

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591641

研究課題名(和文) 蛍光HIVの表皮侵入機構の可視化と新規HIV侵入阻害薬の開発

研究課題名(英文) Visualization of transepidermal invasion of fluorescent HIV and development of the new HIV entry inhibitor

研究代表者

川村 龍吉 (KAWAMURA, Tatsuyoshi)

山梨大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70262657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究結果からMaraviroc (MVC)を内服したヒトの表皮内LCはHIV感染に対して非常に強い抵抗性を持つことが明らかとなった。このことから、AIDS治療薬として開発された同剤が内服マイクロビサイドとして臨床応用可能であることが示唆された。また、Langerhans細胞のHIV感染抑制実験において、EFdAおよびMVCがTenofovirに比べて有意に優れたHIV感染抑制効果を持つことが示唆され、特にEFdAは外用マイクロビサイドとして実用可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It became clear that Langerhans cells (LCs) in the epidermis of volunteer, who took Maraviroc (MVC), had very strong resistance for HIV infection, suggesting that MVC; the agent developed as an AIDS therapeutic drug has been demonstrated as a useful oral micro beside. In addition, in the in vitro HIV infection experiment with monocyte-derived LCs, it was suggested that EFdA and MVC had a superior suppressant effect against HIV infection, and that EFdA can be practically used as micro beside.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：性行為HIV感染 Langerhans cells Maraviroc EFdA

1. 研究開始当初の背景

かつて“死の病”であった HIV (Human immunodeficiency virus) 感染症は、近年の抗ウイルス薬併用療法 (Highly Active Anti-Retroviral Therapy: HAART) の急速な進歩により、現在では慢性疾患の一つとしてとらえられつつある。その一方で、HIV に対する有効なワクチンが未だ存在せず、現在でも世界全体で約 3500 万人が HIV に感染しており、年間約 230 万人もの人新たに HIV に感染している (UNAIDS report on global AIDS epidemic 2013)。

一回の異性間性交渉による HIV 感染リスクは 0.01-0.40% と非常に低いものの、同感染経路は世界における新規 HIV 感染原因の約 8 割を占める。HIV 感染者の精液や膣分泌液などの体液中のウイルスが非感染パートナーの粘膜・皮膚に曝露されると、HIV は粘膜・皮膚局所から生体内侵入し、その後所属リンパ節に運ばれて宿主での永久的な感染を成立させる。性行為 HIV 感染初期において、HIV は粘膜・皮膚の上皮内ランゲルハンス細胞 (LCs) への感染を足がかりとして、上皮内のタイトジャンクションや細胞間デスモゾームといった強固なバリアをすり抜けて生体内に侵入し、さらに LCs をまるで“トロイの木馬”のように巧みに利用しながら生体内に播種していく。

一方、現在推し進められている HIV 感染拡大予防戦略の代表的なものとして、HIV 以外の STD の治療、マイクロビサイドの開発、割礼の推奨などが挙げられる。2010 年に核酸系逆転写酵素阻害薬 (NRTI) の Tenofovir gel の膣内外用が有意に異性間性行為 HIV 感染を抑制することが報告された (抑制率; 39%)。Randomized control trial (RCT) で効果が確認されたマイクロビサイドは現在のところ同剤のみであるが、新たに開発された NRTI の EFdA は既存の抗 HIV 薬に比べて格段に強力な抗 HIV 作用を有し、新規マイクロビサイドとして期待されている。また、CCR5 阻害薬 Maraviroc 内服による RCT (HPTN 069) も現在進行中である。

2. 研究の目的

本邦では、他の先進国の新規 HIV 感染者数が減少傾向に転じつつあるのに対し、依然年間千人を上まわるペースで増加し続けている。現在の HIV の流行を阻止すべく、コンドーム以外の方法で性行為 HIV 感染を防ぐマイクロビサイドの開発が全世界で積極的に推し進められている。近年「異性間性行為において HIV は皮膚・粘膜表皮内ランゲルハンス細胞 (以下 LC) の感染を介して生体内に侵入する」という我々がこれまで提唱してきた仮説が世界的に認められつつある。

