

201104008A

厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

(国際医学協力研究事業)

「H I V感染症制圧のためのワクチン及び薬剤開発に関する研究」

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岩本愛吉

平成24年3月

目 次

I. 総括研究報告

HIV感染症制圧のためのワクチン及び薬剤開発に関する研究 ----- 1

研究代表者 岩本愛吉 (東京大学医科学研究所 教授)

II. 分担研究報告

1. HIV特異的細胞傷害性T細胞の機能解析 ----- 7

東京大学医科学研究所 教授 岩本愛吉

2. HIVプロテアーゼ二量体化阻害活性を有するプロテアーゼ阻害剤 (PDI) の
デザイン・開発とPDIに対するHIVの耐性発現の機序の解明 ----- 10

熊本大学生命科学研究部 教授 満屋 裕明

3. SIVのCTL逃避変異の解析 ----- 13

国立感染症研究所 エイズ研究センター長 俣野 哲朗

4. 慢性HIV感染におけるT細胞疲弊シグナルと抗原提示に関する研究 ----- 16

国立感染症研究所 免疫部 室長 横田 恭子

5. HAART 治療中断により出現するHIVの起源とその制御法の開発 ----- 21

日本医科大学医学部 教授 高橋 秀実

6. OX40 刺激によるR5 HIV-1抑制 : OX40刺激を補足するCXCR4架橋 ----- 27

琉球大学大学院医学研究科 教授 田中 勇悦

7. Intrinsic Immunity によるHIV-1複製抵抗性に関する研究 ----- 31

国立感染症研究所 エイズ研究センター 主任研究官 駒野 淳

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 39

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 49

HIV 感染症制圧のためのワクチン及び薬剤開発に関する研究

研究代表者 岩本 愛吉 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨：

個別研究においては、分担研究者がそれぞれワクチンや抗 HIV 薬開発のために役立つ基礎的な研究成果を挙げた。2011 年 9 月米国アトランタのエモリー大学構内において、日米エイズパネル合同会議を開催するとともに、シンポジウムを開催した。世界最先端の研究を行う研究者が全米から参加し、基礎、動物モデル、臨床、疫学、公衆衛生対策など広範囲な講演が行われた。シンポジウムは、エモリー大学の学生や若手研究者にも公開されており、アジアからの留学生を含むエモリー大学及び近隣のエイズ研究のための人材育成にも貢献した。平成 22 年度は、合同部会が米国で開催されたこともあり、アジア地域への還元が十分できなかった。しかし、現在シンガポールで活躍する山本前エイズ部会長をシンポジウムに招き、アジアにおけるエイズ問題も議論した。

研究分担者 満屋裕明 熊本大学 教授
研究分担者 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 横田恭子 国立感染症研究所
室長
研究分担者 高橋秀実 日本医科大学 教授
研究分担者 田中勇悦 琉球大学 教授
研究分担者 駒野 淳 国立感染症研究所
主任研究官

A. 研究目的

巨大な人口を擁するアジアにおける HIV/AIDS(エイズ)対策は、極めて重要な課題である。アジア随一の先進国として、世界の最先端を走る米国の研究者と密な情報交換を行い、エイズの予防や治療等に関するウイルス学、免疫学、臨床的研究を推進する。米国の研究者との協力を基盤に、ネットワークを通じてアジアの研究者を介して、感染症対策に貢献する。

B. 研究方法

○個別分担研究

(岩本愛吉)

医科学研究所に通院する HLA-A*2402 (HLA-A24) 陽性 HIV 感染者の末梢血中単核球 (PBMC) から Nef138 エピトープ特異的な T 細胞

分画や CTL 株を樹立する。抗原特異的な T 細胞は、ペプチド/HLA-A24 複合体テトラマーや特異抗体で染色、分画、ソーティングを行う。T 細胞集団や細胞株の T 細胞受容体 (TCR) を PCR 法で増幅し、遺伝子解析や高次構造を解析する。研究は中国科学院の高福教授との共同研究である。

(俣野哲朗)

SIV 感染アカゲサルにおける CTL 逃避変異を同定する。同定した変異を有する SIV を作製し、SIV 複製能に及ぼす影響を検討する。

(横田恭子)

CD160 および BTLA (B- and T-lymphocyte attenuator) は HVEM (Herpes virus entry mediator) の同じ領域に結合して T 細胞あるいは NK 細胞に負のシグナルを伝達する。CD160 や BTLA の作用を阻害する単クローン抗体を確立し、樹状細胞-T 細胞の相互作用における阻害効果を *in vitro* で解析する。

(田中勇悦)

これまで以上に高い R5 HIV-1 抑制能を持つ OX40 と OX40L の誘導法を開発する。

(高橋秀実)

強力な抗 HIV 療法を実施した患者の粘膜組織生検材料中の P24 抗原陽性細胞を確認し、その細胞群を同定する。また、末梢血中に潜伏する

プロウイルスDNAと治療の中断に伴い出現したウイルス核酸を比較検討し、出現ウイルスの起源を明らかにする。

(駒野淳)

T細胞に由来するcDNAライブラリーからHIV抵抗性遺伝子を機能的にスクリーニングする。候補遺伝子の中からリンパ球系細胞に特異的かつ恒常的に発現する因子に焦点を当てて、そのウイルス抵抗性メカニズムを解析する。

(満屋裕明)

青色 または黄色蛍光色素をコードする遺伝子をfull-length HIVのプロテアーゼに結合したプラスミドでCOS7細胞にco-transfection (FRET-based HIV expression assay)、種々のPDIの候補薬の存在下で培養、プロテアーゼ二量体化の阻害能を定量するとともに、そのような化合物とプロテアーゼとの相互作用をウイルス学的、結晶学的、構造学的に解析、臨床開発へと進める。

○各人が研究計画・目的に応じて研究を推進するとともに、日米医学協力計画を軸として、エイズパネルとしての技術的・人的交流を深め、共同研究を推進する。平成23年度には、各人が研究を遂行するとともに、9月21-23日米国アトランタ・エモリー大学にて日米エイズパネル合同会議を開催する。

(倫理面への配慮)

臨床検体については、研究者の所属する機関の倫理委員会の承認を得ている。外国機関との研究の場合には、相手機関の倫理委員会の承認を得る。研究内容を説明の上、患者から書面で同意書を得る。研究に関連するガイドラインを遵守する。

C. 研究結果

○個別分担研究

(岩本愛吉)

Nef138 特異的 CTL の α 鎖が TCR の V 領域として V- δ -1 遺伝子を用いる頻度は、患者により著しく異なり、非常に頻度の高い患者 (40%以上) と非常に頻度の低い患者 (15%以下) があることが分かった。ピアコアを用いた蛋白機能解析により、V- δ -1 遺伝子を用いる TCR と Nef138/HLA-A24 の結合は非常に強いことが分かった。また、結晶構造解析により、V- δ -1 遺伝子を用いる TCR と Nef138/HLA-A24 の構造が解けた (論文投稿中)。Nef138 エピトープは N

末端が同一で長さの違う 8mer あるいは 10mer のエピトープとして認識されることが知られていたが、8mer と 10mer では抗原構造が大きく異なり、TCR レパートリーも著しく異なることが分かった (論文準備中)。これらの知見は Nef138 エピトープの免疫原性が高いことの根拠を示唆しており、ワクチン候補を選定する際の基礎として用いることのできる成果である。

(俣野哲朗)

アカゲザルを用いた動物モデルによるワクチン接種・感染 (SIVmac239) 実験を行った。感染後 5 週目のウイルスゲノムの解析では、ワクチン抗原をコードする領域に、それ以外の領域と比べてより多くのアミノ酸置換変異が認められた。この結果は、ウイルス曝露後、ワクチン抗原特異的 CTL 反応が非ワクチン抗原特異的 CTL 反応より先行することを反映するものであると考えられ、これらの CTL のウイルス複製抑制圧を示唆するものである。

(横田恭子)

