

HIV-1 感染によって変動するサイトカインは細胞株と PBMC で程度は異なるが共通するものと、共通しないものがあった。2倍以上の変動を有意と考えた場合、T 細胞株で共通して増大するサイトカインは MCP-1 のみであった。これは CD4 陽性 T 細胞でも増強が確認されたが PBMC や B-LCL では変動が見られなかったため、CD4 陽性 T 細胞に対する HIV-1 感染による特徴的フットプリントとして有用なサイトカインと思われた。このほか、CD4 陽性 T 細胞と T 細胞株 2 種類以上で共通する変化を示したものには IP-10、IL-8 がある。これらも CD4 陽性 T 細胞に対する HIV-1 感染によるフットプリントとして有用と思われる。Primary 細胞における変動に注目すると、CD4 陽性 T 細胞と PBMC で同程度の変動を示すサイトカインには G-CSF、GM-CSF、IL-1b、IL-6、RANTES、VEGF がある。なかでも IL-6 は 100 倍以上という著しい発現増強が認められ、CD4 陽性 T 細胞に対する HIV-1 感染を感度よく捉えるために有用であると思われる。T 細胞株や CD4 陽性 T 細胞で見られない PBMC におけるサイトカイン変動は CD4 陽性 T 細胞以外の細胞集団に由来するサイトカイン発現と思われる。B-LCL でも反応が見られなかったため、HIV-1 暴露に対する monocyte/macrophage 系細胞による反応を反映しているものと考えられる。その特徴的サイトカインとしては IL-5、IL-10、IL-17、MIP-1a、TGF-1 がある。

一方、ウイルス感染に伴って高濃度のレベルから発現が低下するサイトカインには CD4 陽性 T 細胞で IL-5、IL-13 がある。これらも CD4 陽性 T 細胞に対する HIV-1 感染を感度よく捉えるために有用であると思われる。それ以外の減少は非常に低レベルでの濃度における変動でありその生物学的意義は明らかではない。

D. 考察

本検出系では簡便かつ高感度にサイトカインプロファイリングが行える事が判明した。HIV-1 感染に伴う変動を捕捉することによりウイルス暴露や感染がもたらす細胞生物学的な影響を明らかにする事が可能であると思われた。以上の知見により、本実験系を応用する事により SIV mutant によって誘導される優れたワクチン効果の原因となる免疫学的実行因子を検出する事が可能になると期待された。現時点ではサルとヒトで cross react する抗体種に限りがあるため、本研究で検索した 42 種類全てのサイトカインをサルで検討する事は困難であるが、今後系の進化に伴い、ワクチン効果を反映するサイトカインフットプリントを同定し、その結果から活性化されている免疫細胞を同定することも可能と思われる。

本実験系からは heterologous challenge 抵抗性に直接関与しないが、SIV 感染に反応して挙動するサイトカインを補足する可能性もある。真にワクチン効果を反映するサイトカインかを検証するためには非ワクチンサルにおける SIV 感染個体や CD8 depletion 後の血清等を相互に比較することが重要と思われる。

E. 結論

サイトカインアレイ法を利用する事により、deglycosylation SIV mutant によって誘導されるワクチン効果の責任因子を決定するための基盤情報として、ウイルス抵抗性に関連する液性因子を簡便に同定することが可能と思われる。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

論文発表

- 1) Aoki T, Miyauchi K, Urano E, Ichikawa R, Komano J. Protein transduction by pseudotyped lentivirus-like nanoparticles. *Gene Ther*. In press.
- 2) Yanagita H, Urano E, Matsumoto K, Ichikawa R, Takaesu Y, Ogata M, Murakami T, Wu H, Chiba J, Komano J, Hoshino T. Structural and biochemical study on the inhibitory activity of derivatives of 5-nitro-furan-2-carboxylic acid for RNase H function of HIV-1 reverse transcriptase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2011; 19, 816-25.
- 3) Suzuki S, Maddali K, Hashimoto C, Urano E, Ohashi N, Tanaka T, Ozaki T, Arai H, Tsutsumi H, Narumi T, Nomura W, Yamamoto Y, Pommier Y, Komano JA, Tamamura T. Peptidic HIV integrase inhibitors derived from HIV gene products: structure-activity relationship studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2010 Sep 15;18(18):6771-5.
- 4) Aoki T, Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Hamatake M, Tamamura H, Terashima K, Murakami T, Yamamoto N, Komano J. Improvement of lentiviral vector-mediated gene transduction by genetic engineering of the structural protein Pr55^{Gag}. *Gene Therapy*. 2010 Sep; 17(9):1124-33.
- 5) Suzuki S, Urano E, Hashimoto C, Tsutsumi H, Nakahara T, Tanaka T, Nakanishi Y, Maddali K, Han Y, Hamatake M, Miyauchi K, Pommier Y, Beutler JA, Sugiura W, Fuji H, Hoshino T, Itotani K, Nomura W, Narumi T, Yamamoto N, Komano JA, Tamamura H. Peptide HIV-1 integrase inhibitors from HIV-1 gene products. *J Med Chem*. 2010 Jul 22;53(14):5356-60.
- 6) Hamatake M, Komano J, Urano E, Maeda F, Nagatsuka Y, Takekoshi M. Inhibition of HIV replication by a CD4-reactive Fab of an IgM clone isolated from a healthy HIV-seronegative individual. *Euro J Immunol*. 2010 May;40(5):1504-1509.
- 7) Urano E, Ichikawa R, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi T, Komano J. T cell-based functional cDNA library screening identified SEC14-like 1a carboxy-terminal domain as a negative regulator of human immunodeficiency virus replication. *Vaccine*. 2010 May 26;28 Suppl 2:B68-74.
- 8) Kariya Y, Hamatake M, Urano E, Yoshiyama H, Shimizu N, Komano J. A dominant-negative derivative of EBNA1 represses EBNA1-mediated transforming gene expression during the acute phase of Epstein-Barr virus infection independent of rapid loss of viral genome. *Cancer Sci*. 2010 Apr;101(4):876-81.
- 9) 馬場昌範, 中田浩智, 朝光かおり, 駒野 淳, 岡本実佳, 杉浦 互. Perspectives of anti-HIV research (Review). *The Journal of AIDS Research*. 12(2); 74-80, 2010

学会発表

(国際学会)

