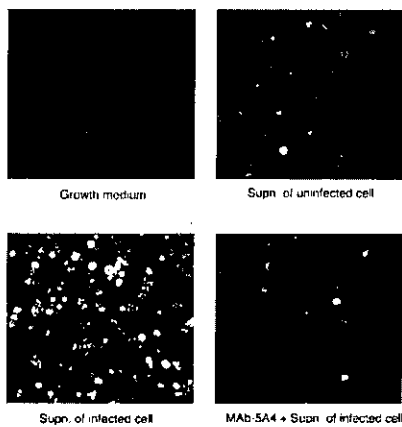


た cysteine-rich 領域はその活性に重要であると考え、亜鉛結合 cysteine-rich 領域を特異的に認識する単クローン抗体 MAb 5A4 を作出した。本抗体は亜鉛処理 Tat₂₀₋₄₁-MAP 抗原から誘導された抗体である。MAb 5A4 は亜鉛結合 Tat₂₀₋₄₁ ペプチドを認識し亜鉛未処理 Tat₂₀₋₄₁ ペプチドを認識しないというユニークな特徴を示した。本

Fig. 8 Effect of MAb 5A4 on Induction of Apoptosis of Jurkat Cells Induced by Supernatant of HIV-1-infected Molt4/CCR5 Cells



領域は亜鉛を結合することによってそのコンホメーションが大きく変化することが既に知られていることから、MAb 5A4 がコンホメーション特異的抗体であることが示唆された。さらに MAb 5A4 は培地に添加した組換え全長 Tat の示す HIV-LTR *trans*-activation 活性を阻害したことから、全長 Tat を認識しその活性を阻害することが示された。また、HIV-1 感染細胞から培地中にリリースされる細胞外 Tat 活性の検出系を構築し、本系における本抗体の効果を検討したところ、細胞外 Tat が関与する HIV-LTR *trans*-activation 活性および非感染細胞に対する apoptosis 誘導活性を阻害した。以上の結果から、細胞外 Tat

の cysteine-rich 領域は亜鉛結合した構造であり、また細胞外 Tat 活性を阻害するために有用なサイトであることが示唆された。先にも述べたが、cysteine-rich 領域は、著しく変異原性の高い HIV-1 の中でも高度に保存された領域の 1 つであることから、clade を超えた抗細胞外 Tat 制御戦略の分子標的となると考えられる。

E. 結論

細胞外 Tat の cysteine-rich 領域は亜鉛が結合した構造であり、本領域が細胞外 Tat 活性制御の分子内標的になることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I. 論文発表

論文発表

1. Misumi, S., Takamune, N., Ohtsubo, Y., Waniguchi, K., and Shoji, S. Zn²⁺ binding to cysteine-rich domain of extracellular human immunodeficiency virus type-1 Tat protein is associated with Tat protein-induced apoptosis. *AIDS Res. Hum.*

- Retroviruses.20, 297-304, 2004
2. Misumi, S., Endo, M., Mukai, R., Tachibana, K., Umeda, M., Honda, T., Takamune, N., Shoji, S. A novel cyclic peptide immunization strategy for preventing HIV-1/AIDS infection and progression. *J. Biol. Chem* 32335-32343, 278, 2003
 3. 三隅将吾、高宗暢暁、庄司省三, HIV-1 感染および病態進行を阻止する新規環状ペプチドワクチンの開発に向かって -HIV-1 コレセプターに対する自己抗体誘導による HIV-1 感染阻害-, *医学のあゆみ* 207, 67-72, 2003
 4. Misumi, S., Morikawa, Y., Tomonaga, M., Ohkuma, K., Takamune, N., and Shoji, S. Blocking of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Virion Autolysis by Autologous p2gag Peptide. *Journal of Biochemistry*. in press
- II. 学会発表
1. 高宗暢暁、三隅将吾、庄司省三. 細胞外 HIV-1 Tat 活性制御における亜鉛結合 cysteine-rich domain の重要性. 第 51 回 日本ウイルス学会学術集会・総会プログラム抄録集 317 p165 (2003)
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
- なし

