

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
分担研究報告書

細胞接着因子を介した HTLV-I 発現増強の検討

分担研究者 中村龍文 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染分子病態学  
協力研究者 西浦義博 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科病態解析制御学

研究要旨 我々は HTLV-I 発現亢進における細胞接着因子の関与を検討しているが、今回はローリングに関与する接着因子であるセレクチンリガンドに注目し、検討を行なった。その結果、本接着因子への刺激において、HTLV-I tax の発現亢進が明らかにされた。加えて、インターロイキン-12 受容体、SOCS-1 および Th1 特異的転写因子である T-bet の発現亢進も確認された。これらの事実より HTLV-I 感染細胞に発現しているセレクチンリガンドの activation は HTLV-I の発現亢進を基盤として、Th1 機能の活性化にも関与することが明らかにされた。

A. 研究目的

我々は昨年度の本会議で HTLV-I の発現亢進に関与する因子として、血管内皮への接着におけるローリングに関与する CD44 の活性化の重要性を報告した。すなわち、HTLV-I associated myelopathy (HAM) 発症の必要条件である末梢血における high HTLV-I proviral load を引き起こす要因の一つとして CD44 の関与が明らかにされたわけであるが、今回同じくローリングに関与する接着因子であるセレクチンリガンドに注目し、その刺激による HTLV-I tax 発現への関与を検討した。また、HAM 患者末梢血では Th1 機能の活性化が起こっていることが報告されているが、今回この点に関して Th1/Th2 特異的転写因子である T-bet/GATA-3、インターロイキン-12 受容体β2 (IL-12Rβ2)、また Th の新しい lineage marker としても言われている suppressor of cytokine signaling (SOCS) family の発現への関与についても検討した。

B. 研究方法

HAM 患者髄液由来 T 細胞株である HCT-4 を用い、mouse anti-human sLe<sup>x</sup> モノクローナル抗体 (KM-93) およびコントロール抗体を用いた。HCT-4 をまず 1%FBS 入り RPMI1640 で 1 時間培養。引き続き 1μg/ml の抗体を添加して culture medium (IL-12 添加 20%FBS 入り RPMI1640) で培養し、1, 3, 36 時間後に細胞を回収し RNA を抽出した。抽出した RNA を DNase で処理し、cDNA 合成、β2-microglobulin を内部コントロールとして、HTLV-I tax, IL-12Rβ2, T-bet, GATA-3, SOCS-1 および SOCS-3 について SYBR GreenI を用いて LightCycler (Roche Diagnostic) にて半定量化 RT-PCR を行った。

B. 研究結果

半定量化 RT-PCR でそれぞれの mRNA の発現を検討したところ、KM93 で刺激された細胞は、非刺激細胞に比べ経時的に HTLV-I tax の mRNA 発現が亢進した。また、IL-12Rβ2, T-bet, GATA-3, SOCS-1 の発現も亢進し、SOCS-3 の発現が低下した。

C. 考察

今回の検索により、HTLV-I 感染細胞に発現しているセレクチンリガンドのクロスリンクによる刺激によって HTLV-I tax mRNA 発現の亢進が惹起されることが明らかにされた。HTLV-I tax は fucosyltransferase VII を transactivate し、セレクチンリガンドそのものの発現を亢進させることは周知の事実であるが、逆にそのセレクチンリガンドへの刺激が HTLV-I tax の発現増強に関与するという事実は HTLV-I の増殖機序を考える上で興味深い。昨年度の結果と併せて考えれば、リンパ球の血管内皮への接着の最初の段階において重要な役割を果たす二つの接着因子が HAM 患者末梢血における high HTLV-I proviral load の形成に関与している可能性が考えられる。現在までは HAM 患者由来の HTLV-I 感染 T 細胞株のみでの検討であるので、これらの現象が HAM 患者での HTLV-I 感染細胞だけに特異的なことであるのかどうか、HTLV-I キャリアー由来の HTLV-I 感染細胞株および末梢血 CD4 陽性 T 細胞を用いて比較検討を現在施行中である。

さて、今回の検討においてにおいても一つ特筆すべきことは HTLV-I 感染細胞ではセレクチンリガンドへの刺激において、T-bet, IL-12Rβ2 および SOCS-1 という Th1 関連因子の mRNA の発現亢進も明らかにされたことである。ただ、GATA-3 mRNA 発現も亢進していた理由は不明である。しかし、SOCS-1 の mRNA の発現亢進と共に SOCS-3 の

mRNA 発現の低下がみられたという事実は HTLV-I 感染細胞内での Th1 シグナリングと Th2 シグナリングのバランスを考える上で興味深い。この点について、シグナル間のクロストークの観点から現在解析中である。

以上より、HTLV-I 感染細胞はセレクトインリガンドを介しての刺激において HTLV-I tax 発現の亢進を基盤として Th1 機能が up-regulate される可能性が示された。

#### D. 結論

- 1) HTLV-I 感染細胞上に発現しているセレクトインリガンドの活性化は HTLV-I tax の発現を増強する。
- 2) 1)の現象と共に、HTLV-I 感染細胞内で、Th1 関連因子(T-bet, IL-12R  $\beta$ 2, SOCS-1)の発現も増強される。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Fujimoto T, Nakamura I, Nishiura Y, Ichinose K, Furuya T, Shirabe S, Eguchi. K. Up-regulation of interleukin-12 receptor expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. J Neurol Sci 2002;196:21-26.

2) Kambara C, Nakamura I, Furuya T, Nishiura Y, Kawakami A, Ichinose K, Shirabe S, Eguchi K. Increased sialyl Lewis<sup>x</sup> antigen-positive cells mediated by HTLV-I infection in peripheral blood CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in patients with HTLV-I-associated myelopathy. J Neuroimmunol 2002;125:179-184.

