

近年、HIV-1 の env 遺伝子により決定される共受容体指向性、CCR5 (R5) 指向性や CXCR4 (X4) 指向性、によって感染個体における標的細胞や病態が大きく異なることが明らかになった。そして、これまで X4 指向性 SHIV を用いた研究が多くなされてきたが、HIV-1 の感染伝播と感染後の病原性に深く関与しているのは R5 指向性であると考えられるようになった。そこで我々は、アカゲザルに安定的に感染する R5 指向性 SHIV を作製することによって、より有効なエイズ霊長類モデル系を確立することを試みた。

高病原性 X4 指向性 SHIV-KS661 の V3 領域に 5 箇所のアミノ酸変異を導入し、共受容体指向性を R5 型にしたウイルスを作製した。作製した変異体ウイルスは、試験管内でサル細胞で複製可能であり、R5 指向性を示すことが確認された。変異体ウイルスの個体内での複製能を確認するため、アカゲザルに静脈内接種し、経時的に採血と小腸生検を行った。感染サルの血漿中のウイルス RNA 量をリアルタイム PCR 法で定量し、フローサイトメトリーを用いて血中と小腸におけるリンパ球サブセットの解析をおこなった。

その結果、変異ウイルスを接種した 2 頭においてウイルス複製が確認された。2 頭中 1 頭のサルで感染 8 週までに血中のウイルス RNA 量が検出限界以下まで減少したが、別の 1 頭のサルでは 12 週以降も 10 の 3 乗～4 乗 copies/ml 程度のウイルス RNA 量が維持された。CD4 陽性 T 細胞の減少は、R5 指向性ウイルスの標的細胞であるメモリー T 細胞の割合が大きい小腸において顕著にみられたが、メモリー T 細胞の割合が小さい末梢血において顕著な減少は見られなかった。また、時間の経過と共に CD4 陽性 T 細胞数の回復が見られた。そこで変異体ウイルスを接種した 2 頭のサルのうち、一定の血中ウイルス RNA 量を維持していたサルから感染 25 週目の血液とソケイリンパ節を採取した。ソケイリンパ節から細胞浮遊液を調製し、血液と共に非感染サルに静脈内接種することで動物継代によるウイルスの馴化を行った。その結果、三代目のサルにおいて一代目、二代目と比較して 10 倍程度の高い血中ウイルス RNA 量のピークと持続的なウイルス複製が認められた。この継代三代目のサルの血液と小腸において CD4 陽性 T 細胞の変動を確認したところ、著しい CD4 陽性 T 細胞の減少が確認されたことから、ウイルス分離を行い、得られたウイルスストックを SHIV-MK38 と名づ

けた。この SHIV-MK38 は継代前のウイルスよりも試験管内で高い複製能を示し、R5 指向性を維持していた。そこで新たに 3 頭のサルに SHIV-MK38 を静脈内接種したところ、継代前のウイルスとは異なり、接種した全てのサルにおいて安定して持続的なウイルス血症を示した。また、接種した三頭のうち一頭では 10 の 6 乗 copies/ml の高い血中ウイルス量を維持した。SHIV-MK38 の血液、および小腸において CD4 陽性 T 細胞の変動を解析したところ、継代前のウイルスを接種したサルとは異なり、CD4 陽性 T 細胞は回復せず、血液、および小腸において CD4 陽性 T 細胞の減少は持続した。また、血中のメモリー CD4 陽性 T 細胞が選択的に減少していることが確認できた。

以上から、アカゲザルに安定して感染し、複製する R5 指向性 SHIV-MK38 株を樹立できた。

D. 考察

同一の遺伝的バックボーンを持つ CXCR4 指向性 SHIV と CCR5 指向性 SHIV が得られた。これらのウイルスが引き起こす病態の違いをアカゲザル感染実験により解析することで、セカンドレセプター指向性と感染個体における病原性の関係を明らかにできるものと期待される。特に CCR5 指向性 SHIV は HIV-1 の病態をより忠実にサルで再現すると考えられ、候補ワクチン評価に有用なモデルとなると期待される。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) 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.

(2) 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., 68: 410-414, 2010.

(3) 武久盾, 三浦智行: HIV の起源と進化, 日本臨牀, 68: 410-414, 2010.

(4) Suzuki, T., Yamamoto, N., Nonaka, M., Hashimoto, Y., Matsuda, G., Takeshima, S. N., Matsuyama, M., Igarashi, T., Miura, T., Tanaka, R., Kato, S., and Aida, Y.: Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nuclear import via Vpr-Importin alpha interactions as a novel HIV-1 therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 380: 838-843, 2009.

(5) Iwami, S., Nakaoka, S., Takeuchi, Y., Miura, Y., and Miura, T.: Immune impairment thresholds in HIV infection. *Immunol. Lett.*, 123: 149-154, 2009.

(6) Iwami, S., Miura, T., Nakaoka, S., Takeuchi, Y.: Immune impairment in HIV infection: Existence of risky and immunodeficiency thresholds. *J. Theor. Biol.*, 260: 490-501, 2009.

2. 学会発表

(1) 三浦智行: 霊長類エイズモデル研究の新展開, 第19回日本数理生物学会年会, 2009年9月9-11日, 東京

(2) 岩見真吾, 三浦智行, 竹内康博: AIDS ワクチン開発への理論的介入 -SHIV 感染実験と数理モデル-, 第19回日本数理生物学会年会, 2009年9月9-11日, 東京

(3) 岩見真吾, 三浦智行, 竹内康博: 実験データによる SHIV 感染力推定理論の開発, 第19回日本数理生物学会年会, 2009年9月9-11日, 東京

(4) 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

(5) 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

(6) 高原悠佑, 武内寛明, 石井洋, 高橋尚史, 三浦

智行, 五十嵐樹彦, 俣野哲朗: ビルマ産アカゲザル SIV 感染により誘導される CTL エピトープの探索, 第57回日本ウイルス学会学術集会, 2009年10月25-27日, 東京

(7) 間陽子, 石井英樹, 萩原恭二, 鈴木辰徳, 北原玄太, 橋本祥江, 野中瑞穂, 松田剛, 武田英里, 薛光愛, 山本典生, 三浦智行, 鈴木正昭: ヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)Vprの新規核移行機序を標的とする創薬開発, 第57回日本ウイルス学会学術集会, 2009年10月25-27日, 東京

(8) 石井英樹, 鈴木辰徳, 松田剛, 武田英里, 三浦智行, 間陽子, 鈴木正昭: ヒト免疫不全にウイルス1型(HIV-1)アクセサリータンパク質 Vpr 検出用試薬の開発, 第57回日本ウイルス学会学術集会, 2009年10月25-27日, 東京

(9) 岩見慎吾, 佐々木頭, 三浦智行: 変異株の固定確立-確率過程によるモデリング-, 第23回日本エイズ学会学術集会, 2009年11月26-28日, 名古屋

(10) Iwami, S., Miura, T., Takeuchi, Y.: Experimental and theoretical perspective of SHIV pathogenesis. The Second International Conference on Infectious Disease Dynamics, Athens, Greece, Dec. 2-4, 2009.

