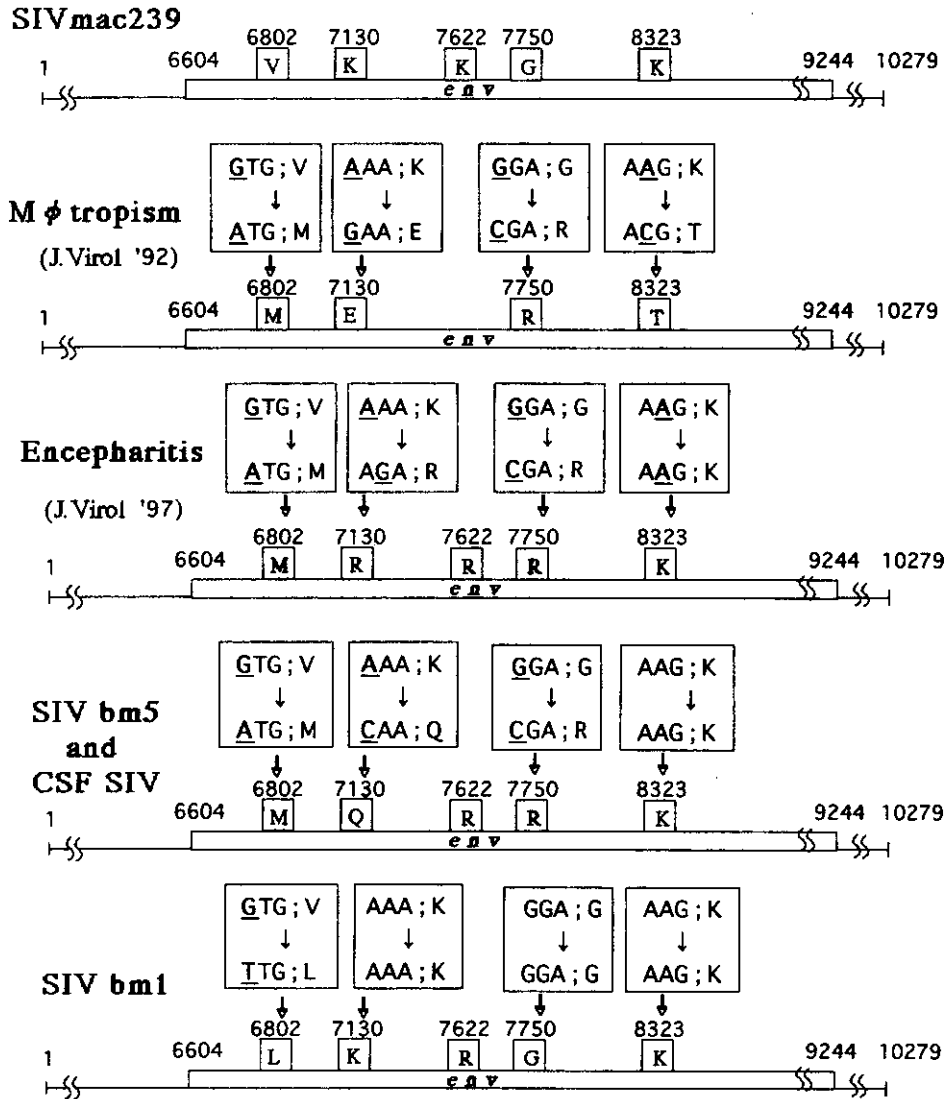


图 4

Amino acid changes in *env* region of SIV



J. Virol . 66, 2067 '92 : Specific mutations for macrophage-tropis

J. Virol . 71, 5790 '97 : Neurovirulent molecular clone of SIV17E-Fr

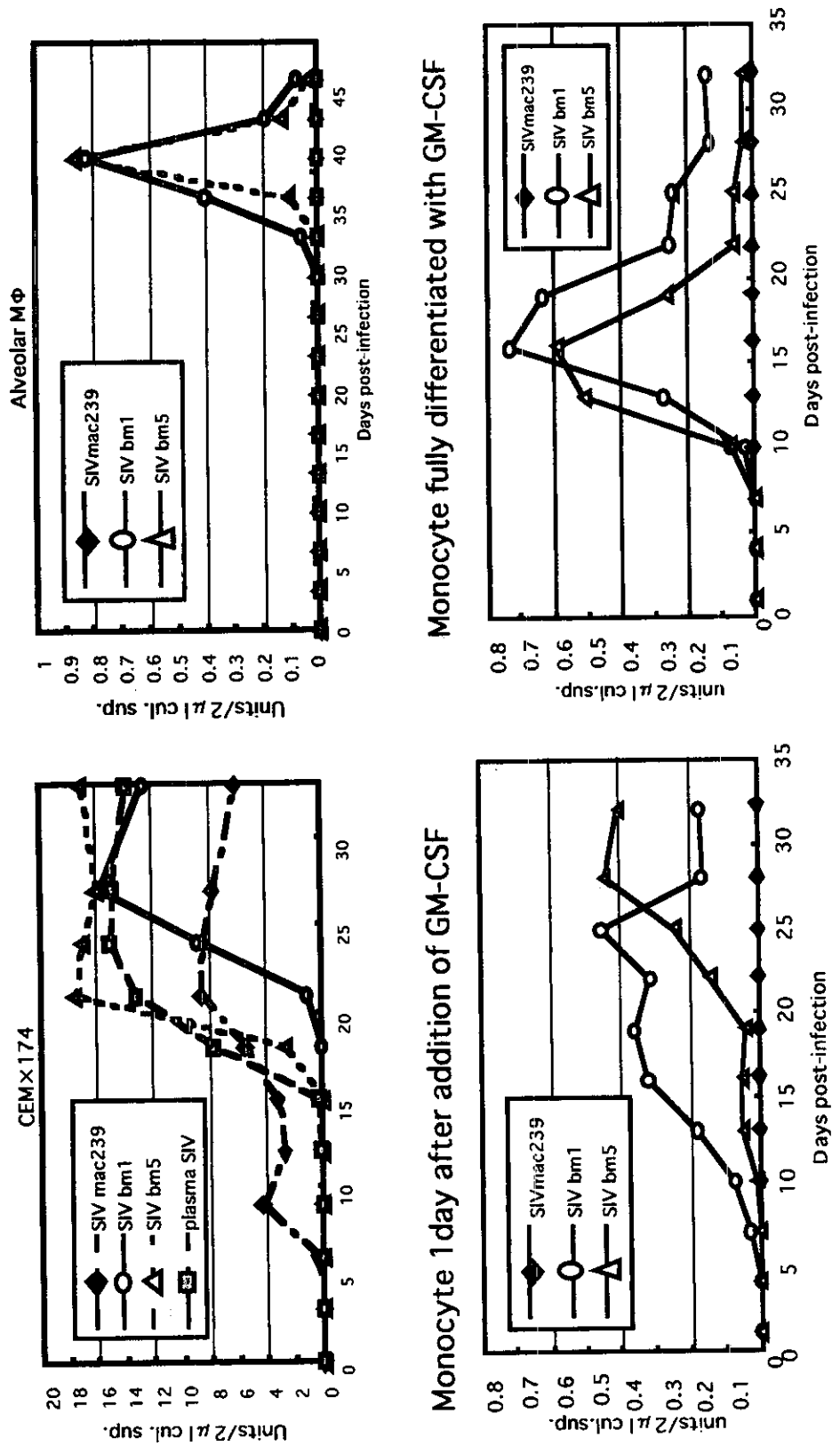
SIV bm5 : Mutations in SIV bm5

CSF SIV : Mutations in SIV in CSF of 1014 monky (end point)

SIV bm1 : Mutations in SIV bm1

Fig 5

Growth kinetics of SIVmac239, bm1 and bm5 on CEM X 174, Alveolar Macrophage and Monocyte



