

厚生労働科学研究費補助金  
創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

課題番号 H13-創薬-009

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

平成14年度 総括・分担研究報告書

平成15年3月

主任研究者

永井美之

(富山県衛生研究所・所長)

厚生労働科学研究費補助金  
創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

課題番号 H13-創薬-009

# 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

平成14年度 総括・分担研究報告書

平成15年 3 月

主任研究者

永 井 美 之

(富山県衛生研究所・所長)

## 研究組織

研究者名	分担	所属	役職
永井 美之	主任	富山県衛生研究所	所長
森 一泰	分担	国立感染症研究所・エイズ研究センター	主任研究官
俣野 哲朗	分担	東京大学大学院・医学系研究科	助教授
宮澤 正顕	分担	近畿大学医学部・免疫学教室	教授
木村 彰方	分担	東京医科歯科大学・難治疾患研究所	教授
保富 康宏	分担	三重大学医学部・生体防御医学講座	助教授
本多 三男	分担	国立感染症研究所・エイズ研究センター	グループ長

## 目 次

### I. 総括研究報告書

1. 総括研究報告書 ..... 1  
主任研究者：永井 美之（富山県衛生研究所・所長）

### II. 分担研究報告書

1. サルエイズモデルの問題点の検討とワクチン開発への応用 ..... 25  
主任研究者：永井 美之（富山県衛生研究所・所長）
2. 糖鎖変異 SIV 感染により誘導されるエイズウイルスに対する感染防御免疫に関する研究 ..... 29  
分担研究者：森 一泰（国立感染症研究所・エイズ研究センター）
3. 抗原発現ベクター投与により誘導されるウイルス特異的細胞性免疫の解析 ..... 37  
分担研究者：俣野 哲朗（東京大学大学院・医学系研究科生物学講座）
4. CD4 陽性 T 細胞ワクチンを用いた SIV 感染予防と治療実験のためのサルの MHC class II 遺伝子の同定 ..... 41  
分担研究者：宮澤 正顯（近畿大学医学部・免疫学教室）
5. サルの MHC クラス I 抗原の解析と応用 ..... 45  
分担研究者：木村 彰方（東京医科歯科大学・難治疾患研究所）
6. サルエイズウイルス認識エピトープと MHC の同定・解析 ..... 49  
分担研究者：保富 康宏（三重大学医学部・生体防御医学）
7. リコンビナントベクターを用いた SIV 抗原の特異的免疫誘導法に関する研究 ..... 55  
分担研究者：本多 三男（国立感染症研究所・エイズ研究センター）

### III. 業績一覧

研究成果の刊行に関する一覧表 .....	61
----------------------	----

# I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）  
総括研究報告書

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

主任研究者 永井 美之 富山県衛生研究所・所長

研究要旨：HIV の予防治療を目的とした候補物質の評価にはサル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きた。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 候補物質の評価には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 研究の進歩に伴い、サル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。3 年間プロジェクトの 2 年目にあたり HIV 感染のコントロールに直結する免疫学的パラメーターの特性を明らかにするために、赤毛サル主要組織適合抗原（MHC）との関連性を以下のように追及した。

- 1) サル MHC の解析：アカゲザルコロニーとして静岡実験動物センター（奄美大島）の、主に中国産サルコロニーを標的にし、インド産アカゲザルの MHC クラス I 及びクラス II 抗原解析法を参考にして、中国産サルの MHC クラス I 及びクラス II 抗原解析法を確立した。さらに、サルコロニー約 10 群の MHC の class I 抗原, class II 抗原を明らかにした。
- 2) ウイルス特異的免疫誘導とその防御免疫に関連した中国産アカゲサル MHC に関する解析：遺伝的なバックグラウンドが雑多な奄美大島のアカゲザル集団を用いて防御免疫誘導能の違いを検討し、1) で得られた MHC との関連性を検討した。その結果感染防御との関連性を示唆する新しい細胞障害性 T 細胞（cytotoxic T lymphocytes, C T L s）MHC class I 候補エピトープ（IL-10）及びヘルパー T 細胞（helper T lymphocytes, H T L s）MHC class II 候補エピトープを検出した。一方、上記のサル群の中に Mamu-A\*08 陽性ザルが高率に検出され、MHC class I – P9CD エピトープを同定した。ワクチン抗原としての P9CD エピトープペプチドは高いキラー活性を誘導したが、ヘルパーエピトープなしでは防御能を誘導できず、キラー活性の質の問題が提起された。

## A. 研究目的

有効なエイズ治療薬が開発されているが、HIV 感染者が急増し続けていることから、HIV 感染を効果的にコントロールするにはワクチンを含めた新しいウイルスのコントロール法の開発が急務となっている。そのために、基盤技術の開発、特にサル MHC との関連を明らかにした詳細な免疫学的な評価系の開発が重要な課題となっている。つまり、その系を用いたウイルス感染の防御能に直結した免疫学的パラメーターの検索が可能になりつつある。本プロジェクトでは、これまでのサルを用いた HIV 感染系の開発やそれを用いたワクチン開発の成果に基づき、更に、ヒト MHC (HLA) 解析の経験を生かして以下の点について明らかにする。

