

厚生労働科学研究費補助金

政策創薬総合研究事業

課題番号 H16-創薬-003

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

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 俣野 哲朗

平成19（2007）年 3月

研究組織

研究者氏名		所属	職名
俣野 哲朗	主任研究者	東京大学医科学研究所	教授
森 一泰	分担研究者	国立感染症研究所エイズ研究センター	主任研究官
木村 彰方	分担研究者	東京医科歯科大学難治疾患研究所	教授
宮澤 正顕	分担研究者	近畿大学医学部	教授
保富 康宏	分担研究者	三重大学医学部	助教授
明里 宏文	分担研究者	医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター	研究リーダー

目 次

I. 総括研究報告書	
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	1
主任研究者：俣野哲朗（東京大学医科学研究所・教授）	
II. 分担研究報告	
1. MHC ハプロタイプの異なるサルにおいて誘導される SIV 特異的 CD8 陽性 T リンパ球の SIV 複製阻止能の比較解析	9
主任研究者：俣野哲朗（東京大学医科学研究所・教授）	
2. SIV 感染制御サルにおける SIV 特異的 CD4 陽性 T リンパ球の役割	14
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）	
3. 実験動物サルにおける MHC クラス I 及び KIR 遺伝子群を中心とする免疫制御 遺伝子の解析	21
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）	
4. 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	27
分担研究者：宮澤正顕（近畿大学医学部・教授）	
5. 抗原提示を効率よく行う新規ワクチンの開発に関する研究	30
分担研究者：保富康宏（三重大学医学部・助教授）	
6. SIV 複製及び宿主免疫回避に関わるウイルス側・宿主側因子の作用機構に 関する解析	38
分担研究者：明里宏文（医薬基盤研究所霊長類医科学研究所・研究リーダー）	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	43
IV. 研究成果の刊行物・別刷	45

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（政策創薬総合研究事業）
総括研究報告書

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

主任研究者 俣野 哲朗 東京大学医科学研究所教授

研究要旨

エイズ発症阻止法の開発には、動物モデルを用いたエイズ発症機序の解析が重要であるが、現状で最適のモデルであるサル免疫不全ウイルス（SIV）感染サルエイズモデルにおいては、エイズ発症に密接に関与する宿主因子の情報が不足している。そこで本研究では、評価系として有用であるだけでなく、抗エイズ薬開発に結びつくエイズ発症機序解明を可能とするサルエイズモデルの確立を目的とし、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）を中心とするサル宿主因子及びそのエイズ発症への関与についての解析を行うこととした。主対象は、ビルマ産アカゲサルで6頭の交配用雄サル由来の6家系とした。これまでの2年間には、サルMHCクラスI（MHC-I）Mamu-A・Mamu-B およびMHCクラスII（MHC-II）DRB・DQA・DQB・DPA・DPB 遺伝子型同定法を確立し、6家系について各々2つずつ計12のMHC-I・MHC-IIハプロタイプを決定した。さらに、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）誘導ワクチン前臨床試験に用いたサルのMHCハプロタイプとワクチン効果との関係について検討し、ワクチン接種によりSIV複製制御にいたるMHCハプロタイプ90120-a共有サル群を同定した。このMHCハプロタイプ90120-a共有サル群の解析では、高いSIV複製抑制能を有するGag CA由来エピトープ特異的CTL（Gag206-216特異的CTLおよびGag241-249特異的CTL）を同定した。また、90120-a由来の主要MHC-IアレルcDNA（Mamu-A90120-4、Mamu-A90120-5、Mamu-B90120-6）を各々単独発現する細胞株を作成し、CTLエピトープGag206-216がMamu-A90120-4によって拘束されることを明らかにした。今年度（平成18年度）は、これまでに樹立した方法を用いてMHC-I・MHC-IIハプロタイピングを推し進めた。特にMHC-II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解析してハプロタイプ構成を決定し、DRB-DQA領域のハプロタイプの安定した再現とDQB-DPB領域での頻繁な組換えを明らかにした。また、主にNK機能に関わるMHC関連遺伝子の多型解析法の樹立も進展させた。一方、CTLエピトープGag241-249がMamu-A90120-5によって拘束されることを明らかにし、さらにGag241-249特異的CTLを特異的に認識するMamu-A90120-5・Gag241-249複合体テトラマー作成に成功した。このテトラマーは、高いSIV複製抑制能を有するCTLを特異的に認識するツールであるという点において特に貴重であり、ワクチン誘導CTLのSIV複製制御効果の解析に極めて有用である。

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	保富康宏	三重大学医学部・助教授
木村彰方	東京医科歯科大学難治疾患研究所・教授	明里宏文	医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター・ 研究リーダー
宮澤正顕	近畿大学医学部・教授		

A. 研究目的

HIV 感染自然経過では、宿主獲得免疫反応が誘導されるにもかかわらず HIV 複製が制御されず、慢性持続感染が成立し、エイズ発症へと進行する。エイズ発症阻止を目的とした抗エイズ薬開発研究においては、このエイズ発症機序の解明が不十分であることが大きな障害である。エイズ発症機序の解明には、動物モデルを用いた個体レベルでの解析が重要であるが、現状で最適のモデルであるサル免疫不全ウイルス (SIV) 感染サルエイズモデルにおいては、エイズ発症に密接に関与する宿主因子の情報が全く不足している。

HIV 感染に対する宿主獲得免疫系エフェクターとしては、CD8 陽性細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) が中心的役割を担っていることが知られている。実際、抗レトロウイルス薬による HIV 複製抑制においても CTL の助けが必須である。さらに、エイズワクチン開発研究においては、ワクチン誘導 CTL による HIV 複製制御の可能性が追求されている。したがって、エイズ発症阻止法の開発を考える際には、まず第一に CTL の関与を検討しうるシステムが必要と考えられる。

そこで本研究では、評価系として有用であるだけでなく、抗エイズ薬開発につながるエイズ発症機序解明を可能とするサルエイズモデルの確立を目的とし、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)を中心とするサル宿主因子及びそのエイズ発症への関与について解析することとした。主な内容は以下の通りである。

- (1) MHC クラス I (MHC-I)・MHC クラス II (MHC-II) のハプロタイプレベルでの解析法の確立とその遺伝子型情報の整備。各ハプロタイプ共有サル群の樹立。
- (2) MHC によって拘束されるエピトープ特異的 CTL およびヘルパー T リンパ球 (HTL) の同定。MHC 遺伝子型のエイズ発症への影響 (あるいは各々の CTL・HTL の SIV 複製抑制効果) の解析。
- (3) MHC 関連遺伝子の多型解析法の樹立とその遺伝子型情報の整備。これらの遺伝子型とエイズ発症との相関の解析。

主対象はビルマ産アカゲサルで 6 頭の交配用雄サル由来の 6 家系とした。ビルマ産アカゲサルの SIV 感染モデルは、欧米で用いられているインド産アカゲサル感染モデルと比較して、ヒト HIV 感染症に近いモデルであることが示唆されており、本研究の成果は最も優れたエイズモデルの確立に直結すると期待される。

