

cross-presentationによるCTL活性化能は弱かった(図1)。アポトーシス細胞は樹状細胞のcross-presentationをうける強力な抗原として知られている。エイズの病態においても血中ウイルスや抗原抗体複合体とともに大量に発生するHIVの細胞傷害によるアポトーシス細胞の存在がcross-presentationを介した抗HIV免疫応答に重要な役割を果たしていると考えられる。センダイウイルスベクターの感染で樹状細胞に強いアポトーシスが誘導されることが明らかとなったため、Gagを発現するセンダイウイルスベクター感染樹状細胞と非感染樹状細胞を混合した場合の抗原提示を比較したところ、センダイウイルス感染のみによるCTL活性化よりも強いことが示された(図2)。

これらの抗原を利用して、最も効率よくGag特異的CD8陽性T細胞を健常人で誘導する方法について検討したところ、Yeast VLPとウイルスベクターとを組み合わせて樹状細胞にGag抗原を提示させることにより、Gagテトラマー陽性細胞の存在を確認できた(図3)。従って内在性の抗原提示とcross-presentationを組み合わせることでT細胞のin vitroプライミングが可能であることを明らかにした。

D. 考察

HIV感染した樹状細胞によるウイルス抗原の発現は低レベルである。一方、感染者の体内には大量のウイルスやGag抗原抗体複合体が存在し、かつ感染T細胞の多くが死んでいくことから、樹状細胞によるcross-presentationがCD8陽性T細胞の活性化に重要であろう。不活化ワクチンの場合、このcross-presentationの効率がCTL誘導能を左右するが、それほど効率はよくない。従って、ウイルスベクターを利用したワクチンと併用するのがCTLの誘導にはより効果的と考えられる。

E. 結論

樹状細胞による外来性抗原のcross-presentationを介するGag特異的CD8陽性T細胞の活性化は、ウイルスベクターによる内在性抗原の提示による活性化と比べて低レベ

ルである。しかしながら、樹状細胞を成熟化させる活性を有するYeast VLPとウイルスベクターを組み合わせることにより、T細胞のin vitroでのプライミングも可能であることが明らかとなった。この様なin vitroの系を用いてワクチン抗原の免疫誘導能の評価およびその効率の改善を図ることは、種々の感染症対策としても有用であろう。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsunetsugu-Yokota, Y., Morikawa, Y., Isogai, M., Kawana-Tachikawa, A., Odawara, T., Nakamura, T., Grassi, F., Autran, B., Iwamoto, A.: Yeast-derived HIV type-1 p55gag virus-like particles activated DCs and induce perforin expression in Gag-specific CD8+ T cells by cross-presentation of DCs. *J. Virol.* 77:10250-10259, 2003
- 2) Komuro, I., Yokota, Y., Yasukda, S., Iwamoto, A., Akagawa, K. S.: CSF-induced and HIV-1-mediated distinct regulation of Hck and C/EBP β represent a heterogeneous susceptibility of monocyte-derived macrophages to M-tropic HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* 198:443-453, 2003
- 3) Yoshizawa, I., Mizuochi, T., Ogata, A., Murakami, M., Yagaita, H., Takahashi, Y., Takemori, T., and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Studies on the generation and maintenance of mucosal CTL against human immunodeficiency virus type-1 Gag in mice. *AIDS Res. Hum. Retro.*, 9:469-479, 2003

2. 学会発表

- 1) Y. Yokota, M. Isogai, K. Otake.: The effect of HIV-1 Nef expression on dendritic cells and macrophages. International AIDS Symposium. パリ、平成15年7月。
- 2) 磯貝まや、藤井陽一、藤田美歌子、足立昭

- 夫、竹森利忠、横田（恒次）恭子。HIV Nef 発現が樹状細胞機能に及ぼす影響の解析。第51回ウイルス学会、京都、平成15年10月。
- 3) 飯島沙幸、木全清典、三輪正道、横田恭子、間陽子。HIV-1 感染・複製における vpr 遺伝子の機能。第51回ウイルス学会、京都、平成15年10月。
 - 4) 笠原（仁田原）優子、宗田光峰、飯島沙幸、横田恭子、間陽子。最終分化マクロファージ細胞内 importin α による HIV-1 vpr の核移行解析。第51回ウイルス学会、京都、平成15年10月。
 - 5) 倉光球、橋爪智恵子、我妻昭彦、横田恭子、間陽子。HIV-1 Vpr による pre-mRNA のスプライシング反応阻害の in vivo および in vitro 解析。第51回ウイルス学会、京都、平成15年10月。
 - 6) 横田（恒次）恭子、磯貝まや、岩本愛吉、立川（川名）愛。HIV 感染における樹状細胞による cross-presentation の重要性について。第33回日本免疫学会総会、福岡、平成15年12月。
 - 7) 倉光球、橋爪智恵子、我妻昭彦、横田恭子、間陽子。HIV-1 Vpr による pre-mRNA スプライシング阻害反応の解析。第17回エイズ学会、神戸、平成15年11月。
 - 8) 飯島沙幸、木全清典、横田恭子、三輪正道、間陽子。ウイルス増殖における HIV-1 Vpr の機能解析。第17回エイズ学会、神戸、平成15年11月。

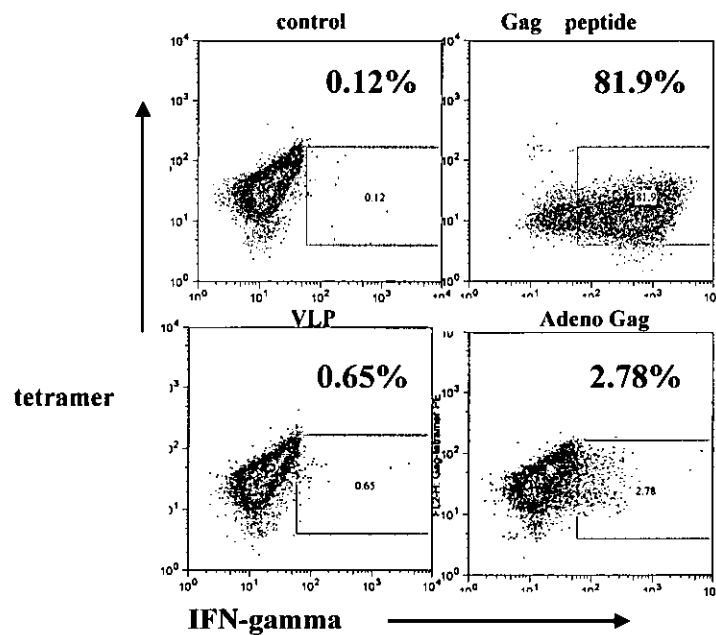


図1. 樹状細胞の抗原提示効率の比較

単球由来樹状細胞に Gag-peptide (1 μ M), VLP (10 μ g/ml), Gag 発現 Adeno virus (moi 500) を加え、翌日 Gag-peptide 特異的 CTL と共培養して 6 時間後の細胞内 IFN- γ 産生 (横軸) を比較した結果、Adeno virus 感染では 2.78%, VLP の cross-presentation では 0.65% が刺激をうけて活性化されていることが明らかとなった。縦軸は Gag tetramer 陽性度を示すが、ペプチド刺激で T 細胞受容体の downmodulation が強く誘導されていることが示されている (右上)。

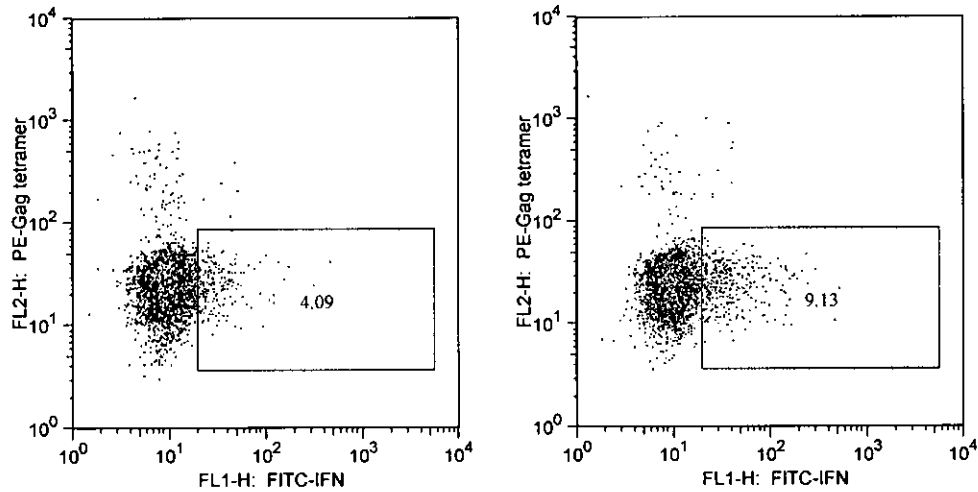


図2. アポトーシス細胞による樹状細胞の抗原提示増強効果。

Gag 発現センダイウイルス感染樹状細胞は Gag 特異的 CTL 細胞を活性化する (左、4.09%)。この時、未熟な非感染樹状細胞を共存させると、その T 細胞活性化は増強した (右、9.13%)。センダイウイルス感染 2 日後にほとんどの樹状細胞にアポトーシスを誘導していたことから、アポトーシス細胞の取り込みがこの効果に関与していると考えられる。

