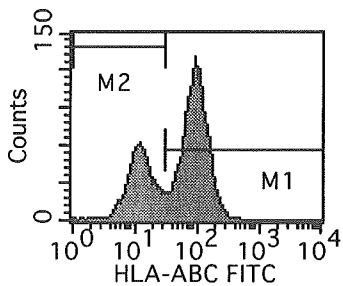
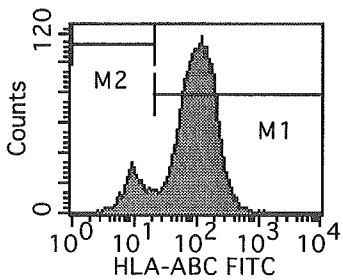


721.221細胞 (negative control)



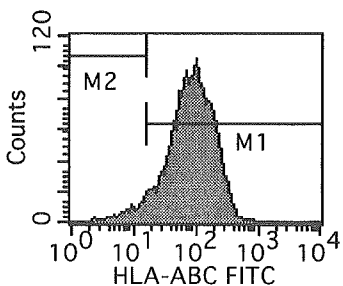
Mamu-A90120-4 発現 721.221細胞

発現細胞頻度 (M1): 67%



Mamu-A90120-5 発現721.221細胞

発現細胞頻度 (M1): 90%



Mamu-B90120-6 発現 721.221細胞

発現細胞頻度 (M1): 96%

図2. サルMHC-Iハプロタイプ90120-a由来MHC-I cDNA単独発現細胞のMHC-I発現効率  
HLA (alpha鎖) 欠損ヒトBリンパ芽球細胞株721.221に、MHC-Iハプロタイプ90120-aを構成する  
主要MHC-Iアレル (Mamu-A90120-4、Mamu-A90120-5、Mamu-B90120-6) の (alpha鎖) を発現する  
ベクターを導入して、各々のMHC-I単独発現細胞株を樹立した。サルMHC-Iを認識する抗体で  
これら細胞株を免疫染色し、flow-cytometryにて解析した。

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）  
分担研究報告書

SIV 感染抑制ザルにおける SIV 特異的 CD4 陽性 T リンパ球の役割

分担研究者 森 一泰 国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官

**研究要旨** エイズワクチンに必要とされる感染防御免疫は弱毒ウイルス感染（生ワクチン）により誘導される。同様の強い防御免疫が感染後早期治療により病原性 SHIV-RT 感染を制御している動物にも誘導されていた。弱毒ウイルスとして糖鎖欠失ウイルス（d-5G）、nef 遺伝子欠失変異ウイルス（d-nef）は生ワクチンとして病原性 SIV239 に対する防御免疫を誘導した。これらの感染制御ザルに誘導された Gag 特異的 CD4+T 細胞、CD8+T 細胞が認識する Gag 領域を決定した。

#### A . 研究目的

エイズワクチン研究は複数の免疫法：DNA ワクチン、ウイルスベクター（ワクシニアウイルス、アデノウイルス等）を組み合わせるプライム/ブースト法を中心に行われている。この方法は、末梢リンパ中に高頻度のウイルス特異 CD8+ T 細胞を誘導することができるが、感染後数週間にかかる激しいウイルス増殖（初期感染）の抑制効果が低いことが明らかとなった。しかし初期感染後のウイルス増殖を低レベルに抑制することからエイズ症状の発症を遅延する効果がある。条件として特定の有効な CTL エピトープを認識する MHC I allele を持つ宿主に限られる。しかし HIV 感染では多種のウイルスによる重感染が起こることから、多種のウイルスに共通かつ有効な CTL を誘導する epitope の同定が有効なワクチン開発に条件となる。ワクチンで誘導された CTL はメモリー T 細胞として維持され、感染により CTL が誘導される。つまり有効なメモリー T 細胞の形成が必要であり、そのためにはヘルパー T 細胞の機能が重要である考えられている。また、特異的

CD4+T 細胞の感染細胞障害性はエイズウイルス感染抑制に必要である可能性も示唆されている。

プライム/ブーストワクチンと対照的に初期感染を非常に強く抑制する防御免疫は弱毒化したエイズウイルス感染により誘導される。そこで当研究では、弱毒ウイルス感染ザルに病原性ウイルスをチャレンジ感染し誘導される宿主応答を解析し感染防御と関連する免疫反応を明らかにする。

本研究では、弱毒ウイルス感染ザル等の感染制御ザルが誘導するエイズウイルスに対する感染防御免疫について細胞性免疫、特にウイルス特異的 CD4+T 細胞に焦点をあてての解析を行う。

#### B . 研究方法

##### チャレンジ感染実験

SIV239 感染に対する感染防御免疫の解析を目的に種々感染制御ザルに高用量(1000 TCID<sub>50</sub>)の SIV239 を静脈内接種した。

感染後早期治療 post-exposure prophylaxis (PEP)群

SHIV-RT (100 TCID<sub>50</sub>) 静脈内接種後、8 時間後または 24 時間から 4 週間の非核酸型逆転写酵素阻害薬(NNRTI)による感染後早期治療を行った。アカゲザル (Mm9703, Mm9704, Mm9711) は 8 時間後から (Mm9701, Mm9705) は 24 時間後からの治療を行った。2 頭(Mm9701, Mm9703)では、投薬中止後一時的な感染ウイルスが検出されたが、3 頭では検出されなかった。Mm9703 は感染後 4 年後にウイルス増殖の再活性化が起こった。感染後 319 週に SIV239 を接種、2 週後に安楽殺した。4 頭では治療後 7.5 年以上血中ウイルス RNA が測定感度以下に抑制され、感染後 394 週に Mm9704 を除く 3 頭に SIV239 を静脈内接種した。Mm9701, Mm9705, Mm9711 をそれぞれ感染 1, 2, 8 週後に安楽殺した。

DNA prime 組み換えワクシニア Boost 法による Env 蛋白免疫

DNA ワクチン用に開発された pJW4303 ベクターに SIV239 または d-5G の gp120 の蛋白コード DNA 導入した Plasmid (pJWSUmac, pJWSUmac d5G) または pJW4303 ベクター 2 mg を 0, 4, 8 週に大腿部左右 2 カ所に筋肉内接種した。21 週に SIV239 または d-5G の gp160 を発現する組み換えワクシニアまたはワクシニアベクター(WR 株)  $5 \times 10^7$  PFU を大腿部左右 2 カ所に皮内+筋肉内接種した。

d-5G 感染

2 頭 (Mm0135, Mm0137) は SIV239Env を用いた DNA-prime/vaccinia-boost で免疫、2 頭 (Mm0139, Mm0140) は SIV239Env を用いた DNA-prime/vaccinia-boost で免疫、d-5G を用いてチャレンジ感染を行った。2 頭のサルでは  $10^6$  copy/ml、残りの 2 頭では  $10^5$  copy/ml のピーク

値とする初期感染が起こったが慢性感染期では血中ウイルス量は検出感度以下に抑制された。118 週後に Mm0137 を除く 3 頭に 1000 TCID<sub>50</sub> の SIV239 を静脈内接種した。Mm0139, Mm0135, Mm0140 をそれぞれ感染 1, 2, 8 週後に安楽殺した。

d-nef 感染

アカゲザル 2 頭 (Mm9414, Mm9416) は SIV239 nef 遺伝子欠損変異ウイルス(d-nef)感染後 9.5 年以上ウイルス感染を低レベルに抑制していた。感染後 509 週に SIV239 を静脈内接種した。Mm9414 は感染後 1 週後に、Mm9416 は感染後 2 週後に安楽殺した。

アカゲザル

ミャンマー原産の育成ザル、オス、B ウイルス、SRV, STLV, SIV に対する抗体が陰性、培養リンパ球における SIV 増殖性に問題がないサルを用いた。

ウイルスストック

ウイルス DNA クローンを培養細胞 (SW480 または COS-1) に transfection を行い作成した。Transfection 2-4 日後の培養上清を種ウイルスとしてアカゲザル培養リンパ球を用いてさらに増殖させ感染実験用ウイルスとした。ウイルス量は gag 抗原量については Coulter 社の p27 gag antigen assay kit により、TCID<sub>50</sub> はサル CD4 陽性 T 細胞 (CyfT/HVS) を用いて測定した。

血しょうウイルス RNA 量の測定

血しょう中のウイルス RNA は Qiagen 製キットを用い精製した。ウイルス RNA 量は SIV の gag 遺伝子配列から作成したプライマー: the gag primers, forward primer: 697F (5' GCAGAGGAGGAAATTACCCAGTAC 3'), reverse primer:

