

D. 考察

Gag 特異的 CTL 誘導ワクチンによる SHIV89.6PD 複製制御において、Gag 特異的 CTL は長期間維持されることが示された。この約 3 ヶ月から約 1 年 2 ヶ月までの約 1 年間の期間、ウイルス血症は検出下限以下で、ウイルス複製は極めて低いレベルに抑えられていたわけであるが、この低いレベルのウイルス複製に反応した、新たなエピトープ特異的 CTL 反応の誘導が示された。このようにワクチン誘導 CTL に新たなエピトープ特異的 CTL の誘導が加わることは、より broad な CTL 反応として、急性エイズモデルにおける安定なウイルス複製制御に貢献している可能性が考えられる。

E. 結論

ワクチン接種により SHIV89.6PD 複製制御にいたったサル CTL の解析を行い、セットポイント期以降のウイルス複製制御が維持されている期間においても、新たなエピトープ特異的 CTL 誘導が生じていることを見出した。

G. 研究発表

1 論文発表

(1) 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.

2 学会発表

- (1) Matano T. Control of viral replication by vaccine-induced CTL in macaque AIDS models. The 13th East Asia Symposium on Biomedical Research: From Genes to Therapeutics, Seoul, Korea, 7/19/2006.
- (2) Matano T. Long-term CTL-based control of simian immunodeficiency virus replication in vaccinated rhesus macaques. The 6th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 9/7/2006.
- (3) 湯浅光博、川田真幹、山本浩之、俣野哲朗. X4-tropic SHIV 複製制御サルにおける R5-tropic SIV 重複感染防御機序. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会、1P119、名古屋、11/19/2006.
- (4) 塚本徹雄、俣野哲朗. サルエイズモデルにて誘導される CTL の SIV 複製抑制能の *in vitro* 評価系の樹立. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会、1P122、名古屋、11/19/2006.
- (5) 山本浩之、川田真幹、俣野哲朗. サル免疫不全ウイルス感染成立後の中和抗体のウイルス複製抑制効果. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会、3C06、名古屋、11/21/2006.
- (6) 川田真幹、山本浩之、塚本徹雄、関紗由里、五十嵐博子、俣野哲朗. 細胞傷害性 T リンパ球誘導型予防エイズワクチンによる長期のサル免疫不全ウイルス複製制御の可能性. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会、3WSA4、名古屋、11/21/2006.
- (7) 俣野哲朗. エイズウイルス感染に対する獲得免疫反応. 第 54 回日本ウイルス学

会学術集会、L5-3、名古屋、11/21/2006.

- (8) Matano T. Multiple epitope-specific CTL responses in control of immunodeficiency virus replication. 20th Annual Meeting of the Japanese Society for AIDS Research, S15-1, Tokyo, Japan, 12/2/2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況
無し。

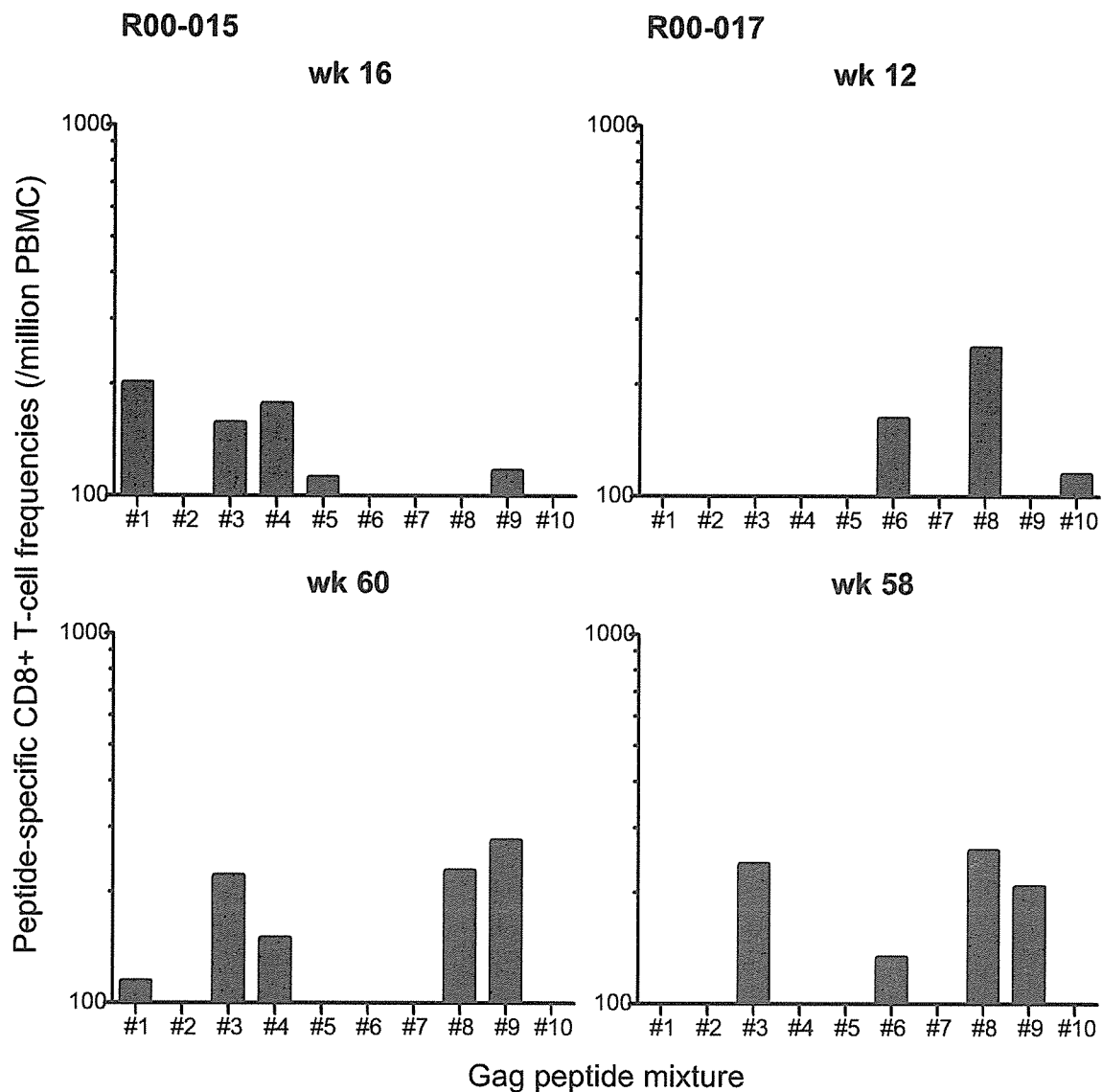


図1 SHIV89.6PD複製制御期間におけるGagエピトープ特異的CTLの変動
 サルR00-015およびR00-017におけるSHIV89.6PDチャレンジ後約3ヶ月（第16週あるいは第12週）および約1年2ヶ月（第60週あるいは第58週）の末梢血単核球を用いた。SIVmac239 Gag全アミノ酸をカバーするoverlapping peptidesを、#1（Gag第1アミノ酸-第65アミノ酸に相当）、#2（第55アミノ酸-第114アミノ酸）、#3（第104アミノ酸-第165アミノ酸）、#4（第155アミノ酸-第213アミノ酸）、#5（第202アミノ酸-第265アミノ酸）、#6（第255アミノ酸-第316アミノ酸）、#7（第306アミノ酸-第364アミノ酸）、#8（第354アミノ酸-第416アミノ酸）、#9（第406アミノ酸-第464アミノ酸）、#10（第453アミノ酸-第510アミノ酸）の10群にわけ、各々のpeptide mixture群を用いた抗原刺激に特異的に反応するCD8陽性Tリンパ球レベルを測定した。

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

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

我々はこれまでの研究で HIV-1 の標的であるとともに粘膜組織におけるウイルスの reservoir と考えられる CD4 分子陽性の樹状細胞は、HIV-1-Nef 遺伝子産物によりその表面に発現したペプチド抗原を提示するクラス I MHC 分子のみならず、脂質抗原提示を担う CD1 分子群のうち、CD1a 及び CD1d 分子の発現を低下させることを見出した。一般にクラス I MHC 分子は個体内では保存されているが個々のヒトでは異なるのに対し、これら CD1 分子群は種族内で保存された構造をとることが知られており、特に CD1d 分子により提示された抗原を認識する NKT(natural killer T)細胞の T細胞受容体の構造も基本的に保存されていることが判明してきた。そこでまず、この 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 $\alpha 1$ 及び $\alpha 2$ 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 $\alpha 1$ 及び $\alpha 2$ 部分がかなり異なることを見出された。このことは、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に何らかの関連性があることを示唆している。そこで、ヒト末梢血 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 -Galactosyl 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。その結果、HIV-1 非存在下に比べ CD8 陽性 NKT 細胞は大半が消失したにも関わらず、CD4 陽性の NKT 細胞の増殖が認められた。この際、CD4 陽性の NKT 細胞の一部は HIV-1 に比較的高い感受性を有していたものの、感染に伴い消滅することはなくその機能は良く保たれていた。こうした事実は、HIV-1 の感染拡大に固定型 T細胞受容体を発現した自然免疫系に属すると考えられる CD4 陽性 NKT 細胞が関与する可能性を示唆しており、その制御の重要性を物語っている。

