

ブチドを合成し(Fig.4a)、ELISA を行った (Fig.4b)。 $\Delta 5G$ 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 (Fig.4b)。V1V2-3 には $\Delta 5G$ 感染ザルの 2 頭でも反応が見られた。

D. 考察

1. $\Delta 5G$ 感染ザルに誘導された感染防御免疫

$\Delta 5G$ 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。 $\Delta 5G$ 感染を制御する免疫を明らかにするため、 $\Delta 5G$ 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+ T 細胞、CD8+ T 細胞を解析した。しかし $\Delta 5G$ 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 $\Delta 5G$ 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 はひじょうによく中和される。しかし、我々の $\Delta 5G$ 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 (Table. 1a)。また、SIVmac239 感染ザル血漿を用いた $\Delta 5G$ 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、 $\Delta 5G$ 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 (Table. 1b)。この点で、M5 と $\Delta 5G$ 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、 $\Delta 5G$ 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 $\Delta 5G$ 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、 $\Delta 5G$ 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 10^1 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、 $\Delta 5G$ 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。

2. 糖鎖欠失による Env 構造変化の可能性

$\Delta 5G$ 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。

E. 結論

$\Delta 5G$ はその感染病態、誘導される免疫の質などの点から見て、これまでの概念とは異なる新規の attenuated virus である。特に、 $\Delta 5G$ 感染ザルで長期間にわたり非常に低く抑えられている viral load とエフェクター細胞の低下、メモリー細胞の誘導は感染制御に重要なファクターであると考えられる。今後は、より高感度に viral load を測定する系を確立し、 $\Delta 5G$ 感染がどの程度のレベルにあるのかを調べ、viral load とエフェクター細胞の低下、メモリーT細胞の誘導と感染制御の関係を明らかにしたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Xing, H. Q., Moritoyo, T., Mori, K., Tadakuma, K., Sugimoto, C., Ono, F., Hayakawa, H. & Izumo, S. (2003) Simian immunodeficiency virus encephalitis in the white matter and degeneration of the cerebral cortex occur independently in simian immunodeficiency virus-infected monkey. *J Neurovirol* in press.

2. Sugimoto, C., Tadakuma, K., Otani, I., Moritoyo, T., Akari, H., Ono, F., Yoshikawa, Y., Sata, T., Izumo, S. & Mori, K. (2003) *Nef* gene is required for robust productive infection of Simian Immunodeficiency Virus in T-cell-rich paracortex in lymph nodes. *J Virol*, 77:4169-

3. Villinger, F., Mayne A. F., Bostik P., Mori, K., Jensen P. E., Ahmed R. & Ansari, A. (2003) Evidence for antibody mediated enhancement of SIVgag antigen processing and cross

presentation in SIV infected rhesus macaques. *J Virol* 77, 10-24.

4. Villinger, F., Brice, G. T., Mayne, A. F., Bostik, P., Mori, K., June, C. H. & Ansari, A. (2002) 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, 590-599.

学会発表

1. Sugimoto, C., Yasutomi, Y., Ohgimoto, S., Shioda, T., Yamamoto, N., Nagai, Y. & Mori, K. (2002) Implication of deglycosylation of Env in pathogenicity of SIVmac239. 20th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS. (Monterey, CA, USA)

2. Sugimoto, C., Ohgimoto, S., Kusakawa, S., Takebe, Y., Shioda, T. Nagai, Y. & Mori, K. (2002) DNA prime-vaccinia boost immunization of deglycosylated Env protein induced more frequent Env specific CD4 and CD8 T cells but less protective immunity against SIVmac239 in rhesus macaques. 20th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS. (Monterey, CA, USA)

3. 杉本智恵、佐多徹太郎、吉川泰弘、森一泰 (2002) *Nef* 遺伝子欠損変異 SIV はリンパ節において B 細胞領域であるリンパ濾胞の CD4+T 細胞に感染していた。第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会 (札幌)

4. 杉本智恵、保富康宏、塩田達雄、永井美之、森一泰 (2002) 糖鎖欠失 SIV 感染ザルに誘導された抗 Env 抗体エピトープの解析。第 16 回日本エイズ学会学術集会・総会 (名古屋)

5. 森一泰、杉本智恵、保富康宏、草川茂、武部豊、中山英美、塩田達雄、永井美之 (2002) Env エイズワクチンへの糖鎖欠失変異の効果。第 16 回日本エイズ学会学術集会・総会 (名古屋)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他
特になし