- 1) Jun Komano, Emiko Urano, Hiroshi Yanagita, Yuko Morikawa, Tyuji Hoshino. Novel HIV-1 inhibitors targeting the last viral enzymatic activity and the structural protein. The 24th Joint meeting of the AIDS panels, HIV Resistance Impact in Asia. Singapore, Dec 8-10, 2010
- 2) Jun Komano. Cytokine signatures of transformed B cells with distinct EBV latency. National Taiwan University, College of Medicine, Room 202, Taiwan, Oct 6, 2010
- 3) Jun Komano, Toru Aoki, Emiko Urano, Reiko Ichikawa, Kosuke Miyauchi. Production of GFP-incorporated infectious pseudovirion by the N-terminal modification of HIV-1 Gag. CSHL meeting on Retroviruses, Cold Spring Harbor, NY, USA May 24-29, 2010.
- 4) Emiko Urano, Noriko Kuramochi, Hiroshi Tomoda, Yutaka Takebe, Kosuke Miyauchi, Jun Komano, Yuko Morikawa. A novel post-entry inhibitor of HIV-1 replication targeting the capsid domain of Gag. CSHL

meeting on Retroviruses, Cold Spring Harbor, NY, USA May 24-29, 2010

5) Emiko Urano, Noriko Kuramochi, Kosuke Miyauchi, Reiko Ichikawa, Hiroshi Tomoda, Yutaka Takebe, Jun Komano, Yuko Morikawa. A novel postentry inhibitor of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication Screened by Yeast Membrane-associated Two-hybrid System. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity Awaji 2010, Awaji Island, Hyogo, Japan, Sept 7-10, 2010

6) Jun Komano. Study on neutralizing antibodies against two highly variable viruses. The US-Japan Cooperative Medical Science Program 23rd Joint Meeting of AIDS Panel. Awaji Island, Hyogo, Japan, Sept 10, 2010

(国内学会)

1) Emiko Urano, Kosuke Miyauchi, Jun Komano. The analysis of novel cyclin T1 splice variant lacking exon 7. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 12月7-10日, 2010

2) Kosuke Miyauchi, Toru Aoki, Emiko Urano, Reiko Ichikawa, Jun Komano. Protein transduction by pseudo-lentiviral nano particles. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 12月7-10日, 2010

3) 山吉 麻子, 林 里衣, 福本 裕之, 小柳 義夫, 駒野 淳, 小堀 哲生, 村上 章. Non-coding RNA (7SK) の機能解析と機能性人工核酸としての応用. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 12月7-10日, 2010

4) 尾崎 太郎, 田中 智博, 橋本 知恵, 宮内 浩典, 鳴海 哲生, 山本 直樹, 駒野 淳, 玉村 啓和. gp120のCD4結合サイトを模倣した新規抗原分子の創製. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 11月24-26日, 2010

5) 柳田 浩志, 松元 輝礁, 尾湯 将一, 高江州 善寿, 浦野 恵美子, 市川 玲子, 村上 努, 駒野

淳, 星野 忠次. 新規HIV-1逆転写酵素RNase H 活性阻害剤開発における構造活性相関. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 11月24-26日, 2010

6) 滝澤万里, 草川 茂, 北村勝彦, 長縄 聡, 本田 三男, 村上利夫, 山本直樹, 駒野 淳. 非エピトープ変異による中和抗体感受性制御を指標にしたHIV Env定常状態の構造解析. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 11月24-26日, 2010

7) 宮内 浩典, 浦野 恵美子, 駒野 淳. HIV複製を増強するEBV感染B細胞由来のサイトカイン. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 11月24-26日, 2010

8) 橋本 知恵, 田中 智博, 浦野 恵美子, 尾崎 太郎, 新井 啓之, 鳴海 哲夫, 野村 涉, Kasthuraiah Maddli, Yves Pommier, 山本 直樹, 駒野 淳, 玉村 啓和. HIV-1遺伝子産物由来のインテグラーゼ阻害剤の創出. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 11月24-26日, 2010

9) 宮内 浩典, 浦野 恵美子, 駒野 淳. ハイスループットディスプレイアッセイの構築. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 11月7-9日, 2010

10) 今留 謙一, 矢島 美沙子, 川野 布由子, 市川 紗弓, 清水 則夫, 中村 浩幸, 松田 剛, 駒野 淳, 山本 直樹, 藤原製悦. EBウイルス関連血球貪食症候群モデルマウスの作製と解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 11月7-9日, 2010

11) 星野 忠次, 柳田 浩志, 松元 輝礁, 尾湯 将一, 高江州 善寿, 浦野 恵美子, 市川 玲子, 村上 努, 駒野 淳. 新規HIV-1逆転写酵素RNase H 活性阻害剤の開発. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 11月7-9日, 2010

12) 浦野 恵美子, 倉持 紀子, 市川 玲子, 宮内 浩典, 供田 浩, 武部 豊, 駒野 淳, 森川 裕子. HIV-1Gagを標的とする低分子化合物BMMPによるウイルスエントリー阻害機構. 第58回日本ウイル

ス学会学術集会, 徳島, 11月7-9日,2010

13) 星野忠次, 柳田浩志, 松元輝礁, 尾瀨将一,
浦野恵美子, 村上 努, 駒野 淳. 抗HIV薬RNaseH
活性阻害剤の開発. 第8回ナノ学会大会, 岡崎市, 5
月14日,2010

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

Tetsuo Narumi, Wataru Nomura, Chie Hashimoto, Aki

Ohya, Jun Komano, et al. HIV外被蛋白質gp41のC34
領域ペプチドの三量体の創製と阻害剤およびワ
クチンとしての開発(出願2010年11月4日) .

2. 実用新案登録

なし

3. その他

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

多様なエイズウイルス株の感染を制御する宿主応答：病理組織学的検索、
免疫担当細胞の画像解析

分担研究者 中村 紳一朗 滋賀医科大学准教授

研究要旨 低病原性 Simian Immunodeficiency Virus (SIV)のワクチン効果が期待されているが、その免疫応答や担当細胞の機能を明確にしなければ応用は不可能である。今年度は低病原性株の Human Immunodeficiency Virus との組換え株 SHIV、糖鎖欠損変異株Δ5G が投与された脾臓を用いて、各種免疫関連細胞を免疫染色で検出、さらに画像解析を行って、それぞれを数値化した。SHIV、Δ5G 接種の後、病原性株 SIV239 接種によるチャレンジを行うと、T 細胞系、B 細胞系はともに減少しており、SIV nef 陽性細胞も減少していた。その中で制御性 T 細胞のマーカーである foxp3 の反応だけが SHIV、Δ5G との間で異なっていた。すなわちΔ5G は単独接種で foxp3 陽性細胞が著しく多く、SIV239 のチャレンジで減少したのに対し、SHIV では単独投与で少なく、チャレンジ後に増加した。これらの差違から制御性 T 細胞が低病原性 SIV ワクチン株の病態制御で、重要な役割を担っていることが示唆された。

