

平成21年度厚生労働科学研究費補助金  
エイズ対策研究事業  
研究成果抄録集

# 目 次

研究代表者名	課 題 名	研究期間	頁
(1) 小池 創一	UNGASS REPORT 等の報告書作成に必要な情報を収集・分析する研究	20-21 年度 .....	6
(2) 山本 太郎	先進諸国を中心とした海外におけるエイズ発生動向、調査体制、対策の分析	19-21 年度 .....	8
(3) 佐藤 義則	HIV 感染モデルマウスの樹立および HIV 特異的細胞傷害性 T 細胞によるエイズ発症遅延機序の解析	20-22 年度 .....	12
(4) 吉岡 靖雄	HIV に対する粘膜ワクチンの最適化に適う安全性・有効性に優れた粘膜ワクチンアジュバントの開発	19-21 年度 .....	16
(5) 張 險峰	HIV-1 感染のヒトラット種間バリエーションの解明	19-21 年度 .....	20
(6) 野村 渉	エイズ感染細胞での配列特異的遺伝子組み換えによる効率的な HIV 遺伝子除去法の開発	20-22 年度 .....	24
(7) 杉浦 互	薬剤耐性 HIV の動向把握のための調査体制確立及びその対策に関する研究	19-21 年度 .....	28
(8) 佐藤 裕徳	薬剤耐性 HIV の発生機序とその制御方法に関する研究	19-21 年度 .....	32
(9) 川下 理日人	多剤耐性 HIV における将来的な変異・構造予測と新規抗 HIV 薬の開発	20-22 年度 .....	36
(10) 高折 晃史	Vif/APOBEC3G の相互作用を標的とした新規抗 HIV-1 薬の開発	19-21 年度 .....	40
(11) 武田 哲	抗ウイルス作用をもつ宿主防御因子 APOBEC3G と HIV-1 Vif との結合領域および特性の解明と、その阻害化合物の検索	19-21 年度 .....	44
(12) 市川 誠一	男性同性間の HIV 感染対策とその介入効果に関する研究	20-22 年度 .....	46
(13) 加藤 慶	沖縄県における男性同性愛者への HIV 感染予防介入に関する研究	20-22 年度 .....	50
(14) 日高 庸晴	インターネット利用層への行動科学的 HIV 予防介入とモニタリングに関する研究	20-22 年度 .....	54
(15) 生島 嗣	地域における HIV 陽性者等支援のための研究	20-22 年度 .....	58
(16) 山中 京子	中核拠点病院において行われるカウンセリングの質を向上させる研究	20-21 年度 .....	62
(17) 仲尾 唯治	個別施策層に対する HIV 感染予防対策とその介入効果の評価に関する研究	19-21 年度 .....	66
(18) 服部 健司	HIV 感染予防個別施策層における予防情報アクセスに関する研究	20-22 年度 .....	70
(19) 濱口 元洋	HIV 感染症の医療体制の整備に関する研究	20-21 年度 .....	74
(20) 菊池 嘉	HIV 診療支援ネットワークを活用した診療連携の利活用に関する研究	20-22 年度 .....	78
(21) 五十嵐 樹彦	エイズ多剤併用療法中のリザーバーの特定および選択的障害に関する研究	20-22 年度 .....	82
(22) 岡田 誠治	HAART 時代の長期予後を脅かす治療抵抗性エイズリンパ腫に対する多面的治療戦略開発に関する研究	19-21 年度 .....	86

研究代表者名	課 題 名	研究期間	頁
(23) 田邊 嘉也	HAART の長期的副作用対策・長期予後に関する研究	19-21 年度 .....	90
(24) 潟永 博之	抗 HIV 薬の適正使用と効果・毒性に関する基礎的研究	20-22 年度 .....	94
(25) 秋田 定伯	HIV 関連 Lipodystrophy の克服に向けて	20-22 年度 .....	98
(26) 佐藤 岳哉	AZT 誘発ミトコンドリア機能障害に対する分子治療方法の開発	19-21 年度 .....	102
(27) 渡邊 大	標準的治療法の確立を目指した急性 HIV 感染症の病態解析	20-22 年度 .....	106
(28) 坂田 洋一	血友病とその治療に伴う合併症の克服に関する研究	21-23 年度 .....	112
(29) 和田 裕一	HIV 感染妊婦とその出生児の調査・解析および診療・支援体制の整備に関する総合的研究	21-23 年度 .....	116
(30) 田中 憲一	安全な生殖補助医療を行うための精液よりの HIV ウイルス分離法の確立	21-23 年度 .....	120
(31) 兼松 隆之	血液製剤による HIV / HCV 重複感染患者に対する肝移植のための組織構築	21-23 年度 .....	124
(32) 白阪 琢磨	HIV 感染症及びその合併症の課題を克服する研究	21-23 年度 .....	128
(33) 安岡 彰	日和見感染症の診断／治療およびそれを端緒とする HIV 感染者の早期発見に関する研究	21-23 年度 .....	132
(34) 俣野 哲朗	HIV 感染防御免疫誘導に関する研究	21-23 年度 .....	136
(35) 山本 直樹 (森 一泰)	HIV の感染防止、AIDS 発症防止に関する免疫学的基礎研究	21-23 年度 .....	140
(36) 横田 恭子	HIV 感染病態に関わる宿主因子および免疫応答の解明	21-23 年度 .....	144
(37) 滝口 雅文	難治性 HIV 感染症に対する治療法開発の基礎的研究	21-23 年度 .....	148
(38) 木原 正博	国内外の HIV 感染症の流行動向及びリスク関連情報の戦略的収集と統合的分析に関する研究	21-23 年度 .....	152
(39) 渋谷 健司	HIV 感染症の疫学的研究：メタ分析とコホート研究	21-23 年度 .....	156
(40) 加藤 真吾	HIV 検査相談体制の充実と活用に関する研究	21-23 年度 .....	158
(41) 木原 雅子	ポピュレーション戦略及びハイリスク戦略による若者に対する HIV 予防啓発手法の開発と普及に関する研究	21-23 年度 .....	162
(42) 嶋田 憲司	地方公共団体－NPO 連携による個別施策層を含めた HIV 対策に関する研究	21-23 年度 .....	166
(43) 東 優子	個別施策層（とくに性風俗に係る人々・移住労働者）の HIV 感染予防対策とその介入効果に関する研究	21-23 年度 .....	170
(44) 鈴木 陽一	HIV が形成する高分子複合体の機能不全化とそれを応用したウイルス制御法の確立に関する研究	21-23 年度 .....	174
(45) 西澤 雅子	高感度薬剤耐性 HIV 検出法を用いた微少集族薬剤耐性 HIV の動態と HAART 治療効果との相関についての研究	21-23 年度 .....	178
(46) 高宗 暢暁	HIV-1 ゲノム産物の翻訳後修飾とその機能に関する研究	21-23 年度 .....	182

## 2年目・3年目研究班

---

研究課題：UNGASS REPORT 等の報告書作成に必要な情報を収集・分析する研究

課題番号：H20-エイズ一般-007

研究代表者：小池創一（東京大学医学部附属病院企画情報運営部 准教授）

研究分担者：諸岡健雄（国際医療福祉大学大学院 准教授）、野田龍也（浜松医科大学健康社会医学講座 助教）

## 1. 研究目的

本研究では、国連エイズ特別総会（UNGASS）のフォローアップとして2年に一度国連に提出が求められるデータについて既存の調査研究を整理するとともに、現状における課題と不十分な情報についての考察を行うこと、ならびに我が国のエイズ対策のレビューや収集データ等を基にした国際比較を通じ、我が国のエイズ対策に関する政策的インプリケーションの検討を行うことを目的としている。

## 2. 研究方法

UNGASS レポートの基礎となるデータの日本国内における所在と、2008UNGASS レポートにおける我が国の位置づけについては、既存の調査研究を文献データベースを用いて調査・整理した。

ハイリスクグループのサイズ推計及び流行状況に関する研究については、情報が不足していると考えられるMSM人口の推計に関する情報を収集し、Scale-Up Methodを用いたインターネットアンケートを実施し推計を試みた。

HIV感染率に関する推計及び将来予測については2001年以降のHIV感染者数（報告値）を基礎資料として用い、指数平滑法により感染者数（報告値）の将来予測を行った。

エイズ対策関連の法制度に関する国際比較研究にあたっては、調査対象をヨーロッパ諸国とし欧州薬事法規データベース（ELDD）を主に利用し、公衆衛生（または感染症）関連法規、薬物の規制に関する法規、医療機器の管理に関する法規 に関する法律あるいは行政ルールを検討した。

### （倫理面への配慮）

インターネットアンケートの実施に際しては、倫理委員会による承認を得て行った。

## 3. 研究結果

我が国において、UNAIDS へ報告すべき情報は、必ずしも最新のデータが定期的に更新をされているわけではない。しかしながら、我が国の行政データ、エイズ動向委員会、厚生労働科学研究によって、国際比較が可能な形でのデータ収集・報告は多くは可能であることが示唆された。