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

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

分担研究者 俣野 哲朗 東京大学大学院医学系研究科微生物学講座助教授

研究要旨

エイズ発症阻止を考えるうえで、HIV 感染抑制のための宿主免疫機構の解析は重要である。HIV 感染の抑制においては、ウイルス特異的宿主細胞性免疫が中心的役割を果たしていると考えられている。我々はこれまで、DNA ワクチンと Gag 発現センダイウイルス(SeV-Gag)ベクターワクチンとを併用した DNA/SeV-Gag プライム・ブースト法を開発し、SHIV（サル・ヒト免疫不全ウイルス）感染サル急性エイズモデルにおける発症防御効果を明らかにしてきた。次のステップとして、SIV（サル免疫不全ウイルス）感染サル慢性エイズモデルにおける検討が重要である。慢性期においては、ウイルス変異によるエスケープの克服が大きな課題であり、個々のエピトープ特異的反応の解析が必要である。しかし、これまでのところ、サルにおける組織適合性抗原（MHC）および SIV エピトープの研究は進展しておらず、同定されたものはわずかである。特に、エイズモデルに最適のサルとして日本で用いられている東南アジア系（中国産）アカゲサルでは、未だ SIV エピトープや MHC は同定されていない。そこで本研究では、サルエイズモデルにおける SIV エピトープ特異的細胞性免疫反応の解析を目的として、SIV エピトープの同定をおこなうこととした。そのエピトープ同定法として、昨年度確立した overlapping peptide を用いた peptide 特異的細胞内インターフェロングamma (IFN- γ) 誘導検出システムを用い、特異的防御免疫反応誘導のための有力な抗原と考えられている Gag に含まれるエピトープの解析から開始した。DNA/SeV-Gag プライム・ブーストワクチン接種をおこなったアカゲサルにおいて、Gag overlapping peptide を用いて特異的 CD8 陽性 T リンパ球（細胞傷害性 T リンパ球、CTL）反応を解析し、エピトープ同定を試みた。その結果、4 頭のサルに共通する SIV Gag 由来の CTL エピトープの同定に成功した。このエピトープ特異的 CD8 陽性 T リンパ球反応は非常に強いものであり、そのうち 2 頭を用いた病原性 SIVmac239 チャレンジ実験における感染初期の解析では、SIV 感染は抑制され、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が示唆された。

A. 研究目的

エイズ発症阻止を考えるうえで、HIV 感染抑制のための宿主免疫機構の解析は重要である。HIV 感染の抑制においては、ウイルス特異的宿主細胞性免疫が中心的役割を果たしていると考えられている。我々はこれまで、DNA ワクチンと Gag 発現センダイウイルス(SeV-Gag)ベクターワクチンとを併用した DNA/SeV-Gag プライム・ブースト法を開発し、SHIV（サル・ヒト免疫不全ウイルス）感染サル急性エイズモデルにおける発症防御効果を明らかにしてきた。次のステップとして、SIV（サル免疫不全ウイルス）感染サル慢性エイズモデルにおける検討が重要であり、そのなかで慢性期におけるウイルス変異によるエスケープの克服が大きな課題である。

我々はこれまで、SIV 特異的 T リンパ球反応定量法を確立し、サルエイズモデルにおいて、SIV 特異的 T リンパ球レベルと SIV 感染抑制レベルとの

相関を検討してきた。この定量法は、ウイルス抗原に含まれる各エピトープに対する免疫反応の総和を測定するものであり、その結果得られる値は、感染抑制レベルとの相関を調べるうえで重要な意義を有する。一方、ウイルス変異に対する免疫反応変化の検討においては、さらに、個々のエピトープ特異的反応の解析が必要である。しかし、サルにおける組織適合性抗原（MHC）および SIV エピトープの研究は進展していない。これまでのところ、同定されたものはわずかであり、米国などで用いられているインド産アカゲサルでいくつか報告されているのみである。日本では、地域的に東南アジア系（中国産）アカゲサルしか手に入らないが、これらを用いたエイズモデルは、その慢性 SIV 感染パターンがよりヒトエイズに近く、より優れたモデルである可能性がある。しかし、我々が用いているこの東南アジア系アカゲサルでは、未だ SIV エピトープや MHC は同定されていない。

そこで本研究では、サルエイズモデルにおける SIV エピトープ特異的細胞性免疫反応の解析を目的として、SIV エピトープの同定をおこなうこととした。まず、特異的防御免疫反応誘導のための有力な抗原と考えられている Gag 抗原に含まれるエピトープに検索対象を絞り、MHC-I 拘束性細胞傷害性 (CTL) エピトープ同定から開始した。

B. 研究方法

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 γ (IFN- γ) 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- γ 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。

(倫理面への配慮)

なお、全ての動物実験は、倫理面も含めて、国立感染症研究所動物実験委員会の審査をうけ、その承諾を得てから開始した。

C. 研究結果

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 10^4 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 (図 1)。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。

D. 考察

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-エピトープテトラマー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。

E. 結論

エイズモデルの解析に用いるアカゲサルに、我々の開発した DNA/SeV-Gag プライム・ブーストワクチンを接種し、誘導される SIV Gag 特異的 CTL の解析を行ない、4 頭に共通する CTL エピトープを同定した。このエピトープ特異的 CD8 陽性 T リンパ球反応は非常に強いものであり、そのうち 2

頭を用いた病原性 SIVmac239 チャレンジ実験における感染初期の解析では、SIV 感染防御効果が認められ、我々の同定したエピトープ特異的 CTL による SIVmac239 感染防御の可能性が示唆された。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1 論文発表

- (1) Kano, M., Matano, T., Kato, A., Nakamura, H., Takeda, A., Suzaki, Y., Ami, Y., Terao, K., and Nagai, Y. Primary replication of a recombinant Sendai viral vector in macaques. *J. Gen. Virol.* 83:1377-1386, 2002.
- (2) Kano, M., Matano, T., Kato, A., Shioda, T., and Nagai, Y. Induction of HIV-1-specific neutralizing antibodies in mice vaccinated with a recombinant Sendai virus vector. *Jpn. J. Infect. Dis.* 55:59-60, 2002.
- (3) Matano, T. Recent advances in AIDS vaccine preclinical trials: challenges against the chronic disease. *Current Topics in Virology*, in press.
- (4) Matano, T., Kano, M., Takeda, A., Nakamura, H., Nomura, N., Furuta, Y., Shioda, T., and Nagai, Y. No significant enhancement of protection by Tat-expressing Sendai viral vector-booster in a macaque AIDS model. *AIDS*, in press.

