

た CTL 免疫圧のうち、特に p24 コアタンパクに対する免疫圧が最も効果的に宿主内 HIV 増殖を抑制することを示唆する 2 つの結果が得られた。ひとつは、低ウイルス量群に p24 コアタンパク領域のペプチドを認識する感染者がより多かったという発見であり、もうひとつは、HLA と関連するアミノ酸変異は p24 領域のアミノ酸変異数のみにおいてウイルス量との相関があったという発見である。前者は、新鮮血中に存在する Effector CTL 細胞を観察しているものであり、HIV 慢性感染期において持続的に活性化されている CTL のエピトープ認識を反映しているものと考えられ、後者は過去の CTL 免疫圧からエスケープして逃れたウイルスを観察しているものであり、過去の（その多くは HIV 急性感染期における）CTL 免疫圧を反映しているものと考えられる。本研究では、そのどちらにおいても p24 コア抗原に対する CTL 免疫圧がウイルス量セットポイントを決定する重要な免疫反応であることが示された。

今回、25 か所のペプチド領域において 45 か所の CTL エピトープを示唆する HLA アリールとの相関を認めた。しかし、これらの CTL エピトープ候補領域と我々が以前に発見した 56 通りの HLA と関連する Gag アミノ酸変異と一致するものは、3 割に満たなかった。このことから、急性感染期の CTL エピトープ認識と慢性感染期の CTL エピトープ認識は、相当異なることが示唆された。

さらに 41 か所のこれまでに報告例のない CTL エピトープを見出した。その大部分は CRF01\_AE に特異的なエピトープであった。このことは、CRF01\_AE 感染に関するワクチン研究、特に CTL 誘導型ワクチンの開発には CRF01\_AE に特異的な CTL エピトープをひとつひとつ解明してゆく必要があることを示唆している。

メルク社によるアデノウイルスをベクターとする CTL 誘導型ワクチンの臨床試験の結果は陰性であったが、昨年報告されたタイで実施されたカナリア痘ウイルスをベクターとするワクチンの第 III 相臨床試験の結果は、その効果は弱いものの有効と判定された。以上のように、ワクチン間によって結果が異なる。このメカニズムについて、さらに詳しく調べることは、今後のエイズワクチン開発に不可欠である。

## E. 結論

### 1) 北タイの CRF01\_AE 感染者コホート患

者においても、Gag に対する CTL のより広い CTL 認識 (Breadth) とより強い CTL 認識 (Magnitude) がより良い臨床経過と相関する。

2) 臨床経過と相関する CTL 認識部位については、過去の CTL 免疫圧を反映する HLA と相関するアミノ酸変異や、現在の CTL 免疫圧を反映する Elispot アッセイによるエピトープ認識の両面から観察したところ、いずれも p24 コア抗原領域に対する CTL 免疫圧がより良い臨床経過と相関することが判明した。

3) 今回見つかったエピトープの大部分は過去に他のサブタイプで報告されたものではないことから、CTL エピトープの大部分はサブタイプ特異的であることが判った。

## F. 健康危険情報

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) N Wichukchinda, T Nakajim, N Saipradit, E E. Nakayama, H Ohtani, A Rojanawiwat, P Pathipvanich, K Ariyoshi, P Sawanpanyalert, T Shioda, A Kimura. TIM1 haplotypes control the disease progression to AIDS in a HIV-1-infected female cohort in Thailand. *AIDS* 2101 (in press)

2) G Gesprasert, N Wichukchinda, M Mori, T Shino, W Auwanit, B Sriwanthana, P Pathipvanich, P Sawanpanyalert, T Miura, P Auewarakul, A Thitithanyanont, K Ariyoshi. HLA-associated immune pressure on Gag protein in CRF01\_AE infected individuals and its association with plasma viral load. *PLoS One* 2010 (in press)

### 2. 学会発表

1) A Rojanawiwat, N Tsuchiya, P Pathipvanich, W Auwanit, P Sawanpanyalert, K Ariyoshi: Opportunistic infections before and after the national antiretroviral program in Thailand. **The 9<sup>th</sup> International Congress on AIDS in Asia and the Pacific**. Bali, Indonesia. August 9-13, 2009 (口頭演題)

