

2) gp120 の CD4 binding/ コレセプター binding 領域を抗原として抗体誘導の検討

前年度までに、gp120 の CD4/コレセプター binding 領域の環状ペプチドおよび、コントロールとしての鎖状ペプチドを用いて、抗体誘導能をマウス、およびウサギで評価したが、採取した血清に中和活性が検出できなかった。そこで、別法として、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。その結果、アフィニティーを持ったクローンが得られた。現在、そのモノクローナル抗体を作製中である。

3) コレセプター CXCR4 の細胞外ループ (Ecl1-Ecl3 & N端) を基にした抗原分子作製& 抗体誘導

N 端の細胞外 CXCR4 に関しては 3 つの断片 (Nt-1, Nt-2, Nt-3) に分割して (10 残基オーバーラップさせて)、合成した。Nt-2, Nt-3 に親水性領域を付加し、MAP テンプレート上に構築した合成結果を図 19, 20 に示した。

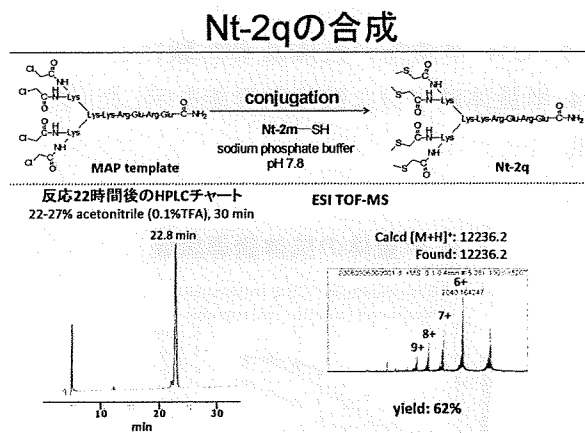


図 19 CXCR4 の N 端ペプチド Nt-2 を提示した抗原分子の合成結果 (HPLC チャートとマススペクトル)

Nt-3qの合成

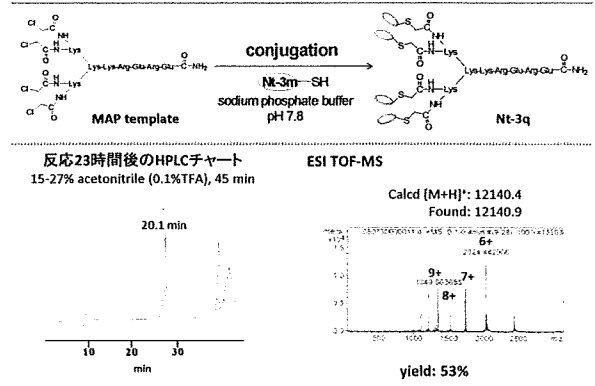


図 20 CXCR4 の N 端ペプチド Nt-3 を提示した抗原分子の合成結果 (HPLC チャートとマススペクトル)

まず、コントロール実験として、Nt-1, 2, 3 単量体をマウスに免疫し、抗体誘導を行った。その ELISA による評価で Nt-1 単量体が顕著な抗体誘導能を示した (図 21)。次に、これらの抗原分子 (Nt-2 と Nt-3 の 4 置換体) をマウスに免疫し、抗体誘導を行った。その血清の ELISA の結果を図 22 に示した。Nt-3 の 4 置換体の方が、効率よく抗体誘導されていることがわかった。その抗 HIV 活性に関して、現在検討中である。価数による N 末端抗原ペプチドの抗体誘導能の変化を比較すると 4 価型 (テトラマー) Nt-3 で抗体誘導が示された。

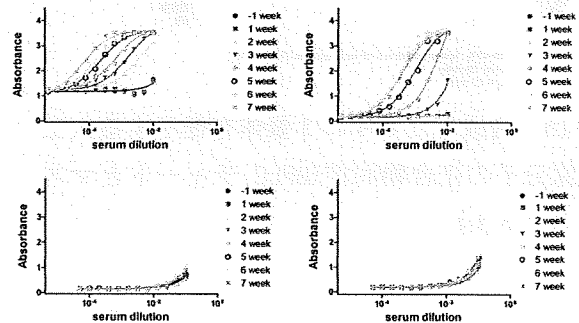


図 21 Nt-1, 2, 3 単量体の抗体誘導能の ELISA による評価

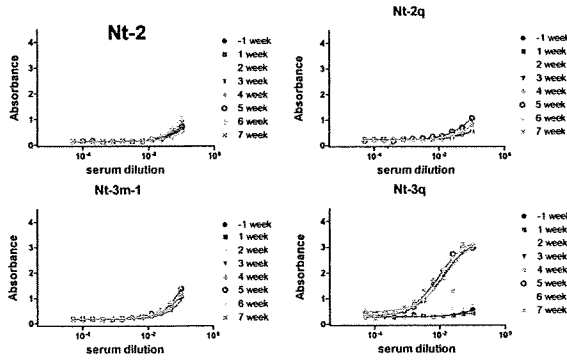


図 22 価数による N 末端抗原ペプチドの抗体誘導能の変化

Ecl に関しては、水溶性の低さを改善するため、親水性領域 Arg-Glu-Arg-Glu を天然型配列の両端に付与した。研究方法の 3) で述べた、2 種類の合成法を用いて、CXCR4 の細胞外ループを合成し、環化し、エピトープ提示のためのテンプレートへ導入した。それぞれの方法で合成した Ecl 1 & 2 領域の環化ペプチドの HPLC チャートとマスペクトルを図 23, 24 に示した。

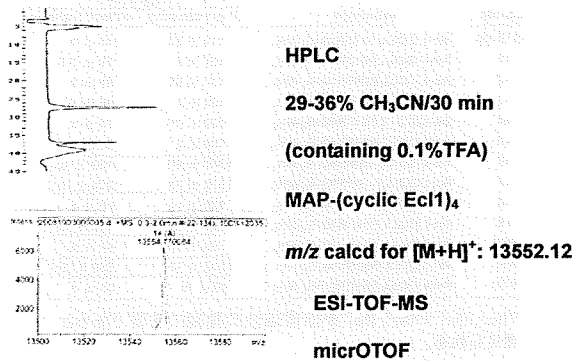


図 23 多価型 Cyclic Ecl1 の精製と同定

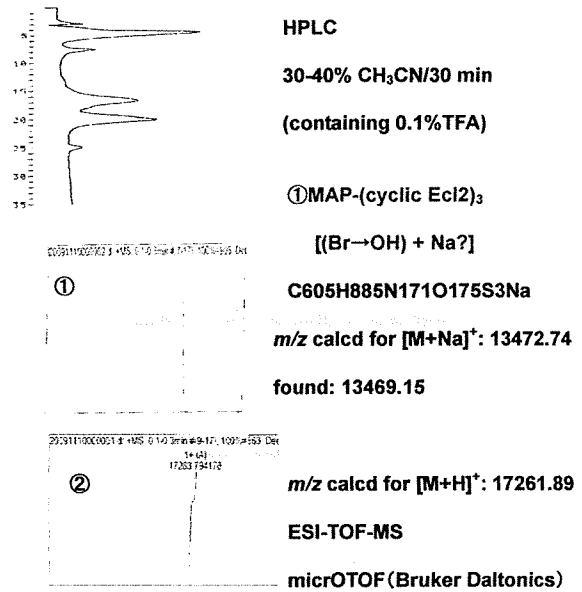


図 24 多価型 Cyclic Ecl2 の精製と同定

4) CD4 mimic 誘導体の合成と抗 HIV 活性の評価および中和抗体等との併用効果および CD4 mimic と T140 との hybrid の合成

CD4 mimic 誘導体に関して、ピペリジン環部のテトラメチル基除去、2 級アミンの窒素原子への種々の置換基の導入による影響を調べた。合成した化合物の FACS 解析により gp120 構造変化誘起能を調べた(図 25)。その結果、テトラメチル基除去による gp120 構造変化誘起能への影響は見られなかった。

NBDシリーズとピペリジン環誘導体による gp120構造変化誘起能の比較

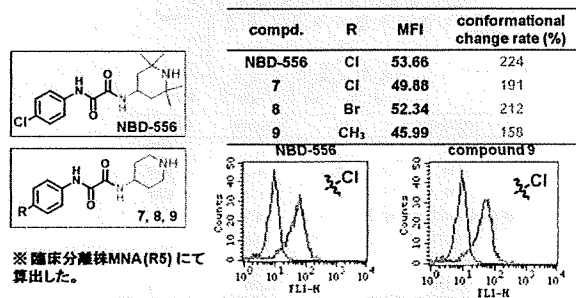


図 25 CD4 mimic NBD シリーズにおけるピペリジン環部のテトラメチル基の影響

次に、CD4 mimic 誘導体において、ピペリジ

別紙3

ン環および二級アミンを用いた gp120 構造変化誘起能に関する構造活性相関を調べた。その結果、有意な gp120 構造変化誘起能が見られた誘導体は共通してピペリジン環構造を有していた (図 26)。

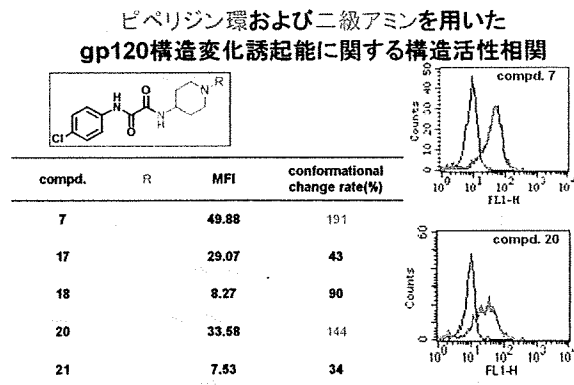


図 26 CD4 mimic 誘導体におけるピペリジン環および二級アミンの gp120 構造変化誘起能に対する影響

さらに、上記で得られた CD4 mimic と CXCR4 アンタゴニスト T140 誘導体 4F-benzoyl-TZ14011 とのハイブリッドの創製に関し 3 種の長さのリンカーで比較評価し、抗 HIV-1 活性が nM レベルまで向上したハイブリッド分子の創製に成功した (図 27)。

