

200/0738

厚生科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

エイズ発症阻止に関する研究

平成13年度総括・分担研究報告書

平成14年3月

主任研究者 岩本愛吉

CONTENTS

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）総括研究報告書	1
主任研究者 東京大学医科学研究所： 教授 岩本愛吉	
H I V特異的免疫能の評価と強化に関する研究	15
分担研究者 東京大学医科学研究所： 教授 岩本愛吉	
H I V感染症の病態とヒトゲノム多型性に関する研究	22
分担研究者 大阪大学微生物病研究所： 教授 塩田達雄	
長期未発症者でのヒトゲノム多型を含む宿主側と ウイルス側の発症遅延要因に関する研究	26
分担研究者 山梨医科大学微生物学講座： 講師 照沼 裕	
H I V感染症の病態に関わる免疫応答の研究	30
分担研究者 国立感染症研究所・免疫部： 感染免疫室長 横田恭子	
H I V感染症の病態と宿主の免疫応答の研究	36
分担研究者 熊本大学エイズ学研究センター： 教授 松下修三	
活性化T細胞サバイバル刺激 OX40-OX40L と HIV-1 感染	40
分担研究者 琉球大学医学部附属沖縄・ アジア医学研究センター： 教授 田中勇悦	
H I V感染症における非感染T細胞の細胞死誘導と制御	45
分担研究者 東京大学医科学研究所付属病院： 助教授 小柳津 直樹	
発症防止ワクチン開発のための基礎研究	49
分担研究者 北海道大学遺伝子病研究所： 教授 志田壽利	
コレセプターを介した感染阻害の研究	52
分担研究者 東京医科歯科大学： 教授 山本直樹	
H I V感染前期過程の解析に関する研究	57
分担研究者 東北大学大学院医学系研究科： 教授 小柳義夫	

V P R測定法の確立とV P Rを標的とした抗H I V薬の開発に関する研究	68
分担研究者 国立国際医療センター研究所： 部長 石坂幸人	
ウイルス感染に伴う宿主細胞遺伝子発現の変化	70
分担研究者 東京大学医科学研究所： 助手 渡辺慎哉	
エピジェネティックな変化とH I Vの潜伏感染・ 再活性化に関する研究	74
分担研究者 東京大学医科学研究所： 助教授 渡邊俊樹	
研究成果の刊行に関する一覧表	78
刊行物別刷り	89

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

総括研究報告書

エイズ発症阻止に関する研究

主任研究者 岩本愛吉 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨

以下の4本の柱に沿って研究を行った。(1) HIV感染症の病態、治療の効果や副作用の発現などに関与するゲノム多型性の研究、(2) HIV感染症におけるウイルス特異的免疫応答とリンパ球破壊に関する研究、(3) HIV感染症に関わる新しい宿主因子の発見と新しい治療標的開発のための基礎研究、(4) HIV感染症に関わる新しい宿主因子解析のための新技術の開発とウイルスゲノム発現機構の解析。(1) ゲノム解析研究では、CCR2 V64I について感染抵抗性との関連という新たな知見が得られた。日本人血友病患者で HIV 感染したものの長期未発症でいる患者群について、必要な承認手続きが終了し、患者検体の収集と解析が始まった。(2) センダイウイルスベクター系を応用し、独自の MHC Class I テトラマー分子の作成法が確立された。同じ系を用いて、将来 HIV 特異的免疫能を誘導するための遺伝子治療法が開発される可能性がある。HIV に対する中和抗体の標的が gp120 分子の C3 や V1 部分にあるとの予想外の結果が得られた。今後のワクチン作製のために示唆を与える結果である。OX40/OX40L と TNF の刺激により急激なアポトーシスが誘導されるとともに、ウイルス産生が停止した。ウイルス産生を抑制する新たな機構が今後明らかになる可能性を秘めた結果である。(3) 経口投与可能な CXCR4 阻害物質 T-1636 は毒性も少ないことが明らかとなった。HIV 複製中間体を用いて、試験管内で組み込み効率を測定できる系が完成した。(4) 12,000 遺伝子を搭載したマイクロアレイが完成した。

分担研究者氏名・所属施設名および所属

石坂幸人・国立国際医療センター部長

施設における職名

渡邊慎哉・東京大学・助手

塩田達雄・大阪大学教授

渡邊俊樹・東京大学助教授

照沼 裕・山梨医科大学助教授

横田恭子・国立感染症研究所室長

A. 研究目的

松下修三・熊本大学教授

以下の4本の柱に従ってエイズ発症

田中勇悦・琉球大学教授

阻止の研究を行う。(1) HIV感染症の病

小柳津直樹・東京大学助教授

態、治療の効果や副作用の発現などに関

志田壽利・北海道大学教授

与するゲノム多型性の研究、(2) HIV感

山本直樹・東京医科歯科大学教授

染症におけるウイルス特異的免疫応答

小柳義夫・東北大学教授

とリンパ球破壊に関する研究、(3) HIV

感染症に関わる新しい宿主因子の発見と新しい治療標的開発のための基礎研究、(4) HIV 感染症に関わる新しい宿主因子解析のための新技術の開発とウイルスゲノム発現機構の解析。

B. 研究方法

ゲノム多型性の研究では、倫理面への配慮を十二分に行った上で、患者本人からインフォームド・コンセントを得る。インフォームド・コンセントを得られた患者の染色体DNAをPCR法などにより増幅し、多型性の研究を行う。HIV感染者の免疫応答とリンパ球破壊に関する研究においては、患者末梢血単核球などを用いて、培養、フローサイトメトリーなどにより機能解析を行う。HIV特異的免疫能を定量するための新たな方法を開発する。自己のHIVに対する中和抗体を持つ患者から、中和抗体を精製し、エスケープ変異体との関連を研究する。新しい宿主因子の発見と治療標的開発の研究では、定量的PCR法により、HIV増殖中間体の定量系を確立する。CXCR4の阻害薬として可能性のある物質のCXCR4結合能、培養によるHIV抑制能、動物を用いた経口吸収試験などを行う。また、Vprの測定系を確立する。HIVの潜伏感染におけるLTR上のヒストンのアセチル化を解析し、アセチル化の程度とHIVの転写について検討する。DNAマイクロアレイに関して独自の技術的な開発を行い、ウイルス感染に際して変動する遺伝子発現の研究を行うための基礎的技術の開発を行う。

