
- ② Miura Y, Misawa N, Mizusawa H, Koyanagi Y An animal model for quantification of apoptosis with HIV-1 infection *Retroviruses Meeting*, Cold Spring Harbor, New York, 2002
- ③ 小柳義夫、鈴木陽一、蝦名博貴 Quantitative analysis of HIV-1 DNA dynamics from reverse transcription to integration in infected cells 第50回日本ウイルス学会、札幌、2002
- ④ 河野祐治、小柳義夫 扁桃スライス培養

を用いたHIV感染細胞の同定と感染維持メカニズムの解析 第16回日本エイズ学会、名古屋、2002

- ⑤ 蝦名博貴、小柳義夫 HIV pre-integration complexの核内移行の解析 第16回日本エイズ学会、名古屋、2002

- ⑥ Takeuchi H, Suzuki Y, Hoshino H, Daar E., Koyanagi Y Extensive variation of CXCR4- and CCR5-dependent human immunodeficiency virus type a in a patient with acute infection 第16回日本エイズ学会、名古屋、2002

- ⑦ 蝦名博貴、小柳義夫 HIV-cDNAの核内移行の分子メカニズムの解明 第25回日本分子生物学会、横浜、2002

H 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む。）

1 特許取得状況

なし

2 実用新案登録

なし

3 その他

なし

図 1.

HIV感染マウス脳組織

a-f

a. Hu-PBMC-NOD-SCID mice

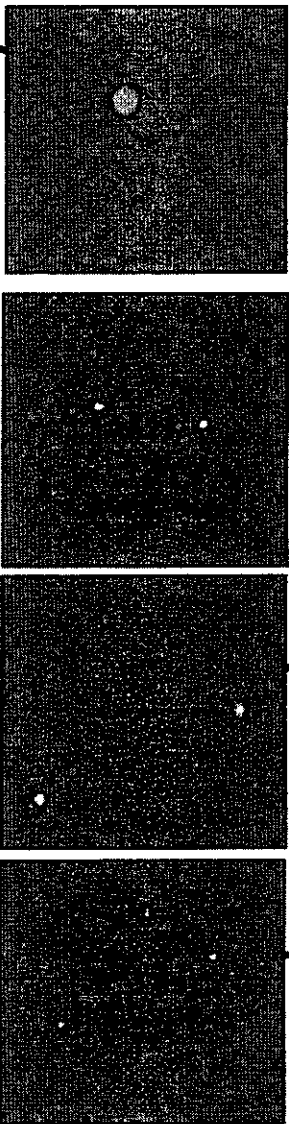
LPS i.p.

fluorescent
Nissl body,
FNB



神経細胞アポトーシス

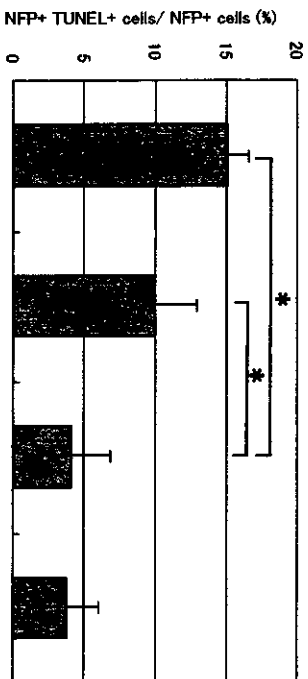
b. FNB/TUNEL c. CD68/TUNEL d. p24/TUNEL e. TRAIL/TUNEL



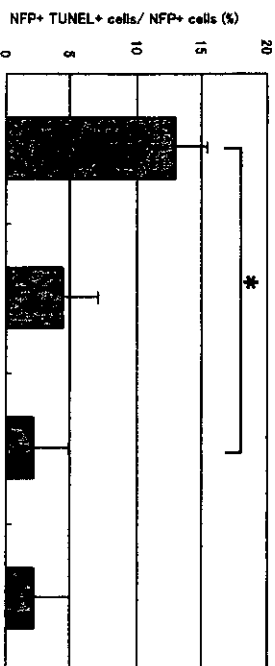
アポトーシス神経細胞に隣接してCD68+, HIV+, TRAIL+マクロファージ細胞がみつかると。

初代神経細胞培養 g, h

g. HIV 感染マクロファージの添加による神経細胞死



h. TRAILあるいはFasL 強制発現細胞の添加による神経細胞死



Proportion of apoptotic neurons calculated by counting NFP+ TUNEL+ cells and total NFP+ cells. Data are mean ± SD of triplicate cultures *, P < 0.05 by Student's t-test.

f. TRAIL 中和抗体による神経細胞死の阻害

Ab	n	TUNEL+ cFNG+
human TRAIL	8	0.38 ± 0.34*
human TNF α	5	5.20 ± 2.59
human FasL	6	9.17 ± 1.47
control mouse IgG	5	8.60 ± 2.07

* p<0.05 compared with control mouse IgG by Welch's t-test

エイズ脳症患者脳組織 j-k

i. 活性型 caspase-8 j. HIV

k. TRAIL



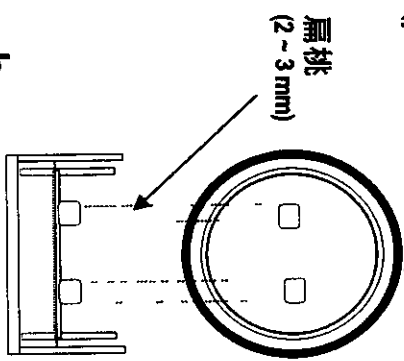
結論. 神経細胞アポトーシスがマウスモデル、神経細胞培養、ヒトのエイズ脳症脳組織においてマクロファージ上のTRAIL発現の増加により誘導される。

図2.

