

- 認識する class I MHC 分子拘束性 peptide の解析. 第 35 回日本肝臓学会総会 1999 年 6 月 24 日~25 日.
6. 福島達伸、栗林秀樹、中川洋子、渡理英二、速水正憲、高橋秀実: HIV-1 V3 領域内 P18 を導入した組み換えインフルエンザウイルスの作成とその免疫誘発能の検索第 47 回日本ウイルス学会総会 1999 年 11 月 7~9 日.
  7. 杉山弘高、柳衛宏宣、吉田稔、三竿幸子、福澤嘉孝、各務伸一、高橋秀実: C 型肝炎ウイルス非構造蛋白 2 の解析 第 47 回日本ウイルス学会総会 1999 年 11 月 7~9 日.
  8. 上坂浩実、福島達伸、杉山弘高、宇井雅弘、田丸敬次郎、寺部正記、速水正憲、高橋秀実: SHIV 感染防御能獲得サルを用いた感染抵抗性の解析 (1) SHIV 感受性 CD4 陽性細胞株の樹立. 第 13 回日本エイズ学会総会 1999 年 12 月 2 日~4 日.
  9. 榎瀬良美、三宅在子、上坂浩実、田丸敬次郎、宮崎恭行、宇井雅弘、高橋秀実、速水正憲: nef 遺伝子欠損 SHIV のアカゲザルへの経鼻投与による感染と粘膜免疫誘導. 第 13 回日本エイズ学会総会 1999 年 12 月 2 日~4 日.
  10. 高橋秀実、野呂瀬嘉彦、中川洋子、納富香子、戸田雅子、渡辺くほみ、阪口雅弘、武部豊: 樹状細胞を介した HIV-1 env 遺伝子による特異的 CTL の誘導. 第 29 回日本免疫学会総会 1999 年 12 月 1 日~3 日.
  11. 熊谷善博、沢田信一郎、大脇敦子、高橋秀実: 抗体超可変部に多価に表現した HIV-1 V3 エピトープ移植抗体を利用した HIV 感染制御の試み. 第 29 回日本免疫学会総会 1999 年 12 月 1 日~3 日.
  12. 高橋めぐみ、中川洋子、清水真澄、高橋秀実: 浮遊ペプチド抗原によるキラー T 細胞の細胞障害活性抑制の機序: (II) 不応答 CTL より産生される T 細胞活性化因子. 第 29 回日本免疫学会総会 1999 年 12 月 1 日~3 日.
  13. 横須賀忠、高瀬完、高橋秀実、荒瀬尚、斉藤隆: HIVgp160 特異的 TCR トランスジェニックマウスの抗原認識における TCR  $\alpha$  鎖の重要性. 第 29 回日本免疫学会総会 1999 年 12 月 1 日~3 日.
  14. 松井聡、高橋秀実、Jay A. Berzofsky: 腫瘍再発を促進する CD4<sup>+</sup>T 細胞と腫瘍拒絶における CD8<sup>+</sup>CTL の細胞障害活性ならびに IFN- $\gamma$  産生の役割. 第 29 回日本免疫学会総会 1999 年 12 月 1 日~3 日.
  13. 若林あや子、宇津山正典、熊谷善博、高橋秀実、広川勝日: OVA の門脈投与により免疫寛容は誘導されない 第 29 回日本免疫学会総会 1999 年 12 月 1 日~3 日.
  14. 竹下俊行、里見操緒、中川洋子、高橋めぐみ、市川雅男、金榮淳、荒木勤、高橋秀実: 流産モデルマウス(CBA/J x DBA/2)における ICAM-1/LFA-1 相互作用の意義. 第 29 回日本免疫学会総会 1999 年 12 月 1 日~3 日.
  15. 中川洋子、清水真澄、高橋秀実: HIV-env 抗原特異的キラー T 細胞前駆細胞のエピトープペプチド処理による活性抑制. 第 29 回日本免疫学会総会 1999 年 12 月 1 日~3 日.
  16. Gaku SAKAUE, Takachika HIROI, Jun KUNISAWA, Tatsunobu FUKUSHIMA, Hidemi TAKAHASHI, Hiroshi KIYONO: HIV mucosal Vaccine: Nasal Immunization with gp160 encapsulated HVJ-liposome Induces Antigen-specific IgA and IgG Responses in Mucosal and Systemic Tissue. 第 29 回日本免疫学会総会 1999 年 12 月 1 日~3 日.
  17. 中島裕史、高橋めぐみ、野呂瀬嘉彦、高橋秀実: 胸腺細胞の apoptosis 誘導に対する局所麻酔薬の影響. 第 29 回日本免疫学会総会 1999 年 12 月 1 日~3 日.
  18. Takahashi, H., Norose, Y., Nakagawa, Y., Takahashi, M., Sakaguchi, M., Takebe, Y.: Efficient priming of HIV-specific CD8<sup>+</sup>CTL with dendritic cells presensitized with HIV-DNA plasmid. Japan-US Cooperative Medical Science Program: The 12th Joint Scientific Meeting of AIDS March 22-24, 2000.

## 6. HIV-1 感染成立に関する宿主因子の解析

分担研究者 高橋 秀宗 (国立感染症研究所感染病理部室長)

**研究要旨** ヒトとサル細胞を使用して HIV-1 感染成立過程を解析した。その結果、エントリーと組み込み以降の差は認められずその間の逆転写に宿主因子による感染成立の制御機構があることがあきらかとなった。Topoisomerase I はこの領域を制御する因子の一つである。また本因子以外の因子探索がこの系を用いて可能になったと考える。

### A. 研究目的

HIV-1 の宿主域は狭いことが知られており、エントリーにおいてはケモカインレセプターが宿主域決定において重要である。しかしウイルスエントリーを可能した場合においても異種細胞において HIV-1 の複製は可能にはならない。本研究ではウイルスエントリー以後にあるウイルス複製の制御機構を調べることが目的とした。

### B. 研究方法

- 1) HIV-1 が感染できない異種細胞 (サル: Vero 細胞、マウス: L929) へエントリーを可能にする宿主因子を発現させる。
- 2) HIV-1 を感染させ、複製を各ステップでモニターする。
- 3) HIV-1 粒子を使用した逆転写系においてヒト及び異種 topoisomerase I の作用を調べる。
- 4) ヒト topoisomerase I の作用を異種細胞において調べる。

### C. 研究結果

1. サル細胞 (S) とヒト細胞 (Hu) へ感染性 DNA クローンをトランスフェクトし得られたウイルス量に差が認められなかった。
2. HIV-1 をサル細胞への感染性で比較すると、サル由来のウイルスによるプロジェニウウイルス量はヒト由来に比べ 1000 分の 1 程度であった。サル細胞を 2 度通すと著しく感染性が下がることが判明した。またこの感染性はヒト細胞で回復した。(図 1)
3. Topoisomerase I は逆転写を活性化する

宿主因子であるが、ヒト topoisomerase I はウイルスを使用した逆転写系を活性化し、マウス及び小麦胚芽の topoisomerase I はしないことが判明した。(図 2)

4. ヒト topoisomerase I をサル細胞で発現させ感染性を調べたところ 2-3 倍程度の上昇が認められるのみであった。

### D. 考察

上記の結果より、HIV-1 はサル細胞を 2 度通過すると著しく感染性が減少するがさらにヒト細胞へ感染させると p24 抗原あたりの感染性を回復することが判明した。これは異種細胞でのエントリーを除く複製制御はウイルス産生細胞にも大きく依存し、制御因子がウイルスにも含まれている宿主因子であることを示していると考えられる。感染性 DNA クローンをトランスフェクトするとサル、ヒト細胞での産生ウイルス量に差がないことと合わせると、エントリー以後、組み込みまでの初期過程に宿主因子の作用点がある、と考えた。

Topoisomerase I はウイルスに含まれ、またこの領域を制御する因子であると考えられるため、ウイルスをテンプレートとした逆転写系において種特異性を調べた。その結果、ヒト topoisomerase I は逆転写系を活性化し完全長の cDNA を合成させるが、マウス topoisomerase I にはその能力がないことが判明した。またサル細胞へヒト topoisomerase I を発現させ、感染性の回復を調べる実験では現在のところ 2-3 倍程度のウイルス産生量の回復を認めるにすぎなかった。Topoisomerase I は細胞に多量に存在する酵素であり、dominant negative に作用すると予測すると外的な発現系による異種細胞での感染性回復の実験には限界があると考えられ

る。またはこの因子以外に重要な因子がサル細胞等異主細胞での逆転写成立に関与する可能性も否定できない。

一方、HIV-1のエントリーが可能な付着サル細胞はエントリーと組み込み間の宿主因子による制御解析に有用であると考えられた。

## E. 結論

ヒトとサル細胞を使用して HIV-1 感染成立過程を解析した結果、逆転写に宿主因子による感染成立の制御機構があることがあきらかとなった。

Topoisomerase Iはこの領域を制御する因子の一つである。また、さらに本因子以外の因子探索がこの系を用いて可能になった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Takahashi, H., Iwata, T., Kitagawa, Y., Takahashi, R.H., Sato, Y., Wakabayashi, H., Takashima, M., Kido, H., Nagashima, K., Kenney, K., Gibbs, C.J., and Kurata, T. Increased levels of  $\epsilon$  and  $\gamma$  isoforms of 14-3-3 proteins in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 6: 983-985, 1999

2. Takahashi, R.H., Nagashima, K., Kurata, T., Takahashi, H. Analysis of HTLV-II-like particle produced by recombinant baculovirus-infected insect cells. Virology, 256: 371-380, 1999
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

