

により誘導された抗ウイルス免疫からエスケープしたと推測される。このようなエスケープウイルスがcontrollerでは出現しなかったために感染制御が維持されている可能性も考えられる。そこで、これら3頭からウイルスを分離し、チャレンジウイルスに用いた(図2)。このウイルスストックには多種多様な変異ウイルスが存在することが確認されたことから、controller4頭と非感染ザル3頭に静脈内接種した。非感染ザルでは初期感染のピークは $10^9$  copies/ml、セットポイントは $10^7$  copies/ml前後を示した。チャレンジウイルスは非感染ザルにおいて、SIVmac239, SIVsmE543-3と比べ10-100倍高いウイルス感染を示した(図2)。ワクチン群3頭では、血中ウイルス量は検出限界以下であった。1頭では持続感染となったが、コントロール群と比べると顕著に低レベルであった。これらの結果は、糖鎖変異SIVワクチンは多様な変異ウイルスに対しても有効な感染防御免疫を誘導していることが明らかとなった。

### 慢性期における感染防御免疫

これまでSIV/HIV感染の制御にCD8+T細胞が重要な役割を担っていることが報告されている。そこでCD8+細胞の役割を調べるために、controllerへCD8抗体を投与し、CD8+細胞を一時的に消失させ、感染制御への影響を調べた。血中CD8+細胞の消失とともにウイルス感染が上昇し、CD8+細胞の回復とともに再びウイルス感染が制御された。すなわち、慢性感染の制御におけるCD8+細胞の重要な役割が明らかとなった。CTLの役割を調べるために、SIV peptidesを用いて末梢血中のSIV特異的CD8+細胞の頻度とウイルス感染との相関性について解析した。controller, non-controllerどちらの群にもSIV特異的CD8+細胞の頻度が高いサル、低いサルが存在し、ウイルス特異的CD8+T細胞の頻度と感染制御との相関は見られなかった。ところがIL-15あるいはIL-2による刺激によりCD107a(エフェクター機能)を発現するCD8+T細胞とNK細胞がcontrollerには高頻度に存在し、non-controllerでは少ないことが明らかとなった(図3A)。次に、エフェクター機能を確認するために、Granzyme-B, perforin, IFN- $\gamma$ , MIP-1 $\beta$ についても解析した。IL-15刺激によりCD107a発現細胞はこれらのエフェクター分子を発現していることが確認された。

末梢単核球のCD8+T細胞とNK細胞以外の免疫細胞についても、IL-15, ConA, SIV peptides刺激により誘導されるCD107a+細胞について解析した(図3B)。チャレンジ感染後18-20週

(non-controllerにおいて感染の再上昇が始まった時点)の末梢単核球を用い、DC/monocyte, CD4+T細胞, NK細胞, CD8+ T細胞, CD4+CD8+ T細胞における解析を行った。IL-15応答性細胞については、CD69+CD107a+細胞を測定した。CD8+T細胞>NK細胞の順で高頻度のCD107a+細胞が検出されたが、それ以外の細胞にもCD107a+細胞が誘導されていた。各免疫細胞におけるCD107a+細胞の頻度には個体差があったが、controllerはnon-controllerと比べ有意に多数のCD107a+細胞を誘導していた(図4A)。しかしながらMm0515においてはnon-controllerと同様に低レベルであった。この結果は、前述のチャレンジ感染実験における弱い感染抑制の結果と一致した。SIV peptides刺激においてもcontrollerはnon-controllerと比べ高頻度のCD107a+細胞が検出されたが、non-controllerの1頭Mm0304は高頻度のCD107a+CD8+T細胞を維持していた(図4B)。ConA刺激では、Mm0301を除くとcontrollerはnon-controllerと比べ有意に高頻度のCD107a+細胞を維持していた(図4D)。

2次リンパ組織は主要感染組織であることから感染制御にはエフェクター細胞が必要と考えられる。しかしCD69+CD107a細胞の多くはCCR7-であることから、CCR7+CD107a+細胞の解析を行った。IL-15反応性のCD69+CD107+細胞の結果とは異なり、DC/monocyteにおいて高頻度のCCR7+CD107a+細胞が検出された(図4E)。SIV peptide反応性細胞においては、DC/monocyte >CD4+T細胞の順でCCR7+CD107a+細胞の頻度が高かった(図4F)。以上の結果からcontrollerはnon-controllerと比べ高頻度のCD69+CD107+細胞、CCR7+CD107a+細胞を誘導していた。

### 初期感染期における感染防御免疫

前述のように、初期感染抑制の特徴は、1)非常に強力な感染抑制、2)MHC等の宿主多様性の影響が小さい、3)ウイルスの多様性である。これらの性質は中和抗体、CTLでは説明が容易ではない。この感染抑制が感染初期に限られることから、病原体の特徴を認識し誘導される自然免疫の関与が示唆された。感染抑制の原因として、感染標的細胞のウイルス感受性の低下あるいは感染標的細胞の減少が考えられた。この仮説を示唆する結果がウイルス特異的CD4+T細胞の解析から明らかとなった。末梢単核細胞中のウイルス特異的CD4+T細胞について解析を行ったところ、これらの細胞の頻度と感染制御との相関性はなかった(図4A)。ところがnon-controller 2頭において

ウイルス特異的CD4+T細胞が顕著に高いことが確認された。さらにウイルス特異的CD4+T細胞の増加は血中ウイルス量の上昇と一致した。この結果は、ウイルス特異的CD4+T細胞が感染の標的細胞となっていることを示唆した。Controllerにはこのような例は見られないことから、ウイルス特異的CD4+T細胞が感染標的細胞となっている、あるいは、その誘導が感染標的細胞の誘導と関連している可能性が示唆された。

初期感染後に糖鎖変異SIV感染は制御される。この機構として組織における感染標的細胞のレベルが重要なファクターとなっている可能性がある。糖鎖変異SIV ( $\Delta 5G$ ) 感染2週では血中ウイルス量はSIVmac239感染とほぼ同じであるが、慢性感染はまったく異なる(図4 B)。SIVmac239感染では、血中ウイルス量は、感染2週から2-3log低下後、持続感染となった。対照的に $\Delta 5G$ 感染では、20週後には検出限界以下となり10年以上感染は制御された。この違いの原因として、初期感染における感染組織、感染細胞の相違が推測された。そこで、初期感染におけるウイルス感染と感染による免疫組織の変化について解析を行った。SIVmac239の主要な感染組織は、リンパ節等の2次リンパ組織であったが、 $\Delta 5G$ の感染細胞はSIVmac239感染の数十分の1であった。 $\Delta 5G$ の主要な感染組織は小腸粘膜組織の固有層であった。さらにSIVmac239の標的細胞はTh1細胞(CXCR3+CCR5+CD4+T細胞)、 $\Delta 5G$ の標的細胞はTh17細胞(CCR6+CCR5+CD4+T細胞)であることが推測された。この結果は、糖鎖変異SIV感染による病原性SIV感染の抑制の機構について、糖鎖変異SIV感染では、病原性SIVの標的となるTh1細胞の誘導が低いことが初期感染後の感染抑制と関連している可能性が示唆された。

#### D. 考察

糖鎖変異SIV感染が誘導する感染抑制は、HIVワクチンに求められる防御免疫の条件を満たすという仮説に基づき研究を行っている。本年度は、多種多様な変異ウイルスにより構成されるウイルスストックを作成し、チャレンジ感染をSIVsmE543-3(サブタイプが異なるウイルス)と同様にほぼ検出限界以下に感染を抑制することを明らかにした。感染抑制ができなかった1頭(Mm0515)の結果は、ワクチンの条件を示唆する。この1頭は $\Delta 3G$ 感染、他の3頭は $\Delta 5G$ 感染であった。糖鎖の違いにより、Mm0515では低レベルのワクチンの持続感染が検出されていた。ワクチン感染の抑制が $\Delta 5G$ 感染より弱いことがチャレンジ感染抑

制と相関していることが推測される。この機構の解明が求められる。

##### 1) 慢性期の感染制御の機構

昨年度までに感染防御におけるCD8+細胞、CD8+T細胞とNK細胞の役割、IL-15刺激による誘導されるCD107a+ (エフェクター機能を発現する)細胞の頻度と感染防御との関連が明らかとなっていた。本年度の研究から、perforin, granzyme Bの発現が確認されたことから、CD8+T細胞、NK細胞の細胞傷害性機能が感染防御と関連することが示された。次にエフェクター細胞の性質としてeffector memory細胞の性質、消化管粘膜組織等のエフェクター部位へのhomingを示し、CCR7+細胞の割合が高いことが確認された。しかしながらSIV/HIVのもう一つの感染組織は2次リンパ組織である。このことは、CCR7+細胞、すなわち2次リンパ組織にhomingされるエフェクター細胞が感染防御には必須である。そこで本年度は、末梢単核球に含まれる免疫細胞を網羅的に解析を行った。これまで行ったCD8+T細胞、NK細胞の解析に加え、あらたにCD4+T細胞、CD4+CD8+T細胞、DC細胞/monocyteについてCD107a+細胞の解析を行った。その結果、IL-15応答性細胞とSIV 応答性細胞がそれぞれ存在することが明らかとなった。SIV応答性細胞は、DC細胞/monocyteにも存在した。この細胞はCCR7+性質を示すことから、2次リンパ組織での感染制御における役割が示唆される。

