

い 10 クローン前後について同様にアミノ酸配列を決定した。一部の感染者においては経時的な解析も行った。

<HLA-A24/Nef138-10 複合体を認識する単鎖抗体の作製>

Nef138-10 を提示する HLA-A24 分子 (A24/Nef138-10) を特異的に認識する抗体の作製には単鎖抗体(scFv)ファージディスプレイ法を用いた。ファージディスプレイ法とはイムノグロブリンの H 鎖、L 鎖がリンカーを介して結合された単鎖抗体を、ファージ表面に発現している GP3 タンパク質との融合タンパク質として発現させるシステムである。本研究ではヒト B 細胞由来の scFv ファージディスプレイライブラリを用い、A24/Nef138-10 複合体と特異的に結合する scFv をパニング法(図 2 A)にて濃縮した。まずビオチン化 A24/Nef138-10 複合体と scFv ファージとを混合した後ストレプトアビジン磁気ビーズと反応させた。その後洗浄することによって A24/Nef138-10 複合体と結合しない scFv ファージを除去した後、トリエチルアミンを用いて scFv ファージを溶出した。溶出された scFv ファージを大腸菌へ感染し増殖させた。この操作 (パニング) を 3 回繰り返すことで A24/Nef138 複合体に結合する scFv を発現するファージの増幅培養を行った。得られた scFv ファージは ELISA にて特異性を検討した。捕捉分子として A24/Nef138-10 複合体、あるいは陰性対照として異なる CTL エピトープを提示した A24/Env584-11 複合体を、検出抗体として M13 ファージ表面タンパク質に対する抗体を用いた。

次に特異性が確認された scFv ファージにおいて G3P タンパク質の代わりに myc タグを付加し scFv を分泌型にした。得られた分泌型 scFv は検出抗体を抗 myc 抗体に変更し上記と同様の ELISA を行った。A24/Nef138-10 に特異性が見られた scFv クローンの多様性は *Bst*OI による消化パターンによって判断

した。

得られた scFv を用いて Nef138-10 をパルスした HLA-A24 陽性 B 細胞株(A24+/LCL)の細胞表面染色を行った。検出にはビオチン標識抗 myc 抗体、ストレプトアビジン-PE を用いた。陰性コントロールとして Env584-11 をパルスした A24+/LCL を用いた。

<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の十分な説明を行い、自由意志による同意 (インフォームドコンセント) を書面によって得られた場合のみを解析対象とした。本研究はすでに東京大学医科学研究所の倫理審査委員会により承認済みである。また、「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し研究を行った。

## C. 研究結果

<日本で流行している HIV の遺伝子解析>

HLA-A24 陽性 HIV 感染者において Nef138-10 が野生型である例は 1 例も見られず、49 名中 42 名(86%)で 2 番目のタイロシン (Y) がフェニルアラニン (F) に変化した Y2F の変異を有していた<図 1 >。Y2F 以外には 5 番目のアミノ酸がスレオニン (T) からシステイン (C) へ変化している T5C の変異、6 番目のフェニルアラニン (F) がロイシン (L) に変化した F6L の変異が見られた。T5C、F6L を持つ感染者の他の HLA 型を調べたところ、T5C 変異を持つ感染者では共通性が見られなかったが、F6L を持つ感染者は全て HLA-B52 陽性であった。そこで F6L 変異に注目し、F6L 変異が個体内で安定であるかどうか調べるために F6L 変異を有する感染者の経時的に解析を行った。その結果、4 名では年余に渡って F6L 変異が維持されていた<表 1 >。それに対して 1 名では感染後 1 年以内の時点では F6L であったのに対して、その 1 年後には F6L を持つウイルスは完全

に消失し、Y2F 変異ウイルスに取って代わられていた。

<HLA-A24/Nef138-10 複合体を認識する単鎖抗体の作製>

scFv ファージディスプレイライブラリを用いて A24/Nef138-10 複合体特異的 scFv を発現するファージをパニング法によって増幅培養した。その結果 3 回のパニングによって A24/Nef138-10 複合体と結合する scFv を約 4200 倍に濃縮でき、そのうち 80 クローンについて ELISA にて A24/Nef138-10 複合体との結合能を調べたところ、64 クローン (80%) が A24/Nef138-10 に結合した。さらに 80 クローン全てを A24/Nef138-10 複合体と、異なるエピトープを提示する HLA-A24 分子、A24/Env584-11 複合体に対する結合能を調べるため ELISA を行った。その結果 16 クローン (20%) が A24/Nef138-10 複合体には結合するが A24/Env584-11 複合体には結合しない「A24/Nef138 特異的な」scFv であった(図 2 B で 10 クローンの例を示した)。制限酵素 BstO1 切断パターンによる遺伝子解析の結果 8 種類の独立したクローンであることがわかった。そのうち 4 種類に関して分泌型 scFv を作製し ELISA を行った。その結果 4 種類とも HLA-A24/Nef138 複合体への特異性は維持されていたが、そのうち 2 種類では結合能が低下していた。最終的に A24/Nef138-10 複合体特異的 scFv として clone3 と clone27 が得られた。