HIVによる持続的抗原刺激でT細胞が活性化する一方、疲弊もしていく機序を明らかにするため、抗原提示細胞とT細胞の相互作用により誘導される負のシグナル (2B4、CD160 あるいは BTLA (B- and T-lymphocyte attenuator) など) と活性化マーカー (HLA-DR や CD25) を、ヒト PBMC を長期抗原刺激し、比較解析した。その結果、活性化分子と疲弊化分子のT細胞分化に伴う発現パターンは大きく異なっていることが明らかとなった。動物モデルの実験を行うため、サル及びマウスを用いてこれらの分子に対する抗体を作製している。

(田中勇悦)

HIV感染時CD4との共同受容体であるケモカイン受容体に対する単クローン抗体を独自に樹立している。3種類の抗CXCR4特異抗体のHIV抑制効果を解析したところ、CXCR4細胞外ループ (ECL) 1 と ECL2 からなる高次構造エピトープに結合する A120 は、X4、R5、X4R5 ウイルスの感染を強力に抑制した。X4 ウイルスの抑制は抗体によるウイルス結合部位の直接遮へい、R5 ウイルスの抑制は A120 による CCR5 結合性 β -ケモカイン (特に MIP-1 α) の酸性促進に産生促進によるものと考えられた。アカゲザルを用いた動物感染モデルの共同研究が、エモリー大学 Ansari 教授との間で進行中である。

(高橋秀実)

HIV の感染リザバを検索するために、抗 HIV 療法により末梢血中のウイルスが検出感度以下となった症例から腸管回盲部粘膜組織を採取し、その生検組織中の HIV 感染細胞について検討した。その結果、CD4 陽性 T 細胞ならびに CD11c 陽性樹状細胞の中に多数の p24 抗原陽性細胞が観察された。さらに p24 抗原陽性細胞の実体を解析したところ、その主体は年粘膜自然免疫を担う NKT 様細胞と樹状細胞であった。また、エンベロープ V3 領域の解析により、腸管系では、HIV 感染の標的が自然免疫系の樹状細胞や NKT 細胞が主体であり、抗 HIV 療法を行っても、これら細胞群の感染が制御されていない可能性が示唆された。

(駒野淳)

ヒト T 細胞を利用した機能的 cDNA ライブラリースクリーニング法を独自に開発し、リンパ球系の細胞に選択的に発現する Intrinsic immunity 因子として ARHGDIB を見出した。ARHGDIB は小分子 GTPases の機能を負に制御することを通じてウイルスの侵入を阻害する働きを持つことが明らかとなった。新たな複製制御の作用点として ARHGDIB-小分子 GTPases 軸が有用な可能性がある。さらに病態進行マーカーや細胞内ワクチンの治療分子としての応用も期待される。

(満屋裕明)

出現しにくいと言われている darunavir の高度耐性株を樹立し、耐性株においては darunavir のウイルスプロテアーゼ 2 量体化阻止能が失われていることを見出した。また、複数のプロテアーゼ阻害薬に耐性の HIV 変異株に対しても効果を持つ新規物質を見出し、開発中である。

○日米合同エイズパネル会議の開催

2011 年 9 月米国アトランタのエモリー大学構内において、日米エイズパネル合同会議を開催するとともに、シンポジウムを開催した。日本側からは、悪天候で急遽フライトがキャンセルされた駒野淳を除き、全員が参加した。

D. 考察

個別研究においては、分担研究者がそれぞれワクチンや抗 HIV 薬開発のために役立つ基礎的な研究成果を挙げた。

エモリー大学で開催されたシンポジウムに

おいては、日本側部会長の岩本と米国側部会長の Ruth Ruprecht ハーバード大学教授が開会宣言をし、James Curran エモリー大学公衆衛生学部長と山本直樹教授(前エイズ部会代表)が基調講演を行った。米国側からは、Guido Silvestri エモリー大学教授、Satya Dandekar カリフォルニア大学教授、Aftab Ansari エモリー大学教授、Raymond Schinazi エモリー大学教授、Mario Stevenson マイアミ大学教授、Steven Deeks カリフォルニア大学教授、Myron Cohen ノースカロライナ大学教授、Dan Kuritzkes ハーバード大学教授を含む世界最先端の研究を行う研究者が全米から参加し、基礎、動物モデル、臨床、疫学、公衆衛生対策など広範囲な講演が行われた。シンポジウムは、エモリー大学の学生や若手研究者にも公開されており、アジアからの留学生を含むエモリー大学及び近隣のエイズ研究のための人材育成にも貢献した。

E. 結論

地球規模で見ると、アフリカが現在最も深刻なエイズ問題を抱えている。しかし、アジアにはすでにアフリカに次ぐ感染者数が存在し、アジアの巨大な人口を考えると、アジアにおけるエイズはゆゆしき課題である。アジアには深刻なエイズ問題を抱えながらも、経済発展しつつある国が多く、単なる支援・援助を越えて、アジアの国々における研究活性化にも大きな意義がある。その点日米医学協力は、今後とも大きく貢献できる可能性がある。平成 22 年度は、合同部会が米国で開催されたこともあり、アジア地域への還元が十分できなかった。しかし、現在シンガポールで活躍する山本前エイズ部会長をシンポジウムに招き、アジアにおけるエイズ問題も議論した。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

(岩本愛吉)

- 1) Long, Y., Meng, F., Kondo, N., Iwamoto, A., and Matsuda, Z. Conserved arginine residue in the membrane-spanning domain of HIV-1 gp41 is required for efficient membrane fusion. *Protein & Cell*. 2: 369-376, 2011.
- 2) Koga, M., Koibuchi, T., Kikuchi, T.,

- Nakamura, H., Miura, T., Iwamoto, A., and Fujii, T. Kinetics of serum β -D-glucan after *Pneumocystis* pneumonia treatment in patients with AIDS. *Intern. Med.* 50: 1397-1401, 2011.
- 3) Shi, Y., Qi, J., Iwamoto, A., and Gao, G.F. Plasticity of human CD8 α binding to peptide-HLA-A*2402. *Mol. Immunol.* 48: 2198-2202, 2011.
 - 4) Imai, K., Koibuchi, T., Kumagai, T., Maeda, T., Osada, Y., Ohta, N., Koga, M., Nakamura, H., Miura, T., Iwamoto, A., and Fujii, T. Cerebral schistosomiasis due to *Schistosoma haematobium* confirmed by PCR analysis of the brain specimen. *J. Clin. Microbiol.* 49: 3703-3706, 2011.
 - 5) Adachi E, Koibuchi T, Okame M, Sato H, Imai K, Shimizu S, Tsurita G, Oyaizu N, Iwamoto A, Fujii T. Case of secondary syphilis presenting with unusual complications: syphilitic proctitis, gastritis and hepatitis. *J. Clin. Microbiol.* 49: 4394-4396, 2011.
 - 6) Nakayama, K., Nakamura, H., Koga, M., Koibuchi, T., Fujii, T., Miura, T., Iwamoto, A., and Kawana-Tachikawa, A. Imbalanced Production Of Cytokines By T Cells Associates With The Activation/Exhaustion Status Of Memory T Cells In Chronic HIV-1 Infection. *AIDS Research and Human Retroviruses.* in press. 2012.
(俣野哲朗)
 - 1) Takahara Y, Matsuoka S, Kuwano T, Tsukamoto T, Yamamoto H, Ishii H, Nakasone T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Sakawaki H, Horiike M, Miura T, Igarashi T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Dominant induction of vaccine antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses after simian immunodeficiency virus challenge. *Biochem Biophys Res Commun* 408:615-619, 2011.
 - 2) Ishii H, Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Matsuoka S, Shiino T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Naruse TK, Kimura A, Takiguchi M, Matano T. Impact of vaccination on cytotoxic T lymphocyte immunodominance and cooperation against simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques. *J Virol* 86:738-745, 2012.
 - 3) Seki S, Matano T. CTL escape and viral fitness in HIV/SIV infection. *Front Microbiol* 2:267, 2012.
(横田恭子)
 - 1) Terahara, K., Yamamoto, T., Mitsuki, Y-y, Shibusawa, K., Ishige, M., Mizukoshi, F., Kobayashi, K., and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Fluorescent reporter signals, EGFP and DsRed, encoded in HIV-1 facilitate the detection of productively infected cells and cell-associated viral replication levels. *Front. Microbiol.*, 2:1-11, 2012.
 - 2) Fujii, H, Ato, M., Takahashi, Y., Otake, K., Hashimoto, S-I., Kaji, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Fujita, M., Adachi, A., Nakayama, T., Taniguchi, M., Koyasu, S., and Takemori, T.: HIV-Nef impairs multiple T cell functions in antigen- specific immune response in mice. *Int. Immunol.* 23:433-441, 2011.
 - 3) Salaun, B., Yamamoto, T., Bardran, B., Tsunetsugu-Yokota, Y., Roux, A., Baitsch, L., Rouas, R., Fayyad-Kazan, H., Baumgaertner, P., Devevre, E., Ramesh, A., Braun, M., Speiser, D., Autran, B., Martiat, P., Appay, V., and Romero, P.: Differentiation associated regulation of microRNA expression in vivo in human CD8⁺ T cell subsets. *J. Transl. Med.* 9:44-52, 2011.
(田中勇悦)
 - 1) Adachi T, Tanaka R, Kodama A, Saito M, Takahashi Y, Ansari AA, Tanaka Y. Identification of an unique CXCR4 epitope whose ligation inhibits infection by both CXCR4 and CCR5 tropic human immunodeficiency type-I viruses. *Retrovirology.* 2011 8:84.
(高橋秀実)
 - 1) Nakagawa, Y., Watari, E., Shimizu, M., and Takahashi, H. One-step simple assay to determine antigen-specific cytotoxic activities by single-color flow cytometry. *Biomedical Res.* 32:159-166, 2011.
 - 2) Takahashi, M., Matsumura, J., Inagaki, S., and Takahashi, H. Induction of CD56⁺ T cells after prolonged activation of T cells in vitro: a possible mechanism for CD4⁺ T-cell depletion in acquired immune deficiency syndrome patients. *Human Immunol.* 72:783-790, 2011.
 - 3) Kobayashi, F., Watanabe, E., Nakagawa, Y., Yamanishi, S., Norose, Y., Fukunaga, Y., and Takahashi, H. Production of Auto-antibodies by Murine B-1a Cells Stimulated with Helicobacter pylori Urease through TLR2 Signaling. *Infect. Immun.* 79:4791-4801, 2011.
 - 4) Ohkuni, H., Nagamune, H., Ozaki, N., , Tabata, A., Todome, Y., Watanabe, Y., Takahashi, H., Ohkura, K., Kourai, H.,

