

厚生労働科学研究費補助金

国際医学協力研究事業

HIV 感染症における免疫応答の解析と

その臨床応用に関する研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山本 直樹

平成19年3月

目 次

I. 総括研究報告書	
HIV 感染症における免疫応答の解析とその臨床応用に関する研究 山本直樹（国立感染症研究所 エイズ研究センター長）	・・・ 1
II. 分担研究報告書	
1. サルを用いたクロスクレイド HIV ワクチンの研究 山本直樹（国立感染症研究所 エイズ研究センター長）	・・・ 9
2. ワクチンによる SHIV 複製制御の長期解析 俣野哲朗（東京大学医科学研究所 教授）	・・・ 15
3. 粘膜組織における HIV の CD4 陽性 NKT 細胞を介した感染拡大の 可能性 高橋秀実（日本医科大学微生物学免疫学教室 教授）	・・・ 21
4. 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：アジアにおける HIV-1 組み換えホットスポットにおける重感染とその生物学的意義 武部 豊（国立感染症研究所エイズ研究センター 第一室長）	・・・ 27
5. 新規の CCR5 阻害剤：AK602 (AVC) の作用機序解明と構造学的解析 満屋裕明（熊本大学医学部免疫病態学内科学第二 教授）	・・・ 31
6. HIV が CTL の認識を回避する分子機構の解析 岩本愛吉（東京大学医科学研究所 教授）	・・・ 37
7. 樹状細胞を用いた HIV-1 感染防御免疫応答の誘導 田中勇悦（琉球大学医学部免疫学分野 教授）	・・・ 41
8. 途上国におけるテーラーメイド治療導入の基礎検討 岡 慎一（国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター長）	・・・ 47
9. 薬剤耐性 HIV の進化・選択における gag-pol の相互干渉 ー耐性獲得における Pol 分子内干渉の決定木による解析ー 杉浦 互（国立感染症研究所エイズ研究センター 第二研究グループ長）	・・・ 51
10. 粘膜における HIV 感染のメカニズムを基盤としたワクチン開発へ 向けての基礎研究 清野 宏（東京大学医科学研究所炎症免疫学分野 教授）	・・・ 57

11. ヒトゲノム多型性と HIV 感染に関する研究 塩田達雄 (大阪大学微生物病研究所 教授)	・・・ 63
12. 転写因子 AP-4 による HIV 潜伏感染維持の分子機構 岡本 尚 (名古屋市立大学大学院医学研究科細胞分子生物学 教授)	・・・ 67
13. CCR5 拮抗薬 TAK-220 存在下における感染細胞の長期培養 - 薬剤耐性ウイルス分離の試み - 馬場昌範 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授)	・・・ 73
14. レトロウイルス感染における CTL とウイルス変異および中枢神経 傷害機序に関する研究 納 光弘 (鹿児島大学 教授)	・・・ 79
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	・・・ 83
IV. 研究成果の刊行物・別刷 (抜粋)	・・・ 99

Ⅰ. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）
総括研究報告書

HIV 感染症における免疫応答の解析とその臨床応用に関する研究

主任研究者 山本 直樹 国立感染症研究所エイズ研究センター長

研究要旨：

アジアのエイズを中心とした問題に対処するため基礎、臨床、疫学の観点から研究を行い、その方策について包括的な検討を行った。中でも HIV 感染のワクチン開発とウイルスの耐性発現に対応できる薬剤の開発に焦点をおいて研究を行った。ワクチンについては、DNA/Sendai prime-boost ワクチンでウイルスが制御されたサルにおける有効な免疫パラメーターの研究を通して安全なワクチンの開発研究を行った。アジアにおけるウイルスの分子疫学研究から、流行のメカニズムに対する考察を行った。クロスクレイド Env ワクチンの研究で V3-tip アミノ酸配列が GPGR を示すクレイド B の Env ペプチドの連続投与実験を行い、広域のウイルスを中和する抗体を得、これがサルに完全な感染防御能を持つことを示した。また、自然免疫系の役割を解明するため、CD1 分子のサル種での保存性について検討した。またそれぞれの細胞群をヒトおよび primate としてのサルの組織や血液、初乳より分離・採取しそれぞれの HIV 感受性、感染細胞の制御能、そして粘膜における CTL の誘導・活性化能などを検討した。一方、治療薬・薬剤耐性・免疫病態の研究では、新規の CCR5 阻害剤 AVC の抗 HIV-1 作用発現の分子レベルでの機序の解明と構造生物学的解析を進めた。また薬剤耐性症例検体を用い、非サブタイプ B において Gag-protease 間どのような相互干渉があるかを調べ、薬剤耐性の選択・進化機序について考察を加えた。また OX40L の役割についての検討、樹状細胞を用いた免疫療法の試み、ウイルスの増殖と転写制御の関連、ヒトゲノム多型と HIV 感染などに関する多彩な研究が行われ多くの重要な知見が得られた。

分担研究者

	塩田達雄（大阪大学微生物病研究所教授）
俣野哲朗（東京大学医科学研究所 教授）	岡本 尚（名古屋市立大学大学院医学研究科細胞分子生物学 教授）
高橋秀実（日本医科大学微生物学免疫学教室 教授）	馬場昌範（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授）
武部 豊（国立感染症研究所エイズ研究センター 第一室長）	納 光弘（鹿児島大学第三内科学 教授）
満屋裕明（熊本大学医学部免疫病態学内科学第二 教授）	A. 研究目的
岩本愛吉（東京大学医科学研究所 教授）	エイズと HIV の感染拡大はとどまることを知らず、国連合同エイズ計画（UNAIDS）は 2010 年頃には全世界で HIV 感染者の数は 8000 万人にもものぼると推定している。中でも世界最大の人口を擁するアジアでの HIV 感染の著しい拡大があり、21 世紀のアジアは、エイズをはじめとする感染症との新たな闘いの場であるといわれている。今日、アジアが地
田中勇悦（琉球大学医学部免疫学分野 教授）	
岡 慎一（国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター長）	
杉浦 互（国立感染症研究所エイズ研究センター第二研究グループ長）	
清野 宏（東京大学医科学研究所炎症免疫学分野 教授）	