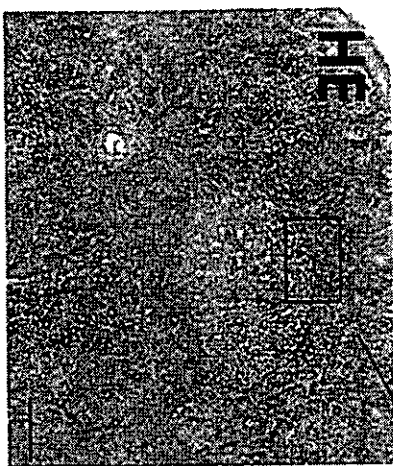
HIV感染リンパ

a. 臓器培養

臓器培養
(pore size is 0.4 μ m)



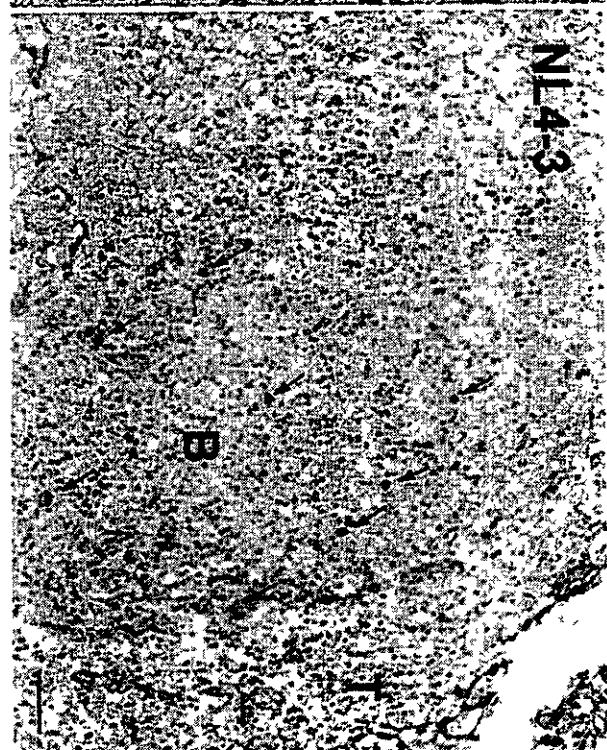
b.



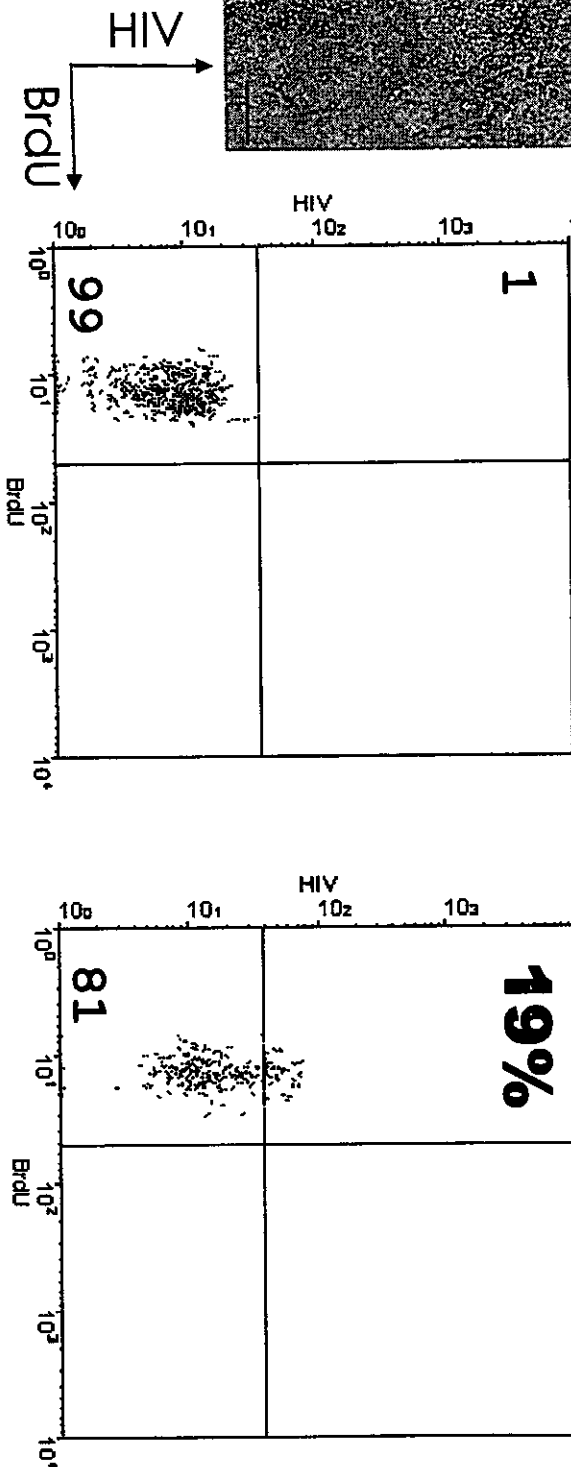
4 days

KI67 染色

分裂細胞は非常に少なくほとんどBゾーンに局在する



d.



リンパ組織のTゾーンにおいてはBrdU陰性ならびにKI67陰性の非分裂CD4+細胞でHIVは活発に増殖する

「Vpr 測定法の確立と Vpr を標的とした抗 HIV 薬の開発」に関する研究
分担研究者 石坂幸人 国立国際医療センター研究所 難治性疾患研究部長

研究要旨 HIV アクセサリー遺伝子である Vpr はウイルスの生体内における複製を誘導する。また患者血清中に存在し、Vpr を細胞培養液に添加することにより、潜伏感染細胞からのウイルス産生を引き起こすことから、エイズ発症において重要な役割を担っていることが知られている。本年度、Vpr がヘテロクロマチン蛋白質 1 の機能障害を誘導して、転写に適したクロマチン構造へと変化させること、一方で、Maturation promoting factor を活性化して I κ B α のリン酸化を誘導することを見出した。このような活性は、比較的少量の Vpr で誘導され、U1 細胞の培養液中に Vpr を添加してもウイルス産生誘導とともに、同様の作用が認められる。一方、サンドウィッチ法による Vpr 測定システムを立ち上げ、血中 Vpr モニタリングのための準備を整えた。今後、血中濃度を測定することを通して、Vpr のエイズ発症における役割を明確にした後、抗 Vpr 因子の投与によるエイズ発症阻止の試みが展開できると期待される。

A 研究目的

Vpr はエイズ患者の血清中に存在し、G2/M 期における細胞周期異常と潜伏感染細胞からのウイルス産生を誘導することが知られている。しかし、細胞周期異常とウイルス産生との間の関連性については、明確な答えが得られていなかった。本年度は、Vpr による細胞周期異常と NF- κ B 活性化の関連性に着目する一方、ヘテロクロマチン蛋白質 (HP1) に対する作用を明確にすることを目的とした。Vpr は患者血清中に存在することが報告されているが、実際にその濃度を測定した研究者はおらず、エイズ病態における Vpr の役割が全く不明である。そこで本年度では Vpr 測定システムの構築を行った。

