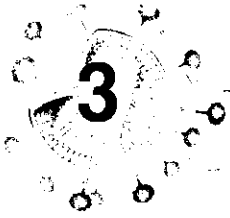


- Day 8 : DC(1)として回収 (凍結保存)。
- peptide-CTL 細胞に用いたものと同種の EBV 抗原ペプチドをパルスした mature DC を選択した。2004 年 3 月 10 日から 2004 年 4 月 30 日にかけて 6 回投与された DC (平均 1.8×10^6 細胞、合計 1.05×10^7 細胞) は TNF α と prostaglandin E2 にて成熟化した mature DC であり、i.v.投与された。

(6)DC(2)

- 2004 年 6 月 1 日以降の DC(2)は成熟化、抗原提示、migration を考慮して培養法及び投与ルートを変更し、TNF α と prostaglandin E2 に IL-1 β と IL-6 を加えた成熟化サイトカインカクテルにて成熟化後に EBV 抗原ペプチドを 1 種ずつパルスした DC が皮下投与された。
- 末梢血 440ml より PBMC を T75 フラスコ (AIM-V20ml) \times 6 枚で 2 時間培養。
- 接着細胞は DC(2)に使用。非接着細胞は一旦凍結し peptideCTL + peptideCTLOKT3(2)に使用。
- Day 0 : 接着細胞を T75 フラスコ \times 6 枚で培養。GM-CSF 500U/mL、IL-4 500U/mL を加えて培養。5 日間。
- Day 5 : Maturation。IL-6 100U/mL、IL- β 10ng/ml、TNF α 10ng/mL、PGE2 1μ g/mL で培養。
- Day 6 : 抗原添加。各プレートにつき各 EBV-peptide を 2μ g/ml で投与。
- Day 7 : DC(2)として回収 (凍結保存)。
- 2004 年 6 月 1 日以降に 20 回投与された。DC 数は平均 5.8×10^6 細胞、合計 1.15×10^8 細胞であった。



3 免疫療法における各種ウイルスに対する細胞性免疫応答の解析

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）

研究協力者：上野 貴将¹、岡 慎一²

¹熊本大学エイズ学研究センター・ウイルス制御分野、

²国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター）

研究要旨

AIDS に合併するウイルス疾患あるいは HIV-1 自体に対する免疫療法の可能性を検討した。AIDS に合併した EBV リンパ腫患者の一卵性双生児（HIV-1 非感染者）から誘導した EBV 特異的 CD8T 細胞を、2 人の患者への移入をおこなうと共に、DC を用いた誘導を試みた。EBV 特異的 CD8T 細胞を、テトラマーを用いて患者末梢血で検出した結果、それぞれ二つの EBV エピトープに対して特異的 CD8T 細胞が検出でき、患者内での特異的 CD8T 細胞誘導もしくは正嫡を確認できた。また長期未発症者（LTNP）で、HIV-1 に対するどのような細胞性免疫が高まっているかを明らかにすることを試みた。HLA-B*5101 抗原をもった人が、LTNP に高頻度に見られることから、HLA-B*5101 が提示する HIV-1 エピトープを認識する CTL の機能を調べた。その結果、非常に強い HIV-1 感染 CD4T 細胞に細胞傷害活性と HIV-1 増殖抑制能を確認できた。これらの CTL は、患者体内で HIV-1 の増殖抑制に関与していると推測された。

A. 研究目的

HIV-1 感染者では、免疫不全が進行するにしたがって EB ウイルス(EBV)によるリンパ腫が発症する患者が日本ではよく見られ、患者の予後に重大な影響を及ぼす。そこで、EBV 特異的 CD8T 細胞の用いた免疫療法をおこない、患者体内での EBV 特異的 CD8T 細胞の誘導を解析し、その効果を検討した。さらに、新たな HIV-1 に対する免疫療法の基盤を確立するために、LTNP に高頻度に見られる HLA-B*5101 が提示する HIV-1 エピトープを認識する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の解析をおこなう。

B. 研究方法

1. EBV 特異的 CD8T 細胞の解析

EBV 特異的 CD8T 細胞を解析するために、EBV 及び HCMV 特異的 CD8T 細胞を検出する HLA クラス I テトラマー（2 種類の EBV エピト-プペプチドを結合した HLA-A*1101 テトラマー、および 2 種類の EBV エピト-プペプチドを結合させた HLA-A*2402 テトラマー）を作製した。これを用いて、患者末梢血中の EBV 特異的 CD8T 細胞を検出した。

2. EBV リンパ腫治療のための EBV 特異的 CD8T 細胞の誘導

EBV リンパ腫を合併した患者の一卵性双生児の兄弟（HIV-1 非感染）の末梢血から、ペプチド刺激して EBV 特異的 CD8T 細胞の誘導をおこない、こ

の T 細胞を患者に導入した。さらに、ペプチドをパルスした樹上細胞 (DC) をこの患者に投与し特異的 CD8T 細胞が出現するかを検討した。

3. HIV-1 特異的 CTL の HIV-1 感染 CD4T 細胞に対する細胞傷害性活性および HIV-1 増殖抑制能

4 つの HIV-1 エピトープを認識する HLA-B*5101 拘束性 CTL クローンおよび、2 つ HIV-1 エピトープを認識する HLA-A*3303 拘束性 CTL クローンを用いて、これらの CTL クローンの HIV-1 感染 CD4T 細胞に対する細胞傷害性活性および HIV-1 増殖抑制能を解析した。

(倫理面への配慮)

患者及びその兄弟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書面にて承諾を得た。さらに、国立国際医療センターの倫理委員会での承認を得た。これらの患者の HLA のタイピングは、熊本大学の倫理委員会での承認を得た。

C. 研究結果

1. 悪性リンパ腫が発症した HIV-1 患者に対する免疫誘導療法における EBV 特異的 CD8T 細胞の解析

EBV 特異的 T 細胞レセプター (TCR) を認識できるテトラマーを用いて、2 人の EBV 特異的 CD8T 細胞を誘導する免疫療法 (HIV-1 非感染の一卵性双

生児の兄弟の末梢血からペプチドで刺激して誘導した EBV 特異的 CD8T 細胞の移入およびペプチドをパルスした樹上細胞の投与) を受けた患者の末梢血中を解析し、特異的 CD8T 細胞が検出できるかを調べた。その結果、HLA-A*1101 をもった患者 (KI-179) では、特異的 CTL 移入両方を開始する以前には、ほとんど末梢血には特異的な CD8T 細胞の検出はされなかったが、治療開始後、高頻度に 2 つのエピトープ特異的 CD8T 細胞が検出された (図 1)。

また同様に HLA-A*2402 をもった患者 (KI-185) でも、特異的 CTL 移入両方を開始する以前には、ほとんど末梢血には特異的な CD8T 細胞の検出はされなかったが、治療開始後、2 つのエピトープ特異的な CD8T 細胞の誘導が確認された (図 1)。

2. HIV-1 特異的 HLA-B*5101 拘束性 CTL

4 つの HIV-1 特異的 HLA-B*5101 拘束性 CTL のうち、2 つの Pol エピトープ特異的 CTL は、Nef による HLA class I の downregulation の影響を受けないほどの強い HIV-1 増殖抑制能 (図 2) と強い HIV-1 感染 CD4T 細胞に対する細胞傷害活性 (図 3) を示した。一方、Gag および Rev 特異的 HLA-B*5101 拘束性 CTL および 2 つの HLA-A*3303 拘束性 CTL は、Nef による HLA class I の downregulation の影響を受けて、HIV-1 感染 CD4T 細胞に対する細胞傷害性活性はみられず、HIV-1 増殖抑制能の大幅な低下が見られた。

