

図2. まとめ (モデル図).

## 9. HIV-1 ゲノム複製における変異誘導機構の解析

分担研究者 高橋秀宗 (国立感染症研究所感染病理部)

**研究要旨** HIV-1 の変異が出現する逆転写機構において宿主 topoisomerase I は nuclease によって digest された HIV-1 ゲノム RNA をそのライゲース活性によって修復し逆転写反応を完結させている。この反応は ATP によって調節されており、変異発生の分子機構として重要であると考えられる。

### A. 研究目的

HIV-1 に対するワクチン開発、抗ウイルス剤開発を阻む大きな要因に HIV-1 の易変異性がある。この変異は逆転写酵素が招く変異に加え逆転写の機構自体に原因があると考えられる。本研究においては HIV-1 について、複製を制御する宿主因子と結びつけ解析することによりエスケープミュータントの出現が少ない抗ウイルス剤開発を模索しモデル動物、ワクチン開発の基礎とすることを目的とした。

### B. 研究方法

精製したレトロウイルスに基質を加えると、非常に効率が悪く、ゲノム RNA をテンプレートとして DNA が産生される (ERT assay, endogenous reverse transcription assay)。この系へ昨年度までの研究により cDNA 産生を上昇させることが判明している宿主因子 topoisomerase I とその機能的ミュータントを加え topoisomerase I と関連分子の HIV-1 逆転写における役割を解析した。

### C. 研究結果

- a, 組替えバキュロウイルスを用いて、ヒト topoisomerase I の野生株及び RNase 活性を失った Y723F、RNase 活性に加えライゲース活性を失った R488F の二つのミュータントを産生させ、精製した。
- b, 精製した野生株 topoisomerase I はスーパーコイル型の DNA をリラックスできたが、他の二つのミュータントは全く活性を示さなかった。
- c, 濃縮した HIV-1 ウイルスへ基質、detergent と共に上記精製酵素を加え、サザンプロ

ットによって産生 cDNA を解析した。その結果、野生株及び RNase 活性を失った Y723F は同様に cDNA 産生を上昇させたが、さらにライゲース活性を失った R488A は全く cDNA の産生に影響を及ぼさなかった。

- d, ATP 添加によってウイルスに含まれる topoisomerase I が活性化されても cDNA 産生へ与える影響がサザンプロット上、認められない少量の濃縮 HIV-1 に対し、上記精製 topoisomerase I と濃度を変え ATP を加えた。その結果、R488A を加えた場合または topoisomerase I を加えない場合に ATP は濃度を変化させても cDNA の産生へ影響を及ぼさなかった。しかし野生株 topoisomerase I の存在下では ATP によって著明に cDNA の産生が上昇した。

### D. 考察

Topoisomerase I は nuclease とライゲース活性を併せ持った酵素であり、核酸のリン酸基へ作用する重要な酵素アミノ酸の置換により nuclease 及びライゲース活性を失う。ワクシニアウイルス topoisomerase I において、RNase 活性とライゲース活性に不可欠なサイトは 18 種において保存されており、よって、ヒト酵素においても同様の置換によって、RNase 活性及びライゲース活性を失ったと考えた。濃縮 HIV-1 における逆転写への影響を上記の酵素を使い調べた結果から、逆転写の活性化には topoisomerase I の RNase 活性ではなく、ライゲース活性が必須であることが判明した。また昨年度の研究により ATP が逆転写を活性することが解っていたが、ATP の作

用点は topoisomerase I であることが強く示唆された。

上記のように topoisomerase I は digest された genome RNA を結合することによって逆転写を上昇させるが、digest 自体はゲノム RNA の二次構造解除に必要であると予想した。よって digest する因子はコンタミした RNase A 等ではなく特異的な RNase であると推測する。

#### E. 結論

Topoisomerase I は何らかの nuclease よって digest された HIV-1 ゲノム RNA をそのライゲース活性に修復し逆転写反応を上昇させる。この反応は ATP の topoisomerase I への結合によって上昇させられると考える。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Takahashi,R.H., Nagashima,K., Kurata,T.,

Takahashi,H. Analysis of HTLV-II-like particle produced by recombinant baculovirus infected insect cells. *Virology* in press.

2. Takahashi,H., Takahashi,R.H., Hasegawa,H., Horiuchi,M., Shinagawa, T., Yokoyama,K., Kimura,K., Haritani,M., Kurata,T., Nagashima,K. Characterization of antibodies raised against bovine-PrP-peptides. *J.NeuroVirol.* in press.
3. Chen,Z., Matsuo,K., Asanuma,H., Takahashi,H., Iwasaki,T., Suzuki,Y., Aizawa,C., Kurata,T., Tamura,S. Enhanced protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with both hemagglutinin- and neuramidase-immunization expressing DNAs. *Vaccine*, 17:653-659, 1999

##### 2. 学会発表

1. 高橋秀宗、高橋礼典、倉田毅：HIV-1複製を制御する宿主因子群の解析 第46回日本ウイルス学会総会

# 10. サルエイズ脳炎発症モデルの確立に関する研究

分担研究者 向井鏡三郎 (国立感染研筑波医学実験用霊長類センター主任研究官)

**研究要旨** S I V<sub>Mac</sub> 239株を接種した一頭のカニクイザル(Cy1-1)は、ウイルス接種後3年7ヶ月目の死亡時には、エイズ脳炎を発症していた。Cy1-1死亡時に2代目カニクイザル(Cy1-2)に輸血したところ、輸血後20週目に脳炎と肉芽腫様肺炎(Granulomatous Pneumonia; GP肺炎)により死亡した。もう一頭のカニクイザル(Cy2-1)はウイルス接種後3年10ヶ月目に死亡したが、著明なGP肺炎と肉芽腫様リンパ節炎(G. Lymphadenitis; GL)が認められた。Cy2-1死亡時に2代目カニクイザル(Cy2-2)に輸血したところ輸血後63週目にやはり脳炎とGP肺炎で死亡した。Cy1-2死亡時に3代目カニクイザルCy1-3に輸血したところ輸血後180週目にGP肺炎を伴ったエイズで死亡した。また、Cy1-2とCy2-2の脳組織からモノサイト系S I V産生細胞株(BM1, BM5)を初めて樹立し、BM5のゲノム中のプロウイルスS I V DNAや、BM5が産生するS I VのRNAゲノムの解析から、産生されたS I Vはモノクローナルであり、マクロファージ指向性塩基配列の一部を持っていることが明らかになり、本細胞株の産生するS I Vが脳炎発症株としてサルへ接種できる可能性が示唆された。

## A. 研究目的

世界的なエイズの蔓延とともに最近ではアジア、アフリカ大陸にもその流行がみられ、エイズの子供・治療法の開発が待たれている。

最近、我国でも種々の抗エイズ薬の使用が認可されたが、エイズウイルスの増殖を一時的に抑制したり、患者の延命を期待できるものしかないのが現状である。また、投薬により、中枢神経系、脳脊髄液中のウイルス量を低下させる薬剤はAZTと我々の報告した6-CI-ddG以外には報告がないし、その効果も一時的なものである(1-6)。

このような中で、サルエイズ脳炎発症モデルの開発とその発症機構の解明は、エイズ克服にとって重要な意義をもつ。昨年度報告したように、S I V<sub>Mac</sub>239株を接種した2頭のカニクイザル(Cy1-1とCy2-1)で3年7カ月目と3年10カ月目に、それぞれ脳炎と、肉芽腫様肺炎(GP肺炎)及び肉芽腫様リンパ節炎(GL)を認め、輸血によりin vivoでウイルスの継代を行ない脳炎の発症を確認した。

また、エイズ脳炎発症サルの脳組織よりウイルス産生培養細胞株(2株; BM1, BM5)を樹立し、この細胞の特性の一部は昨年度報告した。本年

度の目的はこれら細胞株、特に、BM5のゲノム中のプロウイルスS I V DNA、また、BM5が産生するS I VのRNAゲノムの解析を行うことを目的とした。

## B. 研究方法

昨年度の報告のように使用動物は、カニクイザル2頭(Cy1-1、Cy2-1)、2代目カニクイザル2頭(Cy1-2、Cy2-2)及び3代目カニクイザル1頭(Cy1-3)で、初代カニクイザルには、S I V<sub>Mac</sub>239株(TCID<sub>50</sub>~5X10<sup>4</sup>)を静脈接種し、2代目、3代目カニクイザルには5mlの輸血をおこなうことにより、S I Vの接種を行った。また、脳組織由来細胞株BM1, BM5の培養には通常のRPMI培地と6穴平底プレートを用い、培地は4日毎に交換した。

ゲノム中のプロウイルスS I V DNAの塩基配列は、独自にデザインしたプライマー(図1)によるPCR産物をTAクローニングし、1回のPCR反応あたり、3~5クローンの塩基配列をLi-COR Seqencerを用いて決定した。また、BM5が産生するS I VのRNAゲノムの塩基配列決定は、RT-PCR反応以外は同様に行った。