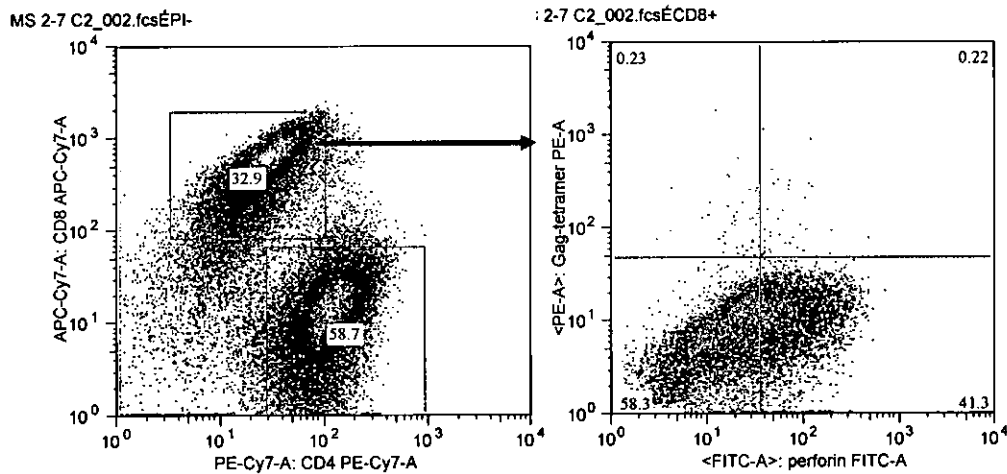


図3. Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞の in vitro 誘導。

SeV Gag 感染 DC に VLP を 10mg/ml でパルスして T 細胞と共培養し、7 日後の T 細胞を更にもう一度同様の抗原で刺激した。7 日後の T 細胞を CD8 陽性 T 細胞にゲートをかけ (左: 横軸は CD4、縦軸は CD8 の発現)、perforin (横軸) と Gag-tetramer (縦軸) の発現を解析した (右)。Tetramer 陽性細胞は 0.45% で、その内半分は perforin 陽性であった。

1 2. CTL による防御免疫の評価系に関する研究

分担研究者 横幕 能行 千葉大学医学部附属病院助手

研究要旨 臨床検体由来 *gag-pol* を直接 provirus DNA に効率よくクローニング可能な plasmid の構築を行った。Gateway cloning system で用いられる組み換え用カセットを改変して使用することにより、HIV-1 provirus DNA への *gag-pol* のクローニングの高効率化を実現した。新規に開発した系を用いて、タイ流行株由来 *gag-pol* を発現する標的細胞作成を試みたところ、6 クローン の確立に成功した。本システムの構築により、エピトープ領域のアミノ酸変異が CTL の認識に与える影響を、non-clade B HIV-1 の *gag-pol* にまで範囲を拡大し、検討することが可能となった。

A. 研究目的

HIV-1 の増殖抑制には特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL) が重要な役割を果たしていると考えられている。これまで様々な CTL 誘導型ワクチンの開発が試みられてきたが、有効な抗 HIV-1 ワクチン開発のためには、HIV-1 の変異による CTL 認識からの逃避機序の解析が必要である。

これまで、CTL 認識からの逃避機序については、主にエピトープ領域の MHC-I 分子へのアンカー部位のアミノ酸変異によるエピトープ-MHC-I 複合体形成障害や、TCR に提示される側のアミノ酸変異による CTL 認識効率低下に関して検討がなされてきた。

我々は、HIV-1 感染細胞では、エピトープや周辺領域のアミノ酸変異によって細胞内抗原提示機構が障害される結果、CTL 認識からの逃避がおこるとの仮説を立てた。これを実証するため、*gag* 領域を組み替え可能な HIV-1 ベクターを構築し、臨床検体由来 *gag* 発現 CTL 標的細胞を作成する系を確立した (HIV-1 法)。HIV-1 法によって HLA-A*0201, 2402 および B*5101 拘束性エピトープ領域に様々なアミノ酸変異を有する clade B 臨床検体由来 *gag* を発現する標的細胞を作成し、peptide pulse 法で作成した標的細胞との認識効率を、CTL アッセイによって比較した。その結果、Figure 1 に示すように、主にエピトープ領域のアミノ酸変異によって従来の peptide pulse 法では検出できないエピトープの切り出しから提示に至る過程に影響を与える機序による CTL 認識からの

逃避が高頻度に生じていることが明らかになった。

抗 HIV-1 ワクチンが最も必要とされる地域で流行しているのは non-clade B HIV-1 であり、ワクチン開発の需要は極めて高い。また、*pol* 領域にも多くの CTL エピトープが同定され、また、存在が予測されている。これまで clade B HIV-1 *gag* の検討で明らかにした逃避機序が、non-clade B HIV-1、また、Gag のみならず Pol に存在するエピトープ領域でも高頻度に認められる現象か否かを、多くの臨床検体の情報に基づいて検討することは、将来、効果的なワクチン抗原選定に有用な情報を提供すると考えられる。

Gag 中のエピトープ解析に使用した pCTLpac (Figure 2a) を用いても、PCR 法で増幅した *gag-pol* を、制限酵素を用いて組み込むことが可能である。しかしながら、多検体の検討には HIV-1 ベクターへの *gag-pol* の効率的なクローニング方法の確立が望ましい。

そこで、本研究では、non-clade B HIV-1 を含め臨床検体由来 *gag-pol* 中の変異エピトープの評価を行うため、効率良く *gag-pol* のクローニングが可能な HIV-1 ベクターの構築を行った。さらに、実際にタイ流行株感染者の臨床検体由来 *gag-pol* 発現標的細胞の作成を試みた。

B. 研究方法

エピトープ領域のアミノ酸変異と CTL 逃避との関連を容易に考察可能とするため、臨床検

体由来 *gag-pol* が組み込まれた provirus クローンを簡易かつ迅速に作成可能な新規 plasmid の構築を、Gateway cloning system (Invitrogen 社) を用いて行う。国立感染症研究所吉先生の協力でタイのランパンコホートでインフォームドコンセントを得て採取された CRF01_AE 感染者 PBMC を使用し、provirus DNA を抽出後、*gag-pol* 領域を PCR で増幅し、新規 plasmid へのクローニングを試みる。成功した場合、VSV pseudotype HIV-1 を作成し、適当な indicator cell を用いて感染性を確認する。十分な感染性が確認された場合、EB virus transformed B cells (B-LCLs) を用いて臨床検体由来 *gag-pol* 発現標的細胞を作成する。作成に成功した場合、sequence 解析を行う。

(倫理面への配慮) 本研究では依頼施設においてインフォームドコンセントを得て採取したものを使用した。

C. 研究結果

Gateway cassette の改変と臨床検体由来 *gag-pol* クローニングベクター CTLpacGW の構築

Gateway cloning system は、 λ フェージの組換え機構を応用することにより、制限酵素を用いることなく、迅速に目的遺伝子のクローニングを可能にする。また、組みかえカセット (Figure 3a) 中に組み込まれた *ccdB* 遺伝子による positive selection によって、効率的な組みかえ体選択が可能である。しかしながら、HIV-1 provirus DNA に組み込んだ場合、何らかの機序により、plasmid DNA の欠失が生じることから使用不可能であった。そこで、*ccdB* 遺伝子領域を、*tac* プロモーターで発現される α ペプチド遺伝子で置換した改変 Gateway cassette を作成した (Figure 3b)。これを、pCTLpac の *SbfI* から *Sall* 領域に組み込み、pCTLpacGW (Figure 2 b) を構築した。強力なプロモーター活性による α ペプチドの過剰発現により、*ccdB* 遺伝子を用いた Gateway cassette と同等の positive selection が可能になった。このプラスミドを用いて臨床検体由来の *gag-pol* を組み込む反応の概略を Figure 4 に示す。PCR 法によって 5',3'末端に

それぞれ異なる組み換えに必要な 25 塩基からなる attachment sequence を付加して増幅した *gag-pol* 全長 5.1kbp の PCR 産物と、pCTLpacGW、組み換え酵素をエッペンドルフチューブ内で反応させることにより、*gag-pol* が改変 Gateway cassette と置き換わる。その後、大腸菌を形質転換すると、*gag-pol* が置換されたもののみが選択されコロニーを形成し、様々な *gag-pol* が組み込まれたクローンを迅速に得ることが可能となった。これらの工夫により、*gag-pol* が得られれば、3 日以内に確実に臨床検体由来 *gag-pol* が組み込まれた provirus クローンを、制限酵素を用いることなく作成することが可能になった。さらに、遺伝子導入効率を in situ で確認可能とするために provirus の領域外に、LTR 以外のプロモーターの調節下で発現される d2EGFP 遺伝子を組み込んだ。

タイ流行株感染者由来の *gag-pol* 発現標的細胞作成

まず、CRF01_AE の感染性分子クローンである NH1 の *gag-pol* を発現する標的細胞の作成を試みたところ、HIV-1 感染者血清を用いた western blotting によって *gag-pol* の発現が確認された (date not shown)。次に、実際にタイ流行株感染者由来の *gag-pol* 発現標的細胞作成を試みた。北タイランパン県病院 HIV 感染者コホートより CD4 が 100/ μ l 以上の感染者 45 人の末梢血リンパ球から採取された DNA より、*gag-pol* 領域を PCR で増幅することに成功した。Gateway 反応によって一人の感染者からそれぞれ 3 クローン、合計 135 クローンを作成した。こうして得られた provirus DNA と VSV-G 発現プラスミドを 293T 細胞に co-transfection し VSV pseudotype virus を作成した。MAGI 細胞などに感染させ、感染性を確認したところ、6 クローン (4.4%) が非常に高い感染性を示した。これらを用いることにより、EB virus transformed B 細胞を用いて CTL 標的細胞の作成が可能であった (data not shown)。