- Ohtsuka, H., Fischetti, V.A., and Zabriskie, J.B. Characterization of recombinant *Streptococcus mitis*-derived human platelet aggregation factor. *APMIS*, 120:56-71, 2011.
- 5) Atsukawa, M., Nakatsuka, K., Kobayashi, T., Shimizu, M., Harimoto, H., Takahashi, H., and Sakamoto, C. Ribavirin down-modulates ICOS on CD4(+) T-cells and their interleukin-10 secretion to assist clearance of hepatitis C virus. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 26, 2011 (in press).
 - 6) Inagaki, S., Takahashi, M., Fukunaga, Y., and Takahashi, H. HLTL-I-infected breast milk macrophages inhibit monocyte differentiation to dendritic cells. *Viral Immunol.* 25, 2012 (in press).
 - 7) Negishi, Y., Wakabayashi, A., Shimizu, M., Ichikawa, T., Kumagai, Y., Takeshita, T., and Takahashi, H. Disruption of maternal immune balance maintained by innate DC subsets results in spontaneous pregnancy loss in mice. *Immunobiology*, 217, 2012 (in press).
- (駒野淳)
- 1) Takizawa M, Miyauchi K, Urano E, Kusagawa S, Kitamura K, Naganawa S, Murakami T, Honda M, Yamamoto N, Komano J*. Regulation of the susceptibility of HIV-1 to a neutralizing antibody KD-247 by non-epitope mutations distant from its epitope. *AIDS*. In press.
 - 2) Nomura W, Hashimoto C, Ohya A, Miyauchi K, Urano E, Tanaka T, Narumi T, Nakahara T, Komano J, Yamamoto N, Tamamura H. Synthetic C34 Trimer of HIV-1 gp41 Shows Significant Increase of Inhibition Potency. *ChemMedChem*. In press.
 - 3) Watanabe T, Urano E, Miyauchi K, Ichikawa ARHGDI Bamatate M, Misawa N, Sato K, Ebina H, Koyanagi Y, Komano J*. The hematopoietic cell-specific Rho GTPase inhibitor ARHGDI BGDIB/D4GDI limits HIV-1 replication. *AIDS Res Hum Retroviruses*. In press.
 - 4) Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakagawa-Nakagawa A, Kawano F, Ichikawa S, Shimizu N, Yamamoto N, Morio T, Ohga S, Nakamura H, Ito M, Miura O, Komano J, Fujiwara S*. CD4-positive T cells have a critical role in the proliferation of EBV-infected T and NK cells. *PLOS Pathog.* In press.
 - 5) Urano E, Kuramochi N, Tomoda H, Takebe Y, Miyauchi K, Komano J*, Morikawa Y*. A Novel Postentry Inhibitor of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication Screened by Yeast Membrane-associated Two-hybrid System. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Sep;55(9):4251-60.
 - 6) Aoki T, Miyauchi K, Urano E, Ichikawa R, Komano J*. Protein transduction by pseudotyped lentivirus-like nanoparticles. *Gene Therapy.* 2011 Sep;18(9):936-41.
 - 7) Miyauchi K, Urano E, Yoshiyama H, Komano J*. Cytokine signatures of transformed B cells with distinct EBV latencies as a potential diagnostic tool for B cell lymphoma. *Cancer Sci.* 2011 Jun;102(6):1236-41.
 - 8) 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. *Bioorg Med Chem.* 2011; 19, 816-25.
- (満屋裕明)
- 1) Ghosh, A.K., Chapsal, B.D., Parham, G.L., Steffey, M., Agniswamy, J., Wang, Y.F., Amano, M., Weber, I.T., and Mitsuya H. Design of HIV-1 protease inhibitors with C3-substituted hexahydrocyclopentafuranyl urethanes as P2-ligands: synthesis, biological evaluation, and protein-ligand X-ray crystal structure. *J. Med. Chem.* 54:5890-901, 2011.
 - 2) Koh, Y., Aoki, M., Danish, M.L., Aoki-Ogata, H., Amano, M., Das, D., Shafer, R.W., and Mitsuya, H. Loss of protease dimerization inhibition activity of darunavir is associated with the acquisition of resistance to darunavir by HIV-1. *J. Virol.* 85:10079-89, 2011.
 - 3) Ide, K., Aoki, M., Amano, M., Koh, Y., Yedidi, R.S., Das, D., Leschenko, S., Chapsal, B., Ghosh, A.K., and Mitsuya, H. Novel HIV-1 protease inhibitors (PIs) containing a bicyclic P2 functional moiety, tetrahydropyrano-tetrahydrofuran (Tp-THF), that are potent against multi-PI-resistant HIV-1 variants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:1717-27, 2011.
 - 4) Ghosh AK, Martyr CD, Steffey M, Wang YF, Agniswamy J, Amano M, Weber IT, Mitsuya H. Design, Synthesis, and X-ray structure of substituted bis-tetrahydrofuran (bis-THF)-derived potent HIV-1 protease inhibitors. *ACS Med Chem Lett.* 2: 298–302, 2011.
 - 5) Ghosh AK, Chapsal BD, Baldrige A, Steffey MP, Walters DE, Koh Y, Amano M, Mitsuya H. Design and synthesis of potent HIV-1 protease inhibitors incorporating

Hexahydrofurofuranol-derived high affinity P(2) ligands: structure-activity studies and biological evaluation. J Med Chem. 54: 622-634, 2011

