

3) IEL における *ex vivo* CTL の誘導には、コレラトキシンアジュバント (CT) の存在が必要である。CT は CTA および CTB サブユニットから構成されているが、CTL の誘導にはこれら CTA, B 双方のサブユニットが必要であり、片方のサブユニットだけでは CTL を誘導することは不可能であった。

以上のような粘膜における抗原特異的 CTL の誘導の結果を踏まえ、*in vivo* における抗腫瘍実験を試みた。腫瘍細胞としては、OVA 発現腫瘍である E.G7-OVA を用い、腫瘍をマウスの皮内または胃壁に移植し、腫瘍が生着した 3 日目のマウスに OVA と CT を経口投与したところ、著しい腫瘍の縮小が認められた。この場合の腫瘍の縮小も、CT アジュバントを用いた時に有意にみられ、抗原と CT を腹腔や皮内から投与したときではなく、経口ルートで投与した場合に著明に腫瘍が制御された (図 3)。

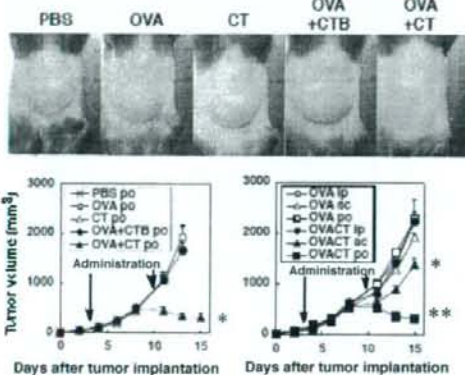


図 3. OVA と CT の経口投与による皮膚に移植した腫瘍成長の抑制

4) OVA と CT の経口投与によって縮小した皮膚および胃の腫瘍組織を免疫組織学的手法で解析したところ、CD8 陽性 T 細胞の著しい浸潤がみられた。更に、この皮膚の腫瘍組織に浸潤しているリンパ球分画を分離し、解析したところ、OVA と CT を経口投与したマウスの腫瘍浸潤細胞においては、OVA 特異的 CTL が顕著にみられ、*ex vivo* で CTL 活性を示した。また、これらのマウスでは、粘膜 IEL に著しい CTL が認められるのが特徴であった (図 4)。

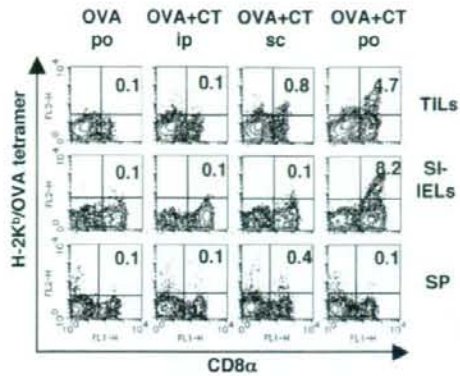


図 4. 縮小した腫瘍における OVA 特異的 CD8 陽性 CTL の浸潤

5) これらの細胞障害活性の高い粘膜 CTL の誘導のメカニズムを探るため、OVA と CT をマウスに経口免疫した場合の、小腸上皮間および脾臓の DC の動態を *ex vivo* で解析した。粘膜 CTL は、OVA と CT 経口投与の 7 日目に誘導のピークを迎えた (図 2) ことより、経口投与 7 日目までの DC について解析を試みた。クラス II MHC 分子による抗原のクロスプレゼンテーションへの関連が示唆されている DEC-205 分子の発現について解析したところ、粘膜 CTL 誘導がピークとなる 7 日目に、小腸上皮間 DC における DEC-205 陽性細胞の有意な増加が見られたが、脾臓 DC における発現に変化は見られなかった (図 5)。

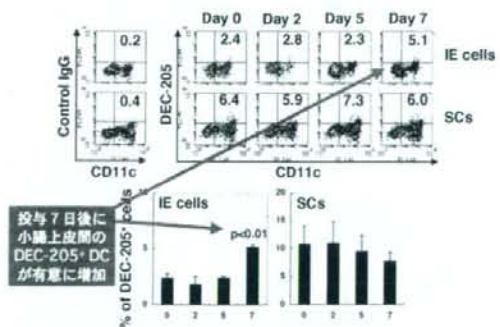


図 5. OVA と CT 経口投与による小腸粘膜における DEC-205 陽性 DC の増加

また、クラスII MHC 分子による抗原提示への関連が報告されている33D1 分子についても調べたところ、7日目に脾臓における33D1 陽性 DC の有意な増加が観察されたが、粘膜 DC における発現変化は観察されなかった。

以上より、抗原と CT アジュバントを経口投与すると、消化管粘膜表面において DEC-205 陽性 DC が増加して抗原がクロスプレゼントされ、粘膜の CD 8 陽性 CTL が誘導される可能性が示唆された。

D. 考察

本研究により、抗原と CT の経口投与により、*ex vivo* 抗原特異的 CTL が、消化管粘膜において著しく誘導されることが示された。この粘膜に誘導された CTL の細胞障害活性は強力であり、胃に移植した腫瘍の成長のみならず、皮膚に移植した腫瘍の成長さえも抑制し、縮小させた。実際、胃や皮膚において縮小した腫瘍組織には、細胞障害活性を有する抗原特異的 CTL が著しく浸潤していた。このことより、今後 HIV 抗原と粘膜アジュバントを経口投与することにより、粘膜を含む体表面組織において、強力な細胞障害活性をもつ CTL が誘導される可能性が示された。現在、gp120 といった HIV 蛋白抗原と粘膜アジュバントを用いて、HIV 特異的 CTL の粘膜における誘導を施行している。

抗原特異的 CTL の誘導には、DC が抗原提示細胞 (APC) として関与することが知られている。APC が蛋白抗原を取り込み処理してペプチド抗原を MHC クラス I 上に提示することはクロスプレゼンテーションと呼ばれ、ウイルス蛋白抗原に対する CTL を誘導するために非常に重要なメカニズムの1つである。最近、DEC-205 陽性 DC が、このクロスプレゼンテーションに関わっていること、一方、蛋白の MHC クラス II への抗原提示には 33D1 陽性 DC が関与することが示された。粘膜 CTL の誘導には、粘膜局所で DC が抗原を取り込み提示していることが考えられるため、今回我々は、抗原経口投与後の粘膜における DC について解析し、脾臓 DC と比較した。その結果、粘膜 CTL の誘導がピークに達する時期と一致して、粘膜における DEC-205 陽性 DC が有意

に増加していたが、脾臓 DEC-205 陽性 DC に変化はみられなかった。また、粘膜における 33D1 陽性 DC の増加も観察されなかった。このことより、強い細胞障害活性を有する抗原特異的粘膜 CTL は、粘膜の DEC-205 陽性 DC によって誘導されている可能性が示唆された。

アジュバントとして用いた CT は、CTA および CTB サブユニットから構成されており、CTA は ADP リボシルトランスフェラーゼ活性を持ち、CTB は細胞表面のモノシアログリコシド (GM1) に結合することが知られている。粘膜 CTL の誘導にはこれら CTA、B、両方のサブユニットが必要であり、どちらか片方のサブユニットだけでは CTL を誘導することは不可能であった。CTA は下痢などの毒性の原因となるため、毒性を持たずに CTL を誘導できるアジュバントの開発も今後の検討課題である。そのためには、DEC-205 陽性 DC における抗原のクロスプレゼンテーションや活性化において、CT の CTA と CTB がどのように関与しているかのメカニズムを明らかにする必要がある。

本研究で明らかになった、抗原の経口投与による強い細胞障害活性を有する粘膜 CTL の誘導は、HIV の経口ワクチンの開発に発展するものと期待している。HIV 特異的 CTL の誘導とその感染制御機能について、現在さらに研究を進めている。

E. 結論

以上、本研究により、抗原と CT 粘膜アジュバントを経口投与することで、著しい細胞障害活性を有する粘膜 CTL が誘導されることが明らかとなった。この誘導された抗原特異的 CTL は、皮膚や粘膜に移植し定着した腫瘍組織に浸潤し、腫瘍の成長を著しく抑制し腫瘍を縮小させた。また、粘膜における抗原特異的 CTL の誘導には、粘膜の局所免疫を Th1 型にシフトさせる作用を有する DEC-205 陽性 DC が関与することが示唆された。以上本研究により、経口ワクチンによる抗有効な HIV 粘膜ワクチンの可能性が明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Wakabayashi, A., Nakagawa Y., Shimizu, M., Moriya, K., Nishiyama, Y., Takahashi, H. Suppression of an already established tumor growing through activated mucosal CTLs induced by oral administration of tumor antigen with cholera toxin. J. Immunol. 180(6):4000-4010, 2008.

