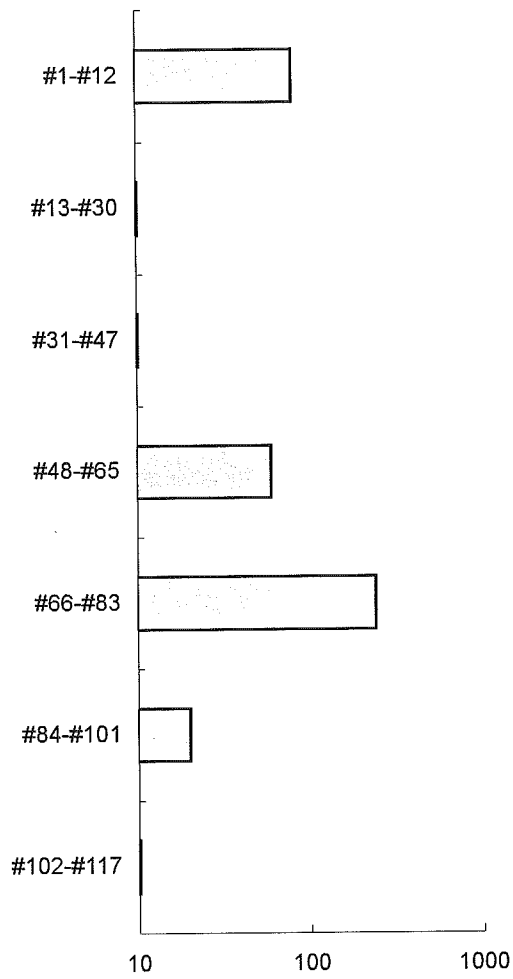


Congress of Virology, V-460, San Francisco, CA, USA, 7/26/2005.

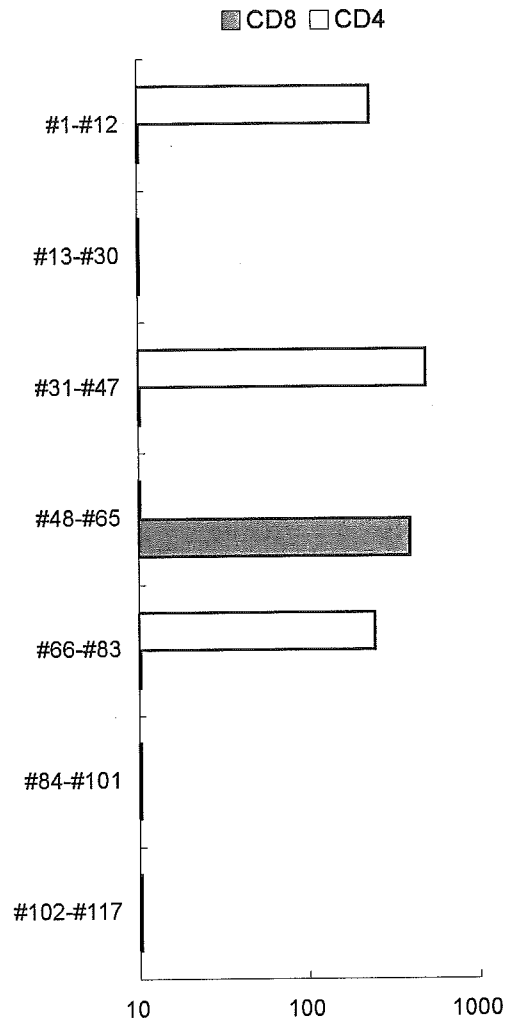
- (4) Matano, T. Multiple epitope-specific CTL-based control of SIV replication in rhesus macaques. International Symposium: The Cooperative Research Project on Clinical and Epidemiological Studies of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases. Kumamoto, Japan, 9/16/2005.
- (5) Moriya, C. and Matano, T. DNA/Sendai prime-boost vaccines. 第10回汎太平洋新興感染症国際会議、ハノイ、ベトナム、11/17/2005.
- (6) 山本浩之、五十嵐博子、武田明子、川田真幹、俣野哲朗. CTL誘導型予防エイズワクチンによるSIV/SHIV複製制御におけるde novo中和抗体の寄与の比較. 第53回日本ウイルス学会学術集会、1B20、横浜、11/20/2004.
- (7) 川田真幹、俣野哲朗. ワクチンによるSIV複製の初期制御後、CTLエスケープ変異の蓄積により複製能低下にもかかわらず再出現したウイルス血症. 第18回日本エイズ学会学術集会、#235、熊本、12/2/2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況
無し。

ELISPOT



ICS



Frequencies of peptide-specific T lymphocytes (/million PBMC)

HIV のコントロールに寄与する中和抗体の検出とその効果的な誘導

分担研究者：本多三男（国立感染症研究所エイズ研究センター）

研究要旨：HIV 感染はコントロールが難しいとされる慢性ウイルス感染症ではあるが顕著なウイルス血症を伴うことからそのコントロールが可能かもしれないと討論されている。その意味で抗原特異的な細胞性免疫の誘導とともに効果的な中和抗体の誘導が可能であれば完全防御を目標にできる感染症と考えられる。

本研究では HIV 感染の特性を考慮に入れて極めて安全なベクターを用いたワクチンの能動免疫による細胞性及び液性免疫の誘導を試み、防御免疫の誘導の確立にむけてワクチン免疫を至適化する。

本年度の研究では特にこれまで明らかでなかった液性免疫の関与を細胞性免疫誘導ワクチンの防御免疫との関連性について明らかにすることができた。HIV 感染症が進行性の免疫不全症を主な病態とすることから極めて安全性に富むワクチンの開発の実用化が重要な因子となる。その意味で免疫不全状態になっても安全であることが確立されているワクチンベクターを検索し、BCG-Tokyo 株とワクシニアウイルス DIs 株を用いたワクチンの開発を行った。

A. 研究目的

効果的な HIV ワクチンの実用化研究を以下のように行う。

- 1) 実用化に有利なこれまでヒトに使われてきたヒトワクチンベクターを用いた安全性に富む候補ワクチンの開発
- 2) 細胞性免疫の誘導を可能とする標的抗原としての種々のサブタイプの gag の解析とその選別
- 3) 液性免疫、特に、中和抗体の誘導を可能とする env 抗原の解析と中和抗体誘導の至適化に伴う env 抗原の修飾との関連性
- 4) 細胞性免疫及び中和抗体誘導型ワクチンの免疫法の確立

- 5) マルチ env HIV ワクチンの確立のための免疫法の至適化

B. 研究方法

本年度の研究では gag 遺伝子を組み込んだ候補ワクチンを作成し、防御免疫を誘導できる実験系を検索するために以下のように系を組んだ。

- 1) カニクイザルを用いて SIV gag 遺伝子を発現できる候補ワクチンを構築する。
- 2) 免疫誘導能をオーバーラッピングペプチドを用いた IFN 分泌 ELISPOT 細胞活性で細胞性免疫を測定する。
- 3) SHIV C2/1 を用いて (20TCID₅₀) チ

チャレンジコントロールベクターのサル群と比較し有効にウイルスのコントロールができる方法を検討する。

- 4) 防御免疫のパラメータとして血中ウイルス量、CD4 陽性細胞数の変化をモニターする。

(倫理面への配慮)

サル及び動物実験については全ての各研究者の研究施設における倫理規定に従って研究を行う。感染研における臨床サンプルの取扱いについては感染研の倫理規定に従って研究を行うが、既に医学研究倫理審査会の承認を得ている。また、動物実験に関しては動物の倫理問題を含めて実験計画が動物実験委員会で検討されるので全ての動物実験は動物実験委員会の承認を得て行う。さらに、ワクチンの構築等に関しては倫理問題も加味して、科学技術庁、感染研の組換え DNA 安全委員会の承認が得られておりそれに従って遂行する。

C. 研究結果

- 1) SIV gag を組込んだワクチンの免疫を行いウイルス血症をコントロールできる免疫グループを作成した。さらにウイルスのコントロールが不可能なベクター接種群と比較するとウイルスのコントロールが可能な群では細胞性免疫の誘導が有意に高い (Fig. 1)。
- 2) 液性免疫の指標としての抗 SIV gag IgG 抗体価はワクチン免疫とともに上昇する。しかし、ベクターコントロール群では抗体価は上昇しない。さらに、env 抗体価を解析すると、チャレンジに用いた SHIV の HIV 部分に対する抗体価はベクターコントロール群でも検出されるがワクチン接種群では有意に高い抗体価が得られる。特記すべきことは防御能を示すサルの群では免

