

築した分子の合成に成功した。また、CXCR4 の細胞外ループを合成し、テンプレートへ導入した。また、gp120 のエピトープ提示のための環状ペプチドを合成し、マウスで抗体誘導を調べた。さらに、この抗原分子に特異的に結合する抗体を得るため、ファージディスプレイライブラリーから *in vitro* アフィニティー選択を行った。細胞毒性の軽減した CD4 ミミック等を合成し、抗 V3 抗体の認識を増強させることを見出した (玉村)。初期感染において生ワクチン Δ5G は野性株 SIV239 と同様に CD4+T 細胞に感染・増殖していた。小腸粘膜組織において、Δ5G 感染では粘膜固有層、SIV239 感染では孤立リンパ小節に感染細胞の局在が明らかとなった。フローサイトメトリー解析からも Δ5G は effector memory 細胞、SIV239 は central memory 細胞での感染が確認された (森)。nef 欠失 SHIV 免疫 4 週間という早期に強毒 SHIV を攻撃接種したことによりサル個体ごとに感染防御の程度に違いが認められた。それらの全身深部組織解析から腸管のエフェクターメモリー CD4T 細胞がウイルス感染により特に破壊されやすいこと、よくウイルスを抑制したサルでは腸管のメモリー CD4T 細胞が維持されていたことが明らかとなった (三浦)。Ag85B リコンビナント蛋白によりリコンビナント HIV ワクチンにおいて細胞性免疫誘導が期待できるアジュバント効果が認められた (保富)。キトサン関連物質のカニクイサル経鼻投与によるアジュバント活性が認められた。また副作用を示す血液学的異常は認められなかった。キトサン関連物質と HIV-1env タンパク質の混合液をマウス経鼻投与して得られた血清を用いた HIV 中和試験では若干であるが中和活性を示唆するデータが得られた (石川)。経口免疫法による粘膜内 CTL の誘導法を確率するとともに、HIV 感染樹状細胞制御への関与が想定される CD1a 拘束性 CD8+T 細胞株及び、CD1d 拘束性 NKT 細胞株を樹立出来た (高橋)。

4. 考察

とくに HIV の易変異性とウイルス間の高いリコンビネーションの確率から、エイズワクチンの実現にはすくなく困難が待ち構えている。ただ分担研究者の個々のプロジェクトはそれぞれユニークなものであり、今後のワクチン開発にとって、貴重な研究資料となるであろう。

5. 自己評価

1) 達成度について

90-120-1a 陽性サルへの Gag を主抗原とする予防 DNA/SeV ワクチン接種後の変異 SIV チャレンジ実験の結果は、これまで明らかになってきた 90-120-1a 陽性ワクチン接種サルの野生型 SIVmac239 持続感染成立阻止効果が、Gag 特異的 CTL によるものであることを証明するものであり、目的とする成果が得られたと考えている。本成果は、Gag 特異的 CTL 誘導ワクチン効果・機序を初めて実証したのとして学術的に重要であるとともに、Gag に含まれる領域がワクチン抗原として有効であることを明確にした点でワクチン実用化においても重要である (保野)。Gag を標的とする細胞性免疫誘導型 rBCG/rDis ワクチンの評価は、その至適化により実用を視野にいたした human dose における免疫原性・持続性を確認できた。しかし、BCG、Dis を用いた gp140、gp145 を標的とする液性免疫誘導型ワクチンでは、中和抗体能の評価系の確立が望まれる (山本・網)。作製した m8Δ-gag は期待通りの免疫原性を示し、猿での SIV 感染抑制効果が期待できる。CD40Lm は免疫増強効果を示さなかったが、これはこれで 1 つの結論

だと考える (志田)。飲むワクチンへ応用するために創製された Senju vaccine が、中和抗体を誘導する免疫原性を有することを確認されたこと、また、Senju vaccine 創製に関連する特許を出願中であることは評価される (庄司)。昨年度に引き続き、4 種の抗体誘導のアプローチをすすめている。単量体の gp41 についてはすでにマウスで有効性を確認していたが今年度、三量体の gp41 の抗原分子の作製にも成功し、免疫を行っている。さらに、gp120 もマウスへの免疫とファージでの抗体作製に取りかかっており、有望なファージが選択されている。コレセプターの細胞外ループは効率的な改良法を確立し、マウスでの評価を行っている (玉村)。強力な防御免疫を遺伝的性質の違いに拘わらず誘導する生ワクチンの性質として Δ5G の免疫組織における組織特異性の特徴が明らかとなり、重要な知見であると考えられた (森)。今回の結果からウイルス感染により障害されやすい腸管のメモリー CD4T 細胞を維持することが重要と考えられ、サルモデルにおけるその評価系を確立した。エイズワクチン開発に向けて重要な知見が得られ、当初の目的はある程度達成できたものと考えられる。

(三浦)。リコンビナント蛋白ワクチンに用いるアジュバントとして Ag85B が有効であることが示唆された。さらにこのアジュバント効果は BCG において増強されることが示された (保富)。液性免疫という観点からはこれまで使用してきたキトサン関連物質の粘膜アジュバント活性が確認され、カニクイサルにおいても同様な結果が認められた事は、より人への応用が近付いたと考えられる。ただ今回は細胞性免疫の検討を行っていないので、今後は細胞性免疫誘導能も併せて検討する必要がある (石川)。経口免疫法による粘膜内 CTL の誘導法を確立するとともに、HIV に感染した樹状細胞上でクラス I MHC 分子のみならず CD1a、CD1d 分子の発現低下が確認でき、その制御に関わる CD1a 拘束性 CD8+T 細胞株及び、CD1d 拘束性 NKT 細胞株を樹立でき、本年度当初の目的は十分に達成されたと考えられる (高橋)。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

現在、抗レトロウイルス薬の役割に大きな関心が向けられているが、エイズの世界的な蔓延をもっとも効率よく防ぐにはワクチンしかない。本研究班からのユニークな研究が、真の感染予防ワクチン開発につながることを期待される。

3) 今後の展望について

これまでのエイズワクチンの開発では、細胞性免疫誘導を目的とした細胞性免疫志向ワクチンの開発が行われてきた。しかし、将来のエイズ ワクチン開発が目指すものは、他のワクチンの場合と同じように、HIV ウイルスからの感染を防ぐ事である。そのためには、HIV Env 蛋白の極度の多様性と中和抗体などの液性免疫からの逃避機構まで考慮に入れた対応が求められている。

6. 結論

班員の密な協力と情報交換のもと、HIV 感染予防ワクチンの開発研究を総合的に行った。とくにプライムブースト、新規ベクター開発、免疫原デザイン、弱毒生ワクチン、アジュバント、自然免疫の研究を精力的に行い、有用な結果が得られた。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

特許 庄司省三 1 件、玉村啓和 1 件。

研究発表

研究代表者

山本直樹

- 1) Saitoh T, Fujita N, Jang M H, Uematsu S, Yang B-G, Satoh T, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Komatsu M, Tanaka K, Kawai T, Tsujimura T, Takeuchi O, Yoshimori T and Akira S. Loss of Atg16L1, an autophagy regulator, enhances endotoxin-induced IL-18 production. *Nature*, 456(7219):264-268, 2008.
- 2) Yajima M, Imadome KI, Nakagawa A, Watanabe S, Terashima K, Nakamura H, Ito M, Shimizu N, Honda M, Yamamoto N, and Fujiwara S. A New Humanized Mouse Model of Epstein-Barr Virus Infection That Reproduces Persistent Infection, Lymphoproliferative Disorder, and Cell-Mediated and Humoral Immune Responses. *J. Infect. Dis.* 198(5):673-682, 2008.
- 3) Urano E, Shimizu S, Futahashi Y, Hamatake M, Morikawa Y, Takahashi N, Fukazawa H, Yamamoto N, and Komano J. Cyclin K/CPR4 inhibits primate lentiviral replication by inactivating Tat/positive transcription elongation factor b-dependent long terminal repeat transcription. *AIDS*. 22(9):1081-1083, 2008.
- 4) Koyanagi Y, Tanaka Y, Ito M, and Yamamoto N. Humanized mice for human retrovirus infection. (Nomura, Watanabe, and Habu Eds.) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 324:138-148, Springer-Verlag, 2008.
- 5) Terunuma H, Deng X, Dewan MZ, Fujimoto S, and Yamamoto N. 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.
- 6) Okuma K, Tanaka R, Ogura T, Ito M, Kumakura S, Yanaka M, Nishizawa M, Sugiura W, Yamamoto N, and Tanaka Y. Interleukin-4-Transgenic hu-PBL-SCID Mice: A Model for the Screening of Antiviral Drugs and Immunotherapeutic Agents against X4 HIV-1 Viruses. *J. Infect. Dis.* 197(1):134-141, 2008.
- 7) 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, and Yamamoto N. 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.* 105:294-299, 2008.