MSM人口の推計に関する既存研究のレビューからは、わが国におけるMSM人口推計に資するデータが限定的なも

のであることが明らかとなった。

インターネットアンケートを用いた Scale-Up Method によるアンケート調査の結果、既知のサイズを有する特定の集団の構成員が、個人のネットワーク中に出現する率から推計した、個人のネットワークサイズは平均192.7名（うち男性92.3名）との推計結果が得られた。同性愛者が個人のネットワーク中に出現した比率（%）は、男女両性の場合に0.0477%、男性のみに限った場合に0.0758%であった。

HIV感染者数（潜在分を含めた総数の推計値）ではなく、今後5年間のHIV感染者数（報告値）を推計した結果、日本国籍を有する者のHIV感染者数（報告値）は、2015年に14,700名ほど（95%信頼区間：13,000～16,500名）に達すると見込まれた。

「エイズ対策関連の法制度に関する国際比較研究」ハームリダクションと薬物規制の刑事罰の運用に関しては、欧州における注射針交換プログラムの法的枠組みに関しては、各国のレベルの法体系において、注射器・注射針の交換は、既存の薬物規制に関する条項に照らせば、犯罪を助長する活動に該当する恐れがあり、違法性を阻却できるような特別な解釈を求められる場合が多い。たとえば、ベルギーやドイツのように法の一定要件のもとに交換プログラムの違法性を阻却できるような仕組みが整えられたり、あるいは警察の行政上の運用によって、法の発動が見送られ、事実上、訴追が免除されている場合があることが明らかとなった。

## 4. 考察

HIV感染率が高い地域ほどUNGASSへの報告が行われていること、日本を含む高所得国におけるUNGASSへの報告率が低いという事実は、HIV/AIDS対策への国連の技術支援活動が一定の成果を上げていることを示すものである一方、国連の活動がサブサハラ地域を中心に、広汎性流行地域における対策を中心としているために、低流行、限局性流行地域や高所得国におけるUNGASSへの報告の難しさも明らかになった。

UNAIDSが報告を求めているデータは、エイズの流行の状況、それぞれの国の保健医療情報システムの状況、国連機関の各国における役割といったものを捨象して各国共

通のデータの報告を求めざるを得ないことは国際比較を行ううえで避けて通れない問題であり、エイズ問題が深刻な開発途上国、広汎流行国中心のアプローチがとられることには理解されてしかるべきものである。このような中で、日本が、各国が報告に苦慮するデータも含め、多くの指標について、報告が出来ているということは、その取り組みは評価されてしかるべきであるものと考えられる。

今後とも、公式な統計、研究班における調査の実施にあたっては国際的に報告を求められる情報との整合性にも一定の留意を行いつつ、情報基盤を整備してゆくことが重要であると考えられる。

個人のネットワークサイズの推計については、米国での先行研究と遜色のない結果が得られた。その一方で、同性愛者の出現比率は、先行研究との比較において大幅な過少推計となっており、わが国における同性愛者のカミングアウト率が低いことがその理由となっている可能性が示唆された。インターネットを通じた調査は、迅速性、簡便性、コスト面からも極めて有益な手法であり、今後、調査デザインや質問の方法を含めた更なる検討が必要であると考えられた。

わが国で性的接触を原因とする HIV 感染が増加を認めながら四半世紀を経つつある。この間、HIV 感染の報告数は一貫して増加しており、増加の態様も指数関数的である。この傾向がいつまで続くかについては医学的、社会文化的な要因が大きく関与するため、正確な推測を行うことが困難である。しかし、現在のところ、感染の増加傾向が鈍化しつつあることを示すデータは見あたらないため、わが国においても引き続き重点的な HIV/AIDS 対策が望まれる。

HIV 感染症の推計手法については、地域の感染率により異なる手法が推奨されるが、いずれも困難を伴う。また、わが国における HIV 感染者数はいまだ増加しており、エイズ動向委員会への報告者数も増加を続ける見込みである。

注射器具の交換プログラムは、一面では薬物乱用を助長する活動とみなされかねない一面を持っている。プログラムの違法性が阻却されるためには、注射針交換プログラムが法的に位置づけられたり、行政上の運用で実質的に訴追されないという状況が必要であり、実際に調査した国の一部でこの方式が法の次元で取り組まれていることが分かった。欧州におけるハームリダクションをめぐる法のアプローチは、個人的な薬物利用についての厳罰化の回避と、注射針交換プログラムの違法性の阻却の両面から取り組まれていることが確認できた。

## 5. 自己評価

### 1) 達成度について

各年度の交付申請時における計画はほぼ目標通り達成できたものと考えている。

### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

国連へ報告に関しては、国際的にみると日本は他の先進諸国に比較して高い割合で報告がなされていることを明らかにしたこと、今後の課題についても明らかにしたことは国内対策を進める上でも社会的意義があったものと考えられる。

また、scale up method を用いた方法が、今後解決すべき課題は残すものの、hard to reach population の size estimate のための新たなアプローチとして適応しうる可能性を明らかにしたことは、学術的にも意義があったと考えられる。

### 3) 今後の展望について

本研究は本年度で終了するが、UNGASS 報告は今後も 2 年に一度求められるものであり、本研究の成果が、国の各種報告。統計を設計するにあたって、国連が求めるデータ様式。内容との整合性をとりつつ行われてゆくための基礎となることが期待される。

一方、本研究班の成果については現在投稿準備中であり研究成果については、研究期間終了後にも引き続き研究成果の普及に努めてゆきたい。

## 6. 結論

UNGASS 報告のためのデータはある程度我が国に整っているものの、国連が要求する頻度で常にすべての情報について既存の枠組のみで情報が得られているわけではない。今後とも、公式な統計、研究班における調査の実施にあたっては国際的に報告を求められる情報との整合性にも一定の留意を行いつつ、情報基盤を整備してゆくことが重要であろう。

また、本研究で得られた、UNGASS レポートにおける我が国の位置づけ、若年者の意識・教育効果に関するデータ、HIV 感染率に関する推計及び将来予測、エイズ対策関連の法制度に関する国際比較研究から得られた知見がエイズ予防に対する意識啓発に資することを期待するものである。

## 7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

該当なし。

研究課題：先進国を中心とした海外におけるエイズ発生動向、調査体制、対策の分析

課題番号：H19-エイズ一般-008

主任研究者：山本 太郎（長崎大学熱帯医学研究所 教授）

分担研究者：奥村 順子（長崎大学熱帯医学研究所 准教授）

研究協力者：蔡 国喜（総合地球環境学研究所 研究員）

研究協力者：秦 亮（久留米大学医学部 助教）

研究協力者：張 卓（日本エイズ予防財団リサーチ・レジデント）

### 1. 研究目的

流動人口に焦点をあて、HIV/エイズのハイリスク集団の特定と発生動向や対策を調査する。

特にわが国と行き来の多い中国、東南アジアを中心にその実態把握を行う。タイ・ミャンマー国境地帯における国際的人口移動とHIV/エイズ発生リスクと対策に関する調査を行う。

### 2. 研究方法

本年度は、文献調査、聞き取りを中心に調査を行った。昨年に引き続き、中国衛生部や国勢調査からのデータを基づき、雲南省の3都市および上海市を中心としたHIV/AIDSの流行と流動人口に関連する情報を収集・解析した。さらに、ラオス国境付近における中国およびラオスの流動人口に対する保健医療サービスのあり方について検討をおこなった。これらについては、主任研究者と研究協力者が中国疾病予防管理センター・エイズ・性病予防管理センター（北京・上海）の協力を得て最新データを収集・解析した。分担研究者は、在日外国人の推移とHIV/AIDS発生動向などのデータを収集し、在日外国人に対する保健医療システム構築の重要性について検討した。

（倫理面への配慮）

感染者・患者などの個人を対象とした調査は実施しないため、倫理上の問題はないと考える。また、資料としてすでに匿名コード化された第1次資料を用いるため、「疫学研究に関する倫理指針（文部科学省、厚生労働省）」の対象外であり、同指針に抵触しないと考える。

### 3. 研究結果

タイを中心とするメコン川経済圏諸国におけるHIV感染拡大とアジアにおける性産業従事者の移動状況、さらには不法（ビザ無し）外国人就労者の流れ、これら3点はそのパターンに共通点多々見られる。事実、1980年後半にタイに持ち込まれたHIVは、その後メコン川経済圏諸国へと拡大した。

タイでは、ビザ無し外国籍労働者を対象とする保健医療システムを構築し、HIV感染リスクとなる疾患の早期発見に努めてきた。同国におけるHIV対策には、対象者として外国人が明確に明記されている。この点を含む積極的な対策プログラムが功を奏し、タイでは1990年代後半には新規HIV感染者数は減少し、現在もその傾向を維持し続けている。

一方、ミャンマーやラオスなどのメコン川経済圏諸国との往来が活発な中国南西部の雲南省では、1980年代半ばにHIVが持ち込まれ、この地に入ったHIV subtype BおよびCは、その後CRF07\_BCやCRF08\_BCに変化し、現在も中国全土で確認されている。ことにCRF07\_BCは2002年には台北でその感染例が報告されており、出稼ぎ労働者などの流動人口により広がっていると考えられる。