CD4ミミック-CXCR4アンタゴニストハイブリッド分子

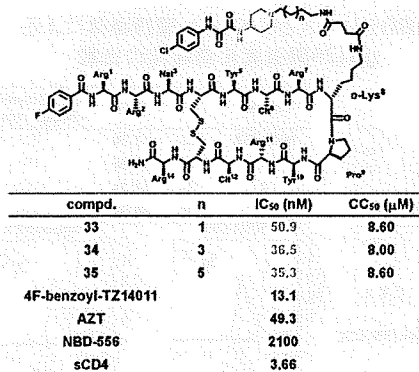


図 27 CD4 mimic と CXCR4 アンタゴニスト T140 誘導体のハイブリッド分子の評価

5) インテグラーゼ阻害剤

細胞膜透過性ペプチドを付与した LQQLLF モチーフペプチドの IN 阻害活性を図 28 に示す。

IN阻害活性

peptide	IC <sub>50</sub> (μM)	
	3'-processing	strand transfer
1	0.006 ± 0.001	0.005 ± 0.002
2	0.004 ± 0.001	0.004 ± 0.001
3	0.83 ± 0.07	0.7 ± 0.06
4	>11.0	6.1 ± 1.1
5	>100	68 ± 1

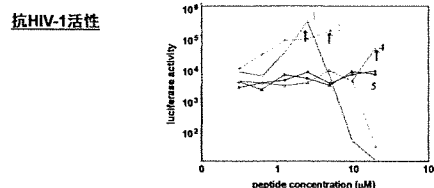


図 28 細胞膜透過性ペプチドを付与した LQQLLF モチーフペプチドの IN 阻害活性

さらに、アラニンスキャンによる IN 阻害活性に重要なアミノ酸残基を同定することにより Phe6, Ile7, Phe9, Ile11 が阻害活性の発現に重要であると考えられる (図 29)。

5) アラニンスキャンによるIN阻害活性に重要なアミノ酸残基の同定

peptide	sequence	IC <sub>50</sub> (nM)	
		3'-processing	strand transfer
WT12-R8	Ac-LQQLLFHFRIG-R <sub>8</sub> -NH <sub>2</sub>	110 ± 30	49 ± 9
A1	Ac-AQQLLFHFRIG-R <sub>8</sub> -NH <sub>2</sub>	120 ± 4	79 ± 7.5
A2	Ac-LAQLLFHFRIG-R <sub>8</sub> -NH <sub>2</sub>	130 ± 20	60 ± 7
A3	Ac-LQQLAFHFRIG-R <sub>8</sub> -NH <sub>2</sub>	100 ± 4	55 ± 8
A4	Ac-LQQLAFHFRIG-R <sub>8</sub> -NH <sub>2</sub>	120 ± 20	72 ± 9
A5	Ac-LQQLAFHFRIG-R <sub>8</sub> -NH <sub>2</sub>	130 ± 3	64 ± 8
A6	Ac-LQQLAFHFRIG-R <sub>8</sub> -NH <sub>2</sub>	340 ± 60	180 ± 25
A7	Ac-LQQLFAHFRIG-R <sub>8</sub> -NH <sub>2</sub>	330 ± 23	220 ± 14
A8	Ac-LQQLFAHFRIG-R <sub>8</sub> -NH <sub>2</sub>	130 ± 14	60 ± 8
A9	Ac-LQQLFAHFRIG-R <sub>8</sub> -NH <sub>2</sub>	250 ± 20	120 ± 13
A10	Ac-LQQLFIHFRIG-R <sub>8</sub> -NH <sub>2</sub>	112 ± 12	47 ± 9
A11	Ac-LQQLFIHFRAG-R <sub>8</sub> -NH <sub>2</sub>	200 ± 33	155 ± 20
A12	Ac-LQQLFIHFRIA-R <sub>8</sub> -NH <sub>2</sub>	92 ± 9	88 ± 8

Phe<sup>6</sup>, Ile<sup>7</sup>, Phe<sup>9</sup>, Ile<sup>11</sup> が阻害活性の発現に重要であると考えられる。

図 29 アラニンスキャンによる IN 阻害活性に重要なアミノ酸残基を同定

6) マトリックス蛋白のペプチド断片 Matrix 断片ペプチドライブラリー (図 30) とそのそれぞれに細胞膜透過性配列を付加した

ペプチドライブラリー (図 31) の抗 HIV 活性を評価することにより、抗 HIV 活性リードペプチドを見出した。

capping peptide	sequence + CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub> at SH of Cys	EC <sub>50</sub> (μM)		
		MT-4 cell NL4-3	PM1/CCR5 cell NL(AD8) JR-CSF	
C1	H-MGARASVLSGGELDKGC-NH <sub>2</sub>	> 50	ND	ND
C2	Ac-GELDKWEKIRLRPGGGC-NH <sub>2</sub>	> 50	ND	ND
C3	Ac-LRPGGKKQYKLVKIVGC-NH <sub>2</sub>	> 50	ND	ND
C4	Ac-LKHIVWASRELERFAGC-NH <sub>2</sub>	no at 12.5 μM	ND	ND
C5	Ac-LERFAVNPGLLETSEGC-NH <sub>2</sub>	> 50	ND	ND
C6	Ac-LETSEGSRLQLQGC-NH <sub>2</sub>	49	24% inh. at 6.25 μM	25% inh. at 50 μM
C7	Ac-LGQLQPSLQTGSEELGC-NH <sub>2</sub>	> 50	ND	ND
C8	Ac-GSEELRSLYNTIAVLGC-NH <sub>2</sub>	> 50	ND	ND
C9	Ac-TIAVLYSVHQRIDVKGNC-NH <sub>2</sub>	30	13	3.1
C10	Ac-RIDVKDTKEALDKIEGC-NH <sub>2</sub>	no at 12.5 μM	ND	ND
C11	Ac-LDKIEEQNKSKKKAGC-NH <sub>2</sub>	> 50	ND	ND
C12	Ac-SKKKAQAAAADTGNNGC-NH <sub>2</sub>	> 50	ND	ND
AZI		0.02	0.46	0.17

図 30 Capping peptides 1-13 の抗 HIV-1 活性

MA peptide	sequence + (CH <sub>2</sub> CO-R <sub>3</sub> )-NH <sub>2</sub> at SH of Cys	EC <sub>50</sub> (μM)		
		MT-4 cell NL4-3	PM1/CCR5 cell NL(AD8) JR-CSF	
L1	H-MGARASVLSGGELDKGC-NH <sub>2</sub>	30	30	40
L2	Ac-GELDKWEKIRLRPGGGC-NH <sub>2</sub>	no at 25 μM	ND	ND
L3	Ac-LRPGGKKQYKLVKIVGC-NH <sub>2</sub>	no at 25 μM	ND	ND
L4	Ac-LKHIVWASRELERFAGC-NH <sub>2</sub>	no at 3.1 μM	ND	ND
L5	Ac-LERFAVNPGLLETSEGC-NH <sub>2</sub>	40	42% inh. at 50 μM	42
L6	Ac-LETSEGSRLQLQGC-NH <sub>2</sub>	33	49% inh. at 50 μM	31
L7	Ac-LGQLQPSLQTGSEELGC-NH <sub>2</sub>	34	37% inh. at 50 μM	35% inh. at 50 μM
L8	Ac-GSEELRSLYNTIAVLGC-NH <sub>2</sub>	2.0	5.8	7.8
L9	Ac-TIAVLYSVHQRIDVKGNC-NH <sub>2</sub>	2.2	0.43	0.55
L10	Ac-RIDVKDTKEALDKIEGC-NH <sub>2</sub>	37	42% inh. at 50 μM	27
L11	Ac-LDKIEEQNKSKKKAGC-NH <sub>2</sub>	15	17% inh. at 25 μM	23
L12	Ac-SKKKAQAAAADTGNNGC-NH <sub>2</sub>	36	30% inh. at 25 μM	27
L13	Ac-DTGNNSQVSQNYGC-NH <sub>2</sub>	18	0.43	11

図 31 膜透過性ペプチド MA peptides の抗 HIV-1 活性

#### D. 考察

前年度からエイズワクチン開発のためアプローチした4種のターゲットはいずれも革新的、斬新なアイデアに基づいている。創薬化学・ペプチド合成の巧みな技術を用い、抗原分子等を順調に合成できた。実際のマウスでの免疫による抗体誘導の実験に加え、ファージディスプレイライブラリーを使った抗体のセレクションも行った。

1) gp41 のヘリカル領域の合成ペプチド

親水性領域を付加した N36 3 量体のマウスでの中和抗体誘導に成功し、今後最適化を検討することにより、有用なワクチンになる可能性がある。C34 についても親水性領域を付加した C34 の抗原ペプチドの 3 量体の構築に成功した。

2) gp120 の CD4 binding/ コレセプター binding 領域

構造を固定化した環状抗原ペプチドの抗体誘導能をファージディスプレイライブラリーでのセレクションを用いて、アフィニティーの高い抗体を得、モノクローナル抗体の創製等を検討している。

3) コレセプター CXCR4 の細胞外ループ (Ec11-Ec13 & N 端)

N 端ペプチドについては抗原分子 (Nt-2 と Nt-3 の 4 置換体) を構築し、マウスに免疫し、抗体誘導を行った。Nt-3 の 4 置換体は効率よく抗体誘導された。Ec1 に関しては、親水性領域を付加することにより、環化を効率的に進行させることができた。MAP-テンプレートに導入も成功し、現在マウスに免疫している。

