

HIV-1 曝露非感染者と HIV 感染者の間で有意に異なることを示してきた。そして、マイクロアレイを用いた網羅的な候補領域遺伝子発現の比較解析と、SNPs によるゲノム塩基配列の比較により、HIV-1 曝露非感染状態を規定すると考えられる宿主ゲノム要因をかなりの程度に絞り込むことに成功した。

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。アレイによる発現解析のデータを個体間で、あるいは刺激後の時間ごとに比較する際には、複数のハウスキーピング遺伝子について、それぞれ多数のプローブを設け、それらの蛍光強度を、Loess 関数を用いて正規化する方法が有効であった。

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。

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 F<sub>1</sub> 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。

## 2) 達成度について

我々は過去 3 年間の研究期間を通じて、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てきた。

マウス遺伝子については、平成 16 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、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ていながら、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て、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<sup>+</sup> 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<sub>mac</sub>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.

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

6) 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.

7) 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.

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

9) 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., 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)

3) 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.

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. 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.

5) Miyazawa, M. Genetic basis for resistance against retroviral infections: mouse models to gene chips. **Thai NIH, Lampang Hospital, Milano University, Kinki University Joint Meeting on Resistance to HIV Infection and Disease Progression**. Nonthaburi, Thailand. October 13-14, 2003.

6) 小川達也、湯浅貴恵、松村治雄、宮澤正顯. マウスレトロウイルス感染初期におけるNK細胞の活性化機構. 第33回日本免疫学会総会・学術集会(福岡). 2003年12月8-10日. 日本免疫学会総会・学術集会記録 **33**:145, 2003.

7) 河俣浩之、河原(辻)佐智代、宮澤正顯. マウスレトロウイルスの持続感染を制御する宿主因子. 第33回日本免疫学会総会・学術集会(福岡). 2003年12月8-10日. 日本免疫学会総会・学術集会記録 **33**:298, 2003.

8) 菅原大輔、河原(辻)佐智代、宮澤正顯. マウスレトロウイルス Gag 蛋白上の感染防御エピトープの同定. 第33回日本免疫学会総会・学術集会(福岡). 2003年12月8-10日. 日本

免疫学会総会・学術集会記録 **33**:298, 2003.

## 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).

2) 宮澤正顯、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

3) Miyazawa, M. and M. Clerici, *inventors*. **Marker Genes**. International Patent Application No. PCT/GB2003/004493.

## 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：CTL は HIV 感染細胞の排除に大きな役割を担うが、HIV は CTL 応答からさまざまな方法で逃避することが知られている。CTL の抗ウイルス機能を持続させられれば、化学療法に頼らず、個々の患者が内在する免疫力によって病態進行の制御が可能である。本研究では、病態進行と関連する HLA-B35 拘束性の CTL 応答をモデルとして、HLA クラス I テトラマー技術を駆使して HIV 特異的 CTL の生体内での機能を総括的に解析した。その結果、HIV 慢性感染者で見られる CTL 機能の低下は、（1）もともと機能が低い CTL が慢性感染期に新たな増えること、（2）抗ウイルス機能が低下した CTL は、CTL エスケープ変異に応答して新たにリクルートされた CTL であることを明らかとした。このことから、慢性感染者では抗ウイルス機能に優れた CTL 応答を新たに誘導することは困難であり、エイズ発症阻止を達成するためには既存の HIV 特異的 CTL の機能を回復させる免疫療法が期待される。

### 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 から逃避することが知られている。CTL の抗ウイルス機能を持続させられれば、化学療法に頼らず、個々の患者が内在する免疫力によって病態進行の制御が可能である。本研究では、HLA クラス I テトラマー技術を駆使して HIV 特異的 CTL の生体内での機能を徹底的に解析する。HIV が CTL の攻撃を回避する機序、および慢性感染者で CTL 機能が低下する原因を解明する。そして、その機序を働きにくくしてエイズ発症阻止につながる新たな方法の確立を目指す。

### B. 研究方法

#### （1）対象患者

エイズ病態の早期進行と関連することが知られている HLA クラス I アリルである HLA-B35 をモデルとして研究を進めた。国立国際医療セ

ンターにおいて（共同研究：岡慎一先生）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る HIV 慢性感染者を対象とした。対象患者からインフォームドコンセントに基づき、血液を採取して、ウイルス RNA およびリンパ球を調製した。