中国におけるHIV感染者数はわが国同様に増加傾向が見られ、有効な対策が検討・構築されつつある。中国へのHIV感染のエントリーポイントといわれている雲南省では、NGOなどの協力を得て対策が実施されている。例えば、臨滄市では、2005年よりIDUsにメサドンによる治療を提供しており、この中には98名のAIDS発症HIV感染者が含まれ、彼らにはARTも提供されている。また、同省西双版纳州では路上で客待ちをするCommercial Sex Workers (CSWs) に対してコンドームを配布するなどの活動がNGOにより実施されている。しかしながら、中国においては、その巨大な人口規模から、自国民に対する支援および対策も目下のところ十分といえる状況ではなく、外国人労働者に対する保健医療システムはほとんど実施されていない。

目下のところ、わが国において報告されたHIV感染例の中には、CRF07\_BCやCRF08\_BCはない。しかしながら、「その他のサブタイプ」として報告されている中にこれらが含まれるか否かは、既存のデータからは不明である。わが国のHIV感染例におけるサブタイプの動向について2001年以前と2007年とで比較したところ、両者ともsubtype Bが主たるもので、次に多かったのは東南アジア

に由来する CRF01\_AE であった。ただし、後者については徐々に減少傾向が見られる。

日本における HIV 感染者の感染地の変遷を追うと、2008年に報告された日本人感染者の91%の感染地が国内であった。一方、在日外国人感染者のうち感染地を日本国内とするものは42%であった。2000年以前は、在日外国人感染者の感染地については不明なケースが大多数を占め、感染地を海外とするものが、日本国内を上回っていたが、2001年以降は在日外国人 HIV 感染者においても感染地として日本が最も多くあげられるようになり、感染地の転換がみられる。

2008年末における韓国・朝鮮国籍以外の在日外国人数（登録者）は1998年に比べるといずれも増加している。法務省によれば、2009年1月1日現在の日本におけるビザ無し在日外国人数は約11万人でその内訳は韓国人22%、中国人16%、フィリピン人15%、タイ人5%であった。これらの在日外国人の健康・職業等の実態はほとんど明らかとなっていない。

#### 4. 考察

タイにおけるビザ無し外国籍労働者を対象とする保健医療システムの構築は、外国籍労働者における HIV 感染リスクとなる疾患の早期発見を可能とし、HIV 感染者数の減少に一部寄与しているものと考えられる。

中国における HIV 感染者数はわが国同様に増加傾向が見られる。「正規に登録済みの在日外国人のうち約30%が中国国籍者であり、近年、日中の交流が活発である」こと、また「CRF07\_BCは1990年代後半には台湾南部に拡がり、その後2002年には台北に拡大した」ことから、目下のところ、わが国の HIV 感染例として報告されていない CRF07\_BC の発生動向に注目する必要性が示唆される。

わが国における HIV 感染者報告数は引き続き増加しており、日本に居住する外国人の数も依然少なくはない。わが国最大の在日外国人コミュニティの本国である中国でも HIV 感染者報告数は増加傾向にある。2009年1月現在でのビザ無し在日外国人の20%を中国籍（台湾を含む）が占めることなどを考慮すると、タイが実施した外国籍労働者を対象とする保健医療制度の導入の検討が必要と思われる。

#### 5. 自己評価

##### 1) 達成度について

これまでの調査により、上海及び雲南省における流動人

口の人口動態学的特徴を明らかにすることができた。また、雲南省を中心とする流動人口のリスク行動を明らかにし、その一部を2009年10月にラオスにおいて開催された The third National Health Research Forum において "Needs assessment for AIDS-related healthcare service among China-Laos migrants" と題し、口頭発表を行った。さらに、先行研究ならびに公表データを一部解析・整理することで、わが国に在住する外国国籍者を対策の対象に加える必要性について検討をおこなった。以上のことから、本研究の本年度目標は達成できたと考える。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

わが国の HIV/エイズの流行は、1999年の感染症法施行によるサーベイランス体制の変化、特に、病変報告の提出が任意化されたことによる推計困難化という要因もあって、一概には断定しにくい点はあるが、HIV 感染報告数のみならず、エイズ発症報告数の増加という憂慮すべき状況にある。その一部は海外との交流によってもたらされている。このような状況の中で、わが国と人的交流の深い国々の疫学動向や対策を調査することは、対策を講じる上においても必要な基礎資料となる。

##### 3) 今後の展望について

- A. 人的交流が盛んであり、中国における HIV のエントリポイントとされる雲南省において、種々の subtype における薬剤耐性発現状況に焦点をあてた研究を計画中である。
- B. 在日外国人における健康問題（HIV/AIDSならびに性感染症を含む）に関する状況を明らかにし、在日外国人を対象とした保健医療制度のあり方に関する研究を計画中である。

#### 6. 結論

国連エイズ合同計画等国際機関による各年の疫学資料は比較的入手しやすいが、特定の集団に焦点を当てた疫学情報、あるいは、わが国との人の交流といった点からの疫学調査、対策調査、つまり国内応用性に言及した調査は少ない。また、発生動向のみならずリスク行動サーベイランスの役割の検討も十分行われてこなかった。本研究では、わが国と交流の頻繁な中国および東南アジアの国を調査対象に加え、対策と国内応用性に言及した調査となるところに特色があるといった点で、本研究実施の意味は大きいと考える。

##### 7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

特になし



## 研究発表

## 主任研究者

山本 太郎

## 原著論文による発表

## 欧文

- 1) Oshima K, Fujii H, Eguchi K, Otani M, Matsuo T, Kondo S, Yoshiura K, Yamamoto T. A Further Insight into the Origin of Human T-Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) in Japan, Based on the Genotyping of ABCC11. *Tropical Medicine and Health*.37(3):121-123, 2009.
- 2) Magafu M, Moji K, Lgumvor EU, Hashizume M, Mizota T, Komazawa O, Cai G, Yamamoto T. Usefulness of Highly Active Antiretroviral Therapy on Health-Related Quality of Life of Adult Recipients in Tanzania. *AIDS PATIENT CARE and STDs*. 23(7):563-570, 2009.
- 3) Abe M, Muhoho ND, Sunahara T, Moji K, Yamamoto T, Aoki Y. Effect of communal piped water supply on water use pattern and the transmission of schistosomiasis haematobia in an endemic area of Kenya. *Tropical Medicine and Health*. 37(2):43-53, 2009.
- 4) Eguchi K, Fujii H, Otani M, Oshima K, Matsuo T, Yamamoto T. Human T-Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) Genetic Typing in Kakeroma Island, an Island at the Crossroads of the Ryukyuan and Wajin in Japan, Providing Further Insights into the Origin of the Virus in Japan. *Journal of Medical Virology* 81: 1450-1456, 2009.
- 5) Zhang Z, Cai G, Moji K, Yamamoto T, Wu X (2008). A practical handbook for preventing exposure to blood among health workers. Tianjin Science and Technology Press. ISBN 978-7-5308-4521-9
- 6) Guoxi CAI, Jun KANG, Ling SHEN, Xiangdong MIN, Zhunyou WU, Keming ROU, Taro YAMAMOTO, Kazuhiko MOJI. Assessment of a questionnaire used for an AIDS-related KABP survey among physicians in China. *Information SCIE* 2009.
- 7) Yamamoto T, Crump A. Japan's aid commitment to health and Africa. *Lancet* 369: 28, 2007.

## 分担研究者

奥村 順子

## 原著論文による発表

## 欧文

- 1) Junko Okumura, Tatsuro Kai, Zinatul Hayati, Fadrial Karmil, Kazuko Kimura, Yasuhiro Yamamoto. Antimicrobial therapy for water-associated wound infections in a disaster setting: Gram-negative bacilli in an aquatic environment and lessons from Banda Aceh, *Prehospital and Disaster Medicine* 24 (3): 187-94, 2009.
- 2) Junko Okumura, Yoshihiro Nishita, Kazuko Kimura. Pharmaceutical supply for disaster victims who need chronic disease management in aging region – Lessons from the Noto Peninsula Earthquake, 2007 in Japan - *Yakugaku Zasshi* 128 (9): 1275-83, 2008.
- 3) Yoshihisa Shirayama, S. Phompida, Chushi Kuroiwa, Miki Miyoshi, Junko Okumura, and Jun Kobayashi. Maintenance behavior and long-lasting insecticide-treated nets (LLITNs) previously introduced into Bourparap district, Khammouance province, Lao PDR, *Public Health* 121 (2): 122-29, 2007.
- 4) Miho Nozue, Miki Miyoshi, Junko Okumura, Hugo Sanchez, Juan Andreu, Chushi Kuroiwa. Prevalence and determinants of obesity and dietary habits among adults in rural area, Chile. *Bio Science Trends* 1 (3): 140-48, 2007.
- 5) Junko Okumura, Susumu Wakai. Concern over localized HIV/sexually transmitted infection epidemic during

conflict in Nepal, *Tropical Doctor* 35(2): 125-6, 2005.