A. 研究目的

我々は IgA に富む粘膜組織を反映しているヒト初乳を用いたこれまでの研究で HIV-1 の重要な標的であるとともに粘膜組織におけるウイルスの reservoir が CD4 分子陽性の樹状細胞であることを見出した。そして、HIV-1-Nef 遺伝子産物により樹状細胞表面に発現したペプチド抗原を提示するクラス I MHC 分子のみならず、脂質抗原提示を担う CD1 分子群のうち、CD1a 及び CD1d 分子の発現が低下することを見出した。こうしたことは、HIV-1 感染に伴いクラス I MHC 分子からペプチド抗原情報を受け取る獲得免疫系の CTL のみならず、CD1a 及び CD1d 分子から提示された糖脂質抗原に対する免疫応答も強く影響を受けるものと想定される。一般にクラス I MHC 分子は個体内では保存されているが個々のヒトでは異なるのに対し、これら CD1 分子群は種族内で保存された構造をとることが知られて

いる。特に CD1d 分子により提示された糖脂質抗原を認識する NKT(natural killer T)細胞の T細胞受容体構造は基本的に Invariant であり保存されているため体表面を防御する自然免疫系に属する可能性が示唆されている。そこで本研究では、まずこの 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、特に T細胞との応答性に関わる $\alpha 1$ 及び $\alpha 2$ 部分が HIV-1 へ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 CD1d 分子の $\alpha 1$ 及び $\alpha 2$ 部分がかなり異なることを見出された。このことは、CD1d 分子を介して抗原情報を受け取る NKT 細胞の活性化と HIV-1 あるいは SIV に対する感受性との間に何らかの関連性があることを示唆している。そこで本研究では、ヒト末梢血 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、HIV-1 感染時における NKT 細胞の影響を解析した。

B. 研究方法

アカゲザル MM257 の PBMC から単球を分離し、GM-CSF (200ng/ml)、IL-4 (50ng/ml) を加え 37°C で 6~8 日間培養し樹状細胞を誘導した。このサル樹状細胞から RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて cDNA を作成した。さらにヒト CD1d 配列を元に予測合成したプライマーを用いアカゲザル CD1d 分子の遺伝子配列を検索した。また、樹状細胞の誘導効率が思わしくなかったものについては、ジェノミック DNA に対するダイレクトシークエンスを行った。続いて、ヒト及びチンパンジーの細胞からジェノミック DNA を採取し、CD1d 分子のダイレクトシークエンスを行った。更に、ヒト末梢血 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、HIV-1 感染時における NKT 細胞の影響を Flow cytometry を用いて解析した。また、HIV-1 に感染しているか否かを観察する目的で、p24 抗原に対する染色を行った。

C. 研究結果

1) アカゲザル由来の樹状細胞から CD1d の cDNA クローニングに成功した。また種における保存性を検討するためさらに 4 頭のアカゲザル、うち 2 頭は中国産、2 頭はインド産、について解析を行ったところ、個体特異的な遺伝子変異が 1、2 カ所認められたものの、生育環境が及ぼしたと思われる変異は確認できなかった。次に SIV に対する感受性が異なるアフリカミドリザルの CD1d 分子についても検討した結果、アカゲザルとは異なる箇所が 3 カ所存在しており、これら 3 カ所の変異は CD1d の抗原結合領域に相当する箇所に存在していたことから、SIV 感染に伴う CD1d 分子の提示する抗原性の差異が SIV に対する感受性の違いに関与する可能性が示唆された (図 1)。また、ヒトと同様 HIV 感受性の高いチンパンジー CD1d 分子の遺伝子配列を検討し

たところ、その抗原結合領域が末端に存在した 1 塩基のアミノ酸変異をのぞいては全くヒトと同一なものであることが判明した (図 2)。以上より、同種間で保存されている CD1d 分子と SIV/HIV 感受性との間に何らかの関係があることが示唆された。

Position (b. p.)	Genomic region	Nucleotide		Amino acid	
		AGM	Macaque	AGM	Macaque
		Consensus	Consensus	Consensus	Consensus
93	Exon2	T	C	L	L
96		G	A	Q	Q
210		T	G	P	P
351	Exon3	C	T	S	S
417		A	T	R	S
510		G	C	K	N
518		G	A	R	K

Consensus sequence of the CD1D for AGM was determined from 3 monkeys. Distinct positions for each specific nucleotide and amino acid were shown. Although the consensus CD1D sequence of AGMs differed by 7 nucleotides from the rhesus consensus sequence, these nucleotide differences induced only 3 amino acids changes within Exon3 (indicated as bold).

図 1. アカゲザルとアフリカミドリザル (AGM) の CD1d 分子の遺伝的な差異

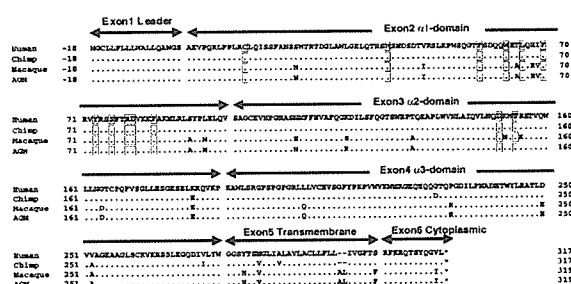


図 2. ヒトとチンパンジーにおける CD1d 分子の類似性

3) そこで、ヒト末梢血 CD4T 細胞に X4-type の HIV-1 感染を MOI 0.1 で惹起する際に、CD1d 分子を介して NKT 細胞を刺激する 100 ng/ml の α -Galactocyl Ceramide (α -Gal Cer) を添加し、20 U/ml の IL-2 存在下で 14 日間培養し経過を観察した。その結果、HIV-1 非存在下で刺激培養した細胞群に比べ HIV-1 存在下では、予想外の結果として V α 24 陽性 CD8 陽性 NKT 細胞は大半が消失したにも関わらず、CD4 陽性の NKT 細胞の増殖が認められた (図 3)。またこの際、増殖が見られた CD4 陽性の NKT 細胞の少なくとも 1 割が X4-type の HIV-1 に感染していた。

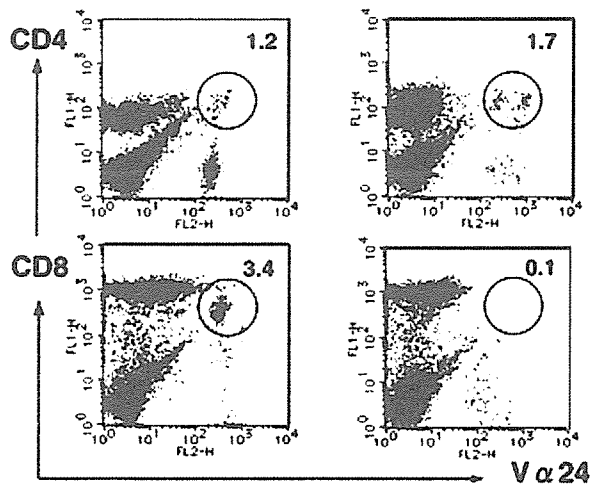


図3. X4-type HIV-1 存在下における NKT 細胞の誘導

4) 通常 NKT 細胞は、CD4 分子を発現したもののみならず CD8 分子を有したもの、および CD4 も CD8 も発現していないものに大別される。そして、X4-type HIV-1 に感受性を有するのは CD4 陽性群のみ出ある。そこで、この X4-type HIV-1 に感染した CD4 陽性 NKT 細胞の細胞傷害性を追跡した結果、非感染 NKT 細胞と同等の傷害性を示した(図4)。また、感染時における IFN- γ の放出量も非感染時と殆ど変わりは無かった。このことは、これら CD4 陽性 NKT 細胞は HIV-1 感染に伴う機能的な低下は生じていないことを示唆している。

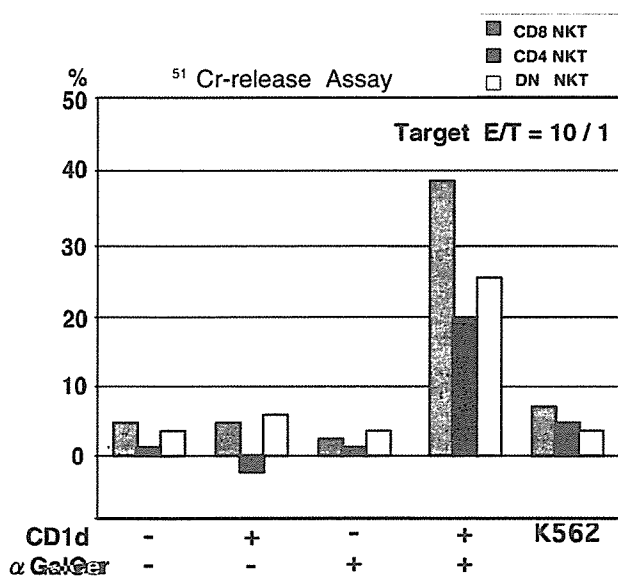


図4. X4-type HIV-1 に感染した NKT 細胞の細胞傷害性

D. 考察

以上より、X4-type の HIV-1 は、これまで標的である獲得免疫システムの中心的な役割を演ずるヘルパーT細胞としての CD4 陽性T細胞のみならず、CD1d 分子によって提示された α -Gal Cer などの糖脂質抗原を認識し活性化する CD4 陽性 NKT 細胞をも標的とすることが判明した。通常 NKT 細胞は固定型のT細胞レセプターを発現した粘膜組織などに局在する自然免疫系に属する特性を有した細胞群であり、抗原刺激により増殖後速やかにその数を減ずる。このため、一般に末梢血などにおいて NKT 細胞数は殆どキャッチすることが出来ず、従ってその生物学的な意義に関しても不明な点が多い。