6

Growth Kinetics of SIVmac239, SIV bm1, SIV bm5 on PBMC and Bone Marrow Cells

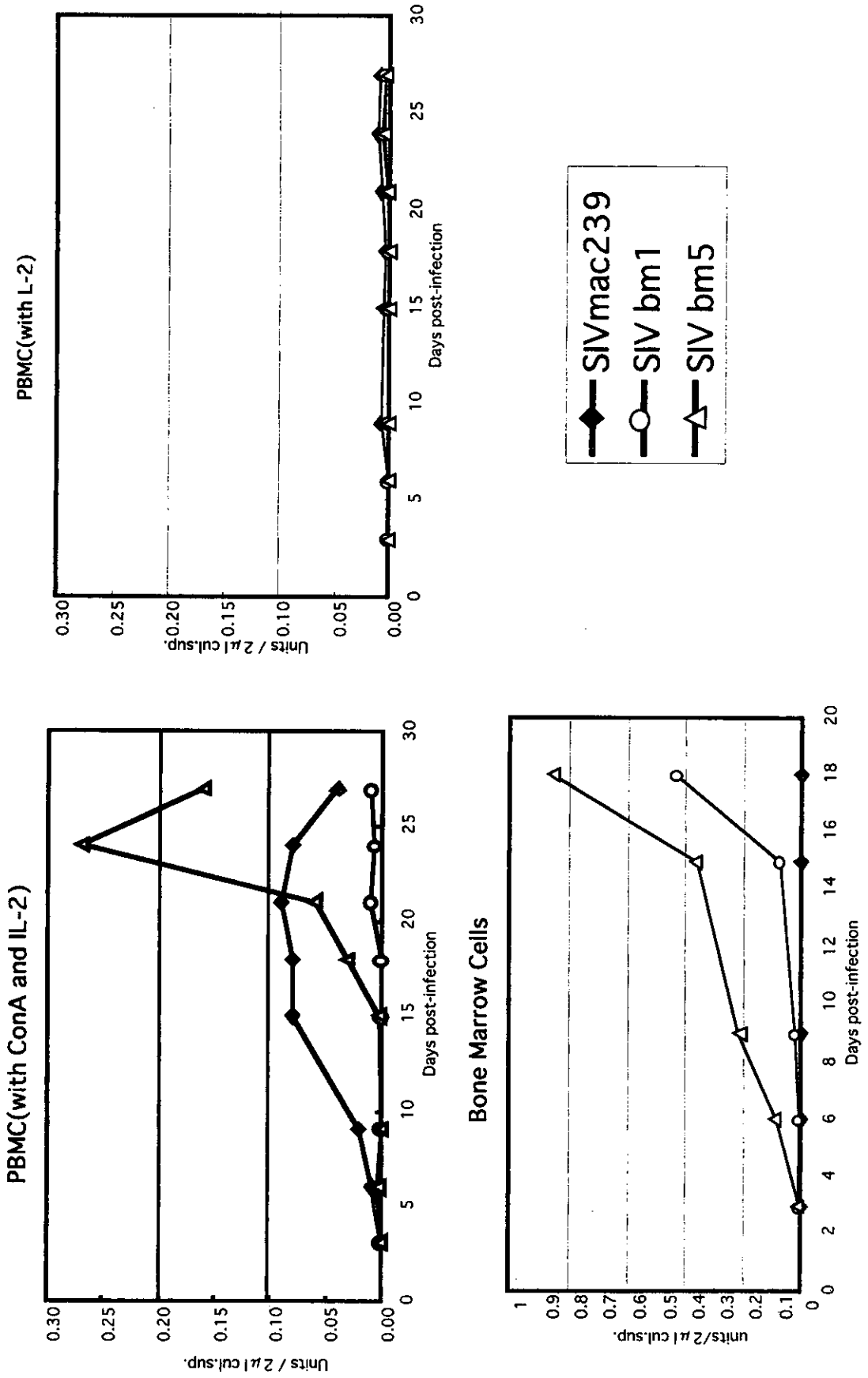
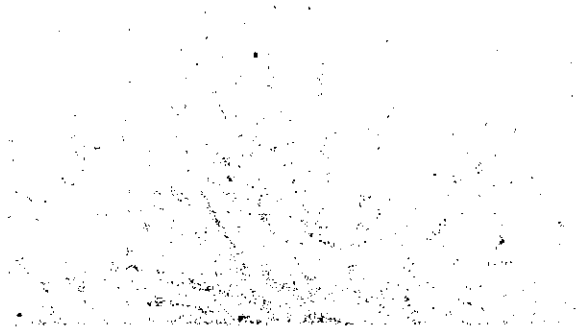
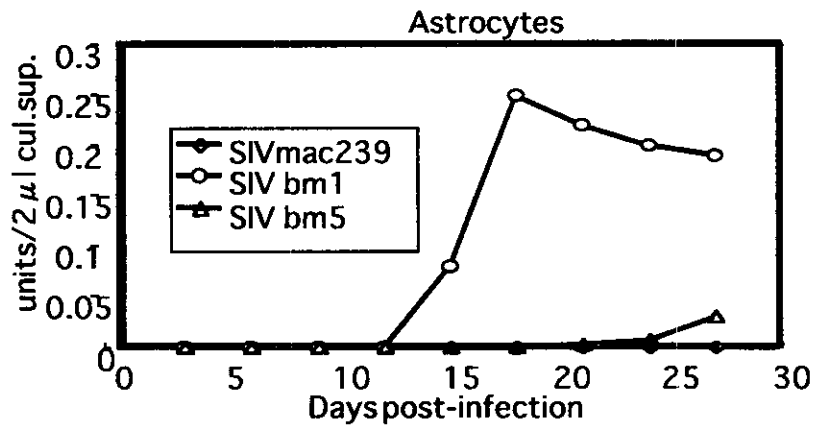


图 7

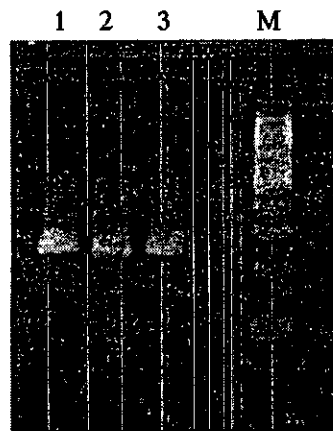
In vitro culture of Astrocytes from Cyno-Brain tissue



Growth kinetics of SIVmac239, SIV bm1 and SIV bm5 on Astrocytes



PCR of SIVmac239, SIV bm1 and SIV bm5 in Astrocytes



Lane 1 : SIVmac239
Lane 2 : SIV bm1
Lane 3 : SIV bm5
Lane M : 100 bp ladder marker

HIV-1 持続感染成立機序と阻止に関する研究

分担研究者 神奈木真理 東京医科歯科大学医歯学総合系研究科教授

研究要旨 無症候 HIV-1 感染者では、長期に渡る宿主免疫の優勢と同時に進行性の免疫破綻が見られる。この特異な宿主免疫とウイルスとの相互関係を形成するメカニズムは、HIV-1 持続感染機序と少なからず重複すると考えられる。HIV-1 感染症の克服のためには、HIV-1 持続感染機序の解明が不可欠である。HIV-1 持続感染細胞にはメモリー T 細胞やマクロファージが含まれると考えられているが詳細は分かっていない。本研究では、持続感染の試験管内実験系の作成と、宿主免疫との関係を解明することを目的としている。試験管内 HIV-1 持続感染系の作成のため抗原特異的 CD4+T 細胞クローンを作成し、静止期で R5 あるいは X4 HIV-1 株への感染性を調べた。その結果、これらのクローンは両ウイルスに感染するが R5 ウイルスに対してより感受性であった。HIV-1 持続感染 CD4+T 細胞と CTL との混合培養により HIV-1p24 発現量の低下が認められたことから、CTL が持続感染細胞に対してウイルス抑制効果を持つことが示唆された。我々は、HIV-1 感染者の CD8+T 細胞が MHC-I 拘束性および非拘束性の HIV-1 抑制効果を持つことを報告してきたが、持続感染細胞では Nef による MHC-I 発現抑制のため MHC-I 非拘束性の抑制活性が主に働くと考えられる。これは、複数の HIV-1 感染者の末梢血由来の CD8+細胞を使った以下の実験結果からも支持される。すなわち、HIV-1 感染者の CD8+細胞の Nef 保存 HIV-1 株に持続感染した細胞に対する細胞傷害性は Nef 欠損 HIV-1 感染細胞に対するより減弱しているにもかかわらず、HIV-1 産生抑制能は Nef 機能の有無により影響されなかった。

以上のことから、抗原特異的静止期 T 細胞が HIV-1 に持続感染可能であること、持続感染細胞に対して CTL が HIV-1 抑制効果を持つこと、しかしその機序は MHC-I 拘束性の細胞傷害性とは異なることが示唆された。

A. 研究目的

HIV-1 感染では、急性感染期ののち活動性の持続感染状態へ移行する。この時期には HIV-1 増殖は抑制されているが、同時に宿主免疫の消耗は徐々に進行する。HIV-1 感染症の病理の本質は、この持続感染における宿主/ウイルスバランスにある。HIV-1 感染症の制御には HIV-1 持続感染阻止あるいはバランスの変換が必要である。HIV-1 持続感染細胞はメモリー T 細胞であることが示唆されているが、これらの細胞への持続感染機序に関しては不明な部分が多い。本研究の目的は、メモリー T 細胞への HIV-1 持続感染細胞機序および持続感染細胞と宿主免疫との関係を解明することである。

B. 研究方法

1) 抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞クローンの樹立: 健康人 PBMC を Raji 細胞で刺激し allo-抗原特異的に増殖する T 細胞株を樹立した。この細胞株を限界希釈法によりクローン化し、IL-2 存在下に定期的な Raji 刺激を加え維持した。この細胞株は、マイトマイシン処理し

た Raji 細胞を加えると著明に増殖するが、自己 EBV トランスフォーム B 細胞株には反応しない。IL-2 存在化でも抗原刺激を加えないと 1 週間以内に静止期に入る。このような T 細胞株に HIV-1 (NL4-3, NFN-SX) を感染させ、HIV-1 感受性と細胞数変化を経時的に調べた。

2) 無症候 HIV-1 感染者 (AC) 由来 CD8 陽性 T 細胞: AC 由来のヘパリン加末梢血から末梢血単核球 (PBMC) を分離し PHA 刺激後 1 週間 IL-2 存在下で培養し、実験前に抗ヒト CD4 抗体結合イムノビーズを用いて CD8+細胞分画を得た。

3) 健康人由来 HIV-1 持続感染細胞: あらかじめ MHC-I のタイピングを行った健康人の PBMC から付着細胞を除去し、PHA 刺激後 HIV-1/LAI または HIV-1/NL4-3 を感染させ数日培養し、AZT と IL-2 を添加した培地で培養したものを、持続感染細胞として用いた。AC 由来 CD8 陽性 T 細胞の HIV-1 産生抑制効果を調べる際の標的として用いた。

4) AC 由来 CD8 陽性 T 細胞の HIV-1 産生抑制効果: 3) の持続感染 PBMC と AC-CD8

細胞を種々の比率で共培養し、4 日後上清中 HIV-1 p24 量を ELISA により調べた。CD8 細胞を加えない培養の p24 量を 50% 抑制する Effector/Target 比を Suppression index 50 (SI 50) として計算した。

5) AC 由来 CD8 陽性 T 細胞の HIV-1 感染細胞に対する傷害活性：感染細胞に対する傷害活性だけを調べるため、3) の持続感染 PBMC と AC-CD8 細胞を種々の比率で共培養し、6 時間後上清中および全培養中の HIV-1 p24 量を調べ、上清中 HIV-1 p24 量の比率を傷害活性として計算した。

