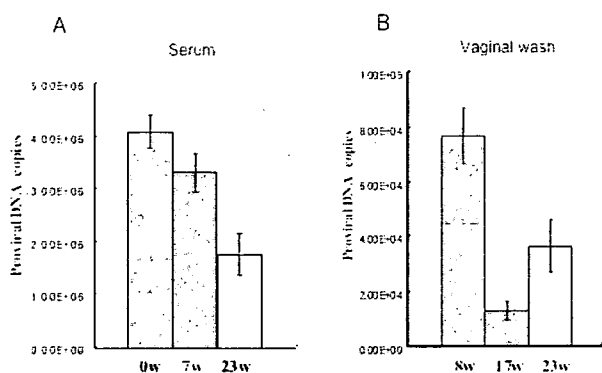


**Fig. 5. Effects of serum and vaginal wash on *SIV<sub>mac239</sub>* infection.** Neutralizing activity of antiserum (A) and vaginal wash (B) against *SIV<sub>mac239</sub>* was evaluated by MAGIC-5 assay. Vaginal wash at 8 weeks was used as a control because anti-*SIV<sub>mac239</sub>* gp140 antibody was not detected by ELISA.



**Fig. 6. Effects of serum and vaginal wash on *SIV<sub>mac239</sub>* infection.** Neutralizing activity of antiserum (A) and vaginal wash (B) was evaluated by post-entry assay. Vaginal wash at 8 weeks was used as a control because anti-*SIV<sub>mac239</sub>* gp140 antibody was not detected by ELISA.

このような特徴を備えた Senju vaccine が免疫原性を有するかを検討するため、アカゲザル 1 頭に Senju vaccine を皮下注射で投与した結果、7 週以降の血清において *SIV<sub>mac239</sub>* gp140 に対する高い抗体価が 20 週以上維持され、膺分泌物では一過性に IgG が検出され、さらに 17 週以降に IgA が検出された。糞便については、10 週にのみ IgA が検出された。血清と及び膺分泌物中の抗体は、

*SIV<sub>mac239</sub>* に対する中和活性を有していた。さらに誘導された抗 gp140 抗体には *SIV<sub>mac239</sub>* 感染を中和する抗体が含まれることが明らかになった。結果を示していないが、CCR5 に対する抗体も誘導されていることを確認している。このことから、Senju vaccine には *SIV<sub>mac239</sub>* gp140 および CCR5 に対する抗体を誘導する免疫原性を有することが確認された。また皮下注射による投与にも関わらず膺分泌物および糞便中に *SIV<sub>mac239</sub>* gp140 に対する IgA を誘導・分泌していたことは、非常に興味深いことである。

Senju vaccine の経口投与の結果、糞便および膺分泌物に *SIV<sub>mac239</sub>* gp140 に対する IgA 抗体が有意に含まれるアカゲザルを確認できた。これは、経口投与されたカプセルが胃を通過し、小腸内で溶解後、Senju vaccine に含まれる TGDK によって特異的に M 細胞に抗原分子が取り込まれ GALT において抗原に対する免疫誘導が起こった結果であると考えられる。本研究において Senju vaccine 10 mg 中に、タンパク質が 183 μg 含まれており、これを被膜 300 mm の腸溶性カプセルに封入し経口投与したのだが、Senju vaccine を皮下注射により投与した場合と比較して抗体価の上昇が小さい結果となった。より強い抗体価、および免疫応答を誘導するための改善策としては、①通常経口ワクチンを開発する場合 1 回で数 mg のタンパク質抗原が要求されるということから、免疫寛容が誘導されない程度に経口投与する抗原量を増やす必要がある。②M 細胞への抗原取り込み機構をより明確にし強固なものにする。③より良質な腸溶性カプセルの選定、などが考えられる。

本研究に用いた HIV-1 defense vaccine (Senju vaccine) は、皮下投与により長期的な中和活性及び抗体価の維持をしていることから、持続性の免疫原性の特性を持つことが示唆される。また粘膜免疫及び全身性免疫の両方を誘導することが

できた。以上のことから Senju vaccine は新世代の AIDS ワクチン創製のための免疫抗原モデルとして有用である考えられる。また、経口 Senju vaccine については、目的とする免疫が安定かつユニバーサルに誘導されるように改良しなければならない。

## E. 結論

本研究で調製した新規経口 HIV-1 defense vaccine (Senju vaccine) は、アカゲザルにおいて、SIV<sub>mac239</sub> Env に対する中和抗体と CCR5 に対する抗体を粘膜および全身に誘導する免疫原性を持つことが明らかになった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 論文発表

- Misumi, S., Takamune, N., and Shoji, S. Immunoreactive cycloimmunogen design based on conformational epitopes derived from human immunodeficiency virus type 1 coreceptors: cyclic dodecapeptides mimic undecapeptidyl arches of extracellular loop-2 in chemokine receptor and inhibit human immunodeficiency virus type 1 infection. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*. 7, 141-152, (2007)
- Takahashi, Y., Misumi, S., Muneoka, A., Masuyama, M., Tokado, H., Fukuzaki, K., Takamune, N., and Shoji, S. Nonhuman primate intestinal villous M-like cells: An effective poliovirus entry site. *Biochem Biophys Res Commun. in press*
- Endo, M., Inatsu, A., Hashimoto, K., Takamune, N., Shoji, S., and Misumi, S. Human immunodeficiency virus-induced apoptosis of human breast cancer cells via CXCR4 is mediated by the viral envelope protein but not require CD4. *Current HIV research in press*
- Takamune, N., Gota, K., Misumi, S., Tanaka, K., Okinaka, S., and Shoji, S. HIV-1 production is specifically associated with human NMT1 long form in human NMT isozymes. *Microbes and Infection, in press*

### 学会発表

- 浦田悟充、三股亮太郎、衛藤あゆみ、三隅将吾、高橋義博、増山光明、戸門洋志、高宗暢暁、庄司省三。HIV-1/AIDS の粘膜ワクチン開発のための基礎研究。第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集 p502 (2007)。
- 高橋義博、宗岡篤信、三隅将吾、戸門洋志、高宗暢暁、庄司省三。ポリオウイルスがパイエル板の胚中心へ集積するには CD155 以外の cofactor が必要なのか？ 第 55 回日本ウイルス学会学術集会プログラム・抄録集 p379 (2007)。
- 松本浩和、中山大介、三股亮太郎、浦田悟充、三隅将吾、高宗暢暁、高橋義博、宗岡篤信、戸門洋志、庄司省三。M cell targeting 分子 TGDK はパイエル板の胚中心に集積する。BMB2007 プログラム p770 (2007)。
- 浦田悟充、三股亮太郎、衛藤あゆみ、三隅将吾、高橋義博、増山光、高宗暢暁、庄司省三。SIV<sub>mac239</sub> gp140 の調製・精製およびワクチンとしての有用性の検討。BMB2007 プログラム p776 (2007)。
- 衛藤あゆみ、三股亮太郎、三隅将吾、高橋義博、増山光明、高宗暢暁、庄司省三。サル केモカインレセプター CCR5 に対する特異的抗体の

誘導. BMB2007 プログラム p778 (2007).

## H. 知的財産の出願・登録状況

1. 腸管免疫賦活剤

国際公開番号: W02007/052641 A1

2. ワクチン剤

特願 2007-076165

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 侵入の動的超分子機構を認識する特異的抗体作製に関する研究

分担研究者 玉村 啓和 東京医科歯科大学生体材料工学研究所教授

研究要旨 これまでエイズワクチン創製の研究であまり取りあげられなかった以下の4種をターゲットとして設定し、有機合成化学を巧みに用い人工抗原分子を作製し、その評価を行っている。1) HIV 侵入の際に最初に結合する宿主細胞のCD4の小分子mimicであるNBD-556とその誘導体を合成し、HIV 侵入の動的超分子機構への影響や中和抗体等との併用の効果を検討した。2) HIV が標的細胞へ侵入するときのHIV表面蛋白gp41の立体構造変化をターゲットとして設定し、gp41のヘリカル領域の断片ペプチド(NおよびC端側)に親水性領域を付与した形で化学合成し、膜融合の中間体構造である3量体を形成するようにアッセムブリーし抗原分子を作製している。N端側のヘリカル領域の断片ペプチドについては実際マウスに免疫し、中和抗体が誘導できていることを確認した。3) 長期未発症のHIV感染者で高く保存されているHIV表面蛋白gp120のCD4 binding/コレセプターbinding領域をターゲットとし、効率的にエピトープを提示できるように構造固定化した環状ペプチドミメティックを作製し、抗体誘導を検討している。また、ファージディスプレイライブラリーからの*in vitro*アフィニティー選択による特異的抗体の探索を行っている。4) 標的細胞側のコレセプターCXCR4の3種の細胞外ループを親水性領域を付与した形で合成し、人工テンプレート上に構築した分子を作製している。

