

ともに、エスケープ変異を克服できるような免疫誘導について検討をすすめる必要がある。

#### E. 結論

この研究は実際の感染症例で中和抗体の選択圧に対して HIV がどのように変異しているのかを明らかにするものである。症例 1,2 は V3 の近傍 C3 の変化が中和抵抗性に関連し、症例 3 では V1 の変化が関連していた。これらの観察は中和抗体を用いた治療法の開発や中和抗体の誘導を目指した治療ワクチンの開発などに重要な示唆を与えるものである。

#### F. 健康危険情報

該当無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ikegawa M., Yuan J., Matsumoto K., Herrmann S., Iwamoto A., Nakamura T., Matsushita S., Kimura T., 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
- 2) 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.
- 3) 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.*, 185:608-607, 2002.

##### 2. 学会発表

- 1) 松下修三:感染症研究の新戦略. 第 25 回阿蘇シンポジウム. 2001.8.25. 熊本県阿蘇町
- 2) 松下修三:overview「免疫応答による HIV 感染・増殖の制御」. 第 49 回日本ウイルス学会学術集会. 総会. 2001.11.18.大阪市.
- 3) 小糸 厚, 重兼弘法, 松下修三:HIV-gag 発現とヒト cyclin-T1 を発現させた小動物細胞における gag 発現、アッセンプリーの解析. 第 49 回日本ウイルス学会学術集会. 総会. 2001.11.18-20. 大阪市.
- 4) 松下修三:抗 HIV 薬の選び方. ～ロピナビル/ε という選択～. 第 15 回日本エイズ学会ランチョンセミナー. 2001.12.1.東京.
- 5) 王 鳳香, 木村哲也, 吉村和久, 小糸 厚, 松下修三: Emergence of autologous neutralization resistant variants from pre-existing quasispecies during viral-rebound of HIV-1 infected patients undergoing HAART. 第 15 回日本エイズ学会学術集会. 総会. 2001.11.29-12.1. 東京.
- 6) 小糸 厚, 重兼弘法, 松下修三:異種細胞 HIV-1 アッセンプリー阻害の解析. 第 15 回日本エイズ学会学術集会. 総会. 2001.11.29-12.1. 東京.
- 7) 木村哲也: HAART 療法前後の抗 HIV-1 中和抗体. 第 15 回日本エイズ学会学術集会. 総会. 2001.11.29-12.1.東京.
- 8) 吉村和久, 木村哲也, 西原久美子, 松下修三: residual replication の新しい指標～高感度プロウイルス DNA(pDNA)の定量と細胞ターンオーバーの測定. 第 15 回日本エイズ学会学術集会. 総会. 2001.11.29-12.1.東京.
- 9) Matsushita S, Kimura T, Nishihara K, Maeda Y, Wang FX, Yoshimura K, Koito A: Autologous isolate neutralizing

- antibodies in plasma from HIV-1 infected patients on highly active antiretroviral therapy. Japan-US Cooperative Medical Science Program 13th Joint Meeting of AIDS Panels. 2001.3.21-23.,Kumamoto.
- 10) Koito A, Shigekane H, Matsushita S: Defects of HIV-1 assembly in murine cells. Japan-US Cooperative Medical Science Program 13th Joint Meeting of AIDS Panels. 2001.3.21-23., Kumamoto.
  - 11) Wang FX, Kimura T, Nishihara K, Yoshimura K, Koito A, Matsushita S: Emergence of autologous neutralization resistant variants from Pre-existing quasispecies during viral-rebound of HIV-1 infected patients under treatment of HAART. 2001 International Meeting of the Institute of Human Virology. 2001.9.9-13 2001. Baltimore, U.S.A
  - 12) Koito A., Shigekane H., Matsushita S: Assembly defects of HIV-1 gag in murine cells. 2nd AIDS Seminar in Kumamoto. 2001.9.20-21 2001
  - 13) Wang FX, Kimura T, Nishihara K, Yoshimura K, Koito A, Matsushita S: Emergence of autologous neutralization resistant variants from Pre-existing quasispecies during viral-rebound of HIV-1 infected patients undergoing HAART. 2nd AIDS Seminar in Kumamoto. 2001.9.20-21, 2001.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

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

活性化 T 細胞サバイバル刺激 OX40-OX40L と HIV-1 感染

分担研究者 田中勇悦 琉球大学医学部附属沖縄・アジア医学研究センター教授

研究要旨

免疫応答活性化補助分子として CD28/B7、CD40/CD40L 以外に OX40/OX40L が注目されてきた。その理由は、活性化 CD4+T 細胞に発現する OX40 と DC やマクロファージ等の抗原提示細胞上の ligand (OX40L) との相互作用が CD4+T 細胞の活性化、分化成熟および増殖に重要な役割を果たすことが分かってきたからである。今回、OX40L で刺激すると、OX40 を発現させた HIV-1 潜伏感染 T 細胞株 (ACH-2/OX40) から多量のウイルス産生が誘導されることを証明した。一方、このような OX40 からのシグナル伝達がある条件下では急激なアポトーシスを誘導するという極めて興味深い事実も見いだした。その結果、HIV-1 産生が著しく抑制された。このような細胞レベルでの HIV-1 産生不稔効果は、HIV-1 感染に対する自然生体防御応答において重要な役割を持つと考えられる。

