

厚生労働科学研究費補助金

政策創薬総合研究事業

小型動物を用いたエイズワクチン・エイズ薬の
予防治療効果評価系の開発

平成16～18年度 総合研究報告書

主任研究者 田中 勇悦

琉球大学大学院医学研究科

平成19（2007）年3月

目次

I. 総括総合研究報告

田中勇悦：小型動物を用いたエイズワクチン・エイズ薬の予防治療効果評価系の開発

II. 分担総合研究報告

- (1) 田中勇悦：hu-PBL-SCID マウスを用いた抗 R5 HIV-1 ヒト免疫応答の誘導と X4 HIV-1 新規薬剤効果評価系の開発
- (2) 小端哲二：BAFF/APRIL 抗原系の人為的操作による抗 HIV 抗体産生/HIV ワクチン効果の増強を目指して
- (3) 伊藤守：「HIV-1 感染増殖と免疫誘導を可能とする新たな高度免疫不全マウスの開発」に関する研究
- (4) 山本直樹：NOD/SCID/IL2Rg^{null} マウス (NOG マウス) へのヒト造血幹細胞移植による新しい HIV-1 感染モデル
- (5) 小柳義夫：HIV 感染による神経組織破壊のモデル動物の開発
- (6) 西澤雅子：ワクチン感作樹状細胞免疫法および薬剤の HIV-1 臨床株、野性株に対する評価
- (7) 本多三男：SCID-hu および hu-PBL-SCID マウス系 HIV-1 中和抗体・ワクチンの抗 HIV-1 評価
- (8) 辻本元：ネコエイズモデルを用いたエイズ治療薬の生体内評価系の開発

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

I . 総括研究報告

「小型動物を用いたエイズワクチン・エイズ薬の予防治療効果評価系の開発」

平成16～18年度総合研究報告書（総括）

主任研究者 田中勇悦 琉球大学大学院医学研究科免疫学分野 教授

研究要旨:エイズワクチンおよび新規エイズ薬候補の生体内効果を簡便かつ迅速に評価するための新たな小型動物エイズ実験系を開発する班研究を3年間に渡り実施した。当初の目標到達は概ね達成できたと思う。また、本研究によりオリジナリティに富む研究成果をあげ、次の新たな段階への基盤を築くことができた。3年間の具体的な研究成果の取りまとめは、本報告書の該当ページに掲載されているが、班研究による成果の概要を以下に述べる。開発したのは、ヒトの免疫細胞を移植した免疫不全マウス（ヒト化マウス）をエイズ研究の動物モデルとする3つの異なる系であり、それぞれの研究目的に従って使い分けることが可能である。ヒトPBMCを移植したhu-PBL-SCIDマウスではヒト樹状細胞(DC)の免疫誘導能を利用して候補ワクチンの評価が可能である。この系では免疫原の評価のみならずアジュバント等の評価も可能であり、T細胞とB細胞免疫を誘導するワクチン戦略の評価系として広く利用できる。さらに本研究で開発したヒトIL-4を産生するマウスで作ったhu-PBL-SCIDマウスはX4 HIV-1感染抑制効果の評価を可能とした。一方、ヒト胎児組織を移植したNOD-SCIDマウスでは野生型X4 HIV-1の感染を再現できるのでX4 HIV-1に対する薬剤の評価に応用できる。最近の成果であるが、ヒト造血幹細胞(CD34+)を高度免疫不全マウスであるNOGマウスに移植し、長期にわたりヒトの免疫担当細胞が生存するヒト化マウスを作製した。この系ではHIV-1の長期持続感染と抗体産生が観察されることから、長期の抗HIV-1薬評価を可能とした。また、本研究では野生HIV-1株や多剤耐性HIV-1株の分離をしており、それらを用いた感染実験が可能である。

A. 研究目的

本研究の目的は、新規エイズ薬およびエイズワクチン候補の生体内における抗ウイルス活性や副作用を、迅速にしかも簡便に評価できる汎用小型動物モデル

を開発することにより、エイズ克服のための医薬品開発に寄与することである。開発目標は、HIV-1感染に用いるヒト免疫細胞を移植した免疫不全(SCID)マウスモデルである。これらの動物モデルはあ

る程度の基盤が確立されていたが、感受性や応用面において未だ不十分な面があった。さらにヒトをシュミレーションしたワクチン評価ということはこれまで不可能であった。そこで、本研究では、最近我が国で開発された高度免疫不全 SCID マウス系統を用いて、さらには新種のマウスを作出し、種々のヒト免疫細胞を移植したキメラマウスを用いることにより、従来よりも高い HIV-1 感受性を持ち、HIV-1 薬剤を評価できる実験系を作ること、ワクチンによりヒト型の抗 HIV-1 感染防御免疫を効率的に誘導しその評価ができる新たな方法を開発すること、国内で開発されたウイルス感染阻止 CXCR4 アンタゴニスト候補等も評価できる系を作ること、以上を当初の到達目標として研究を進めた。

