

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

## 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

所 属 国立感染症研究所  
代表研究者 永井 美之

### 要 旨

ワクチンを含む抗 HIV/AIDS 候補物質の開発は社会的に緊急の課題となっている。エイズ予防治療薬開発のためのスクリーニング系の開発もまた、その緊急の課題の一つになっている。本プロジェクトでは、3年目の最終年度にあたり、小動物及びサルを用いた評価系の開発と、効果的な予防治療薬開発のために適切な HIV/AIDS 動物モデルを用いて病態解析による免疫学的パラメータの解析、さらには新しいアジュバントの実用化研究を行い、以下のような成果が得られた。

- 1) Env 糖鎖を欠くウイルスのサルにおける感染性、免疫応答を検討した。5個の糖鎖の減少は初期感染期には影響を与えなかったが、慢性期の感染は抑制され、野生型ウイルスに対する防御免疫を誘導した。
- 2) SIVmac239/HIV-1 HXBc2 キメラウイルスをカニクイザルにて生体内継代することにより、強病原性のウイルスストック SHIV-C2/1 を得た。さらにその分子クローン SHIV-C2/1 KS661 を作製した。SHIV-C2/1 KS661 は、カニクイザルにおいて、静注や直腸内接種により CD4 陽性細胞の枯渇を惹起し、エイズ治療薬やワクチンの評価に最適であると思われた。
- 3) 小動物によるエイズ治療薬の評価スクリーニング系を開発するために、CyclinT および 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、HIV キャリアーモデルとして有用であることを示した。
- 4) DDS(Drug Delivery System) としての HVJ-liposome 法の安全性試験のために、合成核酸 E2F デコイ含有の HVJ-liposome をカニクイザルに静脈投与したが、被験物質投与に起因する変化を認めず、安全性が確認された。
- 5) ヒトの HIV 感染症のウイルスコピーを再現できる NOD-scid/PBL-マウス HIV 感染系を作製することができた。さらにこのマウス HIV 感染系を用いて HIV 感染における液性免疫及び細胞性免疫の意義を追究した。また、抗原特異的なプライマリー反応を効率良く誘導できるような NOD-scid-マウスモデル系を作製した。

これらの結果からマウス及びサルを用いた HIV/AIDS 動物モデル系がこのプロジェクトで確立し、種々の抗エイズ物質のスクリーニングが我が国において可能となった。

### 1. 研究組織

- |                  |            |
|------------------|------------|
| (1) 国立感染症研究所     | 永井 美之      |
| (2) 東京大学農学部      | 長谷川 篤彦     |
| (3) 国立感染症研究所     | 森 一泰       |
| (4) 東京大学医科学研究所   | 岩倉 洋一郎     |
| (5) 大阪大学細胞工学センター | 金田 安史      |
| (6) 放射線影響研究所     | 京泉 誠之      |
| (7) 東京理科大学基礎工学部  | 千葉 丈       |
| (8) 富山県衛生研究所     | 安藤 秀二      |
| (9) 国立感染症研究所     | 浅野 敏彦      |
| (10) 国立感染症研究所    | 松田 潤一郎     |
| (11) 国立感染症研究所    | 篠原 克明      |
| (12) 国立感染症研究所    | 田中 (庄司) 明子 |
| (13) 国立感染症研究所    | 本多 三男      |

### 2. 研究目的

HIV 感染者は増加し続けておりエイズ予防治療法の開発は科学のみでなく社会的にも求められている緊急課題の一つである。エイズ治療開発のためには、試験管内のテストと臨床試験の中間を繋ぐ動物モデル



を用いる試験が不可欠であるが、この部分の欠落が治療薬開発の大きなネックとなっており、特に我が国では欧米と比べその研究開発が遅れている。本研究の目的は小動物、サルを用いて、エイズ治療薬の開発の基盤となるエイズモデル動物を開発し、さらにそれらを用いた評価スクリーニング系の開発を行うことである。科学的な問題点として、適切な HIV/AIDS 動物モデルとくに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が求められており、時期を得た研究課題としてプロジェクトが進められている。本研究では、まづ国立感染症研究所のエイズ研究センター、動物管理室、獣医科学部、安全性研究部の共同研究で SCID マウスのコロニーを作製、維持する。さらに、SCID/hu マウスや SCID/PBMC マウス等のヒト組織移植免疫不全マウスを作製し、HIV 感染のモデルとしての利点と限界を明らかにする。さらにその成果をエイズ治療薬のスクリーニングやワクチンの開発に応用する。さらに、小動物モデルの改良をめざして、ウイルス感染レセプターのトランスゲニックマウスを作製し、マウス感染 HIV モデルの系を追及する。またエイズ治療薬開発のための評価スクリーニング系として応用可能なエイズサルモデルの開発が重要となってきたので、カニクイサルおよび赤毛サルへの SHIV キメラウイルスの感染モデルスクリーニング系を確立する。また、抗エイズ物質の開発には発症系サルモデルが極めて有用であり、実用化が可能と考えられるので病原性 SHIV を用いたエイズモデルを開発する。