#### G. 知的所有権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
分担研究報告書

成人T細胞白血病ウイルス関連ミエロパチーの病態解明及び治療法の開発に関する研究  
疾患発症モデルの作製、解析とそれを用いた治療実験

分担研究者 吉木 敬 北海道大学教授

研究要旨 成人T細胞白血病ウイルス (HTLV-I) 関連ミエロパチー (HAM) の病態解明や治療実験を目的に、独自に開発した HTLV-I 感染脊髄症発症ラットをモデルとして疾患発症機構の解析を行い、WKAH 系ラットの特異的に発症することやウイルス遺伝子以外に TNF- $\alpha$  や Bcl-2 など感染宿主遺伝子の脊髄局所での発現変化がオリゴデンドロサイトのアポトーシスに関連し、疾患発症に深く関わっていることを示した。今年度は、より網羅的に宿主遺伝子の発現の変化を明らかにすべく、アポトーシスや細胞周期および免疫関連遺伝子を中心とした独自にラット専用の cDNA アレイを作製した。また、このアレイを使用して、非感染ラットと感染ラットの宿主遺伝子発現の比較を行い、その一部の遺伝子については定量的リアルタイム RT-PCR によって確認した。このアレイ解析は病態の解明のみならず、治療実験にも有用であると考えられる。

#### A. 研究目的

成人T細胞白血病ウイルス (HTLV-I) 関連ミエロパチー (HAM) の病態解明及び治療法の開発を推進して行くためには、感染から疾患発症までの宿主とウイルスの相互作用を理解し、感染成立後どの段階でどのようなウイルスの制御が疾患発症の抑制や治療に効果的かを検定して行く必要がある。したがって、適切な疾患モデルの開発はこの宿主とウイルスの相互作用を理解し、治療実験を進める上で有効な手段である。これを受けて、分担研究者は分担研究項目に従い、以下の具体的な目的達成に向けて研究を行う。1) 今までに開発した HTLV-I 感染脊髄症発症ラットモデル (HAM ラット) を用いた疾患発症機構解明を推進する。2) さらにヒトに近いウイルス産生能が期待されるヒト CRM1 (Chromosomal Region Maintenance 1) 遺伝子導入ラットを作製し、HTLV-I 感染を行い、より適切なヒト HAM モデルを樹立、解析する。3) 上記モデルを用いて、新たに開発された治療薬の効果判定などの治療実験を行う。本年度はこの内、1) および 3) の研究に有用なラット専用 cDNA アレイフィルターの作製を行う。また、2) についての実験を継続した。

#### B. 研究方法

##### 1. ラット遺伝子 DNA アレイフィルターの作製

###### 1) ラット遺伝子断片のクローニング

ラットの主要な臓器や組織・細胞から抽出した RNA mixture から oligo(dT) primer または random primer を使用して逆転写反応を施行、cDNA を作製した。これを PCR template として、ラット遺伝子用に設計した primer や既知のヒト及びマウス遺伝

子の特異的 primer で PCR を行い、それぞれ平均 500bp の cDNA 断片を得た。cDNA 断片をプラスミド導入後、DNA シークエンスで目的の遺伝子であることを確認した。

###### 2) cDNA アレイフィルター作製

クローニングしたラット cDNA 遺伝子の断片(平均 500bp) は精製後、DNA アレイフィルター (HYDRA96) を使用し、1つの遺伝子につき約 0.3ng ずつ、それぞれ 2 箇所ナイロン膜上にスポットした。アルカリ処理後、UV Chamber で cDNA をナイロン膜に crosslink した。

##### 2. cDNA アレイ解析とリアルタイム RT-PCR 解析

###### 1) 脊髄からの cDNA プロブの調整

ネンプター麻酔下で HTLV-I 感染及び非感染 WKAH 雄ラット (7ヶ月、各 3頭) を冷 PBS で灌流後、胸髄を採取した。サンプルは液体窒素で瞬間冷凍後、Isogen (ニッポンジーン) にて total RNA を抽出した。DNase 1 処理後、MagExtractor  $\phi$ -mRNA- (TOYOBO) を使用して oligo(dT) 固定化磁性ビーズ法により mRNA を抽出し、Gene Navigator <sup>TM</sup> cDNA Amplification System (TOYOBO) のプロトコルに従って、逆転写反応、poly dC tailing、PCR を施行し、Biotin-16-dUTP 標識 cDNA プロブを作製した。

###### 2) cDNA アレイとシグナルの検出

標識 cDNA プロブを今回開発したラット専用 DNA アレイフィルターと約 12 時間、68°C でハイブリダイゼーション、洗浄後、ストレプトアビジン・ビオチン化アルカリフォスファターゼ系を利用した化学発光を行い、高感度 CCD カメラ (Fluor-S <sup>TM</sup> Multiimager : BIO RAD) で検出、数値化し、遺伝子発現の変化を観察した。各フィル

ター間の標準化には全遺伝子でのシグナル量の平均値を用いた。

### 3) 定量的リアルタイム RT-PCR

cDNA アレイの結果を確認するため、発現量に差の見られた遺伝子を数種類選び、それぞれに特異的 primer を作製し、それを用いて random primer で逆転写した脊髄 cDNA サンプルを template として QuantiTect SYBR Green Master Mix (QIAGEN) による PCR を行った。PCR 反応は ABI PRISM® 7900 Sequence Detection system (Applied biosystems) にて行い、その蛍光強度をリアルタイムに測定した。結果は GAPDH の発現量に対する比率で示した。

(倫理面への配慮)

動物の使用にあたっては北海道大学大学院医学研究科動物実験施設の「動物実験に関する指針」を遵守し、実験に供した。

## C. 研究結果

### 1. ラット専用 cDNA アレイフィルター

今回アポトーシス関連や細胞周期、免疫関連遺伝子を中心に GenBank に登録されているラット遺伝子 193 種と未登録のラット遺伝子 77 種および HTLV-I、HIV-1 遺伝子 11 種の計 281 遺伝子のそれぞれ約 500bp 断片を RT-PCR によりクローニングした。クローニングした遺伝子断片をナイロン膜へスポットすることで 281 遺伝子のラット専用 cDNA アレイフィルターを完成した。

### 2. cDNA アレイ解析

上記で完成したフィルターを利用して、HTLV-I 感染後 7 ヶ月の WKAH ラットおよび同月齢の非感染 WKAH ラット各 3 頭の胸髄から抽出した cDNA をプローブとして、それぞれ cDNA アレイ解析を行った。その結果、感染ラットで発現が増加傾向にあった遺伝子は Laminin A、I $\kappa$ B- $\beta$ 、 $\beta$ -catenin、TRADD(TNF receptor associated death domain) ほか 36 種類であった。一方、発現が抑制されていたのは Bcl-xL ほか 12 種類であった。

### 3. 定量的リアルタイム RT-PCR

上記 cDNA アレイで発現が増加を示していた遺伝子のうち Laminin A、I $\kappa$ B- $\beta$ 、 $\beta$ -catenin、TRADD の 4 種類の遺伝子について、定量的リアルタイム RT-PCR による発現量の定量を行った。Laminin A、I $\kappa$ B- $\beta$ 、 $\beta$ -catenin では有意な差は確認できなかったが、TRADD では 3 頭中 2 頭で HTLV-I 感染による明らかな増加が確認できた。

