

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

「Vpr を標的としたエイズ発症阻止」に関する研究
分担研究者 石坂幸人 国立国際医療センター研究所

Vpr によってゲノム DNA の二重鎖切断 (DSB: double strand breaks) が誘導されることを見出すと共に、血中 Vpr を検出するためのシステムを構築し、14 名の HIV-1 感染者の血漿について解析した。その結果、5 ng/ml 前後の濃度で血中に存在する症例が存在し、Vpr の検出が血中ウイルス RNA のコピー数と良く相関することを認めた。精製 Vpr を調整し、血中で検出されるのとはほぼ同濃度の Vpr をマクロファージに作用させると、DNA 損傷が誘導されることも明らかとなった。

A. 研究目的

Vpr は単球/マクロファージ系細胞へのウイルス初期感染における役割で重要であることが報告されているが、その機序については明確になっていない。本年度は、ウイルスのマクロファージへの感染機序を理解するための重要な情報として Vpr が DSB を誘導することを明らかにするとともに、HIV 陽性者の体内における Vpr 機能を明確にすることを目的に、患者体液中の Vpr 濃度を把握した。

B. 研究方法

ウイルス DNA 感染実験に使用する DNA は NL4-3 株由来遺伝子で、組み換え型 DNA として ENV 領域を欠失し、NEF 領域にルシフェラーゼ遺伝子が挿入されている。この遺伝子は国立感染症研究所、感染病理部の徳永研三博士から供与を受けた。これを基本型 (R+) とし、vpr 領域にストップコドンが挿入された変異体 (以下 R-) の 2 つのウイルスを用いた。VSV-G 発現プラスミド DNA と共に 293T 細胞に導入し、シールドタイプウイルスを作成した。得られたウイルス量は上清中の p24 を ELISA にて測定した。

R+ウイルスによる DSB Vpr を含むウイルスを培養細胞に感染させ 2 日後に回収し、アガロースゲル中に包埋した。Proteinase K 及び SDS を用いて蛋白質を消化し、パルスフィールド電気泳動法による解析に供した。陽性コントロールとして 7.5Gy の放射線照射後の細胞を用いた。電気泳動後、ゲルをピストラグリーンで染色し、DNA の泳動パターンを比較した。

HIV-1 陽性者血漿中 Vpr の検出 2 種類の単クロー

ン抗体の内、C217 で免疫沈降 (IP) を行い、8D1 でウエスタン解析 (WB) を行った。各検体 200 ul を DNaseI 及び RNase で処理した後、解析に供した。標準サンプルとして、大腸菌で発現・精製した Vpr を用いた。以前作成した Vpr 測定用の ELISA (バージョン-1) により、Vpr 濃度を把握した。標準検体として、5、2.5 及び 1.25 ng 相当の Vpr 精製標品を健常人の血漿に混和し、HIV-1 検体と同様の IP-WB を行い、Vpr を検出した。

Vpr 添加による DNA 損傷 HIV-1 陽性患者血漿中で検出される濃度と同程度の濃度で Vpr を作用させた際の細胞側の反応を観察した。健常人由来マクロファージに対して 5 ng/ml の Vpr を添加し、2 日後に、DNA 損傷のマーカーである γ -H2AX の染色性を解析した。

(倫理面への配慮)

HIV-1 陽性者の検体の供与を受けるに当たり、国立国際医療センター倫理委員会及び共同研究の医療機関での承認を得た。健常人から末梢血の供与を受ける場合には、ドナーに実験の内容を十分に説明し、自由意志のもとに献血を依頼した。一回の採血量は 5-50 ml とした。

本研究に関連する実験は大臣確認実験「17 国分科振第 17 号」として承認された。

C. 研究結果

1. 陽性コントロールとして、X-線照射後の細胞の DNA をパルスフィールド電気泳動法で解析すると、高分子 DNA の下に DNA の“ダマ”が検出さ

れた。Vpr を含むウイルスを感染させた後の細胞中にも同様の“ダマ”が認められた。また、Vpr 発現細胞中に DSB の際に誘導されるリン酸化 ATM、リン酸化 Chk2 及び Rad51 のフォーカス形成が認められたことから、Vpr 発現により DSB が誘導されることが明らかとなった。

2. 14 症例の HIV-1 陽性患者血漿中の Vpr を解析した。その結果、6 名で Vpr が検出された。その濃度は、約 5 ng/ml 程度を示す症例が認められた。HIV-1 陰性健常人 30 例について解析したが、いずれの検体でも約 14 kDa の蛋白質が検出されることはなかった。
3. Vpr の検出と血中 HIV-RNA コピー数との間に正の相関が認められたが、今後さらに症例数を増やして解析することを計画している。興味深い事に、高いウイルス価を示すにもかかわらず、Vpr が検出されない症例が認められた。この症例の vpr 遺伝子を解析したところ、ヌクレオチド 79 の位置に 4 個の塩基が挿入され、3'直下にストップコドンが出現することが明らかになった。
4. 患者血中に存在する Vpr と同程度の濃度の生物活性を検定した。健常人由来マクロファージに 5 ng/ml の Vpr を添加し、2 日後に DNA 損傷のマーカである γ -H2AX の染色を行ったところ、数は少ないもののフォーカス形成が認められた。50 ng/ml の Vpr を作用させるとこのフォーカスは顕著に認められた。

