

図 3. ラオス系個体に見出された MHC class II ハプロタイプ

これに関し、ゲノムレベルでアカゲザル MHC 領域を解析し、DQB の inversion を見出した報告があり、DQB 遺伝子座の前後に染色体組換えのホットスポットが存在する可能性がある。

ミャンマー系では比較的多型に乏しい D6S1666 座のマイクロサテライトであるが、ラオス系ではその遺伝子型が多型に富み、DRB-DQA ハプロタイプとの連鎖が明瞭であった。従って、少なくともラオス系については、D6S1666 の遺伝子型を決定することにより、class II ハプロタイプをある程度予測することが出来る。これは、今後遺伝子型決定の簡便化という観点から重要である。一方、ミャンマー系では DP-DQ 境界領域に存在する D6S2876 の多型性が目立つが、上記の通り DQB 遺伝子座の前後に染色体の組換えが生じていると考えられるハプロタイプがあり、class II 全体のハプロタイプ推定には使えない。

現在、これら class II 対立遺伝子の cDNA を全て発現ベクターに組込んでおり、今後タンパク質の発現解析と、提示される SIV 抗原エпитープの解析に有用であると考ええる。

E. 結論

我が国で SIV 感染実験に用いられているアカゲザル個体群、および今後実験に利用予定の個体群が発現する MHC class II 対立遺伝子型を、DR 領域から DP 領域に至る全長について網羅的に決定し、親子関係から予想されるハプロタイプ構成を明らかにした。その結果、DRB から DQA に至るハプロタイプと、DPA-DPB のハプロタイプが、DQB 遺伝子座の前後で組換えを起こしたと考えられるハプロタイプが複数見出され、ゲノム上のマイクロサテライト遺伝子型の解析結果も、これを支持した。

少なくともラオス系の個体群については、第6染色体のマイクロサテライト多型から class II の DRB-DQA ハプロタイプを推定することが可能であり、実用的意義がある。しかし、ミャンマー系、ラオス系とも、DQB 遺伝子座前後の組換えの可能性から、マイクロサテライト解析のみで class II 全体のハプロタイプを決定することは不可能であると考ええる。

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.* Online first: Feb. 21, 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_{mac239} 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 Rae1 ligand. *17th International Workshop on Retroviral Pathogenesis.* Saint-Malo, France,

November 1-6, 2005. (Abstracts for the Workshop p51, 2005)

2) Tsuji-Kawahara, S. and M. Miyazawa. MHC as immune resistance genes against mouse retroviral infections: their mechanisms of action. **International Workshop on Animal Genome Analysis 2005: "Analysis of MHC, MHC-related genes and disease resistance for animal breeding and selection."** November 9, 2005, Tokyo.

3) 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).

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

エイズ発症機序・宿主防御免疫機構解析のための動物モデルの確立
およびその応用に関する研究

分担研究者 本多三男 国立感染症研究所エイズ研究センター 第1研究グループ長

研究要旨：前年度までに、HIV/AIDS 候補ワクチンとしての組換え BCG と組換え DIs をワクチンベクターに用いたプライム・ブーストワクチンを改良し、サルモデルにおいて免疫原性と安全性について検討した。その中で、プライミング抗原として用いる組換え BCG ワクチンにおいて導入遺伝子のコドン使用頻度をマイコバクテリア化することによって、*in vitro* のみならず *in vivo* での抗原性が著しく増幅することを明らかにした。また、組換え DIs のブーストによって細胞性免疫応答は速やかに増強されることも確認した。さらに、BCG 既往免疫個体においても、ヒト投与量の組換え BCG と組換え DIs のプライム・ブーストワクチンは安全であり、高度に免疫応答を誘導することが明らかになった。本年度はワクチン評価に加えて、サルエイズモデルの改良にも着手し、カニクイサルにおいて CCR5-utilizing SHIV の感染モデルを構築し、よりヒトにおける HIV-1 の初感染に近いモデルとして利用可能か検討した。アカゲザルにおいて CCR5-utilizing SHIV として報告されている SHIV_{SF162P3} をカニクイサルで生体継代することでカニクイサルに馴化し、3代目のサルから SHIV_{SF162P3} variant を分離した。また、このウイルスをカニクイサルに接種することで、ウイルス血症を伴う CD4 陽性細胞の減少、とくにメモリーCD4 陽性細胞の減少が顕著に見られた。CCR5-utilizing SHIV 感染モデルでは、中和抗体誘導型ワクチンの評価など、これまで困難であった HIV-1 初感染のモデルとして広く利用できることが示唆された。

協力研究者

兼清優、松尾和浩、岡村智崇、山本直樹（国立感染症研究所エイズ研究センター）、網康至（国立感染症研究所動物管理室）

A. 研究目的

現在までに HIV/AIDS 感染動物モデルとして、非ヒト霊長類をはじめ、ヒト細胞・組織移植 SCID マウスなど報告されているが、十分にヒトにおける HIV-1 感染を模した動物モデルは存在しない。HIV/AIDS ワクチンを開発する上で、ワクチン評価モデルとしてのサルエイズモデルは必須のものとなりつつあり、SIV を用いたサルエイズモデルが最も汎用されているが、ワクチンの標的抗原が Env の場合には適用できず、SHIV 感染モデルが用いられている。

SHIV 感染モデルにおいて問題とされる極めて急性の感染病態と、HIV-1 臨床分離株と異なる細胞の tropism に関して克服すべく、新たな SHIV 感染モデルを構築する。

本研究では、CCR5-utilizing SHIV を用いて、よりヒトにおける HIV-1 の初感染に近い感染病態を呈するサルエイズモデルを

構築し、ワクチン評価モデルとしての利用価値について検討する。

CCR5-utilizing SHIV として Dr. Cheng-Mayer, Dr. Harouse らによって作出された SHIV_{SF162P3} は、標的細胞の coreceptor tropism が完全に CCR5 に依存したウイルスであり、HIV-1 の臨床分離株の持つ特徴を非常に保持した SHIV である。また、アカゲザルやブタオザルに接種することによって、ウイルス血症を引き起こすことが報告されている。

本研究ではこの CCR5-utilizing SHIV に着目し、カニクイサルにおける感染病態について解析するとともに、生体継代することで、よりカニクイサルに馴化することが可能であると考え、生体継代と分離ウイルスの characterization、感染カニクイサルの病態変化について検討した。

B. 研究方法

1. SHIV_{SF162P3} のカニクイサルにおける生体継代。継代1代目のサルに SHIV_{SF162P3} 1000 TCID₅₀ を経静脈的に接種し、感染10日後に末梢血 8 ml と骨髄液 2 ml を採取し、2

代目のサルに transfusion する。同様に感染 10 日後に 3 代目のサルに transfusion する。継代 3 代目のサルの感染 10 日後に鼠径部リンパ節からウイルスを分離する。

2. ウイルスの characterizaiton. 分離したウイルスは CXCR4 と CCR5 のインヒビターである KRH-1636 と TAK-779 を用いて coreceptor を決定する。
3. カニクイサルの感染実験。継代 3 代目のリンパ節より得られたウイルス 20 TCID₅₀ をナイーブなカニクイサルに経静脈的に接種し、感染後のウイルス RNA コピー数、末梢血中 CD4 陽性細胞数、CD4 陽性細胞のサブポピュレーションについて解析する。
4. CCR5-utilizing SHIV と SIV の比較。上述の CCR5-utilizing SHIV と SIV_{mac239} 20 TCID₅₀ を経静脈的に投与した場合の病態について、両者を比較検討する。

(倫理面への配慮)