研究分担者

俣野哲朗

- 1) Seki S, Kawada M, Takeda A, Igarashi H, Sata T, and Matano T. Transmission of simian immunodeficiency virus carrying multiple cytotoxic-T-lymphocyte escape mutations with diminished replicative ability can result in AIDS progression in rhesus macaques. *J. Virol.* 82:5093-5098, 2008.
- 2) Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Iwamoto N, Kurihara K, Takeda A, Moriya C, Takeuchi H, Akari H, and Matano T. Gag-specific cytotoxic T lymphocyte-based control of primary simian immunodeficiency virus replication in a vaccine trial. *J. Virol.* 82:10199-10206, 2008.
- 3) Takeda A, Igarashi H, Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Inoue M, Iida A, Shu T, Hasegawa M, and Matano T. Evaluation of the immunogenicity of replication-competent V-knocked-out and replication-defective F-deleted Sendai virus vector-based vaccines. *Vaccine* 26:6839-6843, 2008.

志田壽利

- 1) Ohashi T, Nagai M, Okada H, Takayanagi R, and Shida H. Activation and Detection of HTLV-I Tax-specific CTLs by Epitope expressing Single-Chain Trimers of MHC Class I in a rat model. *Retrovirology*, in press.
- 2) Suzuki H, Kidokoro M, Fofana I B, Ohashi T, Okamura T, Matsuo K, Yamamoto N, and Shida H. Immunogenicity of newly constructed attenuated vaccinia strain LC16m8Δ that expresses SIV Gag protein. *Vaccine*, in press.
- 3) 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.* 181:6337-6348, 2008.

庄司省三

- 1) Misumi S, Masuyama M, Takamune N, Nakayama D, Mitsumata R, Matsumoto H, Urata N, Takahashi Y, Muneoka A, Sukamoto T, Fukuzaki K, and Shoji S. Targeted delivery of immunogen to primate M-cells with tetragalloyl lysine dendrimer. *J. Immunol.* revised, 2008.
- 2) Endo M, Inatsu A, Hashimoto K, Takamune N, Shoji S, and Misumi S. Human immunodeficiency virus-induced apoptosis of human breast cancer cells via CXCR4 is mediated by the viral envelope protein but does not require CD4. *Curr. HIV Res.* 6:34-42, 2008.
- 3) Takamune N, Gota K, Misumi S, Tanaka K, Okinaka S, and Shoji S. HIV-1 production is specifically associated with human NMT1 long form in human NMT isozymes. *Microbes Infect.* 10:143-150, 2008.

玉村啓和

- 1) Mizukoshi F, Baba K, Goto-Koshino Y, Setoguchi-Mukai A, Fujino Y, Ohno K, Tamamura H, Oishi S, Fujii N, and Tsujimoto H. Inhibitory effect of newly developed CXC-chemokine receptor 4 antagonists on the infection with feline immunodeficiency virus. *J. Vet. Med. Sci.*, in press.
- 2) Nomura W, Tanabe Y, Tsutsumi H, Tanaka T, Ohba K, Yamamoto N, and Tamamura H. Fluorophore labeling enables imaging and evaluation of specific CXCR4-ligand interaction at the cell membrane for fluorescence-based screening. *Bioconjugate Chem.* 19: 1917-1920, 2008.
- 3) Tanaka T, Tsutsumi H, Nomura W, Tanabe Y, Ohashi N, Esaka A, Ochiai C, Sato J, Itotani K, Murakami T, Ohba K, Yamamoto N, Fujii N, and Tamamura H. Structure-activity relationship study of CXCR4 antagonists bearing the cyclic pentapeptide scaffold: identification of the new pharmacophore. *Org. Biomol. Chem.* 6(23):4374-4377, 2008.

森一泰

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Onlamoon N, Rogers K, Mayne A E, Pattanapanyasat K, Mori K, Villinger F, and Ansari AA. 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.

三浦智行

- 1) 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, and Miura T. Small intestine CD4+ T-cells are profoundly depleted during acute infection of simian-human immunodeficiency virus regardless of its pathogenicity. *J. Virol.* 82: 6039-6044, 2008.
- 2) Akiyama H, Ishimatsu M, Miura T, Hayami M, and Ido E. Construction and infection of a new simian/human immunodeficiency chimeric virus (SHIV) containing the integrase gene of the human immunodeficiency virus type 1 genome and analysis of its adaptation to monkey cells. *Microbes and Infection* 10:531-539, 2008.
- 3) Morita D, Katoh K, Harada T, Nakagawa Y, Matsunaga I, Miura T, Adachi A, Igarashi T, and Sugita M. Trans-species activation of human T cells by rhesus macaque CD1b molecules. *BBRC* 377:889-893, 2008.

保富康宏

- 1) Yasutomi Y. Chimeric recombinant hepatitis E virus-like particles presenting foreign epitopes as a novel vector of vaccine by oral administration. (Holland CR, an Mitamura T. Eds.) *Structure-based study of viral replication.* World Scientific. p539-p552, 2008
- 2) Okabayashi S, Ohno C, Kato M, Nakayama H, and Yasutomi Y. Congenital cystic adenomatoid-like malformation in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Vet. Path.* 45:232-235, 2008.
- 3) 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.* 171:1-6, 2008.

高橋秀夫

- 1) 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 pres.
- 2) 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.* 180:4000-4010, 2008.
- 3) 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, and 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.

網康至

- 1) Yoshino N, Kanekiyo M, Hagiwara Y, Okamura T, Someya K, Matsuo K, Ami Y, Sato S, Yamamoto N, and 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.

研究課題：抗エイズ薬を目指したウイルス糖鎖構造制御による宿主免疫の賦活化・機能化分子の開発

課題番号：H18-エイズ-若手-002

主任研究者：袴田 航（日本大学 生物資源科学部 専任講師）

分担研究者：栗原 正明（国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部 室長）、西尾 俊幸（日本大学 生物資源科学部 准教授）

1. 研究目的

エイズの慢性感染症は、多剤併用療法の広がりを含み、それら薬剤に対する耐性株の出現速度を増大させている。それ故に、現在唯一の治療法である多剤併用療法を維持する為には、既存の治療標的だけでなく異なる分子標的、作用機序を有する薬剤の登場が必要不可欠であり強く望まれている。本研究では、多剤耐性株の出現および HIV 特異的免疫反応低下に着目した既存の作用機序とは異なる、ウイルス糖鎖構造制御による宿主免疫の賦活化・機能化分子の開発を行い、抗 HIV 薬候補化合物を得る事を目的とした。HIV は他のウイルスエンベロープ糖タンパク質と比較しても非常に多くの N-結合型糖鎖を有するエンベロープ糖タンパク質 (gp120) を有している。この糖鎖が HIV の慢性的な持続感染・不十分な感染制御・有効な宿主免疫応答の阻害・有効な中和抗体の誘導阻害等の重要な要因であると推測されている。そこで、N-結合型糖鎖の成熟（糖鎖合成、タンパク質輸送、品質管理等）阻害にまで、本研究の阻害概念を拡大し研究を遂行している。以上のように、本研究は N-結合型糖鎖成熟阻害という、新規な分子標的および作用機序を有する抗 HIV 薬の開発であり、多剤併用療法の維持・発展に資する研究である。

2. 研究方法

N-結合型糖鎖の構造を制御する化合物、N-結合型糖鎖プロセッシング酵素阻害剤を得るために「*in silico*による論理的かつ高効率な阻害剤分子設計」および「微生物ライブラリからの阻害剤のハイスループットスクリーニング (HTS)」の2つの異なる戦略を立案した。