A. 研究目的

HIV-1 は、増殖の場として活性化 CD4+細胞を必要とする。T細胞の抗原特異的活性化には、補助刺激シグナルが必要である。最近、活性化補助分子として CD28/B7、CD40/CD40L 以外に OX40/OX40L が注目されてきた。その理由は、活性化 CD4+T 細胞に発現する OX40 と DC やマクロファージ等の抗原提示細胞上の OX40L との相互作用が両細胞にシグナルを伝達し、細胞の活性化、分化成熟、増殖に重要な役割を果たすことが分かってきたからである。特に、OX40 からのシグナルが抗原特異的 CD4+T 細胞に Bcl-XL や Bcl-2 を発現させ、その結果、抗原特異的 CD4+T 細胞の長期生存やトラン

ス解除に働くことが明らかにされた。対照的に HIV-1 感染は CD4+T 細胞を枯渇させるが、OX40/OX40L の刺激が HIV-1 感染病態にどのような影響を与えるのか未だに解明されていない。

私たちは、これまでの OX40L に対する特異的単クロン抗体ライブラリーの他に、今回は OX40 抗体ライブラリーの作成を計り、両ライブラリーにおいて、活性阻害抗体および非阻害抗体群、WB 可能抗体群、ELISA 定量用の組み合わせ抗体群を揃えた。また、OX40、OX40L 遺伝子を導入した種々の細胞株を作製した。そこで、これらの研究材料を用いて HIV-1 感染病態において OX40 がどのような役割を果たすのかを *in vitro* の

実験系で検討した。

## B. 研究方法

HIV-1 潜伏感染細胞である ACH-2 細胞に OX40 を導入した ACH-2/OX40 細胞、または OX40 を導入した Molt-4 細胞 (Molt-4/OX40) に HIV-1NL4-3 を感染させた細胞と、OX40L を発現したマウス細胞 (SV-T2/gp34, PFA 固定) とを混合培養し、HIV-1 産生を p24ELISA 定量で、アポトーシスをアネキシン V 染色でモニターした。反応の特異性は抗 OX40 や抗 OX40L 特異的単クローン抗体による阻止効果で判定した。倫理面の配慮は特に問題ないと考えられる。

## C. 研究結果

OX40L で刺激すると、OX40 を発現させた HIV-1 潜伏感染 T 細胞株 (ACH-2/OX40) から多量のウイルス産生が誘導されることを証明した。この反応は、OX40/OX40L どちらの阻害抗体で有意に阻止された。

新たな事実の発見は、ACH-2/OX40 細胞と OX40L を発現するマウス細胞である SV-T2/gp34 細胞との混合培養系に 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ことである。顕微鏡下では、この二重刺激によって ACH-2/OX40 細胞の急激な死滅が観察された。アポトーシスを示すアネキシン V 染色をしたところ、ACH-2/OX40 は TNF または OX40L 単独刺激でも緩慢なアポトーシスを起したが、両刺激では急速に (15 時間以内では

ほぼ 100%) アポトーシスに陥ることが明らかとなった。つまり、ウイルス産生が始まる前に細胞がアポトーシスを起したのである。このような細胞自殺によるウイルス産生防止は、NL4-3 株を急性感染させた Molt-4/OX40 細胞と SV-T2/gp34 細胞との混合培養系で同様に観察された。Molt-4 細胞の場合は、TNF によるアポトーシスの促進効果は観察されなかった。

## D. 考察

最近、私たちは、(1) OX40 を介する刺激が、CD4+T 細胞における HIV-1 の産生的感染を促進すること、(2) B 細胞からの抗体産生に関わること、(3) OX40L (gp34) が CD4+T 細胞に転移して OX40L 陰性細胞を新たに OX40L 陽性細胞に表現形を変え、OX40 陽性細胞刺激効果を示すこと、(4) 培養した EBV 特異的 CD4+T クローン細胞が OX40L を発現することを証明した。また、(5) HIV-1 の第 2 受容体である CXCR4 の ECL-3 に対する刺激が R5 HIV-1 や X4 HIV-1 どちらにも産生促進作用を持つこと、(6) 新たな遺伝的要因による CCR5 発現低下が HIV-1 感染防御に働くことを単クローン抗体を用いた実験で証明した。

今回の研究によって新たに、OX40 からのシグナル伝達がある条件下ではアポトーシス誘導に関与するという新たな事実を発見した。その結果として HIV-1 産生不稔効果が誘導される。つまり、OX40 刺激の効果は両面性をもち、ある場合は HIV-1 感染を促進し、ある場合は抑制すると考えられる。

本研究での観察は、OX40 を発現させた細胞株における特殊な環境下で観察なので、実際に OX40 のシグナルが活性化 PBMC での HIV-1 増殖においてどのような効果を与えるのかを種々の条件下で調べる必要がある。また、hu-PBL-SCID マウスを使った ex vivo ではどうか、次年度の研究テーマである。さらに、日本でキャリアの多い白血病ウイルス HTLV-I は、感染細胞に OX40 ligand(gp34)と OX40 を発現させるが、HIV-1 と HTLV-I 重感染が OX40/OX40L システムをより強力に動かすことも考えられ、この重感染の意義を調べることも研究課題の一つである。HTLV-I の tax を特異的に検出する抗体と FCM における染色方法を確立したのでその準備は整った。

#### E. 結論

OX40 からのシグナル伝達は CD4+T 細胞の活性化を促進するが、ある条件においては全く逆の細胞死を引き起こすことが分かった。後者の場合、OX40 陽性活性化 CD4+T における HIV-1 感染は不稔に終わる。この現象は細胞レベルでの抗 HIV-1 生体防御機構の一つと考えられる。

#### F. 健康危険情報 特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Goon PKC, Hanon E, Igakura T, Tanaka Y, Weber JN, Taylor GP, and Bangham CRM. High frequencies of Th1 type

CD4+ T-cells specific to HTLV-I Env and Tax proteins in patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). Blood 2002, in press

(2) de Jong EC, Vieira PL, Schuitemaker JHN, Tanaka Y, Wierenga EA, Yazdanbakhsh M, Kapsenberg ML. Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell promoting dendritic cells in vitro with diverse Th cell polarizing signals. J. Immunol 168: 1704-1709, 2002.

