

macrocyclic HIV-1 protease inhibitors to combat drug-resistance. *J. Med.Chem.* 52:7689-705.

5. Hattori S, Ide K, Nakata H, Harada H, Suzu S, Ashida N, Kohgo S, Hayakawa H, Mitsuya H, and Okada S. (2009) Potent activity of a nucleoside reverse transcriptase inhibitor, 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine, against HIV-1 infection in Hu-PBMC-NOD/SCID/JAK3null (NOJ) mouse model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:3887-93.
6. Das D, Koh Y, Tojo Y, Ghosh AK, and Mitsuya H. (2009) Prediction of Potency of Protease Inhibitors Using Free Energy Simulations with Polarizable Quantum Mechanics-Based Ligand Charges and a Hybrid Water Model. *J. Chem. Inf. Model.* 49:2851-62.
7. Michailidis E, Bruno Marchand B, Ei-Ichi Kodama E-I, Kamendra Singh K, Matsuoka M, Ashida N, Kirby K, Ryan EM, Sawani AM, 1, Eva Nagy E, Mitsuya H, Parniak MP, and Sarafianos SG. (2009) Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by 4'-ethynyl-2-fluoro-deoxyadenosine triphosphate, a translocation defective reverse transcriptase inhibitor. *J. Biol. Chem.* 284:35681-91.
8. Aoki M, Venzon DJ, Koh Y, Aoki-Ogata H, Miyakawa T, Yoshimura K, Maeda K, and Mitsuya H. (2009) Non-cleavage site gag mutations in amprenavir-resistant HIV-1 predispose HIV-1 to rapid acquisition of amprenavir resistance but delays development of resistance to other protease inhibitors. *J. Virol.* 83:3059-68.
9. Koh, Y., Das, D., Leschenko, S., Nakata, H., Ogata-Aoki, H., Nakayama, M., Ghosh, A.K., and Mitsuya, H. (2009) GRL-02031: A novel nonpeptidic protease inhibitor (PI) containing a stereochemically defined fused cyclopentanyltetra-hydrofuran (Cp-THF) potent against multi-PI-resistant HIV-1 in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:997-1006.

2. 学会発表(国際学会のみ)

1. "Degradation of Gag Proteins in Multi-drug-resistant HIV Variants Containing Insertions in Gag Proteins." (H-904) Amano M, Koh Y, Tamiya S, Mitsuya H. 49th Annual

Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), September, 12-15, 2009, San Francisco, CA, US.

2. "The binary mechanism of HIV-1 resistance to tipranavir (TPV): Loss of inhibition of protease catalytic activity and protease dimerization." (H-903) Aoki M, Koh Y, Ide K, Danish M, Aoki-Ogata H Mitsuya H. 49th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), September, 12-15, 2009, San Francisco, CA, US.
3. "Macrocyclic component-containing protease inhibitors (PIs) active against multi-PI-resistant HIV-1 in vitro." (H-928), Tojo Y, Koh Y, Amano M, Kulkarni S, Anderson D, Ghosh AK and Mitsuya H. 49th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), September, 12-15, 2009, San Francisco, CA, US.

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 特になし
2. 実用新案登録 特になし

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進 研究事業）
分担研究報告書

サルエイズモデルにおける粘膜免疫の解析

研究分担者 速水 正憲 京都大学ウイルス研究所 名誉教授

研究要旨 ウイルス増殖を抑制している感染サル個体において小腸のCD4陽性T細胞の枯渇や絨毛萎縮等のエイズ腸管病態が進行しうることを明らかにした。

A. 研究目的

本研究の目的は、様々な病態を呈するサルエイズ発症モデルの腸管におけるウイルス感染動態と免疫細胞応答について統合的に解析することにより、エイズウイルスの主要な標的臓器として注目されながらヒトでは解析が困難な腸管における病態形成機構を解明すること、そしてサルエイズモデルによる新規予防・治療法開発の為の腸管病態に基づく評価基準を確立することである。米国をはじめとする先進諸国において種々の抗エイズ薬の開発が積極的に行われ、それらを組合せた多剤併用療法(HAART)の導入によりエイズ感染者の血液中のウイルス量を減少させることに成功した。しかし、HAARTによりエイズ発症遅延効果は得られたが、エイズを根本的に治療する方法は未だ確立されていない。これまでは、基本的に感染者の末梢血中のウイルス量を減少させる効果を基準に治療法開発が行われてきた。しかし、エイズ根本治療法を開発する為には、エイズウイルスが体内のどこでいつどのように増殖しているのか、深部臓器でどんな免疫応答が起こっているのか、エイズウイルスの最も重要な標的部位がどこなのか等を明らかにする必要がある。最近、HIV-1に類似のサルウイルス(SIV)を用いた研究によりエイズの標的臓器として腸管が重要であることが示され、エイズ患者においても腸管の重要性が示唆されている。一方、申請者らは外皮蛋白遺伝子を中心とした約半分のゲノム領域を HIV-1 のものと置き換えた SIV/HIV-1 キメラウイルス(SHIV)の作製によりサルエイズ感染・発症モデル系を確立し、これまでに様々な病態を呈する SHIV 感染性分子クローンを得ている。本研究により、サルエイズモデルの前臨床試験としての有用性が高まり、新しい評価基準に基づくエイズ根本治療法の開発が促進されるものと期待される。

B. 研究方法

アカゲザルを用いたエイズ発症モデル系の腸管におけるウイルス感染動態と免疫細胞応答について、統合的な解析を行うことにより腸管病態形成機構を解明し、サルエイズモデルによる新規治療法開発の為の腸管病態に基づく評価基準を確立する。具体的には、1) 感染サルの腸管におけるウイルス増殖部位や潜伏部位等の感染動態について詳細に解析する。2) 感染サルの腸管や深部リンパ系組織における免疫細胞応答について詳細に解析する。3) 感染サルの腸管をはじめとする全身の深部組織における病変の病理組織学的解析を行う。以上の解析を統合的に行うことにより、エイズウイルス感染サル個体の腸管病態形成における最も重要な標的細胞群を特定し、腸管のウイルス制御に有効に働く腸管免疫機構を明らかにする。

(倫理面への配慮)

動物実験に当たっては、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に基づいた「京都大学における動物実験の実施に関する規定」を遵守する。当施設におけるアカゲザルの飼養については、「特定外来生物による生態系等に係わる被害の防止に関する法律」の規定に基づき、環境大臣より許可を受けている。また、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」の輸入禁止地域等を定める省令に基づき輸入サル飼育施設の指定を受けている。「動物の愛護及び管理に関する法律」も遵守する。また、組換え SHIV 感染実験については第二種使用等をする間に執る拡散防止措置について大臣確認されている。

C. 研究結果

SIVの外被蛋白遺伝子を HIV-1 のものと組み換えたキメラウイルスである SHIV-KS661 をアカゲザルへ経静脈接種すると、感染サルは高レベルのウイルス血漿を示し (High Viral Load: HVL)、全身性の CD4 陽性 T 細胞の枯渇をウイ

ルス接種後約一ヶ月で引き起こす。その後、高度のウイルス血症およびCD4陽性T細胞の枯渇が持続し、慢性の下痢により感染後0.5〜1.5年で衰弱死する。一方、このウイルスを経直腸接種した場合、多くのサルで感染初期に一過性のウイルス増殖がみられるものの、その後のウイルス血症レベルは有意に低く（Low Viral Load: LVL）、CD4陽性T細胞の減少の程度も緩和される。ところがLVLサルでも慢性の下痢を引き起こし、感染後約20週で衰弱死する個体（Symptomatic LVL: Sym LVL）が認められた。そこで、Sym LVLサルの死亡原因を解明することを目的とし、エイズの特徴的病態であるリンパ組織や腸でのウイルス増殖、CD4陽性T細胞減少およびEnteropathyを非感染サル、無症候なLVLサル（Asymptomatic LVL: Asym LVL）、HVLサルとの比較により解析した。血漿中ウイルスRNA量および組織中プロウイルス量は定量PCR法により測定した。血中CD4陽性T細胞数はフローサイトメトリー法により測定した。リンパ組織や腸におけるウイルス感染細胞および免疫細胞マーカーについて免疫組織化学染色を用いて解析した。また、HE染色標本を用いて腸の絨毛萎縮の有無を検討した。Sym LVLサルおよびAsym LVLサルの組織プロウイルス量に差はなく、どちらもHVLより有意に低かった。ウイルス感染（Nef陽性）細胞はHVLの組織でのみ検出され、LVLでは検出されなかった。リンパ組織および腸のCD4陽性T細胞数は非感染サルと比較してSymptomatic群（Sym LVLおよびHVL）では明らかに低かったが、非感染サルとAsym LVL群に差はなかった。また、非感染サルやAsym LVLサル群と比較してSymptomatic群では明らかな腸の絨毛萎縮が認められ、Ki67陽性マクロファージが有意に多く観察された。

