

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05087

研究課題名(和文) エイズ根治を目指した新規免疫賦活化療法の開発

研究課題名(英文) Development of new immunotherapy treatments toward a cure for HIV

研究代表者

山本 拓也 (Yamamoto, Takuya)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 免疫老化プロジェクト・プロジェクトリーダー

研究者番号：60752368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,100,000円

研究成果の概要(和文)：HIV-1は、一度感染すると体内から排除することが難しく、抗ウイルス薬の中断により再度増殖する。従って、エイズ根治にはHIV-1を体内から完全に排除する必要がある。免疫から逃れているウイルス潜伏感染細胞は、特にリンパ組織に集積していることがわかっており、その状況を反映することの出来る動物モデルを用いた新規治療法の検証が必要である。本研究により、我々は、抗ウイルス薬療法中の患者の臨床的特徴を反映したSIV感染慢性期抗ウイルス薬治療サルモデルを樹立した。その上で感染細胞を再活性化し、また同時に免疫反応を活性化し得るエイズ治療薬としてのSTINGリガンドの可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HIV-1に対する抗ウイルス薬は広く普及しているが、依然としてHIV-1感染症に対する根治療法の開発は世界的にも望まれており、本研究を含む新規治療法の開発研究の学術的、社会的意義は高いと考えられる。その目的達成のため、これまでサルを用いた急性期治療モデルは世界的にも多数報告されていたが、本研究により実臨床に近い慢性期治療モデルを世界に先駆けて樹立できたことは、エイズ根治に向けた大きな一歩を踏み出せたと考えられる。さらに、新規免疫療法となる可能性をもつ免疫賦活化剤としてのSTINGリガンドを同定することができたことで、本研究成果が、今後より具体的な新規治療法の確立へと繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)： Elimination of the hidden HIV-1 is required for the cure from diseases related to HIV-1 infection. The latently infected cells under cART located mainly in lymph tissues. For the eradication of such cells, an appropriate animal model, which recapitulate pathological features after HIV-1 infection is essentially required. Here, we have established the macaque model under cART during chronic phase of infection, which potentially reflects many clinical features of HIV-1 infected individuals under cART. On the other hand, we found the potential usages of STING ligands for HIV treatment because STING ligands could stimulate latently infected cells and also activate immune responses simultaneously at least in vitro. Thus, we injected either a STING ligand or saline in two cART treated monkeys. However, we couldn't see any significant difference between them, therefore we are going to increase the number of monkeys for further investigation.

研究分野：感染免疫学

キーワード：エイズ 潜伏感染 免疫療法 アジュバント HIV SIV CTL 自然免疫

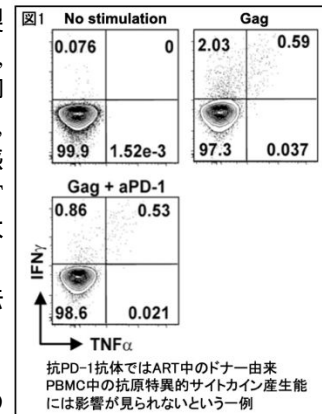
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

複数の抗レトロウイルス薬の開発や多剤併用療法(combination antiretroviral therapy (cART))の確立により、エイズは不治の病ではなくなったと考えられている。cARTでは多くの患者において血中ウイルス量を検出限界以下にコントロール出来る一方、体内からウイルス潜伏感染細胞を完全に除去する事は出来ない。つまり一度cARTを開始すると一生薬を飲み続けなければならない、根本的な治療には未だ至っていないのが現状である。研究開始当初から欧米を中心に、治療用ワクチンという形で、cART中に免疫反応を増強する事で潜伏感染細胞を排除しようとする試みが行われてきたが、良好な結果は得られていなかった(Achenbach CJ. et al, *Lancet HIV*. 2015)。その理由として、大きく2つの可能性を考えていた。

