

- Application of Stimulus-responsive Amino Acid to Traceable Linker for Efficient Enrichment and Specific Labeling of Target Proteins. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Tokyo, Japan, Nov 29-Dec 2, 2011.
- 21) 玉村啓和. ケミカルバイオロジーを基盤とした抗 HIV 剤の創製. シンポジウム「新しい抗感染症剤研究の最前線 - 発見、ケミカルバイオロジーそして創薬へ -」日本薬学会第 131 年会(中止). 静岡, 2011 年 3 月 28-31 日.
 - 21) 鳴海哲夫, 新井啓之, 吉村和久, 原田恵嘉, 野村 渉, 松下修三, 玉村啓和. HIV-1 外被タンパク質 gp120 の構造変化誘起を指向した低分子 CD4 ミミックの創製研究. 日本薬学会第 131 年会(中止). 静岡, 2011 年 3 月 28-31 日.
 - 22) 鳴海哲夫, 玉村啓和. イミダゾリウム塩の構造最適化を指向した構造活性相関研究. 日本薬学会第 131 年会(中止). 静岡, 2011 年 3 月 28-31 日.
 - 23) 森 あつみ, 野村 渉, 鳴海哲夫, 大橋南美, 増田朱美, 玉村啓和. 新規タグ・プローブシステムの細胞内タンパク質イメージングへの応用. 日本薬学会第 131 年会(中止). 静岡, 2011 年 3 月 28-31 日.
 - 24) 野村 渉, 卜部亜里沙, 近藤麻美, 増田朱美, 鳴海哲夫, 梁 明秀, 玉村啓和. ジンクフィンガーヌクレアーゼによる EB ウイルス複製阻害効果の検討. 日本薬学会第 131 年会(中止). 静岡, 2011 年 3 月 28-31 日.
 - 25) 鳴海哲夫, 落合千裕, 吉村和久, 原田恵嘉, 田中智博, 野村 渉, 新井啓之, 尾崎太郎, 大橋南美, 松下修三, 玉村啓和. 新規 HIV 侵入阻害剤の創製研究: 低分子型 CD4 ミミック-CXCR4 アンタゴニストのハイブリッド分子の設計と合成. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 6 回年会. 東京, 2011 年 5 月 23-25 日.
 - 26) 鳴海哲夫, 新井啓之, 吉村和久, 原田恵嘉, 野村 渉, 松下修三, 玉村啓和. HIV 外被タンパク質 gp120 の構造変化を誘起する低分子 CD4 ミミックの構造活性相関研究. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 6 回年会. 東京, 2011 年 5 月 23-25 日.
 - 27) 野村 渉, 玉村啓和. 配列特異的 DNA 切断の化合物による制御法の開発. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 6 回年会. 東京, 2011 年 5 月 23-25 日.
 - 28) 橋本知恵, 野村 渉, 大矢亜紀, 宮内浩典, 鳴海哲夫, 駒野 淳, 山本直樹, 玉村啓和. HIV 外被タンパク質 gp41-C34 3 量体の合成とその抗 HIV 作用. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 6 回年会. 東京, 2011 年 5 月 23-25 日.
 - 29) 鳴海哲夫, 神戸千秋, 野村 渉, 玉村啓和. 水性環境下で効率的に反応する光分解性保護基の開発研究: 8-アザクマリン化合物の合成と光化学的特性. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 6 回年会. 東京, 2011 年 5 月 23-25 日.
 - 30) 増田朱美, 野村 渉, 卜部亜里沙, 玉村啓和. 高い反応効率をもつ亜鉛フィンガー融合型 DNA 組換え酵素の構築. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 6 回年会. 東京, 2011 年 5 月 23 - 25 日.
 - 31) 森 あつみ, 野村 渉, 大橋南美, 鳴海哲夫, 堤浩, 玉村啓和. 細胞内タンパク質可視化を目的としたタグ・プローブシステムの創製. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 6 回年会. 東京, 2011 年 5 月 23-25 日.
 - 32) 大橋南美, 野村 渉, 鳴海哲夫, Nancy E. Lewin, 糸谷恭子, Peter M. Blumberg, 玉村啓和. 環境応答性蛍光基を導入した protein kinase C δ C1bドメインによるリガンド結合活性評価. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 6 回年会. 東京, 2011 年 5 月 23-25 日.
 - 33) 尾崎太郎, 田中智博, 鳴海哲夫, 相馬 晃, 橋本知恵, 野村 渉, 村上 努, 山本直樹, 玉村啓和. 二核亜鉛錯体型 CXCR4 アンタゴニストの構造活性相関研究. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 6 回年会. 東京, 2011 年 5 月 23-25 日.
 - 34) 鳴海哲夫, 清家俊輔, 玉村啓和. シスアミド等価体としての E 型クロロアルケン骨格の合成研究. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 6 回年会. 東京, 2011 年 5 月 23-25 日.
 - 35) 鳴海哲夫, 宍戸美華, 玉村啓和. N-(ベンゾイルオキシ)スルホンアミドを用いる α,β -不飽和エノンのアジリジン化反応. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 6 回年会. 東京, 2011 年 5 月 23-25 日.
 - 36) 野村 渉, 田中智博, 相馬 晃, 鳴海哲夫, 増田朱美, 玉村啓和. 細胞表面における CXCR4 二量体構造解析のための堅固なリンカーを有する二価型リガンドの開発. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 6 回年会. 東京, 2011 年 5 月 23-25 日.
 - 37) 大橋南美, 野村 渉, 鳴海哲夫, 奥田善章, 伊倉貞吉, 伊藤暢聡, Nancy E. Lewin, 糸谷恭子, Peter M. Blumberg, 玉村啓和. 環境応答性蛍光基を活用した PKC リガンドの orthogonal screening methods. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 6 回年会. 東京, 2011 年 5 月 23-25 日.
 - 38) 野村 渉, 近藤麻美, 卜部亜里沙, 増田朱美, 梁 明秀, 玉村啓和. 亜鉛フィンガーヌクレアーゼを用いた EB ウイルス弱毒化に関する研究. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 6 回年会. 東京, 2011 年 5 月 23-25 日.
 - 39) 鳴海哲夫, 清家俊輔, 玉村啓和, Jeffrey W. Bode. 新規アミノ酸モノマーの設計と合成: 縮合剤を用いない α -ペプチド合成への展開. 第9回次世代を担う有機化学シンポジウム. 東京, 2011年5月27-28日.
 - 40) 大附寛幸, 三浦智行, 小林剛, 吉村和久, 玉村啓和, 松下修三, 五十嵐樹彦. HIV-1 エンベロープ蛋白質を標的とした治療を評価するためのサル/ヒト免疫不全ウイルスの作製と in

