

2. 学会発表

(1) 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

(2) Hayashi D, Kubota R, Nose H, Arimura K, Izumo S, Osame M: Increased CTL responses to CMV in HAM/TSP: a relation of FOXP3+ regulatory T cells. *8th International Conference of Neuroimmunology*. Nagoya, Japan, 2006

(3) 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 Conference of Neuroimmunology*. Nagoya, Japan, 2006

(4) 久保田龍二、林 大輔、有村公良、納 光弘、出雲周二: HAM 患者末梢血中 HTLV-I 感染リンパ球の解析。第 47 回日本神経学会総会。2006 年 5 月 東京

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。

HAM/TSP 発症を規定するウイルス因子・宿主因子の異なる民族間での比較検討
—イランと鹿児島における解析—

分担研究者 宇宿 功市郎

共同研究者 斉藤 峰輝、Amir H. Sabouri、能勢 裕久、出雲 周二、有村 公良、Reza Farid、納 光弘

研究要旨:

我々は鹿児島のコホートにおいて HAM を発症しやすい特定の HTLV-I のサブタイプが存在すること、HAM 発症に関連する複数の宿主遺伝子が存在することを報告したが、これらの因子が民族的背景が異なる他の感染地域においてもあてはまるかどうかを検討するため、イラン北東部の感染者について、HAM 発症にかかわる宿主因子、ウイルス因子を解析し鹿児島のコホートのデータと比較した。イランのコホートでは、HLA-A*02、Cw*08 の HAM 発症抑制効果が認められない一方、HLA-DRB1*0101 の HAM 発症促進効果は鹿児島と同様に認められた。イラン株の HTLV-1 Tax の塩基配列は、鹿児島のコホートで HAM になりやすい株として報告した Tax subgroup A と共通の4つの塩基置換(2アミノ酸変異を伴う)に加え、さらに6つの塩基置換(4アミノ酸変異を伴う)を伴っていた。ウイルス因子と宿主因子の複雑な相互作用が最終的な HTLV-1 感染の予後を規定することが示唆された。

A. 研究目的

鹿児島における我々のこれまでの研究から、HAM患者ではHTLV-I感染無症候性キャリアー(Healthy carriers:HC)に比べ、プロウイルス量が10倍以上に増加し最大の発症危険因子であること^[1]、HAMを発症しやすい特定のHTLV-Iのサブタイプが存在すること^[2]、HAM発症に関連する複数の宿主遺伝子が存在すること^[3-7]が明らかになっている。これらの結果が民族的背景が異なる他の感染地域においてもあてはまるかどうかを検討し、普遍的なHAM感受性因子、地域特異的なHAM感受性因子を同定してHAM発症メカニズム解明の一助とすることを目的に研究を行った。イラン、マシャディ大学医学部との共同研究により、HTLV-I高侵淫地域であるイラン北東部のHTLV-1感染者(HAM患者、HC)を対象に、鹿児島のコホートにおいてHAM発症との関連が明らかになったHTLV-1ウイルス型(Tax subgroup)、宿主因子を解析し、そのデータを鹿児島の結果と比較、解析した。

B. 研究方法

鹿児島とイラン北東部マシャディ地区のHTLV-1感染者(鹿児島:HAM 222例、HC 184例 イラン:HAM 58例、HC 74例)について、鹿児島のコホートにおいてHAM発症に関与することが明らかになったHLA宿主遺伝子(HLA-A*02、Cw*08、B*5401、DRB1*0101)の頻度を比較した。また、ABI Prism 7700™ sequence detectorを用いて

HTLV-Iプロウイルス量を定量的PCR法により測定した。鹿児島、イラン双方のHTLV-1ウイルス型を決定するため、各10症例以上のHAM患者、HCに感染しているHTLV-IプロウイルスのLTRおよびTax領域の塩基配列を決定し比較した。

(倫理面への配慮)

本研究は学内倫理委員会の承認を得て行われたものであり、検体の採取においては十分な情報の説明のちに同意を得て行われ、完全に匿名化された後に研究に使用している。

C. 研究結果

我々が報告した鹿児島におけるHLAの解析からは、HLA-A*02、Cw*08がHAM発症抑制に、HLA-DRB1*0101、B*5401が発症促進に関連し、HLA-A*02、Cw*08を持つ感染者は持たない感染者に比較して末梢血リンパ球中のプロウイルス量が少ないことが示された^[4-5]が、HLA-A*02、Cw*08のHAM発症抑制効果はイランのコホートにおいては認められなかった(Table 1, 2)。また、HLA-B*5401陽性者はイラン人集団には見出せなかった。一方、HLA-DRB1*0101陽性者は鹿児島、イランの双方においてHCよりHAM患者において高頻度であり、2つの地域で共通したHAM発症促進因子であった(Table 3)。イランのHTLV-1 Taxの塩基配列は、われわれが以前にHAMになりやすい株として報告した鹿児島のコホートのTax subgroup A と共通の4つの塩基置換(2アミノ

酸変異を伴う)を持ち、さらに6つの塩基置換(4アミノ酸変異を伴う)を伴っていたが、HLA-A*02 拘束性のHTLV-I Taxに対するCTLのdominant epitope (Tax 11-19)の配列は鹿児島株(Tax subgroup AおよびB)とイラン株でまったく同じであった(Table 4)。一方、LTRおよびNFκBプロモーターに対するTaxの転写活性化能も、イラン株のTaxは鹿児島のTax subgroup A, B と比較して同等であった。興味深いことに、HAM発症抑制に対するHLA-A*02、Cw*08 の効果は、鹿児島の cohortにおいてはTax subgroup Bの感染者においてのみ認められ、イラン株と共通の4塩基置換を持つTax subgroup Aの感染者には認められなかった(Table 5)。

D. 考察

今回のイランと鹿児島におけるHLA宿主遺伝子の解析から、両地域に共通の感受性因子、地域特異的な感受性因子があることが明らかになった。HLA-DRB1*0101がHTLV-I env gp21を抗原提示しやすいこと、HTLV-I Taxに対するCTLの dominant epitope (Tax 11-19)がHLA-A*02拘束性であることから、生体内におけるウイルスに対する遺伝的に規定された免疫応答の効率がHTLV-I感染の予後に影響することが考えるが、イランにおいてHLA-A*02、Cw*08の効果が認められない一方でHLA-DRB1*0101の効果が鹿児島とイラン共通に認められたことは、HLA-DRB1*0101を介するHTLV-I特異的CD4細胞のHAM発症における重要性を示唆しており、今後その詳細な機能解析を行うことで病態機序の解明をさらに進めていく必要がある。また、ウイルスの型(Tax subgroup AまたはB)が変わると同じ遺伝背景を持つ集団(鹿児島)においてさえもHLA(HLA-A*02、Cw*08)の効果が異なることが明らかになり、ウイルス因子と宿主因子の複雑な相互作用が最終的なHTLV-1感染の予後を規定することが示唆された。

E. 結論

HAM発症に関連するHLA宿主要因の異なる民族間における比較から、HTLV-I感染に対する宿主の応答効率の差がHAM発症に密接に関連していることが再確認されたのみならず、ウイルス因子もその効果に大きな影響を及ぼすことが示唆された。さらに解析を続け、精度の高いHAM発症予測と治療時期の選択を可能にしたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

[1] Nagai M, et al. Analysis of HTLV-1 proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-1 carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. *J Neurovirol.* 1998 4(6):586-93.