G. 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

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

サルエイズモデルにおける粘膜免疫に関する研究

研究分担者 守屋 智草 東京大学医科学研究所特任研究員

研究要旨

呼吸器ウイルスであるセンダイウイルスを基盤とする抗原特異的細胞障害性Tリンパ球（CTL）誘導型エイズワクチンは、ヒト免疫不全ウイルス（HIV-1）の自然感染での感染経路である粘膜局所での免疫誘導の可能性を有するためその効果が期待されているが、これまでに霊長類への接種により、どの程度の質と規模で、ワクチン抗原特異的な免疫誘導が粘膜局所で誘導されるかの詳細な検討はなされていない。本研究では、HIV-1感染時にどのような粘膜免疫反応がどの程度ウイルス感染抑制に寄与するのかをサルエイズモデルを用いて解析することを目的とし、その第一段階として、これまでの当該ワクチンのプロトコールで使用してきた経鼻投与によるカニクイサルでの検討において、その免疫誘導効率を筋肉内接種の場合と比較し、さらに粘膜周辺のリンパ節内の抗原特異的免疫誘導を検討することにより、粘膜近傍での抗原特異的免疫反応を検討した。全てのサルで抗原特異的またはベクター特異的な免疫誘導が確認され、センダイウイルスベクターの接種による粘膜免疫誘導の可能性が示唆され、さらに当該ワクチンの筋肉内投与の選択の可能性も示唆された。

A. 研究目的

HIV-1感染における粘膜免疫反応、特に粘膜における抗原特異的Tリンパ球反応の解析は技術的な遅れもあり研究が進んでいないのが現状である。しかしながら主たる感染経路が粘膜であるHIV-1感染において、ウイルス特異的粘膜免疫反応の誘導がその感染防御に有効である可能性があることが予想される上、感染初期の腸管周囲のメモリーT細胞への大規模の感染による腸管免疫系の破綻がエイズの進行へ寄与することが指摘されている等、研究の発展が極めて望まれるところである。本研究ではHIV-1感染時にどのような粘膜免疫反応がどの程度ウイルス感染抑制に寄与するのかをサルエイズモデルを用いて解析することを目的とした。所属研究室はこれまでにSIV Gag発現非伝播型センダイウイルス（SeV-Gag）ベクターのエイズワクチンへの応用を目的とした検討を行ってきたが、野生型SeVの自然宿主であるマウスでの自然感染経路が経鼻であることにより、経鼻投与をワクチン接種経路として使用してきた。SeV感染により

粘膜免疫が誘導されることは既知であるが、霊長類において、非伝播型SeV-Gagにより誘導される粘膜局所での抗原特異的免疫反応の質と規模がいかなるものであるかを詳細に検討することは、より有効なエイズワクチン開発のために極めて肝要である。

このような背景から、平成21年度は、SIV Gag発現センダイウイルス（SeV-Gag）ベクターの経鼻接種により誘導される粘膜免疫反応の第一段階の解析として、カニクイサルにSeV-Gag経鼻接種後、鼻腔粘膜周辺の顎下リンパ節、さらには扁桃を採取、リンパ球を分離して、Gag特異的インターフェロン（IFN）- γ 誘導を細胞内免疫染色により検出することにより抗原特異的Tリンパ球レベルを検討した。接種は2回行い、1回目の接種を筋注経路で行うことにより経鼻接種との比較を行った。2回目を双方の経路それぞれで行い、最終的に粘膜周辺リンパ節内に誘導された免疫のレベルを比較することにより、経鼻経路による粘膜免疫誘導を検討した。

B. 研究方法

カニクイサル6頭にDNAワクチン接種後、2回のSeV-Gag接種によるブーストを行った。接種は従来の接種量の1/10量で行った。この低減した量の接種によりサル末梢血中で、従来量の接種による場合とほぼ同レベルでのGag特異的CTLの誘導が得られることは既に過去の検討で確認されている。

1回目は2群とも筋注、2回目を筋注または経鼻経路で接種した。1週と2週後に末梢血中のGag特異的CTL反応を細胞内IFN- γ 染色により検出した。第2回接種の2週後に安楽殺を行い、顎下リンパ節、扁桃、腸管粘膜組織リンパ節を採取し、SIV GagおよびSeV特異的リンパ球反応を細胞内IFN- γ 染色で検討した。また2回目のブーストの効果に対する、1回目の接種により誘導された抗SeV抗体の影響を検討するために、血漿中のSeV中和抗体の活性をGFP発現センダイウイルスの感染抑制効果をLLCMK2細胞で検討する事により測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験については、所属機関において動物実験委員会の承認を得ている。遺伝子組換え生物等を用いる実験については、必要に応じて所属機関の承認および文部科学大臣の承認を得ている。

C. 研究結果

1回目の筋注後の末梢血のSIV Gag特異的リンパ球反応のレベルは、これまで当研究室で行ってきた経鼻接種による検討で誘導されたレベルとほぼ同等であった(図1)。2回目の接種経路を筋注または経鼻により行ったところ、両群のブースト効果の顕著な差は認められなかった(図2)。安楽死時の顎下リンパ節、扁桃、腸管粘膜組織リンパ節内にSIV Gag特異的リンパ球反応が検出され(図3)、またSeV特異的な反応も同様に検出された(図4)。

2回目のブースト時の血漿中のSeV中和抗体の活性は、25倍から200倍であったが、接種後のSIV GagまたはSeV特異的リンパ球反応のレベルとの相関は見られなかった。

D. 考察

筋肉内接種により経鼻接種と同レベルのGag特異的免疫反応誘導が末梢血で見られたこと、また2回の接種後に粘膜周辺のリンパ節組織内にGag特異的リンパ球の誘導が確認できたことにより、当該プロトコールは筋注により行うことも可能であることと、また当該プロトコールによる

粘膜免疫反応誘導の可能性が示唆された。今後、経鼻投与による局所での免疫誘導の直接的な検討、すなわち腸管組織内のリンパ球での同様の検討や、鼻腔粘膜の抗原特異的IgA誘導の検討等を行うことが必要である。

ウイルスベクターを基盤とするワクチンの使用に於いては、ウイルスベクターに対する宿主の免疫応答の、2回目以降の接種によるワクチン効果への修飾について留意する必要がある。今回の検討では1回目の接種で誘導された抗ベクター抗体の影響は確認できなかったが、末梢血抗ベクター中和抗体価が200倍以上で末梢血血漿中の抗原特異的CTL誘導に影響が認められる結果も他の検討で得ており、接種量を増大させたり、接種回数を増やす等、中和抗体価が200倍以上での検討が肝要である。また粘膜局所での抗ベクター抗体の質および量の分布の詳細は未知であり、検討が必要である。さらにセンダイウイルスはマウスを自然宿主とするが、類縁のウイルスであるヒト1型パラインフルエンザウイルスに対する抗体のヒト集団での保有率、抗体のレベルを掌握し、本研究の結果とあわせて、当該ワクチンの効果を検討することが極めて重要であると考えられた。

E. 結論

SeV-Gagベクターワクチン経鼻接種後、顎下リンパ節および扁桃中に、Gag特異的Tリンパ球反応を確認することができ、粘膜免疫反応誘導の可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

(1) Chikaya M, Kyoko K, Takeo K, Yusuke T, Makoto I, Tsugumine S, Mamoru H, and Tetsuro M. Immunogenicity of a Sendai virus vector vaccine expressing SIV Gag in the presence of anti-vector antibodies. 27th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Boston, USA, Oct 29, 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、2009年10月26日

(3) 守屋智草、栗原京子、鎌田健男、井上誠、朱亜峰、長谷川護、俣野哲朗 抗ベクター抗体存在下におけるセンダイウイルスベクターエイズワクチンのCTL誘導効率の解析 第13回日本ワクチン学会、札幌、2009年9月27日

(4) Chikaya M, Kyoko K, Takeo K, Yusuke T, Makoto I, Tsugumine S,

Mamoru H, and Tetsuro M. Immunogenicity of intranasal and intramuscular immunization with a Sendai virus vector. The 9th Awaji international Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, Sep 10, 2009

