

伝子解析は平成13年に大阪大学研究倫理審査委員会の承認を得た。

C. 研究結果

HV-1の主要なコレセプターであるCCR5遺伝子全域ならびに近傍のマイナーなコレセプターであるCCR2遺伝子の多型を日本人50名について検討した。CCR5のコーディング領域については、欧米人に認められるCCR5の32塩基の欠失や303番目のノンセンス変異は日本では認められず、CCR5遺伝子の893番目の塩基が欠失し、CCR5が細胞表面に発現されにくいCCR5 893(-)と、CCR5の668番目の塩基GがAに変化するCCR5 G668A(アミノ酸はアルギニンがグルタミンに変化する)が認められた。

上記の50名の日本人とは重複しない日本人30名とタイ人186名についてCCR5のプロモーター領域とCCR2遺伝子について検討した。得られた結果を基にして日本とタイにおけるCCR2およびCCR5遺伝子のハプロタイプを解析したところ、CCR5の翻訳開始部位から上流に数えて2852番目の塩基が、欧米人で病態進行が加速することが知られているCCR5 P1を、日本においては95%以上、タイにおいては100%代表することが明らかになった。

D. 考察

日本人のCCR5コーディング領域にはCCR5が細胞表面に発現されにくいCCR5 893(-)と、CCR5の668番目の塩基GがAに変化するCCR5 G668Aが認められることが報告されていたが、1%以上の頻度を示すそれ以外の

多型が存在しないことが改めて確認された。CCR5 G668Aの、CCR5のHIV-1コレセプターとしての活性ならびにケモカインレセプターとしての活性に及ぼす影響は今のところ明らかではない。

CCR2およびCCR5遺伝子のハプロタイプCCR5 P1のホモ接合は、欧米人でHIV-1感染症の病態進行が加速することが報告されている。CCR5 P1は、CCR2 遺伝子の1箇所に加えてCCR5翻訳開始部位から上流の2086番目、2135番目および2554番目の合計4箇所の塩基で決定されるハプロタイプであるが、今回の我々の解析から、少なくともタイ人においては、もう少し上流の2852番目の一塩基で決定できることが明らかになった。

E. 結論

HV-1の主要なコレセプターであるCCR5ならびに近傍のマイナーなコレセプターであるCCR2遺伝子の多型を日本人130名およびタイ人186名について検討したところ、欧米人に認められるCCR5 の32塩基の欠失や303番目のノンセンス変異は日本において認められず、CCR5遺伝子の893番目の塩基が欠失し、CCR5が細胞表面に発現されにくいCCR5 893(-)が認められた。日本とタイにおけるCCR2ならびにCCR5遺伝子のハプロタイプを解析したところ、CCR5の翻訳開始部位から上流に数えて2852番目の塩基が、欧米人で病態進行が加速することが知られているCCR5 P1を、日本においては95%以上、タイにおいては100%代表することが明らかになった。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Wichukchinda, N, Nakayama, EE, Rojanawiwat, A, Pathipvanich, P, Auwanit, W, Vongsheree, S, Ariyoshi, K, Sawanpanyalert, P, and Shioda, T. Protective Effects of *IL-4 -589T* and *RANTES -28G* on HIV-1 disease progression in infected Thai females. *AIDS*, 20: 189-196, 2006.

Song, H, Nakayama, EE, and Shioda, T. Effects of human interleukin 7 on HIV-1 replication in monocyte-derived human macrophages. *AIDS*, 20: 937-939, 2006.

Nakayama, EE, Maegawa, H, and Shioda, T. A dominant-negative effect of cynomolgus monkey tripartite motif protein TRIM5 α on anti-simian immunodeficiency virus SIVmac activity of an African green monkey orthologue. *Virology*, 350: 158-163, 2006.

Sakuragi S, Sakuragi J, Morikawa Y, Shioda T. Development of a rapid and convenient method for the quantification of HIV-1 budding. *Microbes Infect.*, 8: 1875-1881, 2006

Shioda T., Nakayama EE. Human genetic

polymorphisms affecting HIV-1 diseases. *Int J Hematol.*, 84:12-17, 2006.

Song, H, Nakayama, EE, Likanonsakul, S, Wasi, C, Iwamoto A, and Shioda T. A three-base-deletion polymorphism in the upstream non-coding region of human interleukin 7 (IL-7) gene could enhance levels of IL-7 expression. *International Journal of Immunogenetics*, 34: 107-113, 2007.

Wichukchinda, N., Rojanawiwat, A., Kitamura, Y., Nakayama, E. E., Pathipvanich, P., Auwanit, W., Sawanpanyalert, P., Iwamoto, A., Shioda, T., and Ariyoshi, K. The polymorphisms in *DC-SIGNR* affect the susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS. Res. Hum. Retrovir.* In press, 2007

Lwembe, R., Ochieng, W., Panikulam, A., Mongoina, C. O., Owens, M., Koizumi, Y., Kageyama, S., Yamamoto, N., Shioda, T., Musoke, R., D'Agostino, A., Songok, E. M., Ichimura, H. ANTI-RETROVIRAL DRUG RESISTANCE-ASSOCIATED MUTATIONS AMONG NON-SUBTYPE B HIV-1-INFECTED KENYAN CHILDREN WITH TREATMENT FAILURE. *J. Med. Virol.* In press, 2007.

Ohishi, M., Shioda, T., and Sakuragi, J-I. Retro-transduction by virus pseudotyped

with glycoprotein of vesicular stomatitis virus. *Virology*. In press, 2007.

KOIZUMI, Y., KAGEYAMA, S., FUJIYAMA, Y., MIYASHITA, M., LWEMBE, R., OGINO, K., SHIODA, T., ICHIMURA, H. RANTES -28G delays and DC-SIGN -139C enhances AIDS progression in HIV-1-infected Japanese hemophiliacs. *AIDS Research and Human Retroviruses*. In press, 2007.

2. 学会発表

Liu, L., Nakayama, E. E., Theodorou, I., Nagai, Y., Likanonsakul, S., Wasi, C., Debre, P., Iwamoto, A., and Shioda, T. Polymorphisms in CCR5 chemokine receptor gene in Japan. The 6th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, Japan, 平成 18 年 9 月。

中山英美、塩田達雄。アフリカミドリザル由来 TRIM5alpha の SIVmac 感染阻害能に対するカニクイザル由来 TRIM5alpha のドミナントネガティブ効果。第 54 回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、平成 18 年 11 月。

Song, H, Nakayama, EE, Likanonsakul, S, Wasi, C, Iwamoto A, and Shioda T. A three-base-deletion polymorphism in the upstream non-coding region of human interleukin 7 (IL-7) gene could enhance levels of IL-7 expression.第 54 回日本ウイ

ルス学会学術集会、名古屋、平成 18 年 11 月。

櫻木淳一、塩田達雄。HIV-1 サブタイプ間組換え体生成機構の解析。第 54 回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、平成 18 年 11 月。

大石真久、櫻木淳一、塩田達雄。水疱性口内炎ウイルス(VSV)の糖タンパク質を用いたシェードタイピングに潜む問題点。第 54 回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、平成 18 年 11 月。

Liu, L., Nakayama, E. E., Theodorou, I., Nagai, Y., Likanonsakul, S., Wasi, C., Debre, P., Iwamoto, A., and Shioda, T. Polymorphisms in CCR5 chemokine receptor gene in Japan. 第 20 回日本エイズ学会学術集会、東京、平成 18 年 12 月。

