

1 1. 強力なワクチン効果を賦与するための T細胞活性化因子の解析

分担研究者 横田 恭子 国立感染症研究所免疫部第1室 室長

研究要旨 EBV 感染あるいはインフルエンザワクチンを受けたドナーの末梢血T細胞を樹状細胞による抗原提示を介して活性化し、抗原特異的な活性化に伴う免疫機能分子の発現変化を Multicolor Flowcytometry で解析する系を確立した。更に、樹状細胞とT細胞の共培養系において抗原特異的な反応を幅広く解析するため、IFN- γ のプロモーター活性を検出するレンチウイルスベクターを構築した。このような樹状細胞を抗原提示細胞とした *in vitro* の系を用い、抗原特異的なT細胞を幅広く検出することが可能となった。

A. 研究目的

ワクチンがその効果を発揮するには、初期のT細胞の活性化が量的および質的に強力で、しかも長期に存続する能力を誘導する必要があると思われる。しかしながら、その様な分子の実態は明らかではない。本研究は HIV 感染に対するワクチンの効果を十分に発揮するために必要な抗原提示細胞とT細胞の相互作用に関わる因子を明らかにすることを目的とする。

B. 材料と方法

1) 細胞

末梢血単核細胞をファイコール密度勾配法で分離しPBMCを得た。PBMCより抗CD14標識磁気ビーズを用いてMACSで単球を分画し、GM-CSFとIL4の存在下に7日培養して樹状細胞(DC)を分化誘導した。CD14陰性細胞はNegative selectionによりT細胞を純化し(98%)、いったん凍結保存して使用時に解凍した。

2) 抗原

Influenza ウイルスはワクチンに用いたA(H1N1とH3N2)及びB株混合液を桑原靖氏(デンカ生研(株))より供与を受けた。樹状細胞にウイルスをHA価にして 10^6 個の細胞あたり200あるいは500HAU感染させた。

EBVの20個のエピトープペプチド混合液はBrigitte Autran博士(フランス・パリ大学)の供与を受け、最終濃度1 μ g/mlをDCに添加

した。

3) 培養

樹状細胞を抗原存在下に培養し、翌日carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) 標識したT細胞を1:10の割合で混合培養した。抗原刺激4~5日後以降はIL-2とIL-7をそれぞれ50U/mlと10ng/mlの濃度で加えて培養した。

4) レンチウイルスベクター

IFN- γ promoterの下流に β -lactamase 遺伝子あるいは蛍光色素マーカーを挿入し、レンチウイルスベクターを構築した(ベクター材料は理研三好浩之博士より供与をうけた)。ベクターを293FT細胞にトランスフェクトし、培養上清を超遠心してウイルス濃縮液を作成した。導入効率は293FT細胞の感染で測定した。

5) 細胞内染色

抗原刺激の翌日、培養した細胞にmonensin 2 μ Mを添加して6時間インキュベートした後、細胞を回収した。細胞洗浄後、0.5% BSA/PBS、0.01% NaN₃ (SB)に浮遊させて細胞表面抗原を染色し、4% formaldehydeで固定し、更に0.2% サポニン含有SBでpermeabilizeした。ついで細胞内染色抗体を反応させ、フローサイトメーターで解析した。細胞表面抗原に対する蛍光標識抗体はCoulter-Immunotech社あるいはe-Bio社の製品を、APC-抗IFN- γ 抗体はBD-Pharmingen社より購入した。

C. 研究結果

前年度に 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、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。しかしながら、*in vitro* プライミングでは活性化される T細胞の頻度は少なく、刺激を繰り返す必要があるため、自己の抗原提示細胞そのものに反応する T細胞を誘導する傾向が強かった。そこで、今年度は EBV 感染あるいはインフルエンザワクチンを受けたドナーの末梢血 T細胞を樹状細胞による抗原提示を介して活性化し、抗原特異的な活性化に伴う免疫機能分子の発現変化を Multicolor Flowcytometry で解析する系を確立した。更に、樹状細胞と T細胞の共培養系において抗原特異的な反応を幅広く解析するため、IFN- γ のプロモーター活性を検出するレンチウイルスベクターを準備した。

まず、同じドナーのインフルエンザワクチン投与数ヶ月前と投与後 2ヶ月の T細胞を CFSE 標識し、Influenza ウイルスに感染した樹状細胞と共培養した。図 1 に示すように、ワクチン投与後 (図 1 b) では *in vitro* 一回の刺激による増殖は CD4 (上段) 陽性 T細胞よりも CD8 (下段) 陽性 T細胞の方が顕著であり、CD8 陽性 T細胞は投与前 (図 1 a) と比較して強く増殖が誘導された。一方、アロ刺激による T細胞増殖反応では、CD4 陽性 T細胞の増殖が優位であった (図 1 c)。これらの細胞において二回目の同じ刺激で特異的に活性化される T細胞を細胞内 IFN- γ 産生を指標に評価すると、特にワクチン投与後に増殖した T細胞が主として IFN- γ 産生細胞であることが明らかとなり、*in vitro* での抗原刺激後早期に増殖する T細胞集団には高率に抗原特異的記憶 T細胞が存在することが示唆された。

そこで、インフルエンザワクチン投与 7 日目の特異的 T細胞を解析するため、Influenza 感染樹状細胞に反応してウイルス感染価 (a; HAU200, b; HAU500) 依存性に IFN- γ を産生する細胞集団が存在することをエリスポットで確認した (図 2、左)。このドナーの T細胞を CFSE 標識し、感染 5 日目に増殖する CD4

(図 2、中央) 及び CD8 陽性 T細胞 (図 2、右) を確認した。これらの増殖細胞をソートして IFN- γ のプロモーター活性を検出するレンチウイルスベクターを感染させて更に解析を進めている。

同様に、EBV エピトープペプチドに反応して増殖 5 日目の T細胞を CD4 と CD8 に分けてソートし、翌日これらの T細胞にレンチウイルスを moi 2 で感染させ、その感染効率をウイルスがコードする EGFP を指標に解析すると、CD4 陽性 T細胞で 42.2%、CD8 陽性 T細胞は 23.3% がレンチウイルスに感染したことが示された (図 3 下段)。ちなみに対照として作成した空ベクターレンチウイルス (図 3 上段) は moi 10 で 66% 程度の遺伝子導入効率があった。これらのソートした細胞は数が少ないため、抗 CD3 抗体で刺激して増殖させる必要がある。

従ってこのような手法を用い、特異的抗原刺激により IFN- γ プロモーターが活性化される T細胞について解析が可能となった。

D. 考 察

構築したレンチウイルスベクターを用いて生体内に存在するウイルス抗原特異的な T細胞の活性化を樹状細胞を抗原提示細胞とした *in vitro* の系で解析できれば、その分化増殖に必要な因子を明らかにすることが可能となり、今後の HIV 感染者の免疫応答の解析にも有用である。

E. 結 論

EBV 感染あるいはインフルエンザワクチンを受けたドナーの末梢血 T細胞を樹状細胞による抗原提示を介して活性化し、抗原特異的な活性化に伴う免疫機能分子の発現変化を Multicolor Flowcytometry で解析する系を確立した。更に、樹状細胞と T細胞の共培養系において抗原特異的な反応を幅広く解析するため、IFN- γ のプロモーター活性を検出するレンチウイルスベクターを準備した。このような樹状細胞を抗原提示細胞とした *in vitro* の系で IFN- γ 検出レンチウイルスベクターと Multicolor Flowcytometry で解析する系を用い

ることにより、生体内に存在するウイルス抗原特異的なT細胞をHLAに依存することなく広く検出することが可能と思われる。更にこの手法を用いて抗原特異的なT細胞の分化増殖に必要な因子を明らかにすることにより、今後のHIV感染者の免疫応答の解明に役立てたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fuji, Y., Murase, Y., Otake, K., Yokota, Y., Omoto, S., Hayashi, H., Okada, H., Okada, N., Kawai, M., Okuyama, H., Imakawa, K.: A potential live vector, foamy virus, directed intra-cellular expression of ovine Interferon-t exhibited the resistance to HIV infection. *J. Vet. Med. Sci.*, 66:115-121, 2004
- 2) Iijima, S., Nitahara-Kasahara, Y., Kimata, K., Zhuang, W. Z., Kamata, M., Isogai, M., Miwa, M., Tsunetsugu-Yokota, Y., Aida, Y. Nuclear localization of Vpr is crucial for the efficient replication of HIV-1 in primary CD4⁺ T cells. *Virology*, 327:249-261, 2004.