[2] Furukawa Y, et al. Phylogenetic subgroups of human T cell lymphotropic virus (HTLV) type I in the tax gene and their association with different risks for HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis.* 2000 182(5):1343-9.

[3] Vine AM, et al. Polygenic control of human T lymphotropic virus type I (HTLV-1) provirus load and the risk of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis.* 2002 186(7):932-9.

[4] Jeffery KJ, et al. HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-1) proviral load and the risk of HTLV-1-associated myelopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 96(7):3848-53.

[5] Jeffery KJ, et al. The influence of HLA class I alleles and heterozygosity on the outcome of human T cell lymphotropic virus type I infection. *J Immunol.* 2000 165(12):7278-84.

[6] Sabouri AH, et al. Polymorphism in the interleukin-10 promoter affects both provirus load and the risk of human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy /tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis.* 2004 190(7):1279-85.

[7] Kodama D, et al. Longer dinucleotide repeat polymorphism in matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene promoter which correlates with higher HTLV-1 Tax mediated transcriptional activity influences the risk of HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *J Neuroimmunol.* 2004 156(1-2):188-94.

[8] Sabouri AH, et al. Differences in viral and host genetic risk factors for development of human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis between Iranian and Japanese HTLV-1-infected individuals. *J Gen Virol.* 2005 86(3):773-81.

H. 知的所有権の出願・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

Table 1: HLA-A*02 and HLA-Cw*08 are not associated with a lower risk of HAM/TSP in Iranian HTLV-1 infected individuals.

Population (N: HAM/HCs)	HLA-A*02	HAM/TSP	HC	χ^2	P	OR	CI, 95%
Iranian (58/74)	positive	21(36.2%)	20(27.0%)	0.887	0.346	1.53	0.73-3.22
	negative	37(63.8%)	54(73.0%)				
Japanese (222/184)	positive	67(30.2%)	87(47.3%)	11.784	0.0006	0.48	0.32-0.72
	negative	155(69.8%)	97(52.7%)				
	HLA-Cw*08	HAM/TSP	HCs	χ^2	P	OR	CI, 95%
Iranian (58/74)	positive	9(15.5%)	10(13.5%)	0.006	0.940	1.18	0.44-3.11
	negative	49(84.5%)	64(86.5%)				
Japanese (222/184)	positive	24(10.8%)	36(19.6%)	5.45	0.0196	0.50	0.29-0.87
	negative	198(89.2%)	148(80.4%)				

Table 4: Nucleotide variations specific to Iranian HTLV-1.

Subgroup (n)	Nucleotide variation, by position and amino acid change in <i>taxA</i> *									
	7622 M? V	7811 I? V	7855 N	7897 N	7959 A? V	7991 N? H	8208 S? N	8313 G? E	8314 N	8344 N
ATK-1 (= <i>taxB</i>)	A	A	T	C	C	A	G	G	C	A
<i>taxA</i>				T	T		A			C
Iranian <i>tax</i>	G	G	C	T	T	C	A	A	G	C

*Nucleotide position corresponds to that of prototypic strain ATK-1. Amino acid change results from nucleotide substitution. N: no change.

Table 2: HLA-A*02 and HLA-Cw*08 are not associated with a lower provirus load in Iranian HTLV-1 infected individuals.

HLA-A*02	Provirus load (Mean±SE)	Provirus load (Median)	No. of subjects	P*	
Iranian	positive	262.1±34.5	190.0	41	0.071
	negative	209.6±24.9	120.0	91	
Japanese	positive	366.8±43.4	118.5	156	0.0003
	negative	525.6±41.5	266.0	250	
HLA-Cw*08	Provirus load (Mean±SE)	Provirus load (Median)	No. of subjects	P*	
Iranian	positive	198.2±42.8	131.0	19	0.75
	negative	233.6±22.9	147.0	113	
Japanese	positive	300.7±56.4	120.0	60	0.009
	negative	492.0±34.5	234.0	346	

HTLV-1 provirus load: HTLV-1 *tax* copy number per 1×10^4 PBMCs for Japanese samples and 1×10^5 nucleated cells for Iranian samples by quantitative PCR.
*Two-tailed Mann-Whitney U test.

Table 5: HLA-A*02 was associated with a lower risk of HAM/TSP only in the *tax* subgroup B subjects in Kagoshima.

<i>tax</i> subgroup	HLA-A*02	HAM/TSP	HC	χ^2	P	OR	CI, 95%
<i>taxA</i>	positive	16 (57%)	6 (60%)	0.047	0.829	0.89	0.20-3.87
	negative	12 (43%)	4 (40%)				
<i>taxB</i>	positive	51 (26%)	81 (47%)	15.5	<0.0001	0.41	0.26-0.63
	negative	143 (74%)	93 (53%)				

Table 3: HLA-DRB1*0101 increases the odds of HAM/TSP in Japanese and Iranian A*02 negative but not in A*02 positive HTLV-1 infected individuals.

Subjects	HAM/TSP (No.)		HC (No.)		χ^2	P	OR	CI, 95%	
	DRB1+	DRB1	DRB1+	DRB1?					
	?								
Iranian	All	18	40	12	62	3.3	0.035	2.33	1.01-5.34
	A*02?	13	24	9	45	3.1	0.038	2.71	1.01-7.24
	A*02+	5	16	3	17	0.1	0.376	1.77	0.36-8.65
Japanese	All	34	161	20	163	2.8	0.049	1.72	0.95-3.12
	A*02?	27	107	10	83	2.9	0.044	2.09	0.96-4.57
	A*02+	7	54	10	80	0.005	0.47	1.03	0.37-2.89

分担研究報告書

臨床徴候及び臨床検査から見た HTLV-I キャリアーにおける
HTLV-I 関連脊髄症(HAM/TSP)発症リスク計算式の有用性の検討

分担研究者 宇宿 功市郎(元 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 医療システム情報学)

(現 熊本大学医学部附属病院 医療情報経営企画部)

共同研究者 能勢 裕久、斉藤 峰輝、松崎 敏男、有村 公良、納 光弘

(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 神経内科・老年病学)

古川 良尚 (鹿児島大学病院 輸血部)

久保田 龍二、出雲 周二 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

附属難治ウイルス病態制御研究センター 分子病理)

研究要旨:

我々はこれまでに HAM 発症に関連する複数の HLA、非 HLA 宿主遺伝子多型と HTLV-I ウイルスサブタイプの変数解析から、HAM 発症リスクを計算する式を示し報告している。実際の臨床での発症リスク計算式の有用性を検討する為、鹿児島大学病院 HTLV-I キャリアー外来に来院した患者の検体を利用し、Odds of HAM を算出し、臨床症状及び臨床検査の結果と対比した。Odds of HAM の高い群(0.78 以上)において、下肢深部腱反射が亢進しており、異常リンパ球数及びその割合も高かった。これは、我々が日常臨床の中で抱いていた HAM の初期臨床像と Odds 比の高い群とが概ね一致するもので、この発症リスク計算式の有用性が確かめられた。

