

- 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, 66 291-298, 2002
- 2) Maeda, Y, M Makino, D C Crick, S Mahapatra, S Srisungnam, T Takii, Y Kashiwabara, and P J Brennan Novel 33-Kilodalton Lipoprotein from *Mycobacterium leprae* Infect Immunity, 70(8) 4106-4111, 2002
 - 3) Shimokubo, S, S Wakamatsu, Y Maeda, M Baba, and M Makino Fusion of Mature Dendritic Cells and Human T-Lymphotropic Virus Type-I-Infected T cells its Efficiency as an Antigen-Presenting Cell Virology, 301 13-20, 2002
 - 4) Hashimoto, K, Y Maeda, H Kimura, K Suzuki, A Masuda, M Matsuoka, and M Makino *Mycobacterium leprae* Infection in Monocyte-Derived Dendritic Cells and Its Influence on Antigen-Presenting Function Infect Immunity, 70(9) 5167-5176, 2002
 - 5) Umemura, M, H Nishimura, T Yajima, W Wajjwalk, T Matsuguchi, M Takahashi, Y Nishiyama, M Makino, Y Nagai, and Y Yoshikai Overexpression of interleukin-15 prevents the development of murine retrovirus-induced acquired immunodeficiency syndrome FASEB, 16 1755-1763, 2002
 - 6) Nomaguchi, H, T Mukai, F Takeshita, M Matsuoka, Y Maeda, T M Aye, N Jahan, Y Yogi, M Endo, Y Sato, and M Makino Effect of hsp65 DNA vaccination carrying immunostimulatory DNA sequences (CpG motifs) against *Mycobacterium leprae* multiplication in mice Int J Lepr Other Mycobact Dis, 70(3) 182-190, 2002
 - 7) 牧野正彦 ハンセン病—Hansen's Disease, Leprosy 小早川隆敏編, 新版 感染症マニュアル, 176-179, 2002
 - 8) 牧野正彦 らい菌と樹状細胞の相互作用 臨床免疫 38(5), in press, 2002
- 2 学会発表
- 1) 前田百美, 柏原嘉子, 牧野正彦 らい菌のリポ蛋白をコートする遺伝子の発現とその機能的役割 第75回日本細菌学会総会 2002年4月 横浜
 - 2) 牧野正彦, 前田百美, 松岡正典 らい菌と正常健常者末梢単球由来樹状細胞の相互作用 第75回日本細菌学会総会 2002年4月 横浜
 - 3) 前田百美, 鈴木幸一, 川津邦雄, 牧野正彦 らい菌のリポ蛋白の発現とその生理的役割 第75回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2002年5月 三島
 - 4) 鈴木幸一, 武下文彦, 中田 登, 川津邦雄, 松岡正典, 石井則久, 牧野正彦 ファコゾーム・ライソゾーム融合阻止に関わる因子 TACO の宿主細胞内らい菌潜伏における役割 第75回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2002年5月 三島
 - 5) 牧野正彦, 前田百美, 儀同政一 らい菌菌膜の細胞性免疫誘導能の検討, 第75回日本ハンセン病学会総会 学術大会 2002年5月 三島
 - 6) 武下文彦, 向井 徹, 牧野正彦 らい菌 Fibronectin Attachment Protein の免疫原性およびその宿主細胞侵入抑制効果 第75回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2002年5月 三島
 - 7) 向井 徹, 武下文彦, 牧野正彦 経鼻腔粘膜ワクチンの開発 第75回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2002年5月 三島
 - 8) 鈴木幸一, 前田百美, 中田 登, 松岡正典, 牧野正彦 DNA マイクロアレイを用いたらい菌感染細胞の遺伝子発見プロファイリング 第75回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2002年5月 三島
 - 9) 中田 登, Khairul A Hashim, 甲斐雅規, 鈴木幸一, 柏原嘉子, 前田伸司, 牧野正彦 大腸菌—抗酸菌シヤトルコスミトを用いたらい菌ゲノムDNAハンクの作製と遺伝子解析 第75回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2002年5月 三島
 - 10) 甲斐雅規, 中田 登, Patrick J Brennan, 牧野正彦 らい菌ゲノム上

に存在する2成分制御系
(ML2439-ML2440)の発現と機能解析
第75回日本ハンセン病学会総会 学
術大会 2002年5月 三島

- 11) Makino, M, and Y Maeda Dendritic cell-mediated production of IL-12 and IFN- γ by *Mycobacterium leprae*-derived cell membrane US-Japan Cooperative Medical Science Program 37th Tuberculoid and Leprosy Research Conference, Kyoto, August 21-23, 2002
- 12) Maeda, Y, Y Kashiwabara, K Suzuki, D C Crick, P J Brennan, and M Makino Characterization of *Mycobacterium leprae* 33 kD lipoprotein and its immunological significance US-Japan Cooperative Medical Science Program 37th Tuberculoid and Leprosy Research Conference, Kyoto, August 21-23, 2002
- 13) Nakata, N, K A Hashim, M Kai, K Suzuki, M Matsuoka, S Maeda, Y Kashiwabara, and M Makino Construction and analyses of a shuttle cosmid library of *Mycobacterium leprae* (Thai 53) US-Japan Cooperative Medical Science Program 37th Tuberculoid and

Leprosy Research Conference, Kyoto, August 21-23, 2002

- 14) Makino M Monocyte-derived dendritic cell-mediated antigenicity of *M leprae* subcellular fractions Pre workshop, 16th International Leprosy Congress, 4-9 August, 2002, Salvador, Bahia, Brasil
- 15) Maeda M, M Gidoh, N Ishii, and M Makino Dendritic cell-mediated production of IL-12 and IFN- γ by *Mycobacterium leprae*-derived cell membrane 16th International Leprosy Congress, 4-9 August, 2002, Salvador, Bahia, Brasil
- 16) Maeda Y, M Makino, D C Crick, Y Kashiwabara, and P J Brennan A novel 33 KD Lipoprotein Antigen from *Mycobacterium leprae* 16th International Leprosy Congress, 4-9 August, 2002, Salvador, Bahia, Brasil

H 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|----------|----|
| 1 特許取得 | なし |
| 2 実用新案登録 | なし |
| 3 その他 | 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サ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 (Cl64) ウイルスは、サルでの増殖が病原性 SHIV に比肩し得る程良好であるが、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で、接種後 2 週目以降回復してくる特異な病態を示す。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要であると考えられる。これに対し、Cl64 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特定するために、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 *in vitro* に於ける増殖性を調べた。その結果、SHIV-C2/1 は常に増殖の立ち上がり早く、ピークは SHIV-89 6 と同等かそれ以上を示した。このことより、SHIV-C2/1 の方が CyPBMC に対する感染性が強いと考えられ、*in vivo* における増殖の良さの一因になっていると思われる。一方、組換えウイルスによる CyPBMC 感染実験では、実験毎のウイルス増殖の変動が大きく、再現性に問題が有ることが判明した。

Cl64 は、比較遺伝子解析より明らかになった Env 534 および Env 669 の 2 個所に焦点を当てて、6 種の組換えクローンを作製した。これら組換えクローンの解析には、HSC-F 細胞感染時のアポトーシス誘導能の差を指標にすることを計画している。

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、サルで継代を繰り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。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。研究成果が ヒトにおける HIV の病原性を考える上でも示唆を与えてくれるものと期待している。

我々は、SHIV-C2/1 を非病原性親株 SHIV-89 6 および他の病原性 SHIV (SHIV-HXBc2P3 2 等) と比較遺伝子解析し、Env C2 および V3 領域に病

原性ウイルス間で共通する変異を見出した。SHIV-C2/1 の場合は、N279D および R308E のアミノ酸変異が存在する。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か知られているので、ウイルスの宿主域の変化を伴っている可能性が有る。病原性 SHIV-C2/1 はサル (*in vivo*) で非常に良好に増殖するのに対して、非病原性 SHIV-89 6 は数桁増殖が悪いことから、高い増殖能の獲得がウイルスの病原性発現に必要であると考えられる。

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 (Cl64) ウイルスは、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 に比肩し得る程良好であるか、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で 接種後 2 週目以降回復してくる特異な病態を示す。ゲノムシーケンスを病原性分子クローン SHIV-C2/1 KS661 および SHIV-KB9 と比較すると、Cl 64 に特異的な塩基変化が 9 箇所見出された (Fig 5)。注目されるのは アミノ酸変異を伴

う Env T534A および Env N669Y のは 2 個所である。両方共 gp41 の ectodomain、つまり細胞膜表面側に位置し、ヒトでは 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・エピトープであると同定されている。SHIV-C2/1 等の病原性 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が、Cl64 の場合は免疫エスケープ機能の方の弱体化あるいは欠損が起きていると考えられる。また、LTR U3 の転写因子結合領域 (-37) に有る変異 (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。

本年度は、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昨年度作製した病原性 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 *in vitro* に於ける増殖性を検証した。これと平行して、Cl64 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、Env gp41 領域の 2 個所の変異を中心に SHIV-C2/1 との組換えウイルスを作製した。

B 研究方法

SHIV-C2/1 と Cl64 間の種々の組換えウイルス作製は、*in vitro* mutagenesis 法、或いは既知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、点突然変異導入クローン 3 種 (Cl64(A534T)、Cl64(Y669N)、Cl64(A534T、Y669N))、制限酵素部位での組換えクローン 3 種の合計 6 種を作製した (Fig 5)。