2) P Pathipvanich, N Tsuchiya, A Rojanawiwat, W Auwanit, P Sawanpanyalert, K Ariyoshi: Over 10 years of experience of treating

HIV/AIDS patients at a government hospital in Thailand. **The 9<sup>th</sup> International Congress on AIDS in Asia and the Pacific.** Bali, Indonesia. August 9-13, 2009 (口頭演題)

- 3) 土屋菜歩 森内浩幸 有吉紅也:北タイにおいてGB virus-C 共感染が HIV 感染者の予後に及ぼした影響について 第 83 回日本感染症学会総会、東京、2009 年 4 月 23-24 日 (口頭演題)
- 4) 森正彦 有吉紅也:タイ国 HIV-1 CRF01\_AE 感染長期未発症者における新たなHLA 拘束性Gag エピトープの同定第 83 回日本感染症学会総会、東京、2009 年 4 月 23-24 日 (口頭演題)
- 5) 土屋菜歩 Pathipvanichi P, Rojanawiwat A, Sawanpanyalert P, 有吉紅也:北タイ政府系病院 HIV が依頼における 13 年間の診療経験—死亡率の推移と新たな問題— 第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会、名古屋市 2009 年 11 月 26~28 日 (口頭演題)

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし.

図1 CRF01\_AE Gag CTL breadth(広さ)と患者 CD4 陽性細胞数 (左図) およびウイルス量 (右図) との相関

ボックスは Interquartile Range を示している ; X 軸は認識したペプチド数を示している

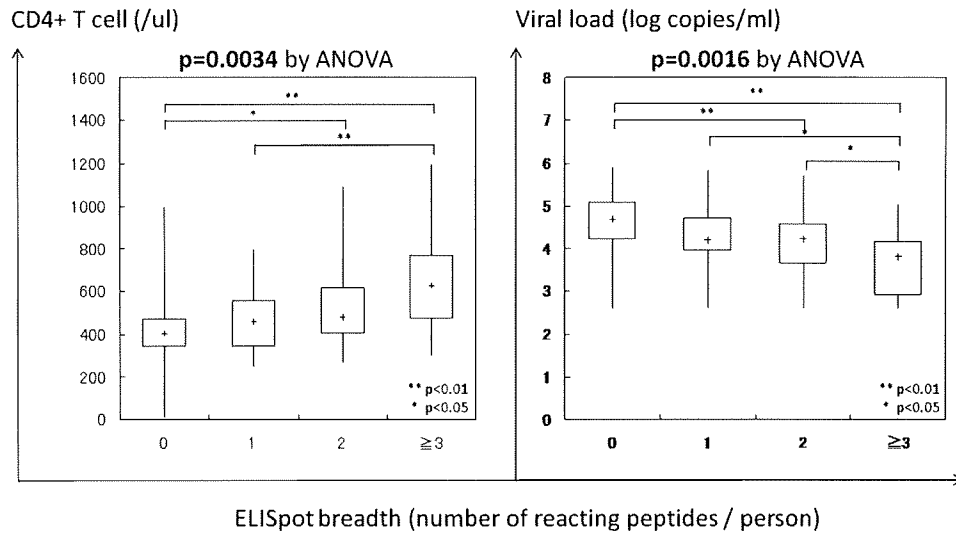


図2 CRF01\_AE Gag CTL magnitude(強さ)と患者 CD4 陽性細胞数 (左図) およびウイルス量 (右図) との相関 ; X 軸にはスポット数をプロットした

