

B. 研究方法

<日本で流行している HIV の遺伝子解析>

HIV サブタイプ B に感染している日本人 HIV 感染者 71 名の血漿を用いた。そのうち HLA-A24 陽性者が 38 名、HLA-A24 陰性者が 33 名であった。また感染経路は性感染が 43 名、(HLA-A24 陽性 23 人、陰性 20 人) と汚染血液製剤による感染 (血友病患者) が 28 名 (HLA-A24 陽性 15 人、陰性 13 人) であった。血漿から HIV ゲノム RNA を含むトータル RNA を抽出し HLA-A24 に提示されることの知られている 5 ヶ所のエピトープ (Gag28-9, Gag263-10, Gag296-11, Env584-11, Nef138-10) を含む領域を RT-PCR 法により増幅し、シーケンス反応を行い塩基配列を決定した。その結果からアミノ酸配列を決定しエピトープ同定に使われた標準株 (SF2 株) のアミノ酸配列と比較した。一部の感染者では約 1 年間隔の 2 時点以上で解析を行った。

<免疫遺伝子治療ベクターの開発>

DC の作製

DC は健常人末梢血単核球 (PBMC) を用いて作製した。PBMC 中の付着細胞を GM-CSF、IL-4 存在下で 7 日間培養し未熟 DC (imDC) を得、さらに TNF- α 存在下で 2 日間培養し成熟 DC (mDC) を得た。

AdV、SeV ベクターによる遺伝子導入効率と細胞毒性の検討

GFP 遺伝子を発現するアデノウイルス (GFP/AdV) とセンダイウイルス (GFP/SeV) を作製し、感染に用いるウイルス量 (MOI) を AdV では MOI=50, 100, 1000, 2500、SeV では MOI=0.5, 2, 10, 50 と変化させて imDC への感染を行った。感染後経時的にフローサイトメーター (FACS) にて GFP 陽性細胞の割合とその平均蛍光強度 (MFI) を測定した。その際同時にヨウ化プロピディウム (PI) で死細胞の染色を行い、細胞毒性も検討した。AdV、SeV ベクターにより DC に導入さ

れた HIV タンパク質の発現量の検討

HIV Gag-Pol を発現し Rev Response Element (RRE) を持つ AdV (GPR/AdV)、HIV Rev を発現する AdV (Rev/AdV)、HIV Env を発現する AdV (Env/AdV)、また HIV Gag を発現する SeV (Gag/SeV)、HIV Env を発現する SeV (Env/SeV) を作製し imDC への感染を行った。感染細胞溶解液を抗 Gag p24 抗体と抗 Env gp120 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、Gag、Env の発現量を検討した。

AdV、SeV ベクター感染による DC への影響

野生型 AdV、SeV (外来遺伝子の挿入の無いウイルスベクター) の imDC への感染を行い、DC の分化の状態を表す MHC class I, MHC class II, CD83, CD86, CD40 に対する抗体を用いて染色し、FACS にて解析を行った。

<倫理面への配慮>

HIV 感染者の試料採取に関しては、研究目的やその為に必要な事項、いつでも研究から離脱できること等を文書によって患者に説明し、書面でインフォームドコンセントを得た。また本研究は東京大学医科学研究所の倫理審査委員会により承認されている。

C. 研究結果

<日本で流行している HIV のシーケンス解析>

解析した 5 ヶ所の CTL エピトープのうち、3 ヶ所 (Gag28-9, Env584-11, Nef138-10) において HLA-A24 陽性 HIV 感染者で高頻度に見られるアミノ酸変異が明らかになった。Gag28-9 では 3 番目のリジン (K) がアルギニン (R) へ (Gag28(K3R))、Env584-11 では 4 番目の R が K へ (Env584(R4K))、Nef138-10 では 2 番目のタイロシン (Y) がフェニルアラニン (F) へ (Nef138(Y2F)) の変異が高頻度に認められ、HLA-A24 陽性感染者における出現頻度は Gag28(K3R) は 81%、Env584(R4K) は 66%、Nef138(Y2F)

は 93%であった。それに対して世界的なデータベース上の HIV サブタイプ B における出現頻度を調べるとそれぞれ 37%、47%、27%であり、いずれの変異の出現頻度も日本人 HLA-A24 陽性感染者で見られた出現頻度に比べて低かった。それに対して Gag263-10、Gag296-11 では標準株と同じアミノ酸配列が保持されていた。