SHIV-C2/1 x SHIV-89 6 および SHIV-C2/1 x Cl64 組換えクローン共に、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) を用いたり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。ウイルス感染実験には、Ficoll 法により分離したカニクイザル PBMC (CyPBMC)、M8166 ヒト T 細胞株、HSC-F カニクイザル T 細胞株を用いた。感染量は、殆どの場合、m.o.i が 0.1 になるように設定した。

(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 x SHIV-89 6 の 8 クローン、SHIV-C2/1 x Cl64 の 6 クローン共に、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感染性を示し、その力価は 10^4 から 10^5 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 (Fig 2 と Fig 5)。M8166 細胞での増殖性は、SHIV-C2/1 と SHIV-89 6 間で顕著な差は無かった (Fig 3)。

病原性 SHIV-C2/1 のサル個体 (*in vivo*) での増殖は、非病原性 SHIV-89 6 に比へ数桁高いことが観察されているが、この現象が *in vitro* で再現されるか否かをカニクイザル PBMC (CyPBMC) を用いて検証した。SHIV-89 6 と SHIV-C2/1 を用いた感染実験の結果、SHIV-C2/1 は常に増殖の立ち上がり早く、ピークは SHIV-89 6 と同等かそれ以上を示した (Fig 4)。一方、組換えウイルスによる CyPBMC 感染実験では、実験毎のウイルス増殖の変動が大きく、再現性に問題が有ることが判明し、明確な結論を出すに至らなかった。なお、結果の一例を、組換えウイルスの増殖性を + の数で表して、Fig 2 に示した。このカニクイザル PBMC に代わる系として、カニクイザルの CD4 陽性リンパ細胞株 (HSC-F) を用いた実験系の構築を計画し、現在実験を進行中である。

病原性 SHIV と Cl64 の *in vitro* に於ける挙動の違いが、HSC-F 細胞株感染時に観察できることが予備実験にて明らかになった。病原性 SHIV はアポトーシスを起こし、Cl64 は起こさない。実験条件が確立できれば、この現象を指標として組換えクローンの解析を行ってゆく予定である。

D 考察

SHIV-C2/1 および SHIV-89 6 の CyPBMC への感染実験より、SHIV-C2/1 は常に速やかな増殖が観察され、SHIV-89 6 は増殖の立ち上がり遅れる傾向があることが判明した。ピーク時のウイルス産生は両者同程度、或いは SHIV-C2/1 が上回った (Fig 4)。このことから、SHIV-89 6 より SHIV-C2/1 の方が CyPBMC に対する感染性が強いと考えられ、*in vivo* における増殖の良さの一因になっていると思われる。ただ、*in vitro* に於いては、*in vivo* 程の増殖差が生していないので、これ以外の因子の関与も考えられる。例えば、SHIV-C2/1 の方が免疫系からのエスケープ能が高いのかも知れない。一方、組換えウイルスによる CyPBMC 感染実験では、実験毎のウイルス増殖の変動が大きく、再現性に問題が有り、明確な結論を出すに

至らなかった。SHIV-C2/1 と SHIV-89 6 の増殖差が余り大きくないのも一因であるか、主な原因としては PBMC のリンパ球組成か実験毎に大きくハラついていることか考えられる。これを回避するために、より単純な系、SHIV の主標的であるカニクイザルの CD4 陽性リンパ細胞株のみを含む実験系の構築を計画した。ヒトとは異なり、カニクイザルの樹立細胞株は殆ど存在しないが、国立感染症研究所の明里博士より当該 HSC-F 細胞株を分与して頂き、現在実験を進行中である。

CI64 は、比較遺伝子解析より明らかになった Env 534 および Env 669 の 2 個所に焦点を当てて、CI64(A534T) = KS715、CI64(Y669N) = KS716、CI64(A534T, Y669N) = KS717 の 3 種の点変異導入クローンを作製した (Fig 5)。更に、他の領域の関与の可能性も検証するために、ゲノム 5' 半分を SHIV-C2/1 型にした KS689、Env 内の全ての CI64 特異的配列を SHIV-C2/1 型にした KS705、Env 534-Env 669 を除く Env 内の CI64 特異的配列を SHIV-C2/1 型にした KS719 の 3 種のクローンも作製した (Fig 5)。これら組換えクローンの解析には、HSC-F 細胞感染時のアポトーシス誘導能の差を指標にすることを主に考えている。

E 結論

病原性 SHIV-C2/1 のサル個体 (*in vivo*) での増殖は、非病原性 SHIV-89 6 に比べ数桁高いことが観察されているが、この現象が *in vitro* で再現されるか否かをカニクイザル PBMC (CyPBMC) を用いて検証した。その結果、SHIV-C2/1 は常に増殖の立ち上がりが高く、ピークは SHIV-89 6 と同等かそれ以上を示した。このことより、SHIV-C2/1 の方が CyPBMC に対する感染性が強いと考えられ、*in vivo* における増殖の良さの一因になっていると思われる。

病原性 SHIV はカニクイザル HSC-F 細胞にアポトーシスを起こすか、CI64 は起こさないことが観察できた。

本研究は京都大学ウイルス研究所の三浦智行助教授、速水正憲教授との共同研究である。

F 研究発表

1 論文発表

(1) Fujita, M, Sakurai, A, Yoshida, A, Miyaura, M, Koyama, A H, Sakai, K, and Adachi, A Amino acid residues 88 and 89 in the central hydrophilic region of human immunodeficiency virus type 1 Vif are critical for viral infectivity by enhancing the steady-state expression of Vif *Journal of Virology*, 77(2), 1626-32, 2003

2 学会発表

(1) Nakasone, T, Ami, Y, Sakai, K, Izumi, Y, Takahashi, E, Sasaki, Y, Takizawa, M, Suzaki, Y, Shinohara, K, and Honda, M SHIV-C2/1 KS661c vs cynomolgus monkey as a mucosal infection and a disease model for AIDS International Meeting on "Development of HIV/AIDS Vaccines targeting HIV-1 Subtype E", 2002

(2) Nakasone, T, Ami, Y, Sakai, K, Izumi, Y, Takahashi, E, Sasaki, Y, Takizawa, M, Suzaki, Y, Shinohara, K, and Honda, M SHIV-C2/1 KS661c vs cynomolgus monkey as a mucosal infection and a disease model for AIDS Japan-U S Cooperative Medical Science Program, 14th Joint Meeting of AIDS Panel, 2002

(3) 榎瀬良美、山本俊郎、宇賀神秀樹、横山京子、鈴木元、桑田岳夫、阪井弘治、高橋栄治 篠原克明、三浦智行、喜多正和、速水正憲 弱毒 SHIV 感染免疫ザルにおける早期の強毒ウイルス攻撃接種に対する防御効果 第 50 回日本ウイルス学会、2002 年

(4) 本多三男、仲宗根正、松尾和浩、網康至、泉泰之、染谷健二、滝沢万理、浜野隆一、海津雅彦、川原守、原敬志、吉野直人、篠原克明、佐々木裕子、高橋栄治、阪井弘治、堀端重男、兼清優、浜武牧子、山崎修道、山本直樹 HIV ワクチンの実用化に向けて サルからヒトへ 第 16 回日本エイズ学会、2002 年

(5) 喜多正和、榎瀬良美、宇賀神秀樹、横山京子、鈴木元、桑田岳夫、三浦智行、阪井弘治、高橋栄治、篠原克明、山本俊郎、今西二郎、速水正憲 IFN- γ 遺伝子組込み弱毒 SHIV のワクチン効果 第 16 回日本エイズ学会学術集会・総会、2002 年

G 知的所有権の取得状況

1 特許取得

(1) 後天性免疫不全症候群の非ヒト霊長類モデル (出願中)

(2) HIV 感染性クローンの樹立法 (出願中)