4) CD4 mimic 誘導體

構造活性相関により、CD4 mimic 誘導體のピペリジン環部のテトラメチル基除去による gp120 構造変化誘起能への影響は見られなかった。また、有意な gp120 構造変化誘起能が見られた誘導體は共通してピペリジン環構造を有していた。gp120 の構造変化を誘起し抗体との反応性を向上させることは、今後の抗体医薬・ワクチン療法において有用な知見を与える。さらに、抗 HIV-1 活性が nM レベルまで向上した CD4 mimic と CXCR4 アンタゴニスト T140 誘導體のハイブリッド分子の創製に成功した。

5) インテグラーゼ阻害剤

IN 阻害ペプチドの活性に重要なアミノ酸は

Phe6, Ile7, Phe9, Ile11 であると考えられる。

6) マトリックス蛋白のペプチド断片

Matrix断片に細胞膜透過性配列を付加したペプチドより抗 HIV 活性を有する配列を見出した。

E. 結論

各種のターゲットにおいて、人工抗原分子を順調に合成できた。gp41-N36 の 3 量体についてはマウスで中和抗体の創製を確認し、gp41-C34 の 3 量体の創製にも成功した。コレセプター-CXCR4 の N 端、細胞外ループは効率的な合成法により、MAP に導入し、マウスでの評価も行った。gp120 エピトープもファージでの抗体作製に成功した。また、CD4 mimic 誘導体の gp120 の構造変化誘起能に関する構造活性相関を検討し、CXCR4 アンタゴニスト T140 誘導体とのハイブリッド分子の創製に成功した。これらの結果は今後の HIV 抗体・ワクチン療法の研究において、重要な知見となると思われる。Vpr 断片から IN 阻害活性を有するペプチドを見出し、Matrix 断片ペプチドより抗 HIV 活性を有する配列を見出した。これらは新規抗 HIV 剤創製に役立つと思われる。

F. 謝辞

抗体誘導の実験に関して、国立感染症研究所エイズ研究センター、山本直樹センター長、村上 努主任研究官、駒野 淳主任研究官、大庭賢二博士にお世話になりました。抗ウイルス活性の測定実験に関して、熊本大学エイズ学センター、松下修三教授、吉村和久講師、原田恵嘉博士にお世話になりました。厚く御礼申し上げます。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamada Y, Ochiai C, Yoshimura K, Tanaka T, Ohashi N, Narumi T, Nomura W, Harada S, Matsushita S, Tamamura H. CD4 mimics targeting the mechanism of HIV . Bioorg. Med. Chem. Lett 20 : 354-358, 2010.
- 2) Tsutsumi H, Nomura W, Abe S, Mino T, Masuda A, Ohashi N, Tanaka T, Ohba K, Yamamoto N, Akiyoshi K, Tamamura H. Fluorogenically Active leucine zipper peptides as new tag-probe pairs for protein imaging in living cells. Angew Chem., Int. Ed. 48 : 9164 -9166, 2009.
- 3) Inaba Y, Yoshimoto N, Sakamaki Y, Nakabayashi M, Ikura T, Tamamura H, Ito N, Shimizu M, Yamamoto K: A new class of vitamin D analogues that induce structural rearrangement of the ligand-binding pocket of the receptor. J. Med. Chem. 52(5):1438-1449, 2009.
- 4) Mizukoshi F, Baba K, Goto-Koshino Y, Setoguchi-Mukai A, Fujino Y, Ohno K, Tamamura H, Oishi S, Fujii N, Tsujimoto H: Inhibitory effect of newly developed CXC-chemokine receptor 4 antagonists on the infection with feline immunodeficiency virus. J. Vet. Med. Sci. 71(1):121-124,2009.
- 5) Tanaka T, Nomura W, Narumi T, Esaka A, Oishi S, Ohashi N, Itotani K, Evans BJ, Wang Z, Peiper SC, Fujii N, Tamamura H: Structure-activity relationship study on artificial CXCR4 ligands possessing the cyclic pentapeptide scaffold: the exploration of amino acid residues of pentapeptides by substitutions of several aromatic amino acids. Org. Biomol. Chem. 7: 3805-3809,2009.
- 6) Ohashi N, Nomura W, Kato M, Narumi T, Lewin NE, Blumberg PM, Tamamura H: Synthesis of protein kinase C $\delta$  C1b domain by native chemical ligation methodology and characterization of its folding and ligand binding. J. Pept. Sci. 15(10): 642-646,2009.

著書

- 1) 玉村啓和「種々の作用点をターゲットとした抗 HIV 剤の創製」日本エイズ学会誌（日本エイズ学会）、11 巻、2 号、頁 100-101、2009 年
2. 学会発表
- 1) Tamamura H. Development of an artificial antigen inducing neutralizing antibodies specific to gp41 trimer. Satellite Symposium at Mt. Aso. September 30, 2009

- 2) 玉村啓和. ペプチドを基盤としたケミカルバイオロジーと抗 HIV 剤の創製. 九州ペプチドフォーラム. 北九州, 2009年1月22-23日.
- 3) 玉村啓和. ペプチドとくすり. 第4回四大学連合文化講演会. 東京, 2009年10月9日.
- 4) 玉村啓和, 野村 渉, 鳴海哲夫, 田中智博, 駒野 淳, 山本直樹. ペプチドミメティクを基盤とした阻害剤と新規概念によるワクチン. 第82回日本生化学会大会 シンポジウム. 神戸, 2009年10月21日.
- 5) 鳴海 哲夫. ペンシルバニア大学留学体験記~化学選択的反応によるペプチド合成~. 若手ペプチド夏の研究会. 東京, 2009年8月2-4日.
- 6) Nomura W, Narumi T, Ohashi N, Tanaka T and Tamamura H. Protein Ligand Biosensors and Fluorescence-based Ligand Screening. Barcelona BioMed Conferences: Fifth Peptide Engineering Meeting. Barcelona, Spain, Oct 26- 28, 2009
- 7) Narumi T, Hayashi R, Tomita K, Kobayashi K, Tanahara N, Ohno H, Naito T, Kodama E, Matsuoka M, Nomura W, Tamamura H, Oishi S, Fujii N. Diastereoselective synthesis of (Z)-fluoroalkene dipeptide isosteres and their incorporation into the selective CXCR4 antagonists. The 3rd Asia-Pacific International Peptide Symposium. Jeju Island, Korea, Nov8-11, 2009
- 8) Tanaka T, Nomura W, Narumi T, Tamamura H. Chemical biology approach utilizing novel bivalent ligands for GPCR CXCR4 leads to the elucidation of a dimeric structure. The 3rd Asia-Pacific International Peptide Symposium. Jeju Island, Korea, Nov8-11, 2009
- 9) Nomura W, Serizawa Y, Ohashi N, Okuda Y, Narumi T, Yoshida K, Furuta T, Tamamura H. Study of PKC-dependent cellular signaling in a spatial- and temporal-specific manner by photoactivatable synthetic compounds. The American Society for Cell Biology 49th Annual Meeting. San Diego, USA, Dec5-9, 2009
- 10) 大橋南美, 野村 渉, 加藤 舞, 堤 浩, 糸谷恭子, 伊倉貞吉, 伊藤暢聡, 吉田清嗣, Nancy E. Lewin, Peter M. Blumberg, 玉村啓和. PKC C1b ドメインの合成およびその蛍光性誘導体を用いた新規スクリーニング法の開発. 日本薬学会第129年会. 京都, 2009年3月26-28日.
- 11) 野村 渉, 芹澤雄樹, 大橋南美, Nancy E. Lewin, 堤 浩, 吉田清嗣, Peter M. Blumberg, 古田寿昭, 玉村啓和. ケージド DAG-ラクトンによるプロテインキナーゼCの活性化制御. 日本薬学会第129年会. 京都, 2009年3月26-28日.
- 12) 野村 渉, 増田朱美, 加藤 舞, 大庭賢二, Carlos F. Barbas, III, 山本直樹, 玉村啓和. 配列特異的 DNA 組換え酵素における DNA 結合親和性が及ぼす組換え反応効率への影響. 日本薬学会第129年会. 京都, 2009年3月26-28日.
- 13) 橋本知恵, 堤 浩, 田中智博, 野村 渉, 大庭賢二, 村上 努, 山本直樹, 玉村啓和. HIV-1 コレセプター CXCR4 を基にした人工設計型抗原分子の開発. 日本薬学会第129年会. 京都, 2009年3月26-28日.
- 14) 田中智博, 野村 渉, 田部泰章, 堤 浩, 糸谷恭子, 大庭賢二, 村上 努, 山本直樹, 玉村啓和. 蛍光性 CXCR4 特異的リガンドの開発:スクリーニング及びイメージングへの展開. 日本薬学会第129年会. 京都, 2009年3月26-28日.
- 15) 奥田善章, 堤 浩, 野村 渉, 大橋南美, 芹澤雄樹, 玉村啓和. センシングバイオロジーを志向した蛍光性DAG-lactone 誘導体の合成と機能評価. 日本化学会第89春季年会. 東京, 2009年3月28日.
- 16) 堤 浩, 阿部清一郎, 蓑 友明, 野村 渉, 玉村啓和. センシングバイオロジーを志向した新規タンパク質イメージングツールの開発. 日本化学会第89春季年会. 東京, 2009年3月29日.
- 17) 野村 渉, 芹澤雄樹, 大橋南美, Nancy E. Lewin, 堤 浩, 吉田清嗣, Peter M. Blumberg, 古田寿昭, 玉村啓和. 光機能性リガンドを用いたプロテインキナーゼCの活性化制御. 日本ケミカルバイオロジー学会第4回年会. 神戸, 2009年5月18-19日.
- 18) 中西勇太, 堤 浩・駒野 淳, 田中智博, 中原 徹, 大橋南美, 野村 渉, 山本直樹, 玉村啓和. フォワードケミカルジェネティクスを応用した HIV インテグラーゼ阻害剤. 日本ケミカルバイオロジー学会 第4回年会. 神戸, 2009年5月18-19日.
- 19) 堤 浩, 阿部清一郎, 蓑 友明, 野村 渉, 玉村啓和. 新規タグ-プローブシステムの開発とタンパク質蛍光イメージングへの応用. 日本ケミカルバイオロジー学会 第4回年会. 神戸, 2009年5月18-19日.
- 20) 大橋南美, 奥田善章, 野村 渉, 堤 浩, 芹澤雄樹, 伊倉貞吉, 伊藤暢聡, 吉田清嗣, Nancy E. Lewin, Peter M. Blumberg, 玉村啓和. 蛍光性 diacylglycerol-lactone 誘導体の合成と機能評価. 日本ケミカルバイオロジー学会 第4回年会. 神戸, 2009年5月18-19日.
- 21) 野村 渉, 増田朱美, 奥田 毅, Carlos F. Barbas, III, 玉村 啓和. 遺伝子機能制