1) HIV 特異的 CD8 T 細胞の機能が完全ではない可能性

研究代表者はこれまでに HIV 特異的 CD8 T 細胞によるウイルス複製抑制が重要である事を報告しており (Yamamoto T, *J Virol*. 2009, Yamamoto T, *J Virol*. 2012) cART 下においても、強力なウイルス複製抑制にはこの CD8 T 細胞が必要であることが報告されている (Deng K, *Nature*. 2015)。しかし HIV 慢性持続感染期においては、多くの HIV 感染者で CD8 T 細胞機能異常が見られ (Yamamoto T, *Blood*. 2011) cART や現行治療用ワクチンではこの CD8 T 細胞の機能が改善されることはなく、CD8 T 細胞による潜伏感染細胞除去がなされないと考えられる。昨今、CD8 T 細胞機能改善を期待した抗 PD-1 抗体によるがん免疫療法が大変に注目されているが、研究代表者のこれまでの研究結果では、cART により CD8 T 細胞上 PD-1 発現量が減少することが分かっており (Yamamoto T, *Blood*. 2011) cART 中の HIV 感染者では抗 PD-1 抗体の CD8 T 細胞機能改善効果には疑問が残るという結果が研究開始時点の予備検討により得られていた (図1)。そのため新たな方法論で HIV に対する免疫反応、特に CD8 T 細胞を刺激、誘導する免疫療法が必要であると考えられた。



2) HIV 特異的 CD4 T 細胞の活性化によりウイルス複製が強力に誘導される可能性

HIV 慢性感染期では HIV 特異的 CD4 T 細胞が、他の T 細胞よりも HIV に感染している事が報告されている(Douek DC. et al *Nature* 2002)。そのため例えば治療用ワクチンでは、ワクチンに含まれる HIV 抗原により HIV 特異的 CD4 T 細胞が強く活性化され、目的とする T 細胞性免疫を誘導するだけでなく、HIV 複製を強力に促進し、結果的に新たな標的細胞が増加してしまう可能性が考えられる。つまり免疫反応を増強するために通常のワクチンにより抗原を加えるリスクは高い。

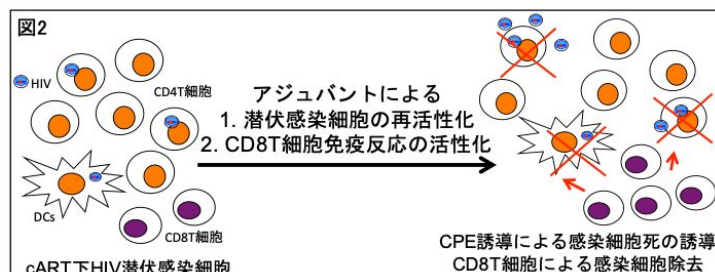
他方、潜伏感染細胞排除のためには、潜伏感染細胞を再活性化させ、ウイルス障害活性(CPE)による感染細胞死を誘導する事、ならびに CD8 T 細胞を中心とする免疫反応の活性化を誘導する事が重要であることが示唆されており、cART 下、ある一定レベルで一過性に潜伏感染細胞を再活性化させることが不可欠であると考えられる。

以上の背景より、過剰な潜伏感染細胞の再活性化を引き起こす事なく、CD8 T 細胞による感染細胞除去を誘導する戦略が有効であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、特定の HIV 抗原を追加することなく、アジュバント単独で自然免疫系を刺激し、潜伏感染細胞を一過性に再活性化、またそれに伴う CD8 T 細胞活性化による潜伏感染細胞除去の有効性を追求することを目的とした (図2)。具体的には Toll 様受容体(TLR)9 ヒト型合成リガンド CpG ODN である K3、あるいは強力に CTL を誘導することが知られている細胞内 DNA 認識受容体 STING のリガンドを単独ないし複合的に用いる事とした。計画開始時において、これら免疫賦活化能を有するアジュバントの HIV 感染症に対する治療効果は不明であった。

また本研究は全身性のウイルス感染症である HIV 感染症に対する新規免疫療法効果を検討するものであるため、最終的には動物実験による生体での評価が必須であると考え、HIV 感染動物モデルで第一選択となるサル SIV 感染エイズモデルを用いて総合的な評価を行うこととした。



