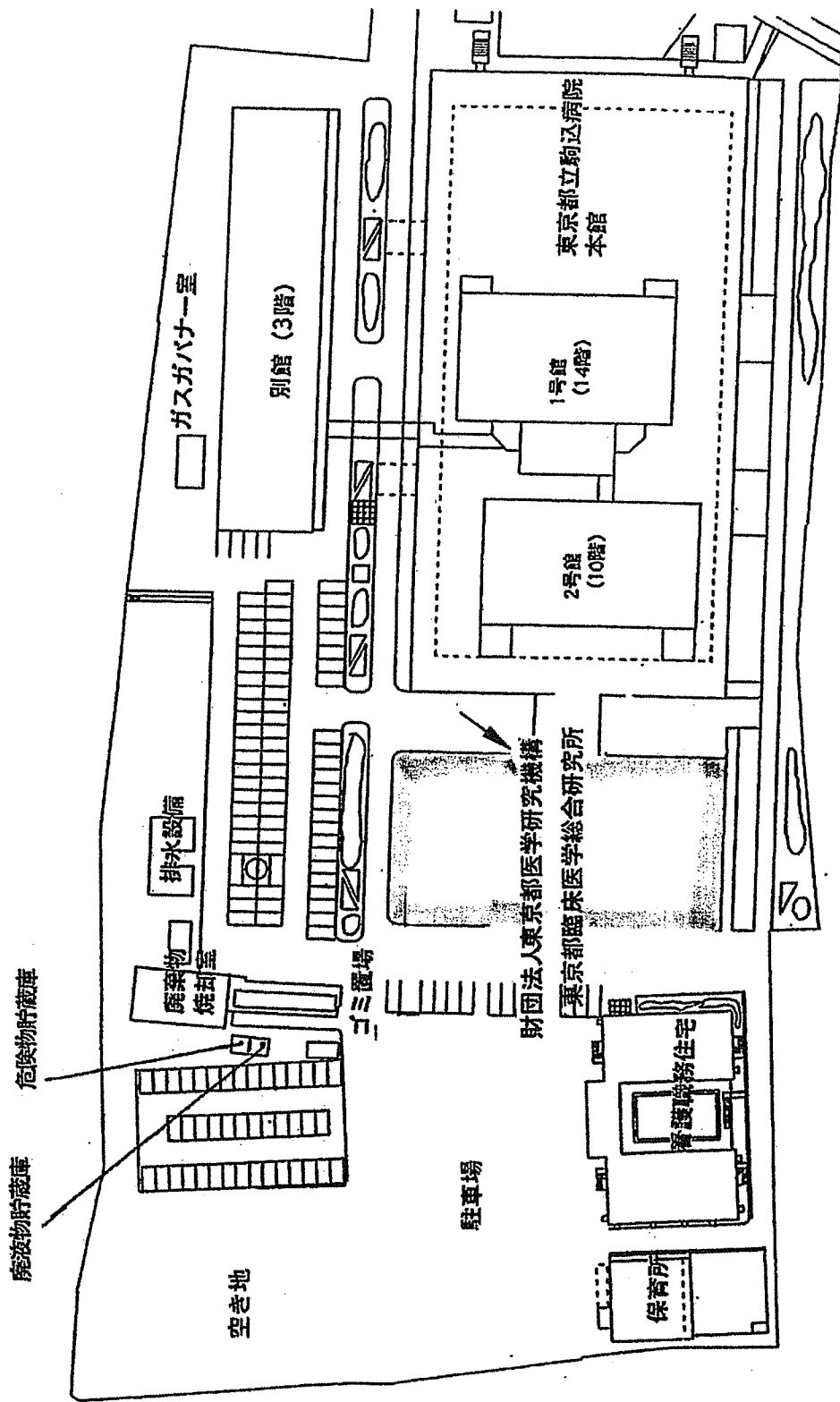


图1 財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所 全体図



配置図 1/1000



図3 P2組換えDNA実験室(312号室)実験区画