(倫理面への配慮) 本研究に用いた末梢血の採取に当たり供血者の理解を得、守秘義務を固守する。

C. 研究成果

1) 抗原特異的メモリー T 細胞への HIV-1 持続感染株 i) メモリー T 細胞における持続感染の疑似実験系を作る目的で、健常人 PBMC を Raji 細胞で刺激し allo-抗原特異的に増殖する T 細胞株を樹立した。この細胞株は、マイトマイシン処理した Raji 細胞による抗原刺激で増殖するが、IL-2 存在化でも抗原刺激を加えないと 1 週間で静止期に入る。これらの T 細胞株に T 細胞親和性 HIV-1 (NL4-3) およびマクロファージ親和性 HIV-1 (NFN-SX) を感染させ、HIV 感受性を調べた。クローン化する前の T 細胞株は両 HIV-1 株に感受性であったが、NL4-3 感染ではウイルスの複製は緩徐であった。クローン化した後も NFN-SX 感染により感受性である傾向は同様に認められた。細胞死の程度はクローン間で異なっていた。

2) AC 由来 CD8 細胞の持続感染 PBMC に対する HIV-1 産生抑制

AC 由来 CD8 細胞が HIV-1 産生を抑制することを我々は報告してきた。昨年度、この抑制が急性感染 PBMC だけでなく持続感染 PBMC についても有効であることをあきらかにした。本年度は例数を増やし、抑制の MHC-I 拘束性および細胞傷害性との関係について検討した。この結果、AC-CD8 細胞は MHC-I の全く一致しない場合にも持続感染 PBMC の HIV-1 産生も抑制した。非感染者由来の CD8 陽性細胞には、このような抑制は認められなかった。しかし、CD8+細胞と感染細胞の一致する MHC-I アレルの数で組み合わせを分類し、抑制の強さを比較したところ、一致する MHC-I アレル数が多いほど強い抑制が認められた (図 1)。

3) AC 由来 CD8 細胞の持続感染 PBMC への HIV-1 産生抑制と傷害活性に対する Nef の影響

HIV-1 持続感染 PBMC では、感染細胞の MHC-I 発現が低下する。これは HIV-1 Nef の働きによるもので、HIV-1/NL4-3 (Nef 保存) 感染では認められるが HIV-1/LAI (Nef 欠損) 感染では認められない。このような HIV-1 持続感染細胞は HIV-1 特異的 CTL の細胞傷害活性に対して抵抗性であることが報告されている。

そこで我々は、健常人由来の PHA 刺激 PBMC に HIV-1 感染を加え 1 週間後に AZT を加えて持続感染状態にした PBMC に対して MHC-I の一致した AC 由来 CD8+細胞が 6 時間の共培養で傷害活性を示すかどうか調べた。この結果、予想どおり AC-CD8+細胞は HIV-1/LAI 感染細胞に対して傷害活性を示したが、HIV-1/NL4-3 に対する傷害活性は有意に低かった。

一方、AC-CD8+細胞による MHC-I の一致した健常人 PBMC に対する HIV-1 抑制能も調べた。抑制活性には個人差があるものの、HIV-1/LAI 感染あるいは HIV-1/NL4-3 感染細胞に対する抑制活性には大きな違いが認められなかった。(図 2)。

D. 考察

抗原特異的 T 細胞株クローンに対する HIV-1 持続感染では、マクロファージ親和性 HIV-1 により感受性が高い結果を得た。この細胞クローンは、一旦活性化された抗原特異的機能 T 細胞であり、抗原刺激不在化では静止期にあるが CD45RO 陽性であること等のメモリー T 細胞の特徴を備えている。静止期におけるこれらの細胞への HIV-1 感染成立は、HIV-1 持続感染メモリー T 細胞を疑似する試験管内実験系として有用と考えられる。

持続感染 PBMC に対しても AC 由来 CD8 陽性 T 細胞は HIV-1 抑制活性を示した。このことは、AC-CD8 細胞が少なくとも HIV-1 複製の転写以降を抑制する機能を有することを示している。この抑制活性は、MHC-I の全く一致しない PBMC にもこの抑制が有効であり、Nef による MHC-I 発現低下の影響も少ないことから、AC-CD8 による持続感染細胞の HIV-1 産生抑制には、MHC-I 非依存的な機序が多分に含まれることが示唆された (図 3)。しかし、一致する MHC-I 数が多い標的に対してより強い活性が認められた。このことは、MHC-I の一致により何らかの近接効果が生じて抑制効果を高めたか、あるいは MHC-I 依存的な抑制も同時に働いていると考えられる。非感染者には抑制効果が認められなかったことを合わせ考慮すると、効果細胞は CD8 陽性 HIV-1 特

異的 T 細胞である可能性が高い。

E. 結論

- i) 静止期の抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞クローンには R5, X4 両 HIV-1 感染が成立するが、R5 HIV-1 に対してより感受性が高かった。
- ii) AC 由来 CD8 陽性細胞の HIV-1 産生抑制能は、急性感染だけでなく持続感染状態の PBMC に対しても有効である。
- iii) AC 由来 CD8 陽性細胞の持続感染 PBMC に対する HIV-1 産生抑制は、MHC-I が一致していなくても有効であるが、一致している方が抑制効率が低い。
- iv) HIV-1 持続感染 PBMC では Nef による MHC-I 発現低下が認められ、AC- CD8 細胞の細胞傷害活性は低下したが、HIV-1 産生抑制にはあまり影響しなかった。
- v) 以上のことから、AC 由来の CD8+CTL は、特異的抗原認識に非依存性に PBMC の HIV-1 産生を抑制するが、持続感染細胞を排除することなく共存すると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- i) S. Hanabuchi, T. Ohashi, Y. Koya, H. Kato, A. Hasegawa, F. Takemura, T. Masuda, M. Kannagi. Regression of Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I)-lymphomas in a rat model: Peptide-induced T-cell immunity. *J. Natl. Cancer Inst.* 93: 1775-1783, 2001
- ii) M. Kannagi, S. Hanabuchi, T. Ohashi, A. Hasegawa, T. Masuda. Host defense Mechanisms against HTLV-I-induced T cell lymphomas in a rat model. *AIDS Research and Human Retroviruses* 17 (Suppl. 1): S14, 2001
- iii) 神奈木真理. HIV-1 感染の制御因子. *エイズ学会誌* 3 : 167-174, 2001

- iv) 神奈木真理. ヒト T 細胞白血病ウイルス感染に対する抗腫瘍ワクチン. *がん治療のあゆみ*, 20 : 21-28, 2001

2. 学会発表

- i) Huining Liu, Makoto Kubo, Takashi Ohashi, Takao Masuda, Mari Kannagi. Allo-specific CTL from a seronegative donor suppress the replication of R5 and X4 HIV-1. 第 49 回日本ウイルス学会、大阪、2001、11 月
- ii) 長谷川温彦、大橋貴、花淵志野、加藤大智、増田貴夫、神奈木真理. HTLV-1 経口感染および腹腔内感染ラットにおける持続感染ウイルス量と免疫応答の比較. 第 49 回ウイルス学会、大阪、2001、11 月
- iii) 大橋貴、花淵志野、増田貴夫、神奈木真理. Tax 発現 DNA ワクチン接種ラットにより誘導した CTL 細胞株の HTLV-I 感染 T 細胞に対する作用の解析. 第 49 回ウイルス学会、大阪、2001、11 月
- iv) 花淵志野、大橋貴、小屋美博、加藤大智、長谷川温彦、増田貴夫、神奈木真理. ラット HTLV-1 腫瘍モデルにおける HTLV-1 特異的 CTL エピトープの同定とペプチドワクチンの抗腫瘍効果. 第 49 回ウイルス学会、大阪、2001、11 月
- v) 鶴谷直美、庭野雪路、周 Xin、池田たま子、大橋貴、花淵志野、山本直樹、神奈木真理、増田貴夫. HIV-1 インテグラーゼ蛋白の核局在シグナルと細胞性因子の検討. 第 49 回日本ウイルス学会、大阪、2001、11 月
- vi) 池田たま子、周 Xin、長谷川温彦、大橋貴、奈良信夫、神奈木真理、増田貴夫. HIV-1 インテグラーゼ PYNP 配列の役割. 第 49 回ウイルス学会、大阪、2001、11 月

図 1

Advantage of MHC-I-matching in AC-CD8+ cell-mediated HIV-1-suppression

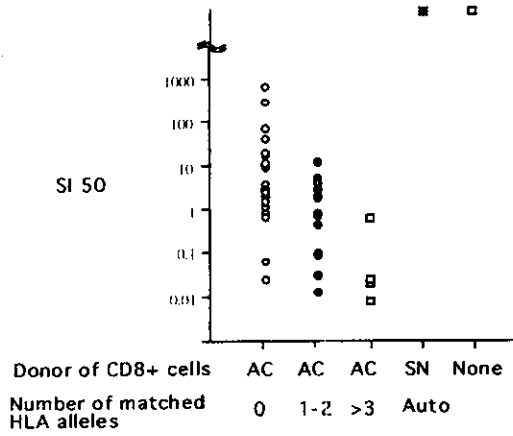
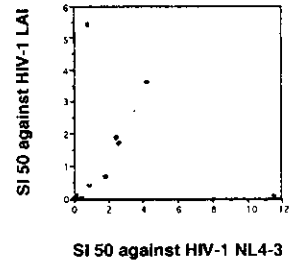


図 2

Comparable suppressive effects against Nef+ or Nef- HIV-1 by MHC-I-matched AC-CD8+ cells



(注：SI 50 は 50%抑制を起こす E/T 比を表す。従って、抑制が強いほど SI 50 は低い。)

図 3

新規あるいは持続感染細胞に対するCTLのHIV抑制機序

CTL/感染細胞 interaction		感染細胞 傷害/死	HIV複製 抑制
MHC-I 一致	 HIV特異的 CTL (TCR) binds to MHC-I on 感染 T細胞.	新規感染 or Nef (-)	(+++)?
MHC-I 一致	 HIV特異的 CTL (TCR) does not bind to MHC-I on 感染 T細胞.	持続感染	(±)
MHC-I 不一致	 HIV特異的 CTL (TCR) binds to MHC-I on 新規感染 or Nef (-) cell.	新規感染 or Nef (-)	(±)
MHC-I 不一致	 HIV特異的 CTL (TCR) does not bind to MHC-I on 持続感染 cell.	持続感染	(+)

