

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ことが考えられる。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 クローンのうち A24/Nef138-10 複合体特異的な scFv は 16 クローンであったが、残りの 48 クローンは HLA-A24 あるいは β 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 クローンは 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。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

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

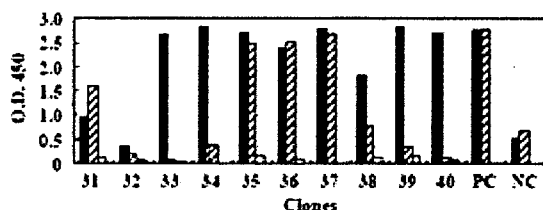
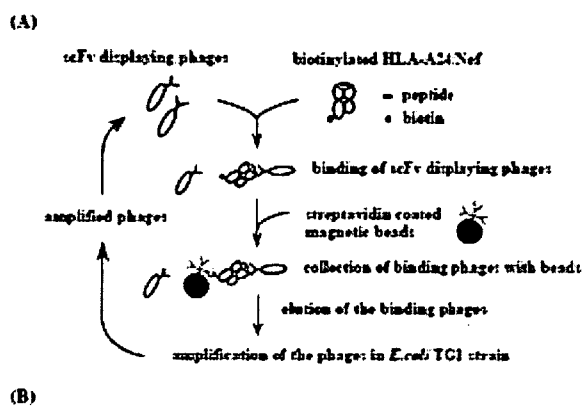
1. 論文発表

1. Hoshino, S., Sun, B., Konishi, M., Shimura, M., Segawa, T. Hagiwara, Y., Koyanagi, Y., Iwamoto, A., Mimaya, J., Terunuma, H., Kano, S., and Ishizaka, Y. Vpr in plasma of HIV-1-positive patients is correlated with the HIV-1 RNA titers. *AIDS Research and Human Retroviruses* 23:391-397, 2007.
2. Wichukchinda, N., Kitamura, Y., Rojanawiwat, A., Nakayama, E.E., Song, H., Pathipvanich, P., Auwanit, W., Sawanpanyalert, P., Iwamoto, A., Shioda, T., and Ariyoshi, K. The polymorphisms in DC-SIGNR affect susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS Research and Human Retroviruses* 23:686-692, 2007.
3. Song, H., Nakayama, E.E., Likansakul, 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 J. Immunogenetics* 34:107-113, 2007.
4. Nakayama, E.E., Carpentier, W., Costagliola, D., Shioda, T., Iwamoto, A., Debre, P., Yoshimura, K., Autran, B., Matsushita, S., and Theodorou, I. Wild type and H43Y variant of human TRIM5a show similar anti-human immunodeficiency virus type 1 activity both in vivo and in vitro. *International J. Immunogenetics* 59:511-515, 2007.
5. Liu, H., Nakayama, E.E., Theodorou, I., Nagai, Y., Likansakul, S., Wasi, C., Debre, P., Iwamoto, A., and Shioda, T. Polymorphisms in CCR5 chemokine

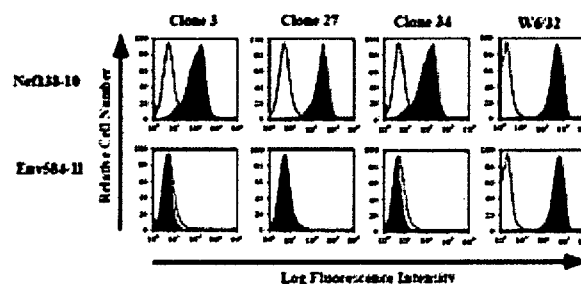
receptor gene in Japan. International J. Immunogenetics. 34:325-335, 2007.

6. Hosoya, N., Miura, T., Kawana-Tachikawa, A., Shioda, T., Odawara, T., Nakamura, T., Kitamura, Y., Kano, M., Kato, A., Hironaka, T., Hasegawa, M., Nagai, Y., and Iwamoto, A. Comparison between Sendai virus and Adenovirus vectors in induction of HIV-1 genes into human dendritic cells. J. Medical Virology, 80:373-382, 2008.
7. Maeda, T., Oyaizu, N., Endo, T., Odawara, T., Nakamura, T., Iwamoto, A., Fujii, T.

Pneumocystis jiroveci pneumonia in an AIDS patient: Unusual manifestation of multiple nodules with multiloculated cavities. European Journal of Radiology, In Press.



〈図 1〉A. パニング法による scFv ファージの濃縮。B. scFv ファージクローンの A24/Nef138-10 複合体との結合能。補足分子として A24/Nef138-10 複合体 (■)、A24/Env584-11 複合体 (□) を用いた。□ は補足分子がない場合を示す。



〈図 2〉HLA-A24 陽性 B 細胞の scFv clone 3, 27 による細胞表面染色。

平成19年度厚生労働科学研究費補助金（社会保障国際協力推進 研究事業）
HIV感染症における免疫応答の解析とその臨床応用に関する研究（H19-国医-指定-008）
平成19年度分担研究報告書

樹状細胞や副刺激分子を介した HIV 免疫応答の誘導

田中勇悦 琉球大学医学研究科免疫学分野 教授

研究要旨：TGF-betaによる免疫抑制活性とエイズ発症との関連性が注目されている。一方マウスの系において、OX40 刺激が Treg の作用に拮抗することが報告されている。Treg が存在することにより強い免疫応答が抑制され、また Treg が HIV の増殖をコントロールしている可能性もある。本年度の研究では、活性化 PBMC の HIV-1 感染に対する TGF-beta の影響とそれに対する OX40/OX40L 反応の効果を解明することを目的とした。TGF-beta 存在下で刺激培養された PBMC での R5 および X4 HIV-1 の感染は顕著に抑制された。この抑制は OX40 に対するアゴニスト抗体で解除された。また、OX40L に対するアゴニスト抗体は TGF-beta による X4 HIV-1 の感染抑制を解除した。TGF-beta 存在下で刺激された CD4+T 細胞も CD8+T 細胞も OX40 と OX40L を発現することから、OX40 や OX40L に対する刺激は、TGF-beta に拮抗し、T 細胞での HIV-1 感染増殖に影響を与えることが明らかにされた。

A. 研究目的

TGF-beta は制御性 T 細胞 (Treg) が免疫応答を抑制する際に使用する主なサイトカインであり、HIV-1 感染者では血清中の濃度の上昇が認められることから、その免疫抑制活性とエイズ発症との関連性が注目されている。Treg が存在することにより強い免疫応答が抑制され、また Treg が HIV の増殖をコントロールしている可能性があるからである。一方、OX40 は活性化 T 細胞に発現する TNFR スーパーファミリーの細胞膜糖タンパク質で、T 細胞への補助刺激活性を持つ。最近マウスの系では、OX40 が Treg に構成的に発現し、そのシグナルが Treg 活性を解除することが示された。さらに OX40 刺激

は外来抗原に対する免疫 T 細胞群でエフェクター・メモリー型に分化した T 細胞の長期生存に働くが知られる。

これらの事実から OX40-OX40L 反応は HIV-1 免疫の調節および HIV-1 の増殖にも深く関与することが示唆される。しかし、具体的で詳しい研究は未だ報告されていない。そこで、本年度の研究では、活性化 PBMC の HIV-1 感染に対する TGF-beta の影響とそれに対する OX40/OX40L 反応の効果を解明することを目的とした。

B. 研究方法（倫理面への配慮）

健常人の PBMC をリコンビナント TGF-beta および単クローン OX40 または OX40L 抗体の存在下または非存在下で 10%FCS-RPMI1640 (+20 U/ml

IL-2) 培地内で固相化 anti-CD3 (OKT-3) プレートで 3 日間刺激培養した。細胞を洗浄後、R5 HIV-1 (JR-CSF), または X4 HIV-1 (NL4-3) を m. o. i. 0.005 の割合で 37° C 2 時間感染させ、洗浄後に IL-2 を含む培地で 3 日間培養し、上清中の p24 を ELISA で測定した。

C. 研究結果

抗 OX40, OX40L 抗体非存在下 TGF-beta 存在下で刺激培養された PBMC での R5 および X4 HIV-1 の感染は、TGF-beta 非処理 PBMC でのそれと比較して顕著に抑制された。細胞培養系に OX40 に対するアゴニスト抗体 W454 (OX40L との結合は阻止する抗体) を加えた場合、TGF-beta の HIV-1 抑制は解除され、コントロールの場合よりも HIV-1 の増殖が促進された。また、OX40L に対するアゴニスト抗体 (OX40 との結合は阻止する抗体) は、R5 HIV-1 の増殖には影響を与えなかったが、X4 HIV-1 の感染を有意に助長した。