(3) 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.

(4) 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.

(5) Takahashi Y, Tanaka Y, Yamashita A, Koyanagi Y, Nakamura M, and Yamamoto N. OX40 stimulation by

gp34/OX40 ligand enhancee productive HIV-1 infection. J. Virol 75:6748-6757, 2001.

(6) 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.

(7) 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.

(8) 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.

(9) 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.

(10) 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.

## 2. 学会発表

(1) 吉田篤司、高橋良明、田中礼子、田中勇悦 hu-PBL-SCID マウスにおけるヒト型抗 HIV-1 免疫応答の誘導 第31回日本免疫学会総会・学術集会記録 p114、平成13年12月11-13日(大阪)

(2) 高橋良明、吉田篤司、田中礼子、田中勇悦 hu-PBL-SCID マウスの HTLV-I 感染 第31回日本免疫学会総会・学術集会記録 p115、平成13年12月11-13日(大阪)

(3) 馬場英司、高橋良明、吉田篤司、田中礼子、ジュリアン・リヒテンフェルド、片野光雄、山本直樹、菅村和夫、田中勇悦 Ligand-dependent intercellular molecular transfer of OX40 is preferentially mediated by an alternative modified OX40-related glycoprotein. 第31回日本免疫学会総会・学術集会記録 p303、平成13年12月11-13日(大阪)

(4) 田中勇悦、吉田篤司、田中礼子、馬場英司、山本直樹 抗 CXCR4 単クローン抗体によるリンパ球凝集と HIV-1 感染促進 第31回日本免疫学会総会・学術集会記

録 p311、平成13年12月11-13 (大阪)

- (5) 田中勇悦 ヒト末梢血単核球移植スキッドマウスを用いた HIV-1 感染モデルの確立と HIV-1 感染免疫応答の誘導 第15回日本エイズ学会集会・総会抄録 平成13年11月29日-12月1日 (東京) 学会誌3巻4号 p256, 2001.
- (6) 高橋良明、吉田篤司、田中礼子、田中勇悦 個体における HIV-1 と HTLV-I 重感染モデル作製の試み 第15回日本エイズ学会集会・総会抄録 平成13年11月29日-12月1日 (東京) 学会誌3巻4号 p340, 2001.
- (7) 山本直樹、横山成、田中勇悦、田中礼子、広瀬国孝、谷中幹郎、黒崎直子、高久洋、小柳義夫、市山浩二 A duodenally absorbable CXCR4 antagonist, KRH-1636, exhibits a potent and selective anti-HIV-1 activity in vivo and in vitro. 第15回日本エイズ学会集会・総会抄録 平成13年11月29日-12月1日 (東京) 学会誌3巻4号 p425, 2001.

### 研究要旨

HIV-1 gp120によるCD4分子との相関を介する機能的CD4T細胞アポトーシス誘導の系でこのシステムにて明らかにした Fas・Fas ligand(FasL)分子相関に基づく細胞死誘導に加え TNF-related apoptosis inducing ligand(TRAIL)の関与を検討、解析した。正常人末梢血単核球(PBMC)を抗CD4抗体を用いてCD4分子の架橋形成(CD4XL)をもたらすマクロファージ依存性に誘導されるCD4+T細胞アポトーシスの実験系および純化したT細胞を(マクロファージの非存在下で)CD4XL後、固層化したCD3抗体で刺激によって惹起されるCD4+およびCD8+T細胞のアポトーシス誘導の系において抗TRAIL中和抗体の添加によるそれぞれの系におけるアポトーシス誘導への影響を検討した。アポトーシスの定量はannexin V結合法を利用しCD8、CD3、CD14の表面マーカーとの染色を組み合わせ各サブセットにおけるアポトーシス誘導をフローサイトメトリーを用いて評価した。結果は上記両者の系において抗TRAIL中和抗体は投与量相関をもってT細胞アポトーシス誘導を有意に抑制した。その抑制効果は抗FasL中和抗体に比べCD4+T細胞アポトーシス誘導に関しては弱かったがCD8T細胞アポトーシス抑制作用は抗FasL中和抗体よりも強い抑制効果を認めた。CD4XLにより一過性のTRAIL発現をCD4+T細胞およびマクロファージに観察した。HIV感染者の個体内で観察されるHIV非感染細胞の機能的T細胞アポトーシス誘導のモデルであるCD4XLの系においてFas/FasL相関のみならずTRAILも関与していることを明らかにした。これらの結果から機能的T細胞アポトーシスを抑制し抗ウイルス免疫の破壊を防止するためにもFasL、TRAILを含めたTNFスーパーファミリーに属する分子群の制御が肝要であることが示唆される。

#### A. 研究目的:

HIV感染症におけるCD4T細胞減少機序を説明する機序としてin vitroにおけるCD4架橋形成(CD4XL)誘導性CD4T細胞アポトーシスの系を開発してきた。このシステムにおいてFas/FasL分子相関がT細胞アポトーシス誘導にて作動している証左を得てきたがTRAILの関与は未検討であった。CD4XLによるTRAIL誘導の有無を含めこの系においてTRAILがどのような役割を果たしているかを解析、検討するのが目的である。