2 実用新案登録

該当無

3 その他

該当無

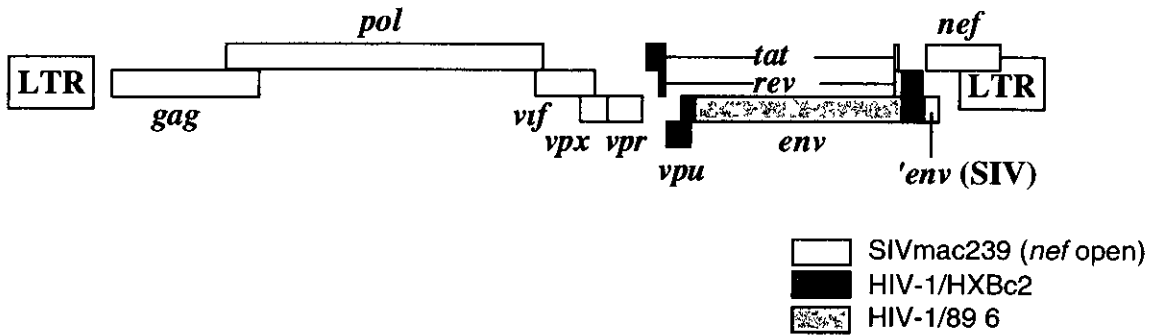


Fig 1 Genomic map of SHIV-C2/1 provirus

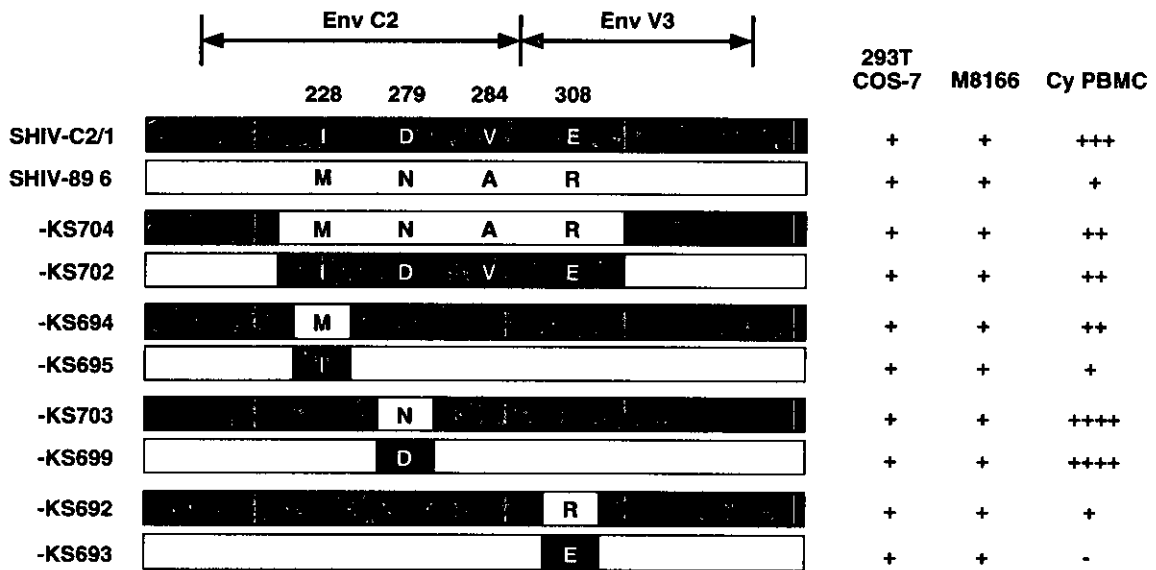


Fig 2 Recombinant clones between SHIV-C2/1 and SHIV-89 6

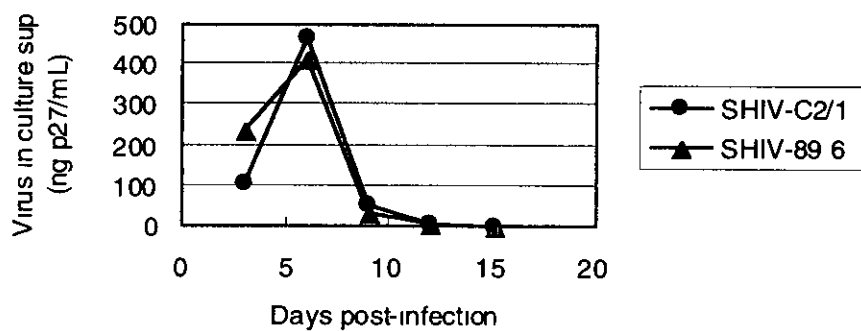


Fig 3 Growth kinetics of SHIV-C2/1 and SHIV-89 6 in M8166

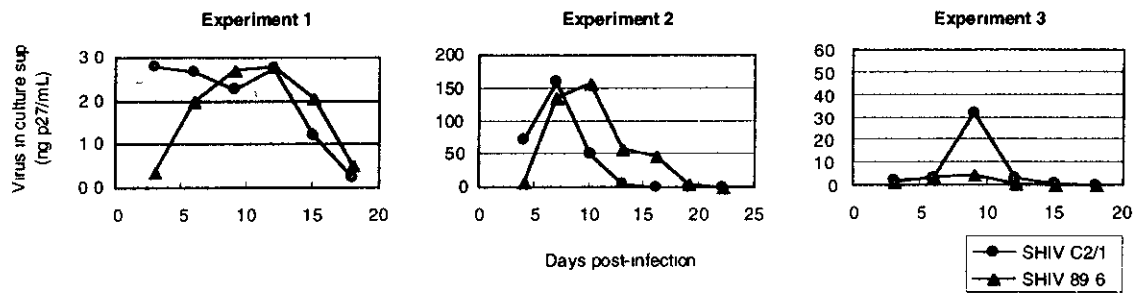


Fig 4 Growth kinetics of SHIV-C2/1 and SHIV-89 6 in cynomolgus monkey PBMC

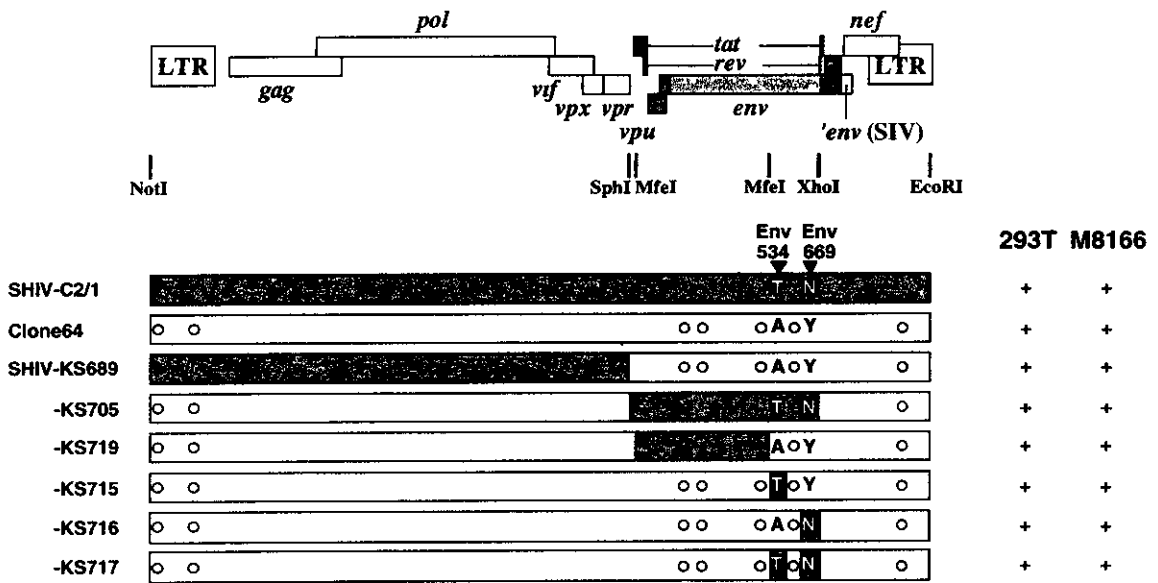


Fig 5 Recombinant clones between SHIV-C2/1 and Clone64

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、昨年度作製した HIV-1 感染受容体であるヒト CD4 および CXCR4 あるいは CCR5、さらにウイルスの発現に関わるヒト Cyclin T1 および MHC class II 転写活性化遺伝子 (CIITA) のトランスジェニック用の発現コンストラクト pUC/hCXCR4/hCyclinT1、pUC/hCIITA/hCD4 および pUC/hCyclinT1/hCCR5 を用いて、今年度はマイクロインジェクション法によるトランスジェニックラットの作製を行い、ヒト CD4、CCR5、CyclinT1 および CIITA を有した Founder ラットを得た。また、in vitro でヒトおよびラット細胞の宿主遺伝子発現の変化を検討し、HIV-1 感染早期ではヒト CyclinT1 の存在が感染細胞の宿主遺伝子発現の変化により深く関わっている可能性を示した。

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。本年度は昨年度作製した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用いて、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、ヒト HIV-1 感染関連遺伝子導入ラット細胞を用いて、HIV-1 に伴う宿主遺伝子の発現の変化を検討する。

B 研究方法

1 トランスジェニックラットの作製

導入用の遺伝子として、昨年度に作製した発現コンストラクト pUC/hCXCR4/hCyclinT1、pUC/hCyclinT1/hCCR5、pUC/hCIITA/hCD4 を用いた。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/hCXCR4/hCyclinT1 と pUC/hCIITA/hCD4 あるいは pUC/hCyclinT1/hCCR5 と pUC/hCIITA/hCD4 の組み合わせで等量づつ混和し、マイクロインジェクションし、産仔を得た。産仔は生後 3 から 4 週目に尾組織から DNA を抽出し、まず pUC 特異的プライマーによって PCR スクリーニングした。陽性であった検体について、それぞれの導入ヒト遺伝子特異的プライマーによって導入遺伝子の確認を行った。導入遺伝子の発現は、末梢血単核球から抽出した RNA の RT-PCR によって行った。

2 HIV-1 感染細胞宿主遺伝子発現の変化の検討

以前に本事業で作製したヒト CD4 と CXCR4 遺伝子導入ラット W31 細胞 (hCD4-hCXCR4/W31) とこの細胞にヒト CyclinT1 および/あるいは CIITA を含む発現ベクターをトランスフェクションした hCD4-hCXCR4-hCycT/W31、hCD4-hCXCR4-hCIITA/W31、hCD4-hCXCR4-hCycT-hCIITA/W31 の計 4 種類のトランスフェクタント、ヒト T 細胞株 HUT78、陰性対照として W31 それぞれに T-tropic HIV-1 SF33 を感染させ、用いた。感染後 3 日目に各細胞から DNA および RNA を抽出した。DNA は HIV-1 env 遺伝子特異的プ

