

- protein-1-related protein of rat (rHIP1R) is localized in the postsynaptic regions. *Brain Res.* 967: 210-225, 2003
- Ohata, H., Tetsuka, T., Hayashi, H., Onozaki, K., and Okamoto, T.: 3-Methylcholanthrene activates human immunodeficiency virus type 1 replication via aryl hydrocarbon receptor. *Microbiol. Immunol.* 45: 363-370, 2003
- Teranishi, F., Liu, Z.-Q., Kunimatsu, M., Imai, K., Takeyama, H., Manabe, T., Sasaki, M., and Okamoto, T.: Calpain is involved in the HIV replication from the latently-infected OM10.1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303: 940-949, 2003
- Asamitsu, K., Kanazawa, S., Tetsuka, T., and Okamoto T.: RING finger protein AO7 supports the NF- $\kappa$ B-mediated transcription by interacting with the transactivation domain of p65 subunit. *J. Biol. Chem.* 278 : 26879-26887, 2003
- Kanazawa, S., Soucek, L., Evan, G., Okamoto, T. and Peterlin, B. M. : c-Myc recruits P-TEFb for transcription, cellular proliferation and apoptosis. *Oncogene* 22: 5707-5711, 2003
- Torigoe, T., Izumi, H., Yoshida, Y., Ishiguchi, H., Okamoto, T., Itoh, H., and Kohno, K.: Low pH enhances Sp1 DNA binding activity and interaction with TBP. *Nucleic Acids Res.* 31: 1-8, 2003
- Ando, K., Kanazawa, S., Tetsuka, T., Ohta, S., Jiang, X., Tada, T., Kobayashi, M., Matsui, N., and Okamoto, T.: Induction of Notch signaling by tumor necrosis factor in rheumatoid synovial fibroblasts. *Oncogene* 22 : 7796-7803, 2003
- Tozawa, K., Kawai, N., Hayashi, Y., Sasaki, S., Kohri K. and Okamoto, T. : Gold compounds inhibit adhesion of human cancer cells to vascular endothelial cells. *Cancer Lett.* 196:93-100, 2003
- Takahashi, N., Kobayashi, S., Jiang, X., Kitagori, K., Imai, K., Hibi, Y., and Okamoto, T. : Expression of 53BP2 and ASPP2 proteins from TP53BP2 gene by alternative splicing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315:434-438, 2004
2. 学会発表
- 岡本 尚、手塚俊文、浦西宏明、朝光かおり、小林真哉、金澤 智: NF- $\kappa$ B による転写制御とがん化促進機構. 第 62 回日本癌学会総会 2003 年 9 月 25 日~27 日 名古屋 シンポジウム
- 林 秀敏、塩谷和昭、瀧井猛将、岡本 尚、小野寄菊夫: ヒトメラノーマ細胞からの構成的 IL-1 $\alpha$ 発現機序の解析-GC rich 領域の関与. 第 62 回日本癌学会総会 2003 年 9 月 25 日~27 日 名古屋
- 朝光かおり、本田三男、岡本 尚: Tat 分子内でより保存されている領域の特定とその意義. 日本ウイルス学会第 51 回学術集会・総会 2003 年 10 月 27 日~29 日 京都
- 今井健一、岡本尚: HIV-1・Tat による OGG1 遺伝子のフィードフォワード活性化. 日本ウイルス学会第 51 回学術集会・総会 2003 年 10 月 27 日~29 日 京都
- 今井健一、岡本 尚: HIV・Tat による OGG1 遺伝子のフィードフォワード活性化. 第 17 回日本エイズ学会学術集会 2003 年 11 月 27 日~29 日 神戸
- Kenichi Imai, Takashi Okamoto : Feedforward Activation of 8-oxoguanine DNA Glycosylase 1 by HIV-1 Tat. 第 26 回日本分子生物学会年会 2003 年 12 月 10 日~13 日 神戸

Kaori Asamitsu, Kenji Nakata, Toshifumi Tetsuka, takashi Okamoto: RING finger protein AO7 supports the NF- $\kappa$ B-mediated transcription by interacting with the transactivation domain of p65 subunit. 第26回日本分子生物学会年会 2003年12月10日~13日 神戸

Takashi Okamoto, Naoko Takahashi, Shinya Kobayashi, Hiroaki Uranishi: 53BP2/ASPP2 and RAI as novel interacting proteins of NF- $\kappa$ B p65. 第26回日本分子生物学会年会 2003年12月10日~13日 神戸 シンポジウム

金澤 智, Matija Peterlin, 岡本 尚: 転写制御機構における転写活性化因子と転写伸長因子 (P-TEFb) の相互作用. 第26回日本分子生物学会年会 2003年12月10日~13日 神戸 シンポジウム

E. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

岡本 尚, 田中清隆, 長谷川順一: NF- $\kappa$ B 活性化抑制剤 (特願 2004-3727) (特願 2004-3728)