HLA-A24 陽性 HIV 感染者での出現頻度がデータベース上の頻度に比べて特に高かった Nef138-10 に注目した。Nef138-10 を含む領域のアミノ酸配列の経時的変化を調べたところ、HLA-A24 陽性 HIV 感染者では Nef138(Y2F)の変異は年余に渡って維持されていた。それに対して感染初期には Nef138(Y2F)であった HLA-A24 陰性 HIV 感染者では時を経るにつれて 2 番目の F が標準株の配列と同じ Y に置換されていた。また、HLA-A24 陰性 HIV 感染者における Nef138(Y2F)の出現頻度を感染経路別に解析すると、性感染群において Nef138(Y2F)の出現頻度が血友病群に比べて有意に高かった。

<免疫遺伝子治療ベクターの開発>

AdV、SeV ベクターによる遺伝子導入効率と細胞毒性の検討

GFP/AdV、GFP/SeV を imDC に感染後 48 時間で FACS 解析を行った。その結果 GFP/AdV は MOI=1000 で感染させた場合に GFP 陽性細胞数は約 90%、MFI=6075 で最も高く、死細胞も 10%程度であった。それに対して GFP/SeV は MOI=2 で感染させた場合 GFP 陽性細胞数は約 40%、MFI=1422 で最も高く、死細胞は約 40%であった。

次に上記の条件(GFP/AdV は MOI=1000 にて、GFP/SeV は MOI=2 にて感染)で DC に感染後経時的に GFP 陽性細胞数、MFI を調べたところ、GFP/AdV は感染後 48 時間が、GFP/SeV は 24 時間後が GFP 陽性細胞数、MFI ともに最も高かった。

AdV、SeV ベクターにより DC に導入された HIV タンパク質の発現量の検討

AdV、SeV それぞれ遺伝子導入効率の最も良い条件 (AdV: MOI=1000、感染後 48

時間、SeV: MOI=2、感染後 24 時間)で GPR/AdV、Env/AdV、Gag/SeV、Env/SeV を DC への感染を行い、Gag、Env の発現量をウエスタンブロッティングにて比較したところ、Gag の発現は AdV ベクター、SeV ベクターではほぼ同等であった。GPR/AdV は Rev/AdV と重感染すると Gag の発現量は約 10 倍高くなった。

一方、Env の発現は SeV ベクターでは AdV ベクターに比べて約 4 倍高かった。

AdV、SeV ベクター感染による DC への影響

野生型 AdV、SeV を同様の条件にて imDC へ感染させ、細胞表面マーカーの発現を imDC、mDC と比較した。その結果、AdV ベクター感染では CD83、MHC class I、MHC class II 分子の発現が著明に増加し mDC とほぼ同等の発現が見られた。一方、SeV ベクター感染では CD86、CD40、MHC class I 分子の増加が見られた。

D. 考察

本研究では日本人で高頻度に見られる HLA-A24 に注目し、複数の HLA-A24 拘束性 CTL エピトープを含む領域の遺伝子解析を行うことによって、日本で流行している HIV の特性を調べた。その結果、一部のエピトープでは HLA-A24 陽性感染者で高頻度に見られる特定のアミノ酸変異があることが明らかとなった。このうち、特に日本人集団において出現頻度の高かった Nef138(Y2F)に注目して詳細な解析を行ったところ、Nef138(Y2F)は HLA-A24 陽性感染者体内では維持されるのに対して、HLA-A24 陰性感染者体内では数ヶ月～数年のうちに野生型が優勢となることが明らかになった。この結果から Nef138(Y2F)を持つ HIV は野生型の HIV に比べて HLA-A24 を持つ個体で選択され、優位に増殖できることが示唆された。Nef138(Y2F)は、HIV の増殖にとって負の影響を及ぼす変異であるが、CTL による選択下では優位なウイルスとして選択される、ことが示唆された。

また、HLA-A24 陰性感染者において、

血友病患者群に比べて性感染群で有意に Nef138(Y2F) の出現頻度が高いことが明らかになった。血友病患者群は欧米から輸入された汚染血液製剤により感染しており、1980年代に欧米で流行した HIV に感染したと考えられる。それに対して性感染群は日本国内で流行している HIV に感染していることから、日本では Nef138(Y2F) を持つ変異 HIV が流行していることが示唆された。

本研究では DC への HIV タンパク質の遺伝子導入を目的として AdV ベクター、SeV ベクターの有用性を検討した。SeV ベクターは低い MOI でも効率よく遺伝子を導入することが可能であり、AdV ベクターは高い MOI を必要とするが、細胞毒性は低いことが明らかになった。HIV タンパク質の発現は AdV、SeV ベクターどちらも高いことが示された。

