

1. Shibata, J., Yoshimura, K., Honda A., Murakami, T., Koito, A., and Matsushita S.: A Role of Mutations in Non-V3 Envelope Regions for Escape from a Broad Neutralizing Anti-V3 Monoclonal Antibody, KD-247, during *in vitro* Selection. 13<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Denver, USA, Feb.4-9, 2006.
2. Yoshimura, K., Shibata, J., Honda A., Murakami, T., Mitsuya, H., Koito, A., and Matsushita S.: Resistance Profile of A Novel Broadly Neutralizing Anti-HIV Monoclonal Antibody, KD-247 That Has Favorable Synergism with Anti-CCR5 Inhibitors *In Vitro*. 13<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Denver, USA, Feb.4-9, 2006.
3. Matsushita S., Honda A., Shibata, J., Kimura T., Ikeda, T., Koito, A., Yoshimura, K.: HIV-1 proviral DNA dynamics in patients with long-term successful HAART. 2<sup>nd</sup> International Workshop on HIV Persistence during Therapy. 12. 6-9, 2005, Saint Martin, FWI.
4. Matsushita S., Shibata, J., Yoshimura, K., Maeda, Y., Murakami, T., Atsushi Koito, Honda, M., Mitsuya, H., Eda, Y.: Development of broadly reactive neutralizing monoclonal antibody KD247: implication for passive immunotherapy. The cooperative research project on clinical and epidemiological studies of emerging and re-emerging infectious diseases, Aso, Japan, Sep. 15-16, 2005.
5. Yoshimura K., Shibata, J., Ikeda, T., Honda A., Koito, A., Matsushita, S.: HIV-1 proviral DNA dynamics in patients with long-term successful HAART. International Symposium, The Cooperative research Project on Clinical and Epidemiological Studies of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, 2005. 9.15-16. Kumamoto.
6. Shibata, J., Yoshimura K., Maeda, Y., Murakami, T., Eda, Y., Koito, A., Matsushita, S.: In vitro induction of human immunodeficiency virus type 1 variants resistant to a novel broad neutralizing anti-HIV monoclonal antibody, KD-247. International Symposium, The Cooperative research Project on Clinical and Epidemiological Studies of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, 2005. 9.15-16. Kumamoto.
7. Ikeda, T., Shibata, J., Honda A., Yoshimura K., Koito, A., Matsushita, S.: Relationship of residual HIV-1 and the integration sites in patients on prolonged and effective HAART. International Symposium, The Cooperative research Project on Clinical and Epidemiological Studies of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, 2005. 9.15-16. Kumamoto.
8. Yoshimura K., Honda A., Kenai, A., Shibata, J., Koito, A., Matsushita, S.: Proviral DNA and Turnover Levels in Aviremic Long-Term Non-Progressors (LTNPs); A Temporary Goal for Patients under HAART. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. 2005. 7. 1-5. Kobe.

9. Matsushita, S., Honda A., Kenai, A., Shibata, J., Koito, A., Yoshimura K.: Long-Term Follow-Up Study for the Change of the Reservoir for HIV-1 on Highly Active Antiretroviral Therapy. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. 2005. 7. 1-5. Kobe.
7. 柴田潤二、吉村和久、小糸厚、松下修三：ヒト免疫不全ウイルス1型 gp120 の C3 領域変異による抗 V3 中和抗体に対する中和抵抗性の獲得. 第 53 回日本ウイルス学会総会、横浜、2005.11.20-22.
8. 柴田潤二、吉村和久、前田洋助、村上利夫、江田康幸、小糸厚、松下修三：広範囲 HIV-1 単クローン抗体の *in vitro* 逃避ウイルスの誘導と解析. 第 6 回熊本エイズセミナー. 2005.9.15. 熊本.

(国内学会)

1. 松下修三：シンポジウム-HIV/AIDS の臨床における最近の問題点-イントロダクション-. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005.12.1-3. 熊本.
2. 吉村和久、柴田潤二、池田輝政、小糸厚、松下修三：HAART により長期間ウイルスが抑制された症例の pDNA の推移. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005.12.1-3. 熊本.
3. 柴田潤二、吉村和久、前田洋助、村上俊夫、小糸厚、松下修三：広範囲 HIV-1 中和単クローン抗体の *in vitro* 逃避ウイルスの誘導と解析. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005.12.1-3. 熊本.
4. 池田輝政、柴田潤二、吉村和久、小糸厚、松下修三：長期間 HAART 有効症例における残存 HIV と integration site の関連性. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005.12.1-3. 熊本.
5. 松下修三：A broadly reactive neutralizing antibody and evolution of escape mutants *in vitro*. 第 8 回白馬シンポジウム in 鹿児島-エイズ治療の最前線-. 2005.11.3-4. 鹿児島.
6. 柴田潤二、吉村和久、前田洋助、村上利夫、江田康幸、小糸厚、松下修三：広範囲 HIV-1 単クローン抗体の *in vitro* 逃避ウイルスの誘導と解析. 第 8 回白馬シンポジウム in 鹿児島-エイズ治療の最前線-. 2005.11.3-4. 鹿児島.

知的所有権の出願・取得状況：  
特になし

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

エイズ発症阻止に関する研究

分担研究者 竹森 利忠 国立感染症研究所免疫部部長  
研究協力者 阿戸 学 国立感染症研究所免疫部研究員  
高橋 宜聖 国立感染症研究所免疫部主任研究官  
橋本 修一 国立感染症研究所免疫部研究員  
加地 友弘 国立感染症研究所免疫部研究員

研究要旨

OVA 特異的 T 細胞レセプターを発現し、コクサキー・アデノウイルス受容体を共発現した double Tg マウスより精製した CD4<sup>+</sup> T 細胞に、nef 組込みアデノウイルスを感染させ、nef 発現による T 細胞の機能と性状を解析した。この結果、Nef 発現により T 細胞の抗原刺激に対する反応が低下し、さらに生体内での抗原刺激への応答性とダイナミクスの異常が誘導される可能性を明らかにした。更に、nef 発現により CD4<sup>+</sup> T 細胞による B 細胞へのヘルパー機能が抑制される可能性が示唆された。この際 CD4 抑制機能を失った nef を発現すると抑制効果は減弱することから、nef 発現による T 細胞機能異常の一部は CD4 発現抑制に影響されることが示唆された。

A. 研究目的

HIVnef はウイルス感染後の病態発症の主要要因の一つとして考えられている。これまで主として T 細胞株を用いた解析から、HIVnef 発現により CD4 と MHC class I 分子の発現抑制、およびウイルス産生増強が報告され、HIVnef は感染細胞の免疫系からの逃避とウイルス産生増加に関わることが予想されていた。これらの結果はがん化された細胞を用いた実験結果であり、HIV 感染による病原性誘導の機序を推論することには無理が生じる。一方、nef トランスジェニック(Tg)の免疫学的解析により、ウイルス粒子産生なしに CD4<sup>+</sup> T 細胞減少をはじめとする AIDS 様症状が誘導されて死亡する可能性が示唆され、nef 分子自身が in vivo

で病原性発症に関与することが示唆された。しかしこの系では nef の発現が幼若 T 細胞より発現され、通常の HIV 感染の状態とは大きく異なる。我々は成熟 T 細胞により構築される生体の免疫系に与える nef の影響を in vivo で検討することを目的に、nef 組込みアデノウイルスを用いて nef 発現による成熟 CD4<sup>+</sup> T 細胞の機能変化を検討するマウスモデルシステムを開発した。この系を用い HIV 感染において成熟 T 細胞で発現する HIVnef が生体での免疫不全発症にどのように関与するかを明らかにし、免疫不全発症抑制の対策を考慮する。