そこで、実際に clone3、clone27 を用いて A24/Nef138-10 複合体を提示する細胞を染色した。その結果、どちらの clone も Env584-11 をパルスした A24+/LCL は染まらなかったが、Nef138-10 をパルスした A24+/LCL は PE で染まっていた(図 3)。細胞表面に提示された A24/Nef138-10 複合体と結合する scFv を得られた。

#### D. 考察

私たちは HLA-A24 によって提示されるエピ

トープの中で、イムノドミナントな Nef138-10 に注目し HIV 感染者における HIV の遺伝子解析を行った。HLA-A24 陽性感染者においてはそのほとんどが Y2F 変異を有することを昨年度報告したが、本年度新たに症例数を増やし解析を行った結果 5 名の感染者で F6L の変異が見られ、全て HLA-B52 陽性感染者においてであった。日本人での B52 の遺伝子頻度が 10%程度であることを考えると F6L を持つ HIV の出現は HLA-B52 によって提示される CTL エピトープの存在を示唆している。あるいは日本人において HLA-A\*2402-B\*5201-Cw\*1202 は最も高頻度に存在するハプロタイプであり、HLA-B52 を有する個体はほぼ Cw\*1202 であると考えられるので、Cw\*1202 により提示されるエピトープである可能性も考えられる。HIV の Nef タンパク質は抗原性が高いことが知られており、複数の HLA クラス I 分子によって提示される領域が存在し得る。現在 HLA-B52 陽性者の末梢血単核球を用いて Nef138-10 周辺領域に対する CTL 応答を解析中である。

効果的なワクチンの開発には高い免疫誘導能を持つ抗原を使用することが重要だが、生体内で抗原に対して誘導される免疫応答の程度が何によって規定されているかは明らかにされていない。TCR が「抗原」として認識するのは実際には「エピトープを提示する HLA クラス I 分子」であって、その絶対的な量が免疫応答を規定する重要な因子であることは間違いない。特定のエピトープを提示する HLA 分子の数は、そのエピトープを含むタンパク質の量、プロセッシングの際にエピトープが正確に切り出される効率、HLA 分子との結合能など多くの要因によって決定されると考えられる。しかしながら現時点ではその測定法が存在しないため、詳細は全く明らかになっていない。私たちは「個々のエピトープを提示する HLA 分子に対する抗体」を樹立できれば目的の

エピトープを提示する HLA 分子を検出することが可能となると考え、A24/Nef138-10 複合体に対する単鎖抗体 (scFv) の作製を試みた。ファージディスプレイ法は目的の scFv をファージ表面に提示させパニング法によって増幅培養できるという点で優れており、それを繰り返すことによって目的の抗原と結合する scFv を濃縮することができる。私たちが得た A24/Nef138-10 複合体と結合する 64 クロンのうち A24/Nef138-10 複合体特異的な scFv は 16 クロンであったが、残りの 48 クロンは HLA-A24 あるいは  $\beta$  2 ミクログロブリン分子に結合する scFv であると考えられる。分泌型にした scFv のうち 2 クロンが A24/Nef138-10 複合体との結合能が低下していたが、分泌型にしたことによる構造的な変化が影響を及ぼしていると考えられる。

A24/Nef138-10 複合体との結合力が維持されていた clone3、7 を用いて実際に A24/Nef138-10 複合体を提示する細胞を特異的に染めることができた。このことから得られた抗体はフローサイトメーターでの解析に耐え得る結合能を有していることが明らかになった。今後 Nef 発現細胞、あるいは HIV 感染細胞において A24/Nef138-10 複合体の発現量を検討したい。

#### E. 結論

日本人の 70% が有する HLA-A24 によって提示される Nef138-10 においてステレオタイプなアミノ酸変化が見られ、さらに同じ部位が他の HLA 分子によっても提示された結果と思われるアミノ酸変異の存在が明らかになった。また単鎖抗体ファージディスプレイライブラリを用いて「Nef138-10 を提示する HLA-A24 分子」に特異的な scFv が得られた。この scFv を用いて感染細胞における抗原提示量を定量できる可能性がある。