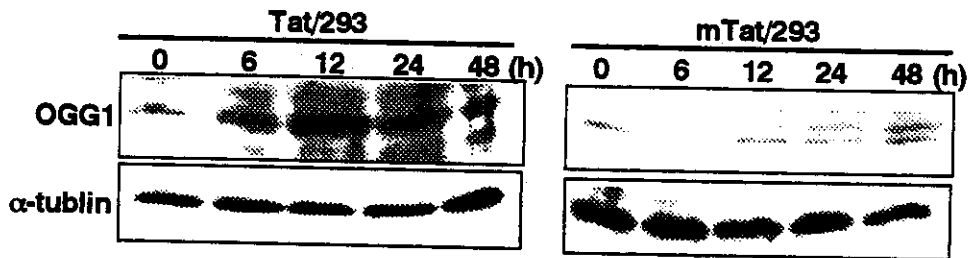


Fig. 1 Tat により OGG1 の誘導発現が起こるが、mTat ではその効果はない。

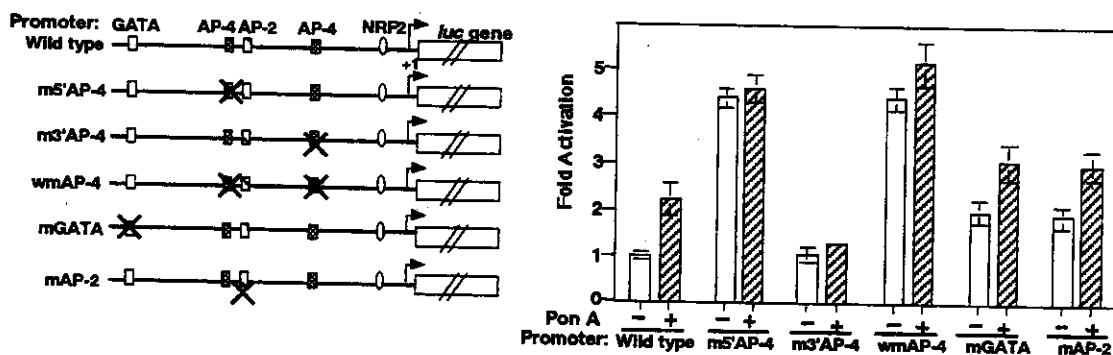


Fig. 2 OGG1 promoter の 5 末端側 AP-4 結合部位 (m5'AP-4) を変異させると、Tat の活性化作用が認められなくなり、basal level での OGG1 遺伝子の活性が上昇した。

