

DNA マイクロアレイを用いたエイズ発症阻止の研究

分担研究者 渡辺 慎哉 東京医科歯科大学・寄附講座教員

研究要旨

エイズ発症の阻止・遅延に関与する宿主遺伝子の同定を目標として、独自に開発・改良した技術に基づいた合成 DNA マイクロアレイ・システムを用いて、HIV 感染長期未発症者（LTNP）を含む HIV 感染者および健常対照者の末梢血 1 ml から直接 RNA を抽出・増幅して遺伝子発現を解析できる系を構築した。その系を用いて、11 例（LTNP: 4 例）の遺伝子発現解析をおこなったが、統計学的有意差のある遺伝子群の特定には至っていない。前年度まで行っていた末梢血単核細胞由来の培養リンパ球での解析系と同様に、末梢血を培養せずに直接解析対象とする今年度開始した系も、その方法論自体の妥当性が問題となる。さらに、遺伝子発現データの統計学的処理に決定的に大きな影響をおよぼす LTNP および slow progressor の分類の規準に関しても、見直し・再検討が迫られる可能性がある。

A. 研究目的

1. 本研究は、HIV 感染者由来の試料を中心にゲノムワイドでの遺伝子発現解析を行うことにより、エイズ発症機構の解明を目指すとともに、エイズの発症阻止・遅延因子を明らかにすることにより、すでに HIV に感染してしまった多くの患者の発症阻止に資することを最終的目標とする。
2. 本研究の最大の特色は、独自に改良・開発した技術に基づいた合成 DNA マイクロアレイ・システムを用いるところにある。この技術を用いれば、マイクロアレイ化する遺伝子の自由自在な選定や遺伝子数の増加が容易に可能となり、低コストで大量のアレイを作製できる。分担研究者（渡辺）は平成 14 年内までに合成 DNA マイクロアレイ技術に関する 6 件の特許申請を行った。これらの出願特許をもとに大量のマイクロアレイを作製し、可能な限り数多くの遺伝

子を対象としたトランスクリプトーム解析を可能にした。

3. 平成 15 年度は、前年度までに解析した 41 検体（末梢血由来の培養リンパ球）についてサンプルの再調製を行い、遺伝子発現プロファイルを取得した。この取り直した並行比較可能な 41 検体の遺伝子発現データから、LTNP3 例および HIV 未感染者 1 例、合計 4 例とその他をクラスタ分析上明確に異なる 2 つの群として区別可能な 21 遺伝子を特定した。平成 16 年度は、総計 111 の培養リンパ球サンプルから得られた遺伝子発現プロファイルより、LTNP5 例に共通し、かつ、他のサンプルとは異なる発現レベル変化を示す遺伝子群を複数の異なる統計学的解析方法にもとづいて特定しようと試みた。しかしながら、この条件をみたす遺伝子群の特定は不可能であった。平成 15 年度に抽出

した 21 遺伝子は、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のノイズであったと結論した。

4. 平成 17 年度は、これまでのサンプル調製方法（末梢血由来のリンパ球を培養して使用する）にかえ、少量の末梢血を直接解析対象とすることを目標とし、末梢血 1 ml を出発材料として mRNA を増幅して解析する系の構築を計画した。さらに、その系を用いて LTNP を含む末梢血サンプル（非培養）の遺伝子発現解析を行い、末梢血サンプルから LTNP 特異的な遺伝子群を同定できるかどうか試みることにした。

B. 研究方法（倫理面への配慮）

1. 合成 DNA マイクロアレイの作製

31,872 種類の転写産物を代表する 80mer の合成 DNA を、スライドガラス上の 18 mm x 36 mm の領域内に極微量分注・配列化し、合成 DNA マイクロアレイ（32K アレイ）を作製した。

2. 末梢血からの RNA の抽出と in vitro 増幅

末梢血 1 ml から Isogen-LS 試薬（ニッポンジーン社製）をもちいて total RNA を抽出した。その RNA を 4 等分し、エタノール沈澱させ保存した。そのうちの 1 本のサンプルについて、SMART mRNA amplification kit（Clontech 社製）により、添付のプロトコルにしたがって cDNA 合成および sense 鎖 RNA の in vitro transcription による増幅を行った。これら一連の精製・合成・増幅の過程について、実験者間の結果の誤差が最少になるように、種々の条件検討を加えた。また、ラットの各組織から調製した total RNA も条件検討用材料として使用し、同様の方法で増幅を行った。

3. サンプル調製

上記 2 で検討を加えたプロトコルにしたがって、健常対照群および LTNP を含む HIV 感染者から提供された末梢血中に含まれる mRNA を増幅した。

4. マイクロアレイによる遺伝子発現レベルの測

定

サンプル mRNA から増幅して得られた sense 鎖 RNA、および、これまでの解析にもちいてきた共通レファレンス RNA（22 種類の細胞株の mRNA の等量混合物）を鋳型として、それぞれ Cyanine-5 dUTP および Cyanine-3 dUTP の存在下で cDNA 合成し、標識 cDNA を調製した。増幅サンプルおよび共通レファレンス由来の標識 cDNA を混合し、32K アレイとハイブリダイズさせ、各スポットの蛍光強度を測定し、各遺伝子の発現比（ \log_2 サンプル蛍光強度/共通レファレンス蛍光強度）を算出し、解析用データとした。

5. データ解析

算出した各遺伝子の発現比（ \log_2 ）をすべてのサンプルについて統合し、データ行列を作成した。このデータ行列から、変化の大きかった遺伝子のデータを抽出し、それらについて LTNP の群と slow progressor/progressor の群の間で t 検定を行った。

（倫理面での配慮）

HIV 感染者からサンプル提供を受けるにあたっては、共同研究者の山梨大学（当時）・照沼裕博士が個人情報の保全に十分留意した上で担当各機関の倫理委員会の了承を受けており、問題ないと判断した。照沼博士は、平成 13 年三省合同（文部科学省・厚生労働省・経済産業省）「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、12 年度倫理審査委員会で受けた研究計画の審査・承認に加え、三省合同基準を満たすように変更を加えて再承認を得た。また、患者主治医の所属施設の倫理委員会での審査・承認、その所属施設長からの研究協力許可書、主治医からの研究協力承諾書を得た。さらに、患者への文書と口頭で研究内容を説明し、研究協力を了解していただいた方から同意書を得た。

C. 研究結果

1. in vitro RNA 増幅の条件検討

本年度当初におこなった kit 付属のプロトコルによる増幅実験では、同一実験者の行った複数の同一サンプルの間で遺伝子発現プロファイル上無視できないほどの大きな差異が生じ、そのままの方法で増幅すれば、サンプルの違いよりも増幅実験の誤差のほうが大きくなってしまい、使用に耐えられないことが判明した。そこで、kit の各種反応について同一サンプル（ラット組織由来 total RNA）を用いた仔細におよぶ条件検討（各種条件の評価はラットマイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイルの比較解析による）を行った。

反応に持ち込む酵素等の試薬の体積、および、反応温度の管理、さらには実験環境の物理的条件等の各種条件が一定になるように検討したところ、ようやく、増幅 RNA を用いても、異なるサンプル（ラット組織各種）を遺伝子発現上非増幅サンプルと同等の解像度で区別できるような精度まで到達した。

以上のことから、検討した諸条件を遵守することによって、*in vitro* 転写を基本とした mRNA 増幅法によって増幅した RNA サンプルを用いても、遺伝子発現解析が可能となったと判断した。

2. 必要血液量の検討

サンプル取得を担当する臨床現場からは、実際問題として採血できる量は数ミリリットルであるという制限が提示されており、そのため、本分担研究のこれまでの解析では末梢血を直接解析する（非増幅の polyA+ RNA が $2\mu\text{g}$ 以上必要；末梢血 40 ml 以上に相当）ことを断念し、培養リンパ球を解析してきたという経緯がある。

