

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

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

所 属 国立感染症研究所

主任研究者 小室 勝利

要旨

日本、東南アジアを中心に流行している HIV-1 (サブタイプ B,E) を標的としたワクチンの開発を目的とし、ワクチン開発、ワクチン開発のために必要な標的抗原、疫学的研究、免疫機能増強法に関する研究評価のためのモデル動物の改良に関する研究を行った。

HIV ワクチンの世界の動向をみると、病原性ウイルスの感染コントロールの方向に進み、内容としてはウイルス増殖の調節に関する調節蛋白を標的とし、これに細胞性免疫や液性免疫を誘導するワクチンを併用することによる病原性ウイルスの増殖阻止にむかっている。班員の研究もこのことを意識して、今までの研究方法を再考する中で実施されている。標的抗原については、gag を粒子化抗原とする試み、抗原変異への対応を考慮したライブラリーワクチン化、抗体超可変部への HIV コンポーネントの多価移植等の研究が行われ、env だけでなく、gag を使用したワクチンの応用が試みられた。又、ヒトでの CTL 誘導をより明確にするため、日本、東南アジア人に高い頻度で存在する HLA クラス抗原が提示する HIV の CTL エピトープの研究が本格的になった。

本年度から本格的に HIV 増殖に関わる調節蛋白 (Tat) を標的抗原とするワクチン開発をスタートさせ mutant Tat をワクシニアベクター、BCG ベクターに組み込むことに成功し、その効果をサルを用いた検討に入った。gag を組み込んだワクチンとの併用が、今後、期待の持てるワクチンとして、希望を持たせる結果となった。HIV-1 全ゲノムプラスミドを用いた DNA ワクチンにも改良が加えられ、接種回数を減らす試みに成功し、インフルエンザウイルスをベクターとするワクチンも、方法論に改良を加え、サルを用いた感染防御能への検討に進んだ。

世界のワクチン開発は CTL 誘導の重要性を意識した gag を標的抗原とするワクチンと、変異への対応を意識した tat, nef 等を標的抗原としたワクチンの方向に進んでいる。

本年度の研究では、これら傾向を考慮したワクチン開発が試みられ、さらに多種ワクチンの併用および HIV の感染ルートを考慮した感作法の検討もスタートさせた。現在まで開発試行したワクチンには、多くの問題点も残っているが、これら新しい方向の中から、病原性ウイルスに対する臨床試行の可能な HIV ワクチンを開発していきたい。

1. 研究組織

(1) 国立感染症研究所	安全性研究部長	小室勝利
国立感染症研究所	エイズ研究センター	
	第一研究グループ長	本多三男
	第一室長	武部 豊

国立感染症研究所	感染病理部分子病理室長	小島朝人
国立感染症研究所	細菌・血液製剤部輸血病態室長	水落利明
国立感染症研究所	動物管理室主任研究官	網 康至
(2) 京都大学、ウイルス研究所	免疫不全ウイルス研究施設教授	速水正憲
(3) 滋賀医科大学	第二病理学教授	小笠原一誠
(4) 名古屋市立大学医学部	分子遺伝学 教授	岡本 尚
(5) 熊本大学、医学部	エイズ学研究センター教授	滝口雅文
(6) 長崎大学、薬学部	医療薬剤学講座 教授	小林信之
(7) 順天堂大学、医学部	免疫学 助教授	八木田秀雄
	第二病理 教授	白井俊一
(8) 日本医科大学、医学部	微生物学免疫学 助教授	熊谷善博
(9) 北海道大学、免疫科学研究所	血清学部門 教授	志田壽利

2. 研究目的

AIDS 予防対策として、HIV 感染様式の解析を基本として多段階でのウイルス感染阻止法、ウイルス増殖抑制療法等、種々の方法がとられようとしている。

東南アジアから中国を含めた国々における HIV 感染率の急激な上昇を考えると、経済的、社会的背景から、可能であれば、予防対策としては HIV に対するワクチンの開発が最も有効な手段となり得る。

本研究は HIV 日本人株、東南アジア株を主要な標的として、HIV ワクチンを開発することを目的として行われた。

3. 研究方法

ワクチン使用の標的地域を日本、東南アジアにおき、疫学調査にもとづく変異性を考慮しつつ、多種の候補ワクチンをとりあげ、その有効性、安全性に関する検討、抗原性増強法の検討、有効性、安全性評価法の改良等を以下のごとく実施した。

(1) 疫学的解析と標的抗原に関する研究

日本、東南アジア地域に流行する HIV 株の分離とその遺伝子解析、分子疫学的検討、分離ウイルスの免疫学的特性に関する検討、集団、個人内での変異状況の検討、感染患者の臨床経過を考慮した目的とする標的抗原の意義及び抗原性を高めるための検討についての解析を行った。

(2) 候補ワクチンの開発と改良

リコンビナント BCG ワクチン、ワクチニアウイルスをベクターとしたワクチン、インフルエンザウイルスをベクターとしたワクチン、抗体超可変部への HIV 抗原を分子移植したワクチン、DNA ワクチンを候補ワクチンとして作製し、有効性、安全性に関する検討、ベクター及び大量生産法の改良に関する検討を行った。

(3) 抗原性増強法及び有効性、安全性評価法に関する研究

ワクチン効果を高めるためのリンパ球機能分子のワクチンとの併用効果、HLA 分子の関与等の免疫学的

調節法の検討、霊長類を用いた有効性、安全性評価法の改良、HIV ワクチン接種に伴う宿主の免疫学的変化をとらえる試験法の検討を行った。

4. 研究成果

(1) 疫学的解析と標的抗原に関する研究

1) ミャンマー中部の HIV 流行の分子疫学的解析

ミャンマーは現在 53 万人 (WHO-UNAIDS 推計値) におよぶ HIV 感染者が存在すると推定されており、タイに次ぐ東南アジア地域における第 2 の流行地となっている。これまでに、首都ヤンゴンにおいて、タイに由来すると考えられるサブタイプ E と B' とを同定していたが、V3 ペプチド EIA を用いた血清学的なサーベイによって、ミャンマー北中部地域に、サブタイプ E と B' 以外の第 3 のサブタイプが存在することを推測していた。そこで、ミャンマー中部の都市マンダレーに注目し、この地域に流布する HIV-1 株の分子疫学的解析を進め、ミャンマーにおける流行と近隣諸国における流行との関連性を明らかにすることを目的とした研究を行った。その結果、ミャンマーではタイに由来すると考えられる HIV-1 サブタイプ E と B' が流布することが知られていたが、ミャンマー中部の都市マンダレーにおける解析によって、新たにサブタイプ C が存在することを明らかにした。また、この地域に複数のサブタイプのウイルスが co-circulate している状況と、高い感染率とを反映して、B'/C や E/B' などの新しいタイプの組換えウイルスが発生していることを見いだした。これらの知見は、複数のサブタイプ間の superinfection を阻害する免疫学的機構が十分には機能しないことを意味しており、ワクチン開発の困難さをあらためて浮きぼりにするものと考えられる。