D. 考察

Vpr による DSB Vpr により DSB が誘導された。精製したリコンビナント Vpr 蛋白質を裸核に作用させると再現良く DSB が誘導されたこと、また Vpr の DNA 結合ドメインである C 末端領域を欠失させると DSB の誘導能が減弱すること、さらに Vpr 自身をプラスミド DNA と混和しても DSB やニックの形成は誘導されないことから、Vpr は核内に存在する内在性の因子に作用しながら、DNA に自身が結合することで、DSB を誘導することが強く示唆された。以前の解析から Vpr はクロマチンヒストンのアセチル化を高度に誘導する事が明らかとなっている。Vpr がマクロファージに感染する際、クロマチン構造を緩めながら、ゲノム DNA に修飾因子をリクルートし、DSB を誘導する機構を考えている。その機序の解明

は今後の研究課題である。

血中 Vpr の検出と DSB HIV 陽性症例中の血液中に 5 ng/ml (約 3 nM) 程度の Vpr が存在することが明確になった。また Vpr の検出と血中 HIV-RNA コピー数との間に正の相関が認められた。

Vpr による DSB R+ウイルスをマクロファージに感染させると DSB が誘導され、精製 Vpr をマクロファージの培養系に添加しても DNA 損傷のマーカである γ -H2AX の発現が誘導された。その濃度としては 5 ng/ml 程度でも活性を示し、50 ng/ml の Vpr で顕著な DNA 損傷形質が認められた。ウイルス産生が盛んに行われている組織中の Vpr は血中の濃度と比較して高い可能性があるため、ウイルス産生部位に局在する細胞中には高度の DSB が存在する可能性が考えられる。

エイズ症例では高頻度の B 細胞性リンパ腫が認められる。また、一度 HIV に感染すると、原行の ART 療法では、体からウイルスを駆逐することは極めて難しいことが知られている。即ち、一度 HIV に感染すると、体中の細胞が一生 DSB を誘発される環境下に置かれるという可能性が考えられる。Vpr による DSB がエイズ症例で認められる悪性腫瘍発症の分子基盤となっている可能性を考えている。今後、この可能性を検証する一方、HIV 陽性者の体細胞中での DSB の検出を試みる予定である。

Vpr による DSB の機序とウイルス感染における意義については、現在のところ不明である。しかし、裸核にリコンビナント Vpr を作用させることにより DSB が誘導されること、Vpr の DNA 結合ドメインである C 末端領域を欠失させると DSB 誘導能が減弱すること、さらに Vpr 自身には DNA に対するニッキング作用や二重鎖切断を誘導する機能を示さないことから、核内の内在性因子に作用して DSB を誘導するものと考えられる。

マクロファージは DNA 合成を行わないため、これに伴って自然に発生する DSB は存在しない。インテグレースがゲノム DNA にウイルス DNA を挿入する際、DSB をより所に行っているのか、または DSB により誘導される細胞内反応に依存して機能しているのかについては不明である。しかし、X-線照射等で DSB を誘導すると、細胞内の組換え修復頻度が増加することを認めており、DSB がウイルスのインテグレーションに対して有利に作用する可能性が考えられる。今後、Vpr によ

る DSB とマクロファージへの感染効率 (挿入頻度) の関連性について明確にし、Vpr-DSB の持つ意義を明らかにする予定である。

E. 結論

Vpr は単球/マクロファージ系細胞へのウイルス感染に重要であること、また Vpr が DSB を誘発することを見出した。2 者の関連について、今後解析する。

F. 健康危険情報 特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tachiwana, T., Shimura, M., Nakai-Murakami, C., Tokunaga, K., Takizawa, Y., Sata, T., Kurumizaka H., and Ishizaka, Y. HIV-1 Vpr induces DNA double-strand breaks. *Cancer Res.*, 66, 627-631, 2006.
2. Mizoguchi, I., Ooe, Y., Hoshino, S., Shimura, M., Kasahara, T., Ohta, T., Kano, S., Takaku, F., Nakayama, Y., and Ishizaka, Y. Improved gene expression in resting macrophages using an oligopeptide derived from Vpr of human

immunodeficiency virus type-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 338, 1499-1506, 2005.

3. Shimura, M., Tokunaga, K., Konishi, M., Sato, Y., Kobayashi, C., Sata, T., and Ishizaka, Y. Premature sister chromatid separation in HIV-1-infected peripheral blood lymphocytes. *AIDS* 19, 1434-1438, 2005.