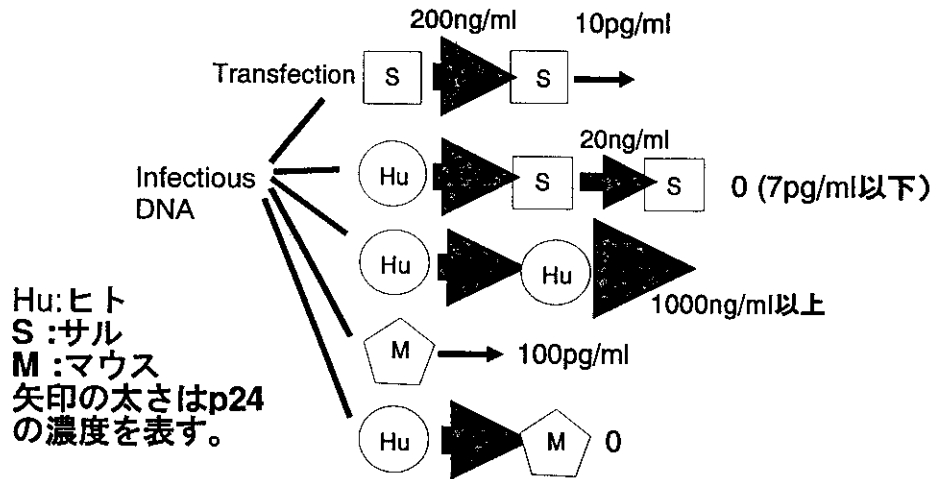
1. 高橋 秀宗、倉田 毅 HIV-1 逆転写における RnaseH と宿主 topoisomerase I の相互作用の解析 第 47 回日本ウイルス学会総会、1999、横浜
2. 庄谷 裕子、巽 正志、高橋 秀宗、倉田 毅 異種細胞における HIV-1 複製制御機構の解析 第 47 回日本ウイルス学会総会、1999、横浜

## G. 知的所有権の取得状況

なし

図 1

1. サル細胞とマウス細胞による感染性の減弱



2. ヒト細胞による感染性の回復

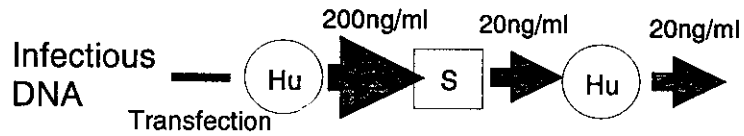
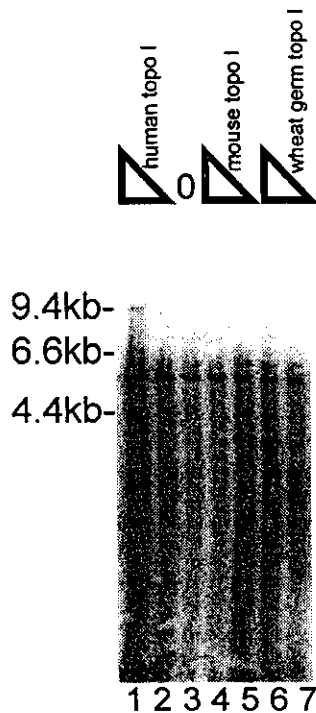


図 2



## 7. HIV クワシスピーシスと免疫応答

分担研究者 松下 修三（熊本大学エイズ学研究センター教授）

**研究要旨** 免疫不全症の進行に伴い、分離ウイルスが中和単クローン抗体(RC25)に対し、中和抵抗性となった症例を経験した。その症例の末梢血クワシスピーシスを分析したところ、病気の進行前に分離した株（A 株）を中心とした A 型クワシスピーシスから進行期の代表株（B 株）を中心とした B クワシスピーシスへの急激な変化がみられた。V3 領域のアミノ酸配列をたどると主要中和決定領域が SINIGPGRA（A 型）から RITLGPGRV（B 型）へ変化していた。A 株のシーケンスを変化させ、変異ウイルスを中和する抗体を誘導できるかどうか調べるためにアミノ酸置換を 2 つずつ持つペプチド 6 種類をマウスに免疫し、抗血清の中和活性を調べた。S11R/N13T という変異ペプチドで免疫すると B 分離株を中和できる抗体が誘導されたが、N13T/I14L というペプチドの免疫では感染増強が観察された。変異ウイルスに対抗するために中和抗体を誘導することは可能であることがわかったが、1 アミノ酸の違い（S11R か又は I14L）で中和抗体の誘導が感染増強抗体の誘導に変わる可能性があることも判明した。これらの観察は今後の免疫療法やワクチンの開発に重要な意味を持つものである。

### A. 研究目的

HIV は生体内ではお互いに似ているが少しずつ異なる集団（クワシスピーシス、準種）として存在する。我々は昨年までにクワシスピーシスに急激な変化が認められた症例を解析し、ウイルスの変化と中和抗体の性質の研究をすすめている。これらの研究を基にクワシスピーシスとして存在する病原体を抑制する免疫療法やワクチン開発の可能性を追究するのが本研究の目的である。

### B. 研究方法

主要中和領域(PND; principal neutralizing determinant)のアミノ酸配列は末梢血血漿中の HIV より RT-PCR にて V3 を増幅し、プラスミドにクローニングして多クローン解析をおこなうことにより決定した。免疫不全進行前に得られた分離株（A 株）と病気の進行期に得られた B 株（TIK11）もシーケンスした。この PND の変化に対応するペプチドをアミノ酸 1 個ずつあるいは 2 個ずつ A 株のものから B 株のものに置き換えたものとして 10 種類合成し、患者血清抗体の反応性を調べた。さらに 2 個ずつ置き換えたペプチド 6 種類についてはマウスに免疫し採血して得られた抗血清中の抗体の交叉反応性と交叉中和活性を調

べた。抗血清の交叉反応性はペプチドを抗原とした ELISA にて調べた。中和活性は B type 株の代表である TIK11 を用いて MAGI/CCR5 細胞を標的細胞として調べた。

### C. 研究結果

我々は昨年までに交叉中和活性を示す単クローン抗体による分離株の中和が病状の進行に伴って困難となった症例について検索し、その HIV クワシスピーシスが急激に変化したことを報告した。（A クワシスピーシスから B クワシスピーシスへの変化）

主要中和領域(PND)のアミノ酸配列をたどると tip 配列の両側の 4 個所を含む 5 個所に変異が有り、トロピズムも NSI/MT(R5)ウイルスから SI/TT(X4R5)ウイルスへ変化していた。この PND の変化に対応するペプチドをアミノ酸 1 個ずつあるいは 2 個ずつ A 型から B 型に置き換えたものとして合成して反応性を調べると、tip 配列の両側の置換により患者血清抗体の反応性は低下した。

このような中和抗体からのエスケープ変異を抑制する免疫強化が可能かどうか検討するために、それぞれ 2 個ずつ変異を持つペプチドをマウスに免疫し交叉反応性と交叉中和活性を調べた。抗血清の反応性を ELISA にて調

べたところ、N13T/I14L や N13T/A19V などを免疫したマウスの中には A と B に対して交叉反応性を示す抗体が誘導されたものがあった。我々はさらにこれらの抗血清の変異株(B)に対する中和活性を測定した。ほとんどの抗血清で中和活性も感染増強活性も有意ではなかったが、変異株(B)を中和する活性が認められる抗血清 (S11R/N13T)とむしろ感染増強活性が認められる抗血清 (N13T/I14L)がおのおののひとつずつ同定できた。これらの抗血清の中和・感染増強活性は濃度依存性であることが確認できた。これらの結果は、精製された gp120 や抗原ペプチドを用いて免疫すると、その株は中和されるが、中和エピトープに変異をともなった株ではむしろ感染増強が起こるといふこれまでの報告に一部一致した結果となった。しかし中和エピトープの変異を選んで免疫すれば出現してくる変異株も中和可能であると考えられることから、今後の免疫療法への応用の可能性を示すものである。

#### D. 考察

免疫不全進行前に得られた A 株の PND 配列 2ヶ所を B 株のものに置換した変異ペプチドを免疫することで得られた抗血清の解析から変異株(B)を中和する抗体を誘導するペプチド (S11R/N13T)とむしろ感染増強を誘導するペプチド(N13T/I14L)を同定した。これらは N13T という共通の変異を持ち、異なるのはもう一つの変異が S11R か又は I14L のどちらかという点である。これらのペプチドをさらに免疫しモノクローナル抗体を作成し、中和と感染増強にかかわるアミノ酸変化を同定し、その機序を明らかにする必要がある。今回の結果は HIV 中和領域の変化が宿主の中和抗体を感染増強抗体として利用する可能性を示すとともにエピトープの選び方によっては X4R5 株の出現を阻止しうる可能性を示す結果であると考えられる。

#### E. 結論

今回の研究で中和抗体と感染増強抗体の誘導が PND の 2ヶ所のアミノ酸の変異に関係することが示された。ペプチドワクチンの開発に向けた詳細なエピトープ解析をおこなう一方では広範囲の HIV 株を中和する抗体を誘導するための新たな免疫法を開発する必要がある。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Y. Maeda, Foda M., S. Matsushita, S. Harada; Involvement of both V2 and V3 region of CCR5-tropic human immunodeficiency virus type-1 envelope for reduced sensitivity to macrophage inflammatory protein a. *J. Virol.* 74: 1787-1793, (2000).
2. S. Matsushita; Current status and future issues in the treatment of HIV infection. *Int. J. Hematol.* (in press, 2000)
3. Tugarinov V, Zvi A, Levy R, Hayek Y, Matsushita S, Anglister J; NMR structure of an anti gp-120 antibody complex with a V3-peptide reveals a surface important for co-receptor binding. *Structure.* (in press, 2000)