疫抗原として SIV gag のみを組込んだにもかかわらず、チャレンジに用いたウイルスに対して中和力価が誘導される (Fig. 2)。

D. 考察

免疫不全ウイルスの防御には標的とする抗原にウイルスのエントリーとは比較的關係していないと思われる gag 抗原のみを組込んでチャレンジとして用いるウイルスの env 特異的な液性免疫特に中和抗体の誘導が感染防御と関連すると示唆された。この条件での防御免疫には細胞性免疫の誘導が液性免疫の誘導よりも強く関与していると考えられる。しかし、中和抗体が産生され防御免疫とかかわり合っていることがデータとして示され、免疫不全ウイルスの感染防御に液性免疫が重要であることが示唆される。その理由として感染防御群では生体内で CD4 細胞がベクターコントロール群に比べて有意に保存されており、抗原特異的リンパ球増殖反応が認められることにより機能的にもその保存は明らかにされた。この CD4 陽性ヘルパー細胞がチャレンジウイルスに対する中和抗体の産生を補助していると予測される。このことを実証するには in vivo での抗 CD4 抗体による CD4 細胞機能不全動物の作成、あるいは抗 B 細胞抗体を用いた抗体産生不全動物の作成により明らかになると考えられ課題となっている。

変則的ではあるが抗 gag 抗体は中和機能を有するのではないかと一部伝えられていることから、その可能性も完全に否定できないが env の中和抗体と比較してその中和力価は有意に弱いので抗 gag 抗体がこの実験系で存在するかどうかを含めて今後の検討課題とした。

E. 結論

HIV 感染症は有効な中和抗体の産生ができれば完全にコントロールが可能である。

本研究では能動免疫法による中和抗体産生の意義を解析し gag 抗原を用いた候補ワクチンでも防御免疫の因子として中和抗体が関与していることを明らかにした。

今後さらに env 遺伝子を組込んだ細胞性免疫及び中和抗体誘導型ワクチンの可能性について検討しその成果を踏まえて感染防御ワクチンの開発を試みる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ami Y, Izumi Y, Matsuo K, Someya K, Kenekiyo M, Horibata S, Yoshino N, Sakai K, Shinohara K, Yamazaki S, Yamamoto N, and Honda M. Priming-boosting vaccination with recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin and a non-replicating vaccinia virus recombinant leads to long-lasting and effective immunity. *J. Virol.* 79: 12871-12879, 2005.
- 2) Someya K, Ami Y, Nakasone T, Izumi Y, Matsuo K, Horibata S, Xin KQ, Yamamoto H, Okuda K, Yamamoto N, and Honda M. Induction of positive cellular and humoral immune responses by a prime-boost vaccine encoded with simian immunodeficiency virus gag/pol. *J. Immunol.* 179: 1784-1795, 2006.
- 3) Eda Y, Takizawa M, Murakami T, Maeda H, Kimachi K, Yonemura H, Koyanagi S,

Shiosaki K, Higuchi H, Makizumi K, Nakashima T, Osatomi K, Tokiyoshi S, Matsushita S, Zolla-Pazner S, Yamamoto N, Honda M. Sequential immunization with V3 peptides from primary HIV-1 produces cross-neutralizing antibodies against primary isolates with matching narrow neutralization sequence motif. *J. Virol.* in press, 2006.

- 4) Eda Y, Murakami T, Ami Y, Nakasone T, Takizawa M, Someya K, Kaizu M, Izumi Y, Yoshino N, Matsushita S, Higuchi H, Matsui H, Shinohara K, Takeuchi H, Koyanagi Y, Yamamoto, Honda M. Anti-V3 humanized antibody KD-247 effectively suppresses *ex vivo* generation of human immunodeficiency virus type 1 and affords sterile protection of monkeys against a heterologous simian/human immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* in press, 2006

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

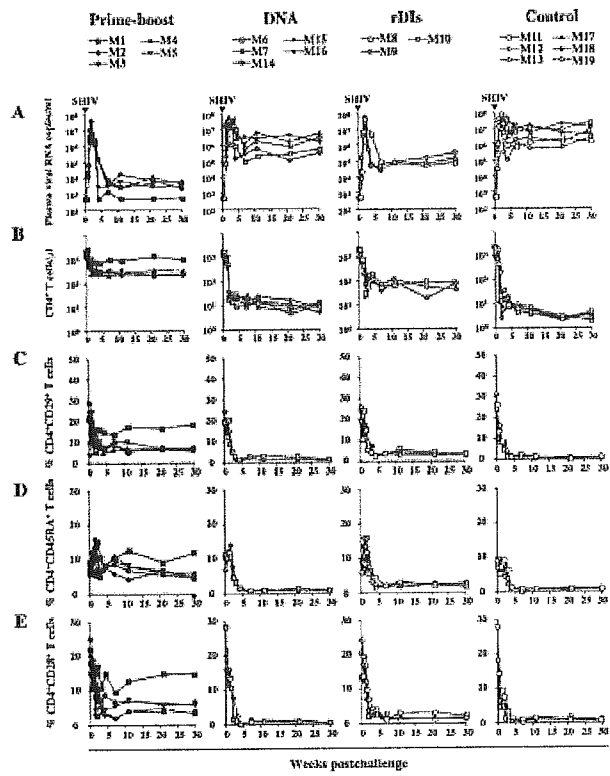


Fig. 1

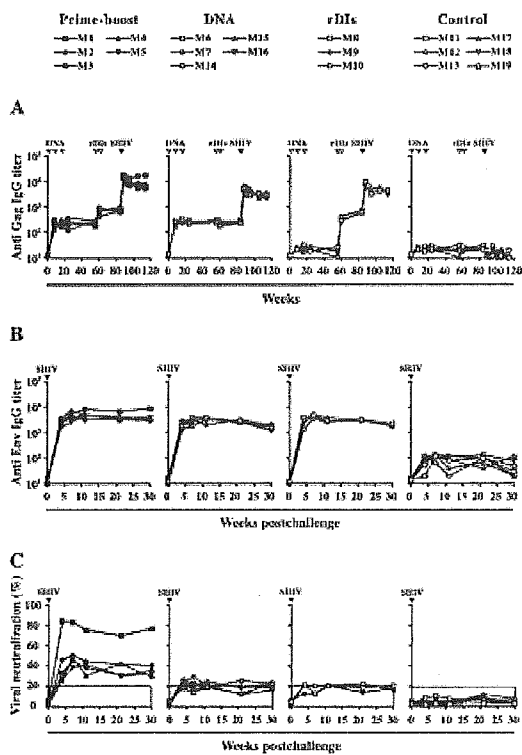


Fig. 2

粘膜組織における HIV の感染拡大および制御機構の解明

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

今回我々は HIV の持続感染および感染拡大の場は血液中ではなく粘膜組織ではないかとの新たな視点に立ち、粘膜組織における HIV の感染拡大のメカニズムとその制御法を探る目的で、粘膜免疫を反映する分泌型 IgA を多量に含有する生直後に分泌される初乳に着目し、その中に含有される細胞群の実体を研究した。その結果、初乳中の細胞の主体は、脂肪粒を多量に含有した CD14 分子陽性のマクロファージ群(BrMMΦ)であり、その中に CD4 陽性の T リンパ球は殆ど認められないことを確認した。そして、この CD14 陽性 BrMMΦは、樹状細胞活性化の指標である CD83 分子が発現しており、樹状細胞への分化因子である GM-CSF を産生・分泌し、IL-4 の添加により容易に樹状突起ならびに CD1 分子を発現した樹状細胞群へ分化することを見出した。またこの CD4 陽性 BrMMΦの表面にはケモカインレセプターが発現しており、R5-type HIV-1 に対する強い感受性が確認されたものの、こうした高い感受性ならびにウイルス産生能を有するマクロファージ群の感染伝播能は、それよりもウイルス複製能の低い樹状細胞に比べ遙かに低く、感染伝播力の強さは樹状細胞上に発現した HIV-1 捕捉レセプターである DC-SIGN の量に依存することを見出した。このような事実は、粘膜組織における HIV-1 の感染標的が従来考えられていたような T リンパ球群ではなく、CD4 陽性の樹状細胞群であり、樹状細胞からの感染伝播力はその表面に発現している HIV-1 の捕捉レセプターである DC-SIGN の発現量によって規定されることを示唆している。