2. 学会発表

1. Taguchi T, Shimura M, Kinomoto M, Tokunaga K, Sata T, Ishizaka Y. Mitotic abnormalities induced by Vpr, an accessory gene product of HIV-1. Salk/EMBL, Oncogene and Growth Control. Salk, Ssan Diego, USA, August, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 無
2. 実用新案登録 無
3. その他 無

研究成果の刊行に関する一覧表

1. 書籍

該当なし

2. 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
Tomonari A, Takahashi S, Shimohakamada Y, Ooi J, Takasugi K, Ohno N, Konuma T, Uchimaru K, Tojo A, Odawara T, Nakamura T, Iwamoto A, Asano S.	Unrelated cord blood transplantation for a human immunodeficiency virus-1-seropositive patient with acute lymphoblastic leukemia.	Bone Marrow Transplant	36	261-262	2005
T. Maeda, T. Fujii, T. Matsumura, T. Endo, T. Odawara, D. Itoh, Y Inoue, T. Okubo, A. Iwamoto, T. Nakamura.	AIDS-related cerebral toxoplasmosis with hypertense foci on T1-weighted MR images: A case report.	J. Infect.	in press		

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
Song, H., Nakayama, E. E., and Shioda, T.	Effects of human interleukin 7 on HIV-1 replication in monocyte-derived human macrophages.	AIDS	In press		2006
Nuanjun Wichukchinda, Emi E Nakayama, Archawin Rojanawiwat, Panita Pathipvanich, Wattana Auwanit, Suthon Vongsheree, Koya Ariyoshi, Pathom Sawanpanyalert, and <u>Tatsuo</u> <u>Shioda</u> .	Protective Effects of <i>IL-4 -589T</i> and <i>RANTES</i> <i>-28G</i> on HIV-1 disease progression in infected Thai females.	AIDS	20	189-196	2006
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.	79	8870-8877	2005

<p>Kazuyasu Mori, Chie Sugimoto, Shinji Ohgimoto, Emi E. Nakayama, <u>Tatsuo Shioda,</u> Shigeru Kusagawa, Yutaka Takebe, Munehide Kano, Tetsuro Matano, Takae Yuasa, Masaaki Miyazawa, Yumiko Takahashi, Michio Yasunami, Akinori Kimura, Naoki Yamamoto, Yasuo Suzuki, and Yoshiyuki Nagai.</p>	<p>Influence of glycosylation on the efficacy of an Env-based vaccine against SIVmac239 in a macaque AIDS model.</p>	<p>J. Virol</p>	<p>79</p>	<p>10386-1039 6</p>	<p>2005</p>
---	--	-----------------	-----------	-------------------------	-------------

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻	ページ	出版年
Munkanta M, Terunuma H, Takahashi M, Hanabusa H, Miura T, Ikeda S, Sakai M, Fujii T, Takahashi Y, Oka S, Matsuda J, Ishikawa M, Taki M, Takashima Y, Mimaya J, Ito M, Kimura A, Yasunami M	HLA-B polymorphism in Japanese HIV-1-infected long-term surviving hemophiliacs.	Viral Immunology	18	500- 505	2005
三間屋純一、福武勝幸、西田恭治、 出河雅彦、徳永信一、花井十伍、 北村健太郎、大西赤人、草田 央	HIV感染症と血友病 —回顧と展望—	日本エイズ 学会誌	Vol. 7 No.2	61-76	2005
三間屋 純一	わが国におけるHIV/AIDS 医療の現状と課題	日本小児科 学会雑誌	Vol. 109 No. 10	1192- 1204	2005

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Fujita N, Miyamoto T, Imai J, Hosogane N, Suzuki T, Yagi M, Morita K, Ninomiya K, Miyamoto K, Takaishi H, Matsumoto M, Morioka H, Yabe H, Chiba K, <u>Watanabe S</u> , Toyama Y, Suda T.	CD24 is expressed specifically in the nucleus pulposus of intervertebral discs.	Biochem Biophys Res Commun.	338	1890-1896	2005
Sakamoto A, Imai J, Nishikawa A, Honma R, Ito E, Yanagisawa Y, Kawamura M, Ogawa R, <u>Watanabe S</u> .	Influence of inhalation anesthesia assessed by comprehensive gene expression profiling.	Gene	356	39-48	2005

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Kida, Y., S. Tsuji-Kawahara, V. Ostapenko, S. Kinoshita, E. Kajiwara, H. Kawabata, T. Yuasa, I. Nishide, S. Yukawa, M. Ichinose, and <u>M. Miyazawa</u>	Increased liver temperature efficiently augments human cellular immune response: T cell activation and possible monocyte translocation.	<i>Cancer Immunol. Immunother.</i>		印刷中	2006
Kawabata, H., A. Niwa, S. Tsuji-Kawahara, H. Uenishi, N. Iwanami, H. Matsukuma, H. Abe, N. Tabata, H. Matsumura, and <u>M. Miyazawa</u>	Peptide-induced immune protection of CD8 ⁺ T cell-deficient mice against Friend retrovirus-induced disease.	<i>Int. Immunol.</i>	18	183-198	2006
Mori, K., C. Sugimoto, S. Ohgimoto, E. E. Nakayama, T. Shioda, S. Kusagawa, Y. Takebe, M. Kano, T. Matano, T. Yuasa, D. Kitaguchi, <u>M. Miyazawa</u> , Y. Takahashi, M. Yasunami, A. Kimura, N. Yamamoto, Y. Suzuki, and Y. Nagai	Influence of glycosylation on the efficacy of an Env-based vaccine against SIV _{mac} 239 in a macaque AIDS model.	<i>J. Virol.</i>	79	10386-10396	2005
Kanari, Y., M. Clerici, H. Abe, H. Kawabata, D. Trabattoni, S. Lo Caputo, F. Mazzotta, H. Fujisawa, A. Niwa, C. Ishihara, Y. A. Takei, and <u>M. Miyazawa</u>	Genotypes at chromosome 22q12-13 are associated with HIV-1-exposed but uninfected status in Italians.	<i>AIDS</i>	19	1015-1024	2005