この研究目標のためには、移植するヒト細胞の選択、移植方法の改良、新規樹状細胞の分化誘導方法の開発、ワクチンアジュバントの改善、経口投与可能な CXCR4 アンタゴニストの開発、発生工学を用いた SCID マウス系統の改良などを重点的に行うことが必須であった。また、評価系の最適化と簡素化あるいは一般化を計ることも重点項目の一つであった。さらに本研究の特色として、より自然な環境での薬剤やワクチンのウイルス感染予防効果やエイズ治療効果の判定を可能とするために、薬剤やワクチンの評価実験には HIV-1 として臨床株あるいは多剤耐性株を用いた感染実験を行うことを基

本姿勢とした。

B. 研究方法（倫理面への配慮）

具体的な方法については各分担研究報告のページを参照してもらいたい。

これらの実験は、各施設の動物実験倫理委員会・感染実験安全委員会等で審査され許可されている。また、PBMC の供与にあたってはドナーに十分な実験の説明を行い、承諾を得ている。

C. 研究結果

hu-PBL-SCID マウスにおいて免疫誘導ワクチンを評価する際には、自家 (autologous) DC を用いた免疫方法が必要である。かつ DC の機能により誘導されるヘルパー T 細胞の性状が決定される。そこで新たな機能的 DC の誘導方法を考案した。まずは、単球の CCR5 や CXCR4 等のケモカイン受容体を刺激して培養する方法である。この DC により Th1 型のヘルパー T 細胞応答が誘導された。この DC 免疫によっても CD4+T 細胞由来のエイズウイルス抑制因子が誘導された。この因子の候補遺伝子の探索を継続している。

一方、単球を IL-4 と IFN-beta 存在下 LPS や不活化 HIV-1 で刺激培養することにより短期間で IL-10 産生誘導性 T 細胞を誘導する DC が誘導されることを見いだした。この DC の生体内での機能は、免疫刺激よりもむしろ免疫抑制活性が期待される。HIV-1 感染症後期における CD4+T 細胞の減少は T 細胞の慢性持続活

性化に起因するものであることから、この DC によるワクチン効果が *in vivo* で CD4⁺T 細胞の減少に歯止めをかけることができるかどうか期待される。

DC 免疫法で誘導される Th1 型のヘルパー T 細胞免疫応答に加えて、hu-PBL-SCID マウス系で HIV-1 中和抗体誘導についても研究を進めている。今回は、中和抗体を検出可能なレベルまでに上昇させることができなかつた。この点の改良法としてヒト B 細胞を活性化させるアゴニスティック抗体の応用について検討を進めている。抗体は BAFF/APRIL 受容体 TACI を認識し、すでにハイブリドーマ樹立により単クローン化している。この抗体は中和抗体を産生する B 細胞を直接刺激する活性がある。このようなアゴニスト抗体のヒト化、および *in vivo* での効果の評価は、今後の Th2 を誘導性 DC の分化誘導とあわせてさらに検討を進める計画を立てている。

hu-PBL-SCID マウスで IL-4 投与が X4 HIV-1 の感染増殖を促進する〔田中らが考案〕。そこで分担研究者の伊藤らと開発したヒト IL-4 を分泌するトランスジェニック免疫不全マウスを使って作製した hu-PBL-SCID マウスでは野生型の X4 HIV-1 の感染が促進され感染細胞をフローサイトメトリー法で細胞内 p24 染色で検出可能である。この系を用いて CXCR4 アンタゴニストの X4 HIV-1 感染防御投与効果を実証することができた。また、多剤耐性の X4HIV-1 の感染もアンタゴニス

トが生体内で阻害することをクリアーに証明した。この系は世界初のものである。この系は、ヒト胎児組織を移植した SCID-hu マウスにおける X4 HIV-1 の感染増殖のレベルまでには届かないものの、X4 HIV-1 に対する薬剤評価には十分な評価系を提供するものと期待できる。

上述の hu-PBL-SCID マウスを用いる実験系は短期の感染実験や免疫誘導実験に最適な環境を提供するが、長期のエイズ病態をシミュレーションできる系ではない。そこで現存する免疫不全マウスで最も免疫不全度の高いマウス系統である NOG マウスを用いて研究を進めた。HIV-1 感染によるヒト免疫組織の破壊を再現する動物モデルを開発するために、新生児 NOG マウスの肝臓に造血幹細胞である CD34⁺細胞を移植し、ヒト T 細胞、B 細胞や DC 細胞が数ヶ月にわたり維持循環するヒト化マウスを確立した。このヒト化マウス (NOG-hCD34) に、HIV-1 を感染させると、すべてのマウスにおいてウイルス血症が再現され、ウイルス分離が可能であった。病態再現では特に X4 HIV-1 感染マウスでは、CD4⁺T 細胞の減少が観察された。

さらに別の試みとして、ヒト造血幹細胞を成獣 NOG マウスに移植した系ではヒト B 細胞が発生し、その後移植 4 ヶ月以降に T 細胞の顕著な増加がみられた。移植マウスは、R5 指向性および X4 指向性両方の HIV-1 に高い感受性を示し、感染マウスの血漿中には 3 ヶ月以上にわた

