

200808019A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

多様なエイズウイルス株の感染を制御する
宿主応答の同定

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 森 一泰

平成21（2009）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

多様なエイズウイルス株の感染を制御する
宿主応答の同定

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 森 一泰

平成21（2009）年 3月

研究組織

研究者氏名		所属	職名
森 一泰	研究代表者	国立感染症研究所エイズ研究センター	主任研究官
木村 彰方	研究分担者	東京医科歯科大学難治疾患研究所	教授
宮澤 正顯	研究分担者	近畿大学医学部	教授
保富 康宏	研究分担者	医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター	センター長
駒野 淳	研究分担者	国立感染症研究所エイズ研究センター	主任研究官
中村 紳一郎	研究分担者	滋賀医科大学動物生命科学研究センター	准教授

目 次

I. 総括研究報告	
多様なエイズウイルス株の感染を制御する宿主応答の同定 -----	1
研究代表者：森 一泰	
II. 分担研究報告	
1. 生ワクチンが誘導する感染防御へのウイルス多様性の影響（感染実験） ----	15
研究代表者：森 一泰	
2. 感染制御宿主応答の個体差と関連する宿主因子の解析（ゲノム解析） -----	22
研究分担者：木村 彰方	
3. 感染制御・感染防御と関連する宿主因子の解析（RNA 解析） -----	27
研究分担者：宮澤 正顕	
4. カニクイザルによるエイズモデルの開発とワクチン研究への応用 -----	32
研究分担者：保富 康宏	
5. 感染防御・制御と関連する宿主因子の解析（タンパク解析） -----	38
研究分担者：駒野 淳	
6. 感染防御・制御と関連する宿主因子の解析（病理解析） -----	42
研究分担者：中村紳一郎	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	45
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	49

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総括研究報告書

多様エイズウイルス株の感染を制御する宿主応答の同定

研究代表者 森 一泰（国立感染症研究所 主任研究官）

研究要旨

HIV ワクチン開発研究には解決すべき課題がある。HIV 感染防御に働く宿主応答の解明と HIV 多様性に対する有効性である。手がかりのひとつは、霊長類を用いたエイズ動物モデルで実証された、低病原性 SIV 感染が宿主に誘導する病原性 SIV 感染に対する抵抗性である。我々はエイズ動物モデルを用いて、糖鎖修飾変異株が生ワクチンとして優れた性質（高い防御効果と長期感染における低病原性）を有することを見いだした。本研究では、HIV ワクチン開発のための基盤研究として、この生ワクチンモデルについて、ウイルス多様性に対する有効性の検討と感染防御に働く宿主応答の解明を行う。

ウイルス多様性に対する有効性を調べるために HIV-1 サブタイプ間の相違性（ウイルスタンパクアミノ酸レベルで 10-30% の違い）と同等の違いを持つワクチンウイルスとチャレンジウイルスを用いた。ワクチンウイルスとして、SIVmac239 の 5 カ所の N 型糖鎖を欠失した 3 種の変異株（Δ5G, Δ5Gver1, Δ5Gver2）、3 カ所の N 型糖鎖を欠失した Δ3G について検討した。いずれの生ワクチンも高容量（1000 TCID₅₀）静脈内接種によるサブタイプが異なるチャレンジウイルス SIVsmE543-3 感染を初期感染から慢性感染期を通じて、血中ウイルス量で 1/1000 以上低下させた。この結果は、HIV 感染予防ワクチンあるいは感染制御を導く免疫治療法の実現性を示唆した。しかし同一株ウイルスチャレンジ感染では見られなかった個体間の感染制御の違いが明らかとなった。用いたアカゲザルの MHC アリル解析から慢性感染期におけるウイルス感染抑制と特定 MHC アリル保有との関連性が明らかになった。この結果はウイルス多様性に有効な宿主応答に影響を与える宿主遺伝的因子の存在を示唆した。宿主遺伝的因子の同定と機能の解明、感染制御に働く宿主応答のメカニズムの解明は、HIV-1 ワクチン開発に多大な貢献をすることが期待される。

