

- rBCG-V3J1 induces a long-term HIV-specific neutralizing immunity in Th1 and Th2 deficient condition. *J. Immunol.* 167: 5862-5867, 2001.
2. Kawahara, M., Matsuo, K., Nakasone, T., Hiroi, T., Kiyono, H., Yamada, T., Yamamoto, N. and Honda, M., Combined intrarectal/intrademal inoculation of recombinant *Mycobacterium Bovis Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) induces enhanced immune responses against the inserted HIV-1 V3 antigen. *Vaccine* 21:158-166, 2002.
  3. Sakaue, G., Hiroi, T., Nakagawa, Y., Someya, K., Iwatani, K., Sawa, Y., Takahashi, H., Honda, M., Kunisawa, J. and Kiyono, H. HIV mucosal vaccine: Nasal immunization with gp160 encapsulated HVJ-liposome induces antigen-specific CTL and neutralizing antibody responses. *J. Immunol.* 170: 495-502, 2003.
  4. Park EJ, Takahashi I, Ikeda J, Kawahara K, Okamoto T, Kweon MN, Fukuyama S, Groh V, Spies T, Obata Y, Miyazaki J, Kiyono H. Clonal expansion of double-positive intraepithelial lymphocytes by MHC class I-related chain a expressed in mouse small intestinal epithelium. *J. Immunol.* 171:4131-4139, 2003.
  5. Tamagawa H, Takahashi I, Furuse M, Yoshitake-Kitano Y, Tsukita S, Ito T, Matsuda H, Kiyono H. Characteristics of claudin expression in follicle-associated epithelium of Peyer's patches: preferential localization of claudin-4 at the apex of the dome region. *Lab Invest.* 83:1045-1053, 2003.
  6. Kobayashi M, Kweon MN, Kuwata H, Schreiber RD, Kiyono H, Takeda K, Akira S. Toll-like receptor-dependent production of IL-12p40 causes chronic enterocolitis in myeloid cell-specific Stat3-deficient mice. *J. Clin Invest.* 111:1297-1308, 2003.
  7. Jang MH, Kweon MN, Hiroi T, Yamamoto M, Takahashi I, Kiyono H. Induction of cytotoxic T lymphocyte responses by cholera toxin-treated bone marrow-derived dendritic cells. *Vaccine.* 21:1613-1619, 2003.
  8. Hagiwara Y, McGhee JR, Fujihashi K, Kobayashi R, Yoshino N, Kataoka K,

- Etani Y, Kweon MN, Tamura S, Kurata T, Takeda Y, Kiyono H, Fujihashi K. Protective mucosal immunity in aging is associated with functional CD4<sup>+</sup> T cells in nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue. *J. Immunol.* 170:1754-1762, 2003.
9. Okuda Y, Takahashi I, Kim JK, Ohta N, Iwatani K, Iijima H, Kai Y, Tamagawa H, Hiroi T, Kweon MN, Kawano S, Takeda K, Akira S, Sasaki Y, Hori M, Kiyono H. Development of colitis in signal transducers and activators of transcription 6-deficient T-cell receptor alpha-deficient mice: a potential role of signal transducers and activators of transcription 6-independent interleukin-4 signaling for the generation of Th2-biased pathological CD4<sup>+</sup> betabeta T cells. *Am J Pathol.* 162:263-271, 2003.
10. Boyaka PN, Ohmura M, Fujihashi K, Koga T, Yamamoto M, Kweon MN, Takeda Y, Jackson RJ, Kiyono H, Yuki Y, McGhee JR. Chimeras of labile toxin one and cholera toxin retain mucosal adjuvanticity and direct Th cell subsets via their B subunit. *J. Immunol.* 170:454-462, 2003.
11. Yuki Y, Kiyono H. New generation of mucosal adjuvants for the induction of protective immunity. *Rev Med Virol.* 13:293-310, 2003.
12. Kweon MN, Kiyono H. Eosinophilic gastroenteritis: a problem of the mucosal immune system? *Curr Allergy Asthma Rep.* 3:79-85, 2003.
2. 学会発表
1. Sakaue, G., Hiroi, T., Kunisawa, J., Fukushima, T., Takahashi, H. and Kiyono, H.: HIV mucosal vaccine: nasal immunization with gp160 encapsulated HVJ-liposome induces antigen-specific IgA and IgG responses in mucosal and systemic tissues. 第29回日本免疫学会総会、京都、1999.
2. Goto, H., Hiroi, T., Yanagita, M., Honda, M., Yamanaka, N., and Kiyono, H.: HIV mucosal vaccine: nasal immunization with rBCG-V3J1 induces a long term HIV-specific neutralizing immunity, 10<sup>th</sup> International Congress of Mucosal Immunology, Amsterdam, 1999.
3. Hiroi, T., Sakaue, G., Nakagawa, Y., Someya, K., Iwatani, K., Sawa, Y., Takahashi, H., Honda, M., Kunisawa, J. and Kiyono, H.: HIV mucosal vaccine: Nasal immunization with gp160 encapsulated HVJ-liposome induces antigen-specific CTL and neutralizing antibody responses. 第32回日本免疫学会総会、東京、2002.

4. Hiroi, T., Sakaue, G., Nakagawa, Y., Someya, K., Iwatani, K., Takahashi, H., Honda, M., and Kiyono, H.: Nasal immunization with gp160 encapsulated HVJ-liposome induced antigen-specific CTL and neutralizing immunity in Th1 and Th2 deficient condition, 11<sup>th</sup> International Congress of Mucosal Immunology, Orland, 2002.
5. Goto, H., Hiroi, T., Yanagita, M., Yamanaka, N., Kiyono, H.: HIV mucosal vaccine: Nasal immunization with rBCG V3J1 induces HIV-specific neutralizing immunity, 5<sup>th</sup> International symposium on tonsils and mucosal barriers of the upper airways, Wakayama, 2003.
6. 廣井隆親、清野宏: 粘膜免疫機構と次世代のHIVワクチン、第18回日本エイズ学会総会シンポジウム、神戸、2003.

#### H.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  
なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）  
分担研究報告書

## エイズ医薬品等開発に関する研究

分担研究者 高橋 秀実 日本医科大学微生物学免疫学教室教授

## 研究要旨

この3年間上記の研究目標に関し、分担研究者としての課題である「ワクチンの CTL 誘導能及び免疫学的交差性の研究」を遂行するため、まず感染抵抗性を構築する CTL の実体を明らかにする目的で、京都大学ウイルス研究所エイズ研究施設の速水正憲教授との共同研究により同教室において確立された、SHIV-dnef (*nef* 遺伝子欠損 SHIV) の接種によってアカゲザル個体内に構築される SHIV 攻撃接種に対する感染抵抗性に関し検討を重ねた。その結果、こうした感染抵抗性は中和抗体や NK 活性によってではなく、ペプチド抗原を用いた ELISPOT 法による IFN- $\gamma$  の追跡によってその存在が示唆される、SHIV 感染細胞を特異的に認識・排除する CTL を主体とした獲得免疫によって担われていることが推測された。この際、強毒株 SHIV89.6P 攻撃接種に対する感染抵抗性を示すキラー細胞は同時に SHIV-3rN 株に対しても交差性を有することが認められたため、抵抗性に関与するキラー細胞は *env* ではなく両株の共通部分である *gag/pol* 領域を認識する可能性を考えた。しかしながら、調べた限りではこのような交差性を有する CTL 株をサル個体から樹立することは出来ず、こうした交差性を有するキラー活性は末梢血リンパ球を追跡した結果次第に消失していった。そこで、再度 SHIV89.6P 株を攻撃接種したところ、再びこうした交差性を有するキラー細胞が末梢血中に一過性に出現したことより、感染抵抗性には通常の CTL とは別のキラー活性を有する免疫応答が関与するものと推測した。今後はその実体を、これまでの獲得免疫系に属する CTL のみならず基本免疫系を構成する NKT 細胞あるいは  $\gamma\delta$ T 細胞の可能性も含め追跡する予定である。一方、こうした感染抵抗性が *nef* 遺伝子の欠損から個体内に誘発されたことから、抵抗性に関与するキラー活性を有した細胞の認識抗原を探るためには、抗原分子が *nef* 遺伝子の存在によって提示されなくなる可能性、且つその抗原は SIV の *gag/pol* 領域の影響を受けるものと考え、*nef* 遺伝子を欠損させるとともに感染細胞を特定できるようにするため、EGFP 遺伝子を *env* 領域に挿入したウイルスベクターを作成した。この際、樹状細胞などの増殖性の低い細胞へも感染可能であると同時に感染後にウイルスを放出せず、細胞表面に提示されたウイルス抗原分子を弱酸抽出法などにより採取することが出来るように、破壊された *env* 領域を VSV-G で pseudotype したウイルスの作成を試みた。その結果、従来から報告されているように、*nef* 遺伝子の存在により感染 CD4T 細胞において CTL の抗原認識に重要な役割を果たす class I MHC と CD4 分子の表面発現が抑制されることを確認するとともに、同様な現象がウイルスの感染した樹状細胞においても観察されることを見出した。さらに、*nef* 遺伝子の存在が樹状細胞上の class I MHC 分子に酷似した脂質抗原提示分子である CD1a の発現低下に強く影響することを見出したため、ウイルス感染に伴い誘導された脂質抗原分子もまた、今後のワクチン開発の指標として考慮すべきものと考えさらに研究を展開している。