#### A. 研究目的

これまでに他のウイルス感染症と同様に、HIV感染症およびエイズに関してもワクチン創製の研究がかなり精力的に行われてきた。しかし、未だ根本的な治療法の確立には至っていない。そこで、我々はワクチン作製に対して、従来の概念とは全く異なる方向からアプローチすることにした。ターゲットとしては図1に挙げた4種類を考えた。まず、1) HIV-1の外被糖タンパク質gp120が宿主細胞のCD4と、ケモカインレセプターCCR5もしくはCXCR4のいずれかへ結合することにより、HIVは宿主細胞へ侵入する。そこで、CXCR4の小分子mimicであるNBD-556とその誘導体を合成し、HIV侵入の動的超分子機構への影響や中和抗体等との併用の効果を検討した。

2) これまでにあまり研究されていなかったHIVの標的細胞への侵入時の立体構造変化に関わる蛋白gp41を認識する抗体を作製することにした。これまでは、HIV表面蛋白gp120上の表面に露出した領域を抗原としていることが多かった。しかし、ここ数年のHIVの標的細胞への侵入機構、種々の蛋白質が複雑に相互作用する動的超分子機構とよばれるメカニズムが明らかになってきたことにより、立体構造変化を起こす蛋白をターゲットとし、構造変化の中間体を有機化学的に再構成した人工分子を抗原とすることにした。具体的にはgp41の3量体ヘリカル構造である。3) 以前、莫大な数のワクチンを作製したが、成功しなかった原因のひとつとして、gp120のある領域の断片ペプチドを抗原として用いていた

(中和抗体のエピトープはβ-ヘアピンループ構造を取っていることが多い)のために、この断片ペプチドがもとの gp120 上での本来の立体構造を再現できていなかった(もとのヘアピン構造を保持できなかった)ということが考えられる。このことが主たる原因で、効率的に抗体を誘導できなかったかもしれない。そこで本研究では、いままで鎖状ペプチドをベースに抗原として使い、うまく抗体誘導できなかったワクチンを取りあげ、鎖状を環状にし、立体構造を固定化したペプチドミメティックを合成した。具体的には、長期未発症の HIV 感染者の間で、CD4 binding/コレセプター-binding 領域が中和抗体のエピトープとして高く保存されている断片ペプチドを取りあげた。また、この領域はβ-ヘアピンループ構造にあたる領域であり、これまで鎖状のペプチドでは効率的に抗体が誘導できなかったため、β-ヘアピンループ構造を提示できるように環状構造に固定化したペプチドミメティックを合成した。

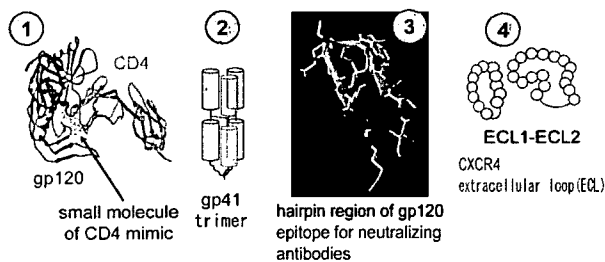


図1 エイズワクチン作製の4種のターゲット

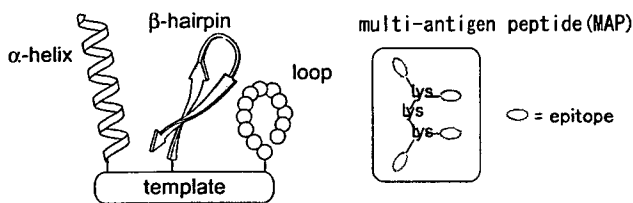


図2 テンプレート上でのペプチドミメティックの構築と MAP 構造による抗原の提示

4) ワクチン作製における常識では、抗原分子のターゲットとしてウイルスの表面蛋白等を基盤とするのが定法であるが、我々のワクチン創製

のターゲットとしては常識にこだわらなかった。すなわち、標的細胞側のコレセプター(第二受容体)にターゲットを設定した。この利点として、レトロウイルスは非常に変異しやすいので、ワクチンによって誘導される抗体は変異してしまったウイルスを効率よく認識することができなくなるが、標的細胞側(宿主ヒト側)を抗原としてワクチンを作製した場合、ホストの方は変異しないと考えられるので、ワクチンが徐々に効かなくなるということがない。しかし、コレセプターの生理的な作用をブロックすることによる副作用の可能性に十分注意しなければいけない。実際、具体例としてコレセプターであるケモカイン受容体 CXCR4 の細胞外ループ(Ec11-Ec13 & N端)を取りあげ、環化&構造固定化したペプチドミメティックを合成し、効率的な抗体誘導をはかることにした。以上これら4種をワクチン創製のターゲットとして目標設定し、図2のようなテンプレート上でのエピトープ領域の構築と multi-antigen peptide (MAP) 構造による抗原の提示などのテクニックを用いた。

B. 研究方法

1) CD4 mimic NBD-556 誘導体の合成と抗 HIV 活性の評価および中和抗体等との併用効果

NBD-556 に関しては分子内に含まれる芳香環(CD4 の Phe43 に対応すると考えられる)部分が gp120 の cavity に相互作用し、さらに芳香環の p-位付近に比較的大きな空間が存在すると推定されるため、芳香環の p-位に種々の置換基を導入した誘導体を合成した(図3)。合成した化合物の各種 HIV 株に対する抗ウイルス活性を CCR5/PM1 細胞を用いて MTT assay で評価した。FACS 解析により抗 V3 抗体(KD-247)や CD4 induced 抗体の envelope への反応性の変化を sCD4 と NBD-556 で比較した。また、JR-FL に対する KD-247 と NBD-556 もしくは sCD4 との併用効果を、CCR5/PM1 細胞を用いて MTT assay で調

べた。

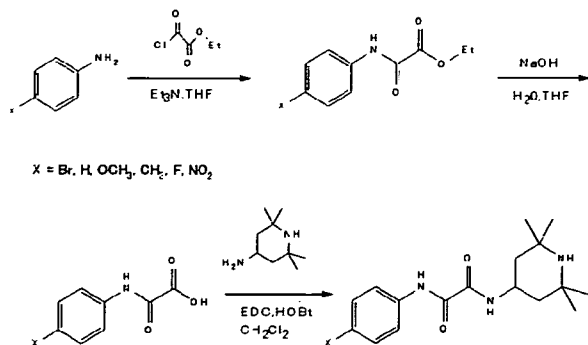


図3 CD4 mimic NBD 誘導体の合成スキーム

2) gp41 のヘリカル領域の合成ペプチド(NおよびC 端側) 3 量体の合成と抗体誘導の検討

前年度より改良した合成スキームにより gp41 の N および C 端側に存在するヘリカル領域のペプチド N36, C34 を 3 量体にアッセンブリするための人工テンプレートを合成した(図 4)。また、別に gp41 の N および C 端側断片(N36/C34)に親水性領域を付加したペプチドを Fmoc 型固相合成法により合成した(図 5)。これを図 4 で合成したテンプレート上に構築し、三量体とし、MAP 等に導入し抗原分子とする。そして、合成した抗原分子を用いてマウスにて抗体誘導を検討する。