り高いウイルスコピー数が持続されていた。組織染色および HIV-1 の DNA の検出により、脾臓、胸腺、骨髄、肺を含めた全身組織に HIV-1 感染が起こっていることが確認された。感染マウスの末梢血と脾臓では CD4 陽性 T 細胞の割合が経時的に減少し、胸腺内では CD4/CD8 共陽性の未熟 T 細胞の消失がみられた。高いウイルスコピー数が検出された個体では、HIV-1 に対する特異抗体の産生がみとめられている。

以上の本研究で開発した新たなヒト化免疫不全マウスのそれぞれの長所を生かすことによって今後のエイズ治療薬やワクチンの評価に幅広く利用できること期待できる。

D. 考察

この3年間の班研究によってヒト血液細胞を移植した作製した免疫不全マウスを HIV-1 薬剤およびワクチン評価系として提供するための確かな基盤と新規の方法論を作ることができたことから目標は概ね達成されたと自己評価している。またこの評価系は一般化することが可能である。しかし、国内においてより安価にしかも十分な数を提供できるまでには至らなかったことが反省される。この点についてはさらなる研究の継続が必要である。

本研究においてヒト化マウス体内でヒトの免疫応答を起こさせ、ワクチンの評価を可能とした成果は大きい。莫大な

予算のもとに多くの研究者が関わっている研究でさえ未だワクチン開発は成功していない現状であるが、このようなエイズワクチンの弱点を探る上でも本評価系の開発意義は大きいと考えている。特に、ワクチンによってエイズ発症阻止を目的とするのか、あるいは HIV-1 の完全除去を目的とするのかで、おのずと誘導すべき免疫応答の質は違うはずである。長期未発症者の強い免疫応答を第一目標とすべきか、あるいは感染しても発症しない猿の弱い免疫応答を目標とすべきか、現在の研究でも混とんとしており、誰もその答えを知らない。完全なウイルス排除は不可能に近いとすれば、感染者のエイズ発症阻止をどのように実現するかに焦点をしばった研究が必要であろう。抗原提示細胞である DC の機能の違いによって誘導されるヘルパー T 細胞の機能に直接的な影響を及ぼすことから、エイズワクチンの評価には多角的な DC の培養分化法を確立し、様々な条件でのワクチン評価が必須であると考ええる。今回我々が開発した IL-4/IFN-beta を用いた方法で誘導された DC は、IL-10 産生制御性 T 細胞 (Treg) を誘導する。IL-10 は免疫応答を負に調節することからこのような DC を用いたワクチン接種が HIV-1 の増殖調節にどのように働くかを解明する研究によって新たなエイズワクチンの方向性が見えてくるように思う。

中和抗体がどれだけ野生 HIV-1 あるいは多剤耐性 HIV-1 の感染阻止に効果が

あるかどうかは論議のあるところである。しかし、多くのクレードのウイルスと交差反応する中和抗体の存在も報告されており、今後 *in vivo* でヒト化マウスにおける HIV-1 中和抗体の誘導や受動免疫における中和抗体の効果の評価は重要と考える。抗体産生を促す Th2 誘導型 DC の培養方法は未だ確立されていないが、コレラトキシンを DC 培養系に添加することによって Th2 誘導性の DC が分化することを確認しており、さらなる検討を継続している。また、BAFF/TACI 受容体 TACI を刺激するアゴニスト抗体の応用が可能となったので、hu-PBL-SCID のみならず血液造血幹細胞移植マウスでの機能検定を進めている。

ヒト血液造血幹細胞を移植したマウスでは HIV-1 の長期感染とある個体では抗体の産生が認められた。この系は臍帯血から分離した CD34 陽性細胞を移植した NOG マウスを応用する系であるが、多数の動物の調達はできないものの、エイズ治療薬の評価する優れた実験系として評価できる。このモデルはすでに新聞報道されている。

一方、本研究の特筆すべき研究成果の一つとして、X4 HIV-1 の感染抑制の評価を可能とする hu-PBL-SCID マウスの作出に成功してことである。この特殊マウス系統はヒト IL-4 遺伝子を導入したマウスであり、この系を用いることによって多剤耐性 X4 HIV-1 の感染が我が国の企業が開発している CXCR4 アンタゴニスト

で感染抑制されることを証明した。(クレハとの共同研究、CROI 2007 で発表)。以前は、ヒト IL-4 を投与する系を用いていたが、それが不要となった。このマウスにおける X4 HIV-1 の感染促進は IL-4 の直接的な CXCR4 の発現促進と関連すると考えている。このマウスを使うことにより、DC 免疫で誘導される HIV-1 抑制因子と CXCR4 アンタゴニストの併用の相加効果の多剤耐性 HIV-1 に対する評価が可能となった。この方法は今後さらなる一般化が可能であり、HIV-1 の研究に弾みをつけるものと期待される。

E. 結論

改良された免疫不全マウスにヒト PBMC あるいは CD34 陽性ヒト造血幹細胞を移植して作製した種々のヒト化マウスを目的によって使い分けることによって、動物モデルにおいて HIV-1 薬剤やワクチンの評価する系を作製した。ワクチンやアジュバントの評価にはヒト PBMC を移植したマウスにヒト由来の樹状細胞を用いた免疫方法を応用する。ケモカイン受容体アンタゴニスト等の X4 HIV-1 に対する評価にはヒト IL-4 産生マウスを用いる。一方、長期感染に対する薬剤の評価はヒト造血幹細胞を移植したヒト化マウスの利用が不可欠である。3年間の研究によりヒト化マウスでの評価系の適用範囲の拡大が計られた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

