

## 7. SAIDS 脳炎発症動物モデルを用いたワクチン開発に関する研究

分担研究者 向井 鎌三郎 国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター 室長

研究協力者 菊池 俊彦 国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター  
中島 典子 国立感染症研究所感染病理部 主任研究官  
原 正幸 国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター

研究要旨 世界的なエイズの蔓延とともに発症の予防・治療法の開発が待たれている。HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) 療法を行っても、エイズ脳炎の発症を見る場合があり、患者の QOL の観点からもその発症機構の解明は必須である。T細胞指向性 SIVmac239 接種によってエイズ脳炎を発症したカニクイザル脳組織から、モノサイト系 SIV 産生細胞株 2 株 (CM1,CM5) を樹立した。この CM 細胞株の諸特性と CM 細胞が由来したサル脳炎組織の病理組織学的解析結果とを合わせて考察することにより、SIV を産生する CM 様細胞の集簇巣が脳血管周囲に形成されることがエイズ脳炎発症病因の一つであるという可能性を示唆してきた。今回、CM 細胞 2 株が産生する SIV (SIVcm1, SIVcm5) を試験管内でサル骨髄細胞に感染させることにより、CM 様細胞のコロニーが形成され、試験管内で分裂増殖した。培養上清中には SIVcm の産生が確認されたので、脳炎発症脳血管周囲に形成される CM 様細胞の集簇巣の由来は、骨髄細胞である可能性が示唆された。今後、CM 細胞の成因とその無限増殖性獲得機序に関して解析を行う。また、試験管内で SIVcm 感染骨髄系細胞が増殖するので、 $10^8$  個レベルの感染自己細胞が容易に調整でき、理研大野らが自家ガンワクチン用に開発したアジュバント (特許) を用いた、有効かつ安全な抗エイズ自家ワクチン作成のための基礎的技術の一部を確立した。

### A. 研究目的

世界的なエイズの蔓延とともに最近ではアジア、アフリカ大陸にもその流行がみられ、HIV の感染予防とともにエイズ発症の予防・治療法の開発が待たれている。複数の抗エイズ薬を同時投与する HAART (Highly Active Anti Retroviral Therapy) 療法により、患者の延命を期待できるようになったが、依然として、耐性ウイルスやリポジストロフィーなど薬物の副作用が問題となっている。また、投薬により、中枢神経系、脳脊髄液中のウイルス量を低下させる薬剤は AZT と我々の報告した 6-CI-ddG を含めてもまだ少ない (1-6)。

エイズ脳炎・痴呆症は HIV 感染者のうち約 30%に見られ HIV 感染に特徴的である。

従って、サルエイズ脳炎発症モデルの開発とそ

の発症機構の解明は、HIV 感染とその予防にとって重要な意義をもつ。

T細胞指向性 SIVmac239 接種によってエイズ脳炎を発症した 2 頭のカニクイザル脳組織から、モノサイト系 SIV 産生細胞株 2 株 (Cerebral Monocytic cells; CM1, CM5) を樹立した。

この CM 細胞 2 株はいずれも Mf 様細胞表面抗原及び Mf、モノサイト系エステラーゼを持ち、CD4 陰性で SIV を産生する無限増殖性細胞であり、エイズ脳炎発症サル脳炎組織を構成する Mf 系細胞に多くの類似点を持つ (図 1)。この CM 細胞の諸特性と CM 細胞が由来したサル脳炎組織の病理組織学的解析結果とを合わせて考察することにより、SIV を産生し且つ増殖マーカーである PCNA 抗原や Ki67 抗原を

もつ CM 様細胞の集族巣が脳血管周囲に形成されることがエイズ脳炎発症病因の一つであるという作業仮説を立てている。

一方、CM 細胞 2 株が産生する SIV (SIVcm1, SIVcm5) はサル Mφ や神経細胞 (アストロサイト) に指向性があり、2 ウイルス株とも野生型 (SIVmac239) に無い共通の表現型を持つ。また、全塩基配列の解析の結果、SIVcm5 が Mφ・神経細胞指向性の変異の一部を獲得していたのに反し、SIVcm1 にはいずれの変異も認められなかった。

本年度は、無限もしくは有限増殖性を獲得したモノサイト系細胞の由来を調べることと、有効かつ安全な抗エイズ自家ワクチン作成のための基礎的技術の 1 つとしての SIV 感染自己細胞の大量調製法を確立することを目的とした。

## B. 研究方法

### 血球系細胞の調製

自家ワクチン作成のためには採取の簡便性から血球系細胞が望ましい。従って、宿主細胞としては、末梢血単核球 (PBMC) と骨髄細胞を選択した。PBMC は常法に従い、Buffy Coat を採取後 Ficoll による密度勾配法により調製した。また、骨髄細胞は麻酔下のサル長骨より、穿刺して採取した。Ficoll による密度勾配法により骨髄細胞を粗精製した後、低張処理により赤血球系細胞を破壊して調製した。

### 細胞培養及びウイルスの感染

脳組織由来細胞株 CM1 細胞株、CM5 細胞株の培養には通常の RPMI 培地と 6 穴平底プレートをを用い、培地は 3 日毎に交換した。また、CM 細胞により産生された SIV は培地交換後 3.5 日目に培養上清を回収しウイルス (SIVcm1, SIVcm5) として使用した。

SIVmac239 株の増殖およびウイルスの TCID<sub>50</sub> は常法に従って CEMx174 細胞株を用いて求めた。ウイルス感染は、SIVmac239 と CEMx174 細胞株の組み合わせで、moi 0.3 で感染させ、その他のウイルスは RT (逆転写酵素) 活性を SIVmac239 に合わせて、宿主細胞に感染させた。また、3 日目毎に培養上清を回収し

た後、よく懸濁後 2/3 量の培地を細胞と共に廃棄し交換した。

### 血球系細胞への SIVmac239, SIVcm の感染による細胞の増殖性の検討

24 穴プレートをを用い、ウイルスの感染後培養・観察を行った。アストロサイトの分画は正常カニクイザルの解剖時の大脳皮質の一部を Gilles ら (J.Neurovirol.6:173-186, 2000) の方法を用いて調製した。

各種ウイルスの各種宿主細胞における増殖は、培養上清中 SIV の逆転写酵素活性を測定し、市販のリコンビナント HIV 逆転写酵素を用いて標準化して定量した。また、産生ウイルスのピーク付近や、産生ウイルスの初期の立ち上がりの時期の確認には p27ELISA (p27 core antigen capture assay kit ; Coulter) を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立感染症研究所動物実験委員会による審査の結果承認を受けた。また、研究の実施にあたっては、筑波医学実験用霊長類センター諸内規、作業方式に従って繁殖育成サルを用い、動物に与える苦痛の軽減と排除に勤めた。

## C. 研究結果

### 血球系細胞への SIVmac239, SIVcm の感染による細胞の増殖性の検討

#### 1) PBMC での SIV の感染・増殖

末梢血単核球を用いて、ConA の刺激有り、ConA 無しの条件で検討を行ったところ、ConA 刺激無しではすべての SIV の感染増殖がほとんどみられず、ConA の刺激下でのみ SIVmac239、SIVcm 2 株に感染・増殖した (図 1 左上)。培養開始 4 週目から次第に細胞が死滅し、継続培養による無限増殖細胞の出現はみられなかった。

#### 2) GM-CSF 分化モノサイト (肺胞マクロファージ) での SIV の感染・増殖

末梢血単核球より、付着性のモノサイトを調製し、GM-CSF により 1 週間分化させた後、SIVmac239 と SIVcm 2 株を感染させ、ウイルスの増殖を検討した。ウイルス感染 2 週目あたりで、SIVcm 2 株のみの増殖がみられたが培養開始 2 ヶ月後には分化マクロファージ様細胞

は死滅した (図 1 右下)。

一方、サル肺胞Mφでは、GMCSF 分化モノサイトと同様の結果が得られたが、培養上清中の SIV cm 2 株のピークはかなり遅れて (感染後 5~6 週目) 見られた。この遅れは、分化モノサイトに比べて、肺胞Mφの代謝レベルが低く、より静止期に近いと推測される (図 1 右上)。

### 3) 骨髄細胞での SIV の感染・増殖

骨髄細胞を宿主として SIVmac239、SIV cm1、SIVcm5 を感染させた場合にも、SIVcm 2 株の増殖のみが認められ、SIV mac 239 の感染・増殖は見られなかった (図 1 左下)。

### SIVcm の宿主域とその感染増殖性

SIVcm1 と SIVcm5 の宿主域に関してまとめると、CEMx174 および末梢血単核球 (PBMC) では親株の SIVmac239、SIVcm1、SIVcm5 の 3 種 SIV すべての増殖がみられるが、GM-CSF 分化モノサイト、肺胞マクロファージ、骨髄細胞においては、親株の SIVmac239 は感染・増殖できず、SIV cm1、SIV cm5 のみが感染・増殖できる。

また、神経系細胞での SIV の感染・増殖に関しては、カニクイザル脳組織より得たアストロサイト初代培養細胞を用いたものであるが、培養上清中の SIV の定量とアストロサイトのゲノムDNAのPCRによるプロウイルスを確認の結果、SIVmac239 は感染のみ確認されウイルスは産生されなかったが、SIV cm1、SIV cm5 は共にアストロサイトへの感染・増殖が確認された (図 2)