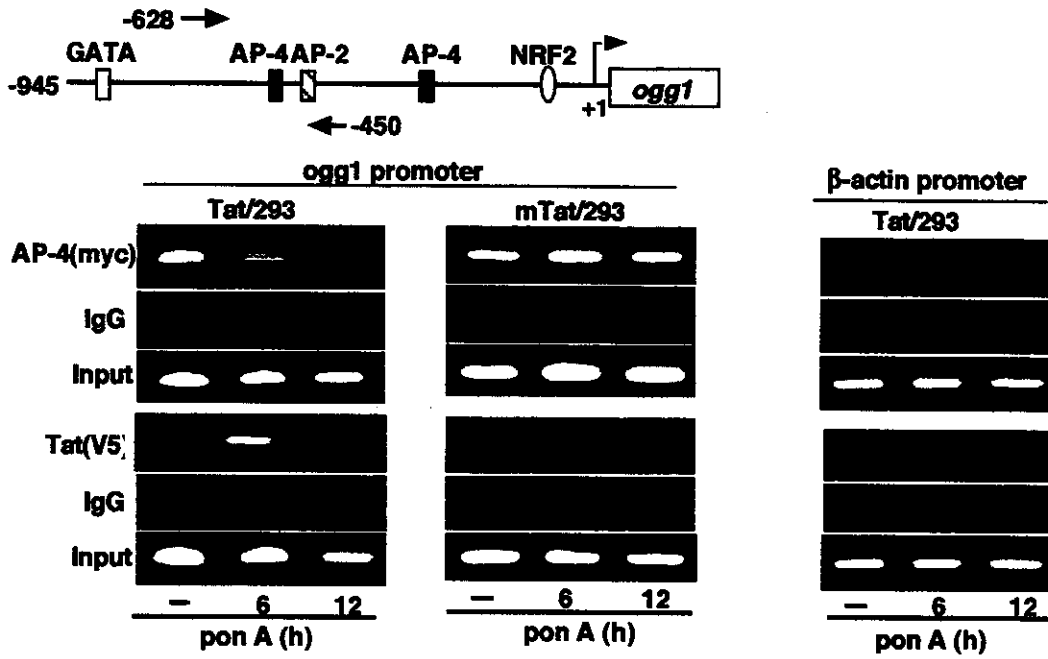


Fig. 3 ChIP assay の結果。Tat 発現に伴い AP4 の DNA との結合が消失した。

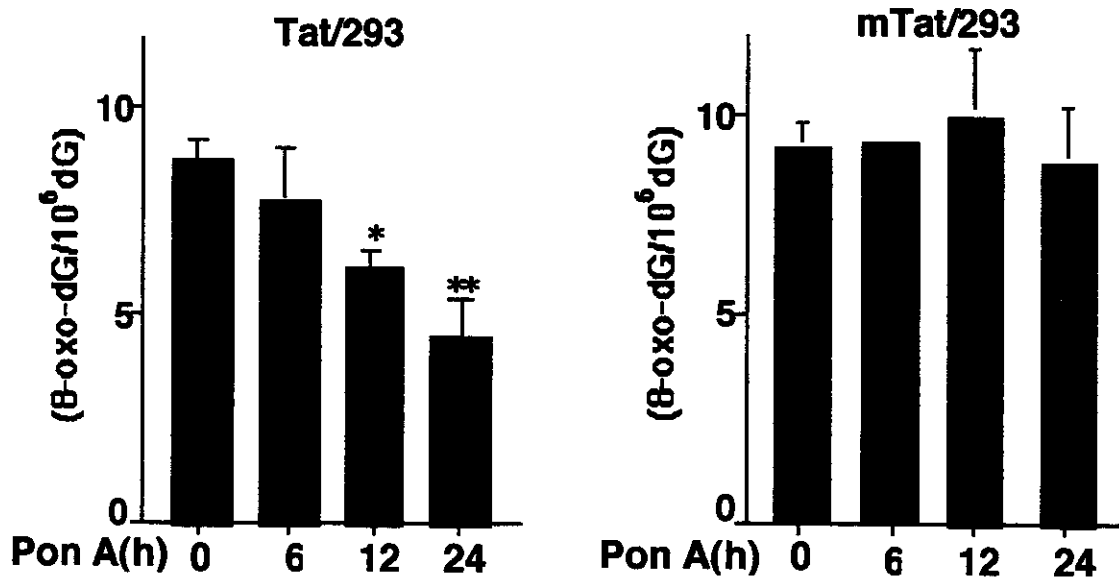


Fig. 4 Tat の発現にともない 8-oxo-dG 量が低下した。変異型 Tat 発現細胞においては変化がなかった。

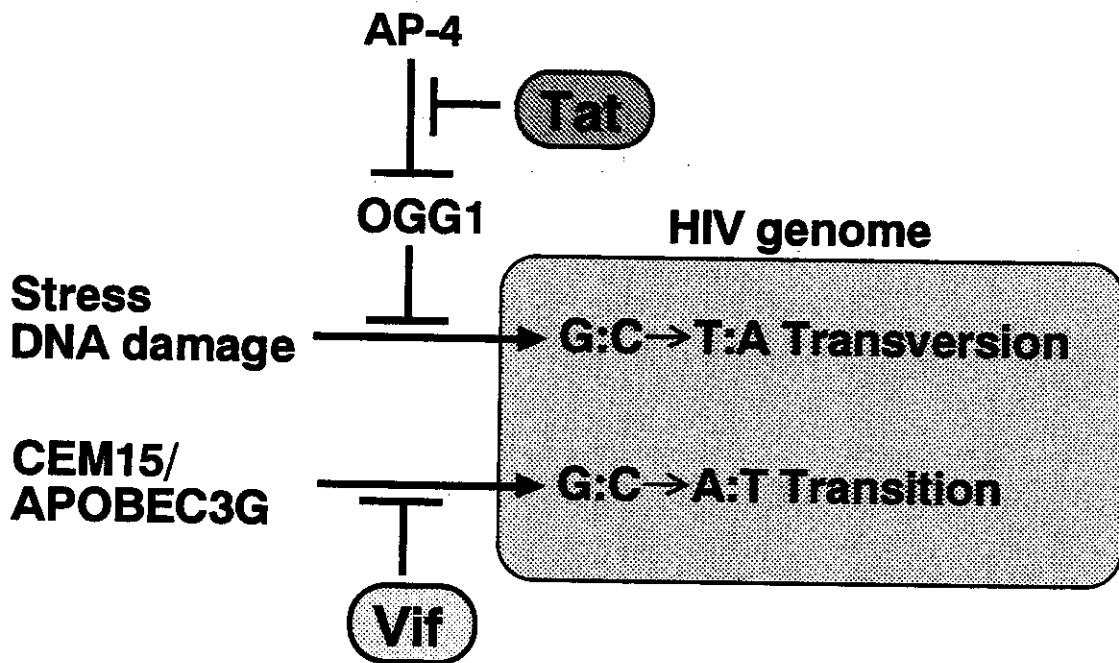


Fig. 5 Tat による HIV ゲノム保持機構。Tat は OGG1 転写抑制因子である AP4 の DNA 結合を抑えることによってあらかじめ OGG1 の発現を誘導し、HIV 複製に伴う酸化ストレスによる DNA 障害(G:C- $\rightarrow$ T:A transversion)を予め阻止している。他方、Vif は CEM15 作用を抑えることにより G:C- $\rightarrow$ A:T transition を抑制している。

## 抗原非特異的機序による HIV 複製の抑制

分担研究者 神奈木真理（東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科）

### 研究要旨

我々は非感染者由来の末梢血単核球(PBMC)から、抗原非特異的に HIV-1 複製を抑制する CD8+ アロ特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を誘導した。この CTL は自己細胞に傷害性を示さないが、HIV-1 株感染自己細胞に対してウイルス抑制活性を持つ。従って、この抑制は HIV-1 特異的 CTL の細胞傷害活性とは異なる機序による。昨年度は、1 サイクルの HIV-1 複製しか起こさない pseudotype virus を用いた解析から、この CTL による抑制は 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た。また、CTL は HIV-1 感染細胞に対して Fas ligand 依存性の bystander killing を低レベルに示すが、CTL による HIV-1 抑制メカニズム全体に占める役割は軽微であった。本年度は、さらに複数のドナーからこのような CD8 陽性 CTL を 3 株樹立し活性を調べたところ、3 株とも自己 PBMC との混合培養によって HIV-1 抑制活性を示した。しかし、その上清が HIV-1 抑制活性を示したのは 1 株のみであった。CTL 上清による抑制は X4 あるいは R5 親和性の両 HIV-1 株に対して有効であり、ケモカインやインターフェロン、デフェンシンに対する抗体で中和されず、明らかな細胞毒性は認められなかった。CTL を無血清培地中で培養した上清をゲルフィルトレーションにより分画したところ、HIV-1 抑制活性を保持した fraction が認められた。さらに責任蛋白の単離・精製を行い、HIV-1 抑制因子の同定作業を行っている。本因子は、今後生物学的な抗 HIV-1 薬としての開発可能性を持つ。

### 1. 研究目的

我々は、非感染者由来の末梢血単核球 (PBMC) から、HIV-1 複製に抑制能を持つ CD8+ T 細胞株を誘導した。これはアロ特異的細胞傷害性 T 細胞(CTL)であり、HIV-1 抗原特異性は無く自己細胞にも傷害性を示さないが、HIV-1 感染自己細胞に対してウイルス抑制活性を持つ。この活性は、生物学的な抗 HIV-1 薬としての可能性を持っている。本研究は、この CD8+CTL の HIV-1 抑制メカニズムの解明を目的とした。本年度は、複数の CTL 株の中から上清中に抑制活性を示すものを見だし、抑制因子の分画精製を行った。

### 2. 方法

#### 1) 健康人由来アロ抗原特異的 CD8 陽性 CTL

株：

3 人の健康人 PBMC をマイトマイシン C 処理した Raji 細胞で刺激し、特異的に増殖する細胞群から CD4+細胞を除去し IL-2 依存性の CD8+細胞株を樹立した。この細胞株は Raji 細胞を認識して殺すが自己細胞とは反応しないアロ特異的 CTL であることを確認している。この CTL 株は、IL-2 存在下で培養し定期的に Raji 刺激を加え維持した。

#### 2) HIV-1 感染 PBMC に対する HIV-1 抑制：

細胞接触を介する抑制活性の検出には、CTL と同一ドナー由来の PHA 刺激 PBMC の CD8+細胞除去分画に 2 時間 HIV-1 感染後、CTL と 4 日間混合培養し上清中 HIV-1 p24 量を ELISA により測定した。細胞上清中の抑制活性の検出には、PHA 刺激 CD4+PBMC に 2 時間 HIV-1 感染させた後、同体積の CTL

上清を加え 4 日後の HIV-1 p24 量を測定した。

### 3) CTL 培養上清の分画：

CTL 培養上清は、CTL を抗原刺激後 IL-2 存在下に種々の期間培養し、遠心した上清を 0.25 $\mu$ m フィルターを通したものをを用いた。精製上不都合となるアルブミンの影響を除くため、血清を含まない培地で CTL を培養した上清も用いた。上清の粗分画と濃縮は分子量 50K および 10K のセントリコン tube を用いて行った。ゲル濾過カラムによる分画は HPLC を用いて行い、得られた分画の濃縮はセントリコン tube を用いて行った。各分画の HIV-1 抑制活性は、感染 PBMC 培養へ添加した際の HIV-1 p24 量で判定した。