櫻木淳一・塩田達雄。ウイルスゲノムの二量体化の感染初期過程に及ぼす影響。第 20 回日本エイズ学会学術集会、東京、平成 18 年 12 月。

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

転写因子 AP-4 による HIV 潜伏感染維持の分子機構

分担研究者：岡本 尚（名古屋市立大学大学院医学研究科細胞分子生物学教授）

共同研究者：今井健一（名古屋市立大学大学院医学研究科細胞分子生物学研究員）

研究要旨： AP-4 は宿主の転写因子であり、HIV 複製を転写レベルで負に制御し、潜伏感染しているプロウイルスからのウイルス複製を抑えることによってその維持に重要な役割を演じている。AP-4 結合配列は HIV プロウイルス LTR 領域内の TATA ボックスのすぐ下流に位置し、種々の HIV-1 株の中でもよく保存されている。本研究では、AP-4 が TBP の TATA ボックスへの結合を抑制し、さらに AP-4 が転写コプレッサーである HDAC1 を HIV-1 LTR にリクルートすることによって HIV 転写を抑制していることを初めて明らかにした。（本研究内容は Imai, K. and Okamoto, T.: J. Biol. Chem., 281: 12495-12506, 2006. に発表。）

A. 研究目的

HIV 感染症におけるウイルス遺伝情報量の増大過程はプロウイルスからの転写の過程であり、ウイルスの複製が宿主転写制御機構に大きく依存する。プロウイルス DNA 合成の際に逆転写の過程でゲノム RNA が RNase H によって分解されるため、ここでは遺伝情報量の増大はおこらない。これまでの研究から、潜伏感染細胞からのウイルス複製の活性化には、宿主細胞の転写活性化因子 NF- κ B とウイルスの持つトランス活性化因子 Tat によって段階的に制御されていることが明らかとなった。NF- κ B をはじめとする転写活性化因子の LTR への結合は、コアクチベーターの作用によるヒストンアセチル化に伴うクロマチン構造の弛緩と TBP (TFIID) 等の基本転写因子や RNA polymerase II のリクルートメントを促す。他方、Tat は転写された mRNA の TAR 領域に特異的に結合し、転写伸長促進因子である P-TEFb を特異的にリクルートすることにより HIV プロウイルスの転写を著しく上昇させる。

このように HIV の転写活性化機構が、転写因子レベル、あるいはクロマチンレベルで明らかとなった一方で、HIV 転写の抑制メカニズムに関しては不明な点が多い。このメカニズムが明らかとなれば、潜伏感染維持機構の解明へとつながることが期待できる。HIV 転

写抑制機構に関しては、これまでに転写因子 YY-1 が HDAC を LTR にリクルートすることによりヒストンの脱アセチル化をひきおこしクロマチンレベルで HIV の転写を抑制していることが報告されている。また、LTR 上の negative regulatory element (NRE) に結合する転写因子が HIV の転写を抑制するという報告があるが、転写因子結合後の詳しい分子機構はわかっていない。筆者らは、HIV LTR の TATA box 近傍に転写因子 AP-4 の結合サイトが存在し、AP-4 が HIV 発現の抑制因子として機能していることを見いだした。

筆者らは、まず遺伝子発現プロファイル解析で Tat 被制御遺伝子を検索した結果、DNA 修復酵素である OGG1 が Tat によって誘導されることを見いだした (Imai et al., J. Biol. Chem. 280: 26701-26713, 2005)。さらに Tat による詳細な OGG1 遺伝子発現の誘導機構を解析したところ、AP-4 が OGG1 の発現を負に制御しており、Tat は AP-4 と結合してその作用を抑制することで OGG1 の転写を誘導していることを見いだした。その後の解析で、HIV LTR の TATA box 近傍 (-22~ -17) に AP-4 の結合サイトが存在すること、さらに種々の HIV サブタイプ LTR の AP-4 結合サイトを調べた結果、サブタイプ B、A、C 等多くのサブタイプで AP-4 の結合配列 (CAGCTG) が良く保存されている

ことに着目した。

AP-4 は 15 年程前に Tjian らによって SV40 late gene を活性化する因子として見つかった HLH-Zip 型の転写因子である。その後の研究で、TGF-beta や Caspase 9, Angiotensinogen などの遺伝子プロモーターに AP-4 の結合部位が存在することが報告されたが、相互作用因子をはじめ詳細な遺伝子発現制御機構については一切報告がない。AP-4 結合サイトが LTR TATA box 近傍に存在し、またその配列が良く保存されていることから、AP-4 が HIV の転写において何らかの作用を及ぼしている可能性が推察された。そこでこの点を追求した。

B. 研究方法

- 1) 細胞株とその培養：HIV 非感染細胞株 CEM, HL-60, Jurkat と HIV 潜伏感染細胞株 ACH2, U1 細胞を用いた。これらの培養は通常の方法で行い、HIV 潜伏感染を維持するために 20 μ M の AZT を培地に加えた。また、ヒト腎由来繊維芽細胞 293 細胞株も使用した。
- 2) プラスミッド：AP-4 cDNA と Myc タグを発現する pMyc-AP-4 を作成した。pCMV-Tat と pNL4-3 はそれぞれ Tat 発現および HIV のフルサイズゲノムを含むプラスミッドである。TBP を発現する pCMV-TBP は千葉大の田村教授より供与された。その他、種々の AP-4 変異体発現プラスミッドを新たに作成した。HIV-1 LTR の制御下に luciferase 遺伝子を発現する CD12-luc は以前の報告にあるものを用いた。その AP-4 部位に変異を加えた種々のプラスミッドを新たに site-directed mutagenesis 法で作成した。これらの塩基配列を定法で決定した。
- 3) 組み換え蛋白とその精製：GST 融合 AP-4 蛋白を産生する pGEX-AP-4 プラスミッドを作成し、GST-AP-4 蛋白を大腸菌で産生させ、GSH アガロースカラムで精製した。
- 4) 抗体とウェスタンブロットおよび免疫沈降：AP-4 に対する抗体は家兎に GST-AP-4 蛋白を免役して作成した。ウェスタンブロ

ットは、細胞抽出液を SDS-PAGE で展開後、PVDF 膜に転写し、一次抗体および 2 次抗体を反応させ、SuperSignal (Pierce 社)を用いて蛍光発色によって蛋白バンドを検出した。

- 5) クロマチン免疫沈降法：種々の処理を行った細胞に最終濃度 1%のフォルムアルデヒドを加え、SDS-lysis buffer で細胞を処理後、超音波処理によってクロマチンを破碎し、各種抗体を室温で 2 時間および 4°C で 1 時間反応させた。その後、protein G ビーズを加えて免疫沈降を行い、フォルムアルデヒドによる架橋反応を 65°C 6 時間の熱処理によって逆転させ、DNA を Qiagen spin column を用いて精製後、AP-4 結合領域を含む HIV LTR 部分の DNA(-176 to +61)を PCR で増幅し、AP-4 が結合している HIV-1 DNA を検出した。
- 6) in vitro DNA 結合反応：EMSA 法を用いた。HIV-1 LTR 上の配列(-42~+4)を含む合成オリゴ DNA を放射線標識したプローブを用いて細胞核抽出液と in vitro で反応したものをアクリルアミドゲル電気泳動し、DNA-蛋白複合体の移動度を観察した。
- 7) 遺伝子導入とルシフェラーゼアッセイ：細胞への遺伝子導入は Fugene-6 を用いた市販のトランスフェクション試薬を使用した。ルシフェラーゼアッセイは、dual-luciferase assay kit を用いて行った。内部対照として pRL-TK 制御下にある Renilla luciferase 遺伝子と種々の HIV-1 LTR-Luc プラスミッドを同時に細胞内導入し、Renilla luciferase の値を基準に標準化した Luc 活性を比較した。
- 8) 細胞株とウイルス産生の定量：種々の HIV 感染培養細胞の上清への HIV 産生量の定量は HIV-1 p24 antigen ELISA kit (Cellular Products 社)を用いた。siRNA 実験では、HIV 産生クローン pNL4-3 と共に AP-4 をノックダウンするための合成 siRNA を Lipofectamine 2000 を用いて細胞内に導入した。
(倫理面への配慮)
本研究には該当せず。