### CM 細胞株を in vitro で作成する試み

カニクイザル 2 頭より、骨髄細胞を調製し、12 穴培養プレート 1 穴あたり  $2.5 \times 10^6$  個の骨髄細胞を加え、S I Vmac239 及び SIV cm1 と SIV cm5 をそれぞれ moi 0.01 で加え感染させたところ、図 3, 4 に示すように、脳組織由来細胞株 CM1、CM5 細胞株と同様の付着性を示す細胞がコロニーを形成しているのが、感染 3 日後に観察された。ところが、野生株の SIVmac239 を感染させた骨髄細胞には、このようなコロニ

一の形成はみられなかった (図 3, 4)。図 4 中表には SIVcm 感染 7 日目のコロニー数を示す。

SIV cm1 と SIV cm5 の感染により生じたコロニーは形態学的にはヘテロな細胞より構成されているので、96 穴平底プレートにクローニングを行い培養を継続した。Growth Factor として 4ng/ml SCF (Stem Cell Factor) と 5ug/ml Insulin を添加して、培養を継続しているが、この条件下で、骨髄由来 in vitro CM 様細胞は増殖を続けている。また、この上清中には低レベルの RT 活性がみられるので、さらにクローニングが必要と思われる。

## D. 考 察

### SIVcm の宿主域とその感染・増殖性

SIVcm1 と SIVcm5 の宿主域に関してまとめると、CEMx174 および末梢血単核球 (PBMC) では親株の SIVmac239、SIV cm1、SIV cm5 の 3 種 SIV すべての増殖がみられるが、GM-CSF 分化モノサイト (肺胞マクロファージ)、骨髄細胞においては、親株の SIVmac239 は感染・増殖できず、SIV cm1、SIV cm5 のみが感染・増殖できる。

また、神経系細胞 (アストロサイト) での SIV の感染増殖に関し、SIVmac239 は感染のみ確認されウイルスは産生されなかったが、SIVcm1、SIV cm5 は共にアストロサイトへの感染・増殖が確認された。

### SIVcm 感染骨髄細胞の脳炎発症における役割

骨髄細胞において、SIVcm の感染により CM 細胞の形態学的特徴を有し、培養上清中へ SIV を産生し、約 2 ヶ月間増殖性を保っていることから、エイズ脳炎脳組織の血管周囲に形成されるマクロファージ系細胞の集簇巣の由来に関して、骨髄系の細胞が 1 つの候補となる可能性が示唆された。

### SIVcm 感染自己骨髄細胞を用いた安全な抗エイズワクチンの可能性

基本的には、本方法は、不活性化した自己感染細胞もしくは、ウイルス感染 Allo 細胞を用いて種々のアジュバントと共に免疫する方法

である。アジュバントの工夫により細胞性免疫も液性抗体も誘導されることが最近明らかになっている。現在、細胞性免疫を誘導する prime-boost ワクチンが開発されているが、Clade を越えて有効なワクチンはまだ開発されていない。本方法は、液性・細胞性免疫を誘導する可能性がある点において、何時、進入するかもしれないサブタイプのエイズウイルスにも対応出来る可能性をもつ。

SIVcm 感染自己骨髄細胞を用いることを提案した根拠は第1に、レトロウイルスではじめて米国 FDA で認可された抗 HIV ワクチンが本方法を用いていることによる。第2には、理研の大野らが開発した、抗ガンワクチンであり、ホルマリン固定された自己ガンをアジュバント（特許）と共に皮内接種し、再発脳腫瘍にも有効であった。

本年度の研究により免疫源細胞として、第1には、SIVcm 感染自己骨髄細胞の利用が現実的に可能となり、第2には、CM1, CM5 細胞は Allo 抗原をもつが約1億個の細胞を容易に得られるという点で有望であることが明らかになった。

## E. 結 論

1. 脳炎発症機構における脳炎脳組織の血管周囲に形成されるマクロファージ系細胞集簇の由来に関して骨髄系の細胞が1つの候補となる可能性が示唆された。

2. 安全な抗エイズワクチンの抗原として、自己の骨髄細胞にエイズウイルスを感染させたものが、量的にも使用に耐える可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Misumi S, Endo M, Mukai R, Tachibana K, Umeda M, Honda T, Takamune N, Shoji S: A novel cyclic peptide vaccine for defense against HIV/AIDS progression. *J Biol Chem* 278: 32335- 32343, 2003.

## 2. 学会発表

- 1) 中山大介、三隅将吾、向井鏖三郎、橘 圀臣、梅田 衛、本田徹朗、高宗暢暁、庄司省三：CCR5 及び CXCR4 を mimic した環状キメラ抗原を免疫したカニクイザルの抗血清による Cross-clade R5 及び X4 HIV-1 感染阻害効果. 第17回日本エイズ学会（神戸）2003年（日本エイズ学会誌 Vol.5 No.4. 372, 2003）
- 2) 遠藤昌史、稲津麻子、三隅将吾、向井鏖三郎、橘 圀臣、梅田 衛、本田徹朗、高宗暢暁、庄司省三：CXCR4 を基礎にした新規ペプチド免疫戦略とその HIV-1 感染防御効果. 第17回日本エイズ学会（神戸）2003年（日本エイズ学会誌 Vol.5 No.4. 372, 2003）
- 3) 草場正司、三隅将吾、向井鏖三郎、橘 圀臣、梅田 衛、本田徹朗、高宗暢暁、庄司省三：Chimeric receptor CCR5 の細胞外第2ループ (ECL-2) 特異的認識自己抗体による種々の HIV-1 に対する感染防止効果. 第17回日本エイズ学会（神戸）2003年（日本エイズ学会誌 Vol.5 No.4. 373, 2003）

## G. 健康危険情報

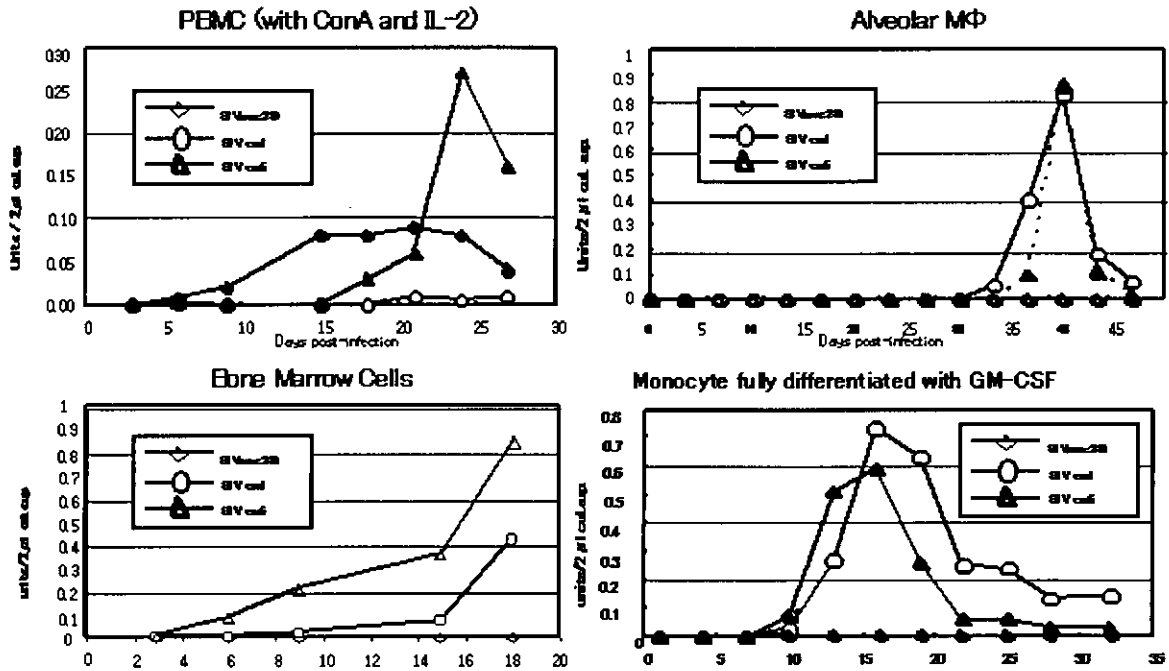
なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

- |           |       |
|-----------|-------|
| 1. 特許取得   | 申請準備中 |
| 2. 実用新案登録 | なし    |
| 3. その他    | なし    |

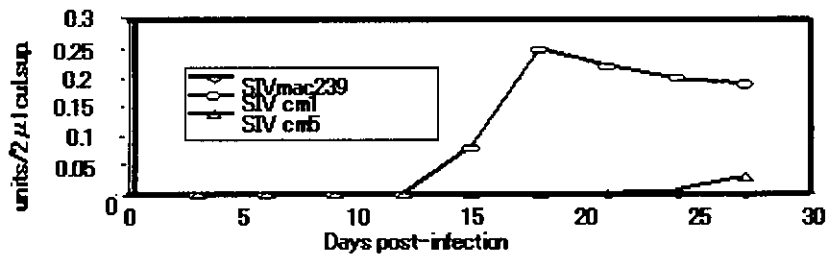
☒ 1

Growth kinetics of SIVmac239, SIVcm1 and SIVcm5 on Blood cells, Alveolar Macrophage and Monocyte