分担研究者

木村 彰方 東京医科歯科大学
難治疾患研究所 教授
宮澤 正顕 近畿大学医学部 教授
保富 康宏 医薬基盤研究所霊長類医科学
研究センター センター長

駒野 淳 国立感染症研究所
エイズ研究センター 主任研究官
中村紳一郎 滋賀医科大学動物生命科学研究
センター 准教授

A. 研究目的

HIV は高い変異性と多様性を持つ。主要 HIV-1 (group M) は 9 種類のサブタイプと複数のサブタイプ間の組み換えウイルスに分類される。サブタイプ内においても高い多様性がある。感染者においては変異によりウイルス多様性は絶えず変化する。このような HIV の性質は HIV ワクチン開発における大きな問題となっている。さらにワクチン開発を遅らせている理由は、ワクチン開発の基本戦略が確立していないことである。HIV 感染制御に働く宿主応答としてウイルス特異的細胞障害性 T 細胞(CTL)の役割が認識されている。その結果 CTL 誘導に優れたプライムブーストワクチンの研究が推進されてきた。しかし動物モデルによる評価は限定的な感染防御効果が確認された程度である。実際、プライムブーストワクチンの代表とされたアデノウイルスベクターワクチン(Ad5)の臨床実験の失敗が報告され、HIV ワクチン開発研究の動向に大きな変化が起こっている。動物モデルによる生ワクチンが誘導する防御免疫の研究の重要性が再認識されてきた。我々は世界に先駆けて糖鎖修飾変異株が生ワクチンとして優れた性質を持つことを報告した。本研究では、動物モデルを用いた糖鎖修飾変異生ワクチンが誘導する防御免疫のウイルス多様性に対する有効性と感染防御のメカニズムの解明を目的とする。

B. 研究方法

1. SIV感染エイズ発症モデルを用いた糖鎖変異生ワクチンの感染防御効果の検討

(1) アカゲザル

ビルマ、ラオス原産、国内繁殖施設で育成された SPF(Bウイルス、SRV、STLV、SIV、SVV等の抗体陰性)サルを用いた。各個体から樹立した B リンパ芽球株を用いて MHC アリルの解析を行った。

(2) MHC クラス I 遺伝子群多型の解析 (木村)

RSCA 法による Mamu-A, B 遺伝子タイピング法によりハプロタイプを決定した。Mamu-A 遺伝子については抗原提示ドメインをコードする exon2 および exon3 領域 cDNA をクローニングして塩基配列を決定した。Mamu-B 遺伝子の全長 cDNA をクローニングし塩基配列を決定した。

(3) MHC class II 遺伝子多型とハプロタイプ構成の解析 (宮澤)

DPA, DPB, DQA, DQB 及び DRB 対立遺伝子群に特異的なプライマーペアを用いて、cDNA をクローニングし塩基配列を決定した。

(4) 動物実験 (森)

a) 糖鎖欠失変異ウイルス生ワクチンの作成

Δ5G: SIVmac239 gp120 23 カ所の N 型糖鎖付加部位中で 5 カ所 (79, 147, 179, 460, 479) の付加部位の Asn を Gln に置換し関連する糖鎖を欠失させた。

Δ5Gver1: Δ5G と同様に 5 カ所 (70, 79, 179, 460, 479) の糖鎖を欠失させた。

Δ5Gver2: Δ5G と同様に 5 カ所 (79, 179, 377, 460, 479) の糖鎖を欠失させた。

Δ3G: SIVmac239 の gp120 の 3 カ所 (147, 179, 460) の糖鎖を欠失させた。

b) チャレンジウイルス

SIVmac239: 系統 8 に分類される高病原性 SIV

SIVsmE543-3: 系統 1 に分類される高病原性 SIV

d) ワクチン接種

12 頭: 1 群 3 頭、4 種類の生ワクチン 100 TCID₅₀ を接種した。

e) 同一株チャレンジ

ワクチン接種 40 週後に各群 1 頭ずつに SIVmac239 1000 TCID₅₀ を静脈内接種した。

f) 異サブタイプ株チャレンジ

8 頭の生ワクチン接種ザル (50 週以降) との生ワクチン接種後 SIVmac239 チャレンジを感染制御した 3 頭 (77 週後) に SIVsmE543-3 1000 TCID₅₀

を静脈内接種した。

g) SIVmac239, SIVsmE543-3 RNA 量の測定

SIVmac239, SIVsmE543 gag 遺伝子それぞれに設定したプライマーを用いリアルタイム PCR 法により測定した。

2. エイズウイルス感染防御に働く宿主応答の解析法の検討

(1) TIM1 遺伝子領域多型の解析 (木村)

Th1/Th2 バランス制御に関わる TIM1 遺伝子の多型アレル分布頻度を解析した。

(2) MHC class II 分子発現ベクターの構築 (宮澤)

アカゲザル class II アレル cDNA を用い細胞表面に class II 分子を発現させる実験系の作成を行った。

(3) エイズウイルス複製阻害因子解析法

(駒野)

HIV 感染抵抗性を有する RK13 細胞由来の cDNA ライブラリーを発現後、HIV-1 感染耐性を示す細胞を選択し耐性獲得に働く遺伝子を同定する。

(4) 病理手法による SIV 感染組織解析法の検討

(中村)

SIV 感染ザル、非感染ザルリンパ組織、腸管粘膜組織から薄切病理標本を作製し、各種抗 SIV、抗免疫細胞抗体について免疫組織化学染色での有用性を検討した。

(5) カニクイザルによるエイズ動物モデルの作成 (保富)