#### （2）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。

#### （3）HLA テトラマーによる HIV 特異的 CD8 T 細胞の解析

HLA-B35 拘束性 CTL エピトープについて、clade B consensus 配列および CTL エスケープ変異型を元にペプチドを化学合成した。これら

のペプチドを、大腸菌で生産した HLA-B35 重鎖タンパク質と  $\beta$ 2ミクログロブリンとともに、*in vitro* で巻き戻して、可溶性のペプチド・HLA-B35 複合体を調製した。この複合体をビオチン化後、蛍光標識されたアビジンと 4 対 1 の割合で混合して、HLA テトラマーを作成した。HLA テトラマーを用いて、HIV 感染者から採取した  $2 \times 10^6$  細胞数の末梢血単核球 (PBMC) を抗 CD8 抗体とともに染色し、フローサイトメトリーで解析して、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。

#### (4) HIV 特異的 T 細胞レセプターの解析

感染者から分離した HIV 特異的 CTL 株を用いて、限界希釈法により CTL クローンを樹立した。CTL クローンから mRNA を調製し、SMART システム (クローンテック) を用いて、TCR の  $\alpha$  および  $\beta$  鎖の遺伝子配列を解析した。また、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。

#### (5) HIV-1 特異的 CD8 T 細胞の機能解析

細胞傷害活性は、C1R-B3501 細胞をターゲットとして、通常のコロミウム放出法により測定した。サイトカイン産生能は、CD8 T 細胞を抗原ペプチドで刺激し、6 時間後に細胞内染色を行って、抗原特異的に放出されるサイトカイン ( $\text{IFN}\gamma$  や  $\text{TNF}\alpha$ ) をフローサイトメトリーによって測定した。CD8 T 細胞の増殖能は、PBMC を抗原ペプチドで刺激し、IL-2 存在下で 12 日間培養後、HLA テトラマーを用いて抗原特異的な CD8 T 細胞の頻度変化を測定した。

#### (6) 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。

#### (7) 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た。

### C. 研究結果

(1) 生体内での HIV 特異的 CTL の機能低下  
HIV 慢性感染者では、HIV 特異的 CTL の抗ウイルス機能が低下することが知られている。もともと機能的であった個々の CTL が機能低下を起こすのか、あるいは機能が低下した CTL サブセットが存在し、その相対的な量が増えるために結果として全体の CTL 機能が低下してしまうのか明らかではなかった。そこで、HIV 慢性感染者の PBMC を HLA テトラマーと T 細胞レセプターに対する抗体で染色して、同一の抗原特異性 (Pol エピトープ: IPLTEEAEL) を持つ CD8 T 細胞をさらに T 細胞レセプター ( $\text{V}\alpha 12$  と  $\text{V}\delta 1$ ) の異なる亜集団に分けた (図 1)。 $\text{V}\alpha 12$  を持つ CTL は HIV 感染細胞を顕著に傷害したが、 $\text{V}\delta 1$  を持つ CTL は全く傷害活性を持たなかった。さらに、患者 PBMC を経時的に解析したところ、抗ウイルス機能が低下した  $\text{V}\delta 1$  の数が増えており、逆に機能的な  $\text{V}\alpha 12$  は減少していた。このことから、生体内での CTL 機能の低下は、もともと抗ウイルス機能が低い CTL サブセットが何らかの理由で相対的に増えるために起こることが明らかとなった。

#### (2) 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2)。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2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)。また、HLA-B35 拘束性の他のエピトープ領域でも同様の変異が認められた。

HLA-B35 拘束性 CTL エピトープは、ほぼすべてが HIV が変異を獲得しやすい領域に位置していることが分かった。

(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3の HLA テトラマーを用いた *ex vivo* での解析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。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(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

本研究では、エイズ病態の早期進行と関連する HLA-B35 アリルをモデルとして、ウイルス学的、免疫学的方法を駆使して、慢性感染期における CTL 応答とその抗ウイルス機能、病態進行への影響を総括的に明らかにした。本研究で得た主な成果は下記の3点である。

(1) ほぼすべての HLA-B35 拘束性エピトープで HIV は変異を獲得する。すなわち、HIV が容易に変異を獲得できる領域が HLA-B35 拘束性 CTL のターゲットとなっているため、HLA-B35 は病態進行を抑える能力が弱いと考えられた。

(2) CTL 機能の低下は個々の T 細胞クローンレベルで起こる。すなわち、抗ウイルス機能に優れた CTL が徐々にその活性を失っていくのではなく、もともと機能が低い CTL が慢性感染期に新たな増えることが分かった。

(3) 抗ウイルス機能が低下した CTL は、CTL エスケープ変異に反応して新たにリクルートされた CTL である。すなわち、HIV の CTL エスケープ変異は、既存の CTL 応答から単に逃避するだけでなく、抗ウイルス機能の低下した CTL を新たに惹起することによって、さらに病態進行を早めさせると示唆された。

