

# エンドゾーム経路輸送蛋白質を欠損させた酵母株における HIV 及び SIV Gag の粒子形成

分担研究者 森川裕子 (北里大学附属北里生命科学研究所 教授)

## 研究要旨

HIV-1 Gag 蛋白発現の plasmid を導入した酵母細胞から細胞壁を除去して培養すると、Gag 粒子が自発的に出芽放出される。この粒子出芽機構を解析する目的で、エンドゾーム経路の輸送蛋白質を欠損させた一連の酵母変異株を用い HIV Gag 粒子の出芽産生を調べた。後期エンドゾームの VPS23 (粒子出芽の宿主因子として注目されている TSG101 の酵母ホモログ) 欠損細胞では Gag 粒子産生量が同等かあるいはむしろ増加する傾向が認められた。特に、野生型の酵母では Gag 粒子を出芽できなかった HIV-2 Gag 蛋白をこの欠損細胞で発現させると、粒子産生が回復した。これに対し、エンドゾーム経路で、この VPS23/TSG101 の直前に位置する輸送蛋白質 Pep12 (Syntaxin の酵母ホモログで、前期エンドソームから後期エンドソームへの輸送における t-SNARE) の欠損細胞では Gag 蛋白の切断分解を伴う粒子形成低下がおこることが明らかとなった。VPS23/TSG101 の下流に位置する輸送蛋白質 Vam3 (Syntaxin7 の酵母ホモログで、後期エンドソームからリソソームへの輸送における t-SNARE) の欠損細胞では粒子産生に差がなかった。

## A、研究目的

HIV 粒子形成は、その主たる構造蛋白である Gag 蛋白の 1) 形質膜への輸送、2) アッセンブリ、3) 形質膜からの粒子出芽の過程により進行し、高等真核細胞では Gag 蛋白単独発現でウイルス様の Gag 粒子が産生される。近年、これらの過程に関与する宿主因子としていくつかの候補が挙げられている。例えば、細胞膜への輸送に関与する因子としてアクチンや微小管などの細胞骨格蛋白とともにラフトと呼ばれる脂質画分の関与が、また、粒子出芽の責任宿主因子として Gag 蛋白 p6 領域に結合するエンドソーム輸送蛋白 TSG101 の関与が示唆されている。しかしながら、これら実験の多くはその宿主因子の阻害剤を処理した場合の現象を観察したにすぎず、その宿主因子が真の責任分子であるかの直接証明になっていない。我々はその証明は遺伝子改変の宿主細胞を用いることによって可能であると考え、宿主遺伝子改変が可能な真核細胞すなわち酵母細胞を宿主とした HIV-1 Gag 粒子形成出芽系を完成させた。本研究では、こうした Gag 粒子の出芽が HIV-1 以外場合でも可能かを明らかにするとともに、酵母の genetics を利用して、これら候補の宿主因子 (特に、エンドゾーム経路輸送蛋白質の 1 つである TSG101) が Gag 粒子形成・出芽の真の責任分子であるか否かを検証した。

## B、研究方法

### 1、Gag 蛋白発現 plasmid と酵母変異株

HIV-1, HIV-2, SIVmac, SIVagm, SIVmnd の Gag 蛋白に相当する cDNA 断片をそれぞれ、URA3 遺伝子を選択マーカーとして有する YEp 型 (ori 2 $\mu$ )

シャトルベクターの GAP プロモーター下流に挿入した。これらの plasmid をエンドゾーム経路の輸送蛋白質 (図 1) をそれぞれ欠損させた *S. cerevisiae* (米国、Emr 博士より分与) に導入した。

### 2、酵母細胞のスフェロプラスト化

形質転換した酵母細胞を uracil dropout の SD 培地で培養した。細胞壁を常法に従って DTT 存在下で zymolyase により消化した後、1M sorbitol 添加の等張 YPD 培地で培養した。

### 3、Gag 粒子の精製

Gag 蛋白発現の酵母スフェロプラスト細胞の培養上清から常法に従い、蔗糖密度勾配遠心により Gag 粒子を精製した。精製 Gag 粒子の検出は、抗 CA 抗体を用いた Western blot あるいは Coomassie brilliant blue 染色で行った。

### 4、Gag 蛋白の膜親和性

Gag 蛋白発現の酵母スフェロプラスト細胞を超音波破碎し、その遠心上清を膜粗画分として membrane floatation 実験に用いた。floatation 溶媒には 70%/65%/10% 蔗糖の step gradient を用いた。分画後、Western blot で Gag 抗原を検出した。

### 5、Gag 蛋白の細胞内局在

uracil dropout の SD 培地で培養した酵母細胞をホルマリンで固定し、常法に従って細胞壁を除去した。膜を Triton X-100 で処理した後、抗 CA 抗体で反応させた。

### 6、電子顕微鏡観察

常法に従って固定し薄切後、観察した。

## C、研究結果

1、酵母における HIV 及び SIV Gag 粒子出芽  
HIV 及び SIV は相同性から、HIV-1/SIVcpz,

HIV 2/SIVmac/SIVsm SIVagm SIVmnd の4グループに大別される。我々は昨年度、酵母細胞を宿主とした HIV 1 Gag 粒子形成出芽系を完成させたか、本年度はこうした Gag 粒子の出芽か HIV 1 以外場合でも可能かを検討した。HIV 1 HIV 2 SIVmac SIVagm SIVmnd の Gag 蛋白発現酵母から細胞壁を除去し、そのスフェロプラスト細胞を培養した。ウイルス粒子精製の常法に従って、この培養液から Gag 粒子を精製したところ、HIV 1 SIVagm SIVmnd の場合には Gag 粒子産生が認められたか、HIV 2 と SIVmac の Gag 蛋白発現では粒子産生が認められなかった(図2)。次に、これらの Gag 発現酵母スフェロプラスト細胞を顕微鏡で観察した。HIV 1 や SIVagm の Gag 発現細胞では、電子密度が高くなった形質膜が観察されるとともに、粒子出芽像が認められた。これに対し、HIV 2 及び SIVmac の Gag 発現細胞では、電子密度が高くなった形質膜が波状に ruffling しているものの、出芽像は観察されなかった(図3)。これらの細胞における Gag 蛋白の局在を蛍光抗体法で調べたところ、いずれの細胞でも、Gag 抗原は王として形質膜に一致して認められた。これらの結果から、いずれの HIV 及び SIV の Gag 蛋白も形質膜に targeting するものの、HIV 2/SIVmac グループの Gag 蛋白は酵母スフェロプラスト細胞から出芽できないと結論された。

## 2、エンドゾーム経路の輸送蛋白質欠損酵母株における HIV 1 及び HIV 2 Gag 粒子の形成

近年、HIV 1 Gag 蛋白 p6 領域内 PTAP 配列に結合する宿主因子として、後期エンドゾームの輸送蛋白質である TSG101 か、ウマ伝染性貧血ウイルス Gag 蛋白に結合する宿主因子として、エンドサイトソームを制御する AP 2/Ciathrin 複合体の構成成分 AP50 が見いだされている。HIV 1 Gag 蛋白結合宿主因子 TSG101 か粒子出芽の真の責任分子であるか検証する目的で、TSG101 (後期エンドゾームの輸送蛋白質)の酵母ホモログである VPS23 及びその経路の前後に位置する輸送蛋白(前期エンドゾームから後期エンドゾームへの輸送に参与する Pep12 と後期エンドゾームからリソソームへの輸送に参与する Vam3)の欠損酵母株を用いて解析した。いずれの細胞でも、HIV 1 Gag 蛋白の細胞内発現量は同程度であり、その Gag 抗原は王として形質膜に一致して認められた。また、membrane floatation 実験で調べた Gag 蛋白の膜親和性にも差がなかった。しかしながら、Gag 粒子の産生量を調べたところ、Pep12 欠損細胞では産生量が低下する傾向か、VPS23 欠損細胞では産生量が同等かあるいはむしろ増加する傾向が観察された。また、前者の細胞では精製 Gag 粒子の Gag 蛋白が切断分解され易い傾向が認められた。一方、Vam3 欠損細胞では粒子産生量に変化はなかった(図4A)。このような VPS23 欠損細胞における粒

子産生量増加は HIV 2 Gag 蛋白を発現させた場合により顕著であった(図4B)。これらの結果から、予想に反し、後期エンドゾームの VPS23 (TSG101 ホモログ)の欠損細胞では粒子産生量が減少しないか、エンドゾーム経路のその前段階である Pep12 (Syntaxin 前期エンドゾームから後期エンドゾームへの輸送における tSNARE)の欠損細胞では Gag 蛋白の切断分解を伴う粒子形成低下がおこることか明らかとなった。

## D、考察

我々は昨年度、宿主遺伝子改変か可能な真核細胞すなわち酵母細胞を宿主とした HIV 1 Gag 粒子形成出芽系を完成させた。本年度はこうした酵母スフェロプラスト細胞からの Gag 粒子形成出芽か HIV 1 以外場合でも可能かを検討したところ、HIV 1 HIV 2/SIVmac SIVagm SIVmnd の4グループのいずれの Gag 蛋白も形質膜に targeting できるものの、HIV 2/SIVmac グループの Gag 蛋白は酵母から粒子形成出芽できないことかまず示された。ところが後に、エンドゾーム経路の輸送蛋白質の1つである VPS23 (TSG101 ホモログ)を欠損させた酵母変異株ではこの HIV 2 Gag 粒子の産生が回復することか判明した。