B 研究方法

i) Vpr による細胞周期異常とウイルス産生誘導

Vpr 発現細胞である MIT-23 にさらに HIV-LTR の下流に EGFP 遺伝子を挿入したプラスミドを導入し、HLEG-29 を樹立した。これに Vpr を発現させることにより生じる EGFP の発現と細胞中の DNA 量の関連を FACS で解析した。細胞周期の進行に必須の因子である cdc2/cyclinB1 (以下 MPF, maturation promoting factor) を抗 cdc2 抗体で調整した。I κ B α を基質とした in vitro 反応系を用いてリン酸化能を解析した。

ii) VPR によるヘテロクロマチン蛋白質 (HP1) に対する阻害作用

Heterochromatin を保つ機能が知られている HP1 に着目して、VPR 存在下での HP1 の挙動を免疫染色法、ウエスタン法で解析した。

iii) Vpr 測定に向けた ELISA の樹立

合成した全長 Vpr 蛋白質を抗原として、マウス単クローン抗体を得た。サブクラスは IgG であった。

一方、Vpr の c-末ペプチドを抗原として家兎に免疫し、精製した IgG 抗体にペルオキシダーゼを結合させた。この 2 種類の抗体を用いてサンドウィッチ法による ELISA システムを構築した。

C 研究成果

i) Vpr による細胞周期異常とウイルス産生誘導

Vpr による細胞周期異常が HIV-LTR 転写促進の必要条件になっていることまた Vpr は、MPF に対して直接的に作用することにより I κ B α をリン酸化し、NF- κ B の核内移行を誘導することを見出した。このような作用は、潜伏感染した U1 細胞の培養液中に 5–50 ng/ml で Vpr を添加した場合でも誘導され、ウイルス産生も誘導された。

ii) Vpr によるヘテロクロマチン蛋白質 (HP1) に対する阻害作用

Vpr が発現すると HP1 がクロマチンから乖離すること、これがヒストン H3 のリシン 9 番目のアセチル化を伴っていること、さらに Vpr は p300 と結合してアセチル化を亢進させることを見出した。

iii) Vpr 測定に向けた ELISA の樹立

合成ペプチドを標準検体として、標準曲線を作成すると、約 1 ng/ml まで測定することが可能であった。Vpr ペプチドの回収率を血清と血漿で比較すると、血漿中の Vpr がより安定的に測定可能であった。岩本愛吉博士の協力を頂き、健常人と HIV 陽性者血漿について、予備的な測定を行ったところ、HIV 陽性者で高値を示す傾向が認められた。

D 考察

Vpr により HIV-LTR 転写活性が誘導されることが報告されているが、今回 Vpr により誘発される細

胞周期異常との関連性が示された。このことは、Vpr により誘導される細胞周期異常の分子機構を明らかにし、これを阻害する因子を同定することが新規抗 HIV 薬開発を進める上で、究めて重要であることを示唆する。Vpr により誘導される細胞周期異常のウイルス産生誘導における意義を理解する機序として、今回 Vpr が MPF に作用して I κ B α を直接リン酸化することにより、NF- κ B の核内移行を誘導する現象を見出した。興味深いことに、この現象は作用させる Vpr の濃度依存的に生じ、少量の Vpr により活性化が認められる。さらに、MPF のキナーゼである cdc2 はチロシン 15 番目がリン酸化を受けると、失活することが知られているが、Vpr が作用するとリン酸型 cdc2 も活性を示すようになる。Vpr が低濃度で作用する際の細胞周期異常の分子機構は、これまで報告された機序では説明できない。

Vpr が作用すると HP1 の核内での局在が阻害されることを見出した。HP1 はヒストン H3 の 9 番目リジンのアセチル化とメチル化により結合が調節されている。一方、Vpr はヒストンアセチルトランスフェラーゼ p300 と結合することが知られており、ヒストンのアセチル化と密接な機能連関を有していることが想像された。そこで、Vpr 抗体を用いて調整した沈降物を用いてヒストン H3 の 9 番目のリジンに対するアセチル化能を解析すると、明らかな活性が認められた。Vpr は一方で、NF- κ B を活性化し、他方でクロマチン構造を転写誘導の受けやすい状態にすることでウイルス産生を正に制御しているものと想像される。

E 結論

本年度は最終年度として、当初目標としていた Vpr による細胞周期異常とウイルス産生誘導を結びつける分子機構について、ある程度明らかに出来たと思われる。即ち、細胞の外に添加された Vpr は、転写に有利なクロマチンの構造変化を誘導し、一方で MPF を活性化することによる I κ B α のリン酸化を促す。ここで用いる Vpr の濃度は、ng/ml のオーダーであった。患者血液中に数 100 pg/ml から数 ng/ml の程度存在することが予想されており、今回の実験結果は、生理学的に意義のある成果と思われる。しかし、今後実際の病態における Vpr の意義を明らかにするためには、患者血中の Vpr 濃度を把握することが必要不可欠である。その値をもとに、抗 VPR 因子を用いたエイズ制御の試みが実を結ぶものと期待される。現在日本人約 70 名、米国人 100 名分の血漿を用いて Vpr 値のカットオフ値を決定中である。このデータを基に HIV 陽性者の血漿についての測定を行うことを予定している。

F 健康危険情報 無

G. 研究発表

1) 国際学会での発表

1. Separation. Cell cycle meeting, Salk, May, (2001). Shimura, M., and Ishizaka, Y. Abnormal mitosis induced by human immunodeficiency virus accessory gene VPR. The 18th annual meeting on oncogenes. Salk, June, (2002).