## E. 結論

病態進行後に惹起される CTL は抗ウイルス機能が低下しているという結果は、治療用ワクチンの研究開発に大きな示唆を与える。単純に抗原を投与して CTL 応答を誘導する方法では有効性が期待できないと示唆される。病態進行者に対しては免疫系機能を回復させるサイトカインなどを用いた方法との併用が好ましいと考えられる。また、HIV 以外の抗原に特異的な CTL (HIV に感染する前から生体内で機能していた CTL 集団) では、その機能が維持されていることが報告されている。このような機能型 CTL を取り出して HIV 特異的 T 細胞レセプ

ター遺伝子を導入して、抗原特異性を変換してから、生体内に戻すというような遺伝子治療と免疫療法を併用した新しい取り組みが期待される。

#### F. 研究発表

##### ① 論文発表

- 1) Ueno T., Tomiyama H., Fujiwara M., Oka S., and Takiguchi M. HLA class I-restricted recognition of an HIV-derived epitope peptide by a human T cell receptor  $\alpha$  chain having a V $\delta$ 1 variable segment. *Eur. J. Immunol.* 33; 2910-2916, 2003.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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
- 6) 滝口雅文: T 細胞による HIV-1 の増殖, 臨床免疫 42(3):369-374, 2004
- 7) 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., Takiguchi M. HIV-specific cytotoxic T lymphocyte clone unable to kill HIV-infected cells shows increased binding capacity to peptide-HLA complex. The Second International AIDS Society Conference on HIV Pathogenesis and Treatment (Paris, France) July 13-16, 2003
- 2) Takiguchi M. HIV-1 escape from HIV-1-specific CD8 T cells in individuals with HIV-1 infection. 7th Asia-Oceania Hitocompatibility Workshop and Conference (Karuzawa, Japan) September 16-19, 2003
- 3) Takata H., Tomiyama H., Takiguchi M. Characterization of HCMV-specific CD8 T cells using HLA-A\*02 tetramers. 7th Asia-Oceania Hitocompatibility Workshop and Conference (Karuzawa, Japan) September 16-19, 2003
- 4) Takiguchi M. HIV-1 escape from HIV-1-specific CD8 T cells in individuals with HIV-1 infection. International symposium "Infection and Immunity" in annual meeting of Japanese Society of Immunology (Fukuoka, Japan) December 8-10, 2003
- 5) 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

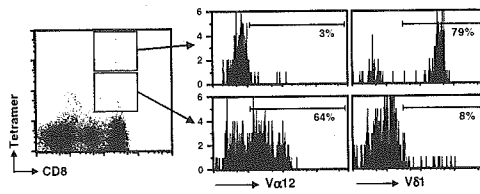
- 6) 上野貴将 (2004) HIV の変異と T 細胞レパートリーのダイナミクス. 第52回日本ウイルス学会学術集会(横浜)11月21-23日
- 7) 上野貴将 (2004) 抗原変異がT細胞レパートリーに与える影響. 第34回日本免疫学会総会・学術集会(札幌)12月1-3日
- 8) 上野貴将, 藤原守, 井手上結香, 富山宏子, 滝口雅文 (2004) T細胞レセプター導入による新たな免疫療法の検討. 第18回日本エイズ学会学術集会(静岡)12月9-11日
- 9) 上野貴将 (2004) T細胞レセプターによるHIV抗原の認識機構 第27回日本分子生物学会年会(神戸)12月8-11日
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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

G. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし



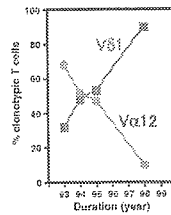
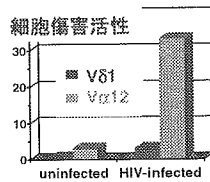
図1: HIV特異的CTLの機能低下は、T細胞レセプターに依存する

HIV慢性感染者のPBMCを同一の抗原特異性を持つCTLをT細胞レセプター(V $\alpha$ 12とV $\delta$ 1)の違いでさらに分けた。



V $\alpha$ 12は、HIV感染細胞を傷害するが、V $\delta$ 1は傷害しなかった。

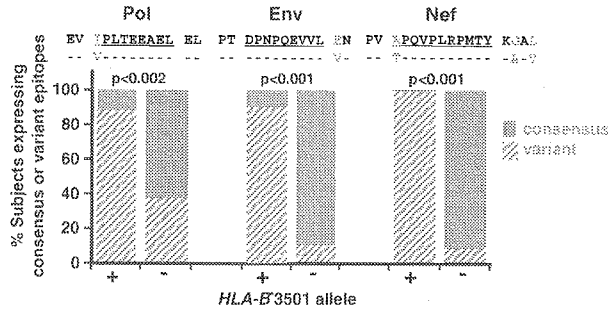
HIV感染者の生体内では、抗ウイルス活性の低いV $\delta$ 1が経時的に増えていた。