### 4. CRM1 遺伝子導入ラットの作製

継続的にマイクロインジェクションを行っているが、現在のところ有用なトランスジェニックラットはまだ作製できていない。

## D. 考察

HTLV-I はラットに感染し、WKAH 系ラットに限

り脊髄症の発症を誘導する。昨年度までの解析結果から、HTLV-I 感染による WKAH 系ラット脊髄傷害機構としては感染後 7 ヶ月をピークとする脊髄局所でのウイルスの増殖とそれに伴う pX 発現増強が TNF- $\alpha$  の発現を増加させる一方、この感染後 7 から 12 ヶ月にかけて bcl-2 の発現が抑制されたオリゴデンドロサイトにアポトーシスを誘導し、その結果髄鞘の破壊を招き、脊髄症を発症すると考えられた。この現象は WKAH 系ラット脊髄に限局しており、ほかの臓器や他系統のラットでは見られない現象である。実際、ヒトの HAM/TSP も感染者の一部にしか発症しないことから考えても、感染宿主の臓器特異的な宿主遺伝子発現が脊髄症発症に重要な働きをしていると考えられる。今年度はこの宿主特異的 HAM 発症に関わる宿主遺伝子発現を明らかにするため、網羅的に多数の遺伝子発現を検討できるラット専用の cDNA アレイを作製した。今回この cDNA アレイを使用した解析は限られたラットのみでしか行っていないものの、感染 WKAH 系ラットで増加が確認された TRADD は TNF- $\alpha$  刺激によりアポトーシスを誘導する重要な遺伝子であり、昨年度までの結果を支持するものである。今後は経時的に、また HAM 抵抗性の系統や脊髄以外の臓器を含め、多数を解析し発症に重要な役割を果たす遺伝子を同定していく予定である。また、このラット専用 cDNA アレイは本 HTLV-I 感染ラットをモデルとした新たな治療薬の *in vivo* 治療効果の判定に有用であると考えられる。一方、ヒト CRM1 遺伝子導入ラットの樹立は HTLV-I の高発現が期待され、よりヒトに近い HTLV-I 感染症モデルとなる可能性が高く、今後も継続していく必要がある。

## E. 結論

1. HAM ラットモデル系での宿主遺伝子発現解析や本モデルでの治療効果判定に有用なラット遺伝子 270 種類を載せたラット専用 cDNA アレイフィルターを開発した。

2. 上記フィルターを用いて、感染後 7 ヶ月の WKAH ラットを解析し、感染ラット脊髄で増加を示した遺伝子に内、TRADD 遺伝子の発現増強を定量的リアルタイム RT-PCR で確認した。

## F. 健康危険情報

HTLV-I の動物への感染実験を行うにあたっては、その管理、安全性を確保するため北海道大学大学院医学研究科動物実験施設の P3 感染動物実験施設を使用した。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) K. Fugo, A. Ishizu, H Ikeda, H. Hayase, T. Sugaya, M. Higuchi, M. Tsuji, A. Abe, A.

Suzuki, M. Shibata, T. Takahashi, T. Yoshiki.: The role of the thymus in development of necrotizing arteritis in transgenic rats carrying the env-pX gene of human T-cell leukemia virus type-I. Am. J. Pathol., 161(3): 755-761, 2002.

- 2) A. Ishizu, T. Tsuji, A. Abe, S. Saito, T. Takahashi, H. Ikeda, D. Meruelo, T. Yoshiki: Transduction of dominant negative ATF-1 suppresses the pX gene expression in joint fibroblastic cells derived from HTLV-I transgenic rats. Exp. Mol. Pathol. (in press).
- 3) M. Higuchi, A. Ishizu, H. Ikeda, H. Hayase, K. Fugo, M. Tsuji, A. Abe, T. Sugaya, A. Suzuki, T. Takahashi, T. Koike, T. Yoshiki: Functional alteration of peripheral CD25+CD4+immunoregulatory T cells in a transgenic rat model of autoimmune diseases. J. Autoimmun. (in press).
- 4) K. Kikuchi, H. Ikeda, T. Tsuchikawa, S. Tanaka, K. Fugo, T. Sugaya, U. Tanaka, M. Tateno, N. Maruyama, T. Yoshiki: A novel animal model of thymic tumor: development of epithelial thymoma in transgenic rats carrying human T lymphocyte virus type I. Int. J. Exp. Pathol. (in press).

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## HTLV-I 感染価及び HTLV-I 複製阻害剤評価システムの研究

分担研究者 足立昭夫(徳島大学大学院医学研究科ウイルス病原学分野)

**研究要旨** HTLV-I の迅速感染価定量システムを確立しウイルス複製阻害剤スクリーニングに資するため、レポーターT細胞株(H9細胞)を樹立した。これらのレポーターH9細胞株は HTLV-I Tax に反応してルシフェラーゼを産生する。他の細胞株より顕著に感度が良い H9/K30-Luc1 株をこのアッセイシステムの標準株として使用した。MT2細胞由来 HTLV-I を用いた解析から、このレポーターシステムは、HTLV-I の細胞融合能を測定するものであることが強く示唆された。

### A. 研究目的

感染価を迅速に定量するシステムがないため、HTLV-I のウイルス学的解析は極めて困難である。HAM の制御のためにはウイルス複製を指標にした複製阻害剤の開発が必要であるが、適当な評価系は未だ報告されていない。本研究では HTLV-I の迅速感染価定量システムの確立を目指し、HTLV-I LTR 発現系を組み込んだリンパ球株を構築した。

### B. 研究方法

HTLV-I の完全長分子クローン K30 を用い遺伝子工学的手法により Tax に反応してルシフェラーゼを産生するレポータークローン(K30 LTR-Luc)を作製した。エレクトロポレーションにより K30 LTR-Luc を *neo* 遺伝子発現ベクターと

ともに H9 細胞に導入し、G418 耐性クローンを選択した(H9/K30-Luc 細胞)。感染性のある HTLV-I を産生する MT2 細胞をウイルス材料として H9/K30-Luc 細胞に感染させ、2日後の細胞内ルシフェラーゼ活性を定量した。H9 細胞(HTLV 遺伝子陰性)、MT4 細胞(HTLV *tax* 遺伝子陽性、ウイルス産生陰性)、および M8166 細胞(HTLV *tax* 遺伝子陽性、ウイルス産生陰性)を MT2 細胞のコントロールとして用いた。