B. 研究方法

1. Nef 遺伝子組み込みアデノウイルスベ

クター作成:Tong-Chen らの提供する A Simplified System for generation of Recombinant Adenoviruses を用いた。アデノウイルス作成過程では、E1E3 遺伝子を持つ野生株の出現が問題になるが、E1E3 非発現 HeLa 細胞を用いて野生株の出現がないことを確認した。

2. CD4<sup>+</sup> T 細胞の調製: CD4<sup>+</sup> T 細胞は DO11.10 TCR transgenic(Tg)マウスと、Coxsackie/Adenovirus Receptor(CAR)Tg マウスをかけ合わせた double Tg マウスの脾臓、リンパ節より、磁気ビーズを用いたカラム分離法によりネガティブに調製した。
3. ウイルス感染と nef 発現細胞の分離: 精製した CD4<sup>+</sup> T 細胞を 24 穴プレートにまき、IL-7 存在下にて nef 組込みアデノウイルス、CD4 発現抑制機能を欠いた nef 発現アデノウイルス、およびコントロールアデノウイルスを MOI 10 にて感染させた。その後 2 日間培養し、EGFP と CD4 の発現量を指標に FACS を用いて感染細胞 (nef 発現細胞と nef 非発現細胞) とに分離した。
4. AICD assay: 精製した CD4<sup>+</sup>T 細胞を抗 CD3 抗体で固相化した 96 穴プレート上で 2 日間培養して増殖させ、細胞を回収した後、別な抗 CD3 抗体固相化プレートでさらに 3 日間培養して、CD4<sup>+</sup>T 細胞に activation-induced cell death (AICD) を誘導し、アポトーシスを TUNEL 法を用いて共焦点顕微鏡で検出した。
5. T 細胞遊走試験: 精製した CD4<sup>+</sup>T 細胞 ( $5 \times 10^5$ ) をトランスウェルの上室へ、ケモカイン CXCL12 または CCL19 を含む培地を下室に入れ 1 時間インキュベートし、上室から下室に遊走してきた細

胞を回収して FACS で解析することにより、それぞれのケモカインに対する遊走能を検討した。

6. 細胞増殖試験: 新たに調整した正常マウスの  $\gamma$  線照射脾臓細胞に OVA<sub>323-339</sub> ペプチドをパルスし、分離した nef 発現、nef 非発現細胞と共培養を行い、経日的に [<sup>3</sup>H] Thymidine の取込みをシンチレーションカウンターにて測定した。
7. 抗原提示部への移動測定: 分離した nef 発現、nef 非発現細胞を同系マウスの BALB/c に  $2 \times 10^6$  個尾静脈より移入し、移入翌日に OVA を完全フロイントアジュバントと共に背部皮下に免疫した。免疫後 5 日目に所属リンパ節に集積した移入細胞数を FACS にて測定した。
8. Nef 発現 T 細胞のヘルパー機能の解析: 精製した GFP 陽性 nef 発現、非発現 T 細胞 ( $3 \times 10^4$ ) と NP-CG B 細胞 ( $3 \times 10^6$ ) を SCID マウスに移入後感作 NP-OVA で免疫した。免疫後 7 日目に血中の抗 NP-IgG1 抗体を ELISA により測定した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は国立感染症研究所動物実験施設の SPF 区で維持飼育を行ない、倫理面も含めて、国立感染症研究所動物実験委員会の審査を受け、その承認を得てから開始した。

### C. 研究結果

精製 CD4<sup>+</sup> T 細胞に nef 組込みアデノウイルス (Ad-nef)、CD4 発現抑制機能を欠いた nef 発現アデノウイルス (Ad-LLAA 及び Ad-WLAA)、およびコントロールアデノウイルスを MOI 10 の条件下で IL-7 存在下において感染させた (図 1)。感染 2 日後、EGFP と CD4 の発現量を指標に FACS を用いて感

染細胞 (nef 発現細胞と nef 非発現細胞) に分離した。

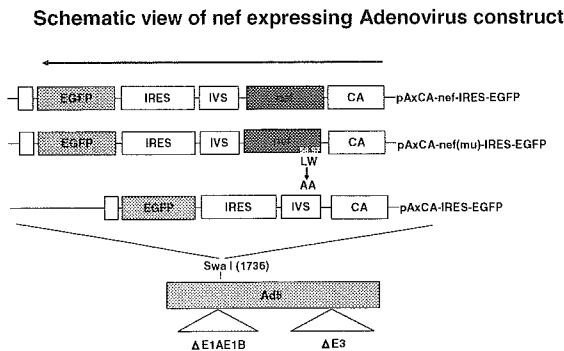


図1

Nef 発現 T 細胞の抗原刺激による免疫反応を検討する目的で、新たに調整した正常マウスのγ線照射脾臓細胞に OVA<sub>323-339</sub> ペプチドを 0.1μM の濃度でパルスし、親株 nef 及び CD4 発現抑制機能を欠いた nef 変異体発現細胞と共培養を行った。刺激後の細胞増殖を [<sup>3</sup>H] Thymidine の取込みを指標に測定すると、いずれも経日的な増殖が見られたが、nef 発現細胞は nef 非発現細胞に比べてその増殖が有意に遅延することが明らかとなった。Nef 発現細胞で認められた T 細胞反応の低下が、活性化後の細胞死亢進によるという可能性を検討するために、T 細胞に AICD を誘導し、アポトーシスの割合を解析した。その結果、Nef 発現細胞と非 Nef 発現細胞の間に有意な差は認められず、Nef 発現細胞で認められた T 細胞応答の低下は、Nef による T 細胞機能修飾が原因で起こることが示唆された (図2)。

AICD with anti-CD3 stimulation of sorted CD4<sup>+</sup> T cells

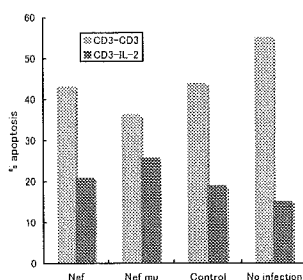


図2 CD4<sup>+</sup>T細胞にAICDを誘導した際のアポトーシスの割合

Nef 発現 T 細胞の生体内での機能を確認する目的で、同系マウスに nef 発現細胞あるいは nef 非発現細胞を移入し、OVA/CFA で免疫後の所属リンパ節への移入細胞数の集積を測定した。合計 3 回の実験を行った結果、nef 発現細胞は nef 非発現細胞に比べて所属リンパ節への集積が著しく減弱することが明らかとなった (図 3)。この効果 CD4 抑制機能を失った変異体を発現する T 細胞においても同等であった。以上の結果は nef 発現により抗原刺激 T 細胞のリンパ節へのホーミングが阻害されることが明らかとなった。

Accumulation of antigen specific CD4<sup>+</sup> T cells in draining LNs

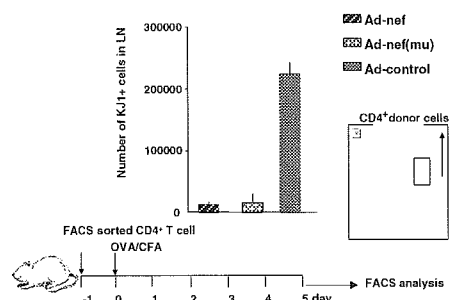


図3 BALB/c mice were injected i.v. with  $2 \times 10^6$  nef or nef DO11.10 cells and 24 h later were injected s.c. with 0.2 mg of LPS-free OVA with CFA on the back. The cell number ( $\pm$ SD) of CD4<sup>+</sup>KJ1-26<sup>+</sup> T cells in the draining lymph nodes (LNs) was measured by FACS at 5 day after OVA injection.

