

C. 研究結果

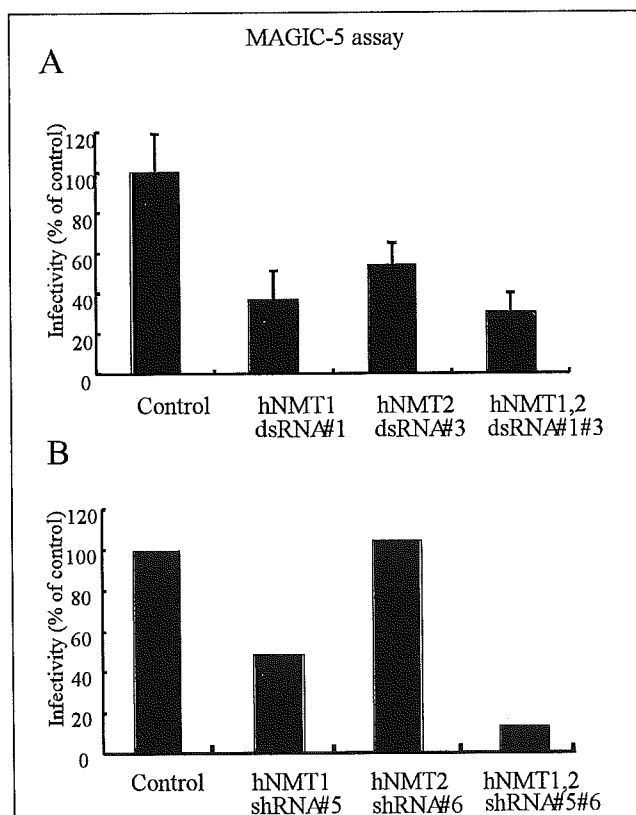
各 siRNA の細胞増殖に与える影響

hNMT1 シングルノックダウン細胞は hNMT1 および2ダブルノックダウン細胞よりも生存率が高いことが示された。

各 siRNA の HIV-1 の感染性に与える影響

HIV-1 発現ベクターをトランスフェクションした HEK293 細胞に各 siRNA を処理し、培養上清中に含まれる産生された HIV-1 の感染性を MAGIC-5 assay によって評価した。その結果、hNMT1 のノックダウンの HIV-1 の感染性の低下に与える影響が、hNMT2 のノックダウンによるそれよりも大きいことが示された (Fig. 2)。

Fig.2 Effect of Knock Down of hNMT1 and hNMT2 on HIV-1 infectivity



各 siRNA の HIV-1 Pr55^{gag} に与える影響

NMT1, NMT2 を標的とした siRNA を用いて NMT1 および NMT2 の発現をノックダウンさせた場合、ミストイ化をうけるウイルス構成タンパク質である Pr55^{gag}、および nef タンパク質に与える影響を検討した。HIV-1 発現ベクターをトランスフェクションした HEK293 細胞に各化学合成 siRNA を処理し、得られた細胞を 0.1% Triton X-100 で可溶化した。昨年度、15,000 rpm で遠心処理後得られた可溶化上清と不溶性の沈殿をそれぞれ soluble fraction、insoluble fraction とし、各 fraction に含まれる Pr55^{gag} を western blot 分析により解析していたが、より明解に raft 画分と non-raft 画分を分けるために、Optiprep (30-35%) を用いて分画し、raft marker である caveolin-1 および non-raft marker である transferrin receptor を指標に分画し、NMT1 もしくは NMT2 を阻害した場合における Pr55^{gag}、および nef タンパク質の細胞内局在を詳しく検討した。その結果、control 細胞および NMT2 をノックダウンした細胞と比べて NMT1 をノックダウンした細胞では、non-raft/raft における Pr55^{gag} の検出比が大きくなっており、やはり NMT1 ノックダウンすることにより Pr55^{gag} の raft への移行が正常に行われなくなり、それに伴ってウイルスの感染価が低下していることが示唆された (現在論文投稿に向けて準備中)。一方、nef タンパク質もウイルス粒子内に取り込まれることが判っていることから、最終的にどちらの NMT isozyme によって nef 機能が機能が影響されるか検討を進めている。

