

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

HIV 感染予防における経粘膜ワクチンの開発

平成19年度 総括・分担研究報告

主任研究者 廣井 隆親

平成20年（2008年）4月

目 次

I. 総括研究報告

- HIV 感染予防における経粘膜ワクチンの開発 ----- 1
廣井隆親

II. 分担研究報告

1. エピトープ特異性を決定する D 型アミノ酸 ----- 5
と L 型アミノ酸の CTL-TCR による判別
高橋秀実
2. ヒト細胞導入マウスにおける HIV 感染と抗 ----- 11
HIV 免疫応答の解析
横田恭子

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 15

IV. 研究成果の刊行物・別冊 ----- 19

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金 エイズ対策研究事業
総括研究報告書

HIV 感染予防における経粘膜ワクチンの開発

主任研究者 廣井 隆親（東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所 副参事研究員）

分担研究者 高橋 秀実（日本医科大学 教授）

横田 恭子（国立感染症研究所 室長）

研究協力者 形山 和史（東京都臨床医学総合研究所 研究員）

中川 洋子（日本医科大学 助手）

横山 清司（エイズ予防財団 リサーチレジデント）

研究要旨

HIV感染は主に性交渉による生殖器粘膜面を介した感染症である。粘膜感染の防御機構は感染初期の粘膜面でウイルスの粘膜上皮への進入を阻止するか、粘膜上皮に感染したウイルスを直接殺傷することが重要である。これまでのHIV感染防御に関する多くの研究で、中和抗体を利用した体液性免疫の誘導とウイルス特異的な細胞傷害活性を誘導する各々のシステムの有効性が全身免疫を用いた研究で明らかになっている。これまでに我々は研究で粘膜面および全身免疫系に細胞性免疫と体液性免疫の両者を誘導する可能性がある液性因子としてIL-15を見出した。本研究の目的は、本来の生体が有するIL-15とHIV抗原を用いて膣粘膜にHIV特異的な体液性免疫である分泌型IgAと細胞傷害活性を有するCD8⁺T細胞の誘導法を開発する。この場合、膣粘膜にHIV抗原の種類と粘膜免疫アジュバントであるIL-15を発現するベクターを導入したウイルスを用いて免疫誘導を試みる。使用するウイルスと抗原はModified Vaccinia Ankara (MVA)をベクターとして用い、HIV-1のGag, Env, Polをワクチン抗原とし、また当研究室で粘膜アジュバントとしての可能性を見出したヒトIL-15を共発現させるウイルスベースHIVワクチンを開発する。免疫誘導に上記ウイルスを用いる利点としては、MVAに関してヒト上皮細胞に感染はするが増殖しない点でありヒトへの影響の倫理的配慮がなされている。

一方、これらの経粘膜HIVワクチンの開発に伴い、よりヒトに近い検査モデルの開発が望まれている。これまでHIVやSHIVが感染するサルやチンパンジーを用いた研究が主であったが、大型動物を用いることによってコストと時間が多く浪費され経済的ではなかった。そこで我々は、マウスにヒトの免疫系を再構築したhu-SCIDマウスを用いることによりワクチンをヒトの免疫細胞を使って簡便に評価するシステムの構築に着手する。

A. A. 研究目的

HIV 感染は、未だ有効なワクチンが存在しない。本研究は、HIV 感染を最初の感染経路である粘膜面で阻止するために、感染経路粘膜上に細胞性ならびに液性免疫の両方を誘導する新規粘膜ワクチンを開発することを目的としている。また現在マウスに感染する HIV 種が存在しないことより、ヒトの免疫系をマウス内で再構築した Hu-SCID マウスを作成し、開発したワクチンの生体内における感染防御の効果を検討するシステムを検討する。