A.研究目的

AIDS 予防のために有力な方法の一つとして、弱毒生ワクチンが知られている。SIV のサロゲートモデルを用いた実験的では、低病原性 Simian Immunodeficiency Virus (SIV)株による免疫の誘導と病態コントロールが有効な手段の一つと考えられている。主な低病原性 SIV 株には Human Immunodeficiency Virus (HIV)と一部を組み換えた SHIV、糖鎖の一部を欠損させた Δ5G が知られている。

SIV のエンベロープ蛋白 Env には多量の糖鎖が付加しており、他のウイルスとは異なる特徴的な構造を持っている。Δ5G は、

高病原性株と同様に感染初期にウイルス量のピークを迎えるが、その後、著しく減少し、終世にわたって持続感染を示す高病原性株とは異なる挙動を示す。さらに、高病原性 SIV239 をチャレンジ投与しても、その感染を防御、病態をコントロールすることが明らかになっている。従ってΔ5G をはじめ、低病原性 SIV のワクチン効果は明らかだが、これら効果が惹起されるために誘導される免疫担当細胞、またはその機能などについて明らかにする必要がある。本分担研究では、SHIV、Δ5G のワクチン効果の中で誘導される宿主応答、すなわち免疫担当細胞の挙動について、免疫組織化学的

に検索かつ画像解析によって数値化し、比較、検討した。

B.研究方法

(材料) 用いられた動物はいずれもアカゲザル、オスである。実験群として1. SHIVが投与された後、高病原性 SIV239 をチャレンジした 3 例 (Mm9701、Mm9705、Mm9711)、2. SHIV のみが投与された 1 例 (Mm9704) 3. Δ5G 投与された後、高病原性 SIV239 をチャレンジした 3 例 (Mm0135、Mm0139、Mm0140)、4. Δ5G のみが投与された 1 頭 (Mm0137) の 4 群を設け、それぞれ病理解剖を行った。

(免疫組織化学的検索) 脾臓、鼠径リンパ節、腸間膜リンパ節および小腸をパラホルムアルデヒド固定、パラフィン包埋ブロックを作製し、約 $4\mu\text{m}$ に薄切した切片を作製したが、今回の検索対象は脾臓のみとした。一次抗体として抗 CD3 抗体 (汎 T 細胞マーカー)、抗 CD4 抗体 (ヘルパー T 細胞マーカー)、抗 foxp3 抗体 (制御性 T 細胞 (T-reg) マーカー)、抗 CD20 抗体 (B 細胞マーカー)、抗 granzyme B 抗体 (NK/T 細胞マーカー)、抗 Ki-67 抗体 (増殖細胞マーカー)、抗 SIV nef 抗体を用いた。ポリマーに HRP が標識された抗マウスグロブリン抗体を二次抗体とし、DAB で発色した。

(画像解析) それぞれの組織標本で白脾髄の濾胞構造と傍濾胞領域に相当する動脈周囲リンパ鞘 (periarteriolar lymphoid sheat; PALS) がまんべんなく確認できる画像を DP-72 (オリンパス) で取り込み、Image J で解析した。CD3 と CD20 の陽性像においては、X100 の対物レンズで $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$ を 5ヶ所取り込み、陽性

エリア面積を計測、 $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$ あたりの平均値を出した。他の抗体においては X200 の対物レンズで $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ を 5ヶ所取り込み、陽性細胞数を計測、 $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ あたりの平均値を出した。

C.研究結果

すべての計測結果は Table1 にまとめた通りである。CD3 陽性エリアは SHIV+SIV239 の群は $1404.2\mu\text{m}^2$ 、SHIV のみの群は $1952.2\mu\text{m}^2$ 、Δ5G+SIV239 の群は $1159.5\mu\text{m}^2$ 、Δ5G のみの群は $2733.2\mu\text{m}^2$ だった。CD20 陽性エリアは SHIV+SIV239 の群は $2952.5\mu\text{m}^2$ 、SHIV のみの群は $5179.6\mu\text{m}^2$ 、Δ5G+SIV239 の群は $3747.6\mu\text{m}^2$ 、Δ5G のみの群は $4589.5\mu\text{m}^2$ だった。CD4 陽性細胞数は、SHIV+SIV239 の濾胞内で $122.5/2500\mu\text{m}^2$ 、動脈周囲リンパ鞘 (PALS) で $675.7/2500\mu\text{m}^2$ 、SHIV のみの濾胞内で $158.2/2500\mu\text{m}^2$ 、PALS では $1117.4/2500\mu\text{m}^2$ 、Δ5G+SIV239 の濾胞内で $167.0/2500\mu\text{m}^2$ 、PALS では $865.7/2500\mu\text{m}^2$ 、Δ5G のみの濾胞内で $173.2/2500\mu\text{m}^2$ 、PALS では $1502.2/2500\mu\text{m}^2$ だった。foxp3 陽性細胞数は、SHIV+SIV239 で $177.6/2500\mu\text{m}^2$ 、SHIV のみで $116.6/2500\mu\text{m}^2$ 、Δ5G+SIV239 で $105.1/2500\mu\text{m}^2$ 、Δ5G のみで $299.6/2500\mu\text{m}^2$ だった。Granzyme B 陽性細胞数は、SHIV+SIV239 で $298.5/2500\mu\text{m}^2$ 、SHIV のみで $427.8/2500\mu\text{m}^2$ 、Δ5G+SIV239 で $319.9/2500\mu\text{m}^2$ 、Δ5G のみで $377.2/2500\mu\text{m}^2$ だった。Ki-67 陽性細胞数は、SHIV+SIV239 の濾胞胚中心で $123.8/2500\mu\text{m}^2$ 、濾胞辺縁帯で $68.3/2500\mu\text{m}^2$ 、PALS で $112.8/2500\mu\text{m}^2$ 、

SHIV のみの濾胞胚中心で $477.2/2500\mu\text{m}^2$ 、濾胞辺縁帯で $140.2/2500\mu\text{m}^2$ 、PALS で $184.8/2500\mu\text{m}^2$ 、 $\Delta 5\text{G}+\text{SIV}239$ の濾胞胚中心で $193.4/2500\mu\text{m}^2$ 、濾胞辺縁帯で $56.9/2500\mu\text{m}^2$ 、PALS で $131.0/2500\mu\text{m}^2$ 、 $\Delta 5\text{G}$ のみの濾胞胚中心で $110.4/2500\mu\text{m}^2$ 、濾胞辺縁帯で $37.4/2500\mu\text{m}^2$ 、PALS で $120.4/2500\mu\text{m}^2$ だった。SIV nef 陽性細胞数は、SHIV+SIV239 で $3.0/2500\mu\text{m}^2$ 、SHIV のみで $9.8/2500\mu\text{m}^2$ 、 $\Delta 5\text{G}+\text{SIV}239$ で $6.7/2500\mu\text{m}^2$ 、 $\Delta 5\text{G}$ のみで $18.4/2500\mu\text{m}^2$ といずれも少数だった。