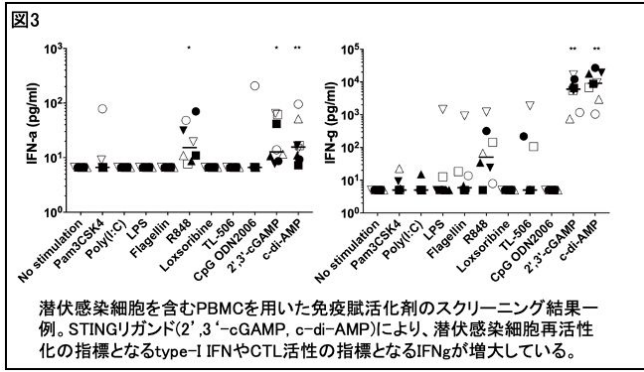
3. 研究の方法

本研究ではまず SIV 慢性感染サル PBMC を用いて、種々アジュバントの *in vitro* 添加による感染細胞再活性化能を検討し、同様に抗原特異的 CD8 T 細胞活性化能について検討を行った。次に慢性感染カニクイザル cART モデルの樹立、さらにはそれを用いた *in vivo* 実験によるアジュバント治療効果の検証と段階的に評価しながら研究を進めた。

4. 研究成果

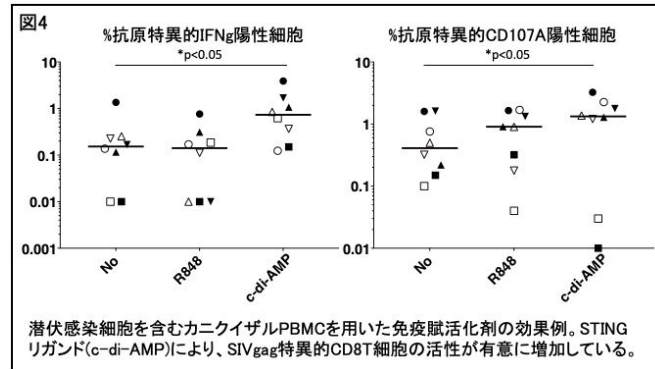
H29 年度：新規治療候補分子としての STING リガンドの同定

初年度は、主に *in vitro* 実験により、SIV 感染細胞における自然免疫賦活化剤の免疫活性化能を評価した。具体的には、SIV 潜伏感染状態のモデルとして、SIV 感染後 40 週の慢性持続感染期にあるカニクイザルのうち、自然に血中ウイルス量が検出限界以下となっているが、末梢血単核細胞(PBMC)中の Gag DNA は測定可能な 8 頭を対象とした実験を行った。まず、これら個体より血液を採取し、PBMC を分離精製後、この PBMC を *in vitro* で各種アジュバントにより刺激した。刺激後の培養上清中のサイトカイン産生を測定した結果、SIV 感染細胞を用いた場合においても、非感染細胞同様に TLR7/8 リガンド、ならびに STING リガンドを用いた場合、Type-I IFN や IFN- γ を強力に賛成することが明らかになった (図 3)。



またこれらアジュバント 添加により、感染細胞より産生されると考えられる培養上清中のウイルス RNA 量が有意に増加した。つまり、これらアジュバント は自然免疫反応の活性化を介して、SIV 潜伏感染細胞の再活性化を引き起こすことが出来る可能性が示唆された。

さらに、抗原特異的 CTL 再活性化能を評価するために、上記感染個体由来 PBMC を SIV Gag に対する overlapping peptides で刺激し、polyfunctional アッセイを行った。未刺激および TLR7/ア

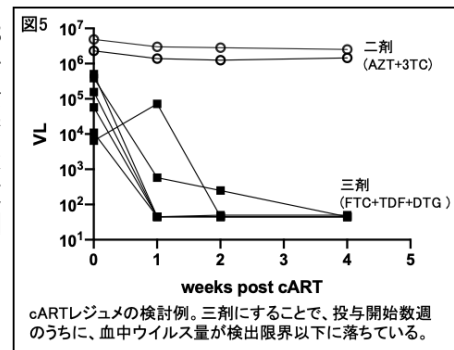


ゴニスト添加群と比較して、STING リガンドである c-di-AMP を添加した場合、抗原特異的 IFN- γ 、ならびに CD107a 産生細胞数が有意に増加していた (図 4)。