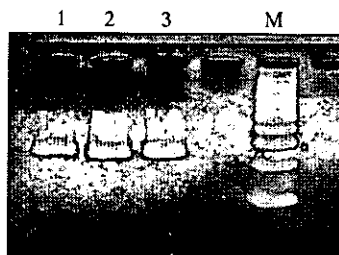


☒ 2

Growth kinetics of SIVmac239, SIV cm1 and SIV cm5 on Astrocytes

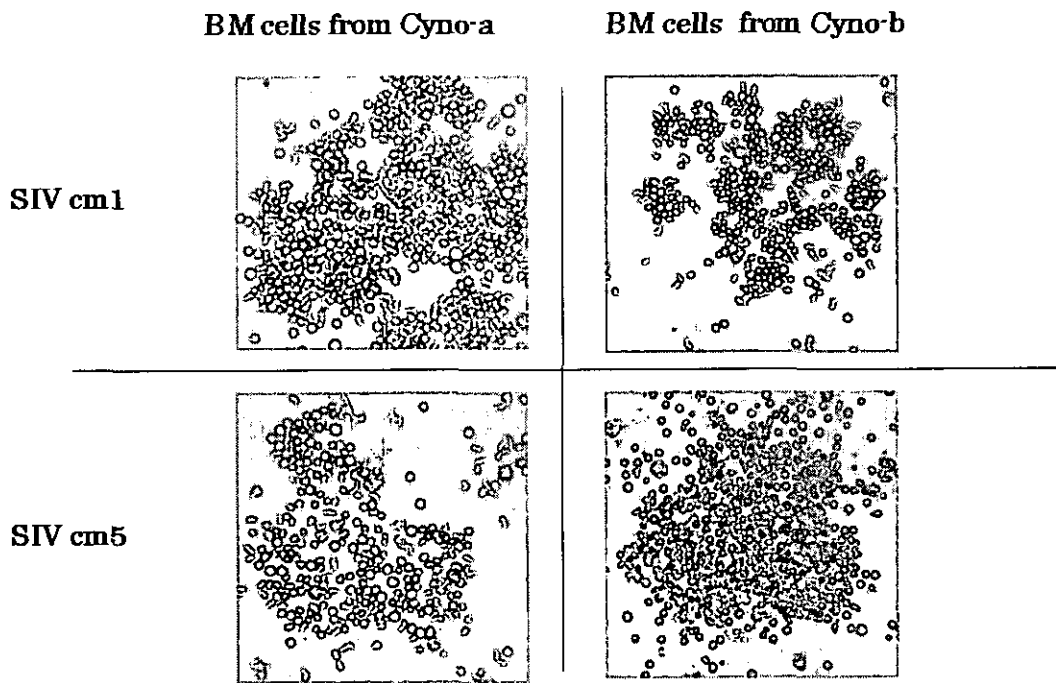


PCR of SIVmac239, SIV cm1 and SIV cm5 in Astrocytes



Lane 1 : SIVmac239  
 Lane 2 : SIV cm1  
 Lane 3 : SIV cm5  
 Lane M : 100 bp ladder marker

☒3 Bone Marrow cells from 2 monkeys (a, b) infected with SIV cm formed Adherent CM-like cell colonies

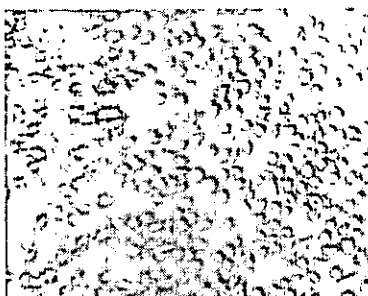


Colonies were observed 3 days post infection.

Cyno-BM cells infected with SIVmac239



Cloned in vitro CM-like cells



※Need to analyze by FACS

☒4

Number of colonies formed with SIV infected Bm cells

	Cyno-a BM cells	Cyno-b BM cells
SIVmac239	0 ※	0
SIV cm1	123	72
SIV cm5	83	28

※: # of colonies

Cyno BM cells :  $2.5 \times 10^6$  cells / 12 well dish

SIV cm 1&5 : 1 ng

## 8. $\alpha$ 抗原を用いたワクチンの増強作用に関する研究

分担研究者 保富 康宏 三重大学医学部助教授

エイズウイルスにたいするワクチン開発においてはウイルスの初回暴露時に強力な免疫誘導、特に細胞性免疫を誘導することが必要である。本研究ではワクチン効果を増強するアジュバントとして抗酸菌由来の $\alpha$ 抗原をDNAワクチンに対しアジュバントとして用いその増強効果を検討した。 $\alpha$ 抗原DNAとHIVenvDNAワクチンを混合して免疫したマウス群ではDNAワクチン単独免疫群に比べ高い細胞傷害性Tリンパ球(CTL)活性が認められ、*in vivo*におけるHIVenv組み込みリコンビナントワクシニアウイルスの排除においても $\alpha$ 抗原DNA混合接種群が有意に更新していた。脾細胞をHIVenvで刺激した後のサイトカイン産生では $\alpha$ 抗原DNA混合接種群では著しいTh1タイプのサイトカイン産生を認めた。これらすべての反応はマウスをBCGで感作することにより増強されていた。以上のことより $\alpha$ 抗原は新規アジュバントとして特にTh1型免疫反応の誘導に極めて効果的であると考えられた。

### A. 研究目的

エイズウイルスに対するワクチン開発は我が国を初め世界中で研究が行われているが未だ現実に使用されているものはない。これらの中には安全性を含め多くの利点を持っているが免疫反応の誘導が不十分であり、特に細胞性免疫の誘導において問題があるために実用化を阻まれているもの存在する。抗酸菌由来の $\alpha$ 抗原は極めて強い免疫誘導能、特に細胞性免疫を多彩なサイトカインの誘導により導くことが知られている。本研究ではワクチン効果、特に細胞性免疫を増強するアジュバントとして抗酸菌由来の $\alpha$ 抗原をDNAワクチンに対しアジュバントとして使用できる可能性を検討した。

### B. 研究方法

1)  $\alpha$ 抗原組み込みプラスミド: *Mycobacterium kansasii* 由来 $\alpha$ 抗原遺伝子をpcDNA3.1にTPA leader sequenceに続き挿入した(pcDNA $\alpha$ -k)。  
2) 免疫: Balb/c x DBA2 F1 (BDF1) マウス筋肉内にHIVenv DNAワクチンと $\alpha$ 抗原DNA各100 $\mu$ gを混合し1週間隔で3回接種した。接種部位にはelectroporationを行った。また免疫マウスはBCG感作群と未感作群の2群作成した。  
3) サイトカイン測定: 免疫マウスの脾細胞を

HIVenv エピトープペプチドで48時間刺激培養した培養上清のIL-4とIFN- $\gamma$ をELISAにて測定した。

4) HIVenv 特異的T細胞の測定: CTLは免疫マウスの脾細胞から誘導し、<sup>51</sup>Cr遊離法にて測定した。また、CD8<sup>+</sup>細胞は特異的IFN- $\gamma$ 産生細胞をELISPOTにて測定した。

5) *In vivo*における抗ウイルス効果: *in vivo*における抗ウイルス効果は免疫マウスにHIVenv遺伝子組み込みワクシニアウイルスをチャレンジし、5日後の卵巣でのウイルス複製をReal Time PCRの測定にて判定した。

6) 倫理面への配慮: 本研究はマウスのみを使用する基礎研究でヒトサンプル、情報等は一切用いていない。

### C. 研究結果

1) HIVenv抗原と $\alpha$ 抗原の発現: electroporation法によるDNAの導入により、 $\alpha$ 抗原、HIVenv抗原とも同一組織に発現していることが確認された(Fig. 1)。

2) HIVenv 特異的IL-4とIFN- $\gamma$ の測定: 免疫マウスの脾細胞におけるHIVenv 特異的IL-4とIFN- $\gamma$ を測定したところ $\alpha$ 抗原添加群ではIL-4産生が低下し、IFN- $\gamma$ が増加を示した。またこのことはBCGの感作でより著明であった(Fig.