##### 2) 初期感染期に誘導される防御免疫

MHC 多様性、ウイルス多様性に影響されない性質から感染初期の防御免疫における自然免疫の関与が推測されていた。本年度は、non-controllerでのSIV特異的CD4+T細胞の誘導とウイルス感染の上昇の一致から感染標的細胞の制限がウイルス感染の制御に働いている可能性が示された。この仮説はSIVmac239と糖鎖変異SIVの初期感染の感染組織、感染細胞の解析結果からも裏付けられた。SIVmac239はTh1細胞を、糖鎖変異SIVはTh17細胞を感染標的細胞とすることが初期感染の解析から明らかとなった。これらの結果から浮かび上がったシナリオは、病原性SIV/HIVはTh1細胞を誘導することにより持続感染しているのではないかということである。それが正しいとすると糖鎖変異SIV感染によりTh1細胞の誘導を抑制する宿主応答が起こっている可能性が推測される。今後の研究が求められる。

#### E. 結論

糖鎖変異SIV感染が誘導する防御免疫についてHIVワクチン研究への波及効果が期待される結果が得られた。まず多様な変異ウイルスに対する高

い感染抑制効果が確認された。次に防御免疫に関し、慢性感染期の感染制御に働く CD8+細胞依存性のエフェクター細胞について IL-15 応答性に加え得、SIV 特異性について新たな知見が得られた。HIV 感染防御に最も重要と考えられる初期感染期の防御免疫については、感染標的細胞供給が新たな課題となった。これらの課題の解明が HIV ワクチン・治療法の開発研究の飛躍的推進に繋がると思われる。

#### F. 健康危険情報

特に該当する情報はなかった

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Kaoru Takeuchi, Noriyo Nagata, Sei-ich Kato, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Tadaki Suzuki, Yuko Sato, Yasuko Tsunetsugu-Yokota, Kazuyasu Mori, Nguyen Van Nguyen, Hideki Kimura and Kyosuke Nagata. Wild-type measles virus with the hemagglutinin protein of the Edmonston vaccine strain retains wild-type tropism in macaques. *J. Virol.* In press.
2. Taeko K. Naruse, Yukiko Okuda, Kazuyasu Mori, Hirofumi Akari, Tetsuro Matano, Akinori Kimura. ULBP4/RAET1E is highly polymorphic in the Old World monkey. *Immunogenetics*. **63**: 501, 2011.

##### 学会発表

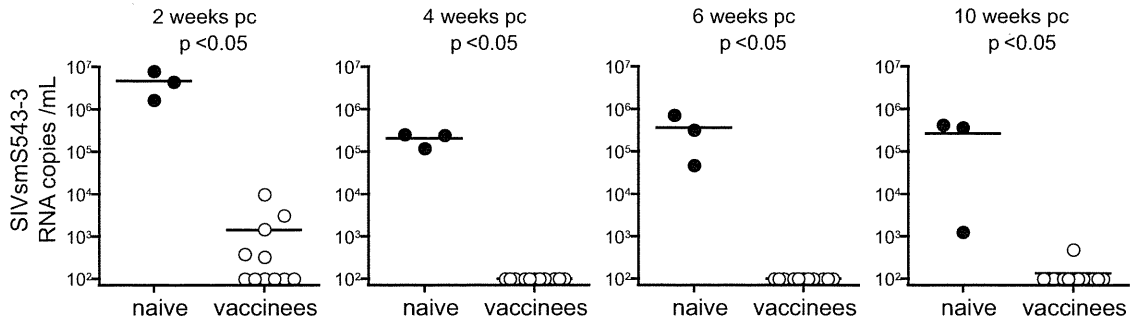
1. Kazuyasu Mori, Hirotaka Sato, Yohei Saito, Nursarat Ahmed, and Chie Sugimoto. Potent protective response against highly diverse and pathogenic SIV elicited with deglycosylated SIV vaccine wanes due to strict containment of SIV infection. 29th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS. October 2011, Seattle, USA.
2. 低病原性糖鎖修飾変異 SIV の初期感染、生ワクチン感作ザルに誘導される宿主遺伝子発現の解析 森一泰、佐藤洋隆、Nursarat Ahmed、武田哲、宇田昌彦、永井美之、日本エイズ学会、2011年、東京
3. 高い多様性と高病原性を示す SIV に対する感染防御に有効な防御免疫 Nursarat Ahmed、齋藤陽平、渡辺哲、山本直樹、永井美之、森一泰 日本エイズ学会、2011年、東京

##### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案特許 該当なし
3. その他 該当なし

図1. 糖鎖変異SIV感染により誘導される感染防御

**Acute-phase**



**Chronic-phase**

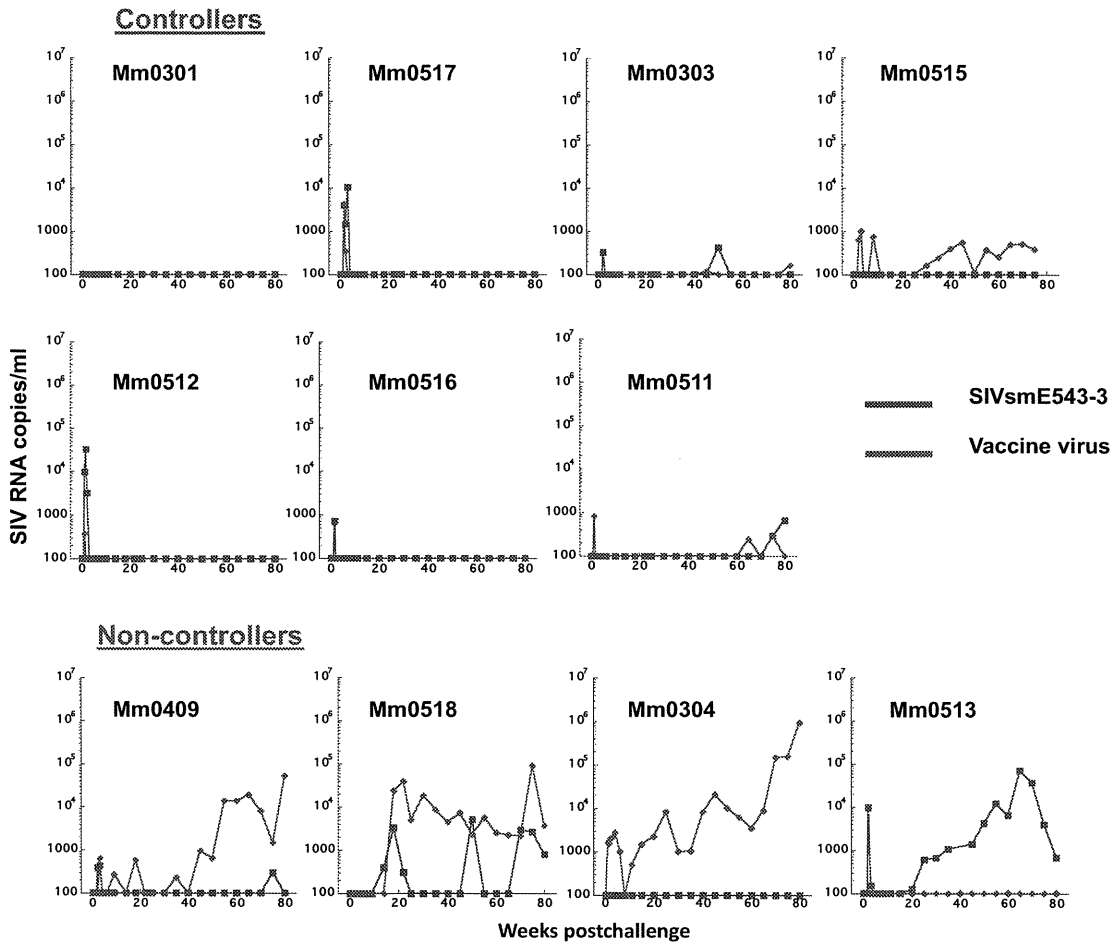




図4. 慢性期における感染防御 (18-20 weeks pc)