域としてこれらの感染症にどのような方策を講じるかが問われており、その成否が今後の世界の感染症対策の方向性を決めるといっても過言ではない。わが国でも 2004 年には、感染者とエイズ患者の合計が年間で初めて 1000 件を超え、2005 年には累計で 1 万人を突破し、さらに昨年は最多となった。エイズ・パンデミーの問題を解決するためには、感染予防と治療の良い科学技術ツールの研究・開発が重要である。

本研究班では、これまでの生命科学の進歩で得られた膨大な研究実績の蓄積をフルに活用しつつ、新たなアプローチでエイズの予防と治療の問題解決を図る。とくにワクチン開発のため、粘膜局所でおこるきわめて早期に侵入する HIV の感染に対応可能な免疫原のデザイン、細胞性免疫と同時に多彩な HIV の感染を中和できる HIV 感染予防に必要とされる抗体を十分な強さと持続性をもって誘導する方法、さらには非特異的といわれる免疫機構の活用、などの問題を試験管と小動物（サル、マウスなど）モデルを用いて探り、真の感染予防ワクチンの開発を目指すものである。また治療面では、エイズが死の病から死なない病に転じたといわれるほどの成功を収めていることも事実である。しかしながら、ウイルスの根治が出来ないことや薬剤耐性、アドヒアレンス、コストの問題など、解決すべき課題は山積みされている。

本研究の目的は、日米が共同で研究を進め、アジア諸国の研究者とともに、エイズの予防と治療について分子生物学、遺伝子工学レベルの研究の推進をおこなうことである。

B. 研究方法

1. HIV 感染症のワクチン研究

1) DNA ワクチンあるいはセンダイウイルス (SeV) ベクターワクチン接種により、SHIV89.6P 複製制御が認められた 3 頭のサルの長期解析を行った。血漿中ウイルス量、ウイルス特異的 CTL レベル、中和抗体レベル、プロウイルスゲノム塩基配列などを経時的に解析した。2) V3-tip アミノ酸配列が GPGR を示すクレイド B のクロスクレイド Env ワクチンの

連続投与実験を行い、カニクイザルを用いて検討した。3) CD1d 分子を介して抗原情報を受け取る NKT の活性化と HIV-1 あるいは SIV に対する感受性との間の関連性を調べるため、CD4T 細胞に X4-type の HIV-1 感染を惹起する際に、CD1d 分子を介して NKT 細胞を刺激する α -Galactocyl Ceramide (α -Gal Cer) を添加し、感染成立に伴う NKT 細胞の動態を観察した。4) 樹状細胞が T 細胞を刺激する際に用いる共刺激分子として OX40L について焦点をあてて研究を進めた。5) アジアにおけるエイズ流行を標的とするワクチン開発のための基盤となるアジア型 HIV 流行株の全塩基配列データベースの拡充と感染性分子クローンなどの基盤的研究試薬の整備を行った。さらに多重感染あるいはスーパーインフェクションに際する incoming virus と resident virus 間の相互作用、ウイルスの個体内進化の解析およびそれによるワクチン開発戦略の考察を行った。

2. 治療・HAART 耐性・免疫病態に関する研究

1) 新規の CCR5 阻害剤 AK602 (aplaviroc, AVC) の抗 HIV-1 作用発現の分子レベルでの機序の解明と AVC がケモカイン-ケモカイン受容体相互作用に及ぼす影響について構造学的解析を進めた。2) 耐性変異 HIV-1 が感染者体内で進化。選択にあたり、Gag と protease の間に相互干渉があることが知られている。そこで薬剤耐性を獲得し、かつ詳細な治療歴があきらかな症例検体を用い、非サブタイプ B において Gag-protease 間にどのような相互干渉があるかを調べ、薬剤耐性の選択・進化機序について考察した。3) HLA-A24 によって拘束される HIV-CTL エピトープが CTL 認識を回避する分子機構を明らかにした。4) ザンビアにおいて連続 100 名の E F V 投与群をコホートとして 1 年後の服薬率、CD4 増加率などを検討し、E F V 血中濃度が及ぼすこれら因子への関与を検討した。5) その他 HTLV-1 に対する CTL など。

(倫理面への配慮)

本研究に臨床材料が使用される場合には、血液など臨床材料提供者の個人情報

が漏出しないよう厳格にプライバシーを保護する。研究はすべて unlinked anonymous の手法によって行われる。研究方法による研究対象者に対する不利益について充分の説明を加え、起こりえる危険性の排除に可能なかぎりの方策をとる。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る。臨床材料の保存・使用に際しては、Informed consent を得ることとし、ヒトゲノム研究に関しては研究者の所属する機関の承認を得る。本研究の成果をヒトに応用する場合には、研究対象者の安全性に細心の注意を払い、研究担当者の所属する機関の IRB の承認を得る。動物を用いる実験に関しては、動物愛護の精神に則って研究を行う。AVC の第3相臨床試験は米国食品医薬品局の監察の下に実施されており高い倫理性が保持されている。AVC の抗 HIV-1 作用発現の分子レベルでの機序解明等はヒト細胞を使用するものの、全て試験管内、または小動物を使うものでヒトへの直接の関連はない。ザンビアでの研究についても同様に、現地での Informed consent を得て、現地の医師が対応している。今回は、その研究の一環として保存検体を用いるため、研究対象者に対する不利益はない。

C. 研究結果

研究結果はワクチン、治療、病態、免疫、分子疫学など多岐にわたるので、それらを箇条書きにする。

ワクチン

1) V3 チップ GPGR エピトープのフランキンギン領域の異なる野生株由来のペプチドを連続投与すると狭い V3 チップをハイアフィニティで認識できるクロスリアクティブな抗体を産生させることができた。今回、サルを用いた実験で、KD-247 のたった一回の多量の受身伝達で SHIV の heterologous 挑戦に対し、完全な感染防御効果が達成できることを示した。

