

修飾変異株が生ワクチンとして優れた性質を持つことを報告した (*J Virol*, **75**, 4023, 2001)。本研究では、動物モデルを用いて糖鎖修飾変異生ワクチンのウイルス多様性に対する有効性とその機序の解明を研究の目的とする。

## B. 研究方法

### アカゲザル

ビルマ、ラオス原産の育成ザル、オス、Bウイルス、SRV, STLV, SIV に対する抗体が陰性、培養リンパ球における SIV 増殖性が確認されたサルを用いた。

### 糖鎖欠変異ウイルス

#### Δ5G

SIVmac239 の gp120 には 23 カ所の N 型結合糖鎖付加部位が存在する。その中で 5 カ所 (アミノ酸残基 79, 147, 179, 460, 479 番) の付加部位の Asn を Gln に置換し関連する糖鎖を欠失させた。

#### Δ5Gver1, Δ5Gver2

Δ5G の 179 の Gln を Asn に復帰変異させ、新たに 70 (Δ5G ver1) または 377 (Δ5G ver2) の付加部位の Asn を Gln に変異させた。

#### Δ3G

SIVmac239 の gp120 には 23 カ所の N 型結合糖鎖付加部位の中で 3 カ所 (147, 179, 460) の Asn を Gln に置換し関連する糖鎖を欠失させた。

### チャレンジウイルス

#### SIVmac239

SIVmac239 は西アフリカに生息するスーティマンガペイの自然感染している SIVsm が米国霊長類センターにおいてマカクザルに感染、伝播した推測される。SIVsm は HIV-1 と同様にウイルスの多様性が明らかとなっている。SIVmac239 は系統 8 に分類される (*J Virol*, **79**, 8991, 2005)。Proviral

DNA をトランスフェクションにより培養細胞 (SW480 または COS-1) で発現させウイルスを作成し、アカゲザル培養リンパ球で増殖し、感染実験用ウイルスストックを作成した。

#### SIVsmE543-3

系統 1 に分類される SIVsm, NIH, Vanessa Hirsch から供与された。アカゲザル培養リンパ球を用いて増殖し感染実験用ウイルスとした。

### 感染性ウイルス量の測定

TCID<sub>50</sub> はサル CD4 陽性 T 細胞 (CyfT/HVS) を用いて測定した。

### 血しょうウイルス RNA 量の測定

血しょう中のウイルス RNA は Roche Magnapure compact を用いて精製した。ウイルス RNA 量は SIVmac239 と SIVsmE543 の gag 遺伝子配列が異なる配列を用いて作成したプライマー: (forward primer, reverse primer TaqMan probe) と RT-PCR キット (Qiagen 社) を用いてリアルタイム PCR 法により測定した。

### ウイルス細胞指向性の解析

CD4+T 細胞でのウイルスの増殖性はアカゲザル末梢単核球を PHA-P で 2 日間刺激後、IL-2 存在下で増殖した細胞を用いた。マクロファージでのウイルスの増殖性はアカゲザル肺洗浄液から分離された肺マクロファージを用いて測定した。

### 中和抗体の測定

SIV の T 細胞での増殖を高感度に測定する方法として、SIV *tat* 遺伝子依存性に発現する分泌型アルカリフォスファターゼ遺伝子を持つ CD4+T 細胞 (SIV-LTR/CEMx174) を用いた。ウイルス (SIVmac239 または SIVsmE543) を感染ザル血しょう (56°C, 30 分間処理) と室温 30 分反応させ、

残存する感染性ウイルス量をSIV-LTR/CEMx174でのウイルス増殖により測定した。

#### 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、医薬基盤研究所、両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関連する動物実験申請について国立感染症研究所、医薬基盤研究所、両動物実験委員会による審査・承認を受けた。

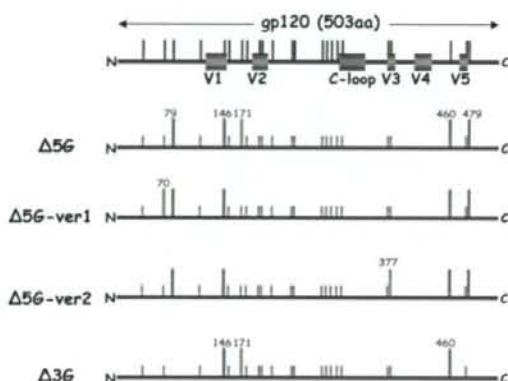
### C. 研究結果

#### 4種の糖鎖欠失変異SIVの性質

HIV-1は中和抗体誘導能が低いことから抗体による感染抑制は弱い。ウイルススパイクが糖鎖に覆われていることが原因のひとつである。糖鎖修飾はウイルスのウイルスレセプターとの親和性、細胞・組織指向性の性質にも影響を与える。野生株SIVmac239と糖鎖変異ウイルス $\Delta$ 5GはCD4+T細胞での増殖性は同等であるが、培養マクロファージでの増殖性に違いがある。5カ所の糖鎖付加部位(アミノ酸残基79, 147, 179, 460, 479)での糖鎖欠失は $\Delta$ 5Gにマクロファージ指向性を与えた。この性質はウイルスがCD4非依存的にCCR5を利用して感染する性質(CD4非依存性)と関連する。培養細胞(In vitroの性質)において、 $\Delta$ 5Gは中和抗体感受性、マクロファージ指向性、CD4非依存性を示すが、SIVmac239は反対の性質を示す。5カ所の糖鎖欠失変異について上記の性質への影響を調べた結果、これらの性質は3カ所(147, 179, 460)の変異に依存することが明らかとなった。そこで新たに3種の糖鎖修飾変異ウイルスを作成した(図1)。171の糖鎖欠失を元にもどし、新たに70番目の糖鎖欠失した $\Delta$ 5Gver1と377番目

の糖鎖欠失した $\Delta$ 5Gver2、3カ所(147, 179, 460)の変異のみを持つ $\Delta$ 3Gを作成した。 $\Delta$ 5Gver1と $\Delta$ 5Gver2は171の糖鎖の復帰によりマクロファージ指向性はSIVmac239のレベルに低下した。対照的に $\Delta$ 3Gは $\Delta$ 5Gよりも高いマクロファージ指向性を示した。新たな変異ウイルスは $\Delta$ 5Gに対する中和抗体に対する感受性も異なる。 $\Delta$ 3Gと $\Delta$ 5Gver2は $\Delta$ 5G中和抗体により中和されたが、 $\Delta$ 5Gver1は中和されなかった。

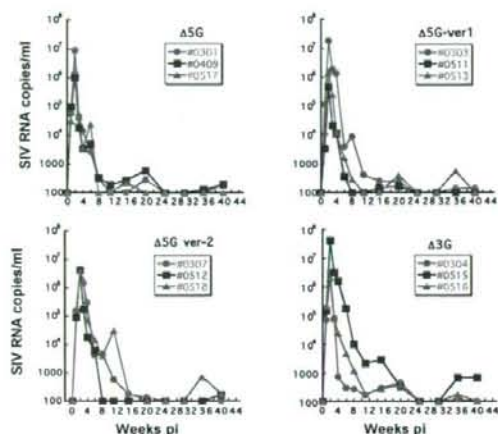
図1. 4種の糖鎖修飾変異ウイルス



アカゲザル3頭にそれぞれ4種類の糖鎖欠失変異ウイルスを感染させた。 $\Delta$ 5G感染ザルはこれまで得られた結果と同じように初期感染は感染後2週にピークとなりその後急速に低下し感染後25週以降は検出限界以下(100 c#/ml)となった(図2)。新たに作成した3種の変異ウイルスもほぼ同様の血中ウイルス量を示した。個体間に違いはあったが、感染25週以降血中ウイルス量は、ほぼ検出限界以下に維持された。4種の糖鎖修飾変異ウイルスはin vitroの性質は異なったが、感染宿主では同じように感染は制御された。糖鎖修飾変異

により低病原性を示すことが明らかとなった。

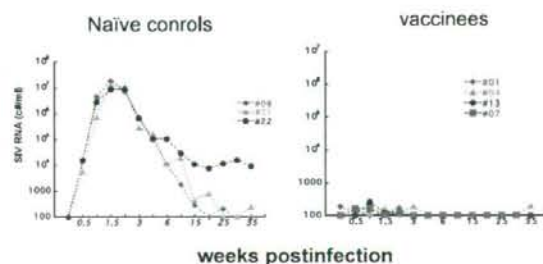
図2. 4種の糖鎖修飾変異SIVのアカゲザルでの感染



### SIVmac239 感染に対する感染防御効果

次に生ワクチンの性質を調べた。感染後40週に各群1頭にSIVmac239 (1000 TCID<sub>50</sub>) を静脈内接種した。ワクチン未接種群では、ピークウイルス量が10<sup>7</sup> c#/mlに達する初期感染を示した(図3)。4種の糖鎖変異ウイルスによる感染を受けた4頭ではチャレンジウイルス感染はほぼ検出限界(10<sup>2</sup> c#/ml)以下に抑制された。この結果から新たに作成した糖鎖変異ウイルスもΔ5Gと同様に生ワクチンとして働くことが明らかになった。

