

d-5G のアカゲザルでの感染増殖 (図 1)

8 頭のアカゲザルを用い、3 頭に SIV239、5 頭に d-5G を接種した。ウイルス感染は血漿中ウイルス RNA 測定によりモニターした。初期感染早期 (感染後 4 週) までは両ウイルス感染とも同様の viral loads を示した。しかし、その後の viral loads は 2 グループ間で異なった。SIV239 感染ザルは 10^5 前後の set points を示し、2 頭は慢性発症型感染、1 頭は遅延発症型感染の viral loads を示した。対照的に d-5G 感染グループは感染後 12-16 週に検出限界以下にウイルス RNA は低下し、感染は少なくとも 6 年以上抑制された。

d-5G 感染ザルにおける中和抗体誘導 (図 2)

HIV/SIV の N 型糖鎖修飾の変化が Env タンパク表面に存在する中和エピトープを露出させ、感染ザルにおいて中和抗体が誘導されることが知られている。SIV239 は中和されにくい性質を持つことが知られていることから、5 頭の d-5G 感染ザルで糖鎖の欠失により極めて高い中和抗体が誘導されたかどうか調べた。中和抗体検出の感度を上げるために、まず T 細胞でのウイルス増殖を 50% 抑制を基準に抗体力価を測定した。2 頭のサル (Mm9707, Mm9922) では中和抗体は感染後 8 週から、2 頭のサル (Mm9712, Mm9923) では感染後 12 週から検出され、感染後 12 週または 18 週にピークに達し、その後低下した。注目すべきことは、1 頭 (Mm9426) では中和抗体は検出されなかった。この結果は糖鎖欠失により高い中和抗体が誘導されたことを示したが、中和抗体の誘導は個体間で違いが大きいことが注目された。In vivo で中和抗体がウイルス感染を抑制するには高い抗体濃度が必要であることから、中和抗体価を 90% 阻害を基準に再評価した。その結果中和抗体が検出されたのは 2 頭 (Mm9707, Mm9922) だけとなった。Viral loads からは、d-5G 感染は 5 頭で同じように制御されたが、中和抗体誘導では個体間で大き

な違いが見られた。これらの結果は初期感染の制御において中和抗体の貢献が小さいことを示す。特に 1 頭ではまったく検出されなかった。

d-5G 感染ザルにおける gp120 ELISA 抗体反応 (図 3)

次に gp120 抗体の誘導について解析をおこなった。SIV239 gp120 に対する抗体反応と d-5Ggp120 に対する抗体反応は基本的には違いがなかった。しかし SIV239 感染と d-5G 感染間では明らかな違いが見られた。d-5G 感染ザルでは感染後 3-4 週には gp120 抗体価はピークとなったが、SIV239 感染ザルでは gp120 抗体反応は弱く、ピークとなるまでの時間がかかり、d-5G 感染のピーク値に達したの感染後 12 週であった。d-5G 感染での gp120 抗体と中和抗体の相関は見られなかったが、感染後 2 週の gp120 抗体価の順番は中和抗体誘導の強弱と一致した。

Env タンパクのリニアールエピトープに対する抗体 (図 4)

Env タンパクをカバーする 72 種類の overlapping peptides を用いて d-5G 感染ザル、SIV239 感染ザルで誘導されたリニアールエピトープに対する抗体について解析した。リニアールエピトープは 2 グループで共通する領域に同定された。gp120 には領域 1 [a. a. (アミノ酸残基) 109-163]、領域 2 (a. a. 493-529)、gp41 には領域 3 (a.a. 589-625)、領域 4 (a.a. 660-685)、領域 5 (a.a. 721-757)、領域 6 (a.a. 841-879) が同定された。ほとんどのリニアールエピトープ抗体は 2 グループ間で一致したが、d-5G 感染ザル特異的に同定されたエピトープ、抗体の反応性が異なるエピトープが同定された。まず領域 1 では peptides ENV10, 12, 13, 14, 15 と結合する抗体が同定されたが、ENV14, 15 に対する反応は d-5G 感染ザルのみに検出された。ENV14 に対する反応性は統計学的に有意であった。次に領域 2、領域 3、領域 4 に対する抗体の反応性は d-5G 感染ザルでは、SIV239 感染ザルと比べて低い結果が得られ

た。しかし両グループ間での有意な違いは ENV51 (領域 3)、ENV56 (領域 4) に対する反応性に見られた。

d-5G 特異的リニアエピトープの V1-V2 領域内の糖鎖欠失変異 (a. a. 171) との関連 (図 4) 領域 1 について新たに作成した overlapping peptides (V1V2-1 から V1V2-12) を用いて抗体が認識する領域を狭めた。その結果 d-5G 特異的な反応は V1V2-9, 10, 11 に見られた。これらの peptide の配列は V1-V2 領域内の糖鎖欠失変異 (a. a. 171) を含むまたは近接していることから、SIV239 の a. a. 171 に付加されていた糖鎖の欠失により新たに生じたリニアエピトープであることが明らかとなった。

d-5G 特異的リニアエピトープに対する抗体誘導と感染制御との関連 領域 1 から 6 までのリニアエピトープに対する抗体誘導について SIV239 感染ザルと d-5G 感染ザルで調べた。その結果、d-5G 特異的リニアエピトープ V1V2-10 に対する抗体はすべての d-5G 感染ザルで同じように感染 3 週に強く誘導され、その後緩やかに低下した。この抗体は中和抗体能は確認されなかったが、d-5G 特異的にウイルスを強く結合することが確認された。しかしこのウイルス結合活性は強い中和抗体が検出された 2 頭 (Mm9707, Mm9922) のみに検出された。

D. 考察

d-5G 感染で誘導される中和抗体 糖鎖修飾は HIV/SIV が宿主免疫応答から回避するための戦略となっていると考えられている。d-5G 感染において細胞性免疫に続き中和抗体の誘導が初期感染後の速やかな感染制御に働いていると考えられた。しかし、機能的な中和抗体の誘導が 5 頭中 2 頭のみであったこと、さらに中和抗体が viral loads がすでに 10^3 - 10^4 に低下した感染後 8 週以降から検

出されたことから、初期感染の制御における中和抗体の役割は小さいと考えられる。

d-5G 特異的リニアエピトープ抗体の役割 中和抗体と対照的に d-5G 特異的リニアエピトープ抗体は感染後 3 週には強い誘導がすべての感染ザルで確認されたことから、感染制御との関連が推測される。さらに 2 頭においては高いウイルス粒子結合活性が確認されたことから、抗体依存性の補体活性化によるウイルスの不活化、感染細胞特異的破壊等によるウイルス感染の制御に働く可能性が推測された。感染早期に抗 HIV 薬治療を行うことにより感染宿主に感染制御免疫を誘導し投薬なしで長期間感染を抑制することが報告されている。そこでこのような感染後早期に誘導された機能的な抗体の d-5G 感染の制御への貢献が示唆される。

機能的抗体誘導と宿主の遺伝的性質

5 頭の d-5G 感染ザルはすべて初期感染後に感染が制御された、d-5G 特異的リニアエピトープ抗体もすべてのザルに誘導されたが、機能的抗体 (高力価の中和抗体とウイルス粒子結合抗体) は 2 頭 (Mm9707, Mm9922) に限られ、残りの 3 頭 (Mm9712, Mm9923, Mm9426) では誘導されなかった。この結果は機能的抗体の誘導が感染宿主側の遺伝的性質に支配されている可能性を示唆している。実際に Mm9707, Mm9922 はラオス原産で Mm9712, Mm9923, Mm9426 はビルマ原産のアカゲザルであった。このような SIV 感染制御に関わる宿主因子としては、CTL の誘導と特定の MHC アリルの関係が報告されている。機能的な抗体誘導にも特定の宿主遺伝子が関与する可能性が示唆される。今後これらの宿主遺伝子の性質を明らかにし、ワクチン開発への応用することの重要性と考えられる。

E. 結論

SIV 感染の制御に働く液性免疫として中和抗体以外に中和抗体よりも早期に誘導される抗体、特にウイルス粒子結合活性を持つ抗体の役割が明らかとなっ

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) Tanaka-Takahashi 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 macaques MHC class I Mamu-A and I Mamu-B loci. Electrophoresis. In press.