2. 学会発表

- 1) 横田(恒次)恭子、立川(川名)愛、山本拓也、磯貝まや、岩本愛吉、森川裕子：樹状細胞を介したウイルス抗原特異的T細胞の活性化に関する *in vitro* 評価解析. 第52回日本ウイルス学会(横浜) 2004.11.
- 2) 磯貝まや、横田(恒次)恭子：HIV-1 Nefが樹状細胞の抗原提示機能に及ぼす影響について. 第52回日本ウイルス学会(横浜) 2004.11.
- 3) 石井幸司、横田恭子、長谷川秀樹、水谷哲也、森川 茂、田口文広、田代真人、吉崎佐矢香、鈴木哲朗、宮村達男：高度弱毒化ワクチニアウイルス株DIsのSARS生ワクチンとしての応用. 第52回ウイルス学会(横浜) 2004.11.
- 4) 笠原(仁田原)優子、飯島沙幸、横田恭子、間陽子：Importin α により促進されるVpr核移行機序のHIV-1標的細胞を用いた解析. 第52回ウイルス学会(横浜) 2004.11.
- 5) 木全清典、倉光 球、我妻昭彦、横田恭子、

間陽子：vprによって変化するHIV-1 mRNA量比の定量解析. 第52回ウイルス学会(横浜) 2004.11.

- 6) 高村史記、新倉昌浩、横田恭子、李天成、武田直和、宮村達男、保富康宏：DNA ワクチン封入キメラ VLP 経口投与による粘膜誘導ワクチンの試み. 第52回ウイルス学会(横浜) 2004.11.
- 7) 山本拓也、磯貝まや、横田(恒次)恭子。HIV-1 nefを標的として siRNA 発現システムによるHIV-1複製抑制効果に関する解析. 第34回日本免疫学会(札幌) 2004.12.
- 8) 横田(恒次)恭子、石毛真行、村上正裕、竹森利忠：弱毒サルモネラ菌ワクチンの経口投与による抗HIV粘膜免疫効果の解析. 第34回日本免疫学会(札幌) 2004.12.
- 9) 高須賀直美、藤猪英樹、高橋よし聖、大島正道、坂口雅弘、大西和夫、橋本修一、竹森利忠、横田(恒次)恭子：UV不活化SARSウイルス全粒子ワクチンの経皮免疫は、強く持続的な液性免疫を誘導する. 第34回日本免疫学会(札幌) 2004.12.
- 10) 大西和夫、坂口雅弘、加地友弘、横田恭子、大島正道、葛西正孝、谷山忠義、赤川清子、高須賀直美、橋本修一、山本紀一、阿戸 学、藤猪英樹、高橋よし聖、竹森利忠：SARSコロナウイルスに対するモノクローナル抗体の確立とウイルス抗原検出法への応用. 第34回日本免疫学会(札幌) 2004.12.
- 11) 笠原(仁田原)優子、飯島沙幸、横田恭子、間陽子：Importin α を介したVpr新規核移行機序のHIV-1標的細胞を用いた解析. 第34回日本免疫学会(札幌) 2004.12.

F. 知的所有権の取得状況

なし

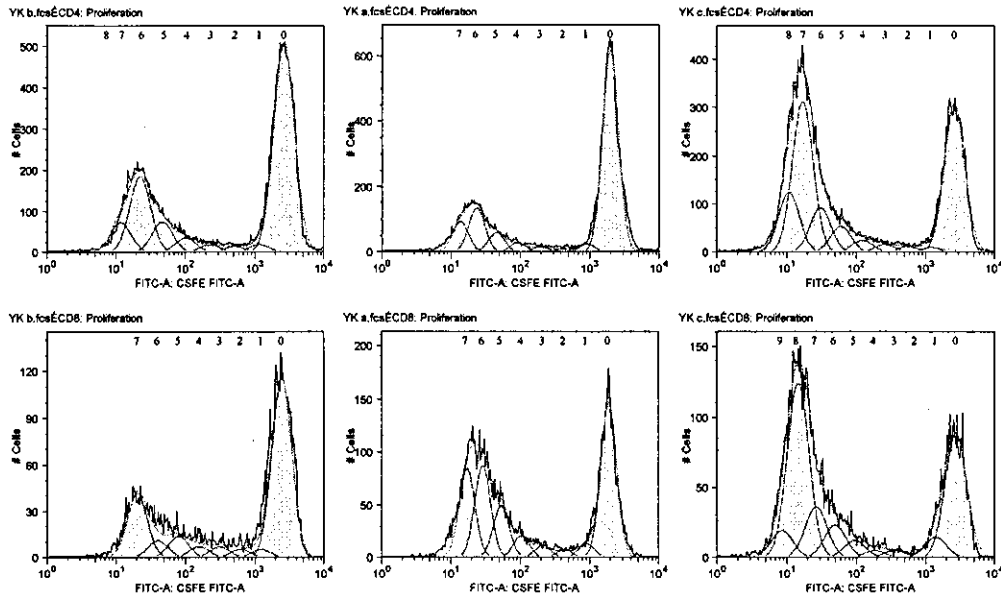


図1. インフルエンザウイルス感染樹状細胞によるT細胞の活性化誘導
 インフルエンザウイルス感染(200HAU)樹状細胞とワクチン投与前後のT細胞をCSFE標識して共培養し、培養4日目にIL2とIL7を添加した。一週間後に増殖する(CSFE陰性)細胞をPE-標識抗CD4抗体とAPC標識抗-CD8抗体で染色し、フローサイトメーターで解析した。T細胞はCD4陽性細胞(上段)とCD8陽性細胞(下段)にゲートをかけて表示した。a, ワクチン投与数ヶ月前のT細胞 b, ワクチン投与後2~3ヶ月のT細胞 c, アロ抗原刺激T細胞。

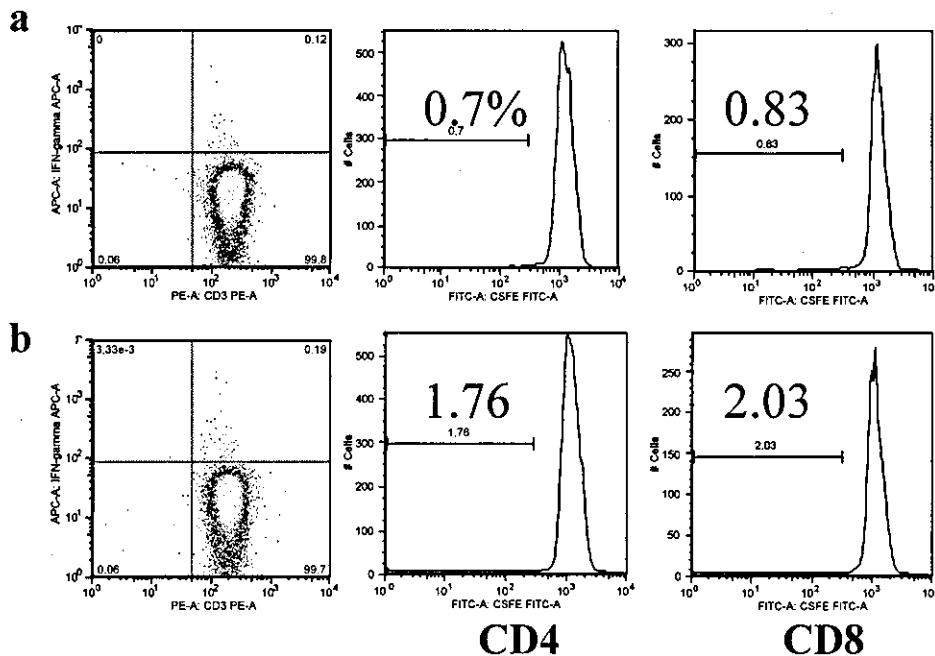
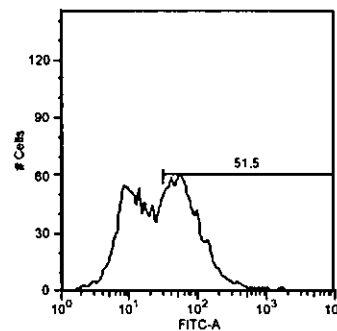
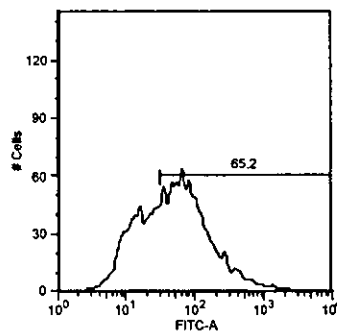


図2. インフルエンザワクチン投与によって誘導されるインフルエンザ特異的T細胞の解析
 インフルエンザウイルスを200HAUあるいは500HAUで感染させた樹状細胞に、ワクチン投与後一週間のT細胞をCSFE標識して加え、共培養した。翌日T細胞の一部を細胞内染色してIFN- γ 産生T細胞の頻度をフローサイトメーターで解析した(左)。培養5日目のT細胞をCD4およびCD8にゲートして増殖細胞の頻度を解析するとともに、増殖した細胞をソートした。サイトカインを全く添加しない条件で培養したため、図1と比較して増殖する細胞の頻度は少ない。

EGFP コントロ
ールレンチ



IFN γ -promoter+
marker レンチ

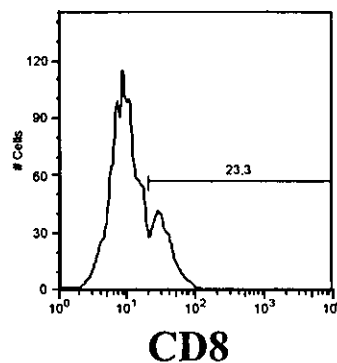
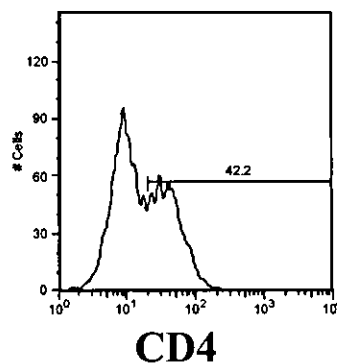


