



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ヒト免疫不全ウイルスとボルナ病ウイルスの持続感染機序に関する研究
Author(s)	中屋, 隆明
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	乙第5105号
Issue Date	1997-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3122381
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51430
Type	doctoral thesis
File Information	000000307571.pdf

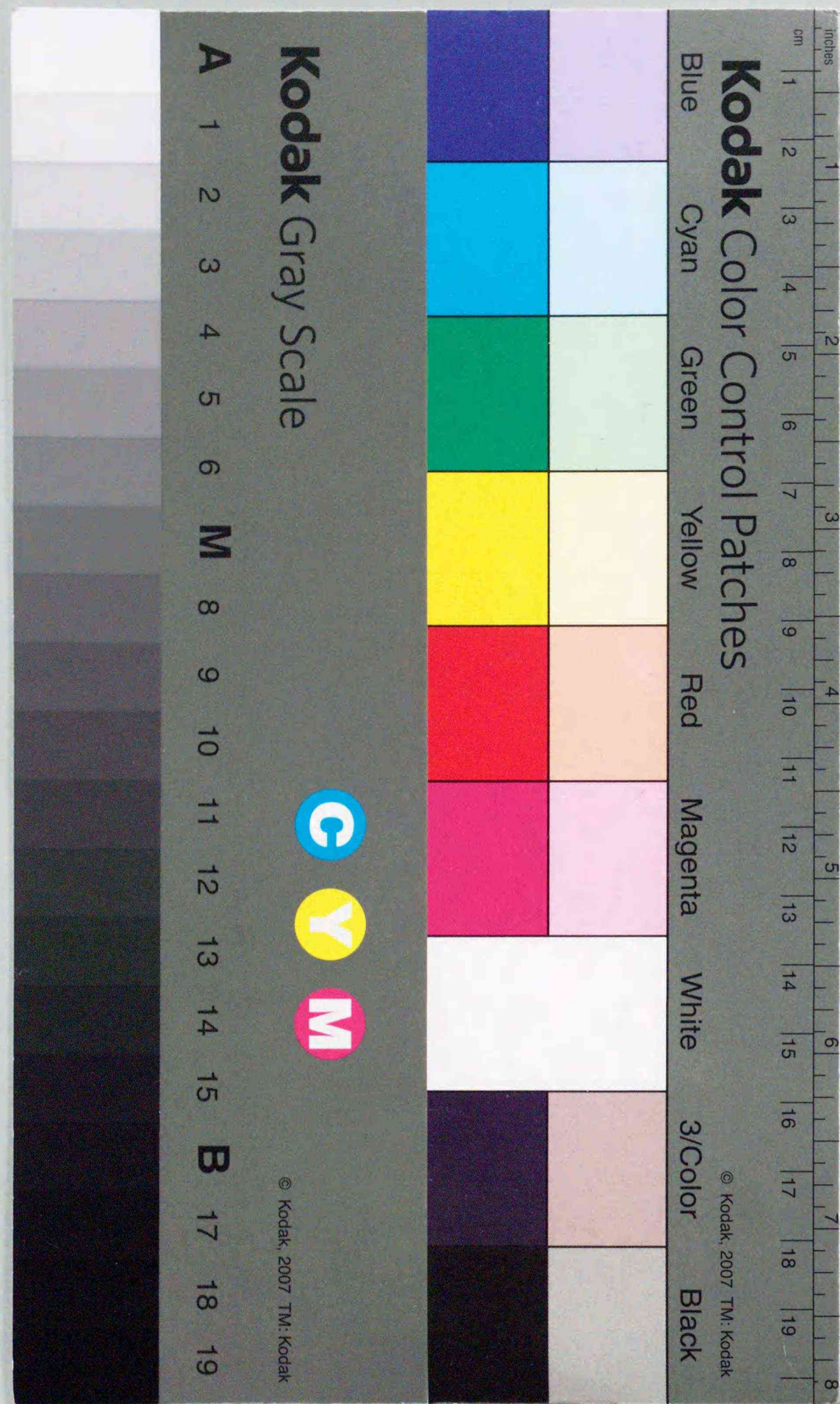


博 士 論 文

ヒト免疫不全ウイルスとボルナ病ウイルスの
持続感染機序に関する研究

平 成 九 年

中 屋 隆 明



ヒト免疫不全ウイルスとボルナ病ウイルスの 持続感染機序に関する研究

中屋 隆明

目 次

略語	iii
要旨	1
序論	3
第1章 ヒト免疫不全ウイルス1型（HIV-1）の細胞傷害性の低下に関わる アクセサリ遺伝子の変異	
第1節 小序論	6
第2節 <i>in vitro</i> 継代感染における各継代ウイルスのPCRによる遺伝子解析	8
第3節 継代ウイルスに持続感染した細胞におけるプロウイルス内の <i>vif-vpr</i> 領域の塩基配列の決定	12
第4節 50継代ウイルスに認められた <i>vif-vpr</i> 領域にまたがる 欠失変異の分子機構	15
第5節 <i>vif</i> 、 <i>vpr</i> 変異ウイルスおよび <i>vif-vpr</i> 欠失ウイルスの細胞傷害性の比較	18
第6節 PCRによる <i>vpr</i> 遺伝子内ナンセンス変異の定量	21
第7節 各継代ウイルスにおける <i>vpr</i> 遺伝子内ナンセンス変異の定量	25
第8節 HIV-1感染者の末梢血単核球由来のプロウイルスDNAにおける <i>vpr</i> 遺伝子のナンセンス変異の検出	27
第9節 この章のまとめ	30
第2章 RREデコイオリゴヌクレオチドによるHIV-1増殖抑制効果	
第1節 小序論	31
第2節 RREデコイオリゴヌクレオチドの構築	35
第3節 <i>in vitro</i> におけるRREデコイオリゴヌクレオチドと Revタンパク質との結合	37
第4節 RREデコイオリゴヌクレオチドの細胞傷害性の検討	41
第5節 HIV-1産生細胞（MOLT#8/LAIおよびM10/LAI）における RREデコイオリゴヌクレオチドのウイルス増殖抑制効果	43
第6節 ACH-2細胞内潜伏HIV-1の活性化時におけるRREデコイ オリゴヌクレオチドのウイルス増殖抑制効果とその機序	47
第7節 臨床株を用いた末梢血単核球細胞における RREデコイオリゴヌクレオチドのウイルス増殖抑制効果	51
第8節 この章のまとめ	53

第3章 ヒトにおけるボルナ病ウイルスの感染に関する研究

第1節 小序論	54
第2節 HIV-1感染者および悪性脳腫瘍患者におけるBDV感染	57
第3節 慢性疲労症候群患者におけるBDV感染	62
第4節 慢性疲労症候群の家族内発症例におけるBDV感染	67
第5節 この章のまとめ	73
総括と展望	74
謝辞	81
参考文献	82

略 語

AC:	Asymptomatic carrier
AIDS:	Acquired immune deficiency syndrome
ARC:	AIDS related complex
AZT:	3'-azido-3'-deoxythymidine
bp:	base pair
BDV:	Borna disease virus
CDC:	Center for Disease Control and Prevention
cDNA:	complementary DNA
CFS:	Chronic fatigue syndrome
cpm:	count per minute
DMEM:	Dulbecco's modified minimum essential medium
DNA:	Deoxyribonucleic acid
DW:	Distilled water
ELISA:	Enzyme-linked immunosorbent assay
EtBr:	Ethidium bromide
FCS:	Fetal calf serum
FITC:	Fluorescein isothiocyanate
GAPDH:	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GST:	Glutathione S-transferase
HIV-1:	Human immunodeficiency virus type 1
HRP:	Horseradish Peroxidase
IF:	Immunofluorescence
IL:	Interleukin
kD:	Kilodalton
m.o.i.:	Multiplicity of infection
MW:	Molecular weight
ORF:	Open reading frame
PBS:	Phosphate-buffered saline
PCR:	Polymerase chain reaction
PHA:	Phytohemagglutinin
PSL:	Photostimulated luminescence
mRNA:	Messenger RNA
RI:	Radio isotope
RNA:	Ribonucleic acid
RPMI:	Roswell Park Memorial Institute
RRE:	Rev response element
RT:	Reverse transcription

SDS:	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE:	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide electrophoresis
STD:	Sexually transmitted disease
TAR:	<i>Trans</i> -activation responsive element
TCID ₅₀ :	50% tissue culture infective dose
TGF- β :	transforming growth factor- β
TNF- α :	Tumor necrosis factor- α
Tris:	Tris (hydroxy methyl) amino methane

要 旨

ウイルスの感染を受けた細胞は、大別して3つの運命をたどる。一つは、ウイルスの増殖に伴い、細胞が破壊される溶解感染 (lytic infection) である。第2の感染様式は、ウイルスの感染によって、細胞が、がん化 (transformation) する場合である。そして第3番目は、細胞とウイルスが共存する感染様式であり、持続感染 (persistent infection) ないしは潜伏感染 (latent infection) と呼ばれる。特に、溶解感染を起こし、死滅するか、あるいは持続感染を起こし、ウイルスとの共存下で生き続けるかは、ウイルスの細胞傷害性と深く関わる。また、潜伏感染からの活性化は宿主側の免疫応答能と深く関わる。本研究では、ヒトに持続、潜伏感染し、免疫疾患を引き起こすヒト免疫不全ウイルス、および精神神経疾患との関連が示唆されているボルナ病ウイルスについて、その感染機序を解明することを目的とした。

ヒト免疫不全ウイルス1型 (Human immunodeficiency virus type 1 : HIV-1) は、後天性免疫不全症候群 (AIDS) の原因ウイルスであり、感染機序の解明は、治療法を確立する上で極めて重要である。本研究では、HIV-1の感染様式を *in vitro* の実験系において解析し、HIV-1の細胞傷害性および持続感染機序に関与する遺伝子の同定を試みた。また、HIV-1の調節タンパク質の一つであるRevの働きを阻害するデコイオリゴヌクレオチドを用いて、抗ウイルス剤としての可能性を検討した。

一方、ボルナ病ウイルス (Borna disease virus : BDV) は、元来ウマに脳炎を起こすボルナ病の原因ウイルスとして分離されたものであるが、最近の研究により、ヒト、特に精神疾患患者との関連が指摘されている。一方、慢性疲労症候群は、その病因にウイルス感染症が疑われており、うつ症状などの精神症状も見られることから、本研究では、BDVと慢性疲労症候群との関連性を検討すると共に、免疫抑制状態にあるHIV-1感染者および悪性脳腫瘍患者に対するBDVの疫学調査を行い、ヒトにおけるBDVの感染様式について検討した。

従って、本論文は「第1章：ヒト免疫不全ウイルス1型 (HIV-1) の細胞傷害性の低下に関わるアクセサリー遺伝子の変異」、「第2章：RREデコイオリゴヌクレオチドによるHIV-1増殖抑制効果」および「第3章：ヒトにおけるボルナ病ウイルスの感染に関する研究」から構成される。

第1章は以下の内容に要約される。

1. HIV-1の *in vitro* における継代感染により、低細胞傷害性のウイルスが現れ、継代4代以降は持続感染する細胞が出現した。継代と共に *vpr* 遺伝子内のナンセンス変異の割合が増加し、20代以降の持続感染細胞では、ほぼ全てのプロウイルスが変異型であった。これらのことから、*vpr* 遺伝子の変異が細胞傷害性の低下をもたらす一因であることが示唆された。
2. 継代50代において、*vif* から *vpr* にかけてミスアライメント欠失と考えられる変異を伴うウイルスが検出された。この欠失ウイルスは、複製、増殖が可能であり、さらに細胞傷害性をほぼ消失していることが、組み換えウイルスを用いた感染実験に

より明らかとなった。

3. *vpr* 遺伝子内のナンセンス変異は生体内のプロウイルスにも高率に認められ、*in vivo* における存在様式の一つであることが示唆された。

第2章は以下の内容に要約される。

1. Rev response element (RRE) 内のRevタンパク質結合部位 (bubble構造) を含むオリゴヌクレオチド (RREオリゴヌクレオチド) を合成した。これらのオリゴヌクレオチドはRevと結合することが明らかとなった。
2. RREオリゴヌクレオチド (ARO-2) は、1 から10 μ M の濃度において、ヒトT細胞由来株であるMOLT#8 およびM10細胞に持続的に感染したHIV-1 (実験室株) のウイルス産生を抑制した。また、HIV-1が潜伏感染したヒトT細胞由来株 (CEM) であるACH-2細胞において、TNF- α 刺激によるウイルスタンパク質の合成 (ウイルスの活性化) を抑制した。一方、添加濃度10 μ M において、RREオリゴヌクレオチドの細胞に対する傷害性は認められなかった。
3. RREオリゴヌクレオチド (ARO-2) は、ヒト末梢血単核球細胞に感染したHIV-1 (臨床株) のウイルス産生を抑制した。

第3章は以下の内容に要約される。

1. HIV-1感染者 (タイ国) は非感染者に比べ、BDV抗体陽性率が有意に高く、特にHIV-1陽性の性病 (STD) 患者ではその傾向は顕著であった。また、一般に免疫抑制状態であることが報告されている悪性脳腫瘍患者 (グリオブラストーマ) の脳腫瘍組織からもBDV RNAが高率に検出された。
2. 日本国内の慢性疲労症候群 (CFS) 患者では、健常者と比較し、抗BDV抗体およびBDV遺伝子の陽性率が有意に高かった。
3. CFSの家族内集団発症例において、CFSと診断された患者 (両親、次男および長女の4名) は全てBDVとの関連が示された。一方、CFSのいずれの基準にも該当しない長男はPBMC中のBDVp24遺伝子および抗BDV抗体は陰性であった。

以上のことから、HIV-1 はアクセサリ遺伝子の変異により、宿主細胞と共存している可能性が示唆されること、また変異が起きにくい領域 (RRE) のアナログであるRREデコイオリゴヌクレオチドの抗ウイルス剤としての有用性を明らかにすることができた。さらに、BDV感染とCFS患者の発病あるいは症状との関連性を指摘すると共に、ヒトにおけるBDVの存在様式は、宿主生体の免疫応答により抑制された状態にあると考えられる知見を得ることができた。

序 論

大部分のウイルス感染症は、ワクチン開発により解決されてきた。従って、現在問題となるウイルス性疾患は、急性感染期後生体から排除されずに、終生にわたって生体内に存在し続けるもので、免疫応答の異常により活性化されるものである。本研究では、持続感染症を起こすウイルス感染症として、免疫系、神経系細胞を標的とするヒト免疫不全ウイルス1型 (Human immunodeficiency virus type 1 : HIV-1)、ボルナ病ウイルス (Borna disease virus : BDV) について検討した。

HIV-1 の感染を受けると、感染者の多くは、感染直後に起こる一過性のウイルス血症を伴う急性感染期、その後平均10年にも及ぶ無症候期 (AC期) を経過し、AIDSへと進行する。これまで生体内のウイルス量は急性感染期に一過性に増加するが、その後の免疫応答の上昇に伴い、AC期の間は低いレベルに抑制されると考えられてきた。しかしながら、近年、HIV-1は無症候性キャリア (AC) 期においても、末梢血細胞でのウイルス複製は抑制されているものの、特にリンパ組織では活発に複製、増殖を繰り返していることが明らかになっている^{70,25,60}。また、ウイルスを産生している末梢血単核球 (PBMC) の半減期は、2ないし3日以内であることが報告されており^{70,25}、CD4陽性細胞数が500/ μ l以下である感染者では、1日に 10^7 - 10^9 個のウイルスが新たに産生され、約 2×10^9 個のCD4陽性細胞が消失しているとの報告がある^{70,25}。その一方で、感染者の生体内には染色体DNAに挿入されたプロウイルスDNAを持った潜伏、持続感染細胞も多く存在する。従って、子孫ウイルスを産生した後、細胞死を起こす急性感染と、細胞と共存する持続感染といった感染様式の違いが何に起因するのかを明らかにすることは、生体内におけるウイルスの伝播様式さらにはAIDS発症機序を理解する上で極めて重要である。

HIV-1は、*gag*、*pol* および*env* といった構造タンパク質をコードする遺伝子の他に、*tat* および*rev* といった調節タンパク質をコードする遺伝子、*vif*、*vpr*、*vpu* および*nef* といったウイルス複製上、明確な機能の認められないアクセサリ遺伝子から構成されている。最近、これらのアクセサリ遺伝子が、生体内におけるウイルスの増殖あるいは病態の進行に必要であるといった報告が集積されてきた。Kestlerら³⁰ は、アカゲザル

にアクセサリ遺伝子の一つである *nef* 遺伝子を欠失させたサル免疫不全ウイルス (Simian immunodeficiency virus: SIV) を感染させたところ、病態の進行が見られず、AIDSを発症しなかったことを報告した。また、Langら³⁷ は *vpr* 遺伝子の欠損ウイルスはAIDSへの病態進行を起こさないことを同様のサル/SIV 感染モデルにおいて報告した。これらの報告は、*in vivo* においては、アクセサリ遺伝子がウイルスの病原性に深く関与する可能性を示唆している。そこで本研究では、*in vitro* 感染実験系において、これらアクセサリ遺伝子の細胞に与える影響を検討し、特に細胞傷害性との関連性について解析した。

一方、生体内のウイルス量は、病態の進行と密接に関連することが明らかにされている。従って、生体内ウイルス量をコントロールすることは、AIDS発症を抑える意味において極めて重要である。現在、臨床において使用されている抗HIV-1薬剤は、逆転写酵素およびプロテアーゼに対する阻害剤であり、いずれも生体内のウイルスの複製を抑制する目的で用いられている。これら抗ウイルス剤の問題点は、投与後、早い段階において、標的となる逆転写酵素やプロテアーゼにアミノ酸の変異を誘導し、耐性ウイルスが出現することである^{13,38}。HIV-1の多様性は、他のレトロウイルスと同様に高く、その原因としては逆転写反応における忠実度の低さが主なものであると考えられる。最近、これら抗ウイルス剤の併用（カクテル療法）により、耐性ウイルスの出現を長期間抑えることが可能であったとの報告がなされ⁴⁸、期待されているが、一方においてその普遍性については疑問視されている。このため、完全にウイルスの増殖を抑える薬が存在しない現段階では、これらの薬剤に加え、ウイルス増殖、特に潜伏ウイルスの活性化を抑制するための新薬の開発は必須であると考えられる。そこで本研究では、耐性ウイルスの出現する可能性が極めて低いと考えられるRevの結合領域であるRRE構造に着目し、ウイルスの増殖に必須なRevの働きを抑制するRREデコイオリゴヌクレオチドの抗ウイルス薬としての可能性を検討した。

一方、ボルナ病ウイルス(BDV)は、18世紀後半にドイツで発生したウマに散在性の進行性脳炎をもたらすボルナ病の原因ウイルスである。BDVは、ウマ以外にもウシ、ヒツ

ジ、ダチョウおよびネコに自然感染することが報告されている¹⁷。また、BDVは鳥類から哺乳類まで、幅広い実験感染が可能であることも明らかにされている。ラットを用いた実験感染では、ラットに脳脊髄炎を引き起こすことが証明され、ボルナ病を研究する上での有力な動物モデルとなっている⁵⁶。ここで特筆すべきことは、ヒトにおいても、特に精神疾患患者において抗BDV抗体が高率に検出され、BDVがヒトにも感染することが指摘されている点である^{63,7}。しかし、献血者にも低率ながら抗BDV抗体が認められることから、BDVと精神疾患との関連性については依然不明である。

慢性疲労症候群 (Chronic fatigue syndrome : CFS) とは、これまで健康に生活していたヒトに原因不明の強い全身倦怠感、微熱、頭痛、筋肉痛と共に精神神経症状等が起こり、長期にこの状態が続いて健全な社会生活が送れなくなる疾患である^{12,34}。CFSは、時として集団発生が認められること、またその発症時に咽頭痛、発熱、呼吸器症状などの感冒様症状が多く、症例に認められることなどから、postviral fatigue syndromeとも言われており、原因ウイルスを同定する試みが世界中で行われている。現在までに、コクサッキーBウイルス、EBウイルス、ヒトヘルペスウイルス6型、7型(HHV-6、7)、およびヒトT細胞白血病ウイルスII型(HTLV-II)などがCFSの病因として候補に挙げられてきたが、明確な関連は未だ明らかにされていない⁴¹。

私達はこれまでに健常者を含め、様々な感染症が疑われる疾患患者におけるBDVの血清学的および分子疫学的検査を行ってきた。その中で、BDVのゲノムおよび抗体保有率が精神疾患患者で有意に高いことを確認した。そこで、本研究では、うつ症状等の病状が多くの患者に認められるCFS患者において、BDV感染との関連性を検討した。さらに、これらの疾患を発症していない健常者においてもBDVが潜伏感染している可能性を明らかにするために、免疫抑制状態にあるHIV-1感染者および悪性脳腫瘍（グリオブラストーマ）患者におけるBDVの存在についても検討した。

第1章

ヒト免疫不全ウイルス1型（HIV-1）の細胞傷害性の低下に関わる

アクセサリ遺伝子の変異

第1節 小序論

ヒト免疫不全ウイルス1型（HIV-1）の感染性分子クローンであるpNL432由来のウイルス（NL432株¹）を、Tリンパ球由来株化細胞であるMT-4細胞に感染させると、感染細胞に強い細胞傷害が現れ、細胞死に至る。西野ら⁵⁶は、NL432株をMT-4細胞に感染させ、放出された子孫ウイルスを新たなMT-4細胞に感染させるという継代感染を繰り返した結果、継代4代以降において持続感染が成立すること、さらに継代を重ねるに従って、持続感染が成立しやすくなること、を報告した。また、これら持続感染細胞より産生されるウイルスは、低細胞傷害性であったことから、持続感染の成立はウイルスの細胞傷害性が低下した為であることが示唆された⁷¹。

一方、これまでHIV-1の各ORFの変異ウイルスを用いた感染実験により、*vif*、*vpr*および*vpu*といったアクセサリ遺伝子の変異が、ウイルスの細胞傷害性を低下させることが報告されている^{31,32}。そこで本研究では、上述した継代ウイルスに見られた細胞傷害性の低下とアクセサリ遺伝子の変異との関連性を明らかにすることを目的とした。*in vitro*において継代感染を行ったウイルスの遺伝子構造を解析した結果、アクセサリ遺伝子である*vpr*遺伝子あるいは*vif*遺伝子の欠損が認められ、これらの変異がウイルスの細胞傷害性を低下させる一因であることを見出した⁵¹。また、半定量的遺伝子増幅（PCR）法を用いた解析により、変異ウイルスが継代と共に増加すること、さらに継代20代以降のウイルス感染では、持続感染を成立させた細胞の大部分が、これら欠損ウイルスによ

り感染した結果であることを明らかにした⁵¹。また、継代50代において認められた*vif*から*vpr*遺伝子の欠失の分子機構についても検討し、それがミスアライメント変異であることを明らかにし⁵⁴、さらに、これらの欠損ウイルスの一部は、HIV-1感染者の生体内においても存在することを確認した⁵¹。

第2節 *in vitro* 継代感染における各継代ウイルスのPCRによる遺伝子解析

1. 目的

HIV-1の*in vitro*における継代感染を繰り返すことにより、ウイルスの細胞傷害性が低下し、持続感染が成立することが報告されている (Fig. 1)。そこで、*in vitro* 継代感染における細胞傷害性の低下に関与するHIV-1遺伝子を同定することを目的として、持続感染細胞のプロウイルスDNAの遺伝子解析を行った。

2. 実験方法

細胞とウイルス：MT-4細胞由来のサブクローンであるM10細胞⁷⁰の培養には、10%ウシ胎児血清を含むRPMI-1640を用いた。ウイルスは、感染性分子クローンpNL432をヒト結腸癌細胞株であるSW480にトランスフェクションし、その培養上清を用いた⁵⁶。このNL432ウイルスを、M10細胞に0.01の感染価 (multiplicity of infection : moi) にて感染させ、感染細胞より放出された子孫ウイルスを1代とし、これを新たなM10細胞に順次感染させた。この過程を50代繰り返し、各継代のウイルスをwt-1からwt-50と命名した。

PCR：HIV-1各継代感染細胞より抽出したDNAの *vif-vpr* 領域の1st PCRには、(+)センスプライマーとして5'-GACATAAAAGTAGTGCCAAGAAGAA-3' (4995-5019塩基) および(-)センスプライマーとして5'-TCTTGCTCTCCTCTGTCGAGTAA-3' (5828-5806塩基)を用いた。一方、対照とした *gag* 領域の1st PCRには、(+)センスプライマーとして5'-TTTGACTAGCGGAGGCTAGAAG-3' (761-782塩基) および(-)センスプライマーとして5'-TTTGGTCCTTGCTTATGTCCAGAATGC-3' (1658-1631塩基)を用いた。2nd PCRには、(+)センスプライマーとして5'-AACAGCCAGGTCAGCCAAAATTA-3' (1162-1184塩基) および (-)センスプライマーに、5'-ATTAAATCCAGGATTATCCATC-3' (1602-1580塩基)を用いた。PCR反応は変性94℃、1分間、アニーリング55

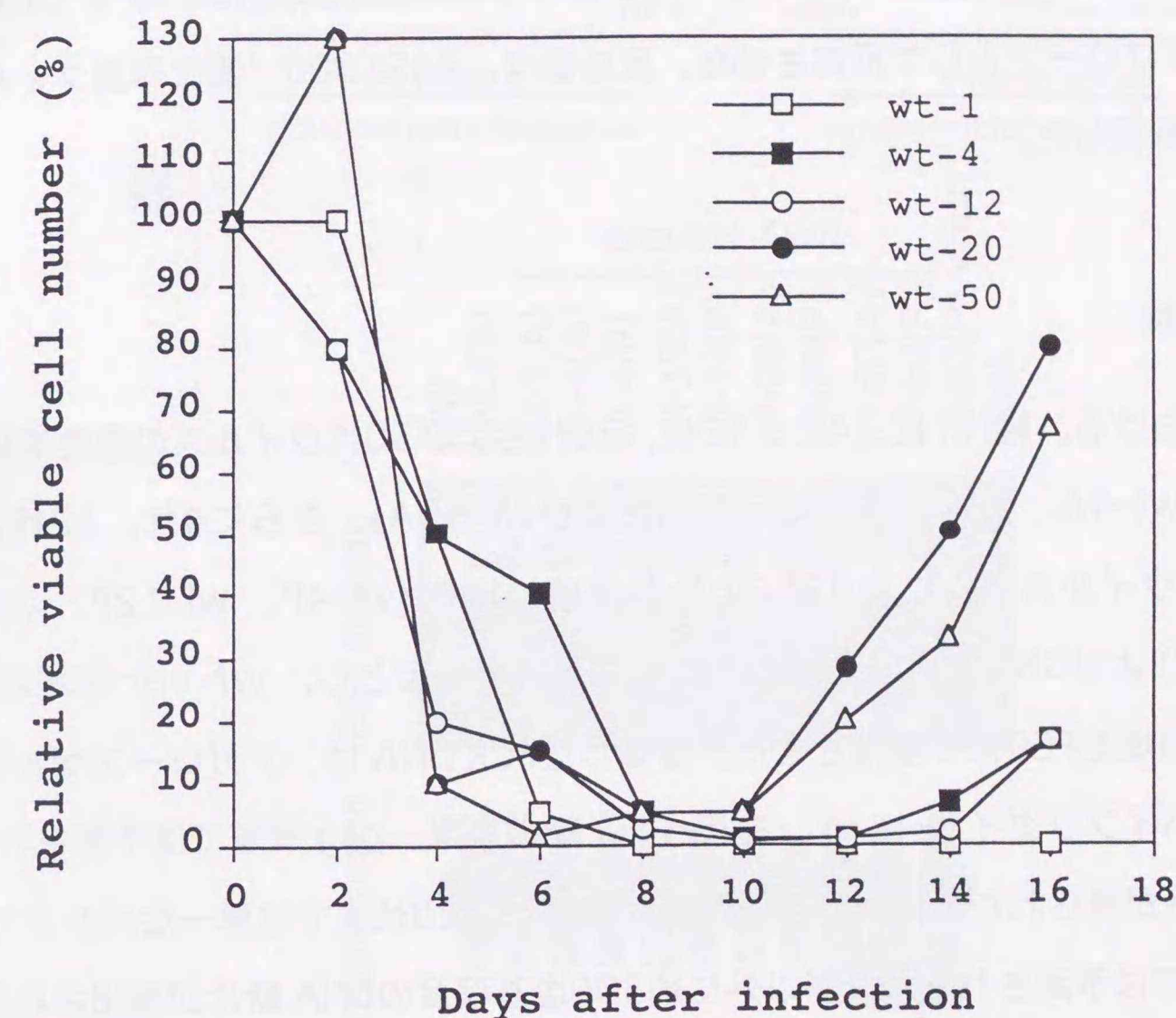


Fig. 1. Kinetics of cytopathogenic properties of serial passages of wild type HIV-1. M10 cells were mock-infected or infected with wt-1A, wt-4A, wt-12A, wt-20A and wt-50A at the same multiplicity of infection, 0.01. The cells were seeded at 5×10^5 / ml. The media were replaced with fresh medium 4 days after infection and thereafter every 3 days. The viable cells were counted by Trypan blue dye exclusion method. The results are shown by relative percentages of viable number of each infected cells, compared with that of mock-infected cells.