また、ウイルス感染に CTL が誘発される機序を再確認した結果、ウイルス由来の蛋白質と遺伝子産物が体内に散布されるが、前者のウイルス蛋白質は未熟な樹状細胞 (iDC: immature dendritic cells) によって捕捉され、後者の遺伝子産物が抗原を取り込んだ iDC を成熟型樹状細胞 (DC) とし、ウイルスを制御するための特異的キラー T 細胞 (CTL) が誘導されるのではないかと推測し研究を展開した。その結果、ウイルス由来の蛋白質として recombinant の HIV-gp120 分子を取り込ませた iDC をウイルス遺伝子を代表とする産物としての Poly(I:C) とともに処理し、Toll-like receptor (TLR)3 を

介した刺激によって活性成熟させた DC を免疫することによって、ウイルス特異的 CTL が誘導されることを見出した。しかしながら、ウイルス蛋白を取り込んだ iDC を細菌由来の LPS によって成熟させた DC を免疫した場合には、ウイルス特異的 CTL は誘導されず、体液性免疫応答としての特異的抗体が誘発されることを見出した。また、こうした DC を免疫する場合には皮内投与が望ましく、この皮内と皮下では樹状細胞の TLR の発現動態は異なることを観察した。

以上、①HIV/SIV 感染制御に関与する免疫の実体は、*gag/pol* 領域を認識する交差性を有するキラー活性を有した細胞群であり、その中には従来の CTL のみならず基本免疫系を構成する NKT 細胞あるいは $\gamma\delta$ T細胞の可能性も含めて考える必要があること、②その細胞群は Nef の欠損により体内に誘導され、その活性化抗原としてウイルス感染に伴って産生されたクラス I MHC 分子によって提示されたペプチド抗原のみならず CD1 分子によって提示された脂質・糖脂質抗原にも着目していく必要があること、③こうしたウイルス産物を取り込んだ iDC がどのような活性化状態に成るかがその後の感染抵抗性を形成する上での鍵を握ること、そして④TLR3 に結合し細胞の活性化を担う Poly(I:C)等の物質群が CTL の誘導に有効に作用すること、等が本研究の結果明らかとなった。今後は、以上のことを踏まえ、実際に個体内に感染抵抗性を誘発出来るようなワクチンの開発をさらに展開する予定である。

#### A. 研究目的

京都大学ウイルス研究所エイズ研究施設の速水正憲教授の教室において確立された、SHIV-dnef (*nef* 遺伝子欠損 SHIV) をアカゲザルに接種すると、SHIV 攻撃接種に対する感染抵抗性がサル個体内に確立されたとの報告に着目し、同研究施設の客員として招聘されたことを機会に、速水研究室との共同研究のもと、この感染抵抗性の実体を探る研究に着手した。この際、感染抵抗性に関与するサル個体内に構築された免疫システムを、従来のペプチド抗原に対する獲得免疫系 (acquired Immunity) のみならず、ウイルスの初期侵入に即座に応答する基本免疫系 (innate immunity) にまで敷衍させて観察することとした。また、抵抗性構築の鍵を握るものとしての *nef* 遺伝子に着目し、感染細胞における *nef* 遺伝子の影響を獲得免疫系の T 細胞のみならず、基本免疫系の樹状細胞においても追跡できるようなシステムの確立を目指した。そして、獲得免疫系の Effector である CTL の誘発・制御を担うものが樹状細胞を中心とした基本免疫系であるとの立場から、基本免疫系の活性化による CTL を主体とした獲得免疫システムの確立法を追跡することとした。

#### B. 研究方法

①アカゲザルを用いた研究：SHIV-dnef (*nef* 遺伝子欠損 SHIV) を接種したアカゲザルに SHIV を攻撃接種前後の血液を採取し、リンパ球群を分離する。この際、感染抵抗性獲得ザル血清中にウイルス中和能が存在するか否かについても調べておく。また、クラス I MHC 分子の異なる個々のサル内に SHIV 特異的な CTL が誘導され

ているか検討するため、SHIV 感染性を有する CD4 陽性 T 細胞株を Herpes virus saimiri (HVS) を用いて誘導した。この自己 T 細胞に SHIV-3rN, SHIV89.6P そして SIVmac239 を感染させた標的細胞に対する傷害性を攻撃接種後のサルリンパ球を用いて実施するとともに、env, gag, pol 領域の合成ペプチドに対する IFN-g の産生状況を ELISPOT 法で追跡した。

②*nef* 遺伝子欠損型 EGFP 発現 Pseudotype virus の作成：図 1 に示すような *nef* 遺伝子にフレームシフトを変異を導入し、env 領域に EGFP 遺伝子を発現させたプラスミドを作成し、Env として vesicular stomatitis virus を組み込んだウイルスを作成した。そして、このウイルスの感染効率を HSV で transform した T 細胞、あるいは末梢血に GM-CSF と IL-4 を添加培養することによって誘導した樹状細胞を用いて追跡した。

③TLR3 を介した樹状細胞成熟作用を有する Poly(I:C) と合成 gp120 蛋白をマウスに接種後、経時的に血液中の IL-12, IL-10 等を ELISA 法により追跡するとともに、脾臓内リンパ球より gp120 内の特異的 CTL epitope である V3(P18) に対する傷害活性を測定した。また、コントロールとして TLR4 を介した樹状細胞成熟促進作用を有する LPS を使用した。

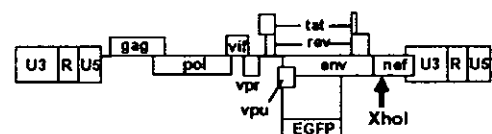


図 1. Pseudotyped virus のプラスミド構造

C. 研究結果

①調べた限りでは、感染抵抗性獲得ザル血清にはウイルスに対する中和能を有する抗体は検出されず、またウイルス感染細胞を特異的に傷害するような NK 活性も認められなかった。従って、感染抵抗性は中和抗体や NK 活性によってではなく、SHIV 感染細胞を特異的に認識・排除する CTL を主体とした獲得免疫によって担われていることが推測された。また、ペプチド抗原を用いた ELISPOT 法による IFN- $\gamma$  の追跡によってこうしたペプチド特異的な CTL が SHIV<sub>nef</sub> 接種ザルの体内に誘導された可能性が示唆された。この際、強毒株 SHIV89.6P 攻撃接種に対する感染抵抗性を示すキラー細胞は同時に SHIV-3rN 株に対しても交差性を有することが認められたため、抵抗性に関与するキラー細胞は *env* ではなく両株の共通部分である *gag/pol* 領域を認識する可能性を考えた (図 2)。しかしながら、調べた限りではこのような交差性を有する CTL 株をサル個体から樹立することは出来ず、こうした交差性を有するキラー活性は末梢血リンパ球を追跡した結果次第に消失していった。そこで、再度 SHIV89.6P 株を攻撃接種したところ、再びこうした交差性を有するキラー細胞が末梢血中に一過性に出現したことより、感染抵抗性には通常の CTL とは別のキラー活性を有する免疫応答が関与するものと推測した。

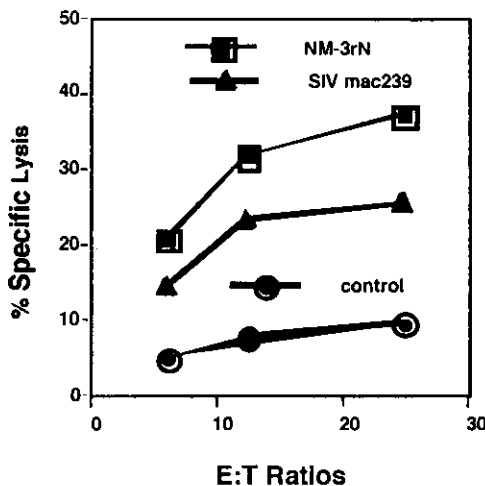


図 2. 交差傷害性を有する CTL の検出

②図 1 に示したようなプラスミドベクターを用いて HVS-transformed CD4 陽性 T 細胞に感染させたところ、*nef* 遺伝子の存在により感染 CD4T 細胞において CTL の抗原認識に重要な役割を果たす class I MHC と CD4 分子の表面発現が抑制されることを確認できた。また、同様な現象がウイルスの感染した樹状細胞においても観察されることを見出した。さらに、*nef* 遺伝子の存在が樹状細胞上の class I MHC 分子に酷似した脂質抗原提示分子である CD1a の発現低下に強く影響することを見出したため、ウイルス感染に伴い誘導された脂質抗原分子もまた、今後のワクチン開発の指標として考慮すべきものと考えさらに研究を展開している。(図 7)。