2) 慢性エイズモデルにおける CTL のウイルス複製抑制機序解明の一助とする目的で、急性エイズモデルにおける CTL のウイルス複製抑制機序を解析し、慢性エ

イズモデルと比較検討することとした。今回、我々の開発した CTL 誘導ワクチン接種により CXCR4 指向性 SHIV 複製制御にいたったサルにおける CTL 反応の解析を行い、複製制御が維持されている間にも、低いレベルに抑制されたウイルス複製に対して、新たなエピトープ特異的 CTL 反応が誘導されていることを明らかにした。

免疫

1) CD1d 分子の種族内での分子レベルでの保存性を調べたところ、ヒト種族内で CD1d 分子の構造が完全に保存されていること、そして T 細胞との応答性に関わる a1 及び a2 部分が HIV-1 への同様の感受性を有するチンパンジーと同一であることが確認された。また一方において、SIV に対し感受性を有するものの HIV-1 には感染しないアカゲザルや AGM (African Green Monkey) ではヒトに比べ a1 及び a2 部分がかなり異なることが見出された。

2) マウスの系では OX40L による T 細胞の OX40 の刺激は、免疫応答後期において T 細胞の長期生存を促す機能を持つことが報告されている。今回の研究では、ヒト T 細胞自身が活性化や培養の条件によって機能的 OX40L を発現することを明らかにすることができた。

3) HTLV-I 感染において変異ウイルスが増殖してウイルス交代現象が起こっているのかを検討した。ウイルスのアミノ酸置換を伴うまたは伴わない遺伝子変異を調べることで HTLV-I 特異的 CTL が HTLV-I に対して正の淘汰圧を与えているエピトープ部位を同定した。この部位で CTL から認識されにくい変異ウイルスも存在したが、CTL から逸脱して増殖する変異ウイルスはなかった。ウイルスの増殖に重要な部位の正の淘汰圧が観察された CTL エピトープはワクチン開発の対象となりえると考えられた。また HAM の中枢神経系においては、HTLV-I 感染 CD4 陽性リンパ球と、著明な HTLV-I 特異的 CD8 陽性 CTL の浸潤を認め、その周囲の神経系細胞にアポトーシスを認めた。

治療

1) CCR5 と CCR5 阻害剤の結合モデルを

構築、aplaviroc (AVC)は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AVCの誘導体で結合親和性・抗HIV活性の異なる複数の化合物の結合様式の比較を行ったところ、強力な抗HIV活性を持つ化合物(AVC)は強力なCCR5結合親和性に加えて、細胞外ループ(extracellular loop, ECL)に対してより強力なアロステリック変化をもたらすような結合プロファイルを持っており、これによりHIVエンベロープとCCR5との結合を強力に阻害することが明らかとなった。

2) TAK-652とは化学構造が全く異なるCCR5拮抗薬のTAK-220について、耐性ウイルスの誘導を試みた。R5 HIV-1臨床分離株をヒト末梢単核球に感染させ、TAK-220の濃度を徐々に上げながら、継代培養を続けた。その結果、約2年間で薬剤の濃度を10 nMから160 nMまで上げることに成功したが、それ以上に薬剤の濃度を上昇させると、ウイルスの増殖が認められなくなった。以上のことから、TAK-652と異なり、TAK-220耐性ウイルスの分離は難しいと思われた。

3) 薬剤耐性を獲得した3症例についてプロテアーゼと逆転写酵素領域合計1.3Kbのクローニングと塩基配列解析を行った。得られた配列情報をもとに決定木を作成し選択経路を解析した結果、プロテアーゼ阻害剤に対する耐性変異の獲得経路ではプロテアーゼ阻害剤耐性には直接には寄与しない部位が分岐点を作ることが明らかになった。之に対し逆転写酵素では薬剤耐性変異そのものが決定木の分岐点を形成することが明らかになった。

4) ザンビアで行った連続100名のEFV投与群をコホートとして1年後の服薬率、CD4増加率などを検討し、EFV血中濃度が及ぼすこれら因子への関与を検討した。1年後の経過観察率は、62%であった。EFV血中濃度に関係なく、自己申告による服薬率は非常によかったが、生存率やCD4増加率は、EFV血中濃度の低い群の方がよかった。

分子疫学、遺伝子多型、ウイルス活性化
1) 中国南西部(雲南省)とミャンマーにかけてのアジア地域の高リスク集団にみられるHIV-1重感染例のスクリーニングを行い、その頻度と構造的特徴に関して解析を進めた結果、重感染が中国雲南省においては約8%(2/26)、ミャンマーにおいては4%(5/118)の比較的高い頻度で見出されることを明らかにした。

2) 欧米人に認められるCCR5の32塩基の欠失や303番目のノンセンス変異は日本では認められず、CCR5遺伝子の893番目の塩基が欠失し、CCR5が細胞表面に発現されにくいCCR5 893(-)が認められた。日本とタイにおけるCCR2およびCCR5遺伝子のハプロタイプを解析したところ、CCR5の翻訳開始部位から上流に数えて2852番目の塩基が、欧米人で病態進行が加速することが知られているCCR5 P1を、日本においては95%以上、タイにおいては100%代表することが明らかになった。

3) AP-4がTBPのTATAボックスへの結合を抑制し、さらにAP-4が転写コレプレッサーであるHDAC1をHIV-1LTRにリクルートすることによってHIV転写を抑制していることを初めて明らかにした。

D. 考察

エイズワクチンの開発は、これまで細胞性免疫誘導を目的としたT細胞ワクチンの開発が行われてきたが、効果的な予防ワクチン開発のめどが立たず、ウイルス量を減らして非感染者への感染率を減少させることが当面の目的の一つとなると思われる。しかし、現在のAIDSワクチン開発が目指しているものは、他のワクチンの場合と同じように、HIVウイルスからの感染を防ぐ事である。そのためには、HIV Env蛋白の極度の多様性と中和抗体などの液性免疫からの逃避機構の解析と対応が求められている。これまで報告されているように、DNA/SeVワクチンなどで特異的T細胞反応を効果的に誘導すると、体内のウイルス量が減少し病期の進行が抑制される事につながる事が、サルエイズモデルで示され、そのimmune correlatesに関し、いくつかの重要な知見も示された。