図 1 Primer designing and sequence

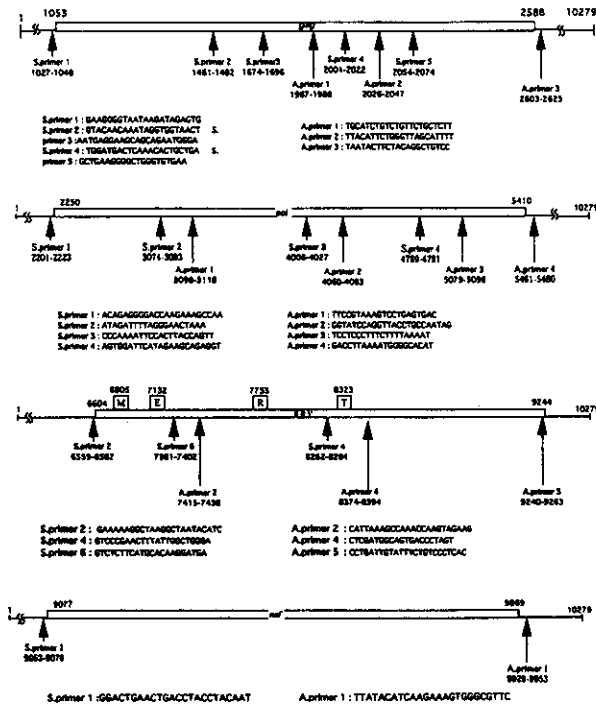


図 2

Onset of AIDS Encephalitis in Cynomolgus Monkeys and Passage by Blood Transfusion

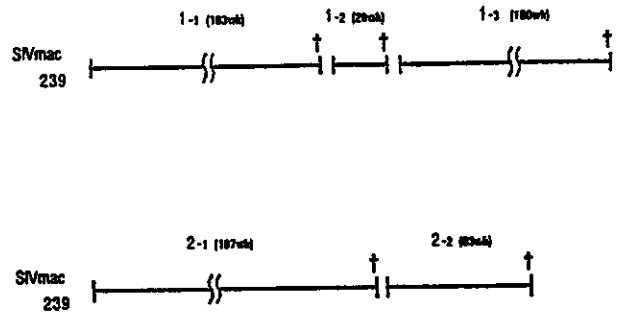


表 1 輸血によるSIVの接種とその病態

動物	Cy 1-1 (7才8カ月齢)	Cy 1-2 (10才10カ月齢)	Cy 1-3 (7才7カ月齢)	Cy 2-1 (8才6カ月齢)	Cy 2-2 (9才7カ月齢)
ウイルス株	239	239 (輸血2代目)	239 (輸血3代目)	239 (輸血2代目)	239 (輸血2代目)
SIV mac	( $5.0 \times 10^4$ TCID <sub>50</sub> )	(輸血: 5 ml)	(輸血: 5 ml)	( $5.0 \times 10^4$ TCID <sub>50</sub> )	(輸血: 5 ml)
発症時期	183 週	20 週	180 週	197 週	63 週
症状 (行動)	沈鬱	沈鬱	沈鬱	沈鬱	沈鬱
病理学的所見	<b>脳炎</b>	<b>脳炎</b>			<b>脳炎</b>
脳	脳膜下に SIV <sup>+</sup> 多核巨細胞、 脳実質にはない	脳膜下に SIV <sup>+</sup> 多核巨細胞、 脳白質灰白質側 小血管周囲に Mφ の結節性 集積と SIV <sup>+</sup> 多核巨細胞			脳白質灰白質側 小血管周囲に Mφ の結節性 集積
肺	肺に SIV <sup>+</sup> 多核巨細胞の浸潤 (GP 肺炎)	著明な肉芽腫様肺炎 (GP 肺炎)	著明な肉芽腫様肺炎 (GP 肺炎)	著明な肉芽腫様肺炎 (GP 肺炎)	著明な肉芽腫様肺炎 (GP 肺炎)
リンパ節	萎縮	萎縮 多核巨細胞あり 肉芽腫様リンパ節炎	萎縮 多核巨細胞あり 肉芽腫様リンパ節炎	萎縮 多核巨細胞あり 肉芽腫様リンパ節炎	萎縮 肉芽腫様リンパ節炎
脾臓	脾臓をを中心とする脾部に に顕性 B 細胞リンパ腫			脾臓下に顕性 B リンパ腫	

研究結果

SIV<sub>MAC</sub> 239 株のカニクイザルへの接種と輸血による感染経過

SIV<sub>MAC</sub> 239 株を接種したアカゲザル3頭のうち2頭は、2年以内に悪性リンパ腫や高度の貧血を伴うエイズを発症して死亡したが、カニクイザルにおいてはエイズ発症までの潜伏

期間が長く、2頭とも4年近く経て、1頭はウイルス接種後3年7カ月目にエイズ脳炎で、もう1頭は3年10ヶ月目に、脳炎は伴わなかったが、GP肺炎により死亡した。

初代カニクイザルCy 1-1死亡時に2代目カニクイザルCy 1-2に5ml輸血したところ、輸血後20週目に脳炎とGP肺炎を伴うエイズで

死亡した。Cy 1-2死亡時に同様に3代目カニクイザルCy 1-3に輸血したところ、輸血後180週目に、脳炎は見られなかったが、著明なGP肺炎を伴って死亡した。

一方脳炎がなく、GP肺炎のみがみられた1代目のCy 2-1から2代目Cy 2-2への輸血では63週目に脳炎と肉芽腫様リンパ節炎(GL)がみられ、死亡した。

組織病理学的解析により、脳炎を発症したカニクイザルCy 1-1では、脳髄膜下にSIV陽性多核巨細胞を認めたが、この多核巨細胞は抗マクロファージ抗体(HAM56)陽性であり、in situ Hybridization (ISH)法でSIVのRNAを検出できたので、髄膜下マクロファージ中でSIVが増殖していたものと考えられる。また、カニクイザル2-1では、肺とリンパ節にHAM 56陽性の組織球の結節性集簇巣があり、その中にISH法で検出されるSIV陽性の多核巨細胞が認められた。従って、この症例に於いても、肺とリンパ節中のマクロファージ系組織球内でSIVの増殖があったものと考えられる。

さらに興味深いことには、SIV陽性のマクロファージ系細胞には通常みられない、増殖性細胞にのみみられるPCNA抗原やKi67抗原が検出された。これらの経過と結果をそれぞれ図2と表1に示す。

#### 輸血2代目脳炎発症カニクイザルの脳組織から樹立されたSIV産生細胞株の特徴

カニクイザルCy 1-2死亡時に脳組織を無菌的に採取し、ハサミで細断しRPMI培地で培養したところ、12日目に線維芽細胞様の単層細胞の上に球形細胞が付着した形でコロニーを形成して増殖しているのを認められた。培養上清には、感染性を持ったSIVの産生がみられた(BM1)。また、同様の球形細胞がカニクイザルCy 2-2の脳組織からも分離培養できた(BM5)。この細胞は無限増殖性を獲得しており、3年以上継代可能である。また、この細胞の表面マーカーをFACSで解析したところ、UM1+, CD14-, CD4-(3.6%), CD20-(8%+)の結果を得た。また、この細胞は、DR+, CD80+, LeuM3-, Mac387-, EB抗原-であり、SIVgag抗原陽性であった。UM-1

抗体はマカク属サルモノサイトを認識する単クローン抗体である。また、細胞内エステラーゼの組織学的染色からも、組織球系もしくは単球系の細胞であることが確認された(図3)。

ちなみに、6頭のAC期のSIV感染カニクイザルと6頭の麻疹ウイルスワクチン株感染カニクイザルの脳組織の培養を試みたが、線維芽細胞様の単層細胞の増殖はみられたが、その上に付着してコロニーを形成する球形細胞の増殖はみられなかった。また、典型的なGP肺炎が認められたが脳炎のみみられなかったCy 1-3の脳組織でもBM(Brain Monocyte-like cells)は培養できなかった(表2)。従って、BM1, BM5と同様の特性をもった細胞株は、エイズ脳炎を有する脳組織からのみ樹立できると考えられる。

#### BM細胞株ゲノムDNA中のプロウイルスSIV遺伝子塩基配列の特徴

BM5細胞株のゲノムDNA中のプロウイルスSIV DNAのLTR領域を除く全塩基配列を決定し、SIVmac239の塩基配列と比較したところ、gag, pol遺伝子ともに置換や欠失は確認されなかった。しかしながら、検出された突然変異部位は、envとnef領域に限局されていた。env遺伝子に関しては、V領域(図4)中のV4, V5領域の間で欠失部分が認められ、9個のアミノ酸に相当する27塩基の欠失が特徴的であった。この他に、env領域には、20数ヶ所の置換が確認されたが、なかでも、R. C. Desrosiersらにより報告(K. Mori et. al. J. Virol. 66, 2067 '92)されているenv領域内、マクロファージ指向性特有の4カ所の置換(6803, 7130, 7753, 8323番目の塩基)に関しては、そのうちの2カ所の置換がマクロファージ指向性特有のものと同じであった。すなわち、6805番目の塩基はGからAに(アミノ酸; V → M)、7753番目の塩基はAからGに(アミノ酸; G → R)置換していた。しかし、ほかの2カ所に関しては、7130番目の塩基はAからCに(アミノ酸; K → Q)、また、8323番目の置換は起きていなかった(図5)。

また、BM5ウイルスのV領域のアミノ酸をDNA塩基配列から推測し、SIVmac239と比較

☒ 3

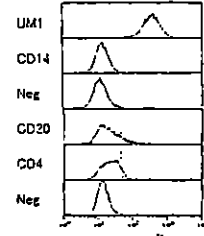
Esterase staining for determination of cell types

	Naphthol AS-D chloroacetate esterase	$\alpha$ -Naphthyl acetate esterase
#1	±	+
#5	±	+
#6	±	+
PBMC	+(partly)	+(partly)

