

厚生労働科学研究研究費補助金

エイズ対策研究事業

HIV-1遺伝子を広域に持つ新規SHIVとサルを用いた
エイズ治療薬開発の研究

平成16年度 総合研究報告書

主任研究者 井戸 栄治
(京都大学ウイルス研究所 助手)

平成17年 (2005年) 3月

目 次

I. 総括研究報告

- HIV-1遺伝子を広域に持つ新規SHIVとサルを用いたエイズ治療薬開発の研究 ---- 1
井戸 栄治
(資料) 研究成果発表会用スライド(1)

II. 分担研究報告

- 免疫不全ウイルス感染におけるNK活性の役割とIL-15投与による治療効果の検討 ---- 11
伊吹 謙太郎
(資料) 研究成果発表会用スライド(2)

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 19

- IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 20

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

総括研究報告書

「HIV-1 遺伝子を広域に持つ新規SHIVとサルを用いたエイズ治療薬開発の研究」

主任研究者 井戸 栄治 京都大学ウイルス研究所 助手

研究要旨

polのRTとINT領域及びenvをHIV-1由来にしたSHIV(SHIV-rti/3rn)のサル感染実験においてサル細胞へのadaptationにともなって生じた変異を解析した。SHIV-rti/3rnは、SIVmac239株のゲノムに、HIV-1 NL432株の逆転写酵素とインテグラーゼ遺伝子およびエンベロープ遺伝子を組み込んだキメラウイルスである。このウイルスは、ヒト由来の細胞株ではよく増殖するもののサル由来の細胞株(HSC-F)では当初増殖が極めて弱かった。そこで、サル細胞へのadaptationをねらってHSC-Fで26週間継代を続けた結果、HSC-FならびにアカゲザルPBMCにおいて明らかな増殖能の向上が見られた。継代中に何らかの変異が起こり、それによりサル細胞への適応ができたものと考えられ、どの段階でどのような変異が生じ、またその増殖性能はどう変化したのかを検討することが、今後のSHIV作成の指針を得る観点からも急務と考えられた。配列分析の結果、継代前と後のウイルスではゲノム全体に渡って全部で11ヶ所(GagのMAとCA、PolのINT、gp120に4ヶ所、gp41に3ヶ所、他にPBSに1ヶ所)の変異(PBSを除いてアミノ酸の置換を伴う変異)が認められた。それぞれの変異を持つウイルスを産生するフルゲノムプラスミドを作成し、それぞれの増殖性能を検討した結果、11ヶ所の変異の内、GagのCA(p27)領域とgp41領域の内の一つ、都合2ヶ所の変異が最もサル細胞における増殖能向上に寄与していることが判明した。またエイズ治療薬探索の研究では、NK活性のエイズウイルス感染に与える影響に注目した結果、IL-15がエイズ治療に効果を表すのではないかと示唆を得ることができた。

分担研究者 伊吹 謙太郎
京都大学ウイルス研究所
助手

A. 研究目的

エイズ治療については、この数年の間にHAART療法などが開発され、光明が見えたかに思えた。しかし、この療法では確かに延命はできるものの、高価な薬剤を大量に摂取し続けねばならず、副作用の問題や投薬を止めれば新たにウイルスが再増殖し始め、しかも通常の薬剤では抑えることができないという多剤耐性株の出現の問題、さらには治療中の免疫系再構築の間に既存の日見感染症が悪化するいわゆる免疫再構築症候群などの問題が指摘されている。治療薬自体の開発が押し進められるべきであることは言うまでもないが、種々の治療薬の最適な組み合わせの探索を始めとして、他の抗ウイルス活性物質あるいは免疫システム自体を活性化する薬剤との併用など、従来試みられていない実験的療法の開拓が強く要望されている。しかしながら、人を対象としてそのような治療効果が保証されない、場合によっては症状増悪のリスクが否定できない実験的治療を安易に試みることは

倫理的に許されない。そこで本研究では、先ず、前臨床の基礎研究として、人に近い動物であるサルを用いてエイズ治療法を実験的に開拓する系を確立することを目的とする。次にその系を用いて、種々の薬剤や新たな治療法の効果判定を行い、人のためのより良い治療法を提示することを最終目標とする。

B. 研究方法

人への治療法として提示するためには、薬剤の標的がエイズの病原ウイルス HIV-1 のものであることが望ましい。ところが HIV-1 は、ヒト以外にはチンパンジーなど一部の例外を除いて、通常の医学実験用のサルには感染しない。そこで我々は、HIV に類似のサルウイルス(SIV)と HIV-1 とのキメラウイルス(SHIV)を作成し、これとサルを用いてエイズの病態を研究してきた。しかし、従来サル感染実験に用いられた SHIV は、主に env 遺伝子とその周辺付属遺伝子のみが HIV-1 由来で、その他は SIV 由来であるものに限られていた。これでは人への治療薬の効果判定に適してはいない。なぜなら、市販されているウイルス複製阻害剤の中には、AZT のようにレトロウイルス全般に効く薬剤もあるが、NNRTI のように

HIV-1 の pol 遺伝子産物を特異的に標的としているものも多いからである。そこで我々は、pol 遺伝子が HIV-1 由来である新規の SHIV を作成することにした。3年計画の研究第2年度は、1) pol の RT と INT 領域及び env を HIV-1 由来にした SHIV (SHIV-rti/3rn) のサル感染実験においてサル細胞への adaptation にともなって生じた変異の解析、2) SHIV の持続感染に与える IL-15 の治療効果の検討、の2項目に重点を置いて研究を行った。分担研究者伊吹謙太郎博士は、特に2)の SHIV の持続感染に与える IL-15 の治療効果の検討を担当した。

(倫理面への配慮)

本研究では、治療薬開発にサルを用いている。従って差し当たって人権上の問題は該当しない。実験動物としてサルを使用する点については、動物愛護の配慮を怠ることなく主任研究者の所属する京都大学ウイルス研究所のサルの飼育と使用に関する委員会(通称「霊長類委員会」)に定める規定・指針に則して研究を行っている。

C. 研究結果

1) pol の RT と INT 領域及び env を HIV-1 由来にした SHIV (SHIV-rti/3rn) のサル感染実験においてサル細胞への adaptation にともなって生じた変異の解析