興味深いことに、今回の我々の結果は、 α -Gal Cer の添加培養によって増殖した NKT 細胞の中で、HIV-1 の標的である CD4 陽性 NKT 細胞が選択的に残存するという結果を得た。そして、こうした傾向は HIV-1 に感染することによって助長される。すなわち、CD4 陽性 NKT 細胞は HIV-1 の侵入を受けることによって、その細胞傷害性やサイトカイン放出能などの機能を保持した体内に残存する可能性がある。驚くべきことに、我々はこの HIV-1 に感染した CD4 陽性 NKT 細胞の存在が、CD4 陽性ヘルパーT細胞に対する HIV-1 の感染性を増強する現象を観察している。

以上より、粘膜などに局在し HIV-1 の侵入を防ぐはずの自然免疫系の CD4 陽性 NKT 細胞は、あたかも HIV-1 の侵入を受け、感染拡大への起爆剤となる可能性が推測された。

E. 結論

CD1d という種固有の抗原提示分子によって活性化される NKT 細胞の亜群である、CD4 陽性 NKT 細胞は HIV-1 に対する感受性を有するのみならず、感染後 HIV-1 の感染拡大、あるいはウイルスの保持に関与する可能性を示唆する結果が得られた。このことは、CD1d-NKT 細胞システムが HIV-1 というウイルスの保存、感受性の維持に関与することを物語っており、HIV-1 に感染したこれら CD4 陽性 NKT 細胞の制御が感染拡大を防ぐ上での重要な手がかりを提供することを暗示している。

F. 論文発表

1. 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.**, 74:248-256, 2006.
2. Wakabayashi A., Utsuyama M., Hosoda T., Sato K., Takahashi, H., Hirokawa K. Induction of immunological tolerance by oral, but not intravenous and intraportal, administration of ovalbumin and the difference between young and old mice. **J. Nutr. Health Aging**, 10:183-191, 2006.
3. 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.
4. Wakabayashi A, Kumagai Y, Watari E, Shimizu M, Utsuyama M, Hirokawa K, Takahashi H. Importance of gastrointestinal ingestion and macromolecular antigens in the vein for oral tolerance induction. **Immunology**, 119:167-177, 2006.
5. Nakagawa Y., Kikuchi H., Takahashi H. Molecular analysis of TCR and peptide/MHC interaction using P18-I10-derived peptides with a single D-amino acid substitution. **Biophysical J.**, 2007 (in press).
6. Takahashi M., Watari E., Shinya E., Shimizu T., Takahashi H. Suppression of virus replication via down-modulation of mitochondrial short chain enoyl-CoA hydratase in human glioblastoma cells. **Antiviral Res.**, 2007 (in press).
7. Wakabayashi A., Nakagawa Y., Shimizu M., Moriya K., Nishiyama Y., Takahashi H. Suppression of Already Established Tumor Growing through Activated Mucosal CTLs Induced by Oral Administration of Tumor Antigen with Cholera Toxin. **Cancer Res.**, 2006 (submitting).
8. Saito N., Shinya E., Shimizu M., Owaki A., Watanabe E., Takahashi M., Hidaka C., Ibuki K., Miura T., Hayami M., Takahashi H. Invariant T-cell receptor mediated functional cross-reactivity of natural killer T cells to species-specific CD1d among primates and rodents. **J. Immunol.**, 2007 (submitting).
9. 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. **日本医科大学医会誌**, 2:1-2, 2006.
10. 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**, 80(5):463-468, 2006.
11. 新谷英滋、大脇敦子、高橋秀実: DsRed2を用いたエイズウイルス nef 遺伝子産物と脂質抗原提示分子 CD1a 相互作用の解析. **日本医科大学医会誌**, 2:134-135, 2006.
12. 高橋秀実: 体表面に配置された自然免疫システムと体内を循環する獲得免疫システム. **炎症と免疫**, 14:449-450, 2006.
13. 高橋秀実: 粘膜組織における HIV の拡散と制御. **炎症と免疫**, 14:479-485, 2006.
14. 飯泉匡、熊谷善博、高橋秀実: Helicobacter pylori 由来 urease の酵素活性を増強させる特異的抗体. **臨床免疫・アレルギー科**, 46:205-207, 2006.
15. 新谷英滋、高橋秀実: ヒト免疫不全ウイルス Nef による免疫抑制の機序. **臨床免疫・アレルギー科**, 46:222-226, 2006.
16. 高橋秀実: HIV-1 と nef. **炎症と免疫**, 14:816-821, 2006.
17. 高橋秀実: 持続感染症としての未病. **未病医学入門 (日本未病システム学会編)**, pp.108-112, 2006.
18. 高橋秀実: 特異免疫およびその賦活法に関する基本原理: ブラック微生物学 (第2版). 林英生、岩本愛吉、神谷茂、高橋秀実編 (**丸善出版**), 2007 (印刷中).
19. 山西慎吾、神谷茂、高橋秀実: ピロリ菌ウレアーゼによる B-1 細胞活性化作用と自己免疫疾患誘導の可能性. **日本ヘリコバクター学会誌**, 2007 (印刷中).

G. 学会発表

1. 山西慎吾、神谷茂、高橋秀実: ピロリ菌ウレアーゼによる B-1 細胞活性化作用と自己免疫疾患誘導の可能性. 第12回日本ヘリコバクター学会 2006年6月22-23 (神戸).

2. 高橋秀実、山西慎吾、飯泉匡、坂本長逸：ピロリ菌ウレアーゼによる B-1 細胞活性化を介した自己免疫疾患誘導。
第 48 回日本消化器病学会大会
2006 年 10 月 11-14 日 (札幌)。
3. 高橋秀実：HIV 感染細胞の制御をめざしたワクチンの開発。
第 10 回日本ワクチン学会学術集会
2006 年 10 月 21-22 日 (大阪)。
4. 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・その 2。
第 54 回日本ウイルス学会総会。
2006 年 11 月 19-21 日 (名古屋)。
5. 渡理英二、高橋めぐみ、高橋秀実：Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) の麻疹ウイルス感染グリオーマ細胞におけるウイルス増殖とサイトカイン産生。
第 54 回日本ウイルス学会総会。
2006 年 11 月 19-21 日 (名古屋)。
6. 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)。
7. 新谷英滋、清水真澄、大脇敦子、渡邊恵理、日高千鶴乃、高橋秀実：HIV-1 Nef down-regulates lipid antigen presentation by CD1a on immature dendritic cells: implications for the lipid antigen as AIDS vaccine candidates。
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. 日高千鶴乃、渡邊恵理、清水真澄、山西慎吾、新谷英滋、高橋秀実：NKT 細胞による X4-type HIV-1 の感染拡大。
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. Takahashi, H. : CD1d-NKT system and HIV. Japan-US Cooperative Medical Science Program: The 19th Joint Scientific Meeting of AIDS. December 6-7, 2006 (Kagoshima).
10. Nakagawa Y., Shimizu M., Noorose Y., Higuchi T., Takahashi M., Takahashi H. : Effect of antigenic peptide on CD8+ HIV-1 gp160-specific CTLs in vivo.
第 35 回日本免疫学会総会
2005 年 12 月 13 日-15 日 (横浜)。
11. Yamanishi S., Watanabe E., Shimizu M., Kobayashi F., Takeuchi H., Iizumi T, Kumagai Y., Takahashi H. : Activation of B-1 cells by *Helicobacter pylori* urease: implications for induction of autoimmunity via *Helicobacter pylori* infection.
第 36 回日本免疫学会総会
2006 年 12 月 11 日-13 日 (大阪)。
12. Kumagai Y., Yamanishi S., Iizumi T, Norose Y., Watanabe E., Fukunaga Y., Takahashi H. : Local immune response to *H. pylori* infection in murine lymph nodes adjacent to the stomach.
第 36 回日本免疫学会総会
2006 年 12 月 11 日-13 日 (大阪)。
13. Katakura T., Katsuhisa N., Shimizu M., Harimoto H., Atsukawa M., Tamura H, Takahashi H., Sakamoto C.: Ribavirin interfered the inhibitory activity of human CD4+CD25+ T-regulatory lymphocytes mainly in a cytokine dependent manner.
第 36 回日本免疫学会総会
2006 年 12 月 11 日-13 日 (大阪)。
14. Hidaka C., Watanabe E., Shimizu M., Yamanishi S., Negishi Y., Komiya N., Shinya E., Takahashi H. : Expansion of T-cell tropic X4-type HIV-1 infection via CD4-positive NKT cells.
第 36 回日本免疫学会総会
2006 年 12 月 11 日-13 日 (大阪)。
15. Wakabayashi A., Kumagai Y., Watari E., Shimizu M., Moriya K., Utsuyama M., Hirokawa K., Takahashi H. : Importance of gastrointestinal ingestion and macromolecular antigens in the vein for oral tolerance induction.
第 36 回日本免疫学会総会
2006 年 12 月 11 日-13 日 (大阪)。
16. Shinya E., Owaki A., Shimizu M., Watanabe E., Yagi Y., Hidaka C., Takahashi H. : Hiv-1 Nef down-regulates both CD1a and CD1d surface expression in immature dendritic cells.
第 36 回日本免疫学会総会
2006 年 12 月 11 日-13 日 (大阪)。