TABLE II  
CYTOCHEMICAL REACTIVITIES OF CYCLOSPORIN  
TREATED LYMPHOCYTES

Cell Type	CD45-RO Cytochrome Esterase	CD45-RO Naphthyl Esterase
Monocytes	+	+
Macrophages	+	+
Neutrophils	+	+
Lymphocytes	-	-
Granulocytes	-	-
Basophils	-	-
Eosinophils	-	-
Plasma Cells	-	-
Small Cells	-	-
Large Cells	-	-

Characterization of CD4 negative SIV producing brain cells



Parameter	Value (%)
CD4	3.6 (weak)
CD8	0
CD20	8 (weak)
PanT	0
CD14	0.1
UM1	98.5

\* DR+, CD80 (weak), Gag+  
LeukA3-, Mac387-, EB-

表 2

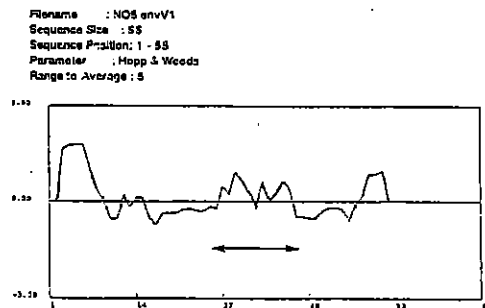
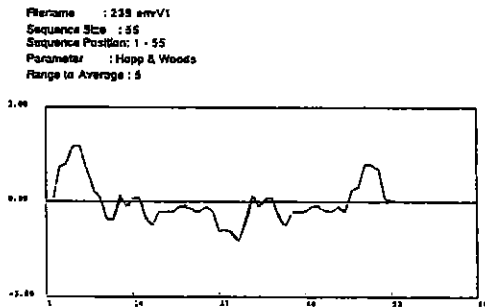
Establishment of Brain Monocyte - like Cells  
by Cynomolgus Brain Tissue Culture

Cynomolgus	BM-like Cells	Fibroblastic Cells	Encephalitis
1-1	NT	NT	+
1-2	+	+	+
1-3	-	+	-
2-1	NT	NT	+
2-2	+	+	+
Cm-1	-	+	-(AC)
Cm-2	-	+	-(AC)
Cm-3	-	+	-(AC)
Cm-4	-	+	-(AC)
Cm-5	-	+	-(AC)
Cm-6	-	+	-(AC)
Cya-1	-	+	-
Cyn-2	-	+	-
Cya-3	-	+	-
Cya-4	-	+	-
Cya-5	-	+	-
Cya-6	-	+	-

NT: Not tried

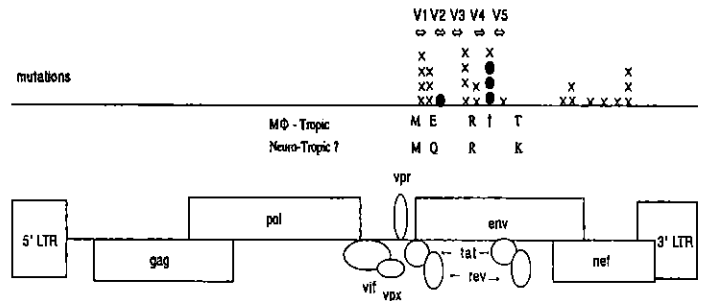
☒ 6

Hydrophobicity / Hydrophobicity Plot of V1 region in SIV mac239 and NO 5 DNA



☒ 4

Mutations in SIV genomic DNA ( BM5 virus )

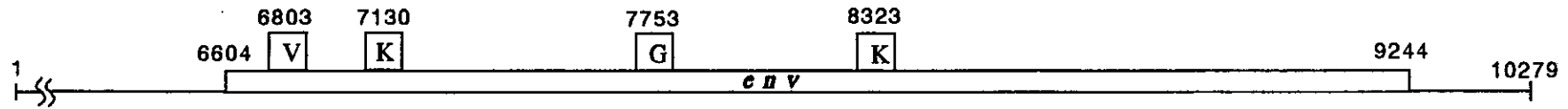


Structure of SIV

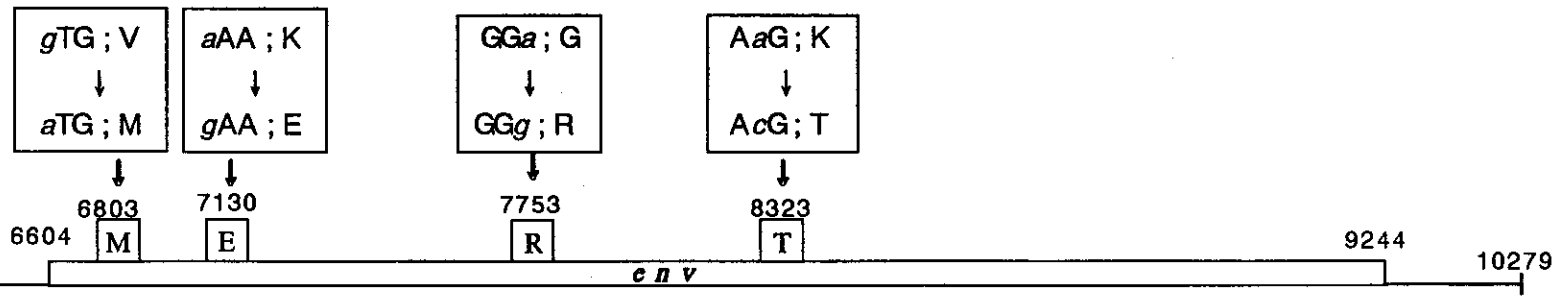
x : one mutation ● : 10 mutations ; within 150 bp stretch  
| : 27 bases deletion

## Amino acid changes in *env*-region

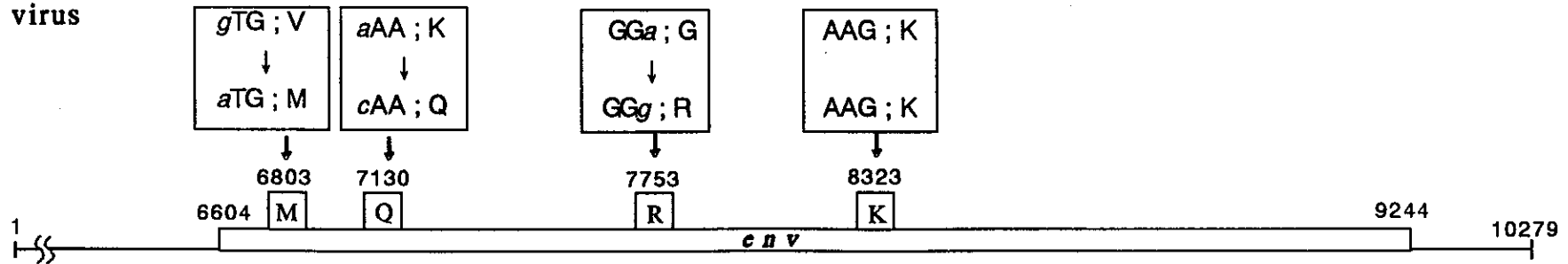
### SIVmac239



### J. Virol '92



### BM5 virus



J. Virol . 66, 2067 '92 : Specific mutations for macrophage-tropism  
 BM 5 virus : Mutations in SIV BM 5



したところ、V1 領域に関して、BM5のプロウイルスの方が親水性が高くなっていたが、他の V 領域では顕著な変化はみられなかった (図6)。また、RT-PCRによりこの細胞の産生する S I V RNA の塩基配列を決定したが、多少の例外を除いて BM5 細胞株のプロウイルス DNA 塩基配列とほぼ同様の変異が認められた。

#### D. 考察

我々のグループでは、過去10年間にわたりアフリカミドリザルとアジア産マカク属を宿主とし、数種の S I V (Simian Immunodeficiency Virus) 株を接種することによりその8割が2年以内にヒトと同様なエイズを発症する動物モデルを作成し報告してきた。現在までに、33例のアカゲザルのエイズ発症を観察してきたが、脳炎の発症は1例のみであった。しかしながら、カニクイザルにおいては、潜伏期にバラツキがあるものの5例中3例に脳炎がみられ、全例において、肉芽腫様肺炎 (GP肺炎) が認められ、肺の組織病理学的解析では、HAM 56陽性の組織球の結節性集簇巣があり、その集簇巣に ISH 法で S I V 陽性の多核巨細胞が認められた。このことは、カニクイザルにおいては、S I V がマクロファージ指向性を獲得するような遺伝子変異を起こし易く、脳炎を起こしうる神経細胞親和性を獲得した可能性が考えられる。

一方、S I V がマクロファージ指向性を獲得したのは、たまたま、感染初代の2頭のカニクイザルの体内であって、その後の輸血による S I V の継代中ではないと考えると、Cy 1-3の GP肺炎発症までの潜伏期が180週間で、初代 S I V 感染カニクイザルの潜伏期とほとんど差がないことの説明がつかない。

また、感染性 S I V<sub>Mac 239</sub> DNA クローンを接種した2頭のカニクイザルが、ほぼ同時期に相次いで (3年7カ月目と3年10カ月目) 死亡したことは、このウイルス株とカニクイザル宿主との組合せは、アカゲザルとの組合せよりも、サルエイズの病態の進行がより緩やかで、より同調しているのかもしれない。

脳炎発症カニクイザルの脳組織の病理学的検索により、大脳内に多核巨細胞を含むマクロフ

ァージの浸潤が認められ、HAM56やMac387等の抗マクロファージ抗体陽性であり *in situ* Hybridization (ISH) 法で S I V の RNA を検出できたので、大脳内マクロファージ中で S I V が増殖していたものと考えられる。