研究成果の刊行に関する一覧表

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
上野貴将、滝口雅文	HIVに対する細胞傷害性T細胞の免疫応答	The Journal of AIDS Research	7	155-160	2005

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
Matsushita, S., Yoshimura, K., Kimura T., Kamihira, A., Takano, M., Eto, K., Shirasaka, T., Mitsuya, H., Oka, S.	Spontaneous recovery of hemoglobin and neutrophil levels in Japanese patients on a long-term Combivir ^B containing regimen.	J.Clin.Virol.	33	188-193	2005
Sakaguchi, N., Kimura T., Matsushita, S., Fujimura S., Shibata J., Araki M., Sakamoto T., Minoda S., and Kuwahara K.	Generation of high-affinity antibody against T cell- dependent antigen in gap gene- transgenic mouse.	J. Immunol.	174	4485-4494	2005

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
なし							

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
Nakata H., Maeda K., Miyakawa T., Shibayama S., Matsuo M., Takaoka Y., Ito M., Koyanagi Y., and Mitsuya H.	Potent Anti-R5-human immunodeficiency virus type 1 effects of a CCR5 antagonist, AK602/ONO4128/GW873140, in a novel human peripheral blood mononuclear cell nonobese diabetic-SCID, interleukin 2 receptor γ -chain-knocked-out AIDS mouse model.	Journal of Virology	79	2087-2096	2005
Miura Y., and Koyanagi Y.	Death ligand-mediated apoptosis in HIV infection.	Reviews in Medical Virology	15	169-178	2005
Matsuura-Sawada R., Murakami T., Ozawa Y., Nabeshima H., Akahira J., Sato Y., Koyanagi Y., Ito M., Terada Y., and Okamura K.	Reproduction of menstrual changes in transplanted human endometrial tissue.	Human Reproduction	20	1477-1484	2005

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
Ohkura S., Yamashita M., Ishida T., Babu P.G., <u>Koyanagi Y.</u> , Yamamoto N., Miura T., and Hayami M.	Phylogenetic heterogeneity of new HTLV type 1 isolates from southern India in subgroup A.	AIDS Research and Human Retroviruses	4	325-330	2005
Baba S., Takahashi K., Noguchi S., Takaku H., Koyanagi Y., Yamamoto N., and Kawai G.	Solution RNA structures of the HIV-1 dimerization initiation site in the kissing-loop and extended-duplex dimers.	Journal of Biochemistry	138	583-592	2005
Munakata Y., Saito-Ito T., Kumura-Ishii K., Huang J., Koder T., Ishii T., Hirabayashi Y., <u>Koyanagi Y.</u> , and Sasaki T.	Ku80 autoantigen as a cellular coreceptor for human parvovirus B19 infection.	Blood	106	3449-3456	2005

別紙5

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
なし							

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
Nimura F., Zhang L., Okuma K, Tanaka R., Sunakawa H., Yamamoto N. and <u>Tanaka Y.</u>	Cross-linking cell surface chemokine receptors leads to isolation, activation and differentiation of monocytes into potent DC's.	Exp. Biol. Med.			2006 in press

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
Tachiwana, T., Shimura, M., Nakai-Murakami, C., Tokunaga, K., Takizawa, Y., Sata, T., Kurumizaka H., and Ishizaka, Y.	HIV-1 Vpr induces DNA double-strand breaks.	Cancer Res.,	66	627-631	2006
Mizoguchi, I., Ooe, Y., Hoshino, S., Shimura, M., Kasahara, T., Ohta, T., Kano, S., Takaku, F., Nakayama, Y., and Ishizaka, Y.	Improved gene expression in resting macrophages using an oligopeptide derived from Vpr of human immunodeficiency virus type-1.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	338	1499-1506	2005
Shimura, M., Tokunaga, K., Konishi, M., Sato, Y., Kobayashi, C., Sata, T., and Ishizaka, Y.	Premature sister chromatid separation in HIV-1-infected peripheral blood lymphocytes.	AIDS	19	1434-1438	2005

Correspondence

Unrelated cord blood transplantation for a human immunodeficiency virus-1-seropositive patient with acute lymphoblastic leukemia

Bone Marrow Transplantation (2005) 36, 261–262.
 doi:10.1038/sj.bmt.1705028; published online 23 May 2005

The concurrent use of highly active antiretroviral therapy (HAART) improves results of high-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation (SCT) for human immunodeficiency virus-1 (HIV)-associated lymphomas.¹ Recently, successful allogeneic SCT from HLA-matched sibling donors was reported in HIV-infected patients.^{2–4} Here, we describe the first case of an HIV-infected patient with acute lymphoblastic leukemia (ALL) who underwent umbilical cord blood transplantation (CBT).