D. 考察

本研究では、HIV-1 複製阻害戦略の一つとして、新たな *N*-myristoylation 阻害戦略を展開するに当たり、ヒトにおいて複数存在する hNMT isozyme の中でどの isozyme が HIV-1 複製と密接に関与しているかを同定することを目的とした。現在までに、hNMT isozyme 特異的阻害剤が存在しないため、本研究では siRNA によって hNMT isozyme の発現量を特異的に抑制させた細胞を用いて検討した。HIV-1 ライフサイクルにおいて HIV-1 の構造タンパク質である Pr55^{gag} は *N*-myristoylation を受けそれがウイルス粒子の感染性獲得に必須であることは周知のことである。そこで、今回はこの *N*-myristoylation が行われる HIV-1 ライフサイクルの中で特に late stage における hNMT isozyme 特異的ノックダウンのウイルス感染性に与える影響を検討した。

はじめに、今回使用した siRNA のノックダウン効果を各 mRNA およびタンパク質発現レベルを調べることで検討した。その結果用いた siRNA はそれぞれの標的 isozyme を同程度にノックダウンすることが確認された。従って、それぞれの isozyme の HIV-1 複製に与える影響を調べるに当たりこれら siRNA は適当であると考えられた。

次に、siRNA の細胞生存に与える影響を検討した。用いた細胞は HEK293 と神経様細胞に分化させた SK-N-SH を用いた。各シングルノックダウンはダブルノックダウンよりも細胞生存率の低下に与える影響が小さいことが示され、各 isozyme 特異的阻害戦略によって、従

来の *N*-myristoylation 阻害戦略で危惧されていた副作用の発現が軽減されることが期待される。

次に各 hNMT isozyme ノックダウンの HIV-1 複製に与える影響を検討した。Fig. 2 に示されたように、hNMT1 isozyme をノックダウンした細胞においてより効果的に HIV-1 の感染性の低下が観察され、HIV-1 複製の late stage において、hNMT1 が hNMT2 より密接に関連していることが示唆された。この結果はまた、細胞内の hNMT isozyme の役割の違いの存在を示す初めての結果である。

昨年度は、界面活性剤 0.1% Triton X100 で可溶化し得られた不溶性の沈殿を raft 由来の細胞性画分として解析を行っていたが、より詳細に Optiprep (30-35%)を用いて解析を行った結果、NMT1 isozyme をノックダウンすると Pr55^{gag} の raft への適切な移行が影響を受けるため、ウイルスの感染性が低下すると示唆される。さらに、我々はこれまでに感染性のウイルスが出芽するには gp41 と Pr55^{gag} の相互作用が重要であることを報告している (Biochem. Biophys. Res. Commun. (1997) 237: 504-511.)。したがって、Pr55^{gag} の raft への traffic が影響を受けることによって Env 自身の膜移行も影響を受けているのではないかと考えており、ENV のウイルス取り込みも検討したいと考えている。Nefタンパク質の解析と NMT1 阻害剤の screening の準備は進行中である。

E. 結論

本年度の研究の結果、各 NMT isozyme は細

胞内で固有の役割を有し、HIV-1 複製の late stage,特にPr55^{gag}のN-myristoylation に対してはNMT1 がNMT2よりも密接に関与していることが示唆された。今回得られた知見が、HIV 脳症発症制御のための新しい戦略の一つへと発展展開すると期待される。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shogo Misumi, Daisuke Nakayama, Masashi Kusaba, Takaaki Iiboshi, Ryouzaburo Mukai, Kuniomi Tachibana, Tadashi Nakasone, Mamoru Umeda, Hideaki Shibata, Masafumi Endo, Nobutoki Takamune, and Shozo Shoji Effects of Immunization with CCR5-Based Cycloimmunogen on Simian/HIVSF162P3 Challenge. *J. Immunol.* 176, 463-471. (2006)
2. Daisuke Nakayama¹, Shogo Misumi¹, Ryouzaburo Mukai, Kuniomi Tachibana, Mamoru Umeda, Hideaki Shibata, Nobutoki Takamune and Shozo Shoji Suppression of Multiclade R5 and X4 Human Immunodeficiency Virus Type-1 Infections by a Coreceptor-Based Anti-HIV Strategy. *J. Biochem.* 138, 1-12 (2005)