2. 学会発表

- 1) Long, Y., Meng, F., Kondo, N., Iwamoto, A., and Matsuda, Z. A highly conserved arginine residue in the membrane-spanning domain of HIV-1 gp41 is required for an efficient membrane fusion. Retroviruses, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, USA. May 23-28, 2011.
- 2) Nomura, S., Kikuchi, T., Hosoya, N., Koga, M., Nakamura, H., Koibuchi, T., Fujii, T., Kawana-Tachikawa, A., Iwamoto, A., and Miura, T. Replication capacities of chimeric NL4-3 encoding *gag-protease* from modern HIV-1 isolates are significantly reduced compared to those derived from isolates in the early days of epidemic in Japan. 6th IAS Conference of HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. Rome, Italy. July 17-20, 2011.
- 3) Kikuchi, T., Iwatsuki-Horimoto, K. Adachi, E., Imai, K., Shimizu, S., Miyazaki, N., Koga, M., Nakamura, H., Kawana-Tachikawa, A., Koibuchi, T., Miura, T., Fujii, T., Iwamoto, A. Induction and maintenance of neutralizing antibodies after single dose of non-adjuvanted split 2009 pandemic H1N1 influenza A vaccine in HIV-1 positive population. 6th IAS Conference of HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. Rome, Italy. July 17-20, 2011.
- 4) Ishikawa, H., Kondo, N., Long, Y., Miyauchi, K., Meng, F., Iwamoto, A., and Matsuda, Z. Improvement of Novel Dual Functional Reporter for Analysis of Membrane Fusion. 25th Anniversary Symposium of the Protein Society. Boston, USA. July 23-27, 2011.
- 5) Iwatsuki-Horimoto, K., Horimoto, T., Tamura, D., Kiso, M., Kawakami, E., Hatakeyama, S., Ebihara, Y., Koibuchi, T., Fujii, T., Takahashi, K., Shimojima, M., Sakai-Tagawa Y., Ito, M., Sakabe, S., Iwasa, A., Takahashi, K., Ishii, T., Gorai, T., Tsuji, K., Iwamoto, A., and Kawaoka, Y. Sero-prevalence of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza A Virus among Schoolchildren and Their Parents in Tokyo, Japan. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo, Japan.

September 6-16, 2011.

- 6) Ishikawa, H., Kondo, N., Long, Y., Miyauchi, K., Meng, F., Iwamoto, A., and Matsuda, Z. Designing new split proteins by using GFP as “beta-tweezers”. 17th International Biophysics Congress (IUPAB). Beijing, China. October 30-November 3, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
該当無し
2. 実用新案登録
該当無し
3. その他
該当無し

HIV 特異的細胞傷害性 T 細胞の機能解析

研究分担者 岩本 愛吉 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨：

日本人で頻度の高い HLA-A*2402 により細胞傷害性 T 細胞 (CTL) に提示される HIV エピトープの一つ Nef138 は、10mer あるいは 8mer として特異的 CTL に認識される。一次構造が同一のアミノ酸配列でも、立体エピトープとしては全く別のエピトープとして提示されることがわかった。また、10mer の Nef138-10 に対する特異的な TCR のうち、 α 鎖 V 領域として V- δ -1 遺伝子を用いる TCR と Nef138-10/HLA-A*2402 の X 線結晶構造が解けた。米国アトランタのエモリー大学で開催された日米合同部会、シンポジウムにおいて成果を発表し、米国を中心とした研究者と密な情報交換を行った。

A. 研究目的

Nef138-10 ペプチドは、日本人で頻度の高い HLA-A*2402 で提示される細胞傷害性 T 細胞 (CTL) エピトープの一つである。Nef138-10 の野性型アミノ酸配列 (RYPLTFGWCF) は免疫原性が高く、それを持つウイルスは感染後急速に血中から排除される。CTL を介した有効なワクチンを開発するためには、エピトープとそれに対して有効に働く CTL の T 細胞受容体 (TCR) の間の相互作用の研究が重要である。本研究では、野性型 Nef138 エピトープとそれに特異的な TCR の相互作用を機能面、構造面から詳細に解析する。構造生物学に優れた中国科学院の研究者と共同研究し、合同部会やシンポジウムを通して米国の研究者と情報交換を行う。

B. 研究方法

HLA-A*2402 (HLA-A24) 陽性 HIV 感染者の末梢血中単核球 (PBMC) を Nef138 (Nef 遺伝子内の CTL エピトープ) 由来の各種ペプチドで刺激し、*in vitro* で培養する。増殖した Nef138 特異的 T 細胞を、Nef138/HLA-A24 複合体テトラマーで染色、分画、ソーティングする。また、Nef138 特異的 CTL クローンを樹立する。ソーティングされたバルク T 細胞やクローンの T 細胞受容体 (TCR) を PCR 法で増幅し、遺伝子解析するとともに、大腸菌で蛋白質を発現し、Nef138/HLA-A24 複合体と TCR の高次構造を解く。V-delta-1 に対する特異的抗体を用いて、

この特殊な V 領域を使う CTL の頻度を解析する。研究は中国科学院の高福教授との共同研究である。

(倫理面への配慮)

臨床材料を用いる研究においては、該当する指針に従い、東京大学医科学研究所の該当する委員会の承認を得ている。病原体の解析研究 (承認番号: 20-31)、ヒトゲノム研究 (承認番号: 20-47)。協力の意志のある患者には研究の概要説明の上、書面で同意を得ている。海外の臨床検体は用いていない。

C. 研究結果

Nef138 特異的 CTL では、TCR α 鎖の可変部位 (V 領域) として、V- δ -1 遺伝子を用いることがわかった。ただし、その頻度は患者により著しく異なり、非常に頻度の高い患者 (40%以上) と非常に頻度の低い患者 (15%以下) があることが分かった。ピアコアを用いた蛋白機能解析により、V- δ -1 遺伝子を用いる TCR と Nef138/HLA-A24 の結合は非常に強いことが分かった。また、結晶構造解析により、V- δ -1 遺伝子を用いる TCR と Nef138/HLA-A24 の構造が解けた (論文投稿中)。Nef138 エピトープは N 末端が同一で長さの違う 8mer あるいは 10mer のエピトープとして認識されることが知られている。8mer と 10mer では抗原構造が大きく異なり、TCR レパートリも著しく異なることが分かった。

た(論文準備中)。これらの知見は Nef138 エピトープの免疫原性が高いことの根拠を示唆しており、ワクチン候補を選定する際の基礎資料として用いることのできる成果である。

D. 考察

免疫原性の高い Nef138 エピトープは、同じ一次構造を持つ 10mer (Nef138-10) と 8mer (Nef138-8) の 2 つの異なるエピトープとして提示される。また、10mer に対しては、TCR α 鎖の V 領域として、V- δ -1 遺伝子を用いる CTL 反応が惹起されており、この TCR は Nef138-10 エピトープに対して、これまで知られているエピトープ/TCR 結合で最も高いものであった。結晶構造により、その詳細を明らかにすることができた。

E. 結論

ワクチン抗原の検索、開発においては、一次構造が同じでも異なるエピトープとして提示される可能性を追求することにより、より広い免疫反応を惹起できる可能性がある。

F. 健康危険情報 該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Long, Y., Meng, F., Kondo, N., Iwamoto, A., and Matsuda, Z. Conserved arginine residue in the membrane-spanning domain of HIV-1 gp41 is required for efficient membrane fusion. *Protein & Cell*. 2: 369-376, 2011.
- 2) Koga, M., Koibuchi, T., Kikuchi, T., Nakamura, H., Miura, T., Iwamoto, A., and Fujii, T. Kinetics of serum β -D-glucan after *Pneumocystis* pneumonia treatment in patients with AIDS. *Intern. Med.* 50: 1397-1401, 2011.
- 3) Shi, Y., Qi, J., Iwamoto, A., and Gao, G.F. Plasticity of human CD8 $\alpha\alpha$ binding to peptide-HLA-A*2402. *Mol. Immunol.* 48: 2198-2202, 2011.
- 4) Imai, K., Koibuchi, T., Kumagai, T., Maeda, T., Osada, Y., Ohta, N., Koga, M., Nakamura, H., Miura, T., Iwamoto, A., and

Fujii, T. Cerebral schistosomiasis due to *Schistosoma haematobium* confirmed by PCR analysis of the brain specimen. *J. Clin. Microbiol.* 49: 3703-3706, 2011.