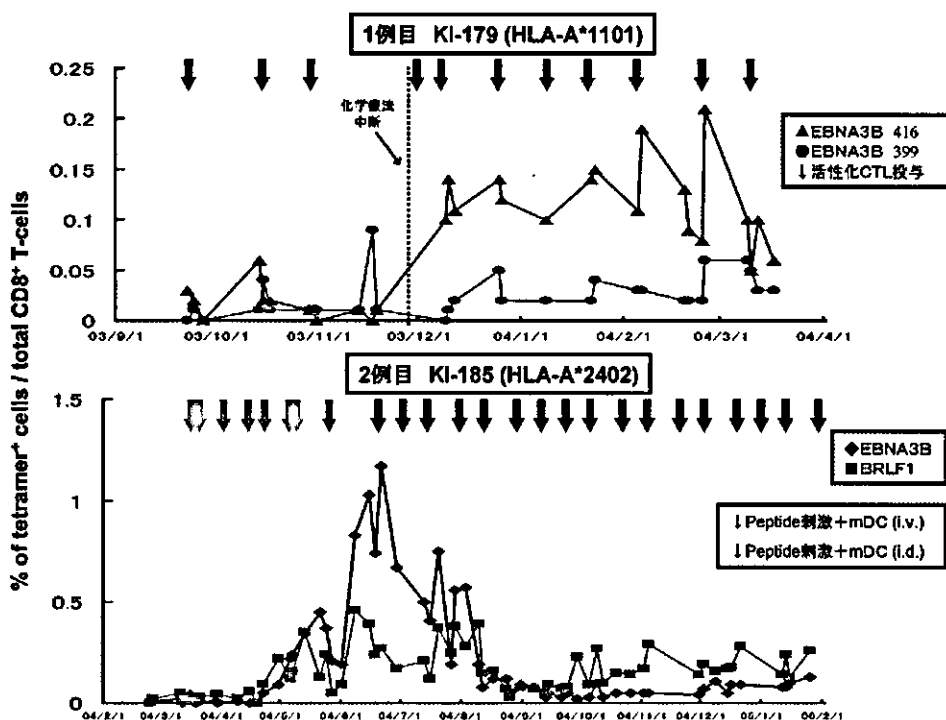


図 1

D. 考察

2人の悪性リンパ腫患者に、HIV-1非感染の一卵性双生児の兄弟の末梢血からペプチドで刺激して誘導したEBV特異的CD8T細胞の移入およびペプチドをパルスした樹上細胞の投与をした結果、それぞれ2つのEBVエピトープに対して特異的CD8T細胞の増加が認められた。これらの特異的CD8T細胞は、投与前には患者末梢血中には検出されなかったことから、投与したEBV特異的CD8T細胞が体内で増加したか、ペプチドをパルスしたDCが体内で

患者のT細胞からEBV特異的CD8T細胞を増加したと考えられた。このような結果から、今回用いた方法によりある程度EBV特異的CD8T細胞の誘導は可能と考えられた。しかしながら、HIV-1非感染の一卵性双生児の兄弟の末梢血からペプチドで刺激して誘導したEBV特異的CD8T細胞の数は必ずしも多くなく、今後効率的に増やす方法を検討する必要がある。

我々も含めた今までの研究成果から、HIV-1特異的CTLは、HIV-1感染CD4T細胞に対して細胞傷害

HIV-1特異的CTLによるHIV-1増殖抑制能

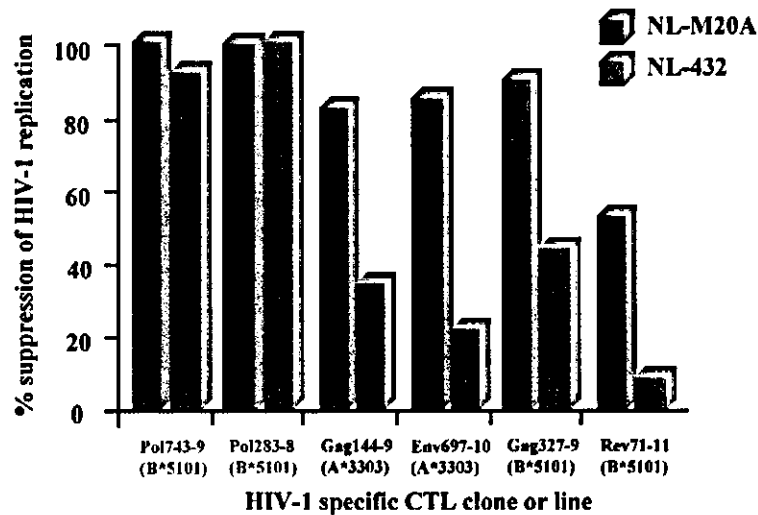


図2

HIV-1感染CD4T細胞に対するHIV-1特異的CTLの細胞傷害活性

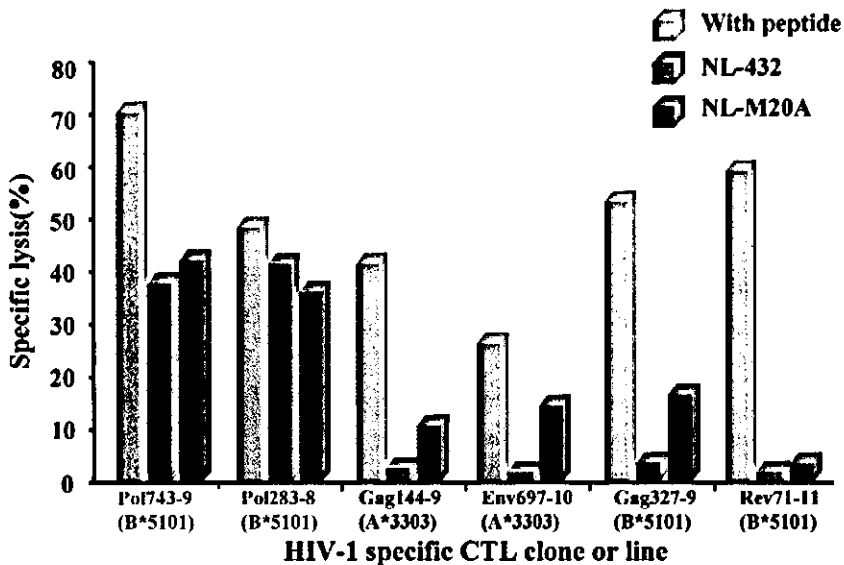


図3

活性を示さないことが明らかになっている。また我々は以前に、HIV-1 特異的 CTL は、HIV-1 感染 CD4T 細胞に感染した HIV-1 の増殖を部分的に抑制することを明らかにした。今回、2つの Pol 特異的 CTL は、Nef による HLA class I の downregulation の影響を受けず、強い HIV-1 増殖抑制能と強い HIV-1 感染 CD4T 細胞に対する細胞傷害活性を示すことを明らかにした。これらの CTL は、HIV-1 感染者体内で HIV-1 の増殖抑制に関与していることが、強く示唆された。

E. 結論

1. 2人の悪性リンパ腫患者に、HIV-1 非感染の一卵性双生児の兄弟の末梢血からペプチドで刺激して誘導した EBV 特異的 CD8T 細胞の移入およびペプチドをパルスした樹上細胞の投与をした結果、それぞれ2つの EBV エピトープに対して特異的 CD8T 細胞の増加が認められた。これらの免疫療法による抗 EBV 細胞性免疫の誘導は可能である事が明らかになった。
2. 4つの HIV-1 特異的 HLA-B*5101 拘束性 CTL のうち、2つの Pol エピトープ特異的 CTL は、Nef による HLA class I の downregulation の影響を受けないほどの強い HIV-1 増殖抑制能と強い HIV-1 感染 CD4T 細胞に対する細胞傷害活性を示し、これらの CTL による体内での HIV-1 増殖の抑制が示唆された。

F. 研究発表

論文発表

1. Yokomaku, Y., Miura, H., Tomiyama, H., Kawana-Tachikawa, A., Takiguchi, M., Kojima, A., Nagai, Y., Iwamoto, A., Matsuda, Z., and 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.* 78: 1324-1332, 2004.
2. Tomiyama, H., Takata, H., Matsuda, T., and Takiguchi, M. Phenotypic classification of human CD8+ T cells reflecting their function: An inverse correlation between quantitative expression of CD27 and cytotoxic effector function. *Eur. J. Immunol.* 34: 999-1010, 2004.