結論:  
生体内でのCTL機能の低下は、個々のCTLの機能が低下するのではなく、抗ウイルス活性の低いCTLが相対的に増大することによって起きる。

図2: HIVのCTLエスケープ変異を集団レベルで同定

アメリカを中心とした大規模コホートの解析から、HLA-B35はエイズ進行と相関するHLAアリルであることが知られている。そこで、病態進行にかかわるCTLエスケープの影響を明らかにするため、HLA-B35拘束性エピトープ領域の変異を42人の慢性感染者から分離したHIV-1を用いて解析した。



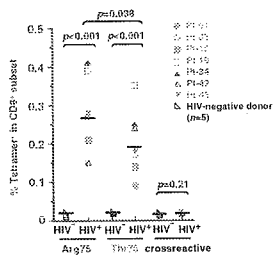
結論: ほぼすべてのエピトープ領域でHLA-B35陽性患者に特有のCTLエスケープ変異を見出した。しかし、病態進行との関連を明らかにするにはCTL機能の解析が必要と考えられた(翌年度に実施)。

### 図3: エスケープ変異が生体内のCTL機能をさらに低下させる

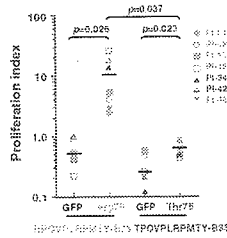
問題: もし変異体に対して新たなCTL応答を獲得できるなら、エスケープ変異は大きな問題にならないはず。なぜ変異によってHIVに対するCTL応答が低下してしまうのか?

Nefエピトープをモデルとして、7人の慢性感染者のCTL機能を解析した。  
 RPQVPLRPMTY(野生型)  
 TPQVPLRPMTY(エスケープ変異)

テトラマー染色結果から、変異エピトープに対する新たなCTL応答が確認された。



変異体に特異的なCTLは抗原特異的な増殖応答を持たない機能的に未熟なCTLであった。



結論:  
 CTLエスケープ変異は、CTLから単に逃避するだけでなく、抗ウイルス機能が低い新たなCTLを惹起することによって、より積極的に病態進行に関与する。

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
（総合）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、長期非進行症例にみられるような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。これらのデータに基づき、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 領域に変異をもつ中和抵抗性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。

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

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ような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。臨床例のウイルスリバウンド時に見られる中和抵抗ウイルスの研究に加えて、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、中和感受性変異について詳細に調べた。

B. 研究方法

HAART 療法中の 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。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で審査され、了承されている。

### C. 研究結果

我々は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、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 down stream 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。これらの組み換えエンベロープをさらに pLP-env-IRES-EGFP ベクターに組み替えて発現を標準化した後に FACS 分析で単クローン抗体に対する反応性を比較すると、中和感受性のある r10 と V3/C3 への結合活性は C3 や p10 より反応性が高い傾向があった。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 (KNIp20) とリバウンド時のウイルス (KNIr1) と KNIp20 の C3 のみ KNIr1 由来のシーケンスにおきかえた 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 V3-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 KNIr1 のほうが KNIp20 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わかるため、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た。

我々はまた 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  $10\mu\text{g/ml}$  から始めて  $200\mu\text{g/ml}$  (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  $2\text{mg/ml}$  (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 ( $1\text{mg/ml}$ ) 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  $\text{IC}_{50}$  が  $0.15\mu\text{g/ml}$  と感受性であったのに対し、5-passage ウイルスは、 $16\mu\text{g/ml}$  であり、9-passage ウイルスでは  $>100\mu\text{g/ml}$  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 KD-247 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 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。中和エピトープの中でも 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きた。一方、臨床分離株に関しては、V3 の反応エピ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きた。その中には、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、原因は不明ながらウイルス膜上では V3 エピトープが隠れているのではないかという説がある。今回我々の研究は、V3 抗体の反応エピ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

In vivo における中和エスケープ変異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。我々は V3