学会発表

1) 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.

2) 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. October, 2006, Atlanta, USA.

3) 新規糖鎖欠損 SIV の性質とアカゲザルでの感染

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、2006年、東京

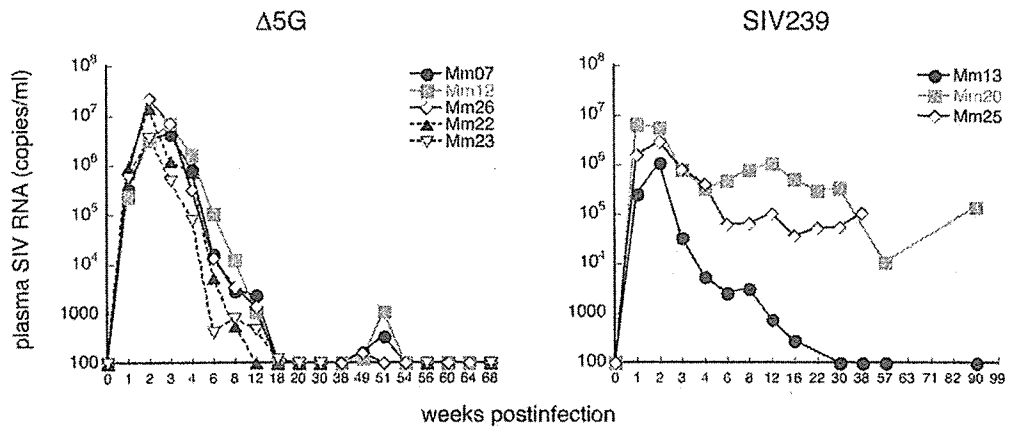
4) Immune correlates: Lessons from a novel attenuated mutant virus. 森 一泰. 日本エイズ学会、2006年、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

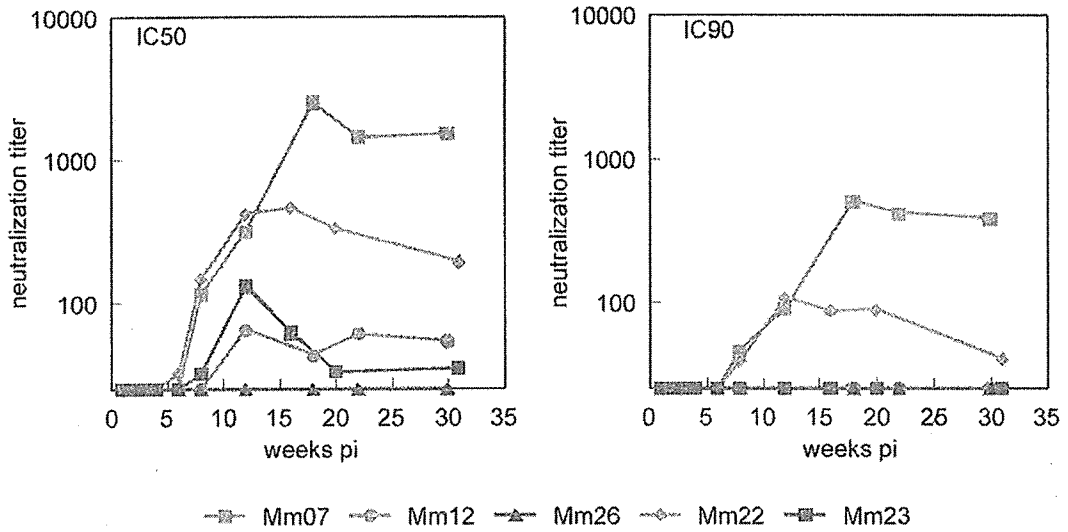
1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

特に該当するものはなかった

☒ 1 viral loads



☒ 2 Neutralizing antibody



☒ 3 Anti-gp120 Ab

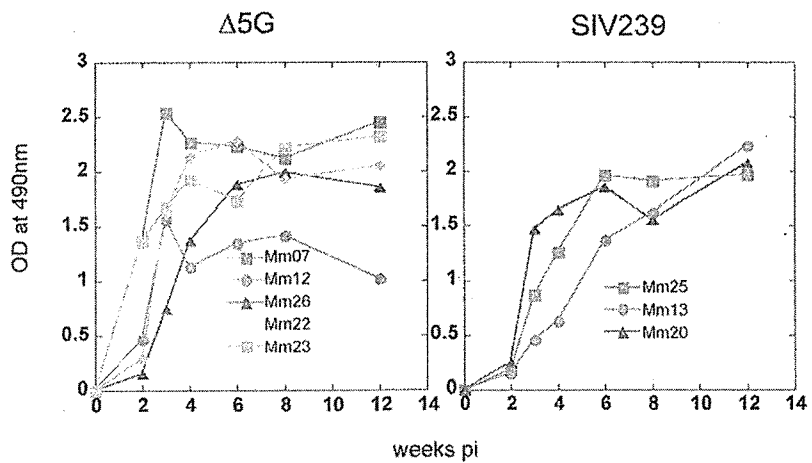
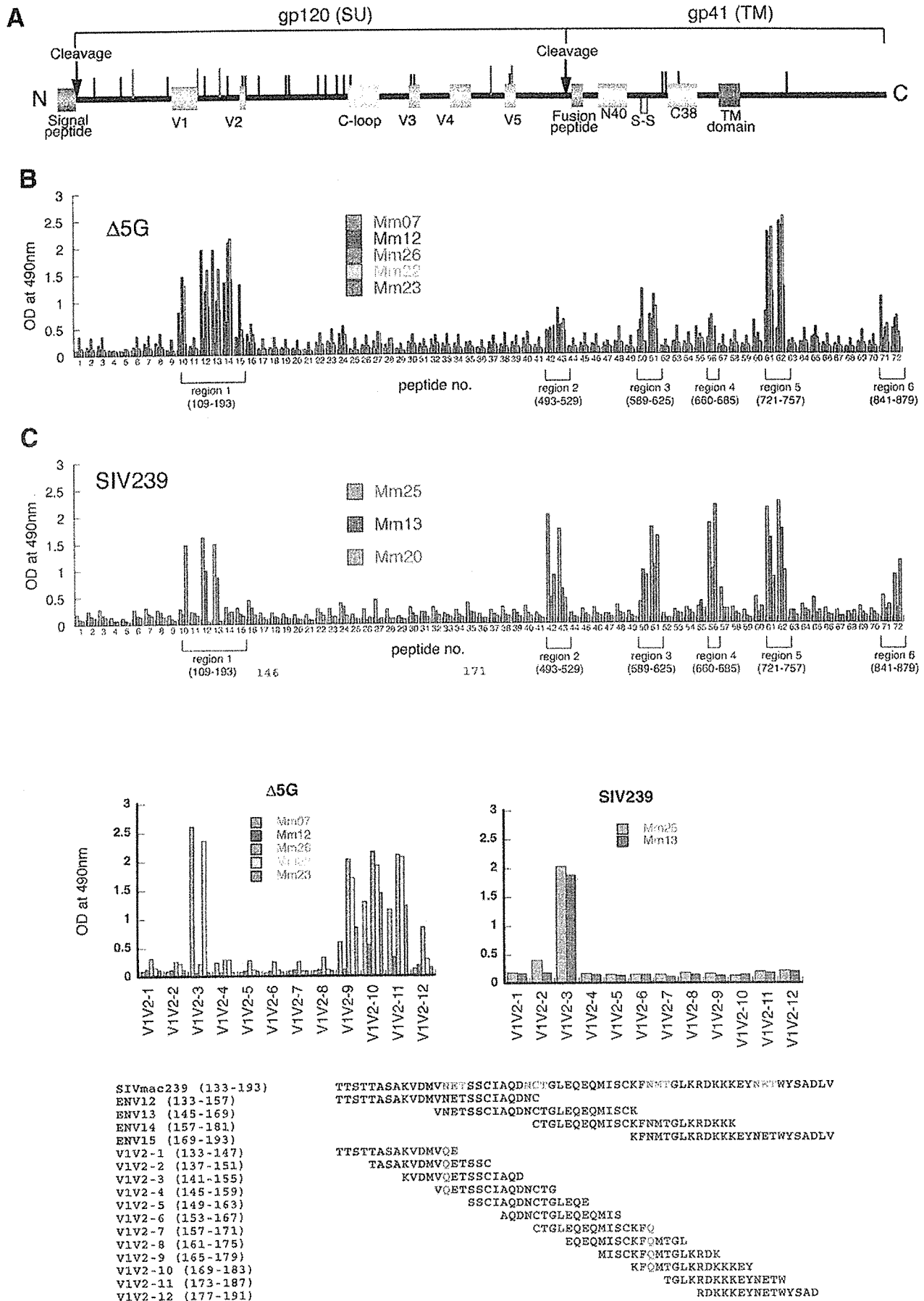