図3. SIVmac239 チャレンジ感染



### HIV 感染に対するワクチン効果を評価するための動物モデル

主要感染ウイルスである HIV-1 グループ M は9種類のサブタイプと種々のサブタイプ間の組み換え型に分類される。サブタイプ内においてもウイルスの多様性は顕著である。表1にアジアで流行しているサブタイプ A、B、C と組み換え型 CRF01AE、CRF02AG のサブタイプ内の多様性を示す。Gag, Pol では相違性が低く4-7%、Tat, Rev, Nef では15%以上に達する。さらに感染地域では複数の異なるタイプの HIV-1 が存在する。これらの異なるサブタイプ間の多様性は高くなる。Gag, Pol で8-10%、Tat, Rev, Nef, Vif では20-30%に達している(表2)。感染地域により感染ウイルスに対応するワクチンが求められるが、ウイルス多様性に対する感染防御効果が必要となる。そこでワクチンは多様性に対する効果が求められることから、我々はサブタイプが異なるチャレンジウイルスを用いた。SIVmac239 が由来する SIVsm は西アフリカに生息するスーティマンガベイに自然感染している。ウイルス遺伝子配列の解析から HIV-1 と同様の多様性が報告されている。ワクチンウイルスΔ5G は系統8に分離されることから系統1に分類される病原性の SIVsmE543-3 をチャレンジウイルスに用いた。SIVsmE543-3 とΔ5G、SIVmac239 の違いはアジアで感染している HIV-1 サブタイプ間の違いとほぼ同じである(表3)。

表1. HIV-1 サブタイプ内の多様性

表2. HIV-1 サブタイプ間の多様性

	Subtype A	Subtype B	Subtype C	CRF01_AE	CRF02_AG
	Mean ± SE	Mean ± SE	Mean ± SE	Mean ± SE	Mean ± SE
gag	6.9 0.8	5 0.6	6.8 0.7	4.3 0.6	5 0.7
pol	5.6 0.5	4.7 0.4	5.2 0.4	2.8 0.3	4.6 0.4
env	12.4 0.9	12.1 0.9	12.4 0.9	7.7 0.7	10.8 0.9
nef	13.1 2.9	14.1 2.9	16.2 3.2	10 2.4	9.8 2.3
tat	16 2.6	17.1 2.7	13.8 2.2	10.9 2.2	9.9 1.9
rev	13.5 2.2	16.5 2.8	13.7 2.3	9 1.9	10.6 2.5
vif	13.6 1.6	12.9 1.6	10.8 1.3	7 1.1	14.2 1.8
vpr	10 2.4	8.5 2	10.6 2.3	7.2 2	7.1 2
vpu	10.1 3.4	9.4 2.9	13.8 3.6	0 0	0 0

	B vs. C		B vs. CRF01_AE		C vs. CRF01_AE	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
gag	10.2	1.2	11	1.4	12.8	1.5
pol	7.8	0.7	8	0.8	7.5	0.7
env	19.2	1.4	18.8	1.4	18.7	1.4
nef	22.6	4.8	21.3	4.8	16.2	3.5
tat	28.8	4.7	31.9	4.9	27.4	4.3
rev	28.3	4.7	26.4	4.7	20.6	4.1
vif	20.5	2.6	21.6	2.9	21.3	2.8
vpr	13.1	3.2	13	3.4	15	3.5
vpu	17.7	5.6	13.8	5.4	12.7	3

表3. SIVsmE543-3 と SIVmac239 の違い

SIVsm543-3 vs SIVmac239	
gag	11.1
pol	7.9
env	18.2
nef	26.2
tat	35.9
rev	32.7
vif	17.8
vpr	14.9
vpu	8.1

#### SIVsmE543-3 感染に対する感染防御効果

ワクチン未接種アカゲザルに SIVsmE543 を感染させた。初期感染は SIVmac239 と同レベルのピークウイルス量 ( $10^7$  c#/ml) を示した (図4)。

慢性感染期では2頭はそれぞれ  $10^6$ ,  $10^5$  c#/ml のセットポイントを示し、感染後50週に発症した。

1頭はセットポイントが  $10^2$  c#/ml 以下であったが、その後上昇した。

ワクチン接種群には、まず6頭 ( $\Delta 5G$ ,  $\Delta 5Gver1$ ,  $\Delta 5Gver2$  の各ウイルス感染2頭ずつ) に、次に5頭 ( $\Delta 5G$ ,  $\Delta 5Gver1$ ,  $\Delta 3G$  感染後 SIVmac239 チャレンジ感染を制御した4頭中3頭と  $\Delta 3G$  感染の2頭) にチャレンジ感染を行った。図5に示されるように個体によりチャレンジウイルス感染抑制が異なった。初期感染のピーク値を見ると3頭

(#0512, #0513, #0517) は  $10^4 - 10^5$  c#/ml、3頭 (#0303, #0516, #0409) は  $10^2 - 10^3$  c#/ml を示した。2頭 (#0518, #0511) では遅れて感染が確認された。残り3頭 (#0515, #0301, #0304) では感染は検出されなかった。チャレンジ感染55週までのワクチン接種群11頭の平均値をワクチン未接種群3頭の平均値と比べた。図7に示されるようにワクチン接種群は未接種群と比べ初期感染、慢性感染期に  $\log_3$  以上の感染抑制効果が確認された。

図5. SIVsmE543-3 感染における血中ウイルス量

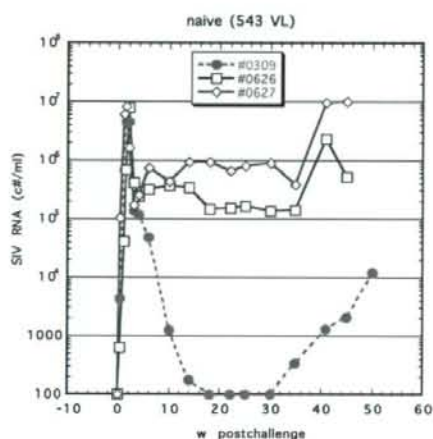


図6. 糖鎖変異ウイルス感染ザルに対する SIVsmE543-3 チャレンジ感染

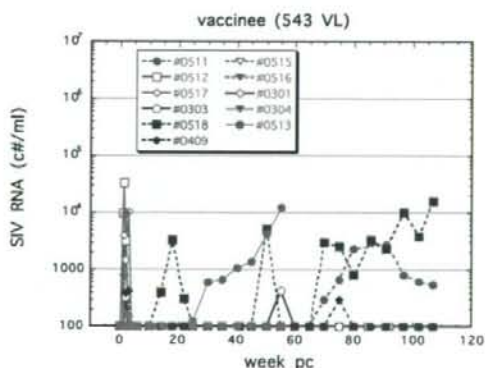
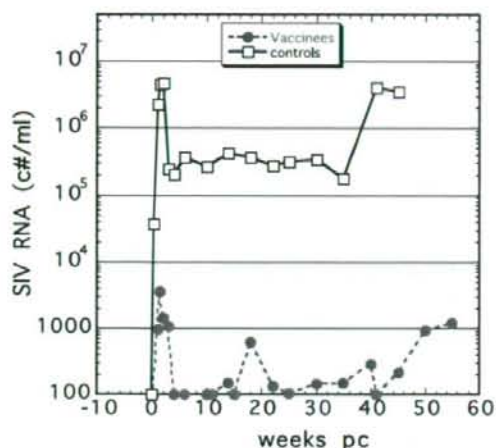


図7. 糖鎖変異ウイルス生ワクチンの SIVsmE543-3 チャレンジ感染に対する効果



#### D. 考察

3種類の5糖鎖欠失変異株と3糖鎖欠失変異株は *in vitro* でのウイルスの性質：マクロファージ指向性、CD4 非依存性レセプター利用の違いに拘わらず *in vivo* (感染宿主) では低病原性と生ワクチンの性質を示した。ウイルスの低病原性と *in vitro* でのマクロファージ指向性との関連はなかった。我々はΔ5Gの低病原性の原因として初期感染における2次リンパ節での低感染性が重要であることを明らかにしている。2次リンパ組織の主要な central memory CD4+T 細胞への感染性の低下が関係していると推測される。In vitro でのウイルスの性質との関連性が低いということは、ウイルスとウイルスレセプター (CCR5) との相互作用ではなくウイルス糖鎖と相互作用する2次リンパ組織免疫細胞との相互作用がウイルスの低病原性化と関連している可能性が推測された。

4種の糖鎖修飾変異ウイルスはサブタイプが異なる SIVsmE543 によるチャレンジ感染を強く抑制した。この結果は糖鎖修飾変異による生ワクチンが誘導する感染防御のメカニズムは多様な HIV-1 感染に対しても有効である可能性を示唆す

