

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

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：

分担研究者 高橋 秀実 日本医科大学微生物学免疫学教室 教授

研究要旨

一般に HIV に感染した樹状細胞(dendritic cells: DC)は、HIVnef 遺伝子の作用により MHC ならびに CD1 の発現が低下しているため抗原提示能が減弱した状態にあり、感染細胞の抗原情報を獲得免疫システムへ伝達し CTL を活性化することができないものと推察される。また、この HIV 感染 DC は HAART 治療を実施後もウイルスを持続的に放出する virus-reservoir の一つであり、事実報告者らは HAART 治療中患者の粘膜組織の中に棲息することを見いだしている。今回我々は、個体内 DC 特にその表面に DEC-205 のマークを有する DC を選択的に活性化させただけで、クラス I MHC 分子に拘束された抗原特異的な CTL が活性化させることを見いだした。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り、このことが特異的 CTL を誘導するようなワクチンの開発を阻んできた。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。本研究の成果は、すでに本年度の成果 (Vaccine, 28S:B3-B7, 2010; Cancer Immunol. Immunother., 59:1083-95 2010) として報告した。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。

A. 研究目的

HAART 治療の中断により、それまで血液中より消失していた HIV 粒子が、速やかに血液中に出現し、それと共に一時的に回復していた CD4 陽性 T 細胞数の減少が誘発され、免疫不全状態が再発する事実は、現時点での抗ウイルス剤の併用による HAART 治療が不十分なものであることを強く示している。事実、我々が HAART 治療中の患者の粘膜組織を調べたところ、末梢血中ではウイルス量が検出感度以下であり、ウイルス感染粒子 P24 抗原陽性細胞は認められなかったにも関わらず、同一患者における回盲部において P24 抗原細胞が多数散見された。また、この際の主たる感染細胞は予想に反し、獲得免疫システムに属する CD4 陽性 T 細胞ではなく、自然免疫システムに属する CD4 陽性の樹状細胞(dendritic cells: DC)、ならびに DC 表面に発現した CD1d 分子を介して制御されている CD4 陽性の NKT 細胞であった (論

文投稿準備中)。

これまでに報告してきたように、一般に HIV に感染した DC は、HIVnef 遺伝子の作用により MHC ならびに CD1 の発現が低下しているため抗原提示能が減弱した状態にあり、感染細胞の存在を確認したとしても、その情報を獲得免疫システムへ伝達しヘルパーならびにキラー T 細胞を活性化することができないものと推察される (Virology, 326: 79-89, 2004)。このような状況下においては、HIV 非感染樹状細胞による獲得免疫システムへの情報提示、ことにクラス I MHC 分子を介した抗原提示を B7 分子などの共刺激因子(co-stimulation molecules)とともに細胞表面に提示することが、キラー T 細胞誘導には必須である (図 1)。ところが、クラス I MHC 分子を介して提示される抗原分子は細胞内で増殖・複製されたもの主体であり、細胞外より捕捉された異物分子由来の抗原分子はクラス II MHC 分子を介して提示される。

こうした中、報告者らは以前よりある種の樹状細胞群は、特殊な刺激を受けた場合、クラス II MHC 分子から提示すべき抗原分子をクラス I MHC 分子を介し提示する能力、すなわち cross-presentation の能力を発揮することがあることを様々な例で示してきた (Vaccine, 28S:B3-B7, 2010) (図2)。

またさらに、cross-presentation 能力を発揮できる DC の表面には DEC-205 という分子が発現しており、DEC-205 陽性 DC が HIV 感染細胞から遊離したウイルス抗原を捕捉した場合、その中に含まれる CTL の Epitope peptide をクラス I MHC 分子を介して CTL 活性化の鍵を握る共刺激分子群とともに提示できる可能性を推測した。以上の見解に基づき、報告者らは感染細胞から抗原分子が放出された場合、抗原を捕捉した DEC-205 陽性 DC を個体内で選択的に活性化することにより捕捉抗原の cross-presentation を介して Epitope peptide 特異的な CTL が in vivo で誘発される可能性を追跡することとした。そのモデルとして、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 (EG7: OVA 遺伝子を導入発現した EL4) 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、OVA-peptide/class I MHC の tetramer を用いて検索した。その結果、生体に全くダメージを与えない程度の少量の抗癌剤 (L-PAM) を同時投与した場合、Epitope peptide 特異的な CTL が in vivo で誘発されることを確認した (Cancer Immunol. Immunother., 59:1083-95 2010)。

このような事実は、HIV 個体内で選択的に DEC-205 陽性 DC を活性化し微量の抗エイズ薬を併用することによって、HIV 感染細胞を制御するような特異的な CTL が体内誘発されることを示唆している。今後は、DEC-205 陽性 DC を選択的に活性化するような方策 (薬剤) に関しても検討を展開する予定である。

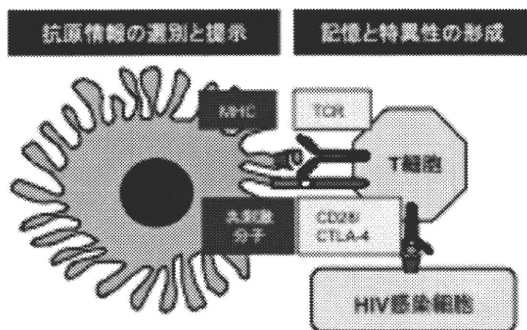


図1 樹状細胞による T 細胞の活性化

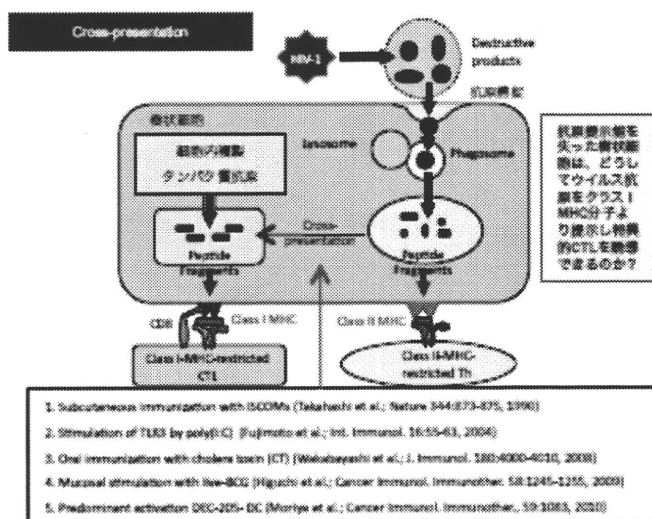


図2 樹状細胞における Cross-presentation

B. 研究方法及び C. 結果

1) 抗原提示を担う樹状細胞には図3に示すように 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。換言すれば、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。