Nef 発現細胞のリンパ節への集積の異常が T 細胞特異的ケモカインに対する反応性の低下によるか否かを検討するために、in vitro 遊走試験を行った。その結果、Nef 発現細胞は Nef 非発現細胞に比べて、CXCL12 および CCL19 に対する遊走能の低下を認めた。しかし、これらのケモカインに対するレセプター発現の低下は認められず、またこの効果は、CD4 発現抑制に影響されなかった (図 4)。以上の結果より、Nef 発現 T 細胞において、末梢 T 細胞がリンパ組織へ遊走する為に必要なケモカインに対する反応性が低下していることが判明した。

#### Effect of nef expression on naive CD4<sup>+</sup> T cell chemotaxis

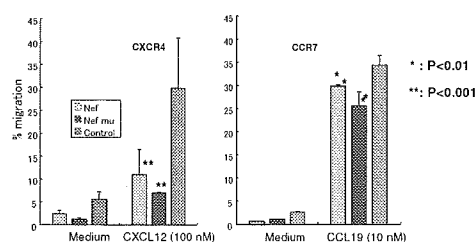


図4 T細胞遊走能に対するNef発現の影響

更に nef 発現 T 細胞の機能変化を明らかにするために、NP-CG 感作 B 細胞とともに nef 発現細胞、nef 変異体発現細胞、あるいは nef 非発現細胞を免疫不全 SCID マウスに移入し、NP-OVA 免疫で惹起される NP に対する抗体産生応答を測定した (図 5)。その結果、nef 発現細胞では nef 非発現細胞と比べて抗体産生のヘルパー活性が 20 分の 1 以下に低下していることが判明した。さらに、CD4 発現抑制機能を欠いた nef 変異体でも nef 非発現細胞と比べ抗体産生が約 4 分の 1 に低下していることから、ヘルパー機能低下は、nef の CD4 発現抑制機能に一部依存するものの、大部分は CD4 発現抑制機能に非依存であることが明らかとなった。

#### Effect of Nef expression on helper function of CD4 T cells

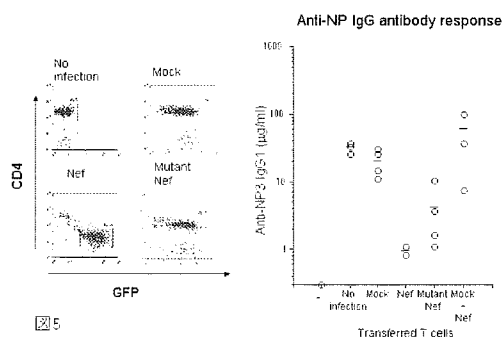


図5

以上の結果より、成熟 T 細胞での nef 発現は、T 細胞株、生体内での細胞動態と免疫反応に大きく影響を及ぼす可能性が示唆された。

#### D. 考察

HIV ウイルス感染初期に誘導される免疫異常や免疫不全に nef の発現が重要な役割を果たすことはこれまでに多くの試験管内の実験から推測されている。Nef の発現により CD4 抗原、MHC class I の発現低下をはじめ、細胞内シグナル分子との結合によりアポトーシス阻害の誘導等が報告されている。しかし nef が個体レベルでどのような機序で免疫不全に関わるか不明であった。一方 nef トランスジェニックマウスにおいて、AIDS 様病態の発症に伴う免疫反応異常が認められるという報告があるが、nef が胸腺内分化における T 細胞から発現しているため、これらの結果が、胸腺内 T 細胞分化異常を反映するかあるいは免疫反応時における T 細胞機能異常を反映するか明らかでない。

本研究では我々が確立した、nef 組み込みアデノウイルスの末梢成熟 T 細胞への感染モデル系を用いて、nef 発現により成熟 T 細胞の抗原刺激に対する反応の減弱、T 細胞の CXCL12 および CCL19 に対する遊走能の低下、さらに生体内における B 細胞へのヘルパー機能とダイナミクス異常が誘導される可能性を示した。これらの T 細胞免疫応答抑制が、細胞死やケモカインレセプター発現の低下を伴わないことから、nef が T 細胞レセプターやケモカインレセプターの細胞内シグナルを修飾しその結果 T 細胞免疫不全を誘導した可能性が考えられる。今後 nef 発現による T 細胞機能障害に関する分子生物学的な解析が必要である。

#### E. 結論

マウスモデルシステムを用い、成熟 T 細

胞への nef 発現により T 細胞機能発現が低下することが明らかとなった。すなわち抗原提示細胞を介した抗原刺激に依存する試験管内での細胞増殖の減弱、さらに抗原刺激後に所属リンパ節に集積する活性 T 細胞数の減少が観察された。更に nef 発現により T 細胞のヘルパー機能が阻害された。これらの結果は、nef 発現が CD4<sup>+</sup> T 細胞の生体内組織における抗原特異的免疫応答を抑制し、HIV 感染に伴う免疫不全の要因の一つであることが強く推察された。

F. 健康危険情報  
なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Ohnishi, K., Sakaguchi, M., Kaji, T., Akagawa, K., Taniyama, T., K., Kasai, M., Yokota-Tsunetsugu, Y., Ohshima, M., Yamamoto, K., Takasuka, N., Hashimoto, S.-I., Ato, M., Fujii, H., Takahashi, Y., Morikawa, S., Ishii, K., Sata, T., Takagi, H., Itamura, S., Odagiri, T., Miyamura, T., Kurane, I., Tashiro, M., Kurata, T., Yoshikura, H. and Takemori, T. Immunological detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by monoclonal antibodies. *Jpn. J. Infect. Dis.* 58:88-94, 2005
- (2) Inamine, A., Takahashi, Y., Tokuhisa, T., Miyae K., Takemori, T. and Abe, R. Two waves of memory B cell generation in the primary immune response. *Int. Immunol.* 17:581-589, 2005
- (3) Takahashi, Y., Inamine A., Hashimoto, S.-I., Yoshioka, E., Kojima, N., Abe, R. and Takemori T. A unique role of Ras in

memory B cell response. *Immunity* 23:127-138, 2005

- (4) Honnma, K., Udono, H., Ohkusu-Tsukada, K., Khono, T., Yamamoto, K., Ogawa, A., Takemori, T. Kumatori, A., Suzuki, S., Matsuyama, T. and Yui, K. Interferon regulatory factor-4 negatively regulates the product of proinflammatory cytokines by macrophages in response to LPS. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102:16001-16006, 2005
- (5) Tsunetsugu-Yokota, Y., Ohnishi, K., and Takemori T. Serological diagnosis for SARS Corona virus. *Review Medical Virology in press*

### 2. 学会発表

[国際学会発表]

- (1) Takemori, T. "Ras is essential for memory B cell survival (招待講演)" 15<sup>th</sup> Germinal centre conference Potsdam, Germany, April, 2005
- (2) Takemori, T. "Unique role of the Ras in memory B cell response (招待講演)" Symposium on regulation of immune diversity and surveillance. Kyoto, March, 2005

[国内学会発表]

- (第35回日本免疫学会総会、横浜、2005年12月)
- (1) Takemori, T., Takahashi, Y., Kaji, T., Hashimoto, S.-I., and Kuraoka, M. "Memory B cells express a set of unique genes, associated with anti-apoptotic activity" (Symposia: from germinal center to memory: affinity selection and cell fate decisions) (シンポジスト：口演)
  - (2) 加地友弘, 高橋宜聖, 竹森利忠 「Survival

of motor neuron(SMN)蛋白質による抗酸化作用抵抗性の賦与」(口演)