無し
 2. 実用新案登録
 無し
 3. その他
 無し

G. 知的財産権の出願・登録状況
 (予定を含む。)

1. 特許取得

図1 筋注1回接種後のPBMC中のGag特異的CTL

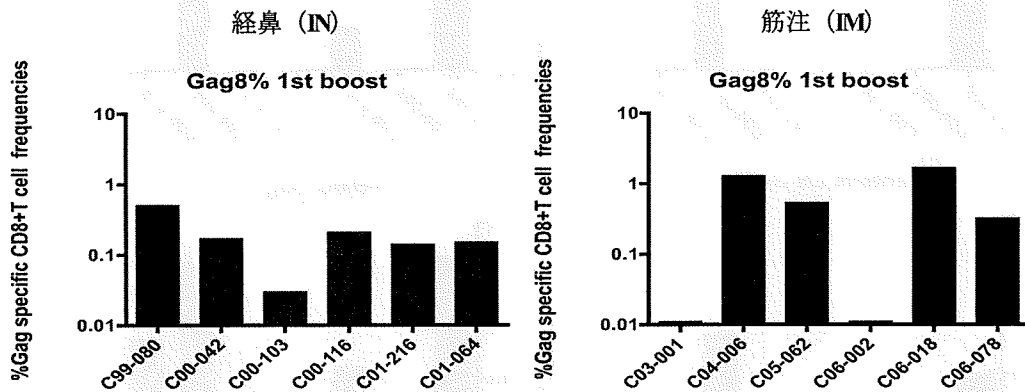
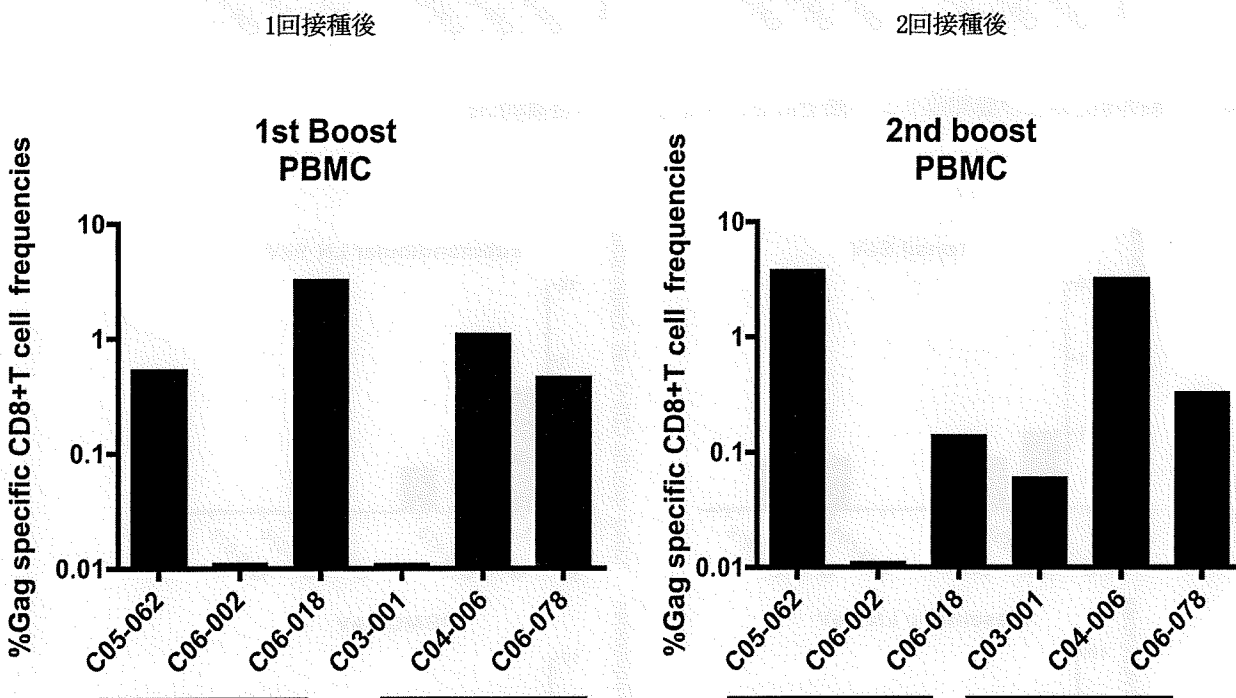


図2 筋注接種後のPBMC中のGag特異的CTL



実験群

1

2

1

2

Group	n	Pre-SeV Week -15	DNA prime Week -6	1st boost Week 0	2nd boost Week 9
1	3	none	IM	IM	IN
2	3	none	IM	IM	IM

図3 鼻腔周辺および腸間膜リンパ節でのGag特異的CTL

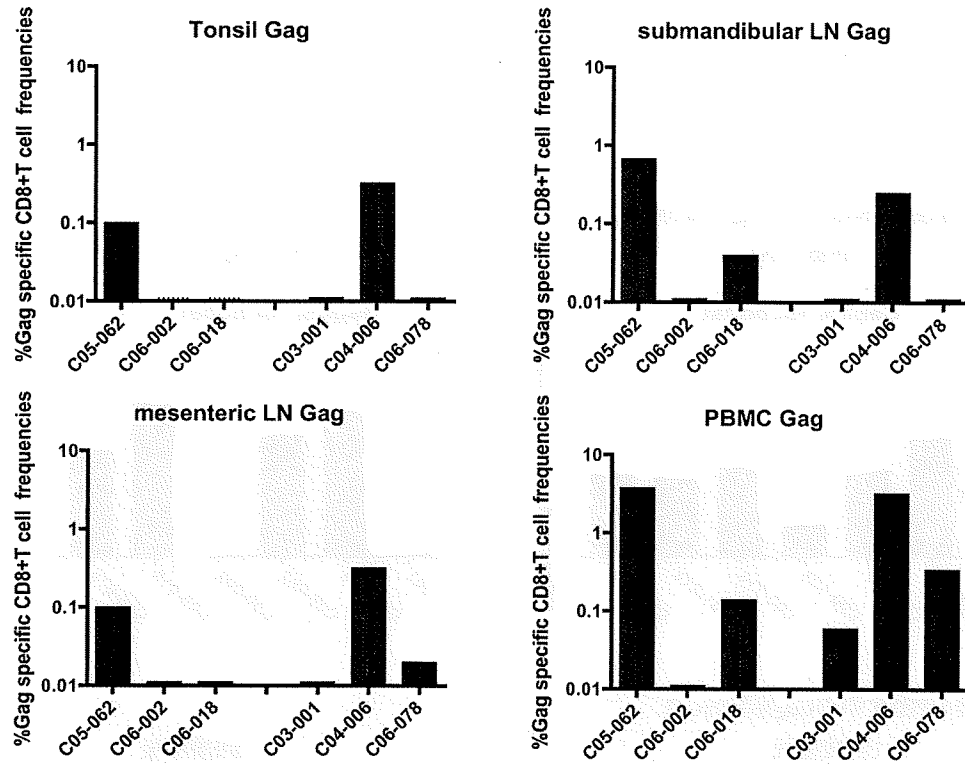
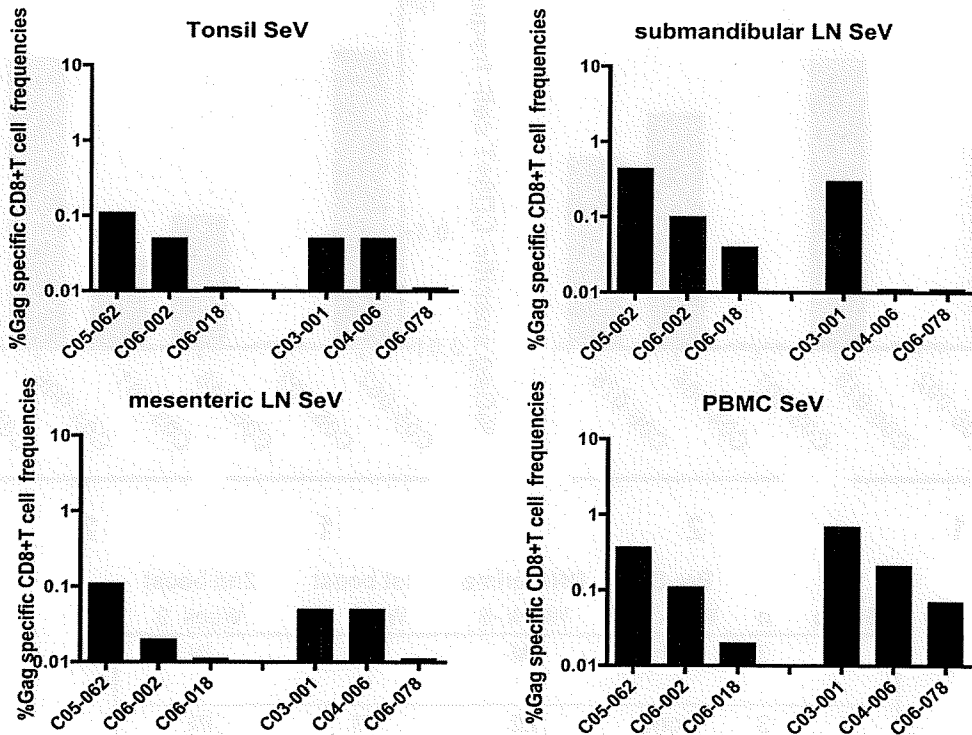