厚生労働科学研究費補助金(エイズ対策研究事業)
「HIV 脳症の発症病態と治療法に関する研究」
分担研究報告書

HIV 脳症の発症を規定するウイルス因子、宿主因子と病態への作用機序

分担研究者 鹿児島大学大学院 人間環境学講座 医療システム情報学 宇宿 功市郎
共同研究者 鹿児島大学大学院 神経病学講座 神経内科・老年病学 斉藤 峰輝

研究要旨: HAM 患者、HTLV-I 感染未発症者(HC)において変異ウイルスの分子進化的解析を行い HIV のデータと比較した。HTLV-I プロウイルスの変異パターンはほとんどが転位(transition)であったが、HIV gag 領域においては、G→C の転換(transversion)変異も一定の割合で認められた。HC では高ウイルス量群、低ウイルス量群共に HAM 患者より HLA-A2 陽性群で約 5 倍、陰性群で約 1.5 倍 dN/dS 比(非同義アミノ酸置換/同義アミノ酸置換比)が高く、HTLV-I に対する生体内での選択圧の差、つまり CTL 機能の差を反映している可能性が示唆された。今回の方法は、今後 HIV 脳症の解析においても有用であると考えられる。

A. 研究目的

HIV 感染では HAART 療法導入後に AIDS そのものの発症が激減し、日和見感染による中枢神経合併症も減少している。しかしながら高齢もしくは高ウイルス量の HIV 感染者において感染期間の増加に伴う神経合併症の増加、特に HIV-1-associated dementia:HAD の増加が報告されている。本研究班では、我々がこれまでの研究で得た HTLV-I 関連脊髄症(HTLV-I-associated myelopathy:HAM)の発症関連ウイルス因子、宿主因子、細胞接着因子、細胞骨格因子の機能と病態への作用機構のデータを HTLV-I 感染者、HIV 感染者間で比較することにより、2 つのヒトレトロウイルス感染が各々の神経病態へどのように関与しているか、その違いを明らかにしていきたい。一方で HAART 療法後の神経合併症の有無を規定する免疫遺伝学的背景を検討することで、神経合併症発症に関連する宿主因子も明らかに出来ればと考えている。

本年度は特にウイルス側要因、宿主側要因について、HAM、HTLV-I 感染未発症者(HC)で得られた情報を、これまでに HIV 感染で報告されている情報と比較し、HIV 脳症を明らかにする基盤を得ることを目的に研究を行なった。

B. 研究方法

我々が過去に報告した HAM 発症に関連しているウイルス因子、宿主因子のうち特に HTLV-I プロウイルス量と HLA-A*02 に着目した。32 例の HTLV-I 感染者(HAM 患者 16 例、HC16 例)を HLA-A*02 保有者、非保有者 8 例ずつ 4 群にわけ

た後、各群をさらに HTLV-I プロウイルス量 2%で高プロウイルス量群、低プロウイルス量群にわけ、計 8 群を解析した。各 HAM 患者、HC の末梢血由来ゲノム DNA を用いて HTLV-I Tax の全長を増幅し、PCR product のサブクローン各々 20 クローン、総計 640 クローンの全塩基配列を決定した。これをもとに各患者に感染しているウイルスの祖先配列を求め、その祖先配列からの非同義置換(dN)と同義置換(dS)の置換距離を Nei and Gojobori の方法で計算し、dN/dS ratio から、HTLV-I プロウイルス量および HAM 発症抑制宿主因子(HLA-A*02)の HAM 発症に対する影響を考察した。さらに、HTLV-I プロウイルスの塩基置換パターンを、データベース上の HIV の塩基配列データと比較し、HIV 脳症発症機構解明への基礎データの収集を試みた。

(倫理面への配慮)