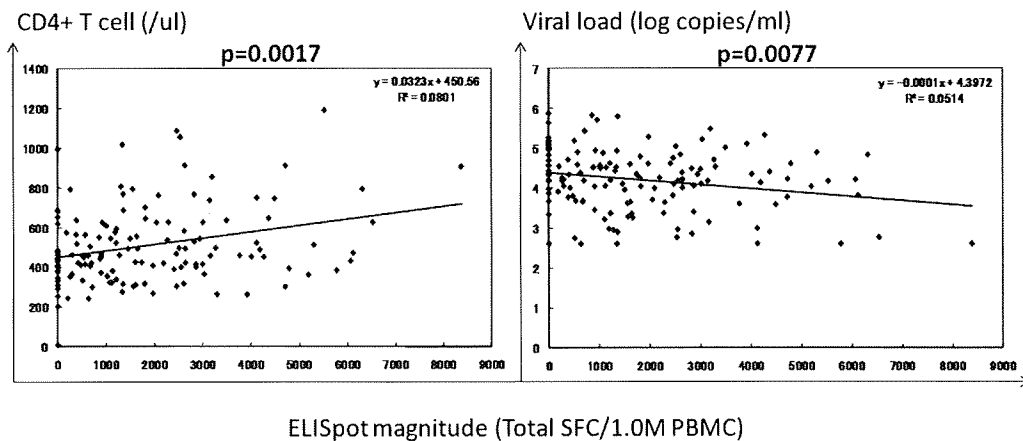


図3 高ウイルス群と低ウイルス群における Gag ペプチド認識パターンの比較

ウイルス量の最も高い群と最も低い群にわけ、p17, p24, p15 の領域をカバーするオーバーラッピングペプチドのうち認識されたペプチドの数の割合（上段）およびそれぞれの領域を認識した感染者の割合を示した（下段）。

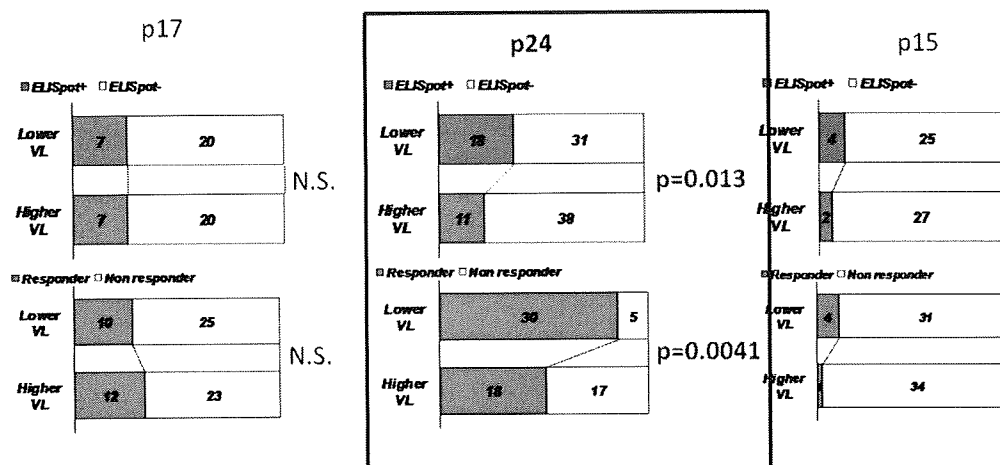
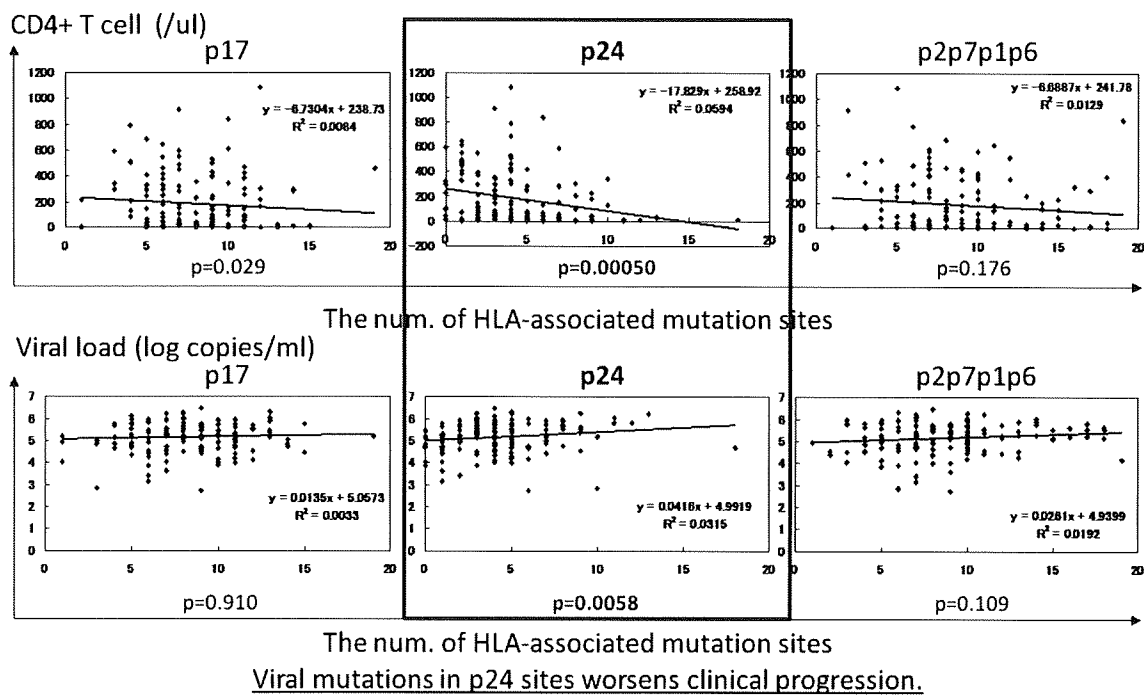


