

201029015A

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

HIV の感染防止、AIDS 発症防止に関する免疫学的基礎研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 森 一泰

平成23(2011)年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
HIV の感染防止、AIDS 発症防止に関する免疫学的基礎研究	・・・ 1
森 一泰 (国立感染症研究所 エイズ研究センター主任研究官)	
II. 分担研究報告	
1. 生ワクチンにより誘導される感染防御の解析	・・・ 29
森 一泰 (国立感染症研究所 エイズ研究センター主任研究官)	
2. 組換え BCG/弱毒ワクシニアによるプライム/ブースト型 HIV ワクチンの研究	・・・ 40
松尾 和浩	
3. 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	・・・ 45
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)	
4. 弱毒ワクシニアベクターによるエイズワクチン開発	・・・ 54
志田 壽利 (北海道大学 遺伝子病制御研究所 教授)	
5. 粘膜免疫活性化による粘膜棲息型 HIV 制御法の開発	・・・ 57
高橋 秀実 (日本医科大学 微生物学免疫学教室 教授)	
6. エイズワクチンを目指したバキュロウイルス粒子の構築とその自然免疫 応答の誘導能	・・・ 63
高久 洋 (千葉工業大学 工学部 教授)	
7. 汎 HIV-1 株中和能を有する抗体誘導に関する研究	・・・ 67
駒野 淳 (国立感染症研究所 エイズ研究センター主任研究官)	
8. HIV-1 の中和抗体誘導	・・・ 73
高橋 秀宗 (国立感染症研究所 感染病理部室長)	
9. HIV の動的超分子機構をターゲットとした阻害剤・抗体の創製	・・・ 76
玉村 啓和 (東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授)	
10. HIV の感染防止粘膜ワクチンの創製	・・・ 92
庄司 省三 (熊本大学 名誉教授、熊本保健科学大学 教授)	
11. 霊長類エイズモデルの粘膜部位における感染動態と免疫応答	・・・ 97
三浦 智行 (京都大学 ウイルス研究所 准教授)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	・・・ 101
IV. 研究成果の刊行物・別刷 (抜粋)	・・・ 111

I. 總括研究報告

HIVの感染防止、AIDS発症防止に関する免疫学的基礎研究

研究代表者 森 一泰（国立感染症研究所 主任研究官）

研究要旨

HIV-1 ワクチン開発研究における課題：エイズウイルス感染制御に働く宿主応答の解明、プライム・ブーストワクチンの開発、広域中和抗体誘導法、細胞性免疫誘導法、ワクチン評価モデル開発に関し、以下の研究を行った。

1. エイズウイルス感染制御モデルを用いた感染制御に関わる宿主応答の解析

糖鎖欠失変異株Δ 5G は HIV ワクチンに求められる多様なウイルスに対する感染防御効果を示す。慢性期における感染制御には個体差があり CD8+細胞に依存し、CD8+T 細胞に加え、NK 細胞の役割が明らかとなった。初期感染期の感染抑制は、個体差がなくウイルスの多様性の影響を受けないことから HIV ワクチンへの応用が求められる。初期感染期における感染抑制に関わる遺伝子発現を明らかにするために末梢単核球を用いマイクロアレイ解析を行った。1) HIV 持続感染における免疫活性化の役割が指摘されているが、Δ 5G ザルのチャレンジ感染前後では、調節性 T 細胞(Treg)関連遺伝子：ENTPD1(CD39), IL2RB, TGFB1, IL10, STAT5B 等の高発現が認められた。2) 抗原提示細胞関連遺伝子として CD83, CD14 遺伝子の高発現が認められた。3) NK レセプターKLRCC1(NKG2A), NCR1(NKp46), NKp30, NCR3 遺伝子発現から、感染制御、チャレンジ感染防御における NK 細胞の役割が示唆された。

2. プライム・ブーストワクチンの開発

SIV Env gp120, RT, Rev-Tat-Nef を発現する BCG を構築した。SIV Gag, Env gp120, RT, Rev-Tat-Nef を発現する rBCG と rVV LC16m8Δを用いるプライム・ブーストワクチンのインド産アカゲザルを用いたワクチン評価実験を開始した。マウスを用いた実験から、m8Δとセンダイベクター(SeV)とのプライム・ブースト法は細胞性免疫と抗体の両方を誘導することを見出した。

3. 広域中和抗体誘導の研究

日本人 HIV-1 感染者から抗体遺伝子を単離し、遺伝子配列から抗体遺伝子についての情報が得られた。有機合成による広域中和抗体の誘導する抗原/ワクチンの創製を行った；1)コレセプターである CXCR4 の細胞外ループの環化&構造固定化したペプチドミメティックを合成した。(2) HIV の侵入時の立体構造変化に関わる蛋白 gp41 を認識する抗体誘導を目的に、gp41-N36 の 3 量体、C34 の 3 量体を合成し、マウスでの中和抗体誘導を確認した。(3) 中和抗体のエピトープとして CD4 binding/コレセプター-binding 領域に保存されている断片ペプチドを環状化し、立体構造を固定化したペプチドミメティックを合成した。(4) CD4 の小分子 mimic 誘導体を合成し、HIV 侵入の動的超分子機構への影響や中和抗体等との併用の効果を検討した。Core-Env を調製し、2F10, 4E10 等の既存広域中和抗体と同等のモノクローナル抗体を多種類作成した。多くの抗体は 4E10 と同様に FCR 発現により中和能が増強された。senju vaccine により誘導される抗体について HIV 感染防止効果を有していることが示唆された。交叉免疫により抗体価の

維持が可能であることを示した。

4. アジュバント・細胞性免疫誘導法の研究

BCG の分泌抗原 Ag85B について、サルを用いた SHIV 感染の制御効果から、細胞性免疫のアジュバント効果が示された。マウスの実験から、ウイルス感染細胞の排除に働く CTL の誘発には、DEC-205 陽性 DC の cross-presentation を利用して、ウイルスイピトープをクラス I MHC 分子に提示させることが最も効率の良い方策と考えられた。HIV-1 Gag 発現バキュロウイルスはマウス樹状細胞を活性化させ、HIV-1 感染抑制効果を示した。

5. ワクチン評価モデルの開発

新規組換えウイルス作製技術の開発により、アカゲザルで良く増殖する CCR5 指向性の HIV 非クレード B 型 SHIV を短期間で新規に作製することができた。HIV 広域中和抗体を誘導するワクチン評価系への貢献が期待される。

分担研究者

松尾 和浩 (日本ビーシージー製造株式会社日本BCG研究所 部長)

志田 壽利 (北海道大学 遺伝子病制研究所 教授)

保富 康宏 (医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター センタ長)

駒野 淳 (国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官)

高橋 秀宗 (国立感染症研究所感染病理部 室長)

庄司 省三 (熊本大学医学薬学研究部 名誉教授)

玉村 啓和 (東京医科歯科大生体材料工学研究所 教授)

三浦 智行 (京都大学ウイルス研究所感染症モデル研究センター 准教授)

高橋 秀実 (日本医科大学微生物免疫学教室 教授)

高久 洋 (千葉工業大学工学部・分子生物学 教授)

A. 研究目的

有効な HIV ワクチンを開発するために、基礎研究から臨床研究まで様々な研究が行われている。1) 安全性が確認された種々のベクターを用いた候補ワクチンの臨床研究、2) 霊長類等を用いた候補ワクチンの有効性、安全性についての前臨床研究、3) HIV 感染制御コホート、動物モデルを用いたエイズウイルス感染防御に働く宿主応答の解明、4) HIV 感染者の細胞性免疫、中和抗体の解析等。

根本的かつ基本的な問題として、HIV はこれまでワクチン開発された病原体と異なる。通常ヒトは HIV 感染を自然に制御することができず、宿主応答にもかかわらず HIV は持続的ウイルス増殖を特徴とする慢性感染となる。HIV は宿主応答による感染抑制から回避する性質を備えている。その一つは、HIV の逆転写酵素の複製エラーに基づく高変異性とその結果である多様性である。第2の問題は、HIV は抗体による中和を受けにくいウイルススパイクを持つ。これまでワクチンの開発された方法、知識だけでは HIV ワクチン開発はできない。