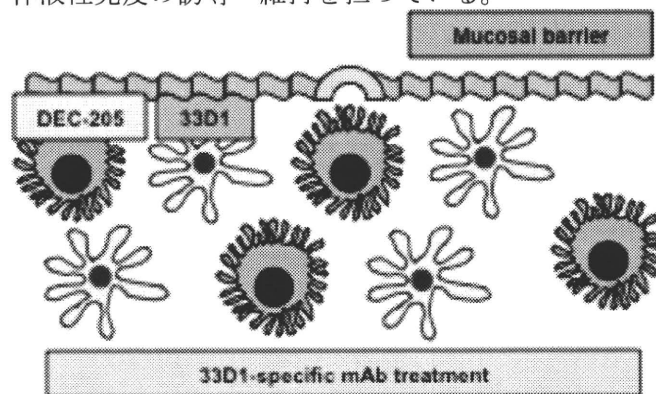


図3 体表面に存在する樹状細胞亜群

2) この内の 33D1 陽性 DC が 33D1 抗体 (3.115) の腹腔内投与によって除去されるか否かを検討したところ、0.5mg を 3 日間連続して投与した場合およそ 2 週間にわたり 33D1 陽性 DC が全身免疫系を反映する脾臓中ならびに粘膜局所免疫系を反映する上皮内リンパ球 (IEL) から除去されることを見いだした。また、

初回接種から 2 週間目にさらに 1 回同量の 3.115 抗体を腹腔内に追加接種したところ、およそ 2 ヶ月にわたって 33D1 陽性 DC が体内から除かれることを見いだした (図 4)。

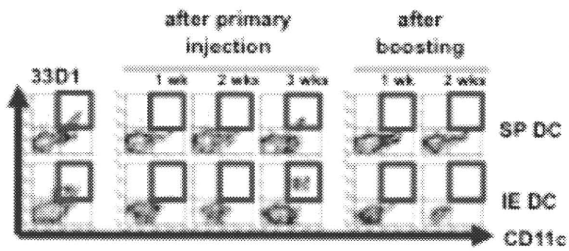


図 4 33D1 陽性樹状細胞亜群の選択的除去

3) DEC-205 陽性 DC と 33D1 陽性 DC は全く別の亜群であるため、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た場合に、果たして Th1 型に免疫応答がシフトされるか否かを調べるため、DC 表面に発現していると推測される 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 で刺激した場合の影響を観察した。その結果、poly(I:C)ならびに LPS で個体を刺激した場合双方において、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。この際、LPS 刺激では若干の IL-10 の放出が確認されたが、poly(I:C)刺激では全放出が見られなかった。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 (図 5)。

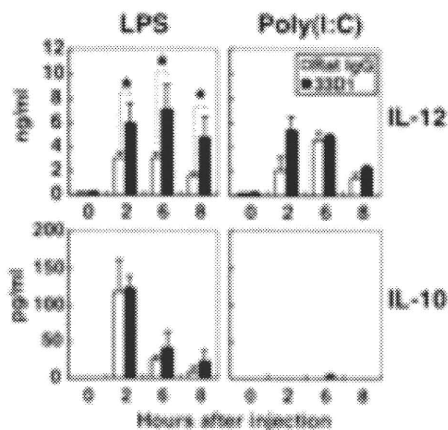


図 5 33D1 陽性 DC 除去マウス LPS 刺激による IL-12 産生

4) 以上より、33D1 陽性 DC 除去マウスを LPS で刺激した場合、選択的に残存した 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、このような状況下に同系腫瘍細胞を移植した場合の効果を見たところ、図 6A のように優位な抗腫瘍効果が認められた。また、その際に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 (図 6B)。

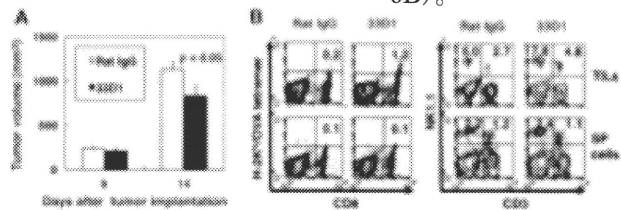


図 6 33D1 陽性樹状細胞亜群の選択的活性化によるクラス I MHC 分子拘束性 CTL の誘導

D. 結論

この事実は、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。本研究の成果は、すでに本年度の成果 (Vaccine, 28S:B3-B7, 2010; Cancer Immunol. Immunother., 59:1083-95 2010) として報告したが、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。

E. 結論

図 7 に示したように、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。本研究において、その糸口となる事実を明らかにすることができた。

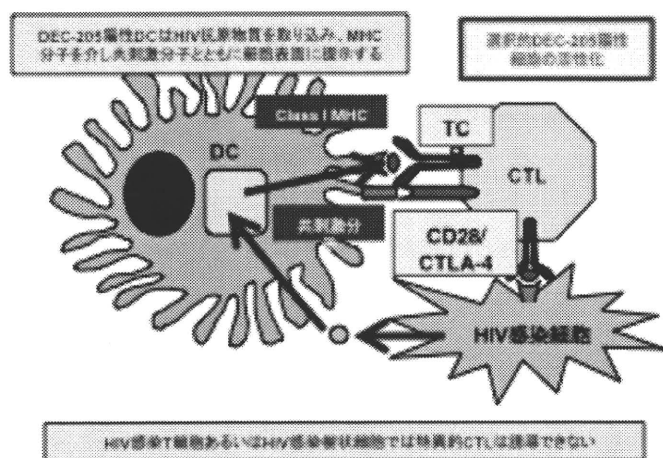


図 7 DEC-205 の選択的活性化法による特異的 CTL 誘導のメカニズム (高橋仮説)

