

HIV 感染者における慢性的な免疫活性化と T 細胞疲弊の要因

研究分担者 立川 愛 東京大学医科学研究所
先端医療研究センター感染症分野 准教授
研究協力者 細谷 香 東京大学医科学研究所

研究要旨：

HIV 感染慢性期において病態進行の早い高 HIV 量の感染者では CD4⁺T 細胞における IL2 遺伝子が高度にメチル化されており、非特異刺激に対する IL2 低発現と関連していることを見いだした。CD4⁺T 細胞における IL2 遺伝子の DNA メチル化状態はサブセット間で大きく異なっており、最終分化段階にあり細胞老化のマーカーである CD57 を発現する CD4⁺T 細胞は他のメモリー CD4⁺T 細胞に比して高度にメチル化されていること、高 HIV 量の感染者では CD57 陽性 CD4⁺T 細胞が高頻度に存在することから、HIV 感染では CD4⁺T 細胞の老化に伴うエピジェネティックな制御による IL2 遺伝子発現抑制が T 細胞機能不全の一因であることが示唆された。

A. 研究目的

HIV 感染症において、エイズ発症のメカニズムは未だ明らかとなっていない。HIV に感染してからエイズ発症までの期間は感染者によって大きく異なり、未治療の感染者において感染後 1 年でエイズを発症する場合もあれば、長期未発症者と呼ばれる感染者では 20 年以上エイズを発症しない場合もある。このような感染者間では宿主側あるいはウイルス側になんらかの相違があると考えられ、その相違を明らかにすることはエイズ発症のメカニズムを明らかにするために重要な研究テーマである。

近年の研究により、HIV 慢性感染期では T 細胞が持続的な活性化により疲弊することで機能が低下していることが明らかとなってきた。T 細胞の疲弊は HIV 特異的 T 細胞に限らず T 細胞全体に起きているため、抗原特異的な刺激による活性化のみならず免疫システム全体の持続的活性化に起因するものと考えられる。しかしながら慢性感染症の中でも HIV 感染症に特有に見られる T 細胞疲弊の背景にある分子メカニズムは明らかになっていない。

血中 HIV 量はエイズ発症までの期間と相関の見られる臨床指標の一つであり、HIV 感染症の免疫病態を考える上で最も重要な指標である。エイズ発症のメカニズムを明らかにするためには、血

中 HIV 量の異なる感染者における T 細胞について、詳細な解析を行うことが有効であると考えられる。昨年度は血中 HIV 量の高い感染者（高 HIV 群）と低い感染者（低 HIV 群）における免疫細胞の機能的な違いの評価を行った。その結果、高 HIV 群では低 HIV 群に比べ刺激後短時間での PBMC による IL2 遺伝子発現が低下しており、CD4⁺T 細胞の IL2 遺伝子プロモーター/エンハンサー領域の転写開始部位直近の CpG 部位 (CpG1) が高度にメチル化されていることを明らかにした。これら IL-2 発現量と CpG1 のメチル化状態は負の相関が見られたことから、IL-2 の遺伝子発現制御には CpG1 メチル化が重要であること、高 HIV 群では DNA メチル化により IL2 発現が抑制されていることを明らかにした。

PBMC 中の CD4⁺T 細胞は多様なサブセットからなる。IL2 遺伝子は Naïve T 細胞では高度にメチル化されていることが知られており、試験管内での TCR 刺激により脱メチル化されることが知られているが、末梢血中の CD4⁺T 細胞における状態は解析されていない。本年度は、末梢血中 CD4⁺T 細胞の IL2 遺伝子プロモーター領域の CpG 部位のメチル化について詳細に解析を行い、高 HIV 群における IL-2 遺伝子の高度メチル化に関連する要因を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

研究対象

東京大学医科学研究所附属病院を受診する HIV 感染者を対象とした。未治療の慢性感染者で血中 HIV 量が高い感染者 (>25,000 copies/ml)、低い感染者 (<1,400 copies/ml) の末梢血単核球 (PBMC) を用いた。一部の解析には健常人の PBMC を解析に用いた。

定量 RT-PCR による mRNA 発現量の解析

PBMC を PHA にて刺激し、2.5 時間培養後に PBMC から RNA を抽出し逆転写反応を行い、IL-2 をコードする遺伝子の mRNA 量を real-time PCR により定量した。

CD4⁺T 細胞中のサブセットの分取

CD4⁺T 細胞中の各分化段階での DNA のメチル化を解析するため、健常人の PBMC を用いて、抗 CD3, CD4, CD8 抗体と同時に分化段階のマーカーである CD45RA, CCR7, CD27, CD28、あるいは CD57 に対する抗体で多重染色を行い分画し、セルソーターを用いて各細胞集団を分取した。

ゲノム DNA のメチル化解析

分画した細胞から DNA を抽出し、バイサルファイト処理した後、解析対象とした IL-2 の遺伝子のプロモーター/エンハンサー領域を PCR にて増幅後、シーケンス解析を行った。

フローサイトメトリーによる CD4⁺T 細胞の性状、機能解析

PBMC を用いて、抗 CD3, CD4, CD8, CD45RA, CCR7, CD57 に対する抗体で多重染色を行い、発現パターンの解析をフローサイトメトリーにより行った。また PMA/ionomycin にて非特異刺激を加えた後、IL-2 産生を細胞内サイトカイン染色にて解析した。

(倫理面への配慮)

臨床材料の提供を受ける場合には研究目的や必要事項を文書を用いて説明し、書面でインフォームドコンセントを得た。研究対象者への負担は、临床上必要な採血に加えての少量の血液採取のみであり、倫理面への問題はないと判断される。本研究内容は東京大学医科学研究所倫理審査委員会により承認されている。

C. 研究結果

各 CD4⁺T サブセットにおける IL2 遺伝子のメチル化状態を明らかにするため、CD45RA, CCR7, CD27, CD28 の発現パターンにより分画し、CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺CD28⁺ (Naïve)、CD45RA⁻CCR7⁺CD27⁺CD28⁺ (central memory (CM))、CD45RA⁻CCR7⁻CD27⁺CD28⁺ (early effector memory (E-EM))、CD45RA⁻CCR7⁻CD27⁻CD28⁺ (intermediate effector memory (I-EM))、CD45RA⁻CCR7⁻CD27⁻CD28⁻ (late-effector memory (L-EM)) の各分画について、IL2 遺伝子のメチル化解析を行った。Naïve 細胞における CpG1 は高頻度にメチル化されているのに対して、CM, E-EM, I-EM 細胞における CpG1 は殆ど脱メチル化されていた。一方で、最終分化細胞である L-EM 細胞では再メチル化されており、CM, E-EM, I-EM 細胞に比べて有意にメチル化 DNA の頻度が高かった。

また、細胞老化のマーカーである CD57 の発現は IL-2 発現低下との関連が報告されていることから、CD57 の発現と IL-2 遺伝子メチル化の関連性についても解析を行った。Naïve, CM, E-EM では CD57 の発現が認められなかったのに対し、分化が進むほど CD57 の発現が上昇し、L-EM 細胞で最大の発現が見られた。CD4⁺T 細胞中のメモリー (CD45RA⁻) 分画における CD57⁻細胞、CD57⁺細胞での IL2 遺伝子のメチル化解析を行ったところ、CD57⁺細胞に比べて CD57⁻細胞で有意に高いメチル化状態を示した。CD57⁺CD4⁺T 細胞は PMA/イオノマイシンを用いた強い T 細胞刺激を行っても IL-2 の産生は認められなかったことから、CD4⁺T 細胞において、最終分化した L-EM 分画の CD57⁺細胞では IL2 遺伝子が再メチル化されることで IL-2 の発現が抑制されている可能性が示唆された。