図4 HLA と相関するアミノ酸変異の総数と CD4 陽性細胞数およびウイルス量



## HIV-1 の中和抗体誘導

研究分担者 高橋秀宗 国立感染症研究所 感染病理部 室長

研究要旨：HIV-1 中和抗体をマウスにおいて誘導する抗原の開発を目的とした。HIV-1 が感染可能な小実験動物はないため、ワクチン開発における意義があると考えた。既に広域中和抗体が得られている、HIV-1 env, gp41 の脂質膜に近い領域（MPER）を標的とするために、HIV-1 様粒子から脂質膜を取り除いた Core-Env を抗原とした。マウスへの免疫で 100 倍を超える中和抗体価が得られ、精製 Env を認識するモノクローナル抗体が誘導された。モノクローナル抗体中に中和能を示すものがあつた。中和活性のあるモノクローナル抗体は MPER のペプチドを認識した。ディタージェントにより HIV-1 様粒子から宿主膜蛋白、膜脂質を除いた Core-Env 抗原は、MPER を認識する広域中和抗体の誘導抗原として有効な可能性があつた。

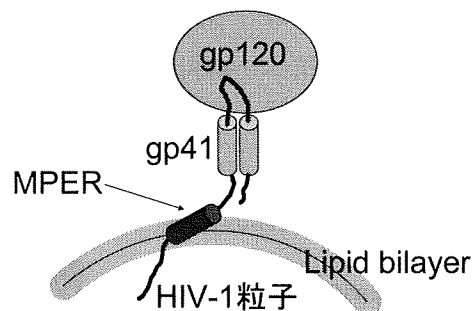
### A. 研究目的

HIV-1 を中和する抗体の誘導をマウスにおいて可能とする抗原の開発を目的とした。HIV-1 粒子にはネイティブな抗原であるという利点があるが、宿主因子、脂質二重膜を多量に含んでいるという短所もある。そこで粒子をディタージェントを含む蔗糖平衡密度勾配法で処理し、Core-Env を分離、抗原として利用した。Core-Env には HIV-1 のライフサイクルでは出現しないという側面もあり、感染者において誘導されている中和抗体とは異なる抗体を誘導する抗原として有用である可能性を予想し、実験を行った。

### B. 研究方法

HIV-1 の env は糖鎖に富み、抗体の接近を阻害し、さらに膜融合における env の構造変化により、env 自体の変異に加え、中和を難しくしている。Gp41 の membrane proximal external region (MPER) は既存の広域中和ヒトモノクローナル抗体 2F5, 4E10 の標的であり、抗体は prehairpin 状態の env へ接近し中和能を示すことが知られている。MPER の抗体を誘導するために HIV-1 様粒子を抗原とした場合、MPER の native な構造を提示する抗原として、広域中和抗体誘導が期待できる。