2) Fukazawa, Y., Miyake, A., Ibuki, K., Inaba, K., Saito, N., Motohara, M., Horiuchi, R., Himeno, A., Matsuda, K., Matsuyama, M., Takahashi, H., Hayami, M., Igarashi, T., Miura, T. Small intestine CD4+ T cells are profoundly depleted during acute simian-human immunodeficiency virus infection, regardless of viral pathogenicity. J. Virol. 82:6039-6044, 2008.

3) Yamashita, T., Tamura, H., Satoh, C., Shinya, E., Takahashi, H., Chen, L., Kondo, A., Tsuji, T., Dan, K., Ogata, K. Functional B7.2 and B7-H2 molecules on myeloma cells are associated with a growth advantage. Clin. Cancer Res. 15(3): 770-777, 2009.

4) Higuchi, T., Shimizu, M., Owaki, A., Takahashi, M., Shinya, E., Nishimura, T., Takahashi, H. A possible mechanism of intravesical BCG therapy for human bladder carcinoma: involvement of innate effector cells for the inhibition of tumor growth. Cancer Immunol. Immunother. Published on line 13 January, 2009.

5) Yagi, Y., Watanabe, E., Satomi, M., Watari, E., Takeshita, T., Takahashi, H. Inhibition of DC-SIGN-mediated HIV-1 transmission via breast-feeding by IFNs released through TLR3 mediated signaling. J. Infect. Dis., 2009 (submitting).

6) Moriya, K., Wakabayashi, A., Shimizu, M., Tamura, H., Dan, K., Takahashi, H. Selective stimulation of DEC-205-positive dendritic cells in vivo results in the suppression of already established tumors and their metastasis in 33D1-positive dendritic cell-depleted mice. Cancer Res., 2009 (submitting).

7) 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、49(2):373-380, 2008.

8) 高橋秀実：HIV に対する防御・細胞性免疫の役割、治療、42(5):72-76, 2008.

9) 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、18(5):45-51, 2008

10) 若林あや子、高橋秀実：感染症と栄養・機能性食品、日本機能性食品学会誌、4(6):373-380, 2008.

11) 高橋秀実：HIV：ヒト免疫不全ウイルス感染と樹状細胞、実験医学 26(20):157-163, 2008.

12) 高橋秀実：日本医科大学微生物学・免疫学講座、ウイルス 58(2):232-234, 2008.

13) 高橋秀実：漢方薬の解表作用：細胞膜上に局在化した脂質の融解と再分配の誘発。漢方医学, 33(1):285-290, 2009.

14) 高橋秀実：BCGによる自然免疫の活性化。泌尿器外科, 2009 (印刷中)

15) 高橋秀実：細胞制免疫 (CTL) の誘導と樹状細胞。臨床粘膜免疫学, 2009 (印刷中)。

2. 学会発表

1) 高橋秀実：アレルギー疾患誘発における新たなメカニズム
第32回日本小児東洋医学会学術集会。
2008年4月26日(東京)。

2) Takahashi H: Inhibition of DC-SIGN-mediated HIV-1 transmission via breast-feeding by IFN- β released through TLR3 mediated signaling. Japan-US Cooperative Medical Science Program: The 21st Joint Scientific Meeting of AIDS Panels. September 13-14, 2008 (Tokyo, Japan).

3) 樋口智江、清水真澄、野呂瀬嘉彦、近藤幸尋、西村泰治、高橋秀実：BCG膀胱注入療法におけるサイトカイン、自然免疫を中心とする作用機序の考察
第96回日本泌尿器科学会総会
2008年4月27日(横浜)

4) 高橋秀実：BCG膀胱内注入療法と自然免疫
第96回日本泌尿器科学会総会
2008年4月27日(横浜)

5) 高橋秀実：エイズってどんな病気？
免疫不思議未来 2008
2008年5月3日(東京)

6) 高橋秀実：漢方薬の効果に関する免疫学的な考察。

第7回お茶の水東洋医学フォーラム
2008年6月11日(東京)

7) 高橋秀実：自然免疫システムと生薬成分：作用解明における新たな視点。

第8回日本臨床中医学学会学術大会
2008年9月27日(大宮)。

8) 中塚雄久、高橋秀実、坂本長逸：RivavirinによるT-Helper 1/2細胞バランス調節の免疫学的機序と慢性C型肝炎に対するInterferon治療効果の関連

第12回日本肝臓学会大会(シンポジウム)
2008年10月1-4日(東京)。

9) 高橋めぐみ、渡邊恵理、渡理英二、高橋秀実：脂質代謝阻害剤etomoxirのSIV及びその宿主細胞に及ぼす影響。

第56回日本ウイルス学会学術集会。
2008年10月26-28日(岡山)。

10) 高橋秀実：BCGによる自然免疫活性化。

第1回BCG注入療法研究会
2008年11月21日(東京)。

11) 新谷英滋、大脇敦子、清水真澄、渡邊恵理、松村次郎、八木幸恵、高久千鶴乃、高橋秀実：Down-regulation of CD1 lipid/glycolipid antigen presentation by HIV-1 Nef in immature dendritic cells.

第22回日本エイズ学会学術集会
2008年11月26-28日(大阪)。

12) 高久千鶴乃、渡邊恵理、大脇敦子、清水真澄、松村次郎、渡理英二、新谷英滋、高橋秀実：樹状細胞とNKT細胞の相互作用によるHIV-1感染拡大の可能性。

第22回日本エイズ学会学術集会
2008年11月26-28日(大阪)。

13) 松村次郎、大脇敦子、清水真澄、近江恭子、秋山純一、本田元人、菊池嘉、新谷英滋、岡慎一、高橋秀実：HIV患者の腸管粘膜における感染細胞とプロウイルスDNAの検索。

第22回日本エイズ学会学術集会
2008年11月26-28日(大阪)。

14) Higuchi T, Shimizu M, Owaki A, Mayumi N, Ohmi K, Takahashi H: Possible involvement of innate alert cells activated by the live BCG-infected DCs for intravesical BCG therapy.

第38回日本免疫学会総会
2008年12月1-3日(京都)。

15) Yagi Y, Watanabe E, Satomi M, Watari E, Takeshita T, Takahashi H: Inhibition of DC-SIGN-mediated HIV-1 transmission via breast-feeding by IFN- β .

第38回日本免疫学会総会
2008年12月1-3日(京都)。

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

第38回日本免疫学会総会
2008年12月1-3日(京都)。

17) Shinya E, Owaki A, Shimizu M, Watanabe E, Takaku C, Watari E, Takahashi H.: A quick and easy method of laboratory-scale production for multimeric human GM-CSF towards PBMC-derived DCs.

