

平成15年度

エイズ医薬品等開発研究

重点研究報告書

国際研究グラント事業 研究報告書

目 次

重点研究

第2分野

課題番号

文献 No 20030989A KA21501	HIV-1ディフェンスワクチンの創製・開発研究	梅田 衛	……	1
KA21502 990A	潜伏HIV-1の再活性化に関わるアクセサリ-遺伝子を標的としたエイズ発症阻止技術の開発	間 陽子	……	6

第3分野

KA31503 2003991A	新規HIV感染価測定細胞株に基づく迅速簡便な実用的薬剤耐性試験法の確立	巽 正志	……	13
---------------------	-------------------------------------	------	----	----

国際研究グラント

SA14711	エイズ遺伝子治療法の開発に関する研究：遺伝子治療臨床研究用ベクター製造およびEx vivo遺伝子導入プロトコールに関する研究	加藤郁之進	……	21
SA14712	翻訳フレームシフトを標的とした抗HIV薬の開発	松 藤 千 弥	……	27
SA14718	新規デザインに基づいた次世代の核酸系逆転写酵素阻害薬の開発研究	馬 場 昌 範	……	32
SA14719	HIV感染動物モデルを用いた遺伝子治療用核酸の抗ウイルス機能と免疫応答に関する研究	山 本 博 一	……	37
SA14720	エイズ発症を抑制する宿主因子の遺伝的および免疫学的解析	横 田 恭 子	……	49
SA14721	HIV潜伏感染の維持と破綻の分子メカニズムに関する研究	岡 本 尚	……	57
SA24713	新しいエイズワクチン開発の研究	奥 田 研 爾	……	69
SA24714	エイズ発症防止ワクチン開発のための細胞性免疫因子の解明とその活性化に関する研究	滝 口 雅 文	……	74
SA24715	ゲノム改変サル・ヒト免疫不全キメラウイルスを用いた弱毒性ワクチンと半生ワクチンの開発	速 水 正 憲	……	82
SA24716	リコンビナントタイプHIVワクチンの標的集団の解析とパイロットプロダクションの可能性の検討	仲 宗 根 正	……	88
SA24717	HIV亜種解析によるHIVワクチンの開発	石 川 晃 一	……	100
SA24722	細胞性免疫誘導型プライムブーストエイズワクチンの臨床評価系の確立	山 本 直 樹	……	106
SA24723	HIV特異的免疫療法開発に関する基礎研究	岩 本 愛 吉	……	111
SA24724	HIV感染抵抗性を決定する新規宿主遺伝子の同定によるワクチン戦略の開発	宮 澤 正 顯	……	116

エイズ医薬品等開発研究

重点研究報告書

第2分野

エイズワクチン等エイズ発症防止薬の
開発に関する研究

潜伏HIV-1の再活性化に関わるアクセサリ-遺伝子を標的としたエイズ発症阻止技術の開発

所属 独立行政法人 理化学研究所
分子ウイルス学研究ユニット
研究者 間 陽子

研究要旨 申請者が見出したアポトーシスを有する HIV-1Vpr 変異体を利用した遺伝子治療用リポソームベクターを中程度の血中ウイルス量を呈するサルに投与し、1週間の投与期間中に血中ウイルス量が投与前の 1/10 程度に減少できた。さらに、Vpr と Nef の機能発現に関わる細胞内因子を解析した。また、エイズ治療法開発のためのサルの評価系の確立と有効な遺伝子治療用リポソームベクターを開発した。

分担研究者

- (1) 理化学研究所 我妻昭彦、宮武秀行
- (2) 横浜市立大学医学部 緒方一博
- (3) 大阪府立大学農学生命科学研究科 渡来仁
- (4) 国立感染症研究所免疫部 横田恭子
- (5) 京都大学ウイルス研究所 三浦智行
- (6) チッソ株式会社横浜研究所 森田裕

A. 研究目的

多剤併用療法が有効に作用して、血中のウイルス量が検出限界以下になった HIV 感染者において潜伏及び持続感染 HIV-1 を完全に排除できていない事実が指摘されている。そこで、多剤併用療法の効果を補うためにも、主たる潜伏感染細胞である静止期 T細胞やマクロファージからのウイルスの再活性化を制御する事による新たなエイズ治療法の開発に取り組むことが本研究の目的である。具体的には、HIV-1Vpr 変異体の強いアポトーシス誘導能によって持続感染細胞を排除し、一方、Vpr の核局在能を阻止するペプチドをコードする発現ベクターによって HIV-1 の感染を阻止するために、Vpr の核移行機序を解析する。さらに、ウイルスの再活性化を目指して、Vpr と Nef の機能発現に関わる細胞内因子の検索とそれらを介して制御されるシグナル伝達の分子機構を解明する。最後に、エイズ治療法開発のためのサルの評価系の確立と有効な遺伝子治療用リポソームベクターの研究開発を目指す。

B. 研究方法

- 1) 蛋白質の精製: GST, GFP融合Vpr野生型及び各変異体、GST融合Importin α を大腸菌で発現精製した。Importin α はproteaseでGSTを切断した。
- 2) *in vitro*核移行解析: Digitonin処理HeLa細胞を用いて行った。
- 3) pull-down assay: GST融合Importin α isoform、GFP融合野生型及び各変異型Vpr蛋白をHeLa細胞に発現させ、その細胞抽出液を用いた。
- 3) 細胞の調製: 健康ドナー由来末梢血リンパ球からCD4⁺T細胞を分画後、IN2含有培地でOKT3, CD28刺激し、活性化CD4⁺T細胞とした。MALS systemで単球を分画し、マクロファージはAB血清とGM-/M-CSF含有培地で培養した。
- 4) 定量RT-PCR法: 細胞から総RNAを回収後cDNAを調整した。総DNAに対してImportin α isoform特異的なプライマーとSYBER GreenIを用いたインターカラーション法でRT-PCRを行った。
- 5) Western blot法: Importin α 蛋白質発現は抗Rchl抗体を用いて検出した。
- 6) 核移行の蛍光イメージング法: GFP融合Vprとその変異体の精製蛋白質を最終分化マクロファージの細胞質領域にマイクロインジェクションし、生細胞内の蛍光蛋白質の挙動を蛍光顕微鏡、高解像度CCDカメラで経時的に観察した。
- 7) 感染実験: *vpr*に変異を挿入したNL432およびNF462をCOS-1細胞に導入して産生させたウイルスの量をp24値で揃えて、CD4⁺T細胞およびマクロファージに感染させた。感染後30日まで、ウイルス量をp24 ELISA法で測定した。
- 8) *in vitro* splicing assay: 基質として³²P-labeled β -globin pre-mRNA、ATP

及び Vpr 発現核抽出液を HeLa 核抽出液へ加えて 30°C で反応し、アクリルアミドゲル電気泳動後オートラジオグラフィで検出した。

9) イントロン 1 の蓄積量の定量: Vpr 発現細胞から RNA を回収し、RT-PCR により α -globin 2 のイントロン 1 を含む配列を増幅させて定量した。

10) Nef 発現ベクター: N1432 由来 Nef とその変異体の下流に EGFP を IRES 組み込んで CAGG プロモーターの下流につないだ CA-Nef と CAcontrol アデノウイルスを発現するアデノウイルスを作成した。

11) アデノウイルス感染と細胞培養: 樹状細胞にアデノウイルスを moi1000 で感染させ一晩培養した。翌日抗原として不活化 Influenza ウイルスあるいは結核菌由来抗原 PPD を加えた後、抗原なしあるいは抗原添加樹状細胞と T 細胞を共培養し、FACS 解析した。

12) 強毒・弱毒 SHIV 感染性分子クローン及びそれらのゲノムを一部互いに入れ替えたウイルスをアカゲザルに接種し、*in vivo* の感染病態について血漿中ウイルス RNA 量、末梢血リンパ球マーカー、抗体応答、病理組織およびウイルス遺伝子変異についての解析をした。

13) 膜融合性陽性荷電リポソームおよび SucPG-TMAG リポソームによる細胞およびサルへの遺伝子導入を検討した。

(倫理面への配慮)

1) サル動物実験は、京都大学ウイルス研究所の「サル類を用いる実験のための基本指針」に基づいて霊長類委員会による倫理審査を受けた上で行った。2) 感染症研究所内の健常人協力者に実験内容を説明し、同意を得た上で血液の採取を行うことを、感染研内の倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

1. Vpr を用いた遺伝子治療用リポソームベクターの開発: 申請者らが初めて見出した Vpr の C 末端欠失変異体 C81 の強力なアポトーシス活性によって HIV-1 持続感染細胞を特続的に破壊し、ウイルスを体内から完全に排除するという新しい発想に基づくエイズ治療薬の開発を目指した。HIV-LTR の下流に C81 変異体を連結することによって、HIV-1 Tat の存在下で発現が誘導されるように、C81 変異体を HIV-1 LTR の下流に連結し、更に抗-HIV-1 gp120 抗体結合リ

ポソームに封入した遺伝子治療用ベクターを作製し(図1)、HIV-1 感染細胞を特異的にアポトーシスにより破壊できる可能性を *in vitro* で立証した。

そこで、本年度は、このベクターを種々の血中ウイルス量を示す SHIV 感染サルに投与したところ、既にエイズを発症し、持続的に 10^7 /ml 以上のウイルス量を示すサルに対しては効果があまり認められなかったものの、 10^5 コピー/ml 程度以下の血中ウイルス量を示すサルに対しては1週間の投与期間中に血中ウイルス量を投与前の 1/10 程度に減少し、末梢血 CD4⁺T 細胞数を増加させる効果があることが確認された(図2)。投与終了直後は、抗 HIV 薬と同様に血中ウイルス量が投与前のレベルにもどったが、数週間後に血中ウイルス量が検出限界以下に激減した。以上の結果は、このベクターを単独または HAART 法と併用することによって、HIV 感染者体内から感染細胞を特異的に駆除できる可能性を強く示唆している。