ライマーを用いた PCR によるプロウイルス DNA の確認に使用した。RNA は以下の cDNA アレイ解析と定量的リアルタイム RT-PCR 解析に用いた。HUT78 には 621 遺伝子が搭載されたヒト免疫関連 cDNA アレイフィルター (TOYOBO) を、ラット細胞には当教室で作製した 284 遺伝子をスポットした専用アレイフィルターを用いた。変化のあった遺伝子の一部についてはそれぞれ特異的プライマーによって、ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System を用いたリアルタイム RT-PCR によって半定量した。

(倫理面への配慮)

動物の使用にあたっては北海道大学大学院医学研究科動物実験施設の「動物実験に関する指針」に遵守し、行った。

C 研究結果

1 HIV-1 感染関連ヒト遺伝子トランスジェニックラット

pUC/hCyclinT1/hCCR5 と pUC/hCIITA/hCD4 の組み合わせでマイクロインジェクションした受精卵から、約 200 以上の産仔を得た。このうち一頭の雌ラット (TgM122) に、PCR によって 4 種類すべての導入ヒト遺伝子の存在を確認した。また、本ラット末梢血単核球 RNA を用いた RT-PCR によって、4 種すべての mRNA 発現を確認した。マウス H-2 プロモーターを使用した CCR5、CyclinT1、CIITA の発現に比べ、ヒト CD4 プロモーターを使用した CD4 の発現は微量であった。本ラットを正常 SD 雄ラットと交配し、得た産仔 12 頭中 4 頭に導入遺伝子の伝達を確認した。この 4 頭いづれにも導入した 4 種類のヒト遺伝子を確認した。

2 HIV-1 感染ラットトランスフェクタントにおける宿主遺伝子発現の変化

感染 3 日後には W31 を除くすべてのトランスフェクタントで HIV-1 プロウイルス DNA の存在を確認した。HUT78 の cDNA アレイ解析では、約 250 種の遺伝子が測定可能であった。未感染細胞に比べ発現が亢進する遺伝子より、発現の低下を示す遺伝子が多かった。発現亢進したのは 18 遺伝子で、この中にはすでに報告のある FAS など以外に PIN (protein inhibitor of NOS1) や HSP90β、PPP1CA (protein phosphatase-1 catalytic subunit alpha isoform) なども含んでいた。一方、発現低下が見られたのは 56 遺伝子で Bcl-x など anti-apoptotic な遺伝子や遺伝子発現制御遺伝子、細胞増殖に関わる遺伝子を多く含んでいた。また、ラットトランスフェクタントでも発現亢進する遺伝子より、発現低下する遺伝子が多かった。フィルター上に搭載されている遺伝子の種類が違い、

共通しているものが少ないものの、FAS の亢進や RANTES、Bcl-x、NFκB の低下は HUT78 と共通していた。次に HIV-1 感染後発現の亢進する遺伝子の候補として FAS、PIN、HSP90β、PPP1CA を、低下するものとして CREB、ICAM、RANTES、Bcl-x、NFκB について定量的リアルタイム RT-PCR にて検討した。その結果、PPP1CA では CIITA の存在がより効果的であったが、FAS、HSP90β では CyclinT1 を持つ HIV-1 感染ラット細胞で HUT78 と同様の発現亢進を認めた。一方、発現低下する遺伝子では調べた 5 種類すべてで CyclinT1 が効果的に働いた。

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。一方、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されているヒト CIITA 遺伝子も加えることにより、我々は *in vitro* で一時的ではあったものの、再感染性のあるウイルス粒子の産生を確認した。

以上の結果を受けて、我々はこれら HIV-1 感染に関連する 4 種類のヒト遺伝子を有するトランスジェニックラットの作製を始めた。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、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混和し、同時にマイクロインジェクションする方法を選択した。その結果、現在のところ一頭であるものの、ヒト CD4、CCR5、CyclinT1、CIITA の 4 種類のヒト遺伝子を有するトランスジェニックラットを作製した。本ラットでは CD4 の発現が微量であったものの、導入遺伝子すべての mRNA 発現を確認できた。また、作製した F1 には分離することなく導入遺伝子すべてが伝達しており、今回我々が選択した方法は有用であると考えられた。現在、F2 ラットの作製、導入遺伝子のサザン解析、蛋白発現の確認を進めているとともに、ヒト CXCR4 を導入したトランスジェニックラットの作製を継続している。

一方、cDNA アレイによるラット感染細胞での宿主遺伝子発現の解析からヒト CyclinT1 の存在が細胞の感染病態に深く関わっている可能性が示唆され、HIV-1 感染に関わる新たなヒト遺伝子の検索に有用であるとともに、トランスジェニックラットでの感染実験へ応用できるものと考えられた。

E 結論

- 1 CD4、CCR5、CyclinT1、CIITA の 4 種類のヒト遺伝子を有するトランスジェニックラットを作製した。本ラットでは CD4 の発現は低いもののすべての mRNA 発現を確認した。また、導入遺伝子は分離することなく F1 に伝達した。
- 2 ヒト、ラット細胞を問わず、HIV-1 感染早期には発現亢進より、発現低下を示す宿主遺伝子が多かった。

- 3 HIV-1 感染早期の宿主遺伝子の発現変化をヒトとラットトランスフェクタントで比較検討し、多くの遺伝子の発現変動にヒト CyclinT1 が重要な働きをしていると考えられた。

F 健康危険情報

in vitro での HIV-1 の感染実験には市立札幌病院特殊感染実験室を使用した。動物個体への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) 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-1 env-pX transgenic rats *Experimental and Molecular Pathology*, 72 56-61, 2002
- 2) Fugo, K, Ishizu, A, Ikeda, H, Hayase, H, Sugaya, T, Higuchi, M, Tsuji, M, Abe, A, Suzuki, A, Shibata, M, Takahashi, T, Yoshiki, T The role of the thymus in development of necrotizing arteritis in transgenic rats carrying the env-pX gene of human T-cell leukemia virus type-1 *Am J Pathol*, 161(3) 755-761, 2002
- 3) Ishizu, A, Tsuji, T, Abe, A, Saito, S, Takahashi, T, Ikeda, H, Meruelo, D, Yoshiki, T Transduction of dominant negative ATF-1 suppresses the pX gene expression in joint fibroblastic cells derived from HTLV-1 transgenic rats *Exp Mol Pathol* (in press)
- 4) Higuchi, M, Ishizu, A, Ikeda, H, Hayase, H, Fugo, K, Tsuji, M, Abe, A, Sugaya, T, Suzuki, A, T, Koike, T, Yoshiki, T Functional alteration of peripheral CD25+CD4+ immunoregulatory T cells in a transgenic rat model of autoimmune diseases *J Autoimmun* (in press)
- 5) Kikuchi, K, Ikeda, H, Tsuchikawa, T, Tanaka, S, Fugo, K, Sugaya, T, Tanaka, Y, Tateno, M, Maruyama, N, Yoshiki, T A novel animal model of thymic tumor development of epithelial thymoma in transgenic rats carrying human T lymphocyte virus type I *Int J Exp Pathol* (in press)
- 6) Tanaka, T, Ikeda, H, Otsuka, N, Yamamoto, Y, Sugaya, T, Yoshiki, T Tissue specific high level expression of the transgene in rats carrying a full human endogenous retrovirus genome, HERV-R, under control of its own promoter *Transgenic Res* (in press)

2 学会発表

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

マウス及びヒトレトロウイルス感染に対する免疫学的抵抗性を支配する 宿主遺伝子の解析と、*gag*遺伝子産物上の感染防御エピトープに関する研究

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 河原(辻) 佐智代・金成 安慶・菅原 大輔・河俣 浩之
（近畿大学医学部免疫学教室）
Mario Clerici, Daria Trabottoni
（ミラノ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に有効な抗原構造が存在する。MA蛋白質全長には感染防御免疫誘導能があるが、これまでに明らかにしたCD4陽性Tリンパ球認識エピトープを含んでいても、C-末側或いはN-末側を欠いた断片には感染防御能がない。一部オーバーラップしてMA全長をカバーするN-末側とC-末側の断片を同時に用いて免疫しても感染防御は出来ないため、N-末端のミスチル化部位に注目した。本来細胞膜の裏打ちに局在するMAタンパク質は、ミスチル化部位をGlyからAlaに置換すると核に移行し、特に核小体に集まった。これと同時に感染防御能も失われたので、N-末側の部分欠損で感染防御能が失われたように見えた理由は、ミスチル化に必要な部位が失われたためであることがわかった。

次に、昨年度までに報告したレトロウイルス感染におけるナチュラルキラー（NK）細胞の役割について解析した。マウスレトロウイルス感染の初期にはNK細胞活性が高まり、感染細胞はNKによって効率的に傷害される。この理由として、レトロウイルス感染細胞ではNK細胞レセプターリガントの発現が上昇していることが明らかになった。

第3に、ヒトとマウスに共通するレトロウイルス感染抵抗性遺伝子の存在を示唆する所見を得た。昨年度までに、マウスレトロウイルス感染時の中和抗体産生を制御する遺伝子座を第15染色体テロメア寄り約3Mbpの範囲に限定した。この部と相同性のあるヒト染色体領域内の多型性マーカーについて、HIV曝露非感染者とHIV感染者の遺伝子型を解析した結果、両グループの遺伝子型分布に有意な差を認めた。

A. 研究目的

ウイルス感染の予防手段を開発するためには、同じウイルスの感染に対し自然抵抗性を示す宿主を見出し、そのメカニズムを明らか

にすることが一つの有力な方法である。我々はこれまでに、マウスレトロウイルス感染に対する自然抵抗性の遺伝的制御機構を解析し、MHC領域の複数の遺伝子と、MHC領域外の