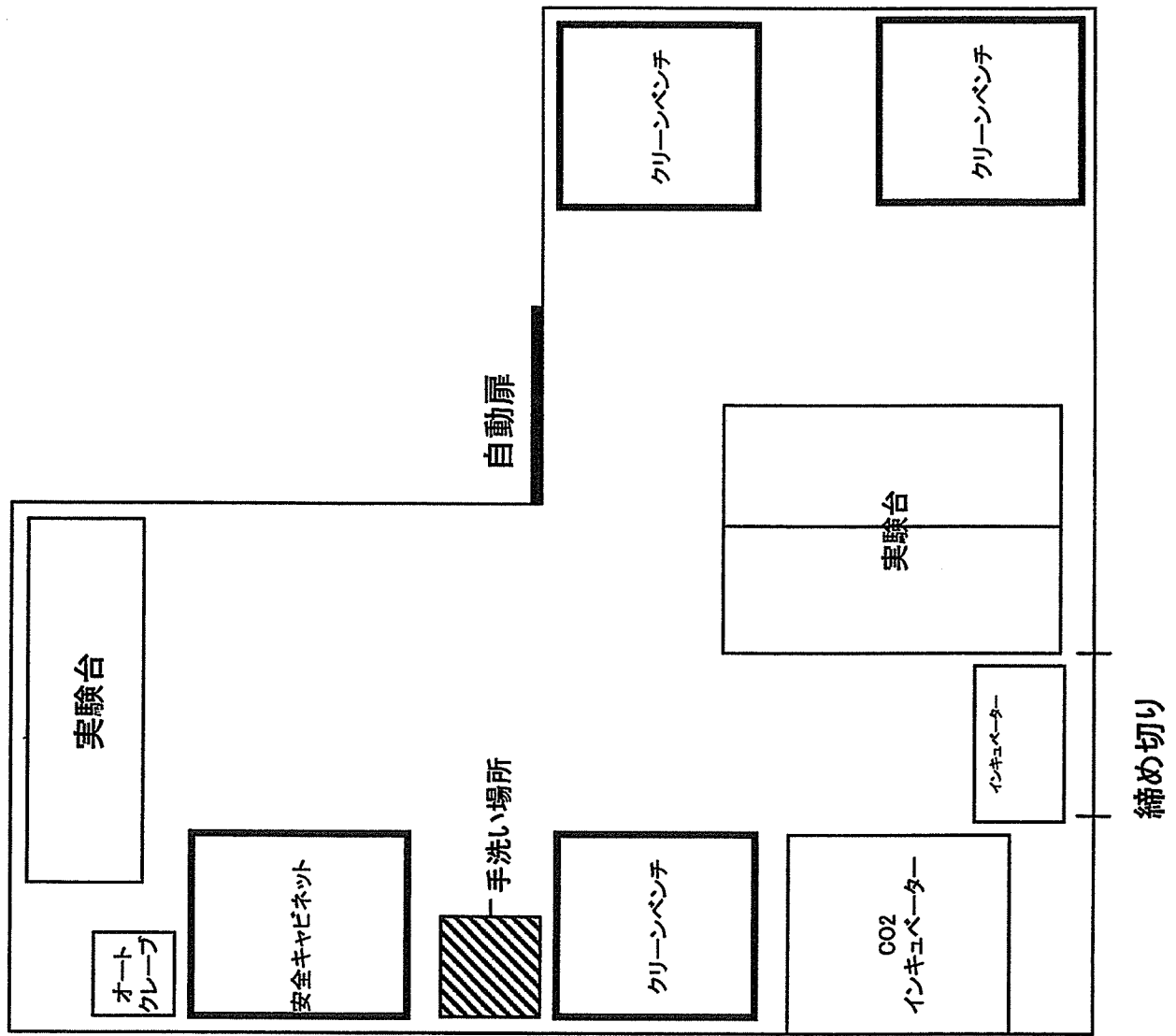


図4 P2A動物感染実験室

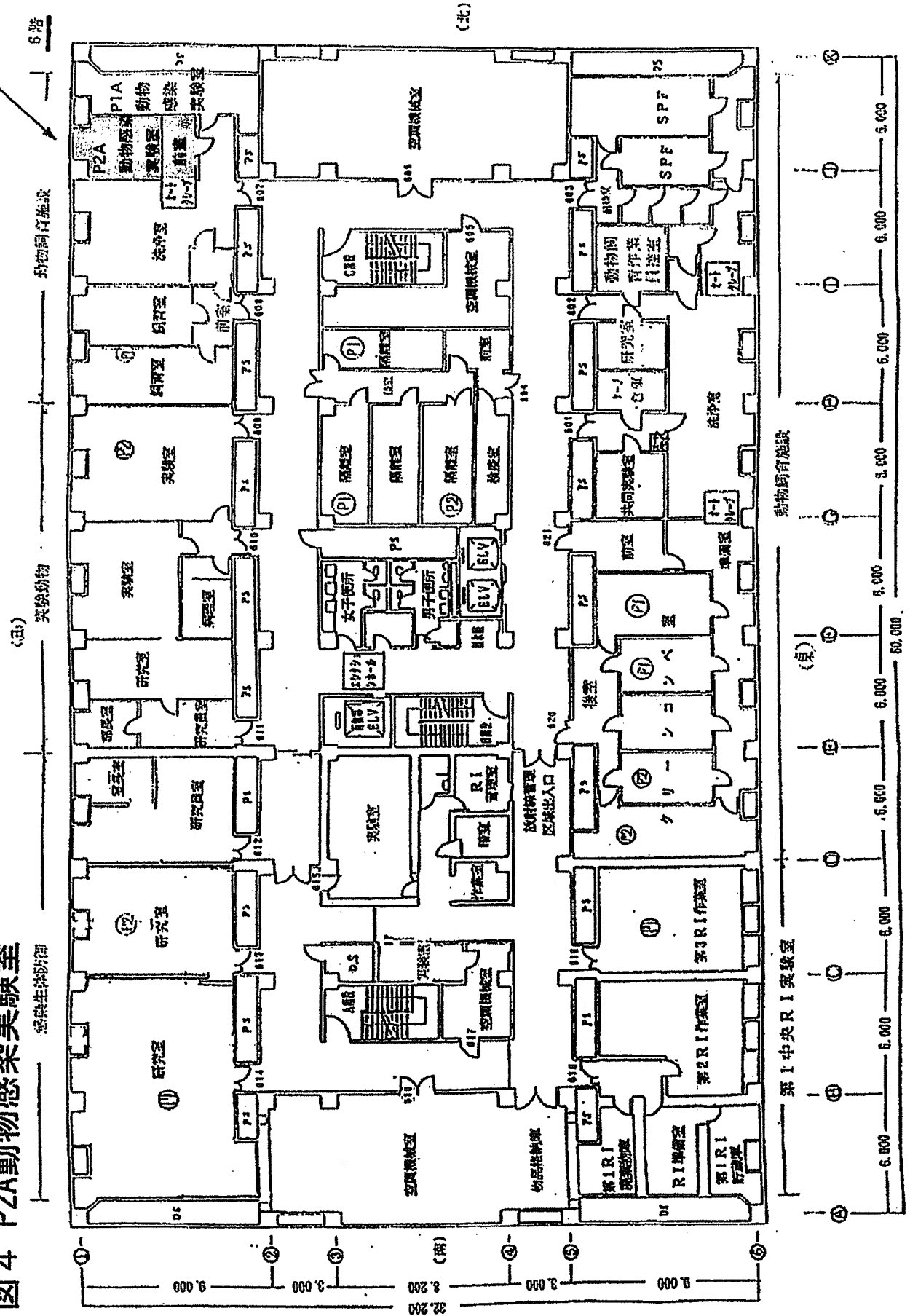
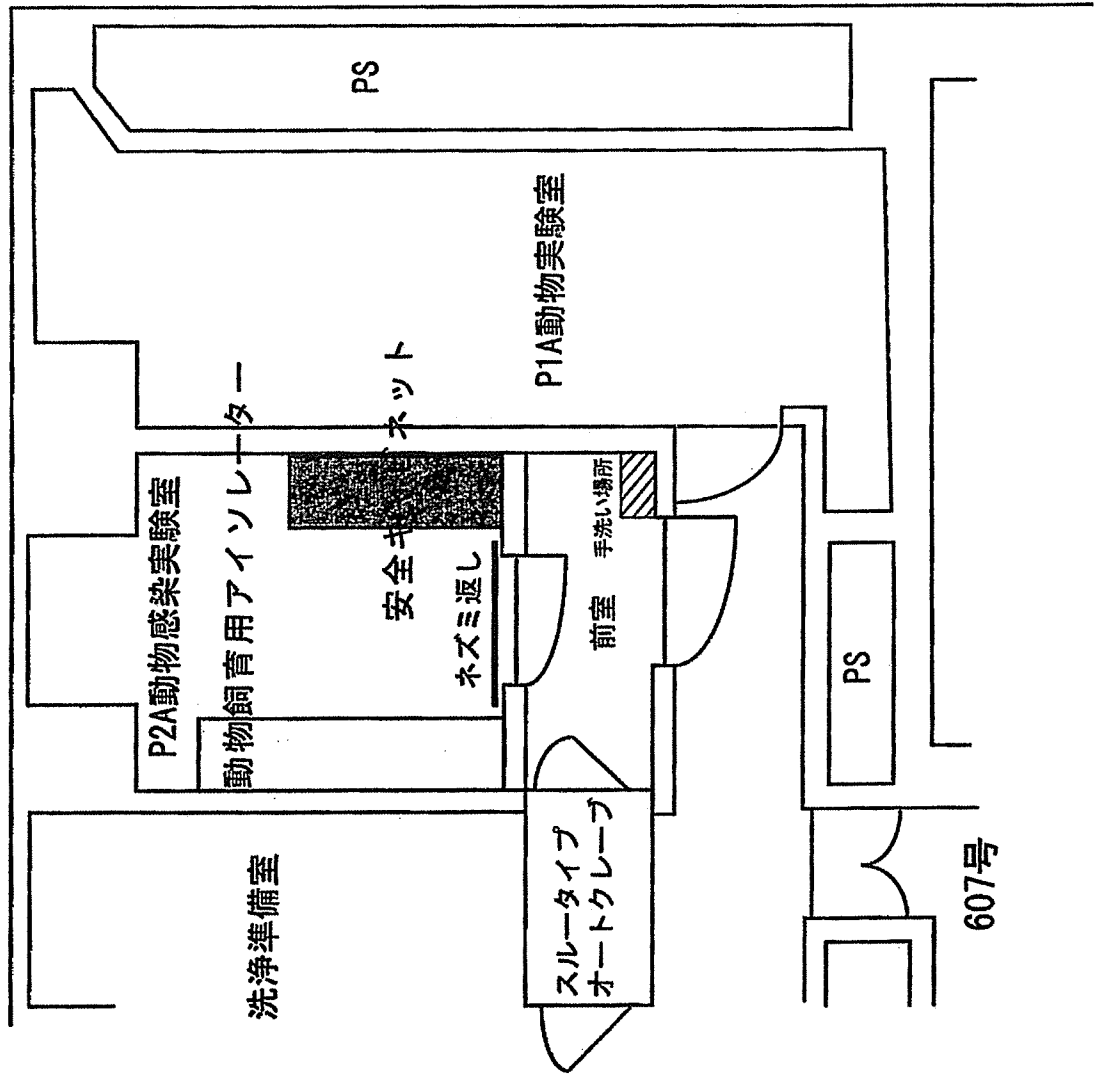