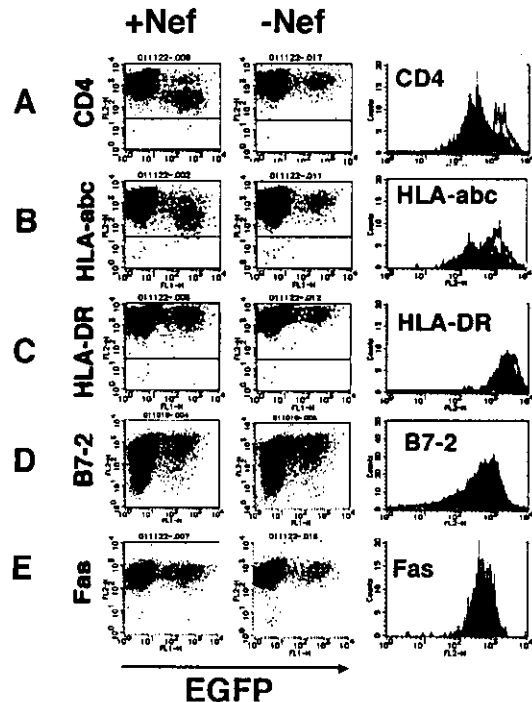


図 3. Nef による樹状細胞上の分子発現の変化

③また、ウイルス由来の蛋白質として recombinant の HIV-gp120 分子を取り込ませた iDC をウイルス遺伝子を代表とする産物としての Poly(I:C) とともに処理し、Toll-like receptor (TLR)3 を介した刺激によって活性化成熟させた DC を免疫することによって、ウイルス特異的 CTL が誘導されることを見出した。しかしながら、ウイルス蛋白を取り込んだ iDC を細菌由来の LPS によって成熟させた DC を免疫した場合には、ウイルス特異的 CTL は誘導されず、体液性免疫応答としての特異的抗体が

誘発されることを見出した（図4）。また、こうした DC を免疫する場合には皮内投与が望ましく、この皮内と皮下では樹状細胞の TLR の発現動態は異なることを観察した。

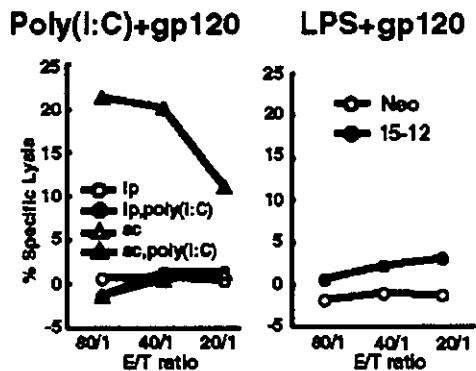


図4. Recombinant 蛋白と Poly(I:C)による特異的 CTL の誘導

#### D. 考察

以上の結果、*nef* 遺伝子を欠損させた SHIV を用いてサル個体内に構築された感染抵抗性の本体は、*gag/pol* 領域の抗原産物を認識する CTL であり、このキラー活性は *env* 領域の異なる SIVmac、あるいは SHIV-89.6P 株感染細胞に交差傷害性を有したものであることが推測された。そして、このキラー活性は抵抗性を獲得したサルにおいてウイルス粒子が消失した際には、血液中よりキャッチ出来なくなるものの、ウイルスの再接種に伴い再び一過性に血液中出现してくる特徴を持っていた。そのため、通常感染者の末梢血から誘導できる CTL のライン化がうまく出来なかった。こうしたことが感染抵抗性の実体であるとするならば、従来のような方策ではこれらの個体から特異的 CTL を誘導維持することは困難であるのかも知れない。おそらくは、ウイルスの終息に伴って、その侵入門戸である粘膜組織に棲息し、NKT 細胞や $\gamma\delta$ T 細胞、そして樹状細胞群などの基本免疫システムを構築する細胞群とともに再度の侵入に備えているのかも知れない。真の感染防御に関与する CTL は、速やかに侵入ウイルスを排除しうるものであり、ウイルス粒子とともに血液中に長期間浮遊する軍団ではない可能性を念頭に置き研究を展開することも重要であろう。

そのような意味で、*nef* の存在により樹状細胞上の CD1a 分子がクラス I MHC 分子とともに

に発現低下を見たことは特筆にあたいする。即ち、HIV は初期侵入の標的である樹状細胞による、クラス I MHC 分子を介したペプチド抗原のみならず、CD1a 分子を介した脂質・糖脂質抗原の提示を Nef 蛋白によって阻害したのである。このことは、ウイルスの制御に当たるのが、従来の蛋白抗原特異的な effector 細胞群のみならず、脂質抗原あるいは類似のアルカロイドなどを識別する NKT 細胞や $\gamma\delta$ T 細胞を含めた細胞群である可能性を示唆している。こうした中、我々は腫瘍表面から弱酸抽出法により得られた抗原物質の中に、CTL の標的分子であるペプチド抗原のみならず、NKT 細胞を活性化する脂質抗原が含まれる可能性を見出した (Ishii et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 2003, in press)。今後は、同様の方法を HIV 感染細胞に展開し新たな抗原分子を探していく予定である。

また、こうした感染細胞制御群を活性化するためには、樹状細胞を体内活性化することが非常に重要であり、その一つの方法として我々はウイルスの遺伝子産物を mimic した TLR3 の刺激作用を有する Poly(I:C)の新たな作用を見出した (Fujimoto, et al., *Int. Immunol.* 2003, in press)。このことは、TLR3 からのシグナルがウイルス感染細胞に伝達された場合には、細胞内でのウイルス制御因子である IFN- $\alpha$ ,  $\beta$  が産生され、ウイルス情報提供を担う樹状細胞に伝達された場合には、感染細胞制御を担う effector 細胞群が速やかに活性化されることを物語っている。TLR3 は人類がウイルスを制御するために獲得した重要な因子であると言えよう。

#### E. 結論

以上、本研究により HIV/SIV に対する感染抵抗性は、交差性を有する CTL を主体とした細胞群によって構築されており、これら細胞群はウイルス粒子を速やかに排除した後は血液中から消失し基本免疫系とともに粘膜組織などに棲息し、新たなウイルスの侵入に備える可能性を見出した。そして、この免疫系を活性化するための因子として TLR3 からのシグナルを発することができる Poly(I:C)の有用性を明らかにした。CTL を保持し感染抵抗性を獲得したと想定されていたアフリカの売春婦群が、粘膜からのウイルス刺激を受けなくなった状況において、抵抗性を失い感染が成立した報告は、CTL を誘導するとともに絶え間ない粘膜を介した基本免疫系への刺激が感染防御の維持に不可欠であることを物語っている。

## G. 研究発表

## 1. 論文発表

- 1) Takahashi, M., Nakagawa, Y., Berzofsky, J.A., Takahashi, H. (2001) Counter-regulation of cytolytic activity and cytokine production in human immunodeficiency virus (HIV)-1-specific murine CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes by free antigenic peptide.  
*Int. Immunol.* 13, 43-51, 2001.
- 2) Nakajima, Y., Takahashi, M., Norose, Y., Ogawa, R., Takahashi, H. (2001) Induction of apoptosis in mice thymocytes by tetracaine.  
*Biomedical Res.* 21, 297-303.
- 3) Watari, E., Shinya, E., Kurane, S., Takahashi, H. (2001) Effect of cyclosporin A on cell fusion in monkey kidney cell line persistently infected with measles virus.  
*Intervirology.* 44, 209-211.
- 4) Machida, K., Kohara, K., Seike, E., Tone, S., Shibasaki, F., Shimizu, M., Takahashi, H., et al. (2001) Inhibition of cytochrome C release in Fas-mediated signaling pathway by hepatitis C viral proteins in transgenic mice liver.  
*J. Biol. Chem.* 276, 12140-12146.
- 5) Hirota, K., Nagata, K., Norose, Y., Futagami, S., Nakagawa, Y., Senpuku, H., Kobayashi, M., Takahashi, H. (2001) Identification of an antigenic epitope in *Helicobacter pylori* urease that induces neutralizing antibody production.  
*Infect. Immun.* 69, 6597-6603.
- 6) Hamada, H., Hiroi, T., Nishiyama, Y., Takahashi, H., Masunaga, Y., Hachimura, S., Kaminogawa, S., Takahashi-Iwanaga, H., Iwanaga, T., Kiyono, H., Yamamoto, H., Ishikawa, H. (2002) Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine.  
*J. Immunol.*, 168, 57-64.
- 7) Nishiyama, Y., Hamada, H., Noonaka, S., Yamamoto, H., Nanno, M., Katayama, Y., Takahashi, H., Ishikawa, H. (2002) Homeostatic regulation of intestinal villous epithelia by B lymphocytes.  
*J. Immunol.*, 168, 2626-2633.
- 8) Yokosuka, T., Takase, K., Suzuki, M., Nakagawa, Y., Taki, S., Takahashi, H., Fujisawa, T., Arase, H., Saito, T. (2002) Predominant role of T cell receptor (TCR)- $\alpha$  chain in forming preimmune TCR repertoire revealed by clonal TCR reconstitution system.  
*J. Exp. Med.*, 195, 991-1001.
- 8) Enose, Y., Ui, M., Miyake, A., Suzuki, H., Uesaka, H., Kuwata, T., Kunisawa, J., Kiyono, H., Takahashi, H., Miura, T., Hayami, M. (2002) Protection by intranasal immunization of a nef-deleted, nonpathogenic SHIV against intravaginal challenge with a heterologous pathogenic SHIV.  
*Virology*, 298, 306-316.
- 9) Li, Q., Nagahara, N., Takahashi, H., Takeda, K., Okumura, K., Minami, M. (2002) Organophosphorus pesticides markedly inhibit the activities of natural killer, cytotoxic T lymphocyte and lymphokine-activated killer: a proposed inhibiting mechanism via granzyme inhibition.  
*Toxicology*, 172, 181-190.
- 10) Takahashi, M., Osono, E., Nakagawa, Y., Wang, J., Berzofsky, J.A., Margulies, D.H., and Takahashi, H. (2002) Rapid induction of apoptosis in CD8<sup>+</sup> HIV-1 envelope-specific murine CTLs by short exposure to antigenic peptide.  
*J. Immunol.*, 169, 6588-6593.
- 11) Ichkawa, M., Sugita, M., Takahashi, M., Satomi, M., Takeshita, T., Araki, T., Takahashi, H. (2003) Breast milk macrophages spontaneously produce GM-CSF and differentiate into dendritic cells in the presence of exogenous IL-4 alone.  
*Immunology*, 108, 189-195.
- 12) Sakaue, G., Hiroi, T., Nakagawa, Y., Someya, K., Iwatani, K., Sawa, Y., Takahashi, H., Honda, M., Kunisawa, J., and Kiyono, H. (2003) HIV Mucosal Vaccine: Nasal Immunization with gp160-Encapsulated Hemagglutinating Virus of Japan-Liposome Induces Antigen-Specific CTLs and Neutralizing Antibody Responses.  
*J. Immunol.*, 170, 495-502.
- 13) Takaku, S., Nakagawa, Y., Shimizu, M., Norose, Y., Maruyama, I., Wakita, T., Takano, T., Kohara, M., Takahashi, H. (2003) Induction of hepatic injury by hepatitis C virus-specific CD8<sup>+</sup> murine cytotoxic T lymphocytes in transgenic mice expressing the viral structural genes.  
*BBRC*, 301, 330-337.
- 14) Shinya, E., Hidaka, C., Owaki, A., Shimizu, M., Li, Y., Watanabe, K., Watari, E., Hayami, M., Klatzmann, D., Takahashi, H. (2003) Effect of Nef-deleted pseudotyped HIV virions bearing an enhanced green fluorescent protein gene in