る。感染制御と関連する宿主応答の解明が今後の重要な研究課題となる。SIVmac239 と SIVsmE543 の各ウイルスのアミノ酸配列の違いは HIV-1 のサブタイプ間の違いとほぼ対応する。SIVmac239 チャレンジ感染ではすべてのワクチン接種ザルで検出限界以下に抑制されたが、SIVsmE543-3 感染では個体差があり、明らかな初期感染が検出された。この個体差によるウイルス感染抑制の違いは宿主免疫のどのような性質を反映するのだろうか？ MHC の違いにより SIVsmE543-3 と SIVmac239 が共有するエピトープが少なくなることが原因である可能性が推測される。CTL あるいはウイルス特異的 CD4+T 細胞による感染抑制効果の違いである。しかし細胞傷害性による感染細胞の除去はウイルス産生を完全に抑制することはできないことから、CTL あるいはウイルス特異的 CD4+T 細胞の機能に加え未解明のメカニズムの存在が示唆される。

#### E. 結論

糖鎖修飾が減少した4種の変異ウイルスΔ5G, Δ5Gver1, Δ5Gver2, Δ3Gは生ワクチンとしてサブタイプが異なる SIVsmE543 に対し有効な感染抑制効果を示した。メカニズムの解明は HIV-1 ワクチン開発への多大な貢献が期待される。

#### 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 Xing, H. Q., Mori, K., Sugimoto, C., Ono, F., Izumo K., Kubota, R., Izumo, S. Impaired Astrocytes and Diffuse Activation of Microglia in the Cerebral Cortex in Simian Immunodeficiency Virus-Infected Macaques Without Simian

Immunodeficiency Virus Encephalitis.

J.Neuropathol. Exp. Neurol. 67, 600-6111, 2008.

- ② Xing, H. Q., Moritoyo, T., Mori, K., Sugimoto, C., Ono, F., Izumo, S. Expression of proinflammatory cytokines and its relationship with virus infection in the brain of macaques inoculated with macrophage-tropic simian immunodeficiency virus. Neuropathology. in press, 2008.
- ③ Onlamoon, N., Rogers, K., Mayne, A. E., Pattanapanyasat, K., Mori, K., Villinger, F., and Ansari, A.A. Soluble PD-1 rescues the proliferative response of simian immunodeficiency virus-specific CD4 and CD8 T cells during chronic infection. Immunology. 124, 277-293. 2008.
- ④ Sugimoto, C., Nakayama E. E., Shioda T., Villinger, F., Ansari, A.A., Yamamoto N., Suzuki Y., Nagai, Y. and Mori, K. Impact of glycosylation on antigenicity of simian immunodeficiency virus SIV239: induction of rapid V1/V2 specific non-neutralizing antibody and delayed neutralizing antibody following infection with an attenuated deglycosylated Mutant. J. Gen. Virol. 89, 554-566, 2008.

## 学会発表

- ①. K. Mori, C. Sugimoto, Nakamura, F. Ono, Y. Nagai, Y. Suzuki, and N. Yamamoto. Tropism of SIV infection determines pathogenicity and induction of protective response against pathogenic SIV infection. 26th annual symposium on nonhuman primate models for AIDS. December, 2008, San Juan, Puerto Rico.
- ②. heterologous SIV 感染モデルによる多様性ウイルス感染を防御する宿主応答の解析 森一泰、杉本智恵、成瀬妙子、椎野禎一郎、武部豊、木村彰方、山本直樹、永井美之、日本エイズ学会、2008年、大阪

## H. 知的所有権の取得状況

- 1. 特許取得 該当なし
- 2. 実用新案特許 該当なし
- 3. その他 該当なし

## 感染制御宿主応答の個体差と関連する宿主因子の解析

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

ワクチン開発研究に用いられているミャンマー産あるいはラオス産アカゲザルの Mamu-B 遺伝子の多様性を遺伝子配列レベルで解析し、インド産や中国産アカゲザルと同様に個体ごとに発現する遺伝子数が大きく異なることを確認した。また、本研究で同定した Mamu-B アリルは 35 種であるが、うち 22 種（63%）はこれまでに報告のない新規アリルであった。なお、今回解析したアカゲザルでは Mamu-B ファミリーの一員である Mamu-I アリルが多数（8 種、うち 7 種は新規アリル）見いだされたことが特徴的であった。さらに、アカゲザルとヒトはそれぞれ特定の SIV あるいは HIV のエピトープを提示し、一部のエピトープはアカゲザルとヒトで共通することが知られているため、SIV ワクチンに対する免疫応答性と Mamu-B アリルとの関連を検討した。その結果、予想に反して、いわゆるエリートコントローラー-MHC と類似した構造の Mamu-B アリルは、早期から高いワクチン効果を認める個体ではなく、むしろ早期のワクチン効果が低い群に多く認められた。

### A. 研究目的

生体は外来微生物・外来抗原を排除するメカニズムとして免疫機構を備えているが、この免疫応答性には個体差があることが知られている。すなわち、細菌やウイルス感染に対する感受性・抵抗性、外来抗原に対する抗体産生量や過応答としてのアレルギー発症、ワクチン接種後の感染防御効果などは個体によって異なっている。このような免疫応答の個体差形成には遺伝的背景が強く関与しており、免疫応答性を担う T 細胞、NK 細胞、抗原提示細胞、B 細胞などの細胞間の機能連関に関わる免疫応答関連分子群の個体差（ゲノム多様性）がその形成に重要な機能を発揮する。このため、より有効なワクチンを開発する上では、免疫応答に関わるゲノム多様性の関与を理解し、その知見を生かすことが有用である。

HIV ワクチン開発においては、モデル動物としてアカゲザルが用いられており、MHC 分子、特に MHC クラス I 分子の多様性が CTL 誘導ワクチンの有効性と直接関連することが報告されているが、欧米ではインド産あるいは中国産のアカゲザルが多く用い

られている。これに対して、わが国においてはミャンマー産あるいはラオス産のアカゲザルが用いられているが、MHC の多様性はアカゲザル集団ごとにかなり異なっていると考えられるものの、その実態については不明な点が多い。また、MHC 以外の分子群におけるゲノム多様性とワクチン効果との関連は明らかにされていない。さらに、わが国における薬剤開発や安全性試験においてはカニクイザルが多く用いられているが、アカゲザルとカニクイザルでの免疫応答性やゲノム多様性の相違についての体系的比較研究は少ない。

ワクチン効果を最大限に発揮させるためには、免疫応答関連分子群の機能的多様性を考慮することが不可欠であるが、ヒトを用いた研究には制限があるため、アカゲザルあるいはカニクイザルを対象としたワクチン開発系での解析を通じて得られた情報をヒト HIV ワクチン開発に応用することが有効な手法である。また、ワクチン接種後の SIV 感染サル個体の予後と免疫応答関連分子群のゲノム多様性との関連を検討することで、ヒト HIV 感染予後を規定する

ゲノム多様性に関する有用な情報が得られる。

そこで本研究では、アカゲザルやカニクイザルを対象として、免疫応答関連分子群のゲノム多様性を検討し、これと弱毒化ウイルス型ワクチンによる感染制御効果との関連を評価しつつ、新たなワクチン開発戦略を得ることを目的とする。

## B. 研究方法

(1) MHC クラス I 遺伝子群多型の解析：これまでに RSCA 法による Mamu-A, B 遺伝子タイピング法を開発し、これを用いた解析でアカゲザルでは著明な遺伝子増幅が生じていることを明らかにした。そこで、ワクチン開発研究においてワクチン接種と SIV 感染予後との関連がフォローアップされているアカゲザル個体について、Mamu-B 遺伝子の全長 cDNA をクローニングし、30-60 クローンの塩基配列を決定した。一方、Mamu-A 遺伝子については抗原提示ドメインをコードする exon2 および exon3 領域 cDNA をクローニングして塩基配列を決定した。また、Mamu-A, -B 遺伝子のゲノム多様性とワクチン接種後の SIV 感染防御効果との関連を検討した。

(2) TIM1 遺伝子領域多型の解析：Th1/Th2 バランス制御に関わる TIM1 遺伝子について、アカゲザルおよびカニクイザルを対象とした構造解析を行い、SIV ワクチン後の抗体産生と TIM1 多型アレル分布頻度との関連を検討した。

### (倫理面への配慮)

本研究にはヒト遺伝子解析研究が含まれるが、東京医科歯科大学難治疾患研究所倫理審査委員会に研究計画を申請し、審査を受けた後、研究機関長による実施承認を受けている。研究課題「HIV ウイルス感染防御機構の究明に関わる研究」(実施責任者 木村彰方) (平成 18 年 7 月 6 日付承認)

## C. 研究結果

(1) MHC クラス I 遺伝子群多型の解析：ワクチン実験に用いたアカゲザル 13 個体について、Mamu-A 遺伝子および Mamu-B 遺伝子 cDNA をクローニングし、各ローカスごとに 30-60 クローンを選