### C. 研究結果

1. H9/K30-Luc1 が他の H9/K30-Luc 細胞株よりはるかに感度良く Tax に反応した。
2. H9/H1-Luc 細胞(HIV-1 LTR 発現系)も低レベルであるが MT2 由来 HTLV-I Tax に反応した。

3. MT2、H9、MT4、およびM8166細胞の培養上清はウイルス産生の有無と関係なく低レベルでH9/K30-Luc1を活性化した。
4. MT2細胞はAZT存在下で培養した場合でも効率良くH9/K30-Luc1を活性化した。

#### D. 考察

得られた成績から、我々の開発したシステムは、MT2細胞からレポーター細胞へ細胞融合を介して移行したHTLV-I Taxを見ている可能性が強い。HIV-1の場合、ウイルスプロテアーゼが機能しなければ細胞融合も起こらないと考えられているので、このシステムでもHTLV-Iプロテアーゼ阻害剤のスクリーニングは可能と考えられる。

#### E. 結論

今後の展開として以下のようなことが考えられる。本研究で開発したルシフェラーゼアッセイによるHTLV-I感染評価法が、実際にプロテアーゼ阻害剤のスクリーニングに有効か否かをHIV-1の系で確認する。さらに、候補薬剤の試験管内と本システムでのHTLV-Iプロテアーゼ阻害活性を比較する。これらを踏まえた上で、HTLV-Iプロテアーゼ阻害剤の有効性の検証を行ないたい。

#### F. 健康危険情報

該当事項なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Fujita, M., Sakurai, A., Yoshida, A., Matsumoto, S., Miyaura, M., and Adachi, A. 2002. Subtle mutations in the cysteine region of HIV-1 Vif drastically alter the viral replication phenotype. *Microbes and Infection* 4: 621-624.
- (2) Tomiyama, H., Akari, H., Adachi, A., and Takiguchi, M. 2002. Different effects of Nef-mediated HLA class I down-regulation on human immunodeficiency virus type 1-specific CD8<sup>+</sup>-T cell cytolytic activity and cytokine production. *Journal of Virology* 76: 7535-7543.
- (3) Nishimura, M., Matsuoka, M., Maeda, M., Mizuta, I., Mita, S., Uchino, M., Matsui, M., Kuroda, Y., Kawakami, H., Kaji, R., Adachi, A., and Uchiyama, T. 2002. Association between interleukin-6 gene polymorphism and human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I)-associated myelopathy. *Human Immunology* 63: 696-700.
- (4) Fujita, M., Matsumoto, S., Sakurai, A., Doi, N., Miyaura, M., Yoshida, A., and Adachi, A. 2002. Apparent lack of

- trans-dominant negative effects of various *vif* mutants on the replication of HIV-1. *Microbes and Infection* 4: 1203-1207.
- (5) Fujita, M., Sakurai, A., Yoshida, A., Miyaura, M., Koyama, A.H., Sakai, K., and **Adachi, A.** 2003. Amino acid residues 88 and 89 in the central hydrophilic region of human immunodeficiency virus type 1 Vif are critical for viral infectivity by enhancing the steady-state expression of Vif. *Journal of Virology* 77: 1626-1632.
- (6) **Adachi, A.**, and Fujita, M. 2003. HIV-1 Vif and AIDS. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, in press.
- (7) Ueno, F., Shiota, H., Miyaura, M., Yoshida, A., Sakurai, A., Tatsuki, J., Koyama, A.H., Akari, H., **Adachi, A.**, and Fujita, M. 2003. Vpx and Vpr proteins of HIV-2 up-regulate the viral infectivity by a distinct mechanism in lymphocytic cells. *Microbes and Infection*, in press.
- (8) Nishimura, M., Maeda, M., Yasunaga, J., Kawakami, H., Kaji, R., **Adachi, A.**, Uchiyama, T., and Matsuoka, M. 2003. Influence of cytokine and mannose binding protein gene polymorphisms on human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) provirus load in HTLV-I asymptomatic carriers. *Human Immunology*, in press.
- (9) Fujita, M., Yoshida, A., Sakurai, A., Tatsuki, J., Ueno, F., Akari, H., and **Adachi, A.** 2003. Susceptibility of HVS-immortalized lymphocytic HSC-F cells to various strains and mutants of HIV/SIV. *International Journal of Molecular Medicine*, in press.
- (10) Koyama, A.H., **Adachi, A.**, and Irie, H. 2003. Apoptosis in animal virus infection. *International Reviews of Immunology*, in press.
- (11) 足立昭夫 2002. ケモカイン. 感染症の宿主防御機構—理論と実際, pp112-121, 医薬ジャーナル社.
- (12) 足立昭夫、上野史子、藤田美歌子 2003. HIV-1, 2. 新世紀の感染症学, 日本臨床社, 印刷中.

## 2. 学会発表

- (1) 藤田美歌子、櫻井明子、吉田亜希子、上野史子、小山 一、足立昭夫 (2002) HIV-1 Vif の 88, 89 番目のグルタミン酸残基とトリプトファン残基は蛋白質の安定性とウイルス複製に必須である. 第 50 回日本ウイ

ルス学会学術集会、札幌.

- (2) 藤田美歌子、吉田亜希子、櫻井明子、上野史子、小山 一、足立昭夫 (2002) HIV-2 Vpx 蛋白質にはマクロファージとリンパ球系 HSC-F 細胞でのウイルス増殖に重要な領域が別個に存在する. 第50回日本ウイルス学会学術集会、札幌.
- (3) 明里宏文、足立昭夫 (2002) HIV-1 Vif 蛋白質はウイルス粒子内においてプロテアーゼによる Gag 前駆体の p2-NC プロセッシングを特異的に阻害する. 第50回日本ウイルス学会学術集会、札幌.
- (4) 藤田美歌子、櫻井明子、上野史子、足立昭夫 (2002) マクロファージとリンパ球系細胞での HIV-2 増殖にそれぞれ特異的に関与する Vpx 内領域. 第16回日本エイズ学会学術集会、名古屋.
- (5) 藤田美歌子、櫻井明子、上野史子、足立昭夫 (2002) HIV-1 Vif 蛋白質の安定化に必須なアミノ酸配列. 第16回日本エイズ学会学術集会、名古屋.
- (6) 明里宏文、足立昭夫 (2002) HIV-1 Vif 蛋白質に関する機能解析. 第16回日本エイズ学会学術集会、名古屋.
- (7) 藤田美歌子、櫻井明子、吉田亜希子、上野史子、小山 一、足立昭夫 (2002) HIV-1 Vif には蛋白質の安定性を支配する領域がある. 第25回日本分子生物学会年会、横浜.

