

type 1. *Biol Pharm Bull.* 33:1903-1906 (2010).

玉村啓和

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.

三浦智行

- 1) Himeno, A., Akagi, T., Uto, T., Wang, X., Baba, M., Ibuki, K., Matsuyama, M., Horiike, M., Igarashi, T., Miura, T., and Akashi, M.: Evaluation of the immune response and protective effects of rhesus macaques vaccinated with biodegradable nanoparticles carrying gp120 of human immunodeficiency virus. *Vaccine*, 28: 5377-5385, 2010.
- 2) Matsuda, K., Inaba, K., Fukazawa, Y., Matsuyama, M., Ibuki, K., Horiike, M., Saito, N., Hayami, M., Igarashi, T., and Miura, T.: *In vivo* analysis of a new R5 tropic SHIV generated from the highly pathogenic SHIV-KS661, a derivative of SHIV-89.6. *Virology*, 399: 134-143, 2010.
- 3) Inaba K, Fukazawa Y, Matsuda K, Himeno A, Matsuyama M, Ibuki K, Miura Y, Koyanagi Y, Nakajima A, Blumberg RS, 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.

保富康宏

- 1) 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.* 85(2):1117-24, 2010.
- 2) 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 and Infection.* 13(1):58-64. 2011.
- 3) Yasuhiro Yasutomi. Establishment of Specific Pathogen-Free Macaque Colonies in Tsukuba Primate Research Center of Japan for AIDS research. *Vaccine.* Suppl 2:B75-B77. 2010.
- 4) 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.* In press.

高橋秀実

- 1) Takahashi, H. Species-specific CD1-restricted innate immunity for the development of HIV vaccine. *Vaccine*, 28S:B3-B7, 2010.
- 2) Yagi, Y., Watanabe, E., Watari, E., Shinya, E., Satomi, M., Takeshita, T., Takahashi, H., Inhibition of DC-SIGN-mediated transmission of human immunodeficiency virus type 1 by Toll-like receptor 3 signalling in breast milk macrophages. *Immunology*, 130:597-607, 2010.
- 3) Moriya, K., Wakabayashi, A., Shimizu, M., Tamura, 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.

高久 洋

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Sugiyama R, Hayafune M, Habu Y, Yamamoto N, Takaku H. HIV-1 RT-dependent DNAzyme expression inhibits HIV-1 replication without the emergence of escape viruses. *Nucleic Acids Res.* in press.
- 4) 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.

研究課題：HIV感染病態に関わる宿主因子および免疫応答の解明

課題番号：H21-エイズ一般-009

研究代表者：横田 恭子（国立感染症研究所 免疫部室長）

研究分担者：徳永 研三（国立感染症研究所感染病理部 主任研究官）、石坂 幸人（国立国際医療センター研究所難治性疾患研究部 部長）、小柳 義夫（京都大学ウイルス研究所ウイルス病態研究領域 教授）、宮澤 正顕（近畿大学医学部 教授）、田中勇悦（琉球大学医学部教授）、神奈木真理（東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 免疫治療学分野、教授）、立川 愛（東京大学医科学研究所先端医療研究センター感染症分野 助教）、有吉 紅也（長崎大学熱帯医学研究所 教授、上野貴将（熊本大学エイズ学研究センター 准教授）

1. 研究目的

制御不能な HIV 増殖と潜伏感染リザーバーの存在はエイズ病態形成の主たる要因である。本研究では、ウイルス制御に関わる主な宿主因子の作用機構、HIV 感染後の病態形成に重要な役割を果たす多様な抗 HIV 免疫応答について *in vivo* および *in vitro* の系で解析を行い、宿主因子を利用したウイルス増殖制御や有効な抗 HIV 免疫応答誘導による感染拡大・潜伏化阻止のための基盤を形成する。

2. 研究方法

宿主因子によるウイルス制御の解析:1) HIV-1 Vpu とヒト宿主因子 BST-2/Tetherin の相互作用部位は抗体の internalization で解析した。また、サブタイプ C 由来 Vif 蛋白の APOBEC3G (A3G) 結合親和性と G→A 変異抑制能を解析した。2) ヒトゲノムに存在しない I-SceI あるいは内在性 PpoI 認識サイト導入 THP-1 細胞を用い、アデノウイルスが発現する制限酵素で誘導した DNA 損傷 (DSB) による HIV-1 感染・挿入部位の配列を決定した。Vpr-Flag タンパクに共沈してプラスミド DNA の泳動度を変化させる細胞タンパクおよびランダムペプチドライブラリー中の Vpr 親和性ペプチドを含むタンパクを同定し、DSB への関与を解析した。3) ヒト造血幹細胞移植免疫不全マウス (ヒト化マウス) に野生型と Vif 欠損 HIV-1 を感染させ、ウイルス遺伝子の変異を解析した。4) *Rac2* siRNA を用いて *Rac2* 発現下流のエフェクター機能を解析した。また、APOBEC3 ノックアウトマウスを用いてレトロウイルス感染 B リンパ球の機能変化について解析した。抗 HIV 免疫応答の解析: 1) 赤色蛍光を発する R5 型 HIV-1 と緑色蛍光を発する X4 型 HIV-1 を同時に感染させた初期培養 CD4 陽性 T 細胞やヒト化マウスにおける免疫組織でのウイルス感染の進行過程と感染細胞分布をフローサイトメーターやリアルタイム PCR を用いて解析した。2) 固相化抗 CD3 抗体に加えて抗 CD28 抗体やサイトカインで活性化した PBMC に R5 型 JR-FL を感染させ、OX40/OX40L 刺激あるいは抗 CXCR4 抗体による HIV-1

抑制効果を解析した。3) 正常 T 細胞を自己細胞や retinoic acid 等で刺激して IL-2 存在下に T 細胞株を誘導し、HIV への感受性を調べた。4) 血中 HIV 量の高い慢性 HIV 感染者 PBMC において非特異的刺激 5 時間後の T 細胞が産生する β ケモカインと IFN- γ を細胞内染色で、18 時間後のこれら分子の遺伝子発現をリアルタイム PCR で解析した。5) 北タイ長期 HIV 感染未発症者コホートの HLA とウイルスの gag/pol 遺伝子配列を決定して臨床経過との相関を統計解析した。また、CRF01_AE Gag 由来オーバーラッピングペプチドを用いて CTL エピトープを同定し、CTL 活性と臨床経過を比較解析した。6) HIV 感染者から HIV 特異的な CTL クローンを樹立してエピトープを解析すると同時にその T 細胞レセプター (TcR) 遺伝子をクローニングし、T 細胞株に TcR を再構築してその抗原認識機能を評価した。

(倫理面への配慮)

該当する実験は各施設の医学研究倫理委員会の承認を得た後、個人情報保護法に基づいて患者情報の徹底管理下に実施された。動物実験は実験動物委員会の承認を得、動物愛護の精神に則って動物に与える苦痛の軽減と排除に努めた。

3. 研究結果

宿主因子によるウイルス制御機構に関して新しい知見がいくつか得られている。1) Vpu は直接細胞表面上の BST-2 の endocytosis を誘導してライソゾーム分解へと導く。また、C 型 HIV-1 の Vif は抗 A3G 活性が高く、末梢血リンパ球感染ウイルスの G→A 変異率が低い。2) 人工的 DSB 部位への HIV 挿入はインテグラーゼ非依存的におこる。また、Vpr と複合体を形成して DNA の構造を変化させる Topoisomerase I (Top-I) と新たな Vpr 結合タンパクとして SNF2h を同定し、その Vpr 結合領域を明らかにした。3) ヒト化マウスにおいて野生型 HIV-1 は高いウイルス血症を示したのに対し、Vif 欠損 HIV-1 は血中ウイルスが検出されない。この野生型 HIV 感染マウスのゲノム RNA に

は変異は少なく、APOBEC3Bあるいは3Gによると思われる変異パターンが多くの proviral DNA クローンで検出されたことから、APOBECの自然抵抗性が生体で機能していることが示された。4) *Rac2*の高発現型イントロン多型をもつTHP-1細胞株にsiRNAで*Rac2*発現を抑制すると、CCR5発現増加とリガンド(CCL5)の発現低下とともにCCR5指向性HIV-1に対する複製が促進され、その機構にp38 MAPK系のシグナルが関与していた。一方、レトロウイルス感染において、APOBECノックアウトマウスでは中和抗体産生が遅延しており、これには骨髄からリンパ節移行型Bリンパ球への選択的感染と細胞数減少が関与していた。

抗HIV免疫応答に関しては、それぞれの解析系が確立され、免疫応答解析への新たなアプローチが提示された。1) R5型HIVの初期の選択的増殖はin vitroでもin vivoでも認められた。特に、CXCR4とCCR5を共発現する記憶CD4⁺T細胞ではX4型HIV-1よりもR5型HIV-1の感染が成立しやすく、両ウイルス同時混合感染における膜融合および逆転写の効率はR5型HIV-1が高いことが示唆された。2) OX40刺激によるR5型HIV-1の増殖抑制発揮にはCD28を介した副刺激が効果的で、抗CXCR4抗体の中にX4のみならずR5型HIV-1の増殖を抑制する抗体が存在した。3) マクロファージのHIV-1感染において、TLR2/4刺激を介したI型インターフェロン産生によりHIV抑制能を有する常在菌が存在する。ラット調節性T細胞はHIV持続感染系に適さず、新たにHIV感受性の高いヒトCD4⁺CD25⁺Fixo3⁺T細胞株を樹立した。4) 高血中ウイルス慢性感染者PBMC刺激早期にはβケモカイン産生に差はなく、IFN-γ発現が有意に低下していた。5) 北タイHIV-1感染者のHLAに相関するCRF01_AE Gag 45カ所のCTLエピトープと臨床経過の相関から、新しい防御的HLAを発見した。6) HIV感染者から得られたNef RY11(RPQVPLRPMTY)ペプチド特異的な5個のCTLのTcRをクローニングし、Nef特異的TcRを再構築したT細胞株を樹立した。

4. 考察

VpuとBST-2相互作用が細胞膜でおこることやVifの抗APOBEC効果のサブタイプによる違いが新たに明らかとなった。このサブタイプによるウイルスタンパク機能の違いがエイズ病態形成にどのように影響を及ぼすか興味深い。VprによるDSBとIntegrase非依存性のDNA挿入がHIV感染に果たす役割、新しい宿主因子TopIとSNF2hの作用機構に関しても今後の展開が期待される。一方、APOBECがHIV感染に対する自然抵抗性因子として感