DC は抗原取り込み能が高い imDC から抗原提示能が高い mDC へと分化するが、細胞性免疫応答を効率よく賦活化するためには mDC への分化（成熟化）が重要である。AdV、SeV ベクターともに imDC に感染すると mDC で発現が高いことが知られている CD83、CD86、MHC class I、MHC class II 分子の発現が上昇していたことから、DC の成熟化を誘導することが明らかになった。これらの結果から AdV、SeV ともに HIV 感染症に対する免疫遺伝子治療ベクターとして有用であることが示唆された。

E. 結論

本研究ではワクチン開発において重要な因子である「抗原」と「免疫方法」に関する基礎的検討を行った。HIV は変化の激しいウイルスであり、地域ごとに流行している HIV は大きく異なっている。本邦における HIV 感染症に対するワクチン開発において、本研究で明らかになった日本で流行している HIV に対する知見は重要な情報である。また、樹状細胞への遺伝子導入ベクターとしてアデノウイルス、センダイウイルスベクターの有用

性が明らかになった。今後、これらの知見をもとに HIV 感染症に対する効果的な治療ワクチンの開発が期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Yamada, T., Watanabe, N., Nakamura, T and Iwamoto, A. Antibody-dependent cellular cytotoxicity via a humoral immune epitope of Nef protein expressed on the cell surface. *J. Immunology*. 172: 2401-6, 2004.
- (2) Furutsuki T, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Tomizawa M, Odawara T, Goto M, Kitamura Y, Nakamura T, Kelleher AD, Cooper DA, Iwamoto A. Frequent transmission of cytotoxic-T-lymphocyte escape mutants of human immunodeficiency virus type 1 in the highly HLA-A24-positive Japanese population. *J Virol*. 78: 8437-45, 2004.
- (3) D Zhu, H Taguchi-Nakamura, M Goto, T Odawara, T Nakamura, H Yamada, H Kotaki, W Sugiura, A Iwamoto & Y Kitamura. Influence of single-nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance-1 gene on the cellular export of nelfinavir and its clinical implication for highly active antiretroviral therapy. *Antiviral Therapy* 9:929-35, 2004.
- (4) Yokomaku, Y., Miura, H., Tomiyama, H., Kawana-Tachikawa, A., Takiguchi, M., Nagai, Y., Iwamoto, A., Matsuda, Z., and Ariyoshi, K. Impaired epitope processing and presentation as a major escape mechanism from CTL recognition in HIV-1 infection. *J. Virol*. 78:1324-1332, 2004.
- (5) Nakayama, E.E., Tanaka, Y., Nagai, Y., Iwamoto, A., and Shioda, T. A CCR2-V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform. *AIDS* 18:729-738, 2004.
- (6) Sakurai, A., Jere, A., Yoshida, A., Yamada, T., Iwamoto, A. Adachi, A., and Fujita, M. Functional analysis of HIV-1 vif genes derived from Japanese long-term non progressors and progressors for AIDS. *Microbes and Infection* 6:799-805, 2004.

2. 学会発表

- (1) T Odawara, M Tomizawa, A Kawana-Tachikawa, F Ide, T Furutsuki, N Hosoya, T Nakamura, and A Iwamoto. Sequences of HLA-A24-restricted HIV-1 CTL epitopes among highly HLA-A24 positive Japanese patients and a phase I clinical trial of therapeutic vaccine based on peptides and autologous dendritic cells. XV International AIDS Conference

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

分担研究報告書

母子感染に関わる HIV および宿主側因子に関する研究

分担研究者 市村 宏 金沢大学大学院医学研究科教授

分担研究者 小泉祐介 金沢大学大学院医学系研究科

研究要旨 これまでに著者らは、HIV コレセプター（CCR5、CCR2）及び CCR5 の生理的リガンドである RANTES のイントロン内の遺伝子多型のうち 10 ヶ所について、ケニアの非都市部で抗 HIV 抗体陽性の妊婦から生まれた小児 147 名を対象とし HIV 母子感染率及び感染児の予後との関係を検討し、CCR5 プロモーター領域内の -2132T/T 及び -2554T/T がアフリカ（ケニア）人において HIV 母子感染の危険を増大する可能性を報告した。今回、さらに HIV コレセプター CXCR4 の生理的リガンドである SDF1 遺伝子の 3'非翻訳領域、CCR5 の生理的リガンドである RANTES のプロモーター領域及び IL-4 のプロモーター領域内の遺伝子多型に着目し、HIV 母子感染との関係を検討した。1996 年から 2001 年にかけてケニア西部で行われた「短期ジドブジン (ZDV) 投与による HIV 母子感染予防のコホート研究」に参加した妊婦から生まれた小児 147 名（母親が短期 ZDV 投与を受けた小児 114 名、受けていない小児 33 名）を対象とした。末梢血リンパ球から DNA を抽出し、PCR 法を用いて増幅し、RFLP 法とダイレクトシーケンス法を用いて遺伝子多型（SNP）を決定した。前述の SNP と HIV 母子感染との相関について検討を行った結果、ZDV 非投与群で、RANTES プロモーター領域内の -403 が A/A である児は G/A である児に比べて母子感染の危険が減少する傾向がみられたが、有意ではなかった（OR: 0.14, [0.018, 1.161]）。他の SNP には特に関連は認められなかった。今後、これらの SNP の出生後の生存率推移への影響も併せて検討したい。

