

#8) HIV 非感染者 (血友病): 18 例

#9) HIV 非感染者 (健康人): 5 例

#10) HIV 非感染者 (非血友病疾患): 43 例

30,336 遺伝子の内、すべてのサンプルでデータが取得され、かつ、共通レファレンスに対して少なくとも 2 倍以上あるいは 1/2 倍以下に発現レベルの変化を示した遺伝子は、8,727 種類であった (基本データ行列)。

次に、基本データ行列から、上記分類#1 特異的遺伝子の絞り込みを試みた。まず、等分散性が棄却される遺伝子があるため、ノンパラメトリック検定であるスチール検定を用いて、分類#1 と他の 9 分類の多重比較を行ったところ、すべての比較で統計量が $P < 0.01$ の規準を超える遺伝子は存在せず、すべての比較で統計量が $P < 0.05$ の規準を超える遺伝子を 23 種類特定した。この 23 遺伝子について、111 サンプルの発現データを抽出し、サンプル間でのクラスタ分析を行ったところ、LTNP (分類#1) の 5 サンプル特異的なクラスタは形成されず、この 23 遺伝子では LTNP と他を明瞭に区別できないことが判明した。

次に、分類#1 と他の分類の多重比較で、総計 9 比較のうち任意の 8 比較で $P < 0.05$ 遺伝子を抽出したところ、基本データ行列から 237 遺伝子が特定された。この 237 遺伝子の発現データのみでサンプル間のクラスタ分析を行った。このクラスタ分析でも、LTNP (分類#1) の 5 サンプル特異的なクラスタは形成されなかった。

以上のことから、分類#1 に対象を限ることは無理と判断し、全 10 種の分類を見直し、分類#1~3 をグループ 1 (LTNP と slow progressor)、分類#4~6 (progressor) をグループ 2 とし、LTNP を含む slow progressor と progressor の 2 群で発現レベルに有意な差のある遺伝子群が特定されるかどうかを調べた。グループ 1 と 2 の間でウェルチの t 検定を行い、両者で差のある ($P < 0.002$) 遺伝子群を抽出したところ、52 遺伝子が特定された。この 52 遺伝子の発現データ

のみで全サンプル間のクラスタ分析を行った。LTNP は大きく分かれた 2 群のうち的一方のみに含まれたが、その群には多くの progressor サンプルも含まれ、slow progressor と progressor を明確に分類できるデータではないことが明らかとなった。

さらに、上記グループ 1、2 に加え、分類#7 単独でグループ 3、分類#8~10 をグループ 4 と定義し、グループ 1 と他のグループのスチール検定による多重比較を行った。すべての比較で $P < 0.01$ となる遺伝子群は、917 種類であり、これらの遺伝子の発現データのみによる全サンプル間のクラスタ分析では、グループ 1 と 2 が混在するクラスタが形成され、両者の分類は不可能であった。

最後に、上記の 917 遺伝子の中から、さらに規準を厳しくした 70 遺伝子を抽出し、同様のサンプル間クラスタ分析を行った。この分析でも、グループ 1 と 2 に属するサンプルが混在して含まれるクラスタしか形成されなかった。

2. サンプル調製条件の違いと遺伝子発現プロファイル

本研究では、平成 12 年度以来、末梢血中の単核細胞を培養したサンプルを解析対象としてきた。これは、本研究開始直後の解析において同一人に由来するサンプルの違いが培養条件の違いよりも大きいことが明らかとなり、特定の個人間の差が遺伝子発現プロファイルによって判別できる可能性を示唆したためであった。その後、解析対象遺伝子数は当初の約 3,000 からヒト全遺伝子数にせまる 30,000 超となり、検出系自体の性能が年々高くなったことを受け、あらためてサンプルの調製条件の違いがサンプル中の遺伝子発現におよぼす影響を調べなおすことにした。

本年度解析した全 111 サンプルについて、基本データ行列のサンプル間クラスタ分析を行ったところ、きわめて明瞭な 2 つのクラスタが形成された。この 2 群を区別する遺伝子群

として、ウェルチのt検定を行い、 $P < 1.0E-18$ なる非常に厳しい条件下で 208 遺伝子を抽出した。この 208 遺伝子だけのデータによる全サンプル間のクラスタ分析を行ったところ、わずかの例外を含みながら、基本データ行列を分けるクラスタと一致した。この遺伝子群には細胞傷害応答遺伝子が多く含まれており、培養状態による違いが遺伝子発現に対して大きく影響していることが示唆された。さらに、同一人から採取した血液サンプルを 2 分割してそれぞれの研究施設で独立に培養したサンプルが、これらの明瞭な 2 群にそれぞれ含まれることが判明した。この同一血液に由来し異なる施設で培養された 2 サンプルについては、マイクロアレイ解析を追試し、2 サンプル間の遺伝子発現プロファイルの違いにおける再現性を確認した。また全サンプルについて、培養を行った研究施設 (2ヶ所) を調べたところ、培養施設ごとに偏ったクラスタを形成していることがわかり、これらの結果は培養施設や培養条件などによって遺伝子発現プロファイルが異なるものに変化してしまうことを示している。

D. 考察

1. 末梢単核細胞由来培養細胞のトランスクリプトーム解析

30,336 遺伝子を対象とした本年度の解析結果は、本研究で調べてきたサンプルから LTNP 群と発症群で発現レベルに差のある遺伝子群を特定することはできないことを示す。前年度までに抽出されていた遺伝子群は、LTNP の解析対象がわずかに 3 例であることから生じた解析中のノイズであったと結論せざるを得ない。

本研究で行っているような臨床サンプルの遺伝子発現解析では、サンプルの分類 (どの群とどの群を区別するのか) が極めて重要な情報となる。すなわち、区別したい群と対象群の違いが、遺伝子発現プロファイル以外の

情報によってすでに明確になっているものであればあるほど、その違いに対応する遺伝子群の特定が容易となる。

したがって、本研究の LTNP 特異的遺伝子群を特定する試みにおいて、LTNP の定義がもっとも重要である。すなわち、LTNP と slow progressor の違いはなにか、また、slow progressor と progressor の違いはなにか、という規準が明確でなければ、それ以上の詳しい解析は意味をなさない。これまで本研究では、臨床経過と CD4 値による分類を用いてきたが、この規準がはたして妥当であったのかどうかについては疑問である。

さらに、本研究の経過とともに、当初 LTNP に分類されていたものが、slow progressor に再分類される例が続いた。これは、LTNP が単一ではなく、特徴を異にする複数の集団の混在であることを示す良い例といえる。LTNP が複数の集団の集合であるとすれば、それらの複数の集団をいかなる規準で分類すべきなのか、それぞれのサンプル数を十分 (統計的な解析にはすくなくとも各集団最低 10 サンプルは必要) 確保できるかどうかという現実的な問題とともに、LTNP の研究をさらに進展させるためには、この点を明らかにしなければならない。

本研究では、臨床経過に加えて、CD4 値に注目した分類を採用してきた。CD4 値が必ずしも臨床経過とよく対応するとは言いきれず、CD4 値に加えてさらなるメルクマールが必要である。

上記結果の最後に、同一血液サンプルを 2 分割して異なる施設で培養した場合、無視できない遺伝子発現プロファイルの差が存在することを記述した。この結果は、単核細胞を培養することによる細胞 population の変化に基づいていると考えられる。採取した血液サンプルの処理の仕方をさらに厳密にコントロールしなければ、個人差に基づく遺伝子発現プロファイルの違いよりも大きな変化として、

培養方法の差をとらえてしまう危険性を示している。これまでのサンプル調製に十分な反省をくわえるとともに、今後のサンプル収集について臨床サイドを含めた再検討が迫られる。

仮に、これまで同様の培養細胞を解析対象とする場合、末梢単核細胞由来の培養細胞に、たとえば外部からなにがしかの化学的・生物学的刺激を加えることにより、その条件に対する細胞応答の差異をトランスクリプトームの視点から調べていくような研究戦略が必要かもしれない。

しかしながら、培養細胞を使って実験的な環境の変化を再現（なんらかの刺激を与える、とくに IL-4 などの炎症に関連するサイトカイン等を用いて）できたとしても、培養細胞を使うことで真の違いを見逃す危険性を避けられない。これは、真のターゲットが培養中に消失ないし変質してしまう可能性があるためである。