そこで 3 日間刺激培養した PBMC の CD4 および CD8 陽性分画の OX40 と OX40L の発現性を検討した。TGF-beta 処理により、OX40 の発現は非処理群と比較して、CD4+T 細胞では 71%から 54%に低下したが、CD8+T 細胞分画では 19%から 35%へと増加した。一方、OX40L の発現は、CD4+T 細胞では 0.4%から 12%に増加し、CD8+T 細胞分画では 0.0%から 47%へと増加した。

同様な条件で TGF-beta 存在下で培養した PBMC の Treg の割合を FoxP3 と CD4 の染色で比較すると、OX40 抗体アゴニスト抗体を入れることによって培養 PBMC 中の CD4+, FoxP3 陽性細胞の比率が有意に低下していた。

D. 考察

今回の研究は、免疫応答をそれぞれ negative および positive に調整すると言われる TGF-beta と OX40 刺激がどのように PBMC の HIV-1 感染に影響を及ぼすのかを探ることを目的で開始した。TGF-beta 存在下で刺激培養された PBMC では、報告されているように R5 および X4 HIV-1 の感染が TGF 非処理 PBMC でのそれと比較して顕著に抑制された。新たに得られたデータは、OX40 に対するアゴニスト抗体 W454 を加えることにより、TGF-beta の HIV-1 抑制は解除され、しかも HIV-1 の増殖の度合いはコントロールより高かった。興味あることに、OX40L に対するアゴニスト抗体は TGF の HIV-1 抑制効果に対して、R5 HIV-1 の増殖には何の影響も与えなかったが、X4 HIV-1 の増殖を有意に助長したことである。活性化 T 細胞が OX40L 陽性になることを我々はすでに報告したが、T 細胞上の OX40L への刺激が免疫応答や HIV-1 感染にどのような影響を与えるのかは未だ未研究である。今後、アゴニスト抗体を用いた追試でより明らかにしてゆきたい。

実際に 3 日間刺激培養した PBMC の CD4 および CD8 陽性分画が、どれ位の OX40 と OX40L を発現するのかをフローサイトメトリーで解析すると、興味あることに、OX40 発現は TGF-beta 処理によって非処理群と比較して、CD4+T 細胞ではやや低下したが、CD8+T 細胞分画では約 2 倍の頻度へと増加することが明らかになった。一方、TGF-beta 処理により OX40L の発現率は、両タイプの細胞で顕著に増加した。ダブルポジティブ細胞の比率も高かった。したがって、TGF-beta 存在下で刺激された T 細胞は、T-T 細

胞間の接触により OX40-OX40L の反応が可能となる。このような反応が、今回観察された TGF-beta あるいは Treg による HIV-1 増殖抑制現象の解除へ関与することは、アゴニスト抗体の結果から容易に想像できる。

TGF-beta は Treg を誘導する因子としての機能を持つが、今回、TGF-beta 存在下で培養した PBMC の Treg の割合は OX40 抗体アゴニスト抗体を入れることによって有意に低下することが分かった。Treg の誘導阻止と HIV-1 の感染増殖解除が直接関係あるかどうか、今後の研究で明らかにしてゆきたい。

E. 結論

活性化 PBMC において、TGF-beta は R5 HIV-1 と X4 HIV-1 感染に抑制的に作用するが、OX40 や OX40L を刺激することによってそれが解除されることが示唆された。

F. 健康危険情報

HIV-1 の感染実験、ウイルスの保管は全て琉球大学医学部で定める感染微生物取り扱い安全管理委員会の規定に基づき、P3 実験施設で行われている。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Zhang LF, Okuma K, Tanaka R, Kodama A, Kondo K, Ansari AA, and Tanaka Y. Generation of mature dendritic cells with unique phenotype and function by in vitro short-term culture of human monocytes in the presence of interleukin-4 and interferon-beta. *Experimental Biology and Medicine*, in press.
- 2) Takahashi Y, Tanaka R, Yamamoto N, and Tanaka Y. Enhancement of OX40-induced apoptosis by

TNF co-activation in OX40-expressing T cell lines in vitro leading to decreased targets for HIV-1 production. *AIDS Res Hum Retroviruses*, in press.

- 3) Okuma K, Tanaka R, Ogura T, Ito M, Kumakura S, Yanaka M, Nishizawa M, Sugiura W, Yamamoto N, and Tanaka Y. The IL-4-transgenic hu-PBL-SCID mice: a model for screening of anti-viral drugs and immunotherapeutic agents against X4 HIV-1 viruses. *J Infect Dis* 197 (1):134-41, 2008.
 - 4) Kondo K, Okuma K, Tanaka R, Zhang LF, Kodama A, Takahashi Y, Yamamoto N, Ansari AA, and Tanaka Y. Requirements for the functional expression of OX40 ligand on human activated CD4+ and CD8+ T cells. *Hum Immunol* 68 (7): 563-71. 2007.
- ##### 2. 学会発表
- 1) 高橋良明, 田中礼子, 田中勇悦: CD4 陽性 T 細胞株での OX40 (CD134) 分子の新たな機能: OX40/OX40L 系により誘導されるアポトーシスのメカニズム. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会記録, 2007. 11. 20-22: 東京. 179.
 - 2) Kondo K, Tanaka R, Tanaka Y: Activation of primary human T cells in DNA synthesis-arrested states rapidly induces significant amounts of functional OX40 ligands. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会記録, 2007. 11. 20-22: 東京. 179.
 - 3) 張麗峰, 児玉晃, 近藤佳代, 田中礼子, 大隈和, 田中勇悦: OX40L 抗体によるヒト制御性 T 細胞 (Treg) の誘導促進. 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2007. 11. 28-30: 広島. 415.
 - 4) 田中勇悦, 田中礼子, 児玉晃, 張麗峰, 近藤佳代, 大隈和: 細胞結合 OX40 リガンドによる活性化 CD4+T 細胞における R5 HIV-1 の抑制. 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2007. 11. 28-30: 広島. 416.
 - 5) 大隈和, 田中礼子, 田中勇悦: ヒト IL-4 産生免疫不全マウスを用いた多剤耐性 HIV-1 臨床分離株に対する薬剤評価系の確立. 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2007. 11. 28-30: 広島. 457.

- 6) 児玉晃, 近藤佳代, 張 麗峰, 田中礼子, 大隈和, 田中勇悦: エイズ樹状細胞免疫療法にむけて: 末精製末梢血単核球群からの樹状細胞分化誘導. 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2007. 11. 28-30: 広島. 525.

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

CYPの人種差とEFV治療に関する研究

分担研究者 岡 慎一 国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター長

研究要旨

我々は、EFVの血中濃度に関連するCYP2B6のSNPsを世界に先
駆け報告した。今年度は、このSNPsの人種差と副作用に関しザンビ
アにおいて検討した。

A. 研究目的

黒人におけるCYP2B6のSNPs検討す
る目的で、ザンビアにおいて解析を行っ
た。

B. 研究方法

ザンビア大学教育病院において
EFV/d4T/3TCで治療開始予定の連続
100例につき、事前に口腔粘膜より
DNAを採取、CYP2B6のSNPsを調
べた。また、治療開始後、1日目、7日
目、30日目、1年後の副作用調査を行
った。EFV血中濃度は、治療開始1ヶ
月後に測定した。CD4は、治療開始前、
1ヶ月後、1年後に測定した。

（倫理面への配慮）

本臨床試験を行うに当たり、国立国際医
療センターとザンビア大学の倫理委員
会の承認を受け、臨床研究に関する倫理
指針にのっとりプロトコールにて行
った。個人のプライバシーに関しては、
厳重に守られるよう最大限努力した。

C. 研究結果

ザンビア人のCYP2B6のallele頻度を
日本人と比較し表1に示した。予想通
り、ザンビア人においては、EFV血中

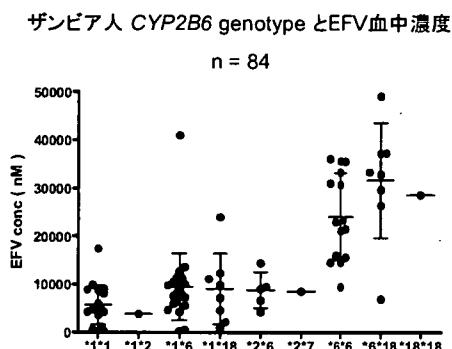
濃度が上昇する*6の頻度は、40.5%と
日本人より高かった。また、日本人には
見られなかった*18もEFV血中濃度
が高くなることがわかったが、この頻度
も10.5%と高く、2つ合わせると50%
にも達した。このことから、*6もしく
は*18のみを遺伝子型として持つ患
者の頻度は25%にたつることになり、
4人に一人はEFV血中濃度が高くなる
ことがわかった。

