

3. 免疫誘導性および免疫寛容性樹状細胞の分化培養と HIV-1 増殖調節への応用

分担研究者 田中 勇悦 琉球大学医学部免疫学 教授

研究要旨 ヒト末梢血単球を体外で短期間に樹状細胞(DC)に分化させる方法として IL-4 と IFN-beta で培養し、単球の刺激物質である KLH、LPS や不活化 HIV-1 粒子を加えて培養する方法を見いだしている。本年度の研究により、この新規 DC が通常用いられている方法で分化培養させた DC と比較して CD8+T 細胞をより強く活性化する DC であることを明らかにした。その理由として、新規 DC が高いレベルの HLA を発現することと同時に OX40 を発現し、CD8+T 細胞の OX40L と反応することが示唆された。また、OX40/OX40L の相互反応において細胞結合型の OX40L が R5 HIV-1 の感染増殖抑制を抑制すること、その OX40L の早期誘導法として PBMC を DNA 合成阻害下で anti-CD3 抗体で刺激する方法を編みだした。

A. 研究目的

エイズの病因は HIV がヒトの体内で過度に増殖することである。その増殖を抑制できるならエイズ発症は阻止できる。本研究の目的は、エイズ制御というテーマにおいて、樹状細胞を用いて過度の HIV 増殖をヒトに備わっている本来の免疫能を調節することで抑制する方法論を確立することであり、様々な角度からアプローチを続けている。

本研究を進めるにあたり、考慮すべきことは、HIV の増殖が宿主の T 細胞免疫機構の活性化、特に炎症性反応に依存するということである。つまり、感染初期において HIV は外来ウイルスとして免疫を惹起させ、CD4 陽性の T 細胞やマクロファージの活性化に乗じて感染を広げ、かつ感染細胞を死滅させる。したがって、この時期には、自己の細胞であろうとも HIV が感染した CD4 細胞を破壊することができる強力な免疫応答、つまり CD8+CTL による破壊的免疫応答が生体防御に重要と考えられる。一方、感染中期～後期に入ると、HIV が HIV 非感染 CD4 細胞の過度な活性化を引き起こすために、HIV が感染していない CD4 細胞のアポトーシスが誘導され、それが CD4 細胞の枯渇、ひいてはエイズの一因となると考えられている。HIV 感染の動物モデルとしてアフリカのサ

ルエイズがある。ある種のサルでは、サルエイズウイルス (SIV) が共存する例、つまり不顕性感染が知られる。このようなサルではウイルスに対する免疫応答はあるものの、非常に弱く、ウイルス血症 (バイレミア) が起きても免疫応答は抑制されている。この事実は、HIV の感染進展において強い免疫応答がむしろ HIV 感染病態を悪化させる原因になりうることを示唆している。

そこで、HIV 感染とエイズ発症を抑制する目的達成において、ワクチンや免疫療法の可能性を探る場合、“どのような質と強さ”の免疫を適用すべきかどうかは感染ステージで適時考慮すべきであると考えられる。これまでの研究で、強いヘルパー T 細胞免疫応答を誘導する樹状細胞の誘導についてはある程度確立できた。

昨年度は、免疫抑制性 CD4+T 細胞(Treg)の誘導を可能とする樹状細胞の研究を報告した。本年度の研究では、樹状細胞研究を進める中で、CD8+T 細胞を優位に活性化する樹状細胞を見出し、かつその樹状細胞が発現する OX40 に注目し、OX40-OX40L の HIV-1 感染に及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

樹状細胞(DC)の培養は、ヒト末梢血単核球

(PBMC)から CD14+単球を negative selection kit (Dyna)で精製し、IFN-beta と IL-4 存在下で 3 日間培養した。培養 1 日目に LPS や不活化 HIV-1 を添加することにより成熟マーカーを有する DC が誘導された(4B-DC)。対照の DC にはコンベンショナルな方法つまり GM-CSF と IL-4 中で 6 日間分化培養し、IFN-beta で成熟させた(G4-DC)を用いた。表現系は特異的単クローン抗体を用いたフローサイトメトリー (FCM)で解析した。DC の機能は、IL-12 産生性、アロ naïve CD4+T あるいはアロ bulk CD8+T 細胞の増殖誘導およびサイトカイン産生性で検討した。アロ naïve CD4+T、CD8+T 細胞は、negative あるいは positive selection kit (MACS) で精製した。

OX40/OX40L 発現細胞は、ACH-2 および SV-T2 細胞に遺伝子を導入した細胞株を用いた。PBMC での OX40/OX40L の発現は特異的単クローン抗体をもちいた FCM で解析した。また可溶性蛋白は市販のものを使用した。ウイルス産生は、p24 ELISA キットを用いた。

なお、供血者には十分な説明をして了解を得た上で協力をいただいた。

C. 研究結果

昨年度の研究によりヒト単球を IFN-beta と IL-4 存在下で刺激培養し得られた DC は、アロ naïve CD4+T 細胞から Th1 と同時に IL-10 産生 CD4+Treg を誘導する DC であることを報告した。今回、新たな試みとしてこの 4B-DC とコンベンショナル DC (G4-DC)の CD8+T 細胞への刺激活性を比較検討した。精製したアロ CD8+T 細胞と混合培養すると、4B-DC は G4-DC と比較して著明に CD8+T 細胞の増殖を誘導することが分かった。そのメカニズムは明らかではないが、DC の表現系を FCM で解析したデータによると 4B-DC が CD80, CD86, HLA-class I と class-II を強く発現する他に、興味深いことであるが、活性化 T 細胞マーカーである OX40 とそのリガンド OX40L を発現する細胞群も共存することが分かった。G4-DC ではその発現は陰性であった。一方、anti-CD3 抗体を使って刺激した精製 CD8+T 細胞集団の 3~4 割は、OX40L を発現することから、4B-DC によるアロ CD8+T 細胞の著明な増殖誘導には、

OX40-OX40L の刺激が関与することが示唆された。

これまでの OX40-OX40L 反応に関する研究で、活性化 PBMC に R5-HIV-1 を感染させ OX40L を発現する細胞と混合培養すると HIV-1 の増殖が著しく抑制できることを把握している。T 細胞がある条件で長期活性化されると大量の OX40L を発現することを報告したが、本年度の研究において MMC 処理あるいは X 線照射した PBMC を anti-CD3 抗体で活性化するとリンパ球が培養一日目にして大量の OX40L を発現することを新たに発見した (論文作成中)。この処理 PBMC を R5 HIV-1 感染 PBMC に加え混合培養すると R5 HIV-1 の産生が有意に阻害された。一方、OX40L の可溶性の標品が市販されているが、アゴニスト活性を持つ濃度 (ACH-2/OX40 を活性化する方法で測定すると 1 ug/ml) においても PBMC での R5 HIV-1 の感染増殖阻止には至らなかった。

今後の OX40/OX40L の CD8+T 細胞誘導および HIV 感染に与える影響の研究に役立てるために、新規アゴニスト抗体を作製した。OX40L に対するアゴニスト抗体は活性化 PBMC に作用して、CD8+T 細胞の%陽性率を高め、CCR5 の down-modulation を引き起した。また、R5 HIV-1 の感染に弱い抵抗性を賦与した。一方、OX40のアゴニスト抗体は同様な条件において CD4/CD8 比の変化や CCR5 発現に変化を与えなかったが、R5 HIV-1 の感染増殖を 50%程度抑制した。

D. 考察

本年度の研究は、新たな研究展開への様々な糸口を提供した。すなわち、CD8+T 細胞を誘導する DC の分化培養法、および OX40/OX40L の免疫応答と HIV-1 感染における新たな機能の発見により、新たな角度からの HIV 抑制の研究の可能性が見えてきた。

至急明らかにすべき項目は、(1) 4B-DC を用いることにより自己の HIV-1 特異的 CTL を誘導できるのかどうか、(2) その誘導には、OX40-OX40L が関与するのかどうか、また(3) アゴニスト抗体で CD8+ CTL の誘導が促進されるのかどうかである。平行して、試験管内で DNA 合成阻害下で刺激培養された PBMC が

R5 HIV-1 抑制をすることから、この自己由来の OX40L 陽性 PBMC が可溶性 OX40L にかわり R5 HIV-1 の生体内での感染増殖を抑制できるのかどうかについてもヒト化マウスを使って早急に明らかにしてゆきたい。

また、基礎研究として上記現象のそれぞれのメカニズムについて免疫学的に明らかにする必要がある。

E. 結論

本年度の研究により CD8+T 細胞を有意に活性化する DC の分化培養法の一つが示された。OX40/OX40L の相互反応を R5 HIV-1 の感染増殖抑制に応用するには細胞結合型の OX40L が必須であること、その OX40L の早期誘導として PBMC を DNA 合成障害下で anti-CD3 抗体で刺激する方法を編みだした。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Zhang LF, Okuma K, Tanaka R, Kodama A, Kondo K, Ansari AA, and Tanaka Y. Generation of mature dendritic cells with unique phenotype and function by in vitro short-term culture of human monocytes in the presence of interleukin-4 and interferon-beta. *Experimental Biology and Medicine*, in press.
- 2) Takahashi Y, Tanaka R, Yamamoto N, and Tanaka Y. Enhancement of OX40-induced apoptosis by TNF co-activation in OX40-expressing T cell lines in vitro leading to decreased targets for HIV-1 production. *AIDS Res Hum Retroviruses*, in press.
- 3) Koyanagi Y, Tanaka Y, Ito M, and Yamamoto N. Humanized mice for human retrovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol*, in press.
- 4) Yoshida T, Kawano Y, Sato K, Ando Y, Aoki J, Miura Y, Komano J, Tanaka Y, and Koyanagi Y. A CD63 mutant inhibits T-cell tropic HIV-1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane. *Traffic*, in press.