図5 6階P2A動物感染実験室 実験区画



## II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

HIV 経粘膜ワクチン開発に向けての組み換えヘルペスウイルスベクターの開発

分担研究者 川口 寧 東京大学医科学研究所 助教授

研究要旨

単純ヘルペスウイルス (HSV: herpes simplex virus) ベクターを改良するためには、様々な観点より HSV 研究を進めることが重要である。その中の 1 つとして、ベクターの弱毒化のメカニズムを明らかにし、よりベクターの安全性を高める点が挙げられる。本研究では HSV 病原因子の 1 つである Us3 プロテインキナーゼの機能発現機構を解析し、Us3 が他のウイルスプロテインキナーゼ UL13 によるリン酸化によってその機能が制御されていることを明らかにした。

A. 研究目的

単純ヘルペスウイルス (HSV: herpes simplex virus) は、性器ヘルペスの原因ウイルスであることより、性器粘膜への感染効率が高く、性器経粘膜ワクチンのベクターとして有用であると考えられている。本研究では、HIV の経性器粘膜ワクチンに HSV ベクターを利用することを念頭に置き、本目的を効率的に遂行するための HSV ベクター開発の基礎的研究を行った。ウイルスベクター開発で重要な点は、1) 外来遺伝子をウイルスゲノムに挿入する過程の簡便化、2) 外来遺伝子発現の効率化、3) ウイルスベクターの弱毒化である。1) に関しては、HSV 改変系の改良が必要である。2) に関しては、HSV のウイルス遺伝子発現、ウイルス mRNA やウイルスタンパク質の安定性、宿主細胞環境等を制御するウイルス因子の機能発現機構解析結果に基づく、総括的なベクターデザインが重要となる。また、3) に関しては、既知の病原性ウイルス因子の改変だけでなく、安全性を高めるために、当該ウイルス因子の機能発現機構や病原性発現機構を明らかにすることが重要である。本年度は、3) に関して重点的に研究を行った。ウイルス病原性因子の中でも、HSV がコードするプロテインキナーゼ Us3 は、感染細胞のアポ

トーシスおよびウイルス粒子成熟に関与していることが報告されているが、その機能発現機構は不明であった。本年度は、Us3 の機能発現機構の解析を行い、Us3 が他のウイルス PK である UL13 にリン酸化されることによって機能発現をしていることを明らかにした。

B. 研究方法

- 1) 細胞：Vero 細胞、SK-N-SH 細胞、Sf9 細胞は定法に従って培養した。
- 2) ウイルス：HSV-1 (F)、UL13 欠損組み換えウイルス R7356、Us3 欠損組み換えウイルス R7041 はシカゴ大学 Roziman 博士より得た。R7356 の変異復帰組み換えウイルス R7356Rep は定法に従って構築した。
- 3) 組み換えバキュロウイルス：GST 融合 UL13 (GST-UL13) およびその変異体 (GST-UL13K176M) を発現する組み換えバキュロウイルス感染 Sf9 細胞からの GST-UL13 または GST-UL13K176M の精製は、我々の過去の報告に従った (J. Virol. 77: 2359-2368, 2003)。
- 4) 大腸菌からの MBP 融合タンパクの精製：NEB 社のプロトコールに従った。
- 5) In vitro kinase assay：試験管内でのキナ

ーゼ反応は、過去の我々の方法(J. Virol. 77: 2359-2368, 2003)に従った。

- 6) カスパーゼ活性の測定：カスパーゼ 3 および 7 の活性は Promega 社の CaspaseGlo 3/7 kit を用いて測定した。

## C. 結果

- 1) UL13 は感染細胞において Us3 のリン酸化に関与している。

野生型 HSV-1 (F) 感染細胞と UL13 欠損ウイルス R7356 感染細胞では、Us3 の電気泳動における移動度が明らかに異なっていた。また、UL13 変異復帰ウイルスは野生体の表現型を示した。この移動度の差は、脱リン酸化酵素処理で消失することより、リン酸化であることが明らかになった。以上より、UL13 は感染細胞において Us3 のリン酸化に関与していることが明らかになった。

- 2) UL13 は *in vitro* において Us3 をリン酸化する。

*In vitro* kinase assay を行った。野生型の UL13 の存在下では、Us3 は [ $g$ - $^{32}P$ ]ATP でラベルされた。一方、キナーゼ活性を消失した変異体 UL13K176M ではラベルされなかった。また、野生体 UL13 による Us3 のラベルは、脱リン酸化酵素で解除された。以上の結果から、UL13 は *in vitro* において特異的に Us3 をリン酸化することが明らかになった。

- 3) UL13 による Us3 のリン酸化は、Us3 の活性または Us3 のアポトーシス制御能には影響を及ぼさない。

野生型 HSV-1 (F) 感染細胞および UL13 欠損ウイルス R7356 感染細胞から Us3 抗体を用いて Us3 を免疫沈降法によって精製し、*in vitro* kinase assay に供し、UL13 によるリン酸化が Us3 の PK 活性に及ぼす影響を調べた。その結果、HSV-1 (F) または R7356 感染細胞から精製した Us3 は同様な PK 活性を示した。以上より、UL13 による Us3 のリン酸化は Us3 の PK 活性には影響を及ぼさないことが明らかになった。