一つの遺伝子の役割、および感染初期のNK細胞活性の重要性を明らかにしてきた。最近、ヒトのHIV感染およびAIDS発症においても、MHC領域の遺伝子型が自然経過に大きな影響を与えることが明らかになってきた。また、感染初期のNK細胞活性がウイルス排除に与える影響は、アカゲザルのSIV感染系でも報告されている。

ゲノム計画の進展に伴い、ヒト染色体上の遺伝子座配列とマウス染色体上の遺伝子座配列の相互対照が可能となった。その結果、マウスで疾患の発症制御に関わる遺伝子が見つかった場合、それと相同の疾患制御遺伝子がヒトでも見つかる可能性を、以前より容易に追求出来るようになった。このような背景に立ち、遺伝的背景の明確なマウスモデルでレトロウイルス感染防御に有効な免疫応答の制御機構を明らかにし、そこから得られた情報をヒトに適用して、最も効率的なHIV感染予防法開発の筋道を示そうとするのが、本研究の目的である。

B. 研究方法

1) マウスレトロウイルスgag遺伝子産物上の感染防御エピトープの解析

昨年度までの研究で、我々がフレンドマウス白血病レトロウイルス(FV)のgag遺伝子産物上にその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MAタンパク質内に限定し、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した。今年度はMAタンパク質内の感染防御構造をさらに細かく解析するため、昨年度開発した改良型ワクシニアウイルス発

現ベクターに、MAタンパク質コート領域の種々の断片、或いは点変異体を組み込んだ。これらミニ遺伝子または変異遺伝子を発現する組換えワクシニアウイルスで(C57BL/6 × A)F₁マウスを免疫し、フレンドウイルスを接種して感染の成立と発症の経過を観察した。

2) レトロウイルス感染時のNK細胞活性化機構の解析

昨年度までに、フレンドマウスレトロウイルス感染宿主では感染の初期にNK細胞活性が高まること、FV感染細胞株は非感染細胞株に較べNK細胞による傷害の感受性が著しく高いこと、またペプチドワクチン投与マウスからNK細胞を除去すると、本来生じるべき感染防御効果が完全に失われることを明らかにしてきた(Iwanami, N *et al* *J. Virol.* **75**: 3152-3163, 2001)。そこで今年度は、マウスレトロウイルス感染細胞における3種のNK細胞レセプターリガンド(Rae-1, H60, Qa-1)の発現を、特異的プライマーを用いたRT-PCR法により検討した。さらに、レトロウイルス感染時のNKレセプターリガンド発現変動を*in vivo*で解析するため、FV感染マウスから経時的に脾を採取し、mRNAを抽出してABI 7700によるTaqMan法でNKレセプター遺伝子の発現を解析した。また、Rae-1とQa-1については、特異抗体を用いた蛍光抗体FACS法でも、細胞表面のNKレセプター発現を定量的に調べた。

3) レトロウイルス感染時の抗体産生を制御するマウスおよびヒト染色体上の遺伝子と感染抵抗性との関係

昨年度までに、FV感染後の中和抗体産生を制御する非MHC遺伝子をマウス第15染色

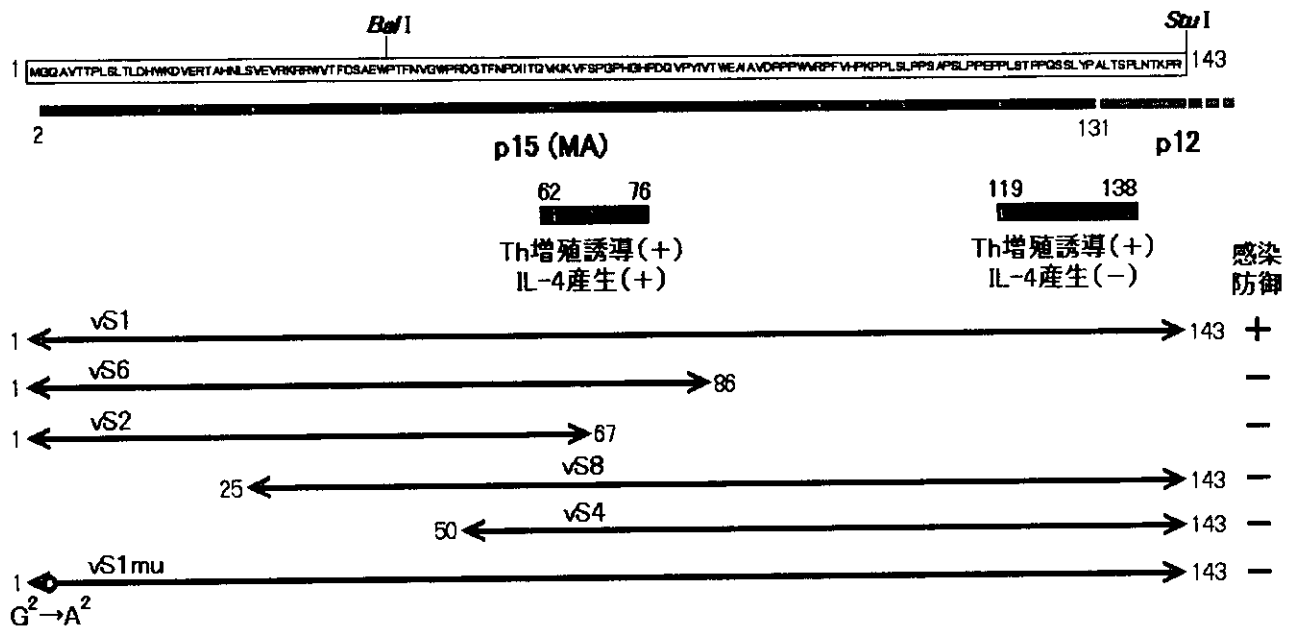


図1 部分遺伝子発現と変異導入によるMAタンパク質上の感染防御抗原構造解析。vS1muはミスチル化部位のGlyをAlaに置換したもので、それ以外はvS1と等しい。

体上にマップした。今年度は、目的遺伝子の存在部位として限定した範囲にある更に多くの既知遺伝子座について、バッククロスマウスでその遺伝子型を同定し、染色体乗り換え部位をより厳密に決定して、目的遺伝子存在部位を一層狭めた。同時に、このレトロウイルス中和抗体産生制御遺伝子存在部位とシンテニーのあるヒト染色体領域内に、複数の多型性マーカーを同定し、それらマーカーの遺伝子型をHIV曝露非感染者とHIV感染者の集団について解析した。ここで「HIV曝露非感染者」とは、HIV感染が血漿中のHIV遺伝子検出・末梢血単核球中のHIV遺伝子検出・血清抗HIV抗体の検出によって確認された特定のHIV感染者と、少なくとも4年間以上にわたって、コンドーム無しで反復して性行為を行っており、しかも上記の基準でHIV感染が証明されない者を言う。これらHIV曝露非感染者では、性器粘膜剥離細胞のPCR法でもHIV遺伝子が検出出来ないか、末梢血リンパ球はHIV抗原特異的サイトカイン産生を示し、粘液中にはHIV抗原特異的IgAが検出されること

が多い。

被験者からは書面による説明と署名による同意の下末梢血単核球を採取し、ゲノムDNAを分離して、PCR法により染色体マーカー遺伝子座の対立遺伝子型を同定した。PCR断片の遺伝子型同定は、蛍光DNAシーケンサーを用いたフラグメント解析によった。

C. 研究結果

1) MA蛋白質上の感染防御抗原構造

MA蛋白質全長を発現する組換えワクシニアウイルスvS1には、FV感染防御能及び白血病死の防止能がある。ところか、一部オーバーラップしたMAタンパク質断片を発現する複数の組換えワクシニアウイルス(vS2, vS4, vS6, vS8)の何れにも、感染防御免疫誘導能はなかった(図1)。更に、組合せによりMAの全長をカバーするはずのvS2とvS4を同時に接種して免疫を行っても、感染防御効果は認められなかった。

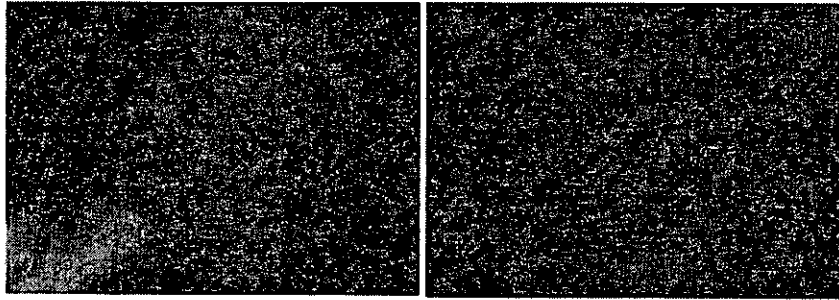


図 2 vS1感染細胞(左)とvS1mu感染細胞(右)におけるMAタンパク質局在部位。モノクローナル抗体による蛍光抗体法。本来N-末端のミスチル化により細胞膜の裏打ちに局在するMAタンパク質は、N-末のGlyをAlaに置換すると核に移行し、特に核小体集まる。