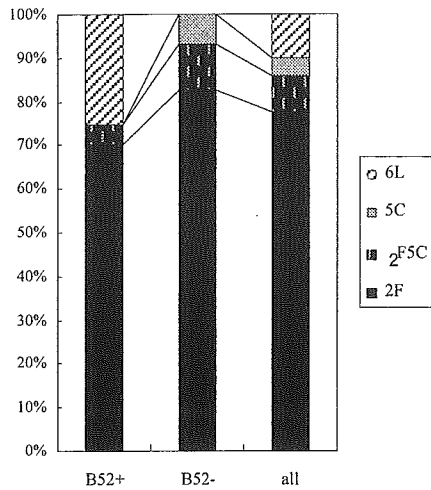
#### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Rojanawiwat, A., Miura, T., Thaisri, H., Pathipvanich, P., Umnajsirisuk, S., Koibuchi, T., Vongheree, S., Iwamoto, A., Ariyoshi, K., and Sawanpanyalert, P. Frequent detection of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus but not JC virus DNA in cerebrospinal fluid samples from human immunodeficiency virus-infected patients in northern Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 43:3484-3486, 2005
2. Tomonari, A., Takahashi, S., Shimohakamada, Y., Ooi, J., Takasugi, K., Ohno, N., Konuma, T., Uchimaru, K., Tojo, A., Odawara, T., Nakamura, T., Iwamoto, A., and Asano, S. Unrelated cord blood transplantation for a human immunodeficiency virus-1-seropositive patient with acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplantation* 36:261-262, 2005.
3. Shinoe, T., Wanaka, A., Nikaido, T., Kakuta, Y., Masunaga, A., Shimizu, J., Duyckaerts, C., Imaizumi, K., Iwamoto, A., and Kanawzawa, I. The pro-apoptotic human BH3-only peptide harakiri is expressed in cryptococcus-infected perivascular macrophages in HIV-1 encephalitis patients. *Neuroscience Letters* 393:102-107, 2006.
4. Ide, F., Nakamura, T., Tomizawa, M., Kawana-Tachikawa, A., Odawara, T., Hosoya, N., Iwamoto, A. Peptide-loaded dendritic-cell vaccination followed by treatment interruption for chronic HIV-1 infection: A phase 1 trial. *J. Med. Virol.* in press, 2006.

#### 2. 学会発表

立川 (川名) 愛、渡辺紗也香、富澤麻利子、小川照美、細谷紀彰、小田原隆、中村哲也、



<図 1> 日本人 HLA-A24 陽性感染者における Nef138-10 エピトープにおける変異体の出現頻度.

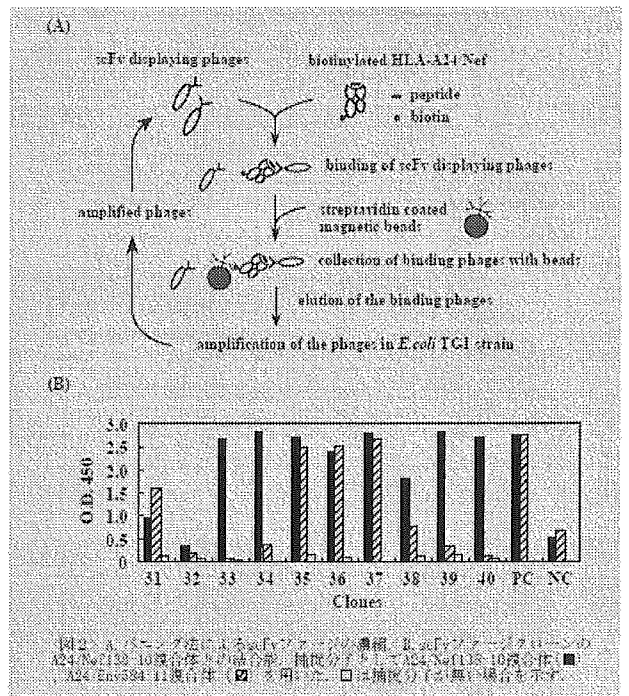
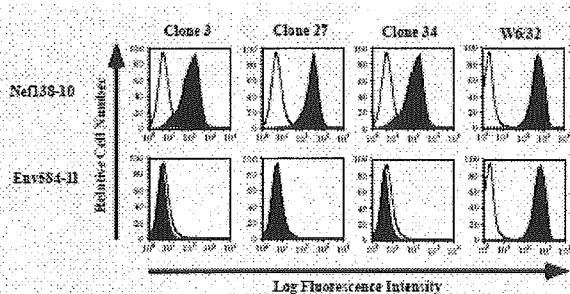


図 2. A: コーピング法による scFv の選別. B: scFv の選別. 10 個の scFv の OD<sub>450</sub> を示す. 10 個の scFv の OD<sub>450</sub> を示す. 10 個の scFv の OD<sub>450</sub> を示す. 10 個の scFv の OD<sub>450</sub> を示す.