2) 組換え HIV-1 キメラ Gag 粒子抗原の発現系を組み合わせた至適免疫法の検討

これまで、HIV の精製蛋白・組換え蛋白・合成ペプチド等を用いたエイズワクチン開発が世界各国で試みられたが、実験室 HIV 株をある程度抑制できても感染者由来の臨床分離株に対しては効果が低かった。しかし、感染者体内では半減期約 2 日で HIV が排除されることから、HIV 阻止に有効な免疫自体は存在している。ただ、試みられたワクチン抗原が必ずしも十分な免疫原性を構成していないためと指摘されている。本研究ではこれまで、種々の組換え HIV 蛋白を作成して抗原性の解析を行ってきた。その中で、Gag 蛋白は臨床分離 HIV 株で抗原共通性が高く、ビリオンと類似した粒子 (VLP: virus-like particle) を形成して最も高い免疫原性を発揮することを明らかにしてきた。また、抗原発現システムについても、組換え生ワクチンベクターとして汎用されているワクシニアウイルス (RVV)、大腸菌に代わる大量発現系のバキュロウイルス、近年着目されている DNA ワクチン、3 種のシステムを用いて発現される Gag VLP の抗原性を検討してきた。そこで今年度は、これら 3 種のシステムを組み合わせたとき誘導される免疫応答を解析し、最も適したプライム・ブーストのプロトコールを明らかにする研究を行った。その結果、初回免疫にプラスミド DNA を接種し、追加免疫には RVV を接種する組み合わせが最も高い抗体産生を誘導できることが示された。現在、T 細胞増殖試験と細胞障害性 T 細胞試験について検討を進めている。今後、複数ワクチン併用に应用させたい。

3) ライブラリーワクチンによる発症防止に関する研究

HIV 感染者への HAART 療法は著効を示し、ウイルス増殖を抑制して症状を改善させた。しかし、体内 HIV は駆逐されず、耐性の獲得や副作用のために HAART 療法にも限界があり、かつ使用期限があるとされている。そこで HAART 療法被治験者へのワクチン接種によって HAART 中止後もウイルスを抑え続けることが出来るかどうかを検討することを目的とし、まずサルと SIV の系で研究を立ち上げ、ヒトへ応用するための前提とする研究を行った。

HIV(SIV)のワクチン開発の難しさは、抗原多様性への対応法にある。類似の HIV が感染しても、体内での免疫系からの回避の結果、個々人によって異なった抗原性を有する HIV(SIV)が生じる。従って、感染者個々人に適したオーダーメイドワクチンを作製する必要がある。そのために、感染者 (HAART 療法開始直前の) 体内に存在する HIV(SIV)ゲノム群を PCR によって取り出し、そのまま発現ベクターに連結するライブラリー-DNA ワクチンを本研究において試みた。

SIV mac239 感染猿を逆転写酵素阻害剤である PMPA で治療しつつ、gag-pol 領域と rev-env 領域を発現するライブラリー-DNA ワクチンを接種して PMPA 投与中止後の体内 SIV 量を追跡した。その結果 PMPA によって体内 SIV 量は検出限界以下にまで下がった。PMPA 中止後は一過性に SIV の rebound がみられたが、再度抑制された。現在のところ、ワクチン接種群と被接種群間で差はみられていない。今後、このライブラリーワクチンの効果を検討したい。

4) 抗体超可変部へのエピトープ分子移植を利用した AIDS ワクチンの分子設計

HIV 主要中和エピトープ (PND) を抗体分子 H 鎖および L 鎖の複数の超可変部に遺伝子組み換え法により分子移植し、V3 エピトープを抗体分子に表現させることに成功した。

このエピトープ移植抗体を利用した HIV-1 の多変異 V3 エピトープライブラリーの構築、エピトープ移植抗体の高い免疫原性と抗原提示細胞上の低親和性 Fc レセプターを介した細胞内移行メカニズム等が明らかとなりつつある。抗体超可変部は、様々なエピトープ構造を分子移植できる有用な構造特性を有していることが過去の本研究の実験結果から示唆されている。HIV-1 の標的細胞への感染にはコレセプター (CCR5, CXCR4 などの bb-chemokine receptor) と CD4 分子の協同的相互作用が必要なことが明らかにされ、コレセプターの HIV-1 感染のトロピズムの密接な関係もあきらかとなってきた。しかし、コレセプターの結合分子である gp120 の反応部位や HIV-1 の細胞侵入との関連については、未だ不明な点が多い。HIV-1 V3 配列が HIV-1 のトロピズムを決定するという報告が複数の研究グループからなされているが、V3 と gp120 との直接相互作用を科学量論的に扱った報告はない。これまでの本研究で作製したエピトープ移植抗体は多価に V3 エピトープを抗体超可変部に表現しているため、HIV-1 gp120 の V3 領域とコレセプターとの相互作用を解析するために有用な研究手段を提供することが期待されている。それらをさらに発展させ、本年度は、多価エピトープ移植抗体の V3 ライブラリースキャニングにより、V3 と CXCR4 の相互作用に必要な V3 のコンセンサス配列に近似することを証明した。また、ピアコアシステムを用いた、8 価 (エピトープ移植抗体) あるいは 4 価 (V3-ストレプトアビジンテトラマー) V3 エピトープの解析から、V3 と CXCR4 の相互作用は、化学量論的に測定できるものであることも証明できた。HIV 感染抵抗性を個体に付与するためのワクチンデザインに有用な情報を得ることができた。

多価エピトープ移植抗体は、免疫グロブリンの血中濃度よりもはるかに低い濃度で、コレセプターと V3 の相互作用を阻止することが、論理的には可能であるため、多価エピトープ移植抗体がワクチンとして免疫応答のスペクトラムを変化させるだけでなく、複数の新 HIV レセプター (CCR5

CXCR4)との相互作用を阻害する効果を発揮すれば、2重の HIV 感染抵抗性を個体に付与する可能性が考えられる。体内寿命が短命なペプチドに比較して、安全性と高いワクチン活性を有する蛋白質製剤の一つとして、複合型エピトープ移植抗体を捉えることができる。