- 御に向けたプログラム可能な DNA メチル化酵素の創製. エピジェネティクス研究会年会. 東京, 2009年5月22-23日.
- 22) 田中智博, 野村 渉, 田部泰明, 鳴海哲夫, 糸谷恭子, 大庭賢二, 山本直樹, 玉村啓和. 蛍光性 CXCR4 プローブを用いた CXCR4 リガンドスクリーニング. 第 120 回日本薬理学会関東支部. 東京, 2009年7月11日.
  - 23) 大橋南美, 野村 渉, 鳴海哲夫, 奥田善章, 堤 浩, 田中智博, 吉田清嗣, 伊倉貞吉, 伊藤暢聡, 玉村啓和. 蛍光標識した PKC C1B ドメインの化学合成とその応用. 第 120 回日本薬理学会関東支部. 東京, 2009年7月11日.
  - 24) 橋本知恵, 堤 浩, 田中智博, 野村 渉, 大庭賢二, 村上 努, 山本直樹, 玉村啓和. HIV-1 コレセプター CXCR4 を基にした人工設計型抗原分子の開発. 第 120 薬理学会関東支部. 東京, 2009年7月11日.
  - 25) 野村 渉, 増田朱美, 加藤 舞, 大庭賢二, Carlos F. Barbas, III, 山本直樹, 玉村啓和. 配列特異的 DNA 組換え酵素における DNA 結合親和性が及ぼす組換え反応効率への影響. 第 120 薬理学会関東支部. 東京, 2009年7月11日.
  - 26) 堤 浩, 玉村啓和. 蛍光 OFF/ON 機能を有するペプチドツールを用いたタンパク質の蛍光イメージング. 第 24 回生体機能関連化学シンポジウム, 第 12 回バイオテクノロジー部会シンポジウム. 福岡, 2009年9月13-15日.
  - 27) 野村 渉, 芹澤雄樹, 大橋南美, Nancy E. Lewin, 奥田善章, 鳴海哲夫, 吉田清嗣, Peter M. Blumberg, 古田寿昭, 玉村啓和. キナーゼの細胞内局在機構解明のためのツールとしてのケージド化合物. 第 24 回生体機能関連化学シンポジウム, 第 12 回バイオテクノロジー部会シンポジウム. 福岡, 2009年9月13-15日.
  - 28) Ochiai C, Yoshimura K, Yamada Y, Tanaka T, Narumi T, Nomura W, Shibata J, Hatada M, Matsushita S, Tamamura H. Development of CD4 mimic small molecules targeted for dynamic supramolecular mechanism of HIV entry. 第 10 回熊本エイズセミナー. 熊本, 2009年9月28-29日.
  - 29) 野村 渉, 芹澤雄樹, 大橋南美, 奥田善章, 鳴海哲夫, 吉田清嗣, 古田寿昭, 玉村啓和. 時間・空間特異的な細胞シグナル解析のためのケージド DAG ラクトンの合成. 第 46 回ペプチド討論会. 北九州, 2009年11月4-6日.
  - 30) 田中智博, 野村 渉, 鳴海哲夫, 吉村和久, 松下修三, 村上努, 駒野 淳, 山本直樹, 玉村啓和. リバースからフォワードヘケミカルゲノミクスを基盤とした抗 HIV 剤の創製. 第 46 回ペプチド討論会. 北九州, 2009年11月4-6日.
  - 31) 大矢亜紀, 中原 徹, 野村 渉, 大庭賢二, 田中智博, 橋本知恵, 鳴海哲夫, 村上 努, 山本直樹, 玉村啓和. HIV 外被蛋白質 gp41 の 3 量体構造に特異的な抗体を誘導する人工抗原ペプチドの合成. 第 46 回ペプチド討論会. 北九州, 2009年11月4-6日.
  - 32) 大橋南美, 野村 渉, 鳴海哲夫, 奥田善章, 伊倉貞吉, 伊藤暢聡, 吉田清嗣, Lewin NE, Blumberg PM, 玉村啓和. 蛍光標識を用いたオルソゴナルな PKC リガンド結合活性評価法の開発. 第 46 回ペプチド討論会. 北九州, 2009年11月4-6日.
  - 33) 中原 徹, 野村 渉, 大庭賢二, 橋本知恵, 大矢亜紀, 田中智博, 鳴海哲夫, 山本直樹, 玉村啓和. HIV 侵入の動的超分子機構を模倣した立体構造制御型人工抗原分子の創製. 第 35 回反応と合成の進歩シンポジウム. 金沢, 2009年11月16-17日.
  - 34) 田中智博, 野村 渉, 鳴海哲夫, 玉村啓和. 合成二価型リガンドを用いた CXCR4 二量体構造の解析研究. 第 28 回メディシナルケミストリーシンポジウム. 東京, 2009年11月25-27日.
  - 35) 奥田善章, 野村 渉, 鳴海哲夫, 大橋南美, 玉村啓和. PKC リガンドの蛍光を用いた洗浄不要型アッセイ法の開発. 第 28 回メディシナルケミストリーシンポジウム. 東京, 2009年11月25-27日.
  - 36) 橋本知恵, 野村 渉, 田中智博, 鳴海哲夫, 大庭賢二, 山本直樹, 玉村啓和. HIV-1 第二受容体 CXCR4 を基にした合成抗原分子の開発. 第 28 回メディシナルケミストリーシンポジウム. 東京, 2009年11月25-27日.
  - 37) 中西 勇太, 中原 徹, 鈴木慎太郎, 田中智博, 大橋南美, 堤 浩, 鳴海哲夫, 野村 渉, 駒野 淳, 山本直樹, 玉村啓和. ペプチドライブラリーを基にした HIV-1 インテグラーゼに対する阻害剤の創製. 第 28 回メディシナルケミストリーシンポジウム. 東京, 2009年11月25-27日.
  - 38) 大矢亜紀, 中原 徹, 野村 渉, 大庭賢二, 田中智博, 橋本知恵, 鳴海哲夫, 村上 努, 山本直樹, 玉村啓和. HIV-gp41 の三量体構造に特異的な中和抗体を誘導する人工抗原ペプチド. 第 28 回メディシナルケミストリーシンポジウム. 東京, 2009年11月25-27日.
  - 39) 青木 徹. Development of 5th generation lentiviral vector. 第 32 回日本分子生物学会年会. 横浜, 2009年12月10日.
  - 40) Masuda A, Nomura W, Okuda T, Narumi T, Tamamura T. Design of zinc finger recombinase (RecZFP) for efficient sequence-specific genome editing. 第 32 回日本分子生物学会年会. 横浜, 2009年12月10日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

- 1) HIV 立体構造認識抗体誘導ペプチド抗原、  
及びその合成方法 : 特許出願番号:2009-120352
- 2) CXCR4多量体を認識する多価型CXCR4リガンド、  
及びその合成方法 : 特許出願番号:  
2009-159771



弱毒ワクシニアベクターによるエイズワクチン開発

分担研究者 志田壽利 北海道大学遺伝子病制御研究所

研究要旨 安全で免疫原性の高い HIV ワクチンを作成する為に、我々の開発したワクシニア m8Δ株と高発現プロモーターpSFJ1-10 を用いた組換えワクシニア(RVV)を作成する。今年度、CD40Lm と HIV env、Ag85B と SIVgag を共発現させることによるアジュバント効果を細胞性免疫・抗体誘導能の両面から検討した。

### A 研究目的

HIV に対するワクチン用のベクターとして、増殖するがまだ安全なワクシニア株は、格段に強い抗 HIV 免疫を誘導する為のベクターとなりうる。以前に、我々は日本の種痘株として10万人に接種され、重篤な副作用の報告がなかった LC16m8 株を改良し、より安全な LC16m8Δ株を作成した。そこで、本株をベクターとして HIV/SIV の種々のコンポーネントを発現する組換えウイルスを作製して免疫原性と感染制御能を検討している。今年度は免疫活性化因子 CD40Lm とフレンドアジュバントの主成分である Ag85B を HIVenv と SIVgag とともに発現させることによって、免疫増強効果を調べた。

### B 研究方法

#### 組換えワクシニア株:

m8ΔHIVenv(JR-CSF); m8Δ株の HA 遺伝子内に pSFJ1-10 プロモーターを組み込み、その下流に HIVenv を発現する。

m8ΔHIVenv-hCD40Lm: m8Δ HIVenv の env 遺伝子の下流に p7.5 プロモーターと hCD40Lm を挿入。

m8Δ-hCD40Lm:m8Δの HA 遺伝子内に p7.5 プロモーターと hCD40Lm を挿入。

m8ΔSIVgag; m8Δ株の HA 遺伝子内で pSFJ1-10 プロモーター下流に SIVgag を発現する。

m8ΔSIVgag: m8Δ HIVenv の env 遺伝子の下流に p7.5 プロモーターと hCD40Lm を挿入。

m8Δ SIVgag-Ag85B:m8Δ SIVgag の gag 遺伝子の下流に p7.5 プロモーターと Ag85B を挿入。

m8Δ-Ag85B:m8Δの HA 遺伝子内に p7.5 プロモーターと Ag85B を挿入。

蛋白質の検出: 各種組換えウイルスに発現する蛋白質は、HeLa, L 又は 293T 細胞に moi3 で感染させて、24 時間後に各種抗体、血清を用いた Western blotting によって検出した。