2 学会発表

- (1) Matano, T., Kano, M., Lun, W. H., Nakamura, H., Takeda, A., Ami, Y., Nomura, N., Furuta, Y., Shioda, T., and Nagai, Y. Comparison of protective efficacies between Gag- and Tat-booster in a DNA-prime/ Sendai viral vector-booster vaccine system against AIDS. The XIVth International AIDS conference, Barcelona, Spain, 7/9/2002.
- (2) Matano, T., Lun, W. H., Kano, M., Takeda, A., Nakamura, H., Mori, K., Sata, T., and Nagai, Y. Loss of viremia control without losing specific CD8+ T cells in vaccinated macaques after showing CTL-based partial protection against SIV infection. The XIIth International Congress of Virology, Paris, France, 7/29/2002.
- (3) Lun, W. H., Kano, M., Takeda, A., Nakamura, H., Mori, K., Sata, T., Nagai, Y., and Matano,

T. Loss of AIDS vaccine-based viremia-control without loss of virus-specific CD8+ T cells in macaque preclinical trials. 第 50 回日本ウイルス学会、札幌、10/16/2002.

- (4) 狩野宗英、中村浩美、武田明子、加藤篤、須崎百合子、網康至、永井美之、俣野哲朗. 組換えセンダイウイルスベクターワクチンのマカクサルエイズモデルによる安全性および有効性の検討. 第 50 回日本ウイルス学会、札幌、10/16/2002.
- (5) 倫文輝、狩野宗英、中村浩美、武田明子、俣野哲朗. サルエイズモデルにおける細胞性免疫破壊機構の解析. 第 16 回日本エイズ学会、名古屋、11/30/2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特許申請中。

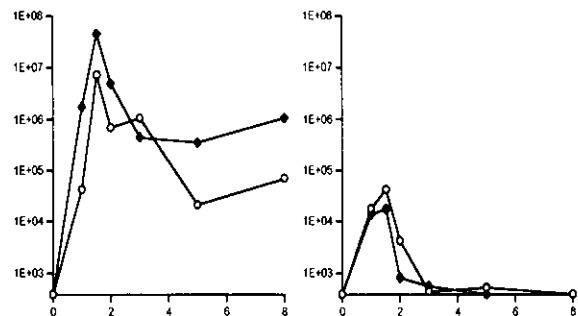


図 1. SIVmac239 チャレンジ後の血漿中 SIV 量の推移。左パネル：対照群 2 頭。右パネル：ワクチン接種群（同定したエピトープ特異的 CTL 反応を呈した）2 頭。縦軸：血漿中 SIV RNA コピー数 (/ml)。横軸：チャレンジ後の週数。

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 MHC class II 遺伝子の同定

分担研究者 宮澤 正 顯（近畿大学医学部 教授）

研究要旨 アカゲザル MHC class II DRB 遺伝子座の対立遺伝子多型性と、その発現の多重性を、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法で網羅的に解析する手法を確立した。この手法を用いて多数のアカゲザル個体の親子関係を確定し、複数個体間で共通に発現する対立遺伝子の存在を明らかにした。この手法は、SIV 感染に対する自然抵抗性と MHC class II 遺伝子発現多重性との関係を明らかにする目的に利用可能である。また、一部の共通対立遺伝子については、ゲル電気泳動のバンド位置と塩基配列決定により同定した遺伝子型との対応を明らかにした。

A. 研究目的

HIV 感染の予防や免疫学的治療のモデルとして、アカゲザルの SIV 感染系は極めて有用である。しかしながら、免疫学的研究対象としてのアカゲザルには、その MHC タイピングが十分になされていないという問題点がある。ウイルス抗原に対する宿主免疫応答は MHC 遺伝子群によって厳密な制御を受けており、細胞傷害性 T リンパ球活性化やウイルス中和抗体産生誘導の鍵を握る CD4 陽性ヘルパー T 細胞による抗原認識は、MHC class II 遺伝子産物の構造に完全に依存している。本研究では、我が国で交配維持されているアカゲザル集団の MHC class 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 感染防御実験を行なえるようにすることを第一の目的とした。また、ヒト HIV 感染者で MHC 遺伝子型、特にヘテロ接合性と AIDS 発症遅延との相関が指摘されており、アカゲザル SIV 感染系でも MHC class II の多重性と SIV 感染抵抗性とが相関する可能性がある。そこで本研究では、我が国で感染実験に用いられているアカゲザルの MHC class II 多重性を網羅的に解析することを目標とした。

B. 研究方法

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ある程度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。

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 クランプを付加した 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。

C. 研究結果

昨年度までの解析で、国立感染症研究所で 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、各固体が発現する 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。

