

厚生労働科学研究費補助金

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

抗エイズ薬開発のための小動物評価系の開発と

新規治療薬の開発研究

(H16-創薬-007)

平成16年度～平成18年度 総合研究報告書

主任研究者 岩倉 洋一郎

平成19(2007)年 3月

目次

I. 総合研究報告

抗エイズ薬開発のための小動物評価系の開発と新規治療薬の開発研究 ----- 1-11

岩倉 洋一郎

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 13-25

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 27-549

I. 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金 (創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業)
総合研究報告書

抗エイズ薬開発のための小動物評価系の開発と新規治療薬の開発研究

主任研究者 岩倉 洋一郎 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨

エイズ治療は HAART 治療法の導入により大きく前進したが、潜伏ウイルスの存在や薬剤耐性ウイルスの出現などの問題によって、まだ完全に治癒できるまでには至っていない。本研究では新しい治療法の開発に資するため、小動物を用いた新たなエイズモデルの開発を目指すと共に、抗 HIV 薬の候補分子、標的分子の解析を行った。この中で、(1) マウスの宿主障壁の一つに PIC の核移行阻害があることを見だし、ヒト LEDGF の導入によりマウス細胞内でもインテグラーゼが正常に核移行すると共に、HIV 感染効率が上昇することを示した。(2) ラット T 細胞で hCRM1 と hCyclinT1 を共発現させることによって HIV-1 の増殖が数十倍となることがわかった。(3) マウス、およびラットの APOBEC3 も HIV 増殖を抑制することがわかった。(4) NOG マウスの新生児肝臓内にヒト血液幹細胞を移植することにより、ヒト T, B, DC, マクロファージの新生が再現できることを示した。(5) 転写因子の AP-4 は TBP の TATA box への結合を阻止し、同時に HDAC をリクルートすることによって HIV プロウイルスからの転写を抑えることを明らかにした。(6) CD8 陽性 CTL 株の培養上清から HIV 増殖抑制蛋白の精製を試み、Mycoplasma 由来の arginine deiminase である事を明らかにした。このように小動物に於ける HIV 感受性に関与する分子の同定を進める同時に、抗 HIV 薬の候補分子や標的分子の解析を行い、小動物モデルを用いた抗 HIV 薬の開発・評価を行うための基盤研究を押し進めることができた。

主任研究者：

岩倉 洋一郎 (東京大学医科学研究所・
ヒト疾患モデル研究センター・細胞機能
研究分野 教授)

分担研究者：

志田 壽利 (北海道大学遺伝子病
制御研究所病態研究部門感染病態分野
教授)

小柳 義夫 (京都大学ウイルス研

研究所所属エイズ研究施設 教授)

岡本 尚 (名古屋市立大学・医学部・分子医学研究所・分子遺伝部門 教授)

小糸 厚 (熊本大学エイズ学研究中心 センター 助教授)

神奈木 真理 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 教授)

A.研究目的

HAART 治療が出現した現在、エイズ治療の次の目標はウイルス負荷を減少させることによって、発症を遅らせると共に新たな耐性ウイルスの出現を抑えることと、最終的には潜伏ウイルスを完全に排除する方法を開発することである。このために必要な動物モデルが、現在霊長類以外に適当な系がないことは治療薬開発上の大きな障害である。本研究では、HIV-1 (HIV) の小動物における増殖の障壁に関与する宿主因子を探索、同定し、これをヒト型化することにより、抗エイズ薬開発に適した小動物モデルを開発する。また、ヒトリンパ球の増殖により適した SCID-*hu* モデルを開発する。宿主障壁となる宿主因子は新たな抗 HIV 薬の標的として重要であり、これを阻害する小分子化合物のスクリーニングを行う。また、小動物モデルを用いることにより、発症機構を解析すると共に、抗エイズ薬を評価し、評価系としての有用性を検証する事を目的としている。

この中で、

1) 岩倉は抗 HIV 薬の開発に適した小動物エイズモデルを作製するために、HIV 感受性マウスの作製とともに、HIV キャリアーマウスの作製を試みる。また、これらのマウスを用いて、HIV の増殖機構や発症機構を開発する共に、病態形成に関与する種々の宿主因子について、その生理的、病理的役割を明らかにすることを目指す。