すべての動物実験は、国立感染症研究所内に設置された動物実験委員会の承認を得て行われた。

C. 研究結果

1. カニクイサルにおいても SHIV_{SF162P3} を 1000 TCID₅₀ 経静脈的に接種することによって、 $10^{10^{6-7}}$ copies/ml 程度の viremia を引き起こし、一過性に末梢血中の CD4 陽性細胞の減少がみられた。また、CD4 陽性細胞の持続的な減少はみられないが、メモリーのサブポピュレーションでは持続的な減少が顕著にみられた (図 1)。
2. 生体継代 3 代目のサルの鼠径部リンパ節から、SHIV_{SF162P3} variant の 074LNI を得た。074LNI においても親株である SHIV_{SF162P3} と同様に CCR5-tropic であることを確認した (図 2)。
3. カニクイサル馴化 SHIV_{SF162P3} 074LNI を 20 TCID₅₀ 経静脈的に投与することで、カニクイサルに感染成立し、 10^{6-7} copies/ml 程度の viremia を起こし、末梢血 CD4/CD8 陽性細胞比の減少、CD4 陽性ナイーブ/メモリー比の上昇がみられた。
4. カニクイサルに SIV_{mac239} 20 TCID₅₀ を経静脈的に接種した場合、 10^7 copies/ml 程度の viremia peak がみられ、 10^{4-5} copies/ml

程度の virus load set point がみられた。また、末梢血 CD4/CD8 陽性細胞比の減少、一過性の CD4 陽性ナイーブ/メモリー比の上昇がみられた。

D. 考察

近年とくに注目の集められている HIV-1 Env を標的としたワクチン開発に対応すべく、よりヒトの HIV-1 初感染病態を模した SHIV 感染モデルの構築を行った。本研究ではワクチンによって誘導される免疫応答を解析する上でも必須次項である SIV/SHIV チャレンジ実験を改良することを主題に、カニクイサルを用いた CCR5-utilizing SHIV 感染モデルについて検討した。

使用した SHIV_{SF162P3} は臨床分離株である HIV-1_{SF162} 由来の Env を持っていることで、ヒトにおける HIV-1 初感染をサルモデルにおいて模すことが示唆されている。今回カニクイサルにおいて生体継代することによって、カニクイサルに馴化され、より安定した結果が得られるようになったことは、今後のワクチン評価実験におけるチャレンジウイルスのひとつの選択肢となることが予想され、大いに期待できる感染モデルであると考えられる。また、CD4 陽性のメモリーサブポピュレーションの細胞が選択的に減少する現象は、今までの SHIV 感染モデルにはない特徴であり、ヒトにおける HIV-1 感染モデルとして非常に優れていると考えられる。

現在サルエイズモデルにおいて、最も汎用されるチャレンジウイルスである SIV_{mac239} と比較した場合には、set point のウイルス RNA コピー数では劣るものの、CD4 陽性細胞の一過性の現象や、メモリーサブポピュレーションの持続的減少については、本モデルの特徴的所見といえる。

今後 HIV-1 Env を標的としたようなワクチンの評価モデルとして応用可能であると考えられ、とくに中和抗体誘導型ワクチンなど short term の感染防御能評価や病態解析に有用なモデルとなる可能性が示唆された。

E. 結論

HIV-1 の絶対的な感染動物モデルは現在

のところ存在しないため、HIV/AIDS ワクチンの評価についてのコンセンサスはない。ヒトにおける HIV-1 感染を模すような感染モデルが待望されている状況において、本研究で行った CCR5-utilizing SHIV の持つ可能性は、今後より一層高まるものと考えられる。また、経粘膜感染系も含めた感染モデルのさらなる改良の必要性があると思われる。

F. 健康危害情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kanekiyo, M., K. Matsuo, M. Hamatake, T. Hamano, T. Ohsu, S. Matsumoto, T. Yamada, S. Yamazaki, A. Hasegawa, N. Yamamoto, and M. Honda. Mycobacterial codon optimization enhances antigen expression and virus-specific immune responses in recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin expressing the human immunodeficiency virus type 1 Gag. *J. Virol.* **79**: 8716-8723, 2005.
- 2) Ami, Y., Y. Izumi, K. Matsuo, K. Someya, M. Kanekiyo, S. Horibata, N. Yoshino, K. Sakai, K. Shinohara, S. Yamazaki, N. Yamamoto, and M. Honda. Priming-boosting vaccination with recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin and a non-replicating vaccinia virus recombinant leads to long-lasting and effective immunity. *J. Virol.* **79**: 12871-12879, 2005.
- 3) Kawahara, M., K. Matsuo, and M. Honda. Intradermal and oral immunization with recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the simian immunodeficiency virus Gag protein induces long-lasting, antigen-specific immune responses in guinea pigs. *Clin. Immun.* **119**: 67-78, 2006.
- 4) Eda, Y., M. Takizawa, T. Murakami, H.

Maeda, K. Kimachi, H. Yonemura, S. Koyanagi, K. Shiosaki, H. Higuchi, K. Makizumi, T. Nakashima, K. Osatomi, S. Tokiyoshi, S. Matsushita, N. Yamamoto, and M. Honda. Sequential immunization with V3 peptides from primary HIV-1 produces cross-neutralizing antibodies against primary isolates with matching narrow neutralization sequence motif. *J. Virol.* in press, 2006.

- 5) Eda, Y., T. Murakami, Y. Ami, T. Nakasone, M. Takizawa, K. Someya, M. Kaizu, Y. Izumi, N. Yoshino, S. Matsushita, H. Higuchi, H. Matsui, K. Shinohara, H. Takeuchi, Y. Koyanagi, N. Yamamoto, and M. Honda. Anti-V3 humanized antibody KD-247 effectively suppresses ex vivo generation of human immunodeficiency virus type 1 and affords sterile protection of monkeys against a heterologous simian/human immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* in press, 2006

2. 学会発表

- 1) Kanekiyo, M., Y. Ami, K. Matsuo, K. Someya, Y. Suzaki, N. Yoshino, A. Hasegawa, N. Yamamoto, and M. Honda. Enhanced effects of codon optimization on HIV/SIV gene expression in recombinant BCG in macaques. *The 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific*. MoA03-04. July 1-5, Kobe.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

図1. カニクイサルにおける SHIV_{SF162P3} の生体継代。継代 1 代目(tpc071), 2 代目(tpc094), 3 代目(tpc074)のウイルス RNA コピー数と末梢血中 CD4 陽性 T 細胞の絶対数を左図に示す。右図は感染前後の CD4 陽性細胞サブポピュレーションの変化を示す。

