

2000/034 ~ 1050

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

平成12年度

エイズ医薬品等開発研究

研究報告書

財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

平成12年度

エイズ医薬品等開発研究

研究報告書

目 次

課題番号

第1分野 抗エイズウイルス薬、エイズ不随症状に対する治療薬の開発に関する研究

10101	国内未承認エイズ治療薬等を用いたHIV感染症治療薬及びHIV感染症至適治療法の開発に係る応用研究	福武 勝幸	……	1
10102	エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究	棚元 憲一	……	13
10103	HIV第二受容体拮抗剤を基盤分子とする戦略的抗エイズ剤の創製と実用化	藤井 信孝	……	16
10104	HIVインテグラーゼおよび複製を制御する蛋白質を標的とする抗ウイルス剤の開発	藤原 民雄	……	22
10105	アポトーシス抑制作用を有する新規抗エイズ薬の開発	吉野公一郎	……	28
10106	細胞性因子を標的にした抗HIV薬の開発研究	金岡 昌治	……	35
10107	カリニ肺炎のゲノム創薬研究	西村 暹	……	46
10108	逆転写酵素阻害剤の併用療法に関する研究	湯浅 聡	……	51
10109	難薬剤耐性且つ多機能を指向した抗エイズ薬の開発及び抗CCR5-CXCR4キメラ環状テトラデカペプチド抗体による感染防御	加藤 英夫	……	61
10110	遺伝子発現制御機能を持つ亜鉛サイクレン錯体による抗エイズ薬の研究	山本 直彦	……	72
10111	HIV-1の細胞侵入機構の解析による抗エイズウイルス薬の開発	鈴木 達夫	……	77
10113	新規クロニング翻訳調節蛋白やIL-15、IL-16、CD26阻害剤によるエイズおよびエイズ付随症状の治療・診断研究	岩倉洋一郎	……	88

第2分野 エイズワクチン等エイズ発症防止薬の開発に関する研究

10201	HIV日本人株及び東南アジア株に対するワクチンの開発とAIDS予防法に関する研究	小室 勝利	……	99
10202	HIV-1vpr遺伝子を用いたHIV感染細胞のアポトーシスによる排除技術の開発	森田 裕	……	115
10204	HIVによる免疫機能不全を治療・予防する新規ワクチンの開発	金子有太郎	……	121

第3分野 抗エイズ薬開発のための基盤技術の開発等に関する研究

10301	エイズ治療薬開発のための評価スクリーニング系の開発	永井 美之	……	133
10303	HIVの病原性遺伝子Nefを標的とした抗AIDS薬開発のための基盤研究	松田 道行	……	144

第1分野

抗エイズウイルス薬、エイズ不随症状
に対する治療薬の開発に関する研究

新規クローニング翻訳調節蛋白やIL-15、IL-16、CD26阻害剤によるエイズおよびエイズ付随症状の治療・診断研究

所 属：東京大学医科学研究所
ヒト疾患モデル研究センター 教授
主任研究者：岩倉洋一郎

要旨

サイトカインによるエイズ制御を目的としてHIV 発現におけるサイトカインの役割を検討し、TNF- α やIL-1が重要な役割を果たすことを示した。また、IL-15やFCSがMAIDS発症に、CXCR4がT細胞の生存に重要な役割を果たすことがわかった。

1. 研究組織

- (1) 東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター 教授 岩倉洋一郎
- (2) 三井製薬工業株式会社 製品計画部 主席部員 粟屋 昭
- (3) 名古屋大学医学部附属病態制御研究施設 生体防御研究部門 教授 吉開泰信
- (4) 千葉大学薬学部生化学研究室 助教授 懸川友人
- (5) 東京医科歯科大学医学部保健衛生学科 助教授 窪田哲朗

2. 研究目的

TNF- α などいくつかのサイトカインはHIV 遺伝子の発現に関与することが示唆されている。従って、これらのサイトカインをコントロールすることにより、エイズの発症を阻止する方策が考えられる。また、CXCR4などいくつかのケモカインはHIV のレセプターとして機能することが知られており、これらのレセプターをブロックすることにより、エイズの治療や発症を阻止できる可能性がある。そのため本研究では、HIV 遺伝子発現や MAIDS ウイルス増殖における種々のサイトカインの役割を検討すると共に、IL-16やCXCR4などの HIV 増殖における役割やT細胞における機能の解析を試みた。

1) 岩倉

第一の柱として、HIV 遺伝子発現におけるサイトカインの役割を検討した。これまでサイトカインがHIV 遺伝子発現に及ぼす影響についての検討は主として試験管内で行われており、生体を用いた検討はなされていなかった。岩倉らは独自にHIV 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製し、このマウスがHIV の持続感染系として利用できることを示した。このマウスのサイトカイン遺伝子を欠損させることにより、LPS投与後に見られるHIV 遺伝子の発現誘導にたいするTNF- α やIL-1などのサイトカインの役割について検討した。

第2の柱として、IL-16ノックアウトマウスの作製を試みた。CD4やCXCR4はHIV のレセプターであり、これらのレセプターの機能を阻害するような薬剤、あるいはペプチドはエイズ治療の大きなターゲットとなり得る。しかし、CD4に対する抗体によりHIV の結合をブロックすることは、HIV のentryを阻害するものの同時にリンパ球のアポトーシスを誘導し、また、すでに感染した細胞には効果が低いことから治療としてはあまり有用ではないことがわかっている。興味深いことにIL-16はHIV と同じくCD4を