しかし、これまでの研究から難問を解く糸口が見つかっている。感染制御の実例が HIV 感染者、動物モデル研究で見いだされている。HIV 感染後早期、あるいは感染前に抗 HIV 治療薬を服薬することにより感染制御する可能性が高くなる。この現象は動物モデルで確認されている。生ワクチン感染ではさらに強力な感染制御免疫が誘導される。しかもこの防御免疫は、HIV の多様性、変異性に対しても有効であることが示された。

次に、昨年のトピックスである中和抗体研究の進展である。NIAID, VRC グループ、Scripps Insitute グループは、それぞれ HIV 感染者から、新たな広域中和抗体を分離した。注目される点は、

これまで発見された広域中和抗体と比べ 100 倍高い中和抗体価があること、さらに、これまでの全 HIV 分離株の 90%に対する中和能が確認された。また約 30%の HIV 感染者から広域中和抗体が検出されたことから、ワクチンによる広域中和抗体の誘導の可能性が示唆された。

本研究班では、このような世界の HIV 研究の動向、情報を元に、独創性の高い研究を行い、HIV ワクチン開発研究への貢献を目標とする。

1. エイズウイルス感染制御モデルを用いた感染制御に関わる宿主応答の解析 (森)

病原性株 SIVmac239 の糖鎖欠失変異株 Δ 5G は生ワクチンとして極めて強力な感染防御能を誘導し、HIV ワクチンに求められる多様なウイルスに対する感染防御効果を示した。感染防御に働く宿主応答は、初期感染期と慢性感染期で異なった。慢性期の感染制御には CD8+細胞に依存し個体間で感染制御が異なった。ところが初期感染期の感染抑制は個体差がなく、多様なウイルスの感染を制御する性質を示した。そこで初期感染を抑制する宿主応答を明らかにすることを目的にマイクロアレイによる宿主遺伝子発現の解析を行った。

2. プライム・ブーストワクチンの開発 組換え BCG を用いたエイズワクチンの開発 (松尾)

昨年度コドン至適化した rBCG-SIVgag を作成し rVV DIs とのプライム・ブーストにより長期間のワクチン効果を明らかにした。今年度は、SIV Env gp120, RT, Rev-Tat-Nef を発現する BCG を構築し、rVV LC16m8Δとのプライム・ブーストワクチンの評価を行う。HIV-Gag 発現 rBCG の細胞性免疫誘導を MHC pentamer で解析する。

弱毒ワクシニアベクターを用いたエイズワクチンの開発 (志田)

種痘ワクチンとして安全性が確認された LC16m8 株を改良し、さらに安全な LC16m8Δ株を作成した。LC16m8Δ株は MVA 株と比べ 1000 倍強い抗強毒ワクチニア抵抗力を付与した。そこで LC16m8Δ株をベクターして HIV/SIV タンパクを発現する HIV ワクチンを作成した。本研究では、細胞性免疫と抗体の両方の誘導するために m8Δとセンダイベクター(SeV)とのプライム・ブースト法について検討した。

3. アジュバント・細胞性免疫誘導法の研究 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に関する研究 (保富)

nef 遺伝子欠損により病原性が低下し、弱毒ワクチンとして機能をも失った弱毒ウイルス SHIV-NI を用い、このウイルスに強力なアジュバント活性を持つ抗酸菌分泌抗原 Ag85B 遺伝子を組み込んだ。免疫誘導能の極めて低い SHIV-NI の免疫原性の変化から、ウイルス制御と免疫反応の解析から Ag85B 遺伝子の機能を調べた。粘膜組織における DEC-205 陽性樹状細胞の選択的活性化による特異的 CTL 誘導の可能性 (高橋秀実)

感染細胞から放出された抗原分子を捕捉し DEC-205 陽性 DC を個体内で選択的に活性化する捕捉抗原の cross-presentation を介した Epitope peptide 特異的な CTL の重要性について検討した。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 (高久)

HIV-1 gag 発現組換えバキュロウイルスをマウス骨髄由来樹状細胞(BMDC)へ感染させ、自然免疫および適応免疫応答を評価し、エイズワクチンとしての新規 HIV-1 gag 発現バキュロウイルス感染樹状細胞ワクチンの開発を目指す。

4. 中和抗体 汎 HIV-1 株中和能を有する抗体誘導に関する研究 (駒野)

日本人血友病患者で血液製剤にて HIV-1 に感

染した症例の中に強い液性免疫を持つ感染者を複数同定した。このような患者が持つ抗エンベロープタンパク質抗体レパートリー、抗原の構造的特徴、抗体の遺伝子的特徴を解析し、ワクチン抗原デザインに応用することにより、液性免疫誘導型エイズワクチンの構築を目指す。

有機合成化学手法による人工抗原分子、ワクチン創製 (玉村)

(1) ワクチン創製のターゲットとしてコレセプターである CXCR4 の細胞外ループを環化&構造固定化したペプチドミメティックを合成し、効率的な抗体誘導をはかる (2) HIV の侵入時の立体構造変化に関わる蛋白 gp41 を認識する抗体を作製する。 (3) 長期未発症の HIV 感染者の間で保存されている CD4 binding/コレセプター-binding 領域が中和抗体のエピトープとして鎖状を環状にし、立体構造を固定化したペプチドミメティックを合成した。 (4) CD4 の小分子 mimic 誘導体を合成し、HIV 侵入の動的超分子機構への影響や中和抗体等との併用の効果を検討した。

(2) HIV-1 中和モノクローナル抗体の誘導 (高橋秀宗)

HIV-1 の広域中和エピトープの一つ membrane proximal external region (MPER)は融脂質膜に埋まっており免疫系への提示が難しい。そこで粒子を detergent を含む蔗糖密度勾配法で処理し Core-Env を分離し、抗原として用いた。

HIV 感染防止粘膜ワクチンの創製 (庄司)

HIV-1 の腸管関連リンパ組織(GALT)におけるウイルス増殖を抑えるために、粘膜免疫系の賦活するワクチンを創製する。Senju vaccine で誘導された免疫応答を免疫抗原によりブーストし迅速なウイルス感染への対応が可能か検討した。

5. ワクチン評価モデルの作成 (三浦)

HIV-1 Env を抗原とするワクチンを評価する動物モデルとして HIV-1 env を中心にゲノムの半分を HIV-1 に置換した SIV/HIV-1 キメラウイルス (SHIV) によるエイズ動物モデルを作成した。

B. 研究方法

1. エイズウイルス感染制御モデルを用いた感染制御に関わる宿主応答の解析

マイクロアレイによる宿主遺伝子の解析 (森)

Δ5G 感染ザルは極めて高い感染防御免疫を誘導する。この感染防御免疫と関連する遺伝子の同定を目的に、末梢単核球を用い、チャレンジ感染前後の感染ザルにおける遺伝子発現の特徴について解析を行った。Δ 5G 感染後 40 週、チャレンジ感染後 3 日のサンプルがチャレンジ前後に対応する。比較コントロール群として、感染抑制が起こらない SIVmac239 感染後 1 週、非感染ザル、Δ 5G 感染後 1 週を用いた。Δ5G 感染ザルへ SIVmac239 チャレンジ感染後、3 日の PBMC をサンプルとして用いた。比較対象として、SIVmac239 感染ザル PBMC (感染後 1 週、40 週) Δ5G 感染ザル PBMC (感染後 1 週、40 週)、非感染ザルの PBMC を用いた。PBMC から RNA を調整し、Agilent アカゲザルマイクロアレイ (43,663 プローブ) を用いて遺伝子発現を解析した。遺伝子リスト以下の遺伝子群について解析した。I 型インターフェロン誘導遺伝子、T 細胞、Th17、Treg、B 細胞、NK 細胞、抗原提示細胞、TLR、ケモカイン

2. プライム・ブーストワクチンの開発

組換え BCG を用いたエイズワクチンの開発

(1) SIV gp120, RT, Rev-Tat-Nef 発現ベクターの構築

SIVmac239 から PCR によりそれぞれの遺伝子を増幅し、BCG の hsp promoter terminator を含むプラスミドにクローニングし、抗酸菌—大腸菌シヤトルプラスミド pSO246 にクローニングした。