本研究は学内倫理委員会の承認を得て行われたものであり、検体の採取においては十分な情報の説明のちに同意を得て行われ、完全に匿名化された後に研究に使用している。

C. 研究結果

全体として HAM 患者は HC に比べて dN/dS ratio が低く、生体内でのウイルスの複製が HC と比較して抑制されていることが示唆された。一方、HLA-A02 の有無が dN/dS ratio に及ぼす影響の解析から、HLA-A02 陽性 HAM 患者の dN/dS ratio が陰性者より低く、HLA-A02 陽性 HAM 患者においてウイルスの複製がもっとも抑制されてい

ること、HLA-A02 陽性 HC の dN/dS ratio が陰性 HC より高く、HLA-A02 陽性 HC においてウイルスの複製がもっとも活発に行なわれていることが示唆された（高ウイルス量群、低ウイルス量群共に HAM 患者より HLA-A2 陽性群で約 5 倍、陰性群で約 1.5 倍）。

HTLV-I プロウイルスの変異パターンはほとんどが転位 (transition) であったが、HIV gag 領域においては、G→C の転換 (transversion) 変異も一定の割合で認められた。

D. 考察

今回の HAM、HC の検討から、HAM 患者においては主に感染細胞の増殖などのウイルスの複製以外の手段でウイルス量が増え、HC においては主にウイルスの複製によりウイルス量が増えていることが示唆された。また、HLA-A02 の有無が dN/dS ratio に直接影響することから、HTLV-I に対する生体内での選択圧の差、すなわち CTL 機能の差を反映している可能性が示唆された。

HIV 脳症は、HIV ウイルス量の高い群、更には脳内でのウイルス抑制が低い群での発症が示唆されており、HIV と HTLV-I で変異ウイルスの塩基置換パターン之差が認められたことは、各々のウイルスの神経病態への作用機構の差を考える上で極めて興味深い。

E. 結論

変異ウイルスの分子進化学的解析からは、HC では高ウイルス量群、低ウイルス量群共に HAM 患者より HLA-A2 陽性群で約 5 倍、陰性群で約 1.5 倍 dN/dS 比 (非同義アミノ酸置換/同義アミノ酸置換比) が高く、HTLV-I に対する生体内における高い選択圧を示唆しており、これが HAM と HC の CTL 機能の差を反映している可能性が示唆された。今回示した変異ウイルスの分子進化学的解析は、今後 HIV 脳症発症機序を解明する上で極めて有効な方法であると考えられる。

F. 健康危険情報

特にない。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Y. Furukawa, M. Saito, W. Matsumoto, K. Usuku, Y. Tanaka, S. Izumo, M. Osame.
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 187:1116-1125.

(2) M. Saito, V.M. Braud, P. Goon, E. Hanon, G.P. Taylor, A. Saito, N. Eiraku, Y. Tanaka, K. Usuku, J.N. Weber, M. Osame, C.R.M.

Bangham. Low frequency of CD94/NKG2A-positive T lymphocytes in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients but not in asymptomatic carriers. *Blood.* 2003 102(2):577-584.

(3) A.H. Sabouri, M. Saito, W. Matsumoto, D. Kodama, R. Farid, S. Izumo, K. Usuku, M. Osame. A C77G point mutation in CD45 exon 4, which is associated with the development of multiple sclerosis and increased susceptibility to HIV-1 infection, is undetectable in Japanese population. *Eur J Neurol.* 2003 10: 737-739.

(4)

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
特にない。

2. 実用新案登録
特にない。

3. その他
特にない。

表. HAM、HC における dN/dS 比

病態	HLA	ウイルス量	dN/dS ratio
HAM	A2+	高	0.3530351
		低	0.1564981
	A2-	高	1.3414263
		低	0.5335414
HC	A2+	高	1.6229691
		低	0.7993175
	A2-	高	0.8796749
		低	0.7729845