<表 1> Nef138-10 F6L 変異体の個体内経時変化.

Pt.	date	WQNYTPGPGI	RYPLTFGWCF	KLVPVEPEKV
K10	02.01.	-----V	-----L---Y	-----D-D--
	02.07.	-----V	-----L---Y	-----D-D--
Y4	98.09	-H-----	-----L---Y	-----
	03.01.	-H-----	-----L---Y	-----
M3	98.01.	-----V	-----L---	-----
	00.05.	-----V	-----L---	-----
	03.04.	--C-----T	-----L---	-----
Y1	98.08.	-----	-----L---	-----D----
	05.05.	-----	-----L---Y	-----D----
O6	97.08.	-----	-----L---	-----D-DQ-
	98.11.	-----	-F-----	-----D-DQ-
	99.07.	-----X	-F-----	-----D-DQ-
	00.10.	-----X	-F-----	-----D-DQ-
	02.06.	-----T	-F-----	-----D-DQ-

Nef138-10(RYPLTFGWCF)とその両側 10 アミノ酸ずつのアミノ酸配列を示す.



<図 3> HLA-A24 陽性細胞の scFv clone 3, 27 による細胞感染.

ケニアにおける HIV 母子感染と病態進行速度に影響を及ぼす宿主因子の検討

－血友病患者の病態進行速度に影響を及ぼす種々の宿主因子の検討－

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** ケニアにおける HIV 母子感染と感染児の病態進行速度並びに日本の血友病患者の病態進行速度に影響を及ぼす種々の宿主因子の検討を行っているが、本年度は、後者について報告する。今回の研究では、日本の HIV-1 感染血友病患者における *RANTES* -28G/-403A, *RNATES* In1.1C, *SDF-1* 3A', *IL-4* -589T と *DC-SIGN* -139C/-336C の遺伝子多型と感染後 AIDS 発症までの期間との関連を明らかにすることを目的とした。1987 年～1996 年の期間に採取した血友病患者 104 名の末梢血単核球からゲノム DNA を抽出し、各対象領域のプライマーを用いた PCR の後、直接シーケンス法により遺伝子多型の有無を決定した。Variant の allelic frequency を AIDS 遅発症群（10 年間未発症）（n=55）と AIDS 発症群（n=49）の間で比較し、統計学的に解析した。その結果、(1) *RANTES* -28G の allelic frequency は AIDS 発症群（0.08）に比較し遅発症群（0.189）で有意に高いこと（ $P=0.037$ ,  $OR=0.37$ ,  $95\%CI [0.149, 9.926]$ ）、(2) *DC-SIGN* -139C の allelic frequency は遅発症群（0.337）に比較し AIDS 発症群（0.200）で有意に高いこと（ $P=0.028$ ,  $OR=2.03$ ,  $95\%CI [1.084, 3.804]$ ）、(3) *RANTES* -403A, *RNATES* In1.1C, *SDF-1* 3A', *IL-4* -589T, *DC-SIGN* -336C の allelic frequency は両群間に有意差は認められないこと、が明らかとなった。これらの結果から、日本の HIV-1 感染血友病患者において、*RANTES* -28G は AIDS 発症遅延に、そして *DC-SIGN* -139C は AIDS 発症促進に関連することが示唆された。

## 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免疫因子遺伝子多型 (SNP) の存在が明らかになりつつある。しかしながら、未だ評価の定まらないものも多い。これまでに著者らのグループは、*CCR5* プロモーター領域の SNP が日本の HIV-1 感染血友病患者の病態進行に影響を与えることを報告した。今回、さらに *SDF-1 3A'*、*RANTES*・*IL-4*・*DC-SIGN* プロモーター領域内の SNPs に着目し、HIV-1 感染後 AIDS 発症までの期間との関係を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

### 対象

1987 年～1996 年の期間に「HIV-1 感染者の発症予防と治療研究班」を通じて採取され、凍結保存されていた日本の血友病患者 104 名の末梢血単核球 (PBMC) を使用した。これらの血友病患者は、1982-1985 年に HIV-1 に感染したと考えられている。