(2) BCG への遺伝子導入と抗原発現

pSO246 を用いた SIV 遺伝子発現ベクターを電気穿孔法により BCG 東京株に導入した。

(3) Gag 高発現 rBCG のマウスにおける細胞性免

疫誘導能の解析

Balbc/c マウス、DBA/2 マウスに Gag 高発現 rBCG を皮内接種し末梢血を用い Gag 特異的 pentamer により反応性細胞を測定した。

弱毒ワクシニアベクターを用いたエイズワクチンの開発

ワクチン：m8ΔHIVenv(JR-CSF)、HIV JR-CSF の gp160 を発現する。SeV-env(JR-CSF): HIV JR-CSF の gp160 を発現する増殖型 SeV (ディナベックより供与)

3. アジュバント・細胞性免疫誘導法の研究

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に関する研究

構築した SHIV-Ag85B の免疫誘導能を解析するため、カニクイザルを用いて評価した。比較対照群として、Ag85 遺伝子を持たない親株 SHIV-NI を用いる。投与量は 10^6 TCID₅₀、静脈内接種を用いた。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 細胞数の算定および各種免疫実験を行った。

粘膜組織における DEC-205 陽性樹状細胞の選択的活性化による特異的 CTL 誘導の可能性

マウスを用い、DEC-205 陽性 DC の細胞性免疫の誘導・維持における役割について検討した。クラス I MHC 分子によって提示される Epitope peptide が既知の腫瘍細胞を移植した同系マウスの DEC-205 陽性 DC を選択的に活性化した場合に OVA 特異的な CTL が体内誘発されるかを検索した。

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

pAcCAGgag と pAcPh-gp64-gag バキュロウイルストランスファーベクターを用いて、組換えバキュロウイルス rBV (AcCAG-gag/Ph-gp64-gag) を作製した。作製したバキュロウイルス粒子による BMDC への感染を試み、細胞表面分子を FACS で解析し、サイトカインの産生を ELISA で測定

した。また、組み換えバキュロウイルス感染 BMDC と脾臓細胞を共培養し、NK 細胞および CD8⁺T 細胞の活性化(CD69 発現と IFN-g 産生細胞)を FACS で解析を行った。さらに、組み換えバキュロウイルス感染 BMDC をマウスへ投与し、脾臓細胞中の B 細胞の活性化を FACS で解析を行った。HIV-1 感染抑制について評価については、組み換えバキュロウイルス感染 BMDC をマウスへ投与し、HIV-1 NL4-3-VSV-G を感染させた後、血清中の p24 量を測定した。

4. 中和抗体

汎 HIV-1 株中和能を有する抗体誘導に関する研究

血液製剤によって1980年代にHIVに感染したが、20年にわたる長期間エイズ発症から免れている日本人血友病HIV感染者の血漿をモノグラム法にて解析し、heterologousなHIV-1株に中和活性を示す血清を有するドナー選定をした。ドナーより末梢血単核球を分離しB95-8株EBVによるB細胞不活化を行いB-LCLを樹立した。B-LCLをoligoclonalに96穴プレートに播種して培養上清をLusiv系によりウイルス感染阻害能を示すものを選定した。陽性ウェルの細胞を96穴プレートにてlimiting dilutionし、再度Lusiv法によりウイルス感染阻害能を有するクローンを選定した。選定したクローンから細胞の全RNAを抽出し、IgG, IgM特異的プライマーにて抗体遺伝子の増幅を行った。増幅した産物について核酸配列を決定し、Kabat databaseによる抗体遺伝子解析を行った。

有機合成化学手法による人工抗原分子、ワクチン創製

- (1) コレセプターであるケモカイン受容体 CXCR4 の細胞外ループ(Ecl1-Ecl2)のみを合成し、Ecl については環化し、MAP 等に導入する。
- (2) gp41 のヘリカル領域の合成ペプチド(N および C 端側)3 量体の合成と抗体誘導: gp41 の C 端側に存在するヘリカル領域のペプチド C34 を 3

量体にアッセムリーするための人工テンプレートを合成した。

- (3) gp120 の CD4 binding/コレセプター-binding 領域を抗原として抗体誘導の検討: 長期未発症の HIV 感染者の間で中和抗体のエピトープとして高く保存されている、gp120 の CD4 binding/コレセプター-binding 領域の断片ペプチドを、環化と構造固定化のコンセプトを用いて、前年度までに分子設計し、合成した。

- (4) CD4 mimic 誘導体の合成と抗 HIV 活性の評価および中和抗体等との併用効果: 合成した化合物の各種 HIV 株に対する抗ウイルス活性を CCR5/PM1 細胞を用いて MTT assay で評価した。FACS 解析により抗 V3 抗体(KD-247)や CD4 induced 抗体の envelope への反応性の変化を sCD4 と NBD-556 で比較した。

HIV-1 中和モノクローナル抗体の誘導

HIV NL4-3 の Gag と各種 Env を発現するプラスミドを 293T 細胞に発現させ HIV-1 様粒子を得た。超遠心により HIV-1 様粒子を濃縮後、TritonX-100 を含む蔗糖密度勾配法により Core-Env を分離した。脂質二重膜を除き、Balb/C マウスへ CpG をアジュバントとして皮下に免疫し、血清を得た。免疫マウス脾臓を用いハイブリドーマを作成しモノクローナル抗体を得た。抗体の中和能について調べた。

HIV 感染防止粘膜ワクチンの創製

Senju vaccine をアカゲザル(♀)鼠頸部皮下に multiple antigen を注射により投与するか、もしくは腸溶カプセルに封入後経口投与し、血清、糞便、および膣分泌液中の抗 ENV 抗体と抗 CCR5 抗体価を調べ、それらの抗体の抗ウイルス効果を評価した。さらに、抗 ENV 抗体を常時粘膜面に誘導するための交叉免疫抗原単独でブーストを行い、抗 ENV 抗体の誘導能を調べた。

5. ワクチン評価モデルの作成 (三浦)

ゲノム改変により種々の病態を呈する SIV/SHIV を得た。霊長類モデル系の感染実験により粘膜部位における防御効果や治療効果の評価基準を確立する。

(倫理への配慮)

本研究では遺伝子組換え実験、病原体の使用、

動物実験を用いることから、研究者が所属する機関の組換え DNA 実験安全委員会、バイオセーフティ委員会、動物実験委員会、医学研究倫理委員会等の承認・認可を得て実験を行なった。また、臨床サンプルの解析およびデータの公表にあつては、倫理委員会の規則にのっとり、当該患者(感染者)の同意を得た上で行った。動物実験は、「動物愛護の精神」を遵守し、極力、動物の苦痛軽減を配慮し行った。細胞移植、採血、剖検の際は、必ず十分量の麻酔薬などにより動物が眠っていることを確認して行った。

C. 研究結果

1. エイズウイルス感染制御モデルを用いた感染制御に関わる宿主応答の解析

インターフェロン関連遺伝子

I型インターフェロン誘導遺伝子MX1、IFIT1、OAS1、IFIT3、およびその転写を活性化するSTAT1 2, STAT1の発現が顕著に増加していた(図1)。Δ 5G感染1週間後においてもSIVmac239感染とほぼ同様の遺伝子発現の増加が確認されたが発現レベルは低い傾向が見られた。

Treg、T細胞関連遺伝子

HIV、SIVの感染では免疫活性化がウイルスの持続感染の促進に働いていることが報告されていることから、活性化した免疫の抑制的に働く調節性T細胞(Treg)関連遺伝子の解析を行った。ENTPD1(CD39)、IL2RB、はΔ 5G感染後40週、チャレンジ感染後3日でそれ以外の群と比べ高い発現が見られた。TGFB1、IL10、STAT5BはΔ 5G感染後40週、チャレンジ感染後3日、SIVmac239感染後40週で高い発現が見られた。Treg分化に働く転写因子FOXP3の遺伝子は、Δ 5G感染1週、40週およびチャレンジ感染において発現が高い傾向が見られた。これらの結果からΔ 5G感染40週からチャレンジ感染3日では、SIVmac239感染と比