SHIV-rti/3rn は、SIVmac239 株のゲノムに、HIV-1 NL432 株の逆転写酵素とインテグラーゼ遺伝子およびエンベロープ遺伝子を組み込んだキメラウイルスである。このプロウイルスプラスミドを培養細胞にトランスフェクションすると、感染性のウイルスが産生される。しかしこのウイルスは、ヒト由来の細胞株ではよく増殖するもののサル由来の細胞株(HSC-F)では増殖が極めて弱かった。そこで、サル細胞への adaptation をねらって HSC-F で 26 週間継代を続けることにした。その結果、HSC-F ならびにアカゲザル PBMC において明らかな増殖能の向上が見られたので、この継代ウイルスを3頭のアカゲザルに iv 接種したところ、いずれのサルにおいても接種後1週目に血中ウイルス量が $10^5 \sim 10^6$ copies/ml のピークに到達し、2週目からは抗体応答も認められた。ウイルス分離、PCR の成績からも感染の成立は明らかであった。当初このウイルスはサル細胞での増殖がよくなかったため、継代

中に何らかの変異が起こり、それによりサル細胞への適応ができたと考えられた。どの段階で変異が生じ、またその増殖性能はどうか変化したのかを検討することが、今後の SHIV 作成の指針を得る観点からも急務と考えられた。配列分析の結果、継代前と後のウイルスではゲノム全体に渡って全部で11ヶ所(GagのMAとCA、PolのINT、gp120に4ヶ所、gp41に3ヶ所、他にPBSに1ヶ所)の変異(PBSを除いてアミノ酸の置換を伴う変異)が認められたが、この内GagのCA(p27)領域とgp41領域の内の一つ、都合2ヶ所の変異が最もサル細胞における増殖能向上に寄与していることが判明した。なおこの研究により、現在世界で最も HIV-1 領域が広いサルに感染する SHIV の分子クローンが得られたことになる。

2) SHIV の持続感染に与える IL-15 の治療効果の検討

エイズ治療においてウイルスの持つ各酵素阻害剤の目覚ましい成果については言うでもない。しかし、治療効果が保証されない新たな薬剤や物質となるとヒトへの試用の前にどうしても動物レベルでの評価が必須と考えられる。そうした物質の一つとして免疫系の特に innate の免疫系を活性化することで注目されているサイトカインの一つ、IL-15 のエイズウイルスに対する影響を調べた。ヒト精製 IL-15 は、in vitro でヒト並びにアカゲザル PBMC の培養液中に添加(25ng/ml)すると、24時間以内に K562 細胞を標的とした NK 活性を顕著に上昇することが明らかとなった。この NK 活性の昂進は in vitro では4日程度持続することも分かった。そこで SHIV89.6p が持続感染しているアカゲザル2頭に、IL-15 を1回当たり5 μ g、隔日で4回血中に投与したところ、2頭共に一過的な NK 活性の上昇が見られ、内1頭では血中ウイルス量が one order 減少することを観察した。

(各実験データについては添付する資料を参照のこと)

D. 考察

SHIV-rti/3rnのサル細胞へのadaptationにおいてcriticalな変異が同定され、その分子クローンが得られたことは、同ウイルスが現在世界で最もHIV-1の領域を広く持つSHIVであることから意義が大きいと思われる。また

その変異の一つがHIV-1に代えたRTやINT領域ではなくCA領域であったことは、HIV-1の種特異性がサル細胞内でのPIC (pre-integration complex) 形成の段階にあることを思えば、CAの変異がPIC全体の整合性を保つ上で必須の変化とも考えられ、興味深い発見である。HIV-1領域のさらなる拡大には、こうした一見意外な領域での変異が必須なのかも知れない。なお現時点では、Env遺伝子もHIV-1由来にするとサル個体において持続感染の成立を見ることが困難であることが分かってきた。今後HIV-1領域の拡大はひとまず置いて、SIVを骨格にpolのPR遺伝子以外の領域がHIV-1遺伝子に代えられたSHIVによるサル感染実験を早急に行い、持続感染状態においてRT阻害剤等の治療効果を見る研究に重点をシフトすることが必要と考えられた。

IL-15によるNK活性の増強効果は、サルでは初めて示されたものである。IL-15の血中投与により、1頭ではあったがウイルス量を下げることがあったことは、今後こうした治療法の可能性が示唆されたものとして重要な知見である。ただし、今回の成績では、まだ実用的に不十分であり、今後より大きな効果が得られるよう投与量や投与方法のさらなる検討が必要であると考えられた。

E. 結論

当初期待していた研究成果は徐々につつある。たとえば免疫活性化能のあるIL-15のように、まったく新たな機能を持つ物質が新たにエイズ治療薬としての可能性があることを示した点は一つの大きな進歩と考えられる。また、エイズの動物モデル系自体についても、これまでで最もHIV-1の領域が広いSHIVが分子クローンの形で得られたことは、新規のSHIVとサルを用いた新しいモデル系が開拓されたものとして意義は大きいと考えられる。しかし一方、HIV-1領域を拡大することには限界も見えてきており、特にサル感染実験において持続感染し、かつ発症に至るSHIVが得られていないことはモデルとしては大きな問題であることが明らかとなってきた。今後HIV-1領域を拡大する努力は一時おいて、現在作成済みのSHIVの中から治療薬開発という目的により合致したものをを用いて新たな治療法の探索に重点を置くべきかと考えている。

F. 健康危険情報

該当するものはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kita, K., Ndembi, N., Ekwilanga, M., Ido, E., Kazadi, R., Bikandou, B., Takehisa, J., Takemura, T., Kageyama, S., Tanaka, J., Parra, H.J., Hayami, M., Ichimura, H.: Genetic diversity of HIV type 1 in Likasi, southeast of the Democratic Republic of Congo. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 20(12):1352-7, 2004.
- 2) Ndembi, N., Takehisa, J., Zekeng, L., Kobayashi, E., Ngansop, C., Songok, E. M., Kageyama, S., Takemura, T., Ido, E., Hayami, M., Kaptue, L., Ichimura, H.: Genetic diversity of HIV type 1 in rural eastern Cameroon. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.*, 37(5):1641-1650, 2004.