第38回日本免疫学会総会
2008年12月1-3日(京都)。

18) Katakura T, Nakatsuka K, Shimizu M, Atsukawa M, Harimoto H, Tamura H, Takahashi H, Sakamoto C: Ribavirin interfered conversion of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T-helper cells into CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T-regulatory cells in an Interleukin 10-dependent manner.

第38回日本免疫学会総会
2008年12月1-3日(京都)。

19) Wakabayashi A, Moriya K, Harimoto K, Watari E, Takahashi H: Enhancement of expression of DEC-205 and co-stimulatory molecules in intraepithelial DCs after oral administration of an antigen and its involvement in mucosal CTL induction.

第38回日本免疫学会総会
2008年12月1-3日(京都)。

20) Kobayashi F, Watanabe E, Takeuchi H, Nakagawa Y, Takahashi H: A role of TLR2 in the activation of B-1 cells to produce autoantibodies by Helicobacter pylori urease.

第38回日本免疫学会総会
2008年12月1-3日(京都)。

21) Takaku S, Terabe M, Ambrosino E, Peng J, Takahashi H, Berzofsky J: Blockade of TGF- β enhances tumor vaccine efficacy independent of CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells, NKT cells, IL-13, and IL4R-STAT-6 immunoregulatory pathway.

第38回日本免疫学会総会
2008年12月1-3日(京都)。

22) Negishi Y, Inagaki S, Kumagai Y, Takeshita T, Takahashi H: Analysis of dendritic cell in pregnant mice.

第 38 回日本免疫学会総会
2008 年 12 月 1-3 日 (京都) .

23) Nakagawa Y, Shimizu M, Matsumura J, Norose Y, Takahashi M, Takahashi H: Rapid loss of CD8+ HIV-1 gp160-specific murine CTLs by free antigenic peptide in vivo was mediated through apoptosis.

第 38 回日本免疫学会総会
2008 年 12 月 1-3 日 (京都) .

24) 高橋秀実：自然免疫と東洋医学

第 8 回大阪漢方研究会 (特別講演)

2009 年 2 月 21 日 (大阪) .

G. 知的財産権の出願・登録状況

本年度は特にございません。

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: 国際医学協力研究事業)
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

研究分担者 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

我々のグループは、新規開発中の HIV-1 逆転写酵素阻害剤(RTI)である 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine の抗 HIV 活性について、NOG-SCID マウスや SIV 感染サルを用いて評価を行った。更に HIV-1 の細胞侵入時にコレセプターとして機能する CCR5 の微細構造学的解析系の確立、また 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・同定を続けている。また我々は 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プロテアーゼ阻害剤(PIs)の開発を米国の研究グループと共同で続けており、新規の HIV-1 PI, GRL-02031 を開発、本剤における抗 HIV-1 活性発揮の機序や耐性獲得の機序について詳細な検討を行った。

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(RTI)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く、しかし、HIV-1 が RTIs と PIs の両剤に対して耐性を獲得し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発揮し、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く、発現しても他薬剤との交差耐性を有しない新規の PIs や RTI、また新しい機序から 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) 化合物の抗 HIV-1 活性評価: 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: 新規に同定された化合物がウイルス、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 効果をもたらすかについて解析を進める。この研究には多数の HIV-1 クロウンの作成・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-3130 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。新規の化合物に対して試験管内で耐性 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・遺伝子の解析や 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) 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、各種顕微鏡を用いた細胞表面 CCR5 の局在性・動態解析も行っている。

5) HIV-1 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-1 クローンと FRET (fluorescence resonance emission transfer) の系を用いて、HIV-1 PR dimerization 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。

(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

新規に開発中の HIV-1 RTI である 4'-Ethinyl-2-Fluoro-2'-Deoxyadenosine (EFdA) 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 (Nakata & Mitsuya *et al*, *Antimicrob Agents Chemother*. 51: 2701-2708, 2007)、EFdA の高い抗 HIV-1 活性を NOG-SCID マウスで証明、更に SIV 感染サルでの実験を進め (米国 Pittsburgh University のグループとの共同研究)、末期 SIV 感染サルで高い抗 SIV 活性を確認、また長期毒性についても検討、サルでの安全性が確認された (投稿準備中)。今後も EFdA の臨床開発へ向けた努力を米国のグループと共同で展開していく予定であり、極めて佳良な準備的データを得ている。

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: Aplaviroc (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。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 感染と CCR5 の生理作用に重要な構造の解析などを既に報告している (Maeda & Mitsuya *et al*, *J Mol Biol*. 381:956-974, 2008)。我々はケモカイン受容体阻害剤開発研究の過程で、CCR5 阻害剤分子が細胞表面の CCR5 の全てに結合しなくても HIV-1 感染がほぼ完

全に抑制されるという事象を見いだした。これに類似するデータとして、細胞表面に HIV-1 被感染性の無い変異 CCR5 が一部含まれるだけで HIV-1 感染性が著明に失われることを明らかにしており、これは HIV-1 と細胞の接着・融合の過程で形成される HIV-1 エンベロープ・CD4・CCR5 複合体が正常に形成されないと HIV の侵入・感染が成立しない、という機序を示唆しているものと思われる (Maeda, Nakata & Mitsuya, 投稿準備中)。一方で結晶解析・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、現在ではこのモデルを応用して CCR5 結合能のある新規の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・同定にも成功している (Yin, Maeda & Mitsuya, 投稿準備中)。今後これらの知見を統合・発展させ、HIV-1 粒子が細胞へ侵入するのに必要な HIV-1 エンベロープ・CD4・CCR5 の量的解析とこれらの結合モデル作成を進めると同時に詳細な CCR5 の微細構造解析を進め、より強力かつ効果的に HIV-1 感染を阻害する低分子化合物の開発を続けていく。

細胞表面の HIV-1 受容体と HIV-1 エンベロープの相互作用と HIV-1 感染の関連をみる手法として、各種画像解析も行っている。具体的には電子顕微鏡・蛍光/共焦点顕微鏡を用いた細胞表面の HIV-1 受容体の局在性・動態解析の手法を確立し、ウイルス接着時のこれらの分子動態を解明することを目標とする。我々は既にレポータータンパク (YFP) を結合させた CCR5 のレーザー顕微鏡での解析により、細胞表面の CCR5 は非常に流動性に富むこと (Nakata & Mitsuya, 投稿準備中)、電子顕微鏡での解析により通常の状態 (HIV-1 感染に関与していない) での CCR5 は細胞表面にクラスターを形成して存在することを明らかにしている。これらの基礎データ・手法を元にウイルス感染時の各タンパク (エンベロープ・受容体) の動態解析の系の樹立を図る。

また、我々は広いスペクトラムの薬剤耐性株に高い活性を発揮する PI, TMC114/darunavir (Koh & Mitsuya *et al*, *Antimicrob Agents Chemother*. 47: 3123-3129, 2003) を米国 Purdue University の Dr. Ghosh グループ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、PrezistaTM として本邦でも臨床に供されることとなった。さらに我々のグループは試験管内における DRV の研究を続けており、複数の多剤耐性臨床分離 HIV-1 混合株を用いた耐性誘導実験において、複数の PI 耐性変異体の重感染と遺伝子相同組み換えが起こることで、HIV-1 が DRV に