- (3) 高橋宜聖、加地友弘、稲嶺絢子、橋本修一、広瀬幸子、竹森利忠「マウス記憶B細胞に発現増強するアポトーシス抑制分子の作用機序」(口演)
- (4) 窪田真澄、高橋宜聖、竹森利忠、大西和夫「B細胞分化の過程で発現するBILL-cadherin は二次免疫応答における抗体産生細胞の分化に関与する」(口演)
- (5) 藤猪英樹、阿戸学、高橋宜聖、橋本修一、中山俊憲、谷口克、小安重夫、竹森利忠「HIVnef 発現により誘導される成熟T細胞の機能低下」(ポスター)
- (6) 山本紀一、阿戸学、藤猪英樹、高橋宜聖、橋本修一、加地友弘、竹森利忠「不活化インフルエンザウイルスに含まれる白血球数減少活性の刺激」(ポスター)

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし



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

「HIV の感染過程や病原性に関わる宿主因子の解析とその抑制に関する研究」

小柳義夫 京都大学ウイルス研究所・エイズ研究施設感染病態研究領域教授

分担研究者 小柳 義夫 京都大学ウイルス研究所 教授  
共同研究者 青木 淳 東北大学医学系研究科 大学院生  
共同研究者 芳田 剛 京都大学医学研究科 大学院生

研究要旨

研究要旨

cDNA ライブラリ発現レンチウイルスベクターを用いた human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) 感染抵抗性付与遺伝子の探索研究から、4 回膜貫通蛋白質のひとつである CD63 分子の N 末端細胞外ドメインを欠損する変異体蛋白質 (CD63dN) は CXCR4 の細胞膜へ移行阻害活性があり、その結果、HIV の感染を強力に抑制していることが判明した。この CXCR4 に対する CD63 分子のダウンレギュレーション活性はこの分子特異的な活性であった。一方、CD63 分子そのものとさらに C 末端の lysosomal sorting motif を欠損する変異体 (CD63dL) は、細胞内において HIV Env 蛋白質と結合し、Env 蛋白質のウイルス粒子内への取り込みを阻害し、細胞外に産生されるウイルス粒子の感染性を強力に抑制することが判明した。これらの事実は CD63 という細胞性因子が HIV-1 感染過程に関わるという新たな知見であり、新たなエイズ発症阻止の治療法開発への手がかりとなることが期待される。

A. 研究目的

HIV 感染を阻害し、エイズの発症を抑制する基盤になる技術を開発し、新規のエイズ治療法として創生することを目的とする。HIV 感染増殖はウイルス性因子だけによって成立しているのではなく、種々の細胞性因子が関与している。それらウイルス感染関連因子として抑制的に働くものがあることはよく知られている。そこで細胞性因子として新たにウイルス感染を抑制する因子群の単離を試みた結果、cDNA ライブラリ発現レンチウイルスベクターを利用して、HIV 感染抵抗性遺伝子探索をはじめた。その結果、細胞内エンドゾームに局在する 4 回膜貫通蛋白質群のひとつである CD63 分子は HIV 感染を抑制することがわかった。そこで、その感染抑制メカニズムの解明を目的とした。

B. 研究方法

細胞培養

ヒト胎児腎臓由来の 293T 細胞と HeLa 細胞にレトロウイルスベクターにより CD4 と CCR5 蛋白質が強制発現されている Magic5A 細胞は、10% ウシ胎仔血清 (FCS) を含有する D-MEM にて培養を行った。

CD63 全長および各欠損変異体発現レンチウイルスベクター DNA の作製

ヒト白血球の cDNA ライブラリ (Invitrogen, Carlsbad, CA) より、完全長のヒト CD63cDNA をクローニングし、CMV プロモーター発現プラスミドである pCMV-SPORT6 (Invitrogen) の *Eco*R I と *Xba* I 部位に挿入し、CD63 発現プラスミド DNA (pCD63) を作製した。pCD63 から N 末端細胞外ドメインを欠損させた CD63 遺伝子 (CD63dN) を pCMV-SPORT6 に挿入した発現プラスミド pCD63dN を作製した。pCD63 にオリゴヌクレオチド (5' → 3')



MA) を、二次抗体として Horse radish peroxidase 標識、抗ラット IgG ロバ抗体 (Rockland, Gilbertsville, PA)、あるいは抗ヤギ IgG ロバ抗体 (Chemicon, Temecula, CA) を反応させ、HIV Env ならびに HIV Gag を検出した。IP-ウエスタンブロットティングには、細胞を RIPA buffer により溶解し、抗 Flag 抗体 (M2; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) と protein G-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) を用いて免疫沈降させ、泳動後、PVDF メンブランに蛋白質をトランスファーした。一次抗体として抗 Env ラット mAb 抗体、二次抗体の反応以降上述の方法に従った。

#### 蛍光抗体法

細胞膜表面上の CXCR4 分子を検出するために、遺伝子導入された生細胞に抗 CXCR4 ラット mAb(A-145) を 4℃ にて反応させ、4% paraformaldehyde (PFA) にて固定した。二次抗体として FITC 標識抗ラットヤギ IgG 抗体 (Zymed, South San Francisco, CA) を用い、共焦点顕微鏡 (Leica DMIRE) にて観察を行った。Magic5A 細胞に pFlagCD63wt および pFlagCD63dN を上述した方法にてトランスフェクションした。24 時間後に 4% PFA を用いて 4℃ にて 20 分間固定した。3% bovine serum albumin (BSA) にて室温で 30 分間ブロック後、FITC 標識抗 Flag マウスモノクローナル抗体 (FITC-M2; Sigma) を一昼夜反応させた。洗浄後、Hoechst33342 を用いて核染色した。レーザー顕微鏡を用いて染色画像を得た。また、CD63 分子の検出ため抗 CD63 マウス mAb (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif.) を反応後、PE 標識の抗マウス IgG ヤギ抗体 (American Qualex Antibodies) を用いて検出した。

#### ウイルスの調整

293T 細胞に HIV 発現プラスミド pNL4-3 をリン酸カルシウム法にて遺伝子導入した 3 日目の培養上清をフィルターでろ過したものをウイルス溶液として -80℃ に保存した。培養上清中のウイルス量は、p24<sup>gag</sup> 抗原量を酵素免疫測定法にて測定し (ZetoMetrix Corp.)、10% FCS を含む RPMI-1640 で培養したヒト MT-4 あるいは Magic5A 細胞に対して感染を行った。さらに、上清中のウイルスを超速心 (30,000RPM、4℃、1

時間) にて濃縮した。

#### (倫理面への配慮)

本研究においてはすべて樹立培養細胞を用いており、その使用にあたり細胞樹立者により倫理的配慮はなされている。実験動物は使用していない。

### C. 研究結果

#### 1. CD63 遺伝子による CXCR4 細胞内局在の変化

昨年、報告したヒト白血球由来 cDNA ライブラリ発現レンチウイルスベクターによる HIV 抵抗遺伝子のスクリーニング実験より、細胞内エンドゾームに局在する 4 回膜貫通蛋白質群のひとつである CD63 分子の N 末端欠損変異体蛋白質をコードする CD63dN 遺伝子を導入した細胞においては、細胞膜上の CXCR4 分子の発現は強力に抑制されており、その結果、HIV-1 のなかで CXCR4 をコレセプターとして用いる X4 ウイルスの感染が 100 分の 1 以上に抑制されることがわかった。そして、蛍光抗体法によりこの CD63dN 導入細胞内において CXCR4 分子は細胞質内に多く集積していることがわかっている。さらに、欠損変異体ではない CD63 そのものを遺伝子導入した細胞においても、その活性は CD63dN の活性と比較して弱いながら、CXCR4 の細胞膜上の発現は抑制されることも見出している。そこで、この CD63 分子による CXCR4 細胞膜上へ発現抑制はどのようなメカニズムによるものか検討する細胞生物学的実験を始めた。まず、レンチウイルスベクターによって CD63dN 遺伝子を導入された細胞とコントロールとして empty ベクターを導入した Magic5A 細胞では、昨年報告したようにフローサイトメトリーを用いた解析より、細胞膜上の CXCR4 の発現がほとんど検出できなかった。そこで、CXCR4 の mRNA 発現量、ならび細胞内の CXCR4 量を測定するために、RT-PCR 法、そして、抗 CXCR4 抗体によるウエスタンブロットティングの解析を行ったところ、empty ベクター導入細胞と CD63dN 遺伝子細胞間には、CXCR4 の mRNA ならびに蛋白質発現レベルは同等であり、さらに蛍光抗体法による解析から細胞内に CXCR4 の発現が確認された (結果示さず)。すなわち、CXCR4