- 5) Sato K, Aoki J, Misawa N, Daikoku E, Sano K, Tanaka Y, and Koyanagi Y. Modulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity through incorporation of tetraspanin proteins. *J Virol* 82(2): 1021-33, 2008.
- 6) Okuma K, Tanaka R, Ogura T, Ito M, Kumakura S, Yanaka M, Nishizawa M, Sugiura W, Yamamoto N, and Tanaka Y. The IL-4-transgenic hu-PBL-SCID mice: a model for screening of anti-viral drugs and immunotherapeutic agents against X4 HIV-1 viruses. *J Infect Dis* 197(1):134-41, 2008.
- 7) Harada S, Monde K, Tanaka Y, Kimura T, Maeda Y and Yusa K. Neutralizing antibodies decrease the envelope fluidity of HIV-1. *Virology* 370(1):142-50, 2008.
- 8) Monde K, Maeda Y, Tanaka Y, Harada S, and Yusa K. Gp120 V3-dependent impairment of R5 HIV-1 infectivity due to virion incorporated CCR5. *J Biol Chem* 282(51): 36923-32, 2007.
- 9) Kubo Y, Yokoyama M, Yoshii H, Mitani C, Tominaga C, Tanaka Y, Sato H, and Yamamoto N. Inhibitory role of CXCR4 glycan in CD4-independent X4-tropic human immunodeficiency virus type 1 infection and its abrogation in CD4-dependent infection. *J Gen Virol*. 88:3139-44, 2007.
- 10) Kondo K, Okuma K, Tanaka R, Zhang LF, Kodama A, Takahashi Y, Yamamoto N, Ansari AA, and Tanaka Y. Requirements for the functional expression of OX40 ligand on human activated CD4+ and CD8+ T cells. *Hum Immunol* 68(7): 563-71. 2007.

2. 学会発表

- 1) 篠田康彦, 田中勇悦, 鈴木陽一, 三浦義治, 小柳義夫: インターフェロンオメガ1による HIV-1 感染抑制. 日本ウイルス学会第 55 回学術集会プログラム・抄録集, 2007.10. 21-23 : 札幌.256.
- 2) 高橋良明, 田中礼子, 田中勇悦 : CD4 陽性 T 細胞株での OX40(CD134)分子の新たな機能: OX40/OX40L 系により誘導される

アポトーシスのメカニズム. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会記録, 2007. 11. 20-22 : 東京.179.

- 3) KONDO Kayo, TANAKA Reiko, TANAKA Yuetsu : Activation of primary human T cells in DNA synthesis-arrested states rapidly induces significant amounts of functional OX40 ligands. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会記録, 2007. 11. 20-22 : 東京.179.
- 4) 張麗峰, 児玉晃, 近藤佳代, 田中礼子, 大隈和, 田中勇悦 : OX40L 抗体によるヒト制御性 T 細胞(Treg)の誘導促進. 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2007. 11. 28-30 : 広島.415.
- 5) 田中勇悦, 田中礼子, 児玉晃, 張麗峰, 近藤佳代, 大隈和 : 細胞結合 OX40 リガンドによる活性化 CD4+T 細胞における R5 HIV-1 の抑制. 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2007. 11. 28-30 : 広島.416.
- 6) 大隈和, 田中礼子, 田中勇悦 : ヒト IL-4 産生免疫不全マウスを用いた多剤耐性 HIV-1 臨床分離株に対する薬剤評価系の確立. 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2007. 11. 28-30 : 広島.457.
- 7) 児玉晃, 近藤佳代, 張麗峰, 田中礼子, 大隈和, 田中勇悦 : エイズ樹状細胞免疫療法にむけて:未精製末梢血単核球群からの樹状細胞分化誘導. 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2007. 11. 28-30 : 広島.525.

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

4. HIV 感染抵抗者で働く宿主遺伝子の同定と HIV 感染防御免疫の増強法

分担研究者 宮澤 正顯 近畿大学医学部免疫学教室 教授

研究協力者 金成 安慶 (近畿大学医学部助教)

武田 英里 (近畿大学大学院医学研究科

ハイテクリサーチセンター研究支援者)

研究要旨 HIV 曝露に対し自然に免疫学的抵抗性を示す個体群の遺伝要因を明らかにすることは、有効な HIV 感染防御法開発の早道である。我々は、イタリアコホートの HIV-1 曝露非感染者とその感染パートナーを遺伝的に比較し、第 22 染色体の狭い領域で非感染者に集積する複数の SNPs アリルを見出した。この染色体領域に存在する感染抵抗性遺伝子の実体を解明するため、DNA マイクロアレイを用いた網羅的な発現解析とゲノム塩基配列の比較を行い、昨年度までに上記第 22 染色体領域の一つの遺伝子座に、曝露非感染者に有意な集積を示すハプロタイプ多型を見出した。今年度はこのハプロタイプ多型の機能性を解析し、曝露非感染者に集積するハプロタイプがこの遺伝子の発現を強く誘導すること、曝露非感染者型のハプロタイプを持つ末梢血単核球では、HIV 抗原刺激および試験管内での HIV 感染後にこの遺伝子の発現が高まること、この遺伝子のハプロタイプ多型は CCR5 指向性 HIV-1 の複製に影響を与えることを明らかにした。一方、マウスでレトロウイルス感染後の中和抗体産生を制御する宿主遺伝子 *Rfv3* を同定する過程で、レトロウイルス複製制御に関与するシチジンデアミナーゼ APOBEC3 がその候補として浮上した。これまで、APOBEC3 はそれが由来する種に自然に存在するレトロウイルスの感染に対して抵抗性を賦与しないと考えられてきたが、我々はマウス APOBEC3 がマウスレトロウイルスの感染抵抗性因子であることを証明した。HIV 曝露非感染者の末梢血単核球では、感染者に比較して APOBEC3 遺伝子、及びタンパク質産物の発現が上昇していた。

A. 研究目的

有効な HIV 感染防御法を開発するには、自然に感染抵抗性を示す個体群の遺伝要因を明らかにするのが早道である。HIV-1 感染の成立に対し抵抗性を付与すると考えられる宿主遺伝子として、これまでに HIV の細胞側受容体であるケモカインレセプターおよびそのリガンドの遺伝的多型や、マクロファージ・抗原提示細胞系の機能に関与するマンノース結合レクチン、DC-SIGN などの遺伝子多型が報告されてきた。しかし、ケモカインレセプター発現欠損の頻度は低く、イタリア・タイ・アフリカ

で把握されてきた HIV-1 曝露非感染者 (HIV-1-exposed seronegative individuals: ESNs) の多くは、CCR5 発現欠損では説明できない。我々はマウスレトロウイルス感染時の中和抗体産生を制御する宿主遺伝子 *Rfv3* を第 15 染色体上にマップし、そのオーソログが存在すると考えられるヒト第 22 染色体上に、ESN の原因遺伝子の存在を追求してきた。その結果、昨年度までに第 22 染色体特定領域に ESN 個体に集積するマーカー遺伝子及び SNPs アリルを見出し、末梢血単核球を HIV 抗原で刺激後に ESN 個体で発現が上昇する少数の遺伝子も

見出してきた。これらの結果に基づいて絞り込んだ第22染色体の候補領域についてゲノム塩基配列を決定した結果、造血系細胞で発現することが知られている特定遺伝子のイントロン領域に、ESN 個体に有意に集積するハプロタイプ多型を見出した。

そこで本年度は、見出したハプロタイプ多型の機能性を解析するとともに、マウスで解析してきた第15染色体の抵抗性遺伝子候補について、それがマウスレトロウイルス感染に及ぼす影響を検定し、同時にそのヒトオースログ多型が HIV 感染に与える影響も検討した。

B. 研究方法

1) マウスレトロウイルス感染抵抗性遺伝子 *Rfv3* の候補としてのマウス *APOBEC3* 遺伝子の機能解析

マウスレトロウイルス中和抗体産生制御遺伝子 *Rfv3* マッピング領域の中央には、レトロウイルス複製時にゲノム RNA 逆転写産物に塩基置換を誘導することによりウイルス複製阻害を引き起こすシチジンデアミナーゼ *APOBEC3* の構造遺伝子が存在する。一方、Bリンパ球の分化・成熟に直接関与する TNF 受容体型のサイトカイン受容体 BAFF receptor (BAFF-R) の遺伝子は、中和抗体産生能を欠く A/WySn マウスで変異があることが知られているが、その遺伝子座は退交配マウスを用いてマッピングした *Rfv3* 存在領域の外にあり、既知の BAFF-R 遺伝子多型とマウスレトロウイルス感染後の中和抗体価には不一致が見られた (Miyazawa, M., S. Tsuji-Kawahara, Y. Kanari. *Vaccine*: doi:10.1016/j.vaccine.2008.01.004, 2008)。

