

2. Active HIV-1 redistribution and replication in the brain with HIV encephalitis. Gatanaga, H., Oka, S., Ida, S., Wakabayashi, T., Shioda, T., and Iwamoto, A. Arch. Virol. 144, 29-43, 1999.
3. Cytotoxic T-lymphocyte recognition of HLA-B\*5101-restricted HIV-1 Rev epitope which is naturally processed in HIV-1 infected cells. Tomiyama, H., Chujo, Y., Shioda, T., Miwa, K., Oka, S., Kaneko, Y., and Takiguchi, M. AIDS. 13, 861-863, 1999.
4. Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression. Huanliang Liu, David Chao, Emi E. Nakayama, Hitomi Taguchi, Mieko Gotoh, Xiaomi Xin, Jun-ki Takamatsu, Hidehiko Saito, Yoshihide Ishikawa, Tatsuya Akaza, Takeo Juji, Yutaka Takebe, Takeshi Ohishi, Katsuyuki Fukutake, Yoshikazu Maruyama, Shinji Yashiki, Shunro Sonoda, Tetsuya Nakamura, Yoshiyuki Nagai, Aikichi Iwamoto and Tatsuo Shioda. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Track II. 96, 4581-4585, 1999.
5. Accumulation of specific amino acid substitutions in HLA B35-restricted human immunodeficiency virus type-1 cytotoxic T lymphocyte epitopes. Kawana, A., Tomiyama, H., Takiguchi M., Shioda, T., Nakamura, T., and Iwamoto, A. AIDS Res. Hum. Retrovir. 15, 1099-1107, 1999.
6. Sendai virus based production of HIV-1 subtype B and subtype E gp120 antigens and their use for highly sensitive detection of subtype-specific serum antibodies. Hidenobu Toriyoshi, Tatsuo Shioda, Hironori Sato, Masahiro Sakaguchi, Yasuyuki Eda, Sachiko Tokiyoshi, Kayoko Kato, Kyoko Nohtomi, Shigeru Kusagawa, Kiyomi Taniguchi, Teiichiro Shiio, Atsushi Kato, Suporn Foongladda, Sirirat Linkanonsakul, Shin-ichi Oka, Aikichi Iwamoto, Chantapong Wasi, Yoshiyuki Nagai, and Yutaka Takebe. AIDS Res. Hum. Retrovir.

15, 1109-1120, 1999.

7. Enhanced anti-HIV-1 activity of CC-chemokine LD78 beta, a non allelic variant of MIP-1 alpha /LD78 alpha. Xiaomi Xin, Tatsuo Shioda, Atsushi Kato, Huanliang Liu, Yuko Sakai, and Yoshiyuki Nagai. FEBS Letters. 457, 219-222, 1999.

8. Distribution of HIV-1 disease modifying RANTES haplotypes in Asians, Africans and Caucasians. Huanliang Liu, Tatsuo Shioda, Yoshiyuki Nagai, Aikichi Iwamoto, Chantapong Wasi, Jingxiang Ma, Wenhua Liang, Yutaka Takebe, Ioannis Theodorou, Magda Magierowska, Rajagopal Krishnamoorthy, André Chaventr  , French ALT and IMMUNOCO Study Groups, and Patrice Debre. AIDS, 13, 2602-2603, 1999.

9. A new polymorphism in promoter region of human interleukin 16 gene. Emi E. Nakayama, Chantapong Wasi, Atsushi Ajisawa, Aikichi Iwamoto, and Tatsuo Shioda. Genes and Immunity, in press.

## 2. 学会発表

1. Comparative analysis of CC-chemokine LD78 beta with MIP-1 alpha/LD78 alpha. Xiaomi Xin, Tatsuo Shioda, Atsushi Kato, Huanliang Liu, Yuko Sakai, and Yoshiyuki Nagai. International Meeting of Institute of Human Virology 1999. Abstract number 111.

2. Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression. Huanliang Liu, David Chao, Emi E. Nakayama, Hitomi Taguchi, Mieko Gotoh, Xiaomi Xin, Jun-ki Takamatsu, Hidehiko Saito, Yoshihide Ishikawa, Tatsuya Akaza, Takeo Juji, Yutaka Takebe, Takeshi Ohishi, Katsuyuki Fukutake, Yoshikazu Maruyama, Shinji Yashiki, Shunro Sonoda, Tetsuya Nakamura, Yoshiyuki Nagai, Aikichi Iwamoto and Tatsuo Shioda. International Meeting of Institute of Human Virology 1999. Abstract number 270.

3. Polymorphism in IL-4 promoter affects acquisition of human

immunodeficiency virus type 1  
syncytium inducing phenotype.

Emi E. Nakayama, Yoshihiko  
Hoshino, Xiaomi Xin, Huanliang  
Liu, Mieko Goto, Nobukazu  
Watanabe, Hitomi Taguchi, Akihiro  
Hitani, Ai Kawana-Tachikawa,  
Masao Fukushima, Kaneo Yamada,  
Wataru Sugiura, Shin-ichi Oka,  
Atsushi Ajisawa, Hironori Sato,  
Yutaka Takebe, Tetsuya Nakamura,  
Yoshiyuki Nagai, Aikichi Iwamoto<sup>1</sup>,  
and Tatsuo Shioda. International  
Meeting of Institute of Human  
Virology 1999. Abstract number  
330.

4. Polymorphism in RANTES  
chemokine promoter affects HIV-1  
disease progression in Japanese  
and distributes differently in  
Asians, Africans and Caucasians.  
H. Liu, D. Chao, E. E. Nakayama,  
H. Taguchi, M. Gotoh, X. Xin, Y.  
Takebe, C. Wasi, J. Ma, W. Liang,  
I. Theodorou, M. Magierowska, R.  
Krishnamoorthy, A. Chaventre,  
French ALT and IMMUNOCO Study  
Groups, P. Debre, T. Nakamura, Y.  
Nagai, A. Iwamoto and T. Shioda.

7th Conference on Retroviruses  
and Opportunistic Infections.

abstract number: 449

5. GENERATION AND  
CHARACTERIZATION OF HIV-1  
PARTICLES WHICH CONTAIN MONOMERIC  
GENOME RNA. Jun-ichi Sakuragi,  
Aikichi Iwamoto, and Tatsuo  
Shioda. Cold Spring Harbor  
Laboratory Retroviruses Meeting  
Abstract number 191.

6. 日本人HIV-1感染者および非感染者に  
おけるRANTES遺伝子制御領域の変異と  
AIDS病態進行との関連。

劉煥亮、中山英美、田口仁美、後藤美江  
子、辛小蜜、川名愛、山田武司、武部豊、  
中村哲也、永井美之、岩本愛吉、塩田達雄  
日本ウイルス学会 第四十七回回学術集会  
演題番号3B01

7. IL-4遺伝子プロモーター領域内変異と  
HIV-1の感染個体内変化。中山英美、星  
野仁彦、辛小蜜、劉煥亮、後藤美江  
子、田口仁美、日谷明裕、山田兼雄、杉浦  
亘、岡慎一、佐藤裕徳、武部豊、中  
村哲也、永井美之、塩田達雄、岩本愛吉。  
第十三回日本エイズ学会、演題番号147。

8. 日本人および中国人に見いだされた

CCR5細胞質内領域変異体の機能解析。

塩田達雄、中山英美、田中勇悦、辛小蜜、劉煥亮、川名愛、加藤篤、坂井優子、永井美之、岩本愛吉。第二十二回日本分子生物学会、演題番号1P-265。

9. Th1/Th2サイトカインの5'非翻訳領域内遺伝子多型とHIV-1の感染個体内進化。中山英美、辛小蜜、劉煥亮、永井美之、岩本愛吉、塩田達雄。第二十二回日本分子生物学会、演題番号2P-1436。

10. HIV-1粒子内RNAのパッケージング及び二量体化とそのシグナル領域に関する解析。櫻木淳一、岩本愛吉、塩田達雄。第二十二回日本分子生物学会、演題番号W3G-4。

表 1

IL-4 genotypes among HIV-1-infected and uninfected individuals

Clinical status	IL-4 genotype at -589			P value (HWE)	T frequency	P value (t test)
	No.	C/C(%)	T/T(%)			
HIV-1-infected	339	13.0	46.3	0.01	0.64	0.29
Hemophilic	137	9.5	45.4	0.81	0.68	0.80
Non-hemophilic	202	15.4	47.0	0.002	0.61	0.13
Homo/Bi-sexual	112	12.5	43.7	0.47	0.66	0.52
Heterosexual	90	18.9	51.1	0.0003	0.56	0.025
(Male)	58	22.4	44.8	0.001	0.55	0.035
(Female)	32	12.5	62.5	0.03	0.56	0.093
Uninfected	52	9.6	42.3	1	0.69	

HWE:Hardy-Weinberg equilibrium

表 2

IL-4 promoter genotype distribution in HIV-1-infected individuals with and without SI variants (frequency, %).