### 4) CTL 由来蛋白のプロテオーム解析：

HIV-1 抑制活性のある CD8<sup>+</sup> CTL と対照細胞の抽出蛋白を二次元電気泳動で展開しクマシブルー染色した後、両者を比較し、量に変化の見られた蛋白スポットをゲルから切り出し、質量分析（トリプシン消化、MALDI-MS）を行った。

## 3. 結果

3 株のアロ特異的 CD8 陽性 CTL は、いずれも HIV-1 感染させた PHA 刺激自己 PBMC と混合培養すると、HIV-1 産生を著明に抑制した。しかし、上清に HIV-1 抑制活性が認められたのは、3 株中 1 株だけであった。CTL 上清による HIV-1 抑制効果は、F5-、X4 HIV-1 株の両者に対して有効であった。また、既知の HIV-1 抑制因子である RANTES, MIP1- $\alpha$ ,  $\beta$ , SDF、インターフェロン $\alpha$ ,  $\beta$ 、Defensin に対する特異抗体を添加しても CTL 上清による抑制は解除できなかった。

昨年、細胞接触を介して HIV-1 抑制活性を示す CTL が Fas ligand 依存性の弱い細胞傷害活性を持っているが、Fas ligand 中和抗

体では HIV-1 抑制活性の大勢に影響しなかったことを示す結果を得た。そこで、今回得られた CTL 上清による HIV-1 抑制についても同様の実験を行った。その結果、Fas ligand に対する中和抗体の存在下で HIV-1 産生量は軽度には増加したが抑制の大部分は保たれていた。従って、CTL 上清に含まれる Fas ligand は HIV-1 抑制の一部を担っているが、major なメカニズムではないと考えた。また、CTL 上清には明らかな細胞傷害活性は認められなかった。

次に、この CTL 上清中の抑制因子の分画を試みた。セントリコンで、>50K、10K~50K、<10K に分けた場合、抑制活性は >50K 以上の分画に認められた。<10K の分画にも抑制が認められたが、これは FCS の濃度変化によるものと考えられた。FCS の影響を除くため、無血清培地で CTL を培養したところ HIV-1 抑制活性が残存することが確認されたので、以後、この上清を用いた。ゲル濾過カラムを用いて分画したところ、14 番目の fraction (60K 前後) に強い HIV-1 抑制活性が認められた。一方、細胞膜に付随する CTL の HIV-1 抑制分子の候補を調べるため、CTL 抽出蛋白を 2 次元展開しプロテオーム解析を試みた。この結果、コントロール細胞と異なる泳動パターンを示した幾つかのスポットをピックアップしたが、その多くは未知の蛋白であった。

## 4. 考察

昨年度の研究結果から、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、pseudotype virus を用いた解析から、主に 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た。また、Fas ligand 依存性の bystander killing も認められたが HIV-1 抑制の全体に対する貢献は少なかった。本年度、別の非感染者からも CD8

陽性 CTL 株を樹立し同様の HIV-1 抑制活性を確認したが、そのうち一株は HIV-1 抑制性の液性因子をも産生していた。この液性因子は、HIV-1 持続感染細胞からの HIV-1 産生に対しては抑制が認められないことから、細胞性因子とは異なるメカニズムで HIV-1 複製を抑制していると考えられた。ケモカイン、IFN 等の中和抗体では影響が見られなかったが、Fas ligand 中和抗体で抑制がわずかに解除されたため、FasL が抑制機序の一部を担うが本体ではないと思われる。これは、昨年度の結果とも一致する。従って、今回得られた CTL 上清には別の因子が含まれると考え、カラム精製分離の後、蛋白の同定と抑制活性の確認を行うことにより新たな抑制因子が得られる見通しである。細胞側の因子についても解析を進めている。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、今後抗 HIV-1 効果を有する新たな生物学的治療薬としての意義を持っている。また、このような活性を生体レベルでの誘導することによっても、HIV-1 初感染時の生体内ウイルス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。

## 5. 結論

F5、X4 両 HIV-1 株の複製を抑制する CD8 陽性 CTL を HIV-1 非感染者から樹立した。さらに、細胞接触依存性の HIV-1 抑制を示す株と抑制活性を持つ液性因子 (CAF) を産生する株を得た。液性因子は 60Kda 前後の fraction に存在し精製中である。CD8+CTL の細胞表面分子とともに、今後、生物学的な抗 HIV-1 薬としての開発可能性を持つと考えられる。

## 6. 研究発表

### 1. 論文発表

- i) H. Liu, T. Ohashi, T. Masuda, X. Zhou, M. Kubo, M. Kannagi. Suppression of HIV-1-replication by HIV-1-irrelevant CD8+ cytotoxic T lymphocytes resulting in preservation of persistently HIV-1-infected cells in vitro. *Viral Immunol.* 16: 381-393, 2003.
- ii) A. Hasegawa, T. Ohashi, S. Hanabuchi, H. Kato, F. Takemura, T. Masuda, and M. Kannagi. Expansion of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) reservoir in orally infected rats: Inverse correlation with HTLV-I-specific cellular immune response. *J.Virol.*, 77: 2956-2963, 2003.
- iii) N. Harashima, K. Kurihara, A. Utsunomiya, R. Tanosaki, S. Hanabuchi, M. Masuda, T. Ohashi, F. Fukui, A. Hasegawa, T. Masuda, Y. Takae, J. Okamura, and M. Kannagi. Graft-versus-HTLV-I response in ATL patients after non-myeloablative hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Research*, 2004, in press.
- iv) H. Nishituji, T. Ikeda, H. Miyoshi, T. Ohashi, M. Kannagi, and T. Masuda. Expression of small hairpin RNA by lentiviral-based vector confers efficient and stable gene-suppression of HIV-1 on human cells including primary non-dividing cells. *Microbes and Infection*, 2004, in press.