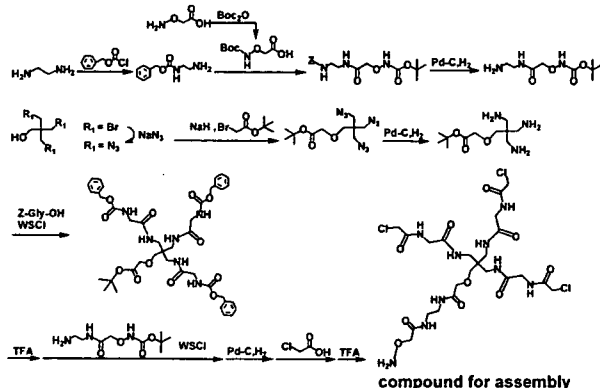


図4 改良した3量体アッセンブリのための人工テンプレートの合成スキーム

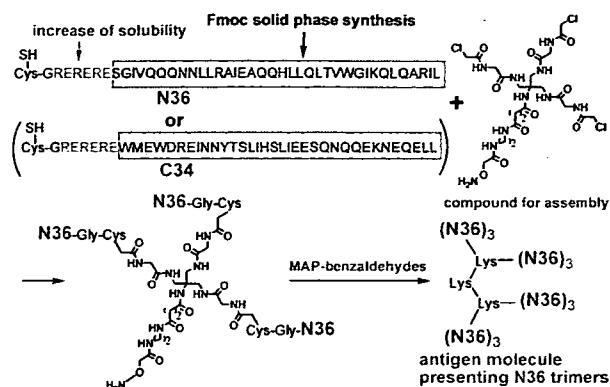


図5 親水性領域を付加した gp41 の N36/C34 の 3 量体を提示する人工抗原分子の合成

3) gp120 の CD4 binding/コレセプター-binding 領域を抗原として抗体誘導の検討

長期未発症の HIV 感染者の間で中和抗体のエピトープとして高く保存されている、gp120 の CD4 binding/コレセプター-binding 領域の断片ペプチドを、環化と構造固定化のコンセプトを用いて、前年度に分子設計し、合成した(図 6)。コントロールとして鎖状ペプチドも合成し、抗原分子を作製している。今年度、マウスおよびウサギを用い、抗体誘導を検討する。さらに、この抗原分子に特異的に結合する抗体を得るため、ファージディスプレイライブラリーから in vitro アフィニティー選択を行う。

linear peptide

cyclic peptide

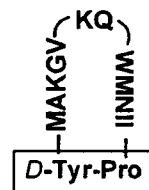


図6 化学合成した gp120 の CD4 binding/コレセプター-binding 領域の鎖状ペプチドとそれを環化した分子構造

4) コレセプター CXCR4 の細胞外ループ (Ecl1-Ecl3 & N 端) を基にした抗原分子作製  
コレセプターであるケモカイン受容体

CXCR4 の細胞外ループ (Ecl1-Ecl3 & N 端) のみを合成し、Ecl1 については環化し、MAP 等に導入する。

前年度の問題点であった水溶性の低さを改善するため、図 7, 8 のように親水性領域 Arg-Glu-Arg-Glu を天然型配列の両端に付与した。また、合成法は 2 種の方法を採用した。一つめの方法は、Fmoc 固相合成法でペプチド鎖を構築し、脱樹脂後、アミド結合により環化し、側鎖の保護基の脱保護をした。生成した環状ペプチドには、導入しておいた Cys のチオール基があり、これを用いて MAP-テンプレートに導入する (図 7)。二つめの方法は、Cys を 2 個導入し、1 個は通常の脱保護条件で切断されないように Acm 基で保護した。N 末端にクロロアセチル基、C 末端に Cys (Trt) を導入する形でペプチド鎖を構築し、脱樹脂と脱保護後、Cys のチオール基とクロロアセチル基の反応により環化し、AgOTf によりもう 1 個の Cys の Acm 基を脱保護し、チオール基が 1 個フリーの形の環状ペプチドを生成する。これを用いて同様に MAP-テンプレートに導入する (図 8)。また、これらの細胞外ループ (Ecl1-Ecl3) & N 端ペプチドを導入するための MAP-benzaldehydes を別途合成する (図 9)。

MAP の各先端のアミノ基にクロロアセチル基を導入し、チオール基を有する環状ペプチドを導入する。

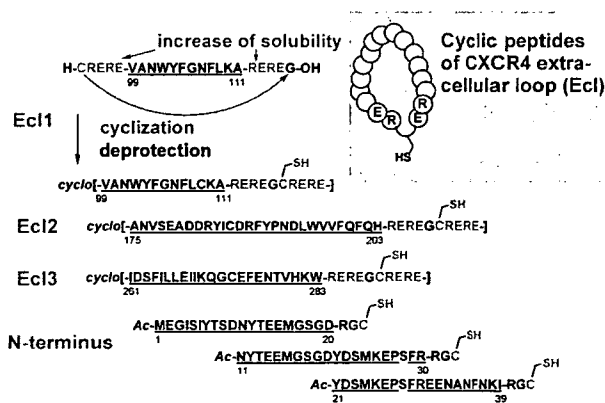


図 7 親水性領域を付加した CXCR4 の細胞外ループ (Ecl1-Ecl3) & N 端ペプチドの合成と環化法 (No. 1)

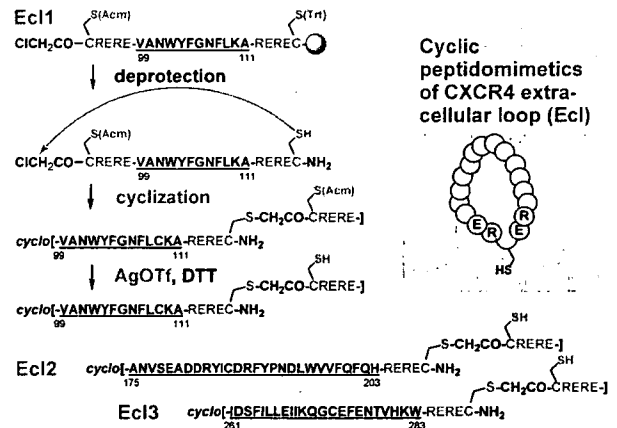


図 8 親水性領域を付加した CXCR4 の細胞外ループ (Ecl1-Ecl3) の合成と環化法 (No. 2)

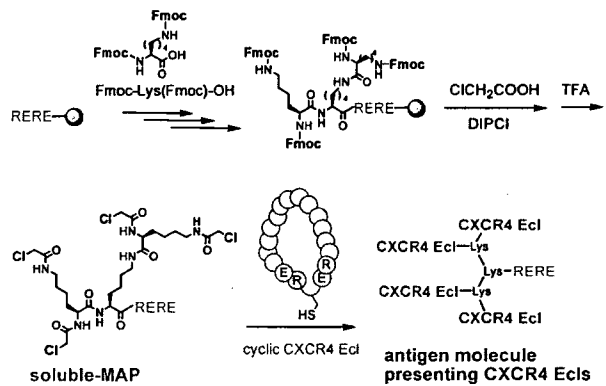


図 9 Ecl1-Ecl3 & N 端ペプチドを提示する人工抗原分子の合成

(倫理面への配慮)

動物実験は、各施設の諸内規や作業方式に従って、動物愛護の精神で動物に与える苦痛の軽減と排除に努めた。

C. 研究結果

1) CD4 mimic NBD-556 誘導体の合成と抗 HIV 活性の評価および中和抗体等との併用効果

化学合成した中で、高活性の誘導体が数個見つかかり、また構造活性相関の情報が得られた (図 10)。各 HIV 株に対して、水素で修飾した (置換基なしの) 化合物 YYA-004(-H) では効果は認めら

れず、それ以外の化合物では、sCD4 の効果とパラレルな挙動を示した。これにより、ベンゼン環のp-位に置換基が必要であることが示唆された。メトキシ基で修飾した化合物 YYA-011(-OCH<sub>3</sub>)も優位な活性が見られなかった。フルオロ基で修飾した化合物 YYA-014(-F)は細胞毒性が低かったが活性も低かった。一方、NBD-556(-Cl), YYA-008(-Br)は高活性であったが毒性も比較的高かった。YYA-021(-CH<sub>3</sub>)は毒性が比較的低く効果的であった。細胞毒性(CC<sub>50</sub>)の結果から、メチル基あるいはフルオロ基で修飾した化合物でさらにベンゼン環以外の部分を修飾した化合物をデザイン、合成できれば、より有用な候補品になる可能性があると考えられた。

結果 (IC<sub>50</sub>: MTT assay)

NBD-	YYA-	X-	MBQ4, Sub B)	89.6(Dual, Sub B)	SF182(R5, Sub B)	TR43(R5, Sub G)	CC <sub>50</sub> (μM)
550	004	H	>100	>100	>100	>100	350
556	-	Cl	5	10	50	>100	170
557	008	Br	4	9	50	>100	150
558	014	F	ND	81	>100	>100	320
559	021	CH <sub>3</sub>	ND	41	>100	>100	210
560	011	OCH <sub>3</sub>	ND	>100	>100	>100	340

Cell: PM1/GCR5 cells  
1.5% DMSO; > 5:20

- ・ H は活性が見られなかった。
- ・ Cl, Br, CH<sub>3</sub> は活性は高かったが、細胞毒性も高かった。
- ・ F は細胞毒性は低かったが、活性も低かった。
- ・ OCH<sub>3</sub> も活性が見られなかった。