图 4 Linear epitopes in Env of SIV239 and D5G



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)群の多型解析法を確立した。一方、NKG2D のリガンドである RAET1/ULBP 遺伝子群が存在する領域のマイクロサテライト多型を検討した。ヒトではこの領域のマイクロサテライトに多型を認め、HIV/AIDS 感受性との有意な関連が観察された。アカゲザルでは ULBP4 近傍および ULBP1 近傍のマイクロサテライトはヒト同様に多型を示し、ULBP2 近傍のマイクロサテライトは多重性を示した。しかしながら、アカゲザルおよびカニクイザルでは ULBP1 には多型を認めず、ULBP3 多型も少なかった。これらとは別に、Th1/Th2 バランス形成に関わると考えられる TIM1 遺伝子および HIV/AIDS 感受性に関わると考えられる CCL3L1 遺伝子の多型を検討したところ、アカゲザルおよびカニクイザルでは TIM1 に著しい多型を認めるとともに CCL3L1 のコピー数多型が観察された。さらに、TIM1 多型と SIV ワクチン接種後の中和抗体産生との関連が示唆された。

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 あるいは B27 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。さらに最近、HIV の起源について、旧世界猿 SIV から霊長類 SIV を経由したものであることが判明した。以前よりチンパンジーでは MHC のレパトワが旧世界猿およびヒトに比べて小さいこと、チンパンジー-MHC はヒト HLA-B57 や B27 と同様の SIV-Gag ペプチドを提示することが知られており、このことから、チンパンジーでは進化の過程で SIV による selective sweep (選択排除) が生じたのではないかと推定されている。すなわち、現存するチンパンジーは SIV への抵抗性を獲得したものが生き残っていると考えられる。事実、最近ケモカインである CCL3L1 のコピー数多型が調査され、HIV/AIDS 感染者では一般集団に比較してコピー数が少なく、一方チンパンジーはコピー数が多いことが報告されている。そ

ここで本研究では、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、KIR 遺伝子群、NKG2 遺伝子群、RAET1/ULBP 遺伝子群、MIC 遺伝子群、TIM 遺伝子群、CCL3L1 遺伝子群など、種々の免疫制御遺伝子群の多様性をヒト、チンパンジー、カニクイザルなどと比較しつつ解析する。

B. 研究方法

1) サル MHC クラス I 抗原遺伝子群の解析：

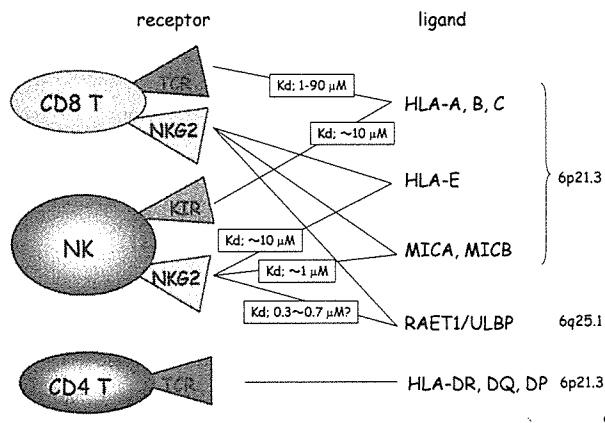
ワクチン開発や薬剤研究に利用されるアカゲザルおよびカニクイザル個体群の MHC クラス I 型を明確にするため、MHC クラス I (Mamu-A および Mamu-B) の cDNA について、RSCA を応用した多型解析法を開発してきた。昨年度までに引き続き、国内で維持されているアカゲザル実験個体群およびカニクイザルについて、B リンパ芽球様細胞株の total RNA を抽出し、ランダムプライマー(6 mer)を用いて cDNA を作製した。これをテンプレートとして、アカゲザル MHC クラス I 遺伝子である Mamu-A 及び Mamu-B の cDNA を、それぞれに特異的なプライマーを用いて RT-PCR 法によって増幅した。また、同一プライマーを用いてカニクイザルの MHC クラス I 遺伝子である Mafa-A 及び Mafa-B の cDNA を増幅した。ついで、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。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。

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、サルにおける遺伝子構成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、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。

3) TIM1 遺伝子の解析：

TIM1 は A 型肝炎ウイルス (HAV) のレセプターとして同定されたが、CD4 陽性 T 細胞や抗原提示

細胞に発現し、Th1/Th2 バランスの形成・維持に関わると考えられる分子である。TIM1 は Th2 活性化に働くが、ヒトでは著明な多型性を示し、ことに exon 4 にコードされるムチン様ドメインの MTTTVP 配列の挿入・欠失多型はアトピーや喘息感受性との関連が知られている。そこで、チンパンジー、アカゲザル、カニクイザルについて、TIM1 遺伝子多型を検討した。また、アカゲザルについては、SIV ワクチン後の中和抗体産生との関連を予備的に検討した。