2. HIV-1 preintegration complex (PIC) の核移行を標的とした抗 HIV 薬の開発:

PIC の核移行を阻害する技術開発を目指し、マクロファージへの HIV-1 感染に重要な Vpr の核移行機序を解析した。

1) Vpr の新規核移行機序の解析: 申請者らは Vpr が核膜に結合後、核移行輸送担体 Importin α のみを介して核移行するという新規核移行機序を有することを報告してきた。そこで、Vpr の核移行に関与する Importin α のドメインを同定するために(図3)、Importin β binding (IBB) ドメイン、NLS 認識領域であるアルマジロ構造、CAS 結合ドメインを欠損した6種類の Importin α 変異体蛋白を用いて、*in vitro* 核移行解析を行った。その結果、Importin α の CAS 結合ドメインが Vpr の核移行に必須であることが明らかとなった。次に、同じ変異体を用いて pull-down assay を行ったところ、Vpr は IBB ドメインと CAS 結合ドメインと結合した。更に、Vpr 発現細胞抽出液を用いた pull down assay の結果、核移行に関与する α H1 は Importin α と直接結合することが見出された(図4)。以上の結果から、Vpr の核移行には CAS 結合ドメインが必要であり、

この過程は Vpr と Importin α との直接結合によって行われる可能性が示唆された (図 5)。

- 2) Vpr の核移行に必要な importin α の isoform の解析: Vpr は複数ある importin α の isoform の内、主要な 3 つ (Rch1、Qipl、NPI-1) により核移行が促進され、いずれの isoform とも結合した (図 6)。さらに、いずれの isoform もヒト末梢血単球および静止期 CD4⁺T 細胞より、最終分化マクロファージおよび活性化 CD4⁺T 細胞において高い発現が認められた (図 7)。in vitro 核移行解析およびマイクロインジェクション法により、Vpr は Importin α の発現が高いマクロファージおよび活性化 CD4⁺T 細胞において核移行した (図 8, 9)。
- 3) Vpr と Importin α との結合は HIV-1 感染に必須である: Importin α との結合能を消失した Vpr 変異体 (L67P、 α LA/L67P) は核移行能を完全に消失していた (図 9, 10)。この Vpr 変異体を有する HIV-1 はマクロファージ及び活性化 CD4⁺T 細胞への感染が激減した (表 1)。以上の結果は、これまで Vpr が必要ないと考えられていた CD4⁺T 細胞への HIV-1 感染を Vpr を標的に阻害できる可能性を示すものである (図 11)。

3. Vpr と SAP145 との相互作用の解析と Vpr の新規スプライシング阻害機能の発見:

- 1) 新規 Vpr 結合細胞内因子の単離: これまでに、Yeast two hybrid 法を用いて、Vpr 結合性蛋白質として、spliceosome-associated protein 145 (SAP145) の単離に成功した。
- 2) Vpr の新しい機能であるスプライシング反応阻害の発見: Vpr がスプライシング反応に及ぼす影響を解析した。 α -globin2 および β -globin pre-mRNA を材料に選択して、半定量的 PCR 法 (図 13)、S1 nuclease 法および in vitro スプライシング法 (図 14) を試みた結果、Vpr 存在下においてこれらの pre-mRNA のイントロンの蓄積量の増加が観察され、Vpr がスプライシング反応阻害を誘導していることを世界に先駆けて明らかにした。
- 3) Vpr によるスプライシング阻害の分子機序: SAP145 はスプライシング触媒反応を担う巨大タンパク質複合体であるスプライソソーム中の U2 核内低分子リボ核タ

ンパク質 (snRNP) のサブユニット Splicing factor (SF)3b の構成因子である。続いて、Vpr は U1snRNP の構成因子 U1-70K 及びスプライシング因子 U2AF/65 とは相互作用することを免疫沈降反応により証明した (図 12)。さらに、Vpr がタンパク質-RNA 複合体である U2 及び U1snRNP と相互作用していることを Northern Blot 法により確認した (図 12)。また、蛍光抗体法によって、GFP を融合させた Vpr の C 末端 77-96 残基が SAP145 およびスプライソソーム局在のマーカートンパク質 SC35 と共局在していることが示された。以上の結果から Vpr は SAP145 と相互作用してスプライソソーム中に存在することが示された。さらに、非変性アクリルアミドゲル電気泳動によって、Vpr はスプライソソーム形成初期の H+E 複合体から A 複合体へ移行する段階を阻害する可能性が見出された (図 15)。さらに、このような阻害活性は SAP145 との結合能が低下した Vpr 変異体で減弱していた (図 16)。一方、野生型 Vpr 存在下では、SAP145 と SAP49 の直接結合が減弱していたが、変異体では回復していた (図 16)。これらの結果から、スプライソソーム中で Vpr は SAP145 との結合を介して、SAP145 と SAP49 との直接結合を減弱させる結果として、 β -globin pre-mRNA のスプライソソーム形成の初期過程を阻害する可能性が示された (図 17)。

4. HIV 潜伏感染細胞におけるウイルスの再活性化に伴う Nef の機能の解析とその制御:

HIV 感染及び再活性化の初期蛋白である Nef の発現が HIV-1 の標的細胞である CD4⁺T 細胞と抗原提示細胞への影響について解析した。Nef 及び変異 Nef を発現するアデノウイルスベクターを作成して抗原提示細胞である樹状細胞機能を解析した結果、T 細胞同様 CD4 や MHC クラス I に加えてクラス II 分子の細胞表面抗原が低下するものの、CD4⁺T 細胞への抗原提示機能は障害されないことが明らかとなった (図 21)。外来性の抗原提示機構に対し、Nef は MHC クラス I 分子の細胞内動態に影響を及ぼし、抗原特異的 CD8⁺T 細胞の反応を低下させていた (図 22)。

5. エイズ発症阻止技術のサルにおける評価系の確立:

1) 接種後1ヶ月以内にアカゲザルにエイズを発症させる強毒 SHIV 分子クローンと、接種後2週目までは強毒 SHIV と同程度に増殖するにも関わらず強力に免疫誘導され増殖が制御される弱毒 SHIV 分子クローンとの塩基配列の違いは、全長約1万塩基中16カ所であることを明らかにした。これら変異部位の一部を交換した種々の分子クローンを作製し、サルに接種することによって、強毒型から弱毒型まで様々な段階の病態を示すサルモデルを作製することが可能となった。さらに、感染サルの血漿中ウイルスの全ゲノム解析から、16ヶ所の変異のうち primer binding site の1ヶ所の塩基置換と env-gp41 の2カ所のアミノ酸変異が感染サルでの病原性に重要である事を示した。また、nef 領域の2ヶ所に新たな変異が起こることがエイズ発症に重要であることが示唆された(図23)。

2) 逆転写酵素阻害剤(コンビビル)とプロテアーゼ阻害剤(Kaletra)を組み合わせた多剤併用療法(HAART)により治療した場合は、持続的に 10^7 コピー/ml以上のウイルス量を示すサルでも1ヶ月の投与期間中にウイルス量は投与前の1/100近くまで減少し続け、投与終了後速やかに投与前のレベル以上に増加した。一方、持続的に 10^6 コピー/ml程度の安定した血中ウイルス量を示す SHIV 感染アカゲザルに Kaletra のみを投与したところ、投与後1週は、一過性にウイルス量を減少させたものの、その後投与中にも関わらずウイルス量は投与前のレベルに戻った(図24)。

6. HIV感染の治療及び予防に有効な遺伝子治療用リポソームベクターの開発:

TMAG:DLPC:DOPE のモル比 1:2:2 から成る陽性荷電リポソームが細胞への遺伝子導入に優れている事、サクシニル化ポリグリシドール(SucPG)を組み込んだ SucPG-リポソームは細胞と特異的に融合できる事、マンノース被覆リポソームによるマクロファージへの特異的遺伝子導入の可能性を明らかにした。さらに、マクロファージに対する遺伝子導入ベクターとして SucPG-TMAG リポソームが有用であることを示した。

D. 考察

Vpr の C 末端欠失変異体 C81 を HIV-1 LTR

の下流に連結した遺伝子治療用ベクターによって感染サル個体からウイルスを激減できる可能性が示された。その再現性も含めて今後の詳細な検討が必要であるが、今後のエイズ治療薬として期待が持たれる。

以前に我々は、HeLa 細胞を用いた生化学的な *in vitro* 解析で Vpr の核移行を解析してきたが、本研究では同一ドナー由来の HIV-1 標的細胞を用いて、Vpr が Importin α や細胞特異的な因子を介して核移行を示すことを立証した。さらに、Importin α との結合能を消失した Vpr 変異体は核移行能を完全に消失していたと同時に、この Vpr 変異体を有する HIV-1 はマクロファージおよび活性化 CD4⁺T 細胞への感染が激減した。Vpr が不要ないと考えられていた CD4⁺T 細胞への HIV-1 感染を Vpr と Importin α との結合能の阻害を標的に阻止できる可能性が示された。

Vpr が細胞側の遺伝子のスプライシング及び HIV-1 ゲノムの選択的スプライシングを制御する事が初めて明らかとなった。これは、Rev 蛋白質に次ぐ、HIV-1 のスプライシングを制御する因子の報告でもあるばかりではなく、未解決である 30 種類以上も存在する HIV-1 ゲノムのスプライシングパターンの生成機構を解明する研究につながる可能性がある。