図3. 抗原刺激により活性化する T 細胞へのレンチウイルス感染効率

EBV peptides mixture をパルスした樹状細胞に CSFE 標識した T 細胞を加えて共培養した。5 日後の増殖する細胞 (CSFE 陰性) を CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞に分けてソートしてレンチウイルスを感染させた後、IL2 と IL7 を加えて維持し、6 日後に EGFP を指標にレンチウイルスの感染効率を比較した。空ベクターである EGFP レンチは moi=10 で感染させ、IFN- γ promoter+marker のレンチは moi=2 で感染させた。右バー上の数値は EGFP 陽性率 (%) をあらわす。

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 国内 Clade B HIV-1 感染者由来 *gag* の解析で、HLA-A*0201, 2402, B*5101 拘束性 epitope 領域で高頻度に認められた抗原の processing と presentation 障害による CTL 認識からの逃避が、① non-clade B HIV-1、② 他の HLA 型、③ 他の構造タンパク質でもみられるかを検討する。その目的のために、昨年度構築した *gag-pol* クローニングシステムを用いて、タイ流行株由来 *gag-pol* 213 クローンを作成し、sequence 解析に着手した。また、*env* のクローニングおよび発現システムの構築に成功した。様々なアミノ酸変異を有する臨床検体由来 *gag, pol, env* のライブラリーを確立できる可能性がある。

A. 研究目的

日本では、先進国でありながらも現在なお新規 HIV-1 感染者が増加傾向を示している。また、近年東アジア地域の感染者の増加が顕著である。社会、経済的状況、さらにそれぞれの地域で異なる clade の HIV-1 が流行していることを考慮すると、周辺諸国を含めた新規感染者増加阻止対策を行うことが必要である。予防および治療ワクチン開発は、開発は困難を極めているものの、費用対効果の点からも、その重要な方策の一つであると考えられる。

近年、中和抗体誘導ワクチンにかわり、CTL 誘導型ワクチン開発のための研究が盛んに行われてきた。我々は、日本国内感染者より分離した HIV-1 Gag の HLA-A* 0201,2402 および B*5101 拘束性の3つの異なる CTL epitope 領域の解析から、HIV-1 が epitope 領域内のアミノ酸変異により、感染細胞内における抗原の processing と presentation を障害することにより、CTL の認識から逃避する頻度が高く、しかもその変異は、HIV-1 の増殖能に影響を与えないことを見だし報告した。また、HLA 型および epitope 領域の違いによって、変異 epitope を有する HIV-1 が存在する割合が大きく異なることを示唆するデータを得た。

現在、これまで得られた様々な知見から、有効な CTL 誘導型抗 HIV-1 ワクチン開発のためには、CTL の感染細胞障害によるウイルス増殖抑制効果とともに、逃避変異がウイルスの増殖能に大きく影響を与えるような epitope 領域

およびその拘束 HLA 型の同定が重要であると考えられている。

本研究においては、周辺諸国での流行も考慮し、non-clade B HIV-1 の代表としてタイ流行株の epitope 領域のアミノ酸変異が CTL 認識に与える影響の検討を目的とする。さらに、*gag* のみならず、残る構造タンパク質である *pol, env* についても検討可能なシステム開発を行うこととした。

今年度は、前年度までに確立した *gag-pol* クローニングシステムを使用することにより、実際にタイ流行株由来 *gag-pol* のクローニングを行った。得られた *gag-pol* クローンについて、*gag* 領域から塩基配列解析を開始した。また、CTL epitope 評価に関しては全構造遺伝子の解析を可能にし、さらに中和抗体誘導型ワクチンの基礎的研究を行うため、新規 *env* クローニングおよび発現システム構築を試みた。そして、これらのシステムを使用することにより、*gag, pol* および *env* のライブラリー作成の可能性について検討した。

B. 研究方法

①タイ流行株 *gag-pol* のクローニングと *gag* sequence 解析：これまでに構築した *gag-pol* 迅速クローニングシステムを使用し、臨床検体から増幅した領域をクローニングした。制限酵素により組み込みを確認後、sequence 解析を行った。

②*env* 発現系開発：Invitrogen 社の Gateway

cloning system の entry vector である pDONR221 を改変して *tat*, *rev*, *env*, *vpu* を含む領域を、一反応でクローニングし、かつ哺乳細胞株で発現可能な plasmid を構築した。さらに、クローニングした *env* の機能スクリーニング方法を検討した。

(倫理面への配慮)

用いた臨床検体はタイランパンコホートの有吉先生より提供された。採取施設においてインフォームドコンセントが得て採取されたもののみを使用した。

C. 研究結果

①タイ流行株 *gag-pol* のクローニングと *gag* sequence 解析：タイ流行株由来 HIV-1 の *gag-pol* 213 クローンを組み込んだ。うち、92 クローンについて *gag* のほぼ全領域の解析を行った。既知の CTL epitope 領域として、我々がこれまで検討してきた HIV-1 *gag* の HLA-A*0201,2402 および B*5101 拘束性 CTL epitope 領域のアミノ酸配列を比較した。タイ流行株においても、A*0201 拘束性 SLYNYVATL および A*2402 拘束性 KYCLKHIVW 領域には多様なアミノ酸変異が蓄積されており、Clade B の HXB2 と同じアミノ酸配列を有するクローンは無かった。また、これまでの報告から、KYCLKHIVW および SLYNTVATL それぞれに特異的 CTL 認識から逃避する可能性があるとして推測されるクローンが多く認められた。B*5101 拘束性 NANPDCTI については、ほとんどのクローンで8番目のアミノ酸が T から S に変異していたものの、同変異を有するものが 80 クローン (87%) を占めていた

②*env* 発現系開発 (図参照)： *vpu*, *tat*, *rev*, *env* の全長の増幅、クローニングが可能になるようにプライマー部位を設定した。pDONR221 を改変し、PCR によって増幅した領域を CMV promoter の下流にワンステップ (BP 反応) でクローニング可能なプラスミド pFG01 を構築した。これを国立感染症研究所巽先生が確立された細胞株である Hela4.5 nEGFP に transfection すると、核に EGFP 発現を確認することで *tat* の機能、細胞融合によって *rev*, *env* の機能の確

認を容易に行うことが可能であった (data not shown)。Non-clade B HIV-1 として、国立感染症研究所佐藤先生より供与いただいた NH-1, NH-2 から *env* を含む本実験の標的領域を増幅後 pFG01 に組み込んだ。群馬大学星野教授が作成された細胞株である NP2-CXCR4, NP2-CCR5 に transfection し、多核細胞形成を確認することにより、co-receptor usage を容易に判断することが可能であった (data not shown)。機能が確認された *env* はワンステップ

(LR 反応) で速やかに provirus (pFG02) へ移動可能であった。HXB2, JRFL, NH-1, NH-2 のそれぞれの *env* を含む領域を有する組み換え HIV-1 を作成したところ、*vpr* の C 末領域ならびに *env* と *nef* の間に 25 塩基からなる attachment sequence が挿入されるものの、全て attachment sequence を含まないものと同等の感染性を有した (data not shown)。HXB2 由来の *env* を含む領域で、attachment sequence が増殖能に与える影響を比較したところ、H9 細胞においては差を認めなかった (data not shown)。

D. 考察

①タイ流行株 *gag-pol* のクローニングと *gag* sequence 解析：現在、タイにおいて *gag* 領域の新規 CTL epitope 同定を試みている。新規 epitope が同定された場合、本研究で作成しつつある豊富な臨床検体由来の *gag-pol* パネルを使用し、HIV-1 vector 法によって標的細胞作成後 CTL アッセイを行う予定である。これにより、non-clade B HIV-1 の新規の異なる HLA 拘束性 CTL epitope 領域について、アミノ酸変異と CTL 逃避の関連についての重要な知見が得られる可能性がある。また、タイ流行株の豊富な *gag*, *pol*, *vif* の sequence 情報により、ワクチン抗原検討、抗 HIV-1 化学療法およびウイルス複製の基礎的研究に重要な知見を提供できる可能性がある。

②*env* 発現系開発：実際に臨床検体から *env* をクローニング、sequence 解析、co-receptor usage 確認を行いタイ流行株由来 *env* ライブラリー作成が可能である。充実したライブラリーが完成すれば、sequence や co-receptor usage の情報

から、クローンのグループ分類を行い、様々な実験に応じたクローン選択、提供が可能となる。効果的に HIV-1 の増殖を抑制するためには、CTLのみではなく、様々な免疫応答等により、ウイルス増殖を可能な限り低いレベルに制御する必要があると考えられる。中和抗体はウイルス複製制御に関与する免疫応答の中でも重要なものの一つであり、中和抗体誘導型ワクチンの再評価が必要であると考えられる。本研究で確立したシステムは、既存の様々な *env* 機能評価システムに応用可能で、中和アッセイにも使用できると考えられる。充実した *env* パネル作成により、中和抗体誘導型ワクチン開発のための epitope 選択に重要な知見を提供できる可能性がある。

E. 結論

タイ流行株由来 *gag, pol* のクローニングを試み、213 クローンを確立し、*gag* の sequence 解析に着手した。これまでの国内感染者の研究で検討してきた CTL epitope 領域のアミノ酸配列を比較したところ、clade B HXB2 および国内感染者由来とは異なるアミノ酸変異パターンが認められた。

さらに、臨床検体由来 *env* のクローニングおよび発現系を確立した。Gateway cloning system を応用することにより一反応で迅速に *env* 発現ベクターにクローニングすることが可能になった。さらに一反応行うことにより、容易かつ確実に provirus plasmid に移動が可能である。既存の様々な実験システムに応用でき、*env* 単独や感染性ウイルスなど多様な形で *env* 機能解析を行うことが可能となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyauchi K, Komano J, Yokomaku Y, Sugiura W, Yamamoto N, Matsuda Z: Role of the specific amino acid sequence of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 in membrane fusion. J Virol, in press.