平成 16 年度には、RSCA (reference strand-mediated conformation analysis) 法を用いたサル MHC-I (Mamu-A・Mamu-B) 遺伝子型同定法および DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) 法を用いたサル MHC-II (DRB・DQA・DQB・DPA・DPB) 遺伝子型同定法を確立し、さらにマイクロサテライトタイピングシステムも確立して、6 家系について各々 2 つずつ計 12 の MHC-I・MHC-II ハプロタイプを決定した。また、MHC ハプロタイプと CTL 誘導ワクチンの効果との関係について検討し、ワクチン接種により SIV 複製制御にいたる MHC ハプロタイプ 90120-a 共有サル群を同定した。この 90120-a 共有サル群における SIV 複製制御に関与する CTL (Gag206-216 特異的 CTL、Gag241-249 特異的 CTL および Gag373-380 特異的 CTL) の機能解析を進展させ、90120-a 由来の主要 MHC-I アレル cDNA (Mamu-A90120-4、Mamu-A90120-5、Mamu-B90120-6) を各々単独発現する細胞株を作成して、CTL エピトープ Gag206-216 が Mamu-A90120-4 によって拘束されることを明らかにした。

平成 18 年度は、主に下記の検討を行った。

- (1) これまでに確立したアカゲサル MHC ハプロタイプシステムを用いたアカゲサル MHC 遺伝子多型解析の進展。
- (2a) MHC ハプロタイプ 90120-a 共有サル群において SIV 複製制御に関与する Gag241-249 特異的 CTL を拘束する MHC-I アレルの同定。
- (2b) Gag241-249 特異的 CTL を特異的に認識する MHC-I・エピトープ複合体テトラマー作成。
- (2c) 抗原特異的宿主免疫反応に関する解析の継続。
- (3) MHC 関連遺伝子、特に NK 細胞の機能に関わる遺伝子の多型解析法の樹立。

B. 研究方法

- (1) これまでに確立した RSCA 法を用いたアカゲサル MHC-I 遺伝子(Mamu-A、Mamu-B)群の遺伝子多型解析、DGGE法を用いたアカゲサルMHC-II 遺伝子(DRB・DQA・DQB・DPA・DPB)群の遺伝子多型解析、およびマイクロサテライトマーカーを用いたアカゲサル MHC-I・MHC-II 遺伝子多型解析を進展させた。(木村・宮澤)
- (2a) これまでに樹立した MHC-I 発現 721.221 細胞株 (MHC ハプロタイプ 90120-a 由来主要 MHC-I アレル cDNA [Mamu-A90120-4、Mamu-A90120-5 および Mamu-B90120-6]を各々発現する HLA-ABC 欠損ヒト B リンパ芽球株)を用い、CTL エピトープ Gag241-249 を拘束する MHC-I アレル同定を進めた。(俣野)
- (2b) 上記実験により同定した Gag241-249 エピトープを提示する Mamu-A90120-5 発現ベクターを用いた MHC-I・エピトープ複合体テトラマー作成を試み、作成したテトラマーの特異的 CTL 検出能を検討した。(俣野)
- (2c) 各種 SIV により誘導される SIV 特異的 T リンパ球反応を解析した。また、SIV Nef タンパクによる MHC-I 細胞表面発現抑制機序について検討した。(森・保富・明里)
- (3) MHC 関連遺伝子、特に NK 細胞の機能に関わる各種遺伝子領域のマイクロサテライト多型解析法の樹立を進展させた。(木村)

(倫理面への配慮)

動物実験については、倫理面も含めて、医薬基盤研究所など各施設の動物実験委員会の審査をうけ、その承諾を得てから開始した。

C. 研究結果

- (1) SIV 感染実験を行ったアカゲサルおよび SIV 感染実験予定のアカゲサルの MHC-I・MHC-II ハプロタイプを推し進め、情報整備を進展させた。特に MHC-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、家系情

報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の安定した再現と、DQB-DPB 遺伝子座領域での頻繁な組換えを明らかにした(表 1)。(木村・宮澤)

- (2a) CTL エピトープ Gag241-249 を提示する MHC-I が Mamu-A90120-5 遺伝子産物であることを明らかにした。(俣野)
- (2b) Gag241-249 特異的 CTL を特異的に認識する Mamu-A90120-5・Gag241-249 複合体テトラマーの作成に成功した。このテトラマーを用いた解析結果例を図 1 に示す。(俣野)
- (2c) 糖鎖結合部位を欠損させた Env (d5G Env)により誘導される適応免疫反応の解析を進展させ、d5G Env を有する SIV 感染後比較的早期の結合抗体誘導例を見出した。(保富)
一方、HIV/SIV 感染細胞に対する CTL 反応に影響する Nef の MHC-I 細胞表面発現抑制機序についての検討では、これまでに同定した MHC-I 発現抑制に関与する疎水性アミノ酸モチーフ (Trp13, Val16, Met20) の構造解析シミュレーションにより、このモチーフが輸送関連因子 AP-1 複合体の構成分子である μ 1A サブユニットの結合ドメインであることを示唆する結果を得た。(明里)
- (3) 主に NK 機能に関わる各種 MHC 関連遺伝子の多型解析法の樹立が進展した。(木村)

D. 考察

昨年度までに、MHC-I 領域について詳細なハプロタイプ構成の情報が得られていたが、今年度は MHC-II についての詳細なハプロタイプ構成の情報が得られ、本研究の主要目的の一つであるアカゲサル 6 家系 MHC-I・MHC-II ハプロタイプ構成の解明をほぼ達成することができた。本研究のようにハプロタイプレベルでサル MHC タイピングを行っている例は他になく、本研究の成果は、エイズ発症機序解明に極めて有用なモデル確立に結びつくことが期待される。

これまでの研究から、MHC ハプロタイプ 90120-a 共有サル群は、世界で唯一、ワクチンにより SIV 複製制御にいたることが見出されたサル群であり、SIV 複製制御機序の解明に極めて有用なサル群と考えられる。今年度に、SIV 複製制御に関与する Gag206-216 特異的 CTL および Gag241-249 特異的 CTL のエピトープを各々拘束する MHC-I アレルを同定できたことは、この 90120-a 共有サル群を用いた免疫学的解析を推進するうえで大きな意義を有する。さらに、Gag241-249 特異的 CTL を認識するテトラマー作成に成功したが、このテトラマー作成も、本研究の主要目的の一つであり、今後の CTL の SIV 複製抑制機序解析を飛躍的に推進する点で極めて重要である。このテトラマーは、われわれの用いているビルマ産アカゲサルにおける初めての CTL 認識ツールであるだけでなく、高い SIV 複製抑制能を有する CTL を特異的に認識するツールであるという点において特に有用である。