### 2. 学会発表

- i) H. Liu, T. Ohashi, M. Kubo, X. Zhou, T. Masuda, M. Kubo, M. Kannagi. Reversible suppression of HIV-1-replication by CD8+ cytotoxic T lymphocytes by antigen-nonspecific mechanisms. 第 17 回エイズ学会、H15 年 11 月、神戸
- ii) X. Zhou, M. Kubo, Y. Enori, T. Ikeda, H. Nishituji, K. Kurihara, T. Ohashi, M. Azuma, T. Masuda, M. Kannagi.

Suppression of HIV-1 replication mediated through ICOS and CD28 in CD4+ T lymphocytes. 第 17 回エイズ学会、H15 年 11 月、神戸

- iii) 西辻裕紀、池田たま子、三好裕之、大橋貴、神奈木真理、増田貴夫。SiRNA 発現レンチウイルスベクターを用いた HIV-1 発現抑制。第 17 回エイズ学会、H15 年 11 月、神戸
- iv) 池田たま子、周 Xin, 吉成隆二、奈良信夫、大橋貴、神奈木真理、増田貴夫。HIV-1 インテグラーゼ変異体の機能解析。第 17 回エイズ学会、H15 年 11 月、神戸
- v) 神奈木真理.ATL に対する腫瘍免疫療法。ウイルス学会シンポジウム。H15 年 10 月、京都



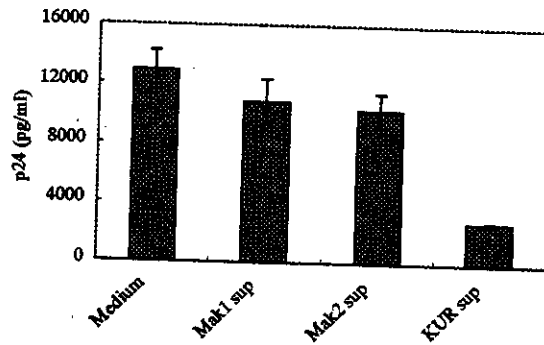


図1 アロ特異的 CD8+ T 細胞株の上清による HIV-1 複製 :

非感染健常人から得られた CD8+ CTL 株のうち 3 株 (Mak1, Mak2, KUR) の上清を、別の非感染者由来 CD4+ PBMC に HIV-1 NL4-3 を 2 時間感染させ洗浄したものに、等量の IL-2 含培地とともに 4 日間培養した。その上清中の HIV-1 p24 量を ELISA で測定した。KUR-CTL の上清を加えた検体にも、有意な HIV-1 抑制活性が認められた。

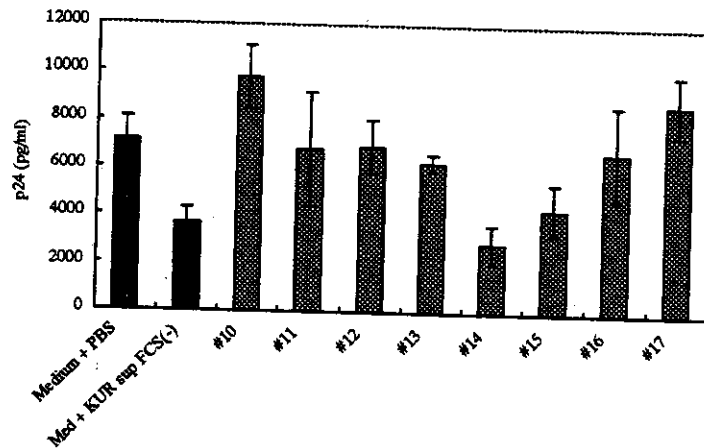


図2 ゲル濾過による KUR-CTL 上清 HIV-1 抑制活性分画

無血清培地で培養した KUR-CTL の上清をゲル濾過カラムにより分画し、各分画を HIV-1 感染させた CD4+ T 細胞とともに培養した。4 日後、上清中の HIV-1 p24 量を ELISA で測定した。第 14 番目の分画に、強い HIV-1 抑制活性が認められた。

## HIV mRNA の核外輸送を標的とした抗エイズ薬の開発研究

分担研究者 志田壽利 北海道大学遺伝子病制御研究所

研究要旨 Rev 阻害剤を見いだすために、30万種類の化合物をスクリーニングし、効果を持つ8種類の化合物を見いだした。薬効検定系としての小動物感染モデル作成のためにラットに注目し、hCRM1 と受容体である CD4, CXCR4 と CCR5 を発現させることによってラット細胞が HIV の増殖を支持できるようになることを示唆した。

### A. 研究目的

HIV はスプライシングを制御することにより、数多くの遺伝子を小さなゲノムにコードしている。スプライシングを制御する因子として Rev を自身がコードしている。Rev はイントロンを含む gag や env mRNA の細胞質への発現に必要であるために、ウイルスの増殖に必須である。Rev は細胞質で合成後核内に移入し、ウイルス RNA と結合して核外に輸送する。Rev はその機能を果たすために核内移入シグナル(NLS)と核外移行シグナル(NES)を有している。Rev が RNA を搬出するためには、Rev の単一分子では不十分であり、RNA 上で多量体化することが必要である。我々は主要コファクターの hCRM1 が Rev を核外に運ぶだけでなく、Rev の多量体化に必要であることを報告してきた。また、ラットの rCRM1 が Rev のよいコファクターとして働かないことを示してきた。これらの分子生物学的な基礎研究は Rev 多量体化過程を標的にした阻害剤のスクリーニングの有用性と、ヒト hCRM1 をラット細胞で発現させることによる HIV 増殖の可能性を示唆している。

昨年度、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、スクリーニングを始めた。そこでスクリーニングを拡大して Rev 阻害剤を見いだすことと、ラット細胞への hCRM1 発現の効果とトランスジェニックラットの作成を今年度に試みた。

### B. 研究方法

**薬効の評価：**昨年度 Rev の阻害剤の作用部位として、Rev-Rev 多量体形成、Rev-CRM1 結合、そして RNA 輸送の3段階を評価できる細胞系を作成した。Rev-Rev 多量体形成を測定するために、Rev-VP16, Gal-Rev, pG5luc を組み込んだ細胞を、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 を導入した細胞を樹立した。樹立した細胞株を 96 well plate にまき、翌日化合物を含む培地に交換した。24時間後にルシフェラーゼ活性を測定し、その減少を阻害活性とした。また、特異性を調べるために CRM1-IkBa 結合への影響を調べた。