次に、オスミウムショックを施した SK-N-SH 細胞に HSV-1 (F)、R7356 および Us3 欠損ウイルス R7041 を感染させ、カスパーゼ 3 および 7 の活性を測定した。その結果、過去の報告通り、Us3 欠損 R7041 感染細胞ではカスパーゼ 3/7 の活性は野生体感染細胞と比して高く、Us3 がアポトーシスをブロックしていることが確認された。一方、UL13 欠損 R7356 感染細胞におけるカスパーゼ 3/7 活性は野生体感染細胞と同様であった。以上より、UL13 による Us3 のリン酸化は Us3 のアポトーシス制御能には影響を及ぼさないことが明らかになった。

- 4) UL13 はウイルス粒子の出芽因子 UL31、UL34 の局在を制御する。

HSV は核でカプシドが構築され、ウイルス DNA がパッケージされた後、核外に移行する。その際、カプシドの核外への出芽を制御するウイルス因子が UL31 と UL34 である。他のグループの報告より、Us3 が UL31 および UL34 の局在を制御していることが報告されている。また、我々は、Us3 が UL31 および UL34 をリン酸化することを報告している (J. Virol. 79: 9325-9331, 2005)。UL13 による Us3 のリン酸化が Us3 の下流で働く出芽因子 UL31 および UL34 の局在に影響を及ぼすかを調べた。野生体感染細胞では、UL31 および UL34 は核膜に均一に局在していた。一方、過去の報告通り、Us3 欠損ウイルス R7041 感染細胞では、UL31 および UL34 は核膜にドット状に局在した。UL13 欠損ウイルス R7356 感染細胞では、R7041 感染細胞と同様に UL31 および UL34 は核膜にドット状に局在していた。以上より、UL13 は Us3 の下流で働く出芽因子 UL31 および UL34 の局在を制御していることが明らかになった。

## D. 考察

HSV がコードする PK UL13 が、Us3 をリン酸化し、その下流で働く出芽因子 UL31 および UL34 の局在を制御することが明らかになった。現在のところ、UL13 による Us3 のリン酸化が



UL31 および UL34 の局在を直接制御しているかは不明である。今後、UL13 による Us3 のリン酸化部位を同定し、その変異体を用いた解析が必要である。

#### E. 結論

本研究により、Us3 の病原性発現機構の一端が明らかになった。本知見は、より安全な HSV ベクター開発の基礎的知見として、今後の HSV ベクター開発に有用であると考えられる。

#### F. 論文発表

1. Kato, A., Yamamoto, M., Ohno, T., Tanaka, M., Sata, T., Nishiyama, Y. and Kawaguchi Y. Herpes Simplex Virus 1-Encoded Protein Kinase UL13 Phosphorylates the Viral Us3 Protein Kinase and Regulates nuclear Localization of Viral Envelopment Factors UL34 and UL31. *J. Virol.* 80: 1476-1486, 2006.
2. Asai, R., Kato, A., Kato, K., Kanamori-Koyama, M., Sugimoto, K., Sairenji, T., Nishiyama, Y. and Y. Kawaguchi. Epstein-Barr Virus Protein Kinase BGLF4 Is a Virion Tegument Protein That Dissociates From Virions in a Phosphorylation Dependent Process and Phosphorylates the Viral Immediate-Early Protein BZLF1. *J. Virol.* 80: 5125-5134, 2006.
3. Kudoh, A., Daikoku, T., Ishimi, Y., Kawaguchi, Y., Shirata, N., Iwahori, S., Isomura, H. and Tsurumi, T. Phosphorylation of MCM4 at Sites Inactivating DNA Helicase Activity of the MCM4-6-7 Complex during Epstein-Barr Virus Productive Replication. *J. Virol.* 80: 10064-10072, 2006.

4. Arii, J., Hushur, O., Kato, K., Kawaguchi, Y., Tohya, Y. and Akashi, H. Construction of an infectious clone of canine herpesvirus genome as a bacterial artificial chromosome. *Microbes and Infection* 8: 1054-1063, 2006.

5. Koshizuka, T., Kawaguchi, Y., Goshima, F., Mori I. and Nishiyama, Y. Association of two membrane proteins encoded by herpes simplex virus type2, UL11 and UL56. *Virus Genes* 32: 157-167 2006.

#### G. 学会発表

1. Kato, A., Yamamoto, M., Ohno, T. and Kawaguchi, Y. Herpes Simplex Virus 1-Encoded Protein Kinase UL13 Phosphorylates the Viral Us3 Protein Kinase and Regulates nuclear Localization of Viral Envelopment Factors UL34 and UL31. 31<sup>st</sup> International Herpesvirus Workshop, Seattle, USA, 2006.
2. Tanaka, M., Kawaguchi, Y. and Sata, T.. (2006) The gene of herpes simplex virus type 1 UL7 is not essential but important for virus replication in cell culture. 31<sup>st</sup> International Herpesvirus Workshop, Seattle, USA.
3. Asai, R., Sugimoto, K., Sairenji, T. and Kawaguchi, Y. Epstein-Barr Virus Protein Kinase BGLF4 Is a Virion Tegument Protein That Dissociates From Virions in a Phosphorylation Dependent Process and Phosphorylates the Viral Immediate-Early Protein BZLF1. 12<sup>th</sup> Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr

Virus and Associated Diseases, Boston, USA.

に対する ATM の関与。第 54 回日本ウイルス学会、名古屋，2006

4. 加藤哲久、西山幸廣、川口 寧、HSV-1 プロテインキナーゼのクロストーク：Us3 の活性制御機構の詳細な解析。第 21 回ヘルペスウイルス研究会、岐阜県白川村，2006.
5. 北村裕子、三浦義治、安藤良徳、川口 寧、小柳義夫。抗 HSV 作用を有する脳内宿主因子の解析-潜伏感染への関与-。第 21 回ヘルペスウイルス研究会、岐阜県白川村，2006
6. 三浦義治、安藤良徳、北村裕子、佐野浩一、川口 寧、小柳義夫。単純ヘルペスウイルス 1 型に感染した neurosphere 形成培養系の解析。第 21 回ヘルペスウイルス研究会、岐阜県白川村，2006.
7. 上間 匡、川口 寧、単純ヘルペスウイルスは特定の細胞ドメインでテグメントを獲得するのか？-生きた感染細胞のリアルタイムイメージングによる解析。第 54 回日本ウイルス学会、名古屋，2006
8. 加藤哲久、西山幸廣、川口 寧、ヘルペスウイルスがコードするプロテインキナーゼの活性化機構。第 54 回日本ウイルス学会、名古屋，2006
9. 田中道子、川口 寧、佐多徹太郎、HSV-1 UL7 の解析。第 54 回日本ウイルス学会、名古屋，2006.
10. 安藤良徳、三浦義治、北村裕子、岡田広司、川口 寧、小柳義夫、HSV-1 に感染したラット脳海馬スライス培養系における神経系細胞の解析。第 54 回日本ウイルス学会、名古屋，2006.
11. 岩堀聡子、川口 寧、鶴見達也、単純ヘルペスウイルス感染に伴う Sp1 のリン酸化