E. 結論

抗エイズ薬・ワクチン開発につながるエイズ発症機序解明を可能とするビルマ産アカゲサルエイズモデルの確立を目的とし、これまでに確立した遺伝子多型解析法を用いて、MHC 遺伝子型情報の整備を推進し、MHC-I および MHC-II の詳細なハプロタイプ構成を決定した。

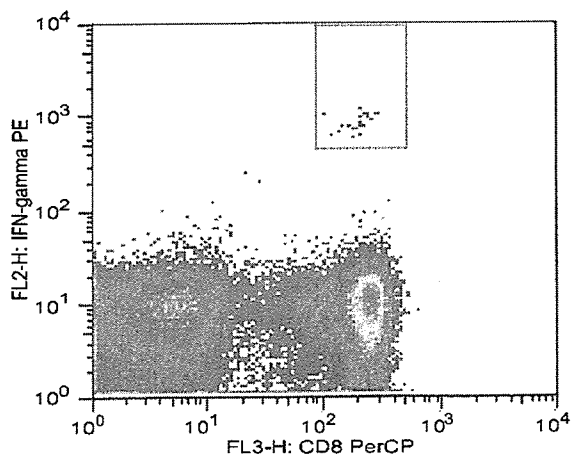
MHC ハプロタイプ 90120-a 共有サル群の解析では、SIV 複製制御に関与する CTL エピトープ Gag241-249 を拘束する MHC-I アレルを Mamu-A90120-5 と同定し、この CTL を認識する Mamu-A90120-5・Gag241-249 複合体テトラマー作成に成功した。このテトラマーは、ワクチン誘導 CTL の SIV 複製制御効果の解析に極めて重要である。以上のごとく、MHC-I・MHC-II ハプロタイプ構成が明らかで、高い SIV 複製抑制能を有する CTL の情報と解析ツールの確立した MHC ハプロタイプ 90120-a 共有サル群は、SIV 複製制御機序解明に非常に有用なサル群である。

F. 健康危険情報

特になし。

ID	father mother	精定 ハプロタイプ	DRA-CA	DRB		DQA	DQ (166)	DQB	DQ (287)	DP (274)	DPA	DPB
R236	R-90-030 R-90-130	d2 b (?)		DRB*W2603 DRB*W2501		DQA1*0502 DQA1*0502					R90030DPA01 (99%)	Mm9712DPB01 DPB1*10
R248	R-89-002LA R-0A8716	New 90-049-1 (?)						DQB1*1603			R90030DPA01 (95%)	DPB1*06 Mm9712DPB01 (88%)
R268	R-90-073LA 006LA	93-06F1-2 (?) d1 (?)		DRB1*0320 DRB*W2603		DQA1*0105		DQB1*0602 DQB1*0602			R90030DPA02 (197/200)	DPB1*14 (98%) DPB1*04
R319	R97-081F2 R-97-069F2	b (?) 93-09-1 (C)		DRB*W2501 DRB1*0300 DRB1*1605		DQA1*0502		DQB1*06111			Mm9712DPA01 (236/237)	Mm9712DPB01 (151/152) DPB1*04
R353	R-97-081F2 R-97-026F1	d2 s	240 254	DRB*W2104 1塩基置換 R90975DR08 (ABI112040)	DRB*W2603 DRB*0360 DRB*2603	DQA1*0502 DQA1*0108			221 131	275	R90030DPA01	DPB1*09
BR355	R90-002LA R-95-035F2	a New	240 258	DRB1*0403 (99%)		DQA1*12		DQB1*1603			DPA1*0101 (97%)	DPB1*04 DPB1*09
BR357	R-97-081F2 R-97-069F2	Mm01340135 b	254 270	DRB*W2104 (259/269)	DRB1*0323 (259/269)	DQA1*0108 DQA1*0502	131	DQB1*0607	211 205	263 265	Mm9712DPA01	DPB1*09
BR360	R-90-010MY R-94-009F1	d1 s (?)	240 250	DRB*W2603	DRB*W606 (99%)	DQA1*0502 DQA1*0108	135 131		205 211	265	R90030DPA02 (98%)	DPB1*04 (99%)
BR363	R-90-010MY R-94-014F1	d1 b (?)	240 270	DRB*W2603		DQA1*0502	135 135		205 205	265 283	R90030DPA01 (97%)	DPB1*04
BR364	R-90-010MY R-92-045F1	e New	252 238	R9014DR03 (=DRB*W2507)	DRB1*1003 (99%)	DQA1*2404	139	DQB1*2401	211	263	R90030DPA01 (97%)	DPB1*06
BR370	R-95-014F1 R-97-066F1	a t-like (?)	238 238	R9101DR02 (=DRB1*0321)	DRB1*0303 (98%)	DQA1*03		DQB1*1801 DQB1*0608	211 221	263	Mm9712DPA01	Mm9712DPB01
BR372	R-90-120MY R-91-019F1	a (?) d2		DRB1*1007 (98%) DRB*W2104 DRB*W2603	DRB1*0303 (98%)	DQA1*03 DQA1*0502	135 135			221 275	R90030DPA01	DPB1*09
BR373	R-95-014F1 R-97-012F2	e j	262 258	R9014DR03 (=DRB*W2507) DRB1276135 (=DRB1*0403)	R90033DR07 (=DRB*W501)		135	DQB1*1802 DQB1*1808	213 239	259 (291?) 275	R90030DPA01	DPB1*14
BR375	R-95-014F1 R-97-033F1	a t-like (?)	238 238	R9101DR02 (=DRB1*0321)	DRB1*0303	DQA1*03 DQA1*0108	133 (?)	DQB1*1801 DQB1*0608	221 211		Mm9712DPA01	Mm9712DPB01 (258/259)
BR377	R-90-010MY R-90-134MY	d1 s (?)	240 252	DRB*W2104 DRB1*0305	DRB*W2603	DQA1*0502 DQA1*05			205 131	265 275	R90030DPA01	DPB1*09
BR382	R-90-120MY R-98-043F1	b R98-043 New	270			DQA1*0502		DQB1*1708 (DQB1*1703)	205 213	263 277	R90030DPA02 (86%)	DPB1*04 DPB1*13

表 1 今年度新たに MHC class II 遺伝子型を解析した個体群のハプロタイプ構成



Gag 発現センダイウイルスベクター接種後の
90120-a 陽性サル由来の末梢血リンパ球の CD8
陽性 T リンパ球分画の CD8 - Tetramer dot plot.
テトラマー陽性細胞が認められる。