昨年度までにプラスミドクローニングを行った我が国アカゲザル個体の DRB 遺伝子塩基配列、お

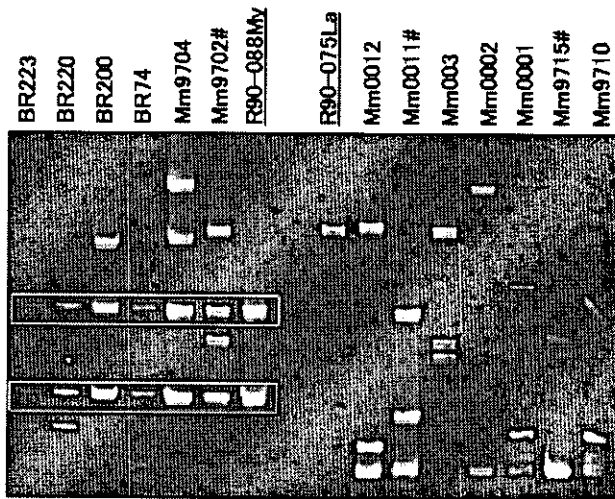


図 3. DGGE 法による DRB 遺伝子多型性と多重性の解析。この例に示す親個体(下線の2頭)は、元々一つまたは二つの DRB 対立遺伝子しか発現していない。四角で囲んだのは子孫個体と共通の対立遺伝子に相当するバンド。

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。

同様の解析をさらに多数個体について行った結果を図3に示す。この図から明らかなように、矢張り大半の個体が DRB 対立遺伝子の発現について4前後の多重性を示すが、大変興味深いことに DRB 対立遺伝子の一つしか発現していない親個体(R90-075La)も見つかった。

D. 考察

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、一個体あたりおよそ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 対立遺伝子の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。

E. 結論

我が国で SIV 感染実験に用いられているアカゲザル個体が発現する MHC class II DRB 遺伝子の多型性と多重性を明らかにした。各個体で DRB 遺伝子座が4前後の多重性を示すこと、繁殖に用いられた親個体の中には一つまたは二つの DRB 対立遺伝子しか発現しないものがあること、主要な DRB 対立遺伝子を共有する個体群が存在することを見出した。SIV 感染に対し抵抗性の個体と AIDS を早期に発症した個体とは異なる DRB 対立遺伝子が存在したが、DRB 多型性または多重性と SIV 感染抵抗性との関係を明らかにするには更に多数個体での相関解析が必要である。

F. 健康危険情報

該当するもの無し

G. 研究発表

- 1) Sugita, J., H. Ohtani, T. Mizoi, K. Saito, K. Shiiba, 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. Cancere Res.* 93:320-328, 2002.
- 2) Kawabata, H., A. Niwa, 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 宮澤正顕. 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.
- 6) 宮澤正顕. 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. 知的所有権の出願・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)

サル MHC クラス I 抗原の解析と応用

分担研究者 木村 彰方 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 教授

研究要旨

アカゲザル MHC クラス I 遺伝子(Mamu-A 及び Mamu-B)群の多型解析及びハプロタイプ構造解析の手法として、RSCA 法を用いた高精度タイピング法を開発した。これを用いて約 60 個体のアカゲザルについて、末梢血顆粒球あるいは B リンパ芽球様細胞株より抽出した mRNA に由来する cDNA を用いて Mamu-A 及び Mamu-B 遺伝子群を解析したところ、1 ハプロタイプ上に少なくとも 1 個以上の遺伝子が存在し、多いものでは 3~4 個にもおよぶことが判明した。また、特定の SIV 抗原への免疫応答性と特定のハプロタイプとの対応が示唆された。一方、RSCA 法を用いた MIC 遺伝子群の解析で、アカゲザルには 3 種の MIC 遺伝子が存在すること、それぞれが多型を示すことが判明した。また簡便な MHC ハプロタイプ識別を目的として、ヒト HLA 領域内にマップされたマイクロサテライトマーカーを用いたアカゲザル個体識別を試みた、ヒトマーカーの約 30%がアカゲザルでも使用可能なことが分かった。さらに NK 細胞レセプターである KIR ファミリーについて、RSCA 法を用いた多型解析を行った。

A. 研究目的

微生物を含む外来抗原への免疫応答には宿主の個体差が存在するが、このことはまた感染症の重症化や合併症の多寡などの疾患感受性の個体差とも関連する。このような免疫応答における個体差は、MHC を含む免疫関連遺伝子群におけるゲノム多様性(遺伝子多型)によって規定されると考えられる。さらに、このような免疫関連遺伝子群のゲノム多様性は、ワクチン接種等による有効な感染防御成立上の個体差にも深く関わる。したがって、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 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。

B. 研究方法

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。

2) ヒト KIR 領域多様性の検討: MHC クラス I 遺伝子は T 細胞への抗原提示分子であると同時に、NK 細胞レセプターの一環である KIR ファミリーのリガンドともなる。また、上記の MIC 遺伝子群は NK 細胞活性化レセプターである NKG2D のリガンドとなることが知られている。このことは MHC 領域遺伝子群が NK 細胞レセプター遺伝子群と機能的に密接な関連を有することを示し、さらには MHC による免疫制御機構においても NK 細胞が関与することを強く示唆する。そこで、ヒト KIR ファミリーのハプロタイプ構成を RSCA 法によって解析する手法の開発を試みた。具体的には、KIR ファミリー間で相関性の高い D2 ドメインを特異的に増幅するプライマーをデザインした。ついで、ランダムに選択した日本人集団及び CEPH ファミリーより得られたゲノム DNA から増幅した D2 ドメインファミリーとリファレンスとの RSCA パターンを検討した。なお、本研究に関連した遺伝子解析研究は、ヒトゲノム遺伝子解析に関する倫理指針を遵守することとし、東京医科歯科大学難治疾患研究所倫理審査委員会の承認を受けている。[研究課題「HIV ウイルス感染防御機構の究明に関

