

200830005A  
200830005B

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20年度 総括・分担研究報告

平成18年～20年度 総合研究報告

主任研究者 廣井 隆親

平成21年（2009年）4月

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20年度 総括・分担研究報告

平成18年～20年度 総合研究報告

主任研究者 廣井 隆親

平成21年（2009年）4月

## 目 次

I. 平成20年度総括研究報告	
HIV 感染予防における経粘膜ワクチンの開発	
廣井隆親	1
II. 平成20年度分担研究報告	
1. 脂質代謝関連分子による持続感染性ウイルス増殖の抑制	
高橋秀実	7
2. 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	
横田恭子	11
III. 平成18年～20年度 総括総合研究報告	
1. HIV 感染予防における経粘膜ワクチンの開発	
廣井隆親	15
IV. 平成18年～20年度 分担総合研究報告	
1. HIV 感染予防における経粘膜ワクチンの開発	
高橋秀実	21
2. 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	
横田恭子	25
V. 全研究期間における研究成果刊行物一覧表	27
VI. 研究成果の刊行物・別刷	37

## I. 平成20年度総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金 エイズ対策研究事業  
平成20年度総括研究報告書

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 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抗原を用いて粘膜面に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<sup>+</sup>T細胞の誘導法を開発する。この場合、粘膜面に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. 研究目的

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<sup>+</sup>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。これら一連の研究により困難とされているHIVワクチン開発の一助と成り得るものと考えている。

## B. 研究方法

平成19年度に作製したHIVのenv遺伝子、SIVMAC239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、コントロールとして同上の組み合わせのうちIL-15遺伝子が挿入されていないMVASHIVをBALB/cマウスにそれぞれ、 $10^7$ pfuを投与ならびに接種した。投与経路として皮下、経鼻、経膣、経肛門の4種類を検討した。一ヶ月後に同量のウイルスを各投与経路で再投与した。その後血清、糞便、膣洗浄液を回収してELISAによりHIV特異的抗体価を測定した。また、免疫したマウスから採取した末梢血単核球(PBMC)や腸管粘膜固有層リンパ球(LPL)をENVペプチドで刺激して、培養上清中のIFN- $\gamma$ 量を測定した。さらに同細胞をENVペプチドで5時間in vitroにて刺激し、細胞内のサイトカイン(IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2)産生をフローサイトメトリーで解析し、抗原特異的CD8<sup>+</sup>T細胞中に含まれるmulti-functional CD8<sup>+</sup>T細胞の出現頻度を計測することにより、IL-15のアジュバント機能によって誘導される免疫増強の効果を検討した。

### (倫理面への配慮)

本研究では、主に実験用マウスならびに分離した細胞を使用して経粘膜HIVワクチンの開発を行った。実験用マウスの使用にあたっては、財団法人東京都臨床医学総合研究所動物実験施設指針や独立法人国立大学実験動物施設協議会指針ならびに厚生労働省国立感染症研究所動物実験施設指針などを厳守した。

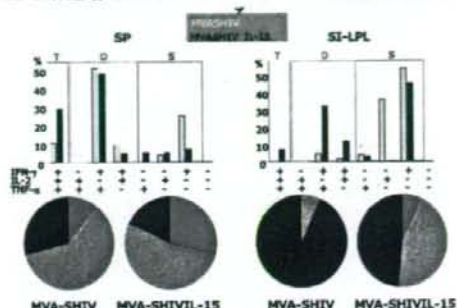
さらに本研究は HIV 菌体を使用するため国立感染症研究所において P3 レベルの実験室にて施設安全基準を厳守して研究を遂行した。

### C. 研究結果

各投与ルートで免疫したマウスの血清中の抗原特異的 IgG を測定した場合、皮下免疫した実験群に強い免疫誘導を確認した。また、経鼻、経膈に抗原特異的 IgG 免疫誘導が確認されたが、経肛門の投与では抗原特異的抗体の誘導は認められなかった。経肛門を除く、すべての投与方法で IL-15 による抗原特異的抗体産生量の増強が確認された。次に免疫したマウスの脾臓細胞ならびに小腸 LPL を分離して、HIV-1 ENV ペプチドで刺激し、3 日後培養上清中に含まれる IFN- $\gamma$  の量を ELISA 法によって検討したところ、皮下免疫した実験群がもっとも高い IFN- $\gamma$  産生を示し、その産生能は IL-15 によって顕著に上昇していた。MVASHIV と比較した MVASHIVIL-15 の IFN- $\gamma$  産生の上昇は、脾臓細胞では 3 倍と有意に確認されたが、小腸 LPL では 10 倍以上の顕著な増加を確認した。そこで、近年慢性的なウイルス感染症においてその CTL 活性の高さから注目を集めている multi-functional CD8T 細胞の頻度を皮下に免疫した実験群の脾臓細胞並びに小腸 LPL を用いて検討した。その結果 MVASHIVIL-15 を免疫した群の脾臓では、コントロールと比較して、multi-functional CD8T 細胞の頻度が上昇することが明らかになった。また小腸 LPL においては、コントロール群では multi-functional CD8T 細胞が検出できなかったが、