標的細胞の作成に成功した 6 クローンの、p17, p24 領域に存在する clade B Gag の解析で注目した HLA-A*0201, A*2402, B*5101 拘束性

CTL エピトープ領域のアミノ酸配列を解析したところ、ことなるパターンのアミノ酸変異が認められた (data not shown)。

D. 考察

本研究において、様々なアミノ酸変異を有する *gag-pol* 発現標的細胞パネルの作成のために、多検体処理が可能かつ簡便な *gag-pol* のクローニングシステムの開発が不可欠であった。この目的のため、Gateway cloning system の応用を試みた。しかしながら、組みかえ用カセットを HIV-1 provirus DNA に組み込んだところ、plasmid が著しく不安定となった。この現象は、効率的な組みかえ体の選択を可能にするために組みかえカセット内に組み込まれていた *ccdB* 遺伝子機能をノックアウトすることにより消失したことから、*ccdB* 遺伝子と HIV-1 provirus DNA との予期せぬ相互作用によるものと考えられた。本研究においては、組みかえ用カセットを改変することによりこの問題を解決した。標的細胞パネル作成のためには、多くのクローンを作成して実際にウイルスを作成したのち、感染性を有する *gag-pol* の選別を行うのが最も効率的であり、Gateway cloning system の導入により、*gag-pol* を直接 provirus DNA に固定可能となった意義は大きいと考えられる。

この系で作成した標的細胞パネルを用いることにより、non-clade B HIV-1 を含め、*gag* と *pol* のエピトープに関する検討が可能となる。clade B *gag* と同様の検討を行うことにより、エピトープ領域のアミノ酸変異がエピトープの切り出しから細胞表面の提示にいたる過程を障害することにより CTL 認識から逃避する機序が、HIV-1 感染症で一般に認められることをより強く証明することができる可能性がある。また、様々な逃避エピトープの情報の蓄積が期待される。現在、ヒト由来細胞においてエピトープの切り出しに関与する分子が同定されており、変異エピトープの情報がこれらの機能解析に有用な可能性がある。

タイの感染者由来の検体を用いた標的細胞作成実験では、感染性を有するクローンの割合

は作成したクローンの約 4%程度にとどまった。現在、クローニングした *gag-pol* の sequence を解析しているが、感染性がない原因は、必ずしも遺伝子中の stop codon によるものではないことを示す結果を得ている。

今回、PCR 法で増幅した範囲は、*gag*、*pol* および *vif* の全長が含まれる。クローニングされた遺伝子の sequence と感染性の情報を詳細に検討することにより、HIV-1 の感染性に関わる塩基配列やアミノ酸配列が明らかになる可能性がある。そこで、現在、本研究で固定した全 135 クローンについて塩基配列の解析をすすめている。

今回、確立した系により、*gag*、*pol* の解析が可能になった。残る構造遺伝子である *env* や多くの CTL エピトープが同定されている *nef* に関しても、今回開発した改変 Gateway cassette を用いることにより、HIV-1 ベクターによる発現系構築が可能である。特に、*env* については、近年、中和抗体誘導ワクチンを再評価する報告もあることから、発現系構築は有用であると考えられ、検討を行っている。

E. 結論

臨床検体由来 *gag-pol* を直接 provirus DNA に効率よく固定可能な plasmid を構築した。Gateway cloning system で用いられる組み換え用カセットを改変して使用することによって、効率よく provirus DNA にクローニングすることが可能になった。

この系を用いて、実際にタイ流行株感染者由来の provirus DNA から PCR 法で増幅した *gag-pol* 全長を、制限酵素を用いることなく、迅速に *gag-pol* を provirus に組み込むことができた。

得られた provirus を用いて、VSV pseudotype virus を作成し、indicator cell で感染性を確認することにより、B-LCL を用いて標的細胞を作成可能なクローンを確実に選択することができ、最終的に 6 クローンのタイ流行株 *gag-pol* 発現標的細胞の作成に成功した。

タイ流行株を始め、Non-clade B HIV-1 由来の様々な *gag-pol* が組み込まれたクローンを容

易に得ることができることから、エピトープ領域のアミノ酸変異が CTL の認識に与える影響を詳細に検討することが可能になると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Myint L, Matsuda M, Matsuda Z, Yokomaku Y, Chiba T, Okano A, Yamada K, Sugiura W: Gag Non-Cleavage Site Mutations Contribute to Full Recovery of Viral Fitness in Protease Inhibitor-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Antimicrob Agents Chemother* 2004, 48: 444-452.
- 2) Yokomaku Y, Miura H, Tomiyama H, Kawana-Tachikawa A, Takiguchi M, Kojima A, Nagai Y, Iwamoto A, Matsuda Z, Ariyoshi K: Impaired Processing and Presentation of Cytotoxic-T-Lymphocyte (CTL) Epitopes Are Major Escape Mechanisms from CTL Immune Pressure in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J Virol* 2004, 78: 1324-1332.

2. 学会発表

- 1) 横幕能行、ジラワン・シーサワット、ブサラワン・シーワンタナ、松田善衛、有吉紅也：タイ流行株臨床検体由来 *gag-pol* 発現 CTL 標的細胞パネル作成の試み. 第 51 回日本ウイルス学会学術集会総会. 2003.10 京都
- 2) 横幕能行、松田善衛、千葉智子、巖馬華、松田昌和、杉浦 互：抗 HIV-1 新規候補薬剤検索のための多検体処理可能なスクリーニングシステム構築. 第 17 回日本エイズ学会学術集会総会 2003.11 神戸

(a) A*2402 KYK LKHIVW

(1) KYK LKHIVW特異的CTLによる認識

amino acid sequence	CTL recognition	
K Y K L K H I V W peptide	HIV-1	
-----	○	○
-- R -----	×	×

(2) KYRLKHIVW特異的CTLによる認識

amino acid sequence	CTL recognition	
K Y K L K H I V W peptide	HIV-1	
-----	×	×
-- R -----	○	○
Q - R -----	○	×
-- R ---- L --	○	×
R - R ---- L --	○	×
Q - K -----	×	×

(b) A*0201 SLYNTVATL

SLYNTVATL特異的CTLによる認識

amino acid sequence	CTL recognition	
S L Y N T V A T L peptide	HIV-1	
-----	○	○
----- I ----	○	○
----- L ----	×	×
- V -----	○	×
-- F ---- V -	○	×

(c) B*5101 NANPDCKTI

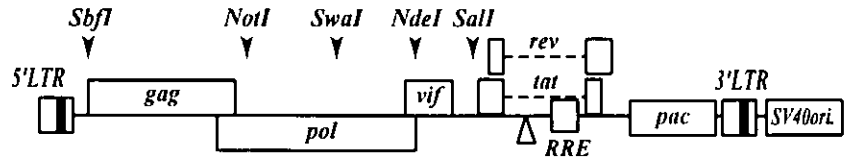
NANPDCKTI特異的CTLによる認識

amino acid sequence	CTL recognition	
N A N P D C K T I peptide	HIV-1	
-----	○	○
-- S -----	×	×

Figure 1 clade B 臨床検体由来Gag中のCTLエピートープのアミノ酸変異とCTL認識

p17MA (A*2402, A*0201) およびp24CA (B*5101) 中のCTLエピートープについて解析を行った。3つのCTLエピートープ領域のアミノ酸変異パターンが最大になるように6つの臨床検体gagクローンを選択し、HIV-1ベクターを用いて標的細胞を作成した (HIV-1法)。clade B臨床検体由来gagでの解析の結果、peptide pulse法では認識されるにもかかわらずHIV-1法で抗原発現した場合は認識されない変異エピートープが見出された。A*2402においては、検討した臨床検体でKYK LKHIVWをもつクローンは存在せず、ほとんどのクローンで3番目のKがRに変異していた。今回、用いたKYK LKHIVW特異的CTLはKYRLKHIVWを認識しなかった。そこで、KYRLKHIVW特異的CTLを用いて認識を検討した。reference sequenceはHXB2。○：認識あり ×：認識なし

(a) pCTLpac



(b) pCTLpacGW

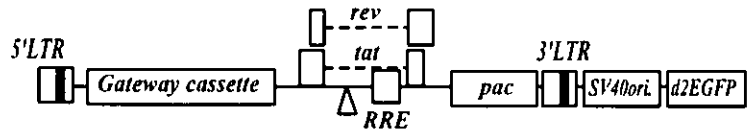
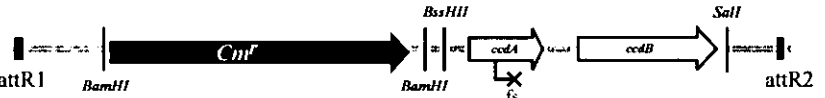


Figure 2 Constructの概略

pCTL.pacのSbfIからSallの間を、改変したGateway cassetteに置換した。△:1.5 kbp env deletion、▼:unique restriction enzyme site, pac: puromycin N-acetyltransferase gene

(a) Gateway cassette



(b) 改変Gateway cassette



Figure 3 改変Gateway cassetteの概略

ccdA(frame shiftによって発現しない) およびccdB全領域を、αペプチド発現ユニットに置き換えた。Cm^r: クロラムフェニコール耐性遺伝子 attR: attachment sequence R