- (8) 藤田美歌子、吉田亜希子、櫻井明子、上野史子、小山 一、白井宏樹、松尾 洋、足立昭夫 (2002) HIV-2 Vpx にはリンパ球系細胞とマクロファージでのウイルス増殖に必要な領域が別個に存在する. 第25回日本分子生物学会年会、横浜.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし。

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
分担研究報告書

HTLV-I プロテアーゼ阻害剤の分子設計・合成に関する研究

分担研究者 木曾良明 京都薬科大学教授

研究要旨：我々は HTLV-I の増殖阻害薬を目指して、HTLV-I 固有のプロテアーゼの阻害剤の創製を試みている。今回我々は *in vitro* の阻害剤評価系を用い、手持ちのプロテアーゼ阻害剤ライブラリのスクリーニングを行ってリード化合物となる阻害剤を見いだした。一方、HTLV-I プロテアーゼの基質のアミノ酸配列に基づいてデザイン・合成した化合物は強い酵素阻害活性を示した。この化合物をもとに構造変換を行ったところ、低分子化と活性上昇を実現した化合物を得た。

A. 研究目的

我々は HTLV-I の増殖阻害薬を目指して、HTLV-I が自ら産生しその増殖に必須な HTLV-I プロテアーゼの阻害剤の創製を試みている。今回我々は、既に構築した *in vitro* の阻害剤評価系を用い、手持ちのプロテアーゼ阻害剤ライブラリのスクリーニングを行ってリード化合物となる阻害剤を見いだすとともに、HTLV-I プロテアーゼの基質部位のアミノ酸配列に基づいた阻害剤の合成、評価を行う。

B. 研究方法

我々は既に、組み替え型 HTLV-I プロテアーゼおよびケミカルリゲーションを用いた HTLV-I プロテアーゼ誘導体の合成に成功しており、これら酵素を用いた *in vitro* の阻害剤評価系を構築している。合成・単離したタンパクの 8M urea 溶液を、10% glycerol, 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol (DTT), citrate buffer (pH 5.3) に対して透析を行って活性体に導いたところ、人工基質の切断部位を特異的に加水分解した。その際、基質には HTLV-I プロテアーゼが切断する MA/CA 部位のアミノ酸配列に基づく人工基質 (Ala-Pro-Gln-Val-Leu\*Nph-Val-Met-His-Pro-Leu, 0.2 mM) を用い 1 mM DTT, 1 M NaCl, 5mM EDTA, 0.1 M citrate buffer (pH 5.3) 中で 6h インキュベートし、トリクロロ酢酸を加えて反応を停止した後、HPLC にて切断された基質断片の定量を行った。上記のアッセイ系に 0.1 mM の阻害剤を添加し、基質の切断量の低下を測定することで阻害剤の評価を行った。

1) プロテアーゼ阻害剤ライブラリのスクリーニング

我々は従来から HIV プロテアーゼを主としたアスパラギン酸プロテアーゼの阻害剤開発を行っ

てきており、多数の阻害剤を合成している。またマラリア原虫プロテアーゼ等の、レトロウイルス以外が産生するアスパラギン酸プロテアーゼをターゲットとした阻害剤も有している。これら手持ちの化合物群の中で、構造に特徴のあるものを 100 点程度抽出し、それらが同じアスパラギン酸プロテアーゼの一つである HTLV-I プロテアーゼをどのくらい強く阻害するか評価した。

2) 基質のアミノ酸配列に基づいた阻害剤の合成

我々のアスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤開発は、基質遷移状態概念誘導体を基質に組み込むことが出発点となる。そして得られた化合物が阻害活性を有していれば、その構造を最適化し薬物として有利な化合物へ導くのである。今回は HTLV-I プロテアーゼの基質部位の一つ、MA/CA 部位のアミノ酸配列 (-Pro-Gln-Val-Leu\*Pro-Val-Met-His-) に基づいて阻害剤の合成を行った。基質遷移状態概念誘導体にはヒドロキシメチルカルボニル (HMC) イソスターを有する allonorstatine, allophenylnorstatine (Apsn) を用いた。つぎに活性発現に必要な最小構造を求めるため、N 末及び C 末のアミノ酸を順次除去し活性評価を行った。また P3-P3' の各アミノ酸の置換を行ってより強い活性化合物の探索を行った。

(倫理面への配慮)  
特に必要としない。

C. 研究結果

1) プロテアーゼ阻害剤ライブラリのスクリーニング

HIV プロテアーゼ阻害剤として開発された化合物は、HTLV-I プロテアーゼに対する阻害活性は低

いとされている。我々のプレリミナリーな実験でもほぼ同様の結果を得ている。そこで我々の合成したプロテアーゼ阻害剤の中で構造に特徴のあるものを100点程度抽出し、それらのHTLV-Iプロテアーゼ阻害活性を評価した。0.1 mMの阻害剤濃度でアッセイした結果の一部をFig. 1に示す。予想されたようにHIVプロテアーゼ阻害剤のネルフィナビルやリトナビルはほとんど活性を示さず、我々の化合物の中でもHIVに最適化されたKNI-272やKNI-764は20-33%の阻害活性しか有していなかった。しかしスクリーニングしたものの中には40%以上の阻害活性を示したものもあった。中でもKNI-1352, -1432, -1435は50-55%の阻害活性を示し、今回測定した化合物の中では最も良い活性を有していた。これらの阻害剤は従来型の阻害剤に比べ、いずれもP2'位にバルキータン $\alpha$ -メチルベンジルアミドの構造を持つことが特徴である。またKNI-10086は阻害活性が53%で、P2位の立体構造が変化しておりP3-P2部分が通常とは異なる。一方、KNI-1167やKNI-1276は阻害活性は42-45%であったが、P1-P1'位に独特のHMC-hydrazine構造を有している。

今回のスクリーニングの結果、HIVよりHTLV-Iにより望ましいと思われる特徴的な構造を見いだすことが出来た。これらの化合物はリード化合物として有望であり、構造変換によってより強い活性を持つ薬剤へと導くことが出来るだろう。

## 2) 基質のアミノ酸配列に基づいた阻害剤の合成

HTLV-Iプロテアーゼが切断するMA/CA部位から誘導した仮想基質

H-Pro-Gln-Val-Leu\*Pro-Val-Met-His-OHに含まれるLeu\*Pro間のペプチド結合をHMCイソスターに変換した(Fig. 2)。基質が切断される際に經由する遷移状態では、ペプチド結合に水が付加して形成される二つの水酸基が存在し、これが酵素側の二つのアスパラギン酸残基のカルボキシル基によって安定化される。ペプチド結合をHMCイソスターに変換すると、HMCに含まれる二つの酸素原子が遷移状態の水酸基にそれぞれ置き変わることが出来る。そしてその状態で安定に存在するため酵素による切断を受けない。通常用いられるヒドロキシエチルアミン等のイソスターでは一つの酸素原子しか持たないため、HMCの方がより優れた相互作用をもたらすと考えられる。P1のLeuをHMCを含むallonorstatineに変換して得られたKNI-10159は予想どおり強いHTLV-Iプロテアーゼ阻害活性を有していた。その阻害率は0.1 mMで93%、0.005 mMでも43%と既存のHIVプロテアーゼ阻害剤よりも強力であった。さらにP1をLeuタイプのallonorstatineからPheタイプのallophenylnorstatine(Apns)に置換した化合