2)。

3) HIVenv 特異的 CTL の誘導 : CTL の誘導は  $\alpha$  抗原を添加したもので明らかに高く、それは BCG により感作しているものでより著明であった。また誘導された CTL は CD8<sup>+</sup>、MHC 拘束性を示した (Fig. 3)。このことは CD8<sup>+</sup>細胞の IFN- $\gamma$  を指標とした HIVenv 特異的 ELISPOT アッセイにおいても同様に確認された (Fig. 4)。

4) *in vivo* における抗ウイルス効果 : 免疫マウスに HIVenv 組み込みワクシニアウイルスを接種したところ、 $\alpha$  抗原遺伝子添加、BCG 感作群で著名にウイルスをコントロールしていることが示され、その接種時の脾細胞は HIVenv 特異的に高い細胞傷害活性を示した (Fig. 5)。

#### D. 考 察

エイズウイルス感染の予防には細胞性免疫は必須であり、また感染直後のウイルスをコントロールすることで予後においても大きくかわってくる。このことからエイズウイルス感染症に対するワクチンは初回ウイルス暴露時に強力な免疫反応、特に細胞性免疫を誘導する試みが数多く報告されている。今回用いた  $\alpha$  抗原は安全であり、強い免疫反応を誘導することが出来る。さらに BCG 等の抗酸菌で感作されているとその効果はより著明であること、更に世界中の多くの国で結核ワクチンとして BCG が用いられ、多数のヒトが抗酸菌感作を受けていることから  $\alpha$  抗原のワクチン増強効果は現実的なアジュバントとして使用されうると考えられる。DNA ワクチンは簡便で開発コスト等の面でも現在最も期待されているワクチンであることから本研究のごとくアジュバントも DNA として用いることで更に DNA ワクチンの使用の可能性が高められると思われる。今後  $\alpha$  抗原を多くのワクチンにアジュバントとして用いるためにリコンビナントタンパク等の作成も行う予定である。

#### E. 結 論

抗酸菌  $\alpha$  抗原がワクチンのアジュバントとして有効である可能性が示された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Uno-Furuta, S., Matsuo, K., Tamaki, S., Takamura, S., Kamei, A., Kuromatsu, I., Kaito, M., Matsuura, Y., Miyamura, T., Adachi, Y., and Yasutomi, Y. Immunization with recombinant bacillus Calmette-Guerin (BCG)-hepatitis C virus (HCV) elicits HCV-specific cytotoxic T lymphocytes in mice. *Vaccine* 21: 3149-3156, 2003.
- 2) Hayashi, T., Yasutomi, Y., Hasegawa, K., Sasaki, Y. and Onodera, T. Interleukin-4-expressing plasmid inhibits reovirus type-2-triggered autoimmune insulinitis in DBA/1J suckling mice. *Int. J. Exp. Path.* 84: 101-106, 2003.
- 3) Nishikubo, K., Murata, Y., Tamaki, S., Sugama, K., Imanaka-Yoshida, K., Yuda, N., Kai, M., Takamura, S., Sebald, W., Adachi, Y. and Yasutomi, Y. A single administration of interleukin-4 antagonistic mutant DNA inhibits allergic airway inflammation in a mouse model of asthma. *Gene Ther.* 10: 2119-2125, 2003.
- 4) Takamura, S., Niikura, M., Li, T.C., Takeda, N., Kusagawa, S., Takebe, Y., Miyamura, T., and Yasutomi, Y. DNA vaccine-encapsulated virus-like particles derived from an orally transmissible virus stimulates mucosal and systemic immune responses by oral administration. *Gene Ther.* (in press)

##### 2. 学会発表

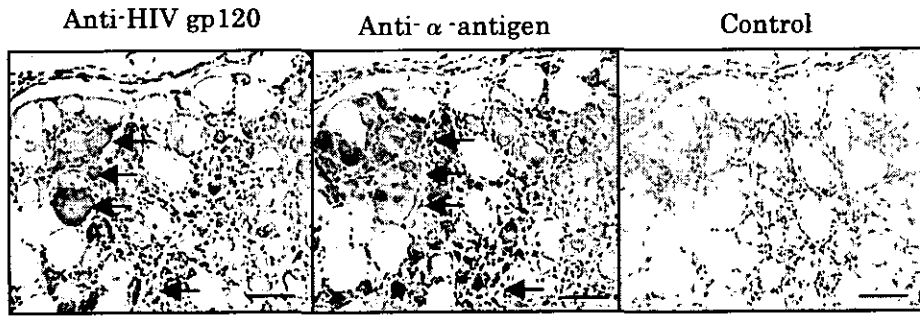
- 1) 杉本知恵、保富康宏、塩田達雄、山本直樹、永井美之、森 一泰 : 糖鎖欠失 SIV の新規 attenuated virus としての性質. 第 17 回日本エイズ学会学術集会 (神戸)
- 2) 森 一泰、杉本知恵、中山英美、塩田達雄、草川 茂、武部 豊、保富康宏、永井美之 : Env エイズワクチンにおける糖鎖の重要性. 第 17 回日本エイズ学会学術集会 (神戸)



- 3) 保富康宏：経口感染ウイルスのウイルス様中空粒子(VLP)を利用した経口ワクチンの開発。第7回日本ワクチン学会学術集会、シンポジウム（名古屋）

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1)  $\alpha$  抗原のワクチンにおけるアジュバント剤としての利用（出願中、特開 2002-114708）
- 2)  $\alpha$  抗原のアレルギー性疾患治療剤としての利用（出願中、PCT/JP/01459）



Bar : 100 μ m

Fig. 1 HIVenv抗原と α 抗原の in vivo における発現  
連続切片にて HIVenv 抗原と α 抗原の in vivo における発現を確認した (矢印)。

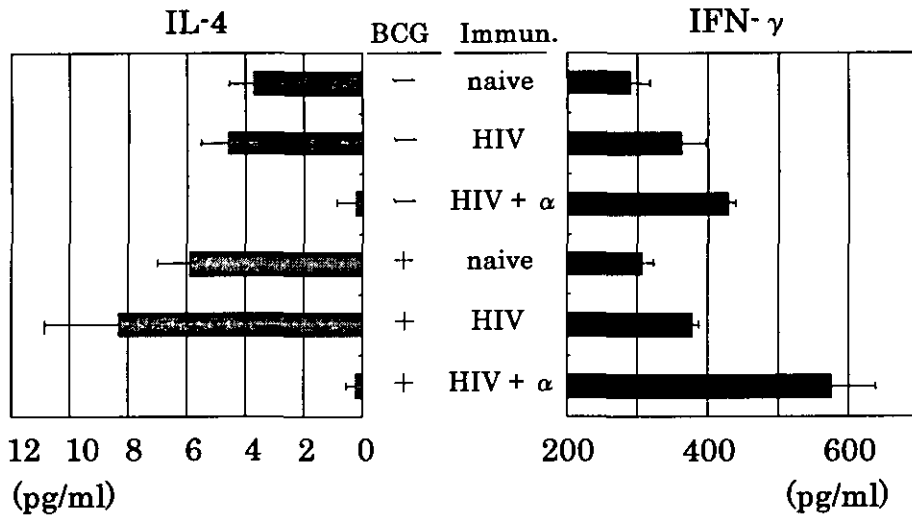


Fig. 2 HIVenv 特異的 IL-4 と IFN-γ の産生  
免疫マウスの脾細胞を HIVenv エピトープペプチドで刺激し、HIVenv 特異的 IL-4 と IFN-γ の産生を ELISA にて測定した。