5) Tat によるクラス II MHC 遺伝子発現抑制作用と免疫不全の形成

HIV-1 感染に伴って class II MHC (MHC II)の発現が減少することは、すでに Polyak ら(J. Immunol. 159: 2177-2188, 1997)により報告されている。他方、BLS は MHC II 遺伝子の発現が先天的に減少している重傷免疫不全症候群であり、その原因遺伝子検索の結果、MHC II 遺伝子発現に関わる転写因子(RFX)および CIITA に遺伝子変異が検出された。CIITA は MHC II のプロモーター領域には結合しないが、DNA 結合蛋白である RFX と結合し、また基本転写因子や CBP などのコアクチベーターに結合し、MHC II 遺伝子転写の活性化に必要不可欠な転写活性化因子である。さらに、 γ インターフェロンによる MHC II の発現誘導には CIITA によることが示されている。このような事実から、CIITA は MHC II の関わる免疫応答とりわけ抗原提示のマスタースイッチと考えられる。

他方、HIV のトランス活性化因子である Tat は、ウイルス mRNA の 5'リーダ配列に存在する TAR RNA 構造に結合し、その作用を発揮する。Tat がウイルス mRNA 転写伸長反応を促進する際に必要な因子として cyclin T1 と CDK9 が必要であり、両者は P-TEFb(positive transcription elongation factor b)を構成する事、などが明らかになっている。すなわち、Tat が TAR と結合する際に、cyclin T1 が加わる事によってその結合が安定化し、さらに RNA polymerase II の CTD 領域のリン酸化が CDK9(P=TEFb)によって引き起こされ、転写の伸長が促進されると考えられる。興味深いことに、cyclin T1 は CIITA の作用に必須の因子としても知られている。このことから、cyclin T1 を巡り Tat と CIITA との間に機能的な競合が起こることが予測される。そこで、本研究では、Tat が MHC II 遺伝子群の転写抑制を実際に引き起こすか、またその際に Tat がいかなるメカニズムで関わっているかを明らかにする事を目的とし実験を行った。その結果、HIV のトランス活性化因子である Tat が MHC II 遺伝子の発現を抑制することを見出し、BLS と同様の病態を引き起こすことを明らかにした。Tat は cyclin T1 の CIITA 結合部位に結合することによって CIITA の作用を抑えることを見いだした。これらの事実は、マクロファージなどの APC への HIV 感染に伴い、Tat は CIITA の作用抑制を通して免疫不全の病態形成に積極的に関与する可能性が示唆する。逆に、CIITA を高発現することにより Tat の機能が抑制され、HIV 複製が抑制されることを見いだした。従って、Tat 作用の抑制および CIITA の活性化は、ウイルス増殖の抑制のみならず免疫不全状態の改善にもつながり、ワクチン候補として有望であると考えられた。

6) HIV-1 clade E CTL エピトープの同定とその解析

アジア人に共通に見られる HLA クラス I 抗原が提示する HIV-1 clade B に対する細胞障害性 T 細胞(CTL)エピトープを、リバーシ・イムノジェネティクス法にて同定してきたが、さらにこれを用いて、アジアで流行している clade E に対する CTL エピトープを同定することを試みた。これによりアジアでの CTL 誘導ワクチンの開発に利用できる clade E CTL エピトープを明らかにする。本年度は、タイ人に多い HLA-A 11 に拘束性の HIV-1 clade E CTL エピトープの同定を行った。その結果、既に報告されている 8 つの HLA-A 11 拘束性 HIV-1 clade B CTL エピトープのシークエンスを、報告されている HIV-1 clade B および clade E で調べると、このうち 3 つのエピトープは clade B と clade E

間で保存されていた。一方、他の 5 つのエピトープは 2 つの clade 間で異なっていた。保存されていた 3 つのエピトープペプチドで、clade E に感染したタイ人および clade B に感染した日本人の末梢血単核球(PBMC)を刺激したところ、特異的な細胞障害性 T 細胞(CTL)を誘導できた。一方、clade B および clade E 間でシークエンスが異なっていた 5 つのエピトープのうち、3 つのエピトープは、それぞれ clade B および clade E 感染者で特異的に認識された。残りの 2 つのエピトープは clade B 特異的であり、clade E 感染者には認識されなかった。6 種類の clade E エピトープを認識する CTL は、HIV-1 clade E ウイルスを感染させた細胞を効果的に傷害し、これらのエピトープは HIV-1 感染に提示されていることが明らかになった。今後、これらのエピトープを用いたテトラマーを作製し、多数の HIV-1 clade E 感染者の末梢血中の CTL をテトラマーを用いた ex vivo の解析を行い、免疫原性を明らかにしていく予定である。

(2) 候補ワクチンの開発と改良

1) 非感染性粒子を産生するウイルス全ゲノムプラスミドを用いた DNA ワクチン

ゲノム RNA を持たないために非感染性のウイルス粒子を産生するフルゲノムの HIV-1 遺伝子改変プラスミドを DNA ワクチンとして利用することを報告してきた。DNA ワクチンはエイズのワクチンとして有力な候補と考えられている。現在の DNA ワクチン研究は、env を始めとして 1 つ、もしくは数種類の遺伝子を CMV など強力なプロモーター下に置いて抗原として発現させる方法が主流であるが、本研究は、従来法とは異なり、各蛋白質を個別に発現させるだけではなく、より実際のウイルスのライフサイクルに近い形で各ウイルス構成蛋白の集合から粒子の形成・発芽までの過程を経ることでワクチンとしてより高い効果的になることをねらいとしている。前年度は DNA ワクチンとして HIV-1 遺伝子改変プラスミドを用い、アカゲザル 4 頭に、それぞれ 1 回当たり 500 μ g のプラスミドを計 14 回筋肉内接種を行った。いずれのサルにおいても抗体または CTL 活性の誘導が見られ、また、攻撃接種により攻撃ウイルスの感染は見られたものの全てのサルに置いて部分的な防御効果を示した。これらの結果から、非感染性ウイルス粒子を産生するフルゲノムプラスミド DNA ワクチンが免疫誘導能と感染防御効果を示すことが明らかになった。しかし、接種回数が多いことから 1 回あたりのワクチン効果の効率を高めることが次の課題と考えられた。そのため本年度は HIV-1 の LTR を用いてウイルス粒子を産生するプラスミドに代えて、SIV の LTR を用いて非感染性キメラウイルス(SHIV)粒子を産生するプラスミドを DNA ワクチンとして使用した。SHIV プラスミドが有望ではないかと考えた第一の理由は、HIV-1 が元来サルでは増殖できないことから LTR に種特異的機能があり SIV の LTR の方がよく働くのではないかと考えられたからである。もう一つの重要な理由は、安全性の確保にある。すなわち、HIV-1 のプラスミドを将来的にヒトに使用した場合に、幾ら変異を複数巧妙に施しても復帰変異の確率を減少させても、野生株にさらされた際にリコンビネーションを起こして強毒株が生ずる可能性を否定できないからである。この点、SHIV を使用した場合にはその可能性は一段と少ないものと考えられ、しかも抗原性としては gag や pol など十分交叉する免疫が誘導されることが期待される。これらの考えをもとにゲノム RNA を持たないために非感染性のウイルス粒子を産生するフルゲノムの SHIV-1 遺伝子改変プラスミドを DNA ワクチンとして利用し、そのサルにおける免疫誘導能及び感染防御試験を行った。ワクチンを投与したいずれのサルにおいても、CTL 活性の誘導又は T 細胞特異的反応が見られ特異的免疫が得られた。また、攻撃接種により攻撃ウイルスの感染は見られたものの全てのサルにおいて部分的な防御