表1. CYP2B6のallele頻度

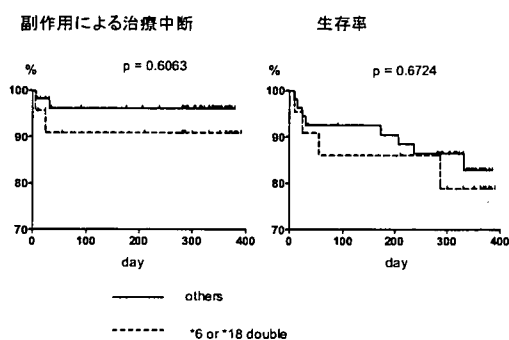
	Japanese	Zambian
n	252	100
*1	68.7	43.0
*2	5.0	5.0
*4	6.2	—
*5	1.0	—
*6	19.2	40.5
*7	—	1.0
*18	?	10.5
計	100.0	100.0

次に、CYP genotypeとEFVの血中濃度の
関連を図1に示す。先に述べたようにEFV
血中濃度が高くなる*18を発見した。

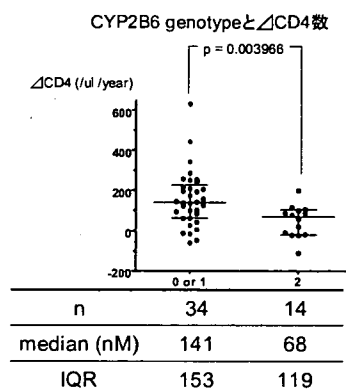
図 1



治療中断率や生存率は血中濃度の高くなる
* 6 ・ * 1 8 群とそれ以外を比べても有意
差はなかった（図 2）。



1 年後の CD4 の増加率を調べると予想に反
し、* 6 / * 1 8 群の方が有意に低値であ
った（図 3）。



D. 考察

ザンビア人においては、日本人より
CYP 2 B6 の多様性の高いことがわかつ
た。今後 EFV で治療を行うときに CYP
検査の重要性は高いものと考えられた。
CD4 の上昇率は、EFV 血中濃度の高い
方が低値であるという予想に反する結
果が得られた。治療効果に関し、
unknown 因子の存在が推定される。

E. 結論

EFV 血中濃度が上昇する新しい CYP
allele を発見した。CD4 上昇率で見た
治療効果は EFV 血中濃度の高い方が悪
い結果となっていた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Bi X, Gatanaga H, Koike K, Kimura S, and Oka S. Reversal periods and patterns from drug resistant to wild type HIV-1 after cessation of anti-HIV therapy. *AIDS Res Hum Retrovirus* 23: 43-50, 2007.
2. Yamanaka H, Gatanaga H, Kosalaraksa P, Matsuoka-Aizawa S, Kimura S, and Oka S. Novel mutation of human polymerase γ associated with mitochondrial toxicity induced by anti-human immunodeficiency virus treatment. *J Infect Dis* 195: 1419-1425, 2007.
3. Gatanaga H, Yazaki H, Tanuma J, Honda M, Genka I, Teruya K,

- Tachikawa N, Kikuchi Y, and **Oka S**. HLA-Cw8 primarily associated with hypersensitivity to nevirapine. *AIDS* (correspondence) 21: 264-265, 2007.
4. Honda M, Yogi A, Ishizuka N, Genka I, Gatanaga H, Teruya K, Tachikawa N, Kikuchi Y, and **Oka S**. Effectiveness of subcutaneous growth hormone in HIV-1 patients with moderate to severe facial lipoatrophy. *Intern Med* 46: 359-362, 2007.
5. Gatanaga H, Hayashida T, Tsuchiya K, Yoshino M, Kuwahara T, Tsukada H, Fujimoto M, Sato I, Ueda M, Horiba M, Hamaguchi M, Yamamoto M, Takata N, Kimura A, Koike T, Gejyo F, Mastushita S, Shirasaka T, Kimura S, and **Oka S**. Successful dose reduction of efavirenz in HIV-1-infected cytochrome P450 2B6 *6 and *26 holders. *Clin Infect Dis* 45: 1230-1237, 2007.
6. Hayashida T, Gatanaga H, Tanuma J, and **Oka S**. Effect of low HIV-1 load and antiretroviral treatment on IgG-capture BED-enzyme immunoassay. *AIDS Res Hum Retrovirus* 24: 495-498, 2008.
7. Hachiya A, Kodama E, Sarafianos SG, Schuckmann MM, Matsuoka M, Takiguchi M, Gatanaga H, and **Oka S**. Amino acid mutation, N348I, in the connection subdomain of HIV-1 reverse transcriptase confers multi-class resistance to NRTIs and NNRTIs. *J Virol* Epub 2008 Jan 23.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

研究報告書

分担研究課題: 薬剤耐性を獲得した CRF01_AE プロテアーゼの構造解析

分担研究者: 杉浦 互 国立感染症研究所 エイズ研究センター グループ長

研究協力者: 柿澤淳子 国立感染症研究所 エイズ研究センター 非常勤職員

研究要旨

HIV-1 CRF01_AE(subtype E)プロテアーゼの結晶構造解析することを目的とし、CRF01_AE プロテアーゼ遺伝子を *E.coli* にトランスフォームしタンパクを精製・解析した。25 番目のアスパラギン酸をアスパラギンに置換した D25N 変異体のプロテアーゼの結晶構造解析を行い Subtype B のプロテアーゼ構造と比較検討した。更に、ネルフィナビル投薬により L10F、N88S の変異を獲得した臨床検体由来のプロテアーゼ遺伝子をクローニングし、Q7K を導入して自己分解能を抑制した活性型プロテアーゼを作製し、プロテアーゼの基質分解能を測定した。この活性測定系を用いてプロテアーゼに対するプロテアーゼ阻害剤の阻害効果をみた。

A. 研究目的

現在臨床で行われている多剤併用療法 (HAART) は HIV 感染症治療で大きな効果を上げている。この HIV 感染症治療で用いられている抗 HIV 薬剤は、欧米で感染の主流となっている Subtype B の逆転写酵素やプロテアーゼの情報や構造を元に設計され使用されているが、東アジアで流行の主流である CRF01_AE や中国・インドで広まっている Subtype C と言った non-B type の HIV の逆転写酵素やプロテアーゼの特徴は考慮されていない。また抗 HIV 薬剤に対する薬剤耐性ウイルスの研究もそのほとんどが Subtype B に関するものである。現在日本における HIV 流行の主流は欧米と同様 Subtype B だがタイなど東南アジアにおける HIV 感染症例の主流の CRE01_AE (Subtype E) による HIV 感染例が増加傾向にある。これまでに、Subtype B と CRE01_AE ではプロテアーゼ阻害剤ネルフィナビルに対する薬剤耐性獲得に差異があることが報告されているが、これは Subtype B と CRE01_AE のプロテアーゼの構造学的差異を示唆している。そこで我々は CRE01_AE のプロテアーゼを精製して結晶構造解析を行い、Subtype B の構造との比較検討を目的とした。更に、CRE01_AE の症例でネルフィナビル耐性変異を獲得したプロテアーゼの結晶構造解析も行い、耐性獲得と構造変化の関係も解明を試みた。

B. 研究方法

1) プロテアーゼ変異体の構築

プロテアーゼの自己分解活性を抑制するため D25N 変異を導入した不活性型のプロテアーゼを Subtype B の分子クローン HXB2 のと CRF01_AE の分子クローンである NH-1 を作製した。また CRF01_AE でネルフィナビル投与履歴のある臨床症例を 1 症例選択し、そのプロテアーゼ領域をクローニングした。このようにネルフィナビル投与前の野生型プロテアーゼ (L10L/N88N)、ネルフィナビル投与によって経時的に N88S を持ったプロテアーゼ (L10L/N88S) 及び L10F と N88S 両方を持ったプロテアーゼ (L10F/N88S/K20I, K41R, M46I, I64V, T74S, I93L) を合計 3 ポイント選択し、各々クローニングをした。なおこの臨床症例のプロテアーゼはプロテアーゼ活性を保ったまま自己分解能を減弱させるため、7 番目のグルタミンをリシンに置換 (Q7K) した。

2) 発現ベクターの構築

構築した HXB2 と NH-1 のプロテアーゼ遺伝子及び臨床検体由来のプロテアーゼ遺伝子 (L10L/N88N、L10L/N88S、L10F/N88S) を pET-11a の T7 プロモーターの下流に組み込んだ発現ベクターを作製した。

3) プロテアーゼタンパクの発現

大腸菌での発現を高めるためヒトの codon usage に適させた *E.coli* (Rosetta) を使用した。*E. coli* にトランスフォーム後 IPTG の存在下で 3 時間誘導をかけてプロテアーゼタンパクを強発現させた。