蛋白質は細胞内に存在しているが、細胞膜上への移行が阻害されていることが示唆された。さらに、CD63dN 遺伝子導入 Magic5A 細胞内の CXCR4 の分布を細胞科学的に解明するために、細胞内小器官マーカー分子 (ER, ERGIC, cisGolgi, trans-Golgi, early endosome, late endosome) に対するそれぞれの抗体を用いて蛍光2重染色法を行った。その結果、CD63dN 導入細胞内の CXCR4 は ER, ERGIC, cisGolgi, trans-Golgi、そして、late endosome とは部分的に共局在はするものの、early endosome マーカーとはまったく共局在はしなかった (結果示さず)。この事実は CXCR4 が細胞内小器官の特に特定の小器官に貯留しているのではなく、細胞膜とそれに続く early endosome への細胞内移行が阻害されていることが強く示唆された。

## 2. CD63dN による CXCR4 分子の細胞膜上への移行阻害

細胞内における CXCR4 分子の移動を経時的に解析するために、CXCR4 のタグ分子として hrGFP あるいは EGFP 分子を付加し、共焦点顕微鏡にて生細胞内における挙動を解析した。その結果、図1に示すようにトランスフェクション後、7時間目まで追跡しても CXCR4 は細胞内に局在し、細胞膜上には移行しないことがわかった。また、抗体分子の endocytosis を阻害するために cytocharasin D を処理した細胞を FITC 標識抗 CXCR4 抗体存在下に2時間以上培養し、その蛍光色素の分布により生細胞における CXCR4 の細胞膜上における発現を検討すると、CD63dN 遺伝子導入細胞ではまったく CXCR4 が検出できず (結果示さず)、CD63dN 遺伝子導入により細胞膜上への CXCR4 の移行は少なくとも培養期間内において抑制されていることがわかった。次に、CXCR4 細胞膜上移行抑制効果が、CXCR4 のどのようなドメインを認識しているか明らかにするために、まず、この細胞膜移行抑制効果が、CD63dN 発現プラスミド DNA と CXCR4 発現プラスミド DNA のコトランスフェクションによっても再現できるか検討した。その結果、CD63dN 発現レンチウイルスベクターによって導入された細胞と同じ効果がこれらのプラスミドをコトランスフェクションした 293T 細胞においても見出されることがわか

った (結果示さず)。この実験系を用いて、CXCR4 のどのようなドメインがこの抑制効果に必要なか検討した。その結果、CXCR4 の細胞内 C 末端のドメイン (Ser<sup>347</sup>SerPheHisSerSer<sup>352</sup>) にそれぞれアミノ酸置換を挿入した発現プラスミドと CD63dN 発現プラスミドのコトランスフェクション後、CXCR4 の細胞膜上の発現を検討したところ、CXCR4 の Ser<sup>348</sup> と Ser<sup>352</sup> アミノ酸配列が重要であることがわかった (図2)。

## 3. HIV 粒子産生抑制メカニズムの解析

昨年報告したように、CD63 分子そのものと、さらに C 末端の lysosomal sorting motif を欠損する変異体 (CD63dL) 発現プラスミドはウイルス産生に対して影響を及ぼすことがわかってきた。まず、CD63、あるいは、CD63dL 発現ベクターを 293T 細胞に一過性に導入し、同時に感染性 HIV 粒子を放出させることができるプラスミド (pNL4-3) をコトランスフェクションし、その効果を判定した (図3A)。その結果、培養上清中の感染性 HIV-1 量が明らかに低下させられることがわかり、CD63 そのもの (CD63wt) とさらに CD63dL は、HIV のウイルス粒子放出を強力に抑制することが判明した。一方、CXCR4 発現を抑制した CD63dN にはウイルス粒子放出過程に対する影響は弱いことがわかった。CD63wt と CD63dL は遺伝子導入によりその局在がリソソーム膜に移行せず細胞質膜にとどまること (結果示さず)、そしてこの細胞質膜から放出されるウイルス粒子中の Env 蛋白質量がきわめて減少していること (図4A) より、ウイルス粒子中へ Env 蛋白質の取り込みの阻害効果があることが示唆された。そこで、Env 蛋白質と CD63 分子の細胞内における存在様式を明らかにするために、Flag 配列を付加した CD63wt 発現プラスミドと HIV-1 を産生するプラスミド (pNL4-3) を 293T 細胞にコトランスフェクションし、抗 Flag 抗体により免疫沈降した細胞分画に Env 蛋白質取り込まれているか IP-ウエスタンブロッティングを行った。図4B に示すように、CD63 は明らかに Env 蛋白質と結合していることが判明した。さらに、種々の CD63 分子変異体が同様に Env 蛋白質と結合しているか検討したところ、lysosomal sorting motif を欠損する変異

体(CD63dL)と N 末端細胞外領域を発現する CD63N は明らかに、Env 蛋白質と結合していること、一方、N 末端欠損変異体である CD63dN は結合しないことを見出し、N 末端領域にその結合ドメインがあることがわかった。

#### D. 考察

本研究では CD63 分子、特にその N 末端細胞外領域を欠損した蛋白質が CXCR4 の細胞膜表面への移行を阻害すること、そして、CD63 そのものは Env 蛋白質と細胞内において結合し、ウイルス粒子への取り込みを阻害する結果、ウイルス感染を抑制することを明らかにした。

$\alpha$  ケモカインである SDF-1 の受容体 CXCR4 については、そのリガンドにより刺激した際の動態についての報告は数多く存在する。SDF-1 のような外因性刺激を介したレセプターのダウンレギュレーション機構とは異なり、CD63 分子、ならびに、その変異体分子のような内因性蛋白質の発現によるケモカインレセプターの発現減少機構についての知見はほとんどない。

CXCR4 のリガンド刺激後のインターナリゼーションには、デグラデーションモチーフと呼ばれる C 末端の SSLKILSKGK アミノ酸が関与している。このアミノ酸配列中の 3 つのリシンがユビキチン化され、その結果リソソームへの移行が促され、その分子の破壊が誘導されると知られている。そして、Nedd4 ファミリーのユビキチンリガーゼ AIP4 が、細胞膜上の CXCR4 をユビキチン化し、その後、エンドソーム膜に局在するユビキチン結合蛋白質である Hrs と結合し、そして、Hrs のユビキチン化を誘導し、その結果 CXCR4 と Hrs そして AIP4 が複合体を形成して共局在することが報告されている。しかし、AIP4 による CXCR4 のユビキチン化は細胞膜上でおこなわれているが、CD63dN 導入細胞における CXCR4 は細胞膜に到達していないこと明らかになったことより、CD63dN 蛋白質による CXCR4 発現抑制メカニズムは細胞膜上の CXCR4 分子をユビキチン化しリソソームにおいて分解させる経路とは異なる経路と考えられる。むしろリボソームで生産された新規の CXCR4 蛋白質が細胞膜に到達せず細胞内

に蓄積し、リソソームにおいて破壊されているものと考えられる。CD63 自体が N 末端を欠損することにより、本来の CD63 蛋白質が局在する部位まで到達できない可能性も考えられる。そして、CD63dN 分子と CXCR4 分子が共局在し、さらに結合していること(結果示さず)を考え合わせると、新たに合成された CD63dN 蛋白質が新たにリボソームにて翻訳された CXCR4 蛋白質をおそらくトランスゴルジ体において結合し late endosome からリソソーム移行させていると考えられる。