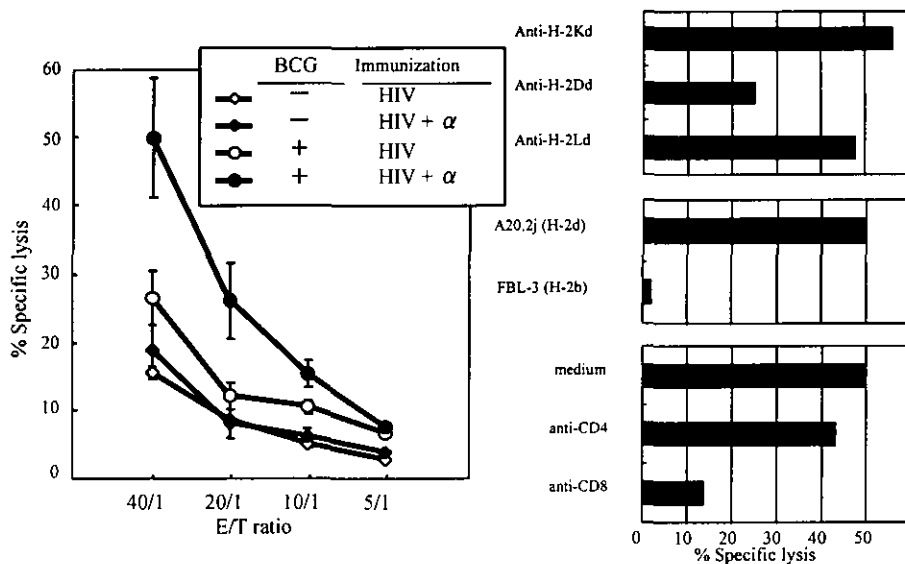


Fig. 3 HIVenv 特異的 CTL の誘導

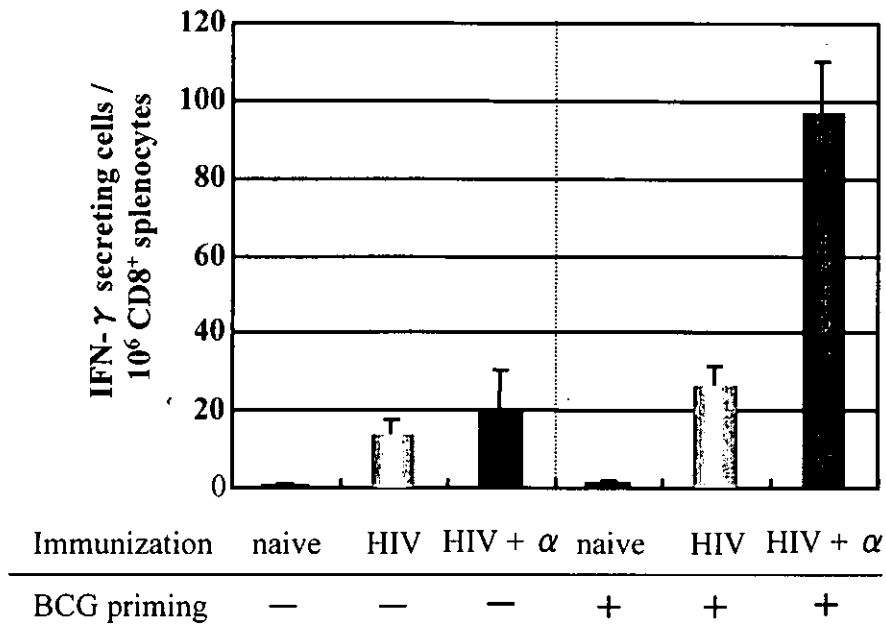


Fig. 4 HIVenv特異的ELISPOT assay

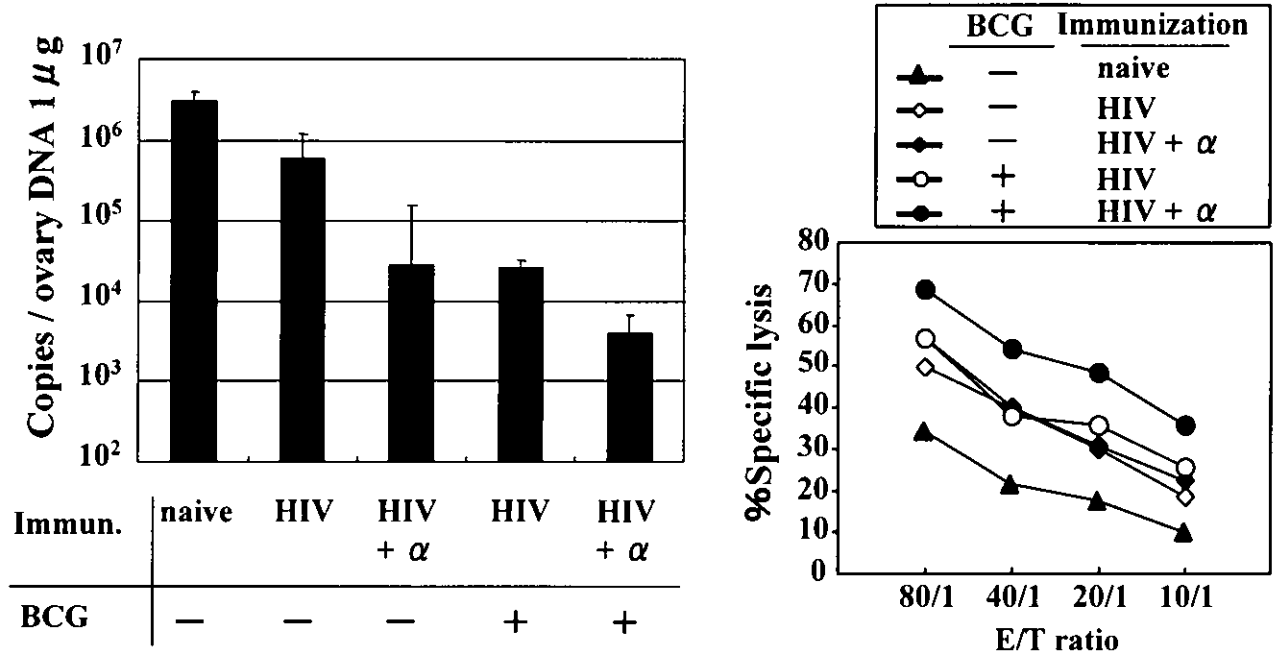


Fig. 5 in vivoにおける抗ウイルス効果とCTLの誘導

## 9. T細胞機能分子を介する HIV-1 感染防御

分担研究者 神奈木 真理 東京医科歯科大学医歯学総合研究科教授

研究要旨 弱毒化生ワクチンは、動物モデルにおいて新たな SIV 感染を防御する有効な方法であるが病原性回復の危険のため実用的ではない。この場合の感染防御機序は明らかではないが、CD8 陽性T細胞による HIV-1 複製抑制は有力候補の一つである。一方、CD4 陽性T細胞の表面には、活性化あるいは抑制シグナルを伝える様々な分子が存在し、HIV-1 複製を制御すると考えられるがその詳細は不明である。CD8 陽性T細胞による HIV-1 複製抑制は、細胞接触を要するが細胞障害性とは異なり MHC-I 非依存性である。従って、CD8 陽性T細胞上のT細胞レセプター以外の表面分子と CD4 陽性細胞側のレセプター分子との接触を介すると想定される。このような HIV-1 複製抑制シグナルを伝える機能分子は HIV-1 感染予防方法の開発に応用できる可能性がある。本研究では、HIV-1 抑制シグナルを伝える CD4 陽性T細胞上の表面分子を検索し、これを介した HIV-1 抑制機序を開明することを目的とした。本年度は CD28 ファミリー分子として知られている CD28, CTLA-4, ICOS, PD1 について解析を行った。この結果、ヒト CD28 と ICOS に対するモノクロナル抗体が R5 あるいは X4 HIV-1 株の急性感染に引き続くウイルス産生を有意に抑制した。感染前に抗体を細胞に作用させると HIV-1 抑制効率はさらに増強した。これらの抗体は細胞増殖抑制や細胞毒性を示さなかった。また、VSV エンベロープを持つ pseudotype HIV-1 の発現に対しては、これらの抗体の抑制効果は弱いことから、HIV-1 感染は主に初期過程で抑制されていると考えられる。しかし、CD4 陽性細胞上の CD4 と CXCR4 の発現量は、抗体処理により影響を受けず、CCR5 の発現はむしろ増加した。従って、CD28 および ICOS 抗体による HIV-1 抑制は、少なくとも HIV-1 レセプター発現変化によるものでないと考えられた。以上から、抑制機序の詳細は今後の解析を待たなければならないが、CD28 と ICOS の刺激は、HIV-1 感染の初期過程の抑制につながるシグナルを下流へ伝達することが分かった。

### A. 研究目的

我々は、これまでの研究経過から、CD8 陽性T細胞による HIV-1 複製抑制が、その機序の有効候補であり、T細胞レセプター以外の未知の CD8T細胞表面分子と CD4 細胞上のレセプター分子との interaction の結果、CD4 細胞に negative signal が伝わるのではないかと仮定している。CD4 陽性T細胞の表面には、活性化あるいは抑制シグナルを伝える様々な分子が存在し、HIV-1 複製を制御すると考えられるがその詳細は不明である。このような HIV-1 複製抑制シグナルを伝える機能分子は HIV-1 感染予防方法の開発に応用できる可能性がある。本研究では、HIV-1 抑制シグナルを伝える CD4 陽性T細胞上の表面分子を見つけ、これを介し

た HIV-1 抑制機序を解明することを目的とした。本年度は CD28 ファミリー分子として知られている CD28, CTLA-4, ICOS, PD1 の HIV-1 複製に対する影響を調べた。

### B. 研究方法

- 1) 健康人末梢血単核球(PBMC)への HIV-1 感染  
非感染健康人 PBMC を PHA 刺激し、IL-2 存在下に一週間培養したものから、磁気ビーズ (MACS) を用いて CD4 陽性T細胞分画を得た。これらの細胞に X4 HIV-1/NL4-3 あるいは R5 HIV-1/JR-CSF 株を 2 時間感染させ、洗浄後様々な抗体とともに IL-2 添加培地で培養した。
- 2) 抗体

ヒト CD28 family 分子に対するマウスモノクロ

ナル抗体 TN228 (CD28)、MIH8 (CTLA-4)、MIH4 (PD-1)は東京医科歯科大学の東博士から、SA12 (ICOS)は Japan Tobacco 社から精製抗体として供与された。対照としてマウス IgG1 を用いた。

### 3) HIV-1 産生抑制の検定

上記 HIV-1 感染 CD4+PBMC 培養の上清を 4 日後にハーベストし、その中に含まれる HIV-1 p24 量を ELISA により調べた。

### 4) 細胞増殖アッセイ

様々な濃度の抗体の存在下あるいは非存在下で CD4+ PBMC を 4 日間培養し、最後の 16 時間 3H-thymidine を添加し、細胞内に取り込まれた 3H-thymidine 量をベータカウンターで定量した。

### 5) Pseudotype HIV-1 の調整

エンベロープ欠損 luciferase 発現 HIV-1 plasmid (pNL4-3 lucΔenv) と VSV-G エンベロープ発現 plasmid (pHCMVG) を 293 T 細胞に co-transfection した上清を DNase 処理し、pseudotype virus として用いた。CD4+PBMC に感染させ 48 時間後に細胞内の luciferase 活性をルミノメーターを用いて定量した。