図4 鼻腔周辺および腸間膜リンパ節でのセンダイウイルス特異的CTL



厚生労働省科学研究補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

サルエイズモデルを用いたアジュバント遺伝子組み込みエイズウイルスの
ワクチン効果に関する研究

研究分担者 保富康宏 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター センター長
研究協力者 岡村智崇 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター 研究員

研究要旨

エイズウイルス感染症における生体の免疫系への認識に関する研究は病態の解明やワクチン開発において重要となる。本研究では、宿主免疫系の認識機構の解明と新規ワクチンの開発を目的としてアジュバントとして有効であると報告された抗酸菌分泌抗原 Ag85B を組み込んだ高度弱毒サル/ヒトエイズウイルス (SHIV-Ag85B) を作製した。構築した SHIV-Ag85B は、*in vitro* においてヒトリンパ球系細胞株に感染させたところ、ウイルス構造タンパク (Gag, Env) および Ag85B の発現が確認された。また SHIV-Ag85B のウイルス複製能について、親株である SHIV-NI と比較検討したところ、同程度の増殖能を示した。さらに、組み込んだ Ag85B 遺伝子は、10 回のウイルス継代を行ってもウイルス内に保存されており、また Ag85B タンパクの発現も認められた。これらの結果から、SHIV-Ag85B は安定して Ag85B を発現するウイルスであることが確認された。

A. 研究目的

弱毒生ワクチンは、ウイルス感染症に対して防御免疫を誘導し、特に細胞性免疫の誘導に優れている。エイズワクチンにおいても、エイズ発症に関連するとされている nef 遺伝子等を欠損した遺伝子欠損エイズ弱毒生ワクチンが作製され、サルエイズモデルを用いて、その効果を検討されてきた。しかしながら、弱毒化のための遺伝子欠損は、ウイルス複製能を低下させ安全性を高めるものの、それに伴い免疫誘導能を低下することが明らかになった。

ワクチンの免疫応答を、より効果的にする手法として、種々のアジュバントが使用されている。しかしながら現在までのアジュバントは不活化（死菌）等で使用され、生ワクチンで用いられるものの報告はない。

我々は現在まで、非定型抗酸菌群 (*M. kansasii*) 由来の Ag85B についてワクチンアジュバントとしての可能性を検討してきた。Ag85B タンパクはアジュバントとしてワクチン抗原特異的な細胞性免疫の増強を誘導し、新規アジュバントの可能性が示唆されていた。

本研究では、nef 遺伝子欠損高度弱毒サル/ヒトエイズウイルス (SHIV-NI) の欠損部位に Ag85B 遺伝子を組み込んだ、高度弱毒エイズウイルス (SHIV-Ag85B) 作製し、サルエイズモデルを用いて、防御免疫機構の解明を目的とする。

本研究では、nef 遺伝子欠損高度弱毒サル/ヒトエイズウイルス (SHIV-NI) の欠損部位に Ag85B 遺伝子を組み込んだ、高度弱毒エイズウイルス (SHIV-Ag85B) 作製し、サルエイズモデルを用いて、防御免疫機構の解明を目的とする。

B. 研究方法

1. SHIV-Ag85B ウイルス構築

外来遺伝子挿入用の nef 遺伝子欠損 SHIV プラスミドベクターにアジュバント Ag85B 遺伝子を挿入し SHIV-Ag85B プラスミドベクターを構築した。構築したプラスミドベクターを霊長類由来培養細胞株にトランスフェクトし、培養上清中に産生された SHIV-Ag85B ウイルスの回収を行った (図 1)。回収したウイルスは、ウイルスの構造

タンパク(Gag、Env)および遺伝子挿入した Ag85B の発現を解析するため Gag(抗マウス p27 抗体)、Env (抗ヤギ gp120 抗体)、ウサギ Ag85B 抗体をそれぞれ用いて、Western Blotting を行った。

2. SHIV-Ag85B ウイルス複製能

構築した SHIV-Ag85B を 100TCID₅₀ で、ヒトリンパ球培養細胞株に感染させた。3 日おきに培養上清を回収し、回収した培養上清を用いて p27 Antigen ELISA 法を行った。

3. SHIV-Ag85B 遺伝子の安定性

ヒトリンパ球培養細胞株を用いて、SHIV-Ag85B のウイルス継代を 10 代まで行った。継代ごとに培養上清を回収し、ウイルス RNA の抽出後、RT-PCR 法で Ag85B 遺伝子の保存状況を検討した。またタンパクレベルでの Ag85B の発現については、継代ごとに感染細胞を回収し Western Blotting 法を行った。

4. 倫理面への配慮

本研究は、培養細胞のみを使用する基礎研究でありヒトサンプル、情報等は一切用いていない。

C. 研究結果

1. SHIV-Ag85B ウイルス構築

作製したプラスミドベクターを霊長類由来株化細胞にトランスフェクトし、SHIV-Ag85B ウイルスの回収を行った。回収したウイルスは、抗マウス p27 抗体、抗ヤギ gp120 抗体、抗ウサギ Ag85B 抗体をそれぞれ用いて、Western Blotting を行ったところ Gag、Env、Ag85B タンパクの発現をそれぞれ確認した (図 2)。

2. SHIV-Ag85B ウイルス複製能

構築した SHIV-Ag85B のウイルス複製能を親株 SHIV-NI と比較検討したところ、ほぼ同じ複製能を有していることが明らかになった (図 3)。

3. SHIV-Ag85B の挿入遺伝子の安定性

SHIV-Ag85B のウイルス継代を 10 代まで継代し、挿入した遺伝子の保存状況を RT-PCR 法で検討したところ、Ag85B 遺伝子の保存が確認された (図 4)。また Ag85B タンパクの発現についても、Western Blotting で検討したところ、タンパクの発現が認められた (図 5)。

D. 考察

アジュバント遺伝子を組込んだ高度弱毒エイズウイルスは、ウイルス複製に伴ってアジュバントを発現する。このウイルスはウイルス感染部位でアジュバント分子を発現するため、より効果的に抗原特異的な免疫応答を誘導させることが可能である。

本研究では、エイズウイルスに対する宿主の免疫誘導能を高めることを目的に、Ag85B アジュバントを結合したエイズ弱毒生ウイルスを作製し、エイズサルモデルにおいて誘導される免疫応答を解析することを目的とした。構築されたウイルスを *in vitro* での解析を行ったところ、構築したウイルスの複製能は、親株 SHIV-NI と同じであり、またウイルス Stock やウイルス Titer (SHIV-NI ; 10⁶TCID₅₀, SHIV-Ag85B ; 5×10⁵TCID₅₀) についても親株と同程度であることが認められた。ワクチンの安定性についても、10 代まで継代したウイルス内に Ag85B 遺伝子が保存され、さらにタンパクレベルでの発現が確認された。これらの結果から、構築したウイルスは、極めて安定な弱毒ウイルスであり、生ワクチンになりうる可能性が示唆された。