エイズモデルに最適なカニクイザルを選別するためにインドネシア産、マレーシア産、フィリピン産サルを用いて SIVmac239 感染実験を行ないウイルス感染・エイズ発症を調べる。

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所属機関、実験実施機関の動物実験委員会が定めたルール、ガイドラインに従った。

C. 研究結果

1. SIV 感染エイズ発症モデルを用いた糖鎖変異生ワクチンの感染防御効果の検討

4 種の糖鎖変異 SIV 生ワクチンの性質

糖鎖付加部位のアミノ酸置換による糖鎖欠失変異が異なる 4 種の変異株 (図 1) を作成した。変異ウイルスは In vitro における性質 (中和抗体感受性、マクロファージ指向性、CD4 非依存性) が異なった。Δ 3G は Δ 5G よりも高いマクロファージ指向性を示した。Δ 5Gver1 と Δ 5Gver2 は SIVmac239 と同じようマクロファージ指向性は示さなかった。Δ 5G 中和抗体に対する感受性もそれぞれのウイルスで異なった。このような in vitro の性質の違いにもかかわらず感染ザルにおける増殖性は同様であった。感染後 2 週に初期感染は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になった。4 変異ウイルスとも糖鎖修飾変異により低病原性を獲得した。

感染後 40 週に各群 1 頭に SIVmac239 (1000 TCID₅₀) を静脈内接種した。ワクチン未接種群では、ピークウイルス量が 10⁷ c#/ml に達する初期感染を示したが (図 2)、4 種の糖鎖変異ウイルスによる感染を受けた 4 頭ではチャレンジウイルス感染はほぼ検出限界 (10² c#/ml) 以下に抑制された。4 種の変異ウイルスは生ワクチンの性質を有した。

HIV ワクチン開発研究のためのサブタイプが異なるウイルス感染に対する防御効果を評価する動

物モデルの作成

HIV-1は感染地域により複数のサブタイプが流行している。アジアではサブタイプB、Cと組み換え型CRF01AE、CRF02AGが主要サブタイプである。サブタイプ間の違いはGag, Polで8-10%、Tat, Rev, Nef, Vifでは20-30%に達している(表1)。ワクチンはこのようなウイルス多様性に対する効果が求められる。つまりワクチンの有効性はサブタイプが異なるウイルス感染に対する感染防御効果から評価される。この目的のために新たな動物モデルを作成した。SIVmac239が属するSIVsmはHIV-1と同様の多様性が知られている。そこで糖鎖変異生ワクチン(系統8)とは異なるチャレンジウイルスとしてSIVsmE543-3(系統1)を用いた。SIVsmE543-3とΔ5Gの野生株SIVmac239の違いはアジアで感染しているHIV-1主要サブタイプ間の違いとほぼ同じである。

SIVsmE543-3感染に対する感染防御効果

4種の糖鎖変異ワクチンの感染防御効果に違いは見られなかったが、個体間に違いがあった。そこで感染55週までの11頭のワクチン群におけるSIVsmE543-3ウイルス量の平均値と非ワクチン群3頭のSIVsmE543感染の平均値の違いから生ワクチンの感染抑制効果を調べた。図3に示されるように、初期感染あるいは慢性感染期においてワクチン群のウイルス量は非ワクチン群と比べ1/1000であった。糖鎖変異生ワクチンは異なるサブタイプの感染に対しても有効な感染防御効果を示した。

ワクチンによる感染防御効果への遺伝的性質の影響

実験に用いたアカゲザルは遺伝的性質の違いと関連してビルマ系(ハプロタイプg, h, non-gh)とラオス系(ハプロタイプp, q, non-pq)に分かれる。そこでSIVsmE543-3感染の結果を両系統

に分けて示した。図4に示されるように、ビルマ系では初期感染が高い複数個体が確認されたが慢性感染期は抑制された。対照的にラオス系では初期感染は低いが、慢性感染期にウイルス感染の上昇した個体数が2例確認された。

MHC class I アリル解析からハプロタイプを構成するMamu*A, Mamu*Bアリルが確認された(表2)。#0513, #0518は慢性感染においてSIV感染の上昇が確認されたがいずれもハプロタイプpを構成するMamu*A, Mamu*Bアリルが同定された。ハプロタイプh, non-ghのすべてのサルは慢性感染期における感染が制御された。

2. エイズウイルス感染防御に働く宿主応答の解析法の検討

(1) TIM1 遺伝子領域多型の解析(木村)