2) 志田は HIV ウイルス mRNA 形成に必要なウイルスの調節因子 Rev を支持すべきラット因子 rCRM1 が機能しないことが、ラットでの HIV の増殖の非効率の 1 原因であることを発見した。さらに、hCRM1 を恒常的に発現させたラット細胞を作成して検討した結果、ヒト細胞に準じる HIV 粒子が生産されることを明らかにした。そこで、受容体と hCRM1 を共発現する Tg ラットを作成すると共に、ラット T 細胞株におけるヒト因子の要求性と抑制因子をさらに検討し、同定された因子を発現またはノックアウトするラットを作成することを目的とした。

3) 小糸は、APOBEC3(APO3)が逆転写の際 first-strand DNA に作用して感染性を抑制するが、HIV Vif はヒト APO3 にのみ対抗し、マウスおよびラット由来のものには作用しないことを示した。更に、ラット由来 APOBEC1 が、RNA をターゲットとして抗 HIV 活性を示すことが示唆されている。その抗ウイルス活性の実

態をより明らかにするため、種々の小動物由来の APOBEC1 分子をクローニングし、その解析をおこなった。げっ歯類に本来存在する HIV などレトロエレメントの複製に対する dominant(優性)インヒビターの実態を明らかにすることを目的とした。

4) 小柳はヒト造血細胞の移植により、ヒト血液・リンパ網内系を忠実に再現し得るヒト化マウス (NOG-hCD34 マウス) を用い、このマウス内で再現される HIV の感染から、その経時的な解析から *in vivo* におけるウイルス産生量、ヒト T 細胞や DC の動態と、これらの細胞が HIV 病態に果たしている役割を解明するとともに、候補薬剤の体内における抗ウイルス作用など多くの情報を得る技術を開発することを目的とした。

5) 岡本は HIV 潜伏感染細胞からのウイルス複製を抑制することにより、従来の HAART 療法を補完するより強力な抗 HIV 治療を開発するべく、潜伏感染メカニズムの解析を行った。潜伏感染細胞からのウイルス複製は HIV プロウイルス DNA からの転写の段階で制御されており、HIV の転写は、宿主転写因子 NF- κ B とウイルスのコードする転写活性化因子 Tat によって段階的に制御されていることに注目し、IKK 阻害剤の潜伏感染細胞への効果を検討するとともに、Tat により制御される宿主側因子の探索を行い、HIV の潜伏感染の維持に関わる機構を解

明することを目的とした。

6) 神奈木は無症候 HIV-1 感染者の CD8 陽性細胞が示す HIV-1 複製抑制効果について解析した。これは、HIV-1 生体防御の重要な機構と考えられる。米国の研究グループは、この抑制効果が未同定の液性因子 CAF (CD8+ cell antiviral factor) を介すると報告している。神奈木らの解析では、無症候 HIV-1 感染者の CD8 陽性細胞による HIV-1 複製抑制は、MHC-I 拘束性を受けないが細胞接触依存性であり上清には抑制活性が無かった。また、同様の細胞接触依存性の HIV-1 抑制効果は、HIV-1 と無関係のアロ特異的 CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞(CTL)にも認められた。本研究では、HIV-1 抑制活性を持つ CTL 株のうち 1 株 (CTL-3) が例外的に上清も HIV-1 抑制活性を示したので、この上清中の HIV-1 抑制液性因子の分離同定を行った。

B.研究方法

1) 岩倉

潜伏状態の HIV 遺伝子発現制御機構を解析するために、NL-4-3-2 から逆転写酵素遺伝子部分を欠失させた遺伝子を導入した HIV-Tg マウスを用いた。マイトジェン刺激に対する HIV-Tg リンパ球の活性化状態を解析するために、野生型マウスおよび HIV-Tg の脾臓から、MACS により B 細胞(抗 B220 抗体)および T 細胞 (抗 Thy1.2 抗体)を精製し、*in vitro* で B

細胞は LPS, 抗 IgM 抗体/IL-4, PMA/ionomycin、T 細胞は ConA、抗 CD3/CD28 抗体、PMA/ionomycin により刺激した。また、マクロファージにおける HIV 発現を解析するために、4% TGC を HIV-Tg の腹腔に投与し 3 から 5 日後にマクロファージを回収し、プレート上で 4 時間接着培養を行った後に非接着細胞を PBS で洗浄することによって除き、LPS, polyI:C, R837, CpG-ODN あるいは TNF- α によって刺激した。これらのサンプルから 24 時間後に RNA を回収しリアルタイム PCR 解析を行った。LPS 刺激時の HIV 発現におけるサイトカイン、新規タンパク合成、NF- κ B の関与を明らかにすべく、TNF- α 中和抗体、シクロヘキシミド (CHX)、あるいは PDTC 存在下で LPS 刺激を行い、HIV 発現をリアルタイム PCR 解析により計測した。