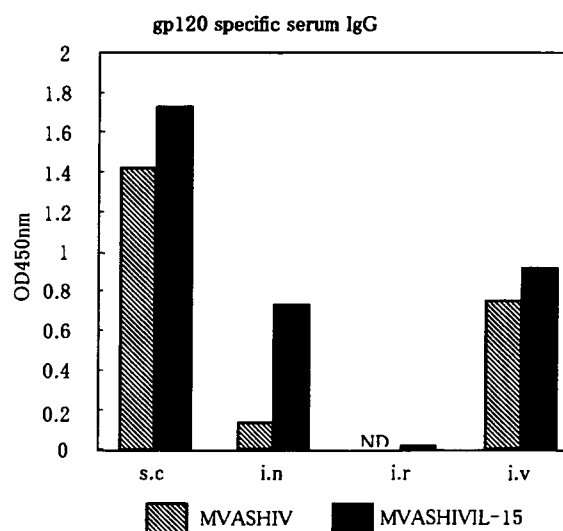
B. B. 研究方法

本研究計画において平成18年度に作製したワクシニアウイルスベクターのうち、Modified Vaccinia Ankara (MVA) に HIV の env 遺伝子、SIV (MAC239) の gag 遺伝子、pol 遺伝子とヒト IL-15 遺伝子を挿入したウイルスベクター MVASHIVIL-15 と、同様の組み合わせのうち IL-15 のみを除去した MVASHIV を BALB/c マウスにそれぞれ、 10^7 pfu 投与感染させた。投与方法は経皮下、経鼻、経膣、経肛門の4種類を検討した。初めの投与一ヶ月後に同量のウイルスを各同じ投与ルートで再投与する。経膣ルートのみ性周期を一定にする為に性ホルモンである progesterone の誘導体を皮下注射した。再投与が2週間後に血清、糞便、膣洗浄液を回収して ELISA により HIV 特異的(gp120 抗原)抗体価を測定した。また、細胞傷害活性の指標として免疫したマウスの末梢血より末梢血単核球 (PBMC) を採取して、env 抗原ペプチドで *in vitro* の培養系にて刺激し、培養上清中の IFN- γ 産生量を測定した。また IL-15 はメモリー CD8T 細胞の長期間の維持に重要な役割を果たすサイトカインであるこれまでの報告を踏まえて、最終免疫後の免疫反応の経時的変化を追跡する。なお、これらのワクチンによりマウスで十分な HIV 特異的免疫反応が誘導可能であれば、ヒト造血幹細胞を NOD/SCID/IL-2R γ chain 欠損マウスに移入してヒトの免疫系を再構築したマウスを作製する(分担研究者:横田恭子)。そのマウスに組換えウイルスワクチンを投与し免疫応答の解析を行い、さらに HIV の感染実験を行うことによりワクチン効果を検討す

る。

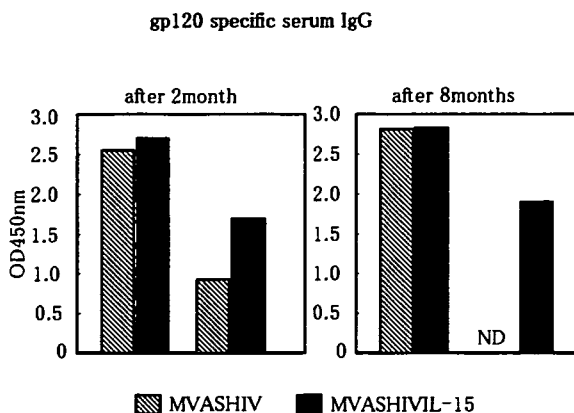
C. C. 結果

平成19年度はワクシニアウイルスの投与方法(回数、量、期間など)を詳細に検討した結果、以下のような方法を標準免疫プロトコールとして採用した。HIV 遺伝子を持つ MVASHIV とさらに MVASHIV にヒト IL-15 遺伝子を追加した MVASHIVIL-15 を BALB/c マウスに 10^7 pfu を投与し、初回投与一ヶ月後に同量のウイルスベクターを同様な方法で追加投与した。投与は経皮下、経鼻、経膣、経肛門の4種類で行った。最終免疫より2週間後に血清、糞便、膣洗浄液を回収して、HIV 特異的抗体を測定した。その結果、各種免疫方法において IL-15 を挿入したワクシニアウイルスを投与した群が有為に env 特異的血清中 IgG、糞便中 IgA、膣洗浄液中 IgG の上昇が確認された。



さらに免疫したマウスより PBMC を単離して env 抗原のペプチドで刺激した結果 IL-15 遺伝子搭載ワクシニアウイルスを免疫した群がより強く IFN- γ を分泌することを認めた。また免疫誘導効率の高いルートは、皮下>経鼻 \approx 経膣>経肛門の順であることが分かった。さらに皮下、経鼻免疫したマウスを最終免疫後、2ヶ月後と8ヶ月後の血清サンプルと膣洗浄液サンプルに含まれる env 抗原特異的 IgG を測定比較したところ MVASHIVIL-15 を経鼻免疫した群では最終免疫後8ヶ月経過しても高いレベルで抗原特異的 IgG が血清中ならびに膣洗浄液中両者に確認され

た。一方、MVASHIVを免疫した群では抗原特異的IgGを検出できなかった。



D. 考察

HIV 粘膜ワクチンの開発において、機能的な粘膜アジュバントは必須であるが、マウスを対象とした実験で使用されている代表的な粘膜アジュバントであるコレラ毒素は、ヒトにおいて神経毒性が報告されているために臨床応用は非常に困難である。その為我々は臨床応用に向けた新規粘膜アジュバントとしてヒト IL-15 の機能解析を行っている。平成20年度のデータより IL-15 は抗原と同時に投与すると全身系、ならびに粘膜系の両方において強いアジュバント活性を示す事が明らかになった。さらに免疫後8ヶ月経過したマウスの抗原特異的 IgG を測定した結果より、IL-15 には CD8T 細胞のメモリー機能を増強するのみならず、抗原特異的抗体産生能を長期間にわたり維持する機能があることが明らかになった。IL-15 がメモリーB 細胞に与える影響については未だ不明であるが、IL-15 がヒトB細胞を増殖させ、さらに B1 細胞に作用するとヘルパーT 細胞との CD40-CD40L の相互作用を介して IgA 抗体産生細胞に分化させるという報告が有る。この事より、IL-15 がメモリーB 細胞の増殖、分化ならびに維持に関わっている可能性がある。以上の結果より IL-15 の影響により全身系ならびに粘膜系において細胞障害活性を持つ T細胞 (CTL) ならびに抗原特異的メモリーB 細胞の増殖と維持の誘導が示唆され、IL-15 が効果的な HIV ワクチンアジュバントとして次年度のヒ