これまでヒトやマウスの *APOBEC3* は、それが由来する種に自然に存在するレトロウイルスの感染に対して抵抗性を賦与しないと考えられてきた。実際、マウスの *APOBEC3* は HIV に対して複製抑制活性を示すが、Moloney 白血病ウイルスの複製は阻害せず、逆にヒトの *APOBEC3G* はマウスレトロウイルスの複製を阻害するが、*vif* を欠損していない HIV の複製は阻害しないとされていた。しかし、これらの実験は何れも、指標となる遺伝子を発現するレトロウイルスベクターと *APOBEC3* 遺伝子をパッケージ細胞に導入し、標的細胞での遺伝子

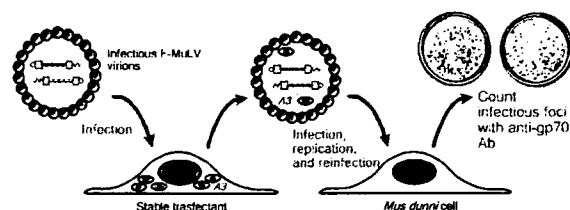


図1. マウス *APOBEC3* 持続発現細胞を用いたマウスレトロウイルス複製抑制実験

発現を検定したもので、厳密な意味でのウイルス複製能を比較したものではない。

そこで、マウス *APOBEC3* がマウスレトロウイルスに対して複製阻害活性を示すか否かを、通常の *in vitro* 感染実験系で検定するため、BALB-3T3 細胞を基盤に *APOBEC3* 遺伝子を恒常的に発現する遺伝子導入細胞株を樹立し、これにフレンド白血病ウイルス分子クローン FB-29 を感染させて、その上清中のウイルスの複製能を *Mus dunni* 細胞での focus assay で定量した (図1)。フレンドウイルス *env* 遺伝子産物特異的なモノクローナル抗体による感染フォーカスの定量法は、既に記載済みである (Robertson, M. N., M. Miyazawa, et al. *J. Virol. Methods* 34:255-271, 1991.)

2) HIV-1 感染抵抗性遺伝子候補領域の網羅的な塩基配列比較とハプロタイプ解析

曝露非感染者で末梢血単核球の HIV 抗原刺激後に発現上昇が認められた遺伝子、及び SNPs 解析において曝露非感染者群と HIV 感染者群の間にアレル頻度の有意な差が認められた遺伝子座の周辺について、ゲノム DNA 断片を高忠実度の long PCR により増幅し、各増幅断片内に塩基配列決定用のプライマーを設定して direct sequencing を行った。得られたゲノム塩基配列多型のアレル頻度を群間で比較するとともに、多型性遺伝子座間の連鎖不平衡の程度を解析するために、ダイナコム社の SNP 疾患関連解析ソフト SNPalyze ver. 5.1 を用いた。既知の SNPs 遺伝子型、及びゲノム塩基配列の決定により新たに見出した多型座位の遺伝子型頻度については、SNPalyze の case-control 解析機能を用いて、 χ^2 検定と Akaike's information criterion (AIC) による有意差検定を行うとともに、Odds ratio とその 95%

信頼区間を算出した。また、多型遺伝子座間の連鎖不平衡の程度は Likelihood ratio test により D 値、D' 値、及び r^2 値を算出し、SNPAlyze の画像表示機能により濃淡差の点描とした。

3) 塩基配列多型の機能解析

ゲノム塩基配列解析の結果、一つの遺伝子の下流域イントロンにおいて ESN 個体群への特定ハプロタイプ集積を見出した。そこで、この領域の塩基配列多型が遺伝子発現に与える影響を明らかにするため、ルシフェラーゼ遺伝子発現ベクターを用いた発現調節機能の検定を行った。即ち、プラスミドベクター上でルシフェラーゼ遺伝子の upstream に上記ハプロタイプ多型の見られる遺伝子のプロモーター領域を組み込み、下流に多型のある調節候補領域を組換えて、Amara 法によりヒト細胞株に移入した。細胞を刺激後のルシフェラーゼ発現を、蛍光法により定量した。

また、ESN 個体及び HIV 感染パートナーの末梢血単核球より、それらを HIV *gag* 及び *env* 遺伝子産物上のエピトープペプチドで刺激前後の総 RNA を抽出し、cDNA を合成後配列特異的プライマー・プローブセットを用いて real-time PCR 法により遺伝子発現を解析した。

4) 末梢血単核球への HIV-1 感染実験

ゲノム解析により HIV-1 曝露非感染者への有意な集積が明らかになった、第 22 染色体特定遺伝子領域の塩基配列多型ハプロタイプについて、同一地区未感染健常者の遺伝子型決定を行った。その結果、曝露非感染者と同一のハプロタイプを保有する健常者が見つかったので、これら「抵抗性に関連すると期待されるハプロタイプ」を持つ、或いはそれを欠く健常人の末梢血単核球に、*in vitro* で CCR5 指向性、または CXCR4 指向性 HIV-1 分子クローンを感染させた。その後、経時的に培養上清を採取し、上清中の HIV-1 p24 を ELISA 法により定量した。

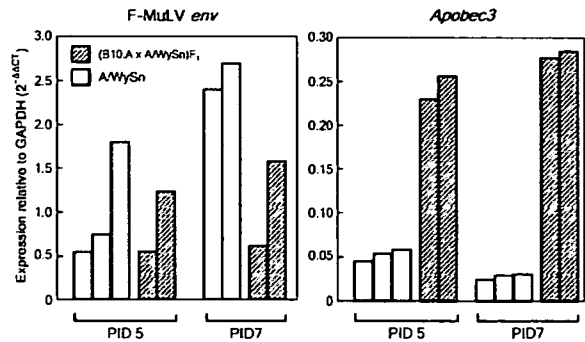


図 2. ウイルス中和抗体を産生する (B10.A × A/WySn)_{F1} (■) 及びこれを欠く A/WySn マウス (□) 脾臓における *APOBEC3* 発現量。左は対照としてのフレンド白血病ウイルス *env* 遺伝子発現量の比較。PID: 感染後の日数。

(倫理面への配慮)

イタリアの HIV 感染状態非一致カップルコホートについては、現地病院倫理委員会による許可を受け、書面による研究目的の説明と署名による同意を得た上で、ゲノム解析・発現解析のための末梢血採血を行った。連結不能匿名化試料を用いたヒトゲノム遺伝子解析の実施については、近畿大学医学部ゲノム倫理委員会より許可を得た (「HIV 曝露非感染状態を制御する宿主遺伝子の解析」、平成 15 年 5 月 27 日許可)。

C. 研究結果

1) マウス APOBEC3 によるマウスレトロウイルス複製抑制

フレンドマウス白血病ウイルスに抵抗性で、感染後 2 週間以内にウイルス中和抗体を産生する C57BL/6 (B6) または C57BL/10 (B10) マウスと、感染感受性が高く、ウイルス接種後 3 週間以上が過ぎても中和抗体を産生しない A/WySn マウスの間で、*APOBEC3* 遺伝子に多型があり、主に発現するアイソフォームが互いに異なることがわかっている (Takeda, E. *et al.*, *manuscript in preparation*)。また、同一 H2 ハプロタイプの組み合わせで、中和抗体を早期に産生する (B10.A × A/WySn)_{F1} マウスでは *APOBEC3* の発現量が高く、中和抗体産生を欠く A/WySn マウスではその発現が低い (図 2)。そこで、B6 マウス由来の *APOBEC3* cDNA を恒常的に発現する細胞株、A/WySn と全く同じ *APOBEC3* 遺伝子型を持つ BALB/c マウスで主に発現する *APOBEC3* アイソフォームの cDNA

を恒常的に発現する細胞株、及び陽性対照としてヒト *APOBEC3G* または *APOBEC3F* を恒常的に発現する細胞株を、BALB-3T3 細胞への遺伝子導入により樹立した。これらの細胞株にフレンド白血病ウイルス分子クローン FB-29 を一定の MOI で感染させたところ、APOBEC3 の発現の有無やその由来に関わらず、マウスレトロウイルスの感染は同等に成立し、それらの上清中にはほぼ同等の感染価でウイルス粒子が産生された。

上清から精製されたウイルスについて Western blot 法により APOBEC3 取り込みの有無を検討したところ、B6 マウスで発現するマウス APOBEC3 アイソフォーム、及びヒト APOBEC3G、3F は、産生されたフレンド白血病ウイルス粒子中に取り込まれていた。そこで、これらのウイルスを *Mus dunni* 細胞に感染させ、感染フォーカス数と染色体ゲノム中のプロウイルス数を定量した (図 1)。B6 マウスで発現するマウス APOBEC3 アイソフォームを発現する細胞から産生されたウイルスは、*Mus dunni* 細胞に対する感染価が対照の 1/20 以下に低下し、ヒト APOBEC3G 発現細胞由来のウイルスと同程度に複製能が低下していることがわかった。一方、BALB/c マウスで主に発現する APOBEC3 アイソフォームには、そのような効果は見られなかった (原著論文投稿前のため、図は省略)。