さらに、マウス細胞における HIV インテグラーゼの核移行過程を解析するために、Hela 細胞および NIH3T3 細胞に GFP-IN および pCAG-hLEDGF (ヒト LEDGF 発現ベクター), pCAG-mLEDGF (マウス LEDGF 発現ベクター) または pCXN2 (コントロールベクター) を co-transfection し、48 時間後に共焦点顕微鏡により細胞内局在を解析した。核染色は DAPI またはヘキスト染色により行った。hLEDGF 安定発現 NIH3T3 株を樹立し、VSV-G pseudotyped HIV 増殖をルシフェラーゼアッセイにより測定した。

マウス細胞における HIV 増殖時の hCycT, hCRM1 の機能を明らかにすべく、hCycT, hCRM1 トランスジェニックマウスを作製し、マクロファージにおける VSV-G pseudotyped HIV の複製をルシフェラーゼアッセイおよびリアルタイム PCR 解析により定量した。

2) 志田

HIV-1 の増殖に必要なヒト遺伝子をレトロ／レンチベクターで transduce し、恒常的に発現する細胞を作成した。一過性の発現は nucleofector を用いた electroporation によった。HIV の増殖は p24 ELISA によって測定した。GFP/Venus 発現ウイルスを感染させ、発光細胞を FACS で計測する事によって感染効率を算出した。hCyclinT1 ゲノムを含む BAC と、制御領域を全て有する hCD4 plasmid を用いて Tg ラットを作製した。

3) 小柳

臍帯血 CD34 陽性細胞を放射線照射新生児免疫不全マウス (NOG マウス) の肝臓へ移植した (NOG-hCD34 マウス)。このマウスに未分化 DC, 成熟 DC を尾静脈より移植した。その際、それぞれの DC を異なる蛍光色素によりラベルした。移植後 2 時間目のマウスの各組織を摘出して細胞を回収し細胞の存在の有無を判定した。

4) 小糸

ラット脾臓由来 APOBEC3 の全長, N 端側ドメイン、および C 端側ドメインに HA タグを付加して発現ベクターに組み込み、抗 HIV、抗 MLV 活性を解析した。さらに酵素活性部位の変異体を作製し、抗ウイルス活性を解析した。また逆転写産物の pol 領域を PCR で増幅し、G to A mutation の導入を検討した。Balb/C マウス、SD ラット、NZW うさぎ、フェレットおよびヒト小腸由来 mRNA より APOBEC1 cDNA をクローニングし、抗 HIV 活性を解析した。また、APOBEC3, APOBEC1 の分子進化的解析をおこなった。

5) 岡本

AP-4 による TBP の TATA box 結合性の変化を EMSA 法で調べた。AP-4 部位に変異を加えた種々の HIV LTR 変異体を作成し、AP-4 による HIV-1 転写に及ぼす影響をルシフェラーゼアッセイにて定量的に調べ、siRNA によって AP-4 をノックダウンした時の効果を調べた。潜伏感染細胞内での HIV LTR DNA への AP-4, TBP, HDAC, RNA pol II などの結合をクロマチン免疫沈降法 ChIP で調べた。

6) 神奈木

HPLC を用いて CTL-3 上清をゲルろ過およびイオン交換クロマトグラフィーにより分画し、各分画について HIV-1 抑制活性を指標にスクリーニングを行った。

HIV-1 抑制活性のある分画を電気泳動で展開し、切り出した蛋白バンドについてマトリックス支援レーザー励起イオン化飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF MS)を用いた解析を行った。同定された因子について、阻害剤や抗生物質添加により抗 HIV 活性を評価し、FACS およびチミジン取り込み法により細胞毒性について検討した。