764R (5' CAATTTTACCCAGGCATTTAATGTT 3') and TaqMan probe 740T: (FAM- 5' TGTCACCTGCCATTAAGCCCGA 3'-3' -TAMRA)を用い、RT-PCRキット(TaqMan EZ RT-PCR kit)を用いてリアルタイム PCR 法により測定した。

フローサイトメトリーによる末梢血リンパ球の細胞表面抗原の解析  
血中のリンパ球サブセット (CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD20+, CD29+リンパ球)の割合についてそれぞれの2種類のモノクローナル抗体の組み合わせにより解析した。血中のCD4+細胞数は自動血球計算機によりリンパ球数を測定し、フローサイトメトリーの結果を用いてCD4+細胞数を算出した。

ELISPOT assayによる末梢血中のSIV特異的CD4+ T細胞またはCD8+ T細胞が認識するSIVタンパクペプチドの決定

サルから末梢リンパ球を分離後、抗CD4抗体結合磁気ビーズまたは抗CD8抗体結合磁気ビーズを用いて末梢リンパ球中のCD4+ T細胞またはCD8+ T細胞を除き、SIV抗原により刺激し活性化されたT細胞が産生するIFN-gammaを免疫学的に染色しSIV抗原により活性化されたT細胞の頻度を算出した。抗原刺激の方法としては全SIVタンパクをカバーするover-lapping peptidesをautologous B LCLにパルスし、UV-psolareneで不活化後リンパ球細胞と共培養した。

#### 倫理への配慮

本研究では動物実験が中心であることから、動物実験方法については倫理上、動物愛護の問題の観点から感染研動物実験委員会が定めたルール、ガイドラインに従った。動物実験開始に際しては事前に感染研動物実験委員会による審査・承認を受けた。

### C . 研究結果

感染後早期治療 (PEP) ザルへの SIV239 チャレンジ感染

#### (1) 感染制御ザル

病原性の SHIV-RT 感染は感染後早期治療により 6

頭中 4 頭で感染後 6 年以上低レベルに抑制された。感染により SIV 抗体が誘導されたが、個体間で抗体価の違いが見られた。Mm9711 は抗体価が上昇したが、3 頭では抗体価は低レベルに維持された。特に Mm9705 は感染直後から低下し検出感度 (OD492 = 0.2) 以下のレベルが継続した。これらのサルでは有意の中和抗体は検出されなかった (結果は示さず)。しかし有意の CTL, ウイルス特異的ヘルパー T 細胞は感染後早期治療開始後からすべてのサルで検出された。図 3 に示すように Gag-Pol 特異的、Env 特異的、Nef 特異的 T 細胞は誘導されていた。ウイルス特異的 CD4+T 細胞は持続的に誘導されていたが、ウイルス特異的 CD8+T 細胞は散発的に検出された。

表 1 に SIV239 感染ザルチャレンジ前後の血中ウイルス RNA 量を示す。PEP 治療後 394 週に 3 頭に SIV239 によるチャレンジ感染を行った。

Mm9701 と Mm9711 では感染による血中ウイルスは検出されなかった。ところが Mm9705 では非感染ザルへの感染と同様の激しい SIV 感染が見られた。

弱毒ウイルス感染ザルへの SIV239 チャレンジ感染

弱毒ウイルス感染は強い感染防御免疫を誘導することが報告されているが、感染防御の機序については未だに未解明である。そこで感染防御と細胞性免疫との関連を調べるために SIV239 によるチャレンジ感染を行った。

#### (1) d-5G 感染ザル

感染 118 週後に 3 頭にチャレンジ感染を行った。表 2 に SIV239 感染ザルチャレンジ前後の血中ウイルス RNA 量を示す。すべてのサルで血中ウイルス量はすべて測定感度以下であった。

#### (2) d-nef 感染ザル

表 3 に SIV239 感染ザルチャレンジ前後の血中ウイルス RNA 量を示す。d-nef 感染後 509 週にチャ

レンジ感染を行った。すべてのサルで測定した血中ウイルス量はすべて測定感度以下であった。

感染防御における epitope 特異的 T 細胞の役割

当研究班では細胞性免疫応答が MHC に支配されることから感染実験に用いるアカゲザル MHC haplotype を決定し、MHC haplotype ベースの感染防御免疫の研究を行っている。

表 4 に上記のチャレンジ感染実験に用いたサルを含む解析を行うサルのデータを示した。種♂ザル(父親)として R90-120, R89-002, R90-030, R-90-010 を持つサルを実験に用いた。

上記感染制御ザルにおける epitope 特異的 T 細胞の感染制御における役割を解析のために、まず脾臓から分離されたリンパ球を用いて、チャレンジ感染により誘導されたエピトープ特異的 T 細胞の解析を行った。表 5 に現時点で決定した Gag エピトープを示した。感染後早期治療ザル 2 頭はそれぞれ Haplotype 90-120a, b を持ち、各 1 頭では感染制御が、残り 1 頭では SIV239 感染が起こった。Haplotype 90-120a を持つ 2 頭では、感染制御がされた Mm9701 では特異的な CD4+T 細胞 (SGM23, SGM31 に反応性) が高頻度に誘導されていた。対照的に感染制御が起こらなかった Mm9705 では弱い CD4+T 細胞の誘導と多種類の CD8+T 細胞の誘導が見られた。Haplotype 90-120b を持つ 2 頭では、感染制御が起こった Mm9711 では特異的な CD4+T 細胞と CD8+T 細胞 (SGM38, SGM39 に反応性) が誘導されていた。感染制御が破綻した Mm9703 では同様に特異的 CD4+T 細胞の誘導が弱いことが明らかとなった。d-5G 感染ザルで SIV239 感染を制御した 3 頭は種♂R-89002 の Haplotype を持つ。Gag 特異的 T 細胞の誘導に関しては CD8+T 細胞と比較して多種類の CD4+T 細胞が誘導されていた。

## D. 考察

d-5G 感染により誘導される極めて強い感染防御免疫を安全性が高いワクチンで誘導することが可能か？または安全な生ワクチンを開発することが可能か。現時点では前者がより実現可能と考えられている。すなわちエイズウイルス感染を防御する免疫を解明しエイズウイルス感染以外の方法でエイズウイルスに対する防御免疫を誘導することが課題となっている。そこで今年度は種々の SIV 感染ザルへの高病原性 SIV239 を用いたチャレンジ感染実験を行った。予想されたように感染後 2 年の d-5G 感染ザルはすべてほぼ完全に SIV239 感染を防御した。次に感染後 10 年の d-nef 感染ザルにおいても同様に感染防御した。次に高病原性の SHIV-RT 感染後短期間の RT 阻害薬投与により感染を制御した 3 頭に上記 2 実験と同様に SIV239 チャレンジを行ったところ、2 頭では感染が防御されたが、1 頭ではほとんど感染の抑制が見られなかった。この例は感染制御を考察する上で重要である。チャレンジ前の測定が必要だが細胞性免疫が感染後 209 週まで検出されていたことからメモリー T 細胞は維持されていた可能性が推測される。しかし SIV 抗体価が低下していたことから、SIV 感染がほぼ完全に消失していた可能性が予想される。これらの結果は、弱毒生ワクチンが誘導する強い感染防御免疫の維持に低いレベルの SIV 感染が必要であることを暗示している。

Gag 特異的 T 細胞の解析からは、感染防御があった個体では異なるエピトープを認識する多数の CD4+T 細胞が誘導されていた。対照的に感染防御がされなかった個体では特異的 CD4+T 細胞の誘導が弱かった。CD8+T 細胞に関しては感染制御ザルでは 1-5 種類の特異的細胞が検出され、非感染ザル SIV239 感染と同様の初期感染が起こった個体 (Mm9705) では 10 種類以上の CD8+T 細胞が誘

導されたことから、感染が低レベルに抑制された場合は比較的少ない種類の CTL の誘導で十分であり、ウイルス増殖の規模が大きくなるとより多種類の CTL が誘導された可能性が推測された。今後さらに獲得免疫、自然免疫の網羅的な解析を行い、感染防御に必要な宿主応答の条件の解明を目指す。

## E. 結論

d-5G 感染ザル、d-nef 感染ザル、感染後早期治療による感染制御ザルには同様の強い防御免疫が誘導されていることが明らかとなった。感染防御と関連する宿主応答のひとつとして Gag 特異的 CD4+T 細胞、CD8+T 細胞が認識する領域を決定した。

## F. 健康危険情報

特に該当する情報はなかった。

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Mori, K., Sugimoto, C., Ohgimoto S., Shioda T., Kusagawa S., Takebe Y., Kano M., Matano, T., Yuasa T., Kitagawa D., Miyazawa, M., Takahashi, Y., Yasunami, M., Kimura, A., Yamamoto N., Suzuki Y., and Nagai, Y. Influence of glycosylation on the efficacy of an Env-based vaccine against SIVmac239 in a macaque AIDS model. *J. Virol.*, 79, 10386-10396, 2005.