これらの事から、ワクチン開発の目標は、広範に反応出来る交差反応性中和抗体の産生が可能で、強い CD8 陽性細胞および CD4 陽性細胞反応誘導能を併せ持つものである。上記のように、これまでのワクチンは、HIV 遺伝子を組み込んだベクターを主体としたものであり、後者の CD8+ T 細胞反応誘導を目標にしてきたが、今後は、液性免疫誘導を目的とし、更には細胞性免疫誘導能を併せ持つワクチン開発が行われると思われる。今回の Broadly-reactive な中和抗体の臨床応用が期待される。

一方、治療面での研究野進展は著しい。現在臨床で使われている抗 HIV-1 薬は逆転写酵素阻害薬とプロテアーゼ阻害薬の 2 種類であるが、薬剤に対する耐性や副作用などの問題が指摘されて久しい。それらに対し、薬剤耐性ウイルスの進化、選択におけるウイルス遺伝子間の相互干渉やザンビアにおける抗 HIV 薬の代謝能力に対する研究も行った。

異なった作用機序を有し交差耐性がなく副作用の少ない新規薬剤の開発が待たれている。既存の薬剤より強力でかつ副作用の少ない逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤の研究・開発とともにウイルスのコレセプターを標的とした新規の作用機序を有する侵入阻害剤 AVC は米欧で第 3 相臨床治試験下にある。TAK シリーズの CCR5 阻害薬も含め、それらの薬剤耐性機序の解明が重要である。

本研究班ではさらに粘膜面での感染メカニズムや拡大とその阻止、樹状細胞を用いた免疫療法の試み、アジアのエイズ流行の分子疫学的な研究、ウイルスの増殖と転写制御の関連、ヒトゲノム多型と HIV 感染などに関する多彩な研究が行われ多くの重要な知見が得られた。

E. 結論

細胞性免疫主導型ワクチンによりウイルス増殖の制御が達成されたサルでの免疫パラメーターの解析を行うとともに、ペプチドによる連続投与方法で免疫したサルでの感染完全ブロックが得られた。さらに粘膜面での感染メカニズムや拡大とその阻止、樹状細胞を用いた免疫療法の試み、アジアのエイズ流行の分子疫学的

な研究、ウイルスの増殖と転写制御の関連、ヒトゲノム多型と HIV 感染などに関する多彩な研究が行われ多くの重要な知見が得られた。

F. 健康危険情報

武部：

「日本人はじめての HIV-2 症例」(2006 年 8 月 11 日健康危険情報として厚労省より報告)

G. 研究発表

1. 論文発表 (抜粋)

山本：

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 N, 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* 80(11):5563-5570, 2006.

俣野：

Yamamoto H, Kawada M, Tsukamoto T, Takeda A, Igarashi H, Miyazawa M, Naruse T, Yasunami M, Kimura A, Matano T. Vaccine-based long-term stable control of simian-human immunodeficiency virus 89.6PD replication in rhesus macaques. *J Gen Virol* 88:652-659, 2007.

高橋：

Watanabe Y, Watari E, Matsunaga I, Hiromatsu K, Dascher C D, Kawashima T, Norose Y, Simizu K, Takahashi H, Yano I, Sugita M. BCG vaccine elicits both T-cell mediated and humoral immune responses directed against mycobacterial lipid components. *Vaccine* 24:5700-5707, 2006.

武部：

Tee K K, Li X-J, Nohtomi K, Ng K P, Kamarulzaman A, and Takebe Y.

Identification of a novel circulating recombinant form (CRF33_01B) disseminating widely among various risk populations in Kuala Lumpur, Malaysia. *J AIDS* 43(5): 523-529, 2006.

満屋 :

Maeda K, Das D, Ogata-Aoki H, Nakata H, Miyakawa T, Tojo Y, Norman R, Takaoka Y, Ding J, Arnord G F, Arnold E, and Mitsuya H. Structural and molecular interactions of CCR5 inhibitors with CCR5. *J Biol Chem* 281:12688-12698, 2006.

岩本 :

Maeda T, Fujii T, Matsumura T, Endo T, Odawara T, Itoh D, Inoue Y, Ohkubo T, Iwamoto A, and Nakamura T. AIDS-related cerebral toxoplasmosis with hyperintense foci on T1-weighted MR images: A case report. *J Infect* 53:e167-e170, 2006.

田中 :

Kondo K, Okuma K, Reiko Tanaka R, Zhang LF, Kodama A, Takahashi Y, Yamamoto N, and Ansari AA, and Tanaka Y: Requirements for the functional expression of OX40 ligand on human activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Hum Immunol* 2007, in press.

岡 :

Bi X, Gatanaga H, Koike K, Kimura S, and Oka S. Reversal periods and patterns from drug resistant to wild type HIV-1 after cessation of anti-HIV therapy. *AIDS Res Hum Retrovirus* 23: 43-50, 2007.

杉浦 :

Miyauchi K, Komano J, Myint L, Futahashi Y, Urano E, Matsuda Z, Chiba T, Miura H, Sugiura W and Yamamoto N. Rapid propagation of low-fitness drug-resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1 by a streptococcal metaboite sparsomycin. *Antivir Chem Chemother* 17(4):167-174, 2006.

清野 :

Fukuyama S, Nagatake T, Kim DY, Takamura K, Park EJ, Kaisho T, Tanaka N, Kurono Y, and Kiyono H. Uniqueness of lymphoid

chemokine requirement for the initiation and maturation of NALT organogenesis. *J Immunol* 177:4276-4280, 2006. (Cutting Edge)

塩田 :

Wichukchinda N, Nakayama E E, Rojanawiwat A, Pathipvanich P, Auwanit W, Vongsheree S, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P, and Shioda T. Protective Effects of *IL-4 -589T* and *RANTES -28G* on HIV-1 disease progression in infected Thai females. *AIDS* 20:189-196, 2006.