the env on HIV-sensitive transformed T cells.  
*Biomed. Res.*, 24, 59-69.

15) Narazaki, H., Watari, E., Shimizu, M., Owaki, A., Das, H., Fukunaga, Y., Takahashi, H., Sugita, M. (2003) Perforin-dependent killing of tumor cells by Vg1Vd1-bearing T cells.  
*Immuno. Lett.*, 86, 113-119.

16) Fujimoto, C., Nakagawa, Y., Shimizu, M., Ohara, K., Takahashi, H. (2003) Isolation of antigenic substances from HIV-1 envelope gp120 gene transfectants by mild acid elution and X-irradiation treatment: for the development of CTL-based immunotherapy.  
*Biomed. Res.*, 24, 115-124.

17) Kawashima, T., Norose, Y., Watanabe, Y., Enomoto, Y., Narazaki, H., Watari, E., Tanaka, S., Takahashi, H., Yano, I., Brenner, M., Sugita, M. (2003) Major CD8 T cell response to live bacillus Calmette-Guérin is mediated by CD1 molecules.  
*J. Immunol.*, 170, 5345-5348.

18) Akahata, W., Ido, E., Akiyama, H., Uesaka, H., Enose, Y., Horiuchi, R., Kuwata, T., Goto, T., Takahashi, H., Hayami, M. (2003) DNA vaccination of macaques by a full-genome simian/human immunodeficiency virus type 1 plasmid chimera that produces non-infectious virus particles.  
*J. Gen. Virol.*, 84, 2237-2244.

19) Takeuchi, J., Watari, E., Shinya, E., Norose, Y., Matsumoto, M., Seya, T., Sugita, M., Kawana, S., Takahashi, H. (2003) Down-regulation of Toll-like receptor expression in monocyte-derived Langerhans cell-like cells: implications of low-responsiveness to bacterial components in the epidermal Langerhans cells.  
*BBRC*, 306, 674-679.

20) Takahashi, H. (2003) Antigen presentation in vaccine development.  
*Comp. Immunol. Microbiol. & Infect. Dis.*, 26, 309-328.

21) Iida, T., Kuwata, T., Ui, M., Suzuki, H., Miura, T., Ibuki, K., Takahashi, H., Yamamoto, T., Imanishi, J., Hayami, M., Kita, M. (2003) Augmentation of antigen-specific cytokine responses in the early phase of vaccination with a live-attenuated simian/human immunodeficiency chimeric virus expressing IFN- $\gamma$ .  
*Arch. Virol.*, (in press).

22) Yanagihara, T., Kumagai, Y., Norose, Y., Moro, I., Nanno, N., Murakami, M., Takahashi, H. (2003) Age dependent decrease of polymeric Ig

receptor expression and IgA elevation in ddY mice: a possible cause of IgA nephropathy.  
*Lab. Invest.*, (in press).

23) Ishii, R., Shimizu, M., Nakagawa, Y., Shimizu, K., Tanaka, S., Takahashi, H. (2003) In vivo priming of natural killer T cells by dendritic cells pulsed with hepatoma-derived acid-eluted substance.  
*Cancer Immunol. Immunother.* (in press).

24) Kim, Y., Nakagawa, Y., Sugiyama, H., Shimizu, M., Takeshita, T., Araki, T., Takahashi, H. (2003) Induction of CD4<sup>+</sup> murine natural killer T-like cells by immunization with syngeneic thymoma expressing embryonic  $\alpha$ -fetoprotein.  
*Cell Immunol.*, (in press).

25) Fujimoto, C., Nakagawa, Y., Ohara, K., Takahashi, H. (2003) Polyriboinosinic polyribocytidylic acid (Poly(I:C))/TLR3 signaling allows class I processing of exogenous protein and induction of HIV-specific CD8<sup>+</sup> CTLs.  
*Int. Immunol.*, (in press).

26) 高橋秀実: HIV ワクチン開発の展望 : DNA ワクチンによる細胞性免疫賦活。カレントセラピー, 19(2): 73-76, 2001.

27) 高橋めぐみ, 高橋秀実: グランゼイム B のレセプターは mannose6-phosphate/Insulin-like growth factor II receptor である。臨床免疫, 36(6): 944-948, 2001.

28) 高橋秀実: HIV 感染症の病態 2) 免疫学的側面から。治療学, 35(2): 123-128, 2001.

29) 高橋秀実: 樹状細胞による細胞性免疫の賦活。感染・炎症・免疫, 31(1): 20-28, 2001.

30) 高橋秀実: エイズワクチン開発に向けて。J.AIDS Res., 3(2): 115-117, 2001.

31) 高橋秀実: DNA ワクチンの実体と応用細胞, 33(9): 352-355, 2001.

32) 高橋秀実: 樹状細胞を用いた腫瘍制御の可能性。炎症と免疫, 9(3): 287-288, 2001.

33) 中川洋子, 高橋秀実: 樹状細胞による抗原特異的細胞傷害性 T 細胞の賦活。炎症と免疫, 9(3): 320-327, 2001.

34) 高橋秀実: HIV 感染症における粘膜免疫の役割: 樹状細胞と  $\gamma\delta$  T 細胞の関与

医学のあゆみ, 199(1): 111-114, 2001.

35) 高橋秀実: HIV と免疫不全: ワクチン戦略の全貌  
Mebio, 18(11), 42-49, 2001.

36) 高橋秀実: 感染症における免疫とワクチン: 細胞性免疫の重要性.  
臨床と微生物, 29(2): 191-194, 2002.

37) 高橋秀実: 臨床研究の進歩: 免疫病態と感染抵抗性の実体について.  
日本臨床, 60(4): 717-723, 2002.

38) 高橋秀実: 基本免疫と獲得免疫  
J Nippon Med Sch, 69(5): 410-414, 2002.

39) 高橋秀実: ウイルス感染と免疫応答  
炎症と免疫, 11(3): 247-248, 2003.

40) 高橋めぐみ、中川洋子、高橋秀実: エピトープペプチドによるキラーT細胞の特異的活性抑制と細胞死の誘導.  
炎症と免疫, 11(3): 249-255, 2003.

41) 高橋秀実: (分担) ブラック微生物学 (林英生、岩本愛吉、神谷茂、高橋秀実編: 丸善)、2003.

42) 高橋秀実: (分担) 分子生物学・免疫学キーワード辞典 (永田和宏、宮坂昌之、宮坂信之、山本一彦編: 医学書院)、2003.

## 2. 学会発表

1) Takahashi, H., Uesaka, H., Fukushima, T., Shimizu, M., Ui, M., Hayami, M.: Induction of CTL specific for SHIV-infected CD4+T cells from SHIV-resistant rhesus mokeys. Japan-US Cooperative Medical Science Program: The 13th Joint Scientific Meeting of AIDS. March 21-23, 2001 (Kumamoto, Japan).