C. 結果

1. AP-4 による HIV の転写の負の制御 : AP-4 が HIV の転写に及ぼす影響を T 細胞および単球系細胞を用いて Luciferase assay にて調べた。

その結果、AP-4 は basal レベルでの転写と Tat や TNF-alpha による HIV の転写活性を強く抑制した。LTR の AP-4 サイトを変異させた変異型 LTR においては抑制作用は認められなかった。実際に内在性の AP-4 が抑制因子として機能しているか否かを調べるために、AP-4 に対する siRNA を細胞に導入した結果、HIV の転写活性が逆に上昇した。以上の結果から、AP-4 は HIV 転写の抑制因子として機能している事が明らかとなった。

AP-4 は HLH-Zip 型の転写因子であり、N 末に DNA 結合に関わる HLH ドメインと dimerization に関わる leucine repeat (LR)、C 末には Q/P-rich と acidic ドメインが存在する。HIV 転写抑制における AP-4 の機能ドメインを調べるために、種々の変異型 AP-4 を作製しその効果を検討した。その結果、HLH ドメインを除いた変異型 AP-4 では抑制効果が認められなかったことから、HIV 転写の抑制には DNA との結合が必須であることがわかった。

2. AP-4 による HIV 転写抑制機構 : AP-4 がどのような機構で HIV の転写を抑制しているか解析を進めた。AP-4 の結合サイトが TATA box の近傍に存在することから、AP-4 が TBP の TATA box への結合を阻害している可能性が推察された。この点を AP-4 の組み換え蛋白を作製し EMSA にて検討した結果、AP-4 は TBP の TATA box への結合を濃度依存的に抑制した。AP-4 と TBP の拮抗作用は *in vivo* においても確認でき、AP-4 による HIV の転写阻害作用は TBP の強制発現によって解除された。

AP-4 による HIV 転写の抑制が TATA box のマスキングのみに依存しているか否かを調べるために、LTR 上の AP-4 の結合サイトを TATA box から離して AP-4 の効果を検討した。そのために、本来の AP-4 結合サイトを変異させた

LTR に、TATA box から様々な距離の所に新たに AP-4 サイトを挿入した変異型 LTR を作製し Luciferase assay を行った。その結果、野生型 LTR にはおとるものの、AP-4 サイトを TATA box から離れた位置に挿入した LTR においても AP-4 による阻害効果が認められた。以上の結果から、AP-4 は TBP のマスキング以外にも、何らかのメカニズムで HIV 転写を抑制していることが推察された。

転写の抑制機構において HDAC によるクロマチンレベルでの転写抑制が注目されている。そこで、AP-4 による HIV 転写抑制機構における HDAC の関与を検討した。AP-4 と HDAC が結合する可能性を免疫沈降法で調べた結果、AP-4 は内在性の HDAC1 および HDAC2 と結合することが認められた。実際に、AP-4 による抑制作用に HDAC が関与しているか否かを確認するために、HDAC の阻害剤である TSA を用いて検討した結果、TSA 処理により AP-4 による HIV の転写阻害作用は解除された。

3. HIV 潜伏感染細胞 LTR 上での AP-4 結合の動態 : 実際の HIV 感染細胞内での AP-4 と TBP、HDAC の動態を調べるために、HIV 慢性潜伏感染細胞である ACH2 と U1 細胞を用いてクロマチン免疫沈降法を行い検討した。その結果、未刺激状態の細胞においては LTR への恒常的な AP-4 と HDAC1 の結合が認められ、TNF- α で細胞を刺激すると、LTR から AP-4 と HDAC1 が遊離し、逆に TBP と pol II が LTR にリクルートされてくること、さらにヒストンのアセチル化がおこなわれていることが認められた。AP-4 の結合サイトを変異させた LTR を細胞に導入しクロマチン免疫沈降を行った結果、HDAC1 が LTR にリクルートされてこなかったことから、AP-4 が HDAC1 を LTR にリクルートしていることが推察された。

4. AP-4 の HIV 複製に対する抑制効果 : HIV 複製に対する AP-4 の効果を検討するために、Jurkat T 細胞に pNL4-3 を導入し p24 ELISA assay

を行った。その結果、AP-4 は basal レベルでのウイルス複製とともに TNF- α による HIV の複製を抑制した。他方、AP-4 siRNA を pNL43 とともに細胞に導入すると HIV の複製は逆に上昇した。

D. 考察

以上の結果から、AP-4 が TATA box のマスキングと HDAC のリクルートによって HIV の転写を負に制御していることが明らかとなった。HIV 慢性潜伏感染細胞において、未刺激の状態では AP-4 が TATA box をマスキングすると同時に HDAC を LTR にリクルートしていること、TNF- α の刺激が入ると AP-4 が LTR から遊離し代わりに TBP と pol II が LTR にリクルートされた結果を考え合わせると、感染細胞内での AP-4 の動態が HIV の潜伏感染維持に重要な役割を担っている可能性が推察された。

多施設臨床研究より感染者体内での HIV 量が AIDS の発症および薬剤耐性ウイルスの出現頻度と高く相関することが明らかになった。このことから、HIV 複製を抑制することで AIDS 発症が遅延し、HAART 療法の有効性が向上することが予測された。しかし、血中ウイルス量が検出限界以下になってもなお潜伏感染細胞が存在することが問題となっている。従って、AIDS 発症を食い止めるには潜伏感染細胞のプロウイルスからの転写レベルで活性化を阻止することが必須であると考えられる。一方で、潜伏感染細胞からのウイルス複製をよびおこし、HAART と組み合わせることによって潜伏感染細胞を排除しようとする臨床試験が実施されている。休止期にある HIV 感染 T 細胞に対し HDAC1 阻害剤 valproic acid や IL-7 を用いた結果、いずれの場合も潜伏感染細胞が有意に減少したことを報告している。しかしながら、HAART で用いる抗ウイルス剤の多くは脳などの組織への移行が充分でない（サンクチュリア）ことから、このような治療法ではたとえ末梢血中のウイルス量が減らすことができても、かえって脳内の HIV を増やす可能性があるため、長期間の治療効果を

厳密に評価する必要がある。

AIDS 治療は HAART 療法により新たな段階を迎えるに至ったが、HIV は感染者の体内に潜伏感染し続ける性質を持つため、現在の治療法が AIDS 発症防止に対しても長期間有効であるという保証はなく、また副作用や薬剤耐性ウイルスの出現など多くの課題が残されており、次世代の AIDS 治療薬・発症予防薬の開発が急務となっている。さらなる HIV の転写調節機構の解明は、新たな AIDS 治療法の開発につながることを期待できる。