研究協力者

蔡 国喜

原著論文による発表

欧文

- 1) Guoxi CAI, Jun KANG, Ling SHEN, Xiangdong MIN, Zhunyou WU, Keming ROU, Taro YAMAMOTO, Kazuhiko MOJI. Assessment of a questionnaire used for an AIDS-related KABP survey among physicians in China. *Information SCIE* 2009.
- 2) Zhang Z, Cai G, Moji K, Yamamoto T, Wu X (2008). A practical handbook for preventing exposure to blood among health workers. Tianjin Science and Technology Press. ISBN 978-7-5308-4521-9
- 3) Cai G, Moji K, Honda S, Wu X, Zhang K: Inequality and unwillingness to care for people living with HIV/AIDS: a survey of medical professionals in Southeast China. *AIDS Patient Care STDS* 21 (8): 593-601, 2007.

口頭発表

海外

Guoxi CAI, Ling SHEN, Jun KANG, Zhuo ZHANG, Taro YAMAMOTO, Kaining ZHANG and Kazuhiko MOJI, (2009.10), Needs assessment for AIDS-related healthcare service among China-Laos migrants, The third National Health Research Forum (NHRF 2009), Oct. 2nd and 3rd, 2009, Champasak, Lao PDR.

秦 亮

原著論文による発表

欧文

- 1) Qin L, Masaki H, Gotoh K, Furumoto A, Terada M, Watanabe K, and Watanabe H. Molecular epidemiological study of *Moraxella catarrhalis* isolated from nosocomial respiratory infection patients in a community hospital in Japan. *Intern Med*, 48:797-803, 2009.
- 2) Kuroki R, Kawakami K, Qin L, Kaji C, Watanabe K, Kimura Y, Ishiguro C, Tanimura S, Tsuchiya Y, Hamaguchi I, Sakakura M, Sakabe S, Tsuji K, Inoue M, and Watanabe H. Nosocomial bacteremia caused by biofilm-forming *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Intern Med*, 48:791-796, 2009.
- 3) Gotoh K, Qin L, Watanabe K, Anh DD, Huong PLT, Anh NTH, Cat NDL, Ha LL, Ai LTT, Tien NM, Minh TT, Oishi K, and Watanabe H. Prevalence of *Haemophilus influenzae* with resistant gene isolated from young children with acute lower respiratory tract infections in Nha Trang, Vietnam. *J Infect Chemother*, 14: 349-353, 2008.

張 卓

原著論文による発表

欧文

- 1) Zhuo Zhang, Kazuhiko Moji, Guoxi Cai, Junichi Ikemoto, Chushi Kuroiwa. Risk of sharps exposure among health science students in northeast China. *BioScience Trends*. 2(3):105-111, 2008.
- 2) Zhang Z, Cai G, Moji K, Yamamoto T, Wu X (2008). A practical handbook for preventing exposure to blood among health workers. Tianjin Science and Technology Press. ISBN 978-7-5308-4521-9.

研究課題：HIV 感染モデルマウスの樹立および HIV 特異的細胞傷害性 T 細胞によるエイズ発症遅延機序の解析

課題番号：H20-エイズ-若手014

研究代表者：佐藤 義則（熊本大学 エイズ学研究センター ウイルス制御分野 COEリサーチ・アソシエイト）

研究分担者：なし

## 1. 研究目的

長期にわたって HIV の増殖を抑えるためには HIV 特異的細胞傷害性 T 細胞によるウイルス感染細胞の排除が重要であることはよく知られている。当研究室では、長期にわたってエイズを発症しない HIV 感染者から非常に強い HIV 増殖抑制能を示す細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の単離に成功した。一方、長期 HIV 感染における免疫応答および病態の解析が困難である理由のひとつとして、小動物を用いた HIV 感染実験系が確立されていない点が挙げられる。そこで我々は、新たに作製した免疫不全マウス (NOD/SCID/Jak3 ノックアウトマウス (以下 NOK マウス)) にヒト臍帯血由来幹細胞を移植したヒト免疫構築 NOK マウス (ヒト化 NOK マウス) を用いて、1. ヒト化 NOK マウスで発生したヒト CD8<sup>+</sup>T 細胞の分化・機能を解析し、これまでのヒト化マウスモデルの問題点等の知見を得る。2. HLA 発現ヒト化 NOK マウスを樹立し、これまでより成熟したヒト化マウスモデルの樹立と HIV 感染マウスモデルを樹立する。さらに長期 HIV 感染における免疫応答と病態進行の機序、HIV 特異的 CTL の動態を解析する。3. 我々の過去の報告に基づくより効果的な HIV 特異的 CTL クローンの移入により、HIV 感染に対する免疫応答および免疫細胞療法の効果について検討する。本研究で樹立する HLA 発現ヒト化マウスでは、ヒトの造血・免疫系を確立した際に問題となる胸腺での発生・分化障害も解決でき、今までのモデルマウスより成熟したヒト免疫系の構築が可能である。さらに HLA ハプロタイプとエイズ進行の相関について動物モデルを用いて検討できる点が優れており、エイズ発症機序の詳細な解析と新規エイズ治療法の開発に大きく貢献することが本研究の目的である。

## 2. 研究方法

ヒト化マウスを樹立するため、幹細胞のマーカーである CD34 に対する特異的抗体がコートされた磁気ビーズをもちいて、臍帯血単核球より臍帯血幹細胞 (CD34<sup>+</sup>細胞) を分離し、NOK マウスの新生仔の肝臓へ移植した。移植から 17 週間後、マウス血液を採取し、HIV の標的細胞である CD4<sup>+</sup>T 細胞や細胞傷害性を担う CD8<sup>+</sup>T 細胞の発生・分化、成熟について CD 抗原、リンパ球の分子マーカーを用いてフローサイトメーターで解析した。また、CD8<sup>+</sup>T 細胞の

分化・機能について、表現形の解析およびサイトカイン産生、抗原刺激に対する反応性について解析した。さらに R-tropic な JR-FL 株および X4-tropic な NL432 株を腹腔内投与でヒト化マウスに感染させ、CD4<sup>+</sup>T 細胞の割合をフローサイトメーター、血中の HIV-RNA 量を RT-PCR を用いて系時的に解析した。

(倫理面への配慮)

本研究におけるヒト由来の検体の使用と遺伝子解析、および理化学研究所 (理研) から購入した臍帯血単核球は提供者に対して既にインフォームド・コンセントを行い得たものであり、本研究によって新たに提供者に危険を及ぼすことは無く、当大学の倫理審査委員会にて承認済みである。また、動物実験についても既に当大学の動物実験委員会にて承認済みである。

## 3. 研究結果

ヒト CD34<sup>+</sup>細胞を移植した NOK マウスで発生したヒト CD8<sup>+</sup>T 細胞は、CD27<sup>hi</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> (Naive 表現型)、CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> (Memory 表現形)、CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> (Early Effector Memory 表現形) の表現形が認められた。しかしながら、CD27<sup>lo</sup>CD28<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> (Late Effector Memory 表現型) および CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> (Effector 表現形) を示したヒト CD8<sup>+</sup>T 細胞は認められなかった。また、PMA/Ionomycin 刺激によるヒト CD8<sup>+</sup>T 細胞のサイトカイン産生能を調べたところ、各種サイトカイン (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2) 産生能を示した。ところが、ウイルス感染細胞の破壊因子となるパーフォリンとグランザイム A/B の各酵素群は、グランザイム A/B の発現は高く認められたが、パーフォリンの発現は低いことが明らかとなった。さらにアロ抗原で免疫したヒト CD8<sup>+</sup>T 細胞は、エフェクター表現形への分化が誘導できず、アロ抗原の再刺激に対しても IFN- $\gamma$  産生および細胞増殖を誘導することはできなかった。さらにこのヒト化マウスに HIV-1 実験株である JR-FL 株および NL432 株を腹腔内投与で感染させ CD4<sup>+</sup>T 細胞の割合を系時的に調べた結果、非感染群に比べ有意な割合減少が見られた。さらに血中の HIV-RNA 量を系時的に調べた結果、感染 14 日目には JR-FL 株および NL432 株ともに検出でき、そのピークは 21 日目と 49 日目で見られた。HIV 感染後

の CD8<sup>+</sup>T 細胞の表現形は感染前のそれと比べ、大きな変化はなかった。

#### 4. 考察

小動物を用いた HIV 感染実験系の確立は、長期 HIV 感染における免疫応答および病態の解析を可能とするとともに、飼育に大掛かりな施設、設備、高額な飼育費を必要とするサルやチンパンジーにかわる代替動物として期待されている。しかし、ヒト化マウスを用いた HIV 感染モデルの報告は数例あるものの、長期 HIV 感染実験モデルや、HIV 感染マウスにおける HIV 特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の動態の解析についての報告は未だされていない。我々が今回用いているヒト化 NOK マウスでは、末梢血中にヒト T 細胞の発生は認められたが、感染細胞排除に重要な役割を持つエフェクター CD8<sup>+</sup>T 細胞は認められなかった。またパーフォリンの発現が低いことや抗原刺激に対して無応答であることは、ヒト T 細胞が分化する際に必要な胸腺における教育が不十分であることに起因すると考えられる（マウス MHC とヒト TCR の親和性不一致によるもの）。またこのヒト化マウスは JR-FL 株および NL432 株で長期的な HIV 感染が成立した。しかし、ヒトエフェクター CD8<sup>+</sup>T 細胞が誘導されなかったことは、すなわちヒト CD8<sup>+</sup>T 細胞の適切な分化教育がされていないことが裏付けられた。そのため、我々はヒト T 細胞の適切な教育にはヒト HLA 分子との相互作用が必要と考え、HLA-B\*51 発現 NOK マウス（NOK/B\*51Tg マウス）の樹立を NOK マウスの解析に加え今年度は行ってきた。現在、NOK/B\*51Tg マウスの樹立に成功し、マウス数を増やしているところである。