対する高度耐性を獲得する可能性があることを見出した(Koh, & Mitsuya *et al.*, 投稿準備中)。最近では、DRV とは異なる基本骨格である cyclopentanyl-tetrahydrofuran (Cp-THF)を有し、多剤耐性臨床分離 HIV-1 株に対して、野生株と同等(EC_{50} 値で2倍以内)の高い活性を発揮する新規 PI, GRL-02031 を開発(Koh, Deb & Mitsuya *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother.* 53: 997-1006, 2009)、結晶構造解析を用いた分子モデリングにて本剤が HIV-1 PR の活性中心部位に2つの異なる結合様式(bimodal binding mode)で結合することを明らかとし、このことが本剤の薬剤耐性 HIV に対して高い活性を発揮する機序の一因と考えられた。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ウイルス学的・構造学的検討も進めており、APV で耐性誘導した HIV-1 において、PR 領域への APV 耐性関連変異に加え Gag 領域の非開裂部位にアミノ酸変異の蓄積を認め、これら Gag 領域のアミノ酸変異の存在は virus の fitness を改善することにより APV に対する早期の耐性獲得に関与するが、他の PIs に対しては耐性発現が遅延するという異なった影響を及ぼす事を報告した(Aoki & Mitsuya *et al.*, *J Virol.* 2009, accepted for publication.)。

D. 考察

これら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 RTIs, PIs の開発を米国グループとの共同研究で継続している。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. Aoki M, David JV, Koh Y, Aoki-Ogata H, Miyakawa T, Yoshimura K, Maeda K, and

- Mitsuya H. (2009) Non-cleavage Site Gag Mutations in Amprenavir-resistant HIV-1 Predispose HIV-1 to Rapid Acquisition of Amprenavir Resistance But Delays Development of Resistance to Other Protease Inhibitors. *J Virol.* accepted for publication.
2. Koh Y, Das D, Leschenko S, Nakata H, Ogata-Aoki H, Amano M, Nakayama M, Ghosh AK and Mitsuya H. (2009) GRL-02031: A Novel Nonpeptidic Protease Inhibitor (PI) Containing A Stereochemically Defined Fused Cyclopentanyltetrahydrofuran (Cp-THF) Potent Against Multi-PI-Resistant HIV-1 In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 53: 997-1006.
3. Ghosh AK, Chapsal BD, Baldrige A, Ide K, Koh Y and Mitsuya H. (2008) Design and Synthesis of Stereochemically Defined Novel Spirocyclic P2-Ligands for HIV-1 Protease Inhibitors. *Org Lett.* 10: 5135-8.
4. Ghosh AK, Gemma S, Takayama J, Baldrige A, Leshchenko-Yashchuk S, Miller HB, Wang YF, Kovalevsky AY, Koh Y, Weber IT and Mitsuya H. (2008) Potent HIV-1 protease inhibitors incorporating meso-bicyclic urethanes as P2-ligands: structure-based design, synthesis, biological evaluation and protein-ligand X-ray studies. *Org Biomol Chem.* 6: 3703-13.
5. Ghosh AK, Gemma S, Baldrige A, Wang YF, Kovalevsky AY, Koh Y, Weber IT and Mitsuya H. (2008) Flexible cyclic ethers/ polyethers as novel P2-ligands for HIV-1 protease inhibitors: design, synthesis, biological evaluation, and protein-ligand X-ray studies. *J Med Chem.* 51: 6021-33.
6. Maeda K, Das D, Yin PD, Tsuchiya K, Ogata-Aoki H, Nakata H, Norman RB, Hackney LA, Takaoka Y and Mitsuya H. (2008) Involvement of the second extracellular loop and transmembrane residues of CCR5 in inhibitor binding and HIV-1 fusion: insights into the mechanism of allosteric inhibition. *J Mol Biol.* 381: 956-74.
7. Kawamoto A, Kodama E, Sarafianos SG, Sakagami Y, Kohgo S, Kitano K, Ashida N, Iwai Y, Hayakawa H, Nakata H, Mitsuya H, Arnold E, Matsuoka M. (2008) 2'-deoxy-4'-C-ethynyl-2-halo-adenosines active against drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 variants. *Int J Biochem Cell Biol.*

40:2410-20.

8. Nakata H, Steinberg SM, Koh Y, Maeda K, Takaoka Y, Tamamura H, Fujii N and Mitsuya H. (2008) Potent synergistic anti-human immunodeficiency virus (HIV) effects using combinations of the CCR5 inhibitor aplaviroc with other anti-HIV drugs. *Antimicrob Agents Chemother*. 52: 2111-9.
 9. Mitsuya H, Maeda K, Das D and Ghosh AK. (2008) Development of protease inhibitors and the fight with drug-resistant HIV-1 variants. *Adv Pharmacol*. 56: 169-97.
 10. Ghosh AK, Chapsal BD, Weber IT and Mitsuya H. (2008) Design of HIV protease inhibitors targeting protein backbone: an effective strategy for combating drug resistance. *Acc Chem Res*. 41: 78-86.
2. 学会発表(国際学会のみ)
1. "Involvement of the Second Extracellular Loop (ECL2) and Transmembrane Residues of CCR5 in Inhibitor Binding and HIV-1 Fusion." (H-4041) K. Maeda K, Das D, Yin PD, Tsuchiya K, Ogata-Aoki H, Nakata H, Norman R, I, L. Hackely L, Takaoka Y and Mitsuya H. 48th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) / 46th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America (IDSA), October, 25-28, 2008, Washington, DC, US.
 2. "Study of Cellular CCR5 Dynamics and its Alterations by CCR5 Inhibitors Using YFP-Tagged CCR5-expressing Cells." (H-4043) Nakata H, Kamata W, Ogata-Aoki H, Maeda K and H. Mitsuya H. 48th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) / 46th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America (IDSA), October, 25-28, 2008, Washington, DC, US.
 3. "Bimodal Binding to HIV-1 Protease of GRL-02031 (G31), a Novel Protease Inhibitor (PI) Containing a Cyclopentanyl- tetrahydrofuran (Cp-THF)." (H-1267), Koh Y, Das D, Leschenko S, Nakata H, Ogata-Aoki H, Amano M, Nakayama M, Ghosh AK and Mitsuya H. 48th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) / 46th Annual Meeting of the Infectious Diseases

Society of America (IDSA), October, 25-28, 2008, Washington, DC, US.

4. "Non-peptidyl Small Molecule Protease Dimerization Inhibitors: Molecular and Structural Analysis of Their HIV-1 Inhibition and Interactions with Protease Monomer Subunit." (Poster 733), Koh Y, Matsumi S, Das D, Amano M, Davis DA, Li J, Leschenko S, Baldridge A, Shioda T, Yarchoan R, Ghosh AK, Mitsuya H. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Feb 3-6, 2008. Boston, MA, US.