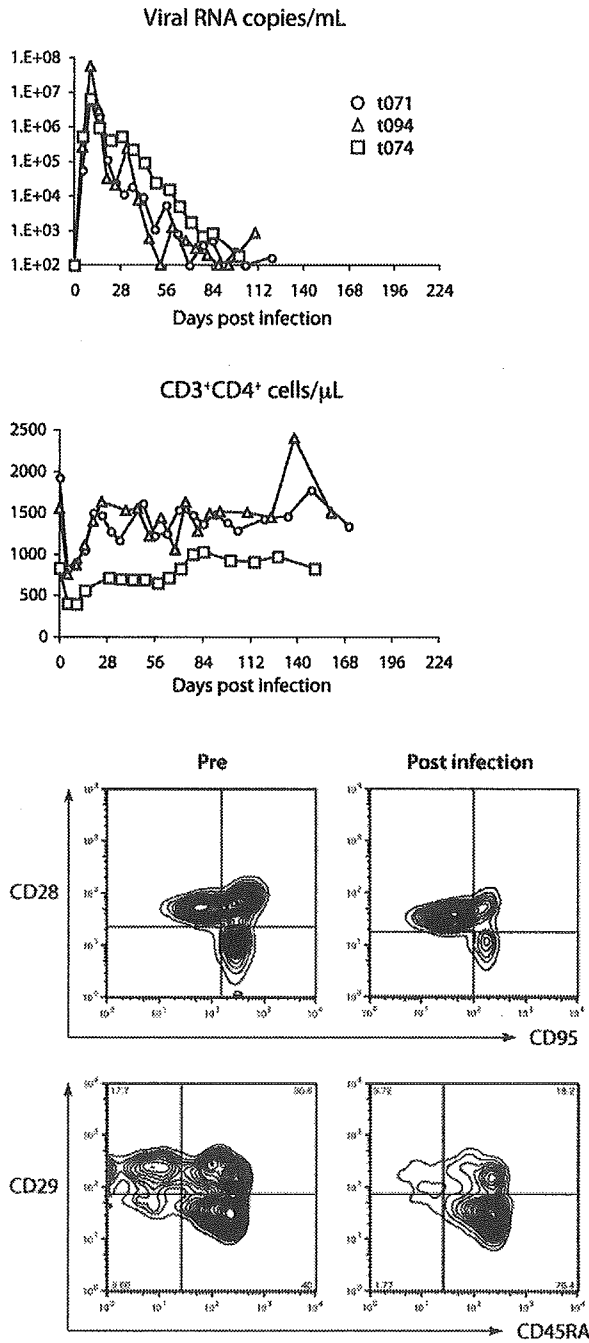
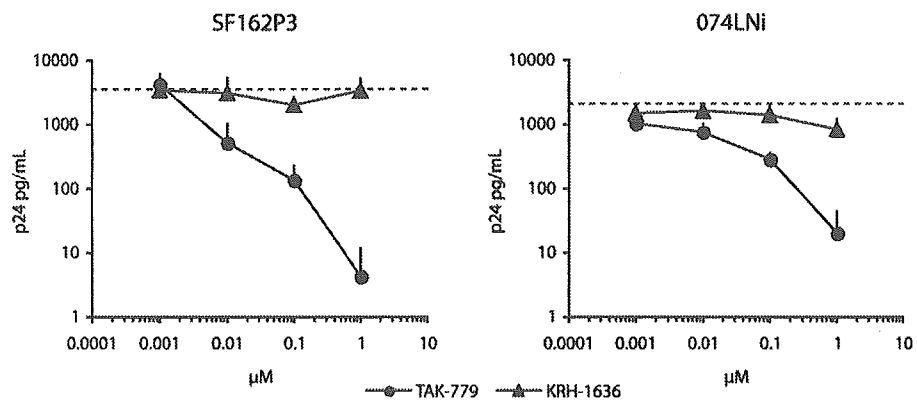


図 2. 生体継代 3 代目(tpc074)の感染 10 日後のリンパ節から得られた SHIV_{SF162P3} variant 074LNI (右) と親株 SHIV_{SF162P3} のコレセプター指向性。CCR5 と CXCR4 特異的インヒビターである TAK-779 と KRH-1636 を使用したウイルス増殖阻害効果の解析。



エイズウイルスは様々な方法にて生体からの免疫反応から回避し、生体内で増殖することが知られている。エイズウイルスの env における糖鎖結合は宿主の免疫系からの回避の一つと考えられ、この糖鎖結合部位を取り除いた SIV(d5G)は生体内で増殖せず、野生型 SIV(WT)に対しワクチン効果をもたらす。本研究では WT と d5G の env の発現ならびに免疫系への認識をマウスを用いて検討した。WT と d5G の蛋白の発現は d5G 感染のほうが WT に比べ早期に細胞膜表面にて行われた。WT と d5G の DNA ワクチンをマウスに投与したところ env 特異抗体の誘導では両免疫群に差は認められなかったが、env 特異的細胞傷害性 T リンパ球(CTL)の誘導では d5G DNA ワクチン免疫群で優位に高い活性が得られ、その標的エピトープを検討したところ d5G では誘導されるが、WT では誘導されないエピトープがあることが示された。

A.研究目的

エイズウイルスは種々の機構により生体の免疫監視機構から回避し、慢性感染を起こすと考えられている。エイズウイルスの env における糖鎖結合部位の存在もその一つと考えられ、この糖鎖結合部位を取り除いた SIV は生体内で増殖せず、野生型 SIV に対しワクチン効果をもたらす。この研究が報告された当初は糖鎖結合部位を取り除いた SIV は中和抗体の誘導を高めウイルス自身も中和されやすいと考えられてきたが、我々は誘導される液性免疫反応は糖鎖結合部位を取り除くことにより変化を示さないことを報告し、細胞性免疫の誘導の差が病態を規定していることが示唆された。本研究では糖鎖結合部位を取り除いた SIV(d5G)と野生型 SIV(WT)の DNA ワクチン、遺伝子組み込みリコンビナントワクチニアワクチンを用い、誘導される細胞性免疫を比較、検討した。

B.研究方法

- 1) 野生型 SIVenv (WT)および SIV5Genv (d5G)をプラスミド(pJW)に組み込み DNA ワクチンを作製した。
- 2) DNA ワクチンを BALB/C x C57BL/6 F1 (CB6F1)マウス筋肉内に electroporation 法を用いて筋肉内に 1 週間隔で 3 回免疫した。
- 3) 免疫マウスの脾細胞の CD8+細胞をを in vitro で SIVenv および SIVd5Genv 組み込みワクチニアウイルスで刺激した後 ELISPOT assay にてインターフェロン γ (IFN- γ)産生細胞を測定した。
- 3) 免疫マウスの脾細胞を用い野生型 SIVenv および SIVd5Genv 組み込みワクチニアウイルスを感染させ、マイトマイシン処理をした同型脾細胞を刺激細胞として細胞傷害性 T リンパ球 (CTL)の誘導を測定した。
- 4) SIVenv のアミノ酸 25mer を 13 オーバーラップさせ 42 個のアミノ酸を作成し、CTL エピトープの検索を行った。

(倫理面への配慮)

本実験はマウスを用いた実験であり、わが国の関連法規及び三重大学医学部共同研究施設・実験動物共同研究室内の規約を遵守し、疼痛の防止に配慮しつつ、動物愛護の精神に則って行った。動物実験の実施については、三重大学医学部動物実験委員会の許可を得た。

C. 研究結果

1. SIVenv (WT) および SIV5Genv (d5G) 組み込みワクシニアウイルス感染による細胞融合：MT-2 細胞に SIVenv (WT) および SIV5Genv (d5G) 組み込みワクシニアウイルス (rVV) を感染させ細胞融合効果を見たところ明らかに rVV-SIVd5G の細胞融合効果が WT 以上に明確に認められた (Fig. 1)。

2. HIV 特異的免疫反応：免疫マウスに SIV env WT および d5G 組み込みワクシニアウイルスを接種したところ d5G 免疫マウスがいずれのウイルスに対しても *in vivo* で WT 免疫に比べ高い抗ウイルス効果を誘導した (Fig. 2)。免疫マウスの脾細胞からの CD8⁺細胞を組み換えワクシニアウイルスで刺激し γ -IFN 産生細胞を ELISPOT assay で調べたところ d5G 免疫マウス細胞を d5G 組み込みワクシニアウイルスで刺激した時が最も高い値を示した (Fig. 3a)。しかしながら SIV env に対する抗体産生は両免疫群に差は無く、中和活性も示さなかった (Fig. 3b、Table 1)。免疫マウスの脾細胞から特異的 CTL を誘導する際に、免疫、*in vitro* での刺激、標的細胞の標識にそれぞれ WT と d5G を用い全ての組み合わせにおいて CTL の誘導を試みたところ、免疫、刺激、標的のいずれにおいても d5G は WT に比べ高い CTL 活性を誘導した (Fig. 4)。オーバーラッピングペプチドで得られたエピトープに

対する CTL 活性では aa.205-229 領域は d5G 免疫でのみ誘導され標的細胞を WT 組み込みワクシニアウイルス感染細胞とした時も aa.205-229 刺激で誘導した CTL は細胞障害活性を示さず、d5G と WT では抗原提示に差があることが認められた (Fig.5)。