(倫理面への配慮)

ヒトゲノム研究については、研究者の所属する施設において倫理審査委員会の承認を受けている。(1) 東京大学医科学研究所：受付番号11-2「宿主および寄生体の両面から見たHIV感染症の研究」、(2) 大阪大学：許可番号1「HIV感染症にかかわる宿主因子の研究」、(3) 山梨医科大学：受付番号79「エイズ発症を阻止する要因に関する研究」。研究

の対象となる患者には目的を十分に説明した上で、書面にてインフォームド・コンセントを得ている。

C. 研究結果と考察

4本の柱にしたがって記載する。(1) ゲノム多型性の研究では、(塩田) CCR2 V64I (64番目のアミノ酸がバリンからイソロイシンに置換した多型) は、ホモ接合体の頻度が1%である欧米においてAIDS発症遅延との相関が指摘されている。HIV-1感染者423名と非感染者288名の比較により、日本人感染者ではこの多型のホモ接合体の頻度は6.6%であるのに対し非感染者では11.8%で、有意差を認めた。感染経路別ではHIV-1感染血友病患者9.8%、性感染3.9%であり、この多型がHIV-1感染に対しても抵抗性を付与する可能性が示された。タイ国マヒドン大学病院産婦人科のDiscordant couple 22組において、discordant-negativeの集団はdiscordant-positiveや非感染者の集団よりも、CCR2 64I変異ホモ接合体の頻度が有意に高かった。従ってアジア人においてはCCR2 64Iのホモ接合体がHIV-1感染抵抗性と関連することが明らかとなった。(照沼) 平成13年3月末三省合同基準に従い、研究の承認を得た。検体を採取する施設でも倫理委員会の承認を得、検体の収集を開始した。長期未発症者やHIV陰性血友病患者の比較からCCR2 V64Iがエイズの発症遅延のみでなく、HIVの感染阻止にも関与していることが示唆された。(2) 免疫応答の研究では、(岩本) 医科学研究所附属病院において、既知および患者のHIV解析により得られたCTLエピトープによるテ

ーラーメイドのペプチド免疫(治療ワクチン) 臨床研究を立ち上げつつある。一方、この治療法を遺伝子治療に発展させる目的および新たな HIV 特異的免疫解析ツールを開発するためにセンダイウイルスベクターを用いた系を開発した。センダイウイルスベクターによりクラス I テトラマーを作製したり、CTL エピトープを標的細胞に発現させることが可能となった。この研究からは 2 件の新たな特許申請がなされた。(松下) HAART 中にウイルスのリバウンドが認められた 3 例につき、治療開始時とリバウンド時の V3 領域クワシスピーシスを解析し、さらに自己由来のウイルス株に対する中和抗体活性について検討した。3 症例いずれもリバウンドウイルスは区別できるクラスターを形成し、治療前の集団から進化し、*in vivo* で選択されて出現したものと考えられた。組み換えウイルスによる実験では 3 症例とも中和抗体に対して中和抵抗性となっていた。さらに症例 1 と 2 では gp120 の C3 部分の関与が同定され、症例 3 では V1 部分の関与が示された。(田中) TNF 刺激により HIV-1 の産生を開始する ACH-2 細胞に OX40 を導入した ACH-2/OX40 は、OX40L を発現した細胞(SV-T2/gp34, PFA 固定)との混合培養により TNF と同程度の HIV-1 を産生する。この反応は OX40 や OX40L 特異的単クローン抗体で阻止される。一方、OX40L と TNF を同時に作用させると、ウイルス産生が見られなくなり、この現象は OX40 または OX40L 特異的単クローン抗体で解除された。顕微鏡下では、この二重刺激によって ACH-2/OX40 細胞の急激なアポトーシスが観察された。こ

のような細胞自殺によるウイルス産生防止は、Molt4 細胞に OX40 を導入した Molt4/OX40 細胞に NL4-3 株を急性感染させた培養系でも同様に観察された。T 細胞に補助刺激シグナルを入れる OX40/OX40L は HIV 感染においても大きく関与する可能性がある。(横田) HIV 感染者の PBMC を p24 抗原で刺激すると、2/5 の患者で IL-10 産生細胞が多く誘導された。しかし、各人の DC を十分分化させて *in vitro* で T 細胞を刺激すると、IFN- γ 産生細胞が誘導され、IL-10 産生細胞は検出されなかった。感染者の抗原提示能力を高めれば、機能的 CTL を誘導可能であることを示唆している。

(小柳津) HIV-1 *env* 蛋白 による機能的 T 細胞アポトーシス誘導モデルとして、正常人 PBMC に CD4 分子の架橋形成 (CD4XL) をもたらし更に抗 CD3 抗体で刺激することにより CD4+T 細胞のみならず CD8T 細胞のアポトーシスが誘導されることを見出した。この現象には Fas-Fas ligand 相関だけでなく、TRAIL も関与していることを明らかにした。

(志田) 国立感染症研究所の向井鎌三郎博士とドイツ霊長類センターの Hunsmann 博士と共同で、猿の感染実験を行った。感染後 4 週間 PMPA を投与した。また、投与開始直前に採血したプラズマから SIV ゲノムを抽出して、PCR 法によって gag-pol 領域と rev-env 領域を増幅し、発現ライブラリーを作製しオーダーメイドワクチンとした。ウイルス量にワクチン接種群と非接種群間で差は見られなかった、しかし PMPA 非投与群との間には感染 1 年後でも有意な差が見られた。(3) 宿主因子と新たな治療標