そこで、本年度条件検討を加えることによって確立した RNA 増幅プロトコルを使う場合、必要血液量をどれだけ減らせるか調べた。最終的に決定したプロトコルにしたがって、末梢血 1 ml から total RNA を抽出し、それらを定量せずに 4 等分後、分注サンプルを独立に増幅し、定量したところ、十分量（ $3\sim 10\mu\text{g}$ ）の

RNA が取得できることが明らかとなった。

以上のことは、マイクロアレイのラベリングにこれまで通り $2\mu\text{g}$ の sense 鎖 RNA を用いても、最悪でも増幅をくりかえすことにより、複数回のラベリングが十分に可能なだけの RNA サンプルを末梢血 1 ml から増幅により取得できることを示している。

3. HIV 感染者および対照群の末梢血サンプルの遺伝子発現解析

上記で確立した RNA 増幅法によって取得したサンプルは、平成 18 年 1 月現在で 11 であった。それらをこれまで用いてきたエイズの発症状態の分類（10 段階）に当てはめると、次の通りであった。

#1) LTNP（血友病、 $\text{CD4} \geq 500$ ）：4 例

#2) Slow progressors（血友病、 $500 > \text{CD4} \geq 350$ ）：1 例

#3) Slow progressors（血友病、 $350 > \text{CD4}$ ）：0 例

#4) Progressors（血友病、ARV 療法、 $\text{CD4} \geq 500$ ）：0 例

#5) Progressors（血友病、ARV 療法、 $500 > \text{CD4} \geq 350$ ）：0 例

#6) Progressors（血友病、ARV 療法、 $350 > \text{CD4}$ ）：2 例

#7) HIV 感染者（非血友病）：0 例

#8) HIV 非感染者（血友病）：3 例

#9) HIV 非感染者（健常人）：1 例

#10) HIV 非感染者（非血友病疾患）：0 例

これらのサンプルの遺伝子発現プロファイルを取得し、LTNP 群（4 サンプル）と slow progressor/progressor 群（3 サンプル）での 2 群比較（*t* 検定； $P < 0.01$ ）をおこなったところ、137 遺伝子が LTNP 特異的遺伝子候補として挙がってきた。さらに、この 137 遺伝子に対して、統計学的有意差だけでなく生物学的有意差を加味した評価を与えるために、比較対象の 2 群の平均発現比が 2 倍以上になるものを選択したところ、候補はわずかに 9 遺伝子となった。さらに、これらの 9 遺伝子による全サンプルの

クラスタ分析を行ったところ、たしかに両群が異なるクラスタには分類されたものの、両群の遺伝子発現パターンを比較すると、それらの間で大きな差異があるとは言いがたい微妙なものであり、統計処理における誤差の範囲であると結論した。

D. 考察

1. LTNP 特異的遺伝子発現の解析

本年度は、昨年度まで行ってきた末梢血由来の培養リンパ球を対象とした解析が統計学的有意差をもつ LTNP 特異的遺伝子群の同定に到達できなかったことをうけ、あらたに、少量のサンプルから RNA を増幅することによってこれまで同様のマイクロアレイ・システムを応用できる系を確立し、提供者に負担のかからない量の末梢血を直接解析して LTNP 特異的遺伝子群の特定を試みた。しかしながら、RNA 増幅系の確立には成功したものの、それによる解析では、現時点において明確な（統計学的有意差をもつ）候補遺伝子群の同定には至っていない。

以上のような結果になった原因は次のようなものと考えられる。1) サンプル数の絶対的不足（LTNP 4 例と slow progressor/progressor 群 3 例）； 2) 比較対象とした群のサンプル設定ミス、すなわち、slow progressor と progressor をあわせて LTNP 群の対照としたことの誤り； 3) slow progressor と progressor の分類の規準の不確かさ； 4) 遺伝子発現データのノイズの取り扱いの誤り。これらはいずれも方法論的な不適切さをしめすものであり、本来あるべき差を検出できていない可能性を示すものである。

しかしながら、本分担研究が根本的に抱える問題として、末梢血およびそれに由来する細胞が LTNP 特異的な特徴を果たして有しているのか、さらには、それらが存在するとしても遺伝子発現レベルの違いに起因するものであるのかどうか、という大きな命題が未解決のまま依然として存在している。この根本命題に対す

る明確な答えを出すためには、統計学的に有意差をいえるほどサンプル数が十分に大きいこと、および、解析に用いる方法論の実験誤差が十分に小さいことの 2 つの条件をみたした研究が必要である。

2. 到達度について

本年度の最初の課題、すなわち、少量の末梢血からでも遺伝子発現解析可能な系を確立すること自体は目標に到達したと判断する。しかしながら、本分担研究の本来の目的である LTNP 特異的遺伝子群の同定には至らず、この点において本来の目標は到達に程遠いと言わざるをえない。本分担研究課題は、当初の予想をはるかにこえて困難なものであることを痛感する。

3. 研究結果の学術的・国際的・社会的意義について

LTNP を遺伝子発現の視点で特徴づけようとする研究が本年度中に論文発表された（PNAS 2005: 9860-9865）。その論文では、小腸粘膜の生検サンプルを材料として本分担研究と同様にマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行い、4 例の LTNP に特異的な遺伝子群を報告している。きわめて貴重なサンプルを用いた困難な研究ではあるが、わずかに 4 例でのデータであり、ここで言及された遺伝子群の真の関与については今後の研究をまって結論を急がず、慎重に対処すべきであろう。サンプル数の絶対的不足が本分担研究同様、最大の問題といえる。また、この論文では、ある特殊なリンパ球における LTNP 特異的遺伝子発現パターンを報告しているが、このことは、やはり LTNP を特徴づけるのはリンパ球であることを示すものであり、研究対象としては血球細胞、特にリンパ球を選定すること自体に大きな誤りはないと考えられる。しかしながら、末梢血がはたして適しているかどうかの結論を現段階でくだすことは不可能である。

本分担研究のような、臨床検体を直接解析対象とする研究は、個人差・外的内的刺激の有無

など、さまざまな変動要因の影響(ノイズ)を、サンプル数を増やすことおよび統計学的手法を用いることによって克服していかなければならない。その意味において、臨床検体を対象とした大規模な LTNP 研究は、本研究班三間屋博士および共同研究者の照沼博士が長期間にわたってフォローしている血友病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自前の合成 DNA マイクロアレイ・システムの存在がともにあって初めて可能になるものであり、その独自性を最大限にいかして、地道な臨床検体の解析を継続することそのものに意義がある。

4. 今後の展望について

少量の末梢血から調製した RNA を増幅して遺伝子発現解析を行うシステムは、本年度後半になってようやく確立をみた。したがって、解析したサンプル数はわずかに 11 であり、評価するにはあまりに不十分である。解析サンプル数を 100 例(以上)程度まで増やし、データのノイズを極力低減化して解析を続け、末梢血を直接解析する方法論自体の妥当性について議論し、結論を出す。

E. 結論

末梢血由来の増幅 RNA 11 例を対象とした遺伝子発現解析では、統計学的有意差をもつ LTNP 特異的遺伝子群の特定には至らなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Fujita N, Miyamoto T, Imai J, Hosogane N, Suzuki T, Yagi M, Morita K, Ninomiya K, Miyamoto K, Takaishi H, Matsumoto M, Morioka H, Yabe H, Chiba K, Watanabe S, Toyama Y, Suda T. CD24 is expressed specifically in the nucleus pulposus of intervertebral discs. *Biochem Biophys Res Commun.* (2005) 338:1890-6.
- (2) Sakamoto A, Imai J, Nishikawa A, Honma R,

Ito E, Yanagisawa Y, Kawamura M, Ogawa R, Watanabe S. Influence of inhalation anesthesia assessed by comprehensive gene expression profiling. *Gene.* (2005) 356:39-48.

