

**図1 SIVmac239スーパーチャレンジ実験**  
 ワクチン接種サル2頭（上段：R00-017、下段：R00-020）にSHIV89.6PDチャレンジ後、慢性期（R00-017: 203週目、R00-020: 151週目）にSIVmac239スーパーチャレンジを行った。血漿中ウイルス量の変化を示す。

粘膜組織における HIV-1 感染 CD4 陽性樹状細胞：  
CD1a 分子拘束性 T 細胞からのエスケープ

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

HIV の侵入部位である粘膜組織において、粘膜下に棲息する樹状細胞群は HIV 感染の主要な初期標的であり HIV の reservoir として感染拡大の鍵を握る。今回我々は Informed Consent を得た HAART 治療中の HIV-1 感染者の腸管粘膜を採取し、そこにおける HIV-1 感染細胞を P24 抗原陽性細胞を指標として追跡したところ、実際に CD4 陽性の樹状細胞が主たる HIV-1 感染細胞として存在することを確認した。また一方において、我々は結核菌感染樹状細胞が、クラス I MHC 分子から提示された抗原を特異的に認識するキラー T 細胞 (CTL) よりも、主として樹状細胞などの抗原提示細胞群に発現し、クラス I MHC 分子に酷似した構造を有し病原体由来の糖脂質抗原を提示する CD1 分子群に拘束された T 細胞群であることを報告してきた。そこで、クラス I MHC 分子の発現低下を誘発し CTL からの逃避を促す HIV-1-nef 遺伝子に着目し、この遺伝子産物が樹状細胞表面の CD1 分子群発現に及ぼす影響を検討したところ、HIV 感染に伴い CD1a および CD1d の発現が著明に抑制されることを見出した。この CD1a 並びに CD1d の発現低下の機序を追跡したところ、HIV の Nef 蛋白と CD1a あるいは CD1d が結合することにより細胞表面から細胞内の後期 endosome 内に送り込まれるためであることを解明した。また、Nef 蛋白により CD1a 分子の発現が低下した細胞は CD1a 拘束性の細胞株の認識から逃れることを見出した。以上の事実は、HIV 感染樹状細胞制御における CD1a 拘束性 T 細胞あるいは CD1d 拘束性 NKT 細胞の関与を強く示唆している。今後はこれら CD1 拘束性 T 細胞群による HIV 感染樹状細胞制御の実体、及び認識抗原の解明へ向けて検討を重ねる予定である。

A. 研究目的

HAART (highly active anti-retroviral therapy) 療法により、HIV 感染者末梢血中のウイルス量は検出限界以下になるとともに CD4 陽性 T 細胞数も上昇し、免疫不全病態から回復するものの、HAART 治療の中断により血液中のウイルス量は短期間にもとの状態に戻り、CD4-T 細胞数も速やかに減少する。このことは、HAART 療法によって HIV そのものが体内から消失したのではなく、体内のどこかにウイルスが潜伏した形で保存されていることを示している。そこで、我々は Informed Consent を得た HAART 治療中の HIV-1 感染者の腸管粘膜を採取し、そこにおける HIV-1 感染細胞を P24 抗原陽性細胞を指標として追跡したところ、CD4 陽性の樹状細胞が主たる HIV-1 感染細胞として存在することを確認した (図 1)。本研究では、これらの粘膜組織における HIV 感染樹状細胞が、真の HIV-reservoir であり、この粘膜組織における HIV 感染樹状細胞の制御こそが、ワクチン開発を含めた感染制御の鍵を握るものと

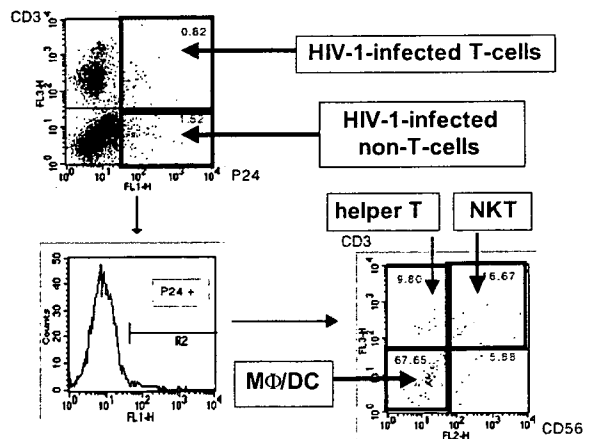


図 1 HAART 治療中の HIV-1 感染者腸管粘膜における P24 抗原陽性細胞

の立場から、研究を展開してきた。また、ウイルスと同様細胞内に侵入しそこで増殖する結核菌の感染した樹状細胞を制御する免疫系を追跡したところ、細胞性免疫の主役を演ずるクラス I MHC 分子から提示された CTL よりも、クラス I MHC 分子に酷似した構造を有し病原

体由来の糖脂質抗原を提示する CD1 分子群に拘束された T 細胞群がその主要な制御細胞であることを見出した。一方において、クラス I MHC 分子の発現低下を誘発し CTL からの逃避を促すものとして HIV-1-nef 遺伝子の存在が知られている。本研究では、この nef 遺伝子が樹状細胞表面の CD1 分子群の発現に及ぼす影響を検討するとともに、nef 遺伝子による影響を受けた CD1 分子が実際にその CD1 分子拘束性 T 細胞の認識応答に及ぼす影響を観察し、HIV-1 感染樹状細胞が CD1 拘束性 T 細胞によって制御される可能性を探ることを目的とする。

## B. 研究方法

- 1) Informed Consent を得た HAART 治療中の HIV-1 感染者の回腸末端の腸管粘膜を採取し、そこにおける HIV-1 感染細胞を P24 抗原陽性細胞を指標として追跡した。
- 2) 図 2 に示すよう、Nef 遺伝子が欠損し且つ感染細胞が同定出来るよう、Nef 遺伝子を欠損させ env の中へ EGFP 遺伝子を導入した HIV (HIV-EGFP/Nef (-)) および EGFP 遺伝子のみを導入した HIV (HIV-EGFP/Nef (+)) を作成し、さらに感染効率を上げるため env 遺伝子を VSV-G で pseudotype 化したウイルスを構築することにより、Nef 遺伝子がヒト樹状細胞上の CD1 分子群に及ぼす影響を検討した。



図 2 感染に用いた Nef 欠損型 HIV の構造

- 3) 樹立樹状細胞及び新たに作成したヒト CD1a-d 遺伝子を発現させた B 細胞株 (JY) に、上記の Nef 遺伝子の発現した HIV と Nef 欠損型 HIV を感染させ、MHC 分子、CD1 分子群の発現を Flow cytometry を用いて追跡した。
- 4) Nef 遺伝子と CD1 分子との相互作用、ならびにそれら結合物の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察するため、Nef 遺伝子に赤い発色剤である DSRed2 を結合した遺伝子を作成した。
- 5) 酵母 2 ハイブリッド法による HIV-1 Nef と CD1a の分子間相互作用の解析を行うため、HIS3 遺伝子および MeII ( $\alpha$ ガラクトシダーゼ) 遺伝子

をレポーター遺伝子として AH109 株を用い、HIV-1 Nef を Bait (X)、CD1a 細胞質内ドメインを Prey (Y) として、AH109 株に遺伝子導入し、レポーター遺伝子の発現を観察した。分子間相互作用が存在すればヒスチジン要求性はキャンセルされ、 $\alpha$ ガラクトシダーゼが発現され、X- $\alpha$ -Gal 含有培地でコロニーは青色となる。

6) 樹状細胞表面の CD1a による抗原提示に対する HIV-1 Nef の影響を観察するため、あらかじめ上記の組換え HIV-1 を感染させておいた未成熟樹状細胞にスルファチドをパルスした後、スルファチド特異的 CD1a 拘束性 CTL クローン K34B9.1 と共培養して上清中に分泌される TNF- $\alpha$ 濃度を測定した。

## C. 研究結果

1) Nef 遺伝子の発現した HIV と Nef 欠損型 HIV の効果を比較する目的で、樹状細胞にこれら 2 種類の HIV を感染させ、まず既知の結果であるクラス I MHC 分子の発現に及ぼす影響を検討したところ、HIV-1-nef の存在により樹状細胞表面のクラス I MHC 分子 (HLA-a, b, c) の発現が著明に低下した (図 3)。