4) CCL3L 遺伝子群の解析：

HIV ウイルスはケモカインレセプターである CCR5 をレセプターとして T 細胞に感染する。このため CCR5 変異 (Δ32) のホモ接合体は HIV 感染に対して抵抗性であることが知られている。最近 CCR5 のリガンドとして CCL3L ファミリーが同定された。CCL3L は LD78 とも呼ばれるが、我々は以前に CCL3L ファミリーの一員である CCL3L1 にはコピー数多型が存在することを報告していた。最近、CCL3L1 のコピー数多型が HIV/AIDS 感受性と関連することが報告された。すなわち、HIV/AIDS 集団には一般集団と比較して CCL3L1 のコピー数が少ないこと、チンパンジーでは CCL3L1 のコピー数が多い。このことから、チンパンジーにおける SIV 抵抗性には CCL3L1 コピー数の多いことが関与すると考えられる。そこで、アカゲザルおよびカニクイザルについて CCL3L1 コピー数の多様性を検討した。

(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 18 年 7 月 6 日付承認)】

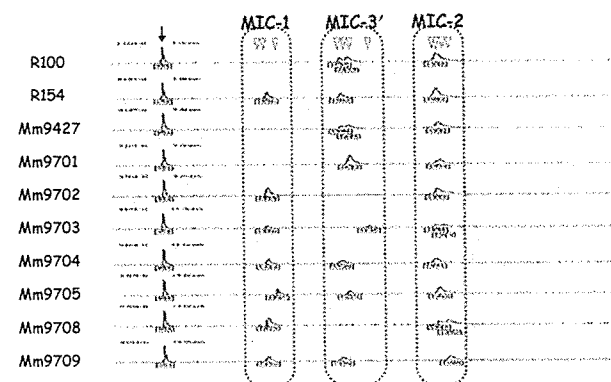
C. 研究結果

1) サル MHC クラス I 抗原遺伝子群の解析：

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 遺伝子が発現し、カニクイザルでは個体あたり 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で類似しているものと考えられた。

また、アカゲザルおよびカニクイザルについて MHC 領域のマイクロサテライトの多型解析を実施したところ、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と考えられた。

さらに、NKG2D のリガンドである MIC 遺伝子群は個体ごとにコピー数が異なっていたが、MHC コピー数との相関関係はなかった。なお、MHC-E については、ヒト用プライマーでは増幅できなかった。



2) サル RAET1/ULBP 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 をリガンドとし、NKG2D はホモダイマーを形成し MIC 分子や RAET1/ULBP 分子をリガンドとする。本年は特に RAET1/ULBP ローカスの多様性

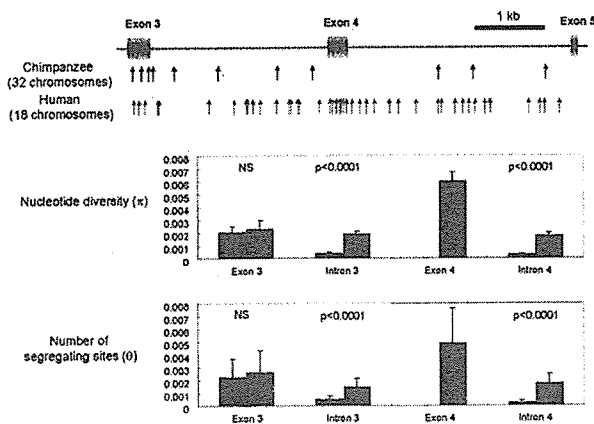
を検討する目的で6種のマイクロサテライトマーカーを設定し、それらを用いて、ヒトおよびアカゲザルの多型解析を行った。

その結果、ULBP4近傍のRAET-MS2, ULBP1近傍のRAET-MS5はヒト、アカゲザルとも多型性を示した。一方、ULBP2近傍のRAET-MS3およびRAET-MS4はヒトでは多型性を示したが、アカゲザルでは前者は多型がなく、後者では3本以上のバンドが同時に検出されたため、遺伝子重複の存在が示唆された。

一方、ヒトプライマーを用いてアカゲザルのRAET1/ULBP遺伝子を増幅したところ、ULBP1およびULBP3遺伝子の増幅が可能であった。そこでダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定したところ、アカゲザルではULBP1には多型がなく、ULBP3の多型も乏しかった。なお、チンパンジーではULBP1には多型があるが、ULBP3には多型を認めなかった。

3) TIM1 遺伝子の解析:

TIM1 遺伝子多型をヒトとチンパンジーで比較解析したところ、ヒトではムチン様ドメインをコードする exon 4 にアミノ酸配列変化を伴う多型が集中していた。このような非同義置換の集中はMHC 遺伝子のペプチド結合ドメインでも認められることであり、非同義置換が当該遺伝子の機能上、進化的に選択された現象であると考えられている。しかしながら、チンパンジーではこの領域に全く多型が観察されなかった。



ついで、アカゲザル、カニクイザルでTIM1遺伝子 exon 4 多型を検討したところ、ムチン様ドメインの6アミノ酸配列 (TTTTLP) 繰り返し数の著明な多型が観察された。ヒトにおいても当該配列に類似した (MTTTPV) 配列の挿入・欠失多型があるが、チンパンジーは挿入型であった。

TIM1 exon 4 sequence variations in *Macaca mulatta* and *Macaca fascicularis*
- Unequal crossing-over might cause a large variation in TIM1 exon 4 sequences -



<i>Macaca mulatta</i>			<i>Macaca fascicularis</i>		
size of Exon 4	n	freq.	size of Exon 4	n	freq.
384	3	0.094	330	2	0.100
402	2	0.063	408	4	0.200
408	2	0.063	414	2	0.100
426	6	0.188	426	3	0.150
438	1	0.031	456	6	0.300
456	2	0.063	459	1	0.050
462	2	0.063	462	1	0.050
474	2	0.063	480	1	0.050
486	6	0.188			
516	6	0.188			

Repeats of the six-amino acid consensus sequence TTTTLP in TIM1-Exon 4

```

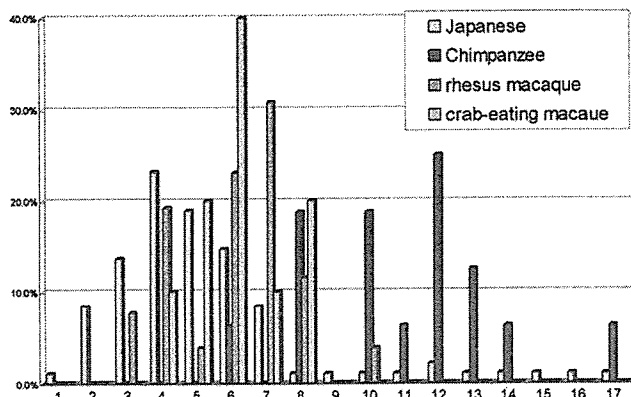
CCAGGTCACAGCTCTCCAGTCTCCAGACTCTCCAGCA
K V T T T P F V R E T V R T
ATATACCTCTCTCCAGCAAGCAAGCCCTCCAGCAAGCA
S T T V F F T E R L E L F T L F
ACTCTCCAGCAAGCAAGCAAGCTCCAGCAAGCAAGCTCT
T L F F T E R L E L F T L F L D
CCAGGTCACAGCTCTCCAGTCTCCAGACTCTCCAGCA
F T F T L F T L F T L F L F F H
AGACAGCTCTCCAGCAAGCAAGCTCTCCAGCAAGCA
T L F F T E R L E L F T L F
ACTCTCCAGCAAGCAAGCTCTCCAGCAAGCAAGCTCT
T L F F T E R L E L F T L F
CCAGGTCACAGCTCTCCAGTCTCCAGACTCTCCAGCA
F T F T L F T L F T L F L F F
AGACAGCTCTCCAGCAAGCAAGCTCTCCAGCAAGCA
T L F F T E R L E L F T L F
ACCTCTCCAGCAAGCAAGCTCTCCAGCAAGCAAGCTCT
T L F F T E R L E L F T L F
CCAGGTCACAGCTCTCCAGTCTCCAGACTCTCCAGCA
F T F T L F T L F T L F L F F
AGACAGCTCTCCAGCAAGCAAGCTCTCCAGCAAGCA
T L F F T E R L E L F T L F
CTCTCCAGCAAGCTCTCCAGTCTCCAGACTCTCCAGCA
F T F T L F T L F T L F L F F