ほとんどの項目が、低病原性株を単独で投与した群で活性化しており、チャレンジを行うと、細胞の分布エリアや細胞数は減少した。その中で唯一異なる挙動を示したのが *foxp3* で検出される T-reg だった。 $\Delta 5\text{G}$ が投与された群では他の項目と同様にチャレンジを行った群で減数していたのに対し、SHIV が投与された群では増数していた。

D. 考察

低病原性株 SHIV、 $\Delta 5\text{G}$ に対する強病原性株 SIV239 の投与で、いずれも免疫担当細胞の減数が見られた。検索動物はいずれも AIDS 症状などが見られないこと、チャレンジした群でともに SIV nef 陽性細胞が少ないことから、病態がコントロールされた上で免疫担当細胞が少なくなっていると考えられた。

その中で T-reg の挙動だけが他とは異なっていた。SHIV の単独感染に対し、 $\Delta 5\text{G}$ の単独感染では CD3 陽性領域、PALS の CD4 陽性細胞数は約 1.5 倍多かったが、*foxp3* 陽性細胞は約 2.5 倍多かった。 $\Delta 5\text{G}$ によって強く T-reg が誘導されることが明らかと

なった。それぞれに SIV239 のチャレンジを行うと、SHIV では T-reg は増数、 $\Delta 5\text{G}$ では減数した。SIV の増殖や慢性潜伏感染において T-reg が増殖するとされている。すなわち SHIV では病態がある程度制御されていたものの、チャレンジの感染による影響が強く出た結果が T-reg の増数として現れたものと考えられた。一方、 $\Delta 5\text{G}$ はより良い病態制御が行われたことで、T-reg が減数したのではないかと考えられた。

E. 結論

SHIV と $\Delta 5\text{G}$ の投与によるワクチン効果は病理組織学的に T 細胞系列、B 細胞系列、両者の減少として標榜された。その中で、病態制御の鍵を握っているのは、いくつかの検査項目の中で唯一、群間の挙動が異なっていた *foxp3* 陽性細胞、すなわち T-reg ではないかと推測された。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ushitora M, Sakurai F, Yamaguchi T, Nakamura S, Kondoh M, Yagi K, Akitomo K, Kawabata K, Mizuguchi H. Prevention of hepatic ischemia-reperfusion injury by pre-administration of catalase-expressing adenovirus vectors. J Control Release. 142(3):431-437, 2010

Shimozawa N, Nakamura S, Takahashi I, Hatori M, Sankai T. Characterization of a novel embryonic stem cell line from an ICSI-derived blastocyst in the African green monkey. Reproduction. 139(3):565-573. 2010

H.知的財産権の出願・登録状況

なし。

2. 学会発表

なし。

Table 1 SIVワケ株に対する免疫細胞の密度

	単位	エリア	ワケ株 チベシ	SHIV		Δ5G	
				SIV239	(-)	SIV239	(-)
CD3	ηm^2			1404.2	1952.2	1159.5	2733.2
CD4	個2500 ηm^2	Follicule		122.5	158.2	167.0	173.2
		PALS		675.7	1117.4	865.7	1502.2
foxp3	個2500 ηm^2			177.6	116.6	105.1	299.6
CD20	ηm^2			2952.5	5179.6	3747.6	4589.5
Granzyme B	個2500 ηm^2			298.5	427.8	319.9	377.2
Ki-67	個2500 ηm^2	Follicule; GC		123.8	477.2	193.4	110.4
		Follicule; MZ		68.3	140.2	56.9	37.4
		PALS		112.8	184.8	131.0	120.4
SIV-nef	個2500 ηm^2			3.0	9.8	6.7	18.4
		PALS		periarteriolar lymphoid sheath			
		GC		germinal center			
		MZ		marginal zone			

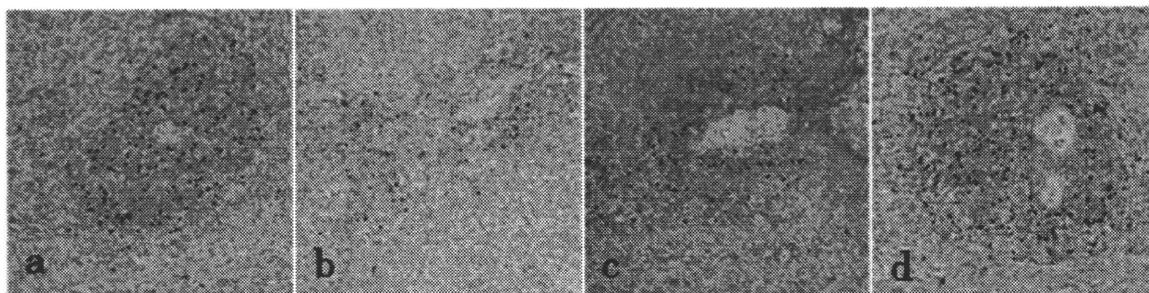


Fig. 1 Foxp3の免疫染色像、SHIV+SIV239 (a)、SHIVのみ(b)、Δ5G+SIV239 (c)、Δ5Gのみ(d)。

エイズ動物モデルとしてのカニクイザルの研究

研究分担者：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

エイズワクチン研究においてサルエイズモデルは極めて重要であり、これまでアカゲザルを用いたエイズワクチン研究の報告は多い。しかし近年の報告において、アカゲザルの系統や産地によって、エイズウイルスに対する感受性や病態が異なることが報告された。このため、特定の産地のアカゲザルを実験に使用する傾向が強くなり、安定した資源の供給が困難な状態にあるため、新たなサル動物モデルの開発が望まれている。

本研究では産地および系統が明らかで、かつ計画的に繁殖育成されている SPF カニクイザルを用いて SIV とカニクイザルの感染系の確立を試み、新たなエイズ動物モデルの開発に取り組む。4 頭のカニクイザルに SIVmac239 分子クローンを接種したところ、2 頭で慢性的な感染を示した。これら持続感染を示すカニクイザルにおいて、SIV 特異的細胞性免疫（IFN- γ ELISPOT Assay）および液性免疫（SIVGag 特異抗体価）を測定したところ、持続感染を示すカニクイザルにおいて免疫応答が認められた。これらの結果から、カニクイザルの SIV の病態が一部明らかになり、今後エイズ動物モデルとしての可能性が示唆された。

A. 研究目的

エイズワクチン開発には、サル動物モデルが必須であり、多くのエイズワクチン研究にアカゲザルを用いた動物実験が行われている。しかし、アカゲザルの系統や産地によって、エイズウイルスに対する反応性が異なることが報告されているため、新たなサルエイズ動物モデルが求められる。