Molt4 細胞での HIV の増殖阻害は ELISA 法による p24 生産量の阻害を基に計算した。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 (cytotoxicity) を検討した。

**細胞：**ヒト細胞として HeLa, CD4-HeLa 細胞を、ラット細胞として ER1 細胞を用いた。HIV の感染価を測定するための indicator cell として TZM-bl 細胞を用いた。

**プラスミド：**Gag 発現のために pNLe-r-Luc, CRM1 発現のために pSRαCRM1, レトロベクター構築のために pMXneo (東大、北村教授より分与) を用いた。感染性 HIV 全長ゲノムを持つプラスミドとして pNL432 を用いた。

### C. 研究成果

#### 阻害物質のスクリーニング

評価系細胞を用いて、Rev-Rev 相互作用 (Rev の多量体化に対応) の阻害を一次スクリーニングとして約30万化合物を調べた。有望な化合物はさらに Rev-CRM1 の結合、輸送活性阻害能を調べた。その結果、8種類の化合物が何れの Rev 活性をも阻害した。それらの Rev-IkBa 結合への影響は比較的軽微であった。代表例を図1に示す。さらに、Molt4 細胞における HIV の増殖阻害があることを認めた。細胞増殖阻害にはより高濃度が必要であった。これらの結果は抗 Rev 剤として有望であることを示唆している。しかし、より低濃度で有効であることが製剤とするには必要である

と思われた。

#### ラット細胞におけるヒト hCRM1 発現の効果

ラット細胞での Rev 活性が弱いことを報告してきた。他方、Rev が十分な活性を持つとの報告もある。そこで、Rev のコファクターである hCRM1 をラット細胞に導入することによって、Gag の発現が増強されるかどうかを調べた。HIV のゲノムに近い構造を持つプラスミド pNLe-r-Luc と hCRM1 発現プラスミドを cotransfection すると Gag 生産量が 5-10 倍増強した。ラット rCRM1 の発現プラスミドにはこの増強効果は見られなかった。このことはコファクターとして rCRM1 が効率よく働かないために、ラット細胞で Rev の活性が弱いことを示している。

次に、レトロベクターを用いて hCRM1 を恒常的に発現するラット ER1 細胞株 (ER1hCRM1 と命名) を作成した。この株はヒト細胞とほぼ同量の hCRM1 を発現した。hCRM1 発現の影響を調べたところ、以下のことが分かった。1. hCRM1 の発現は細胞の増殖に影響を与えない。2. ヒト細胞に近い Gag の発現を可能にする。3. 内在性の rCRM1 に優性阻害効果はない。さらに、ER1 細胞では 侵入した HIV ゲノムのクロモソームへの組み込み効率は悪くない、Tat は機能する、

ウイルス粒子形成がヒト細胞と同程度の効率で起こる、ことが分かった。これらの結果は、HIV ゲノムの侵入以降の過程での HIV 増殖の最大の障害が非効率な rCRM1 にあることを示唆している。実際、HIV 感染性クローンを transfection によって ER1hCRM1 細胞に導入してやると、ヒト細胞に近い量の感染性ウイルスが生産された。これらは hCRM1 と受容体である CD4, CXCR4 と CCR5 を発現させることによってラット細胞が HIV の増殖を支持できるようになることを示唆している。

#### D. 考察

今年度、我々は hCRM1 と受容体である CD4, CXCR4 と CCR5 を発現させることによって、ラット細胞が HIV の増殖を支持できるようになることを示唆した。既に、hCRM1 を発現するトランスジェニックラットを作成しており、受容体を発現させることによって HIV が感染できるようになることが期待される。また、我々は Z 社と協力して、Rev の阻害剤を検索するため 30 万種類の化合物をスクリーニングし、効果を持つ 8 種類の化合物を見いだした。抗 Rev 剤のリード化合物として期待される。

#### F. 結論

我々は hCRM1 と受容体である CD4, CXCR4 と

CCR5 を発現させることによってラット細胞が HIV の増殖を支持できるようになることを示唆した。30 万種類の化合物をスクリーニングし、効果を持つ 8 種類の化合物を見いだした。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Sakurai, A, Yasuda, J, Tanaka, Y, Hatakeyama, M, and Shida, H. (2004): Regulation of human T-cell leukemia virus type-1 (HTLV-1) budding by ubiquitin ligase Nedd4. *Microbes and Infection*. In press.
- (2) Zhang, X, Yamada, M, Mabuchi, N, and Shida, H. (2003): Cellular requirements for CRM1 import and export. *J. Biochem.* 134: 759-764.
- (3) Hakata, Y., Yamada, M., and Shida, H. (2003): A Multi-functional Domain in Human CRM1 (exportin 1) mediates RanBP3 Binding and Multimerization of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Rex Protein. *Mol. Cell. Biol.* 23:8751-8761.
- (4) Yasuda, J, Nakao, M., Kawaoka, Y., and Shida H. (2003): Nedd4 regulates egress of Ebola virus-like particles from host cell. *J. Virol.* 77: 9987-9992.
- (5) Shida, H. and Hakata, Y. (2003): Multiple roles of cellular export machinery in HTLV-1 Rex functioning. *Gann monograph* 50: 61-72.

##### 2. 学会発表

櫻井陽、安田二郎、志田壽利：HTLV-1 の出芽におけるユビキチン連結酵素の関与、日本ウイルス学会 2003、京都

張險法、博多義之、志田壽利：Rat CRM1 is a major block against HTLV-1 replication in rat cells. 日本ウイルス学会 2003、京都

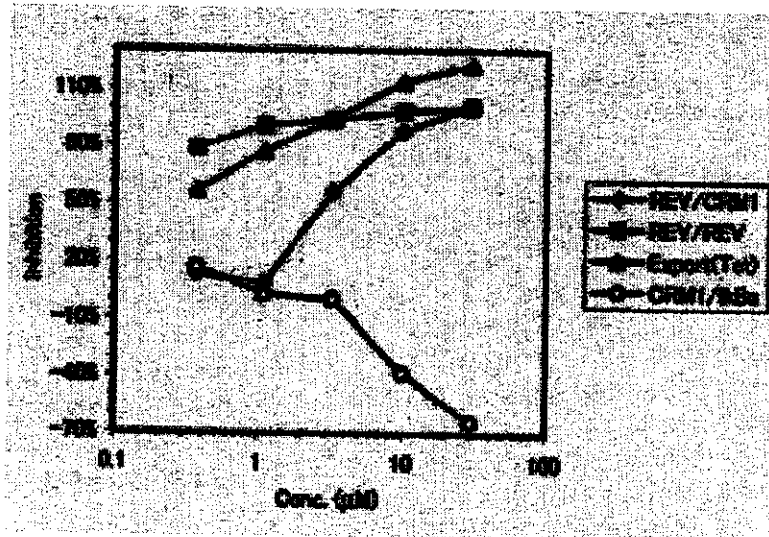
木所稔、田代真人、堀内清、志田壽利：痘瘡ワクチン株 LC16 学的性状の解析、日本ウイルス学会 2003、京都