「*in silico*による論理的かつ高効率な阻害剤分子設計」は、近年続々と明らかにされ始めている酵素の立体構造に基づき *in silico* で論理的かつ高効率に阻害剤分子の探索および設計を行う。「微生物ライブラリからの阻害剤の HTS」は現在その活性測定系が十分ではない。N-結合型糖鎖プロセッシング酵素の活性測定には、基質調製にウイルス培養、活性検出に放射性同位体が汎用され HTS には不向きである。そこで、新たな HTS 法の開発を行う。HTS を用いた阻害剤の網羅的探索は、特異な培養条件下で培養した放線菌ライブラリからのスクリーニングを行う。

このように、*in silico* 技術および HTS 法を両輪とし、パーチャルライブラリおよび微生物ライブラリから阻害剤の探索・分子設計・阻害剤分子の合成・阻害活性の評価を有機的に連携して研究を実施することにより、高活性化化合物を迅速かつ効率的に得る事ができると考えている。

（倫理面への配慮）

本研究は、HIV の宿主ヒト細胞の糖鎖構築酵素の構造および分子認識情報を基に阻害剤を設計・合成および探索を行う研究であり、標的酵素の構造情報・分子認識情報をのみ用いる為、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と理解、実験動物に対する動物愛護上の配慮等を必要とする研究を含まない。

3. 研究結果

「*in silico*による論理的かつ高効率な阻害剤分子設計」：市販化合物ライブラリを用いたパーチャルスクリーニングにより、濃縮された糖鎖構造制御化合物ライブラリを得、ヒット化合物ライブラリの変量解析に基づく定量的構造活性相関を行う事により、化合物ライブラリの品質・多様性について検討を行った。更に、Fragment-based drug 設計によりライブラリの拡充を行い、濃縮された糖鎖構造制御化合物ライブラリを得た。これらの構造はこれまでに報告されている阻害剤とは異なる、非常にユニークな骨格を有していた。まず、得られたヒット化合物群の *in vitro*での阻害活性を測定した。その結果、インドールを母核とする化合物群が高い阻害活性 (IC_{50} 0.5 μ M ~ 数十 μ M) を示す事、2-アミノチアゾロン母核とする化合物群が高い阻害活性 (IC_{50} 0.5 μ M ~ 数 μ M) を示す事を明らかとした。そこで、Dixon plot 法を用いて化合物の酵素への結合位置を確認した結果、インドールを母核とする化合物群は、酵素活性部位に結合する競合阻害型の化合物、活性部位近傍に結合する不競争型および混合型の化合物である事が分かった。2-アミノチアゾロン母核とする化合物では、Dixon plot 法を用いて酵素との結合様式を特定する事ができなかった。しかしながら、反応時間と共に酵素活性が低下する事、透析により酵素活性が復帰しな

い事から、1,4-マイケル付加反応による共有結合形成型の新規阻害剤である事が明らかになった。上記、2母核の内インドールを母核とする化合物に、細胞レベルで抗 HIV 活性を見いだした(本活性測定については、国立感染症研究所 エイズ研究センター 武部 豊 博士のご支援をいただいた)。

「微生物ライブラリからの阻害剤の HTS」: HTS を用いた阻害剤の網羅的探索のために、新たな HTS 法の開発を行い、特異な培養条件で培養した放線菌ライブラリを対象として、HTS を用いた阻害剤の網羅的探索を行い、特異な培養条件においてのみ阻害剤を生産する放線菌を見いだした。得られた阻害剤生産菌は、16s rDNA の配列より *Streptomyces* 属である事を明らかとした。これら放線菌の培養液から阻害剤の単離を試みた。活性画分内において、最も存在量が多かった化合物 A を単離し、構造決定を試みた。FAB MS を用いたイオン化シフト法により分子量 390 であると推定し、UPLC MS/MS (ESI) によりフラグメント情報を得た。NMR (1D Exp: ^1H , ^{13}C , 2D-Exp: H-H COSY, HMQC, HMBC) により化合物 A の構造を推定した。そこで、単離した化合物 A のグルコシダーゼ阻害剤を測定した結果、 IC_{50} 3.3 mM と活性が非常に低かったため、化合物 A が活性本体でないと決定した。次に単離したニンヒドリン反応陰性の化合物 B の構造解析を試みた。UPLC MS/MS (ESI) 分析を行った結果、分子量 494 であると推定し、現在引き続き構造解析を行っている。

4. 考察

これまでの研究の結果、市販化合物をライブラリとした *in silico* 阻害剤スクリーニングによって非常に高効率に阻害剤が得られる事を実証した。

得られた阻害剤は、酵素速度論的な解析の結果、シミュレーションとおり酵素の活性部位に結合する事が分かり、ドッキングシミュレーションの有用性の高さを実証する事ができた。

阻害剤スクリーニングに適した新規活性測定系の開発、特異な培養系を用いた放線菌ライブラリからの阻害剤スクリーニングによって、活性画分を得ることができたが、現在のところ真の阻害剤に構造を明らかにするにはいたっていない。

このような事からも、*in silico* 阻害剤スクリーニングの有用性は非常に高いと感じられた。更に、IT 技術の進歩を抗 HIV 薬開発に活用する事ができる、非常に優れた有意義な方法論を確立したと考えられる。

5. 自己評価

1) 達成度について

本年度迄の3年間において、*in silico* または天然のライブラリから、HIV 糖鎖構築酵素阻害剤候補化合物を得る事ができ、当初の目標はほぼ達成された、と考えている。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

HIV の薬剤耐性獲得のスピードは非常に速い。よって、新規な作用機序に基づく新規な抗 HIV 薬の開発もスピードが求められている。HIV の変異速度に対抗するにはコンピュータの情報処理能力を積極的に活用する事が重要である。本研究の研究成果は、IT 技術の進歩を生化学的研究に取り入れるインターフェイスとして先駆的であり学術的意義は高いと考えられる。また、その結果得られる抗 HIV 薬は、国際的・社会的必要性が非常に高い。

3) 今後の展望について

本年度迄に、HIV 糖鎖構築酵素阻害剤候補化合物の化合物およびライブラリおよび放線菌を特異な培養条件で培養する事により、阻害剤を得た。このように、*in silico* および天然のライブラリから、HIV 糖鎖構築酵素阻害剤候補化合物を得る事に成功した。本結果を基に、今後は細胞レベルでの抗 HIV 活性を有していた化合物のより活性の高い構造を最適化し、抗 HIV 薬候補化合物を得る予定である。

6. 結論

本研究は、IT 技術を積極的に取り入れる事および特異な微生物培養系を用いる事によって、*in silico* または天然のライブラリから HIV 糖鎖構築酵素阻害剤候補化合物を効率的に得る目的をほぼ終了した。得られた化合物の一部は、酵素阻害活性の報告の無い新規母核を有する阻害剤であった。また、活性部以内の水素結合・疎水結合等の重要な相互作用をふんだんに利用した興味深い構造であり、活性部位に競争的に結合する事を実験的にも確認する事ができた。このように、本方法論が非常に強力な阻害剤のスクリーニング手法である事を明らかにした。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

現在、本研究で得られた細胞レベルで抗 HIV 活性が認められた化合物について、日本大学・国立医薬品食品衛生研究所・国立感染症研究所の知財部および職務発明委員会を通して、特許の出願手続きを行っている。