- vitro における中和感受性の評価. 第 25 回近畿エイズ研究会学術集会. 京都, 2011 年 6 月 18 日
- 41) 野村 渉, 増田朱美, 卜部亜里沙, 玉村啓和. 細胞内における配列特異的 DNA 組換え反応の定量的測定法開発. 第 11 回日本蛋白質科学会年会. 大阪, 2011 年 6 月 7-9 日.
- 42) 鳴海哲夫, 新井啓之, 野村 渉, 玉村啓和, 吉村和久, 原田恵嘉, 松下修三. HIV 外被タンパク質 gp120 の構造変化を誘起する低分子 CD4 ミミックの構造活性相関研究. 創薬懇話会. 岡山, 2011 年 7 月 6-7 日
- 43) 玉村啓和. HIV-1 遺伝子産物由来のインテグラーゼ阻害剤. 第 16 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会. 大阪, 2011 年 8 月 26-27 日.
- 44) 野村 渉, 田中智博, 増田朱美, 鳴海哲夫, 玉村啓和. 2 価結合型リガンドの新規デザインによる CXCR4 の細胞表面における機能解析. 第 5 回バイオ関連化学シンポジウム, 筑波, 2011 年 9 月 12-14 日.
- 45) 増田朱美, 野村 渉, 大庭賢二, 卜部亜里沙, 山本直樹, 玉村啓和. ジンクフィンガー融合 DNA 組換え酵素の反応効率最適化. 第 5 回バイオ関連化学シンポジウム. 筑波, 2011 年 9 月 12-14 日.
- 46) 関根綾太, 鈴木商信, 玉村啓和, 古田寿昭. 新規ケージドパクリタキセルの設計・合成と細胞骨格の光制御への応用. 2011 年光化学討論会. 宮崎, 2011 年 9 月 6-8 日.
- 47) 野村 渉, 田中智博, 青木 徹, 相馬 晃, 相川春夫, 鳴海哲夫, 玉村啓和. 2 価型 CXCR4 リガンドの開発と受容体結合機能の解析. 第 48 回ペプチド討論会. 札幌, 2011 年 9 月 27-29 日.
- 48) 野村 渉, 堤 浩, 阿部清一郎, 森 あつみ, 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. ロイシンジッパー構造を基にした青色蛍光を発するターゲットプローブシステム. 第 48 回ペプチド討論会. 札幌, 2011 年 9 月 27-29 日.
- 49) 野村 渉, 橋本知恵, 中原 徹, 大矢亜紀, 宮内浩典, 大庭賢二, 鳴海哲夫, 相川春夫, 駒野淳, 山本直樹, 玉村啓和. HIV ワクチンを指向した gp41 の動的構造変化を模倣した抗原ペプチドの開発研究. 第 48 回ペプチド討論会. 札幌, 2011 年 9 月 27-29 日.
- 50) 新井啓之, 鳴海哲夫, 野村 渉, 原田恵嘉, 吉村和久, 松下修三, 玉村啓和. HIV 外被タンパク質 gp120 の構造変化を誘起する低分子 CD4 ミミックの構造活性相関研究. 第 55 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2011 年 10 月 8 日.
- 51) 卜部亜里沙, 野村 渉, 増田朱美, 玉村啓和. 1 対で反応するジンクフィンガーリコンビナーゼの設計とその反応. 第 55 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2011 年 10 月 8 日.
- 52) 尾崎太郎, 浦野恵美子, 鳴海哲夫, 野村 渉, Kasthuraiah Maddali, Yves Pommier, 山本直樹, 駒野淳, 玉村啓和. HIV タンパク質 Vpr を基にしたインテグラーゼ阻害剤の構造活性相関研究. 第 55 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2011 年 10 月 8 日.
- 53) 宍戸美華, 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. N-(ベンゾイルオキシ)スルホンアミドによる α - β -不飽和エノンの アジリジン化反応. 第 55 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2011 年 10 月 8 日.
- 54) 清家俊輔, 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. クロロアルケン型ジペプチドイソスターの立体選択的合成法の開発. 第 55 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2011 年 10 月 8 日.
- 55) 相馬 晃, 野村 渉, 田中智博, 鳴海哲夫, 相川春夫, 玉村啓和. CXCR4 二量体状態解析のための 2 価結合型リガンドの合成. 第 55 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2011 年 10 月 8 日.
- 56) 森 あつみ, 野村 渉, 大橋 南美, 鳴海 哲夫, 玉村 啓和. 細胞内蛋白質のタグ - プローブシステムを利用した蛍光イメージングツールの創製. 第 55 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 2011 年 10 月 8 日.
- 57) 鳴海哲夫, 野村 渉, 神戸千秋, 相川春夫, 古田寿昭, 玉村啓和. 光制御型 PKC リガンドの創製と新規光分解性保護基の開発研究. 第 37 回反応と合成の進歩シンポジウム. 徳島, 2011 年 11 月 7-8 日.
- 58) 相川春夫, 野村 渉, 鳴海哲夫, 田中智博, 玉村啓和. 蛍光ラベル化した二価結合型 CXCR4 リガンドの創製と応用. 第 37 回反応と合成の進歩シンポジウム. 徳島, 2011 年 11 月 7-8 日.
- 59) 鳴海哲夫, 新井啓之, 吉村和久, 原田恵嘉, 野村 渉, 松下修三, 玉村啓和. 低分子型 CD4 ミミック: HIV 外被タンパク質の構造変化を促す HIV 侵入阻害剤. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会 日本エイズ学会. 東京, 2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日.
- 60) 橋本知恵, 鳴海哲夫, 野村 渉, 村上 努, 山本直樹, 玉村啓和. HIV-1 第二受容体 CXCR4 の細胞外ドメインを基にしたエイズワクチンの開発研究. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会 日本エイズ学会. 東京, 2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日.
- 61) 鳴海哲夫, 新井啓之, 吉村和久, 原田恵嘉, 野村 渉, 松下修三, 玉村啓和. HIV 外被タンパク質 gp120 の構造変化誘起を指向した低分子 CD4 ミミックの構造活性相関研究. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会 日本エイズ学会. 東京, 2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日.
- 62) 尾崎太郎, 浦野恵美子, 鳴海哲夫, 野村 渉, Kasthuraiah Maddali, Yves Pommier, 山本直樹, 駒野淳, Vpr 由来インテグラーゼ阻害剤の構造活性相関. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会 日本エイズ学会. 東京, 2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日.

- 63) 玉村 啓和. ペプチド化学を基盤としたケミカルバイオロジー. 第 14 回ペプチドフォーラム. 鹿児島, 2011 年 12 月 16 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

- 1) HIV 立体構造認識抗体誘導ペプチド：特願 2011-082813
- 2) HIV 立体構造認識抗体誘導ペプチド抗原、及びその合成方法：特願 2011-51432、
- 3) HIV 立体構造認識抗体誘導ペプチド抗原、及びその合成方法：米国出願番号：13/319,813
- 4) HIV 立体構造認識抗体誘導ペプチド抗原、及びその合成方法：EP 出願番号：10777543.9

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

霊長類エイズモデルの粘膜部位における感染動態と免疫応答

研究分担者 三浦 智行 京都大学ウイルス研究所 准教授

研究要旨 従来のCXCR4指向性高病原性SHIV-KS661は、中和抗体に対して感受性であった(Tier1B相当)。SHIV-KS661のV3領域の5アミノ酸を変異させてCCR5指向性にしたSHIV-MK1も中和抗体に対して感受性であった(Tier1B相当)。しかし、SHIV-MK1をアカゲザルに順化させることによって得られたSHIV-MK38は、中和抵抗性(Tier2, 3相当)となっていた。今後、エイズの病態解明やワクチン評価のための攻撃接種ウイルスとしての活用が期待される。

A. 研究目的

本研究の目的は、様々な病態を呈するサルエイズ発症モデルの粘膜部位におけるウイルス感染動態と免疫細胞応答について統合的に解析することにより、エイズウイルスの主要な標的臓器として注目されながらヒトでは解析が困難な粘膜部位における病態形成機構を解明すること、そしてサルエイズモデルによる新規予防・治療法開発の為の粘膜感染病態に基づく評価基準を確立することである。米国をはじめとする先進諸国において種々の抗エイズ薬の開発が積極的に行われ、それらを組合せた多剤併用療法(HAART)の導入によりエイズ感染者の血液中のウイルス量を減少させることが可能となった。しかし、HAARTによりエイズ発症遅延効果は得られたものの、エイズを根本的に治療する方法は未だ確立されていない。これまでは、基本的に感染者の末梢血中のウイルス量を減少させる効果を基準に治療法開発が行われてきた。しかし、エイズ根本治療法を開発する為には、エイズウイルスが体内のどこでいつどのように増殖しているのか、深部臓器でどんな免疫応答が起こっているのか、エイズウイルスの最も重要な標的部位がどこなのか等を明らかにする必要がある。最近、HIV-1に類似のサルウイルス(SIV)を用いた研究によりエイズの標的臓器として腸管が重要であることが示され、エイズ患者においても腸管の重要性が示唆されている。一方、我々は外皮蛋白遺伝子を中心とした約半分のゲノム領域をHIV-1のものと同じく置換えたSIV/HIV-1キメラウイルス(SHIV)の作製によりサルエイズ感染・発症モデル系を確立し、これまでに様々な病態を呈するSHIV感染性分子クローンを得ている。本研究により、サルエイズモデルの前臨床試験としての有用性が高まり、新しい評価基準に基づく

エイズ根本治療法の開発が促進されるものと期待される。

B. 研究方法

アカゲザルを用いたエイズ発症モデル系の粘膜部位におけるウイルス感染動態と免疫細胞応答について、統合的な解析を行うことにより粘膜感染病態形成機構を解明し、サルエイズモデルによる新規治療法開発の為の粘膜感染病態に基づく評価基準を確立する。具体的には、1) 感染サルの粘膜部位におけるウイルス増殖部位や潜伏部位等の感染動態について詳細に解析する。2) 感染サルの粘膜や深部リンパ系組織における免疫細胞応答について詳細に解析する。3) 感染サルの腸管をはじめとする全身の深部組織における病変の病理組織学的解析を行う。以上の解析を統合的に行うことにより、エイズウイルス感染サル個体の粘膜感染病態形成における最も重要な標的細胞群を特定し、ウイルス制御に有効に働く粘膜免疫機構を明らかにする。

(倫理面への配慮)

動物実験に当たっては、「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」に基づいた「京都大学における動物実験の実施に関する規定」を遵守する。当施設におけるアカゲザルの飼養については、「特定外来生物による生態系等に係わる被害の防止に関する法律」の規定に基づき、環境大臣より許可を受けている。また、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」の輸入禁止地域等を定める省令に基づき輸入サル飼育施設の指定を受けている。「動物の愛護及び管理に関する法律」も遵守する。また、組換えSHIV感染実験については第二種使用等をする間に執る拡散防止措置について大臣確認され

ている。

C. 研究結果

近年、HIV-1 の env 遺伝子により決定される共受容体指向性、すなわち CCR5(R5)指向性や CXCR4(X4)指向性、によって感染個体における標的細胞や病態が大きく異なることが明らかになった。そして、従来 X4 指向性 SHIV を用いた研究が多くなされてきたが、HIV-1 の感染伝播と感染後の病原性に深く関与しているのは R5 指向性であると考えられるようになった。そこで我々は、アカゲザルに安定的に感染する R5 指向性 SHIV を作製することによって、より有効なエイズ霊長類モデル系を確立することを試みた。