Nef は樹状細胞の CD4 ヘルパー T 細胞活性化機能には影響しないが、MHC class I 分子の細胞内・外の輸送に影響を与えることにより、CD8⁺T 細胞の活性化を阻害することが明らかとなった。従って、潜伏感染した樹状細胞が体内で刺激を受けてウイルスの再活性化が起こる際に Nef が大量に発現することにより、HIV 感染樹状細胞は CTL の攻撃から逃れてウイルスの reservoir となるだけでなく、外から取り込んだ種々の抗原を CD8⁺T 細胞に提示する機能も障害され、その結果、感染者における更なる免疫機能の低下を誘導する可能性を示唆している。このようなことが慢性感染者の体内で長期に渡って繰り返されることが、エイズの病態に大きく関わっていると考えられる。

SHIV の感染サル個体における病原性に重要な影響を及ぼすウイルスゲノム上の変異が3つの素課程(PBS, env-gp41, nef)としてクローズアップされた。今後、それぞれの素課程が感染個体レベルでの病原性に

与える分子機序の解明が重要である。

E. 結論

1. Vpr の C 末端欠失変異体 C81 を HIV-1 LTR の下流に連結した遺伝子治療用ベクターによって感染サル個体からウイルスを激減できる可能性が示された。
2. HIV-1 標的細胞であるマクロファージおよび活性化 CD4⁺T 細胞内において、Vpr が Importin α との結合を介して核移行することが HIV-1 感染に重要であることを示した。
3. Vpr はスプライシング因子 SAPI45 との結合を介して、細胞遺伝子と HIV-1 ゲノムのスプライシングを制御することを初めて示した。
4. Nef の樹状細胞機能に及ぼす効果を解析した結果 CD4⁺T 細胞への抗原提示機能に障害を与えないが、MHC クラス I 分子の細胞内動態に影響を及ぼし、抗原特異的 CD8⁺T 細胞の反応を低下させた。
5. SHIV クローンウイルスを接種することにより、強毒型から弱毒型まで様々な段階の病態を呈するエイズサルモデルを作製することが可能となった。これらサルモデルは、病態に応じて既存の抗 HIV 薬治療に反応することを確認した。
6. 細胞への遺伝子導入ベクターとしてサクシニル化ポリグリシドールを組み込んだ TMAG:DLPC:DOPE モル比 1:2:2 から成る SucPG-TMAG リポソームが有用であることを示した。

F. 研究発表

1) 論文発表

1. Tajima S., Takahashi, M., Takesima S., Konnai S., Watarai S., Yin S, Tanaka Y., Onuma M., K. Okada and Aida Y. A mutant form of the Tax protein of bovine leukemia virus (BLV) with enhanced transactivation activity, increases the expression and propagation of BLV in vitro but not in vivo. *J. Virol.*, 77:1894-1903, 2003.
2. Tajima S., Tsukamoto M., and Aida Y. Latency of viral expression in vivo is not related to CpG methylation in the U3 region and part of the R region of the long terminal repeat of bovine leukemia virus. *J. Virol.*, 77: 4423-4430, 2003.
3. Konnai S., Takeshima S., Tajima S., Yin S. A., Okada K., Onuma M., and Aida Y. The influence of ovine MHC class II DRB1 alleles on immune response in bovine leukemia virus infection. *Microbiol. Immunol.* 47: 223-232, 2003.
4. Usui T, Konnai S, Tajima S, Watarai S, Aida Y., Ohashi K and Onuma M. "Protective effects of vaccination with bovine leukemia virus (BLV) Tax DNA against BLV infection in sheep." *J. Vet Med Sci.*, 65:1201-1205, 2003
5. Takahashi M., Tajima S., Takeshima SN, Konnai S., Yin SA., Okada K., Davis WC. and Aida Y.: "Ex vivo survival of peripheral blood mononuclear cells in sheep induced by bovine leukemia virus (BLV) mainly occurs in CD5⁺ B cells that express BLV", *Microbes and Infection*, 2004, in press.
6. Kamata M., Miyamoto M., Nitahara-Kasahara Y., Yoneda Y., and Aida Y. Importin- α promotes passage through the nuclear pore complex of human immunodeficiency virus type 1 Vpr without the aid of other soluble factors. submitted in *J. M. B.*
7. Azunma A. and Aida Y. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces cell cycle arrest at the G1 phase and apoptosis via disruption of mitochondrial function in rodent cells., submitted in *J. Virol.*
8. Iijima S., Kasahara Y., Kimata Y., Isogai M, Miwa M., Yokota Y., and Aida Y. Phenotype of HIV-1 lacking Vpr-mediated nuclear import is unable to replicate in primary CD4⁺ T cells., submitted in *Virology*.
9. Azuma A. and Aida Y. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces cell cycle arrest at the G1 phase and apoptosis via disruption of mitochondrial function in rodent cells., submitted.
10. Takeda K., Miyatake H., Yokota N., Matsuyama S., Tokuda H., and Miki K.: "Crystallization and preliminary crystallographic study of the outer-membrane lipoprotein receptor LolB, a member of the lipoprotein localization factors", *Acta Cryst. D Biol. Cryst.* 59, 1224-1226, 2003.
11. Takeda K., Miyatake H., Yokota N., Matsuyama S., Tokuda H., and Miki K.: "A practical phasing procedure using the MAD method without the aid of XAFS measurements: successful solution in the structure determination of the outer-membrane lipoprotein carrier LolA", *Acta Cryst. D Biol. Cryst.* 59, 1440-1446, 2003.
12. Kim S., Miyatake H., Hisano T., Ohtani N., and Miki K.: "Crystallization and preliminary X-ray analysis of a small component of 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase (HpaC) and its cofactor complex from *Thermus thermophilus* HB8", *Acta Cryst. D Biol. Cryst.* 59, 2275-2278, 2003.
13. Takeda K., Miyatake H., Yokota N., Matsuyama S., Tokuda H., and Miki K.: "Crystal structures of bacterial lipoprotein localization factors, LolA and LolB", *EMBO J.* 22, 3199-3209,

- 2003.
14. Ogata, K., Sato, K., Tahirov, T. H., Tahirov, T., Eukaryotic transcriptional regulatory complexes: cooperativity from near and afar. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 13: 40-48, 2003.
 15. Ogata, K., Tahirov, T. H., Ishii, S., c-Myb DNA-binding domain: from molecular structure to functions Myb Transcription Factors: Their Role in Growth, Differentiation and Diseases, ed. by J. Frampton, *Kluwer Academic Publishers B. V.*, in press
 16. Tsunetsugu-Yokota, Y., Morikawa, Y., Isogai, M., Kawana-Tachikawa, A., Odawara, T., Nakamura, T., Grassi, F., Autran, B., Iwamoto, A.: Yeast-derived HIV type 1 p55gag virus-like particles activated DCs and induce perforin expression in Gag-specific CD8+ T cells by cross-presentation of DCs. *J. Virol.* 77:10250-10259, 2003.
 17. Komuro, I., Yokota, Y., Yasukuda, S., Iwamoto, A., Akagawa, K. S.: CSF-1-induced and HIV-1-mediated distinct regulation of Hck and C/EBP β represent a heterogeneous susceptibility of monocyte-derived macrophages to M-tropic HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* 198:443-453, 2003.
 18. Yoshizawa, I., Mizuochi, T., Ogata, A., Murakami, M., Yagaita, H., Takahashi, Y., Takemori, T., and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Studies on the generation and maintenance of mucosal CTL against human immunodeficiency virus type-1 Gag in mice. *AIDS Res. Hum. Retro.*, 9:469-479, 2003.
 19. Isogai, M., Otake, K., Fujii, Y., and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Nef expressed by adenovirus vector in monocyte-derived dendritic cells modulates antigen-specific immune responses (manuscript in preparation).
 20. Enose, Y. et al.: Protection by intranasal immunization of a nef-deleted, nonpathogenic SHIV against intravaginal challenge with a heterologous pathogenic SHIV. *Virology*, 298: 306-316, 2002.
 21. Haga, T. et al.: Construction and in vitro properties of chimeric simian and human immunodeficiency virus with the human TNF- α gene. *Microbiol. Immunol.*, 46: 849-855, 2003.
 22. Shimada, T. et al.: Comparative histopathological studies in the early stages of acute pathogenic and nonpathogenic SHIV-infected lymphoid organs. *Virology*, 306: 334-346, 2003.
 23. Haga, T. et al.: Characterization of vpr vector constructed from chimeric simian and human immunodeficiency virus. *J. Vet. Med. Sci.* 65:633-636, 2003.
 24. 喜多正和 他: IFN- γ 遺伝子組込み弱毒SHIVのワクチン効果. *J. AIDS Res.*, 5(2), 86-88, 2003.
 25. Akiyama, H. et al.: Construction and in vivo infection of a new simian/human immunodeficiency virus chimera containing the reverse transcriptase gene and the 3' half of the genomic region immunodeficiency virus type 1. *J. Gen. Virol.*, 84:1663-1669, 2003.
 26. Iida, T. et al.: Augmentation of antigen-specific cytokine responses in the early phase of infection with a live-attenuated simian/human immunodeficiency virus chimeric virus expressing IFN- γ . *Arch. Virol.* in press.
 27. Usui, T., Konnai, S., Tajima, S., Watarai, S., Aida, Y., Ohashi, K., and Onuma, M. Protective effect of vaccination with bovine leukemia virus (BLV) Tax DNA against BLV infection in sheep. *J. Vet. Med. Sci.*, 65, 1201-1205, 2003.
 28. Li, W., Watarai, S., Iwasaki, T., and Kodama, H. Suppression of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis excretion by intraocular vaccination with fimbriae incorporated in liposomes. *Develop. Comp. Immunol.*, 28, 29-38, 2004.
- 2) 学会発表
1. 橋爪智恵子, 倉光球, 我妻昭彦, 間陽子: "HIV-1 VprとSplicesome-associated protein (SAP)145との相互作用を介して発揮されるスプライシング反応の阻害", 第51回日本ウイルス学会学術集会・総会, 京都, 10月, (2003).
 2. 笠原(仁田原)優子, 宗田光峰, 飯島沙幸, 横田恭子, 間陽子: "最終分化マクロファージ細胞内importin α によるHIV-1 Vprの核移行解析", 第51回日本ウイルス学会学術集会・総会, 京都, 10月 (2003).
 3. 我妻昭彦, 間陽子: "Vprが及ぼすHIV-1 mRNA発現パターンへの影響", 第51回日本ウイルス学会学術集会・総会, 京都, 10月, (2003).
 4. 倉光球, 橋爪智恵子, 我妻昭彦, 横田恭子, 間陽子: "HIV-1 Vprによるpre-mRNAのスプライシング反応阻害のin vivoおよびin vitro解析", 第51回日本ウイルス学会学術集会・総会, 京都, 10月, (2003).
 5. 飯島沙幸, 木全清典, 三輪正直, 横田恭子, 間陽子: "HIV-1感染・複製におけるvpr遺伝子の機能", 第51回日本ウイルス学会学術集会・総会, 京都, 10月, (2003).
 6. 倉光球, 橋爪智恵子, 我妻昭彦, 横田恭子, 間陽子: "HIV-1 Vprによるpre-mRNAスプライシング阻害反応の解析", 第17回日本エイズ学会学術集会・総会, 神戸, 11月, (2003).
 7. 橋爪智恵子, 倉光球, 我妻昭彦, 間陽子: "スプライソソームとの相互作用を介して起こるHIV-1 Vprのスプライシング阻害反応の解析", 第17回日本エイズ学会学術集会・総会, 神戸, 11月, (2003).
 8. 我妻昭彦, 木全清典, 間陽子: "HIV-1 mRNAの量比に及ぼすVprの影響の解析", 第17回日本エイズ学会学術集会・総会, 神戸, 11月, (2003).
 9. 笠原(仁田原)優子, 宗田光峰, 飯島沙幸, 横田恭子, 間陽子: "HIV-1標的細