#### B. 研究方法

##### (1) 細胞およびCD4架橋形成:

【PBMC CD4XL】正常人よりFicollで分離したPBMCをA) gp120 (HTLV-III451感染細胞培養上澄みより精製、10・g/1x10<sup>6</sup> cells)、4° C、1時間処置後、抗gp120を固層化したプレート上へあるいはB) 抗CD4抗体(Leu3a, 5・g/1x10<sup>6</sup> cells)4° C、30分処置後、goat anti-mouse Ig (GAM)を固層化したプレート上へ細胞を移し37° Cにて培養した(CD4XL)。

【PBT CD4XL+CD3】またマグネティック



ビーズにより純化した T 細胞 (PBT) を上記と同様に CD4XL 後、固層化した CD3 抗体で 37° C にて培養した。

### (2) TRAIL 発現の解析

細胞を一定時間培養後

FITC-CD8/PE-strept+biotynylated

TRAIL/PerCP-CD3 または

FITC-CD3/PE-strept+biotynylated

TRAIL/PerCP-CD14 にてフローサイトメリーにて 3 color analysis を試みた。

### (3) TRAIL 中和抗体によるアポトーシス阻止効果の解析

PBMC を CD4XL また T 細胞を純化 (PBT)、CD4XL 後固層化した抗 CD3 抗体上で培養 (CD4XL/aCD3) いずれの系においても表示した抗体

(a-TRAIL:RIK-2, a-CD95L:4H9, mgG: control mouse Igs) を表示量添加、72 時間後細胞を回収 Annexin V/CD8/CD3 の 3 color analysis CD3+CD8- (CD4+T 細胞)、CD3+CD8+ (CD8T 細胞) にそれぞれ gate をかけ Annexin V 結合%によりそれぞれのアポトーシス誘導をフローサイトメリーにより評価した。

(倫理面への配慮): 当該研究ではボランティアから採取された末梢血を材料として細胞機能解析を加えた研究であり倫理面で抵触する要素はない。

## C. 研究結果:

### 1. CD4XL は TRAIL 発現を誘導する

ビオチン化した TRAIL 抗体を用いたフローサイトメリーによる解析により CD4XL 処置後 2 時間から 4 時間の間に CD4+T 細胞 (CD3+CD8-) およびマクロファージ (CD14+) 一過性の TRAIL 発現を観察した。

### 2. TRAIL 中和抗体はアポトーシス阻止効果を

有する

【PBMC CD4XL】の系および【PBT CD4XL +CD3】の系の両者において抗 TRAIL 中和抗体の T 細胞アポトーシスに対する効果を検討した。結果は、【PBMC CD4XL】の系および【PBT CD4XL+CD3】の系の両者において抗 TRAIL 中和抗体が投与量相関をもって有意に T 細胞アポトーシスを抑制した。その阻止効果は【PBMC CD4XL】および【PBT CD4XL +CD3】における CD4+T 細胞アポトーシスに対しては抗 CD95L 抗体よりも弱かったが興味深いこと【PBT CD4XL+CD3】の系においてはその CD8T 細胞アポトーシス抑制効果は CD4+T 細胞よりもより顕著でありまた抗 CD95L 抗体と同等の阻止効果を認めた。アインタイプコントロール抗体にはいかなる効果も認めなかった。

## D. 考察

分担研究者は PBMC を固層化した抗 gp120 抗体上で培養し CD4 分子の架橋形成 (CD4XL) を誘導することによりマクロファージ依存性に CD4+T 細胞選択的アポトーシスを誘導する実験系を確立 (Blood、1993) 【PBMC CD4XL】; 同処置により IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  産生が誘導されこの両者の作用により CD4+, CD8+T 細胞の両者に Fas 抗原発現が誘導される (Blood、1994)、TNF- $\alpha$  産生阻害剤は Fas 発現を抑制し CD4XL 誘導性 CD4+T 細胞アポトーシスを抑制する (Blood、1996); CD4XL にてマクロファージに FasL が誘導され Fas を高発現している T 細胞との細胞接触にて Fas-FasL 相関依存性に CD4+T 細胞アポトーシスが誘導される (J. Immunol. 1997); CD4XL により CD4+T 細胞選択的に Bcl-2 発現の低下が誘導される (Blood、1997); 等の一連の事象を明らかにしてきた。最近においては純化した T 細胞を (マクロファージの非存在下で) CD4XL 後、固層化し

た CD3 抗体で刺激することにより CD4+T 細胞自身が Fas および FasL を発現、CD4+T 細胞相互のアポトーシス誘導のみならず細胞接触依存性に CD8T 細胞のアポトーシスを誘導する;いわば CD4CTL 誘導現象を見出した (Blood, 2000)【PBT CD4XL+CD3】。

上記に述べた CD4XL システムはいずれも Fas・FasL 相関を抗体で遮断することにより T 細胞アポトーシスが阻止されるためこの相関がアポトーシス誘導に関与していることは明らかであるがその阻止効果は完全ではなく他の分子相関も関与している可能性が示唆された。そこで今年度は FasL と同じ TNF スーパーファミリーに属するアポトーシス誘導分子 TRAIL(TNF-related apoptosis-inducing ligand)の関与につき検討を加えた。今回の観察結果は HIV 感染症における非感染 T 細胞の機能的アポトーシス誘導につき Fas のみならず TRAIL を含めた TNF スーパーファミリーが密接に関与していることを示すものである。有効な CD8T 細胞アポトーシスを阻止し CTL をもたすためにも TNF 系分子の過剰発現を抑える観点での治療法の導入が必要であると考えらる。