岡本 :

Imai K, and Okamoto T. Transcriptional repression of human immunodeficiency virus type 1 by AP-4. *J Biol Chem* 281:12495-12506, 2006.

馬場 :

Baba M, Miyake H, Wang X, Okamoto M, Takashima K. Isolation and characterization of human immunodeficiency virus type 1 resistant to the small-molecule CCR5 antagonist TAK-652. *Antimicrob Agents Chemother*. 51:707-715, 2007.

納 :

Nobuhara Y, Usuku K, Saito M, Izumo S, Arimura K, Bangham CR, Osame M. Genetic variability in the extracellular matrix protein as a determinant of risk for developing HTLV-I-associated neurological disease. *Immunogenetics* 57(12):944-952, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

武部 :

1) 「C型肝炎ウイルス阻害剤を検出するためのアッセイ方法」(特願 2006-351809、平成 18 年 12 月 27 日出願)(国立感染症研究所ウイルス II 部脇田、鈴木らとの共同出願)

2) 「(用途) C型肝炎ウイルス(HCV)増殖阻害化合物」(特願 2007-018145、平成 19 年 1 月 29 日)

3) 「最高度の保存領域に対する抗 HIV-1 siRNA 配列」(東大理との共同出願準備中)

岡本 :

1) 「ヒト関節リウマチの病態を再現する
トランスジェニック非ヒト哺乳動物」(特
願 2006-510787、平成18年7月21日)

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

研究協力者

鎌倉光宏 (慶応義塾大学大学院健康マネ
ジメント研究科 教授)

木原正博 (京都大学大学院医学研究科国
際保健学 教授)

佐多徹太郎 (国立感染症研究所感染病理
部長)

服部俊夫 (東北大学大学院医学系研究科
感染病態学 教授)

原田信志 (熊本大学大学院医学薬学研究
部感染防御学 教授)

松下修三 (熊本大学エイズ学研究センタ
ー病態制御分野 教授)

三輪正直 (長浜バイオ大学バイオサイエ
ンス学部細胞生命科学コース
教授)

駒野 淳 (国立感染症研究所エイズ研究
センター 主任研究官)

II. 分担研究報告書

サルを用いたクロスクレイド HIV ワクチンの研究

分担研究者：山本直樹（国立感染症研究所エイズ研究センター長）

研究要旨：われわれは先にクロスクレイド HIV ワクチン開発の第一歩として中和抗体を能動免疫で誘導することを試み、これまで抗原性が弱く有効な抗体産生が困難であるとされてきた HIV-1 V3 チップ部分の中和抗体エピトープに対する抗体産生を可能にすることに成功した。即ち、V3 チップ GPGR エピトープのフランキング領域の異なる野生株由来のペプチドを連続投与すると狭い V3 チップをハイアフィニティで認識できるクロスリアクティブな抗体を産生させることができた。今回、サルを用いた実験で、KD-247 のたった一回の多量の受身伝達で SHIV の heterologous 挑戦に対し、完全な感染防御効果が達成できることを示した。KD-247 は、HIV 感染防止のための受動免疫抗体として有用なだけでなく、HIV に感染した個人の HIV の複製抑制のための免疫治療として貴重なツールとなると考えられる。

A. 研究目的

これまでの HIV ワクチン開発の主な標的は細胞性免疫誘導である。細胞性免疫は言うまでもなく、すでに HIV 遺伝子が組み込まれた細胞からウイルスの遺伝子発現があった際にのみ、作動する。したがって、この種のワクチンがウイルスの新鮮感染を抑制することはできない。そのかわり、その実用化は HIV 感染症の病態進行を抑え、HIV 発症までの期間をできるだけ長期化させることを目的にしている。このような発症予防ワクチンの開発はきわめて重要であるが、当然のこととして、感染予防ができるワクチンを開発することが理想的である。しかし液性免疫誘導型のワクチンの研究は細胞性免疫誘導型に比べ、大きく遅れていた。これが停滞していた理由は、HIV がきわめて容易に変異をし、さらにウイルス間でリコンビネーションも起こすなど、その多様性がきわめて高いこと、野生株 HIV の感染をコントロールできる中和抗体の産生が困難であること、などがあった。しかし最近 Trkola らにより、ヒト型化モノクロナル抗体を ART とコンバインすると ART 単独に

比較して、治療中断後のウイルスのリバウンドが明らかに抑制されるという結果が示され、中和抗体がヒトの体内でも作用しているという初めて結果が示され、改めて液性免疫誘導型のワクチン研究の復権が言われはじめてきた。

われわれはこれまで、HIV の効果的な中和抗体の産生のために、日本に伝搬しているクレイド B HIV 株を分離し、その遺伝子配列情報をもとにして6種類の V3 ペプチドを作成し、マウスに連続免疫を行うことで、狭いコア部分を標的としたフランキング部分のアミノ酸配列にこだわらない幅広い中和活性を示す高親和性抗体の産生法を開発することに成功した。

本研究でわれわれはさらにサルを用いた研究を展開し、ヒト型化モノクロナル抗体 KD-247 が HIV 受身免疫法による防御抗体として有用なだけでなく、感染個体に対する免疫治療のためのツールとしても有用なことを示した。

B. 研究方法

1. サルへの病原性のウイルス挑戦に対す

る KD-247 の受身伝達効果

研究はすべて基盤研究所筑波霊長類センターで行われ、オスの *cynomolgus* サル (*Macaca fascicularis*) が使用された。研究に使用したこれらの動物はレトロウイルス、ヘルペスウイルス、バクテリア、および寄生体フリーであった。

2. In vitro ウイルス中和試験

野生の中和抵抗性株として HIV-1MNp を、また実験室馴化株として HIV-189.6、HIV-1MN を用いた。CXCR4 または CCR5 コレセプターのどちらかを発現する GHOST 細胞を使用した。そして細胞は FACSCalibur Flowcytometry (Becton Dickinson) によって分析された。プラズマのサンプルは、挑戦ウイルスの 100TCID₅₀ から段階希釈し、M8166 細胞に感染させ、中和は培養上清に於ける、サル免疫不全ウイルス p27 抗原生産のパーセント抑制率として表現された。正常のサルプラズマをコントロールとして使用した。