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。

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

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）

共同研究者：Xiao-Jie Li, 草川茂, 保科佳美, 上西理恵, 磯貝まや（国立感染症研エイズ研究センター）
Xueshan Xia (Kunming University of Science and Technology, Kunlong Ben (Kunming Institute of Zoology)
Kay Thi Aye, Khin Yi Oo, Kyaw Zin Thant, Min Thwe (Ministry of Health, Myanmar)

研究要旨 異なる系統の HIV-1 株の重感染 (dual infection) は新規の組換えウイルスが生み出されるための前提条件である。これまでの研究から、中国南西部（雲南省）とミャンマーにかけてのアジア地域に、新しいタイプの組換えウイルスが絶えず新生している地点を見出したが、このことは、同時に異なる系統のウイルス間の重感染が頻繁に起っている可能性を示唆する。そこでわれわれは、これら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。HIV-1 では遺伝子組換えによるゲノム多様性の獲得速度は、複製エラーによる変異の蓄積速度より 10 倍高いと考えられており、重感染さらに遺伝子組換えによって、ワクチンの（もし有効なワクチンが開発されたとしても、その）有効性が急速に失われていく可能性が危惧される。

A. 研究の背景とその目的

異なる系統の HIV-1 株の重感染 (dual infection) は新規の組換えウイルスが生み出されるための前提条件である。また、将来のワクチン戦略を考えた場合、現実のフィールドでの重感染・スーパー感染さらに遺伝子組換えの頻度を知ることは重要と考えられる。

われわれは、これまでの研究から、中国南西部（雲南省）とミャンマーにかけてのアジア地域に、新しいタイプの HIV-1 組み換えウイルスが絶えず新生している地点が見出されることを明らかにした。これらの地域では異なる系統のウイルス間の重感染が頻繁に起っている可能性が推定される。そこでわれわれは、この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。

B. 研究方法

中国雲南省およびミャンマーにおけるハイリスク感染者それぞれ 26 例、118 例の血漿検体から RNA を抽出し、様々な領域のプライマーを用い

た RT-PCR の後、direct sequencing を行った。Direct sequencing の結果、異なるプライマー・ペアによって異なった塩基配列結果が得られる場合や direct sequence における塩基配列の読みに曖昧さがあるものを重感染症例検索のクライテリアとしてスクリーニングを行った。このようにして重感染が疑われる症例に関して、それぞれの PCR 産物を TA クローニング法によって少なくとも 20 クローンをクローニングし、塩基配列を決定した。それぞれのクローンのサブタイプ帰属および組み換え構造を、系統樹解析および組換え点解析技術を用いて解析した。

（倫理面への配慮）アジア各国エイズ研究機関との共同研究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

ハイリスク集団における重感染の検出頻度は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) であった。中国雲南省においては 2 例のハイリスク男性が、それぞれ CRF07_BC と CRF01_AE 間、CRF08_BC と

CRF01_AE 間の重感染例であった (図 1)。一方ミャンマーでは合計 5 例の重感染が見出された (図 2)。うち異性間感染 3 例は CRF01_AE とサブタイプ B' 間の重感染であったが、残り 2 例は注射薬物乱用者 (injecting drug user, IDU) で HIV-1 サブタイプ B', C および CRF01_AE の 3 つの異なる系統のウイルス間の様々な組み合わせの組み換えウイルスを含む極めて複雑なウイルス準種からなる重感染であることが明らかになった。

図 3 に重感染に関与する HIV-1 遺伝子型の起源と推測される伝播経路を示す。

D. 考察

異なる系統の HIV-1 株の重感染あるいはスーパー感染の有無は、ウイルス学上、また将来のワクチンの可能性を探る理論的に重要な試金石である。これまでレトロウイルスでは、superinfection immunity とよばれる現象があり、ウイルスの重 (スーパー) 感染は稀であると考えられてきた。しかし、HIV-1 に関しては、重感染は決して稀な現象ではないと考えられる。またこの地域では多様な組み換えウイルスが 10-30% の高い頻度で検出されることに示唆されるように、HIV-1 重感染がおそらく何の障害もなく容易に起っていると考えられる。このことは、また有効なエイズワクチンの開発が決して容易な課題ではないことを強く示唆するものと考えられる。

E. 結論

新規組み換えウイルスの新生地点と考えられる中国南西部とそれに国境を接するミャンマーでは、異なる系統のウイルス間の重感染が比較的頻繁に見出され、新しいタイプの組換えウイルスを高い頻度で生み出すウイルス学的背景となっていることをはじめて明らかにした。このことは、この地域に見られる極めて高いリスク行動を行っている集団と急速なウイルス伝播を可能とする社会的ネットワークの存在を示唆する。また、遺伝子組換えによって加速される HIV-1 ゲノム多様性の増大に加え、重感染現象が容易に起こり得るという事実は、有効なエイズワクチン開発の困難さを暗示するものと考えられる。

F. 健康危険情報

- 1) 「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)
- 2) 「アジアにおける MSM の間の HIV 流行の激化」 (2006 年 8 月 22 日エイズ研究センター長野承認のもとに感染症情報センター長に報告)
- 3) 「東アジア地域における HIV-2 クラスタ」

(2007 年 1 月 18 日エイズ研究センター長の承認のもとに感染症情報センター長に報告)

G. 研究発表 (2006-2007)

1. 論文発表

1. Naito, Y., Ui-Tei, K., Nishikawa, T., Takebe, Y., Saigo, K. (2006). siVirus: web-based antiviral siRNA design software for highly divergent viral sequences. *Nucl. Acid Res. (Web Server issue)* **W448-W450**.
2. Takebe, Y. and Telesnitsky, A. (2006). Evidence for the acquisition of multidrug resistance by an HIV clinical isolate *via* human gene transduction. *Virology* **351**: 1-6.
3. Murakami, Y., Yamagoe, S., Noguchi, K., Takebe, Y., Uehara, Y. and Fukazawa, H. (2006). Ets-1-dependent expression of vascular endothelial growth factor receptors is activated by Latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus through interaction with Daxx. *J. Biol. Chem.* **281(38)**: 28113-28121.
4. Tee, K. K., Li, X.-J., Nohtomi, K., Ng, K. P., Kamarulzaman, A., and Takebe, Y. (2006). Identification of a novel circulating recombinant form (CRF33_01B) disseminating widely among various risk populations in Kuala Lumpur, Malaysia. *J. AIDS* **43(5)**: 523-9.
5. Shimizu, S., Komano, J., Urano, E., Futahashi, Y., Miyauchi, K., Isogai, M., Matsuda, Z., Notomi, K., Onogi, T., Takebe, Y., and Yamamoto, N. (2006). Inhibiting lentiviral replication by HEXIM1, a cellular negative regulator of the CDK9/cyclin T complex (P-TEFb). *AIDS* (in press).

2. 学会発表 (2006-2007)

1. Takebe, Y. (2006). Selective advantage of LTR of HIV-1 subtype C in in Vivo recombination: Insights into in vivo mechanism of HIV-1 recombination. 13th Conference on retroviruses and opportunistic infectious (Feb.5-9, Denver, Colorado)
2. Takebe, Y. (2006). ICR (Inter-CRF recombinant): Discovery of new class of HIV-1 recombinants and its epidemiological implication. 13th Conference on retroviruses and opportunistic infectious (Feb.5-9, Denver, Colorado)
3. Takebe, Y. (2006). Compilation of recombination breakpoints of HIV-1 chimeras comprised of CRF01_AE and subtype B/B' emerging in Asia: Biological and epidemiological implications. 13th HIV dynamics and evolution (April 5-8, Woods Hole, MA)

