

平成 18 年度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 (H18-国医-指定-008)」

分担研究報告書（平成 18 年度）

分担テーマ：樹状細胞を用いた HIV-1 感染防御免疫応答の誘導

分担研究者 田中勇悦 琉球大学・医学部・免疫学分野 教授

研究要旨：樹状細胞を用いた HIV-1 感染防御免疫応答の誘導法の基盤を確立するために樹状細胞(DC)とヘルパー T 細胞の相互応答に着目し研究を進めている。本年度は樹状細胞が 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。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。この発見をベースに OX40L と OX40 との相互反応による HIV-1 制御の可能性をさらに研究したい。

A. 研究目的

HIV-1 感染およびエイズ発症阻止を目的とする免疫誘導・免疫療法の研究において、DC の役割が注目されている。より機能的なヘルパー T 細胞をより多く誘導する方法を検討する目的で、本年度は DC とヘルパー T 細胞間の認識共刺激分子ペアである OX40L と OX40 に着目した。一般的に OX40L は DC に、OX40 は活性化 T 細胞に発現すると考えられているが、今回の研究によりヒト T 細胞が刺激条件によって機能的な OX40L を発現することを明らかにした。OX40L による OX40 の刺激が R5 HIV-1 の増殖を抑制する効果があることから T 細胞の

OX40L 発現の意義の解明と応用に関して今後のさらなる研究の展開が期待される。

B. 研究方法（倫理面への配慮）

1. PBMC を常法にしたがい分離し、その後試験管内で IL-2 と種々のサイトカインを添加した培地で OKT-3/anti-CD28 を結合した磁気ビーズ(Dynal)を用いて刺激培養した。3日ごとに同条件で刺激培養を繰り返した。また、IL-2 以外にも IL-12、IL-4、IL-18、IFN-gamma、IL-15、TGF-beta の影響を検討した。

2. anti-OX40L 抗体は 5A8-FITC を、anti-OX40 抗体は B-7B5-cy5 を用いて他の CD

抗体(CD3, CD4, CD8)との組み合わせによる3カラー染色を行い、Flowcytometryで解析した。OX40 中和活性をもつラット由来の単クローン抗体 W4-54 を OX40L との反応の阻止に用いた。

3. 種々のサイトカインと HIV-1 の定量には市販の ELISA キットを用いた。

4. 機能検定はビオチン化 soluble OX40, OX40L の結合、および HIV-1 潜伏感染細胞からの HIV-1 誘導で推定した。

すでにこのような一連の研究は、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。また PBMC の供与においては十分な説明をした上で同意を得ている。

C. 研究結果

(1) T 細胞における OX40L の発現

以前、Takasawa らによって、ヒトの活性化 T 細胞においても OX40L の発現することが報告され、T-T 細胞間の刺激の可能性が示唆された。しかし、その発現動態や Th1 および Th2 環境が発現に与える影響は不明であった。そこで、ヒトの T 細胞を IL-12 または IL-4 存在下で CD3/CD28 抗体ビーズで繰り返し刺激培養し、CD4⁺または CD8⁺T 細胞上の OX40 と OX40L の発現動態を比較検討した。

OX40 の発現は刺激培養した PBMC, CD3⁺T 細胞そして CD4⁺T 細胞群の全てで強い発

現が見られた。IL-12 と IL-4 による差は見られなかった。注目すべきは OX40L の発現であり、OX40⁺細胞群のわずかな細胞が発現している事がわかった。具体的には精製 CD4⁺T 細胞群では、OX40L⁺細胞が約 3%見られた。しかし、この時点では、IL-12 と IL-4 刺激による差は見られなかった。

Jurkat という T 細胞株では、tax 発現により OX40 と OX40L の発現が誘導されるが、OX40L の発現は OX40 発現よりも 2~3 日遅れる。そこで、これらの刺激 T 細胞を頻回刺激培養し、OX40 と OX40L の動向を追った。刺激回数を増やすごとに OX40 の発現レベルは徐々に低下してきたが、OX40L の発現頻度は刺激回数を増やすごとに高くなった。

T 細胞が OX40L と OX40 の両方を発現するので OX40L の見掛け上の発現が OX40 の存在で見えなくならないように、OX40 機能をブロックする抗体 W4-54 を入れた培養系も調べた。刺激を繰り返すと CD4⁺T 細胞でも CD8⁺T 細胞群でも明らかに OX40L の発現レベルと発現細胞の割合は上昇した。W4-54 抗体を存在させると OX40L の陽性細胞頻度が特に CD4⁺T 細胞で高くなった。CD8⁺T 細胞群ではより高いレベルの OX40L を発現した。CD4⁺T 細胞では IL-4 に比べて IL-12 で刺激した方が OX40⁺細胞の比率が高かった。また CD4⁺T 細胞では OX40L を発現する細胞の多くは OX40⁺であった。一方、CD8⁺T 細胞群では IL-12 が OX40 の高い発現を誘導し、OX40L も両方発現する細胞が多かった。IL-4 で刺激した CD8⁺T 細胞群ではこのようなダブルポジティブな細胞もあるが、

OX40L シングルポジティブの細胞も多く見られた。データは示さないが、刺激培養を繰り返すと IL-12 と IL-4 の存在にかかわらず T 細胞群は 3~4 回刺激までは分裂増殖したが、その後は増殖しなかった。

(2) 機能的 OX40 と OX40L

T 細胞が発現する OX40 および OX40L が機能的か否かを、それぞれ可溶性 OX40L および OX40 ビオチン標識体の結合性で検討した。4 回刺激を繰り返し培養した細胞において、CD4⁺T 細胞群は可溶性 OX40L のみを、CD8⁺T 細胞群は可溶性 OX40 のみを結合した。さらに IL-12 と IL-4 の影響についてみると、IL-12 存在下 (Th1 環境) で培養した CD4⁺T 細胞群 (Th1 様細胞) は 31.6% が OX40L を結合し、IL-4 存在下 (Th2 環境) で培養した CD4⁺T 細胞群 (Th2 様細胞) より約 2 倍高い機能的 OX40 発現細胞率であった。一方、IL-4 存在下で培養した CD8⁺T 細胞群は 80.7% が可溶性 OX40 を結合し、IL-12 存在下で培養した CD8⁺T 細胞群より約 3 倍多い機能的 OX40L 発現細胞率であった。

以上の結果から、CD3/CD28 分子を介した頻回刺激により CD4⁺T 細胞および CD8⁺T 細胞には OX40 と OX40L が誘導されるが、IL-12 存在下活性化された CD4⁺T 細胞群は機能的な OX40 を、IL-4 存在下で活性化された CD8⁺T 細胞群は機能的な OX40L をより強く発現する事が明らかになった。

D. 考察

本研究により、T 細胞受容体と CD28 を介して繰り返し刺激された活性化 T 細胞は、

CD40L で刺激されたマクロファージや DC よりも強くかつ高頻度に OX40L を発現することが明らかにされた。興味深いことには、長期にわたり刺激され分裂増殖したメモリー (エフェクター) タイプの CD4⁺T 細胞および CD8⁺T 細胞にはそれぞれ機能的な OX40 および機能的な OX40L が強く発現することである。さらに、これら機能的蛋白の発現は CD4⁺T 細胞は IL-12 で、CD8⁺T 細胞は IL-4 で顕著に促進された。このような観察は初めてであり、マウスの系でも報告はない。