エイズ予防治療薬のための次世代の評価スクリーニング系として期待される基礎的研究についても検討する。具体的にはサル、マウス以外モルモットやネコを用いた評価スクリーニング系の開発研究、さらに標的遺伝子のターゲティングに関する研究、標的遺伝子を効率よく細胞内に導入するためのマイクロソフェア (HVJ リポソーム) の臨床への開発応用研究、さらにはサルの遺伝子操作を目的としたサル ES 細胞確立のための研究などを含めた研究の確立を目的とする。

### 3. 研究方法

#### (1) サルを用いた HIV/AIDS 評価スクリーニング系の開発

- 1) 糖鎖変異体 (delta 5G) は SIVmac239 元の env の N-glycosylation sites 79, 146, 171, 460, 479 の Asn を Gln に置換することにより作成した。delta 5G をアカゲザルに接種し、ウイルス学、免疫学解析法を用い感染ウイルス量、中和抗体、CTL 等を解析した。
- 2) SHIV-C2/1 (カニクイザル血漿ウイルスストック) を感染させた M8166 細胞より全 DNA を分離・抽出、この DNA を鋳型とし、PCR を行った。PCR 産物は精製の後、pUC-18 を改変したプラスミドにクローニングした。各々 5 クローンをシーケンスし、血漿ウイルスストックの SHIV-C2/1 ゲノムのシーケンスと一致するものを選抜、それらを再構築してプロウイルス型のクローンを作製した。クローン DNA を COS 7 細胞にトランスフェクションし、SHIV-C2/1 の分子ウイルスクローン SHIV-C2/1 KS661 を得た。本ウイルスクローン SHIV-C2/1 KS661 をカニクイザル及びアカゲザルに静脈内 ( $12,000 \text{ TCID}_{50}$ ) 接種した。また、カニクイザルに  $1.5 \times 10^6 \text{ TCID}_{50}$  を直腸内接種した。
- 3) 病原性ウイルスの SHIV-89.6P と非病原性ウイルス SHIV-HXBc2 を  $20 \text{ TCID}_{50}$  接種したカニクイザルから採取、 $-80^\circ\text{C}$  に保存していた各種臓器について、リンパ系組織を中心に mRNA の発現を解析した。リンパ球  $1 \times 10^6$  から  $1 \times 10^7$  の細胞数に相当するリンパ組織から全 RNA を抽出、RT 反応により cDNA にした後、この cDNA を鋳型に Table.1 に示すプライマーを用いて PCR を行った。
- 4) カニクイザル胚盤胞は、山海グループより提供された。酸性タイロイド液処理により透明帯を除去したカニクイザル胚盤胞をフィーダー細胞 (あらかじめマイトマイシン C 処理によって細胞分裂を抑制した STO 細胞) 上で培養した。培養液は、LIF 等のサイトカインを豊富に産生し、マウス ES 細胞樹立に有効とされている 5637 細胞株 (ヒト膀胱癌由来細胞株) の培養上清 (DME+5 FBS+抗生物質) と、DME に 20 FBS、MEM 非必須アミノ酸、2-メルカプトエタノールおよび抗生物質を加えたものを 1 : 1 の割合で混合したものを用いた。増殖した内部細胞塊由来細胞をトリプシン・EDTA 処理により解離し、新たなフィーダー細胞に載せることにより継代を行なった。3 回継代の後、活性染色によりアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の存在を示唆した。

#### (2) 抗 HIV 候補物質のスクリーニングとしての小動物モデル (マウス、モルモット、ネコ) の作出と応用

- 1) 国立感染症研究所で継代維持している NODscid マウスを用いた。6 週齢～10 週齢のマウスに hu-PBMC を腹腔内に投与した。投与翌日、投与一週後および投与二週後と 3 回にわたり IL-12, IL-18, IFN  $\gamma$ , anti-IFN  $\gamma$ , TGF $\beta$  を単独あるいはコンビネーションで腹腔内に投与した。
  - 2) HIV 野生株のプライマリーウイルス株はボストン大学の J. Sullivan 博士から分与していただいた。NOD Scid マウスの作製およびヒト組織移植マウスは浅野先生との共同研究で行った。ウイルスの感染及び評価については感染研 P3 動物施設で動物実験委員会の承認を受けて行った。抗ウイルス抗体は化血研から分与していただいた。
  - 3) HSCA-2 抗体反応抗原の生化学的性質や T 細胞での分布を免疫沈降や FACS により調べた。
  - 4) CAG(CMV- $\beta$  アクチン) プロモーター結合 CyclinT1 遺伝子導入トランスジェニックマウスを作製した。このマウスを逆転写酵素欠損 HIV-1 全長遺伝子導入トランスジェニックマウスと掛け合わせ、HIV-1 遺伝子の発現をノザン法、および p24 に対する ELISA 法により解析した。
  - 5) ネコ T リンパ系細胞株である Kumi-1 細胞と、サブタイプ A、B、D に属する臨床分離株 FIV を用いた検討をおこなった。CXCR4 アンタゴニスト (T22、T134、T140) の存在下において Kumi-1 細胞に FIV を感染させ、9 日後の培養上清中における逆転写酵素活性を測定した。また、CXCR4 が強く発現していることがすでに報告されているネコリンパ腫由来細胞株である 3201 細胞を用い、抗 CXCR4 モノクローナル抗体の結合に対する CXCR4 アンタゴニストの作用について検討した。
  - 6) リンパ球の混入のほとんどないマクロファージでマウスを免疫し、フローサイトメーターで抗体産生細胞をスクリーニングした。また、クローニングされたモルモット IL-2 遺伝子 (山口大学・岩田裕之先生供与) を用いて大腸菌での発現を行った。
- (3) HIV/AIDS 動物モデル確立のための基盤技術の開発
- 妊娠 13-15 日のマウスの羊水中に Luciferase の発現プラスミドベクター及び FITC-ODN Fluorescence isothiocyanate-labeled oligodeoxyribonucleotides の導入を行い、発現の部位とレベルを検討した。マウス羊水中への導入技術はガラスピペットを用いて検討した。導入効率を増強させる為に、造影剤と超音波処理を用いた。動物実験は全て大阪大学医学部動物実験ガイドラインに沿って行われた。