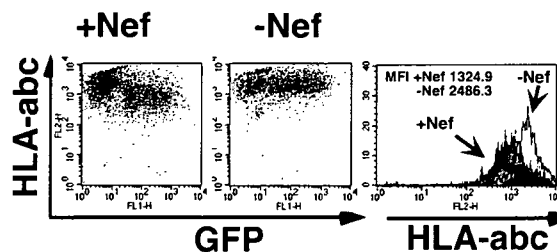


図 3 HIV-1-nef による樹状細胞上のクラス I MHC 分子の発現低下

2) 次に樹状細胞に HIV-EGFP/Nef (-) あるいは HIV-EGFP/Nef (+) を感染させた場合の CD1 分子群に対する影響を追跡したところ、CD1b 及び CD1c 分子の発現に対する影響は全く認められなかったが、CD1a 分子の著明な発現低下が観察された (図 4)。また以上の結果は、B 細胞芽球由来の JY 細胞に CD1a, CD1b, CD1c 分子を発現させた細胞群 (図 5) 及び CD1d 分子を発現している Jurkat 細胞を用いて確認することができた (図 6)。

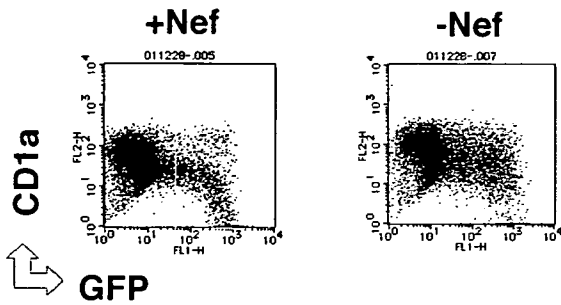


図4 HIV-1-nefによる樹状細胞表面のCD1a分子の発現低下

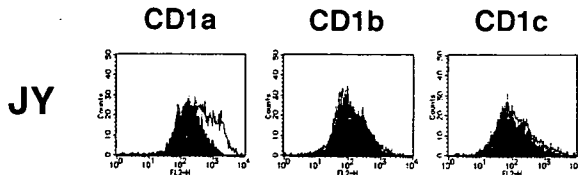


図5 HIV-1-nefによるCD1分子発現JY細胞上のCD1a分子の発現低下

3) なお、樹状細胞におけるCD1d分子の発現レベルが低いため nef 遺伝子の影響を、恒常的にCD1d分子を発現しているJurkat細胞を用いて観察したところ明らかな発現低下が観察された(図6)。以上から、HIV-1-nef 遺伝子の存在によりウイルス由来のペプチド抗原を提示するクラス I MHC 分子のみならず、糖脂質抗原を提示するCD1a 及びCD1d分子の発現が低下することが明らかとなった。

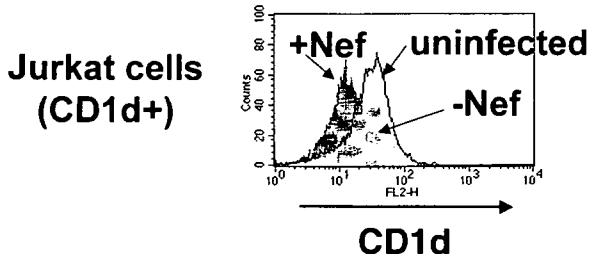


図6 HIV-1-nefによるJurkat細胞上のCD1d分子の発現低下

4) そこで、こうした発現低下が誘導される機序を探る目的で、nef 遺伝子にDsRed2 遺伝子を結合した遺伝子を作成し、それをCD1a 発現JY細胞に作用させることによって細胞内nef とCD1a分子との存在部位とを共焦点レーザー顕微鏡を用いて追跡したところ、後期endosome内にnef とCD1a分子との共局在化が認められた(図7)。また、同様の方法によりCD1d分子とnef 遺伝子との細胞内局在化も観察することができた(図8)。

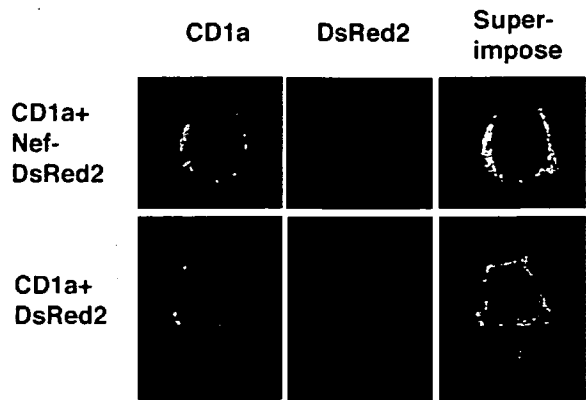


図7 CD1a分子とNef分子の細胞内局在

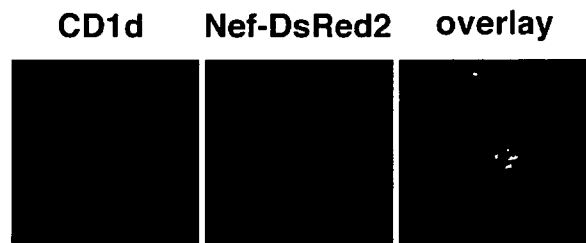


図8 CD1d分子とNef分子の細胞内局在

5) さらに酵母2ハイブリッド法を用いて検討したところ、CD1a細胞質ドメインとNefとの間に分子間相互作用が認められ、その作用はnef 遺伝子産物N側半分に依存することが判明した(図9)。

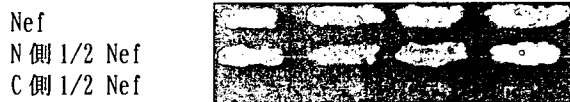


図9 酵母ハイブリッドによるCD1a細胞質ドメインとNefの分子間相互作用の解析

6) そこで、Nefが樹状細胞上のCD1a分子に及ぼす影響が実際にCD1a拘束性のT細胞の認識に影響を及ぼすか否かを検討したところ、図10に示すように認識の低下を惹起することが確認された。このことは、HIV-1感染樹状細胞がCD1a拘束性T細胞の認識から逃避することによって、体内で制御を受けることなくHIV-1のreservoirとして生存し続けることを示唆している。

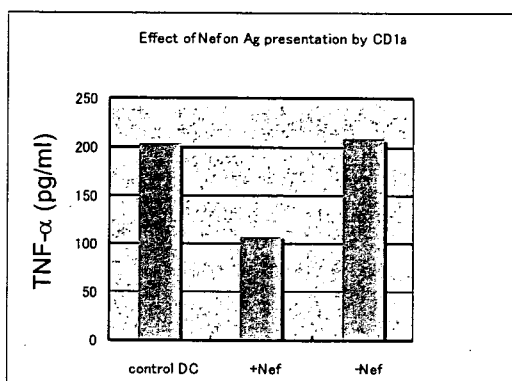


図10 HIV-1感染樹状細胞のCD1a分子拘束性T細胞による認識

### 考察

以上の結果から、粘膜組織に棲息する樹状細胞はHIV感染の主要な初期標的であり、HAART治療によっても感染は継続されることからHIVのreservoirとして感染拡大の鍵を握ることが明らかとなった。この樹状細胞群の制御には、従来のクラスI MHC分子から提示されたCTLのみならず、クラスII MHC分子に酷似した構造を有し病原体由来の糖脂質抗原を提示するCD1分子群に拘束されたT細胞群の存在が大きく関与することが示唆された。特にHIV-1-nef遺伝子の存在によりCD1分子の亜群であるCD1aおよびCD1dの発現が著明に抑制されたことから、CD1a分子拘束性T細胞あるいはCD1d拘束性のNKT細胞がHIV感染樹状細胞の制御に関与することが推測される。