A. 研究目的

HIV (human immunodeficiency virus) 感染症では、HIV 感受性及び感染後の病態進行速度に個人差があることが知られている。近年、これらの原因となる宿主因子が明らかになりつつある。しかしながら、HIV 母子感染例の大半を占めるアフリカにおいて、宿主因子が HIV 母子感染に与える影響を調査した報告は少なく、その評価は確立していない。これまでに著者らは、HIV コレセプター (CCR5、CCR2) 及び CCR5 の生理的リガンドである RANTES のイントロン内の遺伝子多型 (SNP) のうち 10 ヶ所について、ケニアの非都市部で抗 HIV 抗体陽性の妊婦から生まれた小児 147 名を対象とし HIV 母子感染率及び感染児の予後との関係を検討し、CCR5 プロモーター領域内の -2132T/T 及び -2554T/T がアフリカ (ケニア) 人において HIV 母子感染の危険を増大する可能性を報告した。今回、さらに HIV コレセプター CXCR4 の生理的リガンドである SDF1 遺伝子の 3' 非翻訳領域、CCR5 の生理的リガンドである RANTES のプロモーター領域及び IL-4 のプロモーター領域内の SNPs に着目し、

HIV 母子感染との関係を検討した。

B. 研究方法

対象

1996 年から 2001 年にかけて、ケニア西部の非都市部で行われた「短期 ZDV 投与による HIV 母子感染予防のコホート研究」に参加した抗 HIV 抗体陽性の妊婦から生まれた小児のうち、HIV 感染の有無及び出生後 2 年間の生死が確認できた小児 147 名を対象とした。このうち、短期 ZDV 投与を受けた母親から生まれた小児は 114 名、短期 ZDV 投与を受けていない母親から生まれた小児は 33 名であった。

検討した遺伝子多型 (Figure 1)

SDF1 遺伝子の 3' 非翻訳領域 (-801)、RANTES のプロモーター領域 (-28, -403) と IL-4 のプロモーター領域 (-589) について検討を行った。

遺伝子多型の決定方法

あらかじめ児の末梢血リンパ球から抽出された DNA を用い、PCR 法を用いて目的の SNP を含む領域をそれぞれ増幅した。次に、制限酵素切断長多型 (restriction fragment length polymorphism: RFLP) 法 (SDF1) とダイレクトシーケンス法

(RANTES, IL-4) を用いて SNP をそれぞれ決定した。

統計学的検討

SNP と HIV 母子感染との関係について Fisher's exact 検定及びオッズ比を用いて検討した。

倫理面への配慮

これらの検体は、すべて非連結匿名化した上で検討を行った。また、本研究は、ケニア中央医学研究所の倫理委員会ならびに金沢大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の承認を受けた上で行った。

C. 研究結果

遺伝子型の分布

各々の SNP について、ZDV 投与群の児と ZDV 非投与群の児との間で遺伝子型の分布に差がないことを確認するために、「児の遺伝子型」と「母親に対する ZDV 投与の有無」との関係について 3×2 分割表を用い Fisher's exact 検定を行った。その結果、ZDV 投与群の児と ZDV 非投与群の児との間で、今回検討した遺伝子型の分布に有意差は認められなかった (Table 1)。

なお、RANTES-28G は今回検討したケニア人には一人も認められなかった。

SNP の HIV 母子感染への影響

ZDV 投与群の児と ZDV 非投与群の児との間で遺伝子型の分布に有意差が認められなかったが、「短期 ZDV 投与による HIV-1 母子感染減少効果」と「児の遺伝子型による HIV 母子感染への影響」との混同を避けるために、ZDV 投与群の児と ZDV 非投与群の児に分けて検討した (Table 2, 3)。

各々の SNP について、児の遺伝子型と HIV 母子感染の有無との関係を検討した結果、ZDV 非投与群で、RANTES プロモーター領域内の-403 が A/A である児は G/A である児に比べて母子感染の危険が減少する傾向がみられたが、有意ではなかった (OR: 0.14, [0.018, 1.161])。その他の SNP については HIV 母子感染への影響は認められなかった (Table 2, 3, 4)。

D. 考察

今回の検討では、RANTES-403A/A をもつ児は HIV-1 母子感染の危険が減少する傾向が認められたが、有意な相関を見出すことは出来なかった。今後、これらの

SNP の出生後の生存率推移への影響も併せて検討したい。

E. 研究発表

1. 論文発表

・ Kita K, Ichimura H, et al.: Genetic Diversity of HIV Type 1 in Likasi, Southeast of the Democratic Republic of Congo. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 20(12): 1352-7, 2004.