A. 研究目的

HAM は中年女性に多く発症する緩徐進行性の痙性脊髄麻痺であるが、HTLV-I 感染者のごく一部に発症し、大部分の感染者は生涯にわたって無症候性キャリアー(HC)として経過する。我々はこれまでに HAM 発症に関連する複数の HLA、非 HLA 宿主遺伝子多型と HTLV-I ウイルスサブタイプの変数解析から、HAM 発症リスクを計算する式を示し報告した(Journal of Infectious Diseases 2002; 186:932)。この式の有用性の検討のため、以下の検討を行った。

B. 研究方法

2004 年 11 月までに鹿児島大学病院 HTLV-I キャリアー外来に来院し、協力の得られた 181 名を対象とした。末梢血単核球からゲノム DNA を抽出し、HTLV-I プロウイルス量を定量的 PCR 法により測定する一方で、TNF- α -863A/C、SDF-1-801A/G、HLA-A*02、HLA-Cw*08 の各遺伝子多型および HTLV-I Tax サブタイプを決定した。得られたデータを前出論文掲載の計算式に適用して Odds of HAM を算出、臨床症状と比較した。検討項目は、性別、輸血歴、血液疾患及び HAM の家族歴、下肢腱反射亢進、腹壁反射の消失、痙性(クローヌス及び病的反射)、1 日排尿回数、夜間尿回数、表在リンパ節腫脹、皮膚病変とした。また、臨床検査より、LDH 及び白血球数、その分画であるリンパ球、

異型リンパ球、異常リンパ球、CD4+、CD8+、CD4+CD3+、CD8+CD3+、CD16+CD56+CD3-、CD16+CD56+CD3+ に関してはその実数及びパーセンテージについて、Mann-Whitney's U test を用い、統計学的解析を行なった。

(倫理面への配慮)

臨床検体を扱うため、患者よりの採血に関しては、十分なインフォームド・コンセントのもと、書面による研究協力承諾書を頂いた。本研究は鹿児島大学倫理委員会の承諾を得て行った。

C. 研究結果

対象患者の年齢は、46.5 \pm 12.8 歳。男性 95 名、女性 86 名の計 181 名。抗 HTLV-I 抗体価(中央値): 1024 倍。HTLV-I プロウイルス量(中央値): 82Copy/10⁴PBMC。(Table1 参照)

各検査の結果は、Table2 に示すとおりで、既に報告済みのデータと比べ、大きな差を認めなかった。Table3 に示す計算式を用いて、Odds of HAM を計算した。本対象患者の Odds of HAM(中央値)は、0.359 であった。Odds of HAM の有用性とカットオフ値を決めるべく、Receiver Operating Characteristic curve(ROC 曲線)を描いた。ROC 曲線の下面積(Area under the curve of the ROC)を用い、その正確度(accuracy)を検討した結果、Fig.1 に示す如く、HTLV-I 抗体価(点線; 0.86)、HTLV-I プロウイルス量

(破線; 0.88)、Odds of HAM(実線; 0.95)となり、Odds of HAM の有用性は明らかであった ($p < 0.001$)。

感度を出来るだけ上げ、疑陽性率を出来るだけ下げるポイントを求め、Odds of HAM 0.78 をもってカットオフとした。この時、感度 92.1%、特異度 85.6%となった。

Odds of HAM が 0.78 以上の群において、下肢深部腱反射が亢進していた (OR: 2.18, 95%CI: 1.11-4.31, $p=0.036$)。臨床検査においては、Odds of HAM が 0.78 以上の群に、異常リンパ球数 ($p=0.011$)と異常リンパ球の割合 ($p=0.010$)の多いことが分った。

さらに 95%以上の特異度を持つ Odds of HAM3 以上と未満の群に分けて、検討を行なうと、下肢腱反射亢進 ($P=0.0059$)、腹壁反射の消失 ($P=0.042$)、痙性 ($P=0.008$)の 3 つにおいて、有意差が認められた。CD4+及び CD4+CD3+の割合(%)が、Odds 比が 3 未満 (47.09 ± 7.24 及び 43.17 ± 7.84)の群に比較し、3 以上の群 (51.64 ± 6.70 及び 48.14 ± 6.25)に高い傾向が認められた ($p=0.0373$ 及び $p=0.0029$)。

D. 考察

下肢腱反射亢進、腹壁反射の消失、痙性は、脊髄病変を反映すると考えられる。特に下肢腱反射亢進は、ごく早期の症状として、注目すべき臨床病態であると考えられた。我々が日常臨床の中で抱いていた HAM の初期臨床像と Odds of HAM の高い群とが概ね一致することが分った。

異常リンパ球の増加は、成人 T 細胞白血病 (ATL) の経過観察の際にも注目されるが、HC 及び HAM においても、注目すべきである。Hisada らの報告によれば、HC において、異常リンパ球の割合と HTLV-I プロウイルス量は、相関するという。また、Odds of HAM も、HTLV-I プロウイルス量の影響を受けており、多くの抗原暴露の結果として、クローナルな増殖が起こり、異常リンパ球が出現する。Odds of HAM の高い群に異常リンパ球が多いことは、理解しやすく、また、臨床検査において、より良いマーカーとなりうる。

詳細は今後の検討が必要であるが、CD4 陽性リンパ球の割合の増加も初期の病態に関与している可能性があり、注目に値する。

E. 結論

我々の計算式は HTLV-I キャリアーの経過観察、HAM 早期発見に有用である。

F. 健康危険情報

特記すべきものはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

[1] Sabouri AH, et al. Differences in viral and host genetics risk factors for development of HTLV-I

associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) between Iranian and Japanese HTLV-1 infected individuals. *J Gen. Virol.* 2005 86: 773-781.

[2] Saito M, et al. *Apal* polymorphism of vitamin D receptor gene is associated with susceptibility to HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in HTLV-1 infected individuals. *J Neurol Sci.* 2005 232(1-2): 29-35.

[3] Matsuzaki T, et al. A prospective uncontrolled trial of fermented milk drink containing viable *Lactobacillus casei* strain Shirota in the treatment of HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurol Sci.* 2005 237(1-2): 75-81.

[4] Nobuhara Y, et al. Genetic variability in the extracellular matrix protein as a determinant of risk for developing HTLV-I-associated neurological disease. *Immunogenetics.* 57(12): 944-52.

[5] Saito M, et al. Flow cytometry evaluation of the T-cell receptor V β 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.* in press.

2. 学会発表

[第 46 回日本神経学会総会 2005 年 5 月. 鹿児島]

[1] 齊藤峰輝、能勢裕久、宇宿功市郎、出雲周二、有村公良、納 光弘、HAM 発症における HTLV-1 envb gp21 特異的 CD4+ T 細胞の病因的意義

[2] 児玉大介、齊藤峰輝、宇宿功市郎、出雲周二、有村公良、納 光弘、HTLV-1 感染者における Sonic hedgehog, Gli2, CD44v6 分子の解析

[3] 松崎敏男、齊藤峰輝、宇宿功市郎、能勢裕久、出雲周二、有村公良、納 光弘、HAM 患者に対する *Lactobacillus casei* Shirota 株の治療効果

[4] 宇宿功市郎、齊藤峰輝、能勢裕久、納 光弘、HAM 発症関連宿主因子と RA の宿主要因の関連

[5] 能勢裕久、齊藤峰輝、宇宿功市郎、松崎 敏男、久保田 龍二、古川 良尚、有村 公良、納 光弘、HTLV-1 キャリアーにおける HTLV-1 関連脊髄症 (HAM/TSP) 発症リスク計算式の有用性の検討

[The 12th International Conference on Human Retrovirology: HTLV 2004, 6, Montego Bay, Jamaica]

[1] Mineki Saito, Hirohisa Nose, Koichiro Usuku, Amir H. Sabouri, Shuji Izumo, Peter K. Goon, Nilufer

P. Seth, Kai W. Wucherpfennig, Charles R.M. Bangham and Mitsuhiro Osame
Ex vivo analysis of human T cell lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) env gp21-specific CD4+ T cells using MHC class II tetramers.