##### 2. 学会発表

1. 小糸 厚、松下 修三; Inverse PCR によるマウスリンパ球への HIV ヘノム組み込みの解析. 第 47 回日本ウイルス学会総会. 1999.11.7-9 横浜
2. 松下 修三、谷口 泉、青木 学、藤井淳子、満屋裕明; 多剤耐性の 2 症例に対する 5 剤併用の臨床効果. 第 13 回日本エイズ学会総会. 1999.12.2-4. 東京
3. 木村 哲也、西原 久美子、小糸 厚、村上 利夫、江田 康幸、松下 修三; HAART 療法後の抗 HIV 中和抗体. 第 13 回日本エイズ学会総会. 1999.12.2-4. 東京
4. 小糸 厚、松下 修三; マウスリンパ球への HIV ゲノム組み込みの解析. 第 13 回日本エイズ学会総会. 1999.12.2-4. 東京

## 8. CTLによるHIV-1の認識と排除に関する研究

分担研究者 滝口 雅文 (熊本大学エイズ学研究センターウイルス制御分野教授)

**研究要旨** 我々が以前に明らかにした6種類のHLA-B\*3501拘束性HIV-1CTLエピトープに対するCTLが、HIV-1患者の末梢血中でどのように変動するかを定量的に検討するために、それぞれのエピトープに対するHLA-B\*3501の4量体(tetramer)を作製して、これを用いてフローサイトメトリーで解析した。9人のHLA-B35を持ったHIV-1患者の末梢血単核球(PBMC)を調べたところ、4種類のtetramerは6人以上で、他の2種類は3人と1人でtetramer結合CD8T細胞がみられた。このように多数のtetramerを用いてHIV-1特異的CD8T細胞をex vivoで詳細に解析する方法を確立した。4人の患者で経過を追ってtetramer結合CD8T細胞の数を調べたところ、HAARTによってウイルス量が激変した患者で減少が見られた。ウイルス量が減少するとHIV-1特異的CD8T細胞の数は減少することから、生体内のウイルス感染による抗原提示によって、持続的にCTLの増殖が保たれていると考えられた。さらにtetramer結合CD8T細胞のphenotypeを解析したところ、CD28-CD45RA-とCD28-CD45RA+のeffector typeのHIV-1特異的T細胞が増殖しており、CTLとしての機能があるT細胞が増殖していると推測された。

### A. 研究目的

HIV-1感染者の細胞性免疫能、特に細胞傷害性T細胞(CTL)を容易にかつ定量性をもって経時的に調べることが可能になれば、HIV-1患者の免疫状態の把握、AIDS発症の病態解析、さらに将来のワクチンの評価にきわめて有効と考えられる。HIV-1患者の末梢血中でHIV-1特異的CD8T細胞(CTL)がどのように変動するかを、多数のエピトープに対するtetramerを用いて定量的に調べる方法を確立する。またどのようなHIV-1特異的CD8T細胞が増殖しているかを、抗CD28及び抗CD45RA抗体を用いて、4重染色解析にて検討する。

### B. 研究方法

以前に我々の同定したHLA-B\*3501拘束性HIV-1CTLエピトープペプチドを用いて、それぞれのエピトープペプチドに対するHLA-B\*35014量体(テトラマー)結合アピジンを作製した。これと抗CD8、抗CD28およびCD45RA抗体を用いて、HLA-B35をもったHIV-1感染者の末梢血単核球(PBMC)を染色

し、フローサイトメトリーを用いて解析した。  
(倫理面への配慮)

研究に使われた血液を提供してくれた患者には、主治医である医師より研究目的や研究発表時のプライバシーの確保等の説明を十分にし、理解を得たことを確認した上で、血液の本研究への使用の承諾を得た。

### C. 研究結果

1) 6種類のHLA-B\*3501拘束性HIV-1CTLエピトープに対するtetramerの作製  
我々が以前に同定した6種類のHLA-B\*3501拘束性CTLエピトープペプチドを用いて、それぞれのエピトープペプチドを結合させたテトラマーを作製した。作製したテトラマーの特異性を見るために、特異的CTLクローンに結合するかをフローサイトメトリーで調べたところ、エピトープ特異的な結合がみられた。このことより、作製した6種類のテトラマーは、エピトープ特異的なT細胞レセプターに結合する事が明らかになった。

2) tetramer を用いた HIV-1 感染者末梢血 PBMC の解析

これら 6 種類のテトラマーを用いて、9 人の HLA-B35 をもった HIV-1 感染者末梢血単核球 (PBMC) を抗 CD8 抗体と共に染色し解析した。これらのテトラマーで HIV-1 に感染していない HLA-B35<sup>+</sup> の人からの PBMC を染色し、その平均値を調べたところ、CD8<sup>+</sup>細胞の 0.01±0.01%~0.05±0.03% の範囲で結合した。そこで、それぞれ 0.04~0.12% 以上を陽性としたところ、4 つのエピトープに対して 9 人中 6~9 人で陽性であった。他の 2 つのエピトープに対しては、それぞれ 3 人および 1 人で陽性であった。これらの結果から HIV-1 感染者 PBMC の HIV-1 特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞をこれらのテトラマーによって検出できることが明らかになった。

3) HIV-1 感染者末梢血 PBMC 中の tetramer 結合 CD8 T 細胞の変動

4 人の HIV-1 感染者で経過を追って調べた所、HAART によってウイルス量が低下したケースでは、テトラマー結合 CD8<sup>+</sup> T 細胞の数は減少した。一方、一部のエピトープに特異的な CD8<sup>+</sup> T 細胞では減少しないケースもみられた。

4) tetramer 結合 CD8 T 細胞の phenotype の解析

テトラマー、抗 CD8、抗 CD28 および抗 CD45RA 抗体を用いて、テトラマー結合 CD8<sup>+</sup> T 細胞の CD28 および CD45RA 分画について、フローサイトメトリーで解析 (4 重染色) をおこなった。その結果、多くの HIV-1 感染者の末梢血にみられたテトラマー結合 CD8<sup>+</sup> T 細胞では、CD28<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup> および CD28<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup> の分画が増加していた。この分画は effector T 細胞と考えられることから、慢性の HIV-1 感染者では機能をもった CTL が誘導されていると考えられた。この分画は HAART によって血中ウイルスが消失した患者では、その数が著しく減少したことから、慢性的な抗原刺激によって誘導されていると考えられた。

#### D. 考察

HLA-B\*3501 テトラマーによって HIV-1 特

異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞をフローサイトメトリーで解析するシステムを確立した。この方法は冷凍した PBMC もそのまま解析に使用することが可能であり、同時に多量のサンプルを定量的解析できることから、今後患者での細胞性免疫機能を臨床経過とともに調べるのに、きわめて有効な方法であると考えられる。

HIV-1 特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞の CD28CD45 フェノタイプ解析より、CD28<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup> の分画の増大が見られた。この分画は effector T cell と考えられているが、今後パーフォリン等の解析によって、本当に effector 機能をもっているかを詳細に解析する必要があると思われる。

今回我々は 6 種類の HLA-B\*3501 拘束性エピトープに対するテトラマーを作製して解析したが、このように 1 つの HLA クラス I 抗原が提示する多数のエピトープ解析をした例は他になく、きわめて詳細な CTL の動態を解析できると思われる。今後この方法と感染しているウイルスのエピトープ変異解析を組み合わせ、HIV-1 の CTL からの逃避機序の解析をおこなう予定である。

#### E. 結論

6 種類の HLA-B\*3501 拘束性エピトープを用いたテトラマーを作製し、HIV-1 感染者末梢血のエピトープ特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞の数をフローサイトメトリーで解析する方法を確立した。また、各エピトープに対する CD8<sup>+</sup> T 細胞の数の変動を経過を追って定量的に比較でき、HIV-1 感染者の免疫状態の変動を容易に知る事が可能となった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tomiyama, H., T. Sakaguchi, K. Miwa, S. Oka, A. Iwamoto, Y. Kaneko and M. Takiguchi: Identification of Multiple HIV-1 Epitopes presented by HLA-B\*5101 Molecules. Hum. Immunol. 60: 177-186, 1999
- 2) Tomiyama, H., Y. Chujoh, T. Shioda, K. Miwa, S. Oka, Y. Kaneko and M. Takiguchi: Cytotoxic T-lymphocyte recognition of HLA-B\*5101-restricted HIV-1 Rev epitope which is naturally