研究発表

原著論文による発表（2008年以降の欧文論文のみ記載）

主任研究者

袴田 航

- 1) Hakamata, Wataru, Sato, Yukiko, Okuda, Haruhiro, Honzawa, Shinobu, Saito, Nozomi, Kishimoto, Seishi, Yamashita, Atsushi, Sugiura, Takayuki, Kittaka, Atsushi, Kurihara, Masaaki. (2S,2'R)-Analogue of LG190178 is a major active isomer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (2008), 18 (1), 120-123.
- 2) Kazunari Kadokura, Yusuke Sakamoto, Akiko Rokutani, Takanori Ikegami, Takako Hirano, Mahiro Yamamoto, Kaori Saito, Wataru Hakamata, Shiro Itoi, Haruo Sugita, Tadatake Oku, Toshiyuki Nishio, Purification, characterization, and cloning of *Vibrio parahaemolyticus* chitinolytic enzymes and application to oligosaccharide production, *Journal of Applied Glycoscience*, 55(2), 157-164 (2008).
- 3) Akazaki, H., Kawai, F., Chida, H., Matsumoto, Y., Hirayama, M., Hoshikawa, K., Unzai, S., Hakamata, W., Nishio, T., Park, S. Y. and Oku T. (2008): Cloning, expression and purification of cytochrome c6 from the brown alga *Hizikia fusiformis* and complete X-ray diffraction analysis of the structure. *Acta Crystallogr. F.*, 64, 674-680.
- 4) Akazaki, H., Futami, F., Shibayama, N., Shirasaki, I., Nakade, H., Chida, H., Hakamata, W., Park, S. Y., Nishio, T., and Oku, T. (2008): Physicochemical properties of diheme cytochrome c4 of unknown function from *Vibrio parahaemolyticus* strain RIMD2210633. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 72, 2791-2794 (2008).
- 5) Shinji Kakuda, Kazuhisa Okada, Hiroshi Eguchi, Kazuya Takenouchi, Wataru Hakamata, Masaaki Kurihara and Midori Takimoto-Kamimura, Structure of the ligand-binding domain of rat VDR in complex with the nonsecosteroidal vitamin D₃ analogue YR301. *Acta Cryst.* (2008). F64, 970-973.
- 6) Wataru Hakamata, Masaaki Kurihara, Haruhiro Okuda, Toshiyuki Nishio, Tadatake Oku, Design and Screening Strategies for α -Glucosidase Inhibitor Based on Enzymological Information. *Current Topics in Medicinal Chemistry* (in press).
- 7) Akazaki, H., Kawai, F., Hosokawa, M., Hama, T., Chida, H., Hirano, T., Lim, B. K., Sakurai, N., Hakamata, W., Nishio, T., Park, S. Y. and Oku, T. (2008): Crystallization and structural analysis of cytochrome c6 from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* at 1.5 Å resolution. *Biosci. Biotech. Biochem.*, (in press).

分担研究者

栗原 正明

- 1) (2S,2'R)-Analogue of LG190178 is a major active isomer, W. Hakamata, Y. Sato, H. Okuda, S. Honzawa, N. Saito, S. Kishimoto, A. Yamamoto, T. Sugiura, A. Kittaka, M. Kurihara, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 120-123(2008)
- 2) The 2 α -(3-hydroxypropyl) group as an active motif in vitamin D₃ analogues as agonists of the mutant vitamin D receptor (Arg274Leu), S. Honzawa, Y. Yamamoto, A. Yamashita, T. Sugiura, M. Kurihara, M. A. Arai, S. Kato, A.

Kittaka, *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 3002-3024 (2008)

- 3) Computational Study on Secondary Structure of Oligopeptides Containing α, α -Disubstituted α -Amino Acids, M. Kurihara, Y. Sato, F. Kaneko, H. Okuda, M. Nagano, Y. Demizu, M. Doi, M. Tanaka, H. Suemune, *Peptide Science* 2007, 137-138(2008)
- 4) S. Kakuda, K. Okada, H. Eguchi, K. Takenouchi, W. Hakamata, M. Kurihara, M. Takimoto-Kamimura, Structure of the ligand-binding domain of rat VDR in complex with a nonsecosteroidal vitamin D₃ analogue YR301, *Acta Crystallogr. F*, 64, 970-973(2008)
- 5) Isolation and structural elucidation of cyclopentynafil and N-octylnortadalafil found in a dietary supplement, T. Hasegawa, K. Takahashi, M. Saijo, T. Ishii, T. Nagata, M. Kurihara, Y. Haishima, Y. Goda, N. Kawahara, *Chem. Pharm. Bull.*, in press
- 6) Wataru Hakamata, Masaaki Kurihara, Haruhiro Okuda, Toshiyuki Nishio, Tadatake Oku, Design and Screening Strategies for α -Glucosidase Inhibitor Based on Enzymological Information. *Current Topics in Medicinal Chemistry* (in press).

分担研究者

西尾 俊幸

- 1) Kazunari Kadokura, Yusuke Sakamoto, Akiko Rokutani, Takanori Ikegami, Takako Hirano, Mahiro Yamamoto, Kaori Saito, Wataru Hakamata, Shiro Itoi, Haruo Sugita, Tadatake Oku, Toshiyuki Nishio, Purification, characterization, and cloning of *Vibrio parahaemolyticus* chitinolytic enzymes and application to oligosaccharide production, *Journal of Applied Glycoscience*, 55(2), 157-164 (2008).
- 2) Akazaki, H., Kawai, F., Chida, H., Matsumoto, Y., Hirayama, M., Hoshikawa, K., Unzai, S., Hakamata, W., Nishio, T., Park, S. Y. and Oku T. (2008): Cloning, expression and purification of cytochrome c6 from the brown alga *Hizikia fusiformis* and complete X-ray diffraction analysis of the structure. *Acta Crystallogr. F.*, 64, 674-680.
- 3) Akazaki, H., Futami, F., Shibayama, N., Shirasaki, I., Nakade, H., Chida, H., Hakamata, W., Park, S. Y., Nishio, T., and Oku, T. (2008): Physicochemical properties of diheme cytochrome c4 of unknown function from *Vibrio parahaemolyticus* strain RIMD2210633. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 72, 2791-2794 (2008).
- 4) Wataru Hakamata, Masaaki Kurihara, Haruhiro Okuda, Toshiyuki Nishio, Tadatake Oku, Design and Screening Strategies for α -Glucosidase Inhibitor Based on Enzymological Information. *Current Topics in Medicinal Chemistry* (in press).
- 5) Akazaki, H., Kawai, F., Hosokawa, M., Hama, T., Chida, H., Hirano, T., Lim, B. K., Sakurai, N., Hakamata, W., Nishio, T., Park, S. Y. and Oku, T. (2008): Crystallization and structural analysis of cytochrome c6 from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* at 1.5 Å resolution. *Biosci. Biotech. Biochem.*, (in press).

研究課題：HIV感染モデルマウスの樹立およびHIV特異的細胞傷害性T細胞によるエイズ発症遅延機序の解析

課題番号：H20-エイズ-若手014

主任研究者：佐藤 義則（熊本大学 エイズ学研究センター ウイルス制御分野 COEリサーチ・アソシエイト）

分担研究者：なし

1. 研究目的

長期にわたってHIVの増殖を抑えるためにはHIV特異的細胞傷害性T細胞によるウイルス感染細胞の排除が重要であることはよく知られている。当研究室では、長期にわたってエイズを発症しないHIV感染者から非常に強いHIV増殖抑制能を示す細胞傷害性T細胞（CTL）の単離に成功した。一方、長期HIV感染における免疫応答および病態の解析が困難である理由のひとつとして、小動物を用いたHIV感染実験系が確立されていない点が挙げられる。そこで我々は、新たに免疫不全マウス（NOD/SCID/Jak3ノックアウトマウス（以下NOKマウス））を作製し、ヒト臍帯血由来幹細胞を移植したところ、マウス体内においてHIV-1の標的細胞であるヒトCD4T細胞および細胞傷害性を担うヒトCD8T細胞の発生に成功した。そこで本研究では、1. NOKマウスで樹立したヒト免疫構築マウスにおける基礎知見を得るため、発生したヒトT細胞の分化・機能を解析し、免疫細胞のレポトリーについて解析する、2. 長期HIV感染における免疫応答と病態進行の機序を明らかにするため、ヒト免疫構築NOKマウスにおけるHIV感染系の確立、および、HLA発現ヒト免疫構築NOKマウスを樹立し、HIV感染マウスにおけるHIV-1特異的CTLの動態を解析する、3. さらに我々の過去の報告に基づく、より効果的なHIV-1特異的CTLクローンの移入により、HIV感染に対する免疫応答および免疫細胞療法の効果についても検討する。本研究で樹立するHLA発現ヒト免疫構築マウスでは、ヒトの造血・免疫系を確立した際に問題となる胸腺での発生・分化障害も解決でき、今までのモデルマウスより成熟したヒト免疫系の構築が可能である。これはHLAハプロタイプとエイズ進行の相関を動物モデルにおいて検討できる点が優れており、これらの研究を通じて、エイズ発症機序の詳細な解析と新規エイズ治療法の開発に大きく貢献することが本研究の目的である。