レセプターとしており、最近、この IL-16 が HIV の entry を拮抗的に阻害して感染を抑制するほか、IL-16-CD4 のシグナルが HIV 感染細胞において HIV 遺伝子の複製抑制を示すことが明らかにされた。IL-16 の CD4 への結合は抗 CD4 抗体のように T 細胞にアポトーシスを誘導することは知られていない。それゆえ、IL-16 は AIDS 治療薬として、きわめて魅力的である。本研究では、IL-16 の HIV 増殖に対する影響を検討する系を構築するために、IL-16 ノックアウトマウスの作製を試みた。

第 3 の柱として CXCR4 の機能解析を試みた。CXCR4 は SDF-1 レセプターとして活性化シグナルを伝達することが知られている。従って、HIV 感染により、gp120 がこのレセプターに結合すると宿主細胞に何らかの影響を与えることが予想される。また、CXCR4 阻害物質のエイズ治療への応用に当たり、CXCR4 が生体の中で果たしている役割を知ることは、副作用を防ぎ、最大限の効果を得るためにも重要である。そこで本研究では、CXCR4 欠損マウスを作製し、その役割を解析した。CXCR4 の完全欠損は致死性であるため、コンディショナルノックアウトを用いた。

第 4 の柱として、HIV 感受性マウスの開発を試みた。トランスジェニックマウスの場合は、ウイルス遺伝子の宿主染色体への組み込み後の過程は再現できるものの、感染の初期過程を再現することは難しい。この意味では SCID-hu マウスは HIV の感染初期過程を含め全増殖過程を再現できることから、有用である。しかし、通常の SCID-hu ではヒトリンパ球が胸腺に分布しないために定着率が悪く、T 細胞の増殖が認められないことなど、いくつかの問題があり、完全なヒトのモデルとなっていない。本研究では胸腺で特異的にヒトリンパ球のホーミングに関与する遺伝子を発現させることにより、ヒト T 細胞の増殖分化やホーミングが正常におこる SCID-hu マウスを開発することにした。血液幹細胞では CXCR4 が発現していることを利用し、そのリガンドである SDF1 を胸腺で発現させることにより、血液幹細胞を胸腺にホーミングさせ、T 細胞を分化させることを試みた。

2) 粟屋

粟屋らは血清胸腺因子 FTS の解析を行った。HIV 感染に対する化学療法後に、HIV が、再び宿主内で活性化し、AIDS の症状が進行する病態を制御できる、化学療法以外の治療法を、準備しておくことは肝要であり、生体の免疫能を高める生体由来のサイトカイン類等の生体防御物質の、臨床応用の可能性を示唆する基礎的な知見を、十分に蓄積していく必要がある。ブタ、ウシ、ヒトでアミノ酸配列の共通な血清胸腺因子 FTS は、これまで、EAE モルモットやラット、老化マウス、心筋症ハムスター、糖尿病発症ラットやマウス、放射線照射マウス、シスプラチンやアドリアマイシン投与マウス、シクロスポリン投与マウス、FK-506 投与ラット、EMC ウイルス感染心筋炎マウス等において、抗炎症作用を発揮して、それら発症を遅らせたり、症状を緩和したり、臓器傷害を防御し、大幅に生存率を高める効果を有することが私どもにより、見出されてきており、FTS はステロイドとは、異なる内因性の抗炎症物質と考えられる。この有用性と安全性の高い FTS を、副作用と毒性の懸念されるサイトカイン類よりも、早く、AIDS 患者等免疫不全症、自己免疫疾患等患者の治療に応用すべく、研究を加速したいと考える。

3) 吉開

吉開らはマウス後天性免疫不全症候群 (MAIDS) は LP-BM5 マウス白血病ウイルスの感染によって引き起こされる免疫不全の機序の分子機構を解明し、その基礎的知見に基づいた新しい AIDS 治療法の開発を目指す。本年度は分泌型 IL-15Tg マウスに認められる MAIDS 抵抗性の機序を明らかにするとともに、IL-15 遺伝子を組み込んだ発現ベクタープラスミドを正常マウスに投与して、MAIDS の発症を抑制するか検討した。

4) 懸川

懸川らは HIV mRNA の翻訳制御因子について解析した。HIV-1 感染により宿主翻訳系は翻訳伸長因子 EF-1D への Tat の結合により停止する。一方、HIV-1 粒子に宿主の EF-1A が取り込まれるばかりでなく、TOP mRNAs family に属する EF-1A mRNA の翻訳は正および負の作用を gp41 および Vpr より受けていると予想される。以上の背景から、HIV-1 は感染の比較的初期に EF-1A を必要とするため、この選択的かつ経時的な調節を行っていると考えた。そこで、HIV-1 感染とその増殖に対して EF-1A がどのような役割を果たしているかを明らかにするためにまず EF-1A mRNA 翻訳の選択的調節に関与する宿主因子の同定を計画した。

5) 窪田

CD26 を強く発現する細胞には HIV が感染しやすいこと、HIV の gp120 が CD26 と強い親和性をもつこと、抗 CD26 抗体に HIV 感染阻止能があること等が知られており、また HIV 感染者の免疫不全状態は、CD26 に関連した T 細胞機能障害が関わっている。しかし、CD26 が免疫機能を調節する詳細な機構は解明されていない。そこで窪田らは、CD26 の細胞外領域に存在する DP IV 領域に、この酵素の特異的阻害剤 TMC-2 が結合することによって、細胞の活性化機構にどのような影響を生じるかを検討した。