べ、Tregの増加、機能の上昇が推察された。

抗原提示細胞、TLR関連遺伝子

抗原提示細胞の関連遺伝子ではCD1c、FCGR3、CD11c、CD83、CD14、CD274の発現に有意な差が見られた。Δ 5G感染による感染防御との関連性からは、CD83、CD14遺伝子の発現が注目された。CD14+単球、CD83+抗原提示細胞の役割が示唆される。Toll-like receptor (TLR)は単球、DC等の抗原提示細胞での発現が高い。SIVmac239の感染1週でTLR2、TLR3、TLR4、TLR7、TLR8、MYD88発現が高いのに対し、チャレンジ感染ではTLR2、TLR4、TRAF6でのみ有意に高い遺伝子発現が見られた。SIVmac239感染とチャレンジ感染では異なるTLR発現の誘導または、TLR発現の異なる細胞の誘導が起こっている可能性が示唆される。

NK細胞関連遺伝子

NK細胞の関連遺伝子ではgranzyme B(GZMB)、perforin(PRF1)、NKG2D、NCR1、NCR3の発現にSIVmac239感染、Δ 5G感染、チャレンジ感染後3日の間に有意な差が見られた。NKレセプターKLRCC1(NKG2A)、NCR1(NKp46)遺伝子の発現がΔ 5G感染、チャレンジ感染後3日で非感染群と比べ高く、NK細胞の表面抗原CD56遺伝子の発現がSIVmac239感染で低下していた。NKレセプターNKp30の遺伝子NCR3の発現もΔ 5G感染、チャレンジ感染後3日で非感染、SIVmac239感染と比べ高かった。これらの結果は、Δ 5G感染の制御、チャレンジ感染の防御におけるNK細胞の役割を示唆する。

2. プライム・ブーストワクチンの開発 組換え BCG を用いたエイズワクチンの開発

(1) SIV gp120, RT, Rev-Tat-Nef 発現ベクターの構築

BCG 菌体 lysate のウエスタンブロットによる解析から RT の発現は弱かったことから除外した。gp120, と Rev-Tat-Nef 発現 BCG は Gag 発現 BCG

と同様の発現株が得られたことから、この3種はプライムワクチンとして用いた。

(2) HIV Gag 高発現 rBCG のマウスにおける細胞性免疫誘導能の解析

3回の接種でCD8+T細胞の2%はGag特異的であった。

弱毒ワクシニアベクターを用いたエイズワクチンの開発

(1) DNA (pCAGGSenv) prime/m8Δ boost

DNA (pCAGGSenv) prime/m8Δ boostによりm8Δ boostの免疫誘導についてマウスを用いてIFN-g産生CD8+T細胞と抗Env抗体の誘導について調べた。乱利法ではCD8+T細胞の3.3%がEnv特異的細胞で皮内接種法では、1.2%であった。次にEnv抗体については、いずれにおいてもまったく誘導されなかった。

(2) m8Δ prime/SeV boost

m8Δ primeは乱利法、SeV boostを経鼻接種した。この免疫によりCD8+T細胞の6.5%がEnv特異的細胞であった。さらにELISAにより抗Env抗体の誘導が確認され、中和抗体も誘導していた。

3. アジュバント・細胞性免疫誘導法の研究 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に関する研究

SHIV-NIでは接種後2週目にピークを示し、6~8週までウイルスが検出されたが、SHIV-Ag85B接種群では3頭中2頭が1週目にピークを示し、その値はSHIV-NIの数十分の一であった。また、感染後2~4週で検出されなくなった。感染ザルの末梢血を用いてSIVgagに対するELISPOT assayを行ったところ、SHIV-Ag85B感染カニクイザルはSHIV-NI感染に比べ早期に非常に高い反応が誘導されており、末梢血からのウイルスが検出限界以下となっても認められた。また、このELISPOT assayをCD8+T細胞においてCTLとして感染後2週目

に測定したところ、SHIV-Ag85B感染群では明らかに高い活性が認められた。感染8週後に両群においてAg85BおよびSIVgag遺伝子を末梢血リンパ球より検出したところ、SIVgagはSHIV-NI感染群では認められたが、SHIV-Ag85Bでは認められなかった。このことよりSHIV-Ag85Bは慢性感染を示さず、排除されたと考えられた。

粘膜組織におけるDEC-205陽性樹状細胞の選択的活性化による特異的CTL誘導の可能性

抗原提示を担う樹状細胞にはcross-presentation能力を有するDEC-205陽性DCと持たない33D1陽性DCとが存在し、双方が共生し合って体内の獲得免疫システムのバランスをとっている。

DEC-205陽性DCはTh1型のヘルパーT細胞を介して細胞性免疫の誘導・維持を担い、33D1陽性DCはTh2型のヘルパーT細胞を介して体液性免疫の誘導・維持を担っている。

33D1抗体(3.115)の腹腔内投与を行い、脾臓中ならびに上皮内リンパ球(IEL)から除去された。

この33D1陽性DC除去マウスの個体内には相対的にDEC-205陽性DCが優位に存在すると想定される。そこで、このマウスのDCを選択的に活性化させるためにTLR3及びTLR4をそれぞれ固有のリガンドであるpoly(I:C)及びLPSで刺激した。33D1陽性DC除去マウスではコントロールマウスに比してTh1型サイトカインであるIL-12の放出が確認された。また、33D1陽性DC除去マウスにおけるIL-12の放出量は、poly(I:C)に比べLPS刺激群の方が遙かに多かった。DEC-205陽性DC群が活性化され、体内環境はTh1型優位な状態となり、細胞性獲得免疫が活性化されることが予見された。そこで同系腫瘍細胞を移植した場合の効果を見たところ、優位な抗腫瘍効果が認められた。また、縮小した腫瘍内に浸潤したリンパ球を調べたところ、腫瘍特異的なクラスI MHC分子拘束性のCD8陽性キラーT細胞の存在がtetramerにて確認された。

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

組換えバキュロウイルス rBV (AcCAG-gag/Ph-gp64-gag) を作製した。作製した rBV を BMDC に感染させ、Gag タンパク質の発現をウエスタンブロットにて確認した。rBV を BMDC に感染させ、活性化マーカーである MHC クラス I、II、CD80 及び CD86 の発現上昇が確認された。一方、ELISA にて培養上清中のサイトカイン IL-6、IL-12p70 及び IFN- α の産生が認められた。また、rBV 感染 BMDC と脾臓細胞を共培養した結果、NK 細胞および CD8⁺T 細胞の活性化マーカーである CD69 の発現上昇及び IFN- γ 産生が認められた。さらに rBV 感染 BMDC をマウスへ投与すると、B 細胞の活性化マーカーである CD69 の発現上昇が確認された。最終的に rBV 感染 BMDC をマウスへ投与し、HIV-1 NL4-3-VSV-G を感染させると血清中の p24 量が未成熟 BMDC と比較して優位な減少が認められたことから、HIV-1 感染抑制効果が確認できた。

4. 中和抗体

汎 HIV-1 株中和能を有する抗体誘導に関する研究

3 人のドナーから複数の LCL クローンを樹立し、PCR により遺伝子の増幅に成功した。H 鎖と L 鎖のプライマーから免疫グロブリンのクラスを決定したところ、ドナー1 の 2 つのクローンは共に IgM、ドナー2 のクローンは IgM、ドナー3 は 6 つのクローンが IgG で 3 つのが IgM であった。核酸配列を決定することによりドナー1 の 2 つの候補とドナー3 の 6 つと 3 つのクローンはそれぞれ同一クローンであることが判明した。得られた 4 つの独立したクローンについて塩基配列を行い可変領域の抗体遺伝子について解析した。L 鎖 V 領域において 2 人の異なるドナーから得ら

れた独立した 2 つのクローンで L1-51 が共通していた。germline 遺伝子に対する相同性は 93~99% で IgM が IgG より高い相同性を示した。これと一致するように CDR 領域における変異の数も IgG が最も高かった。しかし変異の数は既存の汎 HIV-1 株中和ヒトモノクローナル抗体よりも少なかった。ヒトモノクローナル抗体の分離法には複数のプロトコルが存在するが、EBV を用いる本法では比較的 IgM 産生細胞が選択されやすいといわれている。我々の同定した抗体は 75% が IgM であった。