レトロウイルスのMAタンパク質は、そのN-末端のGly残基がミスチル化され、細胞膜の裏打ちに局在することが知られている。vS1に含まれる既知のT細胞認識エピトープ構造は全て含むはずのvS8にも感染防御能がなかったため(図 1)、このN-末端ミスチル化が感染防御免疫の誘導に必須である可能性を考えた。vS1に組み込んだMA遺伝子のN-末端GlyをAlaに置換した変異体、vS1muを作製すると、発現したMAタンパク質はvS1感染細胞では細胞膜に沿って分布するのに対し、vS1mu感染細胞では核に集まった(図 2)。更にvS1mu接種で免疫したマウスでは、感染防御免疫の誘導が見られなかった(図 1)。

2) レトロウイルス感染におけるNK細胞の活性化

マウスおよびアカゲザルのレトロウイルス感染初期にNK細胞が活性化され、NK細胞活性はレトロウイルス感染抵抗性の誘導に重要な役割を果たす。しかし、レトロウイルス感染細胞がNK細胞によって傷害されるしくみは明らかでない。そこで、まずマウスレトロウイルス持続感染細胞株と対照の非感染細胞株を用い、NK細胞レセプターリガントの発現を検討した。その結果、フレントレトロウイルス持続感染細胞株Y57-2Cでは、H2を共有する非感染

細胞株EL-4と比較して、Rae-1, H60, Qa-1の全てのNKレセプターリガント遺伝子について、そのmRNA発現が構成的に増加していることが明らかとなった(図 3)。

そこで、マウスレトロウイルス感染個体で同様にNKレセプターリガント発現の変化が起こるか否かを、定量的RT-PCR法と特異抗体による蛍光抗体法で解析した。ABI 7700を用いたTaqMan法で、フレント白血病レトロウイルス感染個体の脾では、Rae-1, H60, Qa-1のmRNA量が、何れも感染後6日をピークに上昇すること、感染前に比較して最もmRNA量が増加するのはRae-1であることが明らかとなった。また、FACS解析でも、脾細胞表面のRae-1分子発現が感染後6日にかけて明らかに増加することが示された(図省略)。

3) マウスレトロウイルス感染時の中和抗体産生を制御する宿主遺伝子と、HIV曝露非感染者の遺伝的背景

我々は昨年度までに、FV感染に対して感受性のA系統マウスでは、ウイルス接種15日目の時点で血清中に中和抗体が検出出来ないこと、ところかこれをFV感染に抵抗性のC57BL/6 (B6)マウスと交配してF₁を得ると、FV接種の15日後には中和抗体産生が認められることを示した。マイクロサテライトマーカーを用いたゲノム解析で、感染後15日目の中和抗体検出の有無と、第15染色体上の複数の遺伝子座における対立遺伝子型が相関することを証明し、中和抗体産生制御遺伝子の存在部位をD15Mit71近傍の約3Mbpの範囲に限定した(図 4)。

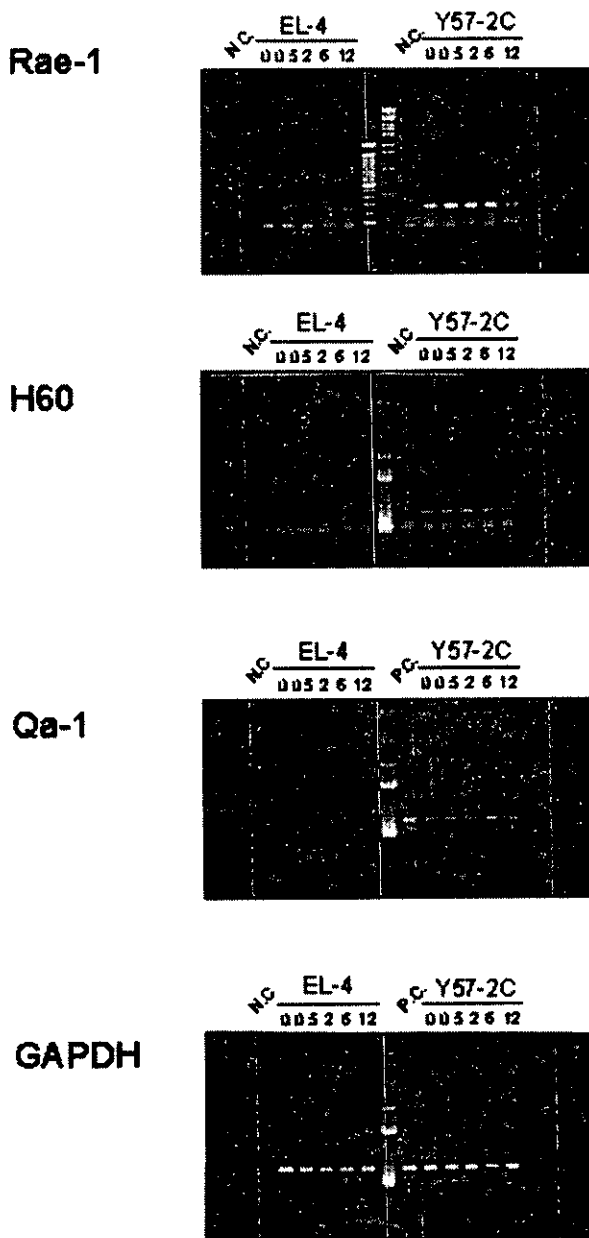


図 3 フレンド白血病レトロウイルス持続感染細胞株 Y57-2C におけるNK 細胞レセプターリガンド Rae-1, H60, Qa-1 の構成的発現検出 (RT-PCR 法)。EL-4 は H2 を共有する未感染対照細胞株。N C, 陰性対照サンプル, P C, 陽性対照サンプル。0~12 の数値は、IFN- γ 処理後の時間経過。

D15Mit71 の遺伝子型から第 15 染色体上の中和抗体産生制御遺伝座に B6 マウス由来の対立遺伝子を持つと考えられる個体では、同じ遺伝子座に A マウス由来の対立遺伝子をホモで持つと考えられる個体に較べ、FV 感染 15 日から 20 日後の血清ウイルス中和抗体価が

有意に高かったか、同じ中和抗体産生制御遺伝子型が A マウス由来対立遺伝子のホモであると考えられる個体でも、H2b プロタイプに b を持つ場合は、感染 15 日後の中和抗体価が高くなった。また、第 15 染色体上の中和抗体産生制御遺伝子座に B6 マウス由来対立遺伝子を持つと考えられる個体が同時に H2^b プロタイプを持った場合は、感染 15 日後の中和抗体価は更に高くなり、かつ IgG へのクラススイッチが見られた。このことから、第 15 染色体上の中和抗体産生制御遺伝子は MHC と協調してヘルパー T 細胞機能を制御している可能性が考えられた。

ヒトの HIV 感染において、「曝露非感染者 (Exposed seronegatives ESN) と呼ばれる集団の存在が知られている。ESN 個体は特定の HIV 感染個体と非防御的な (コンドームを用いない) 性的接触を長期にわたって繰り返しているにも関わらず、HIV 感染が成立していない。ESN 個体の末梢血 T リンパ球は、HIV 感染成立の証拠がないにも関わらず HIV 抗原特異的な増殖およびサイトカイン産生反応を示し、ESN 個体の血清中には抗 HIV 抗体が検出されないにも関わらず、粘液中にはしばしば HIV と反応する IgA 抗体が検出される。しかし、ESN 個体についてはこれまで、ケモカインレセプター遺伝子多型など、既知の遺伝的特性の集積は知られていなかった。

ゲノム計画の進展によりヒト染色体上の遺伝子座配列とマウス染色体上の遺伝子座配列の相互関係が明らかにされ、マウス染色体上で特定の座位に見出された遺伝子については、ヒト染色体上の相同遺伝子存在部位と比較的に容易に推測可能となった。そこで、我々がレトロウイルス中和抗体産生制御遺伝子の存在をマップした部位とシンテニーの関係にあるヒト染色体の領域について、その中にある