効果を示した。今後さらに効率を高めるために、DNA をリポソームに封入するなど接種方法を改良することや nef 欠損 SHIV フルゲノムプラスミドを使用することでより安全性を確保したワクチンの開発を行いたいと考えている。

2) ワクシニアベクターを用いた HIV 候補ワクチンの開発

リコンビナント BCG(rBCG)を用いた HIV 候補ワクチンの開発を行っているが、一回の投与では有効な免疫能を賦与することは困難であり、また rBCG を 2 回接種することは、BCG に対する重篤な局所反応が予想される。そこで、副反応の少ない、効果的な booster の開発が必要である。我々は、MVA(modified vaccinia virus Ankara)を用いたこれまでの成績に注目し、リコンビナントワクシニアを用いることを検討したが、現在 MVA を用いることは供与されないため困難である。そこで、MVA と同等あるいはそれ以上副反応の少ない、国立感染症研究所で開発された DIs 株をベクターとして使用することの検討を行った。DIs 株は、MVA 株とほぼ同じ領域に 15.4kbp の欠損領域を持ちほとんどのほ乳類由来培養細胞では増殖、CPE を形成することはない。また、1971 年に行われた臨床試験では、局所反応およびワクシニアに対する免疫原性が極めて弱く、このことは繰り返し接種が可能であることを意味し、DIs 株が booster としての利点を有すると考えられたので、リコンビナント BCG(rBCG)を用いた HIV 候補ワクチンの副反応の少ない、効果的な booster の開発を目的とし、ワクシニアウイルス DIs 株をベクターとして用いることの検討を行った。Dis 株に HIV あるいは SIV gag 遺伝子を挿入した、rVV-HIV gag あるいは-SIV gag は、in vitro で遺伝子産物である Gag 蛋白を発現し、カニクイザルを用いた in vivo でそれに対し、免疫を誘導することが可能であった。これらの結果は、ワクシニアウイルス DIs 株をベクターとして用いたワクチンが、単独あるいは booster として有用であることを意味すると考えられた。

3) インフルエンザウイルスを用いた HIV 生ワクチンの開発

本研究ではインフルエンザウイルスをウイルスベクターとして用いた、AIDS 生ワクチンの作製を試みた。インフルエンザウイルスをベクターとした生ワクチンの利点としては、

- ①すでに世界的にその安全性が確認されている。
- ②その接種法の簡便さ（経鼻接種が可能である）。
- ③発育鶏卵を用いて大量に高力価のウイルスが安価にできる。
- ④ウイルス株を変えることにより再接種が可能である（今日エイズワクチンとしてワクシニアウイルスをベクターとして使用することが多くの研究施設で考慮されているが、この場合一度免疫後に追加免疫はできないという制約が問題とされている）などを挙げるができる。またその免疫性に関しては

- ⑤IgG 抗体の誘導のほか、分泌型抗体である IgA の産生を誘導できる。

この事は、IgA による粘膜上での感染防御が期待される。HIV 感染症においてその主要感染経路が粘膜であることを考えると、この点は極めて大きな利点と考えられる。

さらに、

- ⑥CTL 誘導活性を持っている。

この事から AIDS ウイルス初期感染において感染細胞の排除や、感染者におけるウイルス感染細胞の排除に効果が期待できる。

また、

⑦他の多くのウイルスベクターとことなりインフルエンザウイルスベクターは遺伝子の挿入をともなわないためより安全性が高いと考えられる。

これらの点を考慮してまず HIV の感染防御を目的とした AIDS 遺伝子断片を持った組み換え型インフルエンザウイルスを作成することを目的として本研究を行った。

その結果、rENV がマウスに組み込み部位特異的な活性の誘導と特異的 IgG および IgA を誘導することが明らかとなった。通常 CTL エピトープは 9 アミノ酸程度で構成されているため、今回我々が成功した 51 アミノ酸領域を含んだ組み換え型インフルエンザウイルスは、十分に複数の CTL エピトープを組み込んだ形で組み換え型インフルエンザウイルスが作成可能である事を示唆している。また組み込んだ抗原特異的な IgG のみならず IgA の誘導がされるという点からも、本組み換え型ウイルスが HIV 感染経路の一つである粘膜感染をも十分に阻止しうる可能性が示された。しかしながらマウスをモデル動物として用いる場合、人におけるエピトープの評価はできないため、今後サル等を用いたモデルでより人の系を反映する実験系に移行する必要がある。またマウスのモデル系では組み換えインフルエンザウイルス接種後 HIV 感染阻止を評価する事はできないため、この意味でもサルを用いた実験系へ移行を考えている。

4) 病原性サル動物モデルを評価系とする新規 HIV ワクチン開発計画

HIV 野生ウイルス株の特性はなかでも感染を司るウイルスの特性はモノサイトマクロファージに感染できるウイルスであり、一部は静止期のリンパ球への感染可能な病原性を示すウイルスであることが明らかになっている。従って、そのような HIV 感染を模倣できるウイルス感染動物モデルを作製することが重要な問題の一つになっており、更にはそのような病原性動物モデルによって評価された候補ワクチンは HIV 感染を制御できるワクチンとして期待できると予想されている。このような病原性ウイルスの感染防御を行うことができるワクチンとしては非病原性のキメラウイルスを使った生ワクチンが代表的なものであり、さらには Tat 抗原、Tat,Rev 抗原を標的としたワクチン開発や、DNA をコンビネーションしたワクチン開発が報告されている。本研究では HIV ワクチン開発の防御免疫における免疫機構を構造蛋白の一つである Gag 蛋白遺伝子を標的として解析し、BCG をベースにしたワクチンレジメンの中でサル動物モデルにおいて病原性のウイルス感染を防御できる能力を付与可能なワクチンレジメンを検討し、その特性を明らかにすることをスタートさせた。現在までの結果及び考え方を列挙すると以下のごとくである。