わる研究」(平成 13 年 8 月 28 日付)]

C. 研究結果

1) Mamu-A 及び Mamu-B 遺伝子 cDNA をアカゲザル個体より増幅し、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 SIVgag207-216 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。

2) 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られた。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。

3) 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-a)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。

4) ヒト KIR レセプターファミリーは HLA クラス I 分子をリガンドとする抑制性ファミリーと、それと細胞外ドメインの構造が酷似した活性化ファミリーとで構成される。これらの全ファミリーの遺伝子は、遺伝子重複で生じたものであるため、互いに構造が類似している。そこでファミリー内で最も良く保存される D2 ドメインに対応するエクソンを特異的に増幅し、RSCA パターンを比較した結果、個体ごとにバンドの数ならびに泳動位置が異なるパターンが観察された。さらに CEPH 家系を用いた解析の結果、これらの多型パターンは家系内での遺伝性が確認され、ハプロタイプごとに 3~4 個の多型性を示すバンドと 2 種の固定バンドとで構成されていることが判明した。また同様の解析をアカゲザル個体についても行ったが、ヒト同様に多型性を示すものであった。

D. 考察

1) アカゲザル MHC クラス I 領域の構造解析：Mamu-A、Mamu-B、MIC のそれぞれが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の 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クラス I 領域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。

2) ヒト、アカゲザルとも KIR ファミリーが多重遺伝子族で構成されること、その多型構造解析が RSCA 法を用いることで可能であることが示された。しかしながら、多重遺伝子族であるが故に RSCA 多型パターンはかなり複雑なものとなっており、SSP 法による KIR ハプロタイプ決定データとのつき合わせを行うことが必要であると考えられた。また、これまでに RSCA 解析に用いるリファレンスとしては 1 種のみをテストしたのみであるため、今後別のリファレンスの使用で、より明瞭な多型パターンが得られるか否かを検討することが必要であると思われる。

E. 結論

アカゲザルの MHC クラス I 領域遺伝子群のハプロタイプ構成を簡便に検出する個体識別法として、RSCA 解析に基づくクラス I 高精度タイピング、MIC タイピング及びマイクロサテライトタイピングシステムを開発した。また、このシステムを用いることで特定の SIVgag エピトープへの免疫応答性が MHC ハプロタイプによって規定されることが証明された。さらに、RSCA 法によって KIR ファミリーの多型性が解析可能であることを示した。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sakaguchi M, Nakayama T, Kaku H, Taniguchi K, Saito S, Kimura A, Inoue S: Analysis of HLA in children with gelatin allergy. Tissue Antigens 2002; 59: 412-416.

2) Horii H, Hattori S, Inouye S, Kimura A, Irie S, Miyazawa H, Sakaguchi M: Analysis of the major epitope of the alpha 2 chain of bovine type I collagen in children with bovine gelatin allergy. J. Clin. Allergy Clin Immunol. 2002; 110: 652-658.

3) Okamoto K, Makino S, Yoshikawa Y, Takaki A, Nagatsuka Y, Ota M, Tamiya G, Kimura A, Bahram S, Inoko H: Identification of IkBL as the second MHC-linked susceptibility locus for Rheumatoid Arthritis. Am. J. Hum. Genet. 2003; 72: 303-312

4) Shao W, Yasunami M, Takahashi M, Shibata H, Hamaguchi K, Sakata T, Ota M, Katsuyama Y, Inoko H, Kimura A: Analysis of HLA-B polymorphism in insulin dependent diabetes mellitus in Japanese. MHC. 2003; 9: 163-169

2. 学会発表

1) 安波 道郎、田中 弓子、本多 光男、森 一泰、俣野 哲朗、木村 彰方: アカゲザルクラス I 座位 Mamu-A および Mamu-B の解析. 第 11 回日本組織適合性学会大会, 川越, 平成 14 年 9 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

厚生省科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）

分担研究報告書

サルエイズウイルス認識エピトープと MHC の同定・解析
(ウイルス抗原の MHC への提示における糖鎖の影響に関する研究)

分担研究者 保富康宏 三重大学医学部 助教授

研究要旨：エイズウイルスの env は糖鎖結合部位が非常に多く存在し、それがエイズウイルスの宿主からの免疫機構回避につながっているのでは考えられている。本研究ではサルエイズウイルス(SIV) env の糖鎖結合部位 5 カ所を取り除いた SIV env (d5G)ウイルスの env DNA ワクチンと組み込みワクシニアウイルスを用いてマウスにおける認識を野生型 env と比較した。ウイルス側からでは糖鎖結合部位を取り除くと産生タンパク量は△5G と野生株 SIV においては同等であるが、env 蛋白の発現が野生株 SIV env に比べ感染細胞中に早期に認められること、さらに d5G env 蛋白は感染細胞の膜に近く発現されていること、MHC に提示される過程においては野生株と d5G では違う経路を利用していることが判明した。宿主の免疫反応におけるものでは d5G の env 蛋白はより大量に提示されることが示唆され、それにより細胞性免疫反応、特に細胞傷害性 T リンパ球(CTL)の誘導、認識の両者を強く引き起こすことを見いだした。