- 1) 中国産赤毛サルの MHC クラス I 及びクラス II 抗原解析法を確立する。
- 2) 新しいウイルス特異的 CTL 及び HTL エピトープを中国産赤毛サルでオーバーラッピングペプチドを用いたエリスポット法で同定する。細胞内サイトカインについてもパラメーターを広げて解析する。
- 3) 中国産赤毛サルのウイルス抗原エピトープ特異的な、MHC クラス I 及びクラス II テトラマーの作製。
- 4) AIDS 病態やワクチン効果に関連したエピトープ解析による HIV 感染モデルとしての SIV あるいは SHIV 感染のコントロール法の開発。
- 5) AIDS 発症やウイルス感染に対する防御機構の研究に資する MHC クラス I ある

いはクラス II 抗原の均一な中国産赤毛サルコロニー作製の可能性と有用性に関する研究資料の作成。

- 6) 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。
- 7) 中国産アカゲザルの MHC に関連した特異免疫解析法、サンプルさらにそれらを用いて得られた成果の分与。

上述のように、HIV ワクチン開発で実際に用いられる中国産アカゲザルでは、このような免疫関連遺伝子群の多様性に関して不明な点が多い。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、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 等の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。

本年 2003 年に入り HIV 感染に対するリコンビナント Envelop 蛋白を抗原に用いたコンポーネントワクチンの第 3 相試行の結果が明らかになり、野生株ウイルスをコントロールすることが難しいことがわかった。従って



次世代ワクチンの開発に期待が寄せられている。その開発を効果的に行うには遺伝的な MHC のバックグラウンドが明らかになったサルを用いることにより免疫誘導能やそのエピトープに対するエスケープミュータントの解析がウイルスチャレンジ後の生存率の変化とともにワクチン効果を推定するのに重要な因子として解析可能となってきた。このようなワクチン効果の誘導と MHC の明らかになったサルを用いることによるワクチン効果の免疫学的メカニズムの解明は、効果的なワクチン開発に強く結びつくと期待される。このことは、HIV・AIDS の治療法の開発においても重要な因子となる。

## B. 研究方法

インド産アカゲザルの MHC class I, class II 抗原の解析法と、これまでヒトにおいて同定されてきた HLA の解析法を応用してインド産とは全く異っている中国産アカゲザルの MHC 解析法を確立し、特に奄美大島の SLC のアカゲザルコロニーを対象として行う。さらに MHC の解析結果に直結した HIV あるいは SIV 抗原のエピトープを同定し、ワクチン防御免疫誘導における関連性を感染防御の立場から推定できる方法を以下のように行う。

### 1. MHC の解析 (木村、宮澤)

- 1) アカゲザル MHC クラス I 抗原の解析：  
これまでにワクチン接種実験に用いられたアカゲザル及びその血縁アカゲザル由来の B リンパ芽球様細胞あるいは末梢血顆粒球より、total RNA 及びゲノム DNA

を抽出した。抽出した total RNA からランダムプライマー(6 mer)を用いて cDNA を作製し、これをテンプレートとして、アカゲザル MHC クラス I 遺伝子である Mamu-A 及び Mamu-B を、それぞれ特異的なプライマーを用いて RT-PCR 法によって増幅した。ついで、RSCA 法を用いて、アカゲザル個体の MHC クラス I 遺伝子ハプロタイプを解析した。さらに、これらのハプロタイプと SIVgag207-216 抗原ペプチドに対する免疫応答性の関連を検討した。一方、ゲノム DNA を用いて、アカゲザル MIC 遺伝子を増幅し、ヒト MICA 遺伝子をリファレンスとした RSCA 解析を行うことで、アカゲザル MIC 遺伝子群の多型を検討した。さらに、ヒト HLA 領域にマップされている 21 種のマイクロサテライトマーカを用いて、アカゲザルの個体識別及び MHC ハプロタイプ構造解析が可能か否かを検討した。(木村)

- 2) 国立感染症研究所で 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と、それらの親個体を解析対象とした。これら複数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 DPB, DQA, DQB, および DRB 遺伝子座に特異

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、各クローンの塩基配列を決定した。(宮澤)

3) MHC class II DRB 遺伝子については、同一染色体上に複数の遺伝子座が存在し、ハプロタイプ構造を形成していることが知られている。そこで、各個体で発現する DRB 対立遺伝子の数を明らかにし、同時に個体間の DRB 対立遺伝子共有の有無を明確にするため、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (Denaturing gradient gel electrophoresis: DGGE) による解析を行った。この目的のために 3' 側に GC クランブを付加した DRB 特異的なプライマーペアを設計し、PCR 反応および電気泳動の条件を検討して、多数固体の検体を同時解析できる実験方法を確立した。さらに、DGGE ゲルから各バンドを切り出してプラスミドベクターにクローニングし、塩基配列の決定を行った。(宮澤)

## 2. ワクチン接種モデル動物のウイルス特異的免疫誘導の解析 (保富、森、俣野、本多)

1) 野生型 SIVenv(WT) および SIV5Genv(d5G) 遺伝子をプラスミド (pJW) に組み込み DNA ワクチンを作製した。

2) DNA ワクチンを 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 回免疫した。

3) 免疫マウスの脾細胞の CD8<sup>+</sup>細胞を in vitro で SIVenv および SIVd5Genv 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ン $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 産生細胞を測定した。