Category	Virus phenotype	IL-4 promoter genotype at position -589		p value
		C/C,C/T(%)	T/T(%)	
Total	SI	17(25.4)	24(50.0)	0.0091
	NSI	50(74.6)	24(50.0)	
	Total	67(100)	48(100)	
Low CD4+ counts (<200/ $\mu$ l)	SI	9(34.6)	17(68.0)	0.025
	NSI	17(65.4)	8(32.0)	
	Total	26(100)	25(100)	
Hemophiliacs	SI	7(24.1)	16(59.3)	0.013
	NSI	22(75.9)	11(42.3)	
	Total	29(100)	27(100)	

# HIV-1 E型oligomeric envelope protein gp120-gp41の高次構造と抗原性の解析

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

研究者 杉浦 互 国立感染症研究所エイズ研究センター

## 要旨

HIV-1E型ウイルスのエンヴェロープタンパクCM235-gp140を特異的に認識する単クローン抗体を作成した。合計9個のクローンを得た。このうち4クローンがCM235を特異的に認識することが明らかになった。

## A.研究目的

我々は今までにサブタイプBの代表的な実験室株であるIIIB、そしてサブタイプEの代表的な株であるCM235のEnvをもとに各々可溶性のgp140を作成し、その特徴について解析してきた。その結果可溶性のgp140はoligomer構造をとり、monomeric Envとは一部異なる抗原提示部を提示し、強い中和活性を持つ血清を誘導することが明らかになった。それぞれのgp140で誘導した抗血清のウイルス中和活性を解析すると、その中和スペクトラムは各々のウイルスサブタイプ内に留まることが明らかになった。われわれの結果を見るかぎり一種類の抗原でサブタイプ越えて中和活性を誘導できるような抗原タンパクを見いだすことは困難であり、幅広くHIV-1を標的とするには各種Envのカクテルを使用することが望ましいと考えられた。本年はB型とE型のgp140上の抗原認識領域の相違をより詳しく調べるためにE型Envを特異的に認識する単クローン抗体の作成を試みた。

## B.研究方法

1. HIV-1サブタイプBあるいはEの可溶性120-41複合体 (gp140) とgp120の作成：サブタイプBの標準株であるIIIBあるいはE型HIV-1の標準株であるCM235株のenv遺伝子より可溶性gp140作成するために、各env遺伝子の5'末にNde I, gp41の膜貫通部直前にstop codonとSal Iをいれ、pVote2タンパク発現ベクターに入れる。このDNAを野生株のワクチニア (vSC60) を感染させたCV-1細胞に導入し、リコンビナントワクチニアウイルスを回収する。各gp120の作成にはgp41の直前にstop codonとSal I siteをいれ、前述gp140同様にしてリコンビナントウイルスを回収する。このようにして作成したリコンビナントワクチニアをBSC-1細胞に感染させ、その培

養上清に分泌されたgp140あるいはgp120をlentil lectin affinity columnで回収、さらにSuperdex columnを用いて、単体、2量体の各分画に分離し、以下に述べるウサギおよびマウスの感作抗原及び解析用のタンパクとして使用する。

2. モノクローナル抗体の作成：精製CM235-gp140とCM235-gp120を各々2匹のBALB/cマウスに感作した。感作は各抗原20  $\mu$ gをLiBiアジュバンドとともに約3週間の間隔で3回行い、最終感作4日後に抗体価を確認した。抗体価の上がっていたものをさらに再感作し、その4日後に屠殺、脾臓よりリンパ球を取りだしP3X63Ag8ハイブリドーマ細胞と融合させた。

## 3. 単クローン抗体の特異性の解析

IIIB-gp140あるいはCM235-gp140をConcanavalinA (ConA)を介してELISA-plateに固着化し、単クローン抗体の結合能の測定を行った。手技は以下の通りである。ConA (100mg/ml) 100ulを加え2時間室温で反応させる。PBS/TWEEN20で洗浄後、100ug/mlの濃度のIIIB-gp140あるいはCM235-gp140を100ul加え、12時間4Cでplateに吸着させる。洗浄後、解析対象である単クローン抗体を加え2時間37Cで反応させる。反応後洗浄し、抗マウスIgG-HRP標識ヒツジ抗体を加え、更に1時間反応させる。反応後洗浄し基質を添加し発色させる。反応後吸光度計で読み取り解析する。ELISAの陽性コントロールとしてはE型およびB型HIV-1陽性者血清を用いた。

## C.研究結果

CM235-gp120で感作したマウスは2匹とも有意の抗体価上昇を認めず、試みにハイブリドーマとの融合を行なったが単クローン抗体の作成に失敗した。

一方CM235-gp140で感作したマウスからは合計9個のクローンを得ることに成功した。前述の固相化したgp140を用いたELISAでは3個のクローンがIII B-gp140との交叉を示さずCM235-gp140を特異的に認識することが明らかになった（下表）。

#### D. 考察

我々が取り組んでいるHIV-1 Envはウイルス感染成立の際に重要な働きをすることが知られおり、また宿主免疫反応の標的となっていることからHIV感染予防のためのワクチンの候補抗原として脚光を浴びてきた。1997年に米国のグループによりこのタンパク質のコアが結晶化され、より多くの事が明らかにされ、gp120-41複合体がウイルス膜状で3量体を形成していることが明らかにされた。一方我々の作成したoligomeric gp140は2量体あるいは4量体を形成しており、必ずしもウイルスエンベロープを正確に模倣したものではない。しかしながらその抗原性は他のエンベロープをもとにした抗原のどれよりも優れており、III B-gp140で感作をした血清は臨床分離株のいくつかの中和に成功している（W Sugiura, P Earl, B Moss unpublished data）しかしながら優れた抗原性をもつgp140をもってしてもサブタイプを越えての異なるウイルスのEnvを認識そして中和する抗血清の誘導をすることはできなかった。どのようにしたらサブタイプの壁を越えることが出来るのか、越えることが可能なのか調べる為に、サブタイプB

あるいはEを特異的に認識するタンクローン抗体を作成し、両者の抗原領域の相違を調べることを計画した。すでにサブタイプBのIII Bを認識する抗体は作成した有るので、今年度はE型ウイルス株であるCM235-gp140に対する単クローン抗体を作成を試みた。最終的にCM235-gp140で感作したマウスより抗体作成に成功した。得られた9個の抗体のうち3個(33%)がIII Bとの交叉を示さずCM235を特異的に認識した。当初予想していたよりクローンの数が少なく、B型と詳細な比較を行なうにはやや少ないためさらに新たな抗体作成を検討している。

#### E. 結論

最終的にCM235-gp140で感作したマウスより9個の単クローン抗体の作製に成功した（C2,C3,C4,C6,C7,C8,C9,C10,C11）。その特異性の解析を行った結果、CM235を特異的に認識し、subtype Bのenvelopeと交叉しないものは3個であった（C4,C6,C7,C9）。現在各抗体の特性をより詳しく知るために、CD4阻止能、ウイルス中和能に関して検討を加えている。

#### F. 研究発表

該当なし

表 抗CM235-gp140単クローン抗体の特性

	Reactivity	
	CM235-gp140	III B-gp140
C2	+	-
C3	+	+
C4	+	-
C6	+	-
C7	+	-
C8	+	-
C9	+	-
C10	+	+
C11	+	+



# HIV Trapping System による HIV 感染性クローンの樹立と解析

分担研究者 巽 正志 国立感染症研究所獣医科学部  
共同研究者 松田道明 望月直樹 国立国際医療センター研究所

研究要旨：MAGIC-5/HeLa4.5 nEGFP 細胞株を用いた HIV ウイルスクローニングと感染性クローンの構築系 (HIV Trapping System ; HIV 捕捉実験系) により世界に先駆けて樹立した subtype C の感染性クローン pIndie-C1 の基本的性状を解析したところ、分子遺伝学的にも免疫学的にも subtype C の特性を有することから標準株になりうるということが明らかになった。さらにいまだ有用な感染性クローンが得られていない subtype にこの実験系を応用して subtype E および subtype A/G recombinant の感染性クローン候補が得られた。