近年、レトロ科ウイルスの粒子出芽の宿主因子としてエンドゾーム輸送経路の蛋白質 (TSG101 Nedd4 AP50 など)が注目されている。これら宿主因子は Gag 蛋白の L domain (HIV や SIV の場合は p6 領域)との結合を指標に単離され、ウイルス粒子出芽を促進すると考えられている。事実、これら宿主因子との結合を決定する p6 領域 PTAP/PPPYPY 配列を欠損あるいは変異させると、粒子は出芽するものの、形質膜に pinch off されないで留まる現象が観察される。このような L domain 効果は、接着細胞やマクロファージ系細胞で顕著であるか、リンパ球系細胞ではほとんど認められない(ただし、リンパ球系細胞で産生されてくる粒子は形態異常を伴った非感染性粒子である)。本研究では、このような粒子の出芽産生低下を期待し、エンドゾーム輸送経路の欠損酵母細胞株を用いた。しかしながら、粒子出芽の責任宿主因子と考えられている TSG101 (後期エンドゾームの輸送蛋白質)の酵母ホモログ VPS23 を欠損させた細胞では粒子産生量が同等かあるいは増加することか明らかとなった。特に、野生型の酵母では粒子出芽できなかった HIV 2 Gag 蛋白をこの VPS23 欠損細胞で発現させた場合、粒子産生が回復することか示された。HIV 2/SIVmac グループの Gag 蛋白だけは PTAP 配列を2つもち (MA 領域と p6 領域)、他の3グループの Gag 蛋白 (p6 領域のみに PTAP 配列)とは異なっている。L domain の効果は position independent すなわち Gag 蛋白上のいずれの位置でもその効果が認められるとされているか、その個数との関連は明らか

でない。PTAP 配列の個数と TSG101/VPS23 の親和性が相関するのか、また、その結果が粒子出芽にどう影響するのか、今後検討を要する。

本研究では、後期エンドゾームを中心とした一連のエンドゾーム輸送経路、すなわち、前期エンドゾームから後期エンドゾームへの輸送における t-SNARE (Syntaxin) の酵母ホモログ Pep12、後期エンドゾームでの輸送蛋白質である TSG101 の酵母ホモログ VPS23、後期エンドゾームからリソソームへの輸送に関与する t-SNARE (Syntaxin7) の酵母ホモログ Vam3 の欠損酵母株を用いて HIV-1 Gag 粒子出芽を解析した。期待された TSG101 のホモログ VPS23 の欠損細胞では粒子産生量の低下が認められなかったが、この経路上流に位置する輸送蛋白質 Pep12 (前期エンドゾームから後期エンドゾームへ t-SNARE) 欠損細胞では Gag 蛋白質の切断分解を伴う粒子産生量低下が観察されており、エンドゾーム経路と Gag 蛋白質の輸送速度、その輸送が停滞した場合の Gag 分解速度と、その結果として生じる Gag 粒子の形態異常などを総合的に解析することが必要と思われる。

#### E、結論

後期エンドゾームの VPS23 (TSG101 の酵母ホモログ) 欠損細胞では Gag 粒子産生量が同等かあるいはむしろ増加する傾向が認められた。特に、野生型の酵母では Gag 粒子を出芽できなかった HIV-2 Gag 蛋白質をこの欠損細胞で発現させると、粒子産生が回復した。一方、一連のエンドゾーム経路で、この VPS23/TSG101 の直前に位置する輸送蛋白質 Pep12 (Syntaxin の酵母ホモログで、前期エンドゾームから後期エンドゾームへの輸送における t-SNARE) の欠損細胞では Gag 蛋白質の切断分解を伴う粒子形成低下がおこることが明らかとなった。

#### F、研究発表

##### 1、論文発表

1) Sayuri Sakuragi, Toshiyuki Goto, Kouichi Sano, and Yuko Morikawa.

HIV type 1 Gag virus-like particle budding from spheroplasts of *Saccharomyces cerevisiae*.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 7956-7961 (2002)

2) Fumitaka Momose, Tadasuke Naito, Keiichi Yano, Seiji Sugimoto, Yuko Morikawa, and Kyosuke Nagata.

Identification of Hsp90 as a stimulatory host factor involved in influenza virus RNA synthesis.

*J. Biol. Chem.* 277: 45306-45314 (2002)

3) Milan V. Nermut, Wei-Hong Zhang, Garry Francis, Fedor Ciamporx, Yuko Morikawa, and Ian M. Jones.

Time course of Gag protein assembly in HIV-1-infected cells: a study by immunoelectron

microscopy.

*Virology* 305: 219-227 (2003)

4) Yuko Morikawa.

HIV capsid assembly.

*Curr HIV Res.* 1: 1-14 (2003)

##### 2、学会発表

1) Yuko Morikawa, Sayuri Sakuragi, Toshiyuki Goto, Kouichi Sano

HIV-1 Gag virus-like particle budding from spheroplasts of *Saccharomyces cerevisiae*

第12回国際ウイルス学会、パリ、2002/7/27-8/1

2) Kyosuke Nagata, Fumitaka Momose, Yuko Morikawa

Functional analysis of a host factor, RAF2p48/NPI-5/UAP56, that stimulates RNA synthesis of influenza virus

第12回国際ウイルス学会、パリ、2002/7/27-8/1

3) Fumitaka Momose, Yuko Morikawa, Kyosuke Nagata

Purification and characterization of RAF-1 as a stimulatory host factor involved in influenza virus RNA synthesis