各分担研究者の頁を参照

H. 知的所有権の出願・取得状況

なし

II. 分担研究報告

「小型動物を用いたエイズワクチン・エイズ薬の予防治療効果評価系の開発」

平成16～18年度分担総合研究報告書

主任研究者 田中勇悦 琉球大学大学院医学研究科免疫学分野 教授

研究要旨：ヒト PBMC を移植した免疫不全マウス（hu-PBL-SCID マウス）を用いてヒト樹状細胞（DC）の免疫誘導能を利用した候補ワクチンの評価系と、新規候補薬剤の R5 および X4 HIV-1 感染抑制効果の評価系を開発した。

A. 研究目的

新規エイズ薬およびエイズワクチン候補の生体内における抗ウイルス活性や副作用を簡便に評価できる汎用小型動物モデルを開発することにより、エイズ克服のための医薬品開発に寄与することを目標とした。私の分担研究の開発目標は、我が国で新たに開発された高度免疫不全 SCID マウス系統を用いて、ワクチンの抗 HIV-1 感染防御免疫効果評価系と新規薬剤の抗 HIV-1 活性評価系を作ることである。免疫不全マウスに移植するヒト細胞は、正常成人の PBMC とした。移植方法の改良や新規ヒト樹状細胞の分化誘導方法の開発、発生工学を用いて作製したヒト IL-4 産生免疫不全マウス系統の評価系への応用に関して重点的に実験を進めた。

B. 研究方法（倫理面への配慮）

(1) SCID マウスにヒト末梢血単核球（PBMC）を移植する hu-PBL-SCID マウス系

で、コントロール抗原（OVA や KLH）そして AT-2 不活化 HIV-1 粒子で感作した自家樹状細胞でマウスを免疫することにより抗原特異的なヒトの免疫応答を誘導できる。これまで一般に用いられている DC の培養方法に替えて、次の新たな方法を試みた。つまり、単球を自家製の種々の抗ケモカイン受容体抗体を用いて、プレート上で単球が発現するケモカイン受容体を架橋し、培養を行なった。この方法で得られた DC の免疫刺激性を *in vitro* のサイトカイン産生能と *in vivo* での免疫誘導能の測定で検討した。また、さらに新たな DC 分化誘導の試みとして、IL-4 と IFN-beta を用いた早期（3日間）誘導方法も試した。

(2) CXCR4 アンタゴニストの評価では、hu-PBL-SCID マウスに新規経口投与可能のアンタゴニスト（クレハ）の HIV-1 感染阻害効果を hu-PBL-SCID マウスで試した。X4 HIV-1 感染促進のためには、1

ug/animal の IL-4 を 2 回投与した。感染後一週間後にマウス腹腔内の細胞に感染したウイルス量を、細胞培養後の p24 測定方法で推定した。

(3) さらに新規 SCID マウス作製においてはヒト IL-4 遺伝子導入を試み、IL-4 産生 SCID マウスの新規開発とその応用を試みた。

以上の実験は、各施設の動物実験倫理委員会・感染実験安全委員会等で審査され許可されている。また、PBMC の供与にあたってはドナーに十分な実験の説明を行い、承諾を得た。

C. 研究結果

(1) hu-PBL-SCID マウス体内でヒトの T 細胞および抗体免疫応答を誘導するには、自家 DC が必要である。DC の培養方法は一般化されてきているが、ただ単にマウス腹腔に移植すればよいというわけではなかった。目的とする抗原で感作した DC を新鮮な PBMC と混合しマウスの脾臓に直接接種する独自の方法がこれまで最良の免疫応答を誘導することを見出した。さらに本研究で開発したのは、新たなヒト DC の誘導方法である。単球を特異的な単クローン抗体を用いて単球のケモカイン受容体を架橋し、IL-4 の添加のみで培養する方法であり、これにより Th1 誘導性 DC が分化培養できた。この DC は IFN-beta で成熟させると同時に不活化 HIV-1 で感作することにより、in vivo で

T 細胞免疫刺激活性をもつ DC となり、実際にこの DC は hu-PBL-SCID マウスにおいて HIV-1 に対する特異的な T 細胞免疫応答を誘導した。さらにこの DC を仲介する不活化 HIV-1 粒子の免疫によって我々が発見した HIV-1 抑制性 CD4 因子を誘導が誘導された。今後、種々のワクチンの目的とする免疫応答が Th1 の場合には、この DC を用いる系が優れた評価系であると考えられる。

(2) まださらなる研究が必要な段階ではあるが、DC の分化培養において、単球を IL-4 と IFN-beta で培養することにより短期の間で抑制的機能を持った T 細胞応答を誘導できる DC を分化させることに成功した。この DC の hu-PBL-SCID マウスで免疫誘導能とその免疫の抗 HIV-1 能については今後の検討課題である。