℃、2分間および伸長反応72℃、2分間（30サイクル）で行った。増幅したPCR DNAは2%アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロミド染色にて解析した。さらに、電気泳動したアガロースゲルは、Hybond-N+メンブレン(Amersham 社)にプロットした後、³²P 標識した合成オリゴヌクレオチド5'-ATGGAAAACAGATGGCAGGTG-3' (5041-5061塩基) をプローブとして反応させた。反応像は、BAS1000（富士写真フィルム株式会社）にて解析した。

3. 結果と考察

M10細胞における、継代1代、4代、12代、20代および50代ウイルスの急性感染期細胞 (wt-1A、wt-4A、wt-12A、wt-20Aおよびwt-50A)、さらに4代、12代、20代および50代ウイルス感染により得られた持続感染細胞 (wt-4P、wt-12P、wt-20Pおよびwt-50P) よりDNAを抽出した。これらのDNAを鋳型とし、*vif-vpr* 領域および対照として*gag* 領域をPCRにて増幅させた。増幅したPCR DNA は、アガロースゲル電気泳動後、サザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、*gag* 領域では予測される位置に単一なバンドが得られたのに対し、*vif-vpr* 領域では20代までは単一なバンドであるものの、50代では予測されるバンド以外に約300塩基程度のDNA 断片が検出された (Fig. 2)。さらに、RT-PCR により、培養上清中のウイルス粒子中のゲノムRNAからも同様なサイズの異なるDNAが検出された。これらのことより、50代において、*vif-vpr* 領域の欠失を伴うウイルスの存在が示唆された。

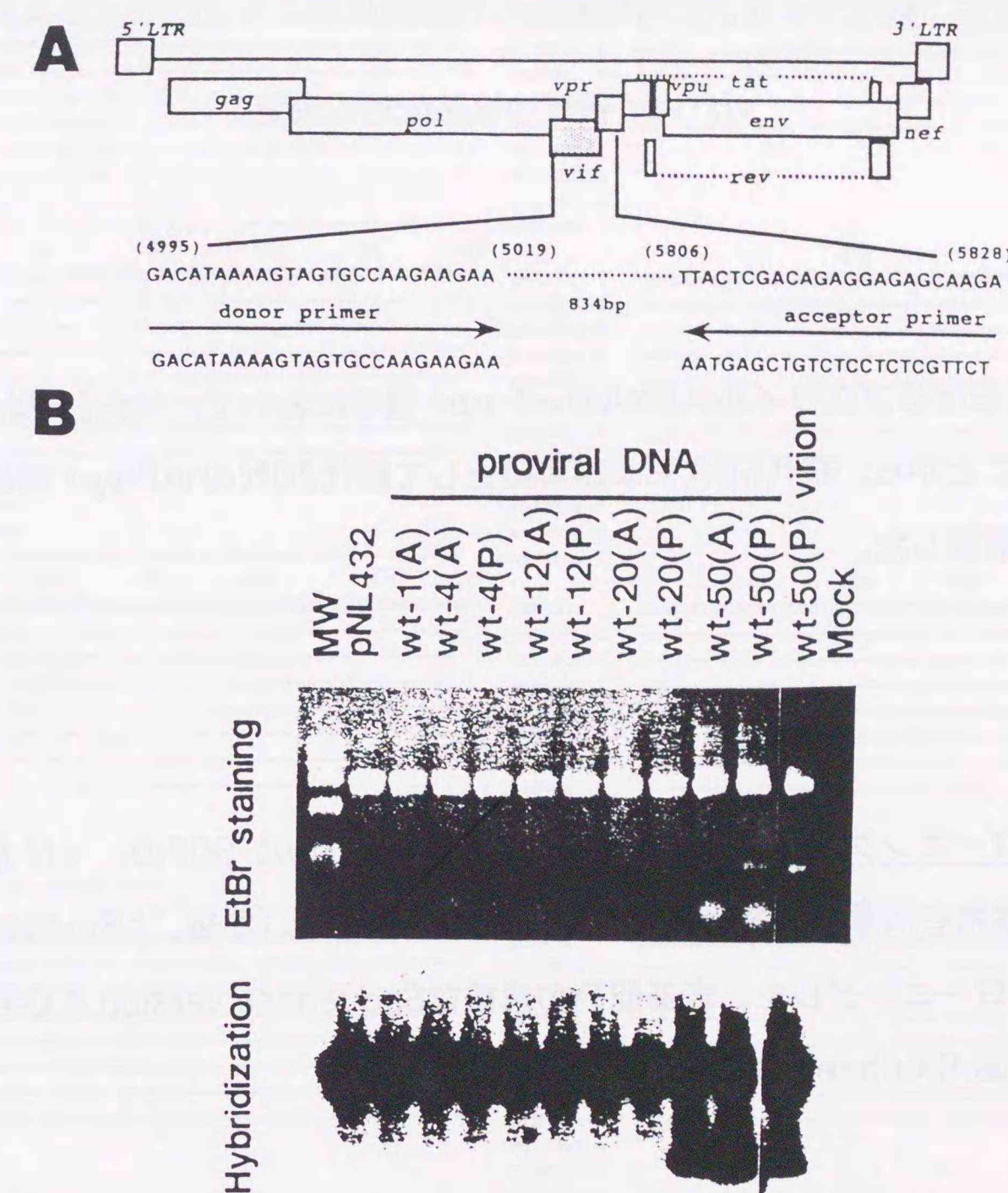


Fig. 2. Analysis of proviral DNA from selected cells acutely or persistently infected with serially passaged (1 to 50) HIV-1. The cells examined for PCR analysis (A) are as follows: M10 cells mock infected (Mock) or acutely infected with HIV-1 (NL432) in conditioned medium of SW480 cells previously transfected with pNL432. Specifically, M10 cells acutely infected with passaged virus are wt-1 (A), wt-4(A), wt-12(A), wt-20(A) and wt-50(A). Persistently infected M10 cells selected are wt-4(P), wt-12(P), wt-20(P) and wt-50(P). The virions in the conditioned medium of wt-50(P) were also subjected to RT-PCR to amplify the same region. PCR products were separated by agarose gel, then stained with ethidium bromide or followed by Southern blot hybridization (B). *Hae* III-digested ϕ X174 DNA was used as size marker (MW).

第3節 継代ウイルスに持続感染した細胞におけるプロウイルス内の

vif-vpr 領域の塩基配列の決定

1. 目的

継代50代におけるプロウイルスDNAの*vif-vpr* 領域において、欠失と思われる遺伝子が検出されたことから、継代50代および対照として継代20代の*vif-vpr* 領域のPCR産物の塩基配列を解読した。

2. 実験方法

PCR産物のクローニングとシーケンス：wt-20Pおよびwt-50Pの、*vif* から*vpr* 領域におけるPCR産物を制限酵素 *Bam* HIおよび *Xho* Iにて切断した後、pBluescript II SK (-)を用いてクローニングした。塩基配列の解読はSequenase version 2.0キット (United Status Biochemicals社) を用いた。

3. 結果と考察

wt-20Pより4クローン、wt-50Pからは完全長3クローンおよび欠失4クロンの計7クローンを得た。これら11クロンの塩基配列を解読した結果を (Fig. 3) に示した。wt-20Pおよびwt-50Pの完全長クローンでは、全てのクローンにおいて、5699塩基から5671塩基のTGGがTAGへと変異し、その結果、タンパク質の翻訳が停止するナンセンス変異が起きていることが予測された。一方、欠失は5119塩基から5679塩基の560塩基に及ぶものと5193塩基から5710塩基の517塩基に及ぶ2つのタイプが認められた (Fig. 4)。いずれのクローンにおいても、欠失以後のフレームは変わり、欠失直後に翻訳が停止することも明らかとなった。これらの結果から、*vif* あるいは/および*vpr* 遺伝子に欠損を起こしたウイルスが、持続感染に関与している可能性が示唆された。

vif

	1	10	20	30	40	50	60		250	260	270	280	290	300
pNL432	ATGGAAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAACACA							pNL432	TTGGGTCAGGGAGTCTCCATAGAAATGGAGGAAAAAGAGATATAGCACACAAGTAGACCCCT					
wt20Pc1.1	-----							wt20Pc1.1	-----					
wt20Pc1.2	-----							wt20Pc1.2	-----					
wt20Pc1.3	-----							wt20Pc1.3	-----					
wt20Pc1.4	-----							wt20Pc1.4	-----					
wt50Pc1.1	-----G-----							wt50Pc1.1	-----					
wt50Pc1.2	-----							wt50Pc1.2	-----					
wt50Pc1.3	---A-----A-----A-----							wt50Pc1.3	-----					
wt50Pc1.4	-----							wt50Pc1.4	-----					
wt50Pc1.5	-----							wt50Pc1.5	-----					
wt50Pc1.6	-----							wt50Pc1.6	-----					
wt50Pc1.7	-----							wt50Pc1.7	-----					
	70	80	90	100	110	120			310	320	330	340	350	360
pNL432	TGGAAAAGATTAGTAAACACCATATGTATATTTCAGGAAAGCTAAGGACTGGTTTAT							pNL432	GACCTAGCAGACCAACTAATTCATCTGCACATTTTGTATTTTCAGAACTGCTATA					
wt20Pc1.1	-----							wt20Pc1.1	-----					
wt20Pc1.2	-----							wt20Pc1.2	-----					
wt20Pc1.3	-----							wt20Pc1.3	-----					
wt20Pc1.4	-----							wt20Pc1.4	-----					
wt50Pc1.1	-----							wt50Pc1.1	-----					
wt50Pc1.2	-----							wt50Pc1.2	-----					
wt50Pc1.3	-----							wt50Pc1.3	-----					
wt50Pc1.4	-----							wt50Pc1.4	-----					
wt50Pc1.5	-----							wt50Pc1.5	-----					
wt50Pc1.6	-----							wt50Pc1.6	-----					
wt50Pc1.7	-----T-----A-----							wt50Pc1.7	-----					
	130	140	150	160	170	180			370	380	390	400	410	420
pNL432	AGACATCACTATGAAAAGTACTAATCCAAAAATAAGTTCAGAAGTACACATCCCACTAGGG							pNL432	AGAAATACCATATTAGGACGTATAGTTAGTCTAGGTGTGAATATCAAGCAGGACATAAC					
wt20Pc1.1	-----C-----							wt20Pc1.1	-----G-----					
wt20Pc1.2	-----C-----							wt20Pc1.2	-----					
wt20Pc1.3	-----C-----							wt20Pc1.3	-----					
wt20Pc1.4	-----C-----							wt20Pc1.4	-----					
wt50Pc1.1	-----C-----							wt50Pc1.1	---A---A-----					
wt50Pc1.2	-----							wt50Pc1.2	-----					
wt50Pc1.3	-----							wt50Pc1.3	-----					
wt50Pc1.4	-----							wt50Pc1.4	-----					
wt50Pc1.5	-----							wt50Pc1.5	-----					
wt50Pc1.6	-----T-----A-----T-----							wt50Pc1.6	-----					
wt50Pc1.7	-----							wt50Pc1.7	-----					
	190	200	210	220	230	240			430	440	450	460	470	480
pNL432	GATGCTAAATTAGTAATAACAACATATTGGGGTCTGCATACAGGAGAAAGAGACTGGCAT							pNL432	AAGGTAGGATCTCTACAGTACTTGGCACTAGCAGCATTAAATAAAACCAAAACAGATAAAG					
wt20Pc1.1	-----							wt20Pc1.1	-----G-----					
wt20Pc1.2	-----							wt20Pc1.2	-----					
wt20Pc1.3	-----							wt20Pc1.3	-----					
wt20Pc1.4	-----							wt20Pc1.4	-----					
wt50Pc1.1	-----							wt50Pc1.1	-----					
wt50Pc1.2	-----							wt50Pc1.2	-----					
wt50Pc1.3	-----							wt50Pc1.3	---A-----					
wt50Pc1.4	-----							wt50Pc1.4	-----					
wt50Pc1.5	-----							wt50Pc1.5	-----					
wt50Pc1.6	-----							wt50Pc1.6	-----					
wt50Pc1.7	-----							wt50Pc1.7	-----					

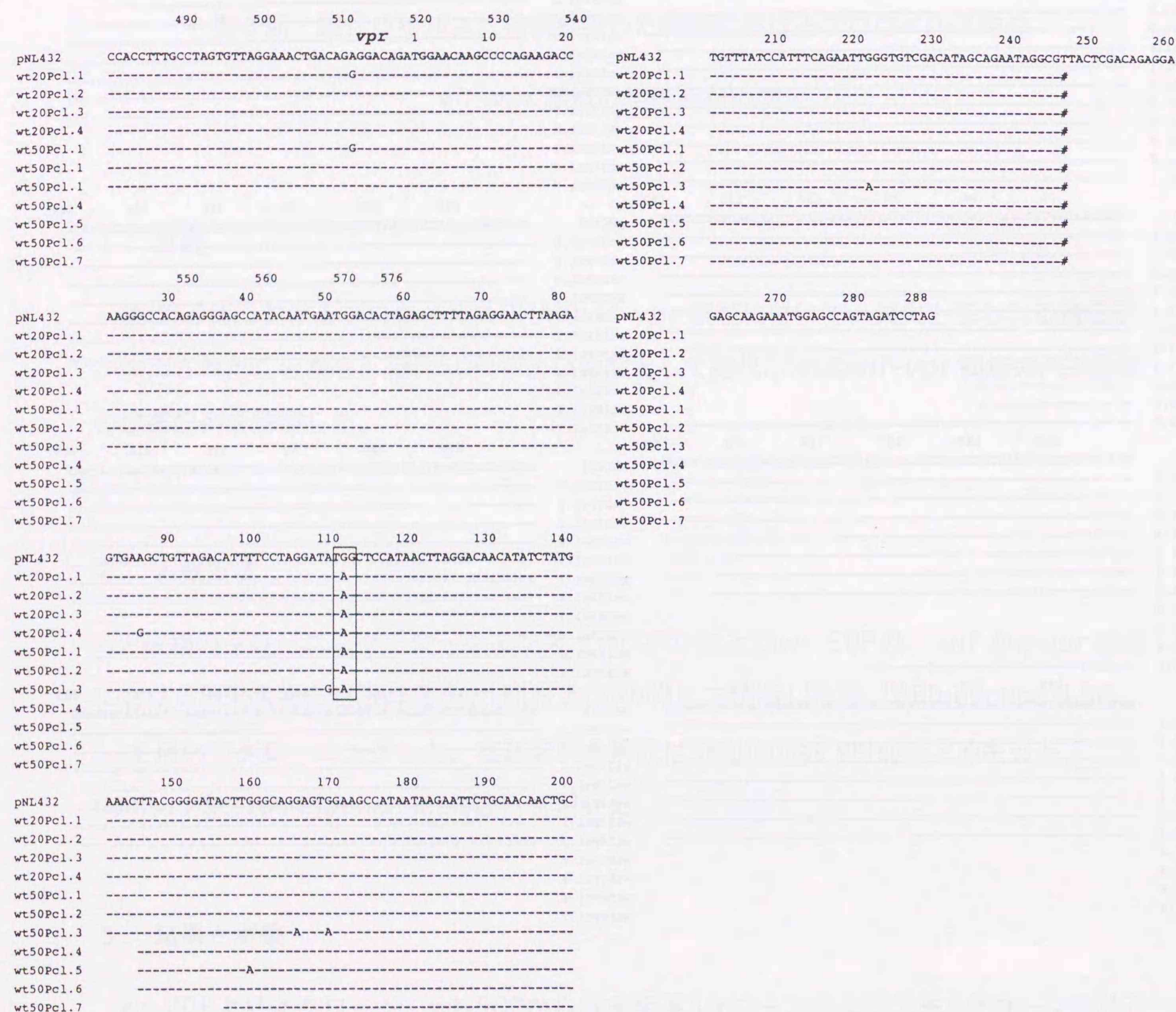


Fig. 3. Nucleotide sequences of accessory genes in proviral DNA from cells persistently infected with wt-20 and wt-50. The *vif* and *vpr* nucleotide sequences of 4 and 7 clonal DNA fragments obtained from DNA of cells persistently infected with wt-20 and wt-50, respectively, are shown. Nucleotide sequences identical with those of the pNL432 are indicated by dashed lines. The primer sites are indicated with "#". Clone wt20Pcl.1 to wt50Pcl.3 contained a nonsense mutation in *vpr*, as shown by the box.

第4節 50継代ウイルスに認められた *vif-vpr* 領域にまたがる欠失変異の分子機構

1. 目的

継代50代において見られた *vif* から *vpr* 領域にまたがる欠失の分子機構について検討した。

2. 結果と考察

wt-50Pの塩基配列の解読の結果より明らかとなった2タイプの欠失は、両タイプ共に欠失の両側に3塩基のshort direct repeat 配列 (タイプ1では、AAC、タイプ2では、ATA) を持つことから、ミスアライメント欠失である可能性が示唆された (Fig. 4)。さらに、両タイプ共に、欠失したフラグメントの両側に6塩基の相補配列が見られることから、今回認められた欠失の機構として考えられるモデルを (Fig. 5) に示した。即ち、逆転写あるいは複製、転写の段階で1本鎖となった鋳型鎖が相補配列によるステムを形成することにより、ポリメラーゼによる伸長反応が一時停止する。その間に一部のポリメラーゼは近くにあるshort direct repeat配列を認識して、鋳型鎖のステム配列を飛び越え、伸長反応を再開する可能性が考えられる。

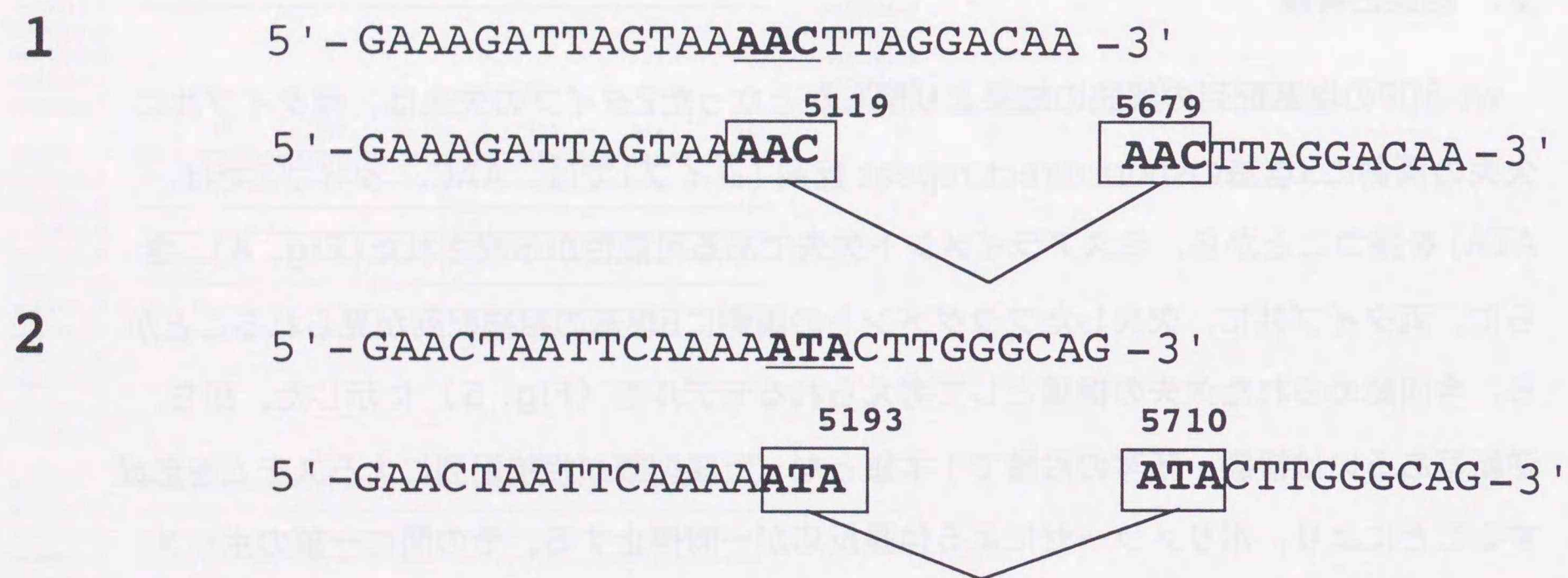


Fig. 4. The nucleotide sequences of misalignment deletion at *vif-vpr*. The nucleotide sequence occurring at junctions of deletions are shown. 1, clones wt50Pcl.4 to 6 and 2, clone wt50Pcl.7. Short direct repeats in both cases are boxed.

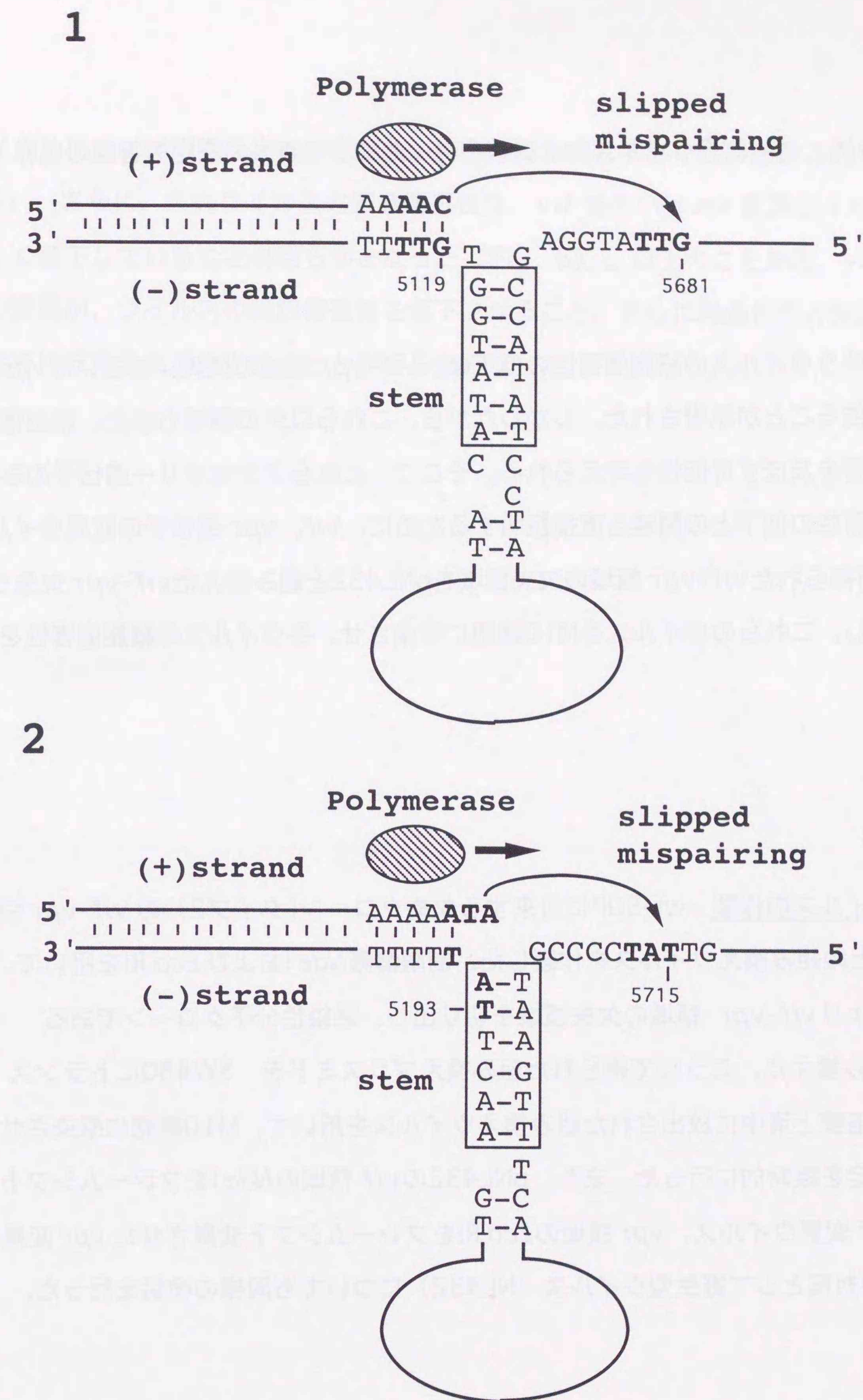


Fig. 5. A proposed model of misalignment deletion at *vif-vpr*. A proposed model to account for misalignment deletions are shown. For both cases (type 1 and 2) shown, one notes the identification of 3 bp repeat sequences (boldline) at the junction and 6 bp sequences (box) for stem-loop structures, at each side of the intervening sequence.

第5節 *vif*、*vpr* 変異ウイルスおよび*vif-vpr* 欠失ウイルスの細胞傷害性の比較

1. 目的

継代感染に伴うウイルスの細胞傷害性の低下は、*vif-vpr* 領域の欠失、あるいは*vpr* 遺伝子の変異に依ることが示唆された。しかしながら、これら以外の領域もまた、細胞傷害性の低下に影響を及ぼす可能性も考えられる。そこで、これらアクセサリー遺伝子のみの変異と細胞傷害性の低下との関連を直接証明するために、*vif*、*vpr* 遺伝子の変異ウイルス²および今回得られた*vif-vpr* 領域の欠失領域をpNL432と組み換えた*vif-vpr* 欠失ウイルスを作製し、これらのウイルスをM10細胞に感染させ、各ウイルスの細胞傷害性を検討した。

2. 実験方法

組み換えウイルスの作製：wt-50Pに由来する欠失クローン(タイプ2)の*vif-vpr* 領域とpNL432との組み換えウイルスを作製した。制限酵素*Nde*Iおよび*Eco*RIを用いて、欠失クローンより*vif-vpr* 領域の欠失領域を切り出し、感染性分子クローンであるpNL432と組み換えた。こうして得られた組み換えプラスミドを、SW480にトランスフェクトし、培養上清中に放出された組み換えウイルスを用いて、M10細胞に感染させ、生細胞数の測定を経時的に行った。また、pNL432の*vif* 領域の*Nde*Iをフレームシフト変異させた*vif* 変異ウイルス、*vpr* 領域の*Eco*RIをフレームシフト変異させた*vpr* 変異ウイルス²および対照として野生型ウイルス (NL432) についても同様の検討を行った。

3. 結果と考察

各ウイルスをM10細胞に感染させた結果、いずれの変異ウイルスも、感染性および増殖性を有することが明らかとなった (Fig. 6)。さらに、これら変異ウイルスは野生型ウ

イルスに比べ、細胞傷害性が低下し、持続感染が成立することが確認された (Fig.