図 1. Mamu-A90120-5・Gag241-249 複合体テトラマーによる Gag241-249 特異的 CTL の検出

G. 研究発表

1 論文発表

- (1) Yamamoto H, Kawada M, Tsukamoto T, Takeda A, Igarashi H, Miyazawa M, Naruse T, Yasunami M, Kimura A, and Matano T. Vaccine-based long-term stable control of simian-human immunodeficiency virus 89.6PD replication in rhesus macaques. *J Gen Virol* 88:652-659, 2007.
 - (2) Takahashi-Tanaka Y, Yasunami M, Naruse T, Hinohara K, Matano T, Mori K, Miyazawa M, Honda M, Yasutomi Y, Nagai Y, Kimura A: Reference strand-mediated conformation analysis (RSCA)-based typing of multiple alleles in the rhesus macaque MHC class I Mamu-A and Mamu-B loci. *Electrophoresis*, in press.
 - (3) Shibata H, Yasunami M, Obuchi N, Takahashi M, Kobayashi Y, Numano F, Kimura A: Direct determination of SNP haplotype of NFKBIL1 promoter polymorphism by DNA conformation analysis and its application to association study of chronic inflammatory diseases. *Hum Immunol* 2006; 67:363-373.
 - (4) Biasin, M., L. Piacentini, S. Lo Caputo, Y. Kanari, G. Magri, D. Trabattoni, V. Naddeo, L. Lopalco, A. Clivio, E. Cesana, F. Fasano, C. Bergamaschi, F. Mazzotta, M. Miyazawa and M. Clerici. APOBEC3G: A possible role in resistance of HIV-exposed seronegative individuals. *J. Infec. Dis.*, in press, 2007.
 - (5) Kajikawa, M., T. Baba, U. Tomaru, Y. Watanabe, S. Koganei, S. Tsuji-Kawahara, N. Matsumoto, K. Yamamoto, M. Miyazawa, K. Maenaka, A. Ishizu, and M. Kasahara. MHC class I-like MILL molecules are β_2 -microglobulin-associated, GPI-anchored glycoproteins that do not require TAP for cell surface expression. *J. Immunol.* 177:3108-3115, 2006.
 - (6) 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.* 55:1459-1469, 2006.
 - (7) Yasutomi Y. 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.
 - (8) Hara M, Kikuchi T, Sata T, Nakajima N, Ami Y, Sato Y, Tanaka K, Narita T, Ono F, Akari H, Terao K, Mukai R. Detection of SRV/D shedding in body fluids of cynomolgus macaques and comparison of partial gp70 sequences in SRV/D-T isolates. *Virus Genes*, in press.
 - (9) Ishii K, Iijima S, Kimura N, Lee Y-J, Ageyama N, Yagi S, Yamaguchi K, Maki N, Yoshizaki S, Machida S, Suzuki T, Iwata N, Sata T, Terao K, Miyamura T, Akari H: GBV-B as a pleiotropic virus: Distribution of GBV-B in extrahepatic tissues *in vivo*. *Microbes and Infection*, in press.
- ### 2 学会発表
- (1) Matano T. Control of viral replication by vaccine-induced CTL in macaque AIDS models. The 13th East Asia Symposium on Biomedical Research: From Genes to Therapeutics, Seoul, Korea, 7/19/2006.
 - (2) Moriya C, Takeda A, and Matano T. A single amino acid change in CTL epitope flanking region can abort efficacy of vaccine-induced CTL responses against simian immunodeficiency virus infection. The 6th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 9/5/2006.
 - (3) Matano T. Long-term CTL-based control of simian immunodeficiency virus replication in vaccinated rhesus macaques. The 6th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 9/7/2006.
 - (4) 侯野哲朗. CTL 誘導エイズワクチンによる長期ウイルス複製制御の可能性. 第9回白馬シンポジウム in 京都、京都、10/12/2006.
 - (5) 関紗由里、川田真幹、侯野哲朗. Gag 特異的 CTL

- からのエスケープ変異を蓄積した SIV の複製能。第 54 回日本ウイルス学会学術集会、1B13、名古屋、11/19/2006.
- (6) 湯浅光博、川田真幹、山本浩之、俣野哲朗。X4-tropic SHIV 複製制御サルにおける R5-tropic SIV 重複感染防御機序。第 54 回日本ウイルス学会学術集会、1P119、名古屋、11/19/2006.
- (7) 塚本徹雄、俣野哲朗。サルエイズモデルにて誘導される CTL の SIV 複製抑制能の in vitro 評価系の樹立。第 54 回日本ウイルス学会学術集会、1P122、名古屋、11/19/2006.
- (8) 守屋智草、五十嵐博子、井上誠、飯田章博、朱亜峰、長谷川護、永井美之、俣野哲朗。ワクチン誘導 CTL に対する異種株サル免疫不全ウイルスのエスケープ機序。第 54 回日本ウイルス学会学術集会、1P148、名古屋、11/19/2006.
- (9) 山本浩之、川田真幹、俣野哲朗。サル免疫不全ウイルス感染成立後の中和抗体のウイルス複製抑制効果。第 54 回日本ウイルス学会学術集会、3C06、名古屋、11/21/2006.
- (10) 川田真幹、山本浩之、塚本徹雄、関紗由里、五十嵐博子、俣野哲朗。細胞傷害性 T リンパ球誘導型予防エイズワクチンによる長期のサル免疫不全ウイルス複製制御の可能性。第 54 回日本ウイルス学会学術集会、3WSA4、名古屋、11/21/2006.
- (11) 俣野哲朗。エイズウイルス感染に対する獲得免疫反応。第 54 回日本ウイルス学会学術集会、L5-3、名古屋、11/21/2006.
- (12) 山本浩之、川田真幹、俣野哲朗。サル免疫不全ウイルス感染に対する細胞傷害性リンパ球と中和抗体の相乗的な複製抑制効果。第 20 回日本エイズ学会学術集会、O-106、東京、12/1/2006.
- (13) Matano T. Multiple epitope-specific CTL responses in control of immunodeficiency virus replication. 20th Annual Meeting of the Japanese Society for AIDS Research, S15-1, Tokyo, Japan, 12/2/2006.
- (14) Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Takeda A, Watkins DI, and Matano T. Long-term CTL-based SIV control by Vaccine-based non-sterile protection in rhesus macaques. 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, #463, Los Angeles, CA, USA, 2/26/2007.
- (15) Moriya C, Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Takeda A, and Matano T. Abrogation of in vivo efficacy of vaccine-induced CTL against heterologous SIV challenge by a single amino acid change in viral epitope flanking region. 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, #468, Los Angeles, CA, USA, 2/26/2007.
- (16) Yamamoto H, Kawada M, Tsukamoto T, Takeda A, Igarashi H, and Matano T. SIV control by post-infection passive immunization of neutralizing antibodies. Keystone Symposium (X7): HIV Vaccines (From Basic Research to Clinical Trials), #320, Whistler, British Columbia, Canada, 3/28-29/2007.
- (17) C. Sugimoto, F. Ono, S. Nakamura, S. Izumo, N. Yamamoto, Y. Nagai, Y. Suzuki and K. Mori. Clues for the attenuation of deglycosylated mutant of SIV239 in the primary infection. 24th annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, October, 2006, Atlanta, USA.
- (18) K. Mori, C. Sugimoto, F. Ono, S. Nakamura, Y. Nagai, Y. Suzuki, F. Villinger, A. Ansari and N. Yamamoto. Suppression of SIV239 challenge infection in the animals controlling pre-existing SIV infections with attenuated viruses or pathogenic viruses. 24th annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, October, 2006, Atlanta, USA.
- (19) 杉本智恵、中山英美、塩田達雄、山本直樹、永井美之、森一泰。新規糖鎖欠損 SIV の性質とアカゲザルでの感染。日本エイズ学会、2006 年、東京。
- (20) 森一泰。Immune correlates: Lessons from a novel attenuated mutant virus. 日本エイズ学会、2006 年、東京。
- (21) 成瀬妙子、安波道郎、俣野哲朗、森一泰、本多三男、保富康宏、宮澤正顯、木村彰方：ヒトおよび実験動物サルにおける NKG2 レセプター関連遺伝子群の遺伝子解析。第 15 回日本組織適合性学会大会、東京、2006 年 9 月。