第12回国際ウイルス学会、パリ、2002/7/27-8/1

3) 森川裕子、後藤俊幸、百瀬文隆

酵母アクチン株を用いた HIV-1 粒子形成機構の解析

第50回日本ウイルス学会、札幌、2000/10/16-18

4) 横田(恒次)恭子、森川裕子、磯貝まや、細谷紀彰、立川(川名)愛、小田原隆、中村哲也、岩本愛吉、Brigitte Autran

樹状細胞による HIV-1 Gag 抗原提示と Gag 特異的 T 細胞の活性化に関する解析

第50回日本ウイルス学会、札幌、2000/10/16-18

5) 百瀬文隆、森川裕子、永田恭介  
インフルエンザウイルス遺伝子からの RNA 合成を促進する宿主因子 RAF-1 の機能解析

第50回日本ウイルス学会、札幌、2000/10/16-18

6) 森川裕子

HIV 粒子の形態発生

第16回日本エイズ学会集会、名古屋、2000/11/28-30

7) 永田恭介、渡辺健、百瀬文隆、森川裕子、三林正樹、杉山賢司、滝沢直己、沼尻明子、川口敦史、内藤忠相

インフルエンザウイルスゲノムの転写・複製と宿主因子

第25回日本分子生物学会年会、横浜、2000/12/11-14

8) 百瀬文隆、森川裕子、永田恭介

インフルエンザウイルス遺伝子からの RNA 合成を促進する宿主因子 RAF-1/Hsp90 の機能解析

第25回日本分子生物学会年会、横浜、2000/12/11-14

図 1、エンドソーム輸送経路

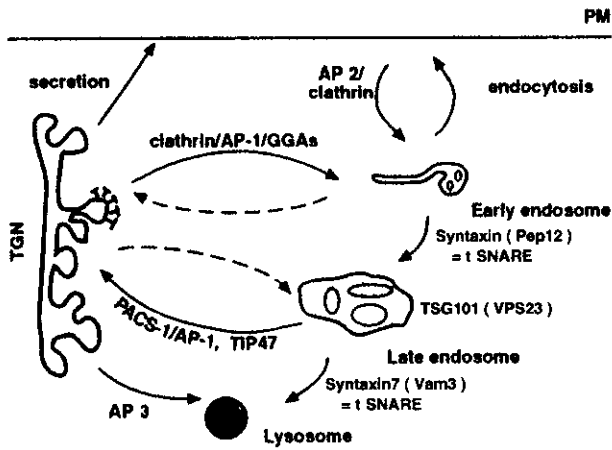


図 2、酵母 VLP 出芽系における HIV/SIV Gag 蛋白の粒子形成

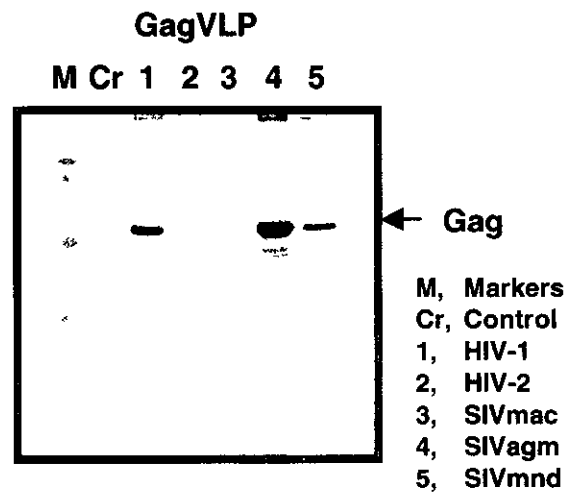


図 3、酵母スフェロプラスト細胞における HIV/SIV Gag 発現

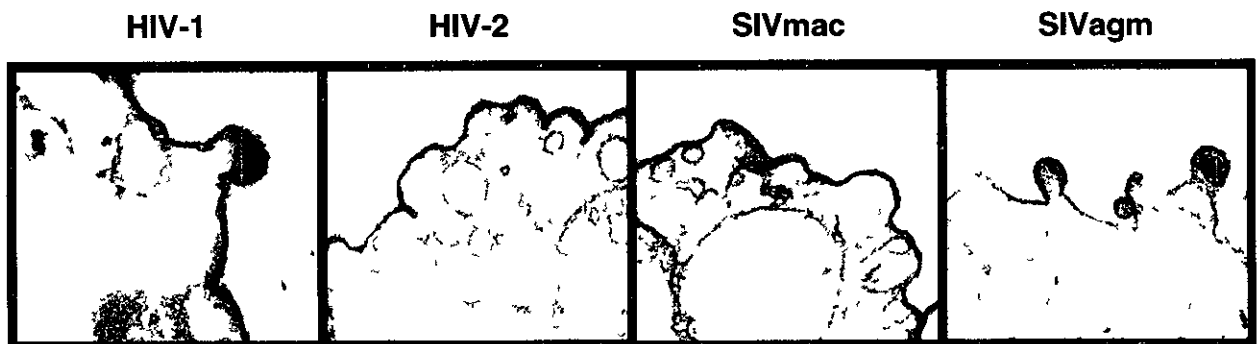
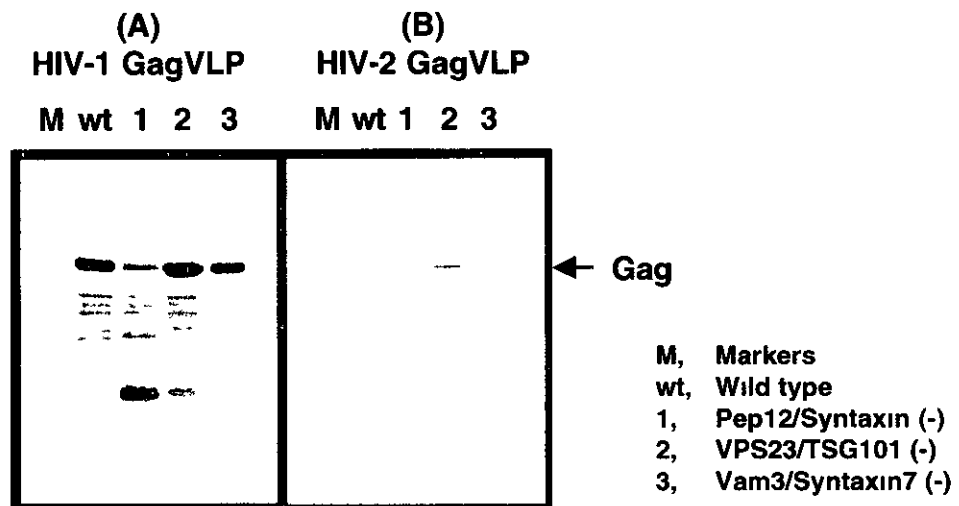


図 4、エンドソーム輸送蛋白欠損酵母株における HIV-1 / HIV-2 Gag の粒子形成



## HIV に対する新世代 DNA ワクチンに関する研究

分担研究者 奥田 研爾 横浜市立大学医学部教授

研究要旨 HIV-1 に対するワクチンを作製している。今回は多くの抗原決定基をコートする約 20 個の minigene を結合し、更に上流にヘルパーエピトープを結合させた多価 DNA ワクチンを作製した。BALB/c マウスにこの DNA ワクチンを免疫したところ、HIV-1 エピトープ特異的 Th1 Th2 反応が出現した。次に免疫したマウスに HIV 遺伝子を発現するワクチニアウイルスを感染させたところ、その著明な増殖抑制が認められた。

### A 研究目的

今回は多くの抗原決定基をコートする約 20 個の mini gene を結合し、更に上流にヘルパーエピトープを結合させた多価 DNA ワクチン（hDNA ワクチン）を作製した。今回のワクチンは Gag などの CTL エピトープを多く含んだ Th1 誘導や clade C の発現等を主目的としている。次に hDNA ワクチンをマウスに免疫し、いくつかのエピトープに対する Th1, Th2 の反応を検討した。この新世代 DNA ワクチンが有効か否かを主に小動物を使用した実験で検討した。

### B 研究方法

**免疫方法** BALB/c マウスに各々 20~30 $\mu$ g の hDNA ワクチンを 3 度筋注にて免疫した。HIV DNA ワクチンの構成は、pCAGGS ヘクターに多くの minigene を結合した DNA ワクチンで clade C, A, E, B の種々のエピトープをコートする DNA ワクチンである。ヘフチトを合成し、HPLC にて精製し、抗原として使用した（図 1）。

**抗体価測定** 抗体価は ELISA にて測定した。

### 細胞性免疫の検討

足蹠腫脹反応は hDNA ワクチンを 3 度免疫した後、1 週間後に測定した。各ヘフチトを足蹠に注入して測定した。同処置したマウス脾細胞を使用し、IFN- $\gamma$  産生 T 細胞 ELISpot 法、及び ICCS 法にて測定した。

**In vivo の有効性の検討** 免疫したマウスにワクチニアキメラウイルス vPE16（HIV-1 III B env 含有）と vP1206（HIV-1 III B gag 含有）を注入後、5 日後における卵巣中のウイルス量を測定した。

（倫理面への配慮）

今回の研究ではヒトに関与する研究を行わない為、考慮は必要無いと思われる。

### C 研究結果

新世代 DNA ワクチンを図 1 に示し、又各エピトープに対する今回実験に使用したヘフチトを記載した。

**Western blotting** ワクチニアウイルスヘクター（WR 株）に hDNA minigene（図 1）を結合させ、ウイルスを感染させた後、蛋白を抽出した。次にこのサンプルを抗 Gag 抗体を使用して、Western blotting を行った。35KD のところに minigene より産生されたホリヘフ

チトのバントが出現した。

**抗体産生** 図2に示すように *hDNA* を免疫した後抗体価を測定したところ、*hDNA* の免疫したグループに高い抗体価が見られた。更にいくつかの抗原やペプチドに対しても高い抗体価が見られた (図3-b)。又、*pCAGGS* プロモーターは *pCMV* プロモーターより強い免疫反応を誘導していることが判明した (図3-a)。

**細胞性免疫反応** 次に *hDNA* を免疫した後に混合したペプチドを注入したのち、足蹠腫脹を検討した。*hDNA* ワクチンは *pCAGGS* プロモーターを使用しており、*Gag*, *Pol* のエピトープを発現している。従って、*hDNA* ワクチンは *Gag*, *Pol* のエピトープを認識し、各エピトープに対応して反応していることが分かった。一方、*pCMVIII B* は *Env* を主に発現しており、*Env* エピトープに反応することが判明した (図4)。

更に、*hDNA* ワクチンを免疫した脾細胞をペプチドとともに培養した後の *IFN- $\gamma$*  産生細胞数を測定した。*hDNA* ワクチンを免疫した脾細胞中に *gag*, *pol* ペプチド (A8, A10, A11) を混合させたグループに対して *IFN- $\gamma$*  の強い産生が見られた (図5)。

細胞内 *IFN- $\gamma$*  産生細胞数 (ICCS) *vP1206*、及び *vPE16* ウイルスを感染させたり、*hDNA* ワクチンを免疫した後の脾細胞中の *IFN- $\gamma$* <sup>+</sup>, *CD8*<sup>+</sup> 細胞数を測定したところ、培養前の脾細胞 (A~D) に対し B (A7, A8, A9, A10) カクテル、C (A1, A2, A3, A4) カクテルを混合ペプチドと反応した脾細胞 (A'~D') が高い *IFN- $\gamma$* <sup>+</sup>, *CD8*<sup>+</sup> 細胞を出現させた (図6)。

**ウイルス感染実験** *hDNA* ワクチンや *pCMVIII B* ワクチンを3度免疫した後、*HIVVIII B env* の組込まれた *vPE16* や、*HIV-1 gag* の組

込まれたワクチニアウイルスを *iv* にて注入し、5日後の卵巣中のウイルス量を定量したところ、*hDNA* ワクチンを免疫したグループのウイルス量が最も少なかった。このウイルス増殖抑制能は *IL-12* の発現プラスミドを添加すると増加した。一方、コントロールとしてワクチニアウイルスを感染させた場合は抑制効果が認められなかった (図7)。

## DE 考察と結論

今回の研究の結果、*minigene* を使用した多価 *HIV DNA* ワクチンは *HIV-1* 特異的免疫反応を付与し、*HIV* 遺伝子を発現するワクチニアウイルスの *challenge* にも強い抑制効果を示した。現在サルをも使用し、有効性の検討を行っている。現在我々は、世界的に最も重要な *clade C* のワクチンを主体とした *poly-gene DNA* ワクチンの開発を急いでいる。更に、ワクチニアウイルスベクター (*LC16m8*) や、アテノ随伴ウイルス (*AAV*) あるいは乳酸桿菌などのベクターの開発も進んでいる。我々の *pCAGGS* ベクターを使用して、*SIVgag pol* を使用した *DNA* ワクチンの有効性を国立感染症研究所の本多三男博士とともにに行い、その有効性がほぼ認められた。今後、種々ベクターワクチンの有効性の検討を行い、出来るだけ早く海外での臨床試験を行えるよう最善の努力する。

## F 健康危険情報

ヒト化コドン断片的に組み立てた *DNA* ワクチンを使用している為、*HIV* ウイルス等のような危険なリコンビナントウイルスの出現する危険性は少ないと思われる。米国 *FDA* でも常染色体への *DNA* ワクチンの取り込みはほとんど行われてないとの見解が出ている。