#### 4. 研究成果

##### (1) サルを用いた HIV/AIDS 評価スクリーニング系の開発

ワクチンを含めた抗エイズ物質の開発のためにサルを用いたスクリーニング系の評価が重要となっており、そのための病原性キメラウイルスの評価系とその系を用いた抗エイズ物質の開発研究を行った。

- 1) 糖鎖はエイズウイルスの慢性期の活発な持続感染の原因であることが分かった。糖鎖変異ウイルス感染モデルは今後の発症機構の解明、ワクチン研究に重要な役割を持つ (図 1)。
- 2) 病原性キメラウイルス分子クローンの作製：SHIV-C2/1 のウイルスクローン SHIV-C2/1 KS661 が得られた。SHIV-C2/1 KS661 の M8166 細胞感染力価は、 $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml と高力価を得た。SHIV-C2/1 KS661 12,000 TCID<sub>50</sub> をカニクイザルとアカゲザルに静脈内接種したところ、接種後 14 日目頃までに CD 4 陽性細胞数が著明に減少して行き、高度のウイルス血症も発現した。さらにカニクイザル直腸内接種でも、持続的な CD4 陽性リンパ球減少が認められた。
- 3) 顎下・腋下・鼠径・腸間膜リンパ節の各リンパ組織、PBMC、骨髄、胸腺ならびに脾臓において、INF  $\gamma$ 、TNF  $\alpha$ 、RANTES の mRNA の発現を検出することができた。また RANTES については、ヒト ELISA キットにより経時的動態もとらえることが可能となった。
- 4) 用いたサル胚盤胞 3 個のうち、1 個に良好な内部細胞塊の発達が見られ、マウスの ES 細胞様のコロニーを形成した。3 回の継代を経た培養開始後 26 日目において、一部のコロニーにおいて ALP 活性を持つ細胞が観察され、ES 細胞様細胞の存在が確認できた。