択し、塩基配列を決定した (表 1)。

Accession	Gene	Species	Mamu-A		Mamu-B		Accession	Gene	Species
			Accession	Gene	Accession	Gene			
AF010201	B*0101	Macaca mulatta	AF010201	B*0101	AF010201	B*0101	AF010201	B*0101	Macaca mulatta
AF010202	B*0102	Macaca mulatta	AF010202	B*0102	AF010202	B*0102	AF010202	B*0102	Macaca mulatta
AF010203	B*0103	Macaca mulatta	AF010203	B*0103	AF010203	B*0103	AF010203	B*0103	Macaca mulatta
AF010204	B*0104	Macaca mulatta	AF010204	B*0104	AF010204	B*0104	AF010204	B*0104	Macaca mulatta
AF010205	B*0105	Macaca mulatta	AF010205	B*0105	AF010205	B*0105	AF010205	B*0105	Macaca mulatta
AF010206	B*0106	Macaca mulatta	AF010206	B*0106	AF010206	B*0106	AF010206	B*0106	Macaca mulatta
AF010207	B*0107	Macaca mulatta	AF010207	B*0107	AF010207	B*0107	AF010207	B*0107	Macaca mulatta
AF010208	B*0108	Macaca mulatta	AF010208	B*0108	AF010208	B*0108	AF010208	B*0108	Macaca mulatta
AF010209	B*0109	Macaca mulatta	AF010209	B*0109	AF010209	B*0109	AF010209	B*0109	Macaca mulatta
AF010210	B*0110	Macaca mulatta	AF010210	B*0110	AF010210	B*0110	AF010210	B*0110	Macaca mulatta
AF010211	B*0111	Macaca mulatta	AF010211	B*0111	AF010211	B*0111	AF010211	B*0111	Macaca mulatta
AF010212	B*0112	Macaca mulatta	AF010212	B*0112	AF010212	B*0112	AF010212	B*0112	Macaca mulatta
AF010213	B*0113	Macaca mulatta	AF010213	B*0113	AF010213	B*0113	AF010213	B*0113	Macaca mulatta
AF010214	B*0114	Macaca mulatta	AF010214	B*0114	AF010214	B*0114	AF010214	B*0114	Macaca mulatta
AF010215	B*0115	Macaca mulatta	AF010215	B*0115	AF010215	B*0115	AF010215	B*0115	Macaca mulatta
AF010216	B*0116	Macaca mulatta	AF010216	B*0116	AF010216	B*0116	AF010216	B*0116	Macaca mulatta
AF010217	B*0117	Macaca mulatta	AF010217	B*0117	AF010217	B*0117	AF010217	B*0117	Macaca mulatta
AF010218	B*0118	Macaca mulatta	AF010218	B*0118	AF010218	B*0118	AF010218	B*0118	Macaca mulatta
AF010219	B*0119	Macaca mulatta	AF010219	B*0119	AF010219	B*0119	AF010219	B*0119	Macaca mulatta
AF010220	B*0120	Macaca mulatta	AF010220	B*0120	AF010220	B*0120	AF010220	B*0120	Macaca mulatta
AF010221	B*0121	Macaca mulatta	AF010221	B*0121	AF010221	B*0121	AF010221	B*0121	Macaca mulatta
AF010222	B*0122	Macaca mulatta	AF010222	B*0122	AF010222	B*0122	AF010222	B*0122	Macaca mulatta
AF010223	B*0123	Macaca mulatta	AF010223	B*0123	AF010223	B*0123	AF010223	B*0123	Macaca mulatta
AF010224	B*0124	Macaca mulatta	AF010224	B*0124	AF010224	B*0124	AF010224	B*0124	Macaca mulatta
AF010225	B*0125	Macaca mulatta	AF010225	B*0125	AF010225	B*0125	AF010225	B*0125	Macaca mulatta
AF010226	B*0126	Macaca mulatta	AF010226	B*0126	AF010226	B*0126	AF010226	B*0126	Macaca mulatta
AF010227	B*0127	Macaca mulatta	AF010227	B*0127	AF010227	B*0127	AF010227	B*0127	Macaca mulatta
AF010228	B*0128	Macaca mulatta	AF010228	B*0128	AF010228	B*0128	AF010228	B*0128	Macaca mulatta
AF010229	B*0129	Macaca mulatta	AF010229	B*0129	AF010229	B*0129	AF010229	B*0129	Macaca mulatta
AF010230	B*0130	Macaca mulatta	AF010230	B*0130	AF010230	B*0130	AF010230	B*0130	Macaca mulatta
AF010231	B*0131	Macaca mulatta	AF010231	B*0131	AF010231	B*0131	AF010231	B*0131	Macaca mulatta
AF010232	B*0132	Macaca mulatta	AF010232	B*0132	AF010232	B*0132	AF010232	B*0132	Macaca mulatta
AF010233	B*0133	Macaca mulatta	AF010233	B*0133	AF010233	B*0133	AF010233	B*0133	Macaca mulatta
AF010234	B*0134	Macaca mulatta	AF010234	B*0134	AF010234	B*0134	AF010234	B*0134	Macaca mulatta
AF010235	B*0135	Macaca mulatta	AF010235	B*0135	AF010235	B*0135	AF010235	B*0135	Macaca mulatta
AF010236	B*0136	Macaca mulatta	AF010236	B*0136	AF010236	B*0136	AF010236	B*0136	Macaca mulatta
AF010237	B*0137	Macaca mulatta	AF010237	B*0137	AF010237	B*0137	AF010237	B*0137	Macaca mulatta
AF010238	B*0138	Macaca mulatta	AF010238	B*0138	AF010238	B*0138	AF010238	B*0138	Macaca mulatta
AF010239	B*0139	Macaca mulatta	AF010239	B*0139	AF010239	B*0139	AF010239	B*0139	Macaca mulatta
AF010240	B*0140	Macaca mulatta	AF010240	B*0140	AF010240	B*0140	AF010240	B*0140	Macaca mulatta
AF010241	B*0141	Macaca mulatta	AF010241	B*0141	AF010241	B*0141	AF010241	B*0141	Macaca mulatta
AF010242	B*0142	Macaca mulatta	AF010242	B*0142	AF010242	B*0142	AF010242	B*0142	Macaca mulatta
AF010243	B*0143	Macaca mulatta	AF010243	B*0143	AF010243	B*0143	AF010243	B*0143	Macaca mulatta
AF010244	B*0144	Macaca mulatta	AF010244	B*0144	AF010244	B*0144	AF010244	B*0144	Macaca mulatta
AF010245	B*0145	Macaca mulatta	AF010245	B*0145	AF010245	B*0145	AF010245	B*0145	Macaca mulatta
AF010246	B*0146	Macaca mulatta	AF010246	B*0146	AF010246	B*0146	AF010246	B*0146	Macaca mulatta
AF010247	B*0147	Macaca mulatta	AF010247	B*0147	AF010247	B*0147	AF010247	B*0147	Macaca mulatta
AF010248	B*0148	Macaca mulatta	AF010248	B*0148	AF010248	B*0148	AF010248	B*0148	Macaca mulatta
AF010249	B*0149	Macaca mulatta	AF010249	B*0149	AF010249	B*0149	AF010249	B*0149	Macaca mulatta
AF010250	B*0150	Macaca mulatta	AF010250	B*0150	AF010250	B*0150	AF010250	B*0150	Macaca mulatta
AF010251	B*0151	Macaca mulatta	AF010251	B*0151	AF010251	B*0151	AF010251	B*0151	Macaca mulatta
AF010252	B*0152	Macaca mulatta	AF010252	B*0152	AF010252	B*0152	AF010252	B*0152	Macaca mulatta
AF010253	B*0153	Macaca mulatta	AF010253	B*0153	AF010253	B*0153	AF010253	B*0153	Macaca mulatta
AF010254	B*0154	Macaca mulatta	AF010254	B*0154	AF010254	B*0154	AF010254	B*0154	Macaca mulatta
AF010255	B*0155	Macaca mulatta	AF010255	B*0155	AF010255	B*0155	AF010255	B*0155	Macaca mulatta
AF010256	B*0156	Macaca mulatta	AF010256	B*0156	AF010256	B*0156	AF010256	B*0156	Macaca mulatta
AF010257	B*0157	Macaca mulatta	AF010257	B*0157	AF010257	B*0157	AF010257	B*0157	Macaca mulatta
AF010258	B*0158	Macaca mulatta	AF010258	B*0158	AF010258	B*0158	AF010258	B*0158	Macaca mulatta
AF010259	B*0159	Macaca mulatta	AF010259	B*0159	AF010259	B*0159	AF010259	B*0159	Macaca mulatta
AF010260	B*0160	Macaca mulatta	AF010260	B*0160	AF010260	B*0160	AF010260	B*0160	Macaca mulatta
AF010261	B*0161	Macaca mulatta	AF010261	B*0161	AF010261	B*0161	AF010261	B*0161	Macaca mulatta
AF010262	B*0162	Macaca mulatta	AF010262	B*0162	AF010262	B*0162	AF010262	B*0162	Macaca mulatta
AF010263	B*0163	Macaca mulatta	AF010263	B*0163	AF010263	B*0163	AF010263	B*0163	Macaca mulatta
AF010264	B*0164	Macaca mulatta	AF010264	B*0164	AF010264	B*0164	AF010264	B*0164	Macaca mulatta
AF010265	B*0165	Macaca mulatta	AF010265	B*0165	AF010265	B*0165	AF010265	B*0165	Macaca mulatta
AF010266	B*0166	Macaca mulatta	AF010266	B*0166	AF010266	B*0166	AF010266	B*0166	Macaca mulatta
AF010267	B*0167	Macaca mulatta	AF010267	B*0167	AF010267	B*0167	AF010267	B*0167	Macaca mulatta
AF010268	B*0168	Macaca mulatta	AF010268	B*0168	AF010268	B*0168	AF010268	B*0168	Macaca mulatta
AF010269	B*0169	Macaca mulatta	AF010269	B*0169	AF010269	B*0169	AF010269	B*0169	Macaca mulatta
AF010270	B*0170	Macaca mulatta	AF010270	B*0170	AF010270	B*0170	AF010270	B*0170	Macaca mulatta
AF010271	B*0171	Macaca mulatta	AF010271	B*0171	AF010271	B*0171	AF010271	B*0171	Macaca mulatta
AF010272	B*0172	Macaca mulatta	AF010272	B*0172	AF010272	B*0172	AF010272	B*0172	Macaca mulatta
AF010273	B*0173	Macaca mulatta	AF010273	B*0173	AF010273	B*0173	AF010273	B*0173	Macaca mulatta
AF010274	B*0174	Macaca mulatta	AF010274	B*0174	AF010274	B*0174	AF010274	B*0174	Macaca mulatta
AF010275	B*0175	Macaca mulatta	AF010275	B*0175	AF010275	B*0175	AF010275	B*0175	Macaca mulatta
AF010276	B*0176	Macaca mulatta	AF010276	B*0176	AF010276	B*0176	AF010276	B*0176	Macaca mulatta
AF010277	B*0177	Macaca mulatta	AF010277	B*0177	AF010277	B*0177	AF010277	B*0177	Macaca mulatta
AF010278	B*0178	Macaca mulatta	AF010278	B*0178	AF010278	B*0178	AF010278	B*0178	Macaca mulatta
AF010279	B*0179	Macaca mulatta	AF010279	B*0179	AF010279	B*0179	AF010279	B*0179	Macaca mulatta
AF010280	B*0180	Macaca mulatta	AF010280	B*0180	AF010280	B*0180	AF010280	B*0180	Macaca mulatta
AF010281	B*0181	Macaca mulatta	AF010281	B*0181	AF010281	B*0181	AF010281	B*0181	Macaca mulatta
AF010282	B*0182	Macaca mulatta	AF010282	B*0182	AF010282	B*0182	AF010282	B*0182	Macaca mulatta
AF010283	B*0183	Macaca mulatta	AF010283	B*0183	AF010283	B*0183	AF010283	B*0183	Macaca mulatta
AF010284	B*0184	Macaca mulatta	AF010284	B*0184	AF010284	B*0184	AF010284	B*0184	Macaca mulatta
AF010285	B*0185	Macaca mulatta	AF010285	B*0185	AF010285	B*0185	AF010285	B*0185	Macaca mulatta
AF010286	B*0186	Macaca mulatta	AF010286	B*0186	AF010286	B*0186	AF010286	B*0186	Macaca mulatta
AF010287	B*0187	Macaca mulatta	AF010287	B*0187	AF010287	B*0187	AF010287	B*0187	Macaca mulatta
AF010288	B*0188	Macaca mulatta	AF010288	B*0188	AF010288	B*0188	AF010288	B*0188	Macaca mulatta
AF010289	B*0189	Macaca mulatta	AF010289	B*0189	AF010289	B*0189	AF010289	B*0189	Macaca mulatta
AF010290	B*0190	Macaca mulatta	AF010290	B*0190	AF010290	B*0190	AF010290	B*0190	Macaca mulatta
AF010291	B*0191	Macaca mulatta	AF010291	B*0191	AF010291	B*0191	AF010291	B*0191	Macaca mulatta
AF010292	B*0192	Macaca mulatta	AF010292	B*0192	AF010292	B*0192	AF010292	B*0192	Mac