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
Baba M	Cellular factors as targets for anti-HIV-1 chemotherapy	Butera ST	HIV Chemotherapy: A Critical Review	Horizon Scientific Press/Cais ter Academic Press	Norfolk, UK	2004	印刷中
馬場昌範	人類とHIVとの攻防	臼井正彦, 薄井紀夫	眼科診療プラクティス	文光堂	東京	2003	136-137
馬場昌範, 平石勝也, 明石 満	超微粒子 (ナノスフェア) を用いた HIV感染予防ワクチンの開発	渡邊 武, 西村泰治, 丸山征郎	なおす免疫学	南山堂	東京	2003	93-104

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
Saito M, Nakagawa M, Kaseda S, Matsuzaki T, Jonosono M, Eiraku N, Kubota R, Takenouchi N, Nagai M, Furukawa Y, Usuku K, Izumo S, Osame M.	Decreased Human T Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I) Provirus Load and Alteration in T Cell Phenotype after Interferon-alpha Therapy for HTLV-I-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis.	J Infect Dis.	189	29-40	2004
出雲周二	HIV感染症, AIDS. 痴呆症学(2)	日本臨床	62巻	219-223	2004
Xing HQ, Moritoyo T, Mori K, Tadakuma K, Sugimoto S, Ono F, Hayakawa H, Izumo S.	Simian immunodeficiency virus encephalitis in the white matter and degeneration of the cerebral cortex occur independently in simian immunodeficiency virus-infected monkey.	J Neurovirol	9	508-518	2003
Hasui K, Takatsuka T, Sakamoto R, Matsushita S, Tsuyama S, Izumo S, Murata F.	Double autoimmunostaining with glycine treatment.	J Histochem Cytochem.	51	1169-1176	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	29-35	2003
Furukawa Y, Kubota R, Eiraku N, Nakagawa M, Usuku K, Izumo S, Osame M.	Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-related clinical and laboratory findings for HTLV-I-infected blood donors.	J Acquir Immune Defic Syndr.	32	328-334	2003

Kubota R, Furukawa Y, Izumo S, Usuku K, Osame M.	Degenerate specificity of HTLV-1-specific CD8+ T cells during viral replication in patients with HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP).	Blood	101	3074-3081	2003
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	17-21	2003
Furukawa Y, M. Saito, W. Matsumoto, K. Usuku, Y. Tanaka, S. Izumo, M. Osame.	Different cytokine production in Tax expressing cells between HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients and asymptomatic HTLV-I carriers.	J Infect Dis.	187	1116-1125	2003
Saito M, Braud V.M, Goon P, Hanon E, Taylor GP, Saito A, Eiraku N, Tanaka Y, Usuku K, Weber JN, Osame M, Bangham	CRM. Low frequency of CD94/NKG2A positive T lymphocytes in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients but not in asymptomatic carriers.	Blood	102(2)	577-584	2003
Sabouri AH, Saito M, Matsumoto W, Kodama D, Farid R, Izumo S, Usuku K, Osame M.	A C77G point mutation in CD45 exon 4, which is associated with the development of multiple sclerosis and increased susceptibility to HIV-1 infection, is undetectable in Japanese population.	Eur J Neurol	10	737-739	2003
Sugimoto C, Tadakuma K, Otani I, Moritoyo T, Akari H, Ono F, Yoshikawa Y, Sata T, Izumo S, Mori K.	Nef gene is required for robust productive infection by simian immunodeficiency virus of T-cell-rich paracortex in lymph nodes.	J Virol.	77	4169-4180	2003
Villinger F, Miller R, Mori K, Mayne AE, Bostik P, Sundstrom JB, Sugimoto C, Ansari A.	IL-15 is superior to IL-2 in the generation of long-lived antigen specific memory CD4 and CD8 T cells in rhesus macaques.	Vaccines	印刷中		
Villinger, F., Mayne A. F., Bostik P., Mori K., Jensen P. E., Ahmed R. Ansari, A.	Evidence for antibody mediated enhancement of SIVgag antigen processing and cross presentation in SIV infected rhesus macaques.	J Virol	77	10-24	2003
森 一泰、永井美之.	糖鎖とAIDSウイルス.	Molecular Medicine.	9	1062-1069	2003
岸田修二	HIV脳症	脳の科学	25	945-951	2003
頼高朝子、岸田修二	Acquired immunodeficiency syndrome(AIDS)にみられる脳疾患.	臨床医	29 (増刊号)	758-761	2003
船田伸顕	HIV-1と中枢神経病変	病理と臨床	21	139-144	2003
森山佐知子、船田伸顕	AIDSに合併する主な日和見感染症	病理と臨床	21	145-151	2003