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の出願・取得状況

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 *Rfv-3* 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 抗体産生に關与する可能性を示してきた。今年度は、マウス側でマイクロアレイを用いた発現解析により *Rfv-3* 候補遺伝子を絞り込み、これを中和抗体早期産生系統のマウスから中和抗体産生能を欠く A/WySn マウス受精卵に導入して、トランスジェニックマウスを得た。また、ヒト22染色体の *Rfv-3* 遺伝子相同領域に存在する HIV 感染抵抗性遺伝子についても、マイクロアレイによる発現解析と単一塩基多型 (SNPs) 遺伝子型決定による絞り込みを行い、曝露非感染者末梢血において HIV 抗原刺激後に発現が上昇する遺伝子の近傍と、それら遺伝子の発現調節部位と考えられる領域とに、曝露非感染者群と HIV 感染者群で頻度の異なる新規 SNPs を見出した。

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關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、CCR5 発現欠損のホモ接合体はほとんど報告されていない。一方、我々はマウス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を第15染色体上にマップした。そのヒトオース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* **19**: 1015, 2005)。

HIV-1 曝露非感染者では、体内に 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。従って、上記の遺伝的解析の結果は、ヒト第22染色体上に、マウスレトロウイルス感染時に中和抗体産生を制御する宿主遺伝子と相同な、「最小限の HIV-1 曝露に対し強い免疫応答を誘導す

る遺伝因子」が存在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目的とした。マウス側については、昨年度から実施している中和抗体産生制御遺伝子マップ領域全遺伝子の発現解析の結果に基づいて、絞り込んだ候補遺伝子を中和抗体早期産生系統から無産生系統である A/WySn に導入したトランスジェニックマウスを樹立することを目標とした。また、ヒト側については、ウイルス中和抗体産生制御遺伝子相同領域に存在する全遺伝子の発現解析と、この領域の SNPs 遺伝子型の網羅的な解析とを行い、曝露非感染者に特有な遺伝的特徴の実体を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析

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 open reading frames (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2箇所から10箇所(通常の遺伝子については平均6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6つのスポットを分散させて配列した。

遺伝子発現の解析は、通常の方法により蛍光標識 cRNA 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、あるいは抗原刺激前後の発現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 -アクチンの発現量による正規化を行った。

2) cRNA 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 B10.A 由来 F_1 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、ゲノム DNA を除去後 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ことが明らかとなった、FV 感染9日後の検体を用いて発現解析を行った。

ヒトについては、イタリア・フィレンツェ地区の HIV-1 感染者および 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(最終濃度 2.5 μ M)で刺激を行った。刺激前、および刺激後の RNA later 処理末梢血単核球より全 RNA を抽出し、cDNA を調製した。

これらマウス及びヒトの cDNA を精製後、ピオチン標識 UTP 存在下で MEGAscript 転写キットを用いて cRNA を作製し、RNeasy キットで精製した。

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つと B リンパ球特異的な発現誘導を促すプロモーター及びエンハンサー配列を繋いだものを、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(TG)個体を作製した。得られた TG 個体について、ゲノム中の導入遺伝子の存在を PCR 法により、また末

梢血中での導入遺伝子の発現を RT-PCR 法により確認した。

4) ヒト22染色体単一塩基多型(SNPs)の網羅的解析

マウスレトロウイルス中和抗体産生制御遺伝子(*Rfv-3*)のマッピング領域に対応する、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、そこに存在する全ての既知 SNPs をデータベースから抽出し、白人における低頻度対立遺伝子の割合が 10~40%程度のもので選んだ。これらについて ABI Prism 7700 を用いた Taq-Man PCR 法により、ゲノム DNA を鋳型とする遺伝子型の決定を行った。

得られた SNPs 遺伝子型については、Fisher's exact test による群間の頻度比較を行うとともに、Arlequin ver. 2001 を用いた EM アルゴリズムにより、遺伝子座間の連鎖不平衡頻度を推定した。

【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の規約を遵守して、疼痛の防止に努め、動物愛護の精神に則ってこれを行った。

C. 研究結果

1) *Rfv-3* 候補遺伝子トランスジェニックマウスの作製

FV 感染9日後の、(B10.A \times A/WySn) F_1 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。これらのうち一つは、中和抗体早期産生能を持つ(B10.A \times A/WySn) F_1 マウスの脾臓で強く発現しており、中和抗体産生を欠く A/WySn マウスでは全く発現が認められなかった。また、同じ遺伝子が B リンパ球の分化に関与することが既に報告されており、ゲノムレベルで A/WySn マウスにはトランスポゾンの組込による構造遺伝子変異が存在することが明らかであった。

そこで、中和抗体早期産生能を持つ B10.A マ

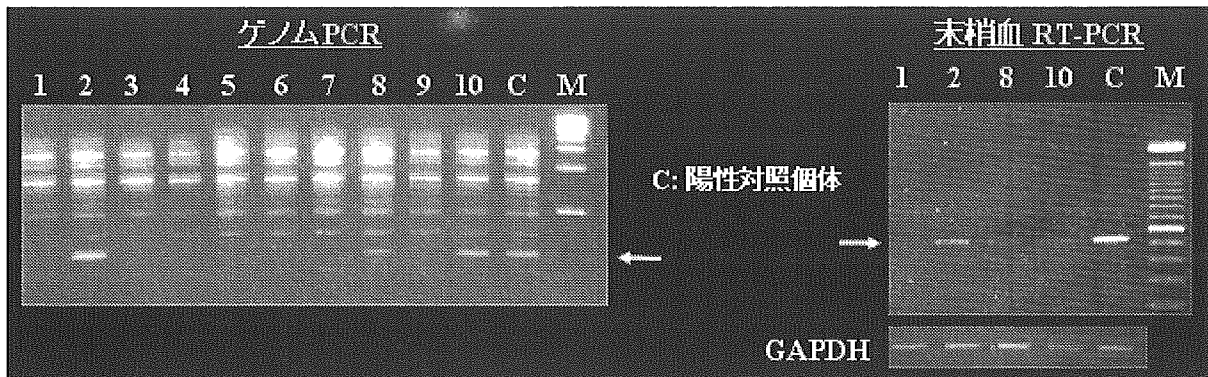


図1. *Rfa-3* 候補遺伝子トランスジェニックマウスの樹立。中和抗体早期産生性の B10.A マウスと同じ遺伝子型を持つ C57BL/6 マウスから、*Rfa-3* 候補遺伝子の cDNA 全長をクローニング、 V_H プロモーター及び Igk エンハンサーとともにレンチウイルスベクターに組込んだ。これを A/WySn 受精卵に導入し、得られた子孫個体についてゲノム DNA の PCR 解析、及び末梢血単核球での RT-PCR による発現解析を行った。

ウスと同じ遺伝子型を持った C57BL/6 マウスから、この遺伝子の cDNA 全長をクローニングし、Bリンパ球特異的な発現を促すよう免疫グロブリン遺伝子 V_H プロモーターと κ 鎖 3'エンハンサーを結合させたコンストラクトを作製、これを複製欠損性のレンチウイルスベクターに組込んだ。通常のマイクロインジェクション法ではトランスジェニックマウスの作製が困難である A/WySn 系統のマウスであっても、レンチウイルスベクターを用いることにより、受精卵への遺伝子導入が可能であった。

図1に示すとおり、ファウンダー系統 2, 8, 10 でゲノムへの候補遺伝子導入が検出でき、導入した遺伝子は末梢血単核球で発現していた。

現在、これらファウンダーマウスを交配して多数の子孫マウスを得ており、十分な数が確保出来次第、FV を接種して中和抗体産生の有無を検定する予定である。

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。

抗原刺激前後の遺伝子発現パターンを定量的に比較するためには、同一プローブに対する蛍光強度をマイクロアレイ間で正規化する必要がある。そこで、GAPDH 及び β -アクチン遺伝子のそれぞれ複数のプローブについて、アレイ上の互いに対応するスポットの蛍光強度測定値をグラフにプロットし、これが直線となるよう Loess 関数による正規化を行った。