当センターは、SPF 化されたクリーンなカニクイザルを繁殖し、実験に供給することが可能である。カニクイザルはアカゲザルよりも小型で扱い易く、世界中で様々な動物実験に用いられている。しかしエイズウイルスに対する感受性・病原性といった詳細な研究は行われていない。

本研究では、当センターで繁殖育成され、産地や系統が明らかになっている SPF カニクイザルを用いて、サル免疫不全ウイルス（SIVmac239）の病態を明らかにする。これまでの研究で、カニクイザルに接種する SIVmac239 分子クローンの *in vitro* の解析

を終えている。本年度はウイルス接種後 1 年間のウイルスロードや CD4+T 細胞の動態、免疫応答について検討した。

B. 研究方法

1. 免疫スケジュール

当センター繁殖育成しているインドネシア産、フィリピン産カニクイザルを用いて SIVmac239 の病態を明らかにする。各産地 2 頭に、それぞれ 10^3 TCID₅₀ を静脈内に接種を行う。接種後、経時的に採血を行い、血漿中のウイルスコピー数や CD4+T 細胞数の動態および各種免疫実験を行う。

2. ウイルスコピー数および CD4+T 細胞数

ウイルスコピー数は、血漿からウイルス RNA を抽出し、SIVgag 特異的 Primer および probe を用いて Real time PCR を行った。また CD4+T 細胞数の算定には、フローサイトメーターを用いて検討した。

3. 細胞性免疫の解析（IFN- γ 産生細胞数の測定）

SIV 抗原発現組換えワクシニアウイルスを感染させた自己由来の B-LCL を APC として利用し、採取した血液から分離した PBMC と共培養することで、SIV 特異的 IFN- γ 産生細胞数を測定した。

4. 液性免疫の解析 (抗体価)

SIVGag 特異的な IgG 抗体価を測定するため、2 倍階段希釈した血漿を用いて ELISA 法を行った。

5. 倫理面への配慮

本研究では動物実験申請等の必要な委員会での承認は既に得ており、ヒトサンプル、情報等は一切用いていない。

C. 研究結果

1. ウイルスコピー数および CD4+T 細胞の動態

SIVmac239 を接種したインドネシア産およびフィリピン産カニクイザルは、それぞれ 1 頭ずつで非常に高いウイルスピーク (2.6×10^7 copies/ml、 4.7×10^7 copies/ml) が確認され、その後の持続感染 ($10^6 \sim 10^7$ copies/ml) も認められた(図 1A)。また CD4+T 細胞数の動態を見たところ、感染ザル 2 頭は、接種後 30 週まで変化がみられなかったが、接種後 40 週から徐々に減少がみられ、接種後 50 週を超えると 500/ul 以下となりエイズ関連症候群 (ARC) レベルまで低下した(図 1B)。

2. SIV 特異的免疫反応

SIV 特異的細胞性免疫反応を自己由来 B-LCL とワクシニアウイルスを用いた ELISPOT assay を確立した(図 2)。その方法を用いて、ウイルス接種後 23、42、52 週の PBMC を用いて IFN- γ ELISPOT assay を行ったところ、持続感染を示すカニクイザルでは、高い SIV 特異的細胞性免疫反応が誘導された(図 3)。また SIV 特異的な Gag 抗体反応においても、持続感染カニクイザルにおいて誘導が確認された(図 4)。

D. 考 察

エイズワクチン研究で用いられるアカゲ

ザルのエイズ動物実験は、世界中で行われている。しかしながらアカゲザルの産地・系統によりウイルスの感受性が異なることが報告されており、アカゲザルに代わるエイズ動物モデルが必要であると考えられる。

カニクイザルは、世界中であらゆる感染症の研究に用いられており、実際にカニクイザルを用いたエイズワクチン研究も行われている。しかし、カニクイザルと SIV の病態に関する詳細な研究は行われてはいない。そのためエイズ動物モデルとして、カニクイザルを用いるならば、SIV の病態ならびにカニクイザルの産地・系統によるウイルス感受性の差異や免疫応答を明らかにするのは極めて重要である。

本研究では、2 頭のカニクイザルに SIV の持続感染を確認することが出来た。また持続感染個体は、細胞性免疫および液性免疫を誘導することも確認した。一方で、産地によるウイルス感染の差異は認められておらず、また持続感染個体同士のウイルスコピー数や CD4 +T 細胞の動態、免疫応答にも差は認められていない。以上のことからさらなる SIV とカニクイザルの感染実験を行い、新たなエイズ動物モデルとしての可能性について検証していく予定である。

E. 結 論

カニクイザルの SIV 病態および免疫応答が明らかになり、今後エイズワクチン研究の動物モデルとしての可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshino N, Kanekiyo M, Hagiwara Y, Okamura T, Someya K, Matsuo K, Ami Y, Sato S, Yamamoto N, Honda M. Intradermal delivery of recombinant vaccinia virus vector DIs induces gut-mucosal immunity. Scand. J.

Immunol. 72(2):98-105. 2010.

2. 学会発表

1. 萩原晶代、岡村智崇、新井陽子、斉藤守弘、伊藤誠一 地方病型牛白血病の血清学のおよび遺伝子学的検討 平成 22 年度関東・東京合同地区獣医師大会日本獣医公衆衛生学会、宇都宮、2010 年 9 月 12 日 (日)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特許出願

なし

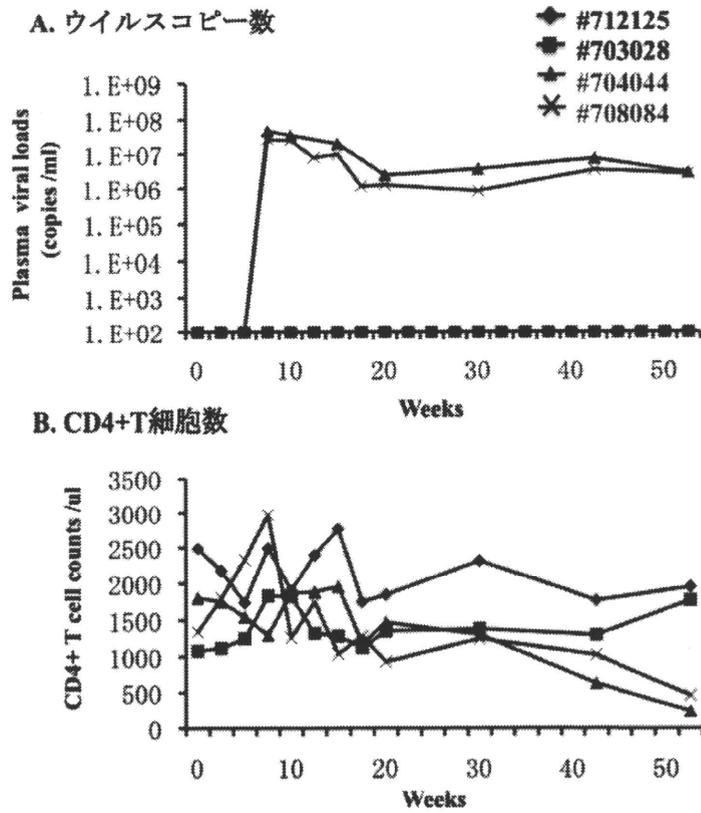


図1. SIV接種カニクイザルの血漿中ウイルスコピー数(A)およびCD4+T細胞の推移(B)