2. 研究方法

ヒト免疫構築マウスを樹立するため、NOKマウスに幹細胞のマーカーであるCD34に対する特異的抗体がコートされた磁気ビーズをもちいて、臍帯血単核球より臍帯血幹細胞を分離し、NOKマウスの新生仔の肝臓へ移植した。移植から20週間後、マウスから脾臓、血液を採取し、HIV-1

の標的細胞であるCD4T細胞や細胞傷害性T細胞であるCD8T細胞を含む免疫細胞の発生・分化・成熟、および、それらの機能について、CD抗原、リンパ球の分化マーカー、サイトカイン等に特異的な抗体をもちいてフローサイトメーターにて解析し、ヒト免疫構築マウスにおける免疫細胞のレポトリーについて解析した。

（倫理面への配慮）

本研究におけるヒト由来の検体の使用と遺伝子解析、および理化学研究所（理研）から購入した臍帯血単核球は提供者に対して既にインフォームド・コンセントを行い得たものであり、本研究によって新たに提供者に危険を及ぼすことは無く、当大学の倫理審査委員会にて承認済みである。また、動物実験についても既に当大学の動物実験委員会にて承認済みである。

3. 研究結果

NOKマウス新生仔の肝臓にヒトCD34陽性臍帯血幹細胞を移植したマウスでは、末梢血中にヒトB細胞と考えられたCD19陽性細胞およびヒトT細胞と考えられたCD3陽性細胞の発生が認められた。その発生頻度は移植後、T細胞では12週から顕著に増加した。しかしながら、ヒトT細胞の発生頻度はヒトB細胞のそれに比べて約2分の1と低いことが明らかとなった。ヒトT細胞が発生したマウス群において、ヒトT細胞の分化・成熟の詳細な解析を行ったところ、CD8T細胞およびCD4T細胞の両者において、CD45RA+CCR7+CD27+CD28+のナイーブ表現型を示したT細胞が多く含まれたマウス（Tn群）と、CD45RA-CCR7-CD27+CD28+のエフェクターメモリー表現型を示したT細胞が多く含まれたマウス（Tem群）の2群に分かれることが判明した。しかしながら、いずれのマウスにおいても、エフェクター表現型を示した細胞は認められなかった。また、PMA/Ionomycin刺激によるCD8T細胞のサイトカイン産生能を調べたところ、Tem群のCD8T細胞では各種サイトカイン（TNF- α 、IFN- γ 、IL-2）産生能を示し、Tn群のCD8T細胞ではそれらの産生能を示さなかった。また、ウイルス感染細胞の破壊因子となるパーフォリンとグランザイムの各酵素群はいずれのマウスのCD8T細胞においても産生は認められなかった。

4. 考察

小動物を用いた HIV 感染実験系の確立は、長期 HIV 感染における免疫応答および病態の解析を可能とするとともに、飼育に大掛かりな施設、設備、高額な飼育費を必要とするサルやチンパンジーにかわる代替動物として期待され、ヒト免疫構築マウスを用いた研究は既に国内外で始まっている。しかしながら、ヒト免疫構築マウスを用いた HIV 感染モデルの報告は数例あるものの、長期的 HIV 感染実験モデルや、HIV 感染マウスにおける HIV-1 特異的 CTL の動態の解析についての報告は未だされていない。我々が今回用いている NOK マウスによるヒト免疫構築マウスでは、移植マウスの末梢血中にヒト B 細胞およびヒト T 細胞と考えられる免疫細胞の発生は認められたが、B 細胞の発生頻度にくらべ T 細胞のそれは約 2 分の 1 と低かった。また末梢 T 細胞についても、CD8 T 細胞および CD4 T 細胞の両方で表現形が 2 群 (Tn, Tem) に別れたことや、いずれの表現形をもつヒト CD8 T 細胞においてもパーフォリンやグランザイムの酵素群の産生が認められなかった。これらの結果は、T 細胞が分化する際に必要な胸腺における教育によってヒト T 細胞が分化できないこと (マウス MHC とヒト TCR の親和性不一致によるもの)、また、偶然に胸腺を通過したものが末梢へ流れ出たものの、ヒト T 細胞は未分化 (未成熟) の状態であると考えられる。HIV 感染に対する免疫応答には HIV 特異的 CTL の機能がより重要となるため、ヒト T 細胞の正常な分化は必要事項であるが、HLA 発現ヒト免疫構築マウスでは胸腺における T 細胞の教育が正常に行われ、今までのモデルマウスより成熟したヒト免疫系の構築が可能であると考えられる。現在 HLA-B51 発現 NOK マウス (NOK/B51Tg マウス) を樹立中である。

5. 自己評価

1) 達成度について

NOK マウス新生仔の肝臓へ臍帯血幹細胞を移植し、20 週間後、脾臓および血液中に HIV-1 の標的細胞である CD4 T 細胞や細胞傷害を担う CD8 T 細胞の発生を確認できた。またそれらの分化・成熟および機能は未分化である知見を得た。この T 細胞未分化という問題点を解決するため、HLA 発現ヒト免疫構築マウス (NOK/B51Tg マウス) の樹立も現在進行中であり完成間近である。さらに、NOK マウスで構築したヒト免疫構築マウスによる HIV 感染実験も現在進行中である。これらの実験より得られる知見から、NOK/B51Tg マウスの樹立後、HIV 感染モデルマウスにおける HIV-1 特異的 CTL の動態と病態進行の解析 (平成 21 年度計画) に速やかに移行できるものと考え、ほぼ計画通り

の達成度といえる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

我々が作製するヒト免疫構築マウスは、HIV 感染における病態とウイルスに対する免疫応答の研究において非常に有用なモデルマウスであると期待する。その理由は、本モデルマウスに HIV を感染させた後、長期にわたる経過観察によって、HIV 感染慢性期における病態と HIV 特異的免疫応答の相関について検討が可能であると考えられる。さらに、研究分野の長期的な成果として、サルやチンパンジーの飼育には大掛かりな施設、特殊な設備、高額な飼育費を要するが、小動物における HIV 感染系の確立によって *in vivo* におけるエイズ研究が容易なものとなり、本研究分野の活性化に寄与すると考える。また、本モデルマウスはエイズワクチン開発や新規エイズ治療法のための実験動物としても非常に有用であり、今後のエイズ治療研究に大きく貢献することが期待できる。

3) 今後の展望について

今年度作成したヒト免疫構築マウス (NOK マウス) から得た知見に基づき、HLA-B51 発現ヒト免疫構築マウス (NOK/B51Tg マウス) およびその HIV 感染モデルの樹立を目指す。さらに、HIV 感染モデルマウスにおける HIV-1 特異的 CTL の動態と病態進行の解析を行い、長期にわたる経過観察から、HIV 感染慢性期における病態と HIV 特異的免疫応答の相関についての検討を目指す。これらの実験からエイズワクチン開発や新規エイズ治療法のために必要な基礎的知見を得ることを目標とする。

6. 結論

本研究では、長期 HIV 感染における免疫応答と病態進行の機序を明らかにするため、マウスによる HIV 感染系の確立、および、HLA 発現ヒト免疫構築マウスを樹立し、HIV 感染マウスにおける HIV-1 特異的 CTL の動態を解析し、最終的に HIV-1 特異的 CTL クローンへの移入による免疫細胞治療法の効果についての検討を目指す。ヒト免疫構築マウスをもちいた研究は既に国内外で始まっているが、本研究で樹立する HLA 発現ヒト免疫構築マウスでは、ヒトの造血・免疫系を確立した際に問題となる胸腺での分化障害も解決でき、今までのモデルマウスより成熟したヒト免疫系の構築が可能であり、また、HLA ハプロタイプとエイズ進行の相関を動物モデルにおいて検討できる点から、今後のエイズ治療研究に大きく貢献することが期待できる。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