4) プロテアーゼタンパク回収・精製

IPTG による発現誘導後 *E.coli* を回収し French press を用いて菌体を破砕し封入体内のプロテアーゼタンパクを回収した。回収した粗精製産物は 2 M urea と酢酸で可溶化した。可溶化したプロテアーゼ粗精製物は、G-75 Sephadex を充填した 5 cm x 100cm column に添加しゲルろ過による分離精製を行った。

5) プロテアーゼの結晶構造解析

HXB2 の D25N 変異体と、NH-1 の D25N 変異体のプロテアーゼサンプルはリフォールディングした後に限外濾過をして濃縮し、共同研究者である Massachusetts 大学の Schiffer 博士へ送付した。プロテアーゼは p1-p6 配列ペプチドと結合したかたちでハンギング・ドロップ法により結晶化し、構造解析を解像度 2.5 Å で行った。

6) プロテアーゼの活性測定

Q7K の変異を導入した CRF01_AE の野生型プロテアーゼ (L10L/N88N) と、ネルフィナビル投与による変異が入った 2 種のプロテアーゼ (L10L/N88S と L10F/N88S/K20I, K41R, M46I, I64V, T74S, I93L) を用いて基質 CA-p2 ペプチドを分解させ、紫外分光計 (ベックマン DU640) で基質の減少を測定し、分解の初速度を得た。この基質分解反応系にプロテアーゼ阻害剤 (ネルフィナビルとダルナビル) を加え、それらによる阻害効果をみた。

C. 研究結果

精製した HXB2 の D25N 変異体と NH-1 の D25N 変異体のプロテアーゼ結晶構造解析を行い構造の比較を行った。その結果 HXB2 ではグルタミン酸 35 とリジン 20 間には水素結合がなかったが、NH-1 ではアスパラギン酸 35 とアルギニン 20 との間に水素結合が見られた (図

1)。サブサイト P3-P3' 間における、プロテアーゼと p1-p6 配列ペプチドとの水素結合数は、NH-1 のほうが HXB2 より 2 か所多いことがわかった。また P3-P3' 間にある 18 の原子対において、NH-1 ではすべてが 3.5 Å 以下だったのに対し、HXB2 では 4.8 Å 以上離れているもの 5 対みられ、NH-1 の方が全体として基質 p1-p6 ペプチドとよく密着していることが示唆された(図 2)。
野生型プロテアーゼ(L10L/N88N)はネルフィナビルとダルナビルに感受性を示し、変異体(L10F/N88S/K20I, K41R, M46I, I64V, T74S, I93L) はネルフィナビルに耐性を示したがダルナビルには感受性であった(図 3)。

D. 考察

Subtype B (HXB2) と CRF01_AE (NH-1) 間ではプロテアーゼ内部の水素結合に差異があることと、基質 p1-p6 ペプチドとプロテアーゼとの間の水素結合数が違っていることから、*in vivo* においてもプロテアーゼと gag の切断部位との結合様式が Subtype B と CRF01_AE では異なる可能性が示唆された。実際に薬剤耐性プロファイルが Subtype B と CRF01_AE で異なるネルフィナビルについてはまだ検討途中であるがこれらの Subtype 間で結合強度や結合様式に差異がある可能性が示唆された。

結晶構造解析の結果をまとめると、サブタイプによる構造的な違いが、基質およびインヒビターとの結合に影響を及ぼしていることが示唆された。インヒビターによる阻害実験の結果では、CRF01_AE における N88S 変異とネルフィナビル耐性との関係を示唆する結果が出た。また、CRF01_AE のネルフィナビル耐性変異はダルナビルには無効であった。

E. 結論

Subtype B の分子クローンである HXB2 の D25N プロテアーゼと CRF01_AE の分子クローンである NH-1 の D25N プロテアーゼの結晶構造解析を行った結果、CRF01_AE では 20 番目のアルギニンと 35 番目のアスパラギン酸の間で Subtype B では見られない水素結合が存在することが明らかになった。またプロテアーゼの基質である p1-p6 ペプチドとプロテアーゼとの結合を解析した結果、CRF01_AE では Subtype B より p1-p6 ペプチドと密着していることが示された。

CRF01_AE の野生型プロテアーゼ(L10L/N88N)はネルフィナビルに感受性だったが、N88S を含むプロテアーゼはネルフィナビルに耐性を示した。ダルナビルは、ネルフィナビル耐性である CRF01_AE プロテアーゼを抑制した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) H Suzuki, M Fujino, M Matsuda, H Yan, Y Iwatani, W Sugiura.: Effects of Protease and reverse transcriptase inhibitor-resistance mutations on integrase polymorphism in multidrug resistance cases. *Antiviral Therapy*. 12(1):S4, 2007
- 2) J Shibata, F Ren, M Nishizawa, M Fujino, Y Iwatani, M Matsuda, H Miura, H Tanaka and W

Sugiura.: Interference between Gag non-cleavage site mutation P453L and HIV-1 protease non-drug resistance mutation E35D. *Antiviral Therapy*. 12(1):S143, 2007

- 3) Okuma K, Tanaka R, Ogura T, Ito M, Kumakura S, Yanaka M, Nishizawa M, Sugiura W, Yamamoto N, Tanaka Y.: Interleukin-4-Transgenic hu-PBL-SCID Mice: A Model for the Screening of Antiviral Drugs and Immunotherapeutic Agents against X4 HIV-1 Viruses. *J Infect Dis*. Jan 1;197(1):134-41, 2008

- 4) Saeng-Aroon S, Yoshida LM, Ariyoshi K, Taguchi M, Pathipvanich P, Rojanawiwat A, Matsuda M, Kannagi M, Sawanpanyalert P, Sugiura W, Auwanit W.: An Efficient Tool for Surveying CRF01_AE HIV Type 1 Resistance in Thailand to Combined Stavudine-Lamivudine-Nevirapine Treatment: Mutagenically Separated PCR Targeting M184I/V. *AIDS Res Hum Retroviruses*. Dec;23(12):1461-8, 2007

- 5) Satoh E, Li XK, Hara Y, Ogata K, Guo L, Kitazawa Y, Funeshima-Fuji N, Satoh T, Miyagi T, Sugiura W, Yamamoto N, Teramoto K, Arai S, Kimura H.: Sensitization to enhanced green fluorescence protein minor histocompatibility antigen by gene transduction into dendritic cells and peritoneal exudate macrophages. *Transpl Immunol*. Nov;18(2):73-84, 2007

- 6) Iwatani Y, Chan DS, Wang F, Maynard KS, Sugiura W, Gronenborn AM, Rouzina I, Williams MC, Musier-Forsyth K, Levin JG.: Deaminase-independent inhibition of HIV-1 reverse transcription by APOBEC3G. *Nucleic Acids Res*. 35(21):7096-108, 2007

- 7) Seichiro Fujisaki, Saeko Fujisaki, Shiro Ibe, Tsukasa Asagi, Toshihiro Itoh, Shigeru Yoshida, Takao Koike, Masayasu Oie, Makiko Kondo, Kenji Sadamasu, Mami Nagashima, Hiroyuki Gatanaga, Masakazu Matsuda, Mikio Ueda, Aki Masakane, Mami Hata, Yasushi Mizogami, Haruyo Mori, Rumi Minami, Kiyomi Okada, Kanako Watanabe, Takuma Shirasaka, Shinichi Oka, Wataru Suigura and Tsuguhiro Kaneda.: Performance and Quality Assurance of Genotypic Drug-Resistance Testing for Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 60:113-117, 2007

- 8) Ode H, Matsuyama S, Hata M, Hoshino T, Kakizawa J, Sugiura W.: Mechanism of drug resistance due to N88S in CRF01_AE HIV-1 protease, analyzed by molecular dynamics simulations. *J Med Chem*. 19;50(8):1768-77, 2007

- 9) Chiba-Mizutani T, Miura H, Matsuda M, Matsuda Z, Yokomaku Y, Miyauchi K, Nishizawa M, Yamamoto N, Sugiura W.: Use of new T-cell-based cell lines expressing two luciferase reporters for accurately evaluating susceptibility to anti-human immunodeficiency virus type 1 drugs. *J Clin Microbiol*. 45(2):477-87, 2007