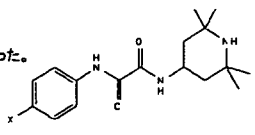


図10 CD4 mimic NBD-556 誘導体の抗 HIV 活性の評価

また、NBD 誘導体の存在下では、非存在下よりも抗 V3 抗体や CD4 induced 抗体の gp120 への反応性が上昇し、sCD4 の存在下と同様の効果が見られた。これにより NBD 誘導体が gp120 のコンフォメーション変化を誘起することが示唆された。また、NBD 誘導体と抗 V3 抗体あるいは CD4 induced 抗体の併用は抗ウイルス活性を増強し、相乗効果を示した。

2) gp41 のヘリカル領域の合成ペプチド(NおよびC 端側)3 量体の合成と抗体誘導の検討

人工テンプレートと親水性領域を付加した gp41 の断片(N および C 端側)N36 peptide (CysGly-ArgGluArgGluArgGlu-N36) と C34 peptide (CysGly-ArgGluArgGluArgGlu-C34)をすでに化学合成し、三量体構築の最適条件を検討中である。MAP に導入した抗原分子(三量体形成は未確認)は、実際マウスで免疫し N36 を認識する抗体が誘導できたことを ELISA で確認した(図 11, 12)。

マウス実験スケジュール

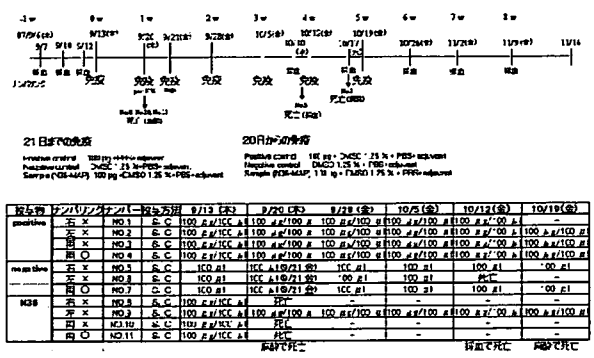


図 11 MAP に導入した抗原分子(N36)のマウスでの免疫スケジュール

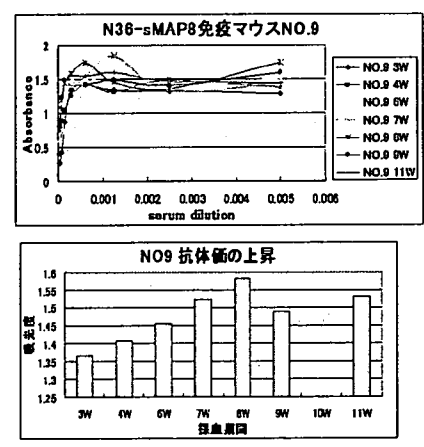


図 12 N36-MAP で免疫したマウスの血清の ELISA

3) gp120 の CD4 binding/コレセプター-binding 領域を抗原として抗体誘導の検討

前年度、gp120 の CD4/コレセプター-binding 領域の環状ペプチドおよび、コントロールとしての鎖状ペプチドを合成した。今年度、それぞれ



のペプチドを用いて、抗体誘導能をマウスで評価したが、採取した血清に中和活性が検出できなかった。現在、ウサギでの免疫を行っている(図 13)。また、同時並行として、この抗原分子に特異的に結合する抗体を得るため、ファージディスプレイライブラリーから *in vitro* アフィニティー選択を行っている。現在、抗原分子である環状ペプチドを固相担体への固定化が終了し、次のステージへ進んでいる(図 14)。

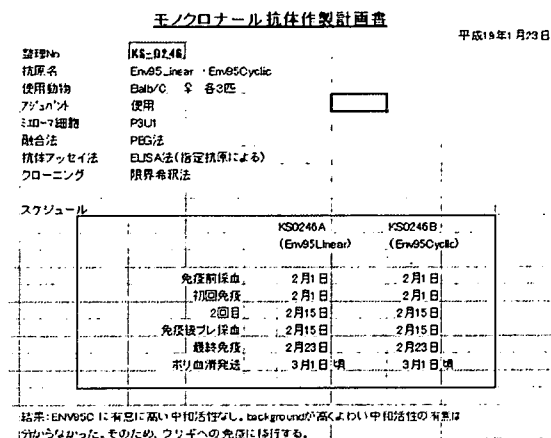


図 13 gp120 の CD4/コレセプター-binding 領域の環状ペプチドのマウスでの免疫結果

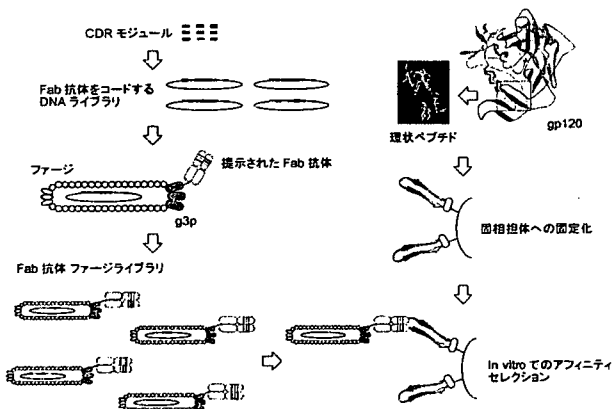


図 14 ファージディスプレイライブラリーによる *in vitro* アフィニティー選択

4) コレセプター CXCR4 の細胞外ループ (Ecl1-Ecl3 & N 端) を基にした抗原分子作製

前年度水溶性に問題点があったので、今年度は親水性領域 Arg-Glu-Arg-Glu を天然型配列

の両端に付与した。研究方法の 4) で述べた、2 種類の合成法を用いて、CXCR4 の細胞外ループを合成し、環化し、エピトープ提示のためのテンプレートへ導入中である。それぞれの方法で合成した Ecl 1 & 2 領域の環化ペプチドの HPLC チャートとマスペクトルを図 15-18 に示した。いずれの場合も、親水性領域 Arg-Glu-Arg-Glu を 2 個付与したことにより、効率よく環化ペプチドを生成した。