- 5) Adachi E, Koibuchi T, Okame M, Sato H, Imai K, Shimizu S, Tsurita G, Oyaizu N, Iwamoto A, Fujii T. Case of secondary syphilis presenting with unusual complications: syphilitic proctitis, gastritis and hepatitis. *J. Clin. Microbiol.* 49: 4394-4396, 2011.
 - 6) Nakayama, K., Nakamura, H., Koga, M., Koibuchi, T., Fujii, T., Miura, T., Iwamoto, A., and Kawana-Tachikawa, A. Imbalanced Production Of Cytokines By T Cells Associates With The Activation/Exhaustion Status Of Memory T Cells In Chronic HIV-1 Infection. *AIDS Research and Human Retroviruses*. in press. 2012.
- ##### 2. 学会発表
- 1) Long, Y., Meng, F., Kondo, N., Iwamoto, A., and Matsuda, Z. A highly conserved arginine residue in the membrane-spanning domain of HIV-1 gp41 is required for an efficient membrane fusion. *Retroviruses*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, USA. May 23-28, 2011.
 - 2) Nomura, S., Kikuchi, T., Hosoya, N., Koga, M., Nakamura, H., Koibuchi, T., Fujii, T., Kawana-Tachikawa, A., Iwamoto, A., and Miura, T. Replication capacities of chimeric NL4-3 encoding *gag-protease* from modern HIV-1 isolates are significantly reduced compared to those derived from isolates in the early days of epidemic in Japan. 6th IAS Conference of HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. Rome, Italy. July 17-20, 2011.
 - 3) Kikuchi, T., Iwatsuki-Horimoto, K. Adachi, E., Imai, K., Shimizu, S., Miyazaki, N., Koga, M., Nakamura, H., Kawana-Tachikawa, A., Koibuchi, T., Miura, T., Fujii, T., Iwamoto, A. Induction and maintenance of neutralizing antibodies after single dose of non-adjuvanted split 2009 pandemic H1N1 influenza A vaccine in

HIV-1 positive population. 6th IAS Conference of HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. Rome, Italy. July 17-20, 2011.

- 4) Ishikawa, H., Kondo, N., Long, Y., Miyauchi, K., Meng, F., Iwamoto, A., and Matsuda, Z. Improvement of Novel Dual Functional Reporter for Analysis of Membrane Fusion. 25th Anniversary Symposium of the Protein Society. Boston, USA. July 23-27, 2011.
- 5) Iwatsuki-Horimoto, K., Horimoto, T., Tamura, D., Kiso, M., Kawakami, E., Hatakeyama, S., Ebihara, Y., Koibuchi, T., Fujii, T., Takahashi, K., Shimojima, M., Sakai-Tagawa Y., Ito, M., Sakabe, S., Iwasa, A., Takahashi, K., Ishii, T., Gorai, T., Tsuji, K., Iwamoto, A., and Kawaoka, Y. Sero-prevalence of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza A Virus among Schoolchildren and Their Parents in Tokyo, Japan. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo, Japan. September 6-16, 2011.
- 6) Ishikawa, H., Kondo, N., Long, Y., Miyauchi, K., Meng, F., Iwamoto, A., and Matsuda, Z. Designing new split proteins by using GFP as “beta-tweezers”. 17th International Biophysics Congress (IUPAB). Beijing, China. October 30-November 3, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
該当無し
2. 実用新案登録
該当無し
3. その他
該当無し

HIV プロテアーゼ二量体化阻害活性を有するプロテアーゼ阻害剤 (PDI) の
デザイン・開発と PDI に対する HIV の耐性発現の機序の解明

分担研究者 満屋 裕明（熊本大学生命科学研究部血液内科学・感染免疫診療部 教授）

研究要旨

HIV プロテアーゼ (PR) の酵素活性獲得には 2 量体形成が必須で、2 量体形成は新規の抗 HIV 剤開発の標的となる。本研究では PR の 2 量体化阻止の態様について分子・原子レベルで解析を進め、タンパクの多分子間相互作用を HIV PR とレポータータンパクの融合タンパクの発現系と解析系 (fluorescence resonance energy transfer/FRET 法) により検討、HIV PR 2 量体形成阻害効果を有する新規化合物をデザイン・合成・同定、併せてそれらの新規化合物に対する耐性 HIV 変異体を作製し耐性変異のメカニズムについて検討した。

A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) 感染によって起こる後天性免疫不全症候群 (AIDS) に対する化学療法は長足の進歩を遂げ、かつて「死の病」とされた本疾患は「コントロール可能な慢性感染症」と再定義し得る程となった。この進歩は、逆転写酵素阻害剤 (RTIs) とプロテアーゼ阻害剤 (PIs) を組み合わせた多剤併用療法 (HAART) に負うところが大きい。しかし、HIV-1 が RTIs と PIs の両剤に対して耐性を獲得し、またその多くが交差耐性である故に治療抵抗性となった症例数の増大、また耐性ウイルスによる初感染症例増多の報告が続いており、これらに対応しうる新たな抗ウイルス薬の開発研究の重要性は増している。

我々が米国グループと開発した darunavir は HIV 感染症に対する first-line 治療薬として汎用されている。我々は最近 darunavir 等の化合物がプロテアーゼの二量体化をも阻害する (PDI) 事を示したが、更に強力な PDI を開発、併せて PDI に対する HIV の耐性発現機序を明らかにする。

B. 研究方法

- 1) 検討中の化合物の抗 HIV-1 活性評価及びより有望な化合物の開発・評価：抗 HIV-1 活性の評価には MTT、MAGI アッセイなどを用いるが、有望なものについては耐性株を含む複数のウイルス株での活性を更に検討するため、p24 アッセイを行う。このアッセイの評価には全自動化学発光度測定機：Lumipulse F を用いる。
- 2) 抗 HIV-1 作用発現のメカニズム解析：新規化合物がウイルス、あるいは生体 (細胞) へ与える変化、それがどのようにして抗 HIV-1 効果をもたらすかについて解析を進める。この研究には多数の HIV-1 クローンの作成・検討が必要で、しかも HIV-1 の広範な遺伝子部分についての検索が必要とされるが、high throughput の DNA sequencer: AB3130 Genetic Analyzer を用いることにより迅速な実験データの解析が可能となる。
- 3) 薬剤耐性のメカニズム解析：HIV-1 が極めて高い増殖能を有し、しかも逆転写酵素 (RT) が error-prone であるという特性のために、

HIV-1 の薬剤耐性発現は不可避である。新規化合物については、試験管内で耐性 HIV-1 変異株の誘導を試み、更にそのようにして誘導された HIV-1 についてのウイルス学・生化学・遺伝子的解析を用いて耐性発現のメカニズム解析を行う。加えて X 線結晶解析をはじめとするタンパクの微細構造研究の方法論を用いて、多剤耐性 HIV-1 株の発現機序の分子・原子レベルでの解析を行う。その後、構造を基礎とした高い抗ウイルス活性を有しかつ耐性の発現に抵抗する薬剤のデザイン・再デザインを行う。

4) HIV-1 PR 2 量体形成阻害効果の解析：HIV PR の作用にはその 2 量体化が重要であり、結晶解析等によるタンパクの分子・原子レベルでの詳細な解析に加えてこれらタンパクの多分子間の相互作用を検討することで新しい作用機序を持つ抗 HIV 薬開発の可能性が考えられる。我々は CFP/YFP タグ付き PR を有する感染性組み換え HIV-1 クローンと FRET (fluorescence resonance emission transfer) の系を用いて、HIV-1 PR 2 量体形成を確認する系を確立した。PR 2 量体形成に重要とされるアミノ酸 (Asp29, Arg87, Thr26 *etc*) 置換を有する種々の CFP/YFP タグ付き変異体を多数作成、FRET の系を用いてこれらのアミノ酸置換が 2 量体形成を阻害することを明らかとした。今後は変異 PR や新規にデザインした化合物が PR 2 量体形成に与える影響などを検討するとともに、そのような化合物と PR との相互作用をウイルス学的・結晶学的・構造学的に解析、臨床開発へと進める。