HIV感染樹状細胞が従来のMHC分子に拘束された獲得免疫系のT細胞群によって制御を受けているのか、はたまた同様にCD1分子群によって制御を受けているNKT細胞のような自然免疫系のT細胞群によって制御を受けているのか、それとも両者の協力により制御を受けているのか、その実体は不明であるが、今後は少なくとも従来のCTLに加え、こうしたCD1分子によって規定されたT細胞群による制御の可能性も考慮すべきと考えられる。

粘膜組織におけるHIV感染の主たる標的が粘膜内の樹状細胞であるならば、HIV感染はヘルパーT細胞を主体とした体内の獲得免疫システムを破壊するのみならず体表面のバリアを破壊する疾患であるという新たな視点が見えてくる。その意味でも、HIV感染樹状細胞の制御はエイズ克服のための新たな戦略として考えて行くべきであろう。

### D. 結論

HIVの侵入部位である粘膜組織において、粘膜下に棲息する樹状細胞群はHIV感染の主要な初期標的でありHIVのreservoirとして感染拡大の鍵を握る。今回我々はInformed Consentを得たHAART治療中のHIV-1感染者の腸管粘膜を採取し、そこにおけるHIV-1感染細胞をP24抗原陽性細胞を指標として追跡したところ、実際にCD4陽性の樹状細胞が主たるHIV-1感染細胞として存在することを確認した。

またHIV-1-nefの作用を検討した結果、HIV感染樹状細胞においてクラスI MHC分子のみならずCD1a及びCD1d分子の発現低下が認められた。この結果は、HIV感染樹状細胞の制御には従来のMHC拘束性ペプチド抗原特異的T細胞のみならず、糖脂質抗原特異的CD1a拘束性T細胞あるいはCD1d拘束性NKT細胞の関与が強く示唆される結果を得た。今後はこれらCD1拘束性T細胞群によるHIV感染樹状細胞制御の実体、及び認識抗原の解明へ向けて検討を重ねる予定である。

### F. 論文発表

1. 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, 2007.
2. 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.*, 92: 2570-2582, 2007.
3. 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.*, 75: 152-158, 2007.
4. 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. *J. Immunol.*, 2007 (in press).

5. Fukazawa Y., Miyake A., Ibuki K., Inaba K., Saito N., Motohara M., Horiuchi R., Himeno A., Matsuda K., Matsuyama M., Takahashi H., Hayami M., Miura T. The small intestine is the most vulnerable target tissue regardless of virus pathogenicity in SHIV-infected rhesus macaques. *J. Virol.*, 2007 (submitted).
  6. 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 (submitted).
  7. Inaba K., Fukazawa Y., Horiuchi R., Matsuda K., Himeno A., Matsuyama M., Ibuki K., Nakajima N., Sata T., Miura Y., Koyanagi Y., Nakajima A., Blumberg R., Takahashi H., Hayami M., Miura T. CD4+ cell reduction and enteropathy in small intestine can occur irrespective of viral load in SHIV-infection. *Virol.*, 2007 (submitted).
  8. 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*, 8:22-26, 2007.
  9. 高橋秀実：母乳を介したエイズウイルスの感染伝播. *日本エイズ学会誌*, 9:11-16, 2007.
  10. 林英生、岩本愛吉、神谷茂、高橋秀実：ブランク微生物学 (第2版). *丸善出版*, 2007.
  11. 高橋秀実：第5回日本中医学交流会大会：感染症に対する温病治療-SARSは攻略できるか. *中医臨床*, 28:374-379, 2007.
  12. 高橋秀実：ワクチンによる特異的免疫機能の誘導：ヒトにおける抗原特異的免疫機構. *治療学*, 41:1041-1045, 2007.
  13. 高橋秀実： $\gamma\delta$  T細胞とリウマチ様関節炎. *リウマチ科*, 38:565-570, 2007.
  14. 新谷英滋、高橋秀実：樹状細胞の機能と HIV-1 Nef. *臨床免疫・アレルギー科*, 48:623-629, 2007.
  15. 高橋秀実：免疫応答とエネルギーのめぐり. *癒しの環境*, 13巻, 2008 (印刷中).
  16. 若林あや子、高橋秀実：感染症と栄養・機能性食品. *日本栄養学会雑誌*, 2008 (印刷中).
  17. 高橋めぐみ、高橋秀実：遊離抗原による CD8+T細胞のアポトーシス誘導. *臨床免疫・アレルギー科*, 2008 (印刷中).
  18. 高橋秀実：HIV に対する防御：細胞性免疫の役割. *治療学*, 2008 (印刷中).
  19. 高橋秀実：HIV 感染伝播における母乳中細胞の役割. *血液フロンティア*, 2008 (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13回日本ヘリコバクター学会 2007年6月22-23 (神戸).
  2. 廣田薫、高久俊、日高千鶴乃、古賀実芳、平馬直樹、高橋秀実：高 CPK 血症を伴い温裏剤と桃核承気湯の併用により著明な改善を示した冷え性の1例. 第58回日本東洋医学会学術総会 2007年6月15-17日 (広島).
  3. 高橋秀実、廣田薫、日高千鶴乃、高久俊、真弓暢子、古賀実芳、平馬直樹：アレルギー疾患に関する解表剤の有効性. 第58回日本東洋医学会学術総会 2007年6月15-17日 (広島).
  4. 日高千鶴乃、廣田薫、高久俊、古賀実芳、平馬直樹、高橋秀実：未治療の多発性硬化症に対する湯液治療の1例. 第58回日本東洋医学会学術総会 2007年6月15-17日 (広島).
  5. 高橋秀実：免疫学的な視点から見た SARS に対する温病的治療の意義. 第5回日本中医学交流会大会 2007年8月5日 (東京).
  6. 高橋秀実：温病における舌診の意義. 第5回日本中医学交流会大会 2007年8月5日 (東京).
  7. Takahashi H. : Cellular HIV dissemination and expansion at the mucosal compartment. Japan-US Cooperative Medical Science Program: The 20th Joint Scientific Meeting of AIDS Panels. September 13-14, 2007 (Monterey).
  8. 高橋めぐみ、渡理英二、清水真澄、新谷英滋、高橋秀実：麻疹ウイルス変異株の持続感染に関する宿主因子・その3. 第55回日本ウイルス学会学術集会.

2007年10月21-23日(札幌).

9. 渡理英二、高橋めぐみ、渡辺恵里、大脇敦子、新谷英滋、高橋秀実: 樹状細胞およびランゲルハンス細胞サブセットの麻疹ウイルスの感受性とサイトカイン産生能.

第55回日本ウイルス学会学術集会.

2007年10月21-23日(札幌).

10. 高橋秀実: HIV感染と免疫応答.

第21回日本エイズ学会学術集会

2007年11月28-30日(広島).

11. 新谷英滋、大脇敦子、清水真澄、渡辺恵理、高久千鶴乃、高橋秀実: Analysis of the down-regulation of CD1-mediated lipid/glycolipid antigen presentation by HIV-1 Nef in immature dendritic cells.

第21回日本エイズ学会学術集会

2007年11月28-30日(広島).

12. 高久千鶴乃、渡辺恵理、大脇敦子、清水真澄、松村次郎、高久俊、渡理英二、新谷英滋、高橋秀実: CD4陽性NKT細胞とHIV-1による感染拡大への相互作用.

第21回日本エイズ学会学術集会

2007年11月28-30日(広島).

13. 松村次郎、清水真澄、高久千鶴乃、近江恭子、吉田岳市、秋山純一、新谷英滋、岡慎一、高橋秀実: HIV患者の腸管粘膜組織における感染細胞の探索.

第21回日本エイズ学会学術集会

2007年11月28-30日(広島).

14. Higuchi T., Takahashi M., Kobayashi F., Inagaki S., Nakagawa Y., Kumagai Y., Takahashi H.: Study on a possible mechanism of intravesical BCG therapy for human bladder carcinoma.

第37回日本免疫学会総会

2007年11月20-22日(東京).

15. Takeuchi H., Shimizu M., Mayumi N., Norose Y., Takahashi H.: Characterization of virus-producing breast milk monocytes transformed with HTLV-1.

第37回日本免疫学会総会

2007年11月20-22日(東京).

16. Kumagai Y., Takahashi H.: Analysis of the interaction between HIV-1-gp120 V3 region and  $\beta$ -chemokine receptor by using multivalent V3 epitopes grafted at the immunoglobulin hyper-variable regions.