的研究では、(山本) CXCR4 阻害物質、T-1636 と 4 種の誘導体について実用化を目指した解析を行った。抗 SDF-1 α 活性は抗 HIV-1 活性と相関しない。ラットに強制経口投与を行った結果、毒性学的な危険性はなく、病理組織学的には特に異常はみられなかった。(小柳) preintegration complex(PIC)を感染早期の細胞から回収し、その機能的解析をおこなった。VSVG 蛋白質にコートされた GFP 蛋白質を発現する HIV ベクターを MOI 200 にて感染後 6 から 8 時間後に細胞質分画より PIC を抽出した。PIC 抽出液による実験の結果、細胞質内の全 full-length DNA のうち、わずか 1% の DNA がインテグレーション能のある PIC であること、そして、そのうちのさらに 12% が核内に移行し染色体へインテグレーションをする活性があることがわかった。今後、これらの過程のメカニズムを詳細に解析し、エイズ発症抑制のための基盤となる薬剤開発のための新たな知見を得ることを目標とする。(石坂) Vpr 由来のペプチドに対する抗体を作成し、サンドウィッチ法により 30 ng/ml までの Vpr を測定することが可能になった。Vpr が Cdc2 の活性を上昇させること、Heat shock protein70 に結合し、その ATPase 活性を上昇させること、を見出した。(4) 新技術開発の研究では、(渡邊慎哉) 平成 13 年 7 月までに human RefSeq 9,600 遺伝子、平成 14 年 1 月までに human RefSeq 12,000 遺伝子からなる合成 DNA マイクロアレイの作製を完了した。合成 DNA マイクロアレイに特化したハイブリダイゼーションにおいてシグナル・ノイズ比を極大化する

装置を開発し、特許出願した(特願 2001-323412; スライドガラスハイブリダイゼーションチャンバ)。(渡邊俊樹) HIV の転写に伴って選択的脱メチル化がおこる CpG を含む CREB/ATF site に特異的に結合するタンパク質の同定するため、DNA カラムによる精製と MALDI-TOF 質量分析をすすめている。OM10.1 細胞を用いてメチル化を介さない HIV 潜伏機構の解析を行った。クロマチン免疫沈降法で LTR 上のヒストンのアセチル化状態を解析した。転写 j 開始点近傍のヌクレオソーム B(NucB)において、H3 のリン酸化およびメチル化には変化が認められず、非刺激時には H1 の結合と H3 の低アセチル化が認められ”repressive histone code”に合致する事、TNF α 刺激後は H1 の解離と H3 のアセチル化の亢進が認められた。この結果は、非メチル化 HIV の潜伏に抑制的ヒストンコードを介したクロマチンの凝集が関与している可能性を示唆している。

D. 結論

ゲノム解析研究では、CCR2 V64I について感染抵抗性との関連という新たな知見が得られた。日本人血友病患者で HIV 感染したものの長期未発症でいる患者群について、必要な承認手続きが終了し、患者検体の収集と解析が始まった。センダイウイルスベクター系を応用し、独自の MHC Class I テトラマー分子の作成法が確立された。同じ系を用いて、将来 HIV 特異的免疫能を誘導するための遺伝子治療法が開発される可能性がある。HIV に対する中和抗体の標的が gp120 分子の C3 や V1 部分にあるとの予想外の結

果が得られた。今後のワクチン作製のために示唆を与える結果である。OX40/OX40L と TNF の刺激により急激なアポトーシスが誘導されるとともに、ウイルス産生が停止した。ウイルス産生を抑制する新たな機構が今後明らかになる可能性を秘めた結果である。経口投与可能な CXCR4 阻害物質 T-1636 は毒性も少ないことが明らかとなった。HIV 複製中間体を用いて、試験管内で組み込み効率を測定できる系が完成した。12,000 遺伝子を搭載したマイクロアレイが完成した。以上、2年目の本研究もほぼ順調に成果を出していると考えられる。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

(塩田)

1. Duplication of the Primary Encapsidation and Dimer Linkage Region of HIV-1 RNA Results in the Appearance of Monomeric RNA in Virus Particles. Jun-ichi Sakuragi, Tatsuo Shioda, and Antonito Panganiban. *J. Virol.* 75, 2557-2565, 2001.
2. Naturally occurring deletional mutation in the C-terminal cytoplasmic tail of CCR5 affects surface trafficking of CCR5. Tatsuo Shioda, Emi E. Nakayama, Yuetsu Tanaka, Xiaomi Xin, Huanliang Liu, Ai Kawana-Tachikawa, Atsushi Kato, Yuko Sakai, Yoshiyuki Nagai, and Aikichi Iwamoto. *J. Virol.* 75, 3462-3468, 2001.
3. Solid-phase synthesis of peptides having difficult sequences: Synthesis of peptides related to HIV-V3 region for immunological studies. Kiyoshi Nokihara, Saya Shimizu, Ruediger Pipkorn, Tadashi Yasuhara, and Tatsuo Shioda. *Peptide Science.* 13-16, 2001.
4. A quintuple deglycosylation mutant of STVmac239 in rhesus macaques. Robust primary replication, tightly contained chronic infection and elicitation of potent immunity against the parental wild type strain. Kazuyasu Mori, Yasuhiro Yasutomi, Shinji Ohgimoto, Tadashi Nakasone, Shiki Takamura, Tatsuo Shioda, and Yoshiyuki Nagai. *J. Virol.* 75, 4023-4028, 2001.
5. Novel polymorphisms in human macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 α) gene. Xiaomi Xin, Koichiro Nakamura, Huanling Liu, Emi E. Nakayama, Mieko Goto, Yoshiyuki Nagai, Yoshihiro Kitamura, Tatsuo Shioda, and Aikichi Iwamoto. *Genes and Immunity.* 2, 156-158, 2001.
6. Dissociation of genomic dimerization from packaging functions and virion maturation of human immunodeficiency virus