#### 5. 自己評価

##### 1) 達成度について

ヒト化 NOK マウスでは、ヒト CD4<sup>+</sup>T 細胞や細胞傷害を担うヒト CD8<sup>+</sup>T 細胞の発生を確認できた。さらに HIV を長期的に感染させることができたものの、ヒト CD8<sup>+</sup>T 細胞の分化・成熟および機能は未分化である知見を得た。この CD8<sup>+</sup>T 細胞未分化という問題点を解決するため、HLA 発現 NOK マウス（NOK/B\*51Tg マウス）の樹立を試み、現在繁殖中である。次年度は、NOK/B\*51Tg マウスを用いてヒト化 NOK/B\*51Tg マウスを構築し、ヒト CD8<sup>+</sup>T 細胞の機能解析、さらには HIV 感染モデルマウスにおける HIV 特異的 CTL の動態と病態進行の解析（平成 22 年度計画）に速やかに移行できるものと考えている。今年度の減額された予算内ではいくつかの問題点（マウス管理費、試薬費などの不足）も発生したが、予算に応じた達成度であるといえる。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

我々が作製するヒト免疫構築マウスは、HIV 感染における病態とウイルスに対する免疫応答の研究において非常に有用なモデルマウスになると考えている。その理由は、本モデルマウスに HIV を感染させた後、長期にわたる経過観察によって、HIV 感染慢性期における病態と HIV 特異的免疫応答の相関について検討が可能であると考えられる。さらに、研究分野の長期的な成果として、サルやチンパンジーの飼育には大掛かりな施設、特殊な設備、高額な飼育費を要するが、小動物における HIV 感染系の確立によって *in vivo* におけるエイズ研究が容易なものとなり、本研究分野の活性化に寄与すると考える。また、本モデルマウスはエイズワクチン開発や新規エイズ治療法のための実験動物としても非常に有用であり、今後のエイズ治療研究に大きく貢献することが期待できる。

##### 3) 今後の展望について

現在繁殖中である NOK/B\*51Tg マウスを用いてヒト化 NOK/B\*51Tg マウスを構築後、ヒト CD8<sup>+</sup>T 細胞の機能解析および HIV 感染モデルの樹立を目指す。さらに、HIV 特異的 CTL の動態と病態進行の解析を行い、長期にわたる経過観察から、HIV 感染慢性期における病態と HIV 特異的免疫応答の相関についての検討を目指す。これらの実験からエイズワクチン開発や新規エイズ治療法のために必要な基礎的知見を得ることを目標とする。

#### 6. 結論

本研究では、長期 HIV 感染における免疫応答と病態進行の機序を明らかにするため、ヒト化マウスによる HIV 感染モデルを確立し、*in vivo* での HIV 特異的 CTL の動態を解析し、最終的に HIV 特異的 CTL クローンへの移入による免疫細胞治療法の効果についての検討を目指す。ヒト免疫構築マウスをもちいた研究は既に国内外で始まっているが、本研究で樹立する HLA 発現ヒト化マウスでは、現在までに明らかとなっているマウスでのヒトエフェクター CD8<sup>+</sup>T 細胞の誘導の問題点も解決でき、今日までのモデルマウスより成熟したヒト免疫系の構築が可能と考えている。また、HLA ハプロタイプとエイズ進行の相関を動物モデルにおいて検討できる点から、今後のエイズ治療研究に大きく貢献することが期待できる。

#### 7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

なし。

## 研究発表

## 研究代表者

佐藤義則

## 原著論文

- 1) Sato Y, Oda H, Patrick MS, Baba Y, Rus'd AA, Azuma Y, Abe T, Shirai M, Suzuki H. Rac GTPases are involved in development, survival and homeostasis of T cells. *Immunol. Lett.* 124; 27-34, 2009.
- 2) Patrick MS, Oda H, Hayakawa K, Sato Y, Eshima K, Kirikae T, Iemura S, Shirai M, Abe T, Natsume T, Sasazuki T, Suzuki H. Gasp, a Grb2 associating protein, is critical for positive selection of thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 106; 16345-50, 2009.
- 3) Oda H, Fujimoto M, Patrick MS, Chida D, Sato Y, Azuma Y, Aoki H, Abe T, Suzuki H, Shirai M. RhoH plays critical roles in FcεRI-dependent signal transduction in mast cells. *J. Immunol.* 182; 957-62, 2009.
- 4) Chida D, Sato T, Sato Y, Kubo M, Yoda T, Suzuki H, Iwakura Y. Characterization of mice deficient in Melanocortin 2 receptor on a B6/Balbc mix background. *Mol. Cell. Endocrinol.* 300; 32-6, 2009.
- 5) Sato Y, Kaneko K, Inoue M. Macrolide antibiotics promote the LPS-induced upregulation of prostaglandin E receptor EP2 and thus attenuate macrolide suppression of IL-6 production. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 76; 181-8, 2007.
- 6) Kaneko K, Sato Y, Ishihara K, Inoue M. Chromosomal AmpC β-lactamase-mediated β-lactam resistance of gram-negative bacteria enhances host inflammatory mediator production via nucleotide-binding oligomerization domain 1. *Kitasato Med. J.* 37; 28-36, 2007.
- 7) Hashimoto A, Hayashi I, Murakami Y, Sato Y, Kitasato H, Matsushita R, Iizuka N, Urabe K, Itoman M, Hirohata S, Endo H. Antiinflammatory Mediator Lipoxin A4 and Its Receptor in Synovitis of Patients with Rheumatoid Arthritis. *J. Rheumatol.* 34; 2144-53, 2007.

## 学会発表

- 1) Sato Y, Takata H, Takiguchi M. Detailed analysis of reconstituted human CD8<sup>+</sup> T cells in humanized mice; their functions and differentiation. 第39回日本免疫学会総会・学術集会、2009年、大阪。(口頭発表)
- 2) Sato Y, Takata H, Tamaki S, Takiguchi M. Impaired differentiation and function of human CD8<sup>+</sup> T cells in humanized mice. The 10th Kumamoto AIDS Seminar. September 28-29, 2009, Kumamoto, Japan. (ポスター発表)
- 3) Sato Y, Oda H, Patrick MS, Shirai M, Suzuki H. Function of Rac1 in survival and homeostasis of mature T cells. 第38回日本免疫学会総会・学術集会、2008年、京都。(口頭発表)

研究課題：HIVに対する粘膜ワクチンの最適化に適う安全性・有効性に優れた粘膜ワクチンアジュバントの開発

課題番号：H19-エイズ-若手-001

研究代表者：吉岡 靖雄（大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 特任講師（常勤））

研究分担者：鎌田 春彦（独立行政法人医薬基盤研究所創薬プロテオミクスプロジェクト 主任研究員）、形山 和史（大阪大学大学院薬学研究科分子生物学分野 助教）

## 1. 研究目的

HIV に対する多剤併用療法は、感染そのものを防御するものではなく、また薬剤耐性・副作用・費用などの解決すべき問題が多数残されている。従って、HIV 治療・予防における最重要課題は、先進国・開発途上国を問わず HIV に対するワクチン開発に他ならない。泌尿生殖器など経粘膜的に感染する HIV の感染経路を考慮した場合、経口・経鼻・経膣投与など経粘膜接種によるワクチン（粘膜ワクチン）は、抗原投与部位の粘膜面のみならず、遠隔の粘膜面、更には脾臓などの全身系免疫組織にも抗原特異的免疫応答が誘導可能なため、HIV 感染制御の点で理想的方法として期待されている。しかし、抗原単独で経粘膜投与しただけでは抗原性の低さなどから、効率よく分泌型 IgA 抗体産生・細胞傷害性 T 細胞（CTL）誘導をはじめとした粘膜免疫応答を誘導することが困難である。さらに、期待しない免疫応答であるアレルギー等を誘導する可能性も考えられることから、粘膜免疫を強力かつ適切に誘導可能な粘膜ワクチンアジュバントの開発が待望されている。本観点から、強い免疫活性化能を持ち、さらに生体の免疫反応を緻密に制御しているサイトカインを利用した、粘膜ワクチンアジュバントへの応用が試みられている。しかし、サイトカインは、経粘膜投与では瞬時に失活・分解してしまい、その結果として粘膜免疫誘導能が低下することから、未だ有望な粘膜ワクチンアジュバントに成り得ていない。そこで本研究では、既にタンパク性医薬品として臨床に応用され、高度に安全性が確保された実績を有するサイトカインをアジュバント素材として新たに開発することを目指し、粘膜アジュバント活性に優れたサイトカインの網羅的探索と、独自の機能性人工タンパク質創出システムとの融合戦略により独自に創製したサイトカイン変異体の HIV 感染症予防に叶う粘膜ワクチンアジュバントとしての可能性を追求した。