D. 考察

エイズウイルスの病態解明は本ウイルスに対する予防、治療を考えた場合に必須であることは疑う余地はない。エイズウイルスの他のウイルスと比較すると極端に多い env における糖鎖結合部位の存在は慢性感染を引き起こす本ウイルス感染症において病態と関連すると考えられる。我々は過去に糖鎖結合部位を取り除いた SIV(d5G) は生体内で増殖せず、野生型 SIV(WT) に対しワクチン効果をもたらすことを報告しており、本研究ではその機構解明をマウスにおいて DNA ワクチン、リコンビナントワクチンを用いた。本研究では糖鎖結合部位を除いた env 蛋白は細胞表面で短時間に合成され、それにより抗原提示が高まり、CTL の誘導が増強されたと考えられる。この様に生体の免疫系、特に細胞性免疫を増強し、ウイルス自身が弱毒化されるという報告は極めて少なく、今後ワクチン開発や治療に新しい可能性を示すと考えられる。

E. 結論

エイズウイルスの env における糖鎖結合部位の除去はウイルス特異的細胞性免疫の誘導を高める。

F. 健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawano,M., Inada,H., Kaito,M., Yoshida,Y., Ito,M., Komada,H., Tsurudome,M., Nishio,M., Yasutomi,Y. and Ito.Y. Enormous aggregates of Nucleocapsid-RNA like structures are observed in the cells infected with recombinant human parainfluenza type 2 virus (hPIV2) having the deleted M protein. submitted
- 2) Nishikubo,K., Imanaka-Yoshida,K., Tamaki,S., Hiroe,M., Yoshida,T., Adachi,Y. and Yasutomi,Y. Establishment of a novel animal model of myocarditis by utilizing different immune responses to Bacillus Calmette-Guérin (BCG) in mice. submitted
- 3) Yasuhiro Yasutomi. Chimeric recombinant hepatitis E virus-like particles presenting foreign epitopes as a novel vector of vaccine by oral administration. Holland,CR. and Miyamura,T Eds. Structure-based viral replication. World Scientific Publishing.in press
- 4) Takamura,S., Matsuo,K., Takebe,Y. and Yasutomi,Y. Ag85B of mycobacteria elicits effective CTL responses through activation of robust Th1 immunity as a novel adjuvant in DNA vaccine. *J.Immunol.*175:2541-2547, 2005.

2.学会発表

- 1) 松原明弘、河岡義裕、保富康宏：インフルエンザ DNA ワクチン封入 E 型肝炎ウイルス様中空粒子(HEV-VLP)による経口インフルエンザワクチン.第 53 回に本ウイルス学会 (横浜)
- 2) 河野光雄、保富康宏、唐松克夫、松原明弘、高村史記、駒田洋、伊藤守弘、鶴留雅人、西尾真智子、伊藤康彦：マウスインターロイキ

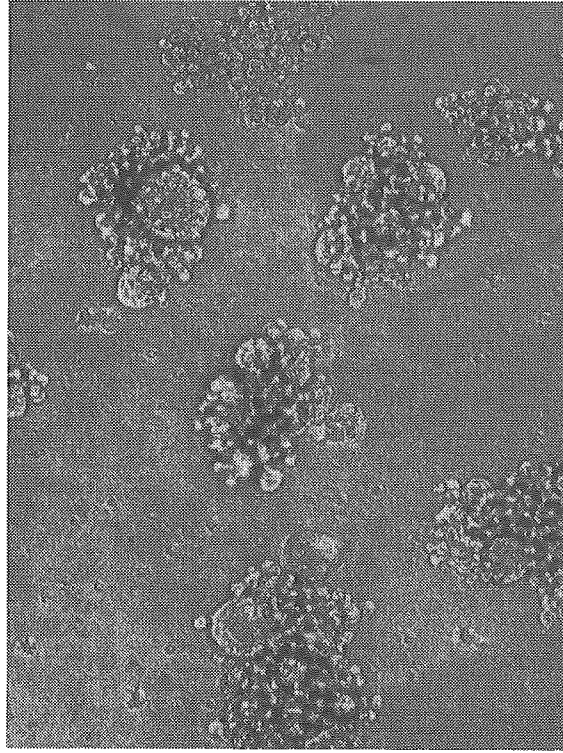
ン 4 を挿入したパラインフルエンザ 2 型ウイルスの性状解析. 第 53 回に本ウイルス学会 (横浜)

- 3) 佐藤憲一、銭谷幹男、高橋宏樹、保富康宏、小原道法:HCV トランスジェニックマウスにおける初期免疫応答. 第 53 回に本ウイルス学会 (横浜)
- 4) 唐松克夫、保富康宏：抗酸菌分泌抗原 Ag85B の新規アジュバントとしての可能性. 第 53 回に本ウイルス学会 (横浜)
- 5) 唐松克夫、保富康宏：抗酸菌由来 Ag85B DNA ワクチンによる喘息の抑制効果.第 35 回日本免疫学会 (横浜)
- 6) 森如、保富康宏、水谷仁：Ag85B のマウス反復ハプテン誘発皮膚炎モデルへの効果の検討. 第 35 回日本免疫学会 (横浜)
- 7) 保富康宏：教育講演「ワクチンとは」.第 37 回日本小児感染症学会
- 8) Yasuhiro Yasutomi: Oral administration of DNA vaccine by using virus-like particles derived from orally transmissible virus. 4th International Gene Therapy Symposium.

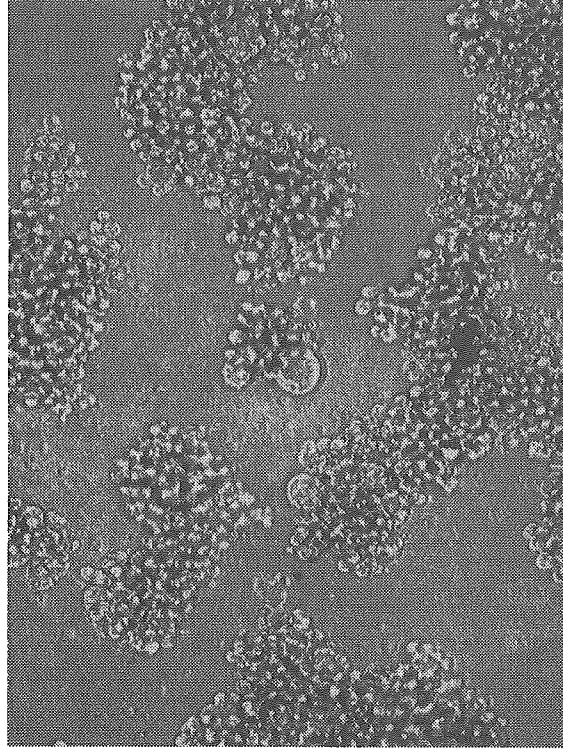
H.知的財産権の出願・登録状況

- 1) α 抗原のワクチンにおけるアジュバント剤としての利用 (出願中、特開 2002-114708)
- 2) α 抗原のアレルギー性疾患治療剤としての利用 (出願中、PCT/JP/01459)
- 3) リポソームワクチンの作製法 (出願中、PCT/JP2006/303371)

MT-2 cell infected with
rVV-SIV d5G (MOI 0.5)



MT-2 cell infected with
rVV-SIV WT (MOI 0.5)



(24hr)

Fig. 1 d5GおよびWT env 組み込みrVV感染細胞における細胞癒合
CD4分子を発現しているMT-2細胞にrVV-SIVd5GおよびrVV-SIVWTを感染させ24時間後の細胞融合を観察した。