- type 1. Jun-ichi Sakuragi, Aikichi Iwamoto, and Tatsuo Shioda. *J. Virol.* In press.
7. Genetic analysis of HIV-1 discordant couples in Thailand: Association of CCR2 64I homozygosity with HIV-1 negative status. Suda Louisirotnachakul, Huanliang Liu, Anuvat Roongpisuthipong, Emi E. Nakayama, Yutaka Takebe, Tatsuo Shioda and Chantapong Wasi. *J. AIDS.* In press.
8. Protective effect of IL4 -589T polymorphism on HIV-1 disease progression: Relationship with viral load. Emi E. Nakayama, Laurence Meyer, Aikichi Iwamoto, Anne Persoz, Yoshiyuki Nagai, Christine Rouzioux, Jean-Francois Delfraissy, SEROCO Study Group, Patrice Debre, Dorian McIlroy, Ioannis Theodorou and Tatsuo Shioda. *J. Infectious Diseases.* In press.
- (照沼)
9. Handema, R., Terunuma, H., Kasolo, F., Kasai, H., Sichone, M., Mulundu, G., Deng, X., Ichiyama, K., Mitarai, S., Honda, M., Yamamoto, N., Ito, M.: Emergence of new HIV-1 subtypes other than subtype C among antenatal women in Lusaka, Zambia. *AIDS Research and Human Retroviruses* 17: 759-763, 2001.
10. Dai, J.H., Iwatani, Y., Ishida, T., Terunuma, H., Kasai, H., Iwakura, Y., Fujiwara, H., Ito, M.: Glycyrrhizin enhances interleukin-12 production in peritoneal macrophages. *Immunology* 103: 235-243, 2001.
11. Cui, S-H., Tanabe, F., Terunuma, H., Iwatani, Y., Numoi, H., Agematsu, K., Komiyama, A., Nomura, A., Hara, T., Onodera, T., Iwata, T., Ito, M.: A thiol proteinase inhibitor, E-64-d, corrects the abnormalities in concanavalin A cap formation and the lysosomal enzyme activity in leukocytes from patients with Chediak-Higashi syndrome by reversing the down-regulated protein kinase C activity. *Clinical and Experimental Immunology* 125: 283-290, 2001.
12. Owada, T., Motomura, T., Miyashita-Ogawa, Y., Kawada-Homma, M., Onishi, M., Matondo, P., Terunuma, H., Numazaki, Y., Yamashita, S., Yamamoto, N.: Antibody masking renders HIV-1 resistant to cationic membrane filtration through alteration of its electrostatic characteristics. *J. Virological Methods* 94: 15-24, 2001.
- (岩本)
13. Takahashi, T., Hosoya, N., Endo, T., Nakamura, T., Sakashita, H., Kimura, K., Ohnishi, K.,

- Nakamura, Y., and Iwamoto, A. Relationship between mutations in dihydropteroate synthase of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* isolates in Japan and resistance to sulfonamide therapy. *J. Clin. Microbiol.* 38:3161-3164, 2000.
14. Takahashi, T., Ebihara, Y., Manabe, A., Tsuji, K., Nakamura, T., Nakahata, T., and Iwamoto, A. Surfactant protein D and KL-6 as serologic indicators of *Pneumocystis carinii* pneumonia in a child with acute lymphoblastic leukemia. *J. Medicine* 32:41-51, 2001.
15. Takahashi, T., Hitani, A., Yamada, H., Nakamura, T., and Iwamoto, A. Desensitization to fluconazole in an AIDS patient. *Annals Pharmacotherapy* 35:642-643, 2001.
16. Ikegawa, M., Yuan, J., Matsumoto, K., Herrmann, S., Iwamoto, A., Nakamura, T., Matsusita, S., Kimura, T., Honjo, T., and Tashiro, K. Elevated plasma stromal cell-derived factor 1 protein level in the progression of HIV type 1 infection/AIDS. *AIDS Research and Human Retroviruses* 17:587-595, 2001.
17. Koibuchi, T., Hitani, A., Nakamura, T., Nojiri, N., Nakajima, K., Jyuji, T., and Iwamoto, A. Predominance of genotype A HBV in HBV-HIV-1 dually positive population as compared to HIV-1-negative counterpart in Japan. *J. Med. Virol.* 64:435-440, 2001.
18. Shioda, T., Nakayama, E.E., Tanaka, Y., Xin, X., Liu, H., Kawana-Tachikawa, A., Kato, A., Sakai, Y., Nagai, Y., and Iwamoto, A. Naturally occurring deletional mutation in the C-terminal cytoplasmic tail of CCR5 affects surface trafficking of CCR5. *J. Virol.* 75:3462-3468, 2001.
19. Watanabe, N., Tomizawa, M., Tachikawa-Kawana, A., Goto, M., Ajisawa, A., Nakamura, T., and Iwamoto, A. Quantitative and qualitative abnormalities in HIV-1-specific T cells. *AIDS* 15:711-715, 2001.
20. Xin, X., Nakamura, K., Liu, H., Nakayama, E.E., Goto, M., Nagai, Y., Kitamura, Y., Shioda, T., and Iwamoto, A. Novel polymorphisms in human macrophage inflammatory protein -1 alpha (MIP-1 α) gene. *Genes and Immunity* 2:156-158, 2001.
21. Taguchi, H., Takahashi, T., Goto, M., Nakamura, T., and Iwamoto, A. Acute parvovirus B19 infection during anti-retroviral therapy. *J. Infect. Chemother.* 7:110-112, 2001.
22. Yamada, H., Kotaki, H.,