2) HIV 曝露非感染者における APOBEC3G の発現増加

HIV 曝露非感染者は、その末梢血単核球が HIV 抗原刺激に対して感染者のそれより強い IFN- γ 産生能を示し、血清中には HIV 反応性の IgG/IgM が検出されないにも関わらず、膣または尿道粘液中に HIV 反応性の IgA が検出される (Kanari, Y., et al. *AIDS* 19:1015-1024, 2005)。また、これら粘液 IgA 抗体については、少なくともその一部が HIV 中和能を持つことが示されている。

そこで、1) に述べたマウスにおけるレトロウイルス中和抗体産生能と *APOBEC3* 遺伝子多型と同様の関係が HIV 曝露非感染者でも見られるか否かを明らかにするため、ヒト APOBEC3G の発現量を mRNA レベルとタンパ

ク質レベルの両方について、曝露非感染者と HIV 感染者間で比較した。その結果、曝露非感染者の末梢血単核球を IFN- α で刺激した場合、感染者よりも有意に高い *APOBEC3G* の発現が見られること、末梢血中で主に *APOBEC3G* を発現する細胞は CD14 陽性の単球であり、単球における APOBEC3G タンパク質の発現も、曝露非感染者群で有意に高いことが明らかとなった (図 3)。

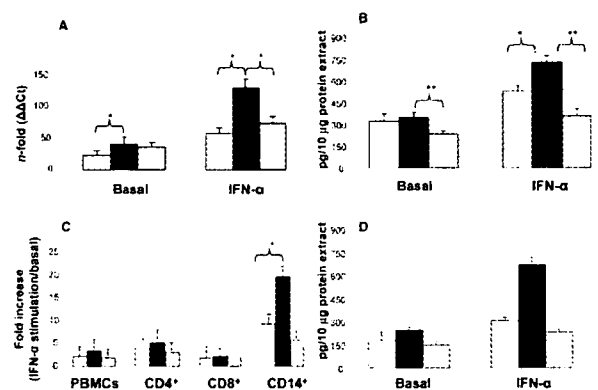


図3. ヒト末梢血単核球における IFN- α 刺激前後の APOBEC3G 発現 未感染健康人(白抜き)、曝露非感染者(黒)、HIV 感染者(灰色)の比較。*は統計的有意差を示す。A. 単核球における APOBEC3G mRNA 発現、B. 同じく APOBEC3G タンパク質発現量、C. 単核球各分画における APOBEC3G mRNA 発現、D. CD14 陽性単球における APOBEC3G タンパク質発現量

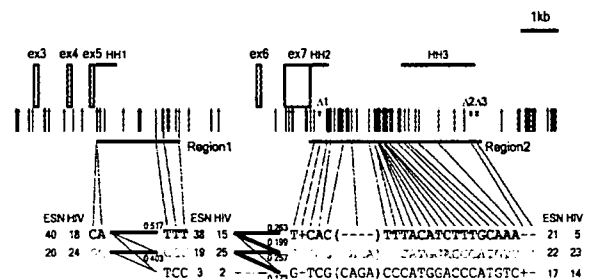


図4. *Gene1* イントロン多型 図の Region 1 と Region 2 内の SNPs は、それぞれ強く連鎖し、ハプロタイプを形成する。ESN 群には、Region 1 のハプロタイプ TTT が有意に集積する。

3) 感染抵抗性遺伝子 *Gene1* のイントロン多型 曝露非感染者と HIV 感染者の SNPs 遺伝子型解析の結果、曝露非感染者で特異的に発現上昇

の見た Genel (投稿論文改訂中につき、遺伝子名の直接記載は避ける)に隣接した別遺伝子のエクソン、及びその近傍の遺伝子間の SNPs に群間でアレル頻度の有意差が認められた。そこで Genel 周辺ゲノム領域の塩基配列決定を行い、群間での多型の有無とアレル頻度差を解析した。

その結果、Genel のセントロメア領域に位置するエクソン 5 とエクソン 6 の間の領域、及びエクソン 7 からその下流にかけての領域に、曝露非感染者群と HIV 感染者群でアレル頻度が有意に異なる多数の塩基配列多型の集積を見出した (図 4)。アレル頻度の異なる塩基配列多型の集積領域 Region 1 と Region 2 の内部では、それぞれ多型座位間で強い連鎖不平衡が認められたが、その程度は曝露非感染者群の方が HIV 感染者群に較べて強く、更に曝露非感染者群では多型集積領域 1 と 2 との間により強い連鎖不平衡が認められた。即ち、曝露非感染者群では多型集積領域 1 と 2 を通じるハプロタイプ形成があった。

曝露非感染者群に集積の見られるハプロタイプについて、領域 1 と 2 のそれぞれにつき HIV 感染者群と頻度比較を行ったところ、領域 1 で $P=0.0013$ 、領域 2 で $P=0.021$ と有意差があった。

なお、これらの領域に見出した新たな一塩基多型及び塩基欠失や挿入については、既にデータベースに登録済みである。

4) Genel インtron 多型の機能性

曝露非感染者に集積する Genel のインtron 多型ハプロタイプが、この遺伝子の機能と関係するかどうかを調べるため、先ずルシフェラーゼ発現ベクターに Genel インtron の Region 1 および Region 2 断片を挿入して Jurkat 細胞に導入、抗 CD3+抗 CD28 抗体で刺激前後の酵素活性を定量した。その結果、曝露非感染者に集積する Region 1 のハプロタイプ (これをハプロタイプ型 R とする)を挿入した場合、HIV 感染者に集積するハプロタイプ型 (S) を挿入した場合より有意に高いルシフェラーゼの発現が起こることが明らかとなった (図 5 : 右半)。遺伝子導入 Jurkat 細胞を T 細胞受容体から刺激した場合にも、R ハプロタイプの

Region 1 を挿入した系でより高いルシフェラーゼ発現が誘導された。

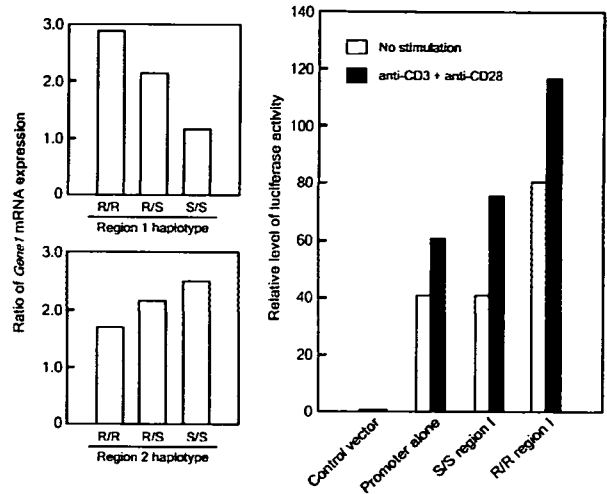


図5. Genel インtron 多型の機能性 左: 末梢血単核球刺激後の Genel 発現量の real-time PCR による比較。Region 1 と Region 2 のハプロタイプの効果を示す。右: R または S ハプロタイプの Region 1 を挿入したルシフェラーゼ発現ベクター導入による、Jurkat 細胞における酵素活性。白抜きは刺激前、黒塗りは刺激後のルシフェラーゼ活性を示す。

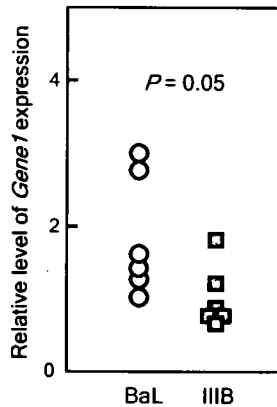


図6. In vitro で HIV-1 を感染させた細胞における Genel 発現 Real-time PCR による定量

一方、曝露非感染者または HIV 感染者の末梢血単核球を HIV 抗原で刺激した場合、Region 1 に R ハプロタイプを持つ細胞ではそうでない細胞に較べて Genel の発現が有意に高く、これを Region 2 の遺伝子型で

比較した場合には有意差はなかった (図 5 : 左半)。

我々は昨年度、Genel の Region 1 に曝露非感染者に集積する R ハプロタイプを持つ健康人と、こ

れを欠く健康人の末梢血単核球に CCR5 指向性または CXCR4 指向性の HIV-1 分子クローンを感染させ、経時的に培養上清中の p24 を定量した結果、R ハプロタイプを持つ未感染健康人の末梢血では、CCR5 指向性 HIV の複製がほとんど見られないこと、しかし CXCR4 指向性の HIV-1 株は複製が進行することを示した。そこで同じ実験系で R ハプロタイプを持つ細胞に

BaL または HIV-IIIB を感染させた場合の *Gene1* 発現を検討したところ、CCR5 指向性の HIV BaL を感染させた場合の方が、この遺伝子の発現は高い傾向が明らかであった (図 6)