2. 学会発表

1. Kenzo Tanaka, Nobutoki Takamune, Shigetaka Okinaka, Ichiro Takahashi, Michiho Takama, Shogo Misumi, Shozo Shoji Human N-myristoyltransferase1 (hNMT1) plays important roles for late stage of human immunodeficiency virus type-1 replication. *Seikagaku* 77, 896 (2005)
2. Kenzo Tanaka, Nobutoki Takamune, Shogo Misumi, Shozo Shoji HIV-1 life cycle における NMT isozyme の siRNA による knockdown による影響 ウイルス学会 53, P2134 (2005)
3. Kenzo Tanaka, Nobutoki Takamune, Shogo Misumi, Shozo Shoji HIV-1life cycle の後期過程に対する NMT isozyme の重要性の検討 エイズ学会 19, 141 (2005)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許出願中

ヒト N-ミリストイルトランスフェラーゼ各アイソザイム特異的抑制:siRNA による各種疾病治療戦略の考案

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

「エイズ脳症の疾患感受性 -HAM との対比-

分担研究者 熊本大学 医学部附属病院 医療情報経営企画部 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：2003年「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」、2004年「HIV 脳症と HAM 発症宿主要因の比較」の検討結果から、HAART 導入以後 HIV 脳症の疫学的背景の変化が著しく、これは HIV 脳症の発症機序が変化してきていることを伺わせた。更に HIV 脳症の発症原因、病態の理解を進めるために、レトロウイルス感染による脊髄症である HAM (HTLV-I 関連脊髄症)との対比を行い、研究を進めた。両疾患に共通な点はウイルス量が増していること、発症に宿主要因が関連していることであった。相違点では、最も大きな違いは、HAM ではウイルス変異がほとんどないに対し、HIV 脳症では末梢血 > 髄液 > 脳内とウイルス変異が少なくなっていく点であり、HIV 脳症の発症予測には V3 envelope の変異が有用である点であった。

A. 研究目的

2003年「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」、2004年「HIV 脳症と HAM 発症宿主要因の比較」の検討結果から、HAART 導入以後 HIV 脳症の疫学的背景の変化が著しく、これは HIV 脳症の発症機序が変化してきていることを伺わせた。更に HIV 脳症の発症原因、病態の理解を進めるために、レトロウイルス感染による脊髄症である HAM (HTLV-I 関連脊髄症)との対比を行い、研究を進めた。

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 HIV 脳症発症に関連しているウイルス因子、宿主要因について解析を行った。

(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

両疾患に共通な点はウイルス量が増していること、発症に宿主要因が関連していることであった(表)。相違点では、最も大きな違いは、HAM ではウイルス変異がほとんどないに対し、HIV 脳症では末梢血 > 髄液 > 脳内とウイルス変異が少なくなっていく点であり、HIV 脳症の発症予測には V3 envelope の変異が有用である点であった(図)。

D. 考察

HIV 脳症と HAM の発症機序に関して、共通と思われる点、全く異なると思われる点が明らかとなってきた。このことは HIV 脳症の治療戦略を決定していく上で極めて重要な情報となると考えられた。

E. 結論

今後 HIV 脳症発症機序を解明する上で他の類似疾患の発症機序も含めた考察を加えてながら治療法を模索していく方法は必須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