CD4⁺T 細胞における CD57 の発現を HIV 感染者群間で比較したところ、CD57 の発現は低 HIV 群に比べて高 HIV 群で有意に高く、IL2 遺伝子の CpG1 メチル化との間には正の相関が見られた。さらに、非特異刺激後の IL-2 産生量とは負の相関を示した。これらの結果から、高 HIV 群では IL2 遺伝子が高度にメチル化された CD57⁺CD4⁺T 細胞が蓄積することで IL-2 産生が抑制されていることが示唆された。

D. 考察

naïve CD4⁺T 細胞では IL2 遺伝子プロモータ

一領域はほぼ完全にメチル化されており、メモリーへ分化すると脱メチル化されるが、最終分化段階であり CD28-の L-EM 細胞で再メチル化されていた。T 細胞の活性化には CD28 からの補助刺激が必須であることが知られており、本研究結果は CD28 からの補助刺激が IL2 遺伝子メチル化の制御に関連している可能性を示唆している。さらに、L-EM で高頻度に発現が見られる CD57 を発現する細胞でも同様に高度メチル化が観察された。CD57⁺メモリーT 細胞では IL-2 産生が著しく低下していたことから、HIV 慢性感染では、エピジェネティックな制御により IL-2 産生能が低下した老化 CD4⁺T 細胞が蓄積していることが明らかとなった。IL-2 は T 細胞の増殖因子であるだけでなく、CD4⁺T 細胞におけるサイトカイン産生、また CD8⁺T 細胞の機能にも影響を及ぼすため、本研究で見られた CD4⁺T 細胞における IL-2 遺伝子の高度メチル化が、高 HIV 群における T 細胞の様々な機能不全の一因であることが示唆された。

E. 結論

病態進行の早い高 HIV 量の感染者で CD4⁺T 細胞において IL2 遺伝子が高度にメチル化されていた。IL2 遺伝子は細胞老化に伴い再メチル化されており、HIV 感染慢性期では老化した CD4⁺T 細胞の蓄積により IL-2 発現が低下していると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimizu A, Kawana-Tachikawa A, Yamagata A, Han C, Zhu D, Sato Y, Nakamura H, Koibuchi T, Carlson J, Martin E, Brumme CJ, Shi Y, Gao GF, Brumme ZL, Fukai S, Iwamoto A. Structure of TCR and antigen complexes at an immunodominant CTL epitope in HIV-1 infection. *Sci Rep.* 3:3097, 2013
- 2) Teeranaipong P, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Fujii T, Koibuchi T, Nakamura H, Koga M, Kondo N, Gao GF, Hoshino H, Matsuda Z, Iwamoto A. Development of a rapid cell-fusion-based phenotypic HIV-1 tropism assay. *J Int AIDS Soc.* 16:18723, 2013.
- 3) Nishimura T, Kaneko S, Kawana-Tachikawa A, Tajima Y, Gotoh H, Zhu D, Nakayama K,

Iriguchi S, Uemura Y, Shimizu T, Takayama N, Yamada D, Nishimura K, Ohtaka M, Watanabe N, Takahashi S, Iwamoto A, Koseki H, Nakanishi M, Eto K, Nakauchi H. Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by pluripotency reprogramming and redifferentiation. *Cell Stem Cell.* 12:114-26, 2013.

2. 学会発表

- 1) Kaori Nakayama-Hosoya, Takaomi Ishida, Noriaki Hosoya, Hitomi Nakamura, Michiko Koga, Tomohiko Koibuchi, Aikichi Iwamoto, Ai Kawana-Tachikawa. Low IL-2 expression by epigenetic modification is associated with immunosenescence in HIV non-controllers. Keystone symposia, HIV Pathogenesis – Virus vs Host. Banff, Alberta, Canada, Mar 2014.
- 2) Meribe SC, Hasan Z, Gatanaga H, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Oka S, Ueno T. Linkage between disease status and a naturally-arising mutation in functional region of HIV-1 Nef. 21th conference on retroviruses and opportunistic infections. Boston, USA. Mar 2014.
- 3) Kawana-Tachikawa A. The 9th China-Japan Laboratory Workshop: Pathogenesis, Gene regulation, and signal transduction. “Interaction between virus and host immune response during chronic HIV-1 infection.”, Beijing, China, Nov 2013.
- 4) Kaori Nakayama-Hosoya, Takaomi Ishida, Noriaki Hosoya, Hitomi Nakamura, Michiko Koga, Tomohiko Koibuchi, Aikichi Iwamoto, Ai Kawana-Tachikawa. The essential role of epigenetic regulation for CD4⁺ T cell dysfunction during chronic HIV-1 infection. AIDS Vaccine 2013 Conference. Barcelona, Spain, Oct 2013.
- 5) Meribe SC, Kawana-Tachikawa A, Takamasa Ueno T. Naturally arising amino-acid polymorphisms within functional regionso of HIV-1 Nef influence viral persistence in vivo. 第42回日本免疫学会学術集会, 千葉, 2013年12月.
- 6) 石坂彩, 立川(川名)愛, 中村仁美, 古賀道子, 細谷紀彰, 鯉淵智彦, 野本明男, 岩本愛吉, 水谷莊利. HIV-1陽性者末梢血からのHIV-1短鎖RNAの検出および定量法の確立. 第27回日本エイズ学会学術集会, 熊本, 2013年11月.

- 7) 立川 (川名) 愛、韓忠勇、清水晃尚、細谷紀彰、中村仁美、古賀道子、鯉渕智彦、いわ本愛吉. 重複するCTLエピトープ部位に生じた1アミノ酸変異によるエピトープの消滅と出現. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013年11月.

Ⅱ. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

HIV 複製を自発的に制御する感染者群でのウイルス蛋白質 Nef の 機能と免疫活性化における役割

研究分担者 上野貴将 熊本大学エイズ学研究センター 准教授

研究要旨：非常に稀ではあるが（全感染者の1%以下）、自身の免疫系で HIV-1 を制御する感染者が知られておりエリートコントローラー（EC）と呼ばれている。EC では、慢性的な免疫活性化は多くの場合認められないため、ウイルス制御や HIV 感染に伴う免疫活性化を研究する上で良いモデルとなりうる。本研究では、免疫活性化に直接的に関わると考えられているウイルス蛋白質である Nef に着目し、EC 由来 Nef の遺伝的、機能的、構造的な特徴を解析した。その結果、EC 由来の Nef では多くの機能が減弱化されており、機能減弱化に関連するアミノ酸変異の多くが HLA アリルと相関していた。こうしたことから、EC で見られる HLA 拘束性免疫応答が、選択圧を通じて、Nef 蛋白質の機能の減弱化に関与していると考えられた。

A. 研究目的

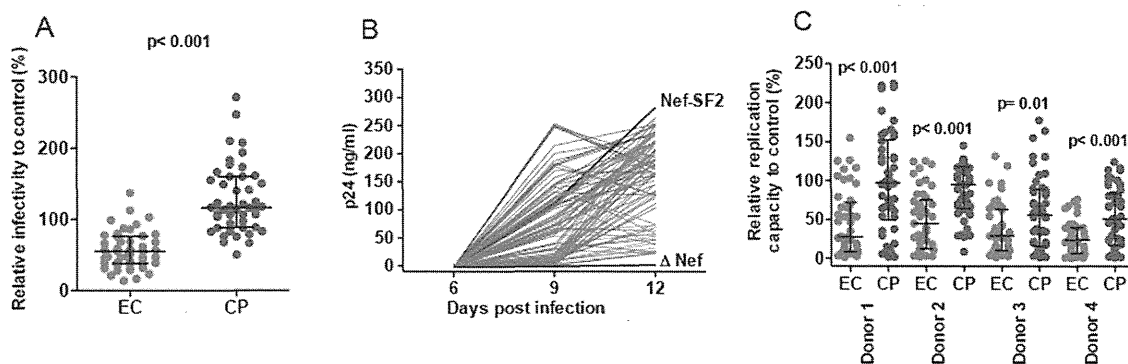
HIV 感染の慢性期には、免疫系は全身的に活性化され、細胞性免疫系による抗原特異的な抗ウイルス機能は疲弊する。一方、非常に稀ではあるが（全感染者の1%以下）、自身の免疫系で HIV-1 を制御する感染者が知られておりエリートコントローラー（EC）と呼ばれている。こうした感染者では、慢性的な免疫活性化は多くの場合認められないため、ウイルス制御や HIV 感染に伴う免疫活性化を研究する上で良いモデルとなりうる。本研究では、免疫活性化に直接的に関わると考えられているウイルス蛋白質である Nef に着目する。EC 由来の Nef について、慢性感染者由来の Nef を比較対照群として、その機能的、遺伝学的特徴を解析した。