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

- (1) The Name of the Patent: Fitness assay and associated methods
Date of Issuance: December 30, 2008
US Patent Number: 7,470,506
Erickson; John W. (Frederick, MD), Gulnik; Sergei V. (Frederick, MD), Mitsuya; Hiroaki (Chevy Chase, MD), Ghosh; Arun K. (River Forest, IL)
Assignee: The United States of America as represented by the Department of Health and Human Services (Washington, DC) and Board of Trustees of the University of Illinois.
Appl. No.: 09/720,276
Filed: June 23, 1999
PCT Filed: June 23, 1999
PCT No.: PCT/US99/14119
371(c)(1),(2),(4) Date: March 07, 2001
PCT Pub. No.: WO99/67417
PCT Pub. Date: December 29, 1999
- (2) The Name of the Patent: 4'-C-substituted-2-haloadenosine derivative
Date of Issuance: March 4, 2008
US Patent Number: 7,470,506
Erickson; Satoru Kohgo, Kashima-gun (JP); Hiroshi Ohruai, Sendai (JP); Eiichi Kodama, Kyoto (JP); Masao Matsuoka, Otsu (JP); Hiroaki Mitsuya, Kumamoto (JP)
Assignee: Yamasa Corporation, Chiba (JP)
Appl. No.: 11/087,588
Filed: March 24, 2005

2. 実用新案登録 特になし

CTL エピトープに反応する CD8+T 細胞集団とその T 細胞受容体(TCR)レパトリーの特定

研究分担者 岩本 愛吉 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨

HIV-1 陽性患者の末梢血単核細胞(PBMCs)を用いて、エスケープ変異を持った人、そうでない人のキラーT 細胞受容体 (CTL) エピトープに反応する CD8+T 細胞集団とそれに対応する T 細胞受容体(TCR)レパトリーの特定を試みた。本研究はエイズのワクチン開発に非常に有用と考えられる。

A. 研究目的

MHC に対して結合能を持つ TCR を持つ CTL は、HIV に対して強い選択圧をかける。HLA クラス I 分子には遺伝子多型があり、多型に応じて結合できるペプチドのアミノ酸配列が異なる。即ち、感染者個人個人で、HIV を攻撃する CTL の標的部位が異なるわけであるが、これが HIV 感染症の進行には大きな個人差があることの根拠だと考えられている。HIV は、Nef タンパク質によって HLA 分子の発現を低下させたり、突然変異によって CTL からエスケープした変異体が増殖する、など種々の方法で CTL の選択圧を逃れようとする。CTL と HIV のバトルを詳細に解析する研究はワクチン開発の基礎となる重要なものである。本研究では、HIV-1 陽性患者からの末梢血単核細胞(PBMCs)を用いて、私たちはエスケープ変異を持った人、そうでない人の CTL エピトープに反応する CD8+T 細胞集団とそれに対応する T 細胞受容体(TCR)レパトリーの特定を試みた。

B. 研究方法

対象者：HLA-A*2402(A24)陽性患者

ペプチド： HIV-1 Nef protein [Nef138-10(wt)]、escape mutant with a Y to F (Y139F) substitution at the second position [Nef138-10(2F)].

培養：PBMCs を Nef138-10(wt) ならびに Nef138-10(2F) 配列を持つ peptide-MHC tetramers で染色した。

TCR レパトリー：エピトープ特有の CD8+T 細胞集団の TCR レパトリーは、塩基配列により決定した。

(倫理面への配慮)

本研究に臨床材料が使用される場合には、血液など臨床材料提供者の個人情報が出漏らないよう厳格にプライバシーを保護する。研究はすべて unlinked anonymous の手法によって行われる。研究方法による研究対象者に対する不利益について充分の説明を加え、起こりえる危険性の排除に可能なかぎりの方策をとる。

C. 研究結果

mutant tetramer (2F)陽性のポピュレーションは、われわれの培養と染色の下ではあまり観測されなかった。wt 陽性の CD8+T 細胞集団は多様な TCR レパトリーを有していたが、ダブル (wt-tetramers と mutant-tetramers)に陽性の CD8+T 細胞集団の TCR レパトリーは高度に限定されていた。ダブルに陽性の CD8+T 細胞集団では、ほとんどのクローン形質が TCR ベータ鎖では TRBV4-1 と TRBJ2-7 遺伝子断片を、TCR アルファ鎖では TRAV8-3、および TRAJ40-1 を使用していた。TCR ベータ鎖の CDR3 領域はほとんど変化を示さなかった。

D. 考察

以上の結果はエスケープエピトープに対す

る特定の CTL 応答に拘束された TCR レパートリーの存在を示している。私たちは、ウイルスからの逃避における、抗原提示の障害が拘束されたレパートリーの基礎となるかもしれないと推測している。

HIVは突然変異の多いウイルスとしてよく知られているが、変異は抗体の結合部位である表面糖タンパク質の一部や CTL エピトープに集積している。CTL が HIV に対して強い選択圧を及ぼしているからである。われわれもこれまで HLA-A*2402 の頻度の高い日本人集団において CTL からのエスケープ変異体が性感染によって流行していることを報告した。CTL エピトープからのエスケープ変異は、HLA の遺伝子型とエピトープの部位によって、感染後に出現する早さが違うといわれている。予後の良い HLA として知られる HLA-B*57 などでは、CTL エピトープがウイルスの構造タンパク質部分にあり、そこにエスケープ変異が入るとウイルスの増殖性 (fitness) が極めて悪くなることが示されている。

CTL からのエスケープ変異体が出現する根拠としては、(1) 変異により HLA クラス I 分子への結合性が無くなり、変異 HIV が CTL から選択圧を受けなくなること、(2) ペプチドのプロセッシングに障害が生じ、適切な長さに切断されなくなったり、切断されすぎたりすること、(3) 変異により CTL の TCR との結合性が変化すること、などが想定される。個別の CTL エスケープ変異体についてその機序が解明されているものはまだ一部であり、今後さらに研究を進める必要がある。

E. 結論

HIV-1 陽性患者の末梢血単核細胞(PBMCs)を用いて、エスケープ変異を持った人、そうでない人のキラーT 細胞受容体 (CTL) エピトープ

に反応する CD8+T 細胞集団とそれに対応する T 細胞受容体(TCR)レパートリーの特定を試みた。ウイルスからの逃避における、抗原提示の障害が拘束されたレパートリーの基礎となるかもしれない。本研究はエイズのワクチン開発に貢献すると考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyazaki E, Kawana-Tachikawa A, Tomizawa M, Nunoya J, Odawara T, Fujii T, Shi Y, Gao GF, Iwamoto A. Highly restricted T-cell receptor repertoire in the CD8+ T-cell response against an HIV-1 epitope with a stereotypic amino acid substitution. *AIDS*. 2009 Mar 27;23(6):651-60.
- 2) Mizukoshi F, Yamamoto T, Mitsuki YY, Terahara K, Kawana-Tachikawa A, Kobayashi K, Iwamoto A, Morikawa Y, Tsunetsugu-Yokota Y. Activation of HIV-1 Gag-specific CD8(+) T cells by yeast-derived VLP-pulsed dendritic cells is influenced by the level of mannose on the VLP antigen. *Microbes Infect*. 2009 Feb;11(2):191-7.
- 3) Komuro I, Sunazuka T, Akagawa KS, Yokota Y, Iwamoto A, Omura S. Erythromycin derivatives inhibit HIV-1 replication in macrophages through modulation of MAPK activity to induce small isoforms of C/EBPbeta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Aug 26;105(34):12509-14.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

粘膜における HIV 感染のメカニズム

研究分担者 清野 宏 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨 本年度の研究においては HIV の主要感染経路である粘膜組織の最前線を覆う上皮細胞層に存在する上皮細胞間 T 細胞 (IEL) に焦点を当て、上皮細胞を介した抗原認識機構を解明することで HIV 感染防御を担う生体免疫応答を明らかにすることを目的に研究を行った。本研究から、上皮細胞は通常の古典的 MHC 分子を介した抗原提示に加え、IEL に特異的な細胞である $\gamma\delta$ 型 IEL の刺激分子である非古典的 MHC 分子の発現をウイルス感染にตอบสนองし上昇させることで IEL の機能を制御していることが示された。

A. 研究目的

生殖器や腸管を始めとする粘膜組織は HIV の主要感染経路である。本研究においては、生体と外界を隔てる最表面である上皮細胞層における自然免疫と獲得免疫の橋渡しの役割を担っている上皮細胞間 T リンパ球 (IEL) に焦点を当て、上皮細胞を介した IEL への抗原提示機構を解明することで HIV 感染における粘膜免疫応答の一端を明らかにする。