- 10) Makiko Hamatake, Masako Nishizawa, Naoki Yamamoto, Shingo Kato, Wataru Sugiura.: A simple competitive RT-PCR assay for quantitation of HIV-1 subtype B and non-BRNA in plasma. *J Virol Methods*. 142:113-7, 2007
- 11) Hiroyuki Gatanaga, Shiro Ibe, Masakazu Matsuda, Shigeru Yoshida, Tsukasa Asagi, Makiko Kondo, Kenji Sadamasu, Hiroki Tsukada, Aki Masakane, Haruyo Mori, Noboru Takata, Itsuhiro Nakagiri, Rumi Minami, Masao Tateyama, Takao Koike, Toshihiro Itoh, Mitsunobu Imai, Fumitake Gejyo, Mikio Ueda, Motohiro Hamaguchi, Yoko Kojima, Takuma Shirasaka, Akio Kimura, Masahiro Yamamoto, Jiro Fujita, Shinichi Oka, and Wataru Sugiura.: Nationwide Survey of Drug-Resistant HIV-1 Prevalence in Patients Newly Diagnosed with HIV/AIDS in Japan. *Antiviral Research*, 75(1):75-82, 2007
- 12) K.Furuya, M.Omura, S.Kudo, W. Sugiura, H. Azuma.: Recognition Profiles of microsporidian Encephalitozoon cuniculi polar tube protein 1 with human immunoglobulin M antibodies. *Parasite Immunology*. 30:13-21, 2008
- 13) Mako Omura, Koji Furuya, Shinichi Kudo, Wataru Sugiura, Hiroshi Azuma.: Detecting Immunoglobulin M Antibodies against Microsporidian Encephalitozoon cuniculi Polar Tubes in Sera from Healthy and Human Immunodeficiency Virus-Infected Persons in Japan. *Clinical and Vaccine Immunology*. 14(2):168-172, 2007
- 14) Afework Kassu, Masayuki Fujino, Masakazu Matsuda, Masako Nishizawa, Fusao Ota, Wataru Sugiura.: Molecular Epidemiology of HIV-1 in Treatment Naïve Patients in North Ethiopia, *AIDS Research and Human Retroviruses*, 23(4):564-568, 2007
- 15) Deforche K, Camacho R, Grossman Z, Silander T, Soares MA, Moreau Y, Shafer RW, Van Laethem K, Carvalho AP, Wynhoven B, Cane P, Snoeck J, Clarke J, Sirivichayakul S, Ariyoshi K, Holguin A, Rudich H, Rodrigues R, Bouzas MB, Cahn P, Brigido LF, Soriano V, Sugiura W, Phanuphak P, Morris L, Weber J, Pillay D, Tanuri A, Harrigan PR, Shapiro JM, Katzenstein DA, Kantor R, Vandamme AM.: Bayesian network analysis of resistance pathways against protease inhibitors. *Infect Genet Evol*. 7(3):382-90, 2007
- 16) 今井光信、中瀬克己、小島弘敬、加藤真吾、杉浦 互、栗原 健、白阪琢磨: HIV 検査および検査体制・技術の進歩と今後の課題. 第 20 回 日本エイズ学会 シンポジウム記録. 9(3):202-208,2007
- 17) 松田昌和、杉浦 互: HIV 薬剤耐性検査. モダンメディア別冊 53(11):319-322, 2007
- 18) 西澤雅子、杉浦 互: 薬剤耐性 HIV の抱える諸問題: Considerable Issues of Drug Resistance. *The Journal of AIDS Research*. 9(3):197-201,2007
- 19) 杉浦 互: 抗ウイルス薬耐性獲得のメカニズム- HIV. 月刊薬事. 49(11):31-36, 2007
- 20) 岩谷靖雅、杉浦 互: DNA マイクロアレイ法.(増刊号)臨床と微生物. 34:479-481, 2007
- 21) 杉浦 互: 薬剤耐性化と対策. 薬剤耐性化. HIV の耐性化機序. 日本臨床 65 増刊号 2.487-492, 2007
- 22) 杉浦 互: 感染症の治療と薬剤耐性. 生体防御医学辞典. 朝倉書店. 66-71, 2007
- 23) 藤崎誠一郎、藤崎彩恵子、伊部史朗、浅黄 司、伊藤俊広、吉田 繁、小池隆夫、大家正泰、渡邊香奈子、正兼亜季、上田幹夫、湯永博之、松田昌和、貞升健志、長島真美、岡田清美、近藤真規子、奏 眞美、溝上泰司、森 治代、南 留美、白阪琢磨、岡 慎一、杉浦 互、金田次弘: 日本における HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査のコントロールサーベイ. 日本エイズ学会誌 (*The Journal of AIDS Research*). 9(2):136-146,2007
- 2.学会発表
- 24) Rajintha Bandaranayake, M Prabu-Jeyablab, J Kakizawa, W Sugiura and C Schiffer.: The Effect of Sequence Polymorphisms on CrF01_AE Protease Structure. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Feb.3-6,2008, Boston, USA.
- 25) H Suzuki, M Fujino, M Matsuda, H Yan, Y Iwatani, W Sugiura: Effects of Protease and reverse transcriptase inhibitor-resistance mutations on integrase polymorphism in multidrug resistance cases. XVI International HIV Drug Resistance Workshop. Jun. 12-16, 2007, Barbados, WestIndies.
- 26) J Shibata, F Ren, M Nishizawa, M Fujino, Y Iwatani, M Matsuda, H Miura, H Tanaka and W Sugiura: Interference between Gag non-cleavage site mutation P453L and HIV-1 protease non-drug resistance mutation E35D. XVI International HIV Drug Resistance Workshop. Jun. 12-16, 2007, Barbados, WestIndies.
- 27) J Shibata, F Ren, M Nishizawa, H Tsang, Y Iwatani, M Matsuda, H Miura, H Tanaka, W Sugiura: Gag and Protease Interference Affect Acquisition and Selection of Resistance Viruses in Antiretroviral Treatment Failure Case. 8th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. Nov.11-14, 2007, USA.
- 28) Wataru Sugiura: Drug Resistance assays. International Conference on Molecular and Cellular Biology of Therapeutics of HIV and Associated Viral Infections. Jan.12-14, 2007, Hyderabad, India.
- 29) 栗原 健、吉野宗宏、佐野俊彦、小島賢一、日笠聡、杉浦 互、白阪琢磨: 拠点病院における抗 HIV 療法と薬剤関連アンケート調査結果(第 4 報). 第 21 回日本エイズ学会学術集会. 2007.11.28-30, 広島
- 30) 中里俊文、高村 斉、大出裕高、清水 愛、杉浦 互、星野忠次: L90M 変異体に阻害作用をもつ抗 HIV 薬の設計・合成. 第 21 回日本エイズ学会学術集会. 2007.11.28-30, 広島
- 31) 羽生勇一郎、山本紀生、日吉真照、黒崎直子、石川晃一、松田昌和、岡田誠治、杉浦 互、山本直樹、高久 洋: shRNA, decoy RNA 共発現レンチウィルスベクターによる HIV-1 複製阻害効果の検討. 第 21 回日

本エイズ学会学術集会. 2007.11.28-30, 広島

32) 田中理恵、柴原 健、杉浦 互、加藤真吾: HPLC によるダルナビルの血中濃度測定法の開発.

33) 岩谷靖雅、杉浦 互: HIV-1 NCとAPOBEC3Gの逆転写反応への作用. 第 21 回日本エイズ学会学術集会. 2007.11.28-30, 広島

34) 松山 翔、大出裕高、柿澤淳子、杉浦 互、星野忠次: 臨床検体由来 Subtype C HIV-1 protease の薬剤耐性機構に関する構造化学的研究. 第 21 回日本エイズ学会学術集会. 2007.11.28-30, 広島

35) 柿澤淳子、松山 翔、大出裕高、星野忠次、大高泰靖、岩谷靖雅、西澤雅子、Rajintha Bandaranayake、Celia A Sciffer、杉浦 互: CRF01_AEとサブタイプ B のプロテアーゼの構造解析. 第 21 回日本エイズ学会学術集会. 2007.11.28-30, 広島

36) 長谷川直紀、杉浦 互、任 鳳蓉、松田昌和、柴田潤子、田中 博: HARRT 下における連続サンプルを用いた経時的な HIV の宿主内進化解析. 第 21 回日本エイズ学会学術集会. 2007.11.28-30, 広島

37) 柴田潤子、任 鳳蓉、西澤雅子、藤野真之、松田昌和、岩谷靖雅、杉浦 互、田中 博: 抗 HIV 薬剤投与下における protease と Gag の共進化に関する研究. 第 21 回日本エイズ学会学術集会. 2007.11.28-30, 広島

38) 吉田いづみ、西澤雅子、藤野真之、仲宗根 正、岩谷靖雅、長谷川直紀、柴田潤子、杉浦 互、任 鳳蓉、田中 博: HIV-1 env 遺伝子の多様性進化. 第 21 回