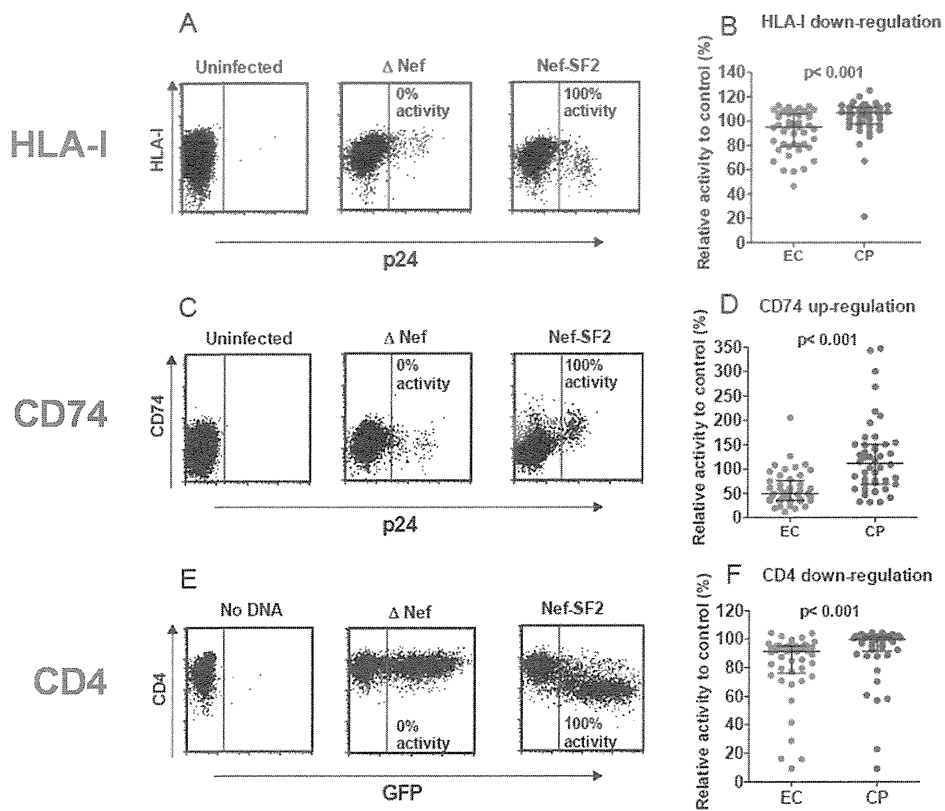
B. 研究方法

ボストン地区で集められた45名の EC および46名の慢性感染期の HIV 感染者の血漿から、ウイルス RNA を抽出し、nef 遺伝子を増幅、クローニングした。pNL43 の nef 領域と入れ替えて、組換えウイルスを作成した。これを用いて、Nef のさまざまな機能解析を行った。

（倫理面への配慮）

HIV 感染者のリクルートと、検体の採取は、米国マサチューセッツ総合病院で実施した。すべての感染者から同意文書に承諾を得ている。感染者の個人情報入手していない。また、研究の実施に当たっては、熊本大学の倫理審査会の審議を受け、承認を得ている。承認を受けた研究計画に厳密にしたがって遂行した。





C. 研究結果

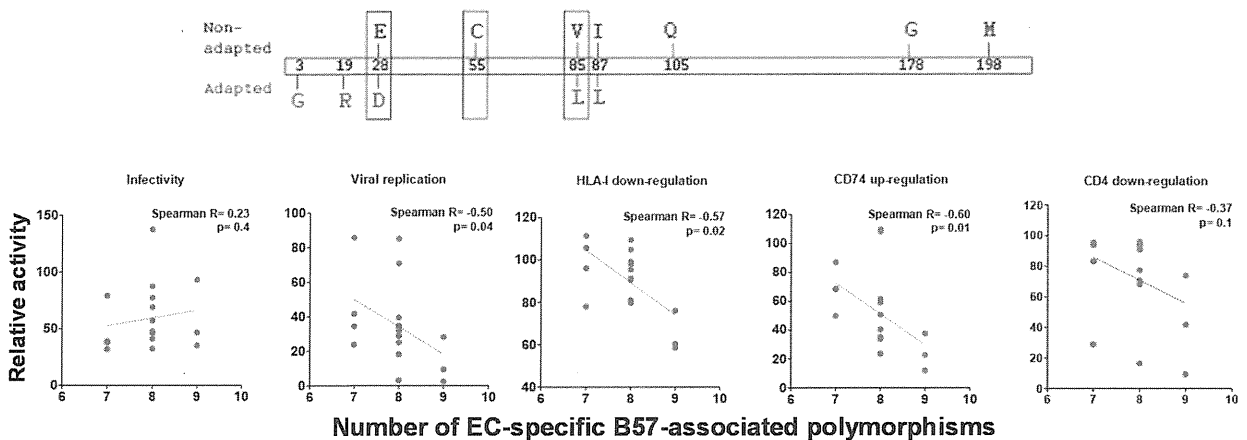
(1) ウイルス感染および複製への影響。

HIV-1 Nef は、ウイルス粒子の感染性を増強するとともに、未刺激の PBMC を用いたウイルス複製を昂進させることが知られている。EC と CP 由来の Nef を持つ組換えウイルスを用いて、両方の機能を測定したところ、それぞれのグループの中央値と比較すると、EC 由来の Nef では統計的に有意に CP 由来 Nef に比較して機能が減弱化していた (図 1A, 1B)。また、PBMC ドナーによって、ウイルス複製は異なるため、4 人の健康人由来の PBMC を用いた。どのドナーに

おいても、EC 由来 Nef の方が低い活性を示した (図 1C)。

(2) 細胞表面抗原発現への影響。

Nef は、HLA クラス I (HLA-I) や CD4 分子の細胞表面での発現を低下させる。一方、Nef は CD74 分子の発現を昂進させる。これらの活性を測定したところ、同じく中央値と比較すると、EC 由来 Nef の方が CP 由来 Nef に比べて有意に減弱化していた (図 2A, 2B, 2C)。



(3) EC で特徴的に見られるアミノ酸多型と Nef 機能との関連。

nef 遺伝子配列を調べたところでは、EC および CP 間に系統樹上の顕著な違いや、クラスターなどは認められなかった(データ未掲載)。一方、EC と CP 間の Nef 機能の差から、EC 由来 Nef にある何か共通のアミノ酸多型あるいは変異が、Nef 機能の差として現れて来るものと考えた。そこで、EC と CP 由来の Nef のアミノ酸配列で、どちらかに有意に頻度高く認められるコドンを検索した。その結果、11個のアミノ酸多型が EC 由来 Nef に有意に多く認められた。一方、HLA-B57 を持つ感染者は EC に有意に多く認められる。EC 由来の Nef で、HLA-B57 を有する検体に多く認められる Nef 多型を調べたところ、先ほどの11個のうち、9個が相当することが分かった(図3)。9か所のうち、3か所のアミノ酸多型は、Nef クローンによって配列がことなっていた。そこで、これらの変異の有無と、各 Nef 機能との相関を調べたところ、非常に興味深いことに、変異の総数と機能に逆相関が認められた。解析した5つの機能のうち、4つで同様の傾向が認められた(図3)。

