

平成13年度

エイズ医薬品等開発研究

重点研究報告書

第3分野

抗エイズ薬開発のための基盤技術の開発等に関する研究

エイズ治療薬開発のためのサル評価スクリーニング系の開発とその応用

所属 富山県衛生研究所

研究者 永井 美之

分担研究者

- | | |
|---------------------|------|
| (1) 国立感染症研究所 | 森一泰 |
| (2) 東京大学大学院医学系研究科 | 俣野哲朗 |
| (3) 近畿大学医学部 免疫学教室 | 宮澤正顕 |
| (4) 東京医科歯科大学難治疾患研究所 | 木村彰方 |
| (5) 三重大学医学部生体防御医学講座 | 保富康宏 |
| (6) 国立感染症研究所 | 本多三男 |

要旨

HIV 予防治療を目的とした候補物質の評価にはサルの評価系の確立が望まれており、そのためにサルの遺伝的バックグラウンドを揃えたサルを含めた均一なサルの確保とその使用が要求されるようになっている。さらに HIV/AIDS の病因が生体の免疫機能を破壊することからその HIV/AIDS 候補物質の評価による免疫能の詳細な解析が望まれており、それらの解析方法が急速に進展しつつある。このような科学的 HIV/AIDS に関する研究の進歩に伴い、サルにおける評価系の開発が極めて緊急な課題の一つになっている。本研究では以下のように、遺伝的なバックグラウンドを明らかにしたサルにおける評価系の開発を行い、そのサルを用いたワクチンの開発研究に資する。

- 1) サル MHC の解析：本年度はアカゲザルコロニーとして静岡実験動物センターの奄美大島サルコロニーを標的にし、アカゲザルの MHC クラス I 及びクラス II 抗原の解析法の確立を試みた。その結果、前実験で推測されていた Mamu-A*08 の MHC クラス I 保有ザルコロニーの存在を同定した。
- 2) サルの評価系の確立と細胞性免疫誘導及びウイルス感染による病態発現の修飾：本年は MHC のバックグラウンドを揃えたサルの供給ができないので遺伝的なバックグラウンドが雑多な集団のアカゲザルあ

るいはカニクイザルを使って防御免疫誘導の違いを検討した。

1. 研究目的

有効な種々のエイズ治療薬が開発されているが HIV 感染者が増加し続けていることから HIV 感染をコントロールするには新しい抗エイズ物質の開発が重要な課題となっている。そのためには基盤技術の開発、特にサルを用いた評価系の開発とその系を用いた候補物質の評価がある。このプロジェクトではこれまで、小動物やサルを用いた HIV 感染系の開発を行ってきたが今回それらの成果に基づきさらに候補物質の臨床応用に必須と考えられる MHC を明らかにしたサルモデルを用いた基盤技術の開発を行い、抗 HIV 候補物質の前臨床レベルの開発研究法を確立する。つまり、AIDS 発症機構を含む HIV ウィルスに対する感染防御機構の研究やワクチン開発においては、免疫関連遺伝子群、特に MHC 領域の遺伝子群の多様性のあり方を理解し、その知見に基づいて、より有効な感染制御系を開発することが必要である。しかしながら、HIV ワクチン開発で用いられているアカゲザル等の実験動物については、このような免疫関連遺伝子群の多様性に不明な点が多い。そこで本研究では、特に MHC クラス I、II 領域の遺伝子群を中心とする種々の免疫関連遺伝子群について、実験動物として用いているアカゲザル集団における多様性を、ヒト集団における多様性と比較検討しつつ解明することを目的とする。また、ヒト MHC (HLA) 領域内の免疫応答関連遺伝子の多様性と機能の解析を、特に HIV ウィルス感染制御との関連で行う。従って、本研究では我が国で交配飼育され、SIV 感染実験に用いられているアカゲザル集団の MHC class I,II 遺伝子型を解析し、MHC 遺伝子型が明らかになったサル個体を用いて SIV、SHIV 感染防御実験を行うことが出来るようにする。

さらに、SIV 糖鎖変異ウィルス(SIV5G)は宿主内にて感染は示すがウィルスが制御されワクチンとなりうる可能性が明らかにされた。このことからアカゲザルの SIV 制御に対する認識エピトープと MHC を同定・解析することがワクチン開発に必要と考え、糖鎖変異ウィルスの免疫系による認識機構を解明するために、SIV5G そのものあるいはそのエンベロープ DNA ワクチンを作製し、野生型 SIVenvDNA ワクチンとの生体における免疫誘導を比較する。更に、SIV・Gag を標的とした細胞性免疫主導型ワクチンの発現増強と防御免疫誘導に関し生物学的、免疫学的パラメーターを明らかにする。

2. 研究方法

(1) 赤毛サル MHC の解析： 国立感染症研究所エイズ研究センター及び筑波医学実験用霊長類センター

で SIV 感染実験に用いられ、感染抵抗性の有無や免疫応答能が既に解析されているアカゲザル個体を今年度の研究材料とした。これらの個体から樹立された B リンパ芽球株 (BLCL) より総 RNA を抽出後、オリゴ dT プライマーを用いて高忠実度の逆転写反応を行い、cDNA を得た。次いで各細胞株由来 cDNA をテンプレートとし、既知のアカゲザル MHC class II 遺伝子の塩基配列情報を参考にして設計した DRB, DQA, DQB, DPB 特異的なプライマーペアを用いて、各 class II cDNA 断片の増幅を行った。得られた PCR 産物はアガロースゲル電気泳動でそのサイズを確認するとともに、プライマー中に設置した制限酵素部位を用いて pUC19 プラスミドへのクローニングを行い、得られたクローンの塩基配列を決定した。更に、DRB cDNA 断片については末端に GC クランプを付加したプライマーを設計し、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (denaturing gradient gel electrophoresis: DGGE) により、発現しているメッセージ数の同定を試みた。