- processed in HIV-1 infected cells. *AIDS*. 13: 861-863, 1999
- 3) Kawana, A., H. Tomiyama, M. Takiguchi, T. Shioda, T. Nakamura and A. Iwamoto: Accumulation of specific amino acid substitutions in HLA-B35-restricted human immunodeficiency virus type-1 cytotoxic T lymphocyte epitopes. *AIDS. Res. Hum. Retroviruses*. 12: 1099-1107, 1999.
  - 4) Fukada, K., Y. Chujoh, H. Tomiyama, K. Miwa, Y. Kaneko, S. Oka and M. Takiguchi: HLA-A\*1101-restricted CTL recognition of HIV-1 Pol protein. *AIDS*. 13: 1413-1414, 1999.
  - 5) Yamada, N., Y. Ishikawa, T. Dumrese, K. Tokunaga, T. Juji, T. Nagatani, K. Miwa, H.-G. Rammensee and M. Takiguchi: Role of anchor residues in peptide binding to three HLA-A26 molecules. *Tissue Antigens*. 54: 325-332, 1999.
  - 6) Fukada, K., H. Tomiyama, Y. Chujoh, K. Miwa, Y. Kaneko, S. Oka and M. Takiguchi: HLA-A\*1101-restricted CTL recognition for a novel epitope derived from the HIV-1 Env protein. *AIDS*. 13: 2597-2599, 1999.
2. 学会発表
- 1) 滝口雅文 (1999) HLA クラス I 抗原とエイズ  
第 8 回日本組織適合性学会・教育講演「疾患と MHC」(京都)平成 11 年 7 月 8 日～9 日
  - 2) 滝口雅文 (1999) 難治性ウイルス感染症におけるウイルスと細胞性免疫の攻防  
第 46 回神奈川県感染症医学会特別講演(横浜)平成 11 年 9 月 11 日
  - 3) 富山宏子、滝口雅文 (1999) HIV-1 特異的 CTL の抗原認識を低下させる Nef 蛋白の役割  
第 47 回日本ウイルス学会総会(横浜)平成 11 年 11 月 7 日～9 日
  - 4) 富山宏子、岡愼一、滝口雅文 (1999) 4 量体 HLA Class I/ペプチド複合体による HIV-1 特異的 T 細胞の解析  
第 29 回日本免疫学会総会・学術集会(京都)平成 11 年 12 月 1 日～3 日
  - 5) 深田勝彦、富山宏子、三輪清志、岡愼一、滝口雅文 (1999) HIV-1 特異的 CTL エピトープの変異が CTL の認識と誘導に及ぼす影響  
第 29 回日本免疫学会総会・学術集会(京都)平成 11 年 12 月 1 日～3 日
  - 6) 富山宏子、岡愼一、滝口雅文 (1999) HIV-1 感染者における HIV-1 特異的 T 細胞の変動 (4 量体 HLA-B35/ペプチド複合体による解析)  
第 13 回日本エイズ学会学術集会・総会(東京)平成 11 年 12 月 2 日～4 日
  - 7) 深田勝彦、富山宏子、三輪清志、岡愼一、金子有太郎、滝口雅文 (1999) HLA-A11 拘束性 HIV-1 特異的 CTL エピトープの検索  
第 13 回日本エイズ学会学術集会・総会(東京)平成 11 年 12 月 2 日～4 日
  - 8) Ikeda-Moore, Y., H. Tomiyama, K. Miwa, S. Oka, A. Iwamoto, Y. Kaneko and M. Takiguchi: Major HIV-specific CTL epitopes presented by HLA-A24 and the possibility of viral escape by their mutation. *FASEB Experimental Biology* 99 (Washington DC) April 17-21, 1999.
  - 9) Takiguchi, M. (2000) HLA-A\*1101-restricted cross-clade CTL epitopes. Workshop on HIV-1 CTL assay: Technique and application. (Bangkok, Thailand) January 17-18, 2000.

## 9. レトロウイルス gag 抗原上の感染防御性及び非防御性 CD4 陽性 T 細胞エピトープ

分担研究者 宮澤 正顕 (近畿大学医学部免疫学教室教授)

共同研究者 丹羽 淳子・岩波 礼将 (近畿大学医学部免疫学教室)

**研究要旨** マウスレトロウイルス gag 遺伝子産物上には、その MA 蛋白質の範囲に複数の感染防御性及び CD4 陽性 T リンパ球認識エピトープ構造が存在する。部分遺伝子の発現と合成ペプチドの利用により、主要な感染防御エピトープを MA 蛋白質のアミノ酸残基 38-67 と 114-143 の範囲に限定した。これらの感染防御エピトープは、既に同定した CTL 認識エピトープとは異なる。また、強い CD4 陽性 T リンパ球刺激能と IL-4 産生誘導能を持つが、全く感染防御能を示さないエピトープが同じ MA 蛋白質上のアミノ酸残基 57-86 の範囲に存在する。

### A. 研究目的

ウイルス感染に対する防御ワクチンとして理論的にも実際にも有効性が高いのは弱毒生ワクチンであるが、HIV 感染においてはウイルスそのものの病原性発揮メカニズムが完全に明らかにされたとは言えず、遺伝子改変によって作製された弱毒株候補についても、その安全性が証明されたとは言いがたい。一方、感染者体内における HIV の急速な抗原変異が、安全かつ有効なサブユニット或いはペプチドワクチンの開発を困難なものとしている。実際、単一または少数のウイルス中和抗体エピトープ或いは細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 認識抗原エピトープを用いたワクチン療法は、却って変異株の出現と病態の進行を早めたとの報告がある。一方で、HIV 抗原特異的な Th1 タイプの CD4 陽性 T リンパ球の反応性が、ハイリスクグループでの感染阻止や感染者における良好な予後と相関すると言われている。

フレンド白血病レトロウイルス複合体(FV)は、免疫系の完成した成熟マウスへの接種により重篤な免疫不全症を伴う致死性の赤白血病を誘発する。FV は静脈内接種で感染し、感受性マウスは極微量のウイルス接種で確実に死に至るほか、感染マウスから性行為を介して伝搬することも証明されており、ヒトレトロウイルス感染に対する宿主免疫応答解析の有効なモデルとなりうる。

我々は FV を用いた実験で、昨年度 env 遺

伝子産物上の CD4 陽性 T リンパ球認識エピトープが、複数のエフェクター機構を誘導することにより感染阻止に有効に働くことを示した。本年度は、株間変異の少ない gag 遺伝子産物上に同定した感染防御に有効な抗原構造を解析し、それが誘導する免疫応答の特徴を明らかにすることを目的とした。

### B. 研究方法

我々が FV の gag 遺伝子産物上に存在を示した感染防御エピトープ (Miyazawa, M. et al. J. Virol. 66: 4497-4507, 1992) の存在部位を限定し、同じく gag 遺伝子産物上に別に同定した細胞傷害性 T リンパ球認識エピトープ (Kondo, T. et al. J. Virol. 69:6735-41, 1995) との異同を明らかにするため、感染防御エピトープが存在すると考えられる MA 蛋白質コード範囲内の更に短い遺伝子断片を発現する組換えワクシニアウイルス、及び CTL エピトープを単独で含むミニ遺伝子を発現する組換えワクシニアウイルスで、FV に感受性の高い(BALB/c X C57BL/6)F<sub>1</sub>マウスを免疫、FV 接種後の脾腫発症及び白血病死の経過を調べた。

上記の方法で限定された MA 蛋白質内の感染防御エピトープ存在範囲内を、更に部分的に重複する合成オリゴペプチドでカバーし、ペプチド免疫後の(BALB/c X C57BL/6)F<sub>1</sub>マ

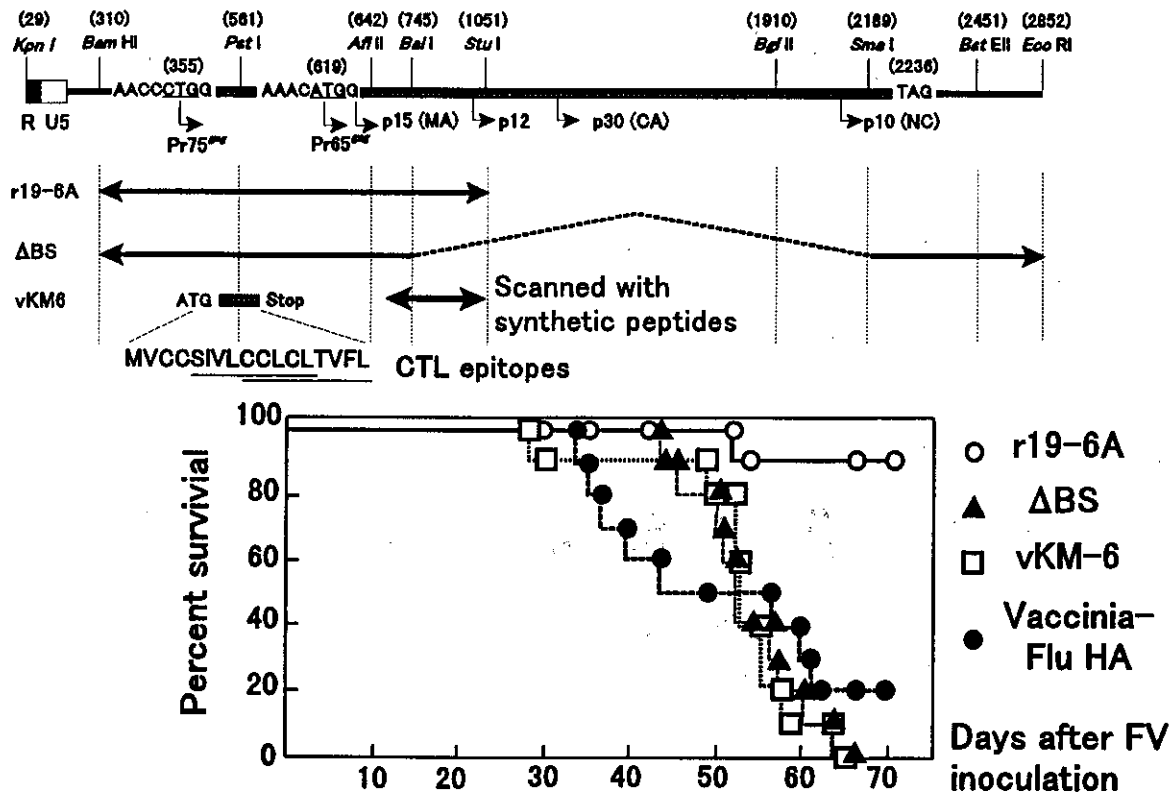


図 1. 部分遺伝子発現によるレトロウイルスgag遺伝子産物内の感染防御エпитープ存在部位の限定

ウスに FV を感染させて白血病の発症経過を観察するとともに、経時的に採血を行ってウイルス中和抗体価を調べた。

更に、これらペプチドで免疫されたマウスから Tリンパ球を分離し、より短い合成ペプチドで刺激して試験管内増殖反応を測定した。また、この際のサイトカイン産生量を、培養上清を用いた ELISA 法にて測定した。

### C. 研究結果

gag 遺伝子 5'-末端から p15 (MA)蛋白質全長までを発現する組換えワクシニアウイルス (r19-6A) には感染防御能があったが、p15 (MA) の N 末端小断片のみを発現する ΔBS、及び我々が glycosylated Gag 蛋白質リーダーペプチド内に同定した CTL エピトープを発現する vKM6 には感染防御能がなかった (図 1)。

そこで、上の実験で同定された gag 遺伝子断片内を、オーバーラップする 30-mer の合成ペプチドでカバーし、マウスを免疫して感染防御実験を行ったところ、38-67 と 114-143 に防御活性を認めた。