有機合成化学手法による人工抗原分子、ワクチン創製

1) コレセプター CXCR4 の細胞外ループ (Ecl1-Ecl2) を基にした抗原分子作製&抗体誘導

Linear Ecl-1-induced antibodies²⁴ assay (western blot) において、4 匹のうち 2 匹のマウス血清が HIV-1 侵入阻害活性を有することを確認した。CXCR4 の細胞外領域(Ecl)を合成し、MAP に導入した Ecl-1 が抗体誘導能を示し、抗体は中和活性を示した。

2) gp41 のヘリカル領域の合成ペプチド(N および C 端側)3 量体の合成と抗体誘導

C34 単量体の抗体誘導試験において C34 単量体は十分な抗体誘導能を示した。C34 trimer の構造特異的な抗体誘導を確認した。また、C34 monomer から誘導された抗体より、C34 trimer から誘導された抗体の方が約 3 倍強い侵入阻害活性を有することが明らかとなった。

3) gp120 の CD4 binding/コレセプター

ファージディスプレイライブラリーから in vitro アフィニティー選択を行った。その結果、アフィニティーを持ったクローンが得られた。また、gp120 のヘアピン領域については Fab ファージディスプレイライブラリーから、これを認識するモノクローナル抗体を得た。

4) CD4 mimic 誘導体の合成と抗 HIV 活性の評価

および中和抗体等との併用効果および CD4 mimic と T140 との hybrid の合成

CD4 mimic 誘導体において、ピペリジン環および二級アミンを用いた gp120 構造変化誘起能に関する構造活性相関を調べた。その結果、有意な gp120 構造変化誘起能が見られた誘導体は共通してピペリジン環構造を有していた。ピペリジン環上の窒素原子を修飾したところ、すべてにおいて毒性の低下が見られた。また、窒素原子自体は修飾せず、その周りを嵩高くしたところ、毒性が低下した。

HIV-1 中和モノクロナール抗体の誘導

抗体には、HIV NL43, サブタイプ A, AE, AG, C, D の pseudo-type を 1 ug/ml で中和するものがあつた。標的細胞に FcR を発現することにより中和能が増強される抗体が多かつた。

HIV 感染防止粘膜ワクチンの創製

Senju vaccine をアカゲザル(♀)に経皮もしくは経口免疫した結果、gp140 および CCR5 に対する抗体の誘導が確認できた。また得られた抗血清は SIVmac239 の感染を阻害した。特に、Senju vaccine を経口免疫することにより粘膜面に CCR5 に対する IgA を誘導でき、その IgA は SIVmac239 の感染を阻害した。さらに、Senju vaccine を免疫することにより誘導された抗 ENV 抗体を持続的に誘導するための交叉免疫抗原を見出した。

5. ワクチン評価モデルの作成 (三浦)

相同組換えを利用して簡便で効率の良い新規組換えウイルス作製技術を開発した。この方法により CCR5 指向性のクレード C 型新規 SHIV-97ZA012 を作製した。SHIV-97ZA012 は末梢血単核球で SIVmac239 と同程度に複製した。SHIV-97ZA012 は、接種したアカゲザル 3 頭全てで急性期に高いピーク (10^6 ~ 10^8 copies/ml) を伴って複製した。肺胞(エフェクターサイト)中での CD4 陽性 T 細胞割合の減少(40~50%から 8~

25%に)が確認された。

D. 考察

1. エイズウイルス感染制御モデルを用いた感染制御に関わる宿主応答の解析

末梢単核球の解析の有用性

マイクロアレイでは各遺伝子から転写される RNA の量的変化の情報が得られる。今回の解析結果から、 Δ 5G 感染では病原性 SIV 感染とは異なる免疫応答が誘導され、感染制御後においても病原性 SIV 感染とも非感染とも異なる遺伝子発現が起こっていることが示された。さらに末梢単核球の免疫細胞においても十分に検出可能であることが明らかとなった。このことは、末梢単核球を構成する全身性免疫系、2 次リンパ組織において SIV 感染防御に働く免疫が機能していることも示唆された。末梢単核球の解析の結果から SIV 感染防御に関連する免疫の解明に繋がる手がかりが得られることが期待される。

ウイルス感染・感染制御と関連する各遺伝子リストによる解析

末梢単核球には T 細胞、B 細胞、NK 細胞、単球、DC が含まれる。各免疫細胞には免疫機能、分化・活性化の状態が異なる多様なサブセットが存在する。SIV 感染の制御、チャレンジ感染に対する感染防御を調節に一部の免疫細胞が機能しているはずである。そこで、HIV/SIV 感染と関連する免疫細胞の機能別に遺伝子リストを作成した解析をおこなった。HIV/SIV 感染に対し自然免疫の宿主応答としてインターフェロン産生細胞が感染部位に集積することが報告されている。本研究においても SIVmac239 感染後 1 週に I 型インターフェロン誘導遺伝子群の顕著な遺伝子発現が検出された。 Δ 5G 感染後 1 週においても同様の結果が得られた。しかし慢性感染において、これらの遺伝子発現は SIVmac239 感染で検出されたが、 Δ 5G 感染、チャレンジ感染後 3 日では非感染群と

同レベルであった。この結果は、I型インターフェロン誘導遺伝子発現と関連する免疫の活性化はHIV/SIVの病原性感染の条件となっているという仮説と一致した。感染に対し誘導された免疫の抑制が感染制御と関連する。関連する免疫としてTreg関連遺伝子(FOXP3, TGFB1, IL10, IL2RB)の発現がΔ 5G感染で顕著に検出された。

Δ 5G感染により誘導される防御免疫を構成する初期感染期に働く宿主応答の解析を行った。Δ 5G感染、チャレンジ感染において種々のNK関連遺伝子(NKp30, NKp46, NKG2A, CD56)の発現が確認された。SIVmac239感染40週ではこれらの遺伝子発現が低いことから、Δ 5G感染により誘導・維持されている感染防御免疫としてNK細胞の重要性が示唆された。抗原提示細胞の関連遺伝子の解析からは、Δ 5G感染におけるCD14, CD83, CD33の遺伝子の高発現が明らかとなった。感染制御におけるDC、単球の役割が示唆される。単球/マクロファージ系細胞での発現が報告されているケモカイン関連遺伝子(CCR1, MCP-1)のΔ 5G感染における高発現の結果も感染制御におけるDC、単球の役割を示唆する。

2. プライム・ブーストワクチンの開発

組換え BCG を用いたエイズワクチンの開発

発現が弱かった RT については、異なる発現ベクターの検討が必要となる。今回得られた Gag, Gp120, Rev-Tat-Nef について rVV LC16m8Δでの発現ベクターを作成し、BCG プライム VV ブースト(2回)の免疫後 SIVmac251 経粘膜低容量頻回チャレンジで感染防御能を評価する実験を行う。

弱毒ワクシニアベクターを用いたエイズワクチンの開発

細胞性免疫と液性免疫の両方を誘導するために m8Δ prime/SeV boost を試みた。この方法は DNA prime/m8Δ boost と比べ細胞性免疫誘導に優れ、

中和抗体を誘導することに成功した。さらに CD40Lm による増強が示された。

3. アジュバント・細胞性免疫誘導法の研究

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に関する研究

本研究では他に類を見ない、弱毒ウイルスにアジュバント遺伝子を挿入し、ウイルスに対する免疫誘導効果を高めるという手法を用いた。このことは現時点で実用化はもちろん、研究レベルでも殆ど報告の無い全く新規の試みである。

抗酸菌分泌抗原 Ag85B は強力なアジュバント活性を持つことが知られている。本研究においても Ag85B 組み込み SHIV はコントロールに比べ、極めて早期にウイルスが排除された。また、ウイルス特異的な細胞性免疫誘導も強力に誘導されていることが示されており、Ag85B によるアジュバント効果が明瞭に示された。