C.研究結果

1) 岩倉

HIV-Tg を用い、T、B 細胞、マクロファージにおける HIV 遺伝子発現制御機構の解析を行った。HIV-Tg のリンパ球は活性化刺激に対して、正常に応答できることがわかった。しかしながら、HIV 遺伝子発現は、LPS 刺激を行った B 細胞でのみ効率的に起こり、T 細胞は全ての刺激で活性化されず、B 細胞も IgM/IL-4 刺激では活性化されなかった。また、抗原特異的 T 細胞刺激を行っても、HIV 遺伝子の活性化は全く起こらなかった。この結果から、T 細胞における非効率的な HIV 発現は T 細胞サブセットの影響によるものではないことがわかった。マクロファージにおける HIV 発現は、全ての TLR リガンド及び TNF- α 刺激で効率的に見られ、発現量は LPS 刺激を行った B 細胞と同程度かそれ以上であった。この LPS 刺激時におけるマクロファージからの HIV 発現は TNF- α 中和抗体および

CHX 存在下でも抑制効果が見られなかったことから、サイトカインの産生による 2 次的な効果によるものではなく、TLR を介した LPS の直接刺激が強く寄与していることが明らかになった。また、NF- κ B 阻害剤 PDTC 存在下で発現が強く抑制されたことから、TLR の下流に位置する NF- κ B がマクロファージにおける HIV 発現の中心的役割を担っていることが明らかになった。

一方、Hela、NIH3T3 とともに、ヒトあるいはマウス LEDGF を co-transfection することにより GFP-IN は強い核局在を示した。更に、hLEDGF 安定発現 NIH3T3 細胞を樹立し、VSV-G pseudotyped HIV 感染を行い、ウイルス複製をルシフェラーゼアッセイにより評価したところ、親株の NIH3T3 細胞と比較して 5 倍前後の発現上昇が見られたものの、Hela 細胞と比較すると 1/10 以下であった。

hCycT, hCRM1 Tg のマクロファージに VSV-G pseudotyped HIV を感染してウイルス複製を検討したところ、ルシフェラーゼアッセイでは hCycT Tg では野生型と比較して約 5 倍の発現増加が見られた。hCRM1 Tg では野生型と同程度であった。リアルタイム PCR 解析により、ウイルス mRNA の分布を詳細に解析したところ、hCycT Tg では 2kb, 4kb mRNA の発現は顕著に増加していたものの、9kb mRNA の増加は見られなかった。一方 hCRM1 Tg では 2kb mRNA に対する 9kb mRNA

の割合が約 2 倍に増加しており、hCRM1 導入による Rev 活性の上昇が見られた。

2) 志田

ラット細胞における HIV の増殖過程を調べ、増強因子と抑制因子を検索した。その結果、以下の結論を得た。①侵入過程にはマクロファージにはない T 細胞特異的な cyclophilinA 依存的な阻害因子がある。②ヒト cyclinT1 と CRM1 の導入により T 細胞で 100 倍以上の Gag の産生増強がある。③上皮系細胞では強感染性、T 細胞では弱感染性のウイルスが作られる。又、ヒト

CD4/CCR5/CXCR4/CRM1/CyclinT1 のトランスジェニックラットを作製した。

3) 小柳

NOG マウスへのヒト CD34 陽性細胞の肝臓内移植により、ヒト T 細胞が末梢血と脾臓において 5-10%以上存在するようになった。さらに、MDC, PDC が共に存在していることが確認された。そして MDC の組織移行効率を検討した。脾臓、肝臓、そして胸腺において、移植した未分化 DC と成熟 DC が存在していることが確認され、肝臓に移行した未分化 DC/成熟 DC の細胞数は同等であったのに対し、脾臓と胸腺へ移行した細胞数は、未分化 DC に比して成熟 DC の方が多かった。

4) 小糸

ラット APOBEC3 の C 末端のみで、HIV の感染性は著明に低下した。G to A hypermutation が確認され、その障害が脱アミノ酵素活性に依存することを明らかにした。ラット APOBEC3 の全長、C 端側分子のいずれも、マウス APOBEC3 と同様に TTC*配列を好んでターゲットにすることがわかった。MLV に対しては障害活性を示さなかった。げっ歯類の APOBEC3 は急速にそのアミノ酸配列を変化させてきたことが示唆されたが、その選択圧は現時点では不明である。さらに、ラットのみならず、マウスの APOBEC1 も Vif 非依存性に HIV の感染性を 10 分の 1 程度に抑制することがわかった。

