

厚生労働科学研究研究費補助金
創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

エイズ治療薬開発のためのマウスモデルの作
製とモデルを用いた抗 HIV 薬の開発研究
(H13-創薬-005)

平成 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岩倉 洋一郎

(東京大学医科学研究所・教授)

厚生労働科学研究研究費補助金
創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

エイズ治療薬開発のためのマウスモデルの作
製とモデルを用いた抗 HIV 薬の開発研究
(H13-創薬-005)

目 次

I. 研究組織 1
II. 総括研究報告	
エイズ治療薬開発のためのマウスモデルの作製とモデルを用いた抗 HIV 薬の開発研究	
岩倉洋一郎 2
III. 分担研究報告	
エイズ治療薬開発のためのマウスモデルの開発	岩倉洋一郎 10
HIV 遺伝子の転写制御による抗エイズ薬の開発研究	岡本 尚 21
HIV 産生抑制能を有する免疫細胞の誘導	神奈木真理 29
HIV mRNA の核外輸送を標的とした抗エイズ薬の開発研究	志田壽利 33
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 38
V. 研究成果の刊行物・印刷 48

I. 研究組織

研究課題：エイズ治療薬開発のためのマウスモデルの作製とモデルを用いた抗 HIV 薬の開発

主任研究者：岩倉洋一郎 (東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター細胞機能研究分野・教授)

分担研究者：岡本 尚 (名古屋市立大学医学部分子医学研究所分子遺伝部門・教授)

神奈木真理 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科免疫治療学分野・教授)

志田 壽利 (北海道大学遺伝子病制御研究所病態研究部門感染病態分野・教授)

II. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）
総括研究報告書

エイズ治療薬開発のためのマウスモデルの作製とモデル を用いた抗 HIV 薬の開発

主任研究者：岩倉洋一郎（東京大学医科学研究所）

研究要旨

エイズ治療は HAART 治療法の導入により大きく前進したが、潜伏ウイルスの存在や薬剤耐性ウイルスの出現などの問題によって、まだ完全に治癒できるまでに至っていない。本研究では新しい治療法の開発に資するため、新たなエイズモデルの開発すると共に、さらにそのモデルを評価系にして、HIV 増殖に關与する宿主因子を標的とした抗 HIV 薬の開発を試みることを目的とした。

岩倉は HIV 遺伝子導入トランスジェニック (Tg) マウスを HIV の潜伏感染モデルとして用いることにより、HIV の活性化には LTR U3 内の CREB/ATF 結合領域の脱メチル化が必要であり、脱メチル化は細胞周期依存性に起きることを明らかにした。また、マウスに於ける宿主域バリアーが核移行のステップにあることを明らかにした。岡本は LTβR シグナリングにおける NF-κB 活性化は IKKβ によらず IKKα に依存する系であり、p65 の核移行に依存しないことなどを明らかにした。また、神奈木は CD8 陽性細胞障害性 T 細胞が HIV 感染細胞に接触すると抗原非特異的機序により HIV 複製を抑制することを示した。また、この HIV 複製抑制は MHC-I 非拘束的であり、別の CTL 表面抗原因子を介することを見いだした。志田は Rev の多量体化、Rev と CRM1 との結合及び Rev の核外輸送機能を阻害する薬物を効率よくスクリーニングする系を開発し、スクリーニングの結果、14 の Rev 活性を阻害する化合物を得た。このようにエイズモデルの作製が進められ、一方で細胞レベルでの抗 HIV 薬の解析が加わることにより、マウスモデルを用いた抗 HIV 薬開発をより多角的に押し進める基盤をつくることのできた。

主任研究者：

岩倉洋一郎（東京大学医科学研究所・ヒト疾患
モデル研究センター・細胞機能研
究分野・教授）

神奈木真理（東京医科歯科大学大学院・医歯学
総合研究科・免疫治療学分野・教
授）

分担研究者：

岡本 尚（名古屋市立大学・医学部・分子医
学研究所分子遺伝部門・教授）

志田 壽利（北海道大学・遺伝子病制御研究所・
病態研究部門感染病態分野・教授）

A. 研究目的

欧米など先進国では増加がやや頭打ちになっているとは言え、世界的には HIV 感染者はますます増加しており、すでにエイズを発症している患者の治療と共に、未発症の3千万人を越える感染者の発症をいかに防ぐかはきわめて大きな社会問題である。比較的感染者の少ない我が国にも相応の国際貢献が求められている。近年、エイズ治療は HAART 治療法の導入により大きく前進したが、現在においてもなお、副作用や薬剤耐性ウイルスの出現などの問題から、ウイルスの完全駆逐やウイルス負荷量を減少させる新たな治療法の開発が急がれている。このためには、感染過程を再現できる動物モデルが必須であるが、マウスのような小動物に HIV が感染しないことがこれまで病態解析や治療薬開発上の大きな制約となっていた。本研究では、抗 HIV 薬開発に適した小動物モデルの開発を第 1 の目的とする。さらにそのモデルを評価系にして、これまで開発が遅れていた、HIV 増殖に関与する宿主因子を標的とした抗 HIV 薬の開発を試みる。

この中で本年度岩倉は、抗 HIV 薬の開発に適した小動物エイズモデルを作製するために、HIV 感受性マウスや HIV キャリアーマウスの作製と共にマウスにおける感染バリアー過程の同定を試みた。また近年の HAART 治療で問題となっているラテントリザーバーにおける HIV 遺伝子の再活性化機構を解析するために、HIV ゲノム全長（逆転写酵素には欠失変異）を導入したトランスジェニック (Tg) マウス (Δ pol-Tg) を用いて、潜伏状態の HIV 遺伝子活性化機構を詳細に解析した。一方、岡本は HIV 感染に重要な役割を果たしていると考えられる樹状突起細胞における転写制御機構の解析を行った。具体的には樹状細胞内での HIV 遺伝子発現に関連するリンフォトキシン β レセプター (LT β R) シグナリングによる NF- κ B 活性化機構における NIK と IKK α の役割について検討し、NF- κ B 活性化シグナルの機序解明を行った。神奈木は従来より行っている CD8 陽性細

胞による HIV の抑制機構を解析した。さらに志田は HIV mRNA の核外輸送に関与する Rev の機能を阻害する化合物を検索するための細胞評価系を構築し、スクリーニングを行った。

本研究により、ヒト感染系に近い HIV 感染マウス、あるいは HIV 感受性マウスが作製され、実際に評価系として有効であることが証明されれば、抗 HIV 薬開発にきわめて重要な貢献をすることを確信している。

B. 研究方法

1) 岩倉

① HIV 感染モデルマウスを用いた、HIV 遺伝子発現制御機構の解析

Δ pol-Tg のリンパ節及び脾臓からリンパ球を単離した。そのリンパ球をメチル化阻害剤存在下で LPS 刺激後、ノーザンブロット解析により HIV mRNA 発現量を比較した。またその細胞の DNA を抽出後、HIV LTR U3 領域における CpG メチル化を亜硫酸塩ゲノムシーケンシング法により検討した。一方 Δ pol-Tg のリンパ球を CFSE で染色後 LPS 刺激し、細胞内 p24 を染色後フローサイトメトリー解析することで細胞周期と HIV 活性化の関係を調べた。またその細胞の DNA を抽出後、HIV LTR U3 領域における CpG メチル化を検討した。