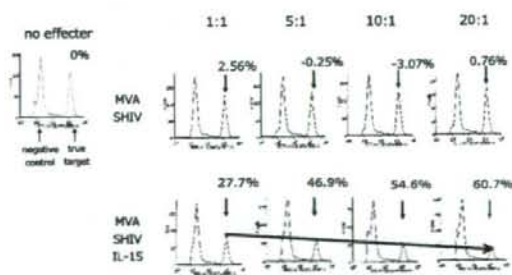
MVASHIVIL-15 を免疫した群では multi-functional CD8T 細胞が顕著に増加していた (図 1)。

図1 IL-15は腸管でmulti-functional CD8T細胞数を増加させ



さらにこれら誘導された multi-functional CD8T 細胞が実際に抗原特異的 CTL 活性を有するかを検討した結果、MVASHIVIL-15 を免疫した群におけるマウスの脾臓ならびに小腸より分離した CD8T 細胞は、IL-15 が挿入されていない MVA を免疫したマウスより分離した CD8T 細胞と比較検討した場合、env ペプチド特異的に優位に高い CTL 活性を有していた (図 2)。

図2 IL-15はmulti-functional腸管の CD8T細胞の強いCTL活性を誘導する



### D. 考察

近年の研究成果より HIV が感染後、おもに腸管で活性型メモリーCD4T 細胞に感染し増殖するということが明らかになっており、腸管免疫の活性化は、

今後のワクチン開発において非常に重要な基準になると思われる。今回の我々の研究結果である、皮下免疫+IL-15で小腸粘膜固有層リンパ球中に含まれるCD8T細胞を活性化するという結果は、粘膜免疫の誘導は全身性の抗原投与では困難であると考えられていた粘膜免疫の概念を刷新する知見であり非常に意義が高い。また multi-functional CD8T細胞は、近年 HIV 患者でありながら長期間後天的免疫不全症候群 (AIDS) を発症しない患者で増加が確認されており、今後のワクチン開発の新規の指標となり得る細胞群である。我々は IL-15 によって全身でこの multi-functional CD8T細胞が増加することを確認した。さらに腸管では通常誘導されない multi-functional CD8T細胞が MVASHIVIL-15 で誘導されたことは、腸管免疫の誘導によって HIV 感染を予防するという開発概念においては非常に将来性のある結果であると思われた。また multi-functional CD8T細胞を増加させる因子の探索は世界中で行われているが、我々の研究結果は世界に先駆けるものと考えられる。

#### E. 結論

第一に既存の概念として粘膜免疫は抗原の粘膜投与を用いないと誘導が困難と考えられていたが、我々は IL-15 をアジュバントに使用することで皮下投与という全身性の免疫法で小腸粘膜固有層の CTL を誘導した。この結果は学術的に非常に新規性の高い結果である。さらに世界中で multi-functional CD8T細胞の増殖因子が検索されているが、IL-15 によ

って同細胞群を増加させ、通常誘導されない腸管で multi-functional CD8T細胞の誘導ができたという結果は世界に先駆ける発見である。この結果により急性期の腸管における HIV の増殖が抑制される可能性が示唆されたことは臨床ならびに基礎研究において非常に意義の高いことである。

今後の展望として、当該研究で我々は IL-15 をアジュバントとして用いることで腸管粘膜を効率よく誘導できることを示した。今後はその誘導した免疫反応により実際に HIV を排除できることをヒト化マウスを用いた実験で検討する必要がある。腸管はメモリー細胞の貯蔵庫といわれる組織であるので、HIV の感染初期に腸管での HIV の増殖を抑制できれば、有効なワクチンとして働く可能性があり、またもし排除ができなくても、血中のウイルス量を低濃度で抑制できる可能性があるため、後天的免疫不全症候群の発症を遅らせることができる可能性がある。以上の結果をヒト化マウスの実験で行い、有意な抑制効果を示した場合、マカクザルを免疫して SIV の感染実験を行う予定である。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yokoyama, S., Watanabe, N., Sato, N., Filkoski, L., Tanaka, T., Miyasaka, M., Waldmann, T.A., Hiroi, T. (corresponding author) and Perera, L.P. Antibody-mediated blockade of IL-15 signaling reverses