マウスのワクチネーション: 図に示されているスケジュールに従って、先ず 50ug env 又は gag 発現 plasmid で免疫後、各種組換えワクシニアでブーストした。

ELISPOT: 免疫したマウス(C57BL6)から脾臓細胞

を調製し、SIV p27 又は HIV gp160 の 15mer の overlapping peptide library を加えて培養し、24 時間後にインターフェロンガンマ(IFN-γ)を産生する細胞数を mouse ELISPOT kit(R&D Systems)を用い、ELISPOT アナライザー-Immunoscan(CTL 社)によってカウントした。

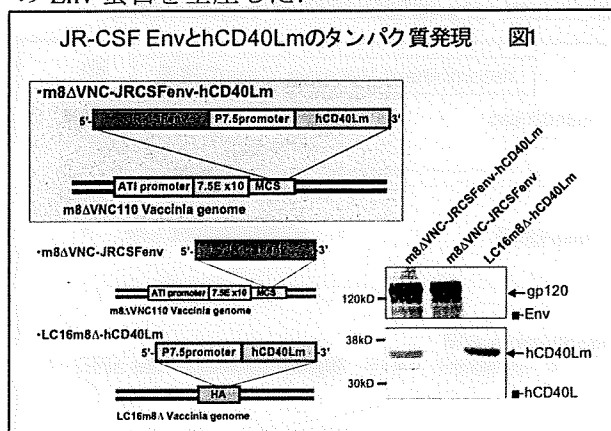
Intracellular cytokine assay (ICS): 免疫マウスの脾臓細胞を overlapping peptide library とともに培養し、抗 CD4/CD8/IFN-γ 抗体で標識後 FACScalibur を用いて分析した。

CTL assay: 免疫マウスの脾臓細胞を overlapping peptide library で刺激した後、GFP 発現 EL4 細胞と 2 日間共培養して GFP 発現細胞の減少を FACS でカウントした。

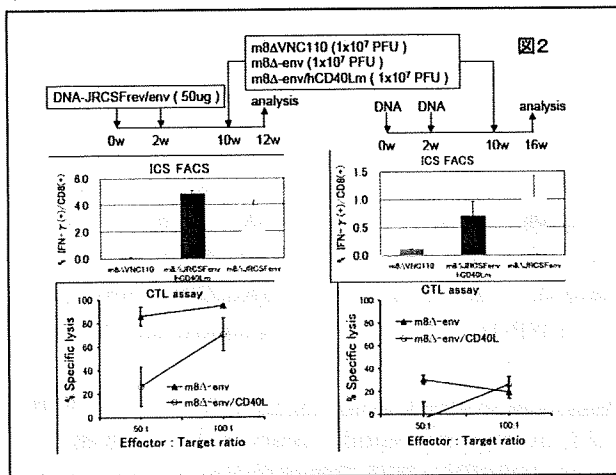
抗 Env 結合抗体の測定: HIVenv 発現 plasmid を transfection した 293T 細胞に、マウス血清を加えさらに FITC-抗マウス IgG Ab を反応後、FACS で MFI を測定した。

### C 研究成果

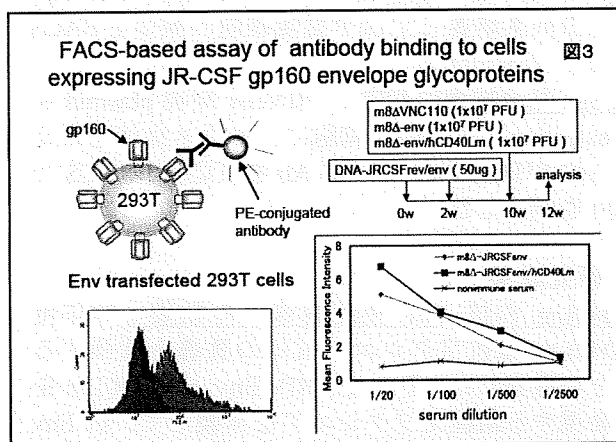
CD40Lm の抗 Env 免疫誘導への効果: 昨年度 CD40Lm は抗ワクシニア抗体の誘導を増強することを観察した。そこで、HIV Env と CD40Lm を共発現する組換えワクシニアを作製して、抗 Env 抗体増強活性を調べた。図 1 に組換えワクシニアの構造と env と CD40Lm の発現の Western blotting 像を示す。Env 単独発現と共発現ベクターは同量の Env 蛋白質を生産した。



ついで、m8ΔHIVenv と m8ΔHIVenv-hCD40Lm の抗 Env CTL 誘導能を比較する為に、Env 発現 plasmid とのプライムブースター法によってマウスを免疫し、ICS と CTL assay を行った。図2に示されているように、IFN-γ 産生 CD8 T 細胞数・細胞障害活性(CTL)共に CD40Lm 共発現によって有意な影響を受けなかった。

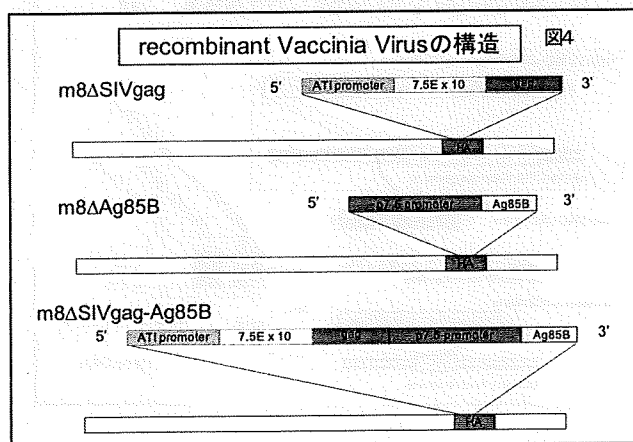


次に、抗体誘導能への影響を調べた。図3に示されているように、CD40Lm の共発現によって、抗 Env 抗体誘導に有意な変化がなかった。



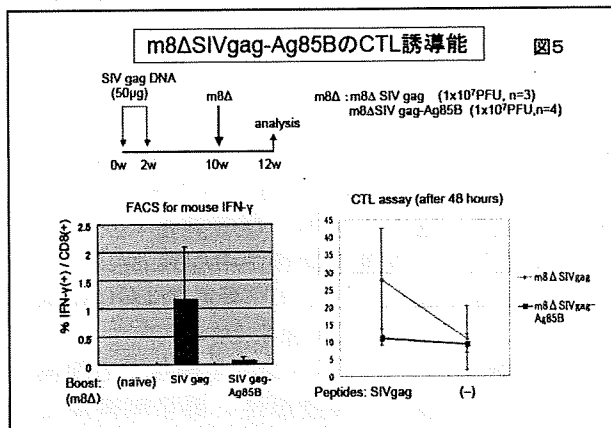
これらのことから、この免疫方法では CD40Lm の共発現は細胞性及び液性免疫の両方に影響を与えないことが分かった。

Ag85B の抗 Gag 細胞性免疫誘導への効果：

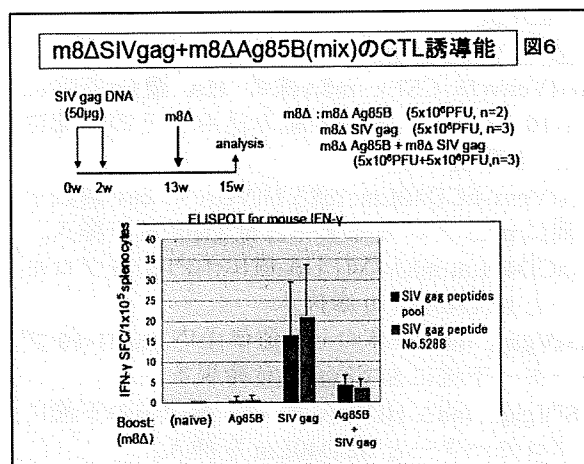


Ag85B はフレンドアジュバントの主成分であり、DNA ワクチンによるワクチネーションにおいては免疫増強効果を有することが報告されている。そこで、SIVgag と Ag85B を共発現する組換えワクシニアを作製して、SIVgag 発現 plasmid とプライム/ブースト免疫することにより Ag85B の細胞性免疫増強効果を検討した。

図5に示されているように、Ag85B の共発現によって IFN-γ 産生 CD8 T 細胞数、細胞障害活性ともに減少した。



次いで、SIVgag 発現ワクシニアと Ag85B 単独発現ワクシニアを混ぜて接種することの効果調べた。しかし、図6に示されているように IFN-γ 産生 CD8 T 細胞数を減少させた。



## D 考察

今年度、DNA ワクチンの系では細胞性と体液性免疫の両方に著しい増強効果を示した CD40Lm と Ag85B を共発現する組換えワクシニアを作製して、その効果を調べた。しかし、CD40Lm、Ag85B 共発現ワクシニアは意に反して免疫増強効果を示さなかった。特に Ag85B は共発現、混合免疫の両方のワクチネーションにおいて免疫抑制効果を示した。他方、CD40Lm には免疫抑制効果もなかった。この原因として CD40L はプライミングの段階で作用することが、班会議の場で指摘された。今後、免疫スケジュール

ルを変えて、さらに CD40Lm の効果を検討したい。

## E 結論

DNA ワクチンの系では細胞性と体液性免疫の両方に著しい増強効果を示した CD40Lm と Ag85B を共発現する組換えワクシニアを作製して、その効果を調べた。しかし、CD40Lm、Ag85B 共発現ワクシニアは意に反して免疫増強効果を示さなかった。