5) 岡本

遺伝子発現プロファイル解析から、Tat 被制御遺伝子として、OGG1 遺伝子を同定した。ヒト末梢血リンパ球を用いた感染実験においても OGG1 の誘導を確認した。siRNA を用いた実験から Tat が OGG1 発現を介して 8-oxo-dG 量の蓄積を抑えることが確認された。AP-4 は TBP の TATA box への結合を阻止し、同時に HDAC をリクルートすることによって HIV プロウイルスからの転写を抑えることを明らかにした。この結果は、siRNA による AP-4 ノックダウンおよび HIV フルサイズ DNA クローンへの AP-4 結合部位欠失変異体の作成によって確認した。

潜伏感染細胞株では刺激前では、AP-4 部位に AP-4 と HDAC が結合しているが、活性化により離脱し、TBP, RNA pol II がリクルートされることを証明した。

6) 神奈木

平成 16 年度は、CTL 株の HIV-1 抑制活性の定性と上清の部分精製を行った。樹立した 4 株のアロ特異的 CD8 陽性 CTL 株は全て、HIV-1 感染させた自己 CD4 陽性細胞との共培養で HIV-1 複製抑制活性を示した。しかし、培養上清が HIV-1 抑制効果を示したのは CTL-3 のみであった。CTL-3 の上清は、R5-、X4 HIV-1 両株に対して抑制効果を示し、その活性は既知のケモカインやインターフェロン、デフェンシンに対する特異抗体により阻害されなかった。CTL-3 の部分精製では牛アルブミンの近傍に活性が認められたため、平成 17 年度は、無血清培地を用いて上清を調整し、ゲルろ過およびイオン交換クロマトグラフィーで HIV-1 抑制活性のある分画を精製した。HIV-1 抑制活性に特異的なバンドを SDS ゲルから切り出しマトリックス支援レーザー励起イオン化飛行時間型質量分析(MALDI-TOF MS)を行なった結果、mycoplasma 由来の arginine deiminase(ADI)を同定した。この時点で CTL-3 が mycoplasma に感染していたことが分った。ADI は arginine を枯渇させる酵素であるが、arginine はヒトでは必須アミノ酸ではない。また、ADI

の抗 HIV-1 活性は知られていないので、平成 18 年度は ADI の抗 HIV-1 活性と細胞毒性について検討した。CTL-3 培養上清中の抗 HIV-1 効果は過剰量の arginine を加えると阻害された。また、同細胞株を抗 mycoplasma 剤で処理すると上清中の抗 HIV-1 活性は消失した。しかし、細胞接触依存性の抗 HIV-1 効果は、arginine 添加や抗生物質処理の影響を受けなかった。また、ADI は細胞増殖を抑制したが apoptosis の誘導は認められなかった。

D. 考察

1) 岩倉

HIV-Tg マウスのリンパ球は野生型マウスのリンパ球と同様に活性化されるにも関わらず、HIV 遺伝子の効率的な活性化させるためには、おそらく TLR を介したシグナルが必須であり、BCR や TCR を介した抗原受容体シグナルでは不十分であることを示した。また、この非効率的な活性化は転写伸長段階ではなく、転写開始段階で起こっている可能性が示唆された。これに対して、マクロファージにおける潜伏感染機構はリンパ球におけるものとは異なっている可能性が示唆された。一方、NIH3T3 における GFP-IN の細胞内局在は、ヒト LEDGF のみならずマウス LEDGF の過剰発現によっても核局在を示したことから、NIH3T3 細胞で見られた GFP-IN の細胞質局在は LEDGF の発現不足あるいはマウス LEDGF と HIV-IN の

相互作用が弱いことによる可能性が示唆された。また、ヒト LEDGF を導入した NIH3T3 細胞では親株と比べて 5 倍程度の HIV 増殖の増加が見られたものの、Hela 細胞と比較すると 1/10 以下であることから、LEDGF 以外の因子もマウス細胞における効率的な HIV 増殖には必要である可能性が示唆された。hCycT, hCRM1 Tg のマクロファージでは Tat および Rev 活性の上昇が見られた。これらの Tg により HIV 感受性マウスの作製へ向けて進歩が見られた。現在、hLEDGF Tg を作製中であり、hCycT, hCRM1 と交配させることにより、更に効率のよい HIV 増殖が期待される。

2) 志田

本研究から、ラットのある種の T 細胞には Trim5 様阻害因子が存在している事が示唆された。しかし、この因子は上皮系細胞には発現しておらず、サル Trim5a と似てはいるが、異なる分子だと予想される。さらに、上皮系細胞には存在しない、T 細胞の感染性減弱因子も示唆された。これらの阻害因子を同定してノックダウンし、hCRM1 と hCyclinT1 を発現させる事がラット感染モデルの作成には必用と考えられる。