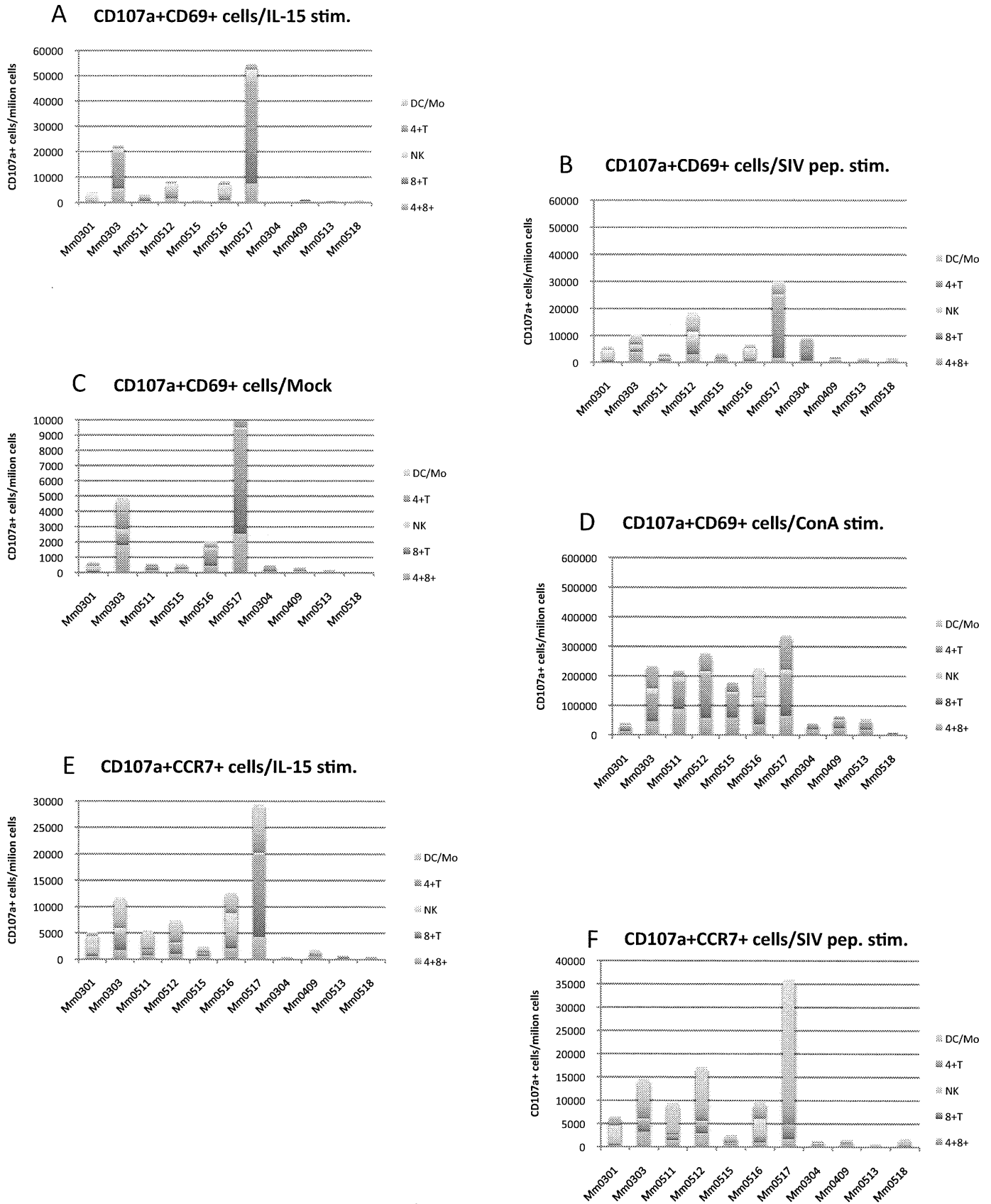
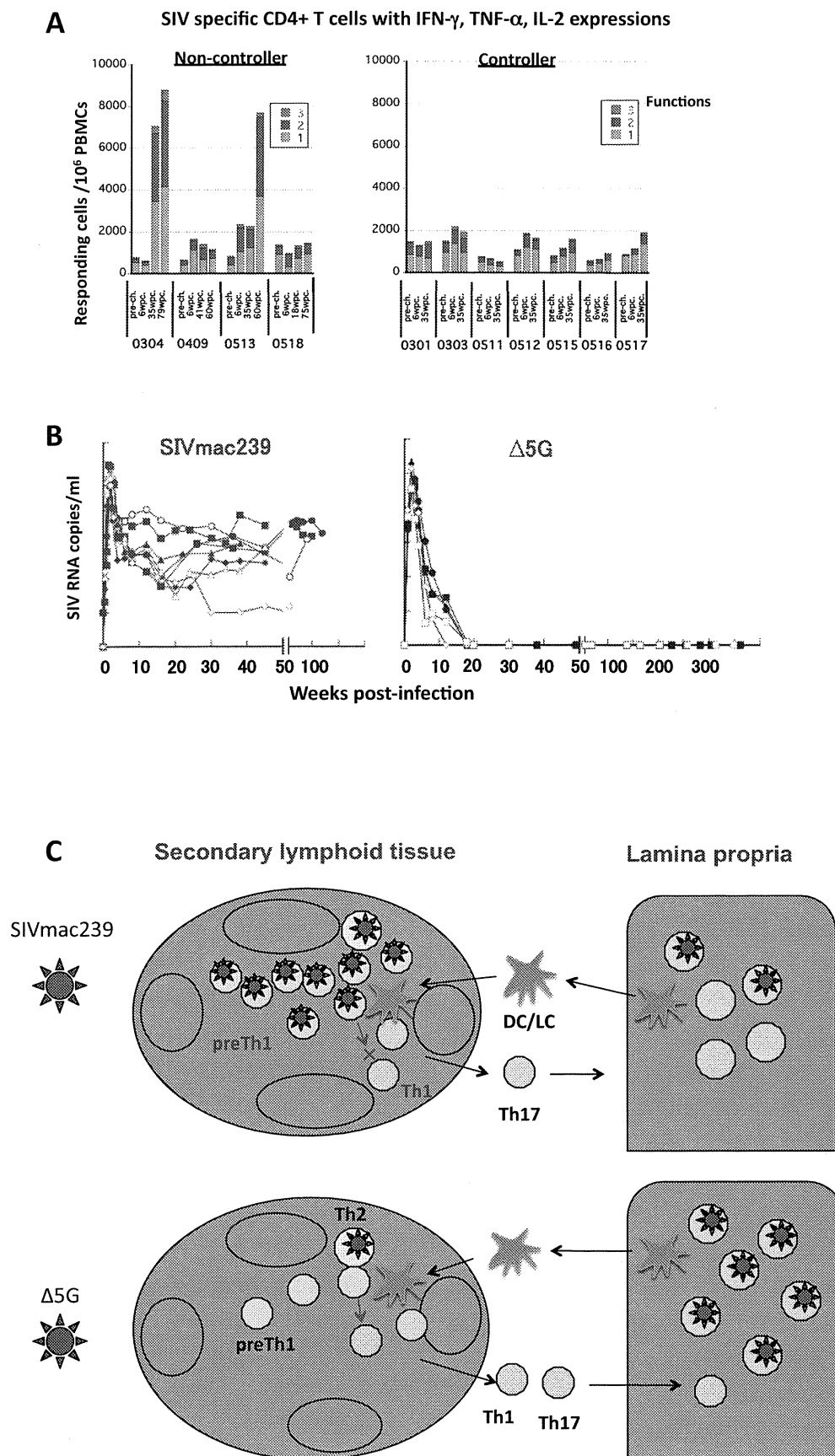


図4. 初期感染における感染防御



## 組換え BCG を用いたプライムブーストエイズワクチンの開発

分担研究者 松尾和浩 日本ビーシージー製造(株) 日本 BCG 研究所 研究第一部長

**研究要旨** 人の結核ワクチンとして広く用いられている BCG ワクチンは、安全かつ低価格で供給できることや新生児にも接種できるなど、実用面での有用な性質を有する。さらに菌体細胞壁成分によるアジュバント作用や強力かつ持続的な Th1 型細胞性免疫誘導能を持つことから、エイズワクチンへの応用が期待されている。昨年度構築した、コドン至適化 SIV Gag、Env gp120 及び Rev-Tat-Nef 融合蛋白質それぞれを発現する BCG 株 3 種のカクテルでプライミングし、同じ遺伝子を発現する組換えワクシニアウイルス LC16m8Δ株でブーストするワクチンの感染防御能を、インド産アカゲザルで評価した。免疫群 2 頭中 1 頭で、SIVmac 251 の低用量頻回チャレンジを完全に防御し、このレジメンの有用性が示唆された。また HIV-1 Env を安定に発現する BCG 株と弱毒ワクシニアのプライムブースト法による、Env 特異的な液性および細胞性免疫をマウスで評価し、細胞性免疫のプライミング活性を確認したが、抗体産生への BCG プライミングのポジティブな効果は顕著ではなかった。実用化に向けて用量の低減化を目指した、BCG ベクターのさらなる免疫原性増強が重要な課題である。