D. 考察

1) 研究結果の考察

我々はこれまで、マウストロウイルス感染時にウイルス中和抗体の産生を制御する宿主遺伝子 *Rfv3* を第 15 染色体上にマップし、その分子同定を進めてきた。その過程で、レトロウイルス複製を制限するシチジンデアミナーゼ APOBEC3 に系統間の多型があり、その遺伝子発現量とアイソフォームの発現パターンが、中和抗体産生性の B6 系マウスとこれを欠く A/WySn マウスとで異なることを見出した (図 2)。*Rfv3* の分子実体については、B リンパ球の分化と活性化を制御することが知られている *BAFF-R* の遺伝子が、その有力な候補と考えられた。しかし、A/WySn 系統に認められる既知の *BAFF-R* 変異と退交配マウスにおける中和抗体産生能とは必ずしも一致せず、*BAFF-R* 遺伝子座は *Rfv3* 候補領域の外に位置していた (Miyazawa, M., S. Tsuji-Kawahara, Y. Kanari. *Vaccine*: doi:10.1016/j.vaccine.2008.01.004, 2008)。一方、*Rfv3* 候補領域の中央には *APOBEC3* 遺伝子座が存在し、その発現量の系統差が中和抗体産生能と相関することから、*APOBEC3* がマウスレトロウイルス感染抵抗性因子として作用する可能性が考えられた。そこで、*APOBEC3* 遺伝子を恒常的に発現する細胞から産生されたマウスレトロウイルスの、標的細胞における複製能を定量したところ、マウス *APOBEC3* のうち B6 マウスで選択的に発現しているアイソフォームが、マウスレトロウイルスに対し強い複製抑制活性を示すことが明らかとなった。

これまで、*APOBEC3G* タンパク質は、それらが由来する動物種に自然に存在するレトロウイルスに対しては複製抑制能を示さないと考えられてきた。実際、ヒトの *APOBEC3G* や 3F はマウスの Moloney 白血病ウイルスの複製は抑制するが *vif* を持つ HIV の複製は抑制出来ず、逆にマウスの *APOBEC3* は HIV の複製を抑制するがマウスレトロウイルスに対しては活性を欠くと言われてきた。最近、マウスの

APOBEC3 がマウス乳癌ウイルスの複製を抑制するとの報告がなされたが、マウス乳癌ウイルスは細胞質内で A 型粒子を形成する β -レトロウイルス群に含まれ、細胞膜出芽時に粒子が形成され、これが出芽後に成熟する C-型レトロウイルスやレンチウイルスとは、粒子への宿主細胞タンパク質取り込み能が全く異なると考えられる。今回我々の発見したマウス *APOBEC3* のマウスレトロウイルス複製抑制活性は、 γ -レトロウイルス群に対する世界で初めての報告である。

APOBEC3 による感染性粒子の複製阻害がどのようにして中和抗体産生能の違いに結びつくのかは、現時点で不明である。しかしながら、HIV 曝露非感染者群で HIV-1 感染者群に比較して *APOBEC3* の発現が高かったこと (図 3) は、マウスの系でもヒトでも、高い *APOBEC3* 活性がウイルス粒子複製を遅らせ、これが宿主に免疫応答を開始させる時間的余裕を与えるという可能性を示唆する。

我々がマウス *Rfv3* 遺伝子マッピング領域とのシンテニーから解析を続けてきた、ヒト第 22 染色体上の HIV 曝露非感染状態を規定する遺伝子は、少なくともその一つが *Gene1* の機能的なイントロン多型であることが明らかとなった。*Gene1* イントロンの特定のハプロタイプ (R と名付けた) が曝露非感染者に有意に集積しており (図 4)、曝露非感染者に集積する R ハプロタイプは遺伝子発現を強く誘導するエンハンサー活性を示す (図 5)。更に R ハプロタイプを持つ細胞では HIV 抗原刺激後の *Gene1* 発現が有意に高く (図 5)、R ハプロタイプを持つ細胞に CCR5 指向性 HIV を感染させた後、*Gene1* の発現が上昇する (図 6)。

昨年度報告した R ハプロタイプを持つ細胞における CCR5 指向性 HIV の複製抑制と併せ考えると、*Gene1* イントロンの R ハプロタイプが、曝露非感染者の持つ HIV 感染抵抗性遺伝子の実体の一つである可能性が極めて高い。

2) 達成度と学術的・国際的・社会的意義について

HIV 曝露非感染者が示す感染抵抗性の分子メカニズムを解明し、これにより効果的な感染防御免疫の誘導法を考えるという目標は、昨年

度から今年度にかけての研究により、*Gene1* の機能的イントロン多型同定によりその前半部分がほぼ達成されたと言える。今後この遺伝子の作用機序と、エンハンサーと考えられる機能的イントロン構造に結合する核内因子を解明して行くことが重要な研究課題になる。

これまで同種細胞に感染するレトロウイルスには効果がないとされていた APOBEC3 について、マウス APOBEC3 がマウスレトロウイルスの複製を強く抑制することを見出した意義は大きい。マウスレトロウイルスの複製を抑制する APOBEC3 アイソフォームと、その活性がないアイソフォームの構造比較により、HIV 複製抑制能を持ったヒト型 APOBEC3 を設計する可能性が拓かれる。

この研究は既に国際的にも注目され、今年度ヨーロッパでの国際学会に招聘を受けて発表した。また、この研究成果の診断薬・治療薬への応用については、既に3件の国際特許を出願済みであり、その一部については実施契約の交渉が進行中である。早ければ来年度にも、エイズ治療薬開発やエイズワクチン治験のコホート研究における遺伝的背景の解析に貢献すると期待される。

E. 結論

HIV 曝露非感染者の持つ第22染色体領域の遺伝的特徴を、*Gene1* イントロンにおける塩基配列多型の集積として同定した。この多型は機能性で、抵抗性のハプロタイプを持つ細胞では *Gene1* の発現が高く、CCR5 指向性 HIV-1 の初期複製が抑制される。また、これまで同種由来レトロウイルスには効果がないとされてきた APOBEC3 について、マウス APOBEC3 の特定アイソフォームはマウスレトロウイルスの複製を強く抑制出来ることを示した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyazawa, M., S. Tsuji-Kawahara, and Y. Kanari. Host genetic factors that control immune responses to retroviral infections.

Vaccine: doi:10.1016/j.vaccine.2008.01.004, 2008.

- 2) 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.* 195:960-964, 2007.
- 3) Tanaka-Takahashi, Y., M. Yasunami, T. Naruse, K. Hinohara, T. Matano, K. Mori, M. Miyazawa, M. Honda, Y. Yasutomi, Y. Nagai, and A. Kimura. 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* 28:918-924, 2007.

2. 学会発表

- 1) Miyazawa, M., Y. Kanari, M. Clerici, N. Wachukuchinda, and W. Auwanit. Host genes controlling immune responses to retroviral infections and genetic correlates of HIV-1-reposed but uninfected status. 1st International Symposium on Genetic and Immune Correlates of HIV Infection and Vaccine-Induced Immunity. June 10-13, 2007. Budapest, Hungary.
- 2) Miyazawa, M., E. Takeda, Y. Kanari, M. Sakamoto, and S. Tsuji-Kawahara. A cluster of retrovirus-restricting genes in mouse chromosome 15 and syntenic human chromosome 22 and their effects on Friend virus infection. 19th International Workshop on Retroviral Pathogenesis. September 25-28, 2007. Vienna, Austria.
- 3) 宮澤正顕. HIV-1 感染抵抗性を賦与する新規宿主遺伝子の解析とその作用機序. 第21回日本エイズ学会学術集会・総会. 2007年11月28日~30日, 広島; 日本エイズ学会誌 9:338, 2007.
- 4) 武田英里、河原佐智代、宮澤正顕. 生理的に発現するマウス APOBEC3 アイソフォームのフレンド白血病ウイルス複製抑

制活性. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 2007年10月21日～23日, 札幌

H. 知的所有権の出願・取得状況

Kanari, Y., M. Miyazawa, S. Irie, and M. Clerici, inventors. Method for diagnosis and induction of resistance to virus. International Patent Application PCT/JP2007/068591, filed September 12, 2007. (国際特許出願)

5. 生体分子を介する HIV-1 感染抵抗性

分担研究者 神奈木 真理 東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 教授

研究要旨 従来の HIV-1 あるいは SIV 特異的 T 細胞応答を目的としたワクチンでは、現在のところ感染防御は達成されていない。その一方で、HIV-1 感染高危険群のヒトの一部に遺伝素因に依らない HIV-1 感染抵抗性を持つ個体がある。このような感染抵抗性は一部の個体では一過性であることから自然免疫による可能性が高い。本研究は、HIV-1 感染防御の達成を目指し、自然免疫による HIV-1 防御機構を解明しこの誘導方法を開発することを目的とする。本年度は、NK 感受性 K562 細胞による刺激、ならびに自然免疫細胞の活性化に重要な役割を担う Toll-like receptor (TLR)の刺激による HIV-1 複製への影響について検討した。ヒト単球由来マクロファージ (MDM) に K562 細胞を前処理した場合には HIV-1 産生は抑制されたが、感染後に処理した場合は逆に増加した。既知の TLR リガンドのうち、TLR3 リガンドおよび TLR4 リガンドは、感染前に処理した場合にも感染後に処理した場合にも HIV-1 複製を抑制した。感染後の TLR2 および TLR5 刺激では抑制は認められなかった。自然免疫細胞における HIV-1 複製を効率良く調べるため、単球系 THP-1 細胞株を用いて HIV-1 NL43/Luc Δenv reporter plasmid を導入し恒常的に HIV-1 と Luciferase を発現する細胞株を樹立した。この細胞株を用いて、感染 MDM で認められた TLR3、4 刺激による HIV-1 抑制が再現できることを確認した。この実験系はマクロファージでの HIV-1 複製抑制物質のスクリーニングに応用可能である。