E. 結論

転写因子 AP-4 は HIV の感染細胞内での潜伏感染の維持に必須の役割を演じている。この事実は今後 HIV 感染細胞を除去するための治療法を開発するための重要な視点を提供する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Victoriano, A. F. B., Asamitsu, K., Hibi, Y., Imai, K., Barzaga, N.G., and Okamoto, T.: Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Replication in Latently Infected Cells by a Novel IKK Inhibitor. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 50: 547-555, 2006.
- 2) Sanda, T., Asamitsu, K., Ogura, H., Iida, S., Utsunomiya, A., Ueda, R., and Okamoto, T. Induction of cell death in adult T-cell leukemia cells by a novel I κ B kinase inhibitor, *Leukemia* 20: 1-9, 2006.
- 3) Katagiri, D., Hayashi, H., Victoriano, A. B., Okamoto, T. and Onozaki, K.: Estrogen Stimulates Transcription and Replication of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1). *Int Immunopharm.* 6: 170-181, 2006
- 4) Okamoto, T., Sanda, T., and Asamitsu, K. NF- κ B signaling and carcinogenesis. <Review> *Curr. Pharm. Design*, 5,447-462.2007
- 5) Imai, K. and Okamoto, T.: Transcriptional repression of human immunodeficiency virus type 1 by AP-4. *J. Biol Chem.*, 281: 12495-12506, 2006.
- 6) Inoue, Y., Itoh, Y., Abe, K., Okamoto, T., Daitoku, H., Fukamizu, A., Onozaki, K., and Hayashi, H. Smad 3 is acetylated by p300/CBP to regulate its transcriptional

- activity. *Oncogene*, 26.500-508.2006
- 7) Okamoto, T. NF- κ B and rheumatic diseases. <Review>
Drug Targets – Immune, Endocrine & Metabolic
Disorders, 6.359-372.2006
- 8) Kanazawa, S., Ota, S., Sekine, C., Tada, T., Otsuka, T.,
Okamoto, T., Sonderstrup, G, Peterlin, B.M.: Aberrant
MHC class II expression in mouse joints leads to
arthritis with extra-articular manifestations similar to
rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
USA.39.14465-12505, 2006
- 9) Hamano T., Matsuo K., Hibi Y., Victoriano, A-F, B.,
Takahashi N., Mabuchi Y., Soji T., Irie S.,
Sawanpanyalert, P., Yanai H., Hara T., Yamazaki S.,

Yamamoto N., and Okamoto T.: A single nucleotide
synonymous mutation in *gag* gene controlling human
immunodeficiency virus type 1 virion production. *J.*
Virology 3.1528-1533.2007 .

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得(出願中)

特許出願日 平成18年7月21日
ヒト関節リウマチの病態を再現するトランスジ
ェニック非ヒト哺乳動物 (特願 2006-510787)

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）
分担研究報告書

CCR5 拮抗薬 TAK-220 存在下における感染細胞の長期培養
—薬剤耐性ウイルス分離の試み—

分担研究者 馬場昌範 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科教授

研究要旨：我々は既に新規 CCR5 拮抗薬 TAK-652 に対する耐性 HIV-1 の出現とそのメカニズムを明らかにするために、*in vitro* において薬剤存在下における感染細胞の長期培養を行い、TAK-652 耐性ウイルスの誘導に成功した。そこで、TAK-652 とは化学構造が全く異なる CCR5 拮抗薬の TAK-220 について、耐性ウイルスの誘導を試みた。R5 HIV-1 臨床分離株をヒト末梢単核球に感染させ、TAK-220 の濃度を徐々に上げながら、継代培養を続けた。その結果、約 2 年間で薬剤の濃度を 10 nM から 160 nM まで上げることに成功したが、それ以上に薬剤の濃度を上昇させると、ウイルスの増殖が認められなくなった。以上のことから、TAK-652 と異なり、TAK-220 耐性ウイルスの分離は難しいと思われた。

A. 研究目的

薬剤耐性ウイルスの出現が highly active antiretroviral therapy (HAART) 失敗の大きな原因となっている。そこで、既存の抗エイズ薬、すなわち逆転写酵素阻害薬やプロテアーゼ阻害薬以外の作用機序を有する薬剤の開発研究が精力的に行われている。その中の 1 つが、インテグラーゼ阻害薬であり、もう一方が HIV-1 のコレセプターである CCR5 を標的とした侵入阻害薬である。CCR5 拮抗薬については現在認可された化合物はなく、2 化合物が臨床試験の最終段階に進んでいるが、今のところ臨床で耐性ウイルスが分離されたとの報告はない。しかしなが

ら、CCR5 から CXCR4 へのウイルスのコレセプター指向性の変化は病態の急速な悪化、及び CD4 陽性 T 細胞の急激な減少をもたらすことが知られている。従って、CCR5 拮抗薬に対する耐性ウイルスが出現した場合、コレセプター指向性が CCR5 から CXCR4 へと変化し、HIV-1 感染者の病態が悪化することが懸念されている。

我々はこれまでの研究により、TAK-779 誘導体である TAK-652 について、*in vitro* で感染 PBMCs の長期継代培養実験を行い、TAK-652 に対する耐性ウイルスを分離することに成功している。また、分離された耐性ウイルスの性状、特にコレセプター指向性、他の

抗 HIV-1 薬との交叉耐性, および envelope 領域における変異について明らかにし, 既に報告済みである。この中で明らかになったことは, TAK-652 耐性ウイルスは, 全く化学構造の異なる TAK-220 に対しては交叉耐性を示さないという点である。そこで, 我々は TAK-652 と全く同様の実験を TAK-220 に対して行い, この薬剤に対する耐性ウイルスを分離することを試みた。

B. 研究方法

薬剤: CCR5 拮抗薬の TAK-220 および TAK-652 (Fig. 1) は武田薬品工業にて合成された。

細胞: 健常成人より得られた末梢単核球 (PBMC) を Ficoll-Hypaque 密度勾配遠心にて分離後, 10% dimethylsulfoxide (DMSO) 含有 RPMI 1640 培地に浮遊し, 使用時まで -80°C で保存した。細胞は使用 6 日前に融解し, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の phytohemagglutinin (PHA) を含む 20% ウシ胎仔血清 (FBS), 100 U/ml recombinant human interleukin-2 (IL-2), 100 U/ml penicillin G, および 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin を添加した RPMI 1640 培地中で 3 日間培養した。PHA を除いた培地をウイルスの継代培養及び薬剤感受性試験に用いた。

ウイルス: 鹿児島大学において治療未経験の HIV-1 感染患者から分離された R5 HIV-1 KK 株を用いた。

TAK-220 存在下における感染細胞の長期継代培養: 5×10^6 cells の PHA 刺激 PBMC に p24 抗原量として 100 ng のウイルスを加え, 液量を 6 ml とし, 2 日間培養した。細胞に未吸着のウイ

ルス粒子を洗浄除去し, 液量を 10 ml として TAK-220 存在下で培養した。TAK-220 の初期濃度は 10 nM とした。継代の際には TAK-220 存在下で 4×10^6 cells の PHA 刺激非感染 PBMC に 1×10^6 cells の感染細胞を加えた。また, 各継代の 4 日後には継代時と同濃度の TAK-220 を含む新鮮培地で感染細胞浮遊液を 4 倍希釈した。TAK-220 添加群の p24 抗原量が薬剤非添加群と同様に推移, 或いは薬剤非添加群の約 50% に増加後, そのレベルが 2 週間以上維持された場合に薬剤の濃度を上げた。薬剤濃度は 10~320 nM までは 2 倍ずつ上げたが, 320 nM の次は 1,000 nM に上げた。継代ごとに培養上清を回収し, 培養上清中の p24 抗原量を ELISA キット (ZeptoMetrix) にて測定した。

PBMC を用いた感染試験: 4×10^6 cells の PHA 刺激 PBMC に 1,400 50% cell culture infectious dose (CCID₅₀) のウイルスを加え, 37°C で 4 時間培養後, 細胞に未吸着のウイルス粒子を洗浄除去した。 2×10^5 cells の感染細胞を 96 穴プレートに播種し, 種々の濃度の薬剤存在下で 4 日間培養した。感染 4 日後に同濃度の薬剤を含有する新鮮培地で培養液を 2 倍希釈し, さらに 3 日間培養した。感染 7 日後に培養上清を回収し, 培養上清中の p24 抗原量を ELISA キットにて測定した。