第37回日本免疫学会総会

2007年11月20-22日(東京).

17. Shinya E., Owaki A., Shimizu M., Watanabe E., Matsumura J., Negishi Y., Takaku C., Takahashi H.: Down-regulation of CD1 lipid/glycolipid antigen presentation by HIV-1 Nef in immature dendritic cells.

第37回日本免疫学会総会

2007年11月20-22日(東京).

18. Takahashi H., Saito N., Shimizu M., Owaki A., Watanabe E., Takahashi M., Ohmi K., Takaku C., Shinya E.: Cross-reactive cytotoxicity of CD1d-NKT cell system between primates and rodents.

第37回日本免疫学会総会

2007年11月20-22日(東京).

19. Moriya K., Wakabayashi A., Shimizu M., Watanabe E., Takaku S., Dan K., Takahashi H.: Effects of 33D1+ or DEC-205+ dendritic cell depletion on cytokine secretion and tumor growing in mice.

第37回日本免疫学会総会

2007年11月20-22日(東京).

20. 高橋秀実: 自然免疫システムと疾病: 慢性関節リウマチに対する新たなアプローチ.

第7回小児感染免疫研究会

2008年2月16日(東京).

## H. 知的財産権の出願・登録状況

現在 Enoyl-CoA hydratase を特異的に阻害する ssRNA の特許出願準備中(文献3参照)。

厚生労働科学研究費補助金（社会保障国際協力推進研究事業）

（分担）研究報告書

### アジアにおける CRF07\_BC 伝播の年代推定に関する研究

#### アジアにおけるエイズ流行のメカニズム・ダイナミックスの全容解明に向けて

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1室室長

研究協力者 Tee Kok Keng, Li Xiaojie, Liao Huonan, 上西理恵, 長谷彩希

（国立感染症研究所エイズ研究センター）

Oliver Pybus（オックスフォード大・動物学部）

#### 研究要旨

HIV-1 CRF07\_BC は中国北西部（新疆ウイグル自治区）の注射薬物乱用者（IDU）におけるエイズ流行の原因となった中国に特有な組換え型流行株（circulating recombinant form, CRF）の一つである。これまで中国以外の地域では見出されてこなかったが、2002-2004年になって、台湾南部ついで中北部地域で IDU 間で大流行が発生していることが報告された。その後、この流行の原因ウイルスは中国に由来する CRF07\_BC であることが明らかにされた。われわれは東アジア地域における CRF07\_BC の感染拡大の timescale を明らかにするために、最新のデータ解析技術を用いて解析した結果、中国新疆ウイグル自治区、台湾南部、中北部に流布する CRF07\_BC が異なるクラスターを形成し、それぞれの共通祖先年代 (tMRCA) がそれぞれ、1993.8 (95% 信頼区間: 1992.3-1995.3); 台湾南部クラスター-1999.8 (95% CR: 1998.4-2001.1); 台湾中北部クラスター-2002.2 (95% CR: 2001.3-2002.8) と推定されることを明らかにした。

#### A. 研究目的

HIV-1 CRF07\_BC はインドに起源をもつサブタイプ C とタイに起源をもつサブタイプ B' との間の組換えウイルスで、中国北西部の新疆ウイグル自治区 (Xinjiang) の注射薬物乱用者 (IDU) の間に最初に報告された。中国東南部 (Guangxi) で見出された近縁の組換え型流行株 CRF08\_BC とともに、中国の IDU 集団に広範に広がっている最も主要なウイルス株である。

CRF07\_BC はこれまで中国国外では検出されてこなかったが、2002 年に入って台湾南部（台湾）ついで 2003-2004 年には台湾中・北部（台中、台北）地域の IDU の間で文字通り爆発的な流行

が始まった。

本研究は、アジアでのエイズ流行の形成メカニズムとそのダイナミックスの全容解明のプロジェクトの一環として、東アジア地域における CRF07\_BC 流行拡大の timescale を、最新のデータ解析技術を用いて推定し、その知見の疫学的・公衆衛生学的意義を考察しようとするものである。

#### B. 研究方法

GenBank から得た CRF07\_BC env 遺伝子配列情報に基づき、解析を行った。得られた env 遺伝子



配列 (n=39) の内訳は、中国 Xinjiang (n=4; 1997-1998); 台南 (n=19); 台湾中部 (n=8); 台湾北部 (n=8)である。台湾からの検体はいずれも 2004 年に採取されたものである。

これらの塩基配列情報をもとに Tajima-Nei 法で遺伝的距離の計算し、系統樹解析を作成、各配列間の系統関係関係を解析した。一方、CRF07\_BC の env 領域はインド由来のサブタイプ C に属することがわかっているため、インドから得られているサブタイプ C 配列 (n=41) をレファレンスとして、ベイズ方法 (Bayesian coalescent method) に基づく解析プログラム BEAST v1.4.2 (<http://www.beast.bio.ed.ac.uk>) によって、各地域に流布する CRF07\_BC 株の共通祖先年代 (time to the most recent common ancestor, tMRCA) を推定した。

### C. 研究結果

系統樹解析の結果、中国および台湾から得られた CRF07\_BC 配列は、3 個のクラスターを形成した。i) 中国 Xinjiang 株に由来するクラスター、ii) 台湾南部のウイルス株に由来するウイルス株のクラスター、iii) 台湾北中部のウイルス株のクラスターの 3 つクラスターに分けられた。ブートストラップ値は 84-100% と極めて明確なクラスターを形成していた (図 1)。

一方、採取年代 (1989-2005 年) が明らかなインドに由来するサブタイプ C 株 (n=41) の env 遺伝子配列を用い、BEAST v1.4 の分子時計法に基づき、env 領域の年当たりの分子進化速度 ( $4.7-5.0 \times 10^{-3}$  置換/サイト/年) を推定した。ついでベイズ-マルコム鎖モンテカルロ法 (Bayesian Markov Monte Carlo method) によって、各クラスターの起源年代 (tMRCA) を推定した。それによると、中国 Xinjiang クラスターが 1993.8 (95% 信頼区間 (CR): 1992.3-1995.3); 台南クラスター 1999.8 (95% CR: 1998.4-2001.1); 台湾中北部クラスター 2002.2 (95% CR: 2001.3-2002.8) と推定された。

### D. 考察

CRF07\_BC は中国南西部の雲南省の IDU 集団に co-circulate していたサブタイプ B' と C の間の遺伝子組み換えの結果生まれたものと推定されている。その発生年代は明らかではないが、おそらく雲南省で流行が開始した 80 年代後半以降にまもなく生まれたものと推定される。

ついで、その地域から中国北西地域に向かう drug trafficking 経路に乗って、Xinjiang の IDU の間での大流行に繋がったと考えられる。我々の解析によれば、Xinjiang 株の起源年代は、雲南省でウイルスが誕生して直後の 90 年代初頭から半ば (1998-2001 年) と推定される。さらに台湾へは、南部地域 (Tainan) が侵入門戸となり、90 年代末 (1998-2001 年) に侵淫し、ついで、2000 年代初め (2001-2003 年) に台湾中北部地域の IDU 集団に伝播したものと推定される。台湾へのウイルス伝播の詳細な経路は明らかではないが、台湾と歴史的・経済的な結びつきの強い中国福建省や広東省の IDU network との係わりが最も考えられる。

また、流行がサーベランスによって検出された (outbreak discovery) 年代とわれわれが推定するウイルス株の起源年代 (tMRCA) には 1-3 年のギャップがあるが、この原因に関しては、i) サーベランス体制の不十分さ、診断の遅れ。ii) 実際に流布するウイルス株の遺伝学的多様性を正しく反映するような検体のサンプリングがなされていないという検体サンプリングの不完全さ。第 3 の可能性としては、iii) 流行の原因となったファウンダーの系統のウイルスが既に姿を失っている可能性など、が挙げられる。

### E. 結論

HIV-1 CRF07\_BC は最初中国新疆ウイグル自治区の IDU 間に 90 年代半ば以降に大流行を招いたが、その共通祖先年代は 1992-1995 年と推定される。中国国外で CRF07\_BC の侵淫がはじめて報告されたのは台湾であるが、その侵入門戸となったと考えられる台湾南部地域への侵淫年代は