ワクチン効果の発揮においてはCTL誘導または中和抗体産生が関与するが、免疫応答の個体差にはMHC以外の多様性も関与する。そこでTIM1遺伝子の多様性を検討した。アカゲザルおよびカニクイザルでは、いずれもmucin様構造部分に著明な多様性が存在する。この領域にはヒトでも多様性が存在するが、アカゲザルやカニクイザルにおける多様性はヒトよりはるかに高度であり、mucin様構造のリピート数多型であり、リピート数と中和抗体価の産生には有意な関連を認めた。

(2) MHC class II 分子発現ベクターの構築(宮澤)

pBudCE4ベースの発現ベクターに、class II分子α鎖とβ鎖のcDNAを組にして挿入することにより、DR, DQ, DPのα鎖・β鎖複合体がそれぞれ発現し、タンパク質の翻訳が起こることをWestern blottingにより確認した。MHC class II分子の細胞表面への発現には、少なくとも小胞体でclass II分子に結合するIi鎖と、ペプチド結合溝からのCLIPペプチド除去による抗原ペプチド結合に必要なMHC-DM分子の存在が必須と考えら

れる。そこでアカゲザル Ii 鎖 (CD74) 及び MHC-DM 分子 α 鎖と β 鎖の cDNA をクローニングし、それらを pBudCE4 ベクターに組込んだものを、class II 分子 α 鎖・ β 鎖の cDNA と同時に COS 細胞にトランスフェクトした。Ii 鎖と DM 分子を class II 分子と同時に発現させると、細胞表面に class II 分子が検出出来るようになった。現在、Ii 鎖と DM 分子を持続発現する細胞株を樹立しており、これまでにクローニングした DR, DQ, DP 分子の α 鎖と β 鎖の組を全て網羅した発現ベクターの構築が終わっているので、今後 T 細胞認識ペプチドの解析が必要な個体については、その個体で考えられる全ての class II 分子について、発現細胞を供給出来るようになる。

(3) エイズウイルス複製阻害因子解析法 (駒野)

RK13 細胞 cDNA から独立の 42 個の候補遺伝子がえられた。回収効率が高かったものに注目し、中から HSP40 遺伝子を選択しヒト T 細胞に導入して HIV-1 複製を評価したところ、ウイルス複製抵抗性を与える活性を有する事が判明した。同様の方法でえられた Brd4 CTD も HIV-1 複製抵抗性がある事も明らかとなった。この他複数の候補遺伝子について解析を並行して行っている。以上の結果より本法がエイズウイルス抵抗性遺伝子を同定するための優れた機能的スクリーニングであることが示された。

(4) 病理手法による SIV 感染組織解析法の検討 (中村)

抗 SIV 抗体では、抗 SIV Nef-Q 抗体のみが SIV に対して適切な反応を示した。

抗 CD3 抗体は T 細胞、抗 CD4 抗体は約半数の T 細胞、抗 CD8 抗体は辺縁帯の少数の T 細胞、抗 CD20

抗体は B 細胞、抗 CD45RA 抗体は少数の傍濾胞領域の B および T 細胞、抗 CD59 抗体も傍濾胞領域の少数の B および T 細胞、抗 CD68 抗体はマクロファージ系細胞、抗 Fascin 抗体は樹状細胞を染色した。免疫二重染色では抗 SIV モノクローナル抗体と抗 CD3 ポリクローナル抗体の組み合わせで両者に適切な陽性像を認めた。

(5) カニクイザルによるエイズ動物モデルの作成 (保富)

SIVmac239 の感染価：Cos-1 にトランスフェクトさせ、回収したウイルスの HSC-F に対する TCID₅₀ は 10^3 - 10^4 /ml であった。

カニクイザル由来 PBMC への SIVmac239 の感染：

Gag P27 は感染 6 日目に最大値となった。カニクイザル由来 PBMC の原産地の違いによる SIVmac239 の感染価への影響は、HSC-F に対する TCID₅₀ においてインドネシア産は $10^{6.42}$ /ml、フィリピン産は $10^{6.47}$ /ml、マレーシア産は $10^{6.10}$ /ml であった。

D. 考察

糖鎖修飾変異の違いと生ワクチンとしての性質

3 種類の 5 糖鎖欠変異株と 3 糖鎖欠変異株は *in vitro* でのウイルスの性質 (マクロファージ指向性、CD4 非依存性レセプター利用) の違いは、生ワクチンとしての性質に明確な影響を与えなかった。初期感染における感染組織の違いが検討課題として残るが、ウイルス粒子当たりの感染性に優れた Δ 5Gver1 を今後の防御免疫解析のための感染実験に用いる計画である。