保富康宏 三重大学医学部 助教授

に野生型において env 抗原の発現と誘導される免疫反応を比較し糖鎖結合部位の存在意義を検討した。

A.研究目的

HIV は様々な手段により生体の免疫系から回避し、生体内で増殖している。env における糖鎖結合もその一つと考えられこの糖鎖結合部位を取り除いた SIV は生体内で増殖せず、野生型 SIV に対しワクチン効果をもたらす。このことからこの env の糖鎖結合部位の意味を知ることは将来のワクチン開発において重要と考えられることから本研究ではマウスを用いこの糖鎖結合部位を除去した env ならば

B.研究方法

1) 野生型 SIVenv(WT) および SIV5Genv(d5G)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+細胞

をを *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 γ (IFN- γ)産製細胞を測定した。

3) 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。

4) 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。

5) 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。

6) 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。

C.研究結果

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(Fig. 1)。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 γ -IFN 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(Fig. 2a)。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(Fig. 2b、Table 1)。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(Fig. 3)。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(Fig. 4)。

2. SIV env 蛋白の細胞内発現：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を比較したところ d5G の方が早期に大量に発現していた(Fig. 5a,b)。しかしながら細胞内の発現は両者に差は認められなかった(Fig. 5c)。

D.考察

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も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。

E. 結論

SIV env の糖鎖を取り除くと感染細胞での発現が膜表面に近づき、そのことにより抗原提示が高進し強い細胞性免疫の誘導が高進する。

F. 健康危険情報

該当するもの無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Niikura, M., Takamura, S., Kim, G., Kawai, S., Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I., Tian-Cheng Li, Takeda, N. and Yasutomi, Y. Chimeric recombinant hepatitis E virus-like particles as an oral vaccine vehicle presenting foreign epitopes. *Virology* 2002;293:273-280.
- 2) Imanaka-Yoshida, K., Hiroe, M., Yasutomi, Y., Maki, S., Tsuchiya, T., Noda, N., Toyozaki, T., Nishikawa, T., Ishiyama, S., Sakakura, T. and Yoshida, T. Tenascin-C is a

Useful Marker for Disease Activity in Myocarditis. *J. Pathol.* 2002;197:388-394.

- 3) Mukai, K., Yasutomi, Y., Watanabe, M., Kenjo, A., Aota, T., Wang, L., Nishikawa, H., Fujita, T., Kuribayashi, K. and Shiku, H. HER2 peptide-specific CD8⁺ T cells are proportionally detectable long after multiple DNA vaccinations. *Gene Ther.* 2002;9:879-888.

- 4) Uno-Furuta, S., Matsuo, K., Kim, G., Tamaki, S., Takamura, S., Kamei, A., Kuromatsu, I., Kaito, M., Matsuura, Y., Miyamura, T., Adachi, Y., and Yasutomi, Y. Immunization with recombinant bacillus Calmette-Guerin (BCG)-hepatitis C virus (HCV) elicits HCV-specific cytotoxic T lymphocytes in mice. submitted

- 5) Takamura, S., Niikura, M., Li, T.C., Takeda, N., Kusagawa, S., Takebe, Y., Miyamura, T., and Yasutomi, Y. DNA vaccine-encapsulated virus-like particles from an orally transmissible virus stimulates immune responses by oral administration. submitted

- 6) Hayashi, T., Yasutomi, Y., Hasegawa, K., Sasaki, Y. and Onodera, T. Interleukin-4-expressing plasmid inhibits reovirus type-2-triggered autoimmune insulinitis in DBA/1J suckling mice. submitted

2. 学会発表

- 1) サル免疫不全ウイルス糖鎖欠損エンペロープ蛋白の免疫誘導能の解析: 高村史記、森一秦、武部豊、草川茂、永井美之、

保富康宏・・・第16回日本エイズ学会
学術集会（名古屋）

2)糖鎖欠失 SIV 感染ザルに誘導された
抗 Env 抗体エピトープの解析:杉本知恵、
保富康宏、塩田達雄、永井美之、森一
秦・・・第16回日本エイズ学会学術集
会（名古屋）

3)Env エイズワクチンへの糖鎖欠失変
異の効果: 森一秦、杉本知恵、保富康宏、
齋藤紀子、杉本知恵、草川茂、武部豊、
中山英美、塩田達雄、永井美之・・・第
16回日本エイズ学会学術集会（名古屋）

4)HIV CTL エピトープ表出 E 型肝炎ウ
イルス様中空粒子の経口投与による粘膜
面におけるエピトープ特異的細胞性免疫
の誘導:高村史記、新倉昌浩、武田直和、
宮村達男、保富康宏・・・第50回日本
ウイルス学会学術集会（札幌）

5)パラインフルエンザ2型ウイルス
(PIV2)による外来遺伝子発現及びM蛋白
を改変/失活させた PIV2 の増殖能解析:
河野光雄、保富康宏、高村史記、玉置繁
憲、西久保公映、垣内雅彦、駒田洋、小
塚祐司、山下恭史、鶴留雅人、伊藤守弘、
西尾真智子、伊藤康彦・・・第50回日
本ウイルス学会学術集会（札幌）