3. PBMC を用いた中和アッセイ

HIV-1MN、primary isolates として HIV-1JR-CSF、CS と JCI シリーズ分離株を用いた。中和抗体価は健常人の血清免疫グロブリンを使用することで見られた p24 産生量の 50%(IC₅₀)か 90%(IC₉₀)の減少をもたらした血清免疫グロブリン抗体の血清希釈の逆数として表現した。

4. プラズマ SHIV RNA の Competitive PCR

Piatak et al.の方法に従った。検出限界はサルプラズマ 1 ml あたり 500 コピーであった。

5. KD-247 の血中濃度

100 μl の KD-247 抗原ペプチド (SP1 [YNKRKRIHIGPGRAFYTTCNC]) per well in 50 mM carbonate buffer (pH 9.3) at 1 μg/ml overnight at 4°C の条件で ELISA アッセイをおこなった。

(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した。

C. 研究結果

1. サルにおける KD-247 の受身伝達による高病原性 SHIV 感染からの完全防御

12 匹のサルに、数種の濃度の KD-247 を接種するとともに、コントロールでは正常の免疫グロブリン (NHIgG) を投与した。KD-247 投与の 5 匹の動物では、45mg/kg、30mg/kg、15mg/kg の 3 種類の投与を行った。抗体投与の 24 時間後に、20TCID₅₀/ml SHIV (図 1) を経静脈的にすべての 12 匹のサルに与えた。ウイルスのチャレンジ時点で、KD-247 のプラズマ濃度は、151、443、496、866、678 μg/ml であった。

2. CD4+T 細胞の割合とプラズマウイルス血症のレベル

すべての正常免疫グロブリンを静脈に接種されたサルでは 10⁷-10⁸ RNA/ml に達するプラズマウイルス血症とともに 7 日以内の CD4+リンパ球の減少が見られた。45mg/kg の NHIgG を受けた 2 匹のコントロールサルでは HIV p27 抗原 (図 1d) に対して両方が seroconvert した。剖検によって、すべてのコントロールサルで、リンパ器官での細胞減少も見られた。

SHIV 挑戦の前に体重 kg あたり 45mg の KD-247 を受けた両方のサルがウイルス挑戦から完全に保護された。これらの動物では seroconversion が起こらず、安定した CD4+T-細胞数を示した。この結果は PCR を使用しても、それらの組織は感染の兆候を全く示

さなかつた。

D. 考察

これまで能動免疫によっては有効な HIV 中和抗体作成は困難であったが、今回、連続免疫法を開発することによってこれを可能にした。産生された中和抗体は実質的には V3 チップの3つのアミノ酸 PGR を認識する極めて狭いエピトープに結合する高親和性中和抗体であった。このような性質をもった中和抗体の産生法はクロスリアクティブな中和抗体の作成法としてユニークなものとして捉えることができ、他のクレイドにも応用可能であることが期待される。

サルでは以前、ヒトの MAbs b12 と 2G12 がそれぞれウイルス挑戦に対して完全または部分的な感染予防を引き起こすことが示された。本研究で選ばれたモノクロナル抗体 KD-247 は IC90 が私たちの研究で 5.0 µg/ml であった。抗体では、単一の抗体か b12 と 2MAbs 2F5 と 2G12 の組み合わせか HIVIG、2F5 の三重の組み合わせと、2G12 によって得られたそれに近似しており、私たちは、KD-247 が病原性の SHIV 挑戦に対してサルに防御を達成することができるくらい強力であることを示した。また、それより低濃度の 15 mg と 30mg の抗体でもある程度の抑制効果を示した。

結論として、サルに受動免疫を行うと濃度に依存して SHIV の感染をコントロールすることができた。このことから連続免疫法による中和抗体産生の重要性が示された。今後、種々のクレイドの envelope の解析を行うとともに中和能との関連性を明らかにすることによりクロスクレイドの中和抗体指向型ワクチンの開発の手がかりを探りたい。

E. 結論

能動免疫によってこれまで不可能であった臨床株に対するクロスリアクティブ中和抗体の産生が可能となり、あらかじめそれ

を受動的に免疫することにより、サルで完全な感染予防を達成することができた。今後種々のクレイドの envelope 情報の解析を行うことによりクロスクレイドの中和抗体指向型ワクチンの可能性について検討する。

(本研究の共同研究者：Yasuyuki Eda, Toshio Murakami, Yasushi Ami, Tadashi Nakasone, Mari Takizawa, Kenji Someya, Masahiko Kaizu, Yasuyuki Izumi, Naoto Yoshino, Shuzo Matsushita, Hirofumi Higuchi, Hajime Matsui, Katsuaki Shinohara, Hiroaki Takeuchi, Yoshio Koyanagi, Mitsuo Honda)

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Miyauchi K, Isogai M, Matsuda Z, Nohtomi K, Onogi T, Takebe Y, Yamamoto N, Komano J. Inhibiting lentiviral replication by HEXIM1, a cellular negative regulator of the CDK9/cyclin T complex. *AIDS* 21(5):575-582, 2007.
- 2) Qi X, Koya Y, Saitoh T, Saitoh Y, Shimizu S, Ohba K, Yamamoto N, Yamaoka S, Yamamoto N. Efficient induction of HIV-1 replication in latently infected cells through contact with CD4(+) T cells: Involvement of NF-kappaB activation. *Virology* 2007 Jan 10; [Epub ahead of print]
- 3) Hamano T, Matsuo K, Hibi Y, Victoriano AF, Takahashi N, Mabuchi Y, Soji T, Irie S, Sawanpanyalert P, Yanai H, Hara T, Yamazaki S, Yamamoto N, Okamoto T. A single-nucleotide synonymous mutation in the gag gene controlling human immunodeficiency virus type 1 virion production. *J Virol* 81(3):1528-1533, 2007.
- 4) Dewan MZ, Terunuma H, Toi M, Tanaka Y,