アカゲザル MHC クラス I 抗原の解析は BLCL を用いて、total RNA およびゲノム DNA を抽出して解析した。RNA よりランダムプライマー (6mer) を用いて cDNA を作製し、これをテンプレートとして、サル MHC クラス I (mamu-A および mamu-B) を RT-PCR 法によって増幅した。得られた RT-PCR 産物をクローニング後、ランダムに選択したクローンとして、full-length cDNA 配列を決定した。一方、mamu-A および mamu-B の多様性を簡便に同定する方法として、reference strand conformation analysis (RSCA) 法を応用したタイピング法の開発を試みた。さらに、アカゲザルの MIC 遺伝子をゲノム DNA より増幅するために、PCR プライマーの決定を行った。また、疾患関連領域マーカーとしてマイクロサテライトの使用が可能かどうかを検討するために、ヒトで多型を示すことが知られているマイクロサテライトマーカーを用いてアカゲザルの多型解析を行った。さらに、これまで MIC 遺伝子の多型解析は体系的に行われていなかったため、MICA 遺伝子について、ヒトゲノム DNA を用いて全エクソン領域の多型解析を体系的に行った。また、ヒトゲノム多様性を簡便かつ高精度に検定する手法である RSCA 法を利用して、MHC クラス I 領域にある新規遺伝子である IKBL 遺伝子のタイピング法を開発した。この際に、多型検出を行う場合にいかなるリファレンスを用いればより高精度のタイピングが可能となるかを検討するために、種々の変異を導入したリファレンスを用いた。さらに、微生物感染症や炎症性疾患への感受性を規定する HLA 以外の遺伝要因を検討する目的で、白血球接着因子である PECAM1 の多型を検索し、見い出された多型について動脈硬化症や脳マラリアとの関連を検討した。

(2) ワクチン接種によるモデル動物の免疫誘導法: 高レベルの Gag 特異的 T リンパ球誘導には、赤毛

サル 5 頭を用い、ワクチン接種をおこなった。プライムには、SIVmac239 の Env・Nef 以外の抗原を発現する DNA を用い、ブーストには、SIVmac239 の Gag を発現する組換え SeV (SeV-Gag) ベクターを用いた。赤毛サルに、DNA ワクチンを接種し (プライム)、その後 6 週目に SeV-Gag ベクターワクチンを接種した (ブースト)。ワクチン接種前に、各々より分離したリンパ球より autologous B 細胞 (B-LCL) を樹立した。ワクチン接種後、経時的に採血し分離したリンパ球中の Gag 特異的 T リンパ球レベルを測定した。測定に際しては、抗原発現細胞と共培養させたリンパ球に抗原特異的に誘導される細胞内インターフェロナー (IFN- γ) を、flow-cytometer にて検出した。抗原発現細胞としては、Gag 発現ワクシニアウイルスベクター感染 B-LCL を用いた。SIV strain 間の特異的リンパ球レベルの比較には、カニクイサル 2 頭を用い、SIVmac239 とは異なる strain である SIVsmE543 を感染させた。感染後、経時的に採血し分離したリンパ球中の SIVmac239 特異的あるいは SIVsmE543 特異的 T リンパ球レベルを測定した。SIVmac239 特異的 T リンパ球レベル測定においては、vesicular stomatitis virus G (VSV-G)-pseudotyped SIVmac239 を作成し、これを感染させた B-LCL を抗原発現細胞として用いた。同様に、SIVsmE543 特異的 T リンパ球レベル測定においては、VSV-G-pseudotyped SIVsmE543 を感染させた B-LCL を抗原発現細胞として用いた。さらに、野生型 SIVenv(WT)および SIV5Genv(d5G)をプラスミド(pJW)に組み込んだ DNA ワクチンを作製し、BALB/C x C57BL/6 F1 (CB6F1)マウス筋肉内に electroporation 法を用いて筋肉内に 1 週間隔で 3 回免疫し、その脾細胞の CD8+細胞を in vitro で SIVenv および SIV5Genv 組み込みワクシニアウイルスで刺激した後 ELISPOT assay にてインターフェロナー (IFN- γ)産製細胞を測定した。その脾細胞を用い野生型 SIVenv および SIV5Genv 組み込みワクシニアウイルスを感染させ、マイトマイシン処理をした同型脾細胞を刺激細胞として細胞傷害性 T リンパ球 (CTL)の誘導を測定した。その CTL 誘導時に種々の酵素阻害剤を用いてその効果を比較検討した。免疫マウスに野生型 SIVenv および SIV5Genv 組み込みワクシニアウイルスをチャレンジし、3 日後に卵巣からウイルスを回収し real time PCR にてウイルス力価を測定した。また、コドンの至適化による Gag 抗原の発現への影響では、r BCG-Gag ワクチンの作成のために、ウイルス抗原の遺伝子をマイコバクテリアコドンに読みなおし、全遺伝子を人工的に作製した。さらに構築した遺伝子を pSO シャトルベクターに挿入して BCG に発現させ rBCG を作製した。その発現の検討は、①ネイティブコドンとオプティマイズコドンを有するベクターを用いて発現させた rBCG を培養し挿入した遺伝子の発現と BCG の増殖を p24 抗原の ELAISA 法と吸光度測定による菌数の