これら感染防御性のペプチド (38-67, 114-143) で免疫すると、ウイルス接種後 IgG クラスの中和抗体が産生された。一方、感染防御能を認めなかった 57-86, 76-104 及び 95-124 で免疫したマウスについては、ウイルス接種 14 日後では中和抗体の産生が殆ど検出されなかった (図 2)。

感染防御能を認めず、ウイルス接種後の中和抗体産生も見られない 57-86 は、しかし強い CD4 陽性 Tリンパ球増殖誘導能を示し、部分ペプチドを用いた刺激実験で、その N-末側アミノ酸残基 62-76 の範囲内に CD4 陽性 Tリンパ球認識エピトープの存在が示唆された。一方、感染防御性の 114-143 による CD4 陽

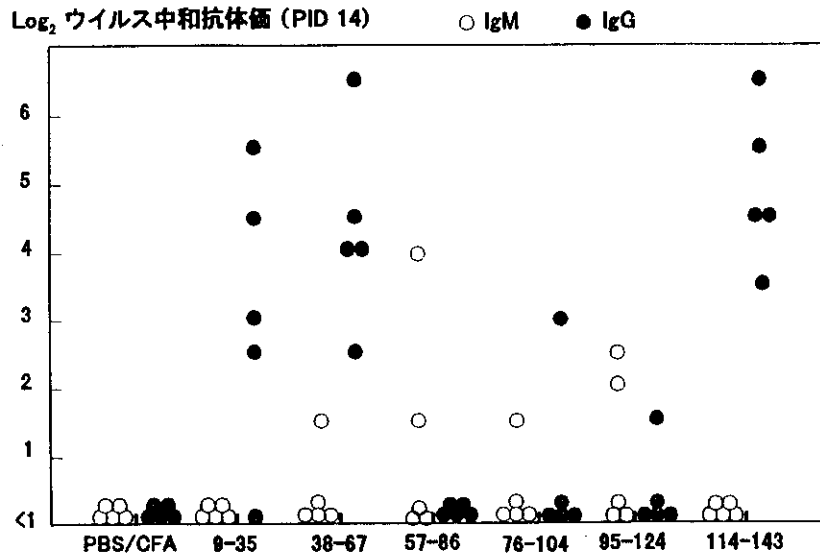


図 2. ペプチドワクチンにより免疫されたマウスにFV接種後14日目の血清ウイルス中和抗体価

性Tリンパ球刺激は弱かったが、同じく部分ペプチドによる刺激により、中央部 124-138 の範囲に CD4 陽性Tリンパ球認識エピトープが存在すると考えられた (図3)。

57-86 で再刺激された感作 CD4 陽性Tリンパ球は、抗原として用いたペプチド濃度に応じて IL-4 を産生した。しかし、114-143 特異的 CD4 陽性Tリンパからは、IL-4 産生は検出出来なかった (図4)。

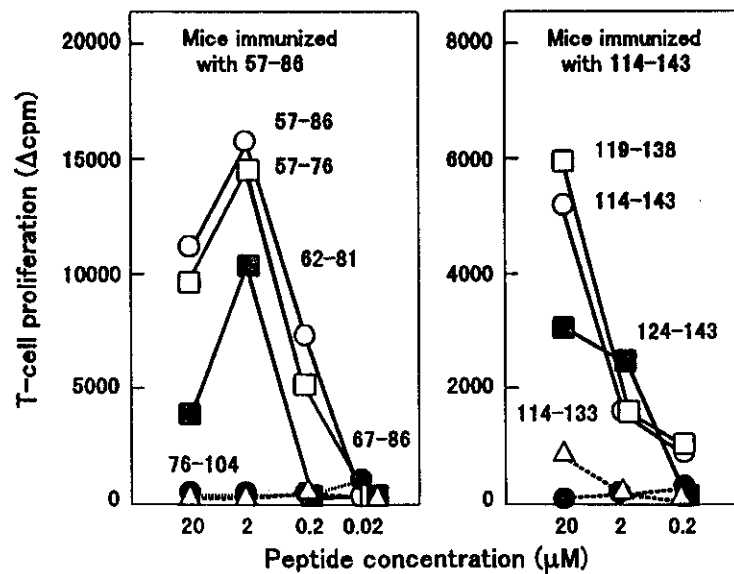


図 3. MA蛋白質ペプチド57-86または114-143で免疫された (BALB/c × C58BL/6) $F_1$ マウスTリンパ球の、ペプチド刺激による増殖反応

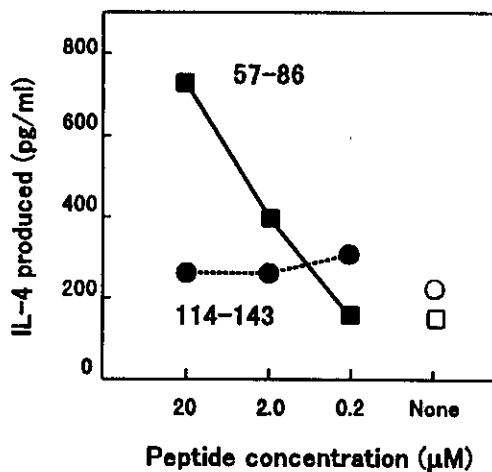


図 4. ペプチド免疫マウス由来Tリンパ球によるIL-4産生

#### D. 考察

HIV 感染に対する防御ワクチンの開発には、これまでウイルス中和抗体や CD8 陽性細胞傷害性Tリンパ球(CTL)の誘導が最も重要と考えられてきた。しかしながら、サルを用いた実験的研究やエイズ患者へのCTL移入実験では、ペプチドワクチンによる CTL や中和抗体の誘導が感染防御に有効でないばかりか、抗体が感染を促進したり、CTL の移入がエスケープ変異体の選択を促進したとの報告が目立つ。一方、我々は昨年度までの研究で、フレンド白血病レトロウイルス env 遺伝子産物上に CD4 陽性T細胞認識エピトープを同定し、これを単独で含むペプチドワクチンが感染マウスの体内で複数のエフェクター機構を誘導することにより、早期のウイルス感染細胞排除に導くことを報告してきた。

今年度は株間変異が少なく、しかも以前に感染防御エピトープが存在することが示唆されていたレトロウイルス gag 遺伝子産物に着目し、部分遺伝子発現により感染防御に有効な抗原構造の同定を試みた。

フレンドウイルス gag 遺伝子産物 N-末の MA 蛋白質内には、複数の感染防御エピトープ及び CD4 陽性Tリンパ球認識抗原エピトープが存在することが明らかとなったが、興味深いことに、前者の感染防御エピトープは、我々が以前に同定した細胞傷害性Tリンパ球認識

エピトープとは、gag 遺伝子産物中の存在部位が全く異なっていた。

MA 蛋白質中に複数見出された感染防御エピトープは、何れもその内部に CD4 陽性Tリンパ球認識抗原エピトープを含むと考えられ、特に C-末の 114-143 については、中央部の 15 アミノ酸残基 (124-138) の範囲に CD4 陽性Tリンパ球認識構造があると推定できた。また、感染防御能のあるペプチドによる免疫で、ウイルス接種後 IgG クラスの中和抗体産生が認められた。

一方、同じ MA 蛋白質内のペプチド 57-86 による免疫ではフレンドウイルスに対する感染抵抗性を誘導することは出来なかった。また、このペプチドで免疫したマウスでは、ウイルス接種後 14 日目に IgG クラスの中和抗体を検出することは出来なかった。

大変興味深いことに、このペプチドは極めて強い CD4 陽性Tリンパ球認識抗原構造を含んでおり、上記の感染防御性ペプチド 114-143 による免疫と較べて、遙かに強いTリンパ球増殖反応を誘導した。しかも、この際刺激に用いたペプチド量に応じて IL-4 の産生が見られたが、114-143 による再刺激では有意な IL-4 産生が見られなかった。

これらの事実は、CD4 陽性Tリンパ球活性化能だけが感染防御エピトープの備えるべき条件でないことを示す。感染防御性の 38-67 と 114-143 がともにウイルス接種後の中和抗体産生を誘導したこと、114-143 による CD4 陽性Tリンパ球刺激が 57-86 に較べ弱いことを考えると、感染防御性の 38-67 と 114-143 に、CD4 陽性Tリンパ球認識構造とともにBリンパ球認識抗原構造も含まれている可能性が考えられる。今後、ペプチド免疫マウスの血清中に存在するペプチド特異的抗体の有無を検討するとともに、CD4 陽性Tリンパ球認識エピトープのみを含む部分ペプチドの感染防御能を検討する必要がある。

また、強い CD4 陽性Tリンパ球刺激能と IL-4 産生誘導能を持った 57-86 が、全く感染防御能を持たない理由として、そのサイトカイン産生パターンが Th2 タイプであることも重要である可能性がある。既に、HIV 感染者における病勢の進行と Th2 タイプのサイトカイン産生とが相関することが知られている。今後、感染防御性の 114-143 による免疫で産生されるサイトカインとエフェクターメカニズムの関係についても、より詳細な検討が必要である。

## E. 結論

マウスレトロウイルス MA 蛋白質内には、複数の感染防御性エピトープと、CD4 陽性 T リンパ球認識エピトープがある。このうち強い CD4 陽性 T リンパ球活性化能と IL-4 産生誘導能を有する 57-86 (コア構造は 62-76 の範囲内) は全く感染防御能を示さない。一方、感染防御性の 114-143 の範囲には、弱い CD4 陽性 T リンパ球刺激エピトープが含まれているが、感染防御に必要とされるのは同じペプチド内のそれ以外の構造であるかも知れない