## 2. 研究方法

【免疫方法】BALB/c マウスへの免疫は、個々のサイトカインあるいはポジティブコントロールとして使用したコレラトキシン B サブユニット(CT-B)をニワトリ卵白アルブミン (OVA) もしくは HIV 由来 gp120 と混合して経鼻投与することにより行なった。【サンプルの回収方法】最

終免疫 7 日後のマウスより血清、鼻腔洗浄液、膣洗浄液および糞便抽出液を回収した。【抗原特異的抗体産生能の評価】抗原を固相した ELISA プレートに各濃度に調製したサンプルを添加し、2次抗体として HRP 標識抗マウス IgG 抗体あるいはビオチン標識抗マウス IgA 抗体/HRP 標識ストレプトアビジンを用い、常法に従い行った。発色反応後、測定波長 450 nm、参考波長 690 nm における吸光度を測定した。

（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、大阪大学等の動物実験規程に則り行った。また組換え DNA 実験は、「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。

## 3. 研究結果

まず、強い免疫活性化能を有する TNF スーパーファミリーサイトカインに焦点を絞り、最も強い粘膜免疫誘導能を有するサイトカインを探索した。その結果、OVA 単独投与群と比較して、APRIL、TNF $\alpha$ 、TL1A 併用投与群では、血清中の抗原特異的 IgG 産生の有意な増加が認められた。また、抗体サブクラスの解析から、IgG1 優位な抗体産生を誘導することが明らかとなった。更に、APRIL、TNF $\alpha$ 、TL1A 併用投与群では、投与部位である鼻腔洗浄液中の抗原特異的 IgA 産生も増加しており、中でも TL1A による IgA 産生能は CT-B に匹敵する程であった。また、遠隔の粘膜面である膣洗浄液、糞便抽出液中でも同様に、TNF $\alpha$ 、TL1A 併用投与群において、OVA 特異的 IgA の産生が有意に増加していた。以上の結果から、TNF スーパーファミリーサイトカインの中でも、TNF $\alpha$ 、TL1A が優れた粘膜ワクチンアジュバントに成り得る可能性が示された。

そこで、バイオコンジュゲート化 TNF $\alpha$  のワクチンアジュバントへの適用を目指し、我々がこれまでに創製したリジン欠損 TNF $\alpha$  変異体の粘膜ワクチンアジュバント能を評価した。リジン欠損 TNF $\alpha$  変異体は、*in vitro* における比活性が野生型より数倍向上し、全てのリジン残基が他のアミノ酸に置換されている。その結果、リジン欠損 TNF $\alpha$  変異体は野生型 TNF $\alpha$  と比較して、全身面、粘膜面のい

れにおいても、有意な抗原特異的 IgG、IgA 産生の増加がみられた。更に、免疫マウスから回収した脾細胞を用いてリジン欠損 TNF $\alpha$ 変異体の免疫誘導特性を解析した結果、IL-4、IL-5 などの Th2 型サイトカイン産生誘導を有意に増強していることが明らかとなった。また、リジン欠損 TNF $\alpha$ 変異体は、投与部位である鼻腔に全く傷害性を示さず、極めて安全であることが判明した。以上の結果から、リジン欠損 TNF $\alpha$ 変異体は、HIV に対する有効性・安全性に優れた粘膜ワクチンアジュバントになり得ることが示された。

HIV に対する粘膜ワクチンアジュバント開発を考えた場合、粘膜面での IgA により HIV の侵入を抑え、万が一侵入した場合に粘膜面・全身面での CTL により感染細胞を排除するという戦略が理想である。一方で、これまでに検討したサイトカインでは、CTL を誘導できないことも明らかとしている。そこで、IL-1 から IL-33 までのサイトカインの中から、抗原特異的抗体産生能ならびに CTL 誘導能が共に優れたサイトカインをスクリーニングした。その結果、抗原単独投与群と比較して、IL-1、IL-18、IL-33 併用投与群では、血清中の抗原特異的 IgG 産生の有意な増加が認められた。また、IL-1、IL-18、IL-33 併用投与群では、投与部位である鼻腔洗浄液中の抗原特異的 IgA 産生も増加しており、遠隔の粘膜面である膣洗浄液、糞便抽出液中でも同様に、抗原特異的 IgA の産生が有意に増加していた。さらに、血清中の抗体サブクラスの解析から、IgG1、IgG2a 共に誘導されたことから、CTL も誘導されている可能性が示唆された。以上の結果から、IL-1、IL-18、IL-33 が、抗体産生のみならず CTL をも誘導する優れた粘膜ワクチンアジュバントに成り得る可能性が示された。

#### 4. 考察

本研究では、TNF $\alpha$ 、TL1A、IL-1、IL-18、IL-33 が優れた粘膜ワクチンアジュバントになり得ることを明らかとした。しかし、これらサイトカインはいずれも自己免疫疾患、アレルギー疾患の誘発に主要な役割を果たすことが知られている。ワクチン開発においては、その安全性は高度に保証されていなければならない、安全性評価をより一層推進する必要がある。

#### 5. 自己評価

##### 1) 達成度について

大きくは当初の予定通り研究を遂行できたと考えている。また、それに準じる成果を公表できたと考えている。一方で、サイトカインのバイオコンジュゲーションは、検討したものの期待した成果が得られなかったこともあり、

十分な検討が行えなかった。今後、より詳細な検討を進めることで、バイオコンジュゲーションの有効性についても言及できるものと考えている。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

これまでに、動物実験においてはコレラトキシンなどの毒素由来蛋白質が、粘膜ワクチンアジュバントとして汎用されてきたが、免疫誘導メカニズムが未だ明確でなく、過剰な免疫応答に対する制御が困難であることから、ヒトに応用するには安全性の問題から未だ実用化されていない。本観点から、サイトカインの粘膜ワクチンアジュバントへの応用が期待されているが、粘膜免疫誘導能に関する基礎情報が乏しい。本研究成果は、サイトカインの HIV に対する粘膜ワクチンアジュバントとしての有用性を明らかとするものであり、HIV 根絶に向けたワクチン開発に多大に貢献するものである。また、新型インフルエンザなど未だ世界中で猛威をふるう新興・再興感染症など致死性の感染症に対する新たな方法論・基盤技術・医療体系を提供することで、国民の健康と福祉に貢献可能と考えられる。

##### 3) 今後の展望について

3年計画の本研究課題は本年度で終了する。この間、サイトカインが HIV に対するワクチン開発に資する粘膜ワクチンアジュバントとして有望であることを世界に先駆け明らかとすることができた。しかし、安全性の問題・コストの問題、さらには高等動物での有効性など、安全かつ有効なワクチン開発に向けては解決すべき問題が多数残されているのが現状である。さらに、本研究課題を通じ、“ワクチンで本当に HIV を予防可能なのか？”という指摘を頂いている。今後は、ワクチンによる HIV 予防が現実のものとなるよう、本成果を活用・発展することで、より有効性・安全性に優れた HIV に対する粘膜ワクチンの開発を進めていきたいと念じている。

#### 6. 結論

種々サイトカインをスクリーニングし、TNF $\alpha$ 、TL1A、IL-1、IL-18、IL-33 が HIV に対する粘膜ワクチンアジュバントとして有望であることを明らかとした。また、リジン欠損 TNF $\alpha$ 変異体が野生型と比較して、優れた HIV に対する粘膜ワクチンアジュバントであることを明らかとした。

#### 7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

該当無し

## 研究発表

研究代表者（吉岡靖雄）及び研究分担者（鎌田春彦、形山和史）

原著論文による発表

欧文

1. Kayamuro H, Abe Y, Yoshioka Y, Katayama K, Nomura T, Yoshida T, Yamashita K, Yoshikawa T, Kawai Y, Mayumi T, Hiroi T, Itoh N, Nagano K, Kamada H, Tsunoda S, Tsutsumi Y. The use of a mutant TNF-alpha as a vaccine adjuvant for the induction of mucosal immune responses. *Biomaterials*. 30(29): 5869-76, 2009.
2. Kayamuro H, Yoshioka Y, Abe Y, Katayama K, Yoshida T, Yamashita K, Yoshikawa T, Hiroi T, Itoh N, Kawai Y, Mayumi T, Kamada H, Tsunoda S, Tsutsumi Y. TNF superfamily member, TL1A, is a potential mucosal vaccine adjuvant. *Biochem Biophys Res Commun*. 384(3): 296-300, 2009.
3. Kayamuro H, Abe Y, Yoshioka Y, Katayama K, Yoshida T, Yamashita K, Yoshikawa T, Kawai Y, Mayumi T, Hiroi T, Ito N, Nagano K, Kamada H, Tsunoda S, Tsutsumi Y. Mutant TNF-alpha, mTNF, K90R, is a novel mucosal vaccine adjuvant candidate against HIV. *Pharmazie*, in press.