- autoimmune intestinal damage in transgenic mouse model of celiac disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (in press)
2. Suzuki, K., Kaminuma, O., Yang, L., Motoi, Y., Takai, T., Ichikawa, S., Okumura, K., Ogawa, H., Mori, A., Takaiwa, F., Hiroi, T. Development of transgenic rice expressing mite antigen for a new concept of immunotherapy. Int Arch Allergy Immunol (in press)
  3. Kaminuma, O. Selective inhibitors of nuclear factor of activated T cells: Potential therapeutic drugs for the treatment of immunological and inflammatory diseases. Inflamm Allergy Drug Targets, 7: 35-40, 2008.
  4. Ohtomo, T., Miyatake, S., Kajiyama, Y., Umezu-Goto, M., Kaminuma, O., Mori, A. Airway eosinophilic inflammation is attenuated in conserved noncoding sequence-1 deficient mice. Int Arch Allergy Immunol, 146: S2-6, 2008.
  5. Suzuki, K., Kaminuma, O., Hiroi, T., Kitamura, F., Miyatake, S., Takaiwa, F., Tatsumi, H., Nemoto, S., Kitamura, N., Mori, A. Downregulation of IL-13 gene transcription by Tbet in human T cells. Int Arch Allergy Immunol, 146: S33-35, 2008.
  6. Kitamura, N., Kaminuma, O., Mori, A. A contraction assay system using established human bronchial smooth muscle cells. Int Arch Allergy Immunol, 146: S36-39, 2008.
  7. Kaminuma, O., Kitamura, F., Kitamura, N., Hiroi, T., Miyoshi, H., Miyawaki, A., Miyatake, S. Differential contribution of NFATc2 and NFATc1 to TNF- $\alpha$  gene expression in T cells. J Immunol, 180: 319-326, 2008.
  8. Takagi, H., Hiroi, T., Yang, L., Takamura, K., Ishimitsu, R., Kawauchi, H., Takaiwa, F. Efficient induction of oral tolerance by fusing cholera toxin B subunit with allergen-specific T-cell epitopes accumulated in rice seed, Vaccine 26: 6025-6028, 2008.
  9. Kaminuma, O., Kitamura, F., Kitamura, N., Miyatake, S., Miyoshi, H., Miyawaki, A., Inokuma, S., Tatsumi, H., Nemoto, S., Kitamura, N., Mori, A., Hiroi, T. Tbet is responsible for incomplete Th2 differentiation in human peripheral CD4+ T cells J Allergy Clin Immunol (in press)
2. 学会発表
    1. 山岡和子、岡山吉道、神沼修、形山和史、森晶夫、巽英樹、根本荘一、廣井隆親 ヒトマスト細胞の活性化に伴うチロシンリン酸化変動たんぱく質の解析 アレルギー・好酸球研究会、東京、2008.
    2. Yamaoka, K., Mishima, K., Nishikawa, R., Matsutani, M., Yamamoto, Y. and Hiroi, H. Proteomic analysis for phosphotyrosine-containing proteins during malignant progression of gliomas. 第6回日本ヒトプロテオーム機構大会、大阪、2008.
    3. 神沼修、加藤茂樹、大友隆之、森晶夫、廣井隆親. T細胞依存性のアレルギー性炎症発症におけるCD44の役割. 第58回日本アレルギー学会総会、東京、2008.
    4. Kaminuma, O., Kitamura, F., Kitamura, N., Miyatake, S., and Hiroi, T. C-terminal transactivation domain is required for NFAT-mediated TNF- $\alpha$  synthesis by T cells. 第38回日本免疫学会総会、京都、2008.
    5. 鈴木一矢、神沼修、楊麗軍、高井敏郎、野田攸子、大町康、後藤牧子、森晶夫、高岩文雄、廣井隆親. 形質転換イネを用いたダニアレルギー緩和米の開発. アレルギー・好酸球研究会 2008.