3. 研究方法

1) 岩倉

- a. 独自に開発した逆転写酵素欠損型の HIV-1 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを HIV 感染モデルとして用いた。HIV 遺伝子の発現は LPS を腹腔に投与することにより誘導した。また、遺伝子発現に対するサイトカインの役割を調べるために IL-1、IFN- γ 、IL-6、TNF- α 遺伝子ノックアウトマウスと掛け合わせ、影響を検討した。
- b. IL-16 ノックアウトマウスの作製は E14.1ES 細胞を用い、ES 細胞凝集法により行った。
- c. CXCR4 のエクソン 2 を loxP で挿んだコンストラクトを作製し、ノックインマウスを作製した。Cre 遺伝子を lck プロモーター制御下に発現するマウスを入手し、掛け合わせることで、T 細胞特異的遺伝子欠損マウスを作製した。
- d. ヒト SDF-1 遺伝子をクローン化し、マウス CD4 エンハンサー・プロモーターの下流に結合した。通常のマイクロインジェクション法により、(NOD/Shi +/+ x NOD/LtSz scid/scid)F1 マウスの受精卵に導入し、トランスジェニックマウスを作製した。

2) 粟屋

- a. 4 週令の C57BL/6 雄マウスで MAIDS を作製し、180 日間、FTS あるいは PBS を投与し、生存率やリンパ球、M ϕ の動態等を調べた。8 週令の ICR 雌マウスに、プレオマイシンを投与し、肺線維症を起こし、FTS 投与の効果、生化学的、組織学的に、肺臓と白血球等の動態につき検討した。6 週令 SD 雄ラットに FK-506 を投与し、腎臓傷害を起こし、FTS 投与による臓器傷害修復・再生効果を、組織学的、生化学的に検討した。TNF- α 誘導の Min6 細胞 apoptosis 惹起の実験系に、FTS あるいは PBS を加え、apoptosis の抑制効果を調べ、各種蛋白質類の動態を、RT-PCR や western blotting で検討した。

3) 吉開

- a. IL-15 トランスジェニック マウス：分泌型 IL-15cDNA を発現した C57BL/6 マウス背景のトランスジェニックマウスに LP-BM5 マウス白血病ウイルスを投与して経時的に脾臓 NK 細胞の NK 活性を YAC-1 細胞を標的細胞として測定した。T 細胞の増殖活性を抗 CD 3 抗体および抗 T 細胞レセプター (TCR) 抗体で刺激して、3 [H]-サイミジンの取り込みで測定した。脾臓 CD 8 T 細胞の CTL 活性を LP-BM5 マウス白血病ウイルス gag p12 由来の 10 アミノ酸 (P12-10: TENLPNLPL) (H-2Db binding motif を含む) で in vitro で刺激した後、P12-10 pulsed EL-4 を標的細胞として測定した。さらに *Mycobacteria bovis* BCG1x10⁶ CFU を投与して、臓器内菌数および NK 細胞、CD 8 T 細胞の動態をフローサイトメーターで解析した。
- b. IL-15 DNA in vivo 投与：IL-15 cDNA を pCR3.1(Invitrogen, Carlsbutg, MD) に組み込んだ pCR3.1:IL-15 プラスミドを作成した。また同様に pEGFP-N1(Clonetech Lab., Palp Aho, CA) に組み込んだプラスミド pEGFP-N1:IL-15 を作成した。Bio-Rad hand-held helium-pulsed gen gun を用いて 4 mg の pEGFP-N1:IL-15 をマウスに投与して経時的に蛍光を共焦点レーザー顕微鏡で測定した。同様の方法で pCR3.1:IL-15 を LP-BM5 マウス白血病ウイルスを投与と同時に 1 回投与した。MAIDS の発症程度を生存率、脾腫、異常リンパ球 (Thy1 陰性、Fas 陽性、IgM^{dull} 細胞など) の出現頻度、LP-BM5 viral DNA の integration 量で検討した。

4) 懸川

- a. TOP mRNAs family の EF-1A mRNA の翻訳が特異的に抑制されるときに誘導される TOP element に特異的に結合する因子 (TOP と紫外線架橋後で p56) をウシリンパ節より精製し、さらに内部アミノ

酸配列を決定した。この配列から予想される遺伝子の mRNA 量を Northern blot 法および RT-PCR 法で解析した。

5) 窪田

- a. CD26 の細胞外領域に存在する DP IV 領域に、この酵素の特異的阻害剤 TMC-2 を結合させ、抗 CD3 抗体等で刺激した後のサイトカイン産生量を測定した。また、サイトカイン mRNA の発現を RT-PCR 法で検出した。さらに、細胞を可溶化して、免疫沈降法、ウェスタンブロット法等で刺激伝達分子の活性を検討した。