## F 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Ryo Takayanagi, Takashi Ohashi, Hisatoshi Shida (2009): Functional analysis of Foxp3 and CTLA-4 expressing HTLV-1-infected cells in a rat model. *Microbes and Infection* 12:964-972.
- (2) Hiroyuki Okada, Xianfeng Zhang, Ismael B Fofana, Mika Nagai, Hajime Suzuki, Takashi Ohashi and Hisatoshi Shida (2009): Synergistic effect of human Cyt1 and CRM1 on HIV-1 propagation in rat T cells and macrophages. *Retrovirology* 6:43
- (3) Hajime Suzuki, Minoru Kidokoro, Ismael Ben Fofana, Takashi Ohashi, Tomotaka Okamura,

Kazuhiro Matsuo, Naoki Yamamoto, Hisatoshi Shida (2009): Immunogenicity of newly constructed attenuated vaccinia strain LC16m8Δ that expresses SIV Gag protein. *Vaccine* 27:966-971

### 2. 学会発表

1. 高柳亮、大橋貴、志田壽利：ラットにおける HTLV-1 の母子感染 第 57 回日本ウイルス学会学術総会 平成 21 年 10 月 都市センターホテル 東京
2. 張險峰、大橋貴、志田壽利：ヒト TRIM5α による HIV-1 産生の抑制効果 第 57 回日本ウイルス学会学術総会 平成 21 年 10 月 都市センターホテル 東京
3. 永井美佳、大橋貴、木村富紀、志田壽利：ラット細胞における HIV 複製への RNA 輸送因子 hCRM1 の効果 第 57 回日本ウイルス学会学術総会 平成 21 年 10 月 都市センターホテル 東京

## G 知的所有権の取得状況

無し

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

生ワクチンにより誘導される感染防御の解析

研究分担者 森 一泰 国立感染症研究所 主任研究官

研究要旨 HIV ワクチン開発の最重要課題は防御免疫の解明である。生ワクチンは種々の抗ウイルス宿主応答を誘導することから高い感染防御を実現すると考えられる。我々は異なるサブタイプに属する SIV によるチャレンジ実験から慢性感染制御が異なる 2 群のアカゲザルの存在を明らかにし細胞性免疫の解析を行った。SIV 特異的 T 細胞のレベルに有意な差は見られなかったが、IL-15 に対する反応性を持つ免疫細胞のレベルに違いを見いだした。細胞内サイトカインの解析から CD8+T 細胞と NK 細胞において IL-15 刺激に IFN-より gamma の産生、エフェクター機能を示す CD107a 陽性細胞を確認した。これらの細胞のレベルは慢性感染の感染制御の違いと関連したことからエイズウイルス感染制御に働く CD8+細胞を構成する免疫細胞と推測される。

A . 研究目的

HIV 感染制御に働く宿主免疫として CTL・中和抗体の誘導を指標とするワクチン開発研究が行われているが、多様性に富む HIV 感染防御に未解明の宿主応答の関与が考えられる。霊長類を用いたエイズ発症動物モデルを用い、我々は糖鎖修飾変異生ワクチンが HIV ワクチンに必要とされるウイルス多様性にも対応可能な強力な感染防御を誘導することを明らかとした。本研究では、低病原性 SIV 感染、病原性 SIV 感染後早期治療により誘導されるエイズウイルス感染制御に働く宿主応答・宿主因子の解析・同定を行い、HIV 感染予防ワクチン・発症予防治療法の開発に必要な HIV 感染制御に働く宿主応答の基本概念の構築を目指す。

B . 研究方法

アカゲザル

ミャンマー産の育成ザル、オス、B ウイルス、SRV, STLV, SIV に対する抗体が陰性、SIV 感受性（培養リンパ球の SIV 増殖性）に問題がないサルを用いた。

低病原性 SIV(生ワクチン)感染

アカゲザル 11 頭に 100 TCID50 の糖鎖欠失変異 SIV を静脈内接種した。糖鎖欠失変異 SIV 感染を制御した。3 頭には変異ウイルスの親株 SIVmac239 1000 TCID50 を静脈内接種したが、ウイルス増殖を初期感染から制御した。

サブタイプが異なる SIV チャレンジ感染実験

11 頭の糖鎖欠失変異 SIV 生ワクチン感作ザルに

ワクチン SIV とはサブタイプが異なる SIV<sub>smE543-3 1000 TCID50</sub> を静脈内接種した。

#### ウイルス RNA 量の測定

感染ザルにおける SIV 感染レベルを血液に含まれるウイルス量により解析した。血しょうウイルス RNA を Roche 製キットと自動核酸精製装置 MagNA pure compact を用いて精製した。チャレンジ感染したワクチン接種ザルにはワクチンウイルスとチャレンジウイルスが存在する可能性があることから、それぞれのウイルス RNA を特異的に定量するリアルタイム PCR 法を用いた。

#### フローサイトメトリーによる免疫細胞サブセットの解析

末梢血に含まれる種々の免疫細胞（リンパ球、単球、NK細胞、樹状細胞等）の構成比、分化・活性化を調べるために種々の蛍光色素標識抗体により染色し FACS Aria, Canto II, Calibur を用いて解析した。T細胞パネル：CD3, CD4, CD8, CD20, CD28, CD95, CCR5 CCR7; NK/DCパネル：CD3, CD14, CD20, DR, NKG2A, CD8, CD16, CD56, CD123, CD11c を用い、B細胞、T細胞サブセット、記憶細胞分化 (naïve, central memory, effector memory)、ケモカインレセプター (CCR5, CCR7)、NK, DC細胞サブセット等を解析した。

#### ELISPOTアッセイによる IFN-gamma 産生細胞の解析

末梢単核球を抗原ペプチド等の刺激し IFN-gamma 産生細胞をサル IFN-gamma ELISPOT キット (U-CyTec) を用いて解析した。

#### 細胞内サイトカイン測定法

末梢単核球を抗原ペプチド、または各種サイトカイン (IL-15, IL-7, IL-2, IL-12, TNF-alpha, IFN-alpha) を用いて刺激した。細胞傷害活性化の指標となる CD107a 抗原発現測定のために CD107a 抗体を存在下、Brefeldin A, monensin により細胞内サイトカインの分泌を抑制、細胞表面抗原を上記標識抗体で染色後、専用バッファー (BD) を用い細胞を固定/透過性化後、IFN-gamma 抗体により細胞内 IFN-gamma を染色した。染色細胞はフローサイトメトリーにより解析した。

#### 倫理への配慮

本研究では動物実験が中心であることから、動物実験方法については倫理上、動物愛護の問題の観点から感染研動物実験委員会が定めたルール、ガイドラインに従った。動物実験開始に際しては事前に感染研動物実験委員会による審査・承認を受けた。

### C. 研究結果

#### 糖鎖変異生ワクチンの SIV<sub>smE543</sub> 感染に対する効果

糖鎖変異生ワクチンは同じ抗原性を持つ親株 SIV<sub>mac239</sub> 感染を個体差の影響を受けずにほぼ完全に制御した。しかし HIV ワクチンに要求される防御免疫の条件を満たしていない。HIV 感染地域においてはウイルスの高い変異性により多様な HIV による感染が蔓延している。そこで生ワクチンが誘導する感染防御効果を調べるためにワクチンとはサブタイプが異なる SIV<sub>smE543</sub> をチャレンジウイルスとして用いた。チャレンジ後、感染ザルにおけるウイルス感染を血中 SIV RNA 量を測定した。図 1 に示されるように感染後 2 週をピークとする初期感染は 11 頭すべてで抑制された。7 頭では引き続きウイルス感染が抑制された。この群を制御群 (Controller) とする。残り 4 頭では持続的なウイルス感染が起こった。この群を非制御群 (Controller) とする。この 2 群について宿主応答の違いについて解析を行った。

#### ウイルス特異的細胞性免疫の解析

感染制御と関連する宿主免疫としてウイルス特異的細胞性免疫をチャレンジウイルス抗原エピトープを網羅するペプチドプールを用いて解析した。チャレンジ後、定期的採血により得られた末梢リンパ球を用い、SIV 特異的 T 細胞の量的変化を IFN-gamma を産生細胞測定により解析した。

初期感染制御における細胞性免疫の役割を調べるために感染前2週、感染後1、2、4、9週でのウイルスタンパク特異的T細胞の変化を調べた。図2に示されるようにトータルのIFN-gamma産生細胞レベルでは、ControllerはNon-controllerと比べ高かった。しかしMock（ペプチド刺激なしの条件）でIFN-gammaを産生する細胞数が多い個体が7頭中4頭（Mm0517, Mm0301, Mm0303, Mm0511）確認された。これらの個体ではMock細胞数を除いた結果であるウイルス特異的細胞数はNon-controllerと比べて有意な違いは見られなかった。これらの結果は、初期感染期においてはControllerとNon-controllerとの間にウイルス特異的T細胞レベルに有意の差がないが、Mock反応性細胞のレベルがControllerに多いことを示唆した。

#### IL-15, IL-7 反応性細胞の解析

上記ELISPOTアッセイにおいては、抗原特異的細胞の検出感度を上げるためにペプチド刺激の際にIL-7, IL-15を加えていた。そこでIL-7, IL-15に反応しIFN-gammaを産生する細胞の頻度について生ワクチン感作前後、チャレンジ後に変化について解析した。図3に示されるように、Controllerの4頭（Mm0303, Mm0517, Mm0516, Mm0512）はNon-controllerと比べ高く、残り3頭はNon-controllerと同程度のレベルであった。次にこれらの反応性細胞とNK細胞との関係について検討した。チャレンジ感染によるCD16+NK細胞の上昇はMm0516, Mm0301において確認された。IL-15, IL-7反応性細胞とCD16+NK細胞との関連性は見られなかった。