3) 小柳

免疫不全マウスへのヒト細胞移植によるヒトキメラマウスを確立した。その結

果、マウス体内にヒト T, B, DC, マクロファージ細胞の新生を再現でき、HIV 感染が可能であることそして、NOG-hCD34 マウス内に DC が構築されていること、*in vitro* で調整した MDC が組織移行能を有していることが確認された。ヒト DC の機能評価実験系として利用することに成功した。

4) 小糸

げっ歯類 APOBEC3 は、個体内での生理的機能を含めて、解明されるべき興味深い問題が残されている。APOBEC1 はげっ歯類では、小腸の他、肝臓、腎臓、脾臓、さらに生殖細胞系でもその発現がみられ、ゲノムを保護する機構に一役かっているのかもしれない。げっ歯類など小動物由来の APOBEC3、APOBEC1 の種々のレトロエレメントに対する活性は、今後、詳細に解析していく必要があると考えられる。また、我々は HIV/MLV シュードタイプをヒト CD4/CXCR4 発現マウスに感染させ、個体レベルでのレトロウイルスの感染系として確立することを現在試みている。

5) 岡本

(1)NF- κ B の作用は細胞内シグナル伝達系によって制御されているが、その中核にある I κ B kinase (IKK)阻害剤である ACHP の効果を種々の HIV-1 潜伏感染細胞で検証した。(2) 遺伝子発現プロフィー

ル解析を用いて Tat の転写活性化作用を受ける細胞側の遺伝子として、酸化修飾された DNA ヌクレオチドを除去修飾する酵素 OGG1 遺伝子を初めて同定した。Tat は OGG1 を誘導することによって、ウイルス複製に伴う酸化ストレスによる遺伝子変異をあらかじめ抑制する作用を持つ可能性が示唆された。また、(3) HIV-1 潜伏感染の維持に関わる宿主側の転写因子として AP-4 を同定し、その作用機構を解明した。AP-4 結合部位は多くの HIV-1 サブタイプ間で共通に保存されており、潜伏感染状態では AP-4 と HDAC 複合体が HIV プロウイルス LTR に見いだされることから、*in vivo* でも機能していることが強く示唆された。

6) 神奈木

CTL-3 株に感染していた *Mycoplasma* 由来の ADI が CTL-3 株の上清の HIV-1 抑制効果の本体であったことが分かった。ADI はすでに抗癌剤として臨床試験の行なわれている薬剤であり、抗 HIV-1 薬としての開発可能性を持つと考えられる。しかし、CTL 株の細胞接触依存性の HIV-1 活性は *Mycoplasma* 感染や ADI とは無関係であり、CTL 表面分子による別の抑制機序によると考えられた。

E. 結論

マウスやラットの HIV 感受性宿主障壁因子を同定、ヒト型化する試みは着実に

進んでおり、また一方では種特異的な HIV 複製阻害因子の探索も行われた。更に、NOG-*hu* マウスや MuLV pseudo virus の系も開発されつつあり、種々のアプローチによる小動物 HIV 感染系の構築が進んでいる。また、潜伏感染細胞の制御を目指した研究もマウスモデルを用いて進んでおり、再活性化時における TLR シグナルの重要性、および HIV ウイルスゲノムの転写における AP-4 の役割が明らかにされると共に、CTL 由来 HIV 抑制因子の精製、同定にも成功した。これらの因子を標的とした新たな治療薬の開発はエイズの完全治癒に向けて非常に重要な意味を持つ。今後、特に、岩倉らによって宿主障壁となることが明らかにされた、LEDGF の機能解析をさらに進めると共に、そのトランスジェニックマウスを作製することは、これまでに作製された hCD4/CCR5/CXCR4/CCR3/CyclinT1/CRM1 トランスジェニックマウスと掛けあわせることにより、HIV 感受性マウスの完成にさらにもう一步近づくことが期待され、きわめて重要である。また、この他 APOBEC3G や Trim5a、CRM1 などの宿主障壁の原因となる宿主因子の解析も、HIV 感受性マウスの作製、抗エイズ薬の開発にとって、重要な課題である。今後、これらの研究をさらに推し進めることにより、小動物を用いた抗エイズ薬評価系を構築する予定である。