- (22) 宮澤正顯、北口大輔、湯浅貴恵、坂本真由美、小原栄、俣野哲朗、森一泰、木村彰方：ビルマ産アカゲザル MHC class II 領域のハプロタイプ構成と組換えの解析。第 15 回日本組織適合性学会大会、東京、2006 年 9 月。
- (23) 成瀬妙子、安波道郎、俣野哲朗、森一泰、本多三男、保富康宏、宮澤正顯、永井美之、木村彰方：ヒトおよび実験動物サルにおける免疫応答関連遺伝子群のゲノム多様性。日本人類遺伝学会第 51 回大会、鳥取、2006 年 10 月。
- (24) Naruse T, Matano T, Mori K, Miyazawa M, Honda M, Yasutomi Y, Kimura A : Diversity of MHC class I and immune-related genes in human and rhesus macaque. 第 36 回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、2006 年 12 月。
- (25) Miyazawa, M. and Y. Kanari. Host genetic factors that control immune resistance to HIV-1 infection. 7th AIDS Seminar in Kumamoto. Sept. 21-22, 2006, Aso, Kumamoto.
- (26) 宮澤正顯、北口大輔、湯浅貴恵、坂本真由美、小原栄、俣野哲朗、森一泰、木村彰方。ビルマ産アカゲザル MHC class II 領域のハプロタイプ構成と組換えの解析。第 15 回日本組織適合性学会大会、平成 18 年 9 月 24 日～26 日、東京。
- (27) Miyazawa, M. Host genetic factors that control immune resistance mechanisms to HIV-1 and mouse retroviral infections. 近畿大学大学院医学研究科ハイテクリサーチセンタープロジェクト公開シンポジウム「細胞・組織工学を駆使した先端治療学の研究・開発」、平成 19 年 2 月 23 日、大阪。
- (28) 松原明弘、唐松克夫、保富康宏：ヘルパー T 細胞(Th)反応調節によるインフルエンザウイルス感染の制御。第 54 回日本ウイルス学会 (名古屋)。
- (29) Matsubara, A., Yasutomi, Y. : Oral administration of DNA vaccine by using virus-like particles derived from HEV. 第 36 回日本免疫学会(大阪)。
- (30) 森如、保富康宏、水谷仁：Ag85B のマウス回復ハプテン誘発皮膚炎モデルへの効果の検討。第 57 回日本アレルギー学会。
- (31) Yasutomi, Y.: Oral administration of DNA vaccine by using virus-like particles derived from orally transmissible virus. 4th International Gene Therapy Symposium.
- (32) 保富康宏：E 型肝炎ウイルス(HEV)のウイルス様中空粒子 (VLP) を用いた経口ワクチンの開発。日本発ワクチン開発シンポジウム(東京)。
- (33) Iijima S, Lee Y-J, Arold S, Strebel K, Akari H. Tripartite hydrophobic residues as a potential myristoyl pocket are a determinant for MHC-I down-regulation by HIV-1 Nef. Cold Spring Harbor meeting on Retroviruses, New York, May 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1 特許取得

- (1) 保富康宏：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) 保富康宏：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) 保富康宏：リポソームワクチンの作製法 (出願中、PCT/JP2006/303371)。

2 実用新案登録 無し

3 その他 無し

II. 分担研究報告

MHC ハプロタイプの異なるサルにおいて誘導される SIV 特異的 CD8 陽性 T リンパ球の SIV 複製阻止能の比較解析

主任研究者 俣野 哲朗 東京大学医科学研究所教授

研究要旨

エイズウイルス感染に対する宿主防御免疫反応において、ウイルス特異的 CD8 陽性細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) は中心的役割を担っている。HIV-1 感染自然経過では、誘導された CTL は HIV-1 複製を抑制するものの充分には HIV-1 を排除できず慢性持続感染が成立する。そこでエイズワクチン開発においては、ワクチン誘導 CTL による HIV-1 複製制御の可能性が追求されている。近年の我々の研究により、優れたウイルス複製抑制能を有するエピトープ特異的 CTL の誘導が、エイズウイルス複製制御に結びつくことが明らかとなってきた。本研究では、個々のエピトープ特異的 CTL のウイルス複製抑制能の解析およびエイズ発症阻止への関与についての検討を可能とするサルエイズモデルの確立を目的として、ビルマ産アカゲサルにおいて、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) ハプロタイプ別に、その拘束性エピトープを同定し、エピトープ特異的 CTL のエイズウイルス複製抑制能について解析することとした。これまでの 2 年間 (平成 16-17 年度) に、ワクチンによる Gag 特異的 CTL 誘導のエイズウイルス複製に対する効果を MHC ハプロタイプ別に整理し、また、ワクチンによりサル免疫不全ウイルス (SIV) 複製制御にいたる MHC ハプロタイプ 90120-a 共有サル群の解析を進め、高い SIV 複製抑制能を有する Gag CA 由来のエピトープ特異的 CTL (Gag206-216 特異的 CTL および Gag241-249 特異的 CTL) を同定した。さらに、MHC ハプロタイプ 90120-a 由来の主要 MHC クラス I アレル cDNA (Mamu-A90120-4、Mamu-A90120-5 および Mamu-B90120-6) を各々単独発現する細胞株を作成し、CTL エピトープ Gag206-216 が Mamu-A90120-4 遺伝子産物によって提示されることを明らかにした。今年度は、もう一方の CTL エピトープ Gag241-249 が Mamu-A90120-5 遺伝子産物によって提示されることを明らかにした。さらに、Gag241-249 特異的 CTL を特異的に認識する Mamu-A90120-5・Gag241-249 複合体テトラマー作成に成功した。このテトラマーは、ビルマ産アカゲサルにおける初めての CTL 認識ツールであるだけでなく、高い SIV 複製抑制能を有する CTL を特異的に認識するツールであるという点においても有用であり、ワクチン誘導 CTL の SIV 複製制御効果の解析に極めて重要である。

A. 研究目的

HIV-1 感染自然経過では、宿主獲得免疫反応が誘導されるにもかかわらず HIV-1 複製の制御には至らない。HIV-1 感染に対する宿主獲得免疫系エフェクターとしては、CD8 陽性細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) が中心的役割を担っており、HIV-1 感染急性期から慢性期の移行期 (セットポイント期) に