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takahashi, H. Species-specific CD1-restricted innate immunity for the development of HIV vaccine. *Vaccine*, 28S:B3-B7, 2010.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Yagi, Y., Watanabe, E., Watari, E., Shinya, E., Satomi, M., Takeshita, T., Takahashi, H. Inhibition of DC-SIGN-mediated transmission of HIV-1 by TLR3 signaling in breast milk macrophages. *Immunology*, 130:597-607, 2010.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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).
- 10) Y. Negishi, E. Y. Kumagai, T. Takeshita, H. Takahashi: Profiling of decidual and splenic dendritic cells in pregnant mice. *Eur. J. Immunol.* 2011 (revised)

- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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)
2. 学会発表
- 国際学会
- 1) (Symposium) H. Takahashi: Selective activation of species-restricted innate immunity for the development of individually restricted acquired immunity. World Immune Regulation Meeting-IV March 29 - April 1, 2010 (Davos, Switzerland).
- 2) Y. Negishi, E. Y. Kumagai, T. Takeshita, H. Takahashi: Profiling of decidual and splenic dendritic cells in pregnant mice. World Immune Regulation Meeting-IV March 29 - April 1, 2010 (Davos, Switzerland).
- 3) Y. Yagi, E. Watanabe, M. Takahashi, E. Watari, M. Satomi, T. Takeshita, H. Takahashi: Suppression of DC-SIGN-mediated transmission of HIV-1 by TLR3 signaling in breast milk macrophages. World Immune Regulation Meeting-IV March 29 - April 1, 2010 (Davos, Switzerland).
- 4) N. Mayumi, E. Watanabe, Y. Yagi, E. Watari, H. Takahashi: Langerin expression on breast milk macrophages under the influence of keratinocytes. World Immune Regulation Meeting-IV March 29 - April 1, 2010 (Davos, Switzerland).
- 5) K. Omi, N. Saito, E. Shinya, M. Shimizu, A. Owaki, E. Watanabe, M. Takahashi, C. Takaku, K. Ibuki, T. Miura, M. Hayami, H. Takahashi: Invariant T-cell receptor-mediated functional cross-reactivity of natural killer T cells among primates and rodents. World Immune Regulation Meeting-IV March 29 - April 1, 2010 (Davos, Switzerland).
- 6) T. Matsuhashi, T. Higuchi, M. Shimizu, A. Owaki, M. Takahashi, E. Shinya, E. Nishimura, H. Takahashi: Possible mechanisms for the inhibition of bladder tumor by intravesical BCG therapy. World Immune Regulation Meeting-IV March 29 - April 1, 2010 (Davos, Switzerland).
- 7) H. Harimoto, M. Shimizu, A., K. Nakatsuka, K. Dan, H. Takahashi: Down-modulation of co-stimulatory molecules on tumor-infiltrating dendritic cells by un-controllable murine hepatoma cells. World Immune Regulation Meeting-IV March 29 - April 1, 2010 (Davos, Switzerland).
- 8) T. Date, K. Moriya, A. Wakabayashi, H. Takahashi: Induction of tumor-specific acquired immunity against already established tumors by selective activation of innate DEC-205+ dendritic cells. World Immune Regulation Meeting-IV March 29 - April 1, 2010 (Davos, Switzerland).
- 9) S. Inagaki, H. Takeuchi, M. Takahashi, Y. Norose, H. Takahashi: Characterization and functional analysis of HTLV-I-transformed breast milk macrophages (HTLV-BrMMø). World Immune Regulation Meeting-IV March 29 - April 1, 2010 (Davos, Switzerland).
- 10) S. Takaku, Y. Nakagawa, M. Takahashi, A. Owaki, M Shimizu, C. Takaku, H. Takahashi: Protection of CD8+ CTL apoptosis induced by brief exposure to an antigenic peptide.. 14th International Congress of Immunology August 22-27, 2010 (Kobe, Japan).
- 11) Y. Negishi, E. Y. Kumagai, T. Takeshita, H. Takahashi: Internal balance of two distinct subsets of murine dendritic cells during pregnancy. 14th International Congress of Immunology August 22-27, 2010 (Kobe, Japan).
- 12) H. Harimoto, M. Shimizu, A., K. Nakatsuka, K. Dan, H. Takahashi: Down-modulation of co-stimulatory molecules on tumor-infiltrating dendritic cells by un-controllable murine hepatoma cells. 14th International Congress of Immunology August 22-27, 2010 (Kobe, Japan).

- 13) Y. Yagi, E. Watanabe, E. Watari, E. Shinya, M. Satomi, T. Takeshita, H. Takahashi: Inhibition of DC-SIGN-mediated transmission of HIV-1 via breast milk macrophages by TLR3 signaling.
14th International Congress of Immunology
August 22-27, 2010 (Kobe, Japan).

国内学会

- 1) 高橋秀実: Helicobacter pylori 感染と生体応答第 14 回小児 Helicobacter pylori 研究会(特別講演)
2010 年 3 月 13 日 (東京) .
- 2) 高橋秀実: エイズの現況と対策
第 20 回日本医科大学医学会公開シンポジウム (シンポジウム)
2010 年 6 月 12 日 (東京) .
- 3) 高橋秀実: 日本医科大学における東洋医学に関する教育の現状と展望
第 42 回日本医学教育学会大会 (ランチョンセミナー)
2010 年 7 月 29 日 (東京) .
- 4) 高橋秀実: 自然免疫を介した生体応答と様々な症候: 漢方薬の新たな作用点
平成 22 年度日本東洋医学会東京都部会 (特別講演)
2010 年 10 月 31 日 (東京) .
- 5) 高橋めぐみ、稲垣真一郎、渡理英二、高橋秀実: HIV-1 感染細胞を傷害する NK レセプター陽性 T 細胞
第 58 回日本ウイルス学会学術集会
2010 年 11 月 7-9 日 (徳島) .
- 6) 中川洋子、渡理英二、高橋秀実: Single-color flow cytometry を用いた HIV 外被糖蛋白 gp160 特異的細胞傷害性 T 細胞活性測定法の検討
第 58 回日本ウイルス学会学術集会
2010 年 11 月 7-9 日 (徳島) .
- 7) 高橋秀実: 感染症に対する生体応答と各種の症候
第 23 回日本外科感染症学会総会学術集会 (特別講演)
2010 年 11 月 18-19 日 (東京) .
- 8) 新谷英滋、清水真澄、大脇敦子、渡邊恵理、高久千鶴乃、松村次郎、DeLibero Gennaro、高橋秀実: Interaction between HIV-1 Nef and the lipid antigen presentation molecules, CD1a and CD1d, in dendritic cells
第 24 回日本エイズ学会学術集会
2010 年 11 月 24-26 日 (東京) .