- Katano H, Deng X, Abe H, Nakasone T, Mori N, Sata T, Yamamoto N. Potential role of natural killer cells in controlling growth and infiltration of AIDS-associated primary effusion lymphoma cells. *Cancer Sci* 97(12):1381-1387, 2006.
- 5) Watanabe S, Terashima K, Ohta S, Horibata S, Yajima M, Shiozawa Y, Dewan MZ, Yu Z, Ito M, Morio T, Shimizu N, Honda M, Yamamoto N. Hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2Rgamma null mice develop human lymphoid systems and induce long-lasting HIV-1 infection with specific humoral immune responses. *Blood* 109(1):212-218, 2007.
- 6) Fukuhara T, Hosoya T, Shimizu S, Sumi K, Oshiro T, Yoshinaka Y, Suzuki M, Yamamoto N, Herzenberg LA, Herzenberg LA, Hagiwara M. Utilization of host SR protein kinases and RNA-splicing machinery during viral replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(30):11329-11333, 2006.
- 7) Tamamura H, Ojida A, Ogawa T, Tsutsumi H, Masuno H, Nakashima H, Yamamoto N, Hamachi I, Fujii N. Identification of a new class of low molecular weight antagonists against the chemokine receptor CXCR4 having the dipicolylamine-zinc(II) complex structure. *J Med Chem.* 49(11):3412-3415, 2006.
- 8) 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 N, 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* 80(11):5563-5570, 2006.
2. 学会発表
- 1) 斉藤尚紀、高橋めぐみ、清水真澄、伊吹謙太郎、速水正憲、三浦智行、高橋秀実：SIV/SHIV 感受性 IL-2 independent アカゲザル細胞株 "MT-IL2I" の樹立とその性状解析. 第 20 回日本エイズ学会学術集会 2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日 (東京)
- 2) Amet Tohti、斎 暁華、山本直樹、山岡昇司：Statin-induced Inhibition of HIV-1 release from latently Infected U1 cells reveals a critical role for protein prenylation. 第 20 回日本エイズ学会学術集会 2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日 (東京)
- 3) 大庭賢二、梁明秀：プロリルイゾメラーゼ Pin1 は HIV-1 の複製を負に制御する 第 20 回日本エイズ学会学術集会 2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日 (東京)
- 4) 鈴木辰徳、山本典生、山本直樹、間陽子：HIV-1 Vpr と Importin α の結合を標的とする新規抗 HIV-1 の薬の開発 第 20 回日本エイズ学会学術集会 2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日 (東京)
- 5) 濱武牧子、浦野恵美子、花房秀次、加藤真吾、TeeKok Keng、武部豊、山本直樹、駒野淳：血友病患者におけるエイズ長期未発症例における高力価中和抗体の存在と標的部位の同定 第 20 回日本エイズ学会学術集会 2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日 (東京)
- 6) 青木徹、貝の瀬由成、二橋悠子、清水佐紀、松田善衛、山本直樹、駒野淳：ミリストイル化非依存的な HIV-1 Gag の Assembly および virus-like particle 産生 第 20 回日本エイズ学会学術集会 2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日 (東京)

- 7) 駒野 淳、二橋悠子、磯貝まや、濱武牧子、松田善衛、佐藤裕徳、椎野貞一郎、武部豊、山本直樹：HIV-1 逆転写酵素 polymerase active site への薬剤耐性異変が誘導する RNase H 活性の低下と耐性亢進への寄与 第 20 回日本エイズ学会学術集会 2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日（東京）
- 8) 山本典生、山本直樹：NAF-1 による HIV-1 複製メカニズムの解析 第 20 回日本エイズ学会学術集会 2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日（東京）
- 9) 杉本智恵、中山英美、塩田達雄、山本

直樹、永井美之、森一泰：新規糖鎖欠失 SIV の性質とアカゲザルでの感染 第 20 回日本エイズ学会学術集会 2006 年 11 月 30 日-12 月 2 日（東京）

G. 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。

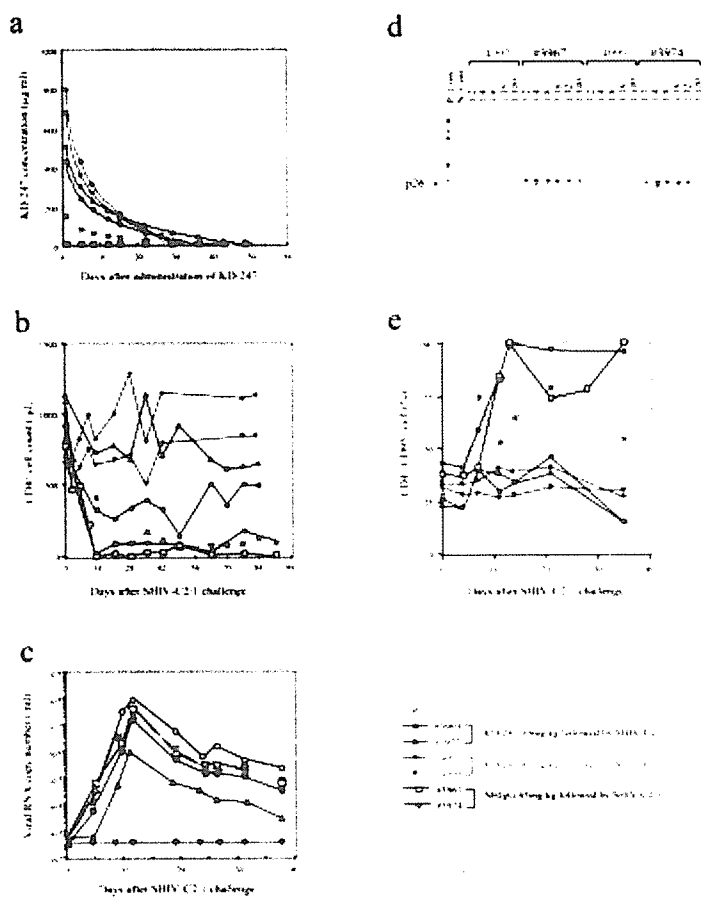


図 1. サルにおける KD-247 の受身伝達による高病原性 SHIV 感染からの完全防御

(a) KD-247 の受身伝達後のプラズマ中の濃度, (b) CD4⁺-T-cell 数, (c) プラズマウイルス血症, (d) 45 mg/kg KD-247 投与サル (monkeys 4092 and 4099) と NHlgG コントロールサル (monkeys 3967 and 3974) の HIV-2 Western blot kit (Diagnostics Pasteur, Marnes-La-Coquette, France) によるウェスタンブロット解析, (e) SHIV チャレンジサル PBMC における CD95 抗原発現