(倫理面への配慮)

開発した化合物の臨床試験導入に際し動物実験でその安全性を確認する。医学部内の IRB で倫理適合性の許可を申請し認可後試験を開始する。

C. 研究結果

我々は広いスペクトラムの薬剤耐性株に高い活性を發揮する PI, TMC114/darunavir/Prezista (DRV) を米国 Purdue University の Dr. Ghosh グループとの共同研究で開発 (Koh & Mitsuya *et al*, *Antimicrob Agents Chemother.* 47: 3123-3129, 2003) し、DRV は 2006 年に米国 FDA に認可、本邦でも臨床に供されている。

また我々は、蛍光蛋白 GFP の誘導体である CFP/YFP を用いた FRET-HIV 発現系を用いて、HIV PR の作用に必須である PR の 2 量体化を阻害する一群の 2 量体形成阻害剤 (PR dimerization inhibitors; PDIs) を分担研究者の Dr. Ghosh らと開発、DRV 等の *bis*-tetrahydrofuranyl-urethane (*bis*-THF) 構造及びその類似構造を有する一連の化合物が成熟 PR の酵素活性を阻害するのみならず、HIV PR 2 量体形成阻害活性を有する *bi*-functional PI であることを報告した (Koh & Mitsuya *et al*, *JBC.* 282: 28709-20, 2007)。また我々のグループは試験管内における DRV の研究を続けており、複数の多剤耐性臨床分離 HIV-1 混合株を用いた耐性誘導実験において、複数の PI 耐性変異体の重感染と遺伝子相同組み換えが起こることで、HIV-1 が DRV に対する高度耐性を獲得する可能性があることを見出した (Koh & Mitsuya *et al*, *J Virol.* 84: 11961-11969, 2010)。更に我々は DRV による治療に不応性となった臨床症例において、耐性 HIV-1 の PR 領域に V32I, L33F, I54M, I84V といった変異が認められ、これら 4 変異を全て同時に有する変異株では *in vitro* において DRV の PR 二量体形成阻害能が阻害される事を報告した (Koh & Mitsuya *et al*, *J Virol.* 85: 10079-10089, 2011)。

近年も我々は、構造解析学的データに基づき macrocyclic 構造という特徴的な構造を有し、薬剤耐性 HIV に対して高い活性を發揮する一

連の低分子化合物、GRL-0216A, -0286A 等の PDI_s を同定、詳細な結晶構造解析により同構造が HIV-PR flap 部位に対し効果的に結合する事で強い活性を發揮する事を見出した (Tojo & Mitsuya *et al*, *Antimicrob Agents Chemother.* 54:3460-3470, 2010)。加えて Tp-THF という bis-THF とは異なる基本骨格を有する PI_s である 2 つの異性体、GRL-1388A, -1398A を同定、DRV 高度耐性株を含む多剤耐性株に対して極めて強力な活性を發揮する事を確認、同化合物群に対する HIV-1 の耐性獲得の機序について詳細に検討、また結晶構造解析により GRL-1398A は DRV と比較して HIV PR との水素結合や疎水性相互作用等をより多く有する事などを報告した (Ide & Mitsuya *et al*, *Antimicrob Agents Chemother.* 55:1717-1787, 2011)。更に新規の *oxatricyclic* 構造を有し、DRV 耐性株を含む複数の高度耐性株に対し広域かつ極めて高い活性を維持、また DRV よりも低濃度で PR 二量体化阻害活性を發揮する新規化合物、GRL-0519A を開発・報告した (Ghosh, Amano & Mitsuya, *ChemMedChem.* 5 :1850-1854, 2010)。また、結晶構造解析学や質量分析学等を通じて DRV および前述した GRL-0519A といった HIV-1 PR 二量体形成阻害剤と PR monomer 間での結合様式、PR の多量体化過程での dynamics の検討を継続して行っている。

D. 考察

本計画では、現時点でも不明である HIV PR の多量体形成過程での新規の分子機構を明らかにすることを目的とし、それに基づいた新たな新規化合物の開発同定、治療法の確立を目指している。HIV の増殖、複製に必須である HIV PR の 2 量体化を検出する系として、HIV PR とレポータータンパクの融合タンパクの発現系とその解析系 (FRET 法) を申請者らは確立、2 量体形成阻害効果を有する一連の低分子化合物 PDI_s を米国の Dr. Ghosh の研究チームとの共同研究で同定・開発し、今後も推し進める。

また、DRV 等の PDI_s 耐性 HIV-1 で PR 領域に蓄積を認めたアミノ酸変異の解析や HIV-1 PR 2 量体形成に重要とされるアミノ酸の詳細な解析を進める。本計画で得られると思われるデータは、臨床試験段階にある阻害薬の研究成果に耐性発現機序に関わる基礎研究の成果を付与することなどが期待でき、阻害剤の基本骨格のデザイン・再デザインや、HIV への酵素学的・ウイルス学的解析が強化・スピードアップされ、更に密な情報交換と人的交流を通じ新しい世代の PDI の開発が強力に推進されると思われる。

E. 結論

本研究では広いスペクトラムで強力な抗 HIV-1 活性を發揮する新規 PI_s のデザイン・合成を進めた。また HIV の増殖、複製に必須とされる HIV PR の 2 量体形成に注目し、2 量体形成過程での新規の分子機構を結晶解析等によるタンパクの分子レベルでの解析に加え、PR モノマー間の相互作用を HIV PR とレポータータンパクの融合タンパクの発現系と解析系により検討、HIV PR 2 量体形成阻害効果を有する一連の新規化合物 PDI_s を同定した。1 剤で 2 つの作用機序を有する新規抗 HIV 剤への耐性発現の genetic barrier は極めて高く、薬剤耐性 HIV への新たな対応策と考えられる。

今後は DRV 等の PDI_s の複数の DRV 耐性関連変異等を有した PR モノマーサブユニットへの結合部位、結合様式に与える影響をウイルス学的・分子構造学的・結晶学的に解析、PR サブユニットによる 2 量体形成のダイナミクスを明らかにする予定である。

SIV の CTL 逃避変異の解析

研究分担者 俣野 哲朗 国立感染症研究所エイズ研究センター長

研究要旨

HIV 感染症において、細胞傷害性 T リンパ球（CTL）反応はウイルス複製抑制に中心的役割を担っている。CTL の抑制圧からの逃避に結びつく変異（CTL 逃避変異）を有する HIV の選択はしばしば認められるところである。本研究では、サルエイズモデルにおいて CTL 反応とウイルス変異選択の解析を進めることとし、DNA ワクチン接種後サル免疫不全ウイルスチャレンジを行ったサルにおけるウイルスゲノム変異を調べた。その結果、ワクチン抗原をコードする領域における変異選択がそれ以外の抗原をコードする領域における変異選択よりも先行することが明らかとなった。本研究の結果は、ウイルス曝露後、ワクチン抗原特異的 CTL 反応が非ワクチン抗原特異的 CTL 反応より先行することを反映するものであると考えられ、これらの CTL 反応のウイルス複製抑制圧を示唆するものである。

A. 研究目的

HIV 感染症においては、細胞傷害性 T リンパ球（CTL）反応がウイルス複製抑制に中心的役割を果たしているが、この CTL 反応にもかかわらず HIV 持続感染が成立しエイズ発症にいたる。CTL 認識からの逃避に結びつく変異（CTL 逃避変異）を有するウイルスの選択はしばしば認められるところである。CTL 逃避変異の解析は、CTL の抑制圧の理解に結びつくことから、本研究では、サルエイズモデルにおいて CTL 反応とウイルス変異選択の解析を進めることとした。

我々はこれまでに CTL 誘導型エイズワクチン開発研究を進めてきたが、ワクチンによる CTL メモリー誘導がウイルス曝露後の CTL 逃避変異選択に及ぼす影響については今後の課題である。そこで本研究では、我々が開発を進めてきたワクチンの一つである DNA ワクチンに着目し、DNA ワクチン接種サルにおいて、サル免疫不全ウイルス（SIV）曝露後のウイルスゲノムの変異を解析した。