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Sakamoto, M., M. Miyazawa, S. Mori, and R. Fujisawa. Anti-cytoplasmic antibodies reactive with epithelial cells of the salivary gland in sera from patients with Sjogren's syndrome: their disease- and organ-specificities. *J. Oral Pathol. Med.* 28:20-25, 1999.
- 2) Okuda, H., M. Adachi, M. Miyazawa, Y. Hinoda, and K. Imai. Protein kinase C  $\alpha$  promotes apoptotic cell death in gastric cancer cells depending on loss of anchorage. *Oncogene* 18:5604-5609, 1999.
- 3) Miyazawa, M., Y. Yanai, and M. Kurimoto. Squirrel monkey retrovirus (SMRV) sequence from an SMRV-negative cell line? *J. Hepatol.* 31: 967-968, 1999.
- 4) Hashimoto K, N. Tabata, R. Fujisawa, H. Matsumura, and M. Miyazawa. Induction of microthrombotic thrombocytopenia in normal mice by transferring a platelet-reactive, monoclonal anti-gp70 autoantibody established from MRL/lpr mice: an autoimmune model of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Clin. Exp. Immunol.* 119: 47-56, 2000.
- 5) Miyazawa M., N. Tabata, R. Fujisawa, K. Hashimoto, H. Shiwaku, and Y. A. Takei. Roles of endogenous retroviruses and platelets in the development of vascular injury in spontaneous mouse models of autoimmune diseases. *Int. J. Cardiol.* 68: in press, 2000.
- 6) Tabata, N, M. Miyazawa, R. Fujisawa, Y. A. Takei, H. Abe and K. Hashimoto. Establishment of monoclonal anti-retroviral gp70 autoantibodies from MRL/lpr lupus mice and induction of glomerular gp70 deposition and pathology by transference into non-autoimmune mice. *J. Virol.* 74: in press, 2000.
- 7) 宮澤正顕. ウイルスと血管炎. *治療学* 33: 157-162, 2000.
- 8) 宮澤正顕. ウイルス感染防御免疫と乳酸菌投与効果. *環境と健康.* 3: 138-154, 2000.

### 2. 学会発表

- 1) Masaaki Miyazawa. Expression of endogenous retroviral antigens and the pathogenesis of autoimmune vasculitis in mouse models. Xth International Conference on Takayasu Arteritis. October 27-28, 1999. Kisarazu, Japan.
- 2) 宮澤正顕、丹羽淳子、上西博英、岩波礼将、田端信忠、松村治雄. 単一エピトープ CD4 T細胞ワクチンによる CD8 エフェクター細胞の誘導とレトロウイルス感染細胞の早期排除. 第 29 回日本免疫学会総会・学術集会. 平成 11 年 12 月 1~3 日、京都市.
- 3) 橋本圭二、宮澤正顕、田端信忠、松村治雄. マウス血小板の gp70 発現と単クローン性抗 gp70 自己抗体による血小板減少症の誘発. 第 29 回日本免疫学会総会・学術集会. 平成 11 年 12 月 1~3 日、京都市.
- 4) 田端信忠、阿部弘之、藤澤隆一、宮澤正顕. 精製単クローン性抗 gp70 抗体静注による糸球体腎炎モデルの確立とその解析. 第 29 回日本免疫学会総会・学術集会. 平成 11 年 12 月 1~3 日、京都市.

## 10. ヘルパー T 細胞、Macrophage における M-tropic, T-tropic HIV-1 strain の増殖性

研究協力者 山岡 昇司 (東京医科歯科大学微生物学助教授)  
共同研究者 佐藤 千尋 (共立薬科大学薬学専攻科大学院)  
市山 浩二 (東京医科歯科大学微生物学専攻生)  
山本 直樹 (東京医科歯科大学微生物学教授)

**研究要旨** HIV-1 の主な標的細胞群である CD4 陽性ヘルパー T (Th) 細胞群は、その産生するサイトカインの種類から Th0, Th1, Th2 サブセットに分けられることが知られている。我々は、マクロファージ指向性 (M-tropic) HIV-1 は Th1 細胞培養系で、T 細胞株指向性 (T-tropic) HIV-1 は Th2 細胞培養系で増殖性が高いことを報告してきた。また、マクロファージにおいては M-tropic HIV-1 だけが選択的に増殖してくることが報告されている。本研究においては HIV-1 の病原性と密接に関わる細胞指向性のメカニズムをウイルスの増殖段階別に解析することによって検討した。その結果、Th1 細胞系では T-tropic HIV-1 の方が細胞への侵入効率がよいにもかかわらず、プロウイルス量・ウイルス産生量ともに M-tropic HIV-1 の方が多いことがわかった。Th1 細胞侵入後のプロウイルス発現量は、VSV-G をもつ replication incompetent virus で比較すると両者に違いは認められなかった。このことは、Th1-type cell ではウイルス受容体発現パターン以外の宿主細胞因子が最終的なウイルス産生量に関与することを意味している。マクロファージでは、VSV-G をもつ replication incompetent virus で侵入効率を同等にすると、プロウイルス発現量は T-tropic HIV-1 の方が M-tropic HIV-1 よりやや高かった。また、マクロファージにおける感染性が Th1 細胞培養系におけると同様にエンベロップ蛋白質の V3 loop によって決定されていることがキメラウイルスを用いた実験で明らかとなった。これらの結果から M-tropic HIV-1 の優位な増殖性については、Th1 細胞培養系において感染後期過程以降での細胞因子の関与が、マクロファージでは侵入効率の違いが主たる要因であると考えられた。

### A. 研究目的

生体内において HIV-1 は quasi-species として存在するが、細胞への指向性をもとにすると、マクロファージおよびヘルパー T 細胞に感染することのできるマクロファージ指向性 (M-tropic) HIV-1 と、ヘルパー T 細胞以外には T 細胞株にしか感染することのできない T 細胞株指向性 (T-tropic) HIV-1 に大別できることが知られている。従来、このような HIV-1 の細胞指向性は、標的細胞表面上におけるレセプターの有無や種類に依存していると考えられてきた。しかしながら最近では、HIV-1 の細胞指向性に影響をおよぼす、細胞への侵入以降の過程が注目を集めている。また、HIV-1 感染者においては、感染初期には Th1 型細胞免疫応答が優位で

あるが、病状の進行に伴い Th2 型の液性免疫応答が優位になると報告され、このことが病態の進行とウイルスの選択的増殖に深い関係があると考えられる。したがって、HIV-1 の細胞指向性のメカニズム解明は、AIDS の病態進行を知る上で重要な意義をもつ。これまでに我々は、IL-12 で誘導した CD4 陽性 T 細胞 (Th1-type cell) において、M-tropic HIV-1 の増殖性は T-tropic HIV-1 より高いことを報告している (J. Virol. 71:465-460)。そこで本研究においては、代表的 M-tropic HIV-1 である JR-CSF、代表的 T-tropic HIV-1 である NL4-3 の Th1-type cell ならびにマクロファージにおける増殖性の違いを決定している機構の解明を目的として実験をおこなった。

## B. 研究方法

### 1. CD4 陽性 T 細胞の分離と Th1-type cell の調製

健康人より採取した末梢血から Ficoll (Amersham Pharmacia Biotech AB) を用いて末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cell; PBMC) を分離し、牛胎児血清 (fetal calf serum, FCS) を含む培地 (RPMI/10% FCS) により 1 回洗浄をおこなった。PBMC は culture plate に移し、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 30 分間インキュベーションすることによって単核細胞をプレート上に吸着させた (peripheral blood lymphocyte; PBL)。2 × 10<sup>7</sup> 個/ml 濃度に調整した PBL は、あらかじめ PBS (-) (1.37 M NaCl, 0.03 M KCl, 0.04 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.01 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)/2% FCS で 2 回洗浄しておいた細胞数と同数の DYNABEAD M-450 CD4 (DYNAL) と混和し、水中で 1 時間インキュベーションした。CD4 陽性 T 細胞が吸着したビーズは、マグネチックスタンドを用いて PBS (-)/2% FCS で 3 回洗浄し、1 ml の RPMI/10% FCS に懸濁後、適量の DETACHaBEAD CD4/CD8 (DYNAL) を加え、水中にてさらに 1 時間インキュベーションした。CD4 陽性 T 細胞は最終的に、細胞とマグネチックビーズとの混合液からマグネチックスタンドを用いてビーズを取り除くことで精製した。このようにして精製した CD4 陽性 T 細胞は、あらかじめ抗ヒト CD3 抗体 (OKT3) を固相化させておいた細胞培養用 12 well culture plate 上で、IL-2 (100 unit/ml; Shionogi) ならびに IL-12 (25 ng/ml; R&D) を含む RPMI/10% FCS を用いて 8 日間培養することで Th1-type cell とし、以降の実験に用いた。

### 2. HIV-1 の作製

2 μg の M-tropic HIV-1 (JR-CSF) ならびに T-tropic HIV-1 (NL4-3) の発現プラスミド DNA (pJR-CSF および pNL4-3) を、FuGENE 6 transfection kit (Boehringer Mannheim) を用い、付属のプロトコールに従って 3 × 10<sup>5</sup> 個の COS 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション後、2 ないし 3 日目の培養上清は、0.45 μm 孔のフィルターで濾過し、その濾液をウイルス溶液とした。各ウイルス溶液に含まれる HIV-1 特異的 p24<sup>gag</sup> 抗原量は、LUMIPULSE f (富士