を含んだ立体構造エピトープに反応する抗体に対する中和抵抗性に gp120 の V2, C3 および V3 領域の変異が関与することを証明した。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 の変異を用いて中和をエスケープするが、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 の変異よりむしろ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. Yoshimura, K., Ido, E., Akiyama, H., Kimura, T., Aoki, M., Suzuki, H., Mitsuya, H., Hayami, M., Matsushita, S. The impact of highly active antiretroviral therapy by the oral route on the CD8 subset in monkeys infected chronically with SHIV<sub>89.6P</sub>. *J. Virological Methods*. 112:121-128, 2003.
2. Koito A, Kameyama Y, Cheng-Mayer C, Matsushita S. Susceptibility of mink (Mustelavision)-derived cells to replication by human immunodeficiency virus type-1. *J. Virol.*, 77:5109-5117, 2003.
3. Koito, A., Shigekane, H., and Matsushita, S. Ability of small animal cells to support the postintegration phase of human immunodeficiency virus type-1 replication. *Virology*, 305:181-191, 2003.
4. 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.
5. 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)

1. Matsushita S., Kimura T., Shirai N., Koito A., Yoshimura K.: Evaluation of residual viral replication for optimization of HAART. 1<sup>st</sup> International Workshop on HIV Persistence during Therapy. 12.10-12, 2003, Saint Martin, FWI.
2. Yoshimura K, Kimura T, Matsushita S: Proviral DNA (pDNA) and turn over levels in HIV-1-positive long-term non-progressors (LTNPs). 2003 International Meeting of the Institute of Human Virology. 9.29-10.3 2003, Baltimore, U.S.A.
3. Matsushita S. Status of HIV/AIDS in Japan. International Symposium of the Foundation of East Asia Network on HIV. 9.26, 2003, Seoul, Korea.
4. Matsushita S.: Anti-HIV immunity of patients with long-term viral suppression by HAART. U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program 15<sup>th</sup> Joint Meeting of the AIDS Panels, 3.5-7, 2003, Okinawa.
5. 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.
6. 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.
7. Kenai, A., Kimura, T., Yoshimura K., Koito, A., Matsushita, S.: Efficient induction of both cellular and humoral immune responses by immunization with Tat-Nef fusion protein (tNEF) without adjuvants. XV International AIDS Conference Bangkok, 2004.7.11-16, Bangkok, Thailand.
8. 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.
9. 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.
10. Shibata, J., Yoshimura, K., Honda A., Murakami, T., Koito, A., and Matsushita S.: A Role of Mutations in Non-V3 Envelope Regions for Escape from a Broad Neutralizing Anti-V3 Monoclonal Antibody, KD-247, during *in vitro* Selection. 13<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Denver, USA, Feb.4-9, 2006.
11. Yoshimura, K., Shibata, J., Honda A., Murakami, T., Mitsuya, H., Koito, A., and Matsushita S.: Resistance Profile of A Novel Broadly Neutralizing Anti-HIV Monoclonal Antibody, KD-247 That Has Favorable Synergism with Anti-CCR5 Inhibitors *In Vitro*. 13<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Denver, USA, Feb.4-9, 2006.
12. Matsushita S., Honda A., Shibata, J., Kimura T., Ikeda, T., Koito, A., Yoshimura, K.: HIV-1 proviral DNA dynamics in patients with long-term successful HAART. 2<sup>nd</sup> International Workshop on HIV Persistence during Therapy. 12. 6-9, 2005, Saint Martin, FWI.
13. Matsushita S., Shibata, J., Yoshimura, K., Maeda, Y., Murakami, T., Atsushi Koito, Honda, M., Mitsuya, H., Eda, Y. : Development of broadly reactive neutralizing monoclonal antibody KD247: implication for passive immunotherapy. The cooperative research project on clinical and epidemiological studies of emerging and re-emerging infectious diseases, Aso, Japan, Sep. 15-16, 2005.