## H. 知的財産の出願・登録状況

### 1. 特許出願

「ウイルス粒子の 3 つのコンポーネントを異なる蛍光タンパク質で標識した組み換えウイルス」・出願番号：特願 2006-318534・出願日：平成 18 年 11 月 27 日・発明者：川口 寧、杉本 研・特許出願人：国立大学法人東京大学

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

D-体のアミノ酸を含むペプチドを用いた  
新たな性状を持つCTL 誘導の試み

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  
研究協力者 中川 洋子 日本医科大学微生物学免疫学教室 助手

研究要旨

HIV のようなウイルス感染の制御においては、ウイルス感染細胞そのものを傷害、排除する CD8 陽性キラーT 細胞(CTL)の誘導が重要であることが判明している。一方、我々はこうして誘導した CD8 陽性の CTL をエピトープペプチドで短時間処理するとそのキラー活性が速やかに低下し、Anergy あるいは Apoptosis の状態に陥る事を *in vitro* の系で見出し、報告してきた。

近年、D-体アミノは生体中には殆ど存在せず、またそれらを切断する酵素を生体は欠くため、D-体アミノを含むペプチドは分解されず安定に存在すると考えられる。そこで本研究では、D-体のアミノ酸を含むペプチドを用いた特異的な CTL 誘導の可能性を検討すると共に、誘導された CTL の特性を追跡した。その結果、エピトープペプチド P18-I10 中、325 番の L-バリンを D-バリンに置換したペプチド I-10(325v)をパルスした樹状細胞の免疫により、このペプチドに特異的なクラス I MHC 分子拘束性、CD8 陽性の conventional な CTL (LINE-III B(325D)) ラインが誘導されること、そしてこの CTL ラインはオリジナルのペプチドに対しても交差傷害性を示し、且つオリジナルの遊離ペプチドによる活性抑制からは回避されることを見出した。

以上のことから、D-アミノ酸を含むペプチドでもウイルス産物では活性抑制が起こらないユニークな CTL が誘導されることが判明した。今後は、本研究の成果を基に D-アミノ酸を含むペプチドを用いたペプチドワクチンの検討を重ねて行く予定である。

A. 研究目的

HIV 感染の制御において、ウイルス感染細胞そのものを傷害、排除する CD8 陽性キラーT 細胞(CTL)を誘導することは非常に重要である。こうした観点から我々は以前より HIV 外被糖蛋白 gp160 に着目し、マウスの系において此の部分に対する CTL を誘導し、解析を行ってきた。

一方、我々はこうして誘導した CD8 陽性の CTL は著明な標的細胞傷害活性を有するものの、この CTL をエピトープペプチドで短時間処理することによりそのキラー活性が速やかに低下し、Anergy あるいは Apoptosis に陥る事、また最近こうしたウイルスの破壊産物としてのペプチドによる活性低下現象が粘膜局所を含む *in vivo* の系においても起こる可能性を見出した。従ってペプチドが存在するような状況下においても Anergy に陥らず、安定な傷害活性を示す様な CTL の誘導及びその持続的維持は重要であると

の考えから以下のような実験を試行した。

近年、通常の生体中には殆ど存在せず、血清中においても分解されず安定に存在することが可能な D-体のアミノ酸を含む薬剤を治療に用いる試みがなされていることに着目し、D-体のアミノ酸を含むペプチドを用いてこうした活性維持可能な新たな性状を持つ CTL の誘導を試みた。

B. 研究方法

1) HIVgp160 中の CTL の認識する 10 個のアミノ酸から成るエピトープペプチド P18-I10(aa318-327:RGPGRAFVTI)中 CTL による認識にとって重要であることが判明している 325 番目のアミノ酸である L-バリンを D-バリンに置換したペプチドを合成した。この置換ペプチドを脾臓細胞由来の樹状細胞にパルスし、マウスを免疫した。一定期間後、免疫脾臓細胞を *in vitro* で再刺激することにより、D-アミノ酸

を含むペプチドに特異的な CTL の誘導を試みた (図 1)。

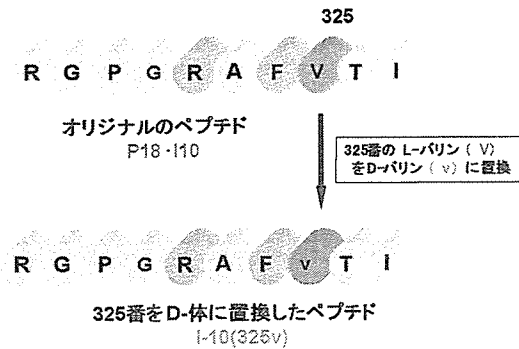


図 1 CTL 誘導に用いた D-アミノ酸含有ペプチド  
2) 誘導した CTL の性状を調べると共に種々の置換ペプチド群を用いて詳細な特異性につき検討を行った。

### C. 研究結果

1) ペプチド I-10(325v) をパルスした樹状細胞の免疫によりこのペプチドに特異的な CTL (LINE-IIIIB(325D)) が誘導された。この CTL はオリジナルの P18-I10 をパルスした標的細胞にも交差傷害性を示した (図 2)。

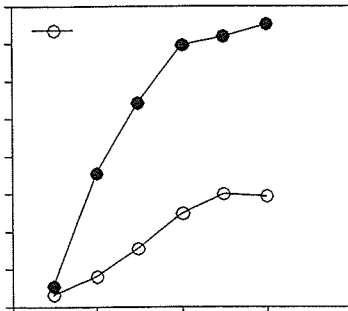


図 2 誘導したペプチド I-10(325v) に特異的な CTL の標的細胞傷害活性

2) 誘導した CTL の性状を調べたところ、クラス I MHC 分子拘束性、CD8 陽性の conventional な CTL で最少認識部分は 10 個のアミノ酸より成るペプチド I-10(325v) であった。