なぜ、T 細胞の刺激により殆どの T 細胞が OX40 を発現するが、刺激培養初期には OX40L を発現する T 細胞は僅かであり、刺激を繰り返すことによって OX40L を発現する細胞の割合が増加するについては、次のような仮説が可能であろう。それは、OX40 の生成が盛んに行われている間は、同じ細胞内あるいは隣同士の間で OX40L が OX40 と結合することにより抗原構造が変化し、抗体で検出される見掛け上の発現量が低くなるという考えである。あるいは、このような反応が OX40L の down-modulation を引き起こす可能性もある。これらの仮説は、T 細胞活性化培養系に OX40 の機能阻害活性のある単クローン抗体 W4-54 を添加することによって OX40L⁺細胞の比率が高まることから支持される。また、機能的 OX40 の発現を欠く頻回刺激 CD8⁺T 細胞がより高い OX40L が発現することとも一致する。Baba らは OX40 と OX40L は細胞接触を介して細胞間を移動することを報告している。今回の実験条件下でも刺激培養中に OX40 と OX40L が細胞間を

移動し、細胞自体が生成し発現した OX40/OX40L の表現系を変えた可能性もある。しかしながら Jurkat 細胞に HTLV-I tax を発現させると、まず OX40 が誘導され、3~4 日遅れて OX40L が発現すること、正常な T 細胞の活性化を少なくとも 2~3 回繰り返さないで全体の細胞の 50%以上が OX40L⁺とならないことは、別の機序の存在も示唆する。例えば、活性化初期の T 細胞では OX40L 遺伝子の発現が抑制される可能性もある。これは、IL-12 と IL-4 が OX40 と OX40L の発現をそれぞれ CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞で促進すること、つまり、刺激の回数あるいは培養の期間のみならず、他に OX40L の発現を調節する因子が存在する可能性も否定できない。

マウスの系での OX40L 発現は、可溶性 OX40 の結合で解析した場合、TCR α/β に対する抗体によって 18 時間活性化された T 細胞群で数パーセントに観察され、その頻度は CD4⁺T 細胞の方が CD8⁺T 細胞よりやや多いと報告された。しかし、マウスの脾臓細胞を活性化しても抗マウス OX40L 抗体で検出できる細胞は無いという報告もある。一方、Kim らは、卵白アルブミンに対する TCR トランスジェニックマウス(OT-II マウス)の CD4⁺T 細胞では、ナイーブ CD4⁺T 細胞(Th0)、Th1 および Th2 細胞で OVA ペプチド⁺APC で活性化後 2 日以内に強く発現してくること、また Th2 細胞では 3 日以内にその発現が消失することを報告した。このマウスでは IL-4 が CD4⁺T 細胞上の OX40L 発現を抑制する活性があった。トランスジェニックマウスの細胞は一般のマウスの細胞と比べて特殊なのかも

しれないが、マウスでも系統あるいは環境により T 細胞に OX40L が発現誘導されることに間違いはないと考えられる。OX40 の発現はラットの場合は、活性化 CD4⁺T 細胞に限定されており、CD8⁺T 細胞は活性化しても OX40 陰性であることも参考にすると、動物種により OX40/OX40L の発現調節機構が異なることが示唆される。

これまで OX40 と OX40L の発現調節については次のような報告がある。OX40 の発現は CD3 からのシグナルで増強され、CD28 からのシグナルを必要としないが、CD28 の刺激は OX40 の発現を促進する。OX40 は T 細胞においては活性化後 24 時間以内に出現し、2~3 日をピークとして徐々に消失するが、OX40L は B 細胞においてはその発現が遅く、活性化後 2~3 日をピークに発現が見られる。B 細胞は OX40 陰性なので、OX40L の発現は OX40 の有無に関係なく遅いかもかもしれない。しかしマウスの樹状細胞では CD40 の刺激により、より早期に OX40L が誘導されることや、今回の実験でも未熟 DC やマクロファージでは CD40 刺激後、1 日目ですでに OX40L の発現が促進されたことから考えると、細胞の種類や分化段階によっても OX40L の発現が制御されると考えられる。

活性化 T 細胞上の OX40 と活性化された DC、マクロファージや B 細胞上の OX40L との結合は、OX40 と OX40L の両方へのシグナルを伝達する。このような OX40 と OX40L を介する T 細胞と抗原提示細胞との相互作用の結果、T 細胞の活性化、分化誘導やアポトーシス抑制と同時に樹状細胞の免疫刺激促

進や B 細胞からの抗体産生促進が起こる。また、OX40L は血管内皮細胞にも発現し OX40 と接着することから、活性化 T 細胞や ATL 白血病細胞の炎症組織への浸潤にも重要な役割を果たすと考えられている。今回の研究で明らかとなった正常 T 細胞上での機能的 OX40L と OX40 発現は、T-T 細胞間でも OX40L/OX40 を介する相互作用が成立する可能性を示唆している。特に活性化された CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞間の相互作用はどのような両方の細胞にとってどのような免疫学的意味を持つのかに興味深い。

CD3 抗体で活性化した OX40 陽性ヒト PBMC を OX40L 発現細胞で刺激培養すると CCR5 をコレセプターとして使う CCR5 指向性 HIV-1 の増殖が抑制される (Tanaka ら未発表)。そのメカニズムは未だ解明されていない。HIV-1 感染者の CD8⁺T 細胞は CD8 因子 (CAF) を産生して CD4⁺T 細胞における HIV-1 の増殖を抑制する。活性化 CD8⁺T 細胞と CD4⁺T 細胞間の OX40L/OX40 作用は CAF 産生に加えて HIV-1 増殖抑制に寄与する可能性は十分にあると考えている。

E. 結論

樹状細胞上の TCR 共刺激分子 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、ヒト T 細胞自身が刺激を繰り返すことによって機能的 OX40L を同時に発現することを明らかされた。活性化した OX40 陽性ヒト T 細胞を OX40L 発現細胞

で刺激培養すると CCR5 指向性 HIV-1 の増殖が抑制されることから本研究の成果を R5 HIV-1 の感染調節に結びつけたい。

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

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. *Human Immunology*, 2007, in press.

2. 学会発表

- (1) 近藤佳代, 張麗峰, 児玉晃, 田中礼子, 大隈和, 田中勇悦: T 細胞の OX40L による HIV-1 増殖調節. 第 20 回日本エイズ学会学術集会, 2006. 東京
- (2) 大隈和, 田中礼子, 伊藤守, 田中勇悦: ヒト IL-4 産生 SCID マウスの X4 HIV-1 感染への応用. 第 20 回日本エイズ学会学術集会, 2006. 東京.
- (3) 田中勇悦, 田中礼子, 大隈和: CCR5, CXCR4 架橋による R5 及び X4 HIV-1 の感染制御. 第 20 回日本エイズ学会学術集会, 2006. 東京.
- (4) 児玉晃, 近藤佳代, 張麗峰, 田中礼子, 大隈和, 田中勇悦: HIV-1 による

樹状細胞の分化誘導阻害. 第 20 回
日本エイズ学会学術集会, 2006. 東
京.