- 9) 高久千鶴乃、渡邊恵理、大脇敦子、清水真澄、松村次郎、近江恭子、渡理英二、新谷英滋: Th2 型環境における CD4 陽性 NKT 細胞の X4 type HIV-1 に対する感受性ならびに感染伝播性の増強.
第 24 回日本エイズ学会学術集会
2010 年 11 月 24-26 日 (東京) .

- 10) 松村次郎、大脇敦子、清水真澄、秋山純一、新谷英滋、岡慎一、高橋秀実: HIV 患者の腸管粘膜感染細胞内に存在するウイルス核酸の実態.
第 24 回日本エイズ学会学術集会
2010 年 11 月 24-26 日 (東京) .

- 11) 高橋秀実、八木幸恵、渡邊恵理、渡理英二、新谷英滋、里見操緒、竹下俊行: TLR3 シグナルによる母乳中マクロファージの DC-SIGN 分子を介したエイズウイルス感染伝播抑制
第 24 回日本エイズ学会学術集会
2010 年 11 月 24-26 日 (東京) .

- 12) 高橋秀実: 日本医科大学における東洋医学教育の現状と展望
KAMPO MEDICAL SYMPOSIUM 2011 (シンポジウム)
2011 年 2 月 5 日 (東京) .

◇講演

- 1) 高橋秀実: 樹状細胞に関する新たな知見: 生体応答と各種の症候、新たな腫瘍制御へのアプローチ
平成 22 年度北区医師会夏の免疫・アレルギーセミナー (特別講演)
2010 年 8 月 4 日 (東京) .
- 2) 高橋秀実: HIV の現状と対応
平成 22 年度第一回院内感染対策講演会 (特別講演)
2010 年 9 月 13 日 (東京) .
- 3) 高橋秀実: 日常診療に役立つ漢方医療
東京医科歯科大学 (イブニングセミナー)
2010 年 10 月 29 日 (東京) .

G. 知的財産権の出願・登録状況

当該年度は特になし。

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

分担研究者 高久 洋 千葉工業大学 工学部 生命環境科学科 教授

研究要旨 本研究は HIV-1 gag 発現組換えバキュロウイルス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。本年度は gag 遺伝子を導入した組換えバキュロウイルス作製し、BMDC に感染させ、BMDC の活性化の評価を行うと共に NK 細胞、T 細胞および B 細胞の活性化についても検討した。さらに、HIV-1 に対して感染抑制効果があるか否かを *in vivo* の系にて評価した。

A. 研究目的

HIV 感染拡大は、流行地域だけでなく世界視点で取り組み解決していくことが重要課題である。そのため、HIV 感染拡大阻止にはエイズワクチンの開発が鍵となる戦略である。しかし、予防感染効果を有するエイズワクチン開発には至っていないのが現状である。そこで、本研究は 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。

前年度は、HIV-1gag 遺伝子及びピューロマイシン耐性遺伝子を導入した組換えバキュロウイルスをヒト樹状細胞に感染させることで Gag 持続発現樹状細胞を作製し、樹状細胞内の APOBEC3 ファミリー、タンパク質発現量が増加することを見出した。また、APOBEC3 ファミリー、タンパク質発現量の増加に伴い、高い HIV-1 感染・複製

抑制効果を示した。

今年度は、HIV-1 gag を粒子表面で被い、哺乳動物細胞でも発現可能な CAG プロモーターの下流に HIV-1gag 遺伝子を挿入した組換えバキュロウイルスを作製。この組換えバキュロウイルスを Balb/c マウス骨髄由来樹状細胞(BMDC)に感染させ、HIV-1 Gag 発現樹状細胞を作製し、樹状細胞が NK 細胞、T 細胞および B 細胞の活性化を誘導するか否かを評価する。さらに HIV-1 に対して感染抑制効果があるか否かを、*in vivo* の系で評価することでエイズワクチンとしての可能性を検討する。バキュロウイルスは一過性ウイルスで動物細胞に対しても細胞毒性もなく、マウス樹状細胞にも感染し NK 細胞、T 細胞および B 細胞を活性化および IFN- α を産生するなど、自然免疫及び獲得免疫を誘導する特色を有する。

B. 研究方法

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- γ 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。

(倫理面への配慮)

- 1) HIV の感染実験は P3 で行い、環境中への拡散が起らないように配慮した。
- 2) 動物実験は、千葉工業大学動物実験規程を遵守し、極力動物の苦痛軽減に配慮して行う。

C. 研究結果

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 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 FACS にて確認された。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。

D. 考察

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、ウエスタンブロットにて Gag タンパク質の発現を確認した。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- 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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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).
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Suzuki H, Nishitsuiji 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.

7. 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.

2. 学会発表 (国際学会)

1. Myint Oo Chang, Tomoyuki Suzuki, Hiroshi Takaku: Activation of natural killer cells and T cells by HIV-1 Gag virus-like particles through the activation of dendritic cells, The 11th International Symposium on Dendritic Cells; P04-048, Lugano (2010. 9)
2. Tomoyuki Suzuki, Myint Oo Chang, Hiroshi Takaku: Baculovirus-infected dendritic cells elicit anti-tumor immunity against mouse carcinoma, The 11th International Symposium on Dendritic Cells; P05-058, Lugano (2010. 9)
3. Myint Oo Chang, Tomoyuki Suzuki, Hitoshi Suzuki, Megumi Watanabe, Hiroshi Takaku: HIV-1 Gag virus-like particles inhibit HIV-1 replication in dendritic cells through up-regulation of APOBEC3 expression, The 5th German-Japanese HIV-Symposium; p.11, Tokyo (2010.5)