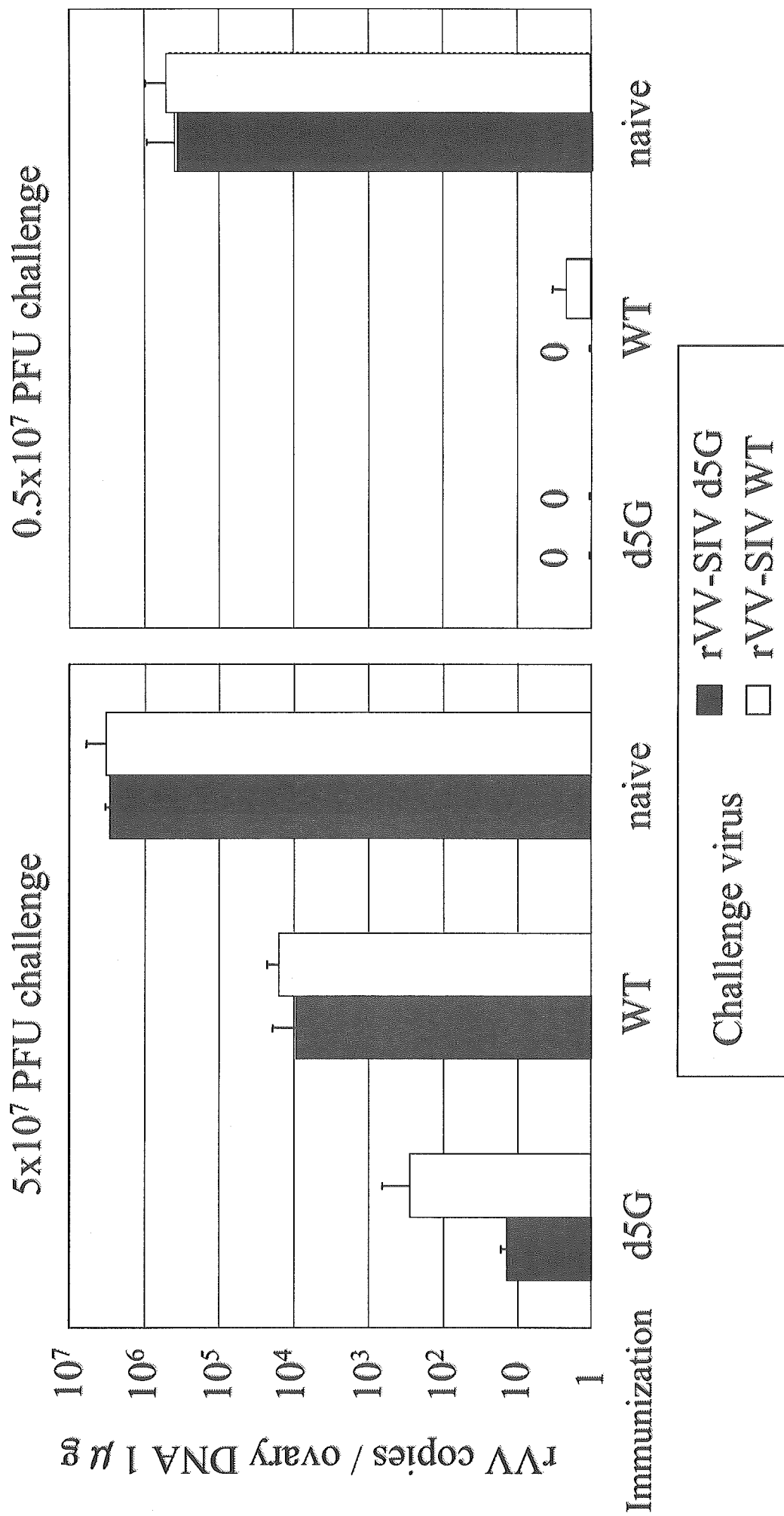


Fig. 2 d5GおよびWT env DNAワクチン免疫マウスのin vivoでの抗ウイルス活性
 マウスにd5GまたはWT env DNAワクチンを接種し、d5GまたはWT env組み込みワクシニアウイルスをチャレンジし、チャレンジ後5日目での卵
 巣におけるワクシニアウイルスをRT-PCRで測定した。

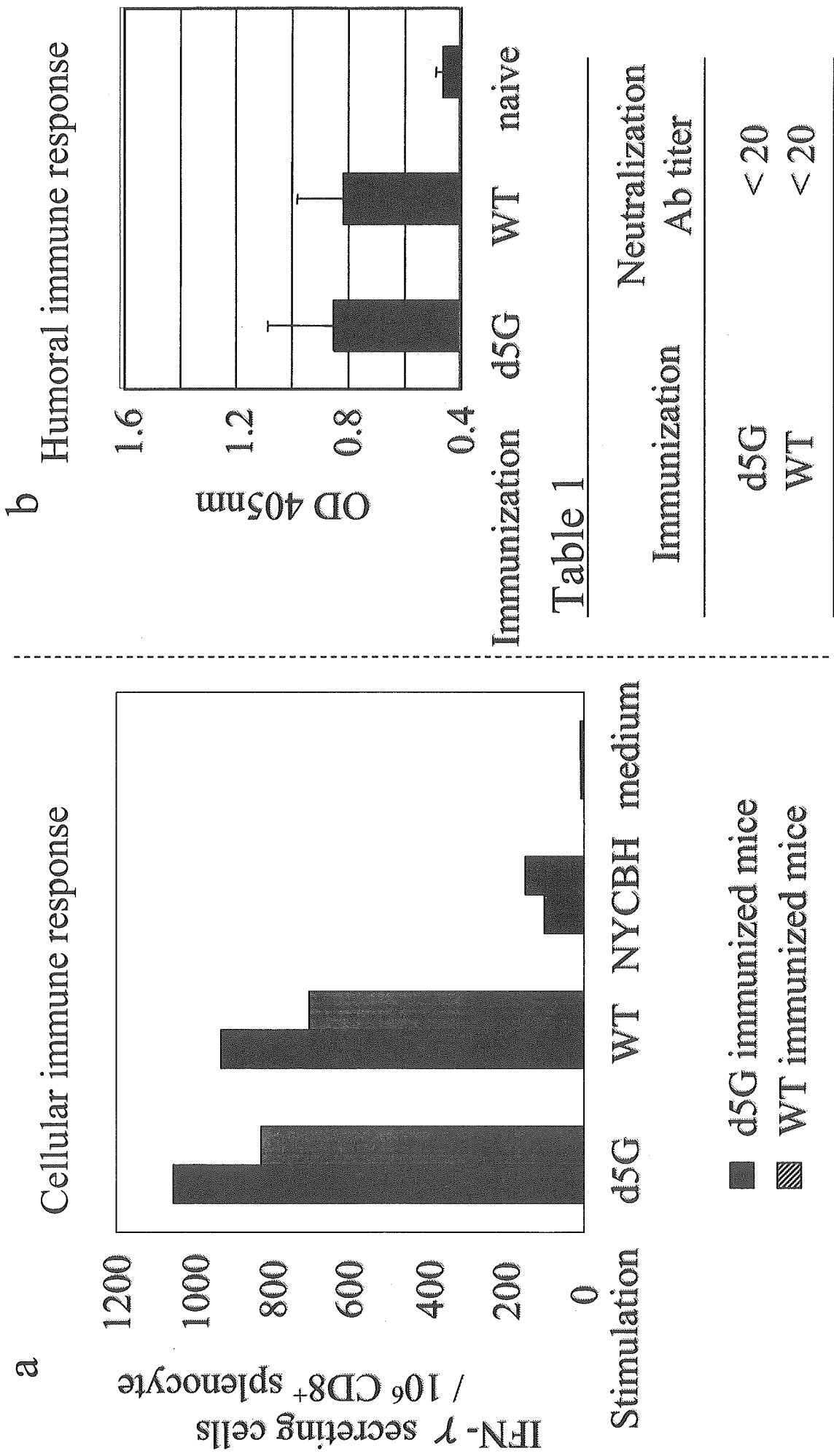


Fig. 3 d5GおよびWT DNAワクチン免疫マウスにおける特異的ELISPOTと抗体誘導免疫マウスの脾細胞のCD8⁺細胞におけるd5GおよびWT特異的IFN- γ 産生細胞のELISAによる測定(b)