変化について検討した。②in vivo による発現系として外来抗原特異的な DTH の誘導と T 細胞増殖反応、抗体産生の面から検討した。

3. 研究成果

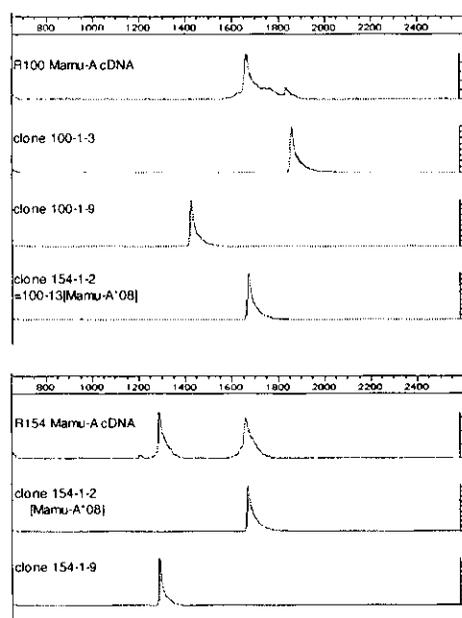
1. MHC の明らかなサルコロニーの構築とその特性

1) アカゲザル MHC クラス I 遺伝子の解析：アカゲザルの MHC クラス I 抗原の多様性を検討するために、まず、full-length cDNA を増幅するプライマーの決定を行った。既知の mamu-A および mamu-B アリルの配列と、既に類似の解析に用いられている PCR プライマーを種々検討することで、mamu-A を主に増幅するプライマーセットおよび mamu-B を主に増幅するプライマーセットを決定した。ついで、これらを用いて 2 頭のアカゲザル (R100 および R154) について MHC クラス I 遺伝子の cDNA を増幅し、ランダムに選んだクローンのシーケンスを行った。その結果、R100 には少なくとも 3 種の mamu-A と 4 種の mamu-B アリルが存在すること、これに対して R154 には少なくとも 2 種の mamu-A と 5 種の mamu-B が存在することが示された。このことは、アカゲザルの場合、ヒトとは異なり、1 本の染色体上にコードされる MHC アリルの数がローカス毎、ハプロタイプ毎に異なることを示す。すなわち、アカゲザルでは、ヒトとは全く異なった MHC クラス I 抗原遺伝子群のハプロタイプ構造を示すことが確認された。また、ランダムに選択したクローンの塩基配列の比較から、一部のクローンには PCR エラーと考えられる配列変化が存在した。このことは、正常 cDNA 配列を忠実に反映するクローンを効率よく選択ないし同定する方法論の開発が必要であることを示す。

そこで、1kb 程度までの比較的長い領域内の多様性パターンを簡便にかつ高い精度で判別する方法論の開発を試みた。まずモデルシステムとして、R100 または R154 より得られた mamu-A および mamu-B クローンを reference とし、標識プライマーを用いて増幅した後に、R100 または R154 の mamu 遺伝子 cDNA の PCR 産物ないしクローンとのヘテロデュプレックスを形成させ、これを非変性ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動することで、多型検出を行う方法論 (RSCA 法) の応用を試みた。その結果、RSCA 法を用いることで、個体の mamu-A および mamu-B アリルがいくつ存在するかをパターン認識することが可能であった。またランダムに選択したクローンでも種々の RSCA パターンが得られるが、それらはもともとの cDNA 中の mamu-A ないし mamu-B 配列を反映するものであった。一部のクローンはもとの cDNA とは異なる RSCA パターン

(図 mamu-A および mamu-B クローンの塩基配列から推定されるアミノ酸配列)

アカゲザルの MHC クラス I 領域の多様性解析と平行して、ヒトの MHC クラス I 領域の多様性解析を行った。特に、NK 細胞の活性化レセプターである NKG2D のリガンドであることが最近判明した MIC 遺伝子の解析を行った。ヒトの MIC 遺伝子は HLA-B 遺伝子近傍に存在し、MICA と MICB の 2 つの遺伝子が存在する。このうち MICA 遺伝子は、MICB 遺伝子と比較して多型性に富むことが既に知られていたが、その解析は一部のエクソンに限られていた。そこで我々は、種々の人種より得られて HLA 多型が良く検討されている BLCL のゲノム DNA を用いて、MICA 遺伝子の第 2 エクソンから第 6 エクソンまでの全領域について、PCR-SSOP 法、PCR-SSP 法およびダイレクトシーケンス法による詳細な多型解析を行った。その結果、これまでに知られていなかったアリルを複数同定したが、特に興味深いことは、第 4 エクソンの 3'側に 1塩基欠失があり、このためフレームシフトを生じて、細胞膜内ドメイン構造が大きく異なり、かつ細胞内ドメインがなくなる 2 つのアリル (MICA*017 と MICA*015 を見出したことにある。



(図 アカゲザル mamu-A および mamu-B cDNA およびクローンの RSCA 解析)

(2) アカゲザル MHC クラス II 遺伝子の解析: アカゲザルの BLCL から作製した cDNA をテンプレートとし、MHC class II DRB, DQA, DQB, DPB 遺伝子に特異的なプライマーペアを用いて遺伝子断片の増幅を試みたところ、アガロースゲル電気泳動でそれぞれ目的とする大きさの PCR 産物を確認した。DRB と DQB の PCR 産物に関しては、さらに pUC19 プラスミドベクターへクローニングを行い、塩基配列を確認

したところ、確かに目的としている遺伝子が増幅されていた

このうち、DRB の cDNA に関しては、一個体から多くの異なる対立遺伝子発現を検出することとなった。一例を挙げると、R100 個体由来 DRB 遺伝子発現産物をクローニングして得た 14 のプラスミドについてそれらの塩基配列を決定したところ、互いに異なる 10 種類の塩基配列を確認できた。そのうち 3 つの配列 (100-02/07/21/23, 100-13, 100-04) は、現在までに報告されているアカゲザル DRB 遺伝子塩基配列と 100% の相同性を認めたが、他の 7 つの塩基配列に関しては、これまで報告されていない新規 DRB 対立遺伝子である可能性が考えられた。なお、これまでに決定した R100 個体由来の 10 の DRB 塩基配列のうち、二つ (100-21 と 100-22) は exon 2 をアミノ酸並列に翻訳すると完全一致を見たが、塩基配列の上ではこれまでに報告された互いに異なる 2 種類の対立遺伝子とお互いに相同性が高く、独立した対立遺伝子である可能性がある。R154 個体についても、これまで解析した 14 クローンの塩基配列中に 9 つの異なる対立遺伝子発現産物が検出され、これらのうち 4 つは既知の対立遺伝子配列と完全に一致したが、残りは未報告の対立遺伝子産物であると考えられた。9913 個体については、これまでに解析した 7 クローンのプラスミドから 5 つの互いに異なる塩基配列が検出され、そのうちの一つだけが既知の DBR 対立遺伝子に一致した。一方で、DQB 発現産物については、R100 と R154 の二つの個体で何れも一個体当たり 2 つだけの対立遺伝子発現を確認することができ、DQB 遺伝子座はハプロイド当たり一つだけ存在することが確認できた。