[2] Hirohisa Nose, Mineki Saito, Koichiro Usuku, Toshio Matsuzaki, Shuji Izumo, Ryuji Kubota, Yoshitaka Furukawa, Kimiyoshi Arimura and Mitsuhiro Osame
Comparison of clinical symptoms and the odds for predicting HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in healthy virus carriers: application of best-fit logistic regression equation based on the genotype, age, and provirus load.

[3] Koichiro Usuku, Mineki Saito, Amir H. Sabouri, Hirohisa Nose, Yoshitaka Furukawa, Shuji Izumo, Reza Farid, Charles R.M. Bangham and Mitsuhiro Osame
Viral and host genetic factors that determine the development of HAM/TSP.

[4] Fujio Umehara, Mineki Saito, Yoshitaka Furukawa, Koichiro Usuku and Mitsuhiro Osame
Chronic progressive cervical myelopathy with HTLV-1 infection: Variant form of HAM/TSP?

H. 知的所有権の出願・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

Figure 1

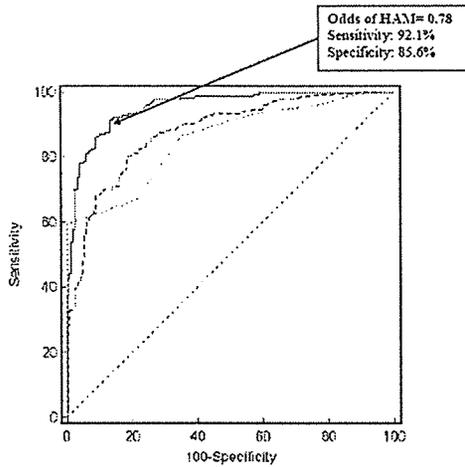


Table 1: Characteristics of 181 asymptomatic HTLV-1 carriers participated in the study.

	HCs (n=181)
Age	46.5 ± 12.7
Sex	
Male	95
Female	86
*Serum anti-HTLV-1 antibody titer (mean ± SD)	>2932.6 ± 6447.4
(median)	>1024
**HTLV-1 provirus load in PBMCs (mean ± SD)	240.8 ± 361.4
(median)	82

* Anti-HTLV-1 antibodies were titrated by the particle agglutination method.
 ** HTLV-1 Tax copy number per 1×10⁵ PBMCs.

Table 2: Frequencies of genotypes and alleles for the different polymorphisms of HAM/TSP associated genes in 181 asymptomatic HTLV-1 carriers participated in the study.

Genes	Alleles	Number of HCs	Genotype	Number of HCs
TNF-α -863	A	80 (22.1)*	AA	18 (9.9)
	C	282 (77.9)	AC	45 (23.8)
			CC	129 (66.3)
	total	362	total	181
SDF-1 +801	G	241 (66.6)	GG	30 (14.2)
	A	121 (33.4)	GA	81 (44.8)
			AA	20 (11.0)
total	362	total	181	
HLA-Cw*08	positive	27 (14.9)		
	negative	154 (85.1)		
	total	181		
HLA-A*02	positive	64 (35.4)		
	negative	117 (64.6)		
	total	181		
Tax subgroup	subgroup A	17 (9.4)		
	subgroup B	164 (90.6)		
	total	181		

*Numbers in parentheses are percentages.

Table 3: Best-fit logistic regression equation for the risk of HAM/TSP in the Kagoshima HTLV-1 infected cohort (n=402) (Vine et al, 2002).

Factor, condition	ln(odds of HAM/TSP)	Odds ratio (P)
Constant	-1.716	
Age	-(0.145×age)+(0.003×age ²)	
Provirus load	+(0.460×load)+(0.487×load ²)	
TNF-α -863A*	+3.057-(4.616×load)+(1.476×load ²)	0.45 (0.042)
SDF-1 +801GA	-0.898	0.18 (0.003)
SDF-1 +801AA	-1.689	0.53 (0.043)
HLA-A*02 ⁺	-0.394	0.41 (0.046)
HLA-Cw*08*	-1.587	0.20 (0.017)

Worked example: an HTLV-1-infected individual in Kagoshima, 60 years old, with a log₁₀ (provirus load) of 2.5 with the genotype TNF-α -863A*, SDF-1 +801AA, HLA-A*02⁺, HLA-Cw*08⁺, HTLV-1 subgroup B has a predicted ln odds of HAM/TSP of -1.716-(0.145×60)+(0.003×60²)+(0.46×2.5)+(0.487×2.5²)+3.057-(4.616×2.5)+(1.476×2.5²)-1.689-0.894-1.587=1.14975. That is, this HTLV-1-infected individual's odds of developing HAM/TSP = exp(1.14975) = 3.157403

Table 4: Comparison between the odds of HAM and clinical findings

	High odds (>0.78)	Low odds (<0.78)	P Value	OR	95% CI
n=181	n=89	n=102			
Age (Years)	44.4 ± 16.8	47.3 ± 12.1	<0.001	N/A	N/A
Sex (Male/Female)	33/56	42/60	0.41	N/A	N/A
Anti-HTLV-1 antibodies*	2122.7 ± 8195.7	1554.1 ± 1545.7	<0.001	N/A	N/A
HTLV-1 provirus load**	553.1 ± 453.0	71.0 ± 181.6	<0.001	N/A	N/A
Brisk gingival bleeding episodes	22/45	22/89	0.016	1.34	1.11-1.61
Abnormal superficial skin rashes/erythema	29/40	32/60	0.069	1.31	0.97-1.4
Increased urinary frequency (≥10 times/day)	17/51	17/95	0.15	1.36	0.88-3.64
Increased sweating (≥2 times/night)	10/54	12/100	0.58	1.41	0.58-3.33
Club hands	6/43	9/103	0.90	1.09	0.37-3.21
Supernodal lymph node swelling	6/43	8/104	0.93	1.24	0.41-3.73
Hair loss of blood transfusion	2/47	5/107	0.60	0.64	0.12-3.39
Family history of HAM/TSP or ATL	14/53	25/82	0.62	0.60	0.43-1.29

N/A: not applicable. The values are shown as the mean ± SD.
 *Anti-HTLV-1 antibodies were titrated by the particle agglutination method.
 **HTLV-1 Tax copy number per 1×10⁵ PBMCs.