#### E. 結論

HIV 感染者の個体内で観察される HIV 非感染細胞の機能的 T 細胞アポトーシス誘導のモデルである CD4XL の系において Fas/FasL 相関のみならず TRAIL も関与していることを明らかにした。これらの結果から機能的 T 細胞アポトーシスを抑制し抗ウイルス免疫の破壊を防止するためにも FasL、TRAIL を含めた TNF スーパーファミリーに属する分子群の制御が肝要であることが示唆される。CD4T 細胞減少・細胞死誘導の機序解析は AIDS 発症病理の基幹をなす問いでありその機序の詳細にさらにせまる成果を挙げ得たと考える。

#### F. 健康危険情報

材料は健康人末梢血でありバイオハザードの面から問題となる要素はない。

#### G. 研究発表

##### (1) 発表発表論文リスト

1. 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
2. Hosaka N. *Oyaizu N.* Than S. Pahwa S. Correlation of loss of CD4 T cells with plasma levels of both soluble form Fas (CD95) Fas ligand (FasL) in HIV-infected infants. *Clinical Immunology.* 95:20-5, 2000
3. Shinohara H. Yagita H. Ikawa Y. *Oyaizu N.* Fas drives cell cycle progression in glioma cells via extracellular signal-regulated kinase activation. *Cancer Research.* 60:1766-72, 2000
4. Tomimori Y. Ikawa Y. *Oyaizu N.* Ultraviolet-irradiated apoptotic lymphocytes produce interleukin-10 by themselves. *Immunology Letters.* 71:49-54, 2000
5. 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

6. Tateyama M. *Oyaizu N* CD4 cross-linking induced T cell apoptosis in PBMC is dependent

not only CD95/CD95L interaction but also utilizes TRAIL. (*manuscript in preparation*)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし。

## 発症防止ワクチン開発のための基礎研究

分担研究者 志田壽利(北海道大学遺伝子病研究所)

研究要旨 SIVmac239 感染猿を逆転写酵素阻害剤である PMPA で治療しつつ、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。rev-env と gag-pol を発現するライブラリーワクチンは猿体内の SIV の増殖を修飾した。しかし、完全に増殖を抑制することはできなかった。感染4週間後から短期間の PMPA 投与は投与中止後も viral load を押さえ続ける効果を示した。

### A. 研究目的

HIV 感染者への HAART 療法の限界を乗り越える方法として計画的中断療法(STI)が試みられるようになった。しかし、STI は急性感染期の患者に対して有効性が認められるものの、慢性感染期の患者には無効とされている。さらに何度も抗エイズ薬を中断することによる耐性ウイルス出現の懸念もある。STI に代わるものとして、HAART 療法被治験者へのワクチン接種があげられる。ワクチンによる免疫増強によって、HAART 中止後もウイルスを抑え続けることを期待するものである。我々はヒトへの応用の前提とするために、猿と SIV の系で研究を立ち上げた。

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(SIV)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、かつクアジスピリスとして存在する。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オーダーメイド DNA ワクチンを本研究において試みる。本方法の特徴は、個々の感染者の HIV(SIV)の抗原性を調査する労力を省略し、かつ抗原混合物としてのワクチンでクアジスピリスとして存在する HIV(SIV)の抗原多様性に対抗しようとするものである。

今回は SIV 感染猿におけるワクチン効果の途中経過を報告する。

### B. 研究方法

プラズミドと細胞:我々が作製したサイトメガロウイルスのプロモーターを持つ pJW322, SIV ゲノムの全長を有する pSIVmac239 を用いた。Rev-env 領域、gag-pol 領域を CMV promoter のもとに発現する plasmid を作成した。HeLa 細胞は RPMI1640, 10% FCS 中で培養した。SIV 感染猿:SIVmac239 を赤毛猿または蟹喰いザルに感染させて P3 の条件で飼育した。感染後の各時期に血液を採取して、クエン酸をもちいて血漿を調製した。採血に際しては、麻酔を施した。

発現ライブラリーの構築:SIV 感染1週間後または4週間後の猿の血漿から QIAGEN の viral RNA isolation kit を用いて SIV の RNA ゲノムを抽出した。ランダムプライマーを用いて逆転写反応を行った後で nested-PCR によって rev-env 領域と gag-pol 領域を増幅した。増幅後、上記のプラズミドに組み込んだ。この発現ライブラリーが Env と Gagたんぱくを生産することを HeLa 細胞に transfection する事によって確認した。

SIV 感染猿の PMPA 処理:蟹喰い猿に SIV を 300 monkey infectious dose の SIV を感染後、30mg/Kg/day の PMPA を1日1回投与した。

ワクチン接種:上記に作成した発現ライブラリーを 500ug ずつ筋肉注射した。ワクチン非接種群として

pJW322 を注射した。

体内ウイルス量の定量: 感染猿の血漿からゲノム RNA を抽出し、ABI PRISM7700 を用いて Taqman PCR 法によってウイルスのコピー数を測定した。検出限界は 500 コピー/ml であった。