## A. 研究目的

HIV-1 は gag, pol および env などの構成蛋白以外に様々な制御および修飾遺伝子を有する複雑な遺伝子構成の Lentivirus である。現在まで主に欧米に流行している subtype B の Molecular clones を用いてその病原性を担う遺伝子領域が検索されてきた。しかしながら HIV-1 subtype B は異性間の感染も認められるが主に homosexual および麻薬静注者などの risk group に侵淫していることが知られている。一方、最近の HIV-1 感染の epicenter は欧米から東南および南アジア地域に Shift しており、主に異性間性交渉で流行している HIV-1 は subtype E および subtype C が多くを占めている。本邦においても、近年異性間性交渉による subtype E の感染者数の増加の兆しが認められている。Subtype 間における感染経路の違いによる感染効率の違いが認められるのにもかかわらず、subtype E および C の感染性クローンが得られていないため、その違いの由来する HIV-1 subtype 間の遺伝子構成の相違に基づく病原性の解析の進展における隘路になっており、早急に感染性クローンの樹立が求められていた。

我々は昨年度 MAGIC-5/HeLa4.5 nEGFP 細胞株を用いた HIV ウイルスクローニングと感染性クローンの構築系 (HIV Trapping System ; HIV 捕捉実験系と呼称する) により subtype C の感染性クローン pIndie-C1 を世界に先駆けて樹立した。本年度はこの感染性クローンの基本的性状を解析し、併せていまだ有用な感染性クローンの得られていない HIV-1 subtype E および subtype A の感染性クローン樹立に HIV Trapping System を応用してみた。これら種々の subtype の感染性クローンは

subtype 間の病原性の異同の解析のみならず、ワクチン開発など様々な抗 HIV 戦略においてその分子基盤を整えるとともに新たな研究領域を開くものと期待される。

## B. 研究方法

HIV-1 subtype C 感染性クローン pIndie-C1 についてその全塩基配列を決定し、Los Alamos HIV Data Base より典型的な subtype の塩基配列を入手し、NJ 法により系統樹を作成した (感染研エイズセンター椎野博士の協力を得た)。またその Coreceptor Usage を解析するとともに、感染細胞 Lysate を subtype B および subtype C 感染患者血清を用いてウイルス蛋白の免疫学的特性を比較した。また抗 Nef および抗 Vif モノクローナル抗体を用いて、その遺伝子産物の発現を解析した。

HIV-1 subtype E および subtype A の感染性クローンを樹立すべく、subtype E については親株ウイルスを国立感染症研究所エイズ研究センター武部 および佐藤両博士から入手し、subtype A については JICA 国際協力によりガーナ国野口記念研究所で国立感染症研究所エイズ研究センター石川博士らにより分離されたウイルスをもとに HIV Trapping System を応用した。

## C. 研究結果

1. HIV-1 subtype C 感染性クローン pIndie-C1 の性状解析の結果つぎの項目が明らかになった。

1) 感染性クローン pIndie-C1 は 9680bp から構成され、全塩基配列にわたる NJ 法による系統樹解析により、1993 年度にインドにおいて分離された

HIV-1 subtype C ウイルス群とクラスターを形成する典型的な subtype C のウイルスであることが確認された (図 1)。

2) 塩基配列解析からこのクローンは全ての構成遺伝子、Accessory および Regulatory gene が開いており、Transfection 後のウイルス産生量も頻用されている実験室株の pNL432 と比して遜色なく高いことが示された。また塩基配列上の特徴として、LTR 領域で subtype C の特徴として報告されている転写因子 NF- $\kappa$ B の Motif 配列が 2ヶ所しかない subtype B と比較して 3ヶ所存在しており、rev 遺伝子には現在まで報告されていない欠損領域が認められ、それぞれ今後の生物学的性状解析により新たな知見が得られる可能性を示している。

3) MAGI 細胞と MAGIC-5 細胞での感染性を調べたところ pIndie-C1 は CCR5 を発現する MAGIC-5 でのみ感染したことから、出発材料のウイルス 93IN101 と同じく CCR5 Tropic であることが明らかになり (図 2)、Con A 刺激末梢血リンパ球でもその感染性が確認された (図 3)。

4) 蛋白レベルでは、抗 Nef および抗 Vpr 抗体により認識される Nef および Vpr 蛋白の発現を Western Blot により確認し、その Env 領域の蛋白はいわゆる subtype B 感染者血清よりもインド人感染者血清により強く反応することが判明し (図 4)、env 蛋白における subtype 間での Heterogeneity 解析のよいモデルとなりうることを示された。

以上の成績からこの樹立した pIndie-C1 は今後 subtype C の標準株として有用であることが示された。

## II. HIV-1 subtype nonB 感染性クローンの樹立

HIV-1 subtype E と subtype A の HIV-1 感染性クローンの樹立の試みにより、現時点では MAGIC-5 細胞での感染性を確認した段階ではあるが、subtype E では国内家族内感染例から pNH1.2 および pNH2.5T の 2 クローンを樹立した。Coreceptor Usage を調べたところ、それぞれ CXCR4/CCR5 および CCR5 を用いていることが明らかになった。次にガーナ国由来で、その env 領域の塩基配列から subtype A と考えられたウイルスを出発材料に感染性クローンの樹立を試みた。得られた感染性クローンは現時点では gag と env 領域の一部しか塩基配列を決定していないが、現在象牙海岸諸国をはじめ中央アフリカで感染者が激増している所謂 A/G recombinant であることが判明した。これらのクローンは A/G recombinant としては世界で初めての感染性クローンである。

これらの感染性クローンは昨年樹立した subtype C の pIndie-C1 とともに今後のワクチン開発戦略においての Reference 株になりうることを期待される。

## D. 考察

昨年度樹立した世界で最初の HIV-1 subtype C の感染性クローン pIndie-C1 の基本的性状を解析した。このクローンは分子遺伝学的にも修飾遺伝子も含め全ての構成遺伝子の ORF が開いており、免疫学的にもインド人感染者血清とより強く反応する env 蛋白をコードするなどの諸点において subtype C の特性を示しており、今後 subtype C の Reference Strain として様々な局面で有用であると考えられる。UNAIDS の統計と今後の感染者数の推移予測によれば、ここ数年の HIV-1 感染の epicenter は既に欧米から東南および南アジア地域に Shift しており、主に異性間性交渉で流行している HIV-1 は subtype E および subtype C が多くを占めていることが指摘されている。特に subtype C はインドおよびアフリカ諸国に感染集積を示し、今後とも激増することが予測されている。これら発展途上国地域において欧米でおこなわれている 3 剤併用療法などの対策は経済性の観点から現実的とは考えられない。そのためより有効で安全な HIV-1 ワクチンの開発が喫緊の要として求められ、精力的に研究されているところである。しかしながら、感染拡大の初期において、その感染中心が欧米にあったため、ワクチン開発に用いられている感染性クローンは欧米で流行した subtype B に属するものであった。しかしながら subtype 間において env 蛋白をはじめとする、種々の差異があることが報告されており、ワクチン開発等の基礎研究および subtype 間のウイルス学的性状の差異の研究のためには Reference となるべき感染性クローンがないことが大きな隘路となっており、各国で感染性クローンの樹立のための努力がなされているところである。このような状況下で今回樹立された subtype C の感染性クローンは様々な HIV-1 研究領域における Reference Strain となりうるものと期待される。

また今年度から新たに開始した subtype E と subtype A の HIV-1 については、それぞれ東南アジアあるいは中央アフリカで猛威を振るっており、その感染者数は激増しているのにもかかわらず、依然有用な感染性クローンの報告はいまだない。今回の感染性クローンの樹立の試みにより、MAGIC-5 細胞での感染性を確認した段階ではあるが、

subtype E では国内家族内感染例から pNH1.2 および pNH2.5T の 2 クローンを樹立し得た。これらの親株ウイルスは国立感染症研究所エイズ研究センター武部および佐藤両博士により精力的に解析されているウイルスで、今後遺伝子レベルからの解析が可能になるものと期待される。また JICA 国際協力によりガーナ国野口記念医学研究所に派遣されている国立感染症研究所エイズ研究センター石川博士らにより分離されたウイルスをもとに同様の戦略で、いまだ報告のない subtype A の感染クローンの樹立を試みたところ、現在象牙海岸諸国をはじめ中央アフリカで感染者が激増している A/G recombinant であることが判明した。このクローンは A/G recombinant としては世界で初めての感染性クローンである。これらのクローンは昨年樹立した subtype C の pIndie-C1 とともに今後のワクチン開発戦略においての有用な Reference 株になりうるものと期待される。

以上の成績は MAGIC-5 細胞株と HeLa4.5 nEGFP 細胞株を用いた HIV Trapping System による感染性クローン樹立の実験系が多く HIV-1 ウイルスに応用可能なことを示している。今後の研究方針として、この HIV Trapping System を用いて様々な subtype の感染性クローンの樹立を試み、Subtype による HIV-1 分布の差異は subtype 間の HIV-1 の病原性などの生物学的差異（例えば経室粘膜における易感染性など）に由来するのかを解析するにあたって、なくてはならない分子基盤を一つ一つ整えることが必要であると考え。さらに実際の感染成立における主役を担う HIV-1 の特性把握のため、特に初期感染時期の Seroconversion 前の HIV-1、あるいは高度薬剤耐性変異株などのウイルス学的に興味深いウイルス株などの感染性クローン樹立を試み、感染経路の違いにより Advantage のある Subtype がありうるのか、あるとすればどの遺伝子構成がその病原性を規定するのか探索して行きたい。

#### E. 結論

昨年度世界に先駆けて樹立した subtype C の感染性クローン pIndie-C1 は分子遺伝学的および免疫学的観点から subtype C の特性を示すことを明らかにした。さらにこの実験系を応用して、いまだ有用な感染性クローンのない subtype E と subtype A/G の感染性クローン候補を作成した。今後これらのクローンはワクチン開発および

subtype 間の病原性の解析などの分子遺伝学的解析に有用な標準株となりうるものと期待される。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

Mochizuki, N., Otsuka, N., Matsuo, K., Shiino, T., Kojima, A., Kurata, T., Sakai, K., Yamamoto, N., Isomura, S., Dhole, T. N., Takebe, Y., Matsuda, M. and Tatsumi, M. an infectious DNA clone of HIV type 1 subtype C AID Res. Human Retroviruses 15: 1321 - 1324, 1999.

##### 学会発表

Tatsumi, M ; Efficient molecular cloning of infectious HIV-1 subtype C and E by MAGIC-5 cell virus cloning and long PCR. the XIth International Congress of Virology, 11 August 1999, Sydney, Australia.

巽 正志 ; CCR5 発現 MAGI 細胞 (MAGIC-5) による HIV ウイルスおよび DNA クローニング 第 47 回日本ウイルス学会 11 月 9 日、横浜

望月直樹、松田道行、巽 正志 ; HIV-1 サブタイプ C の感染性クローン pIndie-C1 第 47 回日本ウイルス学会 11 月 9 日、横浜

庄谷祐子、巽 正志、高橋秀宗、倉田 毅 ; 異種細胞における HIV-1 複製制御機構の解析 第 47 回日本ウイルス学会 11 月 9 日、横浜

向井 徹、河本聡志、黒須 剛、巽 正志、生田和良 ; HIV-1 タイ E 型塩基配列解析および感染性プラスミドの構築 第 47 回日本ウイルス学会 11 月 9 日、横浜

飛梅 実、望月直樹、大塚尚美、巽 正志、松田道行 ; HIV-1 感染における Nef 要求性についての解析 第 47 回日本ウイルス学会 11 月 7 日、横浜

巽 正志 ; MAGIC-5A 細胞による感染性 HIV 分子クローンの確立 第 13 回日本エイズ学会 12 月 2 日、東京

蜂谷敦子、相沢佐織、田中真理、高橋由紀子、平林義弘、井田節子、巽 正志、岡 慎一 ; CCR5 発現 HeLa/CD4-LTR-betaGal 細胞 (MAGIC-5 clone 1-10) を用いた抗 HIV 薬剤耐性検査に関する検討 第 13 回日本エイズ学会 12 月 3 日、東京

須藤弘二、斉藤隆行、近藤真規子、林 孝子、蜂谷敦子、岡 慎一、巽 正志、今井光信 ; MAGIC-5 細胞を用いた HIV 分離株の培養実験の基礎的検討 第 13 回日本エイズ学会 12 月 3 日、東京

G. 図説明

Phylogenetic Tree Created by Neighbor-Joining Analysis of the Complete Sequences of pIndie-C1 and the Representative HIV-1 Clones

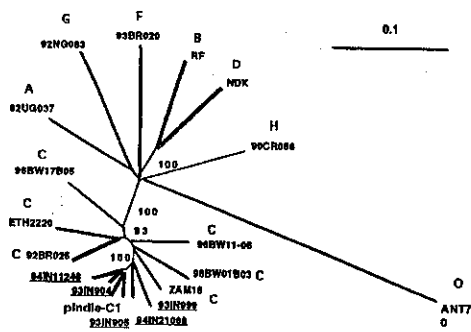
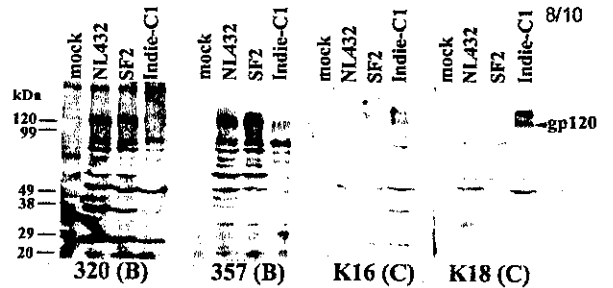
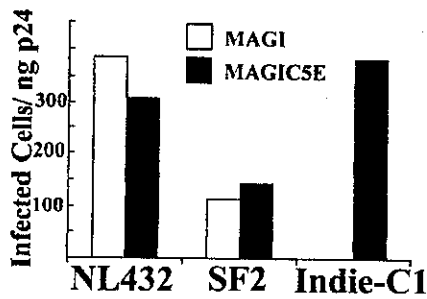


図1) 感染性クローン pIndie-C1 は9680bpから構成され全ての遺伝子が開いており、全塩基配列にわたるNJ法による系統樹解析により、1993年度にインドにおいて分離されたHIV-1 subtype Cウイルス群とクラスターを形成する典型的なsubtype Cのウイルスであることが確認された。



pIndie-C1 ウイルスの Gag はインド人 HIV 陽性患者血清に反応する。

図4) 蛋白レベルでは、抗 Nef および抗 Vpr 抗体により認識される Nef および Vpr 蛋白の発現を Western Blot により確認し、その Env 領域の蛋白はいわゆる subtype B 感染者血清よりもインド人感染者血清により強く反応することが判明し、subtype 間での Heterogeneity 解析のよいモデルとなりうる事が示された。



Indie-C1 は CCR5 を使う

図2) 対照として用いた T-tropic HIV-1 である NL432 と SF2 は CXCR4 を用いるため MAGI と MAGIC-5 で増殖するが、Indie-C1 は CCR5 を発現させた MAGIC-5 のみ増殖した。このことから Indie-C1 はもとの親ウイルスと同じ CCR5 を Coreceptor として用いることが示された。

Infectious Virus Titer of Culture Supernatant after Transfection on 293T Cells

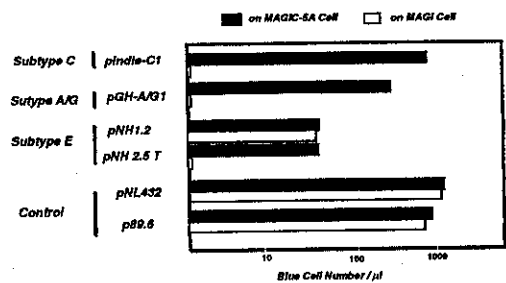


図5) subtype E では国内家族内感染例から pNH1.2 (CXCR4/CCR5 tropic) および pNH2.5T (CCR5 tropic) の2クローンを樹立した。またガーナ国由来 HIV-1 から subtype A の感染性クローンの樹立を試みた。得られた感染性クローン pGH-A/G1 (CCR5 tropic) はいまだ gag と env 領域の一部しか塩基配列を決定していないが、現在象牙海岸諸国をはじめ中央アフリカで感染者が増えている所謂 A/G recombinant であることが判明した。これらのクローンは A/G recombinant としては世界で初めての感染性クローンである。

Infection Kinetics of HIV-1 subtype C Clone Indie-C1 in FBNC

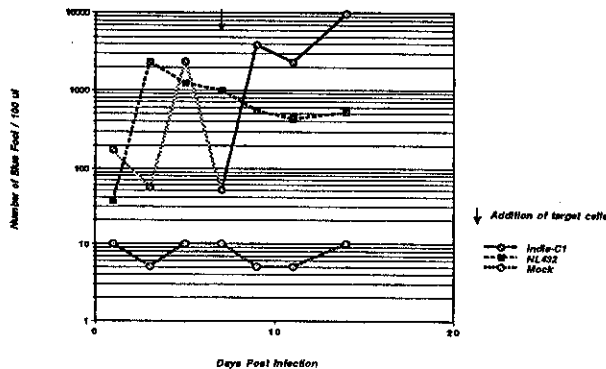


図3) Indie-C1 は ConA 刺激ヒト末梢血リンパ球で NL432 と同レベルまで増殖した。

## 日本のHIV-1の遺伝子・分子生物学的解析（集団的解析）

分担研究者 仲宗根正 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：日本に蔓延しているHIV-1に適したワクチン開発への基礎データ蓄積を最終目的とし、日本のHIV-1について遺伝子学的・分子生物学的特徴を経年的に明らかにすることを目的とし、今年度は以下の研究成果を得た。

1) Subtype Dが2症例、Subtype Gが2症例確認された。

2) 1996-1998年に159の臨床株が分離され、この中で検索した範囲内ではJCSを有する株は無い。

3) 1988-1999年のウイルス分離率の推移を見ると、昨年報告した分離率の低下傾向は1999年にも確認できた。すなわち、分離率はいまだ底値に達していない。

4) 日本のHIV-1集団のうち、垂直感染集団について以下の知見を得た。

a) 集団でみた場合、母親由来HIV-1集団は、様々なサブタイプ（A、B、B'、D、E、G）が混在する雑多な集団であり、一方、児由来HIV-1も今のところ4つのサブタイプ（B、B'、D、E、G）が確認され、やはり雑多な集団である。

b) 多クローン解析により個々でみた場合、母親個体内のHIV-1はquasispeciesが強いのに対して、児体内のHIV-1は、単一クローン傾向にある。

### A. 研究目的

日本に蔓延しているHIV-1に適したワクチン開発への基礎データ蓄積を最終目的とし、日本のHIV-1について遺伝子学的・分子生物学的特徴を経年的に明らかにすることを目的とした。

### B. 研究方法

以下の項目について年単位で追跡調査する。

(1) V3領域におけるJapanese Consensus Sequence (JCS)のGenotypeとPhenotypeの推移

感染者末梢血単核球よりDNAを抽出し、PCR法によりV3領域を増幅後、ダイレクトシーケンシング反応を行い、自動シーケンサーにより塩基配列を決定する。1999年のサンプルから100個のDNAを抽出済みで、2000年と2001年のサンプルと合わせてシーケンスを決定し、ここ3年間のJCSを決定し、1988-1993年と1996-1998年のJCSと比較予定である。

(2) V3領域における日本伝播HIVの遺伝子学的均一性の推移

1999-2001年のシーケンスについて、V3各位のアミノ酸の出現頻度を算出し、さらに相同性

を数値化しヒストグラムを描く。このアミノ酸出現頻度と相同性ヒストグラムについて、1988-93年と1996-1998年のものと比較検討予定である。

また、今年度は、日本のHIV-1集団のうち、垂直感染集団について解析を行った。

(3) ウイルス分離により得られるJCS臨床株の中和抗体による中和性の推移

1996-1998年に分離された159臨床株について、JCSに一致する株を探し、同株の中和抗体による中和性を、1988-93年JCS株の中和性と比較する。

(4) ウイルス分離率の推移

1988年より継続中である、日本のHIV-1感染者からのウイルス分離率の推移を成分別（細胞成分と血漿成分）分離率も含めて解析した。1999年は、208サンプルからウイルス分離を行った。

### C. 研究結果

(1) V3領域におけるJapanese Consensus Sequence (JCS)のGenotypeとPhenotypeの推移

2001年までのシーケンスと合わせて解析予定のため、今年度のデータは割愛する。

(2) V3領域における日本伝播HIVの遺伝子学的均一性の推移

今年度は、日本のHIV-1集団のうち、垂直感染集団について遺伝子学的均一性の解析を行った。1988-1999年間に15症例のHIV-1感染児よりサンプルが得られ、このうち11例のサブタイピングが、8例について多クローン解析が終了した。それによると、これまで報告のあったBとEに加えて、今回新たにDとGが確認され、児由来HIV-1集団は、4つのサブタイプ（B、B'、D、E、G）が混在する雑多な集団であることが判明した。

（図1）

さらに、母親由来HIV-1についても解析したところ、今回新たにDとGが確認でき、母親由来HIV-1集団も5つのサブタイプ（A、B、B'、D、E、G）が混在する雑多な集団である事を明らかにした。（図2）

多クローン解析により個々でみた場合、母親個体内のHIV-1はquasispeciesが強いのにに対して、児体内のHIV-1は、単一クローン傾向にある事を明らかにした。（図3、4）これは諸外国での報告と同様の傾向である。

(3) ウイルス分離により得られるJCS臨床株の中和抗体による中和性の推移

1996-1998年に159の臨床株が分離され、この中で検索した範囲内ではJCSを有する株は無く、JCS株が得られていない。引き続きJCS株を分離すべくサンプルを集積中である。

(4) ウイルス分離率の推移（図5）

昨年度もウイルス分離率の低下傾向を報告したが、今年度は、1999年のウイルス分離率を確定し、1988-1999年のウイルス分離率の推移グラフを完成させた。これに加えて、1989-1999年の治療法（単剤、2剤併用、3剤併用）の推移も完成させ、分離率との相関をみた。これによると、1) ウイルス分離率は1999年もさらに低下傾向にあり、年を追った低下傾向ははまだ底値に達していない。2) 分離率の2箇所の転換点は、2剤併用療法と3剤併用療法の開始時期にそれぞれ一致していた。

#### D. 考察

1999年に新たにSubtype DとGが確認されたことから、日本のHIV-1集団のモザイク化が徐々にではあが確実に進行しつつある。今回発見された

Subtype Dや、昨年度報告したSubtype Aの宿主はいずれもアフリカ国籍者を有している。また、Subtype Gの宿主は日本人ではあるが、ケニアでの感染が推定されており、いずれにしても、アフリカから種々のタイプが流入してくる事が今後も予想される。

また、垂直感染集団も既に雑多な集団であることが今回初めて確認できた。感染児については、今後新たな水平感染源になる可能性は極めて低いものの、垂直感染防御という観点からはサブタイプBあるいはEのみに標的を絞れないという点で、母子感染予防ワクチン等の開発戦略を見直す必要がでてきたと考える。

昨年に引き続き、ウイルス分離率の低下が確認され、しかも未だ底値に達していない点は、近年、他グループが報告しているの薬剤耐性ウイルスの増加と明らかに相反する現象である。われわれの対象についても薬剤耐性ウイルスの頻度について検討する必要がある。また、このウイルス分離率の低下が反転上昇に転じた時こそが、薬剤耐性ウイルス伝播の脅威が現実的なものになる時期と考えられるため、今後もウイルス分離率を注意深く観察していく必要がある。

#### E. 結論

1) Subtype Dが2症例、Subtype Gが2症例確認された。

2) 1996-1998年に159の臨床株が分離され、この中で検索した範囲内ではJCSを有する株は無い。

3) 1988-1999年のウイルス分離率の推移を見ると、昨年報告した分離率の低下傾向は1999年にも確認できた。すなわち、分離率ははまだ底値に達していない。

4) 日本のHIV-1集団のうち、垂直感染集団について以下の知見を得た。

a) 集団でみた場合、母親由来HIV-1集団は、様々なサブタイプ（A、B、B'、D、E、G）が混在する雑多な集団であり、一方、児由来HIV-1も今のところ4つのサブタイプ（B、B'、D、E、G）が確認され、やはり雑多な集団である。

b) 多クローン解析により個々でみた場合、母親個体内のHIV-1はquasispeciesが強いのにに対して、児体内のHIV-1は、単一クローン傾向にある。

#### F. 研究発表

厚生科学研究費補助金 (エイズ対策研究事業)  
分担研究報告書

1. 論文発表

1) K. Shinohara, K. Sakai, S. Ando, Y. Ami, N. Yoshino, E. Takahashi, K. Someya, Y. Suzaki, T. Nakasone, Y. Sasaki, M. Kaizu, Y. Lu, and M. Honda. A highly pathogenic simian/human immunodeficiency virus with genetic changes in cynomolgus monkey. *J. General Virology* 1999, 80:1231-1240

2) Nakasone T, Shinohara K, Ami Y, Yoshino N, Kaizu M, Takahashi E, Touzjian N, Lu Y, Nagai Y and Honda M. SHIV carrying C1-V3 of HIV-1 subtype E infected to a cynomolgus monkey. *J. Med. Primatol.*, 2000 (in press)

3) Y. Sasaki, Y. Ami, T. Nakasone, K. Shinohara, E. Takahashi, S. Ando, K. Someya, Y. Suzaki and M. Honda. Induction of CD95 ligand expression on CD8+ T-lymphocyte correlates with HLA-DR expression and contributes to apoptosis of CD95-upregulated CD4+ T-cells in macaques by infection with a pathogenic simian/human immunodeficiency virus. *Clin & Exp Immunol*, submitted 2000