##### (2) 抗 HIV 候補物質のスクリーニングとしての小動物モデル (マウス、モルモット、ネコ) の作出と応用

ヒトの組織を安定して移植可能なモデル系の開発を行い NOD scid マウスの株化動物の完成と、それを用いた HIV 候補物質のスクリーニングを行った。

- 1) PBMC 移植後 IL-4, IL-12, IL-18 処理マウス脾臓細胞には、90%以上のヒト CD45 陽性細胞が認められた。IL-18 処理マウスは、PBMC を NODscid へ移植後 5 週後、PBS 処理に比べて脾臓や腎臓へ顕著なヒト CD45、CD4 と CD8T 細胞の浸潤が認められた。IL-18 投与群に比べ、ヒトリンパ球が減少する傾向が認められた。さらに、IL-18 に IFN  $\gamma$  の中和抗体を加えることによってその定着がどのように影響するかを検討すると、IFN  $\gamma$  の中和抗体によりその定着は上昇傾向となることが明らかになった。これらのことから、IFN  $\gamma$  の産生は IL-18 によるヒト CD4 と CD8T 細胞の NODscid マウスへの定着と組織浸潤に影響を与えることが示唆された。
  - 2) 感染研 浅野研究室で確立された NOD Scid マウスをヒト組織に対する拒絶反応を示さない選別されたマウスラインテンを用いて NOD Scid PBL マウスを作製した。cross-reactive なモノクローナル抗体を用いると MNp や HIV 感染者のウイルス産生を *in vitro* で効率よく抑制できることから、primary-isolate を中和できる液性抗体としてとらえることができた。その液性抗体を NOD Scid PBL マウスに passive transfer すると MNp ウイルス株の感染を完全にブロックすることが明らかになった。
  - 3) HSCA-2 抗体の認識する抗原は分子量約 110KD の糖膜タンパクで、その生化学的性質や細胞分布は CD43(Leukosialin) とよく似ていた。また、HSCA-2 抗体は単独で CD4+T 細胞の増殖を刺激するとともに、リコール抗原に対する反応も増強した。ヒト PBMC を NOD-SCID マウスの腹腔内に移入すると 3-4 週間後にはほとんどの T 細胞は CD45RO+ に変換した。この間 CD4/CD8 比が非常に低下したが、HSCA-2 抗体を同時に投与するとその低下が抑えられた。一方、PPD に対する反応性は 3-4 週間後に消失したが、HSCA-2 抗体注入群においてもほとんど維持されなかった。
  - 4) HIV-1-CyclinT1 ダブルトランスジェニックマウスに LPS を投与し、HIV の発現を誘導したところ、6 時間後に血中に 9 ng/ml の p24 が検出された。CyclinT1 が存在しない場合は 6 pg/ml であった。また、この時正常なウイルス蛋白の合成が見られ、血中の p24 は比重 1.165 の分画に分布し、正常なウイルス粒子が形成されていることがわかった。
  - 5) いずれのウイルス株においても、3 種類の CXCR4 アンタゴニストの中では T22 が最も高い FIV 増殖抑制効果を有していた。抗 CXCR4 モノクローナル抗体による 3201 細胞の蛍光強度は、T22 の添加により有意に低下しており、T22 が CXCR4 の競合拮抗により FIV 感染阻害作用を示していることが示唆された。
  - 6) モルモット単球と顆粒球の細胞表面分子に反応するモノクローナル抗体 13-2 が初めて作製された。13-2 抗体の認識する抗原は 70% の単球で強く発現し、すべての顆粒球に弱い発現が見られた。クローニングされていたモルモット IL-2 遺伝子を大腸菌で発現させたが、ほとんど発現が見られず、再クローニングしたところアミノ酸配列の一方所に誤りがあることが明らかになった。
- (3) HIV/AIDS 動物モデル確立のための基盤技術の開発
- 新しい評価スクリーニング系の開発のために標的遺伝子の細胞内導入との確立とその臨床応用研究を行った。
- 1) pBR322 配列をもつレトロウイルス様粒子の作成と細胞への感染 上記のような問題を避けるため、まず、pBR322 由来の配列をあらかじめ L929 に導入した細胞株を樹立した。同じく pBR322 由来の配列を MuLV-IRS と packaging signal の下流に持つ含むレトロウイルス様粒子を作成して実験を行った (Fig.1)。感染後の細胞をランダムにクローニングして調べたところ、13 クローンのうちの 3 クローンで、以前精製インテグラーゼを用いた実験で観察されたものと同様の DNA の再構成が観察され、レトロウイルス様の粒子を用いての反応が可能であることが明らかになった。
  - 2) Luciferase の発現ベクター pCMV-Luci をマウス胎仔にガラスピペットで導入したが、ほとんど発現は認めなかった。そこで超音波をかけて物理的に押し込む方法を試みた。これにより Naked DNA の羊膜への導入は約 10 倍上昇したが、胎仔組織への導入効率はやはり低かった。次に超音波造影に使われる造影剤を Naked DNA と混合し、2 Hz の超音波を 5 秒間子宮上からかけた。これにより皮膚への導入効率 (ルシフェラーゼ遺伝子発現) は数百倍増強された。この方法で、FITC-ODN の導入を行ったところ、FITC-ODN の導入も皮膚にスポット状に取り込みが認められた。このときに他の臓器への導入は見られず、ルシフェラーゼ活性でみても皮膚での活性の数百分の一以下であった。また出生率は約 50 であった。



## 5. 考察

HIV/AIDSが増加し続けており、そのコントロールのためにはHIV/AIDS動物モデルの開発研究が重要な課題になっている。その中でもマウスを用いたスクリーニング系の開発と、サルを用いたこうエイズ物質の評価が開発研究の必須となっており、そのためのサルモデル、マウスモデルの開発が行われている。サルモデルの課題はHIVウイルスの感染によるスクリーニング系としての病態の再現が難しいことから正確なエイズ動物モデルが完成していない現状である。したがって病態を再現できるサルモデルとしてサルヒトキメラウイルスの開発が行われ、それを用いたエイズサルモデルの再現と、病態解析、さらにそれらの成果に基づいたHIV候補物質の開発が現在得られるサルモデルとして捉えられている。一方HIV感染サルモデルに関しては病態発現を考慮する必要の無い実験系の場合はチンパンジーやヒヒが用いられる系があるが、経済的な面でスクリーニング系としての確立が極めて難しい現状である。したがって本研究班ではHIV感染と病態発現を解析しうるサルモデルとして

i) 病原性キメラウイルスの開発とその解析

ii) SHIVウイルスを用いたスクリーニング系の開発と病態解析

を行い、そのいずれもスクリーニング系として国立感染症研究所筑波医学実験霊長類センターで確立することができた。

delta 5G感染ザルに誘導された防御免疫の解析からCTLの重要性が認識された。慢性期における機能的なCTLメモリー細胞についての詳細な研究が必要である。

分子クローンSHIV-C2/1 KS661は、カニクイザルにおいて静脈内接種、直腸内接種ともに強い感染性を持ち、ウイルス感染後にはCD4陽性細胞の急激な減少を誘発し、高度のウイルス血症を起こすことが確認された。本クローン-カニクイザルのモデル系は、ウイルスの遺伝子変化と病態の関連や病原性の解析を行う上で有用であると考えられる。また、分子クローンを得たことにより、今後のAIDSワクチンや薬剤の評価におけるChallenge virusの安定供給が可能となった。