2. 達成度について

マイクロアレイによる遺伝子発現解析系の確立は研究計画どおり順調に推移した。しかしながら、HIV 感染者のサンプル取得に関しては、得に LTNP の検体収集およびサンプル調製が当初の計画よりもかなり遅れており、今後の課題である。さらに、これまで同様の培養細胞が解析対象として妥当かどうかは上記したごとく疑問の余地がある。

3. 研究結果の学術的・国際的・社会的意義について

HIV 感染後の LTNP と発症例との違いを大規模に解析する研究も他に例がない。これは、照沼裕博士の掌握している血友病罹患者を中心とした協力者集団の存在と数に制限なく使用できる合成 DNA マイクロアレイ・システムが存在がともにあって初めて可能となった本研究班の高い独自性を示すものである。

4. 今後の展望について

本研究の最終年度において、これまでのサ

ンプル調製方法にかわり、少量（たとえば、10 ml 以下）の血液を直接解析対象とするための解析系の改変が急務である。これまで本研究では、ある統一した RNA サンプルをすべてのサンプルに対して対照として用いることで、異なるサンプル間の並列比較を行ってきた。この解析系は、系として一応の完成をみており、この系に本研究のサンプルを当てはめるためには、polyA+ RNA で 2 µg というかなりの量の RNA を必要とする。したがって、通常の臨床で問題なく採血できる血液量では、この規準をみたすことができず、解析系への応用が不可能となる。しかしながら、他のデータとの相互比較ができなくなるとしても、特殊な系として、より少ない量の RNA から解析できる別の系を構築し、その新規の系によって（直接採取した）血液サンプルを解析すれば、血液サンプル間だけでの比較は理論的に可能となる。末梢血を直接解析することによるデメリットとして、個人の採血時の状態（健康状態、精神状態、環境要素、等々）による変動をうけることが考えられる。これらのサンプル取得時におけるノイズを克服するために、これまでもまして、標本数の充実をはかる必要がある。

E. 結論

30,336 ヒト遺伝子からなる合成 DNA マイクロアレイを用いて、LTNP5 例を含む 111 検体の末梢単核細胞由来培養細胞の遺伝子発現プロファイルの取得・解析を完了したところ、LTNP 群と発症群で発現レベルに差のある遺伝子群を特定できないことが明らかとなった。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Kobayashi S, Ito E, Honma R, Nojima Y, Shibuya

M, Watanabe S, Maru Y. Dynamic regulation of gene expression by the Flt-1 kinase and Matrigel in endothelial tubulogenesis.

Genomics. 2004;84:185-192.

(2)Imanishi T et al. Integrative annotation of 21,037 human genes validated by full-length cDNA clones.

PLoS Biol. 2004;2(6):0856-0875.

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許出願（予定を含む）

なし

ヒトとマウスのゲノム比較による HIV 感染・エイズ発症阻止の研究

分担研究者 宮澤 正顯（近畿大学医学部 教授）
研究協力者 金成 安慶（近畿大学医学部 助手）

研究要旨 マウスレトロウイルス感染時に中和抗体産生の有無を制御する非MHCの宿主遺伝子を、第15染色体上にマッピングし、これと相同なヒト22染色体領域の遺伝子が、HIV-1 曝露非感染者における効率的なT細胞感作と粘液抗 HIV 抗体産生に関与する可能性を示してきた。今年度は、マウスモデルとヒトの両方で、レトロウイルス感染抵抗性の賦与に関与すると考えられる候補遺伝子の発現解析を行い、マウスについては可能性の高い候補遺伝子を絞り込んで、トランスジェニックマウス作製のためレンチウイルスベクターに組込んだ。また、これまで遺伝子改変動物の作製が困難とされてきた A 系統マウス受精卵への遺伝子導入と、個体形成に成功した。

A. 研究目的

これまで HIV-1 感染の成立に対し抵抗性を付与すると考えられる宿主遺伝子として、HIV の細胞側レセプターであるケモカインレセプターおよびそのリガンド分子の遺伝的多型性や、マクロファージ・抗原提示細胞系の機能に関与するマンノース結合レクチンなどの遺伝子多型が報告されてきた。しかし、ケモカインレセプター発現欠損の頻度は低く、イタリア・タイ・アフリカで把握されてきた HIV-1 曝露非感染者（HIV-1-exposed seronegative individuals: ESNs）では、ケモカインレセプター発現欠損のホモ接合個体はほとんど報告されていない。一方、我々がマウスの第15染色体上にマップした、レトロウイルス感染時の中和抗体産生を制御する宿主遺伝子について、そのヒトオアソログが存在すると考えられる第22染色体上の多型性マーカーの遺伝子型を多数例で決定したところ、ESN 群と HIV-1 感染者群とで有意に頻度が異なる複数の対立遺伝子型が見出された。さらに、これら第22染色体上の多型性マーカーについて、遺伝子座間の連鎖不平衡を解析したところ、ESN 群のみに見出される連鎖不平衡の切れ目が存在した（Kanari, Y. *et al.* *AIDS*: in press, 2005）。

HIV-1 曝露非感染者では、体内に感染性 HIV ゲノムが検出されないにもかかわらず、末梢血 T リンパ球が HIV-1 抗原特異的なサイトカイン産生を示し、粘液中に HIV-1 反応性の抗体産生が認められることを考えると、上記の遺伝的解析結果は、ヒト第22染色体上に「最小限の HIV-1 曝露に対し強い免疫応答を誘導する何らかの遺伝因子」が存在し、それがヒトとマウスで共通に機能している可能性を示唆する。

そこで本研究は、マウス第15染色体上のレトロ

ウイルス中和抗体産生制御遺伝子を分子同定し、これと相同なヒト第22染色体上の遺伝子が HIV-1 曝露非感染状態の成立に果たす役割を明らかにすることを最終目的としている。今年度は、上記レトロウイルス中和抗体産生制御遺伝子が存在すると考えられるマウス第15染色体領域、および対応するヒト第22染色体領域の既知遺伝子、および機能未同定の open reading frames (ORFs) を網羅した DNA マイクロアレイを用い、感染抵抗性系統または個体群と感受性系統または個体群とで発現に有意な差のある遺伝子を同定することを試みた。また、発現に差が見られる候補遺伝子の一部につき、これをレンチウイルス発現ベクターに組込んで、レトロウイルス中和抗体産生能を有する系統のマウスからこれを欠く系統の受精卵に遺伝子導入を行い、トランスジェニックマウスを樹立することを目指した。

B. 研究方法

1) DNA マイクロアレイを用いた発現解析

前年度までに我々がレトロウイルス中和抗体産生制御遺伝子の存在をマップした、マウス第15染色体の D15Mit68 から D15Mit107 までの領域、およびこれとシンテニーを持つヒト第22染色体の Mb 遺伝子から *Pacsin2* 遺伝子までの領域について、それぞれに含まれる全ての既知遺伝子、および機能未同定の ORFs を完全に網羅した DNA マイクロアレイを作製した。

マウス側マイクロアレイには、226の遺伝子と ORFs について、1遺伝子当たり二つずつの配列特異的オリゴ DNA プローブを設計し、アレイ上に1プローブにつき21～22箇所のスポットを配列した。一方、ヒト遺伝子のマイクロアレイについては、対照も含め157の遺伝子と ORFs について、その

サイズにより1箇所から7箇所(通常の遺伝子については4~7箇所)の配列特異的オリゴDNAプローブを設定し、アレイ上に1プローブ当たり11~12のスポットを配列した。

遺伝子発現の解析は、通常の方法により蛍光標識 cDNA の結合を測定することにより行い、結果は各スポットの蛍光強度の中央値の平均から陰性対照オリゴDNA プローブが結合したスポットの蛍光強度中央値の平均を引いて算出した。さらに、系統間・個体間のデータを比較するため、ハウスキーピング遺伝子である GAPDH および β -アクチン遺伝子の発現量による標準化を行った。

2) cDNA 検体の調製

フレンド白血病レトロウイルス(FV)感染後早期に中和抗体を産生する C57BL/10 由来 F₁ マウスと、早期の中和抗体産生能を欠く A/WySn 系統のマウスに FV を接種し、経時的に脾臓を採取して全 RNA を調製、cDNA 化した。今回は、予備実験において系統間の遺伝子発現の差が大きいと考えられた感染9日後を中心にマイクロアレイ解析を行った。