1998-2001年、さらに台湾国内の drug trafficking route に乗って台湾中北部へ流行の拡大の原因となったウイルス株の共通起源年代は2001-2003年と推定された。現在われわれは、アジアにおけるエイズ流行の担い手となっているアジア型 HIV-1 株 (サブタイプ C, B', CRF01\_AE, CRF08\_BC, CRF33\_01B など) の各流行地点に流布するウイルス株の共通起源年代を組織的に決定することによって、アジアにおける流行の成り立ちのより深い理解をえようと計画している。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

欧文

1. Takebe, Y., Uenishi, R., and Li, X.-J. Global molecular epidemiology of HIV: Understanding the genesis of AIDS pandemic. "HIV-1: Molecular biology and pathogenesis" (ed. Kuan Teh Jeang). *Advances in Pharmacology* vol. **56**: 1-25, 2008.
2. Tee, K. K., Pybus, OG, Liao, H., Uenishi, R., Hase, S., Kamarulzaman, A., Li, X.-J., and Takebe, Y. Chronology of the HIV-1 CRF07\_BC expansion in East-Asia. *AIDS* **22**: 156-158, 2007.
3. Li, X.-J., Uenishi, R., Hase, S., Liao, H., Tee, K. K., Kusagawa, S., and Takebe, Y. HIV/AIDS in Asia: The shape of epidemics and their molecular epidemiology. *Virologica Sinica* **22**(6): 426-433, 2007.
4. Han, X., Zhang, M., Dai, D., Wang, Y., Zhang, Z., Liu, J., Geng, W., Jiang, Y., Takebe, Y., and Shang, H. Genotypic resistance mutations to antiretroviral drugs in treatment-naive HIV/AIDS patients living in Liaoning Province, China: baseline prevalence and subtype-specific difference. *AIDS Res Hum Retroviruses*. **23**(3): 357-364, 2007.
5. Utsumi, T., Nagakawa, H., Uenishi, R., Kusagawa, S., and Takebe, Y. An HIV-2-infected Japanese man who was a long-term nonprogressor for 36 years. *AIDS* **21**(13): 1834-1835, 2007.
6. Naito, Y., Nohtomi, K., Onogi, T., Uenishi, R., Ui-Tei, K., Saigo, K., and Takebe, Y. Optimal design and validation of antiviral siRNA for targeting HIV-1. *Retrovirology*. **4**(1): 80, 2007.
7. Shimizu, S., Urano, E., Futahashi, Y., Miyauchi, K., Isogai, M., Matsuda, Z., Notomi, K., Onogi, T.,

Takebe, Y., Yamamoto, N., and Komano, J. Inhibiting lentiviral replication by HEXIM1, a cellular negative regulator of the CDK9/cyclin T complex. *AIDS* **21**: 575-582, 2007.

8. Tee, K. K., Li, X.-J., Nohtomi, K., Ng, K. P., Kamarulzaman, A., and Takebe, Y. Identification of a novel circulating recombinant form (CRF33\_01B) disseminating widely among various risk populations in Kuala Lumpur, Malaysia. *J. AIDS* **43**(5): 523-9, 2006.
9. Murakami, Y., Yamagoe, S. Noguchi, K., Takebe, Y., Uehara, Y. and Fukazawa, H. 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, 2006.
10. Takebe, Y. and Telesnitsky, A. Evidence for the acquisition of multidrug resistance by an HIV clinical isolate via human sequence transduction. *Virology* **351**: 1-6, 2006.
11. Naito, Y., Ui-Tei, K., Nishikawa, T., Takebe, Y., Saigo, K. siVirus: web-based antiviral siRNA design software for highly divergent viral sequences. *Nucl. Acid Res.* (Web Server issue) **W448-W450**, 2006.

和文

12. 長谷彩希、草川茂、武部豊. 逆転写酵素活性測定法 <sup>32</sup>P を用いた免疫不全ウイルス (HIV) のウイルス学的研究技術. 秀潤社: 細胞工学別冊 RI の逆襲; アイソトープを活用した簡単・安全バイオ実験. 127-131, 2007.
13. 武部豊. HIV サブタイプと感染経路. 治療. **88**(12): 2843-2851, 2006.
2. 学会発表 (2007-2008)
  1. Isogai, M., Uenishi, R., Hase, S., Suzuki, R., Suzuki, T., Wakita, T., and Takebe, Y. Identification of new class of HCV inhibitors targeting to the entry or late stages in HCV replication cycle using newly developed JFH-1-based infectivity/ replication assay. HCV 2007.(Sept.9-13, 2007, Glasgow, UK).
  2. Takebe, Y. Identification of novel antiviral small molecule compounds that are likely to block early processes in HCV replication cycle. 2<sup>nd</sup> Hepatitis C, resistance and new compounds workshop (Oct 31-Nov 1, 2007, Boston)
  3. Uenishi, R., Nohtomi, K., Hase, S., Suzuki, R., Suzuki, T., and Wakita, T., and Takebe, Y. Identification of new class of HCV inhibitors using newly developed JFH-1-based infectivity/ replication assay. 第7回あわじしま感染症・免疫フォーラム (Sept.1-5, 2007, 淡路島)
  4. 武部豊, 上西理恵, 納富香子, 長谷彩希, 鈴木哲朗, 脇田隆字. 感染性 HCV クローン JFH-1 を用いた感染・増殖アッセイに基づくスクリーニングによる新規標的をもつ HCV 阻害剤

の同定とその解析. 第55回日本ウイルス学会 (2007.10.20-23, 札幌)

5. 上西理恵、納富香子、長谷彩希、鈴木哲朗、鈴木亮介、脇田隆字、武部豊. 新規阻害剤探索のための HCV 感染・増殖アッセイ系の樹立とその評価. 第55回日本ウイルス学会学術集会総会 (2007.10.20)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (2005-2008)  
特許出願 (準備中を含む)

1. 特許取得・出願

- 1) 「HCV 阻害剤」(出願準備中)
- 2) 「新規 HCV エントリー阻害剤」(特願 2008-33598、平成 20 (2008) 年 2 月 14 日出願)
- 3) 「HIV-1 特異的 RNA 干渉分子」(特願 2007-156767、平成 19 年 6 月 13 日出願)
- 4) 「C 型肝炎ウイルス (HCV) 増殖阻害剤」(特願 2007-018145、平成 19 年 1 月 29 日) [PCT 出願: PCT/JP2008/51086 (Jan 25, 2008)]
- 5) 「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)
- 6) 「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)
- 7) 「弱毒型 HIV-1 塩基配列」(特願 2005-08741、平成 17 年 1 月 17 日出願)