ところで、この生体内において CD63dN のような欠損変異体が発現し、これまで述べてきたような役割を担っている可能性について検討すべきである。The European Bioinformatics Institute (EBI) の Alternative Splicing Database (ASD) Project では、いくつかの CD63 の選択的スプライシング産物が報告されており、CD63dN 遺伝子よりさらに N 末端側 11 アミノ酸と C 末端から 22 アミノ酸を欠失した mRNA がヒト細胞内において発現していることが報告されている (<http://www.ebi.ac.uk/asd/>)。今後、骨髄のような、分化の過程において CXCR4 を細胞膜表面上に強発現し一過性に消失する細胞に注目し、CD63dN 遺伝子、もしくは、それに近い CD63 の変異体が生体内に存在するかを検討する必要がある。

CD63dN 分子のきわめて強力な CXCR4 発現抑制活性について述べたと同時に、CD63 分子自身に Env 蛋白質との結合により Env 蛋白質のウイルス粒子内への取り込みを阻害し、その結果、感染性 HIV 産生抑制活性があることを示した(図 3A)。CD63 分子は後期エンドソーム、および、リソソームに局在することは知られているが、その機能の詳細は不明である。これまでにメラノーマ細胞へ CD63 分子の遺伝子導入を行うとその細胞の転移能を抑制するということが知られている。また、多くの癌細胞において CD63 蛋白質の発現が低下、ないし、減少しており、CD63 を発現していないヒトメラノーマ細胞に CD63 遺伝子を強制発現させると、癌細胞の移動と運動性が低下することや、導入した CD63 を安定的に発現するメラノーマ細胞をヌードマウスに接種すると、導入してない細胞を注射した場合よりも腹腔

内転移が減少したことも知られている。

CD63 について細胞内においてウイルス蛋白質ならびにレセプター分子の機能阻害活性があり、さらに、その分化過程に CD63 分子がウイルス関連分子の発現調節に関わる可能性についても、さらに研究を進める必要がある。

#### E. 結論

CD63 分子の発現により HIV の侵入、そして、粒子放出過程を強力に抑制しうることが判明した。これら遺伝子導入により、将来の遺伝子治療への応用の可能性だけでなく、分子機序の解明から新たなメカニズムに基づく治療薬の開発への端緒となることが考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- ① Nakata H., Maeda K., Miyakawa T., Shibayama S., Matsuo M., Takaoka Y., Ito M., Koyanagi Y., and Mitsuya H.: Potent Anti-R5-human immunodeficiency virus type 1 effects of a CCR5 antagonist, AK602/ONO4128/ GW873140, in a novel human peripheral blood mononuclear cell nonobese diabetic-SCID, interleukin 2 receptor  $\gamma$ -chain-knocked-out AIDS mouse model. *J. Virol.* 79: 2087–2096, 2005.
- ② Miura Y., and Koyanagi Y.: Death ligand-mediated apoptosis in HIV infection. *Rev. Med. Virol.* 15: 169-178, 2005.
- ③ Matsuura-Sawada R., Murakami T., Ozawa Y., Nabeshima H., Akahira J., Sato Y., Koyanagi Y., Ito M., Terada Y., and Okamura K.: Reproduction of menstrual changes in transplanted human endometrial tissue. *Hum Reprod.* 20:1477-1484, 2005.
- ④ Ohkura S., Yamashita M., Ishida T., Babu P.G., Koyanagi Y., Yamamoto N., Miura T., and Hayami M.: Phylogenetic heterogeneity of new HTLV type 1 isolates from southern India in subgroup A. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 4:325-330, 2005.
- ⑤ Baba S., Takahashi K., Noguchi S., Takaku H., Koyanagi Y., Yamamoto N., and Kawai G.:

Solution RNA structures of the HIV-1 dimerization initiation site in the kissing-loop and extended-duplex dimmers. *J. Biochem.*, 138:583-592, 2005.

- ⑥ Munakata Y., Saito-Ito T., Kumura-Ishii K., Huang J., Kodera T., Ishii T., Hirabayashi Y., Koyanagi Y., and Sasaki T.: Ku80 autoantigen as a cellular coreceptor for human parvovirus B19 infection. *Blood.* 106:3449-3456, 2005.
2. 学会発表
- ① Yoshida T, Hieda K, Kawano Y, Aoki J, Misawa N, Miura Y, Tanaka Y, Koyanagi Y., A truncated form of CD63-deletion mutant blocks X4-HIV-1 entry through dislocalization of CXCR4. Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2005.
- ② Aoki J, Koyanagi Y. Suppression of HIV-1 release through CD63-overexpressed plasma membrane. Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2005.
- ③ 青木淳、小柳義夫. CXCR4 を標的とした siRNA 発現レンチウイルスベクターを用いた悪性腫瘍の遺伝子治療. 第 64 回日本癌学会、札幌、2005.
- ④ 安藤良徳. 芳田剛. 小柳義夫. 生細胞における CXCR4 分子のイメージング解析. 第 53 回日本ウイルス学会、横浜、2005.
- ⑤ 青木淳、佐藤佳、佐野浩一、大黒恵理子、小柳義夫. CD63 過剰発現による HIV-1 粒子の感染性抑制. 第 53 回日本ウイルス学会、横浜、2005.
- ⑥ 北山裕子、三浦義治、小柳義夫. HIV 感染マクロファージによる中枢神経系未分化細胞群への障害. 第 53 回日本ウイルス学会、横浜、2005.
- ⑦ 篠田康彦、稗田訓子、小柳義夫. 薬剤誘導性発現レンチウイルスベクターの開発. 第 53 回日本ウイルス学会、横浜、2005.
- ⑧ 佐藤佳、青木淳、北山裕子、小柳義夫. がん細胞転移抑制性レンチウイルスベクターの開発. 第 53 回日本ウイルス学会、横浜、2005.
- ⑨ 三浦義治、青木淳、北山裕子、佐野浩一、川

口寧、小柳義夫. 神経幹細胞は単純ヘルペスウイルス1型感染細胞として重要である. 第53回日本ウイルス学会、横浜、2005.

- ⑩ 北山裕子、三浦義治、川口寧、小柳義夫. 中枢神経組織内における抗HSV因子の探索. 第53回日本ウイルス学会、横浜、2005.
- ⑪ 芳田剛、河野祐治、青木淳、三浦義治、田中勇悦、小柳義夫. 抗HIV因子の単離：CXCR4細胞膜移行阻害分子の同定. 第53回日本ウイルス学会、横浜、2005.
- ⑫ 中田浩智、前田賢次、宮川寿一、河野祐治、柴山史郎、高岡義和、小柳義夫、満屋裕明. 第19回日本エイズ学会、熊本、2005.
- ⑬ 三浦義治、北山裕子、小柳義夫. HIV脳症における中枢神経系未分化細胞群関与の検討. 第19回日本エイズ学会、熊本、2005.
- ⑭ 青木淳、佐藤佳、大黒恵理子、佐野浩一、小柳義夫. テトラスパニン分子によるHIV-1粒子の感染性抑制. 第19回日本エイズ学会、熊本、2005.
- ⑮ 芳田剛、河野祐治、青木淳、三浦義治、田中勇悦、小柳義夫. 特定の細胞膜表面分子に対する細胞膜移行阻止因子の単離：CXCR4発現阻止因子. 第28回日本分子生物学会、福岡、2005.
- ⑯ 星野重樹、志村まり、田口崇、小柳義夫、石坂幸人. HIV-1潜伏感染細胞からのウイルス再産生におけるVprの機能. 第28回日本分子生物学会、福岡、2005.

G. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1. CD63dNの導入によりCXCR4の細胞膜への移行が阻害される

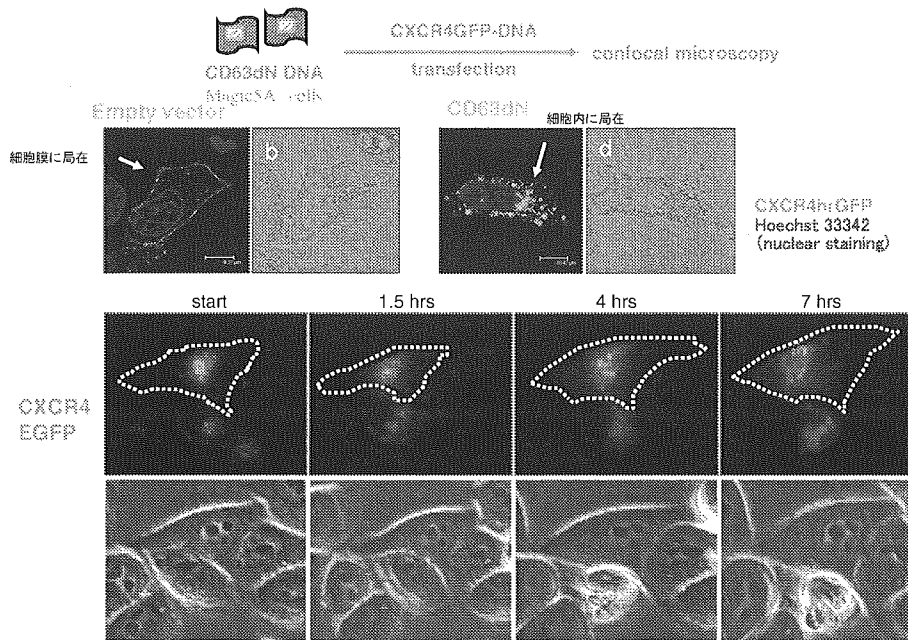


図2A. CD63dNによる細胞膜移行抑制に関わるCXCR4ドメインの解析

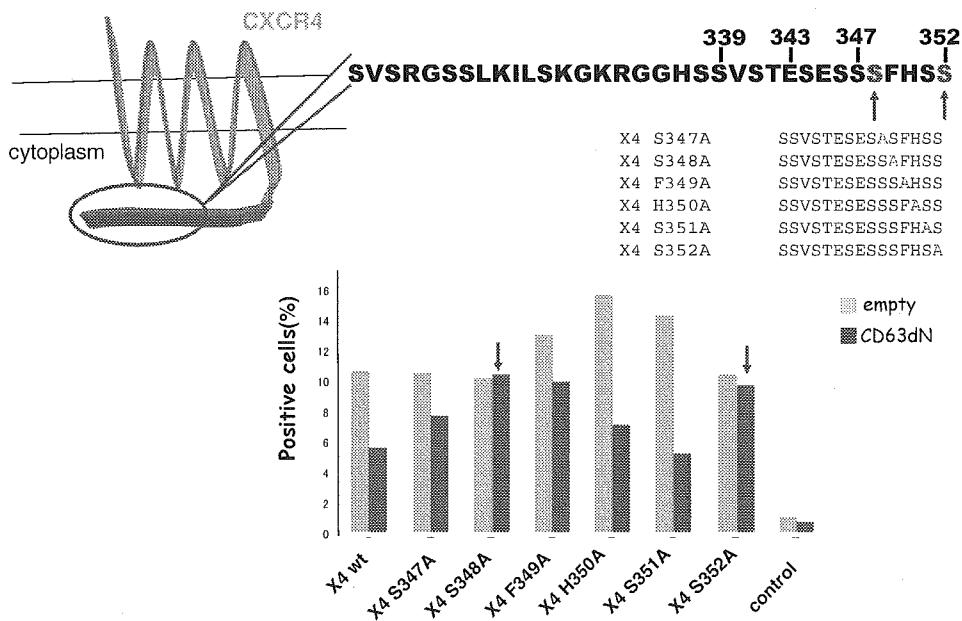




図2B. CD63変異体によるコレセプター分子の抑制はmembrane trafficking異常による

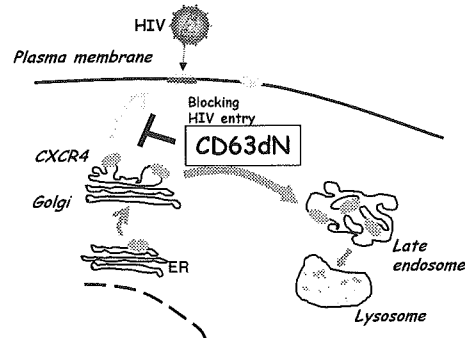


図3 野生型のCD63強制発現によりウイルス感染性が減弱する

CD63wt or its mutant DNA were cotransfected with pNL4-3

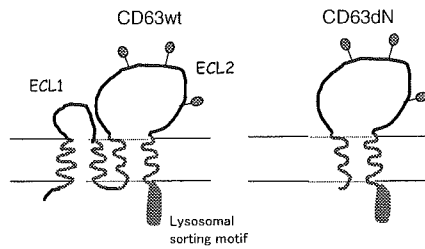
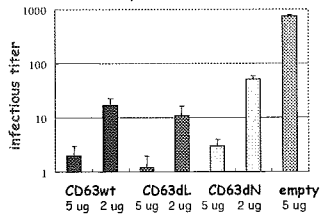


図4A. CD63発現によるHIV Env蛋白質のウイルス粒子内へ取り込み抑制

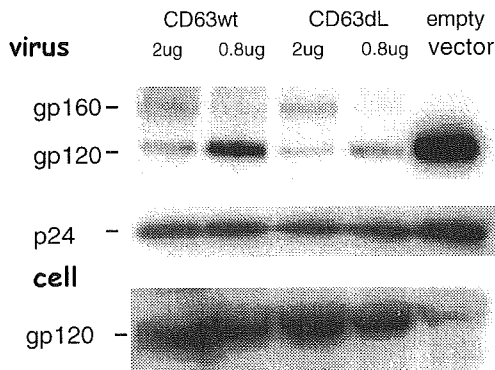
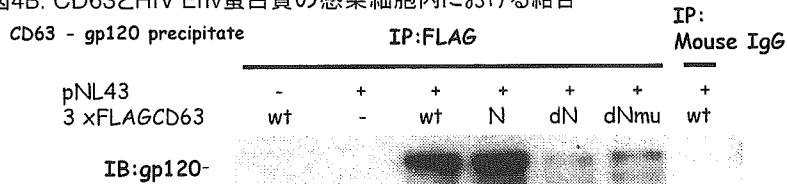


図4B. CD63とHIV Env蛋白質の感染細胞内における結合



厚生労働省科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

エイズ発症阻止に関する研究班 分担研究報告書（平成17年度）

分担研究者 田中勇悦 琉球大学大学院医学研究科免疫学分野 教授

研究要旨：ヒトのTおよびB細胞を生着させ、キメラ動物としてエイズをシミュレーションする系である hu-PBL-SCID マウスを用いて、不活化 HIV-1 で感作した自家樹状細胞(DC)がマウス体内のヒト T細胞を活性化させ、HIV-1 に対する T細胞免疫応答を惹起し、さらに CCR5 指向性 HIV-1 の感染を抑制する因子(CD4 因子)の産生を促す。この事実より、免疫を賦活する活性を持つ DC 免疫の有用性を強調してきた。一方、別の視点から見ると、HIV-1 がリンパ節等において免疫応答の過剰な活性化を引き起こすことがエイズ発症へとつながると考えると、過剰な免疫応答を抑制する能力のある DC（免疫抑制性 DC）がエイズウイルスとヒトとの共存を可能にするとも考えられる。そこで免疫抑制性 DC の誘導法について種々のアプローチを試み、新たな方法論を考案した。