・ Ndembu N, Ichimura H, et al.: Genetic Diversity of HIV Type 1 in Rural Eastern Cameroon. *J Acquir Immune Defic Syndr* 37(5):1641-1650, 2004.

・ Songok EM, Ichimura H, et al.: Active generation and selection for HIV intersubtype A/D recombinant forms in a co-infected patient in Kenya. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 20(2): 255-8, 2004.

2. 学会発表

・ HIV 感染流行予測のための HCV 感染動態の検討. 景山誠二, 市村宏. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会. 2004. 11, 横浜.

・ HIV-2 感染例における血中ウイルス量の増加とその多様性の推移. 景山誠二, 市村宏. 第 18 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2004, 12, 静岡.

・ HIV-1 subtypes in the northern border region of Kenya. Lwembe R, 市村宏, 他. 第 18 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2004, 12, 静岡.

・ 中央アフリカ地域における HIV-1 の多様性の拡大と新しい組換えウイルス群の出現. 原田礼忠, 市村宏, 他. 第 18 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2004, 12, 静岡.

・ Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を用いた HIV-1 RNA の検出. 保坂憲光, 市村宏, 他. 第 18 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2004, 12, 静岡.

F. 知的財産権の出願・登録状況

特に予定なし。

Table 1. Frequency of polymorphisms among ZDV group and non-ZDV group

polymorphism	no ZDV group	ZDV group	P-value
SDF1 3'A	G/G	20	0.70
	G/A	3	
	A/A	0	
RANTES -403	G/G	8	0.39
	G/A	10	
	A/A	8	
IL-4 -589	C/C	0	0.53
	C/T	12	
	T/T	12	

Table 2A. Association between polymorphisms and HIV mother to child transmission in non-ZDV group

polymorphism	HIV(-)	HIV(+)	<i>P-value</i>	Odds ratio	95% C.I.
SDF1 3'A	G/G	11	9	2.44	[0.190, 31.53]
	G/A	1	2	0.59	
	A/A	0	0		
RANTES -403	G/G	4	4	2.33 _(GG&Ga)	[0.336, 16.18]
	G/A	3	7	0.14 _(Ga&aa)	[0.018, 1.161]
	A/A	6	2	0.33 _(GG&aa)	[0.040, 2.769]
IL-4 -589	C/C	0	0		
	C/T	5	7	1.00	[0.143, 3.580]
	T/T	6	6		

Table 2B. Association between polymorphisms and HIV mother-to-child transmission in non-ZDV group

polymorphism	HIV(-)	HIV(+)	<i>P-value</i>	Odds ratio	95% C.I.
SDF1 3'A	G 23	20	1.00	2.3	[0.194, 27.31]
	A 1	2			
RANTES -403	G 11	15	0.27	0.54	[0.179, 1.616]
	A 15	11			
IL-4 -589	C 5	7	0.74	0.79	[0.213, 2.992]
	T 17	19			

Table 3A. Association between polymorphisms and HIV mother-to-child transmission in ZDV group

polymorphism	HIV(-)	HIV(+)	<i>P</i> -value	Odds ratio	95% C.I.
SDF1 3'A	G/G	82	4		
	G/A	9	0	N.D.	N.D.
	A/A	0	0		
RANTES -403	G/G	27	0	N.D.(GG&Ga)	N.D.
	G/A	46	3	0.85(G/a&aa)	[0.083, 8.737]
	A/A	18	1	N.D.(GG&aa)	N.D.
IL-4 -589	C/C	4	0	N.D.(CC&Cf)	N.D.
	C/T	35	2	1.43(Ct&tf)	[0.248, 8.237]
	T/T	49	4	N.D.(CC&tf)	N.D.