一方、短所として MPER は脂質膜に埋没しているところが多く、抗原提示が難しい(下図)。



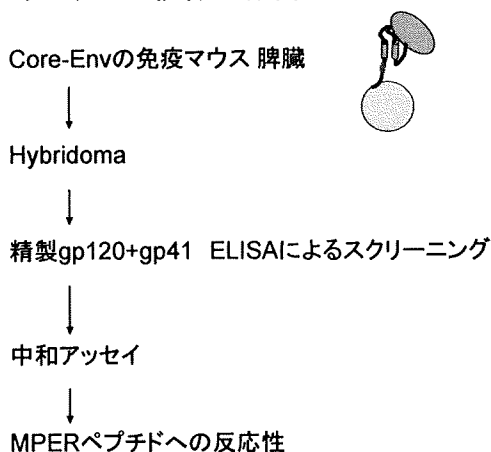
MPERはHIV-1脂質膜にほぼ埋まっている

また宿主膜蛋白を多量に有する。そのため、HIV-1 様粒子からディタージェントにより脂質膜を取り除き、抗原とした(下図)。この Core-Env 抗原は MPER が表出しており、宿主膜蛋白が少ない、脂質膜を認識させない、複製サイクルに提示されない中和エピトープを提示するという長所を有する。



- 1) 免疫抗原としてNL4-3由来の gag 及び各種 env 発現ベクターを 293T 細胞へトランスフェクションして HIV-1 様粒子を得た。
- 2) HIV-1 粒子中のコアを解析するために、20%蔗糖をクッションに超遠心濃縮後、TritonX-100 を含む 30-80%蔗糖平衡密度勾配法により、Core-Env を分離した。
- 3) ウェスタンブロット解析及び、ELISA による p24 の定量を行った。
- 4) 脂質二重膜を除いた Core-Env、HIV 粒子、Core のみをそれぞれ Balb/c マウスへ CpG DNA をアジュバントとして、皮下に 3 回免疫した血清を得た。
- 5) Sp2/o ミエローマを使用して、免疫マウス脾臓よりハイブリドーマを誘導した。モノクロナール抗体を精製 gp120, gp41 を抗原として ELISA により選出した (下図)。

### モノクロナール抗体の作製



- 6) 血清、モノクロナール抗体についてルシフ

エラーゼをゲノムとして有する、HIV-1 増殖欠損株の MAGIC5 細胞、またはヒト CD4、CCR5 を発現させた 293T 細胞における感染価を指標として中和試験を行った。

- 7) NL43 env を 5 アミノ酸ずつずらし N 端へビオチンを付加した 15 アミノ酸のペプチドライブラリーを作製し、各モノクロナール抗体のペプチドに対する反応性を ELISA で調べた。

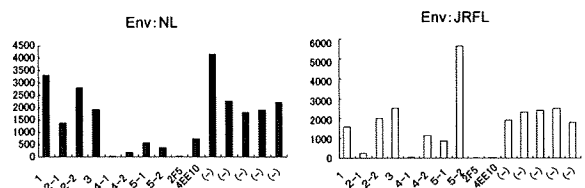
### (倫理面への配慮)

本研究では特に臨床試料を使用していない。

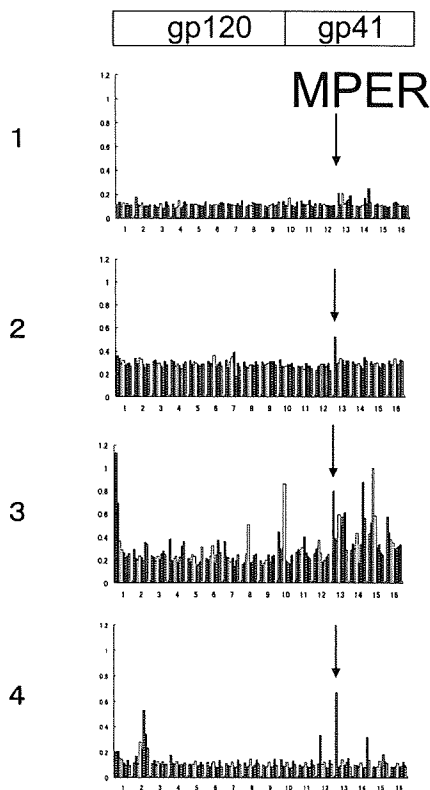
### C. 研究結果

- 1) 免疫により、100 以上の中和抗体価が得られた。アジュバントによる中和抗体誘導の差は大きくはなかった。
- 2) モノクロナール抗体中に、NL 及び JRFL env 増殖欠損株に対する中和能を示すものがあつた。レセプター発現を低くした標的細胞では 0.2 ug/mL 以下で NL43, JRFL の env を中和するものあつた。