### 学会発表

- 1) C. Sugimoto, S. Izumo, Y. Suzuki, Y. Nagai, and K. Mori. Influence of deglycosylated SIVmac239 on primary infection in lymphatic tissues.. 23<sup>nd</sup> annual symposium on nonhuman primate models for AIDS,

September, 2005, Portland, USA.

- 2) K. Mori, C. Sugimoto, E. Nakayama, T. Shioda, F. Villinger, A.A. Ansari and N. Yamamoto. Development of Sendai virus vector system for eliciting epitope specific CD4 T cells. 23<sup>nd</sup> annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, September, 2005, Portland, USA.

- 3) 糖鎖欠損サル免疫不全ウイルスの細胞指向性と初期感染細胞の解析：低病原性との関連について 杉本智恵、鈴木康夫、山本直樹、永井美之、森一泰、日本ウイルス学会、2005 年、横浜

- 3) 糖鎖欠損 SIV の弱毒化のメカニズムの解析 杉本智恵、中山英美、塩田達雄、山本直樹、永井美之、森一泰、日本エイズ学会、2005 年、熊本

- 4) ウイルス特異的 CD4+T 細胞免疫誘導のための Sendai virus vector を用いた CD4+T 細胞エピソード発現系の開発 森一泰、杉本智恵、中山英美、塩田達雄、保富康宏、山本直樹、永井美之、日本エイズ学会、2005 年、熊本

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

特に該当するものはなかった。

图1 Post-exposure prophylaxis (PEP)

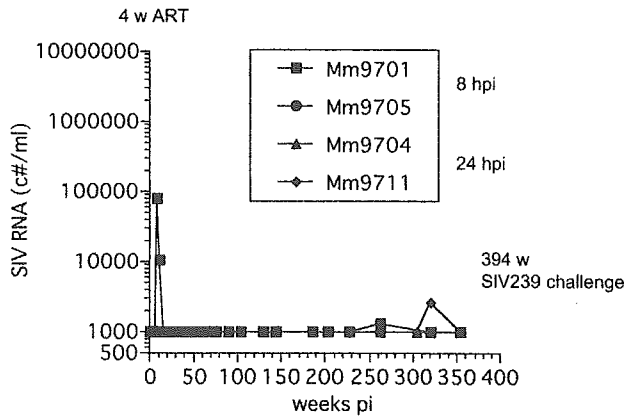


图2 SIV antibody response

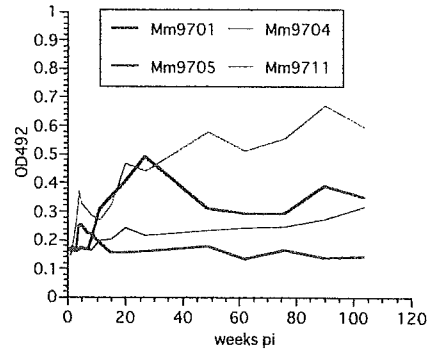
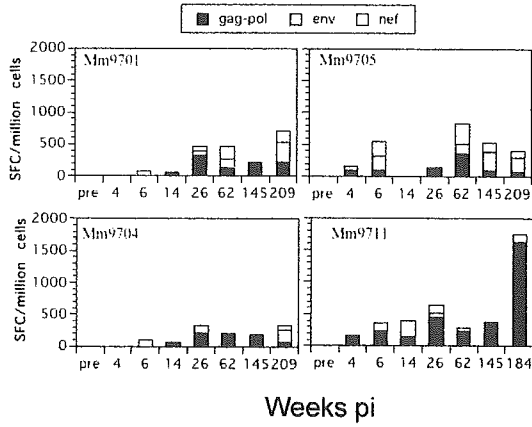


图3 SIV specific CD4+ T cells



SIV specific CD8+ T cells

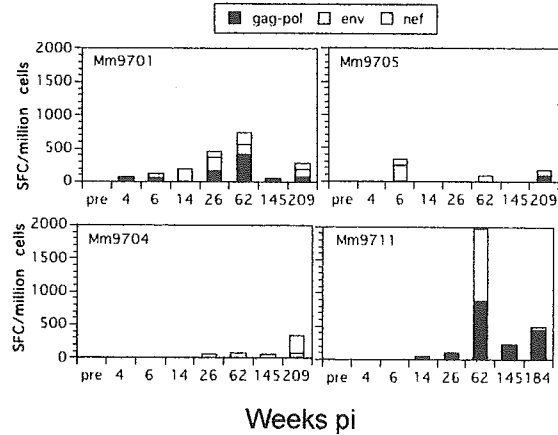


表1 SIV239 challenge of PEP-treated animals

time	1 w	no challenge	2 w	8 w
	Mm9701	Mm9704	Mm9705	Mm9711
371 w	<100	<100	<100	<100
379 w	<100	<100	<100	<100
393 w	<100	190	<100	<100
challenge				
394 w				
3 d	<100		12850	<100
5 d	<100		411000	<100
7 d	<100		1735000	<100
14 d	<100		8950000	<100
21 d		<100		
27 d				<100
41 d				<100
53 d				<100

Plasma viral load (copy#/ml)

表2 SIV239 Challenge of delta 5G-infected animals

challenge	time	2 w	no challenge	1 w	8 w
		Mm0135	Mm0137	Mm0139	Mm0140
	96 w	<100	<100	<100	<100
	101 w	1100	<100	1200	<100
	117 w	<100	<100	<100	<100
	118 w				
	3 d	<100		<100	<100
	5 d	<100		<100	
	7 d	<100		<100	<100
	14 d	<100			<100
	21 d		<100		
	27 d				<100
	41 d				<100
	53 d				<100

表3 SIV239 challenge of Δ Nef infected animals

challenge	time	1 w	2 w
		Mm9414	Mm9416
	508 w	<100	<100
	509 w		
	3 d	<100	<100
	7 d	<100	
	14 d		<100
Plasma viral load (copy#/ml)			

表4 Pedigree of rhesus macaques

Challenge experiments										
		SLC#	Amami#	Father	Mother	virus	infection	duration (weeks)	date autopsy	duration postchallenge
Mm9703	2029702003	R73	95-18	90-120	90-149	SHIV-RT	98.1.26	321	04.3.30	2W
Mm9701	2029702001	R70	95-7	90-120	90-157	SHIV-RT	98.1.26	394 wpi	2005.8.26	1 w
Mm9704	2029702004	R74	95-23	90-88	90-68	SHIV-RT	98.1.26	394 wpi	2005.9.9	No challenge
Mm9705	2029702005	R75	95-24	90-120	90-155	SHIV-RT	98.1.26	394 wpi	2005.9.2	2 w
Mm9711	2029702011	R81	95-43	90-120	90-168	SHIV-RT	98.1.26	394 wpi	2005.10.12	8 w
Mm0133	2020111033	R189		R-89-2	R-90-5F1	239	03.5.15	108	04.10.19	1W
Mm0134	2020111034	R190		R-89-2	R-94-1F1	239	03.5.15	108	04.10.19	1W
Mm0136	2020111036	R194		R-89-2	R-88-11	239	03.5.15	104	04.9.28	1W
Mm0138	2020111038	R198		R-91-36F1	R-90-52	239	03.5.15	104	04.9.28	1W
Mm0135	2020111035	R191		R-89-2	R-94-11F2	DSG	03.5.15	118 wpi	2005.9.2	2W
Mm0139	2020111039	R203		R-89-2	R0A8716	DSG	03.5.15	118 wpi	2005.9.9	1W
Mm0140	2020111040	R212		R-89-2	R-89-9	DSG	03.5.15	118 wpi	2005.8.26	8 W
Mm0137	2020111037	R197		R-90-10	R-90-57	DSG	03.5.15	118 wpi	2005.10.12	No challenge
Mm9702	2029702002	R71	95-9	90-88	90-82	239	99.1.21		04.4.6	15d
Mm9715	2029702015	R82	95-54	90-10	90-50	239	99.1.21		04.4.6	15d
Mm9713	2029702013	R84	95-49	90-120	90-151	239	99.12.20		2005.7.15	2W
Mm9414	2029408014		92-50	89-74	90-103	Δnef	95.9.29		2005.7.7	1W
Mm9416	2019409016		91-4	89-3	88-5	Δnef	95.9.29		2005.7.15	2W
Δ5G infected										
		Amami#	SLC#	Father	Mother	haplotype	virus	infection		
Mm9712	2029702012	R83		90-030	90-049	g	Δ5G	99.1.21		
Mm9923	2029905023	R117		90-030	90-129	h	Δ5G	99.12.20		
Mm9428	2019410028			90-120	90-122	a	Δ5G	99.1.21		
Mm9922	2029905022	R110		89-002	88-010		Δ5G	99.12.20		
Mm9707	2029702007	R77		89-003	88-009		Δ5G	99.1.21		