4. 武部 豊 (2006). アジアにおけるエイズ危機と我が国の役割. 平成 18 年国立感染研シンポジウム (5/5/06)
5. Takebe Y. (2006). Strategic research project on AIDS and related infectious diseases in ARC, NIID (Shinjuku, Tokyo). Drug discovery and vaccine development program: Our “Seeds”. 2nd eIMBL Workshop (May 20-21, Seoul, Korea)
6. Takebe Y. (2006). Molecular epidemiology of HIV in Asia: Understanding the genesis of Asia’s expanding AIDS epidemic. Combating the “Big Three” Diseases: AIDS, Tuberculosis and Malaria (Symposium on infectious diseases) (June 15, Royal Netherlands Embassy, Tokyo)
7. Naito, Y., Takebe, Y., Ui-Tei, K., Saigo, K. (2006). siVirus: web-based antiviral siRNA design software for highly divergent viral sequences. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology/11th FAOBMB Congress (June 18-23, Kyoto, Japan)
8. Xia, X., Yu, J., Zhao, W., Ben, K., Zhang, N., Tee, KK., Li, X-J, Takebe, Y. (2006). Unique profile of HCV genotype distribution among HIV/HCV co-infected. Injecting Drug Users in Yunnan Province, China: Identification of novel HCV genotype and implications for interrelationship with surrounding regions. 6th China-Japan Virology Congress (June 22-24, Shanghai, China)
9. Naito, Y., Takebe, Y., Ui-Tei, K., Saigo, K., Nohtomi, K., Onogi, T., Takebe, Y. (2006). Rational design and evaluation of the effect of siRNA targeted to HIV-1 group M genomes using bioinformatics approach. 6th China-Japan Virology Congress (June 22-24, Shanghai, China)
10. Li, X-J., Hoshina, Y., Yokota, Y., Aye, KT, Thwe, M., Xia, X., Kusagawa, S., Takebe, Y. (2006). Dual infections with multiple lineages of HIV-1 strains in unique geographical recombination “hotspots” in Asia. 6th China-Japan Virology Congress (June 22-24, Shanghai, China)
11. Tee, KK., Li, X-J., Nohtomi, K., Ng, KP., Kamarulzaman, A., Takebe, Y. (2006). Identification of a Novel circulating recombinant form (CRF33_01B) disseminating widely among various risk populations in Malaysia. XVI IAC (August 13-18, Toronto, Canada)
12. Takebe, Y., Telesnitsky, A. (2006). Role of recombination-Driven human sequence transduction on the genesis of multiple-drug resistant mutant identified in Japan. 7th Symposium on antiviral drug resistance (November 12-15, Chantilly, Virginia)
13. Takebe, Y., Sato, H., Shiino, T., Telesnitsky, A. (2006). Role of recombination-driven human sequence transduction on the genesis of multiple-drug resistant mutant identified in Japan. 第 6 回分子環境予防医学研究会 (12 月 1-2 日 京都)
14. Takebe, Y., Sato, H., Shiino, T., Telesnitsky, A. (2006). High level of plasticity and flexibility of HIV-1: Detection of unusual case of human sequence transduction. Us-Japan Cooperative Medical Science Program: 19th Joint Meeting of the AIDS Panels (December 6-7, Kagoshima)
15. 草川茂、武部豊：HIV-1 CRF08_BC 感染性分子クローンの構築とそのウイルス学的性質の解析. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会総会、2006 年 11 月
16. 草川茂、武部豊：HIV-1 サブタイプ B’ 感染性分子クローンの樹立とその性状の解析. 第 20 回日本エイズ学会学術集会総会、2006 年 12 月
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (2005-2007)
1. 「弱毒型 HIV-1 塩基配列」(特願 2005-008741、平成 17 年 1 月 17 日出願)(神奈川衛生研究所 今井光信・近藤真規子博士と共同出願)
2. 「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)(東大理と共同出願)
3. 「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)(国立感染研ウイルス II 部脇田、鈴木らとの共同出願)
4. 「(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)
5. 「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)

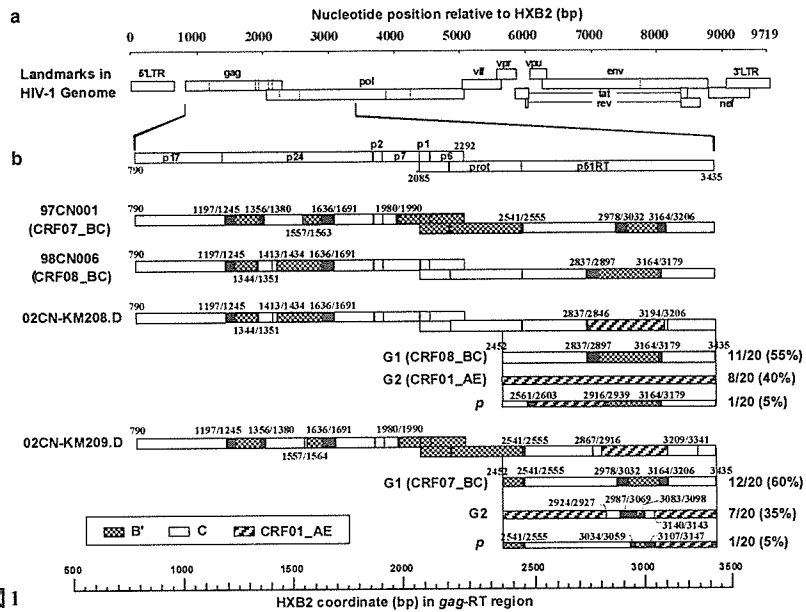
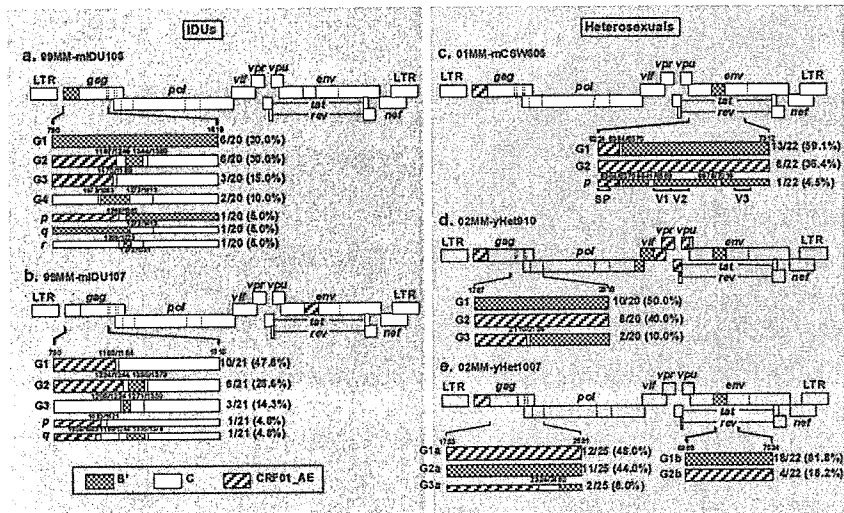
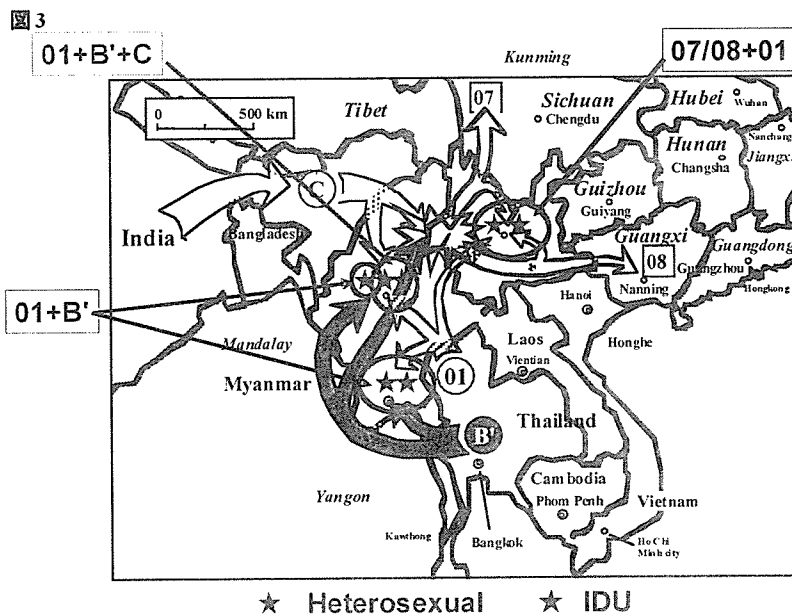


图2 High-frequency detection of coinfections in Myanmar



Estimated incidence of coinfection between different HIV-1 genotypes: 5/~80 = 6.3%



厚生労働科学研究費補助金
分担研究報告書

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
分担研究者 満屋 裕明 熊本大学医学部免疫病態学内科学第二 教授
(分担研究課題：新規の CCR5 阻害剤：AK602(AVC)の作用機序解明と構造学的解析)

研究要旨：

HIV 感染症/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重要な問題である。HIV の細胞への侵入過程に関する分子は既存の抗 HIV 剤と作用機序が異なり既存の薬剤耐性 HIV にも有効な新たな治療薬のターゲットとして有望であり、特にヒトケモカインレセプター：CCR5 に作用して抗 HIV 活性を示す CCR5 阻害剤に関しては複数の候補薬の臨床試験が進行中である。本研究では米国の臨床試験で強力な抗 HIV 効果が確認された CCR5 阻害剤：aplaviroc (AVC/AK602) の作用機序の構造学的解析と感染阻害メカニズムの解析を行った。まず我々は CCR5 と CCR5 阻害剤の結合モデルを構築、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。一方でこの CCR5/CCR5 阻害剤モデルを新規 CCR5 阻害剤の設計・開発へ応用する試みも進め、既に AVC とは異なる基本骨格を有する化合物の同定・評価が進行中である。今回の研究成果はより強力かつ薬剤耐性 HIV にも有効な新規治療薬の開発という目的のみならず、ケモカインレセプターなど細胞 (宿主) 因子を標的とした抗 HIV 剤開発で考慮すべき生体反応 (免疫応答) への影響を検討・解析する上でも有用な所見と考えられる。