HIV-1 特異的 CTL の誘導により体内ウイルス量は低下するが、HIV-1 は排除されきらず慢性持続感染が成立し、エイズ発症へと進行する。そこで、エイズワクチン開発研究においては、ワクチン誘導 CTL による HIV-1 複製制御の可能性が追求されている。

CTL は、標的細胞の主要組織適合遺伝子複合体抗原クラス I (MHC-I) 分子によって提示されるエピト

ープを認識して細胞傷害性を発揮する。近年の我々の研究から、エピトープ特異的 CTL の違いによってエイズウイルス複製抑制能に大きな差異があることがわかってきた。したがって、個々のエピトープ特異的 CTL について、そのウイルス複製抑制能を検証し、エイズ発症阻止効果を検討することは、ワクチンを含めたエイズ発症阻止法の開発において極めて重要な戦略である。そこで本研究は、個々のエピトープ特異的 CTL について、そのウイルス複製抑制能の解析およびエイズ発症阻止への関与の検討を可能とするエイズモデルの確立を目的とする。そのため、ビルマ産アカゲサルエイズモデルにおいて、MHC ハプロタイプ別に、その拘束性エピトープを同定し、エピトープ特異的 T リンパ球のウイルス複製抑制能について解析することとした。

これまでの2年間(平成16-17年度)には、まず、SIVmac239 Gag を主抗原とする DNA プライム・Gag 発現センダイウイルス (SeV-Gag) ベクターブーストワクチン接種後のサルヒト免疫不全ウイルス (SHIV89.6PD) あるいはサル免疫不全ウイルス (SIV) チャレンジ実験結果を整理し、ワクチンによる Gag 特異的 CTL 誘導のエイズウイルス複製に対する効果を、MHC ハプロタイプ別に検討した。また、ワクチンにより SIV 複製制御にいたる MHC ハプロタイプ 90120-a 共有サル群の解析を進め、高い SIV 複製抑制能を有する3つのエピトープ特異的 CTL (Gag206-216 特異的 CTL、Gag241-249 特異的 CTL および Gag373-380 特異的 CTL) を同定した。このうち特に、SIV capsid (CA) タンパク由来の Gag206-216 特異的 CTL と Gag241-249 特異的 CTL は、SIV 複製制御に中心的役割を果たしていると考えられた。さらに、MHC ハプロタイプ 90120-a 由来の主要 MHC-I アレル cDNA (Mamu-A90120-4、Mamu-A90120-5 および Mamu-B90120-6) を各々単独発現する細胞株を樹立し、CTL エピトープ Gag206-216 を拘束する MHC-I アレルを Mamu-A90120-4 であると決定した。

今年度(平成18年度)は、MHC ハプロタイプ 90120-a 共有サル群の解析を進め、Gag206-216 特異的 CTL と Gag241-249 特異的 CTL が、SIVmac239 感

染により誘導されることを確認した。さらに、CTL エピトープ Gag241-249 を提示する MHC-I 分子のアレル同定を進め、この CTL を特異的に認識する MHC-I・エピトープ複合体テトラマー作成を試みた。

B. 研究方法

(1) SIVmac239 感染 MHC ハプロタイプ 90120-a 共有サル群における CTL の解析：MHC ハプロタイプ 90120-a 共有サル群における Gag206-216 特異的 CTL および Gag241-249 特異的 CTL の誘導を確認する目的で、SIVmac239 感染 90120-a 共有サル群におけるこれらの CTL 誘導の有無を、さらに頭数を増やして解析した。測定は、末梢血リンパ球におけるペプチド特異的インターフェロン γ 誘導を細胞内染色にて検出することにより行った。

(2) Gag241-249 エピトープを拘束する MHC-I アレルの同定：昨年度樹立した 90120-a 由来主要 MHC-I (Mamu-A90120-4、Mamu-A90120-5 および Mamu-B90120-6) 発現細胞株を用い、ペプチド特異的インターフェロン γ 誘導の測定、および熊本大学滝口雅文先生の協力による CTL killing assay により、CTL エピトープ Gag241-249 を提示する MHC-I 分子のアレル同定を進めた。

(3) MHC ハプロタイプ 90120-a 由来主要 MHC-I アレル検出用 PCR primer の設定：90120-a 由来の主要 MHC-I アレル (Mamu-A90120-4、Mamu-A90120-5、Mamu-B90120-6) の塩基配列情報から、これらを特異的に検出するための PCR primer の設定を試みた。

(4) CTL を特異的に認識するテトラマー作成：昨年度に同定した Gag206-216 エピトープを提示する Mamu-A90120-4 発現ベクター、および上記実験により同定した Gag241-249 エピトープを提示する Mamu-A90120-5 発現ベクターを用いた MHC-I・エピトープ複合体テトラマー作成を試み、作成したテトラマーの特異的 CTL 検出能を検討した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、倫理面も含めて、国立感染症研究所、医薬基盤研究所および東京大学医科学研究所の動物実験委員会の審査をうけ、その承認を得てから、医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターに

て開始した。

C. 研究結果

(1) SIVmac239 感染 MHC ハプロタイプ 90120-a 共有サル群における CTL の解析：新たに 8 頭の SIVmac239 感染 90120-a 共有サルのサンプルを用い、全頭において Gag206-216 特異的 CTL および Gag241-249 特異的 CTL が誘導されていることを確認した。

(2) Gag241-249 エピトープを拘束する MHC-I アレルの同定：MHC ハプロタイプ 90120-a 由来の主要 MHC-I 単独発現細胞株 (Mamu-A90120-4 発現 721.221 細胞、Mamu-A90120-5 発現 721.221 細胞および Mamu-B90120-6 発現 721.221 細胞) を用いた解析にて、CTL エピトープ Gag241-249 を提示する MHC-I は、Mamu-A90120-5 であることが判明した。

(3) MHC ハプロタイプ 90120-a 由来主要 MHC-I アレル検出用 PCR primer の設定：特異性の面で改良の必要性があるものの、Mamu-A90120-4、Mamu-A90120-5、Mamu-B90120-6 各々のアレルを認識する PCR primer が得られ、特に Mamu-A90120-5 については比較的特異性の高いものが得られた。

(4) CTL を特異的に認識する MHC-I・エピトープ複合体テトラマー作成：Gag241-249 特異的 CTL を特異的に認識する Mamu-A90120-5・Gag241-249 複合体テトラマーの作成に成功した。このテトラマーを用いた解析結果例を図 1 に示す。一方、Gag206-216 特異的 CTL を特異的に認識するテトラマーは未だ得られておらず検討中である。

D. 考察

MHC ハプロタイプ 90120-a 共有サル群において、SIVmac239 感染により、Gag206-216 特異的 CTL および Gag241-249 特異的 CTL が誘導されることが確認できた。