これまでに高病原性 X4 指向性 SHIV-KS661 の V3 領域に 5 箇所のアミノ酸変異を導入することによって、共受容体指向性を R5 型に変えることに成功した。この新規に作製した R5 型 SHIV-MK1 の個体内での複製能は必ずしも高くなかったためアカゲザル個体で継代することにより、アカゲザルに安定して感染し、複製する R5 指向性 SHIV-MK38 株を得た。

本年度は、これらウイルスの中和抗体に対する抵抗性について検討した。まず、HIV-1 感染者 6 名分の pool 血清による中和アッセイを行ったところ、親株の KS661 と馴化前の MK1 は、ID50 が中和感受性の国際標準株(Tier1B)と同等の 500 倍以上であったのに対して MK38 は、Tier2,3 の国際標準株と同等の 100 倍以下であった。さらに MK38 の env 遺伝子領域のシークエンス解析により、中和モノクローナル抗体 KD-247 に対する中和エピソードが保存されていることを確認した上で、KD-247 に対する中和感受性を調べたところ、KS66 と MK1 の IC50 は、5~10 $\mu\text{g/ml}$ 程度(Tier1B 相当)であったのに対し、MK38 の IC50 は、50 $\mu\text{g/ml}$ 以上(Tier2, 3 相当)であった。

以上の結果から、本研究により新規に作製した R5 型 SHIV-MK1 をサル個体に馴化して得られた R5 型 SHIV-MK38 は、HIV-1 臨床分離株と同レベルの中和抵抗性を獲得したことが明らかとなった。

D. 考察

本研究により同一の遺伝的バックボーンを持つ CXCR4 指向性 SHIV と CCR5 指向性 SHIV が得られた。特に CCR5 指向性 SHIV は、従来の CXCR4 指向性 SHIV とは異なり、HIV-1 臨床分離株と同様に中和抗体に対して抵抗性であることが今回明らかとなったことから、HIV-1 の病態をより忠実にサルで再現することが期待される。今後、

これらのウイルスが引き起こす病態の違いをアカゲザル感染実験により詳細に解析することで、セカンドレセプター指向性や中和抵抗性と感染個体における病原性の関係を明らかにできるものと期待される。

E. 結論

従来の CXCR4 指向性高病原性 SHIV-KS661 は、中和抗体に対して感受性であった(Tier1B 相当)。SHIV-KS661 の V3 領域の 5 アミノ酸を変異させて CCR5 指向性にした SHIV-MK1 も中和抗体に対して感受性であった(Tier1B 相当)。しかし、SHIV-MK1 をアカゲザルに馴化させることによって得られた SHIV-MK38 は、中和抵抗性(Tier2 相当以上)となった。SHIV-MK38 は、エイズの病態解明やワクチン評価のための攻撃接種ウイルスとしての活用が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Kuwata, T., Katsumata, Y., Takaki, K., Miura, T. and Igarashi, T.: Isolation of potent neutralizing monoclonal antibodies from an SIV-Infected rhesus macaque by phage display. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 27: 487-500, 2011.
- (2) 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, T. K., Kimura, A. and 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.
- (3) Nakamura, M., Takahara, Y., Ishii, H., Sakawaki, H., Horiike, M., Miura, T., Igarashi, T., Naruse, T. K., Kimura, A., Matano, T., and Matsuoka, S.: Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T 1 lymphocyte responses during primary simian immunodeficiency virus infection in Burmese rhesus macaques. *Microbiol. Immunol.*, 55: 768-773, 2011.

2. 学会発表

- (1) Iwami, S., Beauchemin, C., Tada, T., Igarashi, T., Miura, T.: Quantification system of viral dynamics in vitro -the dynamics of SHIV on HSC-F. 8th ESMTB

Conference, June 28-July 2, 2011, Poland.

(2) Iwami, S., Beauchemin, C., Tada, T., Igarashi, T., Miura, T.: Quantifying viral dynamics based on in vitro experiments and mathematical modeling. IUMS, September 11-16, 2011, Sapporo.

(3) Takahara, Y., Nakamura, M., Higashi, R., Horiike, M., Miura, T., Igarashi, T., Naruse, T., Kimura, A., Matano, T., Matsuoka, S.: Cytotoxic T lymphocyte responses during highly active antiretroviral therapy in simian immunodeficiency virus-infected macaques. IUMS, September 11-16, 2011, Sapporo.

(4) 川岸崇裕、日向亮輔、加藤文博、好井健太朗、高島郁夫、三浦智行、五十嵐樹彦、小林剛：新規相同組換え技術による組換えダニ媒介性脳炎ウイルスの構築、第 152 回日本獣医学会学術集会、2011 年 9 月 19-21 日、大阪。

(5) 大附寛幸、三浦智行、小林剛、吉村和久、玉村啓和、松下修三、五十嵐樹彦：中和抵抗性のサル/ヒト免疫不全ウイルスの作製と in vitro における立体構造変化誘導剤による中和感受性増強効果の評価、第 25 回日本エイズ学会学術集会、2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京。

(6) 中村碧、高原悠佑、阪脇廣美、堀池麻里子、三浦智行、五十嵐樹彦、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗、松岡沙織：サルエイズモデル感染初期における MHC クラス I ハプロタイプ別の CTL 反応優位パターンの解析、第 25 回日本エイズ学会学術集会、2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京。

(7) 張険峰、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、2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日、東京。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働省科学研究補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

サルエイズモデルを用いたアジュバント遺伝子組み込みエイズウイルスに関する研究

研究者分担者 保富康宏 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター センター長
研究協力者 岡村智崇 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター 研究員

研究要旨

エイズウイルスを制御する免疫機構の解明は、ワクチン開発において極めて重要である。本年度は、アジュバント Ag85B 発現エイズ弱毒生ウイルス (SHIV-Ag85B) をカニクイザルに接種し、免疫反応および防御免疫機構を検討した。SHIV-Ag85B を接種した群では、接種初期 (4 週以内) において血漿中のウイルス量は検出限界以下となった。一方で親株 (SHIV-NI) 接種群では、接種後 12 週まで血漿中のウイルス量は検出された。またウイルス感染後の PBMC を用いて SHIV ウイルス DNA の遺伝子検出を試みたところ、SHIV-NI 接種群では接種初期から 37 週まで PBMC からウイルス遺伝子が検出され持続感染が確認されたのに対し、SHIV-Ag85B 接種群では接種後 4~8 週以降、全頭で検出限界以下となった。これら感染初期のウイルス制御について解明するため、接種初期の PBMC を用いてウイルス構造タンパクに対する IFN- γ ELISPOT 反応を行ったところ、SHIV-Ag85B 接種群では SHIV-NI 接種群と比較し、極めて強い細胞性免疫反応が確認された。これらウイルス接種猿に免疫後 37 週において、SHIV-89.6P 強毒株の攻撃接種を行い防御免疫機構について研究を行ったところ、SHIV-Ag85B 接種群では強毒株接種後 6 週以内に 4 頭中 3 頭で血漿中のウイルス量を検出限界以下に抑えた。また、この強毒株をコントロールした 3 頭は、攻撃接種後の IFN- γ 産生細胞数は極めて強い反応を示したことから、ウイルスの制御機構に細胞性免疫反応が関連していることが示唆された。

A. 研究目的

エイズウイルスを制御する免疫機構を解明することは、ワクチン開発において極めて重要である。これまでのエイズワクチン研究では、中和抗体を誘導する液性免疫および細胞性免疫の両方を誘導するワクチンが有望であると考えられてきた。近年、サルエイズ動物モデルを用いた研究からは、細胞性免疫反応、特に CD8 陽性エフェクター T 細胞を主体とした免疫反応が感染防御機構に関連すると報告された。

本研究では、*nef* 遺伝子を欠損することで弱毒化したエイズウイルス (SHIV-NI) に細胞性免疫主導型アジュバント活性をもつ Ag85B を組み込んだ Ag85B 発現エイズ弱毒生ウイルス (SHIV-Ag85B) の免疫誘導能お

よび防御免疫機構についてカニクイザルを用いて評価する。

B. 研究方法

1. 免疫および攻撃接種スケジュール

構築した SHIV-Ag85B の免疫誘導能を解析するため、カニクイザルを用いて評価した (図 1)。比較対照群として、親株 SHIV-NI を用いる。投与量は 10^6 TCID₅₀、静脈内接種を行った。また、これらウイルス接種後 37 週において、強毒株 SHIV89.6P を静脈内より接種した (図 1)。

2. 血漿中のウイルスコピー数および CD4+ T細胞数の測定

ウイルスコピー数は、血漿からウイルス RNA を抽出し、SIVgag 特異的 Primer およ

び probe を用いて Real time PCR を行った。CD4+T 細胞数の算定およびメモリーT細胞分画の解析には、血液を各種 CD 抗体 (CD3/CD4/CD8/CD28/CD95) にて染色し、フローサイトメーターを用いて算定した。