表5 Gag epitope specific T cells in spleen

haplotype 90-120 a	CD4 T cells	CD8 T cells
<b>Mm9701</b> <b>Protected</b>	SGM2     △	SGM1     △
	SGM11    △	SGM6     ○
	SGM23    ◎	SGM23    ○
	SGM26    ○	SGM26    △
	SGM31    ◎	SGM31    ○
	SGM40    ○	
	SGM50    △	
<b>Mm9705</b> <b>Unprotected</b>	SGM24    △	SGM3     ○
	SGM48    △	SGM5     ○
	SGM50    △	SGM10    ○
		SGM15    ○
		SGM25    ○
		SGM27    ○
		SGM31    ○
		SGM34    ○
		SGM46    ○
		SGM57    ○
		SGM62    ○
haplotype 90-120 b	CD4 T cells	CD8 T cells
<b>Mm9711</b> <b>Protected</b>	SGM22    ○	SGM13    ○
	SGM38    ◎	SGM17    △
	SGM39    ◎	SGM37    ○
	SGM53    △	SGM38    ◎
<b>Mm9703</b> <b>Unprotected</b>	SGM31    △	SGM5     ○
	SGM33    △	SGM21    ○
	SGM38    △	SGM38    ○
Father R89-002	CD4 T cells	CD8 T cells
<b>Protected</b>	SGM6     △	SGM9     ○
	SGM15    ○	SGM30    ◎
<b>Mm0135</b>	SGM23    ○	
	SGM45    ○	
	SGM46    ○	
	SGM61    △	
<b>Mm0139</b>	SGM25    ○	SGM17    ○
	SGM33    ○	
	SGM52    ○	
	SGM50    △	
<b>Mm0140</b>	SGM8     ○	SGM47    ○
	SGM25    ○	SGM49    ○

Frequency of IFN- $\gamma$  + cells /  $3-8 \times 10^4$  cells

△: 2-9 cells, ○: 10-50 cells, ◎: >50 cells

**Gag Overlapping peptides**

SGM1. (1-20)	MGVRNSVLSGKKKADELEKIR	SGM32. (250-269)	MYRQQNPIPVGNIYRRWIQL
SGM2. (9-28)	SGKKKADELEKIRLRPNNGKKK	SGM33. (258-277)	PVGNIYRRWIQLGLQKCVRM
SGM3. (17-36)	EKIRLRPNNGKKKYMLKHVVW	SGM34. (266-285)	WIQLGLQKCVRMYNPTNILD
SGM4. (25-44)	GKKKYMLKHVVWAANELDRF	SGM35. (274-292)	CVRMYNPTNILDVKQGPKE
SGM5. (33-52)	HVVWAANELDRFGLAESLLE	SGM36. (281-300)	TNILDVKQGPKEPFQSYVDR
SGM6. (41-60)	LDRFGLAESLLENKEGCQKI	SGM37. (289-308)	GPKEPFQSYVDRFYKSLRAE
SGM7. (49-68)	SLENKEGCQKILSVLAPLV	SGM38. (297-316)	YVDRFYKSLRAEQTDAAVKN
SGM8. (57-76)	CQKILSVLAPLVPTGSENK	SGM39. (305-324)	LRAEQTDAAVKNWMTQTLLI
SGM9. (65-84)	APLVPTGSENKLSLYNTVCV	SGM40. (313-332)	AVKNWMTQTLLIQNANPDCK
SGM10. (73-92)	ENLKSLYNTVCVIWCIHAE	SGM41. (321-340)	TLLIQNANPDCKLVLKGLGV
SGM11. (81-100)	TVCVIWCIHAEKVKHTEEA	SGM42. (329-348)	PDCKLVLKGLGVNPTLEEML
SGM12. (89-108)	HAEKVKHTEEAQIVQRHL	SGM43. (337-356)	GLGVNPTLEEMLTACQGVGG
SGM13. (97-115)	TEEAQIVQRHLVVETGTT	SGM44. (345-364)	EEMLTACQGVGGPGQKARLM
SGM14. (104-123)	VQRHLVVETGTTETMPKTSR	SGM45. (353-372)	GVGGPGQKARLMAEALKEAL
SGM15. (113-132)	GTTETMPKTSRPTAPSSGRG	SGM46. (361-380)	ARLMAEALKEALAPVPI PFA
SGM16. (121-140)	TSRPTAPSSGRGGNYPVQOI	SGM47. (369-389)	KEALAPVPI PFAAAQQRGPRK
SGM17. (129-147)	SGRGGNYPVQOIGGNYVHL	SGM48. (378-397)	PFAAAQQRGPRKPIKCWNCG
SGM18. (136-155)	PVQOIGGNYVHLPLSPRTL	SGM49. (386-405)	GPRKPIKCWNCGKEGHSARQ
SGM19. (144-163)	YVHLPLSPRTLNAWVKLIEE	SGM50. (394-413)	WNCGKEGHSARQCRAPRRQG
SGM20. (152-171)	RTLNAWVKLIEEKKFGAEVV	SGM51. (402-421)	SARQCRAPRRQGCWKCGKMD
SGM21. (160-179)	LIEEKKFGAEVVPGFQALSE	SGM52. (410-430)	RRQGCWKCGKMDHVMAKCPTA
SGM22. (168-187)	AEVVPGFQALSEGCTPYDIN	SGM53. (419-438)	KMDHVMAKCPDRQAGFLGLG
SGM23. (176-195)	ALSEGCTPYDINQMLNCVGD *	SGM54. (427-446)	CPDRQAGFLGLGPWGKKPRN
SGM24. (184-203)	YDINQMLNCVGDHQAAMQII	SGM55. (435-454)	LGLGPWGKKPRNFPMAQVHQ
SGM25. (192-211)	CVGDHQAAMQIIRDIINEEA	SGM56. (443-460)	KPRNFPMAQVHQGLMPTA
SGM26. (200-218)	MQIIRDIINEEAADWDLQH	SGM57. (449-458)	MAQVHQGLMPTAPPEDPAVD
SGM27. (208-227)	NEEAADWDLQHPQPAPQGGQ	SGM58. (457-476)	MPTAPPEDPAVDLLKNYMQ
SGM28. (216-236)	LQHPQPAPQGGQLREPSGSDI	SGM59. (465-484)	PAVDLLKNYMQLGKQQREKQ
SGM29. (226-245)	GQLREPSGSDIAGTTSSVDE	SGM60. (473-493)	YMQLGKQQREKQRESREKPYK
SGM30. (234-253)	SDIAGTTSSVDEQIQWMYRQ	SGM61. (482-501)	EKQRESREKPYKEVTEDLLH
SGM31. (242-261)	SVDEQIQWMYRQQNPIPVGN	SGM62. (490-510)	KPYKEVTEDLLHLNSLFGGDQ

実験動物サルにおける MHC クラス I および KIR 遺伝子群を中心とする免疫制御遺伝子の解析

分担研究者 木村 彰方 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 教授

研究要旨

RSCA 法を応用したアカゲザル MHC クラス I 遺伝子(Mamu-A 及び Mamu-B)群の多型解析法を用いて、B リンパ芽球様細胞株より抽出した RNA に由来する cDNA と配列が決定された cDNA クローンの多様性を検討し、2 種のリファレンスを用いるタイピング法の精度が極めて高いことを証明した。一方、同法を用いてカニクイザル 8 個体の MHC クラス I 遺伝子の多様性を検討したところ、アカゲザルと同様に多重遺伝子群を構成しており、個体あたり 2-5 個の Mamu-A 遺伝子、6-11 個の Mamu-B 遺伝子が発現していることを見出した。さらに、カニクイザルの MHC 領域 BAC クローン配列を参照して 4 種のサルマイクロサテライトマーカーを選定し、これを用いた解析を行ったところアカゲザルとカニクイザルでは多型パターンが大きく異なっていた。このことは、MHC 領域の遺伝子重複構造が旧世界ザル内で大きく異なることを示唆する。これとは別に、KIR ローカスならびに NKC ローカスについてマイクロサテライトマーカーを用いた多型解析を実施した。KIR ローカスではヒトでは多型を認めないマーカーに旧世界ザルでは多型が認められたが、その多型パターンはアカゲザル、カニクイザル、ニホンザルでそれぞれ異なっていた。これに対して、NKC ローカスの 3 種のマイクロサテライトマーカーではヒト、旧世界ザルとも多型が認められた。また、RET1/ULBP 領域についてもマイクロサテライトマーカーを用いた検討を実施し、ヒトで HIV 感染と関連する多型を認めたが、アカゲザルでは当該マーカーに多様性を認めなかった。