染個体で作用していることが、ヒト化マウスやマウスレトロウイルス感染系において同時に明らかになり、レトロウイルス制御に共通して有効なAPOBECの機能を強化するための新たな治療薬探索の方向性が示された。また、遺伝的にHIV感染抵抗性を賦与する*Rac2*高発現は、R5型HIV-1の複製を抑制し、その機構がβケモカインとその受容体CCR5に関わっていること、OX40/OX40Lシグナルがβケモカインの産生を介してR5型HIV-1感染拡大を抑制すること、及び高ウイルス血症を有するHIV感染者のβケモカインの産生は低下していることは相互に関連しており、初期感染段階のR5型優位増殖機構の解明とともにR5型HIV-1に標的を絞った治療法の新たな展開展開が期待される。更に、アジア特有のHLAに提示されたCRF01_AE Gag領域に対するCTL認識と臨床経過の相関は、CTLによるウイルス制御の重要性を再認識するものであり、感染者CTLが有するTcRのエピトープ交差認識機構の解析は、ワクチンでより有効なCTLを誘導するための基盤となる知見を提供するであろう。

5. 自己評価

1) 達成度について

細胞因子と免疫応答の研究は並行して概ね計画通りに進行している(70~80%)。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

既に公表されて国際的評価を得た成果も多く、本研究班においてエイズ病態に関わる宿主因子や免疫応答をそれぞれ分担研究者独自の手法で解析することにより、新たな治療法やワクチン開発のための重要な基盤が形成される。

3) 今後の展望について

前年度までの成果をもとに、宿主因子とウイルスの相互作用機構および抗HIV免疫応答に関する独自の解析を更に発展させていく。特に、APOBECとR5型HIVの増殖制御に関して、班員相互の討議や連携をより強化し、ヒト化マウスや臨床検体等を利用した生体における評価・解析をより積極的に進めることが重要であると考えられる。

6. 結論

宿主細胞因子と抗HIV免疫応答の2本の柱において、病態形成に関わるいくつかの重要な要因が発見され、新たな解析系が確立された。

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

なし。

研究発表

研究代表者

横田恭子

- 1) Tsunetsugu-Yokota, Y. and Yamamoto, T.: Mammalian microRNAs: post-transcriptional gene regulation in RNA virus infection and therapeutic applications. *Frontiers in Microbiology* 1:1-9, 2010.
- 2) Hagiwara, K., Murakami, T., Xue, G., Shimizu, Y., Takeda, E., Hashimoto, Y., Honda, K., Kondoh, Y., Osada, H., Tsunetsugu-Yokota, Y., and Aida, Y.: Identification of a novel Vpr-binding compound that inhibits HIV-1 multiplication in macrophages by chemical array. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* in press, 2010.
- 3) Terahara, K., Nochi, T., Yoshida, M., Takahashi, Y., Goto, Y., Hatai, H., Kurokawa, S., Ho Jang, M., Kweon, M-N., Domino, S.E., Hiroi, T., Yuki, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., Kobayashi, K., and Kiyono, H.: Distinct fucosylation of M cells and epithelial cells by Fut1 and Fut2, respectively, in response to intestinal environmental stress. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* in press, 2010.

研究分担者

徳永研三

- 1) Iwabu, Y., Kinomoto, M., Tatsumi, M., Fujita, H., Shimura, M., Tanaka, Y., Ishizaka, Y., Nolan, D., Mallal, S., Sata, T., and Tokunaga, K. Differential anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif proteins derived from different subtypes. *J. Biol. Chem.* 285: 35350-35358. 2010.
- 2) Utachee, P., Nakamura, S., Isarangkura-na-ayuthaya, P., Tokunaga, K., Sawanpanyalert, P., Ikuta, K., Auwanit, W., and Kameoka, M. Two N-linked glycosylation sites in V2 and C2 regions of human immunodeficiency virus type 1 CRF01_AE envelope glycoprotein gp120 regulate viral neutralization susceptibility to the human monoclonal antibody specific for CD4 binding domain. *J. Virol.* 84:4311-20. 2010.
- 3) Iwabu, Y., Fujita, H., Tanaka, Y., Sata, T., and Tokunaga, K. Direct internalization of cell-surface BST-2/tetherin by the HIV-1 accessory protein Vpu. *Commun. Integr. Biol.* 3:366-369. 2010.

宮澤 正顯

- 1) Sugimoto, C., Watanabe, S., Naruse, T., Kajiwara, E., Shiino, T., Umamo, N., Ueda, K., Sato, H., Ohgimoto, S., Hirsch, V., Villinger, F., Ansari, A. A., Kimura, A., Miyazawa, M., Suzuki, Y., Yamamoto, N., Nagai, Y. and Mori, K. 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) Naruse, T. K., Chen, Z., Yanagida, R., Yamashita, T., Saito, Y., Mori, K., Akari, H., Yasutomi, Y., Miyazawa, M., Matano, T., and Kimura, A. Diversity of MHC class I genes in Burmese-origin rhesus macaques. *Immunogenetics* 62: 601-611, 2010.
- 3) Tsuji-Kawahara, S., Chikaishi, T., Takeda, E., Kato, M., Kinoshita, S., Kajiwara, E., Takamura, S. and Miyazawa, M. Persistence of viremia and production of neutralizing antibodies differentially regulated by polymorphic APOBEC3 and BAFF-R loci in Friend virus-infected mice. *J. Virol.* 84: 6082-6095, 2010.
- 4) Takamura, S., Tsuji-Kawahara, S., Yagita, H., Akiba, H., Sakamoto, M., Chikaishi, T., Kato, M. and Miyazawa, M. Premature terminal exhaustion of Friend virus-specific effector CD8+ T cells by rapid induction of multiple inhibitory receptors. *J. Immunol.* 184:4696-4707, 2010.

田中勇悦

- 1) Tanaka R, Takahashi Y, Kodama A, Saito M, Ansari A.A, and Tanaka Y. Suppression of CCR5-tropic HIV-1 infection by OX40 stimulation via enhanced production of β -chemokines. *AIDS and Human Retroviruses* 26(10): 1147-1154, 2010.

神奈木真理

- 1) Ahmed, N., Hayashi, T., Hasegawa, A., Furukawa, H., Okamura, N., Chida, T., Masuda, T., and Kannagi, M. Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages by commensal bacteria preferentially stimulating Toll-like receptor 4. *J Gen Virol*, 91: 2804-2813, 2010.
- 2) Hayashi, T., Nishitsuji, H., Takamori, A., Hasegawa, A., Masuda, T., and Kannagi, M. DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors enhances the transcription of HIV-1 through NF-kappaB. *Microbes Infect*, 12: 937-947, 2010.

石坂幸人

- 1) Kono, K., Nakashima, S., Kokuryo, D., Aoki, I., Shimomoto, H., Aoshima, S., Maruyama, K., Yuba, E., Kojima, C., Harada, A., Ishizaka, Y. Multifunctional liposomes having temperature-triggered release and magnetic resonance imaging for tumor-specific chemotherapy. *Biomaterials*, accepted.

- 2) Okudaira, N., Iijima, K., Koyama, T., Minemoto, Y., Kano, S., Mimori, A., Ishizaka, Y. Induction of LINE-1 retrotransposition by FICZ, a candidate endogenous ligand of the aryl hydrocarbon receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(43):18487-92, 2010.
- 3) Takahashi, Y., Haga, S., Ishizaka, Y., Mimori, A. Autoantibodies to angiotensin converting enzyme 2 in patients with connective tissue diseases. *Art. Res. & Ther.* 12(3):R8, 2010. (4.5)
- 4) Hoshino, S., Konishi, M., Mori, M., Shimura, M., Nishitani, C., Kuroki, Y., Koyanagi, Y., Kano, S., Itabe, H., Ishizaka, Y. HIV-1 Vpr induces TLR4/MyD88-mediated IL-6 production and reactivates viral production from latency. *J Leukoc Biol.* 87(6) 1133-1143, 2010.

立川 愛

- 1) Liu J, Wu P, Gao F, Qi J, Kawana-Tachikawa A, Xie J, Vavricka CJ, Iwamoto A, Li T, Gao GF. Novel immunodominant peptide presentation strategy: a featured HLA-A*2402 restricted CTL-epitope stabilized by intra-chain hydrogen-bonds from SARS-CoV nucleocapsid protein. *J Virol.* 84:11849-11857, 2010.
- 2) Koga M, Kawana-Tachikawa A, Heckerman D, Odawara T, Nakamura H, Koibuchi T, Fujii T, Miura T, Iwamoto A. Changes in impact of HLA class I allele expression on HIV-1 plasma virus loads at a population level over time. *Microbiol Immunol.* 54:196-205, 2010.
- 3) Zhu D, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Kitamura Y. Influence of polymorphism in dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin-related (DC-SIGNR) gene on HIV-1 trans-infection. *Biochem Biophys Res Commun*, 393:598-602, 2010.

小柳義夫

- 1) Sato K, Nie C, Misawa N, Tanaka Y, Ito M, Koyanagi Y. Dynamics of memory and naive CD8+ T lymphocytes in humanized NOD/SCID/IL-2R γ null mice infected with CCR5-tropic HIV-1. *Vaccine*, 28S2:B32-37, 2010.
- 2) Sato K, Izumi T, Misawa N, Kobayashi T, Yamashita Y, Ohmichi M, Ito M, Takaori-Kondo A, Koyanagi Y. Remarkable lethal G-to-A mutations in vif-proficient HIV-1 provirus by individual APOBEC3 proteins in humanized mice. *J. Virol.* 84:9546-9556, 2010.
- 3) Izumi T, Io K, Matsui M, Shirakawa K, Shinohara M, Nagai Y, Kawahara M, Kobayashi M, Kondoh H, Misawa N, Koyanagi Y., Uchiyama T, Takaori-Kondo A. HIV-1 Vif interacts with TP53 to induce G2 cell cycle arrest and positively regulate viral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, in press.
- 4) Kobayashi T, Ode H, Yoshida T, Sato K, Gee P, Yamamoto SP, Ebina H, Strebel K, Sato, Koyanagi Y. Identification of amino acids in the human tetherin transmembrane domain responsible for HIV-1 Vpu interaction and susceptibility. *J. Virol.* in press.

有吉紅也

- 1) Gesprasert, G., Wichukchinda, N., Mori, M., Shiino, T., Auwanit, W., Sriwanthana, B., Pathipvanich, P., Sawanpanyalert, P., Miura, T., Auewarakul, P., Thitithanyanont, A., Ariyoshi, K. HLA-associated immune pressure on Gag protein in CRF01_AE-infected individuals and its association with plasma viral load. *PLoS One.* 5:e11179, 2010.
- 2) Wichukchinda, N., Nakajima, T., Saipradit, N., Nakayama, E., Ohtani, H., Rojanawiwat, A., Pathipvanich, P., Ariyoshi, K., Sawanpanyalert, P., Shioda, T., Kimura, A. TIM1 haplotypes control the disease progression to AIDS in a HIV-1-infected female cohort in Thailand. *AIDS.* 24:1625-31, 2010.
- 3) Saeng-Aroon, S., Tsuchiya, N., Auwanit, W., Ayuthaya, P., Pathipvanich, P., Sawanpanyalert, P., Rojanawiwat, A., Kannagi, M., Ariyoshi, K., Sugiura, W. Drug-resistant mutation patterns in CRF01_AE cases that failed d4T+3TC+nevirapine fixed-dosed, combination treatment: Follow-up study from the Lampang cohort. *Antiviral Res.* 87: 22-9, 2010.