さらに、通常脳内マクロファージ系細胞にはみられない PCNA や Ki-67 抗原 (細胞増殖のマーカー) が検出できたので、脳炎を示す組織内の一部の S I V 感染マクロファージ系細胞は脳組織内で増殖能を有すると考えられた。

以上の結果が示唆するエイズ脳症の成因に対する仮説の1つは、脳炎発症カニクイザルの脳内では、通常ほとんど細胞分裂しないマクロファージがマクロファージ指向性 S I V の感染を受け、なんらかの機構で増殖能を獲得し細胞分裂を繰り返しながら、ある域値 (Threshold) を越えるまで、効率よく多量の S I V を脳脊髄液中に放出し、脳症を引き起こしているということである。

この仮説に対する証拠は、脳組織由来モノサイト様細胞株 (BM1, BM5) を我々が初めて樹立したことである。前述したように、BM1, 5細胞株はたとえ S I V 感染ザルであっても病理学的に典型的脳炎を示した脳組織からでないとは樹立できないし、試験管内で感染性 S I V を放出しながら1年以上培養可能である。また、BM1, BM5細胞株は通常の抗マクロファージ抗体 (HAM56, Mac387) には反応性しないが、組織球系もしくは単球系のエステラーゼを持つことから、組織病理学的にサル脳組織に認められた S I V 陽性マクロファージが、感染によりなんらかの機構で増殖能を獲得し、脱分化し表面抗原の一部を失いながら不死化していった結果、*in vitro* で細胞株化されたものと考えている。

今回、BM5細胞株のゲノム DNA 中のプロウイルス S I V DNA の LTR 領域を除く全塩基配列を決定したところ、突然変異部位は gag と pol 領域にはなく、env と nef 領域に限局されており、アカゲザルでマクロファージ指向性に必須と言われている塩基配列の一部をもっていた。即ち、マクロファージ指向性特有の4カ所の置換 (6803, 7130, 7753, 8323番目の塩基) に関しては、そのうちの2カ所の同一置換 (6805番目

の塩基はG→Aに、7753番目の塩基はA→Gに)がみられた。

従って、カニクイザルで脳炎を発症し得るSIVのマクロファージ指向性は、env領域の2カ所の塩基置換を含むenv領域の変異と共に、nef領域の変異が必要なのかもしれない。また、V1領域に関して、BM5のプロウイルスの方がSIV親株よりも親水性が高くなっていたので、抗原性が低下し、中枢神経親和性が高くなるのかも知れない。

また、この細胞の産生するSIVのRNAにも同様の変異がみられたことから、本細胞株の産生するSIVが脳炎発症株としてサルへ接種できる可能性が示唆された。

## E. 結論

①SIVmac239接種アカゲザルは2年以内にその8割がエイズを発症して死亡したが、したが、カニクイザル2頭はそれぞれ3年7ヶ月、及び3年10ヶ月間を経てエイズ脳炎と肉芽腫様肺炎で死亡した。

②2代目カニクイザルに輸血したところ、カニクイザル1-2は脳炎と肉芽腫様肺炎により20週目にエイズを発症し死亡し、カニクイザル2-2も1年2カ月に脳炎と肉芽腫様肺炎により死亡した。3代目カニクイザルは脳炎はみとめられなかったが、肉芽腫様肺炎で死亡した。

③輸血された2代目Cy1-2と2-2の脳組織からモノサイト系SIV産生細胞株(BM1, BM5)を初めて樹立し、この細胞の解析により、エイズ脳炎発症機構の1つが示唆された。

④BM5細胞株のゲノムDNA中のプロウイルスSIVDNAのLTR領域を除く全塩基配列を決定したところ、突然変異部位はenvとnef領域に限局されており、アカゲザルでマクロファージ指向性に必須と言われている塩基配列の1部を持っていた。また、この細胞の産生するSIVにも同様の変異がみられたことから、本細胞株の産生するSIVが脳炎発症株としてサルへ接種できる可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1)Fuji, Y., Mukai, R., Murayama, Y., Akari, H., Machida, M., Mori, K., Takasaka, M., Murakami, K., and Yoshikawa, Y.: Efficacy of 6-chloro-2',3'-dideoxyguanosine(6-Cl-ddG) on an ARC/AIDS rhesus macaque(Macaca mulatta) infected with simian immunodeficiency virus. *Exp. Anim.* 46: 83-87, 1997

2)Igarashi, T., Ami, Y., Yamamoto, H., Shibata, R., Kuwata, T., Mukai, R., Shinohara, K., Komatsu, T., Adachi, A., Hayami, M.: Protection of monkeys vaccinated with vpr- and/or nef-defective SIV strain mac/HIV-1 chimeric viruses: a potential candidate live-attenuated human AIDS vaccine. *J. Gen. Virol.* 78: 985-989, 1997.

3)Murayama, Y., Amano, A., Mukai, R., Shibata, H., Matsunaga, S., Takahashi, H., Yoshikawa, Y., Hayami, M., Noguchi, A.: CD4 and CD8 expressions in African green monkey helper T lymphocytes: implication for resistance to SIV infection. *Int. Immunol.* 9: 843-851, 1997.

4)Otani I., Fuji, Y., Akari, H., Mukai, R., Mori K., Ono, F., Kojima, E., Machida, M., Murakami, K., Doi, K., Yoshikawa, Y.: Effects of 6-chloro-2',3'-dideoxy guanosine (6-Cl-ddG) in surface lymph nodes of rhesus monkeys (Macaca mulatta) chronically infected with simian immunodeficiency virus (SIVmac 239).

*J. Veterinary Med. Sci.* 59: 891-896, 1997.

5)Fuji, Y., Mukai, R., Murayama, Y., Akari, H., Machida, M., Mori, K., Takasaka, M., Murakami, K., and Yoshikawa, Y.: Efficacy of 6-chloro-2',3'-dideoxyguanosine(6-Cl-ddG) on rhesus macaque chronically infected with simian immunodeficiency virus (SIVmac239). *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirology.* 16: 313-317, 1997

6)Fuji, Y., Mukai, R., Akari, H., Machida, M., Mori, K., Takasaka, M., Kojima, E., Murakami, K., and Yoshikawa, Y.: Antiviral effects of 6-chloro-2',3'-dideoxy guanosine (6-Cl-d

dG) in rhesus monkeys acutely infected with SIV.

Antiviral Chem. & Chemother. 9: 85-92, 1998

7) Fujii Y, Mukai R, Akari H, Machida M, Mori K, Takasaka M, Kojima E, Murakami K, Yoshikawa Y.: Antiviral effects of 6-chloro-2', 3'-dideoxyguanosine in rhesus monkey acutely infected with simian immunodeficiency virus.

Antivir. Chem. Chemother. 9, 85-92, (1998)

8) Akari H, Ono F, Sakakibara I, Murayama Y, Hiyaoka A, Terao K, Otani I, Mukai R, Adachi A, Yoshikawa Y.: Simian T cell leukemia virus type I-induced malignant adult T cell leukemialike disease in a naturally infected African green monkey: implication of CD8+ T cell leukemia.

AIDS. Res. Hum. Retroviruses, 14, 367-371, (1998)

9) Shoji S, Furuishi K, Ogata A, Yamataka K, Tachibana K, Mukai R, Uda A, Harano K, Matsushita S, Misumi S.: An allosteric drug, o,o'-bismyristoyl thiamine disulfide suppresses HIV-1 replication through prevention of nuclear translocation of both HIV-1 Tat and NF-kappa B.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 249, 745-53 (1998)

## 2. 学会発表

① 向井鏡三郎、佐多徹太郎、宇田晶彦、小松原博文、毒島孝治、村山裕一、倉田 毅、山田章雄：サルエイズ脳炎発症におけるモノサイト様細胞株 (BM1, BM2) の役割。

第12回日本エイズ学会総会 東京、1998年  
12月

# 11. 細胞性免疫誘導を目的とした抗エイズ DNA ワクチン開発研究

研究協力者 俣野 哲朗 (国立感染症研究所エイズ研究センター)

**研究要旨** 従来のものより効率よく抗原蛋白を発現し細胞性免疫を誘導する抗エイズ DNA ワクチン開発を目的として、サル免疫不全ウイルス(SIV)の env をフレンドマウス白血病ウイルス(FMLV)の env に組み換えたキメラウイルスFSIV DNAを作成した。ヒトを含む霊長類動物にはFMLVレセプター(mCAT1)は発現していないため、マカクサルモデルにおいてFSIV DNA および mCAT1 発現プラスミド DNA 投与をおこなえば (FSIV + mCAT1 DNA ワクチン)、mCAT1 発現細胞のみにおける限局的で安全なFSIV複製が可能ではないかと考えられ、従来の DNA ワクチンより高い SIV 抗原発現が期待される。培養細胞実験においては、FSIV DNA transfection により効率よく FSIV が産生され、感染実験により FSIV が mCAT1 発現細胞のみに限局的に感染・複製することが確認された。マカクサル動物実験では、FSIV + mCAT1 DNA ワクチン接種サルにおいて、SIV superchallenge に対する有効な感染防御免疫が誘導されている可能性が示された。

## A. 研究目的

現在のところ、ワクチンにより誘導される宿主防御免疫機構としては、液性免疫と細胞性免疫が重要視されている。我々は以前、SIV-HIV-1 キメラウイルス(SHIV)感染マカクサルモデルにおける CD8 depletion 実験により、感染急性期のウイルス感染抑制に細胞性免疫が重要であることを明らかにした。この結果は、本年になり、米国の他の2グループからの報告においても確認された。そこでまず、細胞性免疫誘導を目的とした抗エイズワクチン開発を検討することとした。