## C. 研究結果

### 1) モノクロナル抗体の HIV-1 複製への影響

培養中に直接モノクロナル抗体を添加した場合、実験間で差はあるが、SA12 は HIV-1 産生を抑制した。TN228 は抑制する場合と促進する場合があり一定しなかった。MIH8 と MIH4 は HIV-1 産生に大きな影響を与えなかった。用いた CD4+PBMC の抗原発現を調べたところ、CD28 と ICOS を強く発現していたため、以後この二種類の抗体について実験を行った。プレートにこれらの抗体を固層化した場合は両抗体とも安定した HIV-1 抑制効果を示した。また、細胞を感染前に抗体で処理すると抑制効果が増強された。

### 2) X4, R5 両 HIV-1 株の抑制

X4 HIV-1 株 NL4-3 感染の場合だけでなく、R5 HIV-1 株 JR-CSF 感染 CD4+細胞に対しても、CD28, ICOS 抗体は 同様の抑制効果を示した (図 1)。

### 3) CD28, ICOS 抗体の細胞増殖への影響

次に、これらの抗体が CD4+PBMC の細胞増殖に影響するかどうか調べた。その結果、CD28 あるいは ICOS 抗体存在下では CD4+細胞は thymidine 取り込みを増加するかあるいは変化しないかであった。

### 4) Pseudotype HIV-1 発現に対する影響

VSV-G エンベロープを有する pseudotype HIV-1 は、HIV-1 特異的な感染初期過程を通らず感染が成立する。このウイルスを感染させ、CD28, ICOS 抗体で細胞を処理した場合、luciferase 活性は、変化しないか弱く減少した。

### 5) HIV-1 レセプター発現に対する影響

感染初期過程の抑制が強く示唆されたため、次に、両抗体の HIV-1 レセプター発現に対する影響を調べた。この結果、CD4 陽性細胞上の CD4 と CXCR4 の発現量は、抗体処理により影響を受けず、CCR5 の発現はむしろ増加した。

## D. 考察

HIV-1 複製の抑制シグナルを伝える CD4+細胞上分子の候補として、CD28 family 分子を取り上げ、このうち CD28 と ICOS を抗体で刺激すると HIV-1 複製が抑制されることが分かった。CD28 の HIV-1 抑制効果については、1996 年に June らが報告している。彼等によれば、特異抗体で細胞上の CD28 を架橋すると、TCR 刺激の有無にかかわらず HIV-1 複製が抑制される。今回の我々の研究でも、CD28 抗体を固層化すると安定した抑制活性が認められた点で一致している。ICOS については HIV-1 に関する報告は少ない。ICOS は CD28 と同様、T 細胞レセプター刺激とともに T 細胞に活性化シグナルを伝達する副刺激分子であるが、IL-2 産生は促進せず、むしろ Th2 型のサイトカイン産生を選択的に促進することが知られている。しかし我々の実験系では、CD4+細胞からのサイトカインやケモカイン産生は、抗体刺激により有意に変化しなかった。

CD28, ICOS 抗体による HIV-1 抑制が同じ機序によるかどうかは分からないが、本研究では少なくとも区別がつかない。両抗体とも細胞増殖抑制や細胞毒性は明らかでなく、HIV-1 抑制

が細胞活性そのものへの negative signal によることは考えにくい。

また、VSV エンベロープを持つ pseudotype HIV-1 の発現に対しては、これらの抗体の抑制効果は弱いことから、HIV-1 の侵入、uncoating 等の段階が主に抑制されていると推察される。しかし、CD4 陽性細胞上の CD4、CXCR4、CCR5 の発現の減少は認められないことから、CD28 および ICOS 抗体による HIV-1 抑制は、少なくとも HIV-1 レセプターの減少によるものではないと考えられた。

CD28, ICOS のリガンドは、B7-1, B7-2 および B7h である。これらは、主に抗原呈示細胞上に存在するが、別の細胞群にも発現される。従って、CD28/B7 family 分子の interaction は抗原特異的 T 細胞と抗原呈示細胞との間だけでなく、非特異的に HIV-1 複製の生体内制御にかかわっている可能性がある。

## E. 結論

CD4+細胞上には、HIV-1 複製を抑制するシグナルを伝える分子があり、CD28 family 分子のうち CD28 と ICOS はそのような分子である。これらが刺激されると、HIV-1 複製の初期段階が抑制されるが、これは HIV-1 レセプターの減少によるものではない。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Liu, H., T. Ohashi, T. Masuda, X. Zhou, M. Kubo, M. Kannagi. Suppression of HIV-1-replication by HIV-1-irrelevant CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes resulting in preservation of persistently HIV-1-infected cells in vitro. *Viral Immunol.* 16: 381-393, 2003.
- 2) Hasegawa, A., T. Ohashi, S. Hanabuchi, H. Kato, F. Takemura, T. Masuda, and M. Kannagi. Expansion of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) reservoir in orally infected rats: Inverse correlation with HTLV-I-specific cellular immune response. *J. Virol.* 77: 2956-2963, 2003.

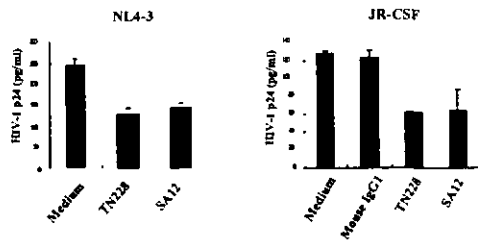
- 3) Harashima, N., K. Kurihara, A. Utsunomiya, R. Tanosaki, S. Hanabuchi, M. Masuda, T. Ohashi, F. Fukui, A. Hasegawa, T. Masuda, Y. Takaue, J. Okamura, and M. Kannagi. Graft-versus-HTLV-I response in ATL patients after non-myeloablative hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Res.*, in press, 2004.

- 4) Nishituji, H., T. Ikeda, H. Miyoshi, T. Ohashi, M. Kannagi, and T. Masuda. Expression of small hairpin RNA by lentiviral-based vector confers efficient and stable gene-suppression of HIV-1 on human cells including primary non-dividing cells. *Microbes and Infection*, in press, 2004.

### 2. 学会発表

- 1) Liu, H., T. Ohashi, M. Kubo, X. Zhou, T. Masuda, M. Kubo, M. Kannagi: Reversible suppression of HIV-1-replication by CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes by antigen-nonspecific mechanisms. 第 17 回エイズ学会、2003 年 11 月、神戸
- 2) Zhou, X., M. Kubo, Y. Emori, T. Ikeda, H. Nishituji, K. Kurihara, T. Ohashi, M. Azuma, T. Masuda, M. Kannagi: Suppression of HIV-1 replication mediated through ICOS and CD28 in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. 第 17 回エイズ学会、2003 年 11 月、神戸
- 3) 西辻裕紀、池田たま子、三好裕之、大橋貴、神奈木真理、増田貴夫。SiRNA 発現レンチウイルスベクターを用いた HIV-1 発現抑制。第 17 回エイズ学会、2003 年 11 月、神戸
- 4) 池田たま子、周 Xin, 吉成隆二、奈良信夫、大橋貴、神奈木真理、増田貴夫：HIV-1 インテグラーゼ変異体の機能解析。第 17 回エイズ学会、2003 年 11 月、神戸
- 5) 神奈木真理：ATL に対する腫瘍免疫療法。ウイルス学会シンポジウム。2003 年 10 月、京都

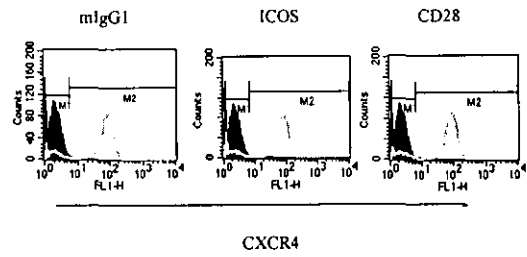
図 1



固相化 ICOS 並びに CD28 抗体による HIV-1 複製抑制。

健康人由来 CD4+PBMC を PHA で刺激し IL-2 存在下に培養したものに HIV-1 NL4-3 あるいは JR-CSF 株を 2 時間感染させ洗浄後、培地のみ、mouse IgG1、抗 ICOS 抗体 (SA12)、抗 CD28 抗体 (TN228) を加えて 4 日間培養し、上清中の HIV-1 p24 濃度を測定した。

図 2



ICOS 並びに CD28 刺激は CXCR4 発現を抑制しない。

健康人由来 CD4+PBMC を PHA で刺激し IL-2 存在下に培養したものを、mouse IgG1、抗 ICOS 抗体、抗 CD28 抗体を固相化したプレート内で培養し 1 日間後の CXCR4 発現を FACS で解析した。CXCR4 発現には変化がなく、同様の所見は培養 3 日後でも認められた。