A. 研究目的

HAART (highly active antiretroviral therapy) 療法の結果、血液中のウイルス量を減少させるとともに CD4 陽性 T リンパ球数の増加を誘発することが可能となり、AIDS による死者が激減する状況が訪れた。しかしながら、HAART 療法に使用する薬剤は非常に高価で有り服薬方法も複雑であるため、HIV の感染爆発を生じている発展途上国においては未だに普及していないのが実体である。また、HAART 療法により血液中を循環するウイルス量は検出限界以下となり HIV 感染 T リンパ球も消失したにも関わらず、その中断によって血液中のウイルス量は速やかに元に戻るとともに CD4 T リンパ球数も減少する。また、アフリカ売春婦群に散見された HIV に対する感染抵抗性は、売春を中断し HIV の粘膜からの侵入がなくなると失われることも判明した。こうした事実は、HIV の持続感染および感染拡大の場が血液中ではなく粘膜組織であることを強く示唆している。以上の点に基づき、粘膜組織における HIV の感染拡大のメカニズムとその制御法を探ることが本研究の目的である。

B. 研究方法

ヒト粘膜免疫を反映する細胞を得る目的で、分泌型 IgA に富む初乳を正常分娩後の褥婦からインフォームドコンセントを得た上で採取し検体を得た。採取検体から Ficoll-Hypaque を用いて母乳細胞を分離し、まずその表面マーカーを Flow Cytometry にて解析した。そして母乳中に含まれる細胞群の主体が、CD4 分子を有した T リンパ球ではなく CD4 分子陽性のマクロファージ(BrMMΦ)であることから、その表面のケモカインレセプターの発現を確認した後、母児感染及び粘膜感染の主要なウイルス株である R5-Type の NLAD8 に対する感受性を追跡した。その際、R5-Type に感受性を有する MAGIC-5 細胞を利用して感染の有無を判定した。一方こうした BrMMΦは、その表面に樹状細胞の活性化マーカーである CD83 を発現していたことから、樹状細胞への分化段階にあるものと考え、その表面の DC-SIGN 分子の発現及び GM-CSF の産生能を追跡するとともに、感染伝播が抗 DC-SIGN 抗体で block されるか否かを検討した。

C. 研究結果

1) 初乳中の細胞の主体は、脂肪粒を多量に含有した CD14 分子陽性のマクロファージ群 (BrMMΦ) であった (下段の四角内は末梢血中のリンパ球) (図 1)。

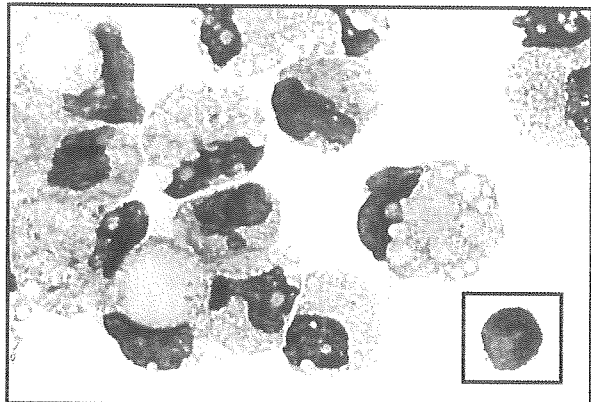


図 1. 初乳中細胞を占める BrMMΦ の形状

2) 初乳中の HIV 感受性を有する CD4 陽性細胞群を調べたところ、予想に反して T 細胞のマークである CD3 陽性細胞はほとんど検出できずその大半は CD14 陽性のマクロファージ群であった (図 2)。

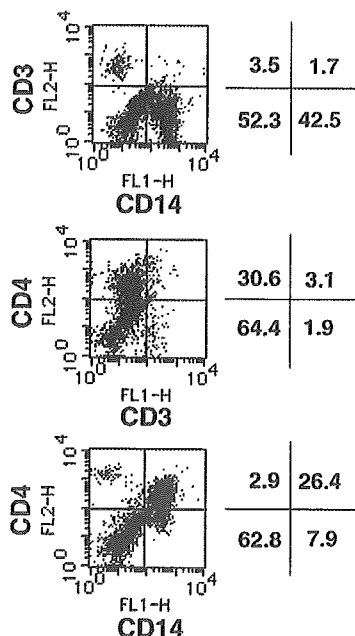


図 2. 初乳中 CD4 陽性細胞の特性

3) この CD14 陽性マクロファージ (BrMMΦ) には、同時に樹状細胞活性化の指標である

CD83 が発現していた (図 3)。

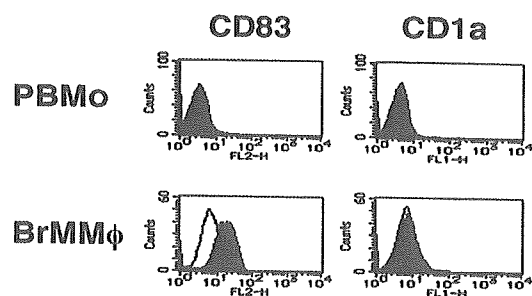
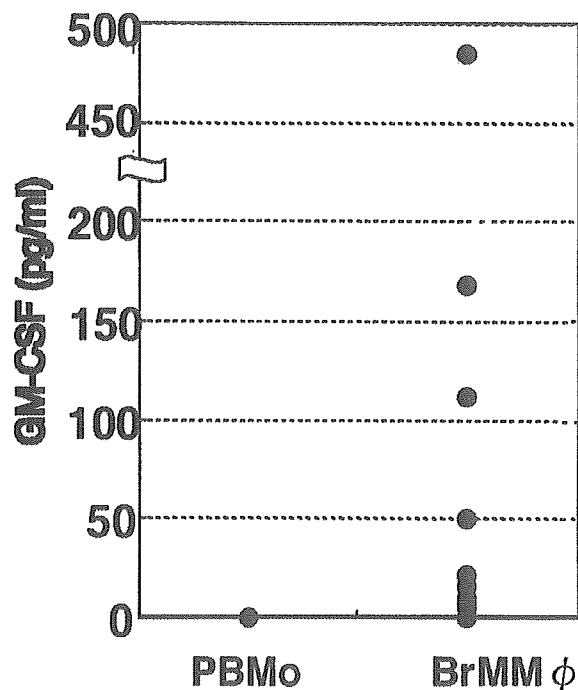


図 3. BrMMΦ 上における CD83 の発現

4) そこで、この BrMMΦ が樹状細胞への分化段階にある細胞ではないかと考え、樹状細胞分化因子である GM-CSF の産生状況を調べたところ、末梢血単核球 (PBMo) では全く産生されていなかったにもかかわらず、母乳中のマクロファージ群 (BrMMΦ) では、大量に産生・放出されていることが確認された (図 4)。

図 4. BrMMΦ における GM-CSF の産生・放出



5) 一般に CD14 陽性のマクロファージ群は、GM-CSF とともに IL-4 の存在下で培養すると樹状細胞へ分化することが知られている。そこでこれまでの結果に基づき、自らが GM-CSF を産生している初乳中の BrMMΦ は IL-4 の添加培養のみで樹状細胞へ分化するのではないかと考え IL-4 を添加培養したところ、CD14 分子が消失し表面に多数の突起を有し CD1 分子が表出した樹状細胞へ分化した細胞群の出現を確認することができた (図 5)。

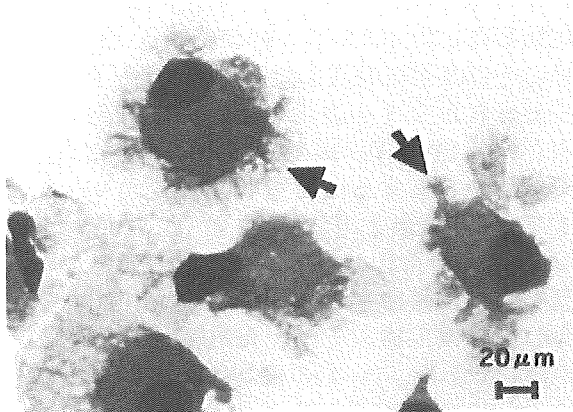


図 5. IL-4 単独添加培養により樹状細胞へ分化した BrMMΦ

6) この樹状細胞へ分化した CD4 陽性かつ CD14 陽性の BrMMΦ は、HIV-1 の細胞内侵入に必要なケモカインレセプター CCR5、CXCR4 も発現しており、興味深いことに HIV-1 ウィルスを捕捉し感染の補助をする DC-SIGN 分子も陽性である事が判明した。また、IL-4 を添加培養した場合には、DC-SIGN の発現が著しく増強し逆にケモカインレセプターは低下していた (図 6)。