4. 研究成果、および考察

1) 岩倉

- a. HIV-1 遺伝子導入トランスジェニックマウスを種々のサイトカイン遺伝子欠損マウスと掛け合わせるにより、遺伝子発現に及ぼすサイトカインの役割を検討した。このマウスでは、リンパ球における HIV-1 遺伝子の発現が大腸菌の LPS 刺激により活性化され、血中に大量の欠損型ウイルス粒子の遊離が起こり、p24 の濃度は 500 pg/ml にも達することがわかった。このとき、遺伝子ノックアウトマウスと掛け合わせるにより、IL-1、あるいは TNF- α を欠損させると HIV-1 の発現が 40~60%抑制されることがわかった。しかし、IFN- γ や IL-6 の欠損は影響を与えなかった。これにより、IL-1、あるいは TNF- α が HIV 遺伝子の発現に重要な役割を果たしていることが初めて動物個体を使って示された。
- b. HIV 感受性マウス作製のために、ヒト SDF-1 を CD4 プロモーターの支配下に発現させるコンストラクトを作製した。この DNA を当初 NOD-Scid/Scid マウスの受精卵に導入したが、トランスジェニックマウスは得られなかった。そこで、NOD-Scid/+マウスの受精卵に導入し、トランスジェニックマウスを得た。これらのマウスは胸腺で強く SDF-1 を発現していた。現在掛け合わせにより NOD-Scid/Scid トランスジェニックマウスを作製し、このマウスにヒト臍帯血移植し、胸腺で T 細胞の増殖が起こるかどうかなを検討している。
- c. IL-16 染色体遺伝子をクローン化し、エクソン 5、6 を欠損させ、代わりに Red Fluorescence Protein 遺伝子を挿入した。この遺伝子を ES 細胞に導入して、相同遺伝子組み換え体を単離した。現在、キメラマウスを作製中である。
- d. CXCR4 のコンディショナルノックアウトマウスを作製する事に成功した。このマウスを、Mx-Cre マウスと掛け合わせ、polyI・polyC 処理をしたところ、リンパ球で CXCR4 が欠損することがわかった。また、lck-Cre マウスと掛け合わせたところ、T 細胞で特異的に CXCR4 が欠損することが示された。このノックアウトマウスを用いて T 細胞の増殖分化に対する影響を検討したところ、ノックアウトマウスでは、胸腺、及び末梢の脾臓、リンパ節などで T 細胞が 40%程度減少していることがわかった。また、胸腺におけるアポトーシス細胞の割合を調べたところ、約 2 倍増加していることがわかった。また、BrdU で標識して生体内の代謝速度を調べたところ、やはり 2 倍程度亢進していた。これらの結果は、CXCR4 からのシグナルが T 細胞の生存に重要な役割を果たしていることを示している。HIV 感染後 T 細胞表面から CXCR4 が消失することが知られており、この結果から HIV 感染後に見られる T 細胞の減少に CXCR4 も寄与している可能性が示唆された。

2) 粟屋

- a. FTS が、MAIDS の発症を抑制・遅延させること、FTS 投与により IL-15 の産生の増強、腸管 I-IEL 数の顕著な差、 γ δ T 細胞の減少の抑制等々の効果が明らかになった。
- b. プレオマイシン惹起肺線維症マウスにおいて、FTS 投与により、肺重量、集積白血球数、組織学的病変等の減少が明らかになった。また、肺線維症に関係する TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1、MIP-1 α 、RANTES、MIP-2、KC 等サイトカイン、ケモカインの産生が抑制された。FK-506 惹起腎臓傷害ラットにおいて、FTS 投与により、低下したクレアチニンクリアランス値の改善、腎臓での低下した catalase 活性の回復、グルタチオンレベルの向上が見られた。これら FTS による臓器傷害の防護・修復や、ROS scavenging 効果に関する知見をもとに、FTS が、酸化過程を block するプロセス・蛋白質の誘導等に関与している可能性を、Min 6 細胞 apoptosis 抑制の系で、明らかにできればと考え

た。FTS の Min 6 細胞 apoptosis 抑制の至適濃度は、10pg/ml ~ 1 ng/ml であった。FTS は、iNOS の mRNA の発現と、蛋白質の発現を抑制した。またこれと逆平行して、想定された、発現が増加する蛋白質類のバンドの存在に気づき、これら蛋白質類の同定を進めている。

- c. 近年、HIV や EBV 等の感染細胞において、細胞は、酸化ストレスを受け、細胞内情報伝達系を介して、NF- κ B をはじめとする核内転写因子が活性化することが明らかにされてきており、NF- κ B は、多くの免疫系遺伝子の発現や、HIV の増殖、AIDS の発症・進展に関与していると考えられている。

3) 吉開

- a. IL-15Tg マウス :

コントロールマウスは LP-BM5 マウス白血病ウイルス感染 175 日目までに全例死亡したが、IL-15Tg マウスでは 85% 生存した。LP-BM5 マウス白血病ウイルス感染後、68 日目の脾臓細胞中の NK 細胞数には両群で変化が認められなかったが、NK 活性はコントロールマウスでは著しく低下していた。一方、IL-15 Tg マウスでは高い NK 活性を認めた。抗 CD 3 抗体や抗 TCR 抗体に対する T 細胞増殖能もコントロールマウスで著しく低下していたが、IL-15Tg マウスでは優位に高い T 細胞増殖能と LP-BM5 マウス白血病ウイルス gag p12-10 に対する CTL 活性が認めれた。BCG 感染後の菌数は IL-15Tg マウスで有意に抑制されており、NK 細胞、CD 8 T 細胞が増加していた。

- b. IL-15cDNA in vivo 投与 :

IL-15cDNA を MAIDS 発症抑制治療薬としての応用の可能性を調べるために IL-15cDNA を組み込んだ発現ベクターの in vivo 投与によって、MAIDS の発症抑制効果を検討した。まず、pEGFP-N1:IL-15 を in vivo に投与して 1 日、3 日、5 日目に局所リンパ節細胞を共焦点レーザー顕微鏡で調べてところ、3 日目から付着細胞に蛍光が検出された。そこで、LP-BM5 マウス白血病ウイルスの感染後、3 日ごとに pCR3.1:IL-15 を投与したところ、ベクターのみ投与のコントロールマウスに比べて、有意に生存率が高かった。脾腫もコントロールマウスに比べて抑制されていた。Thy1 陰性 T 細胞、Fas 陽性リンパ球、IgM μ llB 細胞などの異常細胞の出現頻度も有意に低かった。LP-BM5 viral DNA の integration 量は IL-15DNA 投与マウスで低かった。