A. 研究目的

従来の HIV-1 あるいは SIV 特異的 T 細胞応答を目的としたワクチンでは、現在のところ感染防御は達成されていない。その一方で、HIV-1 その他の病原体に高頻度に曝されながら HIV-1 感染抵抗性のヒト集団が存在する。このような感染抵抗性は一部の個体では一過性であり、遺伝素因や獲得免疫に因るものとは考えにくい。本研究の目的は、HIV-1 感染防御の達成を目指し、これまでに知見の乏しい自然免疫による HIV-1 防御機構を解明し、この誘導方法を開発することである。本年度は、NK 感受性 K562 細胞による刺激、ならびに自然免疫細胞の活性化に重要な役割を担う Toll-like receptor (TLR)の刺激による HIV-1 複製への影響について検討した。

B. 研究方法

1) ヒト単球由来マクロファージ (MDM) の調整

非感染健常人末梢血から Ficoll-Hypaque 密度勾配遠心により分離した単核球分画中の付着細胞を 5%ヒト AB 血清入り培地で 7~10 日間培養し、付着細胞を monocyte derived macrophage (MDM) として用いた。

2) K562 細胞および TLR リガンド刺激

24 well plate 中に培養した MDM にホルマリン処理した K562 細胞を 10(6)/well 加え、感染前 4 時間共培養、あるいは感染中、感染後に共培養し、浮遊細胞を除き洗浄した後さらに培養した。TLR リガンドとして用いた物資は以下のとおりである。TLR2 リガンド: Lipoteichoic Acids (LTA) 10ug/ml (Invivogen), TLR3 リガンド: poly(I:C) 100ug/ml (Amersham), TLR4 リガンド: lypopolysaccharide (LPS) 0.1ug/ml (Sigma),

TLR5 リガンド: Flagellin 1ug/ml (Invivogen).

3) THP-1/NL43luc 細胞の樹立

ヒト単球系細胞株 THP-1 細胞に VSVG/pNL43luc pseudotype ウイルスを感染させ、2週間培養後、96 well plate 内でクローニングした。Luciferase 活性を有するクローンを 10%FCS, 100 U/mL ペニシリン, 100 µg/mL 硫酸ストレプトマイシンを含んだ RPMI-1640 で培養した。この細胞に PMA (5ng/ml) を加え 2 日間培養しマクロファージ様細胞に分化させ実験に用いた。

4) HIV-1 複製抑制の検定

HIV-1JR-CSF 株を感染させた MDM の HIV-1 複製は、K562 細胞あるいは TLR-リガンドを加え培養 4-7 日後上清中の HIV-1 p24 量を ELISA により調べた。THP-1/NL43luc の HIV-1 複製は、TLR-リガンドを加え培養後 48 時間の Luciferase 活性をルミノメーターで測定した。

C. 研究結果

1) MDM の HIV-1 産生に対する K562 細胞の影響

NK 感受性細胞 K562 をホルマリン処理し MDM と 4 時間共培養し、HIV-1 JR-CSF を感染させた場合は HIV-1 複製は有意に減少した。しかし、感染中あるいは感染後に共培養した場合は、共培養開始時間が遅れるほど抑制が消失し、感染後 4~8 時間後に K562 を作用させた場合は、HIV-1 複製は有意に増加した。

これらのことから、K562 細胞からマクロファージにはいる刺激には HIV-1 産生には正負両方の作用が有ることが分かった。

2) MDM の HIV-1 産生に対する TLR 刺激の影響

既知の TLR リガンドのうち、TLR3 リガンド (poly(I:C)) および TLR4 リガンド (LPS) は、感染前に処理した場合にも感染後 6 時間または 24 時間後に処理した場合にも HIV-1 複製を有意に抑制した。感染後の TLR2 (LTA) および TLR5 (Flagellin) 刺激では抑制は認められなかった。

3) THP-1/NL43luc 細胞における TLR 刺激の

影響

自然免疫細胞における HIV-1 複製を効率良く調べるため、単球系 THP-1 細胞株を用いて HIV-1 NL43/Luc Δ env reporter plasmid を導入し恒常的に HIV-1 発現する細胞株を樹立した。この細胞株を用いて HIV-1 感染 MDM で認められた TLR 刺激の影響を再現できることを確認した。この実験系はマクロファージでの HIV-1 複製抑制物質のスクリーニングに応用可能である。

D. 考察

NK 感受性の K562 細胞の表面抗原には MDM を刺激し活性化する分子が表出されていると考えられるが、HIV-1 産生への抑制は K562 を感染前に作用させた場合のみに認められ、感染後の処理では逆に増強した。MDM の HIV-1 複製に対する類似の両面性は TLR2 刺激の際にも認められた。

TLR 刺激はマクロファージから RANTES, MIP-1 α, MIP-1 β などの β-ケモカインの発現を誘導する。これらのケモカインは HIV-1 複製を侵入レベルで抑制することが知られている。従って、前処理でのみ抑制を示し後処理で増強を示すタイプの刺激では、ケモカインの影響と HIV-1 転写の増強がおこっている可能性がある。

これまでに、LPS 刺激による HIV-1 複製への影響については HIV-1 LTR を活性化するという報告がある一方、ウイルス複製を抑制するという報告もあり一定していない。今回我々の実験系では、LPS を前処理した場合も、pseudotype virus 感染後 24 時間の MDMs に処理した場合にも HIV-1 発現が減少した。さらに、マクロファージ様細胞に分化させた THP-1/NL4-3luc Δ env 細胞に LPS 刺激を加えた場合にも HIV-1 発現が減少した。このように、複数の実験系で共通の所見にが得られたことから、LPS による抑制が HIV-1 の転写レベルかそれ以降におこっていると結論した。

TLR3 刺激をいれる poly(I:C)についても類似の結果が得られ、TLR3, TLR4 刺激はともに HIV-1 転写抑制することが分った。HIV-1 初感染の標的細胞であるマクロファージに対して TLR3 あるいは TLR4 選択的な刺激をいれるこ

とは HIV-1 感染防御戦略の一つと考えられる。また、本研究で樹立された THP-1/NL4-3luc Δ env 細胞株は、このような活性物質のスクリーニングに有用である。

E. 結論

TLR3 あるいは TLR4 を刺激するとマクロファージにおける HIV-1 複製が抑制されるが、TLR2 と TLR5 刺激ではこの効果が認められない。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Washiyama M, Nishigaki K, Ahmed N, Kinpara S, Ishii Y, Kanzawa N, Masuda T, and Kannagi M. IL-2 withdrawal induces HTLV-1 expression through p38 activation in ATL cell lines. *FEBS Letters* 2007; 581: 5207-12.
- 2) Kubo, M., Nishitsuji, H., Kurihara, K., Hayashi, T., Masuda, T., and Kannagi, M. Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by arginine deiminase of *Mycoplasma arginini*. *J Gen Virol*, 87: 1589-1593, 2006.
- 3) Nishitsuji, H., Kohara, M., Kannagi, M., and Masuda, T. Effective suppression of human immunodeficiency virus type 1 through a combination of short- or long-hairpin RNAs targeting essential sequences for retroviral integration. *J Virol*, 80: 7658-7666, 2006.
- 4) Kanzawa, N., Nishigaki, K., Hayashi, T., Ishii, Y., Furukawa, S., Niino, A., Yasui, F., Kohara, M., Morita, K., Matsushima, K., Le, M. Q., Masuda, T., and Kannagi, M. Augmentation of chemokine production by severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a/X1 and 7a/X4 proteins through NF-kappaB activation. *FEBS Lett*, 2006; 580: 6807-6812.

2. 学会発表

- 1) 林隆也, 古川裕之, 西辻裕紀 1, 増田貴夫,

神奈木真理. マクロファージの HIV-1 感染に対する自然免疫応答の影響. 第 55 回日本ウイルス学会 2007 (札幌) .