物(KNI-10161:

H-Pro-Gln-Val-Apns-Pro-Val-Met-His-OH)では活性の上昇が見られたのでこれ以降の実験にはApnsを使用することとした。

次に活性発現に必要な最小構造を求めるため、KNI-10161のN末端及びC末端のアミノ酸を一残基ずつ除去し活性評価を行った。その結果、N末のProをAcに変換しても活性は半分程度残存するが、P4を除去しフリーのアミノ基にすると全く活性を示さなかった。さらにアミノ酸を切除したのも活性は見られなかった。一方、C末のHisを除去し、カルボキシアミドに変換したもものでは活性をほぼ維持していたが、それ以上切除すると活性は失われた。以上の結果より、当時点での最小必要構造をP3-P3'からなるヘキサペプチドと判断し、構造の最適化を行うことにした。

まず始めにP1'の検討を行った。これまでの実験ではP1'にはProを使用してきたが、HIVプロテアーゼ阻害剤で実績のある

5,5-dimethyl-thiazolidine-4-carboxylic acid(Dmt)を使用したところ活性上昇が見られた。そこでP1-P1'のコアにApns-Dmtをもち、基質のP3-P3'に相当するアミノ酸配列を持つ

KNI-10127(Ac-Gln-Val-Apns-Dmt-Val-Met-NH<sub>2</sub>)を合成したところ、0.1 mMの阻害剤濃度で66%の阻害活性を示した。これをリードとして各アミノ酸の置換を行ってより強い活性化合物の探索を行った。17種の化合物を合成しその活性を評価した結果、P3位は基質本来のGlnよりLeuやIleの様な疎水性アミノ酸が望ましく、P2位もValよりIleが良いことがわかった。またP2'でもValよりIleが良く、P3'は本来のMetが一番良い結果を与えた。もともとアスパラギン酸プロテアーゼは疎水性のアミノ酸残基を認識して切断する傾向があるが、本酵素の場合特にその傾向が強いと思われる。これらの構造活性相関研究の結果から推測される、最も望ましいアミノ酸配列を持つ化合物

KNI-10166(Ac-Ile-Ile-Apns-Dmt-Ile-Met-NH<sub>2</sub>)を合成したところ、本化合物は0.005 mMの濃度でHTLV-Iプロテアーゼの活性を76%阻害することが出来た(Fig. 2)。これはオクタペプチドであるKNI-10159やKNI-10161よりも強い活性である。KNI-10166をリード化合物として構造変換を行うことにより、より望ましい性質を持つHTLV-Iプロテアーゼ阻害剤が創製できると考えられる。

## D. 考察

今回スクリーニングにより見いだした活性化合物は、それぞれ特徴的な構造を有していた。HTLV-Iプロテアーゼはそのバインディングサイト付近ではHIV-1プロテアーゼに極めて近い構造をしていると考えられる。基質のアミノ酸配列も

P3-P3'においてはほぼ同一のプリファレンスを示す。しかし HIV プロテアーゼに最適化した阻害剤は、HTLV-I プロテアーゼを強く阻害することはない。今回見いだした化合物の構造は、HIV と HTLV-I のプロテアーゼの違いを理解するうえで貴重な情報であり、HTLV-I プロテアーゼに対してより強い阻害剤のデザインに役立つものと考えられる。さらに多様なライブラリの中からスクリーニングすれば、有益な情報が得られることが期待できる。

また基質のアミノ酸配列中に HMC イソスターを導入することにより、強い阻害活性を持つ KNI-10159 を創製することが出来た。すなわち HMC は HTLV-I プロテアーゼの場合でも、遷移状態概念誘導体として有効に機能することが証明された。これを基に低分子化し、アミノ酸置換により活性を増強させた KNI-10166 はヘキサペプチドでありながらオクタペプチドの KNI-10159 や KNI-10161 より強い活性を示した。今回のアミノ酸置換では体構成アミノ酸のみを使用した。これらを異常アミノ酸に置換することでより高活性な化合物に誘導できるものと期待する。また同時に、生体の酵素に対する安定性や膜透過に関しても有利になると考えられる。

#### E. 結論

プロテアーゼ阻害剤ライブラリの中からスクリーニングにより見いだした活性化化合物は、従来の HIV プロテアーゼ阻害剤と区別できる構造上の特徴を有している。これらの化合物は HTLV-I プロテアーゼ阻害活性自体は満足の行くものではないが、リードとして貴重な情報をもたらすものである。これらの特徴を生かした、または組み合わせた阻害剤をデザインをすることで、より高活性な阻害剤が創製できると期待できる。

また基質のアミノ酸配列に基づいた阻害剤のデザインにより、ヘキサペプチドを母核とする高活性な阻害剤を創製することが出来た。本化合物 (KNI-10166) をリード化合物として構造変換を行うことにより、より望ましい性質を持つ HTLV-I プロテアーゼ阻害剤が創製できると考える。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) E. Ami, S. Rajesh, J. Wang, T. Kimura, Y. Hayashi, Y. Kiso: Synthesis of novel amino acid, L-bis-tetrahydrofuranylglycines: *Tetrahedron Letters*, **43** (16) 2931-2934 (2002).
- 2) Y. Hamada, J. Ohtake, Y. Sohma, T. Kimura, Y. Hayashi, Y. Kiso: New water-soluble prodrug of HIV protease inhibitors based on O-N

intramolecular acyl migration: *Bioorg. Med. Chem.*, **10** (12) 4155-4167 (2002).

- 3) S. Rajesh, E. Ami, T. Kotake, T. Kimura, Y. Hayashi, Y. Kiso: An expedient synthesis of N $\alpha$ -protected-L-tetrahydrofuranylglycine and its application in the synthesis of novel substrate based inhibitors of HIV-1 protease: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12** (24) 3615-3617 (2002).
- 4) H. M. Abdel-Rahman, G. S. Alkaramany, N. A. El-Koussi, A. F. Youssef, Y. Kiso: HIV protease inhibitors: Peptidomimetic drugs and future perspectives: *Curr. Med. Chem.*, **9** (21) 1905-1922 (2002).
- 5) K. Hidaka, T. Kimura, Y. Hayashi, K. F. McDaniel, T. Dekhtyar, L. Colletti, Y. Kiso: Design and synthesis of pseudo-symmetric HIV protease inhibitors containing a novel hydroxy-methylcarbonyl (HMC)-hydrazide isostere: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13** (1) 93-96 (2003).