## 10. 樹状細胞の DC-SIGN と感染防御機構

分担研究者 牧野 正彦 国立感染症研究所病原微生物部部長  
協力研究者 向井 徹 国立感染症研究所病原微生物部室長

研究要旨 HIV-1 感染者の日和見感染症として抗酸菌感染症は重要な位置を占める。HIV-1 と結核菌などの抗酸菌は、共に生体内で最も重要な抗原提示細胞である樹状細胞 (DC) に感染し、その抗原提示能に著しい変化をもたらすが、その際両者に共通のレセプター (DC-SIGN 抗原) を介して DC に感染する可能性が近年示唆された。本研究では、HIV-1 および抗酸菌の両者の感染を予防する方策を開発することを目的として、DC-SIGN と両病原体との相互作用について検討した。DC-SIGN 抗原の各種変異株を作製し、DC-SIGN 非発現細胞株 K562 細胞に導入し、HIV-1 および抗酸菌と DC-SIGN の相互分子機構の解析を容易にした。また、モデル抗酸菌として用いた BCG およびらい菌は、共に DC-SIGN 抗原の発現量に依存して DC を活性化し、細胞内ファゴゾームに留まらずライソゾームにまで運搬された。さらに、抗酸菌菌膜の一成分である Major Membrane Protein-II は、糖鎖を有さないにもかかわらず、DC-SIGN 抗原と結合する可能性が示唆された。従って、DC-SIGN は各種抗酸菌に対する DC 上のレセプターとして機能し、HIV-1 および抗酸菌に対する生体防御反応として重要な細胞性免疫応答を賦活し、両病原体による病変発症を同時に阻止する上で今後重要な役割を果たすものと考えられた。

### A. 研究目的

HIV-1 感染に伴う免疫不全症患者に対し、抗酸菌感染症は最大の脅威を与える細菌感染症である。HIV-1 と結核菌の重複感染者では毎年 50 万人が死亡し、HIV-1 と非結核性抗酸菌の重複感染者でも同様に多数が死亡している。このことは、HIV-1 および抗酸菌による病変発症を予防する方策の開発が地球規模において強く望まれていることを示している。しかし、HIV-1 とらい菌の重複感染者においては、ハンセン病の悪化あるいはエイズの悪化は観察されていない。HIV-1 と抗酸菌の感染に伴う病変の顕性化を制御する免疫機構として細胞性免疫が中心的役割を果たしているが、CD4 陽性あるいは CD8 陽性 T 細胞の活性化は抗原提示細胞への抗原性分子の取り込みが不可欠である。しかし、HIV-1 および抗酸菌は共に生体内で最も重要な抗原提示細胞である樹状細胞に感染し、その抗原提示機能を低下させることが知られている。近年、HIV-1 は gp120 抗原を介し DC に侵入し、抗酸菌は種々の分子機構を介して DC へ感染することが明らかになった

が、両者が共通して用いる細胞上のレセプターとして DC-SIGN が強く機能している可能性が示唆されている。本研究では、HIV-1 と抗酸菌が DC-SIGN を介し、どのような分子機構を用いて DC に侵入するかを明らかにし、両病原体による病変の顕性化を抑制する方策を検討することを目的とした。

### B. 研究方法

#### DC-SIGN 変異発現細胞株の樹立

ヒト末梢血より得た樹状細胞より RT-PCR 法により、DC-SIGN 遺伝子のクローニングを行った。同遺伝子を哺乳動物発現ベクター pcDNA3 へクローニングを行い、エレクトロポレーション法により DC-SIGN 非発現細胞 K562 へ遺伝子導入を行った。G418 存在下に於いて限界希釈法により細胞株 3M-1 を得た。PCR 法により DC-SIGN の細胞内局在に関与するシグナル配列に関する塩基配列に変異を導入し、同様の手法により発現細胞株の樹立を行った。

#### GFP 発現抗酸菌の構築

抗酸菌発現ベクター pMV261 へ GFP 遺伝子の



クローニングを行い、エレクトロポレーション法により非病原性である *M. smegmatis*、病原性である *M. avium*、結核菌群である *M. bovis* BCG へ遺伝子導入を行い、カナマイシン耐性コロニーより GFP 陽性菌の選択を行った。

#### 抗酸菌の細胞接着因子として DC-SIGN 抗原の役割の検索

得られた DC-SIGN 発現細胞 3 M-1 に各種 GFP 発現抗酸菌を MOI 20 で 16 時間共培養し、抗 LAMP 抗体および抗 DC-SIGN 抗体による染色を行い、Confocal 顕微鏡により、菌と抗原の局在性の検討を行った。

#### 樹状細胞と抗酸菌の相互作用

正常健常者末梢プラスチック付着性単球を得て、リコンビナント(r)GM-CSF および rIL-4 を用いて樹状細胞を分化・誘導した。樹状細胞の抗酸菌刺激による成熟化は、樹状細胞が産生する IL-12 p70 を ELISA を用いて測定して評価した。DC 上の抗酸菌のレセプターとしての DC-SIGN 抗原の役割を検索するため、DC を予め抗 DC-SIGN 抗体あるいは抗マンノースレセプター抗体で処理した後、DC を BCG 菌あるいはらい菌で刺激した際 DC が産生する IL-12 を同様に測定した。上記抗体は市販の抗体を用いた。抗 DC-SIGN 抗体で処理した DC あるいは非処理 DC にらい菌を感染させた際の DC の抗原提示能は、らい菌刺激 DC を抗原提示細胞として用い、自己の T 細胞を刺激した際の T 細胞の産生する IFN- $\gamma$  を指標として評価した。抗酸菌菌膜に存在し、細胞性免疫賦活能に優れた抗酸菌ワクチン候補分子 Major Membrane Protein-II と DC-SIGN との相互作用の検索には、DC-SIGN 抗原発現細胞株 (3M-1) とその親株 K562 を用いた。

(倫理面への配慮)

国立感染症研究所倫理委員会の審査を受け、以下の通り行った。血液ドナーのプライバシーを完全に守るため、研究結果発表に際しては個人が特定されないよう配慮し、研究者はドナーのいかなる個人情報も漏出しないよう細心の注意を払った。また、使用目的と使用方法および医学上の貢献予測を十分に説明し、さらに拒否し得ることを説明した上で理解

(インフォームドコンセント)を得た。さらに、結果について守秘義務に基づいて知る権利と知りたくない権利を守った。

#### C. 研究結果

##### DC-SIGN 変異発現細胞株の樹立とその解析

各種細胞株を DC-SIGN 抗体にて染色後、FACS 法により、単一性示すクローンを選択した。WB 法と塩基配列の確認により、発現蛋白への変異導入を確認した。

そこで、DC-SIGN 抗原を発現する K562 細胞 (3M-1) の BCG 菌感受性を検索した。解析を容易にするため BCG 菌に GFP を強制発現させ、3M-1 と 16 時間共培養した後 FACS を用いて 3M-1 細胞の蛍光強度を観察すると、全ての 3M-1 細胞が緑色に染色されていた。しかし、DC-SIGN 非発現親 K562 を同様に GFP ラベル BCG 菌と共培養しても K562 細胞は陰性であった。このことは、K562 細胞は DC-SIGN を発現することで BCG 菌に対する感受性を獲得したことを示している。さらに、DC-SIGN を介して 3M-1 細胞に取り込まれた BCG 菌の局在を明らかにするため、GFP ラベルした BCG 菌をパルスした細胞を Confocal 顕微鏡下で抗 LAMP 抗体で培養すると、BCG 菌と LAMP 抗原は細胞内で同一部位に存在すること、すなわち DC-SIGN を通じて細胞内へ侵入した BCG 菌は Lysozome にまで到達し、BCG 菌の細胞内プロセッシングを促進させている可能性が示唆された。さらに、DC 上の DC-SIGN 抗原が BCG 菌に対するレセプターとして作用していることを示すため、DC を BCG 菌で刺激した際の DC の活性化程度を IL-12 p70 の産生能で測定した。DC は BCG 菌に対して易感染性を有するが、DC を BCG 菌で刺激すると活性化型 IL-12 (IL-12 p70) を産生し活性化した。しかし、DC 上の DC-SIGN 抗原を中和抗体を用いてその発現を予め抑制した上で BCG 菌を添加すると、DC からの IL-12 p70 の産生は有意に抑制された。このことは、DC-SIGN が DC 上の BCG 菌に対するリガンドとして機能していることを示唆している。さらに、同様に DC 上の DC-SIGN とらい菌の関係を検索すると、

用いた抗 DC-SIGN 抗体の濃度依存性にらい菌の DC への取り込みが抑制され、かつ、らい菌刺激による DC からの IL-12 p70 の産生も抗 DC-SIGN 抗体処理によって抑制された。

#### DC-SIGN 抗原の抗抗酸菌細胞性免疫応答に及ぼす影響

抗酸菌に対する細胞性免疫応答は、抗酸菌に対する生体防御反応の根幹を成す。その際、DC は抗原提示細胞として一連の細胞性免疫カスケードのトリガーとして重要な位置を占めるが、DC にらい菌をパルスし自己の T 細胞を共培養すると、T 細胞は活性化され IFN- $\gamma$  を産生する。この系において、DC 上の DC-SIGN 抗原を抗体を用いて予め処理しておく、らい菌パルス DC による T 細胞活性化は強く抑制された。従って、DC-SIGN は抗酸菌に対する一連の細胞性免疫反応を賦活する上で、極めて重要な役割を果たしていることが示唆された。一方、我々は抗酸菌生体防御反応を司る抗酸菌由来分子の検索を行ってきたが、これまでに抗酸菌菌膜に存在する Major Membrane Protein-II (MMP-II) が、強い抗原性を有する分子として同定されている。そこで、MMP-II と DC-SIGN の関係について、DC-SIGN 発現細胞株 3M-1 と非発現細胞株 K562 を用いて検索した。3M-1 は MMP-II 濃度依存性に MMP-II と結合したが、K562 と MMP-II の結合は観察されなかった。