② hCRM1 及び hCyclin T1 トランスジェニックマウスの作製

ヒト CyclinT1 およびヒト CRM1 の cDNA を CD4 プロモーターにつないだ Tg コンストラクトを作製し (CD4-CyclinT1、CD4-CRM1)、2 種類の DNA を混合して C3H/HeN マウスの受精卵前核にマイクロインジェクション法により導入した。サザンブロットハイブリダイゼーション法により Tg マウスを確認した。Tg マウスの脾臓や胸線から RNA を精製し、RT-PCR 法により導入遺伝子の発現を検討した。一方でヒト CyclinT やヒト CRM1 の発現により HIV の遺伝子発現が亢進しているかどうか検討するために、CD4-hCyclinT-hCRM1 マウスと Δ pol-Tg を交配させ、仔マウスの脾臓

及び胸腺の RNA を用いたノーザンブロッティング解析を行った。

③ マウス細胞に於ける HIV 宿主域バリアー過程の解析

健康人のバフィーコートあるいはマウスの脾臓からそれぞれリンパ球を単離した。それぞれの細胞を PHA により刺激後 1 週間 IL-2 存在下で培養したものを感染に用いた。ウイルスは envelope 欠損 HIV-1 を含む luciferase 発現ベクターと Amphotropic murine leukemia virus envelope (MuLV env) の発現ベクターを 293T 細胞に co-transfection して得られた pseudotype virus を用いた。逆転写過程及び核以降過程を特異的に検出するプライマーを用いた PCR 法により評価した。またインテグレーション以降の過程は感染後 4 日目の細胞中に発現する luciferase 活性あるいは p24 量をルミノメーターあるいは ELISA により測定することにより評価した。

④ IL-16 遺伝子ノックアウトマウスの作製

IL-16 コンディショナルノックアウトマウスを作製するため、IL-16 遺伝子のカスパーゼ 3 の切断部位であるエクソン 5 及びエクソン 6 を loxP 配列で挟んだ KO コンストラクトを作製し、E14. 1 の ES 細胞に導入し相同組み換えが起きた ES 細胞のみを単離した。得られた ES 細胞は細胞凝集法を用いてキメラマウスの作製を行った。

⑤ CXCR4 の生理機能の解析

T 細胞特異的に CXCR4 遺伝子を欠損させたマウスの胸腺細胞抽出液に対して Bcl-xl、PKB などに対する抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。また、胸腺細胞内の Bcl-2 の発現量はフローサイトメトリー法を用いて検討した。

2) 岡本

① p65 (ワイルドタイプ及びさまざまな変異体) の Luciferase (Luc) 遺伝子発現プラスミドと LT β R、TNF、NIK、IKK α 、IKK β (ワイルドタイプ及びさまざまな変異体) の発

現プラスミドをそれぞれ 293 細胞または HT29 細胞にコトランスフェクションすることにより蛋白を発現させ、Luc 活性を測定することにより、LT β R、TNF、NIK、IkB、IKK α 、IKK β の p65 活性への評価を行った。

② LT β R 刺激による p65 の核移行の有無を解析するため、HT29 細胞を TNF 処理後、LT β R agonistic 抗体で刺激し、細胞を固定し、抗 p65 抗体にて免疫組織化学染色法を行った。

③ NIK-IKK α の作用機構をさらに確認するため、Gal4 結合 p65 (ワイルドタイプ及びさまざまな変異体) 発現プラスミド、Gal4-TATA luc 発現プラスミド、NIK または IKK α 発現プラスミドの 3 種類のプラスミドを細胞に共導入し、Luciferase 活性を測定することにより、NIK または IKK α により誘導されるさまざまな p65 の転写活性領域を同定した。

④ p65 の LT β R シグナリングにより誘導したリン酸化を確認するため、HT29 細胞に FLAG 標識した p65 (FLAG-p65) を発現した後、FLAG に対する抗体で共免疫沈降し、沈降された蛋白を p65 のリン酸化抗体を用いてウエスタンブロット法で解析した。

3) 神奈木

① 健康人 PBMC をマイトマイシン C 処理した Raji 細胞で刺激後、アロ特異的に増殖する細胞群から CD4+細胞を除去することにより、IL-2 依存性の CD8+細胞株を樹立した。この CD8+細胞株は IL-2 存在下で培養維持し、定期的に Raji 刺激を加えた。

② 健康人 PBMC を PHA 刺激後 1 週間 IL-2 存在下で培養し、CD8+細胞を除去することにより、CD4+細胞分画を得た。これらの細胞に X4 HIV-1/NL4-3 あるいは R5 HIV-1/NFN-SX 株を 2 時間感染させ、上記 CD8+CTL と混合、4 日培養後に上清をハーベストしその中に含まれる HIV-1 p24 量を ELISA により測定した。

- ③ envelope 欠損 HIV-1 を含む luciferase 発現ベクターと Amphotropic murine leukemia virus envelope の発現ベクターを COS 細胞に co-transfection して得られた pseudotype virus を CD4+T 細胞クローンに感染させ、24 時間後の培養に抗原刺激および CTL を加え、さらに感染 4 日後まで培養し、細胞中に発現する luciferase 活性をルミノメーターにより測定した。
- ④ HIV-1 感染 PBMC 培養内の新たな感染を AZT 存在下で阻止した状態で、短時間 (6-12 時間) 培養中に上清中に遊離される HIV-1p24 量を CTL の存在下あるいは非存在下で測定した。

4) 志田

- ① Rev をアッセイ時のみ発現させるために Tet-off gene expression system を用いた。Rev-Rev 多量体形成化を測定するために、Rev-VP16, Gal-Rev, pG5luc (GAL4 応答プロモーター支配下にルシフェラーゼを組み込んだプラスミド)、Rev と CRM1 の結合を測定するために Rev-VP16, Gal-CRM1, pG5luc を組み込んだ細胞を、RNA 輸送を測定するために Rev と pDM128Luc (HIV ゲノムの tat-env 領域のイントロンに Luc 遺伝子を挿入したもの) を導入した細胞を樹立した。
- ② 約 3000 の化合物を樹立した細胞を含む培地 (Rev を誘導するために Dexycyclin を含まない) に加え、24 時間後にルシフェラーゼ活性を測定することにより、評価を行った。また MTT 法による細胞増殖抑制作用、乳酸脱水素酵素を指標にした殺作用を検討した。

C. 研究結果

1) 岩倉

- ① HIV 感染モデルマウスを用いた、HIV 遺伝子発現制御機構の解析
一昨年 Δ pol-Tg を LPS で刺激すると HIV

遺伝子の発現が亢進することを報告した (Tanaka et al., AIDS, 2000)。 Δ pol-Tg の染色体上の HIV LTR U3 領域はほぼ完全にメチル化されていたが、LPS 処理により LTR U3 内の CREB/ATF 結合領域のメチル化が選択的にはずれることが分かった。また Δ pol-Tg のリンパ球をメチル化阻害剤存在下で LPS 刺激したところ、阻害剤の濃度依存的に HIV の発現が亢進することがわかった。一方 Δ pol-Tg のリンパ球を CFSE 染色及び LPS 刺激後、p24 Gag の発現を調べたところ、LPS 刺激後の HIV 遺伝子の発現は細胞分裂を起こした細胞で高いことが示された。更に細胞分裂を経た細胞では LTR U3 における CREB/ATF 結合領域の脱メチル化が起こっていることが分かった。この結果、LPS による HIV 遺伝子発現誘導には CREB/ATF 結合領域の脱メチル化が必要であり、脱メチル化は細胞周期依存性に起きることが明らかとなった (Tanaka et al., AIDS, 2002)。