(3) hu-PBL-SCID マウスをさらに X4 HIV-1 感染に対する感受性を高めるために、これまでは IL-4 を接種する方法を用いていたが、ヒト IL-4 を分泌する免疫不全マウスを伊藤らと作出し、その評価系への応用性を試した。このマウスにヒト PBMC を移植することで作製した hu-PBL-SCID マウスでは従来のマウスと比べて格段に X4 HIV-1 感染に対する感受性が高められていた。この hu-PBL-SCID マウスでは、クレハ社製 CXCR4 アンタゴニストの感染防御効果が実際に確かめることに成功した。また特筆すべきはこの実験に使ったのは X4 HIV-1 標準株と西澤らが分離した多剤耐性の CXCR4 使用性

HIV-1 株である。

(4) 前記の HIV-1 感作 DC で免疫した hu-PBL-SCID マウスは R5 HIV-1 感染には耐性を獲得するが、X4 HIV-1 感染には感受性を持つ。そこで DC-HIV-1 免疫 hu-PBL-SCID マウスにクレハ社が開発した経口投与可能な CXCR4 アンタゴニストを投与したところ、R5 HIV-1 にも X4 HIV-1 にも感染を免れる状態が誘導できた。機序は、CD4 因子による R5 HIV-1 感染阻止、CXCR4 アンタゴニストによる X4 HIV-1 の感染阻止であると示唆される。(特許制限のため構造式は非公開である。本成果は、エイズ関連の国際学会 CROI 2006 で late breaker 口頭発表に選ばれた)。

D. 考察

我が国において hu-PBL-SCID マウスを HIV-1 感染症のモデルとして広く応用できるような系に改良するために、様々な試行錯誤と検証を行なった。この系でワクチンによる T 細胞免疫応答と B 細胞免疫応答の誘導能を検討するには、同じドナーの単球から分化培養した DC と PBMC を共移植することが不可欠である。免疫誘導において DC の機能の違いがどのタイプのヘルパー T 細胞を誘導するかを決定することが明らかにされているので、この hu-PBL-SCID マウスの系でも用いる DC の性状が最終の免疫応答を決めることが示唆される。このことは、つまり、ワクチン開発においては宿主側の DC

の調節との関連において行なわなければならないことを示唆する。免疫応答の最適化のため、多角的な DC の培養法の検討が必要である。今回開発したのはケモカイン受容体の架橋と IL-4 の添加により、単球を GM-CSF の刺激を介さない機能的 DC の誘導方法である。この DC は、自家 T 細胞からの IFN-gamma 産生をより強く誘導できるので、Th1 細胞誘導を主目的とするワクチン候補の評価に応用できると考えている。他方、現在開発中の IL-4/IFN-beta を用いる短期 DC 誘導方法は制御性 T 細胞を誘導する負の活性があり、その有用性にも期待される。

ワクチンによる抗体免疫応答の誘導については未だ中和抗体の誘導まで到達していないが、Th2 誘導型 DC の培養方法の確立が必須である。これに関しては、コレラトキシンを使った DC の分化培養法を新たに開発しつつある。

今回の研究で得られた成果の一つとして、経口投与可能な CXCR4 アンタゴニストの効果を hu-PBL-SCID マウスで実証したことである。特許制限のため論文にはされていないが、国際学会では注目を集めた(クレハとの共同研究、CROI 2006 で発表)。この研究を成功させたキーポイントは、ヒト IL-4 の共投与である。IL-4 は X4 HIV-1 受容体である CXCR4 の発現を促進し、hu-PBL-SCID マウスに移植されたヒト CD4+T 細胞の CXCR4 の down-modulation を軽減するからである。この方法を一般化するには、しかしなが

ら高価な IL-4 を購入する必要がある。そこで IL-4 を定常的に産生する SCID マウスの作製にとりかかり、目的とする IL-4 産生マウスの作出に成功した。また、その実用性が検証できた (論文投稿中)。

DC-HIV 免疫で誘導される HIV-1 抑制因子として、我々が見つけた CD4 因子は、R5 HIV-1 の感染を抑制する。この因子を、DC 免疫で誘導し、同時に CXCR4 アンタゴニストを併用することにより、期待通りに hu-PBL-SCID マウスにおいて R5 HIV-1 と X4 HIV-1 の重感染が制御された。今後、R5 および X4 HIV-1 の重感染における種々の CXCR4 アンタゴニストのスクリーニングも可能となった。

研究目的から見た達成度は、小型動物を用いたエイズの新規ワクチンや薬剤の評価を可能にする新たなシステム開発となる基盤を確立できたことから概ね評価されると考えている。今後、さらなる最適化と応用および普及化へむけて努力を続けてゆきたい。

E. 結論

ヒト PBMC を移植した免疫不全マウス (hu-PBL-SCID マウス) で自家樹状細胞 (DC) の免疫誘導能を利用することによってヒト型 T 細胞免疫応答を誘導できることから、この実験系はワクチン評価系として有用である。また、新たな免疫不全マウスを使った hu-PBL-SCID マウスは、新規候補薬剤の R5 および X4 HIV-1 感染抑制効果の評価系を可能とした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 学会発表 (国際)