安田二郎、志田壽利：レトロウイルス出芽と Vps-pathway、日本ウイルス学会 2003、京都

#### G. 知的所有権の取得状況

該当無し

図 1



Rev-Rev 結合阻害でスクリーニングして得られた阻害物質 A は Rev-CRM1 結合、Rev の RNA 輸送活性を阻害する。Control としての CRM1-IkBa 結合活性への影響は比較的弱い。

#### IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

##### 研究成果の刊行に関する一覧表 (岩倉洋一郎)

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
Kobari, Y., Misaki, Y., Setoguchi, K., Zhao, W., Komagata, Y., Kawahata, K., Iwakura, Y., and Yamamoto, K.	Tcells accumulating in the inflamed joints of a spontaneous murine model of rheumatoid arthritis become restricted to common clonotypes during disease progression	<i>Int. Immunol.</i>	16	131-138	2004
Ishida, Y., Kondo, T., Takayasu, T., Iwakura, Y., and Mukaida, N.	The essential involvement of cross-talk between IFN- $\gamma$ and TGF- $\beta$ in the skin wound-healing process.	<i>J. Immunol.</i>	172	1848-1855	2004
Ishida, Y., Maegawa, T., Kondo, T., Kimura, A., Iwakura, Y., Nakamura, S., and Mukaida, N.	Essential involvement of IFN- $\gamma$ in <i>Clostridium difficile</i> toxin A-induced enteritis.	<i>J. Immunol.</i>	172	3018-3025	2004
Ishihara, K., Sawa, S. I., Ikushima, H., Hirota, S., Atsumi, T., Kamimura, D., Park, S. J., Murakami, M., Kitamura, Y., Iwakura, Y., and Hirano, T.	The point mutation of tyrosine 759 of the IL-6 family cytokine receptor gp130 synergizes with HTLV-1 pX in promoting rheumatoid arthritis-like arthritis.	<i>Int. Immunol.</i>	16	455-465	2004

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 $\alpha$ elicits inflammatory cell infiltration in the skin by inducing interferon- $\gamma$ -inducible protein-10 in the elicitation phase of contact hypersensitivity response.	<i>Int. Immunol.</i>	15	251-260	2003
Iwakura, Y.	Autoimmune chronic inflammatory arthropathy in mice transgenic for the HTLV-I tax gene. In "Two decades of adult T-cell leukemia and HTLV-I research", (eds. K. Sugamura, R. Uchiyama, M. Matsuoka, and M. Kannagi),	<i>Gann Monograph on Cancer Res.</i>	50	197-218	2003
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 (ed. G. Fantuzzi)	<i>Cytokine Knockouts</i>		95-109	2003
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	<i>AIDS</i>	17	165-175	2003
Sashinami, H., Nakane, A., Iwakura, Y., and Sasaki, M.	Effective induction of acquired resistance to <i>Listeria monocytogenes</i> by immunizing mice with <i>in vivo</i> -infected dendritic cells.	<i>Infect. Immun.</i>	71	117-125	2003

Nakae, S., Komiyama, Y., Yokoyama, H., Nambu, A., Umeda, M., Iwase, M., Homma, I., Sudo, K., Horai, R., Asano, M. and Iwakura, Y.	Interleukin-1 is required for allergen-specific Th2 cell activation and the development of airway hypersensitivity response.	<i>Int. Immunol.</i>	15	483-490	2003
Voronov, E., Shouval, D. S., Krelin, Y., Cagnano, E., Benharroch, D., Iwakura, Y., Dinarello, C. A., and Apte, R. N.	Interleukin 1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis.	<i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i>	100	2645-2650	2003
Kirii, H., Niwa, T., Yamada, Y., Wada, H., Saito, K., Iwakura, Y., Asano, M., Moriwaki, H., and Seshima, M.	Lack of interleukin-1 $\beta$ decreases the severity of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.	<i>Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.</i>	23	656-660	2003
Nakae, S., Saijo, S., Horai, R., Sudo, K., Mori, S., and Iwakura, Y.	IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist.	<i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i>	100	5986-5990	2003
Asano, M., Nakae, S., Kotani, N., Shirafuji, N., Nambu, A., Hashimoto, N., Kawashima, H., Hirose, M., Miyasaka, M., Takasaki, S., and Iwakura, Y.	Impaired selectin ligand biosynthesis and reduced inflammatory responses in $\beta$ -1,4-galactosyltransferase-I-deficient mice.	<i>Blood</i>	102	1678-1685	2003

Isoda, K., Shiigai, M., Ishigami, N., Matsuki, T., Horai, R., Nishikawa, K., Kusahara, M., Nishida, Y., Iwakura, Y., Ohsuzu, F.	Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist promotes neointimal formation after injury.	<i>Circulation</i>	108	516-518	2003
Matsuki, T., Horai, R., Sudo, K., and Iwakura, Y.	IL-1 plays an important role in lipid metabolism by regulating insulin levels under physiological conditions.	<i>J. Exp. Med.</i>	198	877-888	2003
Miyake-Nishijima, R., Iwata, S., Saijo, S., Kobayashi, H., Kobayashi, S., Souta- Kuribara, A., Hosono, O., Kawasaki, H., Tanaka, H., Ikeda, E., Okada, Y., Iwakura, Y., and Morimoto, C.	Role of Crk-associated substrate lymphocyte type in the pathophysiology of rheumatoid arthritis in <i>tax</i> transgenic mice and in humans.	<i>Arth. Rheum.</i>	48	1890-1900	2003
Kariyone, A., Tamura, T., Kano, H., Iwakura, Y., Takeda, K., Akira, S., and Takatsu, K.	Immunogenicity of peptide-25 of Ag85B in Th1 development: role of IFN- $\gamma$ .	<i>Int. Immunol.</i>	15	1183-1194	2003
Nakae, S., Nambu, A., Sudo, K., and Iwakura, Y.	Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL- 17-deficient mice.	<i>J. Immunol.</i>	171	6173-6177	2003
Norose, K., Mun, H.S., Aosai, F., Chen, M., Piao, L.X., Kobayashi, M., Iwakura Y., and Yano, A.	IFN- $\gamma$ -Regulated <i>Toxoplasma</i> <i>gondii</i> Distribution and Load in the Murine Eye.	<i>Invest.</i> <i>Ophthalmol.</i> <i>Vis. Sci.</i>	44	4375-4381	2003