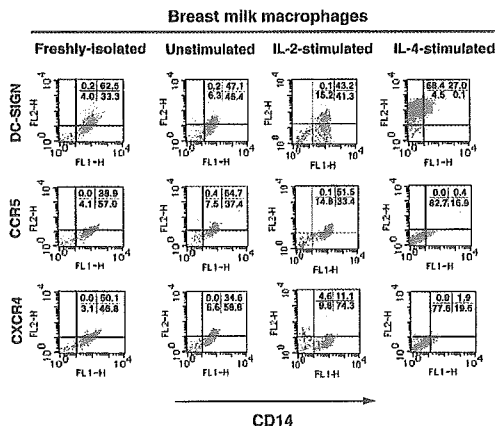
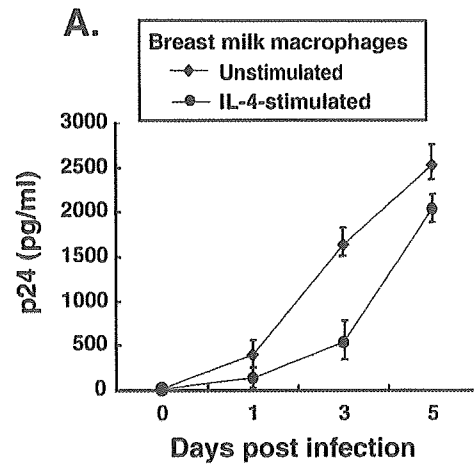


図 6. 母乳細胞上におけるケモカインレセプターの発現

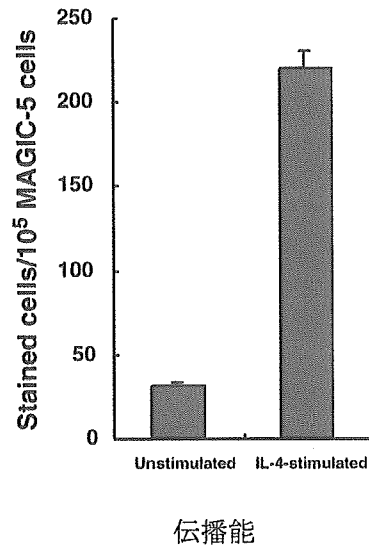
7) 次にこれらの IL-4 により樹状細胞へ分子

した母乳細胞の R5-type NLAD8 株に対する感受性を分化前後で追跡したところ、分化の有無に関わらず HIV に対する高い感受性を有していた (図 7A) が、MAGIC-5 細胞への HIV-1 感染伝播能は、DC-SIGN を強発現している分化後の樹状細胞群の方が遙かに高かった (図 7B)。

図 7. 母乳細胞の HIV に対する感受性と感染



B.



伝播能

8) そこで、この感染伝播能が発現の増強した DC-SIGN を介して誘発されているのか否かを追跡する目的で、抗 DC-SIGN 抗体による感染阻止実験を施行した。その結果、isotype-matched コントロールの抗体群では全く NL(AD8) 株の感染伝播が抑制されなかったものの、抗 DC-SIGN 抗体の存在下でウィルスを感染後、Free Virus を wash out した IL-4 刺激母乳細胞の感染伝播力は著明に抑制された (図

8)。このことは、BrMMΦ上に発現した DC-SIGN を介して捕捉された R5-type の HIV-1 が Free Virus よりも強い感染伝播力を保持していることを示唆している。

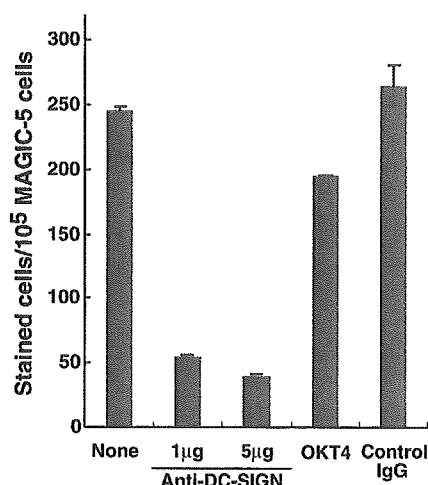


図8. 抗 DC-SIGN 抗体による HIV-1 感染伝播阻止能の検討

D. 考察

粘膜における HIV の感染伝播のメカニズムを探る目的で、粘膜免疫を反映すると推測される分泌型 IgA に富む初乳中の細胞を調べたところ、予想に反し CD4 陽性の T リンパ球の存在は殆ど確認出来なかった。その代わりに多数の CD4 陽性マクロファージ様細胞群が認められた。興味深いことにこのマクロファージ様細胞群は、樹状細胞への分化段階にある状態で、IL-4 の産生を誘発する細菌感染などに伴い容易に樹状細胞へと分化する。またこの CD4 陽性マクロファージ様細胞群の表面には HIV-1 の侵入を規定するケモカインレセプター分子が発現しており、R5-type HIV-1 に対する強い感受性が確認された。

驚くべきことに、高い感受性ならびにウイルス産生能を有する樹状細胞への分化途上にあるマクロファージ群の感染伝播能は、それよりもウイルス複製能の低い樹状細胞に比べ遙かに低く、感染伝播力の強さは樹状細胞上に発現した HIV-1 捕捉レセプターである DC-SIGN の量に依存していた。そしてこのことは、抗 DC-SIGN 抗体によって容易に感染伝播がブロックされることにより確認することができた。このような事実は、粘膜組織における

HIV-1 の感染標的が従来考えられていたような T リンパ球群ではなく、CD4 陽性の樹状細胞群であり、樹状細胞からの感染伝播力はその表面に発現している HIV-1 の捕捉レセプターである DC-SIGN の発現量によって規定されることを示唆している。

また本研究の成果は、発展途上国における HIV 感染爆発の重要な因子である母児感染、ことにその大半を占める母乳を介した HIV-1 の感染伝播の実体が、HIV-1 感受性のある T リンパ球ではなく、初乳中の樹状細胞への分化能を有したマクロファージ系細胞 (BrMMΦ)、特にその表面に発現した DC-SIGN 分子により捕捉されたウイルス粒子が、感染細胞より放出された Free Virus 粒子よりも遙かに高い感染伝播力を有することを物語っており、これまで感染細胞より放出された Free Virus Particle が母乳感染の主たるによるものと推測を完全に覆すものである。DC-SIGN 分子を介した感染伝播こそが、母乳感染を防ぐための標的であり、IL-4 の添加によって BrMMΦ上の DC-SIGN の発現が増強する事実は、母乳中の IL-4 の分泌が引き金となって母乳感染が増大することを暗示している。

以上の事実は、HIV-1 の粘膜組織での標的が樹状細胞群であり、感染伝播の主役は細胞内で複製され局所へ放出された Free Virus ではなく、DC-SIGN により捕捉されたウイルスであることを強く示唆している。

E. 結論

以上本研究の結果、粘膜組織における HIV-1 の感染獲得ならびに感染伝播は、従来の CD4 陽性 T リンパ球によってではなく粘膜内に局在する CD4 分子を発現した樹状細胞群によって担われており、この樹状細胞群表面に発現した HIV-1 レセプター DC-SIGN を介して捕捉された R5 型の HIV が、HIV 感受性を有する T 細胞群に伝播される可能性が判明した。こうした粘膜組織内に棲息する HIV-1 感染あるいは捕捉樹状細胞の制御をすることが、新たな HIV-1 制圧のための指標となるものと考えられる。