- (1) Nakayama EE, Tanaka Y, Nagai Y, Iwamoto A, Shioda T. A CCR2-V641 polymorphism affects stability of CCR2A isoform. XV international AIDS conference, Bangkok, Thailand 11-16 July 2004, abstract vol 2, p 9.
- (2) Tanaka Y, Yoshida A, Tanaka R, Murakami T, Yamamoto N. Heterogeneity of HIV-1 epitopes recognized by a novel HIV-1 suppression factor-producing human CD4+ T cells derived from hu-PBL-SCID mice immunized with HIV-1-loaded autologous DC. XV international AIDS conference, Bangkok, Thailand 11-16 July 2004, abstract vol 2, p 319.
- (3) Murakami T, Yoshida A, Kumakura S, Tanaka R, Mitsuhashi S, Hirose K, Yanaka M, Yamamoto N, Tanaka Y. KRH-2731-5HCl: A new potent and orally bioavailable X4 HIV-1-inhibiting CXCR4 antagonist in vivo. XV international AIDS conference, Bangkok, Thailand 11-16 July 2004, Program supplement, p 30.
- (4) Tanaka Y. Identification of HIV-1 epitopes that induce the synthesis

- of R5 HIV-1 suppression factor by human CD4+ T cells isolated from HIV-1 immunized hu-PBL-SCID mice and immortalization of the factor-producing CD4+ T cells. Fortieth Anniversary United States-Japan cooperative medical science program, Kyoto, 7-10 December 2004. Abstract; 375.
- (5) Tanaka Y, Yoshida A, Tanaka R, Mitsuhashi S, Hirose K, Yanaka M, and Yamamoto N. DC-HIV-1 Vaccination and X4 Antagonist Administration Protect Hu-Pbl-Scid Mice against R5 and X4 HIV-1 Infection. Seventh International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, Kobe Convention Center, 1-5 July 2005.
- (6) Okuma K, Tanaka R, Ito M, Yamamoto N, and Tanaka Y. Human IL-4-Transgenic SCID Mice: A Novel Animal Model for X4 HIV-1 Infection. 1st International Workshop on Humanized Mice. International house of Japan, Roppongi, Tokyo, Japan. 11-12 October 2006.
- (7) Tanaka Y, Tanaka R, Zhang LF, Kodama A, Kondo K, Okuma K, and Yamamoto N. Cross-linking cell surface chemokine receptors on monocytes: activation and differentiation into potent Th1-inducing and HIV-1-resistant DC.
- US-Japan Cooperative Medical Science Program 19th Joint Meeting of the AIDS Panels. Kagoshima, Japan. 6-7 December 2006.
- (8) Tanaka Y, Okuma K, Tanaka R, Kumakura S, Shimoyamada A, Hirose K, Yanaka M, Murakami T, and Yamamoto N. Development of Novel Orally Bioavailable CXCR4 Antagonists, KRH-3955 and KRH-3140: Binding Specificity, Pharmacokinetics, and Anti-HIV-1 Activity in vivo /in vitro. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Denver, Feb. 2006.
- (9) Okuma K, Tanaka R, Ito M, Kumakura S, Yanaka M, Sugiura W, Nishizawa M, Yamamoto N, and Tanaka Y. An Improved Animal Model for X4 HIV-1 Infection: Human IL-4-Transgenic hu-PBL SCID Mice. 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Los Angeles Convention Center, Los Angeles, California, U.S.A. 25-28 February 2007.
2. 論文発表
- (1) Nakayama EE, Tanaka Y, Nagai Y, Iwamoto A, Shioda T. A CCR2-V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform. AIDS 18(5):729-38, 2004.
- (2) Zingoni A, Sornasse T, Cocks BG,

- Tanaka Y, Santoni A, and Lanier LL. Cross-talk between activated human NK cells and CD4⁺ T cells via OX40-OX40 ligand interactions. *J Immunol.* 173(6): 3716-3724, 2004.
- (3) Yoshida A, Tanaka R, Kodama A, Yamamoto N, Ansari AA, Tanaka Y. Identification of HIV-1 epitopes that induce the synthesis of a R5 HIV-1 suppression factor by human CD4⁺ T cells isolated from HIV-1 immunized hu-PBL SCID mice. *Clin Dev Immunol.* 12(4):235-42, 2005.
- (4) Barnard AL, Igakura T, Tanaka Y, Taylor GP, Bangham CR. Engagement of specific T-cell surface molecules regulates cytoskeletal polarization in HTLV-1-infected lymphocytes. *Blood* 106(3):988-95, 2005.
- (5) Nimura F, Zhang LF, Okuma K, Tanaka R, Sunakawa H, Yamamoto N, Tanaka Y. Cross-linking cell surface chemokine receptors leads to isolation, activation, and differentiation of monocytes into potent dendritic cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 231(4):431-43, 2006.
- (6) 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* 97(12):1381-7, 2006.
- (7) Kondo K, Okuma K, Tanaka R, Zhang LF, Kodama A, Takahashi Y, Yamamoto N, 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.
- (8) Koyanagi Y, Tanaka Y, Ito M, Yamamoto N. Humanized mice for human retrovirus infection. *Curt Top Microbiol Immunol*, in press.