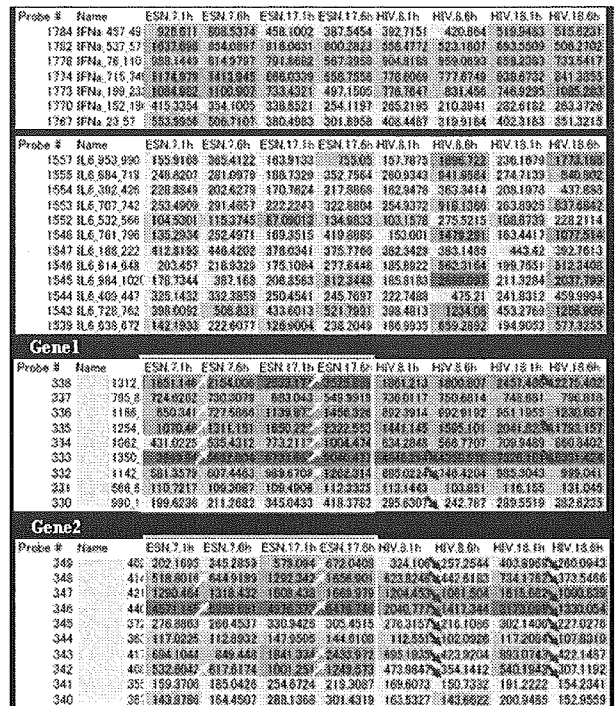


図2. マイクロアレイによるヒト第22染色体遺伝子発現誘導の比較。上から、それぞれ複数プローブによる IFN- α 、IL-6、及び第22染色体の隣接する二遺伝子 (Gene 1, Gene 2 とする) の発現。検体はそれぞれ二名ずつの HIV-1 曝露非感染者 (ESN7, ESN17) と HIV 感染者 (HIV8, HIV18) の末梢血単核球から、HIV 抗原刺激 1 時間後 (1h) 及び 6 時間後 (6h) に得た。

正規化後の各遺伝子の発現量 (蛍光強度) を HIV 抗原刺激の前後で比較すると、曝露非感染者で抗原刺激 6 時間後に発現の増強が見られ、HIV-1 感染者ではむしろ発現が減弱する遺伝子が二つ見つかった (図2)。これら二つの遺伝子は、知られている機能がリンパ球の遊走や活性化に

関係する。一方、HIV 感染者の末梢血単核球では、HIV 感染に伴う全般的な遺伝子発現の低下や、抗原刺激に伴って活性化する T リンパ球サブポピュレーションの減少がある可能性が考えられた。この点を検証するため、マイクロアレイ上に複数のサイトカイン遺伝子のプローブを設定した。図2に示すとおり、I 型インターフェロンや IL-6 などのサイトカイン遺伝子は、HIV 感染者末梢血でも抗原刺激後に発現の増加が見られ、その程度はむしろ曝露非感染者よりも高かった。

従って、曝露非感染者で HIV 抗原刺激に伴って発現が増加し、HIV 感染者の末梢血単核球では発現が低下した遺伝子は、曝露非感染者に特異的に発現増強が起こっている可能性がある。

3) HIV-1 曝露非感染者及び HIV 感染者ゲノムの網羅的 SNP 解析

第22染色体領域における HIV-1 曝露非感染者と HIV 感染者の遺伝的差異をより詳細に絞り込むため、マイクロアレイによる発現解析を行ったのと同じ染色体領域に存在する SNPs の遺伝子型を、曝露非感染者74名及び HIV 感染者77名について比較解析した。今回解析した集団について、以前遺伝解析を行った際に統計的に有意な差が認められた D22S423 の遺伝子型を確認したところ、両群の間に $P = 0.0012$ の有意な差が確認された。

解析を行った SNPs の ABI SNP Browser による ID 番号、連鎖する遺伝子、及び観察された遺伝子型を以下の表に示す。表中の P 値は、曝露非感染者群と HIV 感染者群における遺伝子型頻度の差を Fisher の方法で検定した結果を示す。

hCV ID number	Linked Gene	Alleles		P
		1	2	
1088426	<i>APOL3</i>	A	T	
8713601	<i>MYH9</i>	A	G	
1841062	<i>RABL4</i>	A	G	
8956971	<i>EA57_HUMAN</i>	C	T	
25968036	<i>EA57_HUMAN</i> (exon 1 coding)	A	G	
2403433	<i>IL2RB</i>	G	T	
2403368	<i>C1QTNF6</i>	C	G	
8957740	<i>CARD10</i>	C	T	
25994985	<i>CARD10</i>	C	T	
25993567	<i>CARD10</i>	C	T	0.0313
2491542	<i>CDC42EP1</i>	A	G	0.0043
15875008	<i>LGALS2</i>	A	G	
2233479	<i>POLR2F</i>	C	T	
2501764	<i>MAFF</i>	A	T	

344103	<i>GTPBP1</i>	G	C	
2189646	<i>APOBEC3G</i> (exon4 coding)	A	G	
25649193	<i>APOBEC3G</i> (exon6 coding)	C	G	
2221682	<i>RPL3</i>	G	A	
2222537	<i>GRAP2</i> promoter	A	G	
2222563	<i>GRAP2</i> (intron 1)	A	G	0.0196
2467289	<i>GRAP2</i> (intron 2)	A	G	
15530	<i>GRAP2</i> (intron 3)	A	G	
2467292	<i>GRAP2</i> (intron 3)	G	T	
11484908	<i>GRAP2</i> (exon8 coding)	C	T	
16318	<i>GRAP2</i> (3' intron)	C	T	
11882437	<i>Q9UP9Q</i>	A	G	
224082	<i>NOVEL10</i> (<i>LOC63929</i>)	C	T	
2497323	<i>TOB2</i>	G	A	
2481122	<i>NM_024821</i> (<i>FLJ22349</i>)	C	G	
2189968	<i>BAFF-R</i>	A	G	
2189972	<i>G22orf18</i>	A	G	
2468720	<i>TCF20</i>	A	T	
2986155	<i>NM_170698</i> (<i>dJ222E13.2</i>)	A	G	0.0218
1150511	<i>A4GALT</i>	C	G	

表の通り、近接する二箇所、即ち *Card10* と *CDC42EP1* に連鎖した SNP 座位で、曝露非感染者群と HIV 感染者群の間に有意な遺伝子型頻度の偏りを認め、特に *CDC42EP1* に連鎖した SNP でその程度が強かった。また、他にも二箇所、群間で遺伝子型頻度が異なった座位を認めた。

4) 種間ゲノム比較による高発現遺伝子調節部位の推定と塩基配列多型の検出

マイクロアレイを用いた発現解析によって、HIV 抗原刺激後曝露非感染者の末梢血単核球で発現上昇が見出された二つの遺伝子は、SNPs の解析で曝露非感染者群と HIV 感染者群に遺伝子型頻度の偏りが認められた *Card10* と *CDC42EP1* に、ごく隣接して存在している。そこで、曝露非感染者に認められた遺伝子発現上昇に、発現調節部位のゲノム多型が関与している可能性を考え、発現が上昇した二つの遺伝子の周辺に調節配列の存在を探った。

一般に、遺伝子発現の調節に関わる染色体領域は、構造遺伝子の間にありながら種間で塩基配列の保存性が高い。曝露非感染者で発現の上昇が見られた二つの遺伝子は、その転写方向が互いに逆を向いており、その間に共通の調節領域