4) 免疫マウスの脾細胞を用い野生型 SIVenv および SIVd5Genv 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。

5) 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。

6) 免疫マウスに野生型 SIVenv および SIVd5Genv 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。

7) ウイルス抗原の発現は SIV env 特異的抗体を用いた FACS 分析で行った。(保富)

8) サル感染実験ならびに血液サンプルの採取: アカゲザルに  $\Delta$ 5G ウイルスまたは SIVmac239 を静脈接種し、感染後経時的に血液をクエン酸採血した。血漿は -80°C 保存、PBMC は細胞成分から Ficoll Hypaque 密度勾配遠心により分離し、-160°C で保存した。なお、本研究の動物実験はすべて「国立感染

症研究所動物実験指針」に基づいて行われた。本指針は「動物の愛護及び管理に関する法律」「実験動物の使用及び保管等に関する基準」等に基づき、また「国立感染症研究所における動物実験の基本原則」に則って適正な動物実験を行うことを目的としているため、動物倫理に対する問題はない。

9) 中和抗体価の測定：中和抗体価の測定は Tat responsive LTR 制御下で SEAP (分泌型アルカリフォスファターゼ) を発現する CEMx174SIV-SEAP 細胞を用いて行った。段階希釈した血漿を SIVmac239 または Δ5G と混ぜて室温 1 時間インキュベートした後、CEMx174SIV-SEAP 細胞を加えて 3 日間培養した。培養上清中に分泌される SEAP の活性を Phospho-Light assay kit (アプライドバイオシステムズ) で測定した。

10) ウイルス特異的細胞性免疫の解析：ウイルス特異的細胞性免疫の解析は IFN- $\gamma$  ELISPOT アッセイにより行った。昨年度の報告では組み換えワクシニアウイルスを BLCL 細胞に感染させて抗原提示細胞としたが、ワクシニアウイルス WR 株をベクターとした Env の抗原提示があまりよくなかったため、Env 発現をセンダイウイルスベクターに変えて抗原提示 BLCL を作製し、再検討した。また、その他のウイルスタンパクに対する抗原提示細胞の調製は Tat/Rev/Vif/Vpr/Vpx のオーバーラッピングペプチドの混合ペ

プチドを autologous BLCL 細胞にパルスし、ソラレン-紫外線処理して不活化することにより行った。また感染ザル PBMC はマグネットビーズを用いることにより、CD4<sup>+</sup> T 細胞と CD8<sup>+</sup> T 細胞に分けた。抗原提示 BLCL と CD4<sup>+</sup> T 細胞または CD8<sup>+</sup> T 細胞を一晩混合培養し、定法により IFN- $\gamma$  産生細胞を検出・算定した。

11) T 細胞短期間培養後の ELISPOT アッセイ：Δ5G 感染後約 3 年経ったザル 2 頭の血液から PBMC を分離し、マグネットビーズを用いることにより、CD4<sup>+</sup> T 細胞と CD8<sup>+</sup> T 細胞に分けた。それぞれの細胞を 42 のグループに分けた全 SIV ペプチドと 4 日間 37°C で培養した。4 日後、8 日後に IL-2 を含む RPMI1640-10%FCS で培養液を交換し、12 日目に抗 IFN- $\gamma$  抗体固相化 ELISPOT プレートに細胞を移し、ペプチドとともに一晩培養し、定法により IFN- $\gamma$  産生細胞を検出・算定した。

12) ペプチド ELISA による抗 Env 抗体エピトープの解析：Env 全領域をカバーする 72 本のオーバーラッピングペプチドを個々に 96well-ELISA プレートに固定化した。100 倍希釈した感染 8 週後のサル血漿を添加し、室温 1 時間反応させた後、洗浄し、POD 標識抗サル IgG 抗体を加えて、37°C 30 分間インキュベートした。洗浄後、 $\alpha$ -フェニレンジアミン溶液を加えて発色させ、停止液として 2N-硫酸を加えた。490nm で吸光度を測定した。また、

VIV2 領域をカバーする 12 本のオーバーラッピングペプチドを作製し、同様の方法でさらに詳細な抗体エпитープの解析を行った。(森)

- 1 3) DNA/SeV-Gag プライム・ブーストワクチン接種アカゲサル 10 数頭を用いた。DNA ワクチンプライムとしては、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーターにより SIVmac239 の Env・Nef 以外の抗原を発現する DNA を筋注した。DNA ワクチン接種後 6 週目にブーストとして、SIVmac239 Gag 発現 SeV (SeV-Gag) ベクターを経鼻接種した。

CTL エピトープ同定のための特異的 CD8 陽性 T リンパ球の解析は、SIVmac239 Gag overlapping peptide を用い、各々の peptide 刺激後誘導される細胞内インターフェロン $\gamma$ 陽性細胞を検出することによって行なった。また、Gag 発現ワクシニアウイルス (Vv-Gag) ベクター感染 autologous B 細胞刺激後誘導される細胞内 IFN- $\gamma$ 陽性細胞の検出により、Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球レベルを測定した。