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

エイズ日和見感染発症阻止のための免疫学的・細菌学的研究

分担研究者 牧野 正彦 国立感染症研究所 部長

研究要旨. HIV-1 感染者の日和見感染として抗酸菌感染症が注目されている。抗酸菌感染症の発症阻止を目的として抗抗酸菌細胞性免疫応答を誘導する菌由来分子の同定を図る必要性が高い。そこでらい菌をモデル抗酸菌として、Th1 タイプ CD4 陽性 T 細胞および Tc1 タイプ CD8 陽性 T 細胞の活性化を誘導する分子の菌内分布の解析を行った。その結果、らい菌細胞膜分画は抗原提示細胞である樹状細胞 (DC) に取り込まれプロセッシングされた後、細胞表面に発現した。菌膜をパルスした DC は IL-12 p70 を産生し、この DC によって刺激された CD4 陽性 T 細胞は IFN- γ を、CD8 陽性 T 細胞は IFN- γ およびパーフォリンを産生した。従って、らい菌膜には抗細菌細胞性免疫を誘導する分子が存在すると考えられた。

A. 研究目的

HIV-1 感染者の日和見感染として抗酸菌感染症は重要な位置を占める。抗酸菌感染症の発症を阻止するためワクチンの確立が重要であり、ワクチン開発には細胞性免疫を賦活化する分子の同定が不可欠である。そこでらい菌をモデル抗酸菌として、細胞性免疫誘導性分子の菌内分布を同定することを目的として、菌膜 (Cell membrane) に着目しその抗原性を検索した。

B. 研究方法

正常健常者末梢単球を得て、リコンビナント GM-CSF および IL-4 を用いて樹状細胞 (DC) を分化誘導した。らい菌 (Thai 53 株) はヌードマウスを用いて増殖させビービーダーと超遠心機を用いて、細胞壁・細胞膜・細胞質分画に分類精製した。菌分画成分をパルスした DC の抗原提示能は、自己 T 細胞の活性化誘導能で解析した。細胞表面抗原の解析には FACScalibur を用い、DC により刺激された CD8 陽性 T 細胞の perforin 産生能は T 細胞膜を permeabilize して細胞内 perforin を FACScalibur を用いて検索した。DC から産生された IL-12 p70、T 細胞から産生される IFN- γ は ELISA 法を用いてアッセイキットを用いて定量化した。

倫理面への配慮 国立感染症研究所倫理委員会の審査を受け、以下の通り行った。血液ドナーのプライバシーを完全に守る

ため、研究結果発表に際しては個人が特定されないよう配慮し、研究者はドナーのいかなる個人情報も漏出しないよう細心の注意を払った。また、使用目的と使用方法および医学上の貢献予測を十分に説明し理解 (インフォームドコンセント) を得た。さらに、結果について守秘義務に基づいて知る権利と知りたくない権利を守った。

C. 研究結果

生らい菌・菌膜・細胞質を同量 DC にパルスすると、菌膜を抗原として用いた場合より強い CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞の増殖応答が観察された。そこで、菌膜の抗原性を細胞質分画をコントロールとして検索した。菌膜を DC にパルスし DC の細胞表面を解析すると、細胞壁由来の抗原 (PGL-1) は存在せず、菌膜由来抗原 (LAM) が存在しかつハンセン病患者血清と反応した。菌膜を細胞内プロセッシング阻害剤であるクロロキニン存在下で DC にパルスすると細胞表面に発現し患者血清と反応する抗原量は低下した。従って、菌膜成分は DC 内でプロセッシングを受け、細胞表面に発現すると考えられた。さらに、菌膜成分に FITC をラベルした後 DC にパルスすると、トリパンブルーを用いて細胞表面に残存する FITC をマスクしても DC は FITC を発色し、かつその程度は減少しなかった。従って、菌膜は DC によって細胞内に取り込まれていると判明した。次いで、抗原提示

に関する分子の菌膜パルス DC 表面への発現を検索すると、MHC class I, class II, CD86 および CD83 抗原の発現が菌膜投与により増強された。菌膜パルス DC の抗原提示能を IFN- γ 産生能により解析すると、CD40L 存在下で DC により刺激された CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞は IFN- γ を産生した。IFN- γ 誘導能は菌膜が細胞質よりも強かった。IL-10 は産生されなかった。従って、らい菌膜は Th1 タイプ CD4 陽性 T 細胞および Tc1 タイプ CD8 陽性 T 細胞を活性化する上で重要な抗原を保有していると想定された。菌膜パルス DC を用い 10 日間自己の CD8 陽性 T 細胞を刺激すると、検索したドナーの 1/3 において CD8 陽性 T 細胞の細胞質内に perforin が産生された。しかし、*M. bovis* BCG 菌由来菌膜、あるいは非病原性抗酸菌 *M. smegmatis* 由来菌膜を抗原として用いた場合は全てのドナー CD8 陽性 T 細胞から perforin が産生され、かつその程度もらい菌膜に比し強かった。そこで、菌膜抗原の DC からの IL-12 p70 産生誘導能を検索した。らい菌膜は CD40L 抗原存在下で IL-12 p70 の産生を誘導した。その程度はらい菌膜細胞質を用いた場合よりも強かった。しかし、LPS 存在下では IL-12 p70 の産生は誘導できず、CD40L の存在が必要であった。*M. smegmatis* 菌膜は、LPS の存在下でも IL-12 p70 の産生を誘導した。また、らい菌膜を hydrophobic 分画と hydrophilic 分画に分けて IL-12 p70 の産生能を検索したが、両分画ともに IL-12 を産生した。

D. 考察

ハンセン病の発症を阻止するワクチンはこれまでに確立されておらず、早急な対応が望まれている。これまでに、らい菌はユニークな抗酸菌であって、生らい菌を用いるよりは菌を構成する分画を用いた方が、T 細胞の増殖応答を誘導し易いことを報告してきた。そこで、ワクチンの候補分子を探る目的で、らい菌を細胞膜・壁・細胞質の 3 つに分画しその抗原性を検索した。その結果、細胞膜に Th1 タイプ CD4 陽性 T 細胞・Tc1 タイプ CD8 陽性 T 細胞の活性化を誘導する分子が存在することが判

明した。これらの T 細胞サブセットの活性化は、らい菌膜が DC を刺激し IL-12 p70 を産生することに関連しているものと考えられた。CD8 陽性 T 細胞は perforin と granulysin を産生し、抗抗酸菌キラー活性を獲得し有効なワクチンおよび免疫療法のメディエーターとなり得ると想定されている。その意味において、CD40L 存在下で菌膜は DC を介し perforin 産生に至るまで CD8 陽性 T 細胞を活性化したことは意義深い。一般に、CD8 陽性 T 細胞が Cytotoxic T lymphocytes までに分化されるためには、in vivo において感作されている必要がある。本研究では、約 1/3 のドナーにおいて、in vitro で菌膜パルス DC による刺激を受けて CD8 陽性 T 細胞は CTL にまで分化したが、これはドナーの BCG に対する感受性あるいは BCG 菌による感作程度を反映している可能性が考えられ、抗酸菌に対するワクチンを考える際に有用な知見と思われる。

らい菌膜を油性分画と水性分画にさらに分画し IL-12 p70 産生能を検索すると、両者において同程度にサイトカイン産生をもたらした。従って、菌膜にはワクチンとなり得る分子が複数存在する可能性が示唆された。

E. 結論

抗酸菌菌膜には、樹状細胞より IL-12 p70 を産生し Th1 タイプ CD4 陽性 T 細胞および Tc1 タイプ CD8 陽性 T 細胞を活性化する抗原性分子が複数含まれていた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nomaguchi, H., N. Jahan, B. C. Mandal, Y. Yogi, K. Kawatsu, Y. Yoshizawa, H. Okamura, and M. Makino. IL-12 and IL-18 synergistically induce the bactericidal activity of murine peritoneal cells against *M. leprae*. *Jpn. J. Leprosy*, 70:113-119, 2001.
- 2) Umemura, M., K. Hirose, W. Wajjwaiku, H. Nishimura, T.

- Matsuguchi, Y. Gotoh, M. Takahashi, M. Makino, and Y. Yoshikai. Impaired IL-15 production associated with susceptibility of murine AIDS to mycobacterial infection. *J. Leukoc. Biol.* 69(1):138-148, 2001.
- 3) Makino, M., A. Utsunomiya, Y. Maeda, S. Shimokubo, S. Izumo, and M. Baba. Association of CD40 ligand expression on HTLV-I-infected T cells and maturation of dendritic cells. *Scand. J. Immunol.*, in press, 2002.
- 4) Kawamura, M., T. Naito, M. Ueno, T. Akagi, K. Hiraishi, I. Takai, M. Makino, T. Serizawa, K. Sugimura, M. Akashi, and M. Baba. Induction of mucosal immunity following intravaginal administration of inactivated HIV-1-capturing nanospheres in mice. *J. Med. Microbiology*, in press, 2002.
2. 学会発表
- 1) 野間口博子, 與儀ヤス子, 川津邦雄, 牧野正彦, 吉澤雄介, 岡村春樹。マウス腹腔内マクロファージのらい菌殺菌機構の解析。第74回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2001年5月 米子
- 2) 鈴木幸一, 石井 健, 木村博昭, 中田登, 前田百美, 武下文彦, 牧野正彦。宿主細胞内日本鎖核酸とらい菌感染とによる抗原提示能の活性化。第74回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2001年5月 米子
- 3) 前田百美, ブイ・バン・ホアン, 橋本研, 中田 登, 前田伸司, 柏原嘉子, 牧野正彦。ハンセン病患者血清に反応する未知なる抗原の分子免疫学的解析。第74回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2001年5月 米子
- 4) 牧野正彦, 橋本 研, 前田百美, 松岡正典。らい菌の正常健常者末梢単球由来樹状細胞の抗原提示能に及ぼす影響。第31回日本免疫学会総会 2001年12月 大阪
- 5) 梅村正幸, 西村仁志, 松口徹也, 牧野正彦, 須田貴司, 吉開泰信。IL-15はマウス後天性免疫不全症候群の病態の進展を抑制する。第31回日本免疫学会総会 2001年12月 大阪
- 6) Maeda Y., B. V. Hoang, S. Shrisunggam, S. Maeda, P. J. Brennan, Y. Kashiwabara, and M. Makino. Molecular and immunological analysis of a protein against leprosy. *International Symposium on Mycobacterial Diseases: Pathogenesis, Protection and Control*, Jan., 2001, Bose Institute, Calcutta, India.
- H. 知的所有権の取得状況
なし