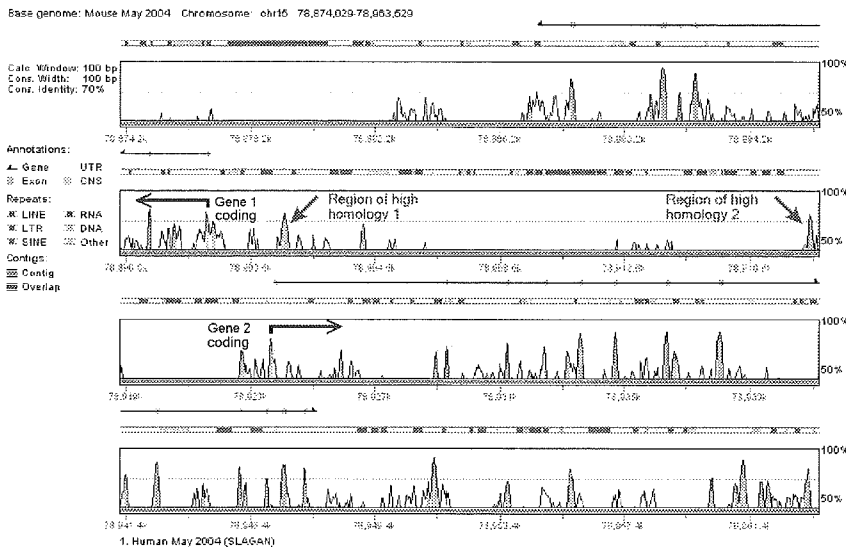


図3. ヒトとマウスのゲノム比較による遺伝子発現調節部位の推定。マクロアレイ解析によって、HIV-1 曝露非感染者で抗原刺激後発現の上昇が見られた、互いに隣接する二つの遺伝子 (Gene 1, Gene 2) について、それらに挟まれた領域の塩基配列を種間で比較した。マウスとヒトの間で50%を越える相同性を示す部分が二箇所あった (矢印)。これらは、その配列の特徴からエンハンサー領域と考えられた。

が存在する可能性が考えられた。そこで、この領域の塩基配列をヒトとマウスの間で比較したところ、それぞれの遺伝子の転写開始部位の近傍に、合計二箇所、種間の相同性が高い領域を見出した (図3)。さらに、それぞれの領域の塩基配列の特徴から、これらの領域は遺伝子発現のエンハンサーとして機能する可能性が考えられた。

そこで、これら二つの領域の塩基配列をゲノムのシーケンシングによって決定し、HIV-1 曝露非感染者と HIV 感染者間で比較を行った。その結果、何れの領域にも新規の塩基多型が存在し、二つの領域の遺伝子型同士でハプロタイプを形成していること、曝露非感染者には、HIV 感染者では頻度の低い特定のハプロタイプが集積していることが見出された (図4)。

D. 考察

1) 研究結果の考察

これまでトランスジェニックマウスの作製は、目的遺伝子をマイクロインジェクションにより直接受精卵に注入する方法により行われてきた。この方法は特定の系統、特に C57BL/6 やその F₁ マウスには有効であるが、受精卵が物理的に脆弱な多くの系統のマウスでは、実際上実施不可能であ

hap		hap3	not hap3
1	G-T	ESN	10
2	A-T	HIV	2
3	A-G		12
4	G-G		13

図4. 発現上昇の認められた遺伝子間に存在するエンハンサーと推定される配列の多型。曝露非感染者に特定のハプロタイプが集積する。

った。一方、我々の研究目的には、ウイルス中和抗体産生能を欠く A/WySn マウスに遺伝子の導入を行う必要があり、マイクロインジェクション法の適用は不可能であった。

今回我々は、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。

ヒト第22染色体に存在する、HIV 曝露非感染状態を決定する遺伝子については、今回その候補をほぼ絞り込むことに成功した。即ち、マイクロアレイを用いた発現解析によって、末梢血単核球の HIV 抗原刺激に伴い、HIV 曝露非感染者で発現が上昇し、感染者では逆に発現が低下する遺伝子二つを見出したが、これら二遺伝子は、染色体上で互いに隣接して、しかも逆向きに存在していた。一方、同じ染色体領域の SNPs の遺伝子型を群間で比較したところ、上記二遺伝子にごく隣接した二つの遺伝子領域、即ち *Card10* と *CDC42EPI* に連鎖した SNPs で、曝露非感染者群と HIV 感染者群間に有意な頻度差を認めた。そこで、曝露非感染者で発現上昇が見られる二つの遺伝子の調節領域を探ったところ、これら二つの遺伝子の構造領域の間に、エンハンサーと思われる二つの領域を見出した。しかも、これら二つのエンハンサー候補領域にはゲノム多型があり、互いにハプロタイプ関係をなす特定の遺伝子型が、曝露非感染者に集積していた。

このように、遺伝子発現と塩基配列多型から見た全てのデータが、第22染色体の特定部位におけるある特定の遺伝子型の存在が、HIV 曝露非感染状態と強く相関することを示している。この関連を明確な因果関係として確定するためには、エ

ンハンサー候補領域の多型が実際に遺伝子発現の差異に結び付くことを証明する必要があり、現在その検定を進めている。

2) 達成度について

本年度は3年計画の最終年度として、レトロウイルス中和抗体産生を制御するマウス遺伝子、及び HIV 曝露非感染状態を決定するヒト遺伝子の分子実体を明らかにすることを目標とした。

マウス遺伝子については、昨年度までに中和抗体産生系統と非産生系統とで、その発現に all-or-none の差がある遺伝子を見出し、両系統間のゲノム遺伝子構造に違いを認めたので、今年度トランスジェニックマウスの作製を開始した。これまでに、候補遺伝子を中和抗体産生系統から非産生系統である A/WySn マウスに導入したファウンダーマウスを複数樹立し、それらの末梢血で導入遺伝子の発現を確認した。最終確定には至っていないが、得られたファウンダーマウスを交配して多数の子孫を得ている最中であり、これらに FV を感染させることにより、間もなく中和抗体産生能導入の有無が検定できる予定である。

ヒト側については、HIV 曝露非感染状態を規定する宿主遺伝子の分子同定が最終段階に至ったと考える。マイクロアレイを用いた発現解析と、SNPs 遺伝子型解析による物理位置の絞り込みの結果が互いに一致し、曝露非感染者で発現上昇が見られる二つの遺伝子のエンハンサー領域に、新たなゲノム多型を見出した。このエンハンサー多型が発現上昇に結び付くか否かが焦点であり、現在最終的な検定を急いでいる。

3) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

これまで、HIV 感染成立後のエイズ病態発症経過に影響を与える宿主遺伝子は多数報告されてきたが、HIV 感染の成立そのものに影響を与える宿主遺伝子は、coreceptor の欠損に結び付く CCR5Δ32 のホモ接合以外知られていなかった。我々がその分子機構を解析してきた HIV 曝露非感染者は、特定の HIV 感染者と非防御的な性交渉を反復しながら、末梢血中に HIV ゲノムの存在が検出されず、にもかかわらず HIV 抗原特異的な T リンパ球反応や粘液抗体産生を示している。曝露非感染者では、HIV 抗原に対して極めて効率的な免疫応答が起こることにより、感染抵抗性が成立していると考えられ、その分子機構を明らかにすれば、感染防御ワクチンの効果増強や HIV 感染の免疫治療に結び付く可能性がある。

この研究の成果は、既に国際的に高い関心を

呼んでおり、宮澤は今年度アフリカウイルス学会に招聘され特別講演を行った。また、曝露非感染状態を決定する宿主遺伝子の同定に関する国際特許の出願を行い、複数の製薬企業から共同研究の申し出を受けている。

E. 結論

レトロウイルス中和抗体早期産生系統マウスから、この系統でウイルス感染後に強く発現し、中和抗体産生能を欠く A/WySn マウスでは発現を欠く遺伝子をクローニングし、A/WySn マウス受精卵に導入した。レンチウイルスベクターを用いることで、通常のマイクロインジェクション法が適用できない A/WySn マウスでもトランスジェニックマウスが樹立でき、末梢血での導入遺伝子発現を検出できた。

HIV 曝露非感染者で HIV 抗原刺激後に発現が上昇し、HIV 感染者では逆に発現が低下する遺伝子が第22染色体に存在する。これら遺伝子の近傍にある複数の単一塩基多型 (SNPs) について、その遺伝子型頻度が曝露非感染者群と HIV 感染者群で有意に異なる。また、上記発現誘導の異なる二つの遺伝子のエンハンサー領域と考えられる部位に、新規の SNPs を見出し、その特定のハプロタイプが HIV 曝露非感染者に集積していることを明らかにした。

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) Kida, Y., S. Tsuji-Kawahara, V. Ostapenko, S. Kinoshita, E. Kajiwara, H. Kawabata, T. Yuasa, I. Nishide, S. Yukawa, M. Ichinose, and M. Miyazawa. Increased liver temperature efficiently augments human cellular immune response: T cell activation and possible monocyte translocation. *Cancer Immunol. Immunother.*: in press, 2006.