## C. 研究結果

本研究はドイツ霊長類センターの Hunsmann 博士と国立感染研霊長類センターの向井鏠三郎博士との共同研究である。

### 1. Hunsmann 博士との研究結果

#### 実験のアウトライン

赤毛猿 10 匹に SIVMac239 を感染させて 1 週間後に、逆転写阻害剤である PMPA を 1 日 1 回毎日投与し始め、感染 5 週間後までの 4 週間続けた。猿 5 匹に感染 2 週後に rev-env と gag-pol 発現 plasmid を 500ug ずつ接種した。また、投与開始直前に採血した血漿から SIV ゲノムを抽出して、PCR 法によって gag-pol 領域と rev-env 領域を増幅した。そして CMV promoter の下流に連結して発現ライブラリーを作製した。この発現ライブラリーをプラズマ採取猿に、感染 4 週間後に筋注した。Taqman PCR 法によって血漿中のウイルス RNA 量を定量した。

#### 体内ウイルス量

感染 1 週間後にウイルス量は約  $1 \times 10^5$  コピー/ml を示した。PMPA 投与後急速に減少したが、検出限界以下になる群と  $10^3$  コピー/ml 前後の SIV が検出される群に分かれた。コントロール群においては PMPA に効果が不完全であった猿で、PMPA 中断後  $10^5$ – $10^6$  コピー/ml にまで rebound が起こった。検出限界以下の猿では rebound したウイルス量は低く  $10^2$ – $10^4$  コピー/ml を推移した。他方、ワクチン接種群では PMPA の効果はやや弱く全頭からウイルスは検出された。PMPA 投与中断後の rebound ウイルスの出現は遅れる傾向にあり、かつ PMPA の効き方と rebound ウイルス量とに相関が見られなかった。特に 1 頭においては、PMPA の効果が十分

でないにもかかわらず rebound が見られなかった。さらに、ウイルス量は観察期間中下がり続けた。この結果は、ワクチンは SIV の rebound を完全には抑制できなかったが、体内ウイルスの複製様式を変化させたことを示唆している。

## 2. 向井博士との研究結果

#### 実験のアウトライン

蟹喰い猿 4 匹に SIVMac239 を感染させて 4 週間後に、逆転写阻害剤である PMPA を 1 日 1 回毎日投与し始め、感染 12 週間後までの 8 週間続けた。また、投与開始直前に採血した血漿から SIV ゲノムを抽出して、PCR 法によって gag-pol 領域と rev-env 領域を増幅した。そして CMV promoter の下流に連結して発現ライブラリーを作製した。この発現ライブラリーをプラズマ採取猿に、感染 7, 10, 14 週間後に筋注した。また、他のコントロールとして感染猿を PMPA で治療することなく観察した。

#### 体内ウイルス量

感染 2 週間後にウイルス量はピークになり、 $2 \times 10^5$ – $5 \times 10^6$  コピー/ml の値を示した。PMPA 投与後ウイルス量は速やかに減少し、3 週間後には全ての猿からウイルスが検出できなくなった。感染 7, 10 週間後のワクチン接種によってウイルスの増加は見られなかった。しかし PMPA 中止 2 週間後すべての猿でウイルスの rebound が見られた。その後 40 週追跡したところウイルス量は  $1 \times 10^3$ – $1 \times 10^5$  /ml 存在した。上述のウイルス量の体内変化にワクチン接種群と非接種群間で差は見られなかった。他方 PMPA 非投与群ではウイルスは観察期間の間  $1 \times 10^5$ – $6 \times 10^6$  /ml 存在し続けた。PMPA 投与群と 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。

## D. 考察

Hunsmann 博士との共同研究で示された PMPA+ワクチン療法が体内 SIV の増殖を修飾した結果は、完全に増殖抑制に成功していないにもかかわらず、ワクチンと実験系の改良による今後の成功を示唆している。つま

り本実験が、ワクチンによって既に感染している SIV の増殖に影響を与えうることを示したからである。しかし、より強い免疫誘導のために、アジュバントの改良とウイルスベクターの利用の検討が必要である。

猿における本実験は急性感染期における PMPA+ワクチン療法であり、既に人で STI の結果が出始めてる現在においては意味がないと指摘がある。しかし、慢性感染期に効果がない STI に代わる方法としての HAART+ワクチン療法に向けて示唆に富む研究であると考えられる。実験期間の短縮と、直裁に人で試みられないことを考慮するならば、SIV-猿における急性感染期で抗エイズ薬+ワクチン療法の効果を確認する事はまず最初に行うべきことである。

我々の試みている order made ワクチンは、感染者個々のウイルスを調査することなく、体内ウイルスのポピュレーションを反映した抗原混合物で免疫することによって体内ウイルスのクアジスピーシスに対抗しようとするものである。体内ウイルスを調査した上で代表的なウイルスの抗原エピトープで免疫しようとするものとは考えが根本的に異なる。

抗エイズ薬として PMPA 単独投与が不十分であるとの指摘がある—耐性ウイルスの速やかな出現の可能性、慢性感染期におけるウイルス抑制効果の不十分さ等。最近 HU+ddi+PMPA の組み合わせによる良好な SIV 抑制結果が報告されている。今後検討すべき組み合わせである。

感染4週過ぎてからでも抗エイズ療法を開始すれば、短期間の療法ではあっても、その後のウイルス増殖を一定抑え続けることが分かった。このことは HIV 感染を心配する人への具体的な対処法を示唆している。

## E. 結論

1. rev-env と gag-pol を発現するライブラリーワクチンは猿体内の SIV の増殖を修飾した。しかし、完全に増殖を抑制することはできなかった。

2. 感染4週間後から短期間の PMPA 投与は投与中止後も viral load を抑さえ続ける効果を示した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