(倫理面への配慮について)

本研究では, 健常人から PBMC の供給を受けたが, その際にはその検体に関する遺伝子解析実験を一切行わないことを必ず説明し, 提供者からの同意を得た。

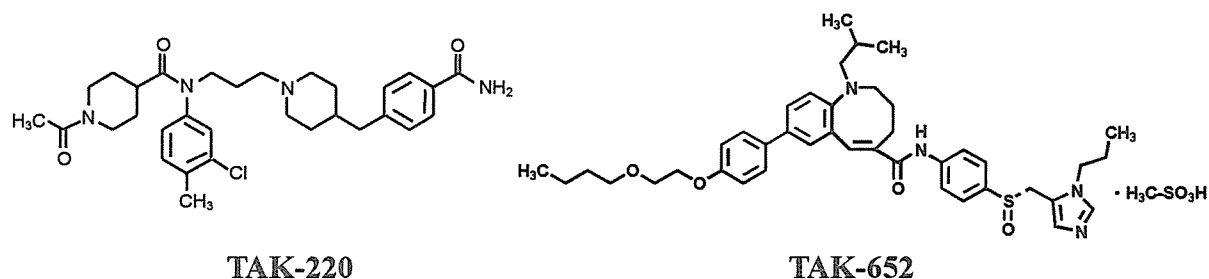


Fig. 1. Chemical structures of TAK-220 and TAK-652

Table 1. Anti-HIV-1 activity of CCR5 antagonists in PBMCs

CCR5 antagonist	EC ₅₀ (nM)
TAK-220	1.2
TAK-652	0.043
TAK-779	2.1

The strain used in this experiment is KK, which was isolated a treatment-naïve patients in Kagoshima University.

EC₅₀: 50% Effective concentration, based on the reduction of p24 antigen in culture supernatants.

C. 研究結果

TAK-220 の抗 HIV-1 効果：薬剤存在下における感染細胞の長期培養実験を開始する前に、初期薬剤濃度を設定する目的で、TAK-220 を含む CCR5 拮抗薬について、それらの抗 HIV-1 活性を検討した。その結果を Table 1 に示す。3 つの薬剤の中では TAK-652 が最も強い抗ウイルス活性を示し、続いて TAK-220、そして TAK-779 であった。

TAK-220 存在下における HIV-1 感染 PBMC の長期継代培養：TAK-220 の EC₅₀ 値は約 1.2 nM であり、EC₉₀ 値は約 10 nM 付近にあることが、PBMC を用いた実験から明らかにされている (data not shown)。そこで、TAK-220 の培養開始濃度を EC₉₀ 値に近い 10

nM に設定し、長期継代培養実験を開始した。TAK-220 添加群の p24 抗原量が薬剤非添加群と同様に推移或いは薬剤非添加群の約 50% に増加後、そのレベルが 2 週間以上維持された場合に薬剤の濃度をひき上げた (Fig. 2)。TAK-220 存在下で培養したウイルスの増殖は、薬剤の濃度を 80 nM まで濃度を上げて、徐々に増加する傾向が認められた。そこで 160 nM に上昇させたところ、ウイルスの増殖が急激に悪くなり、培養上清中にわずかにしか検出できない状況が、約 1 年にわたって継続した。しかし、培養開始後 90 週を過ぎた頃から、再びウイルス増殖が徐々に活発化し、感染 94 週間には TAK-220 160 nM 存在下でもウイルスの増殖が認められるようになった。

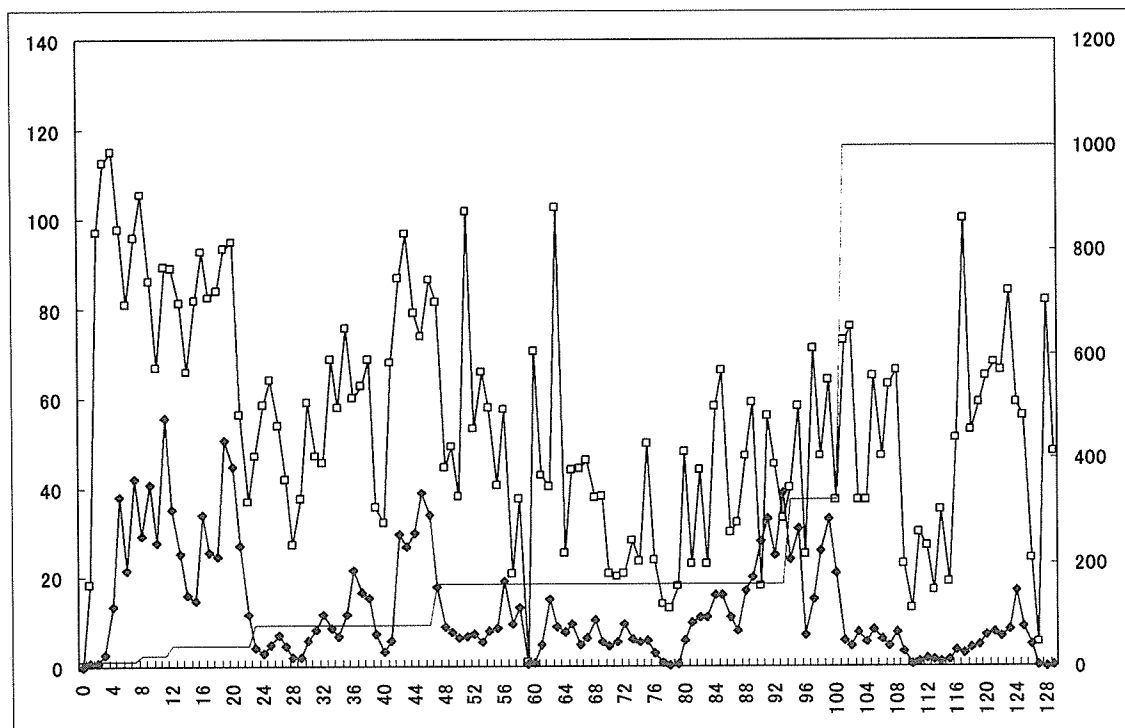


Fig. 2. Replication of the clinical isolate KK in PBMCs with escalating concentration of TAK-220. The R5 HIV-1 clinical isolate KK was passaged weekly in PHA-stimulated PBMCs with (filled diamond) or without (open square) TAK-220. The red line indicates the concentrations of TAK-220. In each passage, PBMCs obtained from the same healthy Left and Right x-axes indicate p24 level (ng/ml) and drug concentration (nM), respectively.