- 東京、2008.
6. 萱室裕之, 吉岡靖雄, 鎌田春彦, 形山和史, 阿部康弘, 野村鉄也, 廣井隆親, 吉川 友章, 角田慎一, 堤康央. 活性増強型 TNF 変異体の粘膜ワクチンアジュバントとしての応用. 第 128 年会 日本薬学会, 横浜, 2008.
  7. 萱室裕之, 吉岡靖雄, 形山和史, 鎌田春彦, 野村鉄也, 阿部康弘, 廣井隆親, 角田慎一, 堤康央. TNF スーパーファミリーに着目した粘膜ワクチンアジュバント能の体系的評価. 第 56 回日本ウイルス学会, 岡山, 2008.
  8. 鎌田春彦, 萱室裕之, 吉岡靖雄, 形山和史, 廣井隆親, 阿部康弘, 角田慎一, 堤康央. 活性増強型 TNF $\alpha$  構造変異体の粘膜ワクチンアジュバントへの応用. 第 22 回 日本エイズ学会, 大阪, 2008.
  9. Kayamura, H., Yoshioka, Y., Katayama, K., Kamada, H., Nomura, T., Abe, Y., Hiroi, T., Tsunoda, S. and Tsutsumi Y. A bioactive mutant TNF (mTNF-K90R) elicited mucosal and systemic immunity against HIV-1 gp120 and influenza virus hemagglutinin. 第 38 回日本免疫学会総会, 京都, 2008.
  10. Yoshioka, Y., Kayamura, H., Katayama, K., Kamada, H., Nomura, T., Abe, Y., Hiroi, T., Tsunoda, S. and Tsutsumi Y. Identification of new candidates as mucosal vaccine adjuvant in TNF superfamily cytokines. 第 38 回日本免疫学会総会, 京都, 2008.
  11. Suzuki, K., Lijun, Y., Takai, T., Ichikawa, S., Hirose, S., Mori, A., Umezu-Goto, M., Ohmachi, Y., Noda, Y., Okumura, K., Ogawa, H., Takada, K., Hirasawa, M., Kaminuma, O., Takaiwa, F., and Hiroi, T. Prevention of allergen-induced airway inflammation by Der p 1 expressed transgenic rice. 第 38 回日本免疫学会総会, 京都, 2008.
  12. 鈴木一矢, 神沼修, 高井敏朗, 森晶夫, 奥村康, 小川秀興, 廣井隆親, 高岩文雄. ダニ抗原 Der p 1 を発現した形質転換イネのアレルギー性気道炎症に対する効果. 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2008.
  13. Yokoyama, S., Watanabe, N., Sato, N., Filkoski, L., Tanaka, T., Miyasaka, M., Waldmann, TA., Perera, LP. and Hiroi, T. Antibody-mediated blockade of IL-15 signaling reverses autoimmune intestinal damage in transgenic mouse model of celiac disease. 第 38 回日本免疫学会総会, 京都, 2008.
  14. Kaminuma, O., Kitamura, F., Kitamura, N., Miyatake, S., Hiroi, T. TNF- $\alpha$  synthesis is differentially regulated by NFATc1 and NFATc2 in T cells. Experimental Biology 2008, AAI Block Symposia "Regulation of effector function and homeostasis by cytokines" (San Diego), 2008.
- H. 知的財産権の出願・登録状態  
該当なし

## Ⅱ. 平成20年度分担研究報告

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

脂質代謝関連分子による持続感染性ウイルス増殖の抑制

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 高橋めぐみ 日本医科大学微生物学免疫学教室 助教

研究要旨

我々はウイルスの持続感染成立に関与する宿主側の因子を明らかにする目的で麻疹ウイルス変異株が持続感染したヒトのグリオーマ細胞株を樹立した。2次元電気泳動法によりこの細胞の発現分子を非感染細胞や野性株ウイルスが感染した細胞と比較した結果、mitochondrial short chain enoyl-CoA hydratase (ECHS) という分子が持続感染細胞において著明に発現が低下していることが観察された。ECHS がウイルスの複製に関与しているかどうかを明らかにするために siRNA により人為的に ECHS の発現を低下させた細胞に麻疹ウイルスを感染させるとウイルス産生が抑制されることが示された。さらに我々はウイルス複製を抑制する作用はインターフェロンによるものではないこと、また水痘性口内炎ウイルスなど他のウイルスの複製も抑制されることを見いだした。ECHS は脂質の $\beta$ 酸化に関与する酵素でありこの分子の発現を低下させても細胞増殖等にほとんど影響が見られないことから抗ウイルス薬の新しい標的分子となりうる可能性が示唆された。

A. 研究目的

ウイルス感染症においては急性で致死性の高い感染症とともに、最近では長期にわたる持続感染により免疫系の破綻や発癌に関与するウイルス感染症が大きな問題となってきた。ウイルスの持続感染成立に関しては、免疫システムがウイルスやその感染細胞を認識できないためにこれらを排除出来ず持続感染状態に陥る、あるいはウイルスや細胞の遺伝子発現が変化し感染細胞が破壊せず存続するような変化をきたす、等の説があるが、いずれにしてもウイルス側及び宿主側双方の要因が複雑に絡み合っていると思われ詳しいメカニズムについては不明である。