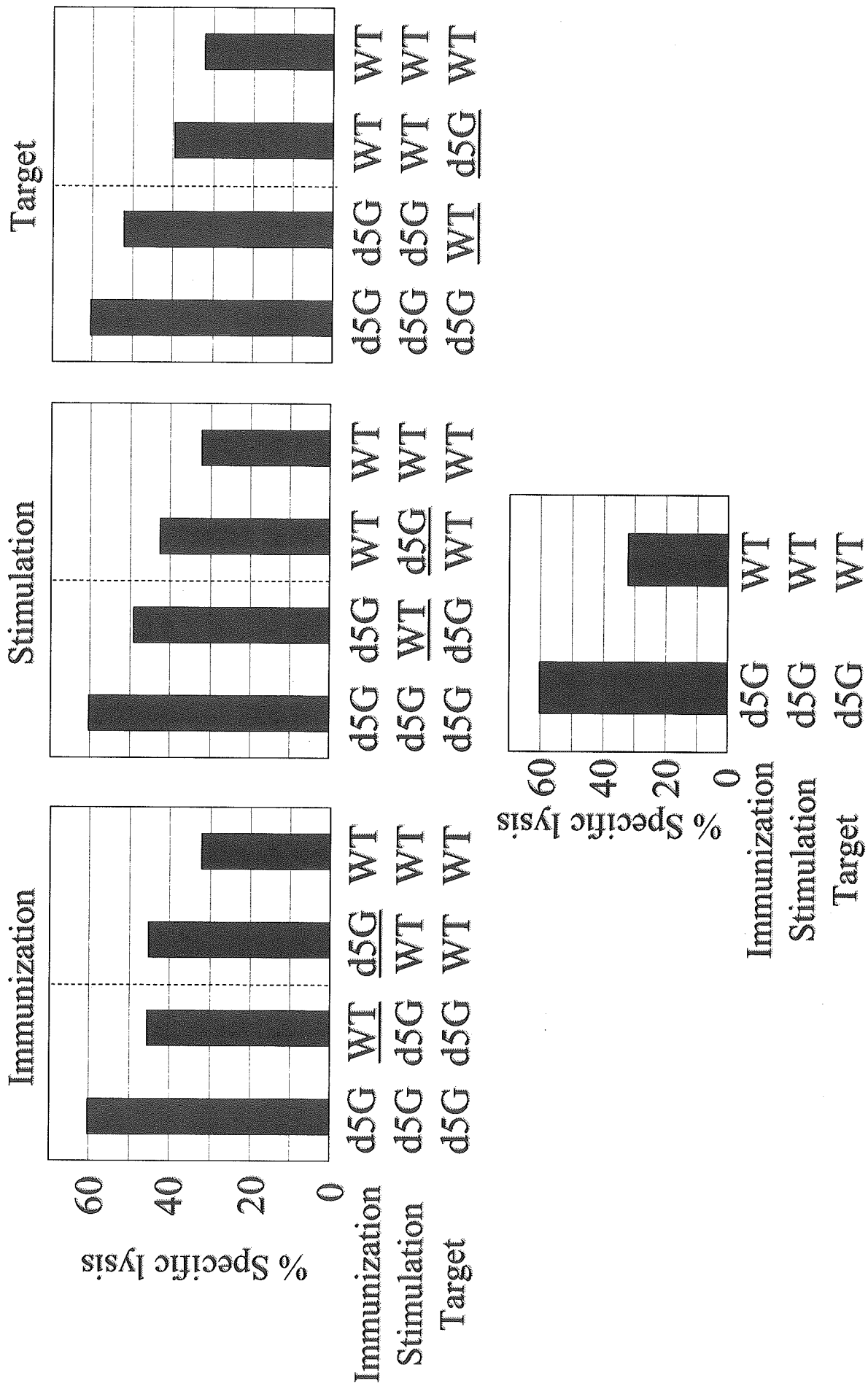
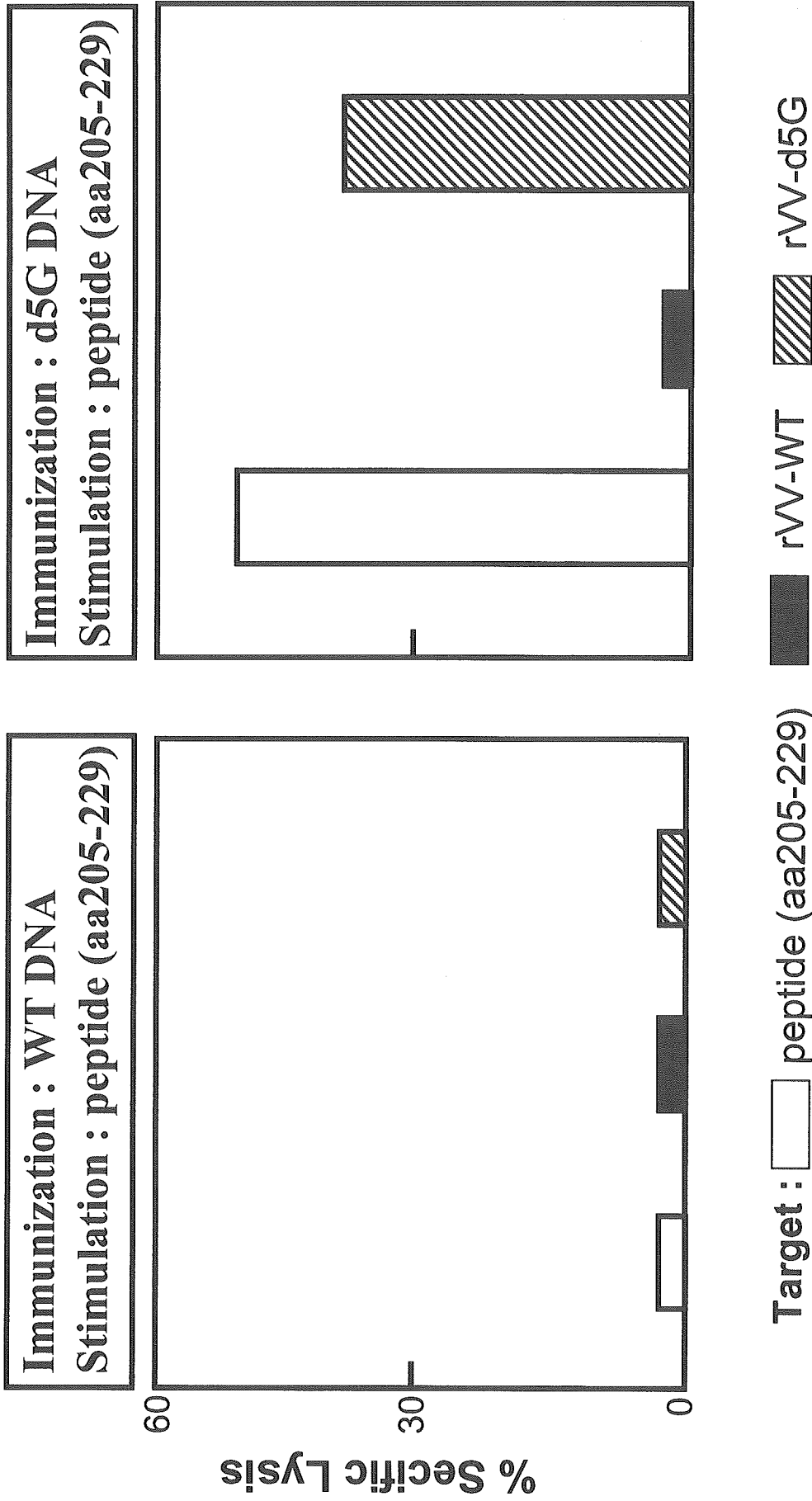


Fig. 4 DNAワクチン免疫マウスにおけるCTLの誘導
 免疫、刺激、標的を各々d5GおよびWTの組み合わせにて免疫マウスの脾細胞で誘導されるCTL活性を比較した。