6)。さらに、欠失ウイルスの細胞傷害性は、*vif* あるいは*vpr* 変異ウイルスに比べ、著しく低下していることが明らかとなった (Fig. 6)。以上のことから、*vif* あるいは*vpr* の変異が、ウイルスの細胞傷害性を低下させること、さらに両遺伝子の欠損が、細胞傷害性をほぼ完全に消失させることが明らかとなった。

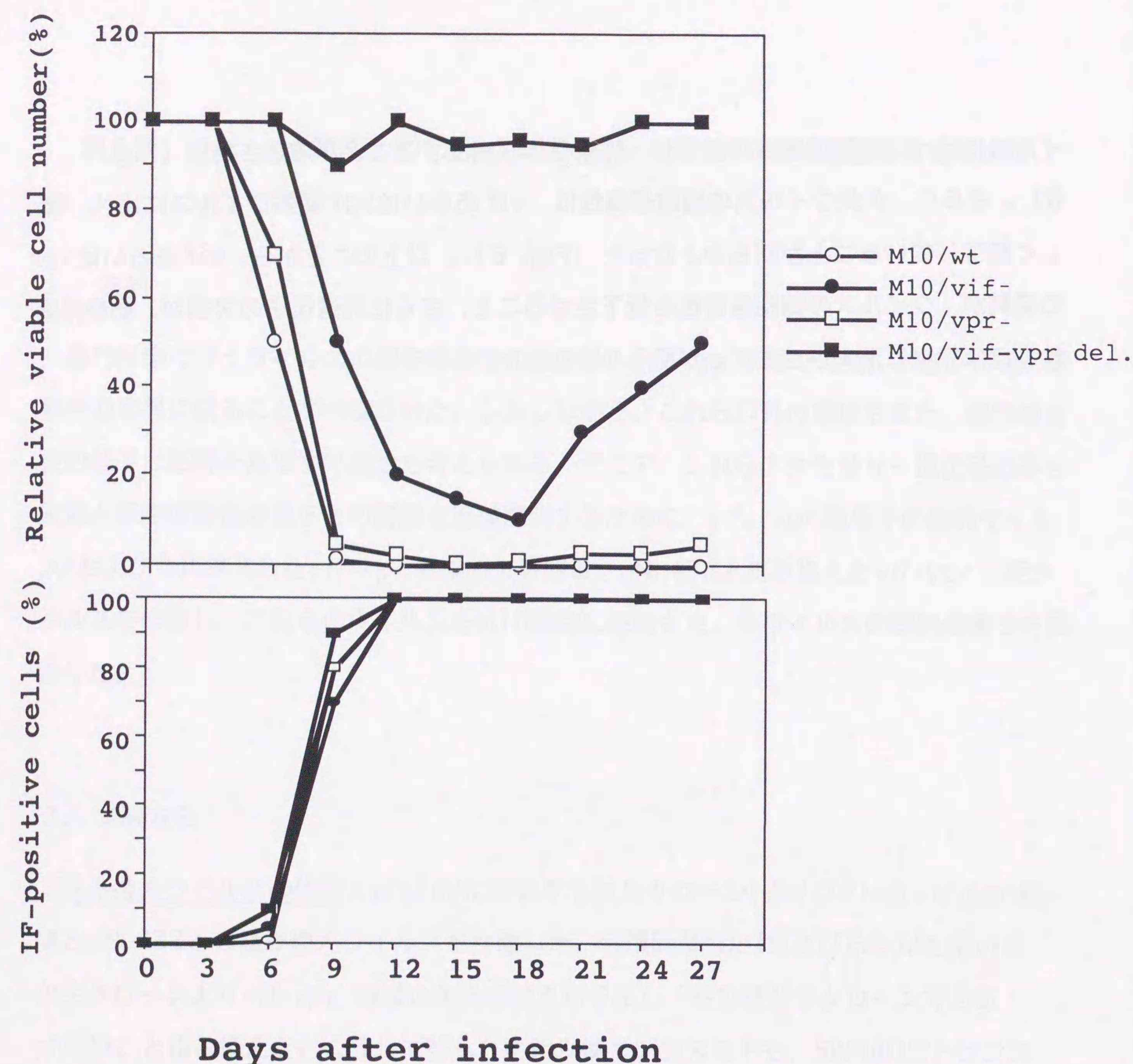


Fig. 6. Kinetics of growth for recombinant HIV-1 containing single *vif* or *vpr* mutants as well as the mutant containing the naturally occurring large deletion of *vif-vpr* gene. M10 cells were mock infected or infected with double mutant (M10/*vif-vpr* del.) at a moi of 0.01. Single mutants at *vif* (M10/*vif*-) or *vpr* (M10/*vpr*-) were used as controls. Cells were similarly infected with pNL432-derived wild type HIV-1 (wt) as a control. Medium was replaced with fresh medium at 3 day intervals after infection and viable cells were counted at 3 day intervals by the trypan blue dye exclusion method. Results show relative percentages of viable cell number for each virally infected cell, as compared with the total found from mock-infected cells. In addition, the percentages of viral antigen-positive cells by indirect IF (with serum from an HIV-1-seropositive patient) are also shown at 3 day intervals after infection.

第6節 PCRによる *vpr* 遺伝子内ナンセンス変異の定量

1. 目的

持続感染細胞内のプロウイルスDNAの多くは、*vpr* 遺伝子内にナンセンス変異を持つことが、塩基配列の解読結果 (Fig. 3) から予測された。そこで、このような *vpr* 遺伝子内のTGG(5671-5673塩基)からTAGへのナンセンス変異ウイルスの定量を行うために、ナンセンス変異を持つ遺伝子のみを選択的にPCRにより定量する方法を確立した。

2. 実験方法

プライマーの設定：野生型 *vpr* 遺伝子の検出には、5'-AAGCCACCTTTGCCTAGTGTTA-3' (5518-5539塩基) を(+)センスプライマーとして、5'-GTTGTCCTAAGTTATGGAGCC-3' (P1: 5691-5671塩基) を(-)センスプライマーとして用いた。一方、P1プライマーの下線部の2塩基が各々CT(P2プライマー)、TT(P3プライマー)、AA(P4プライマー)およびGG(P5プライマー)としたプライマーを合成し、*vpr* 遺伝子内のTGG(5671-5673塩基)からTAGへのナンセンス変異のみを検出する可能性を検討した (Fig. 7)。

半定量的PCR法：PCRの鋳型には、野生型 *vpr* 遺伝子を持つクローン(pWT)および変異型 *vpr* 遺伝子を持つクローン(pMU)を用いた。pWTおよびpMUを10倍ずつ $10^{-5} \mu\text{g}$ から $10^{-9} \mu\text{g}$ まで階段希釈し、それぞれを鋳型として、各プライマーによる検出限界を検討した。反応には AmpliTaq DNA ポリメラーゼ (Perkin elmer社) を使用し、反応条件は変性 94°C 、1分間、アニーリング 60°C 、2分間および伸長反応 72°C 、2分間の反応を30サイクルにて行った。増幅したPCR DNAは2%アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロミド染色にて解析した。

3. 結果と考察

作製したP1-P5の各(-)センスプライマー (Fig. 7) を用いて、野生型 *vpr* 遺伝子のクローン(pWT)および変異型 *vpr* 遺伝子のクローン(pMU)を10倍ずつ(10^{-5} μ gから 10^{-9} μ gまで)階段希釈したプラスミドDNAを鋳型としてPCRを行った。その結果、P1プライマーはpWTおよびpMUに対し、それぞれ 10^{-8} μ g、 10^{-7} μ gまで検出可能であった。一方、P2プライマーではpWTおよびpMUに対する検出感度はそれぞれ 10^{-7} μ g、 10^{-8} μ gであった。また、P3プライマーではpWTは検出限界以下であったのに対し、pMUに対する検出感度は 10^{-7} μ gであった。さらに、P4およびP5プライマーはpWTおよびpMUいずれも検出することはできなかった (Fig. 7)。

以上の結果から、P1プライマーおよびP3プライマーを用いて *vpr* 遺伝子のナンセンス変異の割合を測定することとした。pMU/(pWT+pMU)比をそれぞれ0.001、0.01、0.1、0.25、0.5、0.75、0.9、0.99および0.999とした鋳型DNAに対するP1プライマーおよびP3プライマーの検出限界率(P3/P1)をプロットした結果、(Fig. 8) に示す様にpMU/(pWT+pMU)比と検出限界率(P3/P1)は正の相関関係にあり、回帰直線は、 $\log Y = 0.9888 \log X - 0.01197$ [X : pMU/(pWT+pMU), Y : 検出限界率(P3/P1) $r=0.9976$] となった。

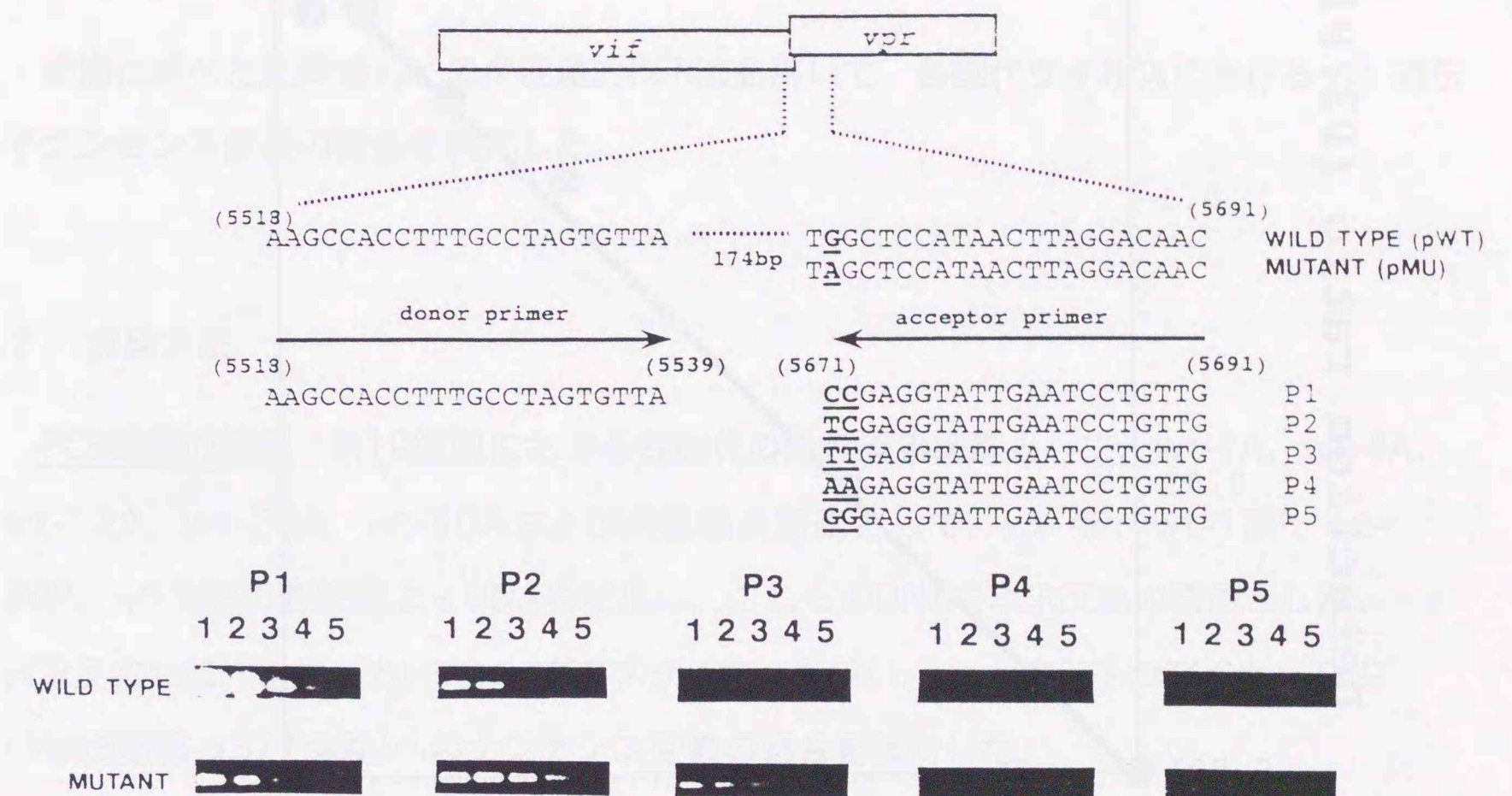


Fig. 7. Selective PCR amplification of nonsense *vpr* gene. Serial ten-fold dilutions of 1 μ g pWT containing wild-type *vpr* sequence and 1 μ g pMU containing *vpr* with nonsense mutation were subjected to PCR by using five acceptor primers P1 to P5 and the same donor primer as described in Fig. 2. The numbers 1 to 5 indicate about 10^{-5} to 10^{-9} μ g of plasmid DNA subjected to PCR.

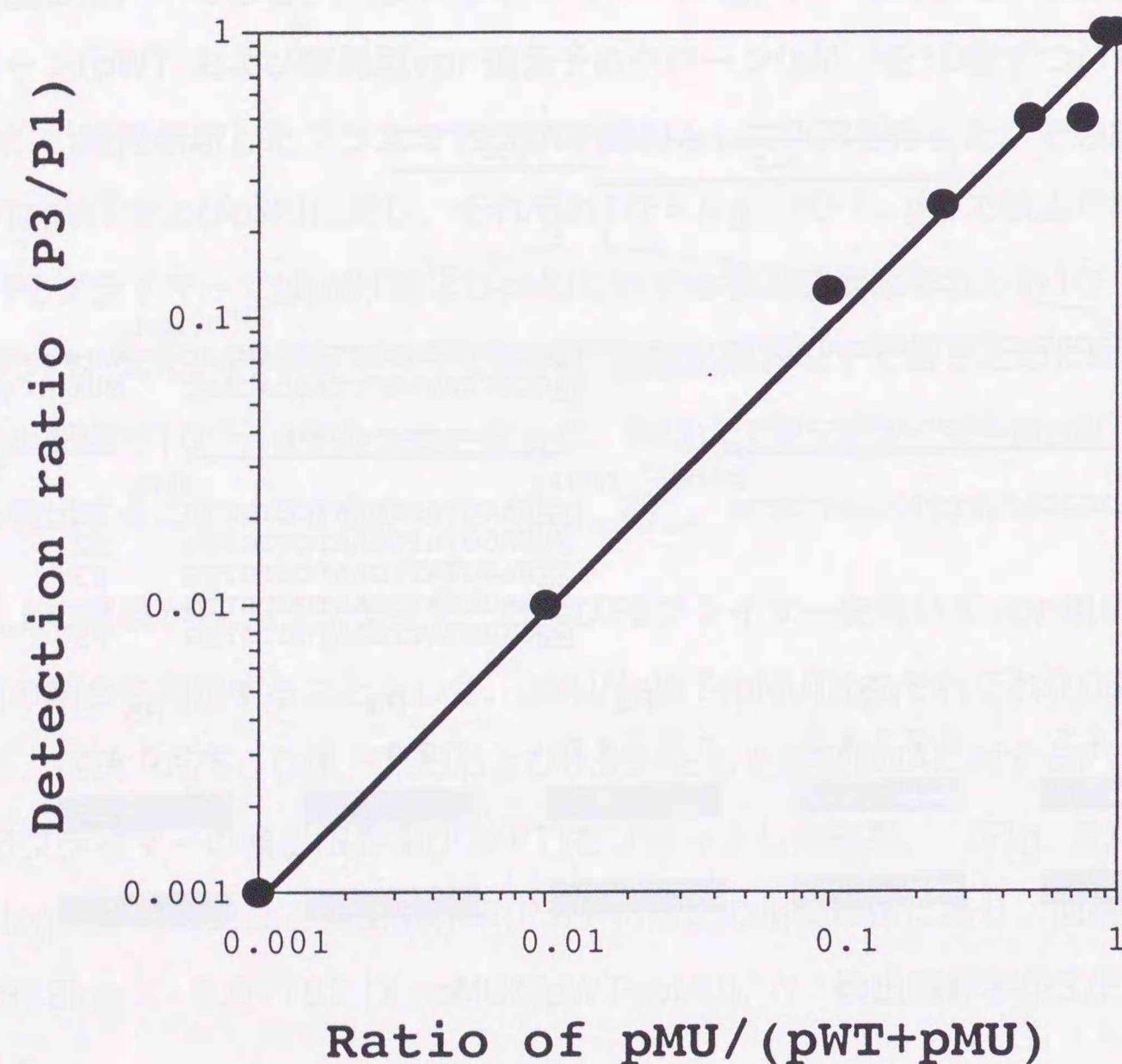


Fig. 8. Efficiency to detect the *vpr* sequence with nonsense mutation in the mixed samples with wild-type *vpr* by PCR using P1 and P3 primers. Serial ten-fold dilutions, and two-fold dilutions if necessary, of 1 μ g DNA samples containing pWT and pMU, in which ratios were 999:1, 99:1, 9:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:9, 1:99, and 1:999, were similarly subjected to PCR. Standard curve fits to the linear equation $[\log y = 0.9888 \log x - 0.01197$ ($r=0.9976$)].

第7節 各継代ウイルスにおける *vpr* 遺伝子内ナンセンス変異の定量

1. 目的

前節に述べた変異型 *vpr* の半定量的PCR法を用いて、各継代ウイルスにおける *vpr* 遺伝子ナンセンス変異の割合を決定した。

2. 実験方法

PCR鑄型の調整 : M10細胞における各継代の急性感染細胞として、wt-1A、wt-4A、wt-12A、wt-20A、wt-50Aおよび持続感染細胞として、wt-4P、wt-12P、wt-20P、wt-50Pの各細胞よりDNAを抽出し、これらのDNAをPCR反応の鑄型とした。PCR反応には、上述したP1およびP3プライマーを用い、*vpr* 遺伝子のTGGからTAG (5699塩基-5671塩基)へのナンセンス変異の割合を検討した。

3. 結果と考察

ナンセンス変異の割合は (Fig. 8) に示した回帰直線より算出した。その結果、ナンセンス変異を伴うウイルスは、急性感染期において継代と共に増加した。wt-1Aでは変異ウイルスの割合は、検出限界以下であるのに対し、wt-4Aでは0.1%、wt-12Aでは0.4%、さらにwt-20Aおよびwt-50Aでは13.2%であった (Table 1)。従って継代と共にこの *vpr* ナンセンス変異を持つウイルスの割合が上昇すること、および継代20代以降ではそれ以上の割合の変化は認められないことが明らかとなった。一方、持続感染細胞では、ナンセンス変異の割合は、急性感染期と比較して相対的に高く、wt-4Pでは1.0%、wt-12Pでは10.6%であり、さらに wt-20Pおよびwt-50Pでは、ほぼ全てのウイルスが変異型であることが明らかとなった (Table 1)。従って、*vpr* ナンセンス変異を持つウイルスに感染した細胞が、選択的に持続感染していると考えられた。

Table 1. Percentage of HIV-1 genome with the mutant *vpr* sequence in M10 cells acutely and persistently infected with serial passaged viruses

Passage number	<i>vpr</i> mutant ratio	
	Acute (%)	Persistent (%)
1	<0.1	None
4	0.1	1.0
12	0.4	10.6
20	13.2	100
50	13.2	100

第8節 HIV-1感染者の末梢血単核球由来のプロウイルスDNAにおける

vpr 遺伝子のナンセンス変異の検出

1. 目的

HIV-1感染者の生体内には、持続あるいは潜伏感染しているウイルスが多く存在することが報告されている。本研究で見られた*vpr* 遺伝子のナンセンス変異を伴うウイルスが実際にHIV-1感染者の生体内においても存在する可能性を検討した。

2. 実験方法

HIV-1感染者の検体：無症候性キャリア（AC）期由来67検体（34名）およびAIDS関連症候群（ARC）/AIDS期由来14検体（8名）のPBMCより抽出したDNAを用いた。このDNA試料は2年5カ月に渡って採取した。これらのDNAを鋳型としてnested PCRによりHIV-1遺伝子を増幅させた後、上述した方法により*vpr* 遺伝子内のナンセンス変異の検定を行った。

3. 結果と考察

最初に、DNA試料中のHIV-1遺伝子の検出感度を確認するために、抽出したDNA 1 μ gより10倍ずつ段階希釈したものを鋳型とし、*gag* 領域のnested-PCRを行った。その結果、PCRにより検出可能であった検体は、AC期由来67検体中60検体、またARC/AIDS期では14検体中14検体であった。そこで、これらPCR検出が可能な検体について、*vif*から*vpr* にまたがる領域の1st PCR産物を鋳型としてP1プライマーおよびP3プライマーを用いた*vpr* ナンセンス変異の検出を行った。その結果、（Table 2）に示すように、*vpr* ナンセンス変異が検出された検体は、AC期由来60検体中21検体（35.0%）、またARC/AIDS期では14検体中6検体（42.9%）であり、生体内においても高い頻度で*vpr* 変異ウイルスが存在することが確認された。さらに個体内において、変異ウイルスの割合

は時間の経過と共に極めて大きく変動することも明らかとなった。本研究期間(2年5カ月)中に、*vpr* 遺伝子のナンセンス変異が検出された感染者の割合は、AC期由来34名中17名(50.0%)、またARC/AIDS期では8名中6名(62.5%)であった。

Table 2
Detection of HIV-1 *vpr* nonsense mutation in PBMC from HIV-1 carriers

HIV-1 carrier	Clinical stage	Date for PBMC preparation	<i>gag</i>	<i>vpr</i> ^a	<i>vpr</i> stop codon ^b	HIV-1 carrier	Clinical stage	Date for PBMC preparation	<i>gag</i>	<i>vpr</i> ^a	<i>vpr</i> stop codon ^b
K.T.	AC	91.12. 9	+++ ^c	+++	+++	T.H.	AC	91. 2. 4	++	+++	-
T.N.	AC	92. 6. 1	+++	++	+			91. 4. 8	+++	++	-
		91. 2. 4	+++	++	+			91. 8.12	++	++	-
		91.12. 9	+++	+++	++	O.K.	AC	91. 3. 4	+++	++++	-
K.R.	AC	92. 6.29	+++	++	++			92. 7. 6	+++	+++	-
		90.12.10	+++	+++	++	I.T.	AC	91. 4. 8	++	+++	-
		93. 3. 8	+++	++	++			91. 8.12	++	++++	-
N.H.	AC	91. 5.27	+++	++	+	F.Y.	AC	93. 4.26	+++	+++	-
M.C.N.	AC	91. 6.17	+++	++	+	G.Y.	AC	91. 3. 4	++	++	-
S.O.	AC	91.12. 9	+++	+++	++			92. 1. 6	+++	++	-
J.D.	AC	91. 4.15	+++	++	+	K.M.	AC	93. 4.12	+++	+	-
T.M.	AC	91. 1. 7	++	+++	-	K.M.	AC	90.12.10	++	++	-
		91. 3. 4	+++	++	++	T.K.	AC	91. 1.28	+++	++	-
		91. 5.13	+++	+++	++	N.H.	AC	91. 2. 4	+++	++	-
		91. 8.19	+++	+	-	F.D.	AC	91. 1.15	+++	++	-
		92. 5.25	++	++	-	T.N.	AC	92. 2.24	+++	++	-
M.H.	AC	91. 1. 7	++++	++++	++++	Y.S.	AC	92. 4. 6	+++	++	-
		91. 3. 4	++	+++	-	F.M.	AC	92. 5.25	+++	++	-
		91. 8.19	+	++	-	H.K.	AC	93. 2. 1	+++	++	-
		93. 2. 8	+++	++	-	F.S.	AC	93. 3. 8	++	+++	-
B.N.	AC	91. 1.28	+++	++	-	T.T.	AC	93. 3.15	+++	++	-
S.Y.	AC	91. 2. 4	++	++	++	N.K.	AIDS	91. 2. 4	+++	++	++
		91. 1.28	+++	++	-			92. 6. 3	+++	++	++
		92. 1.27	++	++	-	T.T.	AIDS	91. 1. 7	++	+++	++
W.S.	AC	92. 6. 8	++	++	+	S.M.	AIDS	91. 7. 8	+++	+++	++
		91. 3.25	+++	++	-						
		91. 9.30	+++	++	-	F.T.	ARC	91. 2. 4	+++	++	-
H.J.	AC	92. 6.15	+++	++	+			91. 6.10	++	++	+
		91. 5.10	++	++	-			91. 8. 5	+++	++	-
		91. 7. 8	+++	++	-	R.B.	ARC	91. 3.25	+++	+++	-
T.Y.	AC	92. 6.29	++	+++	+			91. 4. 8	+++	++	-
		91. 9. 2	+++	++	-			91. 5.27	++++	++++	+++
		93. 3.22	++	++	+						
G.M.	AC	92. 6. 8	+++	++	-	T.G.	AIDS	92. 7.13	++	++	-
A.N.	AC	92. 6.15	+++	++	+			93. 4. 5	+++	++	-
		93. 2. 1	+++	++	+	U.M.	ARC	91. 8.26	+++	+	-
U.Y.	AC	93. 3.29	++	++	-	M.S.	ARC	92. 5.25	+++	++	-
		91. 1. 7	++	++	-						
		91. 9.30	++	++	-						

^aPCR amplification with P1 primer.

^bPCR amplification with P3 primer.

^cSerial 10-fold dilutions of DNA preparation (1 µg) from AC and ARC/AIDS patients were subjected to PCR amplification with *gag* primers. *vpr* primers for wild-type and mutant sequences (P1) and *vpr* primers for only mutant sequence (P3). The results were shown as follows by the highest dilution showing specific amplification: -, <1 µg; +, 1 µg; ++, 100 ng; +++, 10 ng; +++++, 1 ng.