D. 考察

LVLサルでもCD4陽性T細胞の減少や絨毛萎縮が起こりうる事が明らかになった。絨毛萎縮は活性化マクロファージによる自己組織破壊による可能性が示唆された。小腸CD4陽性T細胞の減少や絨毛萎縮は、下痢を呈して死んだサルに特異的にみられたことから感染サルの病態進行と関連があることが示唆された。

E. 結論

ウイルス増殖を抑制している感染サル個体において小腸のCD4陽性T細胞の枯渇や絨毛萎縮等のエイズ病態が進行しうることを明らかにした。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1). Inaba, K., Fukazawa, Y., Matsuda, K., Himeno, A., Matsuyama, M., Ibuki, K., Miura, Y., Koyanagi, Y., Nakajima, A., Blumberg, R. S., Takahashi, H., Hayami, M., Igarashi, T., and Miura, T.: Small intestine CD4⁺ cell reduction and enteropathy in SHIV-KS661-infected rhesus macaques in presence of low viral load. J. Gen. Virol., in press.
- (2). Matsuda, K., Inaba, K., Fukazawa, Y., Matsuyama, M., Ibuki, K., Horiike, M., Saito, N., Hayami, M., Igarashi, T., and Miura, T.: *In vivo* analysis of a new R5 tropic SHIV generated from the highly pathogenic SHIV-KS661, a derivative of SHIV-89.6. Virology, in press.
- (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 infection of simian-human immunodeficiency virus regardless of its pathogenicity. J. Virol., 82: 6039-6044, 2008.

2. 学会発表

- (1) 松田健太、稲葉一寿、伊吹謙太郎、深澤嘉伯、松山めぐみ、斉藤尚紀、堀池麻里子、姫野愛、速水正憲、五十嵐樹彦、三浦智行：新規CCR5指向性SHIVの作製とアカゲザルへの順化、第148回日本獣医学会学術集会、2008年9月25-27日、鳥取
- (2) 松田健太、稲葉一寿、深澤嘉伯、伊吹謙太郎、松山めぐみ、堀池麻里子、速水正憲、五十嵐樹彦、三浦智行：抗HIVワクチン評価に有用なR5指向性SHIVの作製、第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月25-27日、東京。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

粘膜免疫活性化による粘膜棲息型HIV制御法の開発：
BCG を用いた粘膜自然免疫担当細胞の活性化

研究分担者 高橋 秀実 日本医科大学微生物学免疫学教室 教授

研究要旨

膀胱粘膜組織より発生する膀胱癌に対する BCG (bacillus Calmette-Guerin) は膀胱内注入療法の有効性は広く知られているが、その詳細な抗腫瘍機序に関してはいまだ不明な点が多い。我々はこうした BCG を膀胱内に注入することによって惹起される抗腫瘍作用が、膀胱粘膜組織に内在するどのような防御システムに由来するのかを検討する目的で、BCG に感受性を有する樹状細胞 (DC) に着目した。その結果、DC は不活化した BCG よりも生菌 BCG に感染した場合の方が遥かに大量の TNF- α と IL-12 を放出することを見いだした。また一方において、ヒト膀胱腫瘍として広く使用されている腫瘍株 (T24) において、MHC class-I 分子の発現が著明に低下していることを確認した。このことは、T24 細胞株が MHC 拘束性のキラー T 細胞 (CTL) を主体とした細胞性免疫によって制御されにくい可能性を示唆している。そこで、この T24 細胞株と MHC 分子の異なる健康人からの異種末梢血単核細胞 (Allogeneic-PBMC) を生菌あるいは死菌 BCG の存在下で培養し、どのような抗腫瘍免疫が誘導されてくるかを追跡した。その結果、生菌 BCG を取り込んだ DC を Allogeneic-PBMC と共培養すると、CTL は全く誘導されず IL-12 レセプターを発現している NKT 細胞及び γ δ 型 T 細胞を主体とした自然免疫担当細胞が誘導された。この NKT 細胞は、 α -GalCer によって誘導されてくる従来型とは異なり、自身の NKG2D レセプターを介して腫瘍表面に発現した MICA/MICB 分子を認識し抗腫瘍作用を示した。以上、生菌 BCG が感染した DC は、活性化した自然免疫担当細胞である NKT 細胞や γ δ 型 T 細胞を介して抗腫瘍作用を発揮することが明らかとなった。こうした事実は、粘膜内に棲息する HIV 感染細胞が Nef 蛋白によりクラス I MHC 分子の発現が低下している状況において、BCG により活性化した自然免疫担当細胞である NKT 細胞や γ δ 型 T 細胞により制御される可能性を示唆している。

A. 研究目的

HIV-1 は粘膜組織内の CD4 ならびに CXCR4 あるいは CCR5 を発現した細胞群に感染しそこに潜伏するとともに、他の HIV-1 感受性細胞群へとウイルス粒子を伝播する。これまでの研究によれば、HIV-1 感染細胞はウイルスコンポーネントである nef 遺伝子、あるいはその産物としての Nef 蛋白により、抗原提示分子群であるクラス I MHC あるいは CD1a, CD1d 分子群の発現が低下することが判明している。このことは、HIV-1 感染細胞がクラス I MHC 分子によって拘束された CD8 分子を表出した細胞傷害性 T 細胞 (CTL) による制御から逃避する可能性を示唆している。また、粘膜組織内に棲息する CD4 陽性の HIV-1 感受性を有する細胞群は、HAART 治療により血液中のウイルス量が検出感度以下となった場合にも、ウイルス抗原を保持したまま多数棲息することも判明してきた。本研究では、こうした粘膜内に棲息するクラス I MHC 分子が発現低下した CTL の攻撃から回避された状況にある HIV-1 感染細胞を除去、あるいは制御するための方策を検討するため、近年注目を集めている膀胱癌に対する BCG 注入療法に着目し、

この療法がクラス I MHC 分子発現の低下した膀胱腫瘍にも有益である事実から、BCG を用いた粘膜免疫賦活療法の意義を明らかにすることによって、粘膜内に棲息する HIV-1 を保持したクラス I MHC 分子の発現低下細胞群に対する新たな制御法を見いだすことを目的とした。

B. 研究方法

まず、実験に用いる膀胱腫瘍 T24 細胞株においてクラス I MHC 分子の発現が低下していることを Flow cytometer で確認した。また、粘膜組織内に存在し、HIV-1 感染細胞から抗原情報を採取し、その情報を発現している樹状細胞 (DC) に着目し、この DC が BCG により影響を受けることを確認するため、感染性のある生菌 BCG 存在下で DC を培養し、培養上清中に放出されたサイトカインを ELISA 法により測定した。またこの際、熱処理により不活化された BCG を用いた場合と比較検討した。次にクラス I MHC 分子の発現が低下した膀胱癌細胞 T24 の BCG による増殖抑制効果みるため、T24 細胞と Allogeneic-PBMC を BCG 存在下で共培養後、サイ

ミジン (3H-TdR) を加えその up-take 量を追跡した。さらに BCG を取り込んだ DC により Allogeneic-PBMC 中に誘導されてくる T24 細胞を制御する細胞群の種類を、Flow-cytometry によって同定するとともに、それらの T24 細胞に対する細胞傷害活性をクロミウム遊離試験により追跡した。また一方において、クラス I MHC 分子発現の低下に伴い逆に T24 細胞上にクラス I MHC 分子に酷似したストレス関連物質 MICA/MICB 分子が発現することを想定し、その特異的レセプターである NKG2D レセプターの特異的抗体によるブロッキング実験を実施した。

C. 研究結果

1) まず、実験に用いる膀胱腫瘍 T24 細胞株においてクラス I MHC 分子の発現が低下していることを Flow cytometer で確認した (図 1)。

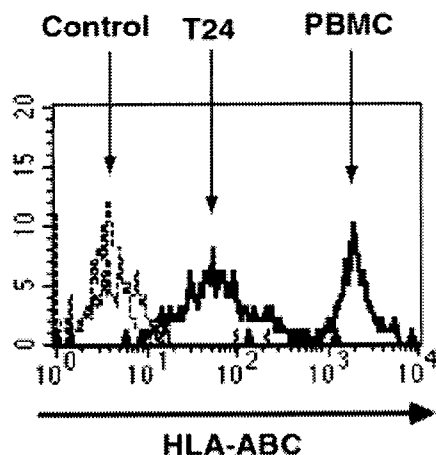


図 1 T24 細胞上のクラス I MHC 分子の発現低下

2) 次に、T24 細胞の増殖過程に生菌 BCG を添加培養したところ、T24 細胞の増殖は著明に抑制された (図 2A)。この際、生菌 BCG に感染した DC を添加した場合には強い増殖抑制活性が認められたものの (図 2B)、加熱処理した BCG により刺激した DC を添加培養した際には軽度の増殖抑制が認められただけであった (図 2C)。以上より、この増殖抑制作用は生菌 BCG により活性化した樹状細胞の作用によるものであったことが判明した。