- Nakamura, T., and Iwamoto, A. Simultaneous determination of the HIV protease inhibitors indinavir, amprenavir, saquinavir, ritonavir and nelfinavir in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 755:85-89, 2001.
23. Komuro, I., Keicho, N., Iwamoto, A., and Akagawa, K.S. Human alveolar macrophages and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced monocyte-derived macrophages are resistant to H₂O₂ via their high basal and inducible levels of catalase activity. *J. Biol. Chem.* 276:24360-24364, 2001.
24. Endo, T., Takahashi, T., Suzuki, M., Minamoto, F., Goto, M., Okuzumi, K., Oyaizu, N., Nakamura, T., Iwamoto, A. *Mycobacterium haemophilum* infection in a Japanese patient with AIDS: a case report. *J. Infect. Chemother.* 7:186-190, 2001.
25. Sakuragi, J., Iwamoto, A., and Shioda, T. Dissociation of genome dimerization from packaging functions and virion maturation of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 76:959-967, 2002.
26. Nakayama, E.E., Meyer, L., Iwamoto, A., Persoz, A., Nagai, Y., Rouzioux, C., Delfraissy, J.-F., SEROCO Study Group, Debre, P., McIlroy, D., Theodorou, I., and Shioda, T. Protective effect of IL4 -589T polymorphism on HIV-1 disease progression: Relationship with viral load. *J. Infect. Dis.* In Press. (松下)
27. Ikegawa M, Matsumoto K, Herrmann S, Iwamoto A, Nakamura T, Matsushita S, Nakamura T, Honjo T, Tashiro K: Elevated plasma SDF-1 protein level in the progression of HIV-1 infection/AIDS. *AIDS Res. Hum. Retrov.* 17(7):587-595., 2001.
28. Kimura, T., Yoshimura, K, Nishihara, K., Maeda, Y., Matsumi, S., Koito, A., and Matsushita, S.: Reconstitution of spontaneous neutralizing antibody response against autologous HIV-1 in chronically infected patients during highly active antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis.*, 185:53-60, 2002.
29. Wang, FX, Kimura, T., Nishihara, K., Yoshimura, K, Koito, A., and Matsushita, S. Emergence of autologous neutralization-resistant variants from pre existing quasi species during viral-rebound of human immunodeficiency virus type-1 infected patients under treatment of highly active anti retroviral therapy (HAART) . *J. Infect. Dis.*, 2002. (in press)

- (田中)
30. Tanaka R, Yoshida A, Murakami T, Baba E, Lichtenfeld J, Omori T, Kimura T, Tsurutani N, Fujii N, Wang Z, Peiper S C, Yamamoto N, and Tanaka Y. A unique monoclonal antibody recognizing the third extracellular loop of the human CXCR4 induces lymphocyte agglutination and enhances human immunodeficiency virus type-1-mediated syncytium formation and productive infection. *J. Virol.*, 75: 11534-11543, 2001.
31. Baba E, Takahashi Y, Lichtenfeld J, Tanaka R, Yoshida A, Sugamura K, Yamamoto N, and Tanaka Y. Functional CD4 T cells after intercellular molecular transfer of OX40 ligand. *J. Immunol.* 167:875-883, 2001.
32. Takahashi Y, Tanaka Y, Yamashita A, Koyanagi Y, Nakamura M, and Yamamoto N. OX40 stimulation by gp34/OX40 ligand enhancees productive HIV-1 infection. *J. Virol.* 75:6748-6757, 2001.
33. Jacquot S, Macon-Lemaitre L., Paris E, Kobata T, Tanaka Y, Morimoto C, Schlossman F S, and Tron F. B cell co-receptors regulating T cell-dependent antibody production in common variable immunodeficiency: CD27 pathway defects identify subsets of severely immuno-compromized patients. *Int. Immunol.* 13:871-876, 2001.
34. Hanon E, Goon P, Taylor G P, Hasegawa H, Tanaka Y, Weber J N, and Bangham C R M. High production of interferon gamma but not interleukin-2 by human T-lymphotropic virus type-I-infected peripheral blood mononuclear cells. *Blood* 98: 721-726. 2001.
35. Shioda T, Nakayama E, Tanaka Y, Xin X, Lawana-Tachikawa A, Kato A, Sakai Y, Nagai Y, and Iwamoto A. Naturally occurring deletional mutation in the C-terminal cytoplasmic tail of CCR5 affects surface trafficking of CCR5. *J. Virol.* 75: 3462-3468, 2001.
36. Song W, Yahara S, Maeda Y, Yusa K, Tanaka Y, Harada S. Enhanced infection of an X4 strain of HIV-1 due to capping and colocalization of CD4 and CXCR4 induced by capsianoside G, a diterpene glycoside. *Biochem Biophys Res Commun* 283:423-429, 2001.
37. Takasawa N, Ishii N, Higashimura N, Murata K, Tanaka Y, Nakamura M, Sasaki T, Sugamura K, Expression of gp34 (OX40 ligand) and OX40 on human T cell clones. *Jpn J Cancer Res.* 92:377-82, 2001.
- (横田)
38. Yoshizawa, I., Soda, Y., Mizuochi, T., Yasuda, S., Rizvi, T. A., Mizuochi, T., Takemori, T. and

- Tsunetsugu-Yokota, Y. : Enhancement of mucosal immune response against HIV-1 Gag by DNA immunization. *Vaccine*, 6:2995-3003, 2001.
(小柳津)
39. Hosaka, N., Oyaizu, N., Than, S., and Pahwa, S. Correlation of loss of CD4 T cells with plasma levels of both soluble form Fas (CD95) and Fas ligand (FasL) in HIV-infected patients. *Clin. Immunol.* 95:20-25, 2000
40. Tateyama M. Oyaizu N. McCloskey TW. Than S. Pahwa S. CD4 T lymphocytes are primed to express Fas ligand by CD4 cross-linking and to contribute to CD8 T-cell apoptosis via Fas/FasL death signaling pathway *Blood* 96:195-202, 2000
41. Shinohara H. Kayagaki N. Yagita H. Oyaizu N. Ohba M. Kuroki T. Ikawa Y. A protective role of PKCepsilon against TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in glioma cells. *Biochemical & Biophysical Research Communications.* 284:1162-7, 2001
(山本)
42. Takahashi Y, Tanaka Y, Yamashita A, Koyanagi Y, Nakamura M, Yamamoto N. OX40 stimulation by gp34/OX40 ligand enhances productive human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 2001 Aug;75(15):6748-57.
43. Baba E, Takahashi Y, Lichtenfeld J, Tanaka R, Yoshida A, Sugamura K, Yamamoto N. Tanaka Y. Functional CD4 T cells after intercellular molecular transfer of OX40 ligand. *J Immunol.* 2001 Jul 15;167(2):875-83.
44. Ishikawa K, Janssens W, Banor JS, Shinno T, Piedade J, Sata T, Ampofo WK, Brandful JA, Koyanagi Y, Yamamoto N. Canas-Ferreira WF, Adu-Sarkodie Y, Kurata T. Genetic Analysis of HIV Type 2 from Ghana and Guinea-Bissau, West Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2001 Nov 20;17(17):1661-3.
45. Tanaka R, Yoshida A, Murakami T, Baba E, Lichtenfeld J, Omori T, Kimura T, Tsurutani N, Fujii N, Wang ZX, Peiper SC, Yamamoto N. Tanaka Y. Unique monoclonal antibody recognizing the third extracellular loop of CXCR4 induces lymphocyte agglutination and enhances human immunodeficiency virus type 1-mediated syncytium formation and productive infection. *J Virol.* 2001 Dec;75(23):11534-43.
46. Tamamura H, Omagari A, Hiramatsu K, Kanamoto T, Gotoh K, Kanbara K, Yamamoto N. Nakashima H,