2) 国内学会での発表

1. 志村まり、石坂幸人: HIV アクセサリー遺伝子 Vpr による細胞分裂異常とヘテロクロマチン蛋白;HP-1 第 61 回日本癌学会年会. 2002 年 10 月、東京。
2. 鈴木康哲、志村まり、石坂幸人: HIV アクセサリー遺伝子産物 Vpr を標的としたエイズ発症予防法の開発 第 25 回日本分子生物学会年会. 2002 年 12 月、横浜。
3. 志村まり、石坂幸人: HIV アクセサリー遺伝子 Vpr による細胞分裂異常とヘテロクロマチン蛋白;HP-1 第 25 回日本分子生物学会年会. 2002 年 12 月、横浜。

3) 論文発表

1. Minemoto, Y., Uchida, S., Ohtsubo, M., Shimura, M., Sasagawa, T., Hirata M., Nakagama, H., Ishizaka, Y., and Yamashita, K. Loss of p53 Induces M-phase retardation following G2 DNA damage Checkpoint abrogation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, in press.
2. Mishima, T., Mishima, Y., Terui, Y., Katsuyama, M., Yamada, M., Mori, M., Ishizaka, Y., Ikeda, K., Watanabe, J., Mizunuma, N., Hayasawa, H., and Hatake, K.: Resistance mechanisms of CD13/ Aminopeptidase-N to apoptosis mediated by endothelial cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 94:1020-1028, 2002.
3. Mishima Y, Terui Y, Mishima Y, Katsuyama M, Mori M, Tomizuka H, Takizawa T, Miyazato A, Ueda M, Yamada M, Hayasawa H, Mizunuma N, Ishizaka Y, Ikeda K, Kato T, Ozawa K, Hatake K. New human myelodysplastic cell line, TER-3: G-CSF specific downregulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV. *J Cell Physiol.* 191:183-190, 2002.

H 知的財産権の出願登録状況（予定を含む。）

- 1 特許取得、出願準備中
- 2 実用新案登録、無
- 3 その他、無

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

ウイルス感染に伴う宿主細胞遺伝子発現の変化

分担研究者 渡辺 慎哉 東京大学医科学研究所助手

研究要旨

ヒト遺伝子 22,000 種類およびヒトサイトメガロウイルス（HCMV）遺伝子 179 種類を搭載した合成 DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析系を確立した。この系を用いて、HCMV 感染にともなうひきおこされる宿主細胞内の現象をウイルス側および宿主側の両面から同時並行的トランスクリプトームとして記述し、ウイルス許容性の異なる細胞間でそれぞれに異なる遺伝子発現プロファイルを明らかにした。さらに、作製した合成 DNA マイクロアレイを大量に使用して HIV 感染後長期未発症例（LTNP）の末梢血単核細胞由来試料のトランスクリプトーム解析を行い、LTNP4 例を含む 56 検体の末梢血単核細胞由来培養細胞の遺伝子発現プロファイルから、LTNP 特異的な発現パターンを示す可能性のある遺伝子候補を含む遺伝子群として 58 遺伝子を特定した。

A 研究目的

- 1 平成 14 年度までにヒト遺伝子 20,000 からなる合成 DNA マイクロアレイを作製し、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）感染各種細胞から得たサンプルをハイブリダイスさせ、感染経過を追って各時点のヒト遺伝子の発現レベルを調べる。その結果をもとに、HCMV 感染にともなう宿主側の細胞応答を網羅的に解析し、ウイルス感染に対するトランスクリプトーム解析の先駆的モデルを提出する。
- 2 本研究班 昭沼 裕 班員と共同し、作製した合成 DNA マイクロアレイを大量に使用して HIV 感染後長期未発症例の末梢血単核細胞由来試料のトランスクリプトーム解析を行い、発症の阻止・遅延に関与する宿主因子遺伝子の同定を目指す。
- 3 本研究の最大の特色は独自に改良・開発した技術を用いて自作の合成 DNA マイクロアレイを用

いるところにある。この技術を用いれば、マイクロアレイ化する遺伝子を自由自在に選定、遺伝子数を容易に増加、低コストで大量のアレイを作製できる。分担研究者（渡辺）は平成 13 年内までに合成 DNA マイクロアレイ技術に関する 5 件の特許申請を行った。これらの出願特許をもとに大量のマイクロアレイを作製し、可能な限り数多くの細胞に対する細胞応答を明らかにすることにより、各種細胞に特異的な遺伝子発現を同定することが可能となる。これらに関する遺伝子がウイルス感染を規定する宿主側因子であり、宿主-寄生体関係を解明する糸口を提供すると期待できる。

- 4 最終的に、本研究は、HIV およびエイズの主要な日和見感染病原体である HCMV の宿主-寄生体関係を明らかにして、エイズ発症機構の解明を目指すとともに、エイズの発症阻止・遅延因子を明らかにすることにより、すでに HIV に感染してしま

った多くの患者の発症阻止に貢献することを目標とする。

B 研究方法

1 合成 DNA マイクロアレイの大量作製

平成 13 年度中にすでにアレイ化の完了したヒト遺伝子 14,000 に新たに 8,000 種類のヒト遺伝子を追加し、合成 DNA マイクロアレイを作製した。さらに、HCMV 遺伝子 179 遺伝子もヒト遺伝子と同時にアレイ化した。

2 HCMV 感染細胞からのサンプルの調製と発現プロファイルの取得

HCMV を正常ヒト線維芽細胞 (HF)・ヒト神経芽細胞腫細胞株 IMR32・ヒト骨肉腫細胞株 Saos2 ヒト滑膜肉腫細胞株 SW982・ヒト網膜芽細胞腫細胞株 Y79 に感染させ、経時的に感染細胞 RNA を抽出し、感染細胞サンプルをスパイクした共通レファレンス RNA を対照としてマイクロアレイにハイブリダイズさせ、発現プロファイリングを得た。

3 HIV 感染者および非感染者からのサンプル調製と発現プロファイルの取得

HIV 感染者および非感染者の末梢血から単核細胞を分離し、IL-2 存在下で培養後、mRNA を抽出した。これらの RNA を、22 種類の細胞株の mRNA を等量ずつ混合したレファレンスを対照としてマイクロアレイにハイブリダイズさせ、発現プロファイリングを得た。

(倫理面への配慮)

HCMV 感染による細胞応答の研究には培養細胞レベルでの実験で十分であるため、倫理面での配慮を特段に行う必要がない。一方、HIV 感染後未発症例のトランスクリプトーム解析に関しては、本研究班 照沼 裕 班員が以下の倫理面での配慮を行った。平成 13 年三省合同 (文部科学省・厚生労働省・経済産業省)「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、12 年度倫理審査委員会 で受けた研究計画の審査・承認に加え、三省合同基準を満たすように変更を加えて再

承認を得た。また、患者主治医の所属施設の倫理委員会での審査・承認、その所属施設長からの研究協力許可書、主治医からの研究協力承諾書を得た。さらに、患者への文書と口頭で研究内容を説明し、研究協力を了解していただいた方から同意書を得た。