多様なウイルスに対する感染防御誘導における宿主因子の影響

野生株 SIVmac239 感染 (図 2) においてワクチン効果の個体間の違いは見られなかったが、SIVsmE543-3 感染 (図 4) において個体間の違いが明らかとなった。#0513, #0518 では、初期感染後は、感染は短期間制御されたが、再び感染の上昇と持続感染となった。この 2 頭はハプロタイプ p を共有していたことから、感染制御の破綻と関連する遺伝的因子の存在が推測される。ワクチンウイルスとチャレンジウイルスとの組み換えウイルスの出現も確認されている。興味深いことに 5 個の MHC I アリルを共有している。対照的に h、non-hg ハプロタイプを持つ個体はすべてチャレンジウイルス感染を長期間制御している。

MHC アリルと感染制御への関与

HIV-1, SIV の自然感染制御と関連する宿主因子として特定の MHC アリルが同定されている。表 3 に示される HLA-B*5701、チンパンジー Pat-B*0301、ビルマ産アカゲザル Mamua*6501 である。これらは MHC-1 分子の抗原ペプチド結合ドメインにおいて高い相同性 (10 カ所のアミノ酸残基が共通) があり、実際に同一の Gag ペプチドを結合する性質を有する。そこで本研究で用いた動物が保有するに MHC アリルの抗原ペプチド結合ドメインについて上記の共通アミノ酸残基と一致するアミノ酸残基の個数を調べた。8 アミノ酸が確認された B01, B0702 は感染制御が不十分な個体 (#0513, #0518) のハプロタイプ p に存在した。B66NI, B38B (それぞれ 8, 6 アミノ酸残基を共有) は感染制御した #0301, #0516 に存在した。特定 MHC-1 アリルを共通に持つ個体が同様な感染制御を示したことから、MHC-1 アリルにより決定される細胞傷害性 T 細胞の役割の関与が示唆された。

F. 結論

糖鎖修飾が減少した 4 種の変異ウイルス Δ 5G, Δ 5Gver1, Δ 5Gver2, Δ 3G は生ワクチンとしてサ

ブタイプが異なる SIVsmE543 に対し有効な感染抑制効果を示した。メカニズムの解明は HIV-1 ワクチン開発への多大な貢献が期待される。

G. 健康危険情報

特に該当する情報はなかった。

図1. 4種の糖鎖修飾変異ウイルス (生ワクチン)

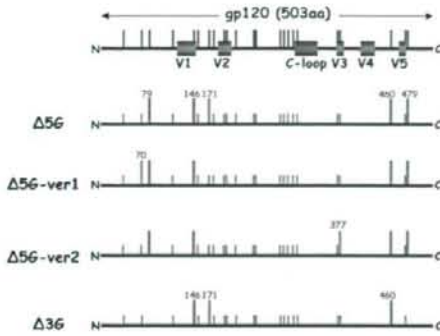


図2. 野生株: SIVmac239 チャレンジ感染

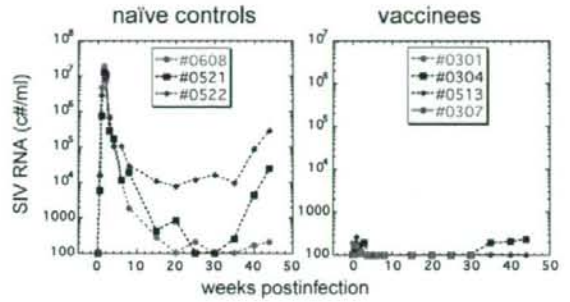
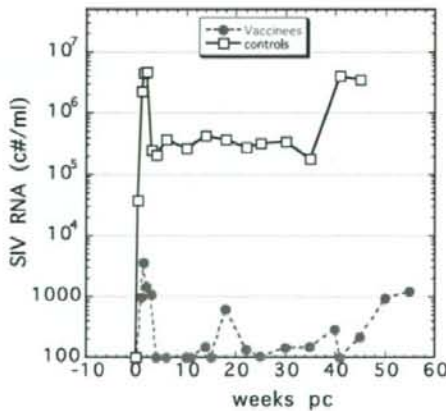


表1. HIV-1サブタイプ間の多様性とSIVsmE543-3とSIVmac239の違い

	B vs. C		B vs. CRF01_AE		C vs. CRF01_AE		SIVsm543-3 vs SIVmac239	
	Mean	± SE	Mean	± SE	Mean	± SE		
<i>gag</i>	10.2	1.2	11	1.4	12.8	1.5	<i>gag</i>	11.1
<i>pol</i>	7.8	0.7	8	0.8	7.5	0.7	<i>pol</i>	7.9
<i>env</i>	19.2	1.4	18.8	1.4	18.7	1.4	<i>env</i>	18.2
<i>nef</i>	22.6	4.8	21.3	4.8	16.2	3.5	<i>nef</i>	26.2
<i>tat</i>	28.8	4.7	31.9	4.9	27.4	4.3	<i>tat</i>	35.9
<i>rev</i>	28.3	4.7	26.4	4.7	20.6	4.1	<i>rev</i>	32.7
<i>vif</i>	20.5	2.6	21.6	2.9	21.3	2.8	<i>vif</i>	17.8
<i>vpr</i>	13.1	3.2	13	3.4	15	3.5	<i>vpr</i>	14.9
<i>vpu</i>	17.7	5.6	13.8	5.4	12.7	3	<i>vpu</i>	8.1