G 研究発表

1 論文発表

- 1) Xin K-Q, Sasaki S, Kojima Y, Jounai N, Kumamoto Y, Hashimoto K, Shinoda K, Hamajima K, Okuda K Detection of progeny immune responses after intravenous administration of DNA vaccine to pregnant mice Biol Proced Online 2002,3(1), 91- 101
- 2) Xin K-Q, Ooki T, Mizukami H, Hamajima K, Okudera K, Hashimoto K, Kojima Y, Jounai N, Kumamoto Y, Sasaki S, Klinman D, Ozawa K, Okuda K Oral administration of recombinant adeno-associated virus elicits HIV-specific immune responses Hum Gene Ther 2002,13(13), 1571- 1581
- 3) Senuma A, Hagiwara E, Nagahama K, Okuda K, Nakamura M, Fukumoto N, Shirai A, Tani K, Ishigatsubo Y Therapeutic effect of CpG motifs on the development of chronic graft-versus-host disease in mice CYTOKINE 2002,20(1), 23- 29
- 4) Sasaki S, Xin K-Q, Okudera K, Okuda K, Ishii N Immunomodulation by apoptosis-inducing caspases for an influenza DNA vaccine delivered by gene gun Gene Ther 2002,9(12), 828- 831
- 5) Miyagi Y, Yamashita T, Fukuya M, Sonoda T, Okuno T, Yamada K, Watanabe M, Nagashima Y, Aoki I, Okuda K, Mishina M, Kawamoto S Deiphilin a novel PDZ and formin homology domain-containing protein that synaptically colocalizes and interacts with glutamate receptor  $\delta 2$  subunit J Neurosci 2002,22(3), 803- 814
- 6) Xin K-Q, Kumamoto Y, Jounai N, Kojima Y, Hamajima K, Okuda K Recombinant vaccinia virus (WR strain) may not be suitable for ex vivo stimulation (Letter to the editor) Vaccine 2002,21(1- 2), 5- 6
- 7) Hamajima K, Hoshino Y, Xin K-Q, Hayashi F, Tadokoro K, Okuda K Systemic and mucosal immune responses in mice after rectal and vaginal immunization with HIV-DNA vaccine Clin Immunol 2002,102(1), 12- 18
- 8) Murata H, Tajima N, Nagashima Y, Yao M, Baba M, Goto M, Kawamoto S, Yamamoto I, Okuda K, Kanno H Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein transforms human neuroblastoma cells into functional neuron-like cells Cancer Res 2002,62(23), 7004- 7011
- 9) Kojima Y, Xin K-Q, Ooki T, Hamajima K, Oikawa T, Shinoda K, Ozaki T, Hoshino Y, Jounai N, Nakazawa M, Klinman D, Okuda K Adjuvant effect of multi-CpG motifs on an HIV-1 DNA vaccine Vaccine, 2002,20(23- 24), 2857- 2865
- 10) Kobayashi N, Koshino T, Uesugi M, Yokoo N, Xin K-Q, Okuda K, Mizukami H, Ozawa K, Saito T Gene marking in adeno-associated virus vector infected periosteum derived cells for cartilage repair J Rheumatol, 2002,29(10), 2176- 2180

厚生科学研究費補助金 (エイズ対策研究事業)  
(総括・分担) 研究報告書

2 学会発表

1) 国内

- 1) Xin K-Q, Mizukami H, Ozawa K, Okuda K  
Oral administration of recombinant adeno-associated virus elicits protective immunity against HIV-1, 第8回日本遺伝子治療学会、2002年7月18-20日、東京
- 2) 篠田香織、忻克勤、城内直、松井清彦、浜島健治、奥田研爾 新世代 DNA ワクチンを使用したエイズワクチンの開発、第16回日本エイズ学会、2002年11月28-30日、名古屋
- 3) 城内直、奥田研爾、忻克勤、浜島健治、篠田香織、松井清彦 HIV env DNA ワクチンにおける HIV *rev* 遺伝子の重要性の検討、第16回日本エイズ学会、2002年11月28-30日、名古屋
- 4) 松井清彦、忻克勤、浜島健治、篠田香織、城内直、奥田研爾 組換えワクシニアウイルスを用いたエイズワクチンの開発、第16回日本エイズ学会、2002年11月28-30日、名古屋
- 5) 忻克勤、浜島健治、篠田香織、城内直、松井清彦、奥田研爾 組換え乳酸菌を用いた HIV ワクチンの開発、第16回日本エイズ学会、2002年11月28-30日、名古屋
- 6) 浜島健治、忻克勤、篠田香織、松井清彦、城内直、奥田研爾 アテノ随伴ウイルス由来 Inverted Terminal Repeats 導入 HIV- DNA ワクチンはその免疫原性が增强される、第16回日本エイズ学会、2002年11月28-30日、名古屋
- 7) 染谷健二、忻克勤、網康至、泉泰之、仲宗根正、山本直樹、奥田研爾 Non human primate を用いた DNA prime/recombinant vaccinia virus boost vaccine regimen の評価、第16回日本エイズ学会、2002年11月28-30日、名古屋

- 8) 篠田香織、浜島健治、奥田研爾 HIV-1 に対する新世代 DNA ワクチンの開発、第32回日本免疫学会総会、2002年12月4-6日、東京
- 9) 小島良績、忻克勤、城内直、大庭賢二、水上浩明、卜部匡司、小澤敬也、奥田研爾 ワクチンベクターとして最適なアデノ随伴ウイルスの血清型の解析、第25回日本分子生物学会、2002年12月11-14日、横浜

2) 海外

- 1) Xin K-Q, Hamajima K, Mizukami H, Jounai N, Kojima Y, Hashimoto K, Kumamoto Y, Matsui K, Ozawa K, Okuda K  
Oral immunization with HIV-expressing adeno-associated virus induces strong antigen-specific immune responses XIV International AIDS Conference, 2002, July 7-12
- 2) Hamajima K, Xin K-Q, Okuda K Immune responses in mice after rectal, vaginal and percutaneous application of HIV-DNA vaccine, XIV International AIDS Conference, 2002, July 7-12

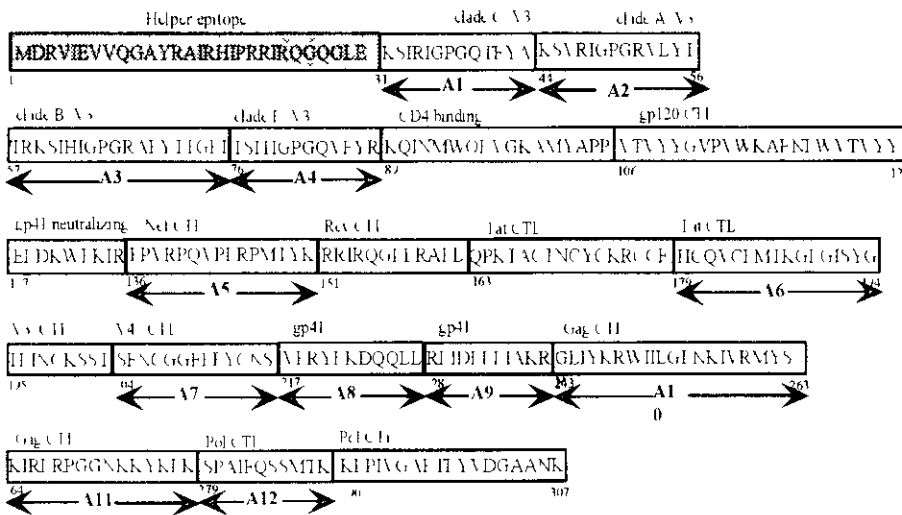
H 知的財産権の出願 登録状況

- 1) 特願 2002-110417、出願人 よこはまティーエルオー株式会社、日本医薬品工業株式会社、発明の名称 HIV-1 に対する新規多価 DNA ワクチン、2002年4月12日出願
- 2) 特願 2002-128141 出願人 科学技術振興事業団 発明の名称 組換えワクシニアウイルスを用いた HIV ワクチン、2002年4月30日出願



図 1

*h*DNA vaccine



Synthetic peptides

- A1, KSIRIGPGQTFYA
- A2, KSVRIGPGRVLYT
- A3, TRKSIHIGPGRAFYTTEI
- A4, TSITIGPGQVFYR
- A5, FPVRPQVPLRPMTYK
- A6, HCQVCFMTKGLGISYG
- A7, SFNCGGEFFYCNS
- A8, VERYLKDQQLL
- A9, RLIDLLLIAKR
- A10, GEIYKRWILGLNKIVRMYS
- A11, KIRLRPGGNKKYKLR
- A12, SPAIFQSSMTK