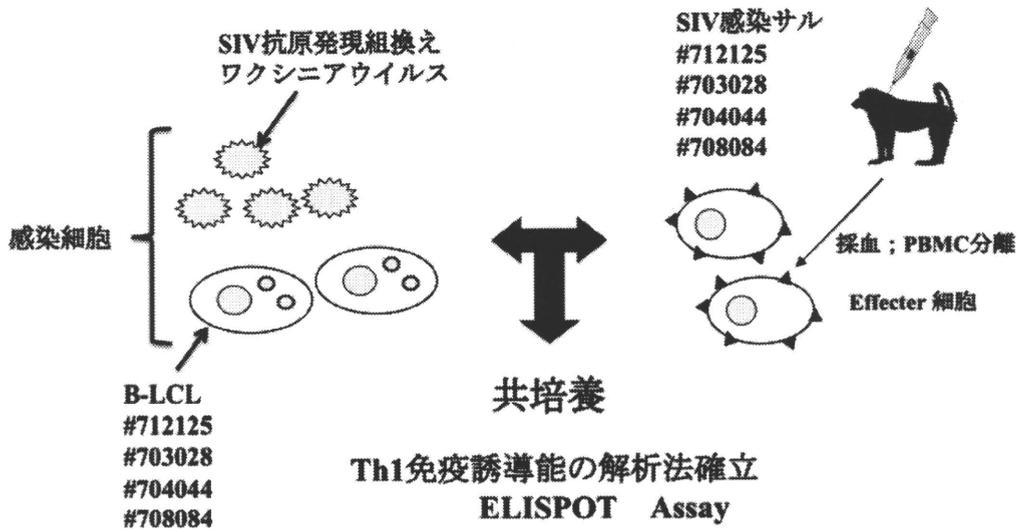


図2. 自己由来B-LCLおよびSIV抗原発現組換えワクシニアウイルスを用いたELISPOT法の確立

抗原刺激；組換えワクシニアウイルスGag-Pol
Effector細胞；PBMC

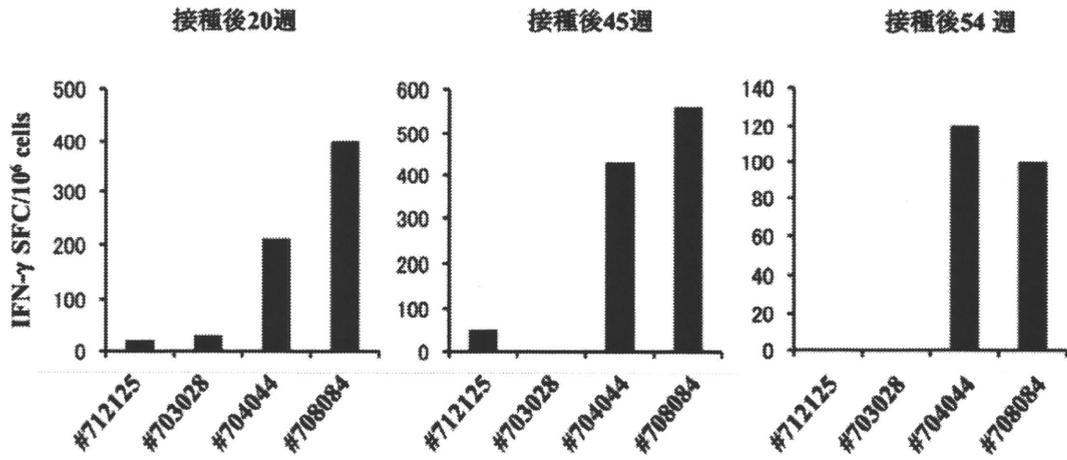


図3. SIV接種後の細胞性免疫応答

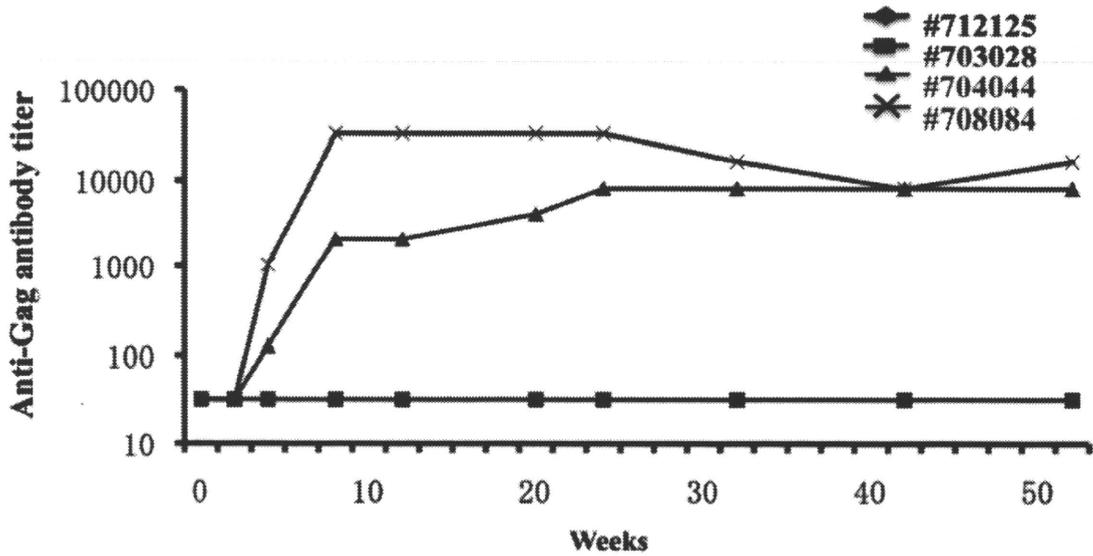


図4. SIV接種後の液性免疫応答

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

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
森 一泰					
Sugimoto C, Watanabe S, Naruse T, Kajiwara E, Shiino T, UmANO N, Ueda K, Sato H, Ohgimoto S, Hirsh V, Villinger F, Ansari AA, Kimura A, Miyazawa M, Suzuki Y, Yamamoto N, Nagai Y, <u>Mori K.</u>	Protection of macaques with diverse MHC genotypes against a heterologous SIV by vaccination with a deglycosylated live-attenuated SIV.	PLoS ON	5(7)	:e11678.	2010
Naruse TK, Chen Z, Yanagida R, Yamashita T, Saito Y, <u>Mori K.</u> , Akari H, Yasutomi Y, Miyazawa M, Matano T, Kimura A	Diversity of MHC class I genes in Burmese-origin rhesus macaque. Immunogenetics.	Immunogenetics	62(9)	601-611.	2010
木村 彰方					
Wichukchinda N, Nakajima T, Saipradit N, Nakayama EE, Ohtani H, Rojanawiwat A, Pathipvanich P, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P, Shioda T, <u>Kimura A.</u>	TIM1 haplotype may control the disease progression to AIDS in a HIV-1-infected female cohort in Thailand	AIDS	24(11)	1625-1631	2010
Itaya S, Nakajima T, Kaur G, Terunuma H, Ohtani H, Mehra N, <u>Kimura A</u>	No evidence of an association between the APOBEC3B deletion polymorphism and susceptibility to HIV infection and AIDS in Japanese and Indian populations.	J Infect Dis	202(5)	815-816	2010
Naruse TK, Chen Z, Yanagida R, Yamashita T, Saito Y, Mori K, Akari H, Yasutomi Y, Miyazawa M, Matano T, Kimura A	Diversity of MHC class I genes in Burmese-origin rhesus macaque. Immunogenetics.	Immunogenetics	62(9)	601-611.	2010
Sugimoto C, Watanabe S, Naruse T, Kajiwara E, Shiino T, UmANO N, Ueda K, Sato H, Ohgimoto S, Hirsh V, Villinger F, Ansari AA, <u>Kimura A.</u> , Miyazawa M, Suzuki Y, Yamamoto N, Nagai Y, Mori K.	Protection of macaques with diverse MHC genotypes against a heterologous SIV by vaccination with a deglycosylated live-attenuated SIV.	PLoS ON	5(7)	:e11678.	2010
宮澤 正顯					
Takamura, S., S. Tsuji-Kawahara, H. Yagita, H. Akiba, M. Sakamoto, T. Chikaishi, M. Kato, and <u>M. Miyazawa</u>	Premature terminal exhaustion of Friend virus-specific effector CD8 ⁺ T cells by rapid induction of multiple inhibitory receptors.	J. Immunol.	184	4696-4707	2010
Tsuji-Kawahara, S., T. Chikaishi, E. Takeda, M. Kato, S. Kinoshita, E. Kajiwara, S. Takamura, and <u>M. Miyazawa</u>	Persistence of viremia and production of neutralizing antibodies differentially regulated by polymorphic <i>APOBEC3</i> and <i>BAFF-R</i> loci in Friend virus-infected mice.	J. Virol.	84	6082-6095	2010