C 研究結果

1 HCMV 感染細胞のトランスクリプトーム解析

平成 14 年度は、年度内に作製した Human 22,000 & HCMV 179 遺伝子アレイを用いて、HCMV 感染後の HF・IMR32・Saos2・SW982・Y79 細胞の遺伝子発現プロファイルを取得した。HF と IMR32 はウイルス遺伝子に関してきわめて似た発現パターンを示した。しかし、HF で感染初期に激しく起きる IFN 反応性遺伝子群の発現が IMR32 では検出不能だった。また、SW982 ではウイルス遺伝子の発現変化をほとんど検出できなかったにもかかわらず、IFN 反応性遺伝子群の発現上昇を弱いながら検出した。さらに、Saos2 では、感染初期に発現する HCMV 遺伝子および IFN 反応性遺伝子群の発現上昇を検出できず、感染後期に HCMV の遺伝子の発現レベル上昇を確認した。Y79 では、感染初期にウイルス遺伝子のわずかな発現レベル上昇を捉えたものの、宿主遺伝子の大きな発現レベル変化を見いだせなかった。

2 HIV 感染者の末梢単核細胞のトランスクリプトーム解析

HIV 感染後長期未発症例 (LTNP) 4 サンプルを含む 56 サンプルについて、22,000 遺伝子アレイを用いてヒト遺伝子の発現プロファイルを取得した。22,000 遺伝子の内、共通レファレンスに対して少なくとも 2 倍以上あるいは 1/2 倍以下に発現レベルの変化を示した遺伝子は、9,842 種類であった。これらの遺伝子を遺伝子間でのクラスター分析にかけたところ、かなりの遺伝子は各サンプル間でほぼ同様の発現プロファイルを示した。次に、全 56 サンプルについて各遺伝子の平均発現比を算出し、その値から少なくとも 2 倍以上あるいは 1/2 倍以下に発現レベルの変化を示した

遺伝子を抽出したところ、5,416 遺伝子が特定できた。これらの遺伝子をクラスタ分析したところ、種々サンプル間で発現レベルに差がある遺伝子群を数多く明らかにできたものの、それらの中で LTNP に特異的な変動を示す遺伝子クラスタは特定できなかった。さらに、これらの中で、LTNP4 例すべてにおいて発現パターンが共通する 58 遺伝子を選択し、これらの遺伝子について全 56 サンプルのデータを抽出し、サンプル間のクラスタ分析を行った。その結果、56 サンプルは、大きく 2 群に分れ、その一方の群に LTNP4 例と発症例 2 例が含まれていた。さらに、この一方の群は LTNP4 例のクラスタと発症例 2 例の 2 群に明瞭に分かれていた。なお、この発症例のうち 1 例は、かつては LTNP と考えられていたものが長期間をへて徐々に発症してきた経過を示すものであった。以上のサンプル間のクラスタ分析により、最終的に絞り込んだ 58 遺伝子の中に、LTNP だけに存在しその他（発症例および健常コントロール）には存在しない発現パターンを示すものか含まれる事が明らかとなった。

D 考察

- 1 HCMV 感染細胞のトランスクリプトーム解析
培養細胞系において HCMV 許容性を示すのは、正常細胞である HF とごく少数の細胞株に限られている。IMR32 はこの限られた HCMV 許容細胞株の一つで、少なくともウイルス遺伝子に関しては HF 同様の発現パターンを示すことが明らかとなり、これまでの知見を裏付けた。しかし、宿主遺伝子の発現パターンは HF と IMR32 で大きく異なっており、これらの違いがウイルス産生効率などの両者で異なる性質を決定している可能性がある。HCMV 許容性が報告されていない 3 細胞株において、それぞれが異なる宿主遺伝子発現プロファイルを示したことから、これらの細胞株では非許容の程度が同じではなく、ウイルスの増殖サイクルの異なる段階で阻害をおきていることが考えられる。
- 2 HIV 感染者の末梢単核細胞のトランスクリプト

ーム解析

22,000 遺伝子を対象とした本年度の解析結果から、サンプル間で発現レベルに変化のある遺伝子約 5,000 を絞り込む事ができた。このデータには、個人間の差・培養条件の差・刺激条件の差等の種々のノイズが含まれている。これらのノイズの影響を極力排除するフィルタープログラムを使用し、LTNP（および一部の健常トナー）には共通して存在し、エイズ発症群には存在しない発現プロファイルを特定すべく解析を進めたところ、これらの中から、58 個の候補遺伝子が特定されてきた。しかしながら、LTNP がわずかに 4 例であることとサンプルの一部に HIV 感染状況に関する情報が欠如していることにより、完全な解析に至るまでにはさらに期間を要するものと判断する。また、これまでは末梢単核細胞由来の培養細胞をそのままの状態て溶解して mRNA サンプルを調製してきたが、これに加えて異なる条件、たとえば外部からなにかしかの化学的・生物学的刺激を加えることにより、その条件に対する細胞応答の差異をトランスクリプトームの視点から調べていくような研究戦略が必要かもしれない。

- 3 研究目標の達成度について
独自のマイクロアレイシステムの構築は計画通りすすみ、来年度中には全ゲノムワイトの解析が可能となる予定である。また、あらゆる実験工程についての条件検討によりプロファイリングデータの再現性も安定してきており、数多くの異なるサンプルを並行して解析できる見通しが十分についた。HIV 感染者のサンプル取得に関しては、得に LTNP の検体収集およびサンプル調製が当初の計画よりもかなり遅れており、今後の課題である。
- 4 研究結果の学術的・国際的・社会的意義について
ヒト遺伝子とウイルス遺伝子を同一平面上に含む合成 DNA マイクロアレイを作製して宿主側およびウイルス側遺伝子の同時並行発現解析を行った研究はこれまでに報告がない。宿主-

寄生体関係を遺伝子発現のレベルで包括的に調べることによりこれまでの方法論では得られなかった新たな知見が次々と明らかになってくる可能性が高い。また、HIV 感染後の LTNP と発症例との違いを大規模に解析する研究も他に例がない。これは、照沼班員の掌握している血友病罹患者を中心とした協力者集団の存在と数に制限なく使用できる合成 DNA マイクロアレイシステムの存在がともにあって初めて可能となった本研究班の高い独自性を示すものである。