本研究の目的は、抗 AIDS 治療薬として開発された CCR5 阻害薬; Maraviroc を性行為前に内服することによって HIV 感染を予防できるか、すなわち Maraviroc が内服マイク

ロビサイドとして応用可能であるかを検討することにある。さらに、新規 NRTI の EFdA が外用マイクロビサイドとして応用可能であるかを検討する。本研究は、新しい性行為 HIV 感染予防法の開発に貢献することが期待され、また Discordant couple (どちらか一方が HIV に感染しているカップル) の生殖補助療法へのトランスレーショナルリサーチとしても重要である。

3. 研究の方法

被験者 (ボランティア) の対象集団と標本の定義: 20 歳以上の健常男性で、一般健康状態が良好な者 (生命にかかわる疾患、麻痺性疾患にかかっていない。長期にわたるステロイド服薬歴がない)。除外基準 (exclusion criteria); HIV 感染者。研究責任者は、候補となる被験者が取り込み基準を満たし、除外基準に該当しないことを確認した上で、被験者として登録した。

MVC (300 mg x 2/day) を 1 日、3 日、あるいは 14 日間内服した健常ボランティア (各 5 名) から表皮、血液、を採取し (最終内服 2 時間後)、MVC 濃度を測定した。

近年我々は、経皮 HIV 侵入メカニズムを解明するため、表皮水疱蓋を用いた新規 ex vivo HIV 感染モデルを確立した (Kawamura T et al. J Exp Med 192:1491-1500, 2000)。このモデルを用いて、性行為 HIV 感染における CCR5 阻害薬; Maraviroc (シーエルセントリ; ファイザー製薬) の経皮的 HIV 感染阻害効果を検討した。まず、Maraviroc 内服前あるいは内服後に健常ボランティアから皮膚 (表皮) を表皮水疱蓋として採取する。この表皮シートに HIV (HIVBaL; R5 HIV) を曝露し、2 時間後に表皮シートを PBS にて 3 回洗浄後培養液に浮かべる。HIV 曝露 3 日後に表皮シートから遊走した細胞 (skin emigrants; 90% 以上が LC) を回収し、skin emigrants を PE 標識抗 CD11c 抗体で染色後、FITC 標識抗 HIVp24 抗体で intracellular staining し、フローサイトメトリーにて解析した。

上記において得た HIV 曝露 3 日後の skin emigrants を自己 CD4 陽性 T 細胞と 2 週間共培養し、培養上清中の HIVp24 を ELISA にて継続的に測定し (上清中の HIV は 99% 以上が T 細胞より産生される) HIV 感染 LC から CD4 陽性 T 細胞への HIV 播種・伝播能を定量した。

健常ボランティアから末梢血を採取して、単球を GM-CSF/ IL-4/ TGF- β 存在下で一週間培養することで mLC を作製した。次に mLC を EFdA、Tenofovir および MVC (100-5000 nM) と 30 分間培養後、各々の mLC に HIV (HIVBaL; R5 HIV) を曝露し、2 時間後に mLC を 3 回 PBS にて洗浄し、培養した。HIV 曝露 7 日後に mLC を回収し、PE 標識抗 langerin 抗体および APC 標識抗 CD11c 抗体 (LC マーカー) で染色後、FITC 標識抗 HIVp24 抗体で intracellular staining し、フローサイトメトリーにて mLC

の HIV 感染率を比較解析した。

さらに、同一ボランティアから得た末梢血より CD4 陽性 T 細胞を調整し、それぞれの Drug/HIV 曝露後 mLC と共培養し (mLC:CD4+ T cells = 1 : 100)、培養上製の HIVp24 を ELISA にて定量し、CD4 陽性 T 細胞からの HIV 産生量、すなわち HIV 感染 mLC から CD4 陽性 T 細胞への HIV 播種能を比較検討した。