以上の結果をまとめると、少なくとも *in vitro* において STING リガンドは、SIV 潜伏感染細胞の再活性化、ならびに抗原特異的 CTL 誘導能を有する可能性が示唆された。本成果は、学術論文として報告している (Yamamoto et al, 2019 Sci Rep)。

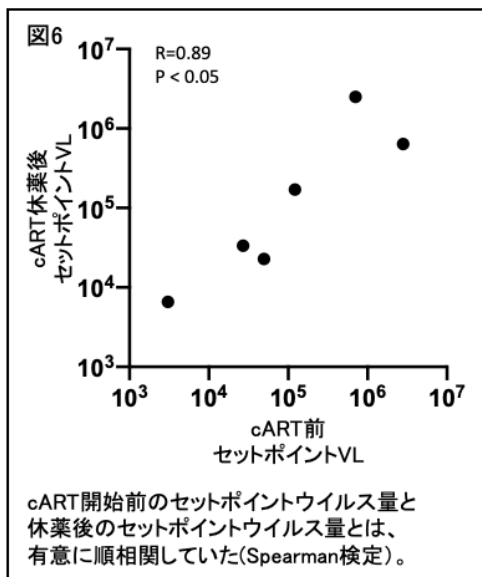
H30 年度:慢性感染カニクイザル cART モデルの樹立

2 年度目には、慢性期 SIV 感染カニクイザルにおける cART モデルを樹立するために、SIVmac239 の直腸感染を行い、明確なセットポイントウイルス量を示す慢性持続感染が確認された 8 頭に関して、感染後 68 週の慢性感染期に cART を 1 日 1 回皮下投与により開始し、その治療効果を検討した。まず、核酸系逆転写酵素阻害剤(AZT+3TC)の二剤による cART を行った 2 頭では、開始後 4 週までに目立った VL の抑制は観察されなかった。一方で、核酸系逆転写酵素阻害剤、非核酸系逆転写酵素阻害剤、インテグラーゼ阻害剤 (FTC+TDF+DTG)の三剤を用いた 6 頭においては、全ての個体で開始後数週間の内に VL は検出限界以下に抑えられ、この効果は 3 ヶ月以上継続することが観察された (図 5)。次に、この一連の cART 経過観察の諸過程における免疫の状態を評価した。まず cART により CD4/CD8 の割合は上昇していることから、cART による CD4 陽性 T 細胞の回復が示唆された。一方で、フローサイトメーターを用いた解析から 1)T 細胞の分化成熟度、2)T 細胞受容体刺激依存的なサイトカイン産生能、3)SIV 抗原特異的 CD8 陽性 T 反応は、それぞれ cART の有無による影響を受けないことが明らかとなった。以上より、本慢性期 SIV 感染カニクイザル cART モデルは、実際の cART 治療中患者における潜伏感染細胞及び免疫学的状態を高度に反映していると考えられ、cART 期の潜伏感染細胞を標的とした新規治療法の前臨床評価モデルとして有用であると考えられた。