なし。

研究発表

主任研究者

佐藤義則

原著論文による発表

- 1) Oda H, Fujimoto M, Patrick MS, Chida D, Sato Y, Azuma Y, Aoki H, Abe T, Suzuki H, Shirai M. RhoH plays critical roles in FceRI-dependent signal transduction in mast cells. *J. Immunol.* (in press.)
- 2) Chida D, Sato T, Sato Y, Kubo M, Yoda T, Suzuki H, Iwakura Y. Characterization of mice deficient in Melanocortin 2 receptor on a B6/Balbc mix background. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2008. 31. (in press.)
- 3) Sato Y, Kaneko K, Inoue M. Macrolide antibiotics promote the LPS-induced upregulation of prostaglandin E receptor EP2 and thus attenuate macrolide suppression of IL-6 production. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 2007. 76: 181-8.
- 4) Kaneko K, Sato Y, Ishihara K, Inoue M. Chromosomal AmpC β -lactamase-mediated β -lactam resistance of gram-negative bacteria enhances host inflammatory mediator production via nucleotide-binding oligomerization domain 1. *Kitasato med. J.* 2007. 37: 28-36.
- 5) Hashimoto A, Hayashi I, Murakami Y, Sato Y, Kitasato H, Matsushita R, Iizuka R, Urabe K, Itoman M, Hirohata S, Endo H. Anti-inflammatory mediator Lipoxin A4 and its receptor in synovitis of patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 2007. 34: 2144-53.
- 6) Sato Y, Kaneko K, Sasahara T, Inoue M. Novel pathogenetic mechanism in a clinical isolate of *Yersinia enterocolitica* KU14. *J. Microbiol.* 2006. 44: 98-105.
- 7) Kaneko K, Sato Y, Tokunaga SK, Tamaki SK, Okamoto R, Inoue M. AmpC beta-lactamase-mediated cefepodoxime-resistant *Escherichia coli* isolated from faecal samples of healthy volunteers. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006. 57: 369-71.

口頭発表

- 1) 佐藤義則、小田浩代、パトリック・マイケル、白井睦訓、鈴木春巳、T細胞の生存および恒常性維持における Rac1 の機能 (Function of Rac1 in survival and homeostasis of mature T cells). 第38回日本免疫学会総会・学術集会、2008年、京都。

前任者 (前主任研究者)

小林直樹

原著論文による発表

- 1) Kitano M, Kobayashi N, Kawashima Y, Akahoshi T, Nokihara K, Oka S, Takiguchi M. Identification and characterization of HLA-B*5401-restricted HIV-1-Nef and Pol-specific CTL epitopes. *Microbes. Infect.* 10:764-772, 2008.
- 2) Kobayashi N, Kondo T, Takata H, Yokota S, Takiguchi M. Functional and phenotypic analysis of human memory CD8+ T cells expressing CXCR3. *J. Leukocyte Biol.* 80: 320-329, 2006.

口頭発表

- 1) Kobayashi N, Takata H, Takiguchi M. The immature differentiation of human T cells in humanized NOD/SCID/Jak3^{-/-} mice. 9th Kumamoto AIDS Seminar, September 18-19, 2008. Aso Resort Grand Vrio Hotel, Kumamoto, Japan.

研究課題：HIVに対する粘膜ワクチンの最適化に適う安全性・有効性に優れた粘膜ワクチンアジュバントの開発

課題番号：H19-エイズ-若手-001

主任研究者：吉岡 靖雄（大阪大学臨床医学融合研究教育センター 特任講師（常勤））

分担研究者：鎌田 春彦（独立行政法人医薬基盤研究所 主任研究員）、山形 和史（大阪大学薬学研究科 助教）

1. 研究目的

AIDSの治療に用いられている多剤併用療法は、AIDS発症の原因であるHIVの感染そのものを防御するものではなく、また薬剤耐性・副作用・費用などの解決すべき問題が多数残されている。従って、AIDSの克服に向けた最重要課題は先進国・開発途上国を問わずHIVに対するワクチン開発に他ならない。泌尿生殖器など経粘膜的に感染するHIVの感染経路を考慮した場合、経口・経鼻・経膈投与など経粘膜接種によるワクチン（粘膜ワクチン）は、抗原投与部位の粘膜面のみならず、遠隔の粘膜面、更には脾臓などの全身系免疫組織にも抗原特異的免疫応答が誘導可能なため、HIV感染制御の点で理想的な方法として期待されている。しかし、抗原単独で経粘膜投与しただけでは抗原性の低さなどから、効率よく分泌型IgA抗体産生・細胞傷害性T細胞（CTL）誘導をはじめとした粘膜免疫応答を誘導することが困難である。さらに、期待しない免疫応答であるアレルギー等を誘導する可能性も考えられることから、粘膜免疫を強力かつ適切に誘導可能な粘膜ワクチンアジュバントの開発が待望されている。本観点から、強い免疫活性化能を持ち、さらに生体の免疫反応を緻密に制御しているサイトカインを利用した、粘膜ワクチンアジュバントへの応用が試みられている。しかし、サイトカインは、経粘膜投与では瞬時に失活・分解してしまい、その結果として粘膜免疫誘導能が低下することから、未だ有望な粘膜ワクチンアジュバントに成り得ていない。我々は昨年度、16種類の腫瘍壊死因子（TNF）スーパーファミリー（TNFSF）サイトカインの中でも、TNF α 、TL1Aが粘膜ワクチンアジュバントとして有望であること、また、これまでに創製してきた機能性TNF変異体mTNF-K90R（プロテアーゼ抵抗性を有し、*in vitro*における比活性が野生型の6倍向上したTNF変異体）が、野生型と比較して優れた粘膜免疫誘導能を有することを明らかとした。本年度は、HIV由来gp120を抗原として用い、mTNF-K90Rの粘膜免疫誘導能を検討すると共に、TNFSFのCTL誘導能に関する検討を行った。更に、TNFSF以外のサイトカインに関しても、粘膜免疫誘導能を評価することで、最適な粘膜ワクチンアジュバントの候補サイトカインの探索を試みた。

2. 研究方法

【免疫方法】BALB/cマウスへの免疫は、個々のサイトカインあるいはポジティブコントロールとして使用したコレラトキシンBサブユニット(CTB)をニワトリ卵白アルブミン(OVA)もしくはHIV由来gp120と混合して経鼻投与することにより行なった。【サンプルの回収方法】最終免疫7日後のマウスより血清、鼻腔洗浄液、膈洗浄液および糞便抽出液を回収した。【抗原特異的抗体産生能の評価】抗原を固相したELISAプレートに各濃度に調製したサンプルを添加し、2次抗体としてHRP標識抗マウスIgG抗体あるいはビオチン標識抗マウスIgA抗体/HRP標識ストレプトアビジンを用い、常法に従った。発色反応後、測定波長450nm、参考波長690nmにおける吸光度を測定した。

（倫理面への配慮）

本研究は動物実験を避け得ないが、ヘルシンキ宣言に基づき動物愛護の精神を遵守しつつ、大阪大学の動物実験規程に則り行った。また組換えDNA実験は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づき、機関承認実験として承認されている。

3. 研究結果

HIVに対するワクチン開発を念頭に、HIV由来抗原gp120を用い、mTNF-K90Rの粘膜免疫誘導能を評価した。その結果、mTNF-K90Rは抗原単独投与と比較して、全身面、粘膜面のいずれにおいても、有意に高いgp120特異的IgG、IgA産生を誘導した。その強度は、ポジティブコントロールとして用いたCTBに匹敵していた。次に、mTNF-K90Rの経鼻投与時における安全性を評価した結果、十分な抗体産生を誘導可能な1 μ gの25倍にあたる25 μ gの大量投与においても全く鼻腔での傷害性を示さず、また立毛や発熱等の全身的な副作用も観察されなかった。以上の結果から、mTNF-K90Rは、HIVに対する有効性・安全性に優れた粘膜ワクチンアジュバントになり得ることが示された。しかしmTNF-K90Rは、抗体産生を強く誘導するものの、サイトカインの産生パターンから考えると、CTLの誘導は困難であると示唆された。そこで、CTLを強く誘導し得るサイトカインアジュバントの探索