A. 研究目的

ウイルス感染症の発症や重症化、ワクチンによる予防効果には個体差があることが知られているが、この個体差は病原体への免疫応答性の個体差によるものであり、それは MHC (ヒトでは HLA)や NK レセプターをはじめとする免疫応答関連遺伝子群の多型に起因する。例えば、HIV ウイルス感染後の AIDS 発症は HLA-B35 陽性者では早く HLA-B57 陽性者では遅い。また活性化 NK レセプターである KIR-3DS と Ile80 型の

HLA-Bw4 アリルを同時に有する場合は、特に AIDS 発症が遅い。一方、HBV ワクチン接種において、HLA-B\*0701, DRB1\*0101, DRB1\*0803 などの保有者では早期より高い抗体価が得られるが、HLA-\*5401, DRB1\*0405, DQB1\*0401 などの保有者では複数回のワクチンでも抗体価が得られない場合がある、などが報告されている。そこで本研究では、ワクチン開発研究に有用な物的基盤とそれについての遺伝的情報資源を整備することを目的として、実験に供されるアカゲザ

ルの集団を対象に、免疫応答の個体差を規定する遺伝的背景を解明する。このため、MHC クラス I 遺伝子群や KIR 遺伝子群など、免疫制御遺伝子群のタイピングシステムを開発し、その多様性を詳細に解析する。

## B. 研究方法

### 1) サル MHC クラス I 抗原遺伝子群の解析：

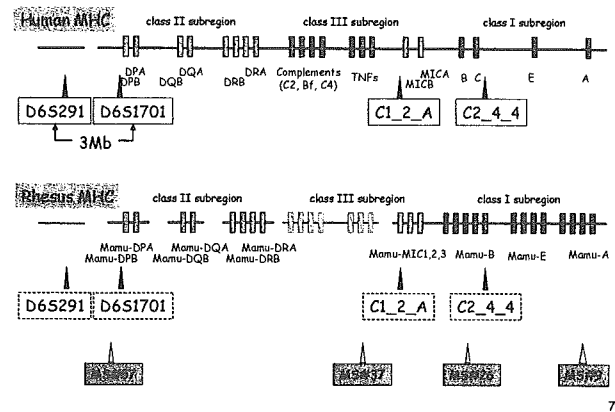
ワクチン開発や薬剤研究に利用されるアカゲザルおよびカニクイザル実験個体群の MHC クラス I の型を明確にするため、これまでに MHC クラス I (Mamu-A および Mamu-B) の cDNA について、クローン化した Mamu 遺伝子をレファレンス鎖とする RSCA を応用した多型解析法を開発してきた。

昨年度までに引き続き、国内で維持されているアカゲザル実験個体群繁殖コロニーのブリーダー個体を含めた合計 200 個体以上に由来する B リンパ芽球様細胞株の total RNA を抽出した。また、カニクイザルについても同様の解析を実施するために、7 個体由来の B リンパ芽球様細胞株の total RNA を抽出した。抽出した total RNA からランダムプライマー(6 mer)を用いて cDNA を作製し、これをテンプレートとして、アカゲザル MHC クラス I 遺伝子である Mamu-A 及び Mamu-B の cDNA を、それぞれに特異的なプライマーを用いて RT-PCR 法によって増幅した。ついで、前述の RSCA 法を用いて、アカゲザルおよびカニクイザル個体の MHC クラス I 遺伝子多型を解析した。ブリーダーとその子孫の間でのアレルの伝達パターンから、実験個体群に比較的高頻度に伝達されている MHC クラス I ハプロタイプの構成を推定し、それによって各個体のハプロタイプを決定した。また並行して、実験個体群に比較的高頻度に伝達されている MHC クラス I ハプロタイプについて個々のアレルの配列をクローニングして配列解析を行った。

一方、Wisconsin 大の Dr. D. Watkins から供与

されたクローン cDNA (Mamu-A は A\*01, \*02, \*03, \*0402, \*0504, \*0602, \*07, \*08, \*11 の 9 アレル、Mamu-B は B\*01, \*03, \*04, \*05, \*0702, \*12, \*20, \*22, \*26, \*27, \*29 の 11 アレル)を用いて、RSCA 法タイピングの精度を検討した。

### MHC 領域の遺伝子構成とマイクロサテライトマーカーの位置



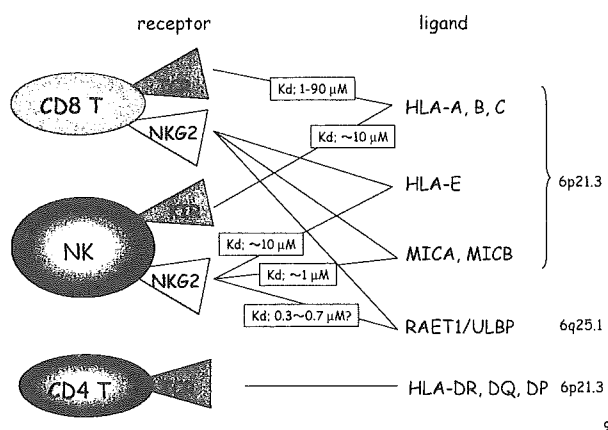
これとは別に、アカゲザル MHC 領域の BAC クローン配列を参考にして 4 種類のマイクロサテライトマーカー (MS#9, MS#26, MS#37, MS#57 ; それぞれ MHC-A, MHC-B, TNF, MHC-DP に連鎖している) を設定した。ついで、B リンパ芽球様細胞株のゲノム DNA を用いて、これらのマーカーがアカゲザルの個体識別及び MHC ハプロタイプ構造解析が可能か否かを検討した。また、これらのマーカーがカニクイザル、ニホンザルにも応用可能であるかを検討した。

### 2) KIR 領域、NKC 領域および RAET/ULBP 領域ゲノム多様性の検討：

古典的 MHC クラス I 分子は CD8 陽性 T 細胞への抗原提示分子であると同時に、NK 細胞レセプター(NKCR)の一群である抑制性あるいは活性化 KIR ファミリーのリガンドともなる。一方、非古典的 MHC クラス I 分子である MHC-E や、MHC 領域内に存在する MIC 遺伝子群にコードされる MIC 分子は、活性化 NKCR である NKG2D のリガンドとなる。また、MHC 様構造をとる RAET/ULBP 分子群も NKG2D のリガンドである。さらに、MIC 分子群は抑制性 NKCR の一員である NKG2A/CD94 や活性化 NKCR である

NKG2C/CD94 のリガンドとなることが知られている。このことは MHC 領域遺伝子群が NK 細胞レセプター遺伝子群と機能的に密接な関連を有することを示し、さらには MHC による免疫制御機構においても NK 細胞が関与することを強く示唆する。

#### T細胞とNK細胞におけるレセプターとリガンドの親和性



これらの知見は主にヒトについて得られたものであるが、サルにおいてどのような遺伝子構成になっているかについては不明な点が多い。ことにサルにおいては MHC クラス I 遺伝子群がハプロタイプごとに遺伝子重複数が異なる多重遺伝子族と構成していることから、その他の MHC 遺伝子群および NK 細胞レセプター群の遺伝子構成と多様性を解明することが重要である。そこで、まずは遺伝子領域の多様性を解析する目的で、ヒトゲノム配列を参考にしてそれぞれの領域についてのマイクロサテライトマーカーを設定し、これを用いて、ヒトおよびアカゲザル、カニクイザルのゲノム多様性を検討した。

(倫理面への配慮)

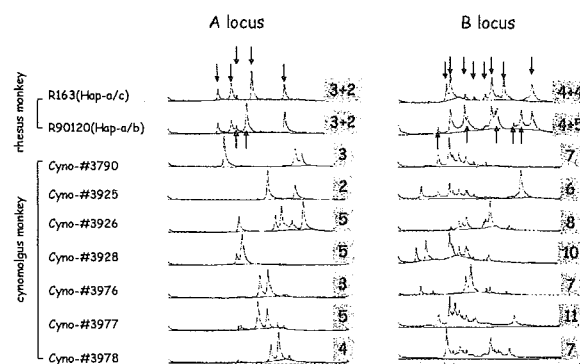
本研究に関連したヒト遺伝子解析研究は、ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守することとし、東京医科歯科大学難治疾患研究所倫理審査委員会の承認を受けている。[研究課題「HIV ウイルス感染防御機構の究明に関わる研究」(平成 13 年 8 月 28 日付)]