①. 我々のワクチン開発の目的は、V3, Gag, Tat を標的としたワクチンをプロトタイプワクチンとして作製することである。しかし動物モデルによる評価はキメラウイルスを用いるので限界がある。したがって HIV 部分の標的蛋白をそのまま使用できない部分は SIV のキメラウイルスのものに変える必要があり、HIV と SIV のキメラウイルス蛋白による免疫誘導能を評価する必要がある。さらに HIV のエピトープをキメラウイルスに組み込むことが不可能な標的蛋白については HIV 自体のワクチンをサルに接種して免疫誘導を確認することになる。本研究ではまず、構造蛋白遺伝子の一つである Gag 蛋白の免疫誘導能に着目しその遺伝子を標的にした rBCG-SIV Gag, rVac-SIV Gag を作製した。これらの候補ワクチン接種動物の免疫誘導能については細胞性免疫及び液性免疫が確認された。ワクシニアをベクターに用いた HIV 候補ワクチンの防御免疫誘導能については (2)、2) の報告をご参照下さい。

②. HIV の制御遺伝子の一つである Tat の防御免疫誘導能に着目し、Tat 遺伝子を発現することができる rBCG-Tat 及び rVac DIs-Tat を作製した。しかし、Tat 蛋白の生体内における非特異的な活性化作用や、アポトーシスの誘導能などを Tat の副作用を除外あるいは軽減するために Tat の活性部位二カ所に back mutation が起きにくい蛋白レベルの変異がおこるように工夫して mutant Tat を作製した。BCG を使って Tat 蛋白の機能を解析させると発現した Tat 遺伝子は in vitro のレベルで天然型の Tat に比べて平易型 Tat では Tat 機能が検出限界以下か、検出限界に近いことがわかった。したがって、mutant Tat を標的とした候補ワクチンの作製が明らかになった。

③. ①、②で得られた成果をもとにして、コンビネーションワクチン療法により Tat 遺伝子を組み込んだ候補ワクチンの免疫誘導実験を行い、免疫誘導能が確認された時点で、高い病原性を示すキメラウイルスの感染防御についての研究を計画中である。

(3) 抗原性増強法及び有効性、安全性評価法に関する研究

1) 単球細胞による標的細胞破壊機構

HIV 感染細胞の破壊機構には多種多様な機構が存在する。それらの一つとして、アポトーシス誘導分子である TWEAK がある。本研究では、腫瘍および病原体に対する免疫遺伝子療法におけるより詳細なエフェクター分子の探索を目的に、tumor necrosis factor (TNF)ファミリーに属する新たに見出された分子、TWEAK の免疫担当細胞での発現誘導のメカニズム、およびその生理的意義を明らかにすることを試みた。TWEAK 分子に関しては、in vitro でリコンビナント体に腫瘍細胞傷害活性があることなどが報告されているものの、その生理学的な意義などは殆ど明らかにされていない。そこで、本研究においては、ヒト TWEAK に対する中和抗体を用い、TWEAK を発現している細胞の解析およびその生理意義について検討した。

その結果、TWEAK が IFN- γ で発現誘導されること、および IFN- γ 活性化単球細胞の標的細胞障害機構には TRAIL や TNF- α に加え、TWEAK を介した経路も存在することが示唆された。単球細胞によるエフェクター機構の詳細について明らかとなれば、各種病原体に対するワクチン開発の一助となることが期待される。

2) ペプチドワクチンによる感染抑制機序の解析

粘膜での感染予防の宿主側のメカニズムは、HIV に対しても、インフルエンザウイルスに対しても類似していると考えられる。

HIV 感染の予防には、中和抗体だけでなく CTL の活性化が極めて重要と考えられている。従来より我々は、インフルエンザウイルスをモデルとしてインフルエンザウイルスに対するペプチドを使用して CTL の活性化を行ってきた。この CTL の活性化機序を詳細に検討すれば、HIV 感染抑制に応用できると考えている。マウス MHC クラス I 分子(D^b)と結合することが判明しているインフルエンザウイルスの NP 由来ペプチド NP366-374(ASNNMETM)を multi-lamellar liposome に封入した。このリポソーム封入ペプチドと一緒に抗 CD40 抗体を混合し、B6 マウスの鼻腔内に投与した。抗 CD40 抗体は DC を活性化して、MHC 分子や CD80,CD86 分子などの発現を増強する。その結果、活性化 DC は効率良く CTL に抗原ペプチドを提示し、CTL を活性化できる。実際、リ

ポソーム封入 NP366-374 と抗 CD40 抗体の両方を投与した場合にのみ、肺内のインフルエンザウイルス感染を抑制することができた。

今回は、MHC class I ノックアウトマウスと MHC class II ノックアウトマウスの鼻腔内にリポソーム封入 NP366-374 と抗 CD40 抗体の両方を投与し、感染抑制に関与する免疫担当細胞について解析した。その結果、肺内での CTL の活性化には、活性 DC からの抗原提示以外にも、ヘルパー T 細胞からの液性因子等の補助が必要である可能性が示唆された。その結果、通常のリンパ節でおこる CTL の活性化と、肺内での CTL の活性化には多少の差異があり、粘膜での免疫反応は特殊であると考えられた。従って、粘膜免疫を活性化するには、粘膜での免疫反応のさらなる解析とそれに伴った工夫が必要になると考えられる。

3) レトロウイルス抗原に対する T 細胞反応増強法に関する研究

MAIDS (マウスエイズ) の実験系を用いて、レトロウイルス感染による免疫異常の発症機序の解析、およびその発症抑制の方法を探る試み、特にレトロウイルス抗原に特異的な T 細胞性免疫応答を惹起する方法の確率を目的とした検討を行った。

MAIDS (マウスエイズ) ウイルス遺伝子(gag p12)由来の 10-mer ペプチドが、CD8 陽性 T 細胞に対して強い抗原性を持つことから、ワクチンとしてマウスに投与し、その後のウイルス接種により誘導されるマウスエイズの発症を抑制できるかについて検討した。マウスにあらかじめ抗 CD40 抗体を投与して、生体内の抗原提示細胞を活性化することにより、引き続いて投与されたペプチド(gag p12 由来 10-mer)をリポソーム表面に結合させたもの、およびリポソーム内にペプチドを封入したものをワクチンとして用いた際に、より強力な免疫応答が得られることを期待した。

