

ロナル抗体を用いて、その抗体の細胞膜への結合に及ぼす影響を観察した。これらより5種類の gp41 由来ペプチドのうち、DP178LAIだけが用量依存的に12G5の結合を抑制した。ただ12G5の結合抑制に要するペプチド量は融合阻止に必要なペプチド量よりもかなり多く、融合阻止活性を反映しているか否かは不明である。他の12G5の結合を抑制しないペプチドについても異なるCXCR4結合モノクロナル抗体を用いて検索することが必要である。またDP178LAIは他にも7回膜貫通型のFMLPの受容体に結合し、その生物活性を抑制することが、最近知られているので興味深い所見である。これらの現象の更なる解明は新たなウイルス感染阻止法の開発につながると思われる。

#### 論文発表

1. Hattori T, Komoda H, Pahwa S, et al.: A decline of anti-DP107 antibody associates with clinical progression. AIDS 12:1557-1559, 1998
2. Sakaida H, Hori T, Yonezawa A, Sato A, Isaka Y, Yoshie O, Hattori T, Uchiyama T.: T-tropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-derived V3 loop peptides directly bind to CXCR-4 and inhibit T-tropic HIV-1 infection. J. Virol 72:9763-70, 1998.
3. Zhang X., Iwatani Y, Shimayama T., Yamada R., Koito A., Xu Y., Sakai, H., Uchiyama T., and Hattori T.: Phosphorothioate hammerhead ribozymes targeting a conserved sequence in V3 loop region inhibit HIV-1 entry. Antisense & nucleic acid

development. 8:441-450, 1998

4. Xu Y, Tamamura H, Arakaki R, Nakashima H, Zhang X, Fujii N, Uchiyama T, Hattori T.: An enhancement in the binding ability of tachyplesin analogues to CXCR4 brought out a marked increase in anti-HIV activity as well as inhibitory activity against HIV entry mediated by CXCR4 AIDS Res. and Hum. Retrovir. 15:419-427, 1999
5. Zhang X., Xu Y., Ling H., and Hattori T. Inhibition of infection of incoming HIV-1 virus by RNA-cleaving DNA enzyme FEBS Letters 458: 151-156, 1999
6. Taniguchi Y., Zolla-Pazner S., Xu Y, Zhang X, Takeda S, and Hattori T. A Human Monoclonal Antibody (98-6) Reacts with the Fusion Active Form of gp41. 投稿中
7. Xu Y., Zhang X, Matsuoka M, Hattori T.: The possible involvement of CXCR4 in the inhibition of HIV-1 infection mediated by DP178/gp41. 投稿中

#### 学会発表

1. Hattori T., Komoda H, Pahwa S, Tateyama M, Zhang X, Xu Y, Uchiyama T. Natural antibody responses against two distinct  $\alpha$ -helical regions in gp41. US-Japan Cooperative Medical Science Program, Hyatt Regency Suites, Palm Springs CA, March 18-20, 1998

- Williamsburgs, VA.
2. Hattori T, and Zolla-Pazner S. HIV-1 gp41の活性化融合構造に対する液性抗体反応。第28回 日本免疫学会 シンポジウム6 エイズ 神戸、1998年12月2-4日。
  3. 徐又農、張曉燕、内山卓、服部俊夫：HIVのgp41由来のペプチドの構造と感染抑制機構。第28回日本免疫学会総会、国際免疫シンポジウム、神戸、1998年11月30-12月6日。
  4. 徐又農、張曉燕、内山卓、服部俊夫：HIVの膜貫通タンパク gp41由来のペプチドの抑制機構の検討。第46回日本ウイルス学会総会、東京、1998年10月12-14日。
  5. Hattori T, Taniguchi Y, Xu Y, Zhang X, Takeda S, Zolla-Pazner S. Characterization of a human monoclonal antibody (98.6) that reacts with the conformational epitope of N36/C34 of gp41. US-Japan Cooperative Medical Science Program, March 23-27 Toyama, Japan 1999
  6. 谷口裕子、武田哲、薦田温子、徐又農、張曉燕、服部俊夫：HIV-1 gp41の活性化融合殻構造に対する抗体の特性。第12回日本エイズ学会 東京、1998年12月1-2日。
  7. Hattori T, Taniguchi Y, Xu Y, Takeda S, Zhang X, Ohno I, Zolla-Pazner S. A human monoclonal antibody (98-6) reacts with the fusion active form of gp41 Cold Spring Harbor Laboratory Sept. 22-26, 1999
  8. 服部俊夫、谷口裕子、武田哲、徐又農、張曉燕、松岡雅雄 融合殻構造を認識する98-6抗体の種々のウイルス膜抗原への反応 第47回 日本ウイルス学会 横浜 1999年 11月7-9日
  9. Hattori T, Zolla-Pazner S. Human monoclonal antibodies against fusion active core structure. 5th Asia-Pacific rim conference on infectious diseases Jan 7-10, Chennai, India, 2000

### 研究要旨

HIV-1 の TM である gp 4 1 の細胞質内部分は他のレンチウイルスと同様、約 150 アミノ酸の長さを持ち、アッセムブリの際のマトリックスタンパク質との相互作用に参与する事が知られている。同部分の構造・機能関連を調べるために、昨年度開発したバクテリアでの大量発現系を改善し可溶性タンパク質の発現を可能にした。また今回同部分を強制発現させると、HIV-1 へのエンベロープタンパク質の取り込みが低下することを示すとともに、その作用のためにはこの部分に存在する 2 つの amphipathic helices が必要であることを示唆する結果を得た。