Takamura, S. and <u>M. Miyazawa</u>	Response to comment on "Premature terminal exhaustion of Friend virus-specific effector CD8 ⁺ T cells by rapid induction of multiple inhibitory receptors."	J. Immunol.	185	1349-1350	2010
Naruse, T. K., Z. Chen, R. Yanagida, T. Yamashita, Y. Saito, K. Mori, H. Akari, Y. Yasutomi, <u>M. Miyazawa</u> , T. Matano, and A. Kimura	Diversity of MHC class I genes in Burmese-origin rhesus macaques.	Immunogenetics	62	601-611	2010
Sugimoto C., S. Watanabe, T. Naruse, E. Kajiwara, T. Shiino, N. Umano, K. Ueda, H. Sato, S. Ohgimoto, V. Hirsch, F. Villinger, A. A. Ansari, A. Kimura, <u>M. Miyazawa</u> , Y. Suzuki, N. Yamamoto, Y. Nagai, and K. Mori	Protection of macaques with diverse MHC genotypes against a heterologous SIV by vaccination with a deglycosylated live-attenuated SIV.	PLoS One	5	e11678	2010
駒野 淳					
Aoki T, Miyauchi K, Urano E, Ichikawa R, Komano J.	Protein transduction by pseudotyped lentivirus-like nanoparticles.	Gene Ther.			In press
Yanagita H, Urano E, Matsumoto K, Ichikawa R, Takaesu Y, Ogata M, Murakami T, Wu H, Chiba J, Komano J, <u>Hoshino T.</u>	Structural and biochemical study on the inhibitory activity of derivatives of 5-nitro-furan-2-carboxylic acid for RNase H function of HIV-1 reverse transcriptase.	Bioorganic & Medicinal Chemistry.	19	816-25	2011
Suzuki S, Maddali K, Hashimoto C, Urano E, Ohashi N, Tanaka T, Ozaki T, Arai H, Tsutsumi H, Narumi T, Nomura W, Yamamoto Y, Pommier Y, <u>Komano JA, Tamamura T.</u>	Peptidic HIV integrase inhibitors derived from HIV gene products: structure-activity relationship studies.	Bioorganic & Medicinal Chemistry.	Sep 15;18(18)	6771-5	2010
Suzuki S, Urano E, Hashimoto C, Tsutsumi H, Nakahara T, Tanaka T, Nakanishi Y, Maddali K, Han Y, Hamatake M, Miyauchi K, Pommier Y, Beutler JA, Sugiura W, Fuji H, Hoshino T, Itotani K, Nomura W, Narumi T, Yamamoto N, Komano JA, <u>Tamamura H.</u>	Peptide HIV-1 integrase inhibitors from HIV-1 gene products.	J Med Chem.	Jul 22;53(14)	5356-60	2010
Aoki T, Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Hamatake M, Tamamura H, Terashima K, Murakami T, Yamamoto N, <u>Komano J.</u>	Improvement of lentiviral vector-mediated gene transduction by genetic engineering of the structural protein Pr55Gag.	Gene Therapy	Sep;17(9)	1124-33	2010
Hamatake M, Komano J, Urano E, Maeda F, Nagatsuka Y, Takekoshi M.	Inhibition of HIV replication by a CD4-reactive Fab of an IgM clone isolated from a healthy HIV seronegative individual.	Euro J Immunol.	May;40(5)	1504-1509	2010