Baba M	Inhibitors of HIV-1 gene expression and transcription	Curr. Topics Med. Chem.	印刷中		2004
Miyake A, Akagi T, Enose Y, Ueno M, Kawamura M, Horiuchi R, Hiraishi K, Adachi M, Serizawa T, Narayan O, Akashi M, Baba M, Hayami M	Induction of HIV-specific antibody response and protection against vaginal SHIV transmission by intranasal immunization with inactivated SHIV-capturing nanospheres in macaques.	J. Med. Virol.	印刷中		2004
Dutschman GE, Grill SP, Gullen EA, Haraguchi K, Takeda S, Tanaka H, Baba M, Cheng Y-C	A novel 4'-substituted analog with improved anti-HIV activity and decreased cytotoxicity	Antimicrob. Agents Chemother.	印刷中		2004
Haraguchi K, Itoh Y, Takeda S, Honma Y, Tabaka H, Nitanda T, Baba M, Dutschman GE, Cheng Y-C	Synthesis and anti-HIV activity of 4'-cyano-2',3'-didehydro-3'-deoxythymidine	Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids	印刷中		2004
Sawada H, Umedo M, Kawase T, Baba M, Tomita T	Synthesis and properties of fluoroalkyl end-capped sulfobetaine polymers	J. Appl. Polym. Sci.	印刷中		2004
Sawada H, Kawai Y, Kawase T, Inaba Y, Sugiya M, Baba M, Tomita T	Synthesis of fluoroalkyl end-capped oligomers containing pendant phosphinic and phosphonic acid segments - application to novel fluorinated bioactive polymers possessing antibacterial and anti-HIV-1 activities.	Int. J. Polym. Mater.	印刷中		2004
Imamura S, Ishihara Y, Hattori T, Kurasawa O, Matsushita Y, Sugihara Y, Kanzaki N, Iizawa Y, Baba M, Hashiguchi S	CCR5 antagonists as anti-HIV-1 agents. 1. Synthesis and biological evaluation of 5-oxopyrrolidine-3-carboxamide derivatives	Chem. Pharm. Bull.	52	67-73	2004
Haraguchi K, Takeda S, Tanaka H, Nitanda T, Baba M, Dutschman GE, Cheng Y-C	Synthesis of a highly active new anti-HIV agent 2',3'-didehydro-3'-deoxy-4'-ethynylthymidine.	Bioorg. Med. Chem. Lett.	13	3775-3777	2003
Mitsuo M, Noguchi T, Nakajima Y, Aoki S, Ren X-Q, Sumizawa T, Haraguchi M, Kobayashi M, Baba M, Nagata Y, Akiyama S, Furukawa T	Binding site(s) on P-glycoprotein for a newly synthesized photoaffinity analog of Agosterol A	Oncol. Res.	14	39-48	2003