ヒトについては、イタリア・フィレンツェ地区の HIV-1 感染者・HIV-1 曝露非感染者カップルより末梢血単核球を採取し(ミラノ大学医学部・Mario Clerici 教授との共同研究)、複数の MHC 遺伝子産物で共通に提示されることがわかっている HIV-1 envelope および gag 抗原ペプチド混合物で刺激を行った。刺激前、および刺激後の末梢血単核球より経時的に全 RNA を抽出し、cDNA を調製した。

3) レンチウイルスベクターを用いたトランスジェニックマウスの樹立

マウス側について、系統間で発現の差が見つかった候補遺伝子の一部と B リンパ球特異的な発現誘導を起こすプロモーター・エンハンサー配列を繋いだもの、および陽性対照の E-GFP 遺伝子を、複製欠損型のレンチウイルスベクターに組込んだ。得られた組換えレンチウイルスを、中和抗体産生能を欠く A/WySn マウスの受精卵に導入し、トランスジェニック個体を作製した。

【倫理面への配慮】

イタリアの HIV 感染状態非一致カップルコホートについては、現地病院倫理委員会による許可を受け、書面による研究目的の説明と署名による同意を得た上で、ゲノム解析・発現解析のための末梢血採血を行った。これら試料を用いたヒトゲノム遺伝子解析の実施については、近畿大学医学部ゲノム倫理委員会より許可を得た(「HIV 曝

露非感染状態を制御する宿主遺伝子の解析」、平成15年5月27日許可)。

動物実験は、わが国の関連法規及び近畿大学医学部共同研究施設・実験動物共同研究室内の規約を遵守し、疼痛の防止に配慮し、動物愛護の精神に則って行った。

C. 研究結果

1) マイクロアレイによるマウス側遺伝子発現解析

FV 感染9日後の(B10.A × A/WySn)F₁ および A/WySn マウスの脾臓における遺伝子発現パターンをマイクロアレイにより比較した結果、発現レベルが十分に高く、しかも系統間で発現量に3倍以上の差がある遺伝子7個を見出した(図1)。これらのうち6個は中和抗体早期産生能を持つ(B10.A × A/WySn)F₁ マウスの脾臓でより強く発現しており、A/WySn マウスでは発現が弱いかほとんど認められなかった。一方、一つの遺伝子は A/WySn マウスでより強い発現が見られた。なお、具体的な遺伝子或いは ORF 名は、特許出願中につき記載を控える。

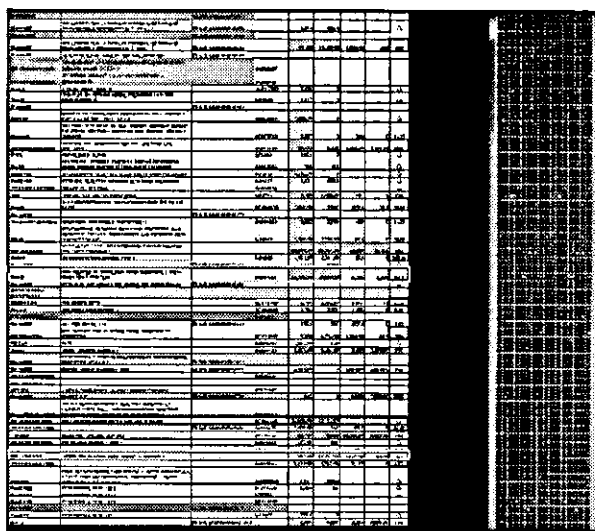


図 1. DNA マイクロアレイを用いたレトロウイルス感染後の遺伝子発現パターン解析。マイクロアレイの蛍光像を右に示す。左は中和抗体産生能を持つ(B10.A × A/WySn)F₁ およびこれを欠く A/WySn マウスにおける、FV 感染9日後の遺伝子発現パターンのまとめ。各2個体を解析した。中央の四列で背景色が濃いものは遺伝子発現が強い。(B10.A × A/WySn)F₁ で強く発現し、A/WySn では発現の無い遺伝子が認められる。

2) マイクロアレイによるヒト側遺伝子発現解析

イタリアコホートの HIV-1 曝露非感染者および HIV-1 感染者の末梢血単核球を、HIV-1 抗原ペプチド混合物で刺激後1時間および6時間の

RNAと、刺激前のRNAを用い、マイクロアレイによる発現解析を行った。刺激後1時間では、刺激前と遺伝子発現パターンに大きな違いは見られなかったが、刺激後6時間になると、刺激前とは全く異なったパターンの遺伝子発現が見られた。

HIV-1 抗原刺激6時間後に HIV-1 曝露非感染者で強い発現誘導が見られ、HIV-1 感染者では発現誘導の程度が曝露非感染者より低い遺伝子が17個見出されたが、うち7個は機能未同定のものであった。また、2個は上記マウス側遺伝子と相同であり、既存の構造・機能情報から造血・免疫系機能と関係があると予想されるものが5個含まれていた(図2)。

| | ESM 1h | HIV 1h | ESM 6h | HIV 6h |
|--------------------------|--------|--------|--------|--------|
| 104 APOL4.959.503 | 4970.1 | 3823.5 | 2901.4 | 4221.8 |
| 683 NM_138435.1682.1717 | 3909.5 | 3943.4 | 3575.7 | 3607.5 |
| 98 RPL4I.242.276 | 2677.5 | 2382.7 | 2324.9 | 1572.5 |
| 146 EPSS7.612.1646 | 5482 | 5243.4 | 2477.3 | 4650.7 |
| 232 NM_020315.1962.1995 | 1722.1 | 1984.8 | 2112.3 | 1282.7 |
| 295 GARDI.0321.2348 | 1387.8 | 1828.8 | 1593.9 | 1905.5 |
| 258 SSTR3.150.708 | 3088.3 | 3377.2 | 2482 | 4126.7 |
| 1049 GAFOR200.459.493 | 1434.1 | 1431.2 | 1732.5 | 1729.5 |
| 463 KRN4.1678.1712 | 4013.2 | 3090.8 | 2248.7 | 4465.3 |
| 028 AIGALT.1900.1979 | 2716.4 | 2567.9 | 2294.3 | 2570.2 |
| 309 RANGAP1.2570.2304 | 1474 | 1486.7 | 1227.5 | 1874 |
| 1052 actn beta.1499.1533 | 1293.3 | 1290 | 1187 | 1214.3 |
| 409 G9N7A7.1376.1410 | 1301.5 | 1238 | 1927.9 | 896.55 |
| 819 G9BYA5.131.185 | 392.13 | 870.57 | 922.71 | 1024.2 |
| 712 MKL1.4030.4064 | 518.36 | 877.77 | 645.05 | 1012.8 |
| 264 RAD2.1254.1288 | 800.32 | 1241.6 | 1073.8 | 1069.5 |
| 821 G9BYA5.185.199 | 822.69 | 668.82 | 936.84 | 989.73 |
| 737 NM_022099.028.242 | 736.91 | 1018.2 | 805.22 | 822.45 |
| 510 | 641.13 | 512.92 | 1121.7 | 600.92 |
| 827 D9N1V0.61.25 | 628.12 | 904.21 | 778.79 | 692.23 |
| 93 | -118.8 | 113.57 | 769.58 | 429.71 |
| 732 Nov69.105.139 | 656.35 | 532.27 | 817.77 | 848.09 |
| 378 EF355IP.40.74 | 121.13 | 271.33 | 226.13 | 148.33 |
| 1075 | -22.67 | 170.92 | 581.82 | 150.33 |
| 622 G9W210.175.210 | 353.35 | 638.31 | 562.36 | 556.8 |
| 907 | -118.5 | 73.409 | 465.01 | 108.14 |
| 258 Nov69.211.248 | -18.82 | 67.853 | 239.32 | 79.23 |
| 65 Y2A1 HLR4N.332.356 | 108.36 | 358.58 | 429.87 | 302.73 |
| 467 KDELR3.93.127 | 176.89 | 278.5 | 471.59 | 356.82 |
| 593 NM_181773.35.129 | 141.82 | 451.91 | 468.05 | 299.8 |
| 451 CSNK1E.938.874 | 155.83 | 249 | 500.42 | 365.58 |
| 251 | 140.04 | 217.82 | 842.36 | 173.29 |
| 247 | -110.4 | 78.825 | 223.17 | 85.111 |
| 679 | 39.409 | 162.87 | 807.41 | 304.43 |
| 724 Nov69.48.82 | 198.23 | 364.5 | 601.88 | 276.45 |
| 225 G96N14.2217.2251 | 434.41 | 682.58 | 592.18 | 298.18 |
| 816 ROXN.HUMAN.4975.501 | 232.42 | 687.45 | 419.98 | 324.35 |
| 442 | 97.536 | 286.82 | 741.05 | 140.43 |