上野貴将

- 1) Koizumi, H., Hashimoto, M., Fujiwara, M., Murakoshi, H., Chikata, T., Borghan, M.A., Hachiya, A., Kawashima, Y., Takata, H., Ueno, T., Oka, S., Takiguchi, M. Different in vivo effects of HIV-1 immunodominant epitope-specific CTLs on selection of escape mutant viruses. *J. Virol.* 84: 5508-5519, 2010.
- 2) Motozono, C., Mwimanzi, P., Ueno, T. Dynamic interplay between viral adaptation and immune recognition during HIV-1 infection. *Protein & Cell* 1, 514-519, 2010.
- 3) Mwimanzi, P., Hasan, Z., Tokunaga, M., Gatanaga, H., Oka, S., Ueno, T. Naturally arising HIV-1 Nef variants conferring escape from cytotoxic T lymphocytes influence viral entry co-receptor expression and susceptibility to superinfection. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* in press 2010.

研究課題：HIV 感染防御免疫誘導に関する研究

課題番号：H21-エイズ一般-007

研究代表者：俣野 哲朗（国立感染症研究所 エイズ研究センター長）

研究分担者：保富 康宏（独立行政法人医薬基盤研究所 長 類医科学研究センター センター長）、三浦 聡之（東京大学医科学研究所 准教授）、森川 裕子（北里大学北里生命科学研究所 教授）、寺原 和孝（国立感染症研究所 免疫部 研究員）、横山 勝（国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 主任研究官）

1. 研究目的

HIV 感染者数の増大は、グローバルな視点で取り組み克服すべき国際的重要課題である。特にアフリカ等で極めて深刻な状況にあることに加え、これら流行地域での感染拡大が HIV に増殖・変異の場を与えることから、宿主免疫反応による抑制をよりうけにくい HIV 変異株や抗 HIV 薬耐性変異株の出現に結びつく可能性も危惧されている。本研究は、この問題解決に必要な予防エイズワクチン開発を目指すものである。

HIV は感染後誘導される適応免疫によっても排除されきらず持続感染に至るため、エイズワクチン開発には、自然感染の模倣を基本とする従来のワクチンを越えた新たな戦略が必要となる。特に、HIV 感染標的が免疫担当細胞であるため、免疫活性化が必ずしも HIV 複製抑制に結びつかず、逆に複製促進に結びつく可能性がある。そこで本研究は、HIV 複製抑制に結びつく防御免疫反応を選択的に誘導する予防エイズワクチン開発を目的とする。

我々が開発したセンダイウイルス (SeV) ベクターを用いた細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 誘導エイズワクチンは、サルエイズモデルで初めて有効性を示した点で注目され、接種者全員への効果は期待できないものの集団での HIV 感染拡大抑制効果を期待した第 1 世代ワクチンとして、国際エイズワクチン推進構想 (IAVI) との国際共同臨床試験計画が米国にて進展中である。本研究では、この第 1 世代ワクチンの有効性確立に向けた研究を進展させるとともに、接種者全員への防御効果を有する第 2 世代エイズワクチン開発に向け、HIV 複製抑制に結びつく CTL の選択的誘導に関する研究を進めることとした。一方、我々は近年、中和抗体受動免疫が機能的 T 細胞反応誘導を促進する可能性を示したが、この抗体と T 細胞の協同作用を期待して中和抗体誘導に関する研究を開始した。

具体的には、HIV 複製抑制に結びつく免疫誘導法の選別により、有効な防御免疫を選択的に誘導する予防エイズワクチン確立への進展を企図し、以下の研究を行うこととした。特に (i) ウイルス多様性に対応した CTL 反応、(ii) ヘルパー T リンパ球 (HTL) 反応、(iii) 中和抗体反応と T 細胞反応の協同作用等に着目し、サル免疫不全ウイルス (SIV) 感染サルエイズモデルにおいて、ワクチンによる免疫誘導が曝露後のウイルス複製に与える影響を検証することとした。また、HIV 感染者の解析等、抗原選択に関する検討を進めた。

1. CTL 誘導ワクチンのデリバリーシステムの研究

1-1. SeV ベクターワクチンシステムの最適化 (俣野)

1-2. 併用プライム法の開発 (保富)

2. CTL 誘導ワクチンの抗原選択法の研究

2-1. CTL 抗原提示効率の解析 (森川)

2-2. CTL 逃避変異の解析 (三浦・俣野)

2-3. 各種抗原特異的 CTL メモリー誘導効果の解析 (俣野)

3. HTL 反応と中和抗体反応についての研究

3-1. HTL 反応が HIV 複製に及ぼす影響の解析 (寺原)

3-2. 中和抗体誘導に結びつく抗原構造の推定 (横山)

平成 22 年度は、平成 21 年度の研究を進展させ、以下の研究を行った。

1-1. SeV ベクターワクチン接種経路の検討

1-2. E 型肝炎ウイルス様粒子 (HEV-VLP) を用いた SIV 抗原発現 DNA ワクチンの免疫誘導能の解析

2-1. 細胞内および HIV 粒子内の Gag 蛋白定量

2-2. 日本人 HIV 感染者およびサルエイズモデルにおける CTL 逃避変異の解析

2-3. 各種抗原特異的 CTL のレベルと SIV 複製抑制能の相関の有無の検討による有効な抗原特異的 CTL の検索

3-1. SIV 感染慢性期の SIV 特異的 HTL 反応の解析

3-2. HIV Env gp120 構造計算

2. 研究方法

(1-1) SIV Gag 発現 SeV (SeV-Gag) ベクターワクチンをサルに経鼻あるいは筋肉内接種し、誘導される Gag 特異的 CTL レベルを比較検討した。SeV-Gag 接種量は昨年度に有効性を確認した 6×10^8 CIU (従来量の 1/10) とした。また、SeV-Gag ベクター接種の 15 週前に SeV 感染を行ったサルにても同様の実験を行い、抗 SeV 中和抗体の影響を調べた。

(1-2) 経口投与可能な HEV の VLP に HIV Env エピトープを組み込んだキメラ VLP (VLP-HIVenv) ベクターの内腔に SIV gag cDNA を封入したワクチンをマウスに接種し免疫誘導能を検討した。

(2-1) His タグ付 HIV Gag 蛋白を大腸菌で発現精製し、定量用標準液とした。HeLa 細胞に HIV 分子クローンを transfection し、細胞および精製粒子の希釈列を作製して半定量 Western blotting を行った。Image J でバンドの intensity を測定した。

(2-2) 東京大学医科学研究所附属病院に 1992 年から 2009 年までに来院した日本人未治療慢性 HIV 感染患者で CD4 陽性 T 細胞数 $\geq 200/\mu\text{l}$ のものについて HLA class I タイプ及び HIV Gag アミノ酸配列を決定し、統計学的手法により、HLA 関連変異の同定を試みた。また SIV 感染サルの慢性期の CTL 逃避変異を調べた。

(2-3) ワクチン接種後の SIV チャレンジ実験で SIV 複製制御に至った MHC-I (主要組織適合遺伝子複合体クラス I) ハプロタイプ A 共有サル群の末梢血リンパ球を用い、各種抗原特異的 CTL レベルと CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能の相関の有無を検討した。

(3-1) ワクチン非接種サル 3 群 (MHC-I ハプロタイプ A 共有群 5 頭、E 共有群 6 頭、B あるいは J 共有群 5 頭) の SIV 感染後約 30 週の末梢血リンパ球を用い、昨年度に確立した方法で SIV 特異的 HTL 反応を解析した。具体的には、SIV Gag・Pol・Vif・Vpx 発現細胞を用いて抗原刺激後、CD4 陽性 T リンパ球中の MIP-1 β ・IL-2・TNF- α ・IFN- γ ・CD107a (5 マーカー) 誘導を細胞内免疫染色により検出した。

(3-2) 主にホモロジーモデリング法により、CD4 結合前および結合後の HIV Env gp120 分子モデルを構築した。CD4 結合前の分子モデルについては分子動力学計算により、V1/V2 ループの配置を調べた。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え生物等を用いる実験については、実施機関

の承認あるいは文部科学大臣の確認を得ている。動物実験については、実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針を遵守し、実施機関の動物実験委員会の承認を得てから開始した。ヒトサンプルを用いる研究については、該当する倫理指針を遵守し、実施機関の倫理委員会の承認を得てから開始した。

3. 研究結果

(1-1) SeV-Gag ベクター経鼻接種および筋肉内接種のいずれによっても効率よく Gag 特異的 CTL が誘導された。一方、SeV 感染サル (抗 SeV 中和抗体存在下) においては、経鼻接種による Gag 特異的 CTL 誘導は認められたが、筋肉内接種では CTL 誘導がほとんど認められなかった。

(1-2) SIV gag cDNA を封入した VLP-HIVenv ベクターワクチンのマウスでの Gag・Env 特異的免疫誘導能を確認し、サル接種実験を開始した。

(2-1) HeLa 細胞の単位細胞あたりの Gag 発現量は、7-10 pg (約 $0.7 \cdot 1 \times 10^8$ 分子) と概算された。産生粒子中の Gag 蛋白量は細胞内量の約 15-20% と判明した。

(2-2) Gag の 14 アミノ酸残基と HLA class I アリル (13 アリル) との間に統計学的に有意な関連を認めた。Gag 変異 14 箇所のうち既知の CTL エピトープ部位にあるものは 5 つのみで、8 つは欧米人で報告済の HLA 関連変異のリストに認められないものであった。また、13 アリルのうち一つを除いて全てが欧米に比べ本邦で頻度の高いアリルであった。SIV 感染サルの長期解析から、感染初期に選択された gag CTL 逃避変異がより複製能が保たれた逃避変異に置換される現象が観察された。

(2-3) Env など多くの SIV 抗原については、特異的 CTL のレベルと SIV 複製抑制能との相関が認められなかったが、Gag206-216 および Gag241-249 特異的 CTL のレベルは SIV 複製抑制能と相関を示した。さらに Vif 特異的 CTL も SIV 複製抑制能と比較的強い相関を示した。

(3-1) SIV 特異的 HTL (5 マーカーのいずれかの特異的誘導が認められた HTL) の頻度は、3 群とも同程度であった。一方、多機能的な SIV 特異的 HTL (5 マーカーのうち 3 つ以上の特異的誘導が認められた HTL) の頻度は、比較的低い血漿中 SIV 量を呈する傾向にある A 共有群で高レベルであった (A 群 > E 群 > B・J 群)。

(3-2) HIV Env gp120 分子モデルより、CD4 結合前では V1/V2 ループは gp120 コアから最も離れて配置され、V3 が gp120 コアと V1/V2 ループの間に配置されることが予測された。CD4 結合後では、V1/V2 ループは CD4 を支えるような構造を取ることが予測された。