Table 3B. Association between polymorphisms and HIV mother-to-child transmission in ZDV group

polymorphism	HIV(-)	HIV(+)	<i>P-value</i>	Odds ratio	95% C.I.
SDF1 3'A	173	8	1.00	N.D.	N.D.
RANTES -403	100	3	0.47	2.03	[0.472, 8.759]
IL-4 -589	43	2	0.73	1.62	[0.341, 7.667]

Table 4A. Association between polymorphisms and HIV mother-to-child transmission (in all the patients)

polymorphism	HIV(-)	HIV(+)	<i>P-value</i>	Odds ratio	95% C.I.
SDF1 3'A	G/G	93	13	1.43 _(GG&Ga)	[0.282, 7.269]
	G/A	10	2	N.D. _(Ga&aa)	N.D.
	A/A	0	0	N.D. _(GG&aa)	N.D.
RANTES -403	G/G	31	4	1.58 _(GG&Ga)	[0.456, 5.486]
	G/A	49	10	0.61 _(Ga&aa)	[0.154, 2.434]
	A/A	24	3	0.97 _(GG&aa)	[0.198, 4.746]
IL-4 -589	C/C	4	0	N.D. _(GG&Ga)	N.D.
	C/T	40	9	0.81 _(Ga&aa)	[0.301, 2.171]
	T/T	55	10	N.D. _(GG&aa)	N.D.

Table 4B. Association between polymorphisms and HIV mother-to-child transmission (in all the patients)

polymorphism	HIV(-)	HIV(+)	<i>P-value</i>	Odds ratio	95% C.I.
SDF1 3'A	G	196	1.00	1.4	[0.292, 6.723]
	A	10			
RANTES -403	G	111	1.00	1.02	[0.492, 2.103]
	A	97			
IL-4 -589	C	48	0.94	1.03	[0.456, 2.331]
	T	150			

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

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

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakayama, E. E., Tanaka, Y., Nagai, Y., Iwamoto, A. and Shioda, T.	A CCR2-V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform.	AIDS.	18	729-738	2004
Emi E. Nakayama, Hiroyuki Miyoshi, Yoshiyuki Nagai, and Tatsuo Shioda,	A specific region of 37 amino acid residues in the SPRY (B30.2) domain of African green monkey TRIM5 α determines species- specific restriction of SIVmac infection.	J. Virol.	in press		2005

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamada, T., Watanabe, N., Nakamura, T and Iwamoto, A.	Antibody-dependent cellular cytotoxicity via a humoral immune epitope of Nef protein expressed on the cell surface.	J. Immunology.	172	2401-6	2004
Furutsuki T, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Tomizawa M, Odawara T, Goto M, Kitamura Y, Nakamura T, Kelleher AD, Cooper DA, Iwamoto A.	Frequent transmission of cytotoxic-T-lymphocyte escape mutants of human immunodeficiency virus type 1 in the highly HLA-A24-positive Japanese population.	J Virol.	78	8437-45	2004
D Zhu, H Taguchi-Nakamura, M Goto, T Odawara, T Nakamura, H Yamada, H Kotaki, W Sugiura, A Iwamoto & Y Kitamura.	Influence of single-nucleotide polymorphisms in the multi drug resistance-1 gene on the cellular export of nelfinavir and its clinical implication for highly active antiretroviral therapy.	Antiviral Therapy	9	929-35	2004
Yokomaku, Y., Miura, H., Tomiyama, H., Kawana-Tachikawa, A., Takiguchi, M., Nagai, Y., Iwamoto, A., Matsuda, Z., and Ariyoshi, K.	Impaired processing and presentation of cytotoxic-T-lymphocyte(CTL) epitopes are major escape mechanism from CTL immune pressure in HIV-1 infection.	J. Virol.	78	1324-1332	2004
Nakayama, E.E., Tanaka, Y., Nagai, Y., Iwamoto, A., and Shioda, T.	A CCR2-V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform.	AIDS	18	729-738	2004
Sakurai, A., Jere, A., Yoshida, A., Yamada, T., Iwamoto, A. Adachi, A., and Fujita, M.	Functional analysis of HIV-1 vif genes derived from Japanese long-term non progressors and progressors for AIDS.	Microbes and Infection	6	799-805	2004

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍： なし

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kayoko Kita, <u>Hiroshi</u> <u>Ichimura</u> (13人中13番目)	Genetic Diversity of HIV Type 1 in Likasi, Southeast of the Democratic Republic of Congo.	AIDS Res. Hum. Retroviruses	20 (12)	1352-1357	2004
Nicaise Ndembi, <u>Hiroshi</u> <u>Ichimura</u> (12人中12番目)	Genetic Diversity of HIV Type 1 in Rural Eastern Cameroon.	J. Acquir. Immune Defic. Syndr.	37 (5)	1641-1650	2004
E. M. Songok, <u>Hiroshi</u> <u>Ichimura</u> (11人中11番目)	Active Generation and Selection for HIV Intersubtype A/D Recombinant Forms in a Co-infected Patient in Kenya.	AIDS Res. Hum. Retroviruses	20 (2)	255-258	2004

A CCR2-V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform

Emi E. Nakayama, Yuetsu Tanaka,^a Yoshiyuki Nagai,^b Aikichi Iwamoto^c
and Tatsuo Shioda

Objective: A valine to isoleucine substitution at position 64 of CCR2 (*CCR2-64I*) is associated with a delay in progression to AIDS in HIV-1-infected individuals. The aim of the present study is to elucidate the molecular mechanism underlying the effect of this allele.