図 2. HIV-1 env および gag 抗原で刺激後の HIV-1 曝露非感染者および HIV-1 感染者末梢血単核球の第22染色体遺伝子発現パターンの比較。数値列は左から順に、曝露非感染者の刺激1時間後、HIV感染者の刺激1時間後、曝露非感染者の刺激6時間後、および HIV-1 感染者の刺激6時間後を示す。刺激前と刺激1時間後の遺伝子発現パターンにはほとんど差がなかった。数値はGAPDHおよびβ-アクチンの発現量によって標準化してある。四角で囲んだ複数の遺伝子は、抗原刺激後曝露非感染者でのみ、感染者より強く誘導されている。特許出願中のため、遺伝子名は伏せてある。

3) 候補遺伝子導入トランスジェニックマウスの作製

マウス側の発現解析で系統間に差が認められた遺伝子の一つは、既にBリンパ球の分化・活性化に影響を及ぼすことが知られているものであ

た。そこで、この遺伝子をマウスにおける中和抗体産生制御遺伝子の最有力候補と考え、Bリンパ球特異的な発現誘導が得られるようプロモータとエンハンサーを結合させた上で、レンチウイルス発現ベクターに組込んだ。現在、A/WySn マウス受精卵への導入によるトランスジェニックマウスの作製を進めている。この過程で、陽性対照の E-GFP 遺伝子を発現するレンチウイルスベクターにより、A/WySn マウス受精卵への遺伝子導入が成功し、既にトランスジェニック個体が得られている。

D. 考察

1) 研究結果の考察

マイクロアレイを用いた発現解析は、感染抵抗性および感受性の系統間或いは個体群間での遺伝子発現パターンの比較解析に極めて有用であることが示された。但し、HIV-1 曝露非感染者と HIV-1 感染者の末梢血単核球の比較では、予想通り無刺激状態での遺伝子発現の差はほとんど見られず、HIV-1 抗原ペプチド混合物による刺激1時間後でも刺激前と変化が無かった。しかし、刺激6時間後になると、劇的な遺伝子発現の誘導が起こり、一部の遺伝子では HIV-1 曝露非感染者と HIV-1 感染者の間で、明らかに発現誘導の程度に差が認められた。このことから、HIV-1 曝露非感染状態は、末梢血免疫細胞の HIV 抗原特異的な反応により維持されていることが推測されるとともに、この免疫学的抵抗性を制御する宿主遺伝子が存在することが、改めて明らかになった。

マイクロアレイ解析により感染抵抗性に関連することが示唆された候補遺伝子の中には、少数ながらヒトとマウスで共通のものが存在する。今後これら遺伝子の機能を *in vitro* と *in vivo* の両面で解析していくことが重要と思われる。

これまでトランスジェニックマウスの作製は特定の系統のマウスでないと不可能と考えられてきたが、今回レンチウイルス発現ベクターを利用することにより、A/WySn マウス受精卵に遺伝子を導入し、トランスジェニックマウスを樹立することに成功した。この方法論は、今後種々の表現型について、系統差の原因遺伝子を同定するのに有用となると考える。

2) 達成度について

本年度は、ヒト側とマウス側の両方について、マイクロアレイを用いた発現解析を立ち上げ、既にマウスレトロウイルスおよび HIV-1 曝露時の急速な免疫応答成立に関与する可能性のある、それぞれ少数の宿主遺伝子候補を同定することに成功した。また、ヒト側のマイクロアレイ解析で、HIV-1 曝露非感染状態と関連する遺伝子を同定するためには、末梢血単核球をそのまま用いるのではな

く、これに HIV 抗原刺激を加えて、6時間後の遺伝子発現誘導を比較することが重要であることを見出した。昨年度の到達点から大幅な進展を得ており、今年度の達成度は目標を越えていると評価したい。また、最大の目標であるトランスジェニックマウスの樹立による抵抗性遺伝子の同定についても、A/WySn マウス受精卵への遺伝子導入による系統作製に成功し、来年度に候補遺伝子の導入マウスを確立・解析出来るところまで到達した。これはアピールしたい点である。

3) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

HIV-1 曝露非感染状態に関連すると考えられるヒト遺伝子と、レトロウイルス感染時の中和抗体産生を制御すると考えられるマウス遺伝子とに、共通のものが存在する可能性が改めて確認された点は、学術的意義が大きい。また、特にヒト側で HIV 感染抵抗性の賦与に関係すると考えられる候補遺伝子に、これまで機能未知のものが多数含まれる点は、今後のヒト遺伝子解析に与える学術的インパクトも高いと考える。さらに、HIV-1 曝露非感染者と HIV-1 感染者の遺伝子発現パターンの比較が、HIV 抗原刺激後に行われるべきことを明らかにした点も、学術的に重要である。

今年度の研究成果を社会に還元するには、さらに一層の進展が必要であるが、HIV-1 感染に対して免疫学的抵抗性を賦与すると考えられる宿主遺伝子の候補が少数に絞られた点は、ワクチン補助剤および免疫学的治療法開発の両面で、希望を与えるものである。

4) 今後の展望

マイクロアレイ解析で発現誘導に差が見られた遺伝子については、既に real-time PCR 解析を進めており、今年度中或いは来年度初めには、曝露非感染者で HIV 抗原刺激により強く誘導される遺伝子が確定できる。その後、直ちにそれら遺伝子のゲノム DNA レベルでの構造比較に入り、感染抵抗性に関与する遺伝子を同定したい。マウス側についても、来年度は候補遺伝子トランスジェニックマウスで抗体産生誘導を測定したい。

E. 結論

レトロウイルス感染後中和抗体を早期に産生するマウス系統と、抗体産生能を欠く系統の間で発現に差のある遺伝子が、第15染色体上に6個ある。これとシンテニーのあるヒト第22染色体上の遺伝子のうち17個は、HIV 抗原刺激後の発現誘導が、HIV-1 曝露非感染者と HIV-1 感染者とで異なる。うち2個の遺伝子はマウスとヒトで共通である。このことから、HIV-1 曝露非感染状態は、末梢血免疫細胞の HIV 抗原特異的な反応により

維持されていることが推測されるとともに、この免疫学的抵抗性を制御する宿主遺伝子が存在することが、改めて明らかになった。

レンチウイルスベクターを利用することにより、これまで遺伝子改変個体の直接作製が不可能と考えられてきた A/WySn マウスで、トランスジェニック個体を作ることが出来た。

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) Kanari, Y., M. Clerici, H. Abe, H. Kawabata, D. Trabattoni, S. Lo Caputo, F. Mazzotta, H. Fujisawa, A. Niwa, C. Ishihara, Y. A. Takei, and M. Miyazawa. Genotypes at chromosome 22q12-13 are associated with HIV-1-exposed but uninfected status in Italians. *AIDS: in press*, 2005.

2) Miyazawa, M. Host genes that influence immune and non-immune resistance mechanisms against retroviral infections. *Recent Res. Devel. Virol.* 6:105-118, 2004.

3) Miyazawa, M., E. Kajiwara, N. Tabata, T. Ogawa, T. Yuasa, and H. Matsumura. Pathogenicity of autoantibodies reactive with the endogenous retroviral envelope glycoprotein gp70. *In From Animal Models to Human Genetics: Research on the Induction and Pathogenicity of Autoantibodies* (K. Conrad, *et al.*, editors). Pabst Science Publishers, Lengerich, 2004. pp85-96.

4) Matano, T., M. Kobayashi, H. Igarashi, A. Takeda, H. Nakamura, M. Kano, C. Sugimoto, K. Mori, A. Iida, T. Hirata, M. Hasegawa, T. Yuasa, M. Miyazawa, Y. Takahashi, M. Yasunami, A. Kimura, D. H. O'Connor, D. I. Watkins, and Y. Nagai. Cytotoxic T lymphocyte-based control of simian immunodeficiency virus replication in a preclinical AIDS vaccine trial. *J. Exp. Med.* 199: 1709-1718, 2004.