2. モデル動物へのワクチン接種による細胞性免疫誘導及びウイルス感染による病態発現の修飾

(1) Δ 5G 初感染における細胞性免疫の解析： Δ 5G をアカゲザルに感染させると、すべての感染ザルで一時的に viremia が起こるが、血中ウイルスは感染後 8 週までに速やかに検出限界以下に低下する。このような Δ 5G 感染制御に関与する細胞性免疫の誘導を調べるため、ELISPOT アッセイによって IFN- γ 産生細胞を検出し、SIVmac239 感染ザルと比較した。以前に行った Cr release assay による CTL アッセイでは、 Δ 5G 感染と SIVmac239 感染では顕著な差は見られず、SIVmac239 感染でも感染後 4 週から 20 週までは CTL 活性が認められた。今回の ELISPOT アッセイの結果では SIVmac239 感染ザルにおけるウイルス特異的 CD4⁺、CD8⁺ 細胞のレベルは概して低い傾向が見られた。とくにウイルス特異的 CD4⁺ 細胞のレベルはすべてのザルで極めて低かった。例外は #25 における CD8⁺ 細胞の誘導であるが、これも急性感染期には高いレベルであったが、その後著しい減少が見られた。一方、 Δ 5G 感染後のウイルス特異的 CD8⁺、CD4⁺ 細胞のレベルは個体

によって異なっていた。以前に行った中和抗体価測定でΔ5G に対する中和抗体が検出されたサル (#7) ではウイルス特異的 CD8+、CD4+細胞はほとんど検出されなかった。#12, 23 では中程度のウイルス特異的 CD8+、CD4+細胞が検出された。感染初期からのデータが得られた#23 では、血中ウイルス量のピークに一致して (感染後 3 週)、極めて高いウイルス特異的 CD8+および CD4+細胞が検出された。#26 では慢性感染期以降でも高いレベルのウイルス特異的 CD8+、CD4+細胞が維持されていた。

また、Δ5G 感染ザルで誘導された Env に対する細胞性免疫は糖鎖を欠失させたことにより生じた新たなエピトープを認識したのかを調べるため、Δ5G Env と SIVmac239 Env とで反応性に違いがあるかを調べた。その結果、#23 の感染後 1 週の CD8+細胞、感染後 3~4 週の CD4+細胞、および#26 の感染後 12 週以降の CD4+細胞は SIVmac239 Env より Δ5G Env に対して応答する細胞が多く存在することがわかった。これらのサルでは糖鎖欠失部位が新たなエピトープとして認識されたことが示唆された。特に、#23 では血中ウイルス量のピーク時に明らかな差が見られたので、このサルでは Δ5G 感染の制御にこれらの細胞が関与している可能性が示された。

(2) Δ5G 感染ザルへの SIVmac239 チャレンジ感染後の細胞性免疫の解析： Δ5G 感染ザルへ感染後 48 週に SIVmac239 のチャレンジを行うと、SIVmac239 は血中でほとんど検出されなかった。防御免疫を調べるため、ELISPOT アッセイを行うと、ウイルス特異的 CD8+細胞は SIVmac239 チャレンジ感染後 1 週でチャレンジ前の 2.5~10 倍に上昇した。この結果は以前の Cr release assay の結果と一致していた。ウイルス特異的 CD4+細胞もチャレンジ後 1 週でチャレンジ前の 2~4 倍に増加した。これらの免疫応答は初感染時の血中ウイルス量のピーク時に誘導された免疫レベルよりも明らかに強かった。また、チャレンジ感染後はウイルス特異的な抗原刺激がなくても IFN- γ を産生する細胞が多く存在することが明らかになった。すなわちチャレンジ感染後 1 週の細胞中にはウイルスタンパク発現ワクシニアウイルスを感染していない BLCL 細胞と共培養することによって、さらには T 細胞のみでも IFN- γ の産生が見られた。その傾向がもっとも強かったのは#26 のサルで、NK 細胞による IFN- γ の産生が考えられたので、抗 CD16 抗体磁気ビーズを用いて NK 細胞を除去したが、ウイルス非特異的な IFN- γ の産生は抑えられなかった。チャレンジ後には活性化された T 細胞が存在し、これらも感染の防御に関与していると考えられた。

(3) DNA ワクチン免疫能のモデル動物による評価： WT または 5G 免疫マウスに WT もしくは d5G 組み込みワクシニアウイルスを接種し、卵巣よりウイルス回収すると、d5G DNA ワクチン接種群は WT DNA

ワクチン接種群に比べ明らかにウイルスの感染を抑制していた。更に、5G 組み込みリコンビナントワクシニアウイルスが WT 組み込みリコンビナントワクシニアウイルスに比べ抑制されていた。免疫マウスの脾細胞の CD8⁺細胞の WT および d5G に対する IFN- γ 産製を ELISPOT assay にて測定したところ d5G DNA ワクチン免疫マウスが WT DNA ワクチン免疫マウスに比べ高い値を示し、刺激においても d5G が WT より高い値を示していた。CTL 誘導 d5G および WT DNA ワクチン接種マウスの脾細胞と d5G または WT 組み込みリコンビナントワクシニアウイルスを刺激細胞、標的細胞として用いて組み合わせによる CTL 活性を測定すると、免疫、刺激、標的のいずれにおいても d5G が WT より CTL 活性が高かった。さらにこの CTL の認識するエピトープの提示が d5G と WT の間にどの程度の差が認められるかを検討するために、d5G DNA ワクチン免疫マウスで誘導された CTL と d5G または WT 組み込みリコンビナントワクシニアウイルスを種々の moi で感染させた標的細胞を用いて検討すると、同程度の細胞障害活性を得るためには d5G と WT の間には約 3 倍の違いがあり、d5G は WT に比較して 1 / 3 の感染価で良いことが示された。また、各リコンビナントワクシニアウイルスを感染させるときに種々の酵素阻害剤で処理し、CTL の標的細胞として使用したところ WT と d5G では 2 種類の酵素阻害剤(Benzyl-succinic acid, Captopril)で d5G は阻害を受けないことから、d5G においては、この経路を用いない経路が抗原提示を促進していると推測された。

SeV-Gag ブースト後、高レベルの Gag 特異的 CD4 陽性 T リンパ球および CD8 陽性 T リンパ球誘導が認められた。その T リンパ球レベルには個体差があり、特異的 CD4 陽性 T リンパ球が優位なもの、特異的 CD8 陽性 T リンパ球が優位なものなど様々であった。また、SIVsmE543 感染サルにおいては、SIVmac239 特異的 T リンパ球および SIVsmE543 特異的 T リンパ球の両者を検出することができた。前者のレベルと比較して、後者のレベルの方が高かった。