```

TIM1 多型とSIVワクチン接種アカゲザルにおける中和抗体産生との関連を予備的に検討したところ、中和抗体高産生個体はTTTTLPリピートの数が少ないアレルを有する傾向があった。

4) CCL3L 遺伝子群の解析:

CCL3L1 遺伝子コピー数多型はヒトにおけるHIV/AIDSとの関連が示されている。そこで、ヒト、チンパンジー、アカゲザル、カニクイザルについて、CCL3L1ファミリーのコピー数を検討した。その結果、アカゲザル、カニクイザルはそれぞれ平均5.0コピー、5.3コピーであり、ヒト(平均4.3コピー)とチンパンジー(平均10.0コピー)との中間に位置していた。



D. 考察

1) MHC クラス I 領域の解析:

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、それらのうちの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 遺伝子群タイピング法を確率し、これがカニクイザルにも応用可能であることを確認した。

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る。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た疾患関連遺伝子マッピングとそれに続く SNP 検索と機能解析から、IKBL 多型が慢性関節リウマチや高安動脈炎の感受性遺伝子であることを見出した。このことから、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も有用であると考えられる。

また、NK レセプターのリガンドである MHC 領域内遺伝子 (MIC および MHC-E) の解析を行った。MIC 遺伝子についてはコピー数多型と遺伝子内多型の両方が観察された。一方、MHC-E の多型解析を試みたが、ヒトプライマーではサル MHC-E の増幅効率が悪いため、詳細な解析は行えなかった。

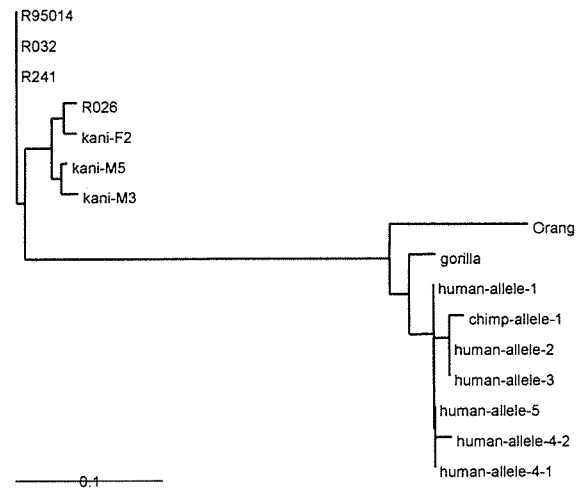
2) RAET1/ULBP 領域の解析:

NKG2D のリガンドである RAET1/ULBP ファミリーの解析を行った。特に ULBP1 および ULBP3

については塩基配列レベルでの多型解析を行ったが、アカゲザルではヒトに比較して多型に乏しいことが示された。また、チンパンジーとアカゲザルでは、前者は ULBP3 に特に多型に乏しく、後者は ULBP1 に特に多型に乏しいことが示されたことから、REAT1/ULBP ファミリーには機能的な差異が存在する可能性がある。REAT1E(ULBP4)および REAT1L については、ヒトで非同義置換多型が多く報告されているためアカゲザルおよびチンパンジーでの解析を進めているが、REAT1E(ULBP4)は複数の PCR 産物が観察されるため、多重コピーとなっていることが示唆される。

3) TIM1 遺伝子の解析:

TIM1 遺伝子多型はアトピーや喘息との感受性と関連することが報告されており、Th1/Th2 バランス形成に関わると考えられる。本研究によってチンパンジーでは多型に乏しく、一方旧世界猿では極めて多型に富むことが明らかとなった。



TIM1 配列を用いて系統樹を描くと、チンパンジーTIM1 はヒトアフリカ群の中に含まれることから、MHC 同様に、TIM1 領域についてもチンパンジーでは selective sweep が生じたことが示唆される。なお、極めて予備的ではあるが、TIM1 遺伝子内の(TTTTLP)配列繰り返し数と免疫応答性との関連を示唆するデータが得られたため、今後さらに検討を重ねる予定である。

4) CCL3L1 ファミリーの解析:

CCL3L1 ファミリーはヒトで遺伝子コピー数に多型がある遺伝子群である。このような遺伝子コピー数多型は、本研究が対象としている MHC 領域、KIR 領域、RAET/ULBP1 領域の遺伝子群にも認められることから、免疫応答性を遺伝子量効果で制御している可能性がある。本研究によって、アカゲザルやカニクイザルでもヒトやチンパンジーと同様にコピー数多型があることが判明したため、今後 SIV ワクチン後の免疫応答性との関連を検討する予定である。

E. 結論

RSCA 法を応用したサル MHC クラス I 遺伝子群のタイピング法を確立した。また、NKG2 のリガンドである MIC 分子ならびに RAET1/ULBP 分子群についても、ヒトおよびサルで多型解析を行った。さらに、TIM1 遺伝子群や CCL3L1 遺伝子群について、ヒト、チンパンジー、アカゲザル、カニクイザルを対象としたゲノム多様性の比較解析を行った。チンパンジーは進化上 SIV 抵抗性を獲得した種であると考えられることから、今後のワクチン研究における示唆を与える。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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(4-5): 363-373.
- 2) Yamamoto H, Kawada M, Tsukamoto T, Takeda A, Igarashi H, Miyazawa M, Naruse T,

Yasunami M, Kimura A, Matano T: Vaccine-based long-term stable control of simian-human immunodeficiency virus 89.6PD replication in rhesus macaques. *J Gen Virol*, in press

- 3) Takahashi-Tanaka Y, Yasunami M, Naruse T, Hinohara K, Matano T, Mori K, Miysazawa 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

2. 学会発表

- 1) 成瀬妙子、安波道郎、俣野哲朗、森一泰、本多三男、保富康宏、宮澤正顕、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.
- 2) 宮澤正顕、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.
- 3) 成瀬妙子、安波道郎、俣野哲朗、森一泰、本多三男、保富康宏、宮澤正顕、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.
- 4) 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.