- Otaka A, Fujii N. Synthesis and evaluation of bifunctional anti-HIV agents based on specific CXCR4 antagonists-AZT conjugation. *Bioorg Med Chem*. 2001 Aug;9(8):2179-87.
47. Takahoko M, Tobiume M, Ishikawa K, Ampofo W, Yamamoto N, Matsuda M, Tatsumi M. Infectious DNA clone of HIV type 1 A/G recombinant (CRF02_AG) replicable in peripheral blood mononuclear cells. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2001 Jul 20;17(11):1083-7.
48. Tamamura H, Omagari A, Hiramatsu K, Gotoh K, Kanamoto T, Xu Y, Kodama E, Matsuoka M, Hattori T, Yamamoto N, Nakashima H, Otaka A, Fujii N. Development of specific CXCR4 inhibitors possessing high selectivity indexes as well as complete stability in serum based on an anti-HIV peptide T140. *Bioorg Med Chem Lett*. 2001 Jul 23;11(14):1897-902.
49. Handema R, Terunuma H, Kasolo F, Kasai H, Sichone M, Mulundu G, Deng X, Ichiyama K, Mitarai S, Honda M, Yamamoto N, Ito M. Emergence of new HIV-1 subtypes other than Subtype C among antenatal women in Lusaka, Zambia. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2001 May 20;17(8):759-63.
50. Takahashi K, Baba S, Koyanagi Y, Yamamoto N, Takaku H, Kawai G. Two basic regions of NCp7 are sufficient for conformational conversion of HIV-1 dimerization initiation site from kissing-loop dimer to extended-duplex dimer. *J Biol Chem*. 2001 Aug 17;276(33):31274-8.
51. Kusagawa S, Takebe Y, Yang R, Motomura K, Ampofo W, Brandful J, Koyanagi Y, Yamamoto N, Sata T, Ishikawa K, Nagai Y, Tatsumi M. Isolation and characterization of a full-length molecular DNA clone of Ghanaian HIV type 1 intersubtype A/G recombinant CRF02_AG, which is replication competent in a restricted host range. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2001 May 1;17(7):649-55.
52. Owada T, Motomura T, Miyashita-Ogawa Y, Kawada-Homma M, Onishi M, Matondo P, Terunuma H, Numazaki Y, Yamashita S, Yamamoto N. Antibody masking renders HIV-1 resistant to cationic membrane filtration through alteration of its electrostatic characteristics. *J Virol Methods*. 2001 May;94(1-2):15-24.
53. Ueki M, Watanabe S, Saitoh T, Nakashima H, Yamamoto N, Ogawara H. Synthesis and chain length-anti-HIV activity

- relationship of fully N- and O-sulfated homooligomers of tyrosine. *Bioorg Med Chem.* 2001 Feb;9(2):487-92.
54. Ueki M, Watanabe S, Ishii Y, Okunaka O, Uchino K, Saitoh T, Higashi K, Nakashima H, Yamamoto N, Ogawara H. Synthesis and anti-HIV activity of nonatyrosine N- and O1-9-decasulfate. *Bioorg Med Chem.* 2001 Feb;9(2):477-86.
55. Miura Y, Misawa N, Maeda N, Inagaki Y, Tanaka Y, Ito M, Kayagaki N, Yamamoto N, Yagita H, Mizusawa H, Koyanagi Y. Critical contribution of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) to apoptosis of human CD4+ T cells in HIV-1-infected hu-PBL-NOD-SCID mice. *J Exp Med.* 2001 Mar 5;193(5):651-60.
56. Tamamura H, Sugioka M, Odagaki Y, Omagari A, Kan Y, Oishi S, Nakashima H, Yamamoto N, Peiper SC, Hamanaka N, Otaka A, Fujii N. Conformational study of a highly specific CXCR4 inhibitor, T140, disclosing the close proximity of its intrinsic pharmacophores associated with strong anti-HIV activity. *Bioorg Med Chem Lett.* 2001 Feb 12;11(3):359-62.
- (小柳)
57. Kusagawa, S., Takebe Y, Yang R, Motomura K, Ampofo W, Brandful J, Koyanagi Y, Yamamoto N, Ishikawa K, Sata T, Nagai Y, Tatsumi M. Isolation and characterization of full-length molecular DNA clones of Ghanaian HIV-1 intersubtype A/G recombinant (CRF02_AG) which is replication-competent in restricted host-range. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 17, 7, 649-655, 2001.
58. Miura Y, Misawa N, Maeda N, Inagaki Y, Tanaka Y, Ito M, Kayagaki N, Yamamoto N, Yagita H, Mizusawa H, Koyanagi Y. Critical contribution of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) to apoptosis of human CD4+ T cells in HIV-1-infected hu-PBL-NOD-SCID mice. *J. Exp. Med.* 193, 651-659, 2001.
59. Takahashi Y, Tanaka Y, Yamashita A, Koyanagi Y, Nakamura M, Yamamoto N. OX40 stimulation by gp34/OX40 ligand enhances productive HIV-1 infection. *J. Virol.* 75, 6748-6757, 2001.
60. Takahashi K, Baba S, Koyanagi Y, Yamamoto N, Takaku H, Kawai G. Two basic regions of NCp7 are sufficient for conformational conversion of HIV-1 dimerization initiation site from kissing-loop dimer to extended-duplex dimer. *J. Biol. Chem.*, 276, 31274-31278, 2001.
61. Ishikawa K, Janssens W, Banor JS,