- (5) 張麗峰, 児玉晃, 近藤佳代, 田中礼
子, 大隈和, 田中勇悦: 樹状細胞を
用いて誘導した IL-10 産生 Treg 細胞
のマクロファージへの R5 HIV-1 感
染抑制. 第 20 回日本エイズ学会学
術集会, 2006. 東京.

H. 知的所有権の出願・取得状況

なし

平成18年度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

研究課題

途上国におけるテーラーメイド治療導入の基礎検討

分担研究者 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

研究要旨

昨年度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良かったが、生存率やCD4増加率は、EFV血中濃度の低い群の方が良かった。これは、EFV高血中濃度が、自己申告に反し服薬率を低下させている事を推定させた。

A. 研究目的

昨年度、EFV代謝酵素であるCYP2B6のザンビア人における遺伝子多型とEFV血中濃度、短期副作用を検討し、CYP2B6の*6/*6の頻度が高いこと、これら患者はEFV血中濃度が高いことを確認したが、EFV血中濃度と副作用には関連のないことを見いだした。今回は、それら患者の1年後の治療効果と副作用を経過観察する目的で研究を行った。

B. 研究方法

前年度のEFVで治療を開始した100名をコホートとしてこれら患者の1年後の服薬率、副作用、CD4増加率、生存の有無に付き検討した。

(倫理面への配慮)

両国の倫理委員会の承認を得ており、患者の人権には最大限の配慮を行った。

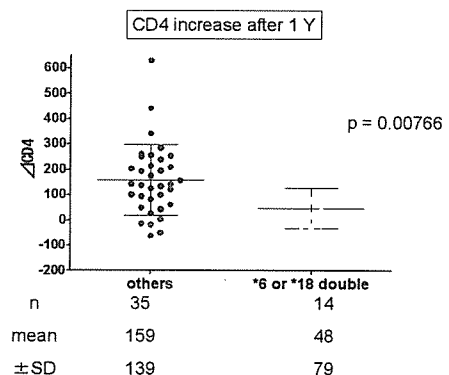
C. 研究結果

1年度に経過を追うことのできたのは62名であった。12名は1年以内に死亡しており、経過の不明になっている患者も多く、アフリカでの臨床

研究の難しさを物語っている。

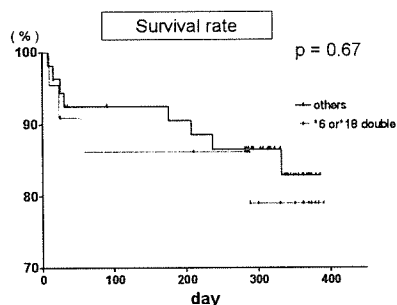
1. CD4増加と遺伝子多型の関係

1年後のCD4増加を遺伝子型で比べると、予想に反し*6および*18のEFVの血中濃度が上昇する遺伝子多型を持つ患者の方がCD4上昇率が優位に少なかった。



2. 遺伝子型と生存率

遺伝子型と生存率の比較でも、予想に反しEFV血中濃度の高い遺伝子型の方が、有意差はないものの生存率は低かった。



D. 考察

今回の結果は、E F Vの血中濃度の高い方が、治療成績が悪いという、全く予想と反するものであった。この原因として、自己申告の副作用や服薬率の信頼度に問題のあることも示唆された。E F Vの最も問題となる副作用は中枢神経系の有害事象である。実際に、日本においても、他覚的には中枢神経系の問題がある場合にも、患者自身はE F Vの服用に執着することや、副作用を自覚していないこともあり、ザンビアでも同じ事が起こっていた可能性がある。E F Vの血中濃度が高すぎる弊害として、実際には服薬率の低下していた可能性があり、これら患者のウイルス量や薬剤耐性の有無など細かく解析することが必要である。

E. 結論

E F V濃度が高い患者群の方が治療成績が悪かったことから、治療前の遺伝子検査の臨床的有効性を示唆する結果となった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Hirabayashi Y, Tsuchiya K, Kimura S, and Oka S.

Simultaneous determination of six HIV protease inhibitors (amprenavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir, and saquinavir), the active metabolite of nelfinavir (M8) and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (efavirenz) in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* 20: 28-36, 2006.

Gatanaga H, Hachiya A, Kimura S, and Oka S. Other mutations than 103N in HIV-1 reverse transcriptase (RT) emerged from K103R polymorphism under non-nucleoside RT inhibitor pressure. *Virology* 344: 354-362, 2006.

Matsuoka AS, Gatanaga H, Sato H, Koike K, Kimura S, and Oka S. Cooperative contribution of Gag substitutions to nelfinavir-dependent enhancement of precursor cleavage and replication of human immunodeficiency virus type-1. *Antiviral Res* 70: 51-59, 2006.

Kawado M, Hashimoto S, Yamaguchi T, Oka S, Yoshizaki K, Kimura S, Fukutake K, Higasa S, Shirasaka T. Progression to AIDS by CD4 cell count, plasma HIV-RNA level and use of antiretroviral therapy among HIV patients infected through blood products in Japan. *J Epidemiol* 16: 101-106, 2006.

Hishima T, Oyaizu N, Fujii T, Tachikawa N, Ajisawa A, Negishi M, Nakamura T, Iwamoto A, Hayashi Y, Matsubara D, Sasao Y, Kimura S, Kikuchi Y, Teruya K, Yasuoka A, Oka S, Saito K, Mori S, Funata N, Sata T, Katano H. Decrease in Epstein-Barr virus-positive AIDS-related lymphoma in the era of highly active antiretroviral therapy. *Microb Infect* 8: 1301-1307, 2006.

- Masaki N, Imamura M, Kikuchi Y, and Oka S. Usefulness of elastometry in evaluating the extents of liver fibrosis in hemophiliacs coinfecting with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus. *Hepatol Res* 35: 135-139, 2006.
- Gatanaga H, Tachikawa N, Kikuchi Y, Teruya K, Genka I, Honda M, Tanuma J, Yazaki H, Ueda A, Kimura S, and Oka S. Urinary β_2 -microglobulin as a sensitive marker for renal injury by tenofovir disoproxil fumarate. *AIDS Res Hum Retrovirus* 22: 744-748, 2006.
- The Smart Study Group (Oka S as a regional principal investigator). CD4+ count-guided interruption of antiretroviral treatment. *N Engl J Med* 355: 2283-2296, 2006.
- 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.
- Yamanaka H, Gatanaga H, Kosalaraksa P, Matsuoka-Aizawa S, Kimura S, and Oka S. Novel mutation of human polymerase γ associated with mitochondrial toxicity induced by anti-human immunodeficiency virus treatment. *J Infect Dis* (in press)
- Gatanaga H, Yazaki H, Tanuma J, Honda M, Genka I, Teruya K, Tachikawa N, Kikuchi Y, and Oka S. HLA-Cw8 primarily associated with hypersensitivity to nevirapine. *AIDS* (correspondence) 21: 264-265, 2007.
- Honda M, Yogi A, Nakayama T, Setoguchi T, Takahashi N, Ishizaka N, Genka I, Gatanaga H, Teruya K, Kikuchi Y, Tachikawa N, Kimura S, and Oka S. Effectiveness of subcutaneous growth hormone in HIV-1 patients with moderate to severe facial lipoatrophy. *Intern Med* (in press)
- Gatanaga H, Ibe S, Matsuda M, Yoshida S, Asagi T, Kondo M, Sagamatsu K, Tsukada H, Masakane A, Mori H, Takata N, Minami R, Tateyama M, Koike T, Itoh T, Imai M, Nagashima M, Gejyo F, Ueda M, Hamaguchi M, Kojima Y, Shirasaka T, Kimura A, Yamamoto M, Fujita J, Oka S, and Sugiura W. Drug-Resistant HIV-1 Prevalence in Patients Newly Diagnosed with HIV/AIDS in Japan. *Antiviral Res* (in press)
- Vasilescu A, Terashima Y, Enomoto M, Heath S, Poonpiriya V, Gatanaga H, Do H, Diop G, Hirtzig T, Charneau P, Marullo S, Oka S, Kanegasaki M, Lathrop M, Matsushima K, Zagury JF, and Matsuda F. A haplotype of the human CXCR1 gene protective against rapid disease progression in HIV-1 patients. *PNAS* (in press)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