ト化マウスを用いた粘膜ワクチンの開発を強くサポートするものであると考えられた。

D. E. 結論

今回の実験で我々の用いた IL-15 は細胞性 (CD8T 細胞) ならびに液性 (抗原特異的 IgG, IgA) の免疫反応を増強するアジュバントとしての活性を見いだした。平成20年度の結果は IL-15 がワクチン開発において今後ますますその重要性を増す可能性を強く示唆するものである。

F. 論文発表

1. Tamagawa, H., Hiroi, T., Mizushima, T., Ito, T., and Kiyono, H. Therapeutic efficacy of roxithromycin on colitis of interleukin-10 deficient mice. *Inflamm Bowel Dis.* 13:547-56, 2007.
2. Nochi, T., Takagi, H., Yuki, Y., Yang, L., Masumura, T., Mejima, M., Nakanishi, U., Matsumura, A., Uozumi, A., Hiroi, T., Morita, S., Tanaka, K., Takaiwa, F., and Kiyono, H. From the Cover: Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:10986-91, 2007.
3. Mori, A., Ogawa, K., Someya, K., Kunori, Y., Nagakubo, D., Yoshie, O., Kitamura, F., Hiroi, T., and Kaminuma, O. Selective suppression of Th2-mediated airway eosinophil infiltration by low-molecular weight CCR3 antagonists. *Int Immunol.* 19:913-21, 2007.
4. Kaminuma, O., Kitamura, F., Kitamura, N., Hiroi, T., Miyoshi, H., Miyawaki, A. and Miyatake, S. Differential contribution of NFATc2 and NFATc1

to TNF- α gene expression in T cells, *J. Immunol.* 180: 319-326, 2008.

5. 横山清司、鈴木一矢、高岩文雄、廣井隆親: スギ花粉症緩和米による予防効果: アレルギーの臨床, 北隆館, vol. 27, No. 1, 17-23, 2007.
6. 渡邊伸昌、清野宏、廣井隆親: 花粉症対策—米国および日本における現状と将来: 治療学, ライフサイエンス出版, vol. 41, No. 1, 32-36, 2007.
7. 本井祐二、高田和子、平澤正知、廣井隆親: アレルギー疾患のペプチド免疫療法と粘膜トランス、*Annual Review 免疫* 2008, 中外医学社, pp. 122-131, 2007.
8. 形山和史、高田和子、平澤正知、廣井隆親: 経口トランスと小腸由来樹状細胞、臨床免疫・アレルギー科、医歯薬出版 Vol. 48, No. 6, 667-672, 2007.
9. 廣井隆親、鈴木一矢、高岩文雄、清野宏: 花粉症緩和米 *Medical Science Digest*, vol. 33, 1143-1144, 2007.

E. G. 学会発表

1. 廣井隆親: T細胞エピトープ発現スギ花粉症緩和米によるアレルギー症状の緩和、第57回日本アレルギー学会秋季大会、横浜、2007.
2. 山岡和子、三島一彦、西川亮、松谷雅生、秋田朗子、山本行男、廣井隆親: ヒトグリオーマの悪性化に関するチロシンリン酸化蛋白質の検索 第5回日本ヒトプロテオーム機構大会、横浜、2007.
3. 山岡和子、岡山吉道、神沼修、形山和史、森晶夫、廣井隆親: A proteomic approach to study signal transduction of mast cell activation by

Fc ϵ RI aggregation. 第37回日本免疫学会総会、東京、2007.

4. 神沼 修、北村 ふじ子、宮武 昌一郎、巽英樹、根本 莊一、北村紀子、森 晶夫、廣井隆親: T-bet はT細胞の IL-13 産生を遺伝子転写レベルで抑制する. 第57回日本アレルギー学会総会 (横浜)、2007.
5. Kaminuma, O., Kitamura, F., Miyatake, S., Kitamura, N., Mori, A. and Hiroi, T. Incompleteness of Th1/Th2 differentiation in human peripheral T cells. 第37回日本免疫学会総会(東京)、2007.
6. Kayamura, H., Kamada, H., Yoshida, Y., Yoshikawa, T., Katayama, K., Hiroi, T., Tsunoda, S. and Tsutsumi Y. Intranasal immunization with mutant TNF induces antigen specific mucosal and systemic immune responses in mice. 第37回日本免疫学会総会、東京、2007.
7. 神沼 修、森 晶夫、北村紀子、巽 英樹、根本 莊一、北村 ふじ子、宮武 昌一郎、廣井 隆親. ヒト末梢血 T細胞における Th1/Th2 分化の不完全性とその要因. アレルギー・好酸球研究会 2007(東京)、2007.