14. Yoshimura K., Shibata, J., Ikeda, T., Honda A., Koito, A., Matsushita, S.: HIV-1 proviral DNA dynamics in patients with long-term successful HAART. International Symposium, The Cooperative research Project on Clinical and Epidemiological Studies of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, 2005. 9.15-16. Kumamoto.
15. Shibata, J., Yoshimura K., Maeda, Y., Murakami, T., Eda. Y., Koito, A., Matsushita, S.: In vitro induction of human immunodeficiency virus type 1 variants resistant to a novel broad neutralizing anti-HIV monoclonal antibody, KD-247. International Symposium, The Cooperative research Project on Clinical and Epidemiological Studies of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, 2005. 9.15-16. Kumamoto.
16. Ikeda, T., Shibata, J., Honda A., Yoshimura K., Koito, A., Matsushita, S.: Relationship of residual HIV-1 and the integration sites in patients on prolonged and effective HAART. International Symposium, The Cooperative research Project on Clinical and Epidemiological Studies of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, 2005. 9.15-16. Kumamoto.
17. Yoshimura K., Honda A., Kenai, A., Shibata, J., Koito, A., Matsushita, S.: Proviral DNA and Turnover Levels in Aviremic Long-Term Non-Progressors (LTNPs); A Temporary Goal for Patients under HAART. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. 2005. 7. 1-5. Kobe.
18. Matsushita, S., Honda A., Kenai, A., Shibata, J., Koito, A., Yoshimura K.: Long-Term Follow-Up Study for the Change of the Reservoir for HIV-1 on Highly Active Antiretroviral Therapy. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. 2005. 7. 1-5. Kobe.
- HIV-1-positive long-term non-progressors (LTNPs). 第 17 回日本エイズ学会学術集会・総会、11.27-29, 2003, 神戸
2. 木村哲也、吉村和久、祁内 梓、小糸 厚、松下修三: HIV エンベロープ C3 変異による抗 HIV 中和抗体からの逃避. 第 17 回日本エイズ学会学術集会・総会、11.27-29, 2003, 神戸
3. 祁内 梓、木村哲也、吉村和久、小糸 厚、松下修三: HIV-nef 融合蛋白を用いた細胞性・液性免疫の誘導. 第 17 回日本エイズ学会学術集会・総会、11.27-29, 2003, 神戸
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 松下修三: シンポジウム・HIV/AIDS の臨床における最近の問題点・イントロダクション. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005.12.1-3. 熊本.
10. 吉村和久、柴田潤二、池田輝政、小糸厚、松下修三: HAART により長期間ウイルスが抑制された症例の pDNA の推移. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005.12.1-3. 熊本.
11. 柴田潤二、吉村和久、前田洋助、村上俊夫、小糸厚、松下修三: 広範囲 HIV-1 中和単クローン抗体の in vitro 逃避ウイルスの誘導と解析. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005.12.1-3. 熊本.
12. 池田輝政、柴田潤二、吉村和久、小糸厚、松下

(国内学会)

1. 吉村和久、木村哲也、松下修三: Proviral DNA (pDNA) and turnover levels in



- 修三：長期間 HAART 有効症例における残存 HIV と integration site の関連性. 第 19 回日本エイズ学会学術集会. 2005.12.1-3. 熊本.
13. 松下修三：A broadly reactive neutralizing antibody and evolution of escape mutants in vitro. 第 8 回白馬シンポジウム in 鹿児島—エイズ治療の最前線—.2005.11.3-4.鹿児島.
  14. 柴田潤二、吉村和久、前田洋助、村上利夫、江田康幸、小糸厚、松下修三： 広範囲 HIV-1 単クローン抗体の in vitro 逃避ウイルスの誘導と解析.第 8 回白馬シンポジウム in 鹿児島-エイズ治療の最前線-.2005.11.3-4.鹿児島.
  15. 柴田潤二、吉村和久、小糸 厚、松下修三：ヒト免疫不全ウイルス 1 型 gp120 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. 第 53 回日本ウイルス学会総会、横浜、2005.11.20-22.
  16. 柴田潤二、吉村和久、前田洋助、村上利夫、江田康幸、小糸厚、松下修三： 広範囲 HIV-1 単クローン抗体の in vitro 逃避ウイルスの誘導と解析. 第 6 回熊本エイズセミナー. 2005.9.15. 熊本.

知的所有権の出願・取得状況：

特になし

エイズ発症阻止に関する研究

分担研究者	竹森 利忠	国立感染症研究所免疫部部長
研究協力者	阿戸 学	国立感染症研究所免疫部研究員
	藤猪 英樹	慶応大学医学部助手・感染研協力研究員
	高橋 宜聖	国立感染症研究所免疫部主任研究官
	橋本 修一	国立感染症研究所免疫部研究員
	加地 友弘	国立感染症研究所免疫部研究員
	横田 恭子	国立感染症研究所免疫部室長
	大竹かおり	国立病院機構名古屋医療センター内科医師
	足立 昭夫	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部教授

研究要旨

これまでに主として T 細胞株を用いた実験から HIV nef の T 細胞機能に対する効果が報告されているが、より生物学的な系での検証が必要である。我々はこの問題について、OVA 特異的 T 細胞レセプターを発現し、コクサキ・アデノウイルス受容体を共発現した double Tg マウスより精製した CD4<sup>+</sup> T 細胞に、nef 組込みアデノウイルスを感染させ、nef 発現による T 細胞の機能と性状を解析した。この結果、Nef 発現により T 細胞の抗原刺激に対する反応性が低下し、生体内での抗原刺激に対応した所属リンパ節への移動が阻害されることが示唆された。更に、nef 発現により抗体産生に対する CD4<sup>+</sup> T 細胞のヘルパー機能が抑制される可能性が示唆された。この際 CD4 抑制機能を失った nef を発現すると抑制効果は減弱することから、nef 発現による T 細胞機能異常の一部は CD4 発現抑制に影響されることが示唆された。