B. 研究方法

SIVmac239 Gag・Pol・Vif・Vpx を発現する DNA ワクチンを接種した後、SIVmac239 チャレンジを行い、ウイルス複製制御にいたらなかったアカゲサル 3 頭のチャレンジ後 5 週目および 12 週目の凍結血漿を用いた。なお、これら 3 頭のサルでは、感染 2 週目において、効率よいワクチン抗原（Gag・Pol・Vif・Vpx）特異的 CTL 反応が認められた。血漿より RNA を抽出し、Env 以外の SIV 各抗原（Gag・Pol・Vif・Vpx・Vpr・Tat・Rev・Nef）をコードする cDNA を nested RT-PCR により増幅して、塩基配列を解析した。アミノ酸置換にいたる変異箇所を同定した。

（倫理面への配慮）

動物実験については、医薬基盤研究所、京都大学ウイルス研究所および所属機関の動物実験委員会の審査をうけ、その承認を得てから開始した。組換え生物等については、第二種使用等拡散防止措置確認（大臣確認）および機関承認済みである。

C. 研究結果

感染後 5 週目および 12 週目のウイルスゲノム変異解析結果 (アミノ酸置換が認められた箇所のアミノ酸番号) を表 1 に示す。5 週目においては、3 個体とも、ワクチン抗原のうちの Gag あるいは Vif にアミノ酸置換を示した (平均 1.3 箇所/個体)。一方、それ以外の非ワクチン抗原 (Vpr・Tat・Rev・Nef) については、1 頭のみで 1 箇所 (Tat) のアミノ酸置換が認められるにとどまった (平均 0.3 箇所/個体)。12 週目においては、ワクチン抗原のアミノ酸置換箇所は 5 週目とほぼ同じであったが (平均 1.7 箇所/個体)、非ワクチン抗原については数多くのアミノ酸置換が加わっていた (平均 3.7 箇所/個体)。

D. 考察

感染後 5 週目のウイルスゲノムの解析では、ワクチン抗原をコードする領域に、それ以外の領域と比べてより多くのアミノ酸置換変異が認められた。この結果は、ウイルス曝露後に先行して誘導されるワクチン抗原特異的 CTL 反応のウイルス複製抑制圧を反映していると考えられる。一方、感染後 12 週目には、ワクチン抗原をコードする領域よりも非ワクチン抗原をコードする領域により多くのアミノ酸置換変異が認められた。この結果は、ウイルス曝露後に遅れて誘導された非ワクチン抗原特異的 CTL 反応のウイルス複製抑制圧を反映していると考えられる。以上のように、本研究の結果は、ウイルス曝露後、ワクチン抗原特異的 CTL 反応が非ワクチン抗原特異的 CTL 反応より先行することを反映するものである。

E. 結論

ワクチン抗原をコードする領域におけるアミノ酸置換変異の選択が、それ以外の抗原をコードする領域における変異の選択よりも先行することが明らかとなった。本研究の結果は、ウイルス曝露後、ワクチン抗原特異的 CTL 反応が非ワクチン抗原特異的 CTL 反応より先行することを反映するものであると考えられ、これらの CTL の

ウイルス複製抑制圧を示唆するものである。

F. 研究発表

1 論文発表

- (1) Takahara Y, Matsuoka S, Kuwano T, Tsukamoto T, Yamamoto H, Ishii H, Nakasone T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Sakawaki H, Horiike M, Miura T, Igarashi T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Dominant induction of vaccine antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses after simian immunodeficiency virus challenge. *Biochem Biophys Res Commun* 408:615-619, 2011.
- (2) Ishii H, Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Matsuoka S, Shiino T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Naruse TK, Kimura A, Takiguchi M, Matano T. Impact of vaccination on cytotoxic T lymphocyte immunodominance and cooperation against simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques. *J Virol* 86:738-745, 2012.
- (3) Seki S, Matano T. CTL escape and viral fitness in HIV/SIV infection. *Front Microbiol* 2:267, 2012.

2 学会発表

- (1) Nomura T, Iwamoto N, Inagaki N, Matsuoka S, Yamamoto H, Matano T. Dynamics of viral CTL escape mutations toward higher viral replicative ability in vivo. The 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention, Rome, Italy, 7/18/2011.
- (2) Nomura T, Yamamoto H, Shi S, Iwamoto N, Matano T. Analysis of viral genome sequences in SIV controllers. The XVth International Congress of Virology, Sapporo,

Japan, 9/13/2011.

- (3) Matano T. Post-challenge SIV-specific CTL responses in vaccinated macaques. Bridging the Sciences, the 25th Joint Meeting of the United States-Japan Cooperative Medical Science Program AIDS Panels, Atlanta, GA, 9/23/2011.

G. 知的財産権の出願・登録状況
無し。

	ワクチン抗原		非ワクチン抗原			
	Gag	Vif	Vpr	Tat	Rev	Nef
wk 5						
#1		143rd				
#2		143rd				
#3	165th, 375th			122nd		
wk 12						
#1	333rd	143rd		120th, 125th	45th, 50th	124th
#2		143rd		23rd, 122nd		
#3	165th, 376th		73rd	115th		63rd, 100th

表 1. DNA ワクチン接種サルにおける SIV 感染後のウイルスゲノム変異 (アミノ酸置換)
SIV Gag・Pol・Vif・Vpx を抗原とする DNA ワクチン接種後に SIVmac239 チャレンジを行ったアカゲサル 3 頭 (#1、#2、#3) の感染後 5 週目および 12 週目の血漿より RNA を抽出し、SIV の (Env を除く) 各抗原をコードする cDNA を増幅して、アミノ酸置換にいたる変異を同定した。置換のみられたアミノ酸の番号を示す。

慢性 HIV 感染における T 細胞疲弊シグナルと抗原提示に関する研究

研究分担者 横田 恭子 国立感染症研究所 免疫部 第一室長
研究協力者 大西 和夫 同上、主任研究官
研究協力者 山本 拓也 NIH ワクチン研究センター(VRC)

研究要旨：

慢性活性化に伴って発現する T 細胞疲弊化分子の機能を解析し、今後のワクチン開発に役立てるため、T 細胞に負のシグナルを与える 2B4、CD160 あるいは BTLA 分子発現細胞株を樹立し、それらの活性阻害抗体の確立を試みている。ヒト PBMC を *in vitro* で抗原刺激して長期に培養した T 細胞における活性化分子とこれら疲弊化分子の T 細胞分化に伴う発現パターンは大きく異なっていた。

A. 研究目的

慢性ウイルス感染時の持続的抗原刺激により活性化された T 細胞は疲弊し、それに関連する PD-1 等いくつかの分子を発現するが、詳細な機構は不明である。本研究では、T 細胞に負のシグナルを与える 2B4、CD160 あるいは BTLA (B- and T-lymphocyte attenuator)分子が抗原提示細胞と T 細胞の相互作用により誘導される機構とこれら分子を介する免疫抑制効果について解析する。

B. 研究方法

1) 細胞の調製と培養

健康人末梢血より PBMC を調整し、抗サイトメガロウイルス (CMV) 抗体陽性健康人 PBMC を CMV 感染細胞溶解液あるいは HLA(A24)拘束性 pp65 peptide で刺激して IL-2 添加培地で 2 週間培養した。あるいは HLA- A24 拘束性 CMV pp65 peptide (QYDPVAALF)で刺激して CD8 細胞を enrich した。培養には 2~5% human plasma/RPMI1640 を用い、抗原刺激後 3 日目より 40U/ml の IL-2 を添加して維持した。

2) 疲弊分子発現細胞株の樹立

ヒト CD160, BTLA (CD272), 2B4 およびサル 2B4 遺伝子を人工的に合成し、EF-1 α をプロモーターとして blastcidin 耐性遺伝子をコードするベクターに組み換えたプラスミド DNA を作製した。これらを CHO-S 細胞やマウス B 細胞株 A20.2J 細胞に Neon transfection system