図3. 糖鎖変異生ワクチンの異なるサブタイプSIVに対する効果



G. 研究発表

論文発表

- Xing, H. Q., Mori, K., Sugimoto, C., Ono, F., Izumo K., Kubota, R., Izumo, S. Impaired Astrocytes and Diffuse Activation of Microglia in the Cerebral Cortex in Simian Immunodeficiency Virus-Infected Macaques Without Simian Immunodeficiency Virus Encephalitis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67, 600-6111, 2008.
- Xing, H. Q., Moritoyo, T., Mori, K., Sugimoto, C., Ono, F., Izumo, S. Expression of proinflammatory cytokines and its relationship with virus infection in the brain of macaques inoculated with macrophage-tropic simian immunodeficiency virus. *Neuropathology.* in press, 2008.
- 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 simian immunodeficiency virus-specific CD4 and CD8 T cells during chronic infection. *Immunology.* 124, 277-293. 2008.
- 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.
- Fuji H, Urano E, Futahashi Y, Hamatake M, Tatsumi J, Hoshino T, Morikawa Y, Yamamoto N, Komano J. Derivatives of 5-nitro-furan-2-carboxylic acid carbamoylmethyl ester inhibit RNase H activity associated with HIV-1 reverse transcriptase. *J Med Chem* (in press)
- 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)
- 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)
- 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)
- 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.
- 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.
- 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
- Nakajima T, Kimura A: Genetic factors which confer sensitivity to highly active antiretroviral therapy (HAART) in HIV-infected subjects: implication of a benefit of an earlier initiation of HAART in HIV therapy. *Pharmacogenomics* 2008; 9(9): 1347-1351.
- Nakajima T, Ohtani H, Satta Y, Uno Y, Akari H, Ishida T, Kimura A: Natural selection in the TLR-related genes in the course of primate evolution. *Immunogenetics* 2008; 60(12): 727-735.
- Miyazawa M., L. Lopalco, F. Mazzotta, S. Lo Caputo, F. Veas, and M. Clerici. The "immunologic advantage" of HIV-exposed seronegative individuals. *AIDS* 23:161-175, 2009.
- Takeda, E., S. Tsuji-Kawahara, M. Sakamoto, M.-A. Langlois, M. S. Neuberger, C. Rada, and M. Miyazawa. Mouse APOBEC3 restricts Friend leukemia virus infection and pathogenesis in vivo. *J. Virol.* 82: 10998-11008, 2008. (Selected for JVI Spotlight)
- Matsumoto, T., T. Ajiki, E. Kajiwara, Y. Mita, T. Fujita, H. Morimoto, M. Miyazawa, and Y. Ku. Decreased expression of intestinal chemokine TECK/CCL25 in experimental obstructive jaundice and its reversal following internal biliary drainage. *J. Gastroenterol.* 43: 390-396, 2008.
- Miyazawa, M., S. Tsuji-Kawahara, and Y. Kanari. Host genetic factors that control immune responses to retrovirus infections. *Vaccine* 26: 2981-2996, 2008.
- 宮澤正顯、横田恭子、三浦聡之、滝口雅文、俣野哲朗. HIV に対する宿主防御免疫機構: 自然免疫から適応免疫まで. *J. AIDS Res.* 10: 85-87, 2008.
- 宮澤正顯、河原佐智代、金成安慶、武田英里、坂本真由美、阿部弘之、木下さおり、湯浅貴恵、梶原栄二、馬野奈津子. レトロウイルス感染と宿主因子: エイズ制圧を目指して. *近大医誌* 33:209-238, 2008.
- Okabayashi, S., Ohno, C., Kato, M., Nakayama H., Yasutomi, Y. Congenital cystic adenomatoid-like malformation in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Vet. Path.* 45:232-235, 2008.
- Tsuchida, J., Yoshida, Y., Sankai, T. and Yasutomi, Y. Maternal behavior of laboratory-born, individually reared long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*) *J. Am. Assoc. Lab. Anim.* 47:29-34, 2008.
- Mori, H., Yamanaka, K., Matsuo, K., Yasutomi, Y. and Mizutani, H. Administration of Ag85B showed therapeutic effects to Th2-type cytokine-mediated acute phase atopic dermatitis by inducing regulatory T cells. *Arch Dermatol. Res. July Epub ahead*, 2008.
- Yasui, F., Kai, C., Kitabatake, M., Inoue, S., Yoneda M., Yokochi, S., Kase, R., Sekiguchi, S., Morita, K., Hishima, T., Suzuki, H., Karamatsu, K., Yasutomi, Y., Shida, H., Kidokoro, M., Mizuno, K., Matsushima K. and Kohara, M. Prior immunization with SARS-CoV nucleocapsid protein causes severe pneumonia in mice infected with SARS-CoV. *J. Immunol.* :181:6367-6348, 2008.
- Morioka, T., Yamanaka, K., Mori, H., Omoto, Y., Tokime, K., Kakeda, M., Kurokawa, I., Gabazza, E., Tsubura A., Yasutomi, Y. and Mizutani, H. IL-4/IL-13 antagonist DNA vaccination successfully suppresses Th2 type chronic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* in press.
- Okabayashi, S., Ohno, C. and Yasutomi, Y. Acute