2. 学会発表

- 1) 藤秀義、田中真理、宮内浩典、松田善衛、星野忠次、有吉紅也、佐藤裕徳、横幕能行：HIV-1 *env* の迅速なクローニング、発現および組み換えウイルス作成システム構築。第 52 回日本ウイルス学会学術集会総会（横浜）2004.10.
- 2) 藤秀義、田中真理、宮内浩典、松田善衛、星野忠次、有吉紅也、星野洪郎、佐藤裕徳、横幕能行：HIV-1 *env* クローンライブラリー作成の試み-HIV-1 *env* の迅速なクローニング、発現および組み換えウイルス作成システム構築。第 18 回日本エイズ学会学術集会総会（静岡）2004.12.
- 3) 横山 勝、木ノ本正信、徳永研三、佐多徹太郎、長縄 聡、北村勝彦、蜂谷敦子、岡慎一、服部知秀、田中真理、横幕能行、有吉紅也、星野忠次、仲宗根 正、佐藤裕徳：計算科学の HIV-1 研究への適用に関する基礎研究。第 18 回日本エイズ学会学術集会総会（静岡）2004.12.
- 4) 太田雅美、簾 貴士、大出裕高、畑 晶之、佐藤武幸、横幕能行、布施 晃、杉浦 互、星野忠次：臨床応用に向けたコンピュータによるエイズ治療薬の適性予測。第 18 回日本エイズ学会学術集会総会（静岡）2004.12.

G. 知的所有権の出願・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

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 神経・グリア細胞における HIV の感染動態を解明することを目的として HIV 脳症の動物モデルである SIV 脳症の病態をサル胎児神経幹細胞由来の培養系を用いて解析した。サル神経幹細胞由来の培養系はニューロン・グリア系の様々な分化段階の細胞の集団からなっているが、マクロファージ・マイクログリア系の細胞は混在しない。神経向性な SIV17E-Fr は、この *in vitro* 培養系で感染増殖し、感染性の子孫ウイルスを産生することがわかった。SIV17E-Fr と env が 16 アミノ酸異なる SIVmac239/316 は SIV17E-Fr と比較してリンパ球系細胞および MDM で感染性が高いが、神経・グリア系細胞では低かった。SIVmac239/316 を VSVg で pseudotype すると神経・グリア系細胞でも感染性が高くなることから、神経向性の決定因子はウイルスの env にあり、神経・グリア細胞への感染性はエントリーの段階で restrict されていると考えられた。SIV17E-Fr と SIVmac239/316 の env 部分の組み換えウイルスの感染性を調べたところ、env の SU 部分が SIV17E-Fr 型であることが神経向性に重要であることがわかった。

A. 研究目的

HIV 脳症及び AIDS 痴呆の発症病理はいまだ不明な点が多い。様々なエイズ治療薬およびワクチンが開発研究されているが、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。HIV は脳内の細胞の中で、主にマイクログリア、マクロファージで増殖し、これらの感染細胞が分泌するサイトカインやケモカインが HIV 脳症の病態を作り出していると考えられている。HIV 脳症の脳組織から回収される major な HIV クロームは、マイクログリアやマクロファージで増殖するマクロファージ tropic なクロームである。しかしながら神経・グリア細胞に感染している神経向性クロームはこれと同一とは限らない。ニューロン、アストロサイトにおける HIV の動態はいまだ明らかではない。脳症発症の機序を解明するには、神経向性クロームが脳症の病態にどのように関与しているのかを解析することが必要である。本邦では倫理面からヒト胎児脳神経幹細胞を用いることが困難である。そこで本研究では HIV 脳症の動物モデルである SIV 脳症の病態をサル胎児脳から分離した神経幹細胞由来の神経・グリア細胞からなる *in*

vitro の培養系で解析することを試みた。本研究の目的は、神経・グリア細胞における SIV の動態を明らかにし、脳症の発症機序を解明することである。

B. 研究方法

1) サル神経幹細胞由来培養系の特徴

在胎 8-11 週のカニクイザルの胎児脳を摘出後、細切し、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)。培地から増殖因子を取り除き、血清を添加し、poly-O をコートしたプレートに増殖継代した神経幹細胞を接着することにより分化誘導した。分化前、分化後 7、14、28 日後の細胞において、ネスチン (神経幹細胞のマーカー)、GFAP (アストロサイトのマーカー)、Tuj (ニューロンのマーカー) の発現を flow cytometry と免疫組織化学で解析した。また SIV のレセプター、コレセプターの候補となる CD4、CXCR4、CCR5、CCR3、APJ、GPR1、GPR15 (BOB)、STRL33 (Bonzo) の発現 (mRNA) を RT-PCR 法で解析した。

2) Neurotropic な SIV17E-Fr の感染様式

SIV17E-Fr が神経幹細胞由来の培養系でどのように感染するか解析するために、(i) SIV p27 抗原量で 100、200、300ng 相当量感染させ、接種量による培養上清中の SIV p27 抗原量の経時的な変化の相違を比較した。(ii) 感染後、逆転写酵素阻害剤(AZT)存在 or 非存在下で培養し、培養上清中の SIV p27 抗原量の経時的な変化を比較した。(iii) SIV17E-Fr 感染細胞培養上清の感染性を LuSIV assay により調べた。(iv) CCR5 のリガンドである RANTES 存在 or 非存在下で培養し、培養上清中の SIV p27 抗原量の経時的な変化を比較した。

3) SIV17E-Fr の神経向性決定領域

神経幹細胞由来の培養系に 2 種類の SIV クローン (SIV17E-Fr、SIVmac239/316E) を接種した。これらの SIV クローンの backbone は SIVmac239 であり、env 領域以外はほぼ同一である (図 1)。また、VSVg で pseudotype した SIVmac239/316E、SIV17E-Fr も同様に接種した。次に SIV17E-Fr、SIVmac239/316E の env 領域の 5'側 (SU 部分) と 3'側を組換えた 6 種の組換えウイルスを作製し、感染性を比較した。SIVmac239/316E、SIV17E-Fr および組換えウイルスを CEM×174 細胞に接種し経時的に培養上清中の SIVp27 抗原量の変化を比較した。LuSIV assay による感染性の評価を行った。分化後神経幹細胞への感染性については、感染 29 日目の細胞中の SIV nef-DNA を定量して評価した。

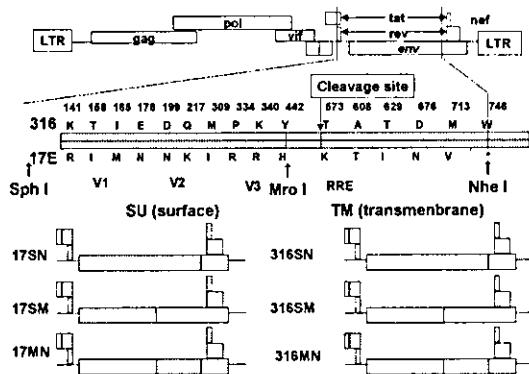


図 1. SIV17E-Fr と SIVmac239/316E の組み換えウイルス

C. 研究結果

1) 神経幹細胞由来の培養系の特徴

サル胎児脳の神経幹細胞は様々な分化段階の神経・グリア細胞に分化誘導される。これらの細胞の phenotype を免疫組織化学及び FACS により解析した (図 2)。FACS 解析により分化前はおおよそ 90% でネスチン陽性であったが、ほとんどが GFAP も同時に陽性であった。分化誘導 14 日目には 80% の細胞で GFAP と Tuj が陽性であり 70% が double-positive であった。GFAP 陽性細胞の中には成熟したアストロサイトだけではなく、未分化あるいは分化途中の progenitor cells が含まれることがわかった。また分化段階で、GFAP とニューロンのマーカーである Tuj をともに発現している細胞が存在することがわかった。免疫組織化学で、神経幹細胞のマーカーであるネスチン、CXCR4 陽性で、RT-PCR で分化誘導前後とも CD4、CXCR4、CCR5、CCR3、GPR1、GPR15、STRL33、APJ、の mRNA が陽性であった。