D. 考察

EC では、自身の免疫系で HIV-1 複製が制御されていると考えられている。病原性との関連が強い Nef の機能が、こうした感染者で減弱化されており、機能に関連するアミノ酸変異の多くが HLA アリルと相関していた。こうしたことから、EC で見られる HLA 拘束性免疫応答が、選択圧を通じて、Nef 蛋白質の機能の減弱化に関与していると考えられた。

E. 結論

薬剤治療なしに HIV-1 複製が制御されている検体では、Nef の機能が有意に減弱化されていることが明らかとなった。また、こうした減弱化には、ヒト宿主の免疫系が関与していると示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mwimanzi P, Markle TJ, Ogata Y, Martin E, Tokunaga M, Mahiti M, Kuang XT, Walker BD, Brockman MA, Brumme ZL, Ueno T. Dynamic range of Nef functions in chronic HIV-1 infection. *Virology* 439:74-80, 2013
- 2) Motozono C, Miles JJ, Hasan Z, Gatanaga H, Meribe SC, Price DA, Oka S, Sewell AK, Ueno T. CD8⁺ T cell cross-reactivity profiles and HIV-1 immune escape towards an HLA-B35-restricted immunodominant Nef epitope. *PLoS ONE* 8: e66152, 2013
- 3) Motozono C, Yokoyama M, Sato H, Ueno T. Cross-reactivity analysis of T cell receptors specific for overlapping HIV-1 Nef epitopes of different lengths. *Microbes Infect* 2014 in press

2. 学会発表

- 1) Stanley M, Kawana-Tachikawa A, Ueno T. Naturally arising amino-acid polymorphisms within functional regions of HIV-1 nef influence viral persistence in vivo. Annual meeting of the Japanese Society for Immunology, Dec 11-13, 2013
- 2) Stanley M, Hasan Z, Gatanaga H, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Oka S, Ueno T. Effects of naturally occurring polymorphisms in functional domains of HIV-1 nef on in vivo disease progression. The 27th Annual meeting of Japanese Society for AIDS Research, Nov 20-22, 2013
- 3) Mahiti M, Mwimanzi P, Ogata Y, Tokunaga M, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Ueno T. Differential modulation of Nef-mediated downregulation activity of HLA-A and B in HIV-1 chronic infection. The 27th Annual meeting of Japanese Society for AIDS Research, Nov 20-22, 2013
- 4) 豊田真子, Mwimanzi P, Markle TJ, 緒方陽子, Mahiti M, Brumme ZL, Brockman MA, 上野貴将: HIV-1 感染者由来の Nef を用いた機能ドメインの解析、第 27 回日本エイズ学会 学術集会・総会-熊本、2013 年 11 月 20 日-11 月 22 日
- 5) Mahiti M, Mwimanzi P, Ogata Y, Tokunaga M, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Ueno T. Impact of naturally-occurring HIV-1 polymorphisms on differential modulation of Nef-mediated down-regulation between HLA class I loci. 61st Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Kobe International Conference Center, Kobe, Japan.

- November 10th-12th, 2013
- 6) Stanley M, Hasan Z, Gatanaga H, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Oka S, Ueno T. Acceleration of disease Progression by a single naturally-arising polymorphism, within functional region of HIV-1 nef. 14th Kumamoto AIDS Seminar, Oct 29-31, 2013
- 7) Mahiti M, Mwimanzi P, Ogata Y, Tokunaga M, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Ueno T. Differential modulation of Nef-mediated downregulation activity of HLA class I alleles in HIV-1 chronic infection. 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan. October 29-31, 2013
- 8) Kamori D, Hasan Z, Gatanaga H, Oka S, Miura T, Iwamoto A, Kawana-Tachikawa A, Ueno T. HLA-A*02 allelic variants differently influence amino acid polymorphisms in an immunodominant epitope of HIV-1 Vpr. 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan. October 29-31, 2013
- 9) Toyoda M, Mwimanzi P, Mahiti M, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Ueno T. Analysis of naturally-occurring polymorphisms of HIV-1 Nef that impair CD4 down-regulation activity. 14th Kumamoto AIDS Seminar, Oct 29-31, 2013
- 10) Mahiti M, Mwimanzi P, Ogata Y, Tokunaga M, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Ueno T. Differential Nef-mediated down-regulation of HLA-A and B in chronic HIV-1 infection. Immune Activation in HIV Infection: Basic Mechanisms and Clinical Implications (D2), [Breckenridge, Colorado USA] April 3-8, 2013
- 11) Mahiti M, Mwimanzi P, Ogata Y, Tokunaga M, Walker BD, Brumme ZL, Brockman MA, Ueno T. Naturally-arising amino acid polymorphisms of HIV-1 Nef that differentially modulate downregulation of HLA-A and HLA-B molecules. Frontiers of Retrovirology conference, at Churchill College, Cambridge, UK. September 16th -18th 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし。
2. 実用新案登録
該当なし。

慢性的免疫活性化制御因子の機能解析

研究分担者 小柳 義夫 京都大学ウイルス研究所 教授
研究協力者 佐藤 佳 京都大学ウイルス研究所 助教
研究協力者 三沢 尚子 京都大学ウイルス研究所 技術補佐員

研究要旨： HIV 感染者にみられる免疫細胞の活性化は、HIV 感染による病態悪化に関わる主要因となる。しかし、その成立メカニズムは未だ不明な点が多い。本研究は、HIV 感染者における制御性 T 細胞がどのように病態悪化に関与するかを明らかにするために、ヒト化マウスを用いて解析した。制御性 T 細胞は、生体内できわめて高い細胞増殖活性を有し、HIV 補受容体である CCR5 の高発現状態にあった。そして、HIV-1 ならびに制御性 T 細胞を特異的に破壊する抗体薬の投与によって誘導された制御性 T 細胞の枯渇状態では、メモリー T 細胞の異常活性化が生じ、生体内の HIV-1 の複製全体を亢進することがわかった。この制御性 T 細胞への感染には、Vpr というウイルス性因子が関与し、感染細胞を G2M 期へ停止させ、それに続くアポトーシスを生じさせると明らかにした昨年との結果とともに、生体内のウイルス感染においては制御性 T 細胞が重要な役割を担っていることがわかった。

A. 研究目的

HIV の慢性的免疫活性化を制御する宿主細胞因子群についてのその機能を明らかにする。HIV の感染により直接的に影響をうける CD4 陽性細胞が関与する免疫反応は、胸腺組織で産出された CD4 ナイーブ細胞 (Tn)、末梢組織で外来抗原に速やかに反応する CD4 メモリー細胞 (Tm)、そして、それらの反応に抑制的に働く T 細胞である CD4 制御性 T 細胞 (Treg) から構成される。いずれの CD4 陽性 T 細胞は HIV 感染により障害をうけるが、その障害の程度ならびに個体内における分布と動態は、適切な機能解析動物モデルが開発されていないために、不明であった。本研究は、HIV 感染時の免疫活性化制御因子について、HIV-1 感染ヒト化マウスという動物モデルを始点にして、ウイルス学的解析まで進展させた。

B. 研究方法

ヒト血液幹細胞移植 NOG マウス (ヒト化マウス) への CCR5 指向性 HIV-1 株 (JR-CSF 株) の野生型ならびに Vpr 欠損ウイルスをマウスの腹腔から接種後、感染後経時的 (7 日目、14 日目、21 日目) に眼窩静脈から採血を行い、CD3⁺CD4⁺ の Tn (CD45R0⁻)、Tm (CD45R0⁺)、Treg (FOXP3⁺) の

細胞数ならびに、上記採取日に加え 2 日目、4 日目に採血を行い血漿ウイルス RNA 量 (Viral load, VL) を測定した。Treg の枯渇実験として、リシン付加抗 CD25 単クローナル抗体薬である denileukin diftitox (DD) の腹腔内投与をおこなった。さらに、flow cytometry 法により細胞分子の発現量を測定した。ヒト化マウスの作製はこれまで報告者らが独自に開発した方法に準じた (Virology 394:64-72, 2009, J. Virol. 84:9546-9556, 2010, Vaccine, 28S2:B68-B74, 2010, Blood 117:5663-5673, 2011)。