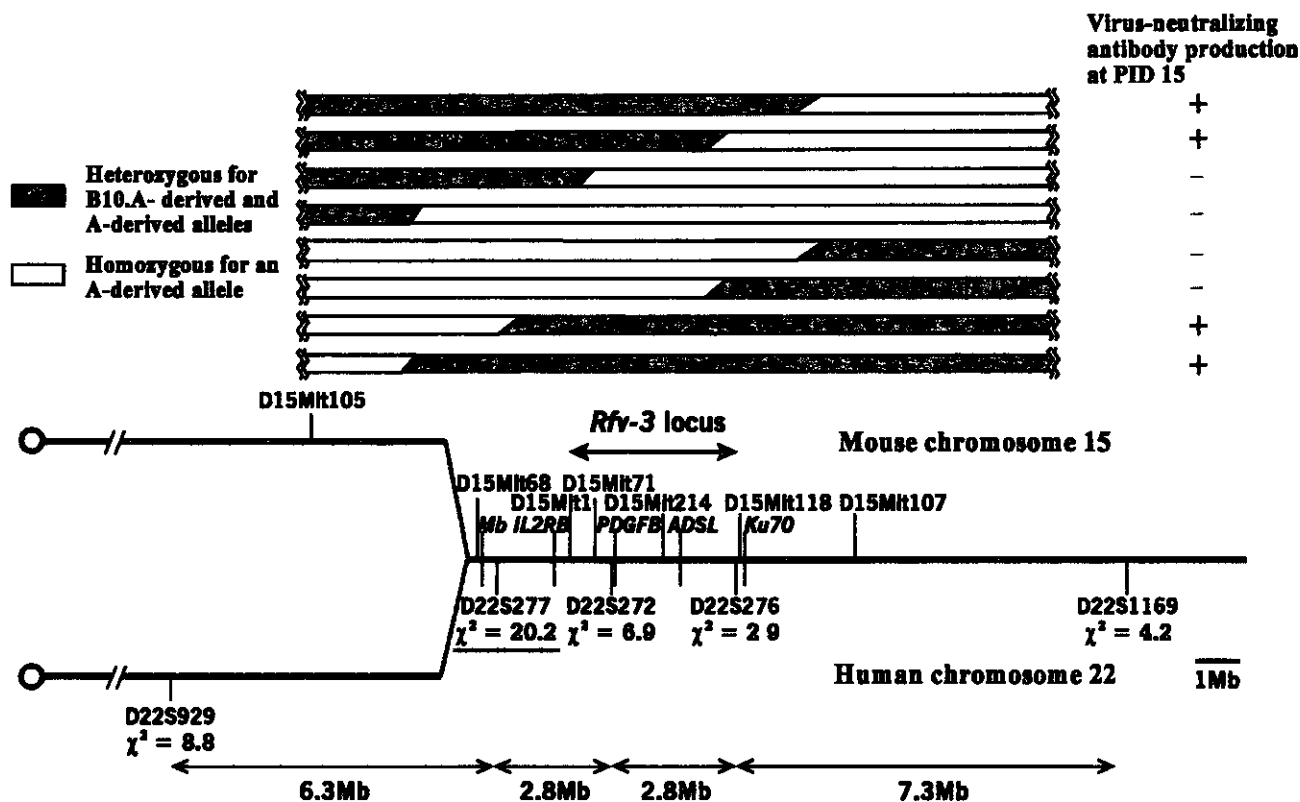


図 4 マウス第15染色体上のレトロウイルス中和抗体産生制御遺伝子存在部位と、対応するヒト第22染色体上の多型性マーカー。フラグメント解析法により、HIV曝露非感染者とHIV感染者由来のゲノムDNAについて、図に示した第22染色体遺伝子座の対立遺伝子型を決定した。図中の χ 値は、HIV曝露非感染者集団とHIV感染者集団の遺伝子型分布の偏りを統計解析した結果。D22S277遺伝子座については、HIV曝露非感染者の18名中10名が、特定の3つの稀な遺伝子型の一つまたは二つを持ち、同じ遺伝子型を持つ個体は、HIV感染者では18名中2名だけだった。

多型性マーカーを検索し、HIV曝露非感染個体とHIV感染個体の間で遺伝子型に何らかの差異が見られるか否かを検討した。その結果、マウス第15染色体上のレトロウイルス中和抗体産生制御遺伝子存在部位と相同なヒト第22染色体上のマーカー遺伝子座、特にD22S277について、その対立遺伝子型の分布がESN群とHIV感染者群で有意に異なり、ESN群には特定の遺伝子型の集積があることが明らかとなった(図 4)。

D. 考察

我々は以前から、フレントウイルスgag遺伝子産物N-末のMA蛋白質内に感染防御に有

効な抗原構造があり、複数のCD4陽性リンパ球認識エピトープが存在することを示してきた。MA蛋白質中に存在する感染防御に有効な抗原構造を同定するため、MAのN-末側またはC-末側を種々に程度に欠損させた部分遺伝子を発現させると、何れの側を欠損させた場合も感染防御免疫誘導能が失われた。そこで、N-末端のミスチル化部位を単一アミノ酸残基の置換によって改変すると、MAタンパクそのものは全長を発現させても感染防御に有効ではなくなった。即ち、N-末端の一部を欠損させた場合に感染防御免疫誘導能が無くなったのは、N-末に重要な抗原エピトープが存在するからではなく、MAタンパク質の細胞内分布が変わってしまったためであると

考えられた。その観点で考察すると、N-末端のミスチル化部位を保ったままMAタンパク質C-末側の約半分を欠失させた部分遺伝子の発現では感染防御能が失われ(図 1)、恐らくC-末側に感染防御に重要な抗原構造が存在するものと考えられる。

以前からHIVのMA蛋白質であるp17に対する抗体がウイルス中和能を示すとの報告がある。今後、MA蛋白質上のB細胞エピトープとT細胞エピトープの協調を視野に、最終的に感染防御抗原構造の同定を目指したい。

マウスおよびアカゲザルのレトロウイルス感染において、その急性期にNK細胞活性が高まり、感染細胞の排除にNK細胞が重要な役割を果たすことが示唆されてきた。しかし、これまでレトロウイルス感染でNK細胞が活性化される理由は明らかでなかった。我々は今回、マウスレトロウイルス感染細胞でNK細胞レセプターリガントの発現が上昇すること、急性感染個体の脾細胞でもNK細胞レセプターリガントの発現上昇が起こることを明らかにした。NK細胞レセプターには、その細胞傷害活性を促進するものと、逆に抑制性のレセプターとがあることが知られている。今回レトロウイルス感染で発現上昇が見られたリガントのうち、Rae-1とH60は活性化型レセプターのリガントであり、Qa-1は抑制性レセプターのリガントである。何れのリガントの発現も、マウス脾臓では感染6日後をピークとして上昇したが、Rae-1の発現が未感染状態に比較して最も高まった。従って、全体としてはレトロウイルス感染細胞はNK細胞感受性が高まる可能性が高い。また、Qa-1は、以前我々がフレンド白血病に対する宿主抵抗性遺伝子座の一つ(*Rfv-2*)として同定したものである(Miyazawa, M *et al* **J. Immunol.** 198 1964-67, 1992)。抵抗性の対立遺伝子*Qa-1^a*を持つ個体と感受性の*Qa-1^b*

を持つ個体で、Qa-1分子の発現量や機能に差があるとすれば、抑制性レセプターを介するNK細胞活性の制御に差異を生じる可能性がある。現在Qa-1遺伝子座がNK細胞活性を制御することで宿主のレトロウイルス感染抵抗性を決定しているとの仮説の下、マウス系統間におけるQa-1発現量の差を解析している。

昨年度までに、FV感染後の中和抗体産生を制御する非MHC遺伝子を、マウス第15染色体テロメア寄りの約3Mbpの範囲にマップした。驚くべきことに、この遺伝子存在領域と相同性を持つヒト第22染色体領域の多型性マーカーを解析すると、HIV曝露非感染者とHIV感染者でその対立遺伝子型分布が有意に異なるとの結果を得た(図 4)。この結果の解釈は慎重に行われる必要があり、現在更に個体数を増やした解析を進める一方、タイ国立衛生研究所およびランパン病院との共同研究により、タイ人コホートの遺伝的解析を計画している。これまでHIV曝露非感染状態と有意に相関する遺伝的マーカーは知られておらず、この研究がHIV曝露非感染状態を決定する遺伝子の同定に繋がる可能性は高い。同時に、B6マウス由来細菌人工染色体をAマウスに導入してレトロウイルス中和抗体産生能を付与する実験により、マウス染色体上の中和抗体産生制御遺伝子そのものを同定する作業も進めており、マウス側とヒト側の両面から、HIV感染抵抗性を決定する宿主遺伝子の同定を目指したい。

E. 結論

1) マウスレトロウイルスMA蛋白質内は、複数のT細胞認識エピトープを含み、その全長を用いて免疫を行うと、感染防御に極めて有効である。MAタンパク質N-末端のミスチル

化を単一アミノ酸残基の置換により阻害すると、感染防御免疫誘導能が失われる。また、N-末端を保ったままC-末側を除去すると、矢張り感染防御能が失われる。従って、MAタンパク質による感染防御には、このタンパク質のミリスチル化と、C-末側エピトープの存在が必要である。

2) マウスレトロウイルス感染細胞はNK細胞による傷害の感受性が高い。この原因として、レトロウイルス感染がNK細胞レセプターリガンドの発現を誘導することか重要であると考えられる。

3) マウスレトロウイルス感染個体でH2と協調して中和抗体産生とそのクラススイッチを制御する非MHC遺伝子を、第15染色体テロメア寄り3Mbpの範囲にマッピングした。この遺伝子座を含む領域にシンテニーのあるヒト第22染色体領域存在する多型性マーカーの遺伝子型が、HIV曝露非感染者集団とHIV感染者集団で有意に異なる。この領域に、HIV感染抵抗性を決定するヒト遺伝子が存在する可能性がある。

F. 健康危険情報

該当するものなし。

G. 研究発表

論文発表

1) Sugita, J, H Ohtani, T Mizoi, K Saito, K Shiba, I Sasaki, S Matsuno, H Yagita, M Miyazawa, and H Nagura Close association of Fas ligand-positive tumor-associated macrophages and apoptotic cancer cells along invasive margin of colorectal carcinoma *Jpn. J. Cancr Res.* 93 320-328, 2002

2) Muto M, Y Kanari, E Kubo, T Takabe, T Kurihara, A Fujimori, and K Tatsumi Targeted disruption of *Np95* gene renders murine embryonic stem cells hypersensitive to DNA damaging agents and DNA replication blocks *J. Biol. Chem.* 13 34549-55, 2002

3) Niwa, A, H Kawabata, N Iwanami, H Uenishi, S Kawahara, N Tabata, H Yamagishi, and M Miyazawa Different requirement for multiple effector mechanisms in vaccine-induced protection against Friend mouse retrovirus infection *Submitted for publication*, 2002

4) Abe, H, A Niwa, C Ishihara, H Kawabata, Y A Takei, and M Miyazawa A gene closely linked to *Rfv-3*, in cooperation with H2, influences early production of virus-neutralizing antibodies in Friend retrovirus-infected mice *Submitted for publication*, 2002