F. H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

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

エピトープ特異性を決定する D 型アミノ酸と L 型アミノ酸の
CTL-TCR による判別

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 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、維持が重要である。HIV 外被糖蛋白 gp160 に特異的な CTL の認識するエピトープ部分は 10 個のアミノ酸より成るペプチド P18-I10 (aa318-327:RGPGRAFVTI) で、この内 325 番のバリンは T 細胞レセプター (TCR) と相互作用し、抗原特異性の決定に関与する重要な部位である。一方バリンと相互作用する TCR 内の領域及び特異性決定の基となる作用機序については不明である。今回はこの点を明らかにする目的で、325 番のバリンに関し特異性を異にする 2 種の CTL クローンを用い、細胞傷害活性を調べると共に細胞表面上に発現している TCR の構造を決定し、MHC 分子/ペプチド/TCR の 3 分子複合体モデルを作成した。その結果、従来 TCR 上に存在する 3 か所のアミノ酸変異の激しい領域 CDR1、2、3 の内、CDR3 が抗原特異性に関与すると考えられてきたが、バリンと相互作用するのは CDR1 領域であることが判明した。更に、エピトープ中 325 番のアミノ酸が L-バリンか D-バリンかというわずかな構造上の違いを TCR はその CDR1 領域を介して識別することが確認された。今回得られたエピトープ内のアミノ酸変異とこれを認識する TCR 間の相互作用の解析結果は、より高い avidity を持つ有効な CTL を誘導するペプチドワクチンを開発する上で重要な知見を提供するものである。

A. 研究目的

HIV 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、維持が重要である。こうした観点から我々は以前よりマウスの系を用いて HIV 外被糖蛋白 gp160 に特異的な CTL を誘導しこの CTL が認識する gp160 中の最小認識部分 (エピトープ) の同定及び標的細胞傷害機構につきその高い抗原特異性を中心に解析を行ってきた。

HIV gp160 特異的 CTL の認識するエピトープ部分は 10 個のアミノ酸より成るペプチドであるが P18-I10(aa318-327:RGPGRAFVTI)、この内 322 番のアルギニン (R) と 324 番のフェニルアラニン (F) は主たる MHC クラス I 分子との相互作用部位であり、325 番のバリン (V) は T 細胞レセプター (TCR) との相互作用部位である。特に 325 番のバリンは抗原特異性の決定に関与する重要な部位で、この部位を他のアミノ酸に置換すると標的細胞傷害活性が大きく低下することが判明してい

る。一方、バリンと相互作用する T 細胞レセプター (TCR) 中の領域及び相互作用の詳細な機序についてはいまだ明らかになっていない。今回はこの点につき検討する目的で、325 番のバリンに関し特異性を異にする 2 種の CTL を用い、それらの細胞傷害活性を調べると共に細胞表面上に発現している TCR の構造を決定し、ペプチドと TCR 間の相互作用につき解析を行った。こうしたペプチド内のアミノ酸変異とそれを認識する TCR 間の詳細な作用機序の解析は有効なペプチドワクチンの開発上からも重要であると考えられる。

B. 研究方法

1) 我々がすでに確立しているエピトープペプチド P18-I10 特異的 CTL (LINE-IIIB) 及び P18-I10 中 325 番の L-バリンを物理化学的性状が同一で立体構造のみが異なる D-バリンに置換したペプチド I-10(325v) に特異的な CTL [(LINE-IIIB(325D))] を使用した。これら 2 種の CTL より限界希

積法を用いて CTL クローンを樹立した。

2) 誘導した CTL クローン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抗原特異性につき検討を行った。

3) 各クローンより mRNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて TCR α 鎖、 β 鎖の DNA 配列を決定し、これよりアミノ酸配列を決定した。

4) 決定した TCR のアミノ酸配列を基に molecular modeling 法により P18-I10 又は I-10(325v) と MHC クラス I 分子、TCR の 3 分子複合体モデルを作成し、バリンと相互作用する TCR 中の領域を決定した。

C. 研究結果

1) LINE-IIIB 及び LINE-IIIB(325D) よりそれぞれ 2 種ずつのクローンが樹立された (図 1)。これらのクローンはすべて MHC クラス I 分子拘束性、CD8 陽性の conventional な CTL で 325 番のバリンに関し、細胞傷害活性は逆相関の関係を示した。

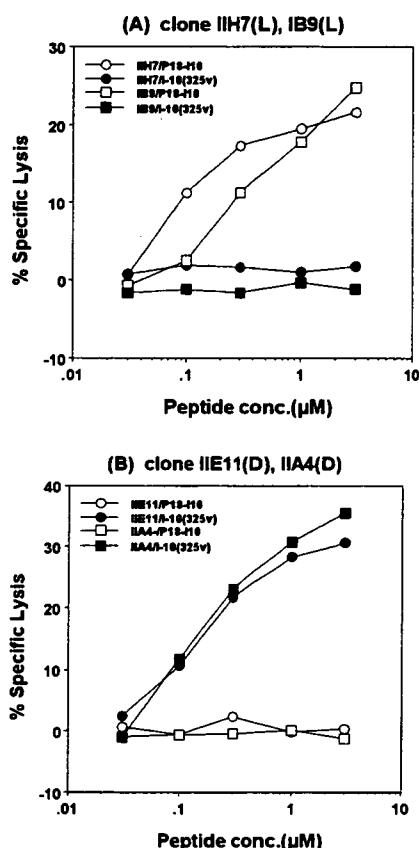


図1 P18-I10 特異的 CTL クローン (IIH7、IB9) 及び I-10(325v) 特異的 CTL クローン (IIE11、IIA4) の細胞傷害活性
2) P18-I10 中 325 番のバリンを他のアミノ酸に