- c. IL-15 産生不全は MAIDS や AIDS の病態形成に深く関与していると考えられる。今回、IL-15 Tg マウスと IL-15DNA 投与マウスにおいて、MAIDS の発症を有意に抑制された。IL-15 Tg マウスでは NK 活性や T 細胞増殖能が十分に保たれており、ウイルスに対する免疫応答が活性化され、MAIDS の発症が抑制されたと考えている。しかしながら、LP-BM5 マウス白血病ウイルス抗原のなかで免疫原性が高い H-2 Db 結合 gag p12-10 に対する CTL 活性は認められなかった。今後、他の LP-BM5 マウス白血病ウイルス抗原で免疫応答を検討する必要がある。治療薬としての IL-15 の有効性を検討するために MAIDS 発症マウスに、IL-15cDNA を発現ベクターを in vivo に投与して MAIDS の進行を抑制することができた。IL-15 が MAIDS や AIDS の治療に有効である可能性が示唆された。

4) 懸川

- a. 前年度までの研究で、ヒトおよびマウスの T 細胞が、100-300 μ M の TMC-2 によって抗原特異的増殖反応を阻害されることが明らかになった。今年度は、TMC-2 の添加により T 細胞の IL-2 産生が抑制されること、および IL-2 mRNA 発現も抑制されることを明らかにした。また、細胞内刺激伝達系蛋白質のチロシンリン酸化におよぼす影響を検討したところ、 ζ 鎖や ZAP-70 のチロシンリン酸化も抑制され、TMC-2 がシグナル伝達系の上流部分に効いていることが明らかとなった。さらに TMC-2 は、T 細胞を可溶化して抗 CD45 抗体で CD45 と、会合している CD26 とを一緒に沈降した分画の、DP IV 活性と同時に CD45 PTPase 活性をも抑制することが判明した。

- b. HIV 感染者では、リンパ球数が著減していない時期においても、細胞性免疫能が低下している。この原因の一つとして、HIV の gp120 と親和性の高い CD26 分子が、CD45 PTPase 活性を制御することによって、TCR-CD3 複合体以下の T 細胞活性化の経路を抑制している可能性が示唆される。

5) 窪田

- a. p56 の内部アミノ酸配列 (KIFVGGGLSPDTPPEEK) から、p56 は 2X RBD-Gly family 蛋白と同定した。

この family の hnRNP D mRNA 発現が、EF-1A mRNA の翻訳が特異的に抑制されるときに増加することが Northern blot 法により明らかとなった。さらに、hnRNP D の4つのサブタイプの内最も長いアミノ酸配列をもつ p45 (ゲノム配列と SDS 電気泳動より同定) に含まれる exon2、exon 7、および exon 9 の発現が誘導されていることが RT-PCR 法により判明した。

b. HIV-1 の gp41 envelope protein は p70 S6 kinase を介して EF-1A mRNA の翻訳を正に、Vpr は glucocorticoid receptor を介して負に影響を及ぼすと考えられる。今回明らかにされた、EF-1A mRNA の特異的翻訳抑制時に誘導される hnRNP D p45 は gp41 により発現が減少し、Vpr により発現が増加すると予想される。更に、hnRNP D p45 と類似の TOP 結合性を示す La autoantigen は HIV-1 mRNA への結合能を持つことが知られている。以上のことから、recombinant hnRNP D p45 をリンパ細胞に導入することで TOP mRNA の選択的な翻訳抑制が誘導され、結果として gp41 の働きを阻害し、HIV-1 が EF-1A を必要とするか否かが明らかになると期待される。

5. 結論

- 1) TNF- α 、あるいは IL-1 をコントロールすることにより、エイズの病態を制御できる可能性がはじめて動物個体を用いて示された。
- 2) IL-16 遺伝子ノックアウト ES 細胞の樹立の成功し、キメラマウスの作製に取りかかった。
- 3) CXCR4 コンディショナルノックアウトマウスの作製に成功し、CXCR4 が B 細胞の分化だけではなく、T 細胞の生存にも関与していることがわかり、エイズ病態形成との関連が示唆された。
- 4) CD4-huSDF-1 トランスジェニック NOD-SCID マウスの作製に成功した。このマウスではヒト造血幹細胞が胸腺にホーミングする事が期待され、現在検討している。
- 5) 細菌・ウイルス・原虫等や薬剤・放射線等の外来異物による、感染やその摂取・投与に起因する様々な臓器傷害を FTS が防護するのは、FTS の持つ、抗炎症性効果・酸化ラジカル scavenging 効果に基づくものと考えられる。FTS により、どのような蛋白質類が、up-regulate し、発現するかを究明することは、極めて重要で、示唆に富む知見が、今後出てくることが期待される。
- 6) IL-15Tg マウスと IL-15cDNA 投与マウスでは MAIDS の発症が有意に抑制された。IL-15 産生不全が MAIDS 自身の病態形成に関与していると考えられ、IL-15 が MAIDS の治療に有効である可能性が示唆された。
- 7) hnRNP D p45 は EF-1A mRNA の選択的翻訳抑制に関与する可能性がある。HIV の感染・増殖に EF-1A が必要かどうかを明らかにするために recombinant hnRNP D p45 の動物モデル等での検討が待たれる。
- 8) CD26 分子は細胞膜上で会合している CD45 分子の PTPase 活性を調節することによって、T 細胞の活性化を制御している可能性が示唆された。