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 正顯（近畿大学医学部 教授）

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)感染及びワクチン開発実験に用いられてきた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てきた。今年度は、過去2年度に確立した方法論を活用し、引き続いて cDNA クローニングによる DRB, DQA, DQB, DPA, DPB 遺伝子座の対立遺伝子型決定と、マイクロサテライト遺伝子型同定によるゲノム解析を推し進め、特に最近 SIV 感染実験に用いられた複数個体について、集中的にその MHC class II 遺伝子型を解析した。その結果、昨年度までの解析では見出されていなかった新規のハプロタイプを多数見出した。

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、免疫学的研究の宿主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。

我々は、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 遺伝子型を、cDNA クローニングによって DR 領域から DP 領域まで網羅的に決定し、親子関係の明らかな個体間における共通アレルの出現と、ゲノムレベルのマイクロサテライト遺伝子型決定を組み合わせることで、class II 領域のハプロタイプ構成と、領域内部での組換えの有無を検討してきた。

今年度は、特に最近 SIV 感染実験に用いられ、ワクチンに対する反応性や T リンパ球応答のエピトープ特異性が明らかになってきたサル個体群について、その class II 遺伝子型とハプロタイプ構成を網羅的に解明し、免疫応答能との相関を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) 対象個体

国立感染症研究所エイズ研究センター、及び医薬基盤研究所霊長類医学科学研究センターで SIV 感染実験に用いられ、感染後の免疫応答能がある程度解析されているアカゲサル個体と、今後実験に用いられる予定の個体群を対象とした。これら個体から樹立された B リンパ芽球株より、総 RNA を抽出後、オリゴ dT プライマーを用いて高忠実度の逆転写反応を行い、得られた cDNA を以下の解析に用いた。また、ハプロタイプ構成のゲノム DNA レベルでの解析のため、同じ細胞株からゲノム DNA も

抽出した。

2) MHC class II 遺伝子多型とハプロタイプ構成の解析

各細胞株由来 cDNA をテンプレートとし、DPA, DPB, DQA, DQB 及び DRB 対立遺伝子群に特異的なプライマーペアを用いて、cDNA 全長の PCR 増幅を行った。得られた PCR 産物は、アガロースゲル電気泳動でそのサイズを確認するとともに、プライマー中に設置した制限酵素切断部位を用いて、pUC19 プラスミドへのクローニングを行い、各クローンの塩基配列を決定した。

3) ゲノム DNA のマイクロサテライト解析

既に我々が HIV-1 曝露非感染ヒト集団のゲノム解析に用いたと同じ方法 (Kanari, Y. *et al.* *AIDS* 19:1015-1024, 2005) により、アカゲサル各個体のゲノム DNA をテンプレートに、第 6 染色体 MHC class II 領域の多型性マイクロサテライトマーカーに特異的な蛍光標識プライマーを用いて PCR 反応を行い、得られた増幅断片のサイズを解析することにより、遺伝子型の決定を行った。

蛍光標識 PCR 産物のピーク同定及びサイズ解析は、ABI 3100 DNA シークエンサーと GeneScan ソフトウェアの組合せによった。この際、一部の親個体について、得られた PCR 産物をプラスミドベクターに組込んで塩基配列決定を行い、反復配列の回数を確定した。こうして絶対サイズの確定した検体を常に電気泳動系に加えることにより、全ての解析結果を絶対値として相互比較できるようにした。

(倫理面への配慮)

本研究はアカゲサルの遺伝子解析に関するもの

ID	Gene marker	種別 ハプロタイプ	DR4/4A	DRB	DQA	DQ (166)	DQB	DQ (267)	DP (274)	DPA	DPB
R226	R-90-019 R-98-153	d2 b(2)		DRB*W2603 DRB*W2601	DQA1*0502 DQA1*0502					R9003DPA01 (98%)	Mem0712DP01 DPB1*0407
R248	R-99-001A R-0A6715	New 90-049-1 (2)			DQA1*0502		DQB1*1603			R9003DPA01 (89%)	DPB1*0407 Mem0712DP01 (85%)
R249	R-99-075LA 995LA	93-06F1-2 (2) d1(2)		DRB1*0310 DRB*W2603	DQA1*0165		DQB1*0602			R9003DPA02 (197/200)	DRB1*0301 DPB1*0407
R219	R-97-051F2 R-97-052F2	b (2) R90-69-1 (2)		DRB*W2601 DRB1*0303 DRB1*1603	DQA1*0502		DQB1*0611			Mem0712DPA01 (156/167)	Mem0712DP01 (151/167) DPB1*0407
R355	R-97-051F2 R-97-025F1	d2 s	240 224	DRB*W2104 1出5進等 R9007DR05 (AB112040) DRB*W2603 DRB*W2603 DRB1*0603	DQA1*0502			221	275	R9003DPA01	DPB1*0407
BR256	R-99-001A R-98-037F2	g New	240 243	DRB1*0405 (89%)	DQA1*012		DQB1*1603		217 253	DPB1*0407 DQA1*0101 (87%)	DPB1*0407
BR257	R-97-051F2 R-97-052F2	Mem01340135 b	254 270	DRB*W2104 DRB1*0513 (250/269)	DQA1*0103 DQA1*0502	131	DQB1*0607	111	263 265	Mem0712DPA01 (87%)	DPB1*0407
BR260	R-90-010AY R-94-005F1	d1 t(C)	240 250	DRB*W2603 DRB*W608 (88%)	DQA1*0502 DQA1*0103	135 131		205 211	265 211	R9003DPA02 (83%)	DPB1*0407 e,s
BR263	R-90-010AY R-94-014F1	d1 b(C)	240 270	DRB*W2603	DQA1*0502	135		205	265 216	R9003DPA01 (87%)	DPB1*0407
BR264	R-90-010AY R-92-045F1	e nona	252 235	R9014DR03 (=DRB*W2607) DRB1*1501 (89%)				213	251	R9003DPA01 (87%)	
BR270	R-97-014F1 R-97-052F1	a t-like (2)	235 235	R9101DR02 (=DRB1*0321) DRB1*1607 DRB1*0303 (83%)	DQA1*03 DQA1*0502	135 135	DQB1*1501	211	253	Mem0712DPA01 (156/167)	Mem0712DP01
BR272	R-90-110AY R-91-012F1	a (2) d2		DRB1*1607 DRB*W2104 DRB*W2603	DQA1*03 DQA1*0502	135 135			221 275		DPB1*0407 R9003DPA01
BR273	R-95-014F1 R-97-012F2	e j	252 255	R9014DR03 (=DRB*W2607) DRB1*0313 R9003DR05 (=DRB1*0403) (=DRB*W501)	DQA1*03	135	DQB1*1502	213	257 (89%) 275	R9003DPA01 (89%)	DPB1*0407
BR275	R-95-014F1 R-97-033F1	a t-like (2)	235 235	R9101DR02 (=DRB1*0321) DRB1*0303	DQA1*03 DQA1*0103	135 (7) 131	DQB1*1801	211	253	Mem0712DPA01 (156/167)	Mem0712DP01
BR277	R-90-110AY R-90-114AY	d1 a (2)	240 252	DRB*W2104 DRB*W2603 DRB1*0504	DQA1*0502 DQA1*0502			205 211	265 275	R9003DPA01 (89%)	DPB1*0407
BR281	R-90-110AY R-98-043F1	b R98-043 New	270		DQA1*0502		DQB1*1708 (DQB1*1703)	205 212	263 277	R9003DPA02 (86%)	DPB1*0407