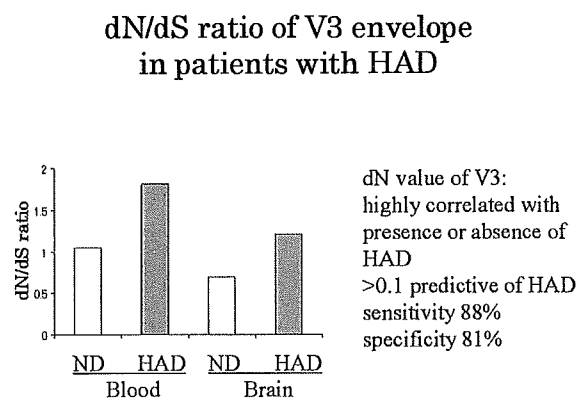
- (1) Nobuhara Y, Usuku K, Saito M, Izumo S, Arimura K, Bangham CR, Osame M. Genetic variability in the extracellular matrix protein as a determinant of risk for developing HTLV-I-associated neurological disease. **Immunogenetics**. 2006 57:944-52.
- (2) Matsuzaki T, Saito M, Usuku K, Nose H, Izumo S, Arimura K, Osame M. A prospective uncontrolled trial of fermented milk drink containing viable *Lactobacillus casei* strain Shiota in the treatment of HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **J Neurol Sci**. 2005 237:75-81.
- (3) Saito M, Eiraku N, Usuku K, Nobuhara Y, Matsumoto W, Kodama D, Sabouri AH, Izumo S, Arimura K, Osame M. ApaI polymorphism of vitamin D receptor gene is associated with susceptibility to HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in HTLV-1 infected individuals. **J Neurol Sci**. 2005 232:29-35.
- (4) Sabouri AH, Saito M, Usuku K, Bajestan SN, Mahmoudi M, Forughipour M, Sabouri Z, Abbaspour Z, Goharjoo ME, Khayami E, Hasani A, Izumo S, Arimura K, Farid R, Osame M. Differences in viral and host genetic risk factors for development of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis between Iranian and Japanese HTLV-1-infected individuals. **J Gen Virol**. 200586:773-81.
- (5) Mori S, Mizoguchi A, Kawabata M, Fukunaga H, Usuku K, Maruyama I, Osame M. Bronchoalveolar lymphocytosis correlates with human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) proviral DNA load in HTLV-I carriers. **Thorax**. 2005 60:138-43.

特にない。

3. その他

特にない。

図. HIV 脳症のウイルス変異



(van Marle et al 2002)

表. HIV 脳症 と HAM の相違

HIV脳症 と HAM

	HAD	HAM
ウイルス量	↑	↑
ウイルス変異	PBL>CSF>Brain	↓↓↓
宿主要因	+	+
多変量解析	-	+
発症予測	dN	予測式

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

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

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
岸田修二	238 AIDS	祖父江 元	看護のための最新 医学講座 第2版	中山書店	東京	2005	228-238
Masanori Baba	Cellular factors as targets for anti-HIV-1 chemotherapy	S.T. Butera	HIV Chemotherapy: A Critical Review	Horizon Scientific Press/Caiste r Academic Press	Norfor k, UK	2005	241-260