さらに安定したサルの系を作るためには遺伝子的な背景が明らかになった、あるいは遺伝子的背景を揃えた動物の供給が今後の課題となるのでサルのES細胞の確立を試みた。

最近、アカゲザルとマーモセットでES細胞が樹立された。今回我々が確認したES細胞様のコロニーは平らで個々の細胞が比較的はっきりしており、マウスのES細胞とは形態的にかなり異なるものである。この形態はアカゲザルなどの報告と良く一致しており、霊長類に特徴的であろうと思われた。これらのES細胞様細胞が多分化能を示すかどうか、また継代維持が可能かどうかなど今後の詳細な検討が待たれる。

マウスを代表とする小動物エイズモデルの開発は二つの方向から進められており、一つはHIV感染に関連した遺伝子をマウスに発現させることにより、マウス細胞への感染を目的としたHIV感染マウスモデルの開発が行われている。他方は小動物評価スクリーニング系の開発の必要性から免疫不全マウスの確立とその動物を用いたヒトリンパ組織の移植によるScidマウスの確立が行われ、そのヒト末梢血細胞、胎児胸腺、肝組織移植ScidマウスHIV感染系の確立を試みた。

IL-18の抗体産生における影響を検討すると、ヒトPBMC移入NODscidマウス血清中のヒトIgM, G, A抗体価をPBS投与のコントロール群に比べて上昇させることが認められた。また、特異抗体を検討する目的で、そのNODscidの腎臓系球体における抗原抗体複合体の沈着を検討するとコントロール群に比べてIgA抗原抗体複合体の沈着が強く認められた。その結果、IL-18は、Th2を介してIgAヘクラススイッチに関与していることが示唆された。

CyclinT1が宿主因子として、HIV-1の転写に重要な役割を果たすことを示すと共に、このマウスがHIV感染モデルとして有用であることを示している。また、このマウスはリンパ組織の萎縮、若年での衰弱死が認められ、今後そのメカニズムについて解析する予定である。

HIV感染の際の細胞侵入機構の解析からネコを使ってエイズモデルの有用性が明らかになった。ネコを用いてのエイズウイルスの多様性と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が行われた。

今回用いたCXCR4アンタゴニストは、日本に分布する主要なFIVのサブタイプであるA, B, Dのいずれに対しても増殖抑制効果を有していたことから、FIV自然感染ネコを用いた*in vivo*における検討が可能であると考えられた。また、CXCR4アンタゴニストのFIV増殖抑制効果は、HIVに対する効果と同様に

CXCR4の競合拮抗作用によるものと考えられた。

小動物モデルとしてのモルモットの重要性が表面抗原の解析の進歩に伴い明らかになりつつある。特に糖や糖脂質を主体にした候補物質、あるいは細菌性ベクターを用いた候補ワクチンの開発の評価のためにはモルモットモデルの有用性があきらかになりつつある。

フローサイトメーターでの解析に有用な単球・マクロファージに特異的なモノクローナル抗体が初めて作製できたので、モルモットでも免疫応答における単球・マクロファージの動向を解析できるようになったと思われる。抗モルモット FcR 抗体（未発表）等との異同を含めて、13-2抗原の分子生物学的解析が必要である。

上記のように完全なエイズ動物モデルの開発は現在の緊急課題の一つとなっており、そのために HIV 感染に関連して遺伝子操作を目的とした基盤技術の開発が求められている。

昨年度までの研究から、インテグラーゼによるゲノム DNA 上の再構成には、導入プラスミド上に存在する IRS 内の LTR U3 の 5' end とゲノム DNA 上の LTR U5 の 3' end 類似の配列とインテグラーゼが作用すること、及び、ゲノム DNA とプラスミド DNA 間に相同部位の存在することが必要であった。一般的にレトロウイルスは、組み込みの際に、特異性を示さないが、それは、ウイルス内部に2つのインテグラーゼの認識部位と2個のLTRという相同配列を有するためと考えられる。すなわち、ウイルス粒子内に1つのインテグラーゼの認識部位と1個のLTRしか存在しなければ、インテグラーゼは、その相手をゲノム DNA 上に求めて、DNA 上の再構成を生じると考えられた。

羊水中だけではなく脳室、腹腔、胸腔等への同様にヌクレオチドを導入可能であったが、導入部位の詳細な検討が必要であろう。

## 6. 結論

エイズ治療薬開発のための評価スクリーニング系をサル、マウスを中心にを行い、安全で安定したサル及び小動物のモデル系を確立することができた。このモデルの有用性はサルにおいてはキメラウイルスの感染あるいは SHIV の感染防御の評価系として用いられ、HIV 候補ワクチンの開発研究でその有用性が明らかにされつつある。