Table 5: Comparison between the odds of HAM and laboratory findings

Odds of HAM/TSP	≥ 0.78	< 0.78	P Value
Counts of Blood Cells	n=68	n=110	
WBC	5430.9 ± 1491.4	5560.9 ± 1333.7	0.36
Lymphocyte	1640.1 ± 708.1	1721.5 ± 337.0	0.39
(%)	30.4 ± 9.8	31.8 ± 8.6	0.27
Abnormal Lymphocyte*	51.7 ± 79.0	19.0 ± 39.4	0.011
(%)	0.88 ± 1.23	0.36 ± 0.77	0.010
Atypical Lymphocyte**	32.6 ± 53.2	36.8 ± 63.2	0.66
(%)	0.65 ± 1.02	0.65 ± 1.23	1.00
Cluster of Differentiation	n=65	n=104	
CD4 ⁺	820.0 ± 410.1	820.1 ± 266.7	0.34
(%)	49.1 ± 8.0	47.3 ± 6.9	0.28
CD8 ⁺	497.3 ± 233.7	532.0 ± 191.2	0.12
(%)	30.5 ± 7.1	30.9 ± 7.3	0.71
CD4/8	1.73 ± 0.62	1.65 ± 0.56	0.21
	n=59	n=101	
CD4 ⁺ CD3 ⁺	797.7 ± 428.8	733.0 ± 249.7	0.59
(%)	45.4 ± 7.9	43.3 ± 7.7	0.21
CD8 ⁺ CD3 ⁺	411.1 ± 241.4	427.1 ± 168.2	0.95
(%)	23.8 ± 6.5	24.5 ± 6.5	0.82
CD4/8	2.13 ± 0.89	1.92 ± 0.70	0.20
CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD3 ⁺	228.7 ± 117.7	257.6 ± 166.5	0.64
(%)	15.3 ± 7.7	14.7 ± 6.9	0.64
CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD3 ⁺	35.8 ± 44.7	47.3 ± 57.8	0.56
(%)	2.25 ± 2.83	2.80 ± 3.39	0.42
Blood Chemistry	n=66	n=109	
LDH	363.2 ± 114.9	349.8 ± 92.4	0.25

* Abnormal Lymphocyte: flower cell (ATL cell)-like lymphocytes (Kondo et al, 1985).
 ** Atypical Lymphocyte: a reactive lymphocyte due to antigenic stimulation with increased size and presence of active DNA synthesis, i.e. lobulated or indented nucleus with slightly finer chromatin, and the cytoplasm vary in color being basophilic, dark blue, plasmacytic to pale gray.

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

高い HAM 発症率を示すイラン型 HTLV-1 Tax/Rex 変異体の機能解析

分担研究者 齊藤 峰輝 金沢医科大学 医学部 助教授 生体感染防御学

共同研究者： 巽 理恵、藤澤 順一（関西医大 微生物学）、
Amir H. Sabouri、納 光弘（鹿児島大 神経内科・老年病学）
出雲周二（鹿児島大 難治ウイルス病態制御研 分子病理）
大原 義朗（金沢医大 生体感染防御学）

研究要旨

日本株より低いプロウイルス量で発症するイラン株 HTLV-1 に注目し、Tax/Rex の構造と機能を解析した。イラン株 pX 領域には、ATK-1 株と比較して 10 塩基の共通した変異が存在し、Tax アミノ酸配列は、日本株 Tax-A（HAM 発症率が高い株）および Tax-B（ATK-1 株）とは、それぞれ 4 および 6 残基異なっていたが、イラン型 Tax (Tax Ir) は NF- κ B 転写活性化能に対する LTR 転写活性化能の比率 (LTR/NF- κ B) が有意に高かった。イラン株 Rex は、ATK-1 株 rex における翻訳停止コドン(TGA)が TGG に変異することで、カルボキシル末端が 20 アミノ酸延長されていたが、非スプライス型 RNA の核外輸送能を測定したところ、ATK-1 株 Rex より活性が低下していた。低スプライシング調節能が HAM 発症リスクに及ぼす影響について興味もたれた。

A. 研究目的

HTLV-1 はその塩基配列から、日本株では大きく A および B の 2 つのサブタイプに分類されるが、鹿児島におけるコホート解析からは、サブタイプ A の HTLV-1 感染者は、サブタイプ B（ATK-1 株）感染者と比較して HAM 罹患危険度が高いことが報告されている。一方、HAM 患者が多く存在するイラン北東部における HTLV-1 の pX 領域の塩基配列を解析したところ、サブタイプ A および B とは異なる塩基置換を伴う新たなサブタイプ（サブタイプ Ir）の存在が明らかとなった（Sabouri et al, J Gen Virol 86:773-81, 2005）。そこで、それぞれのサブタイプにおける Tax および Rex の機能に注目し、その転写活性化能および非スプライス RNA 核外輸送能を比較・解析し、感染者末梢血中プロウイルス量および HAM 発症率との関連を検討することで、HAM 発症の病態について新たな知見が得られるものと考え、以下の研究を行なった。

研究方法

イラン人 HAM 患者から HTLV-1 プロウイルス DNA pX 領域の塩基配列を増幅して Tax および Rex の発現ベクターを作成した。HTLV-1 LTR、NF- κ B 結合部位のレポータープラスミドを用いた

ルシフェラーゼアッセイにより、Tax の活性を比較した。一方、欠損型 HTLV-1 provirus DNA 発現ベクター-pGAGdm（吉田光昭・東大教授より供与）およびルシフェラーゼ遺伝子をスプライスアウトされる部位の間に挟んだベクターを用いて、Rex の活性を測定した。

（倫理面への配慮）

十分なインフォームド・コンセントのもと採血された検体を用いた。本研究はマシャド大学（イラン）、鹿児島大学および金沢医科大学倫理委員会の承諾を得た。

B. 研究結果

イラン株 pX 領域には、ATK-1 株と比較して 10 塩基の共通した変異が存在するため、Tax アミノ酸配列は日本株 Tax-A（HAM 発症率が高い株）および Tax-B（ATK-1 株）とは、それぞれ 4 および 6 残基異なっており、Rex アミノ酸配列は、ATK-1 株 rex における翻訳停止コドン(TGA)が TGG に変異することで、カルボキシル末端が 20 アミノ酸延長されていた。Tax/Rex の機能解析の結果、

① Tax の転写活性化能に関しては、イラン型 Tax (Tax Ir) は NF- κ B 活性化能 に対する LTR 活性化能の比率 (LTR/NF- κ B) が高かった。

② Rex Ir の機能（非スプライス型 RNA の核外

輸送能) は、ATK-1 株 Rex と比較して低下していた。

C. 考察

イラン株 pX 領域に存在する 10 塩基の置換は、HAM 発症率が日本人の約 8 倍近く高いと報告されているジャマイカ株 HTLV-1 にも観察され、イランにおける低プロウイルス量での HAM 発症との関連が示唆される。イラン型 Rex では、日本株 Rex と比較して、spliced form/unsliced form 比の上昇⇒ Tax mRNA/genomic RNA 比の上昇 ⇒ 細胞当たりの Tax 量の上昇をもたらす可能性があり、その結果として、

- ① 感染細胞のクローナルな増殖の活性化を介した無症候性キャリアーにおけるプロウイルス量の増加
- ② 抗 Tax CTL の誘導とその異常な活性化を介した HAM 発症への関与が示唆される。

D. 結論

イラン型 Rex は、日本株と比較して非スプライス型 RNA の核外輸送能が低下していた。この低スプライシング調節能が HAM 発症リスクに及ぼす影響について興味もたれた。

E. 研究発表

1. 論文発表

[1] Nobuhara Y, Saito M, Goto R, et al. Chronic progressive sensory ataxic neuropathy associated with limited systemic sclerosis.
J Neurol Sci. 2006 241(1-2):103-6.