F. 論文発表

1. Satomi, M., Shimizu, M., Shinya, E., Watari, E., Owaki, A., Hidaka, C., Ichikawa, M., Takeshita, T., Takahashi, H.: Transmission of macrophage-tropic HIV-1 by breast milk macrophages via DC-SIGN. **J. Infect. Dis.**, 2005, 191:174-181.
2. Watari, E., Shimizu, M., Takahashi, H.: Langerhans cells stimulated by mechanical stress are susceptible to measles virus infection. **Intervirol.**, 2005, 48:145-152.
3. Iizumi, T., Ymanishi, S., Kumagai, Y., Nagata, K., Kamiya, S., Hirota, K., Watanabe, E., Sakamoto, C., Takahashi, H.: Augmentation of Helicobacter pylori urease activity by its specific IgG antibody: implications for bacterial colonization enhancement. **Biomed. Res.**, 2005, 26:35-42.
4. Saito, N., Takahashi, M., Akahata, W., Ido, E., Hidaka, C., Ibuki, K., Miura, T., Hayamai, M., Takahashi, H.: Analysis of evolutionary conservation in CD1d molecules among primates. **Tissue Antigens**, 2005, 66:674-682.
5. Takahashi, M., Ido, E., Uesaka, H., Fukushima, T., Ibuki, K., Miura, T., Hayami, H., and Takahashi, H.: Comparison of susceptibility to SIVmac239 infection between CD4⁺ and CD4⁺8⁺ T cells. **Arch. Virol.**, 2005, 150:1517-1528.
6. Enomoto, Y., Sugita, M., Matsunaga, I., Naka, T., Sato, A., Kawashima, T., Shimizu, K., Takahashi, H., Norose, Y., Yano, I.: Temperature-dependent biosynthesis of glucose monomycolate and its recognition by CD1-restricted T cells. **BBRC**, 2005, 337:452-456.
7. Yamanishi, S., Iizumi, T., Watanabe, E., Shimizu, M., Kamiya, S., Nagata, K., Kumagai, Y., Fukunaga, Y., Takahashi, H.: Implications for induction of autoimmunity via activation of B-1 cells by Helicobacter pylori urease. **Infect. Immun.**, 2006, 74:248-256.
8. Watanabe, Y., Watari, E., Matsunaga, I., Hiromatsu, K., Dascher, C.D., Kawashima, T., Norose, Y., Shimizu, K., Takahashi, H., Yano, I., Sugita, M.: BCG vaccine elicits both T-cell mediated and humoral immune

responses directed against mycobacterial lipid components. **Vaccine**, 2006 (in press).

9. 高橋秀実: 自然免疫と獲得免疫の基礎: 樹状細胞を介したウイルス特異的キラーT細胞の誘導. **最新医学**, 60:556-565, 2005.
 10. 高橋秀実: HIV/AIDS の病態進行とワクチン開発の進歩. **日本エイズ学会誌**, 7:83-92, 2005.
 11. 高橋秀実: 腸管における innate immunity. **無菌生物**, 35:21-25, 2005.
 12. 高橋秀実: 自然免疫システムと HIV. **日本エイズ学会誌**, 7:556-565, 2005.
 13. 高橋秀実: 癌の免疫療法: 丸山ワクチンの作用機序に関する一考察. **日本医科大学医学会誌**, 2:1-2, 2006.
 14. 高橋秀実: 免疫システムの新たな実態: 基本免疫と獲得免疫. **日本感染症学会雑誌**, 2006, (印刷中).
- ## G. 学会発表
1. 高橋秀実: 新たな未病への挑戦—現代免疫学的視点からみた疾病の本態に関する洞察. 第11回日本未病システム学会総会 2005年1月8-9日(大宮).
 2. 高橋秀実: 腸管における innate immunity. 第38回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会 2005年1月26-27日(大阪).
 3. 高橋秀実: 免疫学の最新情報: 新たな医学をめざして. 平成16年度自己治癒力研究会総会 2005年2月10日(東京).
 4. 高橋秀実: 粘膜免疫とアレルギー. 第16回多摩小児アレルギー臨床懇話会 2005年3月12日(多摩).
 5. 高橋秀実: 免疫システムの新たな実態: 基本免疫と獲得免疫. 第79回日本感染症学会総会 2005年4月14-15日(名古屋).
 6. 高橋秀実: 脂質と粘膜免疫. 第12回関東Lipid Artery研究会 2005年5月25日(東京).
 7. Takahashi, H.: Fetal-maternal transmission of macrophage-tropic HIV-1 by breast milk

macrophages via DC-SIGN.
7th International Congress on AIDS in Asia
and the Pacific.
July 1-5, 2005 (Kobe, Japan).

8. 高橋めぐみ、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。
文科省特定領域研究「サルを用いた感染症研
究」の現状と今後を考える会議
2005 年 9 月 16 日-17 日 (京都)。

9. 高橋秀実：霊長類における CD1d 分子の保存
性と SIV/HIV 感受性。
文科省特定領域研究「サルを用いた感染症研
究」の現状と今後を考える会議
2005 年 9 月 16 日-17 日 (京都)。

10. Takahashi, H. : Endogenously expressed
HIV-1 nef down-regulates not only class I
MHC but also CD1a molecules: A new target for
vaccine development. Japan-US Cooperative
Medical Science Program: The 18th Joint
Scientific Meeting of AIDS. November 15,
2005 (Hanoi, Vietnam).

11. Takahashi, H. : Fetal-maternal
transmission of macrophage-tropic HIV-1
captured by breast milk macrophages. The
17th International Conference on Emerging
Infectious Diseases in the Pacific Rim.
November 16-17, 2005 (Hanoi, Vietnam).

12. 高橋秀実、里見操緒、清水真澄、新谷英
滋、渡理英二、大脇敦子、日高千鶴乃、市川
雅男、竹下俊行：母乳中マクロファージを介
したレトロウイルスの感染伝播のメカニ
ズム：R5-type HIV-1 をモデルとして。
第 53 回日本ウイルス学会総会。
2005 年 11 月 20-22 日 (横浜)。

13. 高橋めぐみ、渡理英二、新谷英滋、高橋秀
実：麻疹ウイルス変異株の持続感染に関与す
る宿主因子。
第 53 回日本ウイルス学会総会。
2005 年 11 月 20-22 日 (横浜)。

14. 高橋秀実、高橋めぐみ、齊藤尚紀、守屋慶
一、上坂浩実、福島達伸、井戸栄治、伊吹謙
太郎、三浦智行、速水正憲：サル CD4+T 細胞
と CD4+CD8+T 細胞の SIVmac239 に対する感受
性の差違。
第 19 回日本エイズ学会総会
2005 年 12 月 1 日-3 日 (熊本)。

15. 里見操緒、清水真澄、新谷英滋、渡理英二、
大脇敦子、八木幸恵、渡邊嘉之、日高千鶴乃、
市川雅男、竹下俊行、高橋秀実：初乳中マク

ロファージ上の DC-SIGN を介した HIV-1 感染
伝播の可能性。
第 19 回日本エイズ学会総会
2005 年 12 月 1 日-3 日 (熊本)。

16. 新谷英滋、大脇敦子、清水真澄、渡邊恵
理、小宮暢子、日高千鶴乃、高橋秀実：HIV-1 Nef
down-regulates surface expression of CD1a
molecules in immature dendritic cells:
analysis of interaction between CD1a
cytoplasmic tail and HIV-1 Nef.
第 19 回日本エイズ学会総会
2005 年 12 月 1 日-3 日 (熊本)。

17. 日高千鶴乃、渡邊恵理、清水真澄、山西慎
吾、里見操緒、樋口智江、高橋めぐみ、新谷
英滋、高橋秀実：Th2 優位の環境下における NKT
細胞を介した X4-type HIV-1 の感染拡大。
第 19 回日本エイズ学会総会
2005 年 12 月 1 日-3 日 (熊本)。

18. 中川洋子、菊地浩人、樋口智江、清水真
澄、高橋秀実：HIV 外被糖蛋白 gp160 に特異
的な細胞傷害性 T 細胞の認識特異性に関する
研究 (2)。
第 35 回日本免疫学会総会
2005 年 12 月 13 日-15 日 (横浜)。

19. Shinya, E., Owaki, A., Shimizu, M.,
Wartanabe, E., Yamanishi, S., Satomi, M.,
Hidaka, C., Watari, E., Takahashi, H. : HIV-1
Nef down-regulates the surface expression
of CD1a molecules as well as class I MHC in
immature dendritic cells.
第 35 回日本免疫学会総会
2005 年 12 月 13 日-15 日 (横浜)。