今後は、カニクイザルを用いた動物接種試験を行い、誘導される細胞性免疫および液性免疫について詳細に解析し、さらに強毒株の攻撃接種を行う。

E. 結論

抗酸菌分泌タンパク Ag85B を発現する SHIV を構築した。

F.健康危険情報
なし

G.研究発表

1. 論文発表

1. Mori, H., Yamanaka, K., Matsuo, K., Yasutomi, Y. And Mizutani, H. Administration of Ag85B showed therapeutic effects to Th2-type cytokine-mediated acute phase atopic dermatitis by inducing regulatory T cells. *Arch Dermatol. Res.* 2009 ; 301 ; 151-157.
2. Okabayashi, S., Ohno, C. and Yasutomi, Y. Acute megakaryocytic leukemia (AMKL)-like disease in a Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *J. Comp. Pathol.* 2009 ; 140 ; 212-216.
3. Morioka, T., Yamanaka, K., Mori, H., Omoto, Y., Tokime, K., Kakeda, M., Kurokawa, I., Gabazza, E., Tsubura A., Yasutomi, Y. and Mizutani, H. IL-4/IL-13 antagonist DNA vaccination successfully suppresses Th2 type chronic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* 2009 ; 160 ; 1172-1179.
4. Takano, J. I., Tachibana, H., Kato, M., Narita, T., Yanagi, T., Yasutomi, Y. and Fujimoto, K. DNA characterization of simian *Entamoeba histolytica*-like strains to differentiate them from *Entamoeba histolytica*. *Parasitol. Res.* 2009 ; 105 ; 929-937.
5. Yasuhiro Yasutomi. Establishment of specific pathogen-free macaque colonies in Tsukuba Primate Research Center of Japan for AIDS research. *Vaccine* 2009 *in press*
6. Fujimoto, K., Takano, J., Narita, T., Hanari, K., Shimozawa, N., Sankai, T., Yoshida T., Terao, K., Kurata, T. and Yasutomi, Y. Simian Retrovirus type D infection in a colony of cynomolgus

monkeys. *Comp. Med.* 2009 *in press*

7. Cueno, M. E., Karamatsu, K., Yasutomi, Y., Laurena, A. C. and Okamoto, T. Preferential expression and immunogenicity of HIV-1 Tat fusion protein expressed in tomato plant. *Transgenic Res.* 2010 *in press*

2. 学会発表

「国内」

- 1) 岡林佐知、大野智恵子、保富康宏：実験用カニクイザルに認められた急性巨核芽球形白血病(AMKL)の一例 第 147 回日本獣医病理学会、栃木、2009 年 4 月 2 日～4 日
- 2) 岡林佐知、小野文子、羽成光二、大野智恵子、加藤美代子、保富康宏：実験用カニクイザルに見られた下垂体腫瘍の一例 第 56 回日本実験動物学会総会、埼玉県、2009 年 5 月 14 日
- 3) 松原明弘、高村史記、加藤翔太、保富康宏：SIVmac239 Env gp120 アスパラギン(N)結合型糖鎖の宿主免疫応答に対する影響 第 57 回日本ウイルス学会、東京、2009 年 10 月 25 日～27 日
- 4) 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：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 第 23 回日本エイズ学会、名古屋、2009 年 11 月 26 日～28 日
- 5) Yusuke TSUJIMURA, Yasuhiro YASUTOMI: Administration of Ag85B showed therapeutic effects to allergic asthma by inducing Th1 response and Interleukin-17 第 38 回日本免疫学会、大阪、2009 年 12 月 1 日～3 日

「国際」

- 1) Nienke E. van Houten, Yasuhiro Yasutomi, and Masahiro Niikura : Protective Mucosal Immunity against a Model Viral Enteric Infection by a Generic Chimeric Hepatitis E Virus-like Particle Vaccine System. The

American Society for Virology 28th Annual Meeting, Vancouver, 2009, July 11-15.

2) Yusuke TSUJIMURA, Yasuhiro YASUTOMI: Administration of Ag85B showed therapeutic effects to allergic asthma by inducing Th1 response and Interleukin-17.

9th International Conference on New trends in Immunosuppression & Immunotherapy
2010. February. 4-6.