日本エイズ学会学術集会. 2007.11.28-30, 広島

39) 近藤真規子、宮崎裕美、須藤弘二、佐野貴子、倉井華子、相楽裕子、岩室紳也、杉浦 互、武部 豊、今井光信: 日本で流行している HIV-1 サブタイプ B の diversity. 第 21 回日本エイズ学会学術集会. 2007.11.28-30, 広島

40) 藤野真之、三浦秀佳、西澤雅子、松田昌和、鈴木寿子、杉浦 互: プロテアーゼ阻害剤耐性 HIV-1 株に対するダルナビルの有効性についての解析. 第 21 回日本エイズ学会学術集会. 2007.11.28-30, 広島
杉浦 互、潟永博之、吉田 繁、千葉仁志、小池隆夫、伊藤俊広、原 孝、佐藤武幸、石ヶ坪良明、上田敦久、近藤真紀子、今井光信、貞升健志、長島真美、福武勝幸、山元泰之、田中理恵、加藤真吾、宮崎菜穂子、岩本愛吉、藤野真之、仲宗根 正、巽 正志、椎野禎一郎、岡 慎一、林田庸聡、服部純子、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、浜口基洋、上田幹夫、正兼亜季、大家正義、下条文武、田邊嘉也、渡邊香奈子、白阪琢磨、柴原 健、森 治代、小島洋子、中桐逸博、高田 昇、木村昭郎、南 留美、山本政弘、松下修三、健山正男、藤田次郎: 2003-2006 年の新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性頻度の動向. 第 21 回日本エイズ学会学術集会. 2007.11.28-30, 広島

H. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)
該当なし

図 1

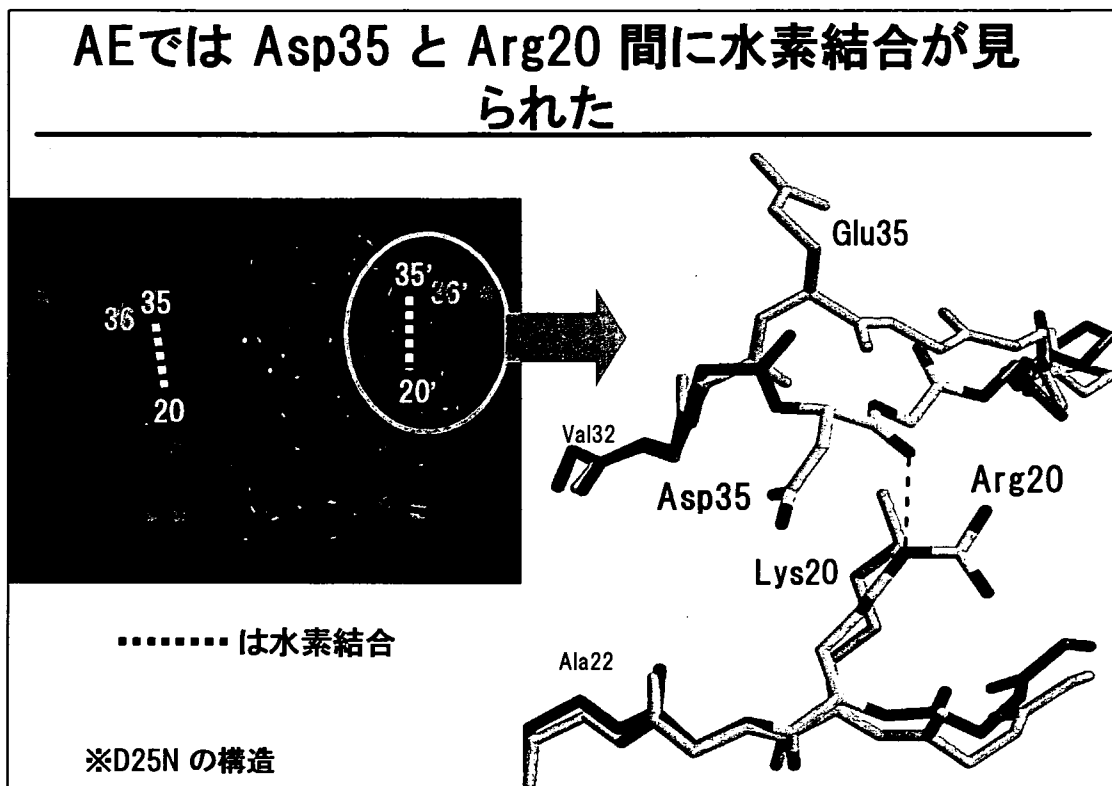
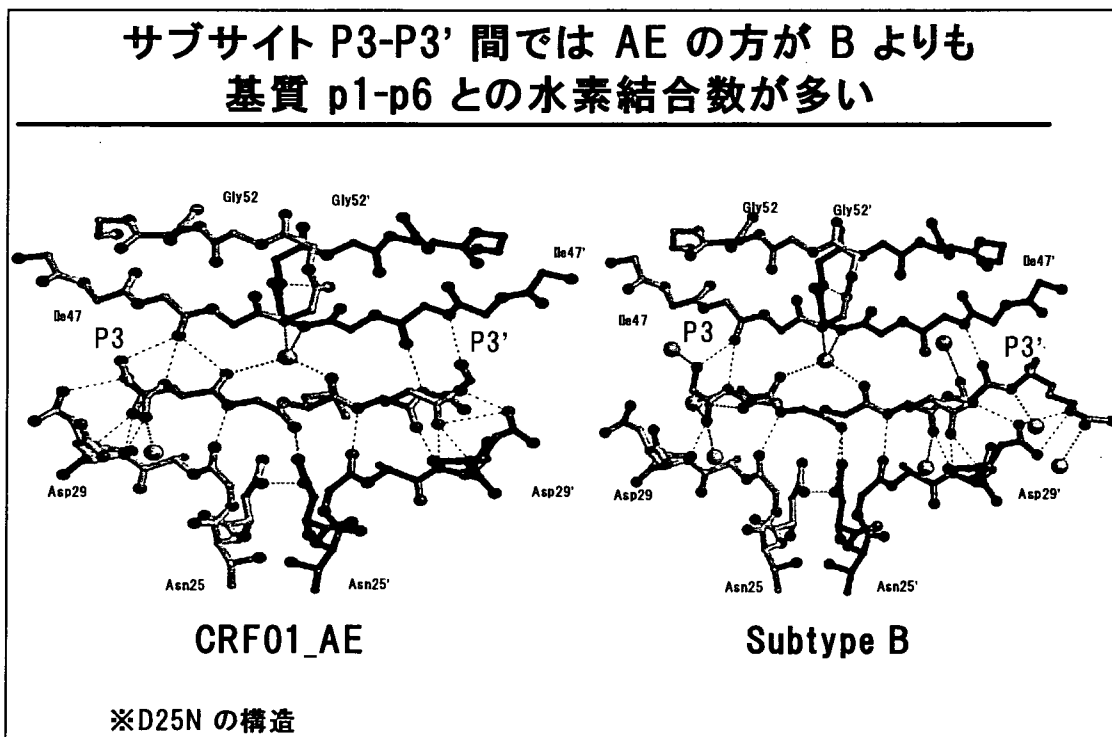
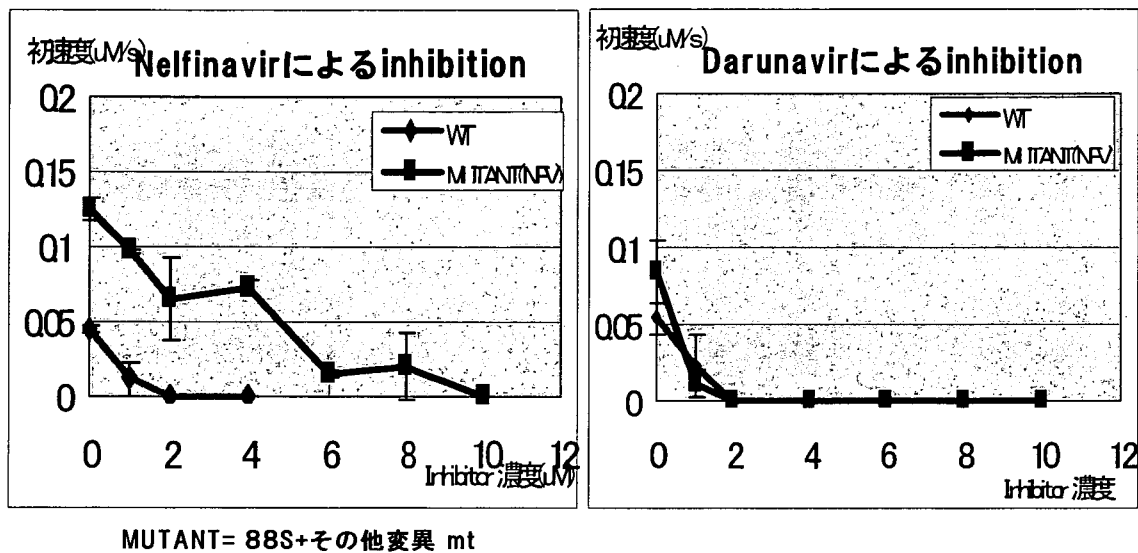