### モノクロナール抗体 (0.2 ug/mL) による中和アッセイ



- 3) レセプター発現の高い標的細胞では中和能を失う抗体が多かつた。
- 4) NL43 env の 15 アミノ酸のペプチドライブラリーに対する反応性を ELISA で調べ 0. D. として表した。中和を示したモノクロナール抗体は矢印のように MPER のペプチドをそれぞれ認識した。



#### D. 考察

Core-Env のマウスへの免疫で 100 倍を超える中和抗体価が得られ、精製 Env を認識するモノクローナル抗体が誘導された。上記モノクローナル抗体中に中和活性を認めるものがあった。2F10, 4E10 など既存の MPER ヒトモノクローナル抗体に比べ中和のレセプター発現量依存が高いことが判明した。中和活性のあるモノクローナル抗体は MPER のペプチドを認識した。

精製 HIV-1 env 糖蛋白の免疫ではマウスにおいて中和抗体誘導が難しいことが知られていたが、粒子構造を有する抗原は中和抗体誘導に有効であったと考える。脂質二重膜を失った精製 Core-Env には疎水アミノ酸部分の会合エネルギーに変化が生じていることが予測できる。既存の MPER を標的とするヒトモノクローナル抗体には、脂質膜を認識するものが複数あることから、このディタージェントによる処理が、脂質膜、宿主因子等の認識を回避させた可能性もある。よって脂質を減少させた粒子による免

疫は有効であると考えた。

HIV-1 感染者に中和抗体は認められるが、病態の進行を抑制することはない。Env のうち、gp120 の広域中和抗体では CD4 結合領域への抗体 CD4bs (b12)、糖鎖認識抗体 (2G12) が知られているが、糖鎖による阻害などでこれらの抗体の誘導は難しいことが知られている。他に、CD4i、抗 V3 抗体が感染者に大量に認められる、中和抗体として知られているが中和するためには CD4 に結合後、Env の構造変化が必須条件であることから、感染者でののはたつきは限られている。残る、gp41 MPER を標的とした広域中和ヒトモノクローナル抗体 2F5、4E10 に関する研究成果は最近特に多い。しかし両抗体ともに脂質二重膜を認識することが知られている。Core-Env は脂質を除いているために膜に含まれていた宿主因子を抗原として含むことがないという点で抗原としての利点がある。また脂質二重膜自体を除いているため蛋白抗原と共に脂質を抗原として認識させる危険が少ないという利点も有する。

Core-Env の特に Env については HIV-1 のライフサイクルでは決して出現しない構造が含まれていると考える。Env はリボゾームで翻訳後、ER の脂質膜と速やかに関係し、粒子と感染のライフサイクルを通じて脂質膜との関係が消失することはないからである。ディタージェントにより脂質膜を除いた Env の構造は生体内では決して、抗原提示されない構造を含んでいる可能性もある。

Core-Env が中和抗体を誘導する機構、得られた中和モノクローナル抗体は NL, JR-FL 以外の広域の Env に有効であるかどうかについては明かにされるべき課題であると考ええる。

#### E. 結論

HIV-1 様粒子からディタージェントにより宿主膜蛋白、膜脂質を除いた Core-Env 抗原は、MPER を認識する広域中和抗体の誘導抗原として有効な可能性がある。

#### F. 健康危険情報



## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Takahashi, H. Kitagawa, Y. Maeda-Satoh, M. Hasegawa, H. Sawa, H. Sata, T. Monoclonal antibody and siRNAs for topoisomerase I suppresses telomerase activity. *Hybridoma* 28(1): 63-65. 2009
- 2) Takahashi, H. Ohtaki, N. Maeda-Sato, M. Tanaka, M. Tanaka, K. Sawa, H. Ishikawa, T. Takamizawa, A. Takasaki, T. Hasegawa, H. Sata, T. Hall, WW. Kurata, T. Kojima, A. Effects of the number of amino acid residues in the signal segment upstream or downstream of the NS2B-3 cleavage site on production and secretion of prM/M-E virus-like particles of West Nile virus. *Microbes Infect.* 11(13):1019-1028. 2009
- 3) Kitagawa, Y. Maeda-Sato, M. Tanaka, K. Tobiume, M. Sawa, H. Hasegawa, H. Kojima, A. Hall, WW. Kurata, T. Sata, T. Takahashi, H. Covalent bonded Gag multimers in human immunodeficiency virus type-1 particles. *Microbiol Immunol.* 53(11):609-620. 2009