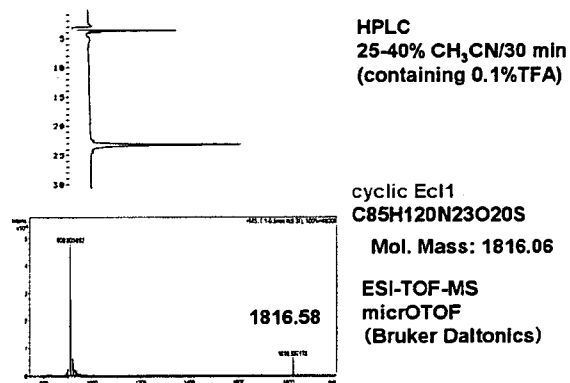


図 15 合成法 (No. 1) による環化 Ecl1 ペプチドの HPLC チャートとマスペクトル

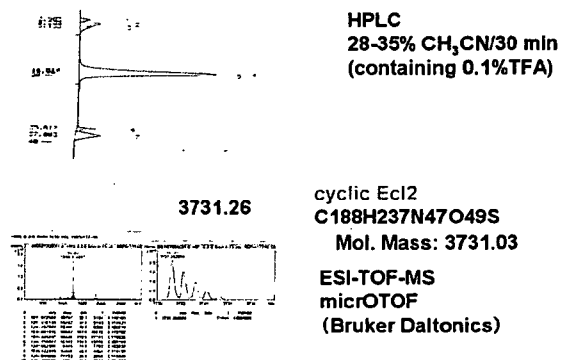


図 16 合成法 (No. 1) による環化 Ecl2 ペプチドの HPLC チャートとマスペクトル

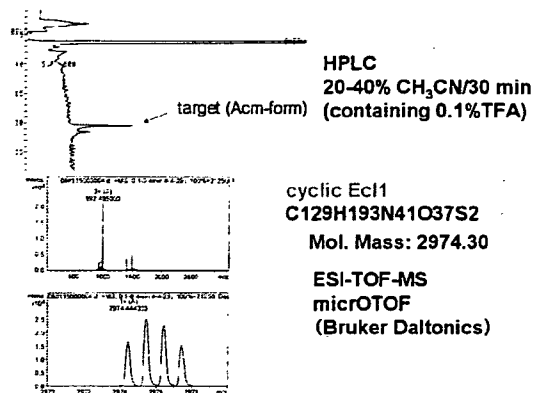


図 17 合成法 (No. 2) による環化 Ecl1 ペプチドの HPLC チャートとマスペクトル

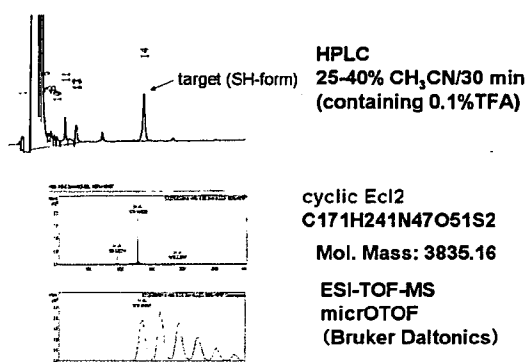


図 18 合成法 (No. 2) による環化 Ecl2 ペプチドの HPLC チャートとマスペクトル

#### D. 考察

本研究でとりあげているエイズワクチン開発の4種のターゲットはどれも非常に革新的であり、斬新なアイデアに基づいている。有機合成・ペプチド合成の巧みなテクニックを用い、抗原分子等を順調に合成できた。実際のマウスやウサギでの免疫による抗体誘導の検討に加え、ファージディスプレイライブラリーを使った抗体のセレクションも行っている。

##### 1) CD4 mimic

CD4 mimic が gp120 のコンフォメーション変化を誘起することが示唆された。また、CD4 mimic と抗 V3 抗体あるいは CD4 induced 抗体

の併用は抗ウイルス活性を増強し、相乗効果を示した。すなわち、gp120 の構造変化を誘起し抗体との反応性を向上させたことは今後の抗体・ワクチン療法において有用な知見を与えると思われる。

##### 2) gp41 のヘリカル領域の合成ペプチド

親水性領域を付加した N36 および C34 の抗原ペプチドを MAP に導入した形で作製している。マウスでの中和抗体誘導も確認しており、今後最適化を検討することにより、有用なワクチンになる可能性がある。

##### 3) gp120 の CD4 binding/コレセプター-binding 領域

構造を固定化した環状抗原ペプチドの抗体誘導能をウサギでの免疫とファージディスプレイライブラリーでのセレクションを用いて検討中である。

##### 4) コレセプター CXCR4 の細胞外ループ (Ecl1-Ecl3 & N 端)

親水性領域を付加することにより、環化を効率的に進行させることができた。すなわち、以前の反応中の沈殿生成等の問題点が改良された。今後、MAP-テンプレートに導入したものをを用いて、マウスに免疫する予定である。

#### E. 結論

4種の抗体誘導のアプローチそれぞれに対して、人工抗原分子を順調に合成できている。1種 (gp41) についてはすでにマウスで有効性を確認しており、もう1種 (gp120) もウサギへの免疫とファージでの抗体作製に取りかかっており、早々に結果が得られると期待される。コレセプターの細胞外ループは効率的な改良法により合成済みであり、今後 MAP に導入後マウスでの評価が可能となる。また、合成した CD4 mimic により、gp120 の構造変化を誘起し抗体との反応性を向上させたことは今後の抗体・ワクチン療法において有用な知見を与えると思われる。

## F. 謝辞

抗体誘導の実験に関して、国立感染症研究所エイズ研究センター、山本直樹センター長、駒野淳主任研究官、東京医科歯科大学ウイルス制御学分野、大庭賢二修士にお世話になりました。抗ウイルス活性の測定実験に関して、熊本大学エイズ学研究センター、吉村和久博士、松下修三教授にお世話になりました。厚く御礼申し上げます。

## G. 研究発表

## 1. 論文発表

1. H. Tamamura et al. *Curr. Med. Chem.*, 14(1), 93-102 (2007)
2. H. Tsutsumi, H. Tamamura & N. Fujii *Lett. Drug Design Discovery*, 4, 20-26 (2007)
3. S. Ueda, H. Tamamura et al. *J. Med. Chem.*, 50(2), 192-198 (2007)
4. H. Tsutsumi, H. Tamamura et al. *Biopolymers: Peptide Science*, 88 (2), 279-289 (2007).
5. S. Kubonishi, H. Tamamura et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 355(4), 970-975 (2007)
6. Y. A. Berchiche, H. Tamamura et al. *J. Biol. Chem. (Commun.)*, 282, 5111-5115 (2007)
7. H. Tamamura, N. Fujii et al. *Tetrahedron*, 63, 9243-9254 (2007)
8. K Kabashima K, H Tamamura et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 361, 1012-1016 (2007)
9. K Kabashima, H Tamamura et al. *Am. J. Pathol.*, 171(4), 1249-1257 (2007)

## 2. 学会発表

1. H Tamamura et al.: Stereoselective synthesis of peptidomimetics based on acid-catalyzed ring-opening of

beta-aziridinyl-alpha,beta-enoates. 20th American Peptide Symposium, Montreal, Canada, Jun26-30, 2007.

2. H Tamamura et al.: Development of chemokine receptor CXCR4 antagonists using bio-mimetic strategy. 20th American Peptide Symposium, Montreal, Canada, Jun26-30, 2007.
3. H Tamamura et al.: Identification of sequential motifs relevant to inhibitory activity against HIV integrase. 4th International Peptide Symposium, Cairns Australia, Oct21-25, 2007.
4. N Ohashi, H Tamamura et al.: Chemical synthesis of a PKC C1b domain by a peptide ligation method and expression of the protein in E. coli and their application. 4th International Peptide Symposium, Cairns, Australia, Oct21-25, 2007.
5. K Yoshimura, H Tamamura et al.: A Potent neutralizing anti-V3 monoclonal antibody, KD-247 shows favorable synergism with other antiretrovirals, sCD4 and CD4 mimic small compound in vitro. 4th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. Sydney, Australia, Jul22-25, 2007.
6. T Aoki, H Tamamura et al.: Rerouting the plasma membrane targeting of HIV-1 and MLV gag by replacing myristoylation signal with membrane proteins. Cold Spring Harbor Laboratory Meetings & Courses Retroviruses. New York, USA, May23, 2007.
7. 玉村啓和, 山田裕子, 田中智博, 堤 浩, 大石真也, 藤井信孝: Development of chemokine receptor CXCR4 antagonists as X4-HIV entry inhibitors. 第8回熊本エイズセミナー. 熊本, 2007年9月13-14日
8. 玉村啓和, 駒野淳, 中原徹, 大橋南美, 田中智博, 柳澤貴之, 堤 浩, 野村涉, 浦野恵美子, 巖馬華, 藤秀義, 濱武牧子, 宮内浩典,