megakaryocytic leukemia (AMKL)-like disease in a Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *J. Comp. Pathol.* in press.

7) Yasuhiro Yasutomi Chimeric recombinant hepatitis E virus-like particles presenting foreign epitopes as a novel vector of vaccine by oral administration. Holland, CR., and Miyamura, T. Eds. Structure-based study of viral replication. World Scientific. 2008;p539-p552.

清水裕也、唐松克夫、松原明弘、保富康宏：ワクチンアジュバントの開発 日本臨床 66：1915-1921、2008.

松原明弘、清水裕也、唐松克夫、保富康宏：経口ワクチンの開発 日本臨床 66：1873-1878、2008.

辻村祐佑、加藤翔太、保富康宏：アレルギー性疾患に対するワクチン開発 PHARMASTAGE 8：14-21、2009.

学会発表

K. Mori, C. Sugimoto, Nakamura, F. Ono, Y. Nagai, Y. Suzuki, and N. Yamamoto. Tropism of SIV infection determines pathogenicity and induction of protective response against pathogenic SIV infection. 26th annual symposium on nonhuman primate models for AIDS. December, 2008, San Juan, Puerto Rico.

heterologous SIV 感染モデルによる多様性ウイルス感染を防御する宿主応答の解析 森 一泰、杉本智恵、成瀬妙子、椎野慎一郎、武部豊、木村彰方、山本直樹、永井美之、日本エイズ学会、2008年、大阪

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

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

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

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

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

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

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. KRII-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

小林明子、芳田 剛、駒野 淳、小柳義夫、レンチウイルスバクテリウムを用いた抗 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

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

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
明里宏文、石田貴文、木村彰方: 霊長類における Toll-like receptor (TLR) 関連遺伝子の分子進化と自然選択 第 10 回日本進化学会 ワークショップ、東京、2008 年 8 月

中島敏晶、大谷仁志、颯田葉子、宇野泰広、明里宏文、石田貴文、木村彰方: 霊長類における Toll-like receptor (TLR) 関連遺伝子の分子進化と自然選択 第 17 回日本組織適合性学会、大阪、2008 年 9 月
中島敏晶、大谷仁志、颯田葉子、宇野泰広、明里宏文、石田貴文、木村彰方: 霊長類における Toll-like receptor (TLR) 関連遺伝子の分子進化と自然選択 第 53 回日本人類遺伝学会、横浜、2008 年 9 月

Naruse T, Chen Z, Yanagida R, Hinohara K, Mori K, Matano T, Miyazawa M, Kimura A: Diversity of MHC class I-A genes in rhesus macaque. 第 8 回あわじしま感染症・免疫フォーラム、兵庫、2008 年 9 月。
柳田梨紗、成瀬妙子、中島敏晶、照沼 裕、三間屋

純一、木村彰方: HIV 感染後 AIDS 発症の個体差と KIR 遺伝子多型との関連. 第 17 回日本組織適合性学会大会、大阪、2008 年 9 月。

成瀬妙子、柳田梨紗、俣野哲朗、森 一泰、保富康宏、宮澤正顕、木村彰方: ヒトおよびアカゲザルにおける NKG2D レセプター関連遺伝子の多型解析. 第 17 回日本組織適合性学会大会、大阪、2008 年 9 月。
成瀬妙子、陳 智勇、柳田梨紗、日野原邦彦、森 一泰、俣野哲朗、宮澤正顕、木村彰方: アカゲザル MHC-A (Mamu-A) 遺伝子群の多様性. 日本人類遺伝学会第 53 回大会、横浜、2008 年 9 月。

Naruse T, Kimura A: Immunogenetics of MHC in susceptibility to infectious disease. 11th Cardiovascular Genetics and Atherosclerosis Symposium Satellite Meeting, Seoul, Korea, Nov. 2008.