「薬剤耐性 HIV の進化・選択における gag-pol の相互干渉」
～耐性獲得における Pol 分子内干渉の決定木による解析～

分担研究者 杉浦 亙(国立感染症研究所 エイズ研究センター第2研究グループ長)

協力研究者 鈴木寿子(国立感染症研究所エイズ研究センター)、田中 博、任 鳳蓉、茂籟 薫、
柴田潤子(東京医科歯科大学大学院疾患生命科学研究所)

要 旨

薬剤耐性が選択・獲得機序を理解することを目的にプロテアーゼ、逆転写酵素の分子内干渉を決定木という解析手法を用いて解析した。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。

今回の3症例では全てにおいて共通となる分岐ルールは見出せず、症例の固有のものだけであった。

A.研究目的

薬剤耐性変異の獲得に際して薬剤の標的であるプロテアーゼや逆転写酵素、さらにプロテアーゼの基質である Gag がどのように分子間あるいは分子内で干渉し、薬剤耐性が選択・獲得されていくのか理解することは適切な治療を実現する上で重要である。本研究ではプロテアーゼ、逆転写酵素の分子内干渉を明らかにするために決定木という解析手法を用いて薬剤耐性を獲得した症例の体内における HIV の進化・選択機序について解析を試みた。

B.研究方法

多剤併用療法を受けているが薬剤耐性を獲得したために血中 HIV RNA コピー数が検出限界に到達していない症例について定期的に血液を採取。血漿中ウイルス RNA を抽出し、RT-PCR でプロテアーゼと逆転写酵素領域合計 1.3Kb を増幅した。採血ポイント毎に 15～20 個のクローンを拾いその塩基配列の解析を行った。得られた塩基配列情報をもとに

決定木の手法を用いて耐性変異獲得の選択経路について解析を行った。

決定木はデータマイニングで良く用いられる分析方法であり、情報の選択分岐に重要な因子を明らかにするバイオインフォマティクス解析手法である。

C.研究結果

プロテアーゼ阻害剤を含む多剤併用療法に失敗し薬剤耐性を獲得した 3 症例について解析を行った。各症例 6～12 ヶ月の間隔で6～7サンプル、合計 120 クローンの解析を行った。得られた配列情報よりそれぞれのサンプルについて決定木を構築し分岐点を構成する部位について調べた結果、プロテアーゼ阻害剤に対する耐性変異の獲得経路では V22A、E35D、M36I、N37S、I64MV、I74VL、I93L などプロテアーゼ阻害剤耐性とは関係のない置換で且つもともと多様性を認める部位が分岐点を作ることが明らかになった。一方、逆転写酵素では AZT 耐性変異の M41L、D67N、3TC 耐性変異の M184V

や非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤耐性変異の Y181C、G190S などの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。今回の3症例は使用薬剤の組み合わせが異なるため全てにおいて共通となる分類ルールは見出せず、症例の固有のものだけであった。

D. 考察

今回のプロテアーゼ阻害剤耐性変異の解析結果では薬剤耐性とは関係のない部位、もともと多様性をもつ部位が選択の分岐点を作り出していることが明らかになったが、之は同じ治療薬の投与を受けながら症例によって何故異なる耐性パターンが生じるのか、プロテアーゼ耐性変異の獲得経路を理解するうえで興味深い結果である。逆転写酵素阻害剤耐性で薬剤耐性変異自体がその後の選択経路を決定しており、これは理解しやすい妥当な結果である。両者の違いは阻害剤の作用機序、それぞれのタンパク分子の可塑性が影響していると考えられる。今回の解析では 3 症例がそれぞれ異なる決定木を呈し、3 症例に共通する法則のようなものを導くことは出来なかった。今後は共通する情報を得るために、同一の薬剤の組み合わせで治療を受けている症例を集めて解析をすることが必要である。

E. 結論

決定木の手法を用いて薬剤耐性 HIV の進化・選択について解析を行った。プロテアーゼ阻害剤と逆転写酵素阻害剤では薬剤耐性の選択の機序が異なっていることが示唆された。今後より多くの症例について解析を行い一般法則を編み出すことが重要である。

F. 研究発表

(1) 論文発表

- 1) Tomoko Chiba-Mizutani, Hideka Miura, Masakazu Matsuda, Zene Matsuda, Yoshiyuki Yokomaku, Kosuke

Miyauchi, Masako Nishizawa, Naoki Yamamoto, Wataru Sugiura: New T-Cell-Based Lines with Two Luciferases for Accurately Evaluating Susceptibility to HIV-1 Drugs. *J Clinical Microbiology*, 45(2):477-487, 2007.

- 2) Hiroyuki Gatanaga, Shiro Ibe, Masakazu Matsuda, Shigeru Yoshida, Tsukasa Asagi, Makiko Kondo, Kenji Sadamasu, Hiroki Tsukada, Aki Masakane, Haruyo Mori, Noboru Takata, Itsuhiro Nakagiri, Rumi Minami, Masao Tateyama, Takao Koike, Toshihiro Itoh, Mitsunobu Imai, Fumitake Gejyo, Mikio Ueda, Motohiro Hamaguchi, Yoko Kojima, Takuma Shirasaka, Akiro Kimura, Masahiro Yamamoto, Jiro Fujita, Shinichi Oka, and Wataru Sugiura: Nationwide Survey of Drug-Resistant HIV-1 Prevalence in Patients Newly Diagnosed with HIV/AIDS in Japan. *Antiviral Research*, in press.
- 3) Afework Kassu, Masayuki Fujino, Masakazu Matsuda, Masako Nishizawa, Fusao Ota, Wataru Sugiura: Molecular Epidemiology of HIV-1 in Treatment Naive Patients in North Ethiopia. *AIDS Research and Human Retroviruses*, in press.
- 4) Kousuke Miyauchi, Jun Komano, Lay Myint, Yuko Futahashi, Emiko Urano, Zene Matsuda, Tomoko Chiba, Hideka Miura, Wataru Sugiura and Naoki Yamamoto: Rapid propagation of low-fitness drug-resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1 by a streptococcal metabolette sparsomycin. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*,