3. Takata, H., Tomiyama, H., Fujiwara, M., Kobayashi, N., and Takiguchi, M. Cutting Edge: Expression of Chemokine Receptor CXCR1 on Human Effector CD8+ T Cells. *J. Immunol.* 173: 2231-2235, 2004.
4. Ueno, T., Tomiyama, H., Fujiwara, M., Oka, S., and Takiguchi, M. Functionally impaired HIV-specific CD8 T cells show high-affinity T cell receptor-ligand interactions. *J. Immunol.* 173: 5451-5457, 2004.
5. Ueno, T., Fujiwara, M., Tomiyama, H., Onodera, M., and Takiguchi, M. Reconstitution of anti-HIV effector functions of primary human CD8 T lymphocytes by transfer of HIV-specific $\alpha\beta$ TCR genes. *Eur. J. Immunol.*, 34(12): 3379-3388, 2004.
6. Kobayashi, N., Takata, H., Yokota S., and Takiguchi, M. Down-regulation of CXCR4 expression on human CD8+ T cells during peripheral differentiation. *Eur. J. Immunol.*, 34(12): 3370-3378, 2004.
7. Tomiyama, H., Fujiwara, M., Oka, S., and Takiguchi, M. Cutting Edge: Epitope-dependent effect of Nef-mediated HLA class I down-regulation on ability of HIV-1-specific CTLs to suppress HIV-1 replication. *J. Immunol.*, 174: 36-40, 2005.
8. Satoh M., Takamiya Y., Oka S., Tokunaga K. and Takiguchi M.*: Identification and characterization of HIV-1-specific CD8+ T cell epitopes presented by HLA-A*2601, Vaccine, In press.

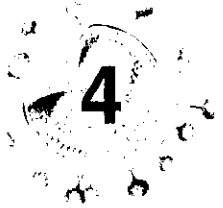
学会発表

1. Ueno, T., Tomiyama, H. and Takiguchi M. Impaired responsiveness of HIV-specific CD8 T cells to HIV-infected cells is caused by high-affinity TCR-ligand interactions: An insight into immune evasion by HIV. Keystone Symposia 2004 (Keystone, Canada) April 12-18, 2004.
2. Takata H., Tomiyama H., Fujiwara M., Kobayashi N. and Takiguchi M. The Role of CXCR1/IL-8 in Acquired Immunity: CXCR1 Expression on Effector CD8+ T Cells. 12th International Congress of Immunology(Montreal, CANADA) July 17-23, 2004.
3. Fujiwara M., Tomiyama H., Oka S. and Takiguchi M. HLA-B*5101-restricted, HIV-1-specific cytotoxic T cells effectively suppress HIV-1 replication and control HIV-1 in long-term non-progressors and slow progressors, AIDS Vaccine 2004 International Conference (Lausanne, Switzerland) August 30-September 1, 2004

4. Takata H., Tomiyama H., Fujiwara M., Oka S. and Takiguchi M. Impaired responsiveness of HIV-specific CD8 T lymphocytes caused by high-affinity T cell receptor-ligand interactions. 12th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (Boston MA, USA) Feb. 22-25, 2005.
5. 上野貴将、井手上結香、富山宏子、岡慎一、滝口雅文 (2004) HIV の変異と T 細胞レパートリーのダイナミクス。第 52 回日本ウイルス学会学術集会(横浜) 2004 年 11 月 21 日～23 日
6. 藤原守、富山宏子、岡慎一、滝口雅文 (2004) HLA-B*5101 拘束性 HIV-1 特異的 CTL の HIV-1 増殖抑制能と病態進行への関与に関する解析 第 52 回日本ウイルス学会学術集会(横浜) 2004 年 11 月 21 日～23 日
7. 近藤孝昭、滝口雅文 (2004) EBV 特異的 memory CD8+T 細胞の機能的解析。第 52 回日本ウイルス学会学術集会(横浜) 2004 年 12 月 1 日～12 月 3 日
8. 滝口雅文、藤原守、富山宏子、岡慎一 (2004)HLA-B*5101 拘束性 HIV-1 特異的 CTL の HIV-1 増殖抑制能と AIDS 進行への関与。第 34 回日本免疫学会総会・学術集会(札幌) 2004 年 12 月 1 日～12 月 3 日
9. 上野貴将、井手上結香、富山宏子、岡慎一、滝口雅文 (2004) 抗原変異が T 細胞レパートリーに与える影響。第 34 回日本免疫学会総会・学術集会(札幌) 2004 年 12 月 1 日～12 月 3 日
10. 高田比呂志、富山宏子、藤原守、小林直樹、滝口雅文 (2004) エフェクター CD8+ T 細胞に発現する CXCR1 の機能解析。第 34 回日本免疫学会総会・学術集会(札幌) 2004 年 12 月 1 日～12 月 3 日
11. 近藤孝昭、滝口雅文 (2004) EBV 特異的 memory CD8+T 細胞の機能的解析 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会(札幌) 2004 年 12 月 1 日～12 月 3 日
12. Takiguchi M., Tomiyama H., Fujiwara M., Oka S. (2004) Epitope-dependent effect of Nef-mediated HLA class I down-regulation on ability of HIV-1-specific CTLs to suppress HIV-1 replication. 第 18 回日本エイズ学会学術集会(静岡) 2004 年 12 月 9 日～11 日
13. 佐藤愛美、岡慎一、滝口雅文 (2004) HLA-A*2601 拘束性・HIV-1 特異的 CTL による変異エピトープの認識 第 18 回日本エイズ学会学術集会(静岡) 2004 年 12 月 9 日～11 日
14. 川島夕佳、佐藤愛美、岡慎一、滝口雅文 (2004) HLA-A*2603 に提示される HIV-1 T 細胞エピトープ同定 第 18 回日本エイズ学会学術集会(静岡) 2004 年 12 月 9 日～11 日
15. 小泉寛和、富山宏子、藤原守、上野貴将、岡慎一、滝口雅文 (2004) 長期未治療患者における Nef 特異的 HLA-A*1101 拘束性 CD 8+T 細胞の解析 第 18 回日本エイズ学会学術集会(静岡) 2004 年 12 月 9 日～11 日
16. 上野貴将、藤原守、井手上結香、富山宏子、滝口雅文 (2004) T 細胞レセプター導入による新たな免疫療法の検討。第 18 回日本エイズ学会学術集会(静岡) 2004 年 12 月 9 日～11 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし



免疫再構築症候群への対処法開発に関する研究

分担研究者：白阪 琢磨

(国立病院機構大阪医療センター
HIV/AIDS 先端医療開発センター センター長)

研究協力者：上田 千里、上平 朝子、山本 善彦

(国立病院機構大阪医療センター)

研究要旨

HAART によって免疫が再構築される過程で、治癒していた日和見感染症が増悪したり、新たな日和見感染症が出現する場合があります、免疫再構築症候群（以下 IRIS）と呼んでいる。この数年で IRIS に関する優れた Review がいくつかある。本研究では IRIS への対処法を検討するため、本症候群の病態を明らかにすることを第一の目標とした。初年度である昨年は、当院に入院した症例から IRIS 症例の抽出を行うために、日和見感染症が出現した 56 症例につき検討を行った。HAART 後の日和見感染症発症群 21 例）と未発症群（35 例）の二群間の比較では HAART 開始時の CD4 値に有意な差を認め、次に限られた症例で HAART 治療前の血中サイトカイン値が IRIS 出現群と非出現群で差異のある事が示唆された。本年度は IRIS と考えられる症例に付きサイトカイン測定も含めて検討を行う事とした。

A. 研究目的

HIV 感染症は抗ウイルス剤多剤併用療法 (HAART) 実施後、その予後は著しく改善している。しかし HAART 開始後に日和見感染症（ニューモシスチス・カリニ肺炎 (PCP)、サイトメガロ (CMV) 感染症等）の増悪を認める免疫再構築症候群 (IRS) が、新たな問題として浮かび上がってきた。免疫再構築症候群は、ときに重篤な病態を引き起こし治療に難渋する。IRS 発症を事前に予測できれば、その影響を最小限にとどめることは可能であると思われる。IRS 発症を予測する十分な検査は未だ無い。いっぽう種々の感染症において宿主の感染防御免疫機構が働くことは周知の事実であり、その一序であるサイトカインの役割については膨大な検討、報告がある。HIV 感染症、および合併する日和見感染症についても同様である。IRS の中で日常臨床においてよく経験する病態として PCP がある。最近その防御免疫において IFN- γ を含む Th1 サイトカインの重要性が報告されている。そこで我々は、血中の

IFN- γ を測定する事が、簡便、迅速な IRS 発症予測検査になりえないかどうかを HAART 開始後肺炎を発症した症例において検討した。その治療経過を併せて報告する。

B. 研究方法

1. 研究対象

肺胞洗浄液中にカリニ原虫を検出し診断しえた PCP を合併した AIDS5 症例である。PCP 軽快後 HAART を開始したところ PCP が再燃、増悪したと考えられた。

2. 方法

上記対象において PCP 初発症時早期、HAART 開始時、及び IRS 発症症例では IRS 治療前後の血漿中 IFN- γ 濃度を当院保存血漿を用いて ELISA 法により測定した。IFN- γ の測定にはそれぞれ High

Sensitivity IFN- γ Human, ELISA Biotrak System (アマシャムバイオサイエンス) を用い添付操作手順に従い測定した。

C. 研究結果

1. 症例 典型例を提示する

症例は 50 代男性である。2004 年 5 月中旬発熱、呼吸困難、胸部単純レ線異常を認め、精査加療入院となった。BALF 中にニューモシスチス・カリニ原虫を検出し、CD4 数 2 個/ μ l、HIV-RNA 量 (VL) は 170 万コピー/ml だったことより PCP 合併 AIDS 症例と診断された。肺炎治療のため ST 合剤が 3 週間投与され、6 月 18 日より 2 次予防投与に変更され、退院となった。

1 ヶ月後 HAART 導入のため再入院となった。HAART 開始前にカリニ肺炎再発の有無を検討するために本人の同意を得て諸検査をおこなった。胸部 CT では新たな陰影の出現は無く、Ga シンチでは胸部に Ga の取り込みは無かった。肺胞洗浄液中カリニ原虫、細菌、抗酸菌を認めなかった。このような結果より新たな日和見感染発症の可能性は少ないと考え 7 月 22 日より HAART (EFV, 3TC, TDF) を開始した。開始時 CD4 数 4 個/ml、VL は 180 万コピー/ml であった。開始 8 日目の 7 月 31 日より 38 - 39 °C の発熱が出現した。発熱後も HAART は継続

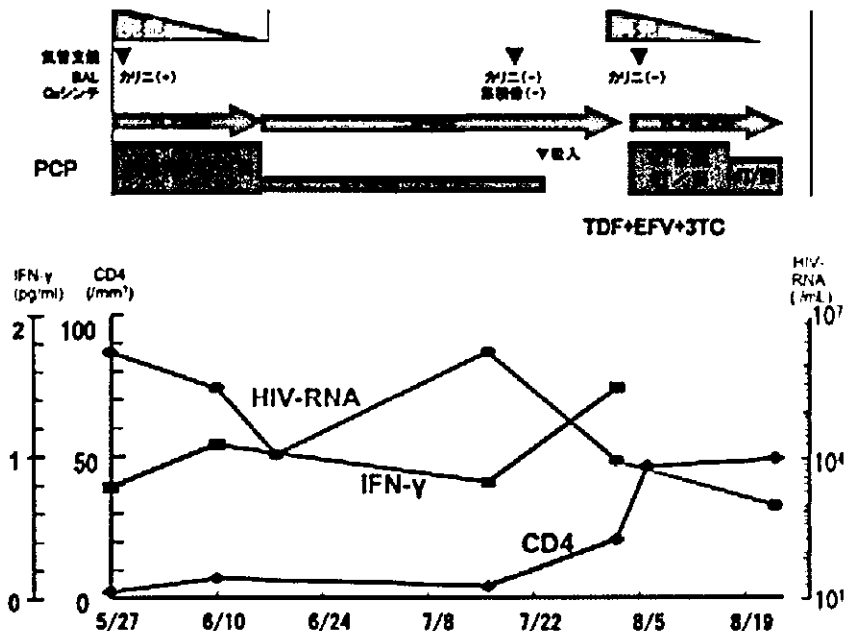
し、この頃 CD4 数 47 個/ μ l と増加し、VL は 8700 コピー/ μ l と著減していた。症状は軽快せず、 β -D グルカン軽度上昇、胸部レ線異常が出現したため 8 月 6 日 BAL、TBLB をおこなった。BALF 中カリニ原虫 (グルコット染色、蛍光染色、PCR 法で検討) 抗酸菌、細菌、真菌を認め無かった。組織上カリニ原虫陰性、CMV、単純ヘルペス免疫染色陰性であった。このような結果であったが、HAART 開始後の CD4 数が増加し、VL が減少していた時期に一致し発症し、カリニ肺炎の既往があることより考え、免疫再構築症候群発症 (IRS) の可能性が考えられた。そこで ST 合剤を治療量まで増量したところ、増量後 4 日目より解熱した。その後胸部レ線上の改善にはさらに約 2 ヶ月間の ST 合剤投与を要した。

2. 血漿中 IFN- γ 濃度

本例でも HAART 開始後早期に血漿中 IFN- γ 濃度の上昇を認めた (図)。他の症例については全例に一致した傾向を見いだせなかった。

D. 考察

PCP 治療後に HAART を始めたところ肺炎を発症した AIDS 症例を経験した。肺炎は ST 合剤長期投与により軽快した。HAART は継続可能であった。我々は今回の肺炎を経過より考え PC による IRS と考えている。一般に PCP を合併した AIDS 患者では