図 2



Nelfinavir 耐性変異を有する AEプロテアーゼ は Nelfinavir 耐性を示したが、 Darunavir には感受性を示した



厚生労働科学研究費補助金（社会保障国際協力推進研究事業）

分担研究報告書

HIV 感染症における免疫応答の解析とその臨床応用に関する研究

分担研究項目：粘膜における HIV 感染のメカニズム解明に向けた粘膜免疫の基礎研究

分担研究者：清野 宏 東京大学医科学研究所 教授

協力研究者：國澤 純 東京大学医科学研究所 講師

研究要旨

HIV 感染ルートに関する昨今の世界的状況は性行為を介した粘膜がその主要な侵入門とであり、さらには腸管が同ウイルスの潜伏・増殖の場として注目されている。そこで、第一線のバリアとして存在する粘膜免疫機構は多種多様な自然・獲得免疫担当細胞の宝庫であり、その機構について感染阻止メカニズム、感染防御免疫誘導などの視点から詳細に解析する必要がある。本研究計画では AIDS、HIV、ウイルス、免疫、化学療法、疫学などの研究グループと連携をはかりながら、粘膜免疫機構のユニーク性とその誘導制御機構の詳細について分子・細胞・個体レベルで解明し、AIDS 対策用ワクチン開発への基盤的情報を発信する。本年度は HIV 侵入門とである粘膜において最前線バリアを形成する上皮細胞層に存在する上皮細胞間リンパ球に焦点をあて、その遊走制御機構について検討した。

A. 研究目的

粘膜免疫機構における多様なユニーク性の一つである $\gamma\delta$ T 細胞をはじめとする腸管上皮細胞間リンパ球 (IEL) の細胞動態について、まず正常時での検討を加えて、HIV が粘膜を介して侵入する際の免疫学的応答・変化を解明する為の基盤情報を確立する。

B. 研究方法

本実験においては、上皮細胞層における自然・獲得免疫制御を行っている IEL に焦点を当て、第一線バリアとして働く同細胞群の遊走メカニズムに関して基礎的検討を進めた。脂質メディエーターであるスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) を介した遊走制御機構に着目し、S1P 受容体の発現抑制を誘導する FTY720 で処理したマウスにおける IEL の動態変化を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験については国立大学法人東京大学医科学研究所動物実験委員会が定める指針に従って行われた。

C. 研究結果

FTY720 で処理したマウスにおいては、シングルポジティブ胸腺細胞を前駆細胞とする CD4 もしくは CD8 $\alpha\beta$ 発現 IEL が減少していたが、 $\gamma\delta$ T 細胞を含む TCR 陽性ダブルネガティブ細胞などの特殊な胸腺細胞を前駆細胞とする CD8 $\alpha\alpha$ 陽性 IEL には変化が認められなかった。これらの結果と相関し、FTY720 非感受性 CD8 $\alpha\alpha$ 陽性 IEL は S1P 受容体陰性であった。

D. 考察

生体最前線において恒常性維持に関与している IEL は、S1P 依存性群と非依存性群に分類されることが判明した。これらの生理学的な意義については不明であるが、外界と直接接する腸管上皮層という特殊な環境における免疫学的多様性をもたらすための一つの機構であると考えられ、今後は HIV 粘膜感染における同 2 群 IEL 集団の応答に関して興味ある展開が期待される。

E. 結論

本研究で粘膜面からの HIV の侵入などに対して第一線のバリアを構築していると考えられる IEL に関して、脂質メディエーターである SIP に対する依存性により 2 群のリンパ球集団が存在することが明らかになった。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

(論文発表)

Kunisawa J, Kurashima Y, Higuchi M, Gohda I, Ishikawa I, Ogahara I, Kim N, Shimizu M, and **Kiyono H**. Sphingosine 1-phosphate dependence in the regulation of lymphocyte trafficking to the gut epithelium. *J. Exp. Med.* 204:2335-2348. 2007.

Kunisawa J, Takahashi I, and **Kiyono H**. Intraepithelial lymphocytes: their shared and divergent immunological behaviors in the small and large intestine. *Immunol. Rev.* 215:136-153. 2007.

Kunisawa J, Kurashima Y, Gohda M, Higuchi M, Ishikawa I, Miura F, Ogahara I, and **Kiyono H**. Sphingosine 1-phosphate regulates peritoneal B cell trafficking for subsequent intestinal IgA production. *Blood.* 109:3749-3756. 2007.

Yuki Y, Nochi T, and **Kiyono H**. Progress towards an AIDS mucosal vaccine. *Tuberculosis.* 11:35-44. 2007.

Ohka S, Igarashi H, Nagata N, Sakai M, Koike S, Nochi T, **Kiyono H**, and Nomoto A. Establishment of a poliovirus oral infection system in human poliovirus receptor-expressing transgenic mice that are deficient in alpha/beta interferon receptor. *J Virol.* 81: 7902-7912. 2007.

Fukuyama S, and **Kiyono H**. Neuroregulator RET initiates Peyer's-patch tissue genesis. *Immunity.* 26 : 393-395. 2007.

McGhee JR, Kunisawa J, and **Kiyono H**. Gut lymphocyte migration: we are halfway 'home'. *Trends Immunol.* 28: 150-3. 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1.特許取得 なし
- 2.実用新案登録 なし
- 3.その他 なし

ヒトゲノム多型性と HIV 感染に関する研究

分担研究者 塩田 達雄（大阪大学微生物病研究所教授）

研究要旨

IL7 は T 細胞の増殖を促すサイトカインで、HIV-1 感染者では血中の IL7 濃度は CD4 陽性 T 細胞数と逆相関し、その多型は治療開始後の CD4 陽性細胞数の回復速度に影響する可能性がある。我々は、IL7 の 5'非翻訳領域内の 3 塩基を欠失する多型が IL7 の翻訳効率を変化させることを見出した。また、IL7 がマクロファージにおいては、HIV-1 の増殖を中程度であるが低下させることを見出した。

A. 研究目的

本研究は、HIV-1 感染者および非感染者について、HIV-1 の生活環に関わる様々な宿主因子の遺伝的多型を検討し、病態進行や HIV-1 感染感受性の違いを決定する宿主側の因子を明らかにすることを目的とする。本年度は以下の 2 点を具体的な研究目的とした。

(1)IL7 は T 細胞の増殖を促すサイトカインで、HIV-1 感染者では血中の IL7 濃度は CD4 陽性 T 細胞数と逆相関し、治療開始後 CD4 陽性細胞数が回復するにつれ、正常値近くまで低下する。従って、その多型は治療開始後の CD4 陽性細胞数の回復速度に影響する可能性がある。本年度は、IL7 の 5'非翻訳領域内に IL7 の発現量を変化させる遺伝子多型が存在するか否かを明らかにすることを目的とした。

(2)IL7 は CD4 陽性 T 細胞においては HIV-1 の増殖を促進するが、もう一つの主要な標的細胞であるマクロファージにおいて HIV-1 増殖への影響を検討した報告はない。マクロファージにおける IL7 の HIV-1 増殖に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

(1)HIV-1 非感染者 55 名および HIV-1 感染者 99 名のゲノム DNA から、PCR 法にて IL7 遺伝子の 5'側非翻訳領域 1470 塩基ならびに第一エクソンと第一イントロンの一部を含む 1658 塩基を含む部分を増幅し、ABI の DNA シーケンサーにてその全塩基配列を決定した。得られた IL7 のプロモーター領域を、IL7 の開始コドンがホタルのルシフェラーゼ遺伝子の

オープンリーディングフレームに合うように結合したプラスミドベクターを構築し、U937 細胞ならびに Jurkat 細胞にトランスフェクションして、細胞内のルシフェラーゼ活性を測定した。

(2)末梢血単球を 100 ng/ml の GM-CSF を用いてマクロファージに分化させ 10ng/ml の IL7 存在下での HIV-1 SF162 株の増殖を検討した。

（倫理面への配慮）

HIV-1 感染者ならびに非感染者の検体を使用するにあたって、検体の提供者には遺伝子解析を行うことを含めて十分に説明を行い、書面による同意を得られた場合のみを解析の対象とし、検体は匿名化して個人情報特定できないようにして扱った。HIV-1 感染者の遺伝子解析は平成 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