しかしながら、320 nM まで薬剤の濃度を上昇させ、さらに短期間に 1,000 nM の薬剤に暴露した結果、培養上清中の p24 は減少を続け、125 週目にはほとんど検出できないレベルにまで低下したため、実験を中止した。

D. 考察

R5 HIV-1 KK 株を PBMC に感染させ、TAK-652 存在下で培養すると、ウイルスの増殖は感染 67 週後に TAK-652 に高度耐性を示すウイルスが分離指された。このウイルスは化学構造が類似している TAK-779 に対しては中程度の耐性を示したが、化学構造の全く異

なる TAK-220 に対しては耐性を示さなかった。このことから、TAK-652 と TAK-220 は同じ CCR5 拮抗薬とはいいながら、CCR5 に対する相互作用が異なっているのではないかと思われた。そこで、これを検証するため、今度は TAK-220 に対する耐性ウイルス樹立を試みた。その結果、途中までは薬剤の濃度を上げて、ウイルスを得ることができたが、160 nM 以上の濃度ではウイルスを得ることが出来なかった。CCR5 拮抗薬については、TAK-220 や TAK-652 以外に数種類のものが報告されており、*in vitro* における耐性ウイルスの誘導に成功している薬剤と、

成功していない薬剤がある。これらの違いが、単に実験手技の差によるものなのか、あるいは化学構造に基づく本質的なものなのか、今後、明らかにする必要がある。また、*in vitro* における薬剤耐性誘導の難易度の違いが、*in vivo* の結果に反映するかどうか興味深い。

E. 結 論

今回、CCR5 拮抗剤である TAK-220 に対する耐性ウイルスの *in vitro* における誘導を試みたが、2 年以上の継代培養によっても、耐性ウイルスを分離することは出来なかった。この結果は、TAK-652 で得た結果とは異なっており、今後これらの薬剤の臨床使用に伴って出現すると考えられる薬剤耐性の問題を考える上で、非常に重要な情報を提供するものと考えられる。

F. 研究発表（本研究に直接関係するもの）

1. 論文発表

1. Baba M, Miyake H, Wang X, Okamoto M, Takashima K. Isolation and characterization of human immunodeficiency virus type 1 resistant to the small-molecule CCR5 antagonist TAK-652. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:707-715 (2007).
2. Baba M. Recent status of HIV-1 gene expression inhibitors. *Antiviral Res.* **71**: 301-306 (2006).
3. Baba M. Recent advances of CCR5 antagonists. *Curr. Opinion HIV AIDS* **1**:367-372 (2006).
4. Imamura S, Ichikawa T, Nishikawa Y, Kanzaki N, Takashima K, Niwa S, Iizawa Y, Baba M, Sugihara Y. Discovery of a piperidine-4-carboxamide CCR5 antagonist (TAK-220) with highly potent anti-HIV-1 activity. *J. Med. Chem.* **49**: 2784-2793 (2006).
5. Seto M, Aikawa K, Miyamoto N, Aramaki Y, Kanzaki N, Kuze Y, Takashima K, Iizawa Y, Baba M, Shiraishi M. Highly potent and orally active CCR5 antagonist as anti-HIV-1 agents: Synthesis and biological activities of 1-benzazocine derivatives containing a sulfoxide moiety. *J. Med. Chem.* **49**: 2037-2048 (2006).

2. 学会発表

1. 王 欣, 山高一修, 岡本実佳, 池田 了, 馬場昌範. Potent and selective inhibition of Tat-dependent human immunodeficiency virus type 1 replication in chronically infected cells by a novel naphthalene derivative. 第20回日本エイズ学会学術集会, 2006年11月30日, 東京.
2. 馬場昌範, 王 欣, 岡本実佳, 高島勝典. 新規 CCR5 拮抗薬 TAK-652 に対する耐性 HIV-1 の誘導とその解析. 第20回日本エイズ学会学術集会, 2006年11月30日, 東京.

G. 知的財産権の出願・登録状況

今年度、本研究に関するものでは、出願および取得特許はない。

レトロウイルス感染における CTL とウイルス変異および中枢神経傷害機序に関する研究

分担研究者 納 光弘 鹿児島大学教授

共同研究者：久保田龍二¹、松浦英治²、¹鹿児島大学難治ウイルス研、²同神経病学講座)

研究要旨：ヒトレトロウイルスである HTLV-I 感染における CTL とウイルス変異の関係、および中枢神経傷害機序に関して研究を行った。1) HTLV-I 感染において変異ウイルスが増殖してウイルス交代現象が起こっているのかを検討した。ウイルスのアミノ酸置換を伴うまたは伴わない遺伝子変異を調べることで HTLV-I 特異的 CTL が HTLV-I に対して正の淘汰圧を与えているエピトープ部位を同定した。この部位で CTL から認識されにくい変異ウイルスも存在したが、CTL から逸脱して増殖する変異ウイルスはなかった。ウイルスの増殖に重要な部位の正の淘汰圧が観察された CTL エピトープはワクチン開発の対象となりえると考えられた。2) HAM の中枢神経系においては、HTLV-I 感染 CD4 陽性リンパ球と、著明な HTLV-I 特異的 CD8 陽性 CTL の浸潤を認め、その周囲の神経系細胞にアポトーシスを認めた。末梢血よりの感染細胞の流入と、それに続く CTL の浸潤による炎症が HAM の中枢神経における神経傷害機序と考えられた。これらの研究は HIV 感染に示唆を与えるものと考えられた。

A. 研究目的

HIV と同じヒトレトロウイルスである HTLV-I における CTL の解析および中枢神経傷害機序解明の研究をとおして、HIV 感染での CTL の役割および HIV 脳症のより深い理解への助けとなることを目的とする。

HAM では HTLV-I ウイルス量が高く、HAM 発症の最大のリスクである。一方、末梢血中には HTLV-I 特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) も高頻度に観察されている。すなわち HTLV-I 特異的 CTL が多岐にもかかわらず、高ウイルス状態が持続している。HTLV-I 特異的 CTL は *in vitro* の細胞傷害性試験ではウイルス蛋白をパルスした細胞を効率的に傷害するが、生体内で HTLV-I 感染細胞を有効に排除しているのかは不明である。生体内での HTLV-I に対する CTL の淘汰圧を検出するために、アミノ酸変異を伴うウイルス遺伝子の変化率（非同義置換：dN）に対するアミノ酸変異を伴わないウイルス遺伝子の変化率（同義置換：dS）を計算した。同時に CTL 淘汰圧がある部位で変異ウイルスが発生し、免疫学的逸脱を起していないか検討した。

HAM 患者末梢血中では HTLV-I プロウイルスと HTLV-I 特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) が増

加し、HTLV-I 特異的 CTL は抗原特異的に IFN- γ や TNF- α などのサイトカインを産生することが報告されている。また剖検脊髄では HTLV-I 感染 CD4 陽性 T 細胞と長期に渡り浸潤し続ける CD8 陽性 T 細胞が認められている。これらのことから HAM の中枢神経系において、HTLV-I 感染 CD4+ 細胞と HTLV-I 特異的 CD8+CTL の免疫反応が HAM 発症に深く関与していると類推されている。我々はすでに中枢神経系における HTLV-I 感染細胞は浸潤 CD4+細胞であることを報告しているが、HAM 脊髄に HTLV-I 特異的 CTL が浸潤しているのかは未だ不明である。今回我々は中枢神経系での HTLV-I 特異的 CTL の HAM 発症への関与を明らかにするために、HAM 脊髄をもちいて免疫組織学的に HTLV-I 特異的 CTL の同定を試みた。

B. 研究方法

1) CTL とウイルス変異の研究

①HLA-A2 患者では HTLV-I Tax 蛋白に対する CTL エピトープがマッピングされている。そのため、対象は HLA-A2 の 3 例の HAM 患者とした。各患者の経過中の 3 ポイントで末梢血リンパ球を分離し DNA を抽出した。HTLV-I のサブクローニングを行い、合計約 450 クローンの tax 遺伝子をシー

クエンスした。

②各患者のウイルス遺伝子の **phylogenic tree** を作製し、既知のエピトープと非エピトープ部の **dN/dS** を計算した。さらに、5 コドン当たりの **dN/dS** を **window analysis** にて検討した。

③正の淘汰圧の観察された CTL エピトープ部位で、変異エピトープをもつウイルスが 3-8 年の経過で増大してこないか検討した。

④経過中変異エピトープ特異的な CTL が変化していないか、変異エピトープ特異的 CTL の頻度を、**IFN-γ** を指標にしたフローサイトメトリーにて検討した。