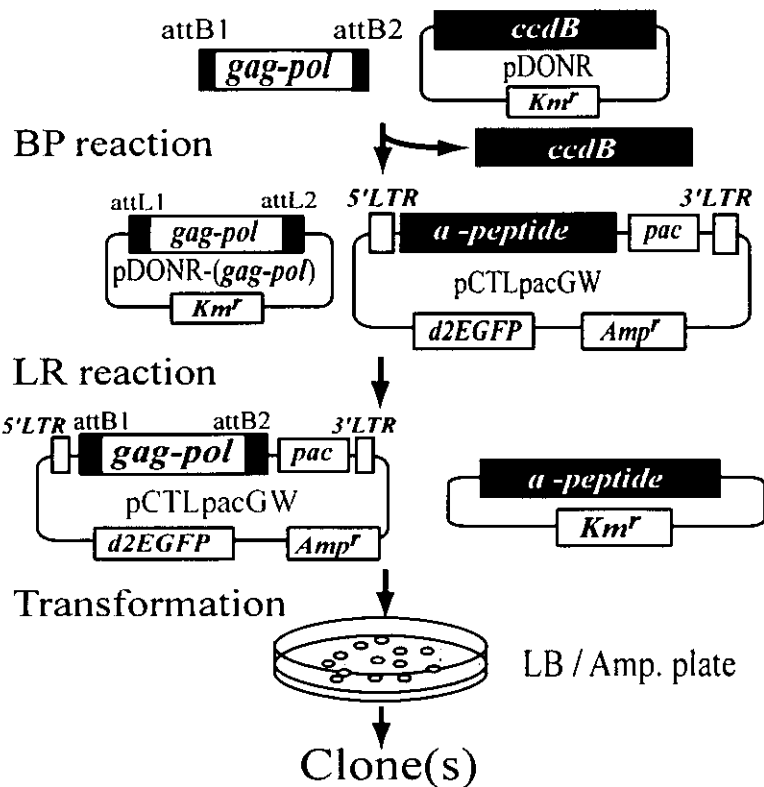


Figure 4 Gateway systemを用いた gag-pol のpCTLpacGWへの組込み反応

gag-polを5',3'末端にそれぞれ異なる25bpの配列からなるattachment sequenceを付加してPCRで増幅し、pCTLpacGWと酵素をチューブ内で反応させるとplasmidに組込まれる。組込み反応は一本のチューブ内でBPとLRという2つの反応を経て行われる。positive selectionによって、gag-polが組込まれたもののみがコロニーを形成し様々なクローンが得られる。短時間の簡易な反応によってclonal fixationが可能となった。

1 3. 神経幹細胞を用いた HIV 感染動態の解明

分担研究者 中島 典子 国立感染症研究所感染病理部

研究協力者 岩田 奈織子 国立感染症研究所感染病理部

研究要旨 HIV 脳症の動物モデルである SIV 脳症の病態を解析できる *in vitro* の培養系をサル胎児脳由来の神経幹細胞を用いて確立した。神経幹細胞をニューロンおよびグリア細胞からなる培養系に分化誘導し、SIV の感染性を調べたところ、マクロファージ向性の SIV の中でも Neurovirulent な SIV17E/Fr の感染性が最も高かった。また EGFP 遺伝子を挿入した SIV17E/Fr Δ nef-GFP を感染させると GFP 陽性細胞は経時的に増加し、SIV p27 抗原陽性であることがわかった。アストロサイトのほか、ニューロンでも GFP 陽性細胞が認められた。以上のことからマイクログリアフリーの培養系でも SIV は脳固有細胞に感染することがわかった。

A. 研究目的

HARRT 療法後、HIV 感染者の延命率は改善されたが、HIV 脳症・AIDS 痴呆は AIDS 患者の 20% に合併し、患者の quality of life を著しく損ねている。その発症病理はいまだ不明な点が多く、HIV 脳症の発症を予防するためには、どの時点でどのような治療を開始すべきかを知る必要がある。これには HIV 感染後の中枢神経系におけるウイルスの動態を明らかにし、脳炎発症の機序を解明することが必要である。HIV は脳組織内では、主にマイクログリア、マクロファージ、血管内皮細胞で増殖するといわれているが、ニューロン、アストロサイトでは restricted な感染にとどまっていると考えられている。本研究により脳固有細胞における HIV の動態および脳固有細胞と感染マクロファージ、感染マイクログリアとの関係を明らかにしたいと考えている。

B. 研究方法

1. サル神経幹細胞を用いた新しい培養系の確立

HIV 脳症の動物実験モデルであるサルの SIV 脳症を解析する際、*in vivo* の実験では大型動物であるサルを扱わなくてはならない。*in vitro* で解析できるようにするために、サル胎児脳から分離培養した神経幹細胞を用いた培養系を確立した。

在胎 8-11 週のカニクイザルの胎児脳を摘出

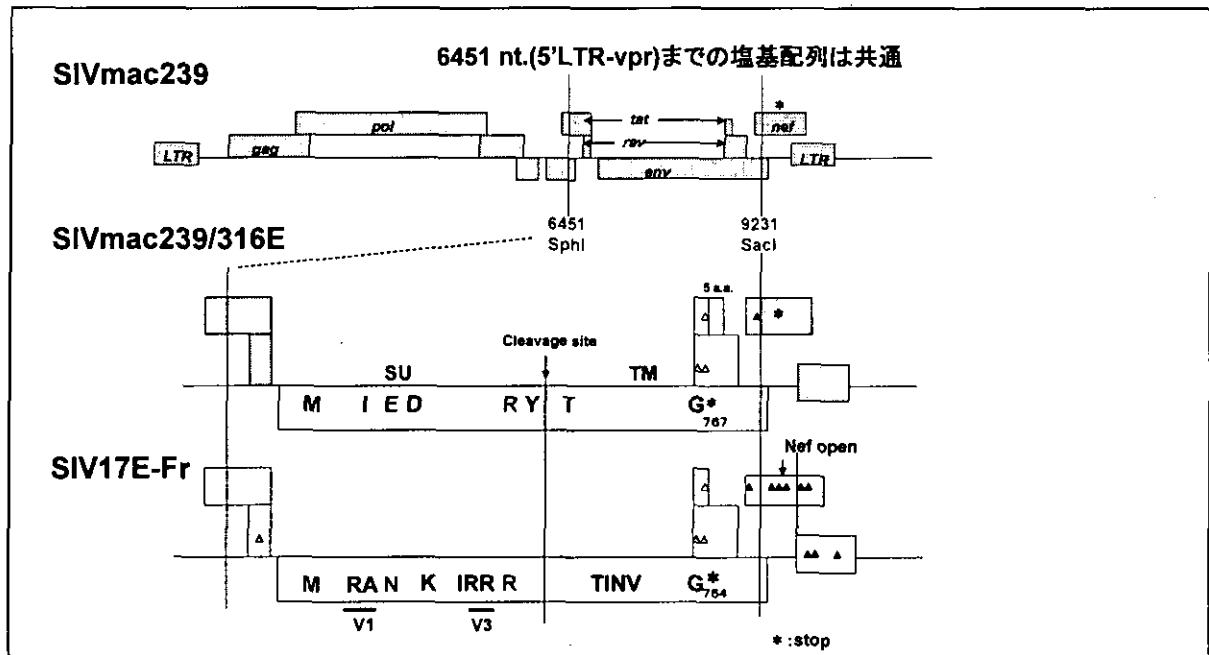
し、線条体、海馬、中脳、脳室周囲部分をミンチにして EGF (上皮増殖因子)、FGF-2 (線維芽細胞増殖因子)、LIF (白血球遊走阻止因子) を含む無血清培地で神経幹細胞を分離培養した (Neurosphere 法)。増殖継代した神経幹細胞を、培地から増殖因子を取り除き、血清を添加することにより分化誘導した。まず、サルの神経幹細胞についての報告はほとんどないのでその特徴を調べた。

- 1) 神経幹細胞であることの確認 (抗 nestin 抗体、抗ムサン抗体、抗 CXCR 4 抗体で免疫染色を行う)。
 - 2) 分化誘導後の細胞の同定とその割合を調べる。
 - 3) SIV のレセプター、コレセプターの候補となる CD4、CXCR4、CCR5、CCR3、APJ の発現を mRNA レベルでは RT-PCR 法で、タンパクレベルでは FACS を用いて調べる。
- ##### 2. 細胞向性の異なる SIV クローンの感染実験
- T 細胞向性 (T-tropic) である pSIVmac239、マクロファージ向性 (M-tropic) である pSIVmac239/316E、M-tropic で neurovirulent (N-tropic) である pSIV17E-Fr の 3 種類の infectious clone および nef に EGFP 遺伝子を CMV の promoter とともに挿入し pSIV17E/Fr Δ nef-GFP を 293T 細胞に transfection してその培養上清をウイルス液として回収した。各 SIV クローンの相違を表 1 及び図 1 に示す。

表 1

SIV クローン	細胞指向性	SIVmac239との相違
SIVmac239	T-tropic	
SIVmac239/316E	M-tropic	Env,tat,rev,nef
SIV17E-Fr	N-tropic	Env,tat,rev,nef,3'LTR
SIV17E-Fr Δ nef-GFP	M-tropic & Neurovirulent	Env,tat,rev, Δ nef-GFP