### A. 研究目的

HIV-1 の外被タンパク質複合体 (gp120・gp41) はレセプター結合能を持つ gp120 と膜融合に参与する gp41 からなる。gp41 は膜融合の中心的役割を果たし、ウイルス感染に必須である。近年 gp120, gp41 とともに細胞外部分については 3 次元構造が明らかにされ、構造・機能関連が明らかにされつつあるが、gp41 の膜貫通部分および細胞質内部分については構造-機能関連がよく知られていない。特に他のレトロウイルスに比して特徴的に長いその細胞質内部分は、2 つの amphipathic helices を含むとされ Gag タンパク質との相互作用や gp120/gp41 複合体の細胞内運搬などに関与する可能性が示されている (Fig.1)。本研究は膜融合を含め病原性に対する gp41 細胞質内部分の構造-機能的解析を行うことを最終目標とする。今年度は初年度開発した gp41 細胞質内部分の大腸菌を用いての大量生成系の改善を試みるとともに、同部分の強制発現による HIV-1 複製への影響を調べた。

### B. 研究方法

#### gp41 細胞質内部分の大腸菌での発現系の改善

昨年度、gp41 細胞質内部分を大腸菌内で効率良く発現させるためにそのコドンが大腸菌の使用頻度に合わせて最適化した後、Intein との融合タンパク質として発現させたところ、発現効率は良かったものの、ソニケーション後、ほとんどの発現タンパク質が不溶画分に存在した。いくつかの界面活性剤等を試みたが可溶化の改善は見られなかった。

不溶性の問題を解決するため、Waugh D.S. らの種々の融合タンパク質の可溶性を比較検討した報告に基づき、もっとも可溶効果の高いことが示されたマルトース結合タンパク質を融合相手として選び、発現ベクターを作成した (Fig.2 A)。

また、発現誘導後リコンビナントタンパク質の回収のための大腸菌の破碎にはソニケーションにかえてフレンチプレスを採用した。また昨年度と同様に今一つのアフィニティタグとしてヒスチジンタグを両者の間に介在させた。

これとは別に、gp41 細胞質内部分のアッセムブリの際の機能を調べるために同部分を高発現するベクターを作成し HIV-1 プロウイルス DNA と共トランスフェクションして、産生するウイルスの複製およびタンパク質プロファイル調べた。

### C. 研究結果

発現に用いる gp41 細胞質内部分の遺伝子としては、昨年度作成した 90 以上のコドンについて大腸菌でのコドン使用頻度に合わせて最適化した合成 gp41 遺伝子を用いた。この遺伝子を、マルトース結合タンパク質遺伝子の下流にクローニングし両者の融合タンパク質を発現するベクターを作成した。バクテリアに導入後、IPTG により発現を誘導したところ、予想されたサイズである約 60 kD のリコンビナントタンパクの発現をみた。同タンパク質は、フレンチプレス破碎後のバクテリア抽出液中に可溶性タンパク質として回収され、ウエスタンブロッティングにて抗マルトース結合タンパク質抗体および抗ヒスチジンタグ抗体に反応性を示した。同タンパク質はアミロースレジンカラムを用いてほぼ均一タンパク質として認められた (Fig.2 B)。

gp41 細胞質内部分のウイルスライフサイクルにおける機能を探るために同部分を含むリコンビナントタンパク質を強制発現させたところウイルスの複製が抑制され、それはウイルス中へのエンベロープタンパク質の取り込み低下に起因する事をしめした。またその機能のためには、ふたつの amphipathic helices の一方のみでは不十分であることを示唆する実験データを得た (Fig.3)。

#### D. 考察

gp41 細胞質内部分は 2 つの amphipathic helices をもち、アッセムブリ、エンベロープタンパク質の細胞内動態等に影響を与えると考えられきたが、本年度のデータからエンベロープ取り込みに関与することが示唆された。おそらく同部分とマトリックスタンパク質の間に直接あるいは間接的相互作用が存在するものと考えられる。同部分は膜融合等の際にもなんらかの機能的な寄与があると考えられるが、細胞膜との相互作用、マトリックスタンパク質との相互作用などについてはまだ分子レベルでの構造・機能関連の理解には至っていない。今後更なる構造・機能解析が必要である。

#### E. 結論

本年度は gp41 細胞質内部分がエンベロープ取り込みに関与することを示すとともに、同部分をマルトース結合タンパク質との融合およびフレンチプレスを採用することにより、可溶タンパク質として発現することに成功した。可溶化できたことでカラムクロマトグラフィーによる精製が可能となり、今後精製を進めて行くことによって生化学的、構造生物学的解析が行える可能性が示された。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Transactivation is a conserved function among primate lentivirus Vpr proteins but is not shared by Vpx.

Philippon V, Matsuda Z, Essex M

J Hum Virol 1999 May-Jun;2(3):167-74

##### 学会発表

1. A Recombinant protein, which contains the cytoplasmic domain of gp41, interferes with the replication of HIV-1. Zene Matsuda, Tun-Hou Lee and Max Essex

13 th Protein Society Symposium, July23- 28, Boston, USA

2. gp41 細胞質内部分を含む 28kD タンパク質による HIV-1 複製の阻害

松田善衛、第 47 回日本ウイルス学会学術集会、1999. 11. 7-9, 横浜

3. Inhibition of HIV-1 replication with a

recombinant protein containing the cytoplasmic portion of TM

松田善衛、第 13 回日本エイズ学会学術集会、1999. 12. 2-4, 東京

#### G. 知的所有権の取得状況

該当なし

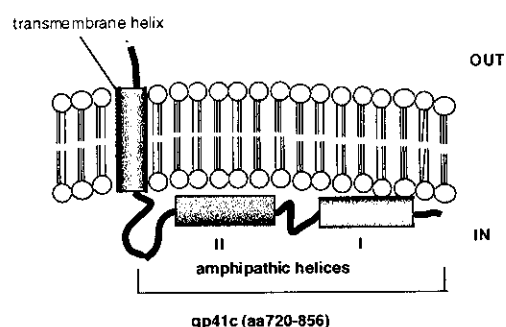
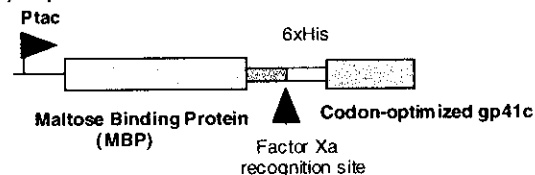


Fig.1. A schematic diagram of the cytoplasmic portion of gp41. The transmembrane and two amphipathic helices (I and II) are shown together with a lipid bilayer. The topological relationship shown here is hypothetical.