2) 中枢神経傷害機序の研究

HLA-A2 陽性の HAM 患者においては、主要なウイルスエピトープは **Tax11-19 (LLFGYPVYV)** であることが報告されている。剖検 9 例の脊髄より DNA を抽出し、PCR にて HLA-A2 を同定した。HLA-A2 陽性であった 2 例の凍結脊髄を用いて検討した。**Tax11-19** ペプチド/HLA-A*02 五量体を用いて免疫染色を行い、HTLV-I **Tax11-19** 特異的 CTL を同定した。陽性細胞は **CD8** と二重染色を行った。**CD4+**細胞、**CD8+**細胞、**Tax11-19** 特異的 CTL の浸潤細胞数を比較検討した。あわせて細胞傷害関連分子である **perforin**、**granzyme B** を、増殖関連分子である **Ki-67** を染色した。さらに脊髄内のアポトーシス細胞を活性型 **caspase 3** で同定し、神経系細胞マーカーと二重染色した。

(倫理面への配慮) 臨床検体は患者への文書によるインフォームドコンセントのもとに採取した。本研究は鹿児島大学倫理委員会の承諾をえて行った。

C. 研究結果

1) CTL とウイルス変異の研究

①各患者 HTLV-I のコンセンサスシーケンスは同一であり、患者特異的なウイルスは見つからなかった。

②dN/dS の検討では、6 個のエピトープの内 3 個の dN/dS は 1 以上(正の淘汰圧)であった。

③window analysis では 6 個のエピトープの内 3 個に統計学的に有意に HTLV-I に対する正の淘汰圧が観察された(図 1)。

④正の淘汰圧が観察された CTL エピトープ部位に変異エピトープを持つウイルスが観察され、CTL にほとんど認識されない変異ウイルスも観

察されたが(図 2 および 3)、経過中増加する変異ウイルスは認めなかった。

⑤変異エピトープ特異的 CTL の頻度は、経過中大きな変化は認めなかった(図 3)。

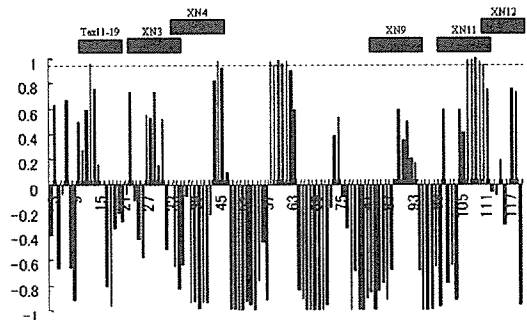


図 1. 横軸が HTLV-I Tax のアミノ酸位置、縦軸の 0 より上は **dN/dS > 1** の確率、下は **dN/dS < 1** の確率を示す。点線より上が統計的に有意な正の淘汰圧の部位。正の淘汰圧は **Tax11-19**、**XN4**、**XN11** エピトープで検出された。

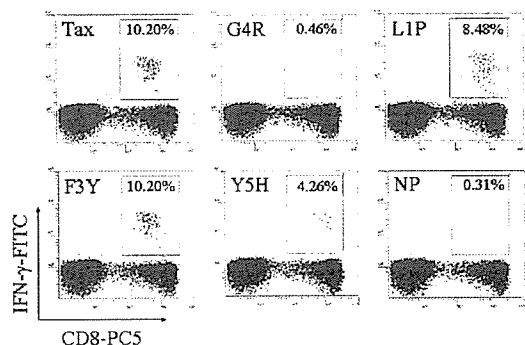


図 2. シークエンスにより同定された変異ウイルスエピトープを認識する CTL の検出。G4R ほとんど認識されていない。

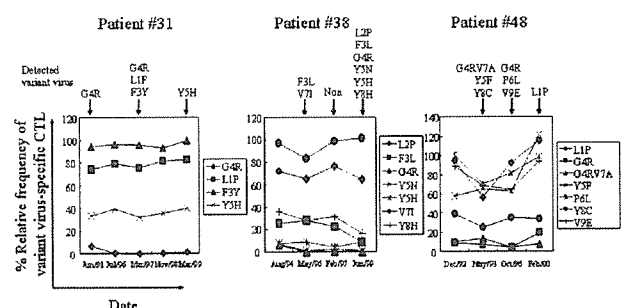


図3. 3-8年の経過中の変異ウイルス特異的 CTL の末梢血中の相対頻度の変化。

2) 中枢神経傷害機序の研究

胸髄に炎症細胞浸潤が強く、脊髄内の血管周囲を中心として CD4 陽性細胞および CD8 陽性細胞の浸潤を認めた。脊髄内に浸潤している細胞は主に CD8 が陽性であり、CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞の比はおよそ 1 : 6 であった。脊髄内に同定された Tax11-19 特異的 CTL は、二重染色で CD8 陽性であり、CD8 陽性細胞のうち Tax11-19 特異的 CTL は約 20% であった。浸潤している HTLV-I 特異的 CTL は perforin、granzyme B を発現し、一部は Ki-67 を発現していた。アポトーシス細胞は細胞浸潤が著明な血管周囲に見られ、主に希突起膠細胞であった。

D. 考察

1) CTL とウイルス変異の研究

Tax の変異は HTLV-I ウイルスの増殖にネガティブに働くことが知られている。本研究で、変異ウイルス特異的 CTL の増加を認めないにもかかわらず変異ウイルスの増大がないのは、変異そのものでウイルスの増殖能が低下するためと考えられた。感染個体内でのウイルスの進化には、その変異がウイルス増殖そのものに与える影響と、CTL からの排除という 2 つのファクターのバランスにより決定されていることが推測された。また、ウイルス増殖に関与する蛋白の CTL の淘汰圧がかかるエピトープ部位は、免疫学的逸脱が起こりにくく、有効なワクチン開発のターゲットになると考えられた。

2) 中枢神経傷害機序の研究

HAM 患者においては末梢血中の HTLV-I 特異的 CTL の解析により CTL が病態に関わっていることが考えられてきたが、HTLV-I 特異的 CTL が中枢神経内に存在するかわかっていなかった。今回の研究により実際に中枢神経系に浸潤しており、加えてその割合は非常に高いことが明らかとなった。HAM において HTLV-I 特異的 CTL が末梢血中に出現する割合は数%であり、今回の結果は、HTLV-I 特異的 CTL が HAM 患者の中枢神経系に集積していることを示唆し、この細胞が HAM の病態に深く関わっていると考えられた。またアポトーシスは、細胞浸潤の著明な血管周囲の、主に希突起膠細胞におこっていた。我々は既に中枢神

経系での HTLV-I 感染細胞は浸潤 CD4 陽性細胞であることを報告しており、本研究の結果とあわせて、HAM の脊髄では HTLV-I 感染 CD4+細胞と HTLV-I 特異的 CTL の浸潤が血管周囲におこり、その周囲の神経系細胞の bystander damage がおこることで神経障害が起こっていると考えられた。HIV 脳症でも HIV 感染マクロファージが中枢神経内に浸潤しており、同様な機序が関与している可能性も考えられた。

E. 結論

HTLV-I 特異的 CTL は HTLV-I に対して正の淘汰圧を与えており、生体内で HTLV-I を排除していると考えられた。CTL から認識されにくい変異ウイルスも存在したが、CTL から逸脱して増加する変異ウイルスは観察されなかった。ウイルスの増殖に重要な部位の正の淘汰圧が観察された CTL エピトープはワクチン開発の対象となりえると考えられた。

HAM 患者脊髄内に HTLV-I 特異的 CTL が多数浸潤していることを組織学的に証明した。HTLV-I 感染 CD4+細胞と HTLV-I 特異的 CD8+CTL の中枢神経系への浸潤による炎症と、それに続く神経系細胞の bystander damage が HAM の発症機序と考えられた。今後 HIV 脳症においても同様な機序が働いていないか検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Taylor GP, Goon P, Furukawa Y, Green H, Barfield A, Mosley A, Nose H, Babiker A, Rudge P, Usuku K, Osame M, Bangham CR, Weber JN. Zidovudine plus lamivudine in Human T-Lymphotropic Virus type-I-associated myelopathy: a randomised trial. *Retrovirology*. 2006 3:63.
2. Nose H, Saito M, Usuku K, Sabouri AH, Matsuzaki T, Kubota R, Eiraku N, Furukawa Y, Izumo S, Arimura K, Osame M. Clinical symptoms and the odds of human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in healthy virus carriers: application of best-fit logistic regression equation based on host genotype, age, and provirus load.