図 2 抗体価測定

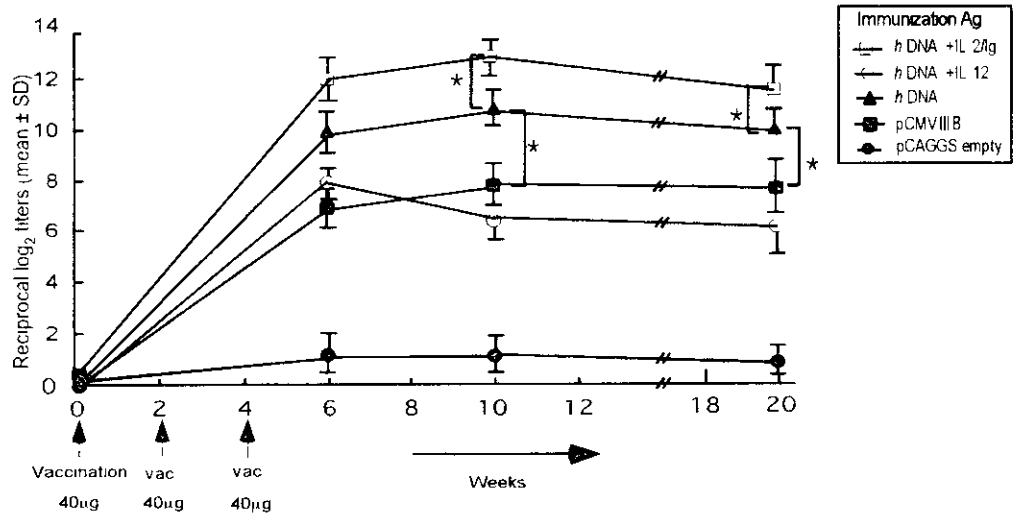


図 3 ペプチドに対する抗体価測定

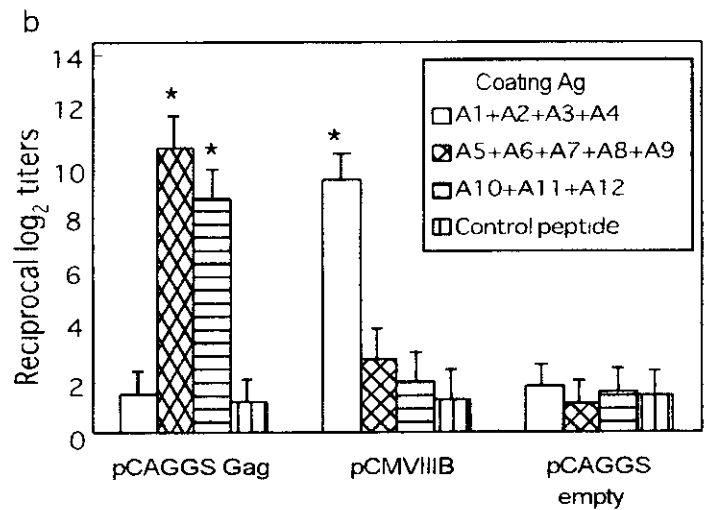
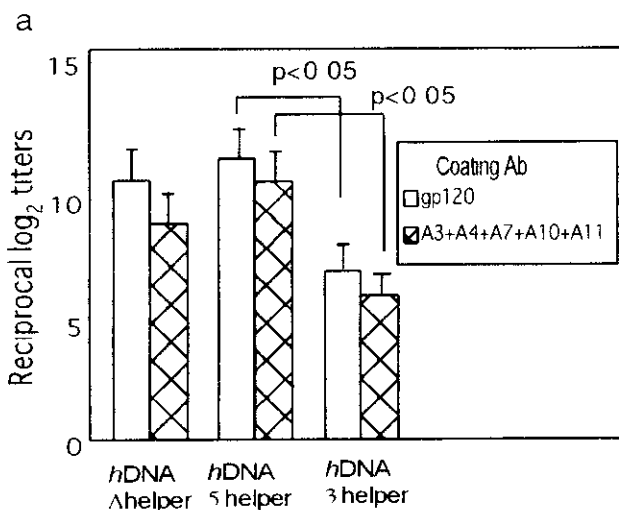


図4 各抗原に対する足蹠腫脹反応

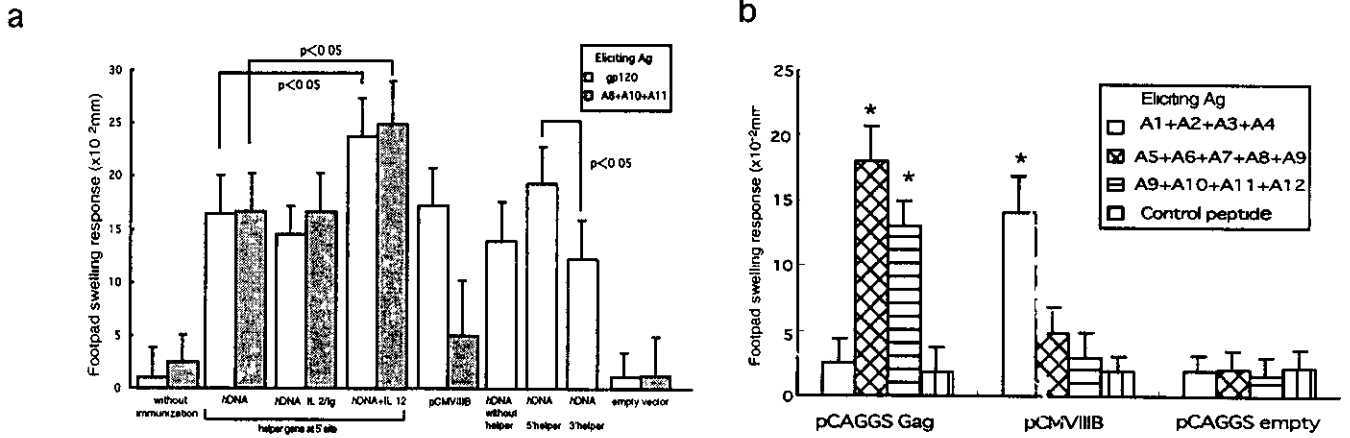


図5 各抗原に対するIFN- $\gamma$ 産生細胞数の検討

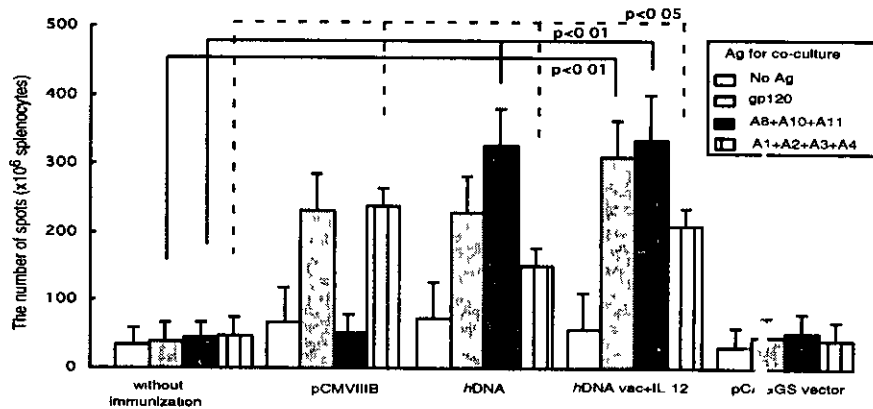


図6 ICCS法によるIFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>細胞数

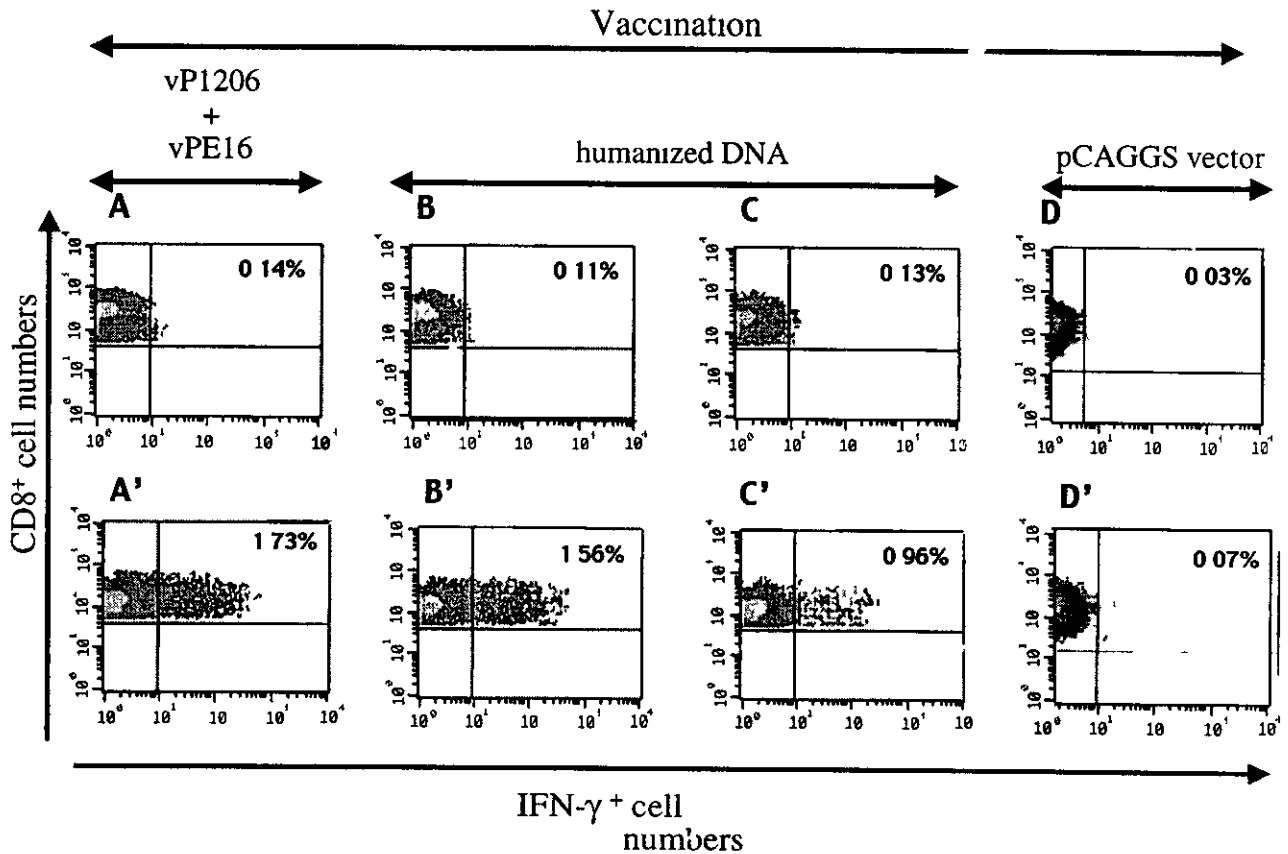
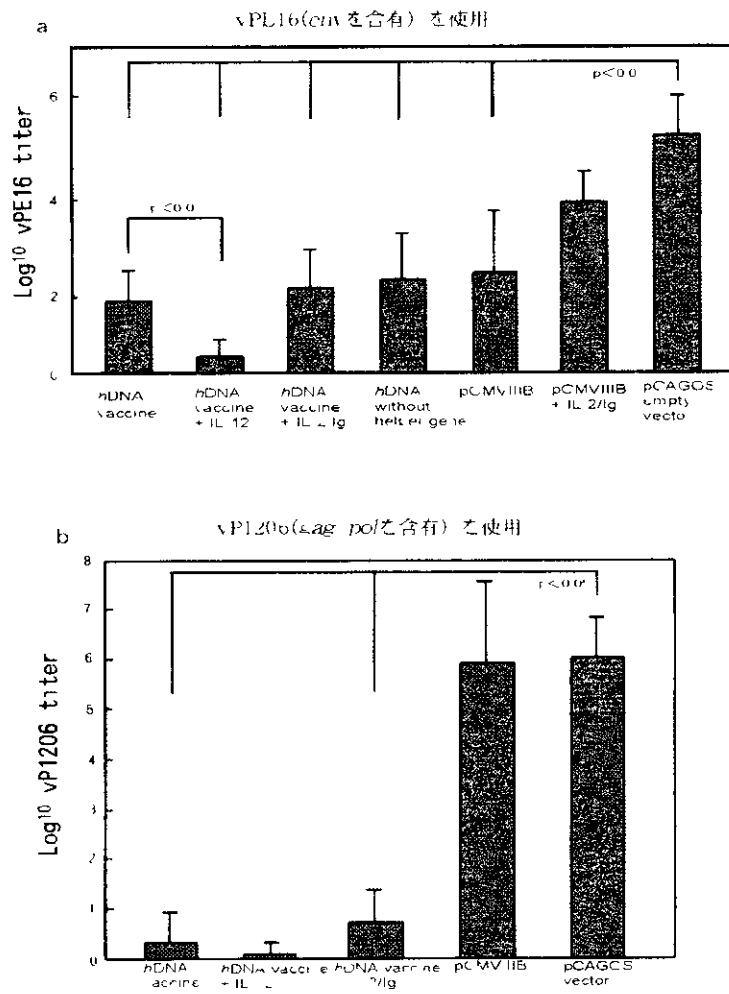