第9節 この章のまとめ

1. HIV-1の*in vitro* 継代感染により、低細胞傷害性のウイルスが現れ、継代4代以降は持続感染する細胞が出現した。持続感染の原因を明らかにするために、各継代ウイルスの遺伝子解析を行ったところ、継代と共に*vpr* 遺伝子内のナンセンス変異の割合が増加し、20代以降の持続感染細胞では、ほぼ全てのプロウイルスが変異型であることが明らかとなった。これらのことから、*vpr* 遺伝子の変異が細胞傷害性の低下をもたらす一因であることが示唆された。

2. 継代50代において、*vif* から*vpr* にかけてミスアライメント欠失と思われる変異を伴うウイルスが検出された。この領域に欠失を持つウイルスは、複製、増殖が可能であり、さらに細胞傷害性をほぼ消失していることが、組み換えウイルスを用いた感染実験により明らかとなった。

3. *vpr* 遺伝子内のナンセンス変異は生体内のプロウイルスにも認められ、*in vivo* における存在様式の一つであることが示唆された。

第2章

RREデコイオリゴヌクレオチドによるHIV-1増殖抑制効果

第1節 小序論

HIV-1感染の初期には二回スプライスされたmRNAのみが翻訳され、Tat、RevおよびNefといったウイルスの複製を調節するタンパク質（調節タンパク質）が作られる。その後、Gag、EnvおよびPolといったウイルスの粒子形成に必要な構造タンパク質およびVif、VprおよびVpuといったアクセサリ遺伝子と呼ばれるタンパク質の合成が開始される。この内、Envとアクセサリ遺伝子のmRNAは一回のスプライス型として、残るGagとPolのmRNAは二回のスプライス型として合成される。

Tatは5'側の非翻訳領域にある*trans*-activation responsive (TAR) RNAと呼ばれる領域に結合し、転写酵素であるRNA IIポリメラーゼによるウイルスmRNAの伸長反応を助け、完全長の転写産物の産生に寄与する^{15,29}。一方、Revは非スプライスあるいは一回スプライスされたウイルスmRNAにあるRev-response element (RRE)と呼ばれる領域と結合し、mRNAの小胞体への移行に関与することが明らかになっており、構造タンパク質の翻訳に寄与している¹⁴。RREは*env* 領域に位置し、234ヌクレオチドからなる2次構造領域であると報告されたが⁴⁶、最近では、1つのlong stemと4つのstem-loop構造からなる351塩基領域が、完全長のRREであることが明らかとなった⁴⁷。Stem IIbにあるinternal loop内の29ヌクレオチドからなる部位がRevタンパク質との最初の結合領域であり²⁸、始めに一つのRevがその部位に結合した後、新たなRevタンパク質がStem IIb、IIaおよびIの順に結合すると共に、Revタンパク質が互いに結合し、マルチマーを形成する⁴⁷。RRE領域のRev結合部位は、その2次構造からbubble構造と呼ばれている。このbubble構造に相当する13塩基を含むオリゴヌクレオチドが、Revと1対1の結合をすることが報告されている²⁸。

Revには主として2つの働きがあることが報告されている²¹。その一つは、Revがスプライシングを阻害するか、あるいはスプライソゾームの集合を阻害することである。Revによるスプライソゾームの形成阻害により、HIV-1のプレmRNAが、核から細胞質に移行できるようになると考えられている。もう一つは、Revが直接プレmRNAを細胞質に移送することである。この説はRevが細胞内のスプライスおよび非スプライスウイルスRNAの量比に影響を与えず、細胞質におけるウイルスRNAの蓄積をもたらすといった実験結果にも適合する。最近の研究結果は、2番目の仮説を支持するものが相次いでおり、分子生物学的手法により、Revにおける機能部位の同定もなされている^{21,66,11}。現在までに明らかとなっている機能部位を（Fig. 1）にまとめた。Revのアミノ末端側にはRRE結合部位、Revの重合および核移行に関与する部位があると考えられている。一方、中央領域にはactivationまたはeffector domainと呼ばれ、一つあるいは複数の細胞因子と結合することが示唆されている部位が存在する。これら細胞因子は核移行に関与することが示唆されていたが、最近になり、その候補となるタンパク質の同定が進んでいる^{21,66,11}。TatとTAR、およびRevとRREの結合は、HIV-1の遺伝子発現に特有なものであることから、これらの相互作用を阻害することは、ウイルスの複製を阻止する上で極めて有効である。そういった観点から今までに幾つかの試みがなされ、デコイオリゴヌクレオチドRNA^{23,39,44,67,68}、trans-dominant タンパク質^{6,27,45,50,59}およびアンチセンスオリゴヌクレオチド^{20,42,43}の、抗ウイルス剤としての有効性が指摘されてきた。

本研究では、上述したベクターウイルスで発現させる試みとは違った新たな抗ウイルス剤の候補として、Revの働きを阻害することが予測される合成RREデコイオリゴヌクレオチドを用い、HIV-1感染細胞内のウイルスの増殖に与える影響を検討した（Fig. 2）。RREのRev結合部位（bubble構造）を含む合成オリゴヌクレオチド（RREオリゴヌクレオチド）は、Revと結合することが示された⁵⁵。これらのRREオリゴヌクレオチド（ARO-2）は、ヒトT細胞由来株であるMOLT#8細胞、M10細胞およびCEM細胞に感染したHIV-1の増殖を抑制することが明らかとなった⁵⁵。さらに、RREオリゴヌクレオチドは、ヒト末梢血単核球細胞に感染したHIV-1（臨床株）のウイルス産生を抑制した⁵⁵。これらのことから、RREオリゴヌクレオチドの抗ウイルス剤としての可能性が示された。

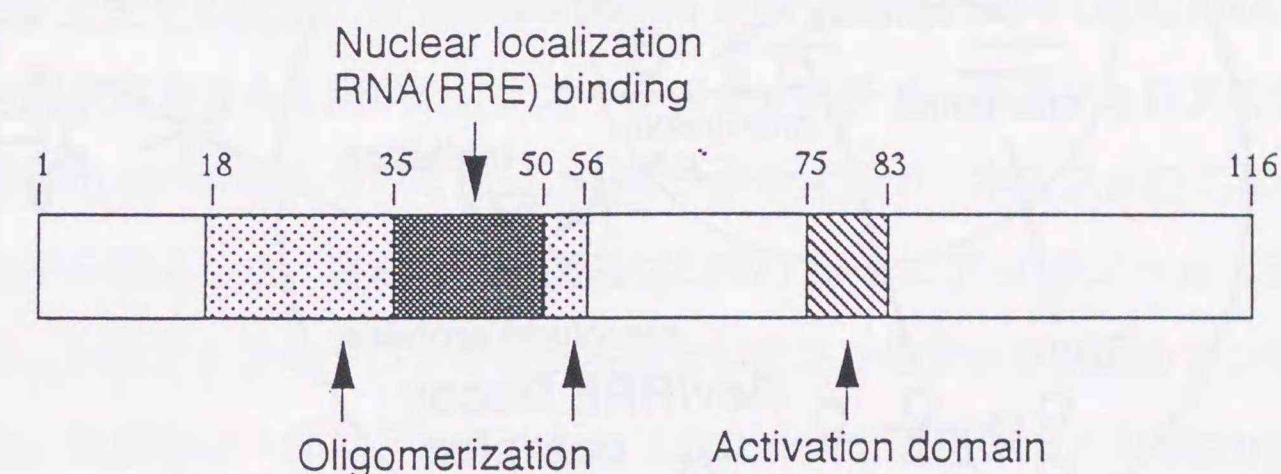


Fig. 1. Proposed domain structure of the HIV-1 Rev.

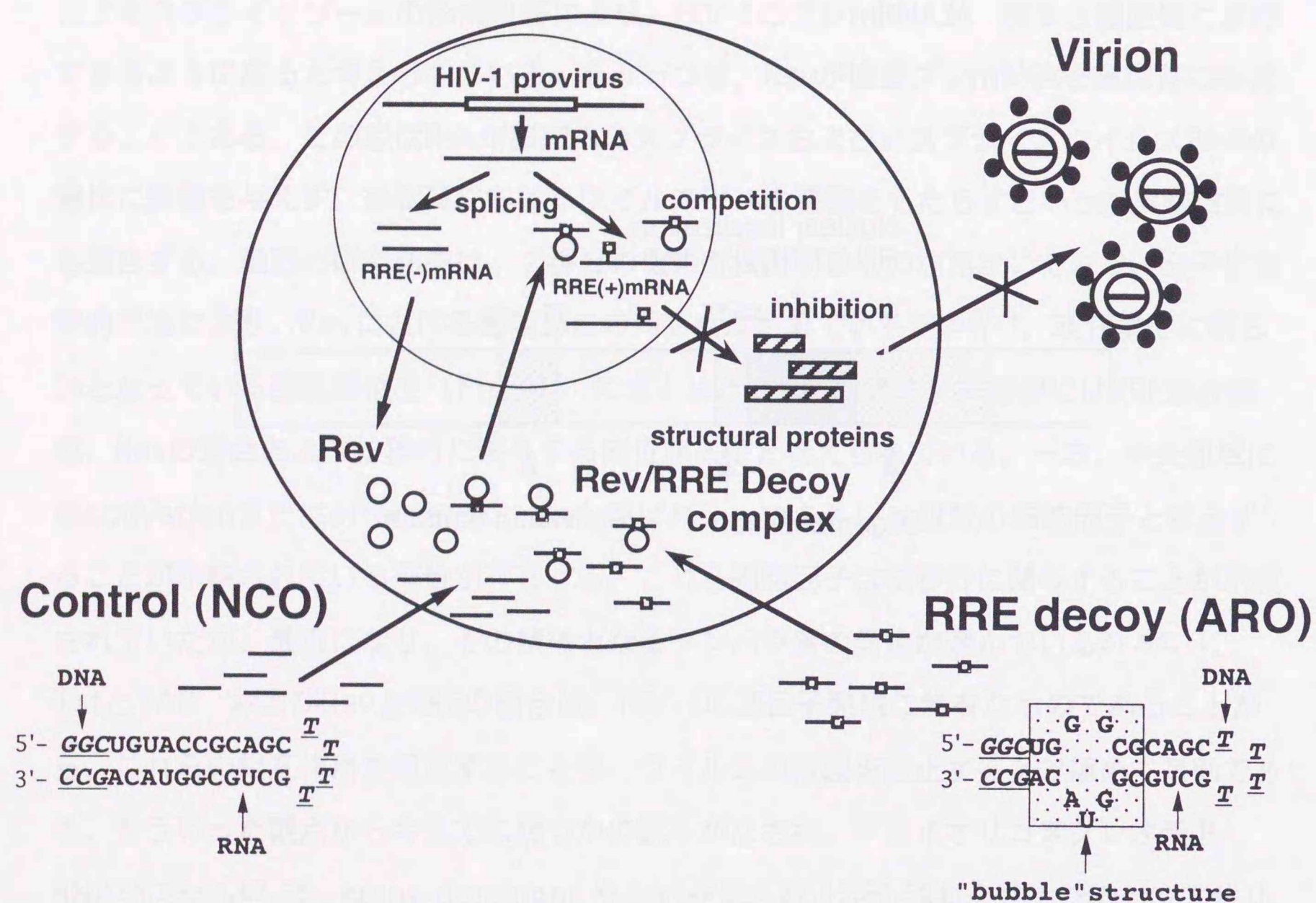


Fig. 2 Structure of synthetic RRE decoy oligonucleotide and model of inhibitory effect of decoy RRE oligonucleotide on HIV-1 replication.

第2節 RRE デコイオリゴヌクレオチドの構築

1. 目的と実験方法

RREデコイオリゴヌクレオチドとして、6つのオリゴヌクレオチドを合成した (Fig. 3)。

オリゴヌクレオチドの合成：合成にはApplied Biosystems 394 DNA/RNA 合成機を使い、10 μ mol反応カラムを用いた。デオキシヌクレオチド ホスホロアミデートおよび試薬はPerkin elmer社のものを用い、リボヌクレオチド ホスホロアミデートはMillipore社から購入した。合成後、保護基は28%アンモニア-エタノール (3 : 1. v/v) 処理した後、1 M テトラヒドロフランを溶媒としたフッ化テトラブチルアンモニウムにて取り除いた。生成物の一部はアルキル化シリカゲル (分取用C18 : Millipore 社) カラムにて精製した。オリゴヌクレオチドは高圧液体クロマトグラフィー (HPLC) にてTSK-ゲルDEAE-2SW カラム (7.8 x 300 mm; TOSO社) を用い、20% アセトニトリル溶液中のギ酸アンモニウムの連続勾配により、単一ピークとして純化した。さらに、Sephadex G-25 (Pharmacia社) を用いたゲル濾過にて脱塩した。

RBC6は岩井ら²⁸が、Revと*in vitro*において1 : 1結合をすることを報告したオリゴヌクレオチドである。本研究では、RBC6のステムの片方をループ化させることにより、安定化を計った (RBC5L)。さらにデコイオリゴヌクレオチドとして細胞内に取り込ませて作用させることから、細胞内におけるRNaseから保護するために片側、あるいは両側をDNAとしたものを構築した (ARO-1、2)。一方、対照として不完全な "bubble" 構造および "bubble" 構造を完全に消失させたもの (NCO-1、2) を構築した。

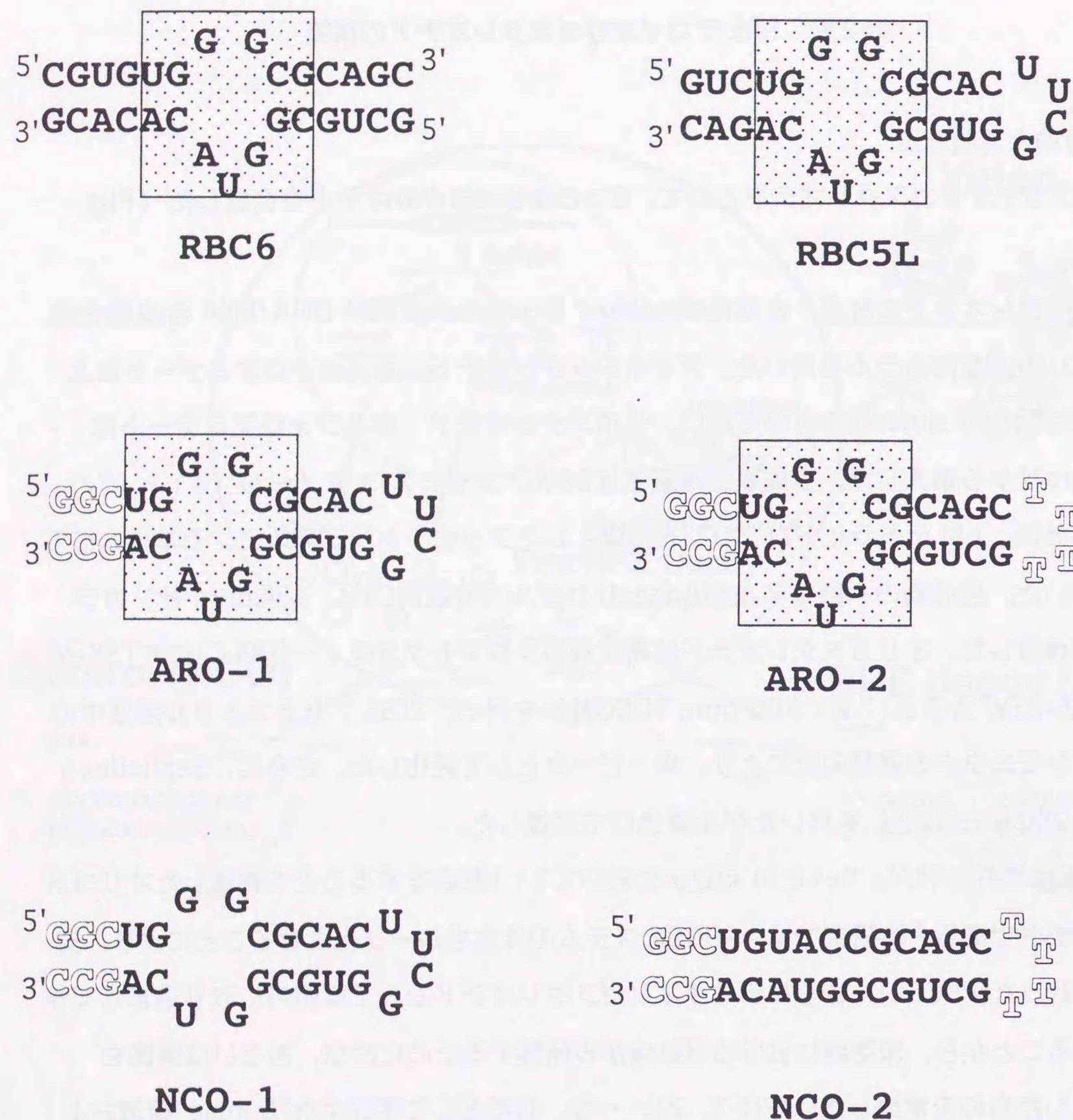


Fig. 3. Oligonucleotides used in this study. The high-affinity Rev binding site with a "bubble" structure is boxed. Deoxyribonucleotides are outlined.

第3節 *in vitro* におけるRREデコイオリゴヌクレオチドとRevタンパク質との結合

1. 目的

上述したオリゴヌクレオチドとRevとの結合性を検討するために、既にRevとの結合能が証明されているRBC6とRevとの結合に対し、それ以外の5つのオリゴヌクレオチドが競合することをフィルター結合法により確認した。

2. 実験方法

***In vitro* 競合アッセイ:** RBC6 (500 pmol)を、T4 polynucleotide kinase (10 units)、50 mM Tris-HCl(pH8.0)、10 mM MgCl₂、5 mM dithiothreitol および20 μ M ATP存在下で、[γ -³²P] ATP (3.6 $\times$ 10⁷ cpm)により標識した。標識したオリゴヌクレオチドは7 M ウレアを含む20 %ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動した後、NENSORB 20カラム (Du Pont社) にて精製した。

標識したRBC (6 1.5 nM : 約15,000 cpm)と組み換えRevタンパク質(20 nM; Repligen社)を、未標識の競合オリゴヌクレオチド (0から60nMまでの各濃度)、80 units/ml RNasin (Promega)、TK緩衝液 (50 mM Tris-HCl、pH 8.0 および20 mM KCl) および0.1% Triton X-100存在下で反応させた。反応は氷中で15分以上行い、その後、反応液はセルロースニトレートメンブレン (ポアサイズ0.2 μ mの2.5 cmディスク) を通した後、0.6 mlの冷TK緩衝液で2回洗浄した。洗浄後、メンブレンを乾燥させ、BAS-2000 (FIJIX社) にて放射線活性を測定した。

結果と考察

In vitro 競合アッセイの結果、"bubble"構造を持つオリゴヌクレオチド(RBC5L、ARO-1およびARO-2)は、濃度依存的にRBC6 とRevとの結合を阻害した (Fig. 4) 。また、阻害の程度は、RBC5LとARO-2 がほぼ同じであり、ARO-1はやや低かった。このことから、ARO-1、ARO-2のDNA-RNAキメラオリゴヌクレオチドが、本来のRNAオリゴヌクレオチド(RBC5L)と同程度のRevに対する結合性を示すことが明らかとなった。

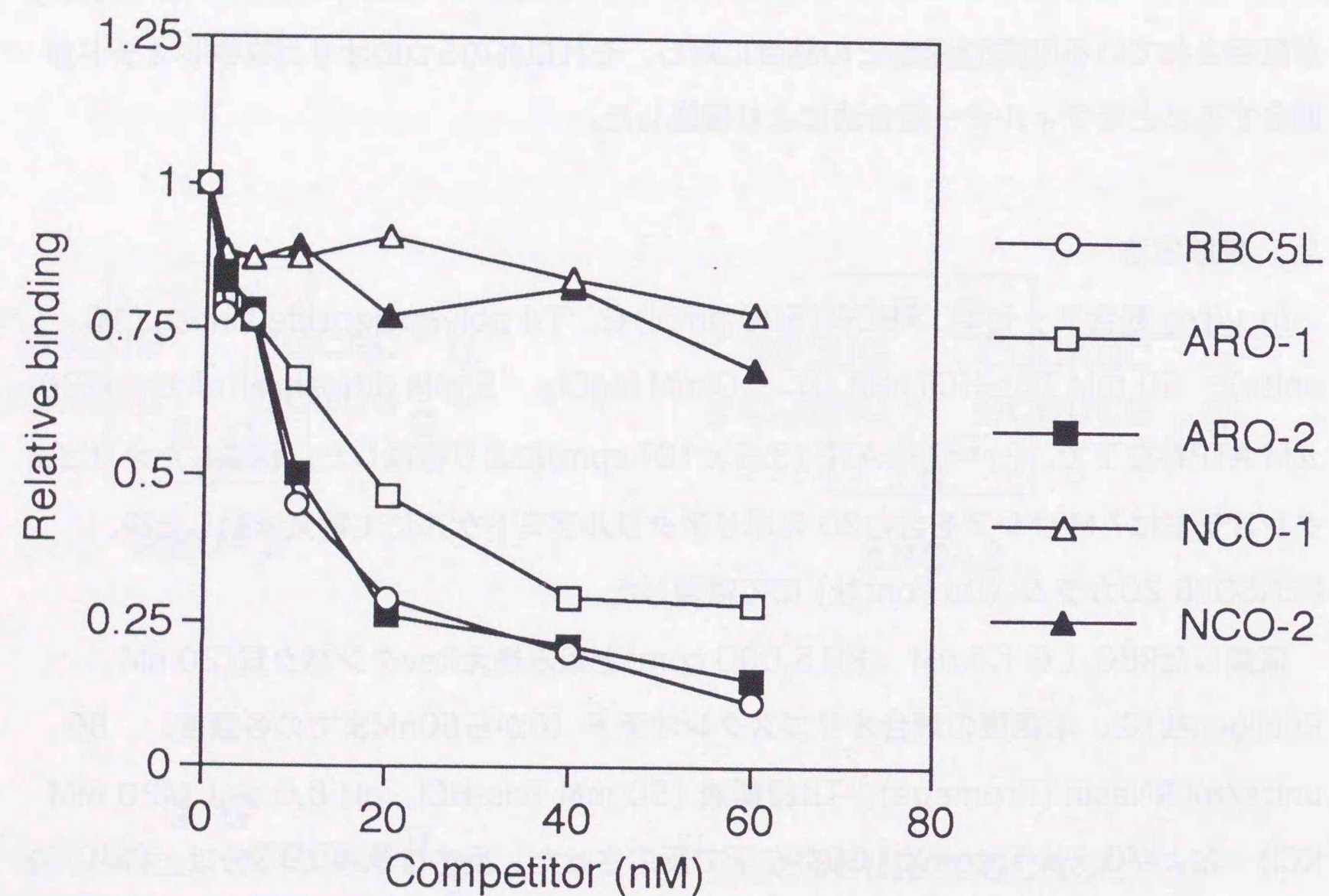


Fig. 4. Competition of the decoy against ^{32}P -labeled RBC6. Varied concentrations (0 to 60 nM) of the decoys (RBC5L, ARO-1, ARO-2, NCO-1 and NCO-2) were mixed with ^{32}P -labeled RBC6 in the presence of 20 nM Rev. The radioactivity retained on the filter with Rev was quantified using a Bio Imaging Analyzer.

一方、対照とした"bubble"構造を持たないオリゴヌクレオチド(NCO-1およびNCO-2)は、RBC6 とRevとの結合を阻害せず、Revと結合しないことが示された。

ARO-1のRevに対する結合性はRBC5LおよびARO-2に比べ、若干弱かったことから、標識および未標識オリゴヌクレオチドを用いたself-competition フィルターアッセイおよびscatchard 解析により、各オリゴヌクレオチドとRevとの解離定数 (K_d) を計算した。その結果、RevとRBC5L、ARO-1およびARO-2の K_d 値はそれぞれ 1.6×10^{-9} 、 2.4×10^{-9} 、 8.4×10^{-10} Mであった (Fig. 5)。以上の結果から、ARO-2がARO-1に比べ、Revとの結合性が高いことが確認され、以下の実験には主にARO-2を使い、対照として、オリゴヌクレオチドの両端がDNA化されており、安定性がARO-2に近いと考えられるNCO-2を用いた。

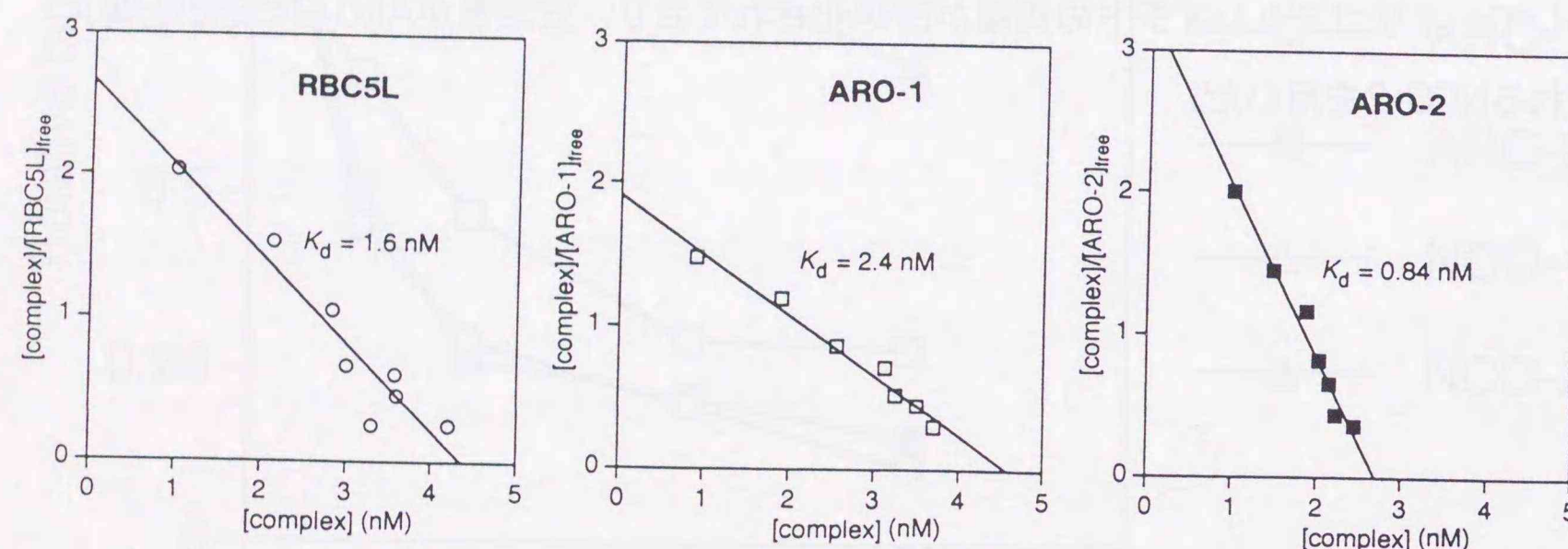


Fig. 5. Dissociation constant for the complexes obtained by a self competition filter assay. The dissociation constant (K_d) of the Rev complexes retained on the filter as shown in Fig. 4 was determined by a Scatchard analysis.