置換した置換ペプチド群を用いて各クローンの特異性を調べたところ、P18-I10 特異的 CTL クローン (IIH7、IB9) は 325 番が L-型の脂肪族側鎖を持つアミノ酸への置換ペプチドに交差傷害性を示したのに対し、I-10(325v) 特異的 CTL クローン (IIE11、IIA4) は D-型の脂肪族側鎖を持つアミノ酸置換ペプチドに交差傷害性を示した (図 2)。

図2 P18-I10 中 325 番のバリンを他のアミノ酸に置換したペプチド群に対する CTL クローンの交差傷害性 (ペプチド中 D-体のアミノ酸は小文字で示した)

3) 各クローンの持つ TCR のアミノ酸配列を調べたところ、 α 鎖の配列は P18-I10 特異的 クローン及び I-10(325v) 特異的クローンの中で類似していたが β 鎖の配列は大きく異なっていた。このことから TCR β 鎖が特異性に関与していることが示唆された (図 3)。

Va chain						
CTL	V gene	V	D	J	J gene	
IIE11 (D)	V α 16	CARR	EAD	STYQLIWSGSPFKLIHKFD	J	α 16BMD42
IIA4 (D)	V α 16	CARR	EAD	STYQLIWSGSPFKLIHKFD	J	α 16BMD42
IIH7 (L)	V α 3	CAL6	ED	STYQLIWSGSPFKLIHKFD	J	α 16BMD42
IB9 (L)	V α 2	CAAS	D	STYQLIWSGSPFKLIHKFD	J	α 16BMD42

V β chain						
CTL	V gene	V	D	J	J gene	
IIE11 (D)	V β .3	CASS	DWGG	STGQLYFGESKLTIVL	J	β .2
IIA4 (D)	V β .3	CASS	DWGG	STGQLYFGESKLTIVL	J	β .2
IIH7 (L)	V β 7	CASS	LVYT	EVFFGKSPALTVV	J	β .1
IB9 (L)	V β 7	CASS	LVYT	EVFFGKSPALTVV	J	β .1

図3 各 CTL クローンの T 細胞レセプター α 鎖及び β 鎖のアミノ酸配列

4) TCR のアミノ酸配列を基に molecular modeling 法を用いて MHC 分子/ペプチド/TCRV β の

3 分子複合体モデルを作成した結果、325 番のバリンと相互作用する TCR 中の領域は従来から T 細胞の抗原特異性に関与すると考えられて来た CDR3 領域ではなく $\nu\beta$ 鎖の CDR1 領域であることが判明した (図 4)。

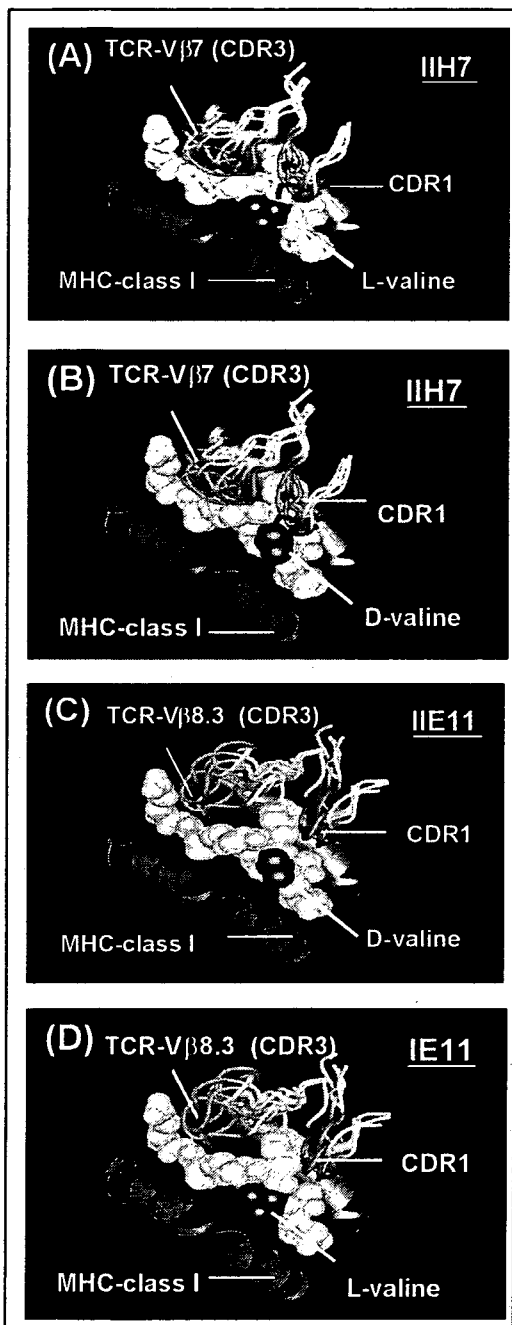


図 4 MHC 分子/ペプチド/TCR-V β の 3 分子複合体モデル

(A) (B): P18-I10 特異的クローン IIH7

(C) (D): I-10(325v) 特異的クローン IIE11

5) このモデル中、P18-I10 特異的クローン IIH7 の持つ TCR $\nu\beta$ 7 は認識できる L-バリンとは相互

作用可能であったが (A)、これを D-バリンに置換すると立体傷害により認識できなくなった (B)。一方、I-10(325v) 特異的クローン IIE11 の TCR $\nu\beta$ 8.3 は D-バリンとは相互作用できるが (C)、L-バリンに置換すると距離が離れ相互作用不可能となった (D)。このことから 325 番のアミノ酸 1 個の違いを TCR は判別しうる事が立体構造上からも確認された。