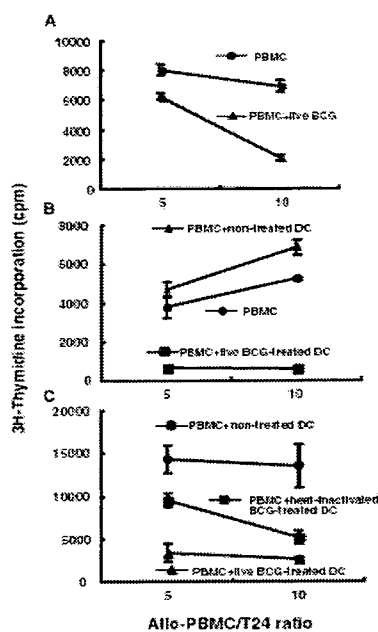


図 2 BCG 添加による DC を介した T24 細胞の増殖抑制

3) この際、DC は不活化した BCG よりも生菌 BCG に感染した場合の方が大量の IL-12 (図 3A) と TNF- α (図 3B) を放出した。

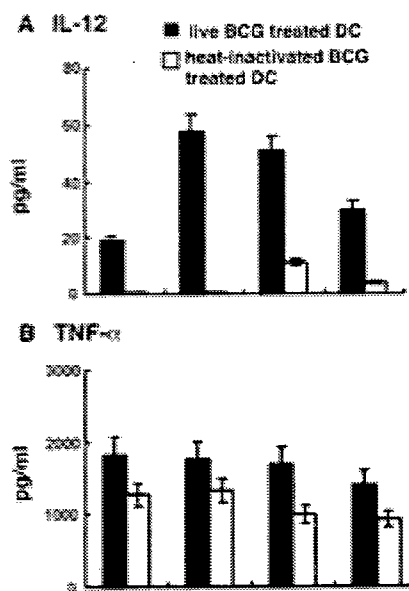


図 3 BCG 感染 DC により放出されるサイトカイン群

4) この生菌 BCG を取り込んだ DC を Allogeneic-PBMC と共培養すると、キラーT細胞 (CTL) は全く誘導されず未刺激状態でも IL-12 レセプターを発現している NKT 細胞及び大半が粘膜組織内に局在する $\gamma\delta$ 型 T 細胞を主体とした自然免疫担当細胞が誘導された (図 4A)。また、これら T 細胞内には抗腫瘍作用を有する多量のパーフォリンならびに Granzyme B が観察された (図 4B)。

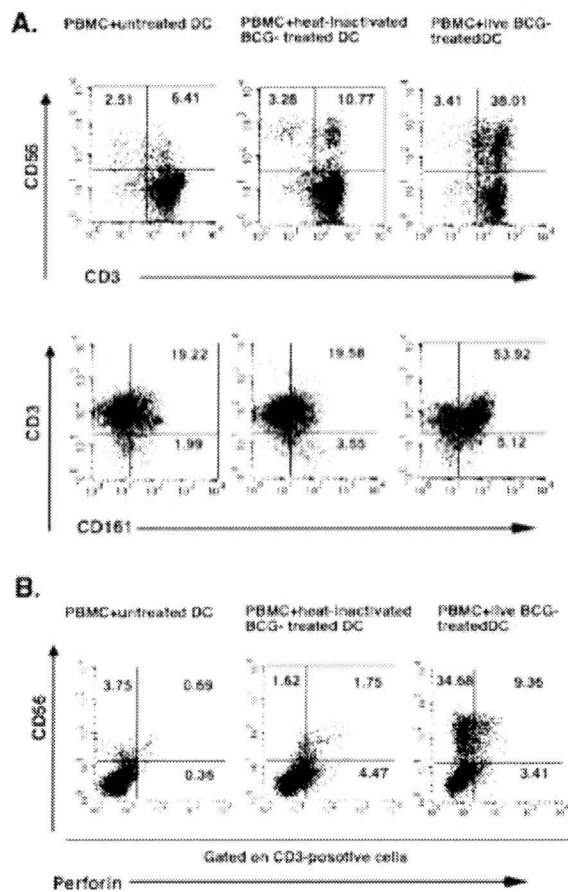


図 4 BCG 感染 DC により活性化された NKT 細胞ならびに Perforin 及び GranzymeB の放出

5) 調べた限りでは、Allogeneic-PBMC より誘導された CD3 陽性 CD56 陽性の NKT 細胞は、従来の CD1d 分子に拘束された細胞ではなかった (data not shown)。しかしながら、細胞上の NKG2D レセプターを特異的抗体でブロックした場合 (図 5A)、あるいはそのカウンター・ポートとして T24 細胞表面の MICA/MICB を抗体でブロックした場合 (図 5B) 抗腫瘍効果の著明な減弱が観察された。

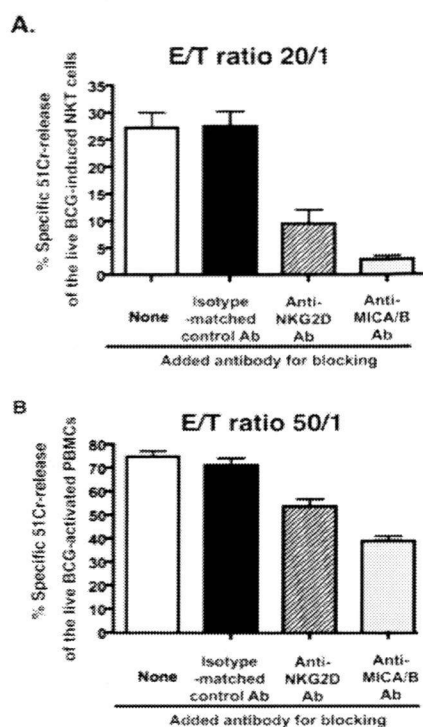


図 5 BCG 感染 DC により活性化抗腫瘍細胞群は、NKG2D レセプターを介し細胞上の MICA/MICB を認識する

以上のことから、BCG により活性化した DC が粘膜組織内に局在する自然免疫系の NKT 細胞及び $\gamma\delta$ 型 T 細胞を活性化し、NKG2D レセプターを介して腫瘍細胞上に発現した MICA/MICB を認識し抗腫瘍作用を示すことが判明した。

D. 考察

生菌 BCG に感染した DC は、Allogeneic な PBMC を刺激し、その中より多量の IL-12 レセプターを有した NKT 細胞を選択的に誘導した。この NKT 細胞は、CD1d 分子と共に細胞表面に提示された α -GalCer などの糖脂質抗原によって誘導されてくる従来型とは異なり、自身の NKG2D レセプターを介して腫瘍表面の MICA/MICB 分子を認識し特異的抗腫瘍作用を示すことが示唆された。このように生菌 BCG が感染した DC は、従来より抗腫瘍免疫の中心的役割を演ずるものと想定されてきた獲得免疫系に属する CD8⁺ のキラーT細胞 (CTL) ではなく、これまであまり注目を集めてこなかった活性化した自然免疫担当細胞である NKT 細胞や $\gamma\delta$ 型 T 細胞を介して抗腫瘍作用を発揮することが明らかとなった。粘膜組織より発生した膀胱癌に対する BCG の膀胱内注入

療法の有効性が高く評価されている現在、こうした結果は抗腫瘍免疫として従来想定されてきた CD8⁺ の CTL ではなく、活性化された自然免疫系に属する NKT 細胞及び $\gamma\delta$ 型 T 細胞による抗腫瘍作用の意義を物語っており、その活性化に対し生菌 BCG により賦活された腫瘍局所の DC が重要な役割を演ずることを示している。また本研究においては、K562 細胞に対する抗腫瘍活性を有した NK 細胞も認められなかった。このことは、MHC 分子群の影響を受けている CTL あるいは NK 細胞群がこうした粘膜感染細胞あるいは粘膜より発生した腫瘍細胞の実質的な制御細胞ではないことを物語っている。翻って、粘膜に棲息する HIV-1 感染細胞を鑑みるに、この感染細胞自身が T24 細胞と同様クラス I MHC 分子の発現低下を起こすため、従来のクラス I MHC 分子拘束性 CTL からの包囲網から逃避していたものだとすると、粘膜内においてこの HIV-1 感染細胞の実質的な制御群は、BCG によって活性化された粘膜防御を担う自然免疫担当細胞群、すなわち NKT 細胞及び $\gamma\delta$ 型 T 細胞であり、それらを統括しているのが粘膜 DC であるといえよう。この粘膜 DC に関わるのが、DC への感染性を有した生菌 BCG であるならば、BCG 由来の DC 活性化成分を同定することで、HIV 制御を可能とする新たな物質が見いだされるかもしれない。結核菌成分の中にある自然免疫を活性化する物質の同定は、HIV-1 粘膜感染を制御する新たな手法を提示するかも知れない

E. 結論

以上、生菌 BCG が感染した DC は、活性化した自然免疫担当細胞である NKT 細胞や $\gamma\delta$ 型 T 細胞を介して抗腫瘍作用を発揮することが明らかとなった。こうした事実は、粘膜内に棲息する HIV 感染細胞が Nef 蛋白によりクラス I MHC 分子の発現が低下している状況において、BCG により活性化した自然免疫担当細胞である NKT 細胞や $\gamma\delta$ 型 T 細胞により制御される可能性が示唆された。

F. 論文発表

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., 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, 2009..

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

3) 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.* 58:1245-1255, 2009.

4) Shinya, E., Owaki, A., Norose, Y., Sato, S., Takahashi, H. Quick methods of multimeric protein production for biologically active substances such as human GM-CSF (hGM-CSF). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 386:40-44, 2009.

5) Machida, K., Tsukiyama-Kohara, K., Sekiguchi, S., SEike, E., One, S., Hayashi, Y., Tobita, Y., Kasama, Y., Shimizu, M., Takahashi, H., Taya, C., Yonekawa, H., Tanaka, N., Kohara, M. Hepatitis C virus and disrupted interferon signaling promote lymphoproliferation via type. *Gastroenterology*, 137:285-296, 2009.

6) Inaba, K., Fukazawa, Y., Mutsuda, K., Himeno, A., Matsuyama, M., Ibuki, K., Miura, Y., Koyanagi, Y., Nakajima, A., Blumberg, R.S., Takahashi, H., Hayami, M., Igarashi, T., Miura, T. Small intestine CD4⁺ cell reduction and enteropathy in SHIV-1 KS661-infected rhesus macaques in presence of low viral load *J. Gen. Virol.* 2009 (in press).

7) Takeuchi, H., Takahashi, M., Norose, Y., Takeshita, T., Fukunaga, Y., Takahashi, H. Transformation of breast milk macrophages by HTLV-1: implications for HTLV-1 transmission via breastfeeding. *Biomedical Res.*, 2009 (in press).

8) Takahashi, H. Species-specific CD1-restricted innate immunity for the development of HIV vaccine. *Vaccine*, 2009 (in press).

9) Yagi, Y., Watanabe, E., Watari, E., Shinya, E., Satomi, M., Takeshita, T., Takahashi, H. Inhibition of DC-SIGN-mediated transmission of HIV-1 by TLR3 signaling in breast milk macrophages.

Immunology, 2009 (in press).

10) 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.

11) 高橋秀実：BCGによる自然免疫の活性化。泌尿器外科, 22(2)：200-202, 2009.

12) 高橋秀実：自然免疫システムと生体防御。炎症と免疫 17(3)：247-249, 2009.

13) 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)

14) 高橋秀実：アレルギー疾患における漢方薬の作用機序に関する一考察, 日本小児科学会雑誌, 113(6)：897-901, 2009.

15) 高橋秀実：CD1 分子群によって規定された自然免疫と MHC 分子群によって拘束された獲得免疫：エイズワクチン開発のための新たな指標, 日本エイズ学会誌, 11 (3)：199-204, 2009.

16) 矢田純一、高橋秀実 (監訳)：リップニコット・イラストレイテッド免疫学。丸善出版, 2009 発刊

G. 学会発表

1) 高橋秀実：膀胱癌に対する BCG 注入療法から見える丸山ワクチンの作用機序
第 6 回 NPO 丸山ワクチンと癌を考える会 (特別講演)
2009 年 5 月 23 日 (東京) .

2) 高橋秀実：生体防御システムの二重構造と新たな腫瘍免疫の構築
西多摩医師会学術講演会 (特別講演)
2009 年 7 月 27 日 (東京) .

3) 高橋秀実：様々な症候と自然免疫の応答
平成 21 年度北区医師会夏の免疫・アレルギーセミナー (特別講演)
2009 年 8 月 19 日 (東京) .

4) Takahashi, H.: Mucosal Innate Immunity and HIV pathogenesis.
US-Japan Joint AIDS-Hepatitis Meeting. September 21-23, 2009(Portland, Oregon, USA).

5) 高橋秀実：漢方療法入門：日常診療に役立つ漢方処方
平成 21 年度日本医師会生涯教育講座 (教育講演)
2009 年 10 月 14 日 (東京) .

6) 高橋めぐみ、渡理英二、新谷英滋、高橋秀実：HIV-1 持続感染細胞を傷害する細胞傷害性 CD8 陽性細胞。
第 57 回日本ウイルス学会総会。
2009 年 10 月 25-27 日 (東京) .

7) 竹内穂高、高橋めぐみ、高橋秀実：HTLV-I の母子感染における母乳マクロファージの関与。
第 57 回日本ウイルス学会総会。
2009 年 10 月 25-27 日 (東京) .

8) 高久千鶴乃、渡邊恵理、大脇敦子、清水真澄、近江恭子、渡理英二、新谷英滋、高橋秀実：HIV 暴露樹状細胞が及ぼす CD4 陽性 NKT 細胞の X4-type HIV-1 感受性増強の可能性。
第 23 回日本エイズ学会総会
2009 年 11 月 26 日-28 日 (名古屋) .

9) 新谷英滋、清水真澄、大脇敦子、渡邊恵理、松村次郎、八木幸恵、高久千鶴乃、高橋秀実：Molecular basis for down-regulation of ZCD1-molecules and their antigen presentation by HIV-1 Nef in immature dendritic cells.
第 23 回日本エイズ学会総会
2009 年 11 月 26 日-28 日 (名古屋)

10) 松村次郎、大脇敦子、清水真澄、本田元人、秋山純一、新谷英滋、岡慎一、高橋秀実：HIV 患者の腸管粘膜における感染細胞とプロウイルス DNA・ウイルス RNA の検索。
第 23 回日本エイズ学会総会
2009 年 11 月 26 日-28 日 (名古屋)

11) 高橋秀実：母乳細胞とレトロウイルス感染
第 24 回日本生殖免疫学会総会・学術集会 (特別講演)
2009 年 11 月 28 日 (東京) .

12) 根岸靖幸、熊谷善博、真弓暢子、松橋智彦、竹下俊行、高橋秀実：妊娠マウスにおける脱落膜、脾臓細胞のプロファイリング。
第 39 回日本免疫学会総会
2009 年 12 月 2 日-4 日 (大阪) .

13) Mayumi, N., Watanabe, E., Yagi, Y., Watari, E., Kawana, S., Takahashi, H.: Langerin Expression on breast milk macrophages in the presence of keratinocytes.
第 39 回日本免疫学会総会
2009 年 12 月 2 日-4 日 (大阪) .

14) Kumagai, Y., Takahashi, H.: Epitope-grafting and construction of epitope libraries at the immunoglobulin hypervariable regions.
第 39 回日本免疫学会総会
2009 年 12 月 2 日-4 日 (大阪) .

15) Watari, E., Watanaba, E., Mayumi, N., Date, T.,

Takahashi, H.: Implications of low-responsiveness for secreting pro-inflammatory molecules to poly(I:C)/TLR3 signaling in monocyte-derived Langerhans cell-like cells.

第 39 回日本免疫学会総会
2009 年 12 月 2 日-4 日 (大阪) .

16) 八木幸恵、渡辺恵理、渡理英二、真弓暢子、松村次郎、新谷英滋、高橋めぐみ、里見操緒、竹下俊行、高橋秀実: 母乳における DC-SIGN を介した HIV-1 の母児感染は TLR3 シグナルにより抑制される.

第 39 回日本免疫学会総会
2009 年 12 月 2 日-4 日 (大阪) .

17) Wakabayashi, A., Moriya, K., Harimoto, H., Tomita, Y., Shimizu, M., Takahashi, H.: Induction of acquired tumore-specific immunity against already established tumors by selective stimulation of innate DEC-205+ dendritic cells with very low-dose of anti-cancer drugs in vivo.

第 39 回日本免疫学会総会
2009 年 12 月 2 日-4 日 (大阪) .

18) Takaku, S., Takahashi, M., Nakagawa, Y., Owaki, A., Shimizu, M., Takaku, C., Takahashi, H.: IL-15 inhibits the apoptosis of CTLs induced by brief exposure to antigenic peptide.

第 39 回日本免疫学会総会
2009 年 12 月 2 日-4 日 (大阪) .

19) 小林史子、渡辺恵理、竹内穂高、稲垣真一郎、中川洋子、野呂瀬嘉彦、高橋秀実: ヘリコバクター・ピロリ表面上のウレアーゼにより誘発された TLR2 を介した B-1 細胞による自己抗体の産生.

第 39 回日本免疫学会総会
2009 年 12 月 2 日-4 日 (大阪) .

20) 中川洋子、清水真澄、大脇敦子、近江恭子、野呂瀬嘉彦、高久俊、高橋秀実: CD8 陽性ヒト免疫不全ウイルス外被糖蛋白特異的細胞傷害性 T 細胞の遊離ペプチド抗原によるアポトーシス誘導 (II).

第 39 回日本免疫学会総会
2009 年 12 月 2 日-4 日 (大阪) .

21) Shinya, E., Shimizu, M., Owaki, A., Watanabe, E., Matsumura, J., Yagi, Y., Takaku, C., Takahashi, H.: Molecular basis for down-regulation of ZCD1-molecules and their antigen presentation by HIV-1 Nef in immature dendritic cells.

第 39 回日本免疫学会総会
2009 年 12 月 2 日-4 日 (大阪) .

22) 高橋秀実: 母乳細胞とレトロウイルス感染
第 24 回日本生殖免疫学会総会・学術集会 (特別講演)

2009 年 11 月 28 日 (東京) .

23) 高橋秀実: ヘリコバクター・ピロリ感染と生体応答

日本小児ヘリコバクター・ピロリ研究会 (特別講演)

2010 年 3 月 13 日 (東京) .

H. 知的財産権の出願・登録状況

本年度は特にございません。

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）
分担研究報告書

サルエイズモデルにおける粘膜感染防御反応

研究分担者 俣野 哲朗 東京大学医科学研究所教授

研究要旨

主要な HIV 増殖の場である腸管粘膜組織近傍を含めた各種局所リンパ組織における宿主免疫反応動態を知ることが目的とし、サル免疫不全ウイルス（SIV）感染サルエイズモデルにおいて、末梢血リンパ球と局所リンパ組織における SIV 抗原特異的細胞傷害性 T リンパ球（CTL）の解析を進めた。ワクチンにより体内ウイルス量が比較的低値に保たれた SIV 感染サルの慢性期の組織を用いた解析では、末梢血リンパ球と比較して、末梢リンパ節や扁桃腺において、より多種の抗原特異的な CTL 反応が認められた。腸管膜リンパ節では、さらに多種の抗原特異的な CTL 反応が検出された。この結果はウイルス増殖の場における局所的な CTL 反応を反映している可能性が考えられる。

A. 研究目的

CCR5 陽性 CD4 陽性 T リンパ球が豊富な腸管組織は、主要な HIV 増殖の場として知られている。この腸管粘膜を含めた組織における宿主免疫反応動態を明らかにし、HIV 増殖に及ぼす影響を知ることが、HIV 感染症の理解に結びつく重要なステップである。本研究では、腸管近傍を含めた各種局所リンパ組織における宿主免疫反応動態を知ることが目的とし、サル免疫不全ウイルス（SIV）感染サルエイズモデルにおいて、末梢血リンパ球と各種局所リンパ組織における T リンパ球反応の解析を進めることとした。特に、HIV 複製抑制に中心的役割を果たしていることが知られている CD8 陽性細胞傷害性 T リンパ球（CTL）反応に着目した解析を進めた。

B. 研究方法

主要組織適合遺伝子複合体クラス I（MHC-I）ハプロタイプ 90-120-Ia を共有する SIV 感染アカゲサル 2 頭を用いた。1 頭（#1）は、SIV 感染後比較的高い血漿中ウイルス量を維持したサルである。もう 1 頭（#2）は、ワクチン後の SIV チャレンジ実験でセットポイント期以降約 2 年間ウイルス血症が認められず、その後ウイルス血症の再出現が認められたサルである。いずれも感染後 3 年あまりを経て安楽殺とし、その際の解剖により得られたリンパ組織からリンパ球を分離し、細胞

表面免疫マーカーを調べた。また、SIV 各抗原のアミノ酸配列をカバーするオーバーラッピングペプチドを用いた抗原刺激後のインターフェロニン γ 誘導を細胞内免疫染色で検出することにより、SIV 各抗原特異的 CTL 反応を解析した。

（倫理面への配慮）

動物実験は、倫理面も含めて、国立感染症研究所、独立行政法人医薬基盤研究所および東京大学医科学研究所の動物実験委員会の審査をうけ、その承認を得てから開始した。組換え生物等については、第二種使用等拡散防止措置確認申請承認（大臣確認）済みである。

C. 研究結果

一般的にリンパ節の CD8 陽性メモリー T リンパ球の大部分は CD28 陽性 CD95 陽性セントラルメモリー（CM）T リンパ球であるが、サル#1 のリンパ節においては、CD8 陽性 CD28 陰性 CD95 陽性エフェクターメモリー（EM）T リンパ球が CD8 陽性 CM-T リンパ球より優位であり、そけいリンパ節・顎下リンパ節と比べて、特に腸管膜リンパ節で CD8 陽性 EM-T リンパ球の頻度が高かった。サル#2 のリンパ節でも比較的高頻度の CD8 陽性 EM-T リンパ球が認められたが、そけいリンパ節・顎下リンパ節・腸管膜リンパ節のいずれにおいてもそのレベルに大きな差はなく、

CM-T リンパ球の方がやや優位であった。

CTL 反応の解析では、SIV の抗原 Gag、Pol、Vif、Vpx、Vpr、Env、Tat、Rev、Nef のうちのどの抗原特異的 CTL 反応が誘導されているかという点に焦点をあてた検討を行った。サル#1 の末梢血リンパ球とそけいリンパ節における SIV 抗原特異的 CTL 反応の解析では、両者に明らかな差は認められなかった (表 1)。一方、サル#2 の解析では (表 2)、末梢血 T リンパ球においては、Gag 特異的 CTL・Env 特異的 CTL・Nef 特異的 CTL 反応しか認められなかったが、そけいリンパ節や顎下リンパ節においては、Gag・Env・Nef 特異的 CTL 反応以外にも Pol 等の抗原特異的 CTL 反応が認められた。腸管膜リンパ節においては、さらに広範囲の抗原 (Rev 以外の SIV 抗原) 特異的 CTL 反応が認められた。なお、扁桃腺から分離したリンパ球を用いた解析においても、SIV 抗原特異的 CTL 反応が認められた。

D. 考察

リンパ節において高頻度の CD8 陽性 EM-T リンパ球が認められたことは、リンパ節における SIV の持続的増殖とそれに対する持続的 CTL 反応を反映している可能性が考えられる。特に、サル#2 より病態が進行したサル#1 で認められた結果は、腸管において激しい SIV 増殖が生じていることを意味しているのかもしれない。

サル#2 の SIV 抗原特異的 CTL 反応の解析では、末梢血リンパ球、各リンパ節間で反応に違いがあり、腸管膜リンパ節において特に広範囲の抗原特異的 CTL 反応が検出された。この結果は、SIV 増殖とそれに対する CTL 反応が、腸管膜において最も強く生じており、まだ全身には反映されていないことを示唆している可能性が考えられる。

なお、扁桃腺における CTL 反応は、ある種の粘膜免疫反応を示唆しているが、腸管関連粘膜免疫反応との関連については今後の課題である。

E. 結論

ワクチンにより体内ウイルス量が比較的 low に保たれた SIV 感染サルの慢性期の組織を用いた解析で、特に腸管膜リンパ節では、多種の抗原特異的な CTL 反応が認められた。この結果は、ウイルス増殖の場における局所的な CTL 反応を反映している可能性が考えられる。

F. 研究発表

1 論文発表

- (1) Yamamoto T, Iwamoto N, Yamamoto H, Tsukamoto T, Kuwano T, Takeda A, Kawada M, Tsunetsugu-Yokota Y, Matano T. Polyfunctional CD4⁺ T-cell induction in neutralizing antibody-triggered control of simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 83:5514-5524, 2009.
- (2) Tsukamoto T, Takeda A, Yamamoto T, Yamamoto H, Kawada M, Matano T. Impact of cytotoxic-T-lymphocyte memory induction without virus-specific CD4⁺ T-cell help on control of a simian immunodeficiency virus challenge in rhesus macaques. *J Virol* 83:9339-9346, 2009.

2 学会発表

- (1) Matano T. Effect of vaccine-induced memory T cells on HIV/SIV replication after virus exposure. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 9/11/2009.
- (2) 守屋智草、鎌田健男、栗原京子、高原悠佑、井上誠、朱亜峰、長谷川護、俣野哲朗. センダイウイルスベクターワクチン接種経路の検討. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、10/26/2009.
- (3) 高橋尚史、塚本徹雄、岩本南、高原悠佑、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗. 細胞性免疫誘導エイズワクチンの有効性が認められたサルにおける SIV 特異的 CTL のエピトープ探索. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、10/26/2009.

G. 知的財産権の出願・登録状況

無し。

表 1 サル#1 の組織別 SIV 抗原特異的 CTL 反応

抗原	Gag	Pol	Vif	Vpx	Vpr	Env	Tat	Rev	Nef
末梢血リンパ球	+	+	—	—	—	+	+	—	+
そけいリンパ節	+	+	—	—	—	+	+	—	+

表 2 サル#2 の組織別 SIV 抗原特異的 CTL 反応

抗原	Gag	Pol	Vif	Vpx	Vpr	Env	Tat	Rev	Nef
末梢血リンパ球	+	—	—	—	—	+	—	—	+
そけいリンパ節	+	+	—	—	+	+	—	—	+
腸管膜リンパ節	+	+	+	+	+	+	+	—	+
顎下リンパ節	+	+	+	—	—	+	+	—	+
扁桃腺	+	+	—	—	—	—	+	—	+

汎 HIV-1 株中和能を有する抗体誘導に関する研究

研究分担者 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

研究要旨 HIV 感染者において、homologous および heterologous な HIV 複製を制御できる液性免疫の本態を知る事により、HIV 感染症の病期進行および治療・予防法の開発に大きく貢献できることが期待される。Homologous な HIV 感染を制御する抗体を同定するためには経時的なウイルスと抗体レパートリーの採取とそれらのクローンレベルの解析が必要と考えられる。また、感染期間が長い HIV 感染者ではしばしば heterologous な HIV 複製を制御できる液性免疫誘導が見られる。Heterologous な HIV 複製を抑制する液性免疫は CD4 結合部位を標的とした抗体を含んだ polyclonal な中和抗体活性と推測されている。しかし、その直截的証拠は提示されていない。これを検証するためにも HIV を認識する抗体レパートリーの解析は必須と考えられる。HIV 複製制御能をもつ抗体遺伝子の解析を可能にするために、HIV 複製阻害能を持つクローンを含むヒト由来 CD4 反応性抗体クローンの抗体遺伝子の解析に関する技術検証を行ったのでここに報告する。

A. 研究目的

宿主の液性免疫応答は HIV 感染症の病期進行を制御する一因と考えられており、実際ウイルスと感染者血清を経時的に採取して解析する事により、感染者内で液性免疫からウイルス逃避が連続的におこっている事が報告されている(Frost et al., PNAS 2005)。このとき、HIV の Env を分子クローンにて解析する技術は確立しているが、HIV の Env に反応する液性免疫応答を遺伝子レベルで理解する手法が確立していないため、その本態を理解するには至っていない。具体的には、既存の抗体産生細胞が新たな抗原に対し somatic hypermutation を獲得することによる免疫応答と新たに誘導される液性免疫反応の割合と有効性が依然不明である。

一方、HIV が長期間感染し続けている感染者では、しばしば heterologous HIV を中和することができる抗体活性が検出される(Burton et al., Nat

Immunol 2004)。この活性は autologous HIV に対しては限定的に作用すると考えられるが、heterologous に対するウイルス複製抑制活性はエイズワクチンが到達すべき目標が実際にヒトで例示されていると見る事が出来る。しかし、heterologous HIV を中和することができるヒト抗体に関して、(1)抗体誘導に必要とされる期間はどれくらいか、(2)なぜ全ての感染者に同様の抗体活性が検出されないのか、(3)ウイルス複製阻害活性が(a) monoclonal/polyclonal antibody に依存するのか、(b)中和標的部位はどこか、など多くの疑問が解決されていない。

(1)や(3-a)を検証するためには Env を認識する液性免疫の本態である抗体のレパートリーをクローンレベルで解析する必要がある。このとき、単に Env に結合する抗体だけではなく、autologous/heterologous なウイルスの中和能力を指標にして抗体クローンを分離同定する必要がある。機能的なスクリーニングは末梢血 B リンパ

球を EBV または hybridoma 法により不死化し、培養上清が含有する中和活性を測定することにより可能となる。この技術は既に我々の研究グループで施行可能であるが、抗体遺伝子の解析とその意義付けに関する研究は技術的に改善の余地があった。本年度は抗体遺伝子の解析に関する研究手法の確立を目指して、HIV 複製阻害活性を持つ CD4 反応性抗体遺伝子の遺伝子クローナリティ解析を行った。

B. 研究方法

健常人由来の IgM 由来 CD4 反応性抗体について解析を行った。遺伝子配列を通常の方法により決定し、遺伝子配列を IgBLAST によって Kabat database に照会することにより、(1)免疫グロブリン遺伝子の可変部位がどのジャームラインに由来するか、(2)免疫グロブリン遺伝子の核酸変異の数と GC が変異に関与する割合、(3)核酸の変異が CDR 内に存在する割合、(4)アミノ酸変異を伴う割合等を解析した。これを各抗体クローンに対し、重鎖と軽鎖についてそれぞれ行った。詳細は Altschul et al, (1997), *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. を参照のこと。

(倫理面への配慮)
特記すべきことなし。

C. 研究結果

3つの抗体クローン HO538-213, HO702-001, and HO702-016 について解析を行った結果を表 1、表 2 に示す。解析により VH、VL family の最も近縁なジャームラインが同定され、それぞれ FR と CDR 部分における A、G、C、T の変異数、さらにアミノ酸変化を伴う変異の割合を導出した。ジャームラインからの遺伝的変化の大きさは 3-5% であった。挿入変異の数は多く検出されたが、欠失変異は検出されなかった。GC に関与は全体の

42% であった。CDR に対してより多くの変異が集積することは IgG の sHM と同様の傾向であった。IgM の sHM は平均して 14.5 個であった。

表 1. Kabat database を IgBLAST にて照会した結果 (I)

Clone	Ig class	VH family	Closest germline	% identity	VL family	Closest germline	% identity
HO538-213	IgM	VH3	VH3-33	95%	Vk3	L6	97%
HO702-001	IgM	VH3	VH3-33	97%	Vk-1	L12	97%
HO702-016	IgM	VH4	VH4-4	96%	Vk-1	L12	97%

表 2. Kabat database を IgBLAST にて照会した結果 (II)

Clone			Number of mutations associated w/ GC Involvement							Total	aa changes	%
			A	G	C	T	ins ¹	del ²	(%) ³			
HO702-001	heavy chain	FR	3	2	1	0	0	0	50.0	6	2	33.3
		CDR	0	0	0	0	5	0	0.0	5	0	0.0
	light chain	FR	0	0	0	2	0	0	0.0	2	1	50.0
		CDR	1	0	0	0	6	0	0.0	7	0	0.0
	Total		4	2	1	2	11	0	33.3	20	3	15.0
HO702-016	heavy chain	FR	1	0	0	0	0	0	0.0	1	0	0.0
		CDR	0	2	1	0	11	0	100.0	6	0	0.0
	light chain	FR	0	0	0	2	0	0	0.0	2	1	50.0
		CDR	1	0	0	0	6	0	0.0	7	0	0.0
	Total		2	2	1	2	17	0	42.9	24	1	4.2
HO538-213	heavy chain	FR	2	1	1	4	0	0	25.0	8	3	37.5
		CDR	2	2	5	1	15	0	70.0	25	5	20.0
	light chain	FR	1	2	1	0	0	0	75.0	4	3	75.0
		CDR	3	1	0	0	2	0	25.0	6	3	50.0
	Total		8	6	7	5	17	0	50.0	43	13	30.2

¹ Nucleotide insertions.

² Nucleotide deletions.

³ The percentage of mutations associated with G and C over the total number of nucleotide changes.

⁴ The number of mutations associated with the amino acid changes.

D. 考察

これらの抗体は独立したクローンであるにもかかわらず非常に多様な Ig 遺伝子の中から特定のジャームラインに由来する可能性が示され、特異的な抗体の創出にジャームライン選択の重要性が示唆された。これらの抗体が IgM の自己反応性抗体であることを考えると、sHM の特性は IgG とは異なる可能性がある。解析結果によると、ジャームラインからの遺伝的多様性は成熟型免疫グロブリン遺伝子で 5% と考えられており、IgM で 3-5% もの多様性が獲得しているのは early response とは考えられないほどの高値である。IgM では GC 変異の割合が少なく、CDR に対する変異の割合が必ずしも多い傾向は観察されなかった。しかし、CDR に対してより多くの変異が集積する

ことは IgG の sHM と同様の傾向であった。また、一般的な sHM は CDR1/2 に多いとされているが、本抗体では CDR2/3 に多い傾向があった。メモリー B 細胞が持つインフルエンザウイルスや HIV-1 に対する病原体特異的抗体遺伝子の可変領域には平均して 20~30 の sHM が存在する。これは平均的な B 細胞の持つ sHM よりも多いことが知られている。IgM の sHM は成熟型抗体遺伝子よりも sHM が少ないと予想されていたが、実際は平均して 14.5 個の sHM であり、一般的な免疫グロブリン成熟プロセスを鑑みると矛盾しない傾向にあるといえる。一方、IgM の sHM として 14.5 個も存在することが観察されたことは驚きである。以上の事実を考え合わせると、成人でも新生児でみられるような IgM におけるクラススイッチを伴わない sHM が抹消で活発に起こっている可能性を示唆している。しかしその特徴は古典的 sHM とは質的に異なる制御であると思われる。ただし、IgM における sHM 制御が一般的なものか、自己抗体に特異的な現象か、特定の遺伝的背景を持つヒトに見られる現象かなど今後の解析を待つ必要がある。

E. 結論

自己反応性 CD4 認識抗体をモデルとして免疫グロブリン遺伝子のクロナリティ解析を行った。HIV に対する液性免疫反応を解析するために必要な抗体レパートリーを遺伝子レベルで解析する技術基盤を構築する事が出来た。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

1) Yumi Kariya, Makiko Hamatake, Emiko Urano,

Hironori Yoshiyama, Norio Shimizu, Jun Komano. A dominant-negative derivative of EBNA1 represses EBNA1-mediated transforming gene expression during the acute phase of Epstein-Barr virus infection independent of rapid loss of viral genome. *Cancer Sci.* In press.