CDC の診断基準 (1987 年) に従い、全ての患者を 2 つの群：感染後 10 年以上無治療で AIDS を発症していない群 (AIDS 遅発症群、n=55) と感染後 10 年以内に AIDS を発症した群 (AIDS 発症群、n=49)、に分類した。

### 検討した遺伝子多型

*SDF1* 遺伝子の 3'UTR (-801) [*SDF-1 3A'*]、*RANTES* のプロモーター領域 (-28, -403)、*RANTES* のイントロン領域 (In1.1C)、*IL-4* のプロモーター領域 (-589)、*DC-SIGN* のプロモーター領域 (-139, -336) について検討を行った。

### 遺伝子多型の決定方法

凍結保存された PBMC から抽出した 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後、ダイレクトシーケンス法を用いて SNP をそれぞれ決定した。

### 統計学的検討

SNP と AIDS 発症までの期間との相関について、 $\chi^2$  検定または 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、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

### Genotype 解析〈表 1〉

*RANTES* -28 の genotype 解析では、C/G と G/G が AIDS 発症群に比べ遅発症群で高頻度に見られる傾向が認められた ( $P=0.11$ )。また、*DC-SIGN* -139 T/C と C/C は AIDS 発症群でより高頻度に見られる傾向が認められた ( $P=0.068$ )。*RANTES* -403, *RANTES* In1.1, *SDF-1* 3'A, *IL-4* -589 では、genotype 分布に 2 群間で有意差ならびに傾向は認められなかった。

### Allelic frequency 解析〈表 2〉

*RANTES* -28G の allelic frequency は AIDS 発症群 (0.08) に比較し遅発症群 (0.189) で有意に高かった ( $P=0.037$ , OR=0.37, 95%CI [0.149, 9.926])。また、*DC-SIGN* -139C の allelic frequency は遅発症群 (0.337) に比較し AIDS 発症群 (0.200) で有意に高かった ( $P=0.028$ , OR=2.03, 95%CI [1.084, 3.804])。しかしながら、*RANTES* -403A, *RNATES* In1.1C,

*SDF-1* 3A', *IL-4* -589T, *DC-SIGN* -336C の allelic frequency は両群間に有意差は認められなかった。

## D. 考察

今回の結果から、日本の HIV-1 感染血友病患者において、*RANTES* -28G は AIDS 発症遅延に、そして *DC-SIGN* -139C は AIDS 発症促進に関連することが示唆された。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

- ・ Khamadi SA, Ichimura H, et al.: HIV-1 subtypes in circulation in Northern Kenya. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* (2005), 21(9):810-4.
- ・ Agdamag DM, Ichimura H, et al.: Rapidly spreading HCV infections from limited sources simulating an AIDS outbreak in the Philippines. *J Med Virol* (2005), 77:221-226.
- ・ Kurbanov F, Ichimura H, et al.: A New Subtype (Subgenotype) Ac (A3) of Hepatitis B Virus and Recombination between Genotypes A and E in Cameroon.

J Gen Virol (2005), 86:2047-2056.

- ・ Takemura T, Ichimura H, et al.: A novel SIV from black mangabey (*Lophocebus aterrimus*) in Democratic Republic of Congo. J Gen Virol (2005), 86:1967-1971.

## 2. 学会発表

- ・ フィリピンにおいて急速に伝播している HCV の解析 (2002 年 - 2005 年). 景山誠二、市村宏. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会. 2005. 11, 横浜.
- ・ 血友病患者の HIV/AIDS 病態進行に関する宿主因子の影響. 小泉祐介、景山誠二、宮下宙子、Lwembe R、塩田達雄、藤山佳秀、市村宏. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会. 2005. 11, 横浜.
- ・ 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.
- ・ カメルーン北西部における HIV-1 サブタイプ分布と未治療群内の薬剤耐性株頻度の解析. 小泉祐介、宮下宙子、Lwembe RW、Nicaise N、景山誠二、藤山佳秀、市村宏.

第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2005, 12, 熊本.

・ REVERSE TRANSCRIPTASE RESISTANCE MUTATIONS IN HIV-1 NON-B STRAINS INFECTING TREATED CHILDREN IN KENYA.

R. Lwembe, E.M. Songok, M. Miyashita, Y. Koizumi, S. Kageyama, H. Ichimura. 第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2005, 12, 熊本.