本研究の結果からエイズウイルスの制御には細胞性免疫が重要であることが示され、この制御メカニズムを検討することがエイズウイルス感染症の病態やワクチン開発研究等に有効であると考えられた。今後、アジュバント分子組み込み SHIV 投与ザルに対し、ホモまたはヘテロのウイルスを攻撃接種し、そのウイルス制御効果を検討する。

粘膜組織における DEC-205 陽性樹状細胞の選択的活性化による特異的 CTL 誘導の可能性

本研究の結果は、体内における DEC-205 陽 DC を選択的に活性化させただけで、腫瘍抗原特異 CTL が活性化させることを示している。従来、腫瘍あるいはウイルス特異的 CTL を誘導するためには、個々の CTL の認識エピトープを個々の個体で同定し、そのエピトープペプチド抗原を結合させた DC を作成し、それを用いて体内あるいは体外でエピトープ特異的 CTL を誘導することが必須であった。ところがこのエピトープペプチ

ドは、個々の個体でそれを提示する MHC 分子が異なるため共通のものを同定することは事実上不可能である。従って本研究で示したように、多くの個体に共通なエピトープペプチドを同定するよりも、ウイルス抗原蛋白を捕捉した樹状細胞、特に Cross-presentation 能力を有する DEC-205 陽性 DC に抗原を捕捉させ、その個体に固有の MHC 分子を介してエピトープペプチドを提示させ、CTL を体内誘発する方策を考案する方が遙かに効率的と考えられる。現在はヒトにおける DEC-205 陽性細胞の cross-presentation 能、ならびにその選択的活性化法の検討をさらに進めている。

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

rBV を BMDC に感染させることにより、MHC クラス I、II、CD80 及び CD86 の発現上昇、IL-6、IL-12p70 及び IFN- α の産生が確認された。また、rBV 感染 BMDC と脾臓細胞を共培養した結果、NK 細胞および CD8⁺T 細胞の活性化マーカーである CD69 の発現上昇及び IFN-g 産生が認められた。さらに、rBV 感染 BMDC をマウスへ投与すると、B 細胞の活性化マーカーの発現上昇が確認された。最終的に HIV-1 感染抑制について評価を行った。rBV 感染 BMDC をマウスへ投与し、HIV-1 NL4-3-VSV-G を感染させるところ、血清中の p24 量が未成熟 BMDC と比較して優位な減少が認められたことから、バキュロウイルス感染 BMDC から産生されたサイトカイン及び Gag タンパク質が NK 細胞、T 細胞及び B 細胞を活性化し、HIV-1 感染を抑制したと考察される。

4. 広域中和抗体

汎 HIV-1 株中和能を有する抗体誘導に関する研究

抗体遺伝子の解析により HIV-1 に対する中和

活性を持つ抗体の germline には一定の選択性を持つことが明らかになった。これらの抗体遺伝子が IgM から IgG にクラススイッチし、時間経過とともにどのような変異が蓄積するか、またそれらが持つ中和能力の変動、及び同時期に存在するウイルスのエンベロープとの関連を併せて解析することにより、生体内で中和抗体がどのように選択されるかを理解することができると思われる。これらの抗体クローンが認識するエピトープを解析することにより、ワクチンに必要な免疫源をデザインすることも可能になると思われる。今後は抗体遺伝子からタンパク質を再構成し、その生化学的、生物学的活性を明らかにする試みを行う予定である。

有機合成化学手法による人工抗原分子、ワクチン創製

1) コレセプター CXCR4 の細胞外ループ (Ecl1-Ecl2) : linear Ecls の方が cyclic Ecls よりも高い抗原性を示し、得られた血清が HIV-1 侵入阻害活性を有することを確認した。

2) gp41 のヘリカル領域の合成ペプチド : 水性領域を付加した N36 3 量体および C34 3 量体のマウスでの中和抗体誘導に成功し、今後最適化を検討することにより、有用なワクチンになる可能性がある。また、阻害剤として C34 trimer は C34 monomer より強い抗 HIV 活性を有することが明らかとなった。

3) gp120 の CD4 binding/コレセプター-binding 領域 : gp120 のヘアピン領域については Fab フェージディスプレイライブラリーから、これを認識するモノクローナル抗体得た。

4) CD4 mimic 誘導體 : 構造活性相関により、CD4 mimic 誘導體のピペリジン環の窒素原子周辺、およびフェニル部位の構造活性相関を行った。今後の CD4mimic の分子設計に有用な情報を得た。

HIV-1 中和モノクローナル抗体の誘導

Core-Env により 2F10, 4E10 等の既存広域中和抗体と同等のモノクローナル抗体が多数得られた。多くの抗体は 4E10 と同様に FCR 発現により中和能が増強された。初期感染の標的細胞である macrophage Lanangerhans 細胞、interstitial DC 細胞では FcR を発現することから、これらの細胞への感染の防御に有効であることが期待される。

HIV 感染防止粘膜ワクチンの創製

HIV-1 の交叉免疫抗原を見いだした。実際に senju vaccine により免疫された個体から gp140 抗体を誘導したことから、HIV 感染を阻止する免疫応答が可能と思われた。

5. ワクチン評価モデルの作成 (三浦)

新規組換えウイルス作製技術の開発により短期間にサル個体における複製能の高い新規 SHIV の作成が可能となった。この技術を用いて有用な新規サルモデルを開発することが期待される。

E. 結論

1. エイズウイルス感染制御モデルを用いた感染制御に関わる宿主応答の解析

末梢単核球の遺伝子解析を行い、非感染、SIVmac239 感染、 Δ 5G 感染およびチャレンジ感染間で遺伝子発現レベルが異なる多数の遺伝子を同定した。同定された遺伝子プロファイルから感染により活性化した免疫のホメオスタシスに働く Treg、単球、DC、マクロファージ、感染抑制に働く、NK 細胞、CD8+細胞が示唆された。

2. プライム・ブーストワクチンの開発

コドン至適化 rBCG-SIV gag に加え、SIV gp120, Rev-Tat-Nef 融合タンパクを発現する BCG を構築した。同じ遺伝子を発現する rVV LC16m8 Δ との組み合わせによるプライムブーストワクチンを作成した。インド産アカゲザルでの SIVmac low dose 経粘膜頻回チャレンジでのワクチン評価を開始した。HIV-1 Gag および Env 特異的 CTL 誘

導の評価のためのマウスでの MHC

pentamer assay 系を確立した。HIV-1 に対する細胞性免疫、中和抗体の両免疫を誘導する方法として m8 Δ env prime/SeV env boost 法を見いだした。

3. アジュバント・細胞性免疫誘導法の研究

抗酸菌分泌タンパク Ag85B を発現する SHIV の免疫増強効果を確認した。

個体内に発生した HIV などのウイルス感染細胞、あるいは個体発生した腫瘍細胞を体内制御するための抗原特異的 CTL の誘発には、ウイルスあるいは腫瘍由来のエピトープペプチドを、様々な共刺激分子を発現した樹状細胞、特に DEC-205 陽性 DC よりそれに固有の cross-presentation 能を利用してクラス I MHC 分子より提示させるのが最も効率の良い方策と考えられる。

HIV-1 Gag 発現バキュロウイルスはマウス樹状細胞を活性化させ、HIV-1 感染抑制効果を示した。組み換えバキュロウイルス感染 DC ワクチンは新規のエイズワクチンとしての可能性が期待される。

4. 広域中和抗体

日本人 HIV-1 感染者の中で長期エイズ未発症者における汎 HIV-1 株中和能に焦点を当てた本研究は、HIV-1 に対する液性免疫に対する理解を深めると同時に、抗原の構造と機能を理解するためにも貢献できる。これらを併せて液性免疫誘導型ワクチンの免疫源をデザインするための重要な情報を提供すると期待される

gp41-N36 の 3 量体および C34 3 量体についてはマウスで中和抗体の創製を確認し、感染モデルラットでも免疫している。コレセプター CXCR4 の N 端、細胞外ループは効率的な合成を行い、マウスでの評価も行い、中和抗体の誘導も確認した。gp120 エピトープもファージでの抗体作製に成功した。また、CD4 mimic 誘導体の抗 HIV 活性および gp120 の構造変化誘起能に関する構造活性相関を行った。これらの結果は今後の HIV