麻疹ウイルスを始め感染及び罹患後持続感染に移行するいくつかのウイルスは、種々の細胞培養系において持続感染状態を樹立維持できることが知られている。我々の研究室では以前より麻疹ウイルス変異株をいくつか分離していたことから、麻疹ウイルス持続感染症としてよく知られている亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) を想定しヒトのグリオーマ細胞に変異ウイルスを感染させ麻疹ウイルス持続感染細胞株 (A172-448) を樹立した。この持続感染細胞の培養上清中には感染性のウイルスが存在しており intact なグリオーマ細胞にこの培養上清を加えて培養すると細胞融合

が誘発され細胞死に至った。A172-448 においては増殖速度も元のグリオーマ細胞とほとんど変わらず細胞融合もみられないことから持続感染細胞においてはどのようにウイルスを制御し細胞死を免れているのか、そのメカニズムを明らかにする目的で以下の実験を行った。

B. 材料と方法

1 持続感染細胞の樹立：ヒトのグリオーマ細胞 A172 に温度感受性麻疹ウイルス変異株 P-448 を感染させ生残した細胞を継代培養することにより持続感染細胞株を樹立した。

2 LC/MS/MS による発現蛋白質の解析：細胞溶解液中の蛋白質を 2 次元電気泳動により分離し銀染色により分離された蛋白質スポットを検出した。目的のスポットをゲルから切り出し LC/MS/MS にて蛋白質の同定を行った。

3 siRNA transfection：ECHS の発現を抑制するために 4 種類の siRNA を作成し予め A172 細胞に transfection し ECHS の発現が減少した細胞を調製した。

C. 結果

1 持続感染細胞特異的に発現が変動している分子を見いだすため、非感染細胞、持続感染細胞、変異ウイルスの野性株を感染させた A172 細胞の 3 種類の細胞について 2 次元電気泳動で蛋白質の分離を行いそれらの発現蛋白質を比較した。その結果 Fig. 1 に示すように 3 種類の蛋白質が同定されたが、我々はこのうち元々の発現量に比べ持続感染細胞において著しく発現量が減少している ECHS について調べることにした。

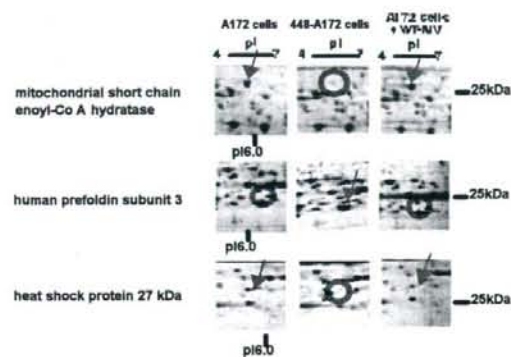


Fig. 1 持続感染細胞における特異的発現分子群

2 A172 細胞に ECHS に対する siRNA を transfection し予め ECHS の発現を減少させた細胞に麻疹ウイルスを感染させウイルスの増殖程度を調べた。その結果 Fig. 2 に示すように control siRNA を transfection した細胞が産生するウイルス量と比べ細胞内外のウイルス量は明らかに減少しており細胞変性効果 (CPE) も検出されなかった。またウェスタンブロット法によりウイルス蛋白質、定量 PCR 法によりウイルス RNA の発現を定量的に測定しそれぞれ大幅に発現が低下していることを確認した。

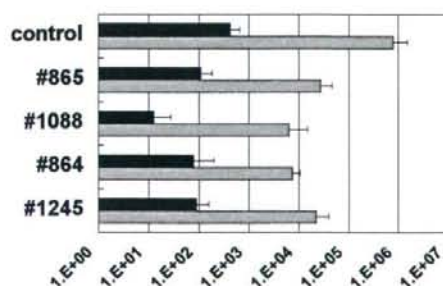
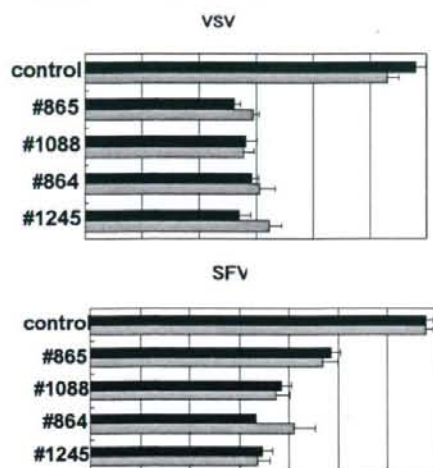


Fig. 2 ECHS 発現量とウイルス増殖との関連

3 他のウイルスに対する効果: ECHS の発現が変動することにより他のウイルスの増殖も影響されるかどうか検討するために ECHS の siRNA を transfection した細胞に水疱性口内炎ウイルス (VSV)、セムリキ森林ウイルス (SFV) を感染させその増殖程度を調べた。Fig. 3 に見られるように両タイプのウイルスとも強くその増殖が抑制されまた CPE も検出されなかった。