Miyashita T, Baba M, Shigeta S, Mori M, Shinozuka K	Synthesis and anti- HIV-1 activities of novel 10-thiaisoalloxazines, a structural analog of C-5 and/or C-6 substituted pyrimidine acyclonucleoside	Chem. Pharm. Bull.	51	630-634	2003
Miyake H, Iizawa Y, Baba M	A novel reporter T-cell line highly susceptible to both CCR5- and CXCR4-using human immunodeficiency virus type 1 and its application to drug susceptibility tests	J. Clin. Microbiol.	41	2515-2521	2003
Sato K, Yamashita N, Baba M, Matsuyama T	Modified myeloid dendritic cells act as regulatory dendritic cells to induce anergic and regulatory T cells	Blood	101	3581-3589	2003
Sato K, Yamashita N, Yamashita N, Baba M, Matsuyama T	Regulatory dendritic cells protect mice from murine acute graft-versus-host disease and leukemia relapse	Immunity	18	1-20	2003
Okamoto M, Wang X, Debyser Z, De Clercq E, Baba M	Establishment of an in vitro assay system mimicking human immunodeficiency virus type 1-induced neural cell death and evaluation of inhibitors thereof	J. Virol. Methods	108	195-203	2003
Akagi T, Kawamura M, Ueno M, Hiraishi K, Adachi M, Serizawa T, Akashi M, Baba M	Mucosal immunization with inactivated HIV-1-capturing nanospheres induces a significant HIV-1-specific vaginal antibody response in mice	J. Med. Virol.	69	163-172	2003
Wang X, Furukawa T, Nitanda T, Okamoto M, Sugimoto Y, Akiyama S, Baba M	Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) induces cellular resistance to HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors	Mol. Pharmacol.	63	65-72	2003
馬場昌範, 明石 満	ナノ粒子を応用した抗エイズワクチンの開発研究	Bioベンチャー	4	72-74	2004
馬場昌範	抗HIV-1薬	臨床と微生物	30	581-588	2003
馬場昌範, 明石 満	エイズ経鼻ワクチンの開発 - ナノ粒子を用いたアプローチ	化学療法の領域	19	1757-1762	2003
馬場昌範	逆転写酵素阻害薬の新薬開発	現代医療	35	1323-1327	2003
金子達雄, 馬場昌範, 明石 満	高分子ナノスフェアを用いるエイズワクチンの開発	生物工学	81	182-186	2003

Iwasaki M, et al.	Tumor necrosis factor- α contributes to the development of allergic rhinitis in mice	J Allergy Clin Immunol	112 (1)	134-140	2003
Ito H, et al.	Role of Valpha 14 NKT cells in the development of impaired liver regeneration in vivo	Hepatology	38 (5)	1116-1124	2003
Fujigaki H, et al.	Genotyping of hepatitis C virus by melting curve analysis with SYBR green I	Ann Clin Biochem	印刷中		2004
Iwasaki M, et al.	Tumor necrosis factor-alpha from bone marrow-derived cells is not essential for the expression of adhesion molecules in lipopolysaccharide-induced nasal inflammation	Cytokine	21 (3)	129-136	2003
Kirii H, et al.	Lack of Interleukin-1 beta Decreases the Severity of Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice	Arterioscler Thromb Vasc Biol	23 (4)	656-660	2003
Kasahara S, et al	Lack of tumor necrosis factor alpha induces impaired proliferation of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes	J Virol	77(4)	2469-2476	2003
Misumi,S., Morikawa,Y., Tomonaga,M., Ohkuma,K., Takamune,N., and Shoji.S.	Blocking of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Virion Autolysis by Autologous p24gag Peptide.	Journal of Biochemistry	印刷中		2004
Misumi,S., Takamune,N., Ohtsubo,Y., Waniguchi,K., Shoji,S.	Zn ²⁺ binding to cysteine-rich domain of extracellular human Immunodeficiency virus type-1 Tat protein is associated with Tat protein-induced apoptosis.	AIDS Res. Hum. Retroviruses.	20	297-304	2004
Misumi ,S., Endo, M., Mukai, R., Tachibana, K., Umeda, M., Honda, T., Takamune, N., Shoji, S.	A novel cyclic peptide immunization strategy for preventing HIV-1/AIDS infection and progression.	J. Biol. Chem.	278	32335-32343	2003
三隅将吾、高宗暢暁、庄司省三	HIV-1 感染および病態進行を阻止する新規環状ペプチドワクチンの開発に向かって—HIV-1 コレセプターに対する自己抗体誘導による HIV-1 感染阻害—	医学のあゆみ	207	67-72	2003