#### C. 研究結果

1) RSCA を応用した Mamu-A および Mamu-B の多型解析：

昨年度までに開発した RSCA 法に基づく MHC クラス I 遺伝子タイピング法を適用して、アカゲザルおよびカニクイザル個体を解析した。昨年度までの解析でアカゲザルではハプロタイプあたり 1-4 個の Mamu-A 遺伝子、2-6 個の Mamu-B 遺伝子が発現しており、このため個体あたりでは 2-8 個の Mamu-A 遺伝子、4-12 個の Mamu-B 遺伝子が発現することが判明している。本年度はアカゲザル実験個体のタイピングを行い、このことを確認した。一方、カニクイザル個体についても本法を用いた解析を実施したところ、個体あたり 2-5 個の Mamu-A 遺伝子、6-11 個の Mamu-B 遺伝子が発現していた。このことから、MHC クラス I 多重遺伝子構成はアカゲザルとカニクイザル (cynomolgus monkey, Mafa-A および Mafa-B 遺伝子) で類似しているものと考えられた。

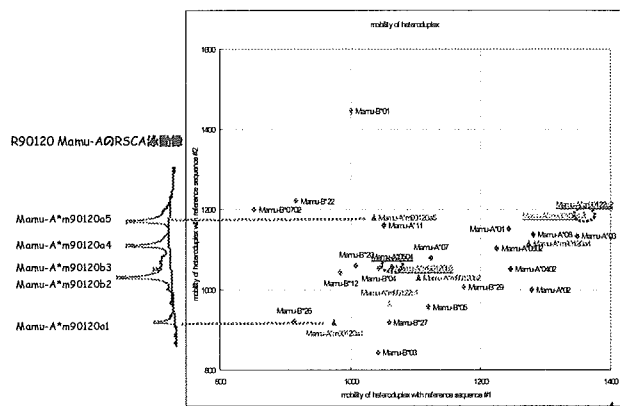
#### RSCA analysis of MHC class I of cynomolgus monkey Mafa-A/B



一方、RSCA 法によるタイピング法の精度を検証するために塩基配列が既知の MHC クラス I アリル (Mamu-A の 9 アリル、Mamu-B の 11 アリル) について、2 種のレファレンスを用いて泳動度を測定し、これを 2 次元にマップした。また、本研究でシーケンス配列を決定した 8 種の Mamu-A アリル、16 種の Mamu-B アリルとともに 2 次元にマップしたところ、配列が同一のアリルは完全に一致した泳動度を示すことが確認

された。このことは本法の精度が極めて高いことを示す。

### Mamu-A、BクローンのRSCAマップ

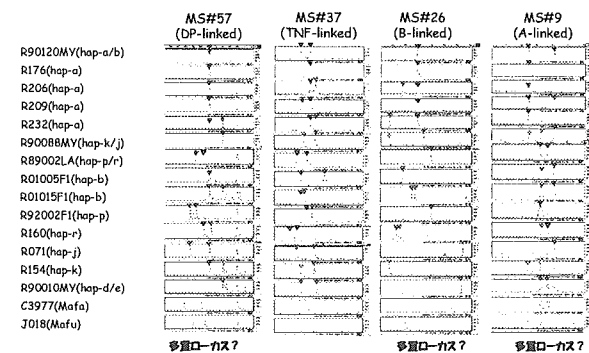


### 2) サル MHC に連鎖したマイクロサテライトの多型解析:

昨年度までにヒト配列を基にして設計したプライマーを用いて MHC 領域のマイクロサテライト解析を行って来た。ヒトにおいては、これらのマイクロサテライトマーカーが MHC 領域内の疾患関連遺伝子のマッピングに有用であるが、本年は HCV 感染後心筋症や HIV 感染後 AIDS などの感染症関連疾患や慢性血栓性肺高血圧のような原因不明の疾患を対象とした解析を行い、それぞれで、MHC 領域内の疾患関連遺伝子のマッピングを行った。

しかしながら、ヒト配列とサル配列には違いがあるため、ヒト用のマーカーの約 3 割程度したアカゲザルの解析には使用できなかった。最近アカゲザルの MHC 領域を含む BAC クローンの配列が公開されたため、その配列中からマイクロサテライト候補を選定し、プライマーを作製した。そのプライマーを用いた解析を実施したところ、いずれの領域のマイクロサテライトともアカゲザルで多型を示した。また、MHC-A、MHC-B、MHC-DP 領域では複数のバンドパターンが得られたことから、それらの領域ではマイクロサテライトを含んで遺伝子重複が生じていることが明らかとなった。また、これらのマーカーはカニクザル、ニホンザルでも使用可能であった。

### Segregation of rhesus MHC-linked microsatellite and monkey MHC haplotype



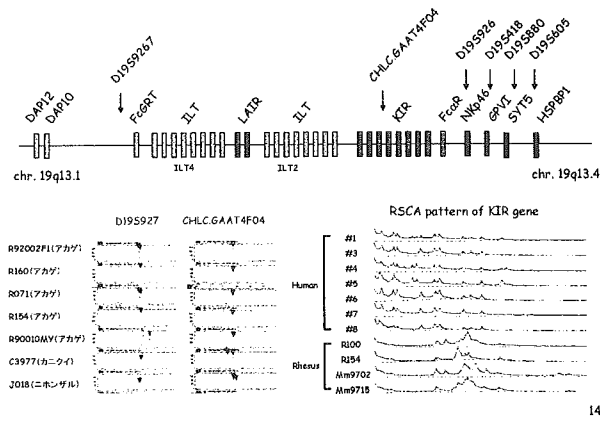
### 3) サル KIR ロカスの解析

Ig ドメイン型 NK レセプターである KIR ファミリーは HLA クラス I 分子をリガンドとするが、抑制性レセプターと活性型レセプターが存在し、それらはクラスターをなして KIR ロカスに存在する。ヒトでは KIR 遺伝子群の構成に大きな個体差があることが知られているが、特に注目すべきは、(1) HIV 感染後の AIDS 発症経過に関わるとされる KIR-3DS1 (活性化レセプター) と 3DL1 (抑制性レセプター) がヒトでは対立遺伝子の関係にあること、(2) 3DL/3DS ファミリーは MHC クラス I 分子をリガンドとするがヒトではそのファミリーを構成する遺伝子が 3 個であるのに対し、アカゲザルでは 10 個を越えると考えられることである。このことは、HIV 感染に関わる KIR 遺伝子群がサルではヒトよりさらに複雑な遺伝子構成をとっていることを示唆する。

昨年度までに KIR 遺伝子ファミリーを一括して増幅し、その PCR 産物の多様性を RSCA 法で解析する技術を開発したが、これのみでは全体の遺伝子構成が解析出来ないため、本年は KIR ロカス内のマイクロサテライトに着目した解析を行った。その結果、ヒトで多型を示すマーカー (D19S926, D19S418, D19S880, D19S605) はいずれもアカゲザルでは増幅できなかった。一方、ヒトで多型がないマーカー (D19S9267) および本研究において新たに設定したマーカー (CHLC.GAAT44F04) はいずれもサルで多型を示した。特に前者はアカゲザルで、後者はカニ

クイザル、ニホンザルで著明な多型パターンを呈した。

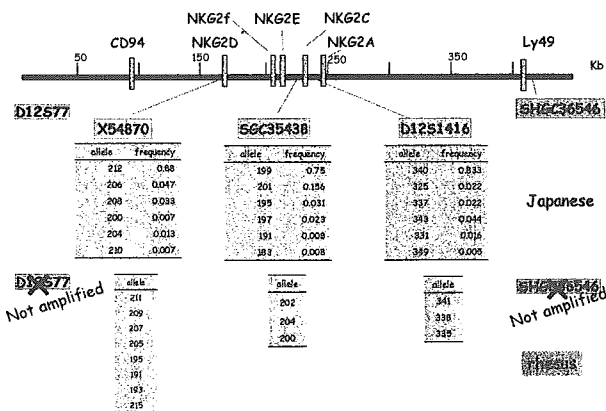
Polymorphism of KIR locus-linked microsatellite markers in old world monkeys



4) サル NKC 領域の解析:

レクチン型 NK レセプターである CD94, NKG2D, NKG2C, NKG2A などの遺伝子はクラスターをなして存在している。これらのうち NKG2A, C, E は CD94 とヘテロダイマーを形成し HLA-E をリガンドとする。一方、NKG2D はホモダイマーを形成し MIC 分子や RAET/ULBP 分子をリガンドとすることが知られている。本年は NKC ローカスの多様性を検討する目的で 5 種のマイクロサテライトマーカーを設定し、それらを用いて、ヒトおよびアカゲザルの多型解析を行った。

Polymorphisms of MS markers in NKC loci from human and rhesus



その結果、NKG2 遺伝子群周辺の 3 マーカー (X54870, SCG35438, D12S1416) ではヒト、アカゲザルのいずれにおいても多型が認められた。一方、2 種のマイクロサテライトマーカー

(S12S77, SHGC36546) ではアカゲザル DNA を増幅できなかった。

D. 考察

1) アカゲザル MHC クラス I 領域の多型解析:

アカゲザルを始めとする旧世界ザルでは MHC 領域に著明な遺伝子重複が生じているが、その重複数に個体差があることが知られている。このためクラス I 遺伝子、クラス II 遺伝子のいずれもがそれぞれの座位ごとにハプロタイプあたり数個から 20 個程度存在する。しかしながら、それらのうちどの遺伝子がどの程度発現しているかの情報は得られていなかった。我々は RSCA 法に基づくアカゲザル MHC クラス I 遺伝子群 (Mamu-A および Mamu-B) を開発し、これを用いてわが国で実験に用いられているコロニーの解析を行った。その結果、(1) ハプロタイプごとに異なる数の Mamu-A および Mamu-B 遺伝子が発現すること、(2) 発現レベルはアレル (正確には対立遺伝子とは言えないが、便宜上アレルとよぶ) ごとにかなり異なっていることが判明した。また、配列が既知のアレルを検討することで、RSCA 法の精度が極めて高いことを確認した。さらに、この方法でカニクイザルの MHC クラス I 遺伝子群 (Mafa-A および Mafa-B) も解析可能であることを明らかにした。本研究は実験動物サルの MHC ハプロタイプ構成を決定するのみならず、旧世界ザルにおける MHC 遺伝子群の分子進化を検討するためのよいツールとなると考えられた。

一方、MHC 領域のマイクロサテライト解析は、旧世界ザルの MHC 遺伝子が、用いたマイクロサテライトマーカーの範囲を含んで遺伝子重複していることを示した。これらのマーカーによる解析はアカゲザルのみならずカニクイザルやニホンザルでも可能であることから、MHC ハプロタイプ構成を簡便かつ迅速に決定する指標となりうると考えられた。また、ヒトにおいてはマイクロサテライトマーカーを用いることで疾患関連

遺伝子のマッピングが可能であったことから、本研究で設定したマーカーは実験動物サルの免疫制御関連遺伝子座のマッピングにおいて有用であると考えられる。

本年度までは旧世界ザルの MHC クラス I 遺伝子群のうち A と B に着目した検討を行って来たが、次年度以降は、NK レセプターのリガンドである MHC 遺伝子群 (MIC および MHC-E) の解析を加える予定である。

## 2) アカゲザル NK レセプターの構造解析:

ヒト、アカゲザルとも KIR ファミリーが遺伝子数に個体差のある多重遺伝子族で構成され、ゲノム DNA について RSCA 法を用いることで構造多型が比較的簡便に解析できた。一方、KIR 遺伝子自体を一括して解析するだけでは KIR ローカス構造の特徴は不明である。そこで本研究ではマイクロサテライトマーカーを用いた多様性解析に着手したが、ヒトとアカゲザルでは多型を示すマーカーがまったく異なっていた。今後新たなマイクロサテライトマーカーを設定し、それを用いた検討が必要である。

一方、NKC ローカスについてはヒト、サルともにマイクロサテライトマーカーを用いた多様性解析が可能であった。ことに活性型レセプターである NKG2D および抑制型レセプターである NKG2A の遺伝子周辺のマーカーにはヒト、アカゲザルいずれにおいても多型が存在したことから、今後これらを用いて免疫応答性との関連を検討することが可能であると考えられた。

これとは別に、NKG2D のリガンドである RAET/ULBP 遺伝子群の解析に着手した。ヒトでは3種のマイクロサテライトマーカーを用いた解析を行い、HIV 感染後の AIDS 発症と RAET/ULBP 領域マーカー多型との関連を見出している。しかしながら、これらのマーカーのいずれもがアカゲザルでは PCR 増幅が出来なかったため、今後さらなる検討を要する。

## E. 結論

RSCA 法を応用した MHC クラス I 遺伝子群の多型解析法を確立し、これがアカゲザル、カニクイザルの MHC 解析に有用であることを示した。また、マイクロサテライト解析を併用してクラス I 遺伝子のハプロタイプ構成を明らかにするとともに、同法を各個体のハプロタイプのタイピングに適用した。一方、最近個体の免疫制御における重要性が明らかとなっている NK 細胞レセプター遺伝子群 (KIR ファミリー、NKC ファミリー) がそれぞれクラスターをなして存在するローカスについて、その多様性をマイクロサテライトマーカーを用いて解析する手法を開発した。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Mori K, Sugimoto C, Ohgimoto S, Nakayama EE, Shinoda T, Kusagasa S, Takebe Y, Kano M, Matano T, Yuasa T, Kitagawa D, Miyazawa M, Takahashi Y, Yasunami M, Kimura A, Yamamoto N, Suzuki Y, Nagai Y: Influence of glycosylation on the efficacy of an Env-based vaccine against SIVmac239 in a macaque AIDS model. *J Virol* 2005; 79: 10386-10389.

2) Shichi D, Kikkawa FE, Ota M, Katsuyama Y, Kimura A, Matsumori A, Kulsky JK, Naruse KT, Inoko H: The haplotype block, NFKBIL1-ATP6V1G2-BAT1-MICB-MICA, within the class III-class I boundary region of the human major histocompatibility complex may control susceptibility to hepatitis C virus associated dilated cardiomyopathy. *Tissue Antigens* 2005; 66: 200-208.

3) Munkanta M, Terunuma H, Takahashi M, Hanabusa H, Miura T, Ikeda S, Sakai M, Fujii



T, Takahashi Y, Oka S, Matsuda J, Ishikawa M, Takashima Y, Mimaya J, Ito M, Kimura A, Yasumani M: HLA-B polymorphism in Japanese HIV-1 infected long-term surviving hemophiliacs. *Viral Immunol* 2005; 18: 500-505.

2. 学会発表

1) 安波道郎、高橋（田中）弓子、日野原邦彦、俣野哲朗、森一泰、本多三男、保富康広、宮澤正顕、木村彰方：アカゲザル MHC クラス I 領域の多型解析. 第 14 回日本組織適合性学会大会、熊本、2005 年 10 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## ワクチン効果判定モデル系の確立と SIV 感染抵抗性遺伝子 同定のためのアカゲサル MHC クラス II 遺伝子の解析

分担研究者 宮澤 正顕（近畿大学医学部 教授）  
 研究協力者 北口 大輔（近畿大学医学部 免疫学教室 研究員）

研究要旨 我々は、わが国で交配・維持され、サル免疫不全症候群ウイルス(SIV)感染・ワクチン開発実験に用いられてきた、或いは今後用いられる予定のアカゲサル個体群について、その MHC class II 遺伝子型を網羅的に決定し、DRB 遺伝子座の多重性とハプロタイプ構成を解明してきた。今年度は、これまで世界的にも解析が進んでいなかった DP および DQ 遺伝子座の対立遺伝子型決定法を開発し、多数個体の遺伝子型及びハプロタイプ構成を明らかにした。また、この過程で DP/DQ 領域における染色体乗り換えが頻繁に起こっている可能性が示唆されたので、これをゲノムレベルで確認するため、第 6 染色体 MHC 領域のマイクロサテライトマーカー遺伝子型を解析した。その結果、アカゲサル MHC 領域では、DP/DQ 領域に組換えの起こったハプロタイプが多く存在することが明らかとなった。

### A. 研究目的

HIV 感染の予防や免疫学的治療のモデルとして、アカゲサルの SIV 感染系は極めて有用である。しかしながら、免疫学的研究対象としてのアカゲサルには、その MHC タイピングが十分行われていないという問題点があった。ウイルス抗原に対する Tリンパ球応答能は MHC 遺伝子群によって厳密な制御を受けており、細胞傷害性 Tリンパ球活性化やウイルス中和抗体産生誘導の鍵となる CD4 陽性ヘルパー T 細胞による抗原認識は、MHC class II 遺伝子産物の構造に完全に依存している。従って、ワクチン開発を意図とした感染防御実験を行う際、対象個体群の MHC 遺伝子型が決定されていることは、採り上げようとするウイルス抗原に対するリンパ球反応性を保証するための必要条件となる。