2. 学会発表

- Saito, N., Takahashi, M., Akahata, W., Ido, E., Hidaka, C., Ibuki, K., Miura, T., Hayami, M., Takahashi, H.: Evolutional conversation of the CD1d molecules among primates. Symposium on protective immunity against HIV/SIV and development of MHC-defined rhesus macaques, Miyazaki, July 19-20, 2004.
- Horiuchi, R., Ido, E., Akahata, W., Enose, Y., Ibuki, K., Miura, T., Goto, T., Takahashi, H., Hayami, M.: DNA vaccination of macaques by full-sized SHIV plasmids that produce non-infectious virus particles. Symposium on protective immunity against HIV/SIV and development of MHC-defined rhesus macaques, Miyazaki, July 19-20, 2004.
- Horiuchi, R., Ido, E., Akahata, W., Enose, Y., Ibuki, K., Miura, T., Goto, T., Takahashi, H., Hayami, M.: DNA vaccination of macaques by full-sized SHIV plasmids that produce non-infectious virus particles. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Hyogo, August 30-September 2, 2004.

秋山尚志、井戸栄治、三浦智行、速水正憲：
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 138 回日本獣医学会、札幌、2004 年 9 月 10-12 日

竹村太地郎、井戸栄治、大倉定之、原田礼忠、Bikandou Blaise、Ekwalinga Michel、Ndemi Nicase、武久盾、市村宏、山口由美、速水正憲、三浦智行：中央アフリカ地域に生息するブラックマンガベイにおける新規 SIV (SIVbkm) の解析、第 138 回日本獣医学会、札幌、2004 年 9 月 10-12 日

堀内励生、井戸栄治、赤畑涉、榎瀬良美、伊吹謙太郎、後藤俊幸、高橋秀実、三浦智行、速水正憲：非感染性粒子を産生する SHIV フルゲノムプラスミドを用いた DNA ワクチンのサルにおける感染防御効果、第 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004 年 11 月 21-23 日

齋藤尚紀、高橋めぐみ、赤畑涉、井戸栄治、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：種々の霊長類における CD1d 分子の解析：SIV/HIV 感受性との関連の可能性、第 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004 年 11 月 21-23 日

Ido, E., Horiuchi, R., Akahata, W., Hyami, M.: Development of DNA vaccination using full-sized SHIV plasmids that produce non-infectious virus particles. 40th Anniversary of US-Japan Cooperative Medical Science Program, 17th Joint Meeting of AIDS Panels, Kyoto, December 8-9, 2004.

鈴木元、井戸栄治、伊吹謙太郎、速水正憲、三浦智行：HIV-由来プロテアーゼを持つ SHIV のサル継代による感染増殖力の増強、第 18 回日本エイズ学会、静岡、2004 年 12 月 9-11 日

秋山尚志、井戸栄治、石松美沙、三浦智行、速水正憲：HIV-1 の逆転写酵素、インテグラーゼおよびゲノムの 3' 側遺伝子を有する新規 SHIV のサルにおける感染・増殖能、第 18 回日本エイズ学会、静岡、2004 年 12 月 9-11 日

堀内励生、秋山尚志、伊吹謙太郎、井戸栄治、三浦智行、速水正憲：非感染性粒子

を産生する SHIV フルゲノムプラスミドを用いた DNA ワクチンの坐薬投与による感染防御効果、第 18 回日本エイズ学会、静岡、2004 年 12 月 9-11 日

原田礼忠、竹村太地郎、井戸栄治、Bikandou Blaise、市村宏、速水正憲、Henri Jopseph Parra：中央アフリカ地域における HIV-1 の多様性の拡大と新しい組み換えウイルス群の出現、第 18 回日本エイズ学会、静岡、2004 年 12 月 9-11 日

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）今のところなし。

研究目的

人になるだけ近い動物モデル(サル)を用いて
実験的治療薬開発研究が可能な系を確立する

前臨床の基礎研究として、作用機構が全く新しい治療薬の
探索や他の抗ウイルス作用または免疫活性化作用のある薬
剤との併用など、従来倫理的な理由から人には試みられて
いない治療法を開拓する

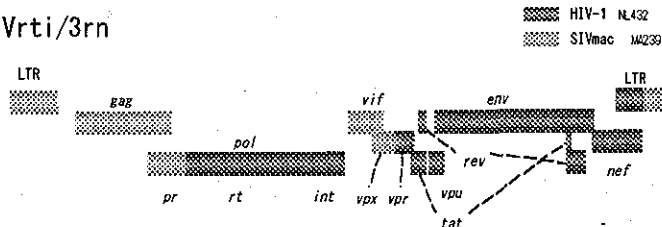
人へのより良い新たな治療法を提示すること为目标

env遺伝子に加えて逆転写酵素やインテグラーゼ遺伝子が
HIV-1由来の新規SHIVのサル感染実験
—サル細胞へのadaptationにともなって生じた変異の解析—

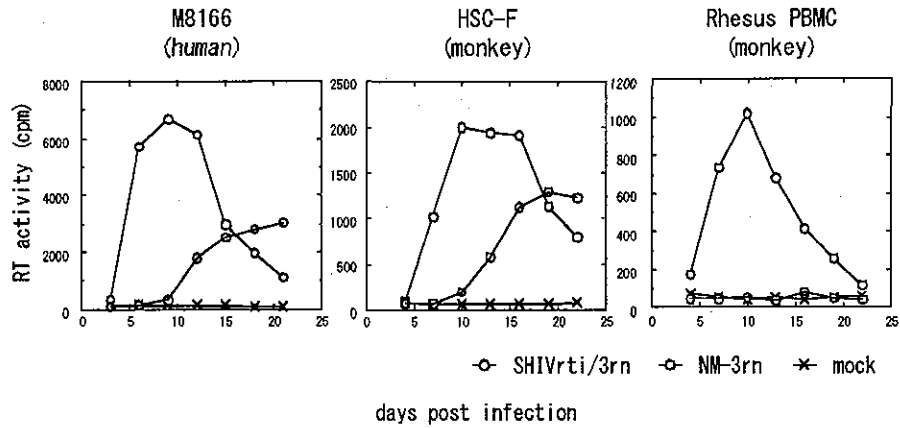
背景と目的

エイズの動物モデルとしてサルに感染するHIV-1/SIVキメラウイルス (SHIV) が多
種報告されているが、それらの多くはenvを含むゲノムの3'側のみがHIV-1由来であつた。
より HIV-1由来遺伝子領域の拡大を目指し、ゲノムの3'側に加えてpolの逆転写酵素
(RT) 遺伝子、さらにはインテグラーゼ (IN) 遺伝子もHIV-1由来にした新しいSHIVを
作製し、*in vitro*ならびに*in vivo*での増殖能を検討したところ、サル細胞にadaptす
る際に変異が起こっていたことが判った。これらの変異を解析することで、さらに
HIV-1由来遺伝子領域を拡大するために有用な情報が得られるものと考えられた。