#### A) Expression module



#### B) Protein profile

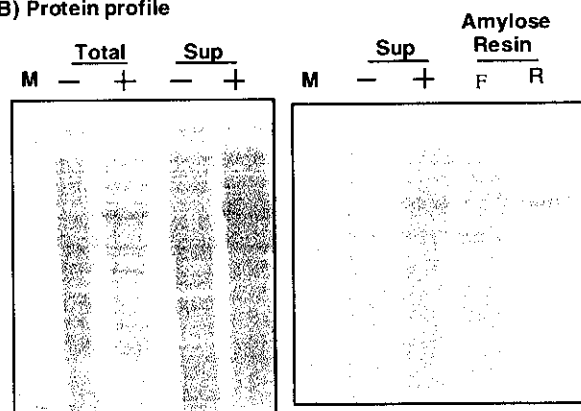
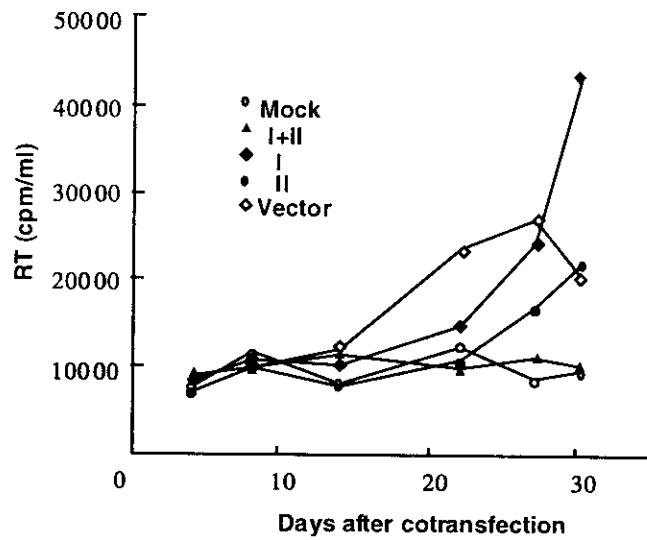


Fig.2 Expression of gp41c in a prokaryotic expression system. An expression module (A) and typical protein profiles (B) on SDS-PAGE are shown. Total: total bacterial lysates, Sup: supernatant after French Press and centrifugation, (-) and (+): with or without induction, F: flow through fraction proteins in amylose resin chromatography, R: retained protein fraction in the same chromatography.



**Fig.3** Cotransfection study with subdomains of gp41. Provirus DNA and the expression vector that expresses the subdomain of the gp41 cytoplasmic portion were co-transfected into a T cell line. The replication was followed by measuring the RT activity of the culture supernatant.

## 病原性を決定するウイルス因子としての env 糖鎖の役割

分担研究者： 森 一泰 国立感染症研究所 主任研究官

共同研究者： 保富康宏 三重大学医学部、生体防御医学

### 研究要旨

エイズウイルスの病原性を決定する重要なウイルスの性質は感染宿主がウイルスに対する有効な免疫応答を誘導できないようにするところにある。その性質を決定する要因のひとつとしてウイルス外膜蛋白の50%を構成する糖鎖があげられる。以上の観点から強病原性 SIVmac239 を用い Env gp120 の23個の糖鎖中5個(79, 146, 171, 460, 479)のアスパラギン結合型糖鎖を欠くウイルス(239/env5G)を作成し、サルにおける感染性、病原性、ウイルスに対する免疫応答を検討した。糖鎖変異ウイルスは初期感染期においては SIVmac239 とほぼ同様な viral load を示したが感染後8週には血中ウイルス量は測定感度以下に減少し観察期間中(感染後46週)ウイルス量の再上昇は見られなかった。親株 SIVmac239 感染では感染制御は不十分で血中 CD4 T細胞数の減少、エイズウイルス感染による異常な活性化、構造の崩壊がリンパ節で観察された。糖鎖変異ウイルス感染における宿主による十分な感染抑制は血中抗 SIV IgG 抗体量からも確認された。感染後3週から検出された抗 SIV 抗体は6週には抗体量の増加は平衡となり、2/3頭においてはその後の増加は見られなかった。SIVmac239 感染においては抗体量は感染後30週まで増加し、6週から30週の間に4-10倍量に増加した。糖鎖変異ウイルスの初期感染の制御に働いた宿主免疫が感染動物に維持されているかどうか検証するために感染後46週に親株 SIVmac239 の接種を行った。感染後2-3週に生じる初期感染のピークは糖鎖変異感染ザル3/3頭では観察されなかった。以上の結果からウイルス外膜蛋白の50%を構成する糖鎖がエイズウイルスの病原性を決定する重要な因子であることが明らかとなった。