(倫理面への配慮)

ヒト由来の試料として提供者の同意のもとに採取を行い、その利益ならびに人権保護の取り扱いに十分配慮した。京都大学の医の倫理委員会承認済みである。実験動物に対する動物愛護上の配慮を考慮した実験計画は京都大学動物委員会承認済みである。組換え DNA 実験についても、P3 レベルの物理的封じ込めの必要な大臣確認実験も含め承認済みである。

C. 研究結果

ヒト化マウスへの DD 投与の 3 日後の末梢血 (PB) における白血球細胞数 (WBC)、総 CD4⁺ T (total CD4) 細胞数、Tn 数、Tm 数には、DD 非投与群と

比べて、細胞数の大きな差異は見出せなかった。一方、Treg は、DD 投与によってほとんど消失した (図 1A と B の Post)。これらのマウス内のヒト CD8 陽性メモリー細胞の活性化状態を MKi67 抗原陽性率で検討したところ、あきらかに DD 投与によって MKi67 抗原陽性細胞が大幅に増加した (図 1C)。CD4 陽性細胞では、Tn ではその増加がみられなかったがメモリー細胞である Tm では MKi67+細胞の増加がみられた (図 1D)。そして、それら Tn ならびに Tm 細胞表面の CCR5 の陽性率は明らかに増加していた (図 1E)。次に、Treg 枯渇環境における、HIV-1 の感染性を検討した。Treg への感染性が優る野生型の HIV-1 と Treg への感染性が劣る Vpr 欠損 HIV-1 をそれぞれ接種後、継続的に採血し、総 CD4 細胞数、Tn 数、Tm 数、そしてウイルス血症レベルを検討した。DD 投与によっていずれのウイルスでも CD4 数の急激な減少、特に Tm 細胞の減少がみられた (図 1F)。そして、ウイルス複製レベルは、野生型の HIV-1 では急速な高レベルのウイルス血症に達すること、Vpr 欠損 HIV-1 もウイルス血症の上昇が遅れながら高レベルウイルス血症に到ることがわかった (図 1G, H)。Treg 枯渇環境においては、ウイルス血症レベルは 10 倍以上高いものになった (図 1G, DD⁺ではいずれも 10⁷copy/ml を上回る)。

D. 考察

Treg が HIV-1 感染者でどのような役割を有するのか、これまで多くの議論があった。これまでの HIV 感染者の末梢血の解析研究では、Treg が減っているという報告と逆に増加しているために免疫不全が起きているという、相反する報告が続いていた。本研究の結果、感染者内の Treg 数は、HIV 感染により影響をうけて減っていると考えられる。一方、定常状態ではきわめて高い細胞分裂能を有する Treg が免疫反応の一部として増加している可能性も高い。免疫細胞の活性化に直接影響を及ぼす Treg を HIV に限らず、特定の分子標的剤 (ここでは DD) の処理によって生じさせた枯渇環境では、メモリー T 細胞の異常活性化が生じ、生体内の HIV-1 の複製全体を亢進する結果、HIV-1 血症レベルが急速に上昇することがわかった。この Treg への感染には、Vpr というウイルス性因子が関与し、感染細胞を G2M 期へ停止させ、それに続くアポトーシスを生じさせると明らかにした

これまでの結果とともに、生体内におけるウイルス感染において、Treg が重要な役割を担っていることがわかった。

E. 結論

HIV-1 感染における Treg が重要な役割を担うメカニズムが解明された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sato, K., Misawa, N., Iwami, S., Satou, Y., Matsuoka, M., Ishizaka, Y., Ito, M., Aihara, K., An, D.S., Koyanagi, Y.: HIV-1 Vpr accelerates viral replication during acute infection by exploitation of proliferating CD4⁺ T cells in vivo. *PLoS Pathog.* 9:e1003812, 2013.
- 2) Ogawa, Y., Kawamura, T., Matsuzawa, T., Aoki, R., Gee, P., Yamashita, A., Moriishi, K., Yamasaki, K., Koyanagi, Y., Blauvelt, A., Shimada, S.: Antimicrobial peptide LL-37 produced by HSV-2-infected keratinocytes enhances HIV infection of Langerhans cells. *Cell Host Microbe* 13, 77-86, 2013.
- 3) Hollenbaugh, J.A., Gee, P., Baker, J., Daly, M.B., Amie, S., Kasai, N., Kanemura, Y., Ward, B.M., Koyanagi, Y., Kim, B.: Host factor SAMHD1 restricts DNA viruses in non-dividing myeloid cells. *PLoS Pathog.* 9, e1003481, 2013.
- 4) Ebina, H., Misawa, N., Kanemura, Y., Koyanagi, Y.: Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sci. Rep.* 3, 2510, 2013.

2. 学会発表

- 1) Sato, K., Iwami, S., Koyanagi, Y.: Quantification system of HIV replication dynamics in vivo. 1st Annual q-bio Meeting, Honolulu, USA, February, 2013.
- 2) Sato, K., Misawa, N., Satou, Y., Matsuoka, M., Ito, M., Koyanagi, Y.: HIV-1 Vpr accelerates viral replication by exploiting regulatory CD4⁺ T cells in humanized mice. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections,