H.知的財産の出願・登録状況

本年度新規は無し

Genetic structure

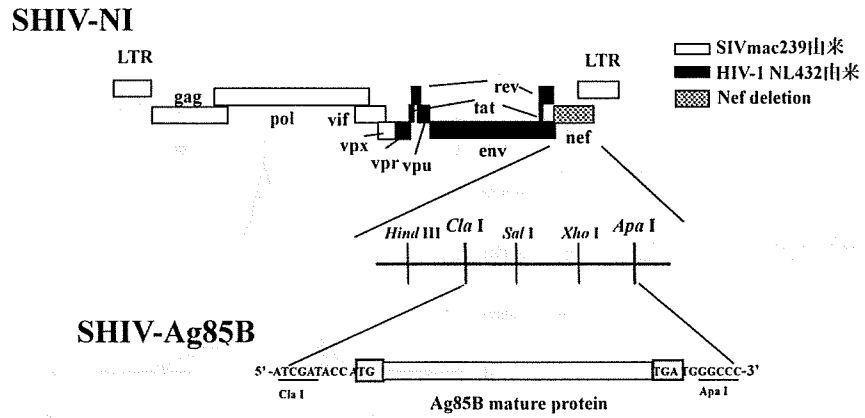


図1 SHIV-Ag85B

Expression of Structure Protein and Ag85B by Western Blotting

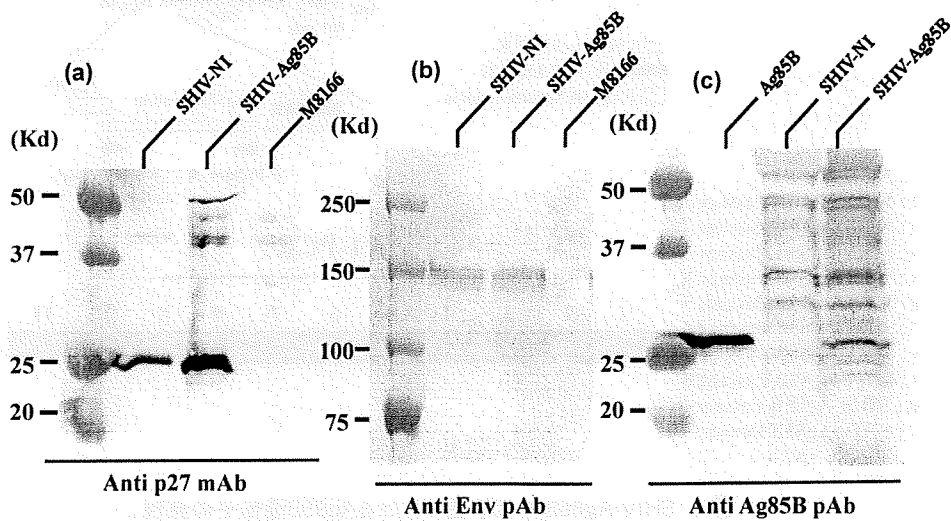


図2 SHIV-Ag85B感染細胞における(a) Gag、(b) Env、(c) Ag85Bタンパクの発現

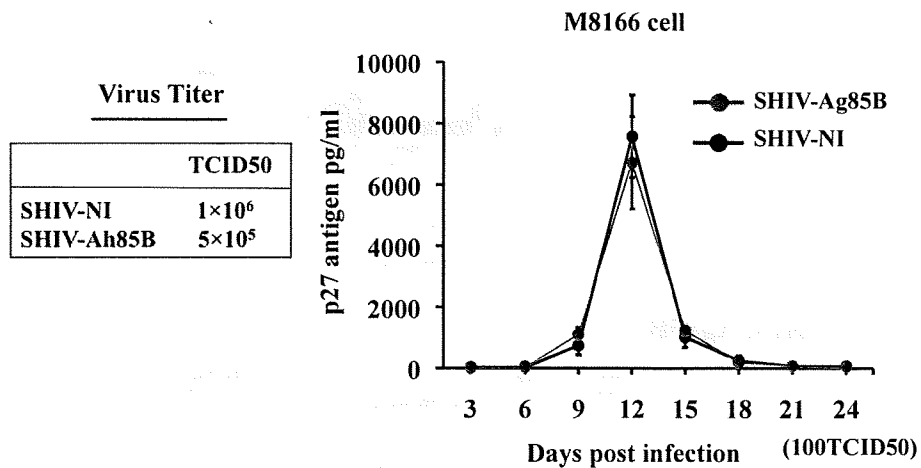


図3 SHIV-NIとSHIV-Ag85B in vitroにおける増殖性

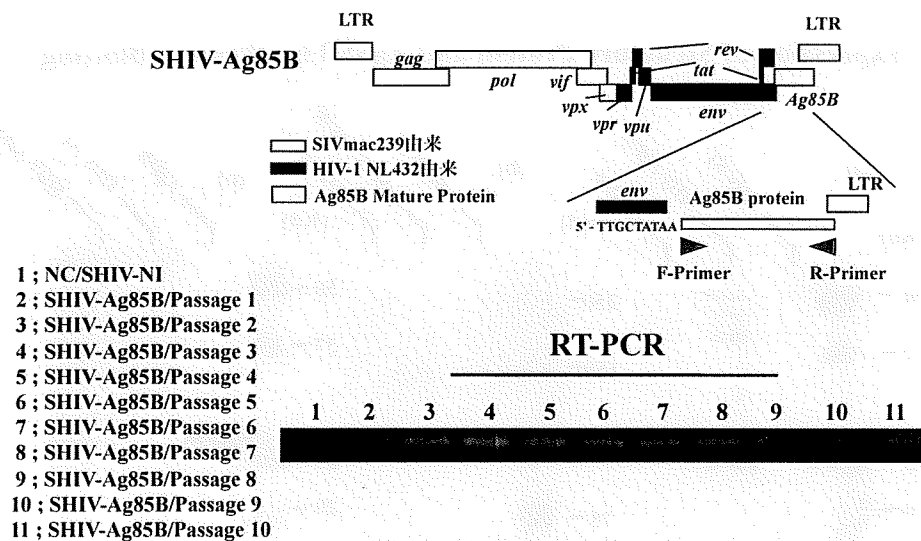


図4 SHIV-Ag85B継代培養におけるAg85B遺伝子の発現

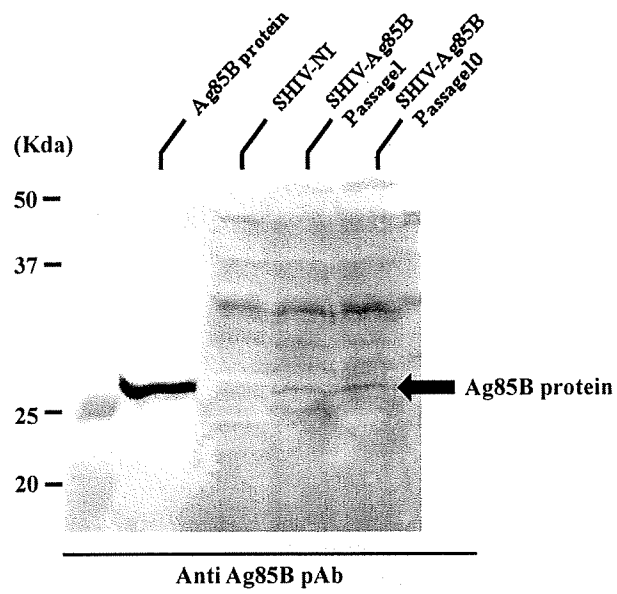


図5 SHIV-Ag85B継代培養におけるAg85Bタンパクの発現

粘膜免疫活性化による粘膜棲息型HIV制御法の開発：
NKT細胞を介した感染伝播の可能性

分担研究者 高橋 秀実 日本医科大学微生物学免疫学教室 教授

研究要旨

粘膜より体内に侵入した 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。近年粘膜感染に関わるウイルスの大部分が CCR5 を介して細胞内に感染する R5type であることが明らかとなってきた。ところが、従来より HIV-1 の標的と考えられてきた CD4 陽性 T 細胞には、この CCR5 の発現がほとんど認められず CXCR4 の発現が優位であることが判明した。粘膜組織内に棲息する一部の樹状細胞 (dendritic cells: DC)、あるいはその表面に発現している CD1d 分子を介して制御されている NKT 細胞の中にも CD4 分子を発現したのがあり、その表面には CXCR4 分子とともに CCR5 分子が強発現していることが明らかとなり、R5-type HIV-1 の感染伝播には、これら粘膜における自然免疫系をになう種特異的 CD1 分子群によって制御されている DC-NKT 細胞群の重要性が注目されるようになってきた。報告者らは、DC 上に発現した CD1d 分子拘束性の NKT 細胞に着目し、その亜群である CD4 陽性 NKT 細胞が HIV-1 に感染後も、比較的細胞数が保存され、その機能が温存されていることを見いだした。さらに、HIV-1 ウイルス粒子の存在下で末梢血リンパ球を NKT 細胞の認識抗原である α -GalCer で刺激培養した結果、選択的に最も感受性の高い R5-type の HIV-1 の存在下で CD4 陽性 NKT 細胞が優位に増殖することを見いだした。また、これら CD4 陽性 NKT 細胞の表面には CXCR4 よりも CCR5 の発現頻度が高く、これが R5-type HIV-1 の初期感染の増幅に関与している可能性、またこの CD4 陽性 NKT 細胞をごく少数混在させることによって、CD4 陽性 T 細胞へ X4-type HIV-1 の感染拡大が誘発されることを示した。以上、粘膜組織内の DC-NKT 細胞を主体とした CD1 分子に拘束された自然免疫システムが、HIV-1 の長期的な保護、ならびに感染拡大に強く関与することが判明した。

A. 研究目的

粘膜より体内に侵入した 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。こうした感染細胞としては、従来 CD4 陽性 T 細胞が主体であると想定されていたが、粘膜感染に関わるウイルスの大部分が CCR5 を介して細胞内に感染する R5type であることが明らかとなってきた。ところが、CD4 陽性 T 細胞には、CCR5 の発現がほとんど認められず CXCR4 の発現が優位であることが判明し、粘膜初期感染の実態を再考する必要が出てきた。

こうした中、粘膜組織内に棲息する一部の樹状細胞 (dendritic cells: DC)、あるいはその表面に発現している CD1d 分子を介して制御されている NKT 細胞の中にも CD4 分子を発現したのがあり、その表面には CXCR4 分子とともに CCR5 分子が強発現していることが判明した。このことは、これら CD4 陽性 DC ならびに NKT 細胞ともに HIV 感染の標的となることを示唆している。

また前者 CD4 陽性 DC の表面には、HIV-1 を捕捉し伝播する能力を有した DC-SIGN 分子も発現しており、図1に示すように、この DC 群が最初の HIV-1 の感染標的であり、保持細胞となるものと推測される。この侵入 HIV-1 を保持した DC は、恐らく粘膜組織内において、保持したウイルス粒子を、その配下にある自らが表出した個特異的な MHC ならびに種特異的な CD1 抗原提示分子群によって統御された T 細胞群へと伝播する。