20. Hidemi Takahashi, Misao Satomi, Masumi
Shimizu, Eiji Shinya, Eiji Watari, Atusko
Owaki, Chizuno Hidaka, Yukie Yagi, Masao
Ichikawa, Toshiyuki Takeshita: Transmission
of macrophage-tropic HIV-1 by breast milk
macrophages via DC-SIGN.
第 35 回日本免疫学会総会
2005 年 12 月 13 日-15 日 (横浜)。

21. 高橋秀実：漢方薬でエイズウイルスの持
続感染は制御できるか。
第 5 回東京大学実践漢方セミナー
2005 年 12 月 20 日 (東京)。

H. 知的財産権の出願・登録状況

本年度は特にございません。

研究課題：アジアにおけるエイズ流行制圧を目的とするワクチンおよび他の新規治療技術開発
へ向けた分子疫学研究

分担研究者： 武部 豊（国立感染症研究所エイズ研究センター・室長）

研究要旨

アジアにおけるエイズ制圧に向けた新規技術開発のための基盤的研究ツールの拡充・整備に向けた国際的な研究貢献を目指し、国内外の共同研究者との共同研究によって、次の3つの柱からなる研究を進めた。

- (1) アジア型 HIV-1 流行株の系統的分離
 - (2) 新たに分離されたアジア型 HIV-1 流行株の全ゲノム塩基配列の決定による国際的 HIV データベース拡充への貢献
 - (3) ウイルス学研究のための基本研究ツールの一つであるアジア型 HIV-1 ヴァリアントの感染性分子クローンの樹立とその性状の解析
- これらの研究活動によって、今年度、近年感染者の増加傾向が著しいマレーシアに出現した新型の組換え型流行株 (circulating recombinant form, CRF) を分離・同定し、その全塩基配列を決定した。この新たに分離された新型流行株は、国際的 HIV sequence database より 33 番目の CRF - CRF33_01B - として正式承認された。また中国における最も主要な流行株の一つである CRF08_BC の感染分子クローンの分離に成功した。

A. 研究目的

アジアにおけるエイズ制圧に向けた感染防止・エイズ発症阻害技術開発のための基盤的研究ツールの拡充・整備を目指して、国内外で次の研究を進めた。

- (1) アジア型 HIV-1 ヴァリアントの系統的分離
- (2) アジア型 HIV-1 ヴァリアントの全塩基配列の決定による HIV データベース拡充
- (3) 基盤的なウイルス学研究ツールであるアジア型 HIV-1 ヴァリアントの感染性分子クローンの樹立とその性状の解析

B. 研究方法

- (1) 我が国を含むアジア各地域に流布する HIV-1 (および HIV-2) 株を活性化した健常人 PBMC との共培養法によって分離した。図 1 に国内外の共同研究ネットワークを模式的に示す。
- (2) ウイルス分離株を活性化 PBMC に感染して得られた細胞 DNA を鋳型として、long PCR 法により near full-length genome を増幅し、TA クロー

ニングを行った。このようにして得られた near full-length clone を鋳型として、cycle sequence 法を用いた primer-walking によって、ほぼ完全長の HIV ゲノム配列を決定した。

(3) 系統樹解析によって HIV サブタイプ帰属を決定し、種々の組み換え点解析 (bootscanning plot analysis, informative site analysis, subregion tree analysis) によって、組換え構造の詳細を明らかにした。

(3) 5'-LTR 部分との連結によって、full-length sequence を再構築し、その感染性を次のようにして検証した。i) 再構築した full-length clone を Fusin 6 を用いた transfection によって HeLa 細胞に導入し、48-72 時間後の培養上清中の virion associated RT 活性を測定することによって、ウイルス粒子産生能 (virus output) を検討した。ii) 培養上清中に良好な RT 活性が検出されたクローンに関して、活性化 PBMC への感染性の有無、およびコレセプター利用能をヒトグリオーマ細胞株 NP2 を用いたアッセイ系によって決定した。

(倫理面への配慮) 国内症例に関しては国立感染症研究所および各協力医療機関(荻窪病院・国立国際医療センター)における医学研究倫理審査委員会において承認済み。またアジア各国エイズ研究機関との共同研究に関しては各国政府所轄機関の指示する倫理規程に従って遂行された。

C. 研究結果

(1) アジア型 HIV 株の分離とその性状の解析:

国内外の共同研究者の協力のもとに、日本、ミャンマー、中国雲南省、マレーシアにおける HIV 感染者から数十種のウイルス株の分離に成功した。そのうち、1例の国内症例は HIV-2 サブタイプ B で、国内症例としては最初の HIV-2 分離例となった。また HIV-2 サブタイプ B としてはアジアで最初の検出例となった。ミャンマーからの分離株の約 10-20%前後は HIV-1 サブタイプ B', C, CRF01_AE 間の様々な組み合わせの新規組み換えウイルスであることが明らかになった。また中国雲南省からは中国型の組換え型流行株 (circulating recombinant form, CRF) - CRF07_BC と CRF08_BC - を分離することに成功した。

また新たな共同研究先であるマレーシアからは、新型の組換えウイルス 5 株の分離に成功し、全ゲノム配列の決定の結果、CRF01_AE からなる基本骨格に短いサブタイプ B/B'断片が gag-RT 領域に挿入された構造をもつ新型の組換え型流行株 (CRF33_01B) であることが明らかになった。CRF33_01B は新たな CRF として今年 (2006 年) 1 月に国際的 HIV sequence database から正式承認を受けた。CRF33_01B は我が国研究機関が報告する最初の CRF となった。

(2) アジア型 HIV-1 ヴァリアントの感染性分子クローンの樹立:

Long PCR 法を用いて、アジア型 HIV-1 ヴァリアントの感染性分子クローンの樹立を目指し、本年度までにいくつかのアジア固有のウイルス株の感染性分子クローンの樹立を目指して研究を進めてきた。その中で重要なものが CRF08_BC 株由来のものである。これは世界で最初の成功例である。

図 2 に研究活動の outline と本年度の主要な研究生成果を示す。

D. 考察

分離ウイルス株のパネル、全塩基配列情報、感染性分子クローンはいずれも我が国を含むアジア地域を標的とするワクチン開発・ウイルス学研究の基礎的研究ツールとして重要であると考える。また、アジア地域における分子疫学研究は本研究の基盤となっているが、その研究成果を礎として、アジア地域における流行の成立ちに関する理解を深める一方、またこの地域における爆発的エイズ流行の原因となっているアジア地域固有のウイルス株の構造とその性質を明らかにすることは、とりわけこの地域を標的とするワクチン戦略を考える上で極めて重要と考える。

E. 結論

国内外の共同研究者との密接な共同研究によって、アジア諸地域に分布するウイルス株の分離を進め、またウイルスゲノムの全塩基配列を決定することによって国際的 HIV sequence database の拡充に貢献している。また、アジア型流行株に関する感染性分子クローンの樹立を通じて、この地域に固有の流行株のウイルス学研究およびワクチン開発研究のための研究ツールの開発を進めた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kondo, M., Shima, T., Sudo, K., Nishizawa, M., Iwamuro, S., Okabe, T., Takebe, Y., Imai, M. (2005). Identification of attenuated HIV-1 CRF01_AE variant associated with slow disease progression due to gross genetic alterations in the *nef*-LTR sequences. *J. Inf Dis.* **192**: 56-61.
- 2) Mori, K., Sugimoto, C., Ohgimoto, S., Shioda, T., Kusagawa, S., Takebe, Y., Kano, M., Matano, T., Yuasa, T., Kitaguchi, D., Miyazawa, M., Takahashi, Y., Yasunami, M., Kimura, A., Yamamoto, N., Suzuki, Y., and Nagai, Y. (2005). Influence of glycosylation on the efficacy of an Env-based vaccine against SIVmac239 in a macaque AIDS model. *J. Virol.* **79** (16): 10386-10396.
- 3) Takamura, S., Matsuo, K., Takebe, Y., and

Yasutomi, Y. (2005). Ag85B of mycobacteria elicits effective CTL responses through activation of robust Th1 immunity as a novel adjuvant in DNA vaccine. *J. Immunol.* **175**: 2541-2547.

4) Li, X.-J., Kusagawa, S., Xia, X., Yang, C., Wang, Q., Yokota, Y., Imamura, Y., Hoshina, Y., Nohtomi, K., Shiino, T., Onogi, T., Yang, R., Yamamoto, N., Ben, K., and Takebe, Y. (2005). Molecular Epidemiology of the Heterosexual HIV-1 Epidemic in Kunming, Yunnan Province, China, Suggests Origin from the Local IDU Epidemic. *AIDS Res and Human Retroviruses* **21**: 977-980.