In July 1996, a 23-year-old Japanese woman presented with fever and genital herpes. She was confirmed as seropositive for HIV, probably transmitted from her boyfriend. In March 2001, a real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) analysis showed that the HIV-RNA level was elevated to 25 000 copies/ml (lower limit of detection, 50). The CD4 count decreased to 28/ μ l.

Therefore, HAART consisting of 60 mg stavudine, 300 mg lamivudine, and 600 mg efavirenz was initiated. In July 2001, the HIV-RNA level decreased to 220 copies/ml, and the CD4 count increased to 129/ μ l. In May 2003, her complete blood count tests showed a white blood cell count (WBC) of 3990/ μ l with 29% lymphoblasts. Bone marrow (BM) examination showed hypercellularity with 96% lymphoblasts, which were positive for CD4, CD10, CD13, CD19, CD33, CD34, and HLA-DR. Cytogenetic analysis disclosed the presence of t(9;22)(q34;q11) in 12 of 20 metaphases. The p190^{BCR-ABL} transcript was shown by a reverse transcriptase (RT)-PCR analysis. She was diagnosed as Philadelphia chromosome-positive ALL. She achieved hematological complete remission after two courses of chemotherapy. She has been taking HAART during and after the chemotherapy and her HIV-RNA level continued to be below detectable levels. She was negative for hepatitis B virus surface antigen and anti-hepatitis C virus antibody, and positive for anti-cytomegalovirus antibody. As she had no HLA-matched related or unrelated BM donors, the patient underwent CBT from an unrelated donor with mismatches at two loci (HLA-B and DR) in September 2003 (Figure 1). The numbers of total nucleated cells and CD34-positive cells in the cord

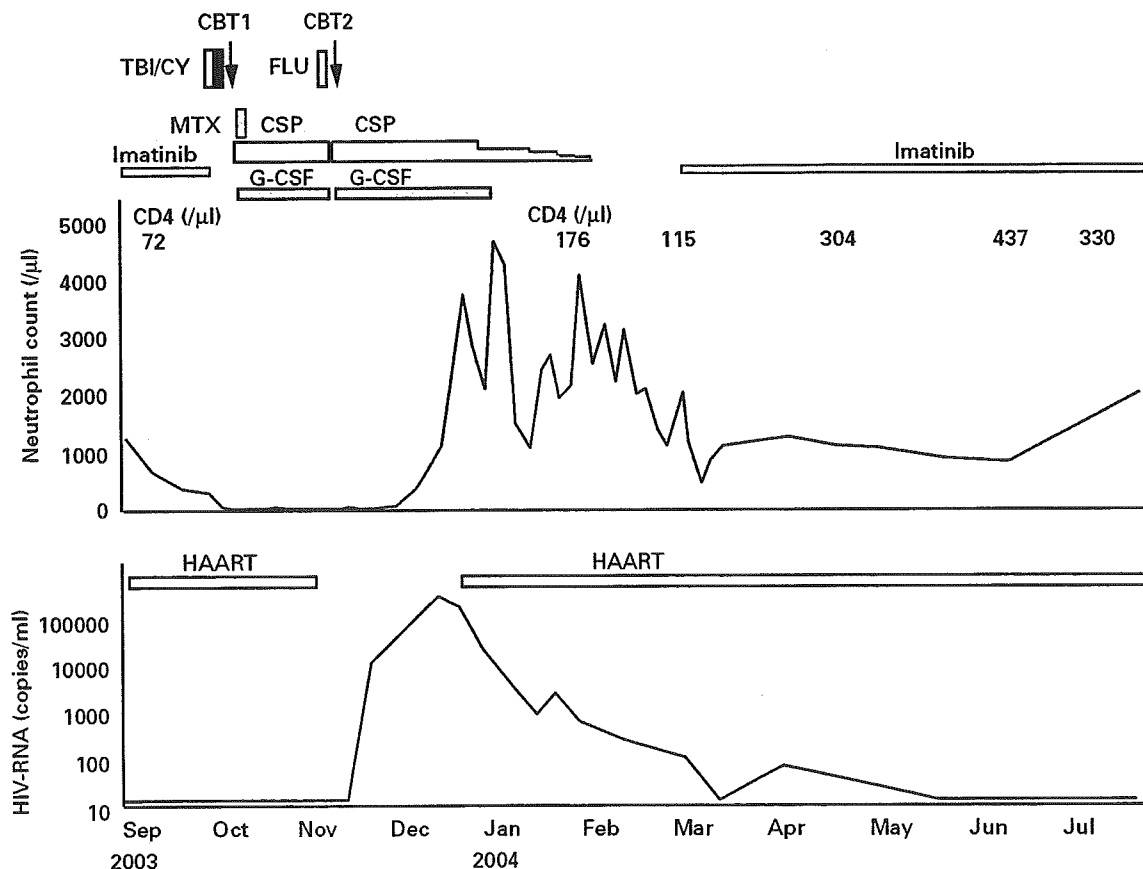


Figure 1 Clinical course of the patient.