SHIV 病原性に関する研究

分担研究者 阪井弘治 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

エイズ研究のための霊長類実験動物系で用いられている病原性 SIV-HIV キメラウイルス (SHIV) は、非病原性親ウイルスをマカクザルで継代することにより得られたものである。その病原性獲得・発現機構は未だ解明されていない。

我々は、国立感染症研究所にて樹立した病原性 SHIV-C2/1 株のゲノム構造を、非病原性親株 SHIV-89.6 と比較解析することにより、*env* 遺伝子の特定領域 (C2 及び V3) の病原性発現への関与の可能性を指摘した。一方、京都大学ウイルス研究所にて分子クローニングされた SHIV-89.6P clone 64 (cl 64) ウイルスは、サルでの増殖が病原性 SHIV に比肩できる程良好であるが、感染初期の CD4 陽性細胞の減少は一過性に止まり、接種後2週目以降回復し正常値まで戻るといった特異な病態を示す。病原性 SHIV-C2/1 はサルで非常に良好に増殖するのに対して、非病原性 SHIV-89.6 は増殖が桁違いに悪いことより、良好な増殖能の獲得がウイルスの病原性発現に必須であると考えられる。これに対し、cl 64 の場合はサルでの増殖が非常に良好であることより、他の要因、例えば免疫エスケープ機能の弱体化・欠落が起こっていると考えられる。

本年度は昨年度に引き続き、SHIV-C2/1 の何れの遺伝子領域が病原性に関与するかを同定するために、Env C2 及び V3 領域に焦点を当てて、病原性 SHIV-C2/1 と非病原性親株 SHIV-89.6 間の種々の組換えウイルスの作製を行った。何れの組換えウイルスも M8166 細胞で良好な増殖性を示し、現在、サルの PBMC での増殖能を検証している。また、これと平行して、cl 64 が示す特異的病態の原因となるウイルス側の遺伝的要因を明らかにするために、ウイルスゲノムの全シーケンスを行い、他の SHIV との比較解析を行った。得られた cl 64 のゲノムシーケンスを親株の SHIV-89.6 と比較すると、30 個所の塩基変化が認められた。その内、cl 64 に特異的な塩基変化は7箇所あり、内、アミノ酸変異を伴うものは2箇所あった (Env T534A 及び Env N669Y、共に gp41 の細胞膜表面側)。また、LTR U3 の転写因子結合領域 (-37) に変異が1箇所 (C/T) 存在した。このように cl 64 は、病原性 SHIV に + α の変異が入ったような遺伝子構成になっており、それらの変異の役割が注目される。

A. 研究目的

抗 HIV ワクチン或いは抗 HIV 薬の開発と評価のために、マカク属のサルと SIV-HIV キメラウイルス (SHIV) を組合せたエイズの霊長類実験動物系が、世界中で複数樹立されている。国立感染症研究所に於ても、カニクイザルと病原性 SHIV-C2/1 を用いたモデル系が樹立、利用されている。これらの SHIV は、SIVmac239 をベースにして、Clade B HIV-1 の *env* 遺伝子を挿入したキメラウイルスである (Fig.1)。作製された組換えウイルスクローンは、通常、病原性を持たず、サルで継代を繰返すことにより病原性を獲得していく。現在のところ、何れのマカクザル-SHIV 実験系に於ても、病原性獲得・発現機構は未だ解明されていない。そこで、本研究では、遺伝子工学的手法を駆使して、ウイルスの病原性獲得機構の解明を目指す。病原性獲得機構が明らかになることにより、動物試験用 SHIV の設計が容易になることが期待され、現在必要となっている、Clade B 以外の HIV-1 とのキメラ SHIV を作製する上でも多大な示唆を得ることができると思われる。更に、ヒトにおける HIV の病原性発現を研究する上で、何らかの手掛かりが得られることも期待している。

我々は、これまで、SHIV-C2/1 と他の病原性 SHIV

(SHIV-HXBc2P3.2 等) 及び非病原性親株 SHIV-89.6 との比較遺伝子解析より、Env C2 及び V3 領域に病原性ウイルス間で共通する変異を見出した。それは、C2 領域のアスパラギン結合糖鎖の消失、及び、V3 ループ内の塩基性アミノ酸の一部が全く極性の異なるアミノ酸に変化していることである。これらの部位は各々ウイルスレセプター及びコレセプターとの結合に関与することが知られており、ウイルスの宿主域が変化している可能性が予想される。病原性 SHIV-C2/1 はサルで非常に良好に増殖するのに対して、非病原性 SHIV-89.6 は増殖が桁違いに悪いことより、良好な増殖能の獲得がウイルスの病原性発現に必須であると考えられる。また、病原性 SHIV は免疫系からエスケープする能力を持っていることが想定される。これらの点において、C2 及び V3 領域の変化が関係している可能性が考えられる。

SHIV-89.6P clone 64 (cl 64) ウイルスは、京都大学ウイルス研究所にて、米国で確立された病原性 SHIV-89.6P ウイルスストックより分子クローニングされたもので、サルでの増殖が病原性 SHIV に比肩できる程良好であるが、病原性 SHIV とは異なり、感染初期の CD4 陽性細胞の減少は一過性に止まり、接種後2週目以降回復し正常値まで戻るといった特異な病態を示す。

非病原性 SHIV-89.6 と病原性 SHIV-C2/1 を比較する限りでは、ウイルス増殖能の差が病原性の違いとして表れている印象を受けるが、cl 64 の場合は増殖能が良好であるので、免疫エスケープ機能の方の弱体化・欠落が起こっていると考えられる。

本年度は昨年度に引き続き、何れの遺伝子領域が病原性に関与するかを同定するために、Env C2 及び V3 領域に焦点を当て、病原性 SHIV-C2/1 と非病原性親株 SHIV-89.6 間の種々の組換えウイルスを作製を行った。これと平行して、cl 64 が示す特異的病態の原因となるウイルス側の遺伝的要因を明らかにするために、ウイルスゲノムの全シーケンスを行い、他の SHIV との比較解析を行った。

B. 研究方法

病原性 SHIV-C2/1 と非病原性 SHIV-89.6 間の種々の組換えウイルスを作製は、*in vitro* mutagenesis 法、或いは既存の制限酵素切断部位を利用して行った。組換えクローンは、SHIV-C2/1(Env I228M, D279N, V284A, E308R)、SHIV-C2/1(Env I228M)、SHIV-C2/1(Env D279N)、SHIV-C2/1(Env E308R)、SHIV-89.6(M228I, N279D, A284V, R308E)、SHIV-89.6(M228I)、SHIV-89.6(N279D)、SHIV-89.6(R308E)の8種を作製した(Fig.2)。各々の組換えプラスミド DNA は、293T 細胞(ヒト腎臓由来の細胞株)に FuGene 6 Transfection Reagent (Roche Diagnostics Corporation)を用いたリポソーム法にてトランスフェクトし、10%牛胎児血清含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) 培地で培養した。48 時間後にウイルスを含む培養上清を採取し、0.45- μ m 孔のフィルターを通して細胞の破片を取り除き、組換えウイルスストックとした。感染力価(TCID₅₀)は M8166 細胞を用いて測定した。

cl 64 のプロウイルスゲノム全長のシーケンスには分子クローンプラスミド DNA を材料として用いた。まず、dideoxy chain termination 法にて蛍光 terminator を用いて DNA を標識し、ABI PRISM 310 Genetic Analyser にて電気泳動して、シーケンスを決定した。得られた cl 64 ゲノムシーケンスを、SHIV-89.6、SHIV-C2/1、及び SHIV-KB9 と比較・解析した。

(倫理面への配慮)

サルへのウイルス接種及び採血は苦痛を与えないためにケタラール麻酔下にて行う等、動物実験は国立感染症研究所の動物実験指針に従って行った。

C. 研究結果

SHIV-C2/1 と SHIV-89.6 間の組換えクローン8種は、作製後 *env* 領域全長のシーケンスを行い、設計通りの塩基配列であることを確認した。293T 細胞にトランスフェクトして回収したウイルスは全てのクローンで感染性を示し、その力価は 10⁴ から 10⁵ 台であった。また、何れの

クローンも M8166 細胞で良好に増殖し、合胞体形成が観察された。

シーケンスの結果得られた cl 64 プロウイルスゲノムの全長は 10,501bp で、SHIV-89.6 より 140bp 短く、SHIV-C2/1 及び SHIV-KB9 と同一長であった。そのシーケンスを親株の SHIV-89.6 と比較すると、30 個所の塩基変化及び1個所(140bp)の欠失が認められた。その内、23 個所の塩基変化と1個所(140bp)の欠失は、SHIV-C2/1 或いは SHIV-KB9 と共通であった。cl 64 に特異的な塩基変化は7個所あり(Fig.3)、その内、アミノ酸変異を伴うものは2個所あった(Env T534A 及び Env N669Y、共に gp41 の ectodomain、つまり細胞膜表面側に位置する)。また、LTR U3 の転写因子結合領域(-37)に変異が1個所(C/T)存在した。