5) Kanari, Y, M Clerici, H Abe, D Trabottoni, S Locaputo, F Mazzotta, A Niwa, C Ishihara, Y A Takei, and M Miyazawa Association of distinct rare alleles at chromosome 22 loci with the HIV-exposed uninfected status *Submitted for publication*, 2002

6) 宮澤正顯 内在性レトロウイルスと自己免疫病自然発症モデル動物 リウマチ科 *27* 218-226, 2002

7) 宮澤正顯 マウスレトロウイルス感染と発症 宿主遺伝子による制御機構 ウイルス *52* 69-76, 2002

H 知的財産権の出願・登録状況
Miyazawa, M and M Clerici Marker
Genes (HIV曝露非感染状態と相関する遺伝
的マーカーとその応用) 英国特許出願済

み (UK Patent Applied, October 16, 2002
No 0223982 0)

ヒト乳汁中マクロファージを介した HIV 伝播の可能性

分担研究者 高橋 秀実 日本医科大学微生物学免疫学教室 教授

研究要旨

ヒト乳汁中から採取した CD14 陽性マクロファージは末梢血単球と較べると大形で大量の母乳成分を貪食しており、T 細胞活性に必要な共刺激分子である HLA-DR, CD86 ならびに CD83 といった樹状細胞への分化マーカーの発現が認められた。そこでこの母乳マクロファージの産生するサイトカインを調べたところ、樹状細胞への分化に必須な因子である GM-CSF を産生していることが判明した。また、この GM-CSF 産生能は母乳成分を貪食することによって得られることも確認された。そこで母乳中マクロファージを IL-4 単独で培養した結果、単球のマーカーである CD14 分子は消失し、樹状細胞のマーカーである CD1 が陽性となることが観察された。また、IL-4 単独添加により分化した樹状細胞は allogenic M1R の増強作用を有していたことから、従来の樹状細胞と同等の 1 細胞の活性化能を持つことが示された。以上より、母乳中マクロファージは自ら GM-CSF を産生し、IL-4 の添加のみで樹状細胞に分化することが証明された。一方母乳栄養によって HIV 感染が助長されることから、母乳中のマクロファージが HIV 感染の標的となりうるかについても検討を加えた。そこで母乳マクロファージが HIV 感染伝播の媒体である DC-SIGN を発現しているか否かを調べたところ、分離直後の母乳マクロファージ上にその発現が確認され、この発現は IL-4 を添加により著しく増強されることが観察された。以上、ヒト母乳中のマクロファージは自ら GM-CSF を産生し、IL-4 単独の添加のみで樹状細胞に分化することが判明した。こうした分化は HIV の母乳を介した垂直感染において重要な役割を担うものと推測される。

A. 研究目的

出産時の輸血により HIV に感染した母親が、母乳を 6 週間授与したところ新生児に HIV が感染した例が存在すること、また、HIV の母子感染は母乳栄養児に多いことなどから、HIV が母乳を介して新生児に伝播する可能性が示唆されている。本研究では、HIV 感染阻止のための新たな対策を探る目的で、こうした母乳感染が free の HIV ではなく、母乳中の細胞、特に HIV 初感染の鍵を握ると推測されているマクロファージ 樹状細胞群に着目し、それらの細胞を介して伝播する可能性を探るため、まず母乳中に含まれるマクロファージ群の実体を明らかにし、こうした細胞群により HIV が伝播する可能性を追跡した。

B 研究方法

出産後 3 - 6 日目の健常な褥婦からヒト母乳を摂取し、プラスチック付着法を用いて母乳中マクロファージを分離した後、Flow cytometry にてそれらの表面抗原の特徴を追跡した。またギムザ染色法を用いて、それらの形態的特徴を末梢血由来単球群と比較するとともに、種々の

サイトカイン産生能を RT-PCR、ELISA 等にて検討した。さらに、これら母乳由来より分離採取した組織マクロファージを GM-CSF/IL-4 あるいは IL-4 単独の存在下にて 6 日間培養し樹状細胞への分化を試みるとともに、表面抗原の変化を flow cytometry にて解析し、その機能を allogenic MLR にて検討した。

さらに、HIV 感染伝播の鍵を握る DC-SIGN の発現状態を、RT-PCR 法ならびに特異的抗体を用いて解析した。

C 研究結果

1) ライトーギムザ染色を用いて、末梢血内の単核球と分離母乳細胞を比較したところ、核の分葉がみられ、細胞質内に lipid particles を多くくわえこんでいる像が観察された (図 1)。

2) これらの細胞における様々な表面マーカーを末梢血の単球群と flow cytometry を用いて比較検討したところ、母乳中のマクロファージ群では樹状細胞のマチュレーションマーカーである CD83 が陽性であった (図 2)。このことより、母乳細胞群は末梢血単球群に比して樹状細胞へ

の分化が進んでいることが推測された。

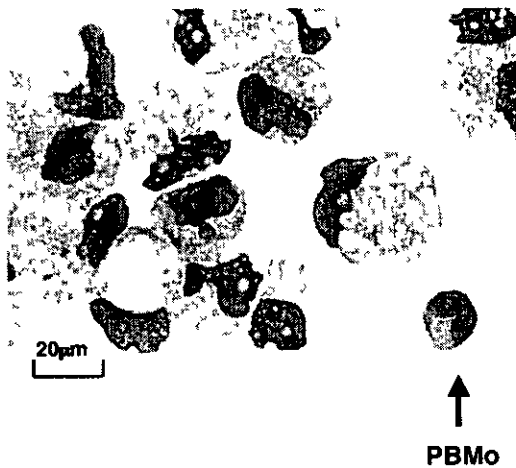


図1 母乳中マクロファージの形態的特徴

3) そこで、樹状細胞への分化に必須の GM-CSF を母乳マクロファージ自らが産生している可能性を考え、培養母乳細胞上清中の GM-CSF を ELISA 法にて計測した。その結果、個体により差異は認められるものの、母乳細胞自身が GM-CSF を産生していることが判明した (図3)。また、このことを RT-PCR 法を用いて遺伝子レベルでも確認した (図4)。

4) こうした GM-CSF 産生能を単球群が獲得する機序を検討する目的で、末梢血単球を培養液で culture する際、上清中に、何も入れない群、latex beads を混ぜた群、milk 上清を加えた群とに分け相互比較した。培養 4 時間後に細胞を洗滌し、さらに 30 時間培養した後の上清中における GM-CSF の産生量を計測したところ、グラフに示すように、食食刺激のみでは GM-CSF 産生の刺激とはならず、milk 成分中の何か、例えば lipid particles を貪食することで産生が開始されるこ

とが推測された (図5)。

5) 以上のように母乳細胞自身が GM-CSF 産生能を有したため、これら母乳細胞に IL-4 を添加することにより樹状細胞への分化を誘導できるのではないかと考え実験を進めた。培養細胞を GM-CSF および IL-4 添加群、IL-4 単独添加群、medium 単独添加群とに分け、5 日間培養後表面マーカーを FACS で検討した。その結果、末梢血単核球に IL-4 を添加した場合には全く CD1 の発現は認められなかったが、母乳細胞では IL-4 添加により、GM-CSF および IL-4 添加群とほぼ同等の CD14 の down regulation、CD1 の発現が認められた (図6)。この際、IL-4 のみを添加して培養した際の培養細胞の形態を比較したところ、末梢血 IL-4 添加群では全く認められなかった樹状突起が母乳細胞で観察された。

6) 次に、母乳細胞に IL-4 を添加することによって誘導された細胞が、GM-CSF と IL-4 を添加誘導した樹状細胞と同等の T 細胞刺激能を有するかを MLR を用いて調べたところ、双方の群でほぼ同等の T 細胞刺激能が認められた (図7)。

7) 最後に、樹状細胞表面に発現し、HIV-1 感染への関与が指摘されている DC-SIGN の発現状態について検討した。まず、IL-4 添加の有無をもとに誘導した母乳細胞群より mRNA を採取し、DC-SIGN の遺伝子レベルでの発現を比較した。その結果、採取直後の母乳細胞において DC-SIGN の発現が mRNA レベルで認められていること、またこうした発現は IL-4 添加培養により増強されることが判明した (図8)。また、DC-SIGN の発現強度を調べたところ、細胞表面において僅かに認められた DC-SIGN が IL-4 の添加培養により増強することが観察された (図9)。

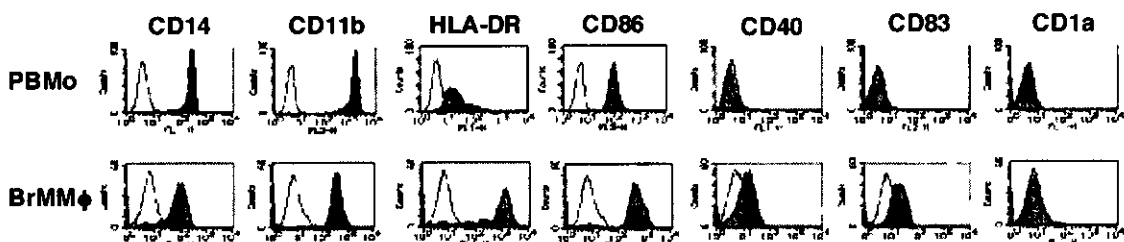


図2 末梢血単核球と母乳中マクロファージの細胞表面抗原の差異