② hCRM1 及び hCyclin T1 トランスジェニックマウスの作製

CD4-hCyclinT や CD4-CRM1 の Tg コンストラクトを導入した受精卵から 5 系統の hCyclin1 と hCRM1 とを持つ Tg を得られた (CD4-hCyclinT-hCRM1)。5 系統の F0 マウスと野生株マウスを交配させ、全ての系統において F1 マウスが得られた。導入遺伝子の発現を脾臓及び胸線から抽出した RNA を用いた RT-PCR 法で確認した。その結果 hCyclinT 及び hCRM1 共に発現が高かった 2 系統を Δ pol Tg との交配に用いた。 Δ pol Tg マウスと交配させた結果、HIV 遺伝子発現は上昇せず、HIV RNA のバンドが確認できなかった。

③ マウス細胞に於ける HIV 宿主域バリアー過程の解析

MuLV env を持つシュードタイプウイルスをヒト及びマウス細胞に感染させた結果、感染 1、2 日目における逆転写過程産物は前期、後期共にマウス細胞においても十分に観察された。しかし核移行産物を検出するための PCR の結

果、マウス細胞において核移行産物はほとんど検出されず、核移行過程に問題があることが明らかとなった。また感染 4 日目のマウス細胞内におけるルシフェラーゼ活性及び p24 は殆ど検出されなかった。

④ IL-16 遺伝子ノックアウトマウスの作製

IL-16 染色体遺伝子をクローン化し、カスパーゼ 3 の切断部位であるエクソン 5 及びエクソン 6 を loxP 配列で挟んだ KO コンストラクトを作製し、ES 細胞のスクリーニングを行った。相同組み換え体が得られ、現在キメラマウスの作製を行っている

⑤ CXCR4 の生理機能の解析

CXCR4 のコンディショナル KO マウスの胸腺細胞を Bcl-2 や Bcl-xl に対する抗体を用いたウェスタンブロットやフローサイトメトリーにより解析した結果、KO とワイルドタイプマウスの間に差は認められなかった。また、SDF-1/CXCR4 からのシグナルの下流に存在し、アポトーシスに対して抑制的に働くことが知られている PKB タンパク質のリン酸化においても、KO とワイルドタイプマウスの間に差は認められなかった。

2) 岡本

① TNF あるいは LTβR 抗体の刺激、および NIK の発現は NFκB 転写活性を誘導したが、IKKα また IKKβ 単独では NFκB 転写活性を誘導することできないことがわかった。さらに、TNF は IκBα のリン酸化を誘導したが、LTβR シグナリングでは IκBα のリン酸化を誘導しないことがわかった。また P65 抗体を用いた免疫組織化学染色の結果、LTβR シグナリングは p65 の核移行を伴わないで NFκB を活性化することがわかった。

② TNF により誘導された NF-κB 活性は NIK dominant negative 変異体 (DN)、IKKα DN、IKKβ DN のいずれの発現によっても抑制を示した。しかし、LTβR シグナリングにより誘導された NF-κB 活性は NIK DN あるいは IKKα DN の発現によって抑えられたが、

IKKβ DN の発現では抑えられなかった。他方、NIK で誘導した NF-κB 活性は IKKα DN の発現によって抑制されたが、IKKβ DN の発現によっても抑制されなかった。以上の結果から、TNF シグナリングは主に IκB リン酸化 cascade を使うが、LTβR シグナリングは主に NIK、IKKα cascade を使い、また NIK の作用は IKKβ でなく主に IKKα と連携していることがわかった。

③ NIK-IKKα のさまざまな領域の p65 への作用機構を luciferase assay により比較した結果、p65 の TA1 領域だけが含まれた Gal4-TA1 融合蛋白は NIK に対して一番高い反応性を示した。さらに TA1 領域の 529 番または 536 番セリンをアラニンに変換した変異体を細胞に導入し、NIK により誘導される転写活性を比較したところ、TA1 の転写活性は 536 番セリンの変異によって明らかに抑制された。これらの結果から p65 の C-末端 TA1 領域、特にセリン 536 が NIK と IKKα の標的であることが示唆された。p65 の C-末端 TA1 領域、特にセリン 536 が NIK と IKKα の標的であり、転写促進していることが示唆された。

④ FLAG 標識した p65 (FLAG-p65) を発現した細胞を LTβR 刺激後、共免疫沈降法で p65 を沈降し、ウェスタンブロット法で p65 セリン 536 リン酸化抗体を用いて確認した。このリン酸化は NIK DN、IKKα DN、IκB 変異体のいずれの発現によっても抑制された。以上より、LTβR シグナリングにおける NF-κB 活性化は p65 セリン 536 の NIK および IKKα を介したリン酸化に依存していることが明らかになった。

3) 神奈木

① アロ特異的 CD8 陽性 CTL は、試験管内で HIV-1 感染させた PHA 刺激自己 PBMC と混合培養すると、HIV-1 産生を CTL 数依存的に抑制した。CTL の上清を HIV 感染 PBMC 培養に加えても HIV-1 抑制効果は再現され

ず、CD4 細胞と CTL の細胞接触が必要であることが確認された。また、既知の RANTES、MIP1- α , β , SDF 等のケモカインに対する中和抗体を加えても CTL による抑制は解除できなかった。

② pseudotype virus を CD4+T 細胞クローンに感染させ、感染 24 時間後に CTL を添加した実験系の luciferase 活性は、CTL 非存在下の培養と比較して有意に抑制されていた。従って、CTL は少なくとも HIV-1 複製サイクルの後半に一つの抑制ステップを有すると考えられた。

③ CTL が HIV-1 感染細胞に対して抗原非特異的な細胞傷害を示さないかどうか調べるために、HIV-1 感染 PBMC を AZT 添加培地中で CTL と短時間培養した際の上清中の p24 量を測定した。この結果、6 時間のアッセイでは有意な細胞傷害性は認められなかったが、12 時間のアッセイでは弱い傷害性が認められた。さらに、この実験系に Fas ligand 中和抗体を加えると細胞傷害性は消失した。従って、CTL は HIV-1 感染細胞に対して Fas ligand 依存性の bystander killing により低レベルの細胞傷害性を持つことが分かった。

④ 上記の Fas ligand 依存性の感染細胞死が、CTL による HIV-1 抑制にどれぐらい貢献しているかを調べるために、CTL と HIV-1 感染自己 PBMC を数日間混合培養し HIV-1 産生量を測定する系に Fas ligand 中和抗体を添加した。この結果、CTL による HIV-1 産生抑制は Fas ligand 中和抗体に影響されなかった。従って、Fas ligand 依存性の bystander killing は CTL の HIV-1 抑制機序の本質ではないと考えられた。

4) 志田

① Rev-Rev 多量体形成、Rev-CRM1 結合、そして RNA 輸送の 3 段階を評価するための細胞系は、全て Doxycyclin を除いて Rev を発現させることによって、高いルシフェ

ラーゼ活性が誘導されることが示された。

② 上記 3 段階での Rev 活性の評価系を用いて、予備的なスクリーニングを開始した。約 3000 化合物を 1 μ M, 24 時間処理してルシフェラーゼ活性の低下で効果を判定した。RNA 輸送をほぼ 100%、Rev-CRM1 の阻害が 30%以下のものが 14 種類見つかった。種々の濃度でのそれらの効果を細胞増殖抑制と殺作用と共に調べたところ、いずれも細胞殺作用は 50 μ M でも見られなかったが、細胞増殖抑制作用が見られた。