4. 考察

(1) SeV ベクターワクチンの接種経路について、従来通りの経鼻接種だけでなく筋肉内接種も有効であることが確認できた。しかし、ワクチン対象者に抗 SeV 中和抗体陽性者が含まれる可能性を考慮すると、経鼻接種が有利であると考えられた。また、SeV ベクター複数回接種においても経鼻接種が有利である。

(2) Gag 定量結果から、発現 Gag 蛋白のうち HIV 粒子に取り込まれず抗原提示に結びつく分解経路に至る可能性のあるものが約 8 割 (細胞あたり 5×10^7 分子以上) であると考えられた。今後、プロテアソーム阻害剤やリソソーム阻害剤を用い Gag 蛋白の合成・分解 kinetics を検討予定である。HIV 感染者の解析結果からは、本邦の HIV 流行株に対する日本人に特徴的な HLA class I 拘束性 CTL の多くが未同定である可能性が示され、今後これらの CTL エピトープの同定が必要と考えられた。SIV 感染

サルの CTL 逃避変異の解析結果からは、CTL が逃避変異選択の後も間接的にウイルス複製抑制に貢献しうることが示唆された。各種抗原特異的 CTL の解析結果からは、Gag 特異的 CTL に加え Vif 特異的 CTL が高い SIV 複製抑制能を有する可能性が示され、CTL 誘導ワクチン抗原としての Gag および Vif の優位性が示唆された。

(3) SIV 感染サルにおいて、体内ウイルス量と多機能的 HTL レベルとの相関の可能性が示された。今後さらに、HTL 多機能性の解析を進める予定である。一方、HIV Env gp120 分子モデルの解析では、CD4 結合前後で V1/V2 ループの配置が変化すると予測され、CD4 結合前の V1/V2 ループは中和抗体の V3 へのアクセスを制限する可能性が考えられた。

5. 自己評価

1) 達成度について

研究費削減により CTL 反応解析等のためのサル実験の規模を縮小したが、基本的には研究計画に沿って着実な成果を得ている。今年度に得られた Gag 蛋白量、CTL 逃避変異および各種抗原特異的 CTL の有効性に関する知見は、有効な CTL 誘導に結びつくワクチン抗原選択に方向性を与える極めて重要かつ斬新な成果であり、今後の研究進展を加速するものとして評価できる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

抗原特異的 CTL のレベルと HIV/SIV 複製抑制能の相関は初の報告であり、Gag および Vif 特異的 CTL の有効性を示す結果は極めて重要な成果である。さらに Gag 蛋白定量、CTL 逃避変異、HTL 多機能性および Env 構造に関して得られた成果についても学術的・国際的意義は高い。これらは、第 1 世代エイズワクチンの有効性の確立および有効な免疫反応を選択的に誘導する第 2 世代エイズワクチン開発に結びつくものであり、社会的意義も極めて高い。

3) 今後の展望について

これまで得られた結果をもとに、HIV 複製抑制に結びつく感染防御免疫誘導法の確立を目指して、CTL 誘導ワクチンのデリバリーシステム最適化と抗原選択法構築および中和抗体誘導抗原獲得に向けた研究を推進する。

6. 結論

CTL 誘導ワクチンのデリバリーシステム最適化に向けた研究では、SeV ベクターの接種経路として経鼻接種が有利であることが判明した。CTL 誘導抗原選択法の樹立に向けた研究では、Gag 蛋白定量にて発現 Gag 蛋白の約 8 割が HIV 粒子に取り込まれず分解される可能性が示された。また、CTL の選択圧に関する知見の集積に加え、HIV 感染者の解析から邦人特有の CTL 逃避と考えられる変異の同定が進展した。さらに、抗原特異的 CTL のレベルと SIV 複製抑制能の相関を初めて見出し、その結果、Gag 特異的 CTL に加え Vif 特異的 CTL が高い SIV 複製抑制能を有する可能性が示された。一方、サルエイズモデルにて、体内ウイルス量と多機能的 HTL レベルとの相関の可能性が示された。HIV Env 構造計算からは、V1/V2 ループが中和反応に影響する機序が示唆された。これらは、第 1 世代エイズワクチンの有効性確立および有効な免疫反応を選択的に誘導する第 2 世代エイズワクチン開発に結びつく重要な成果である。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

特になし。

研究発表

研究代表者

侯野 哲朗

- 1) Saito, A., Nomaguchi, M., Iijima, S., Kuroishi, A., Yoshida, T., Lee, Y.-J., Hayakawa, T., Kono, K., Nakayama, E.E., Shioda, T., Yasutomi, Y., Adachi, A., Matano, T., and Akari, H. Improved capacity of a monkey-tropic HIV-1 derivative to replicate in cynomolgus monkeys with minimal modifications. *Microbes Infect.*, in press.
- 2) Inagaki, N., Takeuchi, H., Yokoyama, M., Sato, H., Ryo, A., Yamamoto, H., Kawada, M., and Matano, T. A structural constraint for functional interaction between N-terminal and C-terminal domains in simian immunodeficiency virus capsid proteins. *Retrovirology* 7:90, 2010.
- 3) Iwamoto, N., Tsukamoto, T., Kawada, M., Takeda, A., Yamamoto, H., Takeuchi, H., and Matano, T. Broadening of CD8⁺ cell responses in vaccine-based simian immunodeficiency virus controllers. *AIDS* 24:2777-2787, 2010.
- 4) Naruse, T.K., Chen, Z., Yanagida, R., Yamashita, T., Saito, Y., Mori, K., Akari, H., Yasutomi, Y., Miyazawa, M., Matano, T., and Kimura, A. Diversity of MHC class I genes in Burmese-origin rhesus macaques. *Immunogenetics* 62:601-611, 2010.
- 5) Yamamoto, H., and Matano, T. Neutralizing antibodies in SIV control: co-impact with T cells. *Vaccine* 28S:B13-B17, 2010.

研究分担者

保富 康宏

- 1) Xing, L., Wang, J.C., Li, T.-C., Yasutomi, Y., Lara, J., Khurdyakaov, Y., Schofield D., Emerson, S., Purcell, R., Takeda, N., Miyamura, T., and Cheng, R.H. Spatial configuration of hepatitis E virus antigenic domain. *J. Virol.*, in press.
- 2) Saito, A., Nomaguchi, M., Iijima, S., Kuroishi, A., Yoshida, T., Lee, Y.-J., Hayakawa, T., Kono, K., Nakayama, E.E., Shioda, T., Yasutomi, Y., Adachi, A., Matano, T., and Akari, H. Improved capacity of a monkey-tropic HIV-1 derivative to replicate in cynomolgus monkeys with minimal modifications. *Microbes Infect.*, in press.
- 3) 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.*, in press.
- 4) 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.*, in press.
- 5) 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.
- 6) Cueno, M.E., Hibi, Y., Karamatsu, K., Yasutomi, Y., Imai, K., Laurena, A.C., and Okamoto, T. Preferential expression and immunogenicity of HIV-1 Tat fusion protein expressed in tomato plant. *Transgenic Res.* 19:889-895, 2010.
- 7) Naruse, T.K., Chen, Z., Yanagida, R., Yamashita, T., Saito, Y., Mori, K., Akari, H., Yasutomi, Y., Miyazawa, M., Matano, T., and Kimura, A. Diversity of MHC class I genes in Burmese-origin rhesus macaques. *Immunogenetics* 62:601-611, 2010.
- 8) Yasutomi, Y. Establishment of specific pathogen-free macaque colonies in Tsukuba Primate Research Center of Japan for AIDS research. *Vaccine* 28S:B75-B77, 2010.
- 9) Fujimoto, K., Takano, J., Narita, T., Hanari, K., Shimozawa, N., Sankai, T., Yoshida, T., Terao, K., Kurata, T., and Yasutomi, Y. Simian betaretrovirus infection in a colony of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Comp. Med.* 60:51-53, 2010.

三浦 聡之

- 1) Brumme, Z.L., Li, C., Miura, T., Sela, J., Rosato, P.C., Brumme, C.J., Markle, T., Martin, E., Block, B.L., Trocha, T., Kadie, C.M., Allen, T.M., Pereyra, F., Heckerman, D., Walker, B.D., and Brockman, M.A. Reduced replication capacity of NL4-3 recombinant viruses encoding RT-Integrase sequences from HIV-1 elite controllers. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, in press.
- 2) Nakamura, H., Miyazaki, N., Hosoya, N., Koga, M., Odawara, T., Kikuchi, T., Koibuchi, T., Kawana-Tachikawa, A., Fujii, T., Miura, T., and Iwamoto, A. Long-term successful control of super-multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 infection by a novel combination therapy of raltegravir, etravirine, and boosted-darunavir. *J. Infect. Chemother.*, in press.
- 3) Gesprasert, G., Wichukchinda, N., Mori, M., Shiino, T., Auwanit, W., Sriwanthana, B., Pathipvanich, P., Sawanpanyalert, P., Miura, T., Auwarakul, P., Thitithanyanont, A., and Ariyoshi, K. HLA-associated immune pressure on Gag protein in CRF01_AE-infected individuals and its association with plasma viral load. *PLoS One* 5:e111179, 2010.
- 4) Miura, T., Brumme, Z.L., Brockman, M.A., Rosato, P., Sela, J., Brumme, C.J., Pereyra, F., Kaufmann, D.E., Trocha, A., Block, B.L., Daar, E.S., Connick, E., Jessen, H., Kelleher, A.D., Rosenberg, E., Markowitz, M., Schafer, K., Vaida, F., Iwamoto, A., Little, S., and Walker, B.D. Impaired replication capacity of acute/early viruses in persons who become HIV controllers. *J. Virol.* 84:7581-7591, 2010.
- 5) Wright, J.K., Brumme, Z.L., Carlson, J.M., Heckerman, D., Kadie, C.M., Brumme, C.J., Wang, B., Losina, E.,

Miura, T., Chonco, F., van der Stok, M., Mncube, Z., Bishop, K., Goulder, P.J., Walker, B.D., Brockman, M.A., and Ndung'u, T. Gag-protease-mediated replication capacity in HIV-1 subtype C chronic infection: associations with HLA type and clinical parameters. *J. Virol.* 84:10820-10831, 2010.

- 6) Julg, B., Pereyra, F., Buzon, M.J., Piechocka-Trocha, A., Clark, M.J., Baker, B.M., Lian, J., Miura, T., Martinez-Picado, J., Addo, M.M., and Walker, B.D. Infrequent recovery of HIV from but robust exogenous infection of activated CD4(+) T cells in HIV elite controllers. *Clin. Infect. Dis.* 51:233-238, 2010.
- 7) Brockman, M.A., Brumme, Z.L., Brumme, C.J., Miura, T., Sela, J., Rosato, P.C., Kadie, C.M., Carlson, J.M., Markle, T.J., Streeck, H., Kelleher, A.D., Markowitz, M., Jessen, H., Rosenberg, E., Altfeld, M., Harrigan, P.R., Heckerman, D., Walker, B.D., and Allen, T.M. Early selection in Gag by protective HLA alleles contributes to reduced HIV-1 replication capacity that may be largely compensated in chronic infection. *J. Virol.* 84:11937-11949, 2010.