チャレンジ実験においては、CTL エピトープの同定ができたワクチン接種サルのうちの 2 頭と、対照群としてワクチン非接種サル 2 頭を用い、SIVmac239 を静注した。チャレンジ後感染初期の血漿中 SIV RNA コピー数を経時的に測定した。

(俣野)

- 1 4) BCG コドンの至適化の検討：方法的抗

原遺伝子として、アッセイ系の構築のし易さからまず p24 抗原遺伝子を標的にした。次に SIV の whole Gag 遺伝子を標的にして至適化を検討した。

1. ウイルス抗原の遺伝子をマイコバクテリア、至適化コドンに読みなおし、全遺伝子を人工的に作製した。
2. 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。
3. 発現の検討
  - 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 ELISA 法と発光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。
4. キラー活性誘導エピトープを組込んだ候補ワクチンの作製とその発現における機能の検討。P9CD エピトープは SIV (Mamu-A\*08) 及び HIV (HLA-A2) に共通であり、キラー活性を誘導できることが Mamu-A\*08 サルで明らかになっている。従って、このエピトープを HBC コア粒子に発現させ、その発現を確認したのち、キメラウイルスをチャレンジし、ウイルス感染の防御能が認められるかを検討する。(本多)

## C. 研究結果

以下のように、中国産赤毛サル MHC クラス I 及びクラス II 抗原解析法を確立し、奄美大島のアカゲザルコロニーを用いた免疫・ウイルスチャレンジによる防御免疫誘導能の解析により、以下の成果が得られた。

### 1. 中国産アカゲザル MHC の解明

インド産アカゲザルと異り、中国産アカゲザルの MHC の解析は現在検討されつつある重要な研究分野の一つであり、本研究班において class I 及び class II の解析法を以下のように確立した。

#### ①MHC class I の解析 (木村)

Mamu-A\*及び Mamu-B\*遺伝子 cDNA をアカゲザル個体より PCR で増幅し、第 2 及び第 3 エクソン多型の RSCA パターンを解析したところ、個体毎に異なる遺伝子数を有することが判明した。1 ハプロタイプあたり、Mamu-A\*遺伝子は 1~3 個、Mamu-B\*遺伝子は 1~4 個発現すると推定される。また、ある個体(R90-120MY)に着目した RSCA パターン解析を行った。R90-120MY は、その子孫の RSCA パターンを比較することで、a ハプロタイプ(Mamu-A\*遺伝子が 3 個、Mamu-B\*遺伝子が 4 個)と b ハプロタイプ(Mamu-A\*遺伝子が 2 個、Mamu-B\*遺伝子が 5 個)を有していると推定された。ついで 90-120 の子孫で SIV<sub>geg207-216</sub> ペプチドへの免疫応答が既知の個体の RSCA パターンを解析すると、免疫応答を示した個体はいずれも a ハプロタイプを有するのに対し、免疫応答を示さなかった個体は b ハプロタイプを有してい

た (図 1)。

RSCA により、Mamu-A\*08 サルが中国産赤毛サルのこのコロニーの 2 群に 7 匹いることを見出した。

#### ②MHC class II の解析 (宮澤)

昨年度までの解析で、SIV 感染実験に用いられているアカゲザルは、ハプロイドあたり一つずつの DPB および DQB 対立遺伝子を発現するが、DRB については一個体から複数の異なる対立遺伝子発現が検出されることを明らかにした。そこで、各個体が発現する DRB 対立遺伝子の数を確定し、個体間で共通する対立遺伝子の有無を明らかにするため、DGGE 法による解析を行った。

一塩基多型を無視し、単一塩基配列のプライマーを用いて実験を行ったところ、プライマー部の多型の有無に拘わらず全ての DRB 遺伝子産物が増幅され、かつ一つの対立遺伝子産物はひとつのバンドを形成することが確認できた。そこで、この方法論を用いて親子関係の明らかな固体を含む複数個体の DRB 多型性を解析した。一個体あたりの DRB 対立遺伝子発現数 (多重性) はおよそ 4 であった。当然のことながら、共通の父親を持つ個体では共通のバンドが見られた。また、BR0202 と Mm0001 の組、および Mm0009 と BR178 の組のように、DRB の遺伝子型が互いに完全に一致すると考えられる個体も見出された。病原性 SIV 感染後長期未発症の Mm9427 と早期に AIDS を発症した Mm0009 との間で、DRB の遺伝子型は二つが共通と考えられ、残りの対立遺伝