D. 考察

1) 岩倉

今回の研究から LPS による Δ pol-Tg における HIV 遺伝子発現誘導には CREB/ATF 結合領域の脱メチル化が必要であり、脱メチル化は細胞周期依存性に起きることが明らかとなった。脱メチル化による HIV 遺伝子の発現亢進は HAART 治療中の HIV 感染者におけるラテントリザーバーのウイルス再活性化機構の一つである可能性が考えられる。脱メチル化による HIV 遺伝子発現亢進の機構の解明は新たな治療薬開発に結びつくことが期待される。また今回作製した hCRM1 及び hCyclin T1 トランスジェニックマウスと Δ pol-Tg との交配した結果では HIV 遺伝子発現は上昇しなかった。これは CD4 プロモーターによって制御される hCRM1 及び hCyclin T の発現が十分ではない可能性が考えられた。現在 lck proximal プロモーターを用いた Tg マウスを作製している。一方マウス細胞に於いて HIV 宿主域バリアー過程は核移行過程にあることが示唆された。現在感染バリア因子の探索を行っており、因子が同定されたらその Tg マウスを作製する予定である。また CXCR4 のコンディショナル KO マウスにおける T 細胞のアポトーシスの原因は不明であった。しかしこのマウスにおけるアポトーシスの機構を解明することが、エイズ患者における CD4 陽性細胞減少の機構解明につながると考えられる。今後今回検討した Bcl-xl 及

び Bcl-2 以外のアポトーシス関連タンパクによる関与を検討する予定である。

2) 岡本

今回の研究から、LT β R シグナリングにおける NF- κ B 活性化は p65 セリン 536 の NIK および IKK α を介したリン酸化に依存していることが確認された。リンフォトキシンからのシグナルは HIV 感染樹状突起細胞でのウイルス遺伝子発現のみならず、リンパ節の形成など HIV によって荒廃されたリンパ組織の再構築にも深く関与している。このシグナルがむしろ活性型 T 細胞を呼び寄せ、HIV 感染の播種に関わっている可能性があるため、LT β R シグナルの選択的抑制は AIDS の進展阻止のためにも重要な標的となる。なお、最近の報告から、LT β R シグナリングは我々が今回研究対象とした NIK-IKK α を介した p65 のリン酸化 cascade 以外に、もうひとつの cascade、すなわち NIK-IKK α を介した p100-p52 processing を誘導することが明らかになった。この一連の研究から、潜伏感染 HIV の増殖制御と AIDS 病態の進展における NIK-IKK α cascade の重要性が改めて注目される。

3) 神奈木

アロ特異的な CD8 陽性 CTL は、抗原非特異的に HIV-1 感染 PBMC のウイルス産生を抑制したが、その機序には少なくとも細胞傷害性と非傷害性の両者が含まれることが分かった。このうち、細胞傷害性は主に Fas ligand 依存性の bystander killing によるものであったが、CTL による HIV-1 抑制の全体に対する貢献は少なかった。Pseudotype virus を用いた解析から、CTL による細胞非傷害性の抑制は HIV-1 の組み込み以降のステップ（おそらく転写段階）に有効であることが推察される。

本研究で示された HIV-1 抑制活性は、非感染者から誘導可能な機能細胞が持つものであり、抑制機序の解明および抑制機能分子の同定は、新たな生物学的 AIDS 治療薬としての意義

を持っている。また、このような活性の生体レベルでの誘導は、初感染時にウイルスの生体内播種増殖を制限する HIV-1 非特異的防御システムの役割を果たす可能性があると考えられる。

4) 志田

Rev の阻害剤を検索するための 3 種類の細胞評価系を構築した。そして予備的に約 3000 化合物を検索した結果 14 物質が Rev の活性を阻害した。しかし、細胞毒性への検討、作用点の同定が必要である。今後 30 万種類の化合物をスクリーニングする予定である。

E. 結論

HIV 感染モデルとしてはサルが比較的ヒトに近いが、遺伝的、微生物学的な統御が不十分であることや、扱い難いこと、供給や動物愛護上の問題を抱えていることなどから、必ずしもモデルとして最も優れているとは言い難い。小動物の疾患モデルが望まれる所以である。マウスモデルは最初 Malcolm Martin (1988) らが HIV 遺伝子導入 Tg マウスを作製し、エイズ様症状を示すことを報告したが、その後この系統は途絶え、これに代わるものは報告されていない。また、ヒト CD4 や CXCR4 または CCR5 遺伝子を導入して作製した感受性マウスは、感染効率が低く実用には適さない。

岩倉らは HIV 遺伝子を導入した Tg マウス (Δ pol) をより感染者の状態に近いマウスモデルにするため、CD4 プロモーターや Ick プロモーターを用いた CyclinT1 や CRM1 の Tg マウスを作製し、 Δ pol マウスとの掛け合わせを行った。CD4-hCycT-hCRM1 Tg は Δ pol との交配によっては HIV の発現を上昇されることができなかったが、Ick プロモーター-hCyc-hCRM1 Tg は無刺激でもリンパ球細胞特異的に HIV 遺伝子の発現が上昇することが期待され、エイズ病態解析や治療薬開発のスクリーニング系として有用であると考えられる。また、IL-16 コンディショナル KO を作製し、今後 Δ pol と交配させることにより、HIV 感染におけ

る IL-16 の関与を *in vivo* で解析する予定である。CXCR4 コンディショナル KO における T 細胞アポトーシスには Bcl-2、Bcl-xl 及び PKB などは関与しないことが明らかとなった。今後他のアポトーシス関連因子を検討することにより、その機序を解明する予定である。以上のような因子による HIV ウイルスの遺伝子発現や増殖に対する影響を調べることでエイズ治療薬のターゲットとしての可能性を検討できると考えられ、またよりヒトに近い HIV 感染モデルが作製できることが期待される。岡本は今回の研究から、LTβR シグナリングにおける NFκB 活性化は p65 の核移行を伴わず、p65 セリン 536 の NIK および IKKα を介したリン酸化に依存していることが確認された。LTβR シグナルによる NFκB 活性化は HIV 感染樹状突起細胞でのウイルス遺伝子発現のみならず、リンパ節の形成など HIV によって荒廃されたリンパ組織の再構築にも深く関与している。この NF-κB 活性化機序を解明することにより、新たな HIV 阻害剤の開発につながると考えられる。神奈木は HIV-1 非感染者由来の CD8 陽性 CTL が、抗原非特異的に HIV-1 感染 PBMC のウイルス産生を抑制し、その機序には Fas ligand 依存性の bystander killing によるもの

とウイルス複製後期段階の非傷害性抑制の両者が含まれ、前者の貢献は minor であることを明らかにした。この CTL 活性は、T 細胞性レセプター以外の CD8+CTL の細胞表面分子を介すると考えられる。昨年 David D. Ho さんも CD8 細胞由来の抗 HIV 因子の同定を報告しているが、soluble な物質であるため神奈木のものとは異なったものであることが予想される。CD8 細胞由来の抗 HIV 因子を同定できれば実用上の意義はきわめて大きい。また、志田は Rev の阻害剤を検索するための細胞評価系を構築し、14 物質の Rev 活性の阻害を示した。Rev-CRM1 または Rev-Rev の結合阻害、Rev の核外輸送に焦点を絞った抗 HIV 薬の開発は独自のものであり、新しい作用機構を持つ抗エイズ薬が開発される可能性がある。

本研究班の研究から、ヒト感染系に近い HIV 感染マウス、あるいは HIV 感受性マウスが作製され、実際に評価系として有効であることが証明されれば、抗 HIV 薬開発にきわめて重要な貢献をすることが期待される。