4 . 研究成果

すべてのボランティアにおいて、MVC 内服前 (Pre) における表皮内 LC の HIV 感染が種々の程度で認められた (0.67-3.11%)。しかし、MVC を 3 日間あるいは 14 日間で内服したボランティアではいずれにおいても、表皮内 LC の HIV 感染率 (Post) は 0.00% と完全に抑制された。一方、MVC を 1 日間で内服したボランティアでは HIV 感染は完全には抑制されなかった (% inhibition: 91.5% および 89.6%)。

MVC 内服前 (Pre) では、すべてのボランティアにおいて、HIV 曝露表皮より遊走した HIV 感染 LC から CD4 陽性 T 細胞への HIV 播種・伝播が観察された。しかし、MVC を 3 日間あるいは 14 日間で内服した後では、T 細胞より産生される上清中の HIV が同定されず、HIV 曝露表皮中 LC から CD4 陽性 T 細胞へ HIV 播種・伝播されていないことが確認された。一方、MVC を 1 日間で内服したボランティアでは、HIV 播種・伝播は完全には抑制されなかった。

さらに、MVC 内服後の同剤の皮膚 (表皮) 血への移行を検討した。MVC を 1 日、2 日、および 3 日間で内服した場合の表皮内平均 MVC 濃度は、それぞれ 21.91 ± 13.80 , 23.36 ± 13.28 , 31.54 ± 20.61 nM であった。

EFdA、Tenofovir および MVC の各薬剤の前処置は、mLC の HIV 感染を有意に抑制した。さらに、3 人のボランティアから樹立した mLC いずれの感染抑制実験においても同様の結果が得られた。

この各薬剤前処置による mLC の HIV 感染効果は HIV 感染 mLC から CD4 陽性 T 細胞への HIV 播種能との相関が認められた。

以上の結果から MVC を内服したヒトの表皮内 LC は HIV 感染に対して非常に強い抵抗性を持つことが明らかとなった。このことから、AIDS 治療薬として開発された MVC が性行為 HIV 感染予防薬として実用可能であることが示唆され、同剤が内服マイクロビサイドとして臨床応用可能であることが示唆された。また、mLC の HIV 感染抑制実験において、EFdA および MVC が Tenofovir に比べて有意に優れた HIV 感染抑制効果を持つことが示唆され、外用マイクロビサイドとして実用可能であることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 13 件)

Inozume T, Nakazawa R, Tanaka K, Harada K, Kawamura T, Shibagaki N, Shimada S. A case of oral mucosal fixed eruption caused by methacrylate. Contact Dermatitis. 2014 70(6):387-8. DOI: 10.1111/cod.12183 査読有

Takaki M, Inozume T, Matsuzawa T, Ando N, Yamaguchi M, Harada K, Kawamura T, Shibagaki N, Shimada S. Case of primary cutaneous peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified, with characteristics of follicular helper T cells. J Dermatol. 2014 In press DOI: 10.1111/1346-8138.12493. 査読有

Matsuzawa T, Kawamura T, Ogawa Y, Maeda K, Nakata H, Moriishi K, Koyanagi Y, Gatanaga H, Shimada S, Mitsuya H. EFdA, a reverse transcriptase inhibitor, potently blocks HIV-1 ex vivo infection of Langerhans cells within epithelium. J Invest Dermatol. 2014 134(4):1158-61. DOI: 10.1038/jid.2013.467. 査読有

Matsuzawa T, Kawamura T, Ogawa Y, Takahashi M, Aoki R, Moriishi K, Koyanagi Y, Gatanaga H, Blauvelt A, Shimada S. Oral administration of the CCR5 inhibitor, maraviroc, blocks HIV ex vivo infection of Langerhans cells within the epithelium. J Invest Dermatol. 2013 133(12):2803-5. DOI: 10.1038/jid.2013.215. 査読有

Harada K, Inozume T, Kawamura T, Shibagaki N, Kinoshita T, Deguchi N, Shimada S. Two cases of autosomal recessive woolly hair with LIPH gene mutations. Int J Dermatol. 2013 52(5):572-4. DOI: 10.1111/j.1365-4632. 査読有