3. SHIV プロウイルス遺伝子の検出

免疫動物の PBMC より DNA の抽出を行い、SIVgag 特異的 Primer を用いて PCR 法を行った。

4. 細胞性免疫の解析 (IFN- γ 産生細胞数の測定)

採取した血液から PBMC の分離を行う。抗原刺激には、各個体より事前に樹立した B-LCL 細胞に SIVGagPol、HIVEnv をそれぞれ発現する組換えワクシニアウイルスを感染させた感染細胞と PBMC の共培養を行った。培養後 Monkey IFN- γ ELISPOT Kit を用いて、SIVGag 特異的 IFN- γ 産生細胞数を測定した。

5. 液性免疫抗体の解析

SHIV および SIVGag 特異的な IgG 抗体価を測定するため、2 倍階段希釈した血漿を用いて ELISA 法を行った。

倫理面への配慮)

本研究では動物実験申請等の必要な委員会での承認は既に得ており、ヒトサンプル、情報等は一切用いていない。

C. 研究結果

1. SHIV-Ag85B, SHIV-NI 接種後の血漿中ウイルス量および CD4+T 細胞数

SHIV-NI 接種群では、接種後 2 週においてウイルスピークを確認し、接種後 12 週において全頭で血漿中のウイルス量は検出限界以下となった。一方で SHIV-Ag85B を接種群では、血漿中のウイルス量は SHIV-NI 群と比較して低く、さらに接種後 4 週以内に全頭のウイルス量は検出限界以下となった (図 2)。一方で、CD4+T 細胞数については、全てのサルで大きな変化は無かった (図 2)。

2. SHIV-Ag85B, SHIV-NI 接種後のプロウイルスの検出

両接種群の PBMC をそれぞれ用いて SHIV ウイルス DNA の遺伝子検出を試みたところ、SHIV-NI 接種群では接種初期から 28 週まで全ての PBMC からウイルス遺伝子が検出され持続感染が確認された。一方 SHIV-Ag85B 接種群では感染初期のみウイルス遺伝子が検出され、接種後 8 週以降では全て検出限界以下となった (図 3)。

3. ウイルス抗原特異的な細胞性免疫反応

接種初期の PBMC を用いてウイルス構造タンパク (SIVGagPol、HIVEnv) 特異的な IFN- γ ELISPOT 反応を行ったところ、SHIV-Ag85B 接種群では SHIV-NI 接種群と比較し極めて強い細胞性免疫反応が確認された (図 4)。

4. ウイルス抗原特異的な液性免疫反応

抗体価について検討したところ、SHIV-NI 接種群は SHIV-Ag85B 接種群と比較して、抗 SHIV および抗 SIVGag 抗体を強く誘導し、また接種後 30 週を超えても高い抗体価を維持していた (図 5)。

5. 攻撃接種後のウイルス量およびメモリーT細胞反応

免疫後 37 週において強毒株 SHIV89.6P 株の攻撃接種を行ったところ、SHIV-Ag85B 接種群では、4 頭中 3 頭で強毒株接種後 6 週以内に強毒ウイルスを検出限界以下に抑えた (図 6)。また、この 3 頭の攻撃接種後 2 週における IFN- γ 産生細胞数は、SHIV-NI 接種群と比較して極めて強い反応を示した (図 7)。

D. 考 察

アジュバント活性をもつ Ag85B 遺伝子を組込んだエイズ弱毒生ウイルスは、ウイルス複製に伴って Ag85B 分子を発現する。このウイルスはウイルス感染部位でアジュバント活性を持つ分子を発現するため、より効果的に抗原特異的な免疫応答を誘導させることが可能である。

本研究において SHIV-Ag85B 接種カニクイザルは、接種初期においてウイルスを検出限界以下に抑え、この機序には強いウイルス特異的な細胞性免疫反応の関連が示唆された。また SHIV89.6P 攻撃接種後においても強毒ウイルスを制御し、またこの制御した個体の攻撃接種後の細胞性免疫反応は、攻撃接種前と比較して、極めて強い反応が確認された。本研究の結果から、エイズウイルスの制御機構には、強力な細胞性免疫反応が重要であることが推測された。今後、誘導されたメモリーT細胞反応を詳細に解析するとともに、初期免疫反応についても明らかにすることで、防御免疫機構との関連性を検討する。

E. 結論

Ag85B 発現エイズ弱毒生ウイルスを免疫したカニクイザルは、強毒株 SHIV89.6P 攻撃接種ウイルスをコントロールした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Uchida, A., Sasaguri, H., Kimura, N., Tajiri, M., Ohkubo, T., Ono, F., Sakaue, F., Kanai, K., Hirai, T., Sano, T., Shibuya, K., Kobayashi, M., Yamamoto, M., Yokota, S., Kubodera, T., Tomori, M., Sakaki, K., Enomoto, M., Hirai, Y., Kumagai, J., Yasutomi, Y., Mochizuki, H., Kuwabara, S., Uchihara, T., Mizusawa, H. and Yokakota, T. Non-human primate model of ALS with cytoplasmic mislocalization of TDP-43. *Brain* in press
- 2) Iwasaki, Y., Mori, K., Ishii, K., Maki, N., Iijima, S., Yoshida, T., Okabayashi, S., Katakai, Y., Lee, J., Saito, A., Fukai, H., Kimura, N., Ageyama, N., Yoshizaki, S., Suzuki, T., Yasutomi, Y., Miyamura, T., Kannagi, M. and Akari, H. Long-term persistent GBV-B infection and

development of a chronic and progressive hepatitis C-like disease in marmosets.

Frontiers Microbiol. in press

- 3) Hirata, H., Kawai, S., Maeda, M., Jinnai, M., Fujisawa, K., Katakai, Y., Hikosaka, K., Tanabe, K., Yasutomi, Y. and Ishihara, C. Identification and Phylogenetic Analysis of Japanese Macaque Babesia-1 (JM-1) Detected from a Japanese Macaque (*Macaca fuscata fuscata*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* in press
- 4) Saito, A., Kono, K., Nomaguchi, M., Yasutomi, Y., Adachi, A., Shioda, T., Akari, H. and Nakayama, E. E. Geographic, Genetic, and Functional Diversity of Antiretroviral Host Factor TRIM5α in Cynomolgus Macaque (*Macaca fascicularis*). *J. Gen. Virol.* in press
- 5) Matsuo, K. and Yasutomi, Y. Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guérin as a vaccine vector for global infectious disease control. *Tuberculosis Res. Treat.* 2011 Epub
- 6) Chono, H., Saito, N., Yasutomi, Y., Mineno, J., and Kato, I. In vivo safety and persistence of endoribonuclease gene-transduced CD4+ T cells in cynomolgus macaques for HIV-1 gene therapy model. *PloS One* 2011; 6: Epub
- 7) Xing, Li., Wang, J.C., Li, T-C., Yasutomi, Y., Lara, J., Purcell, R., Takeda, N., Miyamura, T., and Holland, R.C. Spatial configuration of hepatitis E virus antigenic domain. *J. Virol.* 2011;85:1117-1124.
- 8) Chono, H., Matsumoto, K., Tsuda, H., Saito, N., Lee, K., Kim, S., Shibata, H., Ageyama, N., Terao, K., Yasutomi, Y., Mineno, J., Kim, S., Inoue, M. and Kato, I. Acquisition of HIV-1 resistance in T lymphocytes using an

- ACA-specific E.coli mRNA interferase.
Human Gene Ther. 2011;22:35-43.
- 9) Okabayashi,S., Uchida,K., Ohno,C., Hanari,K., Goto,I. and Yasutomi,Y. Periventricular Leucomalacia(PVL)-like lesions in two neonatal cynomolgus monkeys (macaca fascicularis). J.Comp.Pathol. 2011;144:204-211.
- 10) 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* 2011;13:58-64.
2. 学会発表
- 「国内」
- 1) 渡邊健太、松尾和浩、保富康宏：ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスをベクターとした新規結核ワクチンの開発 第15回日本ワクチン学会 東京 2011年12月10日－11日
- 2) 塩釜ゆみ子、保富康宏：Th制御とインフルエンザ感染の関係 第40回日本免疫学会 千葉 2011年11月27日－29日
- 3) 岡村智崇、保富康宏：カニクイザルを用いたアジュバント組み込みサルヒト免疫不全ウイルスの効果 第40回日本免疫学会 千葉 2011年11月27日－29日
- 4) 和田剛、小原道法、保富康宏：C型慢性肝炎モデルマウスを用いた治療用DNAワクチンの評価 第40回日本免疫学会 千葉 2011年11月27日－29日
- 5) 辻村佑祐、保富康宏：好酸菌分泌抗原 Ag85Bは局所にインターロイキン-17,-22を誘導することでアレルギー喘息の治療効果を促す 第40回日本免疫学会 千葉 2011年11月27日－29日
- 6) 渡邊健太、保富康宏：ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスベクターを用いた新規結核ワクチンの開発 第40回日本免疫学会 千葉 2011年11月27日－29日
- 7) 田尻和子、保富康宏：SOCS1遺伝子治療による自己免疫性心筋炎の制御効果の検討 第40回日本免疫学会 千葉 2011年11月27日－29日
- 8) 塩釜ゆみ子、河岡義裕、保富康宏：ヘルパーT細胞反応制御によるインフルエンザウイルス感染に対する免疫反応 第152回日本獣医学会 大阪 2011年9月19日－21日
- 「国際」
- 1) Akatsuki SAITO, Masako NOMAGUCHI, Ken KONO, Emi E. NAKAYAMA, Tatsuo SHIODA, Tomoyuki YOSHIDA, Yasuhiro YASUTOMI, Naofumi TAKAHASHI, Tetsuro MATANO, Akio ADACHI, Hirofumi Akari: Susceptibility of cynomolgus monkeys to monkey-tropic HIV-1 infection is determined by TRIM5 α genotypes. *Non-Human Primate model for AIDS* Oct. 25-28, 2011, Seattle, WA.
- 2) Kenta WATANABE, Akihiro MATSUBARA, Mitsuo KAWANO, Satoru MIZUNO, Yusuke TSUJIMURA, Hiroyasu INADA, Masayuki FUKUMURA, Isamu SUGAWARA, Tetsuya NOSAKA, Kazuhiro MATSUO, Yasuhiro YASUTOMI: Intranasal immunization with replication-deficient recombinant human parainfluenza type 2 virus-Ag85B showed protective effects against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Interantional Union of Microbiological Societies* 2011Sep. 11-17, 2011, Sapporo.
- 3) Tomotaka OKAMURA, Yuya SHIMIZU, Kazuhiro MATSUO, Yasuhiro YASUTOMI: Adjuvant molecule Ag85B cDNA insertion into live attenuated simian-human immunodeficiency virus enhances the