- 17(4):167-174, 2006.
- 5) Hirotaka Ode, Saburo Neya, Masayuki Hata, Wataru Sugiura, Tyuji Hoshino: Computational Simulations of HIV-1 Proteases-Multi-drug Resistance Due to Nonactive Site Mutation L90M. *J. AM.Chem.Soc.*, 128:7887-7895, 2006.
 - 6) Joke Snoeck, Rami Kantor, Robert W. Shafer, Kristel Van Laethem, Koen Deforche, Ana Patricia Carvalho, Brian Wynhoven, Marcel A. Soares, Patricia Cane, John Clarke, Candice Pillay, Sunee Sirivichayakul, Koya Ariyoshi, Africa Holguin, Hagit Rudich, Rosangela Rodrigues, Maria Belen Bouzas, Françoise Brun-Vezinet, Caroline Reid, Pedro Cahn, Luis Fernando Brigido, Zehava Grossman, Vincent Soriano, Wataru Sugiura, Praphan Phanuphak, Lynn Morris, Jonathan Weber, Deenan Pillay, Amilcar Tanuri, Richard P.Harrigan, Ricardo Camacho, Jonathan M.Schapiro, David Katzenstein, and Anne-Mieke Vandamme: Discordances between Interpretation Algorithms for Genotypic of Human Immunodeficiency Virus Are Subtype Dependent. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50(2): 694-701, 2006.
 - 7) Deforche K, Camacho R, Grossman Z, Silander T, Soares MA, Moreau Y, Shafer RW, Van Laethem K, Carvalho AP, Wynhoven B, Cane P, Snoeck J, Clarke J, Sirivichayakul S, Ariyoshi K, Holguin A, Rudich H, Rodrigues R, Bouzas MB, Cahn P, Brigido LF, Soriano V, Sugiura W, Phanuphak P, Morris L, Weber J, Pillay D, Tanuri A, Harrigan PR, Shapiro JM, Katzenstein DA, Kantor R, Vandamme AM. : Bayesian network analysis of resistance pathways against protease inhibitors., *Infect Genet Evol.* 2006 Nov 24.
 - 8) Koga I, Odawara T, Matsuda M, Sugiura W, Goto M, Nakamura T, Iwamoto A.: Analysis of HIV-1 sequences before and after co-infecting syphilis., *Microbes Infect.* 2006 Oct 23.
 - 9) Omura M, Furuya K, Kudo S, Sugiura W, Azuma H.: Detecting IgM antibodies against microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* polar tubes in sera from healthy and HIV-infected Japanese., *Clin Vaccine Immunol.* 2006 Nov 15.
 - 10) 西澤雅子, 柴田潤子, 杉浦 互: ウィルス感染制御における ncRNA の役割. *実験医学* 24(6):805-809, 2006.
- (2)学会発表
- 1) Wataru Sugiura: Drug Resistance assays. International Conference on Molecular and Cellular Biology of Therapeutics of HIV and Associated Viral Infections. Jan.12-14, 2007, Hyderabad, India.
 - 2) Hua Yan, Kazuro Shiomi Nobuhiko Nomura, Tomoko Chiba-Mizutani, Hideka Miura, Tadakazu Takakura, Haruo Tanaka Wataru Sugiura: New HIV-1 integrase inhibitors identified from small molecule chemical library and microbial metabolites. International Workshop on Discovery of antiviral compounds. Apr. 26-29, 2006, Lubeck, Germany.
 - 3) T Ueda, M Itaya, K Tusge, K Fujita, M Matsuda, M Nishizawa, W Sugiura: Reconstruction of HIV-1 full genome

- clones with *Bacillus subtilis*. HIV Drug Resistance Workshop. Jun 13-17, 2006, Spain.
- 4) Rajintha M. Bandaranayake, Moses Prabu-Jeyabalan, Junko Kakizawa, Wataru Sugiura, Celia Shiffer: Structural Analysis of HIV-1 CRF01_{AE} Protease in Complex with the Substrate p1-p6. 7th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. Nov.12-15, 2006, Virginia.
 - 5) Junko Shibata, Masako Nishizawa, Masakazu Matsuda, Wataru Sugiura, Fengrong Ren, Hiroshi Tanaka: Analysis of Co-Evolution Between Mutations in Protease Inhibitor Resistance and in Gag. 7th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. Nov.12-15, 2006, Virginia.
 - 6) Wataru Sugiura: Virological and Statistical Analyses of Interference between Protease Inhibitor Resistant Mutations and Gag Mutations. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Feb. 5-9, 2006, Denver, USA.
 - 7) Wataru Sugiura: Multi-Center Nationwide Survey of Drug Resistant HIV-1 in Newly Diagnosed HIV/AIDS Patients in Japan from 2003 to 2004. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Feb. 5-9, 2006, Denver, USA.
 - 8) Hua Yan, Nobuhiko Nomura, Tomoko Chiba-Mizutani, Hideka Miura, Tadakazu Takakura, Satoshi Takeda, Wataru Sugiura: New HIV-1 integrase inhibitors identified from small molecule chemical library. 第 16 回抗ウイルス化学療法研究会. 2006 年 5 月 26-27 日, 福島.
 - 9) 岩谷靖雅, レビンジュデイス, 杉浦 互: APOBEC3G の HIV-1 の逆転写阻害メカニズム. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会. 2006 年 11 月 19 日~21 日, 名古屋.
 - 10) 三浦秀佳, 千葉智子, 滝澤万里, 松田昌和, 西澤雅子, 本多三男, 杉浦 互: ヒト細胞由来レポーター細胞 MARRBLE を用いた臨床分離株薬剤感受性検査の評価. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会. 2006 年 11 月 19 日~21 日, 名古屋.
 - 11) 柴田潤子, 西澤雅子, 松田昌和, 長谷川直紀, 吉田いづみ, 杉浦 互, 任 鳳蓉, 田中 博: 抗 HIV 剤治療下における Protease と Gag の相互干渉と共進化に関する解析. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会. 2006 年 11 月 19 日~21 日, 名古屋.
 - 12) 杉浦 互: HIV 遺伝子検査の進歩と今後の課題-本邦における薬剤耐性検査の現状と今後の展望-. 第 20 回日本エイズ学会学術集会. シンポジウム 1, 2006 年 11 月 30 日, 東京.
 - 13) 小池 満, 三好 洋, 山口洋子, 奥瀬千晃, 中島由紀子, 井上靖之, 鈴木貴雄, 高橋正知, 三浦偉久男, 杉浦 互, 中島秀喜: HIV/HIB 重複感染例の検討-. 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.
 - 14) 古賀一郎, 小田原 隆, 松田昌和, 杉浦 互, 後藤美江子, 中村哲也, 岩本愛吉: 良好な HIV 治療中に合併した梅毒感染前後での HIV プロウイルス塩基配列の変化. 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.
 - 15) 大出裕高, 松山 翔, 柿澤淳子, 杉浦 互, 星野忠次: CRF01_{AE} HIV-1 における NFV 耐性変異 N88S の出現メカニズムに関する構造学的知見. 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.