- Shinno T, Piedate J, Sata T, Ampofo WK, Brandful J, Koyanagi Y, Yamamoto N, Canas-Ferreira WA, Adu-Sarkodie Y, and Kurata T. Genetic Analysis of HIV Type 2 from Ghana and Guinea-Bissau, West Africa. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 17, 1661-1663, 2001.
(石坂)
62. Mishima Y, Terui Y, Yuko Mishima Y, Misa Katsuyama M, Masaki Mori M, Tomizuka H, Takizawa T, Miyazato A, Ueda M, Yamada M, Hayasawa H, Mizunuma, N, Ishizaka Y, Ikeda K, Kato T, Ozawa K, and Hatake K. A new human myelodysplastic cell line, TER-3: G-CSF specific downregulation of calmodulin-dependent kinase IV. *J Cell Physiol*, in press.
63. Mori M., Terui, Y., Tanaka, M., Ymizuka, H., Mishima, Y., Ikeda, M., Kasahara, T., Uwai, M., Ueda, M., Inoue, R., Itoh, T., Yamada, M., Hayasawa, H., Furukawa, Y., Ishizaka, Y., Ozawa, K., and Hatake, K. Antitumor effect of b2-microglobulin in leukemic cell-bearing mice via apoptosis-inducing activity: activation of caspase-3 and nuclear factor-kB. *Cancer Res.*, 61, 4414-4417, 2001.
64. Shimura, M., and Ishizaka, Y. Inhibition by quercetin of micronuclei formation via Vpr, an accessory gene of HIV. *Recent Res, Devel. Cancer* 3, 1-5, 2001.
2. 学会発表
1. Miura, T., Hosoya, N., Kawana-Tachikawa, A., Shioda, T., Kitamura, Y., Nakamura, T., Nagai, Y., and Iwamoto, A. Comparison between adenovirus and Sendai virus vectors in inducing HIV-1 genes into human dendritic cells. Second International Conference on Vaccine Development and Immunotherapy. San Juan, Puerto Rico. May 22-25, 2001.
2. Nakayama, E.E., Meyer, L., Iwamoto, A., Persoz, A., Nagai, Y., Rouzioux, C., Delfraissy, J.-F., for the SEROCO Study Group, Debre, P., McIlroy, D., Theodorou, I., and Shioda, T. Protective effect of IL4-589T polymorphism on HIV-1 disease progression: Relationship with viral load. 9th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Seattle, U.S.A. Feb. 24-28, 2002
など
- G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特許出願

1. 出願番号：特願 2001-323412

発明の名称：スライドガラスハイブリダイゼーションチャンバ

2. 発明の名称：エピトープ結合 $\beta 2m$ をコードする哺乳動物細胞感染性ウイルス

スペクターおよびその利用

3. 発明の名称：TAP 活性の阻害により MHC class I による外来エピトープの提示を増強する方法

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

HIV 特異的免疫能の評価と強化に関する研究

分担研究者 岩本愛吉 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨

HAART が導入され抗 HIV 薬によるウイルス増殖のコントロールが可能になってきたが、一方で薬剤耐性、副作用の問題があり、HAART に頼らない治療法の開発が待たれる。我々はヒトに病原性を持たないと考えられているセンダイウイルスベクターを用いて抗原提示を増強する治療ワクチンの開発に関する基礎的検討を行い、*in vitro* で効率よく目的の抗原ペプチドを提示させることができた。加えて免疫治療を施行する際に重要な「治療効果の評価」に有用な MHC class I テトラマーの新しい作製法の開発に成功した。

A. 研究目的

HAART により体内のウイルス増殖を非常に低いレベルに抑えられるようになり、AIDS への発症を遅らせることが可能になってきた。しかしながら高価な薬剤を大量に持続的に摂取することは HIV 感染者にとって大きな負担であり、さらに副作用や耐性ウイルスの出現といった問題も深刻である。近年、計画的治療中断(STI)と呼ばれる一時的に治療を中断しまた再開するという治療法が試みられている。STI を何回か繰り返すと HAART をしなくてもウイルス増殖をコントロールできるようになるという報告がある。これは一時的に HAART を中断することによってウイルスの増殖が再開され、その急激で強い抗原刺激により HIV 特異的免疫応答が再活性化され、繰り返すことにより増強され自己の HIV 特異的免疫応答によってウイルスをコントロールできるようになると考えられている。実際に STI は感染初期の

HIV 感染者においては良好な治療成績を収めている。しかし、慢性期の HIV 感染者においては効果が見られていない。慢性期の患者では HIV に対する免疫応答がすでに低下しているため、HIV の一時的な増殖による抗原刺激だけではウイルス増殖をコントロールできるだけの免疫応答を誘導できないと考えられる。

このような事実を背景に、慢性期の HIV 感染者に対してワクチン治療によって HIV 特異的免疫応答を活性化しその後 STI を施行するという「ワクチン+STI」併用療法の効果が期待されるようになってきた。そこで我々は治療ワクチン開発にむけての基礎的検討を行った。

HIV 感染においてはウイルスのコントロールに細胞性免疫が重要な役割を果たしていることが知られているが、細胞性免疫の本体である HIV 特異的 CD8T 細胞が十分に機能していないことを示

唆する報告があり、その原因の一つとして感染細胞の抗原提示が十分でないことが考えられる。実際に HIV の Nef タンパクは抗原提示を行う MHC class I 分子を細胞表面から減少させることが知られている。そこで我々は CD8T 細胞への抗原提示を増強するためのワクチンの開発を試みた。遺伝子導入ベクターとしてセンダイウイルスベクターを用い、目的の抗原ペプチドを MHC class I 上に効率よく提示することを目的として検討を行った。同時に近年開発され抗原特異的 CD8T 細胞の検出に有用な MHC class I テトラマーの作製も行った。