子の多型性と発症経過との間に何らかの相関が見られるか否かが興味を持たれる点である。

### ③その他の組織適合抗原の解析 (木村)

アカゲザル MIC 遺伝子の第 2 及び第 3 エクソンを含む領域を PCR し、ヒト MICA 遺伝子をリファレンスとして RSCA パターンを解析した。その結果、個体間で多型パターンの違いを認めた。さらにいくつかの個体より MIC 遺伝子をクローニングして塩基配列を決定したところ、アカゲザルには 3 群(MIC1、MIC2、MIC3)の MIC 遺伝子が存在することが判明した。また RSCA パターンより、MIC1 ~MIC3 のいずれもが多型を有すると考えられた。また、ヒト HLA 領域内にマップされる 21 種のマイクロサテライトマーカーを用いて、アカゲザル個体における PCR 増幅性と多型パターンを解析した。その結果 14 種のマーカーで PCR 増幅が可能であることが判明し、さらに MHC クラス I 領域内あるいは近傍の 3 種(C2\_4\_4、C1\_2\_A、TNF- $\alpha$ )とクラス II 領域内の 3 種(D6S1701、D6S1560、D6S291) は個体識別に使用可能と考えられる特徴的な多型パターンを示した。一方、一部のマイクロサテライトマーカーはクラス I 領域内の重複を反映したものと考えられる複雑な多数のバンドパターンを示した。

## 2. HIV ワクチン開発における防御免疫誘導能と MHC class I, class II 抗原との関連性に関する研究

(保富、森、俣野、本多)

### 1) HIV 特異的免疫反応:免疫マウスに SIV

env WT および d5G 組み込みワクシニアウイルスを接種したところ d5G 免疫マウスがいずれのウイルスに対しても in vivo で WT 免疫に比べ高い抗ウイルス効果を誘導した。免疫マウスの脾細胞からの CD8+細胞をを組み換えワクシニアウイルスで刺激し IFN- $\gamma$  産生細胞を ELISPOT assay で調べたところ d5G 免疫マウス細胞を d5G 組み込みワクシニアウイルスで刺激した時が最も高い値を示した。しかしながら SIV env に対する抗体産生は両免疫群に差は無く、中和活性も示さなかった。免疫マウスの脾細胞から特異的 CTL を誘導する際に、免疫、in vitro での刺激、標的細胞の標識にそれぞれ WT と d5G を用い全ての組み合わせにおいて CTL の誘導を試みたところ、免疫、刺激、標的のいずれにおいても d5G は WT に比べ高い CTL 活性を誘導した。これらのことから抗原提示が d5G と WT で異なるのではないかと考え、種々の抑制剤を用いて標的細胞を処理し、CTL 誘導に対する影響を見たところ両者に違いが認められた。SIV env WT および d5G 組み込みワクシニアウイルス感染細胞において細胞表面への発現は d5G の方が早期に大量に発現していた。

### 2) 中和抗体価の変動: $\Delta$ 5G 感染ザルにおける中和抗体は 5 頭中 4 頭で検出された。そのうちの 3 頭 (#07, #22, #23) は viral RNA load のセットポイントで

ある感染後 8 週目までに中和抗体が出現した。しかし、#26 だけは $\Delta 5G$  に対する中和抗体価は全く検出されなかった。さらに SIVmac239 に対する中和抗体はいずれの $\Delta 5G$  感染ザルにおいても検出されなかった。対照群である SIVmac239 感染ザルでは、2 頭では SIVmac239、 $\Delta 5G$  いずれのウイルスに対する中和抗体も検出されなかった。1 頭では両ウイルスに対する中和抗体が同レベルで検出された。

- 3)  $\Delta 5G$  感染ザルにおけるウイルス特異的細胞性免疫の解析： $\Delta 5G$  感染ザルにおけるウイルス特異的細胞性免疫の誘導を IFN- $\gamma$  ELISPOT アッセイにより行った。抗原提示細胞は autologous BLCL 細胞を用いた。Env はセンダイウイルスベクター、Gag と Nef はワクシニアウイルスベクター (NYCBH 株)、Tat/Rev/Vif/Vpr/Vx は合成オーバーラッピングペプチドを用いて抗原を BLCL 細胞に導入した。中和抗体価が比較的高かった 2 頭、#07 と #22 はウイルス特異的 CTL、HTL とも非常に低いレベルであった。他の 3 頭はいずれも plasma viral RNA のセットポイントである 8 週目までに CTL、HTL の検出が確認された。特に、#23 では感染のピーク時のすぐ後である 3 週目に CTL の顕著な上昇が見られた。中和抗体が検出されなかった #26 は 5 頭の中で最も高い HTL と CTL レベルを示した。また、中和抗

体が中程度検出された 2 頭では CTL、HTL とも中～高レベルの誘導を示した。これまで $\Delta 5G$  感染ザルにおける感染防御免疫誘導の性質を調べてきたが、上述したように中和抗体価が高いサルは細胞性免疫が検出されず、中和抗体が検出されなかったサルでは細胞性免疫の誘導が顕著であることが明らかになった。全期間で検出された中和抗体価の平均値を縦軸に、細胞性免疫誘導の平均値（全期間で検出されたウイルス特異的 IFN- $\gamma$  産生 CD4<sup>+</sup> T 細胞と CD8<sup>+</sup> T 細胞の合計値の平均）を横軸に各 $\Delta 5G$  感染ザルの免疫誘導をプロットしたものである。 $\Delta 5G$  感染ザルにおける免疫応答は中和抗体誘導と細胞性免疫誘導が逆相関の関係にあった。