張陔峰、安田二郎、志田壽利: Therapeutic order made DNA vaccine for rhesus macaques during short-term antiretroviral therapy (ART) early SIV infection. 第15回日本エイズ学会 (2001) 東京

## H. 知的財産権

なし

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

コレセプターを介した感染阻害の研究

分担研究者 山本 直樹 東京医科歯科大学

研究要旨

昨年新規に見い出した、非ペプチド性低分子 CXCR4 阻害物質である T-1636 の構造活性相関と動物における副作用発現を中心に研究を行った。T-1636 誘導体を用いてその構造と抗 HIV-1 活性、または SDF-1 $\alpha$  結合阻害活性との相関を検討した。さらにラットを用い T-1636(メシル酸塩)の毒性試験を行った。1g/kg/day を4週間連日投与というかなり厳しい条件にもかかわらず、病理組織学的検査の結果、とくに問題となる変化は少なかった。以上の結果をもとに今後の候補薬の絞り込みを進めた。

A. 研究目的

限定的とはいえ HAART が HIV 感染症の治療や延命に果たした役割は大きい。ただ、ウイルスの酵素を標的とした逆転写酵素阻害剤(RTI)、プロテアーゼ阻害剤(PI)では、HIV の易変異性に耐えられない。そこで新たな薬剤が期待されているが、中でも変異しにくいと考えられる細胞側因子の一つ、コレセプター、を介した感染阻害薬はその最大の候補といえる。これまで CXCR4 antagonist としては T22、AMD3100 などが、一方 CCR5 antagonist としては TAK703 などが報告されているが、化合物の持つ化学的性状からいずれも内服にはたえない。そこで本研究では内服可能なコレセプター阻害剤の開発を目的として研究を行った。

B. 研究方法

1. T-1636(メシル酸塩)のラットを用いた毒性試験

T-1636 投与群と対照群各 6 匹を用いた。薬物投与は 1000mg/kg/day による、強制経口投与を

行った。ラットは Clea 社より購入した。

2. T-1636 およびその誘導体、AMD3100 呉羽化学工業研究所広瀬氏より提供された。

3. 抗 HIV アッセイ

正常人末梢血リンパ球(PBMC)を Ficoll-Conray 法にて分離後、固相化 anti-CD3/anti-CD28 moAb により刺激し、IL-2、RPMI-1640 プラス 20%FCS 存在下で培養した。6 日目に HIV-1(NL4-3)を moi 0.001 にて 3 時間吸着を行った後、遠心にてウイルスを除き、薬剤を加えた。さらに 3 日間の培養を続け、上清中の p24 活性を測定した。

4. SDF-1 $\alpha$  結合試験

種々のコレセプターを発現する HOS 細胞は RPMI-1640 プラス 10%FCS で培養した。HOS 細胞に発現させた CXCR4 に対し、<sup>125</sup>I ラベル SDF-1 $\alpha$  を用いることでその結合を検討した。

(倫理面への配慮)

試験管内の実験が主であること、すでに樹立され実験にも頻用されている細胞株を用いていること、また動物実験もワシントン条約を遵守していることから、特に倫理的に問題となるような内容は含まれていないと考えられる

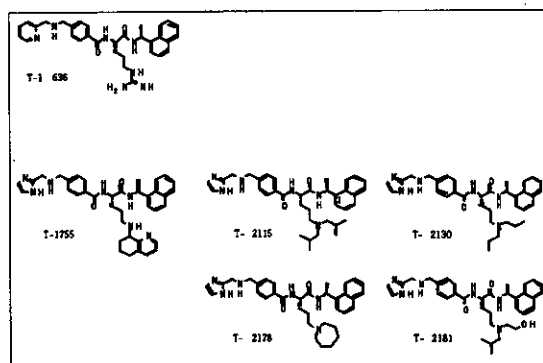
### C. 研究結果

#### 1. T-1636 (メシル酸塩) のラットを用いた毒性試験

病理組織学的検査の結果、被験物質投与による影響として、腎臓の近位尿細管上皮好酸性小体沈着が 5 例中 5 例全例にみられた。これは、T-1636 と  $\alpha$ 2ミクログロブリンが結合し、好酸性小体が形成されたものと考えられた。この所見は雄ラットに特有な変化であり、変異原性のない物質はであることが分かった。その他、腎臓の腎盂拡張、限局性好塩基性尿細管が観察されたが、これは対照群にもみられた所見であるため、T-1636 による影響ではないと考えられた。さらに臓器重量において、胸腺および脾臓の有意低下がみられた(それぞれ26%、25%)が、病理組織学的検査において特に異常はみられなかった。

#### 2. T-1636 誘導体を用いた抗 HIV-1 活性と構造活性相関

T-2115, T-2130, T-2178, T-2181 と名づけた 4 種の誘導体(図 1)を用いて抗 HIV-1 活性を比較した。その結果、EC<sub>50</sub>( $\mu$ M)値は T-2181=0.0105、T-2115=0.0155、T-2130=0.0185、T-2178=0.0742 であり、EC<sub>90</sub>もこの順であった。



### 3. SDF-1 $\alpha$ 結合阻害活性

AMD3100 を陽性対照として 4 種の誘導体の SDF-1  $\alpha$  結合阻害活性を比較検討した。それぞれの薬物で 10, 1, 0.1, 0.01  $\mu$ M で検討を行った。その結果、阻害率 (0.1  $\mu$ M, 0.01  $\mu$ M) は AMD3100(71.4%, 9.5%), T-2115(101.4%, 75.6%), T-2130(98.0%, 68.2%), T-2178(89.3%, 46.9%), T-2181(90.6%, 44.0%)であった。