2) Akahata, W., Ido, E., Akiyama, H., Enose, Y., Takahashi, H., Hayami, M.: DNA vaccination of macaques by a full genome plasmid which produces non-infectious virus particles. Japan-US Cooperative Medical Science Program: The 13th Joint Scientific Meeting of AIDS. March 21-23, 2001 (Kumamoto, Japan).

3) Ichikawa, M., Takahashi, M., Takeshita, T., Araki, T., Takahashi, H.: The character and potentiality of macrophages in human breast milk. 11<sup>th</sup> International Congress of Immunology.

July 22-27, 2001 (Stockholm, Sweden).

4) Yanagihara, T., Norose, Y., Matsuoka, Y., Kumagai, Y., Takahashi, H.: Polymeric Ig receptor deficiency in glomerulus is responsible for the IgA nephropathy in DDY mice.

11<sup>th</sup> International Congress of Immunology. July 22-27, 2001 (Stockholm, Sweden).

5) Kumagai, Y., Kiyoshima, Y., Owaki, A., Takahashi, H.: The processing of epitopes grafted into the immunoglobulin hypervariable regions.

11<sup>th</sup> International Congress of Immunology. July 22-27, 2001 (Stockholm, Sweden).

6) Sugiyama H., Yanagie, H., Takaku, S., Takahashi, H.: Cytotoxicity of hepatitis C virus nonstructural protein 2.

11<sup>th</sup> International Congress of Immunology. July 22-27, 2001 (Stockholm, Sweden).

7) Takahashi, H., Takahashi, M., Berzofsky, J., Nakagawa, Y.: Counter-regulation of cytolytic activity and cytokine production in HIV-1-specific murine CD8+ CTL by free epitopic peptide.

11<sup>th</sup> International Congress of Immunology. July 22-27, 2001 (Stockholm, Sweden).

8) Takeuchi, J., Watari, E., Owaki, A., Takahashi, M., Shinya, E., Kawana, S., Takahashi, H.: The effects of CpG motif on various type of dendritic cells induced from human blood mononuclear cells.

11<sup>th</sup> International Congress of Immunology. July 22-27, 2001 (Stockholm, Sweden).

9) Shinya, E., Watari, E., Takahashi, H.: Plasmid lentivirus: A novel non-viral /viral vector.

11<sup>th</sup> International Congress of Immunology. July 22-27, 2001 (Stockholm, Sweden).

10) Yokosuka, T. Takase, K., Takahashi, H., Arase, H., Saito, T.: Unexpectedly high flexibility of CDR3b in antigen recognition by cytotoxic T cells from HIV gp160-specific TCR-transgenic mice. 11<sup>th</sup> International Congress of Immunology.

July 22-27, 2001 (Stockholm, Sweden).

11) Wakabayashi, A., Watari, E., Takahashi, M., Kumagai, Y., Hirokawa, K., Takahashi, H.: Analysis of the mechanisms of oral tolerance mediated in OVA-immunized mice: Detection of antigenic OVA fragments in the sera.

11<sup>th</sup> International Congress of Immunology.

July 22-27, 2001 (Stockholm, Sweden).

12) Takaku, S., Wakita, Y., Nakagawa, Y., Takano, T., Kohara, M., Takahashi, H.: Induction and analysis of cytotoxic T lymphocytes against hepatitis C virus (HCV) structural antigens using HCV transgenic mice with Cre/Lox-P switching expression system.

11<sup>th</sup> International Congress of Immunology.  
July 22-27, 2001 (Stockholm, Sweden).

13) Takahashi, H., Takahashi, M.: Brief exposure to the epitopic peptide can induce apoptosis for HIV-1-specific CD8+ CTL. Japan-US Cooperative Medical Science Program: The 14th Joint Scientific Meeting of AIDS.

March 19-21, 2002 (Seattle, USA).

14) 高橋秀実: ウイルス感染制御における細胞性免疫の役割:  $\alpha\beta$ 型T細胞と $\gamma\delta$ 型T細胞の関与について

第49回日本ウイルス学会総会.

2001年11月18-20日(大阪).

15) 榎瀬良美、三宅在子、宇井雅博、鈴木元、上坂浩実、国澤純、清野宏、高橋秀実、速水正憲: nef 欠損 SIVmac/HIV-1 キメラウイルス (SHIV-dn)の免疫誘導能と粘膜感染防御効果.

第49回日本ウイルス学会総会.

2001年11月18-20日(大阪).

16) 赤畑涉、井戸栄治、秋山尚志、高橋秀実、速水正憲: 非感染性粒子を産生する SHIV 全ゲノムプラスミドを用いた DNA ワクチン.

第49回日本ウイルス学会総会.

2001年11月18-20日(大阪).

17) 栗林秀樹、金子礼志、中川洋子、渡理英二、齋藤隆、熊谷善博、高橋秀実: HIV-P18 特異的 CTL の TCR トランスジェニックマウスを用いた HIV-P18 組み換えワクチニアウイルスに対する感染防御能の解析

第15回日本エイズ学会総会

2001年11月30日(東京)

18) 宇賀神秀樹、福島達伸、上坂浩実、清水真澄、日高千鶴乃、渡理英二、速水正憲、高橋秀実: SHIV 感染防御能獲得ザルを用いた感染抵抗性の解析: 感染T細胞を特異的に傷害するキラーT細胞の特性

第15回日本エイズ学会総会

2001年11月30日(東京)

19) SHINYA Eiji, OWAKI Atusko, WATANABE Kuhomi, KAWASHIMA Tetsuo, IIZUMI Tasuku, TAKAHASHI Hidemi: Production of multimeric

soluble CD4 using C-terminal fragment of C4-binding protein gen.

第31回日本免疫学会総会

2001年12月11日-13日(大阪).

20) 高久俊、清水真澄、脇田隆宇、中川洋子、石井律子、杉山弘高、高野照夫、小原道法、高橋秀実: C形肝炎ウイルス(HCV)トランスジェニックマウスにおける HCV 構造蛋白特異的細胞傷害性Tリンパ球の誘導とその解析

第31回日本免疫学会総会

2001年12月11日-13日(大阪).

21) 渡理英二、倉根修二、清水真澄、日高千鶴乃、杉田昌彦、高橋秀実: Mycobacterium(M. tuberculosis)のT細胞活性化蛋白(EAST-6)由来ペプチドに対する人リンパ球反応性の検討

第31回日本免疫学会総会

2001年12月11日-13日(大阪).

22) 大国寿士、渡辺ユキノ、留目優子、櫻田紳策、高橋秀実、斉藤博久: 組み換え型 Streptococcal pyrogenic exotoxin B(rSPE B)の性状に関する研究

第31回日本免疫学会総会

2001年12月11日-13日(大阪).

23) 高橋めぐみ、大園英一、馬淵綾子、高橋秀実: 浮遊ペプチド抗原によるキラーT細胞のアポトーシス誘導(II)

第31回日本免疫学会総会

2001年12月11日-13日(大阪).

24) 熊谷善博、大脇敦子、栗林秀樹、高橋秀実: 免疫グロブリン超可変部へ分子移植した HIV-1 の gp120V3 エピトープのプロセッシングと抗原提示

第31回日本免疫学会総会

2001年12月11日-13日(大阪).

25) 市川雅男、高橋めぐみ、金栄淳、里見操緒、竹下俊行、高橋秀実: 母乳由来マクロファージの特徴と樹状細胞への分化

第31回日本免疫学会総会

2001年12月11日-13日(大阪).

26) 竹下淳子、渡理英二、大脇敦子、新谷英滋、藤本千明、川名誠司、高橋秀実: ヒト末梢血単球由来樹状細胞の菌体成分に対する反応

第31回日本免疫学会総会

2001年12月11日-13日(大阪).

27) 西山康裕、金城安慶、浜田裕公、坂上静香、栗原さやか、野中聡史、高橋秀実、山岸秀夫、石川博通:  $\gamma\delta$ 型上皮細胞間T細胞サブセットによる腸管上皮細胞の再生統御

第31回日本免疫学会総会

2001年12月11日-13日(大阪).

28) 坂上静香、栗原さやか、野中聡史、浜田裕公、西山康裕、高橋秀実、石川博通；免疫機能関連遺伝子ミュータントマウスにおける腸管上皮細胞の増殖

第31回日本免疫学会総会  
2001年12月11日-13日（大阪）。

29) 柳原剛、野呂瀬嘉彦、松岡良彰、茂呂周、榑崎秀彦、村上睦美、熊谷善博、高橋秀実；腎における poly Ig receptor(plgR)発現の低下は ddY マウスにおける IgA 腎症発症要因の一つである

第31回日本免疫学会総会  
2001年12月11日-13日（大阪）。

30) 浜田裕公、廣井隆親、西山康裕、高橋秀実、八村敏志、上野川修一、清野宏、山元弘、石川博通；マウス腸管粘膜に分布する孤立リンパ小節（第2報）

第31回日本免疫学会総会  
2001年12月11日-13日（大阪）。

31) 若林あや子、清水真澄、中川洋子、西山康裕、斉藤善、熊谷善博、高橋秀実；OVA 経口投与による抗 OVA 抗体産生ならびに OVA 特異的 CTL の誘導

第31回日本免疫学会総会  
2001年12月11日-13日（大阪）。

32) 高橋秀実：新たな腫瘍免疫への期待  
第8回外科侵襲とサイトカイン研究会  
2001年12月15日（東京）

33) Takahashi, H., Takahashi, M.: Brief exposure to the epitopic peptide can induce apoptosis for HIV-1-specific CD8+ CTL. Japan-US Cooperative Medical Science Program: The 14th Joint Scientific Meeting of AIDS. March 19-21, 2002 (Seattle, USA).