肺炎治療が成功し症状改善後もカリニ原虫の排除に日を要する場合があると考えられている。O. Donnell 等は、PCP 合併 AIDS 症例において3週間の標準治療成功後も、その四分の一の症例に痰中のカリニ原虫を証明している。PC が残存する時期に HAART を開始した場合、CD4 数の増加および、免疫抑制に働く HIV の減少は感染防御免疫を賦活し炎症反応の拡大につながる可能性が示唆される。今回我々は患者氏の同意を得て HAART 開始前に気管支鏡検査を実施した。PC の存在は確認できなかった。HAART 開始後 IRS 発症時 BALF 中に PCR 法を用いてもカリニ原虫を証明することが出来なかった。これは現在臨床現場で利用可能な微生物検索では、さらに検査感度を上げない限り IRS 発症を予測することが困難な症例の存在を示している。そこで我々は感染に対する宿主側の反応で IRS を予測出来る可能性を検討した。今回検討した症例では IRS 診断前に血中 IFN- γ 濃度の上昇を認めた。IFN- γ は PC に対して感染防御に働くという報告があり、早期に誘導される可能性が想像される。

PC による IRS 治療は、HAART 継続、抗菌剤投与および症例によってステロイド投与と考えられる。今回の症例は、HAART を継続し ST 合剤を併用することで軽快した。しかしその投与時期、投与期間に定まったものはなく重要な課題と思われる。発症予測が、早期 ST 合剤投与につながれば炎症の拡大を抑えることができるかもしれない。

E. 結論

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

なし（本研究に関連する業績）

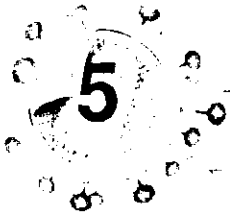
学会発表

1. 高濱宗一郎、上田千里、森正彦、長谷川善一、上平朝子、山本善彦、白阪琢磨：HIV 感染症に合併する CMV 感染症発症予測における末梢血中サイトメガロウイルス抗原検査の有用性。第 78 回日本感染症学会総会、東京、2004 年 4 月

2. 上平朝子、谷岡理恵、上田千里、森正彦、高濱宗一郎、長谷川善一、山本善彦、下司有加、織田幸子、白阪琢磨：HAART 開始後に劇症肝炎を発症し死亡した HBV/HIV 重複感染の一例。第 18 回日本エイズ学会・総会、静岡、2004 年 12 月

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし



ケモカインレセプターに影響しない侵入阻害剤の開発

分担研究者：満屋 裕明（熊本大学医学部免疫病態学内科学第二 教授）

研究協力者：松岡 雅雄（京都大学ウイルス研究所附属エイズ研究施設）

研究要旨

AIDS に対する化学療法は近年長足の進歩を遂げたが、薬剤耐性 HIV の出現が大きな問題となっている。我々は薬剤耐性変異株にも強力な活性を示し、かつ薬剤耐性発現の起こりにくい新規の薬剤開発の一例として CD4 と共に HIV のレセプターとして機能するケモカインレセプター (CCR5) に対するアンタゴニストの研究を進めている。その 1 つである AK602/GW873140 は米国における phase 2a 臨床試験で HIV 感染者への短期間投与により良好な HIV 抑制効果を示し、現在 phase 2b 試験が行われている。しかし CCR5 阻害剤が宿主 (生体) 側因子である CCR5 を阻害することによる長期的な生体への影響については現在のところ未知である。そこで本研究では CCR5 阻害剤が CCR5 を介したケモカインの作用に与える影響とその機序を中心に検討した。AK602 は CCR5 をコレセプターとして用いる R5 HIV-1 の増殖を試験管内 (IC_{50} : 0.2 nM) および動物モデルの系で強力に抑制した。アイソトープでラベルした AK602 は CCR5 に対して非常に強力な結合親和性 (K_D 値: ~ 3 nM) を持ちながら、CC-ケモカイン (RANTES) の CCR5 への結合にはわずかしか影響を与えず、RANTES が CCR5 を介してもたらす生理的作用 (chemotaxis や CCR5 の internalization) についても完全には阻害しないことが分かった。AK602 と CCR5 の構造学的解析により AK602 が extracellular loop 2 とその直下の上部膜貫通ドメインの疎水性ポケットに結合する可能性が示唆され、この部位は既存の CCR5 阻害剤の結合部位とは異なっていた。これらの結果は今後、ケモカインの作用に影響せずに抗 HIV 活性を発揮する新しい CCR5 阻害剤の開発に向けた有用な知見となり得る。

A. 研究目的

分担研究者 (満屋) は一貫して AIDS に対する治療法の研究開発を続けているが、最近満屋が蓄積してきた AIDS 治療薬開発の手法に細胞側の分子標的を対象にした基礎的アプローチを組み合わせた研究を進めている。その一例として細胞側因子であるケモカインレセプター (CCR5) に対する一群のアンタゴニスト (spirodiketopiperazine: SDP 誘導体) の研究を開始し (Maeda & Mitsuya, *JBC*, 276:35194-200,

2001 でプロトタイプを発表)、最近同定した AK602/GW873140 (Maeda & Mitsuya, *J. Virol.*, 78: 8654-62, 2004) は 2004 年米国で phase 2a の臨床試験が行われ、良好な抗 HIV 活性が報告され、本報告書執筆現在で米国での phase 2b 臨床試験段階にある。本研究では CCR5 阻害剤研究の一環として、AK602 と一連の誘導体を用いて HIV 感染を阻害する具体的なメカニズム、CCR5 阻害剤・ケモカインとレセプター (CCR5) の相互作用といった基礎的研

究を進め、ケモカインレセプターのケモカインを介した各種の生理作用に影響を与えない CCR5 阻害剤の開発を進めている。

B. 研究方法

- 1) 新規化合物の抗 HIV 活性評価には試験管内での評価 (p24 アッセイ・MTT アッセイ・MAGI アッセイ) に加え、SCID-hu マウス AIDS モデルを用いた評価法を用いた。また AK602 の他薬剤との試験管内での相互作用についても p24 アッセイデータをもとに検討した。
- 2) CCR5 阻害剤の作用機序の解析を目的として CCR5 阻害剤の ^3H ラベル体を作製および CCR5 の各ドメインに変異を加えた変異 CCR5 発現細胞株を多数作製、更に ^{125}I ラベル化ケモカイン (RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β) を用いて野生株・変異 CCR5 との結合能や CCR5 阻害剤とケモカインとの相互作用を検討した。
- 3) 分子構造解析機器 (SYBYL) を用いた構造モデリングの手法により CCR5 の構造学的解析を行う。更に変異 CCR5 とケモカイン・CCR5 阻害剤との結合能の変化のデータを元に、これらと CCR5 との結合様式の解析を進めた。

(倫理面への配慮)

開発中の化合物の臨床試験導入に際しては、動物実験などでその安全性を十分に確認し、動物実験に際しても大学倫理委員会での承認の上で行う。さらに volunteers については医学部・大学内の該当する IRB で倫理面での適合性について許可を申請、認可された後で、臨床試験の具体的な内容、及び考えられる副作用の危険性について十分な説明を行い、承諾が得られた後に試験を開始する。

C. 研究結果

CCR5 に対する一群のアンタゴニストは CCR5 をコレセプターとして用いる R5 HIV-1 の感染性を強力に抑制した。特に AK602 (図 1) は試験管内で強力な活性を示し (IC_{50} : 0.2 nM)、既存の抗 HIV 剤と全く交差耐性を認めず、huPBL-NOD-SCID マウスモデルの系でも強力な抗 HIV 活性を示した (血中ウイルスレベルが 2 log 減少)。他の薬剤との試験管内での相互作用についても AK602 は既存の抗 HIV 剤を始め、作用機序の異なる種々の薬剤との間で概ね相