- 16) 藤崎誠一郎, 藤崎彩恵子, 伊部史朗, 浅黄司, 吉田 繁, 正兼亜季, 大家正泰, 渡邊香奈子, 瀧永博之, 松田昌和, 貞升健志, 岡田清美, 近藤真規子, 奏 眞美, 溝上泰司, 森治代, 南 留美, 杉浦 互, 金田次弘: HIV-1 遺伝子型薬剤耐性検査のバリデーション. 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.
- 17) 西澤雅子, 加藤真吾, 三浦秀佳, 山本直樹, 杉浦 互: 細胞内における抗 HIV 薬(プロテアーゼ阻害剤) の薬剤濃度のモニタリング. 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

該当なし

分担研究報告書

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

分担研究者 清野 宏 東京大学医科学研究所 炎症免疫学分野

協力研究者 萩原 由加利 社団法人北里研究所・生物製剤研究所

研究要旨：HIV の感染経路を考慮すると、その大半の侵入は生殖器、消化器粘膜を介している。そこで、粘膜面に効果的な感染阻止機構を誘導させるワクチンの開発は理にかなった戦略と言える。その目的達成に向けて、粘膜面に効果的に HIV 特異的免疫誘導をする為のアジュバントを開発する為の研究を推進している。そこで、天然型コレラ毒素（nCT）の粘膜アジュバント効果に着目し、毒性を排除した安全なアジュバントの開発を試みている。そこで nCT の細胞内輸送に関連する A サブユニットの COOH-末端に存在する小胞体残留シグナル KDEL 配列（リジン-アスパラギン酸-グルタミン酸-ロイシン）と毒素活性中心の 2 カ所に変異を導入した 2 種のダブル変異 CT（dmCT E112K/KDEV, dmCT E112K/KDGL）を作製し、その安全性と有効性を検討した。dmCT の安全性、粘膜アジュバント活性を検討した結果、dmCT E112K/KDEV と dmCT E112K/KDGL は共に著しく減毒されており、経鼻免疫した際の中枢神経系への蓄積は nCT と比較して有意に低下していた。粘膜アジュバント活性の評価においては、経鼻アジュバントとしては両 dmCT 共に nCT と同等の活性を示し、HIV 粘膜ワクチン開発への応用性が示唆された。

A. 研究目的

性行為を介した HIV の感染が拡大し、世界的問題となっている昨今、その感染経路を考慮した予防対策が重要となる。その視点から、粘膜ワクチンは HIV 感染制御に向けた次世代ワクチンとして期待されている。しかし、効果的な抗原特異的分泌型 IgA（S-IgA）や傷害性 T 細胞を粘膜上皮に誘導するためにはワクチン抗原をアジュバントと共に投与する必要がある。コレラ菌の産生する天然型コレラ毒素（nCT）には、分泌液中に効率良く分泌型 IgA を誘導する強力なアジュバントとして知られているが、実際にヒトへのワクチンに用いるにはその毒性が問題となる。この点を改善するために分子生物学的手法を用いて毒性を排除、且つ免疫増強活性が維持されている無毒化変異型 CT（mCT）の開発を進めている。

タンパク抗原と nCT を経鼻免疫したところ嗅神経等の中枢神経系に取り込まれ神経障害を認める所見が得られ、CT 併用経鼻ワクチンの安全性が懸念されている。そこで中枢神経へ移行しない mCT を作製するために、CT が細胞内に取り込まれる際に、細胞内逆行性輸送のシグナルとして働く CT-A サブユニ

ット COOH-末端の小胞体残留シグナル KDEL 配列（リジン-アスパラギン酸-グルタミン酸-ロイシン）に変異を導入することを試みた。そして、すでにその安全性および有効性が確認されている mCT E112K（A サブユニットの 112 番目をグルタミン酸からリジンに置換）にこの第 2 の変異を導入し、2 種のダブル mCT（dmCT E112K/KDEV, dmCT E112K/KDGL）を作製し、その安全性と粘膜アジュバントとしての有効性を検討した。

B. 研究方法

- 1) 粘膜アジュバントとしての dmCT の安全性に関する検討；dmCT の毒性評価は ADP-リボシルトランスフェラーゼ活性、Y-1 細胞アッセイにより行った。また *in vivo*での毒性をマウス腸管ループ法により評価した。dmCT の中枢神経系への取込みのは、C57BL/6 マウスに acridinium-標識した nCT、dmCT を経鼻接種し、嗅神経細胞および嗅脳への取込み・蓄積を測定した。
- 2) dmCT の経鼻アジュバント活性；マウスに卵白アルブミン（OVA）100 µg を抗原として dmCT

E112K/KDEV、dmCT E112K/KDGL または陽性コントロールとして nCT 0.5 μ g と共に、1 週間間隔で 3 回経鼻接種し、最終免疫から 1 週間後に血漿および粘膜分泌液を採取し、OVA-特異的抗体価の測定を行った。

- 3) dmCT 経鼻免疫により誘導される抗原特異的 T 細胞性免疫応答の解析; 経鼻免疫したマウスの脾臓および頸部リンパ節より CD4⁺ T 細胞および CD8⁺ T 細胞を分離し、抗原特異的応答を測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は東京大学、北里研究所の動物取り扱い規定に準拠して飼育し、取り扱いにおいては苦痛を軽減するよう配慮した。

C. 研究結果

- 1) 粘膜アジュバントとしての dmCT の安全性に関する評価; ADP-リボシルトランスフェラーゼ活性測定において 2 種の dmCT は共に活性が認められなかった。Y-1 細胞アッセイにおいては、nCT の毒性を 1 としたとして比較した場合に、dmCT E112K/KDEV は 1/2083 に、dmCT E112K/KDGL は 1/2778 にまで減毒していた。マウス腸管ループ法では何れの dmCT も腸管への液の貯留を誘導しなかった。acridinium-標識した dmCT を用いての中樞神経系への取込みと蓄積の評価においては、経鼻免疫により dmCT は用量依存的に嗅神経/上皮に吸着はするが、嗅脳へは nCT と比べて輸送されないか、非常に輸送されにくいことが示唆された。
- 2) dmCT の経鼻アジュバント活性; 経鼻免疫したマウスにおける血漿中 OVA-特異的抗体応答を測定した結果、dmCT は共に nCT と同程度の高い OVA-特異的 IgG 応答を誘導した。粘膜面での OVA-特異的 IgA 応答を測定した結果、鼻腔洗浄液、糞便抽出液、唾液の全てにおいて、dmCT は nCT と同程度の抗原-特異的 IgA を誘導した。
- 3) dmCT 経鼻免疫により誘導される抗原特異的 T 細胞性免疫応答の解析; dmCT は nCT に匹敵する高い T 細胞増殖活性を誘導した。OVA 特異的 CD4⁺ T 細胞による Th2-type サイトカインの産生においては、両 dmCT で nCT と同程度であった。一方 Th1-type サイトカインの産生においては、dmCT E112K/KDGL は高い IL-2 および IFN- γ 産生を認めたのに対して、dmCT E112K/KDEV では mCT E112K と同様に有意に低