SHIVrti/3rn

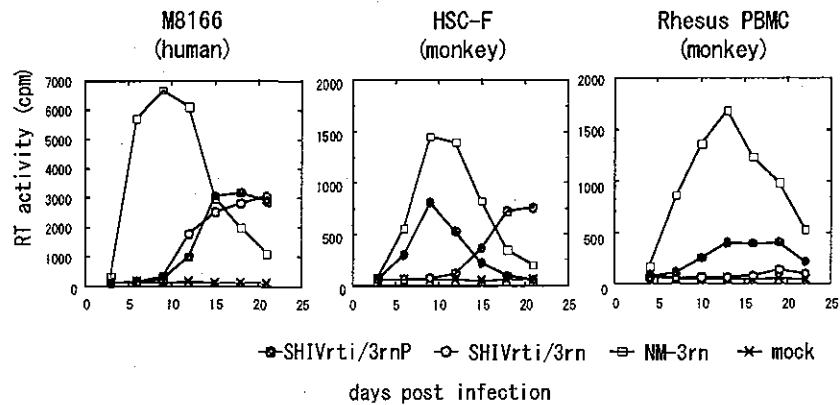


培養細胞における増殖能



⇒ サル細胞へのadaptationを狙い、HSC-F細胞を用いてウイルス継代を26週間行った

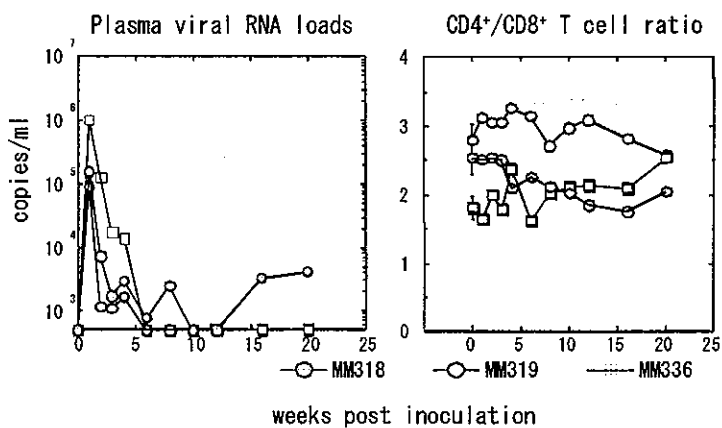
サル細胞へのadaptation



⇒ サル細胞特異的に馴化し、rhesus PBMCにおいても明らかに増殖するようになった

SHIVrti/3rnPのサル個体における増殖能-1

接種: SHIVrti/3rnP $0.2-1 \times 10^5$ TCID₅₀, intravenously



SHIVrti/3rnPのサル個体における増殖能-2

Week	Provirus DNA			Virus Isolation			Antibody titers ^a		
	MM318	MM319	MM336	MM318	MM319	MM336	MM318	MM319	MM336
0	-	-	-	ND ^b	ND	ND	<32	<32	<32
1	+	+	-	-	-	-	<32	<32	<32
2	+	+	-	+	-	-	1024	256	64
3	+	+	-	-	-	-	2048	1024	64
4	+	+	+	-	-	-	8192	8192	256
6	+	+	+	-	-	-	8192	8192	1024
8	+	+	+	-	-	-	8192	4096	1024
10	+	+	+	-	-	-	8192	2048	2048
12	+	+	+	-	-	-	8192	2048	512
16	+	+	+	-	-	-	8192	2048	512
20	+	+	+	-	-	-	8192	8192	512

^a Genedia HIV-1/2, Fujirebio

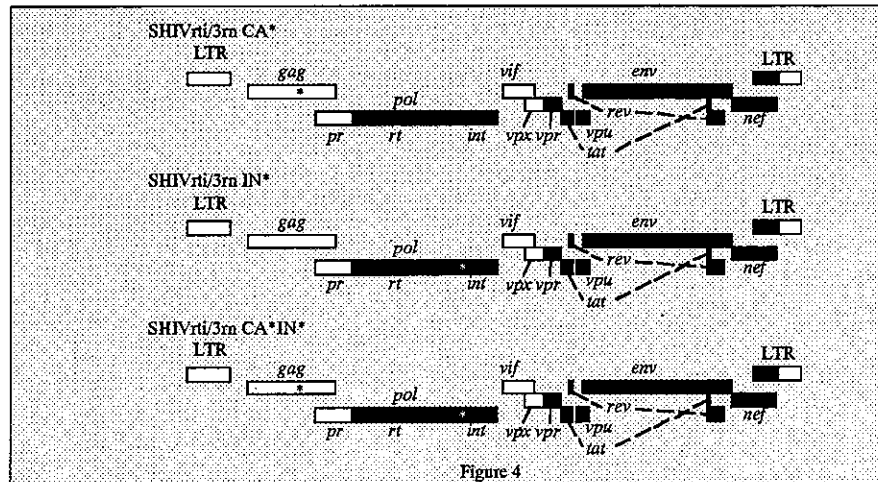
^b Not done

⇒ SHIVrti/3rnPはサル個体においても感染・増殖能を有する

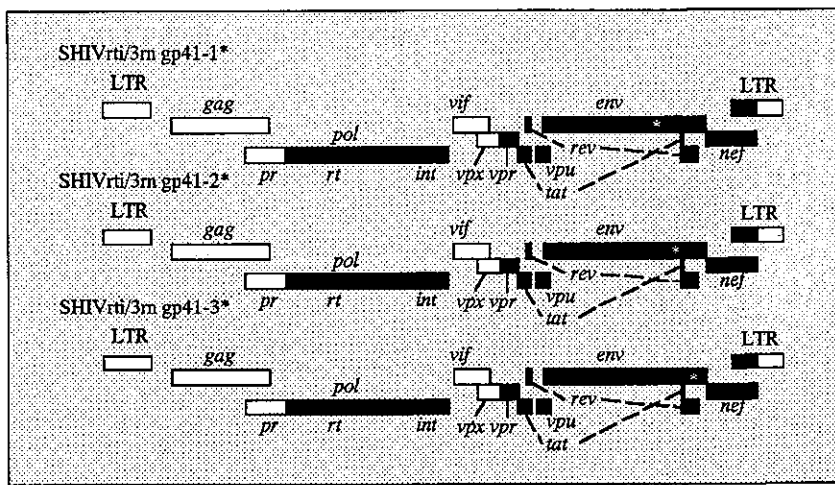
TABLE 2. Nucleotide mutations in SHIVrti/3rnP