森川 裕子

- 1) Fukuma, A., Kurosaki, Y., Morikawa, Y., Grolla, A., Feldmann, H., and Yasuda, J. Rapid detection of Lassa virus by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *Microbiol. Immunol.*, in press.
- 2) Yamamoto, S.P., Okawa, K., Nakano, T., Sano, K., Ogawa, K., Masuda, T., Morikawa, Y., Koyanagi, Y., and Suzuki, Y. Huwe1, a novel cellular interactor of Gag-Pol through integrase binding, negatively influences HIV-1 infectivity. *Microbes Infect.*, in press.
- 3) Haraguchi, H., Sudo, S., Noda, T., Momose, F., Kawaoka, Y., and Morikawa, Y. Intracellular localization of human immunodeficiency virus type 1 Gag and GagPol products and virus particle release: relationship with the Gag-to-GagPol ratio. *Microbiol. Immunol.* 54: 734-746, 2010.

横山 勝

- 1) Inagaki, N., Takeuchi, H., Yokoyama, M., Sato, H., Ryo, A., Yamamoto, H., Kawada, M., and Matano, T. A structural constraint for functional interaction between N-terminal and C-terminal domains in simian immunodeficiency virus capsid proteins. *Retrovirology* 7:90, 2010.
- 2) Kono, K., Song, H., Yokoyama, M., Sato, H., Shioda, T., and Nakayama, E.E. Multiple sites in the N-terminal half of simian immunodeficiency virus capsid protein contribute to evasion from rhesus monkey TRIM5 α -mediated restriction. *Retrovirology* 7:72, 2010.
- 3) Onyango, C.O., Leligdowicz, A., Yokoyama, M., Sato, H., Song, H., Nakayama, E.E., Shioda, T., de Silva, T., Townend, J., Jaye, A., Whittle, H., Rowland-Jones, S., and Cotton, M. HIV-2 capsids distinguish high and low virus load patients in a West African community cohort. *Vaccine* 28S:B60-B67, 2010.

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

課題番号：H20-エイズ-若手014

研究代表者：佐藤 義則（熊本大学 エイズ学研究センター 滝口プロジェクト研究室 COEリサーチ・アソシエイト）

研究分担者：なし

1. 研究目的

HIV 感染に対する免疫応答および病態の解析が困難である理由の1つとして、小動物を用いた HIV 感染実験系が確立されていない点が挙げられる。これまでヒト化マウスを用いた HIV 感染実験系の構築が試みられているが、HIV 感染細胞の排除に重要な役割を持つヒト T 細胞の免疫応答の誘導がヒト化マウス内で起きるかどうかは不明のままであった。そこで我々は、新たに作製した高度免疫不全マウス (NOD/SCID/Jak3 ノックアウトマウス (以下 NOK マウス)) にヒト臍帯血由来幹細胞 (CD34⁺細胞) を移植しヒト免疫系を構築した NOK マウス (ヒト化 NOK マウス) を用いて、1. HIV 感染細胞の排除に重要な役割を持つヒト CD8⁺T 細胞の分化と抗原に対する免疫応答について解析した、2. HLA を発現したヒト化 NOK マウスを樹立し、ヒト化 NOK マウスより成熟したヒト T 細胞を誘導できるヒト化マウスモデルを樹立した、3. HIV 感染における免疫応答の機序、HIV 特異的 CTL の動態やウイルス動態を長期間にわたって解析することが可能な HIV 感染マウスモデルを構築した。本研究で樹立した HLA 発現ヒト化 NOK マウスでは、ヒトの造血・免疫系をマウス内で確立した際に問題となる胸腺での発生・分化障害を解決でき、これまで報告されているモデルマウスより成熟したヒト T 細胞免疫系の構築が可能であると考えている。そのため、HIV 感染に対するヒト T 細胞免疫応答の解析と HIV のウイルス動態について小動物を用いた検討が可能となることが期待でき、新規エイズ治療法の開発に大きく貢献することができると考えている。

2. 研究方法

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

した。また、NOK マウスに HLA-B5101 遺伝子を組み込んだ NOK/B51Tg マウスを作製した。そのマウスに HIV-1 実験株である NL432 株を腹腔内投与で感染させ、系時的にヒト T 細胞の割合と血漿中の HIV 量および HIV-RNA の塩基配列を解析した。

(倫理面への配慮)

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

3. 研究結果

ヒト CD34⁺細胞を移植した NOK マウスで発生したヒト CD8⁺T 細胞の表現形解析を行った結果、CD27^{high}CD28⁺CD45RA⁺CCR7⁺ (Naive 表現型)、CD27⁺CD28⁺CD45RA⁺CCR7⁺ (Memory 表現型)、CD27⁺CD28⁺CD45RA⁺CCR7⁻ (Early Effector Memory 表現型) の T 細胞サブセットが認められ、CD27^{low}CD28⁻CD45RA⁺CCR7⁻ (Late Effector Memory 表現型) および CD27⁻CD28⁻CD45RA⁺CCR7⁻ (Effector 表現型) の T 細胞サブセットは認められなかった。PMA/Ionomycin で刺激したヒト CD8⁺T 細胞では、各種サイトカイン (TNF- α , IFN- γ , IL-2) の産生を確認できた。またウイルス感染細胞の破壊因子となるパーフォリンとグランザイム A/B の各酵素郡を解析した結果、ヒト CD8⁺T 細胞はグランザイム A/B の発現が高く認められたが、パーフォリンの発現は低いことが明らかとなった。アロ抗原で免疫したヒト化 NOK マウスでは、ヒト CD8⁺T 細胞のエフェクター細胞への分化を誘導できず、アロ抗原の再刺激に対してもヒト CD8⁺T 細胞の IFN- γ 産生および細胞増殖を誘導することができなかった。ヒト化 NOK マウスに HIV-1 実験株である JR-FL 株および NL432 株を腹腔内投与で感染させ血中の HIV-RNA 量を系時的に調べた結果、感染 14 日目には JR-FL 株および NL432 株の HIV-RNA が検出でき、その検出ピークは 21 日目と 49 日

目で見られた。今年度は NOK マウスに HLA-B5101 遺伝子を組み込んだ NOK/B51Tg マウスの樹立に成功し、このマウスに NL432 株を腹腔内投与により感染させ、系時的にヒト T 細胞の割合とウイルス動態を解析した。その結果、感染 2 週目以降からヒト CD4⁺T 細胞の減少が見られ、感染 6 週目の各ヒト化 NOK/B51Tg マウスから採取した HIV の塩基配列には数箇所の遺伝子変異が認められた。

4. 考察

ヒト化マウスを用いた HIV 感染モデルは過去に数例あるものの、HIV 感染マウスにおける HIV 特異的ヒト CD8⁺T 細胞の免疫応答の解析やウイルス動態についての報告は未だされていない。我々が今回作製したヒト化 NOK マウスにおいて、ヒト CD8⁺T 細胞のパーフォリン発現が低いことや外来抗原刺激に対して免疫応答が誘導されないことは、ヒト CD8⁺T 細胞の未分化が HIV 感染モデルマウス構築の障害になっていることを示唆するものである。これはヒト T 細胞が分化する際に必要な胸腺における教育が不十分であること(マウス MHC とヒト TCR の親和性不一致によるもの)に起因すると考えられる。また JR-FL 株および NL432 株を感染させたヒト化 NOK マウスでは長期間に渡り HIV-RNA を検出できたものの、ヒトエフェクター CD8⁺T 細胞が誘導されなかった。すなわちヒト CD8⁺T 細胞の機能が欠如していることが裏付けられた。そこでヒト T 細胞の適切な教育が可能となる HLA-B51 発現 NOK マウス (NOK/B51Tg マウス) を樹立し、さらにヒト化 NOK/B51Tg マウスの作製を行った。このヒト化マウスに HIV-1(NL432) を感染させ 6 週目の各ヒト化 NOK/B51Tg マウスから採取した HIV の塩基配列には、数箇所の遺伝子変異が確認できた。現在、HIV の遺伝子変異が細胞傷害性 T 細胞からの免疫圧によるものか解析中である。

5. 自己評価

1) 達成度について

ヒト化 NOK マウスでは、ヒト CD4⁺T 細胞や細胞傷害を担うヒト CD8⁺T 細胞の発生を確認できた。さらに HIV を長期的に感染させることができたものの、ヒト CD8⁺T 細胞の分化・成熟および機能は未分化であった。このヒト CD8⁺T 細胞未分化という問題点を解決するため、HLA 発現 NOK マウス (NOK/B51Tg マウス) を樹立した。さらに、NOK/B51Tg マウスを用いたヒト化 NOK/B51Tg マ

ウスの作製と HIV-1 の長期感染に成功した。さらに現在、NOK/B51Tg マウスのヒト CD8⁺T 細胞の機能解析と HIV 感染モデルマウスにおける HIV 特異的 CTL の解析を行っている。実験はほぼ計画通りの達成度であるといえる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

我々が作製したヒト化 NOK/B51Tg マウスは、HIV 感染におけるヒト T 細胞の免疫応答と HIV のウイルス動態の研究に非常に有用なモデルマウスになると考えている。また本モデルマウスは長期的な免疫応答の解析が可能であり、エイズワクチン開発や新規エイズ治療法のための実験動物としても非常に有用で、今後のエイズ治療研究に大きく貢献することが期待できる。さらにヒト化マウスを用いた HIV 感染実験系の確立によって、現在 HIV 研究に用いられているサルやチンパンジーの飼育に要する大掛かりな施設、特殊な設備、高額な飼育費の削減や *in vivo* におけるエイズ研究がより容易なものとなり、本研究分野の活性化に寄与すると考える。

3) 今後の展望について

新たに構築したヒト化 NOK/B51Tg マウスを用いて、ヒト CD8⁺T 細胞の分化・機能解析および HIV に対する免疫応答の解析を行っていく。さらに HIV 特異的 CTL の移植やエイズワクチン接種による HIV 特異的免疫反応の誘導を解析し、新規エイズ治療法やエイズワクチン開発のために必要な基礎的知見を得ることを目指していく。

6. 結論

本研究では、長期 HIV 感染における免疫応答とウイルス動態の機序を明らかにするため、ヒト化マウスを用いた HIV 感染モデルを確立し、*in vivo* での HIV 特異的 CTL の解析やエイズワクチンの開発、さらに HIV 特異的 CTL クローンの移入による免疫細胞治療法の効果についての検討を目指す。ヒト化マウスをもちいた研究は既に国内外で始まっているが、本研究で樹立した HLA 発現ヒト化マウス(NOK/B51Tg)では、現在までに明らかとなっているマウスでのヒトエフェクター CD8⁺T 細胞の誘導の問題点も解決でき、今日までのヒト化マウスモデルより成熟したヒト免疫系の構築が可能と考えている。また、今後のエイズ治療研究に大きく貢献することが期待できる。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