SHIV-specific immune responses in
Cynomologous monkeys. Interantional Union
of Microbiological Societies 2011Sep. 11-17,
2011, Sapporoo.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を
含む)

特許出願

1) 遺伝子導入用ウイルスベクターの製造
方法(特願 2011-025234)

2) 新規な組換え BCG ワクチン (特願
2011-199422)

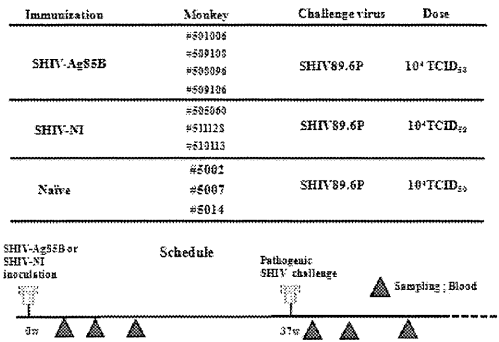


図1:免疫スケジュールおよび攻撃接種スケジュール

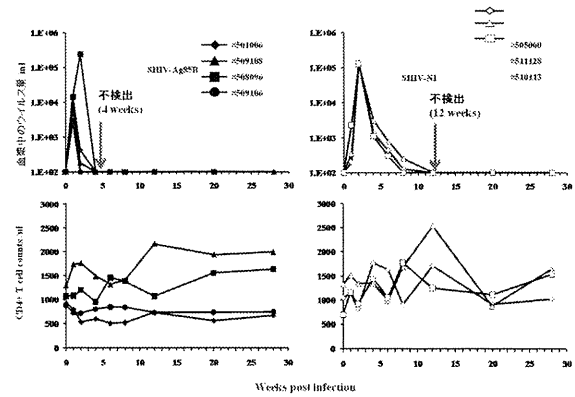


図2: SHIV-Ag85B, -NI接種後の血漿中のウイルス量およびCD4+T細胞数

Nested PCR法によるプロウイルスの検出

Weeks	SHIV-Ag85B				SHIV-NI		
	#501006	#509108	#508096	#509106	#505060	#511128	#510113
2	+	+	+	+	+	+	+
4	-	-	+	-	+	+	+
8	-	-	-	-	+	+	+
12	-	-	-	-	+	+	+
28	-	-	-	-	+	+	+

(+): ウイルス遺伝子検出
 (-): ウイルス遺伝子不検出

図3: SHIV-Ag85B, -NI接種後のPBMC中のプロウイルスの検出

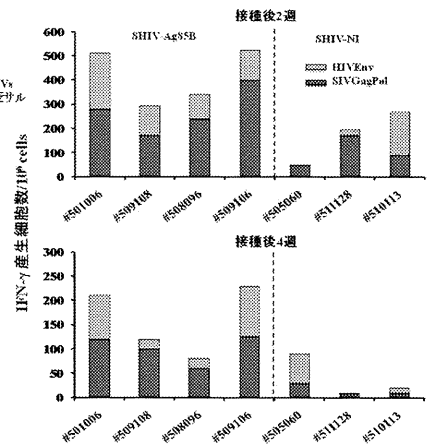
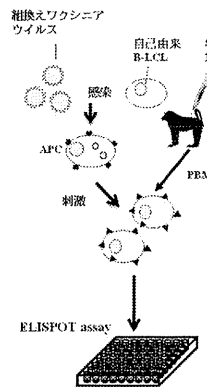