6)E型肝炎ウイルス(HEV)ウイルス様中
空粒子(VLP)をベクターとして用いた
HIV 経口ワクチンの開発: 保富康宏、高
村史記、新倉昌浩、武田直和、宮村達
男・・・第50回日本ウイルス学会学術
集会（札幌）

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

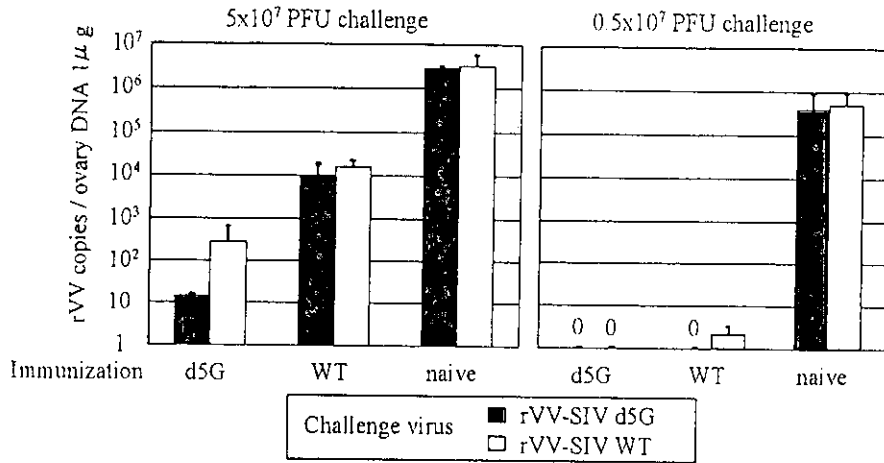


Fig. 1 免疫マウスにおける *in vivo* での SIV env 組み込みワクシニアウイルスに対する抗ウイルス効果

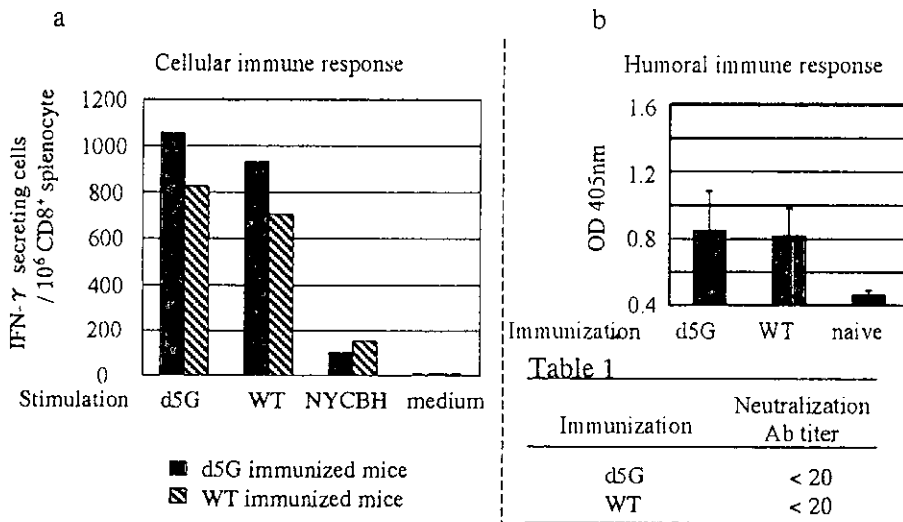


Fig.2 DNA ワクチンにより誘導される免疫反応の比較 (a)ELISPOT assay (b)ELISA による抗 SIV env 抗体の測定 Table 1 SIV に対する中和活性