2) Kawabata, H., A. Niwa, S. Tsuji-Kawahara, H. Uenishi, N. Iwanami, H. Matsukuma, H. Abe, N. Tabata, H. Matsumura, and M. Miyazawa. Peptide-induced immune protection of CD8⁺ T cell-deficient mice against Friend retrovirus-induced disease. *Int. Immunol.* **18**:183-198, 2006.

3) Mori, K., C. Sugimoto, S. Ohgimoto, E. E. Nakayama, T. Shioda, S. Kusagawa, Y. Takebe, M. Kano, T. Matano, T. Yuasa, D. Kitaguchi, M. Miyazawa, Y. Takahashi, M. Yasunami, A. Kimura, N. Yamamoto, Y. Suzuki, and Y. Nagai. Influence of glycosylation on the efficacy of an Env-based vaccine against SIV_{mac}239 in a macaque AIDS model. *J. Virol.* **79**:10386-10396,

2005.

4) 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* **19**:1015-1024, 2005.

2. 学会発表

1) Miyazawa, M., T. Yuasa, T. Ogawa, and H. Matsumura. Natural killer cells recognize mouse retrovirus-infected cells through NKG2D receptor and Rael ligand. **17th International Workshop on Retroviral Pathogenesis**. Saint-Malo, France, November 1-6, 2005. (Abstracts for the Workshop p51, 2005)

2) Miyazawa, M. Plenary Lecture: Host resistance genes in immunity against human and mouse retroviral infections. **Virology Africa 2005**. Cape Town, South Africa, November 8-11, 2005. (Abstracts p5, 2005)

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**. International Patent Application No. PCT/GB2005/005078 (Filed December 24, 2005).

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 特異的 CTL は、急性感染期には非常に強い抗ウイルス作用を示すにもかかわらず、慢性感染期には抗ウイルス作用が減弱することが知られている。しかしながら、こうした機能低下 CTL がどのようにして生体内で発生してくるのか明らかではない。本研究では、HIV-1 が CTL エスケープ変異を起こしたあとの CTL 応答に着目して、HIV-1 特異的 CTL 機能の広範な解析を多くの慢性 HIV-1 感染者について実施した。その結果、機能が低下した CTL サブセットは、HIV-1 の変異に呼応して新たに惹起された CTL で構成されていた。以上のことから、CTL エスケープ変異は単に既存の CTL から逃避するのみならず、低機能の新たな CTL サブセットを増やすことによって、これまで考えられていたよりもより積極的にエイズ病態の進行に関わることが明らかとなった。

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、慢性感染期には HIV 特異的 CTL は量的に十分存在するにもかかわらず、その抗ウイルス機能が低下しているという現象が報告されている。しかしながら、こうした CTL の機能低下がどのように起こるのか明らかになっていない。我々は、エイズ病態への早期の進行と相関することが知られている HLA-B35 拘束性の CTL 応答をモデルとして、CTL 機能と病態進行との関連を解析した。

B. 研究方法

(1) HIV-1 の遺伝子解析

国立国際医療センターで臨床症状がフォローアップされている HIV-1 慢性感染者 ($n=42$) から、血漿中の HIV-1 粒子を回収して、ウイルス RNA を調製した。cDNA 合成と領域特異的な PCR 法を用いて、HLA-B35 拘束性エピトープとその周辺領域の遺伝子配列を決定した。

(2) HIV-1 特異的 CD8 T 細胞の機能解析

国立国際医療センターで臨床症状がフォローアップされている HIV-1 慢性感染者のうち、HLA-B35 を有する 7 人の患者と HIV-1 に未感染の 5 人のボランティアから、末梢血単核球 (PBMC) を採取し凍結保存した。野生型と変異型エピトープペプチドを用いて調製した HLA-B35 テトラマーを用いて、凍結 PBMC を染色して、それぞれのエピトープに対する抗原特異的 T 細胞の頻度をフローサイトメトリーによって測定した (ex vivo assay)。また、同じ PBMC に対して野生型および変異型エピトープで抗原刺激を加えて、IL-2 存在下で 1 2 日間培養して、それぞれの抗原に特異的な T 細胞の増殖能力を評価した。

(3) 統計解析

本研究で得たデータは市販のコンピュータソフトウェアを用いて図表化した。有意差の検定は、スチューデントの t 分布に従う確率を両側分布を用いて計算した。

(4) 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（インフォームドコンセントを含む）に従って研究を進めている。

C. 研究結果

(1) CTL エスケープ変異

エイズ病態への早期の進行と相関することが知られている HLA-B35 拘束性 CTL 応答による選択圧が、生体内での HIV-1 の変異獲得に与える影響を集団レベルで明らかとするため、HLA-B35 を有する患者(12人)と有しない患者(30人)から HIV-1 を分離して、その遺伝子配列を解析した。その結果、Pol および Nef エピトープ領域では、エピトープ内に HLA-B35 陽性感染者に共通した変異を認めたが、Env エピトープには変異はなかった(図1)。一方、Env および Nef エピトープではエピトープの外側に HLA-B35 陽性感染者に共通した変異が認められた。

また、7人の HLA-B35 陽性患者では、経時的に血漿をサンプリングして HIV-1 の遺伝子配列を同定した。その結果、図1で認められた HLA-B35 で共通する変異は、個々の感染者で経時的に出現することが明らかとなった(データ未掲載)。これらの結果から、これらの変異は HLA-B35 拘束性 CTL 応答によって選択されたエスケープ変異であると示唆された。

(2) Nef とその変異エピトープに対する CTL 応答

これまでの研究から、Pol、Env、Nef エピトープのうち、Nef エピトープに対する CTL 応答が最も広範に HLA-B35 陽性の HIV 感染者で認められた。そこで、本研究では Nef の野生型エピトープ (RPQVPLRPMTY) と変異エピトープ (TPQVPLRPMTY) に対する CTL 応答の解析を行った(図2)。両エピトープを用いて調製した HLA-B35 テトラマーを用いて、7人の慢性 HIV 感染者(HLA-B35 陽性)の PBMC を染色して、

フローサイトメトリーで解析した。その結果、HIV 感染者では有意に両方のエピトープに対して特異的な CD8 T 細胞が検出された。両方のテトラマーに同時に染色される(交差反応性を有する)サブセットは認められなかった。変異エピトープが HIV-1 に感染経過後に出現したことを考えると、変異エピトープにのみ特異的な CD8 T 細胞サブセットは、変異型の HIV-1 を抗原として慢性感染期に新たに惹起された T 細胞であると考えられた。

(3) 変異エピトープ特異的 CTL の機能解析

HIV が CTL エスケープ変異を獲得しても、免疫系が新たな CTL を誘導して HIV に立ち向かうならば、結果として HIV-1 は CTL によって制御され、病態進行は遅延するはずである。Nef の変異エピトープに対して新たな CTL サブセットが誘導されるという図2のデータはこのことと矛盾する。そこで、変異エピトープに特異的な CTL サブセットは何らかの機能障害があるのでないかと仮定し、CD8 T 細胞の機能解析を行った。実際、慢性感染者の CD8 T 細胞は、傷害活性やサイトカイン産生能はあるにもかかわらず、抗原特異的な増殖能を示さないことが知られている。