Position (n.t.) ^a		Nucleotide				Amino acid		Genomic region	
		Original (DNA)	Inoculum (M8166)	13 wpi	Passaged	Reisolated	Original		Passaged
1085	MA239	T	Ⓢ	C	Ⓢ	ND		PBS	
1316	MA239	T	T	T	T/C	ND	V	V/A	<i>ma</i>
2252	MA239	A	Ⓢ	G	Ⓢ	G	K	R	<i>ca</i>
4803	NI432	G	G	G	Ⓢ	G	D	D/N	<i>int</i>
6709	NI432	A	A	A	A/G	G	S	S/G	<i>env</i> (gp120)
6773	NI432	G	G	G/A	G/A	A	D	D/N	
6803	NI432	A	A	A/G	G	G	N	D	
7056	NI432	C	C	C	T	T	A	V	
7854	NI432	A	A	G	Ⓢ	G	D	G	<i>env</i> (gp41)
8125	NI432	T	T	T	T/A	A	N	N/K	
8463	NI432	A	A	G	G	G	N	S	

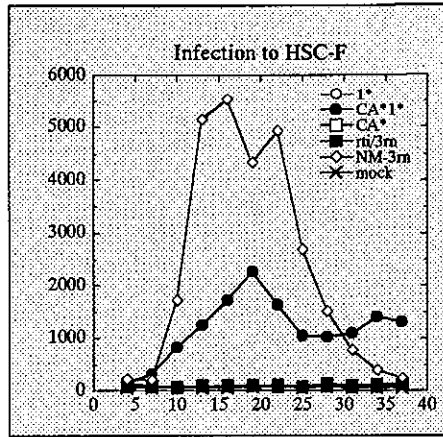
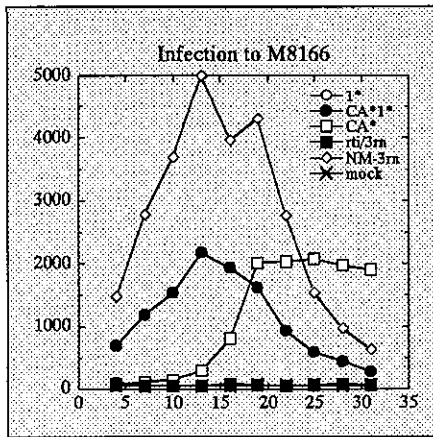
^a Positions are expressed by those in parental pMA239 or pNL432



Proviral plasmidをHEK293T細胞にtransfectionした上清を inoculumとして感染増殖能力を調べたところ、CA*とCA*IN*はあったが、IN*は遅くかつ弱く、親株のSHIVrti/3rnは無かった