A. 研究目的

HIVnef はウイルス感染後の病態発症の主要要因の一つとして考えられ、これまで主として T 細胞株を用いた解析から、HIVnef 発現により CD4 と MHC class I 分子の発現が抑制されることが知られ、HIV 感染細胞の免疫系からの逃避の一つの原因となることが予測され、また感染細胞に抗アポトーシス活性が賦与され、ウイルス産生増強の誘導に寄与する可能性が推察されて

いる。一方、T 細胞株を用いた実験では nef の発現により T 細胞抗原受容体シグナル伝達系の亢進が報告されている。しかし、これらの結果はがん化された細胞を用いた実験結果であることに注意を要する。一方、nef トランスジェニック(Tg)の免疫学的解析により、ウイルス粒子産生なしに CD4<sup>+</sup> T 細胞減少をはじめとする AIDS 様症状が誘導される可能性が示唆され、nef 分子自身が病原性発症に関与することが示唆された。

しかしこの系では nef の発現が幼若 T 細胞より発現され、通常の HIV 感染の状態とは大きく異なる。

我々は成熟 T 細胞機能に対する nef の影響を in vivo で検討することを目的として、新たなシステムを開発した。すなわち nef 組込みアデノウイルスを用いて成熟 CD4<sup>+</sup> T 細胞に nef を発現させ、その機能の変化を可能にするマウスモデルシステムを開発した。この系を用い、HIV 感染において成熟 T 細胞で発現する HIVnef が生体での免疫不全発症にどのように関与するかを明らかにし、免疫不全発症抑制の対策を考慮する。

## B. 研究方法

1. Nef 遺伝子組み込みアデノウイルスベクター作成:Tong-Chen らの提供する A Simplified System for generation of Recombinant Adenoviruses を用いた。アデノウイルス作成過程では、E1E3 遺伝子を持つ野生株の出現が問題になるが、E1E3 非発現 HeLa 細胞を用いて野生株の出現がないことを確認した。
2. CD4<sup>+</sup> T 細胞の調製:CD4<sup>+</sup> T 細胞は DO11.10 TCR transgenic(Tg)マウスと、Coxsackie/Adenovirus Receptor(CAR)Tg マウスを掛け合わせた double Tg マウスの脾臓、リンパ節より、磁気ビーズを用いたカラム分離法によりネガティブに調製した。
3. ウイルス感染と nef 発現細胞の分離: 精製した CD4<sup>+</sup> T 細胞を 24 穴プレートにまき、IL-7 存在下にて nef 組込みアデノウイルス、CD4 発現抑制機能を欠いた nef 発現アデノウイルス、およびコントロールアデノウイルスを MOI 10 にて感染させた。その後 2 日間培養し、EGFP と CD4 の発現量を指標に FACS を用いて感染細胞 (nef 発現細胞と nef 非発現細胞) とに分離した。
4. 細胞増殖試験とサイトカイン産生測定:新たに調整した正常マウスのγ線照射脾臓細胞に OVA<sub>323-339</sub> ペプチドをパルスし、分離した nef 発現、nef 非発現細胞と共培養を行い、経日的に [<sup>3</sup>H] Thymidine の取込みをシンチレーションカウンターにて測定した。また同時に培養上清中の IFN-γ の産生量を ELISA にて測定した。
5. AICD assay: 精製した CD4<sup>+</sup> T 細胞を抗 CD3 抗体で固相化した 96 穴プレート上で 2 日間培養して増殖させ、細胞を回収した後、別な抗 CD3 抗体固相化プレートでさらに 3 日間培養して、CD4<sup>+</sup> T 細胞に activation-induced cell death (AICD) を誘導し、アポトーシスを TUNEL 法を用いて共焦点顕微鏡で検出した。
6. T 細胞遊走試験: 精製した CD4<sup>+</sup> T 細胞 (5x10<sup>5</sup>) をトランスウェルの上室へ、ケモカイン CXCL12 または CCL19 を含む培地を下室に入れ 1 時間インキュベートし、上室から下室に遊走してきた細胞を回収して FACS で解析することにより、それぞれのケモカインに対する遊走能を検討した。
7. 細胞増殖試験: 新たに調整した正常マウスのγ線照射脾臓細胞に OVA<sub>323-339</sub> ペプチドをパルスし、分離した nef 発現、nef 非発現細胞と共培養を行い、経日的に [<sup>3</sup>H] Thymidine の取込みをシンチレーションカウンターにて測定した。
8. 抗原提示部への移動測定: 分離した nef 発現、nef 非発現細胞を同系マウスの