B. 研究方法

粘膜系上皮細胞として A549 細胞と HeLa 細胞を用いた。ウイルス感染は人工二本鎖 RNA である poly I:C を用いた。Poly I:C を上皮細胞に作用させた際の古典的 MHC 分子 (HLA-I) と非古典的 MHC 分子 (MICA) の発現をフローサイトメーターで測定した。またサイトカインの影響を検討する目的で各種サイトカインに対する中和抗体を用いた実験を同時に行った。

(倫理面への配慮)

本研究は細胞株を用いた実験を行っているため、倫理面の問題はない。

C. 研究結果

粘膜系上皮細胞株の培養液中に poly I:C を加えた際の HLA-I と MICA の発現を測定したところ、培養液中に poly I:C を加えた際には両分子とも発現変化は認められなかったが、リポフェクション法により poly I:C を細胞質内に導入したところ両分子の発現上昇が観察された。この発現変化は DNA

型である poly dI:dC を用いた際には観察されなかったことから、細胞質内二本鎖 RNA 受容体が発現制御に関与していることが示唆された。またサイトカインの関与について検討する目的で各種サイトカイン特異的の中和抗体を作用させたところ、I 型 IFN の中和抗体により HLA-I の発現上昇が阻害された。一方で MICA の発現上昇は I 型 IFN 中和抗体の影響を受けなかった。

D. 考察

IEL を介した自然免疫応答と獲得免疫応答を制御する上皮細胞を介した抗原提示がウイルス感染に伴う刺激により発現上昇するのは理にかなった応答だと考えられる。また自然免疫系抗原提示分子である MICA はサイトカインを介した刺激を必要とせず二本鎖 RNA を介した直接的刺激により発現増強されることは、自然免疫応答を迅速に誘導するためのシステムであると考えられる。これは IEL のスフィンゴシン 1 リン酸非依存的遊走制御と併せ、腸管最前線における生体防御を迅速に行うための反応であり、HIV 感染防御システムの一つとして機能し得ると考えられる。

E. 結論

上皮細胞はウイルス感染に対し、速やかに自然免疫型、獲得免疫型抗原提示分子の発現を増強することが示され、粘膜組織における HIV 感染防御免疫経路の一端を明らかにすることが出来た。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kunisawa, J., Gohda, M., Kurashima, Y., Ishikawa, I., Higuchi, M. and **Kiyono, H.** 2008. Sphingosine-phosphate-dependent trafficking of peritoneal B cells requires functional NF κ B-inducing kinase in stromal cells. *Blood*. 111: 4646-4652.

Gohda, M., Kunisawa, J., Miura, F., Kagiyama, Y., Kurashima, Y., Higuchi, M., Ishikawa, I., Ogahara, I. and **Kiyono, H.** 2008. Sphingosine 1-phosphate regulates the egress of IgA plasmablasts from Peyer's patches for intestinal IgA responses. *J. Immunol.* 180: 5335-5343.

Terahara, T., Igarashi, O., Yoshida, M., Nochi, T., Kurokawa, S., Takayama, N., Yuki, Y., Low, A.W. and **Kiyono, H.** 2008. Comprehensive gene expression analysis among Peyer's patch M cells, villous M cells and intestinal epithelial cells by DNA microarray analysis. *J. Immunol.* 180: 7840-7846.

Chang, S.Y., Cha H.R., Uematsu, S., Akira, S., Igarashi, O., **Kiyono, H.**, and Kweon, M.N. 2008. Colonic patches direct the cross-talk between systemic compartments and large intestine independently of innate immunity. *J. Immunol.* 180: 1609-1618.

Chang, S.Y., Cha, H.R., Igarashi, O., Rennert, P.D., Kissenpennig, A., Malissen, B., Nanno, M., **Kiyono, H.**, and Kweon, M.N. 2008. Cutting edge: Langerin+ dendritic cells in the mesenteric lymph node set the stage for skin and gut immune system cross-talk. *J. Immunol.* 180: 4361-5.

Uematsu, S., Fujimoto, K., Jang, M.H., Yang, B.G., Jung, Y.J., Nishiyama, M., Sato, S., Tsujimura, T., Yamamoto, M., Yokota, Y., **Kiyono, H.**, Miyasaka, M., Ishii, K.J., and Akira, S. 2008. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol.* 9: 769-776.

Hashizume, T., Togawa, A., Nochi, T., Igarashi, O., Kweon, M.N., **Kiyono, H.** and Yamamoto, M. 2008. Peyer's patches are required for intestinal IgA responses to *Salmonella*. *Infect Immun.* 76: 927-934.

Momoi, F., Hashizume, T., Kurita-Ochiai, T., Yuki, Y., **Kiyono, H.**, and Yamamoto, M. 2008. Nasal vaccination with the 40-kilodalton outer membrane protein of *porphyromonas gingivalis* and a nontoxic chimeric enterotoxin adjuvant induces long-term protective immunity with reduced levels of immunoglobulin E antibodies. *Infect Immun.* 76: 2777-2784.

Kunisawa, J., Nochi, T. and **Kiyono, H.** 2008. Immunological con and distinctions between airway and digestive immunity. *Trends Immunol.* 29: 505-513.

Fehervari, Z., and **Kiyono, H.** 2008. The mucosa: at the frontlines of immunity. *Trends Immunol.* 29: 503-504.

2. 学会発表

The 7th Japan-China International Conference of Virology, Keynote Lecture, "M cell targeted rice-based vaccine for the development of needle and cold chain free vaccine." Tokyo, Japan.

US-Japan Cooperative Medical Science Program, Aging & Immunosenescence Joint Meeting and Workshop, "Dinamism of mucosal gateway and migration for the induction of IgA response." San Francisco, USA.

The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity, S-V: Mucosal Infection and Immunity, "Mucosal decision for immunity and tolerance", Hyogo, Japan.

Sixth World Congress on Vaccines, Immunisation and Immunotherapy, Invited Speaker, "Rice-based vaccine: MucoRice for the development of self administered immunization", Milan, Italy.

Modern Mucosal Vaccines, Adjuvants and Microbicides, Keynote lecture, "Transgenic rice expressing vaccine antigens", Porto, Portugal.

Germany-Japan International Immunology Seminar 2008, Lecture, "Mucosally regulated productive and quiescent immunity for the development of mucosal vaccine", Hakata, Japan.

Vaccine 2nd Global Congress, Invited Lecture, "Development of self-administrative by MucoRiceTM system", Boston, USA.