あげられるが、系統樹解析(図1)を行ったところ、Mamu-IアリルはMamu-B\*01と共にクラスターを成していた。このことはMamu-IおよびMamu-B\*01が他のMamu-Bアリルとは異なる独自の進化過程を辿ったことを示唆する。また、多数のMamu-Iアリルが見出されたが、それらの間の相違は小さく、分岐後の距離が短かったことから、Mamu-Iの多様性は他のMamu-Bアリルの多様性より遅れて生じたものと考えられた。ついで、ワクチン後の感染防御とMamu-AあるいはMamu-Bアリルとの関連を検討した(表2)。

	KIR3DL1	KIR3DP1	KIR3DL2	KIR3DL3	KIR3DL4	KIR3DL5A	KIR3DL5B	KIR3DL6	KIR3DL7	KIR3DL8	KIR3DL9	KIR3DP2
major A (91)	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01
minor A (other A)	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01
major B	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01
minor B	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01

表2. 感染防御効果と Mamu アリルとの関連

その結果、Mamu-Aアリルとの関連は明確ではなかったが、Mamu-Bアリルの抗原結合ドメインの構造との対応関係を解析すると、表3に示すとおり、感染防御効果が早期から観察された個体ではなく、むしろ早期の感染防御効果がやや弱い個体に、いわゆるエリートコントローラーアリル(Mamu-A\*6501, Patr-B\*03, HLA-B\*57)と類似した構造が多く認められることが判明した。

	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01	HLA-B*08:01
HLA-B*08:01													
HLA-B*08:01													
HLA-B*08:01													
HLA-B*08:01													
HLA-B*08:01													
HLA-B*08:01													
HLA-B*08:01													
HLA-B*08:01													
HLA-B*08:01													
HLA-B*08:01													

表3. 抗原ペプチド結合ドメイン構造の比較

すなわち、MHC分子における抗原ペプチド結合ドメインであるA、B、C、D、E、Fポケットを構成するアミノ酸配列のうちMamu-A\*6501、Patr-B\*03およびHLA-B\*57の3アリルに共通する部分は10カ所あるが、早期感染防御効果が高い4種のMamu-Bアリルは0-5カ所のみ一致していたのに対し、早期防御効

果が低い5種のMamu-Bアリルでは4-9カ所の一致であった。なお、早期防御効果が高いMamu-Bで8カ所一致するものがあったが、これは抗原ペプチド結合において最も重要なFポケットの相溶性が低かった。また、早期防御効果が低いMamu-BアリルにはMamu-B\*01が含まれていたが、Mamu-B\*01は抗原ペプチド提示作用が弱いことが報告されているため、抗原提示能だけでは感染防御との関連性を説明出来ない可能性がある。極めて興味深いことに、エリートコントローラーアリルは、ヒトにおいてKIR-3DL1のリガンド配列(HLA-Bw4 エピトープ)部分も一致しているが、Mamu-Bアリルについて見れば、早期防御効果が高い4アリル中1アリル、低い5アリル中3アリルがHLA-Bw4 エピトープ配列を有していた。

これらのことから、早期防御効果が低いこととMamu-B分子のBポケット、Fポケット、KIR-3Dリガンド構造の3カ所の構造類似性が関連することが推定された(図2)。

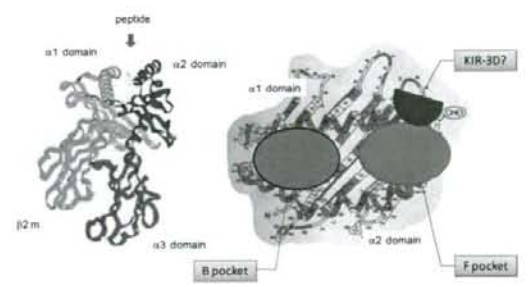


図2. MHC分子のペプチド結合構造

(2) TIM1 遺伝子領域多型の解析: ワクチン効果の発揮においては CTL 誘導または中和抗体産生が関与するが、ワクチン効果には個体差がある。CTL 誘導性の個体差には MHC クラス I の多様性、抗体産生の個体差には MHC クラス II の多様性が関与する。そこで昨年度に引き続き TIM1 遺伝子の多様性を検討した。アカゲザルおよびカニクイザルでは、いずれも mucin 様構造部分に著明な多様性が存在する。この領域にはヒトでも多様性が存在するが、アカゲザルやカニクイザルにおける多様性はヒトよりはるかに高度であり、mucin 様構造のリピート数

多型であり、リピート数と中和抗体価の産生には有意な関連を認めた (表 4)。

アリル	中和抗体 (-)	中和抗体 (+)
1 repeat	0 (0.00)	2 (0.14)
2 repeats	1 (0.08)	5 (0.36)
3 repeats	4 (0.33)	4 (0.29)
4 repeats	2 (0.17)	1 (0.07)
5 repeats	0 (0.00)	0 (0.00)
6 repeats	0 (0.00)	1 (0.07)
7 repeats	5 (0.42)	1 (0.07)
p=0.0126		