F. 研究発表

各分担研究報告書に掲載。

Ⅲ. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業） 分担研究報告書

エイズ治療薬開発のためのマウスモデルの開発

分担研究者：岩倉洋一郎（東京大学医科学研究所）

研究要旨

エイズ治療は HAART 治療法の導入により大きく前進したが、潜伏ウイルスの存在や薬剤耐性ウイルスの出現などの問題によって、まだ完全に治癒できるまでには至っていない。本研究では新しい治療法の開発に資するため、潜伏ウイルスの活性化機構について検討を加えると共に、新たなエイズモデルの開発を試みた。HIV 遺伝子導入トランスジェニック (Tg) マウスを HIV の潜伏感染モデルとして用いることにより、HIV の活性化には LTR U3 内の CREB/ATF 結合領域の脱メチル化が必要であり、脱メチル化は細胞周期依存性に起きることを明らかにした。この結果は、新たなエイズ治療法開発への手掛かりを与えるものである。また、より効率的な感染モデルの樹立を目指して、CyclinT1 や CRM1 の Tg を作製すると共に、HIV 感受性マウスの開発のため、宿主間バリアーとなっている感染過程を検討し、感染の核移行過程に問題があることを見いだした。この他、IL-16 欠損マウスの作製を試みると共に、CXCR4 欠損マウスを用いて、この分子が T 細胞の生存に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

1. 研究目的

抗 HIV 薬の開発に適した小動物エイズモデルを作製するために、HIV 感受性マウスの作製と共に、HIV キャリアーマウスの作製を試みている。また、これらのマウスを用いて、HIV の増殖機構や発症機構を解析すると共に、病態形成に関与する種々の宿主因子について、その生理的、病理的役割を明らかにすることを目指している。

1) HIV 感染モデルマウスを用いた HIV 遺伝子発現制御機構の解析

これまでに HIV ゲノム全長（逆転写酵素には欠失変異）を導入したトランスジェニック

(Tg) マウスを作製し (Δ pol-Tg)、このマウスが HIV のキャリアーモデルとして有用であることを示した (Iwakura et al., AIDS, 1992)。導入遺伝子の発現はリンパ細胞の他、筋肉や皮膚など、体の多くの細胞で認められ、このため、このマウスは Gag 蛋白質のリンパ細胞への蓄積のために白内障を発症する。ところが、リンパ球での発現は非常に低いことから、リンパ球では潜伏感染状態になっていることが分かった。しかし、このマウスに LPS を投与すると、T 細胞でも HIV 発現が誘導され、潜伏状態のウイルス活性化が見られることが分かった。この時、ウイルス活性化には TNF α 、および IL-1 が関与していることがわかっている (Tanaka

et al., AIDS, 2000)。このとき、T細胞で発現している HIV mRNA は正常であり、血中には RNA ゲノムを持ち、正常な沈降常数を持つウイルス粒子が認められ、その濃度は Gag 蛋白質にして 400 pg/ml に達した。従って、このマウスでは正常な蛋白構成を持つウイルス粒子の産生が起こっているものと考えられ、HIV 感染モデルとして利用できることがわかっている。

ところで、近年、HAART 治療により、多くの患者で AIDS の進行がくい止められるようになったが、治療を中断すると潜伏状態のウイルスの活性化が見られ、完治することは難しいことが分かっている。したがって、エイズを完全に治すためには、潜伏ウイルスを二度と活性化させないか、あるいは、HAART 治療中に潜伏ウイルスを活性化させて、強制的に感染細胞を殺すことが必要である。このような治療法を確立するためには、まず HIV の潜伏状態とその活性化のメカニズムを知ることが重要である。本感染モデルにおいては、全てのリンパ球において、クローナルな HIV 遺伝子の組込が起こっており、遺伝子活性化のメカニズムを解析するのにきわめて適した系である。本年度はこのマウスを用いて潜伏状態の HIV 遺伝子活性化機構を解析した。

2) hCRM1 及び hCyclin T1 トランスジェニックマウスの作製

最近、CyclinT1 が転写因子として HIV の転写に関与しており、この因子が宿主域バリアーの一因になっていることが示された。また、当研究班の班員の志田らは、CRM1 が HIV mRNA の核外輸送に関与しており、この因子も宿主域バリアーを構成している可能性を示唆した。そこで、本研究ではこれらの因子をヒト型化した Tg マウスを作製し、 Δ pol-Tg マウスと掛け合わせるにより、さらに発現効率の良いキャリアーモデルの作製を試みた。

既に我々は、 β -アクチンプロモーターの制御下にヒト CyclinT1 遺伝子を導入したマウス

を作製し、 Δ pol マウスと掛け合わせると HIV 遺伝子の転写効率が 1000 倍も亢進し、血中のウイルス粒子濃度は 9 ng/ml にも達することを観察している。しかし、HIV 遺伝子の発現が T細胞に限局せず、筋肉や皮膚などいろいろな臓器でみられ、エイズ感染者の発現状態と異なることが分かった。また、この Tg は生後 8 週齢までに半分以上のマウスが死亡するため、成体での遺伝子発現や免疫機能の解析が困難であった。そこで、実際の感染者により近いモデルを作製するため、T細胞特異的な CD4 プロモーターや Ick プロモーターを用いたヒト CyclinT1 Tg 及びヒト CRM1 遺伝子の Tg を作製し、粒子産生の効率を上げることを試みた。

3) マウス細胞に於ける HIV 宿主域バリアー過程の解析

HIV 感受性マウスを作製するために、マウス細胞に於ける HIV 宿主域バリアー過程の同定を試みた。これまでヒト CD4 遺伝子、ヒト CCR5 遺伝子、ヒト CCR3 遺伝子、ヒト CXCR4 遺伝子、などを導入した Tg マウスを作製した。しかしながら、これらのマウス T細胞にウイルスは侵入するものの、増殖は認められず、さらにヒト CyclinT1 を導入しても同様であった。従って、これらの事実はレセプター、転写因子以外に宿主域バリアーとなるステップが存在することを示唆する。我々は、 Δ pol-Tg マウスにおいて明らかにウイルス粒子の産生が認められることから、このバリアー過程は主として宿主染色体への組込みが起こる前であると考え、感染前期過程に焦点を絞り、ヒト細胞とマウス細胞で感染各過程の効率を比較検討した。

4) IL-16 遺伝子ノックアウトマウスの作製

CD4 や CXCR4 は HIV のレセプターであり、これらのレセプターの機能を阻害する薬剤、あるいはペプチドはエイズ治療の大きなターゲットとなりうる。しかし、CD4 に対する抗体により HIV の結合を阻害することは HIV の感

染を阻害すると同時にリンパ球のアポトーシスを誘導し、また、すでに感染している細胞には効果が低いことから治療としてはあまり有効ではないことがわかっている。IL-16 は CD8+T 細胞によって分泌される 121 アミノ酸残基のペプチドで、80 kDa の前駆体である pro-IL-16 が caspase-3 により切断されてできる。このサイトカインは HIV と同じく CD4 をレセプターとしており、HIV の entry を拮抗的に阻害することが知られている。また、IL-16-CD4 のシグナルは HIV 遺伝子の複製を抑制することから、HIV 感染細胞において IL-16-CD4 のシグナルが HIV 遺伝子の発現制御に関与している可能性が示唆されている。そこで、IL-16 の HIV 増殖に対する影響を検討するために、IL-16 ノックアウトマウスを作製することにした。この遺伝子はリンパ球以外に、脳でも発現しており、欠損マウスは胎生致死になる可能性が考えられたため、コンディショナルノックアウトマウスの作製を試みた。