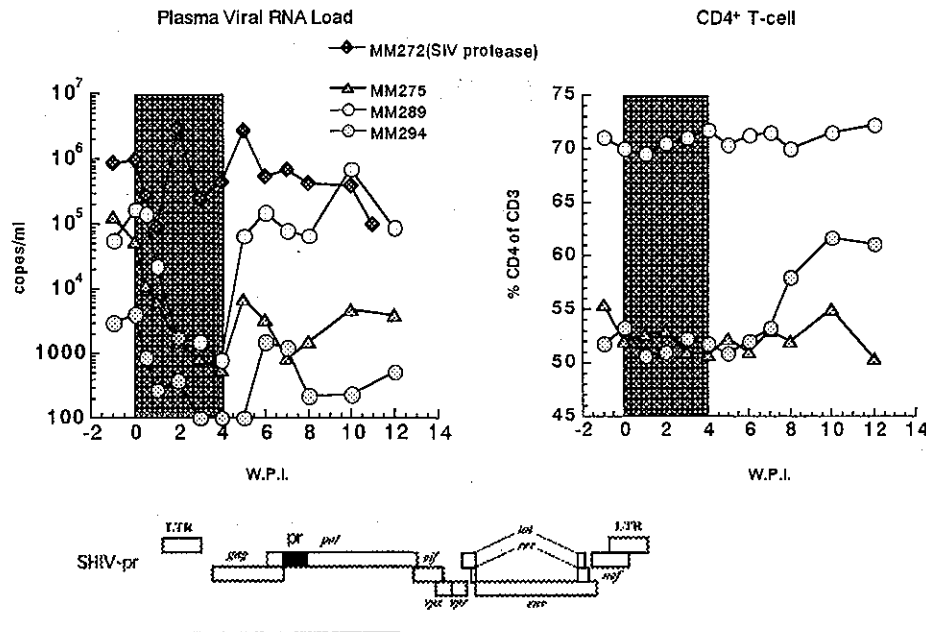


Gp41-1*のみ培養細胞 (M8166, HSC-F) で極めて遅く、また弱い増殖能を示した

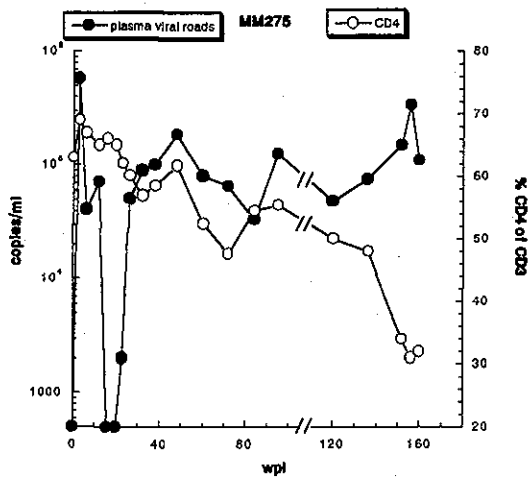


SHIVrti/3rnPの場合、サル細胞への感染増殖能の獲得には、CA*と1* (capsidとgp41の変異の一つ) が大きく貢献していることが判明した

HIV-1 プロテアーゼ阻害剤(カレトラ)の経口投与によるサル個体内での効果



SHIVpr感染サルの1頭が発症しつつある



In vivo継代, 変異の解析, 再度の薬剤処理などを予定

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

免疫不全ウイルス感染におけるNK活性の役割とIL-15投与による治療効果の検討

分担研究者 伊吹 謙太郎 京都大学ウイルス研究所 助手

研究要旨

エイズウイルス感染における natural killer(NK) 活性の役割を明らかにすることを目的として、まず初めに NK 活性を実験的に制御する方法を探索した。低分子化合物 PTX(pentoxifylline) 存在下でヒトもしくはサルの PBMC を培養すると、細胞毒性を示さない濃度 (50~100 $\mu\text{g/ml}$) で PBMC の持つ NK 活性が強く抑制された。また同化合物のサル個体への経口投与においても、NK 活性の抑制が観察された。一方、NK 細胞の活性化に関しては、interleukin-15 (IL-15) と呼ばれる サイトカインを培養液中に添加 (25~50 ng/ml) すると、PBMC の NK 活性が著しく亢進することが分かった。IL-15 のエイズ治療薬としての可能性を検討するために、SHIV 89.6p が持続感染し高いウイルスロードを維持している 2 頭のアカゲザルに IL-15 を血中投与したところ、投与後数日で 2 頭共に NK 活性は一過的な上昇を示し、2 頭中 1 頭では血中ウイルス量が 10 分の 1 程度に減少した。

A. 研究目的

AIDS は個体の持つ免疫系がエイズウイルス感染によって徐々に破壊される疾病である。従来、獲得免疫系破綻のメカニズムについては、極めて詳細な研究がなされており本疾病の全容がかなり明らかにされている。しかし近年、微生物（ウイルス）感染の防御には NK 細胞のような基本免疫系が実は重要な関わりを持っていることが認識され始めている。ところが、これまでのところ基本免疫系と HIV 感染の関係についてはほとんど研究されておらず、未知の部分が極めて大きい。そこで本研究では、AIDS の前臨床モデルとなるアカゲザルと SHIV の系を用いて、基本免疫の中でも特に NK 活性とウイルス感染の関係に注目することにした。まず初めに NK 活性を実験的に抑制もしくは

亢進する方法を探索することにした。次いで NK 活性の亢進によりエイズウイルス感染はどのような影響を受けるかを明らかにすることを目的として、interleukin-15(IL-15) の in vivo 投与実験を行った。

B. 研究方法

NK 活性の抑制に関しては、サルから採取した PBMC を種々の濃度の PTX 存在下で共培養し、NK 活性を測定した。また PTX を飲料水に混ぜサル個体に経口投与し、適時採血を行い PBMC の NK 活性を測定した。次に、NK 細胞の活性化に関しては、種々の濃度のヒトリコンビナント IL-15 (human rIL-15) をサル PBMC と 1-3 日間共培養し、NK 活性を測定した。次に SHIV89.6p 接種後 2 年または 4 年経過しウイルスロードが安定しているサル 2 頭に、IL-15 (5 μg) を 2 回または 4 回経静脈投与し、NK 活性とウイルスロードについて経過を観察した。

(倫理面への配慮)

本研究では、治療薬開発にサルを用いている。従って差し当たって人権上の問題は該当しない。実験動物としてサルを使用する点については、動物愛護の配慮を怠ることなく主任研究者の所属する京都大学ウイルス研究所のサルの飼育と使用に関する委員会（通称「霊長類委員会」）に定める規定・指針に則して研究を行っている。

C. 研究結果

1) NK 活性の制御

50~100 $\mu\text{g/ml}$ の PTX 処理によって、in vitro における PBMC の NK 活性は抑制されることが分かった。また PTX は、その経口投与により in vivo においても抑制効果を示すことが明かとなった。IL-15 処理では in vitro において PBMC の NK 活性は著しく上昇した。in vivo においても投与後一過性の亢

進の傾向が見られた。

2) IL-15 の SHIV 感染サルへの投与

SHIV 感染サルへの IL-15 投与において NK 活性は一時的に上昇した。2 頭中 1 頭では血中ウイルス量が 10 分の 1 に減少した。(各実験データについては添付する資料を参照のこと)。

D. 考察

PTX もしくは IL-15 処理によってサル PBMC の NK 活性を実験的に抑制もしくは亢進できることが判った。この抑制/亢進効果は、特に *in vitro* において顕著に現れたものであったが、投与量や投与方法を検討することで、*in vivo* でも NK 活性を比較的長期に制御することが可能になるものと考えられた。

IL-15 のウイルス感染サルへの投与において、2 頭中 1 頭ではあるがウイルス量が 10 分の 1 程度減少したことは、IL-15 による AIDS 治療の可能性を示唆するものと考えられた。今後、IL-15 の投与量や投与方法を検討することで、同サイトカインによる実効的な治療法を模索していきたいと考えている。

E. 結論

PTX と IL-15 という 2 つの作用の異なる物質により、NK 活性を実験的に制御できることが明らかとなった。とりわけ human rIL-15 は、*in vitro* におけるサル PBMC の NK 活性亢進の効果が著しく、*in vivo* においても一過的ながら NK 活性を上昇させることが確認された。同サイトカインによって AIDS 治療の可能性が示唆されたことは、その作用機構から言っても従来にないまったく新しいアプローチであり、重要な知見であると考えられる。

F. 健康危険情報

該当するものはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Iida, T., Kuwata, T., Ui, M., Suzuki, H., Miura, T., Ibuki, K., Takahashi, H., Yamamoto, T., Imanishi, J., Hayami, M., Kita, M.: Augmentation of antigen-specific cytokine responses in the early phase of vaccination with a

live-attenuated simian/human immunodeficiency chimeric virus expressing IFN- γ . Arch. Virol., 149:743-757. 2004.

Enose, Y., Kita, M., Yamamoto, T., Suzuki, H., Miyake, A., Horiuchi, R., Ibuki, K., Kaneyasu, K., Kuwata, T., Takahashi, E., Sakai, K., Shinohara, K., Miura, T., Hayami, M.: Protective effects of nef-deleted SHIV or that having IFN- γ against disease induced with a pathogenic virus early after vaccination. Arch. Virol., 149:1705-1720, 2004.