3) CTL の他のペプチドに対する交差傷害性を調べたところ、325 番のアミノ酸が D-バリンで

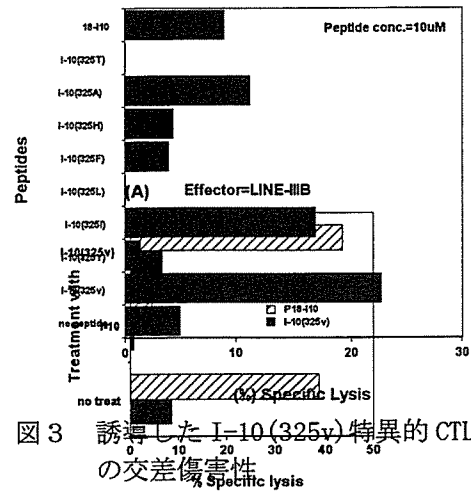


図 3 誘導した I-10(325v) 特異的 CTL の交差傷害性

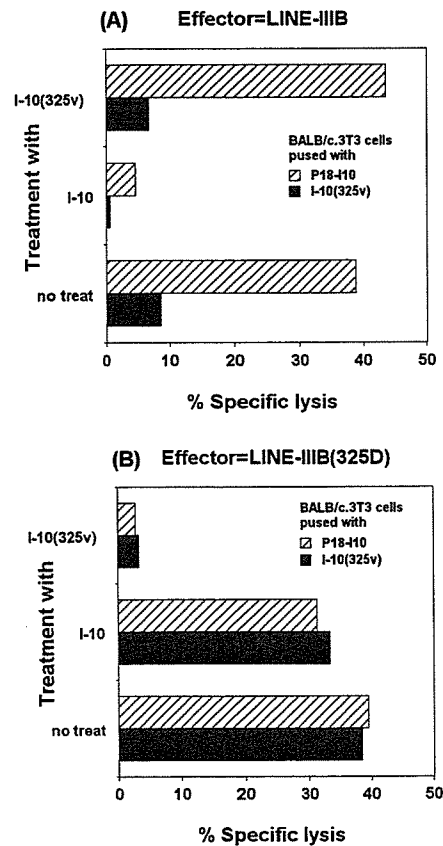


図 4 (A, B) エピトープペプチドによる CTL の

あるものの他、いくつかの置換ペプチドに対し、交差傷害性を示した (図 3)。

4) オリジナルの P18-I10 特異的 CTL (LINE-III B) は遊離の P18-I10 により活性の低下が認められたが (図 4 A)、今回樹立した D-体を含むペプチド特異的 CTL の活性は遊離のペプチド I-10 (325v) により著明な抑制効果が見られたが、オリジナルの P18-I10 による抑制は認められなかった (図 4 B)。

#### D. 考察

HIV のようなウイルスに対する感染制御においては、特異的抗体 (主として分泌型 IgA) 及び抗原特異的 CD8 陽性の CTL の誘導・維持が重要である。しかしながら我々は、局所において CTL による標的細胞の破壊産物から生じたと考えられるウイルス由来のペプチドにより逆にこれら CTL 活性の著明な低下が起こる事を明らかにした。今回ウイルス特異的 CTL 誘導型ペプチドワクチンを開発するにあたり、こうした活性抑制現象を回避し、安定な活性を持った CTL を誘導することを目的とするために、生体内で分解されにくい D-体のアミノ酸を含むペプチドを用いるという新たな方法を試みた。その結果、生体中には存在しないアミノ酸を含むペプチドに対しても細胞性免疫が誘導されることが判明すると同時に、誘導された CTL はオリジナルの抗原ペプチドに対しても交差傷害性を示し、且つウイルス由来の破壊産物により生じると想定されるペプチドによる抑制からは回避されることを観察することができた。本研究の結果はペプチド中にこうした特殊な D-体アミノ酸を組み入れることにより今までとは異なる性状を持つ CTL を誘導できる可能性を示しており、新しいタイプのワクチン作成の試みとして重要と考えられる。

#### E. 結論

生体中には一般に存在しない D-アミノ酸を含むペプチドの免疫で特異的な CTL が誘導された。誘導された CTL は D-アミノ酸を含むペプチドに対し傷害活性を示すと共にオリジナルの L-アミノ酸のみから成る抗原ペプチドに対しても交差傷害性を示し、且つオリジナルのペプチドによる活性抑制からは回避されるという性状を有しており、D-体を用いた新たなタイプのペプチドワク

チンの可能性が示唆された。

#### F. 論文発表

1. Yamanishi, S., Iizumi, T., Watanabe, E., Shimizu, M., Kamiya, S., Nagata, K., Kumagai, Y., Fukunaga, Y. and 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., and 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., Dasche, r CD., Kawashima, T., Norose, Y., Simizu, K., Takahashi, H., Yano I. and 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., and 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. and 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. and 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. and 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. and 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.
12. 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.
4. 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. 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. 古賀実芳、日高千鶴乃、廣田薫、平馬直樹、高橋秀実：玉屏風散の合方が奏功した 3 例. 第 57 回日本東洋医学会学術総会 2006 年 6 月 23-25 日 (大阪).
3. 高橋秀実、日高千鶴乃、廣田薫、古賀実芳、平馬直樹：ウイルス感染症における解表作用の意義に対する一考察. 第 57 回日本東洋医学会学術総会 2006 年 6 月 23-25 日 (大阪).
4. 日高千鶴乃、古賀実芳、廣田薫、平馬直樹、高橋秀実：腸管ペーチェット病に対する発熱、下血に対し生薬治療を試みた一例. 第 57 回日本東洋医学会学術総会 2006 年 6 月 23-25 日 (大阪).
5. 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).
6. 山西慎吾、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. 多摩小児アレルギー臨床懇話会 2006 年 10 月 14 日 (多摩).
7. 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).
8. 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).
9. 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).
10. 齊藤尚紀、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).
11. 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) .
12. 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)
13. 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).
14. 高橋秀実: 脂質と粘膜免疫. 第 12 回癒しの療法研究会 2006 年 12 月 16 日 (東京) .
15. Nakagawa, Y., Shimizu, M., Noorose, Y., Higuchi T., Takahashi, M. and 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) .
16. Yamanishi, S., Watanabe, E., Shimizu, M., Kobayashi, F., Takeuchi, H., Iizumi, T, Kumagai, Y. and 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) .
17. Kumagai, Y., Yamanishi, S., Iizumi, T, Norose, Y., Watanabe, E., Fukunaga, Y., and 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) .
18. Katakura, T., Katsuhisa, N., Shimizu, M., Harimoto, H., Atsukawa, M., Tamura, H, Takahashi, H. and 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) .
19. Hidaka, C., Watanabe, E., Shimizu, M., Yamanishi, S., Negishi, Y., Komiya, N., Shinya, E. and 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) .
20. Wakabayashi, A., Kumagai, Y., Watari, E., Shimizu, M., Moriya, K., Utsuyama, M., Hirokawa, K. and 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) .
21. Shinya, E., Owaki, A., Shimizu, M., Watanabe, E., Yagi, Y., Hidaka, C. and 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) .
22. 高橋秀実: 漢方と免疫. 第 7 回東京大学実践漢方セミナー 2007 年 2 月 7 日 (東京) .