2. 実用新案登録 該当無し

3. その他 該当無し

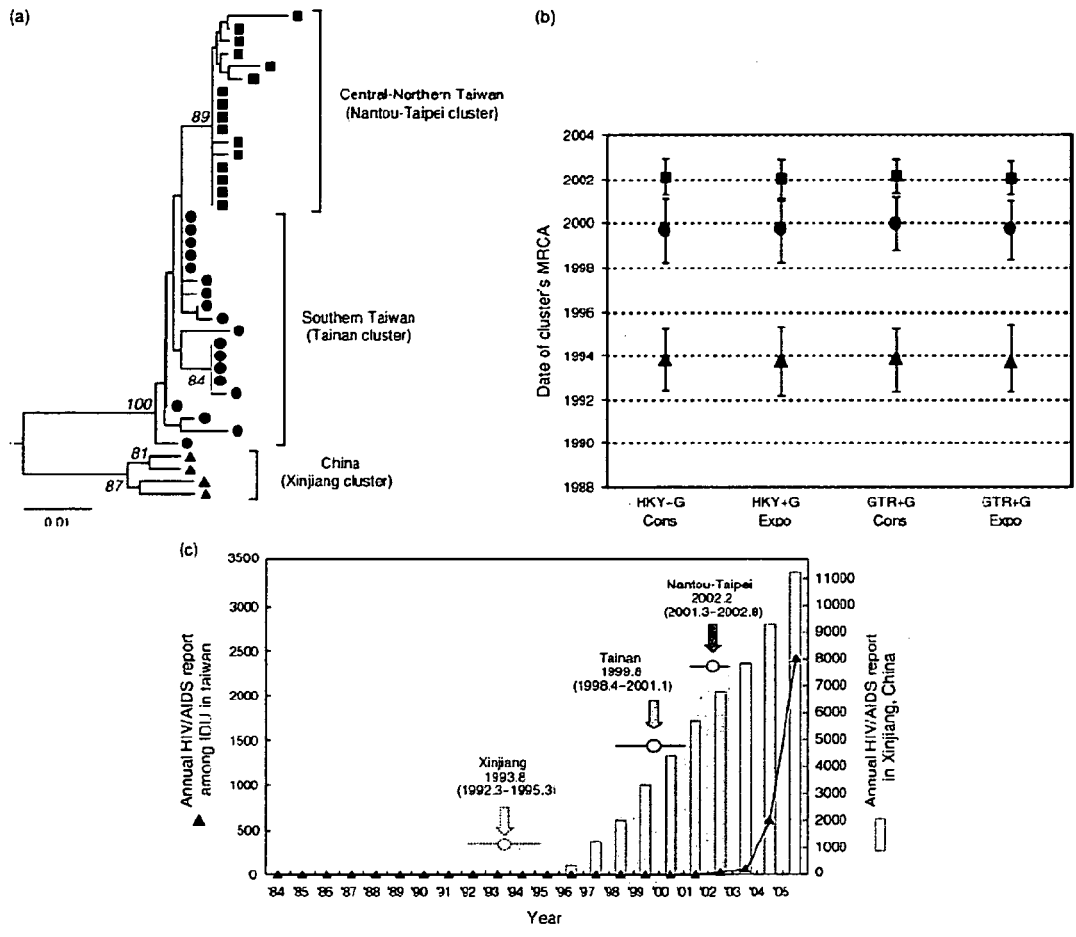


図1. 中国および台湾に流布する HIV-1 CRF07\_BC 株の流行起源年代決定

厚生労働科学研究費補助金（社会保障国際協力推進研究事業）  
分担研究報告書

新規のエイズの化学療法剤の開発とそれによる免疫応答能の回復に関する研究

分担研究者 満屋 裕明（熊本大学医学薬学研究部血液内科学・感染免疫診療部 教授）

研究要旨

HIV-1 が耐性を獲得しにくく、獲得しても他薬剤との交差耐性を有しない新規のエイズ治療薬の開発を進め、プロテアーゼ阻害剤 (PIs)、PR 2 量体形成阻害剤、CCR5 阻害剤の研究開発を続けている。HIV-1 の増殖に重要である HIV-1 プロテアーゼ二量体形成を評価するために、CFP/YFP タグ付き PR を有する感染性組み換え HIV-1 クローンをを用いた FRET (fluorescence resonance emission transfer)の系を確立し、新たな機序である PR 二量体形成阻害による HIV-1 複製阻害について考察を行った。また CCR5 の微細構造学的解析系の確立、CCR5 阻害剤の結合モデル、分子レベルでの機序解析の研究も進めて、これらの解析結果を基にして、新たに見出された CCR5 阻害剤 AK602 (AVC) およびその周辺化合物のモデリングを行い、強力な抗 HIV 活性を有する新しい化合物の設計・同定を続けて、また AVC がケモカイン-ケモカイン受容体相互作用に及ぼす影響について構造学的解析を進めた。

A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) 感染によって起こる後天性免疫不全症候群 (AIDS) に対する化学療法は長足の進歩を遂げ、かつて「死の病」とされた本疾患は「コントロール可能な慢性感染症」と再定義し得る程となった。この進歩は、逆転写酵素阻害剤 (RTIs) とプロテアーゼ阻害剤 (PIs) を組み合わせた多剤併用療法 (HAART) に負うところが大きい。しかし、HIV-1 が RTIs と PIs の両剤に対して耐性を獲得してその多くが交差耐性であって治療抵抗性となった症例数の増大、また耐性ウイルスによる初感染症例増多の報告が続いており、野生 HIV-1 株と多剤耐性株の双方に強力な活性を發揮し、薬剤耐性を誘導しにくく、副作用が少なく、服用しやすい新規の薬剤の開発が文字通り急務の課題となっている。本研究では、HIV-1 が耐性を発現しにくい薬剤、発現しても他薬剤との交差耐

性を有しない新規の PIs や新しい機序から HIV-1 の感染を阻害する CCR5 阻害剤の開発を進めるとともに、その基礎となるウイルス学・酵素学・細胞生物学・薬理学・結晶解析学的な基礎研究を進める。

B. 研究方法

- 1) 検討中の化合物の抗HIV-1活性評価及びより有望な化合物の開発・評価：抗HIV-1活性の評価にはMTT、MAGIアッセイなどを用いるが有望なものについては耐性株を含む複数のウイルス株での活性を更に検討するため、p24アッセイを行う。このアッセイには全自動化学発光度測定機：Lumipulse Fを用いる。このようにして見いだされたより有望な化合物について前臨床試験の準備を進める。
- 2) 抗 HIV-1 作用発現のメカニズム解析：PIs がウイルス、あるいは生体（細胞）へ与える変化、それがどのようにして抗 HIV-1 効果を

もたらずかについて解析を進める。この研究には多数の HIV-1 クローンの作成・検討が必要で、しかも HIV-1 の広範な遺伝子部分についての検索が必要とされるが、high throughput の DNA sequencer : ABI-377 を用いるので迅速な実験データの解析が可能となる。

3) 薬剤耐性のメカニズム解析 : HIV-1 が極めて高い増殖能を有し、しかも逆転写酵素 (RT) が error-prone であるという特性のために、HIV-1 の薬剤耐性発現は不可避である。X 線結晶解析をはじめとするタンパクの微細構造研究の方法論を用いて、多剤耐性 HIV-1 株の発現機序の分子・原子レベルでの解析を行う。その後、構造を基礎とした高い抗ウイルス活性を有しかつ耐性の発現に抵抗する薬剤のデザイン・再デザインを行う。新規のプロテアーゼ阻害剤について試験管内で耐性 HIV-1 変異株の誘導を試み、更にそのようにして誘導された HIV-1 についてのウイルス学・生化学・遺伝子的解析や X 線結晶解析を用いて耐性発現のメカニズムの解析を行う。

4) HIV-1 プロテアーゼ (PR) 二量体形成 (dimerization) 阻害 : 我々は CFP/YFP タグ付き PR を有する感染性組み換え HIV クローンと FRET (fluorescence resonance emission transfer) の系を用いて、HIV PR の二量体形成を確認する系を確立した。Dimerization に重要とされるアミノ酸 (Asp29, Arg87, Thr26 etc) 置換を有する種々の CFP/YFP タグ付き変異体を多数作成、FRET の系を用いてこれらのアミノ酸置換が dimerization を阻害することを明らかとした。dimerization に重要とされるアミノ酸の詳細な解析を進め、新たな HIV-1 PR 阻害への機序を明らかにする。

5) CCR5 の微細構造学的解析・生理学的解析 : 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、HIV-1 感染 (エンベロープとの結合) と CCR5 の生理作用 (ケモカインによる作用) に重要な構造の解析など行っている。また、電子顕微鏡・蛍光/共焦

点顕微鏡を用いた細胞表面の CCR5 の局在性・動態解析も行っている。

(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、まず動物実験などでその安全性を十分に確認する。さらに医学部・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、認可された後で試験を開始する。