D. 考察

SHIV-C2/1 と SHIV-89.6 間の組換えクローンの設計は、SHIV-C2/1 の比較遺伝子解析より特定した Env 279(C2 領域)と Env 308(V3 領域)に、米国ハーバード大学の Sodroski らにより指摘された Env 228 を加した3個所に焦点を当てて行った(Fig.2)。SHIV-C2/1 をベースに、上記各々1アミノ酸のみを SHIV-89.6 型にした変異体3種、及び3アミノ酸全てを含む領域を SHIV-89.6 型にしたもの1種、合計4種のクローンを作製した。更に、SHIV-89.6 をベースにして同様な変異体4種も作製した。これら8変異体プラスミドをトランスフェクトした293T 細胞からは何れも感染性ウイルスを生じ、M8166 細胞で良好な増殖・合胞体形成が観察された(Fig.2)。この事実は、これら3個所の変異ポイントが、各々独立に変異し得ることを示唆している(もちろん、互いに関連して変異した可能性を排除するものではない)。M8166 細胞での増殖性は、SHIV-C2/1 と SHIV-89.6 間で顕著な差異は無いが、サル個体を用いた *in vivo* では、SHIV-89.6 の増殖は SHIV-C2/1 と比較して桁違いに悪い。サルの PBMC を用いた *in vitro* でも、或る程度、*in vivo* を反映した傾向が見られることが明らかになっている。そこで、現在、作製した8変異ウイルスの増殖能をサルの PBMC を用いて検証している。

cl 64 プロウイルスゲノムには、SHIV-89.6 と比較して、30 個所の塩基変異と1個所(140bp)の欠失が見出された。その内、SHIV-C2/1 或いは SHIV-KB9 と共通する23 個所の塩基変化と1個所(140bp)の欠失は、病原性に関係する可能性があると考えられる。従って、cl64 特有の「免疫エスケープに不成功」な性質を付与するのは、残る7個所の、cl64 に特異的な塩基変化の何れかであると思われる。特に、アミノ酸変化を伴っている点で、Env gp41 ectodomain 領域に位置する2個所の変異、Env T534A 及び Env N669Y が注目される。HIV-1 の場合、Env 534 を含む領域は抗体エпитープ、Env 669 を含む領域はヘルパー・エпитープであると同定されている。Env gp41 の立体構造に関して、gp41 ectodomain は

この2アミノ酸の中間付近で二つ折りになっていることが知られており、Env 534 と Env 669 は互いに近接している可能性が高く、何らかの相互作用があるかも知れない。LTR U3 の転写因子結合領域(-37)の変異(C/T)は、Sp1 結合部位と TBP(TFIID)結合部位の間に位置し、ウイルスRNA 転写に何らかの影響を及ぼす可能性も考えられる。以上の点より、これら3個所の変異の意義の解明が望まれる。

E. 結論

Env 228, 279, 308 に焦点を当てて、病原性 SHIV-C2/1 と非病原性 SHIV-89.6 間の組換えウイルス8種を作製した。何れの組換えウイルスでも、M8166 細胞で良好な増殖・合胞体形成が観察された。この事実は、これら3個所の変異ポイントが、各々独立に変異し得ることを示唆している。

SHIV-89.6P cl 64 ゲノムは7ヶ所の特異的塩基変化を持ち、これらが cl 64 ウイルスの特異的性質の発現に寄与している可能性が考えられる。特に、アミノ酸変異を伴う Env gp41 の2個所(T534A と N669Y)、および LTR U3 領域の変異が注目される。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Fujita, M., Sakurai, A., Doi, N., Miyaura, M., Yosida, A., Sakai, K. and Adachi, A. : Analysis of the cell-dependent replication potentials of human immunodeficiency virus type 1 *vif* mutants. *Microbes and Infection*, 3(13), 1093-9, 2001.

2. 学会発表

(1) Shinohara, K., Sakai, K., Takahashi, E., Izumi, Y., Arai, Y., Sasaki, Y., Suzuki, Y., Ando, S., Nakasone, T. and Honda, M.: Cynomolgus monkey HIV/AIDS model using a pathogenic molecular clone of a simian-human immunodeficiency virus. Japan-U.S. Cooperative Medical Science Program, 13th Joint Meeting of AIDS Panel, 2001.

(2) Yokomaku, Y., Matsuda, Z., Sugiura, W., Matsuda, M., Sakai, K. and Nagai, Y.: Phenotypic analysis of HIV-1 protease by virus-like particle ELISA. 5th International Workshop on HIV Drug Resistance & treatment Strategies. June 2001, Arizona, USA.

(3) Nakasone, T., Sakai, K., Ami, Y., Shinohara, K., Izumi, Y., Takahashi, E., Sasaki, Y., Takizawa, M., Suzuki, Y. and Honda, M.: Genetic and biological characterization of a molecular clone, SHIV-C2/1 KS661, derived from a highly pathogenic SHIV-C2/1. International Meeting on Thailand and Japan Co-operative Project Research and Development of HIV/AIDS Vaccine, 2001.

(4) Sakai, K., Shinohara, K., Takahashi, E., Izumi, Y.,

Ami, Y., Sasaki, Y., Suzuki, Y., Ando, S., Nakasone, T. and Honda, M.: Molecular cloning of a pathogenic simian-human immunodeficiency virus for HIV/AIDS monkey model. Sixth International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, 2001.

(5) Nakasone, T., Sakai, K., Ami, Y., Izumi, Y., Takahashi, E., Sasaki, Y., Takizawa, M., Suzuki, Y., Shinohara, K., and Honda, M.: Genetic and biological characterization of a highly pathogenic molecular clone, SHIV-C2/1 KS661. 19th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, 2001.

(6) 横幕能行、杉浦互、阪井弘治、松田昌和、宮内浩典、永井美之、松田善衛: 新たな HIV-1 protease の phenotype 解析法である virus like particle (VLP) ELISA 法の確立. 第 49 回日本ウイルス学会、2001 年.

(7) 阪井弘治、篠原克明、高橋栄治、Iouri L. Kozyrev、三浦智行: マカクザルに異なった病態を惹起する病原性 SHIV の比較遺伝子解析. 第 15 回日本エイズ学会、2001 年.

(8) 仲宗根正、阪井弘治、網康至、泉泰之、高橋栄治、佐々木裕子、須崎百合子、篠原克明、本多三男: 強病原性 SHIV-C2/1 由来分子クローンウイルスによる感染発症サルモデル系の確立. 第 15 回日本エイズ学会、2001 年.

(9) 松尾和浩、泉泰之、大洲竹晃、浜野隆一、網康至、阪井弘治、仲宗根正、永井美之、山崎修道、本多三男: SIVmac 由来 Gag 蛋白質を発現する組み換え BCG 及び組み換えワクシニアウイルス Dis 株によるカニクイザルでの免疫誘導能と感染防御能の評価. 第 15 回日本エイズ学会、2001 年.

(10) 横幕能行、杉浦互、阪井弘治、松田昌和、岡野愛子、鑑英恵、永井美之、松田善衛: HIV-1 プロテアーゼの迅速表現型解析法 (virus like particle (VLP) ELISA 法) の確立. 第 15 回日本エイズ学会、2001 年.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

(1) 病原性 SIV/HIV キメラウイルス(申請中)