blood (CB) unit were $2.9 \times 10^7/\text{kg}$ and $0.76 \times 10^5/\text{kg}$, respectively. The conditioning regimen included 12 Gy total body irradiation and 120 mg/kg cyclophosphamide. Graft-versus-host disease (GVHD) prophylaxis consisted of cyclosporine and methotrexate. The patient tolerated the procedure well with minimal regimen-related toxicity. Owing to possible myelosuppression, HAART was discontinued on day +28. On day +33, her WBC remained below $100/\mu\text{l}$ and all of the BM cells were shown to be derived from the recipient. At 40 days after the first CBT, second CBT was performed from an unrelated donor with a one-locus mismatch at HLA-DR. The numbers of total nucleated cells and CD34-positive cells in the CB unit were $2.1 \times 10^7/\text{kg}$ and $0.46 \times 10^5/\text{kg}$, respectively. The conditioning regimen included 40 mg/m² fludarabine for 3 days. Cyclosporine was administered for GVHD prophylaxis. A neutrophil count consistently greater than $500/\mu\text{l}$ was achieved on day +27. Full donor chimerism of BM cells was shown on day +28. The HIV-RNA level increased to 3×10^6 copies/ml on day +31. After the administration of HAART from day +38, the HIV-RNA levels returned to below detectable levels from day +195, and the CD4 count increased to above $300/\mu\text{l}$ from day +170. No bacterial or fungal infections were documented during the first and second CBT processes and cytomegalovirus reactivation was successfully treated with ganciclovir and foscarnet. Grade I acute GVHD occurred, but resolved without any additional immunosuppressants. No chronic GVHD was observed. An RT-PCR analysis showed continuous negative test results for the p190^{BCR-ABL} transcript until the last follow-up evaluation at 15 months post-CBT.

CBT for adults has been associated with a high rate of early transplantation-related mortality (TRM).^{5,6} However, our single-institution experience showed a 1-year TRM of 9% and 2-year disease-free survival of 74% in 68 adults after CBT.⁷ Both CB donors and the patient in the present study were Japanese. The lesser genetic diversity in a single ethnic population in our studies might be associated with the favorable outcomes of CBT, such as the lower rates of severe acute GVHD. Although our results suggest that CBT is feasible for HIV-infected patients on HAART, the safety and efficacy should be further examined by prospective studies.

A Tomonari¹
S Takahashi¹
Y Shimohakamada¹
J Ooi¹
K Takasugi¹
N Ohno¹
T Konuma¹
K Uchimarui¹
A Tojo¹
T Odawara²
T Nakamura²
A Iwamoto²
S Asano¹

¹Department of Hematology/
Oncology, The Institute
of Medical Science, The
University of Tokyo, Tokyo,
Japan; and
²Department of Infectious
Diseases and Applied
Immunology, The Institute
of Medical Science,
The University of Tokyo,
Tokyo, Japan

References

- 1 Krishnan A, Zaia J, Forman SJ. Should HIV-positive patients with lymphoma be offered stem cell transplants? *Bone Marrow Transplant* 2003; **32**: 741-748.
- 2 Schlegel P, Beatty P, Halvorsen R, McCune J. Successful allogeneic bone marrow transplant in an HIV-1-positive man with chronic myelogenous leukemia. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000; **24**: 289-290.
- 3 Sora F, Antinori A, Piccirillo N *et al*. Highly active antiretroviral therapy and allogeneic CD34(+) peripheral blood progenitor cells transplantation in an HIV/HCV coinfecting patient with acute myeloid leukemia. *Exp Hematol* 2002; **30**: 279-284.
- 4 Kang EM, de Witte M, Malech H *et al*. Nonmyeloablative conditioning followed by transplantation of genetically modified HLA-matched peripheral blood progenitor cells for hematologic malignancies in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Blood* 2002; **99**: 698-701.
- 5 Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P *et al*. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med* 2004; **351**: 2265-2275.
- 6 Rocha V, Labopin M, Sanz G *et al*. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N Engl J Med* 2004; **351**: 2276-2285.
- 7 Takahashi S, Iseki T, Ooi J *et al*. Single institute comparative analysis of unrelated bone marrow transplantation and cord blood transplantation for adult patients with hematological malignancies. *Blood* 2004; **104**: 3813-3820.



ELSEVIER

CASE REPORT

AIDS-related cerebral toxoplasmosis with hyperintense foci on T1-weighted MR images: A case report

T. Maeda^{a,c,*}, T. Fujii^{b,c}, T. Matsumura^{b,c}, T. Endo^c, T. Odawara^c,
D. Itoh^d, Y. Inoue^d, T. Okubo^d, A. Iwamoto^{a,b,c}, T. Nakamura^c

^a International Research Center for Infectious Diseases, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan

^b Division of Infectious Diseases, Advanced Clinical Research Center, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan

^c Department of Infectious Diseases and Applied Immunology, Research Hospital, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan

^d Department of Radiology, Research Hospital, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan

Accepted 8 December 2005

KEYWORDS

Toxoplasmosis;
MRI;
AIDS

Summary The neuroradiological findings are helpful for the diagnosis of toxoplasmic encephalitis. The T1 hypersignal intensity foci on brain magnetic resonance (MR) images without contrast enhancement are presented and can be a pathognomonic sign of this disease.