[2] Nobuhara Y, Usuku K, Saito M, et al. Genetic variability in the extracellular matrix protein as a determinant of risk for developing HTLV-I associated neurological disease.
Immunogenetics. 2006 57 (12): 944-952.

[3] Ward V, Hennig BJ, Hirai K, et al. Geographical distribution and disease associations of the CD45 exon 6 138G variant.
Immunogenetics. 2006 58(2-3):235-9.

[4] Saito M, Nose H, Usuku K, et al. Flow cytometry evaluation of the T-cell receptor Vβ 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] Nose H, Saito M, Usuku K, et al. Clinical

symptoms and the odds of human T-cell lymphotropic virus type 1-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.
J Neurovirol. 2006 12(3):171-7.

2. 学会発表

[第 18 回日本神経免疫学会 2006 年 4 月 名古屋]
齊藤峰輝, Amir H. Sabouri, 宇宿功市郎、能勢裕久、出雲周二、有村公良、納 光弘
イラン北東部と鹿児島における HAM/TSP 発症感受性因子と病態への作用機構の比較

[第 47 回日本神経学会総会 2006 年 5 月 東京]
齊藤峰輝, Amir H Sabouri, 能勢裕久、出雲周二、宇宿功市郎、有村公良、納 光弘
HTLV-1 感染者 T リンパ球における共刺激分子発現の変化と HAM 発症への関与

[第 10 回神経ウイルス研究会 2006 年 6 月 石川]
齊藤峰輝、大原義朗
HAM/TSP 発症を規定するウイルス因子・宿主因子と HTLV-1 に対する免疫応答

[第 43 回日本細菌学会中部支部総会 2006 年 10 月 岐阜]
齊藤峰輝、大原義朗、松崎敏男、納 光弘
HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) 患者に対する *Lactobacillus casei shirota* 株の治療効果

[第 54 回日本ウイルス学会 2006 年 11 月 名古屋]
齊藤峰輝、大原義朗
HTLV-1 感染者 T リンパ球における共刺激分子発現の変化と HAM 発症への関与

[The 7th International Symposium on NeuroVirology, May 2006, Philadelphia, USA]
Saito M, Usuku K, Izumo S, Osame M, Ohara Y
Virus-host interactions and its implication in the development of HAM/TSP

[The 8th International Congress of Neuroimmunology October 2006, Nagoya, Japan]
Saito M, Usuku K, Nose H, Sabouri AH, Arimura K, Izumo S, Osame M, Ohara Y
Virus-Host Interactions and its Implication in the Development of HTLV-1-Associated Myelopathy/ Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP).

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
Tomaru U, Yamano Y, Jacobson S.	HTLV-I infection and the Nervous system	Antel J	Clinical Neuroimmunology 2 nd edition	Oxford University Press	US	2005	285-99
木曾良明	アミロイド生成阻害薬開発の展望.	井原康夫	第19回「大学と科学」公開シンポジウム講演収録集: アルツハイマー病: 治療の可能性を探る,	クバプロ	東京	2005	pp160-172
Ayako Itami, Hikoichiro Maegawa, Keiji Nishiyama, Koushi Hidaka, Yasuhiro Arii, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso	Evaluation of peptidomimetic HTLV-1 protease inhibitors containing hydroxymethylcarbonyl as a transition-state isostere.	T. Wakamiya	Peptide Science 2005	The Japanese Peptide Society	Osaka	2006	237-240
J-T. Nguyen, A. Itami, H. Maegawa, K. Nishiyama, T. Kimura, Y. Kiso	From peptide substrate to small inhibitor possessing non-natural amino acids: a summary on HTLV-I protease inhibitor optimization sutides	Y. Kiso	2nd International Symposium on Biomolecules and Related Compounds: Program and Abstracts	2nd ISB Office	Kyoto	2006	52
足立昭夫 鎌田和弥 藤田美歌子	シクロフィリンとHIV-1	シクロスポリン学術国際シンポジウム 編	免疫の進化—シクロスポリン20年の軌跡	医薬ジャーナル社	大阪	2006	206-214
Nakamura T, Nishiura Y, Fukushima N, Furuya T.	The role of HTLV-I-infected CD4 ⁺ T cells as activated Th1 cells in the immunopathogenesis of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis.	Broglio PV.	Neuroimmunology Research Focus	Nova Science Publishers		2007	in press
中村龍文.	神経系感染症が疑われたとき.	河野茂ら	ベッドサイドで役立つ微生物検査ガイド	文光堂		2006	41-49

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
Saito M, Usuku K, Nobuhara Y, Matsumoto W, Kodama D, Sabouri AH, Izumo S, Arimura K, Osame M.	Serum concentration and genetic polymorphism in the 5'-untranslated region of VEGF is not associated with susceptibility to HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in HTLV-I infected individuals.	J Neurol Sci.	219(1-2)	157-61	2004
Sabouri AH, Saito M, Lloyd AL, Vine AM, Witkover AW, Furukawa Y, Izumo S, Arimura K, Marshall SE, Usuku K, Bangham CR, Osame M.	Polymorphism in the interleukin-10 promoter affects both provirus load and the risk of human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis.	J Infect Dis.	190(7)	1279-85	2004
Kodama D, Saito M, Matsumoto W, Sabouri AH, Izumo S, Arimura K, Usuku K, Bangham CR, Osame M.	Longer dinucleotide repeat polymorphism in matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene promoter which correlates with higher HTLV-I Tax mediated transcriptional activity influences the risk of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP).	J Neuroimmunol.	156(1-2)	188-94	2004
Umehara F, Nagatomo S, Yoshishige K, Saito M, Furukawa Y, Usuku K, Osame M.	Chronic progressive cervical myelopathy with HTLV-I infection: Variant form of HAM/TSP?	Neurology.	63(7)	1276-80	2004
Furukawa Y, Usuku K, Izumo S, Osame M.	Human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) p12I is dispensable for HTLV-I transmission and maintenance of infection in vivo.	AIDS Res Hum Retroviruses.	20(10)	1092-9	2004
Tomoya Kotake, S. Rajesh, Yoshio Hayashi, Yoshie Mukai, Mitsuhiro Ueda, Tooru Kimura, and Yoshiaki Kiso	A new polymer-supported Evans-type chiral auxiliary derived from α -hydroxy- β -amino acid, phenylnorstatine: Synthesis and application in solid-phase asymmetric alkylation reactions.	Tetrahedron Letters	45 (18)	3651-3654	2004