を目的に、16種類の TNFSF サイトカインの粘膜免疫誘導特性を評価した。その結果、TRAIL、TWEAK、TRANCEの経鼻投与によって、抗原特異的 CTL の誘導の指標となる IFN γ の産生が認められた。一方で、血清 IgG、粘膜 IgA 産生能に優れた TL1A、APRIL などは、CTL 誘導の指標となる IFN γ の産生を殆ど誘導しなかった。以上の結果から、TNFSF サイトカインは、優れた抗原特異的抗体産生能を有するものの、抗原特異的 CTL を誘導できない可能性が強く示唆された。HIV に対する粘膜ワクチンアジュバント開発を考えた場合、粘膜面での IgA により HIV の侵入を抑え、万が一侵入した場合に粘膜面・全身面での CTL により感染細胞を排除するという戦略が理想である。そこで、IL-1 から IL-33 までのサイトカインの中から、抗原特異的抗体産生能ならびに CTL 誘導能が共に優れたサイトカインをスクリーニングした。その結果、抗原単独投与群と比較して、IL-1、IL-18、IL-33 併用投与群では、血清中の抗原特異的 IgG 産生の有意な増加が認められた。また、IL-1、IL-18、IL-33 併用投与群では、投与部位である鼻腔洗浄液中の抗原特異的 IgA 産生も増加しており、遠隔の粘膜面である膺洗浄液、糞便抽出液中でも同様に、抗原特異的 IgA の産生が有意に増加していた。さらに、血清中の抗体サブクラスの解析から、IgG1、IgG2a 共に誘導されたことから、CTL も誘導されている可能性が示唆された。以上の結果から、IL-1、IL-18、IL-33 が、抗体産生のみならず CTL をも誘導する優れた粘膜ワクチンアジュバントに成り得る可能性が示された。

4. 考察

IL-1、IL-18、IL-33 はいずれも IL-1 ファミリーに属するサイトカインであり、これらのみが抗体産生・CTL 共に誘導し得るという知見は大変興味深いものである。特に IL-33 は、2005 年になって初めて IL-1 ファミリーとして発見されたサイトカインであり、ワクチン効果などに関する検討は少ないが、マスト細胞や NKT 細胞に作用することで免疫反応を制御するという知見が報告されている。今後は、これらサイトカインの粘膜免疫誘導特性を詳細に比較検討すると共に、そのメカニズム解析を進めることが重要課題と考えられる。

5. 自己評価

1) 達成度について

当初の予定では、mTNF-K90R もしくは TNFSF サイトカインを用いてバイオコンジュゲーション体を作製する予定であった。しかし、これらサイトカインでは、HIV

に対するワクチン開発に必須と考えられる CTL は誘導しなかった。一方で、IL-1、IL-18、IL-33 は、これまで検討したサイトカインの中で、最も強い抗体誘導能を有する事と共に、CTL をも誘導する可能性が示唆された。従って、来年度は IL-1、IL-18、IL-33 を用いてバイオコンジュゲーションの検討を進める。以上の成果は、当初の予定を上回る成果であると考えている。また、平成 21 年度に予定している研究に関しても、実験手技・設備・体制は整っていることから、問題なく遂行可能と考えている。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

これまでに、動物実験においてはコレラトキシンなどの毒素由来蛋白質が、粘膜ワクチンアジュバントとして汎用されてきたが、免疫誘導メカニズムが未だ明確でなく、過剰な免疫応答に対する制御が困難であることから、ヒトに応用するには安全性の問題から未だ実用化されていない。本観点から、作用点が明確なサイトカインの粘膜ワクチンアジュバントへの応用が期待されているが、粘膜免疫誘導能に関する基礎情報が乏しい。以上から、本研究成果及び、次年度の研究により創製予定の機能性サイトカインは、HIV に対する優れた粘膜ワクチンアジュバントとなり、HIV 根絶に向けたワクチン開発に貢献可能と期待される。

3) 今後の展望について

IL-1、IL-18、IL-33 に対して、“水溶性高分子・ナノ粒子バイオコンジュゲーションシステム”を融合することで、経粘膜投与可能なバイオコンジュゲート化サイトカインを創製した上で、粘膜ワクチンアジュバント効果を検討する。また、IL-1、IL-18、IL-33 の粘膜免疫誘導メカニズムについても検討する。

6. 結論

mTNF-K90R が、HIV 由来抗原に対しても効率良く粘膜免疫を誘導可能であることが示された。TRAIL、TWEAK、TRANCE が CTL を誘導する可能性が示された。IL-1、IL-18、IL-33 が、抗体産生のみならず CTL をも誘導し得る可能性が示され、優れた粘膜ワクチンアジュバントの候補サイトカインであることが示唆された。

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

現時点では知的所有権の出願・取得はしていない。現在、TNFSF の粘膜ワクチンアジュバントとしての適用及び、IL-1・IL-18・IL-33 の粘膜ワクチンアジュバントとしての適用に関して、特許出願可能か検討中である。

研究発表

主任研究者（吉岡靖雄）及び分担研究者（鎌田春彦、形山和史）

原著論文による発表

欧文

- 1) Imai S., Mukai Y., Takeda T., Abe Y., Nagano K., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y. The effect of protein properties on display efficiency using the M13 phage display system. *Pharmazie*. 63(10):760-764, 2008.
- 2) Abe Y., Yoshikawa T., Kamada H., Shibata H., Nomura T., Minowa K., Kayamuro H., Katayama K., Miyoshi H., Mukai Y., Yoshioka Y., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y. Simple and highly sensitive assay system for TNFR2-mediated soluble- and transmembrane-TNF activity. *J. Immunol. Methods*. 335(1-2):71-8, 2008.
- 3) Kayamuro H., Yoshioka Y., Abe Y., Katayama K., Kamada H., Nomura T., Yoshikawa T., Hiroi T., Tsunoda S., Tsutsumi Y. Mutant TNF- α with enhanced bioactivity and protease resistance elicits Th2-type immune responses for enhanced mucosal immunity. (submitted)
- 4) Kayamuro H., Yoshioka Y., Abe Y., Katayama K., Kamada H., Nomura T., Yoshikawa T., Hiroi T., Tsunoda S., Tsutsumi Y. Comparative study of mucosal adjuvant activities from TNF super family cytokines. (submitted)

口頭発表

海外

- 1) Kayamuro H., Yoshioka Y., Katayama K., Kamada H., Nomura T., Abe Y., Hiroi T., Tsunoda S., Tsutsumi Y. MUTANT TNF ELICITS TH2-TYPE RESPONSES FOR ENHANCED MUCOSAL IMMUNITY. 7th Joint Conference of the International Society for Interferon and Cytokine Research and International Cytokine Society. 12-16 October, 2008, Montréal/Québec, CANADA.
- 2) Yoshioka Y., Kayamuro H., Katayama K., Kamada H., Abe Y., Hiroi T., Tsunoda S., Tsutsumi Y. IDENTIFICATION OF NEW CANDIDATES AS MUCOSAL VACCINE ADJUVANT IN TNF SUPERFAMILY CYTOKINES. FIMSA 2008. 17-20 October, 2008, Taipei, Taiwan.

国内

- 1) 渡辺 光, 吉岡靖雄, 森重智弘, 鎌田春彦, 向 洋平, 角田慎一, 堤 康央, 岡田直貴, 中川晋作. ファージ表面提示法を用いた活性増強型リンフォトキシンの創製とその特性評価. 第8回 日本蛋白質科学会年会, 2008年6月, 東京.
- 2) 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 日本ウイルス学会学術集会, 2008年10月, 岡山.
- 3) 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 日本エイズ学会学術集会, 2008年11月, 大阪.
- 4) 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. 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・学術集会, 2008年12月, 京都.
- 5) 吉岡靖雄, 萱室裕之, 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. Identification of new candidates as mucosal vaccine adjuvant in TNF superfamily cytokines. 第38回 日本免疫学会・学術集会, 2008年12月, 京都.
- 6) 萱室裕之, 吉岡靖雄, 阿部康弘, 形山和史, 廣井隆親, 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への応用. 日本薬学会 第129年回, 2009年3月, 京都 (予定).