4) T. Nakasone, J. Takamatsu, K. Yamada, M. Honda and Y. Nagai. Decline in the HIV-1 isolate rate in Japan. *Lancet*, submitted 2000

5) H. Yamamoto, K. Katsuyama, K. Shinohara, Y. Ami, T. Nakasone, M. Honda. Induction of SHIV Specific Killer Activities, and the Effects of Neutralizing Humanized MAB(RC25) to Immunopathogenicity in the Pathogenic SHIV-C2/1 Infected Cynomolgus Monkeys. *J. Med. Primatol.*, 2000 (in press)

7) 仲宗根正 エイズの正しい知識を持とう2 「正しく知れば怖くないエイズ」 学校保健フォーラム 健学社 1999, Vol.3 No.19 p35-37

2. 学会発表

1) T. Nakasone, K. Shinohara, Y. Ami, N. Yoshino, M. Kaizu, E. Takahashi, N. Touzjian, Y. Lu, Y. Nagai, and M. Honda. SHIV carrying C1-V3 of HIV-1 subtype E infected to a cynomolgus monkey  
17th Annual Symposium on Nonhuman Primate (Models for AIDS, New Orleans, LA. 5-11 Oct 1999)

2) H. Yamamoto, K. Katsuyama, K.

Shinohara, Y. Ami, T. Nakasone, M. Honda. Induction of SHIV Specific Killer Activities, and the Effects of Neutralizing Humanized MAB(RC25) to Immunopathogenicity in the Pathogenic SHIV-C2/1 Infected Cynomolgus Monkeys. 17th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, (New Orleans, LA. 5-11 Oct 1999)

3) T. Nakasone. Vaccine Efficacy Tests in Animal Models International Workshop "Research and Development of Recombinant BCG-Based HIV Vaccine (1999.11.22-23 Tokyo)

4) T. Nakasone, J. Takamatsu, K. Yamada, Y. Nagai, M. Honda. Biological and genetic analysis of HIV-1 in Japan: 12 years observation. 12th US-Japan Joint Scientific Meeting of the AIDS Panels. (2000.3.22-24, Santa Fe)

5) S. Ando, N. Yoshino, Y. Ami, K. Shinohara, K. Someya, T. Kitamura, T. Nakasone and M. Honda. Immunological Analysis of SHIV Challenged Monkeys. 12th US-Japan Joint Scientific Meeting of the AIDS Panels. (2000.3.22-24, Santa Fe)

6) 本多三男、松尾和浩、仲宗根正、吉野直人、海津雅彦、大洲竹晃、浜野隆一、長縄聰、滝沢万里、川原守、原敬志、芳賀伸治、山本三郎、山崎修道：リコンビナントBCGのワクチン開発の試み、第69回実験結核研究会 (99.04.14 宇都宮市)

7) 仲宗根正：母児間のHIVの遺伝子学的解析、HIV母子感染の先進基礎医学・セミオープンセミナー (1999.06.04 名古屋)

8) 本多三男 Pajjit Warachit, Tawee Chotpitayasunondh, Pilaipan Puthavathana, 浜野隆一、松尾和浩、吉野直人、仲宗根正：HIV感染児における病態進行の加速を作用する因子の解析、HIV母子感染の先進基礎医学・セミオープンセミナー (1999.06.04 名古屋)

9) 仲宗根正：日本、タイ、およびロシアにおけるHIV-1の遺伝子学的特性 第505回岩手医学会 特別講演 (99.09.30 岩手医科大学)

10) 仲宗根正、篠原克明、網康至、吉野直人、海津雅彦、高橋栄治、永井美之、Yichen Lu、本多三男：Subtype E-SHIV/サル感染モデル開発

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

の試み 第47回日本ウイルス学会（1999.11.7-9  
横浜）

12) 本多三男、松尾和浩、大洲竹晃、仲宗根正、吉野直人、長縄聰、滝澤万里、浜野隆一、海津雅彦、原敬志、川原守、堀端重男、泉泰之：HIV ワクチン開発への応用を目的としたベクターの解析 第128回日本獣医学会（1999.10.13 熊本）

13) 海津雅彦、北村勝彦、朽久保修、仲宗根正：国立感染症研究所における過去12年間のHIV分離検体の検討 日本公衆衛生学（1999.10.20-22 大分）

14) 仲宗根正、山本博、網康至、塩先巧一、篠原克明、深田勝彦、江田康幸、城野洋一郎、時吉幸男、高橋栄治、須崎百合子、海津雅彦、吉野直人、本多三男：HIV-HBc キメラ粒子の赤毛サルを用いた有効性評価系の構築（2）第13回日本エイズ学会（1999.12/2-4 東京）

15) 吉野直人、網康至、篠原克明、仲宗根正、泉泰之、海津雅彦、滝澤万里、川原守、須崎百合子、高橋栄治、柳富子、田代文夫、本多三男：病原性キメラウイルス（SHIV C2/1）接種カニクイザルでの初期生体応答 第13回日本エイズ学会（1999.12/2-4 東京）

16) 吉野直人、仲宗根正、杉浦互、原敬志、滝澤万里、泉泰之、大洲竹晃、川原守、海津雅彦、松田昌和、鏡英恵、岡野愛子、井村総一、大久保秀夫、大場悟、鈴木三郎、須藤寛人、高野政志、高山直秀、塚原優己、外川正生、早川智、保田仁介、喜多恒和、戸谷良造、田代文夫、本多三男：日本における母子感染一過去11年間の感染研での解析一 第13回日本エイズ学会（1999.12/2-4 東京）

17) 原敬志、仲宗根正、吉野直人、井村総一、大久保秀夫、大場悟、鈴木三郎、須藤寛人、高野政志、高山直秀、塚原優己、外川正生、早川智、保田仁介、喜多恒和、戸谷良造、本多三男：我が国における垂直感染HIVのV3PND領域の多クローン解析 第13回日本エイズ学会（1999.12/2-4 東京）

18) 篠原克明、阪井弘治、高橋栄治、網康至、吉野直人、海津雅彦、佐々木裕子、須崎百合子、仲宗根正、本多三男：カニクイザル病原性SIV/HIVキメラウイルスの安定性 第13回日本エイズ学会（1999.12/2-4 東京）

19) 佐々木裕子、網康至、阪井弘治、篠原克明、高橋栄治、安藤秀二、染谷健二、須崎百合子、

海津雅彦、仲宗根正、本多三男：HIV-1 89.6由来Env等シークエンスを挿入したSIV/HIVキメラウイルスの株間による変化一感染サルにおけるCD4陽性細胞減少とCD4陽性細胞におけるCD95発現の解析 第13回日本エイズ学会（1999.12/2-4 東京）

20) 塩先巧一、本多三男、仲宗根正、網康至、山本博、深田勝彦、江田康幸、城野洋一郎、時吉幸男：HIV-HBc キメラ粒子のアカゲサルを用いた有効性評価系の構築 第13回日本エイズ学会（1999.12/2-4 東京）

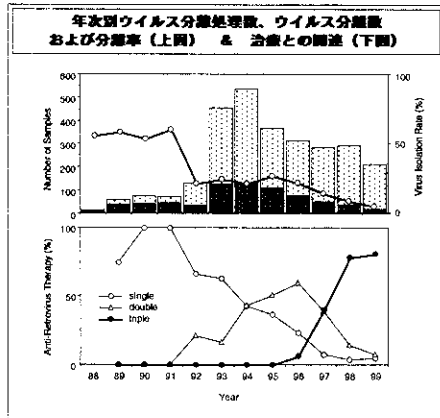
21) 阪井弘治、篠原克明、高橋栄治、網康至、海津雅彦、吉野直人、佐々木裕子、須崎百合子、仲宗根正、本多三男：カニクイザルに病原性のSHIV-C2/1 キメラウイルスのゲノム解析 第13回日本エイズ学会（1999.12/2-4 東京）



# 日本のHIV-1の遺伝子・分子生物学的解析 (集団的解析)

国立感染症研究所・エイズ研究センター 仲宗根正

図 5



- (1) Subtype Dが2症例、Subtype Gが2症例確認された。
- (2) 1996-1998年に159の臨床株が分離され、この中で検索した範囲内ではJCSを有する株は無い。
- (3) 1988-1999年のウイルス分離率の推移を見ると、昨年報告した分離率の低下傾向は1999年にも確認できた。すなわち、分離率はいまだ底値に達していない。
- (4) 日本のHIV-1集団のうち、垂直感染集団について以下の知見を得た。
  - a) 集団でみた場合、母親由来HIV-1集団は、様々なサブタイプ (A、B、B'、D、E、G) が混在する雑多な集団であり、一方、児由来HIV-1も今のところ4つのサブタイプ (B、B'、D、E、G) が確認され、やはり雑多な集団である。
  - b) 多クローン解析により個々でみた場合、母親個体内のHIV-1はquasi-speciesが強いのにに対して、児体内のHIV-1は、ほぼ単一クローン傾向にある。

図 2

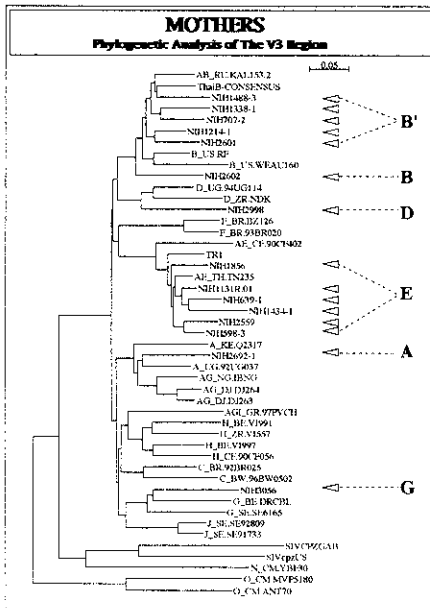
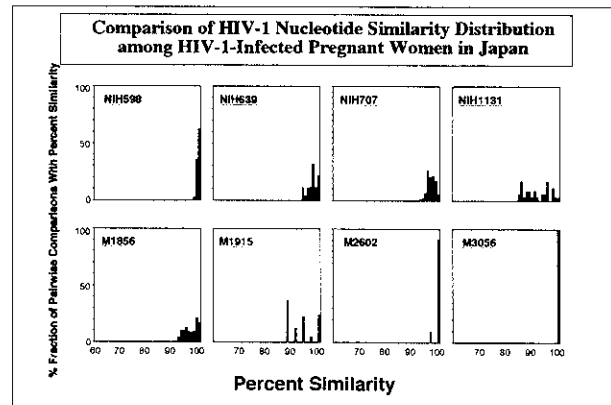


図 3



母

図 1

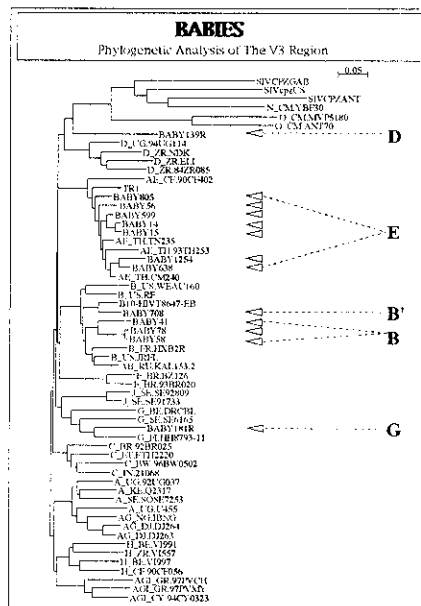
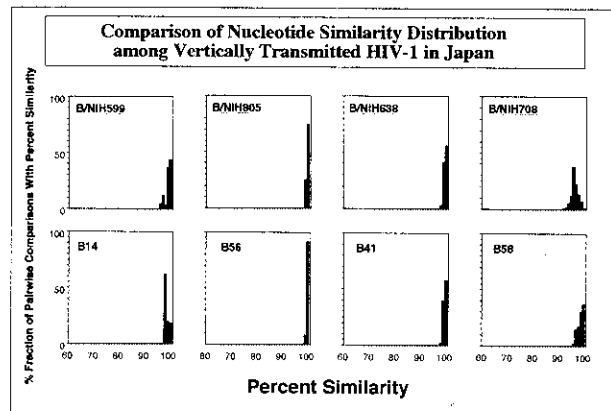


図 4



児

# 抗 gp41 抗体の中和活性と gp41 由来ペプチドの融合阻止機構

東北大学大学院医学系研究科感染症態学分野 服部俊夫

Gp41 の融合殻構造を認識する二つの異なるモノクロナル抗体 98.6 と 50.69 抗体の中和活性を比較検討すると 50.69 抗体のみに中和能が認められた。また種々の gp41 由来ペプチドの融合阻止活性を観察すると、R5 の抑制にはより多くのペプチドが必要であることが判明した。種々のペプチドのなかで、LAI 株由来の DP178 は 12G5 抗体の細胞膜蛋白への結合を阻止したので、CXCR4 に結合することが示唆された。

## A. 研究目的

HIV の env は細胞膜受容体への結合を担う gp120 と融合を担う膜貫通糖蛋白 (gp41) よりなる。gp41 は融合直前に二つのアルファヘリックス領域が二つの 3 量体がアンチパラレルコイルを形成し、6 量体の融合殻構造を認識することが知られている。研究者らは N 端側に存在する DP107 に対する抗体価が病勢の進行とともに低下することを見出し、この抗体の低下が活性化融合殻構造に対する抗体の低下と関連している可能性を検索するために、本構造に対する抗体の特性について検討を加えた。この領域の二つの異なるエピトープを認識するモノクロナル抗体 98.6 と 50.69 抗体の中和活性を Luciferase を用いた single round assay で評価した。また融合殻構造の意義を解析するために、異なる envelope を用いた感染系において、種々の gp41 由来ペプチドの融合阻止活性を検討した。一部のペプチドの標的が gp41 だけではないことを明らかにした。

## B. 研究方法

主に解析に使用したのはヒト型モノクロナル抗体 98.6 と 50.69 抗体で、前者の認識するエピトープは立体構造であるが、aa 644-663 を含む領域を認識し、後者の認識する epitope は用いたペプチドの gp41 は当該領域の研究で以前より融合阻止活性

が強いことが知られている LAI 株由来の DP107: aa 553-590 と DP178: aa 638-673 及び近年結晶化された活性化融合殻構造を構成する N36: aa 546-580 と C34: aa 628-661 と呼ばれるペプチドを合成した。(図 1) それ以外に R5 tropic ウイル

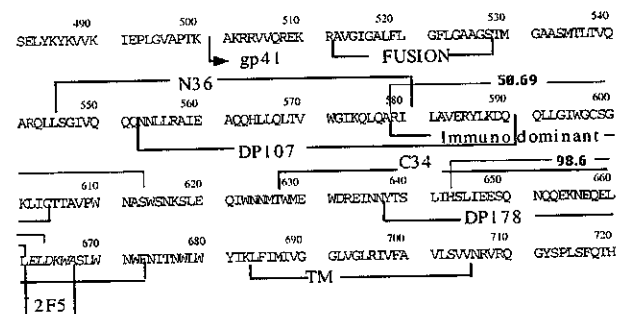


図 1 gp41 のアミノ酸配列と合成ペプチド

ス ADA 由来の DP178ADA を用いた。次にこれらのモノクロナル抗体とペプチドの融合に及ぼす影響を観察した。融合は single round luciferase assay でおこなった。ルシフェラーゼレポーター遺伝子としては pNL4-3-Luc-E-R-を env 遺伝子としては、X4 ウイルス pSMHXB-2 R5 ウイルス pSMADA R5X4(89.6)として psp272 を使用した。レポーター遺伝子と env 遺伝子を 293T 細胞に共導入して、2-3 日後に上清を回収し、P24 抗原でウイルス量を揃えた。得たウイルスを標的細胞として、CD4 と補受容体を発現している U87 細胞に感染させ、entry の有無を 3 日後、細胞

破碎溶液のルシフェラーゼ活性で測定した。その他に R5 として SF162 と ADA を末梢血リンパ球に感染させて得た。また NL432 を 293 T 細胞に感染させて pNL432 ウイルスを獲得してこれらを末梢血リンパ球感染へのペプチドの影響を観察した。

フローサイトメーターを用いて SUPT1 表面での CXCR4 発現(12G5)と CEMCCR5 での CCR5 発現(2D7)を観察した。それぞれの抗体の結合に及ぼすペプチドの影響を観察した。

### C. 研究成果

モノクロナル抗体の融合に及ぼす影響

コントロールとして用いた V3 ループに対する抗体 694 は融合を強く阻止した。また 50.69 にも有意な抑制活性がみられた。しかしながら、98.6 あるいはコントロール IgG にはそれらの抑制活性はみられなかった。(図2) 融合に及ぼすペプチドの