- 胞において importin α により促進される Vpr 核移行の解析”, 第17回日本エイズ学会学術集会・総会, 神戸, 11月, (2003).
10. 飯島沙幸, 木全清典, 横田恭子, 三輪正直, 間陽子: “ウイルス増殖における HIV-1 Vpr の機能解析”, 第17回日本エイズ学会学術集会・総会, 神戸, 11月, (2003).
 11. Aida Y., Kasahara-Nitahara Y., Yokota Y., Muneta K., and Iijima S.: “Role of Vpr protein in HIV-1 infection into primary macrophage”, 3rd Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awajishima, Japan, August (2003).
 12. 倉光球, 橋爪智恵子, 我妻昭彦, 横田恭子, 間陽子: “HIV-1 Vpr による pre-mRNA スプライシング阻害反応の解析”, 第17回日本エイズ学会学術集会・総会, 神戸, 11月, (2003).
 13. 橋爪智恵子, 倉光球, 我妻昭彦, 間陽子: “スプライソソームとの相互作用を介して起こる HIV-1 Vpr のスプライシング阻害反応の解析”, 第17回日本エイズ学会学術集会・総会, 神戸, 11月, (2003).
 14. 我妻昭彦, 木全清典, 間陽子: “HIV-1 mRNA の量比に及ぼす Vpr の影響の解析”, 第17回日本エイズ学会学術集会・総会, 神戸, 11月, (2003).
 16. 我妻昭彦, 間陽子: “Vpr が及ぼす HIV-1 mRNA 発現パターンへの影響”, 第51回日本ウイルス学会学術集会・総会, 京都, 10月, (2003).
 17. 倉光球, 橋爪智恵子, 我妻昭彦, 横田恭子, 間陽子: “HIV-1 Vpr による pre-mRNA のスプライシング反応阻害の *in vivo* および *in vitro* 解析”, 第51回日本ウイルス学会学術集会・総会, 京都, 10月, (2003).
 18. 橋爪智恵子, 倉光球, 我妻昭彦, 間陽子: “HIV-1 Vpr と Spliceosome-associated protein (SAP)145 との相互作用を介して発揮される スプライシング反応の阻害”, 第51回日本ウイルス学会学術集会・総会, 京都, 10月, (2003).
 19. Y. Yokota, M. Isogai, K. Otake.: The effect of HIV-1 Nef expression on dendritic cells and macrophages. International AIDS Symposium. パリ, September, (2003).
 20. 磯貝まや, 藤井陽一, 藤田美歌子, 足立昭夫, 竹森利忠, 横田(恒次)恭子. HIV Nef 発現が樹状細胞機能に及ぼす影響の解析. 第51回ウイルス学会, 京都, 10月, (2003).
 21. 横田(恒次)恭子, 磯貝まや, 岩本愛吉, 立川(川名)愛. HIV 感染における樹状細胞による cross-presentation の重要性について. 第33回日本免疫学会総会, 福岡, 12月, (2003).
 22. 三浦智行 他: サル/ヒト免疫不全キメラウイルス強毒・弱毒分子クローンの塩基配列と増殖能との関連, 第135回日本獣医学会, 東京, 3月, (2003).
 23. 鈴木元 他: 強毒サル/ヒト免疫不全キメラウイルス感染初期における胸腺組織及び胸腺内 T 前駆細胞の解析, 第136回日本獣医学会, 青森, 10月, (2003).
 24. 伊吹謙太郎 他: 強毒 SHIV の経直腸感染初期における腸管粘膜免疫細胞の動態, 第136回日本獣医学会, 青森, 10月, (2003).
 25. Suzuki, H. et al.: The effects of pathogenic SHIV infection on the thymus and intrathymic T cell progenitor in rhesus monkeys. 21st Annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, Seattle, Oct. (2003).
 26. Kozyrev, Y. et al.: Comparative analysis of acute pathogenic and less pathogenic SHIV molecular clones. 21st Annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, Seattle, Oct. (2003).
 27. Ibuki, K. et al.: Analysis of viral expansion and immune reaction at early phase of acute pathogenic SHIV intrarectal infection in macaques. 21st Annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, Seattle, Oct. (2003).
 28. Akiyama, H. et al.: Construction and *in vivo* infection of a novel simian/human immunodeficiency chimeric virus containing the reverse transcriptase, integrase and the 3' half of the genomic region of HIV-1. 21st Annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, Seattle, Oct. (2003).
 29. 三浦智行 他: サル/ヒト免疫不全キメラウイルス感染性クローンにおける塩基置換と病原性との関連, 第51回日本ウイルス学会, 京都, 10月, (2003).
 30. 三宅在子 他: 強毒 SHIV の粘膜感染初期におけるウイルス動態の解析, 第51回日本ウイルス学会, 京都, 10月, (2003).
 31. 鈴木麻貴子 他: 強毒 SHIV の感染初期における胸腺組織及び胸腺内 T 前駆細胞の解析, 第51回日本ウイルス学会, 京都, 10月, (2003).
 32. 秋山尚志 他: HIV-1 由来の逆転写酵素, インテグラーゼおよび env を含むゲノムの 3' 側遺伝子を持つ新しい SHIV のサル感染実験, 第51回日本ウイルス学会, 京都, 10月, (2003).
 33. 齋藤尚紀 他: 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17回日本エイズ学会, 神戸, 10月, (2003).
 34. 清水佑也 他: TNF- α 遺伝子組み込み SHIV 感染ザルにおける細胞死と免疫応答, 第17回日本エイズ学会, 神戸, 10月, (2003).
 35. Iouri Kozyrev et.al.: Genetic analysis of acute pathogenic and less pathogenic SHIV molecular clones to determine the responsive site for *in vivo* pathogenicity. 第17回日本エイズ学会, 神戸, 11月, (2003).
 36. Kwofie T. B. 他: Increased virus replication and cytotoxicity of non-pathogenic SHIV-NM-3rN after serial passage on monkey derived cell line. 第17回日本エイズ学会, 神戸, 11月, (2003).
 37. 石松美沙 他: サルの SHIV 感染に対する IL-15 投与効果の解析, 第17回日本エイズ学会, 神戸, 11月, (2003).
 38. 三浦智行: サルから学ぶレトロウイ

ルス感染症～HTLV/HIVの起源・進化とエイズ病態モデル～, 感染研学会シンポジウム, 東京, 12月, (2003).

39. 渡来仁, 大橋吾郎, 塔娜, 児玉洋. リポソーム型経鼻ワクチン用アジュバントの検討. 第19回日本DDS学会, 京都, 6月, (2003).
40. 児玉洋, 李文哲, 渡来仁, 岩崎忠. リポソーム封入 *Salmonella enterica* serovar Enteritidis線毛のニワトリ点眼内免疫による腸管粘膜免疫応答の誘導. 第15回日本比較免疫学会, 東京, 8月, (2003).
41. 林伸幸, 河野健司, 渡来仁, 木浦勝行, 高岸徹. 抗がん剤を結合したポリエチレングリコール修飾デンドリマーの細胞毒性. 第25回バイオマテリアル学会, 大

阪, 12月, (2003).