#### 2. 学会発表

- 1) H. Maegawa, T. Kimura, Y. Arii, Y. Matsui, Y. Hayashi and Y. Kiso: Identification of peptidomimetic HTLV-I protease inhibitors containing allophenylnorstatine as a transition-state isostere: 27th European peptide symposium, 31st Aug.-6th Sept. 2002, sorrento, Italy.

#### H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



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
納 光弘	中枢神経系の感染性疾患の特徴	島田 馨編	内科学書	中山出版	東京	2002	2151-2166
納 光弘	15-10. 中毒性神経疾患 7) 血液疾患に伴う神経系障害	杉本恒明・小俣政男・水野美邦 総編集	内科学 第8版	朝倉書店	東京	2003	2083-2084
納 光弘	15-10. 中毒性神経疾患 8) 悪性腫瘍に伴う神経系障害	杉本恒明・小俣政男・水野美邦 総編集	内科学 第8版	朝倉書店	東京	2003	2084-2086
納 光弘	15-11. 内科疾患に伴う神経系障害 1) ビタミン欠乏症	杉本恒明・小俣政男・水野美邦 総編集	内科学 第8版	朝倉書店	東京	2003	2073-2074
Kenichi Akaji and Yoshiaki Kiso.	Synthesis of cystine peptide.	Murray Goodman	Synthesis of Peptides and Peptidomimetics	Georg Thieme Verlag	Germany	2002	101-141
足立昭夫	ケモカイン	今西二郎	感染症の宿主防御機構—理論と実際	医薬ジャーナル社	大阪	2002	112-121
足立昭夫 上野史子 藤田美歌子	HIV-1, 2		新世紀の感染症学	日本臨床社	大阪	2003 印刷中	

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
納 光弘	HTLV-I-associated myelopathy(HAM)	日本内科学会雑誌 創立100周年記念号	91	2308-2311	2002
Osame M.	Pathological mechanisms of human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy (HAM/TSP).	J Neurovirol	8(5)	359-364	2002

Yamano Y, Nagai M, Brennan M, Mora CA, Soldan SS, Tomaru U, Takenouchi N, Izumo S, Osame M, Jacobson S	Correlation of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) mRNA with proviral DNA load, virus-specific CD8(+) T cells, and disease severity in HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP).	Blood	99(1)	88-94	2002
Hashiguchi T, Tara M, Niina K, Higuchi I, Arimura K, Osame M, Maruyama I	Adult T-cell leukemia (ATL) cells which express neural cell adhesion molecule (NCAM) and infiltrate into the central nervous system.	Intern Med	41(1)	34-38	2002
Umehara F, Itoh K, Michizono K, Abe M, Izumo S, Osame M	Involvement of Fas/Fas ligand system in the spinal cords of HTLV-I-associated myelopathy.	Acta Neuropathol (Berl)	103(4)	384-390	2002
Ikegami M, Umehara F, Ikegami N, Maekawa R, Osame M	Selective matrix metalloproteinase inhibitor, N-biphenyl sulfonyl phenylalanine hydroxamic acid, inhibits the migration of CD4+ T lymphocytes in patients with HTLV-I-associated myelopathy.	J Neuroimmunol	127(1-2)	134-138	2002
Itoh K, Umehara F, Osame M	Multifocal relapsing-remitting myelitis in a patient with atopic dermatitis: multiple sclerosis or atopic myelitis?	Intern Med	41(6)	495-497	2002
Vine AM, Witkover AD, Lloyd AL, Jeffery KJ, Siddiqui A, Marshall SE, Bunce M, Eiraku N, Izumo S, Usuku K, Osame M, Bangham CR	Polygenic control of human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-I) provirus load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis.	J Infect Dis	186(7)	932-939	2002
Nagai M, Utsunomiya T, Takenouchi N, Izumo S, Osame M	Failure to detect HTLV type 1 DNA from HTLV type 1-seronegative patients with chronic progressive spastic paraparesis in Kagoshima.	AIDS Res Hum Retroviruses	18(14)	1089-1090	2002

Saito M, Higuchi I, Saito A, Izumo S, Usuku K, Bangham CR, Osame M	Molecular analysis of T cell clonotypes in muscle-infiltrating lymphocytes from patients with human T lymphotropic virus type 1 polymyositis.	J Infect Dis	186(9)	1231-1241	2002
Yoshida Y, Machigashira N, Wang SY, Osame M	A patient with acute-onset HAM/TSP after blood transfusion complicated with pseudopseudohypoparathyroidism.	Intern Med	41(10)	899-900	2002
Kiwaki T, Umehara F, Arimura Y, Izumo S, Arimura K, Itoh K, Osame M	The clinical and pathological features of peripheral neuropathy accompanied with HTLV-I associated myelopathy.	J Neurol Sci	206(1)	17-21	2003
Takenouchi N, Yamano Y, Usuku K, Osame M, Izumo S	Usefulness of proviral load measurement for monitoring of disease activity in individual patients with human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis.	J Neurovirol	9(1)	29-35	2003
Furukawa Y, Saito M, Matsumoto W, Usuku K, Tanaka Y, Izumo S, Osame M	Different cytokine production in Tax expressing cells between HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients and asymptomatic HTLV-I carriers.	J Infect Dis			2003 in press
Kubota R, Furukawa Y, Izumo S, Usuku K, Osame M	Degenerate specificity of HTLV-I-specific CD8+ T cells during viral replication in patients with HTLV-I-associated myelopathy (HAM/TSP).	Blood			2003 in press
Saito M, Braud VM, Goon P, Hanon E, Taylor GP, Saito A, Eiraku N, Tanaka Y, Usuku K, Weber JN, Osame M, Bangham CR	Low frequency of CD94/NKG2A-positive T lymphocytes in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients but not in asymptomatic carriers.	Blood			2003 in press