## A. 研究目的

エイズワクチン開発の困難さの根拠のひとつとして、ウイルス外膜蛋白(Env)に存在するおびただしい数の糖鎖が本来は有効であるべき近傍の抗原エピトープを覆い無効にしていることが示唆されている。われわれは、サルエイズウイルス Env gp120 サブユニット上の23個の糖鎖についての欠失変異体作成により、個々の糖鎖の試験管内細胞でのウイルス増殖能への貢献度を評価すると共にウイルス増殖を損なわず可及的多数の糖鎖を欠失させることを試みた。その過程で、CD4 結合部位の1個の糖鎖を欠くウイルス、総計5個の糖鎖を欠くウイルスの作成に成功した。これらの変異体は糖鎖によるエピトープの被覆の実態、レセプター結合部位の糖鎖の生体レベルでの役割を解明する上で極めて有効であると考えられる。また、糖鎖付加反応は一般的には一様でなく、生成した Env 蛋白毎に糖鎖付加は不均一(必ずしも付加部位がすべてそのとおり使用されているわけではない)ことを考慮すると、これらの変異体は感染防御抗原として親株より優れている可能性がある。以上によりこれら変異体のサルにおける増殖性、病原性、免疫原性を親株と比較する。さらに、感染からの回復、生存が見られる場合には、親株のチャレンジにより防御免疫が成立しているかを明らかにする。

## B. 研究方法

### サル

アカゲザル(ミャンマー原産の育成ザル、オス、3-5才、体重3-4Kg)、Bウイルス、SRV、STLV、SIVに対する抗体が陰性、培養リンパ球におけるSIV増殖性に問題がない動物を選んだ。

### ウイルス

ウイルス DNA クローンを培養細胞(SW480 または COS-1)に transfection を行い2-4日後の培養上清を種ウイルスとした。このウイルスをアカゲザル培養リンパ球を用いて増殖させ感染実験用ウイルス

とした。ウイルス量は、gag 抗原量については Coulter 社の p27 gag antigen assay kit により決定した。TCID<sub>50</sub> は、サル CD4 陽性 T 細胞 (CyfT/HVS) を用いて測定した。

### ウイルス接種

感染実験1においては100 TCID<sub>50</sub>、感染実験2においては500 TCID<sub>50</sub>のウイルスを静脈内接種した。

### 血しょうウイルス RNA 量の測定

血しょう中のウイルス RNA は Boehringer Mannheim 製キットを用いて精製した。ウイルス RNA 量は SIV の gag 遺伝子配列から作成したプライマー: SG05i: (5'-ACTGCTGATTCAAATGCIACC-3')、SG06i: (5'-CTACTGGTCTICTCCAAAGAGAGAATTG-3') を用いて、リアルタイム PCR 法により測定した。

### SIV 感染末梢リンパ球

末梢リンパ球を 10<sup>6</sup> から 4 倍希釈し、サル CD4 陽性 T 細胞 (cyfT/HVS) と co-culture を行い SIV 増殖が見られた最少のリンパ球数を測定した。

### 抗 SIV 結合抗体価の測定

SIVmac239 virion lysate を抗原として作成した ELISA プレートを用いて血漿を 100 倍希釈し抗体価を測定した。

### 中和抗体価の測定

SIV tat 依存性に発現する分泌型アルカリフォスファターゼ遺伝子をレポータ遺伝子として持つ CE Mx174 を用いてウイルス感染量を高感度に測定できる系を用いて、血しょう中のウイルス中和抗体価を測定した。

中和されるウイルスとして 239/env5G と SIVmac239 を用いた。

### フローサイトメトリーによる末梢血リンパ球の細胞表面抗原の解析

血中のリンパ球サブセット (CD3+, CD4+, CD8

+, CD16+, CD20+, CD29+)の割合についてそれぞれの2種類のモノクローナル抗体の組み合わせにより解析した。血中のCD4+細胞数は自動血球計算機によりリンパ球数を測定し、フローサイトメトリーの結果を用いてCD4+細胞数を算出した。

#### CTL 活性

$^{51}\text{Cr}$  release assay により末梢リンパ球の CTL 活性を測定した。Target 細胞は実験に用いたサルの末梢リンパ球から B lymphoid blast cell line (BLCL)を作成し、この細胞に SIV gag-pol, or env 遺伝子を発現する recombinant vaccinia virus を感染させて作成した。末梢リンパ球は毎回の採血時にリンパ球分離後、 $-80^{\circ}\text{C}$  冷凍庫に保存した。CTL 活性は凍結保存された末梢リンパ球を用い測定した。

#### SIV env specific proliferation

SIV env epitopes によるリンパ球増殖(CD4+ T cells が誘導される)は上記の CTL target cells をホルマリン固定したものを stimulator として末梢リンパ球を4日間培養し  $^3\text{H}$  Thymidine の取り込みを測定した。

### C. 研究結果

#### Viral load

糖鎖変異ウイルスは初期感染期においては SIVmac239 とほぼ同様な viral load を示した。糖鎖変異ウイルス感染ザルにおいては感染後8週には血中ウイルス RNA 量は測定感度前後(1000 copy/ml)まで減少し観察期間中ウイルス量の再上昇は見られなかった。感染8週の SIV 感染末梢リンパ球数においても糖鎖変異ウイルス感染ザルでは  $10^6$  個のリンパ球を用いても SIV 感染を確認できなかった。親株 SIVmac239 感染では感染2-3週では糖鎖変異ウイルス感染と同様であるがその後のウイルス量の減少は少なく:血中ウイルス量では感染後6週前後から再上昇し以後活発なウイルス感染が持続した。感染性リンパ球数においても

持続的に検出された。

#### 血中の抗ウイルス抗体価

ウイルス感染による血中の抗 SIV IgG 抗体量は感染後3週から検出され感染後6週まで増加したが、6週以後抗体量は平衡となり、2/3頭においては観察期間中平衡状態を保った。1頭においては感染後12週以降再上昇した。SIVmac239 感染においては抗体量は感染後6週以降30週まで増加しその間4-10倍に増加した。糖鎖変異ウイルス感染ザルに見られたこのような ELISA のパターンは感染宿主における SIV 感染の制御の結果であると推測される。