3) 特許の出願

1. 特許出願

発明の名称: 「HIV-Vprの機能に関する発明」
 発明者: 間陽子, 我妻昭彦, 倉光球, 橋爪智恵子

出願番号: 特願2003-346377

出願日: 2003年10月3日

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

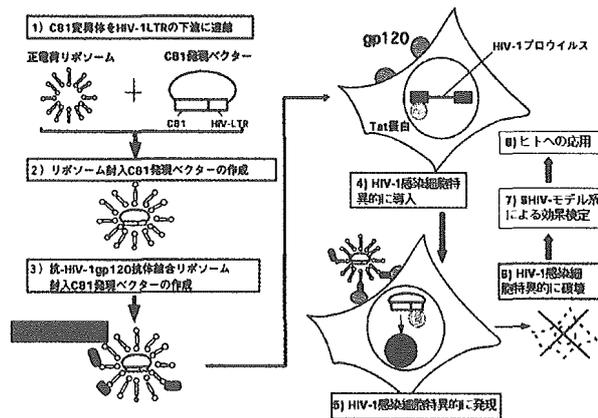


図1 C81治療ベクターの構築

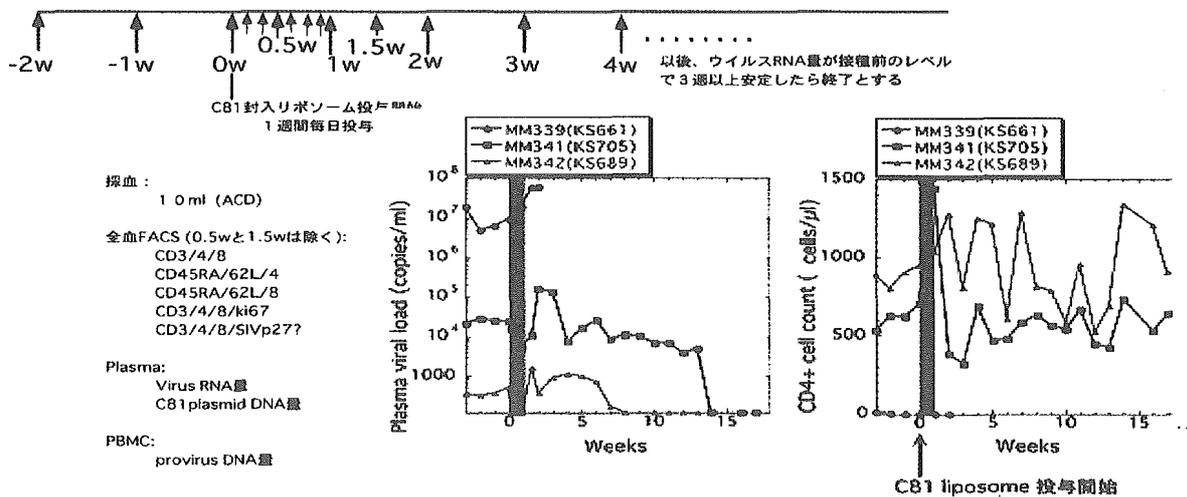


図2 C81リポソームベクターのSHIV感染サルに対する治療効果。HIV-1感染細胞に対して強くアポトーシスを誘導するvpr変異体C81をリポソームに封入したものを種々の血中ウイルス量を示すSHIV感染サル, 持続的に10の7乗コピー/ml以上のウイルス量を示すサル (MM339, 10の5乗コピー/ml程度以下の血中ウイルス量を示すサル (MM341, MM342) 投与した。

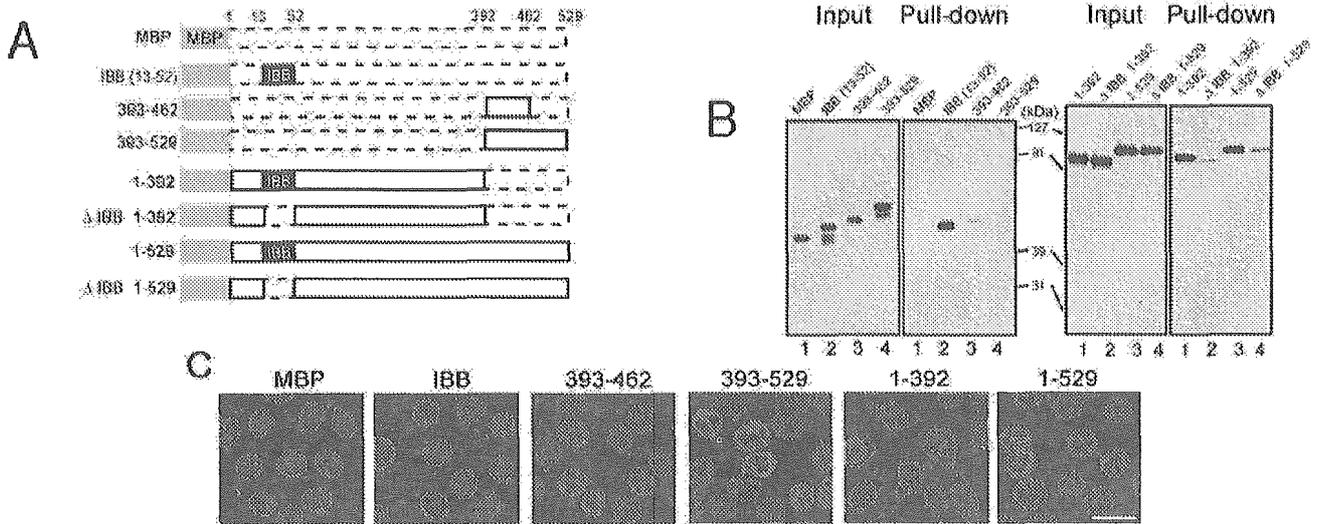


図3. Vprの核移行に要求されるVprとimportin α C末端側との間接結合
 A. 解析に用いたimportin α の欠損変異体 B. GST融合N17C74とimportin α 変異体によるGST-pull down法 C. Importin α isoform存在下での*in vivo*核移行解析