6. 研究発表

原著論文

- 1) Hino, A., Igarashi, O., Tagawa, Y., Iwakura, Y., and Nariuchi, H. Interferon-g priming is not critical for IL-12 production of murine spleen cells. *Cytokine*, **12**, 12-20 (2000).
- 2) Horai, R., Saijo, S., Tanioka, H., Nakae, S., Sudo, K., Okahara, A., Ikuse, T., Asano, M., and Iwakura, Y. Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *J. Exp. Med.*, **191**, 313-320 (2000).
- 3) Tagawa, Y., Matthys, P., Heremans, H., Dillen, C., Zaman, Z., Iwakura, Y., and Billiau, A. Bimodal role of endogenous interleukin-6 in concanavalin A-induced hepatitis in mice. *J. Leukocyte Biology*, **67**, 90-96 (2000).
- 4) Miyazato, A., Kawakami, K., Iwakura, Y., and Saito, A. Chemokine synthesis and cellular inflammatory changes in lungs of mice bearing p40tax of human T-lymphotropic virus type 1. *Clin Exp Immunol.*, **120**, 113-124 (2000).
- 5) Nishihori, H., Tsuji, H., Wang, H., Tahara, H., Akiyama, M., Ogawa, Y., Matsushima, K., Iwakura, Y., and Mukaida, N. Participation of endogenously produced IFN-g in interleukin 4-mediated tumor rejection. *Human Gene Therapy*, **11**, 659-668 (2000).

- 6) Ohkusu, K., Yoshimoto, T., Takeda, K., Ogura, T., Kashiwamura, S., Iwakura, Y., Akira, S., Okamura, H., and Nakanishi, K. Potentiality of interleukin-18 as a useful reagent for treatment and prevention of *Leishmania major* infection. *Infect Immun.*, **68**, 2449-2456 (2000).
- 7) Sasaki, S., Nishikawa, S., Miura, T., Mizuki, M., Yamada, K., Madarame, H., Tagawa, Y., Iwakura, Y., and Nakane, A. Interleukin-4 and interleukin-10 are involved in host resistance to *Staphylococcus aureus* infection through regulation of gamma interferon. *Infect Immun.*, **68**, 2424-2430 (2000).
- 8) Yamada, H., Mizumo, S., Horai, R., Iwakura, Y., and Sugawara, I. Protective role of interleukin-1 in mycobacterial infection in IL-1 alpha/beta double-knockout mice. *Lab Invest.*, **80**, 759-67 (2000).
- 9) Ohta, A., Sekimoto, M., Sato, M., Koda, T., Nishimura, Si., Iwakura, Y., Sekikawa, K., and Nishimura, T. Indispensable role for TNF-alpha and IFN-gamma at the effector phase of liver injury mediated by Th1 cells specific to hepatitis B virus surface antigen. *J Immunol.*, **165**, 956-961 (2000).
- 10) Kawakami, K., Koguchi, Y., Qureshi, M. H., Miyazato, A., Yara, S., Kinjo, Y., Iwakura, Y., Takeda, K., Akira, S., Kurimoto, M., and Saito, A. IL-18 contributes to host resistance against infection with *Cryptococcus neoformans* in mice with defective IL-12 synthesis through induction of IFN-gamma production by NK Cells. *J Immunol.*, **165**, 941-947 (2000).
- 11) Tanaka, J., Ozaki, H., Yasuda, J., Horai, R., Tagawa, Y., Asano, M., Saijo, S., Imai, M., Sekikawa, K., Kopf, M., and Iwakura, Y. Lipopolysaccharide-induced HIV-I expression in transgenic mice is mediated by tumor necrosis factor-a and interleukin-1, but not by interferon-g nor interleukin-6. *AIDS*, **14**, 1299-1307 (2000).
- 12) Miura, T., Nishikawa, S., Sasaki, S., Yamada, K., Hasegawa, S., Mizuki, D., Mizuki, M., Hatayama, I., Sekikawa, K., Tagawa, Y., Iwakura, Y., and Nakane, A. Roles of endogenous cytokines in liver apoptosis of mice in lethal *Listeria monocytogenes* infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **28**, 335-41 (2000).
- 13) Yamaguchi, K., Motegi, K., Iwakura, Y., and Endo, Y. Involvement of interleukin-1 in the inflammatory actions of aminobisphosphonates in mice. *Br. J. Pharmacol.*, **130**, 1646-1654 (2000).
- 14) Igarashi, I., Asaba, U., Xuan, X., Omata, Y., Saito, A., Nagasawa, H., Fujisaki, K., Suzuki, N., Iwakura, Y., and Mikami, T. Immunization with recombinant surface antigens p26 with Freund's adjuvants against *Babesia rodhaini* infection. *J. Vet. Med. Sci.* **62**, 717-723 (2000).
- 15) Mun, H.-S., Aosai, F., Norose, K., Chen, M., Hata, H., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Byun, D.-S., and Yano, A. *Toxoplasma gondii* Hsp70 as a danger signal in *Toxoplasma gondii*-infected mice. *Cell Stress & Chaperones* **5**, 328-335 (2000).
- 16) Sugawara, I., Ymamada, H., Mizuno, S., and Iwakura, Y. IL-4 is required for defense against Mycobacterial infection. *Microbiol. Immunol.*, **44**, 971-979 (2000).
- 17) Hayashi, K., Natsume, W., Watanabe, T., Abe, N., Iwai, N., Okada, H., Ito, Y., Asano, M., Iwakura, Y., Habu, S., Takehama, Y., and Satake, M. Diminution of the AML1 transcription factor function causes differential effects on the fates of CD4 and CD8 single positive T cells. *J. Immunol.*, **165**, 6816-6824 (2000).
- 18) Hayakawa, Y., Smyth, M. J., Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Kakuta, S., Iwakura, Y., Yagita, H., Okumura, K., and Takeda, K. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nature Medicine*, **7**, 94-100 (2001).
- 19) Seino, K., Fukao, K., Muramoto, K., Yanagisawa, K., Takada, Y., Kakuta, S., Iwakura, Y., Van Kaer, L., Takeda, K., Nakayama, T., Taniguchi, M., Bashuda, H., Yagita, H., and Okumura, K. Requirement for NKT cells in the induction of allograft tolerance. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.*, **98**, 2577-2581, (2001).
- 20) Yoneto, T., Waki, S., Takai, T., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Mizuguchi, J., Nariuchi, H., and Yoshimoto, T. A Critical Role of Fc Receptor-Mediated Antibody-Dependent Phagocytosis in The Host Resistance to Blood-Stage *Plasmodium berghei* XAT Infection. *J. Immunol.* in press.
- 21) S. Yara, K. Kawakami, A. Awaya and A. Saito: Inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by a nonapeptide thymic hormone through modulation of the synthesis of inflammatory cytokines and chemokines in murine lungs. *Clin. Exp. Immunol.*, in press.