さらにマウスモデルについては NOD Scid マウスの株化が完成し、安定してヒト組織の移植が可能となったことは HIV 感染モデル系として安定して確立することができた。さらにマウスへの HIV 関連トランスジェニックマウスを作製し、HIV 候補物質の評価系として使用可能であると示唆される。

ネコエイズウイルスの感染機構の解析の進歩から HIV モデル系としての有用性が明らかになりウイルス感染のコレセプターを標的にしたウイルス感染阻害剤の開発等に用いられ、その有用性が明らかにされた。

また、モルモットを用いた免疫誘導のウイルスの解析や候補物質の安全性安定性の解析にその有用性が示された。

HIV/AIDS 動物モデル確立のための基盤技術においては今後の次世代の遺伝子改変動物モデルの開発のためのサルの ES 細胞の系の樹立や遺伝子導入法の開発と臨床が行われている。

## 7. 研究発表

### 1) 論文発表

1. Goto, Y., Nishimura, Y., Mizuno, T., Endo, Y., Baba, K., Momoi, Y., Watari, T., Hasegawa, A. and Tsujimoto, H. Quantification of viral ribonucleic acid in plasma of cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. *Am. J. Vet. Res.* 61:1609-13 (2000).
2. Endo, Y., Nishimura, Y., Mizuno, T., Goto, Y., Watari, T., Hasegawa, A., Hohdatsu, T., Koyama, H. and Tsujimoto, H. Inhibitory effect of stromal cell derived factor-1 (SDF-1) on the replication of divergent strains of feline immunodeficiency virus in feline T-lymphoid cell line. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 74:303-14 (2000).
3. Mori, K., Yasutomi Y., Ohgimoto S., Nakasone T., Takamura S., Shioda T. and Nagai Y. A quintuple deglycosylated mutant of SIV in rhesus macaques. Robust primary replication, tightly contained chronic infection and elicitation of potent immunity against the parental wild-type

- strain. *J. Virol.* 2001. (In press)
4. Mori, K., Rosenzweig, M., and Desrosiers, R. C. Mechanism for adaptation of simian immunodeficiency virus to replication in alveolar macrophages. *J. Virol.* 74, 10852–10859. 2000.
  5. Mori, K., Yasutomi, Y., Sawada, S., Villinger, F., Sugama, K., Rosenwith, B., Ueberla, K., Yamazaki, S., Ansari, A., and Ruebsamen-Weigmann, H. Suppression of acute viremia by short term post-exposure prophylaxis of SHIV-RT infected monkeys with a novel RT inhibitor (GW420867) allows for the development of potent anti-viral immune responses resulting in efficient containment of the infection. *J. Virol.* 74, 5747–5753. 2000.
  6. 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).
  7. 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).
  8. 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).
  9. 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).
  10. 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).
  11. 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).
  12. 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).
  13. 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).
  14. 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).
  15. 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).
  16. 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).
  17. 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).
18. 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).
  19. 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).
  20. 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).
  21. Sugawara, I., Yamamada, H., Mizuno, S., and Iwakura, Y. IL-4 is required for defense against Mycobacterial infection. *Microbiol. Immunol.*, 44, 971-979 (2000).
  22. 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).
  23. 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).
  24. 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).
  25. 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.
  26. Kaneda, Y., Nakasima, H., Tsuboniwa, N., and Morishita, R.: Progress of fusigenic viral-liposomes. *Progress in Gene Therapy; Basic and Clinical Frontiers*, pp225-243, R. Bertolotti et al. Eds VSP, 2000.
  27. Kaneda, Y.: Virosomes; evolution of the liposome as a targeted drug delivery system. *Advanced Drug Delivery Reviews* 43, 197-205, 2000.
  28. Nobuyoshi M, Kusunoki Y, Seyama T, Kodama K, Kimura A, Kyoizumi S. Maturation arrest of human dendritic cells at the CD34-/CD4+/HLA-DR+ stage in the bone marrow of NOD/SCID-human chimeric mice. *Blood* (in press)
  29. 京泉 誠之、小山 和章 SCID-hu マウスをもちいたヒト放射線生物学 アニテックス (印刷中)
  30. H. Ohba, T. Soga, T. Tomozawa, Y. Nishikawa, A. Yasuda, A. Kojima, T. Kurata, and J. Chiba: An Immunodominant Neutralization Epitope on the Thumb Subdomain of HIV-1 Reverse Transcriptase Revealed by Phage Display Antibodies. *Journal of General Virology* in press
  31. N. Okui, R. Sakuma, N. Kobayashi, H. Yoshikura, T. Kitamura, J. Chiba, and Y. Kitamura 2000 : Packageable antiviral therapeutics against human immunodeficiency virus type 1: virion-targeted virus inactivation by incorporation of a single-chain antibody against viral integrase into progeny virions. *Hum. Gene. Ther.*, 11 4, 537-46.
  32. Naoto Yoshino, Yasushi Ami, Kenji Someya, Shuji Ando, Katsuaki Shinohara, Fumio Tashiro, Yichen Lu and Mitsuo Honda. : Protective immune responses induced by a non-pathogenic simian/human immunodeficiency virus (SHIV) against a challenge of a pathogenic SHIV in monkeys. *Microbiology and Immunology*, 44: 363-372, 2000