4. Ryuichi Sugiyama, Hironori Nishitsuji, Yuichiro Habu, Haruki Naganuma, Hiroshi Koseki, Ayako Furukawa, Takashi Nagata, Masato Katahira, Hiroshi Takaku: Heat shock protein 70 inhibits HIV-1 Vif-mediated ubiquitination and degradation of APOBEC3G, The 5th German-Japanese HIV-Symposium; P.3, Tokyo(2010.5)

(国内学会)

1. 天田 謙、鈴木友幸、高久 洋: バキュロウイルスによるマウス肺樹状細胞の免疫応答評価. 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; p291、神戸 (2010 年 12 月)

2. Myint Oo Chang、鈴木友幸、高久 洋: HIV-1 Gag Virus-like particles inhibit HIV-1 replication in dendritic cells and T cells. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会; p278、東京 (2010 年 11 月)

3. 杉山隆一、西辻裕紀、長沼晴樹、小関寛、古川亜矢子、片平正人、羽生勇一郎、高久 洋; HSP70 は Vif による APOBEC3G のユビキチン化を阻害することで APOBEC3G の分解を抑制する; 第 58 回ウイルス学会学術集会; p445、徳島 (2010 年 11 月)

4. 小関 寛、杉山隆一、西辻裕紀、古川亜矢子、片平正人、高久 洋: Hsp70 は APOBEC3G の HIV-1 粒子への取り込みを促進する. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会; p220、東京 (2010 年 11 月)

5. 鈴木 友幸、Chang Myint Oo、高久 洋: バキュロウイルス感染樹状細胞による抗腫瘍免疫の誘導. 第 69 回日本癌学会学術総会; p430、大阪 (2010 年 9 月)

6. 鈴木 等、齋藤大史、石川麻由子、大野

亜希子、高久 洋: バキュロウイルス発現 shRNA による A 型および B 型インフルエンザウイルスの増殖抑制. 第 20 回抗ウイルス療法研究会記念大会; p69、熊本 (2010 年 5 月)

7. 西部好美、鈴木 等、高久 洋: バキュロウイルスによる肝硬変の改善. 第 20 回抗ウイルス療法研究会記念大会; p43、熊本 (2010 年 5 月)

G. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1. 特許出願

国際特許申請(米国)、KPCT011: 医薬組成物を製造する方法: 高久洋、鈴木友幸、チャミンウー、山本典生、若林一夫、千葉工業大学平: 22年 9 月 10 日

汎 HIV-1 株中和能を有する抗体誘導に関する研究

分担研究者 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

研究要旨 汎 HIV-1 株中和能を持つ液性免疫を獲得したヒト HIV-1 感染者の存在は、液性免疫誘導型エイズワクチンが可能であることを強く示唆している。本研究では日本人血友病 HIV-1 感染者に見いだされた汎 HIV-1 株中和能を持つ症例を解析の中心に据えて、これらの症例が持つ免疫学的特性をワクチン免疫デザインに生かしてエイズワクチンの実現を目指す。本年度は cross reactive な血清を有する日本人血友病 HIV-1 感染者から B 細胞クローンを樹立し、細胞培養上清の抗 HIV-1 活性を指標に選択された B 細胞に由来する免疫グロブリン遺伝子の解析を行った。その結果、中和能を持つと予想される複数の抗体には germlin 免疫グロブリン遺伝子の選択性が見いだされた。これは中和抗体が誘導されるためには Env に反応性のある IgM 抗体が確実に誘導される必要性を示唆するものであり、somatic hypermutation 等によって中和抗体が生体内でどのように変化していくかを理解する起点になる重要な研究結果である。それと同時に液性免疫誘導型ワクチンの開発にも大きな示唆を与えると考えられる。

A. 研究目的

HIV-1感染症のパンデミックは危機的状況にあり、エイズワクチン開発は世界的な要請である。これまでいくつかの臨床試験が行われてきたが、未だ満足できるレベルの予防ワクチン候補はなく、重点的な研究開発が求められている。

エイズワクチンには2種類の作用機序が提唱されている。細胞障害性T細胞誘導型、中和抗体誘導型ワクチンである。自然感染経過の中でウイルス制御に中心的役割を担うのは細胞障害性T細胞である。特に初感染時のviremiaを制御するために重要な役割を担う事が知られている。ヒトにおけるHIV-1自然感染経過において中和抗体は限定的な機能しか検出されなかった事などから、液性免疫誘導型エイズワクチンは困難であると考えられてきた。しかし、近年になって中和抗

体がHIV-1に対する免疫学的選択圧を常に与えている事が証明された(Richman et al. 2003 PNAS; Wei et al. 2003 Nature; Frost et al. 2005 Nature; Mikell et al. 2011 PLoS Pathog)。ヒトのHIV感染者で中和抗体誘導型ワクチンが誘導すべき液性免疫を獲得した例が報告されるようになってきた(Li et al. Nat Med 2007; Zhou et al. Nature 2007)。さらに、近年多様なHIV株の複製を阻害できる汎HIV-1株中和抗体もHIV感染者から続々と分離同定されている(Walker et al. 2009 Science; Simek et al. 2009 JV; Burton et al, Science 2010)。汎HIV-1株中和抗体は動物モデルにおける攻撃ウイルス接種からの感染も阻止できる(Van Rompav et al. 1998 JID; Gardner et al. 1994 J Med Primatol; Gardner et al. AHR 1995; Shibata et al. 1999 Nat Med; Mascola et al. 2000 Nat Med; Hofmann-Lehman et al. 2001 JVI; others)。これまで樹立に成功して

いるウイルス感染症に対するワクチンの多くは液性免疫誘導型である(Walker et al. 2008 Science)。HIV-1感染を仮に完全に抑制できなくても感染者における病期進行を遅らせる利益があることも中和抗体誘導型ワクチン動物実験で報告されている(Parren et al. 2001 JV; Haigwood et al. 2004 JV)。以上の知見は液性免疫誘導型エイズワクチンの可能性を示している。

これらの知見に基づき、我々はヒトにおける液性免疫反応の本質を理解することを通じて、中和抗体誘導型エイズワクチンの可能性を追求するための研究を行う。我々は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液性免疫誘導型エイズワクチンが到達目標とする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。