外来挿入遺伝子の発現は、たとえば rBCG の場合、挿入遺伝子のマイコバクテリアコドンの至適化により極めて効果的に上昇することが次の成果からわかった。①ウイルス抗原遺伝子は GC の含有率は約 45%であるがコドンの至適化をしたものは約 70%になる。この GC コンテンツの差を見るだけでもこの発現の上昇が予測できる。②具体的にコドンの至適化をした DNA を作製しシャトルベクターに pSO を挿入して BCG に発現させ WB によって外来抗原を発現した rBCG を作製することができた。③in vitro カルチャーにおけるコドンの至適化の評価：rBCG のコドンの至適化したものと、ネイティブなものを in vitro カルチャーにより

比較した。コドンの至適化した rBCG は in vitro カルチャー約 2 週間で増殖にブレーキをかける。しかし、ネイティブなものは BCG 菌は同じように増殖し続ける。その菌体の外来抗原の発現を比較すると菌体ないにおける外来抗原の発現が培養 1 週間目で約 10 倍の差が認められ培養 3 週間後実験した実験して 3 週間後の最終産物では約 30 倍の発現の差が認められた。さらに、in vivo において、外来抗原遺伝子の至適化の有用性を以下のように明らかにした。①BCG の評価動物であるモルモットを用いて DTH の発現を検討するとコドンを至適化した BCG 接種動物は非接種動物と比較して DTH の反応が 0.1mg 接種でも、5mg 接種でも DTH の強さが 10mm でほとんど差が無かった、抗原接種量をもう一桁減らして 0.01mg で比較すると T 細胞の増殖反応においてコドンの至適化動物では有意に細胞増強反応が認められた。コドンを至適化していない動物での 0.01mg 接種では有意な細胞増強反応は全く認められていなかった。現在これらの培養浄清中のサイトカイン産生の差について検討中である。②抗体産生をマウスを用いて検討すると 0.05mg rBCG 接種マウスのコドン至適化動物群では抗原に対する抗体価が非至適化群に比べて約 3 倍上昇したことが認められた。現在、in vivo 発現における投与量の至適化と投与ルートの至適化を小動物レベルで検討中である、さらに細胞性免疫の接種をしたマウスを用いて CTL の解析を検討中である。また、SIV の全遺伝子を発現した rBCG が作製され、発現が明らかになったのでサルを用いたウイルスチャレンジによる防御免疫誘導の至適化について検討を始める。

4. 考察

本プロジェクトの初年度に当り、遺伝的バックグラウンドの明らかになったサルコロニーを同定することができた。このコロニーは mamuA*-08 の MHC Class I 抗原を有するコロニーであり、これまで報告されている mamuA*-01、mamuA*-02 のコロニーとは異なった独自のコロニーとして評価できる。まず、我が国で SIV 感染実験に用いられているアカゲザルの MHC class II cDNA 塩基配列を決定したところ、DQB についてはハプロイド当たり一つの遺伝子座があるが、DRB 領域には一染色体当たり複数の遺伝子座が存在し、ハプロタイプを形成していることが確認された。また、DQB、DRB 何れの遺伝子座の発現産物についても、これまで欧米の研究グループが報告したのものとは異なった対立遺伝子の産物が見出された。欧米で実験に用いられているアカゲザルコロニーと我が国で繁殖飼育されているアカゲザルコロニーでは、元親の捕獲地が異なると言われており、今後の解析で未知の class II 対立遺伝子が次々と見つかる可能性が高い。

R100 及び R154 個体が発現する互いに異なったそれぞれ二つの DQB 対立遺伝子のうち、ひとつは兩個体間で全く共通であり、もう一つの対立遺伝子は兩個体間でごく僅かに塩基配列が異なっていた。また、これら 2 個体間で共通に発現する DRB 対立遺伝子が少なくとも一つ存在する。このことから、これら 2 個体は片親が共通である可能性が高い。当初は DQB と DRB の連鎖不平衡を期待し、DQB 遺伝子型を決定すれば DRB ハプロタイプはほぼ自動的に決まるのではないかと考えたが、予想に反し DQB 遺伝子型のほぼ一致する 2 個体間で DRB 遺伝子型の一致度は低かった。アカゲザル DRB 遺伝子の多重性はすでに報告されており、ハプロイド当たり最大で 6 遺伝子座が存在する。従って、単一個体から 10 近くの互いに異なる塩基配列を持った DRB cDNA クローンが検出されることは驚くには当たらない。但し、各個体で見出された互いに異なる cDNA 塩基配列が全てそのままゲノム上の対立遺伝子多重性を反映するとは限らず、cDNA 作成及び PCR 反応過程での塩基置換を慎重に排除する必要がある。この点に鑑み、PCR 反応産物の DGGE 法による解析を併用し、まず各個体で発現する対立遺伝指数を確定することが望ましい。既に予備的な実験を行っているが、これまでに解析した個体で少なくとも 5 つ程度の DRB 対立遺伝子発現を認めており、cDNA クローン解析の結果が一部 PCR 及び塩基配列決定時のエラーを含んでいる可能性は否定出来ない。しかし、何れにしても各個体に相当の DRB 多重性が認められることは間違いなく、今後は個体ごとに極めて複雑な DRB 遺伝子のハプロタイプ構成を解明していかなければならないと予想される。ゲノム DNA の直接解析は多大の労力と物量を要求されるので、当面実現可能なハプロタイプ構成解析法は、交配関係のわかっている個体について、親子間に共通する DRB 発現産物をグループ分けして行くことである。このため、次年度の研究では交配に用いられている親個体の cDNA 解析を優先させるべきであると考えます。

MHC クラス I 領域には、抗原特異的な感染防御（後期感染防御）に関わる古典的クラス I 抗原の遺伝子群に加えて、初期感染防御を担う MIC 分子の遺伝子群や IkappaB 様構造の遺伝子 (IKBL1) などの多数の免疫関連遺伝子群が存在するが、それぞれに特有な多様性が認められる。このような MHC クラス I 領域の多様性はヒトで最も良く解析されており、我々も本研究に示す MICA の多様性解析などを行っている。これに対して、アカゲザルでの MHC 解析はまだ始められたばかりであるが、これまでに mamu-A、mamu-B 遺伝子の多型とハプロタイプ上の遺伝子数の違いなどが報告されている。本研究においても、アカゲザル個体間で mamu-A および mamu-B 遺伝子、さらには MIC 遺伝子の数自体にも多様性があり、また個々の遺伝子に多型の存在することが確認された。このようなアカゲザル個体の mamu-A および B 遺伝子のアリル型を