(1)HIV-1 非感染者 55 名および HIV-1 感染者 99 名のゲノム DNA から、IL7 遺伝子の 5'側非翻訳領域 1470 塩基ならびに第一エクソンと第一イントロンの一部を含む 1658 塩基を含む部分を増幅し、その全塩基配列を決定した。その結果、IL7 の翻訳開始部位から上流に数えて 27 番目から 29 番目の 3 塩基 ATC が欠失する多型が解析した 154 名中 2 名において認められた。この ATC は IL7 の開始コドン上流に複数存在する ATG の一つに隣接しており、ATC の欠失によりその ATG 周辺の配列が atcATGa から gtcATGa に変化する。ATG

周辺の配列、特にこの ATG の上流 3 番目の a から g に変化した部位はその ATG からの翻訳効率に影響することから、IL7 の本来の翻訳開始コドンまでの非翻訳領域をルシフェラーゼのオープンリーディングフレームに結合したプラスミドを作成し、この欠失が、ルシフェラーゼの発現に及ぼす影響を検討した。その結果、この 3 塩基の欠失により、IL7 の本来の翻訳開始コドンからのルシフェラーゼの発現が増強されることが明らかとなった。

(2) 10ng/ml の IL7 の添加により、センダイウイルスの増殖は影響されなかったが、HIV-1SF162 の増殖は半分程度に減少した。

D. 考察

(1) IL7 の 5'非翻訳領域内の本来の開始コドンより上流にある ATG に隣接する ATC が欠失する多型により、本来の ATG からの遺伝子発現が増強することが明らかとなった。翻訳開始コドン近傍の多型によって遺伝子発現量に変化する例としては、annexin V、BRCA1、androgen receptor、および CD40 などが知られているが、これらはいずれも本来の翻訳開始コドン近傍の多型による影響であり、本来の開始コドンよりも上流にある ATG 近傍の多型によって遺伝子発現量に変化するものとしては、この IL7 が初めての例になる。

(2) IL7 は HIV-1 感染者の低下した CD4 陽性細胞を回復させるための薬剤として使用できるか否かの検討がなされている。本研究の結果は、IL7 の HIV-1 感染者における免疫活性化因子としての有用性を支持するものである。

E. 結論

(1) T 細胞の増殖を促すサイトカインである IL7 の遺伝子の 5'非翻訳領域内の 3 塩基を欠失する多型が IL7 の翻訳効率を変化させることを見出した。

(2) IL7 がマクロファージにおいては、HIV-1 の増殖を中程度であるが低下させることを見出した。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

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. 2007;34:107-13.

Nuanjun Wichukchinda, Archawin Rojanawiwat, Yoshihiro Kitamura, Emi E Nakayama, Panita Pathipvanich, Wattana Auwanit, Pathom Sawanpanyalert, Aikichi Iwamoto, Tatsuo Shioda, and Koya Ariyoshi. The polymorphisms in *DC-SIGNR* affect the susceptibility to HIV-1 infection. AIDS. Res. Hum. Retrovir. 2007;23:686-92.

Raphael Lwembe, Washington Ochieng, Annie Panikulam, Charles O. Mongoina, Mary Owens, Yusuke Koizumi, Seiji Kageyama, Naohiko Yamamoto, Tatsuo Shioda, Rachel Musoke, Angel D'Agostino, Elijah M. Songok, Hiroshi Ichimura. Anti-Retroviral Drug Resistance-Associated Mutations Among Non-subtype B HIV-1-Infected Kenyan Children With Treatment Failure. J. Med. Virol. 2007;79:865-72.

Masahisa Ohishi, Tatsuo Shioda, and Jun-ichi Sakuragi. Retro-transduction by virus pseudotyped with glycoprotein of vesicular stomatitis virus. Virology. 2007;362:131-8.

Yusuke KOIZUMI, Seiji KAGEYAMA, Yoshihide FUJIYAMA, Michiko MIYASHITA, Raphael LWEMBE, Keiki OGINO, Tatsuo SHIODA, Hiroshi ICHIMURA. RANTES -28G delays and DC-SIGN -139C enhances AIDS progression in HIV-1-infected Japanese hemophiliacs. AIDS Research and Human Retroviruses. 2007;23:713-9.

Nakayama EE, Carpentier W, Costagliola D, Shioda T, Iwamoto A, Debre P, Yoshimura K, Autran B, Matsushita S, Theodorou I. Wild type and H43Y variant of human TRIM5alpha show similar anti-human immunodeficiency virus type 1 activity both in vivo and in vitro. Immunogenetics. 2007 ;59:511-5.

Song H, Nakayama EE, Yokoyama M, Sato H, Levy JA, Shioda T. A single amino acid of the human immunodeficiency virus type 2 capsid affects its replication in the presence of cynomolgus monkey and human TRIM5alphas. J Virol. 2007;81:7280-5.

Sakuragi J, Sakuragi S, Shioda T. Minimal

region sufficient for genome dimerization in the human immunodeficiency virus type 1 virion and its potential roles in the early stages of viral replication. *J Virol.* 2007;81:7985-92.

Koh Y, Matsumi S, Das D, Amano M, Davis DA, Li J, Leschenko S, Baldrige A, Shioda T, Yarchoan R, Ghosh AK, Mitsuya H. Potent inhibition of HIV-1 replication by novel non-peptidyl small molecule inhibitors of protease dimerization. *J Biol Chem.* 2007;282:28709-20.

Liu H, Nakayama EE, Theodorou I, Nagai Y, Likansakul S, Wasi C, Debre P, Iwamoto A, Shioda T. Polymorphisms in CCR5 chemokine receptor gene in Japan. *Int J Immunogenet.* 2007;34:325-335.

Louisiriratchanakul S, Sutthent R, Wasi C, Chuenchitra T, Nitayaphan S, Brown AE, Polonis VR, Nakayama EE, Shioda T, Liu H, Takebe Y. Host Genetic Analysis of HIV-1 Subtype CRF01_AE(E)-Infected Thai Patients with Different Rates of Disease Progression. *AIDS Research and Human Retroviruses.* 2007;23:1605-1607

Sugimoto C, Nakayama EE, Shioda T, Villinger F, Ansari AA, Yamamoto N, Suzuki Y, Nagai Y, Mori K. Impact of Glycosylation on Antigenicity of Simian Immunodeficiency Virus SIV239: Induction of Rapid V1/V2 Specific Non-neutralizing Antibody and Delayed Neutralizing Antibody Following Infection with an Attenuated Deglycosylated SIV239 Mutant. *Journal of General Virology.* 2008;89:554-66.

Hosoya N, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Koibuchi T, Shioda T, Odawara T, Nakamura T, Kitamura Y, Kano M, Kato A, Hasegawa M, Nagai Y, Iwamoto A. Comparison between Sendai virus and Adenovirus vectors to transduce HIV-1 genes into human dendritic cells. *Journal of Medical Virology.* in press

Nuanjun Wichukchinda, Emi E Nakayama, Archawin Rojanawiwat, Panita Pathipvanich, Wattana Auwanit, Suthon Vongsheree, Koya Ariyoshi, Pathom Sawanpanyalert, and Tatsuo Shioda. Effects of CCR2 and CCR5 polymorphisms on HIV-1 infection in Thai females. *Journal of AIDS.* in press

Ken Kono, Haihan Song, Yasuhiro Shingai, Tatsuo Shioda and Emi E. Nakayama. Comparison of anti-viral activity of rhesus monkey and cynomolgus monkey TRIM5αs against HIV-2 infection. *Virology.* in press

Jun-ichi Sakuragi, Sayuri Sakuragi, Masahisa Ohishi, and Tatsuo Shioda. A rapid recombination assay of HIV-1 using murine CD52 as a novel biomarker. *Microbes and Infection.* in press

Nakayama, EE., Shingai, Y., Kono, K. and Shioda, T. TRIM5α-independent anti-human immunodeficiency virus type 1 activity mediated by cyclophilin A in Old World monkey cells. *Virology.* In press

2. 学会発表

Song H, Nakayama EE, Yokoyama M, Sato H, Levy JA, Shioda T. A single amino acid of the human immunodeficiency virus type 2 capsid affects its replication in the presence of cynomolgus monkey and human TRIM5αs. Conference for Retrovirus and Opportunistic Infection 2008, Boston, USA.

中山英美、塩田達雄。サイクロフィリン A の HIV-1 感染阻害効果。第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌。

櫻木淳一・櫻木小百合・塩田達雄 HIV-1 ゲノム組換え標的の必要条件 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌。

大石真久・櫻木淳一・塩田達雄 HIV-1 のゲノム二量体化とウイルス粒子成熟との相関に関する研究 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌。

櫻木淳一・塩田達雄 HIV-1 ゲノム組換え標的の必要条件に関する解析 第 21 回日本エイズ学会学術集会、広島。

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし