

図4. 末梢血 T 細胞のワクチン投与による活性化
Ki-67 陽性 CD4+ および CD8+ T 細胞の割合の SeV-Gag 投与 2 週前および 1 週後の比較を示す。

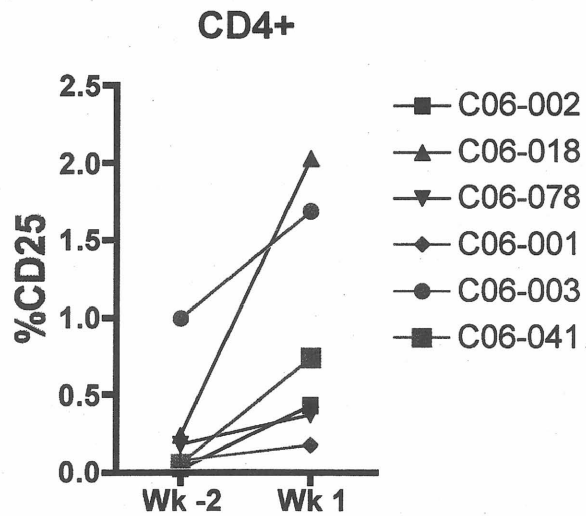


図5. 末梢血中の CD25 陽性 CD4+ T 細胞のワクチン投与による変化
SeV-Gag 投与 2 週前および 1 週後の比較を示す。

HIVに対して効率的に免疫誘導可能な人工リンパ組織構築に向けた基盤技術の開発

所属 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター
研究者 吉岡 靖雄

研究期間 平成 19 年 4 月～平成 22 年 3 月

研究要旨 本研究では、“ファージ表面提示法による機能性蛋白質創製技術”及び“あらゆる細胞で遺伝子発現可能な遺伝子導入用ベクター”を駆使し、二次リンパ組織の機能を模倣した機能性人工リンパ組織の創製を図り、エイズの液性・細胞性免疫療法への適用を試みる。

A. 研究目的

多剤併用療法の確立は、HIV 感染者の劇的な死亡率低下をもたらし、エイズは“致命的な病”から“長期的に制御可能な慢性感染症”へと変化した。しかし現在の治療法・治療薬はいずれも、あくまでも対処療法でしかないため、不治の病であることに変わりないうえ、薬剤耐性ウイルスの頻発、薬剤の重篤な副作用、患者の QOL、エイズ治療に要する高額費用などの解決すべき問題が多数残されている。今後は、HAART 療法の最適化と共に、生体のウイルス排除機構である免疫系を再生させると共に、ウイルスとその感染細胞を徹底的に免疫的排除する根本的治療が必須である。この両者を同時に達成するためには、HIV が CD4 陽性 T 細胞への感染を介し免疫不全を誘導することを考慮すると、低下した免疫機能を患者の生体内外で効率良く回復・活性化できる免疫活性化装置とも言うべきシステム(機能性人工リンパ組織)の開発が待望されている。今後は、人工リンパ組織の効率的構築・機能付与の為に、リンパ組織形成のマスター分子や免疫制御分子を組織構築部位へ効果的に送達する技術開発が必須である。しかし、人工リンパ組織を効率よく誘導可能なサイトカイン等の生理活性蛋白質は体内安定性に乏しく、生体に投与しても目的部位への到達量は極微量であると共に、遺伝子導入を試みても、免疫細胞へ効率良く遺伝子導入可能なベクターの欠如から、未だ任意の部位へ効率的に人工リンパ組織を構築し、機能を改変する基盤技術

は皆無である。従って、上記問題点を克服し得る方法論を構築した上で、機能性人工リンパ組織による免疫反応制御に向けた概念的及び技術的枠組みの確立が必須である。

申請者はこれまでに、蛋白質を水溶性高分子で化学修飾するバイオコンジュゲーションが、サイトカインの体内安定性を飛躍的に向上させ得ることを明らかとしてきた。また、バイオコンジュゲーションの最大の問題点である致命的な比活性低下やバイオコンジュゲート体の分子的・機能的不均一性を、“ファージ表面提示法によるリジン欠損変異体創製システム”と“N 末端部位特異的バイオコンジュゲーション”を世界に先駆け開発することで克服してきた。更に、遺伝子導入用ベクター開発に関しても、従来まで全く遺伝子導入できなかった免疫細胞に対して、効率的に遺伝子導入可能なベクター開発に成功している。そこで本研究では、機能性人工リンパ組織を効率良く構築するためのこれらシステムのシステムアップを図り、機能性人工リンパ組織の構築に向けた基礎検討を図った。

B. 研究方法

機能性人工リンパ組織の効率的形成に向けた、ファージ表面提示法による機能性蛋白質の創製;リンパ組織形成能を有する腫瘍壊死因子(TNF)スーパーファミリーサイトカインであるリンフォトキシン α (LT α)の 6 箇所のリジン残基を、一挙に 20 種類のアミノ酸

へ網羅的に置換した構造変異 LT α 発現ファージライブラリを構築した。続いて、TNF 受容体 1(TNFR1) に対してパンニングすることで、レセプター指向性・活性増強型の LT α 変異体を濃縮した。

機能性人工リンパ組織の効率的形成に向けた、あらゆる細胞種で遺伝子発現可能な遺伝子導入用ベクターの開発; 代表的な細胞内移行ペプチドである Tat ペプチド(GRKKRRQRRRPPQ)及び R8 ペプチド(RRRRRRRR)に活性基を付与したペプチドで、アデノウイルスベクター(Adv)を表面修飾した。その後、細胞における導入遺伝子(ルシフェラーゼ遺伝子)の発現を指標に遺伝子導入効率を評価した。

機能性人工リンパ組織の形成; リンパ組織形成のマスター分子であるサイトカイン LT α , LT β , LIGHT を強制発現させた間葉系幹細胞または脾臓間質細胞株 BLS4 細胞を樹状細胞と混合したものを調製し、それぞれコラーゲンスポンジに吸着させた。これを C57BL/6 マウスの腎皮膜下へ移植し、人工リンパ組織形成能を評価した。

(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行うものであり、動物実験に関しては、大阪大学の動物実験規程に則り行った。さらに本研究における実験動物の取り扱いおよび動物実験の手順は、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」に準拠し、倫理審査の承諾を得て行ったものであり、当該研究は既承認済みである。また本研究計画では組換え DNA 実験を行うが、「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。

C. 研究結果および D. 考察

機能性人工リンパ組織の効率的形成に向けた、ファージ表面提示法による機能性蛋白質の創製; 機能性人工リンパ組織を効率良く構築するには、人工リンパ組織形成のマスター分子であるサイトカイン等の生理活性蛋白質の体内安定性・活性を向上させ、それら

を目的部位へ投与する必要がある。本研究では、リンパ組織形成能を有する TNF スーパーファミリーサイトカイン LT α , LIGHT に対して、これまで活性発現に必須と考えられていたリジン残基を含む全てのリジン残基が他のアミノ酸に置換され、かつ活性が同等もしくは 30-100 倍近く増強した機能性変異体を得ることに成功した。更に、これら変異体に対して N 末端部位特異的バイオコンジュゲーションすることで、体内安定性が飛躍的に向上した LT α , LIGHT の創製に成功した。

機能性人工リンパ組織の効率的形成に向けた、あらゆる細胞種で遺伝子発現可能な遺伝子導入用ベクターの開発; 血球系細胞や組織支持細胞には、Adv のレセプターである CAR の発現が乏しいものが多い。従って、リンパ組織形成を目指し、リンパ組織形成マスター分子を組織支持細胞に発現させようとした場合にも、遺伝子導入効率は著しく制限されているのが現状である。本観点から、細胞内移行活性を有する Tat ペプチドや R8 ペプチドを Adv 表面に化学結合させることによって、CAR の発現していない細胞に対しても効率良く遺伝子導入できる新規 Adv の開発を図った。その結果、Tat 修飾 Adv、R8 修飾 Adv が、あらゆる細胞種に対して野生型 Adv よりも 10-100 倍強い遺伝子導入活性を有することを明らかとし、人工リンパ組織形成を目的とした組織支持細胞に効率良く遺伝子導入可能な Adv であることを明らかとした。更に、Tat 修飾 Adv や R8 修飾 Adv が、細胞表面上のヘパラン硫酸に結合した後、マクロピノサイトーシスにより細胞内に取り込まれることにより、高い遺伝子導入効率を可能としていることを示した。

機能性人工リンパ組織の形成; 機能性人工リンパ組織の構築には、支持細胞の選択、支持細胞の改変が重要と考えられることから、機能性人工リンパ組織の構築に向けた最適条件を検討した。支持細胞に、リンパ組織形成におけるマスターサイトカインを遺伝子導入することで、人工リンパ組織形成の最適化を図った。その結果、脾臓間質細胞株が骨髄由来間葉系幹細胞よりも優れた人工リンパ組織構築能を有しており、さらに LT α , LT β , LIGHT を発現させた脾臓間

質細胞株が、T細胞領域・B細胞領域が明確なリンパ組織構造を有する人工リンパ組織を効率良く誘導可能であることを明らかとした。また、形成された人工リンパ組織を免疫不全マウスに移植したところ、元来免疫応答ができない免疫不全マウスにおいても、特異的免疫応答を誘導可能となることを明らかとした。

E. 結論

本研究では、ヒト二次リンパ組織の構造・機能を模倣しつつ目的機能を付与した機能性人工リンパ組織の創製を図り、以下の結論を得た。

・リンパ組織形成のマスター分子である LT α 、LIGHT の体内安定性を飛躍的に改善し得る高分子バイオコンジュゲート体の創製に成功した。

・あらゆる細胞種に遺伝子導入可能な細胞内移行ペプチド修飾 Adv の創製に成功した。

・上記の基盤技術を駆使することで、リンパ組織の機能を模倣した機能性人工リンパ組織を効率的に構築することに成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yao X, Yoshioka Y, et al. TERT promoter-driven adenovirus vector for cancer gene therapy via systemic injection. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Oct 19;362(2):419-24.
2. Yoshioka Y, Asavatanabodee R, et al. Tat conjugation of adenovirus vector broadens tropism and enhances transduction efficiency. *Life Sci.* 2008 Nov 21;83(21-22):747-55.
3. Yao X, Yoshioka Y, et al. Systemic administration of a PEGylated adenovirus vector with a cancer-specific promoter is effective in a mouse model of metastasis. *Gene Ther.* 2009 Dec;16(12):1395-404.
4. Eto Y, Yoshioka Y, et al. Transduction of adenovirus vectors modified with cell penetrating peptides. *Peptides.* 2009

Aug;30(8):1548-52.

5. Morishige T, Yoshioka Y, et al. LIGHT protein suppresses tumor growth by augmentation of immune response. *Immunol Lett.* 2009 Dec 2;127(1):33-8.
6. Yoshioka Y, Watanabe H, et al. Creation of lysine-deficient mutant lymphotoxin- α with receptor selectivity by using a phage display system. *Biomaterials.* 2010 Mar;31(7):1935-43.
7. Morishige T, Yoshioka Y, et al. Creation of a LIGHT mutant with the capacity to evade the decoy receptor for cancer therapy. *Biomaterials.* 2010 Apr;31(12):3357-63.
8. Morishige T, Yoshioka Y, et al. Comparison of the anti-tumor activity of native, secreted, and membrane-bound LIGHT in mouse tumor models. *International Immunopharmacology.* 2010 Jan;10(1):26-33.
9. Morishige T, Yoshioka Y, et al. Creation of a lysine-deficient LIGHT mutant with the capacity for site-specific PEGylation and low affinity for a decoy receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* in press.

2. 学会発表

国内

1. 吉岡靖雄. 新規遺伝子治療用ベクターの開発:平成 19 年度大阪大学大学院薬学研究科公開講座「くすりと医療」,大阪,2007 年 11 月
2. Asavatanabodee R, 吉岡靖雄, et al. 感染域の拡大を目指した Tat ペプチド修飾アデノウイルスベクターの作製と遺伝子導入特性評価:2007 年度 神戸学院大学 ライフサイエンス産学連携研究センター 研究成果発表会,神戸,2007 年 8 月
3. 吉岡靖雄, 喜田進也, et al. Tat ペプチド修飾アデノウイルスベクターの構築と遺伝子導入特性評価:第 30 回日本血栓止血学会学術集会,三重,2007 年 11 月

4. Asavatanabodee R, 吉岡靖雄, et al. 各種細胞膜移行ペプチドにより修飾したアデノウイルスベクターの遺伝子導入特性評価: 日本薬学会第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
 5. 姚 醒蕾, 吉岡靖雄, et al. 転移癌遺伝子治療における全身投与型腫瘍標的化アデノウイルスベクターの有用性評価: 日本遺伝子デリバリー研究会第 8 回シンポジウム, 大阪, 2008 年 5 月
 6. 渡辺 光, 吉岡靖雄, et al. 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 α の創製とその特性評価: 第 8 回日本蛋白質科学会年会, 東京, 2008 年 6 月
 7. Watanabe H, Yoshioka Y, et al. In vitro and in vivo antitumor effects of mutant lymphotoxin- α s with enhanced bioactivities: 第 67 回癌学会学術集会, 名古屋, 2008 年 10 月
 8. Watanabe H, Yoshioka Y, et al. ファージ表面提示法を用いた TNFR1 指向性リンフォトキシン α の創製とその特性評価: 日本生物物理学会第 46 回年会, 福岡, 2008 年 12 月
 9. 成松翔伍, 吉岡靖雄, et al. T細胞受容体を用いた新規ターゲティング分子の創製に関する基礎的検討: BMB2008 第 31 回日本分子生物学会年会・第 82 回日本生化学会年会 合同大会, 神戸, 2008 年 12 月
 10. 吉岡靖雄, 渡辺 光, et al. レセプター指向性を有するリンフォトキシン α の創製と特性評価: 第 9 回日本蛋白質科学会年会, 熊本, 2009 年 5 月.
 11. 稲倉 裕, 吉岡靖雄, et al. 抑制性レセプターを回避し得る LIGHT 変異体の創製とその機能評価: 第 9 回日本蛋白質科学会年会, 熊本, 2009 年 5 月.
 12. 渡辺 光, 吉岡靖雄, et al. 活性増強型リンフォトキシン α の機能解明: 第 9 回日本蛋白質科学会年会, 熊本, 2009 年 5 月.
 13. 成松翔伍, 吉岡靖雄, et al. T細胞受容体を用いた新規ターゲティング分子の創製: 第 9 回日本蛋白質科学会年会, 熊本, 2009 年 5 月.
- 国際学会
1. Nomura T, Shibata H, Abe Y, Minowa K, Mukai Y, Yoshioka Y, Nakagawa S, Tsunoda S, Kamada H, Tsutsumi Y. Creation of bioactive Lysine-deficient tumor necrosis factor for antitumor therapy. 15th Annual Meeting of the International Cytokine Society, San Francisco (USA), October, 2007.
 2. Yoshioka Y, Morishige T, et al. Site-specific PEGylation of a lysine-deficient TNF superfamily with full bioactivity. 15th Annual Meeting of the International Cytokine Society, San Francisco (USA), October, 2007.
 3. Minowa K, Yoshioka Y, et al. Creation of TNF receptor1-selective mutant TNF using phage display system. 15th Annual Meeting of the International Cytokine Society, San Francisco (USA), October, 2007.
 4. Minowa K, Shibata H, Abe Y, Nomura T, Nabeshi H, Fujita T, Yamamoto A, Yoshioka Y, Tsunoda S, Kamada H, Tsutsumi Y. Creation of TNFR1-selective mutant TNF using phage display system. Pharmaceutical Sciences World Congress, Amsterdam (Netherlands), April, 2007.
 5. Yao X, Yoshioka Y, et al. Systemic administration of PEGylated adenovirus vectors driven by TERT promoter effectively inhibits metastasis without side effect. The 4th SEOUL-KYOTO-OSAKA JOINT SYMPOSIUM ON PHARMACEUTICAL SCIENCES FOR YOUNG SCIENTISTS. 京都, 2008 年 4 月
 6. Yoshioka Y, Asavatanabodee R, et al. Tat conjugation of adenovirus vector broadens tropism and enhances transduction efficiency. 2008 Annual meeting of The American Society of Gene Therapy. Boston (USA), May, 2008.

7. Yao X, Yoshioka Y, et al. PEGylated adenovirus vectors driven by TERT promoter effectively inhibit metastasis without side effect via systemic injection. 2008 Annual meeting of The American Society of Gene Therapy. Boston (USA), May, 2008.
8. Yoshioka Y and Nakagawa S. Tat conjugation of adenovirus vector broadens tropism and enhances transduction efficiency. 6th Symposium on Membrane Stress Biotechnology. 大阪, 2008年9月
9. Watanabe H, Yoshioka Y, et al. Creation of TNFR1-Selective Mutant Lymphotoxin-Alpha Using Phage Display System. FIMSA2008. Taipei, October, 2008.
10. Morishige T, Yoshioka Y, et al. LIGHT induces the anti-tumor effect by activating the tumor specific immune response. FIMSA2008. October, 2008.
11. Yoshioka Y, Watanabe H, et al. Creation of mutant lymphotoxins with enhanced bioactivities by phage display technique., 12th International TNF Conference, Madrid (Spain), April, 2009.
12. Yoshioka Y, Watanabe H, et al. Creation of mutant lymphotoxin-alphas with enhanced bioactivities by phage display technique., The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, 京都, 2009年8月
13. Yoshioka Y, Watanabe H, et al. Creation of lysine-deficient mutant lymphotoxin- α with receptor selectivity by using phage display., 2009 Annual Meeting of the Society for Leukocyte Biology, International Cytokine Society, & International Society for Interferon and Cytokine Research (Tri-Society), Lisbon (Portugal), October, 2009.
14. Yoshioka Y, Kayamuro H, et al. TNF superfamily member, TL1A, is a potential

immunoregulator for development of mucosal vaccin., 9th International Conference on New Trends in Immunosuppression and Immunotherapy (IMMUNO2010), Geneva (Switzerland), February, 2010.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

本研究で創製した、細胞内移行ペプチド修飾アデノウイルスベクター並びに活性増強型リンフォトキシンは、特許出願に向け現在準備中である。

HIVに対して効率的に免疫誘導可能な人工リンパ組織構築に向けた基盤技術の開発

所属 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター
研究者 吉岡 靖雄

研究要旨

本研究では、“ファージ表面提示法による機能性蛋白質創製技術”及び“あらゆる細胞で遺伝子発現可能な遺伝子導入用ベクター”を駆使し、二次リンパ組織の機能を模倣した機能性人工リンパ組織の創製を図り、エイズの液性・細胞性免疫療法への適用を試みる。

A. 研究目的

多剤併用療法の確立は、HIV 感染者の劇的な死亡率低下をもたらし、エイズは“致命的な病”から“長期的に制御可能な慢性感染症”へと変化した。しかし現在の治療法・治療薬はいずれも、あくまでも対処療法でしかないため、不治の病であることに変わりない。うえ、薬剤耐性ウイルスの頻発、薬剤の重篤な副作用、患者の QOL、エイズ治療に要する高額費用などの解決すべき問題が多数残されている。今後は、HAART 療法の最適化と共に、生体のウイルス排除機構である免疫系を再生させると共に、ウイルスとその感染細胞を徹底的に免疫的排除する根本的治療が必須である。この両者を同時に達成するためには、HIV が CD4 陽性 T 細胞への感染を介し免疫不全を誘導することを考慮すると、低下した免疫機能を患者の生体内外で効率良く回復・活性化できる免疫活性化装置とも言うべきシステム(機能性人工リンパ組織)の開発が待望されている。今後は、人工リンパ組織の効率的構築・機能付与の為に、リンパ組織形成のマスター分子や免疫制御分子を組織構築部位へ効果的に送達する技術開発が必須である。しかし、人工リンパ組織を効率よく誘導可能なサイトカイン等の生理活性蛋白質は体内安定性に乏しく、生体に投与しても目的部位への到達量は極微量であると共に、遺伝子導入を試みても、免疫細胞へ効率良く遺伝子導入可能なベクターの欠如から、未だ任意の部位へ効率的に人工リンパ組織を構築し、機能を改変する基盤技術は皆無である。従って、上記問題点を克服し得

る方法論を構築した上で、機能性人工リンパ組織による免疫反応制御に向けた概念的及び技術的枠組みの確立が必須である。

申請者はこれまでに、蛋白質を水溶性高分子で化学修飾するバイオコンジュゲーションが、サイトカインの体内安定性を飛躍的に向上させ得ることを明らかにしてきた。また、バイオコンジュゲーションの最大の問題点である致命的な比活性低下やバイオコンジュゲート体の分子的・機能的不均一性を、“ファージ表面提示法によるリジン欠損変異体創製システム”と“N 末端部位特異的バイオコンジュゲーション”を世界に先駆け開発することで克服してきた。更に、遺伝子導入用ベクター開発に関しても、従来まで全く遺伝子導入できなかった免疫細胞に対して、効率的に遺伝子導入可能なベクター開発に成功している。そこで本研究では、機能性人工リンパ組織を効率良く構築するためのこれらシステムのシステムアップを図り、機能性人工リンパ組織が HIV 感染時の免疫力改善およびエイズ治療に対して有効な方法であることを検証する。特に、成功の鍵を握る、目的部位で効果的に蛋白質・遺伝子を送達・作用発現させ得る生体内安定性に優れた機能性人工サイトカインの開発、遺伝子導入用ベクターの探索を通し、目的作用を有する機能性人工リンパ組織構築を試みる。平成 21 年度は、平成 19、20 年度に引き続き、目的機能を有する機能性人工リンパ組織構築に向けた基盤技術開発を試み、「ファージ表面提示法による機能性人工蛋白質の創製」と「新規遺伝子導入用ベクターの機能評価」

を行い、人工リンパ組織構築部位への蛋白質・遺伝子送達法を確立した。更に、間葉系幹細胞、脾臓間質細胞株にリンフォトキシン、LIGHT 遺伝子などを導入した後、人工リンパ組織を構築することで、人工リンパ組織構築における最適条件の探索を行った。

B. 研究方法

構造変異 LIGHT 提示ファージライブラリの作製; ヒト野生型 LIGHT (wtLIGHT) の全 3 個のリジン残基、あるいはレセプター結合に関与する 6 個のアミノ酸を、20 種類のアミノ酸に網羅的に置換した LIGHT 構造変異体プラスミドライブラリを PCR により作製した。その後、ファージミドベクター pY03' へと遺伝子工学的に組み込んだ後、定法によりファージを精製し、ファージライブラリとした。

構造変異 LIGHT 発現ファージライブラリを用いたパンニング・スクリーニング; lymphotoxin beta receptor (LTβR) を ELISA プレートに固相し、作製したファージライブラリ 50 μL を添加した後、室温で 2 時間反応させた。洗浄後、レセプターに結合したファージを 10 mM Glycine-HCl (pH 2.0) にて溶出回収した。回収したファージを大腸菌株 TG1 に感染させ、モノクローン化した後、96 穴プレート中でファージを産生させた。産生した各クローンのファージを、LTβR を固相化した 96 穴 ELISA プレートにそれぞれ添加し、室温で 2 時間反応させた。3 回洗浄後、HRP/anti-M13 monoclonal antibody 及び TMB 溶液を加えて発色を行い、2 N 硫酸を添加することで反応を停止させた。吸光度 (測定波長 450 nm、対照波長 655 nm) は、マイクロプレートリーダーで測定した。

リコンビナントタンパク質の産出; wtLIGHT ならびに各クローンの遺伝子を、pET-15b に組み込むことで、wtLIGHT および変異体の発現プラスミドを構築した。構築したプラスミドを大腸菌株 BL21 (DE3) に形質転換し、100 μg/mL アンピシリン、0.4% グルコース、1.68 mM MgSO₄ 含有 Terrific Broth 培地 1 L に加え、37°C で振とう培養した。OD 600 = 1.0 になった時点で終濃度 1 mM の Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside を加え、更に 6 時間培養することで、リコンビナントタン

パク質をインクルージョンボディとして大量誘導した。インクルージョンボディの回収・可溶化; 培養した大腸菌を遠心により回収し、TES buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 40 mM EDTA, 250 mM NaCl) で懸濁し、終濃度 0.23 mg/mL となるように Lysozyme を加え、室温で 1 時間振とうした。その後、Triton X-100 ならびに TES buffer を用いて洗浄し、4°C、10000 rpm、40 分間の遠心により得られた沈殿をインクルージョンボディとして回収した。終濃度 10 mg/mL になるよう GTE (6 M Guanidine hydrochloride, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM EDTA) に懸濁し、4°C、12000 rpm、40 分遠心することで不溶物を除去した。その後、Dithioerythritol を終濃度 10 mg/mL となるように添加し、一晚室温で静置した。

Refolding、透析; 氷冷した refolding buffer (100 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1 M Arginine, 551 mg/L Glutathione oxidized; pH 9.5) に可溶化したインクルージョンボディを加え、4°C で 36 時間静置した。SPECTRA/POR® Membrane MWCO 6-8000 を用い、refolding buffer 1 L に対して 40 L の dialysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM Urea) を用いて 4°C で透析を行った。

wtLIGHT の精製; Buffer A (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 7.4) で平衡化した Q sepharose Fast Flow にアプライし、100 mM NaCl 含有 buffer A で溶出させることによりタンパク質を濃縮した。得られた溶出液を、PBS で平衡化した Sephacryl S-100 HR column に 0.8 mL/分の流速で注入し、約 60 kDa の分画である 100 分付近の溶出ピークを回収した。

HT29.14S 細胞を用いた生物活性の評価; HT29.14S 細胞を 5×10^3 cell/100 μL/well で播種し、12 時間培養した。その後、10 U/mL interferon-gamma 存在下、段階希釈した各 LIGHT タンパク質を 100 μL/well で添加し、72 時間培養した。25% グルタルアルデヒドで生細胞を固定し、0.05% メチレンブルー溶液で細胞を染色し、プレートを洗浄した後、0.33 N HCl によりメチレンブルーを溶出させた。吸光度 (測定波長 655 nm、対照波長 415 nm) を測定し、比活性を評価した。

LIGHT の PEG 化と PEG 化体の精製; LIGHT の PEG 化には、アミノ基指向性の活性基である NHS (N-Hydroxy-succinimidyl) 基を付与した分子量 5,000 の PEG を使用した。PEG を添加し、37°C で 10 分間反応させた後、εアミノカプロン酸を PEG の 10 倍モル量添加することで反応を停止させた。その後、SDS-PAGE 法により PEG 修飾状態を解析すると共に、HiLoad 16/60 Superdex 200 pg に 1.0 mL/min の流速で PEG 化体を注入し、PEG 化 LIGHT を分取、精製した。

LIGHT の結合特性評価; 各構造変異 LIGHT のレセプターに対する結合特性は、BIAcore を用いて評価した。レセプターを固相化した CM5 センサーチップに、2.2 から 35 nM に希釈した各 LIGHT を 20 μL/min で添加し、得られたセンサーグラムから結合特性を解析した。

ベクターの作製、精製、および力価測定; アデノウイルスベクター (Ad) は、水口らが開発した改良 *in vitro* ligation 法に準拠して作製した。本研究では、Cytomegalovirus プロモーター制御下にホタルルシフェラーゼを発現する Ad を構築した。作製した Ad は、293 細胞を用いて増幅し、塩化セシウム密度勾配遠心法にて精製した。また、Ad 粒子数 (vector particle; vp) の測定は Maizel らの方法に準拠した。

機能性人工リンパ組織の効率的形成に向けた、あらゆる細胞種で遺伝子発現可能な遺伝子導入用ベクターの開発; 代表的な細胞内移行ペプチドである Tat ペプチド (GRKKRRQRRPPQ)、R8 ペプチド (RRRRRRRR) に活性基を付与したペプチドで、Ad を表面修飾した。

細胞内移行ペプチド修飾 Ad の *in vitro* 遺伝子導入効率の評価; 未修飾 Ad、細胞内移行ペプチド修飾 Ad を 10000 VP/cell で用いて細胞に遺伝子導入した。24 時間培養した後、これらの細胞における導入遺伝子 (ルシフェラーゼ遺伝子) の発現を指標に遺伝子導入効率を評価した。

細胞内移行ペプチド修飾 Ad のへパラン硫酸・コンドロイチン硫酸依存的な遺伝子導入;

1 × 10⁴ cells/well の A549 細胞を 48 穴プレートに播

種し、12 時間培養した。その後、各種 Ad (10000 VP/cell) をへパラン硫酸またはコンドロイチン硫酸存在下に加えた。2 時間後、培養液を新鮮なものに変え、24 時間培養した。これらの細胞における導入遺伝子 (ルシフェラーゼ遺伝子) の発現を指標に遺伝子導入効率を評価した。

細胞内移行ペプチド修飾 Ad のマクロピノサイトーシス依存的な遺伝子導入; 1 × 10⁴ cells/well の A549 細胞を 48 穴プレートに播種し、12 時間培養した。その後、各種 Ad (1000 VP/cell) を 2.5 mM マクロピノサイトーシス阻害剤 (amiloride HCl) 存在下に加えた。30 時間後、培養液を新鮮なものに変え、24 時間培養した。これらの細胞におけるルシフェラーゼ遺伝子の発現を指標に遺伝子導入効率を評価した。

マウス腎皮膜下への細胞移植; LTα、LTβ、LIGHT 発現 BLS4 細胞または間葉系幹細胞 を樹状細胞とそれぞれ 1 × 10⁶ cells/ml で 1:1 の割合で混合したものを調製し、それぞれ 3 mm² のコラーゲンスポンジ (KOKEN) に吸着させた。これを麻酔した C57BL/6 マウスの腎皮膜下へ移植した。

(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行ったものであり、動物実験に関しては、大阪大学の動物実験規程に則り行った。さらに本研究における実験動物の取り扱いおよび動物実験の手順は、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」に準拠し、倫理審査の承諾を得て行ったものであり、当該継続申請研究は既承認済みである。また本研究計画では組換え DNA 実験を行うが、「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。

C. 研究結果および D. 考 察

1. リンパ組織形成を目指したファージ表面提示法による機能性蛋白質の創製

我々は昨年度までに、リンパ組織形成能を有する

TNF スーパーファミリー サイトカイン lymphotoxin-alpha (LT α) に対して、ファージ表面提示法を適用することで、N末端部位特異的バイオコンジュゲーションを可能とする機能性変異体を複数得ることに成功してきた。さらに得られた変異 LT α に対して N末端部位特異的にバイオコンジュゲーションを施した PEG 化変異 LT α では野生型 LT α と比較して、PEG 修飾による著しい活性の低下を回避し得ることを明らかとするなど、本方法論の有用性を明らかとしてきた。そこで本年度は、LT α に加え、リンパ組織形成に関与し、かつリンパ組織の最も重要な機能である免疫活性化能をも有する LIGHT に着目し、同様に検討を進めた。

はじめに、PEG化による活性低下を回避しつつ分子的均一性に優れた PEG化 LIGHT の創製を目的に、野生型 LIGHT の全リジン残基を、活性を完全に保持しつつ他のアミノ酸に置換したリジン欠損 LIGHT 変異体の創製を試みた。まず、野生型 LIGHT の全リジン残基を 20 種類のアミノ酸へ網羅的に一挙に置換した LIGHT 構造変異体を、ファージ g3p 先端に提示したファージライブラリを作製した。その後、LIGHT のレセプターである LT β R を用いた選択を行い、LT β R に対して高い結合力を保持したファージクローンを濃縮した。その結果、全てのリジン残基が他のアミノ酸に置換しつつ、LT β R に対して野生型 LIGHT 発現ファージと同等に結合し得るクローンを得ることに成功した。そこで、大腸菌を用いて、リコンビナント蛋白質を作成した後、*in vitro* において特性を評価した。その結果、リジン欠損 LIGHT 変異体は、野生型 LIGHT と同等の生物活性を有すると共に、LT β R への結合力も同等であることが判明した。そこで、分子量 5,000 の PEG を用いバイオコンジュゲーションを行ったところ、N末端部位特異的な PEG 化を施した PEG 化リジン欠損 LIGHT 変異体は全く活性低下を示さなかった (Figure 1)。また、PEG 化野生型 LIGHT は、様々な部位に PEG が結合した不均一な分子集団であるのに対して、PEG 化リジン欠損 LIGHT 変異体は N末端のみに PEG が結合した均一な分子集団であることから、今後の臨床応用を見据えた場合にも優れていると考えられた。現在、

PEG化リジン欠損 LIGHT 変異体の *in vivo* におけるリンパ組織形成能及び免疫活性化能を評価しているところである。

また、生体においては LIGHT の活性を阻害する可溶性レセプター (Decoy Receptor 3) が発現していることから、LIGHT の免疫活性化能を減弱させる大きな障壁になっていることが知られている。そこで次に、LT β R を介した生物活性を保持しつつ、Decoy Receptor 3 には結合しないレセプター特異的 LIGHT 変異体の創製を試みた。Decoy Receptor 3 との結合に重要とされる 6 つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換した LIGHT 構造変異体を提示したファージライブラリを作製した後、LT β R を用いた選択を行った。その結果、レセプター特異的 LIGHT 変異体の候補クローンを複数得た。そこで、*in vitro* における特性を評価したところ、レセプター特異的 LIGHT 変異体は、LT β R を介した生物活性及び LT β R に対する結合力は野生型 LIGHT と同等であるにも関わらず、Decoy Receptor 3 による阻害を全く受けないことが判明した (Figure 2)。可溶性レセプターによる作用減弱は、他のサイトカインでも多数観察される現象であることから、本アプローチは多くのサイトカインで適用可能な有効な戦略になり得ると考えられた。現在、レセプター特異的 LIGHT 変異体についても、*in vivo* リンパ組織形成能及び免疫活性化能について検討を進めているところである。

2. あらゆる細胞種で遺伝子発現可能な遺伝子導入用ベクターの開発

血球系細胞や組織支持細胞には、Ad のレセプターである CAR の発現が乏しいものが多い。従って、リンパ組織形成を目指し、上述の LT α や LIGHT などリンパ組織形成マスター分子を組織支持細胞に発現させようとした場合にも、遺伝子導入効率は著しく制限されているのが現状である。本観点からこれまでに、細胞内移行ペプチドである Tat や R8 で修飾した Ad が、あらゆる細胞種に対して野生型 Ad よりも 10-100 倍強い遺伝子導入活性を有することを明らかとし、人工リンパ組織形成を目的とした組織支持細胞に効率

良く遺伝子導入可能な Ad であることを明らかとした。そこで本年度は、R8 修飾 Ad の遺伝子導入特性について詳細に検討した。

昨年度、Tat 修飾 Ad は、細胞表面上のヘパラン硫酸に結合した後、マクロピノサイトーシスにより細胞内に取り込まれることにより、高い遺伝子導入効率を可能としていることを明らかとした。そこで、R8 修飾 Ad も同様の経路で細胞内に取り込まれるかに関して検討した。まず、可溶性ヘパリン存在下での R8 修飾 Ad の遺伝子導入効率を検討した。その結果、Tat 修飾 Ad では可溶性ヘパリン存在下では、非存在下と比較して著しい遺伝子導入効率の低下が観察されたのに対して、R8 修飾 Ad では全く遺伝子導入効率の低下は観察されなかった。そこで、コンドロイチン硫酸存在下での遺伝子導入効率を検討した。その結果、R8 修飾 Ad、Tat 修飾 Ad ともにコンドロイチン硫酸 B 存在下において遺伝子導入効率の低下が観察された (Figure 3)。以上の結果から、R8 修飾 Ad は Tat 修飾 Ad と異なる経路で遺伝子導入することが示唆された。次に、マクロピノサイトーシス阻害剤を用いることで、マクロピノサイトーシスの関与を検討した。その結果、未修飾 Ad では、マクロピノサイトーシス阻害剤の有無に関わらず遺伝子導入効率は全く変化がなかったのに対して、R8 修飾 Ad、Tat 修飾 Ad ともにマクロピノサイトーシス阻害剤により著しい遺伝子導入効率の低下が観察された。以上をまとめると、Tat 修飾 Ad は、細胞表面上のヘパラン硫酸に結合した後、マクロピノサイトーシスにより細胞内に取り込まれるのに対して、R8 修飾 Ad はコンドロイチン硫酸 B などヘパラン硫酸以外の糖鎖に結合した後、マクロピノサイトーシスにより細胞内に取り込まれることが示唆された。

3. 機能性人工リンパ組織の形成

昨年度までに、機能性人工リンパ組織の構築に向けた最適条件を検討し、T 細胞領域、B 細胞領域とともに、リンパ組織に特徴的な高内皮細静脈が観察される人工リンパ組織の構築に成功した。そこで本年度は、この人工リンパ組織の機能を、免疫誘導能の観点から評価した。LT α 、LT β 、LIGHT 発現 BLS4 細

胞または間葉系幹細胞 を、樹状細胞と共にコラーゲンスポンジに吸着させ、マウスの腎皮膜下へ移植した。その後、形成された人工リンパ組織を免疫不全スキッドマウスの腎皮膜下へ移植した。その後、OVA で免疫した後、血清中の OVA 特異的抗体価を測定した。その結果、スキッドマウスに OVA を免疫しても全く抗体産生が観察されない一方で、人工リンパ組織を移植したスキッドマウスでは、不十分ではあるものの OVA 特異的抗体価の上昇が認められた。以上の結果から、作製した人工リンパ組織は、免疫応答可能な機能を備えた組織であることが判明した。

E. 結論

目的機能を有する機能性人工リンパ組織構築に向けた基盤技術開発を試み、「フェージ表面提示法による機能性人工蛋白質の創製」と「新規遺伝子導入用ベクターの機能評価」を行い、人工リンパ組織構築部位への蛋白質・遺伝子送達法を確立した。

まず、リンパ組織形成能を有する LIGHT に対して、N 末端部位特異的バイオコンジュゲーションが、バイオコンジュゲーションの致命的問題点である比活性低下を克服可能であることを示した。また、レセプター特異的 LIGHT 変異体の創製に成功した。

また、これまで開発してきた R8 修飾 Ad が、Tat 修飾 Ad とは異なる経路で細胞内に侵入することを明らかとした。

昨年度までに創製法を最適化・確立した人工リンパ組織の免疫誘導特性を評価し、抗原特異的免疫応答を誘導し得ることを明らかとした。

本研究は未だ途中段階ではあるものの、リンパ組織形成に向けた重要な基礎情報を提供するものであり、今後のリンパ組織形成に基づく疾病治療に貢献し得るものであると確信している。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yao X, Yoshioka Y, Morishige T, Eto Y, Watanabe H, Okada Y, Mizuguchi H, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S. Systemic administration

of a PEGylated adenovirus vector with a cancer-specific promoter is effective in a mouse model of metastasis. *Gene Ther.* 2009 Dec;16(12):1395-404.

2. Eto Y, Yoshioka Y, Asavatanabodee R, Kida S, Maeda M, Mukai Y, Mizuguchi H, Kawasaki K, Okada N, Nakagawa S. Transduction of adenovirus vectors modified with cell penetrating peptides. *Peptides.* 2009 Aug;30(8):1548-52.
3. Morishige T, Yoshioka Y, Inakura H, Tanabe A, Watanabe H, Yao X, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Mukai Y, Okada N, Nakagawa N. LIGHT protein suppresses tumor growth by augmentation of immune response. *Immunol Lett.* 2009 Dec 2;127(1):33-8.
4. Yoshioka Y, Watanabe H, Morishige T, Yao X, Ikemizu S, Nagao C, Ahmad S, Mizuguchi K, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S. Creation of lysine-deficient mutant lymphotoxin- α with receptor selectivity by using a phage display system. *Biomaterials.* 2010 Mar;31(7):1935-43.
5. Morishige T, Yoshioka Y, Inakura H, Tanabe A, Yao X, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S. Creation of a LIGHT mutant with the capacity to evade the decoy receptor for cancer therapy. *Biomaterials.* 2010 Apr;31(12):3357-63.
6. Morishige T, Yoshioka Y, Tanabe A, Yao X, Mizuguchi H, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S. Comparison of the anti-tumor activity of native, secreted, and membrane-bound LIGHT in mouse tumor models. *International Immunopharmacology,* 2010 Jan;10(1):26-33.
7. Morishige T, Yoshioka Y, Inakura H, Tanabe A, Yao X, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S. Creation of a lysine-deficient

LIGHT mutant with the capacity for site-specific PEGylation and low affinity for a decoy receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* in press.

2. 学会発表

国内

1. 吉岡靖雄, 渡辺 光, 堤 康央, Ahmad S, 長尾知生子, 池水信二, 水口賢司, 向 洋平, 岡田直貴, 中川晋作:レセプター指向性を有するリンフォトキシン α の創製と特性評価、第9回日本蛋白質科学会年会、熊本、2009年5月
2. 稲倉 裕, 吉岡靖雄, 森重智弘, 堤 康央, 向洋平, 岡田直貴, 中川晋作:抑制性レセプターを回避し得る LIGHT 変異体の創製とその機能評価、第9回日本蛋白質科学会年会、熊本、2009年5月
3. 渡辺 光, 吉岡靖雄, 堤 康央, 向 洋平, 岡田直貴, 中川晋作:活性増強型リンフォトキシン α の機能解明、第9回日本蛋白質科学会年会、熊本、2009年5月
4. 成松翔伍, 吉岡靖雄, 渡辺光, 堤 康央, 向洋平, 岡田直貴, 中川晋作:T細胞受容体を用いた新規ターゲティング分子の創製、第9回日本蛋白質科学会年会、熊本、2009年5月

国際学会

1. Yoshioka Y., Watanabe H., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. Creation of mutant lymphotoxins with enhanced bioactivities by phage display technique., 12th International TNF Conference, Madrid (Spain), April, 2009.
2. Yoshioka Y., Watanabe H., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. Creation of mutant lymphotoxin-alphas with enhanced bioactivities by phage display technique. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, Kyoto (Japan), August, 2009.
3. Yoshioka Y., Watanabe H., Morishige T., Yao X., Ikemizu S., Nagao C., Ahmad S., Mizuguchi K., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. Creation of lysine-deficient mutant

lymphotoxin- α with receptor selectivity by using phage display., 2009 Annual Meeting of the Society for Leukocyte Biology, International Cytokine Society, & International Society for Interferon and Cytokine Research (Tri-Society), Lisbon (Portugal), October, 2009.

4. Yoshioka Y., Kayamuro H., Abe Y., Arita S., Katayama K., Yoshikawa T., Nagano K., Hiroi T., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. TNF superfamily member, TL1A, is a potential immunoregulator for development of mucosal vaccin., 9th International Conference on New Trends in Immunosuppression and Immunotherapy (IMMUNO2010), Geneva (Switzerland), February, 2010.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

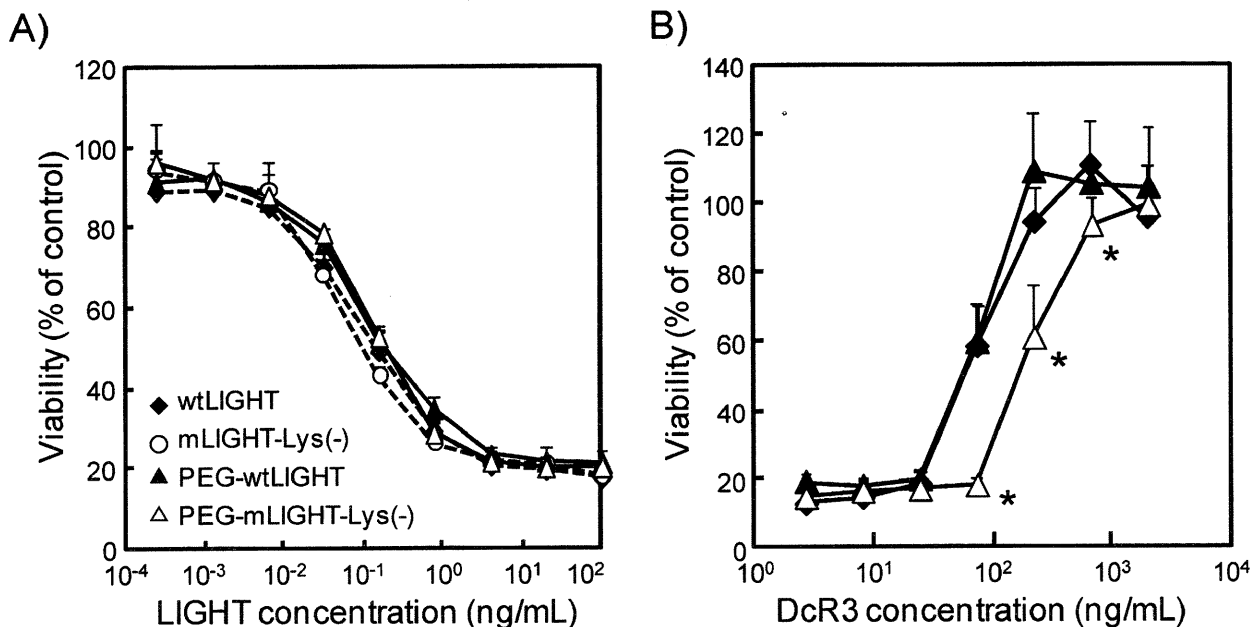


Figure 1. Properties of site-specific PEGylated mLIGHT-Lys(-). (A) *In vitro* bioactivity of PEGylated LIGHTs. HT29.14S cells were incubated with various concentrations of each LIGHT for 72 h. Cell viability was determined with the methylene blue assay. (B) The ability of PEG-mLIGHT-Lys(-) to evade DcR3. HT29.14S cells were incubated with each LIGHT (10 ng/mL) in the presence of various concentrations of DcR3 for 72 h. Cell viability was determined with the methylene blue assay. The data represent the mean \pm S.D. (n = 4; **P* < 0.05 versus the value for wtLIGHT, *t*-test.)

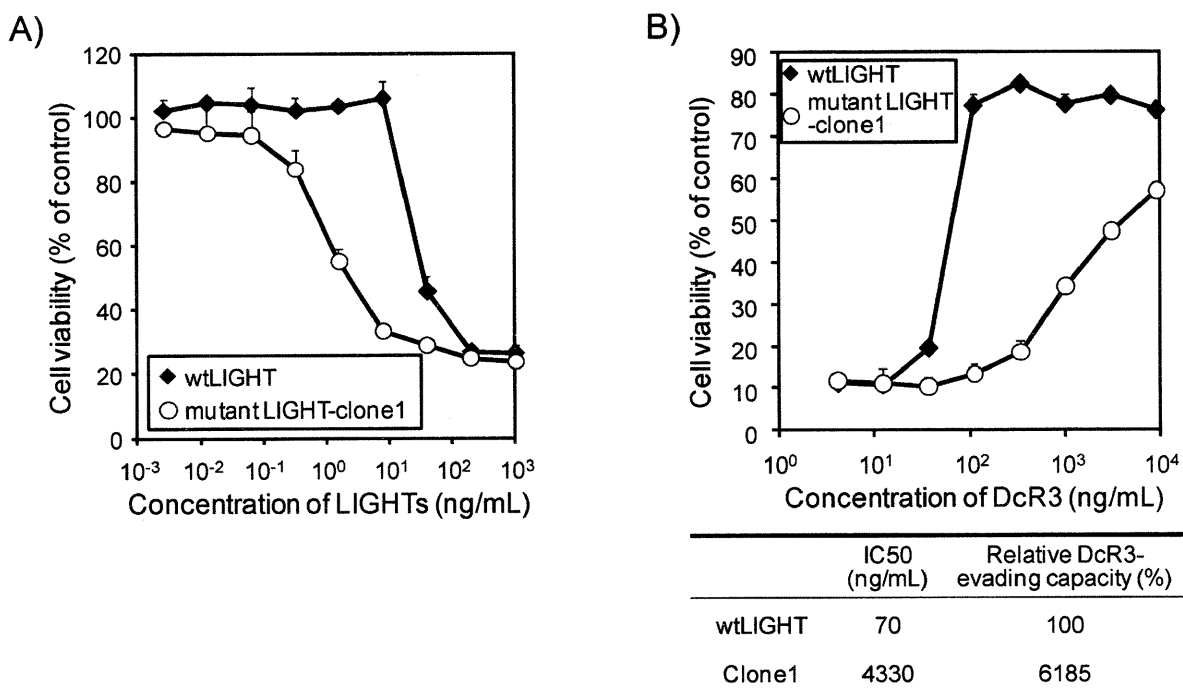


Figure 2. Effect of DcR3 on LIGHT-mediated apoptosis in human HT29.14S cells. (A) HT29.14S cells were incubated with serial dilutions of wtLIGHT or LIGHT mutant-clone 1 in the presence of 200 ng/mL DcR3 and 40 units/mL IFN- γ . After 72-h incubation, cell viability was assessed by WST-8 assay. (B) HT29.14S cells were incubated with LIGHT (10 ng) in the presence of various concentrations of DcR3 with 40 units/mL IFN- γ . After 72 h incubation, cell viability was assessed by WST-8 assay. Each data point represents the mean \pm SD. The IC₅₀ is the concentration of DcR3 required to inhibit the cytotoxicity of LIGHT by 50%.

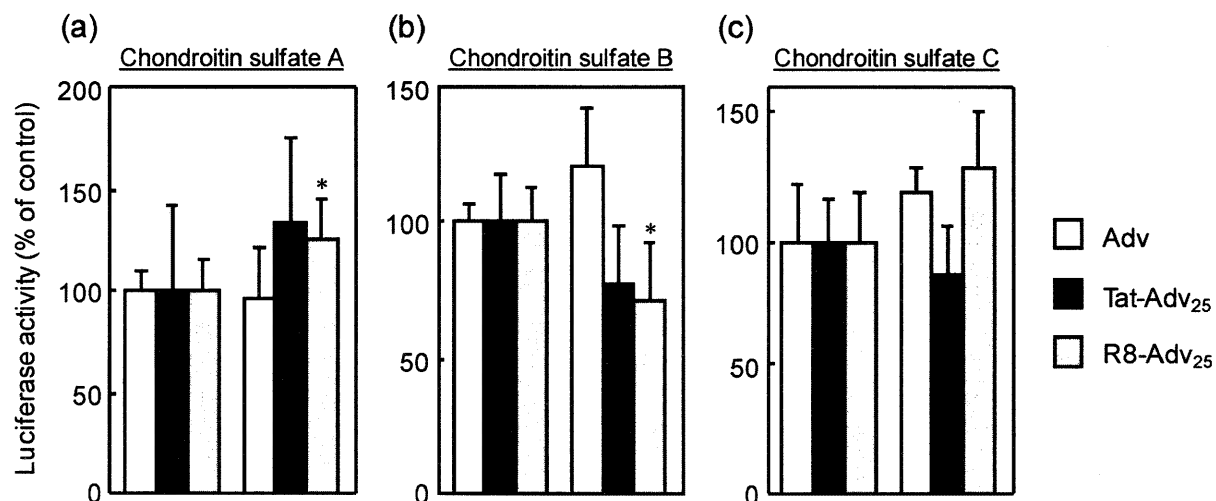


Figure 3. Cellular uptake of Tat-Adv and R8-Adv depends on chondroitin sulfate. A549 cells (1×10^4) were transduced with 1×10^4 vp/cell of each vector in the absence or presence of 90 μ g/ml of (a) chondroitin sulfate-A, (b) chondroitin sulfate-B, or (c) chondroitin sulfate-C. After 2 h incubation, the cells were washed twice by PBS, and the virus solution was replaced with fresh medium. After 24 h cultivation, luciferase expression was measured. Each point represents the mean \pm S.D. (n = 5; * P < 0.05 versus value for the absence of chondroitin sulfate by Student's t-test)

エイズ発症サルモデル確立のためのHIV-1病原性クローンの構築：遺伝子工学的改変と細胞馴化によるウイルスの変異・進化の戦略的利用

所属 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
研究者 野間口 雅子

研究要旨

エイズ発症サルモデル確立を目指し、HIV-1病原性分子クローンの構築を試みた。サル細胞での馴化、遺伝子工学的改変と構造解析を行い、サル病原性標準株 SIVmac239 と同等以上の増殖能を持つ HIV-1 クローンの構築に成功した。

A. 研究目的

HIV-1/エイズ発症サルモデルは、(1) 個体レベルでの HIV-1 複製および病原性発現機構の解析や、(2) HIV-1 感染制御のためのワクチン・新薬の評価に不可欠である。しかし、HIV-1 は宿主域が狭く実用的な動物モデルは存在しない。本研究室では、プロトタイプサル指向性 HIV-1 (NL-DT5R; *vif* の全遺伝子と *gag-CA* の helix 4/5 loop をサル病原性標準株 SIVmac239 の対応領域に置換) を世界に先駆けて作製した。NL-DT5R はブタオザルおよびカニクイザル細胞・個体で増殖可能となったが、SIVmac239 よりもサル細胞での増殖効率が悪く、サル個体でのウイルス血症は一過性で病原性を示さなかった。HIV-1 病原性分子クローン構築のためには、まず、SIVmac239 のサル細胞での複製レベルを指標として、これに匹敵する増殖能を有するクローンを取得する必要がある。そこで本年度は、実験用霊長類として汎用される2種のサル種由来の細胞(カニクイザル由来 HSC-F 細胞およびアカゲザル由来 HSR5.4 細胞)での馴化、遺伝子工学的改変や構造解析を適宜組み合わせ、サル細胞で効率良く増殖する HIV-1 分子クローンの構築を試みた。

B. 研究方法

1. 馴化型 HIV-1 クローンの構築と改変：NL-DT5R (X4) および NL-DT5R5-1 (R5) を感染させた HSC-F 細胞および HSR5.4 細胞を長期培養した。出現した馴化型ウイルスは PCR 法にて分子クローニングした。サル細胞

での増殖速度を指標としてクローンをスクリーニングした。増殖効率が向上したクローンについては、ウイルスゲノム全長をシーケンスした。増殖適応変異は親株への変異導入後、サル細胞での感染実験により同定した。遺伝子工学的改変は定法に従った。

2. ウイルス調製とウイルス量の測定：ウイルスストックは、ヒト 293T 細胞へのリン酸カルシウム法によるトランスフェクションで調製した。ウイルス量は逆転写酵素活性により測定した。
3. ウイルス感染実験：HSC-F 細胞、HSR5.4 細胞、ヒト由来 MT4/CCR5 細胞 (阪大微研/塩田博士、中山博士より分与) と、カニクイザルおよびアカゲザル由来 CD8(-) PBMC を使用した。HSC-F 細胞は 10%FCS 加 RPMI 培地、HSR5.4 細胞は 10%FCS/IL-2 加 RPMI 培地、MT4/CCR5 細胞は 10%FCS/ハイグロマイシン加 RPMI 培地で培養した。サル細胞での感染実験は IL-2 存在下で行った。
4. TRIM5 α 感受性試験：TRIM5 α (*Mamu3* と *Mamu4*) はアカゲザル由来 HSR1.4 細胞から PCR 法で増幅した。TRIM5 α 恒常発現細胞株は、ネコ由来 CRFK 細胞に遺伝子導入後 G418 による選択とクローニングを行い樹立した。カニクイザル TRIM5 α 恒常発現 CRFK 細胞は本研究室で既に樹立されていたものを用いた。これらの細胞に対するウイルス感染価は VSV-G シュードタイプウイルスを用いたルシフェラーゼアッセイで定量した。

(倫理面への配慮)

本研究では、動物実験あるいはヒト材料を用いた実験は行っていない。

C. 研究結果

1. 2種のサル細胞での NL-DT5R および NL-DT5R5-1 馴化実験の結果、増殖適応変異は IN の C 末端領域 (CTD) および Env-gp120 に集中して起こることが分かった。サルおよびヒト細胞での感染実験により、これらの変異は HIV-1 種特異性に関わるものではなく、HIV-1 自体の増殖能を向上させるものであることが示された。感染実験や構造解析の結果、Env-gp120 の増殖適応変異は CD4 や CCR5 との結合性を増大させ、ウイルス複製を亢進することが示唆された。IN-CTD 変異は領域内の狭い範囲 (13 アミノ酸) に集中して起こっており、これらの増殖促進機構については現在検討中である。
2. IN-CTD および Env-gp120 の増殖適応変異を有し、かつ、CA の helix 6/7 loop を SIVmac239 の対応領域に置換した HIV-1 クローン (MN4-5S) は、NL-DT5R よりもカニクイザル PBMC での増殖効率が向上しており、カニクイザル個体でも持続感染を成立させた。
3. HSR5.4 細胞での MN4-5S 馴化実験において、適応変異を有する馴化型ウイルスが出現した (図1の③-25)。増殖適応変異の構造解析により、サル細胞での増殖効率向上に寄与する Gag-CA の 1 アミノ酸を同定した (図2. 黒矢印: 増殖適応変異, 赤矢印: 構造解析に基づく変異)。MN4-5S にこの変異を導入した HIV-1 クローン (MN4Rh-3) は、HSC-F 細胞および HSR5.4 細胞において SIVmac239 と同程度かそれ以上の高い増殖効率を示した (図3)。カニクイザル PBMC においても、MN4Rh-3 の増殖効率は MN4-5S に比べて著しく向上しており、予定されている個体感染実験の結果が期待される。
4. カニクイザル PBMC で高い増殖効率を有する MN4Rh-3 であっても、アカゲザル PBMC ではほとんど増殖することができなかった。サル細胞における抗 HIV-1 因子の 1 つである TRIM5 α に対する HIV-1 クローンの

感受性を調べた結果、MN4Rh-3 はカニクイザル TRIM5 α の抑制は回避しているが、アカゲザル TRIM5 α に対しては、なお感受性であることが分かった。この結果は、MN4Rh-3 のアカゲザル PBMC での増殖効率の低さとよく一致しており、TRIM5 α が HIV-1 複製抑制能に関するサル種間差を生じる要因の 1 つであることが示唆された。

D. 考察

HIV-1/エイズ発症動物モデルは、細胞レベルや SIV/SHIV 感染サルモデルでは解析が困難な、HIV-1 特異的な複製・病原性発現機構やその制御法の確立のために必要である。本年度は、サル細胞での増殖効率を向上させるためウイルス馴化を試みた。興味深いことに、IN-CTD と Env-gp120 に増殖適応変異を有する馴化型ウイルスクローンを高頻度で取得した。IN-CTD 変異による増殖促進については報告がなく、今後その促進機序について検討していく。MN4Rh-3 構築の過程で、種特異性に関わる領域 (*vif* および *gag-CA* 内 helix 4/5 loop) と、サル細胞での増殖効率の向上に寄与する領域 (IN-CTD と Env-gp120 における増殖適応変異 および *gag-CA* 内 helix 6/7 loop と 1 アミノ酸変異) が明らかとなった。MN4-5S はカニクイザル個体に持続感染するが、MN4Rh-3 はカニクイザル PBMC での増殖効率がさらに向上しているため、HIV-1 感染カニクイザルモデルを確立する道筋はできたと考えている。ただし、MN4Rh-3 はアカゲザル TRIM5 α の抑制を回避していないため、このバリアを克服する HIV-1 の構築は今後の検討課題である。これにより、サル種間差を生じる要因や不明な点の多い TRIM5 α による抑制機構の解析と、作用機序に基づく HIV-1 複製制御に向けた臨床応用への展開も可能になると考えられる。

E. 結論

細胞での馴化によるウイルスの変異・進化という自然に起こる現象と遺伝子工学的改変・構造解析の活用により、カニクイザルでの増殖効率が格段に向上した MN4Rh-3 の構築に成功した。今後は、MN4Rh-3 感染個体での HIV-1 複製・病原性発現機構および HIV-1 の個体内進

化・多様性に関する実験的解析を進めるとともに、アカゲザル指向性 HIV-1 の構築と HIV-1 複製抑制に関するサル種間差の解明に取り組んでいく。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nagao, T., Hatcho, K., Doi, N., Fujiwara, S., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2009. Amino acid alterations in Gag that confer the ability to grow in simian cells on HIV-1 are located at a narrow CA region. *Journal of Medical Investigation* 56: 21-25.
- 2) Kamada, K., Yamashita, T., Hatcho, K., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2009. Evasion from CypA- and APOBEC-mediated restrictions is insufficient for HIV-1 to efficiently grow in simian cells. *Microbes and Infection* 11: 164-171.
- 3) Kuroishi, A., Saito, A., Shingai, Y., Shioda, T., Nomaguchi, M., Adachi, A., Akari, H., and Nakayama, E.E. 2009. Modification of a loop sequence between α -helices 6 and 7 of virus capsid (CA) protein in a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) derivative that has simian immunodeficiency virus (SIVmac239) *vif* and CA α -helices 4 and 5 loop improves replication in cynomolgus monkey cells. *Retrovirology* 6: 70.
- 4) 野間口雅子 2009. HIV-1 の病原性：細胞から個体へ. *Journal of AIDS Research* 11: 94-95.
- 5) 野間口雅子、足立昭夫 2009. アクセサリー蛋白質と抗 HIV 細胞因子. *ウイルス* 59: 67-74.
- 6) Jere, A., Fujita, M., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2010. Role of HIV-1 Nef protein for virus replication *in vitro*. *Microbes and Infection* 12: 65-70.
- 7) Yamashita, T., Nomaguchi, M., Miyake, A., Uchiyama, T., and Adachi, A. 2010. Status of APOBEC3G/F in cells and

progeny virions modulated by Vif determines HIV-1 infectivity. *Microbes and Infection* 12: 166-171.

- 8) Fujita, M., Otsuka, M., Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2010. Multifaceted activity of HIV Vpr/Vpx proteins: the current view of their virological functions. *Reviews in Medical Virology* 20: 68-76.
 - 9) Nagao, T., Yamashita, T., Miyake, A., Uchiyama, T., Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2010. Different interaction between HIV-1 Vif and its cellular target proteins APOBEC3G/APOBEC3F. *Journal of Medical Investigation* 57: 89-94.
- ### 2. 学会発表
- 1) Kuroishi, A., Saito, A., Shingai, Y., Shioda, T., Nomaguchi, M., Adachi, A., Akari, H., and Nakayama, E. E. Modification of a loop between α -helices 6 and 7 of virus capsid protein improves human immunodeficiency virus type 1 replication in cynomolgus monkey cells. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Sept. 10, 2009, Awaji, Japan.
 - 2) 三宅在子、野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、足立昭夫 HIV-1 インテグラーゼ (IN) C 末端領域 (CTD) における 1 アミノ酸変異によるウイルス増殖促進機構の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 25 日、東京.
 - 3) 土肥直哉、野間口雅子、藤原佐知、三宅在子、足立昭夫 サル細胞指向性 HIV-1 の増殖適応変異の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 26 日、東京.
 - 4) 野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、三宅在子、横山 勝、大出裕高、佐藤裕徳、足立昭夫 HIV-1 Env の 1 アミノ酸変異による増殖促進機構の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 26 日、東京.
 - 5) 齊藤 暁、飯島沙幸、岩崎優紀、黒石 歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、俣野哲朗、明里宏文 SIV 由来 CA h6/7 loop を持つ第 2 世代サル指向性 HIV-1 クローンはカニクイザル個体で効率よく増殖す

- る。 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、
2009 年 10 月 26 日、東京。
- 6) 黒石 歩、齊藤 暁、塩田達雄、野間口雅子、足立昭夫、明里宏文、中山英美 サル指向性 HIV-1 のサル細胞でのウイルス増殖におけるカプシド α -ヘリックス 6-7 間のループの重要性. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 26 日、東京。
- 7) 横山 勝、大出裕高、野間口雅子、神田忠仁、足立昭夫、佐藤裕徳 HIV-1 Env V3 ループ構造の安定性を制御するアミノ酸. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 27 日、東京。
- 8) 三宅在子、野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、足立昭夫 HIV-1 増殖過程におけるインテグラーゼ (IN) C 末端領域 (CTD) の影響. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、2009 年 11 月 26 日、名古屋。
- 9) 黒石 歩、齊藤 暁、新開泰宏、塩田達雄、野間口雅子、足立昭夫、明里宏文、中山英美 サル指向性 HIV-1 のサル細胞でのウイルス増殖におけるカプシド α -ヘリックス 6-7 間のループの重要性. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、2009 年 11 月 26 日、名古屋。
- 10) 横山 勝、大出裕高、野間口雅子、神田忠仁、足立昭夫、佐藤裕徳 HIV-1 Env V3 ループ構造の安定性を制御するアミノ酸. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、2009 年 11 月 26 日、名古屋。
- 11) 野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、三宅在子、横山 勝、大出裕高、佐藤裕徳、足立昭夫 サル細胞指向性 HIV-1 の細胞馴化による増殖適応変異の解析. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、2009 年 11 月 28 日、名古屋。
- 12) 齊藤 暁、飯島沙幸、岩崎優紀、黒石 歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、俣野哲朗、明里宏文 第 2 世代サル指向性 HIV-1 クローンはカニクイザル個体において効率よく増殖する. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、2009 年 11 月 28 日、名古屋。

1. 特許取得
なし。
2. 新案登録
なし。
3. その他
なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

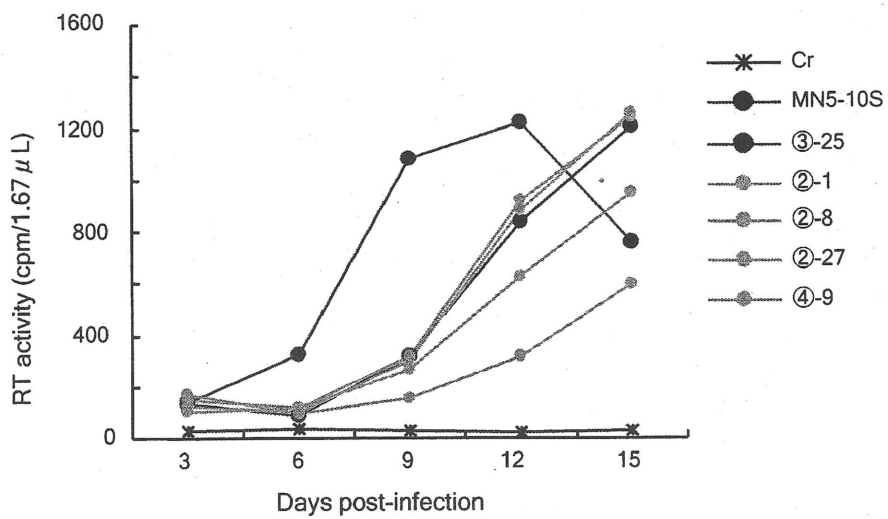


図1. HSR5.4馴化型ウイルス由来分子クローンの増殖特性

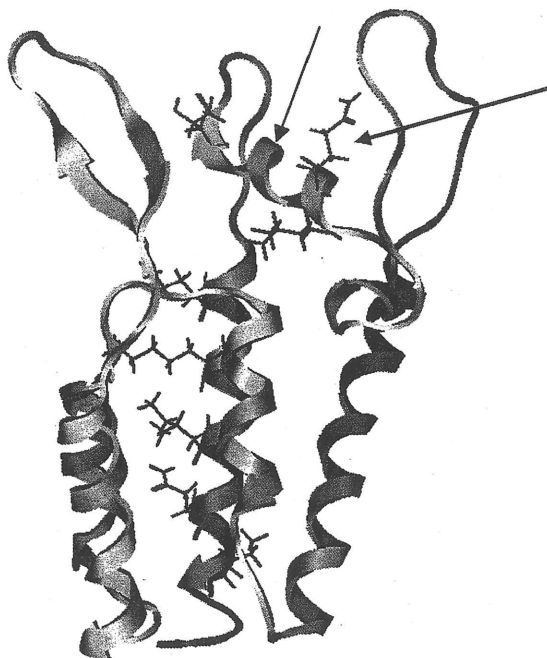


図2. MN4-5SのCA-NTD構造

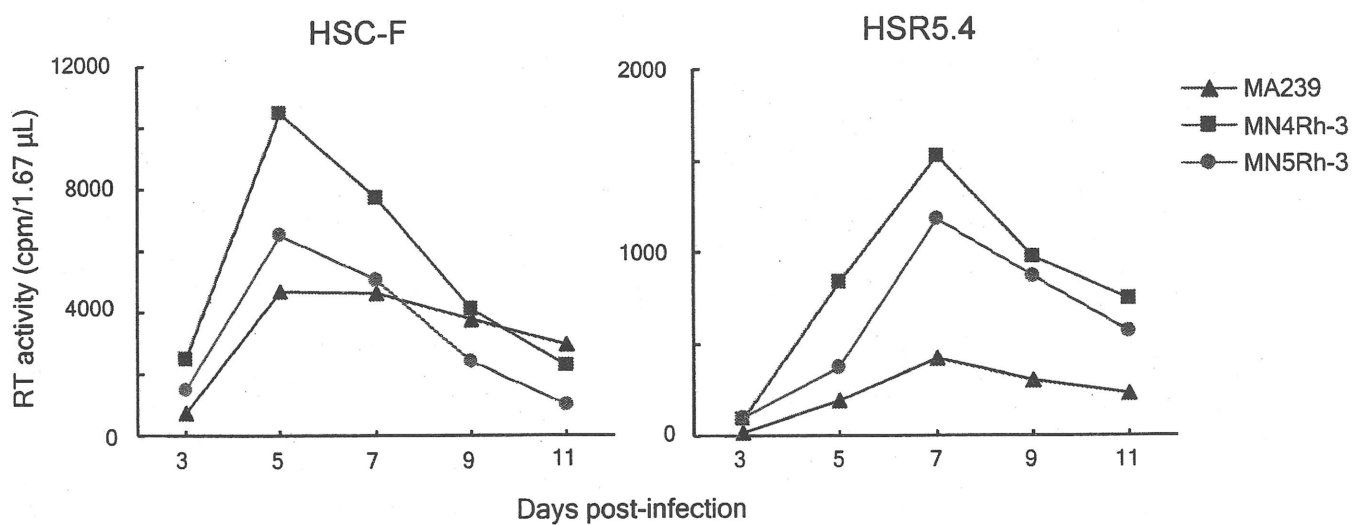


図3. サル細胞でのMN4Rh-3/MN5Rh-3とMA239との増殖特性比較