第4節 RREデコイオリゴヌクレオチドの細胞傷害性の検討

1. 目的

デコイオリゴヌクレオチドを抗ウイルス剤として、細胞に加える場合、オリゴヌクレオチド自身の細胞に与える毒性が問題となる。そのため、ヒトT細胞株であるMOLT-4のクローンNo.8 (MOLT#8) 細胞を使ってデコイオリゴヌクレオチド(ARO-1、ARO-2、NCO-1およびNCO-2)の細胞増殖に及ぼす影響を検討した。

2. 実験方法

MOLT#8細胞培養：24 ウェルマイクロプレート中のMOLT#8細胞 (5×10^5 cells/ml) に対し、各オリゴヌクレオチド (ARO-1、ARO-2、NCO-1およびNCO-2) をそれぞれ0.1、1および10 μ M 加えた。デコイオリゴヌクレオチドは24時間毎に添加し、添加後1日および3日の生細胞数をトリパンブルー染色法にて測定した。

3. 結果と考察

各試験区における細胞数を測定した結果、各オリゴヌクレオチド間あるいは添加濃度の違いによる細胞増殖性の変化は認められず、対照としたオリゴヌクレオチド非添加区のものと同様であった (Fig. 6)。これらのことから、10 μ Mまでの濃度によるデコイオリゴヌクレオチドでは細胞傷害性は認められないことが明らかとなった。

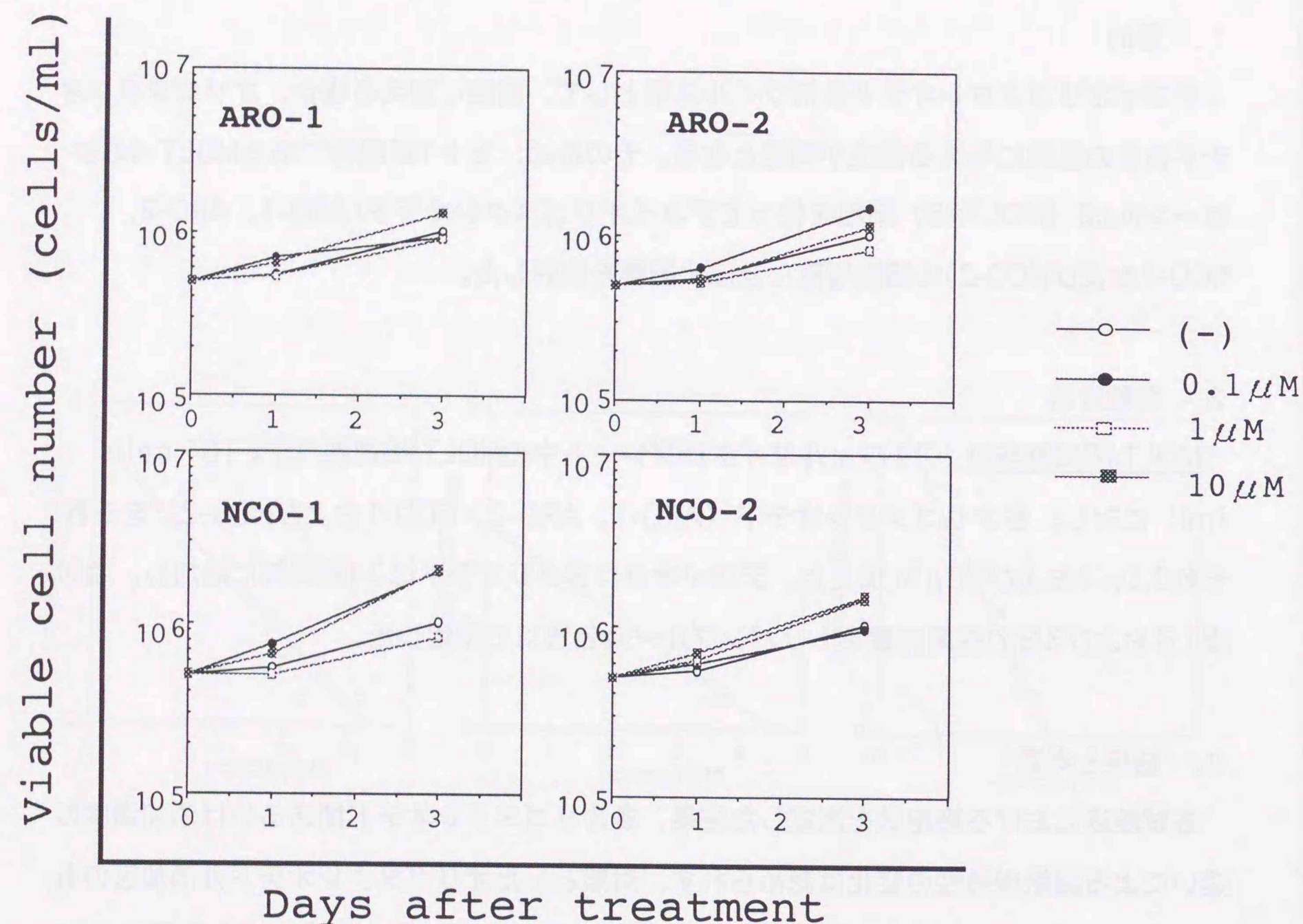


Fig. 6. Cytotoxicity test of RRE decoys in MOLT#8 cells. MOLT#8 cells at $5 \times 10^5/\text{ml}$ were cultured in complete medium in the absence (-) or presence of decoys (ARO-1, ARO-2, NCO-1, and NCO-2) at various concentrations (0.1, 1, and $10 \mu\text{M}$). Decoys were added every 24 h. The viable cells were determined after 1 and 3 day incubations by trypan blue dye exclusion.

第5節 HIV-1 産生細胞(MOLT#8/LAIおよびM10/LAI)における RREデコイオリゴヌクレオチドのウイルス増殖抑制効果

1. 目的

In vitro においてRevタンパク質とRREデコイオリゴヌクレオチドが結合すること、さらにその複合体は他のRREとの結合を阻害することが示された。そこで、これらの効果がHIV-1感染細胞において認められるかを検討するために、HIV-1感染細胞にRREデコイオリゴヌクレオチドを加え、感染細胞より放出されるウイルス量を測定した。

2. 実験方法

HIV-1感染細胞 (MOLT#8/LAI) へのデコイオリゴヌクレオチドの添加 : ヒトT細胞株であるMOLT#8細胞にHIV-1のLAI株を感染させ、得られた持続感染細胞(MOLT#8/LAI, $5 \times 10^5 \text{ cells/ml}$) に、RREデコイオリゴヌクレオチドを添加した。添加後の培養上清を回収し、逆転写酵素 (RT) アッセイおよびGag p24抗原のELISA(Intracel社)を行い、ウイルス産生量を定量した。

RTアッセイ : RTアッセイは以下の方法で行った。培養上清 $4 \mu\text{l}$ に5% NP40液を加え、超音波にてウイルス粒子を破碎した後、50 mM Tris-HCl (pH 8)、7.5 mM KCl、2 mM DTT、4.95 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $5 \mu\text{g/ml}$ poly(rA)および $6.25 \mu\text{g/ml}$ oligo d(T)の反応液 $10 \mu\text{l}$ を加え、さらに $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{dTTP}$ (800 Ci/ μl , New England Nuclear社)を加えて 37°C で3時間反応させた。反応後、反応液をDEAEフィルター (DE81, Whatman社) にスポットし、 $2 \times \text{SSC}$ にて洗浄した後、乾燥させ、BAS 1000(FIJIX社)にて放射線活性量を測定した。

Gag p24抗原ELISA : Gag p24抗原の定量は、キットのプロトコールに従い測定した。

3. 結果と考察

RREデコイオリゴヌクレオチドの、添加時間および添加量の検討を行った。MOLT#8

/LAIに、RREデコイオリゴヌクレオチドを最終濃度 $1\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ および $40\mu\text{M}$ で添加した。添加は8時間毎および24時間毎に行い、添加後48時間の培養上清を回収し、RTアッセイを行った。その結果、ARO-2添加区において添加濃度 $1\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ において濃度依存的にウイルス産生量の低下が認められた。また、添加濃度 $40\mu\text{M}$ 区では $10\mu\text{M}$ 区とウイルス産生量に違いは見られなかった。さらに、8時間毎および24時間毎の両試験区による違いも認められなかった。そこで、以降の実験は、オリゴヌクレオチドの添加濃度を $1\mu\text{M}$ および $10\mu\text{M}$ 、添加時間は24時間毎で行うこととした。

次に、より長い時間のウイルス増殖抑制効果を検討するために、MOLT#8/LAI細胞にRREデコイオリゴヌクレオチドを $1\mu\text{M}$ および $10\mu\text{M}$ の濃度で24時間毎に加え、添加後2日、4日および6日の培養上清中のウイルス量を、RTアッセイおよびGag p24抗原のELISAにて測定した。RTアッセイによる測定の結果、ARO-2添加区において、2日後からウイルスの増殖抑制が認められ、その傾向は4日、6日でより顕著になった (Fig. 7A)。一方、NCO-1、NCO-2およびARO-1区ではこのようなウイルス増殖抑制効果は認められなかった。また、ARO-2によるウイルス増殖抑制効果は、Gag p24抗原ELISAによるウイルス量の測定でも確認された (Fig. 7B)。これらのことから、デコイオリゴヌクレオチド、特にARO-2によるウイルス増殖抑制効果が、長時間安定して認められることが明らかとなった。

上述したウイルス増殖抑制効果がMOLT#8細胞に特異的である可能性があるため、別のヒトT細胞株であるMT-4細胞のサブクローンであるM10細胞に、HIV-1 (LAI株)が持続感染した細胞 (M10/LAI) を用い、デコイオリゴヌクレオチドによるウイルス増殖抑制効果を上記と同じ方法により検討した。その結果、M10細胞においてもMOLT#8細胞と同様に、ARO-2特異的にウイルス産生を抑制した (Fig. 8)。

以上の結果から、デコイオリゴヌクレオチドARO-2が、HIV-1持続感染細胞において、ウイルス産生を抑制することが確認された。

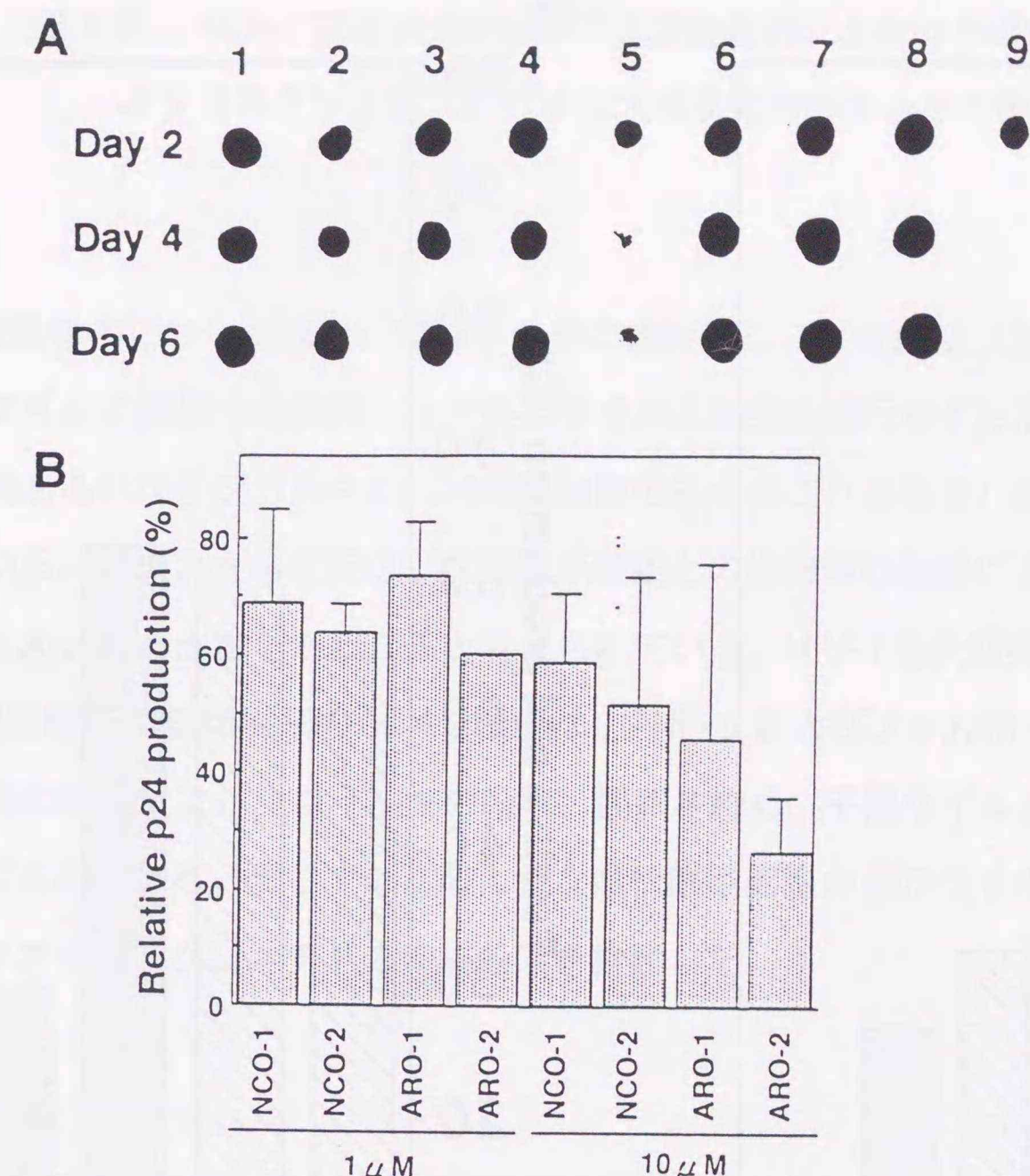


Fig. 7. Inhibitory effects of RRE decoys on HIV-1 production from MOLT#8/LAI cells. The MOLT#8/LAI cells at $5 \times 10^5/\text{ml}$ were cultured in the absence (1) or presence of decoys (2 and 6, NCO-1; 3 and 7, NCO-2; 4 and 8, ARO-1; and 5 and 9, ARO-2) at 1 (2-5) or 10 (6-9) μM . Decoys were added every 24 h for 6 days. The conditioned media of these cultures were assayed for HIV-1 RT activity every 2 days and the activity was visualized on X-ray film (A). The same conditioned media obtained on day 6 were also subjected to Gag p24 antigen-capture ELISA (B).

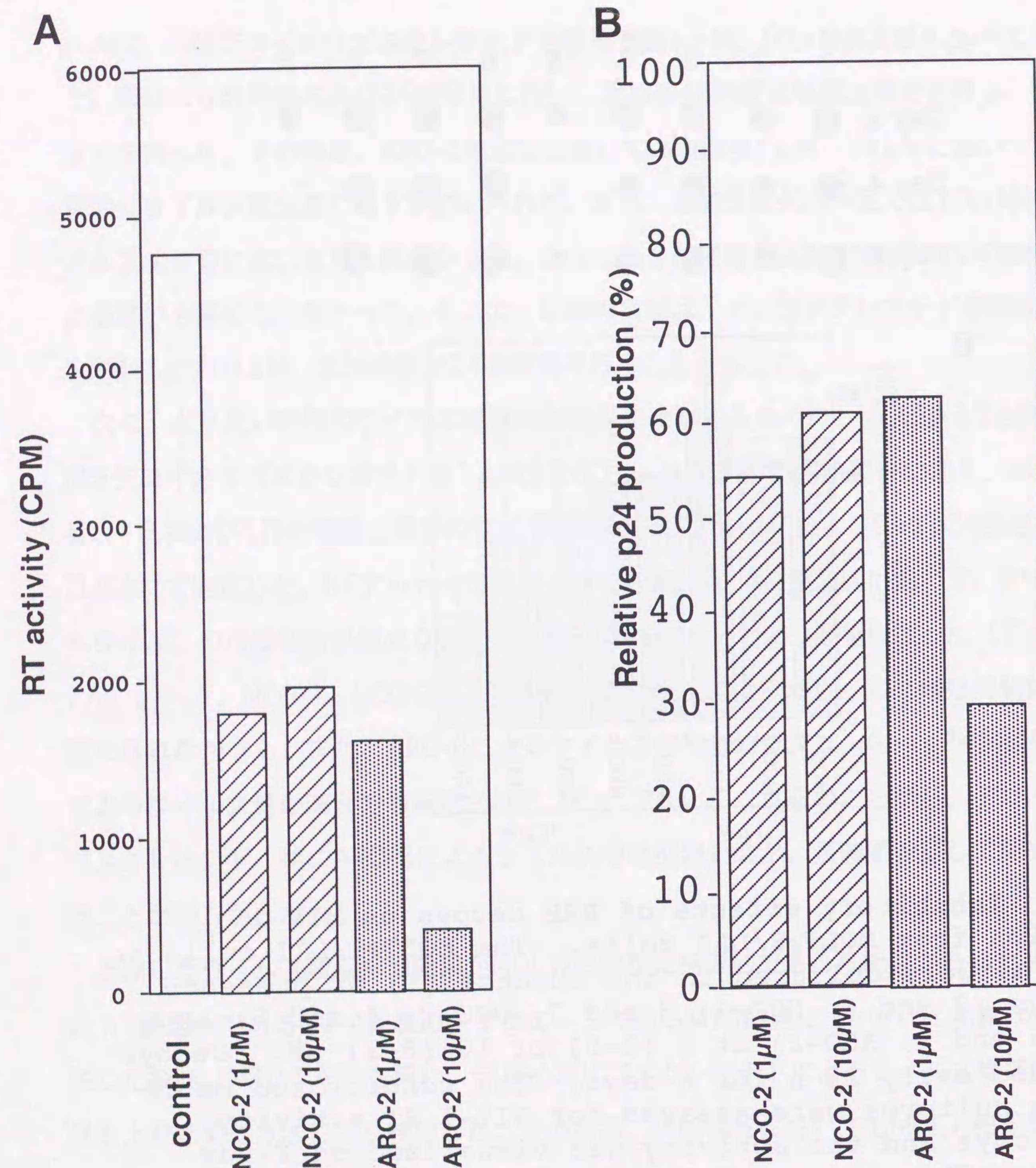


Fig. 8. Inhibitory effects of RRE decoys on HIV-1 production from M10/LAI cells. The M10/LAI cells at 5×10^5 /ml were cultured in the absence or presence of decoys at 1 or 10 μ M. Decoys were added every 24 h for 6 days. The conditioned media of these cultures were assayed for HIV-1 RT activities 4 days after treatment and the activity was quantified using a scintillation counter (A). The same conditioned media were also subjected to Gag p24 antigen-capture ELISA (B).

第6節 ACH-2細胞内潜伏HIV-1の活性化時におけるRREデコイオリゴヌクレオチドのウイルス増殖抑制効果とその機序

1. 目的

HIV-1は生体内において感染、増殖を活発に繰り返している細胞（血液中のPBMC等）以外に、ウイルス遺伝子は保持したままでウイルスの産生は行わずに潜伏している細胞（神経細胞あるいはリンパ節中のCD4陽性細胞の多くがこれに相当）が存在することが報告されている。このような細胞は、抗原提示細胞との接触等の刺激により活性化し、その過程でウイルスの再活性化が起こると考えられている。HIV-1潜伏感染のモデル細胞であるヒトT細胞株CEM細胞由来のACH-2細胞は、TNF- α およびフォルボールエステル（PMA）等の刺激により、ウイルスの転写、翻訳を始め、子孫ウイルスを産生することが明らかにされている。そこで、このような潜伏感染細胞からのウイルスの再活性化に対するデコイオリゴヌクレオチドの抑制効果を検討した。

2. 実験方法

HIV-1感染細胞（ACH-2）へのTNF- α による刺激とデコイオリゴヌクレオチドの添加：ACH-2細胞（ 1×10^6 cells/ml）にTNF- α を最終濃度50 units/mlになるように加えた後、デコイオリゴヌクレオチド（1 μ M、10 μ M）を添加し、添加後4日目の細胞におけるGagタンパク質の発現量を間接蛍光抗体法（IFA法）およびイムノブロット法にて解析、定量した。

IFA法：IFA法は以下の方法で行った。8ウェルスライドガラス上に塗末し、冷アセトンにて固定したACH-2細胞に、抗Gag p24モノクローナル抗体（V107：10 μ g/ml）を反応させ、FITC標識抗マウスIgG抗体を2次抗体として反応させた。

イムノブロット法：イムノブロットは以下の方法で行った。0.5% NP40に懸濁させたACH-2細胞から得られた可溶性タンパク質をSDS-ポリアクリルアミドゲルにて泳動し、PVDFメンブレン（Millipore社）にセミドライ法にてブロッティングし、抗Gagモノクローナル抗体V107による反応後、HRP標識抗マウスIgG抗体を2次抗体として反応させ、

ECL western blotting detection 試薬 (Amersham 社) によりX線フィルムに感光させ、laser densitometry (FAST SCAN社) により定量した。

ノーザンブロット法：さらに感染細胞におけるウイルスのmRNA発現レベルの解析を行うため、感染細胞のHIV-1 mRNAに対するノーザンブロッティングを行った。ACH-2細胞よりIsogen (Nippon gene社) にて全RNAを抽出し、1.5%アガロースゲルにより電気泳動した後、ナイロンメンブレン (Hybond-N+, Amersham社) にブロットした。メンブレンはHIV-1 DNAを鋳型としたランダムプライム法 (Random Primer DNA Labelling kit ver.2.0, TAKARA社) によるプライマーと反応させた後、BAS1000にて解析した。また対照区としてglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNAに対するハイブリダイゼーションを行い、転写されたRNA量を確認した。

3. 結果と考察

TNF- α による刺激を加えたACH-2細胞にデコイオリゴヌクレオチドを添加し、添加4日後における細胞のGag p24タンパク質発現をIFAにより解析した結果、非処理区、NCO-2処理区に比べ、ARO-2処理区では発現量の有意な低下が認められた (Fig. 9A)。また、イムノブロットによる定量により、タンパク質発現量は約50%低下していることが明らかとなった (Fig. 9B、C)。従って、RREデコイオリゴヌクレオチドは、潜伏感染細胞におけるウイルスの再活性化を抑制することが明らかとなった。さらに、ノーザンブロット法による解析の結果、ウイルスのmRNAの発現は、非スプライス、1回スプライスおよび2回スプライス全てのRNAにおいて抑制されていることが明らかとなった (Fig. 10)。一方、MOLT#8/LAI細胞におけるHIV-1のmRNA 発現パターンはNCO-2処理区、ARO-2処理区および対照区においても変化がないことが明らかとなり (Fig. 10)、細胞により、デコイオリゴヌクレオチドによるウイルス増殖抑制効果が、必ずしも同じ機序で起きていない可能性が示唆された。

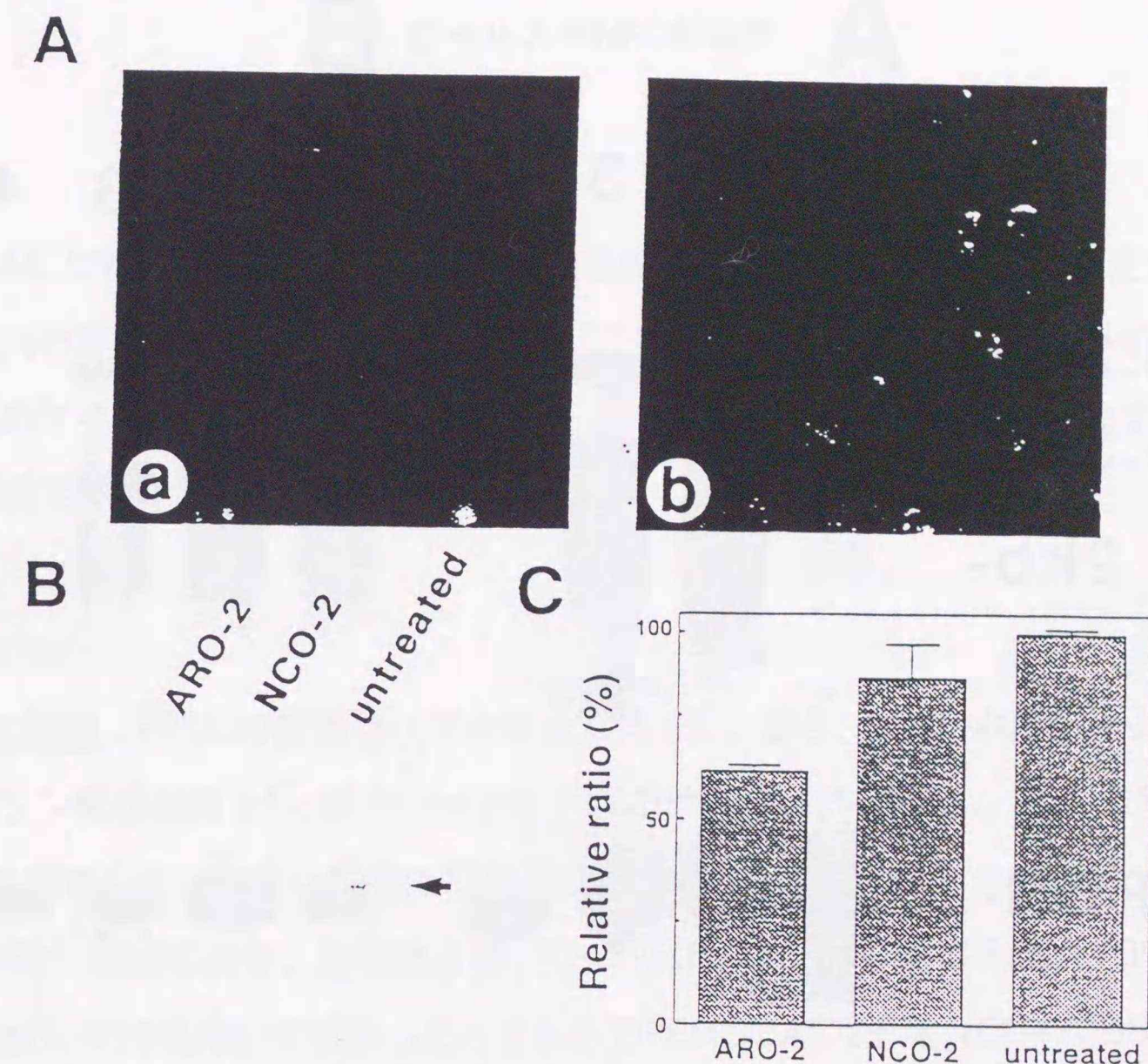


Fig. 9. Reduction of HIV-1 antigen expression by ARO-2 decoy in ACH-2 which has been stimulated with TNF- α . The ACH-2 cells stimulated with TNF- α in the presence of ARO-2 (a) or NCO-2 (b) at 10 μ M for 4 days were smeared, fixed and reacted with V107 anti-Gag p24 monoclonal antibody (A). HIV-1 proteins (arrow) in the cells were also analyzed by ECL Immunoblotting with V107 antibody (B). Each band of Gag proteins was scanned by laser densitometry (C). The relative ratio (%) of Gag protein amounts in the cells treated with ARO-2 or NCO-2, compared with that in the untreated cells, was calculated.