D. 考察

従来より T 細胞レセプター上に存在する 3 か所のアミノ酸変異の激しい領域 CDR1、CDR2、CDR3 の内、CDR3 が抗原特異性に関与すると考えられてきたが、今回の我々の結果ではエピトープ P18-I10 中、特異性の鍵をにぎるバリンと相互作用するのは CDR1 という特殊な領域であった。又エピトープ中バリン 1 個の L-体と D-体の違いを TCR は CDR1 により区別し認識することが可能である事が立体構造の上からも確認された。

今回解析に用いたエピトープ部分 (P18-I10) は、gp160 に対する主たる中和抗体の認識部位 (PND) と重複しており、又ヘルパー T 細胞のエピトープの一つであることも判明している。更にこのマウスの系を用いて同定されたエピトープはヒトの HLA-A2、A3、A11 など多彩な MHC 分子により提示される CTL エピトープである事も判明しており、種を越えて細胞性免疫の誘導に関与する重要な部位である。従って今回得られたエピトープ内のアミノ酸変異とこれを認識する TCR 間の相互作用の解析結果はペプチドワクチンの開発上、より avidity の高い有効な CTL を誘導する上において重要と考えられる。

E. 結論

抗原特異性の異なる 2 種の CTL クローンをを用いて解析した結果、エピトープペプチド中特異性の鍵を握る 325 番のバリンと相互作用するのは TCR 中の CDR1 であり、この領域で CTL はバリンの構造上の違いを認識することが可能であった。こうしたエピトープ内のアミノ酸変異とこれを認識する TCR 間の相互作用の解析結果はペプチドワクチンの開発上、重要な知見であると考えられる。

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., Koya oyanagi 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：ブラック微生物学（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に対する温病学的治療の意義。
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、渡邊恵理、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、渡邊恵理、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 β -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（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：
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

R5 型の赤色蛍光発現組換え HIV-1 を作製し、X4 型の緑色蛍光発現組換え HIV-1 と同量混在する条件で樹状細胞からヒト CD4 陽性 T 細胞への感染伝播効率を FACS で比較した。樹状細胞での感染は同じでも、CD4 陽性 T 細胞において静止期から活性化に伴って増殖するのは R5 型で、X4 型は高度に活性化された T 細胞でのみ増殖した。このことはヒトで HIV 感染初期に分離されるのが R5 型優位であることと類似し、ヒト化マウスでの HIV-1 感染モデルには R5 型が有用である。

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し、蛍光発現ウイルスを用いてその増殖を解析する。

B. 材料と方法

1. 組換え HIV-1 の作製

EGFP あるいは 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 の下流にそれぞれ挿入した。プラスミドを 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-E 及び NLAD8-D と命名した。

2. 細胞と HIV-1 感染実験

健常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 CD14 陽性細胞と T 細胞に分画した。CD14 陽性細胞より樹状細胞 (DC) を培養分化させ、 10^6 個の細胞あたり NL-E と NLAD8-D をそれぞれ p24 量にして 200 ng-400 ng 相当感染させた。翌日樹状細胞を十分に洗浄し、T 細胞よりエンリッチした CD4 陽性 T 細胞と (99%以上) 共培養した。一部は固層化抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で刺激して活性化 CD4 陽性 T 細胞とした。

(なお、健常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 APC 標識 CD3 で細胞表面を染色して、FACS Calibur で解析した (すべて BD BioScience 社)。CD3 陽性生細胞 (PI 陰性) にゲートをかけた。

C. 研究結果

感染研でヒト化マウスを作製するため、NOD/SCID/Jak-3 KO マウス (熊本大学エイズセンター・岡田誠治教授より供与された) の繁殖を開始した。同時に HIV-1 感染ヒト細胞の FACS 解析に有用な、X4 型緑色蛍光発現および R5 型赤色蛍光発現組換え HIV-1 を作製した。この組換え 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ており、マウス体内で増殖する HIV の型の判別も容易に FACS 解析できる。

ヒトからヒトへの感染初期に分離される HIV-1 はもっぱら R5 型であることが知られている。NOD/SCID/Jak-3 KO マウスに臍帯血由来 CD34 陽性幹細胞を入れたマウスではヒトの単球や樹状細胞、マクロファージも増殖することが明らかにされていることから、これらの抗原提示細胞に感染したウイルスから CD4 陽性 T 細胞への感染伝播を FACS で解析する系を確立するため、*in vitro* の系で検討した。その結果、樹状細胞に X4 型と R5 型 HIV-1 を同量感染させた後、アロ CD4 陽性 T 細胞あるいは抗原と CD4 陽性 T 細胞を共培養して 6-8 日後の感染細胞では