なし。

研究発表

研究代表者

佐藤義則

原著論文

- 1) **Sato Y**, Takata H, Kobayashi N, Nagata S, Nakagata N, Ueno T, Takiguchi M. Failure of effector function of human CD8⁺ T cells in NOD/SCID/JAK3^{-/-} immunodeficient mice transplanted with human CD34⁺ hematopoietic stem cells. *PLoS ONE*. 5; e13109, 2010.
- 2) **Sato Y**, Suzuki H, Sato T, Suda T, Yoda T, Iwakura Y, Chida D. The role of endogenous glucocorticoids in lymphocyte development in melanocortin receptor 2-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 403; 253-7 2010.
- 3) **Sato Y**, Oda H, Patrick MS, Baba Y, Rus'd AA, Azuma Y, Abe T, Shirai M, Suzuki H. Rac GTPases are involved in development, survival and homeostasis of T cells. *Immunol. Lett.* 124; 27-34, 2009.
- 4) Patrick MS, Oda H, Hayakawa K, **Sato Y**, Eshima K, Kirikae T, Iemura S, Shirai M, Abe T, Natsume T, Sasazuki T, Suzuki H. Gasp, a Grb2 associating protein, is critical for positive selection of thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 106; 16345-50, 2009.
- 5) Oda H, Fujimoto M, Patrick MS, Chida D, **Sato Y**, Azuma Y, Aoki H, Abe T, Suzuki H, Shirai M. RhoH plays critical roles in FceRI-dependent signal transduction in mast cells. *J. Immunol.* 182; 957-62, 2009.
- 6) Chida D, Sato T, **Sato Y**, Kubo M, Yoda T, Suzuki H, Iwakura Y. Characterization of mice deficient in Melanocortin 2 receptor on a B6/Balbc mix background. *Mol. Cell. Endocrinol.* 300; 32-6, 2009.
- 7) **Sato Y**, Kaneko K, Inoue M. Macrolide antibiotics promote the LPS-induced upregulation of prostaglandin E receptor EP2 and thus attenuate macrolide suppression of IL-6 production. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 76; 181-8, 2007.
- 8) Kaneko K, **Sato Y**, Ishihara K, Inoue M. Chromosomal AmpC β -lactamase-mediated β -lactam resistance of gram-negative bacteria enhances host inflammatory mediator production via nucleotide-binding oligomerization domain 1. *Kitasato Med. J.* 37; 28-36, 2007.
- 9) Hashimoto A, Hayashi I, Murakami Y, **Sato Y**, Kitasato H, Matsushita R, Iizuka N, Urabe K, Itoman M, Hirohata S, Endo H. Antiinflammatory Mediator Lipoxin A4 and Its Receptor in Synovitis of Patients with Rheumatoid Arthritis. *J. Rheumatol.* 34; 2144-53, 2007.

学会発表

- 1) **Sato Y**, Takata H, Nagata S, Takiguchi M. Failure of effector function of human CD8⁺ T cells in NOD/SCID/JAK3^{-/-} immunodeficient mice transplanted with human CD34⁺ hematopoietic stem cells. 11th Kumamoto AIDS Seminar -GCOE Joint International Symposium, 2010, Kumamoto. (ポスター発表)
- 2) **Sato Y**, Takata H, Takiguchi M. Detailed analysis of reconstituted human CD8⁺ T cells in humanized mice: their functions and differentiation. 第39回日本免疫学会総会・学術集会、2009年、大阪。(口頭発表)
- 3) **Sato Y**, Takata H, Tamaki S, Takiguchi M. Impaired differentiation and function of human CD8⁺ T cells in humanized mice. 10th Kumamoto AIDS Seminar -GCOE Joint International Symposium, 2009, Kumamoto.(ポスター発表)
- 4) **Sato Y**, Oda H, Patrick MS, Shirai M, Suzuki H. Function of Rac1 in survival and homeostasis of mature T cells. 第38回日本免疫学会総会・学術集会、2008年、京都。(口頭発表)

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

課題番号：H20-エイズ-若手-016

研究代表者：野村 渉（東京医科歯科大学生体材料工学研究所 助教）

1. 研究目的

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

2. 研究方法

1) 標的配列の選択と組み換え酵素の構築

保存度の高い *gag-pol* 遺伝子配列から 4 対の候補配列を選定し、その配列に特異的に結合する ZFP 遺伝子を構築した。DNA 結合活性が確認された ZFP に組換え酵素 Tn3 または Gin の酵素ドメインを融合させ、大腸菌内で発現、酵素活性の確認を行った。

2) 組み換え酵素の反応効率に関する評価法の構築

これまでの遺伝子組み換え効率の評価は酵素遺伝子の導入後、薬剤選択などを経て 2 週間以上必要とする方法のみであった。本研究では酵素の導入効率をパラメーターとして加える新規測定方法を開発することにした。融合酵素遺伝子の下流に IRES 配列および赤色蛍光タンパク質 (DsRed) 遺伝子を有するプラスミドを構築した。遺伝子導入後 48 時間で酵素遺伝子導入効率 (DsRed) と組み換え反応効率 (EGFP) を組み合わせた定量を行った。

3) *gag* モデル遺伝子をもつ哺乳類細胞内での反応評価

KS3+4 および KS5+6 の ZFP の組み合わせを用いた系を構築するため、各亜鉛フィンガー融合酵素遺伝子を哺乳類細胞内発現ベクターに導入した。哺乳類細胞ゲノム上に標的配列を導入した安定発現株を構築した。細胞株として CHO-K1 および HEK293 を用いた。組み換え反応では亜鉛フィンガードメインの働きによって各標的配列で二量体形成が起こり、それらが更に四量体を形成して組み換え反応が起こる。安定発現株では標的配列間に CMV プロモ

ーター下流にコードされた EGFP 遺伝子があるため、組み換え反応の進行を EGFP 発現量で評価した。この評価系では 1 細胞中に標的遺伝子配列が 1 箇所のみ存在するため正確な定量を行えるモデルである。EGFP 発現量の定量はフローサイトメトリー、ゲノム PCR、および RT-PCR によって測定を行った。

4) *in vitro* 翻訳系を用いた遺伝子組み換え反応評価方法の開発

4 種類の亜鉛フィンガー融合酵素を利用する遺伝子組み換え反応は大腸菌内における評価が困難である。また、遺伝子デリバリー方法に関して克服する課題も多いため、タンパク質の直接デリバリー方法も検討する必要性から *in vitro* でのタンパク質翻訳系を利用した。翻訳反応をウェスタンブロットティングで確認を行い、プラスミド遺伝子に対する反応効率を検討した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え実験に関しては研究計画の承認を東京医科歯科大学遺伝子組み換え委員会から得たうえで適切な実験施設によって実施した。

3. 研究結果

1) *gag-pol* 遺伝子配列に結合する ZFP は遺伝子を構築後に発現・精製を行い、ELISA 法によって 10~400 nM という強い DNA 結合活性を有することが明らかになった。KS6 を標的とする ZFP と変異を導入して活性を向上させた Tn3 酵素ドメインとの融合体を作成して大腸菌内で発現させたところ、50%以上の酵素活性が確認できた。また、Gin 酵素ドメイン融合体ではさらに高い活性を示すことが明らかになった。

2) EGFP をレポーターとする KS6 サイトのみから構成される標的配列遺伝子を有する安定発現株 (CHO-K1) を樹立した。亜鉛フィンガー融合酵素の発現ベクターは下流に IRES-DsRed 配列を有するため、遺伝子導入効率を定量可能であることをフローサイトメーターで確認した。組み換え酵素の活性に影響を与えられとされる (1) DNA 結合活性および (2) 亜鉛フィンガードメインと組み換え酵素ドメインをつなぐリンカー配列に関して検討を行った。DNA 結合活性に関しては亜鉛フィンガーモジュールの数を変えたドメインを 5 種類作成した。リンカー配列に関しては異なる変異体を 21 種類作成した。つまり 100 条

件以上の反応効率を検討したことに等しい。それぞれの変異体について大腸菌内および哺乳類細胞内での反応効率について定量を行った。大腸菌内では DNA 結合ドメインについては 5 フィンガードメインが最も効率よい組み換え反応を示し、リンカー配列に関しては 12 アミノ酸のリンカー配列が最適であることが示された。哺乳類細胞内では 5 フィンガードメインが最適であることは一致していたが、リンカーは 6 アミノ酸が最適であった。

3) gag 標的配列のモデル配列を有する安定発現株 (CHO-K1) を利用して遺伝子デリバリー方法にアデノウイルスベクターを利用する方法を用いた。KS34 と KS56 のサイトを標的とした組み換え反応効率は約 25% と前年度と比較して 2.5 倍の活性上昇が認められた。HEK293 を用いた安定発現株は樹立が終了し、現在組み換え反応効率の解析を行っている。

4) *in vitro* 翻訳に用いるプラスミド遺伝子を構築し、翻訳反応後にウェスタンブロットングによって翻訳反応を確認した。標的として gag 標的モデル配列を有するプラスミドベクターを用いて KS3-6 サイトを標的とする 4 種類の亜鉛フィンガー融合組み換え酵素を加え、組み換え反応が認められた。現在、定量的な解析を進めている。

4. 考察

亜鉛フィンガー融合組み換え酵素の反応効率に関する解析においては、大腸菌内と哺乳類細胞内において最適なリンカーの長さが異なった。これは標的とする DNA が大腸菌内では環状プラスミドであるのに対して哺乳類細胞内ではゲノム遺伝子であることに起因すると考えられる。

gag モデル遺伝子に対する反応効率に関しては前年度と比較して 2.5 倍の活性の上昇が得られた。これは特に遺伝子デリバリー方法としてアデノウイルスベクターを用いたことで遺伝子導入効率および組み換え酵素の発現量が改善されたことによると考えられる。この方法を感染細胞に適用することによってプロウイルス遺伝子の組み換え反応による除去がみられると期待できる。感染細胞を用いた解析は現在進行中である。

5. 自己評価

1) 達成度について

本研究では HIV-1 プロウイルス遺伝子を標的とする遺伝子組み換え法という新規な概念を利用した研究を 3 年間行ってきた。モデル遺伝子を有する細胞株を利用して定量的な解析方法を新規に開発して本研究に適用することで組み換え反応に関する詳細な解析を行うことが可能になった点は意義深い。また、本年度においては組み換え反

応効率の上昇も達成できた。感染細胞を利用した解析に関しては現在進行中であるが年度終了時点までに結果を得る予定である。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究では亜鉛フィンガー融合酵素を用いた HIV-1 治療法の開発という次世代につながる革新的なウイルス研究を行うことができた。亜鉛フィンガータンパク質は遺伝子配列に対する高い特異性を利用して、標的遺伝子の切断による変異導入を用いた遺伝子ノックダウン方法を基礎研究および様々な疾病治療に利用する試みが世界で展開されており、報告例が増えている。組み換え酵素を利用する方法は遺伝子配列の正確な制御が可能である利点があり、本研究で行った 4 種類の標的配列を組み合わせた組み換え反応は世界初の報告例である。この研究成果については現在論文投稿準備中であり、報告は大きなインパクトを与えると考えられる。