Design: We analysed the effect of the 64I substitution on levels of expression of CCR2A and CCR2B, two CCR2 isoforms produced by alternative splicing.

Methods: Sendai virus vector was used to express CCR2 molecules.

Results: While CCR2B trafficked well to the cell surface, CCR2A, which differs from CCR2B only by the sequence of its C-terminal cytoplasmic tail, was detected predominantly in the cytoplasm. The level of expression of CCR2A-64I was significantly higher than that of CCR2A without the substitution. On the other hand, the 64I substitution did not affect levels of CCR2B expression. Pulse-chase experiments revealed that the 64I substitution increased the half-life of CCR2A in cells. When co-expressed with CCR5, CCR2A-64I interfered more severely with cell surface expression of CCR5 than did wild-type CCR2A. Furthermore, immunoprecipitation experiments showed that CCR2A co-precipitated with an immature form of CCR5.

Conclusion: These results suggest that CCR2A binds to CCR5 in the cytoplasm and down-modulates its surface expression. We propose that the increased ability of CCR2A-64I to down-modulate CCR5 expression might be a possible cause of a delay in HIV-1 disease progression in patients with this allele.

© 2004 Lippincott Williams & Wilkins

AIDS 2004, 18:729–738

Keywords: polymorphism, CCR2-64I, CCR2A, CCR5, stability

Introduction

The chemokine receptor CCR2B has been regarded as a minor HIV-1 coreceptor because only a small number of HIV-1 strains has been shown to use CCR2B as an entry coreceptor [1–3]. Nevertheless, a polymorphism in the CCR2 gene, *CCR2-64I*, has been reported to be associated with delayed disease progression in HIV-1 infected individuals in several Caucasian cohorts [4–8]. This polymorphism, a G-to-A transition at position 190, changes CCR2B codon

64 from valine to isoleucine, introducing a conservative amino acid change into the first transmembrane domain. It was unclear why a single amino acid substitution in a minor coreceptor could affect HIV-1 disease progression, as there was no difference in HIV-1 co-receptor activity between the variant CCR2B-64I and CCR2B without the 64I substitution (*CCR2B-64V*) [9,10]. Furthermore, these studies also excluded the possibility that CCR2B-64I exerts a dominant-negative effect on the expression and activity of CCR5.

From the Research Institute for Microbial diseases, Osaka University, Osaka, the ^aUniversity of the Ryukyus, Okinawa, ^bToyama Institute of Health, Toyama, and the ^cInstitute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan.

Correspondence to T. Shioda, Department of Viral Infections, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, 3-1 Yamada-oka, Suita-shi, Osaka 565-0871, Japan.

Received: 5 May 2003; revised: 27 September 2003; accepted: 15 October 2003.

DOI: 10.1097/01.aids.0000111407.02002.15

It is possible that the *CCR2* polymorphism may be linked to other polymorphisms in genes that influence AIDS progression. The *CCR2* gene is located approximately 15 kb from the 5' end of the *CCR5* gene, and the *CCR2-64I* allele is indeed linked to a certain *CCR5* promoter haplotype [11]. However, experiments using promoter-reporter fusion constructs showed that the *CCR5* promoter haplotype, which is in a strong linkage disequilibrium with *CCR2-64I*, did not affect transcriptional activity of the *CCR5* promoter [10]. Thus, the mechanism underlying the protective effect of *CCR2-64I* against AIDS progression still remained to be elucidated.

Two alternatively spliced *CCR2* isoforms, *CCR2A* and *CCR2B*, were reported to be present in freshly isolated human monocyte, THP-1, and MonoMac 6 leukaemia cell lines [12,13]. An open reading frame encoded in the chromosome corresponds to *CCR2B*,

while alternatively spliced transcripts produce *CCR2A*. The two *CCR2* isoforms differ only in their C-terminal cytoplasmic tails (Fig. 1). Therefore, an individual carrying the *CCR2-64I* allele also produces *CCR2A* molecules with isoleucine at position 64. Although the cytoplasmic tail spans less than one-fifth of the entire *CCR2* molecule, this difference caused a drastic alteration in their localization in cells [13]. While *CCR2B* trafficked well to the cell surface, *CCR2A* was detected predominantly in the cytoplasm. A progressive truncation study of the C-terminal cytoplasmic tail indicated that a cytoplasmic retention signal(s) was located in the C-terminal cytoplasmic tail [13]. Nevertheless, *CCR2A* molecules that successfully trafficked to the cell surface could respond to the stimulation of monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 in a similar fashion to *CCR2B* [14].