34) 山西慎吾、花輪智子、田口晴彦、大崎敬子、山本友子、高橋秀実、神谷茂；Listeria monocytogenes における DnaK の病原因子発現への関与。

第75回日本細菌学会総会。  
2002年4月4-6日（横浜）。

35) 高橋秀実：ウイルス感染制御における細胞性免疫の役割： $\alpha\beta$ 型T細胞と $\gamma\delta$ 型T細胞の関与について。

第38回日本肝臓学会総会  
2002年6月13-14日（大阪）

36) 高久俊、清水真澄、中川洋子、脇田隆宇、小原道法、高橋秀実；C型肝炎ウイルス transgenic mice を用いた HCV 特異的細胞障害

性T細胞の誘導と解析。

第50回日本ウイルス学会総会。  
2002年10月16-18日（札幌）。

37) 高橋秀実、大園英一、渡理英二、渡辺恵理、高橋めぐみ；HIV 由来浮遊抗原ペプチドによる特異的 CTL のアポトーシス誘導。

第50回日本ウイルス学会総会。  
2002年10月16-18日（札幌）。

38) 高橋秀実：免疫システムの新たな実体：基本免疫と獲得免疫。

第5回日本臨床腸内微生物学会総会。  
2002年11月9日（東京）。

39) 高橋秀実：病と闘う体内の免疫システム。

日本ホリスティック医学シンポジウム 2002。  
2002年11月24日（東京）。

40) SHINYA Eiji, KAWASHIMA Tetsuo, TAKEUCHI Junko, OWAKI Atusko, SHIMIZU Masumi, HIDAKA Chizuno, SUGITA Masahiko, TAKAHASHI Hidemi: Nef down-regulates CD1 surface expression: Another mechanism for immune evasion by HIV-1.

第16回日本エイズ学会総会  
2002年11月28日-30日（名古屋）。

41) 里見操緒、市川雅男、杉田昌彦、新谷英滋、竹下俊行、高橋秀実；ヒト母乳中マクロファージの IL-4 による分化と HIV 運搬の可能性。

第16回日本エイズ学会総会  
2002年11月28日-30日（名古屋）。

42) 高橋秀実：HIV 免疫応答とワクチン開発に関する最近の話題。

第16回日本エイズ学会総会  
2002年11月28日-30日（名古屋）。

43) HIROI Takachika, SAKAUE Gaku, NAKAGAWA Yohko, SOMEYA Kenji, IWATANI Kohichi, SAWA Yoshiki, TAKAHASHI Hidemi, HONDA Mitsuo, KUNISAWA Jun, KIYONO Hiroshi；HIV mucosal vaccine: Nasal immunization with gp160 encapsulated HVJ-liposome induces antigen-specific CTL and neutralizing antibody responses.

第32回日本免疫学会総会  
2002年12月4日-6日（東京）。

44) 柳原剛、野呂瀬嘉彦、松岡良彰、茂呂周、榑崎秀彦、若林あや子、熊谷善博、高橋秀実；腎における poly Ig receptor(plgR)発現の低下は ddY マウスにおける IgA 腎症発症要因の一つである（第2報）。

第32回日本免疫学会総会  
2002年12月4日-6日（東京）。

- 45) 熊谷善博、大脇敦子、高橋秀実：抗体超可変部を用いたエピトープライブラリーの構築と感染防御への利用  
第 32 回日本免疫学会総会  
2002 年 12 月 4 日-6 日（東京）。
- 46) 市川雅男、杉田昌彦、高橋めぐみ、新谷英滋、里見操緒、竹下俊行、高橋秀実：IL-4 によるヒト母乳中マクロファージの樹状細胞への分化。  
第 32 回日本免疫学会総会  
2002 年 12 月 4 日-6 日（東京）。
- 47) KAWASHIMA Tetsuo, NOROSE Yoshihiko, NARAZAKI Hidehiko, ENOMOTO Yutaka, WATARI Eiji, TAKAHASHI Hidemi, SUGITA Masahiko : CD1 dependent T-cell recognition of BCG-infected dendritic cells.  
第 32 回日本免疫学会総会  
2002 年 12 月 4 日-6 日（東京）。
- 48) 金栄淳、中川洋子、杉山弘高、渡理英二、竹下俊行、高橋秀実：胎児期蛋白(AFP)発現細胞を傷害する IL-13 産生 CD4 陽性 $\alpha\beta$ 型 T 細胞。  
第 32 回日本免疫学会総会  
2002 年 12 月 4 日-6 日（東京）。
- 49) 石井律子、清水真澄、大脇敦子、渡辺恵理、野呂瀬嘉彦、高橋秀実：腫瘍表面より抽出した抗原による樹状細胞を介した腫瘍特異的 CTL の誘導。  
第 32 回日本免疫学会総会  
2002 年 12 月 4 日-6 日（東京）。
- 50) Takahashi, H.: DC-SIGN expression on breast milk macrophages : Implication for HIV-1 transmission. Japan-US Cooperative Medical Science Program: The 15th Joint Scientific Meeting of AIDS. March 5-7, 2003 (Okinawa, Japan)..
- 51) Hidemi Takahashi, Masao Ichikawa, Misao Satomi, Megumi Takahashi, Masahiko Sugita and Toshiyuki Takeshita: Expression of DC-SIGN on breast milk macrophages: Implications for HIV vertical transmission. The 3<sup>rd</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity. August 25-28, 2003 (Awaji, Japan).
- 52) Chiaki Fujimoto, Rie Goto, Yohko Nakagawa, Hidemi Takahashi: Poly(I:C) signalling allows class I processing of exogenous protein and induction of HIV-specific CTLs. The 3<sup>rd</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity. August 25-28, 2003 (Awaji, Japan).
- 53) Junko Takauchi, Eiji Watari, Eiji Shinya, Yoshihiko Norose, Misako Matsumoto, Tsukasa Seya, Masahiko Sugita, Seiji Kawana, Hidemi Takahashi: Down-regulation of toll-like receptor expression in monocyte-derived Langerhans cell-like cells: implications of low-responsiveness to bacterial components in epidermal langerhans cells. 8<sup>th</sup> International Workshop on Langerhans cells. September 5-7, 2003 (Tokyo Japan).
- 54) 高橋秀実、藤本千明、渡理英二、中川洋子：Poly(I:C)を介した外来性ウイルス蛋白特異的な CTL の誘導。  
第 51 回日本ウイルス学会総会。  
2003 年 10 月 27-29 日（京都）。
- 55) 堀内励生、榎瀬良美、伊吹謙太郎、三宅在子、鈴木元、高橋めぐみ、斉藤尚紀、仲宗根正、本多三男、高橋秀実、速水正憲、三浦智行：強毒 SHIV のアカゲザル経直腸感染初期における腸管粘膜免疫応答の解析。  
第 51 回日本ウイルス学会総会。  
2003 年 10 月 27-29 日（京都）。
- 56) 高橋秀実：HIV ワクチン開発における新たな方策と免疫学的指標。  
エイズワクチンシンポジウム「日本独自のエイズワクチンの開発とその実用化」。  
2003 年 10 月 31 日（東京）。
- 57) 齊藤尚紀、高橋めぐみ、赤畑涉、清水真澄、日高千鶴乃、新谷英滋、伊吹謙太郎、三浦智行、速水正憲、高橋秀実：SIV/SHIV 接種ザルにおける NKT 細胞の動態解析に向けて：サル CD1d 分子の解析と発現。  
第 16 回日本エイズ学会総会  
2003 年 11 月 27 日-29 日（神戸）。
- 58) Eiji Shinya, Atsuko Owaki, Masumi Shimizu, Eri Watanabe, Misao Satomi, Chizuno Hidaka, Eiji Watari, Hidemi Takahashi : HIV-1 augmented interleukin(IL)-12p70 production but inhibited phenotypic maturation of LPS stimulated-dendritic cells. 第 16 回日本エイズ学会総会  
2003 年 11 月 27 日-29 日（神戸）。
- 59) 里見操緒、清水真澄、市川雅男、新谷英滋、竹下俊行、高橋秀実：ヒト母乳中マクロファージを介した HIV 感染伝播メカニズムの解明へ向けて。  
第 16 回日本エイズ学会総会  
2003 年 11 月 27 日-29 日（神戸）。
- 60) 栗林秀樹、若林あや子、清水真澄、金子礼

志、野呂瀬嘉彦、中川洋子、Jian Wang、熊谷善博、David H. Margulies、高橋秀実：HIV-V3(P18) 特異的 CTL-TCR 発現トランスジェニックマウスを用いたウイルス感染防御能の解析。

第 16 回日本エイズ学会総会  
2003 年 11 月 27 日-29 日 (神戸) .