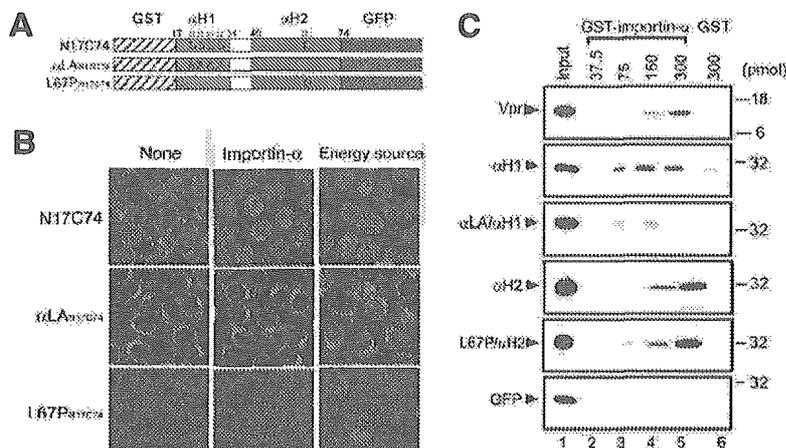


図4. *in vitro*核移行解析およびVpr発現HeLa細胞抽出液存在下でのGST pull down

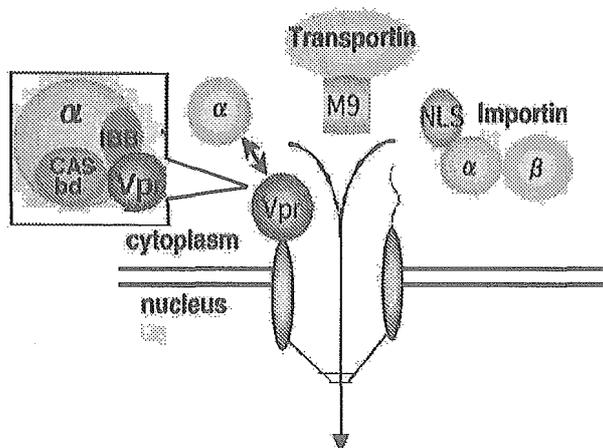


図5 Vprの新規核移行のモデル図

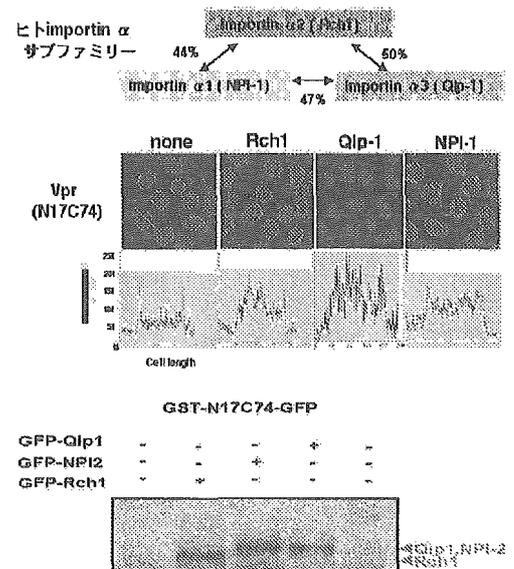


図6 各種importin α isoformを用いたVprの*in vitro*核移行解析およびGST pull down

A. 定量的 PCR

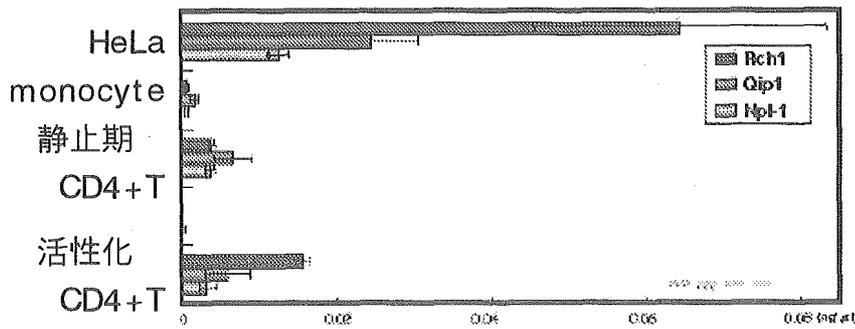


図7. マクロファージおよび活性化CD4⁺T細胞でimportin α はmRNA (A)および蛋白(B)レベルで発現している。

B. Western Blot

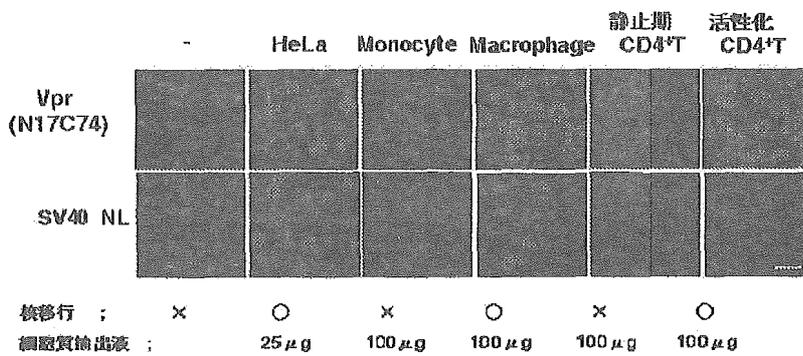
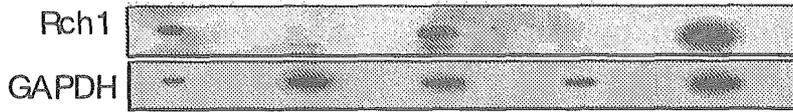


図8 Vprはマクロファージおよび活性化CD4⁺T細胞の細胞画分を用いたin vitro核移行解析

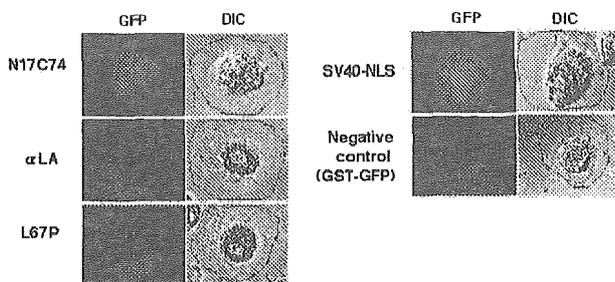


図9 マクロファージおよび活性化CD4⁺T細胞におけるVprのマイクロインジェクション

表1 HIV-1 Vpr変異体の感染効率

Virus	Infectivity		Nuclear import		Binding of H1 & imp α
	Macro-phage	Activated CD4 ⁺ T	Macro-phage	Activated CD4 ⁺ T	
Vpr	++	++	+	+	+
α LA	N.D	±	---	---	---
HI4546WA	N.D	+			
α LA/L67P	±	±	---	---	---
Δ Vpr	+/±	+	/	/	/

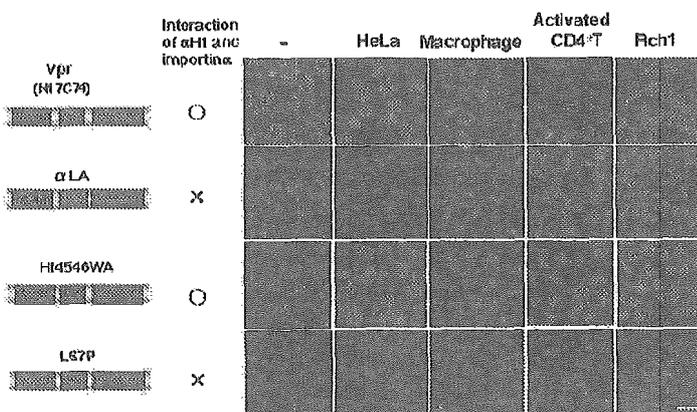


図10 importin α との結合能を消失したVpr変異体(L67P)は核移行能を消失する。

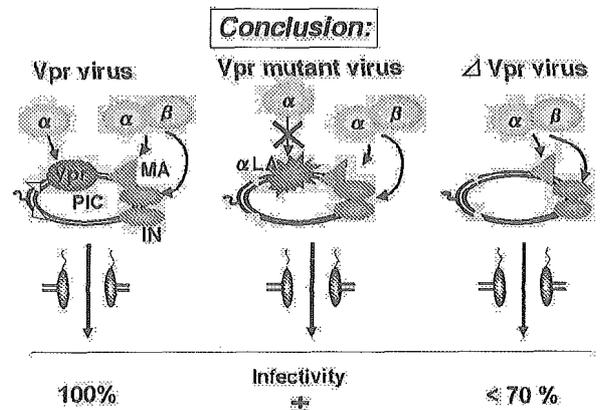


図11 HIV-1感染をVprを標的に阻害できる可能性を示すモデル図。

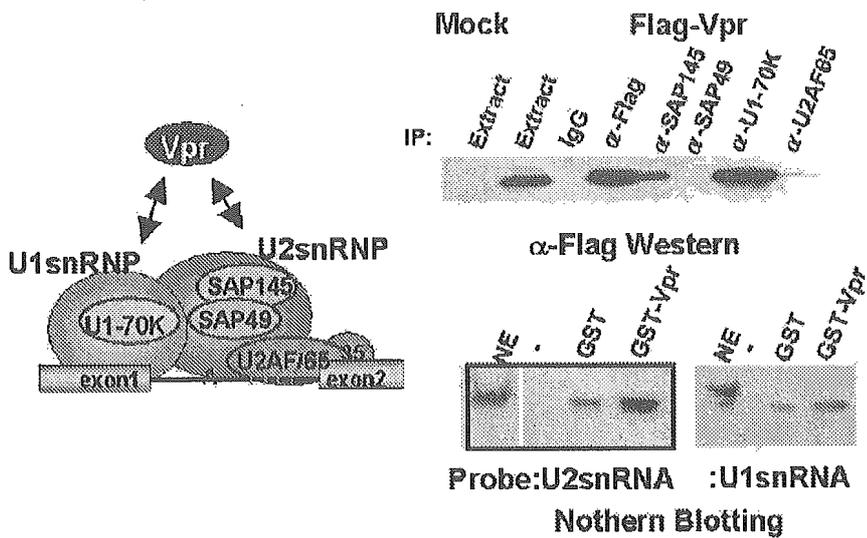


図12 Vprはスプライソソーム中に存在する (上段) Flag-Vprを一過性に発現させたHeLa細胞の抽出液を、抗Flag抗体、抗SAP145抗体、抗SAP49抗体、抗U1-70K抗体、及び抗U2AF65抗体で免疫沈降し、その沈降産物を抗Flag抗体でWestern Blotした。(下段) GST又はGST-Vprと核抽出液(NE)を混ぜGST-pull downを行い、そこからRNAを抽出しU2及びU1snRNAプローブを用いてNorthern Blotを行った。

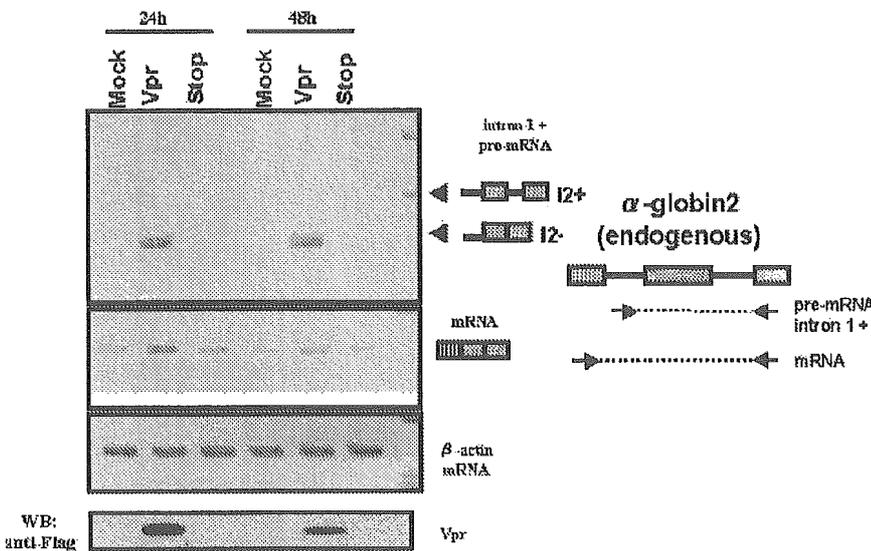


図13 Vprは細胞内でスプライシングを阻害する(*in vivo*解析)

HeLa細胞にFlag-Vpr発現ベクターを導入し、24及び48時間後の細胞からRNAを回収し、RT-PCRを行ってcDNAを合成した。そのcDNAを鋳型として、 α -globin2のイントロン1を含む配列が増幅するプライマーを用いて半定量的PCR法を行った。コントロールとして、 α -globin2及び β -actinの全長mRNAを増幅するプライマーを用いた。それぞれの細胞抽出液中のVprの存在の有無を抗Flag抗体