決定するためには、きわめて多数のクローンを選択し、その配列を決定することが必要となるが、そのような方法では多大な努力と時間およびコストを要する。そこで、簡便かつ高精度に個々のアカゲザルにいくつの mamu-A および mamu-B 遺伝子が存在するかを検出し、かつ塩基配列を決定すべきクローンを効率よく選択する手法の開発を試みた。RSCA 法を原理とする mamu アリルの検出法は、本研究で示されたように、モデル系では充分使用可能であった。しかしながら、ヒト IKBLI 遺伝子多型の解析において示されているように、場合によっては RSCA で単塩基置換が検出出来ないこともあり得ると考えられるため、今後多数のアカゲザル個体より得た cDNA を対象とした RSCA 解析と、その cDNA のクローンについての RSCA パターンと塩基配列の比較を行うことが必要である。このことは RSCA 法によるアカゲザルの mamu-A および mamu-B 遺伝子タイピング手法を確定する上でも必要な研究である。さらに、これらとは別にアカゲザル個体の識別やハプロタイプ構成の簡便な判定法として、マイクロサテライト多型を用いることが考えられる。このため既にヒトで多型を示すことが判明しているマイクロサテライトマーカーを用いた解析を行った。その結果、全体の約 30% のヒトマーカーがアカゲザルにおいても多型マーカーとして用い得ることが示された。このことは、マイクロサテライトマーカーが、MHC 領域に限らず、他の免疫関連ゲノム領域を解析する上での有用なツールとなることを示唆する。

一方、本研究でヒト MICA 多型の特徴を明らかにしたが、MICA 遺伝子は HLA-B 遺伝子のごく近傍（約 50kb の距離）にあるため、これらのアリル間には強い連鎖不平衡が成立している。これまで HIV 感染後の AIDS 発症には著明な個体差があり、それが HLA-B の特定のアリルと相関することが報告されているが、この現象には NK 機能に基づく初期感染防御が関与することも推定される。従って AIDS 発症における個体差には、HLA-B のみならず MICA が関与する可能性もあるため、HIV 感染後に長期に AIDS を発症しない群を対象として MICA 多型の検討を行うことが必要である。特に、MIC 分子は NKG2D レセプターのリガンドであることが最近判明したが、MIC 分子は $\beta 2$ ミクログロブリンを結合せず、また細胞外ドメインは抗原ペプチドなどを結合していないとされている。さらに、結晶解析から MIC 分子は古典的 MHC クラス I 分子とは全く異なった立体関係で NKG2D レセプターによって認識されることが判明しているため、NK 機能の個体差には、MIC 分子の細胞外ドメインの多型と同時に細胞内ドメインの多型が関連している可能性がある。さらに、微生物感染症や炎症性膝下への感受性、抵抗性には MHC 以外の遺伝子における多型が関与すると考えられることから、接着因子である PECAM1 に着目した解析を行った。その結果、PECAM1 のそれぞれ

異なるアリルが、動脈硬化（動脈内皮下の炎症）や脳マラリア（マラリアの重症型）と有意な相関を示すことを見出した。このことは、免疫応答の個体差を解析する上で、MHC 以外の遺伝要因にも着目する必要性を示すものである。

モデル動物における評価では、以前に行った Cr release assay による CTL アッセイでは $\Delta 5G$ 感染と SIVmac239 感染では顕著な差は見られず、SIVmac239 感染ザルにおいても CTL 活性が認められた。本研究による ELISPOT アッセイの結果から、 $\Delta 5G$ 感染ではウイルス特異的 $CD8^+$ 、 $CD4^+$ 細胞ともにある程度のレベルが維持され、それに対して SIVmac239 感染では両者とも低いレベルで維持されていることが示された。Cr release assay は CTL の定性的試験の要素が強く、エフェクター細胞を増殖させる段階でわずかに存在するウイルス特異的 $CD8^+$ 細胞が増幅された可能性がある。つまり、Cr release assay と ELISPOT アッセイの結果を総合して考えると、SIVmac239 感染ザルでは機能的には有効なウイルス特異的 $CD8^+$ 細胞が誘導されているが、そのレベルが低く維持されているのは、ウイルス特異的 $CD4^+$ 細胞のレベルが低いためにヘルパー活性が十分に機能していないからだと考えられた。このように ELISPOT アッセイにより、 $\Delta 5G$ 感染と SIVmac239 感染において同じ CTL 活性が見られたとしても、そこには質的、量的な差があることが示唆された。 $\Delta 5G$ 感染が感染ザルにおいて防御されたのは大きく 2 つの要因があると考えられた。ひとつは糖鎖が欠失したことにより $\Delta 5G$ Env がよりよい免疫源になったこと、もうひとつはウイルス感染様式が野生株とは異なるため、感染個体での障害が回避され、有効な免疫が誘導されたことである。最初の点については SIVmac239 Env より $\Delta 5G$ Env に対する免疫応答が 2 頭のサルにおいて高かったため、これらのサルでは糖鎖欠失による新たなエピトープの出現が $\Delta 5G$ 感染の防御に関与している可能性が示唆された。しかし、 $\Delta 5G$ を感染させたすべてのサルが同じように感染を制御したにもかかわらず、 $\Delta 5G$ 感染によって誘導された免疫は個体ごとに異なっていたので、むしろ $\Delta 5G$ は attenuate virus であるために、宿主によりよい免疫を誘導したのではないかと考えられた。 $\Delta 5G$ に対する中和抗体が誘導されたサルはウイルス特異的な IFN- γ 産生細胞はひじょうに低いレベルでしか検出されなかった。このサルでは ELISA による抗 SIV binding 抗体価も高いことが明らかにされており、本実験の結果と併せて、 $\Delta 5G$ 感染により Th2 タイプの免疫誘導が起こったと考えられた。その他の $\Delta 5G$ 感染ザルではウイルス特異的な細胞性免疫の誘導が示されたが、そのレベルは個体ごとに差があった。しかし、SIVmac239 感染ザルと顕著に違う点は $\Delta 5G$ 感染後長期にわたってウイルス特異的 $CD4^+$ 細胞のレベルが維持されていたことである。この結果は長期無発症の HIV 感染者では