ところが、両者とも抗原特異的 CTL を誘導できず、またマウスエイズの発症抑制は、一部の実験群のみでしか誘導することができなかった。そこで、より効率的に T 細胞を活性化できると考えられる骨髄由来の樹状細胞の亜群(BMDC1)を用いる試みをした。この細胞群は確かに強力な抗原提示能を有していることが *in vitro* での実験系で確かめられた。今後は、この細胞群にペプチドを結合させて、あらかじめ抗 CD40 および抗 CD40L 抗体で処理したマウスに免疫し、マウスエイズの発症抑制が誘導されるかについて検討を進めたい。

4) HIV 感染症における高 IgG 血症と自己抗体産生 : IgG Fc 受容体の関与についての基礎的研究

HIV 感染症では T 細胞系特に補助 T 細胞の機能低下が注目されているが、不思議なことに、B 細胞系の機能はむしろ亢進しており、著しい多クローン性 B 細胞活性化により、高 IgG 血症や種々の自己抗体が出現する。HIV 感染症患者のリンパ組織には高度に発達した胚中心を伴うリンパ濾胞の過形成が起こる。リンパ濾胞の胚中心は抗体の親和性成熟やクラス転換の場であるので、ここに高 IgG 血症や高親和性 IgG 自己抗体産生に関わる異常が存在していると考えられる。胚中心を場とするこのような B 細胞の異常な多クローン性活性化は、新しい抗原刺激に対する生体の免疫応答を低下させるので、HIV ワクチン療法にとっては不都合な免疫異常と考えられる。これらを考慮し、ワクチン開発上の注意すべき点とする目的でその機序の検討を行った。

HIV 感染症と酷似する B 細胞異常を自然発症するモデルマウス系で、高 IgG 血症や自己抗体産生亢進は、B 細胞活性化に際して negative feedback regulator として働く IgG Fc レセプター-IIbI(Fc γ

RIIB1)分子のリンパ濾胞胚中心における異常な down-regulation の結果起こる事が明らかとなった。遺伝学的解析から、この Fc γ RIIB1 の down-regulation は Fc γ RIIB 遺伝子の表現の程度と逆相関した現象であり、また、その遺伝子制御領域多型と関連している事が明らかとなった。この事を検証すべく、ルシフェラーゼレポーター法で解析したところ、Fc γ RIIB 遺伝子の表現の程度は遺伝子欠損を伴うプロモーター領域多型によることが証明された。

今回の研究から、HIV 感染に伴う高 IgG 血症や自己抗体産生は、このような遺伝子多型を持つ個体に現れやすいのか、あるいは、HIV 感染が何らかの pathway を介して B 細胞における Fc γ RIIB1 発現を down-regulate する生物活性を持っている可能性が考えられた。B 細胞異常を伴うこれらのマウス系では、加齢とともに外来性抗原に対する IgG 応答が著しく低下するので、B 細胞の多クローン性異常活性化はワクチン療法にとっては不都合な免疫異常と考えられた。

5. 考察

病原性のある HIV を対象とする防御ワクチンの開発には、臨床ウイルス株の感染を正確に模倣出来る動物モデル評価系の開発、正確な有効性を客観的に評価できる評価系、方法の開発、HIV 感染ルートを考慮した感作法の開発、必要に応じた多種ワクチンの併用が求められる。本研究班では、これらの点を意識しつつ、HIV ワクチン開発に必要な疫学的検討、標的抗原の分析と免疫原性の強化、免疫学的増強法を主とする免疫学的背景、評価動物モデル系の開発、改良について研究を進めてきた。

BCG、ワクシニアウイルス、インフルエンザウイルスをベクターとして使用するワクチンも env を標的抗原とする方向から、gag 又は tat, nef を標的抗原とする方向に向かい、HIV 全ゲノムプラスミドを用いた DNA ワクチンにも、安全性と有効性増強に配慮したワクチンの改良が行われ、多くの進歩がみられた。しかしながら、疫学的検討、HIV 感染者での免疫異常状態にみられるごとく、完成は容易ではない。

世界的な HIV ワクチン開発の傾向は、日本の状況と同じ歴史をたどり、現在では、gag を主とする CTL 誘導能のあるワクチン、tat を主とする HIV 増殖に関連する蛋白を標的としたワクチン開発へと進んでいる。本研究班の方向も、同様の方向に進んでおり、今まで経験した多くの知識がいかされようとしている。これら研究方向に、多種ワクチン併用、免疫ルートの改良、有効なアジュバントの使用を加え、臨床試行型の HIV ワクチンを開発していきたい。方向性はかなり固まってきたと考えられるので、ウイルス学、免疫学の専門家等、多くの御協力をいただき、継続させていただける様、お願いしたい。

6. 研究発表

- 1) Shiino, T, Kato, K., Kodaka Miyakuni, T., Takebe Y., and Sato, H. (2000). A group of V3 sequences of human immunodeficiency virus type I subtype E nonsyncytium-inducing, CCR-using variants are resistant to positive selection pressure. *J. Virol.* 74 : 1069-1078.
- 2) Sato, H., T, Tomita, Y., Shibamura, K., Shiino, T. Miyakuni, T., and Takebe Y. (2000). Convergent evolution of reverse transcriptase (RT) genes between human immunodeficiency virus type I subtypes E and B following nucleoside analogue RT inhibitor therapies. *J. Virol.* 74 : 5357-5362.
- 3) Motomura, K., Kusagawa, S., Kato, K., Lwin, H. H., Tun, K. M., Thwe, M., Oo, K. Y., Kyaw, O., Zaw, M., Nagai, Y., and Takebe Y. (2000). Emergence of new forms of human immunodeficiency virus type I intersubtype recombinants in Central Myanmar. *AIDS Research and Human Retroviruses* 16 : 1831 - 1843.
- 4) Kato, K., Kusagawa, S., Motomura, K., Yang, R., Shiino, T., Nohtomi, K., Sato, H., Shibamura, K., Hien, N. T., Chi, P. K., Thang, P. H., Thang, D. C., Quoc, N. C., Thang, B. D., Long, H. T., Yamazaki, S., Nagai, Y., and Takebe Y. (2001). Closely related HIV-1 CRF01_AE variants among injecting drug users in northern Vietnam: Evidence of HIV spread across the Vietnam-China border. *AIDS Research and Human Retroviruses* 17 : 113- 123.
- 5) Hachiya, A., Aizawa-matsuoka, S., Tanaka, M., Takahashi, Y., Ida, S., Gatanaga, H., Hirabayashi, Y., Kojima, A., Tatsumi, M., and Oka, S. : Rapid and simple phenotypic assay for drug susceptibility of human immunodeficiency virus type I by using CCR5-expressing HeLa/CD4 cell clone 1-10 (MAGIC-5). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (in press).
- 6) Ohba, H., Soga, T., Tomozawa, T., Nishikawa, Y., Yasuda, A., Kojima, A., Kurata, T. and Chiba, J. : An immunodominant neutralization epitope on the thumb subdomain of HIV-1 reverse transcriptase revealed by phage display antibodies. *J. Gen. Virol.* (in press).
- 7) Xiao, Y., Kuwata, T., Miura, T., Hayami, M., Shida, H. (2000): Dox-dependent SIVmac with tetracycline inducible promoter in the U3 promoter region. *Virology* 269: 268-275.
- 8) Okamoto, H., Asamitsu, I., Nishimura, H., Kamatani, N., Okamoto, T. : Reciprocal modulation of transcriptional activities between HIV-1 Tat and MHC class II transactivator CII TA. *B. B. R. C.* 279:494-499, 2000.
- 9) Kameoka, R. L., Ota, K., Tetsuka, T., Tanaka, Y., Itaya, A., Okamoto, T., and Yoshihara, K. : Evidence for Regulation of NF- κ B by Poly (ADP-ribose) Polymerase. *Biochem. J.* 346:641- 649 2000.
- 10) Kajino, S., Suganuma, M., Teranishi, E., Takahashi, N., Tetsuka, T., Ohara, H., Ito, M. and Okamoto, T. : Evidence that de novo protein synthesis is dispensable for anti-apoptotic effects of NF- κ B. *Oncogene* 19:2233-2239, 2000.