© 2005 The British Infection Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Most toxoplasmic encephalitis is opportunistic infection complicated with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and immunosuppressive conditions. The diagnosis of this disease is difficult

because of the incompetence of the serological examination for the immunocompromised patients.¹ Although the direct detection method for the pathogen by polymerase chain reaction (PCR) using the cerebrospinal fluid (CSF) has high specificity, the sensitivity of this method is insufficient for definitive diagnosis.² We, therefore, have to synthetically diagnose with clinical symptoms, signs, laboratory data, neuroradiological images and the response to anti-toxoplasmosis therapy.

We report here our experience of a unique MR imaging finding of toxoplasmic encephalitis in an

* Corresponding author. International Research Center for Infectious Diseases, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan. Tel: +81 3 5449 5338; fax: +81 3 5449 5427.
E-mail address: tmaeda@ims.u-tokyo.ac.jp (T. Maeda).

AIDS patient and emphasize the hyperintense foci on T1-weighted MR images that can be one of the pathognomonic MR images of this disease.

Case report

A 44-year-old man with disturbance of consciousness and respiratory insufficiency was admitted to our hospital in April 2005. His consciousness had been rapidly deteriorated and he developed coma 2–3 days before hospitalization. Serological tests of HIV antibodies and *Toxoplasma gondii* IgG antibody were positive, but the *T. gondii* IgM antibody was not detected. The concentration of HIV RNA in plasma was 120,000 copies/ml and the CD 4 cell count was 8 mm³. The chest X-ray showed bilateral ground glass shadow and *Pneumocystis jiroveci* (carinii) was detected from bronchoalveolar lavage (BAL) fluid. CSF showed mild elevated protein level of 65 mg/dl and pleocytosis, and the opening pressure was over 300 mmH₂O. No malignant cells or microorganisms were detected. *T. gondii* B1-gene fragment was detected by PCR using CSF, therefore, the diagnosis of an AIDS case with toxoplasmic encephalitis was made.³

MRI of the brain showed multiple high intensity lesions on T2-weighted image (Fig. 1a) and the corresponding T1-weighted image showed low intensity lesions. Contrast enhanced T1-weighted images showed multiple nodular and ring enhancement lesions.

The chemotherapy with trimethoprim/sulfamethoxazole (TMP/SMX) was very effective and the patient's consciousness level was improved gradually. *P. jiroveci* pneumonia was also cured. MR imaging after 4 weeks of treatment demonstrated that the multiple nodular lesions on T1 and T2-weighted images had significantly been reduced. After 8 weeks of treatment, the contrast enhanced T1-weighted images showed only residual small lesions without contrast enhancement. Interestingly, the hypersignal intensity foci appeared at bilateral basal ganglia obviously after 2 weeks of treatment on the non-enhanced T1-weighted images (Fig. 1b). Corresponding computed tomography (CT) image did not show hemorrhagic or calcified densities (Fig. 1c). These T1 hypersignal intensity foci regressed gradually along with anti-toxoplasmic chemotherapy in proportion to other mass lesions. The T2* (star)-weighted image, which can detect the hemosiderin deposition as hypointensity lesion, operated after 12 weeks of treatment showed no hypointensity at corresponding T1 hypersignal intensity foci on basal ganglia (Fig. 1d).⁴ We concluded that the toxoplasmic

encephalitis showed the hypersignal intensity foci on T1-weighted MR imaging without hemorrhage or calcification.

Discussion

Toxoplasmic encephalitis progresses rapidly and is life threatening to immunocompromised patients. Therefore, we often have to start the anti-toxoplasmosis therapy when this encephalitis is suspected on the neuroradiologic images and laboratory data. Typically, the toxoplasmic encephalitis lesions on MRI studies appear as T2 hypersignal intensity foci and T1 hypo-isosignal intensity foci, and reveal a rim of enhancement surrounding the edema on contrast enhanced T1-weighted images. Nevertheless, even characteristic foci on these MR imagings are not pathognomonic. Since the differential diagnosis of toxoplasmic encephalitis from other infections or CNS lymphoma is difficult, improvement in the diagnostic methods is an urgent necessity.

In our case, the toxoplasmic encephalitis was diagnosed with the highly specific PCR and confirmed by the response to anti-toxoplasmosis therapy. Brain MRI revealed unusual findings, T1 hypersignal intensity foci, accompanied by typical multiple high intense lesions on T2-weighted image during the treatment. These unique MR findings have been reported on only a few cases of non-HIV/AIDS-related toxoplasmic encephalitis. Terada et al.⁵ reported a case of toxoplasmic encephalitis after stem cell transplantation with T1 hypersignal intensity foci. Autopsy revealed the disseminated toxoplasmosis, and coagulative necrosis without hemorrhage or calcification was revealed at corresponding T1 hypersignal intensity foci by neuropathological study. In another post-bone marrow transplantation case, inflammatory and vascular changes without hemorrhage appeared to be the cause of iso or hypersignal intensity rings by the stereotactic biopsy of T1 hypersignal intensity foci.⁶ On the other hand, Navia et al.⁷ demonstrated that the T1 hypersignal intensity foci were caused by coagulative necrosis with lipid-laden macrophages. The pathophysiological and neuroradiological mechanisms to create these MRI findings are far from clear yet. The reason why the T1 hypersignal intensity foci tend to localize in the basal ganglia is not clear either.^{5,6}