レビオ) を用い、付属のプロトコールに従って測定した。上記のようにして作製した HIV-1 JR-CSF ならびに NL4-3 の感染価 (infectious unit; IU) は次のようにして測定した。まず p24<sup>gag</sup> 抗原量で 1 ng に相当するウイルス液より、96 well plate 内で 3 倍希釈系列を 10 段階調製し (原液から 3<sup>-9</sup> 希釈まで)、各希釈ウイルス液は 2 × 10<sup>5</sup> 個の phytohemagglutinin (PHA) 刺激した PBMC (PHA-PBMC) とともに 2 週間培養した。感染価は、2 週間後における各培養上清中の p24<sup>gag</sup> 抗原量が陽性と判定された最大希釈倍数の culture から感染価 (1 IU) を算出し、最終的に原液中に含まれる感染性ウイルスの量を測定した。VSV-G/NL-luc および VSV-G/JR-luc : 293T 細胞を 2 × 10<sup>6</sup> cells/6cm plate に 5ug の pVSV-G および 5ug の pNL-luc または 5ug の pJR-luc を CaPO<sub>4</sub> 法を用いてトランスフェクションを行った。トランスフェクション後 2 日目および 3 日目の培養上清をウイルス液とした。NL-E および NLCSF V3EGFP: 293T 細胞を 2 × 10<sup>6</sup> cells/6cm plate に 10ug の pNL-E または 10ug の pNLCSF V3ECFP を CaPO<sub>4</sub> 法を用いてトランスフェクションを行った。トランスフェクション後 2 日目および 3 日目の培養上清をウイルス液とした。

### 3. 感染実験

HIV-1 の感染は、感染実験に用いる細胞と各ウイルスとを multiplicity of infection (MOI) 0.01 で、37°C、2 時間インキュベーションすることでおこなった。インキュベーション後、細胞は RPMI/10% FCS で 2 回洗浄し、適切な培養液を用いて、1 × 10<sup>6</sup> 個/ml の濃度で培養した。それぞれの感染細胞における HIV-1 の増殖性の検討は、各感染細胞培養上清中の p24<sup>gag</sup> 抗原量を LUMIPULSE f を用いて測定することでおこなった。

### 4. Binding/entry assay

p24<sup>gag</sup> 抗原量で 200 ng に相当する JR-CSF と NL4-3 をそれぞれ 1 × 10<sup>6</sup> 個の Th1-type cell とともに水中で 1 時間吸着させ、PBS (-)/2% FCS で 2 回洗浄後、細胞表面に吸着したウイルス量を p24<sup>gag</sup> 抗原量で測定した (binding assay)。また、同量の HIV-1 と 1 × 10<sup>6</sup> 個の Th1-type cell を 37°C で 1 時間インキュベーションし、細胞表面に吸着したウイルスをトリプシン EDTA 溶液 (0.25% trypsin, 0.53 mM EDTA · 4Na) を用いて、37°C で 5 分間処理することによって除去し



た。細胞表面のウイルスが取り除かれた細胞は PBS(-)/2% FCS で 2 回洗浄し、最終的に細胞内の p24<sup>gag</sup> 抗原量を測定することで細胞内に侵入したウイルス量を解析した (entry assay)。

#### 5. Single-round HIV-luc assay

ルシフェラーゼ遺伝子 (luciferase; luc) をもつ replication incompetent な JR-CSF (JR-luc) または NL4-3 (NL-luc) に、vesicular stomatitis virus (VSV)、M-tropic HIV-1 JR-FL もしくは T-tropic HIV-1 IIIB のエンベロープ蛋白 (以降それぞれを VSV, FLenv ならびに IIIBenv とする) を coat した pseudo-type HIV-luc の作製は以下のようにしておこなった。10 µg の各エンベロープ蛋白発現プラスミド DNA と 10 µg の各 HIV-luc 発現プラスミド DNA をリン酸カルシウム法にて 293T 細胞にトランスフェクションし、16 時間後培養液を RPMI/10% FCS に変え、3 日後に回収し 0.45 mm 孔のフィルターで濾過した培養上清を最終的に pseudo-type virus 溶液とした。各培養上清中のウイルス量は、溶液中の p24<sup>gag</sup> 抗原量を LUMIPULSE *f* で測定することで定量し、また各 pseudo-type virus の感染性は PHA-PBMC への感染実験によって確認した。次に、感染実験は以下のようにしておこなった。p24<sup>gag</sup> 抗原量で 100 ng に相当する各 pseudo-type HIV-luc (VSV/JR-luc, VSV/NL-luc, FLenv/JR-luc, FLenv/NL-luc, IIIB/JR-luc ならびに IIIB/NL-luc) は  $1 \times 10^6$  個の細胞とともに 37 °C で 2 時間インキュベーションし、RPMI/10% FCS で 2 回洗浄した後、感染細胞を適切な培養液中で培養した。48 時間後、回収した細胞をルシフェラーゼアッセイに用いた。また、各感染細胞溶解液中の total 蛋白量は BCA Protein Assay Reagent kit (PIERCE) を用い、最終的に各感染細胞におけるルシフェラーゼの活性をサンプル中の total 蛋白量で補正した。

#### 6. リアルタイム PCR 法による HIV-1 特異的 DNA の定量

JR-CSF と NL4-3 を感染させた Th1-type cell を感染後 4, 7 および 11 日目に回収し、細胞内 DNA を抽出した。抽出した DNA のプロウイルス量の定量は、まず 1st PCR として Alu 配列から HIV LTR 領域まで

long-PCR をし、この 1st PCR 産物から HIV LTR 領域を PCR で検出することによりおこなった。各 primer による PCR と蛍光標識された PCR products の検出・定量は ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System を用い、付属のマニュアルに従っておこなった。

#### 7. CCR5 ならびに CXCR4 の発現量の解析

IL-2 と IL-12 を含む培地で 8 日間培養した Th1-type cell ( $1 \times 10^6$  個) を pellet down した後、細胞ペレットに抗ヒト CCR5 抗体 (anti-human CCR5 mouse IgG<sub>2B</sub>; MAB182, R&D) もしくは抗ヒト CXCR4 抗体 (anti-human CXCR4 mouse IgG<sub>2A</sub>; 12G5, R&D) をそれぞれ最終濃度が 10 µg/ml になるように加え、氷中で 30 分間反応させた (一次反応)。細胞は PBS/2% FCS で 1 回洗浄し、次に fluorescein isothiocyanate 標識抗マウス IgG 抗体 (DAKO) を最終濃度が 100 µg/ml になるように加え、30 分間氷中・暗所で反応させた (2 次反応)。細胞は PBS/2% FCS で 1 回洗浄した後、500 µl の 0.5% ホルムアルデヒド/PBS(-) 溶液で固定し、最終的に細胞表面上の CCR5 と CXCR4 分子の発現量を FACSCalibur (BECTON DICKINSON) を用いて解析した。

#### 8. マクロファージの調製・感染実験

あらかじめ AB 型血清でコートしたプラスチックシャーレに健常人の末梢血から分離した PBMC 浮遊液を加え 1 時間から 2 時間培養し、単球をプレートに吸着させる。培養後プレートを振盪し上清を捨て非吸着細胞を除去し 0.2% EDTA-Na および 1% FCS 加 PBS 液で吸着した単球を遊離させた。その単球を  $1 \times 10^6$  cells/well に調整し、10% 自己血清で 1 週間培養したものを MDM とした。感染実験は、 $1 \times 10^6$  cells/well の MDM に VSV-G/NL-luc、VSV-G/JR-luc、NL-E または NLCSF V3EGFP ウイルス液 100ng (p24 量) を 37 °C 2 時間吸着後 4 回洗浄し 10% 自己血清加 RPMI-1640 を加え培養した。NL-E および NLCSF V3EGFP は、nef の N 末端を EGFP に置換した。

### C. 研究結果

#### 1. Th1-type cell に対する各 HIV-1 の結合・侵入効率

我々はすでに、M-tropic HIV-1 と T-tropic HIV-1 のキメラウイルスを用いた実験から、

Th1-type cell における M-tropic HIV-1 の高い増殖性は、エンベロープ、特に V3 loop といわれる領域に依存していることを明らかにしている (J.Virol. 73, 316)。M-tropic HIV-1 の V3 loop は細胞膜表面のケモカインレセプター CCR5 と、また T-tropic HIV-1 の V3 loop はケモカインレセプター CXCR4 と結合することから、次に Th1-type cell 表面上の CCR5 と CXCR4 蛋白質の発現量をフローサイトメーターで解析した。その結果、Th1-type cell には CCR5 だけでなく CXCR4 も高頻度に発現していることが明らかになった (CCR5: 91.6%, CXCR4: 90.1%)。そこで、Th1-type cell に対する JR-CSF と NL4-3 の細胞への結合と侵入効率を検討した。まず細胞に侵入および結合したウイルス量を p24<sup>gag</sup> 抗原量で測定する binding/entry assay の結果からは、Th1-type cell 表面への binding 効率は JR-CSF と NL4-3 では変わらなかった。一方、細胞内への entry 効率については、NL4-3 のほうが 2 倍以上も高いことが示された (図 1)。この傾向は、OKT3 による刺激がなくなってから 7 日目の Th1-type cell でもみられたことから、Th1-type cell における M-tropic HIV-1 の優位な増殖性は、感染後 7 日目においても、その細胞侵入段階で決定されていないことが考えられ、このことは Th1-type cell 表面における CCR5 と CXCR4 の発現量の結果からも強く裏付けられた。

## 2. Th1-type cell における M-tropic HIV-1 と T-tropic HIV-1 の増殖性

次に、Th1-type cell に M-tropic HIV-1 である JR-CSF ならびに T-tropic HIV-1 である NL4-3 を MOI 0.01 で感染させその増殖性を検討した。感染後 1 日目から 11 日目までの培養上清を回収し、その培養上清中の p24<sup>gag</sup> 抗原濃度を測定したところ、感染後 6 日目までの増殖性は両 HIV-1 ではほぼ変わらないものの、7 日目から JR-CSF と NL4-3 の増殖性に差があらわれはじめ、感染 11 日後の JR-CSF 感染細胞の培養上清中の p24<sup>gag</sup> 抗原濃度は NL4-3 のものよりも 10 倍以上高かった (図 2)。一方、Th1-type cell と同様に分離し、IL-12 を含まない培地で調製した CD4 陽性 T 細胞 (非 IL-12 誘導 CD4 陽性 T 細胞) においては、JR-CSF と NL4-3 はほぼ同じ増殖性を示したことから (図