3) 今後の展望について

機能性タンパク質もしくは核酸を利用したバイオ医薬品は抗体や RNA 干渉法などを初めとして、次世代の医薬品の主流として注目されている。タンパク質の利用に関して遺伝子もしくはタンパク質のデリバリー方法などの技術は発展が目覚ましい。そのような流れのなかでタンパク質を利用した HIV-1 治療法に関する研究を推進することは将来的に革新的な治療法の開発につながる基礎研究であると考えられる。今後は感染細胞における組み換え反応を発展させる形で研究を継続すると同時に亜鉛フィンガータンパク質を利用した新規な HIV-1 感染症治療法の開発にも取り組む。

6. 結論

本研究では感染細胞内に存在するプロウイルス遺伝子に着目し、亜鉛フィンガータンパク質の配列に対する高い特異性をもった DNA 結合を利用した DNA 組み換え反応によるプロウイルス遺伝子の除去という革新的な手法の開発に取り組んだ。モデル遺伝子に対する反応においては本手法の有効性を示すことができた。感染細胞においても同様の結果が得られると期待できるが、感染細胞におけるプロウイルス遺伝子の存在状態や臨床応用において重要になる遺伝子デリバリー方法に関する知見を今後得ていく必要があると考えられる。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

本研究の成果に関して特許取得予定である。

研究発表

研究代表者

野村 渉

1. 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.*, 130:15899-15901, 2010
2. 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 (Pept. Sci.)*, 94:843-852, 2010
3. 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.*, 53:5356-5360, 2010
4. 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
5. 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
6. 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.*, 21:709-714, 2010
7. Yamada Y, Ochiai C, Yoshimura K, Tanaka T, Ohashi N, Narumi T, Nomura W, Harada S, Matsushita S, Tamamura T*, CD4 Mimics Targeting the Mechanism of HIV. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20:354-358, 2010
8. Ohashi N, Nomura W*, Narumi T, Lewin NE, Itotani K, Blumberg PM, Tamamura H*, Fluorescent-responsive Synthetic C1b Domains of Protein Kinase Cdelta as Reporters of Specific High Affinity Ligand Binding. *Bioconjugate Chem.*, in press
9. Nomura W, Narumi T, Serizawa Y, Ohashi N, Lewin NE, Blumberg PM, Furuta T, Tamamura H*, Synthetic caged DAG-lactones for photochemically-controlled activation of protein kinase C. *ChemBioChem*, in press
10. Tsutsumi H, Abe S, Mino T, Nomura W, Tamamura H*, Intense Blue Fluorescence in a Leucine Zipper Assembly. *ChemBioChem*, in press
11. 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*, in press

研究課題：Vif/APOBEC3Gの相互作用を標的とした新規抗 HIV-1 薬の開発

課題番号：H20-エイズ一般-004

主任研究者：高折 晃史（京都大学医学研究科 教授）

分担研究者：錦織 桃子（京都大学医学研究科 助教）、梁 明秀（横浜市立大学医学部 教授）、木曾 良明（京都薬科大学薬学部 教授）、小林 正行（京都大学医学研究科 助教）

1. 研究目的

HIV-1 感染は、HAART の出現によりウイルス複製をある程度制御可能になったとはいえ、一方でその長期服用による副作用、また薬剤耐性の出現が大きな問題となっており、これらの克服に向け、新規作用機序の抗 HIV-1 薬の早期開発が待たれている。HIV-1 Vif は、ウイルス複製および AIDS 発症に必須の蛋白であるが、その機能の本態は、本来 HIV-1 の標的細胞が有する抗 HIV-1 宿主因子 APOBEC3G を中和することであることが近年明らかにされた。Vif がウイルス複製にとって必須の蛋白であること、および Vif/APOBEC3G の相互作用の分子機構が詳細に明らかにされたことにより、これらの分子およびその相互作用は、新規の抗 HIV-1 薬の絶好の標的と考えられる。そこで、本研究では、Vif/APOBEC3G 両分子およびその相互作用を標的とした新規抗 HIV-1 の開発を目指した研究を行った。

2. 研究方法

①Vif による APOBEC3G のユビキチン依存性分解を阻害する化合物に関しては平成 21 年度までに 17280 化合物から 1 次スクリーニング、2 次スクリーニングを完了し、24 の候補化合物を同定したが、本年度は

①-1) ウイルス感染実験により *in vitro* における抗 HIV-1 活性の確認

①-2) 候補化合物の作用機序の同定

①-3) リード化合物の選択とその機能解析を目的として研究を行った。

また、②分担研究者の梁による無細胞合成系を用いた新たなアッセイ系については、平成 21 年度までに約 1 万のライブラリーの 1 次スクリーニングを完了し 253 個の候補化合物を同定したが、本年度は

②-1) ウェスタンブロット法を用いた 2 次スクリーニング

②-2) 候補化合物の作用機序の同定

を目的とした研究を行った。

（倫理面への配慮）

特に存在しない。

3. 研究結果

Vif による APOBEC3G のユビキチン依存性分解を阻害する化合物に関して得られた研究結果として、

- 1) ウイルス感染実験では 2 つの候補化合物が抗 HIV-1 活性を示した
- 2) 上記 2 つの候補化合物の抗 HIV-1 活性は Vif 依存性であった
- 3) 上記 2 つの候補化合物は Vif による APOBEC3G のユビキチン化を阻害しなかった
- 4) 上記 2 つの候補化合物はプロテオソームを阻害しなかった
- 5) 分担研究者の木曾により 9 つの類似化合物が抽出された
- 6) 9 つの類似化合物のうち 2 つが APOBEC3G の Vif による分解を阻害した
- 7) そのうちの 1 つがウイルス感染実験により抗 HIV-1 活性を示した

などの成果が得られた。

また、無細胞合成系を用いた新たなアッセイ系に関して得られた研究結果として、

- 8) 3 つの候補化合物が Vif による APOBEC3G の分解を阻害した
 - 9) それらの化合物は Vif による APOBEC3G のユビキチン化も阻害した
 - 10) それらの化合物は APOBEC3G の複合体形成を促進することによりユビキチン化を阻害することが示唆された
- などの成果が得られた。

4. 考察

Vif による APOBEC3G のユビキチン依存性分解を阻害する化合物に関しては、細胞内過剰発現によるスクリーニングを行った結果、培養細胞による感染実験でも効果が確認された化合物が同定されており、今後の細胞毒性試験でよい結果が得られれば新規の治療薬として期待できる段階である一方、その作用機序に関しては現段階では不明な点が多い。一方、無細胞合成系を用いたスクリーニングで得られた化合物は APOBEC3G と Vif の結合を阻害すること、APOBEC3G のユビキチン化を阻害することなどの機

序が明らかになっているけれども、細胞内感染実験での効果に関しては現在のところ不明である。これらの候補化合物の実用化にはさらに研究を進めていくことが必要である。

5. 自己評価

1) 達成度について

前述のごとく、2つのことなる実験系を用いて一次スクリーニングを完了し、それぞれから複数の有望な候補化合物が同定されている点は非常に評価できると考えている。また、それぞれの候補化合物に関して、2次スクリーニングを含めた基礎的な検討も進展しており、研究はほぼ予定通りの成果を達成していると考えている。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究で行われた細胞内過剰発現を用いた APOBEC3G の分解を阻害する化合物のスクリーニングはすでに報告があり、国際的には必ずしも学術的な新規性や意義は非常に高いというわけではないが、得られた化合物は現在のところ他に報告がなく、学術的、国際的にも新規性があり、その点には意義がある。無細胞合成系を用いた

APOBEC3G/Vif の相互作用を阻害する化合物のスクリーニングは現在のところ他に報告がなく、学術的、国際的に大いに意義がある。これらの化合物は現時点では実用化されてはいないため、社会的な意義は必ずしも大きくないが、近い将来の社会的意義につながる成果であると考えている。

3) 今後の展望について

これまでに同定された候補化合物に関しては細胞毒性試験を早急を実施し、よい結果が得られれば動物実験の段階へと進みたい。また、これまでに得られたスクリーニング系、確認実験系などを利用して、さらに大きな化合物ライブラリーから新規薬剤候補の同定も引き続き施行していきたい。

6. 結論

Vi/APOBEC3G の相互作用を標的とした新規抗 HIV-1 薬の開発に関する研究が順調に進んだ。

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

特に存在しない。

研究発表

研究代表者

高折晃史

- 1) Izumi T, Io K, Matsui M, Shirakawa K, Shinohara M, Nagai Y, Kawahara M, Kobayashi M, Kondoh H, Misawa N, Koyanagi Y, Uchiyama T, and Takaori-Kondo A*: HIV-1 Vif interacts with TP53 to induce G2 cell cycle arrest and positively regulate viral replication. *Proc Natl Acad Sci USA* (2010)107(48):20798-803.
- 2) Hirai M, Kadowaki N, Kitawaki T, Fujita H, Takaori-Kondo A, Fukui R, Miyake K, Maeda T, Kamihira S, Miyachi Y, Uchiyama T: A proteasome inhibitor bortezomib suppresses immunostimulatory activity of human plasmacytoid dendritic cells by targeting intracellular trafficking of nucleic acid-sensing Toll-like receptors and endoplasmic reticulum homeostasis. *Blood* in press.
- 3) Sato K, Izumi T, Misawa N, Kobayashi T, Yamashita Y, Ohmichi M, Ito M, Takaori-Kondo A, and Koyanagi Y: Remarkable Lethal G-to-A Mutations in *vif*-Proficient HIV-1 Provirus by Individual APOBEC3 Proteins in Humanized Mice. *J Virol* (2010) 84(18):9546-56.