表 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

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

今年度新たに決定されたアカゲザル MHC class II 遺伝子型とハプロタイプ構成の一覧を、上の表に示す。ミャンマー系と名付けた個体群で昨年度までに繰り返し確認されている class II ハプロタイプである a, b, d1, d2, e や、ラオス系と名付けた個体群でこれまでに繰り返し確認してきたハプロタイプ s, t と思われる対立遺伝子型が一組となって確認されているほか、これまで交配の親個体では確認されず、複数の子孫個体に共通して見出されることから独立のハプロタイプと認識されてきた j が、ここでも再確認されている。

また、これまでに class II の全遺伝子型をほぼ完全に決定し、対立する染色体の明確な既知ハプロタイプの存在から、もう一つの染色体上のハプロタイプとして推定されてきた 90-49-1, 93-06F1-2, R90-69-1, R98-43 などの遺伝子型について、それと同じハプロタイプの再現を示す遺伝子型が少数ずつながら確認された。

但し、大変興味深いことに、これまでに見出してきたハプロタイプと、DRB 遺伝子座から DQA 遺伝子座に至る対立遺伝子型、或いはマイクロサテライト遺伝子型が一致しながら、DQB から DPB に至る領域の何れかで染色体乗換えが生じたと考えざるを得ない新規ハプロタイプも多数見出され(表の下線部アリル)、既に昨年度指摘したように、アカゲザル MHC class II 領域では、DRB から DQA 迄のハプロタイプ構成が安定しているのに対し、DQ 領域と DP 領域の間或いは内部には、組換えのホットスポットが多数あるものと考えられた。

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、その発現多量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、昨年度まで未確認の新規ハプロタイプ構成を明らかにした。

今年度の研究結果から、昨年度予備的な印象を得ていた DR 領域から DQA 領域に至るハプロタイプの安定性と、これとは対照的な DQ-DP 領域での頻繁な染色体乗換えが実証され、今後アカゲザル

MHC class II ハプロタイプの解析においては、DQ, DP 領域の遺伝子型までを完全に決定することが不可欠であることが明らかとなった。

現在、ワクチンに対する反応性、特に中和抗体産生速度と class II 遺伝子型との相関を解析中であり、DQ, DP 領域の遺伝子型が SIV 抗原に対する T 細胞免疫応答に与える影響を早急に解明したい。

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。

従って、従来行われてきたような DRB ハプロタイプの決定のみで、アカゲザル MHC class II 全体のハプロタイプ構成を決定することは不可能である。

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) 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. Infect. Dis.*, in press, 2007.

2) Yamamoto, H., M. Kawada, T. Tsukamoto, A. Takeda, H. Igarashi, M. Miyazawa, T. Naruse, M. Yasunami, A. Kimura, and T. Matano. Vaccine-based long-term stable control of simian-human immunodeficiency virus 89.6PD replication in rhesus macaques. *J. Gen. Virol.* **88**:652-659, 2007.

3) 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.

4) Kida, Y., S. Tsuji-Kawahara, V. Ostapenko, S. Kinoshita, E. Kajiwar, 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.

2. 学会発表

1) 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.

2) 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。

3) 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。

H. 知的所有権の出願・取得状況

該当するもの無し

研究要旨

エイズウイルスの env は他のウイルスと比較すれば糖鎖結合部位が極めて多い。このことは生体からの免疫反応から回避することに重要であると考えられ、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。WTenv および d5G 組み込みワクシニアウイルスを用いて特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL)の標的細胞としたところ d5G を用いると明らかに CTL に対する傷害性が増加した。この効果は細胞膜近傍での蛋白合成を阻害すると抑制された。また、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 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。エイズウイルスは env において非常に多くの糖鎖結合部位をもち、このことも免疫監視機構からの回避に関係していると考えられている。この糖鎖結合部位を取り除いた SIV は弱毒生ワクチンとして、野生型 SIV に対しワクチン効果をもたらす。この糖鎖結合部位を取り除いた SIV delta 5G の感染では液性免疫反応は野生株との差異は認められず、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シ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(Fig. 1)。
- 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 in vitro で SIVenv および SIVd5Genv 組み込みワクシ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。また免疫マウスの血清中の SIVenv 特異的抗体ならびに中和抗体価を測定した。
- 4) 免疫マウスの脾細胞を用い野生型 SIVenv および SIVd5Genv 組み込みワクシニ

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。

5) SIVenv WT および d5G を組み込んだワクシニアウイルスをマウス細胞 LB27.4 に感染させた CTL の標的細胞を種々の蛋白分解酵素阻害剤を用いて CTL の細胞傷害活性に対する影響を検討した。

6) 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. HIV 特異的免疫反応：DNA ワクチン投与マウスの SIV env に対する抗体を測定したところ両免疫群に差は無く、中和活性も示さなかった(Fig. 2、Table 1)。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. 3)。しかしながら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

エイズウイルスの感染予防に対する試みは数多く報告されているが未だ実用化されているものは無い。エイズウイルス遺伝子の nef を取り除いたウイルスが生体内で増殖をせず、ワクチン効果をもたらすと報告されて以来エイズウイルス感染予防には生ワクチンが効果的であると考えられてきた。しかしながらその危険性が指摘され、実際には使用されていない。エイズウイルスと他のウイルスを比較すると env における糖鎖結合部位が極端に多く、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。このこと

は env タンパクの分解が細胞膜近傍で行われていることによることが確認された。この様にウイルスタンパクへの糖鎖結合を阻害すると生体の免疫系、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) Tanaka-Takahashi, Y., Yasunami, M., Naruse, T., Hinohara, K., Matano T., Mori, K., Miyazawa, 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) 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

2. 学会発表

- 1) 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回に本ウイルス学会(名古屋)
- 2) 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)
- 3) 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(大阪)
- 4) 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57回日本アレルギー学会
- 5) Yasuhiro Yasutomi: Oral administration of DNA vaccine by using virus-like particles derived from orally transmissible virus. 4th International Gene Therapy Symposium.
- 6) 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)

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)