A. 研究目的

免疫関連分子を介したエイズ発症阻止の研究において、HIV-1 感作樹状細胞(DC)で免疫した hu-PBL-SCID マウスが CCR5 使用(R5)HIV-1 感染に対して完全に耐性になることに注目し、このような DC 免疫療法に用いる免疫賦活性の高い DC の分化培養方法を研究することを目的に、前年度まではさらに新たな DC 培養方法の開発に力を入れてきた。このような研究をしてゆく中で、免疫抑制性 T細胞(Treg)がエイズウイルスに対する過剰な応答を抑制し、その結果エイズウイルスとヒトとの共存が可能になり、エイズ発症を抑止できるかもしれないと考えるに至った。そこで平成17年度の研究では、過剰な免疫応答を抑制する Treg 細胞群を優勢に誘導できるような DC の分化培養方法を開発することを目的とした。

B. 研究方法（倫理面への配慮）

DCへ分化させる細胞として単球を用いた。新鮮単球は、正常人PBMCより Dynal の Negative Selection 法で分離した。免疫賦活性をもつ conventional な DC (cDC)は、GM-CSF と IL-4 で培養し、最終的に IFN- $\beta$  で成熟させた。今回、様々なサイトカインを用いる方法で単球の分化培養を検討した。得られた DC の表面抗原はフローサイトメトリーで、免疫誘導性は、in vitro ではアロ naïve CD4+T細胞との混合培養法で、in vivo では hu-PBL-SCID マウスを用いる系で検討した。細胞増殖は BrdU 取り込み ELISA、サイトカイン産生は市販の ELISA キットで判定した。すでにこのような動物実験を含む一連の研究は、琉球大学の動物実験倫理委員会・感染微

生物取り扱い安全管理委員会で審査され、許可されている。

### C. 研究結果

単球を GM-CSF と IL-4 を加えて培養することにより 5-7 日間で未熟 DC 様細胞が誘導され、さらに抗原感作と IFN- $\beta$  により 1-2 日間で免疫誘導能を持つ成熟 DC が誘導される。種々の DC 誘導法を検討する中で、次の培養方法を考案した。つまり、単球を培養初日から IFN-beta と IL-4 を含む培地で培養し、1 日後に外来抗原である KLH や不活化 HIV-1 (あるは LPS) を培養系に添加し、さらに 2 日間培養する方法である。詳細は論文発表する予定である。このような方法で得られた DC は、DC 成熟マーカーである CD83 陽性であり、CD80 と CD86 が強く up-modulation されていた。抗原刺激を加えないと CD83 は誘導できなかった。このような DC 培養系の培養上清には、IL-10、IL-12 と TNF  $\alpha$  が検出された。免疫刺激性の DC は、LPS と IFN- $\gamma$  で刺激しないと IL-12 を産生しなかった。両タイプの DC の免疫調節作用を naive アロ CD4+T 細胞との混合培養で比較検討すると、GM-CSF/IL-4 で培養し IFN- $\beta$  で成熟させた DC に比べて IFN- $\beta$  /IL-4/抗原で刺激された DC(quick DC)は、CD4+T 細胞の増殖抑制活性、IFN- $\gamma$  産生刺激活性とも弱かった。しかし、quick DC のみが、CD4+T 細胞の IL-10 産生を誘導した。誘導された CD4+T 細胞を in vitro で anti-CD3, anti-CD28 抗体で刺激するとより高濃度の IL-10 が産生され、Treg の一種である免疫誘導性 IL-10 産生性 Treg が誘導されることが分

かった。In vivo においても KLH 感作 DC を使った場合、quick DC の免疫誘導能は無いか、あるいはとても低いことを示すデータが得られた。

### D. 考察

単球を IFN- $\beta$  と IL-4 で培養し、翌日に抗原を加えてさらに 2 日間培養することにより、これまでの免疫賦活 DC とは機能が正反対の免疫抑制性 DC が誘導された。その機能は、IL-10 産生 Treg の誘導であり、in vivo においても免疫誘導性は陰性であった。これらの観察は同じ単球でも分化培養の条件によって両極端の DC になることを示す。今回の Treg 誘導性 DC が実際に HIV-1 の増殖や病原性にどのような影響力をもつのか今後の研究に期待される。

### E. 結論

免疫賦活性ヘルパー T 細胞を刺激する活性を持つ機能的 DC と、Treg を誘導する活性をもつ DC の培養方法が確立された。どちらの DC がエイズ発症抑制能をもつのか、感染実験で検討する意義があると考えられる。

### F. 健康危険情報

HIV-1 の感染実験、ウイルスの保管は全て琉球大学医学部で定める感染微生物取り扱い安全管理委員会の規定に基づき、P3 実験施設で行われている。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Nimura F., Zhang L., Okuma K, Tanaka R., Sunakawa H., Yamamoto N. and Tanaka Y. Cross-linking cell surface chemokine receptors leads to isolation, activation and differentiation of monocytes into potent DC's. Exp. Biol. Med. 2006, in press.

## 2. 学会発表

- (1) 大隈和, 田中勇悦: サルエイズウイルス感染細胞を特異的に攻撃する新規組換え VSV. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会, 2005. 11. 20: 横浜.
- (2) 芳田剛, 河野祐治, 青木淳, 三浦義治, 田中勇悦, 小柳義夫: 抗 HIV 因子の単離: CXCR4 細胞膜移行阻害分子の同定. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会, 2005. 11. 20: 横浜
- (3) 久保嘉直, 吉居廣郎, 田中勇悦, 佐藤裕徳, 山本直樹: HIV-1 の細胞内侵入におけるエズリンの関与. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会, 2005. 11. 20: 横浜
- (4) 山下篤哉, 照沼裕, とう学文, 金浩範, MUNKANTA Muwansa, 葛西宏威, 加藤伊陽子, 田中勇悦, 山本直樹, 伊藤正彦: HIV-1 感染長期末発症者由来 CD8 陽性 T 細胞株の産生する抗 HIV-1 液性因子. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会, 2005. 11. 20: 横浜
- (5) 張 險峰, 田中勇悦, 間陽子: Regulation of HIV-1 viron protein expression by Vpr. 第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2005. 12. 1: 熊本
- (6) 大隈和, 吉田篤司, 田中礼子, 田中勇悦: エイズウイルス感染細胞を標的とし攻撃する新規組換えウイルスベクター. 第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2005. 12. 2: 熊本
- (7) 吉田篤司, 大隈和, 田中礼子, 山本直樹, 田中勇悦: 不活化 HIV-1 感作樹状細胞免疫と CXCR4 アンタゴニスト投与による R5 および X4 HIV-1 感染防御. 第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2005. 12. 3: 熊本
- (8) 田中勇悦, 吉田篤司, 大隈和, 田中礼子, 山本直樹: HIV-1 感染防御を目的とする単球のマニピュレーション: 単球の CXCR4, CCR5 架橋を介する HIV-1 受容体の発現抑制と HIV-1 免疫誘導樹状細胞の分化培養. 第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2005. 12. 3: 熊本
- (9) 山下篤哉, 照沼裕, とう学文, 高嶋能文, 花房秀次, 岡慎一, 酒井道生, 白幡聡, 藤井輝久, 石川正明, 高橋義博, 池田柊一, 三浦琢磨, 松田重三, 田中勇悦, 葛西宏威, 加藤伊陽子, 山本直樹, 三間屋純一, 伊藤正彦: T 細胞由来抗 HIV-1 液性因子からみた HIV-1 感染長期末発症者の AIDS 発症遅延要因. 第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2005. 12. 3: 熊本

H. 知的所有権の出願・取得状況  
なし