#### 免疫応答

感染制御と関連する宿主免疫応答として中和抗体、CTL、env 蛋白に対する細胞増殖活性を測定した。SIVmac239 に対する中和抗体は当ウイルス感染ザル(3/3頭)において感染後18週に検出されたが、それ以外の採血では検出されなかった。239/env5G に対する中和抗体については当ウイルス感染ザル1/3頭では感染後12週以降に検出されたが、残る2頭では検出されなかった。CTL、細胞増殖活性は感染ザルで検出されが、個体間、各採血サンプル間の違いが見られ、感染ウイルスによる違いは見られなかった。

#### 感染防御能

ウイルス感染制御が感染により誘導されたウイルスに対する防御免疫によるのか検証するために感染後4-6週に病原性の親株 SIVmac239 (500 TCID)の接種を行った。感染後4週の時点では SIVmac239 感染による初期感染によるウイルス量の上昇は観察されなかった。コントロール感染群では感染後1-2週に典型的な初期感染が確認された。

### E. 考察

エイズウイルスの外膜タンパクは感染細胞のウイ



ルスレセプターとの結合、感染細胞内への侵入を決定することからウイルスの感染性、組織特異性を決定していると考えられている。またウイルス粒子の外膜を形成することから宿主免疫応答のターゲットとしても重要である。これらの理由からワクチン開発において重要な標的ウイルスタンパクとなっている。ところがエイズウイルスにおいては外膜蛋白の約50%は糖鎖で構成され、また糖鎖に対する有効な宿主免疫が誘導されにくいことからエイズウイルス感染においては糖鎖が有効な防御免疫の誘導の障害となっていることが推測されている。用いた変異ウイルス(239/env5G)はこれらの疑問を解決するためにウイルスの感染性への障害を最小限にし、かつ最多の糖鎖数の欠損を持つウイルスとしてデザインされた。サルにおける感染性については初期感染におけるウイルス増殖のレベルから判断できるが239/env5G感染ザルでは感染後1-3週に親株SIVmac239感染と同レベルの感染が観察された。宿主免疫応答については初期感染以降の血中ウイルス量から判断すると感染後8週から46週の観察期間中3/3頭のサルにおいて検出感度前後(1000 copy/ml)の低値であったことから有効な感染防御免疫が誘導されたと推測された。強いウイルス感染抑制は血中の抗ウイルス抗体産生量からも確認された。ELISA法で測定したところ239/env5G感染ザルにおいては感染後4-8週に抗体産生の抑制が見られた。2/3頭においては抗体量は感染後36週の観察期間中ほとんど増加しなかった。このような初期感染直後の抗体産生誘導の抑制は親株SIVmac239感染では観察されなかった。感染制御と関連する免疫については今回の解析からは同定することはできなかった。ウイルスに対する感染制御については中和抗体、CTLが重要な役割を果たすことが知られているが、今回の解析では中和抗体については可能性が否定された。CTLについてはenv蛋白に対する反応では糖鎖変異ウイルス感染における高い活性は検出されな

った。

SIVを用いた糖鎖変異ウイルスの研究についてはDesrosiersのグループにより報告されている。彼らは、同様にSIVmac239を用いて糖鎖変異ウイルス作成しサルにおける糖鎖変異ウイルスの感染制御を観察しているが感染制御と関連する機序として中和抗体の誘導の促進と結論している。我々の解析では中和抗体以外の免疫反応が重要と考えられる。両者の結果の違いは糖鎖欠失変異の違いによると考えられる。

糖鎖変異ウイルス感染ザルにおいて初期感染期以降においても感染防御免疫が維持されているか、また維持されている場合その防御免疫が親株の病原性SIVmac239感染に対して有効であるかを調べるためにSIVmac239を用いたチャレンジ感染実験を行った。3/3頭において感染4週までの観察においては再感染における血中ウイルス量の増加は観察されなかった。

今後、糖鎖の欠失ウイルス感染によるSIV感染防御免疫誘導の機序、免疫の実体の性状についてのより詳細な解析が必要である。

## F. 結論

Env gp120の5個(79, 146, 171, 460, 479)の糖鎖を欠損したSIVは親株のSIVmac239とは異なり感染後8週には血中ウイルス量は測定感度以下に減少した。さらに感染後46週において親株SIVmac239の感染を阻止した。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Akari H, Nam K.-H, Mori K, Otani I, Shibata H, Adachi A, Terao K and Yoshikawa Y. Effects of SIVmac infection on peripheral blood CD4+CD8+ T lymphocytes in cynomolgus. 1999. *Clinical Immunology* 91: 321-329.

2. Otani I, Mori K, Sata T, Terao K, Doi K, Akari H, and Yoshikawa Y. Accumulation of MAC387+ macrophages in paracortical area of lymph nodes in rhesus monkeys acutely infected with simian immunodeficiency virus. 1999. *Microbes and Infection*, 1: 977-985.

3. Kano M, Matano T, Nakamura H, Takeda A, Kato A, Ariyoshi K, Mori K, Sata T, and Nagai Y. Elicitation of protective immunity against simian immunodeficiency virus infection by recombinant sendai virus expressing the gag protein. *AIDS*, 2000. (in press)

## 2. 学会発表

1) Kazuyasu Mori, Yasuhiro Yasutomi, Shuzo Sawada, Francois Villinger, Kazushige Sugama, Brigitte Rosenwith, Klaus Ueberla, Shudo Yamazaki, Aftab A. Ansari, Helga Ruebsamen-Waigmann, Post-exposure prophylaxis of SHIV-RT infected monkeys with a non-nucleoside RT inhibitor GW420867. 17<sup>th</sup> annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, October, 1999, New Orleans, USA.

2) Francois Villinger, Kazuyasu Mori, Shuzo Sawada, Kazushige Sugama, Helga Ruebsamen-Waigmann, Aftab A. Ansari, High viral replication of SHIV-RT In vivo leads to the emergence of mutants partially resistant to non-nucleosidic Reverse transcriptase treatment. 17<sup>th</sup> annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, October, 1999, New Orleans, USA.