- Atlanta, USA, March, 2013.
- 3) Sato, K., Shibata, J., Izumi, T., Misawa, N., Kobayashi, T., Kimura, Y., Ito, M., Pathak, K.V., Koyanagi, Y.: Differential Impact of HIV-1 G-to-A Hypermutation Induced by APOBEC3G and APOBEC3F in vivo. Retroviruses Meeting Cold Spring Harbor, New York, USA. May, 2013.
 - 4) Sato, K. Dynamics of HIV-1 Infection in Humanized Mouse Model, 熊本大学エイズ学研究センターWYIS セミナー(招待講演), Kumamoto, 2013年7月.
 - 5) 佐藤佳. Distinct impact of HIV-1 G-to-A hypermutation induced by APOBEC3G and APOBEC3F in humanized mice, 第15回白馬シンポジウム, 名古屋, 2013年7月.
 - 6) 竹内(柴田)潤子, Perche, B., Migraine, J., Mercier-Delarue, S., Ponscarne, D., Simon, F., Clavel, F., Labrosse, B. High level of susceptibility to human TRIM5 α conferred by HIV-2 capsid sequences, 第15回白馬シンポジウム, 名古屋, 2013年7月.
 - 7) Koyanagi, Y. Intrinsic cellular defenses against retroviruses and DNA viruses. The 12th Awaji International Forum on Infection and Immunity (AIFI 12), Awaji, Japan. September, 2013.
 - 8) Sato, K., Takeuchi, J.S., Misawa, N., Izumi, T., Kobayashi, T., Kimura, Y., Iwami, S., Takaori-Kondo, A., Hu W.-S., Aihara, K., Ito, M., An, D.S., Pathak, K.V., Koyanagi, Y.: Restriction and diversification of HIV-1 mediated by APOBEC3-induced G-to-A mutation in humanized mouse model. 4th International Workshop on Humanized mice, Seoul, Korea. September 30-October 2, 2013.
 - 9) Kobayashi, T., Sato, K., Misawa, N., Yoshikawa, R., Shibata, J., Kanemura, Y., Fukuhara, M., Okamoto, M., Miyazawa, T., Yasunaga, J., Matsuoka, M., Aihara, K., An, D. S., Ito, M., and Koyanagi, Y.: Assessment of the pathogenic potential of simian retrovirus type 4 in humanized mice model, 4th International Workshop on Humanized Mice, Seoul, Korea, 2013年10月.
 - 10) 蝦名博貴. ゲノム編集技術による潜伏 HIV プロウイルスの制御と除去, 第3回ゲノム編集研究会, 広島. 2013年10月.
 - 11) Koyanagi, Y.: Strategy of disrupting latent form of HIV-1 proviral DNA, 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, October, 2013.
 - 12) Takeuchi, J. S., Sato, K., Iwami, S., Misawa, N., Kobayashi, T., Aihara, K., Koyanagi, Y.: Quantification of HIV cell-free and cell-to-cell transmissions based on experimental-mathematical investigations, 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, October, 2013.
 - 13) Koyanagi, Y. Misawa N., Sato K., Ebina H.: HIV strategy for acceleration of viral replication in vivo and eradication approach of HIV proviral DNA, Japan-Russia International Workshop, Kyoto, Japan. October, 2013.
 - 14) 小柳義夫, Gee Peter, 金村優香. 核酸代謝酵素 SAMHD1 による HSV-1 複製の抑制, 第60回日本ウイルス学会学術集会, 神戸. 2013年11月.
 - 15) 佐藤佳, 竹内(柴田)潤子, 三沢尚子, 泉泰輔, 小林朋子, 木村雄一, 岩見真吾, 高折晃史, Hu, W.-S., 合原一幸, 伊藤守, An, D. S., Pathak, V. K., 小柳義夫. 生体内 HIV-1 増殖過程における APOBEC3G, APOBEC3F 依存的 G \rightarrow A 変異のウイルス学的意義の解明, 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013年11月.
 - 16) 竹内(柴田)潤子, 佐藤佳, 岩見真吾, 三沢尚子, 小林朋子, 合原一幸, 小柳義夫. HIV-1 感染における Cell-free 感染と Cell-to-cell 感染の定量的解析, 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013年11月.
 - 17) 金村優香, Gee Peter, 蝦名博貴, Yoo Ji Seung, 藤田尚志, 小柳義夫 I型 IFN 発現制御における SAMHD1 の新規機能の解析 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸. 2013年11月.
 - 18) Takeuchi, J. S., Sato, K., Iwami, S., Kobayashi, T., Aihara, K., Koyanagi, Y.: Quantification of HIV cell-free and cell-to-cell transmissions based on experimental-mathematical investigations, The 3rd International Symposium on Innovative Mathematical Modelling, Tokyo, 2013年11月.
 - 19) Kobayashi, T., Koizumi, Y., Misawa, N., Takeuchi, J. S., Aihara, K., Koyanagi, Y., Iwami, S., Sato, K.: Quantification of G-to-A Mutation-dependent and -independent Inhibition of HIV-1 Replication Mediated by APOBEC 3G/3F Based on Experimental-Mathematical Investigation, The 3rd International Symposium on Innovative Mathematical Modelling, Tokyo, 2013年11月.
 - 20) Iwami, S., Takeuchi, J. S., Sato, K., Aihara, K.: Quantification of cell-to-cell infection in cell

culture system, The 3rd International Symposium on Innovative Mathematical Modelling, Tokyo, 2013年11月.

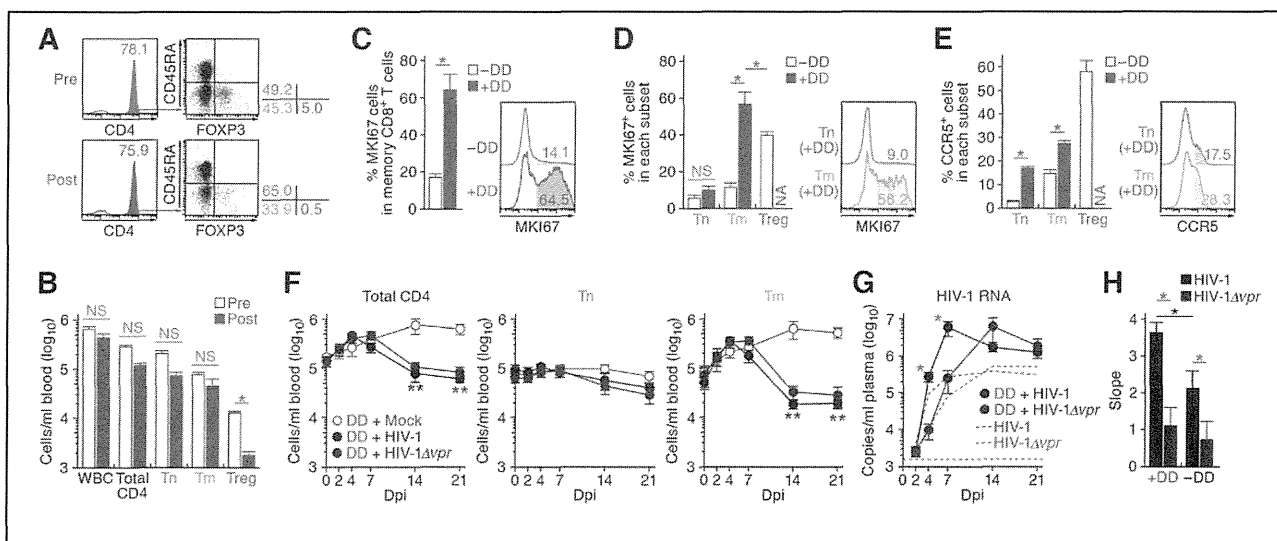
- 21) Nishimura, S.-I., Sato, K., Iwami, S., Aihara, K.: A Theoretical Model of CD4 T cell Migration and Cell-to-Cell Transmission of HIV Virus in Lymph Nodes, The 3rd International Symposium on Innovative Mathematical Modelling, Tokyo, 2013年11月.
- 22) Sato, K., Takeuchi, J. S., Izumi, T., Misawa, N., Iwami, S., Kobayashi, T., Kimura, Y., Pathak, V. K., Aihara, K., Koyanagi, Y.: Differential Impact of HIV-1 G-to-A Hypermutation Induced by APOBEC3G and APOBEC3F in vivo, The 3rd International Symposium on Innovative Mathematical Modelling, Tokyo, 2013年11月.
- 23) 竹内(柴田)潤子, 佐藤佳, 三沢尚子, 泉泰輔, 小林朋子, 木村雄一, 岩見真吾, 高折晃史, Hu, W.-S., 合原一幸, 伊藤守, An, D. S., Pathak, V. K., 小柳義夫. HIV-1感染ヒト化マウスモデルを用いた APOBEC3G/F の機能解析, 第27回日本エイズ学会学術集会・総会, 熊本, 2013年11月.
- 24) 蝦名博貴, 三沢尚子, 金村優香, 小柳義夫. ゲノム編集技術による潜伏 HIV プロウイルスの制御と除去, 第27回日本エイズ学会学術集会, 熊本. 2013年11月.

- 25) 佐藤佳. エイズウイルス研究の最前線: これまでの研究とこれからの研究, 京都薬科大学セミナー(招待講演), 京都, 2013年11月.
- 26) 佐藤佳. テトラスパニンタンパク質のウイルス粒子への取り込みによる HIV 感染性の制御, 第36回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013年12月.
- 27) Ebina, H., Misawa, N., Kanemura, Y., Koyanagi, Y.: Development of the CRISPR/Cas9 system editing for latent HIV-1 provirus. 第36回日本分子生物学会年会, 神戸. 2013年12月.
- 28) 金村優香, Peter Gee, 蝦名博貴, Yoo Ji Seung, 藤田尚志, 小柳義夫. Novel function of SAMHD1 to involve in regulation of type I interferon induction. 第36回日本分子生物学会年会, 神戸. 2013年12月.