昨年度の結果とあわせ、今年度の解析により、90120-a 共有サル群において高い SIV 複製抑制能を有する Gag206-216 特異的 CTL および Gag241-249 特異的 CTL の各々のエピトープを提示する MHC-I を明らかにすることができた。これらのアレルを検出

するための PCR システムも、特異性の面で改良の必要性があるものの、進展がみられた。さらに、Gag241-249 特異的 CTL を特異的に認識するテトラマー作成に成功した。このテトラマー作成は、本研究プロジェクトの主要目的の一つであり、その意義は非常に大きい。このテトラマーは、ビルマ産アカゲサルにおける初めての CTL 認識ツールであるだけでなく、高い SIV 複製抑制能を有する CTL を特異的に認識するツールであるという点においても有用であり、ワクチン誘導 CTL の SIV 複製制御効果の解析に極めて重要である。

E. 結論

ワクチンにより SIV 複製制御にいたる MHC ハプロタイプ 90120-a 共有サル群において、高い SIV 複製抑制能を有する Gag241-249 特異的 CTL のエピトープを提示する MHC-I アレルが Mamu-A90120-5 であると決定した。さらに、この Gag241-249 特異的 CTL を特異的に認識するテトラマーの作成に成功した。この成果は、今後の CTL の SIV 複製抑制能の解析に極めて有用である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1 論文発表

- (1) Yamamoto H, Kawada M, Tsukamoto T, Takeda A, Igarashi H, Miyazawa M, Naruse T, Yasunami M, Kimura A, and Matano T. Vaccine-based long-term stable control of simian-human immunodeficiency virus 89.6PD replication in rhesus macaques. *J Gen Virol* 88:652-659, 2007.
- (2) Takahashi-Tanaka Y, Yasunami M, Naruse T, Hinohara K, Matano T, Mori K, Miysazawa M, Honda M, Yasutomi Y, Nagai Y, and Kimura A. Reference strand-mediated conformation analysis (RSCA)-based typing of multiple alleles in the rhesus macaque MHC class I Mamu-A and Mamu-B loci. *Electrophoresis*, in press.

2 学会発表

- (1) Matano T. Control of viral replication by vaccine-induced CTL in macaque AIDS models. The 13th East Asia Symposium on Biomedical Research: From Genes to Therapeutics, Seoul, Korea, 7/19/2006.
- (2) Moriya C, Takeda A, and Matano T. A single amino acid change in CTL epitope flanking region can abort efficacy of vaccine-induced CTL responses against simian immunodeficiency virus infection. The 6th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 9/5/2006.
- (3) Matano T. Long-term CTL-based control of simian immunodeficiency virus replication in vaccinated rhesus macaques. The 6th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 9/7/2006.
- (4) 俣野哲朗. CTL 誘導エイズワクチンによる長期ウイルス複製制御の可能性. 第9回白馬シンポジウム in 京都、京都、10/12/2006.
- (5) 関紗由里、川田真幹、俣野哲朗. Gag 特異的 CTL からのエスケープ変異を蓄積した SIV の複製能. 第54回日本ウイルス学会学術集会、1B13、名古屋、11/19/2006.
- (6) 湯浅光博、川田真幹、山本浩之、俣野哲朗. X4-tropic SHIV 複製制御サルにおける R5-tropic SIV 重複感染防御機序. 第54回日本ウイルス学会学術集会、1P119、名古屋、11/19/2006.
- (7) 塚本徹雄、俣野哲朗. サルエイズモデルにて誘導される CTL の SIV 複製抑制能の in vitro 評価系の樹立. 第54回日本ウイルス学会学術集会、1P122、名古屋、11/19/2006.
- (8) 守屋智草、五十嵐博子、井上誠、飯田章博、朱亜峰、長谷川護、永井美之、俣野哲朗. ワクチン誘導 CTL に対する異種株サル免疫不全ウイルスのエスケープ機序. 第54回日本ウイルス学会学術集会、1P148、名古屋、11/19/2006.
- (9) 山本浩之、川田真幹、俣野哲朗. サル免疫不全ウイルス感染成立後の中和抗体のウイルス複製抑制効果. 第54回日本ウイルス学会学術集会、3C06、名古屋、11/21/2006.
- (10) 川田真幹、山本浩之、塚本徹雄、関紗由里、五十嵐博子、俣野哲朗. 細胞傷害性 T リンパ球誘導型予防エイズワクチンによる長期のサル免疫不全ウイルス複製制御の可能性. 第54回日本ウイルス学会学術集会、3WSA4、名古屋、11/21/2006.
- (11) 俣野哲朗. エイズウイルス感染に対する獲得免疫反応. 第54回日本ウイルス学会学術集会、L5-3、名古屋、11/21/2006.
- (12) 山本浩之、川田真幹、俣野哲朗. サル免疫不全ウイルス感染に対する細胞傷害性リンパ球と中和抗体の相乗的な複製抑制効果. 第20回日本エイズ学会学術集会、O-106、東京、12/1/2006.
- (13) Matano T. Multiple epitope-specific CTL responses in control of immunodeficiency virus replication. 20th Annual Meeting of the Japanese Society for AIDS Research, S15-1, Tokyo, Japan, 12/2/2006.
- (14) Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Takeda A, Watkins DI, and Matano T. Long-term CTL-based SIV control by Vaccine-based non-sterile protection in rhesus macaques. 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, #463, Los Angeles, CA, USA, 2/26/2007.
- (15) Moriya C, Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Takeda A, and Matano T. Abrogation of in vivo efficacy of vaccine-induced CTL against heterologous SIV challenge by a single amino acid change in viral epitope flanking region. 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, #468, Los Angeles, CA, USA, 2/26/2007.
- (16) Yamamoto H, Kawada M, Tsukamoto T, Takeda A, Igarashi H, and Matano T. SIV control by post-infection passive immunization of neutralizing antibodies. Keystone Symposium (X7): HIV Vaccines (From Basic Research to Clinical Trials), #320, Whistler, British Columbia, Canada, 3/28-29/2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

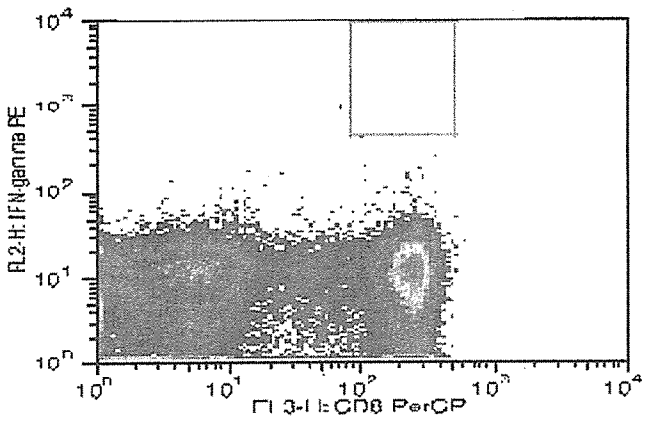
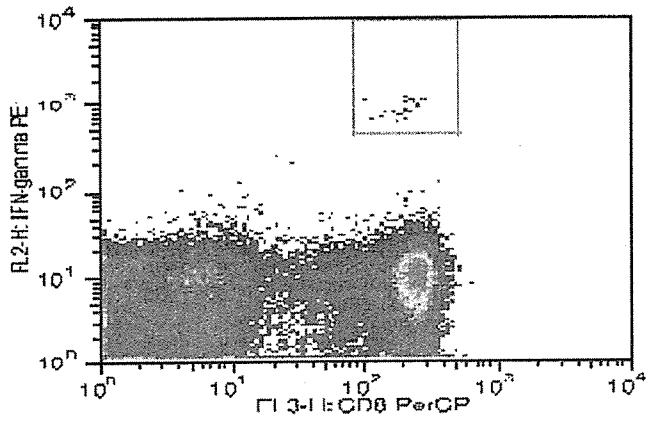