3. 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(12):944-52.
 4. Saito M, Nose H, Usuku K, Sabouri AH, Matsuzaki T, Izumo S, Arimura K, Osame M. Flow cytometry evaluation of the T-cell receptor Vbeta repertoire among human T-cell lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) infected individuals: effect of interferon alpha therapy in HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *J Neurol Sci*. 2006;246(1-2): 37-43
 5. 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*. 2006;118(2):381-7
 6. Kubota R, Hnada K, Furukawa Y, Arimura K, Osame M, Gojobori T, Izumo S. Genetic stability of human T lymphotropic virus type I despite antiviral pressures by CTLs, *J Immunol*. In press, 2007
2. 学会発表
1. Hayashi D, Kubota R, Nose H, Arimura K, Izumo S, Osame M. Increased CTL responses to CMV in HAM/TSP patients: A relation of FOXP3 regulatory T cells. 8th International Congress of Neuroimmunology (Nagoya, Japan) 2006.Oct.
 2. Nose H, Saito M, Sabouri AH, Usuku K, Kubota R, Izumo S, Arimura K, Osame M. In vivo selection of T-cell receptor junction region sequences by HLA-DRB1-0101 human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) envelope gp21 peptide complexes in HTLV-1 associated myelopathy/tropic spastic paraparesis(HAM/TSP) 8th International Congress of Neuroimmunology (Nagoya, Japan) 2006.Oct.
 3. Kubota R, Arimura K, Osame M, Izumo S: HTLV-I-specific CTL with high TCR degeneracy efficiently recognize naturally occurring mutant viruses in patients with HAM/TSP. *8th International Conference of Neuroimmunology*. Nagoya, Japan, 2006
 4. Matsuura E, Kubota R, Saito M, Suehara M, Matsuzaki T, Arimura K, Osame M, Izumo S. Visualization of HTLV-I Tax-specific cytotoxic T lymphocytes in the central nervous system of HTLV-I-associated myelopathy. 8th International Congress of Neuroimmunology (Nagoya, Japan) 2006.Oct.
- G. 知的財産権の出題・登録状況(予定を含む。)
1. 特許取得 なし
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし

Ⅲ. 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
高橋秀実							
高橋秀実	持続感染症としての未病	日本未病システム学会編	未病医学入門	金芳堂	京都	2006	108-112
高橋秀実	特異免疫およびその賦活法に関する基本原理	林英生、岩本愛吉、神谷茂、高橋秀実	ブラック微生物学	丸善出版	東京	2007	495-533
岡本 尚							
岡本 尚	ELL	田村 隆明 山本 雅之	転写因子・転写制御キーワードブック	羊土社	東京	2006	92-93
岡本 尚	DSIF	田村 隆明 山本 雅之	転写因子・転写制御キーワードブック	羊土社	東京	2006	86-87
岡本 尚	NELF	田村 隆明 山本 雅之	転写因子・転写制御キーワードブック	羊土社	東京	2006	145
岡本 尚	エロンゲーター	田村 隆明 山本 雅之	転写因子・転写制御キーワードブック	羊土社	東京	2006	248
岡本 尚	S II	田村 隆明 山本 雅之	転写因子・転写制御キーワードブック	羊土社	東京	2006	183
岡本 尚	エロンギン	田村 隆明 山本 雅之	転写因子・転写制御キーワードブック	羊土社	東京	2006	246-247
岡本 尚	P-TEFb	田村 隆明 山本 雅之	転写因子・転写制御キーワードブック	羊土社	東京	2006	167-168
岡本 尚	CSB	田村 隆明 山本 雅之	転写因子・転写制御キーワードブック	羊土社	東京	2006	75-76

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
山本直樹					
Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Miyauchi K, Isogai M, Matsuda Z, Nohtomi K, Onogi T, Takebe Y, Yamamoto N, Komano J.	Inhibiting lentiviral replication by HEXIM1, a cellular negative regulator of the CDK9/cyclin T complex.	AIDS	21(5)	575-582	2007

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Qi X, Koya Y, Saitoh T, Saitoh Y, Shimizu S, Ohba K, Yamamoto N, Yamaoka S, Yamamoto N.	Efficient induction of HIV-1 replication in latently infected cells through contact with CD4(+) T cells: Involvement of NF-kappaB activation.	Virology	Epub ahead of print		2007
Hamano T, Matsuo K, Hibi Y, Victoriano AF, Takahashi N, Mabuchi Y, Soji T, Irie S, Sawanpanyalert P, Yanai H, Hara T, Yamazaki S, Yamamoto N, Okamoto T.	A single-nucleotide synonymous mutation in the gag gene controlling human immunodeficiency virus type 1 virion production.	J Virol	81(3)	1528-1533	2007
Dewan MZ, Terunuma H, Toi M, Tanaka Y, Katano H, Deng X, Abe H, Nakasone T, Mori N, Sata T, Yamamoto N.	Potential role of natural killer cells in controlling growth and infiltration of AIDS-associated primary effusion lymphoma cells.	Cancer Sci	97(12)	1381-1387	2006
Watanabe S, Terashima K, Ohta S, Horibata S, Yajima M, Shiozawa Y, Dewan MZ, Yu Z, Ito M, Morio T, Shimizu N, Honda M, Yamamoto N.	Hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2Rgamma null mice develop human lymphoid systems and induce long-lasting HIV-1 infection with specific humoral immune responses.	Blood	109(1)	212-218	2007
Fukuhara T, Hosoya T, Shimizu S, Sumi K, Oshiro T, Yoshinaka Y, Suzuki M, Yamamoto N, Herzenberg LA, Herzenberg LA, Hagiwara M.	Utilization of host SR protein kinases and RNA-splicing machinery during viral replication.	Proc Natl Acad Sci USA	103(30)	11329-11333	2006
Tamamura H, Ojida A, Ogawa T, Tsutsumi H, Masuno H, Nakashima H, Yamamoto N, Hamachi I, Fujii N.	Identification of a new class of low molecular weight antagonists against the chemokine receptor CXCR4 having the dipicolylamine-zinc(II) complex structure.	J Med Chem	49(11)	3412-3415	2006
Eda Y, Murakami T, Ami Y, Nakasone T, Takizawa M, Someya K, Kaizu M, Izumi Y, Yoshino N, Matsushita S, Higuchi H, Matsui H, Shinohara K, Takeuchi H, Koyanagi Y, Yamamoto N, Honda M.	Anti-V3 humanized antibody KD-247 effectively suppresses ex vivo generation of human immunodeficiency virus type 1 and affords sterile protection of monkeys against a heterologous simian/human immunodeficiency virus infection.	J Virol	80(11)	5563-5570	2006
侯野哲朗					
Yamamoto H, Kawada M, Tsukamoto T, Takeda A, Igarashi H, Miyazawa M, Naruse T, Yasunami M, Kimura A, Matano T	Vaccine-based long-term stable control of simian-human immunodeficiency virus 89.6PD replication in rhesus macaques.	J Gen Virol	88	652-659	2007