- 22) N. Tokuda, Y. Fujikura, T. Sawada, Y-H. Wang, T. Kakegawa, M. Tamechika, A. Awaya and T. Fukumoto The effects of facteur thymique serique (FTS) on local graft-versus-host (GVH) reaction in rat popliteal lymph node. (Submitted).
- 23) H. Tada, A. Nakashima, K. Kawamura, A. Awaya, K. Inoue, S. Yanagiwara, A. Fujisaki, K. Itoh and T. Suzuki Effect of thymic hormone as reactive oxygen species-scavenger on renal function in tacrolimus-induced nephrotoxicity. (Submitted).
- 24) Matsuguchi, T., Takagi, K., Musikachoen, T., and Yoshikai, Y.: Gene expressions of lipopolysaccharide receptors, Toll-like receptors 2 and 4, are differently regulated in mouse T lymphocytes. **Blood** 95:1378-1385, 2000.
- 25) Kimura, K., Nishimura, H., Matsuzaki, T., Yokokura, T., Nimura, Y. and Yoahikai, Y.: Synergistic effect of IL-15 and IL-12 on anti-tumor activity in a murine malignant pleurisy model. **Cancer Immunol Immunother.** 49:71-77, 2000.
- 26) Yoshikai Y. and Nishimura, H. The role of interleukin 15 in mounting an immune response against microbial infections **Microbes. Infect.** 2:381-389, 2000.
- 27) Mokuno, Y., Matsuguchi, T., Takano, M., Nishimura, H., Washizu J., Ogawa T., Nimura, Y. and Yoshikai Y. : Expression of Toll-like receptor 2 on gd T cells bearing invariant Vg6/Vd1 indyced by *Escherichia coli* infection. **J. Immunol.** 165:931-40, 2000.
- 28) Murosaki, S., Muroyama K., Yamamoto Y., and Yoshikai Y.: Antitumor effect of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 through restoration of impaired IL-12 production in tumor-bearing mice. **Cancer Immunol Immunother.** 49:157-64, 2000.
- 29) Liu, T., Nishimura, H., Matsuguchi, T. and Yoshikai, Y. Difference in interleukin-12 and -15 production by dendritic cells at the early stage of *Listeria monocytogenes* infection between BALB/c and C57 BL/6 mice **Cell. Immunol.** 202:31-40, 2000.
- 30) Umemura, M., Wajjwalku, W., Upragarin, N., Liu, T., Nishimura, H., Matsuguchi T., Wilson G.M., and Yoshikai Y.. Expression of mouse mammary tumor virus superantigen accelerates tumorigenicity of myeloma cells **J. Virol** 74:8226-8233, 2000.
- 31) Tsunobuchi, T., Nishimura, H., Goshima, F., Daikoku, T., Suzuki, H., Nakashima, I., Nishiyama, Y., and Yoshikai, Y. A protective role of interleukin-15 in a mouse model for systemic infection with herpes simplex virus. **Virology** 275:57-66 2000
- 32) Tsunobuchi, H., Nishimura, H., Goshima, F., Daikoku, T., Nishiyama, Y., and Yoshikai, Y. Memory Type CD8+ T cells Protect IL-2R a-deficient mice from systemic infection with HSV Type 2 **J. Immunol.** 165:4552-4560, 2000
- 33) Masuda A., Matsuguchi T., Hayakawa T and Yoshikai Y. Exogenous interleukin-15 induced STAT6 tyrosine-phosphorylation and IL-4 synthesis in a mouse mast cell line. **J. Biol. Chem.** 275:29331-29337, 2000
- 34) Matsuguchi, T., Musikachoen, T., Ogawa, T., and Yoshikai, Y. : Gene expression of Toll-like receptor 2 but not Toll-like receptor 4, is induced by LPS and inflammatory cytokines in mouse macrophages. **J. Immunol.** 165:5767-5772, 2000.
- 35) Iwami, K., Matsuguchi, T., Masuda, A., Kikuchi, T., Musikachoen, T., and Yoshikai, Y.: Naturally occuring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits LPS signaling. **J. Immunol.** 165: 6682-6686, 2000.
- 36) Nishimura, H., Yajima, T., Naiki, Y., Tsunobuchi, H., Umemura, M., Itano, K., Matsuguchi, T., Suzuki, M., Ohashi, P, M., and Yoshikai, Y.: Differential roles of IL-15 mRNA isoforms generated by alternative splicing in immune responses in vivo. **J. Exp. Med.** 191:157-170, 2000.
- 37) Umemura, M., Wajjwalku, W., Hirose, K., Emoto, M., Nishimura, H., Matsuguchi, T., Gotoh, Y., Takahashi, M., Makino, M. and Yoshikai, Y.: Impaired IL-15 production in murine AIDS mice might underlie susceptibility to mycobacterial infection. **J. Leuko. Biol.** 69:138-148. 2001.