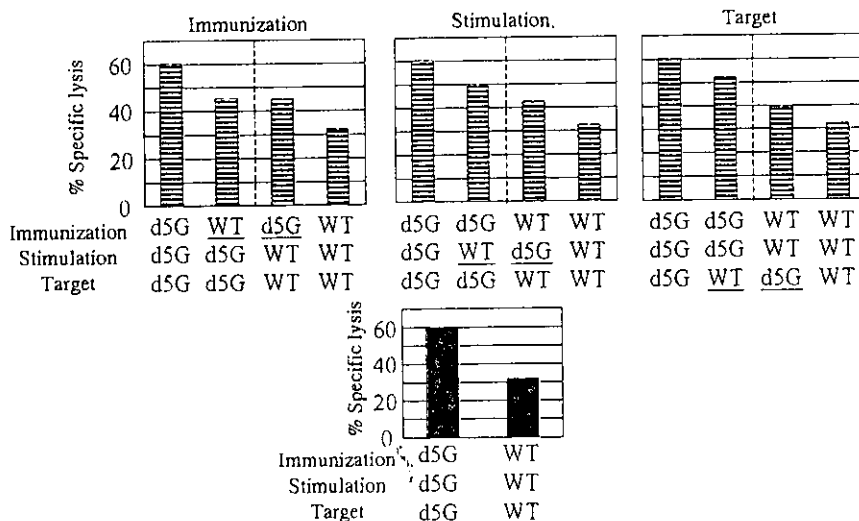


Fig. 3 WT env と d5G により誘導される CTL 活性の比較

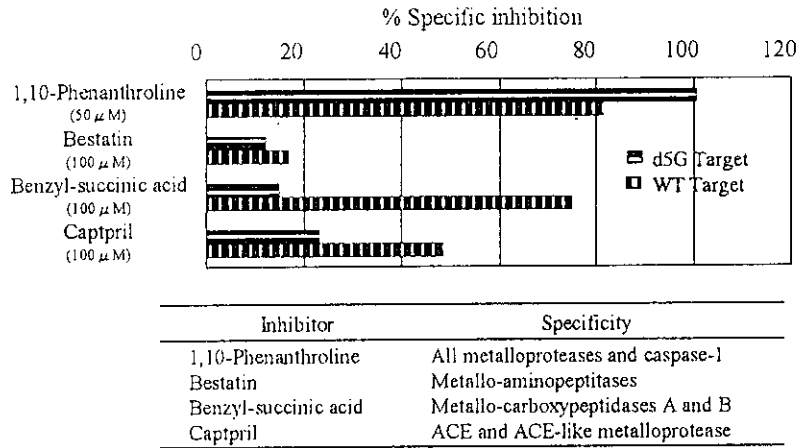


Fig. 4 標的細胞の抗原提示の CTL による認識における WT と d5G の違い

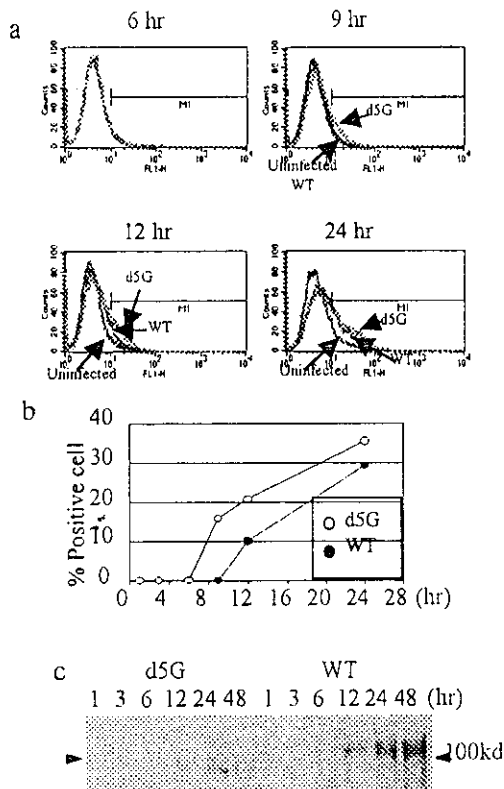


Fig. 5 WT env と d5 env の感染細胞における発現の違い (a)細胞膜表面への env 蛋白の発現 (b)発現率の時間的な変化 (c)細胞内の発現量の Western blot による検討

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

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 グループ長

研究要旨：リコンビナントベクターを用いて SIV あるいは HIV 抗原に特異的な免疫を誘導し、それらを防御免疫に関連させることの可能性を検討した。

協力研究者

仲宗根正、松尾和浩、浜野隆一、染谷健二、川原守、海津雅彦、滝澤万里、泉泰之、原敬志、吉野直人、堀端重男、兼清優、浜武牧子、田中陽子、山本直樹（国立感染症研究所・エイズ研究センター）

A. 研究目的

HIV 感染が WHO の報告で約 6 0 0 0 万人に達しており種々の治療法や薬剤の開発にもかかわらず、増加し続けており、その 95%以上が発展途上国に認められている。これらの現状から HIV 感染を有効にコントロールするにはワクチン開発が最も効果的であることは明らかである。しかし、HIV 感染が免疫組織を破壊することからこれまでのワクチン開発とは異なった課題として人類の健康を保持するためには第一のプライオリティとしてとらえられている。従って効果的なワクチンを作製するにはワクチンの有効性のみでなく安全性や安定性さらに易入手性が要求されている。これらの課題に対応することを目的にして安

全でかつ免疫誘導能に優れたワクチンとしてリコンビナントベクターを用いた HIV 候補ワクチンを開発する。

本研究では特に BCG のリコンビナントベクターとしての有効性と問題点を検討し、HIV ワクチンのベクターとして実用化が可能かどうかを検討する。さらに上記の目的を満たす他のリコンビナントベクターの有用性についても検討する。

結核ワクチンとしての BCG は世界で最も使用されているワクチンであり、その有用性や問題点については既に明らかになっている。HIV ワクチンのリコンビナントベクターとしての BCG については約 2 0 年前からその開発が進められているが HIV に対する有用性については明らかにされていない。その理由として挿入した外来抗原に対する免疫の持続に関しては他のベクターより優れており、少なくとも数年は持続する事が明らかになっている。しかし rBCG 単独では外来抗原の発現が他のベクターに比べてやや劣るのではないかと懸念されており、単独投与による防御免疫の誘

導は成功していない。しかし、BCG の有用性を考慮してその発現を上昇させることができるかどうかについて外来抗原の発現のためのプロモーターエンハンスの改良とともにコドンの至適化を検討し、HIV ワクチンとしての BCG の有用性を高めることができるかどうかを検討する。

さらに感染防御に結びつく細胞性免疫能の特性をサル MHC の情報を加味しながら検討する。

B. 研究方法

1) BCG のコドンの至適化による影響を検討した。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、オプティマル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。

2) 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を行う P9CD エピトープは SIV 及び SHIV 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。

(倫理面への配慮)

所内に設置された動物実験委員会の承認を得て行われた。

C. 研究結果

1) rBCG におけるマイコバクテリアコドン至適化による in vivo での免疫誘導能発現の増幅について検討した。

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、