これまで試みられてきた細胞性免疫誘導型のワクチンとしては、ワクシニアウイルスベクターなどのウイルスベクターを用いるものと DNA ワクチンとがあるが、前者はウイルスベクター由来の抗原に対する免疫反応が強く誘導されることが難点であり、その点で後者の DNA ワクチンが有利と考えられる。この DNA ワクチンの問題点としては、十分な抗原発現レベルが得られていないことが挙げられる。そこで本研究では、抗エイズワクチン開発を目的として、従来のものより効率よく抗原蛋白を発現し細胞性免疫を誘導する新しいタイプの DNA ワクチンを考案し、SIV 感染マカクサルモデルにて検討した。

具体的には、FMLV の env を有するキメラ SIV ウイルス(FSIV)DNA を作成し、FSIV DNA と FMLV レセプター(mCAT1)発現プラスミド DNA とを DNA ワクチン (FSIV + mCAT1 DNA ワクチン) として投与することとした。霊長類動物においては、mCAT1 の発現は認められないことが知られており、FMLV のエンベロープ蛋白

(Env)をもつ FSIV は感染しえない。そこで霊長類において、FSIV + mCAT1 DNA ワクチン接種により、mCAT1 発現細胞のみにおける限局的で安全な FSIV 複製が可能ではないかと考えた。この場合、FSIV の複製により、従来の DNA ワクチンより高い SIV 抗原発現が期待される。

## B. 研究方法

**FSIV DNA 作成:** SIV の env を FMLV の env に組み換えた Friend SIV (FSIV) DNA を作成した。複製に必要と考えられる RRE 領域は保存した。env を SIV の vpu フレームに組み込んだ FSIV13、env を SIV の env フレームに組み込んだ FSIV23、および FSIV23 の nef を delete した FSIV21 を作成した。マカクサル動物実験には FSIV21 を用いた。

**サル由来の COS 細胞を用いた培養細胞実験:** まず、FSIV DNA を transfection した細胞の培養上清中の FSIV 産生量を知る目的で、SIV Gag 蛋白(p27)濃度を ELISA 法により定量した。次に、産生された FSIV を用いて、COS 細胞あるいは mCAT1 発現プラスミド DNA を transfection した COS 細胞への感染実験をおこなった。感染の有無は、感染後の細胞培養上清中の p27 濃度を調べることにより検出した。また、FSIV ウイルス粒子への FMLV Env の取り込みを免疫沈降法にて調べた。

**マカクサルを用いた動物実験:** マカクサルをワクチン接種しない対照群、FSIV DNA のみ接種する対照群、FSIV + mCAT1 DNA ワクチン接種群の3群に分けた。DNA 接種は筋肉内注射および遺伝子銃を併用した。ワクチン接種開始後24週目にSIV感染をおこなった。SIV感染に

対する感染防御をみる目的で、感染後の生体内 SIV 量を、ELISA による plasma 中の p27 濃度定量、RT-PCR による plasma 中の SIV RNA コピー数定量、DNA-PCR による末梢血リンパ球中の SIV DNA コピー数定量により測定した。

against SIV infection. The 2nd Annual Conference on Vaccine Research (Bethesda, MD, USA), 1999.

### C. 研究成果

培養細胞実験では、FSIV DNA を transfection した細胞の培養上清中の p27 濃度は高値を示した。感染実験では、COS 細胞への FSIV 感染は成立しなかったが、DNA transfection により mCAT1 を発現させた COS 細胞においては FSIV の感染・複製が認められた。また、FSIV ウィルス粒子への FMLV Env の取り込みが確認された。

マカクサルを用いた SIV 感染実験では、FSIV + mCAT1 DNA ワクチン接種サルの生体内 SIV ウィルス量は、対照サルと比較して低値を示した。

### D. 考察

培養細胞レベルでは、作成した FSIV DNA の transfection により、細胞は FMLV Env を有する FSIV を効率よく産生すると考えられた。また、FSIV は mCAT1 発現細胞のみに感染することが確認された。

マカクサルを用いた SIV 感染実験では、FSIV + mCAT1 DNA ワクチン接種サルにおいて、SIV 感染に対する防御免疫が誘導されている可能性が示された。

### E. 結論

SIV の env を FMLV の env に組み換えたキメラウィルス(FSIV)DNA を作成した。培養細胞実験では、FSIV が mCAT1 発現細胞のみに限局的に感染・複製することが確認された。マカクサルモデルにおいては、FSIV + mCAT1 DNA ワクチン接種により、有効な抗 SIV 感染防御免疫が誘導されている可能性が示された。

### F. 研究発表

#### 1 論文発表

- 1) Matano, T., Shibata, R., Siemon, C., Connors, M., Lane, H. C., and Martin, M. A. Administration of an anti-CD8 monoclonal antibody interferes with the clearance of SIV/HIV chimeric virus during primary infections of rhesus macaques. *J. Virol.* 72:164-169, 1998.

#### 2 学会発表

- 1) Matano, T., Odawara, T., Kano, M., Mori, K., and Ami, Y. A. Restricted replication of a chimeric virus for inducing protect immunity

## 12. 粘膜を介した抗 HIV 免疫反応の誘導とその感染防御効果に関する研究

分担研究者 横田 恭子 (国立感染症研究所免疫部)  
研究協力者 保田 幸子、吉澤ひとみ (国立感染症研究所・免疫部研究員)  
早田 陽子、佐々木 剛 (東海大・工学部)

**研究要旨** 粘膜面に有効な抗 HIV 免疫を誘導する技術の開発とそのメカニズムの解析、さらには粘膜免疫による感染防御効果について明らかにすることを目的として、HIV-1 gag を発現する DNA を用い、gene gun あるいは筋注による DNA 免疫の効果について解析した。DNA にはプライミング効果があること、筋注は Th1 型の免疫を誘導しやすい可能性があることが明らかとなった。また、gag に対する CTL 活性を測定するため、gag 発現マウス細胞株を樹立した。更に、弱毒化 *Salmonella Typhimurium* 菌を担体として gag 発現 DNA を投与することにより、腸管粘膜面に抗 p24 IgA 抗体が誘導される可能性が示唆された。

### A. 研究目的

粘膜を介した抗 HIV 免疫は、年々増加している異性間接触による HIV 感染伝播を阻止するための有効な手段となりうる可能性が高い。HIV の envelope を標的とした従来の感染防御の試みは、患者由来の primary isolate には有効性が低いことが指摘され、envelope 以外の比較的 variation の少ない gag/pol 領域に対する免疫方法の確立が望まれている。しかしながら、粘膜面での細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の誘導機構、その抗 HIV 効果に関してはまだ不明な点が多い。その主な理由として、安全かつ強力な粘膜アジュバントがほとんどなく、粘膜面に特異的な免疫反応を誘導しにくいことがあげられる。そこで粘膜面に有効な抗 HIV 免疫を誘導する技術の開発とそのメカニズムの解析、さらには粘膜免疫による感染防御効果について明らかにすることを目的とする。

### B. 材料と方法

#### 1. マウスおよび細胞等

Balb/c マウスの雌 7-8 週令を用いて免疫を開始した。Cos 細胞、NIH3T3/Balb は 10%FBS 含有 DMEM で培養した。組み替え gag 発現ワクシニアは感染研・感染病理部、小島朝人先生より供与いただき、マウスに  $1-2 \times 10^7$  2 回静注して CTL の陽性コントロールとした。組み替え gag p24 蛋白は大腸菌より調整し、アフィニティーカラムで純化した。

#### 2. プラスミド DNA

DNA ワクチン用に開発された pJW4303 は H.L. Robinson 博士より供与いただいた。このプラスミドに基づいて構築された HIV-1 gag 発現プラスミド pKAL148 はテキサス大学 T. A. Rizvi 博士より供与されたもので、protease の遺伝子を含む。これらのプラスミドの CMV プロモーターのかわりに EF-1 プロモーターとプラストサイジン薬剤耐性遺伝子を

含むプラスミド (pEF-BOSbsr) を感染研・巽正志先生より供与を受け、HIV-1 gag 発現プラスミドを再構築した (pEF-148)。

#### 3. トランスフェクション

NIH3T3/Balb 細胞にリポソーム法 (FuGENE™6: Boehringer) で pEF-BOSbsr あるいは pEF-148 をトランスフェクトし、blasticidin 耐性コロニーを得、RT-PCR で gag あるいは blasticidin の発現を確認した (NIH3T3/Balb-EFBOS-1, NIH3T3/Balb-EF148-2, NIH3T3/Balb-EF148-4)。更に gag 蛋白の発現は p24 エライザおよび免疫沈降で確認した。弱毒化サルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*: SL7207) はスタンフォード大学 B. Stocker 博士より供与を受け、エレクトロポレーションでプラスミドをトランスフェクトした。プラスミドをもつサルモネラ菌は OD550 が 1.0 の時に形成するアンピシリン耐性コロニー数にもとづいて cfu/ml を算出した。

#### 4. CTL assay

免疫後のマウスの脾臓細胞あるいは所属リンパ節細胞を採取し、脾臓細胞はナイロンウールカラムで T 細胞をエンリッチした。一部の脾臓細胞を 3000 rad 照射して抗原提示細胞として用い、純化した組み替え p24 を 25  $\mu$ g/ml になるように加えて 5 日間培養した。回収した T 細胞に  $^{51}\text{Cr}$  標識した NIH3T3 トランスフェクタントを標的細胞として加え、4 時間あるいは 6 時間培養後の培養上清中の chromium release によって CTL 活性を測定した。