Aoki R, Kawamura T, Goshima F, Ogawa Y, Nakae S, Nakao A, Moriishi K, Nishiyama Y, Shimada S. Mast cells play a key role in host defense against herpes simplex virus infection through TNF- α and IL-6 production. J Invest Dermatol. 2013;133(9):2170-9. DOI: 10.1038/jid.2013.150. 査読有

Ogawa Y, Kawamura T, Matsuzawa T, Aoki R, Gee P, Yamashita A, Moriishi K, Yamasaki K, Koyanagi Y, Blauvelt A, Shimada S. Antimicrobial peptide LL-37 produced by HSV-2-infected keratinocytes enhances HIV infection of Langerhans cells.

Cell Host Microbe. 2013 16;13(1):77-86.
DOI: 10.1016/j.chom.2012.12.002. 査読有

Inozume T, Ando N, Sano S, Harada K, Kawamura T, Shibagaki N, Shimada S. Case of rheumatoid papules: is this a link between vasculitis and rheumatoid nodules? J Dermatol. 2012 39(12):1091-2.
DOI: 10.1111/j.1346-8138.2012.01597. 査読有

Hanawa F, Inozume T, Harada K, Andou N, Kawamura T, Shibagaki N, Shimada S. A case of dermatomyositis accompanied by spontaneous intramuscular hemorrhage despite normal coagulability. Rheumatol Int. 2013 33(11):2949-50.
DOI: 10.1007/s00296-012-2492-3. 査読有

Ogawa Y, Aoki R, Harada K, Matsuzawa T, Inozume T, Shibagaki N, Kawamura T, Shimada S. Neutrophilic panniculitis with non-caseating granulomas in a Crohn's disease patient. Eur J Dermatol. 2012 22(3):404-5.
DOI: 10.1684/ejd.2012.1737. 査読有

Harada K, Yamaguchi M, Miyajima S, Kawamura T, Shibagaki S, Shimada S. Gutter method: noninvasive management of ingrown nails caused by epidermal growth factor inhibitor treatment. Clin Exp Dermatol. 2012;37(6):703-4.
DOI: 10.1111/j.1365-2230.2012.04358 査読有

Hanawa F, Harada K, Andou N, Kawamura T, Shibagaki N, Fukuda S, Hashimoto T, Shimada S. Case of mucous membrane pemphigoid characterized by circulating immunoglobulin A and immunoglobulin G autoantibodies to the gamma-2 subunit of laminin-332. J Dermatol. 2012 39(11):962-3.
DOI: 10.1111/j.1346-8138.2011.01501. 査読有

Kawamura T, Ogawa Y, Nakamura Y, Nakamizo S, Ohta Y, Nakano H, Kabashima K, Katayama I, Koizumi S, Kodama T, Nakao A, Shimada S. Severe dermatitis with loss of epidermal Langerhans cells in human and mouse zinc deficiency. J Clin Invest. 2012 1;122(2):722-32.
DOI: 10.1172/JCI58618. 査読有

〔学会発表〕(計 3件)

T. Kawamura, The roles of Langerhans cell in acrodermatitis enteropathica and HIV infection. The 11th International Symposium of the Cutaneous Biology Research Institute. 2013 Sep, Seoul

T. Kawamura, Strategies for preventing sexual transmission of HIV. 13th KUMAMOTO AIDS Seminar, 2012, Oct, Kumamoto

T. Matsuzawa, T. Kawamura, R. Aoki, Y. Ogawa, M. Takahashi, Y. Koyanagi, A. Blauvelt, H. Gatanaga and S. Shimada. A novel strategy to prevent sexual transmission of HIV-1 by oral administration of CCR5 inhibitor. The 36th Japanese Society for Investigative Dermatology Annual Meeting. 2011 Dec, Kyoto.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川村 龍吉 (KAWAMURA Tatsuyoshi)
山梨大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：70262657