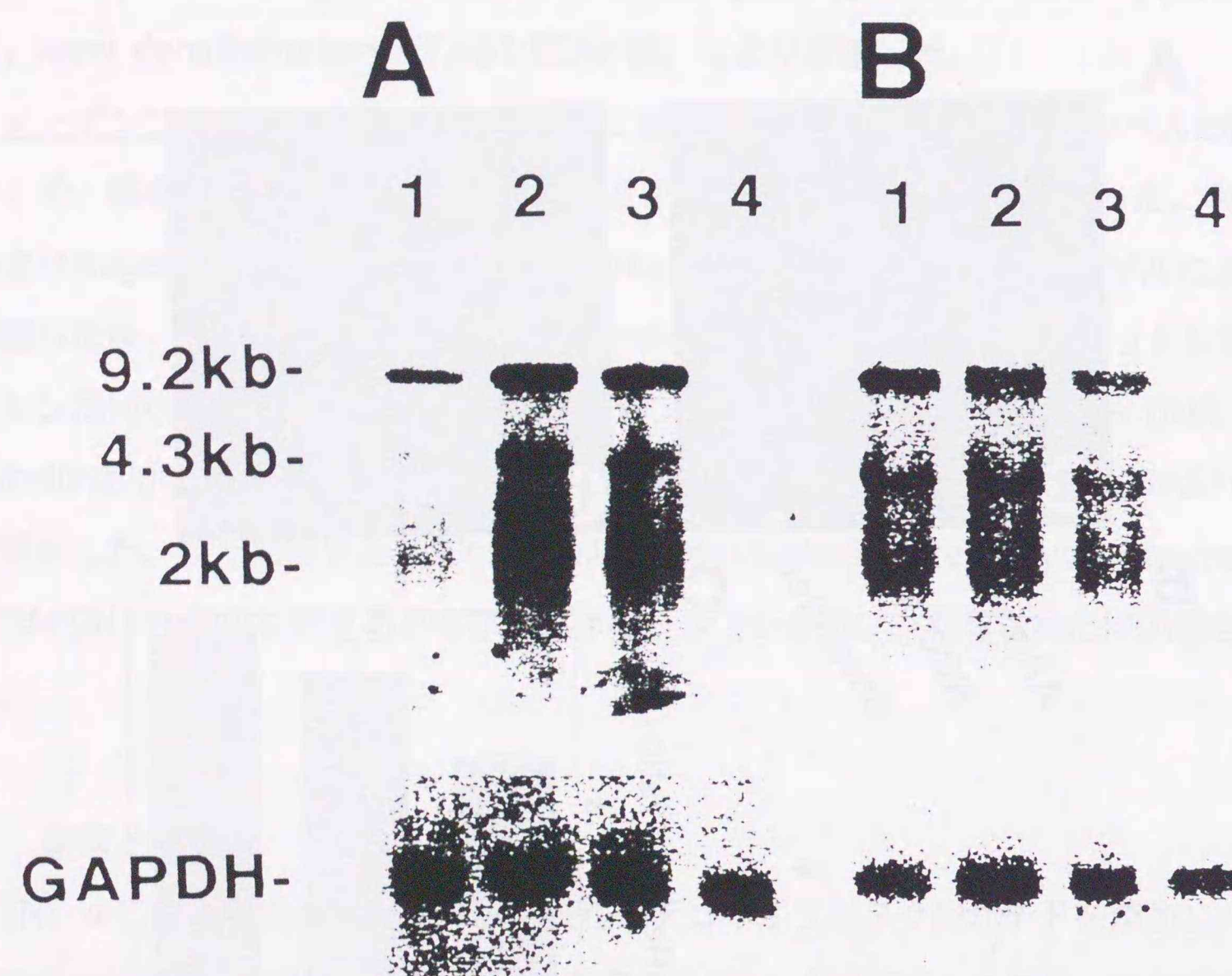


Fig. 10. Northern blots of viral mRNAs in ACH-2 stimulated with TNF- α or MOLT#8/LAI in the presence of RRE decoys. HIV-1 in ACH-2 was activated by stimulation with TNF- α for 4 days (A). The cells were exposed to ARO-2 (1) or NCO-2 (2) at 10 μ M or not (3). Decoys were added every 24 h. ACH-2 cells without TNF- α or ARO-2 were also used as controls (4). MOLT#8/LAI cells were similarly treated with 10 μ M decoys, without TNF- α stimulation (B). The cells were exposed to ARO-2 (1) or NCO-2 (2) at 10 μ M or not (3). The control was uninfected MOLT#8 cells (4). The RNA extracted from these cells was Northern blotted using 32 P-labeled DNA containing almost full-length HIV-1 sequences as a probe. RNA loading was determined by GAPDH probe.

第7節 臨床株を用いた末梢血単核球細胞におけるRREデコイオリゴヌクレオチドのウイルス増殖抑制効果

1. 目的

ヒトPBMCに対する臨床ウイルス株の感染実験は、*in vitro* のHIV-1感染系において、最も生体内の感染動態を反映する。そこで、これらの感染系を用いて、デコイオリゴヌクレオチドのウイルス増殖抑制効果を検討し、デコイオリゴヌクレオチドの抗ウイルス薬としての可能性を検討した。

2. 実験方法

PBMCの調整：PBMCの調整は以下の方法で行った。即ち、HIV-1非感染者より提供されたヘパリン処理血液をFicoll-Hypaque (Pharmacia社) に重層し、遠心分離後、PBMC層を回収した。こうして得たPBMCを、5 μ g/mlのphytohemagglutinin (Sigma Chemical社) 添加により、活性化させ、IL-2 (50 units/ml) を加えた (10% ウシ胎児血清添加) RPMI培地にて培養した。これらのPBMCにAIDS患者 (CD4/CD8比=0.01、CD4 細胞数=2/mm³) より分離したウイルス (臨床株) を加え、感染させた。また対照区として、pNL432由来の実験ウイルス株であるNL432を用いた。感染後5時間に、デコイオリゴヌクレオチド (ARO-2およびNCO-2) を最終濃度10 μ Mになるように添加し、感染6日後の培養上清を回収し、RTアッセイを行った。

3. 結果

臨床ウイルス感染PBMCにおいて、ARO-2 区では有意にウイルス産生量を低下させた (Fig. 11)。この抑制効果は、対照区であるNCO-2では見られなかったことから、これらの系においてもデコイオリゴヌクレオチドのウイルス増殖抑制効果が確認された。また、NL432ウイルスを用いたPBMC感染試験での抑制効果は、臨床ウイルス感染区と比較し、若干低かった (Fig. 11)。以上のことより、PBMCを用いた臨床ウイルス感染系において、デコイオリゴヌクレオチドの増殖抑制効果が確認された。

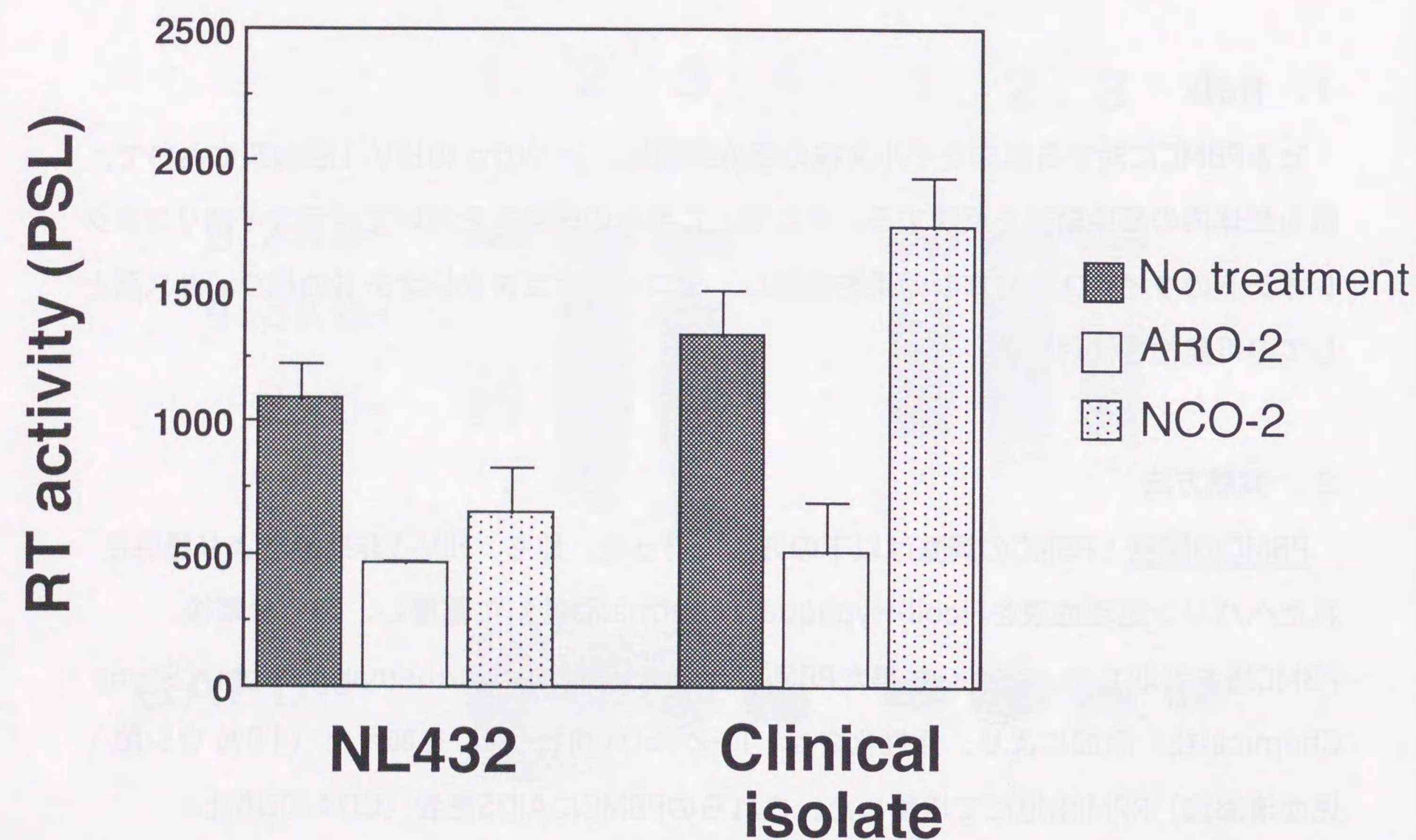


Fig. 11. Inhibitory effects of RRE decoys on HIV-1 production from PBMCs acutely infected with primary isolate. The PBMCs derived from a HIV-1-negative healthy donor and stimulated with PHA were infected with primary HIV-1 isolate from AIDS patient or pNL432-derived virus (NL432). RT activity in the conditioned media of the cultures on day 6 in the absence or presence of ARO-2 or NCO-2 at 10 μ M, was examined. The decoy was added every 24 h. Standard deviation from the mean (error bars) was calculated for triplicate samples.

第8節 この章のまとめ

1. RREのRev結合部位 (bubble構造) を含むオリゴヌクレオチド (RREオリゴヌクレオチド) を合成した。これらのオリゴヌクレオチドはRevと結合することが明らかとなった。
2. RREオリゴヌクレオチド (ARO-2) は、添加濃度1 μ Mから10 μ Mの濃度で、ヒトT細胞由来株であるMOLT#8 およびM10細胞に持続的に感染したHIV-1 (実験株) のウイルス産生を抑制した。また、HIV-1が潜伏感染したヒトT細胞由来株 (CEM) であるACH-2細胞において、TNF- α によるウイルスのタンパク質合成を抑制した。一方、添加濃度10 μ MにおけるRREオリゴヌクレオチドの細胞に対する傷害性は認められなかった。
3. RREオリゴヌクレオチド (ARO-2) は、ヒト末梢血単核球細胞に感染したHIV-1 (臨床株) のウイルス産生を抑制した。

第3章

ヒトにおけるボルナ病ウイルスの感染に関する研究

第1節 小序論

ボルナ病ウイルス (BDV) は、好神経性のエンベロープウイルスであり、約9000塩基の1本鎖RNAをゲノムとするnonsegment-negative strand (NNS) ウイルスである¹⁷。BDVは (Fig. 1) に示すように、少なくともヌクレオプロテイン (p40)、ポリメラーゼコファクター (p24)、マトリックス (gp18)、エンベロープ (gp56) およびポリメラーゼ (p180) の5つのタンパク質をコードすることが明らかになっており、ゲノム構造の相同性からラブドウイルス科の狂犬病ウイルスや水疱性口内炎ウイルスとの類似性が認められる¹⁷。しかしながら、BDVは球状 (約100 nm) のウイルスであり、核内で複製するなどラブドウイルスとは異なる点もあることから、現段階では未分類である¹⁷。

ヒトとボルナ病ウイルス (BDV) との関連性に関する研究は、緒に着いたばかりである。これまでのヒトにおけるBDVの疫学調査は、主に蛍光抗体法によりヒトの精神疾患患者において抗BDV抗体の保有率が高いと指摘されてきたが、昨年私達とドイツの研究グループは、相次いで精神疾患患者の末梢血単核球 (PBMC) において、RT-PCR法によりBDV遺伝子を高率に検出し得ることを初めて報告した^{10,33}。最近、アメリカの研究グループは、一部の精神疾患患者の脳所見で認められる海馬硬化症を呈した脳組織において、BDVの遺伝子と抗原を検出した¹⁸。精神疾患患者のPBMCから、BDVが分離され、その全塩基配列が明らかにされた¹⁹。

私達も、これまでに健常者を含め、様々な感染症が疑われる疾患患者におけるBDVの血清学的および分子疫学的検査を行った。その中で、BDVのゲノムおよび抗体保有率が精神疾患患者で有意に高いことを確認した⁵²。本研究では、免疫抑制状態にあるヒト免疫不全ウイルス1型 (HIV-1) 感染者および悪性脳腫瘍 (グリオブラストーマ) 患者にも高率に

BDVが検出されることを見出した^{3,53}。これらの患者は精神疾患との関連性が認められないことから、健常者にも高い頻度でBDVが潜伏感染し、免疫抑制状態においてウイルスが再活性化していることが示唆された。一方、本研究では日本国内の慢性疲労症候群 (CFS) 患者において、BDV陽性率が健常者に比べ、有意に高いことを明らかにした。これらのCFS患者では免疫抑制は認められないことから、HIV-1感染者や悪性脳腫瘍 (グリオブラストーマ) 患者の場合とは異なる機序によりBDVが活性化している可能性が考えられた。

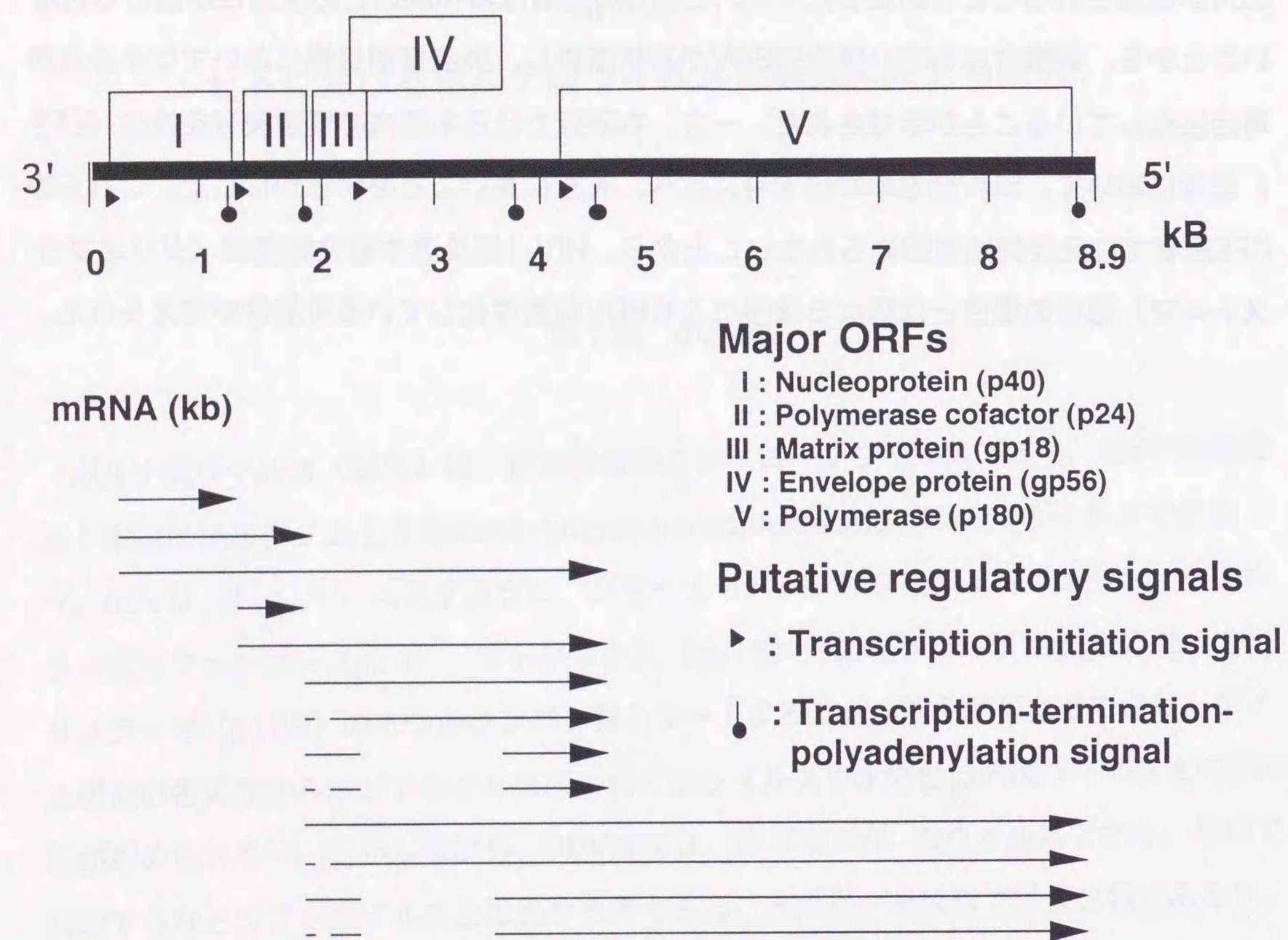


Fig.1. Genomic organization and transcription map of the BDV genome RNA. Putative transcription initiation signal (arrow head) and transcription termination signals (circle) in the genome are also indicated.

第2節 HIV-1感染者および悪性脳腫瘍患者におけるBDV感染

1. 目的

BDVに対する抗体陽性率は、健常者に比べ精神疾患患者において有意に高いことが報告されている^{7,10,33}。しかしながら健常者においても低率ながら抗BDV抗体およびBDVゲノム陽性者は存在する。また、ドイツのグループは、HIV-1感染者においてBDV抗体の検出率が健常者に比べて上昇していることを報告している^{7,8}。これらのことから、健常者においてもBDVは広く潜伏感染しており、生体の免疫力の低下と共にBDVが活性化する可能性が考えられる。そこで、HIV-1感染者および一般に免疫抑制状態にあると考えられる悪性脳腫瘍（グリオブラストーマ）患者における抗BDV抗体およびBDV遺伝子陽性率を検討した。

2. 材料と実験方法

検体：タイ国のHIV-1感染者177名（無症候性キャリア期127名、AIDS期に50名）について、BDV p24に対する抗体陽性率をELISAにより検討した。また、脳腫瘍（アストロサイトーマ）患者（Grade 1：7名、Grade 2：9名、Grade 3：5名およびGrade 4：16名）より外科手術により摘出された脳腫瘍組織のRNAについてBDV遺伝子の有無をRT-PCRにより検討した。

分子生物学的診断（RT-PCR）：プライマーにoligo d(T)（Pharmacia社）を用いて逆転写酵素（SuperScript II：Gibco-BRL社）によりcDNAを合成し、AmpliTaq DNA polymerase（Perkin elmer社）によりnested-PCRを行った。PCRの増幅は、塩基配列が比較的保存されていると報告されているp24（ポリメラーゼコファクター）領域およびp40（ヌクレオプロテイン）領域を標的とした。

p24領域の1st PCRには、(+)センスプライマーとして5'-TGACCCAACCAAGTAGACC A-3' (1387-1405塩基)および(-)センスプライマーとして5'-GTCCCATTCATCCGTTGTC-3' (1865-1847塩基)を用いた。2nd PCRには、(+)センスプライマーとして5'-TCAGACCCAGACCAGCGAA-3' (1443-1461塩基)および(-)センスプライマーに、5'-

AGCTGGGGATAAATGCGCG-3' (1834-1816塩基)を用いた。また、p40領域の1st PCRには、(+)センスプライマーとして5'-GTCACGGCGCGATATGTTTC-3' (242-261塩基)および(-)センスプライマーとして5'-CTTCTTACTCCAGTAAAACGC-3' (989-969塩基)を用いた。2nd PCRには、(+)センスプライマーとして5'-GCCTTGTGTTTCTATGTTG-3' (277-296塩基)および(-)センスプライマーに、5'-ATTCTTTACCTGGGGACTCA-3' (717-698塩基)を用いた。

PCRの反応条件はプロトコールに従った。PCR産物は1.5%アガロースにて泳動した後、ゲルを、Hybond-N+メンブレン (Amersham 社) にブロットした。サザンハイブリダイゼーションには、³²P 標識した合成オリゴヌクレオチド (BDV p24領域: センスオリゴヌクレオチド; 1462-1485塩基、1485-1507塩基および1637-1658塩基、アンチセンスオリゴヌクレオチド; 1811-1791塩基、BDV p40領域: センスオリゴヌクレオチド; 407-427塩基、アンチセンスオリゴヌクレオチド; 611-590塩基) をプローブとして反応させた。反応像は、BAS1000 (富士写真フイルム株式会社) にて解析した。PCR産物はpCRTM IIベクター (Invitrogen社) にクローニングした後、第1章と同様の方法で塩基配列の決定を行った。

3. 結果と考察

タイ国内の9地域におけるHIV-1感染者127名 (無症候性キャリア期60名、AIDS発症期67名) について抗BDV抗体陽性率を検査した。その結果、無症候性キャリア60名とAIDS発症患者67名間では、それぞれ9名(15%)と12名(18%)が抗体陽性であり、ほぼ同程度であった。そこで、HIV-1キャリア間のリスクグループの比較を行うと、性病(STD)を併発している群に有意な高い陽性率(38%)が認められた。更に、同じチェンマイ市内のSTD陽性HIV-1感染者50名とHIV-1陰性者107名について検索した結果、それぞれ24名(48%)と2名(1.9%)が抗体陽性であり、STD陽性のHIV-1感染者の多くがBDV抗体保有者であることが明らかになった³。HIV-1感染者の中でもSTDの併発群に特にBDV陽性率が高くなった原因については現在のところ不明である。STDの併発群では一般に病気の進行が早いことから、より強い免疫抑制状態である可能性が考えられるが、今後個々の免疫状

態を把握した詳細かつ経時的な調査が必要であると思われる。

アストロサイトーマは、その病状によりGrade 1 から 4 にまで分けられる。各検体について、p24領域およびp40領域を標的としたRT-PCRを行った結果 (Fig. 2)、最も悪性であるGrade 4 (グリオブラストーマ) の患者16名中2名にp24のバンドが、また3名にp40のバンドが検出された (Table 1)。グリオブラストーマの患者では一般に強い免疫抑制が認められ、その原因はTGF- β 2、インターロイキン10あるいはprostaglandine E₂といった免疫抑制因子の産生に依ると考えられている⁶⁹。HIV-1感染者の抗BDV抗体陽性率が有意に高かったこと、およびアストロサイトーマの患者群で免疫抑制状態である可能性が高いグリオブラストーマの患者のみにBDVのmRNAが検出されたことを考えあわせると、免疫抑制により本来潜伏感染していたBDVが再活性化した可能性が示唆された。

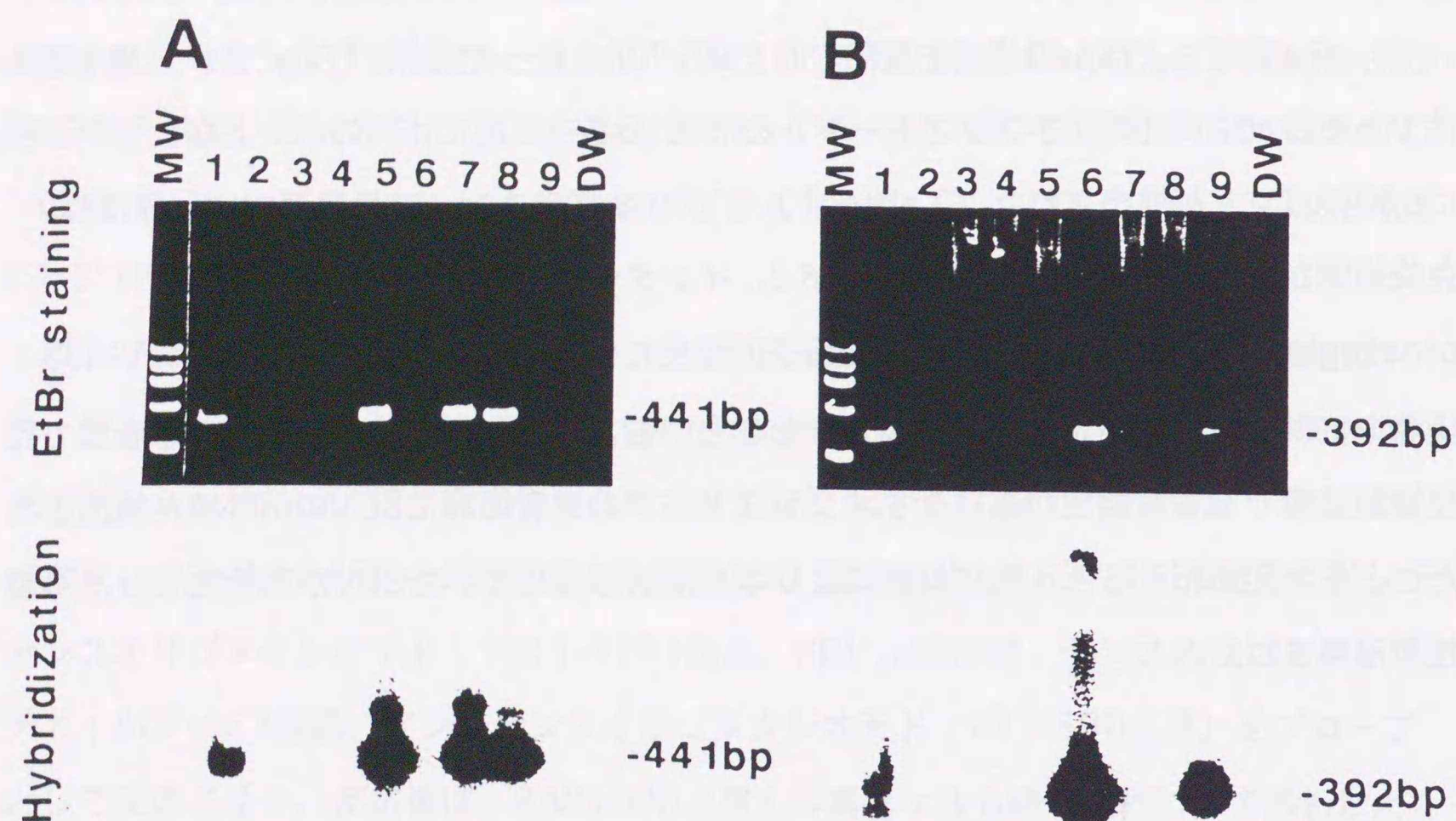


Fig. 2. Nested RT-PCR for the detection of BDV p40 (A) and p24 (B) RNA footprints in brain tumors. The results of representative brain tumors derived from 7 representative patients with glioblastoma (p40-positive #30 in lane 5, #25 in lane 7 and #31 in lane 8; p24-positive #18 in lane 6 and #24 in lane 9; and negative #36 in lane 4) or astrocytoma (lane 3, #17) are shown. The products of RT-PCR amplification of the BDV p40 and p24 regions were resolved by agarose gel electrophoresis, then stained with ethidium bromide. Southern blots are also shown. The positive and negative controls were the RNA fractions from MDCK/BDV (lane 1) and MDCK (lane 2), respectively. DW means distilled water in place of the RNA. MW indicates the size markers (ϕ x174 DNA/Hae III fragments).