口頭発表

海外

1. Abe Y, Kayamuro H, Yoshioka Y, Katayama K, Nomura T, Hiroi T, Tsunoda S, Tsutsumi Y. Evaluation of efficacy of mutant TNF as a mucosal vaccine adjuvant against HIV-1 and influenza virus. 12th International TNF Conference, Madrid (Spain), 26-29 April, 2009.
2. Kayamuro H, Yoshioka Y, Abe Y, Katayama K, Nomura T, Hiroi T, Tsunoda S, Tsutsumi Y. Identification of new candidates as mucosal vaccine adjuvant in TNF superfamily cytokines. 12th International TNF Conference, Madrid (Spain), 26-29 April, 2009.
3. Abe Y, Kayamuro H, Yoshioka Y, Arita S, Katayama K, Kamada H, Nomura T, Itoh N, Yoshikawa T, Nagano K, Tsunoda S, Tsutsumi Y. Mast cells are required for interleukin-18 dependent mucosal immune responses., 2009 Annual Meeting of the Society for Leukocyte Biology, International Cytokine Society, & International Society for Interferon and Cytokine Research (Tri-Society), Lisbon (Portugal), 18-21 October, 2009.

国内

1. 萱室裕之, 吉岡靖雄, 阿部康弘, 形山和史, 廣井隆親, 角田慎一, 堤 康央: 活性増強型 TNF 変異体の粘膜ワクチンアジュバントへの応用., 日本薬学会 第 129 年回, 京都 (京都), 2009 年 3 月.
2. 阿部康弘, 萱室裕之, 吉岡靖雄, 形山和史, 野村鉄也, 廣井隆親, 角田慎一, 堤 康央: 生物学的 DDS による活性増強型 TNF 変異体の創出とその粘膜ワクチンアジュバントとしての有用性評価., 第 25 回 DDS 学会, 文京区 (東京), 2009 年 7 月.
3. Arita S, Kayamuro H, Yoshioka Y, Abe Y, Katayama K, Kamada H, Nomura T, Itoh N, Nagano K, Tsunoda S, Tsutsumi Y. Mast cells are essential for inducing mucosal immune responses by interleukin-18., 第 39 回 日本免疫学会学術集会, 大阪 (大阪), 2009 年 12 月.



研究課題：HIV-1 感染のヒト-ラット種間バリアーの解明  
 課題番号：H19-エイズ-若手-004  
 研究代表者：張 陰峰（北海道大学 遺伝子病制御研究所 助教）

## 1. 研究目的

HIV-1 感染小動物モデルの開発は、エイズ研究の重要なテーマである。当研究室ではラット感染モデルの改良を進めており、ヒト CCR5, CXCR4, CD4, CRF1, CytT1 の 5 種のヒト遺伝子を発現する Tg ラットの作製に成功した。このラットは近交系であり、完全な免疫系を有し、遺伝子操作が可能な点、詳細な免疫学/遺伝学的解析を可能とする。しかし、それでも、人と同等の感受性を有し、AIDS 発症が可能な動物モデルとするには改良が必要である。本 Tg ラットがまだ人と同等の HIV-1 の増殖を許さない原因は、単なる HIV-1 増殖に必須の因子の欠損ではなく、ウイルス抑制因子を持つことにあると考えられる。本研究の目的はウイルス粒子の感染性と侵入過程に関与しているウイルス性、細胞性因子を同定し、ラット感染モデルの作製に資することを目的にした。本年度は、HIV-1 の侵入過程で働く阻害因子の同定を中心に研究を行った。

## 2. 研究方法

### 1) マイクロアレイ法により侵入過程で働く阻害因子の同定

1. HIV-1 侵入効率に関して両極をなし、更にサイクロスポリン A (CsA) を作用させると感染効率が異なるラット T 細胞株である FPM1, C58NTD, NB2 の Total RNA を精製し、Agilent 社により cDNA マイクロアレイを作製し、GeneSpringGX 及び GenMAPP のソフトウェアで各細胞の遺伝子発現プロファイルと比較した。

2. 候補 cDNA 発現コンストラクトを入手し、ヒト 293T 細胞に発現させ、VENUS を発現する HIV シュードウイルス (HIV-Venus) を感染させ、FACS による HIV-1 感染阻害効果を調べた。

### 2) Functional Cloning 法による侵入過程で働く阻害因子の同定

1. HIV-1 侵入効率の低いラット T 細胞株から抽出した mRNA を基にレトロベクター cDNA ライブラリーを作成し、ヒト Mo1t5CCR5 細胞にトランスデュースし、ラット遺伝子発現細胞群を構築した。HIV-Venus を感染させて、VENUS<sup>+</sup> 細胞を FACSvantage の自動細胞捕集装置で回収し、細胞をクローニングした。

2. ベクター部分に設計したプライマーを用いて、VENUS<sup>+</sup> 細胞からラット cDNA を回収した。

3. cDNA の発現コンストラクトを作製し、293T 細胞にトランスフェクション後、HIV-venus の感染阻害効果を調べた。

### 3) ヒト Trim5 $\alpha$ の HIV-1 産生の抑制効果の検討

1. ヒト Trim5 $\alpha$  の過剰発現による HIV-1 産生の抑制効果アガザル、ヒト TRIM5 $\alpha$ 、または SPRY ドメインに点変異した変異体を HIV-1 分子クローンと 293T 細胞に導入し、細胞内または培養上清中に HIV-1 Gag の量を p24 ELISA または western blot で検討した。

#### 2. 内在性ヒト Trim5 $\alpha$ の HIV-1 産生の抑制効果

HIV-1 分子クローンを導入したヒト HT1080 また Jurkat 細胞に抗 TRIM5 $\alpha$  siRNA を lipofectamine または nucleofection により導入し、培養上清中の HIV-1 Gag の量を測定した。

#### 3. ヒト Trim5 $\alpha$ の HIV-1 粒子内への取り込み

培養上清を 20% sucrose 層にのせ、超遠心によって HIV-1 粒子を濃縮した。ウイルス粒子を Western blot によって Trim5 $\alpha$  と Gag 蛋白質を検出した。

(論理面への配慮)

遺伝子組み換え実験は北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規程に沿って許可を得た上、倫理規則を厳守した。HIV 感染実験は P3 実験室で行い、安全の面に十分配慮した。

## 3. 研究結果

### 1. HIV-1 侵入過程で働く阻害因子の同定

各ラット T 細胞株の遺伝子発現プロファイルを分析した。侵入効率の低い細胞株において、侵入効率の高い細胞株より発現が 10 倍以上高い遺伝子の発現クローンを 46 個入手し、293T 細胞に発現させ、HIV-1 の感染の抑制効果を評価したところ、HIV-1 感染抑制効果のあるラット宿主因子が 1 種類同定できた。この因子はラット JunB であり、転写因子、癌遺伝子として知られている。HIV-1 感染またはウイルス増殖に関与する情報は現在まで報告されていない。

HIV-1 の感染効率が低く、CsA 処理により感染効率が上がる細胞で発現が高く、HIV-1 感染効率が高く、CsA 処理で下がる細胞で発現が低い遺伝子の発現クローンを 18 個入手し、293T 細胞に発現させ、HIV-1 の感染への影響を調べた。その結果一つの分子クローン gene X (特許申

請の関係で遺伝子名を伏せさせていただきます。)が HIV-1 感染を顕著に抑制した。Gene X は DNA, RNA との結合能を持ち、胚の発達の調節、アポトーシスの制御などに関与する因子である。しかし、gene X ノックアウトマウスは生存可能である。

一方、Functional cloning 法を用いて、ラット cDNA を導入した HIV-1 抵抗性の Molt4CCR5 細胞をスクリーニングした、その中から HIV-1 感染効率がサル TRIM5 $\alpha$  発現 Molt4CCR5 と同程度、又はより低い細胞クローンを 32 個得た。現在そのクローンから cDNA 発現コンストラクトを作製し、ヒト細胞に発現させることによる HIV-1 感染阻害効果を調べている最中である。本年度中に HIV-1 感染阻害因子の同定ができる見込みである。

## 2. ヒト Trim5 $\alpha$ の HIV-1 産生の抑制効果

ヒト Trim5 $\alpha$  の HIV-1 の複製への影響を調べ、以下のことを明らかにした。過剰発現したヒト野生型の Trim5 $\alpha$  はアカゲザルと同程度、量依存的に HIV-1 Gag の産生を抑制した。また、437 番目アミノ酸がアルギニンからシステインへ変異しているヒト Trim5 $\alpha$  変異体 (R437C) は Gag の産生を抑制しなかった。ヒト HT1080 細胞と Jurkat 細胞では siRNA で Trim5 $\alpha$  をノックダウンすることにより、Gag の生産量が約 2 倍から 3 倍増加した、一方、元々 Trim5 $\alpha$  の発現が少ない 293T 細胞では、Gag の生産量に変化はなかった。野生型のヒト Trim5 $\alpha$  はわずかに HIV-1 粒子に取り込まれた。R437C 変異体の粒子への取り込みは更に少なかった。野生型ヒト Trim5 $\alpha$  が MLV-N の感染を抑制するのに対し、R437C 変異体は抑制しなかった。