CNS lymphoma, which is important for the distinction from toxoplasmic encephalitis, shows T1 hypo-isosignal intensity foci and never shows T1 hypersignal intensity foci except subacute

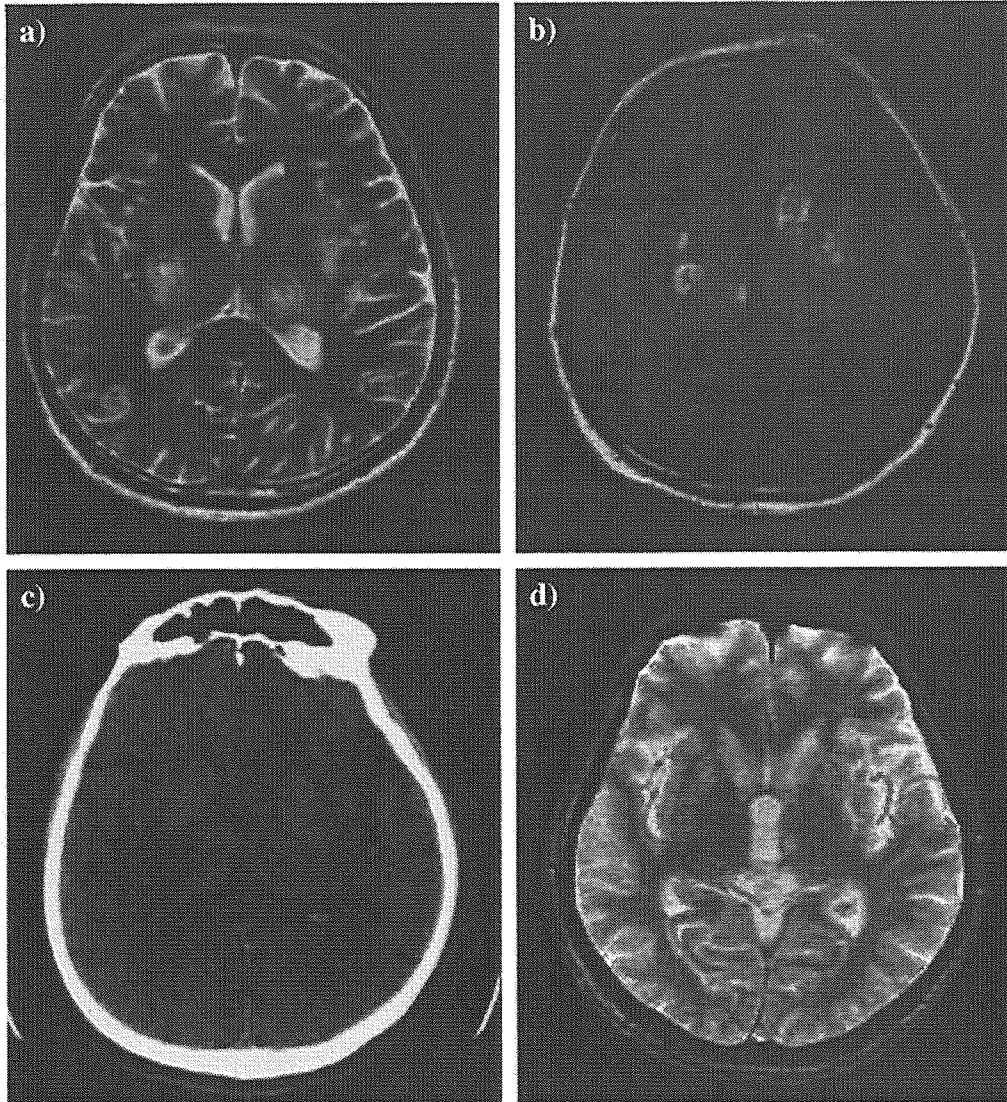


Figure 1 (a) The T2-weighted magnetic resonance image presented multiple high intense lesions. (b) Non-enhanced T1-weighted image showed hypersignal intensity foci at bilateral basal ganglia. (c) The corresponding CT image showed non-hemorrhagic or non-calcified density. (d) The T2* (star)-weighted image showed non-hemorrhagic observations at basal ganglia.

hemorrhage with hypervascular CNS lymphoma.^{8,9} However, the CT imaging and T2* (star)-weighted MR imaging can simply distinguish it from the toxoplasmic T1 hypersignal intensity foci without hemorrhage or calcification.

We reported here the unique MRI findings, T1 hypersignal intensity foci, without hemorrhage or calcification on HIV/AIDS-related toxoplasmic encephalitis. It will be helpful for the diagnosis of toxoplasmic encephalitis and may be a pathognomonic finding. Unfortunately, we have not experienced another case of toxoplasmic encephalitis after this case, but we would like to continue to explore this unique MRI finding of this disease.

Acknowledgement

This work was partly supported by the Special Coordination Funds for Promoting Science and Technology of MEXT: strategic cooperation to control emerging and reemerging infections and grants for AIDS research from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

References

1. Luft BJ, Brooks RG, Conley FK, McCabe RE, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. *JAMA* 1984;252:913-7.