#### D. 考察

ワクチン実験アカゲザル集団について、Mamu-A および Mamu-B 遺伝子 cDNA の配列解析を行った結果、認められたアリルの 2/3 は新規アリルであった。また、ワクチン後の感染防御効果との関連では、エリートコントローラーと類似した構造の Mamu-B アリルは、むしろ早期防御効果が低い個体に多く観察された。さらに、早期防御効果が低い Mamu-B アリルには KIR-3D のリガンド構造を有しているものが多かった。今後は感染個体における CTL 誘導性と Mamu-B アリルとの関連を検討するとともに、アカゲザルにおける KIR 遺伝子群の多型解析を行うことが必要である。

これらとは別に、HIV ウイルスあるいは SIV ウイルスに対する感染感受性や免疫応答性を規定する遺伝要因の検索を行った。本年度は TIMI についての解析結果が得られたが、その多様性はワクチン接種後の中和抗体産生との関連が示唆される。今後中和抗体測定集団数を増やしての解析を行うのみならず、mucin 用ドメインの機能的意義の検討と、ヒト HIV/AIDS 発症感受性との関連を検討する予定である。

#### E. 結論

アカゲザルにおけるワクチン接種後の SIV 感染防御に関わる MHC クラス I 遺伝子群の多様性を解明した。今後さらに実験個体群の MHC クラス I 遺伝子群の多様性を解明することで、提示するペプチド抗原との対応関係をより詳細に検討することをが可能となる。また、KIR 遺伝子の解析はワクチン後感染制御における NK 細胞の意義の解明につながると

考えられる。さらに、MHC 分子以外で免疫応答の個体差形成に関わる遺伝的要因を検討することで、より有効なワクチン効果をもたらすための戦略が得られる可能性がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1 論文発表

- (1) Nakajima T, Kimura A: Genetic factors which confer sensitivity to highly active antiretroviral therapy (HAART) in HIV-infected subjects: implication of a benefit of an earlier initiation of HAART in HIV therapy. *Pharmacogenomics* 2008; 9(9): 1347-1351.
- (2) Nakajima T, Ohtani H, Satta Y, Uno Y, Akari H, Ishida T, Kimura A: Natural selection in the TLR-related genes in the course of primate evolution. *Immunogenetics* 2008; 60(12): 727-735.

##### 2 学会発表

- (1) 中島敏晶、大谷仁志、颯田葉子、宇野泰広、明里宏文、石田貴文、木村彰方：霊長類における Toll-like receptor (TLR) 関連遺伝子の分子進化と自然選択 第 10 回日本進化学会 ワークショップ、東京、2008 年 8 月
- (2) 中島敏晶、大谷仁志、颯田葉子、宇野泰広、明里宏文、石田貴文、木村彰方：霊長類における Toll-like receptor (TLR) 関連遺伝子の分子進化と自然選択 第 17 回日本組織適合性学会、大阪、2008 年 9 月
- (3) 中島敏晶、大谷仁志、颯田葉子、宇野泰広、明里宏文、石田貴文、木村彰方：霊長類における Toll-like receptor (TLR) 関連遺伝子の分子進化と自然選択 第 53 回日本人類遺伝学会、横浜、2008 年 9 月
- (4) Naruse T, Chen Z, Yanagida R, Hinohara K, Mori K, Matano T, Miyazawa M, Kimura A: Diversity of MHC class I-A genes in rhesus macaque. 第 8 回あ

わじしま感染症・免疫フォーラム、兵庫、2008年9月。

- (5) 柳田梨紗、成瀬妙子、中島敏晶、照沼 裕、三間屋純一、木村彰方：HIV 感染後 AIDS 発症の個体差と KIR 遺伝子多型との関連。第 17 回日本組織適合性学会大会、大阪、2008 年 9 月。
- (6) 成瀬妙子、柳田梨紗、俣野哲朗、森 一泰、保富康宏、宮澤正顕、木村彰方：ヒトおよびアカゲザルにおける NKG2D レセプター関連遺伝子の多型解析。第 17 回日本組織適合性学会大会、大阪、2008 年 9 月。
- (7) 成瀬妙子、陳 智勇、柳田梨紗、日野原邦彦、森 一泰、俣野哲朗、宮澤正顕、木村彰方：アカゲザル MHC-A (Mamu-A) 遺伝子群の多様性。日本人類遺伝学会第 53 回大会、横浜、2008 年

9 月。

- (8) Naruse T, Kimura A: Immunogenetics of MHC in susceptibility to infectious disease. 11th Cardiovascular Genetics and Atherosclerosis Symposium Satellite Meeting, Seoul, Korea, Nov. 2008.
- (9) 成瀬妙子、陳 智勇、柳田梨紗、日野原邦彦、森 一泰、俣野哲朗、宮澤正顕、木村彰方：アカゲザル MHC-A(Mamu-A) 遺伝子群の多様性。BMB2008(第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会)、神戸、2008 年 12 月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 感染制御・感染防御と関連する宿主因子の解析

研究分担者 宮澤 正顯（近畿大学医学部 教授）

研究協力者 梶原 栄二、馬野 奈津子（近畿大学医学部 免疫学教室）

**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ザル個体群について、そのMHC class II 遺伝子型を網羅的に決定してきた。その結果、糖鎖欠損型 SIV ワクチン接種・病原性 SIV チャレンジ個体におけるウイルス複製経過や組換えウイルス出現の動態が、MHC ハプロタイプに依存して異なる可能性が示された。これは特定のMHC 分子によって提示されるウイルス抗原ペプチドが、ワクチン接種・SIV チャレンジ後のウイルス複製動態に重大な影響を与えることを示唆する。そこで本研究では、SIV 感染経過の異なるアカゲザル個体で発現するMHC class II 分子の抗原提示機能を明らかにするため、感染実験に使用された全個体の DRB, DQA, DQB, DPA, DPB 遺伝子座対立遺伝子型の網羅的決定と、マイクロサテライト遺伝子型同定によるハプロタイプ構成解析を推し進めると共に、単離した全ての class II cDNA をプラスミドベクターに挿入し、導入細胞の表面にそれらの産物を発現させる系を確立した。

### 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、アカゲザルの SIV 感染系は極めて有用である。最近国内外の研究において、感染初期のウイルス複製制御に関与すると考えられる宿主 T 細胞応答のエピトープ特異性が、ヒトの HIV 感染とアカゲザルの SIV 感染でほぼ共通であることが明らかとなってきた。また、セトポイントウイルス価が極端に低く保たれる個体群には、ヒトとアカゲザルで互いに相同な MHC 遺伝子型が存在することも示されている。

我々は、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により、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解析してきた。

今年度は、主任研究者・森らのグループが進めている糖鎖欠損ウイルスによる SIV 感染防御実験において、ウイルス複製動態や組換えウイルス出現頻度が異なる個体群に見出される MHC class II アレルについて、それらの機能を明らかにすることを目的として、class II cDNA の発現ベクターへのクローニングと、遺伝子導入による class II 分子発現細胞系構築を試みた。また、本研究において実施されている SIV 感染サル免疫系組織の細胞動態解析に関連して、粘膜免疫系の機能維持と活性化に関連するケモカイン分子の発現制御機構を、ラットモデルを用いて解析した。

### 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で SIV 感染実験に用いられ、感染後のウイルス複製動態や免疫応答能が解析されているアカゲザル個体と、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、アカゲザル各個体のゲノム DNA をテンプレートに、第6染色体 MHC class

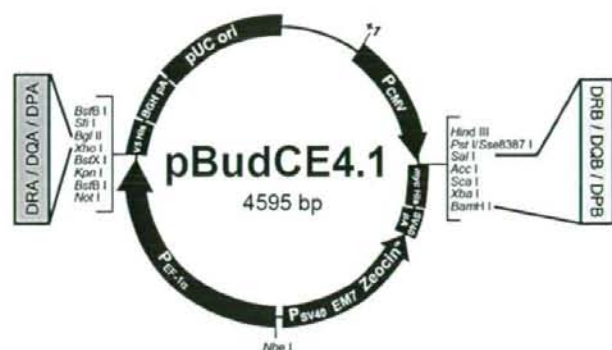


図 1. アカゲザル MHC class II 分子発現ベクターの構築

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。

#### 4) MHC class II 分子発現ベクターの構築

2) でクローニングされた各 class II アリル発現産物の cDNA を、二つの発現カセットを持つプラスミドベクター pBudCE4 に  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖の組として挿入し、得られた両鎖挿入クローンを Lipofectamine 2000 により COS7 細胞に導入した(図1)。目的遺伝子産物の発現は、C-末端側に挿入した His タグに対する抗体を用いた Western blot 法、及びヒト DRA 分子に対するモノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法で検定した。