2) Emiko Urano, Reiko Ichikawa, Yuko Morikawa, Takeshi Yoshida, Yoshio Koyanagi, Jun Komano. T cell-based functional cDNA library screening identified SEC14-like 1a carboxy-terminal domain as a negative regulator of human immunodeficiency virus replication. *Vaccine.* In press.

3) Makiko Hamatake, Jun Komano, Emiko Urano, Fumiko Maeda, Yasuko Nagatsuka, Masataka Takekoshi. Inhibition of HIV replication by a CD4-reactive Fab of an IgM clone isolated from a healthy HIV-seronegative individual. *Euro J Immunol.* In press.

4) Ranya Hassan, Shinya Suzu, Masateru Hiyoshi, Naoko Takahashi-Makise, Takamasa Ueno, Tsutomu Agatsuma, Hirofumi Akari, Jun Komano, Yutaka Takebe, Kazuo Motoyoshi and Seiji Okada.

Dys-regulated activation of a Src tyrosine kinase Hck at the Golgi disturbs *N*-glycosylation of a cytokine receptor Fms. *Journal of Cellular Physiology.* 2009 Nov;221(2):458-468.

5) Tsutomu Murakami, Sei Kumakura, Toru Yamazaki, Reiko Tanaka, Makiko Hamatake, Kazu Okuma, Wei Huang, Jonathan Toma, Jun Komano, Mikiro Yanaka, Yuetsu Tanaka, and Naoki Yamamoto. The Novel CXCR4 Antagonist, KRH-3955 Is an Orally Bioavailable and Extremely Potent Inhibitor of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection: Comparative Studies with AMD3100. *Antimicrobe Agents and Chemotherapy.* 2009 Jul;53(7):2940-2948.

学会発表

(国際学会)

1) T Murakami, K Miyakawa, C Bucci, J Komano, N Yamamoto. Role of Rab7 and its effector protein in HIV-1 assembly. CSHL meeting on Retroviruses, Cold Spring Harbor, NY, USA 2009

2) E Urano, H Okunaga, Y Morikawa, J Komano. Inhibition of HIV-1 replication by the co-chaperone DnaJ/Hsp40 protein family. CSHL meeting on Retroviruses, Cold Spring Harbor, NY, USA 2009

(国内学会)

1) 駒野 淳. オーミクス解析手法が次世代エイズ治療・予防法開発に与えるインパクトシンポジウム「これからのHIV研究の進むべき方向」第23回日本エイズ学会, 名古屋, 11月27日 2009

2) 濱武牧子, 宮内浩典, 青木 徹, 浦野恵美子, 駒野 淳. Higher-order homotypic oligomerization determines the steady-state cell surface levels of CXCR4. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009

3) 上原大輔, 坂本真衣子, 吉川治孝, 泉川圭一, 早川俊哉, 駒野 淳, 高橋信弘. Proteomic search for the function of HIV-1Rev protein in human cells. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009

4) 青木 徹, 清水佐紀, 浦野恵美子, 濱武牧子, 寺嶋一夫, 玉村啓和, 村上 努, 山本直樹, 駒野 淳. Development of 5th generation lentiviral vector. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009

5) 浦野 恵美子, 市川 玲子, 森川 裕子, 芳田剛, 小柳 義夫, 駒野 淳. SEC14-like 1a carboxy-terminal domain negatively regulates the infectivity of human immunodeficiency virus replication. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009

6) 村上 努, 呉 鴻規, 富田香織, 伯川冬美, 駒野 淳, 千葉 丈, 山本直樹. Rab蛋白質とそのエ

フェクター蛋白質のHIV-1粒子形成における役割 (Rab7を中心に). 第23回日本エイズ学会学術集会, 名古屋, 2009

7) 浦野 恵美子, 倉持紀子, 供田 洋, 武部 豊, 駒野 淳, 森川 裕子. 酵母の膜結合Gag-Gag反応系で同定されたHIV-1 Gagアセンブリー阻害剤. 第23回日本エイズ学会学術集会, 名古屋, 2009

8) 浦野 恵美子, 市川 玲子, 森川 裕子, 芳田剛, 小柳 義夫, 駒野 淳. T細胞におけるHIV-1抵抗性遺伝子のスクリーニング-SEC14L1a C末端ドメインの同定とその機能解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009

9) 濱武牧子, 駒野 淳, 前田 史子, 長塚靖子, 竹腰 正隆. HIV-1複製抑制能を有する健常人由来CD4反応性IgM抗体クローンの分離: HIV-1に対するnatural humoral resistance. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009

10) 滝澤 万里, 草川 茂, 北村克彦, 長縄 聡, 村上 利夫, 本多 三男, 山本 直樹, 駒野 淳. Diversified HIV-1を利用した中和抗体KD-247感受性を規定するEnv アミノ酸残基の網羅的解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009

11) 村上 努, 呉 鴻規, 富田 香織, 伯川 冬美, 駒野 淳, 千葉 丈, 山本 直樹. HIV-1粒子形成におけるRab7とそのエフェクタータンパク質の役割. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

Hideto Chono, Jun Komano, et al. Inventory of high-titer lentivirus production system by modifying the amino-terminus of Gag (出願2009年11月19日特願2009-263587).

2. 実用新案登録

なし

3. その他
なし

HIV の免疫コントロールに関わるウイルス及び宿主要因に関する研究

研究分担者 三浦 聡之 東京大学医科学研究所 准教授

研究要旨 抗 HIV 薬の投与を必要とせず体内ウイルス産生をコントロールできる患者群は HIV controllers と言われている。これらの患者群では特定の HLA クラス I B タイプ (B57) の頻度が著しく高い。分担研究者は過去において、HIV elite controllers (<50 RNA copies/ml) 由来の *gag-protease* をもつキメラ HIV の複製能力が進行感染者群由来のものに比べ有意に減弱していることを明らかにし、それには HLA で拘束される細胞傷害性 T 細胞反応からのウイルス逃避変異が関与している可能性が高いことを示した。しかしながら、それらはすでに何年間もウイルスに感染している患者群を対象とした研究であり、急性感染期におけるウイルスを対象とした研究が必要とされていた。本分担研究では、急性感染期間中に HIV 陽性と診断された患者の内、その後 HIV controllers になったものを対象とし、診断後間もない血液サンプルを用いて同様の実験を行い、HIV controllers になる患者群では、すでに急性期の時点でウイルス複製能力が低下していることを明らかにした。

A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)の複製を抗 HIV 薬の投与なしでコントロールできる慢性 HIV 感染者から複製能力の減弱したウイルスが分離されることが報告されている。しかしながら、この減弱がいつどのような形で起こっているかは明らかでない。本研究では、急性感染期のウイルス複製能力が、その後の病気の進行とどのような関連があるかを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

対象：米国及びオーストラリアにおいて、感染急性期から早期に HIV 陽性と診断された患者群の内、その後最低一年間にわたり血漿ウイルス量を 2,000 RNA コピー/ml 未満に保った群 (C-PI, 18 名)、及びその基準を満たさなかった群 (NC-PI, 80 名)。

材料：上記対象者の急性感染期から採取された EDTA 血液及び臨床データ (CD4 陽性 T 細胞数、HIV-RNA 量)。

方法：上記 EDTA 血から分離された末梢血単核球から DNA を抽出し、PCR 及びシーケンシングにより患者の HLA クラス I タイプを決定した。また、血漿よりウイルス RNA を抽出し、nested RT-PCR によりウイルスの *gag-pol* 領域を増幅し、標準的な方法によりウイルスの population sequence を得た。ウイルスのサブタイプは web 上の Rega HIV

subtyping tool を用いて決定した。コンタミネーションは分子系統樹解析 (Maximum-Likelihood method) を行うことによりチェックした。さらに、増幅した *gag-protease* 領域を HIV 実験株である NL4-3 に組み込んだキメラウイルスを作製し、GFP レポーター T-cell line に感染させ、その複製能力を解析した。

(倫理面への配慮)

研究目的等を文書によって患者に説明し、書面でインフォームドコンセントを得ている。本研究内容はマサチューセッツ総合病院エイズ研究センターとの共同研究で現地で行われ、同病院の倫理審査を受け承認済みである。