(Invitrogen) で遺伝子導入し、それぞれの発現クローンを得た。

3) フローサイトメーター解析

サル PBMC は CD95⁻CD28⁺ naïve, CD95⁺CD28⁺ central memory (CM), CD95⁺CD28⁻ effector memory (EM)の 3 つの分画に分けて 2B4 の発現パターンを解析した (米国)。

ヒト PBMC の活性化と疲弊化マーカーの発現は FACSaria で解析した。T 細胞活性化マーカーとして HLA-DR と CD25、疲弊化マーカーとして CD160 と BTLA および 2B4 を組み合わせ細胞染色し、CD4、CD3、および CD8 でゲートをかけた。また、T 細胞は CD45RA の発現にもとづいて大きく naïve (CD45RA⁻)、と memory (CD45 RA⁺)に分類した。

健康人 PBMC の利用に関しては感染研医学研究倫理委員会で承認され、インフォームドコンセントを得て献血を実施している。免疫用マウスおよびサル PBMC の利用は各実験動物委員会の承認を受けた。

C. 研究結果

いわゆる疲弊分子群として知られる分子のうち、CD160 および BTLA(B- and T-lymphocyte attenuator)は HVEM (Herpes virus entry mediator) の同じ領域に結合して T 細胞あるいは NK 細胞に負のシグナルを伝達することが知られている。2B4 は活性化 CD8 陽性 T 細胞や NK 細胞に高発現し、多くのリンパ球、単球に発現する

CD48 に結合する。現存するこれら分子を認識する抗ヒト CD160, 2B4, BTLA 抗体は、サル分子に反応しないため、サル感染モデルにおけるこれら分子の発現または機能は不明である。我々はこれらの分子の発現パターンを明らかにし、それらの相互作用を阻害するマウスモノクローナル抗体を確立するため、サル 2B4、ヒト CD160、ヒト BTLA 発現 CHO-S 細胞とマウス B 細胞株を作製した。CHO-S 細胞トランスフェクタントをマウスに 3 回免疫しただけでは目的の抗原特異的な抗体があまり上昇しなかったため、マウス B 細胞株トランスフェクタントで追加免疫した。最初にサル 2B4 に反応すると思われる抗体を 1 クローン樹立した。サルの PBMC を染色して解析したところ、ヒトの 2B4 同様に naïve<CM<EM と発現が高くなっているものの、結合力が弱く、阻害実験には不適當であると判断した(図 1)。そのため、再度マウスへの免疫を開始して細胞融合し、現在スクリーニングを行っている。

まず細胞の疲弊化状態を *in vitro* で解析可能かどうかを確認するため、CMV 抗原特異的 *in vitro* stimulation の系で 2 週間以上培養した T 細胞での発現を解析した。CMV 感染細胞溶解液では CD4 陽性 T 細胞が主として増殖していた (CD4 は 71%、図 2A)。CD45RA 陽性細胞は残ってはいるが、CD25 (not shown) や HLA-DR の発現はなく、抗原刺激を受けなかった naive 細胞と考えられる。BTLA のみは naïve でも高発現していたが、2B4 は主として memory で発現し、CD160 陽性細胞はごくわずかであった。この培養系では CD4 も CD8 もこれら疲弊化分子の発現パターンに違いは認められなかった。

一方、同じドナー (HLA-A24 陽性) の PBMC を CMV A24-peptide で数回刺激して IL-2 存在下に長期培養した系では、ペプチド特異的な CD8 陽性細胞頻度が高くなっていた (CD8 は 60%、図 2B)。CD4 は全て CD45RA 陰性となっていたが、CD8 はほとんどが活性化マーカー (CD25 と HLA-DR) 陽性で CD45RA 陽性細胞も多く存在し、effector memory への分化誘導状態にあると考えられた。しかしながら BTLA や CD160 分子の発現様式は (A) と類似していた。

D. 考察

2B4 に関しては、サル PBMC では mRNA の発現を確認したものの、蛋白の発現は明らかではない。一方、CD160 や BTLA は CD4 陽性 T 細胞にも発現し、リガンドである HVEM は正と負のスイッチを伝達する。ヒト PBMC の *in vitro* 培養系において、これらの分子の発現パターンはいわゆる活性化マーカー (HLA-DR や CD25) とは異なっていた。詳細な解析を進めると同時に、これら分子の生物学的意義を明らかにするためには、更に *in vivo* の実験が必要となる。サルにも反応する、これら分子に対するモノクローナル抗体が確立できれば、米国と共同で PD-L1 blocking 抗体と併用あるいは単独で疲弊 T 細胞の免疫能を回復させる可能性について検討する予定であり、本研究の成果は今後のワクチン開発にも有用な知見が得られることが期待される。

E. 結論

慢性活性化に伴って発現する T 細胞疲弊化分子の機能を解析し、今後のワクチン開発に役立てるため、2B4、CD160、BTLA 分子発現細胞株を樹立し、マウスに免疫してそれらの活性阻害抗体の確立を試みている。ヒト PBMC を *in vitro* で抗原刺激して長期に培養した T 細胞における活性化分子とこれら疲弊化分子の T 細胞分化に伴う発現パターンは大きく異なっていることが明らかとなり、更に詳細な解析が必要である。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Terahara, K., Yamamoto, T., Mitsuki, Y-y, Shibusawa, K., Ishige, M., Mizukoshi, F., Kobayashi, K., and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Fluorescent reporter signals, EGFP and DsRed, encoded in HIV-1 facilitate the detection of productively infected cells and cell-associated viral replication levels. *Front. Microbiol.*, 2:1-11, 2012.
- 2) Fujii1, H, Ato, M., Takahashi, Y., Otake, K., Hashimoto, S-I., Kaji, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Fujita, M., Adachi, A., Nakayama, T., Taniguchi, M., Koyasu, S., and Takemori, T.: HIV-Nef impairs multiple T cell functions in antigen-specific immune response in mice. *Int. Immunol.*

23:433-441, 2011.

- 3) Salaun, B., Yamamoto, T., Bardran, B., Tsunetsugu-Yokota, Y., Roux, A., Baitsch, L., Rouas, R., Fayyad-Kazan, H., Baumgaertner, P., Devevre, E., Ramesh, A., Braun, M., Speiser, D., Autran, B., Martiat, P., Appay, V., and Romero, P.: Differentiation associated regulation of microRNA expression in vivo in human CD8⁺ T cell subsets. *J. Transl. Med.* 9:44-52, 2011.

2. 学会発表

- 1) Mitsuki, Y-y., Shibusawa, K., Terahara, K., Kobayashi, K., Moriakwa, Y., Takeda, M., Yanagi, Y., and Tsunetsugu-Yokota, Y.: HIV-1 infection enhances the susceptibility of T cells to measles virus infection by upregulating signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) expression. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress XV International Congress of Virology. Sapporo. September, 2011
- 2) Tsunetsugu-Yokota, Y.: HIV-1 transmission through immunological synapse and T-cell activation: How can we control virus replication? US-Japan AIDS Panel Meeting, Atlanta, USA, September 21-23, 2011
- 3) Tsunetsugu-Yokota, Y., Ishige, M., Mitsuki, Y-y., Shibusawa, K., Okada, S., and Terahara, K.:

Impact of selective infection and expansion of CCR5-utilizing HIV-1 in CD4⁺CXCR4^{high} CCR5⁺ memory T cells in humanized mouse model. 8th German-Japanese HIV-Symposium, Bochum, Germany, November 21-22, 2011.

- 4) 渋沢謙太郎、寺原和孝、石毛真行、光木裕也、横田（恒次）恭子。麻疹ウイルス偽型化 HIV-1 抑制性 shRNA 発現 レンチウイルスベクターのヒト化マウスにおける in vivo 評価。第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、12 月、東京
- 5) 石毛真行、寺原和孝、渋沢謙太郎、光木裕也、池野翔太、小林和夫、岡田誠治、横田（恒次）恭子。R5 および X4 HIV-1 同時感染ヒト化マウスモデルによる感染早期のウイルス優位性の解析。第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、12 月、東京

H. 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