5) CXCR4 の生理機能の解析

T 細胞上に発現している CXCR4 は HIV 感染時のコレセプターとして機能しており、CXCR4 に対する中和抗体及び拮抗的ペプチドを用いたエイズ治療が検討されている。また、CXCR4 のリガンドである SDF-1 からのシグナルがリンパ球細胞の分化、増殖に必須であることが明らかになり、そのシグナルが HIV の増殖に何らかの影響を及ぼす可能性が考えられる。また、CXCR4 の生体内での機能を明らかにすることは、CXCR4 をターゲットとする治療時に副作用を防ぎ、最大限の効果を得るためにも重要である。昨年度までの研究では CXCR4 のホモ欠損マウスは出産前後に死亡するため、コンディショナルノックアウトマウスを作製し、T 細胞特異的に CXCR4 遺伝子を欠損させたマウスでは T 細胞のアポトーシスが亢進し、免疫組織での T 細胞の数や割合が減少していることを明らかにした。今年度の研究では CXCR4 シグナルによるアポトーシス抑制のメカニズムを

解析するために、アポトーシス関連遺伝子の挙動を解析した。

2. 研究方法

1) HIV 感染モデルマウスを用いた、HIV 遺伝子発現制御機構の解析

Δ pol-Tg のリンパ節及び脾臓から比重遠心法によりリンパ球を単離した。そのリンパ球をメチル化阻害剤 5-Asa-2deoxycytidine (AzaC) 存在下あるいは非存在下で 48 時間 LPS 刺激あるいは無刺激後、ノーザンブロット解析により HIV mRNA 発現量を比較した。またその細胞の DNA を抽出後、HIV LTR U3 領域における CpG メチル化を亜硫酸塩ゲノムシーケンシング法により検討した。一方 Δ pol-Tg のリンパ球を carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) で染色後 48 時間 LPS 刺激し、細胞内 p24 を染色後フローサイトメトリー解析することで細胞周期と HIV 活性化の関係を調べた。またその細胞の DNA を抽出後、HIV LTR U3 領域における CpG メチル化を検討した。

2) hCRM1 及び hCyclin T1 トランスジェニックマウスの作製

ヒト CyclinT1、およびヒト CRM1 の cDNA を CD4 プロモーターにつないだ Tg コンストラクトを作製し (CD4-CyclinT1、CD4-CRM1)、2 種類の DNA を混合して C3H/HeN マウスの受精卵前核にマイクロインジェクション法により導入した。サザンブロットハイブリダイゼーション法により Tg マウスを確認した。Tg マウスの脾臓や胸腺から RNA を精製し、RT-PCR 法によりヒト CyclinT1 及びヒト CRM1 の発現を検討した。一方で HIV の遺伝子発現が、ヒト CyclinT やヒト CRM1 の発現により亢進しているかどうか検討するために CD4-hCyclinT-hCRM1 マウスと Δ pol-Tg を交配させ、仔マウスの脾臓及び胸腺の RNA を用いたノーザンブロット解析を行った。

3) マウス細胞に於ける HIV 宿主域バリアー過程の解析

感染前期過程におけるバリアー過程を検討するために、ヒト細胞及びマウス細胞を用いて感染各過程の効率を比較検討した。ヒト細胞は健常人の Buffy-coat から比重遠心法により PBMC を単離し、一方、マウス細胞は脾臓から赤血球溶解法にてリンパ球を単離した。それぞれの細胞を PHA により一晩刺激後 1 週間 IL-2 存在下で培養したものを感染に用いた。ウイルスは envelope 欠損 HIV-1 を含む luciferase 発現ベクターと Amphotropic murine leukemia virus envelope (MuLV env) の発現ベクターを 293T 細胞に co-transfection して得られた pseudotype virus を用いた。逆転写過程及び核以降過程は感染後 1、2 日目の DNA を抽出し、逆転写前期、後期過程、核以降過程を特異的に検出するプライマーを用いた PCR 法により評価した。またインテグレーション以降の過程は感染後 4 日目の細胞中に発現する luciferase 活性あるいは p24 量をルミノメーターあるいは ELISA により測定することにより評価した。

4) IL-16 遺伝子ノックアウトマウスの作製

IL-16 コンディショナルノックアウトマウスを作製するため、IL-16 遺伝子のエクソン 5 と 6 を loxP 配列で挟んだコンストラクトを作製し、E14. 1 の ES 細胞に導入し相同組み換えが起きた ES 細胞のみを単離した。得られた ES 細胞は細胞凝集法を用いてキメラマウスの作製を行っている。

5) CXCR4 の生理機能の解析

T 細胞特異的に CXCR4 遺伝子を欠損させたマウスの胸線細胞抽出液に対して Bcl-xl、PKB などに対する抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。また、胸線細胞内の Bcl-2 の発現量はフローサイトメトリー法を用いて検討した。

3. 結果と考察

1) HIV 感染モデルマウスを用いた、HIV 遺伝子発現制御機構の解析

昨年 Δ pol-Tg を LPS で刺激すると HIV 遺伝子の発現が亢進することを報告した。 Δ pol-Tg の染色体上の HIV LTR U3 領域を調べたところ、ほぼ完全にメチル化されていることが分かった。ところが、LPS 処理を行うと、選択的に LTR U3 内の CREB/ATF 結合領域のメチル化がはずれることが分かった。また Δ pol-Tg のリンパ球をメチル化阻害剤である AzaC 存在下で LPS 刺激したところ、AzaC 濃度依存的に HIV の発現が亢進することがわかった (図 1)。従って、HIV 遺伝子の LTR U3 内の CREB/ATF 結合領域の脱メチル化が HIV 遺伝子の発現亢進に関与することが示唆された。一方 Δ pol-Tg のリンパ球を CFSE 染色及び LPS 刺激後、p24 Gag の発現を調べたところ、LPS 刺激後の HIV 遺伝子の発現は細胞分裂を起こした細胞で高いことが示された (図 2)。更に細胞分裂を経た細胞では LTR U3 における CREB/ATF 結合領域の脱メチル化が起きていることが分かった。この結果、LPS による HIV 遺伝子発現誘導には CREB/ATF 結合領域の脱メチル化が必要であり、脱メチル化は細胞周期依存性に起きることが明らかとなった (図 3)。

2) hCRM1 及び hCyclin T1 トランスジェニックマウスの作製

CD4-hCyclinT1 と CD4-CRM1 の Tg コンストラクトを導入した受精卵から 103 匹のマウスが得られ、その内 5 匹が hCyclin T1 と hCRM1 を持つ Tg であった (CD4-hCyclinT1-hCRM1)。5 系統の F0 マウスと野生株マウスを交配させた結果、全ての系統において F1 マウスが得られた。導入遺伝子の発現を Tg マウスの脾臓や胸線から精製した RNA を用いた RT-PCR 法で確認し、発現量の高いライン 2 系統を Δ pol マウスとの交配に用いた。仔マウスの RNA を用いたノーザンブロッティ

ング解析を行った結果、LPS 無刺激では Δ pol Tg マウスでもダブル Tg マウスでも HIV 遺伝子発現が低く、HIV RNA のバンドが確認できなかった。CD4 プロモーターによって制御される hCRM1 及び hCyclin T1 の発現が十分ではない可能性が考えられる。LPS 刺激時の HIV 遺伝子発現に及ぼす hCyclinT1 や hCRM1 の機能を現在検討している。導入遺伝子の強発現を目的に CD4 プロモーター以外に lck proximal プロモーターを用いた Tg マウスを作製し、現在 5 系統の F0 マウスが確認できた。ノーザンプロッティング解析で導入遺伝子の強い発現が確認できたため、現在 Δ pol-Tg マウスとの交配を進めている。

3) マウス細胞に於ける HIV 宿主域バリアー過程の解析

MuLV env を持つシュードタイプウイルスをヒト及びマウス細胞に感染させた結果、感染 1、2 日目における逆転写過程産物は前期、後期共にマウス細胞においても十分に観察された。しかし核移行産物を検出するための PCR の結果、マウス細胞において核移行産物はほとんど検出されず、核移行過程に問題があることが明らかとなった。また感染 4 日目のマウス細胞内におけるルシフェラーゼ活性及び p24 は殆ど検出されなかった。以上の結果より、マウス細胞における HIV 感染のバリアー過程は核移行過程にあることが示唆された。