## F. 知的財産権の出願・登録状況

特に予定なし。



**Table 1.**  
**Association between genotypes of host immune factors and clinical outcomes of HIV-1 infected Japanese hemophiliacs**

<i>Polymorphism</i>		<i>Genotype distribution (cases)</i>		<i>P value</i> (Fisher's exact test)
		<i>Non-progressor</i>	<i>Progressor</i>	
<b>RANTES -28</b> (n=97)	<b>C/C</b>	36	37	0.11
	<b>C/G</b>	14	7	
	<b>G/G</b>	3	0	
<b>RANTES -403</b> (n=98)	<b>G/G</b>	23	24	0.41
	<b>G/A</b>	24	17	
	<b>A/A</b>	7	3	
<b>RANTES In1.1</b> (n=102)	<b>T/T</b>	24	25	0.21
	<b>T/C</b>	24	22	
	<b>C/C</b>	6	1	
<b>SDF1 -801</b> (n=104)	<b>G/G</b>	24	21	0.84
	<b>G/A</b>	25	24	
	<b>A/A</b>	6	4	
<b>IL-4 -589</b> (n=96)	<b>C/C</b>	4	4	0.91
	<b>C/T</b>	24	18	
	<b>T/T</b>	25	21	
<b>DC-SIGN -139</b> (n=104)	<b>T/T</b>	36	21	0.068
	<b>T/C</b>	16	23	
	<b>C/C</b>	3	5	
<b>DC-SIGN -336</b> (n=103)	<b>T/T</b>	51	44	1.00
	<b>T/C</b>	4	4	
	<b>C/C</b>	0	0	

Table 2.

Association between allelic frequencies of host immune factors and clinical outcomes of HIV-1 infected Japanese hemophiliacs

<i>Polymorphism</i>		<i>Allelic Frequency</i>		<i>P value</i>	<i>Odds ratio</i> [95% C.I.]
		<i>Non-progressor</i>	<i>Progressor</i>		
<b>RANTES -28</b> (n=97)	<b>C</b>	0.811	0.920	0.037	0.37
	<b>G</b>	0.189	0.080		[0.149, 0.926]
<b>RANTES -403</b> (n=98)	<b>G</b>	0.648	0.739	0.21	0.65
	<b>A</b>	0.352	0.261		[0.351, 1.209]
<b>RANTES In1.1</b> (n=102)	<b>T</b>	0.667	0.750	0.22	0.67
	<b>C</b>	0.333	0.250		[0.362, 1.228]
<b>SDF1 -801</b> (n=104)	<b>G</b>	0.664	0.673	0.88	0.96
	<b>A</b>	0.336	0.327		[0.536, 1.706]
<b>IL-4 -589</b> (n=96)	<b>C</b>	0.302	0.302	1.00	1.00
	<b>T</b>	0.698	0.698		[0.537, 1.854]
<b>DC-SIGN -139</b> (n=104)	<b>T</b>	0.800	0.663	0.028	2.03
	<b>C</b>	0.200	0.337		[1.084, 3.804]
<b>DC-SIGN -336</b> (n=103)	<b>T</b>	0.964	0.958	1.00*	1.15
	<b>C</b>	0.036	0.042		[0.280, 4.737]

\*Fischer's exact test

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 Shioda</u> .	Protective Effects of <i>IL-4 -589T</i> and <i>RANTES -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 $\alpha$ determines species- specific restriction of SIVmac infection.	J. Virol.	79	8870-8877	2005

<p>Kazuyasu Mori, Chie Sugimoto, Shinji Ohgimoto, Emi E. Nakayama, Tatsuo Shioda, 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- 10396</p>	<p>2005</p>
--	---	-----------------	-----------	-------------------------	-------------

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
Ide, F., Nakamura, T., Tomizawa, M., Kawana- Tachikawa, A., Odawara, T., Hosoya, N., Iwamoto, A.	Peptide-loaded dendritic-cell vaccination followed by treatment interruption for chronic HIV-1 infection: A phase 1 trial.	J. Med. Virol.	In press		2006
Shinoe, T., Wanaka, A., Nikaido, T., Kakuta, Y., Masunaga, A., Shimizu, J., Duyckaerts, C., Imaizumi, K., Iwamoto, A., and Kanawzawa, I.	The pro-apoptotic human BH3-only peptide harakiri is expressed in cryptococcus <sup>-</sup> infected perivascular macrophages in HIV-1 encephalitis patients.	Neuroscience Letters	393	102-107	2006