### C. 研究結果

広いスペクトラムの薬剤耐性 HIV 株に高い活性を発揮する PI, TMC114/darunavir (Koh & Mitsuya, *Antimicrob Agents Chemother.* 47: 3123-3129, 2003) を分担研究者の Purdue University, Dr. Ghosh との共同研究で開発、本剤は 2006 年 6 月に米国 FDA にて認可され、Prezista™ として本邦でも 2007 年 12 月に臨床に供されることとなった。また DRV は結晶構造解析において、P2 部位に bis-THF というユニークな構造を有し、HIV プロテアーゼ (PR) 活性部位である Asp-29/Asp-30 の主鎖 (back bone) と極めて強固な水素結合を形成することで強力な抗 HIV 活性を発揮するが、DRV と同様に P2 部位に bis-THF 構造を有し、野生型から多剤耐性株における広いスペクトラムでの強力な抗 HIV 活性を発揮する GRL-98065 を同定、本化合物の薬剤高度耐性変異株を含む各種 HIV-1,2 株に対する抗 HIV 活性や細胞毒性を評価し、試験管内耐性誘導実験により HIV-1 の本化合物に対する耐性獲得機序を解明し、更に詳細な結晶構造解析により、bis-THF 構造が HIV PR 活性部位である Asp-29/Asp-30 の主鎖と強固な水素結合を有することに加えて、P2' 部位の benzodioxole 構造が HIV PR の flap 領域と水素結合を持つことで薬剤の結合を安定化させる、といった本化合物における強力な抗 HIV 活性発揮の機序を明らかにした (Amano & Mitsuya, *Antimicrob Agents Chemother.* 51: 2143-2155, 2007)。また、我々のグループは PIs 耐性と gag の遺伝子変異についての構造学的検討も進めており、こ

これらの分子を標的とする新規の化合物のデザインの詳細も引き続き行っている(Tamiya & Mitsuya, *J.Virol.* 78: 12030-12040, 2004; Gatanaga & Mitsuya, *J Biol Chem.* 281: 1241-1250, 2006)。

HIV PR の二量体形成 (dimerization) は HIV の増殖に重要であり、このことは dimerization の阻害が新規薬剤の標的部位となる可能性を示唆している。我々は CFP/YFP タグ付き PR を有する感染性組み換え HIV クローンと FRET (fluorescence resonance emission transfer) の系を用いて、HIV PR の二量体形成を確認する系を確立した。この系を用いて HIV PR dimerization に重要とされるアミノ酸(Asp29, Arg87, Thr26 etc)置換が dimerization を阻害することを解明、更に我々が米国の研究グループと共同で開発した bis-THF 構造及びその類似構造を有する一連の化合物が HIV PR dimerization 阻害活性を有することを明らかにした(Koh & Mitsuya, *J Biol Chem.* 282: 28709-20, 2007)。

また、新規開発中の HIV-1 逆転写酵素阻害剤である 4'-Ethynyl-2-Fluoro-2'-Deoxyadenosine における抗 HIV 活性及び同化合物の細胞内代謝を評価し、ヒト DNA ポリメラーゼに対する影響等を明らかにした(Nakata & Mitsuya, *Antimicrob Agents Chemother.* 51: 2701-2708, 2007)。

ケモカイン受容体である CCR5, CXCR4 は HIV-1 のコレセプターとして HIV-1 の細胞侵入過程に重要な役割を持っている。このようなウイルスの細胞への侵入過程は既存の主な抗 HIV 剤と作用機序の異なる新たな治療薬のターゲットとしても有望であり、満屋は 1999 年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-1 効果が確認された CCR5 阻害剤: Atravirine (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.* 276:35194-35200, 2001; Maeda & Mitsuya, *J.Virol.* 78: 8654-8662, 2004; Nakata & Mitsuya, *J.Virol.* 79:2087-2096, 2005)。一方で我々はこれらの阻害剤の作用機序の解明のための研究も進めており、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、HIV-1 感染 (エンベロープとの結合) と CCR5 の生理作用 (ケモカインによる作用) に重要な構造の解析などを既に報告している(Maeda & Mitsuya, *J Biol Chem.* 281:12688-12698, 2006)。

#### D. 考察

これらの一連の研究の特色として、抗 HIV-1 薬開発に必要なウイルス学的研究手技に加えて、新規 (独自) の低分子化合物の合成や結晶構造解析、コンピューター・モデリングなど 1 研究施設では通常施行困難な多岐にわたる研究領域をカバーする研究体制が国内外のグループとの共同研究として整えられていることが挙げられる。今後もこれらの研究を継続し、新興再興感染症の予防・治療薬開発を進める。

#### E. 結論

我々のグループは HIV-1 が耐性を発現しにくい薬剤、発現しても他薬剤との交差耐性を有しない新規の PIs の開発を米国グループとの共同研究で継続しているが、さらに HIV-1 PR 二量体形成に重要とされるアミノ酸の詳細な解析を進め、新規の機序である HIV-1 PR 二量体形成阻害剤の開発・構造解析を米国の研究グループと共同で行っていく。また CCR5 の微細構造学的解析系の確立、CCR5 阻害剤の結合モデル、分子レベルでの機序解析の研究も進めており、これらの解析結果を基にして、CCR5 結合能のある新規低分子化合物のモデリングを行い、強力な抗 HIV 活性を有する新しい化合物の設計・同定を続ける。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Koh Y, Matsumi S, Das D, Amano M, Davis DA, Li J, Leschenko S, Baldrige A, Shioda T, Yarchoan R, Ghosh AK, Mitsuya H. (2007) Potent Inhibition of HIV-1 Replication by Novel Non-peptidyl Small Molecule Inhibitors of Protease Dimerization. *J Biol Chem.* 282: 28709-28720.
2. Nakata H, Amano M, Koh Y, Kodama E, Yang G, Bailey CM, Kohgo S, Hayakawa H, Matsuoka M, Anderson KS, Cheng YC, Mitsuya H. (2007) Activity against human immunodeficiency virus type 1, intracellular metabolism, and effects on human DNA polymerases of 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine. *Antimicrob Agents Chemother.* 51: 2701-2708.
3. Harada S, Hazra R, Tamiya S, Zeichner SL, Mitsuya H. (2007) Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants containing the Q151M complex in children receiving long-term antiretroviral chemotherapy. *Antiviral Res.* 75: 159-166.
4. Amano M, Koh Y, Das D, Li J, Leschenko S, Wang YF, Boross PI, Weber IT, Ghosh AK, Mitsuya H. (2007) A novel bis-tetrahydrofuranylurethane-containing nonpeptidic protease inhibitor (PI), GRL-98065, is potent against multiple-PI-resistant human immunodeficiency virus in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 51: 2143-2155.
5. 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, Mitsuya H. (2007) Spirodiketopiperazine-based CCR5 antagonists: Lead optimization from biologically active metabolite. *Bioorg Med Chem Lett.* 17: 727-731.
6. Mitchell MS, Bodine ET, Hill S, Princler G, Lloyd P, Mitsuya H, Matsuoka M, Derse D. (2007) Phenotypic and genotypic comparisons of human T-cell leukemia virus type 1 reverse transcriptases from infected T-cell lines and patient samples. *J Virol.* 81: 4422-4428.
7. Ohrui H, Kohgo S, Hayakawa H, Kodama E, Matsuoka M, Nakata T, Mitsuya H. (2007) 2'-deoxy-4'-C-ethynyl-2-fluoroadenosine: a nucleoside reverse transcriptase inhibitor with highly potent activity against wide spectrum of HIV-1 strains, favorable toxic profiles, and stability in plasma. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 26(10-12): 1543-6.
8. Ghosh AK, Dawson ZL, Mitsuya H. (2007) Darunavir, a conceptually new HIV-1 protease inhibitor for the treatment of drug-resistant HIV. *Bioorg Med Chem.* 15(24): 7576-80.
9. Maeda K, Mitsuya H. (2007) Development of therapeutics for AIDS: structure-based molecular targeting. *Tuberculosis (Edinb).* 87 Suppl 1: S31-4.
10. Gatanaga, H., Das, D., Suzuki, Y., Yeh, D.D., Hussain, K.A., Ghosh, A.K., and Mitsuya, H. (2006) 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.
11. Maeda, K., Das, D., Ogata-Aoki, H., Nakata, H., Miyakawa, T., Tojo, Y., Norman, R., Takaoka, Y., Ding, J., Arnold, GF., Arnold, E., and Mitsuya, H. (2006)