2)、Th1-type cell における JR-CSF の優位な増殖性は IL-12 の影響によることが示唆された。

さらに Th1-type cell における JR-CSF と NL4-3 の増殖性の違いをプロウイルス量で確認するために、各感染細胞内の HIV 特異的プロウイルス分子をリアルタイム PCR を用いて定量しその変化をモニターした (図 2)。従来の核酸分子の定量は、RT-PCR を応用したオートラジオグラフィや、enzyme-linked immunosorbent assay を用いた定量系が一般的であったが、近年、蛍光標識された PCR 産物を高精度に検出・定量できるリアルタイム PCR 法が開発され、新しい核酸分子の解析法として利用されている。本研究においても、リアルタイム PCR 法による HIV-1 プロウイルス定量系を開発した。この定量系を用いて、JR-CSF または NL4-3 感染 4、7 ないし 11 日後の Th1-type cell における HIV-1 プロウイルス DNA を定量したところ、p24<sup>gag</sup> 抗原量濃度でみられた JR-CSF と NL4-3 の増殖性の違いは、プロウイルスコピー数と強い相関があった (図 2)。以上のことより Th1-type cell における M-tropic HIV-1 の優位な増殖性は、感染後 11 日目まで続く高いプロウイルス量の反映であることが示唆された。

## 3. Single-round HIV-luc assay

JR-CSF と NL4-3 の Th1-type cell に対する侵入効率は、その増殖性に反して、NL4-3 のほうが高いことが示されたが、細胞膜に非特異的に吸着する VSV 由来のエンベロープ蛋白質 (VSV-G) をもつ pseudotype virus を用いて侵入効率を同等にした場合においては、JR-luc と NL-luc との間でそのルシフェラーゼ活性に有意な差は認められず、同じサンプルを使って測定したプロウイルス量にも有意な違いはなかった。以上のことより、Th1-type cell における T-tropic HIV-1 の高い侵入効率は、そのエンベロープ蛋白質と Th1-type cell との親和性のみで決定されており、もし同じエンベロープ蛋白質を有するならば、少なくとも single-round の感染系においては、M-tropic HIV-1 と T-tropic HIV-1 との間で遺伝子の発現には差がないことが示された。

## 4. V3 領域の違いによるマクロファージにおける感染性の違い

MDM(1x10<sup>6</sup>cells/well)に、NL4-3 の V3 領域を JR-CSF の V3 領域に変えた上 nef の N

末端をEGFPに置換したNLCSFV3EGFP、およびNL4-3のnefのN末端にEGFPをつけたNL-Eウイルスを含む培養液(p24量で各100ng)を加え、37°C 2時間培養後PBSで4回洗浄後10%自己血清加RPMI-1640を加えて培養した。図4は感染後12日目である。NLCSFV3EGFP感染細胞は日増しに増加していったが、NL-E感染細胞は全視野で1個しか認めず、これは20日間培養しても増えることはなかった。

5. マクロファージにおけるVSV-G/JR-LucおよびVSV-G/NL-Lucの感染  
MDM( $1 \times 10^6$  cells/well)にVSV-G/JR-lucおよびVSV-G/NL-lucウイルス液各100ng(p24量)を加え37°C 2時間培養後PBSで4回洗浄後10%自己血清加RPMI-1640を加えて培養した。培養後3日目にルシフェラーゼ活性を測定した。VSVのエンベロップを発現させることでCD4およびco-receptor発現量に関係なく同量のウイルスを細胞内に導入できる。その結果、ルシフェラーゼ活性はVSV-G/JR-lucおよびVSV-G/NL-lucに大差はなく、わずかにVSV-G-NL-lucの方が高かった。

#### D. 考察

生体内におけるHIV-1の標的細胞は、ヘルパーT細胞とマクロファージ、もしくは樹状細胞といったCD4分子を発現している細胞である。HIV-1はその非常に高い変異性ゆえに、感染者体内においてはquasi-speciesとして存在しているが、標的細胞への感染性、すなわち細胞指向性をもとにすると、マクロファージとヘルパーT細胞で増殖することのできるM-tropic HIV-1と、ヘルパーT細胞以外では試験管内で自己増殖する腫瘍細胞由来のT細胞株において増殖できるT-tropic HIV-1に大別できることが知られている。これまでに多くの研究グループから、初期感染者体内からはM-tropic HIV-1が優位に分離されるのに対し、T-tropic HIV-1は感染中・後期から優位に分離されるという報告がなされており、HIV-1の細胞指向性はHIV感染症の病態進行を知るうえでも大変重要であると考えられる。その後、CCR5やCXCR4が主要レセプターであるCD4に結合したHIVの細胞への侵入を補助する役目、すなわちco-receptorとして働くことがわかり、

HIV-1の侵入機構に関する理解が飛躍的に進んだ。このため、HIV-1の細胞指向性をco-receptorの有無やその種類のみで説明づけようとする試みが数多くおこなわれ、確かに多くのHIVの感染性はco-receptorの発現パターンで結論づけられた。しかし、近年それだけでは説明できないウイルスの細胞指向性について数多くの報告がなされている。本研究で用いたTh1-type cellについては、これまでに我々が、M-tropic HIV-1の増殖性がT-tropic HIV-1よりも高いことを報告し、さらにその増殖性の違いはV3 loopに依存することを明らかにした。しかしながら、その報告ではM-tropic HIV-1のTh1-type cell指向性が、V3 loopが関与すると思われる細胞への侵入効率の違いによって決定されているとの直接的な結果は示されていない。そこで本研究ではまず、代表的なM-tropic HIV-1であるJR-CSFと、代表的なT-tropic HIV-1であるNL4-3のTh1-type cellに対する侵入効率を、細胞内のウイルス抗原量やウイルス特異的DNAを定量することによって比較した。すると予想に反して、最終的に増殖性が低くなるNL4-3のほうが侵入効率が高いことが示された(図1)。また、Th1-type cellにはJR-CSFのco-receptorであるCCR5だけでなくNL4-3のco-receptorであるCXCR4も高頻度で発現していたことから、M-tropic HIV-1のTh1-type cell指向性は、そのco-receptorの発現パターンだけでは説明できず、細胞侵入以降の段階(post-entry step)で決定されていることが予想された。実際、すでに報告されているHIV-1の各proviral DNAを特異的に検出するprimer setをリアルタイムPCR法に応用し、定量性の高い解析系を用いてTh1-type cellに感染したJR-CSFとNL4-3の前期過程における各HIV-1特異的DNAの合成効率を比較すると、感染後24時間ではstrong-stop, near-full lengthならびにcircular formの各DNAのコピー数はすべてT-tropic HIV-1(NL4-3)の方が高いことがわかった。しかしながら、感染後のTh1-type cellにおけるproviral DNA量をJR-CSFとNL4-3で比較したところ、感染後日数が進むにつれて、JR-CSFのほうが高くなることが判明した(図2)。この結果を理解するためには、ウイルス側要因として複製されるウイルスの感染性を、細胞側要因として感染後期過程でのウイルス複製効率の違いと感染細胞の生存・増殖性の違いを考慮する必要があるであろう。また非IL-12誘導CD4陽性T細胞においても、JR-CSFはNL4-3よりも侵入効率が低いものの、結果としてはNL4-3と同程度の増殖性を示すことができることから(図2)、Th1-type

cell でみられた T-tropic HIV-1 の低い増殖性はヘルパー T 細胞では普遍的に存在しており、IL-12 はそれをさらに促進する効果をもつことも予想される。さらに M-tropic HIV-1 の Th1-type cell 指向性は V3 loop が決定することが証明されていることから、HIV-1 の増殖性に関わる感染後期過程に V3 loop がなんらかの形で関与していることも考えられる。そうであるとするならば、エンベロープ蛋白質を同じものにした場合で JR-luc と NL-luc のルシフェラーゼ活性がほぼ同じであったという結果は、侵入過程以外でエンベロープが関与している新たな細胞指向性のメカニズムの存在を反映しているのかもしれない (図 6)。

1998 年、Schmidt-mayerova らは、マクロファージ細胞表面には CCR5 のみならず CXCR4 も高頻度に発現しており、T-tropic HIV-1 はマクロファージ細胞内に侵入することはできるものの、proviral DNA の核への移行効率が低いために、結果としてその後の増殖性が低くなるという現象を報告している<sup>17)</sup>。しかしながら我々の今回得た結果では、侵入効率を同等にした場合プロウイルス発現量はむしろ T-tropic HIV-1 のほうがわずかながら優位であった (図 5)。エンベロープ蛋白質の V3 loop が感染細胞の増加を決定する要因のひとつであるとの結果 (図 4) をあわせると、マクロファージにおける HIV-1 の増殖性は主に侵入効率が関与していると考えられた。今後、感染後のプロウイルス DNA 量の定量、さらに侵入効率の比較などの知見を加えていきたい。

本研究においては、JR-CSF や NL4-3 と

いったウイルス株特異的に HIV-1 の増殖性を促進 (もしくは抑制) する因子の同定までには至らなかったものの、AIDS の発症にも密接に関係すると思われるヘルパー T 細胞における HIV-1 の増殖性に影響をおよぼすような細胞内因子を明らかにしていくことは、未だに不十分な HIV 感染症の治療戦略において、新たな抗 HIV 剤の開発につながる重要なテーマであると考えられる。

## E. 結論

Th1-type cell における JR-CSF の高い増殖性の原因は、感染後期過程でのウイルス複製効率の違い、複製されたウイルスの感染性の違い、感染細胞の生存・増殖性の違い、などの可能性が考えられた。マクロファージでは侵入効率の違いが JR-CSF の高い増殖性の主因であると考えられた。

## F. 研究発表

### 2. 学会発表

リアルタイム PCR を利用した HIV-1 複製過程の解析

佐藤千尋ほか。第 13 回日本エイズ学会。The Journal of AIDS Research, vol. 1 (4) p313, 1999.

## G. 知的所有権の取得状況

特になし。