F.研究発表

G.知的所有権の取得状況

F.G.は分冊を参照。

II. 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(岩倉)

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
Hirota, K., Hashimoto, M., Yoshitomi, H., Tanaka, S., Nomura, T., Yamaguchi, T., Iwakura, Y., Sakaguchi, N., and Sakaguchi, S.	T cell self-reactivity forms cytokine milieu for spontaneous development of IL-17 ⁺ helper T cells that cause autoimmune arthritis.	J. Exp. Med.			in press.
Sato, K., Suematsu, A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y., Tanaka, S., Kodama, T., Shizuo, A., Iwakura, Y., Cua, D. J., and Takayanagi, H.	T _H 17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction.	J. Exp. Med.			in press.
Nigrovic, P. A., Binstadt, B. A., Monach, P. A., Johnsen, A., Gurish, M., Iwakura, Y., Benoist, C., Mathis, D., and Lee, D. M.	Mast cells contribute to initiation of autoantibody-mediated arthritis via IL-1.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA,			in press.
Saijo, S., Fujikado, N., Furuta, T., Chung, S., Kotaki, H., Seki, K., Sudo, K., Akira, S., Adachi, Y., Ohno, N., Kinjo, T., Nakamura, K., Kawakami, K., and	Dectin-1 plays an important role in host defense against the pathogenic fungus <i>Pneumocystis carinii</i> .	Nature Immunol.	8	39-46	2007

<u>Iwakura, Y.</u>					
Tsurutani, N., Yasuda, J., Yamamoto, N., Choi, B., Kadoki, M., and <u>Iwakura, Y.</u>	Nuclear import of the pre-integration complex is blocked upon infection by HIV-1 in mouse cells.	J. Virol.	81	677-688	2007
Umemura, M., Yahagi, A., Hamada, S., Begum, M-D., Watanabe, H., Kawakami, K., Suda, T., Sudo, K., Nakae, S., <u>Iwakura, Y.</u> , and Matsuzaki, G	IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary <i>Mycobacterium bovis bacilli Calmette-Guerin</i> infection.	J. Immunol.	176	7317-7324	2006
Matsuki, T., Nakae, S., Sudo, K., Horai, R., and <u>Iwakura, Y.</u>	Abnormal T cell activation caused by the imbalance of the IL-1/IL-1 receptor antagonist system is responsible for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis.	Int. Immunol.	8	399-407	2006
Ishigame, H., Nakajima, A., Saijo, S., Komiyama, Y., Mastuki, T., Nakae, S., Horai, R., Kakuta, S., and <u>Iwakura, Y.</u>	The role of TNF α and IL-17 in the development of excess IL-1 signaling-induced inflammatory diseases in IL-1 receptor antagonist-deficient mice.	Ernst Schering Res. Found. (Workshop)	56	129-153	2006
Vonk, A. G., Netea, M. G., van Krieken, J. H., <u>Iwakura, Y.</u> , van der Meer, J. W. M., and Kullberg, J. B.	Endogenous interleukin-1 α and interleukin-1 β are crucial for host defense against disseminated candidiasis.	J. Infect. Dis.	193	1419-1426	2006
Nambu, A., Nakae, S., and <u>Iwakura, Y.</u>	IL-1 β , but not IL-1 α , is required for antigen-specific T cell activation and the induction of local inflammation in the delayed-type hypersensitivity responses.	Int. Immunol.	18	701-712	2006

Iwakura, Y., and Ishigame, H.	The IL-23/IL-17 axis in inflammation.	J. Clin. Invest.	116	1218-1222	2006
Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K., and Iwakura, Y.	IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis.	J. Immunol.	177	566-573	2006
Murakami, M., Iwai, S., Hiratsuka, S., Yamauchi, M., Nakamura, K., Iwakura, Y., and Shibuya, M.	Signaling of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine kinase promotes rheumatoid arthritis through activation of monocyte/macrophage..	Blood	108	1849-1856	2006
Okada, K., Inoue, A., Okada, M., Murata, Y., Kakuta, S., Jigami, T., Shiraishi, H., Eguchi, K., Motomura, M., Akiyama, T., Iwakura, Y., Higuchi, O., and Yamanashi, Y.	The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular synaptogenesis.	Science	312	1802-1805	2006
Fujikado, N., Saijo, S., and Iwakura, Y.	Identification of arthritis-related gene clusters by microarray analysis of two independent mouse models for rheumatoid arthritis.	Arthritis Res. Ther.	8(R100)	1-13	2006
Shinohara, H., Inoue, A., Toyama-Sorimachi, N., Nagai, Y., Yasuda, T., Suzuki, H., Horai, R., Iwakura, Y., Yamamoto, T., Karasuyama, H., Miyake, K., and Yamanashi, Y.	Dok-1 and Dok-2 are negative regulators of lipopolysaccharide-induced signaling.	J. Exp. Med.	201	333-339	2005
Matsuki, T., Isoda, K., Horai, R., Nakajima, A.,	Involvement of TNF α in the development of T cell-dependent aortitis	Circulation	112	1323-1331	2005