As none of the previous studies investigated the effect

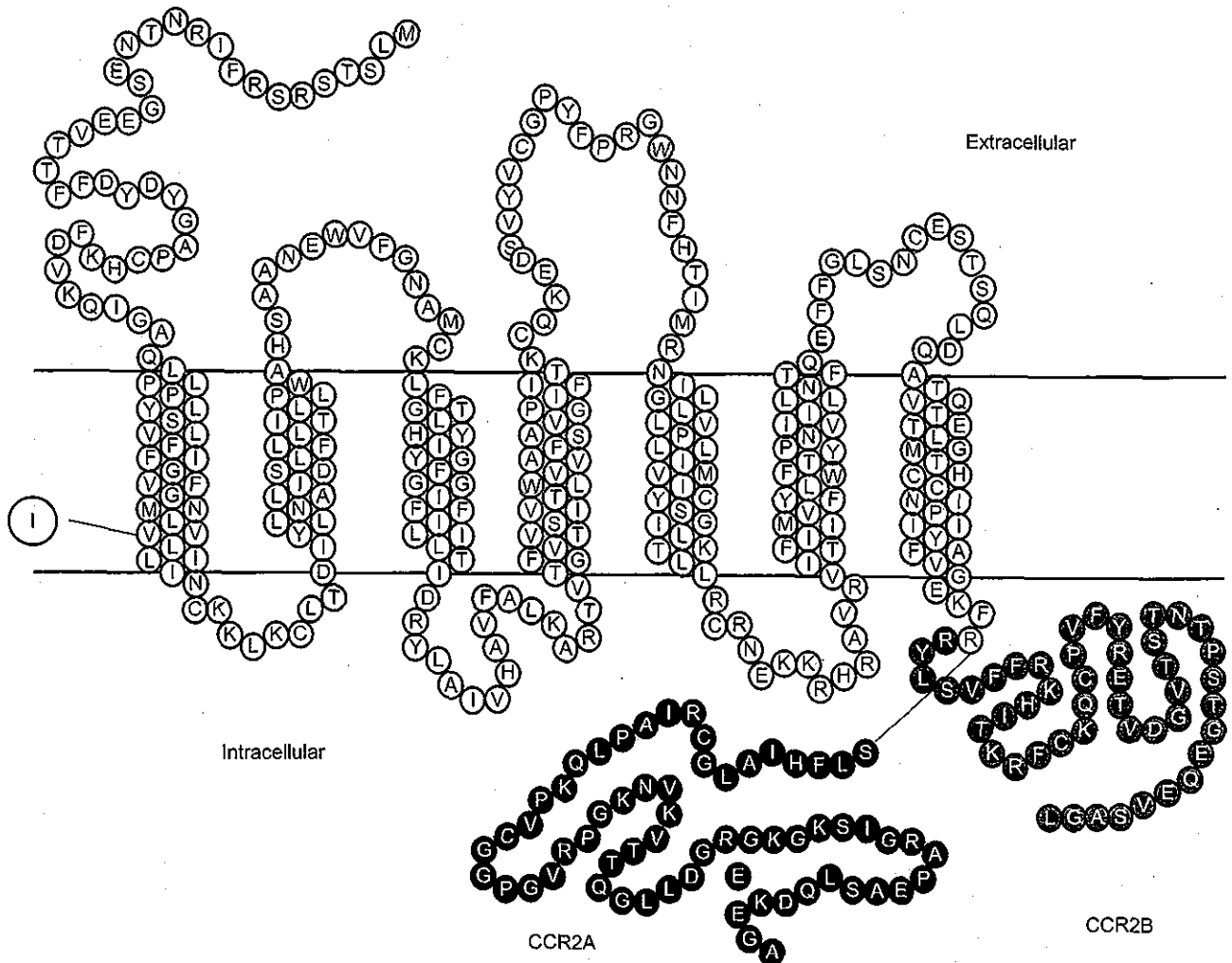


Fig. 1. The structure of the CCR2A and CCR2B molecules. Outlined letters in grey circles denote amino acid residues present in CCR2B. Outlined letters in black circles denote amino acid residues present in CCR2A. A letter I in a large circle denotes a substitution at position 64.