分担研究者

錦織桃子

特になし

梁 明秀

- 1) Kojima Y, and Ryo A: Pinning down viral proteins: A new prototype for virus-host cell interaction. *Frontiers in MICROBIOLOGY* in press.
- 2) Inagaki N, Takeuchi H, Yokoyama M, Sato H, Ryo A, Yamamoto H, Kawada M, and Matano T: A structural constraint for functional interaction between N-terminal and C-terminal domains in simian immunodeficiency virus capsid proteins. *Retrovirology* (2010) 7:90
- 3) Tsukagoshi H, Masuda Y, Mizutani T, Mizuta K, Saitoh M, Morita Y, Nishina A, Kozawa K, Noda M, Ryo A, and Kimura H: Sequencing and phylogenetic analyses of Saffold cardiovirus (SAFV) genotype 3 isolates from children with upper respiratory infection in Gunma, Japan. *Jpn J Infect Dis* (2010) 63(5):378-80.
- 4) Kanzaki S, Yamaguchi A, Yamaguchi K, Kojima Y, Suzuki K, Koumitsu N, Nagashima Y, Nagahama K, Ehara M, Hirayasu Y, Ryo A, Aoki I, and Yamanaka S: Thymic Alterations in GM2 Gangliosidosis Model Mice. *PLoS ONE* (2010) 5(8) pii: e12105.
- 5) Shimada M, Yoshizaki S, Jounai N, Kondo A, Ichino M, Ryo A, and Okuda K: DNA vaccine expressing HIV-1 gp120/immunoglobulin fusion protein enhances cellular immunity. *Vaccine* (2010) 28(31):4920-7.
- 6) Akiyama T, Abe Y, Iida H, Endo H, Hosono K, Yoneda K, Takahashi H, Inamori M, Ryo A, Yamanaka S, Inayama Y, and Nakajima A: Endoscopic therapy using an endoscopic variceal ligation for minute cancer of the esophagogastric junction complicated with esophageal varices: a case report. *J Med Case Reports* (2010) 4:149.
- 7) Pulikkan JA, Dengler V, Peer Zada AA, Kawasaki A, Geletu M, Pasalic Z, Bohlander SK, Ryo A, Tenen DG, and Behre G: Elevated PIN1 expression by C/EBPalpha-p30 blocks C/EBPalpha-induced granulocytic differentiation through c-Jun in AML. *Leukemia* (2010) 24(5):914-23.
- 8) Yashima S, Yoshizaki S, Shinoda K, Yoshida A, Kondo A, Mizuguchi H, Ryo A, Okuda K, and Shimada M: Co-administration of viral vector-based vaccines suppresses antigen-specific effector CD8 T cells. *Vaccine*. (2010) 28(18):3257-64.
- 9) Matsuura I, Chiang KN, Lai CY, He D, Wang G, Ramkumar R, Uchida T, Ryo A, Lu K, and Liu F: Pin1 promotes transforming growth factor-beta-induced migration and invasion. *J Biol Chem* (2010) 285(3):1754-64.

木曾 良明

- 1) Tadashi Satoh, Mi Li, Jeffrey-Tri Nguyen, Yoshiaki Kiso, Alla Gustchina, Alexander Wlodawer: Crystal structures of inhibitor complexes of human T-cell leukemia virus (HTLV-1) protease. *J Mol Biol* 401 (4), 626-641 (2010).
- 2) Takuya Miura, Koushi Hidaka, Tsuyoshi Uemura, Keisuke Kashimoto, Yuto Hori, Yuko Kawasaki, Adam J. Ruben, Ernesto Freire, Tooru Kimura, Yoshiaki Kiso: Improvement of both plasmepsin inhibitory activity and antimalarial activity by 2-aminoethylamino substitution. *Bioorg Med Chem Lett* 20 (16), 4836-4839 (2010).
- 3) Taku Yoshiya, Hiroyuki Kawashima, Yuka Hasegawa, Kazuhiro Okamoto, Tooru Kimura, Youhei Sohma and Yoshiaki Kiso: Epimerization-free synthesis of cyclic peptide by use of the *O*-acyl isopeptide method. *J Peptide Science* 16(8), 437-442 (2010).
- 4) Noriko Shimizu, Shigeru Sugiyama, Mihoko Maruyama, Yoshinori Takahashi, Motoyasu Adachi, Taro Tamada, Koushi Hidaka, Yoshio Hayashi, Tooru Kimura, Yoshiaki Kiso, Hiroaki Adachi, Kazufumi Takano, Satoshi Murakami, Tsuyoshi Inoue, Ryota Kuroki, Yusuke Mori, Hiroyoshi Matsumura: Crystal Growth Procedure of HIV-1 Protease-Inhibitor KNI-272 Complex for Neutron Structural Analysis at 1.9 Å Resolution. *Crystal Growth & Design* 10 (7), 2990-2994 (2010).
- 5) Michael Beisswenger, Taku Yoshiya, Yoshiaki Kiso and Chiara Cabrele: Synthesis and conformation of an analog of the helix-loop-helix domain of the Id1 protein containing the *O*-acyl iso-prolyl-seryl switch motif. *J Peptide Science* 16 (6), 303-308 (2010).
- 6) Taeko Kakizawa, Koushi Hidaka, Daisuke Hamada, Ryoji Yamaguchi, Tsuyoshi Uemura, Hitomi Kitamura, Harichandra D. Tagad,

- Takashi Hamada, Zyta Ziora, Yoshio Hamada, Tooru Kimura and Yoshiaki Kiso: Tetrapeptides, as small-sized peptidic inhibitors; synthesis and their inhibitory activity against BACE1. *J Peptide Science* 16 (6), 257-262 (2010).
- 7) Harichandra D. Tagad, Yoshio Hamada, Jeffrey-Tri Nguyen, Takashi Hamada, Hamdy Abdel-Rahman, Abdellah Yamani, Ayaka Nagamine, Hayato Ikari, Naoto Igawa, Koushi Hidaka, Youhei Sohma, Tooru Kimura, Yoshiaki Kiso: Design of pentapeptidic BACE1 inhibitors with carboxylic acid bioisosteres at P1' and P4 positions. *Bioorg Med Chem* 18 (9), 3175-3186 (2010).
 - 8) Yuri Yamazaki, Makiko Sumikura, Koushi Hidaka, Hiroyuki Yasui, Yoshiaki Kiso, Fumika Yakushiji, Yoshio Hayashi: Anti-microtubule "plinabulin" chemical probe KPU-244-B3 labeled both α - and β -tubulin. *Bioorg Med Chem* 18 (9), 3169-3174 (2010).
 - 9) Kazuki Saito, Itsuki Yasuo, Hiromasa Uchimura, Shizuyo Koide-Yoshida, Takaaki Mizuguchi, Yoshiaki Kiso: Verification of protein disulfide bond arrangement by in-gel tryptic digestion under entirely neutral pH conditions. *Proteomics* 10 (7), 1505-1509 (2010).

小林正行

- 1) Izumi T, Ito K, Matsui M, Shirakawa K, Shinohara M, Nagai Y, Kawahara M, Kobayashi M, Kondoh H, Misawa N, Koyanagi Y, Uchiyama T, and Takaori-Kondo A*: HIV-1 Vif interacts with TP53 to induce G2 cell cycle arrest and positively regulate viral replication. *Proc Natl Acad Sci USA* (2010)107(48):20798-803.

研究課題：エイズ多剤併用療法中のリザーバーの特定および選択的障害に関する研究

課題番号：H20-エイズ-一般-003

研究代表者：五十嵐 樹彦（京都大学ウイルス研究所 教授）

研究分担者：なし

1. 研究目的

現在行われている抗 HIV 多剤併用療法は感染者からウイルスを完全に排除する事が出来ないため生涯服用せねばならず、薬剤の副作用、耐性ウイルスの出現といった長期治療に伴う問題がある。本研究計画では多剤併用療法中にウイルスを産生し続けるリザーバーを特定、そのリザーバーを選択的に傷害する方法を開発し、現行の多剤併用療法と組み合わせることで、感染者からのウイルス駆逐を最終目的とする。

2. 研究方法

1) 動物：アカゲザル9頭を用い、6頭を治療群（内2頭は短期治療群、4頭は長期治療群）、3頭を非治療群として実験に用いた。

2) ウイルス：SIV239を2000 TCID₅₀ 静脈内接種した。

3) 薬剤：逆転写酵素阻害剤としてジドブジン（AZT、150mg × 2回/日）、ラミブジン（3TC、75mg × 2回/日）およびテノフォビル（TDF、150mg × 1回/日）を選択した。プロテアーゼ阻害剤としてロピナビル（LPV、200mg × 2回/日）およびリトナビル（RTV、50mg × 2回/日）を選択した。上記抗ウイルス剤は錠剤を（AZTおよび3TCはコンビルドとして、TDFはテノフォビルとして、LPVおよびRTVはカレトラとして）粉砕後、同様に粉砕した飼料およびバナナと混合・成形し、自由摂食させた。治療個体は投薬期間中、給餌後2時間以内に90%以上を安定して摂食した。

4) 感染実験および投薬スケジュール：ウイルス接種前より末梢血 CD4 陽性 T 細胞数を、ウイルス接種後はそれに加えて血漿中ウイルス RNA 量を経時的に計測した。ウイルス接種8週後より上記の投薬を行った。短期治療群は接種8週後から10週間、さらに、接種38週後から8週間投薬し、2回目の治療中断10日後に殺処分した。長期治療群は接種8週後より投薬を開始し、53から57週間治療した。本群の個体はいずれも治療中に殺処分した。非治療群は接種66-117週後に殺処分した。

5) 解析：殺処分した個体から、主要臓器（肝、腎、心、肺および消化管）、中枢神経系、生殖器およびリンパ系組織（脾、胸腺および各リンパ節）を採材し、核酸（RNA）を抽出、gag 領域を標的とした PCR 検索および抗 Nef 抗

体および細胞表面マーカーの2重染色による組織化学的検索を行った。

（倫理面への配慮）

実験は「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に基づく「京都大学における動物実験の実施に関する規程」則って行った。

3. 研究結果

1) 抗 HIV 剤投与による SIV 抑制効果

短期投与群（2頭）では2度の治療サイクルとも、投与開始5週間以内に血漿中ウイルス RNA 量が検出限界

（200 copies/ μ l）以下に抑制された。治療を中断するとウイルス RNA 量は速やかに上昇した。長期投与群（4頭）では個体により差があったものの、治療開始後2週間から14週間で血漿中ウイルス RNA 量は検出限界以下に抑制された。その後、治療期間中ウイルス量は安定して検出限界以下に抑制され、一過性上昇は見られなかった。

2) 末梢血 CD4 陽性 T 細胞数の変動

治療個体は両群とも、非治療群と比較して細胞数は保存されたものの、治療により接種前のレベルに回復することはなかった。

3) 各組織ウイルス量の比較

多剤併用療法中にもウイルスを産生しうる組織・細胞を検出する目的で、各組織から抽出した RNA を用い、ウイルスシグナルを定量 PCR 検索した。非治療群では 3000 ~ 2 \times 10⁶ copies/ μ g 総 RNA のウイルス RNA が、非リンパ系主要臓器および中枢神経系から検出されたが、短期及び長期治療群いずれの個体でも検出限界（2900 copies/ μ g 総 RNA）以下だった。大多数の HIV 分離株および SIV が指向するエフェクターメモリー CD4 陽性 T 細胞が分布する消化管、肺および生殖器といった所謂エフェクターサイトにおけるウイルス RNA 量は非治療個体で 2 \times 10⁶ ~ 2 \times 10⁸ copies/ μ g 総 RNA の値であったが、短期治療群では検出限界以下、長期治療群では 2900 ~ 6.5 \times 10⁴ copies/ μ g 総 RNA と低値ながらウイルス RNA が検出された。リンパ系組織におけるウイルス RNA 量は検索した組織中で最も高く、非治療群で 10⁵ ~ 10⁸ copies/ μ g 総 RNA のウイルスシグナルが検出された。これに対して治療群では