- 11) Nagaya, T., Fujieda, M., Otsuka, G., Yang, J-P., Okamoto, T., and Seo, H. : A potential role of activated NF- κ B in the pathogenesis of euthyroid sick syndrome. *J. Clin Invest.* 391-402, 2000.
- 12) Kanazawa, S., Okamoto T., Matija Peterlin. B. : Tat competes with CII TA for the binding to P-TEFb and blocks the expression of MHC class II genes in HIV infection. *Immunity* :61-70, 2000.
- 13) Okamoto, H., Cujec, T.P., Matija Peterlin, B. and Okamoto T. : HIV-1 replication is inhibited by a pseudo-substrate peptide that blocks Tat transactivation. *Virology* 270:337-344, 2000.
- 14) Takiguchi, M. T. Matsuda, H. Tomiyama, and K. Miwa : Analysis of three HIA-A*3303 binding peptide anchors using an HIA-A*3303 stabilization assay. *Tissue Antigens.* 55: 296-302, 2000 .
- 15) Tomiyama, H., S. Oka, G. S. Ogg, S. Ida, A. J. McMichael and M. Takiguchi : Expansion of HIV-1-specific CD28-CD45RA-CD8⁺ T cells in chronically HIV-1 infected individuals. *AIDS.* 14: 2049-2051, 2000.
- 16) Maenaka, K., T. Maenaka, H. Tomiyama, M. Takiguchi, D. I. Stuart and E. Y. Jones: Nonstandard peptide binding revealed by crystal structures of HIA-B:5101 complexed with HIV immunodominant epitopes. *J. Immunol.* 165:3268-3274, 2000.
- 17) Takiguchi, M., T. Matsuda and H. Tomiyama: Polarity of the P1 anchor residue determines peptide binding specificity between HIA-A*3101 and HIA-A*3303. *Tissue Antigens.* 56: 501-506, 2000.
- 18) Akahata, W., Ido, E., Shimada, T., Katsuyama, K., Yamamoto, H., Uesaka, .H., Ui, M., Kuwata, T., Takahashi, H., Hayami, M. : DNA vaccination of macaques by a full genome HIV-1 plasmid which produces non-infectious virus particles. *Virology*, 275:116-124, 2000.
- 19) Ibuki, K., Ido, E., Funahashi, S., Miura, T., Hayami, M., Shida, H. : Protective effects to simian immunodeficiency virus agm (SIVagm) infection in cynomolgus monkeys immunized with a recombinant vaccinia virus expressing the SIV agm envelope gene. *Vaccine*, 18:511-516, 2000.
- 20) Haga, T., Kuwata, T., Kozyrev, I., Kwofie, T.B., Hayami, M., Miura, T. : Construction of an
- 21) Kwofie, T., Haga, T., Iida, T., Hayami, M., Miura, T. : Plasma levels of the chemokine RANTES in macaque monkeys infected with pathogenic and non-pathogenic SIV/HIV-1 chimeric viruses at an early stage of infection. *J. Vet. Med. Sci.*, 62(12):1311-1312, 2000.
- 22) Falk, L.A., K. L Goldenthal, J. Esparza, M. T. Aguado, S. Osmanov, W.R. Ballou, S. Beddows, N. Bharnarapravati, G. Biberfeld, G. Ferrari, D. Hoft, M. Honda, A Jackson. Y. Lu, G. Marchal, J. McKinney and S. Yamazaki. (2000). Recombinant bacillus Calmett-Guerin as a potential vector for preventive HIV type 1 vaccines. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16: 91-8.
- 23) Yoshino, N., Y. Ami, K. Someya, S. Ando, K. Shinohara, F. Tashiro, Y. Lu and M. Honda. (2000). Protective immune responses induced by a non-pathogenic simian/human immunodeficiency virus