5) Sugahara, D., S. Tsuji-Kawahara, and M. Miyazawa. Identification of a protective CD4⁺ T-cell epitope in p15^{gag} of Friend murine leukemia virus and role of the MA protein targeting to the plasma membrane in immunogenicity. *J. Virol.* 78: 6322-6334, 2004.

6) Tahara H., N. Iwanami, N. Tabata, H. Matsumura, T. Matsuura, T. Kurita, and M. Miyazawa. Both T and non-T cells with proliferating potentials are effective in inducing suppression of allograft responses by alloantigen-specific intravenous presensitization combined with suboptimal doses of 15-deoxyspergualin. *Transplant. Immunol.* 13:25-32, 2004.

2. 学会発表

1) Miyazawa, M. Special lecture: Genetic basis for resistance against retroviral infections – from mouse models to humans. **Third International Workshop on Immunology and Infectious Diseases.** Naples, June 8-10, 2004.

2) Kanari, Y., M. Clerici, H. Abe, H. Kawabata, D. Trabattoni, S. Lo Caputo, F. Mazzotta, H. Fujisawa, A. Niwa, C. Ishihara, Y. A. Takei, and M. Miyazawa. Genetic background of HIV-specific immune responses in HIV-exposed but uninfected: chromosome 22q13 is associated with anti-HIV immune responses. **XV International AIDS Conference.** Bangkok, July 11-16, 2004.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許出願

1) Miyazawa, M., M. Clerici, and S. Irie, inventors. **Resistance Genes:** Supplementary Patent Application to PCT/GB2003/004493 (Filed December 23, 2004).

2) 宮澤正顕、阿部弘之: 新規ヒト内在性レトロウイルス HC2 の *env* 遺伝子. 特願 2004-231412, 2004

HIV 特異的 CTL とその機能の研究

分担研究者 滝口 雅文（熊本大学エイズ学研究センター・ウイルス制御分野・教授）

研究協力者 上野 貴将（熊本大学エイズ学研究センター・ウイルス制御分野・講師）

研究要旨：HIV は CTL エピトープやその周辺領域に変異を獲得して個々の CTL から逃避するが、こうした変異がヒト T 細胞免疫系の全体に与える効果は明らかになっていない。HLA-B35 拘束性で Pol、Env、Nef に由来する 3 つのエピトープについて、HLA-B35 を持つ 5 人の慢性 HIV 感染者の HIV 遺伝子配列、HLA テトラマーを用いた抗原特異的 CD8 T 細胞の数および T 細胞レパートリー構成の経時変化を追うとともに、各 CD8 T 細胞サブセットの抗 HIV 機能を解析した。その結果、Pol および Nef エピトープで HLA-B35 陽性患者に共通した変異を見出した。変異に対する T 細胞応答を解析したところ、Pol 特異的 CD8 T 細胞ではエピトープ変異に応答して新たな T 細胞サブセットが誘導されたが、抗ウイルス活性は顕著に低下していた。我々の結果は、HIV 慢性感染期に抗原特異的 CD8 T 細胞サブセットが入れ替わるといふ HIV に対するヒト T 細胞応答のダイナミクスを始めて明らかにしたばかりでなく、HIV 特異的 CTL が数的には十分存在するにもかかわらず、抗ウイルス活性を失っている原因を示唆するものである。

A. 研究目的

CD8 陽性の細胞傷害性 T 細胞 (CTL) は、HIV 感染細胞の排除に大きな役割を担うが、HIV はさまざまな方法で CTL から逃避するため、適切な化学療法をしない限り、ほぼすべての HIV 感染者はエイズを発症する。この一つの原因として、HIV は細胞傷害性 T 細胞 (CTL) のエピトープあるいはその周辺領域に変異を獲得して、個々の CTL から逃避することが上げられる。しかしながら、こうした変異がヒト T 細胞免疫系の全体に与える効果、たとえば変異体は新たな T 細胞を誘導するか、誘導された T 細胞は変異体を制御できるかは明らかになっていない。

B. 研究方法

5 年間以上にわたって臨床症状がフォローアップされていて、かつ末梢リンパ球と血漿をサンプリングしている慢性 HIV 感染者のうち、HLA-B35 を持つ 5 人を対象として解析を行った(表 1、国立国際医療センター岡先生との共同研究)。また、CTL エピトープについては、

HLA-B35 に拘束される HIV-1 の Pol、Env、Nef タンパク質に由来する 3 つのエピトープ (図 1) に着目した。

HIV 遺伝子配列の解析では、患者の血漿中の HIV-1 粒子から QIAamp MinElute Virus Spin kit (キアゲン) を用いて RNA を精製し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって CTL エピトープをコードする領域の遺伝子を増幅した。PCR 産物は精製後、そのままシーケンス反応に供するか、またはプラスミドにクローニングしてからシーケンス反応を行なった。そして、ターゲット領域の DNA 配列を決定する (ABI-310 ジェネティックアナライザー) とともに、コンピュータプログラム (Genetyx-Win) を用いてマルチプルアラインメント解析を行った。

抗原特異的 CD8 T 細胞の数は HLA テトラマーを用いて解析した。3 つの CTL エピトープ領域の clade B consensus 配列(図 1) を元に合成したペプチドと、大腸菌で生産した HLA-B35 重鎖タンパク質と $\beta 2$ ミクログロブリンを *in vitro* で巻き戻して調製した。HIV 感

染者から採取し、凍結保存していた 2×10^6 細胞数の末梢血単核球 (PBMC) を先に調製した HLA テトラマーと抗 CD8 抗体で染色し、CD8 T 細胞に占めるテトラマー陽性画分の頻度を測定した。

抗原特異的 T 細胞のレパートリー構成は、T 細胞レセプター (TCR) の可変領域に特異的な抗体を用いて測定した。まず抗原特異的 CD8 T 細胞から mRNA を調製し、SMART システム (クロンテック) を用いて、TCR の α および β 鎖の遺伝子配列を解析した。また、CTL クローンは限界希釈法を用いて樹立した。CTL 活性は通常のクロミウム放出試験法にしたがって測定した。

(倫理面への配慮)

共同研究先の国際国立医療センターおよび熊本大学において、研究計画を前もって提出するとともに、該当する倫理審査委員会で認可を受けた方法に従って研究を進めている。

C. 研究結果

HLA テトラマーによる解析の結果、5 人中 3 人では 3 つのすべてのエピトープに対して特異的な CD8 T 細胞を検出 (全 CD8 T 細胞の 0.08~0.4%) したが、2 人の患者では Pol および Env エピトープに対してテトラマー陽性細胞は全 CD8 T 細胞の 0.05% 未満であった (データ未掲載)。このうち KI-003 では、3 つのエピトープに対してテトラマー陽性細胞が認められ (0.1~0.4%)、3 年以上にわたってその頻度はほぼ一定であった (図 2A)。しかしながら、テトラマー陽性細胞数の頻度と血中ウイルス量 (表 1) の間には何ら相関は認められなかった。

HIV の遺伝子配列解析から、5 人の患者から分離した HIV-1 では Env エピトープ領域に変異は認めなかったが、Pol エピトープでは 5 人に共通して N 末端のアミノ酸が Ile から Val に変異していた。KI-003 のデータを図 2B に示す。このエピトープに特異的な CTL クローンでは、

エピトープペプチドの N 末端のアミノ酸を変化させると CTL 活性に影響することを以前の研究で明らかとした。したがって、5 人の患者で共通して見られた Ile から Val への変異は、CTL 応答に何らかの影響を与えるものと推察された。

KI-003 の Pol エピトープ特異的 CD8 T 細胞は、TCR の異なる 2 つのサブセット ($V\alpha 12$ と $V\delta 1$) で構成されている (昨年度に報告済み)。そこで、それぞれの TCR に特異的な抗体を用いて、Pol エピトープ特異的 CD8 T 細胞中の TCR レパートリー構成の変化を経時的に解析した (図 3A)。この期間で、Pol エピトープ特異的 CD8 T 細胞の全体量は大きく変化していないにも関わらず (図 2A)、TCR レパートリー構成には著明な変化が認められた (図 3A)。 $V\delta 1$ を持つ T 細胞の構成頻度の劇的な上昇は、Pol エピトープの N 末端アミノ酸が Ile から Val に変異したこと (図 2B) に起因するかもしれない。そこで、次に各 T 細胞サブセットのエピトープ変異に対する応答変化を解析した。