- 森川裕子, 星野忠次, 杉浦互, 山本直樹: HIV インテグラーゼ阻害活性に関連したペプチド配列モチーフの同定. 第44回ペプチド討論会. 富山, 2007年11月8日
9. K Yoshimura, H Tamamura et al.: A potent neutralizing anti-V3 monoclonal antibody, KD-247 shows favorable synergism with other antiretrovirals, sCD4 and CD4 mimic small compound in vitro. 第8回熊本エイズセミナー. 熊本, 2007年9月13-14日
  10. E Urano, H Tamamura et al.: Identification of hexa-peptidic motifs that inhibit the strand transfer activity of HIV-1 integrase pointing a molecular surface which serves as a potent drug target. 第8回熊本エイズセミナー. 熊本, 2007年9月13-14日
  11. 吉村和久, 柴田潤二, 畑田万紀子, 玉村啓和, 山田裕子, 松下修三: CD4 mimic small compound と anti-HIV monoclonal antibody のウイルス中和における相乗効果. 第21回エイズ学会年会. 広島, 2007年11月28-30日
  12. 駒野淳, 浦野恵美子, 巖馬華, 中原徹, 堤浩, 濱武牧子, 宮内浩典, 森川裕子, 玉村啓和, 杉浦互, 山本直樹: HIV-1 インテグラーゼ阻害活性を有する6アミノ酸モチーフの同定とその抗ウイルス活性. 第55回日本ウイルス学会. 札幌, 2007年10月21-23日
  13. 青木徹, 清水佐紀, 浦野恵美子, 二橋悠子, 濱武牧子, 玉村啓和, 寺嶋一夫, 村上努, 山本直樹, 駒野淳: Gagタンパク質の形質膜輸送シグナルがミリスチル化であることのウイルス学的意義について. 第21回日本エイズ学会. 広島, 2007年11月28-30日
  14. 青木徹, 清水佐紀, 浦野恵美子, 二橋悠子, 濱武牧子, 玉村啓和, 寺嶋一夫, 村上努, 山本直樹, 駒野淳: レトロウイルス Gag 細胞膜輸送の Vps 依存的ルート変換がもたらすウイルス複製後期過程における Gag 機能への影響: Gag ミリスチル化のウイルス学的意義. 第30回日本分子生物学会. 横浜, 2007年12月11-15日
  15. 堤 浩, 田中智博, 松本洋典, 玉村啓和: ペプチド-ペプチド間相互作用を利用したタンパク質イメージングツールの開発. 日本薬学会第127年会. 富山, 2007年3月
  16. 堤 浩, 大橋南美, 田部泰章, 玉村啓和: ペプチド-ペプチド間相互作用を利用したタンパク質イメージングツールの開発. 日本化学会第87春季年会. 大阪, 2007年3月25-29日
  17. 松本洋典, 堤 浩, 大橋南美, Blumberg PM, Marquez VE, 玉村啓和:  $\gamma$ -ラクトン環誘導体を基盤とした PK-C 結合活性化化合物の創製. 日本ケミカルバイオロジー研究会第2回年会. 京都, 2007年5月9-10日
  18. 堤 浩, 田部泰章, 田中智博, 玉村啓和: タンパク質蛍光イメージングを志向したロイシンジッパー型タグ-プローブペプチドの開発. 日本ケミカルバイオロジー研究会第2回年会. 京都, 2007年5月9-10日
  19. 堤 浩, 田部泰章, 阿部清一郎, 蓑友明, 大橋南美, 田中智博, 玉村啓和: 蛍光応答能を有するタンパク質イメージングツールの開発. 第22回生体機能関連化学シンポジウム. 仙台, 2007年9月28-29日
  20. 堤 浩, 大橋南美, 田中智博, 田部泰章, 阿部清一郎, 蓑友明, 玉村啓和: 標的タンパク質を特異的に蛍光検出する新規タグ-プローブシステムの開発. 第33回反応と合成の進歩シンポジウム. 長崎, 2007年11月6日
  21. 堤 浩, 田部泰章, 阿部清一郎, 蓑友明, 大橋南美, 田中智博, 野村渉, 玉村啓和: 細胞内タンパク質の蛍光イメージングのためのペプチドツールの開発. 第44回ペプチド討論会. 富山, 2007年11月7-9日

22. H Tsutsumi, H Tamamura et al.: Peptide tools toward fluorescent imaging of proteins. 第4回武田科学振興財団薬化学シンポジウム. 東京, 2007年12月3-4日
23. 野村渉, 玉村啓和, Carlos F. Barbas, III.: 分割型亜鉛フィンガー融合メチル化酵素による in vivo での DNA 配列特異的メチル化. 第22回生体機能関連化学シンポジウム. 仙台, 2007年9月28-29日
24. 野村渉, 玉村啓和, Carlos F. Barbas, III.: 亜鉛フィンガードメイン融合分割型 DNA メチル化酵素による in vivo での配列特異的 DNA メチル化. 第26回メディシナルケミストリーシンポジウム. 神奈川, 2007年11月28-30日
25. W Nomura, H. Tamamura, CF Barbas, III.: Toward heritable targeted gene silencing: site-specific DNA methylation with zinc finger tethered split DNA methylase. 第4回武田科学振興財団薬化学シンポジウム. 東京, 2007年12月3-4日
26. 中原徹, 駒野淳, 大橋南美, 田中智博, 堤浩, 野村渉, 浦野恵美子, 巖馬華, 藤秀義, 濱武牧子, 宮内浩典, 森川裕子, 星野忠次, 杉浦互, 山本直樹, 玉村啓和: HIV インテグラーゼ阻害活性を持ったペプチド配列モチーフ. 第26回メディシナルケミストリーシンポジウム. 神奈川, 2007年11月28-30日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

1. 新規 CXCR4 拮抗剤及びその用途: 国際出願番号 PCT/JP2006/326069
2. 標的物質の検出方法、並びに、これに用いるタグ、DNA、ベクター、プローブ及び検出キット:  
特願 2007-007916

## エイズウイルス感染を抑制する宿主応答の解析

分担研究者 森 一泰 国立感染症研究所 主任研究官

研究要旨 病原性 SIVmac239 を元に 5 カ所の N 型糖鎖の欠失により作製した  $\Delta 5G$  は低病原性、生ワクチンとしての性質を持つ。 $\Delta 5G$  の 179 番目の糖鎖欠失変異を元に戻し、新たに糖鎖欠失変異を導入したウイルス  $\Delta 5Gver1$ ,  $\Delta 5Gver2$  を作製した。これら 3 種のウイルスは細胞性指向性、中和抗体感受性など培養細胞 (in vitro) での性質に違いがあった。アカゲザル感染では中和抗体誘導に違いが見られた。しかし低病原性と SIVmac239 感染を防御する生ワクチンとしての性質は変わらなかった。そこでこれらのウイルス感染が誘導する感染防御についてサブタイプが異なる SIVsmE543 感染に対する防御効果を調べた。個体間に違いが見られたが初期感染はピーク値において  $\log 3$  以下に低下し、慢性感染においてはすべてのサルで血中ウイルス RNA は検出感度以下となった。3 種の糖鎖欠失変異ウイルスが生ワクチンとして誘導する感染防御の機序は多様性に富む HIV-1 感染に対するワクチン研究への応用が期待される。

### A. 研究目的

HIV の世界的流行を止めるには HIV ワクチンによる感染予防が最も有効な方法である。しかし従来のワクチン開発方法が HIV については使えないことが明らかとなった。HIV 感染防御に有効な中和抗体を誘導するワクチン開発の用途はたっていない。中和抗体は主にウイルススパイクに対する抗体であるが、中和抗体エピトープとなる構造がスパイクの表面には少ないためではないかと考えられている。原因としては、スパイクの表面が多く糖鎖により覆い隠されていること、ウイルスレセプターである CCR5 分子との結合部位が通常隠されていることが上げられる。HIV 感染に対し中和抗体は誘導されるが、誘導された抗体により感染が制御されるケースは少ない。中和抗体から逃れるウイルスが容易に出現するためである。HIV は慢性感染しウイルス複製が持続する特徴をもつ。そのため細胞傷害

性 T 細胞 (CTL) が感染制御に重要な役割を担う。CTL を効率良く誘導するプライムブーストワクチンは慢性感染期のウイルス感染の抑制に効果があることは我々を含め複数のグループから報告された (J Virol, 79, 10386, 2005)。しかしプライムブーストワクチンは初期感染の抑制が低く、またワクチンとしての効果は MHC 等の宿主因子に影響されることが明らかとなっている。このようなワクチン研究の結果から、獲得免疫の免疫記憶の誘導だけでは HIV 感染を制御することはできないのではないかと推測されている。我々は生ワクチンが HIV 感染予防に有効であることを、糖鎖欠失変異ウイルスを用いた動物実験から明らかにした (J Virol, 75, 4023, 2001)。しかしワクチン効果の評価がワクチンウイルスと同じウイルス株を用いた実験からなされていることが問題となっている。HIV は高い変異性を持つ。分子疫学研究から主要 HIV-1 (group M) は

少なくとも約 10 種類の clade (サブタイプ) に分類され、サブタイプ内においても高い多様性があることが確認されている。ウイルスの多様性は感染者レベルにおいても確認されている。変異ウイルスが絶えず出現するためである。このような多様性に対する感染抑制効果とその機序が生ワクチン研究の課題となっている。

## B. 研究方法

### アカゲザル

ビルマ、ラオス原産の育成ザル、オス、Bウイルス、SRV, STL, SIV に対する抗体が陰性、培養リンパ球における SIV 増殖性が確認されたサルを用いた。

### 糖鎖欠失変異ウイルス

#### Δ5G

SIVmac239 の gp120 には 23 カ所の N 型結合糖鎖付加部位が存在する。その中で 5 カ所 (アミノ酸残基 79, 147, 179, 460, 479 番) の Asn を Gln に変異し N 型糖鎖を欠失させた変異ウイルス。活性化 T 細胞での増殖性は SIVmac239 と変わらない。アカゲザルを用いた感染実験では SIVmac239 と同じように高い初期感染を起こすが、その後、血中ウイルス量は急速に低下し感染後 20 週以内に測定限界以下となった。Δ5G 感染ザルは SIVmac239 によるチャレンジ感染を強く抑制した。