Tomonari, A., Takahashi, S., Shimohakamada, Y., Ooi, J., Takasugi, K., Ohno, N., Konuma, T., Uchimaru, K., Tojo, A., Odawara, T., Nakamura, T., Iwamoto, A., and Asano, S.	Unrelated cord blood transplantation for a human immunodeficiency virus-1-seropositive patient with acute lymphoblastic leukemia	Bone Marrow Transplantat ion	36	261-262	2005
Rojanawiwat, A., Miura, T., Thaisri, H., Pathipvanich, P., Umnajsirisuk, S., Koibuchi, T., Vongheree, S., Iwamoto, A., Ariyoshi, K., and Sawanpanyalert, P.	Frequent detection of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus but not JC virus DNA in cerebrospinal fluid samples from human immunodeficiency virus-infected patients in northern Thailand.	J. Clin. Micro biol.	43	3484-3486	2005

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
Khamadi SA, <u>Hiroshi</u> <u>Ichimura</u> 他 17 名	HIV-1 subtypes in circulation in Northern Kenya.	AIDS Res. Hum. Retroviruses	21 (9)	810-814	2005
Agdamag DM, <u>Hiroshi</u> <u>Ichimura</u> 他8名	Rapidly spreading HCV infections from limited sources simulating an AIDS outbreak in the Philippines.	J Med Virol	77	221-226	2005
Kurbanov F, <u>Hiroshi</u> <u>Ichimura</u> 他 12 名	A New Subtype (Subgenotype) Ac (A3) of Hepatitis B Virus and Recombination between Genotypes A and E in Cameroon.	J Gen Virol	86	2047-2056	2005
Takemura T, Ichimura H, 他 13名	A novel SIV from black mangabey (Lophocebus aterimus) in Democratic Republic of Congo.	J Gen Virol	86	1967-1971	2005

Effects of human interleukin 7 on HIV-1 replication in monocyte-derived human macrophages

Running head: human interleukin 7 and HIV-1 replication in monocyte derived human macrophages.

Haihan Song<sup>a</sup>, Emi E. Nakayama<sup>a</sup> and Tatsuo Shioda<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Viral Infections, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka, Japan.

Total number of words: 968

Correspondence to: Tatsuo Shioda, Department of Viral Infections, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, 3-1 Yamada-oka, Suita-shi, Osaka 565-0871, Japan.  
Tel: +81 6 6879 8346; fax: +81 6 6879 8347;  
e-mail: [shioda@biken.osaka-u.ac.jp](mailto:shioda@biken.osaka-u.ac.jp)

Support for the work: This study was supported by grants from the Human Science Foundation; the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology; and the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan.



## Summary

Interleukin 7 (IL-7) contributes to development and proliferation of T cells. We investigated the effect of IL-7 on HIV-1 infected monocyte-derived human macrophages. IL-7 treatment for macrophages at a concentration of 10ng/ml reduced replication of the R5 HIV-1 strain by approximately 50%. Meanwhile, HIV-1-infected macrophages themselves could excrete IL-7 approximately 20% more than uninfected macrophages. These results suggested the advantage of IL-7 as a therapeutic modality to recover CD4+ T cells.

## Text

Macrophages and CD4+ T cells are the predominant cell types for human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infection [1,14]. Macrophages can be infected by HIV-1 in many tissues, including the brain, lung and lymph nodes [16]. Unlike infected CD4+ T cells, which have a short half-life of 1-1.5 days, macrophages are quite resistant to the cytopathic effect of the virus, and may thus provide a reservoir for persistent infection and virus dissemination. It is known that cytokines play an important role in HIV-1 infection. Interleukin 7 is a cytokine produced by stromal cells of the thymus and bone marrow [2-4]. It has capacity to induce growth of immature B lymphocytes [5], and contributes to development and proliferation of T cells [6-9]. With respect to HIV-1 infection, there is a reverse correlation between CD4+ T cell number and IL-7 serum levels in HIV-1-infected patients [17-19]. After patients started to receive antiretroviral drugs, the elevated IL-7 in the serum decreased to normal levels [17]. On the other hand, IL-7 increases HIV-1 replication in thymic organ cultures [10-12] and to induce latent HIV-1 in resting CD4+

T cells [13]. However, effects of IL-7 on HIV-1 replication in macrophages remain unclear. In the present study, we evaluated levels of HIV-1 proliferation in monocyte-derived human macrophages treated with or without exogenous IL-7.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from blood buffy coats of healthy donors were isolated by centrifugation through Ficoll-Hypaque and plated on a 24 well MULTIWELL™ PRIMARIA™ plate (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) with RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). After incubation at 37°C for one day, the floating cells were removed by washing the plate with phosphate-buffered saline four times and the adherent cells were incubated at 37°C for 11 days with 0.5ml of RPMI 1640 supplemented with 10% FCS plus 100ng/ml of granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF).