3) 森 一泰、保富康宏、向井隼三郎、山田章雄、扇本真治、塩田達雄、永井美之、SIV の感染と宿主応答における糖鎖の意義、第47回日本ウイルス学会、1999年、横浜

4) Sanjit Kumar Dhar, Kei Tadakuma, and Kazuyasu Mori. GENETIC VARIATION IN ENV OF MACROPHAGE-TROPIC SIV IN VIVO. 第13回日

本エイズ学会、1999年、東京

5) Kei Tadakuma, Takashi Moritoyo, Shuji Izumo, Mituhiro Osame, Tetsutaro Sata, Fumiko Ono, and Kazuyasu Mori. SIV CELL TROPISM, TISSUE TROPISM AND PATHOGENICITY. 第13回日本エイズ学会、1999年、東京

### Ⅲ. 研究協力者

# 臨床株 HIV Gag タンパク上の HIV 特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL) エピトープに関する研究

分担研究者 有吉紅也 (国立感染症研究所 エイズ研究センター)

研究協力者 三浦秀佳 横幕能行 松田善衛 (国立感染症研究所 エイズ研究センター)

岩本愛吉 (東京大学医科学研究所 感染症研究部)

**研究要旨** 患者由来の臨床株 HIV Gag タンパクが既知のエピトープを認識する HIV 特異的細胞障害性 T 細胞(CTL)によってどのように認識されるかを調べる為、HIV 感染者の HLA A2, A24, B51 拘束性 HIV Gag 特異性 CTL 活性を調べたところ、A24 感染者 17 名中 6 名 (35%)、A2 感染者 7 名中 2 名 (28.6%)、B51 感染者 7 名中 3 名 (42.8%) において有意な CTL 活性が認められた。同時に同感染者の Gag エピトープ領域アミノ酸配列と比較したところ、A24 感染者においてその CTL エピトープ領域多様の変異が認められ、新たなエスケープ変異が確認された。一方 B51 感染者においてはその CTL エピトープ領域の変異はわずかであった。また VSV-G pseudotype virion 形成による HIV-1 Gag 遺伝子を標的細胞 (ヒト B リンパ細胞) に導入発現させるシステムを開発した。

## A. 研究目的

HIV 特異的 CTL 細胞は、HIV の体内増殖を抑制するのに重要な役割を担っている。またこれまでに数多くの CTL エピトープが同定報告され、最近ではテトラマーアッセイを用いて、末梢血におけるエピトープ特異的 CTL 細胞の頻度をより正確にまた簡便に測定することが可能になってきた。しかしこれまでの CTL 研究は、CTL 細胞側に主眼が置かれ CTL の標的となるウイルス側に関する研究は限られていた。すなわち従来の CTL 活性測定法は、標的細胞の class I 抗原上に HIV 由来の CTL エピトープを提示させるのに、ペプチドを exogenous に加えるか、HIV 遺伝子が組み込まれた vaccine を感染させる方法に限られており、臨床株 HIV 遺伝子を endogenous に発現させた時の CTL エピトープ提示効率については、調べられていなかった。そこで、本研究では a) HIV 感染者の Gag を認識する CTL 活性を測定、b) 同患者の末梢血リンパ細胞 DNA 中の gag 遺伝子のシーケンス解析、c) 標的細胞に HIV-1 gag 遺伝子を形質導入するシステムの開発を目的とした。

## B. 研究方法

HLA A2, A24, B51 を持った HIV-1 感染者それぞれ 7 名、17 名、7 名の末梢血より末梢

血リンパ細胞を分離、96-well plate 上に分注した後、既知の HLA A2, A24, B51 拘束性 Gag CTL エピトープ領域に相応する合成ペプチド (それぞれ SLYNTVATL、KYKLVHIVW、NANPDCKTI) によって刺激、IL-2 存在下で 2 週間培養した。この様にして作成した CTL line 中の Gag CTL 活性を、それぞれのペプチドでパルスしたヒト B 細胞を用いた <sup>51</sup>Cr release assay によって測定した。ペプチドでパルスしていないコントロール細胞と比較して <sup>51</sup>Cr release に 10% 以上の差がある line を有意とした。

一方同患者の臨床株 gag の CTL エピトープ領域のアミノ酸配列を調べる為、末梢血リンパ細胞より DNA を抽出、gag 遺伝子を PCR 増幅した後 PCR 産物を直接シーケンス解析した。10 名の患者については、全 gag 遺伝子の PCR 増幅、クローニングを行い、各患者につき 3 クローンの全 gag 遺伝子のシーケンス解析を行った。

平行して、標識遺伝子として EGFP を組み入れた env 欠損 HIV-1 ベクターを作成、VSV-G 表現ベクターと共に COS 細胞へ fugene によって導入し pseudotype virion を形成させることによって、ヒト B 細胞へ HIV gag (IIIB) を形質導入させた。

### C. 研究結果

HIV-1 感染者の CTL 活性およびその CTL エピトープ領域のシーケンス結果を表 1 にまとめた。A24 感染者 17 名中 6 名 (35%)、A2 感染者 7 名中 2 名 (28.6%)、B51 感染者 7 名中 3 名 (42.8%) において有意な CTL 活性が認められた。以上の結果をエピトープ領域のアミノ酸配列と比較したところ、A24 感染者においては、反応したペプチドと同一配列が見られるものは無かった。患者検体 A24 エピトープ領域アミノ酸配列の中で最も高率に認められた KYRLK<sup>R</sup>HIVW について合成ペプチドを作成し、元の KYKLKHIVW に反応する CTL line によってクロス認識するか調べたところ、KYRLK<sup>R</sup>HIVW は HLA A24 HLA 分子に結合するにもかかわらず、KYKLKHIVW を認識する CTL 細胞からエスケープされていることが判明した (図 1)。対照的に B51 感染者については、臨床株の B51 エピトープ領域アミノ酸配列に変異は少なく、CTL 活性が認められた P10 および P18 感染者については、同一の配列であった。A2 感染者については、A24 感染者同様に多様の変異が認められたが、7/10 line に CTL 活性が認められた P11 感染者については、その CTL エピトープ領域のアミノ酸配列が用いた合成ペプチドと同一であった (表 1)。

10 名の感染者について全 gag 遺伝子のクローニングを行い、各 3 クローンのシーケンス解析したところ、特に 3 剤併用療法を受けていた 3 名において、ひとつのクローンに最高 6 個までのストップコドンが認められた (表 2)。

標識遺伝子(EGFP)が挿入された env 欠損 HIV-1 ベクターを作成、VSV envelop によって pseudotype HIV-1 を形成させることによりベクターをヒト T 細胞 (sup T) に導入させたところ、13.89%の細胞に HIV-1 ベクターが導入されることが確認された (図 2、図 3)。

### D. 考察

A24 ペプチド KYKLKHIVW を認識する CTL 活性が認められるにもかかわらずなぜクロス

認識されない変異配列 KYRLK<sup>R</sup>HIVW のみが臨床株に認められるのか疑問であった。この考察として患者体内の HIV クワシスピーシーズのうちの少数配列として KYKLKHIVW 配列が存在していた可能性が推測された。そこで強い CTL 活性が認められた P1、P2 感染者において 3 クローンを採取して調べたところ、P2 感染者で 1/3 のクローンにペプチド配列と同じ配列が認められた。この事実は、ペプチドと同配列が少数であるが、患者内に存在していたことが CTL 活性を誘導する結果と関連があったことを示唆する。また A2Gag ペプチドを強く認識した P11 感染者や B51Gag ペプチドを認識した P10、P18 感染者においてそれぞれの Gag CTL エピトープ領域のアミノ酸配列は、ペプチドと同一であった。従って CTL 活性の有無とアミノ酸 1 次配列との間にある程度の相関関係はある。しかし、B51 感染者においては、ペプチドと同一の配列が存在するにもかかわらず CTL 活性が認められる患者と CTL 活性が認められない患者がいた。この事は、Gag タンパクのアミノ酸 1 次配列以外に CTL 活性誘導の有無を決定する因子があることを示唆し、我々の本来の課題である同患者の臨床株の B51 CTL エピトープ抗原提示高率を調べる必要がある。A2 感染者についても、臨床株に認められた SLYNTVA<sup>V</sup>L や SLYNTI<sup>A</sup><sup>V</sup>L はペプチド配列の SLYNTVATL とクロス認識することが報告されているが、これらの配列を保有した感染者において A2 ペプチドを認識する CTL は誘導されなかった。今後 B51 感染者と同様そのエピトープの抗原提示高率を調べる必要がある。

本研究の課題から多少異なるが、今回薬剤治療を受けている感染者のプロウイルスにストップコドンが多数見つかった。これは W(TGG)の G が A に置換され amber codon(TAG) となった為で、ストップコドンが入った部位以外の置換の傾向を見ると、薬剤投与感染者のプロウイルスは一般的に G to A 置換が多くなっていることがわかった。

今回 VSV-G pseudotype virion 形成による HIV gag のヒト B 細胞への形質導入が初めて

成功した。またこの方法によって gag 遺伝子をヒト細胞へ高頻度に発現させることが示された。VSV-G pseudotype virion によって形質導入されたヒト細胞のクロムの自然放出をみたところ、いずれも 20% 以下で低く、また形質導入後の細胞の増殖も良好で、この方法による gag 遺伝子発現の細胞への障害は少ないと考えられた。今後この細胞を用いた CTL 実験系を確立させ、さらには臨床株をこのシステムによって標的細胞へ発現させた CTL 実験を行い臨床株の CTL エピトープ抗原提示効率について調べてゆく計画である。

#### E. 結論

今回の研究から、患者の CTL 活性と臨床株のアミノ酸一次配列との間にある程度の相関が認められたが、CTL エピトープと一致する配列を保有するにもかかわらず CTL 活性が認められない患者が存在し、従来通りの臨床株の一次アミノ酸配列を解析する方法だけでは、HIV 感染者における CTL 活性と HIV ウイルスとの相互関係を明らかにすることは出来ないことが再認識された。今後さらなる知見を得る為には、従来の組み換えバクシニアウイルスを用いて、あるいは今回開発された VSV-G pseudotype HIV virion を用いて臨床株 HIV 由来の遺伝子を標的細胞へ発現させた CTL 実験を行い、CTL エピトープ抗原の HLA 分子上への提示効率について調べる必要がある。

#### F. 研究発表

横幕能行、有吉紅也、杉浦互、永井美之、松田善衛：臨床検体由来の Gag/pol 領域の機能解析を目的とした HIV ウイルスベクターの構築 第 13 回日本エイズ学会学術集会 1999

Table 1. CTL response to the peptides and a.a. sequence in the CTL epitope regions

a) CTL response to HLA A24 peptide "KYKLVKHIW"							
ID	pos. CTL	no. of line	a.a. sequence	ID	pos. CTL	no. of Line	a.a. sequence
P1	7	10	KYRLKHIVW	P7	0	10	KYRMKHLVW
P2	5	20	KYRLKHIVW	P8	0	10	KYRLKHIVW
P3	2	11	KYRLKHIVW	P9	0	10	KYRLKHIVW
P4	2	14	KYRLKHIVW	P10	0	10	KYRLKHIVW
P5	1	14	KYRLKHIVW	P11	0	10	KYRLKHIVW
P6	1	20	n.a.	P12	0	20	KYRLKHIVW
				P13	0	18	KYRLKHIVW
				P14	0	11	KYRLKHIVW
				P15	0	21	n.a.
				P16	0	4	KYRLKHIVW
				P17	0	8	KYRLKHIVW