61) Yoshiyuki W atanabe, Eiji Watari, Yutaka Enomoto, Atsuko Owaki, Yoshihiko Norose, Hidemi Takahashi, Kenji Hiromatsu, Ikuya Yano, Masahiko Sugita: In vivo induction of CD1-dependent immunity by BCG vaccine.

第 33 回日本免疫学会総会  
2003 年 12 月 8-10 日 (福岡) .

62) 杉山弘高、金栄淳、中川洋子、清水真澄、竹下俊行、高橋秀実：IL-13 を分泌し CD25+CD4+CD3+ でかつ NKT 様の形質をもつ新しい T 細胞の誘導と解析。

第 33 回日本免疫学会総会  
2003 年 12 月 8-10 日 (福岡) .

63) 齊藤善、多田欣司、清水真澄、中村哲郎、高橋秀実：骨粗鬆症患者におけるリセドロネート内服投与による  $\gamma\delta$  T 細胞への影響。

第 33 回日本免疫学会総会  
2003 年 12 月 8-10 日 (福岡) .

64) 中川洋子、清水真澄、渡邊恵理、栗林秀樹、高橋秀実：HIV-env 抗原特異的キラー T 細胞の認識エピトープに関する研究 - 細胞外 processing の可能性について。

第 33 回日本免疫学会総会  
2003 年 12 月 8-10 日 (福岡) .

65) 清水真澄、藤本千明、後藤里江、渡邊恵理、中川洋子、高橋秀実：弱酸抽出法ならびに X 線照射による HIV-1 エンヴェロープ gp160 遺伝子導入細胞からの抗原物質の抽出：CTL による免疫療法の開発に向けて。

第 33 回日本免疫学会総会  
2003 年 12 月 8-10 日 (福岡) .

66) 渡理英二、竹内淳子、清水真澄、新谷英滋、野呂瀬嘉彦、山西慎吾、松本美佐子、瀬谷司、杉田昌彦、川名誠司、高橋秀実：単球由来ランゲルハンス様細胞における Toll-like receptor の発現低下：表皮ランゲルハンス細胞の細菌菌体成分に対する低応答性。

第 33 回日本免疫学会総会  
2003 年 12 月 8-10 日 (福岡) .

67) Yoshihiro Kumagai, Takeshi Yanagihara, Shingo Yamanishi, Tadasu Iizumi, Yoshihiko Norose, Hidemi Takahashi: The increase of serum IgA level in aged ddy mice is caused by the decrease of poly-Ig receptor expression on the mucosal surface.

第 33 回日本免疫学会総会  
2003 年 12 月 8-10 日 (福岡) .

68) 若林あや子、西山康裕、飯泉匡、後藤里江、清水真澄、熊谷善博、高橋秀実：経口免疫による IEL における OVA 特異的 CTL の動態。

第 33 回日本免疫学会総会  
2003 年 12 月 8-10 日 (福岡) .

69) Hidemi Takahashi, Chiaki Fujimoto, Eri Watanabe, Atsuko Owaki, Eiji Watari, Yohko Nakagawa: Polyribonucleosinic polyribocytidylic acid (Poly(I:C))/TLR3 signaling allows class I processing of exogenous protein and induction of HIV-specific CD8+ CTLs.

第 33 回日本免疫学会総会  
2003 年 12 月 8-10 日 (福岡) .

70) 高橋めぐみ、日高千鶴乃、速水正憲、高橋秀実：SIV 感染に対する CD4 陽性 T 細胞と CD4/8 陽性 T 細胞の感受性の相違。

第 33 回日本免疫学会総会  
2003 年 12 月 8-10 日 (福岡) .

71) 荒木靖人、藤尾圭志、中川洋子、高橋秀実、山本一彦：単一細胞からの遺伝情報に基づく HIV ウイルス特異的 T 細胞抗原受容体の試験管内における機能的再構築。

第 33 回日本免疫学会総会  
2003 年 12 月 8-10 日 (福岡) .

72) Eiji Shinya, Atsuko Owaki, Masumi Shimizu, Junko Takeuchi, Misao Satomi, Chizuno Hidaka, Eiji Watari, Masahiko Sugita, Hidemi Takahashi: Human immunodeficiency virus-1 Nef down regulates lipid antigen presenting CD1a in immature dendritic cells: another way for immune evasion?

第 33 回日本免疫学会総会  
2003 年 12 月 8-10 日 (福岡) .

分担研究報告書

CTL 判定法の改良及び CTL 交差性に関する研究

分担研究者 滝口雅文 熊本大学エイズ学研究センターウイルス制御分野教授

研究要旨：リバーシムノジェネテックス法を用いて新たに HLA-A\*3303 の HIV-1 エピトープの同定に成功した。また HLA-A\*2402, A\*0201, A\*1101, B\*3501, B\*5101, A\*3303 の HIV-1 エピトープを用いて、21 種類の HIV-1 テトラマーを作製し、これらのエピトープに特異的な CTL を HIV-1 感染者末梢血中で検出する事が可能になった。この方法により凍結保存した多数の検体を処理でき、定量、定性的解析が可能になった。ワクチンによる細胞性免疫誘導能の評価などに極めて有効な方法と考えられる。更にサブタイプ B で見つけたエピトープを基に、サブタイプ E のエピトープを同定する事を試みた。HLA-A\*1101 と HLA-A\*3303 のサブタイプ B のエピトープからサブタイプ E のエピトープを同定する事に成功した。これにより、あるサブタイプで既に明らかになっているエピトープを用いる事により、より効率的に他のサブタイプのエピトープを同定することが可能となり、アジアで流行しているサブタイプのエピトープの同定が容易になった。

A. 研究目的

現在様々なエイズワクチンの開発がおこなわれているが、これらのワクチンは液性免疫だけでなく細胞性免疫を誘導する事が重要であると考えられている。よってこれらのワクチンの効果測定には、ワクチンを接種した実験動物や

ヒトの細胞性免疫能を正確にかつ安易に評価するシステムの開発が必須である、しかし最も重要な細胞性免疫の一つである細胞傷害性 T 細胞 (CTL) は、 $^{51}\text{Cr}$  で標識した標的細胞の傷害を調べる機能的なアッセイによって測定するために、アイソトープが使える施設でしか調べることができない。さらに機能的なアッセイで

あり、また材料が標準化されていないために、必ずしも信頼度が高い、安定したデータが得られるわけでもない。そこで今まで同定したエピトープを用いてテトラマーを作製して、特異的な CD8T 細胞を検出する方法を確立する事を試みた。また新に HLA-A\*3303 に拘束するエピトープの同定を試みた。

一方、HIV-1 の CTL エピトープのほとんどがサブタイプ B でされており、アジアで流行しているサブタイプ E 及び C ではほとんど明らかにされていない。そこで、サブタイプ B のエピトープを用いて新にサブタイプ E のエピトープを同定する方法を確立を試みた。また、これらのサブタイプ間におけるエピトープの交差反応性に関しても解析した。

## B. 研究方法

### 1) HLA-A\*3303 エピトープの同定：

HLA-A\*3303 結合ペプチドモチーフ（2番目が Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, で C 末端は Arg）に一致するの HIV-1SF2 Pol, Gag および Nef 由来の 8-mer から 11-mer のペプチドを

選択する。これらのシーケンスを持ったペプチドを合成して、RMA-S-A\*3303 細胞を用いたアゼンプリング法でその結合を調べた。HLA-A\*3303 に結合したペプチドを、HLA-A\*3303 を持った HIV-1 慢性患者の末梢血リンパ球を刺激して、ペプチド特異的 CTL を誘導する。さらに特異的 CTL が誘導できたペプチドに対して CTL クローンを作製する。CTL クローンを用いて、HIV-1 リコンビナントワクチニアウイルスに感染した細胞の傷害活性を調べる

### 2) HIV-1 epitope peptide-HLA class I tetramer の作製：

21 種類の HIV-1 epitope と HLA-A\*3303 分子を用いて、HLA クラス I tetramer を作成した。作製した tetramer は、それぞれ特異的な CTL クローンあるいは CTL 細胞株を用いて、その特異性を確認した。HIV-1 感染患者の末梢血単核球 (PBMC) を、抗 CD8 抗体と tetramer で染色して HIV-1 特異的 CD8 T 細胞の数を flowcytometry で測定した。

### 3) サブタイプ E の CTL エピトープの同



定と交差反応性の解析：

HLA-A\*1101 と HLA-A\*3303 のサブタイプ B の CTL エピトープを用いて、その部位に一致するサブタイプ E のペプチドを合成し、これを用いてサブタイプ E の CTL エピトープを同定した。

(倫理面への配慮)

患者の血液の使用については、インフォームドコンセントをおこない承諾を得た。共同研究者の所属する国立国際医療センターの倫理委員会の承認を得た。また研究発表において、各個人が特定できないようにした。