Sonia Vega, Lin-Woo Kang, Adrian Velazquez-Campoy , Yoshiaki Kiso, Mario Amzel, and Ernesto Freire	A structural and thermodynamic escape mechanism from a drug resistant mutation of the HIV-1 protease.	Proteins: Str., Funct. & Bioinformatics	55 (3)	594-602	2004
Youhei Sohma, Masato Sasaki, Yoshio Hayashi, Tooru Kimura, Yoshiaki Kiso	Design and synthesis of a novel water-soluble A β 1-42 isopeptide: an efficient strategy for the preparation of Alzheimer's disease-related peptide, A β 1-42, via O-N intramolecular acyl migration reaction.	Tetrahedron Letters	45 (31)	5965-5968	2004
Mitsunobu Doi, Tooru Kimura, Toshimasa Ishida, Yoshiaki Kiso	Rigid backbone moiety of KNI-272, a highly selective HIV protease inhibitor: methanol, acetone and dimethylsulfoxide solvated forms of 3-[3-benzyl-2-hydroxy-9-(isoquinolin-5-ylloxy)-6-methylsulfanylmethyl-5,8-dioxo-4,7-diazanonanoyl]-N-tert-butyl-1,3-thiazolidine-4-carboxamide.	Acta Crystallographica Sect. B.	B60 (4)	433-437	2004
Yohei Sohma, Yoshio Hayshi, Mariusz Skwarczynski, Yoshio Hamada, Masato Sasaki, Tooru Kimura, Yoshiaki Kiso	O-N Intramolecular acyl migration reaction in the development of prodrugs and the synthesis of difficult sequence-containing bioactive peptides.	Biopolymers Peptide Science	76 (4)	344-356	2004
Hikoichiro Maegawa, Tooru Kimura, Yasuhiro Arii, Yasuko Matsui, Soko Kasai, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso	Identification of peptidomimetic HTLV-1 protease inhibitors containing hydroxymethylcarbonyl (HMC) isostere as the transition-state mimic.	Bioorg. Med. Chem. Lett.	14 (23)	5925-5929	2004
Aiko Kiso, Koushi Hidaka, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Azin Nezami, Ernesto Freire, Yoshiaki Kiso	Search for substrate-based inhibitors fitting the S2' space of malarial aspartic protease plasmepsin II.	J. Peptide Sci.	10 (11)	641-647	2004
Hamdy M. Abdel-Rahman, Tooru Kimura, Koushi Hidaka, Aiko Kiso, Azin Nezami, Ernesto Freire, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso	Design of inhibitors against HIV, HTLV-I, and Plasmodium falciparum aspartic proteases.	Biological Chemistry	385 (11)	1035-1039	2004
Hamdy M. Abdel-Rahman, Nawal A. El-Koussi, Gamal S. Alkaramany, Adel F. Youssef, Yoshiaki Kiso	A novel dipeptide-based HIV protease inhibitor containing allophenylnorstatine.	Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.	337 (11)	587-598	2004

Tooru Kimura, Daisuke Shuto Yoshio Hamada, Naoto Igawa, Soko Kasai, Ping Liu, Koushi Hidaka, Takashi Hamada, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso	Design and synthesis of highly active Alzheimer's β -secretase (BACE1) inhibitors, KMI-420 and KMI-429, with enhanced chemical stability.	Bioorg. Med. Chem. Lett.	15 (1)	211-215	2005
Akari, H., Fujita, M., Kao, S., Khan, M.A., Shehu-Xhilaga, M., Adachi, A., and Strebel, K.	High level expression of Human Immunodeficiency Virus type-1 Vif inhibits viral infectivity by modulating proteolytic processing of the Gag precursor at the p2/NC processing site	J. Biol. Chem.	279	12355-1 2362	2004
Sugahara, F., Uchiyama, T., Watanabe, H., Shimazu, Y., Kuwayama, M., Fujii, Y., Kiyotani, K., Adachi, A., Kohno, N, Yoshida, T., and Sakaguchi, T.	Paramyxovirus Sendai virus-like particle formation by expression of multiple viral proteins and acceleration of its release by C protein	Virology	325	1-10	2004
Fujita, M., Akari, H., Sakurai, A., Yoshida, A., Chiba, T., Tanaka, K., Strebel, K., and Adachi, A.	Expression of HIV-1 accessory protein Vif is controlled uniquely to be low and optimal by proteasome-degradation	Microbes Infect.	6	791-798	2004
Sakurai, A., Jere, A., Yoshida, A., Yamada, T., Iwamoto, A., Adachi, A., and Fujita, M.	Functional analysis of HIV-1 <i>vif</i> genes derived from Japanese long-term nonprogressors and progressors for AIDS	Microbes Infect.	6	799-805	2004
Piroozmand, A., Koyama, A.H., Shimada, Y., Fujita, M., Arakawa, T., and Adachi, A.	Role of Us3 gene of herpes simplex virus type 1 for resistance to interferon	Int. J. Mol. Med.	14	641-645	2004

Nagao, T., Yoshida, A., Sakurai, A., Piroozmand, A., Jere, A., Fujita, M., Uchiyama, T., and Adachi, A.	Determination of HIV-1 infectivity by lymphocytic cell lines with integrated luciferase gene	Int. J. Mol. Med.	14	1073-1076	2004
Jere, A., Piroozmand, A., Tripathy, S., Paranjape, R., Sakurai, A., Fujita, M., and Adachi, A.	Generation and characterization of HIV-1 clones chimeric for subtypes B and C <i>nef</i>	Int. J. Mol. Med.	14	1087-1090	2004
Miyatake Y, Ikeda H, Michimata R, Koizumi S, Ishizu A, Nishimura N, Yoshiki T.	Differential modulation of gene expression among rat tissues with warm ischemia.	Exp Mol Pathol	77	222-230	2004
Abe A, Ishizu A, Ikeda H, Hayase H, Tsuji T, Miyatake Y, Tsuji M, Fugo K, Sugaya T, Higuchi M, Matsuno T, Yoshiki T.	Bone marrow cells carrying the env-pX transgene play a role in the severity but not prolongation of arthritis in human T-cell leukaemia virus type-I transgenic rats: a possible role of articular tissues carrying the transgene in the prolongation of arthritis.	Int J Exp Pathol	85	191-200	2004
Tsuchikawa T, Ikeda H, Kikuchi K, Tsuji T, Baba T, Ishizu A, Tanaka Y, Kato H, Yoshiki T.	Hematopoietic progenitor cells as possible origins of epithelial thymoma in a human T lymphocyte virus type I pX gene transgenic rat model.	Lab Invest.	84	245-252	2004
Yoshihiro Nishiura, Tatsufumi Nakamura, Naomi Fukushima, Ryozo Moriuchi, Shigeru Katamine, Katsumi Eguchi.	Increased mRNA expression of Th1-cytokine signaling molecules in patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis.	Tohoku J Exp Med	204	289-298	2004

Naomi Fukushima, Yoshihiro Nishiura, Tatsufumi Nakamura, Yasuaki Yamada, Shigeru Kohno, Katsumi Eguchi.	Involvement of p38 MAPK signaling pathway in IFN- γ and HTLV-I expression in patients with HTLV-I-associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis.	J Neuroimmunol	159	196-202	2005
Mori S, Mizoguchi A, Kawabata M, Fukunaga H, Usuku K, Maruyama I, Osame M.	Bronchoalveolar lymphocytosis correlates with human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) proviral DNA load in HTLV-I carriers.	Thorax.	60(2)	138-43.	2005
Sabouri AH, Saito M, Usuku K, Naghizadeh Bajestan S, Mahmoudi M, Foroughipour M, Sabouri Z, Abbaspour Z, Goharjoo ME, Khayami E, Hasani A, Izumo S, Arimura K, Farid R, Osame M.	Differences in viral and host genetics risk factors for development of HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) between Iranian and Japanese HTLV-1 infected individuals.	J Gen Virol.	86(3)	773-81.	2005
Saito M, Eiraku N, Usuku K, Nobuhara Y, Matsumoto W, Kodama D, Sabouri AH, Izumo S, Arimura K, Osame M	<i>Apal</i> polymorphism of vitamin D receptor gene is associated with susceptibility to HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in HTLV-1 infected individuals.	J Neurol Sci.	232(1-2)	29-35.	2005
Matsuzaki T, Saito M, Usuku K, Nose H, Izumo S, Arimura K, Osame M.	A prospective uncontrolled trial of fermented milk drink containing viable <i>Lactobacillus casei</i> strain Shirota in the treatment of HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis.	J Neurol Sci.	237(1-2)	75-81.	2005