4) IL-16 遺伝子ノックアウトマウスの作製

caspase 3 の切断部位であるエクソン 5 及びエクソン 6 を loxP 配列で挟んだノックアウトコンストラクトを作製し、ES 細胞のスクリーニングを行った。複数の相同組み換え体を得られ、現在キメラマウスの作製を行っている。loxP 配列を持つ IL-16 のノックインマウスが得られ次第、lck-Cre-Tg マウスなどのリンパ球系特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Tg マウスと掛け合わせ、生体における IL-16 の機能に

対する検討を行う。また、IL-16 の HIV 遺伝子発現や増殖に及ぼす影響を調べるために Δ pol との交配を行う予定である。

5) CXCR4 の生理機能の解析

T 細胞特異的に CXCR4 遺伝子を欠損させたコンディショナル KO マウスでの T 細胞減少の原因を明らかにするためにアポトーシス関連遺伝子に対する解析を行った。胸腺由来の T 細胞を Bcl-2 や Bcl-xl に対する抗体を用いたウエスタンブロット法やフローサイトメトリー法により解析した結果、KO マウスとワイルドタイプマウスの間には差を認められなかった。また、SDF-1/CXCR4 からのシグナルの下流に存在し、アポトーシスに対して抑制的に働くことが知られている PKB タンパク質のリン酸化においても、KO マウスとワイルドタイプマウスの間には差が認められなかった。CXCR4 の発現低下によって T 細胞のアポトーシスが亢進の原因を解明することが、エイズ患者における CD4 陽性細胞減少の機構解明につながると考えられる。よって CXCR4 のコンディショナル KO マウスにおいてアポトーシスに関与する因子を探索し、これを不活性化することがエイズ治療につながる可能性がある。今後、今回検討した因子以外のアポトーシス関連タンパクの関与を検討する予定である。また、SDF-1/CXCR4 からのシグナルがウイルス遺伝子の発現に何らかの影響を与える可能性が考えられるため、CXCR4 ノックアウトマウスと Δ pol-Tg との交配を行い、HIV 遺伝子発現への影響を検討する予定である。

4. 結論

HIV 遺伝子導入 Tg マウスを HIV の潜伏感染モデルとして使い、HIV の活性化には LTR U3 内の CREB/ATF 結合領域の脱メチル化が必要であり、脱メチル化は細胞周期依存性に起きることを明らかにした (Tanaka et al., AIDS, 2002)。この結果は、新たなエイズ治療法開発

への手掛かりを与えるものである。また、より効率的な感染モデルの樹立を目指して、CD4 プロモーターや Ick プロモーターを用いた CyclinT1 や CRM1 の Tg を作製し、HIV(Δ pol)Tg マウスとの掛け合わせを行った。これらのマウスにおいて、恒常的な HIV 遺伝子発現が認められれば、エイズ病態解析や治療薬開発のスクリーニング系として有用であると考えられる。この他、HIV 感受性マウスの開発のため、宿主間バリアーとなっている感染過程を検討し、感染の核移行過程に問題があることを見いだした。また、CXCR4 欠損マウスを用いて、この分子がT細胞の生存に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

5. 研究発表

1. Yokoyama, H., Yasuda, J., Okamoto, H., and Iwakura, Y. Pathological changes of renal epithelial cells in mice transgenic for the TT virus ORF1 gene. *J. Gen. Virol.*, **83**, 141-150 (2002).
2. Saijo, S., Asano, M., Horai, R., Yamamoto, H., and Iwakura, Y. Suppression of autoimmune arthritis in IL-1-deficient mice in which T cell activation is impaired due to low levels of CD40L and OX40 expression on T cells. *Arth. Rheum.*, **46**, 533-544 (2002).
3. Kakuta, S., Tagawa, Y., Shibata, S., Nanno, M., and Iwakura, Y. Inhibition of B16 melanoma experimental metastasis by interferon-g through direct inhibition of cell proliferation and activation of anti-tumor host mechanisms. *Immunology*, **105**, 92-100 (2002).
4. Brough, D., LeFeuvre, R. A., Iwakura, Y., and Rothwell, N. J. Purinergic (P2X7) receptor activation of microglia induces cell death via an interleukin-1-independent mechanism. *Mol. Cell Neurosci.*, **19**, 272-280 (2002).
5. Nagai, Y., Shimazu, R., Ogata, H., Akashi, S., Sudo, K., Yamasaki, H., Hayashi, S., Iwakura, Y., Kimoto, M., and Miyake, K. Requirement for MD-1 in cell surface expression of RP105/CD180 and B-cell responsiveness to lipopolysaccharide. *Blood*, **99**, 1699-1705 (2002).
6. Kyuwa, S., Shibata, S., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Machii, K., and Urano, T. Acute hepatic failure in IFN-g-deficient BALB/c mice after murine coronavirus infection. *Virus Research*, **83**, 169-177 (2002).
7. Shinozawa, Y., Matsumoto, T., Uchida, K., Tsujimoto, S., Iwakura, Y., and Yamaguchi, K. Role of interferon-gamma in inflammatory responses in murine respiratory infection with *Legionella pneumophila*. *J. Med. Microbiol.*, **51**, 225-230 (2002).
8. Furuzawa, M., Kuwahara, M., Ishii, K., Iwakura, Y., and Tsubone, H. Diurnal variation of heart rate, locomotor activity, and body temperature in interleukin-1 alpha/beta doubly deficient mice. *Exp. Anim.*, **51**, 49-56 (2002).
9. Asahi, Y., Yoshikawa, T., Watanabe, I., Iwasaki, T., Hasegawa, H., Sato, Y., Shimada, S., Nanno, M., Matsuoka, Y., Ohwaki, M., Iwakura, Y., Suzuki, Y., Aizawa, C., Sata, T., Kurata, T. and Tamura, S. Protection against influenza virus infection in polymeric Ig receptor knockout mice immunized intranasally with adjuvant-combined vaccines. *J. Immunol.*, **168**, 2930-2938 (2002).
10. Battsetseg, B., Mamiro, K., Inoue, N., Makala, L., Nagasanw, H., Iwakura, Y., Toyoda, Y., Mikami, T., Fujisaki, K. Immune responses of interferon gamma (IFN-gamma) knock out mice to repeated *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae) nymph infestations. *J. Med. Entomol.*, **39**, 173-176 (2002).
11. Oguro, T., Takahashi, Y., Ashino, T., Takaki, A., Shioda, S., Horai, R., Asano, M., Sekikawa, K., Iwakura, Y., and Yoshida, T. Involvement of tumor necrosis factor α , rather than interleukin-1 or nitric oxides in the HEME