## 4. 考察

マイクロアレイ法により新規 HIV-1 侵入過程で働く阻害因子を同定した。同定されたラット JunB は転写因子であり、他の宿主因子の発現を制御することより HIV-1 感染を阻害する可能性が考えられる。従って、JunB は直接の侵入阻害因子ではないと思われる。

ラット gene X は直接 HIV-1 感染を阻害する可能性を持ち、さらに解析を進める予定である。さらに、他のレトロウイルスの感染にも抑制効果を持つ可能性を検討したい。

昨年 hCRM1 と hCycT1 を発現する Tg ラットから高感受性の HIV-1 がヒト細胞に準じる量 (1/10-1/3) 生産される結果から、ラットでは、HIV-1 感染の後期過程において種間バリアーが存在しないと考えた。しかし、本年度、

他の研究グループよりラット CD317 (Tetherin) が HIV-1 粒子の放出を抑制するとの報告があった。これらの結果を基にヒト CCR5, CXCR4, CD4, CRM1, CycT1 Tg ラットと geneX/CD317 ノックダウン/アウトラットを交配することより高感受性 HIV-1 感染ラットモデルを作製したい。

ヒト TRIM5 $\alpha$  が HIV-1 産生を阻害することと本計画初年度で見出した過剰発現ラット TRIM5 がヒト TRIM5 $\alpha$  と共に HIV-1 の Gag 蛋白の産生を抑制するとの結果から、ラット TRIM5 をノックダウンする事によって、更なる HIV-1 感染ラットモデルの改善が期待される。

## 5. 自己評価

### 1) 達成度について

3 年の研究期間で新規 HIV-1 侵入過程における阻害因子の同定に成功した。また 19, 20 年度 hCRM1, hCycT1 Tg ラットからヒト細胞に準じる量の感染性 HIV-1 が生産されるとの研究結果を報告した。従って、本研究は概ね最初の研究計画通り進行した。

### 2) 研究成果の学術的、社会的意義について

本研究で同定された阻害因子をノックダウン/アウトする事により、HIV 感染ラットモデルの作成しうる。このラットは完全な免疫系を有し、特別な技術や設備を持たない研究グループでも広く利用できる。新しい治療と予防法開発のために有用である。さらに、本ラットは近交系であるために詳細な免疫学的手法が利用でき、かつ発生工学的手法により免疫系遺伝子等を欠損させることを通じて、HIV の複製/発症に関与する因子の同定にも寄与できる。同定された阻害因子がファミリーをなしている可能性も高く、HIV の感染に限らず、他のレンチウイルスの感染抑制への効果も考えられ、げっ歯類がレンチウイルス free であることの原因の解明につながる。

### 3) 今後の展望について

同定された阻害因子の HIV-1 感染への抑制機序を分子レベルで解明したい。また同定された阻害因子のノックダウンラットを作製し、HIV-1 感染モデルとしての有用性を検討したい。

## 6. 結論

HIV-1 侵入過程で働く阻害因子を同定した。この研究結果は HIV-1 感染ラットモデルの作成にむけて大きな貢献が期待できる。

## 7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

該当なし

研究発表

論文発表

1. Hiroyuki Okada, Xianfeng Zhang, Ismael Ben Fofana, Mika Nagai, Hajime Suzuki, Takashi Ohashi, and Hisatoshi Shida. Synergistic effect of human-CycT1 and -CRM1 on HIV-1 propagation in rat T cells and macrophages  
Retrovirology 2009, May 12; 6:43
2. Xianfeng Zhang, Yoko Aida. HIV-1 Vpr: a novel role in regulating RNA splicing  
Curr HIV Res 2009; 7(2): 163-8
3. Xianfeng Zhang, Mariko Kondo, Jing Chen, Hiroyuki Miyoshi, Hajime Suzuki, Takashi Ohashi, Hisatoshi Shida Inhibitory effect of human TRIM5a on HIV-1 production (submitted)

学会発表

張 險峰、大橋 貴、志田 壽利

ヒト Trim5 $\alpha$  による HIV-1 産生の抑制効果 第57回日本ウイルス学会

研究課題：エイズ感染細胞での配列特異的遺伝子組換えによる効率的な HIV 遺伝子除去法の開発

課題番号：H20-エイズ-若手-016

研究代表者：野村 渉（東京医科歯科大学生体材料工学研究所 助教）

## 1. 研究目的

現在の HIV 感染患者における治療は、多剤併用療法が主流であり成果を挙げているが、副作用や高額な医療費、またエスケープミュータントの発生などが問題点となっている。長期にわたる投薬も患者の QOL 面から望ましくない。そのため、新たな概念に基づく治療法の開発、確立が必要である。本研究では、特定の遺伝子配列に対して働く DNA 組換え酵素を用いて感染細胞のゲノム中に組み込まれた HIV-1 プロウイルス遺伝子を除去するという新規な治療法の開発を行う。本方法では根本的にウイルス産生を抑制できるため、画期的な治療法となる。また、プロウイルス遺伝子を 100% 除けない場合においても、これまでに利用されている阻害剤との組み合わせで有効な治療の選択肢になると考えられる。

## 2. 研究方法

保存度の高い *gag-pol* 遺伝子配列から 4~5 対程度の候補配列を選定し、その配列に特異的に結合する ZFP 遺伝子を構築する。DNA 結合活性が確認された ZFP に組換え酵素ドメイン Tn3 を融合させ、大腸菌内で発現、酵素活性の確認を行う。高い酵素活性が確認された場合は、それを用いて哺乳類細胞内での反応評価に進む。同時に感染細胞を用いてプロウイルス遺伝子の切除効率を検討する。今年度においては KS3+4 および KS5+6 という ZFP の組み合わせに焦点を絞り、研究を進めることにした。各標的配列で二量体を形成し、それらが更に四量体となることで組み換え反応が起こり、標的配列間の遺伝子が切除される。哺乳類細胞内での酵素活性評価は、標的となる *gag* 遺伝子配列を両端に置いた蛍光タンパク質遺伝子を有するプラスミドをレポーターとして用いた。このプラスミド遺伝子を CHO-K1、および HEK293 細胞にトランスフェクションで導入して Flp-IN システムを用いて安定的にレポーターを発現する細胞株を樹立する。これによって 1 細胞中に標的遺伝子配列が 1 箇所のみ存在するモデルを確立できる。標的配列に特異的な DNA 組換え反応が進行した場合、蛍光タンパク質の遺伝子が欠損するため、FACS で検出できる。また、ゲノム PCR、もしくは RT-PCR により組み換え効率を測定する方法も用いる。感染細胞からの遺伝子切除の定量的評価は、ウイルス産生細胞に対して 4

種類の ZFP 融合型組換え酵素をコードしたプラスミドをトランスフェクションで導入し、4~10 週後にウイルス粒子産生数の変化を p24 抗体による ELISA 法で追跡する。また、*gag* 遺伝子周辺に特異的なプライマーセットを用いた PCR による検出も行う。また、新たな標的として LTR 配列中に ZFP の結合サイトを見出したため、この ZFP を構築して DNA 結合を確認する。酵素ドメインについては Tn3 だけでなく Gin (G segment invertase) も用いて ZFP 融合型酵素を作成し、より最適な活性を持つ融合酵素の構築を試みる。

(倫理面への配慮)

実験動物に対する動物愛護上の配慮に関しては、日本学術会議による動物実験の適切な実施に向けたガイドライン及び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を厳密に遵守して、実験計画を綿密に検討した上で必要最小限の実験動物を用いて効率的に実験を実施する。

## 3. 研究結果

*gag-pol* 遺伝子配列に結合する ZFP は遺伝子を構築後に発現・精製を行い、ELISA 法によって 10~400nM という強い DNA 結合活性を有することが明らかになった。KS6 を標的とする ZFP と変異を導入して活性を向上させた Tn3 の融合体を作成して大腸菌内で発現させたところ、50% 以上の酵素活性が確認できた。そのため、その Tn3 ドメインを用いて哺乳類細胞内での反応の確認に進んだ。Flp-IN システムを用いて安定的にレポーターを発現する細胞株の樹立については *gag* 配列のうち KS34 および 56 の標的配列をレポーター遺伝子の両端にもつ細胞と、KS6 の標的配列のみの細胞を樹立することに成功した。前者は HIV 感染細胞を標的とする場合のモデル系となるものであり、後者は大腸菌の系との比較を行うためのものである。KS3456 レポーター細胞に 4 種類の ZFP 融合 Tn3 をトランスフェクションで導入して、FACS によって反応効率を確認した結果、10% 程度であることが明らかになった。各融合酵素の発現はウェスタンブロットによって確認された。また、ゲノム PCR では組み換え反応を示すバンドが検出されたが、結果が不安定であるためプライマーデザインなどの実験系の最適化が必要である。感染細胞における組み換え反応の検討においては細胞への導入効率を向上