- 38) Hara, T., Nishimura, H., and Yoshikai, Y. : Thymus-dependent modulation of Ly49 inhibitory receptor expression on NK1.1+g/d T cells. *Immunology* 102:24-30. 2001.
- 39) Ishimitsu, R., Nishimura, H., Yajima, T., Watase, T., Kawachi, H., and Yoshikai, Y.: Overexpression of Interleukin-15 in vivo enhances Tc1 response which inhibits allergic inflammation in a murine model of asthma. *J. Immunol.* 166:1991-2001. 2001.
- 40) Nishimura, H., Tagaya, M., Tsunobuchi, H., Suzuki, H., Nakashima, I., and Yoshikai, Y. : Mice lacking IL-2/IL-15 receptor b chain are susceptible but mice lacking IL-2 are resistant to infection with avirulent *Salmonella choleraesuis*. *Infect. Immun.* 69:1226-1229.2001.
- 41) Umemura, M., Nishimura, H., Hirose, K., Matsuguchi, T., and Yoshikai, Y.: Overexpression of IL-15 in vivo induces a predominant Tc1 response in mice inoculated with *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin infection. *J.Immunol.* in press. 2001.
- 42) Yajima, T., Nishimura, H., Ishimitsu, R., Yamamura, K., Watase, T., D. H. Busch, E. G. Pamer, Kuwano, H., and Yoshikai, Y. : Memory phenotype CD8+T cells increased in IL-15 transgenic mice are involved in early protection against a primary infection with *Listeria monocytogenes*. *Eur. J. Immunol.* in press. 2001.
- 43) Musikacharoen, T., Matsuguchi, T., Kikuchi, T. and Yoshikai, Y: NF- κ B and STAT5 play important roles in the regulation of mouse Toll-like receptor 2 gene expression *J.Immunol* in press 2001.
- 44) Jianfeng Zhu, Akiko Hayakawa, Tomohito Kakegawa, Roger L. Kaspar : Binding of the La autoantigen to the 5' UTR of a chimeric human translation elongation factor 1A reporter mRNA inhibits translation *in vitro*, *Eur J Biochem*, (Submitted)
- 45) S.Yara, K.Kawakami, A.Awaya and A.Saito *et al.* Inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by a nonapeptide thymic hormone through modulation of the synthesis of inflammatory cytokines and chemokines in murine lungs. In press (2001).
- 46) N.Tokuda, Y.Fujikura, T.Sawada, Y-H.Wang, T.Kakegawa, M.Tamechika, A.Awaya and T.Fukumoto *et al.* The effects of facteur thymique serique (FTS) on local graft-versus-host (GVH) reaction in rat popliteal lymph node. (Submitted).
- 47) H.Tada, A.Nakashima, K.Kawamura, A.Awaya, K.Itoh and T. Suzuki *et al.* Effect of thymic hormone as reactive oxygen species-scavenger on renal function in tacrolimus-induced nephrotoxicity. (Submitted).
- 48) T. Onodera, W. Nishioka, J. Yasuda, K. Saeki, Y. Matsumoto and A. Awaya. Protection by serum thymic factor (FTS) of tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in mouse pancreatic beta cell line (Min6). (Submitted).
- 49) Masayuki Umemura, Hitoshi Nishimura, Worawidh Wajjwalku, Genta Yamamoto, Testuya Matsuguchi, Masahide Takahashi, Yukihiko Nishiyama, Masahiko Makino, Akira Awaya, and Yasunobu Yoshikai. *In vivo* treatment with a nonapeptide thymic hormone, facteur thymique serique (FTS), protects mice from progression of a murine retrovirus-induced acquired immunodeficiency syndrome (MAIDS). (Submitted).

学会発表

- 1) Tomohito Kakegawa, Makoto Ito, Hiromi Saito, Hiroshi Kobayashi: Rapamycin Administration Increases Repression of Translation of TOP mRNAs in Lymph Node and Parotid Gland but not in Thymus nor Submaxillary Gland of Rat, Cold Spring Harbor Meeting (Translational Control), (2000) September 6~10.
- 2) Akiko Hayakawa, Hiroshi Kobayashi, Hiromi Saito, Roger L. Kaspar, Tomohito Kakegawa: Rapamycin Treatment leads to Increased Binding Activity of HnRNP C-like/UP2 Protein to the R-protein L32 mRNA TOP Element, Cold Spring Harbor Meeting (Translational Control), (2000) September 6~10.
- 3) 懸川友人、田村紗代子、早川晶子、齋藤浩美、小林弘：マクロライド系抗生物質のTOP遺伝子発現系に与える影響、第120回日本薬学会2000年3月29日~31日
- 4) 早川晶子、懸川友人、齋藤浩美、小林弘：Terminal oligo pyrimidine (TOP) 結合因子の生理的意義、

第120回日本薬学会 2000年3月29日～31日

- 5) Tetsuo Kubota, Yuko N. Williams, Nobuyuki Miyasaka: Indirect suppression of CD45 tyrosine phosphatase by an inhibitor of CD26-dipeptidyl peptidase IV relieves rat arthritis. 第30回日本免疫学会学術集会. 2000年11月14～16日.

7. 知的所有権の取得状況

分泌型 II-15 遺伝子の BCG ワクチンアジュバントとしての応用
特許申請中

平成12年度

エイズ医薬品等開発研究
研究報告書

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社