まず始めに HIV-1 分子クローン (HXB2-D) の Pol エピトープ領域に N 末端が Val となる変異を導入した。変異型 HIV-1 を調製したところ、この変異による HIV-1 の感染性や複製能に与える影響は認められなかった (データ未掲載)。次に VSV でシュドタイピングした野生型 (Pol-1I) と変異型 (Pol-1V) HIV-1 を HLA-B*3501 を安定発現させた C1R 細胞に感染させて CTL アッセイのターゲットとした。CTL クローン 55 ($V\delta 1$ 陽性) と 589 ($V\alpha 12$ 陽性) の CTL 活性を測定したところ、CTL589 は両ウイルス感染細胞に対して顕著な細胞傷害活性を示した (図 3B)。一方、CTL55 は変異型 (Pol-1V) を殺傷したが、野生型 HIV-1 (Pol-1I) には CTL 活性を示さなかった (図 3B)。CTL55 が変異体に対してのみ CTL 活性を示すことから、 $V\delta 1$ 陽性の Pol 特異的 CD8 T 細胞は Pol エピトープの変異によって新たに誘導された CD8 T 細胞サブセットであると考えられ

た。また興味深いことに両 CTL クローンの変異型 (Pol-1V) HIV 感染細胞に対する CTL 活性を見ると(図 3B)、CTL55 の活性は CTL589 に対して非常に弱い。このことから、HIV のエピトープ領域の変異に対応して慢性感染後に誘導された CD8 T 細胞は、HIV 感染細胞に対する抗ウイルス機能が低下していると考えられた。

D. 考察

個々のエピトープと T 細胞レパートリーを詳細に解析することにより、HIV の抗原変異に対するヒトの T 細胞免疫系の応答様式とその機能を明らかとした。病原体が慢性的に存在する中で、抗原特異的 T 細胞数はほぼ一定であったにもかかわらず、構成する T 細胞のレパートリーが入れ替わったことは、個々の HIV 特異的 CD8 T 細胞の寿命あるいは HIV に対する応答性の喪失を反映していると考えられる。我々の結果は、HIV 慢性感染期に抗原特異的 CD8 T 細胞が数的には十分存在するにもかかわらず、HIV 特異的 CD8 T 細胞が全体として抗ウイルス活性を失っている原因を示唆するものである。

E. 結論

多数の HIV 感染者検体と多数の CTL エピトープを包括的に解析するとともに、HIV の抗原変異に対するヒト CD8 T 細胞レパートリー応答を明らかにすることによって、HIV-1 の変異がヒト T 細胞免疫系の全体に与える効果を明らかとした。我々の研究成果は、予防および治療を目指したワクチン開発に大きな示唆を与えるものである。

G. 研究発表

① 論文発表

- 1) Yokomaku Y., Miura H., Tomiyama H., Kawana-Tachikawa A., Takiguchi M., Kojima A., Nagai Y., Iwamoto A., Matsuda Z., and

Ariyoshi K., Impaired Processing and Presentation of Cytotoxic T-Lymphocyte (CTL) Epitope is a Major Escape Mechanism from CTL Immune Pressure in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J. Virol.* 78: 1324-1332, 2004.

- 2) Ueno T., Tomiyama H., Fujiwara M., Oka S., and Takiguchi M.: Functionally impaired HIV-specific CD8 T cells show high-affinity T cell receptor-ligand interactions. *J. Immunol.* 173: 5451-5457, 2004.
- 3) Ueno T., Fujiwara M., Tomiyama H., Onodera M., Takiguchi M.: Reconstitution of anti-HIV effector functions of primary human CD8 T lymphocytes by transfer of HIV-specific $\alpha\beta$ TCR genes, *Eur. J. Immunol.*, 34(12): 3379-3388, 2004.
- 4) 富山宏子, 上野貴将: MHC テトラマーによる抗原特異的 T 細胞の解析, 実験医学別冊免疫学的プロトコール, pp150-157, 2004
- 5) 滝口雅文: T 細胞による HIV-1 の増殖, 臨床免疫 42(3):369-374, 2004

② 学会発表

- 1) Ueno T., Tomiyama H., and Takiguchi M.: Impaired responsiveness of HIV-specific CD8 T cells to HIV-infected cells is caused by high-affinity TCR-ligand interactions: An insight into immune evasion by HIV. Keystone Symposia 2004 (Keystone, Canada) April 12-18, 2004
- 2) 上野貴将 (2004) HIV の変異と T 細胞レパートリーのダイナミクス. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会(横浜)11月 21-23 日
- 3) 上野貴将 (2004) 抗原変異が T 細胞レパートリーに与える影響. 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会(札幌)12月 1-3 日
- 4) 上野貴将, 藤原守, 井手上結香, 富山宏子, 滝口雅文 (2004) T 細胞レセプター導入に

よる新たな免疫療法の検討. 第 18 回日本エイズ学会学術集会(静岡) 12 月 9-11 日

- 5) 上野貴将 (2004) T 細胞レセプターによる HIV 抗原の認識機構 第 27 回日本分子生物学会年会(神戸) 12 月 8-11 日
- 6) 泉泰輔, 上野貴将, 本園千尋, 井手上結香, 渡邊秀樹 津本浩平, 熊谷泉, 滝口雅文 (2004) HIV 感染細胞上に提示される T 細胞エピトープ動態解析の試み 第 27 回日本分子生物学会年会(神戸) 12 月 8-11 日

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

Table1 本研究で解析した慢性 HIV-1 感染者の臨床データー

| 患者 | HLA | Date | VL (log10) | CD4 | CD8 | Treatment |
|--------|--------------------------|---------|------------|-----|------|-----------------|
| KI-001 | A2402/A2603, B3501/B4002 | 1994.4 | ND | 227 | 1188 | AZT + ddC |
| | | 1995.10 | ND | 47 | 548 | AZT + ddI |
| | | 1996.7 | 5.2 | 23 | 442 | AZT + ddI |
| | | 1997.3 | 4.5 | 146 | 628 | AZT + ddC + IDV |
| KI-003 | A2402/A2601, B3501/B5101 | 1993.3 | ND | 289 | | AZT + IFN |
| | | 1994.4 | ND | 286 | | AZT + IFN |
| | | 1995.5 | ND | 252 | 2339 | AZT + ddI |
| | | 1996.5 | 5.1 | 216 | 2569 | AZT + ddI |
| | | 1997.7 | 4.2 | 320 | 3896 | AZT + ddI + SQV |
| | | 1998.4 | 3.8 | 328 | 3776 | 3TC + d4T + NFV |
| | | 1999.3 | 4.0 | 252 | 3176 | 3TC + d4T + NFV |
| KI-015 | A11/A24, B35/B54 | 1997.12 | 3.3 | 193 | 1132 | 3TC + d4T + NFV |
| | | 1998.12 | 4.6 | 162 | 1282 | 3TC + d4T + NFV |
| | | 1999.3 | 4.1 | 184 | 1078 | 3TC + d4T + NFV |
| KI-017 | A2/A24, B35/B48 | 1996.5 | 3.0 | 275 | 426 | AZT + ddI |
| | | 1999.5 | <2.6 | 305 | 478 | 3TC + d4T + NFV |
| KI-019 | A2402/-, B3501/B5201 | 1997.7 | 4.3 | 714 | 1705 | ND |
| | | 1998.8 | 2.8 | 518 | 880 | AZT + 3TC + IDV |
| | | 1999.5 | 2.8 | 601 | 964 | 3TC + d4T + IDV |