図7 in vivoにおけるHIV遺伝子を含むワクチニアウイルスchallengeの実験



## 細胞性免疫誘導型エイズワクチン開発の為に CTL 誘導因子の解明

分担研究者 滝口雅文 熊本大学エイズ研究センター・ウイルス制御分野 教授

研究要旨 HIV-1 が感染した細胞を確実に排除できる細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を誘導するワクチンの作製が臨まれるか、HIV-1 は様々な方法で CTL からの攻撃から逃避しており、これらの逃避機序を回避する CTL を誘導できるワクチンの開発には、CTL からの逃避機序を解明するとともに逃避機序を回避する方法を検討する必要がある。まず我々は、新しい HIV-1 の細胞性免疫からの逃避機序を明らかにすることを試みたところ、HIV-1 特異的 CTL の高親和性 TCR が不適当な抗原認識をすることにより、HIV-1 感染細胞を認識できなくなる機序を明らかにした。同じ HLA-B\*3501 分子によって提示される、同じ HIV-1 ペプチドエピトープを認識する 2 種類の CTL クローンを作成した。これらのクローンの一つは、ウイルス感染細胞を傷害したか、他方は傷害を示さなかった。ウイルス感染細胞を傷害したクローンと比べてウイルス感染細胞を傷害しなかったクローンの TCR の結合能ははるかに高く、不適当な TCR 結合能が細胞傷害性機能等の機能障害に関与していることが示唆された。このような、高親和性 TCR を持った CTL を誘導しないワクチン開発の必要性が必要かもしれない。

### A 研究目的

HIV-1 の CTL からの逃避機構の解明は、どのような細胞性免疫を誘導するワクチンを作成するかを検討する上でも、きわめて重要である。HIV-1 の CTL からの逃避の機序としては、Nef による HLA クラス I 抗原の downregulation による CTL の認識障害、末梢の HIV-1 特異的 T 細胞の成熟・分化段階での異常アポトーシスへの高感受性、あるいは HIV の CTL エピトープ部位の変異による CTL が認識できなくなることなどが考えられている。今回我々は新たな HIV-1 の CTL からの逃避機序の可能性について検討した。

### B 研究方法

HIV-1 Pol 448-456 由来のペプチド特異的、HLA-B\*3501 拘束性の CTL クローンである CTL589 と CTL55 を作製した。これらの CTL クローンの細胞傷害活性を、HLA-B\*3501 を発現している細胞を標的細胞として用いて調べた。標的細胞は、ペプチドを

パルスしたものの、HIV-1 Pol を組み込んだワクチンにウイルスを感染させたもの、HIV-1 LAI 株を感染させたものをそれぞれ UICr で標識して用いた。またこれらのクローンのサイトカイン (IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ ) 産生能をこれらの標的細胞を刺激細胞として用いて、6 時間後に細胞内サイトカインを抗体で染色し、フローサイトメトリーで解析する事により測定した。

HIV-1 Pol 448-456 と HLA-B\*3501 分子を用いて以前に報告してあるようにテトラマーを作成した (Tomiyama et al. Eur J Immunol 30:2521-2530, 2000)。このテトラマーと抗 CD8 抗体を用いてフローサイトメトリーを用いて HIV-1 慢性感染症患者由来の末梢血リンパ球中の特異的 CD8 T 細胞を解析した。また、CTL クローンの TCR と HLA-B\*3501 とペプチドの複合体との結合能をテトラマーを用いて測定した。

(倫理面への配慮)

HIV-1 感染者の末梢血リンパ球を本研究に使用することはインフォームドコンセントにより確認し

た。また、その研究成果発表においては、各個人が識別できないように配慮をした。

### C. 研究結果

HIV-1 Pol 由来のペプチド Pol1448-456 は、感染細胞内でプロセッシングされ、HLA-B\*3501 分子に提示される T 細胞エピトープであることを以前に明らかにした。このペプチドを用いて作製した HLA-B\*3501 テトラマーを使って、特異的 CD8T 細胞を検出することができた HIV-1 慢性患者の末梢血単核球から (図 1)、ペプチド刺激によって CTL クロンの樹立を試みたところ、顕著な機能的相違を示す 2 つの CTL クローンが樹立できた。CTL589 と CTL55 は、共に Pol ペプチドをパルスした標的細胞に対してほぼ同程度の細胞傷害活性 (図 2) とサイトカイン産生を示した。しかし、CTL589 は、HIV の Gag-Pol を挿入した組換え型ワクシニアウイルス感染細胞、HIV-1 感染細胞のいずれに対しても細胞傷害活性とサイトカイン産生を示したが、CTL55 は、ウイルス感染細胞に対してはいずれの活性も認められなかった (図 3)。どちらのクローンも Pol ペプチドを結合させた HLA-B\*3501 テトラマーに特異的に結合したことから、2 つの CTL クローンの抗原特異性が確認された。

一方、HLA テトラマーに対する結合活性をフローサイトメトリーを用いて解析したところ、CTL55 の方が、CTL589 と比べてより強く HLA テトラマーに結合することが明らかとなった (図 4)。またこれらの CTL クローンの TCR の遺伝子解析をおこなったところ、CTL55 と CTL589 は異なる TCR を用いていた。

### D. 考察

我々は、HIV-1 エピトープに特異性を有するにも関わらず、HIV-1 感染細胞を排除できない CD8T 細胞を HIV 感染患者の末梢血より見いだした。このことは、HIV-1 感染患者において、CTL が HIV-1 感染細胞を完全に排除できない新たな機序を示唆している。興味深いことに、ウイルス感染細胞を認識し細胞傷害活性を示さ

なかった CTL クローンは高親和性の TCR を保有していた。このことから、HIV-1 の細胞性免疫からの逃避機序に、TCR の高親和性によるものがある可能性が示唆された。今後 HIV-1 感染細胞に対して機能を示さないこのクロンの詳細な機序の解析をおこなうよいである。また HIV-1 感染者内でこのような機序がどれほど HIV-1 の免疫逃避にかかわっているかの明らかにする必要である。

### E. 結論

HIV-1 慢性感染患者から、同じ HLA クラス II 分子によって提示される、同じ HIV-1 ペプチドエピトープを認識する 2 種類の CTL クローンを作成し、これらのクローンの一つは、ウイルス感染細胞を傷害したが、他方は傷害を示さなかった。ウイルス感染細胞を傷害したクローンと比べてウイルス感染細胞を傷害しなかったクローンの TCR の結合能ははるかに高く、不適当な TCR 結合能が、細胞傷害性機能等の機能障害に関与していることが示唆された。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Fukada K., Tomiyama H., Wasi C., Matsuda T., Kusagawa S., Sato H., Oka S., Takebe Y., and Takiguchi M. Cytotoxic T Cell Recognition of HIV-1 Cross-Clade and Clade-Specific Epitopes in HIV-1-infected Thais and Japanese. *AIDS*. 16; 701-711, 2002.
- 2) Fukada K., Sobao Y., Tomiyama H., Oka S., and Takiguchi M. Functional Expression of the Chemokine Receptor CCR5 on Virus Epitope-Specific Memory and Effector CD8+ T Cells. *J. Immunol.* 168; 2225-2232, 2002.
- 3) Tomiyama H., Matsuda T., and Takiguchi M. Differentiation of Human CD8+ T Cells from a Memory to Memory/Effector Phenotype. *J. Immunol.* 168; 5538-5550, 2002.

4) Tomiyama H, Akari H, Adachi A, and Takiguchi M Different effects of Nef-mediated HLA class I down-regulation on HIV-1-specific CD8+ T cell cytolytic activity and cytokine production J Virol 76, 7535-7543, 2002

平成14年12月4日～6日

5) Ueno T, Tomiyama H, and Takiguchi M Single T cell receptor-mediated recognition of an identical HIV-derived peptide presented by multiple HLA class I molecules J Immunol 169, 4961-4969, 2002

6) 上野貴将、滝口雅文 エピトープペプチド・HLA 四量体 (HLA テトラマー) を用いた HIV 特異的 T 細胞の解析 第25回日本分子生物学会(横浜)平成14年12月11日～14日

## 2 学会発表

1) Tomiyama, H, Akari, H, Adachi, A, Takiguchi, M Different effects of Nef mediated HLA class I down-regulation on HIV-1-specific CD8+ T cell cytolytic activity and cytokine production XIV International AIDS Conference in Barcelona, Spain July 7-12, 2002

2) Fukada, K, Tomiyama, H, Wası, C, Matsuda, T, Kusagawa, S, Sato, H, Oka, S, Takebe, Y, and Takiguchi, M Cytotoxic T cell recognition of HIV-1 cross clade and clade-specific Epitopes in HIV-1-infected Thais and Japanese XIV International AIDS Conference in Barcelona, Spain July 7-12, 2002