乗効果を示した。

また ^3H -ラベル化合物を用いた検討で AK602 は非常に強力な CCR5 に対する結合親和性 (K_D 値: ~ 3 nM) を持ちながら、ケモカイン (RANTES) が CCR5 を介してもたらず生理的作用 (chemotaxis や CCR5 の internalization) については完全には阻害しないことが分かった。AK602 のこのような特徴を構造学的に解析するために CCR5 阻害剤の ^3H ラベル体・ラベル化ケモカインと多数の変異 CCR5 発現細胞株を用いた結合能解析実験を行い、AK602 の CCR5 との結合に extracellular loop 2 の両端に位置するアミノ酸 (G163 と K191) が重要であることを示した。その他の AK602 の結合に関与する部位と併せて mapping した結果、既存の CCR5 阻害剤の結合部位とは異なり extracellular loop 2 とその直下の上部膜貫通ドメインに AK602 の結合に重要なアミノ酸のクラスターが形成されることがわかり、この部位が AK602 の結合部位である可能性が示唆された (図 2)。また、ケモカイン・gp120 と変異 CCR5 との結合プロファイルの検討により、HIV 感染とケモカイン結合の両者に重要な部位あるいは一方にのみ影響を与える部位を同定した。

D. 考察

既に臨床試験段階にある CCR5 阻害剤 (AK602) のより詳細な基礎的データの蓄積がなされたことに加えて、生体への影響の少ない新たな薬剤開発のための新たな知見が得られた。特に多数のアイソトープラベル体や変異 CCR5 株を用いた研究成果は構造学的モデリングの手法 (米国 Rutgers University の Edward Arnold 教授と共同研究) を組み合わせることで、今後更に詳細な情報から得られるものと思われる。

E. 結論

本研究では CCR5 阻害剤 (AK602) の基礎的な生物学的活性を詳細に明らかにすると共に CCR5 阻害剤の抗 HIV 活性とケモカイン阻害作用との関連を検討した。今回得られた結果を元に今後、CCR5 のどの部位が HIV 感染に特異的に重要であるか、さらにはどのような特徴 (構造) を有する化合物が HIV 特異的な CCR5 阻害を来す可能性があるかといった具体的な知見を得るための研究を進める。

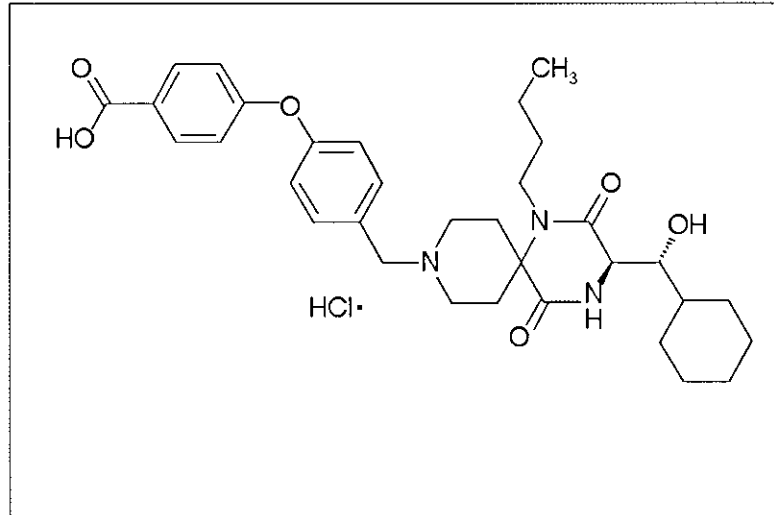


図 1. AK602/ONO4128 の構造

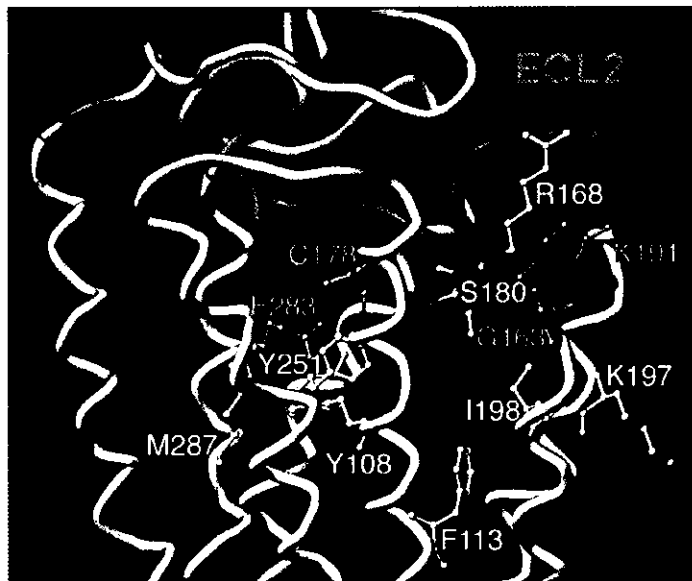


図 2. AK602 と CCR5 の結合

多数の変異 CCR5 と AK602 の結合親和性を調べたところ、AK602 の結合親和性を著しく減少させる変異は CCR5 の第 2 細胞外ドメイン(ECL2: magenta) とその直下の上部膜貫通ドメインでクラスターを形成しており、これらの部位が AK602 の結合に重要な部位であると考えられた。(赤字: K_D 値が $>200\text{nM}$ となる変異、黄字: K_D 値が $10 \sim 200\text{nM}$ となる変異)