- (SHIV) against a challenge of a pathogenic SHIV in monkey. *Microbiol. Immunol.* 44: 363-372.
- 24) Sasaki, Y., Y. Ami, K. Shinohara, E. Takahashi, S. Ando, K. Someya, Y. Suzaki, T. Nakasone and M. Honda. Induction of CD95 ligand expression on CD8+T-lymphocyte correlates with HIA-DR expression and contributes to apoptosis of CD95-upregulated CD4+ T-cells in macaques by infection with a pathogenic simian/human immunodeficiency virus. (2000), *Clin. Exper. Immunol.* 121:1-10.
- 25) Nakasone, T., Takamatsu, J., Watanabe, K., Naganawa, S., Someya, K., Yoshino, N., Kaizu, M., Ohsu, T., Takizawa, M., Izumi, Y., Kawahara, M., Hara, T., Fujimura, Y., Yamada, K., Nagai, Y., Yamazaki, S., and Honda M. Decline in the HIV-1 isolation rate in Japan: A 12 year observation. *Microbiol Immunol* (2000):44(11): 949-952.
- 26) Hara, T., Yoshino, N., Takayama, N., Minamidani, M., Naganawa, S., Onkubo, H., Takizawa, M., Izumi, Y., Kantake, M., Suzuki, S., Takano, M., Kita, T., Totani, R., Nagai Y., Honda M. and Nakasone T. Presence of multiple HIV-1 subtypes among mothers and children in Japan. *AIDS Res. & Human Retroviruses* (2001) (in press).
- 27) Morimoto, S., Y. Kanno, Y., Tanaka, Y., Tokano, H., Hashimoto, S., Jacquot, C., Morimoto, S. F. Schlossman, H. Yagita, K. Okumura, and T. Kobata. (2000). CD134L engagement enhances human B cell Ig production: CD154/CD40, CD70/CD27, and CD134/CD134L interactions coordinately regulate T cell-dependent B cell responses. *J Immunol* 164:4097.
- 28) Nakayama, M., N. Kayagaki, N. Yamaguchi, K. Okumura, and H. Yagita. (2000). Involvement of TWEAK in interferon gamma-stimulated monocyte cytotoxicity. *J Exp. Med.* 192:1373.
- 29) Takeda, K, Y. Hayakawa, M. Atsuta, S. Hong, L Van Kaer, K. Kobayashi, M. Ito, H. Yagita, and K. Okumura. 2000. Relative contribution of NK and NKT cells to the anti-metastatic activities of IL-12. *Int. Immunol.* 12:909.
- 30) Takeda, K, Y. Hayakawa, L Van Kaer, H. Matsuda, H. Yagita, and K. Okumura. (2000). Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:5498.
- 31) Tsukada, N., H. Akiba, T. Kobata, Y. Aizawa, H. Yagita, and K. Okumura. (2000). Blockade of CD134 (OX40)-CD134L interaction ameliorates lethal acute graft-versus-host disease in a murine model of allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 95:2434.
- 32) Takeda, K, H. Oshima, Y. Hayakawa, H. Akiba, M. Atsuta, T. Kobata, K. Kobayashi, M. Ito, H. Yagita, and K. Okumura. (2000). CD27-mediated activation of murine NK cells. *J Immunol.* 164:1741.
- 33) Seino K, K., K. Fukao, K. Muramoto, K. Yanagisawa, Y. Takada, S. Kakuta, Y. Iwakura, L Van Kaer, K. Takeda, T. Nakayama, M. Taniguchi, H. Bashuda, H. Yagita, and K. Okumura. (2001). Requirement

for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance. Proc Natl Acad Sci U S A 98:2577.

- 34) Muno, D., E. Kominami, and T. Mizuochi: Generation of both MHC class I- and class II-restricted antigenic peptides from exogenously added ovalbumin in murine phagosomes. FEBS Lett. 478:178-182 (2000).
- 35) Odaka, C. and T. Mizuochi: Angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril prevents activation-induced apoptosis by interfering with T cell activation signals. Clin. Exp. Immunol. 121:515-522 (2000).
- 36) Suriki, H., K. Suzuki, Y. Baba, K. Hasegawa, R. Narusawa, Y. Okada, T. Mizuochi, .Kawachi, F. Shimizu, and H. Asakura: Analysis of cytokine production in the colon of nude mice with experimental colitis induced by transfer of immunocompetent cells from mice infected with a murine retrovirus. Clin. Immunol. 97:33-42 (2000).
- 37) Yoshizawa, I., Y. Soda, T. Mizuochi, S. Yasuda, T. A. Rizvi, T. Mizuochi, T. Takemori, and Y. Tsunetsugu-Yokota: Enhancement of mucosal immune response against HIV-1 Gag by DNA immunization. Vaccine (in press).
- 38) Naito, S., Y. Okada, H. Kato, M. Taneichi, M. Takahashi, Y. Ami, Y. Suzaki, T. Oka, . Okuma, M. Morokuma, H. Onodera, M. Inoue, Y. Takahashi, S. Yamazaki, H. Kimura, .K. Komuro, and T. Uchida: Anti-tetanus toxoid antibody production and protection against lethal doses of tetanus toxin in SCID-hu-PBL mice. Int. Arch. Allergy Immunol. 123:149-154 (2000).
- 39) Nakano, Y., M. Mori, S. Nishinohara, Y. Takita, S. Naito, H. Kato, M. Taneichi, K. Komuro, and T. Uchida: Differential adjuvant effects of liposomes made using different lipid components in the immunization with a surface-linked liposomal antigen. Bioconjugate Chemistry (in press).
- 40) Ito, D., Ogasawara, K., Iwabuchi, K., Inuyama, Y., and Onoe, K.: Induction of CTL responses by simultaneous administration of liposomal peptide vaccine with anti-CD40 and anti-CTLA-4 mAb. J. Immunol. 164, 1230-1235, 2000.
- 41) Ito, D., Ogasawara, K., Matsushima, K., Morohashi, T., Namba, K., Matsuki, N., Kitaichi, N., Inuyama, Y., Hosokawa M., Nakayama E., Iwabuchi, K., and Onoe, K.: Effective priming of cytotoxic T lymphocyte precursors by subcutaneous administration of peptide antigens in liposomes accompanied with anti-CD40 and anti-CTLA-4 antibodies. Immunobiol. 201, 527-540, 2000.
- 42) Iwabuchi, K., Iwabuchi, C., Tone, S., Itoh, D., Tosa, N., Negishi, I., Ogasawara, K., Uede, T., and Onoe, K.: Defective development of NK1.1⁺ T cell antigen receptor (TCR) $\alpha\beta$ ⁺ cells in zeta-associated protein (ZAP) null mice with an accumulation of NK1.1⁺CD3-NK-like cells in the thymus. Blood (in press).

- 43) Nishimoto, N., Sasai, M., Shima, Y., Nakagawa M., Matsumoto, T., Shirai, T., Kishimoto, T. & Yoshizaki K.: Improvement in Castleman's disease by humanized anti-interleukin-6 receptor antibody therapy. *Blood*, 95: 56-61, 2000.
- 44) Tsurui, H., Nishimura H., Hattori, S., Hirose, S., Okumura K. & Shirai, T.: Seven-color fluorescence imaging of tissue samples based on Fourier spectroscopy and singular value decomposition. *J. Histochem. Cytochem.*, 8:653-662, 2000.
- 45) Hirose, S., Jiang, Y., Hamano, Y. & Shirai, T.: Genetic aspects of inherent B-cell abnormalities associated with SLE and B-cell malignancy; Lessons from New Zealand mouse models. *Int. Rev. Immunol.* 19:389-421, 2000.
- 46) Jiang, Y., Hirose, S., Abe, M., Sanokawa-Akakura, R, Ohtsuji, M., Mi, X., Li, N., Xiu, Y., Zhang, D., Shilai; J., Hamano, Y., Fujii, H. & Shirai, T.: Polymorphisms in IgG Fc receptor IIB regulatory regions associated with autoimmune susceptibility. *Immunogenetics*, 51: 429-635, 2000.