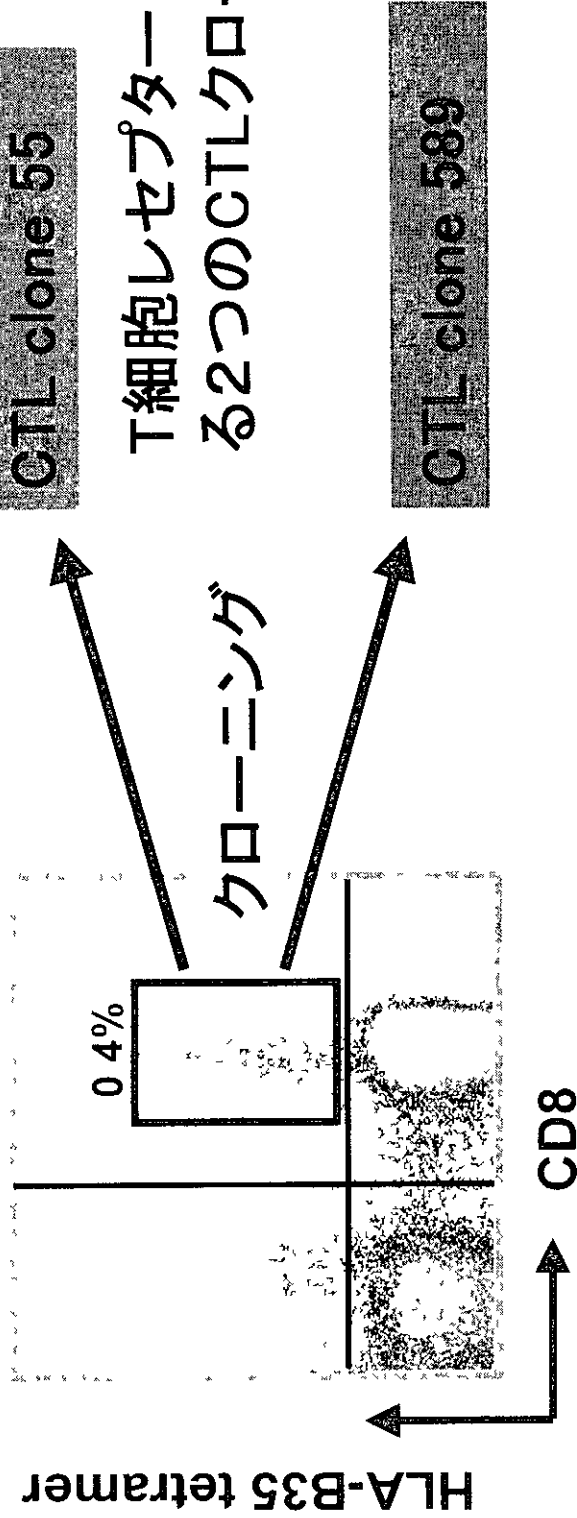
3) 上野貴将 富山宏子、藤原守 滝口雅文 HIV による免疫逃避機構の新たな可能性 第50回日本ウイルス学会(札幌)平成14年10月16日～18日

4) 滝口雅文 HIV 1 特異的 CD8 T 細胞からの HIV 1 の逃避記序 第16回日本エイズ学会(名古屋)平成14年11月28日～30日

5) 上野貴将 富山宏子、藤原守、滝口雅文 HLA テトラマーに高親和性を示す HIV 特異的 CTL クローンの解析 第32回日本免疫学会(東京)