5 今後の展望について

LTNP のサンプルをできる限り増やして対照群と比較することが今後もっとも重要な課題である。解析対象サンプル数をできるだけ大きくする事により、個人差・培養実験誤差等の様々なノイズを含む膨大なデータエレメントから構成されるトランスクリプトーム解析結果から LTNP に特異的な発現プロファイルを示す遺伝子群が浮かび上がってくるのではないかと予想する。さらに、これまでは培養系に移した HIV 感染者の末梢単核細胞をそのままの状態で行回収して発現プロファイルを取得してきたが、今後、これに加えて培養細胞系に HIV を新たに感染させて感染直後の細胞応答に差があるかどうかを調べる事により、LTNP とその他の差異を別の解析視点から引き出すことができると期待する。

E 結論

- 1) ヒト遺伝子と HCMV 遺伝子を同一平面上に含む合成 DNA マイクロアレイを用いて宿主側およびウイルス側遺伝子の同時並行発現解析を行い、HCMV 感染により起きる細胞応答が各種 HCMV 許容・非許容細胞で大きく異なることを明らかにした。
- 2) 22,000 ヒト遺伝子からなる合成 DNA マイクロアレイを用いて、LTNP4 例を含む 56 検体の末梢単核細胞由来培養細胞の遺伝子発現プロファイルの取得を完了し、LTNP 特異的な発現パターンを

示す可能性のある遺伝子候補を含む遺伝子群として 58 遺伝子を特定した。

F 健康危険情報

該当なし。

G 研究発表

1 論文発表

- (1) Omori Y, Imai J, Suzuki Y, Watanabe S, Tanigami A, Sugano S OASIS is a transcriptional activator of CREB/ATF family with a transmembrane domain Biochem Biophys Res Commun 293(1) 470-7 2002
- (2) Hayashi M, Mizoguchi H, Shiraishi N, Obayashi M, Nakagawa S, Imai J, Watanabe S, Ota T, Ikeda M Transcriptome analysis of acetate metabolism in Corynebacterium glutamicum using a newly developed metabolic array Biosci Biotechnol Biochem 66 1337-44 2002

2 学会発表

- (1) 渡辺慎哉 ヒトサイトメガロウイルス遺伝子と宿主細胞遺伝子の同時並行トランスクリプトーム解析 第 50 回日本ウイルス学会学術集会 総会

H 知的財産権の出願・登録状況

1 特許出願

- (1) 発明の名称 DNA マイクロアレイの製造方法
出願番号 特願 2003-19434 号

研究要旨 HIV に対する多剤併用化学療法は HIV の潜伏感染している reservoir pool に対しては無効である。そこで、HIV の排除を目的とする治療法の基盤を明らかにすることを目的に HIV の潜伏と再活性化の機構を明らかにすることを目指した。本研究では昨年迄の成果をもとに、培養細胞系を用いた CpG メチル化による LTR の活性抑制とシクナルによる再活性化の機構およびヒストンコートを介したメチル化非依存的転写抑制機構の解析を継続する。更に HIV 感染者末梢血では極度に少ないスコピー数によりプロウイルスのメチル化状態が解析不能であるため *in vivo* での潜伏感染の分子機構を解析する目的で SHIV の感染モデル系を用いてプロウイルスの LTR のメチル化状態を検討した（京都大学ウイルス研究所 速水教授との共同研究）。その結果 HTLV-1 と同様に HIV においても 5'-LTR の選択的メチル化が見られること HIV-Tg と同様にシクナル依存的な再活性化に際して特異的 CpG サイトの脱メチル化が認められることをはじめて明らかにした。SHIV 感染モデルの解析では viremia の無い時期の末梢血単核球においては、CpG メチル化は一部のプロウイルスで認められたか、大部分のプロウイルスが全くメチル化されていない事が明らかになり、*in vivo* でのメチル化非依存的潜伏感染様式が存在が示唆された。

A 研究目的

HIV 感染の治療に多剤併用療法が導入され複製ウイルスロートの減少は可能となったが 生体内に残存する潜伏感染細胞の除去方法は未だに開発されていない。一方 DNA 上の CpG のメチル化が遺伝子の発現制御に関与し ウイルス遺伝子の CpG メチル化による発現抑制はゲノム防御機構の一つと考えられている。我々は、HIV も LTR の CpG のメチル化により遺伝子の発現が抑制されること、細胞外刺激によるウイルス遺伝子の再活性化と LTR 上の CpG サイトの脱メチル化が関連することを見出した。一方最近では、CpG メチル化を介さないレトロウイルスの発現制御機構が注

目されている。そこで、本研究では、ひとレトロウイルスの潜伏感染におけるエピジェネティックな制御と言う視点から、HIV に加えて HTLV-1 を解析対象に含め HIV の知見と相互に比較検討も行った。また、メチル化を介さない HIV 発現抑制機構をヒストン修飾によるクロマチン構造性御の観点から解析すると共に、*in vivo* における潜伏感染機構を SHIV の感染モデルを利用して検討する事を目的とした。

B 研究方法

HIV 潜伏感染細胞株 ACH2 を用いた LTR のメチル化解析は 昨年に引き続き行った。更に、非メチル化プロウイルスを持つ慢性持続感染細胞株

OM101 を材料に、プロウイルス LTR ヌクレオソームの構造を *in vivo* footprinting 法を用いて解析した。京都大学ウイルス研速水教授らとの共同研究でアカゲザルを用いた SHIV の感染モデルを利用した、*in vivo* のプロウイルスのメチル化解析を行った。具体的には、5頭のサルについて、感染後の viremia のある時期とそれが見られなくなった時期の末梢血単核球検体を用いて bisulfite genomic sequence 法で解析した。実験は動物実験に関する国際倫理および安全ガイドラインに従って行われた。

C 研究結果

1) プロウイルス 5'-LTR の選択的 CpG メチル化とシグナル依存的脱メチル化 HTLV-1 LTR の CpG メチル化解析から、*in vitro* のみならず *in vivo* の潜伏感染細胞において、LTR の CpG メチル化は 5'-LTR に選択的であり、3'-LTR は全くメチル化されていない事が初めて明らかになった (Korwa et al, J Virol, 76, 9389, 2002)。HIV 潜伏感染細胞株 ACH2 を用いた解析では、同様に、Inverse PCR によるプロウイルス組み込み部位の染色体 DNA 塩基配列の決定を行い、5'-と 3'-LTR のメチル化を選択的に解析した。その結果、HIV においても 5'-LTR 選択的 CpG メチル化と 3'-LTR の脱メチル化が認められることが明らかになった。また、TNF- α による再活性化に際して、HIV-tg で観察された LTR 内の CREB/ATF 結合配列に存在する CpG サイトの選択的脱メチル化も認められた (Ishida et al, manuscript in preparation)。