抗体・ワクチン療法の研究において、重要な知見となると思われる。

Core-Env により 2F10, 4E10 等の既存広域中和抗体と同等のモノクローナル抗体が多数得られた。多くの抗体は 4E10 と同様に FCR 発現により中和能が増強された。

senju vaccine により誘導される抗体には HIV 感染防止効果を有していることが示唆された。交叉免疫により抗体価の維持が可能であることを示した。

5. ワクチン評価モデルの作成

新規組換えウイルス作製技術の開発によりアカゲザルで良く増殖する CCR5 指向性の非クレード B 型 SHIV を短期間で新規に作製することができた。よりよいワクチン評価系の確立が期待できた。

F. 健康危険情報

特に該当する情報はなかった。

G. 研究報告

論文発表

- 1 Chie Sugimoto, Satoru Watanabe, Taeko Naruse, Eiji Kajiwara, Teiichiro Shiino, Natsuko Umamo, Kayoko Ueda, Hirotaka Sato, Shinji Ohgimoto, Vanessa Hirsch, Francois Villinger, Aftab A. Ansari, Akinori Kimura, Masaaki Miyazawa, Yasuo Suzuki, Naoki Yamamoto, Yoshiyuki Nagai, Kazuyasu 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.
- 2 Taeko K. Naruse, Zhiyong Chen, Risa Yanagida, Tomoko Yamashita, Yusuke Saito, Kazuyasu Mori, Hirofumi Akari, Yasuhiro Yasutomi, Masaaki Miyazawa, Tetsuro Matano, Akinori Kimura. Diversity of MHC class I genes in Burmese-origin rhesus macaques. Immunogenetics. 62, 601, 2010
- 3 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: 98-105 (2010)
- 4 Matsuo K, Yamamoto N. Paradigm change in immune correlation: cellular or humoral? Expert Rev. Vaccines 9: 985-987 (2010)
- 5 Mika Nagai-Fukataki, Takashi Ohashi, Iwao Hashimoto, Tominori Kimura, Yoshiyuki Hakata, Hisatoshi Shida (2011): Nuclear and Cytoplasmic Effects of Human CRM1 on HIV-1 Production in Rat Cells. Genes to Cells In press
- 6 Makoto Abe, Hitoshi Suzuki, Hironori Nishitsuji, Hisatoshi Shida, Hiroshi Takaku (2010): Interaction of human T-cell lymphotropic virus type I Rex protein with Dicer suppresses RNAi silencing. FEBS Lett. 584:4313-4318.
- 7 Xianfeng Zhang, Mariko Kondo, Jing Chen, Hiroyuki Miyoshi, Hajime Suzuki, Takashi Ohashi, Hisatoshi Shida (2010): Inhibitory effect of human TRIM5a on HIV-1 production. Microbes and Infection 12:768-777
- 8 Yoshida,T., Saito,A., Iwasaki,Y.,Iijima,S., Kurosawa,T., Katakai,Y., Yasutomi,Y.,Reimann,K.A., Hayakawa,T. and Akari,H. Characterization of natural killer cells in tamarins: a technical basis for studies of innate immunity. Frontiers Microbiol. in press.
- 9 Xing, Li., Wang, J.C., Li, T-C., Yasutomi,Y., Lara,J., Khurdyakaov,Y., Schofield D., Emerson,S., Purcell,R., Takeda,N., Miyamura,T. and Holland,R.C. Spatial configuration of hepatitis E virus antigenic domain. J.Virol. 2011;85:1117-1124.
- 10 Chono,H., Matsumoto,K., Tsuda,H., Saito,N., Lee,K., Kim,S., Shibata,H., Ageyama,N., Terao,K., Yasutomi,Y., Mineno J., Kim,S., Inoue,M. and Kato,I. Acquisition of HIV-1 resistance in T lymphocytes using an ACA-specific E.coli mRNA interferase. Human Gene Ther. 2011;22:35-43.
- 11 Saito,A., Nomaguchi,M., Iijima,S., Lee,Y-J., Kono,K., Nakayama,E.E., Shioda,T., Yasutomi,Y., Adachi,A., Matano,T., Akari,H. A novel monkey-tropic HIV-1 derivative encoding only minimal SIV sequences can replicate in cynomolgus monkeys. Micorbes

- Infect. 2011;13:58-64.
- 12 Naruse,T.K., Zhiyong,C., Yanagida,R., Yamashita,T., Saito,Y., Mori,K., Akari,H., Yasutomi,Y., Matano,T. and Kimura,A. Diversity of MHC class I genes in Burmese-origine rhesus macaques. Immunogenetics 2010;62:601-611.
 - 13 Okabayashi,S., Uchida,K., Nakayama,H., Ohno,C., Hanari,K., Goto,I. and Yasutomi,Y. Periventricular Leucomalacia (PVL)-like lesions in two neonatal cynomolgus monkeys (macaca fascicularis). J.Comp.Pathol. 2010 Epub.
 - 14 Yasuhiro Yasutomi. Establishment of Specific Pathogen-Free Macaque Colonies in Tsukuba Primate Research Center of Japan for AIDS research. Vaccine 2010;B75-B77.
 - 15 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. 2010;60:51-53.
 - 16 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;19:889-895.
 - 17 Takahashi, H. Species-specific CD1- restricted innate immunity for the development of HIV vaccine. Vaccine, 28S:B3-B7, 2010.
 - 18 Takeuchi, H., Takahashi, M., Norose, Y., Takeshita, T., Fukunaga, Y., K., Takahashi, H. Transformation of breast milk macrophages by HTLV-I: implications for HTLV-I transmission via breastfeeding. Biomedical Res., 31:53-61, 2010.
 - 19 Wakabayashi, A., Nakagawa, Y., Shimizu, M., Takahashi, H.: Development of anti-tumor immunity by oral vaccination with tumor antigen and cholera toxin. J. Nippon Med. Sch. 77:50-52, 2010.
 - 20 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., Miura, T. Small intestine CD4+ cell reduction and enteropathy in SHIV-KS661-infected rhesus macaques in presence of low viral load. J. Gen. Virol., 91:773-781, 2010.
 - 21 Miyazaki, Y, Kamiya, S., Hanawa, T., Fukuda, M., Kawakami, H., Takahashi, H., Yokota, H.: Effect of probiotic bacterial strains of Lactobacillus, Bifidobacterium and Enterococcus on enteroaggregative Echerichia coli. J. Infect. Chemother., 16:10-18, 2010.
 - 22 Yagi, Y., Watanabe, E., Watari, E., Shinya, E., Satomi, M., Takeshita, T., Takahashi, H. Inhibition of DC-SIGN-mediated tatransmission of HIV-1 by TLR3 signaling in breast milk macrophages. Immunology, 130:597-607, 2010.
 - 23 Moriya, K., Wakabayashi, A., Shimizu, M., Tamiura, 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, 59:1083-1095, 2010.
 - 24 Kondo, A, Yamashita, T., Tamura, H., Zhao, W., Tsuji, T., Shimizu, M., Shinya, E., Takahashi, H., Tamada, K., Chen, L., Dan, K., Ogata, K.: Interferon- gamma and tumor necrosis factor-alpha induce an immunoinhibitory molecule, B7-H1, via nuclear factor-kappaB activation in blasts in myelodysplastic syndromes. Blood, 116:1124-1131, 2010.
 - 25 Nakagawa, Y., Watari, E., Shimizu, M., Takahashi, H.: One-step simple assay to determine antigen-specific cytotoxic activities by single-color flow cytometry. Biomedical Res., 32: 2011 (in press).
 - 26 Y. Negishi, E. Y. Kumagai, T. Takeshita, H. Takahashi: Profiling of decidual and splenic dendritic cells in pregnant mice. Eur. J. Immunol. 2011 (revised)
 - 27 高橋秀実: 免疫力による未病のガンの制御。未病と抗老化, 19:24-28, 2010.
 - 28 高橋秀実: 宿主免疫応答と各種病態。臨床と微生物, 38:9-14, 2011.
 - 29 高橋秀実: 細胞性免疫(CTL)の誘導と樹状細胞 (pp195-223), 臨床粘膜免疫学(清野宏編), 2010.12月20日発刊(総ページ722、株式会社シナジー)
 - 30 Sugiyama R,Nishitsuiji H,Furukawa A, Katahira M, Habu Y, Takeuchi H, Ryo A, Takaku H. Heat shock protein 70 inhibits HIV-1 Vif-mediated ubiquitination and