5) Takebe, Y. and Telesnitsky, A. (2006). Evidence for the acquisition of multidrug resistance by an HIV clinical isolate *via* human gene transduction. submitted to *Nature Med.*

6) Tee, K. K., Li, X.-J., Nohtomi, K., Ng, K. P., Kamarulzaman, A., and Takebe, Y. (2006). Emergence of Novel Circulating Recombinant Form (CRF33_01B) Disseminating Widely among Various Risk Populations, Malaysia. submitted to *Emerging Infectious Dis.*

7) Li, X.-J., Kusagawa, S., Aye, K.T., Hoshina, Y., Yokota, Y., Xia, X., Ben, K., Oo, K. Y., Aung, T., Thant, K. Z., Moe, K., Thwe, M., and Takebe, Y. (2006). Dual infections with multiple lineages of HIV-1 strains in unique geographical recombination "hotspots" in Asia. submitted to *AIDS*.

8) Kusagawa, S., Li, X.-J., Nohtomi, K., Yang, R., and Takebe, Y. (2004). Isolation and characterization of replication-competent molecular clones of human immunodeficiency virus type 1 circulating recombinant form 08_BC (CRF08_BC) with different biological properties. submitted to *J. Virol.*

2. 学会発表

1) 武部豊、横田侑子、小泉寛和、Xi Xiao-Jie、滝口雅文、岡慎一. (2005). HIV-1 スーパー感染：レジデント・ウイルスとスーパー感染ウイルス間の組換えウイルスの急速な出現とその生物学的意義. 第53回日本ウイルス学会 (2005.11.20-22. 横浜)

2) 近藤真規子、嶋貴子、武部豊、加藤真吾、今井光信. (2005). Real-time PCR 法を用いた HIV-1 プロウイルス定量法—6種類の HIV-1 サブタイプとプライマー、プローブの反応性の検討 第53回日本ウイルス学会 (2005.11.20

—22. 横浜)

3) 草川茂、武部豊. (2005). 広い宿主域と高い増殖能を持つ HIV-1 CRF08_BC 感染性分子クローンの構築. 第53回日本ウイルス学会 (2005.11.20-22. 横浜)

4) 清水佐紀、駒野淳、浦野恵美子、二橋悠子、宮内浩典、磯貝まや、松田善衛、納富香子、小野木利成、武部豊、山本直樹. (2005). HIV-1 感染細胞における Tat を介した P-TEFb の活性化を抑制する細胞内因子の解析. 第53回日本ウイルス学会 (2005.11.20-22. 横浜)

5) 武部豊、納富香子、小野木利成、西郷薫、内藤雄樹. (2005). バイオインフォマティクスの手法に基づいた抗 HIV-1 至適汎用 siRNA の設計とそれによる HIV-1 増殖阻害効果の評価. 第53回日本ウイルス学会 (2005.11.20

—22. 横浜)

6) 武部豊、Xi Xiao-Jie、Ma Yanling、Xia Xueshan. (2005). HIV-1 遺伝子組換えにおけるサブタイプ C LTR の selective advantage (選択優位性). 第19回日本エイズ学会 (2005.12.1-3. 熊本)

7) 駒野淳、二橋悠子、浦野恵美子、青木徹、貝の瀬由成、宮内浩典、磯貝まや、松田善衛、山本直樹. (2005). Cell surface expression of CXCR4 is regulated by a non-tyrosine-based diacidic motif within the cytoplasmic tail. 第19回日本エイズ学会 (2005.12.1-3. 熊本)

8) 清水佐紀、駒野淳、浦野恵美子、二橋悠子、宮内浩典、磯貝まや、松田善衛、納富香子、小野木利成、武部豊、山本直樹. (2005). T-type cyclin/ CDK9 複合体の活性化を抑制する細胞因子による HIV-1 複合制御. 第19回日本エイズ学会 (2005.12.1-3. 熊本)

9) 武部豊、横田侑子、小泉寛和、Xi Xiao-Jie、滝口雅文、岡慎一. (2005). HIV-1 スーパー感染とウイルスの個体内進化に関する解析. 第19回日本エイズ学会 (2005.12.1-3. 熊本)

10) Tee Kok-Keng, Li Xiao-Jie, Nohtomi Kyouko, Pon Chee Keong, Kamarulzaman Adeeba, Ng Kee Peng, Takebe Yutaka. (2005). Emergence of new HIV-1 recombinant forms in Malaysia. 第19回日本エイズ学会 (2005.12.1-3. 熊本)

11) 近藤真規子、須藤弘二、田中里恵、嶋貴子、足立拓也、設楽裕子、岩室紳也、向出雅一、武

部豊、加藤真吾、今井光信. (2005). 各種サブタイプに対応できる real-time PCR 法による HIV-1 プロウイルスの定量法の検討. 第19回日本エイズ学会 (2005.12.1-3. 熊本)

12) Yutaka Takebe. (2005). Precise mapping of recombination breakpoints of HIV-1 recombinants in Asia: Insight into *in vivo* recombination mechanism. The 12th International Workshop on HIV Dynamics and Evolution (April 23-26, 2005 Cleveland, Ohio, USA).

13) Yutaka Takebe. (2005). Selective advantage of LTR of HIV-1 subtype C over that of subtype B in *in vivo* recombination event. 6th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance (November 13-16, 2005 Chantilly, Virginia, USA).

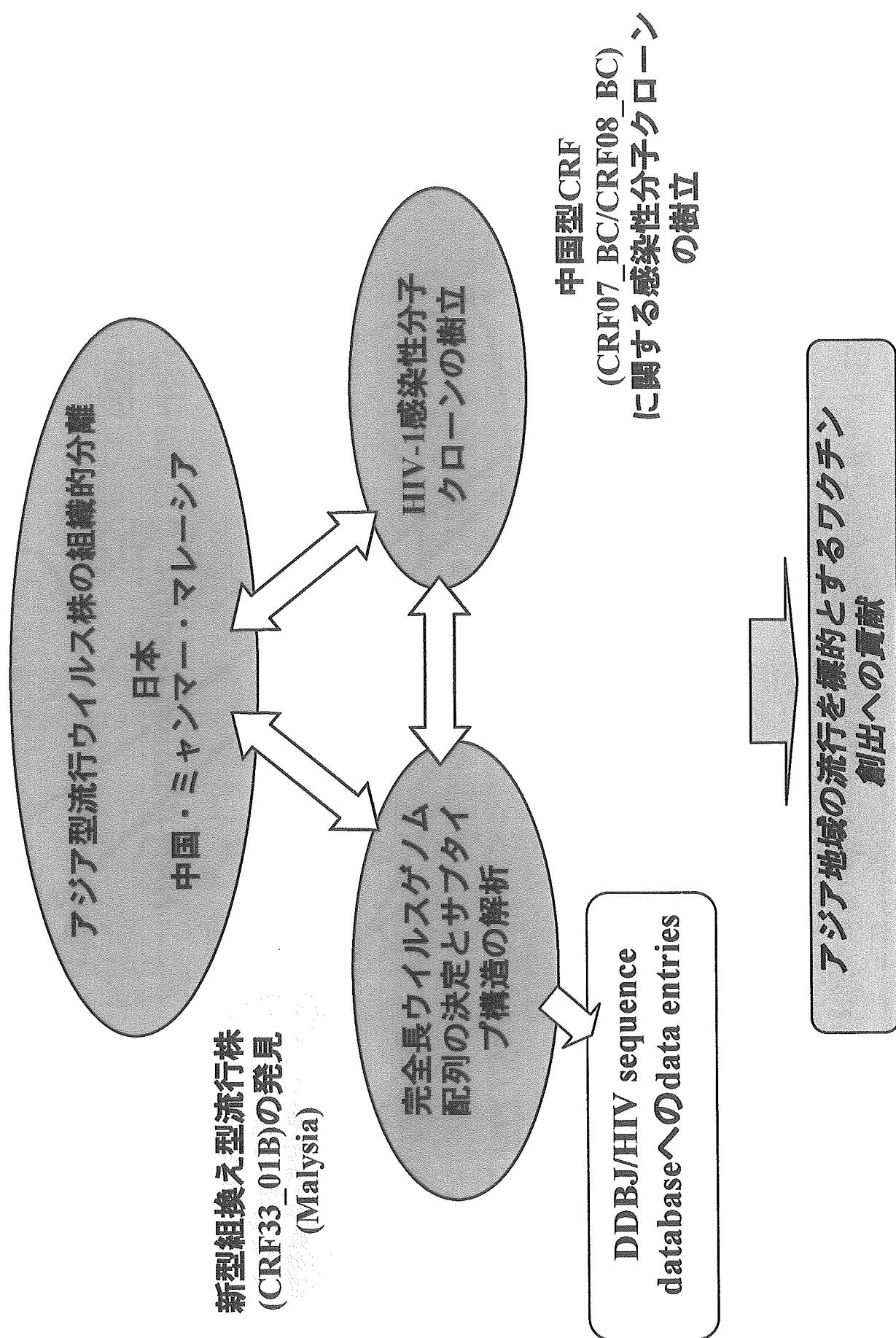
14) Yutaka Takebe. (2006). Selective advantage of HIV-1 subtype C LTR in inter-subtype recombination *in vivo*. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. (February 5-8, 2006 Denver, Co, USA).