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

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(国際医学協力研究事業)）
分担研究報告書

エイズウイルスに対する液性免疫応答誘導とその制御に関する研究

分担研究者：駒野 淳（国立感染症研究所 エイズ研究センター 第3室 主任研究官）

HIV/AIDSの流行拡大を完全にコントロールするため感染予防法の開発が行われているが未だエイズワクチン開発は難渋を極めている。液性免疫主導型および細胞免疫誘導型エイズワクチン開発のためにはさらに基礎的なウイルス学的・免疫学的理解が欠かせない。本研究ではウイルスの免疫抗原としてのエンベロープタンパク質の立体構造を理解するための研究を行った。その結果エンベロープタンパク質は機能を保持しつつ多様なエンベロープ内アミノ酸変異を許容するが、アミノ酸変異は局所だけでなく容易にエンベロープタンパク質全体の体構造変化をもたらすことが示唆された。これはウイルスが非エピトープ変異による中和抗体エスケープ機能を有している事を示していると同時に、エイズワクチン抗原のデザインにはウイルス抗原を注意深く安定化させる必要があること、また実際の抗原デザインには中和抗体との相互作用を並行して機能的に検証する必要があると考えられる。

A. 研究目的

世界的に蔓延しているエイズHIV/AIDSに対し、エイズワクチンの開発が切望されている。2007年末メルク社のエイズワクチンの治験が失敗したことを受け、ワクチン開発の基礎研究をさらに充実させねばならない。メルク社が使用したアデノウイルスベクターが治験の失敗原因であったかなど治験が失敗した原因を精査して今後のワクチンをデザインに生かす必要がある。細胞性免疫を誘導するワクチンとしては多様なヒトのMHCに対応できるウイルスCTL抗原を複数同定し、誘導された細胞性免疫が確実に多くのウイルス株に

反応できる必要がある。さらにCTLエスケープが生じないようなCTLである必要もある。一方、液性免疫誘導では広くウイルス株を中和できる2F5、4E10、b12、2G12に代表される汎中和抗体誘導法の開発が必要である。このためにはなぜこのような優秀な汎中和抗体がヒトで誘導できないのかも構造生物学・免疫学的に解明する必要がある。

本研究では液性免疫誘導型ワクチン開発の基礎研究として現在まだ部分的にしか解明されていない抗体の標的抗原であるエンベロープタンパク質の構造と機能を機能的な方法で解析し、ワクチンの抗原デザイン

に資することを目的とする。

B. 研究報告

エンベロープタンパク質の立体構造を推測するため、V3 を標的とする中和抗体 KD-247 の感受性を利用した。中和抗体 KD-247 の感受性を IC50 にて評価した。ウイルスは AD8 株を使用し、これを MOLT-4 にて 50 代以上に継代して、人為的に試験管内で多様化させたウイルスを「機能的 Env 遺伝子プール」として用いた (図 1)。IC50 計測は TZM-bl 細胞を使用し、常法に基づきウイルス感染の有無をウイルス感染後 3 日目の Luciferase にて算定した。

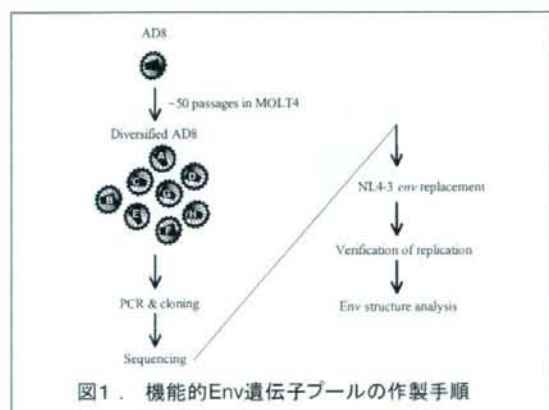


図1. 機能的Env遺伝子プールの作製手順

C. 研究結果

多様化された AD8 エンベロープ遺伝子を NL4-3 にクローン化し、同一の遺伝子背景を持ちエンベロープのみ多様性をちその他の部分が同一の分子クローンライブラリーを構築した。エンベロープが機能的であるということは TZM-bl によるシグナルと P BMC におけるウイルス複製測定により確かめた。このライブラリーを用いて複数のアミノ酸変異が KD-247 中和

感受性に与える影響を評価した。その結果、V3 loop だけでなく V1/V2 loop から gp41 細胞外ドメインにおけるアミノ酸変異が V3 中和抗体の感受性を上昇させることが明らかになった。上昇の程度は約 3 倍から 130 倍ほど幅広く、特に V3 loop に近接するほど程度の著しいことが判明した。興味深いことに最も V3 中和抗体上昇させる変異体はエンベロープの CD4 結合部位を標的とする汎ウイルス株中和抗体 b12 や gp41 を標的とする汎ウイルス株中和抗体 2F5 の感受性も上昇させることがわかった。

D. 考察

以上の結果からエンベロープタンパク質は非常に高い可塑性を有しており、機能を損なわれないような変異が、変異の局所の構造だけでなくエンベロープ全体の構造を変化させることが示された。gp41 の変異が gp120 の中和抗体感受性を変化させることは我々の知見が初めてである。エンベロープタンパク質がこのような大きな可塑性を持つことはエイズワクチン抗原をデザインするときには注意深くタンパク質の立体構造安定化を図る必要があることを示唆する。立体構造安定化のため導入するアミノ酸変異自体も容易に全体のタンパク質構造を変化させてしまう危険があるため、抗原安定化のためエンベロープ改変は中和抗体との機能的な相関を評価しながら統合的に行う必要がある。本研究結果は日米エイズパネル会議にて発表され、日米両国の会員と有意義な議論を交わすことができた。

E. 結論

液性免疫誘導のためエンベロープタンパク質立体構造を理解するため、多様なエピソード外変異による網羅的なアミノ酸変異解析を行い、抗原の構造は機能を損なわずに著しく多様な立体構造を持つことが明らかになった。中和抗体誘導型エイズワクチンの抗原をデザインするにはこの事実に基づいて注意深く行う必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Urano E, Kariya Y, Futahashi Y, Ichikawa R, Hamatake M, Fukazawa H, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi Y, Yamamoto N, Komano J. Identification of the P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 as an inhibitor of HIV-1 replication by functional cDNA library screening in MT-4 cells. FEBS Let (in press)
- 2) Hamatake M, Aoki T, Futahashi Y, Urano E, Yamamoto N, Komano J. Ligand-independent higher-order multimerization of CXCR4, a G-protein-coupled chemokine receptor involved in the targeted metastasis. Cancer Sci (in press)
- 3) Urano E, Aoki T, Futahashi Y, Murakami T, Morikawa Y, Yamamoto N, Komano J. Substitution of the myristoylation signal of human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag with the phospholipase C delta 1 pleckstrin homology domain results in infectious pseudovirion production. J Gen Virol (in press)
- 4) Emiko Urano, Saki Shimizu, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Yuko Morikawa, Naoko Takahashi, Hidesuke Fukazawa, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Cyclin K/CPR4 inhibits primate lentiviral replication by inactivating Tat/P-TEFb-dependent LTR transcription. AIDS. May 31; 22 (9) :1081-3, 2008.
- 5) Akihiko Ryo, Naomi Tsurutani, Kenji Ohba, Ryuichiro Kimura, Jun Komano, Mayuko Nishi, Hiromi Soedal, Shinichiro Hattori, Kilian Perrem, Mikio Yamamoto, Joh Chiba, Jun-ichi Mimaya, Kazuhisa Yoshimura, Shuzo Matsushita, Mitsuo Honda, Akihiko Yoshimura, Ichiro Aoki, Yuko Morikawa and Naoki Yamamoto. SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. Proc Natl Acad Sci U S A. Jan 8; 105 (1) :294-9 2008.
- 6) Takeshi Yoshida, Yuji Kawano, Kei Sato, Yoshiharu Miura, Yoshinori Ando, Jun Aoki, Jun Komano, Yuetsu Tanaka, Yoshio Koyanagi. A CD63 mutant inhibits T-cell tropic human immunodeficiency virus type 1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane. Traffic. Apr; 9 (4) :540-58 2008.
- 7) Komano J, Hamatake M, and Yamamoto N. Analyses of long-term surviving HIV-infected Japanese patients with coagulation disorders hint at novel means to prevent and treat HIV/AIDS (review). Challenging practices on HIV/AIDS in Japan 2008, Kashiwazaki ed., JFAP publications, 97-99, 2008

学会発表 (抜粋)