### A. 研究目的

現在のエイズ予防ワクチン研究には、大きく分けて 2 つの方向性がある。2009 年に発表されたタイでの第三相臨床試験（組換えカナリーボックス + gp120 プライムブーストワクチン）の結果を受けて抗体産生を目指すものと、Rouis Picker らのサイトメガロウイルスワクチンによる、サルでの SIVmac 感染制御の結果を基に、ベクターワクチンによる細胞性免疫誘導型ワクチン開発を目指すものの 2 つである。我々が開発中の BCG ベクターをベースにしたワクチンは、後者にあたるが、Env に対する抗体産生誘導能についても、有効性を動物実験で確かめる必要があると考えている。今年度は、前年度に広範な CTL epitope に対する細胞性免疫誘導を期待して構築した、コドン至適化 rBCG-SIVgag、SIV Env gp120 及び Rev-Tat-Nef 融合蛋白質を発現する BCG でプライミングし、同じ遺伝子を発現する組換えワクシニアウイルス LC16m8Δ株でブーストするワクチンレジメンの、インド産アカゲザルでの SIVmac 感染防御能評価を、北大遺制研、京大ウイルス研と共同で行なうことを第一の目的とした。

第二に、昨年度得た安定に Env gp120 を発現する組換え BCG の、液性及び細胞性免疫のプライミング能をマウスで確認することを目的とした。

第三に、実用化にはさらに BCG ベクターの免

疫原性の増強が要求されることから、BCG ベクターのポテンシャルを向上させる試みを行なうこととした。具体的には、BCG はウレアーゼを産生するために、食食されたマクロファージ細胞内で尿素からアンモニアを生成し、ファゴゾームの pH 環境を中性ないしアルカリ性に保つ。それによりライソゾームとの融合を阻止し、宿主細胞内で生存する。ウレアーゼ欠損により BCG が分解されやすくなり、発現した組換え蛋白質が免疫系に到達しやすくなることが期待されるので、ウレアーゼ欠損 BCG 東京変異株に SIV Gag を発現させ、親株を用いた場合よりも、Gag 特異的細胞性免疫が増強されるかどうかを調べた。

### B. 研究方法

(1) SIV 遺伝子組換え BCG-組換えワクシニアプライムブーストワクチンの感染防御能評価  
インド産アカゲザルへの免疫および SIVmac 251 チャレンジ実験のスケジュールを図 1 に示す。

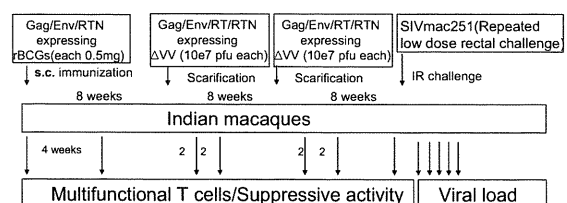


図 1 アカゲザルでのワクチン接種及び SIV 攻撃接種スケジュール



2 頭のサルに 3 種の組換え BCG (rBCG-SIVgag-opt, rBCG-SIV gp120, rBCG-SIV RevTatNef)をそれぞれ 0.5 mg ずつ混合し、皮下接種した。その 8 週後、16 週後に、SIV gag, env (gp160), reverse transcriptase, rev-tat-nef を発現する組換えワクシニアウイルス LC16m8Δ株 4 種を、それぞれ  $10^7$  pfu ずつ混合して scarification 法により接種した。2 回目のブーストの 8 週後に、SIVmac 251, 300 TCID50 を 1 週おきに 5 回、経直腸投与し、その後定期的に血漿中のウイルス量をリアルタイム PCR 法により定量した(京都大学ウイルス研究所と共同)。

(2) Env 安定発現型組換え BCG のマウスにおける液性及び細胞性免疫プライミング能の解析

6-8 週齢の Balb/c マウスに、Env gp120 発現型組換え BCG, 0.5 mg を皮下接種し、5 週及び 8 週後に Env 発現組換えワクシニアウイルス DIs,  $10^7$  pfu を皮下接種した。2 回目のブーストの 1 週後にマウスを解剖し、末梢血および脾細胞を用いて、V3 特異的 MHC pentamer 反応性の細胞をフローサイトメトリーにより解析した。また末梢血から血清を分離し HIV-1 Env gp140 抗原を用いた ELISA 法により、抗 Env 抗体価を測定した(国立感染症研究所との共同)。

(3)ウレアーゼ欠損 BCG への遺伝子導入、SIV Gag 抗原発現とマウスでの免疫原性の解析

ウレアーゼ欠損 BCG 東京株 (BCGΔUT) は、国立感染症研究所ハンセン病研究センターの向井徹博士より分与いただいた。既に報告したコドン至適化 SIV Gag 発現ベクターを BCGΔUT に電気穿孔法で導入し、既報と同様にウエスタンブロット法によるスクリーニングにより、SIV Gag 発現株を得た (rBCGΔUT-SIVgag-opt)。C57BL/6 マウスを、以前に用いた rBCG-SIVgag-opt と今回構築した rBCG それぞれで免疫し、2 週後の脾細胞を用いて、SIV Gag p27 及び AL11 CTL エピトープペプチド刺激による ELISPOT 法により、IFN- $\gamma$  産生細胞を測定した(医薬基盤研究所霊長類医学研究センターとの共同)。

(4) 倫理面への配慮

遺伝子組換え体の第二種使用における拡散防止措置については、国立感染症研究所及び医薬基

盤研究所の機関承認済みである。マウス実験は、国立感染症研究所動物実験実施規定及び医薬基盤研究所動物実験実施規程に従って行った。

## C. 研究結果

(1) SIV 遺伝子組換え BCG-組換えワクシニアプライムブーストワクチンの感染防御能評価

免疫群 2 頭 (MM547, MM549)、非免疫群 2 頭 (MM551, MM555) の SIVmac 251 チャレンジ後の血漿中ウイルス量の経時変化を図 2 に示す。免疫群の 1 頭 (MM549) で観察期間中、全くウイルスが検出されなかった。このサルの CD8 陽性 T 細胞は、ウイルスチャレンジ前の *in vitro* SIV suppression assay において、強力なウイルス産生抑制効果を有していたこと、SIVmac に対する中和抗体は検出できなかったことから (data not shown)、SIV 特異的細胞性免疫により、SIV 感染を完璧にブロックできたものと考えられる。免疫群のあと 1 頭 (MM547) も、感染はしたものの set point でのウイルス量は、コントロールの 2 頭と比較して顕著に抑制されていた。この結果は、BCG/増殖型ワクシニアのプライムブーストワクチンコンセプトが、SIV 感染防御に有効であることを示唆するものである。

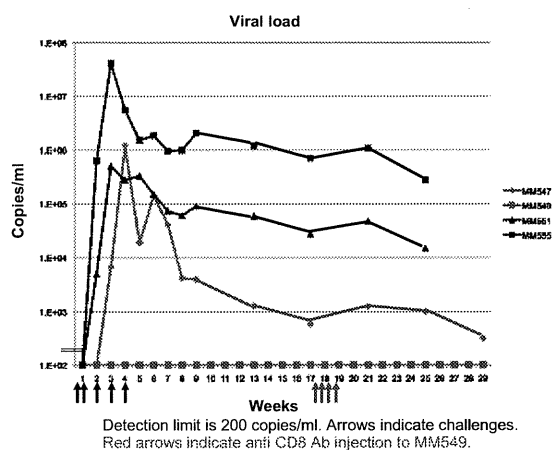


図 2 免疫及び非免疫アカゲザルでの SIVmac 251 チャレンジ後の血漿中ウイルス量の推移

これまでに行なった BCG/ワクシニアプライムブーストワクチンによるサルでの感染防御実験をまとめたものが表 1 である。野生型 SIV Gag 発現 BCG では、たとえブースターに増殖型ワクシニア (LC16m8Δ) を用いて強化しても SIV 感染防御効果は得られず、逆にコドン至適化で抗原発現を増強した BCG をプライミングに用いれば、ブ

ースターに用いるワクシニアが非増殖型の弱いウイルス (DIs) であっても、何らかの防御効果が得られる傾向が見て取れる。

表1 これまでに行なったサルでの感染防御実験のまとめ

Priming	Boosting	Challenge	Macaque	Results
rBCG-SIVgag (10 mg x 1)	rDis-SIVgag (10 <sup>6</sup> pfu x 2)	SHIV C2/1	Cynomolgus	2/3頭: set pointで検出限界以下
rBCG-SIVgag-opt (0.1 mg x 1)	rDis-SIVgag (10 <sup>7</sup> pfu x 2)	SIV <sub>mac</sub> 239 (high dose)	Cynomolgus	2/3頭: 抑制効果弱い 3年後のrecall response
rBCG-SIVgag (0.1 mg x 2)	rLC16m8Δ-SIVgag (10 <sup>7</sup> pfu x 2)	SIV <sub>mac</sub> 251 (high dose)	Indian rhesus	2頭: 防御効果なし
rBCG-SIVgag-opt rBCG-SIVenv rBCG-SIV RTN (0.5 mg each x 1)	rLC16m8Δ-SIVgag rLC16m8Δ-SIVenv rLC16m8Δ-SIV RTN repeated rLC16m8Δ-SIV RT (10 <sup>7</sup> pfu each x 2)	SIV <sub>mac</sub> 251 (low dose, repeated)	Indian rhesus	1/2頭: 完全に感染防御 要サル頭数増