### D. 考察

病理組織学的検査の結果、被験物質投与による影響として、腎臓の近位尿細管上皮好酸性小体沈着が 5 例中 5 例全例にみられたが、この所見は雄ラットに特有な変化であった。しかしこれまで変異原性のない物質はヒトに対する毒性学的な危険性はないとされていることから、問題となる可能性は少ないと考えられた。その他、腎臓の腎盂拡張、限局性好塩基性尿細管は対照群にも観察されている所見であるため、T-1636 による影響ではないと考えられた。今回は 1000mg/kg/day という大量の T-1636 で 4 週間の連続投与でもさほどの問題がなかったことは実用化されたときの副作用の点からみてもかなり期待のできる結果ととらえてよいと考える。ただ今回は、経口投与後の血清中の抗 HIV 活性については検討していないので、今後はその点に焦点をお



いて解析を進める必要があると考えられる。

T-1636 誘導体を用い抗 HIV-1 活性と SDF-1  $\alpha$  結合阻害活性を測定し、構造活性相関を検討した。T-2115, T-2130, T-2178, T-2181 と名づけた 4 種の誘導体を用いて抗 HIV-1 活性を比較した。その結果、EC50( $\mu$ M) 値は T-2181=0.0105、T-2115 = 0.0155、T-2130 = 0.0185、T-2178 = 0.0742 であり、EC90 もこの順であった。

SDF-1  $\alpha$  結合阻害活性試験においては、AMD3100 を陽性対照として 4 種の誘導体の SDF-1  $\alpha$  結合阻害活性を比較検討した。それぞれの薬物で 10, 1, 0.1, 0.01  $\mu$ M で検討を行ったが、本研究から明らかになったことは抗 SDF-1  $\alpha$  活性は抗 HIV-1 活性と相関しないということであった。このことはこれらの薬物の作用機序を解明する上で重要な所見であると考えられた。今後は HIV-1 の結合に関わる部位を含むいくつかの抗 CXCR4 mAb を用いて、誘導体によるその結合阻害についても検討する予定である。SDF-1  $\alpha$  結合阻害活性試験においても一つの興味ある知見は、AMD3100 では 0.1  $\mu$ M と 0.01  $\mu$ M との間で阻害活性の急激な低下がみられたのに対し、われわれの誘導体では 4 種の誘導体とも低濃度においても強い阻害活性を有していたという事実である。この点についても今後検討を続ける予定である。

#### E. 結論

現在、AMD3100 や T22、TAK703 などの臨床応用が進められており、新しい作用機序の抗 HIV-1 薬として期待されている。AMD3100 は米国でフェーズ 2 まで進んだにもかかわらず、副作用のために脱落したということである。本当に薬を作ることの厳しさを感じる。本研究では、内服

可能な CXCR4 antagonist のリード化合物を見いだしたので、実用化をめざして、今後も最適化合物の絞り込みに総力を結集したい。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1: 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.

2: 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.

3: 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.

4: 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.
- 5: 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.
- 6: 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.
- 7: 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.
- 8: 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.
- 9: 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.
- 10: 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.
- 11: 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.
- 12: 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.
- 13: 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.
- 14: 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.

15: 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.

## 2. 学会発表

1:N.Yamamoto et al., A duodenally absorbable CXCR4 antagonist, KRH-1636, exhibits a potent and selective anti-HIV-1 activity in vivo and in vitro. 第15回日本エイズ学会集会(東京)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

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 感染前期過程の解析に関する研究

分担研究者 小柳義夫 東北大学大学院医学系研究科教授

研究要旨

昨年度までの研究によりウイルス粒子が侵入後の前期過程において逆転写酵素により生成されたウイルス DNA の核内移行ならびにインテグレーションを測定できる実験系が確立した。そして本年度はインテグレース、マトリックス、VPR などのウイルス蛋白質とウイルス DNA の複合体である 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 時間後に細胞質分画より PIC を抽出した。われわれの PIC 抽出液は生細胞内にマイクロインジェクションにより注入すると GFP 蛋白質を発現することより細胞質から核内に移行し、さらに蛋白質を発現する活性を有することを確認した。そしてこの PIC の外来 DNA への試験管内インテグレーション能、あるいはジギトニン処理により抽出した細胞核に対する核内染色体へのインテグレーション能を測定する方法を開発した。その結果、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。後者の抽出細胞核内の染色体 DNA へのインテグレーション能は核膜孔複合体に対する阻害剤である wheat germ agglutinin の添加により強力に抑制されたことより、この PIC の核内移行の特異性は確認された。これらの結果から HIV が感染後 PIC を形成し核内に移行、そして、染色体にインテグレーションされるまでの移行効率は極めて悪いことがわかった。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。

A. 研究目的

エイズ発症抑制のため、HIV 増殖の分子メカニズムを解明する。本研究はこのウイルスの増殖の前期過程に焦点を絞る。その理由はこの過程においては、ウイルス遺伝子数は細胞あたり非常に少なく、制御可能と考えるからである。そして、薬剤開発ならびに遺伝子治療のための基礎的知見を得

る。とくに今回の研究目的はウイルスが細胞に侵入後、インテグレーションに到るまでに必要なウイルスと細胞蛋白質の複合体である preintegration complex(PIC)の機能解析を行なう。

B. 研究方法

細胞：HTLV 陽性 CD4 陽性細胞株である MT-4 細胞とヒト付着細胞である 293T 細