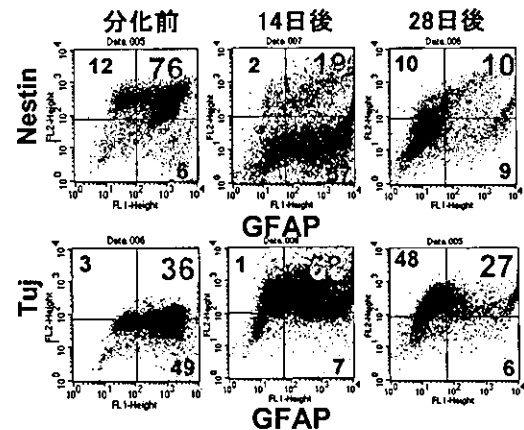


図 2. サル胎児神経幹細胞培養系 (分化前・後) で発現している各細胞マーカーの割合の変化

2) SIV17E-Fr の感染性

SIVmac239/316E、SIV17E-Fr (図 1) を CEM×174 に接種すると、SIV17E-Fr よりも SIVmac239/316E の方が培養上清中の SIVp27 量が接種後早期に最高値をとり、感染増殖しやすいことがわかった (図 3a)。monocyte derived macrophage(MDM)に接種した場合は、mock と比較して SIV17E-Fr も培養上清中の SIVp27 量が上昇したが、はるかに SIVmac239/316E の方が高い感染性を示した (図 3b)。一方、分化後神

神経幹細胞（神経・グリア細胞）に接種すると、SIVmac239/316E の感染性は非常に低く、SIV17E-Fr がはるかに高い感染性を示した(図 3c)。VSVg で pseudotype した SIVmac239/316E、SIV17E-Fr を分化後神経幹細胞に接種した場合は、感染初期の培養上清中の SIVp27 量は逆転し、SIVmac239/316E (316VSVg) の方が SIV17E-Fr (17VSVg) よりも高い感染性を示す結果となった (図 3d)。

SIV17E-Fr を感染した神経・グリア細胞培養上清中の SIVp27 量は、接種量と比較して高くはなかったが、感染性のあるウイルスが産出されていることがわかった。また逆転写阻害剤 (AZT) 添加により培養上清中の SIVp27 量の増加が消失したことから、この SIVp27 は前期過程を経て産出されるものであることがわかった。CCR5 のリガンドである RANTES を添加することにより培養上清中の SIVp27 量が減少したことから CCR5 が SIV17E-Fr の感染に関与していることが示唆された。

3) SIV17E-Fr の神経向性決定領域

SIVmac239/316E、SIV17E-Fr の env ほぼ全長 (SphI~NheI) を MroI で 5' 側前半と 3' 側後半に切断し、作製した 6 種類の組換えウイルス (17SN、17SM、17MN、316SN、316SM、316MN; 図 1) と SIVmac239/316E、SIV17E-Fr を CEMx174 細胞に接種し、感染性を比較検討したところ、env の SU (surface) 部分である 5' 側前半を SIVmac239/316E に組換えた 316SN、316SM、17MN は SIVmac239/316E (以下 316) 型、SIV17E-Fr に組換えた 17SN、17SM、316MN は SIV17E-Fr (以下 17) 型とほぼ同じ感染性を示した。また SU 部分が 316 型であるウイルスの方が、17 型であるウイルスと比較して CEMx174 細胞でより感染増殖した。また、組換えウイルス 17SN、17SM、17MN、および SIV17E-Fr 17MN、SIVmac239/316E を LuSIV 細胞に接種後、48 時間後に発現するルシフェラーゼの活性を測定した結果、5' 側前半が 316 型の SIV を感染した場合の方が 17 型と比較してルシフェラーゼ活性が高かった (図 4)。すなわち 5' 側前半が 316 型の SIV の方が

CEMx174 細胞への感染性が高いことがわかった。

分化後神経幹細胞に組換えウイルス (17SN、17SM、17MN) と SIVmac239/316E、SIV17E-Fr を接種し、接種後 29 日目に細胞から回収した DNA 中の SIV nef -DNA を PCR で定量した。回収された SIV nef-DNA のコピー数は、5' 側前半が 17 型の SIV を感染させた場合の方が 316 型と比較して多く、分化後神経幹細胞への感染性に 17 型の SU 部分が重要であることを示唆する結果が得られた (図 4)。

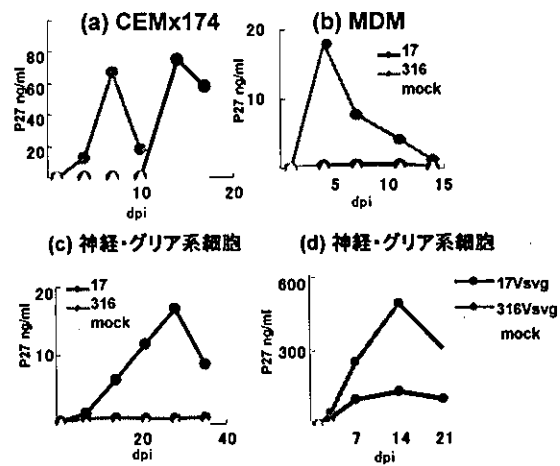


図 3 . 各細胞における SIV17E-Fr と SIVmac239/316E の感染性 (a-c) 及び VSVg pseudotyping による神経・グリア細胞への感染性の逆転(d)

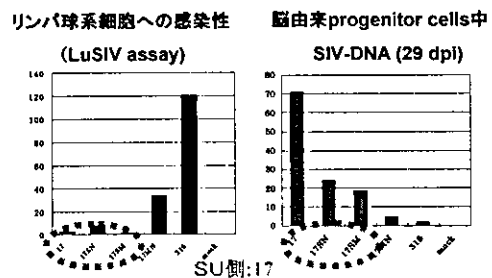


図 4. 組み換えウイルスの感染性

D. 考 察

HIV 脳症の病態については、いまだ明らかでない点が多い。脳症の剖検脳組織においてウイルス抗原およびウイルス核酸は主にマイクログリア・マクロファージに検出される。また、マイクロダイセクション-PCR 法により、アストロサイトおよびニューロンからもウイルス核酸が検出されることがわかっている。最近の報告によると、アストロサイトから検出される HIV クローンはマイクログリアから検出されるクローンと異なっており、神経向性のクローンの存在が示唆されている。本研究においても、神経向性の SIV クローンが *in vitro* 培養系で productive な感染をすることが確認されている。いままで脳症の原因ウイルスとして HIV 脳症の脳組織から回収されるマクロファージ tropic なクローンが注目されてきたが、これとは性質を異にする神経・グリア細胞に感染している神経向性なクローンについて解析した報告はまだ少ない。この神経向性のウイルスは、神経・グリア細胞に何らかの機能障害をもたらしているかどうかを明らかにする必要がある。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を解明しなくてはならない。

本研究で、神経・グリア細胞への感染はエントリーの段階でまず restrict されることがわかった。SIV のコレセプターの報告があるケモカインレセプターの発現を解析してみたが、ほとんどのケモカインレセプターの発現が認められた。各ケモカインレセプターの Usage に関しては不明であるが、CCR5 のリガンドである RANTES によって感染性が減少したことから、CCR5 の関与が示唆された。

今後、SIV 感染時の神経・グリア細胞とマクロファージとの相互作用を解析し、神経・グリア細胞に SIV が感染しているか否かにかかわらず感染マクロファージ・マイクログリアだけで脳症は発症するか、神経向性な SIV が感染していることの意義について検討していく予定である。

E. 結 論

サル胎児脳から分離した神経幹細胞 (Brain progenitor cells) 由来の培養系は様々な分化段階の神経・グリア系統の細胞からなることがわかった。神経向性な SIV17E-Fr は、神経幹細胞由来の神経・グリア細胞に感染後、感染性の子孫ウイルスを産生することがわかった。また逆転写の過程(前期過程)を経て、ウイルスが産生されることが示唆された。Env 蛋白の SU(Surface)側が、神経幹細胞由来の神経・グリア細胞へのエントリーに重要であることがわかった。

(倫理面への配慮)

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Lu R, Nakajima N, Hofmann W, Benkirane M, Jeang KT, Sodroski J, Engelman A, The-Jeang K: 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.