HIV-1

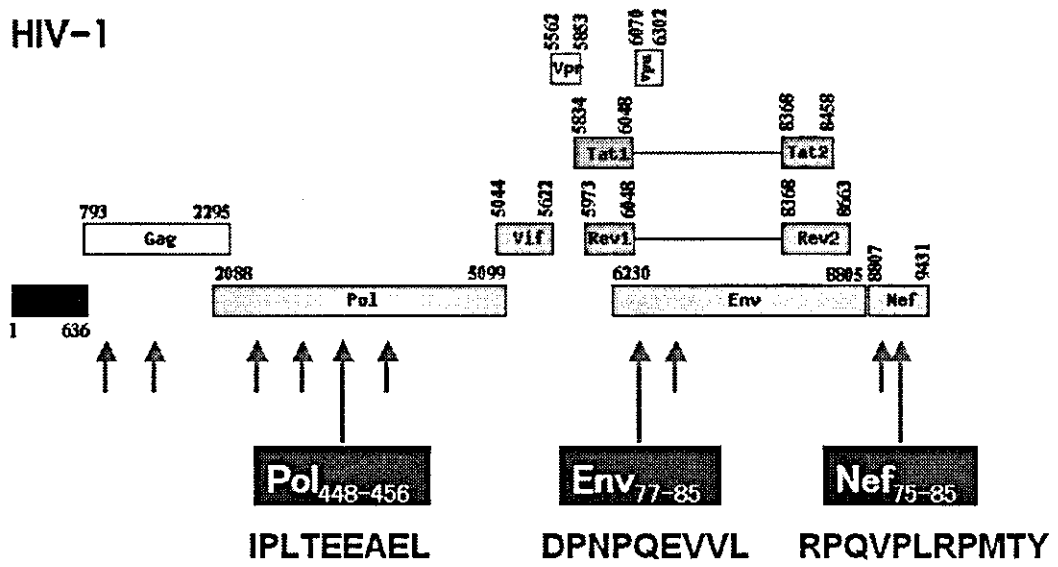


Fig1. HIV-1 の遺伝子構成と HLA-B35 拘束性 CTL エピトープ

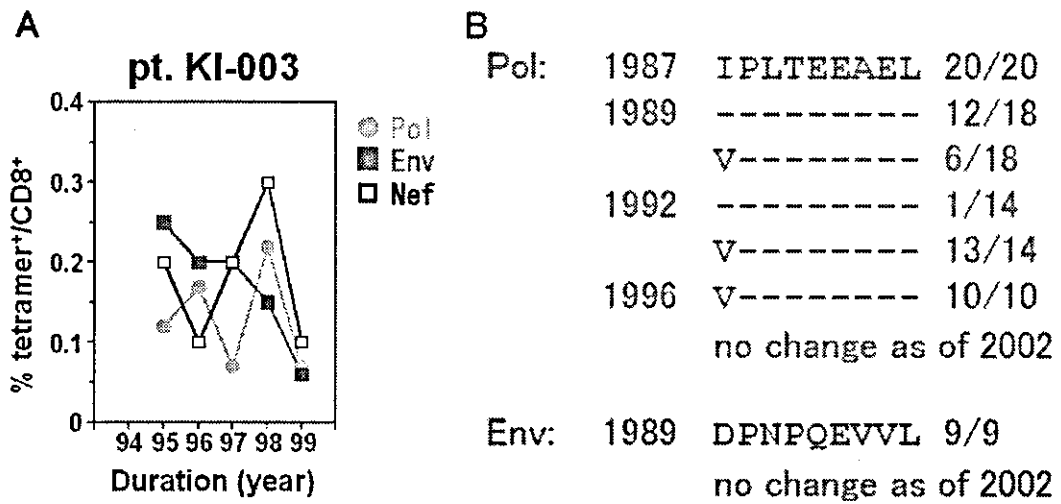


Fig2. 慢性 HIV-1 感染者(KI-003)の CTL エピトープとエピトープ特異的な CD8T 細胞数の変化

(A) KI-003 の Pol, Env および Nef エピトープに特異的な CD8T 細胞数の経時変化

(B) KI-003 から分離した HIV-1 の CTL エピトープ領域の経時変化

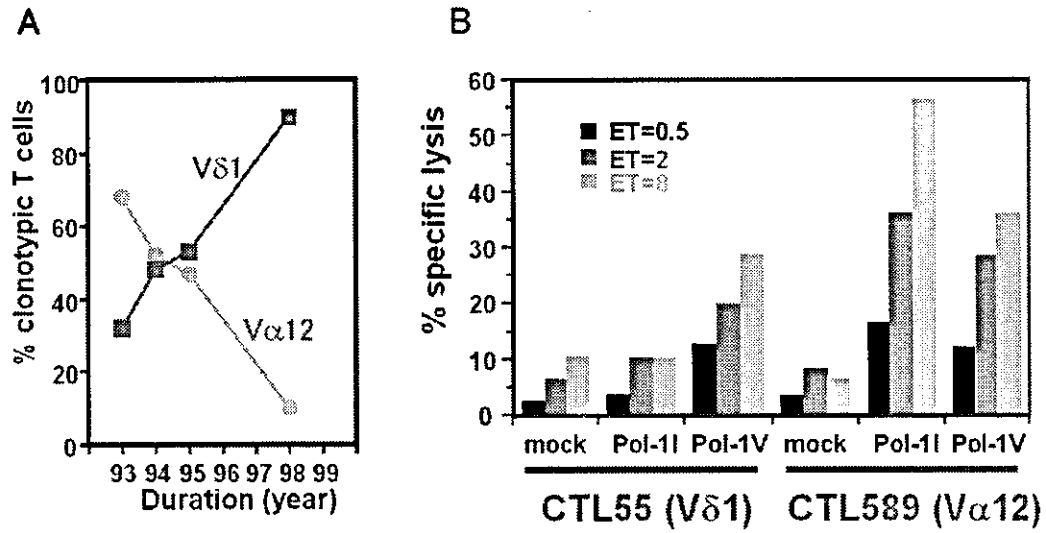


Fig3. HIV 特異的 CD8T 細胞のレパートリー構成と抗 HIV-1 活性
 (A) Pol 特異的 CD8T 細胞レパートリー構成の経時変化
 (B) エピトープに変異を導入した時の各 CTL クローンの CTL 活性

厚生労働省科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

HIV 感染症の病態と宿主の免疫応答の研究

分担研究者 松下修三 熊本大学エイズ学研究センター病態制御分野 教授

研究要旨

我々は中和抗体の臨床応用を計画中であるが、in vivo での中和エスケープの研究は、長期非進行例にみられる有効な中和抗体の誘導を目指すうえでも極めて重要である。我々は昨年度までに、自己由来の分離株に対する中和抗体活性を持ち HAART 療法下にウイルスのリバウンドが見られた症例における gp120-C3 領域の変化が、V3 を含んだ立体構造エピトープに関する中和抵抗性メカニズムに関係していることを明らかにした。本年度は異なる症例の解析により、同 C3 領域の変化が広範囲の分離株に対して中和活性を持つ V3loop の tip 部分に対する中和抗体に対する中和感受性に影響することがわかった。これらの研究は有効な免疫療法の開発ばかりでなく感染阻止ワクチンの開発に意義を持つといえる。

A. 研究目的

抗ウイルス剤多剤併用療法（HAART）下に残存するウイルスの性質を調べ、これに対する宿主の免疫応答を解析し、発症阻止を目指した新規治療法を開発するのが本研究の目的である。我々は中和抗体の臨床応用を計画中であるが、in vivo での中和エスケープの研究は、長期非進行例にみられる有効な中和抗体の誘導を目指すうえでも極めて重要である。本年度はこれまでとは異なる臨床株の gp120-C3 領域の変化が、中和抗体反応に影響するかを調べ、中和感受性株にこれを導入し中和抵抗性への変化を調べた。

B. 研究方法

HAART 療法下にある HIV 感染症例で、自己由来の分離株に対する中和抗体活性をもった状態で、様々な理由で治療が中断され、ウイルスのリバウンドが見られた症例を 4 例経験した。HAART 開始時及びリバウンド時の血漿より RT-PCR にて HIV-gp120 を増幅し、多クローン解析でアミノ酸配列を決定し系統樹解析を行った。リバウンド前後の gp120 のアミノ酸配列をもつ組み換えウイルスを複数作成し患者血漿から精製した IgG を用いて、MAGI-CCR5 細胞を標的細胞として、それぞれのウイルスに対する中和活性を測定した。さらに中和感受性ウイ

ルスと中和抵抗性ウイルスクローンよりリコンビナントエンベロープを作製し、中和抵抗性変化に関連する部位を同定した。gp120 の立体構造エピトープに反応し、感染を中和する単クローン抗体 15 種類を用い HAART 開始前とリバウンドウイルス及びそれらのキメラウイルスに対する中和活性を測定した。中和抵抗性ウイルスと感受性ウイルスのエンベロープ蛋白への中和単クローン抗体の結合活性を調べるためにそれぞれのエンベロープ遺伝子を pLP-env-IRES-EGFP ベクターに導入し GFP 発現細胞にゲートをかけて FACS にて分析した。同定した C3 上流部分の変異を中和感受性株である SF162 のエンベロープに導入し中和感受性を wild type と比較した。