2) HIV のメチル化非依存的潜伏様式におけるクロマチン構造の解析 我々は HIV と HTLV-1 の何れにおいても CpG メチル化を介さない潜伏の

様式が存在することを明らかにし、この場合、ヒストンコードによる HIV LTR 活性制御の概念が適用できることを昨年までに明らかにした。つまり、転写開始点近傍のヌクレオソーム (NucB) のクロマチン構造は刺激依存的に repressive histone code から permissive histone code への変換が見られたが、転写開始点の下流に存在する U5 領域のヌクレオソーム (NucC) ではそれが明らかでなかった。しかし、クロマチン免疫沈降法 (ChIPs) では、技術的に 5'-と 3'-の 2つの LTR を区別して検討することか技術的に困難であったため、今年度は *in vivo* footprinting 法を用いて、5'-と 3'-の LTR における NucB の構造を選択的に解析した。その結果、5'-LTR のヌクレオソームが選択的に relax している事が示された (Ishida et al, manuscript in preparation)。

4) SHIV 感染モデル系の解析 アカゲザル 5 個体の、SHIV 感染後 viremia のある時期から見られなくなった時期まで経時的に採取した末梢血単核球を用いてプロウイルスのメチル化解析を行った。その結果、viremia 消失後の検体でプロウイルス LTR のメチル化はごく一部 CpG サイトで確認されたか、大部分の検体ではメチル化が見られなかった。これらの結果は、*in vivo* でも HIV LTR のメチル化は起こりうる事を示しているか、基本的には、メチル化非依存的な潜伏機構の存在を強く示唆する結果と考えられる。

D 考察

本年度の研究においては、以下の点について解析を行った。まず、HTLV-1 で初めて見いだされた 5'-LTR の選択的メチル化とその潜伏感染における意義を ACH2 細胞で検討し、HIV においても 5'-LTR の選択的メチル化が存在し、それが潜伏

に關与すると共に HIV-Tg で認められたシグナル依存的な特異的 CpG サイトの脱メチル化が確認された。次に、我々が新たに注目した CpG メチル化非依存的潜伏感染機構の解析を進め HIV においても"repressive histone code"の概念が適用出来る事を確認した。

さらに、昨年までの我々の解析から明らかになった検討課題である、生体内の HIV の潜伏感染における CpG メチル化の意義に関して、京都大学ウイルス研究所の速水教授らのグループとの共同研究を開始して アカケサルの SHIV 感染系の検体を解析を行った。結果は、生体内の SHIV プロウイルスにおいても CpG のメチル化が生じること、しかしそれは一部のプロウイルスに限られた CpG サイトで見られるのみであること 従って viremia の無い個体の末梢血単核球では メチル化非依存的機構によってウイルス遺伝子発現抑制＝潜伏感染が維持されている事が明らかになった。従って今後は、脾臓などのリンパ組織の研究者グループにおけるプロウイルスの解析に基づき生体内での潜伏感染維持機構の全体像を明らかにする必要がある。

E 結論

今後は、実際に感染者の研究者での潜伏様式はとうなっているのかを明らかにするため メチル化の解析法の感度をあげる方法を考慮しつつ (技術的には非常に困難である)、SHIV の実験系から リンパ節等のプロウイルスのメチル化状態を解析することにより 感染者の生体内での現象を理解する手かかりを得る事を旨とする。

F 健康危険情報 該当せず

G 研究発表

1 論文発表

1 Koiwa T, Hamano-Usumi A, Ishida T, Okayama A, Yamaguchi K, Kamihira S, Watanabe T

5'-LTR-selective CpG methylation of latent HTLV-1 provirus *in vitro* and *in vivo*

J Virol 76, 9389-9397, 2002

2 Tanaka J, Ishida T, Choi B-I, Watanabe T, Yasuda J, Iwakura Y

Latent HIV-1 reactivation in transgenic mice requires cell cycle-dependent demethylation of CREB/ATF sites in the LTR

AIDS 17 167-175, 2002

2 学会発表

1 国際学会

1-1 2002 International Meeting of the Institute of Human Virology, University of Maryland, 2002 Baltimore, Maryland, U S A

"5'-LTR selective methylation of latently infected HIV provirus that is demethylated by reactivation signals" Ishida T, Hamano-Usumi A, Koiwa T, and Watanabe T

2、国内学会

(1) 第 50 回 日本ウイルス学会学術集会

「HIV 5-LTR 特異的 CpG メチル化と再活性化刺激による CpG 脱メチル化」石田 尚臣 宇佐美 (濱野) 章子、小岩 司、渡邊 俊樹

(2) 第 16 回 日本エイズ学会学術集会

2-1 「潜伏 HIV 再活性化と選択的メチル化」(ノンホナム) 渡邊 俊樹

2-2 「CpG メチル化によらない HIV の潜伏様式」濱野 章子 石田 尚臣、渡邊俊樹

2-3 「HIV 5-LTR 特異的 CpG メチル化と再活

性化シグナルによる CpG 脱メチル化」石田 尚
臣、濱野 章子、小岩 司、渡邊 俊樹

(3) 第 25 回 日本分子生物学会年会

「HIV 5'-LTR 特異的 CpG メチル化と再活性化刺
激による CpG 脱メチル化」石田 尚臣、濱野 章

子、小岩 司、渡邊 俊樹

H 知的財産権の出願・登録状況 なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

なし

雑誌

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sakuragi, J, Iwamoto, A, and Shioda, T	Dissociation of genome dimerization from packaging functions and virion maturation of human immunodeficiency virus type 1	J Virol	76	959-967	2002
Ohmune, T, Katsube, T, Tsuzaki, Y, Kazui, M, Kobayashi, N, Komai, T, Hagihara, M, Nishigaki, T, Iwamoto, A, Kimura, T, Kashiwase, H, and Yamashita, M	Anti HIV 1 activities and pharmacokinetics of new arylpiperazinyl fluoroquinolones	Bioorganic & Medical Chemistry Letters	12	739-742	2002
Takahashi, T, Endo, T, Nakamura, T, Sakashita, H, Kimura, K, Ohnishi, K, Kitamura, Y, and Iwamoto, A	Dihydrofolate reductase gene polymorphisms in <i>Pneumocystis carinii</i> sp. <i>hominis</i> in Japan	J Med Microbiol	51	510-515	2002
Nakayama, E E, Meyer, L, Iwamoto, A, Persoz, A, Nagai, Y, Rouzioux, C	Protective effect of IL4 -589T polymorphism on HIV 1 disease progression	J Infect Dis	185	1183-1186	2002