図4: ウイルス抗原 (SIV GagPol, HIV Env) 特異的な細胞性免疫反応

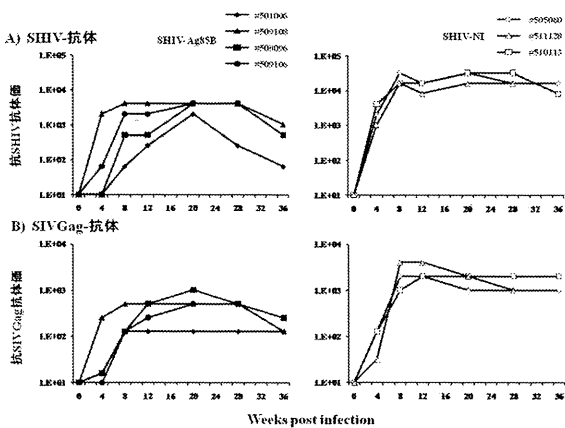


図5: SHIV-Ag85B, -NI接種後の液性免疫反応

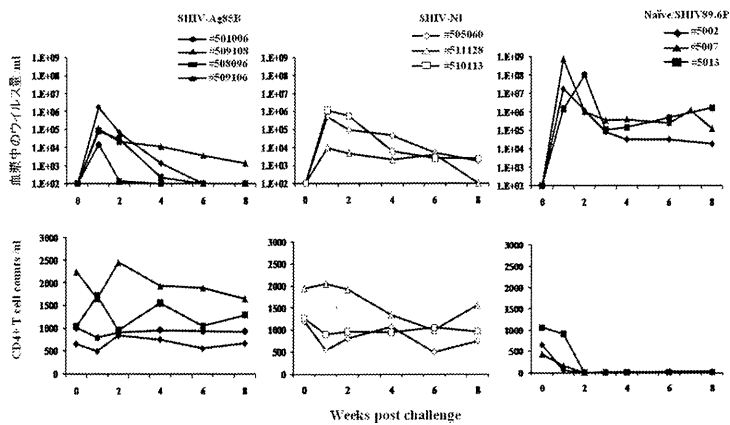


図6; SHIV-Ag85B, -NI接種後の液性免疫反応

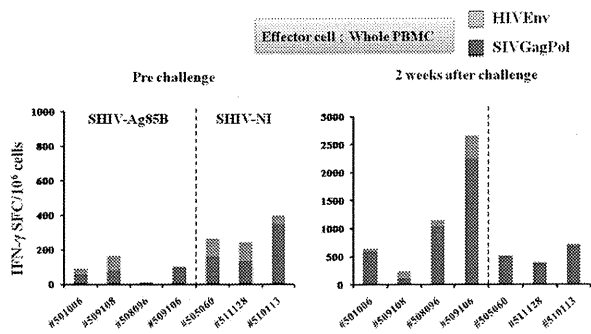


図7: 攻撃接種後におけるメモリーT細胞免疫反応

粘膜免疫活性化による粘膜棲息型HIV制御法の開発：
HIVの初期感染標的である樹状細胞とNKT細胞

分担研究者 高橋 秀実 日本医科大学微生物学免疫学教室 教授

研究要旨

HIV-1 は通常粘膜組織より体内に侵入する。そして粘膜組織内の CD4 ならびに CXCR4 あるいは CCR5 分子を発現した細胞群に感染しそこに潜伏する。HIV-1 の第 1 の感染標的は粘膜内で侵入異物の状況を自らに発現した Toll-like receptor (TLR) を介して認知する CD4 分子を発現した樹状細胞群である。その際、CD4 陽性樹状細胞の表面には CXCR4 ならびに CCR5 分子の双方が発現しているため、X4-type のみならず R5-type の HIV-1 に対する感受性を有する。一方報告者らは、HIV-1 の Nef が、感染樹状細胞上の脂質抗原提示分子である CD1d 分子の発現を低下させることを報告してきた。一般に樹状細胞は、CD4 陽性のみならず、CD8 陽性、あるいは CD8 ならびに CD4 分子双方の発現を認めない全てのパターンの NKT 細胞を誘導するのに対し、HIV-1 に感染した樹状細胞は選択的に CD4 陽性 NKT 細胞の誘導を増加させることを見いだした。一方、IgG の存在しない培養環境において樹状細胞は CD1d 分子の発現が低下するという報告に則り、IgG の欠損した FCS 添加培地と AB 型血清添加培地とで樹状細胞を誘導した結果、前者において明らかに CD1d 分子の発現が低下することを見いだした。そしてこれらの樹状細胞を用いて NKT 細胞の誘導を試みた結果、有意な CD4 陽性 NKT 細胞の誘導が確認された。このことは、粘膜より侵入した HIV-1 が樹状細胞に感染することにより、自らが潜入・複製の基盤とする CD4 陽性 NKT 細胞を選択的に誘導することを示している。これまで HIV-1 の標的と考えられてきた CD4 陽性 T 細胞は、CXCR4 の発現が優位であるのに対し、CD4 陽性 NKT 細胞には CCR5 分子の発現が優位であることから、粘膜初期感染の主体である R5-type HIV-1 の感染伝播には、粘膜自然免疫系をになう CD1d 分子群によって制御された樹状細胞-NKT 細胞群の重要性が想定される。さらに報告者らは、CD4 陽性 NKT 細胞の存在が、R5-type HIV-1 の CD4 陽性 T 細胞への感染拡大にも関与することを見いだした。以上より、現在蔓延している HIV-1 の主体が R5-type であることを勘案すると、粘膜組織内の樹状細胞-CD4 陽性 NKT 細胞内における R5-type HIV-1 を封じ込めることが、HIV-1 の制圧において重要であることが想定される。

A. 研究目的

HIV-1 の感染標的の主体は CD4 陽性 T 細胞であるものと考えられ様々な研究が進められているが、HAART 治療が展開されている現在、蔓延している HIV-1 の主体はこの CD4 陽性 T 細胞への感受性が低い R5-type である。

こうした中、粘膜組織内に棲息する樹状細胞、ならびにその表面に発現している CD1d 分子を介して制御されている CD4 陽性 NKT 細胞には、CCR5 分子が強発現しており、CD4 分子を発現した DC ならびに NKT 細胞が R5-type HIV-1 の初期感染標的となりうることが示唆される。

また CD4 陽性 DC の表面には、HIV-1 を捕捉し伝播する能力を有した DC-SIGN 分子も発現しており、報告者らはこの DC-SIGN により捕

捉された R5-type HIV-1 が感受性を有した T 細胞に伝播されることを示した (JID, 191:174-181, 2005)。また一方において、HIV-1 の Nef が、感染樹状細胞上の脂質抗原提示分子である CD1d 分子の発現を低下させることを報告した (Virology 326:79-89, 2004)。

さらに、HAART 治療実施により制圧できず、治療の中断によって速やかに R5-type ウイルス粒子の再燃が招来される事実は、粘膜組織における自然免疫担当細胞群、ことに樹状細胞-NKT

細胞における R5-type HIV-1 の制圧が、HAART 治療では不完全であることを物語っている。

本研究では、HIV-1、特に R5-type HIV-1 の感染標的である樹状細胞ならびに NKT 細胞における R5-type HIV-1 感受性の誘発、ならびに粘膜組織における CD4 陽性 T 細胞への感染伝

播・拡大の可能性に対し、樹状細胞上の CD1d 分子の発現低下の影響を含め検討し、現在の HAART 治療との併用を念頭においた、新たな治療法の開発を目的とする。

B. 研究方法

DC 上に発現した抗原提示分子である CD1d によって拘束された NKT 細胞は均一な T 細胞レセプター（不変鎖： invariant TCR）を発現しており、特に特異的糖脂質抗原である α -Galactosyl Ceramide (α -GalCer) を認識する T 細胞レセプターは全て $V\alpha 24V\beta 11$ であることが判明している。通常ヒトの細胞群は β 型の糖鎖しか産生しないことに着目し、最近、細胞内糖脂質である β -Glucosyl Ceramide (α -GluCer) が、NKT 細胞の活性化に関わる主たる内因性糖脂質であることが判明した (図 1)。

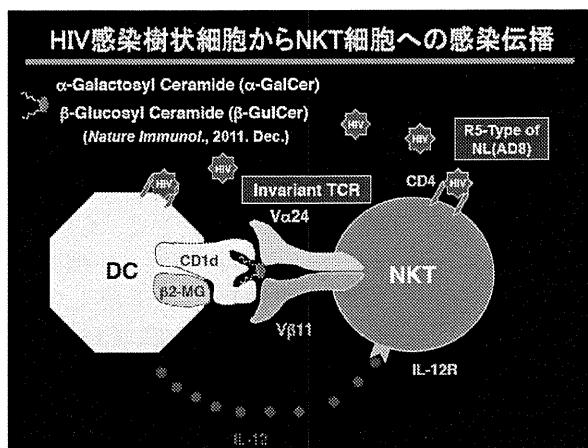


図 1 HIV-1 感受性樹状細胞及び NKT 細胞

報告者らは、ヒト末梢血に α -GalCer を添加培養し、誘導されてくる細胞の中で抗 $V\alpha 24$ 抗体により検知される細胞を NKT 細胞であるとし、FACS-vintage を用いて $V\alpha 24$ 陽性 NKT 細胞を集積し、誘導されてきた NKT 細胞の中に CD4 陽性細胞が存在するかを抗 CD4、抗 CD8 抗体を用い Flow cytometry で追跡した。

また、HIV-1 に対する NKT 細胞の感受性を検討するため、X4-type の HIV-1 として NL432 株を、R5-type の株として NL(8AD)を用いて研究を進めた。また、HIV-1 に感染した細胞を p24 抗原陽性細胞数を指標として同定した。この際、コントロールの X4-type HIV-1 に対する CD4 陽性 T 細胞群を末梢血にスーパー抗原 (SEB) を添加することによって得た。また、HIV-1 に感

染した DC あるいは NKT 細胞が産生・放出したサイトカインを ELISA 法によって検出した。

C. 研究結果

1) まず、ヒト末梢血に α -GalCer を添加培養し、誘導されてくる細胞の中で抗 $V\alpha 24$ 抗体により検知される細胞を NKT 細胞であるとし、HIV-1 感受性を有する $V\alpha 24$ 陽性 CD4 陽性 NKT 細胞を Sort した。そして、NKT 細胞上の CXCR4 と CCR5 との発現を、末梢血にスーパー抗原を添加することによって誘導した CD4 陽性 T 細胞と比較検討した。その結果、CD4 陽性 NKT 細胞上では CCR5 の優位な発現が認められたのに対し、CD4 陽性 T 細胞上には CXCR4 の優位な発現が観察された (図 2)。

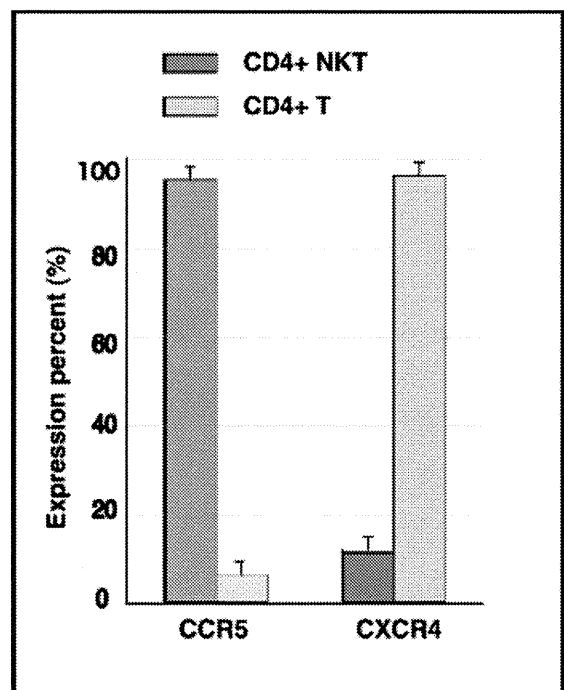


図 2 CD4 陽性 NKT 細胞と CD4 陽性 T 細胞に発現しているケモカインレセプターの比較

2) 次に、HIV-1 の存在下で末梢血単核球に α -GalCer を加え NKT 細胞を誘導する際、R5-type である NL(AD8)株を添加した場合と X4-type の NL4-3 株とを比較したところ、どちらのウイルス株存在下であっても、選択的に HIV-1 に感染した CD4 陽性 NKT 細胞の割合が優位に増加していた。また、HIV-1 への感受性を持たない、CD8 陽性 NKT 細胞、ならびに CD4 分子も CD8 分子も発現していない DN (double-negative) NKT 細胞はともに HIV-1 存在下では消滅する可能性を示唆していた (図 3)。