図 1 SIV クローンの相違



増殖している神経幹細胞 (neurosphere) をトリプシン処理し、6 well plate に 10^5 cells/ well まき、各 SIV 株を SIV p27 抗原量で 100 ng 相当量感染させた。感染時に分化誘導用の培地に変更した。翌日 PBS で 3 回洗い、新しい培地に交換した。7 日ごとに培養上清を回収保存し、PBS で 1 回洗ったあと、新しい培地に交換した。回収保存した上清中の SIV p27 抗原量を ELISA 法で測定し、経時的な変化を解析した。

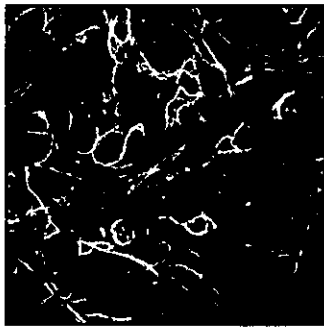
SIV17E/Fr Δ nef-GFP を感染させた well では、蛍光顕微鏡下で GFP の発現を観察した。

C. 研究結果

1. サル胎児脳からの神経幹細胞の分離と培養

サル胎児の脳から神経幹細胞を分離培養し、これを分化誘導することにより、ニューロンとグリアからなる新しい培養系を確立できた。分離培養した神経幹細胞は、神経幹細胞のマーカーであるネスチン、CXCR4 陽性で、分化誘導前後とも CD4, CXCR4, CCR5, APJ の mRNA が陽性であった。分化誘導により得られた培養系は免疫染色により、約 70% のアストロサイトと約 30% のニューロンからなっていた (図 2)

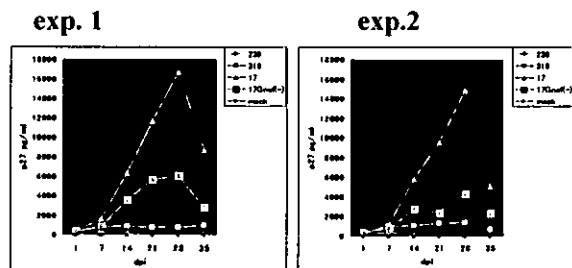
図2 赤: GFAP 陽性アストロサイト、緑: Tuj 陽性ニューロン



2. 各 SIV クローンの感染性

この培養系に細胞向性の異なる SIV クローン (表 1) を感染させたところ、マクロファージ向性で Neurovirulent のクローンである SIV17E/Fr とマクロファージ向性の SIVmac239/316E を接種した場合には感染 7 日目ころより培養上清中に SIV p27 抗原が検出されはじめ、28 日目にはピーク値をとった。一方 T 細胞向性の SIVmac239 は productive な感染はしなかった。SIV17E/Fr は SIVmac239/316E と比べはるかに培養上清中の SIV p27 量が多く、Neurovirulent という in vivo での性質がこの培養系で追試・確認できた。SIV17E/Fr に GFP 遺伝子を挿入した SIV17E/FrΔnef-GFP を作製し、この培養系に接種したところ、SIV17E-Fr の場合より培養上清中の SIV p27 量は少なかったが同様に感染した (図 3)。

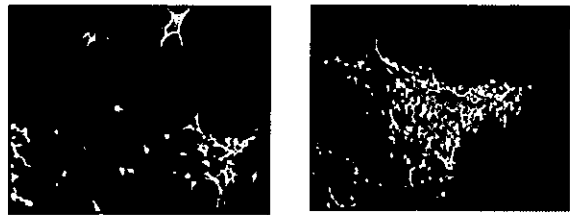
図 3 SIV 感染実験



GFP の発現は感染 4-6 日目から、観察され始め、群をなしながら増えていった。全視野で 1~3 箇所であったのが、数十箇所に増加した。GFP 陽性細胞は様々な形態のものがあつた。同じ形態の細胞がふえている場合は、感染細胞が分裂

増殖しているためと推測された。図 4 に SIV17E-FrΔnef-GFP 感染後の写真を示した。

図 4 SIV17E-FrΔnef-GFP 感染後



GFP 陽性細胞が SIV p27 抗原陽性であるかどうかを二重免疫染色法で調べたところ両者とも陽性である細胞が確認された。また GFP 陽性細胞の phenotype を調べたところ GFAP 陽性の細胞も Tuj 陽性の細胞もあつた。すなわちアストロサイトのみならずニューロンにも SIV17E/FrΔnef-GFP は感染し、Gag 蛋白が発現していることがわかつた。

培養上清中に感染性ウイルス粒子が産生されていることを確認するために LuSIV assay (tat 依存性に LTR 下流のルシフェラーゼ遺伝子が発現する CEMx174 細胞: LuSIV 細胞を用いた感染性の assay 系) を行ったところ、感染後 21 日目の培養上清を感染させた LuSIV 細胞では 48 時間後、非感染 LuSIV 細胞と比較して 100 倍以上のルシフェラーゼ活性がみられた。

感染による明らかな細胞変性や細胞融解は観察されなかつた。アポトーシスに関しては、感染細胞の Tunnel 陽性数、Caspase3 陽性細胞数については非感染細胞 (mock) と比較して明らかな差は観察できなかつた。

D. 考 察

ヒト HIV 脳症の病態については、いまだ明らかでない点が多い。HIV 脳症の脳組織においてウイルスは主にマクロファージやマイクログリア、血管内皮細胞に感染増殖していることが知られている。ニューロンやアストロサイトについては感染侵入しても子孫ウイルスを産生しているかについては明らかでない。神経細胞数の減少、アストロサイトーシスなどは、ニューロンやアストロサイトへのウイルスの直接作用によるものなのか、感染マクロファージ

の分泌する液性因子によるものなのか、あるいはその両方か、など、HIV 脳症・AIDS 痴呆の発症病理について明らかでない点が多い。そこで HIV 脳症の動物モデルである SIV 脳症の病態を解析するための培養系を確立した。

一般の primary cell culture と比較して神経幹細胞の特徴は、培養条件で増殖させることができること、マイクログリアを含まない脳固有細胞からなる培養系に分化誘導できることである。また分化誘導時に添加する増殖因子によりこれらの細胞の割合を調節することが可能である。

この培養系では、M-tropic で Neurovirulent な SIV17E/Fr の感染性が最も高かった。M-tropic の SIVmac239/316E の感染性は低く、T-tropic の SIVmac239 は感染しなかった。よって Neurovirulent な SIV の解析に適していると考えられた。また SIV17E/Fr が、このマクロファージ・マイクログリアフリーの培養系でもっとも感染性が高かったことは、マイクログリア向性とは異なるニューロン・グリア向性のクローンがあることが示唆された。

SIV17E/Fr Δ nef-GFP 感染において、GFP 陽性細胞は培養上清中の SIV p27 量の増加と並行して増加していったが、感染細胞の増殖によるものか、産生ウイルスの spreading infection によるものか明らかにする必要がある。サルの神経幹細胞を用いた培養系では、分化誘導後も細胞の分裂能が残存しており、その増殖能について細胞の phenotype とともに調べる必要があると考えられた。

未分化な細胞ほど感染性が高いことが予想されるが、小児エイズにおいて日和見感染、日和見腫瘍が発症する前に脳症（痴呆）が発症することが多いことと関係があるかもしれない。

今後さらにこの培養系の特性と SIV17E/Fr の神経向性の決定因子について解析していく予定である。

E. 結論

サル胎児脳から分離培養した神経幹細胞を用いた培養系を確立することができた。また感染材料として3種類の SIV クローンと GFP 挿

入クローンを作製しそれぞれの感染性を確認できた。分化誘導した神経幹細胞から微量でもウイルスが産生されることがわかった。In vivo で Neurovirulent な SIV クローンが感染する in vitro の培養系を確立できた。

F. 研究倫理

動物実験に関しては、当研究所動物実験委員会の許可のもとに行った。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakajima N, Ionescu P, Sato Y, Hashimoto M, Kuroita T, Takahashi H, Yoshikura and Sata T: In situ hybridization AT-tailing with catalyzed signal amplification for sensitive and specific in situ detection of human immunodeficiency virus -1 m RNA in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Am J Pathol* 162: 381-389, 2003.
- 2) Nakajima N, Asahi-Ozaki Y, Nagata N, Satao Y, Dizon F, Paladin FJ, Olveda RM, Odagiri T, Tashiro M, Sata T: SARS coronavirus-infected cells in lung detected by new in situ hybridization technique. *Jpn J Infect Dis* 56: 139-141, 2003.
- 3) Lu R, Nakajima N, Hofmann W, Benkirane M, The-Jeang K, Sodroski J, Engelman A: Simian virus 40-based replication of catalytically inactive human immunodeficiency virus type 1 integrase mutants in nonpermissive T cells and monocyte-derived macrophages. *J Virol* 78: 658-668, 2004.