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

図1. Treg 枯渇による HIV-1 感染の促進。DD 投与後の A. PB 中の Treg の検出、B. DD 投与後の WBC 数、total CD4 細胞数、Tn 数、Tm 数、Treg 数、C. CD8⁺メモリー細胞内の MKi67 抗原陽性率、D. CD4 陽性 Tn, Tm, Treg 内の MKi67 抗原陽性率、E. Tn, Tm, Treg 表面の CCR5 の陽性率、F と G. Treg 枯渇 (DD+) と Treg 存在 (記入なし) 下における、HIV-1 の感染性。野生型のウイルス (HIV-1) と Vpr 欠損 (HIV-1 Δ vpr) ウイルスをそれぞれ接種後の総 CD4 細胞数、Tn 数、Tm 数 (F)、そしてウイルス血症レベルをしめす (G)。H 接種後のウイルス血症ピークに達する上昇カーブ (H)。



T 細胞の活性化刺激と HIV 感染制御

研究分担者 田中勇悦 琉球大学大学院医学研究科 免疫学講座 教授

研究要旨：免疫応答における T 細胞の活性化は抗原による TCR の直接刺激の他に、種々の補助刺激分子の影響を受ける。HIV-1 の増殖も同じである。補助刺激分子として我々が注目している OX40 は、T 細胞上に活性化により発現が誘導され、そのリガンドである OX40L と反応することにより、T 細胞のサイトカイン産生を促進し、また T 細胞の寿命を延ばす役割がある。我々はこれまで、活性化した末梢血単核球 (PBMC) を組換え OX40L で刺激すると CCR5 結合性 β ケモカインの産生が促進され、その結果 R5 HIV-1 の感染が抑制されることを明らかにした。このように OX40/OX40L を介する T 細胞の活性化は、将来、臨床の場でもその応用が期待される。そこで我々は、HTLV-I でトランスフォーム (HTLV-I⁺) した T 細胞株が OX40L を構成的に発現することに注目し、HTLV-I⁺ T 細胞株が活性化した自家 PBMC における R5 HIV-1 感染を OX40L 依存的に抑制することをここに検証した。種々のドナーにおいて自家 HTLV-I⁺ T 細胞株は容易に樹立し培養できることから、HTLV-I⁺ T 細胞株が自家 OX40L 源として利用できる可能性が示唆された。一方、新鮮 T 細胞の活性化を抑制する方法として今回新たに抗体による CXCR4 の架橋を見いだした。

A. 研究目的

腫瘍壊死因子 (TNF) 受容体ファミリーである OX40 は活性化 T 細胞に誘導され、その特異的リガンドである OX40L と反応することにより、免疫 T 細胞を補助刺激 (co-stimulation) する。その結果、T 細胞ではサイトカイン産生促進や T 細胞の延命が促される。我々は、活性化した末梢血単核球 (PBMC) を組換え OX40L で刺激することにより、CCR5 結合性 β ケモカインである MIP-1 α 、MIP-1 β および RANTES の産生が促進され、CCR5 指向性 (R5) HIV-1 感染を制御することを報告した。今回、我々は、HTLV-I⁺ T 細胞株が OX40L を大量に発現し、R5 HIV-1 の感染を抑制することを検証した。一方、HIV-1 の増殖は慢性的な T 細胞の活性化に依存することから、今回、CXCR4 を標的とした T 細胞の活性化抑制法について検討した。

B. 研究方法

HTLV-I⁺ T 細胞株として、既存の MT-2 細胞、HTLV-I 感染ドナーから樹立した IL-2 依存性 T 細胞株 (ILT)-M1 および健常人 PBMC と HTLV-I⁺ T 細胞株との混合培養で新たに樹立した T 細胞株を用いた。OX40L または OX40 を安定に発現する遺伝子導入 CEM 細胞をコントロールとして用

いた。ビオチン化組換え OX40L および OX40 は市販品を購入し、PE-streptavidin と合わせて FCM 解析に用いた。HIV-1 感染では、OKT-3 抗体で 1 日活性化した PBMC に R5 または X4 HIV-1 を感染させ、OX40L を発現する自家 HTLV-I 不死化細胞 (予め 4%PFA で固定したもの) と混合培養し p24 産生を定量する p24 ELISA や p24 陽性細胞を染色する FCM でモニターした。CXCR4 に対する抗体は自家製の抗体を用い、新鮮 PBMC の活性化培養に添加してその効果を判定した。(倫理面への配慮)

健常人の PBMC 使用実験は倫理委員会で承認され、また、遺伝子組換え生物等使用実験と動物実験も琉大で承認されている。

C. 研究結果

(1) HTLV-I 感染 T 細胞株は、調べた全てのドナーの株において機能的な OX40L を発現した。同時に発現する OX40 は、内在性の OX40L で飽和されて機能的ではないことが示唆された。

(2) HTLV-I⁺ T 細胞株は、組換え OX40L と同様に、活性化自家 PBMC の R5 HIV-1 の感染を β ケモカイン依存性に強く抑制した。しかし、X4 HIV-1 感染は全く阻害しなかった。

(3) 4 種類の抗 CXCR4 抗体の内、CXCR4 使用

HIV-1 の感染を阻止する一種類の抗体は新鮮 PBMC の OKT-3 抗体による T 細胞の活性化を有意に阻害した。

D. 考察

種々の細胞における OX40L の発現は限定的であり、また、OX40L だけを発現する組換え OX40L が未だ作製されていないことから、前年度より HTLV-I⁺T 細胞株が OX40L を大量に発現することに着目し、自家 HTLV-I⁺T 細胞株が OX40L のソースとして使えないかを検討し、本年度にその有用性を証明した。in vitro の系であるが、パラフォルムアルデヒド (PFA) で不活化した自家 HTLV-I⁺T 細胞株が OX40L を介する刺激を活性化 T 細胞に入れることにより、T 細胞からの β ケモカインの産生を誘導し、R5 HIV-1 を選択的に抑制することを明らかにした。OX40L の OX40 刺激活性は、OX40 モノマーよりも OX40 オリゴマーの方が優れることが報告されているが、HTLV-I⁺T 細胞株表面に発現された OX40L はより密度が高く配置されることが推測され、単量体や多量体の OX40L に勝ると期待できる。

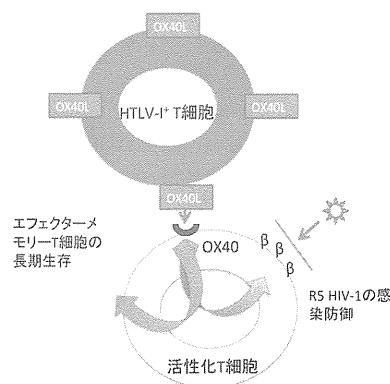
さらに、OX40L はワクチンによる T 細胞免疫を促進する活性もあるので、今後のエイズ予防ワクチン戦略への候補としてさらに研究を進めたい。

これと対照的に T 細胞の活性化は CXCR4 のエピトープ依存性架橋により抑制できることを見いだした。そのメカニズムと応用について明らかにするのは次年度の課題である。

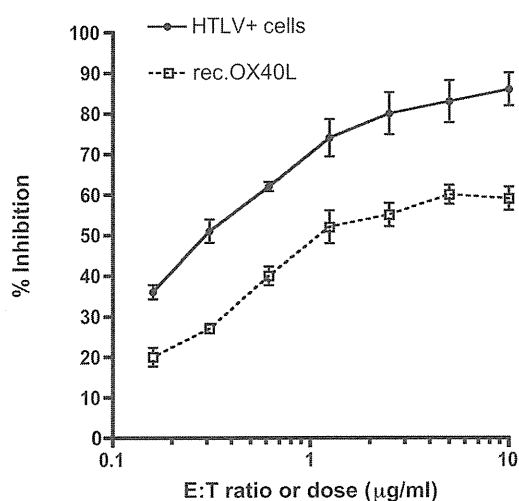
E. 結論

HTLV-I で不活化した自家 T 細胞株は細胞表面に大量の機能的 OX40L を発現し、その OX40L による活性化 T 細胞への刺激は、 β ケモカイン産生を促進させ R5 HIV-1 感染を抑制する (図 1 & 2)。また、CXCR4 は新たな免疫抑制法の標的となる可能性がある。

HTLV-I 感染自家 T 細胞の OX40L を介する免疫促進と R5 HIV-1 感染制御



(図 1) OX40 を介する HIV-1 制御



(図 2) HTLV-I⁺T 細胞株による R5 HIV-1 抑制

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kasahara D, Takara A, Takahashi Y, Kodama A, Tanaka R, Ansari AA, Tanaka Y. Natural OX40L expressed on human T cell leukemia virus type-I-immortalized T cell lines interferes with infection of activated peripheral blood mononuclear cells by CCR5-utilizing human immunodeficiency virus. *Virology*. 2013; 54:338.