#### 5. エライザ法による抗 p24 抗体価の測定

精製 p24 抗原を 1  $\mu$ g/ml の濃度にコートした Maxisorp plate (Nunc) を 5% スキムミルク/PBS/0.05% Tween 20 で 2 時間ブロッキングし、洗浄後適度に希釈した検体を加えて室温で 2 時間反応させた。洗浄後、IgG サブクラス毎に認識するビオチン標識ラット抗マウス IgG (1, 2a, 2b) モノクローナル抗体で 1

時間、次いで 2000 倍に希釈したストレプトアビジン HRP(Boehringer)を加えて 30 分インキュベートした。発色には o-Phenylene Diaminedihydrochloride, OPD: Sigma)を用い、OD490 の吸光度を測定した。IgA 抗体の測定には HRP 標識ヤギ抗マウス IgA( ) を 2000 倍に希釈し、感度を高めるために TMB 基質(DAKO)を用いて測定した。

### C. 研究結果

#### 1. DNA の皮内あるいは筋肉投与によるプライミング効果

マウスに DNA (pJW4303 あるいは pKAL148 を(1) gene gun で皮内、あるいは(2) bupivacane と混合して筋肉内に、2 週間毎 4 回、最後の 1 回は 1 ヶ月後に計 5 回投与した。血清中の抗 p24 抗体価を測定すると、(1)(2)ともに pKAL148 の投与群のうちの一部のマウスで 10 ng/ml 前後の IgG 抗体を検出した。そこで、最後の免疫から 10 日後に p24 抗原(30  $\mu$ g)を完全フロイントアジュバントと混合して foot pad に投与した。更に 10 日後、血清および腫瘍洗浄液を採取して、抗 p24 抗体価を測定した。図 1 に示す様に、抗 p24 IgG1 抗体価は(1) (2)の方法ともにコントロール DNA 投与群と比較して、pKAL148 を投与した群が 2-3 倍高かった。IgG のサブクラス毎にみると、IgG2a は(2)の系の pKAL148 筋注群でのみ有為に上昇していた。IgG2b はどちらの系でも 1  $\mu$ g/ml 以下であった。従って、gag 発現 DNA 投与によりプライミング効果があることが示された。

#### 2. HIV-1 gag 発現細胞の確立と CTL 活性測定

Gag に対する抗体は中和抗体ではないが、HIV の感染防御には中和抗体よりも CTL 活性の方が重要であると考えられている。マウスにおける gag の抗原エピトープの解析はほとんどなく、CTL 活性を測定するためには gag を発現するマウスの抗原提示細胞および標的細胞が必要となる。更に、マウスでは HIV-1 gag は単独では非常に発現しにくいことが知られているため、gag 発現プラスミド pKAL148 は、サル D type レトロウイルス由来の CTE (constitutively transporting element)を 3-プライム側に組み込み、rev 非依存性に gag の発現を高めるように工夫されている(図 2)。更にこのプラスミドをヒト EF-1 $\alpha$  プロモーターと blasticidine 耐性遺伝子を含む発現ベクター(pEF-BOSbsr)に組み換えて pEF-148 を再構築し、マウスの B 細胞、P815 細胞、NIH3T3/Balb 等にエレクトロポレーションあるいはリポソームで DNA を導入した。得られた blasticidine 耐性のコロニーの RNA を抽出し、発現の有無を RT-PCR で確認して幾つかのクローンを選択した。これらの細胞株の培養上清中の p24 抗原をエライザ法で測定したところ、NIH では 50-200 pg/ml 程度であり、B 細胞系の blasticidine 耐性細胞では全

く検出できなかった。Cos 細胞での一過性発現が 10-100 ng/ml 程度であることを考えると、やはりマウスでは発現効率はかなり低いことが明らかとなった。

NIH3T3 トランスフェクタントのうち、p24 発現の高い NIH3T3/Balb-148-2 及び 148-4 を標的細胞とし、gag 発現あるいは非発現ワクシニアウイルスに感染したマウスの脾臓をエフェクター細胞として、抗 gag-CTL 活性を測定した(図 3、最上段)。その結果、コントロールトランスフェクタント NIH3T3/Balb/EF-BOSbsr-1 は殺さず、EF-148-2 と EF-148-4 のみ殺す CTL 活性が、gag 発現ワクシニア感染マウスにのみ認められたことから、これら二つのクローンは CTL の標的細胞として十分機能すると思われる。これらの細胞を標的として、DNA プライムブーストして蛋白を免疫して 2 ヶ月経過したマウスの CTL 活性を測定した。脾臓細胞では明らかな活性は認められなかったが、pKAL148 を gene gun でプライムしたマウスの鼠経部リンパ節細胞ではわずかながら CTL 活性を認めた(図 3、中下段)。

#### 3. DNA による粘膜免疫の確立

経鼻による粘膜免疫が可能かどうか検討するため、Balb/c マウスに DNA(5  $\mu$ g)とリポソーム(DOTAP: Boehringer)の複合体を鼻を介して 5 回投与した。抗体産生が確認できなかったため、コレラトキシンをアジュバントとして p24 抗原を追加免疫した。しかしながら、pJW4303 投与群と pKAL148 投与群ともに抗体価は上昇せず、この方法ではプライミング効果もないことが示唆された。DNA を用いて粘膜免疫を誘導するためには、投与局所に応じた担体やアジュバントが必要となる。弱毒 *Salmonella Typhimurium* (ST)は菌体内で発現させた蛋白を抗原とする経口ワクチンとして以前より用いられていたが、近年、ST が腸管上皮細胞の M 細胞、マクロファージや樹状細胞等の細胞内にとりこまれることを利用して、eukaryote 発現用 DNA( $\beta$ -galactosidase:  $\beta$ -gal)を導入した ST を経口投与し、 $\beta$ -gal に対する免疫応答を誘導することが可能であることが報告された。そこで preliminary experiment として、これらのマウスに pEF-148 を導入した ST を  $10^8$  cfu で 2 週間毎に 4 回経口投与した。血中 IgG 抗体価は両群ともにしだいに低下していった。一方、腸管の洗浄液を採取して抗 p24 IgA 抗体を測定したところ、pKAL148 免疫群のマウスの一部で抗体価がやや高い個体があることが確認され、ST による粘膜免疫の有用性が示唆された。

### D. 考 察

DNA 免疫は、その調整の容易さや保存の簡便さを考えると、特に低開発国でのワクチン開発にむけて魅力的な技術である。しかしながら、現在までの

研究では、プライミングは可能だがそれだけでは免疫原としては比較的弱いことが指摘されている。我々も、gene gun および筋注による DNA の投与により、プライミングはされるが、それだけでは強い抗体反応は誘導されないことを明らかにした。ただし、プライミング反応は2つの投与方法で幾分異なっており、筋注では Th1 型の免疫反応を誘導する傾向があることが示唆された。残念ながら筋注群の細胞培養が不良であったため、最終段階で CTL 活性を確認できなかったが、DNA 免疫のより早期に CTL 活性が上昇していた可能性は残っており、DNA を筋注することにより細胞性免疫をより強く賦活するのかどうか今後の検討を要する。今回、マウスで発現効率が悪い HIV-1 gag を低レベルながら発現するトランスフェクタントを樹立し、これを標的として gag に対する CTL の測定が可能となったことは、今後の細胞性免疫誘導の解析に大変有用であると思われる。

Salmonella 菌は取り扱いが簡単で、しかも目的の遺伝子を簡単に導入できるという利点がある。しかも経口を介した免疫は非侵襲的かつ単純な方法であり、回数を増やすことも比較的容易である。このような弱毒化 Salmonella 菌を担体とし、粘膜面に HIV-1 gag 発現 DNA 免疫がことが可能となれば、粘膜面での CTL の誘導機構の解析およびその増強のための技術的検討を加え、粘膜免疫による感染防御の有用性を明らかにしていきたいと考えている。

## E. 結論

HIV-1 gag を発現する DNA を用い、gene gun あるいは筋注による DNA 免疫の効果について解析した結果、DNA にはプライミング効果があること、筋注は Th1 型の免疫を誘導しやすい可能性があることが明らかとなった。また、gag に対する CTL 活性を測定するため、gag 発現マウス細胞株を樹立し、この細胞を標的とした CTL 活性の測定が可能であることを確認した。更に粘膜面を介して DNA 免疫をするため、弱毒化 Salmonella Typhimurium 菌を担体として gag 発現 DNA を投与することにより、腸管粘膜面に抗 p24 IgA 抗体が誘導される可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Yasuda, S., Oka, S., Naganawa, S., Nakasone, T., Honda, M., Iwasaki, M., Sata, T., Kojima, A., Matsuda, S., Takemori, T., and Tsunetsugu-Yokota, Y. : Detection of HIV-specific antibodies in sera and saliva of HIV-infected adults and in sera of infants born to HIV-1-infected mothers. *Mirobiol. Immunol.*,42:305-311, 1998.