G. 知的所有権の取得状況

特になし。

14. 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 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/GBV-C)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GBV-C感染実験系の確立を目指して、昨年度、GBV-C遺伝子の全長クローニングを行った。今年度はその改良型を構築し、GBV-Cの産生増強を試みた。またこの5'UTR及び他の臨床分離株由来5'UTRのIRES活性とHCVのそれとを、新たに樹立したDual luc reporter IRES assayを用いて比較検討した。その結果、GBV-C IRES活性が本質的に低レベルであることが明らかになった。この低IRES活性を補うために、あらかじめ転写量を増加させた結果、代償的にウイルスRNA産生を高めることに成功した。この系を利用してHIV-1複製への関与を検討したところ、preliminaryではあるがHIV-1複製阻害が認められた。これが再確認できればゲノタイプ3型GBV-CによるHIV-1複製阻害の初の報告となる。

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ことが知られている。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GBV-Cのウイルス蛋白を検索することを研究目的とした。昨年度作製した全長GBV-C DNAより得られたRNAレプリコンの細胞内導入では、RT-PCRによりわずかにウイルス核酸が検出できるとどまったため、今年度は改良型GBV-C DNAの作製によるウイルス産生の増強を試み、またGBV-Cを含むフラビウイルスの複製能力を規定することが示唆されている5'UTRのIRES活性を、今回新たに樹立したアッセイ系を用いて他のウイルスの5'UTRのIRES活性と比較検討した。最後に改良型GBV-C DNAから得られ

たウイルスによるHIV-1複製阻害活性の有無を検討した。

B. 研究方法

a) DNAクローニング

i) 改良型全長GBV-C DNAの構築：昨年度、国内GBV-C感染者血清中のウイルスRNAゲノムよりRT-PCR増幅した複数のPCR断片の結合により構築した全長GBV-C DNA pCMV-GBVc-IM71を用いて、その5'側にT7 promoter、3'側にHDVリボザイム/T7 terminatorを持ったGBV-C DNAの作製を行った。まず、HDVリボザイム/T7 terminatorの全長約115塩基のオリゴDNA(プラス鎖及びマイナス鎖)を合成し、それをアニールさせたものを*Sma*I/*Aat*IIで制限酵素処理してpUC20に挿入した(pUC-T7PT/hdvrzと命名)。次に、pCMV-GBVc-IM71の3'側約600bpをpfu DNAポリメラーゼにより余分なアデニン残基付加のないPCRで増幅、その産物の5'側のみを*Hind*III処理して、それを*Hind*III/*Sma*Iで切断したpUC-T7PT/hdvrzに挿入することにより、GBV-C 3'UTRとHDVリボザイム間から一切の余分な塩基配列を排した直接結合に成功した(pUC-3UTR-T7PT/hdvrzと命名)。T7 promoter及び残りのGBV-C全塩基配列を含むDNA断片をpCMV-GBVc-IM71より*Scal*/*Hind*III処理で切

り出し、*PvuII/HindIII* で切断した pUC-3UTR-T7PT/hdvrz に挿入して、最終型 GBV-C DNA クローン pGBVc-IM71-T7PT/hdvrz の構築に成功した。

ii) アデノ T7 ポリメラーゼベクター ウイルスの作製：1998 年に Vogelstein らが開発した大腸菌体内相同組換え方式による T7 RNA ポリメラーゼ発現アデノベクターを作製した。T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を有する pAK-T7 (感染研・鈴木哲朗博士より分与) を鋳型として、センスとアンチセンスにそれぞれ *HindIII* と *XbaI* 末端を持つプライマーを用い、T7 ポリメラーゼ遺伝子を増幅、その PCR 産物を制限酵素処理後、GFP を有するアデノシャトルベクター、pAdTrack-CMV (Dr. Bert Vogelstein より分与) に挿入した (pAdTrack-CMV-T7pol)。アデノ完全長ベクター-DNA である pAdEasy-1 (Dr. Vogelstein より分与) と *PmeI* で直線化した pAdTrack-CMV-T7pol を、*recA* (遺伝子相同組換え酵素) 遺伝子が保存されている大腸菌株 BJ5183 (インビトロジェン社) にエレクトロポレーションにより導入した。菌体内で pAdEasy-1/pAdTrack-CMV-T7pol 間の相同組換えが起こった DNA を、シャトルベクター側の選択マーカーであるカナマイシン耐性遺伝子により薬剤選択し、得られた完全長アデノ T7 ポリメラーゼベクター DNA を pAd-T7pol と命名した。*PacI* で直線化した pAd-T7pol 及び陰性対照用の pAdEasy-1 をそれぞれヒト胎児腎細胞株 293 にトランスフェクトし、10 日後に細胞を回収、凍結融解後、上清を大容量の 293 細胞に添加してウイルスを大量増殖させた。GFP 陽性細胞数の計測による力価測定により、最終的に 5×10^{10} 感染性ウイルス粒子を作製した。

iii) Dual luc reporter IRES カセットベクター-DNA の作製：まず pGL3 (プロメガ社) を鋳型として、センスに *BamHI* 末端、アンチセンスに polyA 配列と *NheI* 末端を持つプライマーで、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を増幅した。その PCR 産物を制限酵素処理後、前出の pUC-T7PT/hdvrz を用いて、マルチクロニングサイト内の *BamHI* と HDV リボザイム/T7 terminator 間に存在する *NheI* で切断して、pUC-T7PT/hdvrz 内

にホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を挿入した (pUC-FL-T7PT)。次に phRL-CMV (プロメガ社) を鋳型として、センスに *HindIII* 末端及び T7 promoter 配列、アンチセンスに *SalI* 末端を持つプライマーで、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子を増幅した。pUC-FL-T7PT ベクターをマルチクロニングサイト内の *HindIII* と *SalI* で切断して、同制限酵素で処理したウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子を挿入した DNA を phRL/FL-IRES カセットベクターと命名した。センスに *SalI* 末端、アンチセンスに *BamHI* 末端を持つプライマーを用いて pGBVc-IM71-T7PT/hdvrz を鋳型として PCR 増幅した 5'UTR 領域を、*SalI/BamHI* で処理後、同制限酵素処理した phRL/FL-IRES カセットベクターに挿入して phRL/FL-IM71-5'UTR を作製した。更に 7 人の国内 GBV-C 感染者血清中のウイルス RNA ゲノムより、同プライマーを用いて RT-PCR 増幅、制限酵素処理した 5'UTR 領域を phRL/FL-IRES カセットベクターに挿入して患者由来 IRES ベクターを作製した。また HCV IRES 活性との比較のため、2 名の HCV 感染者血清中のウイルス RNA より RT-PCR 増幅した HCV 5'UTR を用いて IRES ベクターを作製した。陽性対照として EMCV (encephalomyocarditis virus) の IRES を挿入した phRL/FL-emcvIRES を作製した。

b) 臨床株由来 GBV-C 5'UTR の塩基配列決定及びその系統樹解析

phRL/FL-IRES カセットベクターに挿入した患者由来 GBV-C 5'UTR の塩基配列を、ABI モデル 310 DNA シークエンサー (アプライド・バイオシステム社) により決定した。異なるゲノタイプを代表する数種類の対照株と今回新たに塩基配列を決定した臨床分離株の 5'UTR の比較を CLUSTAL W プログラムにより行い、neighbor-joining 法により系統樹を構築した。また遺伝子間距離は Kimura two-parameter 法により算定した。

c) IRES アッセイ

phRL/FL-IRES カセットベクターに IM72 を含む患者由来 GBV-C 5'UTR を挿入して作製した各 IRES ベクター、及び HCV IRES ベクター、陽性

対照の EMCV IRES ベクターを各々2 μ g、リポフェクタミン (ロシュ社) を用いて、 4×10^5 個の HeLa 細胞にトランスフェクトした。その 16 時間後に pAd-T7pro アデノベクターウイルスを m.o.i. (multiplicity of infection) 10 で感染させた。トランスフェクションの 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 のライシスバッファー (プロメガ社) を加えて細胞を溶解した。ホタル及びウミシイタケのルシフェラーゼ活性は Dual-luciferase assay system (プロメガ社) を用いて MicroLumat LB 96V (ベルトールド社) により測定した。

d) GBV-C のウイルス産生実験

14 μ g の pGBVc-IM71-T7PT/hdvrc を、リポフェクタミンを用いて 2.8×10^6 個の HeLa 細胞にトランスフェクションした。16 時間後に pAd-T7pro アデノベクターウイルスを m.o.i. 500 で感染させ、その 32 時間後に培養上清と細胞を回収した。培養上清は一部感染実験用に保存し、残りを 20% ショ糖溶液上に重層、ベックマン TL-100 卓上超遠心機にて、70,000 rpm、5 分遠心後、沈渣を PBS で懸濁、High Pure RNA Isolation Kit (ロシュ社) にて RNA を抽出した。細胞は上清回収後、PBS で洗浄、上記 RNA 抽出キットにより RNA を単離した。

e) GBV-C ゲノムの検出

トランスフェクトした細胞内における GBV-C のアンチセンス RNA の検出のためにマイナス鎖特異的 RT-PCR を行った。tag 配列を有するオリゴヌクレオチドプライマー、HGVS-S1 (5'-AGTCATGGTGGCGAATAAAAGCCCCAGAAACCGACGCC-3'; 太字は tag 配列) を用いて、細胞より抽出した RNA を鋳型とし、RNasin (RNase inhibitor; Promega) 存在下にて MuLV Reverse transcriptase (Promega) による逆転写反応を 37°C、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 HGVS-S2(5'-AGTCATGGTGGCGAATAAAAGCCCCAGAAACCGACGCC-3') とアンチセンスプライマー、HGVS-S2(5'-CCCCACTGGTCCTTGTCAACT