海外

- 1) Takeshi Yoshida, Yuji Kawano, Yoshinori

Ando, Kei Sato, Jun Komano, Yuetsu Tanaka and Yoshio Koyanagi. A CD63 mutant inhibits CXCR4 trafficking to the plasma membrane and blocks X4 HIV-1 entry. CSH Meeting on Retroviruses, May 18-24, 2008, Cold Spring Harbor, NY

2) Emiko Urano, Yuki Kariya, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Yuko Morikawa, Takeshi Yoshida, Yoshio Koyanagi, Naoki Yamamoto, and Jun Komano. Identification of the carboxy-terminal domain of bromodomain containing 4 as a specific silencer of HIV-1 replication. CSH Meeting on Retroviruses, May 18-24, 2008, Cold Spring Harbor, NY

3) Toru Aoki, Saki Shimizu, Emiko Urano, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Kazuo Terashima, Hirokazu Tamamura, Tsutomu Murakami, Yuko Morikawa, Naoki Yamamoto and Jun Komano. Functional substitution of the myristoylation signal of HIV-1 gag with phospholipase C delta 1 pleckstrin homology domain. CSH Meeting on Retroviruses, May 18-24, 2008, Cold Spring Harbor, NY
国内

1) Makiko Hamatake, Yuko Futahashi, Toru Aoki, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Detection of ligand-independent higher-order oligomerization state of a G-protein-coupled receptor CXCR4 by BiFC/BRET. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity Awaji 2008, 2008年、兵庫

2) Toru Aoki, Saki Shimizu, Emiko Urano, Makiko Hamatake, Kazuo Terashima, Hirokazu Tamamura, Tsutomu Murakami, Yuko Morikawa, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Substitution of

the myristoylation signal of HIV-1 Pr55Gag with PLC delta 1 pleckstrin homology domain results in fully infectious pseudovirion production. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity Awaji 2008, 2008年、兵庫

3) Emiko Urano, Yumi Kariya, Makiko Hamatake, Hidesuke Fukazawa, Yuko Morikawa, Yoshio Koyanagi, Naoki Yamamoto, Jun Komano. P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 inhibits HIV-1 replication through restricting Tat-mediated enhancement of LTR promoter activity. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity Awaji 2008, 2008年、兵庫

4) 浦野 恵美子, 奥長浩之, 森川裕子, 駒野 淳. DNA J/HSP40 Co-chaperone familyによる HIV-1 複製抑制. 第56回日本ウイルス学会学術集会 2008年、岡山

5) 駒野 淳, 浦野 恵美子, 刈屋 祐美, 二橋 悠子, 市川 玲子, 濱武 牧子, 深觸 秀輔, 森川 裕子, 芳田 剛, 小柳 義夫, 山本直樹. T細胞における HIV-1 抵抗性遺伝子のスクリーニング - Brd4 C 末端ドメインの同定とその機能解析. 第56回日本ウイルス学会学術集会 2008年、岡山

6) 駒野 淳, 濱武 牧子, 青木 徹, 浦野 恵美子, 二橋 悠子, 山本 直樹. BiFC/BRETによる癌転移増強分子 CXCR4 の Ligand 非依存的な多量体形成の解析. 第67回日本癌学会学術総会, 2008, 名古屋

7) 村上 努, 大隈 和, 田中礼子, 仲宗根正, 濱武牧子, 駒野 淳, 谷中幹郎, 田中勇悦, 山本直樹. KRH-3955 は経口投与可能な高活性抗 X4 HIV-1 阻害剤である. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会, 2008, 大阪

8) 青木 徹、清水佐紀、浦野恵美子、濱武牧子、寺嶋一夫、玉村啓和、村上 努、森川裕子、山本直樹、駒野 淳。HIV-1 Pre55Gag のミリストイル基非依存性ウイルス粒子産生と感染性。第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、2008, 大阪

9) 高橋良明、村上 努、駒野 淳、古田 篤司、田中礼子、山本直樹、田中勇悦。宿主由来タンパク OX40L, OX40 の HIV-1 感染に与える影響。第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、2008, 大阪

10) 浦野 恵美子、奥長浩之、森川裕子、山本直樹、駒野 淳。Inhibition of HIV-1 replication by co-chaperone DNA J/HSP40 protein family。第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪

11) 小林明子、芳田 剛、駒野 淳、小柳義夫。レンチウイルスバクターを用いた抗 HIV 因子のスクリーニングとその解析。第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、2008, 大阪

12) Makiko Hamatake, Yuko Futahashi, Toru Aoki, Naoki Yamamoto, Jun Komano。Detection of ligand-independent higher-order oligomerization state of a G-protein-coupled receptor CXCR4 by BiFC/BRET。BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会)、2008, 神戸

13) Emiko Urano, Yumi Kariya, Makiko Hamatake, Hidesuke Fukazawa, Yuko Morikawa, Yoshio Koyanagi, Naoki Yamamoto, Jun Komano。P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 inhibits

HIV-1 replication through restricting Tat-mediated enhancement of LTR promoter activity。BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会)、2008, 神戸

14) Toru Aoki, Saki Shimizu, Emiko Urano, Makiko Hamatake, Kazuo Terashima, Hirokazu Tamamura, Tsutomu Murakami, Yuko Morikawa, Naoki Yamamoto, Jun Komano。Substitution of the myristoylation signal of HIV-1 Pr55Gag with PLC delta 1 pleckstrin homology domain results in fully infectious pseudovirion production。BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会)、2008, 神戸

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特記すべきことなし
2. 実用新案登録
特記すべきことなし
3. その他
特記すべきことなし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書籍名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|--|---|-------------------|---|-------------------|-------|-----------|-------|
| 高橋秀実 | | | | | | | |
| 高橋秀実 | 書籍全体 | 矢田純一、高橋秀実 | リップインコット・イラストレイテッド免疫学 | 丸善出版 | 東京 | 2009.1.10 | 1-353 |
| 駒野 淳 | | | | | | | |
| <u>Komano J</u> , Hamatake M, and Yamamoto N | Analyses of long-term surviving HIV-infected Japanese patients with coagulation disorders hint at novel means to prevent and treat HIV/AIDS | Masao Kashiwazaki | Challenging practices on HIV/AIDS in Japan 2008 | JFAP publications | Tokyo | 2008 | 97-99 |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|--|-------------------------------------|-----------|---------|------|
| 山本直樹 | | | | | |
| Yoshino N, Kanekiyo M, Hagiwara Y, Okamura T, Someya K, Matsuo K, Ami Y, Sato S, <u>Yamamoto N</u> , Honda M. | Mucosal administration of completely non-replicative vaccinia virus recombinant Dairen I strain elicits effective mucosal and systemic immunity. | Scand J Immunol | 68(5) | 476-483 | 2008 |
| Terunuma H, Deng X, Dewan MZ, Fujimoto S, <u>Yamamoto N</u> . | Potential role of NK cells in the induction of immune responses: Implications for NK cell-based immunotherapy for cancers and viral infections. | International Reviews of Immunology | 27(3) | 93-110 | 2008 |
| Sugimoto C, Nakayama EE, Shioda T, Villinger F, Ansari AA, <u>Yamamoto N</u> , Suzuki Y, Nagai Y, 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 (Pt 2) | 554-566 | 2008 |
| Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Kimura R, Komano J, Nishi M, Soeda H, Hattori S, Perrem K, Yamamoto M, Chiba J, Mimaya JI, Yoshimura K, Matsushita S, Honda M, Yoshimura A, Sawasaki T, Aoki I, Morikawa Y, <u>Yamamoto N</u> . | SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. | Proc Natl Acad Sci USA | 105 | 294-299 | 2008 |