33. Yuko Sasaki, Yasushi Ami, Tadashi Nakasone, Katsuaki Shinohara, Eiji Takahashi, Shuji Ando, Kenji Someya, Yuriko Suzaki and Mitsuo Honda. : Induction of CD95 ligand expression on T lymphocytes and B lymphocytes and its contribution to apoptosis of CD95-up-regulated CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in macaques by infection with a pathogenic simian/human immunodeficiency virus. *Clin. Exp. Immunol.*, 122: 381-389, 2000
34. Ogura A, Inoue K, Ogonuki N, Suzuki O, Mochida K, Matsuda J and Sankai T. Recent advances in the microinsemination of laboratory animals. *International J of Andrology*, 23, Suppl. 2: 60-62, 2000.
35. Shinohara, K., Sakai, K., Takahashi, E., Ami, Y., Sasaki, Y., Yoshino, N., Suzaki, Y., Nakasone, T. and Honda, M. : A Pathogenic SHIV-C2/1-Cynomolgus Monkey Model for Evaluation of HIV Vaccine Candidates. XIII International AIDS conference., Basic Science, Clinical Science, Epidemiology, Prevention and Public Health., Durban, South Africa. 247-250 (2000).
36. Tanaka-Shoji, A. , Tanaka, M., and Komuro, K. Transfection of a plasmid DNA carrying the LTR end with the purified integrase can mimic an integration process of retrovirus. (submitted).
37. Eda, Y., Murakami, T., Ami, Y., Nakasone, T, Kaizu, M., Izumi, Y., Yoshino, N., Takizawa, M., Someya, K., Ohsu, T., Masda, H., Yonemura, H., Shinohara, K., Sasaki, Y., Suzaki, Y., Sakai, K., and Honda, M. A high-affinity humanized antibody that recognizes the tip V3 sequence neutralizes a neutralization-resistant primary isolate and affords sterile protection against a pathogenic simian/human immunodeficiency virus. (in preparation).
38. Horibata, S., Asano, T., Murakami, T., Eda, Y., Maeda H., and Honda, M. Passive transfer of a humanized anti V3 tip antibody prevent neutralization-resistant primary isolate in NOD Scid hu PBL mice. (in preparation).

## 2) 学会発表

1. Y. Goto, Y. Nishimura, K. Baba, T. Mizuno, K. Masuda, K. Ohno and H. Tsujimoto: Association of plasma viral load with disease progression in cats naturally infected with FIV. Fifth international feline retrovirus research symposium. May 25-27, 2000
2. Y. Goto, Y. Endo, T. Mizuno, K. Baba, K. Masuda, K. Ohno and H. Tsujimoto: Studies on cytokine therapy for feline immunodeficiency virus infection in cats by using chemokines and chemokine receptor antagonists. International Veterinary Cytokine and Vaccine Conference. March 16-17, 2000
3. Y. Goto, Y. Endo, T. Mizuno, K. Baba, T. Murakami, N. Yamamoto, H. Nakashima, N. Fujii, K. Masuda, K. Ohno and H. Tsujimoto: Inhibitory effect of CXCR4 antagonists on the replication of feline immunodeficiency virus. Cold Spring Harbor Retroviruses Meeting. May 23-28, 2000
4. T. Mizuno, Y. Goto, K. Baba, K. Masuda, K. Ohno and H. Tsujimoto: TNF- $\alpha$  induced cell death in feline immunodeficiency virus-infected cells mediated by caspase cascade. Cold Spring Harbor Retroviruses Meeting. May 23-28, 2000
5. 後藤裕子、馬場健司、水野拓也、増田健一、大野耕一、辻本元：ケモカインレセプターアンタゴニストによるネコ免疫不全ウイルスの感染阻害効果 第129回日本獣医学会学術集会 2000年4月4日～6日
6. 水野拓也、馬場健司、後藤裕子、増田健一、大野耕一、辻本元：ネコリンパ腫細胞株におけるFas抗原の選択的スプライシング機構の解析 第129回日本獣医学会学術集会 2000年4月4日～6日
7. 水野拓也、後藤裕子、馬場健司、増田健一、大野耕一、辻本元：ネコ免疫不全ウイルス感染細胞におけるFas抗原およびFasリガンドの発現解析 第130回日本獣医学会学術集会 2000年10月7日～9日