研究課題：HIV 感染予防における経粘膜ワクチンの開発

課題番号：H20-エイズ-一般-006

主任研究者：廣井 隆親（財団法人東京都医学研究機構 東京都立臨床医学総合研究所）

分担研究者：横田 恭子（国立感染症研究所 免疫部第一室 室長）、高橋 秀実（日本医科大学医学部 微生物・免疫学教室 教授）

1. 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抗原を用いて腔粘膜に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、腔粘膜に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。

2. 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、経膺、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、腫洗浄液を回収して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- γ 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- γ , TNF- α , 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⁺T細胞中に含まれるmulti-functional CD8⁺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。

3. 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、経膣に抗原特異的 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- γ 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- γ 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- γ 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。

4. 考察

近年の研究結果より 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のものと考えられる。

5. 自己評価

1) 達成度について

各投与方法の比較による最適な免疫法の検索は、皮下免疫が有効であるということを見出したことで達成したと考える。また IL-15 による粘膜免疫の誘導能の検討は、特に最も重要な腸管での細胞性免疫の誘導が確認した為、ほぼ達成したと考えられる。今後は小腸以外の粘膜面 (膣や直腸など HIV の感染組織) での検討を行う必要がある。また計画したヒト化マウスでの感染実験は、ヒト化マウスの作成に時間がかかったため今後の検討課題となる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

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非常に臨床ならびに基礎研究において意義の高いことである。

3) 今後の展望について

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。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

該当なし。

研究発表 (原著論文による発表)

主任研究者

廣井隆親

1. Yokoyama, S., Watanabe, N., Sato, N., Filkoski, L., Tanaka, T., Miyasaka, M., Waldmann, TA., Hiroi, T. (corresponding author) and Perera, LP. 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- α gene expression in T cells. *J Immunol*, 180: 319-326, 2008.
8. Takagi, H., Hiroi, T., Yang, L., Takamura, K., Ishimitsu, R., Kawachi, 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.

分担研究者

横田恭子

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 Pathogen*, in press, 2008.
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⁺ T cells by yeast-derived VLP-pulsed dendritic cells is influenced by the level of mannose on the VLP antigen. *Microbes Infect.* 2008 in press.
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 β . *Proc Natl Acad Sci USA.* 105:12509-14, 2008.

4. Mitsuki, Y-Y, Ohnishi, K., Oshima, M., Yamamoto, T., Mizukoshi, F., Kobayashi, K., Yamamoto, N., Yamaoka, S., and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Amino acids in the S1 and S2 spike protein domains determines the neutralization escape phenotype of SARS-CoV. *Microbes Infect.* 10:908-915, 2008.
5. Yamamoto, T and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Prospects for the therapeutic application of lentivirus-mediated gene therapy to HIV-1 infection. *Curr Gene Ther.* 8:1-8, 2008.

高橋秀実

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.* 180:4000-4010, 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.* 2008 (in press).
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.* 2008 (in press).
5. 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、49:373-380, 2008.
6. 若林あや子、高橋秀実:感染症と栄養・機能的食品、日本機能的食品学会誌、4:373-380, 2008.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 矢田純一、高橋秀実(監訳):リップスコット・イラストレイテッド免疫学、2008.12月発刊、総ページ360頁(丸善)

研究課題：HIV 感染症の治療開発に関する研究

課題番号：H18-エイズ-一般012

主任研究者：滝口 雅文（熊本大学エイズ学研究センター センター長/教授）

分担研究者：岡 慎一（国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター センター長）、満屋 裕明（熊本大学大学院医学薬学研究部 教授）、馬場 昌範（鹿児島大学大学院医学総合研究科 教授）、松岡 雅雄（京都大学ウイルス研究所附属エイズ研究施設 教授）、松下 修三（熊本大学エイズ学研究センター 教授）

1. 研究目的

薬剤耐性ウイルスというエイズ治療における大きな問題が出現してきた。このため、耐性ウイルスに対応できるような新規薬剤の開発や薬剤以外の新たな治療法が開発が強く求められている。本研究班では、1) 柱1: 耐性ウイルスに対応できる新規薬剤の研究開発、2) 柱2: HIV-1 特異的免疫を用いた新しい治療法の研究開発の2つの柱を置き、この両面からエイズの治療に貢献できる成果を目指した研究をおこなう。

2. 研究方法

1) 柱1: 耐性ウイルスに対応できる新規薬剤の研究開発
・新規HIV-1 PDIs (protease dimerization inhibitors) の開発とPDIs耐性機序の解析: 蛍光蛋白CFP/YFPタグ付きPRを有する感染性組み換えHIVクローンをを用いたFRETの系を用いて、構造学的デザインに基づいた新規PDIsの開発を進めた。またPR dimerizationに重要とされるアミノ酸、PDIs耐性関連変異アミノ酸の詳細な解析を進め、HIV-1 PR阻害への新たな機序、結晶構造解析、モデリングの手法を用いてPDIsとHIV PR monomer subunitとの結合様式を明らかにした。

・新規のヌクレオチド系逆転写酵素阻害剤 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA) の抗ウイルス活性、細胞内代謝経路、耐性機構を解析する。さらに高い抗 HIV-1 活性を NOG-SCID マウス、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 (n=2) で高い抗 SIV 活性、長期毒性についても検討した。

・核酸系逆転写酵素阻害薬 4'-Ed4T について、その薬剤耐性プロフィールを更に詳しく検討するために、4'-EFdA と、我々が分離した 4'-Ed4T 耐性ウイルスに対する感受性について調べた。

・HIV-1 の転写阻害薬を同定する目的で、HIV-1 遺伝子発現機構に関わる分子（例えば cyclin T1/CDK9）と種々の薬剤との分子間相互作用をコンピューター上で解析する、いわゆる *in silico* スクリーニングを導入し、薬剤ライブラリーから可能性のある薬剤を選び出した。

2) 柱2: HIV-1 特異的免疫を用いた新しい治療法の研究開発

・Replication suppression assay を使い、強い HIV-1 増殖抑制能を有した CTL を同定する。更にこの CTL に耐性な HIV-1 の出現を調べ、逃避ウイルスの蓄積度を調べた。

・非サブタイプ B ウイルスに対する中和単クローン抗体の中和活性の測定を 15 種類のエンベロープベクターを用いて、pseudovirus neutralization assay でおこなった。PM1/CCR5 細胞を用いて、臨床分離株の中和抵抗性のメカニズムを検討した。

（倫理面への配慮）

現時点では柱2の免疫療法の開発が対象となるが、既にその一部は各施設の倫理委員会の承認を受けている。患者の血液を用いて行なう研究に関しては、これらの倫理委員会が規定する指針に従っておこなった。

3. 研究結果

1) 柱1: 耐性ウイルスに対応できる新規薬剤の研究開発
・新規のプロテアーゼ阻害剤 darunavir を開発し、2008年に1日1回投与の初回治療薬としても認可され、日本でも認可申請が承認されて実用化した。HIV の増殖に必須である HIV PR の二量体形成を確認する FRET-HIV 発現系を確立し、DRV を含めた一連の新規化合物 HIV PR dimerization inhibitor (PDIs) を開発した。

・2'-deoxy-4'-C ethynyl-2'-fluoro-adenosine (EFdA) を同定し、*in vitro* で野生型 HIV に対して強力な抗ウイルス活性 (EC50=0.073nM) を示すのみでなく耐性ウイルスに対しても強い抑制効果を有することを明らかにした。

EFdA は 4'-ethynyl-deoxyadenosine (EdA) に対して誘導した耐性ウイルス (I142V/T165R/M184V) に対しても抗ウイルス活性を保っていた。一方、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、末期 SIV 感染サル (n=2) で高い抗 SIV 活性を確認、長期毒性についても検討、サルでの安全性が確認された。

・HIV-1 が 4'-Ed4T に対する耐性を獲得するためには、逆転写酵素領域のアミノ酸変位 M184V に加えて、さらに2つの変位 (P119S および T165A) が必要であると考えられており、これにより HIV-1 は 4'-Ed4T に対して約 10 倍、4'-EFdA に対して約 25 倍の耐性を獲得した。

・200,000 化合物からなる薬剤ライブラリーに対し、cyclin T1 のポケット領域に結合する可能性を有する化合物の *in silico* スクリーニングを行い、その結果を基に 124 種類の薬剤を選び出すことに成功した。

2) 柱2: HIV-1 特異的免疫を用いた新しい治療法の研究開発

細胞性免疫を用いた治療法の開発の研究では、Nefによ