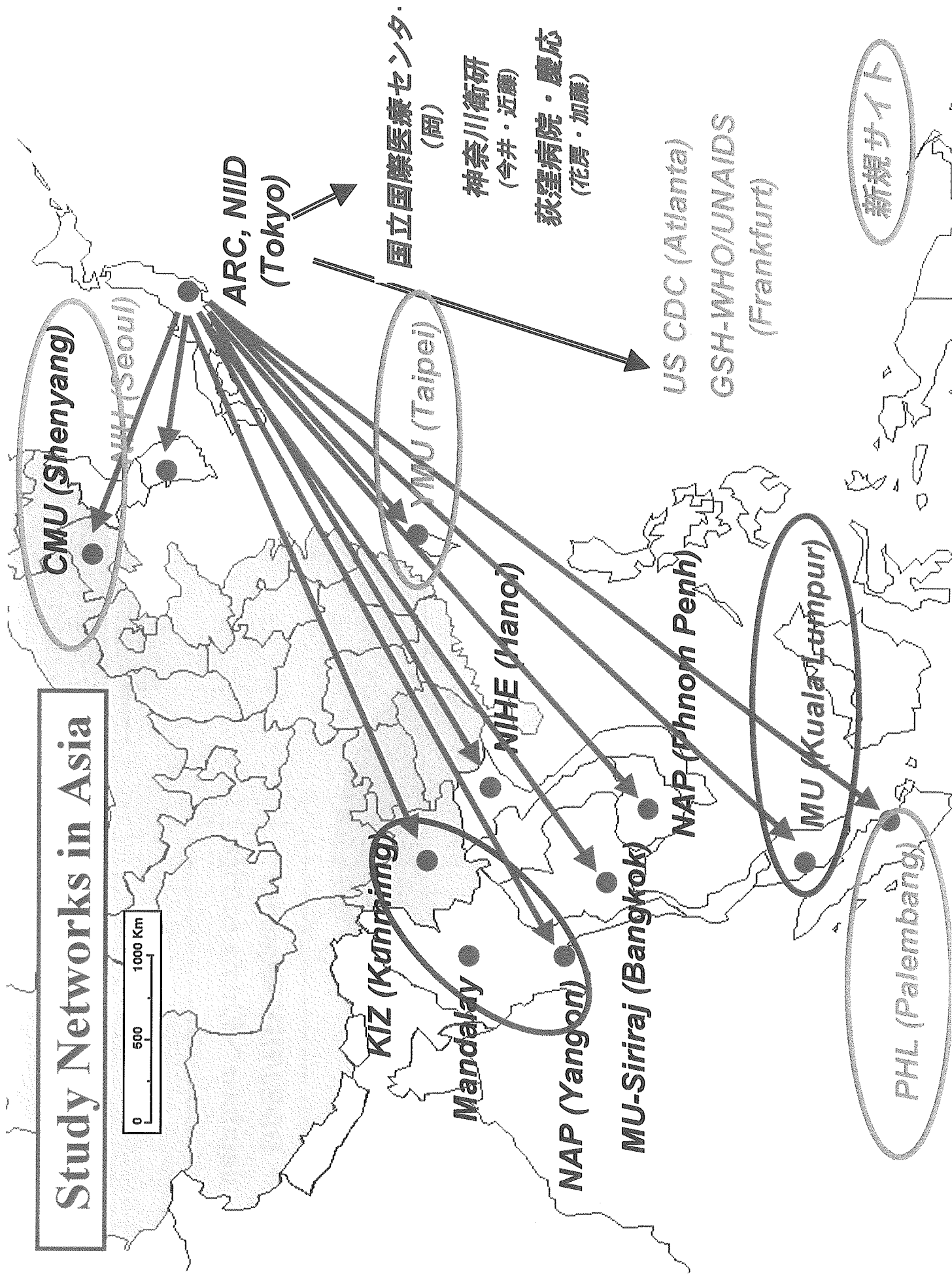
15) Yutaka Takebe. (2006). Inter-CRF recombinants (ICRs): New class of HIV-1 recombinants and its epidemiological implications. (February 5-8, 2006 Denver, Co, USA).

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1) 「RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の設計方法、RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の設計装置、RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の作製方法、RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の設計プログラム、及び RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物」 (特願 2005-55064、平成 17 年 2 月 28 日出願)

アジアにおけるエイズ流行制圧を目的とするワクチンおよび他の新規治療技術 開発へ向けた分子疫学研究：研究のOutlineと本年度の成果





新規の CCR5 阻害剤 AK602 (AVC) の作用機序解明と構造学的解析
分担研究者 満屋 裕明 熊本大学医学薬学研究部 教授

研究要旨：AIDS に対する化学療法では薬剤耐性 HIV に対する治療法の確立が最も重要な問題の一つとなって久しい。本研究では宿主（細胞側）因子であるケモカインレセプター(CCR5) に作用し既存の抗 HIV 剤に耐性のウイルスに対しても活性を示す AK602/aplaviroc (AVC) の開発を進めると共に AVC の作用機序解析を進め、CCR5 を介したケモカイン本来の生理作用に影響を与えない新しい抗 HIV 剤の開発を目指した。平成 16 年度までに AVC が多剤耐性株を含む R5-HIV-1 の感染・増殖を試験管内で強力に抑制、動物モデル (NOG-SCID マウス) の系でも強力な抗ウイルス活性を発揮する一方で、ケモカイン (RANTES) の CCR5 への結合にはわずかしかな影響を与えず、RANTES の CCR5 を介した生理的作用を部分的にしか阻害しないこと、AVC のこのような特徴を構造学的に解析するために CCR5 と CCR5 阻害剤の結合モデルの構築を進めていることを報告した。これらの研究から我々は AVC が CCR5 の細胞外ドメインと上部膜貫通ドメインで形成される疎水性ポケットに結合し、その結合様式は他の構造を有する CCR5 阻害剤 (SCH-C, TAK-779) といくつかの点で異なっていることを見出した。更に CCR5 の AVC 結合ポケットの一部 (第 4-5 膜貫通ドメイン近傍) に HIV 感染に重要でありながら、ケモカイン作用へはほとんど影響しない領域があることを明らかにし、HIV 感染のみに重要な構造をターゲットとした低分子化合物をデザインすることで、ケモカインレセプターの生理的作用を阻害しない抗 HIV 薬のモデリングが可能である事を示した。

A. 研究目的

AIDS に対する HAART 療法（多剤併用療法）を主とした化学療法は一定の成果を挙げているが、副作用、薬剤耐性変異株の出現、アドヒアランスの低下などクリアすべき課題が山積している。分担研究者（満屋）は最近、多剤耐性 HIV にも有効な抗 HIV 薬開発の一環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の研究を進めてきたが、本研究では *in vitro/in vivo* で強力な活性を有する AK602/GW873140/aplaviroc (AVC) 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 CCR5 の相互作用などの基礎的研究を進め、ケモカインを介した免疫系など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た。

B. 研究方法

1) 抗 HIV 化合物の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系を用いた。

2) CCR5 阻害剤の ^3H ラベル体作成および複数の変異 CCR5 発現細胞株を作成、更に ^{125}I ラベル化されたケモカイン (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の検討を行なった。

3) ウシロドプシン結晶構造を基に CCR5 の構造学的解析を行なった。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基に 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た。さらに医学部・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、試験を開始した。