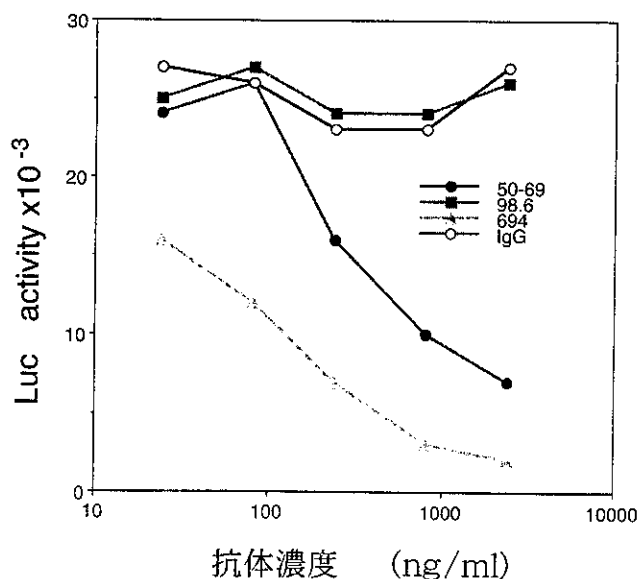


図2 種々の抗体の融合阻止活性

影響。数種類のペプチドを用いて検索した結果すべての gp41 由来ペプチドは融合を用量 依存的に抑制した。その IC50 を計算すると、ADA への IC50 は HXB-2 への IC50 より常に2倍以上であり、R5 の

抑制にはより多くのペプチドが必要であることが判明した。(図3) この様な現象が

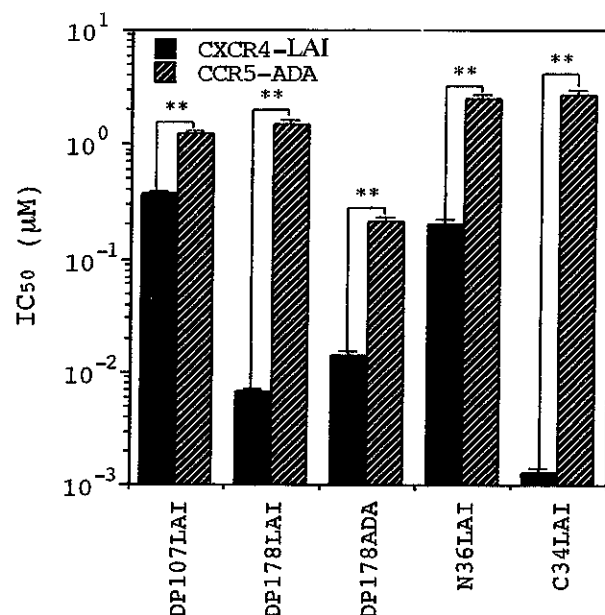


図3 ペプチドによる融合阻止活性

HXB-2 と ADA 間のみで生じるものか、一般化できるかを確認するために、まず R5X4 ウイルスである 89.6 を使用して比較検討を行った。同じ envelope 遺伝子で標的細胞の補受容体が異なる系においても標的が CCR5 の場合は CXCR4 を発現している場合に比べ、より多くのペプチドが必要であることが、明らかになった。CCR5 保有細胞への侵入に及ぼす影響と CXCR4 保有細胞への侵入に及ぼす影響を比較すると、DP107LAI は2倍、N36LAI は6.5倍、DP178ADA は3.0倍、DP178LAI は3.3倍、C34LAI は3.9倍のペプチドが必要である。種々のウイルスの末梢血リンパ球での複製に及ぼす影響 HIV-1 更にこの現象が標的が U87.CD4.Co-R の場合だけに生ずるあるいはこの系のような偽ウイルスを使用した時にだけ認められる現象か否かを検討した。標的を末梢血とした場合はその IC50 は偽ウイルスを使用した際よりも高く、おそらく培養している際の分裂回数が高いことを反映していると思われる。そ

の様な事情にも拘わらず、ADA ウイルスと SF162 への IC<sub>50</sub> は、差がないが、pNL432 感染には低濃度のペプチドでも有効であった。(図 4) ペプチドの 12G5 の

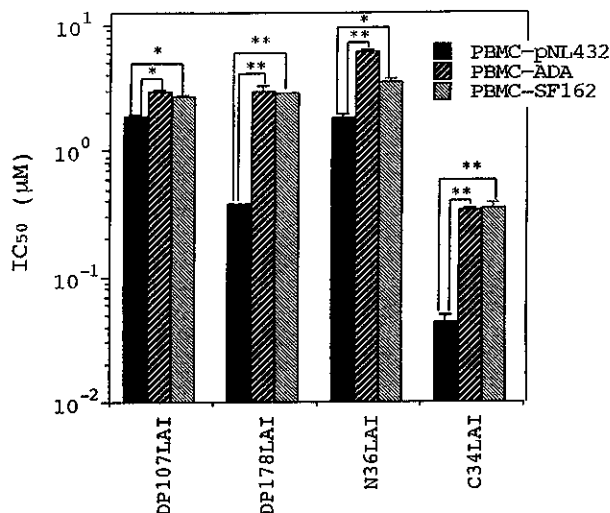


図 4 ペプチドのウイルス増殖阻止作用

細胞膜への結合の影響程度の差は異なれ、ある種のペプチドが R5 ウイルスより X4 ウイルスにより特異的に抑制度が高いことは、CXCR4 インヒビターである、T22 で経験したことである。故に同じ様な現象が gp41 由来ペプチドで観察されるか否かを検索した。12G5 への結合を SUPT1 細胞を標的として観察し、2D7 の結合を CEM-CCR5 を用いて行った。いずれのペプチドも 2D7 の CCR5 の結合に対して抑制の影響は観察されなかったが、12G5 への結合には DP178LAI が抑制的に作用することが明らかになった。しかしながら、アミノ酸配列上僅かしか異ならない DP178ADA はおろお、X4 ウイルスへの抑制度が R5 ウイルスより強い C34 にしても 12G5 への結合抑制が生じなかった。そこでこの抑制が特異的な現象であるか否かを検索する目的で、様々な用量のペプチドを用いて 12G5 抗体の SUPT1 細胞への結合を観察し、このような影響が用量依存的に観察されるか否かを観察した。図

5 に示した如く、DP178 は T22 よりもより大量で 12G5 の CXCR4 への結合を抑制することが明らかになった。

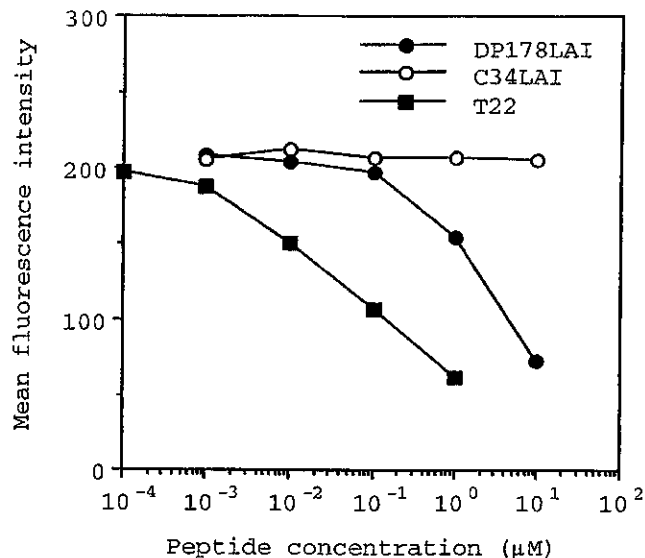


図 5 DP178 による 12G5 結合阻止効果

#### D. 考案

ウイルスの侵入だけを観察できる single round entry assay を用いて、gp41 由来のペプチドの侵入に及ぼす影響を観察した。ADA と HXB2 の envelope を用いた偽ウイルスを感染させた U87.CD4.CXCR4 と U87.CD4.CCR5 の luciferase 活性はそれ程相模止められなかった。しかしながら、用いた全ての gp41 由来ペプチドは R5 ウイルスの entry に対して X4 ウイルスの entry に対してより多くのペプチドが必要であることが明らかになった。これらの現象が特異的なウイルスの組み合わせで生じているのではないことを、他のウイルス由来の envelope でも見られる現象であることを R5X4 である 89.6 を、補受容体発現のみが異なる U87.CD4.CXCR4 あるいは U87.CD4.CCR5 用いて確認した。さらに末梢血リンパへの様々なウイルスの観察においても同様な R5 ウイルスの抵抗性が確認された。そのような現象の機構を解明する為に CXCR4, CCR5 へのそれぞれのモノク