アカゲサルの MHC class II 遺伝子座、特に DRB 座が多重性に富み、同一染色体上に発現可能な複数の遺伝子座が重複して存在して、極めて多様なハプロタイプを構成していることは、周知の事実である。このことは、単に遺伝学的に興味深いばかりでなく、ヒトを含む霊長類の進化における、感染抵抗性による選択を考える上でも重要である。一方、本研究の分担研究者の一人である森らが行ってきた、SIV 遺伝子産物上の Tリンパ球認識エピトープの解析で、DP または DQ 分子により提示される SIV 抗原エピトープが存在する可能性が示唆されている。しかしながら、アカゲサル DP, DQ 遺伝子座の多重性や多型性については、世界的にも研究が遅れており、ごく少数の exon 2 配列がデータベースに登録されているに過ぎない。

そこで本研究では、我が国で感染実験に用いられているアカゲサル個体群の MHC class II 遺伝子型とそのハプロタイプ構成を、DR 領域から DP 領域までの全体について網羅的に解析し、class II 領域内部での組換えの有無を検討することを目標とした。

### B. 研究方法

#### 1) 対象個体

国立感染症研究所及び医薬基盤研究所霊長類

Locus	Label	Forward primer	Reverse primer	Repeat unit	Number	Genescan size	Sequencing size
DRB274	VIC	AGACTAGATGTAGGGCTAGC	GTGTCTCTGCACTTGGCTATCTCAAC	TG	16	265	268
DRB276	FAM	GGTAAAATTCCTGACTGGCC	GTGTCTCGACAGCTCTTCTTAACCTGC	TG	12	205 221	210 226
	PET	CTGAGTTGGGCAGCATTG	GTGTCTCAGCCAGCATTGAGGATTG	AC	11	135	140
DRA-CA	NED	TGGAATCTCATCAAGGTCAG	GTGTCTCAGATTGTATGCTTCAGATG	TG	10	238 270	240 272

表 1. アカゲサル MHC class II 領域のマイクロサテライトとその遺伝子型決定に用いたプライマー



(倫理面への配慮)

本研究はアカゲザルの遺伝子解析に関するものであり、動物からの採血は、疼痛の防止に配慮し、動物愛護の精神に則り行った。

C. 研究結果

昨年度までに DRB 遺伝子型及びハプロタイプ構成が確定していた個体、及び今年度新たに DRB 遺伝子型を解析した個体について、DP/DQ 領域の対立遺伝子型を cDNA 塩基配列決定により確定した。DPA, DPB, DQA, DQB の各遺伝子座について、発現する対立遺伝子は一個体あたり最大二つであり、これら DP/DQ 遺伝子座については、DRB と異なり、染色体上の遺伝子座に多重性は無いことが明らかとなった。

共通の父親を持つ個体群についてその class II 遺伝子型を網羅的に解析し、ハプロタイプ構成を推定した例を図 1 に示す。子孫に共通して発現する class II 対立遺伝子の組から、R90-120 が持つ対立遺伝子は、DRB1\*1007-DRBZ26137-DQA\*03-DQB1\*1603-DQA\*0201 (96%)-DPB1\*04 の組(ハプロタイプ 90120-a)と、DRB\*w2002-DRB\*w2501-DQA\*0502-DQB1\*1603-DQA\*0201 (96%)-DPB1\*04 の組(ハプロタイプ 90120-b)であることがわかる。このことは、この二つのハプロタイプ間で多型性の認められるマイクロサテライトマーカーの遺伝子型、即ち DRA-CA (238)と D6S2876 (221)の組、及び DRA-CA (270)と D6S2876 (205)の組が、上記 class II 対立遺伝子の発現と同じ個体で観察される例が複数あることから、ゲノムレベルで支持されるが、一方で、発現する class II 対立遺伝子、マイクロサテライト遺伝子型の何れの観点からも、親個体と部分

的な相違を認める子孫個体も複数存在した。また、ごく少数の個体は父親から遺伝するはずのハプロタイプを全く持たず、親子関係の記録に誤りがあると推定された。

なお、DPA 座の対立遺伝子、DPA1\*0201 として登録されている exon 2 塩基配列と、96%の相同性を示す新規対立遺伝子を見出したが、その全長塩基配列は、本来の開始コドンが GTG に変異しており、18塩基対下流に in-frame の ATG コドンが存在していた。以下本来の stop codon までフレームシフトや stop codon の挿入はなく、恐らくタンパク質をコード出来ると思われる。

このようにして推定された MHC class II ハプロタイプ構成のうち、ミャンマー系とされる家系群に見出されたものを図 2 に、またラオス系とされる家系群に見出されたものを図 3 に、それぞれ模式的に纏めた。空欄となっている遺伝子座については、現在遺伝子型の確定を進めている。

D. 考察

我が国で SIV 感染実験に用いられているアカゲザルの MHC class II 遺伝子型と、その発現多重性を網羅的に解析し、これまで未報告の対立遺伝子多数を記載・登録すると共に、ハプロタイプ構成を明らかにしてきた。今年度は、DRB 遺伝子型とそのハプロタイプ構成に加え、DPA, DPB, DQA, DQB 各遺伝子の全長発現産物を解析する方法を確立し、ミャンマー系およびラオス系多数個体の class II 全遺伝子型を決定した。また、ゲノム上のマイクロサテライトマーカーについてもその遺伝子型を決定し、cDNA から決定した class II 対立遺伝子型と比較対照して、class II 領域全体のハプロタイプ構成を確定した。

図2から明らかな通り、ミャンマー系の個体群では DPA\*0201-DPB1\*04、或いはこれに類縁の DP ハプロタイプが、互いに全く異なる DRB-DQA ハプロタイプと同じ染色体上に存在すると考えられる例(ハプロタイプ 2a と 2b)、及びその逆に、DRB-DQA ハプロタイプは共通であるのに、同じ染色体上の DPA ハプロタイプは明らかに異なっている例が認められた(ハプロタイプ 2d1 と 2d2)。これらの例では、ゲノム上のマイクロサテライト遺伝子型からも同じ結論が得られ、DQ 領域と DP 領域の間に染色体の乗り換えが生じた結果、これらのハプロタイプが生まれた可能性が高い。

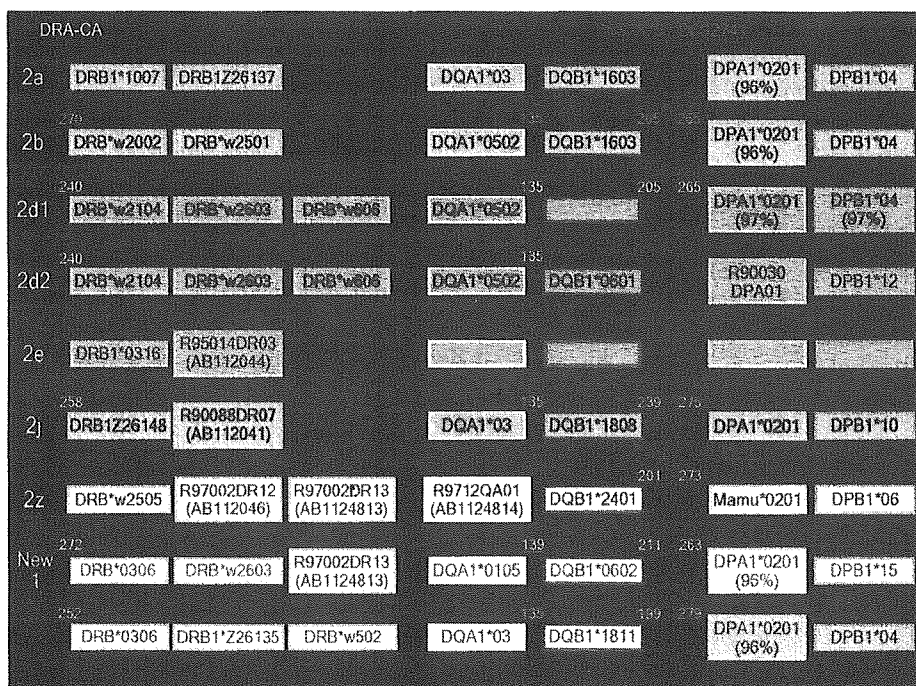


図 2. ミャンマー系個体に見出された MHC class II ハプロタイプ