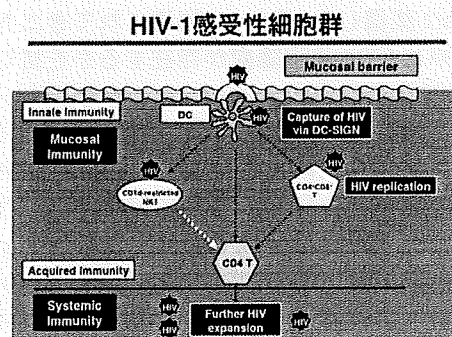


図1 HIV-1 感受性細胞群

この際注目すべきことは、NKT 細胞表面には元来 DC が放出するサイトカインである IL-12 のレセプターが発現していること、また DC 群と同様粘膜組織に比較的局在することから、従来の CD4 陽性 T 細胞よりも NKT 細胞は直接的な樹状細胞による制御を受けていることが推察される。

以上のことに則り、本研究は、CD4 陽性 NKT 細胞における HIV-1 感受性、ならびにその HIV-1 感染拡大に及ぼす影響について検討することを目的としたものである。

B. 研究方法

DC 上に発現した抗原提示分子である CD1d によって拘束された NKT 細胞は均一された T 細胞レセプター（不変鎖： invariant TCR）を発現しており、特に特異的糖脂質抗原である α -Galactosyl Ceramide (α -GalCer) を認識する T 細胞レセプターは全て V α 24V β 11 であることが判明している（図 2）。

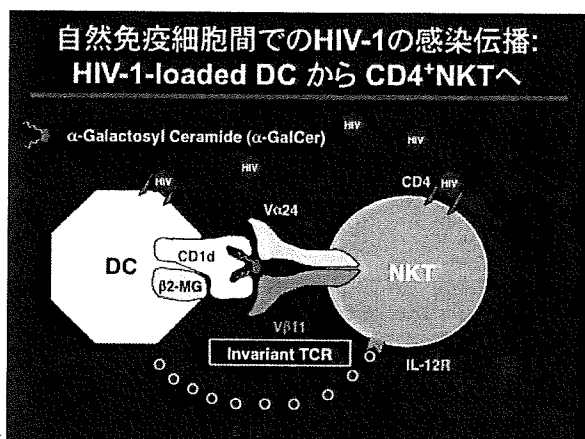


図 2 HIV-1 感受性 DC 及び NKT 細胞

そこで報告者らは、ヒト末梢血に α -GalCer を添加培養し、誘導されてくる細胞の中で抗 V α 24 抗体により検知される細胞を NKT 細胞であるとし、FACS-vintage を用いて V α 24 陽性 NKT 細胞を sort 集積した。そして、誘導されてきた NKT 細胞の中に CD4 陽性細胞が存在するかを抗 CD4、抗 CD8 抗体を用い Flow cytometry で追跡した。

また、HIV-1 に対する NKT 細胞の感受性を検討するため、X4-type の HIV-1 として NL432 株を、R5-type の株として NL(8AD) を用いて研究を進めた。また、HIV-1 に感染した細胞を p24 抗原陽性細胞数を指標として同定した。この際、コントロールの X4-type HIV-1 に対する CD4 陽性 T 細胞群を末梢血にスーパー抗原 (SEB) を添加することによって得た。また、HIV-1 に感染

した NKT 細胞の α -GalCer でマークした細胞群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、HIV-1 に感染した DC あるいは NKT 細胞が産生・放出したサイトカインを ELISA 法によって検出した。

C. 研究結果

1) まず、ヒト末梢血に α -GalCer を添加培養し、誘導されてくる細胞の中で抗 V α 24 抗体により検知される細胞を NKT 細胞であるとし、FACS-vintage を用いて V α 24 陽性 NKT 細胞を sort 集積した。そして、誘導されてきた NKT 細胞の中に CD4 陽性細胞が存在するかを抗 CD4、抗 CD8 抗体を用い Flow cytometry で追跡した（図 3）。

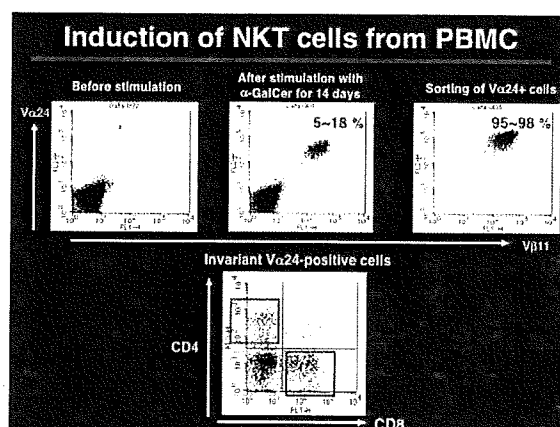


図 3 α -GalCer 特異的 NKT 細胞とその亜群

2) 次に、FACS-vintage で集積した CD4 陽性 NKT 細胞に HIV-1 を感染させた場合、その α -GalCer 特異的な細胞傷害活性の低下が認められるか否かを検討したところ、予想に反し HIV-1 感染 NKT 細胞の活性低下及び細胞数の減少は認められなかった（図 4）。

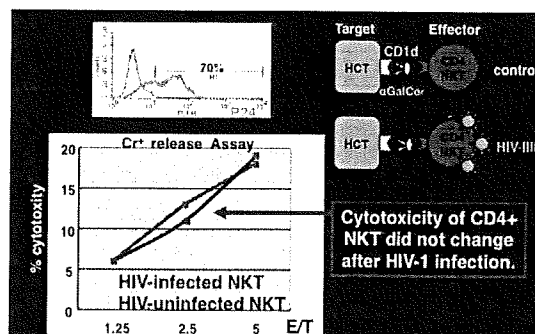


図 4 HIV-1 感染 CD4-NKT 細胞の細胞傷害活性

3) 以上より、HIV-1 感染により CD4 陽性 NKT 細胞は、減少もせずその細胞傷害性も残存することが明らかとなった、そこで、HIV-1 の存在下で末梢血単核球に α -GalCer を加え培養を試みた結果、R5-type である NL(AD8) 株を添加した場合、X4-type の NL4-3 を添加培養した結果に比較し、選択的に HIV-1 に感染した CD4 陽性 NKT 細胞が増加していた (図 5)。また、HIV-1 への感受性を持たない、CD8 陽性 NKT 細胞、ならびに CD4 分子も CD8 分子も発現していない DN (double-negative) NKT 細胞はともに HIV-1 存在下では消滅する可能性を示唆している。現在、この予想外の結果に対し検討を加えている。

こうした実験的事実は、R5-type HIV-1 の感染した NKT 細胞が選択的に体内に残存する可能性を示している。

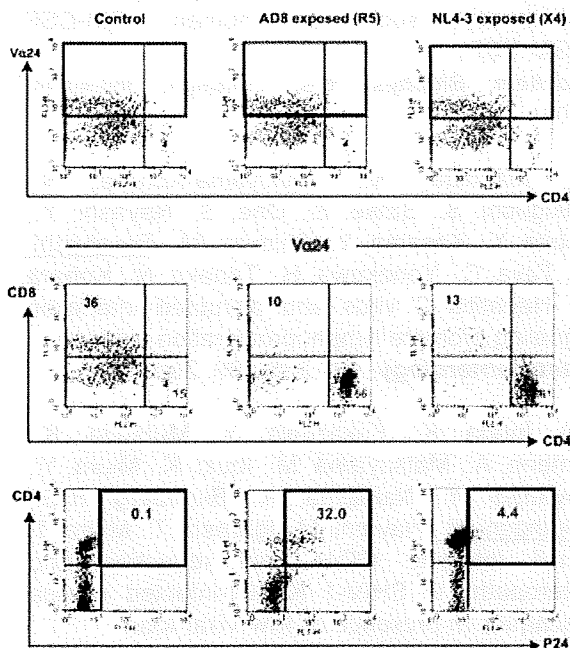


図 5 HIV-1 存在下における R5-type HIV-1 感染 NKT 細胞の選択的な増加

4) 以上の結果は、CD4 陽性 NKT 細胞が R5-type HIV-1 へのより強い感受性を有していること、そして HIV-1 に感染することが、体内においては生存への道となることを強く示唆している。そこで、NKT 細胞上の CXCR5 と CCR5 との発現を検索したところ、末梢血にスーパー抗原を添加することによって誘導した CD4 陽性 T 細胞とは逆に、NKT 細胞上では CCR5 の優位な発現が認められた (図 6)。