<amino acid sequence>

aa.205-229 RCYMNHCNTSVIQESCDKH YWDAIR

Fig. 5 d5GとWTのエピトープ特異的CTLの誘導とCTLエピトープの発現
d5GおよびWT DNAワクチン免疫マウスの脾細胞をペプチド(aa205-229)で刺激し、標的細胞をペプチド、d5G組み込みワクチニアウ
イルス、WT組み込みワクチニアウイルスとしてCTL活性を比較した。

SIV 複製及び宿主免疫回避に関わるウイルス側・宿主因子側の作用機構に関する解析

分担研究者 明里宏文（独立行政法人 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター）

研究協力者 飯島沙幸、李永仲

研究要旨：nef 遺伝子はウイルス感染細胞における MHC-I 発現を抑制することにより、CTL による抗原認識からの回避を可能とする。本研究では、HIV 及び SIV 由来 nef に共通する MHC-I 発現抑制機構を解明するための基盤として、HIV 由来 Nef 蛋白において同機能に寄与するアミノ酸残基の特定を試みた。その結果、HIV/SIV 間で保存性の高い N 末端側 Val16 及び Met20 に加え、Trp13 が MHC-I 発現制御に寄与していることが明らかとなった。また、これらのアミノ酸が Nef N 末に存在するミリスチン酸との相互作用により、Nef 蛋白の構造変換に関与している可能性が示唆された。本研究成果は Nef による宿主免疫回避のメカニズムを解明するための重要な知見であると考えられた。

A. 研究目的

SIV サル感染実験系はエイズの動物モデルとして、抗 HIV 薬やワクチン開発のための前臨床試験のみならず、エイズウイルスに特徴的な「アクセサリー遺伝子」の機能的解明にも重要な役割を果たしてきた。アクセサリー遺伝子の一つである nef 遺伝子は宿主免疫の制御機能を司っていることが知られており、ウイルス感染細胞における MHC class-I 発現を抑制することで CTL による抗原認識を回避する。このような Nef 機能は HIV, SIV 共に認められ、

HIV 由来 nef 遺伝子を SIV の nef 遺伝子部位に組み換えたキメラウイルスはサルに病原性を示すことから機能的に補完性があると考えられる。そこで本研究では、HIV および SIV 由来 nef に共通する MHC class-I 発現抑制機構を明らかにするとともに、その機能発現に関わる宿主側因子の役割を解析することを最終目標としたい。

B. 研究方法

env 欠損型 HIV-1 分子クローンである pNL43 Δenv を基に、Nef N 末端側においてサブタイプ間で保存性の高いアミノ酸残基に各種点変異を導入した。これらを VSV-G 発現ベクターと共に HeLa 細胞へ遺伝子導入し、48 時間後 Nef 変異体を含む VSV-G シュードタイプウイルス産生細胞を回収した。ウイルスを CEM-GFP 細胞に感染 2-3 日後、ウイルス感染細胞 (GFP 陽性) の細胞表面上 MHC-I の発現量を flow cytometry にて解析した。同時に得られたウイルス産生細胞・ウイルス上清について、Western blotting 法により Nef 蛋白をはじめとするウイルスタンパク質の解析を行った。さらに、Nef の N 末端領域の分子構造について、これまでに報告されている NMR データと上記の変異体解析の結果をあわせ、構造解析シミュレーションを行った。

C. 研究結果

これまでの研究により、HIV/SIV Nef N 末端領域はミリスチル化を受けるのみならず、塩基性アミノ酸に富んでおり、また α -helix 構造をとると予測される。この領域は HIV-1 Nef における MHC-I 発現抑制機能に大きく関与することが知られており、この領域の欠失または 20 番目のアミノ酸残基である Met の Ala への置換変異 (M20A) により同機能を失活する (Akari et al., 2000) が SIV-Nef では不明である。以上の理由から、HIV/SIV Nef において保存性の高いこの領域が MHC-I 発現抑制を調節するドメインであると予想し、HIV Nef において塩基性アミノ酸の機能発現への関与を検討したところ、Arg17,19,21,22 を全て Ala に置換した変異体 ΔR では MHC-I 発現抑制機能は維持されていた。そこで HIV Nef N 末端領域において、Met20 以外に MHC-I 発現抑制効果に寄与するアミノ酸残基の有無について検討したところ、Nef N 末端 α -helix 領域でよく保存されているアミノ酸残基 Val16 の置換変異体 V16R 及び V16E において MHC-I 発現抑制効果の低下が確認された(平成 16 年度報告)。

さらに他の保存性の高いアミノ酸に検討を進めるため、Gly12, Trp13 を選択し(Fig.1)、変異体として、これらを側鎖の極性の異なるアミノ酸 (G12R, G12E, W13Y)、側鎖の極性が同じで長さの異なるアミノ酸 (G12A, W13A) に置換した Nef を持つ HIV-1 NL43 感染性分子クローンを構築した。この変異体を持つウイルスを作成し、CEM-GFP 細胞における MHC-I への影響について解析を行った。その結果、W13A で MHC-I 発現抑制効果が顕著に低下する一方、W13Y 及び全ての G12 変異体では影響は見られなかった。これらの変異体について CD4 発現抑制効果を検討したところ全ての変異体において野生型 Nef と同様の作用が認められた(Fig.2)。

以上の変異体解析の結果と、これまでに報告されている NMR 解析 (Geyer et al., JMB 1999) のデータ等を参照し、HIV Nef N 末端領域構造のシミュレーション解析を行った (Fig.3)。MHC-I 発現抑制機能発現に寄与している三つのアミノ酸のうち、Val16, Met20 は N 末端の α -helix 内に存在し、ミリスチル基と「疎水性結合」によって相互作用している可能性が示唆された。また Trp13 は、5 番目のトリプトファン (Trp5) と側鎖のインドール環で相互作用し、N 末端領域の構造維持に関わっている可能性が考えられる。

D. 考察

HIV Nef の MHC-I 発現抑制効果において、以前に報告した Met20 に加え、Trp13, Val16 も本作用に寄与していることが明らかとなった。Trp13 では、側鎖の極性は異なるが Trp と同じくベンゼン環が存在するアミノ酸 (Tyr) に置換することで顕著な機能低下が見られた。Val16 では側鎖の極性が変化すると機能低下が見られたことから、(i)Trp13 の側鎖にあるベンゼン環が重要(ii)Val16, Met20 の側鎖の疎水性が重要、というように異なる機序で MHC-I 発現抑制効果に関与していることが示唆された。HIV Nef の N 末端領域の構造解析シミュレーション結果によると、Trp13 では側鎖の構造が、Val16 では側鎖の極性がより重要である可能性が示され、置換変異体での機能解析結果を補完していると考えられる。

SIV, HIV-2 の Nef においても、上記の HIV Nef Val16/Met20 と類似した位置に疎水性アミノ酸残基 (Leu) が高度に保存されている。このことはこの Di-Leu 残基が SIV, HIV-2 においても同様に MHC-I 発現制御に寄与している可能性を示唆するものと思われる。今後は HIV Nef の結果を基に SIV, HIV-2 由来 Nef の同領域の解析を進め、さらにその共通

する分子機構を明らかにしていきたい。

E. 結論

HIV/SIV 間で保存性の高い HIV Nef 末端領域は、予想に反して MHC-I 発現抑制制御作用を調節するアミノ酸が離れて存在していることが明らかとなった。機能発現に関わるこれらのアミノ酸残基は、HIV Nef N末のミリスチン酸と N 末領域の相互作用に関わり、N 末領域の蛋白構造に影響を及ぼす可能性が示唆された。本研究結果は、HIV および SIV Nef に共通する MHC-I 発現制御機構を解明するための基盤となるものと期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

Shirakawa K, Takaori-Kondo A, Kobayashi M, Tomonaga M, Izumi T, Fukunaga K,

Sasada A, Abudu A, Miyauchi Y, Akari H, Iwai K, Uchiyama T: Ubiquitination of APOBEC3 proteins by the Vif-Cullin5-ElonginB-ElonginC complex. *Virology*, 344, 263-236, 2006.