Kariya Y, Hamatake M, Urano E, Yoshiyama H, Shimizu N, Komano J.	A dominant-negative derivative of EBNA1 represses EBNA1-mediated transforming gene expression during the acute phase of Epstein-Barr virus infection independent of rapid loss of viral genome.	Cancer Sci.	Apr;101(4)	876-81	2010
Urano E, Ichikawa R, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi T, Komano J.	T cell-based functional cDNA library screening identified SEC14-like 1a carboxy-terminal domain as a negative regulator of human immunodeficiency virus replication.	Vaccine.	May 26;28 Suppl 2	B68-74	2010
馬場昌範, 中田浩智, 朝光かおり, 駒野 淳, 岡本実佳, 杉浦 互.	Perspectives of anti-HIV research (Review).	The Journal of AIDS Research.	12(2)	74-80	2010
中村 紳一朗					
Shimozawa N, Nakamura S, Takahashi I, Hatori M, Sankai T	Characterization of a novel embryonic stem cell line from an intracytoplasmic sperm injection-derived blastocyst in the African green monkey	Reproduction	139 (3)	565-573	2010
Ushitora M, Sakurai F, Yamaguchi T, Nakamura SI, Kondoh M, Yagi K, Kawabata K, Mizuguchi H	Prevention of hepatic ischemia-reperfusion injury by pre-administration of catalase-expressing adenovirus vectors	J Control Release	142 (3)	431-437	2010
岡村 智崇					
Yoshino N, Kanekiyo M, Hagiwara Y, Okamura T, Someya K, Matsuo K, Ami Y, Sato S, Yamamoto N, Honda M.	Intradermal delivery of recombinant vaccinia virus vector DIs induces gut-mucosal immunity.	Scand. J. Immunol.	72(2)	98-105	2010

IV. 研究成果の刊行物・別刷(抜粋)

Protection of Macaques with Diverse MHC Genotypes against a Heterologous SIV by Vaccination with a Deglycosylated Live-Attenuated SIV

Chie Sugimoto^{1,2,3#a}, Satoru Watanabe^{1,2#b}, Taeko Naruse⁴, Eiji Kajiwara⁵, Teiichiro Shiino¹, Natsuko Umamo⁵, Kayoko Ueda^{1,2}, Hirotaka Sato^{1,2}, Shinji Ohgimoto⁶, Vanessa Hirsch⁷, Francois Villinger^{8,9}, Aftab A. Ansari⁸, Akinori Kimura⁴, Masaaki Miyazawa⁵, Yasuo Suzuki^{3,10}, Naoki Yamamoto^{1#b}, Yoshiyuki Nagai¹¹, Kazuyasu Mori^{1,2,3,8*}

1 AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan, 2 Tsukuba Primate Research Center, National Institute of Biomedical Innovation, Tsukuba, Ibaraki, Japan, 3 CREST, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi, Saitama, Japan, 4 Division of Medical Science, Department of Molecular Pathogenesis, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan, 5 Department of Immunology, Kinki University School of Medicine, Osaka-Sayama, Osaka, Japan, 6 Department of Virology, Osaka City University Graduate School of Medicine, Abeno-ku, Osaka, Japan, 7 Laboratory of Molecular Microbiology, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, United States of America, 8 Department of Pathology and Laboratory Medicine, Emory University, Atlanta, Georgia, United States of America, 9 Yerkes National Primate Research Center, Emory University, Atlanta, Georgia, United States of America, 10 Department of Biomedical Sciences, College of Life and Health Sciences, Chubu University, Kasugai, Aichi, Japan, 11 Center of Research Network for Infectious Diseases, Riken, Chiyoda-ku, Tokyo Japan

Abstract

HIV vaccine development has been hampered by issues such as undefined correlates of protection and extensive diversity of HIV. We addressed these issues using a previously established SIV-macaque model in which SIV mutants with deletions of multiple gp120 N-glycans function as potent live attenuated vaccines to induce near-sterile immunity against the parental pathogenic SIVmac239. In this study, we investigated the protective efficacy of these mutants against a highly pathogenic heterologous SIVsmE543-3 delivered intravenously to rhesus macaques with diverse MHC genotypes. All 11 vaccinated macaques contained the acute-phase infection with blood viral loads below the level of detection between 4 and 10 weeks postchallenge (pc), following a transient but marginal peak of viral replication at 2 weeks in only half of the challenged animals. In the chronic phase, seven vaccinees contained viral replication for over 80 weeks pc, while four did not. Neutralizing antibodies against challenge virus were not detected. Although overall levels of SIV specific T cell responses did not correlate with containment of acute and chronic viral replication, a critical role of cellular responses in the containment of viral replication was suggested. Emergence of viruses with altered fitness due to recombination between the vaccine and challenge viruses and increased gp120 glycosylation was linked to the failure to control SIV. These results demonstrate the induction of effective protective immune responses in a significant number of animals against heterologous virus by infection with deglycosylated attenuated SIV mutants in macaques with highly diverse MHC background. These findings suggest that broad HIV cross clade protection is possible, even in hosts with diverse genetic backgrounds. In summary, results of this study indicate that deglycosylated live-attenuated vaccines may provide a platform for the elucidation of correlates of protection needed for a successful HIV vaccine against diverse isolates.

Citation: Sugimoto C, Watanabe S, Naruse T, Kajiwara E, Shiino T, et al. (2010) Protection of Macaques with Diverse MHC Genotypes against a Heterologous SIV by Vaccination with a Deglycosylated Live-Attenuated SIV. PLoS ONE 5(7): e11678. doi:10.1371/journal.pone.0011678

Editor: Douglas F. Nixon, University of California San Francisco, United States of America

Received: March 22, 2010; **Accepted:** June 28, 2010; **Published:** July 20, 2010

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Public Domain declaration which stipulates that, once placed in the public domain, this work may be freely reproduced, distributed, transmitted, modified, built upon, or otherwise used by anyone for any lawful purpose.

Funding: This work was supported by AIDS research grants from the Health Sciences Research Grants, from the Ministry of Health, Labor, and Welfare in Japan, and from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology in Japan. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: mori@nibio.go.jp

#a Current address: Division of Immunology, Tulane National Primate Research Center, Covington, Louisiana, United States of America

#b Current address: Department of Microbiology, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, Singapore, Singapore

Introduction

Molecular epidemiological studies have revealed the existence of an extensive degree of diversity of HIV-1 isolates [1]. HIV-1 is classified in three major groups (M, N, O) based on their geographical origin. Group M represents the predominant HIV-1 circulating through the world and has been divided into more than 10 subtypes (clades) as well as increasing number of circulating recombinant forms (CRF) primarily due to error-prone viral

reverse transcriptase and the occurrence of super-infections. This diversity is continuously expanding worldwide and is a major obstacle for the successful development of an AIDS vaccine. While the generation of a vaccine capable to prevent transmission of HIV isolates endemic in a particular area remains an unfulfilled task, protection against phylogenetically distant viruses represents an even more formidable hurdle. The failure and dismal success of HIV-1 vaccine trials that have been conducted so far has prompted a re-emphasis for more basic studies concerning vaccine