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

HIV 感染予防における経粘膜ワクチンの開発  
ヒト細胞導入マウスにおける HIV 感染と抗 HIV 免疫応答の解析

分担研究者 横田 恭子 国立感染症研究所・免疫部・第一室長

研究要旨

X4 と R5 型の赤色蛍光発現組換え HIV-1 を作製し、ヒト T 細胞株と初代培養細胞 (PBMC) で両者ともに十分な感染性があることを確認した。緑色蛍光発現組換え HIV-1 と組み合わせて感染細胞をモニターすることも容易になり、ヒト化マウスモデルでの HIV-1 感染実験にも有用である。

A. 研究目的

HIV-1 感染モデルとしてヒトの血液系幹細胞導入マウスを用い、マウス生体内で維持され増殖するヒトの免疫系細胞においてワクチンで誘導される抗 HIV 免疫応答と感染防御効果を評価するシステムを確立する。

B. 研究方法

1)赤色蛍光を発する組換え HIV-1 の作製

DsRed 遺伝子と IRES-Nef 遺伝子を合成オリゴを用いて結合し、プロウイルスクローン pNL432 あるいは NL(AD8)の env の下流に挿入した。プラスミドを調整して 293T 細胞にトランスフェクトし、2 日後の培養上清を回収した。In house ELISA 法で上清中の p24 量を測定した後、分注して凍結保存した。それぞれのウイルスを NL-D 及び NLAD8-D と命名した。

2)細胞と HIV-1 感染実験

CCR5 を発現する CEMx174 細胞に HIV-1 LTR をプロモーターとする EGFP を導入し、HIV-1 に感染して緑色に光る indicator 細胞を作製した。あるいは健康人末梢血よりファイコールで単核球を分離し、PBMC を調整して PHA で刺激した。

HIV-1 は  $10^6$  個の細胞に p24 量にして 20 ng 相当感染させた。

(なお、健康人の末梢血単核球細胞を同様の研究に使用する実験は、平成 14 年 6 月に倫理委員会の承認を受けている)

3)FACS 解析

HIV-1 感染 5 日～9 日後に PerCP 標識 CD3 と FITC-あるいは PE 標識抗 CD4 抗体で細胞表面を染色して、FACS Calibur で解析した (すべて BD BioScience 社)。

C. 研究結果

本年度は感染研での動物実験に備えて、組換えワクチンに関わる書類を準備した。また、既存の緑色蛍光発現組換え HIV-1 と組み合わせてヒト細胞の FACS 解析に有用な、X4 および R5 型赤色蛍光発現組換え HIV-1 を作製した。

この組換え赤色 HIV-1 の感染性を確認するために、HIV-1 の TAT 依存性に緑色蛍光を発現する CEMx174/CCR5/LTR-EGFP 細胞に NL-D あるいは NLAD8-D、あるいはそれぞれの野生型 HIV-1 である NL432 (X4)あるいは NF462 (R5)を感染させ、感染 4 日あるいは 7 日後に細胞を回収して FACS 解析した。図 1 に示すように、NL432 は 70%



程度の細胞が感染しており、NL-D もほぼ 70%が DsRed+GFP+であった。また、NF462 では 30%程度感染しており、NLAD8-D もほぼ同程度 DsRed+GFP+細胞が検出されたが、DsRed のみ陽性の細胞群が 15%も存在した。これが TAT の発現が低下した、あるいは死にかけの細胞であるのかは今のところ不明である。いづれにしてもこれら組換え HIV-1 の感染性は野生株とほぼ同等であることが明らかとなった。なお、培養上清中の p24 量産生量もほとんど変わらなかった。更に、図 2 では活性化した PBMC での感染性を確認した。NL-E は既に報告された緑色蛍光発現 HIV-1 である(東京医科歯科大学・微生物教室の稲垣先生より供与を受けた)。感染 9 日後には NL-E, NL-D, NLAD8-D はそれぞれ 1.25 %, 6.55 %, 1.39% の T 細胞に感染していることが FACS で検出可能であった。従って DsRed の発現は EGFP よりは低いものの、感染細胞のマーカーとしては十分使用が可能である。

#### D. 考察

ヒト化マウスの HIV-1 感染系をモデルとしてワクチンの免疫能、防御効果を評価解析する系が確立されれば、多くのワクチンや薬剤をヒトの細胞で比較的簡単にスクリーニングでき、今後のエイズの治療法の開発に大きく貢献すると思われる。

#### E. 結論

X4 と R5 型の赤色蛍光発現組換え HIV-1 を作製し、ヒト T 細胞株と初代培養細胞 (PBMC) で両者ともに十分な感染性があることを確認した。これらは緑色蛍光発現組換え HIV-1 と組み合わせてヒト化マウスモデルでの HIV-1 感染実験にも応用可能であり、今後の解析に非常に有用である。

#### F. 論文発表

1. Tsunetsugu-Yokota, Y., Ishige, M., and Murakami, M. Attenuated *Salmonella Typhimurimu* expressing codon-optimized HIV-1 Gag potentiated Gag-specific CD8+ T cell-response in intestinal mucosa. *Aids Res. Hum. Retro.* 2007. (in press)
2. Yamamoto, T., Isogai, M., Ohtake, K., and Tsunetsugu-Yokota, Y. High and inducible expression of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Nef by adenovirus vector does not disturb potent antigen-presentation by monocyte-derived dendritic cells. *Microbes Infect.*, 8: 2522-2530, 2006.
3. Yamamoto, T., Miyoshi, H., Yamamoto, N., Yamamoto, N., Inoue, J-I, Tsunetsugu-Yokota, Y. Lentivirus vectors expressing short hairpin RNAs against the U3-overlapping region of HIV nef inhibit HIV replication and infectivity in primary macrophages. *Blood*, 108: 3305-3312, 2006.
4. Ishii, K., Hasegawa, H., Nagata, N., Mizutani, T., Morikawa, S., Tashiro, M., Suzuki, T., Taguchi, F., Takemori, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., and Miyamura, T. Induction of Protective Immunity against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS- CoV) infection using highly attenuated recombinant- vaccinia Virus Dis. *Virology*, 351: 368-380, 2006
5. Tsunetsugu-Yokota, Y., Ohnishi, K., and Takemori, T. Severe acute respiratory