本年度は、汎 HIV-1 株中和能を有する複数の日本人血友病長期エイズ未発症 HIV-1 感染者から HIV-1 中和活性を持つ抗体遺伝子をクローニングし抗体遺伝子の解析を行った。なお本研究はエイズ予防財団宮内浩典博士、東海大竹腰正隆博士との共同研究である。

B. 研究方法

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細胞不死化を行い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。
(倫理面への配慮)

ヒトに由来する研究試料を利用した研究は国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査および荻窪病院倫理委員会にて認可をうけている。

C. 研究結果

3人のドナーから複数のLCLクローンを樹立し、その抗体遺伝子の増幅を試みたところ、ドナー1から2つ、ドナー2から1つ、ドナー3から9つのサンプルで増幅に成功した(表1参照)。PCRによる抗体遺伝子増幅パターンの解析に基づき、これらのクローンはモノクローナルな背景を有することが示唆された。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。多数の候補から絞り込まれて得られたクローンが同一であったことから、Lusiv系スクリーニングによる細胞の選別は十分機能していることが示唆される。抗体遺伝子増幅効率が100%にみたなかった原因は、RNAの質と細胞の増幅に伴う抗体遺伝子の脱落に由来する可能性が考えられた。

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。H鎖L鎖のVDJはそれぞれ表1に示す通りである。なかでも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。数多くの抗体遺伝子座の中から同一のセグメントが使用されていることは、中和抗体の遺伝子構成に一定の選択性が存在することを強く示唆する。

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。これは過去の報告とよく一致している。

Table 1. Isolation of human monoclonal HIV-neutralizing antibody and immunoglobulin gene analysis

Donor	1	2	3	3
Ig class	IgM	IgM	IgG	IgM
# of clones	2	1	6	3
Heavy chain V	H3-9*01	H5-51*01	H1-46*01	H4-61*02
Heavy chain D	D6-19*01	D2-2*02	D6-19*01	D5-12*01
Heavy chain J	J4*02	J5*02	J4*02	J6*03
Light chain V	L1-40*01	L1-51*01	K1-16*01	L1-51*01
Light chain J	J3*01	J3*02	J4*01	J3*01
VH homology to germline	98.30%	97.30%	93.90%	99.30%
VL homology to germline	97.00%	99.00%	95.30%	99.30%
VH & VL CDR mt	7	5	11	0

D. 考察

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。

これまでに分離同定されている汎HIV-1株中和抗体クローンとしてb12, 2F5, 4E10, 2G12, VRC01, PG9, PG16, HJ16, Z13e1が知られている。(Burton and Weiss, 2010 Science) 抗体と抗原の共結晶構造により中和エピトープの立体構造や抗体の作用機序が徐々に明らかになってきた。しかし、これらは限られた抗体クローンによる情報であり、ワクチンの免疫源としてのエンベロープタンパク質立体構造の理解は十分とは言えない。一部の抗体においてはscaffoldingによる中和抗体誘導が試みられた。結晶構造解析にてエピトープ構造の再現に成功したこと、結合抗体が誘導されたこと、結合様式が汎HIV-1中和抗体クローンと同様であることが示された。しかし、これらの抗体には中和活性は検出されなかった(Ofek et al. 2010 PNAS)。これは免疫源の構造と機能及び中和抗体の作用機序がまだまだ十分に明らかになっていないことを示している。我々が分離した抗体を利用することによって抗原の立体構造に対する理解がさらに深まり、ワクチン源を科学的根拠に基づいて戦略的にデザインすることが可能になると思われる。

既存の抗体の立体構造は非常に特殊な形態が多く、somatic hypermutation(sHM)の数も非常に多いことが報告されている。例えば、b12はH鎖のCDR3が主な抗原認識部位である。2F5, 4E10は脂質成分を同時に認識する性質を持つ。VRC01

は特殊な修飾と特異な hammerhead 様 CDR 構造を持つ。これらに共通する germline はなく、ウイルス抗原の情報、経時的な抗体遺伝子の変化などの解析には乏しく、どのようにしてこれらが生体内で選択されてきたか明らかでない。少なくとも VRC01 においては弱いエンベロープとの反応性があることが明らかになった。これは我々の知見と非常によく合致する。ワクチンが誘導する抗体は IgM から生じる。IgM の中でどのようなクローンが潜在的にエンベロープと反応する能力を有しているか、そのエピトープはエンベロープのどの領域かを系統的に forward genetics により解析する必要があるかもしれない。この意味で IgM クローンの解析は非常に価値が高いと思われる。

抗体の選択にヒトの遺伝的な背景がどの程度強く関与するかについては明らかにされていない。しかし、一定の感染感受性を持ち、ウイルスの複製を低レベルで許容する状況下でこれらの汎 HIV-1 株中和抗体は選択されたと思われる。ウイルス複製が乏しいような遺伝的背景を持つヒトでは汎 HIV-1 株中和抗体は生じにくいことが推測される。汎 HIV-1 株中和抗体をワクチンによって誘導するためには、同一のエピトープであっても複数の免疫源を利用したり、曝露する抗原の構造を経時的に変化させるなど、自然感染にみられる免疫とウイルスの攻防をある程度再現する必要があるのかもしれない。

E. 結論

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。

F. 健康危機情報

該当なし

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. ハイスループレットディスプレイアセンブリーアッセイの構築.