- degradation of APOBEC3G. **J. Biol. Chem.** in press (2011).
- 31 Sugiyama R, Hayafune M, Habu Y, Yamamoto N, Takaku H. HIV-1 RT-dependent DNase expression inhibits HIV-1 replication without the emergence of escape viruses. **Nucleic Acids Res.** 39:589-598, 2011.
 - 32 Suzuki T, Chang MO, Kitajima M, Takaku H. Induction of antitumor immunity against mouse carcinoma by baculovirus-infected dendritic cells. **Cell. Mol. Immunol.** 7: 440- 446, 2010.
 - 33 Suzui T, Chang MO, Kitajima, M, Takaku H. Baculovirus activates murine dendritic cells and induces non-specific NK cell and T cell immune responses. **Cell. Immunol.** 262, 35-43, 2010.
 - 34 Suzuki H, Nishitsuji H, Shida H, Takaku H. Interaction of human T-cell lymphotropic virus type I Rex protein with Dicer suppresses RNAi silencing. **FEBS Lett.** 584: 4313-4318, 2010. 6. Ujino S, Yamaguchi S, Shimotohno K, Takaku H. Combination therapy for hepatitis C virus with heat-shock protein 90 inhibitor 17-AAG and proteasome inhibitor MG132. **Antivir. Chem. Chemother.** 20:161- 167, 2010.
 - 35 Hishiki T, Shimizu Y, Tobita R, Sugiyama K, Ogawa K, Funami K, Ohsaki Y, Fujimoto T, Takaku H., Wakita T, Baumert TF, Miyanari Y, Shimotohno K. Hepatitis C virus infectivity is influenced by association of apolipoprotein E isoforms. **J. Virol.** 84:12048- 12057, 2010.
 - 36 Aoki T, Miyauchi K, Urano E, Ichikawa R, Komano J. Protein transduction by pseudotyped lentivirus-like nanoparticles. *Gene Ther.* In press.
 - 37 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.
 - 38 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.
 - 39 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.
 - 40 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.
 - 41 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.
 - 42 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
 - 43 Tanaka T, Narumi T, Ozaki T, Sohma A, Ohashi N, Hashimoto C, Itotani K, Nomura W, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Azamacrocyclic-metal Complexes as CXCR4 Antagonists. *ChemMedChem.*, 2011, *in press*
 - 44 Tsutsumi H, Abe S, Mino T, Nomura W, Tamamura H. Intense blue fluorescence in a leucine zipper assembly. *ChemBioChem.*, 2011,

- in press*
- 45 Nomura W, Narumi T, Ohashi N, Serizawa Y, Lewin NE, Blumberg PM, Furuta T, Tamamura H. Synthetic Caged DAG-lactones for Photochemically-controlled Activation of Protein Kinase C. *ChemBioChem*, 2011, *in press*
 - 46 Ohashi N, Nomura W, Narumi T, Lewin NE, Itotani K, Blumberg PM, Tamamura H. Fluorescent-responsive Synthetic C1b Domains of Protein Kinase C δ as Reporters of Specific High Affinity Ligand Binding. *Bioconjugate Chem.*, 22: 82-87, 2011.
 - 47 Yamada Y, Ochiai C, Yoshimura K, Tanaka T, Ohashi N, Narumi T, Nomura W, Harada S, Matsushita S, Tamamura H. CD4 mimics targeting the mechanism of HIV. *Bioorg Med Chem Lett* 20 : 354-358, 2010.
 - 48 Nakahara T, Nomura W, Ohba K, Ohya A, Tanaka T, Hashimoto C, Narumi T, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Remodeling of dynamic structures of HIV-1 envelope proteins leads to synthetic antigen molecules inducing neutralizing antibodies. *Bioconjugate Chem* 21(4): 709-714, 2010.
 - 49 Melchionna R, Carlo AD, Mori RD, Cappuzzello C, Barberi L, Musarò A, Cencioni C, Fujii N, Tamamura H, Crescenzi M, Maurizio C, Napolitano CM, Germani A. Induction of myogenic differentiation by SDF-1 via CXCR4 and CXCR7 receptors. *Muscle Nerve* 41(6): 828-835, 2010.
 - 50 Yoshimura K, Harada S, Shibata J, Hatada M, Yamada Y, Ochiai C, Tamamura H, Matsushita S. Enhanced exposure of human immunodeficiency virus type 1 primary isolate neutralization epitopes through binding of CD4 mimetic compounds. *J Virol* 84(15): 7558-7568, 2010.
 - 51 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, Wataru W, Narumi T, Yamamoto N, Komano JA, Tamamura H. Peptide HIV-1 integrase inhibitors from HIV-1 gene products. *J Med Chem* 53 (14): 5356-5360, 2010.
 - 52 Suzuki S, Maddali K, Hashimoto C, Urano E, Ohashi N, Tanaka T, Ozaki T, Arai H, Tsutsumi H, Narumi T, Nomura W, Yamamoto N, Pommier Y, Komano JA, Tamamura H. Peptidic HIV integrase inhibitors derived from HIV gene products: Structure-activity relationship studies. *Bioorg Med Chem* 18: 6771-6775, 2010.
 - 53 Narumi T, Ochiai C, Yoshimura K, Harada S, Tanaka T, Nomura W, Arai H, Ozaki T, Ohashi N, Matsushita S, Tamamura H. CD4 mimics targeting the HIV entry mechanism and their hybrid molecules with a CXCR4 antagonist. *Bioorg Med Chem Lett* 20: 5853-5858, 2010.
 - 54 Tanaka T, Nomura W, Narumi T, Masuda A, Tamamura H. Bivalent ligands of CXCR4 with rigid linkers for elucidation of dimerization state in cells. *J Am Chem Soc* 132 (45): 15899-15901, 2010.
 - 55 Nomura W, Mino T, Narumi T, Ohashi N, Masuda A, Hashimoto C, Tsutsumi H, Tamamura H. Development of Crosslink-Type Tag-Probe Pairs for Fluorescent Imaging of Proteins. *Biopolymers: Peptide Science*, 94: 843-852, 2010.
 - 56 鳴海哲夫, 玉村啓和. ペプチドミメティックによる創薬研究, 生化学 特集号「ペプチド科学と生化学の接点」(日本生化学会 東京) 82(6): 515-523, 2010.
 - 57 野村 渉, 増田朱美, 玉村啓和. エピジェネティックな遺伝子発現制御のための DNA メチル化酵素の創製, 生化学 ミニレビュー (日本生化学会 東京), 82(5): 393-397, 2010.
 - 58 Tanaka T, Nomura W, Narumi T, Yoshimura K, Matsushita S, Murakami T, Komano J, Yamamoto N, Tamamura H. From Reverse to Forward Chemical Genomics: Development of Anti-HIV Agent. *Peptide Science 2009*, Kouji Okamoto (Eds.), The Japanese peptide Society, Osaka, 105-106, 2010.
 - 59 Ohya A, Nakahara T, Nomura W, Ohba K, Tanaka T, Hashimoto C, Narumi T, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Synthesis and Evaluation of Artificial Antigen Peptide Based on the Trimeric Form of HIV Fusion Protein. *Peptide Science 2009*, Kouji Okamoto (Ed.), The Japanese peptide Society, Osaka, 29-32, 2010.
 - 60 Nomura W, Serizawa Y, Ohashi N, Okubo Y, Narumi T, Yoshida K, Furuta T, Tamamura H. Caged DAG-Lactones for Study of Cellular Signaling in a Spatial-and Temporal Specific Manner. *Peptide Science 2009*, Kouji Okamoto (Ed.), The Japanese peptide Society, Osaka, 347-348, 2010.
 - 61 Ohashi N, Nomura W, Narumi T, Okubo Y, Ikura T, Ito N, Yoshida K, Lewin NE, Blumberg PM, Tamamura H. Fluorescent-Based