2. 学会発表

清水佑也、宮崎恭行、兼安健太郎、鈴木元、伊吹謙太郎、後藤義孝、三浦智行、速水正憲、芳賀猛: TNF- α 遺伝子組み込み SHIV 感染サルにおける細胞死と免疫応答、第 50 回日本実験動物学会、長崎、2004 年 5 月 29-31 日

Miyake, A., Ibuki, K., Enose, Y., Suzuki, H., Horiuchi, R., Saito, N., Nakasone, T., Honda, M., Miura, T., Hayami, M.: Early virological events in various tissues of adult and newborn macaques after intrarectal infection with pathogenic SHIV. XVth International AIDS Conference, Bangkok, Thailand, July 11-16, 2004.

Saito, N., Takahashi, M., Akahata, W., Ido, E., Hidaka, C., Ibuki, K., Miura, T., Hayami, M., Takahashi, H.: Evolutional conversation of the CD1d molecules among primates. Symposium on protective immunity against HIV/SIV and development of MHC-defined rhesus macaques, Miyazaki, July 19-20, 2004.

Horiuchi, R., Ido, E., Akahata, W., Enose, Y., Ibuki, K., Miura, T., Goto, T., Takahashi, H., Hayami, M.: DNA vaccination of macaques by full-sized SHIV plasmids that produce non-infectious virus particles. Symposium on protective immunity against HIV/SIV and development of MHC-defined rhesus macaques, Miyazaki, July 19-20, 2004.

- Haga, T., Shimizu, Y., Miyazaki, Y., Ibuki, K., Kaneyasu, K., Suzuki, H., Goto, Y., Miura, T., Hayami, M.: Induction of immune response in macaque monkeys infected with SHIV having TNF- α gene. Symposium on protective immunity against HIV/SIV and development of MHC-defined rhesus macaques, Miyazaki, July 19-20, 2004.
- Kaneyasu, K., Okura, S., Kita, M., Yamamoto, T., Ibuki, K., Sato, A., Miura, T., Hayami, M.: Protective efficacy of nonpathogenic nef-deleted SHIV vaccination combined with recombinant IFN- γ administration against a pathogenic SHIV challenge in rhesus monkeys. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Hyogo, August 30-September 2, 2004.
- Ibuki, K., Miyake, A., Horiuchi, R., Saitou, N., Suzuki, H., Motohara, M., Inaba, K., Miura, T., Hayami, M.: The effects of low-pathogenic SHIV intrarectal infection on immune cell population of the intestinal tract in comparison to acute-pathogenic SHIV infection. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Hyogo, August 30-September 2, 2004.
- Horiuchi, R., Ido, E., Akahata, W., Enose, Y., Ibuki, K., Miura, T., Goto, T., Takahashi, H., Hayami, M.: DNA vaccination of macaques by full-sized SHIV plasmids that produce non-infectious virus particles. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Hyogo, August 30-September 2, 2004.
- 伊吹謙太郎、三宅在子、堀内励生、齋藤尚紀、鈴木元、元原麻貴子、稲葉一寿、速水正憲、三浦智行：サル／ヒト免疫不全キメラウイルス (SHIV) 弱毒分子クローンのサル経粘膜感染における免疫応答の解析、第 138 回日本獣医学会、札幌、2004 年 9 月 10-12 日
- 清水祐也、宮崎恭行、兼安健太郎、鈴木元、伊吹謙太郎、後藤義孝、三浦智行、速水正憲、芳賀猛：TNF- α 遺伝子組み込み SHIV 感染ザルに認められた感染早期の効果的な免疫誘導、第 138 回日本獣医学会、札幌、2004 年 9 月 10-12 日
- 伊吹謙太郎：病原性 SHIV 感染初期の腸管免疫の解析、第 20 回日本獣医畜産大学学術交流会、京都、2004 年 9 月 19 日
- 元原麻貴子、伊吹謙太郎、三宅在子、鈴木元、稲葉一寿、増田恭子、河本宏、三浦智行、速水正憲：弱毒 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 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004 年 11 月 21-23 日
- 堀内励生、井戸栄治、赤畑渉、榎瀬良美、伊吹謙太郎、後藤俊幸、高橋秀実、三浦智行、速水正憲：非感染性粒子を産生する SHIV フルゲノムプラスミドを用いた DNA ワクチンのサルにおける感染防御効果、第 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004 年 11 月 21-23 日
- 齋藤尚紀、高橋めぐみ、赤畑渉、井戸栄治、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：種々の霊長類における CD1d 分子の解析：SIV/HIV 感受性との関連の可能性、第 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004 年 11 月 21-23 日
- 三宅在子、伊吹謙太郎、深澤嘉伯、鈴木元、堀内励生、齋藤尚紀、元原麻貴子、渡邊俊樹、三浦智行、速水正憲：弱毒 SHIV の粘膜感染初期におけるウイルス動態の解析、第 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004 年 11 月 21-23 日
- 兼安健太郎、大倉定之、喜多正和、山本俊郎、伊吹謙太郎、佐藤彰彦、三浦智行、速水正憲：nef 欠損弱毒 SHIV のワクチン効果に対する rIFN- γ 投与の増強効果、第 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004 年 11 月 21-23 日
- Ibuki, K., Miyake, A., Horiuchi, R., Saitou, N., Suzuki, H., Motohara, M., Inaba, K., Miura, T., Hayami, M.: The effect of low-pathogenic SHIV intrarectal infection on immune cell population of the intestinal tract in comparison to acute-pathogenic SHIV infection. 40th Anniversary of US-Japan Cooperative Medical Science Program, 17th Joint Meeting of AIDS Panels, Kyoto, December 8-9, 2004.

Kaneyasu, K., Okura, S., Kira, M., Yamamoto, T., Ibuki, K., Sato, A., Miura, T., Hayami, M.: Protective efficacy of nonpathogenic nef-deleted SHIV Vaccination combined with recombinant IFN-gamma administration against a pathogenic SHIV challenge in rhesus macaques. 40th Anniversary of US-Japan Cooperative Medical Science Program, 17th Joint Meeting of AIDS Panels, Kyoto, December 8-9, 2004.