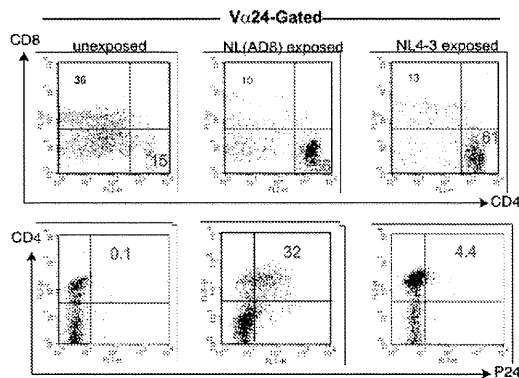


図3 HIV-1 存在下における R5-type HIV-1 感染 NKT 細胞の選択的な増加

3) HIV-1 存在下において、ウイルスの種類には関係なく CD4 陽性 NKT 細胞の割合が優位に増加していたことから、HIV-1 そのものの感染、ことにあらゆる HIV-1 の初期感染標的である樹状細胞が CD4 陽性 NKT 細胞の増加に参与することが想定される。報告者らは、これまで HIV-1 の Nef が感染樹状細胞上の脂質抗原提示分子である CD1d 分子の発現を低下させることを示してきたが、この CD1d 分子の発現低下が抗体非存在下で誘発されるとの報告 (Blood, 111:5037, 2008) に則り、IgG の欠損した FCS 添加培地と AB 型血清添加培地とで樹状細胞を誘導した結果、前者において明らかに CD1d 分子の発現が低下することを見いだした (図 4)。

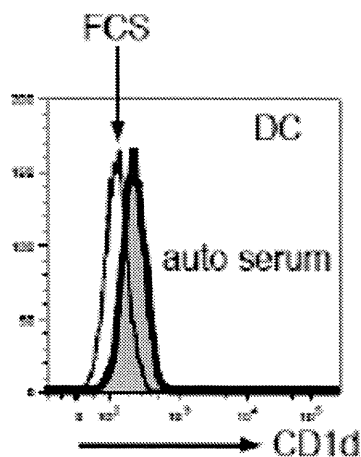


図4 FCS 培地による CD1d 分子の発現低下

4) そこで、この様な樹状細胞を用いて NKT 細胞の誘導を試みたところ、培養 14 日目においてコントロールの AB 型血清培地で誘導し

た場合と比較した結果、CD4 陽性 NKT 細胞の明らかに優位な増加が認められた (図 5)。

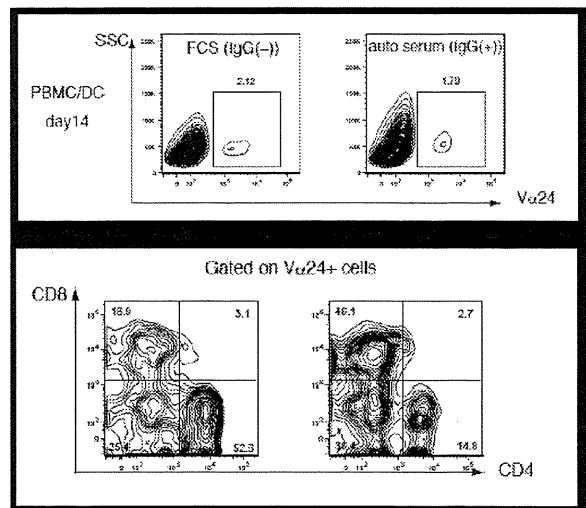


図5 CD1d 分子の発現低下樹状細胞による CD4 陽性 NKT 細胞の選択的増加

5) 以上より、HIV-1 の存在下では Nef により CD1d 分子の発現が低下した樹状細胞により選択的に CD4 陽性 NKT 細胞が増加することが想定された。先述したように、この CD4 陽性 NKT 細胞には CCR5 が優位に発現してしたことから、CD4 陽性 NKT 細胞の存在下で、CXCR4 が優位に発現している CD4 陽性 T 細胞に R5-type HIV-1 に対する感染効率を追跡したところ、培養開始から 5-6 日目において、CD4 陽性 T 細胞への優位な感染拡大が観察された (図 6)。

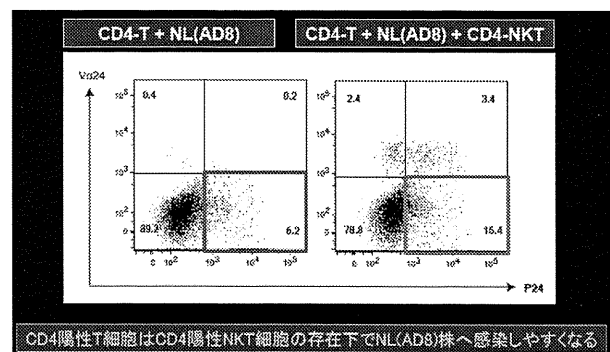


図6 CD4-NKT 存在下における R5-type 株の感染拡大

D. 考察

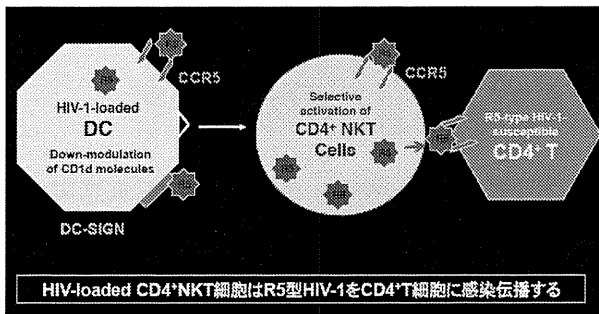


図7 粘膜自然免疫における R5-type の感染拡大 (まとめ)

以上の結果を纏めたものが図7である。この図が示すように、HIV-1 感染初期において、粘膜感染型のマクロファージ指向性 R5-type ウイルスが樹状細胞に潜入すると、その表面に発現した CD1d 分子の発現低下が引き起こされる。この CD1d 分子の発現低下により、R5-type HIV-1 に対する感受性の高い CD4 陽性 NKT 細胞が選択的に誘導され、その中で R5-type HIV-1 は効率的に増幅することによって感染の拡大が惹起される (data not shown)。また、CD4 陽性 NKT 細胞の存在によって、R5-type HIV-1 に対する感受性の低い CD4 陽性 T 細胞に対しても感染の拡大が認められた。

このように、樹状細胞-CD4 陽性 NKT 細胞の中で、粘膜より侵入した R5-type HIV-1 が、選択的に保持され、さらには感受性の低い CD4 陽性 T 細胞を含め組織内に伝播される。その結果、R5-type HIV-1 は現状の HAART 治療中の患者をみても、長期間に亘り体内に保持されるものと推測される。

現在蔓延している HIV-1 の主体が R5-type であることを勘案すると、粘膜組織内の樹状細胞-CD4 陽性 NKT 細胞内における R5-type HIV-1 を封じ込めることが、HIV-1 の制圧において非常に重要であり、そのためにはウイルスを保持する HIV-1 感染樹状細胞のみならず、ウイルスを増幅し伝播する CD4 陽性感染 NKT 細胞を制圧することが肝要である。

E. 結論

HIV-1 初期感染標的としての粘膜免疫を担う樹状細胞-CD4 陽性 NKT 細胞を主体とした CD1d 分子に拘束された自然免疫システムが、R5-type HIV-1 の長期的な保持、ならびに CD4 陽性 T 細胞を含めた感染の拡大に大きく関与

することがヒト血液を用いた研究において明らかとなった。HIV-1 が免疫の中枢を担う樹状細胞に感染することによって、その増幅システムである CD4 陽性 NKT 細胞を選択的に増大することが明らかとなってきた現在、粘膜自然免疫システムにおける HIV-1、特に R5-type HIV-1 の制御法を開発することがエイズ制圧のために必須であると考えられる。

F. 論文発表

- 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).

- 8) 高橋秀実：免疫と漢方. からだの科学増刊, 56-61, 2011.
- 9) 村上努、高橋秀実：HIV と闘う宿主防御因子, 日本エイズ学会誌 14 巻号, 2012 (印刷中).
- 10) 新谷英滋、高橋秀実：ヒト免疫不全ウイルス HIV-1 の Nef による樹状細胞 CD1 脂質抗原提示機能の低下. 臨床免疫・アレルギー科, 2012 (印刷中) .

◇著 書

- 1) Takahashi, H. Co-operation of innate and acquired immunity for controlling tumor cells. In "Melanoma in The Clinic". (Ed. Murph. M.) Chapter 7: 107-114 (2011. 7 月発刊 (総ページ 310) by INTEC)
- 2) 高橋秀実：第 17 章「免疫応答不全」、微生物学 (メディカル・サイエンス・インターナショナル社編) 2012 (3 月発刊)

G. 学会発表

- 1) 高橋秀実：日本医科大学における東洋医学教育の現状と展望. KAMPO MEDICAL SYMPOSIUM 2011 (シンポジウム) 2011 年 2 月 5 日 (東京)
- 2) 高橋秀実：ピロリ菌と自己免疫. 第 21 回千駄木 感染・免疫・アレルギー研究会 (特別講演) 2011 年 3 月 1 日 (東京) .
- 3) 高橋秀実、廣田薫、高久俊、高久千鶴乃、近江恭子、福山耕治、小野頭人、吉永恵美、平馬直樹：自己免疫性肝炎に合併した血小板減少性紫斑病に奏功した東洋医学的治療 第 6 2 回日本東洋医学会学術総会 2011 年 6 月 10-12 日 (札幌) .
- 4) 高久俊、大藪英一、栗林秀樹、高久千鶴乃、廣田薫、吉永恵美、近江恭子、福山耕治、小野頭人、平馬直樹、高橋秀実：偏頭痛に対して三黄瀉心湯が著効した一例 第 6 2 回日本東洋医学会学術総会 2011 年 6 月 10-12 日 (札幌) .