かった。次に、dmCT による抗原特異的細胞障害性 CD8⁺ T 細胞 (CTL) 活性の誘導の誘導を調べた。dmCT E112K/KDGL は nCT と同等の強い OVA-特異的 CD8⁺ CTL 活性が見られた。それに対し、dmCT E112K/KDEV では有意に低く、nCT の 50-60%程度の活性であった。

D. 考察

HIV の感染経路を考慮すると、粘膜ワクチンは抗原と粘膜アジュバントの混合物を鼻から噴霧あるいは飲むだけで免疫応答を誘導でき、針を使用しないことから痛みを伴わず、安全なワクチンとして期待されている。この粘膜ワクチン開発の鍵を握っているのが有効で安全な粘膜アジュバントの開発である。

コレラ毒素 (CT) の強力な粘膜アジュバント効果は良く知られているが、その強力な毒性故に臨床応用は困難である。また最近、マウスとサルを用いた実験において nCT の経鼻投与により同毒素が嗅神経等の中枢神経系に取り込まれ神経障害を認める所見が報告されたことから、安全性が懸念されている。そこで、本研究では、nCT-A サブユニットの COOH-末端に存在する小胞体残留シグナル KDEL 配列に変異を導入することにより、中枢神経系への取込みを回避した mCT を作成できるのではないかと考え、更なる安全性とアジュバント活性の向上を目指して、2 種類の dmCT、dmCT E112K/KDEV と dmCT E112K/KDGL を作成し、その有効性および安全性を評価した。

安全性の評価においては、2 種類の dmCT は既に安全な粘膜アジュバントとして我々が報告している mCT E112K と同等まで無毒化されていた。CT は消化管上皮細胞に作用して重篤な下痢を起こる毒素であるが、その下痢を実験的に再現したマウス腸管ループアッセイにおいて、液の貯留が全く認められなかった。dmCT をマウスに経鼻接種した際の脳神経系に対する取り込み・蓄積の検討では、細胞への吸着能力はいずれの dmCT でも nCT と同等であることから、嗅神経/上皮への取り込みは認められたものの、dmCT では嗅脳への蓄積が認められなかった。CT を経鼻アジュバントとした場合の中樞神経系への安全性が懸念されているが、これら dmCT を用いることによりその危険を回避することが可能な事が示唆された。

dmCT の経鼻アジュバント活性を検討したところ、dmCT は共に非常に高い経鼻アジュバント

活性を保持しており、nCT に匹敵するアジュバント活性を示し、効果的に抗原特異的分泌型 IgA と血漿中抗原特異的 IgG 抗体を誘導した。抗原特異的 CD4⁺ T 細胞応答を解析した結果、抗原特異的 CD4⁺ T 細胞からの Th1-型サイトカイン産生に、dmCT E112K/KDEV と E112K/KDGL の間で差が認められた。特に、dmCT E112K/KDGL は Th1 も Th2 も共に強く誘導することが示唆された。さらに、抗原特異的 CD8⁺ T 細胞応答について解析した結果、dmCT E112K/KDGL は抗原特異的 CD8⁺ CTL 活性を示し、IFN- γ 産生抗原特異的 CD8⁺ T 細胞の増加と関連していた。HIV 対策用ワクチンとしては液性免疫と細胞性免疫両者を効果的に誘導出来る dmCT E112K/KDGL の粘膜アジュバントとしての開発研究が期待される。今後は HIV ワクチン候補抗原を使った粘膜アジュバント効果の検討が必要であろう。

E. 結論

HIV 対策用粘膜ワクチン開発に向けて、安全でかつ抗原特異的免疫誘導効果のある粘膜アジュバント開発を目指して、特に経鼻アジュバントとしての中枢神経系への安全性を強化した粘膜アジュバント開発を目的に、有効で安全なアジュバントとして既に報告している mCT E112K の A サブユニット COOH-末端小胞体残留シグナル KDEL に第 2 のアミノ酸置換を導入したダブルミュータントコレラ毒素 dmCT E112K/KDEV と dmCT E112K/KDGL を作成した。そして、その有効性および安全性を評価した結果、dmCT E112K/KDGL は、HIV に対するの防御免疫として必要と考えられている液性（例、分泌型 IgA）と CD8⁺ T 細胞による細胞性免疫誘導効果と安全性（例、毒性の無毒化）確認され、有効で安全な粘膜アジュバントになる可能性が示唆された。

F. 研究発表

(論文発表)

Kunisawa J, Kurashima Y, Gohda M, Higuchi M, Ishikawa I, Ogahara I, and Kiyono H. Sphingosine 1-phosphate regulates peritoneal B cell trafficking for subsequent intestinal IgA production. *Blood* 2007.

(published)

Kunisawa J, Takahashi I, and Kiyono H. Intraepithelial lymphocytes: their shared and divergent immunological behaviors in the small and large intestine. *Immunol. Rev.*215:136-153. 2007.

Tamagawa H, Hiroi T, Mizushima T, Ito T, Matsuda H, and Kiyono H. Therapeutic effects of roxithromycin in interleukin -10-deficient colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 2007. (published)

Takayama N, Igarashi O, Kweon MN, and Kiyono H. Regulatory role of Peyer's patches for the inhibition of OVA-induced allergic diarrhea. *Clin.Immunol.*2007. (in press)

Kim N, Kunisawa J, Kweon MN, Eog Ji G and Kiyono H. Oral feeding of *Bifidobacterium bifidum* (BGN4) prevents CD4⁺ CD45RB (high) T cell-mediated inflammatory bowel disease by inhibition of disordered T cell activation. *Clin.Immunol.* 123:30-39. 2007.

Maddaloni M, Staats HF, Mierzejewska D, Hoyt T, Robonson A, Callis G, Kozaki S, Kiyono H, McGhee JR, Fujihashi K, and Pascual DW. Mucosal vaccine targeting improves onset of mucosal and systemic immunity to *Botulinum* neurotoxin A. *J. Immunol.* 177 : 5524-5432. 2006.

Nochi T, and Kiyono H. Innate immunity in the mucosal immune system. *Curr Pharm Des.* 12 : 4203-4213. 2006.

Duverger A, Jackson RJ, van Ginkel FW, Fischer R, Tafaro A, Leppla SH, Fujihashi K, Kiyono H, McGhee JR, and Boyaka PN. *Bacillus anthracis* edema toxin acts as an adjuvant for mucosal immune responses to nasally administered vaccine antigens. *J. Immunol.* 176 : 1776-1783. 2006.