Mun, HS., Aosai, F., Chen, M., Piao, LX., Norose, K., Iwakura, Y. and Yano, A.	Pathogenicity of <i>Toxoplasma gondii</i> through B-2 cell-mediated downregulation of host defense responses.	<i>Micobiol Immunol.</i>	47	533-542	2003
Kyuwa, S., Kwamura, S., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Urano, T. and Yoshikawa, Y.	Differences between Balb/c and C57 BL/6 mice in mouse hepatitis virus replication in primary hepatocyte culture.	<i>Exp. Anim.</i>	52	81-84	2003

研究成果の刊行に関する一覧表 (岡本 尚)

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
Tetsuka, T., Okamoto, T.	Oxidative stress and signal transduction pathway of redox sensor protein.	Eds. R. G. Cutler and H. Rodriguez	Critical Reviews of Oxidative Stress and Aging.	World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd	U.S.A.	2003	112-127

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tozawa, K., Kawai, N., Hayashi, Y., Sasaki, S., Kohri K. and Okamoto, T.	Gold compounds inhibit adhesion of human cancer cells to vascular endothelial cells.	Cancer Lett.	196	93- 100	2003
Ando, K., Kanazawa, S., Tetsuka, T., Ohta, S., Jiang, X., Tada, T., Kobayashi, M., Matsui, N., and Okamoto, T.	Induction of Notch signaling by tumor necrosis factor in rheumatoid synovial fibroblasts.	Oncogene	22	7796- 7803	2003
Torigoe, T., Izumi, H., Yoshida, Y., Ishiguchi, H., Okamoto, T., Itoh, H., and Kohno, K.	Low pH enhances Sp1 DNA binding activity and interaction with TBP.	Nucleic Acids Res.	31	1-8	2003
Kanazawa, S., Soucek, L., Evan, G., Okamoto, T. and Peterlin, B. M.	c-Myc recruits P-TEFb for transcription, cellular proliferation and apoptosis.	Oncogene	22	5705- 5711	2003
Asamitsu, K., Kanazawa, S., Tetsuka, T., and Okamoto T.	RING finger protein AO7 supports the NF- $\kappa$ B- mediated transcription by interacting with the transactivation domain of p65 subunit.	J. Biol. Chem.	278	26879 - 26887	2003
Teranishi, F., Liu, Z.-Q., Kunimatsu, M., Imai, K., Takeyama, H., Manabe, T., Sasaki, M., and Okamoto, T.	Calpain is involved in the HIV replication from the latently-infected OM10.1 cells.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	303	940- 949	2003
Ohata, H., Tetsuka, T., Hayashi, H., Onozaki, K., and Okamoto, T.	3-Methylcholanthrene activates human immunodeficiency virus type 1 replication via aryl hydrocarbon receptor.	Microbiol. Immunol.	45	363- 370	2003

Okano, A., Usuda, N., Furihata, K., Nakayama, K., Tian, Q B., Okamoto, T., and Suzuki, T.	Huntingtin-interacting protein-1-related protein of rat (rHIP1R) is localized in the postsynaptic regions.	Brain Res.	967	210-225	2003
Matsumura, T., Degawa, T., Takii, T., Hayashi, H., Okamoto, T., Inoue, J., and Onozaki, K.	TRAF6- NF- $\kappa$ B pathway is essential for IL-1-induced TLR2 expression and its functional response to TLR2 ligand in murine hepatocytes.	Immunology	109	127-136	2003
Jiang, X., Takahashi, N., Ando, K., Otsuka, T., Tetsuka, T., and Okamoto, T.	NF- $\kappa$ B p65 transactivation domain is involved in the NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK) pathway.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	301	583-590	2003
Jiang, X., Takahashi, N., Matsui, N., Tetsuka, T., and Okamoto, T.	The NF- $\kappa$ B activation in the lymphotoxin beta receptor signaling depends on the phosphorylation of p65 at serine 536.	J. Biol. Chem.	278	919-926	2003
Takahashi, N., Kobayashi, S., Jiang, X., Kitagori, K., Imai, K., Hibi, Y., and Okamoto, T.	Expression of 53BP2 and ASPP2 proteins from TP53BP2 gene by alternative splicing.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	315	434-438	2004

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

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
Mari Kannagi, Shino Hanabuchi, Takashi Ohashi	A rat model of ATL and tumor-vaccine, Two Decades of Adult T cell leukemia and HTLV-I research	K. Sugamura	Gann Monograph on Cancer Research No. 50	Japan Scientific Societies Press Karger	Tokyo Basel	2003	219-230
神奈木真理	ATL に対する免疫療法の可能性.		血液・腫瘍科	科学評論社		2003	46(4) : 320-328
神奈木真理	ATL 発症リスクと免疫療法の可能性.	鶴池直邦、岡村純	成人 T 細胞白血病 (ATL) の基礎と臨床—新規治療法の開発へ向けて—	長寿科学振興財団		2003	47-57

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
H. Liu, T. Ohashi, T. Masuda. X. Zhou, M. Kubo, and M. Kannagi	Suppression of HIV-1 replication by HIV-1-irrelevant CD8+ cytotoxic T lymphocytes resulting in preservation of persistently HIV-1-infected cells in vitro	Viral Immunology	16	381-393	2003
A. Hasegawa, T. Ohashi, S. Hanabuchi, H.	Expansion of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) reservoir in orally infected rats :	J. Virol	77	2956-2963	2003