4 インターフェロンの関与: このウイルスの増殖抑制がインターフェロンを介するものではないことを証明するために siRNA を transfection した細胞の IFN 産生能を調べた。A172 細胞はもともと少量の IFN- $\alpha$  を産生しているがその産生量が増えたりあるいは siRNA の transfection により新たに IFN- $\beta$  や IFN- $\gamma$  の発現が誘導されることはなかった (Fig. 4)。

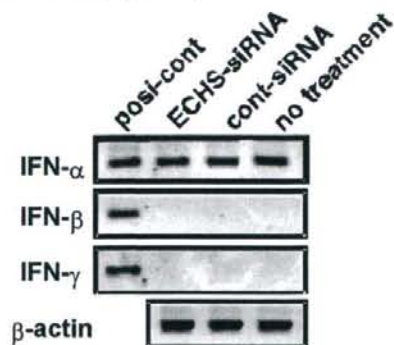


Fig. 4 ECHS によるウイルス増殖抑制はインターフェロンとは無関係

#### D. 考察

今回我々は麻疹ウイルス変異株が持続感染した細胞は、非感染細胞あるいは野性株ウイルスが感染した細胞とは発現量が異なる蛋白分子がいくつか存在することを見いだした。我々はこのうち特に発現の差が大きかった ECHS という分子について解析を進めることにし、siRNA により人為的に ECHS の発現を減少させた細胞においてもウイルスの増殖が抑制されるかどうか検討した。その結果麻疹ウイルスのみならず他の RNA ウイルスの増殖も抑制されることが明らかになった。ECHS は脂質の  $\beta$  酸化に関与する酵素の一つでありエネルギー産生に寄与する。これまで酵素学的性状や構造については詳細に調べられているが、その発現の調節や疾病との関係についての報告は少なくまだ不明な点が多い。少数ではあるが癌細胞では ECHS の発現が減少しているという報告や C 型肝炎ウイルス罹患者の肝臓においてもその発現が減少していたという報告がなされており発癌とも関連があるのかもしれない。

最近ウイルス複製に関与する細胞内因子が数多く見いだされてきた。例えば HIV-1 の場合 APOBEC や TRIM5a のような抗ウイルス活性を持つ分子によってその複製が抑制されることが知られている。APOBEC は cytidine deaminase に保存されたアミノ酸配列を有する DNA 変換酵素であり、HIV-1 ウイルスのマイナス鎖 DNA の dC を dU に変換することにより、HIV-1 の複製を阻害する。なぜ細胞内の ECHS の発現が減少するとウイルスの増殖が抑制されるかその詳しいメカニズムについてはまだ明らかにしていないが、一般的にウイルスの複製が抑制されるメカニズムとしてはウイルスの複製に必要な細胞内因子が欠除している場合、あるいは APOBEC のように積極的にウイルスの複製を抑制する機構が細胞に存在する場合が考えられる。ECHS の発現が抑制されることにより発揮される抗ウイルス活性はその両方に関与している可能性がある。つまり  $\beta$  酸化が阻害されることによりエネルギー代謝が低下し ATP が不足するためにウイルス複製の進行が遅くなる、あるいは脂肪酸の分解が低下するため分解されない脂肪酸やその中間代謝物が蓄積しウイルスの複製に悪影響を及ぼす、などの可能性が考えられる。

これまで抗ウイルス薬として知られている多くの薬剤は細胞の代謝にも影響するため副作用が問題になることが多かった。しかし ECHS の発現を低下させても細胞増殖速度はほとんど変化しなかったことから細胞への影響は少ないと思

われる。このことから今後 ECHS を含め脂質代謝に関わる分子を標的とした副作用の少ない新しい抗ウイルス薬の開発に繋がることを期待し研究を進展させるつもりである。

#### D. 論文発表

1. 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.* 180:4000-4010, 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.* 75:152-158, 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.* In press 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. 高橋秀実 : 免疫応答とエネルギーめぐり, 癒しの環境 13: 34-36, 2008.
8. 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の可能性. *臨床免疫・アレルギー科* 43: 223-238, 2008.
9. 若林あや子、高橋秀実 : 感染症と栄養・機能性食品 *本機能性食品学会誌* 4: 373-378, 2008.
10. 高橋秀実 : HIV に対する防御・細胞性免疫の役割 *治療* 42:72-76, 2008.
11. 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: 45-51, 2008.
12. 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: 157-163, 2008.
13. 高橋秀実 : 日本医科大学微生物学・免疫学講座. *ウイルス* 58: 232-234, 2008.
14. 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: 285-290, 2009.
15. 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
16. 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
17. 高橋秀実 : アレルギー疾患における漢方薬の作用機序に対する一考察. *日本小児科学会雑誌* 2009 印刷中

#### E. 書籍

1. 高橋秀実 : リッピンコット・イラストレイテッド免疫学 (矢田純一、高橋秀実) 丸善出版 2009.