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）
分担研究報告書

ワクチンによる SHIV 複製制御の長期解析

分担研究者 俣野 哲朗 東京大学医科学研究所教授

研究要旨

HIV 感染症では、細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) がウイルス複製抑制に中心的役割を担っていることが知られており、感染初期に CTL による血中ウイルス量の低下がみられるが、HIV 複製の制御には至らず慢性持続感染が成立し、ウイルス血症が持続してエイズ発症にいたる。CCR5 指向性サル免疫不全ウイルス (SIV) 慢性持続感染サルエイズモデルでは、ワクチンによる CTL 誘導が必ずしもウイルス複製制御に直結するわけではなく、CTL ワクチンによる慢性持続感染成立阻止を目指すにあたっては、CTL によるウイルス複製抑制機序の解析が重要である。一方、急性エイズモデルとして知られている CXCR4 指向性サル免疫不全ウイルス SHIV 感染モデルでは、ワクチンによる CTL 誘導がウイルス複製制御に比較的容易に直結する。そこで本研究では、慢性エイズモデルにおける CTL のウイルス複製抑制機序解明の一助とする目的で、急性エイズモデルにおける CTL のウイルス複製抑制機序を解析し、慢性エイズモデルと比較検討することとした。今回、我々の開発した CTL 誘導ワクチン接種により CXCR4 指向性 SHIV 複製制御にいたったサルにおける CTL 反応の解析を行い、複製制御が維持されている間にも、低いレベルに抑制されたウイルス複製に対して、新たなエピトープ特異的 CTL 反応が誘導されていることを明らかにした。このような CTL の誘導は、急性エイズモデルにおける安定したウイルス複製制御に貢献しうると考えられる。

A. 研究目的

HIV 感染症では、感染後に宿主適応免疫反応が誘導されるにもかかわらず慢性持続感染が成立し、ウイルス血症が持続してエイズ発症にいたる。適応免疫系のエフェクターとしては、細胞傷害性 T リンパ球

(CTL) が HIV 複製抑制に中心的役割を担っていることが知られており、HIV 感染初期に CTL による血中ウイルス量の低下がみられるが、HIV 複製の制御には至らず慢性持続感染が成立する。

この慢性持続感染成立を阻止するエイズ

ワクチン開発のための動物モデルとしては、CCR5 指向性サル免疫不全ウイルス (SIV) 感染サルエイズモデルが最適と考えられている。この慢性エイズモデルでは、ワクチンによる CTL 誘導がウイルス複製制御に直結するわけではない。我々はこれまで、CTL 誘導を基本とするエイズワクチン開発に主眼をおき、優れた CTL 誘導能を有する Gag 発現センダイウイルス (SeV-Gag) ベクターを用いたワクチンシステムを開発した。さらに、CCR5 指向性 SIVmac239 慢性持続感染サルエイズモデルにて、ワクチンによる SIV 複製制御の可能性を初めて示すことに成功し、CTL による SIV 複製制御機序の解析を進めている。

一方、CXCR4 指向性サルヒト免疫不全ウイルス SHIV (89.6P、89.6PD 等) 感染急性エイズモデルでは、CTL 誘導がウイルス複製制御に比較的容易に直結する。そこで本研究では、慢性エイズモデルにおける CTL のウイルス複製抑制機序解明の一助とする目的で、急性エイズモデルにおいて CTL 誘導がウイルス複製制御に結びつく機序を解析し、慢性エイズモデルと比較検討することとした。

これまでに、CTL 誘導ワクチン接種により SHIV89.6PD 複製制御に至ったサルの長期解析を進め、長期間ウイルス複製制御が維持されることを明らかにしてきたが、今回、ワクチンにより長期の SHIV89.6PD 複製制御にいたったサルにおける CTL 反応の解析を行った。

B. 研究方法

SeV-Gag ベクターワクチン接種後 SHIV89.6PD チャレンジ実験を行ったアカ

ゲサル 2 頭 (R00-015、R00-017) の長期解析を行った。いずれもセットポイント期以降 SHIV 複製は制御されウイルス血症は検出下限以下であった。チャレンジ後約 3 ヶ月 (セットポイント期) および約 1 年 2 ヶ月 (慢性期) の時点のリンパ球について、Gag 全アミノ酸配列をカバーする overlapping peptide mixture を用いた抗原刺激特異的インターフェロン γ 誘導を細胞内免疫染色で検出することにより、Gag ペプチド特異的 CTL 反応を測定した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、倫理面も含めて、国立感染症研究所、医薬基盤研究所および東京大学医科学研究所の動物実験委員会の審査をうけ、その承認を得てから開始した。

C. 研究結果

2 頭ともにおいて、SHIV89.6PD チャレンジ後約 3-4 ヶ月および 1 年の時点のいずれでも Gag 特異的 CTL 反応は検出された。

サル R00-015 においては、第 16 週で peptide mixture #1・#3・#4 特異的 CTL が優位であったが、第 60 週では#3・(#4)・#8・#9 特異的 CTL が優位となっていた (図 1)。つまり第 16 週から第 60 週の間、#1 特異的 CTL レベルが低下し、新たに#8・#9 特異的 CTL が誘導されたと考えられた。

サル R00-017 においては、第 12 週で peptide mixture #6・#8 特異的 CTL が優位であったが、第 58 週では#3・(#6)・#8・#9 特異的 CTL が優位となっていた (図 1)。つまり第 12 週から第 58 週の間、新たに#3・#9 特異的 CTL が誘導されたと考えられた。