#### Δ5Gver1, Δ5Gver2

Δ5G を元に 179 の Gln を Asn に復帰変異させ、新たに N 型糖鎖付加部位 : 70 または 377 の Asn を Gln に変異させた 5 糖鎖欠失変異ウイルス。

### チャレンジウイルス

#### SIVmac239

ウイルスストックはウイルス DNA クローンを培養

細胞 (SW480 または COS-1) に transfection し、アカゲザル培養リンパ球を用いて増殖し、感染実験用ウイルスとした。

#### SIVsmE543-3

SIVmac239 とは異なるサブタイプに分類される。NIH, Vanessa Hirsch から供与された。アカゲザル培養リンパ球を用いて増殖し感染実験用ウイルスとした。gag 抗原量については Coulter 社の p27 gag antigen assay kit により、TCID<sub>50</sub> はサル CD4 陽性 T 細胞 (CyfT/HVS) を用いて測定した。

### 血しょうウイルス RNA 量の測定

血しょう中のウイルス RNA は Roche Magnapure compact を用いて精製した。ウイルス RNA 量は SIVmac239 と SIVsmE543 の gag 遺伝子配列が異なる配列を用いて作成したプライマー: (forward primer, reverse primer TaqMan probe) と RT-PCR キット (Quiagen 社) を用いてリアルタイム PCR 法により測定した。

### 中和抗体の測定

SIV の T 細胞での増殖と高感度に測定する方法として、SIV *tat* 遺伝子依存性に発現する分泌型アルカリフォスファターゼ遺伝子を持つ CD4+T 細胞 (SIV-LTR/CEMx174) を用いた。ウイルス (SIVmac239 または SIVsmE543) を感染ザル血しょう (56°C, 30 分間処理) と室温 30 分反応させ、残存する感染性ウイルス量を SIV-LTR/CEMx174 でのウイルス増殖により測定した。

### 倫理への配慮

本研究では動物実験が中心であることから、動物実験方法については倫理上、動物愛護の問題の観点から感染研動物実験委員会が定めたルール、ガイドラインに従った。動物実験開始に際しては事前に感染

研動物実験委員会による審査・承認を受けた。

### C. 研究結果

#### 1カ所の糖鎖欠失部位が異なる3種の5糖鎖欠失変異SIVのin vitroにおける性質

病原性のSIVmac239はHIV-1臨床株と同じように中和抗体誘導が低く中和されにくい。In vitroでの細胞指向性についてはT細胞指向性でマクロファージでの感染性が低い。ところが5カ所のN型糖鎖を欠失した $\Delta 5G$ は中和抗体誘導能がSIVmac239と比べ高い。T細胞での増殖性は変わらないがマクロファージでの感染性がSIVmac239と比べて高い。この二つの性質にはV1/V2の2カ所の糖鎖欠失が関係していることから、171の糖鎖欠失を元にもどし、新たに70番目の糖鎖欠失した $\Delta 5Gver1$ と377番目の糖鎖欠失した $\Delta 5Gver2$ を作成した。新たに作成した変異ウイルスは171の糖鎖の復帰によりマクロファージ指向性は低い。しかし新たな糖鎖欠失により $\Delta 5G$ に対する中和抗体への感受性が異なる。 $\Delta 5Gver1$ は $\Delta 5G$ 中和抗体により中和されなかったが、 $\Delta 5Gver2$ は中和された。

#### 3種の5糖鎖欠失変異SIVのアカゲザルでの感染

アカゲザル3頭にそれぞれ3種類の糖鎖欠失変異ウイルスを感染させた。 $\Delta 5G$ 感染ザルではこれまでの得られた結果と同じように初期感染は感染後2週にピークとなりその後急速に低下し感染後25週以降は検出限界以下となった(図1)。新たな2種類のウイルスを用いた感染でもほぼ同様の結果が得られた。個体間の違いが観察されるが、 $\Delta 5Gver1$ は初期感染のレベルがこの3種類のウイルスの中では最も小さい。逆に $\Delta 5Gver2$ は初期感染のレベルが最も大きい。しかしその違いにも拘わらず感染後25週以降はウイルス感染は、ほぼ検出限界以下に維持された。

これらの結果からin vitroの性質の違いにも拘わらず3種の5糖鎖欠失変異ウイルスは低病原性の性質を持つことが明らかとなった。

#### 3種の5糖鎖欠失変異SIVに対する中和抗体誘導

ウイルススパイクの表面を覆う糖鎖修飾は中和抗体の誘導に影響する。我々は $\Delta 5G$ は糖鎖修飾の減少により中和抗体が誘導が高くなるがそのレベルは小さいことを報告した。新たな3頭への感染実験ではこれまでの結果が再現された(図2)。また、新たな2種類の変異ウイルスと比較すると最も中和抗体誘導が低かった。対照的に $\Delta 5Gver2$ 感染では、最も高い中和抗体が誘導された。3頭とも抗体価1000以上の中和抗体が検出された。 $\Delta 5Gver1$ 感染は両者の中間の中和抗体が誘導された。

#### SIVmac239感染に対する感染防御効果

3種類の5糖鎖欠失変異ウイルスはいずれも慢性感染が宿主に制御される低病原性の性質を示したことから、生ワクチンの性質について調べた。感染後40週に各群1頭へSIVmac239(1000 TCID<sub>50</sub>)を静脈内接種した。ワクチン未接種群では、初期感染後、2頭では高い持続感染、1頭では感染が抑制された(図3)。ところが3種の糖鎖変異ウイルスによる感染を受けた3頭(各群1頭)ではチャレンジ感染後1-2週に非常に低いレベルのウイルスRNAが検出されたが、それ以外はほぼ検出限界以下に感染は抑制された。

#### サブタイプの異なるSIV感染に対するワクチン効果

3種の糖鎖欠失変異ウイルスの極めて高いワクチン効果が確認されたことから、次にSIVmac239とは異なるサブタイプに分類されるSIVsmE543に対する感染抑制効果について検討した。まずワク



チン未接種のアカゲザルに SIVsmE543 を感染させた。3 頭とも SIVmac239 と同様の高い初期感染と持続的な慢性感染が継続し 2 頭は感染後 50 週に発症した (図 4)。1 頭では初期感染後に一時的に感染は抑制されたがその後ウイルス増殖は上昇し持続感染した。ワクチン接種群 (各変異ウイルス感染ザル 2 頭、合計 6 頭) では個体間の違いにも拘わらず強い感染抑制が確認された。感染 2 週をピークとする初期感染において、コントロール群と比較して、2 頭 (#12, #17) で 3 log、2 頭 (#03, #49) では 4 log の抑制、2 頭 (#11, #18) ではウイルス RNA は検出されなかった。ところが 1 頭 (#18) では感染後 10-15 週に一時的なウイルス感染が確認された。しかしすべてのサルで慢性感染期においてウイルス感染は検出限界以下に抑制された。

#### D. 考察

HIV/SIV スパイク表面は糖鎖に覆われており、糖鎖修飾は中和抗体誘導に影響する。3 種の糖鎖欠失変異ウイルス ( $\Delta 5G$ ,  $\Delta 5Gver1$ ,  $\Delta 5Gver2$ ) は培養細胞での中和抗体に対する感受性、宿主感染での中和抗体誘導において異なった。この結果は一カ所の糖鎖修飾の違いがスパイクにおける中和抗体エピトープの形成に質的、量的に影響した結果ではないかと推測される。3 種のウイルスの  $\Delta 5G$  抗体に対する感受性から  $\Delta 5G$  と  $\Delta 5Gver2$  は共通するエピトープを持つと推測される。一方、感染宿主におけるそれぞれのウイルスに対する中和抗体の誘導は  $\Delta 5Gver2 > \Delta 5Gver1 > \Delta 5G$  の順である。この違いは中和抗体エピトープの抗原提示における違い、おそらくスパイク、感染性ウイルスの量的な違いを反映するのではないかと推測される。ウイルスストックの gag タンパク当たりの TCID<sub>50</sub> を見ると  $\Delta 5Gver2 > \Delta 5Gver1 >> \Delta 5G$  であることからウイルスの fitness つまり、機能的なスパイクの量