2. 実用新案登録

該当無

3. その他

該当無

SHIV-C2/1 provirus

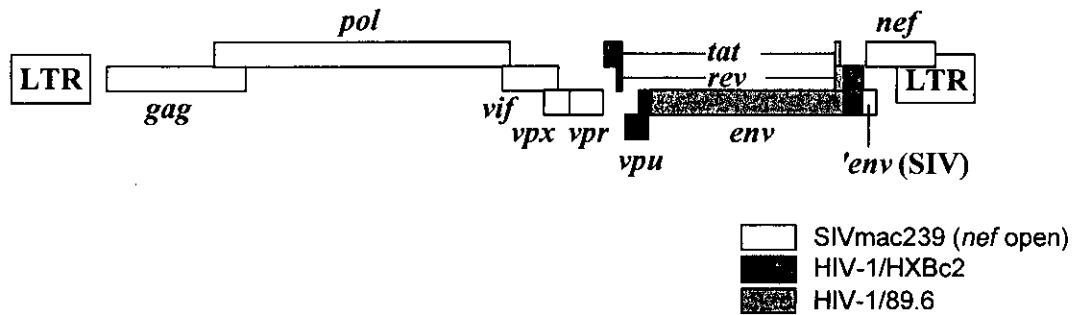


Fig.1. Genomic map of SHIV-C2/1

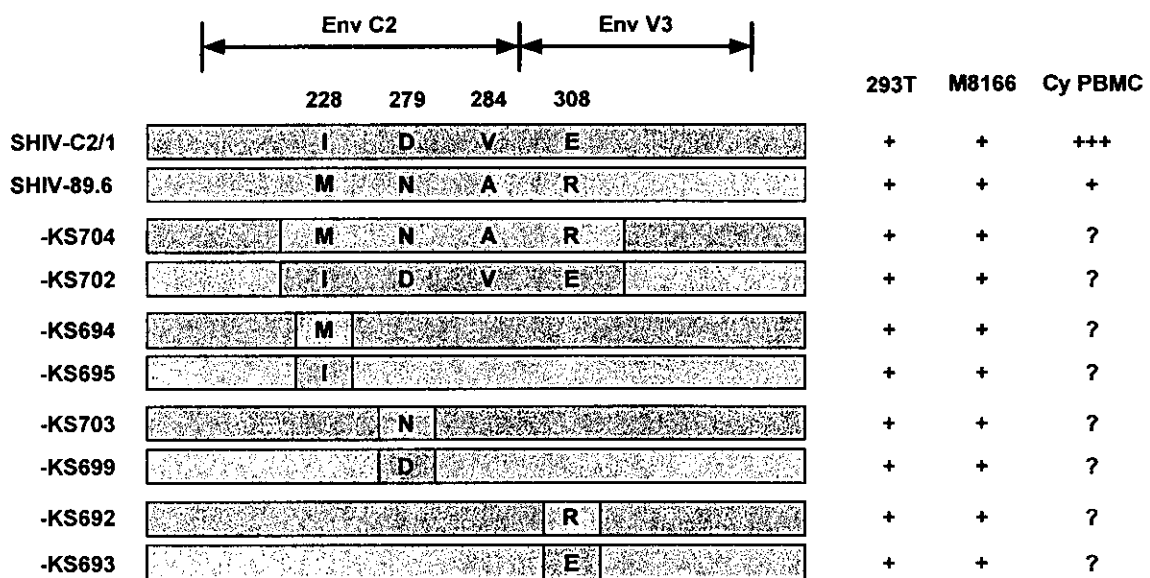


Fig.2. Recombinant clones between SHIV-C2/1 and SHIV-89.6

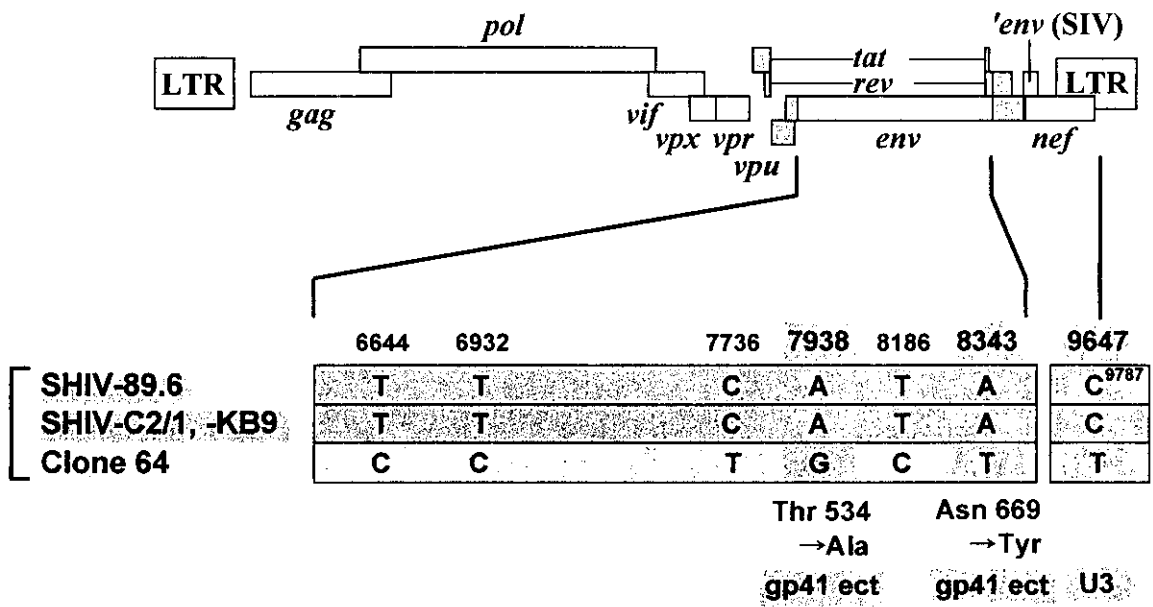


Fig.3. Nucleotide changes unique to SHIV-89.6P Clone 64

HIV 感染実験モデルの作製

分担研究者 吉木 敬 北海道大学教授

研究要旨 HIV-1 感染小動物モデルの作製を目的に、昨年度はラット培養細胞株を用いた *in vitro* の感染実験を行い、ウイルス産生能を有する HIV-1 感染には HIV-1 感染受容体であるヒト CD4 および CXCR4 あるいは CCR5 以外にヒト Cyclin T1 および MHC class II 転写活性化遺伝子が必要であることを示した。この結果を受けて、本年度はこれら 4 種類のヒト遺伝子を同時に発現するトランスジェニックラットの樹立に向けて、これらの遺伝子についてトランスジェニック用の発現コンストラクトを作製し、トランスジェニックラットの作製を開始した。

A. 研究目的

HIV-1 感染やエイズの発症に対して有効な感染予防や発症阻止法を開発研究するためには、安定的に供給されるモデル系が必要となる。しかし、いまだ適切な HIV-1 感染小動物モデルは作製されていない。本研究計画では HIV-1 感染受容体であるヒト CD4 および CXCR4 あるいは CCR5 さらに HIV-1 の活性化に重要とされるヒト cyclin T1 や MHC class II 転写活性化遺伝子 (CIITA) などを導入したトランスジェニックラットを作製し、HIV-1 を感染させることによりエイズ発症モデルの樹立を目指すとともに、本ラットを用いた感染予防や発症阻止法の開発を行うことを目的とする。本年度は昨年度の研究成果を受けてウイルス産生能を伴う HIV 感染に必要なヒト遺伝子のトランスジェニック用の発現コンストラクトを作製し、ラット受精卵へのマイクロインジェクションを行う。また、HIV-1 や HTLV-1 の mRNA の核内から細胞質への輸送に重要な働きをするヒト *crm1* トランスジェニックラットの作製も行う。

B. 研究方法

導入用の遺伝子として、昨年度のトランスフェクション用に用意したヒト CD4、CXCR4、CCR5、cyclin T1、CIITA の cDNA を用いた。CXCR4、CCR5、cyclin T1、CIITA 遺伝子はそれぞれマウス H-2Kd プロモーターを持つ発現コンストラクトに導入した。一方、CD4 のプロモーターにはヒト CD4 プロモーター領域を PCR クローニングし、DNA シークエンスでその塩基配列を確認の上、前出のマウス H-2Kd プロモーターと置換して用いた。出来上がった計 5 種類の発現コンストラクトはそれぞれラット W31 細胞にリポフェクション法にてトランスフェクションし、48~72 時間後に RT-PCR によってそれぞれの発現を確認した。次に、それぞれプロモーターから poly A シグナルまでを含む発現ユニットを制限酵素で切り出し、pUC119 に CXCR4 あるいは CCR5 と cyclin T1、CIITA と CD4 のそれぞれ 2 種類の発現ユニットを持つコンストラクトを作製した。作製した発現コンストラクト pUC/CXCR4/CyclinT1、pUC/CyclinT1/CCR5、pUC/CIITA/CD4 は、W31 にトランスフェクションし、RT-PCR によってそれぞれの発現を確認した。トラン

スジェニックラットの作製は我々が以前に報告した方法 (Cancer Res, 55:2524-2527, 1995, Int Immunol, 9:339-346, 1997) に準じて、SD ラット受精卵に pUC/CXCR4/CyclinT1 と pUC/CIITA/CD4 あるいは pUC/CyclinT1/CCR5 と pUC/CIITA/CD4 の組み合わせで等量ずつ混和し、マイクロインジェクション法によって行う。一方、H-2Kd プロモーター下流にヒト *crm1* 遺伝子 (北大遺伝子病制御研究所、志田博士より供与) を導入した発現コンストラクトのトランスジェニックラットの作製も行う。

(倫理面への配慮)

動物の使用にあたっては北海道大学医学部動物実験施設の「動物実験に関する指針」に遵守し、行う。

C. 研究結果

昨年度の *in vitro* の実験結果から、ラット細胞での HIV-1 感染では感染からプロウイルス遺伝子のゲノム内への挿入にはヒト CD4 とケモカイン受容体である CXCR4 あるいは CCR5 の感染受容体遺伝子の存在で十分であるものの、ウイルスの産生には少なくともヒト cyclin T1 および CIITA 両方の遺伝子の存在が必要であることを明らかにした。したがって、ウイルス産生を伴う HIV-1 感染モデルラットの作製には少なくともこの 4 種類のヒト遺伝子を発現するラットの作製が要求される。そのため 4 種の導入遺伝子をそれぞれ別個に導入するのではなく、2 種類の発現ユニットを一つのベクターに組み込んだ pUC/CXCR4/CyclinT1、pUC/CyclinT1/CCR5、pUC/CIITA/CD4 を作製した。なお、感染可能な細胞を限定する目的で、新たにヒト CD4 プロモーター領域をクローニングし、CD4 用の発現プロモーターとした。いずれの発現コンストラクトも、*in vitro* でそれぞれの遺伝子の発現が確認された。現在、pUC/CXCR4/CyclinT1 と pUC/CIITA/CD4 あるいは pUC/CyclinT1/CCR5 と pUC/CIITA/CD4 の組み合わせで 4 種類の遺伝子のマイクロインジェクションを行っている。

ヒト *crm1* 遺伝子導入ラットについては、一頭の founder が確認されたが、導入遺伝子の発現は確認されず、新たに作製中である。

D. 考察

HIV-1 感染受容体が同定されて以来、多くの研究がなされているにもかかわらず、小動物での一般的な使用に適した HIV-1 感染モデル系は未だ樹立されていない。この理由として、HIV-1 に感染した細胞がウイルス粒子を形成するには、感染受容体以外にもヒト由来の因子が必要であることが示されている。最近、HIV-1 ウイルス遺伝子の発現にはヒト cyclin T1 遺伝子が重要な働きをしていることが明らかとなり、ヒト CD4、CCR5 および cyclin T1 遺伝子を導入したマウス細胞への HIV-1 感染実験が報告された。しかし、ウイルス遺伝子の発現は微量で、十分なウイルス粒子形成を得るには至っていない。このことは、昨年度の我々がラット細胞を用いた研究でもこれら 3 つのヒト遺伝子だけではウイルス粒子の発現に不十分であったことで確認された。一方、最近ではヒト CIITA 遺伝子が HIV-1 の転写活性を高めウイルス発現を増強することが報告がされている。実際、我々が作製した上記のラット HIV-1 感染細胞にヒト CIITA 遺伝子を導入すると再感染性のあるウイルス粒子を産生した。以上の結果を受けて、本年度はこれら HIV-1 感染に関連する 4 種類のヒト遺伝子を導入したトランスジェニックラット作製の発現コンストラクトを作製した。4 種類の遺伝子を発現するトランスジェニックラットの作製にはそれぞれを別個に導入し、各トランスジェニックラットを掛け合わせて作製する方法と一つのコンストラクト中に 4 種類の発現ユニットを入れ、遺伝子導入する方法が考えられるが、どちらも技術的に克服しなければならない点が多い。そこで我々はそれぞれ 2 種類の発現ユニットを持つ 2 つの発現コンストラクトを作製し、その両方を同時にマイクロインジェクションすることとした。作製した発現コンストラクト pUC/CXCR4/CyclinT1、pUC/CyclinT1/CCR5、pUC/CIITA/CD4 はいずれもラット細胞へのトランスフェクションでそれぞれ 2 種類の遺伝子発現が確認され、同時にマイクロインジェクションすることにより 4 種類のヒト遺伝子を発現するトランスジェニックラットの作製が可能と考えられた。