H. 知的所有権の出願・取得状況

なし

BAFF/APRIL 抗原系の人為的操作による抗 HIV 抗体産生/HIV ワクチン効果の増強を目指して

分担研究者 小端 哲二 獨協医科大学医学部免疫学講座教授

研究要旨

抗 HIV 抗体の産生増強および HIV ワクチンの効果増強への応用を目的に、T 細胞非依存性 B 細胞活性化を制御する TNF ファミリー分子 BAFF/APRIL の受容体 (BAFF-R および TACI) に対するアゴニスト単クローン抗体を開発し、その作用機序を解析した。その結果、BAFF-R は BAFF による B 細胞応答を正に制御する受容体であるのに対して、TACI は BAFF に対しては負の制御受容体として、また APRIL に対しては正の制御受容体として機能することが明らかとなった。

小端 哲二
獨協医科大学
教授

BAFF/APRIL との結合阻害による B 細胞応答への効果を検討した。B 細胞アポトーシスの検出はアネキシン V 結合能をフローサイトメーターにて検討した。NF- κ B2 の核内移行、活性化誘導シチジンデアミナーゼ (AID) の発現およびプロテインキナーゼ A (PKA) のリン酸化の程度を免疫ブロット法にて検討した。

（倫理面への配慮）

実験には匿名化された日本赤十字社血液センターからの研究譲渡血を用いるため、倫理面の問題は無い。

A . 研究目的

BAFF/APRIL による T 細胞非依存性 B 細胞活性化系の制御機構の解明を通して、HIV 特異的 B 細胞の生存維持、抗 HIV 抗体の産生増強および HIV ワクチンの効果増強への応用を図る。開発したヒト BAFF/APRIL の受容体 BAFF-R および TACI に対するアゴニスト単クローン抗体を用いて、その作用機序を解析した。

B . 研究方法

ヒト末梢血 B 細胞に BAFF、APRIL、抗ヒト BAFF-R アゴニスト単クローン抗体 (8A7) または抗ヒト TACI アゴニスト単クローン抗体 (11H3) を添加し培養した。B 細胞増殖と IgG および IgA の産生は、それぞれ DNA 合成能ならびに ELISA を用いて測定した。また siRNA 技術を用いて TACI の発現抑制ならびにヘパリチナーゼ処理によりヘパラン硫酸ペプチドグリカン (HSPG) を変性した後、

C . 研究結果

1) 8A7 抗体は、NF- κ B2 の核内移行、B 細胞の増殖、そして IgG 産生を誘導した (図 1)。2) 11H3 抗体は、8A7 抗体により誘導された NF- κ B2 核内移行、B 細胞増殖、そして IgG 産生を有意に抑制した (図 1)。2) 11H3 抗体は、B 細胞アポトーシスを誘導した (図 2)。3) TACI siRNA は、BAFF により誘導された B 細胞増殖、IgG および IgA の産生を有意に増強した (図 3)。4) TACI siRNA は、APRIL により誘導された IgA 産生を有意に抑制し

たが B 細胞増殖や IgG 産生には影響しなかった (図 3)。5) ヘパリチナーゼ処理は、APRIL により誘導された B 細胞増殖と IgG および IgA 産生を有意に抑制したが BAFF によるものには影響しなかった (図 3)。6) 特異抗体を用いた HSPG 刺激により AID の発現が誘導され、次に 11H3 抗体の添加により PKA のリン酸化が誘導された結果、IgA の産生が誘導された (図 4)。

D . 考察

BAFF-R による B 細胞活性化シグナルを TACI は少なくとも NF- κ B2 の転写因子レベルで抑制することが示唆された。また、TACI は B 細胞アポトーシスを誘導することが明らかとなった。よって、BAFF は BAFF-R を介する正のシグナルと TACI を介する負のシグナルを通して NF- κ B2 の活性化と B 細胞アポトーシスを制御し、B 細胞応答を調節しているようである。さらに、TACI は APRIL-HSPG 相互作用による IgA 産生を誘導すること、HSPG は APRIL による B 細胞活性化に必須であることから、TACI は BAFF に対しては負の受容体として、一方、APRIL に対しては正の受容体として機能していることが明らかとなった。

E . 結論

受容体 BAFF-R は、唯一のリガンド BAFF との結合により B 細胞応答を正に調節する。一方、受容体 TACI は、その単独刺激では B 細胞アポトーシスを誘導するだけだが、結合するリガンドによって B 細胞応答を正にも負にも調節し得る。したがって、TACI を標的とした人為的操作によって抗体産生/ワクチン効果の増強を図ることは必ずしも容易ではない。よって、BAFF-R (T 細胞非依存性) および CD40 (T 細胞依存性) シグナルの増強を中心に抗体産生/ワクチン効果の増強を図るのがより現実的と考える。

F . 研究発表

1. 論文発表

1) Nakamura, N., Hase H., Sakurai D., Yoshida S., Abe M., Tsukada N., Takizawa J., Aoki S., Kojima M., Nakamura S., and Kobata T.: Expression of BAFF-R (BR3) in normal and neoplastic lymphoid tissues characterized with a newly developed monoclonal antibody. *Virchows Arch.* 447:53-60, 2005.