1 4. HGVのエイズ発症遅延機構の解明に関する研究

分担研究者 佐多 徹太郎 国立感染症研究所感染病理部長

研究協力者 徳永 研三 国立感染症研究所感染病理部主任研究官

研究要旨 G型肝炎ウイルス (HGV) 感染に感染しているHIV/AIDS患者におけるAIDS発症遅延の原因を探るため、*in vitro*でのHGV感染実験系の確立を目指して、HGV遺伝子のクローニングを行った。血清中ウイルスRNAのRT-PCRにより得られたPCR産物12断片を更に乗換えPCRで連結させる手法を取った。各断片を制限酵素処理後、それぞれクローニングベクターに挿入した。そこから再び各断片を制限酵素で切り出して繋いでいく作業を繰り返し、最後にT7 promoterを有する発現ベクターに挿入して全長のHGV DNAを構築した。各断片増幅時のPCRエラーによる変異部分が、シーケンシングにより6箇所判明した為、site-directed mutagenesisにより全修復した。*In vitro* transcriptionによりRNAレプリコンを作製、293T細胞へのRNAトランスフェクションによるウイルス産生を試みた。蛋白レベルでの複製確認はできなかったが、RT-PCRによるウイルスRNAの検出は可能であったことから、今後更に遺伝子発現を増強すべく発現系の改良を行う必要性が求められた。

A. 研究目的

1996年に肝炎患者から分離された第7番目の肝炎ウイルス、G型肝炎ウイルス (HGV/GBV-C) は、その名称に反して肝炎を起こすことなく何の病原性も持たないが、このウイルスに感染しているHIV/AIDS患者では、CD4陽性リンパ球数がHGV/GBV-C陰性患者と比較して極めて多く、またAIDSの発症が遅延すること、また*in vitro*でもHIV-1の増殖効率をHGV/GBV-Cが低下させることが、欧米の複数のグループによって報告されている。欧米で流行しているHGV/GBV-Cのゲノタイプは2型であるのに対し、我が国で流行しているタイプは主に3型である。そこで我々は、3型のHGV/GBV-Cも2型同様に、HIV-1増殖抑制効果を有するか否かを検討、その効果に関わるHGVのウイルス蛋白を検索することを研究目的とした。HGVのHIV-1増殖に対する直接的な抑制効果の有無を*in vitro*のレベルで明らかにするために、まずHGVの全長クローニングとそれを用いたウイルス複製システムの確立を試みた。

B. 研究方法

1) DNAクローニング 感染病理部の阿部らに

よって以前、日本のHGV感染者血清中のウイルスRNAゲノムよりRT-PCR増幅されたPCR産物12断片 (Frag-A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, 及びL) を用いて、乗り換えPCR (交差する部分を有する、異なる2つ或いは3つのPCR産物をテンプレートとして利用するPCR) を行い、HGVの各遺伝子断片の増幅を行った。それにより得られた7断片の乗り換えPCR産物、Frag-AB, CD, DE, EFG, HI, IJ, 及びJKLを、既存の制限酵素部位を利用して各断片の両末端を切断、両端の切断部位と同様の制限酵素部位を有するクローニングベクターにそれぞれ挿入して、7つのサブクローンを構築した。それを用いて制限酵素部位を利用しながら繋げていき、4つのサブクローン、pAD, pDG, pEI, 及びpILに縮めた。更に2つ、pAG及びpELに縮め、最後に1本の全長DNAクローン pFull-AL を構築した。*In vitro* transcription用にT7プロモーターを5'UTRの上流に、DNAトランスフェクションによる発現用にCMVプロモーターを更に上流に挿入した最終クローンをpCMV-GBVc-IM71と命名した。

2) 変異箇所のリペアリング 全長のDNAシーケンシング後に、既知の遺伝子配列との比較を行い、乗り換えPCR時のエラーによる変異と考えられた変異部分の修復を、各サブクロー

ン上において QuikChange Mutagenesis (Stratagene) により行った。各修復断片をサブクローンから切り出して、pCMV-GBVc-IM71 の同領域と各々取り換え、修正 DNA クローン pCMV-GBVc-IM71-Rep を構築した。

3) *In vitro* transcription 2 μ g の pCMV-GBVc-IM71-Rep を Sca I で制限酵素処理してゲル精製した後、T7 RNA ポリメラーゼ (Promega) を用いて 37°C で 1 時間インキュベートして *In vitro* transcription を行った。テンプレートであるプラスミド DNA は RNase-free DNase により 37°C 15 分で消化した。RNA 産物 (RNA レプリコン) はフェノール・クロロフォルム抽出とエタノール沈殿により精製した。

4) DNA/RNA トランスフェクション 2 μ g の pCMV-GBVc-IM71-Rep DNA またはその RNA レプリコンを、Fugene 6 (Roche) 或いは、TransMessenger (Promega) により、7 x 10⁵ 個のヒト胎児腎細胞 293T にトランスフェクションした。48 時間後に細胞を洗浄し 2 ml の培養液を換えて、更に 48 時間後に細胞を洗浄、200 μ l の SDS サンプルバッファーを加えて細胞を溶解した。

5) イムノブロットィング トランスフェクション後の細胞溶解液は、2%SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動、GBV-C E2 蛋白に対する 2 種類の単クローン抗体 (Bioscience Resource Project, East Coast Biologics) を用いたウエスタンブロットィング法により解析した。

6) 間接蛍光抗体法 トランスフェクション後 2 日目に、293T 細胞を 4%ホルムアルデヒドで 20 分間固定し、0.1% Triton X-100 にて 10 分間、細胞膜透過処理を行った。2 種類の抗 GBV-C E2 蛋白単クローン抗体 (Bioscience Resource Project, East Coast Biologics) で 1 時間処理、蛍光標識ヤギ抗マウス 2 次抗体で更に 1 時間処理して、E2 蛋白の発現の有無を蛍光顕微鏡下で観察した。

7) マイナス鎖特異的 RT-PCR GBV-C のアンチセンス RNA の検出のために、tag 配列を有するオリゴヌクレオチドプライマー、HGV-SSP-S1 (5'-AGTCATGGTGGCGAATAAAAGCCCCAGAAACCGACGCC-3'; 太字は tag 配列) を用いて、RNasin (RNase inhibitor; Promega) 存在下にて

MuLV Reverse transcriptase (Promega) による逆転写反応を 37°C で 30 分で行った。cDNA 合成を 99°C 30 分間で停止させた後、テンプレートである RNA を RNase 50 μ g/ml にて 37°C、30 分で消化した。合成された cDNA をもとに、tag 配列プライマー HGV-SSP-S2 (5'-AGTCATGGTGGCGAATAA-3') とアンチセンスプライマー、HGV-SSP-S2

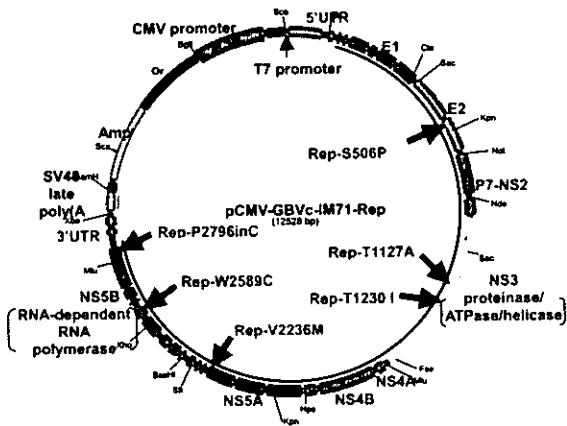
(5'-CCCCACTGGTCCTTGTCAACTC-3') を用いて Expand High-Fidelity PCR System (Roche) により、PCR を行った。更に HGV-SSP-S2 と HGV-24R (5'-CACCGGTAGGGCCAACACCT-3') を用いて 2-round PCR を試みた。

C. 研究結果

血清中ウイルス RNA の RT-PCR により得られた PCR 産物 12 断片を、乗換え PCR で連結させ各断片を制限酵素処理後、それぞれクローニングベクターに挿入した。そこから再び各断片を制限酵素で切り出して繋いでいく作業を繰り返し、最後に T7 promoter と CMV Promoter を有する発現ベクターに挿入して全長の HGV DNA を構築した。シーケンシングを DNA 全長に渡って行ったところ、各断片増幅時の PCR エラーによるものと思われる 5 箇所のアミノ酸変異、P506S (CCG \rightarrow TCG; E2 遺伝子)、A1127T (GCC \rightarrow ACC; NS3, protease/ATPase/helicase 遺伝子)、I1230T (ATC \rightarrow ACC; NS3, protease/ATPase/helicase 遺伝子)、M2236V (ATG \rightarrow GTG; NS5A 遺伝子)、C2589W (TGC \rightarrow TGG; NS5B, RNA-dependent RNA polymerase 遺伝子) が認められた。更に 2796 番目の Proline (CCC; NS5B, RNA-dependent RNA polymerase 遺伝子) の C の欠落によるストップコドン変異の出現が、複製に必要不可欠であると考えられている NS5B, RNA-dependent RNA polymerase 蛋白の欠損につながるため、最も致命的な変異と判断された。それぞれの変異部分を、各サブクローンに戻って、506 番目のアミノ酸 S \rightarrow P の修復 (以下 Rep-S506P の様に記す) を pAD 上で、Rep-T1127A 及び Rep-T1230I を pDG 上で、Rep-V2236M、Rep-W2589C 及び Rep-Stop2796P

を pIL 上にて、site-directed mutagenesis により全修復した。サブクローンから修復箇所を含む領域を、ユニークな制限酵素部位で切り出し、pCMV-GBVc-IM71 の同一箇所それぞれ挿入した。修復の有無はそれぞれ DNA シークエンシングにより確認した。完成した最終クローンを pCMV-GBVc-IM71-Rep と命名した(図1参照)。