A. 研究目的

逆転写酵素阻害剤にプロテアーゼ阻害剤を加えた HAART 療法は HIV 感染症に対して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。ケモカイン受容体である CCR5, CXCR4 など、ウイルスの細胞への侵入過程に関する分子は既存の抗 HIV 剤と作用機序の異なり既存の薬剤耐性 HIV にも有効な新たな治療薬のターゲットとして有望であり、特に CCR5 阻害剤に関しては複数の候補薬の臨床試験が進行中である。分担研究者 (満屋) は 1999 年末より国内の製薬会社との共同研究でケモカイン受容体 (CCR5) 阻害剤の開発に着手、現在までに米国での臨床試験で強力な抗 HIV 効果が確認された CCR5 阻害剤：aplaviroc (AVC/AK602：肝障害のため第三相臨床試験は休止中) を始め、複数の CCR5 阻害剤の同定に成功している (Maeda & Mitsuya, *J Biol Chem.* 276:35194-200, 2001; Maeda & Mitsuya, *J.Virol.* 78: 8654-62, 2004; Nakata & Mitsuya, *J.Virol.* 79:2087-96, 2005)。本研究では、より強力な HIV 侵入阻害剤の開発に繋がることを最終目的として、結晶解析・コンピュータモデリングの手法を用いた CCR5 の微細構造学的解析の系を確立、CCR5

と阻害剤の結合モデル、CCR5 阻害剤の詳細な作用機序の構造学的解析、更には構造モデリングを用いた新しい骨格を有する新規阻害剤の開発を行った。

B. 研究方法

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。一方、ウシロドプシン結晶構造を基に CCR5 の構造学的解析、CCR5 モデル作成を行なった。更に変異 CCR5 と CCR5 阻害剤との結合能 (^3H ラベル体を用いて測定) 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 volunteers については医学部・大学内の該当する IRB で倫理面での適合性について許可を申請、認可された後で、臨床試験の具体的な内容、及び考えられる副作用の危険性について十分な説明を行い、承諾が得られた後に試験を開始した。

C. 研究結果

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から選定された aplaviroc (AVC) (図1) は試験管内で強力な活性を示し(IC₅₀:0.2nM)、既存の抗 HIV 剤 [逆転写酵素阻害剤(RTIs), プロテアーゼ阻害剤(Pis)]と全く交差耐性を認めず (Maeda & Mitsuya, *J.Virol.* 78: 8654, 2004)、動物モデル(huPBL-NOG-SCID マウス)の系でも強力な抗 HIV 活性を有していた (Nakata & Mitsuya, *J.Virol.* 79:2087-96, 2005)。

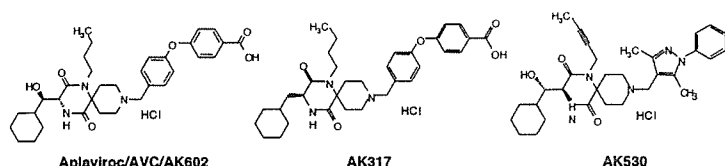


図 1.CCR5 阻害剤の構造.

このような AVC の抗 HIV 作用機序を構造学的に解析するために ³H ラベル CCR5 阻害剤と変異 CCR5 発現細胞株を用いた生物学的結合能解析実験系に CCR5・CCR5 阻害剤のコンピューターモデリングの手法を組み合わせた構造解析系を確立、解析した。その結果、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ており (図 2)、その結合部位は他の構造を有する CCR5 阻害剤 (SCH-C, TAK-779) ともおおよそ一致するもののいくつかの領域でその結合様式が異なっていることを見出した (Maeda & Mitsuya, *J. Biol. Chem.* 281:12688-12698, 2006)。

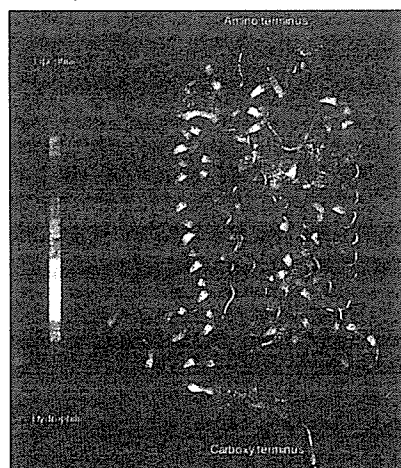


図 2(左下).CCR5 のモデルと CCR5 阻害剤結合ポケット.細胞外ドメインと膜貫通ドメインの間に位置する疎水性ポケット(赤矢印)に低分子 CCR5 阻害剤は結合する.

更に CCR5 阻害剤が抗 HIV 活性を発揮する詳細なメカニズムを構造学的に検討するために我々は AVC と非常に似た構造を持ちながら抗 HIV 活性の異なる化合物 (AK317, AK530) (図 1) に着目、構造解析を行った。AVC より低い CCR5 結合親和性を有する AK317 (K_D 値、AVC:3 nM, AK317:16 nM) は AVC と同じ結合ポケットに結合するが、その抗 HIV 活性は AVC より 10 倍程度低かった。一方で AVC より強い CCR5 結合親和性 (K_D 値: 1.5 nM) を持っていないながら、抗 HIV 活性がやはり 10 倍程度弱い AK530 についてその結合様式を詳細に検討すると、AVC が第二細胞外ループ (ECL2) 起始部を含む複数の CCR5 のアミノ酸と水素結合ネットワークを形成している (図 3-A) のに対して AK530 はこれらのアミノ酸との結合が弱い事が分かった (図 4)。AVC の ECL2 起始部のアミノ酸に対する強い結合・構造変化が CCR5 の細胞外ドメイン (ECL2) に対する強力なアロステリックな変化を引き起こし、これが強力な HIV-gp120 結合阻害、更には強い抗 HIV 活性をもたらしていると考えられた。

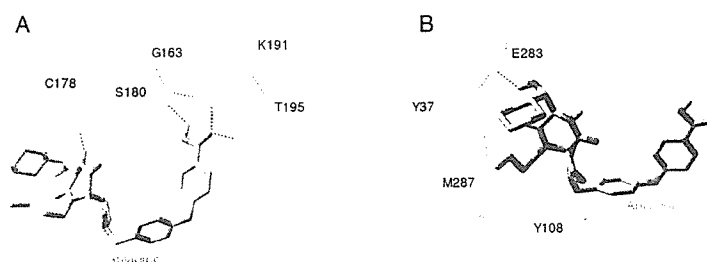


図 3.CCR5 阻害剤と CCR5 アミノ酸との水素結合ネットワーク.AVC は ECL2/ECL2 起始部のアミノ酸 (G163,C178,S180,K191) と水素結合ネットワークを形成する.

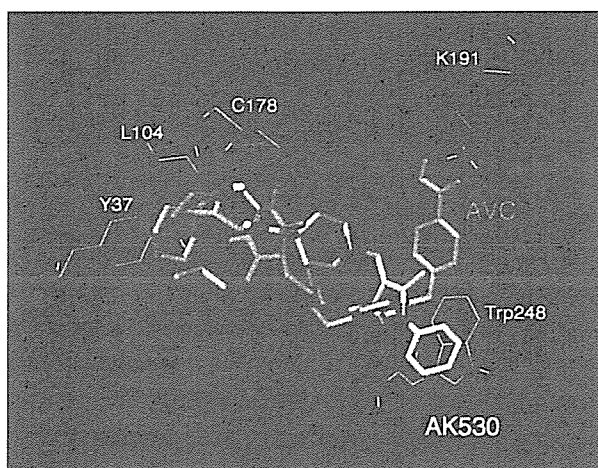


図 4. AVC と AK530 の結合様式の違い. AK530 は AVC と異なり ECL2 起始部のアミノ酸 (K191 など) に結合しない. この違いが CCR5 の細胞外ドメインに対するアロステリックな構造変化の違いと抗 HIV 活性の違いをもたらすと考えられる.