C-3')を用いて Expand High-Fidelity PCR System (Roche) により、PCR を行った。更に HGVS-S2 と

HGV-24R(5'-CACCCGGTAGGGCCAACACCT-3') を用いて 2-round PCR を行った。上清中のウイルス粒子内プラス鎖ゲノム RNA の検出は、培養上清より抽出した RNA を鋳型に NS2-NS3 領域をターゲットとした 2-round PCR 用によって行った。

f) GBV-C/HIV-1 混合感染実験

1×10^6 個の健常人末梢血リンパ球を 3 μ g/ml フィトヘマグルチニン (シグマ社) で 48 時間刺激後、10 U/ml の IL-2 (R&D システムズ社) を添加した 10% 牛胎児血清入り RPMI1640 (インビトロジェン社) で 24 時間培養、GBV-C ウイルスストック (pGBVc-IM71-T7PT/hdvrc をトランスフェクトした HeLa 細胞の培養上清) 1 ml 分を感染させた。その 24 時間後に、Gag p24 量で 20 ng 相当の T 細胞指向性 HIV-1 NL4-3 を感染させた。CD4 陽性細胞株 Daudi-CD4 (Dr. Olivier Schwartz より分与) を用いて同様の感染実験を行った。3 日毎に培養上清を回収して凍結保存、感染後 12 日で回収を終了して保存した上清サンプルの p24 量の測定を p24-antigen capture ELISA (RETRO-TEK 社) により行った。

C. 研究結果

昨年試みた GBV-C 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 ウイルスで用いられている手法であるが、HGVS 複製の確認は RT-PCR によりわずかにウイルス核酸が検出できる程度であった。近年いくつかの研究グループがレオウイルスやブニヤウイルス等の発現系において試みている手法として、T7 RNA ポリメラーゼを発現させた細胞に、T7 プロモーターと 3'側に HDV リボザイム/T7 terminator を有する全長ウイルス DNA のトランスフェクションを行うという方法がある。この系では T7 ポリメラーゼ存在下で T7 promoter より GBV-C RNA の発現が開始して T7 terminator にて転写停止となり、GBV-C リボザイムによる 3'UTR の末端部分での自己切断作用で、余分な RNA を除去する(図

1)。こうしてプラスミド DNA のトランスフェクションのみで、RNA ウイルスの複製効率を促進させることが可能になるケースが数多く報告されている。今回 GBV-C にもこの手法を取り入れてウイルス複製の増強を試みるべく、T7 RNA pol アデノベクター-DNA 及び T7 pro-HDV リボザイム保有型全長ウイルス DNA の構築を行った。同時に GBV-C IM71 株が有する 5'UTR の IRES 活性が本質的に低レベルである可能性を検討するため、他のウイルス由来 5'UTR の IRES 活性と定量的に比較できる Dual luc reporter IRES カセットベクター (図 2A) を構築して実験を行った。IM71 5'UTR あるいは EMCV IRES をカセットベクターに挿入した DNA を HeLa 細胞にトランスフェクトして 16 時間後、T7 RNA pol アデノウイルスを感染、その 32 時間後に細胞を溶解して、ルシフェラーゼアッセイにより IRES 活性の比較を行った。その結果、GBV-C IM71 の IRES 活性は EMCV のそれに比べて 100 倍以上低いことが明らかになった (図 2B)。そこで GBV-C の中で IM71 株の 5'UTR の IRES 活性のみが特異的に低いかな否かを検討するために、他の臨床分離 GBV-C 株の 5'UTR IRES 活性との比較を行った。GBV-C 陽性と診断された感染者血清サンプルより RNA を抽出、5'UTR をターゲットとした PCR を行ったところ、7 人のサンプルより陽性のシグナルが得られ、それら PCR 産物を制限酵素処理後、直接 IRES カセットベクター-DNA に挿入した。塩基配列決定後、系統樹を作製したところ、すべての臨床分離株 5'UTR は、日本及び東アジアで流行しているゲノタイプ 3 に分類されることが明らかになった (図 3A)。次にこれら臨床分離株由来 5'UTR の IRES 活性を IRES アッセイにより、IM71、EMCV 及び 2 種類の HCV 臨床分離株由来 5'UTR のそれと比較検討した。その結果今回新たに分離した 7 種類の GBV-C 5'UTR の IRES は、その活性において IM71 と同程度で、いずれも EMCV や HCV と比べて、100 倍以上低レベルであったことから、GBV-C 5'UTR の IRES 活性は IM71 のそれに限らず本質的に低いことが示唆された。(図 3B)

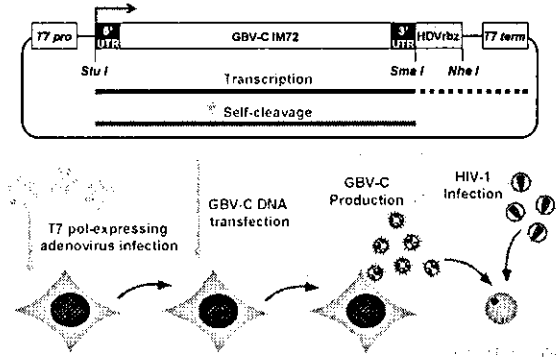


図 1. 改良型 GBV-C DNA によるウイルス産生システム

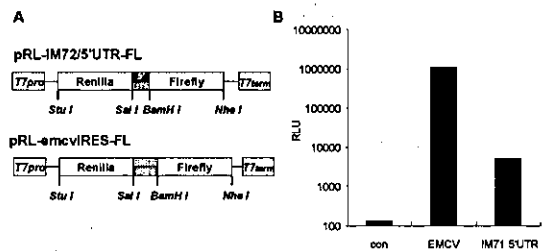


図 2. IRES カセットベクターシステムによる IRES 活性比較

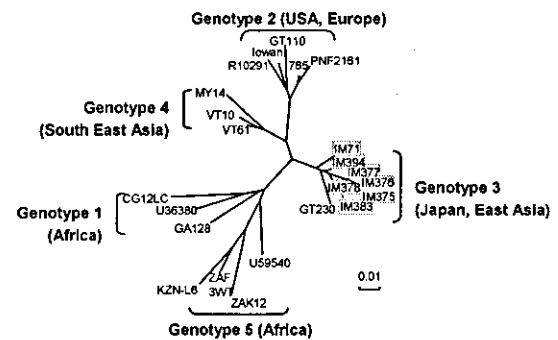
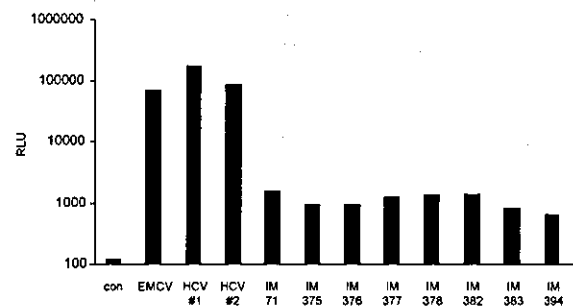


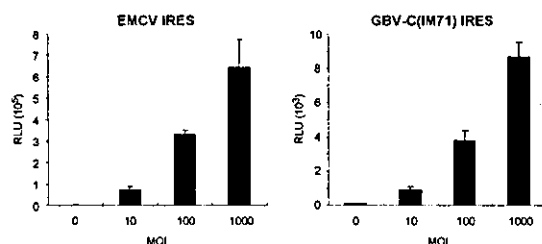
図 3A. 国内臨床分離 GBV-C 株 5'UTR の系統樹解析



3B. 国内臨床分離GBV-C株5'UTRのIRES活性比較

この低レベルIRES活性を代償的に高めるべく、予め細胞内RNAコピー数をRNAポリメラーゼの強発現で増加させることにより、最終的なターゲット遺伝子産物の産生を促進させることが可能か否かを検討した。T7 RNA polアデノウイルスを感染時のm.o.i.を10, 100, 1000と高めた結果、EMCVとGBV-C IM71のIRES活性の差は依然として100倍程度あったが、アデノウイルスm.o.i.依存的に、GBV-C IM71 5'UTRの低IRES活性による低ルシフェラーゼ活性を代償的に高められることが明らかになった(図3C)。完成した改良型GBV-C DNA、pGBVc-IM71-T7PT/hdvrzを用いてHeLa細胞へのトランスフェクションを行い、T7 RNA polアデノウイルスをm.o.i. 500で感染させた後、細胞内及び上清中のGBV-C RNAゲノムの検出を試みた。まず細胞内のGBV-Cゲノムでは、その複製中間体であるマイナス鎖RNA特異的RT-PCRを行ったところ、図4左に見られるようにクリアなシグナルを検出することができた。逆転写のステップなしで行ったPCRでは何もシグナルが認められないことから、RT-PCRで検出されたバンドはトランスフェクション時のDNAのcarry-overによるものではないことを確認することができた。次に培養上清の超遠心による沈渣より抽出したRNAを用いて、プラス鎖をターゲットとしたRT-PCRを行った結果、こちらもクリアなシグナルの検出に成功した(図4右)。このことから、改良型GBV-C全長DNA、pGBVc-IM71-T7PT/hdvrzのHeLa細胞へのトランスフェクションにより、細胞内でGBV-C RNAゲノムが複製され、更にそのウイルス粒子が上清中に産生されている可能性が示唆された。