2. 学会発表

- 1) 田中 勇悦, 田中 礼子: CXCR4 架橋による

HIV-1 感染と T 細胞活性化の抑制 第 27 回
日本エイズ学会学術集会・総会 熊本
(2013. 11. 20)

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

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
無し							

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
Yamashita, Y., Hoshino, Y., Oka, M., Matsumoto, S., Ariga, H., Nagai, H., Makino, M., Ariyoshi, K., <u>Tsunetsugu-Yokota, Y.</u>	Multicolor flow cytometric analyses of CD4 ⁺ T cell responses to Mycobacterium tuberculosis-related latent antigens.	Jpn.J.Infect.Dis.	3	207-215	2013
<u>Tsunetsugu-Yokota, Y</u> and Muhsen, M.	Development of human dendritic cells and their role in HIV infection: antiviral immunity versus HIV transmission.	Front. Microbiol.	4	1-10	2013
Ikeno, S., Suzuki, M., Muhsen, M., Ishige, M., Kobayashi-Ishihara, M., Ohno, S., Takeda, M., Nakayama, T., Morikawa, Y., Terahara, K., Okada, S., Takeyama, H., <u>Tsunetsugu-Yokota, Y.</u>	Sensitive detection of measles virus infection in the blood and tissues of humanized mouse by one-step quantitative RT-PCR.	Front. Microbiol.	4	1-8	2013
Nomaguchi, M., Miyake, A., Doi, N., Fujiwara, S., Miyazaki, Y., <u>Tsunetsugu-Yokota, Y.</u> , Yokoyama, M., Sato, H., Masuda, T., Adachi, A.	Natural single-nucleotide polymorphisms in the 3' region of HIV-1 pol gene modulate viral replication ability.	J.Virol.	in press		2014

Koyama, T., Sun, B., <u>Tokunaga, K.</u> , Tatsumi, M., and Ishizaka, Y.	DNA damage aids HIV-1 infection of macrophages by overcoming integrase inhibition.	Retrovirology	10	21	2013
Chutiwitoonchai, N., Hiyoshi, M., Hiyoshi-Yoshidomi, Y., Hashimoto, M., <u>Tokunaga, K.</u> , and Suzu, S.	Characteristics of IFITM, the newly identified IFN-inducible anti-HIV-1 family proteins.	Microbes Infect.	15	280-90	2013
Fujita, H., Iwabu, Y., <u>Tokunaga, K.</u> (<u>co-corresponding author</u>), and Tanaka, Y.	Membrane-associated RING-CH (MARCH) 8 mediates the ubiquitination and lysosomal degradation of the transferrin receptor.	J. Cell Sci.	126	2798-809	2013
Tada, T., Kadoki, M., Liu, Y., <u>Tokunaga, K.</u> (<u>co-corresponding author</u>), and Iwakura, Y.	Transgenic expression of the human LEDGF/p75 gene relieves the species barrier against HIV-1 infection in mouse cells.	Front Microbiol.	4	377	2013
Koyama, T., Arias, J.F., Iwabu, Y., Yokoyama, M., Fujita, H., Sato, H., and <u>Tokunaga, K.</u> (<u>corresponding author</u>).	APOBEC3G oligomerization is associated with the inhibition of both Alu and LINE-1 retrotransposition.	PLOS ONE	8	e84228	2013
Kasahara D, Takara A, Takahashi Y, Kodama A, Tanaka R, Ansari AA, <u>Tanaka Y.</u>	Natural OX40L expressed on human T cell leukemia virus type-I-immortalized T cell lines interferes with infection of activated peripheral blood mononuclear cells by CCR5-utilizing human immunodeficiency virus.	Viol. J.	10	338	2013

Sato, K., Misawa, N., Iwami, S., Satou, Y., Matsuoka, M., Ishizaka, Y., Ito, M., Aihara, K., An, D.S., and <u>Koyanagi, Y.</u>	HIV-1 Vpr accelerates viral replication during acute infection by exploitation of proliferating CD4 ⁺ T cells in vivo.	PLOS Pathogens	9	e1003812	2013
Ogawa, Y., Kawamura, T., Matsuzawa, T., Aoki, R., Gee, P., Yamashita, A., Moriishi, K., Yamasaki, K., <u>Koyanagi, Y.</u> , Blauvelt, A., and Shimada, S.	Antimicrobial peptide LL-37 produced by HSV-2-infected keratinocytes enhances HIV infection of Langerhans cells.	Cell Host Microbe.	13	77-86	2013
Hollenbaugh, J.A., Gee, P., Baker, J., Daly, M.B., Amie, S., Kasai, N., Kanemura, Y., Ward, B.M., <u>Koyanagi, Y.</u> , and Kim, B.	Host factor SAMHD1 restricts DNA viruses in non-dividing myeloid cells.	PLOS Pathogens	9	e1003481	2013
Ebina, H., Misawa, N., Kanemura, Y., and <u>Koyanagi, Y.</u>	Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus.	Scientific Reports	3	2510	2013
Shi S, Seki S, Matano T, <u>Yamamoto H.</u>	IL-21-producer CD4 ⁺ T cell kinetics during primary simian immunodeficiency virus infection	Microbes Infect.	15	697-707	2013
Nakane T, Nomura T, Shi S, Nakamura M, Naruse TK, Kimura A, Matano T, <u>Yamamoto H.</u>	Limited impact of passive non-neutralizing antibody immunization in acute SIV infection on viremia control in rhesus macaques	PLOS ONE	8	e73453	2013
Iwamoto N, Takahashi N, Seki Sm Nomura T, <u>Yamamoto H.</u> , Inoue M, Shu T, Naruse TK, Kimura A, Matano T.	Control of simian immunodeficiency virus replication by vaccine-induced Gag- and Vif-specific CD8 ⁺ T cells.	J. Virol.	88	425-433	2014

Oue, M., Sakabe, S., Horiike, M., Yasui, M., Miura, T., and <u>Igarashi, T.</u>	No viral evolution in the lymph nodes of SIV-infected rhesus macaques during combined antiretroviral therapy.	J. Virol.	87	4789-4793	2013
Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, E.E., Shioda, T., Doi, N., Fujiwara, S., Saito, A., Akari, H., Miyakawa, K., Ryo, A., Ode, H., Iwatani, Y., Miura, T., <u>Igarashi, T.</u> , Sato, H., and Adachi, A.	Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1 clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors.	J. Virol.	87	11447-114 61	2013
Otsuki, H., Hishiki, T., Miura, T., Hashimoto, C., Narumi, T., Tamamura, H., Yoshimura, K., Matsushita, S., and <u>Igarashi, T.</u>	Generation of a replication-competent simian-human immunodeficiency virus, the neutralisation sensitivity of which can be enhanced in the presence of a small molecule CD4 mimic.	J. Gen. Virol.	94	2710-2716	2013
Hashimoto, C., Narumi, T., Otsuki, H., Hirota, Y., Arai, H., Yoshimura, K., Harada, S., Ohashi, N., Nomura, W., Miura, T., <u>Igarashi, T.</u> , Matsushita, S., and Tamamura, H.	A CD4 mimic as an HIV entry inhibitor: Pharmacokinetics.	Bioorg. Med. Chem.	21	7884-7889	2013
Mwimanzi P, Markle TJ, Ogata Y, Martin E, Tokunaga M, Mahiti M, Kuang XT, Walker BD, Brockman MA, Brumme ZL, <u>Ueno T.</u>	Dynamic range of Nef functions in chronic HIV-1 infection.	Virology	439	74-80	2013