## (2) Env 安定発現型組換え BCG のマウスにおける液性及び細胞性免疫プライミング能の解析

昨年度に構築した、抗酸菌の *blaF* または *blaC* のシグナル配列に HIV-1 *env gp120* 遺伝子を繋いで、分泌はできなかったものの安定に Env 抗原を発現できる2種の組換え BCG の免疫誘導能をマウスで解析した。実験スケジュールを図3に、MHC ペンタマーアッセイによる細胞性免疫解析の結果を図4に示す。Env 発現型組換え BCG のプライミングにより、ワクシニアブースト後の Env 特異的な細胞性免疫 (CD8 陽性 T 細胞) の増強効果が観察された (図4)。

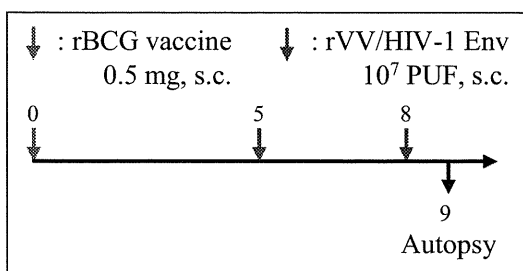


図3 BCG/ワクシニア DIs-Env プライムブーストワクチンの免疫スケジュール

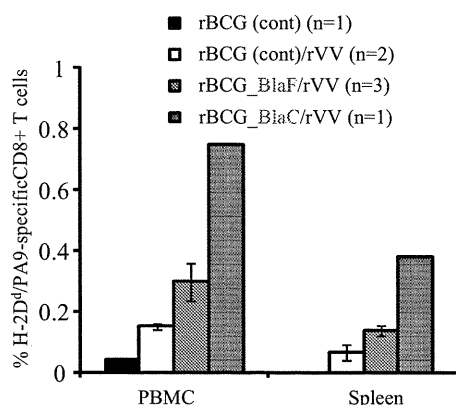


図4 免疫マウス末梢血及び脾細胞を用いた Env V3 特異的 MHC ペンタマーアッセイ

一方抗体産生誘導について、Env gp140 抗原を用いた ELISA 法で調べた結果を、図5に示す。Env 発現 BCG でプライミングした群と、コントロールの BCG でプライミングした群で、ワクシニアブースト後の抗 Env 抗体に有意な差は認められず、組換え BCG プライミングの有効性は証明できなかった。

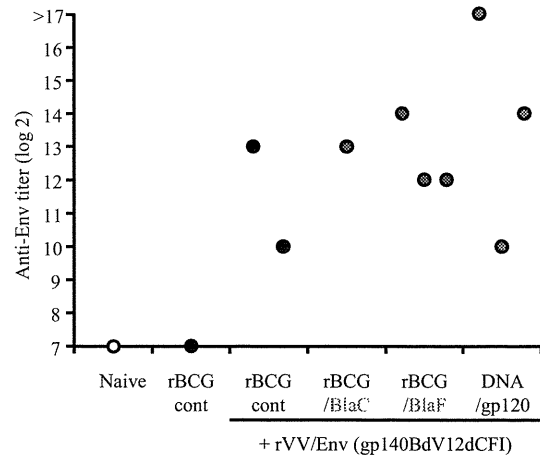


図5 免疫マウス血清中の抗 Env 抗体価の測定

## (3) ウレアーゼ欠損 BCG での SIV Gag 抗原発現とマウスでの免疫原性評価

コドン至適化 SIV Gag 発現ベクターを、ウレアーゼ欠損 BCG 東京株に導入し、高発現株を構築した。予備的なマウス免疫実験の結果、SIV Gag p27 刺激により検出される IFN- $\gamma$ 産生細胞数が、rBCG-SIVgag-opt よりも rBCG $\Delta$ UT-SIVgag-opt で免疫したマウスで多い傾向が認められた (data not shown)。

## D. 考察

SIV Env gp120, Rev-Tat-Nef およびコドン至適化 Gag 発現の3種の組換え BCG 株をカクテルにしてプライミングし、同じ抗原を発現する組換えワクシニア LC16m8 $\Delta$ 株を2回ブースしたインド産アカゲサル1頭で、SIV<sub>mac</sub> 251 の経粘膜低用量頻回チャレンジを完璧にブロックした。さらにサルの頭数を増やして実験を行なう必要があるが、本候補ワクチンによる SIV 特異的細胞性免疫により、サルエイズモデルでの感染防御が可能であることがわかり、コンセプトの有用性を証明することができた。実用化には、さらに組換え BCG の用量を低減化することが必要である。そのための方策として、ウレアーゼ欠損 BCG を用いることを

試みている。予備検討では、通常の BCG を用いるよりも、Gag 特異的免疫応答がやや増強されており、ワクシニアブーストによって、この差はより顕著になるものと思われる。

一方、Env に対する抗体産生も、現在のエイズワクチン開発の重要なテーマであるが、マウスにおいて、BCG ベクターのプライミングによる抗体産生の増強効果は顕著ではなかった。現時点では Env 抗原の菌体外への分泌が難しい状況であり、細胞内寄生性細菌である BCG は、他のウイルスベクターよりも抗体産生という観点からは不利であると言わざるを得ない。

## E. 結論

組換え BCG と組換えワクシニアウイルス LC16m8Δ株のプライムブーストワクチンにより、インド産アカゲザルでの SIVmac 低用量経粘膜頻回チャレンジによる感染を完璧に防御できることを明らかにした。抗体産生増強効果は限定的であるものの、細胞性免疫による感染防御能への BCG ベクターによるプライミングの効果は顕著であり、BCG ベクターのさらなる免疫原性増強が、本レジメン実用化への極めて重要な課題である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) Matsuo K, and Yasutomi Y. *Mycobacterium bovis* bacilli Calmette-Guerin vector for global infectious disease control. *Tuberculosis Research and Treatment* 2011: Article ID 574591, 2011

### 2. 学会発表

(1) Kanekiyo M, Ami Y, Matsuo K, Someya K, Yamamoto N, and Honda M. A low dose immunization of codon-optimized recombinant BCG confers long-lasting SIV-specific memory T cells after recombinant vaccinia boost in macaques. *AIDS Vaccine* 2011, September 12-15, 2011, Bangkok, Thailand

(2) Okamura T, Shimizu Y, Matsuo K, and Yasutomi Y. Adjuvant molecule Ag85B cDNA insertion into live attenuated simian-human immunodeficiency virus enhances the SHIV-specific immune responses in cynomolgus monkeys. *IUMS* 2011, September 11-15, 2011, Sapporo, Japan

(3) 張 險峰、五十嵐樹彦、松尾和浩、堀端重男、横溝香里、三浦智行、大橋 貴、山本直樹、志田壽利. 高病原性 SIV に対する組換え BCG と弱毒ワクシニア(m8Δ)エイズワクチンの防御効果. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会, 2011年、東京

### 3. 書籍

(1) Matsuo K and Ami Y. BCG as a vector for HIV/AIDS vaccine. *BCG Vaccine and Adjuvant*, pp124-141. Edited by T. Takii, J. Maeyama and S. Yamamoto. Japan Anti-Tuberculosis Association, 2011

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許出願

松尾和浩、水野 悟、川原 守、保富康宏、渡邊健太. 新規な組換え BCG ワクチン. 特願 2011-199422

弱毒ワクシニアベクターによるエイズワクチン開発

分担研究者 志田壽利 北海道大学遺伝子病制御研究所

研究要旨 HIV-1 特異的細胞性と液性の両免疫を効率よく誘導する免疫法として m8Δenv prime/SeVenv boost 法を確立した。さらに、hCD40Lm を priming 時に発現させることによって、両免疫を増強できることを見いだした。

### A 研究目的

HIV に対するワクチン用のベクターとして、増殖するがまだ安全なワクシニア株は、格段に強い抗 HIV 免疫を誘導する為のベクターとなりうる。以前に、我々は日本の種痘株として 10 万人に接種され、重篤な副作用の報告がなかった LC16m8 株を改良し、より安全な LC16m8Δ株を作成した。本株は世界中で頻用されている MVA 株より約 1000 倍強い抗強毒ワクシニア抵抗力を付与した。そこで、本株をベクターとして HIV/SIV の種々のコンポーネントを発現する組換えウイルスを作製して免疫原性と感染制御能を検討している。

有効な抗 HIV-1 ワクチンとして抗体と細胞性免疫の両方を誘導することが望ましい。そこで、昨年度その方法として HIV-1 nev 発現 m8Δプライム、センダイウイルス(SeV)ベクターブーストの共免疫法を試み、両免疫を効率よく誘導できることを認めた。今年度は、その研究を引き続き、さらに詳細な解析をおこない、免疫活性化因子 CD40Lm の免疫増強効果を調べた。