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, 尾湯将一, 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

HIV-1 中和モノクロナール抗体の誘導

研究分担者 高橋秀宗 国立感染症研究所 感染病理部

研究要旨 HIV-1 中和抗体をマウスにおいて誘導する抗原の開発を目的とした。小実験動物での抗体誘導は、ワクチン開発における意義があると考えた。広域中和エピトープとして知られている gp41 の脂質膜に近い領域（MPER）を標的とするために、HIV-1 様粒子から脂質膜を取り除いた Core-Env を抗原とした。さらに中和能をエンハンスさせる目的で標的細胞へ Fc レセプターを発現させ中和能を調べた。誘導したモノクロナール抗体の中には、サブタイプ A, AE, AG, B, C, D の env を有するシールドウイルスに対し、1 ug/mL で中和能を示すものがあった。Core-Env 抗原は、広域中和抗体誘導抗原として有効な可能性がある。

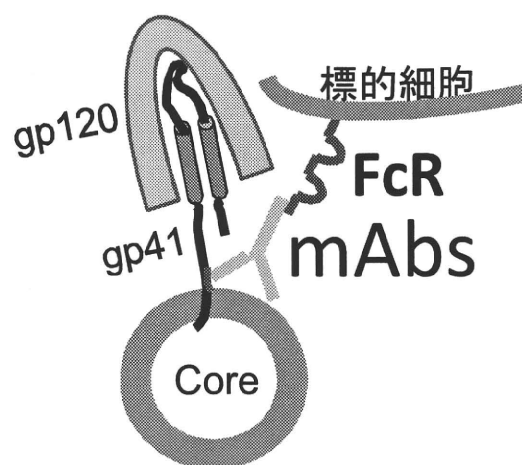
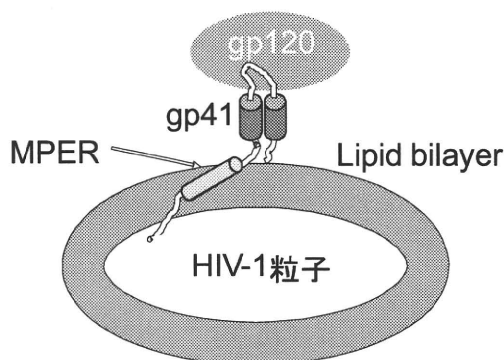
A. 研究目的

HIV-1 を中和する抗体の誘導をマウスにおいて可能とする抗原の開発を目的とした。HIV-1 の広域中和エピトープの一つ、membrane proximal external region (MPER) は粒子脂質膜に埋まっており容易に免疫系への提示が難しい。そこで粒子をディタージェントを含む蔗糖平衡密度勾配法で処理し、Core-Env を分離、抗原として利用した。

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

B. 研究方法

HIV-1 の env は糖鎖に富み、抗体の接近を阻害し、さらに膜融合における env の構造変化により、env 自体の変異に加え、中和を難しくしている。例えば gp41 の MPER は既存の広域中和ヒトモノクロナール抗体 2F5, 4E10 の標的であるが、MPER は脂質膜に埋没しているところが多く、抗原提示が難しい（下図）。



一方、上図のように標的細胞における Fc レセプター (FcR) 発現は抗体中和能のエンハンスをもたらすことが報告されていることから、中和アッセイの標的細胞に FcR を発現させて中和

能を測定した。

- 1) 免疫抗原として NL4-3 由来の gag 及び各種 env 発現ベクターを 293T 細胞へトランスフェクションして HIV-1 様粒子を得た。
- 2) HIV-1 粒子中のコアを解析するために、20%蔗糖をクッションに超遠心濃縮後、TritonX-100 を含む 30-80%蔗糖平衡密度勾配法により、Core-Env を分離した。
- 3) ウェスタンブロット解析及び、ELISA による p24 の定量を行った。
- 4) 脂質二重膜を除いた Core-Env、HIV 粒子、Core のみをそれぞれ Balb/c マウスへ CpG DNA をアジュバントとして、皮下に 3 回免疫した血清を得た。
- 5) Sp2/o ミエローマを使用して、免疫マウス脾臓よりハイブリドーマを誘導した。モノクロナール抗体を精製 gp120, gp41 を抗原として ELISA により選出した。
- 6) HIV-1 サブタイプ A, AE, AG, B, C, D の env 発現ベクターを MAGIC5 細胞からクローニングした分離株クローン DNA から PCR を用いて作成した。
- 7) ルシフェラーゼをゲノムとして有し、各サブタイプ env を有するシュードウイルスを作成した。
- 8) 各モノクロナール抗体と各シュードウイルスについて、293T 細胞へヒト CD4、CCR5、さらに FcR を発現させ感染価を指標として中和試験を行った。

(倫理面への配慮)

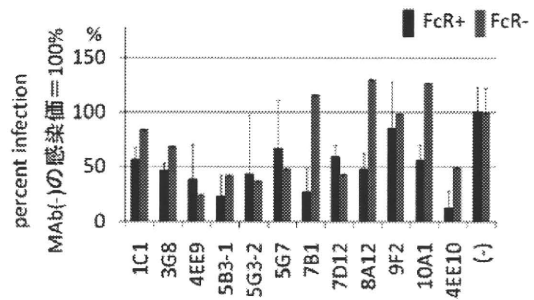
本研究では特に臨床試料を使用していない。

C. 研究結果

- 1) マウスへの免疫により、env を認識するモノクロナール抗体産生クローンを 100 程度誘導することができた。
- 2) モノクロナール抗体中に、NL43 env 増殖欠損株に対する中和能を 1 ug/mL で示すものがあった。(図)
- 3) さらに他のサブタイプ A, AE, AG, C, D のシュードウイルスに対する中和能を 1 ug/mL で示すものがあった。

- 4) 標的細胞での FcR の発現により、抗体の中和能がエンハンスされるものが多かった。

シュードウイルス(サブタイプ B)に対する、mAbによる中和能



D. 考察

Core-Env のマウスへの免疫で 2F10, 4E10 など既存の広域ヒトモノクロナール抗体と同等の中和モノクロナール抗体価が多数得られた。精製 HIV-1 env 糖蛋白や不活化ウイルスの免疫ではマウスにおいて中和抗体誘導が難しいことが知られていたが、Core-env 抗原は広域中和抗体誘導において有効性があつたと考える。

誘導したモノクロナール抗体群の多くは既存の HIV-1 広域中和モノクロナール抗体 4E10 などと同様に、標的細胞における Fc レセプター発現による中和能のエンハンスが認められた。エピトープの多くは標的細胞のレセプター、コレセプターとの会合により、様々なコンフォメーション変化が生じることによって表出されてくるものと考えられ、標的細胞で Fc レセプターにより抗体が固定化されることが中和に有用だったのではないかと考えた。

T 細胞系では活性化 T 細胞でしか Fc レセプターは発現していないが、初感染の標的であると言われている macrophage、Langerhans 細胞、interstitial DC 細胞で発現されているため生理学的な防御に有用な抗体が誘導できなたのではないかと考えた。