Igakura T. Stinchcombe JC, Goon PK, Taylor GP, Weber JN, Griffiths GM, Tanaka Y, Osame M, Bangham CR	Spread of HTLV-1 Between Lymphocytes by Virus-Induced Polarization of the Cytoskeleton.	Science			2003 in press
Fugo, K., Ishizu, A., Ikeda, H., Hayase, H., Sugaya, T., Higuchi, M., Tsuji, M., Abe, A., Suzuki, A., Shibata, M., Takahashi, T., Yoshiki, T.	The role of the thymus in development of necrotizing arteritis in transgenic rats carrying the env-pX gene of human T-cell leukemia virus type-1.	American Journal of Pathology	161(3)	755-761	2002
Eiichi Ami, S. Rajesh, Jung Wang, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso	Synthesis of novel amino acid, L-bis-tetrahydrofuranylglycin es.	Tetrahedron Letters	43 (16)	2931-29 34	2002
木曾良明, 相馬洋平	新しいHIVプロテアーゼ阻害 剤。—大量投与や薬剤耐性など の問題克服をめざして。	医学のあゆみ	201 (4)	231-235	2002
Yoshio Hamada, Jun Ohtake, Youhei Sohma, Tooru Kimrua, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso	New water-soluble prodrug of HIV protease inhibitors based on O-N intramolecular acyl migration.	Bioorg. Med. Chem.	10 (12)	4155-41 67	2002
S. Rajesh, Eiichi Ami, Tomoya Kotake, Tooru Kimrua, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso.	An expedient synthesis of Na-protected-L-tetrahydrofur anylglycine and its application in the synthesis of novel substrate based inhibitors of HIV-1 protease.	Bioorg. Med. Chem. Lett.	12 (24)	3615-36 17	2002
H. M. Abdel- Rahman, G. S. Alkaramany, N. A. El-Koussi, A. F. Youssef, Y. Kiso.	HIV protease inhibitors: Peptidomimetic drugs and future perspectives.	Curr. Med. Chem.	9(21)	1905-19 22	2002

Koushi Hidaka, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Keith F. McDaniel, Tatyana Dekhtyar, Lynn Colletti, Yoshiaki Kiso	Design and synthesis of pseudo-symmetric HIV protease inhibitors containing a novel hydroxymethylcarbonyl (HMC)-hydrazide isostere.	Bioorg. Med. Chem. Lett.	13(1)	93-96	2003
Fujita, M., Sakurai, A., Yoshida, A., Matsumoto, S., Miyaura, M., and Adachi, A.	Subtle mutations in the cysteine region of HIV-1 Vif drastically alter the viral replication phenotype	Microbes and Infection	4	621-624	2002
Tomiya, H., Akari, H., Adachi, A., and Takiguchi, M.	Different effects of Nef-mediated HLA class I down-regulation on human immunodeficiency virus type 1-specific CD8 <sup>+</sup> T cell cytolytic activity and cytokine production	Journal of Virology	76	7535-75 43	2002
Nishimura, M., Matsuoka, M., Maeda, M., Mizuta, I., Mita, S., Uchino, M., Matsui, M., Kuroda, Y., Kawakami, H., Kaji, R., Adachi, A., and Uchiyama, T.	Association between interleukin-6 gene polymorphism and human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I)-associated myelopathy	Human Immunology	63	696- 700	2002
Fujita, M., Matsumoto, S., Sakurai, A., Doi, N., Miyaura, M., Yoshida, A., and Adachi, A.	Apparent lack of trans-dominant negative effects of various <i>vif</i> mutants on the replication of HIV-1	Microbes and Infection	4	1203-12 07	2002
Fujita, M., Sakurai, A., Yoshida, A., Miyaura, M., Koyama, A.H., Sakai, K., and Adachi, A.	Amino acid residues 88 and 89 in the central hydrophilic region of human immunodeficiency virus type 1 Vif are critical for viral infectivity by enhancing the steady-state expression of Vif	Journal of Virology	77	1626-16 32	2003
Adachi, A., and Fujita, M.	HIV-1 Vif and AIDS	Expert Opinion on Therapeutic Targets			2003 in press

Ueno, F., Shiota, H., Miyaura, M., Yoshida, A., Sakurai, A., Tatsuki, J., Koyama, A.H., Akari, H., Adachi, A., and Fujita, M.	Vpx and Vpr proteins of HIV-2 up-regulate the viral infectivity by a distinct mechanism in lymphocytic cells	Microbes and Infection			2003 in press
Nishimura, M., Maeda, M., Yasunaga, J., Kawakami, H., Kaji, R., Adachi, A., Uchiyama, T., and Matsuoka, M.	Influence of cytokine and mannose binding protein gene polymorphisms on human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) provirus load in HTLV-I asymptomatic carriers	Human Immunology			2003 in press
Fujita, M., Yoshida, A., Sakurai, A., Tatsuki, J., Ueno, F., Akari, H., and Adachi, A.	Susceptibility of HVS-immortalized lymphocytic HSC-F cells to various strains and mutants of HIV/SIV	International Journal of Molecular Medicine			2003 in press
Koyama, A.H., Adachi, A., and Irie, H.	Apoptosis in animal virus infection	International Reviews of Immunology			2003 in press
Fujimoto T, Nakamura T, Nishiura Y, Ichinose K, Furuya T, Shirabe S, Eguchi, K.	Up-regulation of interleukin-12 receptor expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis	J Neurol Sci	196	21-26	2002
Kambara C, Nakamura T, Furuya T, Nishiura Y, Kawakami A, Ichinose K, Shirabe S, Eguchi K.	Increased sialyl Lewis <sup>x</sup> antigen-positive cells mediated by HTLV-I infection in peripheral blood CD4 <sup>+</sup> T lymphocytes in patients with HTLV-I-associated myelopathy	J Neuroimmunol	125	179-184	2002
Kubota R, Furukawa Y, Izumo S, Usuku K, Osame M.	HTLV-I-specific CD8 <sup>+</sup> T cells during viral replication in patients with HTLV-I-associated myelopathy (HAM/TSP).	Blood. in press			2003
Kubota R, Soldan SS, Martin R, Jacobson S.	Selected cytotoxic T lymphocytes with high specificity for HTLV-I in cerebrospinal fluid from a HAM/TSP patient.	J Neurovirol.	8(1)	53-7	2002

Furukawa Y. Kubota R. Tara M. Izumo S. Osame M	Existence of escape mutant in HTLV-I tax during the development of adult T-cell leukemia.	Blood.	97(4)	987-993	2001
Kitze B, Usuku K.	HTLV-1-mediated immunopathological CNS disease.	Curr Top Microbiol Immunol.	265	197-211	2002
Matsuzaki T, Nakagawa M, Nagai M, Usuku K, Higuchi I, Arimura K, Kubota H, Izumo S, Akiba S, Osame M.	HTLV-1 proviral load correlates with progression of motor disability in HAM/TSP: analysis of 239 HAM/TSP patients including 64 patients followed up for 10 years.	J.Neurovirol.	7	228-234	2001
Wodarz D, Hall SE, Usuku K, Osame M, Ogg GS, McMichael AJ, Nowak MA, Bangham CR.	Cytotoxic T-cell abundance and virus load in human immunodeficiency virus type 1 and human T-cell leukaemia virus type 1.	Proc R Soc Lond B Biol Sci	268	1215-1221	2001