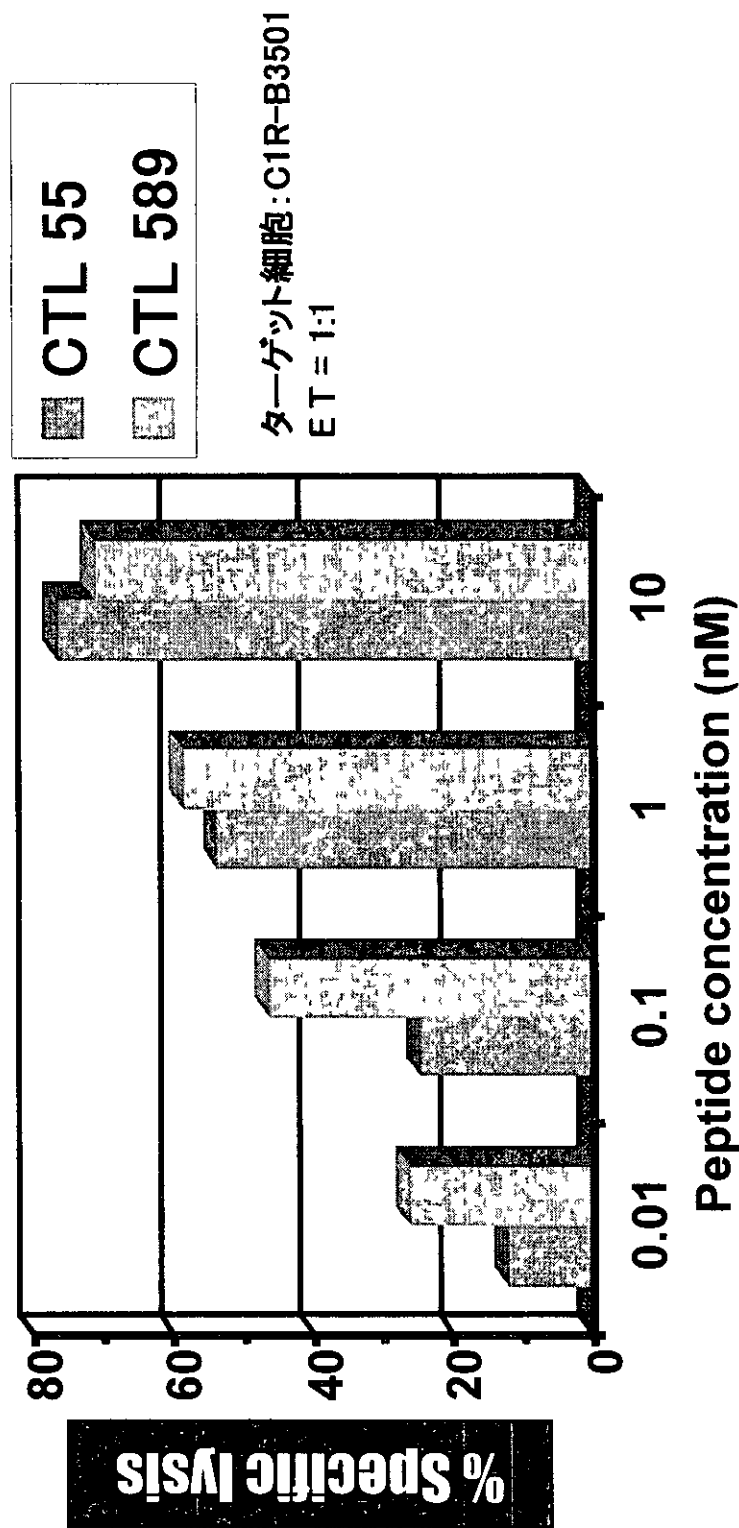
# 図1. HIV特異的CTLクローンの樹立

HIV感染者の末梢リンパ球



T細胞レセプター (TCR) が異なる2つのCTLクローンを樹立

図2. ペプチドをパルスした細胞  
 に対する傷害活性





# 図3. ウイルス感染細胞に対する傷害活性

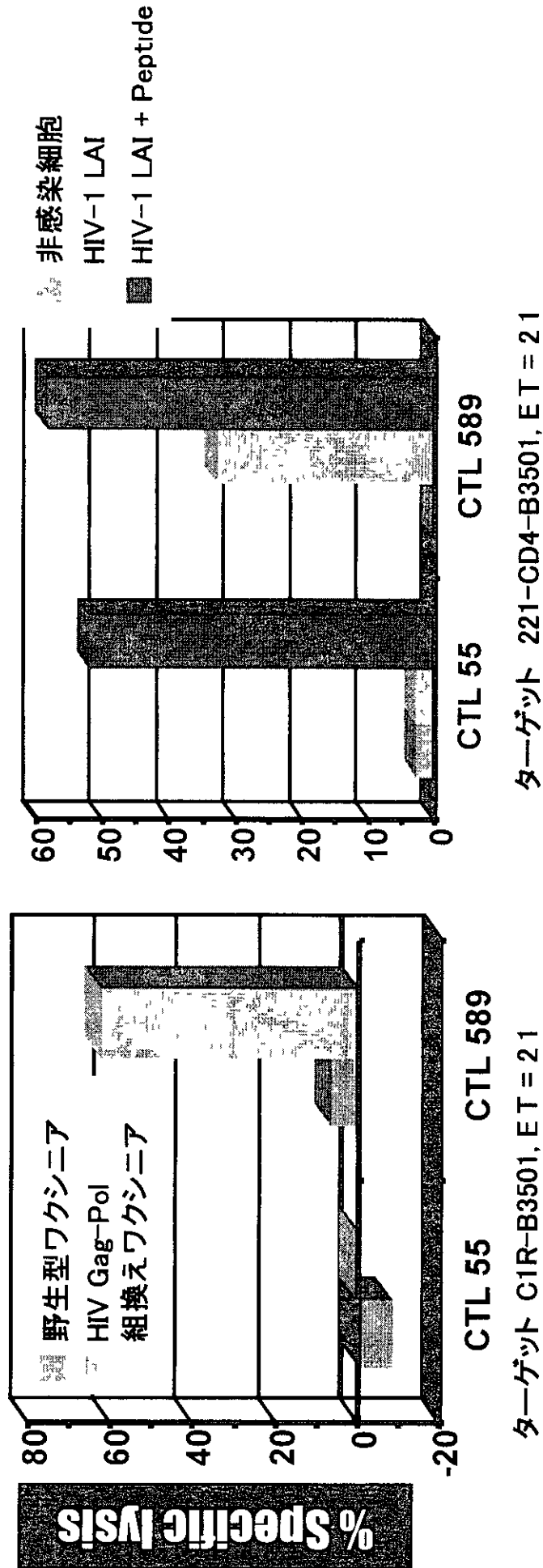
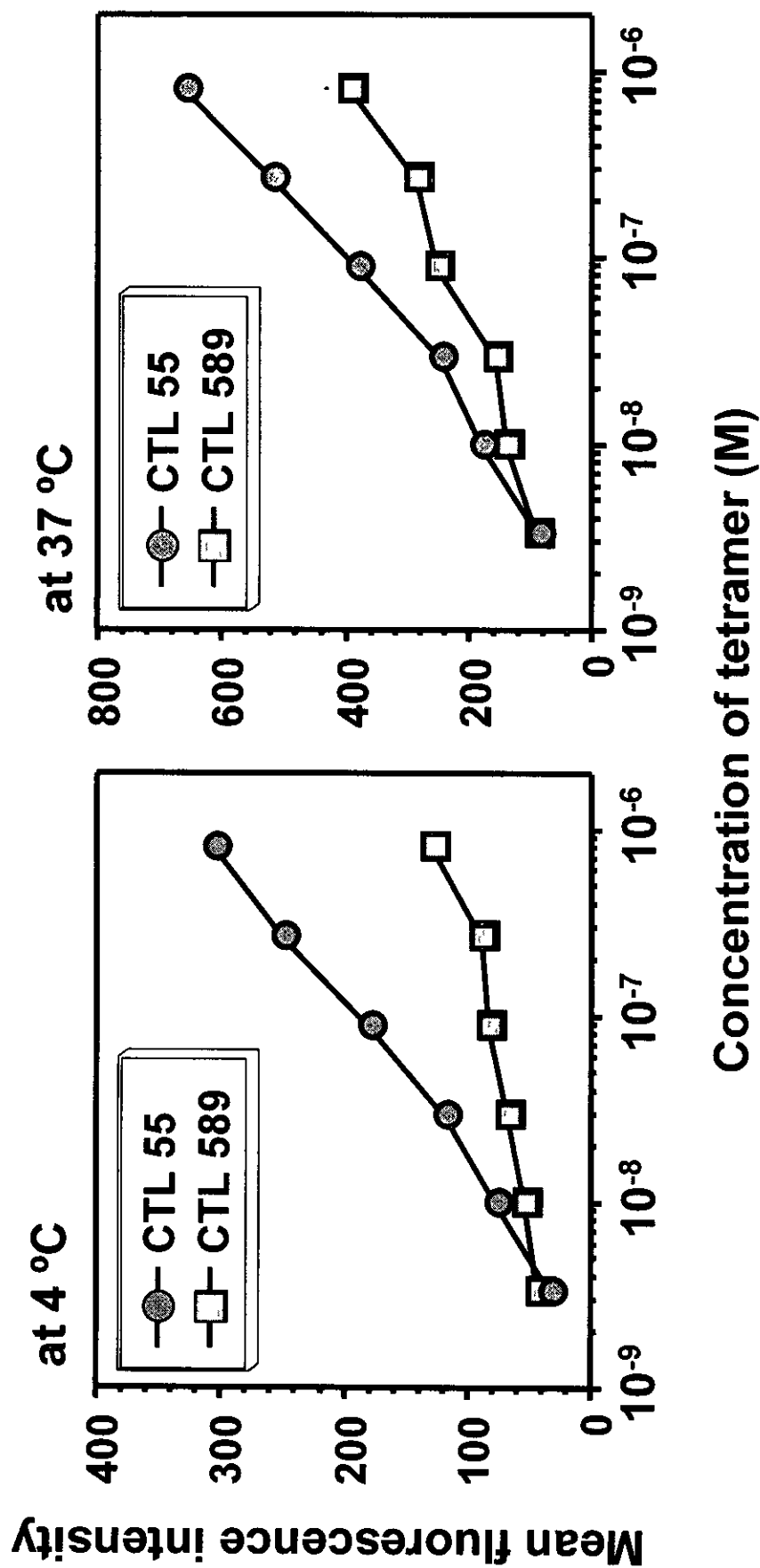


図4. HLA-B\*3501テトラマーに対するアブイニティー



## HIV-1 エントリーインヒビターの研究開発

分担研究者 杉村 和久 鹿児島大学 教授 工学部生体工学科

研究協力者

伊東 祐二 鹿児島大学工学部生体工学科

橋口 周平 鹿児島大学工学部生体工学科

中島 敏博 (財)化学及血清療法研究所

馬場 昌範 鹿児島大学医学部難治性ウイルス疾患研究センター

### 研究要旨

平成 14 年度はこれまでのアプローチとは異なる 2 種の手法で HIV-1 エントリーインヒビターの単離を試みた。即ち、HIV-1 感染に重要な役割を果たすと推定される CCR5 のループ 2 の環状構造を模したペプチド、CCR5-L2 を合成した。HIV-1 感染を阻害する 2D7 単クローン抗体が CCR5-L2 と特異的に結合することより、この CCR5-L2 を認識するヒト抗体を作製すれば HIV-1 感染を阻害する抗体を単離できる可能性が期待された。20 クローン以上の CCR5-L2 特異的ヒト一本鎖抗体の単離を達成したか、HIV-1 感染の阻害活性を検出てきなかった。CCR5-L2 自身にも HIV-1 感染阻害の活性は見いだせなかった。

一方、CCR5 に対する抗体ファージを単離する方法として、CCR5 を強制発現させた細胞株（CCR5<sup>+</sup>293 細胞）と反応するが、293 細胞には結合しないクローンを探索するという方法が考えられる。CCR5<sup>+</sup>293 細胞に結合するが CCR5<sup>-</sup>293 細胞には結合しないファージクローンの単離を、CCR5<sup>+</sup>293 細胞に結合させたのち、37°C でインキュベートし、CCR5 特異的に結合したファージをエントサイトーシスさせてからクローンを回収するという方法を試み、細胞表面に発現する CCR5 に特異的に結合すると推定されるクローンの単離を達成した。

### A 研究目的

HIV-1 エントリーインヒビターの研究開発のために、私ともはペプチドを提示するファージライブラリーを用い ペプチドのエントリーインヒビターの単離を試みた（1、2）。しかし、ファージクローンでは HIV-1 の感染

を阻害するクローンを単離することかてきるものの、合成ペプチドで、感染阻害活性を再現することはできなかった。このため、新たにヒト抗体を提示するファージライブラリーを用いた HIV-1 エントリーインヒビターを開発する新しい研究を開始した。

この目的のために私どもは 20 名のヒト健康人の末梢血リンパ球を用いて、大規模な non-immune human single chain Fv (scFv) library を 4 種類 ( $V_{\gamma}$  と  $V_{\lambda}$ ,  $V_{\gamma}$  と  $V_{\kappa}$ ,  $V_{\mu}$  と  $V_{\gamma}$ ,  $V_{\mu}$  と  $V_{\kappa}$ ) 作製することを達成した (3)。HIV-1 の感染を阻害するワクチン開発が重要視されている。しかし HIV-1 は高頻度に変異するため、ワクチン接種がかえって悪性度の高い HIV-1 の出現頻度と速度を促進してしまう可能性があることも示唆されている。一方、感染阻止活性のあるヒト抗体の受動免疫による治療では、HIV-1 のバックファイアが起きた場合、その投与を中止し、新たな抑制活性のある抗体を投与することができ、ワクチンで起こりうる深刻な悪影響を避けることができる。また、その他の薬剤との併用も容易である。

平成 12 年度より、私どものヒト一本鎖抗体を提示するファージディスプレイライブラリーを用いて CCR5 に特異的なヒト scFv の単離を試みてきたが (2、4)、本年度は新しい手法、即ち、1) CCR5 陽性 293 細胞を用いた細胞パンニング法、および 2) CCR5 合成ペプチド、CCR5-L2(168-178)を用いたビーズパンニング法により試み、1) の手法により 2 つの CCR5 特異的ファージクローンの単離に成功した (5)。

## B 研究方法

### 1 抗体と合成ペプチド

マウス抗ヒト CCR5 モノクローナル抗体 (2D7 PharMingen)、ビオチン化マウス抗 M13 抗体 (Amersham Pharmacia), Ultravidin-

FITC (Leinco Technologies Inc) はそれぞれ購入した。

CCR5 の細胞外第二ループの配列 (Arg-168 から Cys-178) を含む合成ペプチド CCR5-L2 (biotin-GGCAGRSQKEGLHYTCS) を合成した (6)。ペプチド内の disulfide bond は MALDI TOF-MS で確認した。

### 2 ヒト一本鎖抗体提示 M13 ファージライブラリーとパンニング

私どもが作製したヒト一本鎖抗体を提示した M13 ファージライブラリーを用いた (3)。パンニングは 2 種類の方法を試みた。

1) 結合ファージを細胞内に取り込ませる細胞表面パンニング法 (図 1) T Heitner らの方法に準じた (7)。具体的には、scFv ファージライブラリー ( $1 \times 10^{12}$  Transforming units [TU]/ml) と CCR5<sup>-</sup>293 細胞 ( $1 \times 10^7$  個) を培地中で反応させ、CCR5<sup>-</sup>293 細胞上の表面分子に結合するファージを遠心により除去した (4°C、60 分間)。以上の操作を 2 回行った後、その上清を CCR5<sup>-</sup>293 細胞 ( $1 \times 10^7$  個) と混合し、プレート上に培養した CCR5<sup>+</sup>293 細胞 (90% confluence) と反応させた (4°C、2 時間)。反応後、上清をアスピレートし、冷した培地で 6 回洗浄した。次に 37°C に温めておいた培地を加え、そのプレートを 37°C、CO<sub>2</sub> インキュベーター内に 30 分間静置させ、CCR5 に結合したファージのエンドサイトーシスを誘導させた。次に、internalize しなかった細胞表面に結合したファージを 0.1M Glycine-HCl (pH 2.2) を用いて洗浄・除去した (4°C、3 回)。プレート上のファージを含む CCR5<sup>+</sup>293 細胞を培地で 1 回洗浄後、