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
Izumo S, Xing HQ, Hayakawa H, Kasai T, Budka H.	HIV encephalitis and degeneration of the cerebral cortex occur independently in the brain of AIDS patients.	J Neurol Sci	238	S98	2005
Xing HQ, Hayakawa H, Kasai T, Budka H, Izumo S.	Reduced expression of excitatory amino acid transporter-2 (EAAT-2) and activation of microglia in the cerebral cortex of AIDS patient.	J Neurol Sci	238	S318	2005
Furukawa Y, Tara M, Izumo S, Arimura K, Osame M.,:	HTLV-I viral escape and host genetic changes in the development of adult T cell leukemia.	Int J Cancer	118	381-387	2006
Matsuzaki T, Saito M, Usuku K, Nose H, Izumo S, Arimura K, Osame M.	A prospective uncontrolled trial of fermented milk drink containing viable Lactobacillus casei strain Shirota in the treatment of HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis.	J Neurol Sci	237	75-81	2005
Sabouri AH, Saito M, Usuku K, Bajestan SN, Mahmoudi M, Foroughipour M, Sabouri Z, Abbaspour Z, Goharjoo ME, Khayami E, Hasani A, Izumo S, Arimura K, Farid R, Osame M.	Differences in viral and host genetic risk factors for development of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis between Iranian and Japanese HTLV-1-infected individuals	J Gen Virol	86	773-781	2005
岸田修二	HIV脳症の治療	日本医事新報	NO. 4250	89	2005
岸田修二	AIDS患者に伴う中枢神経日和見感染症：診断と治療.	Neuroinfection	10	24-30	2005
Yoritaka A, Ohta K, Kishida S	Herpetic lumbosacral radiculoneuropathy in patients with human immunodeficiency virus infection	Eur Neurol	53	179-181	2005
岸田修二	HIV脳症	Clinical Neuroscience	23	788-791	2005
Fujigaki H, Saito K, Lin F, Fujigaki S, Takahashi k, Martin BM, Chen CY, Masuda J, Kowalak J, Takikawa O, Seishima M, Markey SP	Nitration and inactivation ofIDO by peroxynitrite	J. Immunol.	176	372-379	2006

Fujigaki H, Saito K, Fujigaki S, Takemura M, Sudo K, Ishiguro H, Seishima M.	The signal transducer and activator of transcription 1 α and interferon regulatory factor 1 are not essential for induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by lipopolysaccharide: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor κ B pathways, and synergistic effect of several proinflammatory cytokines.	J Biochem.	In Press		2006
Zhu Y, Saito K, Murakami Y, Asano M, Iwakura Y, Seishima M	Early increase in mRNA levels of pro-inflammatory cytokines and their interaction in the mouse hippocampus after transient global ischemia	Neurosci Lett	393	122-126	2006
Murakami Y, Saito K, Hara A, Zhu Y, Sudo K, Niwa M, Fujii H, Wada H, Ishiguro H, Mori H, Seishima M	Increases in TNF- α following transient global cerebral ischemia do not contribute to neuron death in mouse hippocampus	J. Neurochem,	93	1616-1622	2005
Sudo K, Ymada Y, Moriwaki H, Saito K, Seishima M	Lack of tumor necrosis factor receptor type 1 inhibits liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice.	Cytokine,	29	236-244	2005
Miyoshi M, Nadai M, Nitta A, Ueyama J, Shimizu A, Takagi K, Nabeshima T, Takagi K, Saito K, Hasegawa T.	Role of tumor necrosis factor-alpha in down-regulation of hepatic cytochrome P450 and P-glycoprotein by endotoxin	Eur J Pharmacol.,	507	229-37	2005
Nakai M, Sudo K, Yamada Y, Kojima Y, Kato T, Saito K, Moriwaki H, Seishima M.	The Role of the Tumor Necrosis Factor Receptor in 2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid (TNBS)-Induced Colitis in Mice.	Dig Dis Sci.	50	1669-76	2005
Wang X, Baba M	A role of breast cancer resistance protein (BCRP/ ABCG2) in the cellular resistance to HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors	Antiviral Chem. Chemother.	16	213-216	2005
Tanaka H, Haraguchi K, Kumamoto H, Baba M, Cheng Y-C	4'-Ethynylstavudine (4'-Ed4T) has potent anti- HIV-1 activity with reduced toxicity and shows a unique activity profile against drug-resistant mutants	Antiviral Chem. Chemother	16	217-221	2005
Nitanda T, Wang X, Kumamoto H, Haraguchi K, Tanaka H, Cheng Y-C, Baba M	Anti-human immunodeficiency virus type 1 activity and resistance profile of 2',3'-didehydro-3'- deoxy-4'- ethynylthymidine in vitro	Antimicrob. Agents Chemother.	49	3355-3360	2005
Takashima K, Miyake H, Kanzaki N, Tagawa Y, Wang X, Sugihara Y, Iizawa Y, Baba M	Highly potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by TAK-220, an orally bioavailable small molecule CCR5 antagonist	Antimicrob. Agents Chemother.	49	3474-3482	2005
Okamoto M, Wang X, Baba M	HIV-1-infected macrophages induce astrogliosis by SDF-1 α and matrix metalloproteinases	Biochem. Biophys. Res. Commun.	336	1214-1220	2005
Baba M, Takashima K, Miyake H, Kanzaki N, Teshima K, Wang X, Shiraishi M, Iizawa Y	TAK-652 inhibits CCR5-mediated HIV-1 infection in vitro and has favorable pharmacokinetics in humans	Antimicrob. Agents Chemother.	49	4584-4591	2005
Baba M	Recent status of HIV-1 gene expression inhibitors	Antiviral Res.			in press