#### D. 考察

抗酸菌に対する生体防御反応は、細胞性免疫とりわけタイプ 1 CD4 陽性 T 細胞による獲得性免疫がその根幹を成す。一般に抗酸菌は、抗原提示細胞であるマクロファージあるいは樹状細胞に感染した後、自らの産生するファクターにより寄生性感染を果たす。その最大の機序は、菌体自らをファゴゾームに封じ込め、プロセッシングを遂行するライソゾームとの融合を阻止することにある。本研究においては、抗酸菌感染症に対する生ワクチンとして広く用いられてきた *M. bovis* BCG 菌と *M. leprae* をモデル抗酸菌として、抗酸菌に対する細胞側のリガンドに着目し、HIV-1 と抗酸菌の

両者の病変発症を阻止する方策を開発することを目的として細胞性免疫賦活に関する分子機構を検討した。両抗酸菌は、共に樹状細胞上の DC-SIGN 抗原と結合し、樹状細胞を成熟化および活性化させ、かつ CD4 陽性 T 細胞の活性化をもたらすことを明らかにした。さらに、DC-SIGN に抗酸菌が結合すると抗酸菌はライソゾームにまで運搬され、抗原提示細胞の持つプロセッシング機構により細分画される可能性が示唆された。このことは、DC-SIGN を介することで免疫活性化を誘導し、生体防御反応の賦活化に寄与し得るものと想定された。さらに、抗酸菌菌膜に存在し、新たに同定された非常に強い細胞性免疫賦活能を有するタンパク Major Membrane Protein-II が DC-SIGN 抗原と結合する可能性が示唆されたことは、新しい予防法の開発に向け今後の展開が期待される。

#### E. 結論

各種変異導入 DC-SIGN 発現細胞株を樹立した。BCG 菌およびらい菌は、共に結核菌群と同様に DC-SIGN と結合し、樹状細胞へ感染することが明らかとなった。DC-SIGN を介し細胞内に取り込まれた抗酸菌は、ライソゾームまで運搬されプロセッシングを受ける可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 牧野正彦. らい菌と樹状細胞の相互作用. 臨床免疫 39(2):109-115, 2003.
- 2) Maeda Y., M. Gidoh, N. Ishii, C. Mukai, and M. Makino. Assessment of cell mediated immunogenicity of *Mycobacterium leprae*-derived antigens. Cell. Immunol., 222:69-77, 2003.
- 3) Maeda, Y., P. J. Brennan, and M. Makino. Studies of lipoproteins of *Mycobacterium leprae*. Jpn. J. Leprosy, in press, 2004.

- 4) Kai, M., Y. Maeda, S. Maeda, Y. Fukutomi, K. Kobayashi, Y. Kashiwabara, M. Makino, M. A. Abbasi, M. Z. Khan, and P. A. Shah. Active surveillance of leprosy contacts in country with low prevalence rate. *Intl. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.*, in press, 2004.

## 2. 学会発表

### 国際学会

Makino M., Y. Maeda, H. Kimura, and F. Takeshita. Up-regulation of antigen presenting function of mycobacteria infected macrophage. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 38<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Newark, USA, July 21-23, 2003.

### 国内学会

- 1) 牧野正彦, 前田百美. タイプ1細胞性免疫を誘導するらい菌抗原の探索. 第76回日本細菌学会総会 2003年4月 熊本.
- 2) 中田 登, 甲斐雅規, 鈴木幸一, 前田伸司, 松岡正典, 牧野正彦. 大腸菌 - 抗酸菌シャトルコスミドを用いたらい菌 Thai53 株整列クローンライブラリの作製と遺伝子解析. 第76回日本細菌学会総会 2003年4月 熊本.
- 3) 甲斐雅規, 藤田由希子, 矢野郁也, 牧野正彦. らい菌由来糖脂質の解析. 第76回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2003年7月 神戸.
- 4) 宮本友司, 武下文彦, 中田 登, 前田百美, 甲斐雅規, 牧野正彦, 向井 徹. 抗酸菌 Fibronectin Attachment Protein の機能解析. 第76回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2003年7月 神戸.
- 5) 前田百美, 遠藤真澄, 寺尾恵治, 牧野正彦. シュワン細胞とらい菌の相互作用の解明. 第76回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2003年7月 神戸.
- 6) 武下文彦, 向井 徹, 宮本友司, 牧野正彦. らい菌 Fibronectin Attachment Protein (FAP) を標的にした DNA ワクチンの検討. 第76回日本ハンセン病学会総会・学術大会

2003年7月 神戸.

- 7) 甲斐雅規, 中田 登, 牧野正彦. 速発育性抗酸菌 *M. smegmatis* のトランスポゾン変異株ライブラリーの作製と解析. 第86回日本細菌学会関東支部総会 2003年10月 横浜.
- 8) 宮本友司, 武下文彦, 中田 登, 前田百美, 甲斐雅規, 牧野正彦, 向井 徹. *Mycobacterium smegmatis* 由来 Fibronectin Attachment Protein の解析. 第26回日本分子生物学会年会 2003年12月 神戸.
- 9) 牧野正彦, 前田百美, 木村博昭, 武下文彦, 稲垣勝也. らい菌感染マクロファージの抗原提示能の増強. 第33回日本免疫学会総会 2003年12月 福岡.
- 10) 福富康夫, 牧野正彦. マクロファージ内におけるらい菌増殖機構. 第33回日本免疫学会総会 2003年12月 福岡.

## 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 |

# 1 1. 強力なワクチン効果を賦与するためのT細胞活性化因子の解析

分担研究者 横田 恭子 国立感染症研究所免疫部室長

研究要旨 樹状細胞による外来性抗原の cross-presentation を介する Gag 特異的 CD8 陽性T細胞の活性化は、ウイルスベクターによる内在性抗原の提示による活性化と比べて低レベルである。しかしながら、樹状細胞を成熟化させる活性を有する Yeast VLP とウイルスベクターを組み合わせることにより、T細胞の in vitro でのプライミングも可能であることが明らかとなった。このような in vitro の系は、ワクチン抗原の免疫誘導能の評価およびその効率の改善を図る方法として有用であると考えられる。

## A. 研究目的

ワクチンがその効果を発揮するには、初期のT細胞の活性化が量的および質的に強力であり、しかも長期に存続する能力を誘導する必要があると思われる。しかしながら、そのような分子の実態は明らかではない。本研究は HIV 感染に対するワクチンの効果を十分に発揮するために必要な抗原提示細胞とT細胞の相互作用に関わる因子を明らかにすることを目的とする。

## B. 材料と方法

### 1. 細胞

末梢血単核細胞をファイコール密度勾配法で分離し PBMC を得た。PBMC より抗 CD14 標識磁気ビーズを用いて MACS で単球を分画し、GM-CSF と IL4 の存在下に 7-8 日培養して樹状細胞(DC)を分化誘導した。CD14 陰性細胞は Negative selection によりT細胞を純化し(98%)、いったん凍結保存して使用時に解凍した。

HIV-1 Gag peptide (KYKLVHIVW)特異的 CTL line は東大医科研川名(立川)愛先生から供与された。

### 2. HIV-1 抗原

Yeast 由来 Gag 粒子(VLP)とその対照となる Yeast 培養液 (CS)は北里大学・森川裕子教授より、Gag/Pol 発現アデノウイルス(Ax GP) と Rev 発現アデノウイルス は東大医科研岩本愛吉教授より、Gag 発現センダイウイルスは永井

美之前エイズセンター長よりそれぞれ供与を受けた。

### 3. FACS 解析

細胞は 0.5% BSA/PBS、0.01% NaN<sub>3</sub> (SB)に浮遊させ、細胞表面抗原を染色した後 4% formaldehyde で固定し、0.2%サポニン含有 SB で permeabilize した。更に細胞内染色抗体を反応させ、フローサイトメーターで解析した。細胞表面抗原に対する蛍光標識抗体は Coulter-Immunotech 社あるいは e-Bio 社の製品を、FITC-抗 IFN- $\gamma$  抗体は BD-Pharmingen 社より購入した。MHC-Gag peptide complex は東大医科研川名(立川)愛先生より供与を受けた。

### 4. 培養

DC をウイルスベクター等の抗原存在下に培養し、翌日T細胞を 1 : 10 の割合で混合培養した。1週間後のT細胞を同様の条件で再刺激した。抗原刺激3日後以降は IL-2 を 50U/ml の濃度で加えて培養した。

## C. 研究結果

これまでに、樹状細胞を成熟化させる活性を有する Yeast 由来 VLP は、樹状細胞による cross-presentation を介して Gag 特異的 CD8 陽性 T細胞を活性化しうることをしめしてきた。今回抗原提示の効果を Gag peptide 特異的 CTL の活性化を指標に比較すると、HIV のワクチン候補のひとつであるアデノウイルスベクターによる内在性抗原の提示と比較すると