### B 研究方法

#### 組換えワクシニア株:

m8ΔHIVenv(JR-CSF); m8Δ株の HA 遺伝子内に pSFJ1-10 プロモーターを組み込み、その下流に HIVenv を発現する。

m8Δ-p7.5-hCD40Lm:m8Δ株の HA 遺伝子内に p7.5 プロモーターと hCD40Lm を挿入。

m8Δenv(JR-CSF)/hCD40Lm: m8Δ株の HA 遺伝子内に pSFJ1-10-env と p7.5-hCD40Lm を挿入

SeV-env(JRCSF):JRCSF 株の gp160 を発現する非増殖型センダイウイルスベクター (ディナベック社より供与)

蛋白質の検出: 各種組換えウイルスに発現する蛋白質は、RK13 又は 293T 細胞に moi3 で感染させて、24 時間後に各種抗体、血清を用いた Western blotting によって検出した。

#### マウスのワクチネーション:

1x10<sup>7</sup> PFU の組換え m8Δを乱刮法で接種し、8 週後に 4x10<sup>7</sup> CFU SeV-env を経鼻接種した。

Intracellular cytokine assay (ICS): 最終免疫 2 週後に、免疫マウスの脾臓細胞を HIV gp160 の 15mer

overlapping peptide library とともに培養し、抗 CD4/CD8/IFN-γ/CD107a 抗体で標識後 FACScalibur を用いて分析した。

#### 抗 Env 結合抗体の測定:

ELISA:pCAGGS-env(JRCSF) を transfection した 293T 細胞を detergent で溶解し、96 well ELISA plate に加えて保温した。洗浄と blocking 後、免疫マウス血清を段階希釈後に加え、さらに HRP 標識-抗マウス IgG 抗体を反応させた。発色後、OD495 で吸光度を測定した。OD0.5 を示す希釈倍数を抗体価とした。対照として空の pCAGGS を transfection した 293T 細胞を用いた。

#### 抗 Env 結合抗体の affinity の測定:

上記 ELISA plate 上で抗体を反応させた後で、1-9M の尿素溶液で plate を洗い、付着している抗体量を上記のように測定した。尿素洗浄前の OD 値との比を affinity の目安とした。

### C 研究成果

#### M8Δ prime/SeV boost スケジュールにおける細胞性免疫誘導:

HIV-1 に対する細胞性免疫と抗体の両方を誘導できる免疫法を開発する為、HIV-1 Env 発現 m8Δ と SeV ベクターを prime/boost して検討した。m8Δ は乱刮法、SeV は経鼻接種した。Prime の時に m8Δenv と m8Δ-p7.5-hCD40Lm の混合、env と hCD40Lm 共発現 m8Δ(m8Δenv/hCD40Lm)を用いて CD40Lm の効果を検討した。図 1 に示すように、本免疫法は CD40Lm の発現のない場合でも全 CD8+T 細胞中の 6.5% に及ぶ Env 特異的 IFN-γ 産

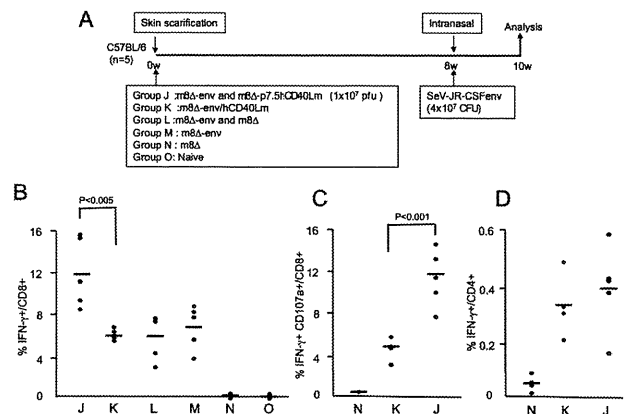


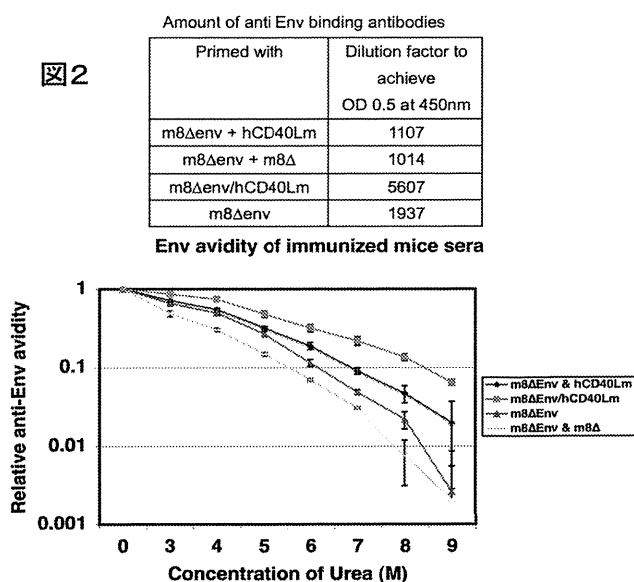
図 1

生 CD8+ T 細胞を誘導した。m8Δenv と m8Δ-p7.5-hCD40Lm を混合した場合は 12% の IFN-γ 産生 CD8+ T 細胞が誘導された。このほとんどが IFN-γ と CD107a double positive の細胞であった。m8Δenv/hCD40Lm で prime した場合は m8Δenv と同程度の IFN-γ 産生 CD8+ T 細胞が誘導された (図 1)。

M8Δ prime/SeV boost スケジュールにおける抗体誘導 :

抗 Env 抗体価を gp160 ELISA 法で測定した。M8Δenv 単独で prime し、SeV boost の免疫で高い抗 Env 抗体が誘導された。m8Δenv と

図 2



m8Δ-p7.5-hCD40Lm を混合した場合は抗 Env 抗体量を増加させなかったが抗体の affinity を増加させた。m8Δenv/hCD40Lm で prime した場合は高い affinity の抗 Env 抗体を数倍効率よく誘導した (図 2)。

#### D 考察

細胞性と液性免疫の両方の免疫を誘導する為に、m8Δenv prime/SeVenv boost でマウスを免疫し、詳細な解析を行った。そして、Env 特異的 IFN-γ/CD107a 産生 CD8+ T 細胞と抗 Env 抗体を効率よく誘導することを確認した。さらに、CD40Lm を priming 時に発現させることによってさらに効率よく免疫を誘導できることが分った。CD40Lm を Env と別のワクシニアで発現させると細胞性免疫と抗体の affinity を増強したのに対し、同じワクシニアによって共発現させると細胞性免疫の増強は見られなかったが抗体誘導の大幅な増強が見られた。同一の細胞表面で Env と CD40Lm が存在する場合と、別の細胞で発現している場合で免疫刺激が異なることは興味深い。

#### E 結論

HIV-1 特異的細胞性と液性の両免疫を効率よく誘導する免疫法として m8Δenv prime/SeVenv boost 法を確立した。さらに、hCD40Lm を priming 時に発現させることによって、両免疫を増強できることを見いだした。

#### F 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Fofana IB, Colantonio AD, Reeves RK, Connole MA, Gillis JM, Hall LR, Sato S, Audin CR, Evans DT, Shida H, Johnson RP, Johnson WE (2011): Flow cytometry based identification of simian immunodeficiency virus Env-specific B lymphocytes. *J Immunol Methods*. 370:75-85
- (2) Mina Hikichi, Minoru Kidokoro, Takeshi Haraguchi, Hideo Iba, Hisatoshi Shida, Hideaki Tahara, Takafumi Nakamura (2011): MicroRNA Regulation of Glycoprotein B5R in Oncolytic Vaccinia Virus Reduces Viral Pathogenicity without Impairing its Antitumor Efficacy. *Mol. Ther.* 19:1107-15
- (3) Mika Nagai-Fukataki, Takashi Ohashi, Iwao Hashimoto, Tominori Kimura, Yoshiyuki Hakata, Hisatoshi Shida (2011): Nuclear and Cytoplasmic Effects of Human CRM1 on HIV-1 Production in Rat Cells. *Genes to Cells* 16:203-216.

##### 2. 学会発表

1. 宮崎かや、張陰峰、大橋貴、志田壽利：ラット T 細胞への HIV-1 感染における CSA,As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> の増強効果 第 25 回日本エイズ第学会学術総会 平成 23 年 11 月 ハイアットリージェンシー東京 東京
2. 張陰峰、五十嵐樹彦、松尾和浩、堀端重男、横溝香里、三浦智行、大橋貴、山本直樹、志田壽利：抗病原性 SIV に対する組換え BCG と弱毒ワクシニア(m8Δ)エイズワクチンの防御効果 第 25 回日本エイズ第学会学術総会 平成 23 年 11 月 ハイアットリージェンシー東京 東京
3. H. Shida: Immunogenicity of LC16m8Δ Vaccinia Virus/Sendai Virus Vector Expressing the gp160 of HIV-1 and Effect of CD40Lm AIDS VCCINE 2011 September 2011 Bangkok Thailand
4. Tomoyoshi Sobue, Shun-Ichi Makino, Xianfeng Zhang, Takashi Ohashi, Kazunori Kato, Tatsuo Shioda, Nakoto Inoue, Mamoru Hasegawa, Hisatoshi Shida: Immunogenicity of Lc16M8Δ Vaccinia Prime/Sendai Virus Vector Boost Targeting the Envelope Glycoprotein of HIV-1 and Contribution of CD40Lm. September 2011, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan.