まず、抗原刺激によるサイトカイン産生能を評価したところ、どちらのエピトープペプチドによる刺激でも、CD8 T 細胞の機能はほぼ同等であった(データ未掲載)。次に抗原刺激に対する増殖能を解析した。抗原刺激後12日間の培養をおこなったときの、抗原特異的 CD8 T 細胞 (HLA テトラマーに染色される細胞) の頻度の変化を指標として、T 細胞の増殖能を評価した(図3)。その結果、野生型エピトープに特異的な CD8 T 細胞サブセットは顕著な増殖を示したにもかかわらず、変異型エピトープに特異的な CD8 T 細胞サブセットはほとんど増殖応答を示さなかった。

D. 考察

HLA-B35 拘束性エピトープ領域の変異解析から、ほぼすべての感染者で CTL エスケープを起こすと考えられる変異を同定した。広範な CTL 機能の解析から、Nef エピトープでは変異エピトープに対する新たな CTL 応答がおこることが明らかとなったが、同時に新たに誘導された CD8 T 細胞は抗原刺激による増殖応答を示さないという機能障害を持った細胞群であった。これと同様な結果は、Pol エピトープでも認めれたことから(データ未掲載)、Nef エピトープに限定された現象ではなく、慢性感染者で広く認められる現象であると示唆された。

我々の結果は、CTL エスケープ変異は単に既存の CTL から逃避するのみならず、低機能の新たな CTL サブセットを誘導する“おとり抗原”としてはたらく、これまでに考えられていたよりもより積極的にエイズ病態の進行に関わることが明らかとなった。

E. 結論

本研究は、これまでに HIV 感染症で知られていた HIV 特異的 CTL の機能障害と、HIV-1 の CTL エスケープ変異をリンクさせ、慢性感染期の CTL の機能障害発生メカニズムを明らかにしたという点で非常に興味深い。このような HIV 特異的 CTL の機能障害をいかに防ぐか、あるいは CTL 機能をいかに回復させるかという新たな抗 HIV 免疫療法確立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) 上野貴将、滝口雅文：HIV に対する細胞傷害性 T 細胞の免疫応答, The Journal of AIDS Research, 7(3) 155-160, 2005

② 学会発表

- 1) Ueno T., Tomiyama H., Fujiwara M., Oka

S., and Takiguchi M.: Impaired responsiveness of HIV-specific CD8 T lymphocytes caused by high-affinity T cell receptor-ligand interactions. 12th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (Boston MA, USA), Feb. 22-25, 2005

- 2) 上野貴将、井手上結香、岡慎一、滝口雅文 (2005) HIV の抗原変異に対する細胞傷害性 T 細胞応答の解析 第 6 回熊本エイズセミナー (熊本) 平成 17 年 9 月 15 日
- 3) 上野貴将、井手上結香、岡慎一、滝口雅文 (2005) HIV の CTL エスケープ変異体に対する CTL の応答 第 53 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 平成 17 年 11 月 20 日-22 日
- 4) 上野貴将、井手上結香、岡慎一、滝口雅文 (2005) 抗 HIV 活性を喪失した HIV 特異的な細胞傷害性 T 細胞の解析 第 19 回日本エイズ学会学術集会(熊本)12 月 1 日~3 日
- 5) 上野貴将、滝口雅文 (2005) HIV の CTL エスケープ変異と変異体に対するヒト CTL 応答の解析 第 35 回日本免疫学会学術集会(横浜)12 月 13 日~15 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

図1 HLA-B35 拘束性エピトープと CTL エスケープ変異

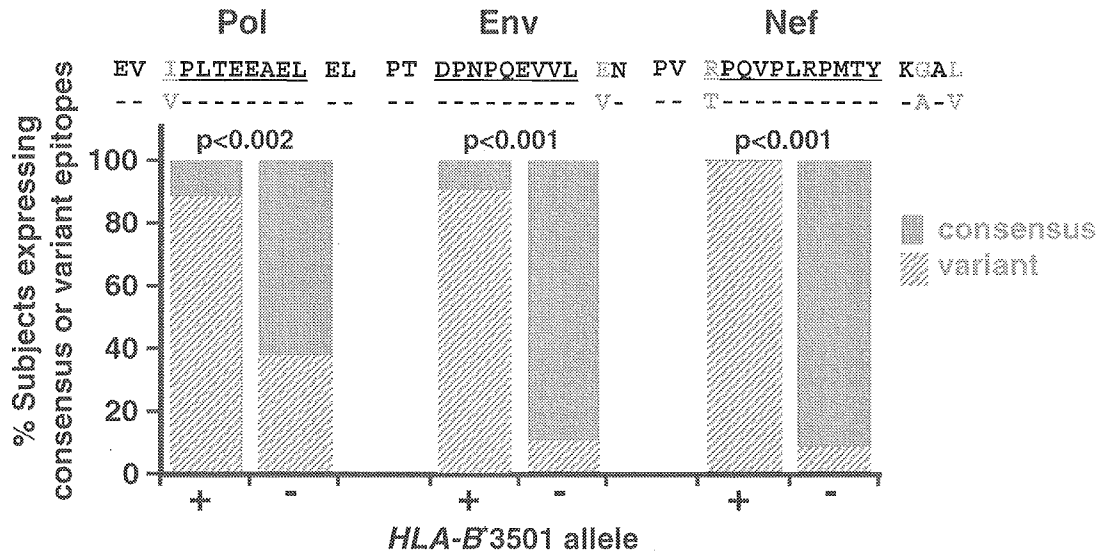


図2 野生型および変異型 Nef エピトープに特異的な CD8 T 細胞応答の ex vivo 解析

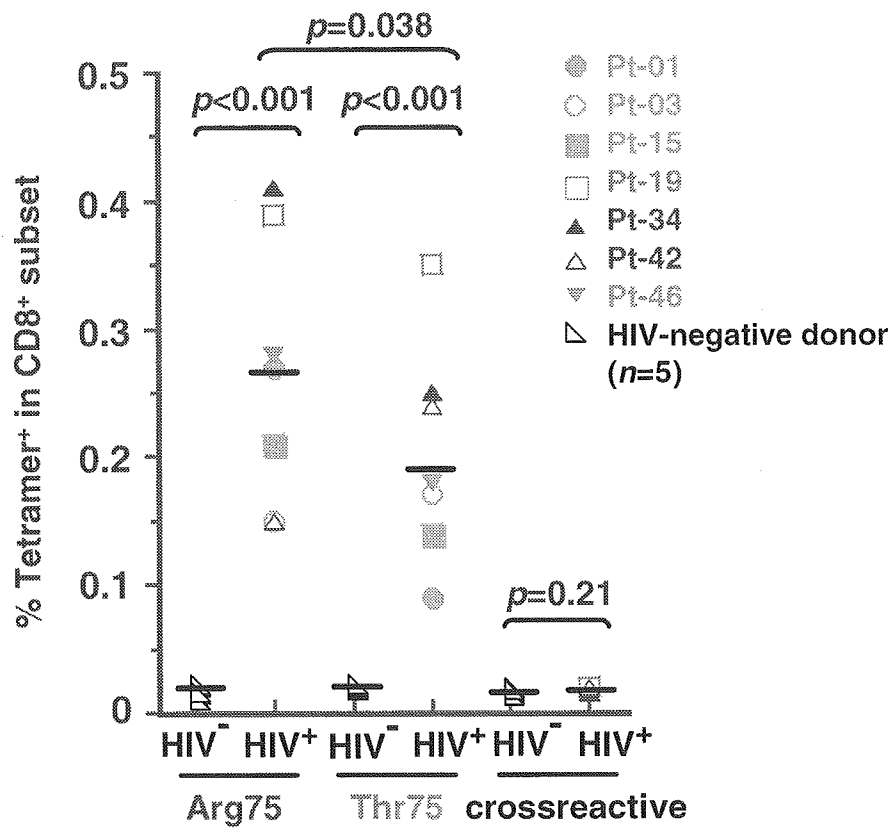
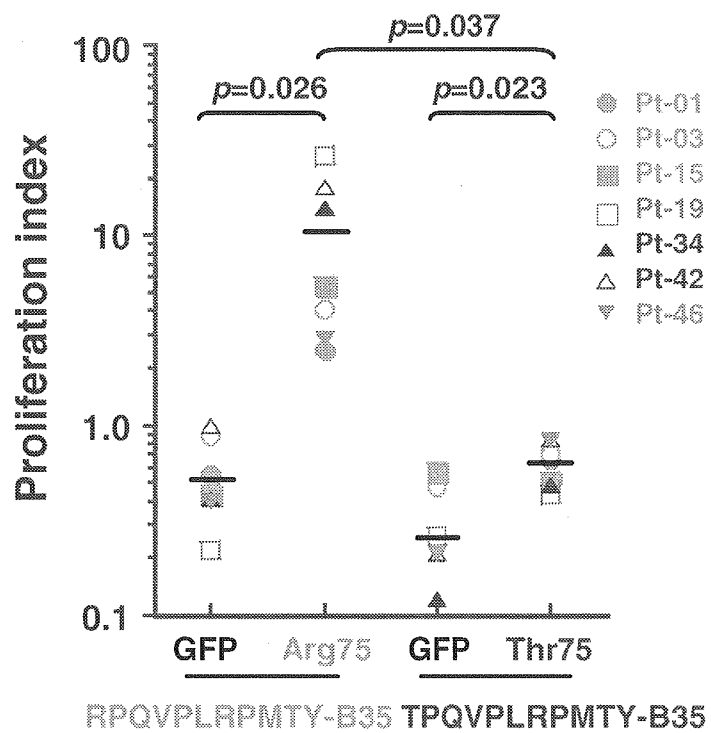