図1. Mamu-A90120-5・Gag241-249 複合体テトラマーによる Gag241-249 特異的 CTL の検出
 CD3 陽性 T リンパ球分画の CD8 - Tetramer dot plot.
 上段：SeV-Gag 接種後の 90120-a 陽性サル由来の末梢血リンパ球。テトラマー陽性細胞が認められる。
 下段：ワクチン非接種・SIV 非感染 90120-a 陽性サル由来の末梢血リンパ球 (Negative control)。

SIV 感染抑制サルにおける 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

高病原性 SIV239 から 5 糖鎖を欠失した d-5G は極めて低い病原性を示し、SIV239 感染と同等の高い初期感染後に速やかに感染は制御される。この制御の原因として糖鎖欠失による中和抗体の役割が推測されたが、中和抗体の誘導は遅く感染が低下した感染後 8 週に出現した。また中和抗体価は個体間の違いが大きく感染制御と関連する抗体価は 5 頭中 2 頭の個体に限られた。しかしこの 2 頭では感染後 3 週にウイルス粒子結合活性をもつ d-5G 特異的抗体が誘導され感染制御における役割が推測された。このように機能的抗体誘導においても細胞性免疫と同様な宿主遺伝的性質の関与が強く示唆された。ワクチン開発においては、このような感染制御関連遺伝子、関連する CD4 陽性 T 細胞の役割の解明が必要となると考える。

A . 研究目的

HIV の発見から 23 年経過した現在も HIV 感染の拡大が続いている。全世界の新規感染者は年間 500 万人を越えている。この世界的な流行の抑制にはワクチンによる感染予防が必須である。しかし HIV に対するワクチン開発は、HIV 特有の性質 (HIV が免疫の司令塔である CD4 陽性 T 細胞に感染しその機能を著しく損なうこと、HIV が高頻度に変異すること、中和抗体の誘導が難しいことなど) から未だに有効なワクチン開発の見通しが立っていない。近年、細胞性免疫が HIV 感染防御において重要な役割を持つことが明らかになり、サル動物モデルを用いたワクチン評価研究から、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、センダイベクター等) ワクチンを組み合わせたプライム/ブースト法の有効性が確認された。しかし感染防御効果は CTL エピトープ特異性に依存することから、関連 CTL エピトープを提示する MHC I アリルを保持する

宿主に限られる。しかし安全性の利点からワクチン効果を確認する臨床研究が開始されている。対照的に安全性の問題からウイルスを弱毒化した生ワクチンは臨床研究の段階に至っていない。しかし生ワクチンは MHC 等の宿主遺伝的性質に左右されず極めて高い感染防御効果を誘導することから、生ワクチンが誘導する防御免疫の研究が続けられている。我々は 5 糖鎖を欠失した変異ウイルス (d-5G) が極めて低い病原性とワクチンとしての高い有効性を持つことから、防御免疫の解析、低病原性の機序の解析、HIV と同等の相違性を示すウイルスに対する感染防御能について研究を行っている。d-5G 感染動物には高い防御免疫が誘導・維持されるが、その詳細は不明である。ワクチンとしての d-5G の初期感染の制御は防御免疫誘導と関連すると考えられるが、獲得免疫として細胞性免疫と抗体が関与する。我々は個体により両免疫の誘導、バランスが異なることを明らかにしたが、今年度は d-5G 感染初期に誘導さ

れる抗体反応について詳細に解析を行った。

B . 研究方法

ウイルス

病原性分子クローン SIV239 とその 5 糖鎖欠失変異ウイルス d-5G を用いた。d-5G は N 型結合糖鎖付加部位 (Env タンパクの 79, 146, 171, 460, 479 アミノ酸残基) の Asn を Gln に変異させることにより N 型結合糖鎖を欠失させた。それぞれの proviral DNA からウイルスを発現させ、アカゲザル PBMC で増殖させウイルスストックを作成した。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、TCID₅₀ はサル CD4 陽性 T 細胞 (CyfT/HVS) を用いて測定した。

アカゲザル

B ウイルス、SRV、STLV、SIV に対する抗体が陰性のオスのサルを選別した。ミャンマー原産の育成ザル (Mm9712, Mm9713, Mm9920, Mm9923, Mm9426) , ラオス原産の育成ザル (Mm9707, Mm9922, Mm9425) を用いた。

SIV 感染

以下のウイルス量 (括弧内に示す。単位 TCID₅₀) をそれぞれのサルに静脈内接種した。

SIV239 接種 : Mm9425 (100), Mm9713 (500), Mm9920 (500)。

d-5G 接種 : Mm9707 (100), Mm9712 (100), Mm9426 (100), Mm9922 (500), Mm9923 (500)。

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 Roche 製キットを用いて精製した。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' TGTCCACCTGCCATTAAGCCCGA 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。

中和抗体価の測定

中和抗体価の測定は Tat 反応性 LTR 制御下で SEAP (分泌型アルカリフォスファターゼ) を発現する CEMx174SIV-SEAP 細胞を用いて行った。段階希釈した血漿をウイルスと混ぜて室温 1 時間インキュベートした後、CEMx174SIV-SEAP 細胞を加えて 3 日間培養した。培養上清中に分泌される SEAP 活性を測定した。

ペプチド ELISA による抗 Env 抗体エпитオプの解析 Env 全領域をカバーする 72 本のオーバーラッピングペプチドを個々に 96 ウェル Immobilizer-ELISA プレートに固相化した。100 倍希釈した感染 8 週後のサル血漿をサンプルとし、上記 ELISA と同様にアッセイを行った。

ウイルス粒子結合アッセイ

Nunc イムノプレートをサル血漿から精製した IgG 分画をコーティングした。洗浄、ブロッキング後、d-5G または SIV239 を加え 37 ° C, 3 時間インキュベートした。RPMI で未結合のウイルスを洗浄した。抗体に結合したウイルスはウイルス RNA 精製キットの lysis buffer を用いて溶出しウイルス RNA を精製後 real time PCR 法で定量した。

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国立感染症研究所 (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