C. 研究結果

(1) HLA クラス I タイプ

欧米において、未治療慢性期に血中ウイルス量を 2,000 RNA copies/ml 未満に抑制できる患者の約 40% が HLA-B57 を発現しているとされる。一方、当研究においては、急性感染期に診断されその後一年以上に渡りこの低い血中ウイルスを保っていた 18 人 (C-PI) の中で HLA-B57 を発現している患者はわずかに 2 人 (11%) であり、コントロール群 (NC-PI) と差を認めなかった (図 1)。

(2) *Gag-protease* キメラ HIV の複製能力
患者血漿から RT-PCR により、*gag-protease* 遺伝

子を増幅し、実験株 HIV-1 である NL4-3 の骨子に組み込んだキメラウイルスを作製した。これらウイルスを LTR-driven GFP レポーター T cell line に感染させ、GFP 発現細胞の比率を 8 日間測定し、複製キネティクスを計算した。RT-PCR が可能だった 16 人の C-PI のうち、一名の non-B サブタイプ感染者を除いた 15 人、及びランダムに抽出された 45 人の NC-PI について検討した。図 2 に示すように、C-PI 由来のキメラウイルスは、NC-PI 由来のキメラウイルスに比べて、有意に減弱した複製能力を示した。

(3) CTL 逃避変異体の伝播

HLA-B57 拘束性 CTL エピトープは Gag タンパク内にあり、代表的なエピトープである TW10 における逃避変異 (T242N) は HLA-B57 に強い関連を持っている。また、実験的にウイルス複製能力を減弱させることが証明されている。上記の結果の原因を探るため、ウイルスアミノ酸配列を解析したところ、2 人の B57 陽性患者からのウイルスは、T242N 逃避変異を持っていた。面白いことに、さらに 2 人の non-B57 患者由来のウイルスがこの T242N 変異を持っており、NC-PI 群での比率より有意に高い頻度であった。これは、HLA-B57 陽性ドナーから複製の減弱したウイルスが伝播した可能性を示唆した。

(3) 薬剤耐性ウイルスの伝播

さらに、ウイルスの pol 遺伝子配列を解析したところ、実に 40% の C-PI 由来ウイルスは何らかの薬剤耐性変異を持っていることが明らかとなった (図 3)。その割合は、病気進行遅延に関連する HLA クラス I アリルを発現する患者を除いた場合、60% までに達した (図 4)。実際の逆転写酵素に関連するウイルス複製能力は測定していないが、RT 領域に生じる多くの薬剤耐性変異はウイルス複製能を減弱させることが知られている。したがって、これら薬剤耐性変異による複製能力の減弱したウイルスの伝播が、レシピエント側での早期のウイルス複製コントロールに有利に働く可能性が示唆された。

以上まとめると、急性感染期後に体内ウイルス産生を抑制できている患者では、急性期のウイルス複製能力が減弱しており、その原因として①ドナー体内において選択された複製能力の減じたウイルス (CTL 逃避変異及び薬剤耐性変異による) の伝播、②あるいは HLA-B57 陽性者に見られるように、ウイルス伝播後にレシピエント体内で、ウイルス複製能力が減少していた可能性が考えられた。

D. 考察

今までの長期末発症者 (Long-term non-Progressors, LTNP) や HIV controllers におけるウイルス複製能力の検討では、慢性感染期におけるサンプルが使用されてきた。しかしながら、同一感染個体内においても、急性感染期と慢性進行感染期ではウイルス複製能力に違いがあることが分かっていた。HIV controllers においては、ウイルス産生量が少ないため、ウイルスの配列は、比較的急性期に近い状態にあると言える。従って、慢性感染期における HIV controllers と進行感染者間の比較では、単に急性感染期のウイルスと慢性進行期のウイルスでの複製能力の違いを反映しているだけかも知れず、感染直後のウイルスでの比較が必要とされていた。本研究では、実験的に証明したのは *gag-protease* についてのみであるが、後に controllers となる患者では、急性感染期においてすでにウイルスの複製能力が減弱していることが明らかとなった。これらは、急性感染期におけるウイルスのダイナミズムが、その後のウイルス産生コントロールに大きく関与することを示した。

E. 結論

急性感染期におけるウイルス複製能力の低下が、その後のウイルス産生コントロールに大きく寄与している。その原因としては、複製能力の低下した薬剤耐性変異体・CTL 逃避変異体の伝播、または、感染後のウイルス複製能力を減じる CTL 逃避変異の選択によるものが考えられた。この効果が、長期間のウイルス産生抑制にどの程度寄与しているかさらに検討する必要があるだろう。

F. 研究発表

1 論文発表

- 1) Koga, M., Tachikawa, A., Heckerman, D., Odawara, T., Nakamura, H., Koibuchi, T., Fujii, T., Miura, T., Iwamoto, A. Transition of impact of HLA class I allele expression on HIV-1 plasma virus loads at a population level over time. *Microbiology and Immunology*, In press
- 2) Oka, Y., Tashiro, H., Mizutani-Noguchi, M., Koga, I., Sugao, Y., Shirasaki, R., Miura, T., Akiyama, N., Kawasugi, K., Fujimori, S., Shirafuji, N. Successful unrelated bone marrow transplantation for a human immunodeficiency virus type-1-seropositive acute myelogenous leukemia patient following HAART. *Int J Hematol.* 91, 140-145, 2010.

- 3) Pereyra, F., Palmer, S., Miura, T., Block, B., Wiegand, A., Rothchild, A., Baker, B., Rosenberg, R., Cutrell, E., Seaman, M., Coffin, J., Walker, B. Persistent low level viremia in HIV-1 elite controllers and relationship to immunologic parameters. *Journal Infect Dis.*200:984-990, 2009.
- 4) Chen, H., Piechocka-Trocha, A., Miura, T., Brockman, M., Julg, B., Baker, B., Rothchild, A., Block, B., Schneidewind, A., Koibuchi, T., Pereyra, F., Allen, T., Walker, B. Differential neutralization of human immunodeficiency virus (HIV) replication in autologous CD4 T cells by HIV-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* 83:3138-3149, 2009.
- 5) Miura, T., Brumme, C., Brockman, M., Brumme, Z., Pereyra, F., Block, B., Trocha, A., John, M., Mallal, S., Harrigan, PR., Walker, B. HLA-associated viral mutations are common in human immunodeficiency virus type 1 elite controllers. *J Virol* 83:3407-3412, 2009.
- 6) 三浦 聡之. HIV Elite Controllers –HIV感染症の自然制御―. *感染症*. Vol 39. 219-223. 2009
- 2 学会発表
- (1) 鯉渕智彦、今井健太郎、菊地正、古賀道子、中村仁美、三浦聡之、藤井毅、岩本愛吉. HAART 導入一年半後に CD4 数の減少を来たし、diffuse large B-cell lymphoma と診断された一例. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、名古屋、11/26-28/2009.
- (2) 菊地正、古賀道子、鯉渕智彦、今井健太郎、中村仁美、三浦聡之、小田原隆、藤井毅、岩本愛吉. ART 初回導入した ABC、TDF 使用症例の血清脂質の経時的変化について. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、名古屋、11/26-28/2009.
- (3) 今井健太郎、前田卓也、菊地正、宮崎菜穂子、鯉渕智彦、古賀道子、中村仁美、三浦聡之、藤井毅、岩本愛吉. ペンタミジンによる低血糖が長期間遷延した AIDS 患者の一例. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、名古屋、11/26-28/2009.
- (4) 今井健太郎、菊地正、鯉渕智彦、古賀道子、中村仁美、三浦聡之、藤井毅、岩本愛吉. ニューモシスチス肺炎と肺ノカルジア症を合併した AIDS 患者の一例. 第 58 回日本感染症学会東日本地方会学術集会、東京、10/30-31/2009.
- (5) Koga, M., Tachikawa, A., Heckerman, D., Odawara, T., Nakamura, H., Koibuchi, T., Fujii, T., Miura, T. and Iwamoto, A. The impacts of HLA class I alleles on HIV-1 plasma virus loads in a unique Asian population with a narrow spectrum of HLA, and their changes at the population level over time. 5th IAS Conference on HIV pathogenesis, Treatment and Prevention, Capetown, South Africa, 19-22 July 2009.
- (6) Miura, T., Brumme, ZL., Brumme, CJ., Block, B., Brockman, MA., Trocha, A., Pereyra, F., Kaufmann, D., Iwamoto, A., Rosenberg, E., Jessen, H., Kelleher, A., Markowitz, M., Little, S., Walker, BD and AIEDRP network. Characterization of HIV-1 from Acute/Early Infection in Individuals who Subsequently become Viremia Controllers. 5th IAS Conference on HIV pathogenesis, Treatment and Prevention, Capetown, South Africa, 19-22 July 2009.
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む.)
- 1 特許取得
なし。
- 2 実用新案登録
なし。
- 3 その他
なし