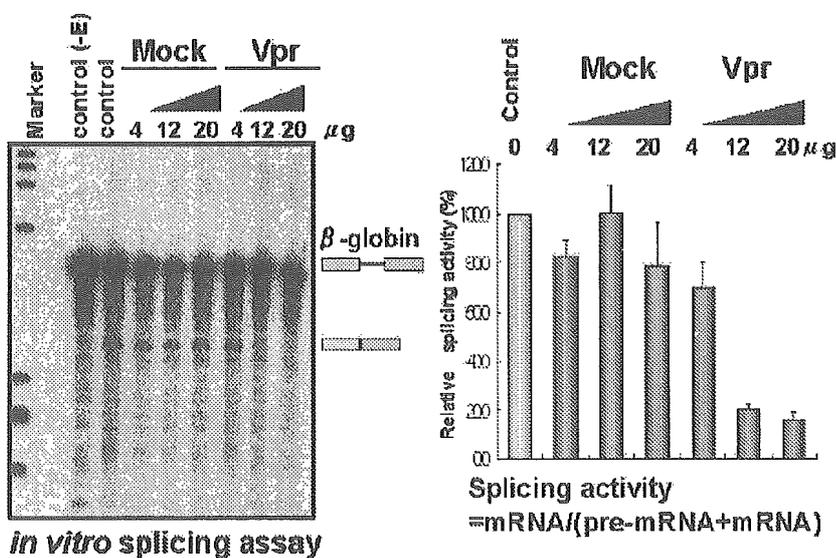


図14 Vprはスプライシング反応を阻害する(*in vitro*解析) (左図) 除蛋白処理をした*in vitro* splicing反応後を変性アクリルアミドゲルで電気泳動した。各レーンは、エネルギーなし(control(-E))、基本の反応系(control)、この反応系にMockまたは、Vpr発現細胞の核抽出液を各々4, 12, 20 μ g添加した系。(右図) 左図のバンドを定量し、スプライシング活性を比較したグラフ。(スプライシング活性 = mRNA/(pre-mRNA+mRNA))

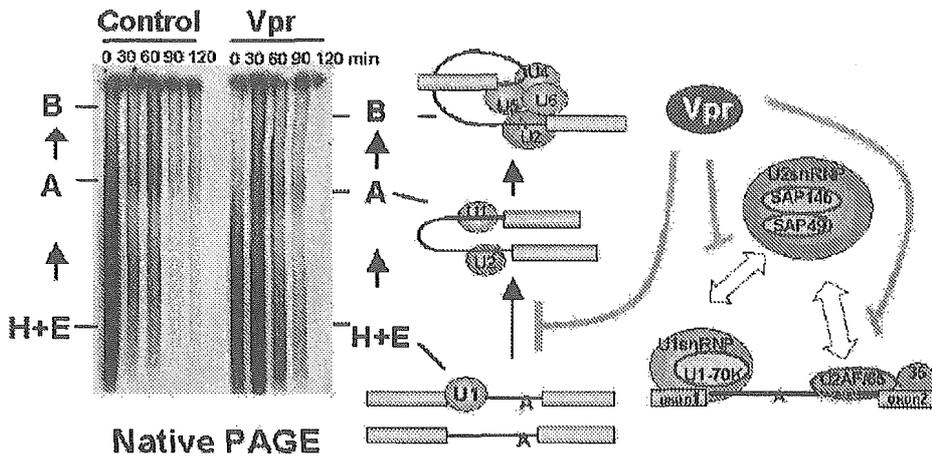


図15 Vprはスプライソソーム形成の初期段階を抑制する(左図)反応開始0, 30, 90, 120分後の *in vitro* splicing反応液を非変性アクリルアミドゲルで泳動した。(右模式図) Vprはスプライソソーム形成初期のH+EからA複合体の形成を抑制する。

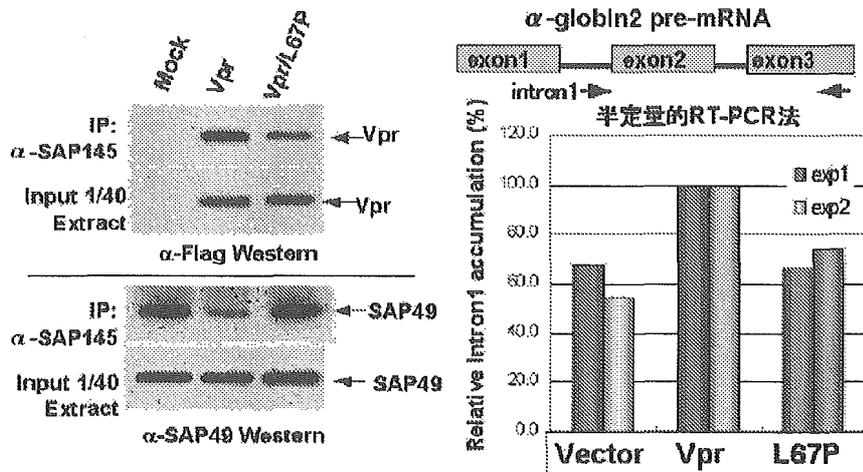


図16 VprはSAP145と結合し、SAP145とSAP49の直接結合を減弱させる結果としてスプライシングを阻害する(左図上段) HeLa細胞内で野生型Flag-Vpr及び点変異体Flag-L67Pを発現させ、抗SAP145抗体で免疫沈降し、その沈降産物を抗Flag抗体でWestern Blotした。(左図下段) 上段の沈降産物を抗SAP49抗体でWestern Blotした。(右図) HeLa細胞内で野生型Flag-Vpr及び点変異体Flag-L67Pを発現させ、24時間後細胞からRNAを回収し、RT-PCR法によってcDNAを合成した。そのcDNAを鋳型として、 α -globin2のイントロン1を含む配列が増幅するプライマーを用いてPCRを行った。野生型Flag-Vprのバンド(イントロン1

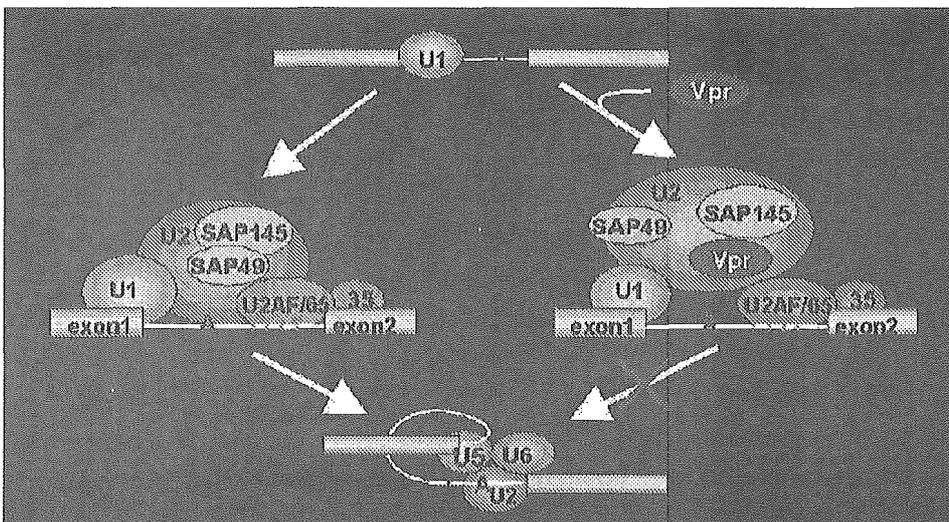


図17 Vprによるスプライシング阻害機構の概念図 Vprはスライソソーム中でSAP145と結合することにより、SAP145とSAP49の直接結合を減弱させる。さらにスプライソソーム中でU1-70K及びU2AF65と相互作用することにより、スプライソソーム形成の初期段階を抑制する結果、スプライシング反応を阻害していると考えられる。

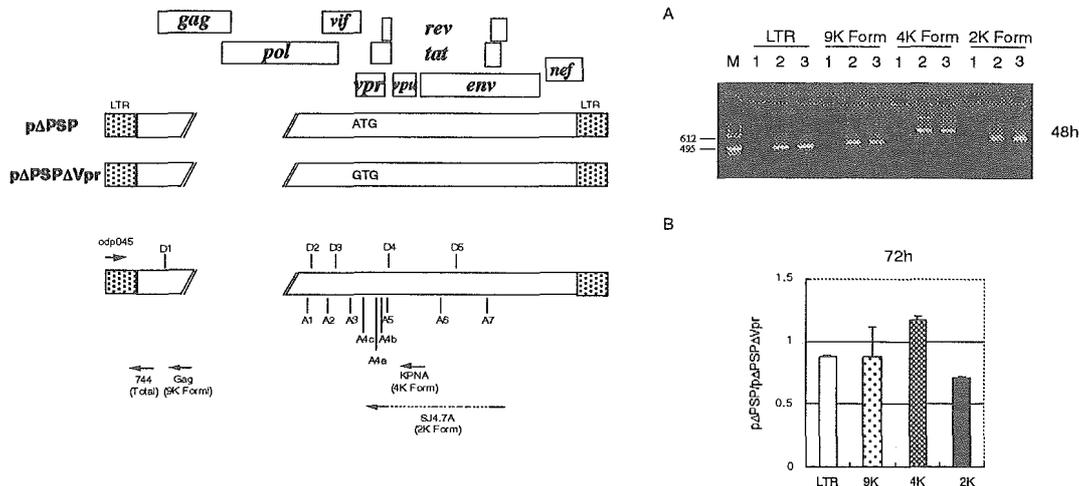


図18 HIV-1 NL4-3株のGag-Pol領域の大部分を欠失させた変異体pΔPSPおよびpΔPSP内に存在するvpr遺伝子の開始コドンに変異を入れ、Vprを発現しなくなった変異体であるpΔPSPΔvprを作製した。各々をHeLa細胞に遺伝子導入し、RNAを抽出し、9K,4K及び2K Formに特異的なプライマーを用いて、RT-PCRを行った。A. DNA導入後48時間目でのRT-PCRの結果。B. DNA導入後72時間目での各mRNAの量を比較したところ、pΔPSPに比べ、pΔPSPΔvprでは4K Formの減少と2K Formの増加が観察された。