- 4)  $\Delta 5G$  感染後長期間 (154 週) 経た時点での細胞性免疫の解析： $\Delta 5G$  感染では感染後 2 週目に plasma viral load のピークを迎えるが、8 週目で検出限界以下にウイルス感染は制御され、その後その状態が維持されている。一方、同じく attenuated SIV の一種である $\Delta Nef$  の感染では 10<sup>4</sup> レベルの感染が続き、高い CTL ならびに HTL 誘導が感染後長期間経っても検出される。そこでウイルス増殖が低く抑えられている $\Delta 5G$  感染ザルでは感染後長期間その反応性には両者に違いがあった。最も違いが顕著だったのは V1V2 領域に対する反応で、この部分は $\Delta 5G$  の 5 カ所の糖鎖

欠失のうちの2カ所を含む。この部位のペプチド、Env12~15にΔ5G感染ザル5頭の血漿がすべて反応したのに対し、SIVmac239感染ザルでは2頭だけしか反応しなかった。Δ5Gの他の3カ所の糖鎖欠失部位には両感染ザルで抗体反応性の違いが見られなかった。また、gp120のC末からgp41にわたる3つのドメインでΔ5G感染はSIVmac239感染より抗体反応性が低かった。

最も違いが顕著であったV1V2領域について、さらに詳細に抗体エピトープの解析を行った(図2)。V1V2のEnv12~15領域に対する12本のペプチドを合成し(図2)、ELISAを行った(図2)。Δ5G感染ではすべてのサルにおいてV1V2-9~11に強い反応が見られたのに対し、SIVmac239感染でV1V2に反応が見られた2頭ではV1V2-3に反応した(図2)。V1V2-3にはΔ5G感染ザルの2頭でも反応が見られた。

5) peptide 特異的 CD8 陽性 T リンパ球の解析により、いくつかのエピトープ領域の候補が得られた。その中で、特に強い特異的反応を呈した CTL エピトープの同定に成功した。このエピトープ特異的反応は、今回解析したワクチン接種サルのうち4頭に共通に認められた。Vv-Gag 感染 B 細胞刺激による解析により、この4頭ともワクチン

接種後、非常に高いレベルの Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球が誘導されることが示された。このエピトープ特異的反応が認められたワクチン接種サルのうち2頭に対して、SIVmac239 チャレンジを行なった。また、対照群として、ワクチン非接種サル2頭に対しSIVmac239 チャレンジを行なった。対照群2頭の血漿中 SIV RNA コピー数は、チャレンジ後1.5週目にピークとなり、その後の set-point 期には $10^1$ 代- $10^5$ 代の値を維持して、典型的なSIVmac239感染パターンを示した。一方、同定したエピトープ特異的反応が認められたワクチン接種サル2頭の血漿中 SIV RNA コピー数は、ピーク時においても $10^5$ をはるかに下回り、その後の set-point 期には検出下限以下で、対照群と比較して極めて低い値を示した。つまり、この2頭では、SIV感染防御効果が認められた。また、この2頭では、感染急性期に、非常に強い Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球2次反応が示された。(俣野)

6) rBCG におけるマイコバクテリアコードン至適化による in vivo での免疫誘導能発現の増幅：①挿入外来性遺伝子として HIV-1 clade B p24 抗原遺伝子をマスターコードンに至適化し、BCG Tokyo 株に発現させた。Native コドンを組込んだ BCG はこの至適化コードンを組込んだ BCG に比べて有意に増殖力が強い



が継代を繰り返すとこのコドン BCG は次第に増殖力が回復する。この際組込んだ外来性遺伝子の変異は認められなかった。②その結果にもとづいて至適化コドン BCG をマウスに接種し、Native コドンの rBCG と比較検討した。特に p24 抗原特異的な細胞性免疫の指標としてリンパ系増殖反応を検討した。その結果接種量 0.01mg の至適化 BCG は有意にリンパ球の増殖を示し、その機能は p24 ペプチド群の No.1 フラクションに認められた。他のフラクションでは有意なデータは得られなかった。この結果は抗原特異的な Elispot 活性においても確認されつつある。

- 7) 細胞性免疫 P9CD エピトープのサルにおける発現と防御能との関連性の評価： Mamu-A\*08 サル 7 匹中 5 匹を用い P9CD エピトープの免疫原性をサルレベルで同定した。①HBC コア粒子遺伝子ベクターに P9CD エピトープ遺伝子を組み込み *in vivo* で Mamu-A\*08 サルに接種しその機能を解析すると極めて強いエピトープ特異的なキラー活性が得られた。②この活性が誘導されたサルに SHIV を接種するとコントロールとしてのベクター投与群では強いウイルス血症と細胞の減少がみとめられたが P9CD キラー活性を示すサルの群ではその防御能が全く認められなかった。(本多)