Aizawa, Y., Suzuki, K., Ohsuzu, F., and <u>Iwakura, Y.</u>	in IL-1 receptor antagonist-deficient mice.				
Chida, D., Imaki, T., Suda, T., and <u>Iwakura, Y.</u>	Involvement of CRH- and IL-6-dependent proopiomelanocortin induction in the anterior pituitary during hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation by IL-1 α .	Endocrinology	146	5496-5502	2005
Hata, H., Sakaguchi, N., Yoshitomi, H., <u>Iwakura, Y.</u> , Sekikawa, K., Azuma, Y., Kanai, C., Moriizumi, E., Nomura, T., Nakamura, T., and Sakaguchi, S.	Distinct contribution of IL-6, TNF- α , IL-1, and IL-10 to T cell-mediated spontaneous autoimmune arthritis in mice.	J. Clin. Invest.	114	582-588	2004
Horai, R., Nakajima, A., Habiro, K., Kotani, M., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Saijo, S., Kotaki, H., Sudo, K., Okahara, A., Tanioka, H., Ikuse, T., Ishii, N., Schwartzberg, P. L., Abe, R., and <u>Iwakura, Y.</u>	TNF- α is crucial for the development of autoimmune arthritis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice.	J. Clin. Invest.	114	1603-1611	2004

研究成果の刊行に関する一覧表(志田)

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
Kitabatake, M, Inoue,S, Yasui, F, Shoji, Y, Arai,M, Morita, K, <u>Shida,H.</u> Kidokoro, M, Murai,F, Quynh, M, Le, Matsushima, K, and Kohara, M	SARS-CoV spike protein-expressing recombinant vaccinia virus efficiently induces neutralizing antibodies in rabbits pre-immunized with vaccinia virus.	Vaccine	25	630-637	2007
Zhang, X, Hakata, Y, Tanaka, Y, and <u>Shida H.</u>	CRM1, an RNA transporter, is a major species-specific restriction factor of human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) in rat cells. Microbes and Infection.	Microbes and Infection	8	851-859	2006
Kidokoro, M, Tashiro, M, and <u>Shida H.:</u>	Genetically stable and fully effective smallpox vaccine strain constructed from highly attenuated vaccinia LC16m8.	Proc. Natl. Acad. Sci	102	4152-415 7	2005
Sakurai, A, Yasuda, J, Tanaka, Y, Hatakeyama, M, and <u>Shida H.</u>	Regulation of human T-cell leukemia virus type-1 (HTLV-1) budding by ubiquitin ligase Nedd4.	Microbes and Infection	6	150-156	2004

研究成果の刊行に関する一覧表(小柳)

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
Ebina H, Aoki J, Hatta S, Yoshida T, Koyanagi Y	Role of Nup98 in nuclear entry of human immunodeficiency virus type 1 cDNA	Microbes & Infection	6	715-724	2004
Maeda K, Nakata H, Koh Y, Miyakawa T, Ogata H, Takaoka Y, Shibayama S, Sagawa K, Fukushima D, Moravek J, Koyanagi Y, Mitsuya H	Spirodiketopiperazine-based CCR5 inhibitor which preserves CC-Chemokine/CCR5 interactions and exerts potent activity against R5 human immunodeficiency virus type 1 in vitro	Journal of Virology	78	:8654-8662	2004
Kawano Y, Yoshida T, Hieda K, Aoki J, Miyoshi H, Koyanagi Y	A lentiviral cDNA library employing lambda recombination used to clone an inhibitor of human immunodeficiency virus type 1-induced cell death	Journal of Virology	78	11352-11359	2004
Nakata H, Maeda K, Miyakawa T, Shibayama S, Matsuo M, Takaoka Y, Ito M, Koyanagi Y, 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 g-chain-knocked-out AIDS mouse model	Journal of Virology	79	2087-2096	2005