- Structural and molecular interactions of CCR5 inhibitors with CCR5. *J. Biol. Chem.* 281: 12688-12698.
12. Ohrui, H., Kohgo, S., Hayakawa, H., Kodama, E., Matsuoka, M., Nakata, T., and Mitsuya, H. (2006) 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
  13. Miyazato, P., Yasunaga, J., Taniguchi, Y., Koyanagi, Y., Mitsuya, H., and Matsuoka, M. (2006) De novo Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Infection of Human Lymphocytes in NOD-SCID, Common  $\gamma$ -Chain Knockout Mice. *J. Virol.* 80:10683-10691.
  14. 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. (2006) Inhibition of HIV-1 replication by a peptide dimerization inhibitor of HIV-1 protease. *Antiviral Res.* 72: 89-99.
  15. Ghosh, A.K., Schiltz, G., Perali, R. S., Leshchenko, S., Kay, S., Walters, D. E., Koh, Y., Maeda, K., Mitsuya, H. (2006) Design and synthesis of novel HIV-1 protease inhibitors incorporating oxyindoles as the P2'-ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16: 1869-1873.
  16. Yin, P.D., Das, D., and Mitsuya, H. (2006) 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
  17. Habashita, H., Kokubo, M., Hamano, S., Hamanaka, N., Toda, M., Shibayama, S., Tada, H., Sagawa, K., Fukushima, D., Maeda, K., and Mitsuya, H. (2006) 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
  18. 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. (2006) Structure-Based Design of HIV-1 Protease Inhibitors to Combat Drug Resistance. *J. Med. Chem.* 49: 5252-5261.
  19. Zhou, S., Kern, E.R., Gullen, E., Cheng, Y.-C., Drach, J.C., Tamiya, S., Mitsuya, H., and Zemlicka, J. (2006) 9-[[3-Fluoro-2-(hydroxymethyl)cyclopropylidene]methyl] adenines and guanines. Synthesis and Antiviral Activity of All Stereoisomers. *J. Med. Chem.* 49: 6120-6128
  20. Yoshimura, K., Shibata, J., Kimura, T., Honda, A., Maeda, Y., Koito, A., Murakami, T., Mitsuya, H., and Matsushita, S. (2006) 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
  21. Ghosh, A.K., Sridhar, P.R., Kumaragurubaran, N., Koh, Y., Weber, I.T., and Mitsuya, H. (2006) 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

2. 学会発表(国際学会のみ)

1. “Study of Dynamics of Cellular CCR5 and Its Alterations by CCR5 Inhibitors Using YFP-tagged CCR5-expressing Cells”  
Hiroto Nakata, W Kamata, H Ogata-Aoki, K Maeda, and H Mitsuya,  
14<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections.  
February 25-28, 2007 L.A., California, US  
Program and abstracts CROI 2007 p494
  2. “Structural/Molecular Analysis of HIV Inhibition by Small Molecule CCR5 Inhibitors”  
Kenji Maeda, D Das, K Tsuchiya, P Yin, H Ogata-Aoki, H Nakata, H Nakata, R Norman, Y Takaoka, and H Mitsuya,  
14<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections.  
February 25-28, 2007 L.A., California, US  
Program and abstracts CROI 2007 p493
  3. “In-vitro Selection of HIV-1 Variants Highly Resistant to Darunavir (DRV) Using a Mixture of HIV-1 Isolates Resistant to Multiple Protease Inhibitors (PIs)”  
Yasuhiro Koh, T Towata, A Ghosh, and H Mitsuya,  
14<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections.  
February 25-28, 2007 L.A., California, US  
Program and abstracts CROI 2007 p606
  4. “A Novel bis-Tetrahydrofranylurethane-Containing Nonpeptidic Protease Inhibitor (PI) GRL-98065 Potent Against Multi-PI-Resistant HIV In Vitro.”  
Masayuki Amano, Y Koh, A Ghosh, and H Mitsuya,  
14<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections.  
February 25-28, 2007 L.A., California, US  
Program and abstracts CROI 2007 p492
  5. “TTNTRNS: An amino acid insert near the p17/p24 Gag cleavage site associated with resistance to protease inhibitors”  
Manabu Aoki, H Aoki, T Miyakawa, and H Mitsuya,  
14<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections.  
February 25-28, 2007 L.A., California, US  
Program and abstracts CROI 2007 p601
  6. “Potent Inhibition of HIV-1 Replication By Novel Non-peptidyl Small Molecule Protease Dimerization Inhibitors”  
Koh Y., Matsumi S., Amano M., Das D., Davis D.A., Li J., Leschenko S., Baldrige A., Shioda T., Yarchoan R., Ghosh A.K., Mitsuya H.  
4<sup>th</sup> IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention  
July 22-25, 2007, Sydney, Australia  
Abstract No. MOPDX04
- G. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む)  
特になし

厚生労働科学研究費補助金（社会保障国際協力推進研究事業）  
分担研究報告書

CTL エピトープを認識する抗体の作製に関する研究

分担研究者 岩本 愛吉

東京大学医科学研究所先端医療研究センター感染症分野 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。CTL に対する抗原提示については、これまでほとんど詳細な解析がされていない。そこで、本研究ではそのような解析を可能とするためのツールとして HLA-A24 分子上に CTL エピトープとして提示されるペプチド-主要組織適合抗原複合体 (p-MHC) に特異的な抗体の作製を試みた。

A. 研究目的

HIV 感染症において細胞傷害性 T 細胞 (CTL) による細胞性免疫応答はウイルスのコントロールに重要であることが知られている一方で、CTL からはエスケープ変異ウイルスが出現する。ワクチン開発においてその解析は重要であるため、外国でも多くの研究がなされている。しかし、CTL による抗原認識は宿主の HLA によって異なるため、本邦にて流行している HIV とそれに対する CTL 応答を解析することが重要である。私たちは日本人集団に高頻度に見られる HLA-A24 によって提示される CTL エピトープについて、日本で流行している HIV の性状を検討しており、昨年までに Nef 由来のエピトープ Nef138-10 (RYPLTFGWCF) において CTL からのエスケープ変異であると考えられるステレオタイプなアミノ酸変化を見出した。

CTL 応答は T 細胞レセプター (TCR) が標的細胞表面の HLA クラス I 分子によって提示される抗原ペプチド (p-MHC) を認識することで惹起される。そのため細胞表面に存在する抗原量、すなわち特定のエピトープを提示する HLA クラス I 分子の数は CTL による免疫応答を考える上で非常に重要である。しかしながらその測定は非常に困難であり、これまでに全く明らかにされ

ていない。そこで本研究では上記 Nef138-10 を提示する HLA-A24 分子 (A24/Nef138-10) に特異的な抗体を作製することを試みた。特異的な抗体を樹立できれば HIV 感染細胞を染色することによって A24/Nef138-10 量を可視化することができ、抗原提示量などを測定できる可能性がある。本研究ではヒト B 細胞由来の単鎖抗体 (scFv) ファージディスプレイライブラリーを用いて A24/Nef138-10 複合体特異的 scFv の樹立を試みた。

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。ファージディスプレイ法とはイムノグロブリンの H 鎖、L 鎖がリンカーを介して結合された短鎖抗体を、ファージ表面に発現している GP3 タンパク質との融合タンパク質として発現させるシステムである。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ーを用い、A24/Nef138-10 複合体と特異的に結合する scFv をパニング法 (図 1A) にて濃縮した。まずビオチン化 A24/Nef138-10 複合体と scFv ファージとを混合した後ストレプトアビジン磁気ビーズと反応させた。そ

の後洗浄することによって A24/Nef138-10 複合体と結合しない scFv ファージを除去した後、トリエチルアミンを用いて scFv ファージを溶出した。溶出された scFv ファージを大腸菌へ感染し増殖させた。この操作（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 に特異性の見られた scFv クローンの多様性は *Bst*01 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。

#### <倫理面への配慮>

本研究は、医科学研究所の遺伝子組換え委員会の承認を得ている。倫理審査等には該当しない。

#### C. 研究結果

scFv ファージディスプレイライブラリを用いて A24/Nef138-10 複合体特異的 scFv を発現するファージをパニング法によって増幅培養した。その結果 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(図 1B で 10 クローンの例を示した)。制限酵素 *Bst*01 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<図 2>。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