5. Xianfeng Zhang, Tomoyoshi Sobue, Hisatoshi Shida: Enhancement of CD40Lm on Vaccine Elicited Anti-HIV-1 Immunity. July 2011, 6<sup>th</sup> IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. Rome, Italy.

**G** 知的所有権の取得状況  
無し

汎 HIV-1 株中和能を有する抗体誘導に関する研究

分担研究者 駒野 淳 国立感染症研究所 エイズ研究センター 主任研究官

**研究要旨** 汎 HIV-1 株中和能を持つ液性免疫を獲得したヒト HIV-1 感染者の存在と病期進行遅延に貢献する責任モノクローナル抗体の解析は液性免疫誘導型エイズワクチンの可能性に大きな期待を与える。本研究は中和抗体クローンから得られるワクチン抗原 gp120 の構造的特性に関する解析を推進し、ワクチン標的として有望な V1/V2 ループと V3 ループ間にリガンド非結合—結合状態を通じた相互作用が存在し、これが定常状態における相互作用と質的に異なる事を明らかにした。我々のデータは X 線立体構造解析では得ることのできない知見である。ワクチン源 gp120 の構造特性の理解は液性免疫誘導型ワクチンの開発に大きな示唆を与えられ考えられる。

## A. 研究目的

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

エイズワクチンには2種類の作用機序が提唱されている。細胞障害性T細胞誘導型、中和抗体誘導型ワクチンである。自然感染経過の中でウイルス制御に中心的役割を担うのは細胞障害性T細胞である。特に初感染時のviremiaを制御するために重要な役割を担う事が知られている。ヒトにおけるHIV-1自然感染経過において中和抗体は限定的な機能しか検出されなかった事などから、液性免疫誘導型エイズワクチンは困難であると考えられてきた。しかし、近年になって中和抗体がHIV-1に対する免疫学的選択圧を常に与えている事が証明された(Richman et al. PNAS 2003; Wei et al. Nature 2003; Frost et al. Nature 2005; Mikell et al. PLoS Pathog 2011)。ヒトのHIV感染者

で中和抗体誘導型ワクチンが誘導すべき液性免疫を獲得した例が報告されるようになってきた(Li et al. Nat Med 2007; Zhou et al. Nature 2007)。さらに、近年多様なHIV株の複製を阻害できる汎HIV-1株中和抗体もHIV感染者から続々と分離同定されている(Walker et al. Science 2009; Simek et al. JV 2009; Burton et al, Science 2010; Pejchal et al. Science 2011; McLellan et al. Nature 2011)。汎HIV-1株中和抗体は動物モデルにおける攻撃ウイルス接種からの感染も阻止できる(Van Rompav et al. JID 1998; Gardner et al. J Med Primatol 1994; Gardner et al. AHR 1995; Shibata et al. Nat Med 1999; Mascola et al. Nat Med 2000; Hofmann-Lehman et al. JVI 2001; others)。これまで樹立に成功しているウイルス感染症に対するワクチンの多くは液性免疫誘導型である(Walker et al. 2008 Science)。HIV-1感染を仮に完全に抑制できなくても感染者における病期進行を遅らせる利益があることも中和抗体誘導型ワクチン動物実験で報告されている(Parren et al. JV 2001; Haigwood et al. JV 2004)。以上の知見は液性免疫誘導型エイズ

ワクチンの可能性を示している。

液性免疫誘導型エイズワクチンを成功させるためには、抗原の立体構造に対する理解が必須である。Env の立体構造は、部分的かつ限定的な条件下で解析されているにすぎない。タンパク質全体の構造を自然な状態で解析した例はなく、現在の物理化学的研究手法では Env の高解像度解析は著しく困難と予想される。Env の全体構造が物理的に同定できない事、熱力学動態研究による知見、感染に際して動的な構造変化が予想されている事、免疫学的な圧力により Env に変異が容易に蓄積される事、世界中に蔓延するウイルスの Env は非常に多様である事などから、Env の構造は非常に動的であると考えられている。一方で Env はレセプターに結合してウイルスと細胞の膜融合を惹起する機能を維持する必要がある。さらに、CD4BS, V1/V2 ループ, V3 ループ, MPER を標的とするヒト由来の汎 HIV-1 株中和能を有するモノクローナル抗体が数種類知られていることなどから、Env の構造の可変性には制限があると考えられている。しかし、その物理的可変性の制約メカニズムは十分解明されていない。我々は機能的観点から Env の分子構造を明らかにするための研究を行い、研究成果のワクチン開発研究へのフィードバックを試みる。

我々は本研究班の初年度の研究にて複製可能なAD8ウイルス変異体のEnvをNL4-3に移入したウイルスクローンを用いて、V3ループの先端をエピトープとする中和抗体KD-247の感受性と結合性を解析した。その結果、定常状態のEnvとKD-247相互作用を制御するアミノ酸がV3ループ以外の多くのEnv領域に数多く見出された。V3ループに独立した“なわとび様”の大きな分子動態があると仮定すれば、V3ループ以外のEnv領域における変異がV3ループ構造に与える影響は非常に

低いと思われる。したがって、このデータは逆説的に定常状態におけるV3ループの分子dynamicsはEnv各ドメインとの相互作用によって制約された状況にあることを示している(Takizawa et al. AIDS 2011)。

本年度は、Env の liganded conformational dynamics の解析を行い、初年度に行った steady-state dynamism との比較検討を行った。

## B. 研究方法

我々が前回の研究で作出した複製可能なAD8の変異体のEnvをNL4-3に導入した種々のウイルスクローンに対して、sCD4存在下でKD-247によるウイルス捕捉実験を行った(Takizawa et al. AIDS 2011)。エライザプレートにKD-247を固層化し、sCD4と事前に30分間37<sub>°</sub>で反応させたウイルス(p24換算にて100 ng分)と37<sub>°</sub>で30分間結合反応を行った。結合したウイルスはウイルスを溶解した後p24の量として定量した。この値をsCD4非存在下で行った実験の値と既報のIC<sub>50</sub>値と比較した(Takizawa et al. AIDS 2011)。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

## C. 研究結果

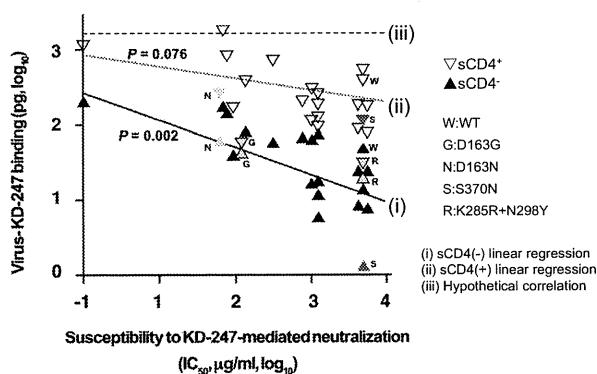
野生型AD8 Env とそれに1-6箇所のアミノ酸変異を持つ変異体EnvをもつNL4-3を背景とする計23種類のウイルスについて、捕捉効率を飽和させる量のsCD4存在下でKD-247に補足されたウイルス量を測定した。その価とウイルスのKD-247に対する中和感受性IC<sub>50</sub>との相関を示す(図1)。sCD4の影響を明らかにするために、sCD4非存在下での捕捉量も同時に示す(図1)。sCD4存在下でKD-247によるウイルス捕捉率は平均約8.9倍で向上した。KD-247のエピトープはV3ループであるため、V3ループがliganded formで分



子の外側により expose される (solvent accessible) とすれば、過去の X 線構造解析データに基づく gp120 構造変化仮説と一致するものである (Huang et al. Science 2005; Liu et al. Nature 2008)。

興味深い事に、sCD4(-) と sCD4(+) のグループは、共に IC<sub>50</sub> と負の相関を示した。しかし、sCD4 による KD-247 のウイルス捕捉率向上は IC<sub>50</sub> と相関しなかった。つまり、中和されやすいウイルスもされにくいウイルスも同程度にしか捕捉効率の上昇が見られなかった。もし、liganded form における V3 ループの立体構造が“なわとび様”の自由な分子 dynamics を呈するならば、全ての変異体が同程度に効率よく KD-247 に認識されるはずである。V3 ループのチップは Env 本体から飛び出した状態にあるとすれば、このデータは説明できない。つまり、全てのウイルス捕捉レベルが高いレベルで一定となるはずである (図 1 の点線)。従って、このデータは liganded form における V3 loop の立体構造がある程度拘束されているために KD-247 のエピトープは自由な分子運動に制約がかかっていることを示している。

図 1. KD-247 binding does not correlate well with viral neutralization susceptibility to KD-247