b) CTL response to the B51 peptide "NANPDCKTI"							
ID	pos. CTL	no. of line	a.a. sequence	ID	pos. CTL	no. of line	a.a. sequence
P10	2	10	NANPDCKTI	P20	0	16	NANPDCKTI
P18	2	20	NANPDCKTI	P15	0	18	n.a.
P19	3	64	NANPDCKTI	P21	0	12	NANPDCKTI
				P22	0	10	NANPDCKTI

c) CTL response to the A2 peptide "SLYNTVATL"							
ID	pos. CTL	no. of line	a.a. sequence	ID	pos. CTL	no. of line	a.a. sequence
P11	7	10	SLYNTVATL	P23	0	36	SLYNTVATL
P21	2	12	SLYNTVATL	P3	0	37	SLYNTVATL
				P4	0	28	SLYNTVATL
				P20	0	10	SLYNTVATL
				P12	0	10	SLYNTVATL

表1  
HLA A2感染者 7名(Table c), A24感染者 17名(Table a), B51感染者 7名(Table b) から誘導された CTL ラインのそれぞれのペプチドに対する認識を表にまとめた。No. of lineは、作成したラインの総数、pos CTLは内10%以上の specific lysisを示したラインの数を示す。使用したペプチドは、A2 ペプチド(SLYNTVATL), A24 ペプチド(KYKLVKHIW), B51ペプチド(NANPDCKTI)である。また同感染者プロウイルスの CTL エピトープ領域アミノ酸配列をダイレクトシーケンシングで調べた結果も同じ表に示した。

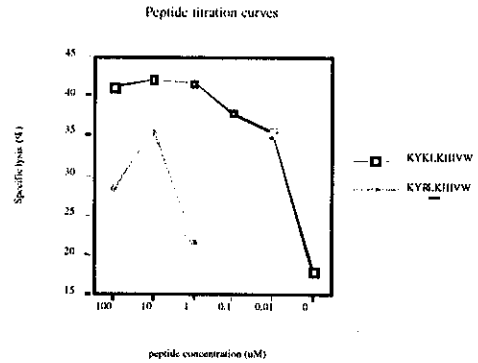


図1  
A24 ペプチド(KYKLVKHIW)を認識する CTL ラインが、変異ペプチド KYRLKHIVW をクロス認識しない事を示した図。横軸に標的細胞にハルスした時にペプチドの濃度を示す。

Stop codon sites in whole gag genes										
clone ID	Rx	No. of stop	WEK	WAS	KKK	WVK	WDR	WIL	WMT	WKC
			50	110	340	47C	65C	79C	950	124C
1 P-10	Triple	1								
2		2								
3		6								
10 P-15	Triple	5								
11		0								
12		5								
31 P-23	Triple	1								
32		3								
33		3								
4 P-18	Triple	0								
5		0								
6		0								
22 P-10	off	0								
23		0								
24		1								
7 P-1	none	0								
8		4								
9		0								
16 P-12	none	0								
17		0								
18		0								
19 P-21	none	0								
20		0								
21		0								
25 P-11	none	0								
26		0								
27		0								
28 P-20	none	1								
29		0								
30		0								
13 P-24		0								
14		0								
15		0								

表2  
10名の感染者から全 Gag 遺伝子 3 クロオンをとり、シーケンシングした結果を示す。特に 3 剤併用療法にて治療中の感染者にストップコドンが、多数認められた(□で示された)。

Transduction of human B-cell by VSV-G pseudotyped HIV-1

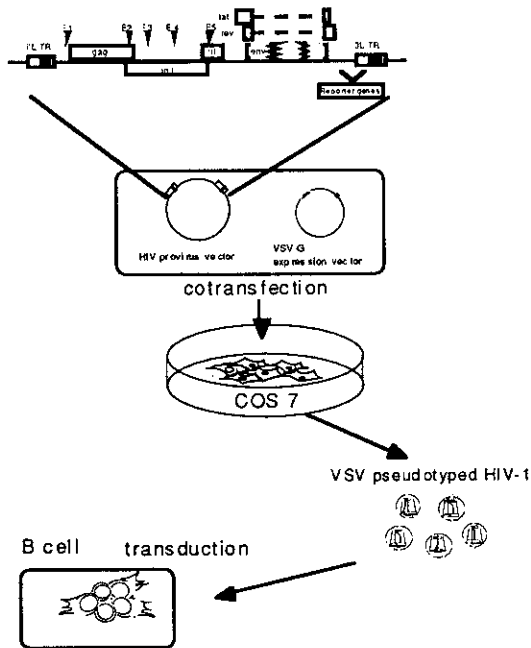


図2  
VSV-G pseudotype HIV-1 virion 形成によってヒトB細胞へHIV gag遺伝子を形質導入させた実験の概要図。

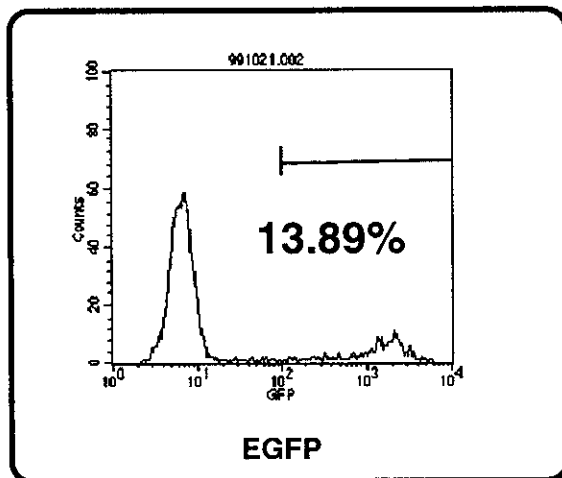


図3  
VSV-G pseudotype HIV-1 virion 形成によって EGFP 遺伝子を導入したヒト T 細胞(Sup T1)を FACS で解析した。