成瀬妙子、陳 智勇、柳田梨紗、日野原邦彦、森 一泰、俣野哲朗、宮澤正顕、木村彰方: アカゲザル MHC-A (Mamu-A) 遺伝子群の多様性. BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会)、神戸、2008 年 12 月

武田英里、河原佐智代、宮澤正顕、マウス APOBEC 3 はフレンド白血病ウイルスに対する宿主抵抗性因子である. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、2008 年 10 月 26 日～28 日、岡山。

松原明弘、清水裕也、加藤翔太、河岡義裕、保富康宏: IL-4 アンタゴニストを用いた Th 反応調節によるインフルエンザウイルス感染の制御 第 56 回日本ウイルス学会 岡山 10 月 26 日-28 日。

松原明弘、高村史記、清水裕也、保富康宏: SIVmac239 の Env gp120 アスパラギン結合型糖鎖欠損株を用いた SIV DNA ワクチンの開発 第 12 回日本ワクチン学会 熊本 11 月 8 日-9 日

千代智子、関口敏、松原明弘、保富康宏、脇田隆宇、村井深、小原道法: HCV 遺伝子組み換えワクチニアウイルスの作製とワクチンとしての検討 第 12 回日本ワクチン学会 熊本 11 月 8 日-9 日

関口敏、千代智子、飛田良美、松原明弘、保富康宏、
村井深、小原道法：HCV 遺伝子組み換えワクチニア
ウイルスの治療ワクチン効果第 12 回日本ワクチン
学会 熊本 11 月 8 日-9 日

Marni Cueno、唐松克夫、保富康宏、Antonio Laurena、
岡本尚：Immunogenicity of HIV-1 Tat protein
expressed in tomato. 第 56 回日本ウイルス学会 岡

山 10 月 26 日-28 日

H. 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

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

生ワクチンが誘導する感染防御へのウイルス多様性の影響；感染実験

研究分担者 森 一泰（国立感染症研究所 主任研究官）

研究要旨 SIVmac239 の糖鎖修飾を減少させた 4 種の変異ウイルス $\Delta 5G$, $\Delta 5Gver1$, $\Delta 5Gver2$, $\Delta 3G$ は *in vitro* でのマクロファージ指向性に違いがあったが、*in vivo* での性質の違いは観察されなかった。アカゲザル（1 群 3 頭、合計 12 頭）を用いた感染実験（100 TCID₅₀ 静脈内接種）において、すべての感染ザルは、SIVmac239 と同様の初期感染と初期感染後の感染抑制（25 週以降、血中ウイルス量は検出限界以下）を示した。生ワクチンとしての性質を調べるために、同一ウイルス株チャレンジ感染（SIVmac239 1000 TCID₅₀ 静脈内接種）を行った。すべての糖鎖変異株感染ザルにおいてチャレンジ感染が抑制された。4 種の変異株の感染防御宿主応答誘導が明らかとなった。次に糖鎖変異株とはサブタイプが異なる高病原性株：SIVsmE543-3 によるチャレンジ感染（1000 TCID₅₀ 静脈内接種）を行った。感染抑制には個体間の違いが見られたが、初期感染、慢性感染いずれにおいても、ワクチン群では、ワクチン未接種群と比べ 1/1000 以上の感染抑制が確認された。サブタイプが異なるウイルスに対する感染防御は、HIV ワクチンに求められるウイルス多様性への有効性を示すことから、HIV-1 ワクチン開発研究における糖鎖変異生ワクチンモデルの重要性が確認された。

A. 研究目的

HIV は慢性感染しウイルス感染が持続する。感染制御には細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が重要な役割を担う。CTL を効率良く誘導するプライムブーストワクチンが慢性感染期の感染制御に有効であることは、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の効果は限定的である。初期感染の抑制が低い、またワクチンの有効性は MHC 等の宿主因子に影響される。実際、プライムブーストワクチンの代表とされたアデノウイルスベクターワクチン (Ad5) の臨床実験は失敗し、HIV ワクチン開発研究の動向に大きな影響を与えた。多くの候補ワクチンについて臨床研究を行い、有効な

ワクチンを探すという従来の戦略は見直された。代わって、動物実験によるワクチン効果の客観的な評価等の条件が臨床研究開始に求められることになった。さらに防御免疫の理解こそ、この困難な状況を克服する道であるという判断から、動物モデルを用いた生ワクチンが誘導する防御免疫の解明が重要なテーマとなった。

HIV は高い変異性と多様性を持つ。主要 HIV-1 (group M) は 9 種類のサブタイプと複数のサブタイプ間の組み換えウイルスに分類される。サブタイプ内においても高い多様性がある。感染者体内においてもウイルス多様性は絶えず変化する。ウイルス多様性は HIV ワクチン開発における大きな課題となっている。我々は世界に先駆けて糖鎖