HIV 特異的 CD4⁺ヘルパー細胞が維持されているという知見などとも一致している。Δ5G 感染により感染防御免疫を獲得したサルでは、SIVmac239 のチャレンジ感染を完全に制御した。チャレンジ感染の回避にはウイルス特異的 CD8⁺および CD4⁺細胞の速やかでかつ強い誘導が重要であることが明らかになった。特に1週における CTL を含む CD8⁺細胞の強い誘導はウイルス感染細胞の排除に機能していると考えられる。また、チャレンジ後の早期にはウイルス非特異的な IFN- γ 産生細胞の増加も見られ、これらの細胞も感染防御に関与していることが示唆された。

DNA ワクチンを用いた評価では、SeV-Gag ブーストにより、高レベルの Gag 特異的 CD4 陽性 T リンパ球および CD8 陽性 T リンパ球誘導が認められたことから、これらのサルは、Gag エピトープの検索に有用と考えられた。今後は、ペプチドを用いて、これらのサルにおける SIV Gag エピトープを同定していく予定である。一方、今回確立した特異的 T リンパ球測定系により、SIVmac239 特異的 T リンパ球レベルと SIVsmE543 特異的 T リンパ球レベルとの比較が可能となった。SIVsmE543 感染サルにおける SIVmac239 特異的 T リンパ球レベルと SIVsmE543 特異的 T リンパ球レベルとの比較では、後者の方が高く、このことは、SIVmac239 と SIVsmE543 のアミノ酸配列の違いによるエピトープ特異的反応の違いを反映していると考えられる。今後は、このシステム、および、SIVmac239 と SIVsmE543 の各々由来のペプチドを用いたシステムの両方により、SIVmac239 特異的 T リンパ球レベルと SIVsmE543 特異的 T リンパ球レベルとを比較検討していく予定である。

BCG を例としたリコンビナントベクターを用いたリコンビナントベクター HIV ワクチンの開発が我々を含めて3つのグループで行われてきた。しかし、実質的に HIV ワクチンの開発を続けているグループは現在我々のみとなっている。rBCG-HIV ワクチンの課題点として挿入外来遺伝子の発現が他の系に比べて比較的弱いことが指摘されており、これらの rBCG-HIV ワクチンの開発への努力にもかかわらず、防御免疫を誘導できるような強発現の rBCG をベースにした HIV ワクチンの開発は成功していない。しかし、rBCG-HIV ワクチンは他のベクター系に比べて免疫の持続能が極めて優れており、我々の観察した動物モデルでは観察を続けた数年において免疫が持続していることが明らかである。10年以上の持続の報告もあり、プライミング抗原系として優れた特徴を有している。したがって、プライムブーストの系で用いることによりブースター抗原を選択有効に選択できれば、現在の rBCG-HIV ワクチンでもその有用性が示されると理解できる。しかし、HIV ワクチンの開発は強い細胞性免疫誘導能を目的としていることから BCG をベクターに用いた

rBCG-HIV ワクチンの完成にはいずれにしろ、挿入した外来抗原遺伝子の発現を増強させることが効果的な HIV ワクチンの開発につながると予測される。本年度の研究で、挿入した外来遺伝子を BCG のコドンに至適化することにより *in vitro* の培養系で約 30 倍の増強が認められた。DNA ワクチンの至適化による効果が約 10 倍であることを考慮すると、BCG のコドンの至適化は抗原の発現において極めて優れた方法であるといえる。DNA ワクチンにおいて *in vivo* における防御効果の発現は *in vitro* の抗原発現に比べてさらに 10 倍増強すると示唆されていることから BCG 単独投与における防御免疫誘導能の増強が期待される。今回、SIV-Gag の全遺伝子を至適化し、BCG に発現させることができた。今後、その至適化 rBCG-HIV Gag をサルに投与することにより、単独投与の系の防御免疫の誘導が可能であるかどうかについてその投与の量とルートを検討する。

5. まとめ

我が国で SIV 感染実験に用いられているアカゲザル個体由来 BLCL で発現する MHC class I,II 遺伝子産物をクローニングし、その塩基配列を決定した。その結果、MamuA*-08 優位のアカゲザルコロニーがわが国にあることを同定した。アカゲザルの MHC クラス I 抗原遺伝子多型を検討する系として、mamu-A および mamu-B それぞれに特異的なプライマーの決定と RT-PCR 法による full-length cDNA のクローニングと塩基配列の決定を行った。また mamu 多型を簡便かつ高精度に区別する手法として RSCA 法に基づく mamu タイピング法の開発を試みた。さらに、アカゲザルの MIC 遺伝子を増幅する PCR プライマーの設定を行った。これらの解析から、アカゲザルにおいては MHC クラス I 抗原遺伝子領域に大きな重複があり、このためハプロタイプごとに MHC 関連遺伝子数が異なることが示された。一方、ヒトにおいて MICA 多型の詳細な検討を行うことで、これまでに知られていない特徴的な構造をとるアリルの存在を明らかにした。これらのアリルは細胞外ドメイン構造が異なるとともに、細胞膜ドメインや細胞内ドメインの構造が大きく異なっていた。さらに、MIC アリルは HLA-B アリルとの間に強い連鎖不平衡が成立しているが、HIV ウイルス感染後の AIDS 発症感受性と HLA-B との相関は、MIC アリルとの相関の反映である可能性もあると考えられた。これとは別に、MHC 以外の感染症関連遺伝要因として PECAMI 多型を検討し、これらが動脈硬化や脳マリアの発症に関与することが示された。