B. 研究方法

本来 MHC class I 分子は heavy chain、 $\beta 2$ ミクログロブリン ($\beta 2m$)、抗原ペプチド (エピトープ) の 3 分子からなる複合体である。本研究では特定の抗原ペプチドを融合した $\beta 2m$ を作製し、heavy chain、エピトープ融合 $\beta 2m$ の 2 分子からなる MHC class I 分子の作製を試みた。膜タンパク質である heavy chain はテトラマー作製のため、膜貫通領域より下流を除去し、分泌型として用いた。heavy chain として日本人の 6 ~ 7 割が持つヒト白血球抗原 (HLA)-A*2402 を用いた。またエピトープとして HLA-A*2402 によって提示されることが知られている HIV-1 Nef138-10 を用いた。まず C 末端にビオチン付加配列 (BSP)、ヒスチジンタグを付加した HLA-A*2402 細胞外領域を発現する SeV (A24-BSPHis/SeV)、N 末端にリンカーを介して Nef138-10 を融合している $\beta 2m$ を発現する SeV (Nef138- $\beta 2m$ /SeV) を各々作製した(図

1)。

1) MHC class I テトラマーの作製

A24-BSPHis, Nef138-10- $\beta 2m$ からなる可溶性 MHC class I 分子、A24/Nef を得るために CV-1 細胞に A24-BSPHis/SeV, Nef138- $\beta 2m$ /SeV をウイルス量比 (m. o. i. 比) を変えて感染させた。培養上清中への A24/Nef の分泌量は heavy chain/ $\beta 2m$ /peptide 複合体を特異的に認識する抗体を用いた酵素免疫測定法 (ELISA) にて測定した。A24-BSPHis/SeV, Nef138- $\beta 2m$ /SeV を重感染することによって得られた可溶性 A24/Nef はヒスチジンタグを用いたアフィニティークロマトグラフィーにて精製し、BirA ビオチン付加酵素を用いて BSP にビオチンを付加した。その後蛍光標識されたストレプトアビジンを用いて多量体化し、A24/Nef テトラマーを作製した。A24/Nef テトラマーを用いて HLA-A24 を持つ HIV-1 感染者と健常人の末梢血単核球を染色し、フローサイトメトリーにて解析した。同時に大腸菌由来の A24/Nef テトラマーを用いて同様の実験を行い感度、特異度を比較した。

2) エピトープ融合 $\beta 2m$ による抗原提示

HLA-A*2402 を持つ B cell line (B-LCL) を、Nef138- $\beta 2m$ /SeV 感染細胞の培養上清、または Nef138-10 ペプチドで 1 時間パルスし、それらを標的細胞として Nef138-10 特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) による ^{51}Cr release assay を行った。また Nef138- $\beta 2m$ /SeV 感染細胞を標的細胞として、同様に ^{51}Cr release assay を行い、Nef138- $\beta 2m$ による抗原提示能を検討した。

3) TAP 阻害剤とエピトープ融合 $\beta 2m$ を

用いた単一抗原提示法

MHC class I分子によって提示される抗原ペプチドは細胞質でタンパク質からプロセッシングされることによって作られ、TAPと呼ばれるトランスポーターを介して粗面小胞体 (ER) へと輸送される。ERでheavy chain, $\beta 2m$ と出会い、MHC class I分子を形成する。一方本研究で使用したエピトープ融合 $\beta 2m$ はTAP非依存性にERに運ばれると考えられるため、TAP阻害剤を同時に遺伝子導入するとエピトープ融合 $\beta 2m$ を高頻度にMHC class I分子に提示させることができると考えられる。このことを証明するためにサイトメガロウイルス (CMV) 由来のTAP阻害剤であるUS6を単独で (US6his/SeV)、あるいはNef138- $\beta 2m$ と共発現するSeV (<Nef138- $\beta 2m$ +US6his>/SeV) を作製し、各々をHLA-A*2402陽性のT cell lineに感染させ、細胞表面上のMHC class I分子の発現量を調べた。US6の効果を確認するために、感染18時間後に酸処理を行うことによって既存の細胞表面MHC class I分子を除去した。その6時間後に新たに細胞表面に発現してきたMHC class I分子を抗HLA-A24抗体で染色することによって、US6の効果を検討した。

C. 研究結果

1) A24-BSPHis/SeV, Nef138- $\beta 2m$ /SeVをm.o.i.比1:1でCV-1細胞に重感染すると、その培養上清にNef138-10を提示する可溶性A24/Nefが効率よく分泌されることが確認された(図2)。その培養上清を用いてA24/Nefを精製した結果、

100mlの培養上清から約1mgという大量のA24/Nefを回収することができた。このようにして得られたA24/Nefを多量体化して得られたA24/Nefテトラマーは大腸菌発現系を用いて作製されたA24/Nefテトラマーと同様の感度、特異度を示した(図3)。

2) Nef138- $\beta 2m$ /SeV感染細胞培養上清でパルスしたB-LCLを標的細胞とした場合も、Nef138- $\beta 2m$ /SeVを感染させたB-LCLを標的細胞に用いた場合もともにNef138-10特異的CTLはCTL活性を示し、高濃度(10 μ M)のNef138-10ペプチドでパルスした場合と同程度のCTL活性であった(図4、標的細胞としてNef138- $\beta 2m$ /SeV感染細胞を用いた場合の結果)。このことよりNef138- $\beta 2m$ はNef138-10と同様の抗原性を有していることが明らかになった。

3) US6his/SeVを感染した細胞では新規の細胞膜表面でのHLA-A24分子の発現が野生株SeV(wt/SeV)感染細胞に比して減少していたのに対して、<Nef138- $\beta 2m$ +US6his>/SeVを感染させた細胞ではHLA-A24分子の細胞表面発現がwt/SeV感染細胞と同程度まで回復していた(図5)。

D. 考察

1) 現在使われているMHC class Iテトラマーの多くは大腸菌の発現系を用いて作製されているが、大腸菌の発現系を用いて作製されたMHC class I分子はin vitroで複合体形成を行う必要があり、その形成効率は10~20%と低く、エピトープによっては複合体形成が不可能なものもある。しかしながら我々の