すなわち強力な抗 HIV 活性を持つ CCR5 阻害剤は強力な 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いることが明らかとなった (Maeda & Mitsuya, 投稿準備中)。

一方で、我々は新規の構造を有する CCR5 阻害剤の設計・開発にこの CCR5/CCR5 阻害剤モデルを応用する試みも進めている。既に AVC とは異なる基本骨格を有する化合物に対する抗 HIV 活性評価とそれらの化合物のモデリング、更にはこれらの結果を基に、より結合親和性を亢進させる化合物側鎖の検討・活性評価を進めており、現在までの段階で既に良好な抗 HIV 活性を持つ複数の化合物の同定に成功している。

D. 考察

CCR5 阻害剤などのケモカインレセプター阻害剤は既存の抗 HIV 薬と異なり生体 (細胞) の分子を標的とした薬剤であり、当然、生体・免疫系への影響は否定できない。我々は今までの研究でも阻害剤のケモカイン作用への影響などを検討してきたが、今回報告する CCR5/CCR5 阻害剤の構造学的解析研究はそれらの研究結果をより詳細に考察する上で非常に重要な所見となり得る。

CCR5 などのケモカインレセプターは GPCR (G タンパク共役受容体) に含まれる。GPCR は免疫系のみならず幅広い細胞系に発現しており、

これらを標的とする各種治療薬開発も盛んである。しかしこれらの受容体の詳細な活性化メカニズム、あるいは阻害剤による阻害メカニズムは未だ不明の部分も多い。特に CCR5 はケモカインレセプターとしての機能と同時に HIV のコレセプターとしての作用を持っており、これらの詳細な比較・解析は抗 HIV 剤の標的としてのみならず、HIV の感染 (細胞侵入) の機序を明らかにする上でも大きな興味をもたれる課題である。

AVC は米国での臨床試験 (第 3 相試験) で AIDS 患者に単剤および併用で投与されて、強力な抗 HIV 活性を発揮することが示されたが、不測の肝障害が一部の患者で見られて、臨床試験への新しい患者の enrollment は中断されている (2005 年 12 月現在)。しかし他グループにより臨床試験が進められている CCR5 阻害剤 (maraviroc) は現在までのところ、重大な副作用も無く、近い将来、CCR5 阻害剤が抗 AIDS 治療薬として臨床応用される可能性は高い。一方、試験管内での検討では幾つかの CCR5 阻害剤 (maraviroc, vicriviroc など) に対する高度耐性 HIV が既に報告されているが、興味あることに maraviroc 高度耐性 HIV は AVC に対する感受性を完全に維持していた (Pugach P. *et al. Virology*, 2007, *in press*; Westby M. *et al. J. Virol.* 81:2359-2371, 2007)。CCR5 阻害剤に対する耐性 HIV の耐性機序の 1 つとして、HIV のエンベロップ (gp120) に阻害剤の結合した CCR5 にも結合できるような変化が生じ耐性化するとされている。つまりこの事象は maraviroc 耐性 HIV (エンベロップ) は maraviroc の結合した CCR5 をエントリーに使うことができるが、AVC の結合した CCR5 は使うことができない事を示しており (交差耐性が無い)、今後 CCR5 を標的にした治療でも (HIV 逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤と同様に) 耐性を起こしにくい特性を持つ阻害剤の開発のための研究の重要性が考えられる。今回得られた AVC の構造学的特性、特に細胞外ドメイン (ECL) の構造変化に対する新知見が耐性プロファイル解析・交差耐性の無い阻害剤の開発に関しても非常に重要な所見となるのは明白である。

E. 結論

本研究は近い将来、AIDS 治療薬として臨床応用される可能性の高い CCR5 阻害剤の作用機序を構造学的に詳細に解析したものであると同時に、得られた構造モデルから、より特異的・選択的な薬剤のデザインを図るという最近の分子標的のアプローチに即した研究と評価できる。それと同時

に生体の免疫応答に関連する因子を標的とした抗ウイルス剤開発に必要な方向性を示唆するものとも考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Gatanaga, H., Das, D., Suzuki, Y., Yeh, D.D., Hussain, K.A., Ghosh, A.K., and Mitsuya, H. Altered HIV-1 Gag Protein Interactions with Cyclophilin A(CypA) on the Acquisition of H219Q and H219P Substitutions in the CypA Binding Loop. *J Biol Chem.* 281: 1241-1250, 2006.
- 2) 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.
- 3) Ohrui, H., Kohgo, S., Hayakawa, H., Kodama, E., Matsuoka, M., Nakata, T., and Mitsuya, H. 2'-Deoxy-4'-C-ethynyl-2-fluoroadenosine: A nucleoside reverse transcriptase inhibitor with highly potent activity against all HIV-1 strains, favorable toxic profiles and stability in plasma. *Nucleic Acids Symposium Series.* 50: 1-2, 2006.
- 4) Davis, D.A., Brown, C.A., Wang, V., Singer, K.E., Kaufman, J., Stahl, S.J., Wingfield, P., Maeda, K., Harada, S., Yoshimura, K., Kosalaraksa, P., Mitsuya, H., and Yarchoan, R. Inhibition of HIV-1 replication by a peptide dimerization inhibitor of HIV-1 protease. *Antiviral Res.* 72: 89-99, 2006.
- 5) Ghosh, A.K., Schiltz, G., Perali, R. S., Leshchenko, S., Kay, S., Walters, D. E., Koh, Y., Maeda, K., Mitsuya, H. Design and synthesis of novel HIV-1 protease inhibitors incorporating oxyindoles as the P2'-ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16: 1869-1873, 2006.
- 6) Yin, P.D., Das, D., and Mitsuya, H. Overcoming HIV Drug Resistance through Rational Drug Design Based on Molecular, Biochemical, and Structural Profiles of HIV Resistance. *Cell Mol Life Sci.* 63: 1706-1724, 2006.
- 7) Habashita, H., Kokubo, M., Hamano, S., Hamanaka, N., Toda, M., Shibayama, S., Tada, H., Sagawa, K., Fukushima, D., Maeda, K., and Mitsuya, H. Design, synthesis and biological evaluation of combinatorial library with new spirodiketopiperazine scaffold. Discovery of novel, potent and selective low-molecular weight CCR5 antagonists. *J. Med. Chem.* 49: 4140-4152, 2006.
- 8) Ghosh, A.K., Sridhar, P.R., Hussain, A.K., Leshchenko, S., Li, J., Kovalevsky, A.Y., Walters, D.E., Wedekind, J.E., Tokars, V.L., Das, D., Koh, Y., Maeda, K., Gatanaga, H., Weber, I.T., and Mitsuya, H. Structure-Based Design of HIV-1 Protease Inhibitors to Combat Drug Resistance. *J. Med. Chem.* 49: 5252-5261, 2006.
- 9) Zhou, S., Kern, E.R., Gullen, E., Cheng, Y.-C., Drach, J.C., Tamiya, S., Mitsuya, H., and Zemlicka, J. 9-([3-Fluoro-2-(hydroxymethyl)cyclopropylidene]methyl}adenines and guanines. Synthesis and Antiviral Activity of All Stereoisomers. *J. Med. Chem.* 49: 6120-6128, 2006.
- 10) Yoshimura, K., Shibata, J., Kimura, T., Honda, A., Maeda, Y., Koito, A., Murakami, T., Mitsuya, H., and Matsushita, S. Resistance profile of a novel broadly neutralizing anti-HIV monoclonal antibody, KD-247, that shows favorable synergism with anti-CCR5 inhibitors. *AIDS* 20: 2065-2073, 2006.
- 11) Ghosh, A.K., Sridhar, P.R., Kumaragurubaran, N., Koh, Y., Weber, I.T., and Mitsuya, H. Bis-Tetrahydrofuran: A Privileged Ligand for Darunavir and a New Generation of HIV-Protease Inhibitors That Combat Drug Resistance. *Chem. Med. Chem.* 1: 939-950, 2006.
- 12) Miyazato, P., Yasunaga, J., Taniguchi, Y., Koyanagi, Y., Mitsuya, H., and Matsuoka, M. De novo Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Infection of Human Lymphocytes in NOD-SCID, Common γ -Chain Knockout Mice. *J Virol.* 80: 10683-10691, 2006.
- 13) Nishizawa, R., Nishiyama, T., Hisaichi, K., Matsunaga, N., Minamoto, C., Habashita, H., Takaoka, Y., Toda, M., Shibayama, S., Tada, H., Sagawa, K., Fukushima, D., Maeda, K., and Mitsuya, H. Spirodiketopiperazine-based CCR5 antagonist: Lead optimization from biologically active metabolite. *Bioorg Med Chem Lett.* 17: 727-731, 2007.
- 14) Michael, M.S., Bodine, E.T., Hill, S., Princler, G., Lloyd, P., Mitsuya, H., Matsuoka, M., and Derse, D. Phenotypic and genotypic comparison of human T-cell leukemia virus type 1 reverse transcriptase from infected T-cell lines and patient samples. *J. Virol.* (in press) 2007.
- 15) Maeda, K. and Mitsuya, H. Development of Therapeutics for AIDS: Structure-Based Molecular Targeting. In: Monograph: US-Japan AIDS Panel Meeting in Hanoi 2005 (in press) 2007.