(倫理面への配慮)

本研究を行うに当たり各症例には研究の概要を説明し同意を得た上で採血し解析した。なお本研究の倫理的・科学的妥当性は熊本大学附属病院の先進医療審査委員会で審査され、了承されている。

C. 研究結果

我々は昨年までに自己の分離株に対する中和抗体をもつ症例を継続的に観察し、HAART にて長期に亘りウイルス血症の抑制が得られた中で、ウイルスのリバウンドが認められた 4 症例を解析した。その結果、in vivo での中和エスケープには V1/V2 や V3 などの可変部位ばか

りでなく、定常部位である C3 領域の変異が影響することを示した。しかし、C3 領域に対応する合成ペプチドに反応する抗体は検出されず、C3 領域はリニアエピトープを形成しないと考えられることから、この中和エスケープには何らかの立体構造を認識する抗体の関与が考えられた。

In vivo での選択圧となっている抗体の性質を調べるために、我々は gp120 の立体構造を認識して中和する単クローン抗体の HAART 前のウイルス (pMOK10) 及びリバウンド時のウイルス (rMOK10) に対する中和能を検討した。単クローン抗体としては、CD4 結合部位に対する抗体や、gp120 が CD4 に結合後に出現するエピトープに対する抗体、さらに V3 を含んだ立体構造を認識する抗体などを準備した。この結果、V3 の立体構造を認識する単クローン抗体の一つ、2442 が C3 及び V3/C3 のアミノ酸変化にて中和感受性が変わることがわかった。2442 の中和は HIV 感染症例の中和抗体とは逆に HAART 開始前のウイルスが中和抵抗性であり、V3/C3 及び C3 がリバウンド型となると中和感受性が増加した。一方、他の V3 の立体構造を認識する単クローン抗体 2182 やリニアエピトープと認識する 477-52D はリバウンドウイルス (rMOK10) のみ感受性で新しく作成した V1/V2 をリバウンド型に組み替えた rMOKV1/V2 を含む他の組み換えウイルスは全て中和抵抗性であり、V3 に反応しておこるウイルス感染の中和には downstream C3 および V4 に中和抵抗性を与える領域があると考えられた。

本年度はこれに加えて、異なる症例の治療前ウイルス由来のエンベロープキメラウイルス (pKNI20) とリバウンド時のウイルス (rKNI1) と pKNI20 の C3 のみ rKNI1 由来のシークエンスにおきかえた KNIC3 を準備し解析した。すると、この症例では広範囲の分離株に対して中和活性を持つ V3loop の tip 部分に対する中和抗体 477-52D や C25 に対する中和感受性が同 C3 領域の変化で低下することがわかった。抗体の反応性についても rKNI1 のほうが pKNI20 より有意に高く KNIC3 はその中間であった。我々はこの現象が他のウイルス株でも起こるかどうか

調べるため、C3 上流部分の変異を中和感受性株である SF162 のエンベロープに導入し wild type と比較したところ、C3 を pKNI20 型にした変異株 (SF162 C3-23) は wild type に比べて 477-52D や C25 に対する中和感受性が有意に低下していた。C3 の変異はこのように臨床株の中和抵抗性に関連すると考えられる。

D. 考察

HIV に対するワクチン開発のこれまでの報告では、実験室株に対する中和抗体は誘導できても、臨床分離株の中和は困難であると報告されてきた。また、中和単クローン抗体を用いた研究でも、反応エピトープは保存されているが、臨床分離株は中和抵抗性であるという報告もある。その説明として、臨床分離株では糖鎖が抗体のエピトープに対する accessibility を阻害しているという説や、ウイルス膜上では V3 エピトープが隠れているのではないかという説などが唱えられてきた。今回我々の研究は、抗体の反応エピトープ以外のアミノ酸の変化が中和抵抗性に関係すること示した。細胞表面のエンベロープに対する結合活性については中和抵抗性のウイルスについても保たれており、ウイルス粒子上のエンベロープに対する反応性の検討が必要である。すなわち、C3 の変異による中和抵抗性のメカニズムとして、抗体のエンベロープ抗原への反応性の低下と関連するのか、引き続き中和メカニズムと関連するのかの検討が必要である。

E. 結論

我々は gp120 の C3 領域が in vivo における中和抗体からのエスケープに関与することを証明するとともに、V3 を含んだ立体構造エピトープに対する抗体の中和抵抗性メカニズムを明らかにした。In vivo における中和抗体からのウイルスのエスケープの研究は少ない。これらの研究は有効な免疫療法の開発ばかりでなく感染阻止ワクチンの開発に意義を持つ。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsushita, S., Yoshimura, K., Kimura T., Kamihira, A., Takano, M., Eto, K., Shirasaka, T., Mitsuya, H., Oka, S.: Spontaneous recovery of hemoglobin and neutrophil levels in Japanese patients on a long-term Combivir® containing regimen. *J. Clin. Virol.* 2005 (in press).
2. Sakaguchi, N., Kimura T., Matsushita, S., Fujimura S., Shibata J., Araki M., Sakamoto T., Minoda S., and Kuwahara K. Generation of high-affinity antibody against T cell- dependent antigen in *gagp* gene- transgenic mouse. *J. Immunol.* 2005 (in press).

2) 学会発表

1. 小糸厚、柴田潤二、大杉剛生、松下修三、亀山祐一：小動物由来 APOBEC3G の抗 HIV-1 活性の解析. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会. 2004. 11. 21-23. 横浜.
2. 祁内 梓、木村 哲也、吉村 和久、小糸 厚、松下 修三：HIV Tat-Nef 融合タンパクを用いた細胞性・液性免疫の誘導. 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会. 2004. 12. 1-3. 札幌.
3. 濱本理恵子、祁内 梓、吉村和久、小糸厚、松下修三：HIV 感染患者におけるヘルパーT 細胞活性に対する制御性 T 細胞の影響. 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会. 2004. 12. 1-3. 札幌.
4. 柴田潤二、木村哲也、岩田隆一、吉村和久、小糸厚、松下修三：gp 120 の C3 領域変異による抗 V3 中和抗体に対する中和抵抗性の獲得自己由来の HIV に対して中和活性をもつ血清中和抗体の交差中和性の研究. 第 18 回日本エイズ学会学術集会. 2004. 12. 9-11. 静岡.
5. 岩田隆一、柴田潤二、木村哲也、吉村和久、小糸厚、松下修三：自己由来の HIV に対して中和活性をもつ血清中和抗体の交差中和性の研究. 第 18 回日本エイズ学会学術集会. 2004. 12. 9-11. 静岡.

6. 松下修三：Introductory comments on HIV residual diseases (イントロダクション：HAART で残存するウイルスとは?) 第 18 回日本エイズ学会学術集会. 2004. 12. 9-11. 静岡.
7. Shibata, J., Wang, F.X., Kimura, T., Iwata R., Yoshimura K., Koito, A., Matsushita, S.: Involvement of C3 mutation in neutralization sensitivity for anti-V3 antibodies. 5th AIDS seminar in Kumamoto 2004. 9. 9-10. Kumamoto.
8. Iwata, R., Shibata, J., Kimura, T., Yoshimura K., Koito, A., Matsushita, S.: Cross neutralizing activity of serum antibodies with neutralizing activity against autologous HIV. 5th AIDS seminar in Kumamoto 2004. 9. 9-10. Kumamoto.
9. Kenai, A., Kimura, T., Yoshimura K., Koito, A., Matsushita, S.: Efficient induction of both cellular and humoral immune response by immunization with Tat-Nef fusion protein (tNEF) without adjuvants. XV International AIDS Conference Bangkok, 2004. 7. 11-16, Bangkok, Thailand.
10. Matsushita, S., Kimura, T., Shirai, N., Koito, A., Yoshimura, K. New approach for optimization of HAART; Evaluation of residual viral replication by monitoring proviral DNA level and T cell turnover rate. [TuPeA4356], XV International AIDS Conference Bangkok, 2004. 7. 11-16, Bangkok, Thailand.
11. Matsushita, S.: Evaluation of residual viral replication for optimization of HAART. International symposium of AIDS Research Institute in Yonsei University College of Medicine "HIV/AIDS". 2004. 10. 15. Seoul, Korea.

H. 知的所有権の出願・取得状況 特になし