Table 1. Profiles of 36 patients with glioblastoma and their summarized results for BDV

Patients	Age	Sex	Pathological diagnosis	BDV p24 RNA	BDV p40 RNA
Grade 1					
1	3m	M	pilocytic astrocytoma	-	-
2	1	M	pilocytic astrocytoma	-	-
3	26	M	pilocytic astrocytoma	-	-
4	48	M	pilocytic astrocytoma	-	-
5	3	F	pilocytic astrocytoma	-	-
6	25	F	pilocytic astrocytoma	-	-
7	27	F	pilocytic astrocytoma	-	-
Grade 2					
8	11	M	giant cell astrocytoma	-	-
9	16	M	astrocytoma	-	-
10	40	M	astrocytoma	-	-
11	58	M	astrocytoma	-	-
12	7	F	astrocytoma	-	-
13	25	F	astrocytoma	-	-
14	41	F	astrocytoma	-	-
15	41	F	astrocytoma	-	-
16	59	F	oligoastrocytoma	-	-
Grade 3					
17	40	M	anaplastic astrocytoma	-	-
18	49	M	anaplastic astrocytoma	-	-
19	9	F	anaplastic astrocytoma	-	-
20	31	F	anaplastic astrocytoma	-	-
21	41	F	anaplastic astrocytoma	-	-
Grade 4					
22	27	M	glioblastoma multiforme	-	-
23	27	M	glioblastoma multiforme	-	-
24	39	M	glioblastoma multiforme	+	-
18 ^a	49	M	glioblastoma multiforme	+	-
25	55	M	glioblastoma multiforme	-	+
26	66	M	glioblastoma multiforme	-	-
27	66	M	glioblastoma multiforme	-	-
28	68	M	glioblastoma multiforme	-	-
29	69	M	glioblastoma multiforme	-	-
30	78	M	glioblastoma multiforme	-	+
31	5	F	glioblastoma multiforme	-	+
32	12	F	glioblastoma multiforme	-	-
33	12	F	giant cell glioblastoma	-	-
34	34	F	glioblastoma multiforme	-	-
35	49	F	glioblastoma multiforme	-	-
36	63	F	glioblastoma multiforme	-	-

a: recurrent tumor after 6 months

第3節 慢性疲労症候群患者におけるBDV感染

1. 目的

慢性疲労症候群 (CFS) とは、これまで健康に生活していたヒトに原因不明の強い全身倦怠感、微熱、頭痛、筋肉痛と共に精神神経症状等が起こり、長期にこの状態が続いて健全な社会生活が送れなくなる疾患である。CFSは、時として集団発生が認められること、またその発症時に咽頭痛、発熱、呼吸器症状などの感冒様症状が多くの症例に認められることなどから、postviral fatigue syndrome とも言われており、原因ウイルスを同定する試みが世界中でなされている。現在までに、コクサッキーBウイルス、EBウイルス、ヒトヘルペス6型、7型ウイルス (HHV-6、7)、およびヒトT細胞白血病ウイルスII型 (HTLV-II) などがCFSの病因として候補に挙げられている⁴¹⁾が、明確な関連は未だ明らかにされていない。またCFSの症状の一つにうつ症状が挙げられることから、本研究ではBDV感染とCFSとの関連について検討した。

2. 材料と実験方法

検体：日本国内のCFS患者28名 (男性16名、女性12名) の血液より得た末梢血単核球および血漿を用いて分子生物学的診断および血清学的診断を行った。CFSの診断はアメリカ合衆国 Center for Disease Control (CDC) から 1988年²⁶⁾および1994年²²⁾に提出されたガイドラインに従って行われた。

分子生物学的診断 (RT-PCR)：分子生物学的診断 (遺伝子診断) は末梢血単核球 (PBMC) から抽出したRNAを鋳型とし、nested RT-PCR法にて行った。PBMCは全血よりFicoll-paque (1077 g/ml : Pharmacia Biotech社) にて分離し、Isogen (ニッポンジーン社) にてRNAを抽出した。RT-PCRはEZ rTth RNA PCR kit (Perkin elmer社) および逆転写酵素 (SuperScript II : Gibco-BRL社)、AmpliTaq DNA polymerase (Perkin elmer社) を用いた。p24領域に対するPCRの増幅は、第2節に記述した方法に準じた。また、対照として、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) のPCRを行った。PCRには、(+)センスプライマーとして5'-

GATGCTGGCGCTGAGTACGTCG-3' (325-346塩基) および(-)センスプライマーとして5'-GTGGTGCAGGAGGCATTGCTGA-3' (521-500塩基) を用いた。またプローブとして (センスオリゴヌクレオチド : 371-390塩基、アンチセンスオリゴヌクレオチド : 435-416塩基) を用い、ハイブリダイゼーションを行った。反応像は、BAS1000 (富士写真フイルム株式会社) にて解析した。PCR産物はpCRTM IIベクター (Invitrogen社) にクローニングした後、第1章と同様の方法で塩基配列の決定を行った。

血清学的診断 (ELISAおよびイムノブロットング)：血清学的診断はELISAおよびイムノブロット法にて行った。抗原として、BDVのp40 (ヌクレオプロテイン)、p24 (ポリメラーゼコファクター) およびgp18 (マトリックス) の各タンパク質を、大腸菌内でグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク質として発現、精製したものを用いた。

ELISAは以下の方法で行った。抗原 (5 μ g/ml) をプレートに吸着させた後、検体 (ヒト血漿) を100倍希釈した溶液を1次抗体として反応させた。次に、HRP標識抗ヒトIgG抗体 (Jackson ImmunoResearch社) を1000倍に希釈した液を2次抗体として反応させた。さらに、o-phenylen diamineを基質として発色させ、マイクロプレートリーダーU-2000 (Hitachi社) にて吸光値 (OD 492nm) を測定した。

イムノブロットは以下の方法で行った。GST融合タンパク質を12および15% SDS-PAGEにて電気泳動した後、セミドライ法にてPVDFメンブレン (Immobilon : Millipore社) にブロットした。1次抗体および2次抗体の反応はELISAに準じた。発色はコニカイムノステインHRP-1000 (コニカ社) を用いて行った。

3. 結果と考察

国内のCFS患者25名 (男性15名、女性10名 : 年齢19-57才、平均年齢32才) について検討した結果を (Table 2) に示した。RT-PCRによる遺伝子診断の結果、25名中3名に陽性のシグナルが検出された。一方、GST-p24融合タンパク質を用いたELISAおよびイムノブロット法による血清学的診断の結果、6名に抗BDV抗体が検出された。これら陽性者の中で、遺伝子および抗体が共に陽性であった検体は1例であった。従って、遺伝

Table 2. Profiles of 25 CFS patients and their summarized results for BDV

Patients	Age	Sex	Disease onset	BDV-p24 RNA	Anti-BDV-p24 Ab
1	19	M	1990.7	-	-
2	23	M	1991.5	-	-
3	24	M	1994.4	-	-
4	24	M	1988.12	-	-
5	25	M	1991.12	-	-
6	26	M	1994.9	-	-
7	32	M	1990.7	-	+
8	36	M	1994.1	-	-
9	36	M	Around 1988	-	-
10	37	M	1993.10	-	-
11	40	M	Around 1985	-	+
12	40	M	1989.1	-	-
13	43	M	1991.9	-	+
14	44	M	1992.3	+	+
15	57	M	1990.2	-	-
16	21	F	1991.6	-	+
17	21	F	1995.2	-	+
18	22	F	1991.12	-	-
19	25	F	1991.1	-	-
20	25	F	1994.3	-	-
21	28	F	1991.8	+	-
22	30	F	1993.2	-	-
23	35	F	1991.5	-	-
24	36	F	1991.4	-	-
25	52	F	1990.4	+	-

子あるいは抗体が陽性と判定された検体は25例中8例（32%）であった。私達の研究室において行った献血者のBDV検査では、BDVの遺伝子陽性率が5%以下であり、抗体陽性率が1-2%であった結果を考え合わせると、CFS患者におけるBDV陽性率は有意に高いと考えられた。現在までに私達が報告した国内の精神疾患患者、CFS患者および対照とした健康者（献血者）のBDVの疫学調査の結果を（Table 3）にまとめた。

Table 3. Summarized results of BDV prevalence

Samples	Sample number (location)	BDV-p24 RNA	Anti-BDV p24 antibody	RNA and/or antibody
Psychiatric disease ^a	60 (Sapporo)	37%	30%	52%
CFS ^b	25 (Osaka)	12%	24%	32%
Blood donors ^c	100 (Sapporo)	5%	1%	6%

a:Kishi et al.(1995), b:Nakaya et al. (1996), c:Kishi et al.(1995)

第4節 慢性疲労症候群の家族内発症例におけるBDV感染

1. 目的

第3節で認められたBDVの遺伝子、抗体が共に陽性である患者（父親）の家族5名の内、同患者を含む4名（父親、母親、次男および長女）が、ほぼ同じ時期にCFSを発症していた。そこで、第3節において示唆されたCFSとBDV感染との関連性をより詳細に検討するため、同家族のBDV検査を経時的（1995年および1年半後の1996年）に行い、BDVの各抗原に対する抗体の反応性および末梢血単核球中のBDV 遺伝子の検出と遺伝子型の解析を行った。

2. 実験方法

遺伝子診断は第2節と同じ方法を用い、血清学的診断にはGST-p24以外にGST-p40およびGST-p16（マトリックスプロテイン：糖鎖が付加されたものをgp18と呼ぶ）を抗原としたイムノブロット法を行った。

3. 結果と考察

今回検査した家族の構成は以下の通りである。父親46才、母親46才、長男19才、次男17才および長女14才であり、父親と長女はHolmesのガイドライン（Center for Disease Control : CDC 1988年²⁶⁾）により、1992年3月、1993年8月にそれぞれCFSと診断された。母親と次男は上記のガイドラインにより1991年7月、1993年4月にそれぞれCFSの疑いがあると診断されたが、1994年に提出された新しいガイドライン^{17,22)}により、CFSと診断された。一方、長男はCFSのいずれの症状も認められず、健康であった。各々の病状と病気の推移を（Table 4）にまとめた。

この家族について、1995年4月と1996年9月に採取した血液を用いて、BDVの検査を行い、その結果を（Table 5）にまとめた。1995年の検体では、長男を除く4名にBDVの遺伝子が検出された（Fig. 3）。一方、父親および長女は全ての抗原（p40、p24、p16）で抗体陽性であり、母親は抗p40抗体のみが、また次男は抗p24抗体のみが陽性で

Table 4. Summary of signs and symptoms in a family cluster of patients with CFS associated with BDV infection

	Father	Mother	Y. Son	Daughter
Onset of CFS	3/1992	7/1991	4/1993	8/1993
Age at the onset (years-old)	41	41	13	11
Signs and symptoms ^a				
Fatiguability	+++ / +++	+++ / -	+++ / +	+++ / ++
Mild fever	- / -	- / -	- / -	+ / -
Sore throat	+++ / +	- / -	+++ / ++	- / -
Lymphadenopathy	- / -	- / -	+ / -	+ / -
Muscle weakness	+++ / ++	- / -	+ / +	+++ / +
Muscle discomfort	+++ / ++	- / -	+++ / ++	+++ / +++
Headache	- / -	+ / +	- / -	+++ / +
Post-exertion malaise	+++ / +++	++ / +	+++ / ++	+++ / +++
Headache	- / -	+ / +	- / -	+++ / +
Migratory arthralgia	+ / +	- / -	- / -	+ / -
Hypersomnia	- / -	+++ / +	+++ / +	- / -
Insomnia	+++ / +++	- / -	- / -	+++ / ++
Scotomata	- / -	- / -	+ / -	++ / +
Forgetfulness	+ / +	+ / +	+ / -	++ / +
Irritability	+ / +	- / -	++ / +	- / -
Confusion	++ / ++	- / -	+ / +	- / +
Difficulty thinking	++ / ++	+ / +	++ / +	++ / +
Inability to concentrate	++ / ++	+ / +	++ / +	++ / -
Depression	++ / ++	- / -	++ / +	++ / +

^a Signs and symptoms were expressed by four grades: -, no; +, mild; ++, slightly strong; +++, very strong. The results of the highest signs and symptoms after the onset were shown at lefts, while the results at the time for the examination of BDV infection were shown in rights.

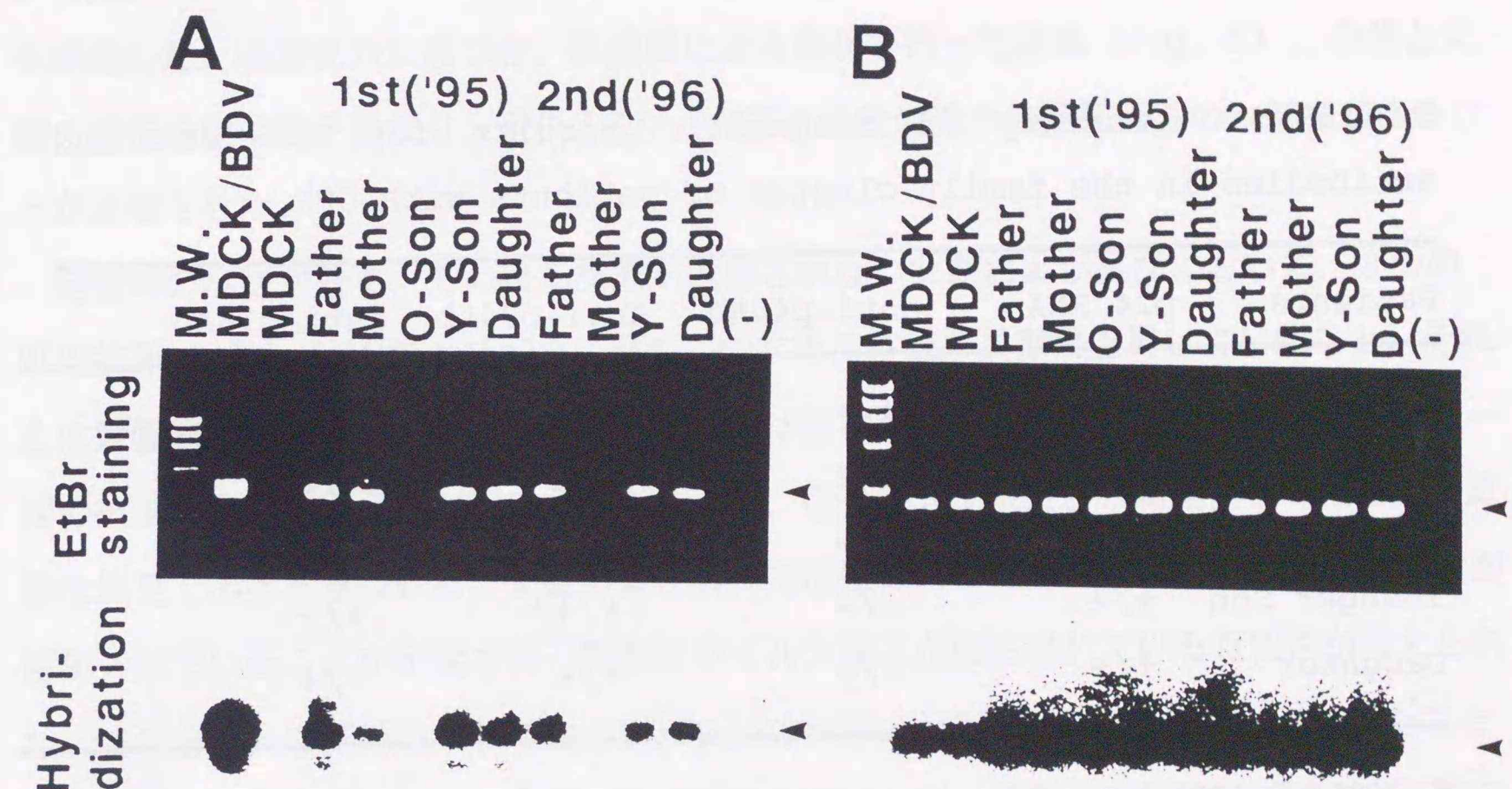


Fig.3. Demonstration of BDV infection in a family cluster with CFS by nested RT-PCR for BDV RNA in PBMCs. The RNA extracted from the PBMCs of father, mother, older (O-Son) and younger (Y-Son) sons and daughter. All of PBMCs were obtained at April, 1995 (1st) and September, 1996 (2nd). Amplified PCR products were resolved by 1.5% agarose gel electrophoresis followed by Ethidium bromide staining, then southern hybridized (A). The positive and negative controls were the RNA fractions from MDCK/BDV and MDCK, respectively. (-) indicates distilled water as the template of RT-PCR, M.W. indicates the size marker (ϕ x 174 DNA / Hae III fragment). Arrowhead indicates the expected size of p24 (392 bp) and GAPDH (197 bp), respectively. As an internal control, GAPDH mRNA were amplified by RT-PCR (B).

Table 5. Summary of diagnostic results for BDV RNA and antibodies in the family cluster of patients with CFS

Patients	p24 RNA	anti-p40Ab	anti-p24Ab	anti-p16Ab
Father	+a/+b	+/+	+/+	+/+
Mother	+/-	+/+	-/-	-/-
Older Son	-/-	-/-	-/-	-/-
Younger Son	+/+	-/-	++/++	+/+
Daughter	+/+	+/+	+/+	+/+

a; 1995, b; 1996 : -, no; +, strong; ++, very strong.

あった。長男はいずれの抗原とも反応しなかった。1996年の検体では、父親、次男および長女に遺伝子が検出され、母親からは検出されなかった。また抗体の反応性に変化はなかった。1995年および1996年に検出されたPCR産物はクローニングした後、塩基配列を解読した。塩基配列に基づき、系統樹による解析を行った結果 (Fig. 4)、母親と父親の遺伝子型は若干異なり、子供2名が、父親と母親の両方の遺伝子型の一部を有することが示唆された。

発症時の症状が重く、その後も病態が改善されない父親および長女において、3つのBDV抗原 (p24、p40およびp16) 全てに対する抗体価が長期間上昇していたこと、それとは対照的に、発症時の症状が軽く、その後は症状が軽減している母親および次男では一部の抗原のみに抗体反応が認められたことは、CFSとBDV感染との関連性を考える上で重要な知見であると思われる。父親および長女では生体内において活発にBDVタンパク質が産生されていることが示唆され、実際にウイルス粒子が産生されている可能性が考えられた。これら2人の末梢血単核球よりBDVp24のmRNAが2回の検査両方で検出されたことは、上記の推察を裏付けるものであると思われる。一方、母親の末梢血単核球では初回の検査においてBDV遺伝子が検出されたものの、2回目の検査では検出限界以下であった。このことは末梢血単核球においてウイルス量あるいはウイルス抗原発現量が低下していることを示唆する。今回CFS患者において遺伝子検査を行うことが可能であったのは末梢血単核球のみであったため、今後、末梢血単核球以外の細胞、組織におけるBDVの分子生物学的検査を行い、生体内のBDVの存在場所およびウイルス量とCFS病態との関連性をより総合的に解析する必要があると思われる。

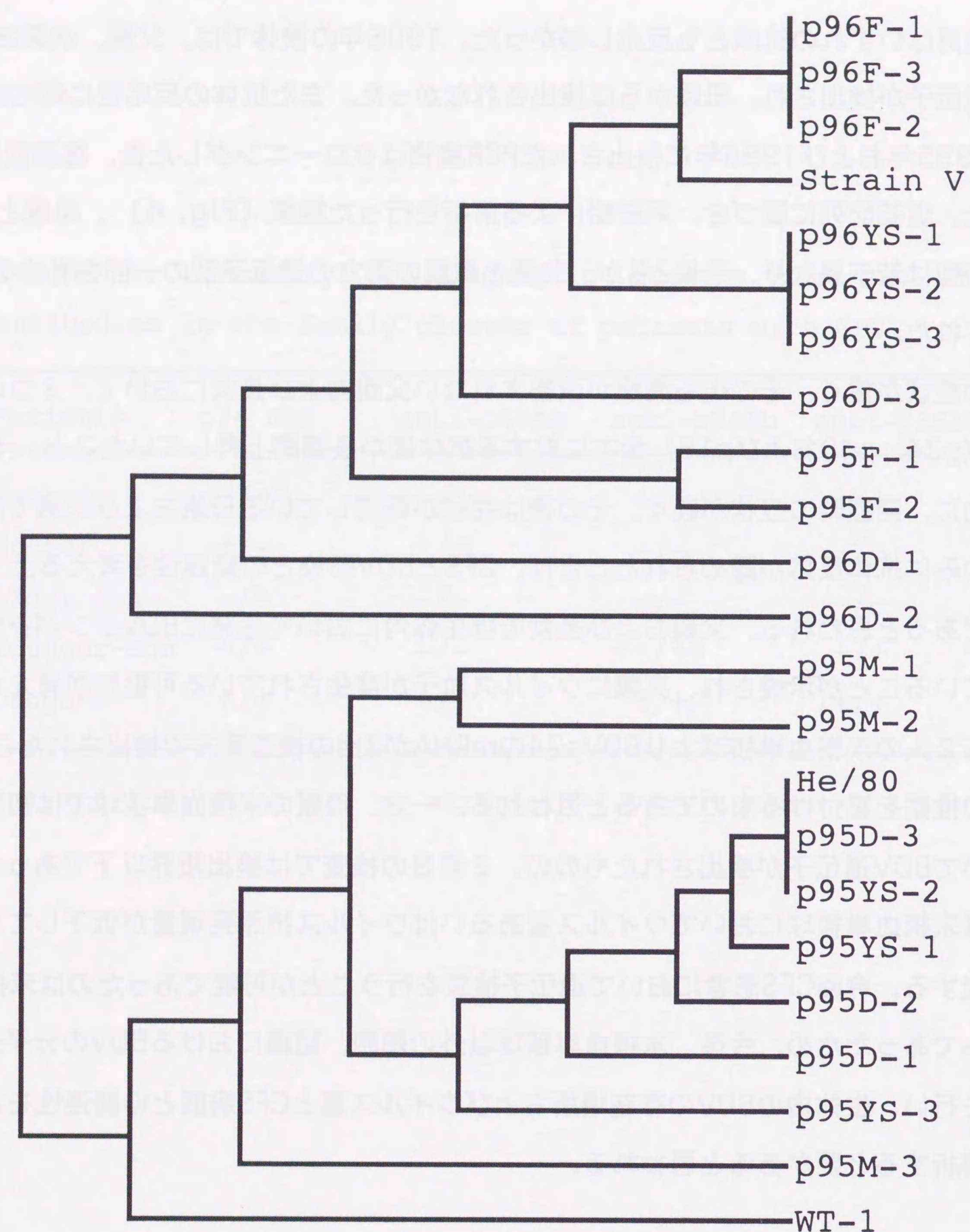


Fig. 4. Phylogeny of the p24 region of BDVs derived from 4 family members. As a control, the p24 sequences of horse-derived BDVs (Strain V, He/80 and WT-1) were also analyzed.

第5節 この章のまとめ

1. HIV-1感染者（タイ国）は非感染者に比べ、BDV抗体陽性率が有意に高く、特に HIV-1陽性の性病（STD）患者ではその傾向は顕著であった。また、一般に免疫抑制状態であることが報告されている悪性脳腫瘍患者（グリオブラストーマ）の脳腫瘍組織からもBDV RNAが高率に検出された。
2. 日本国内の慢性疲労症候群（CFS）患者では、健常者と比較し、抗BDV抗体およびBDV遺伝子の陽性率が有意に高かった。
3. CFSの家族内集団発症例において、CFSと診断された患者（両親、次男および長女の4名）は全てBDVとの関連が示された。一方、CFSのいずれの基準にも該当しない長男はPBMC中のBDVp24遺伝子および抗BDV抗体は陰性であった。

総括と展望

一般に病原性の強いウイルスを*in vitro*において継代感染させると、弱毒化ウイルスが出現する現象は広く知られており、実際これを利用して、弱毒生ワクチン開発が行われてきた⁶³。レトロウイルスにおいても、ウマ伝染性貧血ウイルス(Equine infectious anemia virus: EIAV)を*in vitro*において継代感染させると、ウイルス血症を起こさない弱毒化ウイルスが出現することが報告されている^{35,65}。しかしながら、これら弱毒ウイルスがどのような機序で現れるのか、あるいはその遺伝型の背景については不明な点が多い。

私達⁵⁶はこれまでの研究において、感染性分子クローン由来であり、全てのORFが発現しているNL432株(野生型)を出発ウイルスとし、*in vitro* 継代感染実験を行った結果、継代と共に細胞傷害性の低いウイルスが出現し、この低細胞傷害性ウイルスが持続感染の成立に深く関与していることを明らかにしてきた。本研究では、この系において細胞傷害性の低下をもたらした原因を解析し、その一つがアクセサリー遺伝子である*vpr* 遺伝子の欠損にあることを明らかにした。HIV-1型には4つのアクセサリー遺伝子(*vif*、*vpr*、*vpu* および *nef*)が存在するが、以前よりこれらのアクセサリー遺伝子は*in vitro* 細胞培養系において、ウイルスの増殖や複製に必須ではないことが報告されている。近年、これらアクセサリー遺伝子の機能について様々な報告がなされており、*vpr* 遺伝子は最初 Heinzingerら²⁴により、ウイルス感染初期段階におけるpreintegration complexの核への移行過程に機能することが明らかにされた。一方、Levyら⁴⁰はVprタンパク質が、細胞の増殖を停止させることを報告した。また、Rogelら⁶²はさらに解析を進め、Vprタンパク質が細胞をG2期に集積させ、その結果、Tリンパ球への持続感染を阻止することを明らかにした。このことは、本研究で得られた知見を支持する結果である。

さらに本研究では、変異ウイルスの割合が継代を重ねると共に増加することを明らかにした。即ち、定量的PCR法による解析により、急性感染期における変異ウイルスの割合は1代では検出限界以下であるのに対し、4代では0.1%、12代では0.4%、さらに20代では

13.2%と増加した。このことは、宿主である細胞を破壊せずに共存し、子孫ウイルスを産生し続けることのできる低細胞傷害性のウイルスが、ウイルスにとって有利であることを示唆する。しかし興味深いことに、この*vpr* 変異ウイルスの割合は、20代以降は増加せず、50代においても13.2%のままであった。また感染細胞が持続感染する割合も、20代以降では大きく変化しなかった。他のRNAウイルスの*in vitro* 継代感染において、増殖に有利な変異ウイルスが出現しても、ある一定の割合で平衡状態となり、それ以上の割合にはならないことは以前より指摘されている¹⁶。感染細胞より放出された子孫ウイルスのみを回収し、新たな細胞に感染させるといった急性感染のみを繰り返させる本研究の感染系においては、子孫ウイルスを増やすのに有利であると考えられる*vpr* 変異ウイルスの割合は全体の1割程度で平衡化したと推察できる。一方、持続感染細胞では、変異ウイルス遺伝子をプロウイルスとして持つ割合は相対的に高く、継代4代では1.0%、12代では10.6%であり、さらに20代および50代ではほぼ全てのウイルスが変異型であった。これらの知見を含め、生体内におけるウイルスの伝播様式を考える時、環境が大きく変化しない状態では、quasispeciesの平衡状態が保持され、新たに出現した変異ウイルスも、ある一定の割合で存続すると考えられる。しかし、環境に変化が起きた場合には、さらにその変化に適応し、かつ子孫ウイルスを持続的に産生し続けることのできる遺伝子型をもつウイルスが、quasispeciesの平衡状態を破って優勢になると考えられる。実際、HIV-1の増殖抑制剤であるAZTを感染者に投与すると、極めて早い時期に、薬剤耐性ウイルスが優勢になると報告されている^{70,25}。

本研究では、上述した*vpr* のナンセンス変異ウイルスが、感染者の生体内にも存在することを明らかにした。さらに、この変異ウイルスの割合は、時間の経過と共に大きく変動することを、同一感染者の経時的な調査により明らかにした。*in vivo* のウイルス存在様式は極めて複雑と考えられるが、少なくとも今回得られた*vpr* 変異が、生体内においても細胞との共存関係を築くのに適しており、宿主環境の変化に迅速に適応する機序の一つと考えられる。

一方、マウスレトロウイルスにおいては、ゲノムの欠失が起こることは既に報告されていた。Teminら^{58,61}は、マウスレトロウイルスに見られる欠失ウイルスの一部は、欠失

領域の両側にshort direct repeat 配列が認められるミスアライメント欠失であることを報告した。本研究においても、HIV-1の継代50代のプロウイルスDNAに、*vif* から*vpr* にかけて500塩基程度の欠失が検出された。これら欠失領域の両側には、3塩基のshort direct repeat配列が見られ、さらに欠失した領域内の両側には6塩基の相補配列が認められることから、(Fig. 5) に示す様なミスアライメント欠失の分子モデルが考えられた。さらに、これら*vif-vpr* 欠失ウイルスは、MT-4細胞において、複製能および増殖過程は野生型ウイルスと違いがないものの、細胞傷害性はほぼ消失しており、極めて低細胞傷害性のウイルスであることが明らかとなった。このことは、*vif* と*vpr* が細胞傷害性において直接あるいは間接に関与していることを示唆している。その詳細な機構の解明は、今後に残された課題である。