日

8. 後藤裕子、水野拓也、藤井信孝、山本直樹、中島秀喜、長谷川篤彦、大野耕一、辻本元：ケモカインレセプターアンタゴニストによるネコ免疫不全ウイルスの感染阻害効果 第14回日本エイズ学会学術集会 2000年11月28日～30日
9. 水野拓也、後藤裕子、長屋英和、長谷川篤彦、大野耕一、辻本元：ネコ免疫不全ウイルス感染細胞におけるFas抗原およびFasリガンドの発現解析 第14回日本エイズ学会学術集会 2000年11月28日～30日
10. 森 一泰、保富康宏、向井隼三郎、山田章雄、扇本真治、塩田達雄、永井美之、SIVの感染と宿主応答における糖鎖の意義、第47回日本ウイルス学会、1999年11月
11. Kaneda, Y. and Morishita, R.: Evolution of a virosome-mediated gene transfer. The 27th Symposium for Controlled Release of Bioactive Materials, July 12, 2000, Paris
12. Kaneda, Y.: Treatment of intractable diseases using synthetic oligonucleotides coupled with fusogenic liposomes. 2000 International Chemical Congress, December 17, 2000, Honolulu
13. 金田安史、森下竜一：デコイオリゴヌクレオチドの導入による疾病治療 第73回日本生化学会大会シンポジウム 2000年10月12日 横浜
14. 大原 高秋、楠 洋一郎、林 奉権、角谷 徹、京泉 誠之：CD43 (leukosialin) を高発現するCD4メモリーT細胞サブセット。日本免疫学会第30回大会 仙台 2000年11月14日～16日
15. 滝澤万里、芳賀伸治、千葉丈、浅野敏彦、本多三男：モルモットのBCG免疫における活性化T細胞の検出とその生物学的意義 第10回日本サイトメトリー学会 2000年8月5日～6日 東京
16. 中野正和、石村正和、前島朋幸、大場浩美、小島朝人、倉田 毅、千葉 丈：HIV-1逆転写酵素に対するイントラボディ発現組換えアデノウイルスによる細胞内免疫 第30回日本免疫学会 2000年12月14日～16日 仙台
17. 武田哲、中里見哲也、吉崎ひとみ、染谷健二、吉野直人、仲宗根正、安藤秀二、芳賀伸治、塩先巧一、深田勝彦、時吉幸男、本多三男：HVJリポソームはHIV-HVJワクチンで免役した場合のヘルパーTの応答に有効に働く。第14回日本エイズ学会総会、京都府、平成11年12月2-4日。
18. Mitsuo Honda, Tadashi Nakasone, Kazuhiro Matsuo, Takeaki Ohsu, Yasuyuki Izaumi, Masahiko Kaizu, Mari Takizawa, Kenji Someya, Mamoru Kawahara, Takashi Hara, Shigeru Horibata, Naoto Yoshino, Shuji Ando, Takaichi Hamano, Yasushi Ami, Koji Sakai, Katsuaki Shinohara, Yuko Sasaki, Yoshiyuki Nagai, Shudo Yamazaki . : Efficacy of a human immunodeficiency virus vaccine regimen consisting of recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) and vaccinia DIs vectors . 日米医学協力計画エイズ部会第13回合同会議、熊本、2000年3月21日～23日
19. Katsuaki Shinohara, Koji Sakai, Eiji Takahashi, Yasuyuki Izumi, Yasushi Ami, Yuko Sasaki, Yuriko Suzuki, Shuji Ando, Tadashi Nakasone, and Mitsuo Honda. : Cynomolgus monkey HIV/AIDS model using a pathogenic molecular clone of a simian-human immunodeficiency virus. 日米医学協力計画エイズ部会第13回合同会議、熊本、2000年3月21日～23日
20. 小倉淳郎、井上貴美子、越後貫成美、高野 薫、永野（大迫）麗子、野口 章、鈴木 治、松田潤一郎：新鮮、培養、および凍結由来未成熟セルトリ細胞からのクローンマウスの作出 第46回日本実験動物学会総会 2000年5月21日～23日。
21. Shinohara, K., Sakai, K., Takahashi, E., Ami, Y., Sasaki, Y., Yoshino, N., Suzuki, Y., Nakasone, T. and Honda, M., : A pathogenic SHIV-C2/1-cynomolgus monkey model for evaluation of HIV vaccine candidate. 13rd International AIDS Conference, July 9-14, 2000, Durban, South Africa.
22. 阪井弘治、篠原克明、高橋栄治、網康至、佐々木裕子、吉野直人、須崎百合子、仲宗根正、本多三男：カニクイザルに病原性を示すSHIV-C2/1株の分子クローニング。第14回 日本エイズ学会学術集会・総会、2000年11月28日～30日、京都。
23. 田中（庄司）明子、小室勝利： ゲノムDNAのターゲティングを可能にするレトロウイルスベクターの開発 第23回 日本分子生物学会年会 （2000年12月13日-16日）。



24. 堀端重男、浅野敏彦、玉崗有告、小林進、本多三男. HIV 感染病態小動物モデルの開発と検討. 第 14 回  
エイズ学会学術集会・総会 (2000.11/28-30 京都)

8. 知的所有権の取得状況

1. 金田安史：「遺伝子導入のためのウイルスエンベロープベクター」特願 2000-25596
2. 篠原克明：「後天性免疫不全症候群の非ヒト霊長類モデル」特願 2000-360274 平成 12 年 11 月 27 日  
出願

---

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