#### IL-15, IL-7 以外のサイトカインに対する反応性

IL-15はCD8記憶細胞の維持、エフェクター機能を持つCD8+T細胞、CD4+T細胞、NK細胞の増殖に働くサイトカインである。IL-7は広範囲の免疫

細胞の増殖性を上昇させる。このふたつ以外のサイトカインについて同様の作用があるのか調べた。Mm0516, Nn0517, Mm0303のチャレンジ後25週の末梢単核球ではIL-15, 次にIL-2によりIFN-gamma産生細胞が誘導された（図4）。IL-7とIL-12と反応する細胞数はほぼ同程度であった。しかしTNF-alpha, IFN-alphaの効果は観察されなかった。

#### IL-15により活性化する細胞の同定

末梢血中のIL-15に反応する細胞を細胞内サイトカイン法により同定した。IL-15による細胞機能をIFN-gamma産生と細胞傷害性のマーカーであるCD107aの発現により調べた。チャレンジ感染後45週のcontroller 2頭、Non-controller 2頭について解析した。Mm0516ではNK細胞が、Mm0517ではCD8+T細胞とNK細胞がIFN-gammaとCD107aの発現を誘導した（図5）。しかしNon-controllerでは反応性細胞はほとんど検出されなかった。

#### 慢性感染制御とIL-15反応性細胞

ControllerとNon-controllerは慢性感染における感染制御に違いがある。そこで感染後45週の両群におけるIL-15反応性細胞の頻度について解析した。図6に示されるようにcontrollerのすべての個体でエフェクター機能を持つCD8+T細胞とNK細胞が検出された。Non-controllerではMm0513においてCD107aの発現細胞が検出されたが残り3頭では反応性細胞の頻度は非常に低レベルであった。IL-15反応性細胞の頻度と慢性感染制御との相関関係が明らかとなった。NK細胞とCD8+T細胞の誘導には個体差が確認された。

#### D. 考察

生ワクチンが誘導する極めて高い感染防御のメ

カニズムはエイズワクチン開発研究のブレークスルーとなることが期待される。我々は糖鎖修飾変異生ワクチンがウイルス多様性に対応可能な防御免疫を誘導する可能性を明らかにしている。宿主はウイルスである生ワクチンの感染を制御において種々の抗ウイルス応答を動員する。

感染宿主にはウイルス特異的 T 細胞が誘導されるが、controller と Non-controller の比較解析から IL-15 等のリンパ球の活性化・増殖に働くサイトカインに反応する細胞が controller に誘導されていることが明らかとなった。IL-15 はウイルス感染により活性化された DC/マクロファージ等の自然免疫系細胞により分泌され、NK 細胞、CD8+T 細胞を活性化しエフェクター機能を誘導する。感染制御グループにおいて IL-15 反応性細胞の頻度が高いことは、これらの細胞が感染制御に働いていることを示す。NK 細胞誘導、IL-15 レセプターの発現等による慢性感染制御の機序が推測される。

エイズウイルス慢性感染における CTL の役割は CD8 抗体による CD8+細胞消失によるウイルス感染上昇が証拠となっている。しかし CD8+細胞の消失実験の結果は Controller から IL-15 反応性細胞が消失した状態、すなわち Non-controller になったことを意味する。ウイルス特異的 T 細胞が維持されている条件においても IL-15 反応性細胞のレベルが低下すると感染制御ができなくなることが推察される。

感染制御における IL-15 反応性細胞の機能としてエフェクター機能による感染細胞の除去が推測される。DC/マクロファージ等の自然免疫系細胞と NK 細胞、CD8+T 細胞による IL-15 を解する感染制御が慢性感染制御において重要な役割を行っていることが推測される。これらのメカニズムの解明は、ワクチン開発においても重要な課題である。

## E. 結論

サブタイプが異なるチャレンジウイルスによる慢性感染の制御に働く細胞として IL-15 反応性 CD8+T 細胞、NK 細胞の役割が示唆された。

## F. 健康危険情報

特に該当する情報はなかった。

## G. 研究発表

### 論文発表

Pereira LE, Onlamoon N, Wang X, Wang R, Li J, Reimann KA, Villinger F, Pattanapanyasat K, Mori K, Ansari AA. Preliminary in vivo efficacy studies of a recombinant rhesus anti-alpha(4)beta(7) monoclonal antibody. Cell Immunol. 259,165-176, 2009

### 学会発表

1. K. Mori, C. Sugimoto, Teiichiro Shiino, Akinori Kimura, Masaaki Miyazawa, Vanessa Hirsch, Naoki Yamamoto, Yoshiyuki Nagai. Long-term control of heterologous challenge infection in rhesus macaques vaccinated with live attenuated deglycosylated SIV by CD8+ cells mediated response. 27th annual symposium on nonhuman primate models for AIDS. October, 2009, Boston, USA.
2. 糖鎖修飾による組織・細胞指向性はエイズウイルスの病原性・感染防御免疫誘導を決定する。森 一泰、杉本智恵、横田恭子、鈴木康夫、山本直樹、永井美之 日本ウイルス学会、2009年、東京
3. heterologous SIV 感染モデルによる多様性ウイルス感染を防御する宿主応答の解析 2 森 一泰、杉本智恵、渡辺哲、佐藤洋隆、成瀬妙子、椎野禎一郎、宮澤正顯、木村彰方、山本直樹、永井美之、日本エイズ学会、2009年、名古屋

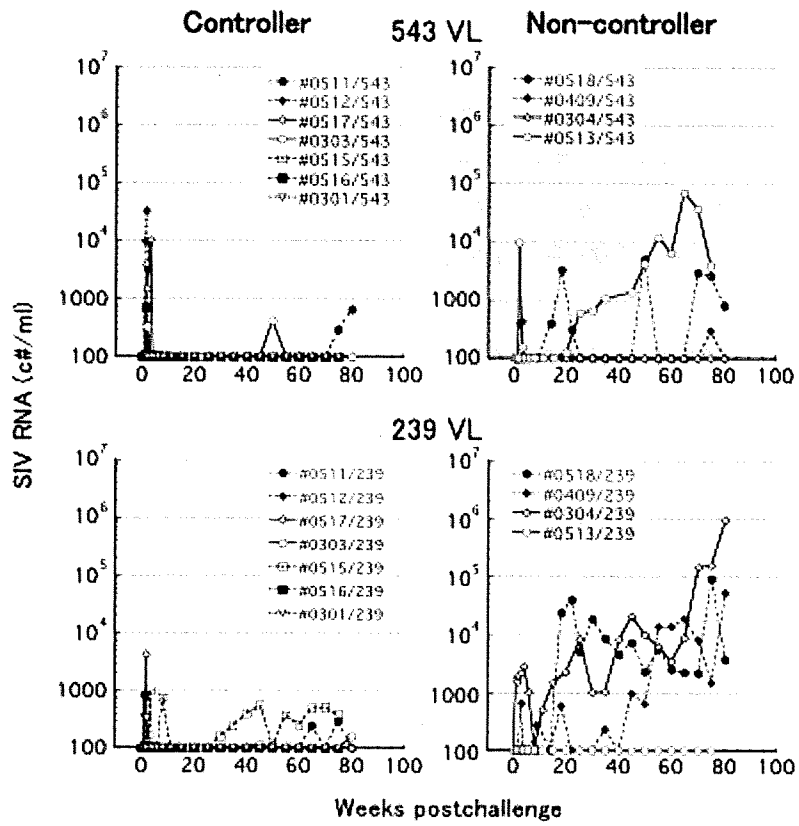
4. 長期感染における糖鎖欠失変異 SIV の病原性  
森 一泰、杉本智恵、佐藤洋隆、渡辺哲、山本直樹、永井美之、日本エイズ学会、2009 年、名古屋
5. SIVmac239 Env gp120 アスパラギン結合型糖鎖の宿主免疫応答に対する影響 松原明弘、高村史記、草川茂、武部豊、森 一泰、永井美之、保富康宏 日本エイズ学会、2009 年、名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

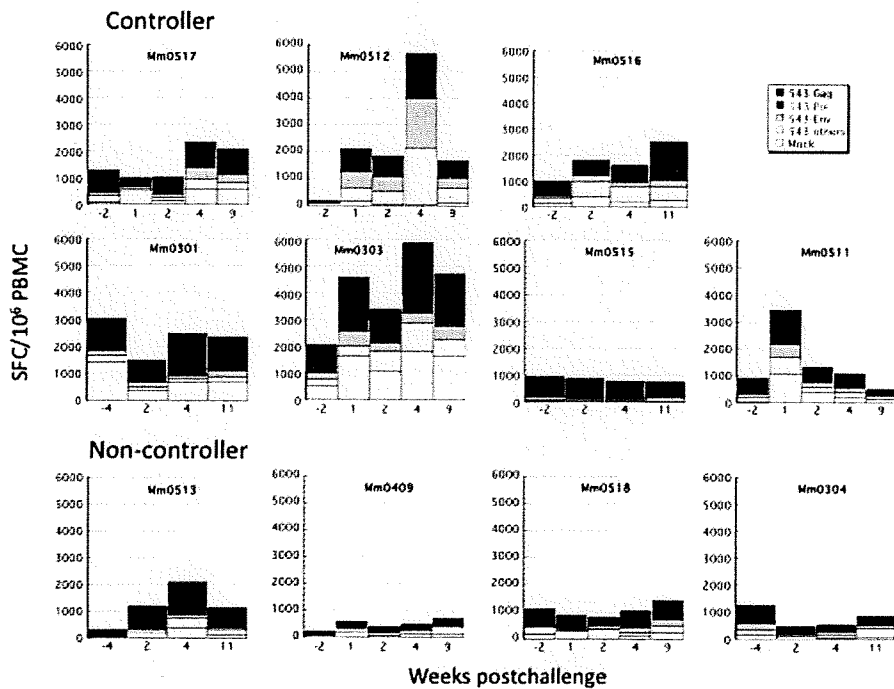
1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案特許 該当なし
3. その他 該当なし