一方、HIV-1感染者の発症を抑制する治療法の開発も進められ、AZTなどの抗HIV-1薬剤に加え、ワクチンや遺伝子治療法の開発が進められている。特に、潜伏ウイルスが多いHIV-1感染者に対しては、ワクチン開発よりも遺伝子レベルで潜伏からの活性化を封じ込める治療法の確立に期待がもたれる。"intracellular immunization"とは、ウイルス複製を阻害、抑制する遺伝子(抵抗性遺伝子)を、標的細胞に導入することにより、その細胞にウイルスに対する抵抗性を獲得させようとする試みである⁵。HIV-1感染に対しても、このような*ex vivo* 遺伝子治療は様々な形で試みられており、抵抗性遺伝子をCD4陽性細胞あるいは骨髄幹細胞にウイルスベクター等を用いて導入し、ウイルスの感染を抑制したとの報告がなされている⁴。

現在までにアンチセンス、リボザイム、dominant negative変異体およびデコイRNAが抵抗性遺伝子の候補に挙げられ、遺伝子は主にレトロウイルスおよびアデノウイルスをベクターとして細胞に導入されている。しかしながら、これらの方法を臨床応用するまでには、以下のような幾つかの解決すべき問題が残っている。第1に導入効率の問題がある。上述した遺伝子導入方法は標的となる細胞を身体から取り出し、遺伝子を導入した後再び身体に戻す方法であり、手間およびコストがかかる上に一度に導入できる細胞の数が制限される。第2に安全性の問題がある。現在使われているウイルスベクターは、ある程度安全性が確認されているものの、長期に渡る使用例は未だ報告が少なく、試験段階で

あるということができる。また、dominant negative変異体等を用いる方法ではそれ自身の細胞傷害性および免疫性の獲得などの問題をクリアする必要がある。

本研究で用いたデコイオリゴヌクレオチド法は、30塩基程度のオリゴヌクレオチドを体内に投与してウイルスの増殖を抑制しようとする試みであり、副作用が少ないこと、また抗AIDS薬であるAZTのように経口投与することも可能であると考えられる。今回、RREデコイオリゴヌクレオチドARO-1およびARO-2を合成し、HIV-1感染細胞に添加することによる抗ウイルス作用を検討した。その結果、ARO-2において、ウイルス産生の抑制効果が認められることが明らかとなった⁵⁵。抑制効果は細胞およびウイルス株の種類を問わず有効であり、ヒト末梢血単核球にHIV-1臨床株を感染させた系においても、ウイルスの増殖を抑える効果が認められた。一方、ARO-2とほぼ同じ構造であるARO-1ではこのようなウイルス増殖抑制効果は見られなかった。その理由として以下のことが考えられる。第1に、ARO-1はRevとの親和性がARO-2に比べて低く、その結果、細胞内においてRevとの結合性が十分ではなかったことが考えられる。ARO-1はARO-2に比べ、"bubble"構造とループの間にあるステムが1塩基対長いことが、その原因であると推察される。第2に、ARO-1はARO-2に比べて安定性が低い可能性が考えられる。ARO-2は末端のステムおよびもう一方のループがDNA化されているのに対し、ARO-1は末端のステムのみがDNAであり、ループはRNAのままである。このことが、RNA分解酵素に対する抵抗性を低下させる一因となったと推察される。

MOLT#8/LAI細胞においては、ARO-2添加により、HIV-1のmRNAの転写量は変化せず、ウイルス産生量が低下したのに対し、ACH-2 (TNF- α 処理) 細胞ではHIV-1の全mRNAの低下が認められ、その結果、構造タンパク質の発現量が減少した。従って、ARO-2によるHIV-1産生抑制機序としては、ウイルスmRNAの抑制とそれ以降のウイルスタンパク質発現の段階における抑制が考えられる。これらのことから、ARO-2におけるHIV-1産生抑制効果には、少なくとも2つ以上の要因があると考えられる。Revは一回スプライスおよび非スプライス型の構造タンパク質をコードするmRNAを細胞質に移行し、翻訳を誘導する。従って、Revの機能を阻害しても、細胞内のmRNA量には影響を与えないことが予測される。Revのもう一つの働きに、HIV-1プレmRNAのスプライシング

を抑制することが報告されているが、この場合は、Revの機能を阻害することにより、2回スプライスmRNAのみが蓄積すると考えられる。今回、HIV-1が潜伏感染しているACH-2細胞に、TNF- α 処理によるウイルスの再活性を誘導した結果、HIV-1全mRNA量の低下が認められた現象は、いずれの予想にも矛盾するものである。この原因について明確な解答を出すには至っていないが、本研究で行ったRevの機能阻害はRRE結合領域のみをマスクしたものであり、一般にRevを完全に欠損させた系において得られた上記の結果とは一致しない可能性が考えられる。また、Revは細胞内タンパク質と直接あるいは間接に作用することが示唆される。これらRev結合性の細胞タンパク質の同定は未だ不十分であるが、細胞間のこれらRev結合タンパク質の違いが、上記した結果をもたらした可能性も考えられる。

RREデコイオリゴヌクレオチドは逆転写酵素阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤と同じく投薬として使用できる可能性を有し、かつ、これらの薬の使用時に見られる耐性ウイルスが出現しにくい利点を持った物質である。今後、RREデコイオリゴヌクレオチドを、抗ウイルス薬として開発するためには、様々な問題を解決する必要がある。その第1歩はウイルス増殖抑制効果を更に上昇させることであり、デコイオリゴヌクレオチドをビタミン等と架橋し、細胞内取り込み効率を上昇させる試みが必要である。また、scidマウス等を用いた動物実験を行い、生体内におけるデコイオリゴヌクレオチドの抗ウイルス増殖抑制効果および安全性を確認していく必要がある。

一方、蓄積された疫学的情報から、精神疾患との関連性が疑われるBDVについて、更に広範に検索し、原因不明の他の疾患との関連性、また健常者における潜伏感染の可能性を検討した。これまでの疫学調査は、主に蛍光抗体法等による抗BDV抗体の検出であり、ヨーロッパを中心に進められてきた。その結果、ウマ由来のBDVはドイツで分離され、好神経性のウイルスであることが確認された。近年ではBDVのウイルス学的解析および生物学的解析が進められ、今年になって、アメリカとドイツのグループから精神疾患患者のPBMCよりBDVが分離されたとの報告が相次ぎ、ヒト由来のBDVの全塩基配列が決定された¹⁹。さらに最近、アメリカのグループから精神疾患患者の剖検脳より、BDVの抗原およ

びゲノムが検出されたとの報告¹⁸もなされ、BDVがヒトに感染することを指摘する研究結果が蓄積されてきた。

一方、CFSとBDVとの関連については、1992年にドイツのグループが行った血清学的検査では、その関連性が認められないと報告されていたが⁹、本研究において、遺伝子検査と血清学的検査から、CFSとBDVとが関連する可能性が示唆された。この違いについては、用いた手法の検出感度によるものか、あるいは同じCFSと診断されても、国により原因が異なる等の可能性が考えられる。私達の報告以後、同様の調査が他の地域でも行われ、スウェーデンの患者では、ほぼ同様の感染率、一方、アメリカ合衆国の調査ではやや低い感染率であるとの私信（Dr. Dobbin、CDC、アトランタ）を得ている。また、CFSの発症は、通常散発的であると考えられているが、1989年にアメリカカリフォルニア州の高校教師が集団で、上気道感染様症状と激しい疲労感に襲われた例や、1990年の湾岸戦争の際にアメリカ軍兵士の間でCFS様症状が集団発生した例⁴⁹もある。本研究で見られたCFSの家族内集団発生例において、BDV感染との関連が示唆されたことは、CFSの病因および病態を研究する上で重要な知見と思われる。CFSの診断基準は現在のところ、国、地域あるいは医師によって差があることから、BDV感染が一部のCFS患者の発症要因となっている可能性も考えられる。今後、CFS患者におけるBDVの動態を解析することにより、CFSの発症あるいは症状とBDV感染との関わりをより明らかにすることができると考える。

さらに本研究では、免疫抑制状態であるヒト免疫不全ウイルス感染者において有意に高いBDV抗体陽性率を示すこと、また脳腫瘍患者の脳腫瘍組織中にBDV遺伝子が高率に検出されることを明らかにした。本研究においてBDV遺伝子が検出された5検体は、いずれもアストロサイトーマの中で最も悪性のがん患者であるグリオブラストーマ（Grade 4）患者由来であった。グリオブラストーマ患者では、一般に免疫抑制状態にあることが報告されており、その原因は、癌細胞がTGF- β_2 などの免疫抑制因子を産生するためであると考えられている⁶⁹。上述したCFS患者においても種々の免疫抑制、免疫異常が報告されており³⁶、このことが病態に深く関与することが考えられることから、今後、BDV感染と免疫抑制との関連を明らかにしていく必要があると考えられる。

以上の結果から、外見上神経症状が認められない健常なヒトにおいても、BDVが血液細胞以外の組織や細胞で潜伏感染状態にあり、免疫の抑制によりBDVが再活性化することが示唆された。一方、精神疾患患者やCFS患者では免疫の状態に関わらず、BDVが生体内において活発に複製していることが推測され、今後、その活性化の機序と病態との関連性を明らかにすることが必要であると考えられる。

謝 辞

稿を終えるに当たって、懇切な御指導と御校閲を賜りました北海道大学免疫科学研究所化学部門教授 東市郎先生、同大学免疫科学研究所生化学部門教授 菊池九二三先生、同大学免疫科学研究所血清学部門教授 生田和良先生、同大学院理学研究科生命分子化学講座教授 谷口和弥先生に深く感謝いたします。本研究の遂行に当たり、数々のご協力、ご助言をいただきました北海道大学細菌感染部門助教授 岸雅彦先生、同大学薬学部遺伝子有機化学講座教授 大塚栄子先生、同助手 岩井成憲先生、同大学医学部脳神経外科学教授 阿部弘先生、同講師 澤村豊先生、同医局員 多田光宏先生、佐久間司郎先生、大阪大学医学部血液・腫瘍内科教授 木谷照夫先生、同講師 倉恒弘彦先生、同大学医学部細菌学講座教授 山西弘一先生、タイ国 National Institute of Health Wattana Auwanit先生、英国 NERC Institute of Virology Ian M. Jones博士、米国 Louisiana State University Ronald B. Luftig 博士に感謝いたします。また、数々の御助言を頂いた北海道大学免疫科学研究所血清学部門助教授 木村卓郎先生に厚くお礼申し上げます。また、実験等で様々な面において御協力頂いた諸先生方、並びに血清学部門の教室の皆様にご心よりお礼申し上げます。

参考文献

1. Adachi, A., H.E. Gendelman, S. Koenig, T. Folks, R. Willey, A. Rabson, and M.A. Martin. 1986. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J. Virol.* 59:284.
2. Adachi, A., N. Ono, H. Sakai, K. Ogawa, R. Shibata, T. Kiyomasu, H. Masuike, and S. Ueda. 1991. Generation and characterization of the human immunodeficiency virus type 1 mutants. *Arch. Virol.* 117:45.
3. Auwanit, W., P. I. N. Ayuthaya, T. Nakaya, S. Fujiwara, H. Kurata, K. Yamanishi, and K. Ikuta. 1996. Unusually high seroprevalence of Borna disease virus in clade E human immunodeficiency virus type 1-infected patients with sexually transmitted disease in Thailand. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 3:590.
4. Bahner, I., K. Kearns, Q. L. Hao, E. M. Smogorzewska, and D.E. Kohn. 1996. Transduction of human CD34+ hematopoietic progenitor cells by a retroviral vector expressing an RRE decoy inhibits human immunodeficiency virus replication in myelomonocytic cells produced in long-term culture. *J. Virol.* 70:4352.
5. Baltimore, D. 1988. Intracellular immunization. *Nature (London)* 335:395.
6. Bevec, D., M. Dobrovnik, J. Hauber, and E. Bnlein. 1992. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in human T cells by retroviral-mediated gene transfer of a dominant-negative Rev trans-activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9870.
7. Bode, L., S. Riegel, H. Ludwig, J. D. Amsterdam, W. Lange, W. and H. Koprowski. 1988. Borna disease virus-specific antibodies in patients with HIV infection and with mental disorders. *Lancet* ii:689.
8. Bode, L., S. Riegel, W. Lange, and H. Ludwig. 1992. Human infections with Borna disease virus: seroprevalence in patients with HIV infection and with chronic diseases and healthy individuals. *J. Med. Virol.* 36:309.
9. Bode, L., A. L. Komaroff, and H. Ludwig. 1992. No serologic evidence of Borna disease virus in patients with chronic fatigue syndrome. *Clin. Inf. Dis.* 15:1049.
10. Bode, L., W. Zimmermann, R. Ferszt, F. Steinbach, and H. Ludwig. 1995. Borna disease virus genome transcribed and expressed in psychiatric patients. *Nature Medicine* 11:232.
11. Bogerd, H. P., R. A. Fridell, S. Madore, and B. R. Cullen. 1995. Identification of novel cellular cofactor for the Rev/Rex class of retroviral regulatory proteins. *Cell* 82:485.
12. Buchwald, D. and A.L. Komaroff. 1991. Review of laboratory findings in patients with chronic fatigue syndrome. *Rev. Inf. Dis.* 13:12.
13. Chow, Y. K., M. S. Hirsch, D. P. Merrill, L. J. Bechtel, J. J. Eron, J.C. Kaplan, and R. T. D'Aquila. 1993. Use of evolutionary limitations of HIV-1 multidrug resistance to optimize therapy. *Nature* 361:650.
14. Cullen, B. R., and W. C. Greene. 1989. Regulatory pathways governing HIV-1 replication. *Cell* 58:423.
15. Cullen, B. R. 1993. Does HIV-1 Tat induce a change in viral initiation rights? *Cell* 73:417.
16. de la Torre, J. C., and J. J. Holland. 1990. RNA virus quasispecies populations can suppress vastly superior mutant progeny. *J. Virol.* 64:6278.
17. de la Torre, J. C. 1994. Molecular biology of Borna disease virus: prototype of a new group of animal viruses. *J. Virol.* 68: 7669.
18. de la Torre, J. C., D. Gonzalez-Dunia, B. Cubbit, M. Mallory, N. Muller-Lantzsch, F. A. Grasser, L. A. Hansen, and E. Masliah. 1996. Detection of Borna disease virus antigen and RNA in human autopsy brain samples from neuropsychiatric patients. *Virology* 223:272.

19. de la Torre, J. C., L. Bode, R. Durrwald, B. Cubbit, H. Ludwig. 1996. Sequence characterization of human Borna disease virus. *Virus Res.* 44:33.
20. Fenster, S. D., R. W. Wagner, B. C. Froehler, and D. J. Chin. 1994. Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 env expression by C-5 propyne oligonucleotides specific for Rev-responsive element stem-loop V. *Biochemistry* 33:8391.
21. Fischer, U., S. Meyer, M. Teufel, C. Heckel, R. Lrmann, and G. Rautmann. 1994. Evidence that HIV-1 Rev directly promotes the nuclear export of unspliced RNA. *EMBO J.* 13:4105.
22. Fukuda, K., S. E. Straus, I. Hickie, M.C. Sharpe, J.G. Dobbins, A. Komaroff, and International Chronic Fatigue Syndrome Study Group. 1994. The Chronic Fatigue Syndrome: a comprehensive approach to its definition and study. *Ann. Intern. Med.* 121:953.
23. Graham, G. J., and J. J. Maio. 1990. RNA transcripts of the human immunodeficiency virus transactivation response element can inhibit action of the viral transactivator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:5817.
24. Heinzinger, N. K., M. I. Bukrinsky, S. A. Haggerty, A. M. Ragland, V. Kewalramani, M. A. Lee, H. E. Gendelman, L. Ratner, M. Stevenson, and M. Emerman. 1994. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7311.
25. Ho, D. D., A. U. Neumann, A. S. Perelson, W. Chen, J. M. Leonard, and M. Markowitz. 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373:123.
26. Holmes, G. P., J. E. Kaplan, N. M. Gantz, A. L. Komaroff, L. B. Schonberger, S. E. Straus, J. F. Jones, R. E. Dubois, C. Cunningham-Rundles, S. Pahwa, G. Tosato, L.S. Zegans, D. T. Purtilo, N. Brown, R. T. Shooley, and I. Brus. 1988. Chronic fatigue syndrome: a working case definition. *Annal. Inter. Med.* 108:387.
27. Hope, T. J., N. P. Klein, M. E. Elder, and T. G. Parslow. 1992. trans-dominant inhibition of human immunodeficiency virus type 1 Rev occurs through formation of inactive protein complexes. *J. Virol.* 66:1849.
28. Iwai, S., C. Pritchard, D. A. Mann, J. Karn, and M. J. Gait. 1992. Recognition of the high affinity binding site in rev-

- responsive element RNA by the human immunodeficiency virus type-1 rev protein. *Nucleic Acids Res.* 20:6465.
29. Jones, K. A., and B. M. Peterlin. 1994. Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu. Rev. Biochem.* 63:717.
30. Kestler, H. W., III, D. J. Ringer, K. Mori, D. L. Panicali, P. L. Shgal, M.D. Daniel, and R.C. Desrosiers. 1991. Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* 65:651.
31. Kishi, M., Y. Nishino, M. Sumiya, K. Ohki, T. Kimura, T. Goto, M. Nakai, M. Kakinuma, and K. Ikuta. 1992. Cells surviving infection by human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1): vif or vpu mutants produce non-infectious or markedly less cytopathic viruses. *J. Gen. Virol.* 73:77.
32. Kishi, M., K. Tokunaga, Y-H. Zheng, M. K. Bahmani, M. Kakinuma, M. Nonoyama, P. K. Lai, and K. Ikuta. 1995. Superinfection of a defective human immunodeficiency virus type-1 provirus-carrying T cell clone with vif or vpu mutants gives cytopathic virus particles by homologous recombination. *AIDS Res. Hum. Retrov.* 11:45.
33. Kishi, M., T. Nakaya, Y. Nakamura, Q. Zhong, K. Ikeda, M. Senjo, M. Kakinuma, S. Kato, and K. Ikuta. 1995. Demonstration of human Borna disease virus RNA in human peripheral blood mononuclear cells. *FEBS Lett.* 364:293.
34. Komaroff, A. L., and D. Buchwald. 1991. Symptoms and signs in chronic fatigue syndrome. *Rev. Inf. Dis.* 13:8.
35. Kono, Y., and K. Kobayashi. 1970. Changes in pathogenicity of equine infectious anemia virus during in horse leukocyte cultures. *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.* 10:106.
36. Landay, A. L., C. Jessop, E. T. Lennette, and J. A. Levy. 1991. Chronic fatigue syndrome: clinical condition associated with immune activation. *Lancet.* 338:707.
37. Lang, S.M., M. Weeger, C. Stahl-Heinnig, C. Coulibaly, G. Hunsmann, J. Muller and B. Fleckenstein. 1993. Importance of vpr infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* 67:902.
38. Larder, B. A., and S. D. Kemp. 1989. Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase confer high-level resistance to Zidovudine

(AZT). *Science* 246:1155.

39. Lee, T. C., B. A. Sullenger, H. F. Gallardo, G. E. Ungers, and E. Gilboa. 1992. Overexpression of RRE-derived sequences inhibits HIV-1 replication in CEM cells. *New Biol.* 4:66.
40. Levy, D. N., L. S. Fernandes, W. V. Williams and D. B. Weiner. 1993. Induction of cell differentiation by human immunodeficiency virus type 1 vpr. *Cell.* 72:541.
41. Levy, J.A. 1994.: Viral studies of chronic fatigue syndrome (Review). *Clin. Inf. Dis.* 18 (Suppl 1): S117.
42. Li, G., J. Lisziewicz, D. Sun, G. Zon, S. Daefer, F. Wong-Staal, R. C. Gallo, and M. E. Klotman. 1993. Inhibition of Rev activity and human immunodeficiency virus type 1 replication by antisense oligonucleotide phosphorothioate analogs directed against the Rev-responsive element. *J. Virol.* 67:6882.
43. Lisziewicz, J., D. Sun, M. Klotman, S. Agrawal, and P. Zamecnik. 1992. Specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by antisense oligonucleotides: An in vitro model for treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11209.
44. Lisziewicz, J., D. Sun, J. Smythe, P. Lusso, F. Lori, A. Louie, P. Markham, J. Rossi, M. Reiz, and R. C. Gallo. 1993. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by regulated expression of a polymeric Tat activation response RNA decoy as a strategy for gene therapy in AIDS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8000.
45. Liu, J., C. Woffendin, Z.-Y. Yang, and G. Nabel. 1994. Regulated expression of a dominant negative form of Rev improves resistance to HIV replication in T cells. *Gene Ther.* 1:32.
46. Malim, M. H., J. Hauber, S.-Y. Le, J. V. Maizel, and B. R. Cullen. 1989. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature (London)* 338:254.
47. Mann, D. A., I. Mikaelian, R. W. Zimmell, S. M. Green, A. D. Lowe, T. Kimura, M. Singh, P. J. G. Butler, M. J. Gait, and J. Karn. 1994. Co-operative Rev binding to stem I of the Rev-responsive element modulates human immunodeficiency virus type-1 late gene expression. *J. Mol. Biol.* 241:193.
48. Mathez, D., P. Bagnarelli, J. Izopet, M. Cazabat, M. Clementi. 1996: Effective triple nucleoside analogue therapy unveils a

lack of inducible HIV reservoir in circulating CD4 T cells. *J. AIDS.* (abstracts of the 1996 annual meeting of the institute of human virology) 2.

49. Milner, I. B., B. N. Axelrod, J. Pasquantonio, and M. Sillanpaa. 1994: Is there s Gulf War syndrome? *JAMA* 271:661.
50. Modesti, N., J. Garcia, C. Debouck, M. Peterlin, and R. Gaynor. 1991. Trans-dominant Tat mutants with alterations in the basic domain inhibit HIV-1 gene expression. *New Biol.* 3:759.
51. Nakaya, T., K. Fujinaga, M. Kishi, S. Oka, T. Kurata, I. M. Jones, and K. Ikuta. 1994. Nonsense mutations in the vpr gene of HIV-1 during in vitro virus passage and in HIV-1 carrier-derived peripheral blood mononuclear cells. *FEBS Lett.* 354:17.
52. Nakaya, T., H. Takahashi, Y. Nakamura, S. Asahi, M. Tobiume, H. Kuratsune, T. Kitani, K. Yamanishi, and K. Ikuta. 1996. Demonstration of Borna disease virus RNA in peripheral blood mononuclear cells derived from Japanese patients with chronic fatigue syndrome. *FEBS Lett.* 378:145.
53. Nakaya, T., M. Tada, H. Takahashi, S. Fujiwara, S. Sakuma, Y. Sawamura, H. Abe, and K. Ikuta. 1996: Expression of Borna disease virus in clinical samples from patients with brain malignant tumors. *Proc. Japan. Acad.* 72: 157.
54. Nakaya, T., K. Fujinaga, H. Doi, S. Suzuki, H. Takahashi, Y. Nishino, M. Kishi, I. Azuma, R. B. Luftig, and K. Ikuta. Serial passage of human immunodeficiency virus type 1 generates misalignment deletions in non-essential accessory genes. *Virus. Res.* in press.
55. Nakaya, T., S. Iwai, K. Fujinaga, Y. Sato, E. Otsuka, and K. Ikuta. Decoy approach using RNA-DNA chimera oligonucleotides to inhibit the regulatory function of human immunodeficiency virus type 1 Rev protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* in press.
56. Narayan, O., S. Herzog, K. Freese, H. Scheefers, and R. Rott. 1983. Pathogenesis of Borna disease in rats.: immune-mediated viral ophtalmeoncephalopathy causing blindness and behavioral abnormalities. *J. Inf. Dis.* 48:305.
57. Nishino, Y., T. Nakaya, K. Fujinaga, M. Kishi, I. Azuma, and K. Ikuta. 1994. Persistent infection of MT-4 cells by human immunodeficiency virus type 1 becomes increasingly likely with in vitro serial passage of wild-type but not nef mutant virus. *J. Gen. Virol.* 75:2241.

58. Pathak, V. K. and H. M. Temin. 1990. Broad spectrum of in vivo forward mutations, hypermutations, and mutational hot spots in a retroviral shuttle vector after a single replication cycle: deletions and deletions with insertions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6024.
59. Pearson, L., J. Garcia, F. Wu, N. Modesti, J. Nelson, and R. Gaynor. 1990. A transdominant tat mutant that inhibits tat-induced gene expression from the human immunodeficiency virus long terminal repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:5079.
60. Piatak, M. Jr., M. S. Saag, L. C. Yang, S. J. Cjark, J. C. Kappes, K. C. Luk, B. H. Hahn G. M. Shaw, and J. D. Lifson. 1993. High level of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science*. 259:1749.
61. Pulsinelli, G. A. and H.M. Temin. 1991. Characterization of large deletions occurring during a single round of retrovirus vector replication: novel deletion mutation mechanism involving errors in strand transfer. *J. Virol.* 65:4786.
62. Rogel, M. E., L. I. Wu, and M. Emerman. 1995. The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene prevents cell proliferation during chronic infection. *J. Virol.* 69:882.
63. Rott, R., S. Herzog, B. Fleischer, A. Winokur, J. Amsterdam, W. Dyson, and H. Koprowski. 1985. Detection of serum antibodies to Borna disease virus in patients with psychiatric disorders. *Science* 228:755.
64. Sabin, A. B. 1957: Properties and behavior of orally administered attenuated poliovirus vaccine. *J. Am. Med. Assoc.* 164:1216.
65. Shen, R. 1983. Development and use of equine infectious anemia donkey leukocyte attenuated vaccine. The international symposium on immunity to equine infectious anemia:34.
66. Stutz, F., and M. Rosbash. 1994. A functional interaction between Rev and yeast pre-mRNA is related to splicing complex formation. *EMBO J.* 13:4096.
67. Sullenger, B. A., H. F. Gallardo, G. E. Ungers, and E. Gilboa. 1990. Overexpression of TAR sequences renders cells resistant to human immunodeficiency virus replication. *Cell* 63:601.
68. Sullenger, B. A., H. F. Gallardo, G. E. Ungers, and E. Gilboa. 1991. Analysis of trans-acting response decoy RNA-mediated inhibition of human immunodeficiency virus type 1 transactivation. *J. Virol.* 65:6811.
69. Tada, M. and N. de Tribolet. 1996: Immunobiology of malignant gliomas. *J. Clin. Neuroscience.* 3:102.
70. Wei, X., S. K. Ghosh, M. E. Taylor, V. A. Johnson, E. A. Emini, P. Deutsch, J. D. Lifson, S. Bonhoeffer, M. A. Nowak, B. H. Hahn, M.S. Saag, and G. M. Shaw. 1995 : Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 373:117.
71. Yunoki, M., K. Maotani-Imai, H. Kusuda, M. Motoyama, S. Miyake, H. Imai, Y.S. Shin, S. Kato, K. Sano, C. Morita, M. Nakai, K. Hirai, and K. Ikuta. 1991. Production of infectious particles from defective human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-producing cell clones by superinfection with infectious HIV-1. *Arch. Virol.* 116:143.