2. 学会発表

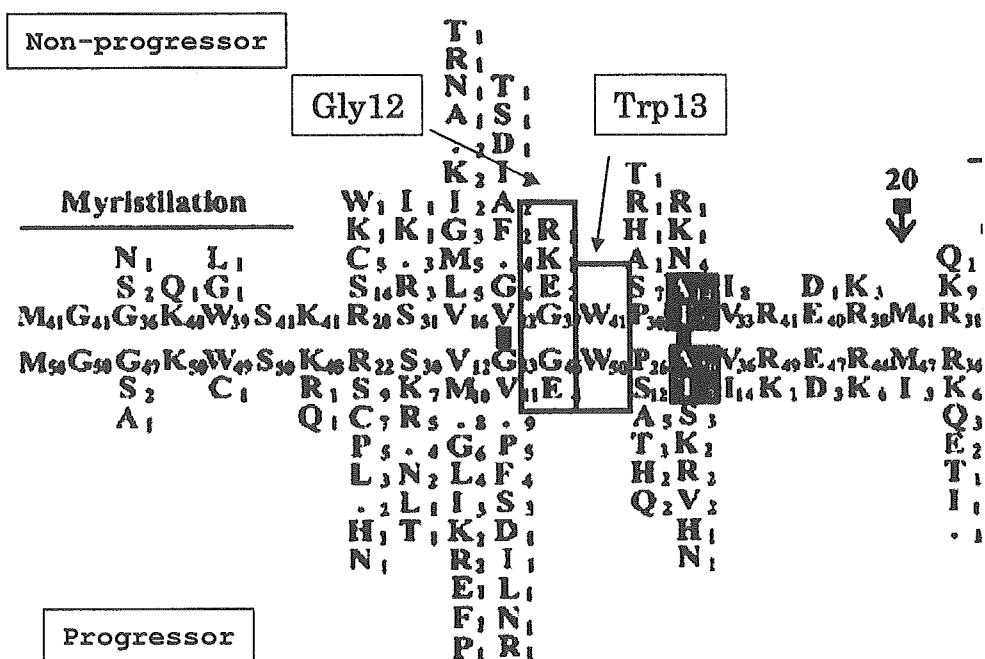
(1) 飯島沙幸, 李永仲, 明里宏文: HIV-1 Nef MHC-1 発現抑制機能における N 末端アミノ酸の関与. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会、平成 17 年 11 月

(2) 飯島沙幸, 李永仲, 明里宏文: HIV-1 Nef MHC-1 発現抑制機能における N 末端アミノ酸の関与. 第 19 回日本エイズ学会学術集会、平成 17 年 12 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

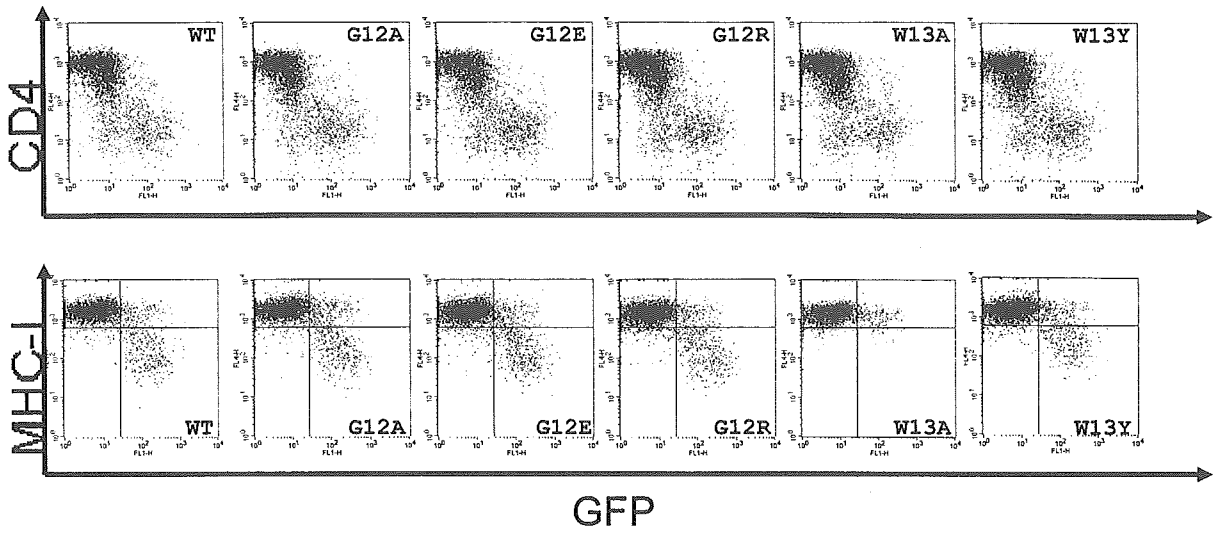
特になし

Fig.1 Gly12 and Trp13 are highly conserved in N-terminus of HIV Nef within and between non-progressors and progressors.



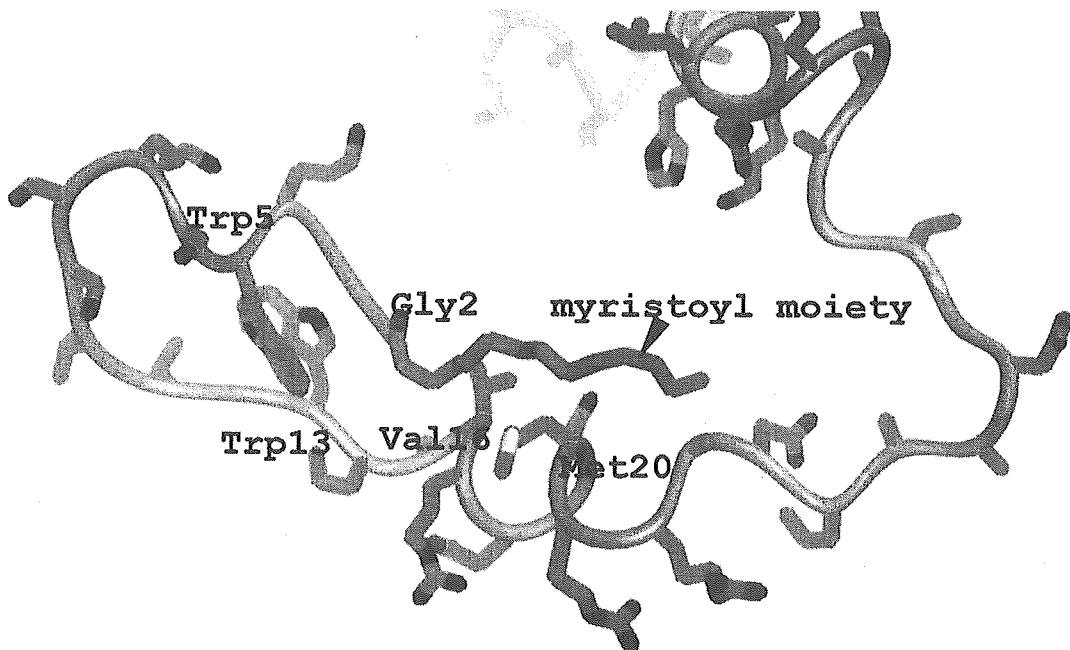
(Kirchhoff et al., J Viol. 1999より改変)

Fig.2 Contribution of Trp13 but not Gly12 to the ability of Nef to downregulate MHC-I.



疎水性アミノ鎖
 酸性アミノ酸
 塩基性アミノ酸

Fig.3 Tripartate residues might contribute to the stabilitation of myristoyl group and N-terminus of Nef.



Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表