Matsuda T, Tomita M, Uchihara JN, Okudaira T, Ohshiro K, Tomoyose T, Ikema T, Masuda M, Saito M, Osame M, Takasu N, Ohta T, Mori N.	Human T cell leukemia virus type I-infected patients with Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease.	J Clin Endocrinol Metab.	90(10)	5704-10	2005
松崎敏男、 齊藤峰輝、納 光 弘	HAMの診断と治療の進歩	臨床検査	第 49 卷 第4号	409-414	2005
Tomoya Kotake, Yoshio Hayashi, S. Rajesh, Yoshie Mukai, Yuka Takiguchi, Tooru Kimrui, Yoshiaki Kiso	Design and synthesis of a new polymer-supported Evans-type oxazolidinone: an efficient chiral auxiliary in the solid-phase asymmetric alkylation reactions.	Tetrahedron	61 (15)	3819-3833	2005
林良雄, 木曾良明	α -ヒドロキシ- β -アミノ酸を基盤とした有機化学・創薬化学研究.	有機合成化学協会誌	63(6)	640-651	2005
Mariusz Skwarczynski, Youhei Sohma, Mayo Noguchi, Maiko Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshio Hamada, Tooru Kimura, Yoshiaki Kiso	No auxiliary, no byproduct strategy for water-soluble prodrugs of taxoids: scope and limitation of O-N intramolecular acyl and acyloxy migration reaction.	J. Med. Chem.	48 (7)	2655-2666	2005
Akiko Yoshida, Ahmad Piroozmand, Akiko sakurai, Mikako Fujita, Tsuneo Uchiyama, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso, Akio Adachi	Establishment of a biological assay system for human retroviral protease activity.	Microbes and Infection	7(5/6)	820-824	2005
Yohei Sohma, Yoshio Hayashi, Maiko Kimura, Yousuke Chiyomori, Atsuhiko Taniguchi, Masato Sasaki, Tooru Kimura, Yoshiaki Kiso	The 'O-acyl isopeptide method' for the synthesis of difficult sequence-containing peptides: application to the synthesis of Alzheimer's disease-related amyloid β -peptide (A β) 1-42.	J. Peptide Sci.	11(8)	441-451	2005

Youhei Sohma, Yousuke Chiyomori, Maiko Kimura, Fukue Fukao, Atsuhiko Taniguchi, Yoshio Hayashi, Tooru Kimura and Yoshiaki Kiso	“O-Acyl isopeptide method” for the efficient preparation of amyloid β peptide (A β) 1-42 mutants.	Bioorg. Med. Chem.	13 (22)	6167-6174	2005
Adam J. Ruben, Yoshiaki Kiso, Ernesto Freire	Overcoming roadblocks in lead optimization: a thermodynamic perspective.	Chem. Biol. Drug. Des.	67 (1)	2-4	2006
Wang, H., Sakurai, A., Khamsri, B., Uchiyama, T., Gu, H., Adachi, A., and Fujita, M.	Unique characteristics of HIV-1 Vif expression	Microbes Infect.	7	385-390	2005
足立昭夫	HIV感染症	日本臨床	63 増刊号 12	342-346	2005
Prat E, Tomaru U, Sabater L, Park DM, Granger R, Kruse N, Ohayon JM, Bettinotti MP, Martin R.	HLA-DRB5*0101 and -DRB1*1501 expression in the multiple sclerosis-associated HLA-DR15 haplotype.	J Neuroimmunol	167(1-2)	108-19	2005
Hayase H, Ishizu A, Ikeda H, Miyatake Y, Baba T, Higuchi M, Abe A, Tomaru U, Yoshiki T.	Aberrant gene expression by CD25+CD4+ immunoregulatory T cells in autoimmune-prone rats carrying the human T cell leukemia virus type-I gene.	Int Immunol.	17(6)	677-84	2005
Yamano Y, Takenouchi N, Li HC, Tomaru U, Yao K, Grant CW, Maric DA, Jacobson S.	Virus-induced dysfunction of CD4+CD25+ T cells in patients with HTLV-I-associated neuroimmunological disease.	J Clin Invest.	115(5)	1361-8	2005
Baba T, Ishizu A, Ikeda H, Miyatake Y, Tsuji T, Suzuki A, Tomaru U, Yoshiki T.	Chronic graft-versus-hostdisease-like autoimmune disorders spontaneously occurred in rats with neonatal thymus atrophy.	Eur J Immunol.	35(6)	1731-40	2005
Bangham CR, Osame M.	Cellular immune response to HTLV-1.	Oncogene.	24(39)	6035-46	2005

Umehara F, Tokunaga N, Hokezu Y, Hokonohara E, Yoshishige K, Shiraishi T, Okubo R, Osame M.	Relapsing cervical cord lesions on MRI in patients with HTLV-I-associated myelopathy.	Neurology.	66(2)	289.	2006
Furukawa Y, Tara M, Izumo S, Arimura K, Osame M.	HTLV-I viral escape and host genetic changes in the development of adult T cell leukemia.	Int J Cancer.	118(2)	381-7.	2006
Nobuhara Y, Usuku K, Saito M, Izumo S, Arimura K, Bangham CR, Osame M.	Genetic variability in the extracellular matrix protein as a determinant of risk for developing HTLV-I-associated neurological disease.	Immunogenetics.	57(12)	944-52	2006
Youhei Sohma, Atsuhiko Taniguchi, Mariusz Skwarczynski, Taku Yoshiya, Fukue Fukao, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso	"O-Acyl isopeptide method" for the efficient synthesis of difficult sequence-containing peptides: use of "O-acyl isodipeptide unit".	<i>Tetrahedron Letters</i>	47 (18)	3013-3017	2006
日高興士, 木曾良 明	今エイズ薬研究はどうなっているか.	化学	61 (5)	25-29	2006
Yoshio Hamada, Naoto Igawa, Hayato Ikari, Zyta Ziora, Abdellah Yamani, Koushi Hidaka, Tooru Kimura, Kazuki Saito, Yoshio Hayashi, Shoichi Ishiura, Yoshiaki Kiso	β -Secretase inhibitors: Modification at the P4 position and improvement of inhibitory activity in cultured cell.	<i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i>	16 (16)	4354-4359	2006
Mariusz Skwarczynski, Mayo Noguchi, Shun Hirota, Youhei Sohma, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, Yoshiaki Kiso	Development of first photoresponsive prodrug of paclitaxel.	<i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i>	16 (17)	4492-4496	2006
Magne O. Sydnes, Yoshio Hayashi, Vinay K. Sharma, Takashi Hamda, Usman Bacha, Jennifer Barrila, Ernesto Freire, Yoshiaki Kiso	Synthesis of glutamic acid and glutamine peptides possessing a trifluoromethyl ketone group as SARS-CoV 3CL protease inhibitors.	<i>Tetrahedron</i>	62 (36)	8601-8609	2006