G. 研究発表

論文発表

1. Maeda, K., H. Nakata, Y. Koh, T. Miyakawa, H. Ogata, Y. Takaoka, S. Shibayama, K. Sagawa, D. Fukushima, J. Moravek, Y. Koyanagi, and H. Mitsuya. 2004. Spirodiketopiperazine-based CCR5 inhibitor which preserves CC-chemokine /CCR5 interactions and exerts potent activity against R5 human immunodeficiency virus type 1 *in vitro*. *J Virol* 78:8654-8662.
2. Maeda, K., H. Nakata, H. Ogata, Y. Koh, T. Miyakawa, and H. Mitsuya. 2004. The current status of, and challenges in, the development of CCR5 inhibitors as therapeutics for HIV-1 infection. *Curr Opin Pharmacol* 4:447-452.
3. Tamiya, S., S. Mardy, M.F. Kavlick, K. Yoshimura, and H. Mitsuya. 2004. Amino acid insertions near Gag cleavage sites restore the otherwise compromised replication of human immunodeficiency virus type 1 variants resistant to protease inhibitors. *J Virol* 78:12030-12040.
4. Kitano, K., S. Kohgo, K. Yamada, S. Sakata, N. Ashida, H. Hayakawa, D. Nameki, E. Kodama, M. Matsuoka, H. Mitsuya, and H. Ohrai. 2004. Attempt to reduce cytotoxicity by synthesizing the L-enantiomer of 4'-C-ethynyl-2'-deoxypurine nucleosides as antiviral agents against HIV and HBV. *Antivir Chem Chemother* 15:161-167.
5. Kohgo, S., K. Yamada, K. Kitano, Y. Iwai, S. Sakata, N. Ashida, H. Hayakawa, D. Nameki, E. Kodama, M. Matsuoka, H. Mitsuya, and H. Ohrai. 2004. Design, efficient synthesis, and anti-HIV activity of 4'-C-cyano- and 4'-C-ethynyl-2'-deoxy purine nucleosides. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 23: 671- 690.
6. Yanada, R., Y. Koh, N. Nishimori, A. Matsumura, S. Obika, H. Mitsuya, N. Fujii, and Y. Takemoto. 2004. Iridium-mediated atom-transfer and reductive radical cyclizations of iodoalkynes: synthesis and biological evaluation of HIV- protease inhibitors. *J Org Chem* 69:2417-2422.
7. Hayakawa, H., S. Kohgo, K. Kitano, N. Ashida, E. Kodama, H. Mitsuya, and H. Ohrai. 2004. Potential of 4'-C-substituted nucleosides for the treatment of HIV-1. *Antivir Chem Chemother* 15:169-187.
8. Hachiya, A., H. Gatanaga, E. Kodama, M. Ikeuchi, M. Matsuoka, S. Harada, H. Mitsuya, S. Kimura, and S. Oka. 2004. Novel patterns of nevirapine resistance-associated mutations of human immunodeficiency virus type 1 in treatment-naive patients. *Virology* 327:215-224.
9. Yasunaga, J., Y. Taniguchi, K. Nosaka, M. Yoshida, Y. Satou, T. Sakai, H. Mitsuya, and M. Matsuoka. 2004. Identification of aberrantly methylated genes in association with adult T-cell leukemia. *Cancer Res* 64:6002-6009.
10. Matsuno, N., K. Hoshino, T. Nanri, T. Kawakita, H. Mitsuya, and N. Asou. 2004. Transcriptional repression of the p15 gene predicts the clinical outcome of acute myeloblastic leukemia with intermediate and adverse cytogenetics. *Leukemia* 18:1146-1148.
11. Siddiqui, M.A., S.H. Hughes, P.L. Boyer, H. Mitsuya, Q.N. Van, C. George, S.G. Sarafinanos, and V.E. Marquez. 2004. A 4'-C-ethynyl- 2',3'-dideoxynucleoside analogue highlights the role of the 3'-OH in anti-HIV active 4'-C-ethynyl-2'- deoxy nucleosides. *J Med Chem* 47:5041-5048.
12. Depboylu, C., T.A. Reinhart, O. Takikawa, Y. Imai, H. Maeda, H. Mitsuya, D. Rausch, L.E. Eiden, and E. Weihe. 2004. Brain virus burden and indoleamine-2,3-dioxygenase expression during lentiviral infection of rhesus monkey are concomitantly lowered by 6-chloro-2',3'-di- deoxyguanosine. *Eur J Neurosci* 19:2997-3005.
13. Nakata, H., K. Maeda, T. Miyakawa, S. Shibayama, M. Matsuo, Y. Takaoka, M. Ito, Y. Koyanagi, and H. Mitsuya. 2005. Potent anti- R5-HIV-1 effects of a CCR5 antagonist AK602 in a novel hu-PBMC-non-obese diabetic-SCID, IL-2R γ -chain-knocked-out AIDS mouse model. *J Virol*. 79:2087-96.

学会発表 (国際学会のみ)

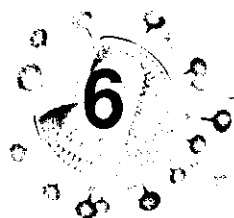
1. Mitsuya, H., K., Maeda, H., Nakata, H., Ogata, T., Miyakawa, Y., Koh, Y., Tojo, and Y., Koyanagi. A CCR5 inhibitor AK602/ONO4128/ GW873140 potent against HIV-1, its CCR5 binding profile and the synergy with other anti-HIV-1 agents. Japan-US Cooperative Medical Science Program Dec 7-10, 2004. Kyoto, Japan.

2. Nakata, H., Y., Koh, K., Maeda, Y., Takaoka, H., Tamamura, N., Fujii, and H., Mitsuya. Greater synergistic anti-HIV effects upon combination of a CCR5 inhibitor AK602/ONO4128/GW873140 with CXCR4 inhibitors than other anti-HIV drugs 12th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Abstract 543, Feb 22-25, 2005. Boston, MA.
3. Koh, Y., H., Nakata, H., Ogata, S., Leschenko, A., Ghosh, and H., Mitsuya. UIC-02031: A novel non-peptidic protease inhibitor containing a stereochemically defined fused cyclopentanyl- tetrahydrouran potent against multi-PI-resistant HIV-1 *in vitro*. 12th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Abstract 562, Feb 22-25, 2005. Boston, MA.
4. Tamiya, S., M., Sek Mardy, M.F., Kavlick and H., Mitsuya. Restoration of the Otherwise Compromised Replication of HIV Variants Highly Resistant to Multiple Protease Inhibitors (PI) by Amino Acid Insertions near Gag Cleavage Sites. XV International AIDS Conference, Abstract OrA 1272, 11-16 July 2004, Bangkok, Thailand.
5. Maeda, K., H., Nakata, H., Ogata, T., Miyakawa, Y., Koh, Y., Tojo, Y., Koyanagi, and H Mitsuya. A CCR5 Inhibitor AK602/ONO4128/GW873140 Potent against HIV-1, its CCR5 binding profile and the synergy with other anti-HIV-1 agents. HIV DART 2004, Frontiers in Drug Development for Antiretroviral Therapies, December 12-16, 2004, Montego Bay, Jamaica.

H. 知的所有権の出願・登録状況

日本国内：

1. 特願 2000-137975 整理番号 YP2000-007 (平成 12 年) 4'-C-エチニルピリミジンヌクレオシド化合物
2. 特願 2001-079611 整理番号 ONP3741 (平成 13 年) トリアザスピロ [5, 5] ウンデカン誘導体を有効成分とする HIV 感染の予防および／または治療剤



ケモカイン・レセプターによる免疫応答に関する解析

分担研究者：森内 浩幸

(長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染疾病病態制御学系 教授)

研究協力者：森内 昌子

(長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染疾病病態制御学系)

研究要旨

従来の治療法の限界（薬剤耐性ウイルスの出現や許容し難い副反応）を打開するための新たな治療戦略として、ケモカイン・レセプター、特に CCR5 をターゲットとした治療薬が注目されるが、この治療法の有効性と安全性の確保のために明らかにしておくべき事がある。第一に、CCR5 の発現には個人差があり、また様々な刺激により変動するため、治療効果を最大限に発揮させるためには、CCR5 の発現とその制御についての情報が求められる。第二に、開発される薬剤が CCR5 に結合するケモカインの作用を阻害するか、逆にケモカイン類似の作用（細胞の遊走・活性化）を及ぼすのであれば、免疫のバランスを崩し逆に HIV 感染者にとって不利な状況をもたらす恐れもある。本研究はこれらの課題を追求するものであり、本年度は“CCR5 の発現とその制御機序”に関する研究では、①精液が CCR5 の発現と HIV の感染性に及ぼす影響（性行為感染における意義）について、そして、②臍帯血単核球における CCR5 の発現と alpha-fetoprotein が CCR5 発現に及ぼす影響（母子感染における意義）について報告する。“CCR5 ligands が HIV 感染に与える影響”に関する研究では、① CCR5 ligands が潜伏した HIV の再活性化に及ぼす影響を示し、② alpha-fetoprotein (CCR5 antagonist) は in vitro の HIV 感染を entry と post-entry の双方のステップで抑制することを示す。