### 2. 学会発表

- 1) 高橋秀宗, 飛梅実, 金子恵子, 佐多徹太郎. HIV-1 中和抗体を誘導する抗原開発. 第 57 回日本ウイルス学会総会 2009. 10.
- 2) 高橋秀宗, 佐多徹太郎. HIV-1 中和抗体を誘導する抗原開発. 第 13 回ワクチン学会総会 2009. 9.
- 3) Takahashi, H. Immunogen utilizing the stable interaction of cytoplasmic tails of HIV-1 envelope and cores. AIDS vaccine 2009 conference. Paris, France, October, 2009

## H. 知的所有権の出願・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

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
小杉伊三夫、梁明秀	幹細胞とウイルス感染症		「医学のあゆみ」第5土曜特集第229巻9号 細胞医療 Update	医歯薬出版株式会社		2009	720-725
宮澤 正顕	総論第5章 免疫	青笹 克之	解明 病理学：病気のメカニズムを解く	医歯薬出版(株)	東京	2009	84-129
神奈木真理	ウイルス感染と免疫	高田 賢蔵	医科ウイルス学改訂第3版	南江堂	東京	2009	223-233

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamamoto, T., Samri, A., Mitsuki, Y-Y., Mizukoshi, F., Kobayashi, K., Inoue, J.-I., Autran, B. and Tsunetsugu-Yokota, Y.	siRNA inhibiting HIV-1 reactivation restores function of HIV-specific CD4+ T cells in chronically HIV-infected individuals.	AIDS	23	2265 -2275	2009
Yamamoto, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Mitsuki, Y-Y, Mizukoshi, F., Terahara, K., Inagaki, Y., Yamamoto, N., Kobayashi, K. and Inoue, J-I.	Selective transmission of R5 HIV-1 over X4 HIV-1 at the dendritic cell-T cell infectious synapse is determined by the T cell activation state.	PLoS Pathogen	5	e1000279	2009
Iwabu, Y., Fujita, H., Kinomoto, M., Kaneko, K., Ishizaka, Y., Tanaka, Y., Sata, T., and Tokunaga, K.:	HIV-1 accessory protein Vpu internalizes cell-surface BST-2/tetherin through transmembrane interactions leading to lysosomes.	J. Biol. Chem.	284	35060-72	2009
Hoshino, S., Konishi, M., Mori, M., Shimura, M., Nishitani, C., Kuroki, Y., Koyanagi, Y., Kano, S., Itabe, H. and Ishizaka, Y.	HIV-1 Vpr induces TLR4/MyD88-mediated IL-6 production and reactivates viral production from latency.	J. Leukocyte Biol.	87	(doi:10.1189/jlb.0809547)	2010
Shinoda Y, Hieda K, Koyanagi Y, Suzuki Y.	Efficient transduction of cytotoxic and anti-HIV-1 genes by a gene-regulatable lentiviral vector.	Virus Genes	25	165-175	2009