さらに興味深いことに、2つの異なる IC<sub>50</sub> を有するウイルスが非常に低い sCD4 反応性を示した。そのウイルスが持つ変異のひとつは 163 番目のアミノ酸が D から G に変化したもので、増強率は 1.1 倍であった (HXB2 coordinate G167)。この変異は

中和感受性を約 60 倍増強する。D163N 変異体はウイルスの中和感受性を約 70 倍に増大させるが、D163G とは異なり、sCD4 存在時の KD-247 によるウイルス捕捉率は 4.4 倍だった。もう一つは K285R と N298Y を持つクローンであり、その増強率は 1.4 倍であった。K285R/N298Y は C2 と V3 ループに存在する。D163G のウイルスの KD-247 中和の感受性があった。つまり、このウイルスの V3 ループは少なくとも CD4(-) の定常状態で KD-247 と結合するはずである。それなのに sCD4 存在下で捕捉効率が増しなかった。一方、S370N 変異はウイルス中和感受性が低いものの、sCD4 により 90 倍もの KD-247 による捕捉率向上が認められた。この変異は C3 領域に存在する。以上のデータは以下の表にまとめられる。

表 1. Summary of Env mutations and their effects

	Virus-Ab binding enhancement by sCD4	Enhancement of neut susceptibility	Location of mutations
WT	8-fold	-	
D163G	1.1-fold	59.4	V1/V2
D163N	4.4-fold	74.3	V1/V2
K285R+N298Y	1.4-fold	-	C2/V3
S370N	91-fold	-	C3

これらの解析結果を総合すると、liganded form になっても自由な V3 ループ構造可塑性が他の変異体より強く制限されており、KD-247 が認識できるエピトープ立体構造をとる事を阻害しているためと考えられる。163 番目のアミノ酸は V1/V2 ループの中に存在する。従って、この実験データは CD4 と結合したエンベロープの V3 ループが V1/V2 ループ、C2、C3 領域との間で相互作用を維持させている可能性を示唆している。

#### D. 考察

今回の報告では、我々は定常状態ではなく CD4

と結合した状況下での構造変化について解析を行った。前回の報告と総合すると、定常状態においてもリガンド結合状態においてもV3ループがdomain-independent free thermodynamic structural dynamismを行っているとは考えにくい。従って、V3ループのthermodynamicsはこれまで思われていた以上に安定したものであろう。V3ループの機能の一つはコレセプターとの相互作用である。liganded formにおけるV3ループのamorphic free molecular dynamismがあったら、コレセプター分子との相互作用には負の影響がでると思われる。これはウイルスにとってメリットは少ない。従って、我々の仮説「V3ループは構造的に極めて動的である可能性は低い」は理にかなっていると考えられる。V3ループを標的とするcross-clade 中和抗体クローンがisolateされている事を考えあわせると、V3ループ単独での使用はワクチンの免疫源として必ずしも適していないかもしれない。

定常状態における非エピトープ領域でV3ループの構造に影響を与えるアミノ酸変異の数よりもCD4結合後で影響を与えるアミノ酸変異の数が多い。このデータは大きな構造変化が起きてV3ループがgp120のコアから離れた位置に動くというモデルとよく一致する。このデータは定常状態におけるV1/V2ループとV3ループの相互作用の仕方は質的に異なる事を示唆する。liganded formでもV1/V2ループとV3ループには相互作用があるという可能性はこれまで検出できなかった新しい知見である。liganded formでもV3ループの構造的自由度が制約されていると仮定すると、IC<sub>50</sub>に依存しないKD-247によるウイルス捕捉率も説明できる。AD8のEnvにおけるliganded formのV3ループ構造制約特性は抗体のアクセスが約5倍増大するような性質と定義できる。heterologous

なウイルスパネル解析に基づくとこれは各ウイルス株に固有の特性であり一般化することは困難と思われる。

これまでに分離同定されている汎 HIV-1 株中和抗体クローンとして b12, 2F5, 4E10, 2G12, VRC01, PG9, PG16, HJ16, Z13e1, VRC-PG04, PGT127, PGT128が知られている(Burton and Weiss, Science 2010, ほか)。抗体と抗原の共結晶構造により中和エピトープの立体構造や抗体の作用機序が徐々に明らかになってきた。しかし、これらは限られた抗体クローンによる情報であり、ワクチンの免疫源としての Env 立体構造の理解は十分とは言えない。一部の抗体においてはscaffolding による中和抗体誘導が試みられた。結晶構造解析にてエピトープ構造の再現に成功したこと、結合抗体が誘導されたこと、結合様式が汎 HIV-1 中和抗体クローンと同様であることが示された。しかし、これらの抗体には中和活性は検出されなかった(Ofek et al. PNAS 2010)。これは免疫源の構造と機能及び中和抗体の作用機序がいまだ十分に明らかになっていないことを示している。我々が確立した抗体-ウイルスパネル戦略を利用することによって抗原の立体構造に対する理解がさらに深まり、ワクチン源を科学的根拠に基づいて戦略的にデザインすることが可能になると思われる。

## E. 結論

CD4 と結合した Env ではこれまで仮説されてきたように、V3 ループがより分子表面に曝露されるような位置へと構造変化する。ところが、この立体構造変化は V1/V2 ループと V3 ループとが常に相互作用を保った状態で挙動している可能性が示唆された。V3 ループにおける自由な構造変化の制約は CD4 に結合する前と後では質的に異なる制御下にある。この物理学的特性は

V3 ループがコレセプター認識機能を発揮するために理にかなっている。これは中和抗体を利用した研究アプローチで初めて判明した構造特性であり、ワクチン源の開発に大きな貢献が期待される。

## F. 研究発表

### 1. 原著論文による発表

欧文

1) Takizawa M., Miyauchi K., Urano E., Kusagawa S., Kitamura K., Naganawa S., Murakami T., Honda M., Yamamoto N., and 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., and 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 R., Hamatake M., Misawa N., Sato K., Ebina H., Koyanagi Y., and Komano J\*. The hematopoietic cell-specific Rho GTPase inhibitor ARHGDI/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., and 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.\*, and Morikawa Y\*. A Novel Postentry Inhibitor of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication Screened by Yeast Membrane-associated Two-hybrid System. Antimicrob Agents Chemother. Sep;55(9): 4251-60, 2011.

6) Aoki T., Miyauchi K., Urano E., Ichikawa R., and Komano J\*. Protein transduction by pseudotyped lentivirus-like nanoparticles. Gene Therapy.

Sep;18(9): 936-41, 2011.

7) Miyauchi K., Urano E., Yoshiyama H., and Komano J\*. Cytokine signatures of transformed B cells with distinct EBV latencies as a potential diagnostic tool for B cell lymphoma. Cancer Sci. Jun;102(6): 1236-41, 2011.

8) Yanagita H., Urano E., Matsumoto K., Ichikawa R., Takaesu Y., Ogata M., Murakami T., Wu H., Chiba J., Komano J., and 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. 19: 816-25, 2011.

和文

1) 駒野 淳. 止まらないエイズウイルス流行の拡大. 中央論評. In press

2. 口頭発表

海外

1) Urano E., Miyauchi K., Ichikawa R., Takizawa M., and Komano J. HIV-1 protease-activable CASP3 as a therapeutic gene against HIV-1 infection. IUMS 2011 The Unlimited World of Microbes XV International Congress of Virology. Sep 13, 2011, Sapporo, Japan.

2) Watanabe T., Urano E., Miyauchi K., Ichikawa R., Hamatake M., Sato K., Ebina H., Koyanagi Y., and Komano J. The hematopoietic cell-specific Rho GTPase inhibitor ARHGDI/D4GDI limits HIV-1 replication. IUMS 2011 The Unlimited World of Microbes XV International Congress of Virology. Sep 13, 2011, Sapporo, Japan.

国内

1) Urano E., Miyauchi K., Takizawa M., Ichikawa R., and Komano J. Therapeutic potential of CASP3 engineered to be activated by HIV-1 protease. 第34回日本分子生物学会年会、2011年、横浜.

2) 齊藤達哉、駒野淳、斎藤愛記、山岡昇司、山本直樹. 好中球は Neutrophil extracellular traps により Human immunodeficiency virus-1 を排除する. 第34回日本分子生物学会年会、2011年、横浜.

3) Komano J., Miyauchi K., Urano E., Okada Y., Kui C., and Hang Y. Activation of TLR3-mediated innate immune response by retroviral infection in human cells. 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年、横浜.

4) 柳田浩志、横田瑞穂、尾瀨将一、浦野恵美子、市川玲子、村上努、駒野淳、星野忠次. HIV-1 逆転写酵素 RNase H 活性阻害剤の開発. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、2011 年、東京.

5) 招待講演 Komano J. Cytokine signatures of transformed B cells with distinct EBV latencies as a potential diagnostic tool for B cell lymphoma. シン

ポジウム「ガン・免疫・代謝研究を加速する Multiplex Assay とその応用」、2011 年、東京.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

##### 1. 特許取得

特記すべきことなし

##### 2. 実用新案登録

特記すべきことなし

##### 3. その他

特記すべきことなし