Hagiwara Y, Kawamura YI, Kataoka K, Rahima B, Jackson RJ, Komase K, Dohi T, Boyaka PN, Takeda Y, Kiyono H, McGhee JR, and Fujihashi K. A second

- generation of double mutant cholera toxin adjuvants: enhanced immunity without intracellular trafficking. *J. Immunol.* 177 : 3045-3054. 2006.
- Jang MH, Sougawa N, Tanaka T, Hirata T, Hiroi T, Tohya K, Guo Z, Umemoto E, Ebisuno Y, Tang BG, Seoh JY, Lipp M, Kiyono H, Miyasaka M. CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. *J. Immunol.* 176 : 803-810. 2006.
- 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)
- 吉田理人、五十嵐脩、寺原和孝、清野宏、織毛 M 細胞の形態と機能. *臨床免疫.* 45:236-242. 2006.
- 廣井隆親、塚越百合子、清野宏 粘膜系好酸球様樹状細胞による免疫寛容制御
感染と免疫 221-230 2007.
- (学会発表)
Kiyono H. 粘膜ワクチン開発へ向けて：新しい展開. The 79th Annual meeting of Japanese Society for Bacteriology. Kanazawa. Japan. March 2006.
- Kiyono H. 粘膜免疫を応用した感染症ワクチン開発ストラテジー. The 80th Annual Meeting of the Japanese Association for Infectious Diseases. Tokyo. April 2006.
- Kurashima Y, Kunisawa J, Gohda M, Higuchi M, Shimizu M, and Kiyono H. . Different roles of sphingosine 1-phosphate in the regulation of mobility of mast cells and eosinophils in peritoneal and intestinal compartments. *Immunology* 2006, Annual Meeting of The American Association of Immunologists. Massachusetts, USA. May 12th. 2006.
- Kiyono H. M cell targeted mucosal vaccine. *Immunology* 2006, Annual Meeting of The American Association of Immunologists. Massachusetts, USA. May 13th. 2006.
- Kunisawa J, Kurashima Y, Higuchi M, Gohda M, Shimizu M, and Kiyono H. Sphingosine-1-phosphate-mediated regulatory T cell trafficking in the large intestinal epithelium. *Immunology* 2006, Annual Meeting of The American Association of Immunologists. Massachusetts, USA. May 13th. 2006.
- Takayama N, Igarashi O, Kweon MN, and Kiyono H. Peyer's patch NKT and CD4⁺CD25⁺ T cell mediated mucosal regulatory network for the control of intestinal allergy. *Immunology* 2006, Annual Meeting of The American Association of Immunologists. Massachusetts, USA. May 13th. 2006.
- Gohda M, Kunisawa J, Kurashima Y, Higuchi M, Shimizu M, and Kiyono H. Regulation of peritoneal B cell mobility to intestine and subsequent production of the intestinal IgA by sphingosine -1- phosphate *Immunology* 2006, Annual Meeting of The American Association of Immunologists. Massachusetts, USA. May 14th. 2006.
- Terahara K, Igarashi O, Gotoh Y, Nochi T, Yuki Y, Hiroi T, Kiyono H. Induction of villous M-cells by intestinal environmental factors. *Immunology* 2006, Annual Meeting of The American Association of Immunologists. Massachusetts, USA. May 14th. 2006.
- Yuki Y, Takagi H, Nochi T, Yang L, Hiroi T, Takaiwa F, and Kiyono H. Development of a rice-based oral vaccine. *Immunology* 2006, Annual Meeting of The American Association of Immunologists. Massachusetts, USA. May 14th. 2006.
- Terahara K, Igarashi O, Yoshida Y, Nochi T, Goto G, Taguchi F, Beauchemin N, and Kiyono H. Novel CEACAM 1 splice variants expressed by murine small intestinal epithelium. The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and the 11th FAOBMB Congress. Kyoto, Japan. Jun 17th. 2006.
- Kiyono H. Mucosal decision for immunity, tolerance

and infection. 2nd the Biomolecule Secretion Research Symposium. Seoul, Korea. October 2006.

Kiyono H. 粘膜免疫:免疫とアレルギーの接点. The 43th Annual meeting of Japanese Society of Pediatric Allergy and Clinical immunology. Chiba. November 2006.

Kiyono H. Mucosal antigen uptake network : A key for the development of mucosal vaccine. US-Japan Cooperative Medical science Program, 19th Joint Meeting of the AIDS Panels. Kagoshima. December 2006.

國澤純、倉島洋介、樋口森生、合田昌史、清野宏. Sphingosine 1-phosphate receptor differently regulates naïve and activated intraepithelial T lymphocytes. 第36回日本免疫学会総会・学術総会, 大阪市, 大阪府, 12月13日, 2006.

高山尚子、五十嵐脩、権美那、清野宏. Role of NKT cells for the formation of a mucosal regulatory network in the control of intestinal allergy. 第36回日本免疫学会総会・学術総会, 大阪市, 大阪府, 12月13日, 2006.

樋口森生、國澤純、倉島洋介、合田昌史、清野宏. Cytokine regulation of epithelial cell-mediated innate and acquired phases of antigen presentation. 第36回日本免疫学会総会・学術総会, 大阪市, 大阪府, 12月13日, 2006.

野地智法、幸義和、依田昌樹、魚住明央、寺原和孝、金銅瑩、福山聡、五十嵐脩、清野宏. Immunological and biochemical characterization of M-cell by newly established monoclonal antibody. 第36回日本免疫学会総会・学術総会, 大阪市, 大阪府, 12月13日, 2006.

魚住明央、野地智法、依田昌樹、幸義和、五十嵐脩、柴田宏昭、清野宏. Identification and characterization of non-human primate M-cells. 第36回日本免疫学会総会・学術総会, 大阪市, 大阪府, 12月13日, 2006.

厚生科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）

分担研究報告書

ヒトゲノム多型性と HIV 感染に関する研究

分担研究者 塩田 達雄（大阪大学微生物病研究所教授）

研究要旨

HIV-1の主要なコレセプターであるCCR5遺伝子全域ならびに近傍のマイナーなコレセプターであるCCR2遺伝子の多型を日本人50名について検討した。さらに上記の50名の日本人とは重複しない日本人30名とタイ人186名についてCCR5のプロモーター領域とCCR2遺伝子について検討した。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。

A. 研究目的

エイズの病態ならびに進行速度は感染者ごとに大きく異なり、感染後急激にCD4陽性細胞数の減少をみる感染者から10年以上発症しない感染者まで様々である。また、HIV-1感染感受性自体にも個人差が存在する。本研究は、多数のHIV-1感染者および非感染者について、HIV-1の生活環に関わる様々な宿主因子の遺伝的多型を検討し、病態進行やHIV-1感染感受性の違いを決定する宿主側の因子を明らかにすることを目的とする。また抗HIV薬の有効性や副作用の個人差を決定する宿主因子の同定も重要な課題である。本年度はHIV-1の主要なコレセプターであるCCR5ならびに近傍のマイナーなコレセプターであるCCR2遺伝子の多型を日本人130名およびタイ人186名について検討し、アジア人種におけるCCR2およびCCR5遺伝子多型の特性を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

日本人50名について、CCR5遺伝子のプロモーターやコーディング領域全域の8.1Kbの領域をPCR法で増幅し、ABI DNA シークエンサーを用いてその領域の全塩基配列を決定した。上記の50名とは重複しない30名の日本人とタイ人186名について、CCR5のプロモーター領域に対応する約1Kbの領域を同様にPCR法で増幅し、その領域の全塩基配列を決定した。HIV-1感染症の病態進行の遅延と相関するCCR2の多型CCR2 V64Iは、PCR-RFLP法にて決定した。

（倫理面への配慮）

HIV-1感染者ならびに非感染者の検体を使用するにあたって、検体の提供者には遺伝子解析を行うことを含めて十分に説明を行い、書面による同意を得られた場合のみを解析の対象とし、検体は匿名化して個人情報特定できないようにして扱った。HIV-1感染者の遺