ヒト *crml* トランスジェニックラットの樹立は HIV-1 のみならず HTLV-I 感染でウイルス高発現が期待され、よりヒトに近い HTLV-I 感染症モデルとなる可能性が高い。

E. 結論

1. 4 種類のヒト遺伝子を発現するトランスジェニックラット作製の発現コンストラクト pUC/CXCR4/CyclinT1、pUC/CyclinT1/CCR5、pUC/CIITA/CD4 を作製した。
2. 感染特異性を持たせるため CD4 の発現プロモーターにはヒト CD4 プロモーター領域を用いた。
3. pUC/CXCR4/CyclinT1、pUC/CyclinT1/CCR5、pUC/CIITA/CD4 はいずれもラット細胞でそれぞれ 2 つの遺伝子を発現した。

F. 健康危険情報

HIV-1 の動物への感染実験は P3 レベルであり、感染実験を行うに当たっては、北海道大学大学院医学研究科動物実験施設の P3 感染動物実験施設を使用する。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakamaru Y, Ishizu A, Ikeda H, Sugaya T, Fugo K, Higuchi M, Yamazaki H, Yoshiki T.: Immunological hyperresponsiveness in HTLV-I LTR-env-pX transgenic rats: A prototype animal model for collagen vascular and HTLV-I-related inflammatory diseases. *Pathobiology* 69:11-18, 2001.
- 2) Sugaya T, Ishizu A, Ikeda H, Nakamaru Y, Fugo K, Higuchi M, Yamazaki H, Imai K, Yoshiki T.: Clonotypic Analysis of T Cells Accumulating at Arthritic Lesions in HTLV-I env-pX Transgenic Rats. *Experimental and Molecular Pathology* 72:56-61, 2002

2. 学会発表

- 1) Yoshiki T.: Rat Models for HTLV-I Infection. 10th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related viruses, Dublin, Ireland, 2001. *AIDS Research and Human Retroviruses* 17:S-14, 2001.
- 2) Lai Y, Ikeda H, Tateno M, Zhao X, Yoshiki T.: HIV-1 infection in a rodent fibroblastic cell line expressed human cyclin T1, CD4 and CXCR4 or CCR4. 11th International Congress of Immunology, Stockholm, Sweden, 2001. *Scandinavian Journal of Immunology* 54:(Mon)131, 2001.
- 3) 吉木 敬: レトロウイルス感染と免疫疾患 日本学術会議 免疫・感染症研究連絡委員会 シンポジウム「感染・免疫・アレルギーの接点を求めて—難病の解明と治療へ向けての展望—」、H13.11.15、東京、2001.
- 4) 吉木 敬: 教育講演「ヒトレトロウイルス感染症のラットモデル」第 49 回日本ウイルス学会学術集会・総会、大阪、2001. 日本ウイルス学会第 49 回学術集会・総会プログラム:5, 2001.

H. 知的所有権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

「ヒト免疫不全ウイルスタイプ 1 (HIV-1) ウイルス粒子を産生しうる齧歯類動物細胞」として出願中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

レトロウイルスgag抗原上の感染防御エピトープとウイルス感染 初期過程を制御する宿主遺伝子に関する研究

分担研究者： 宮澤 正顯（近畿大学医学部免疫学教室 教授）

共同研究者： 阿部 弘之・河原(辻) 佐智代・金成 安慶・菅原 大輔
（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CD4陽性Tリンパ球認識エピトープと感染防御エピトープが存在する。新たに開発した改良型ワクシニアウイルスベクターを用いてMA蛋白質の部分遺伝子を発現することにより、MA蛋白質全長には感染防御能があるが、これまで明らかにして来たCD4陽性Tリンパ球認識エピトープを単独で含む遺伝子断片には感染防御能がないことがわかった。合成ペプチドを用いたエピトープ解析の結果と総合すると、MA蛋白質上の抗体認識エピトープとCD4陽性Tリンパ球認識エピトープが結合した状態で免疫が行われると、ウイルス感染後早期に遮断抗体が誘導される可能性がある。

一方、マウスレトロウイルス感染初期の中和抗体産生の有無を決定する非MHC宿主遺伝子について連鎖解析を行い、第15染色体テロメア寄りの約5Mbpの範囲に遺伝子座を限定した。既にこの範囲をカバーする互いに重複した96クローンのBACによりコンティグを作成し、劣性ホモマウスにBACを導入して中和抗体産生能を検定する実験を開始した。この遺伝子座とシンテニーのあるヒト第22染色体領域に多型性に富むマーカーがあり、ヒト相同遺伝子領域の多型性とHIV感染抵抗性の相関を解析することを計画している。

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上も最も有効性が高いのは、弱毒生ワクチンである。しかしHIV感染に対して生ワクチンを用いることは、株間変異と安全性確保の両面で必ずしも容易とは言えず、遺伝子改変によって作製された弱毒株候補についても、サルモデルの実験で病原性復帰株の出現が報告されている。

我々は、免疫系の完成した成体マウスに接種することで重篤な免疫不全症を伴う急性白

血病を誘発するフレンド白血病レトロウイルス(FV)を用いて、レトロウイルス感染に対する感染防御免疫応答誘導機構を解析してきた。マウスレトロウイルスを用いて「HIV感染予防」を目指した実験を行う理由と意義は次の通りである： 1) 実際に感染実験を行い、ワクチン効果を検証できる。2) HIVに対しても、ウイルス侵入後ごく初期(複製サイクルが何回も回る前)に感染を遮断するか、感染細胞を完全に排除できれば、防御ワクチンとして有効なはずと考えられ、このことは Exposed seronegative

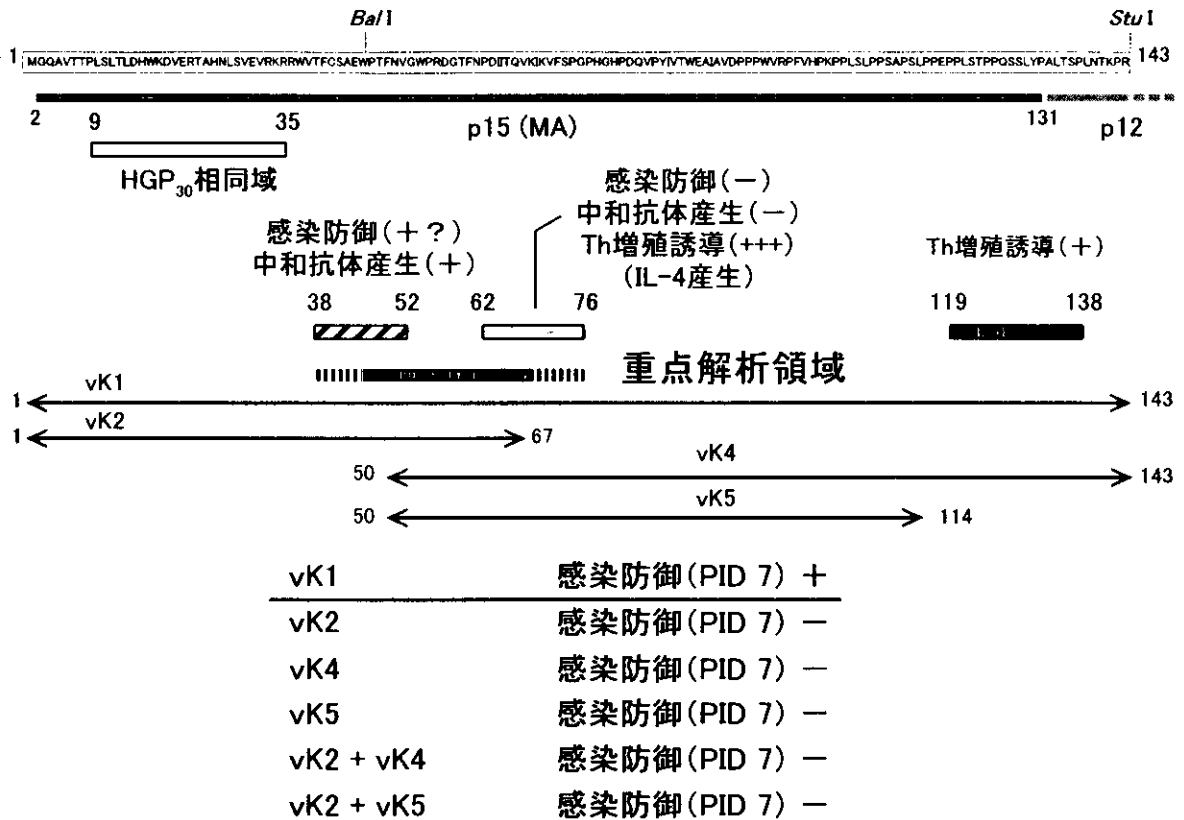


図 1. マウスレトロウイルスMA蛋白質中の感染防御エピトープと、これまでに明らかにした T細胞認識エピトープ等との関係

groupsの解析データから類推出来る。3) 感染早期に有効な防御ワクチンの要件は、マウスレトロウイルスの系でも解析可能であり、実際我々は、Th1反応の重要性、NK活性の重要性、中和抗体早期産生の重要性など、ヒト Exposed seronegative groupsやサルSIV感染系と共通の結果を得てきた。また、5) NK感受性や中和抗体産生を制御する非MHC遺伝子など、ヒトとマウスでの共通の遺伝的制御機構が存在する可能性がある。

我々はこれまでにFVを用いた実験で、env遺伝子産物上のCD4陽性Tリンパ球認識エピトープが、それ単独でレトロウイルス感染阻止に有効に働くことを示して来た。本研究

班では、株間変異の少ないgag遺伝子産物上に感染防御に有効な抗原構造を同定し、その作用機序を明らかにすることを目標としている。本年度は、MA蛋白質上の感染防御エピトープ同定実験の進行状況と、ウイルス中和抗体産生を制御する非MHC宿主遺伝子の同定について報告する。

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