A. 研究目的

従来の治療法の限界（薬剤耐性ウイルスの出現や許容し難い副反応）を打開するための新たな治療戦略として、ケモカイン・レセプター、特に CCR5 をターゲットとした治療薬が注目されている。しかしこの新たな治療法が有効かつ安全に行えるために明らかにしておくべき事がある。第一に、CCR5 の発現には個人差があり、また様々な刺激により変動するため、治療効果を最大限に発揮させるためには、CCR5 の発現とその制御についての情報を得る事が望ましい。第二に、開発される薬剤が CCR5 に結合するケモカインの作用を阻害するか、逆にケモカイン類似の作用（細胞の遊走・活性化）をもたらすの

であれば、免疫のバランスを崩し逆に HIV 感染者にとって不利な状況をもたらす恐れもある。本研究はこれらの課題を追求するものである。

B. 研究方法

1) CCR5 の発現とその制御機序

①精液が CCR5 の発現と HIV の感染性に及ぼす影響
～性行為感染における意義：

健康成人から末梢血単核球(PBMC)を分離し、さらに Auto-MACS (Miltenyi Biotec)を用いて T 細胞 (CD3-positive) と単球 (CD14-positive) の 2 分画を採取

した。後者は7日間の培養の後に monocyte-derived macrophages (MDM)として実験に供与した。Seminal fluidは健康成人男子から採取した精液を遠心し、その上清を用いた。

T細胞とMDMを様々な濃度の seminal fluidの添加・無添加で AIM-V 無血清培地にて培養し、経時的に細胞の生存率を Trypan blue exclusion assay によって算定した。

また monoclonal anti-CCR5 antibody (2D7)で細胞表面を染色し flow cytometry によって CCR5 の発現を調べた。

さらに、HIV の *in vitro* 感染実験を以下の2種類のアッセイを用いて行った。Single-round viral replication assay は replication-incompetent, luciferase-reporter molecular clone NL4-3-Luc-R-E に Env 糖蛋白を補填した後にを行い、luciferase assays によって評価した。Multiple-round viral replication assays は HIV-1 AD8 (R5-tropic) または HIV-1 NL4-3 (T-tropic) を感染させ、培養上清中の逆転写酵素活性を測定することで評価した。

②臍帯血単核球 (CBMC) における CCR5 の発現と alpha-fetoprotein (AFP) が CCR5 発現に及ぼす影響～母子感染における意義：

臍帯血および健康成人末梢血を採血後数時間以内に全血のまま monoclonal anti-CCR5 antibody (2D7) で染色し、lysis buffer で処理後に flow cytometry に供し、CCR5 の発現を調べた。

また PBMC 分離後、RPMI-1640 (with 10% FBS and 50 U IL-2 per ml) に AFP 添加・無添加で培養し、CCR5 の発現の変化を調べた。

2) CCR5 ligands が HIV 感染に与える影響

① CCR5 ligands が潜伏した HIV の再活性化に及ぼす影響：

HARRT によりウイルスが検出限界以下となった患者からインフォームド・コンセントを得た上で採血し、PBMC (CD8-depleted, CD8&CD14-depleted) 培養において RANTES (CCR5 agonist) + 抗 CD3 抗体 (1 μ g/ml) の刺激がウイルス発現を促すかどうかを評価した。CD8 または CD14-positive cells の除去は DynaBeads® M-450 CD8 または CD14 (DYNAL) を用いて行った。ウイルスの増殖は培養上清中の p24 抗原を ELISA で定量することによって評価した。

② AFP (CCR5 antagonist) が *in vitro* の HIV 感染に及

ぼす影響：

AFP が HIV-1 感染に及ぼす影響を3つのアッセイを用いて解析した。最初に 1)-①で述べた multiple-round viral replication assays で末梢血リンパ球 (PBL) と MDM に対する影響を調べた。

次に同様の HIV-1 感染の24時間後に細胞をハーベストし、抽出した DNA からリアルタイム PCR によって proviral DNA の定量を行って、感染初期における AFP の影響を調べた。

最後に pGL-HIV-1-LTR (HIV-1 LTR-driven luciferase reporter) とこのコンストラクトから HIV-1 LTR の NF- κ B-binding sites または SP1-binding sites を除去したプラスミッドを PBMC または MDM にトランスフェクションし、AFP 添加・無添加で培養後に細胞をハーベストし、luciferase assays を行って HIV-1 の転写活性に及ぼす影響を調べた。PBMC へのトランスフェクションは electroporation により、そして MDM に対しては calcium phosphate 法を用いた。

C. 研究結果

1) CCR5 の発現とその制御機序

①精液が CCR5 の発現と HIV の感染性に及ぼす影響～性行為感染における意義：

Seminal fluid 存在下で T細胞と MDM の CCR5 発現が減少した (図1)。

Seminal fluid は T細胞に対して顕著な毒性を示したため (図2)、single-round viral replication assays によって HIV-1 への感染性における影響を調べたところ、R5-HIV-1 や X4-HIV-1 のみならず murine leukemia virus 由来の amphotropic Env で pseudotype させたウイルスを含め、seminal fluid は T細胞の感染性を減少させた (図3)。

一方 MDM では CCR5 発現の減少にも関わらず multiple-round viral replication assays において R5-HIV-1 の増殖は seminal fluid の添加によって亢進した (図4)。さらに single-round viral replication assays では、seminal fluid は感染前の添加では R5-HIV-1 に対して抑制的に、感染後の添加では Env の種類に関わらず促進的に働くことが分かった (図5)。

そこで次に seminal fluid が感染後期の重要なステップであるウイルスの転写にどのような影響を及ぼすのかを transient expression assays により検討した。

Fig. 1

Seminal Fluid Downregulates CCR5 Expression on Macrophages

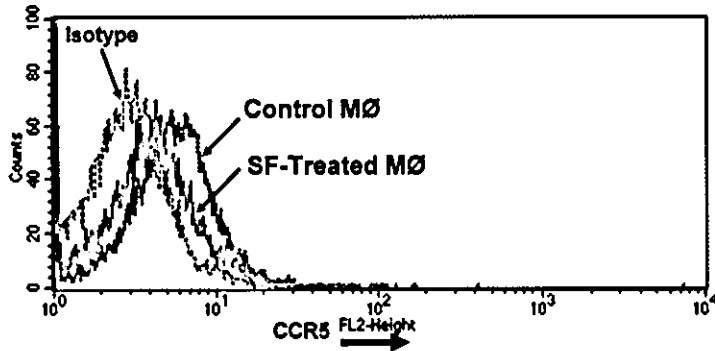


Fig. 2

Seminal fluid is Toxic to Lymphocytes, But Not to Macrophages

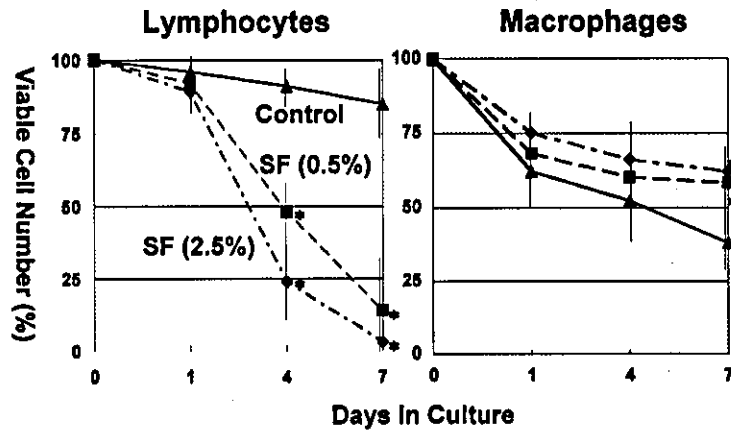


Fig. 3

Either Pre-treatment or Post-treatment with Seminal Fluid Suppresses HIV-1 Infection of PBL