Yoshida T, Ebina H, <u>Koyanagi Y.</u>	N-linked glycan-dependent interaction of CD63 with CXCR4 at the Golgi apparatus induces downregulation of CXCR4.	Microbiol. Immunol.	53	629-635	2009
Miyakawa K, <u>Ryo A</u> , Murakami T, Ohba K, Yamaoka S, Fukuda M, Guatelli J, Yamamoto N.	BCA2/Rabring7 promotes tetherin -dependent HIV-1 restriction.	PLoS Pathog.	5	e1000700	2009
Ohba K, <u>Ryo A</u> , Dewan MZ, Nishi M, Naito T, Qi X, Inagaki Y, Nagashima Y, Tanaka Y, Okamoto T, Terashima K, Yamamoto N.	Follicular dendritic cells activate HIV-1 replication in monocytes/macrophages through a juxtacrine mechanism mediated by P-selectin glycoprotein ligand 1.	J Immunol.	183	524-32	2009
<u>Miyazawa M.</u> , L. Lopalco, F. Mazzotta, S. Lo Caputo, F. Veas, and M. Clerici.	The "immunologic advantage" of HIV-exposed seronegative individuals.	AIDS	23	161-175	2009
<u>Miyazawa, M.</u> and M. Clerici.	The 'immunologic advantages' of HIV-exposed seronegative individuals: authors' reply.	AIDS	23	1612	2009
Murakami T, Kumakura S, Yamazaki T, Tanaka R, Hamatake M, Okuma K, Huang W, Toma J, Komano J, Yanaka M, <u>Tanaka Y</u> , Yamamoto N.	The novel CXCR4 antagonist KRH-3955 is an orally bioavailable and extremely potent inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 infection: comparative studies with AMD3100.	Antimicrob Agents Chemother.	53	2940-48	2009
Nie C, Sato K, Misawa N, Kitayama H, Fujino H, Hiramatsu H, Heike T, Nakahata T, Tanaka Y, Ito M, <u>Koyanagi Y.</u>	Selective infection of CD4+ effector memory T lymphocytes leads to preferential depletion of memory T lymphocytes in R5 HIV-1-infected humanized NOD/SCID/IL-2R $\gamma$ manull mice.	Virology	394	64-72	2009
Nishitsuji, H., Hayashi, T., Takahashi, T., Miyano, M., <u>Kannagi M.</u> , and Masuda, T.	Augmentation of reverse transcription by integrase through an interaction with host factor, SIP1/Gemin2 Is critical for HIV-1 infection.	PLoS One	4	e7825	2009
Nunoya J, Nakashima T, <u>Kawana-Tachikawa A</u> , Kiyotani K, Ito Y, Sugimura K, Iwamoto A.	Short communication: generation of recombinant monoclonal antibodies against an immunodominant HLA-A*2402-restricted HIV type 1 CTL epitope.	AIDS Res Hum Retroviruses.	25	897-904	2009

Mizutani T, Ishizaka A, Tomizawa M, Okazaki T, Yamamichi N, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Iba H.	Loss of the Brm-type SWI/SNF chromatin remodeling complex is a strong barrier to the Tat-independent transcriptional elongation of HIV-1 transcripts.	J Virol.	83	11569-80	2009
Kono K, Bozek K, Domingues FS, Shioda T, Nakayama EE.	Impact of a single amino acid in the variable region 2 of the old world monkey TRIM5a SPRY (B30.2) domain on anti-human immunodeficiency virus type 2 activity.	Virology	388	160-8	2009
Kuroishi A, Saito A, Shingai Y, Shioda T, Nomaguchi M, Adachi A, Akari H, Nakayama EE.	Modification of a loop sequence between alpha-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 alpha-helices 4 and 5 loop improves replication in cynomolgus monkey cells.	Retrovirology	6	70	2009
Nakajima T, Nakayama EE, Kaur G, Terunuma H, Mimaya JI, Ohtani H, Mehra N, Shioda T, Kimura A.	Impact of novel TRIM5alpha variants, Gly110Arg and G176del, on the anti-HIV-1 activity and the susceptibility to HIV-1 infection.	AIDS.	23	2091-100	2009
Nakayama EE, Shioda T.	Anti-retroviral activity of TRIM5 (alpha).	Reviews in Medical Virology	20	77-92	2010
Maegawa H, Miyamoto T, Sakuragi J, Shioda T, Nakayama EE.	Contribution of RING domain to retrovirus restriction by TRIM5 $\alpha$ depends on combination of host and Virus.	Virology	399	212-220	2010
Takahashi, H. Kitagawa, Y. Maeda-Satoh, M. Hasegawa, H. Sawa, H. Sata, T.	Monoclonal antibody and siRNAs for topoisomerase I suppresses telomerase activity.	Hybridoma	28	63-65	2009
Kitagawa, Y. Maeda-Sato, M. Tanaka, K. Tobiume, M. Sawa, H. Hasegawa, H. Kojima, A. Hall, WW. Kurata, T. Sata, T. Takahashi, H.	Covalent bonded Gag multimers in human immunodeficiency virus type-1 particles.	Microbiol Immunol.	53	609-620	2009
G Gesprasert, N Wichukchinda, M Mori, T Shino, W Auwanit, B Sriwanthana, P Pathipvanich, P Sawanpanyalert, T Miura, P Auewarakul, A Thitithayanont, K Ariyoshi.	HLA-associated immune pressure on Gag protein in CRF01_AE infected individuals and its association with plasma viral load.	PLoS One		in press	2010