C , Delfraissy, J -F , SEROCO Study Group, Debre, P, McIlroy, D , Theodorou, I , and Shioda, T	Relationship with viral load				
Tobiume, M , Takahoko, M , Yamada, T , Iwamoto, A , and Matsuda, M	Inefficient enhancement of viral infectivity and CD4 downregulation by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef from Japanese long-term nonprogressors	J Virol	76	5959-5965	2002
Koibuchi, T , Takahashi, T , Nakamura, T , Suzuki, M , Minamoto, F , Oyaizu, N , Yazawa, K , Mikami, Y , and Iwamoto, A	The first isolation of <i>Nocardia nova</i> from an HIV-1 infected individual in Japan	J Infect Chemother	8	358-360	2002
Kobayashi, N , Taguchi Nakamura, H , Goto, M , Nakamura, T , Nakamura, K , Sugiura, W , Iwamoto, A , and Kitamura, Y	Polymorphisms and haplotypes of the CD209L gene and their association with the clinical courses of HIV-positive Japanese patients	Jpn J Infect Dis	55	131-133	2002
Kawana-Tachikawa, A , Tomizawa, M , Nunoya, J , Shioda, T , Kato, A , Nakayama, E E , Nakamura, T , Nagai, Y , and Iwamoto, A	An efficient and versatile mammalian viral vector system for MHC class I/peptide complexes	J Virol	76	11982-11988	2002

Yamada, T, Kaji, N, Odawara, T, Chiba, J, Iwamoto, A, and Kitamura, Y	Proline 78 is crucial for human immunodeficiency virus type 1 Nef to down regulate class I human leukocyte antigen	J Virol	77	1589-1594	2003
Endo, T, Miura, T, Koibuchi, T, Nakamura, H, Takahashi, T, Odawara, T, Goto, M, Aisawa, A, Iwamoto, A, and Nakamura, T	Molecular analysis of human herpesvirus 8 using single nucleotide polymorphisms in open reading frame 26	J Clin Microbiol		In press	2003
Miura, T, Goto, M, Hosoya, N, Odawara, T, Kitamura, Y, Nakamura, T, and Iwamoto, A	Depletion of mitochondrial DNA in HIV 1 infected patients and its amelioration by antiretroviral therapy	J Med Virol		In press	2003

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Jun-ichi Sakuragi, Aikichi Iwamoto, and <u>Tatsuo Shioda</u> .	Dissociation of genomic dimerization from packaging functions and virion maturation of human immunodeficiency virus type 1	J Virol	76	959-967	2002
Suda Louisinrotchanakul , Huanliang Liu, Anuvat Roongpisuthipong, Emi E Nakayama, Yutaka Takebe, <u>Tatsuo Shioda</u> and Chantapong Wasi	Genetic analysis of HIV-1 discordant couples in Thailand Association of CCR2 64I homozygosity with HIV-1 negative status	J AIDS	29	314-315	2002
Emi E Nakayama, Laurence Meyer, Aikichi Iwamoto, Anne Persoz, Yoshiyuki Nagai, Christine Rouzioux, Jean- Francois Delfraissy, SEROCO Study Group, Patrice Debre, Dorian McIlroy, Ioannis Theodorou and <u>Tatsuo Shioda</u>	Protective effect of IL4 -589T polymorphism on HIV-1 disease progression Relationship with viral load	J Infectious Diseases	185	1183-1186,	2002
Yoshihiko Hoshino, Koh Nakata, Satomi Hoshino, Yoshihiro Honda, Doris Tse, <u>Tatsuo Shioda</u> , William N Rom, Michael Weiden	Maximal HIV-1 replication in alveolar macrophages during tuberculosis requires both lymphocyte contact and cytokines	J Exp Med	195,	495-505	2002
Munehide Kano, Tetsuo Matano, Atsushi Kato, <u>Tatsuo Shioda</u> and Yoshiyuki Nagai	Induction of HIV-1- Specific Neutralizing Antibodies in Mice Vaccinated with a Recombinant Sendai Virus Vector	Jpn J Infect Dis	55,	59-60,	2002
Kawana- Tachikawa A, Tomizawa M, Nunoya J, <u>Shioda</u> T, Kato A, Nakayama EE, Nakamura T, Nagai Y, and Iwamoto A	An efficient and versatile mammalian viral vector system for major histocompatibility complex class I/peptide complexes	J Virol	76	11982- 11988	2002
Murakami N, Ye Y, Kawanishi M, Aoki S, Kudo N, Yoshida M,	New Rev-transport inhibitor with a anti-HIV activity from Valerianae Radix	Bioorg Med Chem Lett ,	12	2807-2810	2002

Nakayama EE, <u>Shioda T</u> , Kobayashi M					
Jun-Ichi Sakuragi, Shigeharu Ueda, Atsichi Iwamoto, and <u>Tatsuo Shioda</u>	Relationship between dimerization and packaging of HIV-1 genome RNA, a possible role of dimerization in genome packaging	J Virol	In press		

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出 版 年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Tsunetsugu-Yokota, Y.</u> , Tamura, H , Tachibana, M , Ogata, K , Honda, M , and Takemori, T	Selective expansion of perforin-positive CD8 ⁺ T cells by immature dendritic cells infected with live Bacillus Calmette-Guérin mycobacteria	J Leu Biol	72	115-124	2002
Harada, T , <u>Tsunetsugu-Yokota, Y.</u> , Koyanagi, Y, Sata, T , Kurata, T and Kojima, A	Role of nucleotide sequences in the V3 region in efficient replication of CCR5-utilizing human Immunodeficiency virus type 1 in macrophages	Virology	299	192-203	2002