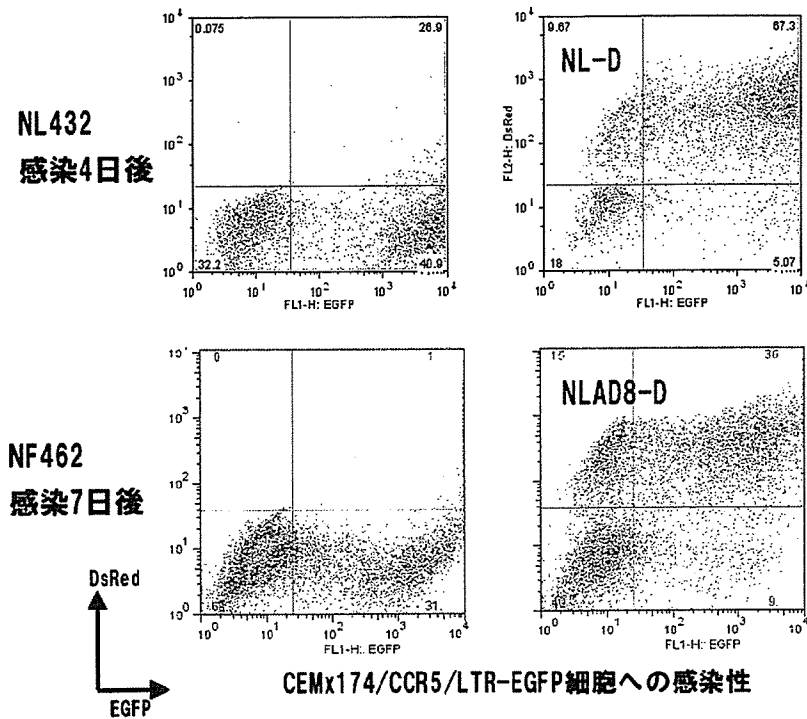
syndrome (SARS) coronavirus:  
application of monoclonal antibodies  
and development of an effective vaccine.  
Rev. Med. Virol., 16:117-131, 2006.

#### G. 学会発表

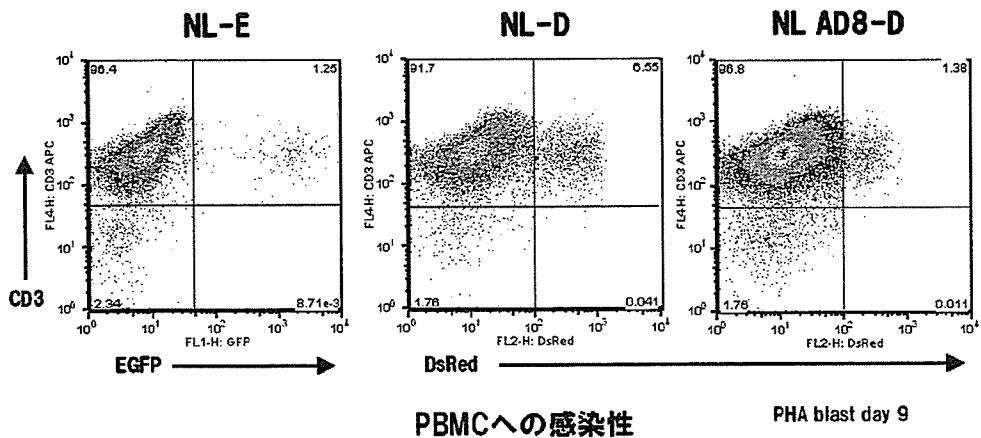
1. 光木裕也、大島正道、山本拓也、高木弘隆、森川茂、山岡昇司、永井美之、大西和夫、横田（恒次）恭子：SARS-CoV Spike に対する中和抗体のエスケープ変異ウイルスの単離と感染防御に重要な抗体エピトープの同定。第 54 回ウイルス学会、名古屋、平成 18 年 11 月。
2. 水越文徳、山本拓也、光木裕也、立川（川名）愛、横田（恒次）恭子：抗原の糖鎖による樹状細胞の cross-presentation の影響。第 35 回免疫学会、大阪、平成 18 年 12 月。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし



**図1 赤色蛍光組換え HIV-1 の感染性。**  
 CCR5 と CXCR4 を発現し、HIV-1 LTR プロモーターの下流の GFP が TAT 依存性に発現する CEMx174 細胞を indicator 細胞として赤色蛍光を発現する組換え HIV-1 の感染・増殖性を FACS で解析した。X4 ウイルス感染 4 日後 (NL-D) と R5 ウイルス感染 7 日後 (NLAD8-D) の GFP と DsRed の発現を示す。野生株である NL432 (X4 型) と NF462 (R5 型) の GFP 発現を左パネルに示した。



**図2 PBMC への感染性と感染細胞の解析。**  
 PBMC を PHA で刺激し、4 日後に NL-432, NL-D, NLAD8-D を感染させた。9 日後の感染細胞集団を抗体染色し、FACS で解析した。生きた細胞にゲートをかけて示した。

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

HIV 感染予防における経粘膜ワクチンの開発  
分担研究項目：抗原の取り込み解析

分担研究者 清野 宏 （東京大学医科学研究所 教授）

研究要旨

HIV 対等用粘膜ワクチン開発の大きな鍵をにぎっているのが、腸管、呼吸器粘膜に存在する抗原特異的免疫応答誘導の中核組織である粘膜関連組織（MALT）での抗原取り込み機構である。そこで腸管関連リンパ組織（GALT）と鼻咽頭関連リンパ組織（NALT）における抗原取り込み機構について、その発達・形式メカニズムも含めて検討する事により、HIV 粘膜ワクチンの開発へ向けての理論構築とその基盤を確立する。そこで本年度は NALT・GALT における抗原取り込みシステムを含めた同組織形成プログラムの解明について検討を進め、抗原取り込み細胞である M 細胞の存在とリンフォイドケモカインによる NALT・GALT 誘導細胞の制御について成果をあげることが出来た。

A. 研究目的

HIV 粘膜ワクチンの開発に向けて、生殖器への効果的な抗原特異的免疫誘導を考慮した時、経鼻免疫の有効性が齧歯類と霊長類で証明されている。そこで、NALT を標的とした HIV 粘膜ワクチン開発の理論的背景と技術基盤を確立する為に、本年度は NALT 抗原取り込み機構と組織形成プログラムについて明らかにする事を目的として研究を進めた。さらに GALT に関しては M 細胞についての免疫生物学的解明も含めて検討した。

B. 研究方法

1) NALT・GALT 組織形成プログラムの解析：二次リンパ組織形成に関与していると言われるリンフォイドケモカイン（例 CXCL13）の

NALT・GALT 組織形成への直接的関与を解明する為に CXCL13 欠損マウスを使用し、正常マウスとの比較・検討を下記の実験手技を駆使して行った。

2) 組織誘導細胞と M 細胞の同定とその分離法の確立：細胞組織学的解明については、各組織から分離した細胞集団を蛍光色素標識した CD3、CD4、CD45 特異的モノクローナル抗体（mAb）と反応させ組織誘導細胞（CD3<sup>-</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD45<sup>+</sup>）の分離を FACS において行った。同様に 4%パラホルムアルデヒド-PBS にて固定した各組織に対して、蛍光標識した UEA-1 のほか、上皮細胞と杯細胞に反応性を示すレクチン WGA を反応させ、ホールマウントによる共焦点レーザー顕微鏡観察を行った。さらに、GALT・NALT 上皮層から EDTA による細胞分離法によって得られた細胞群に対して、蛍光色素標識した