また、各個体で DRB 遺伝子座が著しい多重性を有すること、DQB 遺伝子座はハプロイド当たり一つであ

ること、我が国で使用されているアカゲザルの DQB 及び DRB 対立遺伝子には、これまで欧米で報告されたものとは異なる塩基配列が多数見出されることが明らかとなった。DQB の多型性は期待したほど高くない可能性があり、DQB と DRB の連鎖不平衡を利用して DQB 遺伝子型から DRB ハプロタイプを推測する方法は、予想よりも困難であると考えられる。今後多数個体で DRB ハプロタイプを決定していくためには、交配の親として用いられた個体とその子孫について、発現する DRB 対立遺伝子を組として解析することが必要となる。

サルモデルによる評価では、 $\Delta 5G$ を感染させたすべてのサルが同じように感染を制御するにも関わらず、誘導された免疫はあるものは中和抗体、あるものは細胞性免疫と異なっていた。 $\Delta 5G$ 感染がなぜ制御されたかについては、糖鎖欠失によって新たな免疫エピトープが出現した可能性も 2 頭のサルで確認されたので、否定はできないが、糖鎖欠失による抗原提示の違いがあること以外に、 $\Delta 5G$ の感染様式が SIVmac239 とは異なるため、宿主細胞に対する細胞障害性が低下し、 $CD4^+$ 細胞の減少が抑制されるなど、免疫細胞の維持がよりよい感染防御免疫の誘導を導いているのではないかと考えられた。また、SIV エピトープ特異的免疫反応解析システムの確立試みると、検索対象を Gag エピトープに絞り、その第一段階として、DNA/ScV-Gag ワクチン接種により、高レベルの Gag 特異的 T リンパ球を有するサルを作成し、エピトープ変異の影響を調べるためのシステム立ち上げを目的として、2 つの SIV strain (SIVmac239, SIVsmE543) の各々に特異的な T リンパ球レベルを測定し、比較検討する系を確立した。

BCG の中の最も安全であると思われる BCG 東京株をベクターに用いてウイルス遺伝子、特に Gag 抗原を挿入外来抗原として標的にすることにより細胞性免疫の誘導を目的としたワクチン開発を行った。抗原発現を増強させるために Gag 抗原遺伝子のコドンの至適化を行うと約 30 倍の *in vitro* における発現が認められた。その発現は *in vivo* の免疫誘導能の発現に比例した。したがって、BCG をベースにしたリコンビナントワクチンの免疫誘導能を増強させることが可能となった。これまで、rBCG-HIV ワクチンの単独投与によるチャレンジウイルスのコントロールに成功した例が無いので、BCG 単独投与あるいはプライムブーストの系によるコドンの至適化の有用性について検討し、rBCG-HIV ワクチンの完成を計る。

6. 研究発表

- ① Mori, K., Yasutomi Y., Ohgimoto S., Nakasone T., Takamura S., Shioda T. and Nagai Y. A quintuple deglycosylated mutant of SIV in rhesus macaques. Robust primary replication, tightly contained chronic

- infection and elicitation of potent immunity against the wild_type strain. *J. Virol.* **75**, 4023-4028. 2001
- ② Villinger, F, Brice G. T., Mayne A. F., Bostik P., Mori K., June C. H., and Ansari, A. Adoptive transfer of SIV naïve autologous CD4+ cells to macaques chronically infected with SIV is sufficient to induce long term non progressor status. *Blood* **99**. 500-599. 2002
 - ③ Matano, T., Kano, M., Nakamura, H., Takeda, H., & Nagai, Y. Rapid appearance of secondary immune responses and protection from acute CD4 depletion after a highly pathogenic immunodeficiency virus challenge in macaques vaccinated with a DNA-prime/Sendai viral vector-boost regimen. *Journal of Virology*, **75**, 11891-11896, 2001.
 - ④ Kano, M., Matano, T., Kato, A., Nakamura, H., Takeda, A., Suzaki, Y., Ami, Y., Terao, K., & Nagai, Y. Primary replication of a recombinant Sendai viral vector in macaques. *Journal of General Virology*, in submission.
 - ⑤ Iwanami, N., A. Niwa, Y. Yasutomi, N. Tabata, and M. Miyazawa. Role of natural killer cells in resistance against Friend retrovirus-induced leukemia. *J. Virol.* **75**: 3152-3163, 2001.
 - ⑥ Fukuoka, K., T. Ajiki, M. Miyazawa, Y. Takeyama, H. Onoyama, and Y. Kuroda. Changes in the number of mucosal T-lymphocytes and macrophages in patients subject to external biliary drainage. *Eur. J. Surgery* **167**:684-688, 2001.
 - ⑦ Niwa, A., N. Iwanami, H. Uenishi, N. Tabata, H. Yamagishi, and M. Miyazawa. A single-epitope CD4+ T-cell vaccine protects mice against fatal retroviral infection by eliciting multiple effector mechanisms and preventing immunosuppression. *Submitted for publication*, 2001.
 - ⑧ Abe, H., A. Niwa, C. Ishihara, H. Kawabata, Y. Takei, and M. Miyazawa. *Rfv-3* gene and a novel epigenetic factor control the kinetics of neutralizing antibody production at the early stage of Friend virus infection. *Submitted for publication*, 2002.
 - ⑨ Obuchi N, Takahashi M, Nouchi T, Satoh M, Arimura T, Ueda K, Akai J, Ota M, Naruse T, Inoko H, Numano F, Kimura A: Identification of MICA alleles with a long Leu-repeat in the transmembrane region and no cytoplasmic tail due to a frameshift deletion in exon 4. *Tissue Antigens* **57**: 520-535, 2001.
 - ⑩ Sasaoka T, Kimura A, Hohta S, Fukuda N, Kurosawa T, Izumi T: Polymorphisms in the platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM1) gene, Asn563Ser and Gly670Arg, associated with myocardial infarction in the Japanese. *Ann. New York Acad. Sci.* **947**: 259-270, 2001.
 - ⑪ Kikuchi M, Looareesuwan S, Ubalee R, Tasanor O, Suzuki F, Wattanagoon Y, Na-Bangchang K, Kimura A, Aikawa M, Hirayama K: Association of adhesion molecule PECAM-1/CD31 polymorphism with susceptibility to cerebral malaria in Thais. *Parasitol. Int.* **50**: 235-239, 2001.

7. 知的所有権の取得状況

1) 特許取得

特許出願：

名称：Method and Medicaments for post exposure prophylaxis of an HIV infection