図1. pCMV-GBVc-IM71-Rep のプラスミドマップ



In vitro transcriptionによりRNAレプリコンを作製、DNAと共に、293T細胞へのトランスフェクションを試みた。トランスフェクションして48時間後に細胞を固定あるいは溶解して、GBV-C E2蛋白に対する2種類の単クローン抗体を用いた間接蛍光抗体法またはイムノブロットングを行ったところ、どちらのアッセイにおいても、RNAまたはDNAトランスフェクションによるE2蛋白の発現は確認できなかった。次に、核酸レベルでの検出可能性の有無を検討する為に、標的細胞内での複製中間体であるマイナス鎖RNAを特異的に検出するRT-PCRを行ったところ、1st-roundのPCRでは何も認められず、2nd-round目で初めて、ようやくマイナス鎖のウイルスRNAゲノムを検出することができた(表1参照)。

表1. ウイルス核酸・蛋白の発現確認

	RT-PCR		蛍光抗体法	イムノブロットング
	1st	2nd		
DNA transfection	-	+	-	-
RNA transfection	-	+	-	-

D. 考察

今回試みた T7 RNA ポリメラーゼにより作製した HGV RNA レプリコンを用いたトランスフェクションは、一般にプラス一本鎖 RNA ウィルスで用いられている手法であるが、この方法では、ウィルス複製の確認を RT-PCR に頼らざるを得ないほどウィルス複製効率が低いことが明らかになっている。また CMV プロモーターによるウィルス蛋白発現を試みた DNA トランスフェクションに関しても、本来、細胞質内で複製するウィルス RNA ゲノムが、DNA として人工的に直接核内に取り込まれた場合に異常スプライシングによるゲノム RNA の縮小化が起こる可能性が考えられる為、この方法も、複製において逆転写段階を持たない RNA ウィルスの産生には適さないかもしれない。近年いくつかの研究グループがレオウィルスやブニヤウィルス等の発現系において試みている手法として、T7 RNA polymerase を発現するアデノウィルスベクターを感染させた細胞に、T7 プロモーターと 3'側に HDV リボザイム/T7 terminator を有する全長ウィルス DNA のトランスフェクションを行うというやり方がある。これによりウィルス複製の蛋白レベルでの確認が可能になるケースが多いとのことで、早速 HGV にもこの手法を取り入れるべく、ベクターの構築を開始している。

E. 結論

血清中ウィルス RNA の RT-PCR により得られた PCR 産物 12 断片を、乗換え PCR で連結させ各断片を制限酵素処理後、それぞれクローニングベクターに挿入した。そこから再び各断片を制限酵素で切り出して繋いでいく作業を繰り返し、最後に T7 promoter を有する発現ベクターに挿入して全長の HGV DNA を構築した。シーケンシングにより、各断片増幅時の PCR エラーによる変異部分が 6 箇所判明した為、site-directed mutagenesis により全修復した。*In vitro* transcription により RNA レプリコンを作製、293T 細胞への RNA トランスフェクションによるウィルス産生を試みたところ、RT-PCR によるウィルス RNA の検出は可能で

あったが、蛋白レベルでは現在まで確認できていない。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Richardson, R. M., Tokunaga, K., Marjoram, R., Sata, T., and Snyderman, R.: Interleukin-8 cross-desensitizes cellular responses to both CCR5 and CXCR4 but inhibits HIV-1 infection only to CCR5: role of receptor cross-internalization and signal strength. *J. Biol. Chem.* 278: 15867-73, 2003.
- 2) Shoya, Y., Tokunaga, K. (co-corresponding author), Sawa, H., Maeda, M., Ueno, T., Yoshikawa, T., Sata, T., Kurata, T., Cullen, B. R., and Takahashi, H.: Human topoisomerase I promotes HIV-1 proviral DNA synthesis: implications for the species specificity of HIV-1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 8442-7, 2003.
- 3) Ueno, T., Tokunaga, K., Sawa, H., Maeda, M., Chiba, J., Kojima, A., Hasegawa, H., Shoya, Y., Sata, T., Kurata, T., and Takahashi, H.: Nucleolin, and the packaging signal, ψ , promote the budding of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Microbiol. Immunol.* 48: 111-8, 2004.
- 4) Zheng, Y.-H., Irwin, D., Kurosu, T., Tokunaga, K., Sata, T., and Peterlin, B.M.: Human APOBEC3F is another host factor that blocks HIV-1 replication. *J. Virol.* (in press)

2. 学会発表

- 1) 徳永研三、木ノ本正信、生田和良、倉田 毅、佐多徹太郎：HIV-1 西アフリカ分離株の抗レトロウイルス剤に対する感受性の検索。第51回日本ウイルス学会総会、京都、2003年10月
- 2) 木ノ本正信、向井 徹、李 永剛、辻祥太郎、徳永研三、佐多徹太郎、後藤俊幸、生

田和良：シンシチウム形成能の高い非感染性 HIV-1 粒子の Env 機能検索。第51回日本ウイルス学会総会、京都、2003年10月

- 3) 飛梅 実、高橋秀宗、徳永研三、佐多徹太郎、Chris Aiken, Michael Miller：HIV Nefの融合、進入過程における影響。第17回日本エイズ学会総会、神戸、2003年11月
- 4) 木ノ本正信、向井 徹、李 永剛、辻祥太郎、徳永研三、佐多徹太郎、後藤俊幸、生田和良：高いシンシチウム形成能を規定するEnv領域の同定。第17回日本エイズ学会総会、神戸、2003年11月

15. 粘膜組織における感染伝播と CTL を主体とした感染制御の解明に関する研究

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 HIV 感染防御に関与する小腸上皮内リンパ球 (IEL) の役割を検討する目的で、Env 糖蛋白内の CTL エピトープである P18-I10 (RGPGRAFVTI) に特異的 TCR 遺伝子を発現させた Tg マウス (以下 Tg-RT1) に、P18 を発現した組換えワクチニアウイルス (EA2) を投与した場合の特異的 CTL の動態ならびに感染阻止能の解析を試みた。H-2D^d/P18-I10 テトラマーを用いて、特異的 CTL を発現した細胞数を解析したところ、未免疫 Tg-RT1 の脾臓や腸管膜リンパ節 (MLN) における T 細胞は全て $\alpha\beta$ 型 TCR を発現しているのに対し、粘膜免疫を反映する IEL は CD8 $\alpha\alpha$ と CD8 $\alpha\beta$ 型双方からなる $\alpha\beta$ TCR T 細胞と CD8 $\alpha\alpha$ 型 $\gamma\delta$ TCR 発現 T 細胞によって構成されることが判明した。この Tg-RT1 にワクチニアウイルスを腹腔内 (IP) 投与した場合、コントロールワクチニアウイルス (EA0) 投与群では殆ど変化はなかったが、EA2 投与群では CTL 活性が脾臓、MLN、IEL 全てにおいて検出されたが、その特異性は IEL で最も顕著であった。また、EA2 IP 接種 3 日後における体内での動態を追跡したところ、小腸粘膜上皮内においてウイルス粒子の集積が観察されたことから、腹腔内に接種した EA2 は小腸粘膜組織に集積し、それが粘膜上皮内の IEL を活性化させたことが明らかとなった。そこで抗 CD8 β 抗体を用いて CD8 $\alpha\beta$ 陽性 T 細胞を IEL から除いた結果、P18-I10 ペプチドをパルスした標的細胞に対する活性が消失したものの、EA2 感染細胞に対する傷害活性は中程度残存しており、その制御に粘膜内 $\gamma\delta$ T 細胞の関与が示唆された。さらに、Tg-RT1 の卵巣内における接種ウイルスの残存量を追跡したところ、EA2 投与群では EA0 投与群と比べ、卵巣中のウイルスタイターが約 2 オーダー減少していることが観察された。以上より、HIV 感染を制御するためには、粘膜組織における従来の CTL のみならず $\gamma\delta$ T 細胞を活性化するようなワクチンを開発することが重要であることが明らかとなった。

A. 研究目的

エイズウイルス (HIV) は性的接触などにより経粘膜的に体内に侵入するため、粘膜組織における CTL が感染初期に重要な役割を果たすものと想定される。しかしながら、粘膜における CTL の動態解析をヒト組織を用いて実施することは困難であり、実際これまでヒト粘膜における CTL について調べた報告はほとんど認められていない。さらに、エイズモデルとしての SIV 感染サルにおいても、機能的解析に十分な小腸上皮細胞間リンパ球 (以下 IEL) を集めることは実際上かなり難しく、その粘膜免疫の詳細な解析は進展していないのが現状である。本研究では、感染防御に関与する IEL の重

要性を検討する目的で、HIV gp160 Env 糖蛋白内の CTL エピトープである P18-I10 (RGPGRAFVTI) に特異的なマウス CTL クローン RT1 の TCR 遺伝子を発現させた Tg マウス (以下 Tg-RT1) に、P18 を発現した組換えワクチニアウイルス (以下 EA2) を投与した場合の粘膜組織における P18 特異的 CTL の動態ならびに感染阻止能の解析を倫理的に問題ないと考える状況で試みた。

B. 研究方法

1) P18-I10 はクラス I MHC 分子である H-2D^d により細胞表面に提示されるため、Avidin 分子で標識した H-2D^d/P18-I10 テトラマーを用いて、

特異的 CTL を発現した細胞数を Flow cytometry により解析した。

2) P18-II0 特異的なマウス CTL クローン RT1 の TCR 遺伝子を発現させた Tg-RT1 に、P18 を Infuruennza HA 遺伝子カセット内に挿入し、それを組換え発現させたワクチニアウイルス (以下 EA2) ならびにコントロールのワクチニアウイルス (以下 EA0) を、経直腸 (IR) あるいは経腹腔 (IP) 投与した場合の粘膜組織における P18 特異的 CTL の動態ならびに感染阻止能の解析を試みた。