この際、class II 分子の細胞表面への発現には、小胞体で class II 分子に結合する Ii 鎖の発現と、ペプチド結合溝からの CLIP ペプチド除去による抗原ペプチド結合に必要な MHC-DM 分子の存在が必須と予想されたので、2) と同様に配列特異的な PCR プライマーを用いてアカゲザル Ii 鎖(CD74)及び MHC-DM 分子  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖の cDNA をクローニングし、pBudCE4 ベクターに組込んだものを同時にトランスフェクトした。

#### 5) 小腸粘膜組織におけるケモカイン発現の局在解析

ラット小腸より粘膜リンパ装置に富む部位を切除し、新鮮凍結切片を作製した。これをクリオスタットで薄切後、4%パラホルムアルデヒドで後固定を

加えて標本とした。ラット CCL25 (TECK), CCL28 (MECK) 及び CCL20 (LARK) の cDNA は配列特異的なプライマーを用いて PCR 法によりプラスミドベクターにクローニングし、ベクター上の SP6 及び T7 プロモータと DIG RNA ラベリングキットを用いて、ジゴキシゲニン標識されたセンス及びアンチセンスプローブを調製した。その後酵素抗体法により、プローブの局在を検出した。

#### (倫理面への配慮)

本研究はアカゲザルの遺伝子解析に関するものであり、動物からの採血は、疼痛の防止に配慮し、動物愛護の精神に則り行った。また、ラットを用いた動物実験については、動物の愛護及び管理に関する法律を遵守し、動物実験委員会の許可を得て実施した。

### C. 研究結果

#### 1) アカゲザル MHC class II 遺伝子座ハプロタイプ構成の解析

今年度までに、網羅的な cDNA クローニング及び塩基配列決定と、親子間共通アリの解析から推定してきたアカゲザル MHC class II 遺伝子型とハプロタイプ構成の一覧を図2に示す。

ハプロタイプ d1 と d2 で DQA 遺伝子座と DQB 遺伝子座の間に認められるように、class II 遺伝子座間で染色体乗換えが生じたと考えられるハプロタイプが推定されてきたが、今年度はゲノム DNA 上のマイクロサテライトマーカーを解析することにより、これらハプロタイプ構成と組換えの存在を直接的に検定した。その結果、cDNA 塩基配列決定により親子間のアリル共有パターンから推定してきたハプロタイプ構成がゲノム DNA マーカーの遺伝子型からも裏打ちされ、上記 d1/d2 ハプロタイプ間では、確かに DQA と DQB の遺伝子座の間で組換えが起こっていることが明らかとなった。更に、一頭の親個体(90-120)とその子孫で見出されていたハプロタイプ a と b については、その DPA-DPB ハプロタイプが共通であることが明らかとなった。

興味深いことに、y と名付けたハプロタイプと、暫定的に 90-69-1 と呼んでいるハプロタイプについては、その DQ-DP ハプロタイプが共通で、ハプロタイプ y では DRB の二つの遺伝子座のアリルが新規のものに変わっている。これらも、互いに組換え型の関係にあるものと考えられた。また、ハプロタイプ z と、同じく暫定的に 93-06F<sub>1-2</sub> と呼んでいるハプロタイプは、共に DRB 領域に DR4 遺伝子座を持つ点が共通しているが、今年度行ったマイクロサテライト解析で、DR4 から DP に至るゲノム領域のマイクロサテライト遺伝子型も共通であることが判明した。従って、両者は近縁関係にあるハプロタイプと考えられ、今後 DRB, DQ, DP 各遺伝子座アリの近縁関係が

DRA-CA				D6S1666		D6S2876		D6S2741			
y (90-099)	Mm0006 DR02	Mm0006 DR09		DQA1*06	125(?)	DQB1*1811		DPA1*0601	DPB1*04		
90-69-1	252	DRB1*0306	DRB1*1003	DQA1*06	125	DQB1*1811	199	279	DPA1*0601	DPB1*04	
a (90-120)	238	DRB1*0303	DRB1*1007	DQA1*05	135	DQB1*1801	211	265	DPA1*0601	DPB1*04	
b (90-120)	270	DRB*w2002	DRB*w2501	DQA1*0502	135	DQB1*1603	205	265	DPA1*0601	DPB1*04	
e (90-010)	252	DRB1*0309	DRB*w2507	DQA1*0501		DQB1*1802	213	291	R90030 DPA01	DPB1*14	
d1 (90-010)	240	DRB*w606	DRB*w2104	DRB*w2603	DQA1*0502	135(?)	DQB1*1603	205	265	Mamu*0201	DPB1*04
d2 (90-030)	240	DRB*w606	DRB*w2104	DRB*w2604 (exon2 = 2603)	DQA1*0502	135	DQB1*1503	211	275	R90030 DPA01	DPB1*12
h (90-030)	266	DRB1*0321	DRB1*0323		DQA1*05	143	DQB1*0601	213	289	R90030 DPA02	DPB1*09
i (90-088)		DRB1*0403	DRB*w502		DQA1*03	135(?)	DQB1*1808		275	Mamu*0201	DPB1*10
p (89-002)	278	DRB1*07032	DRB*w203		89002 DQA01	131	DQB1*1812	217(?)	277(?)	(902120 DPA01)	(DPB1*04)
q (89-002)	240	R170 DR08		DRB5*0305	DQA1*2404	137	DQB1*1806	217	275	(89002 DPA01)	(DPB1*06)
s (89-075)	272	DRB*w101	DRB*w3602	DRB3*0410	DQA1*0108	131	DQB1*0607	211(?)	275	89075 DPA01	DPB1*15 (88%)
t (89-075)	238	DRB1*320	DRB*w3601		DQA1*0108	135(?)	DQB1*0608	211	295	Mamu*0201	DPB1*06
z (90-014)	238(?)	DRB1*0704	DRB*w2505	DRB4*0104	DQA1*0503	139(?)	DQB1*2401	211	263	Mamu*0201	DPB1*06
93-06F <sub>1</sub> -2272(?)		DRB1*0306	DRB*w0704	DRB4*2603	DQA1*0105	139(?)	DQB1*0602	211(?)	263(?)	(ND)	DPB1*15
(LA3)	238(?)	DRB*w305 (?)	DRB3*0410 (97%)	DRB5*0303 (99%)	DQA1*0108		DQB1*0607			DPA*0201 (98%)	DPB1*15

図 2. 今年度までに明らかにしたアカゲザル MHC class II ハプロタイプ構成

互いに一致するかどうかを、配列相同性の観点から確認したいと考えている。

## 2) MHC class II 分子発現ベクターの完成

図 1 に示した pBudCE4 ベースの発現ベクターに、class II 分子  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖の cDNA を組にして挿入することにより、DR, DQ, DP の  $\alpha$  鎖・ $\beta$  鎖複がそれぞれ発現し、タンパク質の翻訳が起こることを Western blotting により確認した。しかし、 $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖の cDNA を組にして発現させただけでは、細胞表面への class II 分子発現は検出出来なかった。

MHC class II 分子の細胞表面への発現には、少なくとも小胞体で class II 分子に結合する Ii 鎖と、ペプチド結合溝からの CLIP ペプチド除去による抗

原ペプチド結合に必要な MHC-DM 分子の存在が必要と考えられる。class II  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖の発現のみでは細胞表面への class II 分子の局在が検出出来なかった理由として、これら分子の発現も要求されるものと考えたので、配列特異的な PCR プライマーを用いてアカゲザル Ii 鎖 (CD74) 及び MHC-DM 分子  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖の cDNA をクローニングし、それらを pBudCE4 ベクターに組込んだものを、class II 分子  $\alpha$  鎖・ $\beta$  鎖の cDNA と同時に COS 細胞にトランスフェクトした。

Ii 鎖遺伝子の同時発現のみでは class II 分子の細胞表面への局在は検出出来なかったが、Ii 鎖と DM 分子を class II 分子と同時に発現させると、細胞表面に class II 分子が検出出来るようになった (図 3)。現在、Ii 鎖と DM 分子を持続発現する細胞株を樹立しており、これまでにクローニングした DR, DQ, DP 分子の  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖の組を全て網羅した発現ベクターの構築が終わっているため、今後 T 細胞認識ペプチドの解析が必要な個体については、その個体で考えられる全ての class II 分子について、発現細胞を供給出来るようになる。

## 3) 小腸粘膜上皮におけるケモカイン分子発現の局在

非 RI 標識 *in situ* hybridization の技法を用いて、消化管粘膜固有層及び粘膜リンパ装置へのリンパ球集積に関与すると考えられるケモカイン分子の発



・ DRA+DRB\*w2603-His  
・ アカゲザル Ii chain (CD74)  
・ アカゲザル DMA/DMB

・ DRA+DRB\*w2603-His  
・ アカゲザル Ii chain (CD74)

図 3. 遺伝子導入細胞に於ける、アカゲザル MHC class II 分子の細胞表面への発現 (蛍光抗体法)