**Figure 1** Viral loads in vaccinees

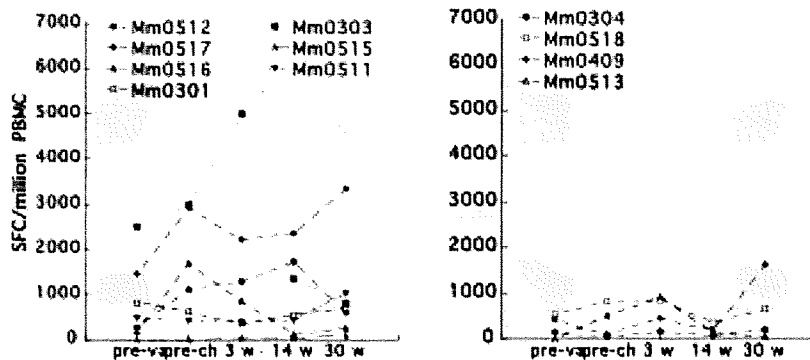


**Figure 2** IFN-gamma ELISPOT assay with SIVsmE543 peptides

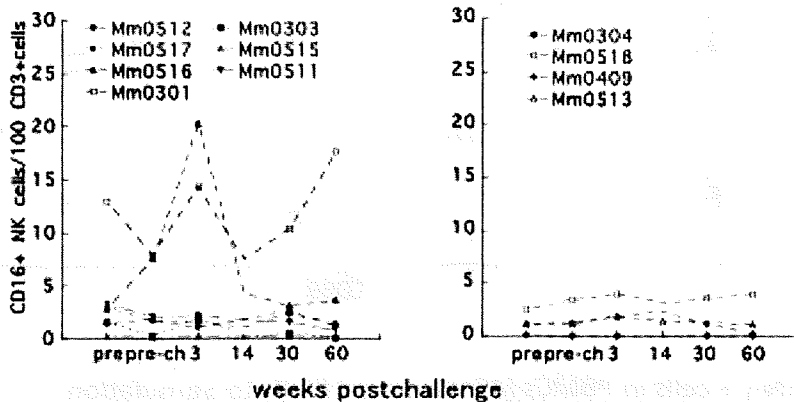


**3** Controller Non-controller

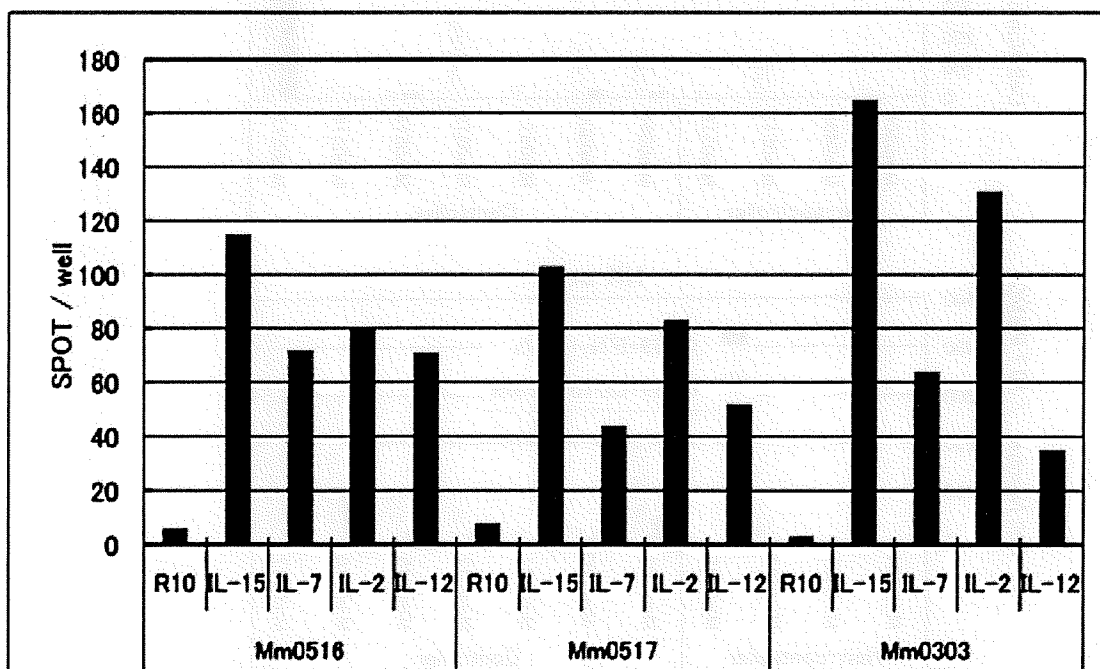
**IFN- $\gamma$ + cells in PBMCs by IL-15+ IL-7 stimulation**



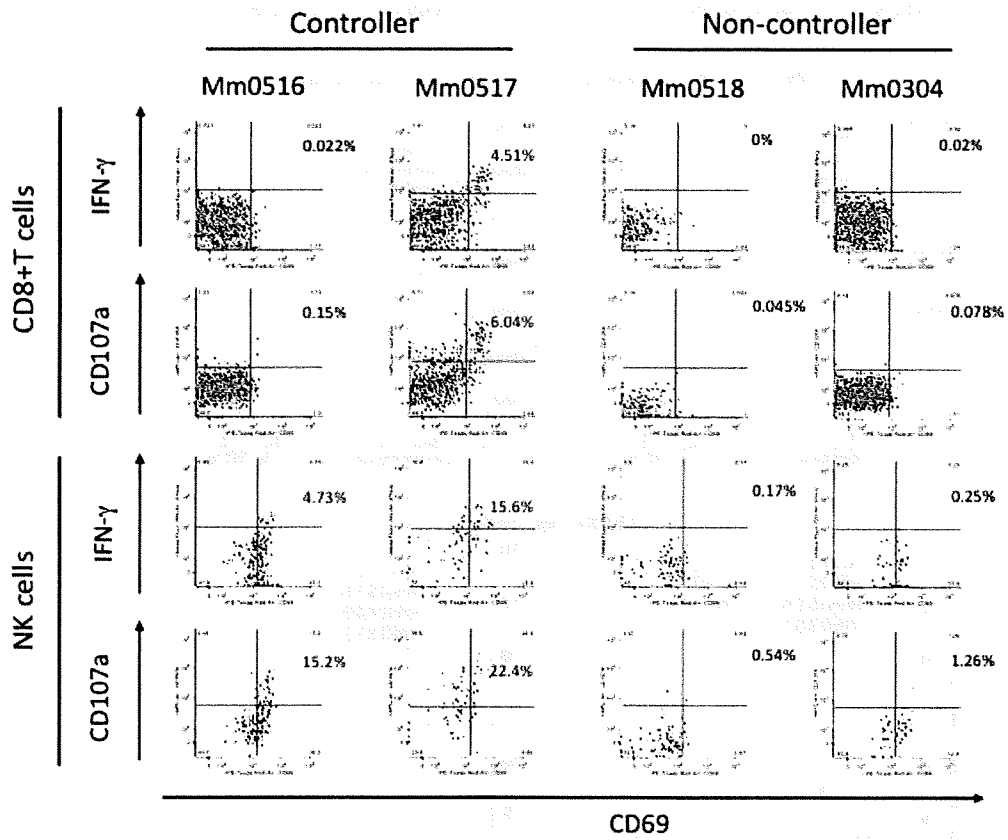
**CD16+ NK cells**



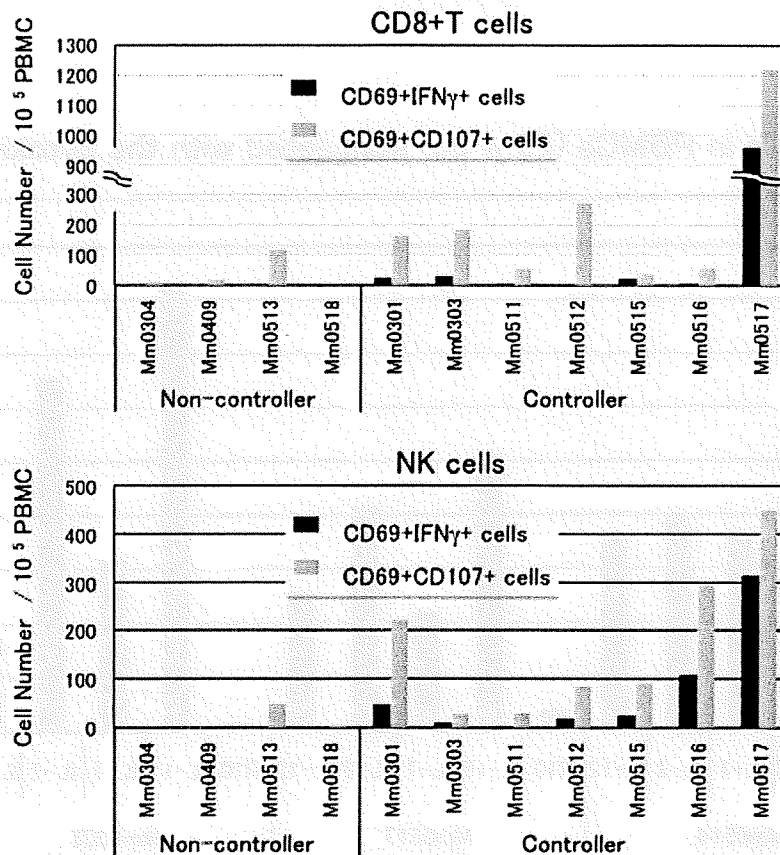
**4** IFN- $\gamma$ + cells in PBMCs (25 w pc) stimulated with the cytokines



5 ICS assay after IL-15 stimulation, 45 weeks pc



6 IFN- $\gamma$  + cells in PBMCs (45 weeks pc) by IL-15 Stimulation



厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

霊長類エイズモデルの粘膜部位における感染動態と免疫応答  
分担研究者 三浦 智行 京都大学ウイルス研究所 准教授

研究要旨 腸管親和性があり、ヒトのモデルにより近いと期待されるCCR5指向性SHIVを新規に作製し、アカゲザルに順化させることに成功した。

#### 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、我々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