- 2) 古川裕之, 林隆也, 西辻裕紀 1, 増田貴夫, 神奈木真理. マクロファージの TLR 刺激により HIV-1 転写制御. 第 55 回日本ウイルス学会 2007 (札幌)
- 3) 西辻裕紀, 小櫃冨未, 金平舞, 高津哲, 神奈木真理, 増田貴夫 HIV-1 インテグラーゼ結合宿主因子 Gemin 2 はインテグラーゼの安定性に関与する. 第 55 回日本ウイルス学会 2007 (札幌) .
- 4) 鷲山美樹, 西垣一男, 金原秀一, 神澤範行, 西辻裕紀, 増田貴夫, 神奈木真理. 成人 T 細胞白血病 (ATL) 細胞におけるストレスシグナルを介した HTLV-1 発現誘導の解析. 第 55 回日本ウイルス学会 2007 (札幌) .
- 5) 高塚奈津子, 清水由紀子, 高森絢子, 増田貴夫, 天笠光雄, 神奈木真理. HTLV-1 感染ラットから樹立された自己反応性 T 細胞の性状. 第 55 回日本ウイルス学会 2007 (札幌) .
- 6) 清水由紀子, 高森絢子, 宇都宮與, 山野嘉久, 栗原清, 岡村純, 増田貴夫, 神奈木真理. 無症候 HTLV-I キャリアーにおける T 細胞の低応答性. 第 55 回日本ウイルス学会 2007 (札幌) .
- 7) 西辻裕紀, 小櫃冨未, 金平舞, 高津哲, 神奈木真理, 増田貴夫 HIV-1 インテグラーゼ結合宿主因子 Gemin 2 はインテグラーゼの安定性に関与する. 第 21 回日本エイズ学会 2007 (広島) .
- 8) M. Kannagi, Y. Shimizu, A. Takamori, K. Kurihara, N. Harashima, A. Utunomiya. Insufficient HTLV-I-specific T-cell response as an ATL risk factor. (ATL 発症の免疫学的危険因子) 第 66 回日本癌学会、シンポジウム、2007 年 10 月、横浜

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

THP-1/NL43luc 細胞のHIV-1転写に対する
TLR ligands の影響

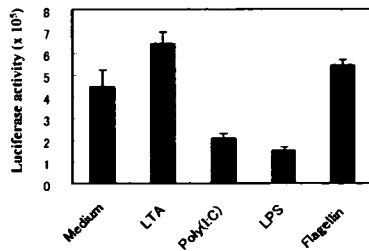


図1.MDM の HIV-1 発現に対する種々の TLR リガンドの影響.

健康人由来の単球由来マクロファージに pseudotype HIV-1 (NL-luc)を感染させ、6 時間後に TLR2 リガンド(LTA)、TLR3 リガンド(poly(I:C))、TLR4 リガンド(LPS)、または TLR5 リガンド(Flagellin)を添加し 48 時間後に Luciferase 活性を測定した。

MDMsにおける pseudotype HIV-1発現に対する
TLR ligands の影響

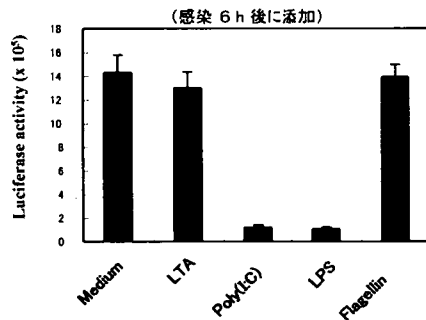


図2.TLR 刺激による HIV-1 抑制の THP-1/NL43luc 細胞における再現.

今回樹立した pNL43luc を恒常的に発現するヒト単球系細胞株 THP-1 細胞 (THP-1/NL43luc) をマクロファージ様に分化させた後、図 1 と同様の TLR 刺激を加え 24 時間後の Luciferase 活性を測定した。

6. CRF01_AE 株由来 Gag タンパクにおける細胞傷害性 T 細胞 (CTL) エピトープに関する研究

分担研究者 有吉 紅也 長崎大学熱帯医学研究所感染症予防治療分野 教授

研究協力者 Busarawan Sriwanthana (タイ国立衛生研究所研究員)

研究要旨 細胞傷害性 T 細胞 (CTL) による HIV ウイルス増殖抑制効果は、CTL が認識するエピトープ領域によって異なる。そこで、本分担研究は、CTL 誘導型予防および治療ワクチンの開発に有用な CTL エピトープ情報を得るために、宿主 CTL 免疫とウイルスの相関関係を分子レベルで解明することを目的とする。

昨年度は、北タイの双方が CRF01_AE 株に感染した 114 組の夫婦由来の Gag シーケンス解析から、特定の HLA アリールと有意な相関のあるアミノ酸変異を 52 箇所発見したが、本年度は、このデータの解析をさらに進め、系統樹解析にてウイルス学的に夫婦間伝播が確認できる 71 組を特定した。この内伝播の方向が疫学的に判明した 65 組の夫婦において、特定の HLA 関連アミノ酸変異を有するウイルスが異なる HLA 環境下へ伝播した際にどのように変化するかを解析したところ、1) ある HLA 圧の存在下で特異的な変異が入る変異率 (Mutation rate) と、その逆に HLA 圧の非存在下で変異が消失する復帰率 (Reversion rate) は逆相関する傾向にあること、2) 変異率が高く、かつ復帰率の低い変異は、北タイ HIV 感染者集団内で優勢 (dominant) なアミノ酸配列となること、3) B*57 または B*58 と相関する T242 部位の変異は、例外的に変異率と復帰率のどちらも高いことが判明した。さらに、これらの HLA 関連アミノ酸変異の有無と感染者の臨床経過との相関を解析したところ、T242 部位に変異を有する感染者の CD4 値は有意に高く、またウイルス量が有意に低いこと、さらには生存曲線から生命予後が良い傾向にあることが判明した。これらの情報は、CTL 誘導型ワクチンに組み込まれるべき抗原をデザインするのに役立つことが期待される。

今後さらに、北タイのエイズ進行遅延型 HIV 感染者コホートを拡大することにより、この集団の認識エピトープおよびエピトープ抗原提示効率の側面から、長期生存 HIV 感染者に特徴的な HLA 拘束性 CTL 免疫圧を解明することを計画している。

A. 研究目的

細胞傷害性 T リンパ細胞 (Cytotoxic T-Lymphocyte, CTL) は、宿主内の HIV 増殖抑制に重要な役割を担っており、また有効な予防的もしくは治療的ワクチンの開発に不可欠な免疫反応である。しかし、アジアに流行している CRF01_AE サブタイプに関する CTL エピトープ情報は限られている。本分担研究の最終目標は、タイにおける CTL 誘導型予防および治

療ワクチンの開発に有用な CTL エピトープ情報を提供することにある。

CTL 免疫反応による HIV 増殖抑制効果は宿主によって大きく異なることが知られている。これらは主に HIV ウイルス蛋白の多様性や宿主遺伝子 (特に HLA) の多様性によって決定されると考えられ、有効なワクチン開発には分子レベルでの CTL 情報が不可欠である。そこで、本分担研究の具体的な研究目的は、A)

CRF01_AE 株の特にワクチン抗原として最も重要視される Gag 領域の CTL エピトープマッピングを行うこと；B)コホートを活用して臨床経過とエピトープ認識情報を関連付けること、特にエイズ進行遅延型 HIV 感染者に特徴的な CTL エピトープ認識パターンを明らかにすること；C)HLA 情報が揃った感染者の gag シーケンス解析を行い CTL 免疫圧とウイルス進化および臨床経過との関係を明確にすること；D)同定された CTL エピトープの細胞表面上抗原提示効率の評価を加えることにある。

B. 研究方法

1) CTL エピトープマッピング

北タイ HIV 感染者 38 名の Gag アミノ酸配列情報を基にデザインされた 15-mer x 98 本の Gag オーバーラッピングペプチドを作成、このペプチドを認識して反応する γ IFN 産生リンパ細胞を Elispot 法にて定量測定する。対象は、北タイランパン病院 HIV 外来に通院する抗 HIV 薬未治療で CD4 値 200cells/ μ l 以上の HIV 感染者を対象にした。本研究活動は現在も進行中である。

2) エイズ進行遅延型 HIV 感染者の CTL エピトープ認識パターン

上記の高 CD4 値を維持している未治療 HIV 感染者をエイズ進行遅延型 HIV 感染者候補とし、同感染者の CTL エピトープ認識パターンを 6 ヶ月毎に前向きに追跡し上記オーバーラッピングペプチドを用いた Elispot 実験を実施し、これらの感染者の CTL 認識パターンを継続的に観察する。本研究活動は現在も進行中である。

3) CTL 免疫圧とウイルス進化および臨床経過との関係

昨年度、上記ランパン病院 HIV 外来にてリクルートされた双方が HIV に感染している夫婦 114 組由来の末梢血リンパ細胞より、プロウイルス DNA の gag 領域のダイレクトシーケンスを行い、特定の HLA アリールと χ 二乗検定で相関のある Gag アミノ酸変異を 52 箇所同定したが、本年度は、さらに解析を進め、Neighbor-Joining Method により系統樹解析を行

い、夫婦間の HIV 伝播が証明できる夫婦を特定した。さらに、疫学的情報より、これらの夫婦伝播の方向を決定し、異なる宿主 HLA 環境下への伝播後のウイルス進化の方向性について検討を加えた。

また、本年度は、昨年度同定された HLA と関連する Gag アミノ酸変異の臨床経過への影響を調べるため、これらアミノ酸変異の有無とコホート臨床情報（コホート参加時の CD4 値、ウイルス量および抗 HIV 薬非治療下での生存予後）との比較検討を行った。

4) CTL エピトープの細胞表面上抗原提示効率の評価

CTL エピトープの細胞表面上抗原提示効率の評価を行うために Gag を発現させる Env 欠損/pac 遺伝子保有 HIV ベクター[Yokomaku et al., J Virol., 2004]へ、北タイ HIV 感染者由来 Gag クローンを組み込み、VSVG 発現ベクターと共に COS 細胞へトランスフェクションすることにより、VSVG タンパクをウイルス粒子表面抗原とする偽 HIV ウイルス粒子を作製した。これを CTL の標的細胞となる EBV で不死化された B 細胞ラインへ感染させ、puromycin にて HIV ベクター感染 B 細胞のみを選択し、CRF01_AE Gag を安定して発現する標的細胞の作製を試みた。昨年度まで、この実験系を繰り返し行っても B 細胞への感染に成功しなかった。上記ベクターは、臨床株由来 Gag 遺伝子のクローニングプロセスを簡素化するため Gateway システムを導入していたが、このシステムが実験の障害となっている可能性を考え、本年度は Gateway システムの導入の際に挿入した AttBI および NotI サイトをベクターから削除し、再度 B 細胞への感染実験を実施した。