の違いが中和抗体誘導に影響したと推測される。SIVmac239 は fitness が高いことから抗体誘導における感染性ウイルス量は高いと推測される。 $\Delta 5G$  は糖鎖修飾の減少にも拘わらず中和抗体誘導が低いことから糖鎖修飾の減少と中和抗体誘導の上昇との相関が明白ではなかった。新たに作製された  $\Delta 5Gver2$  は fitness が高く、中和抗体誘導も高かったことから、糖鎖修飾の減少により中和抗体誘導が高くなるという従来の結果と一致した。しかし 3 種のウイルス感染は中和抗体の誘導が異なるにも拘わらず同様の初期感染と感染制御が起こった。この結果は、初期感染制御における中和抗体の役割は小さいとした我々の報告 (J Gen Virol, 89, 554, 2008) と一致した。次に、糖鎖修飾のレベル自身がウイルスの病原性と逆相関の関係にあることが推測された。 $\Delta 5G$  は fitness が SIVmac239 と比べて大きく低下していることから低病原性の原因として fitness の低下の影響は否定できなかった。しかし今回 fitness が高い  $\Delta 5Gver2$ 、 $\Delta 5Gver1$  が  $\Delta 5G$  と同様の低病原性と生ワクチンの性質を持つことが確認された。スパイクにおける糖鎖修飾の量的な違いがウイルスの病原性に影響する可能性が推測された。

3 種の糖鎖欠失変異ウイルスはサブタイプが異なる SIVsmE543 によるチャレンジ感染を強く抑制した。SIVmac239 と SIVsmE543 の Gag, Pol, Env のアミノ酸配列の違いは HIV-1 のサブタイプ間の違いとサブタイプ内の違いの中間に位置する。ウイルスの多様性の上昇は、ウイルスタンパクの特異的配列を認識する細胞性免疫による感染制御から逃れるウイルスが存在する可能性を高める。中和抗体もウイルス特異的な中和エピトープとの相互作用を介してウイルス感染性を失わせることから、ウイルスの多様性は中和抗体による感染制御にとって問題となる。糖鎖欠失変異ウイルス感染が誘導する感染抑制の機序は

今後の課題となるが細胞性免疫、中和抗体以外の宿主応答も関連することが推測される。糖鎖欠失変異ウイルス生ワクチンを用いたサブタイプが異なるウイルス感染に対する抑制は、多様性に富む HIV-1 感染に対するワクチン開発への貢献が期待される。

#### D. 結論

5カ所のN型糖鎖が欠失した3種の変異ウイルスΔ5G, Δ5Gver1, Δ5Gver2は低病原性、生ワクチンの性質、さらにサブタイプが異なる SIVsmE543 に対する感染抑制効果を持つこと、HIV-1 ワクチン研究への貢献が期待された。

#### E. 健康危険情報

特に該当する情報はなかった。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

- ① Sugimoto, C., Nakayama E. E., Shioda T., Villinger, F., Ansari, A.A., Yamamoto N., Suzuki Y., Nagai, Y. and Mori, K. Impact of glycosylation on antigenicity of simian immunodeficiency virus SIV239: induction of rapid V1/V2 specific non-neutralizing antibody and delayed neutralizing antibody following infection with an attenuated deglycosylated Mutant. *J. Gen. Virol.* 89, 554-566, 2008.
- ② Onlamoon, N., Rogers, K., Mayne, A. E., Pattanapanyasat, K., Mori, K., Villinger, F., and Ansari, A.A. Soluble PD-1 rescues the proliferative response of SIV specific CD4 and CD8 T cells during chronic infection. *J. Immunol.* In press.
- ③ Pereira, L.E., Villinger, F., Onlamoon, N., Bryan P., Cardona A., Pattanapanyasat, K., Mori, K.

Hagen S., Picker L., and Ansari, A.A. SIV infection influences the level and function of Tregs in SIV-infected rhesus macaques but not SIV-infected sooty mangabeys. *J. Virol.* 81, 4445-4456, 2007.

- ④ Ansari, A.A., Pereira, L.E. Mayne, A.E., Onlamoon, N., Pattanapanyasat, K., Mori, K. and Villinger, F. The role of disease stage, plasma viral load and regulatory T cells (Tregs) on autoantibody production in SIV-infected non-human primates. *J. Autoimmunity.* 28, 152-159. 2007.
- ⑤ Tanaka-Takahashi Y., Yasunami M., Naruse T., Hinohara K., Matano T., Mori, K., Miyazawa M., Honda M., Yasutomi Y., Nagai Y., Kimura A. Reference strand-mediated conformation analysis (RSCA) – based typing of multiple alleles in the rhesus macaques MHC class I Mamu-A and I Mamu-B loci. *Electrophoresis.* 28, 918-924, 2007.

##### 学会発表

- ① Chie Sugimoto, Yasuo Suzuki, Yoshiyuki Nagai, Vanessa Hirsch, Naoki Yamamoto, Kazuyasu Mori. : Efficacy of deglycosylation mutants derived from SIVmac239 as live attenuated vaccines against SIVsmE543; A heterologous challenge model for vaccine against naturally occurred HIV diversity 25th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS (米国・モントレール 2007. 9. 10-13)
- ② Chie Sugimoto, Yasuko Yokota, Aftab A. Ansari, Francois Villinger, Yoshiyuki Nagai, Naoki Yamamoto, Yasuo Suzuki, Kazuyasu Mori: Pathogenicity of AIDS virus infection viewed from primary infection with deglycosylation mutant SIV. 25th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS. (米国・モントレール 2007. 9. 10-13)

染に対する生ワクチン効果. 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会(広島. 2007. 11. 28-30)

③ 杉本智恵、鈴木康夫、山本直樹、永井美之、森一泰：アカゲザルにおける SIV 初期感染から見たエイズ発症機構. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会(札幌 2007. 10. 21-23)

④ 杉本智恵、山本直樹、永井美之、森一泰：糖鎖欠失 SIV の heterologous SIV チャレンジ感

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案特許 該当なし
3. その他 該当なし

図1. ウイルスRNA量(Plasma viral loads)

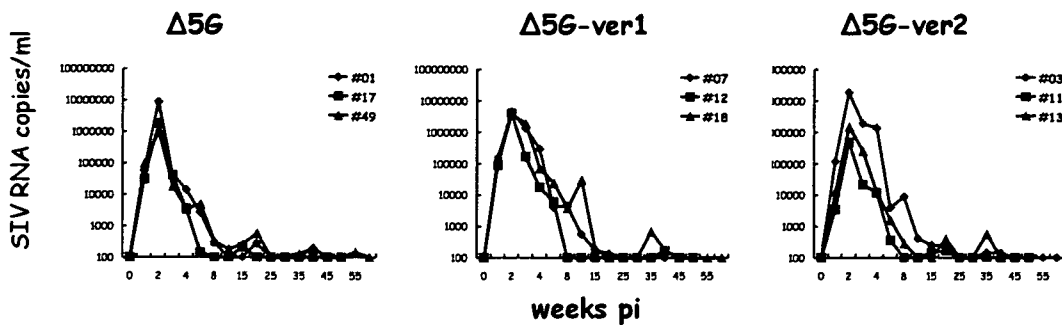


図2. 中和抗体

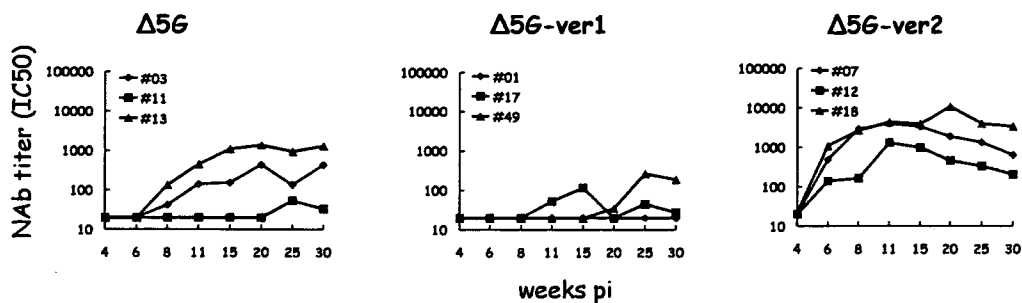


図3. Challenge against SIVmac239

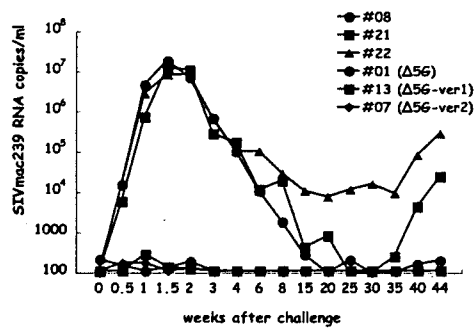


図4. Challenge against SIVsmE543