### C. 研究結果

#### ① HLA-A\*3303 エピトープの同定

HLA-A\*3303 結合ペプチドモチーフに一致する 99 個の HIV-1 ペプチドの HLA-A\*3303 への結合を調べた結果、52 ペプチドが結合した。これらの HLA-A\*3303 結合ペプチドを用いて、HLA-A\*3303 を持った HIV-1 慢性感染者の末梢血リンパ球を刺激して、特異的 CTL の誘導を試みた所、8つのペプチドによってペプチド特異的 CTL の誘導が見られた。このうち3

つのペプチドは、overlap しており、9-mer がエピトープと考えられた。そこでこれらの6つのペプチドに対する特異的 CTL クローンを作製して、これを用いて HIV-1 リコンビナントワクチニアウイルスに感染した細胞の傷害活性を調べた所、4つの Pol 蛋白由来、1つの Gag 蛋白由来のペプチドに対する CTL クローンは、特異的な細胞傷害活性を示した (Table 1)。このことからこれら 4 つのペプチドは、HLA-A\*3303 によって提示される CTL エピトープであると考えられた。

#### ② 21種類のテトラマーの作製

21種類のエピトープを用いてテトラマーを作製した。それぞれのテトラマーの特異性は、特異的 CTL クローンを用いて確認した。FITC 標識抗 CD8 抗体と PE 標識テトラマーを用いて HIV-1 非感染者 PBMC を染色し、テトラマーの非特異的結合を調べたところ、総 CD8T 細胞の 0.01~0.03%であった。これらのテトラマーを用いて、HIV-1 感染者の末梢血リンパ球中の特異的 CD8 T細胞を調べた所、全てのテトラマーで感染者末梢血で特異的 CD8T 細胞を検

出できた (Fig. 1)。このように、21種類のテトラマーを用いて flowcytometry で HIV-1 特異的 CD8T 細胞を検出する方法を確立した。

### ③ サブタイプ E の CTL エピトープの同定とサブタイプ間の交差反応性の解析

HLA-A\*1101 と HLA-A\*3303 拘束性のサブタイプ B の CTL エピトープを用いて、サブタイプ E のエピトープを同定する事を試みた。その結果、6つの HLA-A\*1101 拘束性サブタイプ E エピトープと一つの HLA-A\*3303 拘束性サブタイプ E エピトープを同定する事に成功した (Fig 2)。このうちの3つのエピトープはサブタイプ間で交差反応性を示した。

## D. 考察

tetramer を用いた HIV-1 特異的 CD8 T 細胞の検出は、欧米では主に HLA-A2 (A\*0201) tetramer を用いておこなわれている。我々は、A\*0201, A\*0206, A\*2402, A\*1101, B\*3501, B\*5101, B\*3303 の tetramer を作製して、21種類のエピトープに関して特異的 CD8T 細胞を検出する事が可能になった。これらのエピトープは日本人に多く見られるものが多く、日本人

の HIV-1 感染者の解析能力を拡大することができた。これによって日本人の9割以上に HIV-1 感染者の解析が可能となった。また、テトラマーを用いる事で、CTL アッセイでは解析できないような、質の高い解析が可能となってきた。今後、この解析法がエイズワクチン開発のために重要な貢献をすると期待される。

一方アジアでのワクチンを考えるとサブタイプ E やサブタイプ C に対する特異的 CTL を検出する技術は極めて重要である。サブタイプ B のエピトープを用いてサブタイプ E の CTL エピトープを検出する事が可能になり、これによりより早くこれらのサブタイプの CTL エピトープを検出する事が可能となった。また、これらのサブタイプ間で交差反応性を示すエピトープの同定もでき、これらのエピトープはアジアでのワクチン開発に極めて有効であると考えられる。

## E. 結論

新に4つの HLA-B\*3303 拘束性の CTL エピトープを同定した。このエピトープを含めて今までに同定したエピトープの内から、HIV-1

感染者で強く認識されている 21 種類のエピトープを選別し、テトラマーを作製した。これらのテトラマーは、実際 HIV-1 感染者で特異的 CD8T 細胞を検出するのに有効である事を確認した。更に、アジアで流行しているサブタイプ E を同定する新たな方法を確立し、またこれらのサブタイプ間で交差反応を示す CTL エピトープの同定に成功した。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Matsui, M., Machida, S., Tomiyama, H., Takiguchi, M., Akatsuka, T. Introduction of tapasin gene restores surface expression of HLA class I molecules, but not antigen presentation of an HIV envelope peptide in a hepatoma cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285; 508-517, 2001.
- 2) Mohammad S. Hossain., Tomiyama, H., Inagawa, Takabumi., Busarawan Sriwanthana., Oka, S., Takiguchi, M. HLA-A\*3303-Restricted CTL Recognition for Novel Epitopes Derived from the Highly Variable Region of the HIV-1 Env Protein. *AIDS.* 15; 2199-2201, 2001.
- 3) Fukada, K., Tomiyama, H., Chantapong W., Matsuda, T., Kusagawa, S., Sato, H., Oka, S., Takebe, T., Takiguchi, M. Cytotoxic T Cell Recognition of HIV-1 Cross-Clade and Clade-Specific Epitopes in HIV-1-infected Thais and Japanese. *AIDS.* 16; 701-711, 2002.
- 4) Fukada, H., Sobao, Y., Tomiyama, H., Oka, S., Takiguchi, M. Functional Expression of the Chemokine Receptor CCR5 on Virus Epitope-Specific Memory and Effector CD8<sup>+</sup> T Cells. *J. Immunol.* 168; 2225-2232, 2002.
- 5) Ueno T., Tomiyama H., Takiguchi M. Single T cell receptor-mediated recognition of an identical HIV-derived peptide presented by multiple HLA class I molecules. *J. Immunol.* 169; 4961-4969, 2002.
- 6) Tomiyama H., Akari H., Adachi A., Takiguchi M. Different effects of Nef-mediated HLA class I down-regulation on HIV-1-specific CD8<sup>+</sup> T cell cytokine activity and cytokine production. *J. Virol.* 76; 7535-7543, 2002.
- 7) Tomiyama H., Matsuda T., Takiguchi M. Differentiation of human CD8<sup>+</sup> T cells from a memory to memory/effector phenotype. *J. Immunol.* 168; 5538-5550, 2002.

- 8) Hossain MS., Tomiyama H., Inagawa T., Ida S., Oka S., Takiguchi M. Identification and characterization of HLA-A\*3303-restricted, HIV-1 Pol- and Gag-derived cytotoxic T cell epitopes. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 19; 503-510, 2003.
- 9) Ueno, T., Tomiyama, H., Fujiwara, M., Oka, S., Takiguchi, M. HLA class I-restricted recognition of an HIV-derived epitope peptide by a human T cell receptor  $\alpha$  chain having a V<sub>1</sub> variable segment. *Eur. J. Immunol.* 33; 2910-2916, 2003.
- 10) Yokomaku, Y., Miura, H., Tomiyama, H., Tachikawa A., Takiguchi, M., Kojima, A., Nagai, Y., Iwamoto, A., Matsuda, Z., Ariyoshi, K. Impaired Processing and Presentation of Cytotoxic T-Lymphocyte (CTL) Epitope is a Major Escape Mechanism from CTL Immune Pressure in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J. Virol.* In press.
- 2) Tomiyama, H., Takiguchi, M.: Recognition of CD8<sup>+</sup> T cells for purified CD4<sup>+</sup>T cells infected with HIV-1: Effects of Nef-mediated HLA-class I downregulation. 2<sup>nd</sup> AIDS Seminar in Kumamoto. September 20-21, 2001.
- 3) Ueno, T., Tomiyama, H., Takiguchi, M.: A single T cell receptor-mediated recognition of an HIV-derived peptide in the context of multiple HLA molecules. 2<sup>nd</sup> AIDS seminar in Kumamoto. September 20-21, 2001.
- 4) Mohammad Sohrab Hossain, Tomiyama, H., Inagawa, T., Oka, S., Takiguchi, M.: Identification of HIV-1 CTL epitopes presented by HLA-A\*3303 molecules. 2<sup>nd</sup> AIDS seminar in Kumamoto. September 21-21, 2001.
- 5) 富山宏子、明里宏文、足立昭夫、滝口雅文 (2001) Nef 蛋白による HLA-ClassI 分子の発現低下が HIV-1 特異的 CTL の抗原認識に与える影響 (液性因子産生能への影響) . 第 49 回日本ウイルス学会 (大阪) 平成 13 年 11 月 18 日 ~ 20 日

## 2. 学会発表

- 1) Tomiyama, H., Oka, S., Takiguchi, M.: Functional discrepancy between two HIV-1-specific effector CD8<sup>+</sup> T cells in individuals with chronic HIV-1 infection. Keystone Symposia (Keystone, Colorado, USA) March 29, 2001.
- 6) Mohammad Sohrab Hossain、富山宏子、稲川卓文、岡慎一、滝口雅文 (2001) HLA-A\*3303 拘束性 HIV-1 CTL エピトープの同定. 第 15 回日本エイズ学会 (東京) 平成 13 年 11 月 29 日 ~ 12 月 1 日