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 特願 2000-137975 整理番号 YP2000-007 (平成 12 年) 4'-C-エチニルピリミジンヌクレオシド化合物
- 2) 特願 2001-079611 整理番号 ONP3741 (平成 13 年) トリアザスピロ [5, 5] ウンデカン誘導体を有効

成分とする HIV 感染の予防および/または治療剤

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）
分担報告書

HIV が CTL の認識を回避する分子機構の解析

分担研究者 岩本愛吉 東京大学医科学研究所 教授

HIV 感染症において CTL による細胞性免疫が重要な防御機構として働いており、治療ワクチン開発においても CTL を賦活化することが重要と考えられている。本研究では本邦で流行している HIV に関して日本人に高頻度に見られる HLA-A24 に提示されるイムノドミナントな CTL エピトープに注目し HIV の遺伝子解析を行った。また HIV 感染細胞における CTL への抗原提示量を定量することを目的とし、「HIV CTL エピトープを提示する HLA-A24 分子」に特異的な抗体の作製を試みた。

A. 研究目的

抗 HIV 薬の進歩、多剤併用療法 (HAART) の導入により HIV 感染症は「コントロール可能な慢性感染症」的な側面を持つようになってきた。しかしながら薬剤耐性ウイルスの出現、長期服用による副作用、医療費増加といった深刻な問題点も多々存在し、抗 HIV 薬のみに依存しない HIV コントロール法の開発が急務である。HIV は感染個体において非常に強い免疫応答を誘導することが知られており、特に HIV 特異的細胞性免疫が HIV のコントロールに重要であることが知られている。我々のグループでは HAART の効果を補填するような治療ワクチンの開発を目指しているが、その基礎として日本で流行している HIV について細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の標的となる配列 (CTL エピトープ) の解析を行った。

HIV は変異を起こしやすいウイルスであり、宿主の免疫応答に対応した変異体が選択される可能性がある。CTL は HLA class I 分子によって提示された抗原ペプチド (CTL エピトープ) を認識するが、多型性に富む HLA は民族によって異なった分布を示す。遺伝的背景を異にする集団においてどのような特徴を持った HIV が流行しているかを解析することは、治療ワクチンあるいは予防ワクチンの開発において極めて重要な基礎的データを提供すると考える。本研究では日本人の約 70% が発現する HLA class I 分子 (HLA-A24) により提示される HIV の CTL エピトープに注目し、日本で流行している HIV の遺伝子解析を行った。

HLA-A24 によって提示される Nef 遺伝子内の CTL エピトープ (Nef138-10 : RYPLTFGWCF) は、HLA-A24 を有する患者の大多数において 2 番目のタイロシン (Y) がフェニルアラニン (F) に変化した Y2F の変異を有していた。このエピトープの

抗原提示について、さらに詳細な解析を進めるために特異抗体の作製を試みた。

B. 研究方法

Nef138-10 を提示する HLA-A24 分子 (A24/Nef138-10) を特異的に認識する抗体の作製には単鎖抗体 (scFv) ファージディスプレイ法を用いた。本研究ではヒト B 細胞由来の scFv ファージディスプレイライブラリを用い、A24/Nef138-10 複合体と特異的に結合する scFv をパニング法にて濃縮した。パニングを 3 回繰り返すことで A24/Nef138 複合体に結合する scFv を発現するファージの増幅培養を行った。得られた scFv ファージは ELISA にて特異性を検討した。捕捉分子として A24/Nef138-10 複合体、あるいは陰性対照として異なる CTL エピトープを提示した A24/Env584-11 複合体を、検出抗体として M13 ファージ表面タンパク質に対する抗体を用いた。次に特異性が確認された scFv ファージにおいて G3P タンパク質の代わりに myc タグを付加し scFv を分泌型にした。得られた分泌型 scFv は検出抗体を抗 myc 抗体に変更し上記と同様の ELISA を行った。A24/Nef138-10 に特異性が見られた scFv クローンの多様性は *Bst*DI による消化パターンによって判断した。得られた scFv を用いて Nef138-10 をパルスした HLA-A24 陽性 B 細胞株 (A24+/LCL) の細胞表面染色を行った。検出にはビオチン標識抗 myc 抗体、ストレプトアビジン-PE を用いた。陰性コントロールとして Env584-11 をパルスした A24+/LCL を用いた。

C. 研究結果

3 回のパニングによって A24/Nef138-10 複合体と結合する scFv を約 4200 倍に濃縮でき、そのう

ち80クローンについてELISAにてA24/Nef138-10複合体との結合能を調べたところ、64クローン(80%)がA24/Nef138-10に結合した。さらに80クローン全てをA24/Nef138-10複合体と、異なるエピトープを提示するHLA-A24分子、A24/Env584-11複合体に対する結合能を調べるためELISAを行った。その結果16クローン(20%)がA24/Nef138-10複合体には結合するがA24/Env584-11複合体には結合しない「A24/Nef138 特異的な」scFvであった。制限酵素Bst01切断パターンによる遺伝子解析の結果8種類の独立したクローンであることがわかった。そのうち4種類に関して分泌型scFvを作製しELISAを行った。その結果4種類ともHLA-A24/Nef138複合体への特異性は維持されていたが、そのうち2種類では結合能が低下していた。最終的にA24/Nef138-10複合体特異的scFvとしてclone3とclone27が得られた。

そこで、実際にclone3、clone27を用いてA24/Nef138-10複合体を提示する細胞を染色した。その結果、どちらのcloneもEnv584-11をパルスしたA24+/LCLは染まらなかったが、Nef138-10をパルスしたA24+/LCLはPEで染まっていた細胞表面に提示されたA24/Nef138-10複合体と結合するscFvを得られた。

D. 考察

効果的なワクチンの開発には高い免疫誘導能を持つ抗原を使用することが重要だが、生体内で抗原に対して誘導される免疫応答の程度が何によって規定されているかは明らかにされていない。TCRが「抗原」として認識するのは実際には「エピトープを提示するHLAクラスI分子」であって、その絶対的な量が免疫応答を規定する重要な因子であることは間違いない。特定のエピトープを提示するHLA分子の数は、そのエピトープを含むタンパク質の量、プロセッシングの際にエピトープが正確に切り出される効率、HLA分子との結合能など多くの要因によって決定されることが考えられる。しかしながら現時点ではその測定法が存在しないため、詳細は全く明らかになっていない。

私たちが得たA24/Nef138-10複合体と結合する64クローンのうちA24/Nef138-10複合体特異的なscFvは16クローンであったが、残りの48クローンはHLA-A24あるいは β 2ミクログロブリン分子に結合するscFvであると考えられる。分泌型にしたscFvのうち2クローンがA24/Nef138-10複合体との結合能が低下していたが、分泌型にし

たことによる構造的な変化が影響を及ぼしていると考えられる。

A24/Nef138-10複合体との結合力が維持されていたclone3、7を用いて実際にA24/Nef138-10複合体を提示する細胞を特異的に染めることができた。フローサイトメーターでの解析に耐え得る結合能を有していることが明らかになった。

E. 結論

単鎖抗体ファージディスプレイライブラリを用いて「Nef138-10を提示するHLA-A24分子」に特異的なscFvが得られた。このscFvをさらに改良し、感染細胞における抗原提示量を定量できる可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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. *Journal of Infection* 53:e167-e170, 2006.
- 2) Shinoe, T., Wanaka, A., Nikaido, T., Kakuta, Y., Masunaga, A., Shimizu, J., Duyckaerts, C., Imaizumi, K., Iwamoto, A., and Kanazawa, I. The pro-apoptotic human BH3-only peptide harakiri is expressed in cryptococcus-infected perivascular macrophages in HIV-1 encephalitis patients. *Neuroscience Letters* 393:102-107, 2006.
- 3) Hoshino, S., Sun, B., Konishi, M., Shimura, M., Segawa, T., Hagiwara, Y., Koyanagi, Y., Iwamoto, A., Mimaya, J., Terunuma, H., Kano, S., and Ishizaka, Y. Vpr in plasma of HIV-1-positive patients is correlated with the HIV-1 RNA titers. In press. *AIDS Research and Human Retroviruses*.
- 4) Takahashi, H., Yotsuyanaggi, H., Yasuda, K., Koibuchi, T., Suzuki, M., Kato, T., Nakamura, T., Iwamoto, A., Nishioka, K., Iino, S., Koike, K., and Itoh, F. Molecular epidemiology of hepatitis A virus in the Metropolitan Area in Japan. *J. Gastroenterology*. In press.
- 5) Wichukchinda, N., Kitamura, Y., Rojanawiwat, A., Nakayama, EE., Song, H., Pathipvanich, P., Auwanit, W., Sawanpanyalert, P., Iwamoto, A., Shioda, T., and Ariyoshi, K. The polymorphisms in DC-SIGNR affect

susceptibility to HIV-1 infection. AIDS Research and Human Retroviruses. In press.

6) Fujii, T, Nakamura T, Iwamoto A. Pneumocystis pneumonia in patients with HIV infection - Clinical manifestations, laboratory findings and radiological features -. J Infect Chemother. In press

7) Maeda, T., Oyaizu, N., Endo, T., Odawara, T., Nakamura, T., Iwamoto, A., Fujii, T. Pneumocystis jiroveci pneumonia in an AIDS patient: Unusual manifestation of multiple nodules with multiloculated cavities. European Journal of Radiology, In Press.

2. 学会発表

1) 渡邊紗也香、立川（川名）愛、小田原隆、中村哲也、岩本愛吉『HIV 伝播が確認された感染者間における HIV の遺伝子解析』日本エイズ学会。平成 18 年 11 月。東京。

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特許取得なし

2. 実用新案登録

登録なし

3. その他

なし