To determine whether or not differentiated macrophages express the IL-7 receptor, we analyzed total RNA extracted from macrophages. PBMC stimulated with PHA and 10ng/ml of IL-2 for three days and monkey kidney CV-1 cells served as positive and negative controls, respectively. RNA was reverse-transcribed into cDNA, and levels of IL-7 receptor cDNA were measured by an ABI 7500 Real-time PCR System. As shown in Fig. 1a, IL-7 receptor mRNA in macrophages was clearly detected. It was also detected in PHA and IL-2-stimulated PBMC. Levels of IL-7 receptor mRNA in macrophages were approximately 1/10 of those in PHA and IL-2-stimulated PBMC, while CV-1 cells were totally negative for expression of the IL-7 receptor.

Macrophages were infected with 6.5ng of p24 of HIV-1 SF162 strain for two hours on day 12. Cells were then incubated with 1ml of RPMI 1640 supplemented with 10% FCS plus 100ng/ml of GM-CSF

and 0, 3 or 10ng/ml of IL-7 (Techne, Minneapolis, Minnesota, USA). Infected macrophages were fed on days 3, 6, 9 and 12 (after infection) by exchanging one half of the culture supernatant with fresh media containing the same amount of cytokines. Levels of HIV-1 p24 antigen in culture supernatants on days 1, 3, 6, 9 and 12 were measured by using an HIV-1 P24 Antigen ELISA Kit (Fig. 1b). The p24 antigen level in the culture supernatant of macrophages treated with 3ng/ml of IL-7 was apparently less than that of macrophages without IL-7 treatment (Fig. 1b). This difference was evident on day 3 and became greater with time. On day 12, the p24 level of macrophages treated with 3ng/ml of IL-7 was 2220 pg/ml while that of untreated macrophages was 3542 pg/ml. That is, the suppression with 3ng/ml of IL-7 on HIV-1 replication was 37.4% on day 12. Treatment of macrophages with 10ng/ml of IL-7 showed a greater suppressive effect on HIV-1 replication (Fig. 1b). On day 12, the p24 level of macrophages treated with 10ng/ml of IL-7 was 1760 pg/ml. That is, suppression with 10ng/ml of IL-7 on HIV-1 replication was 50.3% on day 12.

Monocyte-derived human macrophages were also infected with the Z strain of the Sendai virus. Hemagglutination assay (HA) titers were measured on days 1, 3 and 6 after infection. As shown in Fig. 1c, there was no difference in HA titers between IL-7-treated and untreated macrophages, indicating no apparent effect of IL-7 on Sendai virus replication in macrophages.

Levels of IL-7 in supernatants of macrophages were measured on days 1 and 3 after HIV-1 infection (Fig. 1d). On day 1, there was no difference in levels of IL-7 between HIV-1 infected and uninfected macrophages. On day 3, IL-7 levels in HIV-1-infected macrophages slightly increased, while those in uninfected macrophages did not.

The mechanisms of the suppressive effect of IL-7 on R5 HIV-1 replication in macrophages are still not clear. A previous study showed that IL-7 treatment for PBMC enhanced excretion of  $\beta$  chemokines including MIP-1  $\beta$ , which can suppress R5 HIV-1 replication [15]. We pretreated macrophages with 10ng/ml of IL-7 for one day, and then inoculated them with HIV-1. However, we failed to detect any further suppression of HIV-1 replication compared with macrophages treated with IL-7 only after HIV-1 infection (data not shown). Therefore, it is unlikely that IL-7 could suppress HIV-1 replication by up regulation of MIP-1  $\beta$ . It is possible that IL-7 could affect HIV-1 replication after HIV-1 enters macrophages.

We have shown that HIV-1-infected macrophages could excrete more IL-7 than uninfected ones. Therefore, it is likely that IL-7 is a self-defense system for macrophages against HIV-1 infection. Furthermore, our finding that IL-7 could moderately suppress HIV-1 replication in macrophages suggested the advantage of IL-7 as an immune modulator which could be used to recover CD4+ T cell numbers in HIV-1-infected individuals.

#### Acknowledgements

We thank Drs. Junichi Sakuragi, Sayuri Sakuragi, for their helpful discussions, Ms. Setsuko Bandou for technical assistance and Ms. Noriko Teramoto for help.