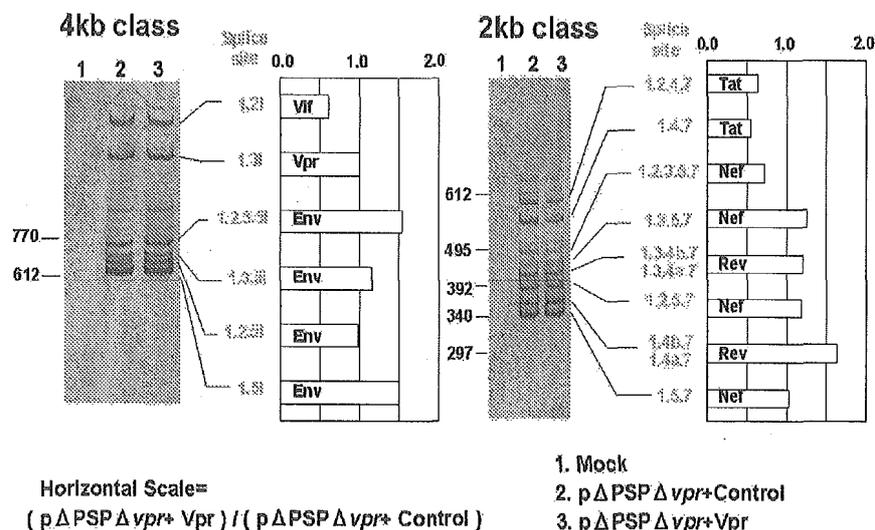


図19 各FormにおけるそれぞれのmRNAに対する影響

RT-PCR産物をアクリルアミドゲルにて分離後、CYBER Green試薬にて染色し、蛍光イメージアナライザーにて、各Form内のmRNAの量比に与える影響について観察した。

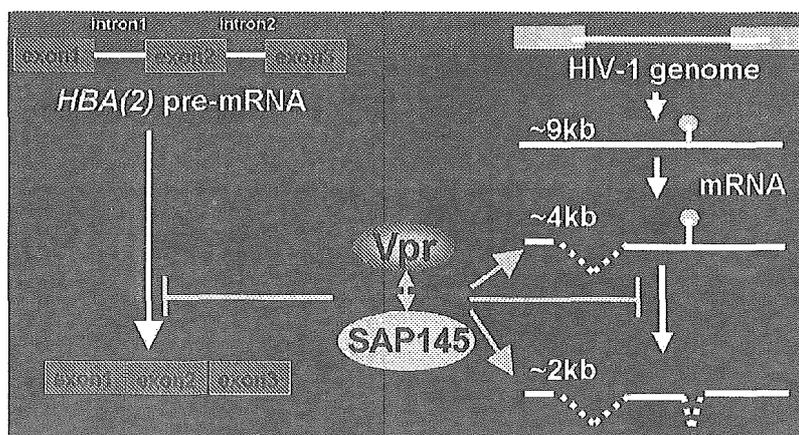


図20 Vprはスプライソソーム中でSAP145との結合を介して細胞側遺伝子およびHIV-1ゲノムのスプライシングを制御する

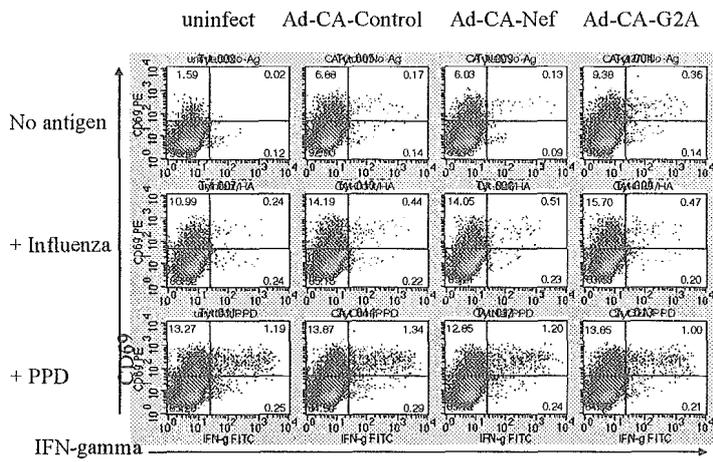


図 21 樹状細胞の初期 CD4 陽性 T 細胞活性化能における Nef 発現の影響
 健康ヒト単球より分化誘導した DC に Nef 発現アデノウイルスベクターを感染させて 1 日間培養した後、抗原無添加、または不活化 Influenza ウイルスあるいは結核菌由来 PPD 抗原による抗原刺激を与えてから、同じドナー由来の T 細胞と DC を 1 日間共培養した。翌日初期の T 細胞活性化マーカーである CD69 発現および IFN-g 産生細胞の割合を FACS で解析した。どの系においても Nef 発現は DC の初期 CD4 陽性 T 細胞活性化能を阻害しなかった。

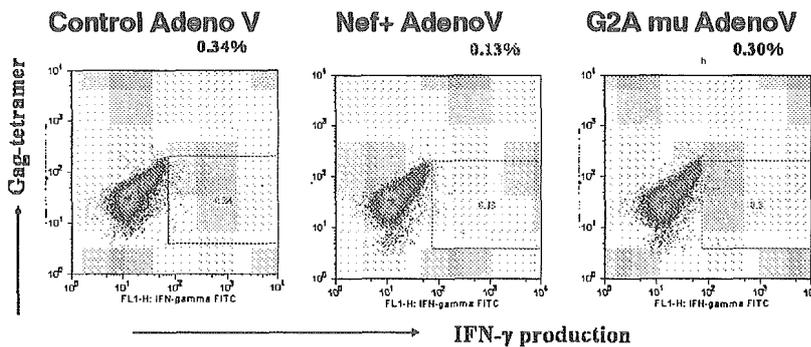


図 22 樹状細胞の CD8 陽性 T 細胞活性化能における Nef 発現の影響
 DC に Nef および変異 Nef 発現アデノウイルスベクターを感染させた後、Yeast VLP をパルスして 1 日培養した。翌日 HIV-1 Gag p17 peptide 特異的 CD8 陽性 T 細胞クローンを加え、6 時間後の細胞内 IFN- γ 産生細胞の割合を FACS で解析した。DC による外来性抗原の cross-presentation を介した CD8 陽性 T 細胞活性化能は半分以下の効率に低下していた。

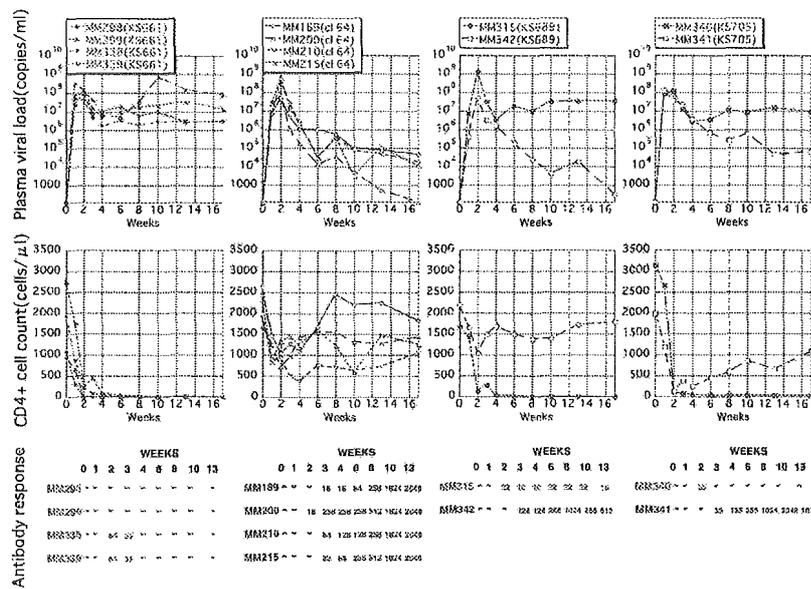


図 23 強毒/弱毒 SHIV 組換えクローンウイルス接種サルにおける血漿中ウイルス量 (上段)、末梢血 CD4 陽性細胞数 (中段) 及び抗体価 (下段) の推移

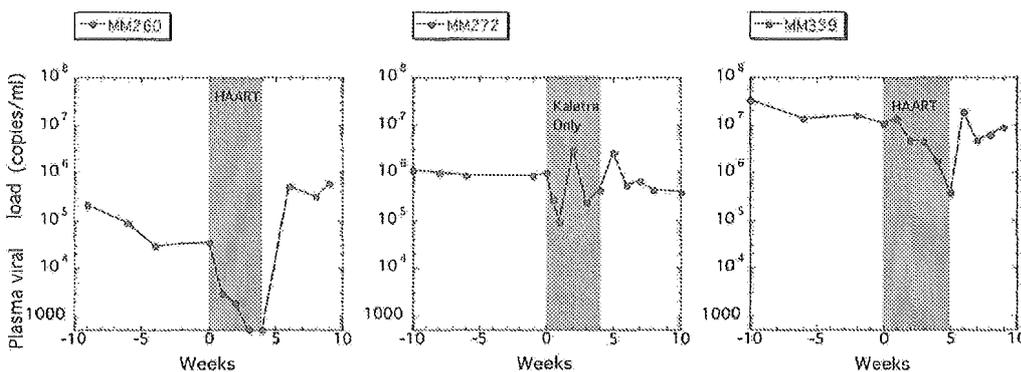


図 24 多剤併用療法 (HAART) あるいはプロテアーゼ阻害剤 (Kaletra) 単剤処置サルにおける血漿中ウイルス量の推移。

平成15年度

エイズ医薬品等開発研究
重点研究報告書
国際研究グラント事業 研究報告書

平成16年9月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社