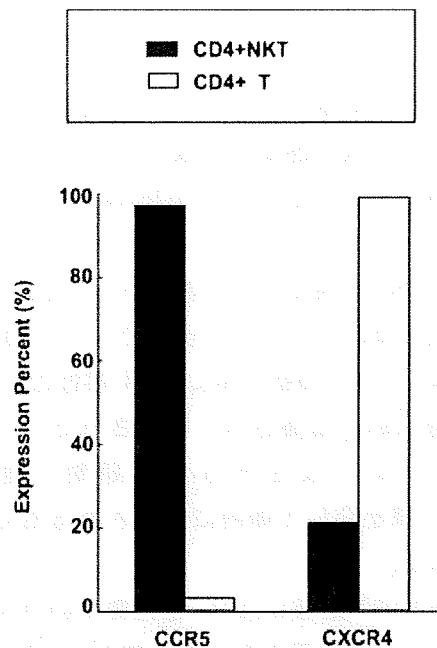


図 6 CD4 陽性 T 細胞と NKT 細胞に発現しているケモカインレセプターの比較

5) CCR5 を用いて感染する R5-type HIV-1 に感染した NKT 細胞が、他の CD8 陽性あるいは DN-NKT と比較し選択的に残存していたこと、ならびに CD4 陽性 NKT 細胞は同時に X4-type HIV-1 にも感受性を有していたことから、スーパー抗原を添加することによって誘導した X4-type HIV-1 にも感受性を有する CD4 陽性 T 細胞に、この CD4 陽性 NKT 細胞を 1% 添加し、そこに X4-type の NL4-3 株を添加培養したところ、培養開始から 5-6 日において、CD4 陽性 T 細胞への著明な感染増大が観察された (図 7)。

X4-HIV感染CD4陽性NKT細胞による感染拡大

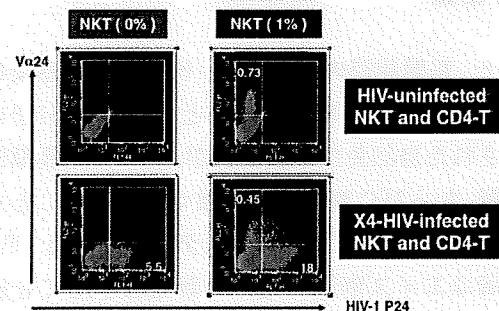


図 7 CD4-NKT 存在下での X4-type 株の感染拡大

D. 考察

HIV-1 感染初期において、CD4 陽性 T 細胞にとっては比較的感受性の低い R5-type ウイルスが蔓延する理由は、NL(AD8)株などの粘膜より侵入した R5-type HIV-1 が、DC-SIGN 等を介して DC に捕捉された後、DC の表面に発現した種特異的な CD1d 分子を介し、その配下として働く NKT 細胞、特に CD4 陽性の NKT 細胞に選択的に伝播され、保持される。この R5-type HIV-1 はおそらく長期間に亘り DC-NKT 間を介して体内に保持されるものと推測される。

一方 HAART 治療により、末梢血中のウイルス量が検出感度以下となっても、治療の中断によってウイルス量は速やかに元の状態になってしまう。この事実は、末梢血中のウイルスを制御できたとしても、どこかに HIV-1 が残存しており、それが治療の中断に伴って感染拡大を起こす可能性を示している。事実我々は、HAART 治療中の患者において、その粘膜組織内に棲息する DC-NKT 内に p24 抗原を発現した細胞群が残存していることを確認している。

また本研究の結果、DC-NKT 内 X4-type の HIV-1 が潜入した場合、NKT は強烈な CD4 陽性 T 細胞への感染拡大を誘発する可能性があることが判明した。こうした粘膜組織に棲息する HIV-1 感受性のある CD4 陽性 NKT 細胞を制御するための手法の開発は、今後のエイズ制圧のための新たな手法を提供するものと考えられる。

E. 結論

以上、粘膜組織内に棲息し、HIV-1 初期感染に関与する DC-NKT 細胞を主体とした CD1 分子に拘束された自然免疫システムが、HIV-1 の長期的な保護、ならびに感染拡大に強く関与することが判明した。この DC-NKT システムにおける HIV の制御はエイズ制圧のための新たな手だてを提供する可能性を秘めている。

F. 論文発表

1) 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.

2) 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.

3) 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.

4) 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.

5) 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).

6) 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).

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

8) 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).

9) Moriya, K, Wakabayashi, A., Shimizu, M., Tamura, H., Dan, K., Takahashi, H. Induction of tumor-specific acquired immunity against already established tumors by selective stimulation of innate DEC-205+ dendritic cells.
Cancer Immunol. Immunother. 58:1245-1255, 2009.

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)：リップスコット・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 注入療法から見えてく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., Watanabe, 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 2 4 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。

エイズワクチンを目指した HIV-1 gag 発現組換えバキュロウイルス粒子の構築と免疫応答の誘導能

分担研究者 高久 洋 千葉工業大学 工学部 生命環境科学科 教授

研究要旨 本研究は HIV-1 gag 発現組換えバキュロウイルスによる免疫および適応免疫応答の解析をエイズワクチンとしての開発を検討する。本の研究では、gag 遺伝子及びピューロマイシン耐性遺伝子を導入した組換えバキュロウイルスをヒト樹状細胞に感染させることで Gag 持続発現樹状細胞を作製し、樹状細胞内の APOBEC3 タンパク質発現量が増加することにより抗 HIV-1 活性を示せるかどうかを検討する。

A. 研究目的

本研究では、HIV-1 gag 遺伝子組換えバキュロウイルスを樹状細胞に感染させて HIV-1 Gag 持続発現樹状細胞を作製し、この樹状細胞が APOBEC3 タンパク質による抗 HIV-1 活性を示せることで、エイズワクチンとしての可能性を検討する。バキュロウイルスは一過性ウイルスで動物細胞に対しても細胞毒性もなく、ヒト樹状細胞にも感染し T 細胞、NK 細胞の活性化および IFN- α を産生するなど、細胞性免疫を誘導する特色を有する。

B. 研究方法

pAcCAGgag-puro と pAcCAG-PGKpuro バキュロウイルストランスファクターを用いて、組換えバキュロウイルス rBV (AcCAG-gag) と Control rBV を作製した。一方、バキュロウイルス粒子表面に HIV-1 gag タンパク質を提示した Ac/gp64-gag を構築する。構築したバキュロウイルス粒子でヒト樹状細胞への感染を試み、細胞表面分子、サイトカインの発現等を確認するこ

とで細胞免疫の活性化を検討する。また、バキュロウイルス粒子による IFN- α の産生および APOBEC ファミリー発現を検討するとともに抗 HIV-1 効果を検討するため、p24 量を測定する。

(倫理面への配慮)

1) 研究対象者に対する人権擁護上の配慮
研究に用いる末梢血は、他の研究目的には使用しない。

2) 研究方法による研究対象者に対する利益・不利益

本研究により、直接提供者が医学上の利益・不利益を得ることはない。

3) 危険性の排除

末梢血は、医師が問診した上で健康上に問題ないと判断した場合に限り、医師が採血した。採血に伴う身体への危険性はあるが、これは通常の診療行為を超えるものではない。一回の採血量は約 50 ml であり、採血量は毎回本人の了解のもとに決定した。HIV の感染実験は P3 で行い、環境中への拡散が起こらないように配慮した。