(倫理面への配慮)

本分担研究にて活用した北タイ HIV コホートは、2006 年 3 月に新たにタイ政府保健省医学研究倫理委員会にて承認され、承認内容の中に本分担研究の研究目的が含まれている。本研究に協力したすべてのコホート参加者から署名入り同意書が得られている。

C. 研究結果

1) CTL エピトープマッピング

本年度は、北タイランパン病院 HIV 外来に通院する CD4 値 200/ul 以上の未治療 HIV 感染患者の Elispot 実験を継続し、昨年度までの 76 名に加え、さらに 73 名の感染者をリクルートした結果、総計 149 名のオーバーラッピングペプチド認識パターンが評価され、これまで 500 回以上の実験結果を集積してきた。今後、これらの膨大なデータを解析するとともに、ペプチド認識を拘束している HLA の同定実験方法をこれまでの 51Cr 放出アッセイ実験から Intra-cellular cytokine staining (ICS) method へ変更し、拘束 HLA の同定実験の迅速・効率化を図る予定である。

2) エイズ進行遅延型 HIV 感染者の CTL エピトープ認識パターン

上記の 149 名の高 CD4 値を維持している抗 HIV 薬未治療感染者をエイズ進行遅延型 HIV 感染者候補とし、同感染者の CTL エピトープ認識パターンを 6 ヶ月毎前向きに追跡し上記オーバーラッピングペプチドを用いた Elispot 実験により、エイズ進行遅延型 HIV 感染者の CTL エピトープ認識パターンの特徴を明らかにすること試みてきた。しかし、上記エイズ進行遅延型 HIV 感染者候補の免疫不全・CD4 値低下はその後進行し、5 年以上抗 HIV 薬の投与なしに CD4 値が 200/ul 以上の感染者は 30 症例以下に減った。このことから、さらに多くのエイズ進行遅延型 HIV 感染者候補をリクルートするために、本年度は、ランパン病院以外の北タイのエイズ拠点病院 3 病院 (パヤオ県病院、チェンライ病院、チェンマイ県病院) とのネットワークを確立させた。このことにより、5 年以上抗 HIV 薬の投与なしに CD4 値が 200/ul 以上といった条件を満たす長期エイズ進行遅延型 HIV 感染者のリクルートを促進させ、同感染者群における CTL エピトープ認識パターンの解明研究を促進させることが可能になった。

3) CTL 免疫圧とウイルス進化との関係

昨年度は、北タイの双方が CRF01_AE 株に感染した 114 組の夫婦由来の Gag シーケンス解析から、特定の HLA アリールと有意な相関のあるアミノ酸変異を 52 箇所発見したが、本

年度は、このデータの解析をさらに進め、系統樹解析にてウイルス学的に夫婦間伝播が確認できる 71 組を特定した。この内伝播の方向が疫学的に判明した 65 組の夫婦において、特定の HLA 関連アミノ酸変異を有するウイルスが異なる HLA 環境下へ伝播した際に Gag タンパクがどのように変化するかを詳細に解析したところ以下のことが判明した。

- ① 夫婦間の HLA アリールの相違とアミノ酸変異数との間に有意な相関があり、その相関は、特に B 遺伝子座におけるアリールの差の方が A 遺伝子座におけるアリールの相違よりも、Gag アミノ酸変異数に対してより強い影響を与えていることが判明した。(図 1)
- ② 52 箇所の HLA と相関する Gag アミノ酸変異のうち、各々の HLA 環境が異なる充分数 (5 組以上) の夫婦が観察された 31 箇所の HLA 関連アミノ酸変異において、ある特定の HLA アリールの存在下・非存在下へ HIV が伝播した際、それぞれの HLA 関連アミノ酸変異がどのように変化するか、詳細な観察を行った。(表 1) その結果、ある HLA アリールが存在しない宿主環境から存在する宿主環境へ HIV が伝播した場合、特定のアミノ酸変異が入る頻度 (変異率、Mutation rate) や、その逆にある HLA が存在する宿主環境から存在しない宿主環境へ HIV が伝播した際に、特定のアミノ酸変異がもとの野生株アミノ酸配列へ戻る頻度 (復帰率、Reversion rate) は、Gag アミノ酸変異の部位によって大きくことなることが判明した。
- ③ ②の観察をもとに変異率と復帰率を、散布図を用いて比較検討したところ、変異率と復帰率は逆相関する傾向にあることが判明した。このうち、変異率が平均より高く、復帰率の平均より低い 6 つの変異は蓄積する傾向にあり、このうち HLA 圧によって生じる 4 つの変異は、既にこの宿主集団における優勢アミノ酸配列になっていた。一方で、変異率と復帰率のどちらも高い変異はむしろ例外的であり、長期生存と関連する B*57 または B*58 と相関する T242 部

位の変異がそれにあたることが判明した。
(図2)

- ④ さらに、これらの HLA 関連アミノ酸変異の有無と感染者の CD4 値およびセットポイントウイルス量との相関を解析したところ、CD4 値が低くウイルス量が高いという 4 箇所が発見された一方で、CD4 値が高くウイルス量が低い変異が 3 箇所見つかった。これら 3 箇所の HLA 相関 Gag アミノ酸変異は、それぞれ B*57, B*58 拘束性 p24 領域の "TSTLQEQIGW"、B*07 拘束性 p24 領域の "GPGHKARVL"、B*40 拘束性 p6 領域の "KELPLTSL" エピトープによる CTL 免疫圧に相当する箇所、有意に高い CD4 値および有意に低いウイルス量が図 3 に示してある。このうち、B*57/B*58 と相関する T242 変異については、ウイルス量が低い傾向にあったが、有意な差はなかった。しかし、さらに報告された T242 を補足する変異 H219, M228, G248 を除いた T242 の単独変異を有する感染者を調べたところ、他に比べ有意に低いウイルス量であることが判明した。T242 および p485 については、 Kaplan-Meier 生存曲線により、これらの変異を持たない感染者群と比較してより良い予後であることが判明した。(図4)

4) CTL エピトープの細胞表面上抗原提示効率の評価

昨年度までは、偽ウイルス粒子による B 細胞への感染実験に成功しなかったが、本年度は、AttB1 および NotI サイトを Gag 発現 HIV ベクターから削除し、再度 B 細胞への感染実験を実施したところ、効率よく B 細胞を感染させ Gag を発現できることが判明した。(図5) その結果、当初の目的であった多種類の CRF01_AE 臨床株を発現する CTL 標的細胞の作製が成功し、現在そのライブラリーを作製中である。

D. 考察

宿主 CTL 免疫とウイルスの相関関係を分子レベルで解明するためには、CTL エピトープ情報 (すなわち T-cell receptor) のみならず、

CTL 免疫圧を受ける HIV ウイルスタンパクのシーケンス情報、ウイルス抗原の細胞内プロセッシング情報 (すなわち CTL エピトープ抗原提示効率) ならびに宿主遺伝子多型 (HLA アリール) 情報、さらには宿主の臨床経過に関する情報といった、多方面からの包括的研究が必要となる。本分担研究は、北タイの CRF01_AE に感染した HIV 感染者の Gag タンパクに絞って包括的研究を実施しており、本年度は、1) 異なる HLA 環境下へウイルスが伝播した際のウイルス進化の方向性が細かく観察された、2) HLA 免疫圧による Gag タンパクアミノ酸変異と臨床経過 (CD4 値・ウイルス量・生存曲線) との相関が明らかになったという 2 つの大きな発見があった。

HLA 免疫圧の存在下から非存在下へウイルスが伝播した後も、その変異がもとへ戻らない変異は将来その集団内で優勢アミノ酸配列として蓄積してゆくことが容易に推測される一方で、直ぐにもとへ戻る復帰率の高い変異は、逆にウイルスにとっては可塑性が低く、即ちウイルスの機能に傷害を与える変異である可能性が高いことが推測された。そして、サブタイプ B や C にて、低ウイルス量と相関があると報告された B*57, B*58 CTL 免疫圧によって誘導される T242 変異が、北タイの CRF01_AE サブタイプに感染した感染者群においても、より良い臨床経過と相関があり、この変異は復帰率が高いことが判明した。これらのことを考え合わせると、復帰率の高い変異を誘導するような CTL エピトープが、治療的ワクチンの標的エピトープとして適切であると推測される。

HLA と Gag アミノ酸配列との統計解析から CTL エピトープを推測する方法は、統計的パワーが得られる比較的頻度の高い HLA によって拘束される CTL に限られる。しかし、図 1 で示されたとおり、実際はより多様性の高い HLA B 遺伝子座のように稀な HLA アリールによってウイルスの形は、より大きく影響していると推測されており、これら稀なアリールによって影響を受ける CTL 免疫圧をさらに詳しく調べるには、臨床的にエイズ進行遅延型として明確な表現系を有する感染者の CTL 認識パタ