#### D. 考察

HIV 感染症を始めとした人間に重篤な疾患をもたらす感染症でモデル動物としてのサルに病原性を示さないものは他にも知られているが、このような病原体に対するワクチン等の効果的なコントロール法の確立のためには、特異的防御免疫能の解析が極めて重要な研究課題としてとらえられている。即ち、遺伝的バックグラウンドが明らかになったサルを用いた病原体の感染発症の病因解析、さらにはワクチン接種により誘導された防御免疫誘導に関連したサル MHC との関連性を示す免疫学的パラメーターの解析が可能となり、ワクチン開発に応用され始めている。具体的には、細胞性免疫主導型ワクチンの効果的な防御免疫誘導とそのエピトープ特異的なエスケープの問題が取り上げられ、その発現がワクチン効果の消失と相関していることから HIV ワクチン開発における極めて重要な課題としてとらえられている。このような免疫反応の解析は遺伝的バックグラウンドの明らかになったサルを用いた研究でしか解析ができないことから、効果的な感染症のコントロール法の開発には、モデル動物としてのバックグラウンドの明らかになったサルの解析法の開発、さらに同定されたサルをいかに確保するかが極めて重要な問題となっている。本プロジェクトの成果により、これまで困難であった中国産アカゲザルの MHC の解析法を確立し、その成果をもとに HIV 感染の防御免疫エピトープとの相関を解析することが可能となった。

アカゲザル MHC クラス I 領域遺伝子 Mamu-A\*、Mamu-B\*、MIC はいずれも多重遺伝子族を構成しており、ヒトとは異なる進化過程による遺伝子重複を重ねたことが示された。このことは、カニクイザルにも共通して観察されることであり、旧世界猿に特徴的な進化過程であると考えられる。個体ごとに遺伝子数が異なるため、免疫応答性の解析が複雑化することも推定されたが、少なくとも SIVgag270-216 エピトープに対する反応性を見る限り、高応答性と低応答性に分離し、かつそれぞれが特定のハプロタイプの存在の有無と共分離することが示された。高応答性ハプロタイプと低応答性ハプロタイプには遺伝子数の大きな違いはないことから、このエピトープへの反応は特定のハプロタイプ上の特定 MHC クラス I 分子によって担われることが強く示唆される。RSCA パターンによる個体識別は、このエピトープに対する反応性を示すハプロタイプを有する個体を簡便に選択可能とする方法であると考えられる。今後、免疫応答性との対応が判明したハプロタイプについて cDNA のクローニングと配列決定を行い、さらにトランスフェクタントの作製を行う予定である。また、マイクロサテライトマーカーを併用することで、MHC 内での組み換え体の検出など、MHC ハプロタイプ構成をより詳細に検討することが可能となると考えられた。(木村)

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 DRB 遺伝子多型性と多重性を、DGGE 法と各バンドの塩基

配列決定により解析したところ、一頭あたりおよそ4つの DRB 対立遺伝子発現が観察された。昨年度報告した通り、我が国で保有されているアカゲザルの MHC class II 対立遺伝子には、既報告の塩基配列と完全に一致するものも認められるが、新規の多型性も存在する。今回、R90-120My 個体をオス親とする子孫個体群では、既知の DRB\*w2002 と DRB\*w2501 の対立遺伝子が多数個体に共有されていることを明らかにした。また、大変興味深いことに、オス親に用いられている個体の中に、DRB 対立遺伝子を一つまたは二つしか発現していないものが見出された。これらの個体の子孫は、従ってワクチン投与による感染防御実験に利用し易いと期待される。今回、SIV 接種に対して自然抵抗性を示す個体(長期未発症群)と、早期に AIDS 病態を発症した個体との間に共通する DRB 対立遺伝子と非共有の DRB 対立遺伝子とが見つかった。DRB の多型性または多重性と SIV 感染抵抗性との間に相関が見られるか否かは今後の重要な研究課題である。(宮澤)

SIV d5G は in vivo ではエイズ発症をせず、生体にコントロールされることから何らかの免疫反応に制御されていることが示唆されている。今回の研究にて SIV env に存在する糖鎖結合部位を取り除くと細胞性免疫の誘導能が高進していることが示された。また、この誘導能の高進には細胞膜表面への移送が高率に行われることが示唆され、その経路も酵素阻害剤の結果から通常の env の提示経路と異なっていると考えられた。エイズウイルス

スの env の抗原提示は通常の TAP を介すものと異なることが報告されており、我々の結果はさらに通常経路の提示よりむしろ膜表面に近い TAP 非依存性の経路を利用しているのでは無いかと考えられた。このことは今後エイズウイルスに対する免疫反応、病態、ワクチン開発に考慮されることと思われる。(保富)

Δ5G 感染ザルに誘導された感染防御免疫において、Δ5G は感染後 2 週で SIVmac239 と同等の peak viremia を示すにもかかわらず、感染後 8 週には血中ウイルス量が検出限界以下にまで低下し、その後もずっと低レベルを維持する。Δ5G 感染を制御する免疫を明らかにするため、Δ5G 感染ザルに誘導された中和抗体ならびにウイルス特異的 CD4<sup>+</sup>T 細胞、CD8<sup>+</sup>T 細胞を解析した。しかし Δ5G 感染に共通した免疫応答は検出できなかった。Harvard Medical School, Desrosiers らは V1V2 領域の 5 カ所の糖鎖を欠失した M5 感染で Δ5G と同様に感染が防御されることを示し、M5 の感染防御に関与する免疫は中和抗体であると報告している。実際、M5 感染ザルには M5 に対する高い中和抗体誘導が見られることが報告されている。また、M5 のウイルス学的特徴として、SIVmac239 感染ザル血清でも M5 は非常によく中和される。しかし、我々の Δ5G 感染では中和抗体が検出されたサルもいるが、全く検出されないサルもいた。また、SIVmac239 感染ザル血漿を用いた Δ5G の中和実験では 2 頭の血漿では中和されず、1 頭の血漿で中和