- (2) Yagi, T., Sugimoto, A., Tanaka, M., Nagata, S., Yasuda, S., Yagita, H., Kuriyama, T., Takemori, T., and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Fas/FasL interaction is not involved in apoptosis of activated CD4+T cells upon HIV-1 infection in vitro. *J. Acq. Imm. Def. Synd. Hum. Retro.* 18:307-315, 1998

- (3) Tsunetsugu-Yokota, Y., Kato, T., Yasuda, S., Matsuda, Z., Suzuki, Y., Koyanagi, Y., Yamamoto, N., Akagawa, K., Cho, M.W. and Takemori, T. : Distinct regulation of HIV-1 LTR in CD45RA+ and CD45RO+ T cells activated by PPD-antigen presentation of dendritic cells. submit, 1999

### 2. 学会発表

- (1) 横田 (恒次) 恭子, 田村秀人, 保田幸子, 加藤珠実, 竹森利忠。樹状細胞における HIV の増殖制御について。第46回日本ウイルス学会、東京、平成10年10月
- (2) 加藤珠実, 田村秀人, 松田善衛, 竹森利忠, 横田 (恒次) 恭子。HIV-1 Nef 蛋白の生物学的機能の解析。第46回日本ウイルス学会、東京、平成10年10月
- (3) 横田 (恒次) 恭子, 田村秀人, 加藤珠実, 保田幸子, 巽正志, Yichen Lu。樹状細胞を介した抗原刺激によって伝播活性化される SHIV の増殖能と病原性に関する解析。第12回日本エイズ学会総会、東京、平成10年12月。
- (4) 田村秀人, 渡辺信和, 加藤珠実, 保田幸子, 赤川清子, 本多三男, 竹森利忠, 横田 (恒次) 恭子。樹状細胞の BCG 感染とその抗原提示を介して誘導される BCG 特異的細胞傷害性 T 細胞の性状について。第28回日本免疫学会総会、神戸、平成10年12月。
- (5) Y. T. YOKOTA, T. KATO, H. TAMURA, Y. SOUDA, S. YASUDA, K. AKAGAWA, & T. TAKEMORI : Differentiation of monocytes to macrophages but not to immature and mature dendritic cells leads to a high level of HIV-1BaL production, despite of a low level of chemokine receptor, CCR5. 6th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Chicago, IL, USA, February, 1999.



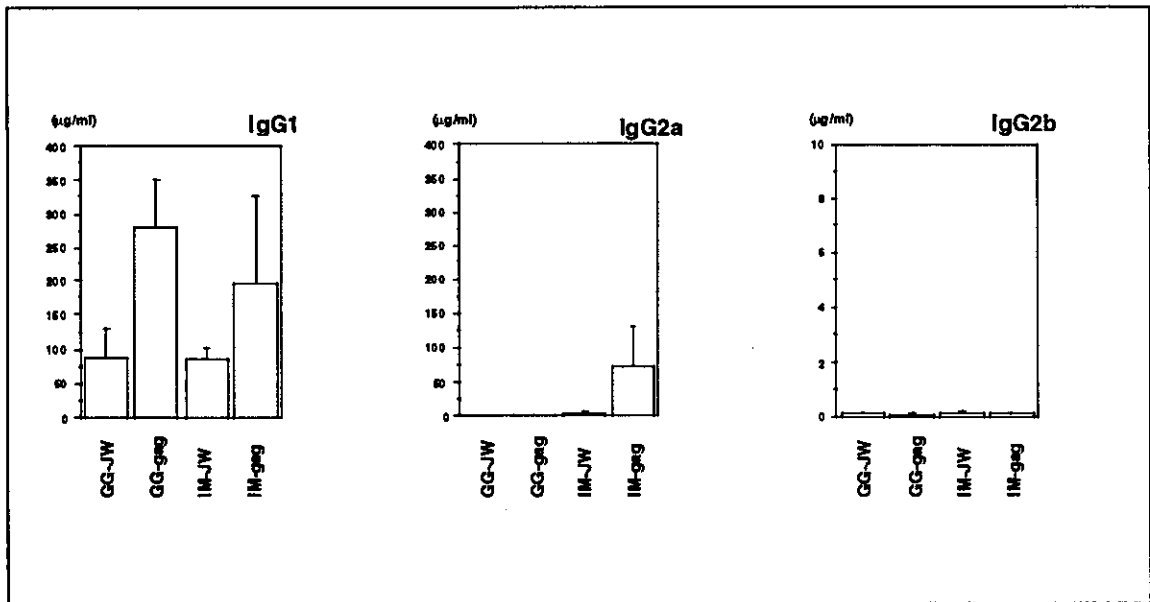


図1. DNA プライムして p24 抗原を追加免疫したマウスの IgG サブクラス毎の抗 p24 抗体価

GG-JW: gene gun で pJW4303 を投与、GG-gag: gene gun で pKAL148 を投与、IM-JW: pJW4303 を筋注、IM-gag: pKAL148 を筋注

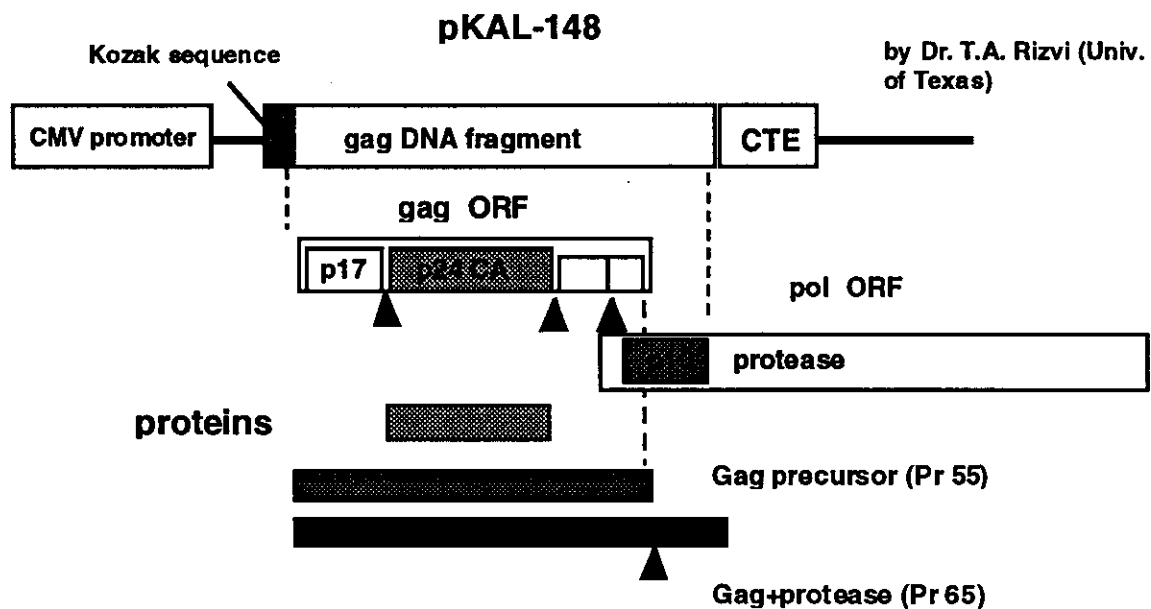


図2. HIV-1 gag を発現する DNA の構造

### HIV-1 gag-specific CTL activity

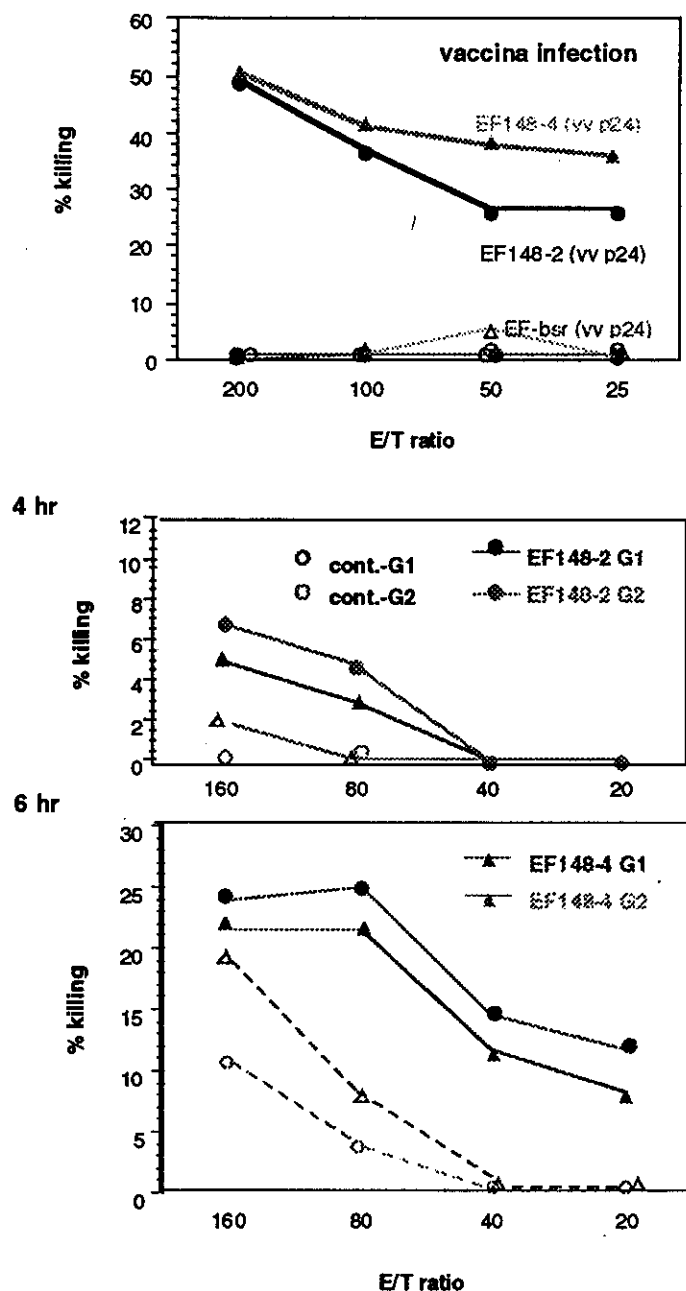


図3. HIV-gag を発現するマウス NIH3T3/Balb 細胞を標的とした CTL 活性

gene gun で pJW4303 (triangle)あるいは pKAL148 (circle)を皮内投与し、p24 抗原で追加免疫したマウスの鼠径リンパ節細胞をエフェクターとし、NIH3T3/Balb に pEF-148 をトランスフェクトしたクローン No.2 (4 hr), No4 (6 hr)の killing を測定した。