主としてR5型のウイルスが増殖することが明らかとなった(図1b, c)。一方、CD4陽性T細胞をあらかじめ抗CD3/CD28抗体で活性化してから共培養した場合、あるいは活性化が強力な条件ではX4型も増殖し、両方に感染したと思われる細胞も出現していた(図1a)。通常CCR5は一部のT細胞にしか発現しておらず、CXCR4はほぼ全てのT細胞で発現していることを考えると、R5型が初期感染の主体となるのは樹状細胞への感染性の違いではなく、CD4陽性T細胞の活性化のレベルに依存することが示された。

D. 考察

生体内では高度に活性化されたT細胞にHIV-1が直接感染するよりも静止期から抗原刺激を受けて活性化するT細胞に感染するケースが多いと思われる。従って、ヒト化マウスの場合、マウス体内で分化したT細胞が免疫刺激の少ない環境で飼育されるため、X4型よりもR5型HIV-1の増殖が優位となると考えられる。

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できれば、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であろう。

E. 結論

X4とR5型の赤色蛍光発現組換えHIV-1を作製し、緑色蛍光発現組換えHIV-1と組み合わせ、FACSで解析する系を確立した。特にR5型HIV-1はヒト化マウスモデルでのHIV-1感染実験にも有用である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsunetsugu-Yokota, Y., Ishige, M., Murakami, M.: Attenuated *Salmonella* Typhimurium expressing codon-optimized HIV-1 Gag potentiated Gag-specific CD8+ T cell-response in intestinal mucosa. *Aids Res. Hum. Retro.* 23:278-286, 2007
 - 2) Tsunetsugu-Yokota, Y., Ato, M., Takahashi, Y., Hashimoto, S-I., Kaji, T., Kuraoka, M., Yamamoto, K-I., Mitsuki, Y-Y., Yamamoto, T., Ohshima, M., Ohnishi, K., Takemori, T. Formalin-treated UV-inactivated SARS coronavirus vaccine retains its immunogenicity and promotes Th2-type immune responses. *Jap. J. Infect. Dis.*, 60:106-112, 2007
 - 3) Nitahara-Kasahara, Y., Kamata, M., Zhang, X., Muneta, K., Miyamoto, Y., Yamamoto, T., Iijima, S., Yoneda, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., Aida, Y. A novel nuclear import of Vpr promoted by importin α is crucial for HIV-1 replication in macrophage. *J. Virol.* 81:5284-5293, 2007
 - 4) Takayanagi, R., Ohashi, T., Yamashita, E., Kurosaki, Y., Tanaka, K., Hakata, Y., Komoda, Y., Ikeda, S., Tsunetsugu-Yokota, Y., Tanaka, Y., H. Shida. Enhanced replication of human T-cell leukemia virus type 1 in T cells from transgenic rats expressing human CRM1 that is regulated in a natural manner. *J. Virol.*, 81:5908-5918, 2007
 - 5) Takuya, Y and Tsunetsugu-Yokota, Y. Prospects for the therapeutic application of lentivirus-mediated gene therapy to HIV-1 infection. *Curr. Gene Therapy*, in press, 2008
 - 6) 寺原和孝 横田(恒次) 恭子: 粘膜ワクチンの研究開発、ワクチンの展望4、ワクチン感染症のコントロールに向けて、*治療学* 4: 67-70, 2007
- ##### 2. 学会発表
- 1) Tsunetsugu-Yokota, Y. and Yamamoto, T. Immune control of HIV-1 by restoring HIV-specific CD4+ T-cell function: a vaccine strategy against chronic HIV/SIV infection. The 8th Seminar in Kumamoto, Kumamoto, September, 2007
 - 2) 光木裕也、山本拓也、水越文徳、山岡昇司、山本直樹、横田(恒次) 恭子: マクロファージにおけるNef蛋白質発現に伴う自然免疫機構異常に関する解析。第55回ウイルス学会、札幌、平成19年10月。
 - 3) 光木裕也、山本拓也、水越文徳、寺原和孝、稲垣好雄、山岡昇司、山本直樹、横田(恒次) 恭子: EGFPとDsRedを発現するX4型及びR5型HIV-1の作製とその応用。第55回ウイルス学会、札幌、平成19年10月。
 - 4) 石井孝司、横田恭子、長谷川秀樹、永田典代、森川茂、福士秀悦、水谷哲也、鈴木哲郎、田代真人、田口文広: 高度弱毒化ワクチニアウイルス株DIsの組換えSARSワクチンとしての検討。第55回ウイルス学会、札幌、平成19年10月。
 - 5) 山本拓也、光木裕也、水越文徳、小林和夫、井上純一郎、横田(恒次) 恭子: HIV特異的な免疫担当細胞にHIV抵抗性を賦与するRNAi誘導型エイズワクチンの開発。第55回ウイルス学会、札幌、平成19年10月。
 - 6) Yamamoto, T., Tachikawa-Kawana, A., Iwamoto, A., Kobayashi, K., Inoue, J-I, Autran,

B., and Yokota-Tsunetsugu, Y.: Development of a novel IFN-gamma detection system of virus-specific T cell activation by flow cytometry. 第37回免疫学会、東京、平成19年11月。