HIV-1 感染者に中和抗体は認められるが、病態の進行を特に抑制してはいないと考えられている。Env のうち、gp120 の広域中和抗体

では CD4 結合領域への抗体 CD4bs (b12)、糖鎖認識抗体 (2G12) が知られているが、糖鎖による阻害などでこれらの抗体の誘導は難しい。他に、CD4i、抗 V3 抗体が感染者に大量に認められる、中和抗体として知られているが中和するためには CD4 に結合後、Env の構造変化が必須条件であることから、感染者でののはたらくは限られている。MPER を標的とした既存の広域中和ヒトモノクロナール抗体 2F5、4E10 には脂質二重膜を認識するという問題が指摘されている。Core-Env は脂質を除いているために膜に含まれていた宿主因子を抗原として含むことがないという利点がある。また脂質二重膜自体を除いているため蛋白抗原と共に脂質を抗原として認識させる危険が少ないという利点も有していると考えられる。

E. 結論

HIV-1 様粒子からディタージェントにより宿主膜蛋白、膜脂質を除いた Core-Env 抗原は、マウスにおいて広域中和モノクロナール抗体を誘導し、抗原として有効な可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ichinohe, T. Aina, A. Nakamura, T. Akiyama, Y. Maeyama, J. Odagiri, T. Tashiro, M. Takahashi, H. Sawa, H. Tamura, S. Chiba, J. Kurata, T. Sata, T. Hasegawa, H. Induction of cross-protective immunity against influenza A virus H5N1 by an intranasal vaccine with extracts of mushroom mycelia. *J Med Virol.* 82(1):128-137. 2010

Sato, Y. Shimonohara, N. Hanaki, KI. Goto, M. Yamakawa, Y. Horiuchi, M. Takahashi, H. Sata, T. Nakajima, N. ImmunoAT method: An initial assessment for the detection of abnormal isoforms of prion protein in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *J Virol Methods.* 165(2):261-267. 2010

Ohtaki, N. Takahashi, H. Kaneko, K. Gomi, Y.

Ishikawa, T. Higashi, Y. Kurata, T. Sata, T. Kojima, A. Immunogenicity and efficacy of two types of West Nile virus-like particles different in size and maturation as a second-generation vaccine candidate. *Vaccine* 28(40):6588-6596. 2010

2. 学会発表

- 1) 高橋秀宗, 飛梅実, 金子恵子, 巽正志, 佐多徹太郎. HIV-1 広域中和抗体誘導抗原の開発. 第 58 回日本ウイルス学会総会 2010. 11.
- 2) 高橋秀宗, 飛梅実, 金子恵子, 巽正志, 佐多徹太郎. HIV-1 広域中和抗体誘導抗原の開発. 第 14 回ワクチン学会総会 2010.12.
- 3) Takahashi, H., Tobiume, M., Sata, T. Immunization with virus-like particles of human immunodeficiency virus type 1 produces neutralizing antibodies against subtype B pseudoviruses. AIDS vaccine 2010 conference. Atlanta, USA, September, 2010

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
 分担研究報告書

HIV の感染防止、AIDS 発症防止に関する免疫学的基礎研究

分担研究者 玉村 啓和 東京医科歯科大学学生体材料工学研究所教授

研究要旨 我々は、これまでワクチン創製研究であり取りあげられなかった以下の3種をターゲットとして設定し、有機合成化学を巧みに用い人工抗原分子を作製し、また、新規阻害剤を4種創製し、その評価を行っている。1) 標的細胞側のコレセプターCXCR4のN端領域および2種の細胞外ループ(Ec11-Ec12)に親水性領域を付与したペプチドを合成し、人工テンプレート上に構築した分子を作製した。マウスに免疫し、抗体誘導を行った。MAPテンプレートで4価型にしたNt-2が抗体誘導能を示した。CXCR4の細胞外領域(Ec1)を合成し、MAPに導入したEc1-1が抗体誘導能を示し、抗体は中和活性を示した。2) HIVが標的細胞へ侵入するときのHIV表面蛋白gp41の立体構造変化をターゲットとして設定し、gp41のC端側ヘリカル領域の断片ペプチドに親水性領域を付与した形で化学合成し、膜融合の中間体構造である3量体を形成するようにアッセムブリーし抗原分子を作製した。gp41-N363量体構造を模倣した抗原分子をHIV感染モデルラットで免疫し、抗体を誘導した。gp41-C343量体構造を模倣した抗原分子も合成し、中和抗体の誘導に成功した。3) HIV表面蛋白gp120のCD4 binding/コレセプター-binding領域をターゲットとし、効率的にエピトープを提示できるように構造固定化した環状ペプチドミメティックを作製した。ファージディスプレイライブラリーからのin vitroアフィニティー選択により、特異的抗体を創出し、gp120のヘアピン領域を認識するモノクローナル抗体を得た。4) 侵入時に結合する宿主側のCD4の小分子mimicの構造活性相関研究を行った。また、HIV侵入の動的超分子機構においてgp120構造変化を誘起する効果があることを見出した。5) Vpr断片からIN阻害活性を有するペプチドを見出し、活性に必要なアミノ酸を同定した。また、構造活性相関を展開した。6) Matrix断片に細胞膜透過性配列を付加した抗HIVペプチドを創出し、イメージングで細胞内導入を確認した。7) 新規低分子CXCR4アンタゴニストを創出した。

A. 研究目的

今までにエイズに関してもワクチン創製の研究がかなり精力的に行われてきたが、根本的な治療法の確立には至っていない。我々はワクチン作製に対して、従来の概念とは全く異なる方向から図1に挙げた3種類のアプローチすることにした。1) 一般のワクチンの常識では、抗原分子のターゲットとしてウイルス外皮蛋白等を基盤とするのが一般のワクチンの常識

であるが、我々のワクチン創製のターゲットとしては常識にこだわらなかった。すなわち、標的細胞側のコレセプター(第二受容体)にターゲットを設定した。この利点として、レトロウイルスは非常に変異しやすいので、ワクチンによって誘導される抗体は変異してしまったウイルスを効率よく認識することができなくなるが、標的細胞側(宿主ヒト側)を抗原としてワクチンを作製した場合、ホスト蛋白質は変異