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

協力研究者 寺原 和孝 国立感染症研究所・免疫部・研究員

研究要旨

免疫不全マウスにヒト臍帯血由来 CD34 陽性幹細胞を導入したヒト化マウスを作製して蛍光発現組換え HIV-1 を感染させたところ、R5 型 HIV-1 感染細胞集団をフローサイトメーターで確認することが可能であった。この様なヒト化マウスの HIV-1 感染モデルは今後ワクチンの有効性を評価するために有用である。

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 遺伝子を IRES-Nef 遺伝子上流にコードするプロウイルスクローン pNL-E あるいは pNLAD8-D のプラスミドを 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。

2. マウス

NOD/SCID/Jak-3 KO マウスは熊本大学エイズ学研究センター岡田誠治教授より供与をうけ、感染研で繁殖させた。

3. ヒト化マウスの作製

臍帯血よりファイコールで単核球を分離し、CD34 分離キット (StemCell Technology) を用いて血液幹細胞をエンリッチした。

(なお、ヒト臍帯血は東京臍帯血バンクの倫理委員会の承認を受けて供与され、ヒト臍帯血を移入したヒト化マウスの作製は、平成 19 年 7 月 24 日に感染研のヒトを対象とする医学研究倫理委員会の承認を受けている)

4. HIV 感染と FACS 解析

ヒト化マウスに上述の組換え HIV-1 を静脈注射し、感染約 1, 2 週間後の末梢血を採取し、3 週

間後にマウスを安楽殺した。血液細胞は赤血球を溶解後、各種蛍光標識抗体 (Pacific Blue 標識抗ヒト CD45, FITC 標識抗マウス CD45, PE-Cy7 標識抗ヒト CD3, AmCyan 標識抗ヒト CD4, APC-Cy7 標識抗ヒト CD8) で染色し、FACS Calibur (BD BioScience 社) で生細胞 (PI 陰性) にゲートをかけて解析した。

C. 研究結果

新生 NOD/SCID/Jak-3 KO マウスの肝臓に臍帯血由来 CD34 陽性幹細胞を入れたマウスを作製し、経時的にマウス体内で増殖維持されるヒト血液細胞を解析した。その結果、生後約 15 週齢以降には CD4 陽性のヒト T 細胞集団がフローサイトメトリー上で明確に検出可能であることが明らかとなった。そこで 3 匹のマウスを用いて我々の作製した蛍光を発する X4 型、R5 型あるいは両方の HIV-1 を同量感染させ、感染後の血中ウイルス量の測定と感染細胞の検出を行った。そのうち 2 匹において感染後 2 週間目をピークとする血中ウイルス量の増大を観察した。感染後 1 週間の血液細胞を解析したところ、両方のウイルスを同時に感染させた 1 匹のマウスにおいて明らかな R5 型 HIV-1 (HIV<sub>NLAD8-D</sub>) 陽性感染細胞が検出された (図 1)。

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。ヒト化マウスの場合、xenogenic なマウス体内で分化成熟したヒト T 細胞は、ほとん



どが静止期にあるヒト末梢血 T 細胞とは異なるもののその活性化状態は限定されていると考えられる。従って外来からの免疫刺激の少ない環境で飼育されたマウスにおいては、X4 型よりも R5 型 HIV-1 の増殖が優位となることを想定していたが、実際にその傾向があることが確認された。X4 型と R5 型 HIV-1 のウイルス感染様式についてはヒト化マウスの匹数を増やして更に詳細な検討が必要である。この様なヒト化マウスの HIV-1 感染系の確立は多くのワクチンや薬剤をヒトの細胞でスクリーニングすることを可能にさせ、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