2) Sakurai, D., Kanno Y., Hase H., Kojima H., Okumura K., and Kobata T.: TACI attenuates antibody production costimulated by BAFF-R and CD40. *Eur. J. Immunol.* 37: 110-118, 2007.

3) Sakurai, D., Hase H., Kanno Y., Kojima H., Okumura K., and Kobata T.: TACI regulates IgA production by APRIL in collaboration with HSPG. *Blood* published online Nov. 21, 2006.

2. 学会発表

1) 櫻井大祐、小嶋英史、小端哲二. BAFF-R 誘導性 NF- κ B2 活性化に対する TACI の働き. 第 35 回日本免疫学会. 2005 年 12 月 13 日. (横浜)

2) Sakurai D., Kanno Y., Hase H., Kojima H., and Kobata T. Pivotal roles for the BAFF/BAFF-R and BAFF/TACI axes in B-cell responses: analyzed by new anti-human BAFF-R and TACI agonistic mAbs. The 44th Midwinter Conference of Immunologists. January 28, 2006. (Pacific Grove, CA, USA)

3) Sakurai D., Kanno Y., Hase H., Kojima H., and Kobata T.: Pivotal roles for the BAFF/BAFF-R and BAFF/TACI axes in B-cell responses analyzed by new anti-human BAFF-R and TACI agonistic mAbs. The 11th International Conference on Lymphocyte Activation and Immune Regulation, February 2,

2006. (Newport Beach, CO, USA)

4) 菅野由美子、櫻井大祐、長谷英徳、小嶋英史、小端哲二. PKC δ transition in TACI-mediated B cell death. 2006年12月12日. (大阪)

5) 櫻井大祐、菅野由美子、長谷英徳、小嶋英史、小端哲二. TACI positively regulates APRIL-induced IgA production in concert with HSPG. 第36回日本免疫学会. 2006年12月13日. (大阪)

6) 小端哲二、菅野由美子、長谷英徳、小嶋英史、

櫻井大祐. TACI can antagonize BAFF-R- and CD40-mediated non-canonical NF- κ B activation in B cells. 第36回日本免疫学会. 2006年12月13日. (大阪)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

図1 アゴニスト抗ヒト BAFF-R および TACI 単クローン抗体の B 細胞応答に対する効果

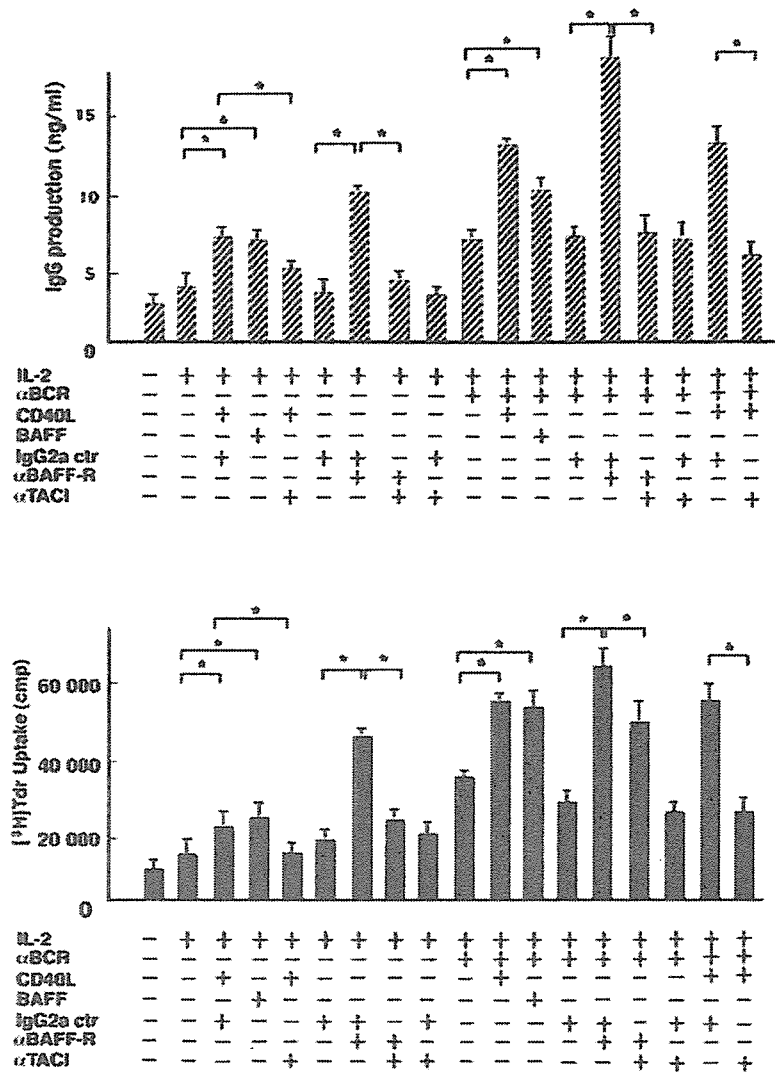


図2 アゴニスト抗ヒト TACI 単クローン抗体による B 細胞アポトーシスの誘導