3) ウイルス接種後 3-5 日目の各臓器の切片を作成し、Infuruennza HA 蛋白に対する抗体を用いてウイルスの局在を酵素抗体法により追跡した。

4) 10^7 PFU のワクチニアウイルスを接種後 5 日目における摘出卵巣内のウイルス量を BSC-1 細胞を用いた段階希釈法により測定した。

この Tg-RT1 に組み換えワクチニアウイルス EA2 を経直腸的 (IR) に接種した場合、IEL 中の $\gamma\delta$ T 細胞数の増加が認められ、体内へのウイルス侵入が阻止されることが観察された。興味深いことに、コントロールとしてのワクチニアウイルス (EA0) を接種した場合にも IEL 中の $\gamma\delta$ T 細胞数の増加が認められた。一方、ウイルスを腹腔内 (IP) に投与した場合、EA2 投与群では P18 特異的 CTL 活性が脾臓、MLN、IEL 全てにおいて検出されたが、その特異性は IEL で最も顕著であった。この際、IEL におけるテトラマー陽性 T 細胞数は EA0 投与群では殆ど変化はなかったものの、EA2 投与群で著増ししていた。また、EA2 ウイルス粒子を IP 接種 3 日後における体内でのウイルス動態を追跡したところ、小腸粘膜上皮内においてウイルス粒子の集積が観察された。以上の知見から、腹腔内に接種した EA2 は小腸粘膜組織に集積し、それが粘膜上皮内の IEL を活性化させたことが明らかとなった。そこで IEL 中のどの細胞がウイルス感染細胞排除能力を示すかを検討する目的で、抗 CD8 β 抗体を用いて CD8 $\alpha\beta$ 陽性 T 細胞を IEL から除いた結果、P18-II0 ペプチドをパルスした標的細胞に対する活性が消

失したものの、EA2 感染細胞に対する傷害活性は中程度残存していた。さらに、Tg-RT1 の卵巣内における接種ウイルスの残存量を追跡したところ、EA2 投与群では EA0 投与群と比べ、卵巣中のウイルスタイターが約 2 オーダー減少していることが観察された。

C. 研究結果

1) 未免疫 Tg-RT1 におけるテトラマー陽性 T 細胞の大部分は、全臓器で CD8 陽性 CD4 陰性であったが、これら未免疫状態での TCR 発現細胞は P18-提示細胞に対する細胞傷害活性は示さなかった。この際、全身性免疫を反映すると考えられる脾臓や腸管膜リンパ節 (MLN) における T 細胞は全て $\alpha\beta$ 型の TCR を発現しており、その内のテトラマー陽性細胞は全て胸腺で教育を受けたと考えられる CD8 $\alpha\beta$ 陽性型であった。これに対し、粘膜免疫を反映する IEL ではその 60%以上が胸腺外分化を受けたと推測される CD8 $\alpha\alpha$ 陽性型を呈しており、P18 特異的 TCR をもつ $\gamma\delta$ T 細胞も多数認められたが、それらも全て CD8 $\alpha\alpha$ を発現していた (図 1)。従って、脾臓や MLN では P18 特異的 TCR 発現細胞の大多数が CD8 $\alpha\beta$ 型の $\alpha\beta$ TCR を有した T 細胞であるのに対し、IEL は CD8 $\alpha\alpha$ と CD8 $\alpha\beta$ 型双方からなる $\alpha\beta$ TCR T 細胞と CD8 $\alpha\alpha$ 型 $\gamma\delta$ TCR 発現 T 細胞によって構成されることが判明した。

2) この Tg-RT1 に組み換えワクチニアウイルス EA2 を経直腸的 (IR) に接種した場合、IEL 中の $\gamma\delta$ T 細胞数の増加が認められ、体内へのウイルス侵入が阻止されることが観察された。興味深いことに、コントロールとしてのワクチニアウイルス (EA0) を接種した場合にも IEL 中の $\gamma\delta$ T 細胞数の増加が認められた。一方、ウイルスを腹腔内 (IP) に投与した場合、EA2 投与群では P18 特異的 CTL 活性が脾臓、MLN、IEL 全てにおいて検出されたが、その特異性は IEL で最も顕著であった (図 2)。

3) この際、IEL におけるテトラマー陽性 T 細胞数は EA0 投与群では殆ど変化はなかったものの、EA2 投与群で著増ししていた (図 3)。また、EA2 ウイルス粒子を IP 接種 3 日後にお

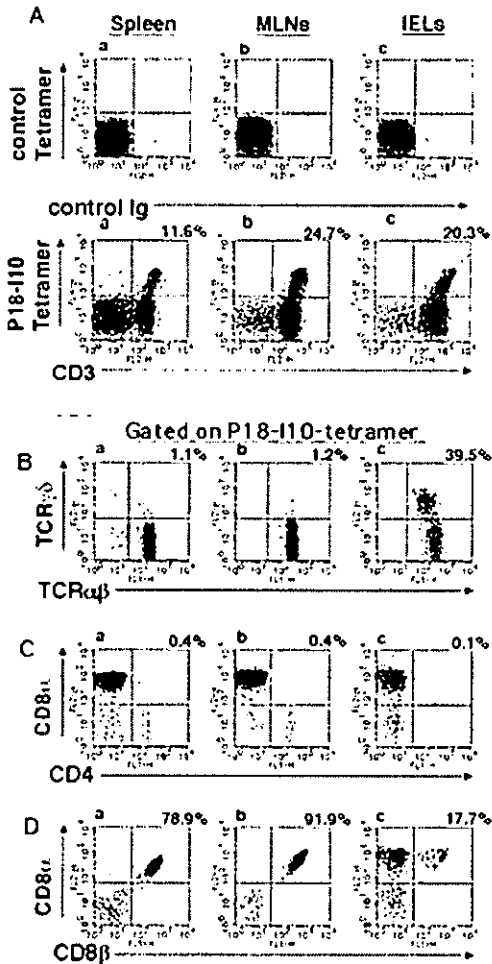


図1. Tetramer を用いた P18-I10 特異的 TCR 発現細胞の臓器別分布状態

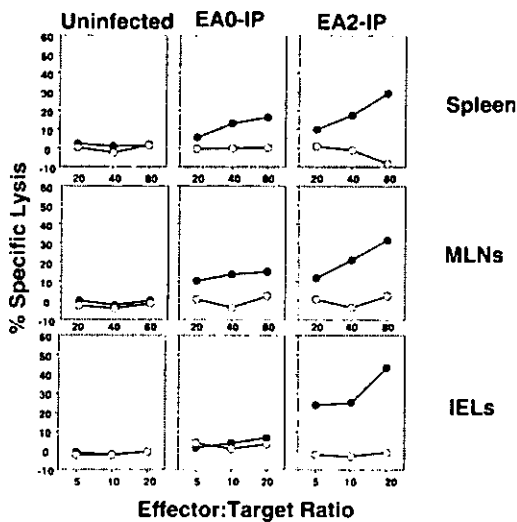


図2. ウイルス IP 接種後の各臓器における ex vivo での特異的 CTL 活性

ける体内でのウイルス動態を追跡したところ、小腸粘膜上皮内においてウイルス粒子の集積が観察された (図4)。以上の知見から、腹腔内に接種した EA2 は小腸粘膜組織に集積し、それが粘膜上皮内の IEL を活性化させたことが明らかとなった。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。

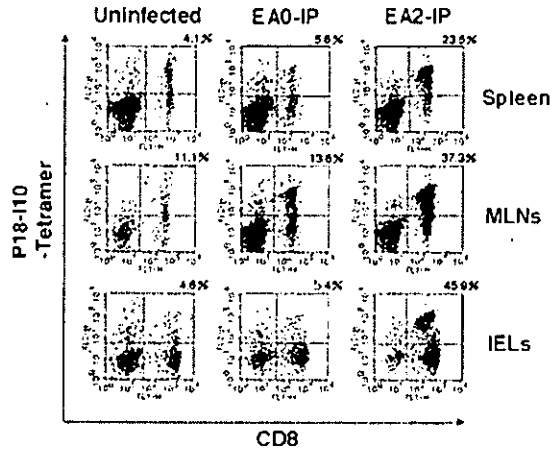


図3. ウイルス IP 接種前後の各臓器における Tetramer 陽性細胞数の変化

Uninfected rVV-EA2 IP

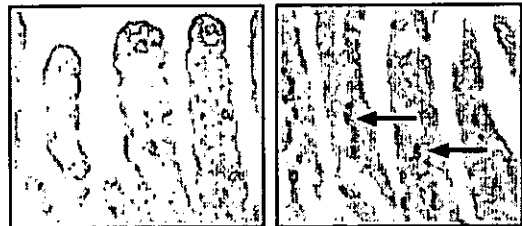


図4. 小腸粘膜におけるウイルス粒子の集積

4) IEL 中のどの細胞がウイルス感染細胞排除能力を示すかを検討する目的で、抗 CD8 β 抗体を用いて CD8 $\alpha\beta$ 陽性 T 細胞を IEL から除いた結果、P18-I10 ペプチドをパルスした標的細胞に対する活性が消失したものの、EA2 感染細胞に対する傷害活性は中程度残存していた (図5)。

このことは、粘膜組織における感染細胞制御に関わる細胞が、従来推測されてきたような胸腺で教育を受けたと推測されるペプチド抗原特異的な CD8 $\alpha\beta$ 陽性の T 細胞、即ちキラー T