Shiga Y, Wakabayashi H, Miyazawa K, Kido H and Itoyama Y.	14-3-3 Protein levels and isoform patterns in the cerebrospinal fluid of Creutzfeldt-Jakob disease patients in the progressive and terminal stages.	J. Clin. Neurosci.		In press	2006
Yao D, Kuwajima M, Chen Y, Shiota M, Okumura Y, Yamada H and Kido H.	Impaired long-chain fatty acid metabolism in mitochondria causes brain vascular invasion by a non-neurotropic epidemic influenza A virus in the newborn/suckling period: implications for influenza-associated encephalopathy.	Mol. Cell Biochem.		In press	2006
Chen Y, Mizuguchi D, Yao D, Ide M, Kuroda Y, Shigematsu Y, Yamaguchi S, Yamaguchi M, Kinoshita M and Kido H.	Thermolabile phenotype of carnitine palmitoyltransferase II variations as a predisposing factor for influenza-associated encephalopathy.	FEBS Lett.	579	2040-2044	2005
Mori K, Sugimoto C, Ohgimoto S, Nakayama EE, Shioda T, Kusagawa S, Takebe Y, Kano M, Matano T, Yuasa T, Kitaguchi D, Miyazawa M, Takahashi Y, Yasunami M, Kimura A, Yamamoto N, Suzuki Y, Nagai Y	Influence of glycosylation on the efficacy of an Env-based vaccine against simian immunodeficiency virus SIVmac239 in a macaque AIDS model.	J Virol	79	10386-96	2005
Shogo Misumi, Daisuke Nakayama, Masashi Kusaba, Takaaki Iiboshi, Ryouzaburo Mukai, Kuniomi Tachibana, Tadashi Nakasone, Mamoru Umeda, Hideaki Shibata, Masafumi Endo, Nobutoki Takamune, and Shozo Shoji	Effects of Immunization with CCR5-Based Cycloimmunogen on Simian/HIVSF _{162P3} Challenge.	J. Immunol.	176	463-471	2006
Daisuke Nakayama, Shogo Misumi, Ryouzaburo Mukai, Kuniomi Tachibana, Mamoru Umeda, Hideaki Shibata, Nobutoki Takamune and Shozo Shoji	Suppression of Multiclade R5 and X4 Human Immunodeficiency Virus Type-1 Infections by a Coreceptor-Based Anti-HIV Strategy.	J. Biochem	138	1-12	2005
Nobuhara Y, Usuku K, Saito M, Izumo S, Arimura K, Bangham CR, Osame M.	Genetic variability in the extracellular matrix protein as a determinant of risk for developing HTLV-I-associated neurological disease.	Immunogenetics	57	944-52	2006
Saito M, Eiraku N, Usuku K, Nobuhara Y, Matsumoto W, Kodama D, Sabouri AH, Izumo S, Arimura K, Osame M.	ApaI polymorphism of vitamin D receptor gene is associated with susceptibility to HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in HTLV-1 infected individuals.	J Neurol Sci.	232	29-35	2005
Mori S, Mizoguchi A, Kawabata M, Fukunaga H, Usuku K, Maruyama I, Osame M.	Bronchoalveolar lymphocytosis correlates with human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) proviral DNA load in HTLV-I carriers.	Thorax.	60	138-43	2005