BALB/c に  $2 \times 10^6$  個尾静脈より移入し、移入翌日に OVA を完全フロイントアジュバントと共に背部皮下に免疫した。免疫後 5 日目に所属リンパ節に集積した移入細胞数を FACS にて測定した。

9. Nef 発現 T 細胞のヘルパー機能の解析：精製した GFP 陽性 nef 発現、非発現 T 細胞 ( $3 \times 10^4$ ) と NP-CG B 細胞 ( $3 \times 10^6$ ) を SCID マウスに移入後感作 NP-OVA で免疫した。免疫後 7 日目に血中の抗 NP-IgG1 抗体を ELISA により測定した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は国立感染症研究所動物実験施設の SPF 区で維持飼育を行ない、倫理面も含めて、国立感染症研究所動物実験委員会の審査を受け、その承認を得てから開始した。

### C. 研究結果

精製  $CD4^+$  T 細胞に nef 組込みアデノウイルス (Ad-nef)、 $CD4$  発現抑制機能を欠いた nef 発現アデノウイルス (Ad-LLAA 及び Ad-WLAA)、およびコントロールアデノウイルスを精製した CAR 陽性 OVA TCR 陽性 T リンパ球に試験管内で MOI 10 の条件下で IL-7 存在下において感染させた (図 1)。

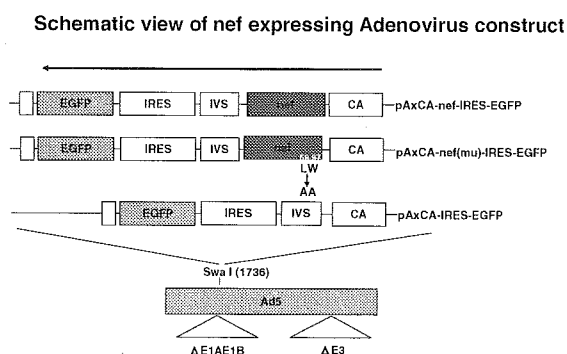


図1

感染 2 日後、EGFP と  $CD4$  の発現量を指標に FACS を用いて感染細胞 (GFP 陽性 nef

発現細胞と nef 非発現細胞) に分離した (図 2)。

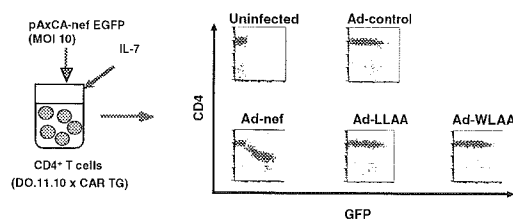


図2 Nef発現細胞と mutant Nef発現細胞の調製

図は未感染(uninfected)Adウイルス(Ad-control), nef組込Adウイルス(Ad-nef), nef変異体組込Adウイルス(Ad-LLAA及びAd-WLAA)のFACSのパターンを示す。

Nef 発現による T 細胞の抗原刺激による免疫反応を検討する目的で、正常マウスの  $\gamma$  線照射脾臓細胞に OVA<sub>323-339</sub> ペプチドを  $0.1 \mu\text{M}$  の濃度でパルスし、親株 nef 及び  $CD4$  発現抑制機能を欠いた nef 変異体発現 T 細胞と共培養を行った。刺激後の細胞増殖を [ $^3\text{H}$ ] Thymidine の取込みを指標に測定すると、いずれも経日的な増殖が見られたが、nef 発現細胞は nef 非発現細胞に比べてその増殖が有意に遅延することが明らかとなった (図 3)。

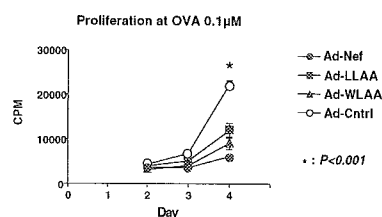


図3 Nef発現による抗原特異的T細胞反応に及ぼす影響

同様に抗原刺激により T 細胞から産生されるサイトカインのレベルも nef 発現により抑制されることが明らかにされた (図 4)。この反応性の抑制は  $CD4$  抑制効果を消失した nef によってもほぼ同程度認められた。