鈴木元、井戸栄治、伊吹謙太郎、速水正憲、三浦智行：HIV-由来プロテアーゼを持つ SHIV のサル継代による感染増殖力の増強、第 18 回日本エイズ学会、静岡、2004 年 12 月 9-11 日

堀内励生、秋山尚志、伊吹謙太郎、井戸栄治、三浦智行、速水正憲：非感染性粒子を産生する SHIV フルゲノムプラスミドを用いた DNA ワクチンの坐薬投与による感染防御効果、第 18 回日本エイズ学会、静岡、2004 年 12 月 9-11 日

伊吹謙太郎、三宅在子、堀内励生、齊藤尚紀、鈴木元、元原麻貴子、稲葉一寿、速水正憲、三浦智行：弱毒 SHIV 分子クローンのサル経直腸感染初期における腸管粘膜免疫の解析、第 18 回日本エイズ学会、静岡、2004 年 12 月 9-11 日

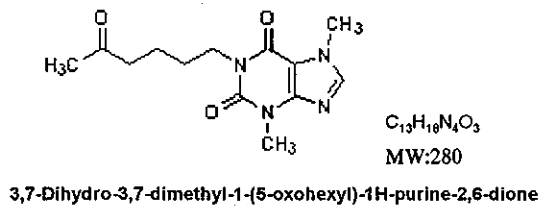
H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）
今のところなし。

NK活性とエイズウイルス感染

HIV感染による免疫応答については、中和抗体やCTLなど獲得免疫に関する研究が中心であった。近年、抗原非特異的に作用するいわゆる基本免疫系の研究が注目を浴びている。基本免疫系はNK細胞やマクロファージなどが知られており、ウイルス感染に対するこれら基本免疫系の関与については殆ど未解明である。ここでは、基本免疫系の、特にNK活性がエイズウイルス感染に与える影響を新しい治療法を開拓する観点から明らかにすることを目的とした。

Pentoxifylline (PTX)

構造



機能

- ・血管拡張作用（臨床にて使用）

PTX処理

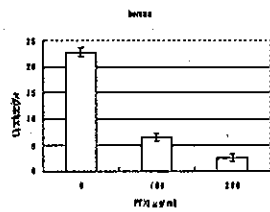
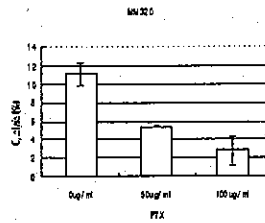
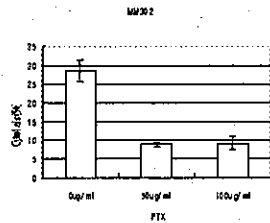
PBMC in medium

+ PTX

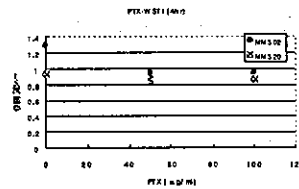
(50 or 100 μ g/ml)

NK assay

PTX 処理によるin vitroにおけるNK活性への影響



WST-1によるPTXの細胞毒性の検討

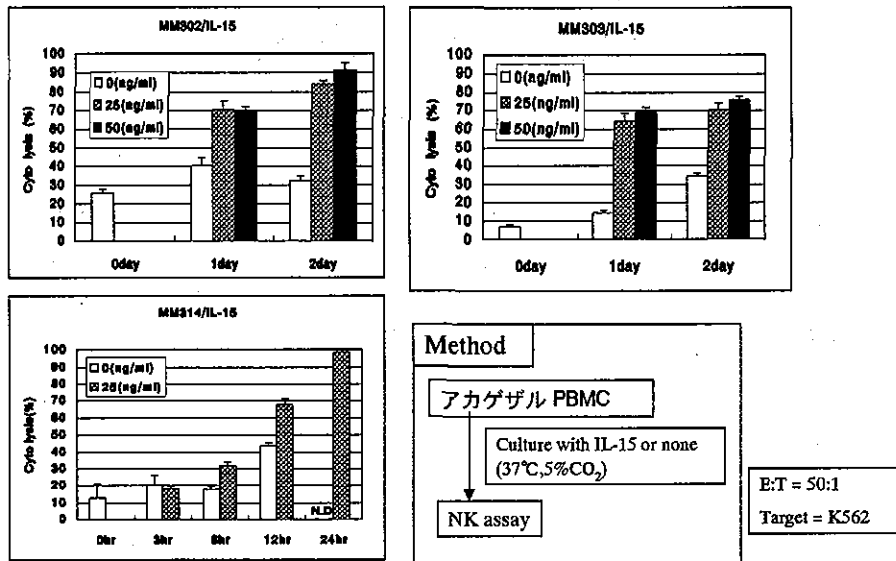


NK活性の亢進 IL-15

産生細胞	標的細胞
マクロファージ	NK細胞 CD8 ⁺ メモリー細胞
上皮細胞	NKT細胞 $\gamma\delta$ 細胞

Interleukin-15 (IL-15)は、近年ナチュラルキラー (NK) 細胞を始めとして、種々の免疫担当細胞群を賦活することが知られ、ウイルス感染防御への関与が注目されているサイトカインの一つである。まず、IL-15のサルPBMC中のNK細胞の賦活化を、次にSHIV感染に対する影響について、サルを用いて検討した。

IL-15によるin vitroでのNK 活性の亢進



IL-15のin vivo 投与

MM260 : SHIV 10⁶ TCID₅₀ 接種アカゲザル (24 m.p.i.)

MM202 : SHIV 10 TCID₅₀ 接種アカゲザル (48 m.p.i.)

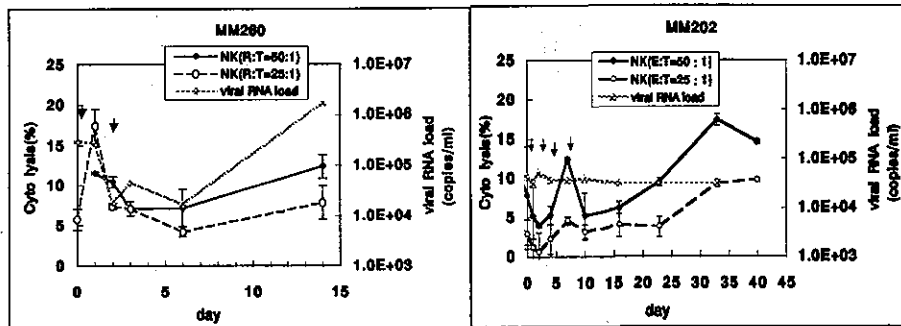
各サルに、ヒトrIL-15を隔日5 μg, 2 or 4回 静脈内投与
投与後、適時PBMCと血漿を採取



PBMC→NK活性, 血漿→ウイルス量・IL-15濃度を測定

IL-15のin vivo 投与による SHIV感染への影響

<ウイルス量とNK活性>



↓ IL-15 (5 μ g) 投与