- 5) 高久千鶴乃、廣田薫、高久俊、吉永恵美、近江恭子、福山耕治、小野頭人、平馬直樹、高橋秀実：随伴症状を治療することで改善した慢性蕁麻疹の 3 症例 第 6 2 回日本東洋医学会学術総会 2011 年 6 月 10-12 日 (札幌) .
- 6) 廣田薫、近江恭子、小野頭人、吉永恵美、福山耕治、高久千鶴乃、高久俊、平馬直樹、高橋秀実：難治性逆流性食道炎を伴い心因的ストレスにより増悪を繰り返した唾液分泌過多症の一例. 第 6 2 回日本東洋医学会学術総会 2011 年 6 月 10-12 日 (札幌) .
- 7) 近江恭子、福山耕治、小野頭人、吉永恵美、廣田薫、高久俊、高久千鶴乃、平馬直樹、高橋秀実：月経時に必発する頭痛に対して、漢方治療が奏功した一例. 第 6 2 回日本東洋医学会学術総会 2011 年 6 月 10-12 日 (札幌) .
- 8) 小野頭人、福山耕治、近江恭子、廣田薫、高久千鶴乃、高久俊、平馬直樹、高橋秀実：漢方治療にて呼吸状態が改善した COPD の一例. 第 6 2 回日本東洋医学会学術総会 2011 年 6 月 10-12 日 (札幌) .
- 9) 高橋秀実：東洋医学入門：免疫と漢方 平成 23 年度山形大学講演 (特別講演) 2011 年 7 月 27 日 (東京) .
- 10) Takahashi, H.: Uptake and Dissemination of HIV by Mucosal Innate Cells. Japan-US Cooperative Medical Science Program: The 25th Joint Scientific Meeting of AIDS Panels. September 21-23, 2011 (Atlanta).
- 11) 高橋秀実：丸山ワクチンの作用機序に対する新たな視点 ガンプロフェッショナル養成プランセミナー 2011 年 10 月 1 日 (東京) .
- 12) 高橋秀実：漢方医学と最新の免疫学 東京女子医科大学東洋医学研究所特別講演 2011 年 10 月 20 日 (東京) .
- 13) Wakabayashi, A., Nakagawa, Y., Shimizu, M., Takahashi, H.: Enhancement of co-stimulatory molecule-expression and cross-presentation of antigens in mucosal DCs after oral administration of antigenic molecules plus cholera toxin. 第 40 回日本免疫学会学術集会 2011 年 11 月 27-29 日 (千葉) .

- 14) Shinya, E., Shimizu, M., Owaki A., Watanabe E., Matsumura, J., Takaku, C., Takahashi, H. : HIV-1 Nef interferes with CD1a lipid antigen presentation via PAK2.
第 40 回日本免疫学会学術集会
2011 年 11 月 27-29 日 (千葉) .
- 15) Takahashi, H. : Control of HIV infection and dissemination at the mucosal compartments.
第 25 回日本エイズ学会学術集会 (特別講演) 2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日 (東京) .
- 16) 高橋秀実. : 母乳を介した HIV 感染伝播に関する免疫学. 第 25 回日本エイズ学会学術集会 (セミナー)
2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日 (東京) .
- 17) 高橋秀実. : 感染症と東洋医学
第 25 回日本エイズ学会学術集会 (ランチョセミナー)
2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日 (東京) .
- 18) 新谷英滋、清水真澄、大脇敦子、渡邊恵理、松村次郎、高久千鶴乃、高橋秀実 : Interaction of HIV-1 Nef and p21-Activated Kinase 2 (PAK2): Nef down-regulates CD1a lipid Ag presentation via PAK2.
第 25 回日本エイズ学会学術集会
2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日 (東京) .
- 19) 高久千鶴乃、清水真澄、大脇敦子、渡邊恵理、松村次郎、近江恭子、渡理英二、新谷英滋、高橋秀実 : 樹状細胞上の CD1d 発現の低下は HIV 感染標的である CD4 陽性 NKT 細胞の誘導率を上昇させる.
第 25 回日本エイズ学会学術集会
2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日 (東京) .
- 20) 松村次郎、大脇敦子、清水真澄、秋山純一、新谷英滋、岡慎一、高橋秀実 : HIV 患者の腸管粘膜感染細胞内におけるウイルス核酸の実態.
第 25 回日本エイズ学会学術集会
2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日 (東京) .
- 21) 高橋めぐみ、松村次郎、稲垣真一郎、高橋秀実 : 長期培養の結果誘導された HIV-1 感染者由来 CD56+T 細胞の CD4+T 細胞に対する細胞傷害活性.
第 25 回日本エイズ学会学術集会
2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日 (東京) .

H. 知的財産権の出願・登録状況

本年度は特にございません。

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

分担研究者 高久 洋 千葉工業大学 工学部 生命環境科学科 教授

研究要旨 本研究は HIV-1 gag 発現組換えバキュロウイルスをマウス骨髄由来樹状細胞(BMDC)へ感染させ、自然免疫および適応免疫応答を評価し、エイズワクチンとしてのバキュロウイルス感染樹状細胞ワクチン開発を目指す。今年度は、HIV-1 gag 遺伝子組換えバキュロウイルスを Balb/c マウス骨髄由来樹状細胞(BMDC)に感染させ HIV-1 Gag 発現樹状細胞を作製し、樹状細胞が NK 細胞、T 細胞および B 細胞の活性化を誘導するか否かを *in vitro* と *in vivo* で評価した。その結果、rBV-gag はマウス樹状細胞を活性化させ多彩な自然免疫および適応免疫応答を發揮し、HIV-1 感染制御がマウスレベルで確認できた。

A. 研究目的

HIV 感染拡大は、流行地域だけでなく世界視点で取り組み解決していくことが重要課題である。そのため、HIV 感染拡大阻止にはエイズワクチンの開発が鍵となる戦略である。しかし、予防感染効果を有するエイズワクチン開発には至っていないのが現状である。そこで、本研究ではバキュロウイルスより産生させた gag タンパク質ウイルス粒子(gag-VLP)および HIV-1 gag 発現組換えバキュロウイルスをマウス骨髄由来樹状細胞(BMDC)へ感染させ、自然免疫および適応免疫応答を評価し、エイズワクチンとしての新規 HIV-1 gag 発現バキュロウイルス感染樹状細胞ワクチンの開発を目指す。

特に樹状細胞 (dendritic cell ; DC) は強力な抗原提示細胞として近年最も注目されている細胞で、HIV-1 の最初の標的細胞であり、HIV を T 細胞へ伝達する役割をもつ。樹状細胞における HIV の潜伏感染は、メモリーT 細胞やマクロファージ同様エイズの病態に重要な意味をもつと考えられることから、活性化樹状細胞(自然免疫)を HIV ワクチンとして用いる研究を遂行する。

今年度は、HIV-1 gag 遺伝子組換えバキュロウイルスを Balb/c マウス骨髄由来樹状細胞(BMDC)に感染させ HIV-1 Gag 発現樹状細胞を作製し、樹状細胞が NK 細胞、T

細胞および B 細胞の活性化を誘導するか否かを *in vitro* と *in vivo* で評価した。さらに HIV-1 Gag 特異的細胞障害性効果があるか否かを評価することでエイズワクチンとしての可能性を検討した。特にバキュロウイルスは一過性ウイルスで哺乳類細胞に対して細胞毒性はなく、マウス樹状細胞にも感染し、NK 細胞、T 細胞および B 細胞を活性化および IFN- γ を産生するなど、自然免疫及び獲得免疫を誘導する特色を有する。

B. 研究方法

gag タンパク質をウイルス粒子表面および感染細胞内で発現する rBV-gag(AcCAG-gag/Ph-gp64-gag) は HIV-1 NL4-3 株の全長 gag 遺伝子を導入した pAcCAGgag-Ph-gp64-gag とバキュロウイルスゲノムを sf9 細胞に形質導入し HIV-1gag 発現組換えバキュロウイルス(rBV-gag)を作製した。構築したバキュロウイルス粒子で BMDC への感染を試み、細胞表面分子を FACS で解析し、サイトカインの産生を ELISA で測定することで細胞性免疫の活性化を検討した。また、バキュロウイルス感染 BMDC と脾臓細胞を共培養し、NK 細胞、CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞及び B 細胞の活性化(CD69 発現と IFN- γ 産生細胞)を FACS で解析した。さらにバキュロウイルス感染 BMDC をマウスへ投与し、