## 13. HIV ペプチド断片による CTL 活性抑制：そのメカニズムの解析

分担研究者 高橋 秀実（日本医科大学微生物学免疫学教室）

共同研究者 中川 洋子、高橋 めぐみ（日本医科大学微生物学免疫学教室）

**研究要旨** 以前より報告者らは HIV 特異的 CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞(CTL)をエピトープペプチドで処理すると、著明にキラー活性が低下し Anergy に陥ることを報告してきた。今回は、この Anergy に陥った CTL の性状を調べ、1) キラー活性の抑制は一時的であり、時間の経過とともに回復すること、2) キラー活性抑制時には IL-2 レセプター b 鎖発現が低下しているが、活性の回復に伴い経時的に b 鎖の発現が上昇すること、3) そしてキラー活性の低下は Granzyme B の放出による細胞傷害因子の枯渇に起因すること、4) また Anergy に陥った CTL は、大量の IFN-g を放出するとともに、自らが放出した IFN-g の影響を受けないように IFN-g レセプターの発現を著明に低下させていることなどを見いだした。現在これらの現象から CTL が Anergy に陥るメカニズムについて考察し、こうした抑制に陥らないような方策を検討中である。

### A.研究目的

HIV の体内制御の鍵を握ると推測されるウイルス特異的 CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞(CTL)が HIV-env 蛋白により apoptosis に陥る現象が報告され、CTL のダメージと病状進行との関連性が示唆されている(Nature, 395:189-194, 1998)。一方、我々もこうした CD8 のダメージこそが HIV 感染の一局面であろうとの立場から、HIV-V3 ペプチドによる CD8 陽性 CTL 傷害活性の特異的抑制現象を報告してきた (J.Exp.Med.183: 879, 1996)。なおこれまでは、活性化した CTL が制御される機構に関し、CTL が認識するエピトープペプチドに酷似したアナログペプチドにより T 細胞がレセプターレベルで競合的に阻害される現象（アンタゴニズム）が注目され、競合阻害説が提唱されてきた。すなわちウイルスに変異が起こり、その変異ウイルス由来の蛋白質がもとの CTL の認識を妨げ、その活性が抑制されるという説である。しかしながらそのためには変異ウイルスがその変異ウイルス特異的 CTL から逃れて生体内に存在すること、及びその変異ウイルス由来のペプチドが大量に血液中に存在することが必須であることから、この機構のみによる CTL の不活化を説明するのは困難と考えられる。報告者らは、HIV-1 特異的 CTL を高濃度の最小認識エピトープペプチドと抗原提示細胞非存在下で培養すると、著明にキラー活性が低下することを見だし、そのメカニズムの解析を進めてきた。そして、こうした現象はペプチドの結合した CTL が他の CTL によって傷害されたり、自己の MHC 分子にペプチドが結合

することにより Apoptosis が誘発された結果ではなく、一時的な麻痺状態（Anergy）によることを証明してきた。本研究では、ペプチドにより Anergy に陥った CTL の性状の変化を調べその詳細なメカニズムを探るとともに、こうした抑制に陥らないような方策を検討することを目的とする。

### B.研究方法

CD8 陽性 CTL line としては HIV-1 (IIIB 株)env 蛋白 gp160 を特異的に認識する Line-IIIB を用いた。この Line-IIIB に最小認識ペプチド I-10 (minimal immunodominant epitope; RGPGRFVVTI) を 1 時間 pulse し、洗浄後 1 時間、1 日、2 日、3 日目の細胞を IL-2 存在下、及び非存在下で培養し、その gp160 gene transfected BALB/c 3T3 細胞に対する細胞傷害活性を 51Cr リリース法により測定すると共に、IL-2 レセプター b 鎖の発現を FACS により追跡した。また、IL-2 に対する反応性は、IL-2 存在下及び非存在下で細胞を培養し、3H-Thymidine uptake によりその増殖能を調べた。またペプチド処置した細胞の上清中に含まれる IFN-g 産生量を mouse IFN-g 測定キットにより測定し、細胞を NP-40 で溶解して得た cell lysate に含まれる Granzyme B 活性を B LT 法により測定した。

### C.研究結果

Line-IIIB にペプチド I-10 をパルスすると 1 時間後から顕著なキラー活性の抑制が認められた。この抑制は添加ペプチド量に依存するが、抗原

提示細胞による刺激、及び IL-2 の存在がなくとも時間の経過とともに徐々に回復した (図 1)。この際、IL-2 レセプター b 鎖の発現もペプチド添加 1 時間後から抑制されており、キラー活性の抑制、回復とよく一致することが観察された (図 2 左)。また、IL-2 レセプター b 鎖の発現低下に伴って、ペプチド添加 1, 2 日目には IL-2 依存性増殖が著明に低下するものの、逆に IL-2 には依存しない自立性増殖が観察された (図 3)。更にペプチド処理をした細胞内の Granzyme B 活性は、未処置の細胞や特異性の異なるペプチド MN (immunodominant epitope from HIV-1 strain MN) で処理した場合に比べて 1 日目から顕著に低下していたが、時間の経過とともに回復傾向を示した (表 1)。これに対し培養上清中の IFN-g 産生量は、ペプチド処理 1 日後の細胞で非常に高値を呈し、時間の経過とともにその産生量は低下した (表 2)。しかし CTL 上の IFN-g レセプターの発現は、ペプチド処理直後から著明に抑制されており観察期間中 (3 日間) 回復することはなかった (図 2 右)。また細胞を抗 CD3 抗体で刺激すると軽度の Granzyme B 活性低下と IFN-g の産生が認められた。

#### D. 考 察

今回の検討により、最小認識ペプチドで処理された HIV 特異的 CTL は、キラー活性の低下とともに他の性状も大きく変化していることが明らかとなった。以前よりペプチド処理により種々の表面抗原の発現が低下することが確認されていたが、今回の研究からキラー活性の低下と回復に伴って変動するのは IL-2 レセプター b 鎖が主体であることが示された。Hoskin らは IL-2 レセプターからのシグナル伝達経路を阻害する Rapamycin により CTL 活性が低下すること、そしてその一因として Granzyme B 及び Perforin の発現抑制が関与していることを証明している。一般に In vitro での CTL 誘導には IL-2 が不可欠であるが、彼らの結果は IL-2 が CTL の数を増やすだけでなく、IL-2 を介するシグナル伝達によりキラー活性そのものにも重要な役割を果たしていることが示唆している。報告者らは、ペプチド処理によるキラー活性の低下が、わずか数分で生じることから、この急激な活性低下の直接の原因は、Granzyme B 等の放出による細胞傷害因子の枯渇に起因すると推察している。

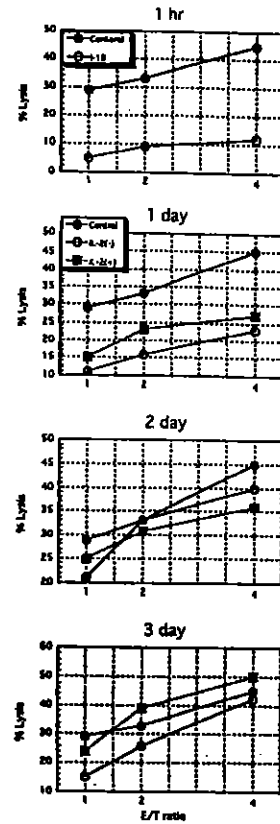


図 1 ペプチド I-10 によるキラー活性の経時的変化

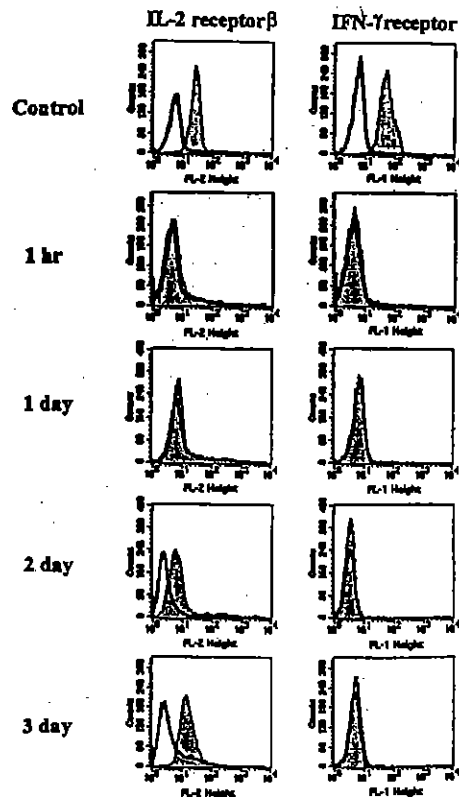


図 2 ペプチド I-10 パルスによる表面抗原の変化