最後にpreliminaryな実験として、ヒトリンパ球およびGBV-C感受性Daudi-CD4細胞でのHIV-1感染実験を行ったところ、ヒトリンパ球では~2.5倍、Daudi-CD4細胞では~4.5倍程度のHIV-1の産生低下が観察された。これにより、日本国内に存在するゲノタイプ3型も、欧米の2型同様にHIV-1複製抑制効果を有する可能性が示唆された。



3C. GBV-C 5'UTRの低IRES活性に対する代償的転写促進



図4. 細胞内及び上清中でのGBV-C複製確認

D. 考察

昨年度作製した全長GBV-C DNAより得られたRNAレプリコンからのウイルス複製の確認は困難であったため、今年度はウイルス産生の増強を試みるべく改良型GBV-C DNAの構築を行った。同時に、クローン化したIM71株の有する5'UTRのIRES活性に欠陥がある可能性を考慮して、複数の国内感染者由来GBV-Cの5'UTRのクローニングを行い、IM71及びEMCV、HCVのIRES活性との比較を行った。その結果、GBV-C 5'UTRのIRES活性は本質的に低レベルであることが明らかになった。そのためT7 RNAポリメラーゼの発現増大による総転写量の増加によってIRES依存的発現を高めることを試みた。その結果Adeno-T7 polの感染ウイルス量を増やして代償的にウイルスRNA産生量を増加させることが可能になった。将来的にウイルス産生の蛋白レベルでの確認を目指す上でこの意義は大きい。現在ウサギ免疫でポリクローナル抗体を作製すべくGBV-Cエンベロップ蛋白を大腸菌で発現させその蛋白の精製に着手しているところである。このHDV ribozyme/T7 terminator付全長ウイルスDNAトランスフェクション・T7 RNAポリメラーゼアデノウイルス感染の系を利用して得られたGBV-Cを用い

て、ヒトリンパ球及び CD4 陽性細胞株における HIV-1 複製への関与を検討したところ preliminary ではあるが 2.5~4.5 倍の HIV-1 複製抑制効果が認められた。この結果の再現性を確認すべく現在、追試験を行っているところである。これが再確認できればゲノタイプ 3 型 GBV-C による HIV-1 複製阻害の初の報告となる。今回は PHA 刺激後の末梢血リンパ球に GBV-C を感染させたが、Stapleton らによる報告では、未刺激リンパ球に GBV-C を感染させた場合、そのコピー数は刺激後の感染に比べて、10 倍以上高まることが明らかになっている。更に彼らは、GBV-C 感染細胞での RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β の高産生による共受容体ブロックによって、マクロファージ指向性 HIV-1 が T 細胞指向性 HIV-1 よりも細胞内侵入阻害を受けることを報告している。これらの情報をもとに、次回の感染実験では、GBV-C 感染を未刺激リンパ球で行い、その後、マクロファージ指向性及び T 細胞指向性 HIV-1 をそれぞれ感染させて、両ウイルス間での複製低下レベルの相違を検討する予定である。更にその複製阻害に関して、共受容体ブロック以外のメカニズムが存在するか否かを検証していくことが今後の主要課題となるであろう。

E. 結論

前年度に作製した全長 GBV-C DNA の改良型を構築し、GBV-C のウイルス産生の増強を試みた。またこの GBV-C クローンが有する 5'UTR 及び他の臨床分離株由来 5'UTR の IRES 活性と HCV のそれとを、今回新たに樹立した Dual luc reporter IRES assay を用いて比較検討したところ、GBV-C IRES 活性は本質的に低いことが明らかになった。この低 IRES 活性を補うために、Adeno-T7 pol の感染ウイルス量を増やして転写量を高めた結果、代償的にウイルス RNA 産生量を増加させることに成功した。この系を利用して HIV-1 複製への関与を検討したところ、preliminary ではあるが HIV-1 複製阻害が認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Zheng YH, Irwin D, Kurosu T, Tokunaga K, Sata T, Peterlin BM: Human APOBEC3F is another host factor that blocks human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol* 78:6073-6076, 2004.
- 2) Ueno T, Tokunaga K, Sawa H, Maeda M, Chiba J, Kojima A, Hasegawa H, Shoya Y, Sata T, Kurata T, Takahashi H: Nucleolin and the packaging signal, ψ , promote the budding of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). *Microbiol Immunol* 48:111-118, 2004.
- 3) Yong-Gang L, Iwabu Y, Warachit J, Kinomoto M, Ibrahim MS, Tsuji Y, Mukai T, Kameoka M, Tokunaga K, Sata T, Ikuta K: Interleukin-4 upregulates T-tropic human immunodeficiency virus type 1 transcription in primary CD4⁺CD38⁺ T-lymphocyte subset. *Microbiol Immunol*. (in press)
- 4) Kinomoto M, Appiah-Opong R, Brandful JAM, Yokoyama M, Nii-Trebi N, Ugly-Kwame E, Sato H, Ofori-Adjei D, Kurata T, Barre-Sinoussi F, Sata T, Tokunaga K: HIV-1 proteases from drug-naïve West African patients are differentially less susceptible to protease inhibitors. *Clin Infect Dis*. (in press)
- 5) Kinomoto M, Yokoyama M, Sato H, Kojima A, Kurata T, Ikuta K, Sata T, Tokunaga K: Amino acid 36 in HIV-1 gp41 ectodomain controls fusogenic activity: Implications for the molecular mechanism of viral escape from a fusion inhibitor. *J Virol*. (in press)

2. 学会発表

国際学会

- 1) Tokunaga, K., Kinomoto, M., Appiah-Opong, R., Brandful, J. A. M., Yokoyama, M., Sato, H., Ofori-Adjei, D., Kurata, T., Barre-Sinoussi, F. and Sata, T.: Low-level susceptibility to protease inhibitors in drug-naïve Ghanaian HIV-1 proteases classifiable as subtype CRF02A/G” 第5回熊本エイズセミナー、熊本、2004年9月(英語口頭)
- 2) Kinomoto, M., Yokoyama, M., Sato, H., Kurata,

- T., Ikuta, K., Sata, T., and Tokunaga, K.: "Mutation of amino acid 36 in HIV-1 gp41 ectodomain drastically alters fusogenic activity: Implications for the molecular dynamism of six-helical bundle formation" 第5回熊本エイズセミナー、熊本、2004年9月 (英語ポスター)
- 3) Kinomoto, M., Yokoyama, M., Sato, H., Kurata, T., Ikuta, K., Sata, T., and Tokunaga, K. (演者): "Amino acid 36 in HIV-1 gp41 ectodomain controls fusogenic activity: Implications for the molecular mechanism of viral escape from a fusion inhibitor" 1st Dominique Dormont International Conference on "Host pathogen interactions in chronic infections" -Viral and host determinants of HCV, HCMV, HIV infections. Paris, France. 2004年12月 (英語口頭)
- 4) Tokunaga, K., Kinomoto, M., Appiah-Opong, R., Brandful, J. A. M., Yokoyama, M., Sato, H., Ofori-Adjei, D., Kurata, T., Barre-Sinoussi, F. and Sata, T.: "Low-level susceptibility to protease inhibitors in drug-naive Ghanaian HIV-1 proteases classifiable as subtype CRF02A/G" The 40th Anniversary of U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program. The 17th Joint Meeting of the AIDS Panels 京都、2004年12月 (英語ポスター)
- SystemによるGhanaで流行するHIV-1感染性分子クローンの樹立. 第18回日本エイズ学会総会 (静岡) 2004.12.
- 5) 横山 勝、木ノ本正信、徳永研三、佐多徹太郎、長縄 聡、北村勝彦、蜂谷敦子、岡 慎一、服部知秀、田中真理、横幕能行、有吉紅也、星野忠次、仲宗根 正、佐藤裕徳: 計算科学のHIV-1研究への適用に関する基礎研究. 第18回日本エイズ学会総会 (静岡) 2004.12.
- 6) 徳永研三、木ノ本正信、横山 勝、佐藤裕徳、倉田 毅、佐多徹太郎: 西アフリカ未治療患者由来HIV-1株のプロテアーゼ阻害剤に対する低感受性. 第27回日本分子生物学会 (神戸) 2004.12.
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
無し

国内学会

- 1) 徳永研三、木ノ本正信、横山 勝、佐藤裕徳、倉田 毅、佐多徹太郎: サブタイプA/G組換え型HIV-1ガーナ分離株のプロテアーゼ阻害剤に対する低感受性. 第52回日本ウイルス学会総会 (横浜) 2004.11.
- 2) 木ノ本正信、横山 勝、佐藤裕徳、生田和良、倉田 毅、佐多徹太郎、徳永研三: 高融合活性を規定するEnv領域のアミノ酸の同定および機能・構造解析. 第52回日本ウイルス学会総会 (横浜) 2004.11.
- 3) 木ノ本正信、徳永研三、坂本優子、生田和良、倉田 毅、佐多徹太郎、巽 正志: Ghana由来HIV-1感染性分子クローンの樹立と解析. 第52回日本ウイルス学会総会 (横浜) 2004.11.
- 4) 木ノ本正信、徳永研三、坂本優子、生田和良、倉田 毅、佐多徹太郎、巽 正志: HIV Trapping