- 7) Konno, H., Yamamoto, T., Yamazaki, K., Qin J., Ghoda, J., Akiyama, T., Yokota-Tsunetsugu, Y., Inoue, J-I.: ウイルス感染時のインターフェロン及び炎症性サイトカイン産生に対する TRAF6 の役割。第37回免疫学会、東京、平成19年11月。
- 8) 横田(恒次)恭子、山本拓也、Brigitter Autran: HIV 慢性感染期における HIV 特異的 CD4 陽性 T 細胞の機能障害—ワクチン開発に向けての考察。第21回日本エイズ学会、広島、平成19年11月。
- 9) 水越文徳、山本拓也、立川(川名)愛、岩本愛吉、森川裕子、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21回日本エイズ学会、広島、平成19年11月。

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

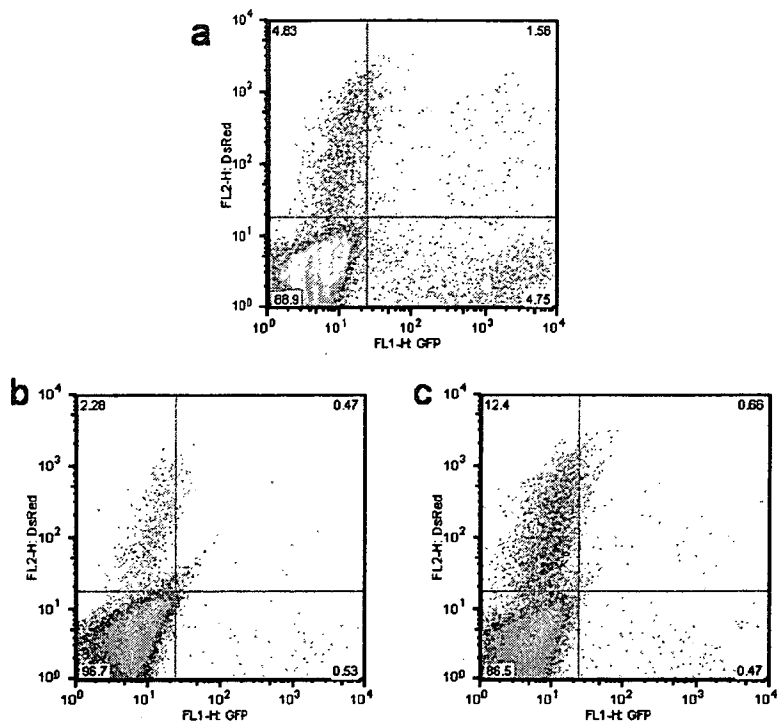


図1 R5型とX4型に感染した樹状細胞からCD4陽性T細胞への感染伝播
 樹状細胞に蛍光を発現する組換えX4型およびR5型HIV-1を同量のp24Gag量感染させて洗浄後培養し、翌日更にトリプシン処理後に洗浄してCD4陽性T細胞と共培養した。ウイルス感染9日後のX4(NL-E)とR5ウイルス(NLAD8-D)のGFPとDsRedの発現をFACSで解析した。aは活性化T細胞、bとcはそれぞれPPD抗原とアロ抗原刺激によるされた静止期T細胞におけるウイルス感染パターンである。

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

廣井隆親

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Tamagawa, H., Hiroi, T., Mizushima, T., Ito, T., Kiyono, H.	Therapeutic efficacy of roxithromycin on colitis of interleukin-10 deficient mice.	Inflamm Bowel Dis.	13	547-556	2007
Nochi, T., Takagi, H., Yuki, Y., Yang, L., Masumura, T., Mejima, M., Nakanishi, U., Matsumura, A., Uozumi, A., Hiroi, T., Morita, S., Tanaka, K., Takaiwa, F., and Kiyono, H.	From the Cover: Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination.	Proc Natl Acad Sci U S A.	104	10986-10991	2007
Mori, A., Ogawa, K., Someya, K., Kunori, Y., Nagakubo, D., Yoshie, O., Kitamura, F., Hiroi, T., and Kaminuma, O.	Selective suppression of Th2-mediated airway eosinophil infiltration by low-molecular weight CCR3 antagonists.	Int Immunol.	19	913-921	2007
Kaminuma, O., Kitamura, F., Kitamura, N., Hiroi, T., Miyoshi, H., Miyawaki, A. and Miyatake, S.	Differential contribution of NFATc2 and NFATc1 to TNF- α gene expression in T cells.	J. Immunol.	180	319-326	2008
横山清司、鈴木一 矢、高岩文雄、 廣井隆親	スギ花粉症緩和米に よる予防効果	アレルギー の臨床	27	17-23	2007
渡邊伸昌、清野宏、 廣井隆親	花粉症対策－米国お よび日本における現 状と将来	治療学	41	32-36	2007
本井祐二、高田和 子、平澤正知、 廣井隆親	アレルギー疾患のペ プチド免疫療法と粘 膜トレランス	Annual Review 免疫 2008		122-131	2007
形山和史、高田和 子、平澤正知、 廣井隆親	経口トレランスと小 腸由来樹状細胞	臨床免疫・ア レルギー科	48	667-672	2007
廣井隆親、鈴木一 矢、高岩文雄、 清野宏	花粉症緩和米	Medical Science Digest	33	1143-1144	2007