H31 年度：新治療の検証開始、及び治療効果の新規評価系の樹立

最終年度には、前年度までに樹立した慢性期 SIV 感染カニクイザル cART モデルを用いて、初年度に *in vitro* の系で同定した新規治療薬候補 STING リガンド c-di-AMP の治療効果を *in vivo* にて検証した。2 頭の c-di-AMP 投与個体を、それぞれ生食投与個体と比較した結果、cART の中断により、全ての個体においてウイルス量のリバウンドが観察された。問題点として、このような複雑な動物モデルにおいて、既存のウイルス学的、免疫学的評価系では、対象個体が少ない場合に治療効果を正しく評価することが非常に困難であった。そのため、本研究では、次世代型フローサイトメーターを用いた高次解析系を導入し、評価系の最適化を進めた。具体的には cART を施したサル血液及びリンパ組織を用いて、潜伏感染細胞の排除に重要な抗原特異的 T 細胞応答が解析可能になり、また潜伏感染細胞の集積しているリンパ組織の T 細胞解析系を新たに樹立し、さらに得られた多次元データを、機械学習を組み合わせた方法により解析する手法も確立した。結果、特筆すべき点として、リバウンド後のウイルス量は c-di-AMP 投与の有無によらず、cART 開始前のウイルス量と相関しており、cART 開始前のウイルス量を治療効果の評価指標に入れる必要性が示唆された(図 6)。以上、現時点では c-di-AMP の単剤投与で主だった治療効果を証明する結果は得られていないものの、今後対象となるサル個体数を増加し、新しく確立した評価系を用いて、個体ごとの更なる治療効果の検証を行っていくことで、引き続き STING リガンドの治療薬としての可能性を検討していく。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamamoto T, Masuta Y, Momota M, Kanekiyo M, Kanuma T, Takahama S, Moriishi E, Yasutomi Y, Saito T, Graham BS, Takahashi Y, Ishii KJ.	4. 巻 31
2. 論文標題 A unique nanoparticulate TLR9 agonist enables a HA split vaccine to confer Fc R-mediated protection against heterologous lethal influenza virus infection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 81~90
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxy069	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fali T, Fabre-Mersseman V, Yamamoto T, Bayard C, Papagno L, Fastenackels S, Zoorab R, Koup RA, Boddaert J, Sauce D, Appay V.	4. 巻 3
2. 論文標題 Elderly human hematopoietic progenitor cells express cellular senescence markers and are more susceptible to pyroptosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 1~14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.95319	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Masuta Y, Yamamoto T, Natsume-Kitatani Y, Kanuma T, Moriishi E, Kobiyama K, Mizuguchi K, Yasutomi Y, Ishii KJ.	4. 巻 200(6)
2. 論文標題 An Antigen-Free, Plasmacytoid Dendritic Cell-Targeting Immunotherapy To Bolster Memory CD8+ T Cells in Nonhuman Primates.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Immunol.	6. 最初と最後の頁 2067-2075
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1701183.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanuma T, Yamamoto T, Kobiyama K, Moriishi E, Masuta Y, Kusakabe T, Ozasa K, Kuroda E, Jounai N, Ishii KJ.	4. 巻 198(12)
2. 論文標題 An antigen-free, pDC-targeting immunotherapy to bolster memory CD8+ T cells in non-human primates.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Immunol.	6. 最初と最後の頁 4707-4715
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1600731.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高濱正吉、岡村智崇、神沼智裕、滝口雅文、保富康宏、山本拓也
2. 発表標題 免疫賦活化剤によるSIV潜伏感染細胞排除の可能性
3. 学会等名 第32回近畿エイズ研究会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高濱正吉、神沼智裕、岡村智崇、保富康宏、山本拓也
2. 発表標題 SIV潜伏感染細胞排除を目指した自然免疫賦活化剤の応用
3. 学会等名 第32回日本エイズ学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kanuma T, Takahama S, Okamura T, Yasutomi Y, Yamamoto T.
2. 発表標題 STING ligand re-activates latently SIV infected cells and enhances SIV-specific CTL responses.
3. 学会等名 The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamamoto T, Masuta Y, Momota M, Takahashi Y, Ishii KJ.
2. 発表標題 Adjuvant effect of a nanoparticulate TLR9 agonist for protection against heterologous influenza challenge through FcR - mediated effector functions.
3. 学会等名 The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 3. 升田雄士, 山本拓也, 百田匡寿, 高橋宜聖, 石井健
2. 発表標題 ユニバーサルインフルエンザワクチン開発に向けたK3-SPGアジュバントの応用
3. 学会等名 第22回日本ワクチン学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takuya Yamamoto
2. 発表標題 How can we improve CTL functions during cART?
3. 学会等名 18th Kumamoto AIDS seminar (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山本拓也
2. 発表標題 ART開始時期の違いによるHIV特異的CD8T細胞機能変化
3. 学会等名 第31回日本エイズ学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考