が認められたが SIVmac239 に対する中和と同程度で、Δ5G がきわめて中和されやすいウイルスではないことが明らかになった。この点で、M5 と Δ5G は同じ糖鎖欠失ウイルスでありながら、性質が大きく異なることが明らかになった。

現在、Δ5G 感染後 3 年以上経過しているが、血中ウイルス量は検出限界以下で推移している。このようなウイルス感染状態において、誘導された免疫はどのように維持されているのかを調べるため、2 頭の Δ5G 感染ザルの感染後 154 週の細胞性免疫を調べた。その結果、採血・細胞分離後直ちに抗原刺激をし、翌日解析する ex vivo 解析では細胞性免疫応答はほとんど検出されなかった。しかし、細胞分離後抗原刺激とともに 12 日間の短期間培養後の解析では、複数のウイルスタンパクに対する強い細胞性免疫誘導が検出された。すなわち、Δ5G 感染後長期間経ったサルではエフェクター細胞が存在せず、メモリー細胞群が形成されていると考えられる。エフェクター細胞の消失は血中ウイルス量の減少と関連すると考えられる。その根拠となるのは Δnef 感染ザルにおける血中ウイルス量と細胞性免疫誘導の関係で、Δnef 感染では 10<sup>4</sup> レベルの感染が続き、細胞性免疫誘導においても強い誘導が持続している。このようにメモリー細胞の誘導は感染防御に強く関与すると考えられる。昨年度報告したが、Δ5G 感染後に中和抗体が優位で細胞性免疫が検出できなかったサルにおいても、SIVmac239 チャレンジ感染後には顕著な細胞性免疫誘導が

見られたことから、 $\Delta 5G$  感染ザルにおける低いレベルのメモリー細胞が感染制御に有効に機能すると考えられ、このような免疫を誘導することが感染防御ワクチン開発にとって重要であると考えられる。

糖鎖欠失による Env 構造変化の可能性について、 $\Delta 5G$  の性質を明らかにするひとつの方法として、 $\Delta 5G$  感染ザルに誘導された抗 Env 抗体のエピトープを解析することにより、 $\Delta 5G$  と SIVmac239 の違いを検討した。その結果、V1V2 領域に対する抗体反応性が  $\Delta 5G$  感染では高くなっており、抗体エピトープも SIVmac239 とは異なる部位に存在していた。このことから  $\Delta 5G$  Env の V1V2 領域に存在する 2 カ所の糖鎖欠失は V1V2 領域の露出と関与していると考えられる。V1V2 領域はまた中和抗体エピトープとしても知られている部位であるので、中和抗体誘導との関連性が示唆されたが、 $\Delta 5G$  感染ザルで見られた V1V2-9 から 11 に対する反応の強さと中和抗体価は一致しなかった。すなわち V1V2 領域のリニアールエピトープを認識した抗体は中和抗体ではないと考えられる。さらに  $\Delta 5G$  感染では gp41 の抗体反応ドメインへの反応性が SIVmac239 感染より低下していることが示された。このことから、gp120 に導入した糖鎖欠失は gp120 と gp41 の interaction に影響を与えている可能性が考えられる。以上のように、 $\Delta 5G$  感染において V1V2 領域に対する特異的な抗体の存在や gp41 に対する抗体反応性の低下が示されたことから、 $\Delta 5G$  の糖鎖欠失は Env の構造変

化を引き起こした可能性が示唆された。Env の構造変化は Env と宿主細胞との相互作用に影響を及ぼすと予測される (森)。

本研究では、我々がエイズモデルに用いている東南アジア系 (中国産) アカゲサルにおいて、初めて SIV CTL エピトープを同定した。サルの家計図を調べると、このエピトープ特異的反応を呈した 4 頭は、全てある雄親サル 1 頭の末裔であり、当班の共同研究者のハプロタイプ解析からも、その親サル由来のアレルによってコードされる MHC-I 拘束性のエピトープであると考えられた。今後 (来年度)、この MHC-I アレルをクローニングし、たしかに我々の同定した CTL エピトープを提示することを機能的に確認することができれば、その MHC-エピトープ特異的 T 細胞レセプター検出のための MHC-エピトープペプチドを作成することができ、SIV 特異的 T リンパ球の解析が飛躍的に進展しうると考えられる。これまでのサル慢性エイズモデルにおけるワクチン研究において、ワクチンにより誘導されたエピトープ特異的 CTL の SIVmac239 感染防御効果については、Mamu-A\*01 拘束性のドミナントエピトープである Tat SL8 と Gag CM9 についての解析しかなく、両者とも感染初期に防御しきれない結果が報告されている。今回、我々のチャレンジ実験で得られた結果は、我々の同定したエピトープ特異的 CTL による SIVmac239 感染防御効果の可能性を示唆しており、今後の解析が期待される。(俣野)

rBCG-HIV ワクチンの挿入外来遺伝子の発