- Oxygenase-1 gene expression by lipopolysaccharide in the mouse liver. *FEBS Letters*, **516**, 63-66 (2002).
12. Asada, H., Kishida, T., Hirai, H., Satoh, E., Ohashi, S., Takeuchi, M., Kubo, T., Kita, M., Iwakura, Y., Imanishi, J., and Mazda, O. Significant antitumor effects obtained by autologous tumor cell vaccine engineered to secrete interleukin (IL)-12 and IL-18 by means of the EBV/lipoplex. *Molec. Therapy*, **5**, 609-616, (2002).
 13. Mizushima, H., Cheng, J-Z., Dohi, K., Horai, R., Asano, M., Iwakura, Y., Hirabayashi, T., Arata, S., Nakajo, S., Takaki, A., Ohtaki, H., and Shioda, S. Reduced postischemic apoptosis in the hippocampus of mice deficient in interleukin-1. *J. comparative Neurol.*, **448**, 203-216 (2002).
 14. Yamamoto, S., Oka, S., Inoue, M., Shimuta, M., Manabe, T., Takahashi, H., Miyamoto, M., Asano, M., Sakagami, J., Sudo, K., Iwakura, Y., and Kawasaki, T. Mice deficient in nervous system-specific carbohydrate epitope HNK-1 exhibit impaired synaptic plasticity and spatial learning. *J. Biol. Chem.*, **277**, 27227-27231 (2002).
 15. Nagai, Y., Akashi, S., Nagafuku, M., Ogata, M., Iwakura, Y., Akira, S., Kitamura, T., Kosugi, A., Kimoto, M., and Miyake, K. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat. Immunol.*, **3**, 667-672 (2002).
 16. Sasaki, S., Omoe, K., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Sekikawa, K., Shinagawa, K., and Nakane, A. Roles of gamma interferon and tumor necrosis factor-alpha in shiga toxin lethality. *Microb. Pathog.*, **33**, 43-47 (2002).
 17. Konishi, H., Tsutsui, H., Murakami, T., Yumikura-Futatsugi, S., Yamanaka, K., Tanaka, M., Iwakura, Y., Suzuki, N., Fuchs, E. V., Takeda, K., Akira, S., Nakanishi, K., and Mizutani, H. IL-18 contributes to the spontaneous development of atopic dermatitis-like inflammatory skin lesion independently of IgE/stat6 under specific pathogen-free conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 11340-11345 (2002).
 18. Ishida, Y., Kondo, T., Ohshima, T., Fujiwara, H., Iwakura, Y., and Mukaida, N. A pivotal involvement of IFN-gamma in the pathogenesis of acetaminophen-induced acute liver injury. *FASEB J.*, **16**, 1227-1236 (2002).
 19. Minami, M., Kita, M., Yan, X.-Q., Yamamoto, T., Iida, T., Sekikawa, K., Iwakura, Y., and Imanishi, J. Role of IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha in herpes simplex virus type I infection. *J. Interferon Cytokine Res.*, **22**, 671-676, (2002).
 20. Shiraishi, K., Hanada, K., Iwakura, Y., and Ikeda, H. Roles of RecJ, RecO, and RecR in RecET-mediated illegitimate recombination in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **184**, 4715-4721 (2002).
 21. Mizuki, M., Nakane, A., Sekikawa, K., Tagawa, Y.-I., and Iwakura, Y. Comparison of host resistance to primary and secondary *Listeria monocytogenes* infections in mice by intranasal and intravenous routes. *Infect. Immun.*, **70**, 4805-4811 (2002).
 22. Iwakura, Y. Roles of IL-1 in the development of rheumatoid arthritis: Consideration from mouse models. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **13**, 341-355 (2002).
 23. Yan, X., Kita, M., Minami, M., Yamamoto, T., Kuriyama, H., Ohno, T., Iwakura, Y., and Imanishi, J. Antibacterial effect of Kambo herbal formulation Hochu-ekki-to (Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang) on *Helicobacter pylori* infection in mice. *Microbiol. Immunol.*, **46**, 475-482 (2002).
 24. Nakae, S., Komiyama, Y., Nambu, A., Sudo, K., Iwase, M., Homma, I., Sekikawa, K., Asano, M., and Iwakura, Y. Antigen-specific T cell

- sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, resulting in the suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity*, **17**, 375-387 (2002).
25. Sakamaki, K., Inoue, T., Asano, M., Sudo, K., Kazama, H., Sakagami, J., Sakata, S., Ozaki, M., Nakamura, S., Toyokuni, S., Osumi, N., Iwakura, Y. and Yonehara, S. *Ex vivo* whole-embryo culture of caspase-8-deficient embryos normalize their aberrant phenotypes in the developing neural tube and heart. *Cell Death and Differentiation*, in press.
 26. Kakuta, S., Shibata, S., and Iwakura, Y. Genomic structure of the mouse 2', 5'-oligoadenylate synthetase gene family. *J. Interferon Cytokine Res.*, **22**, 981-993 (2002).
 27. Oguri, S., Motegi, K., Iwakura, Y., and Endo, Y. Primary role of interleukin-1a and Interleukin-1b in lipopolysaccharide-induced hypoglycemia in mice. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **9**, 1307-1312 (2002).
 28. Yoshida, M., Shirai, Y., Watanabe, T., Yamori, M., Iwakura, Y., Chiba T., Kita, T., and Wakatsuki, Y. Differential localization of colitogenic Th1 and Th2 cells monospecific to a microflora-associated antigen in mice. *Gastroenterology*. **123**, 1949-1961 (2002).
 29. Desaki, M., Sugawara, I., Iwakura, Y., Yamamoto, K., and Takizawa, H. Role of interferon-gamma in the development of murine bronchus-associated lymphoid tissues induced by silica *in vivo*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **185**, 1-7 (2002).
 30. Yano, A., Mun, H.S., Chin, M., Norose, K., Hata, K., Kobayashi, M., Aosai, F., and Iwakura, Y. Roles of IFN-gamma on stage conversion of an obligate intracellular protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*. *Int. Rev. Immunol.*, **21**, 405-421 (2002).
 31. Kurisaki, T., Masuda, A., Sudo, K., Sakagami, J., Higashiyama, S., Matsuda, Y., Nagabukuro, A., Tsuji, A., Nabeshima, Y., Asano, M., Iwakura, Y., and Sehara-Fujisawa, A. Phenotypic analysis of Meltrin a (ADAM12)-deficient mice: involvement of Meltrin a in adipogenesis and myogenesis. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 55-61 (2003).
 32. Ikegaya, Y., Delcroix, I., Iwakura, Y., Matsuki, N., and Nishiyama, N. Interleukin-1b abrogates long-term depression of hippocampal CA1 synaptic transmission. *Synapse*, **47**, 54-57 (2003).
 33. Nakae, S., Komiyama, Y., Narumi, S., Sudo, K., Horai, R., Tagawa, Y., Sekikawa, K., Matsushima, K., Asano, M., and Iwakura, Y. IL-1-induced TNF α elicits inflammatory cell infiltration in the skin by inducing interferon- γ -inducible protein-10 in the elicitation phase of contact hypersensitivity response. *Int. Immunol.*, **15**, in press.
 34. Iwakura, Y. Autoimmune chronic inflammatory arthropathy in mice transgenic for the HTLV-I *tax* gene. *Gann Monograph*, in press.
 35. Nakae, S., Horai, R., Komiyama, Y., Nambu, A., Asano, M., Nakane, A., and Iwakura, Y. The role of IL-1 in the immune system. In "Cytokine Knockouts", (ed. G. Fantuzzi), Humana Press, Totowa, NJ, in press.
 36. Tanaka, J., Ishida, T., Choi, B.-I., Watanabe, T., Yasuda, J., and Iwakura, Y. Latent HIV-1 reactivation in transgenic mice requires cell cycle-dependent demethylation of CREB/ATF sites in the LTR. *AIDS*, **17**, 165-175 (2003).
 37. Li, H., Takeda, Y., Niki, H., Ogawa, J., Kobayashi, S., Kai, N., Akasaka, K., Asano, M., Sudo, K., Iwakura, Y., and Watanabe K. Aberrant responses to acoustic stimuli in mice deficient for neural recognition molecule NB-2. *Eur. J. Neurosci.*, **17**, 929-936 (2003).
 38. Sashinami, H., Nakane, A., Iwakura, Y., and Sasaki, M. Effective induction of acquired resistance to *Listeria monocytogenes* by