図3 野生型および変異型 Nef エピトープに特異的な CD8 T 細胞応答の抗原刺激による増殖応答の解析



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。本年度は広範囲の分離株に対して中和活性を持つ V3-tip に対する中和単クローン抗体を用いて、臨床分離株に *in vitro* でエスケープ変異を誘導し、中和感受性に影響する変異について詳細に調べた。低濃度の中和抗体存在下では、gp120 の V2 領及び C3 領域に変異を有する中和抵抗株の選択的増殖が起こり、さらに高濃度の抗体の存在下には反応エピトープである V3 の変異が観察された。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考えられる。

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。本年度は広範囲の分離株に対して中和活性を持つ、V3-tip に対する中和単クローン抗体を用いて、臨床分離株に *in vitro* でエスケープ変異を誘導し、中和感受性に影響する変異について詳細に調べた。

B. 研究方法

CCR5 高発現 T 細胞株である PM1/CCR5 細胞を用い R5 の primary isolate のひとつの MOKW 株を V3-tip に対する中和単クローン抗体である KD-247 存在下に培養し、逃避ウイルスの誘導を試みた。その結果得られた逃避ウイルスを用いて、抗体の耐性度を PM1/CCR5 細胞を用いた MTT assay により判定した。また同時に、得られた逃避ウイルスの各 passage における envelope の sequence を行った。sequence の結果から、逃避能付与責任変異部位の特定を行い、site-directed mutagenesis 法により変異アミノ酸を導入したエンベロープを持つ pseudotype ウイルスを作製し

た。この pseudotype ウイルスを GHOST-hi5 細胞に感染させて、様々な抗体濃度でルシフェラーゼ活性を測定した（single-round replication assay）。また、プロテアーゼ阻害剤（PI）、核酸系逆転写酵素阻害剤（NRTI）などや、現在開発が進められている CCR5 阻害剤において逃避ウイルスにおける感受性の違いを測定した。

（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病院の先進医療審査委員会にて審査され、了承されている。

C. 研究結果

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 V3-tip に対する中和単クローン抗体である KD-247 存在下に臨床分離株 MOKW を培養し、中和エスケープウイルスを誘導した。抗体濃度を 10 μ g/ml から始めて 200 μ g/ml（5-passage）まで上げたところで、MOKW 株の gp120-V2 および C3 に変異がはいった株が出現し、さらに 2 mg/ml（9-passage）まで抗体濃度を上げると、100% のウイルスにおいて -GPGR- から -GLGR- に置き換わる V3-tip の変異が認められた。

これらの変異をたどっていくと、V2 及び C3 の変異は 1-passage の段階から認められた。経過を追うと、C3 の変化はその後低下したが、V2 の変化は 5-passage 以降は 100% の株に認められた。一方、V3 の変異は抗体濃度が比較的高濃度 (1 mg/ml) の 8-passage に急に出現し、9-passage で 100% となった。KD-247 に対する感受性を MTT assay で測定すると、野生株の MOKW の IC₅₀ が 0.15µg/ml と感受性であったのに対し、5-passage ウイルスは、16µg/ml であり、9-passage ウイルスでは >100µg/ml と KD-247 の中和に対して完全耐性となっていた。この逃避ウイルスは既存の抗 HIV 薬である、プロテアーゼ阻害剤 (NFV, IDV, APV, SQV) や核酸系逆転写酵素阻害剤 (ddI, 3TC) に対しては感受性の変化は見られなかったが、CCR5 阻害剤 (TAK-779, SCH-C, AK-602)、rsCD4 や anti-CCR5 monoclonal 抗体 (2D7) に対しては、感受性になっていた。V2, C3 及び V3 の変異を、それぞれ Wild type envelope に導入した pseudotype ウイルスを作成し、single-round replication assay にて検討した。V3 抗体である KD247 および 447-52D に対する中和感受性を比較すると、C3 mutant だけでは中和抵抗性にならなかったが、V2 の変異導入で部分的な中和抵抗性、V3 の変異で完全な中和抵抗性が観察された。

D. 考察

HIV に対する中和抗体が存在しながらウイルスが増殖し続ける理由として、さまざまな中和抵抗性のメカニズムが提唱されてきた。中和エプトープの中でも V3 領域は変異原性が強く、比較的保存されている V3-tip 領域についても、さまざまな変異が報告されている。一方、特に臨床分離株に関して、V3 の反応エプトープは保存されているながら、中和抵抗性となる理由が研究されている。その中には、臨床分離株では糖鎖が抗体のエプトープに対する accessibility を阻害しているという説や、原因は不明ながらウイルス膜上では V3 エプトープが隠れているのではないかという説がある。今回我々の研究は、V3 抗体の反応エプトープは保存されているながら、V2 の特定のアミノ酸の変化が中和抵抗性に関係すること示した。この変異は抗体でのセレクションの早期に出現したことから、臨床分離株の中に minor population として存在したと考えられる。一方、V3 の変異は中和抗体の強力な

選択圧の結果誘導されたものと考えられる。このように、臨床分離株では中和感受性の異なるウイルスがもともと含まれており、低濃度の中和抗体の存在下にはこれらが選択的に増殖し、高濃度の抗体の存在下では新たに V3 変異体が進化して出現することが考えられた。

E. 結論

我々は、V3 を含んだ立体構造エプトープに対する抗体の中和抵抗性メカニズムとして、gp120 の V2, C3 および V3 領域が関与することを示した。今回の実験の結果から、中和抗体濃度が低いときは V2 や C3 の変異を用いてエスケープするが、抗体濃度が高いときは V3 の変化で中和を逃れると考えられた。V3 の変異はケモカインレセプターのアフィニティーを低下させると考えられ、抗体濃度が低いときは V3 以外の変異を持つ中和抵抗性ウイルスが選択的に増殖すると考えられる。多くの場合自己の分離株に対する中和抗体活性は弱く、*in vivo* では V3 の変異ではなく、その他の領域の変異が、中和抗体からのエスケープに関与していることを示唆する。

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.* 33: 188-193, 2005.
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 ganp gene- transgenic mouse. *J. Immunol.* 174 : 4485-4494, 2005.

2) 学会発表 (国際学会)