免疫不全マウスにヒト臍帯血 CD34 陽性幹細胞を導入したヒト化マウスの作製を行った。マウスの週齢とマウス体内でのヒト血液細胞の分化増殖を解析し、ほぼ 3-4 か月程度でヒト CD4 陽性 T 細胞が優位に増加してくるマウス個体が得られることを確認した。一部のマウスに蛍光発現組換え HIV-1 を感染させてその経過を観察し、感染後 1 週間目の末梢血リンパ球において R5 型 HIV-1 感染細胞集団を検出した。この様なヒト化マウスの HIV-1 感染系の確立は今後ワクチンの有効性を評価するモデルとして有用である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yamamoto, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Mitsuki, Y-Y, Mizukoshi, F., Terahara, K., Inagaki, Y., Yamamoto, N., Kobayashi, K. and Inoue, J-I.: Selective transmission of R5 HIV-1 over X4 HIV-1 at the dendritic cell-T cell infectious synapse is determined by the T cell activation state. **PLoS Path.** 5:e1000279, 2009
- 2) Mizukoshi, F., Yamamoto, T., Mitsuki, Y-y., Terahara, K., Kawana-Tachikawa, A., Kobayashi, K., Iwamoto, A., Morikawa, Y., and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Activation of HIV-1 Gag-specific CD8<sup>+</sup> T cells by yeast-derived VLP-pulsed dendritic cells is influenced by the

level of mannose on the VLP antigen. **Microbes Infect.** 11:191-197, 2009

- 3) Komuro, I., Sunazuka, T., Akagawa, S.K., Tsunetsugu-Yokota, Y., Iwamoto, A., and Omura, S.: Erythromycin-derivatives inhibit HIV-1 replication in macrophages through modulation of MAPK activity to induce small isoform of C/EBP $\beta$ . **Proc Natl Acad Sci USA.** 105:12509-14, 2008
- 4) Yamamoto, T and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Prospects for the therapeutic application of lentivirus-Based gene therapy to HIV-1 infection. **Curr Gene Ther.** 8:1-8, 2008

### 2. 学会発表

- 1) Terahara, K., Mizukoshi, F., Yamamoto, T., Mitsuki, Y-Y, Tsuchiya, T., Kobayashi, K. and Tsunetsugu-Yokota, Y.: HIV-1 Nef dysregulates the innate immune function of macrophages, The 8<sup>th</sup> Awaji International Forum of Infection and Immunity, September 7-11, 2008
- 2) Mitsuki, Y-Y, Yamamoto, T., Tsunetsugu-Yokota, Y.: Selective transmission of R5 HIV-1 over X4 HIV-1 at the dendritic cell? T cell infectious synapse is determined by the T cell activation state. The 9<sup>th</sup> Seminar in Kumamoto, Kumamoto, September 16-17, 2008
- 3) 山本拓也、光木裕也、水越文徳、寺原和孝、稲垣好雄、山本直樹、横田(恒次)恭子: 樹状細胞の抗原提示に伴う感染シナプスを介した R5 型 HIV-1 選択的伝播機構の解析。第 56 回ウイルス学会、岡山、平成 20 年 10 月
- 4) 水越文徳、山本拓也、光木裕也、寺原和孝、小林和夫、横田(恒次)恭子: Nef 蛋白質発現に伴うマクロファージの自然免疫機能異常に関する解析。第 22 回日本エイズ学会、大阪、平成 20 年 11 月。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

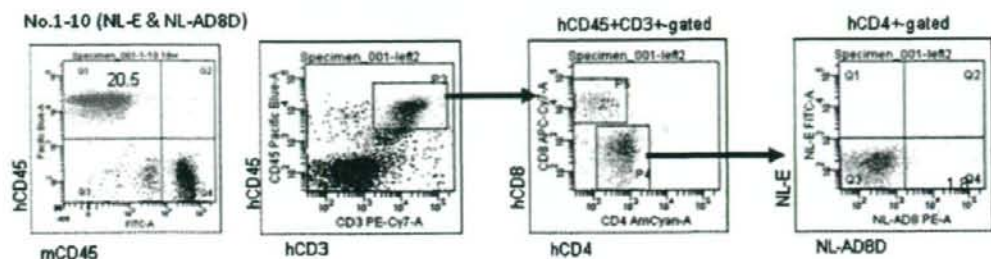


図1 ヒト化マウスへの HIV-1 感染様式の解析

18週齢のヒト臍帯血移植マウスに HIV<sub>NL-E</sub>(X4)と HIV<sub>NL-AD8-D</sub>(R5)それぞれ 200 ng づつを静脈注射し、1週間後の末梢血中の単核球を蛍光染色して FACScanto で解析した。リンパ球分画にあるヒト血液細胞(hCD45<sup>+</sup>)にゲートをかけてマウス血液細胞(mCD45<sup>+</sup>)と区別し、更に T 細胞(CD3<sup>+</sup>)を CD4<sup>+</sup>と CD8<sup>+</sup>に分け、CD4<sup>+</sup>細胞の蛍光シグナルを解析した。赤色蛍光 (HIV<sub>NL-AD8-D</sub>) 陽性の R5 型 HIV 感染細胞が 1.8% (Q4)検出されたが、緑色蛍光 (HIV<sub>NL-E</sub>(X4)) 陽性の X4 型 HIV 感染細胞は検出されなかった。