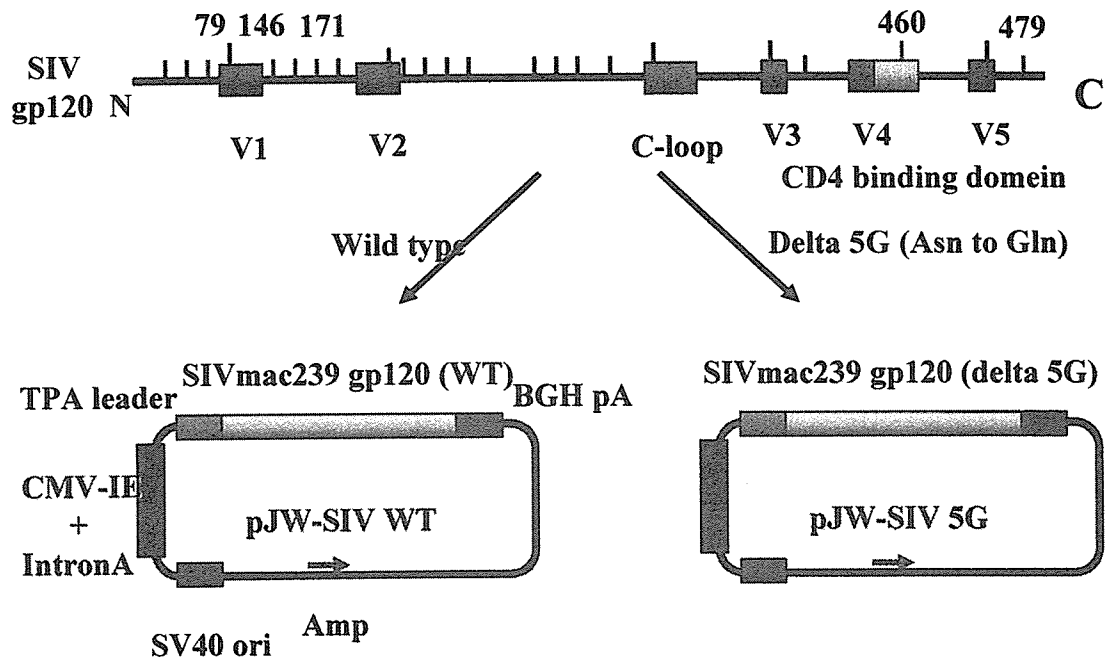
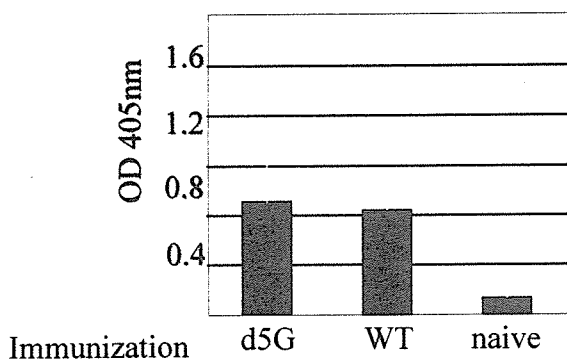


Fig.1 作製した2種類のDNAワクチン



Immunization	Neutralization Ab titer
d5G	< 20
WT	< 20

Fig.2 SIVenv特異的抗体の誘導と中和抗体価

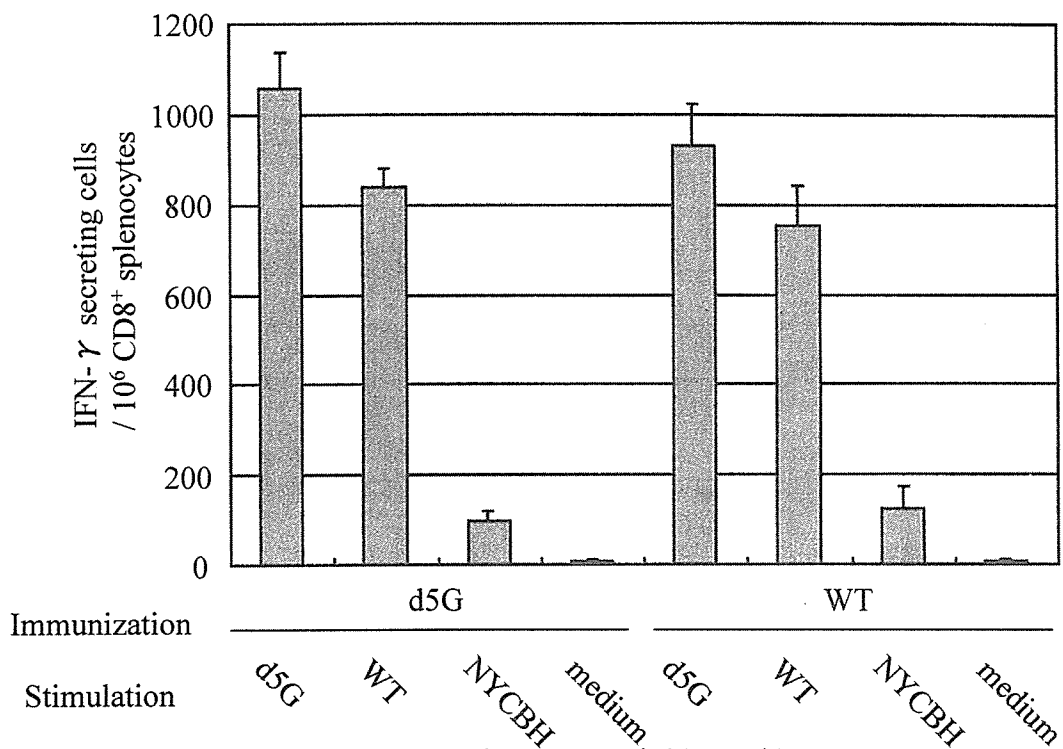


Fig. 3 ELISPOT assayによるCD8+細胞のIFN- γ 産製の比較

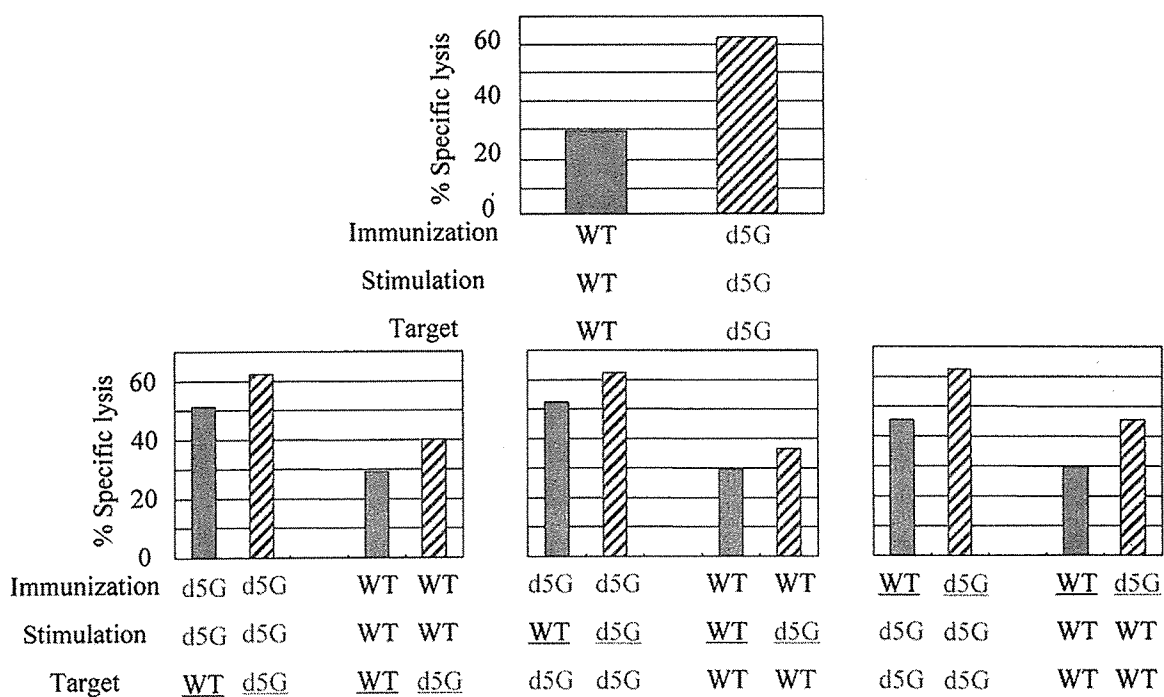


Fig. 4 免疫、刺激、標的を各々変化させたときのCTL活性