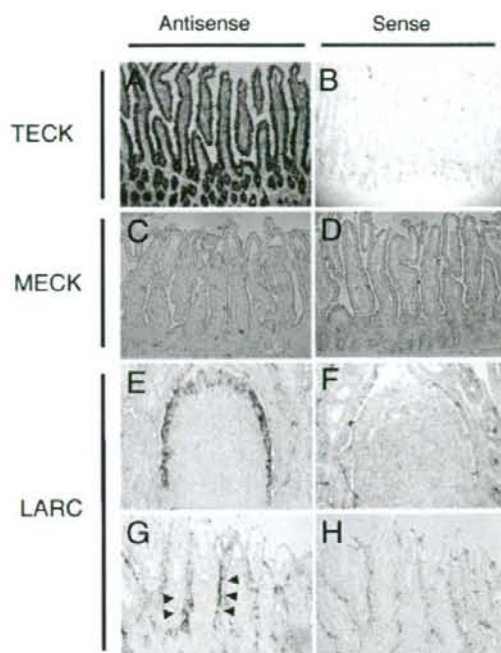


図 4. ラット小腸粘膜におけるケモカイン発現の *in situ* hybridization による局在解析 上から CCL25 (TECK)、CCL28 (MECK)、及び CCL20 (LARC) の発現を検出した。右列はセンスプローブによる陰性対照。A~D と G, H は絨毛上皮と粘膜固有層を、E, F はパイエル板を示す。G では陽性細胞を矢頭で示した。

現局在を解析した。

小腸粘膜への T リンパ球集積に重要な役割を果たすと言われる CCL25 (TECK) は、粘膜絨毛上皮細胞に一樣に強く発現していた (図4)。一方、同じく消化管での発現が報告されていた粘膜関連ケモカイン CCL28 (MECK) については、絨毛上皮細胞での発現は検出出来なかった。

極めて興味深いことに、CCL20 (LARC) の発現はパイエル板のドーム上皮に局在して強く認められ、絨毛上皮でも一部の細胞が発現していた。この結果は、消化管粘膜リンパ装置へのリンパ球集積に、CCL20 が重要な役割を果たすことを示している。

#### D. 考察

我々はこれまで、我が国で SIV 感染実験に用いられているアカゲザル個体の MHC class II 遺伝子 cDNA を網羅的にクローニングして塩基配列を決定し、親子間で共通に発現しているアレルの解析からハプロタイプ構成を推定してきた。共通アレルの解析によって推定した class II ハプロタイプには、DRB から DP までの領域間に組換えがあると推定される組が存在したが、ゲノムレベルでの確定は出来ていなかった。

今年度は染色体ゲノム上のマイクロサテライトマーカー遺伝子型を網羅的に決定し、これまでに各個体の家系データと class II アレルに基づいて推定して来たハプロタイプ構成と比較することにより、class II ハプロタイプの存在をゲノムレベルで確認すると共に、組換えハプロタイプの存在を確定することに成功した。その結果、例えば DRB4 遺伝子座を持つ二つのハプロタイプが、ゲノムレベルで互いに近縁である可能性が示された (図4)。今後、このような近縁ハプロタイプ間の相同性解析、及び組換え型と考えられるハプロタイプにおける非一致部分の相同性解析によって、組換えが生じた時期をある程度推定することが可能になると考えられ、我が国で感染実験に用いられているアカゲザル個体群 (ビルマ系) と欧米で用いられているインド系アカゲザルの近縁関係の解析にも役立つと考える。

主任研究者・森らのグループは、糖鎖欠損ウイルスによるワクチン接種後の SIV 感染防御実験で、チャレンジ後のウイルス複製動態や組換えウイルス出現頻度が感染個体の MHC 遺伝子型によって異なる可能性を指摘している。しかし、我々がこれまでに行ってきた class II 遺伝子型とハプロタイプ構成の解明だけでは、SIV 感染病態に与える MHC class II 分子の機能的役割、特に T 細胞応答能とウイルス複製動態や抗体産生応答との関わりについては解析が出来ない。そこで、各個体で発現する class II 分子がどのようなウイルス抗原の認識やサイトカイン産生と相関するかを直接解析出来るようにすることを目的として、今年度は網羅的な発現ベクター系の構築を試みた。その結果、class II 分子  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖の cDNA と共に、アカゲザルからクローニングした Ii 鎖と MHC-DM 分子  $\alpha$  鎖・ $\beta$  鎖を同時発現させることにより、class II 分子が細胞表面に発現することが明らかとなった (図3)。この成果は、今後 SIV 感染個体による CD4 陽性 T リンパ球応答のウイルス抗原エピトープ特異性を解析する上で極めて重要な基礎となると考える。

最後に、HIV や SIV 感染の病態形成において、感染初期の粘膜組織におけるウイルス複製及び T リンパ球活性化動態が極めて重要な役割を果たすことが知られている。主任研究者・森らもこの点に着目し、SIV 感染個体の粘膜及び二次リンパ組織におけるウイルス抗原の検出と、リンパ球サブセットの動態解析を試みている。

我々は今回、ラットの組織標本を用いて、粘膜組織へのリンパ球局在に関与すると考えられてきたケモカイン遺伝子の発現局在を解析することに成功した。我々が用いた非 RI 標識 *in situ* hybridization の技法により、特定のケモカインの絨毛上皮或いはパイエル板ドーム上皮への局在を証明出来たので (図4)、今後この技法を SIV 感染アカゲザル組織におけるサイトカイン・ケモカイン及びウイルス遺伝子発現の局在解析にも応用出来るよう協力したい。

## 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、親子関係から推定されたハプロタイプ構成を、ゲノム DNA のマイクロサテライト解析で確認した。その結果、class II 領域内での組換え型ハプロタイプの存在をゲノムレベルで確認すると共に、class II 遺伝子座の重複パターンとマイクロサテライト遺伝子型から、互いに近縁と考えられるハプロタイプの組が見出された。今後これらハプロタイプの相互関係を解析することで、我が国で用いられているビルマ産アカゲザルと、欧米で用いられているインド産アカゲザルの遺伝的関係を理解する可能性があると期待される。また、各個体で発現する MHC class II 分子をそれぞれ網羅的に発現出来るベクターと遺伝子導入細胞の組を開発した。細胞表面への class II 分子発現には Ii 鎖と MHC-DM 分子の存在が必要で、かつ十分であった。

## 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) Miyazawa M., L. Lopalco, F. Mazzotta, S. Lo Caputo, F. Veas, and M. Clerici. The "immunologic advantage" of HIV-exposed seronegative individuals. *AIDS* 23:161-175, 2009.
- 2) Takeda, E., S. Tsuji-Kawahara, M. Sakamoto, M.-A. Langlois, M. S. Neuberger, C. Rada, and M. Miyazawa. Mouse APOBEC3

restricts Friend leukemia virus infection and pathogenesis in vivo. *J. Virol.* 82: 10998-11008, 2008. (Selected for JVI Spotlight)

- 3) Matsumoto, T., T. Ajiki, E. Kajiwara, Y. Mita, T. Fujita, H. Morimoto, M. Miyazawa, and Y. Ku. Decreased expression of intestinal chemokine TECK/CCL25 in experimental obstructive jaundice and its reversal following internal biliary drainage. *J. Gastroenterol.* 43: 390-396, 2008.

- 4) Miyazawa, M., S. Tsuji-Kawahara, and Y. Kanari. Host genetic factors that control immune responses to retrovirus infections. *Vaccine* 26: 2981-2996, 2008.

- 5) 宮澤正顯、横田恭子、三浦聡之、滝口雅文、俣野哲朗. HIV に対する宿主防御免疫機構: 自然免疫から適応免疫まで. *J. AIDS Res.* 10: 85-87, 2008.

- 6) 宮澤正顯、河原佐智代、金成安慶、武田英里、坂本真由美、阿部弘之、木下さおり、湯浅貴恵、梶原栄二、馬野奈津子. レトロウイルス感染と宿主因子: エイズ制圧を目指して. *近大医誌* 33:209-238, 2008.

## 2. 学会発表

- 1) 武田英里、河原佐智代、宮澤正顯. マウス APOBEC3 はフレンド白血病ウイルスに対する宿主抵抗性因子である. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 2008 年 10 月 26 日～28 日、岡山.

## H. 知的所有権の出願・取得状況

該当するもの無し



厚生労働省科学研究補助金（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告書

カニクイザルによるエイズモデルの開発とワクチン研究への応用

分担研究者 保富康宏 医薬基盤研究所霊長類医学研究センター センター長

研究要旨 エイズウイルス感染症研究、特に病態やワクチン開発においては有効な動物モデルが必要である。ヒトエイズウイルス(HIV)はヒト以外ではチンパンジーに感染するが、エイズを発症することはない。このためにヒトと同様な病態を示すサルエイズウイルス(SIV)とアカゲザルの系を用いての研究が広く行われている。しかしながらアカゲザルの産地による病態の差異が認められること、安定的な供給を確保することが困難であるために、新たな動物モデルの開発が望まれている。本研究では産地が特定されており、系統が明らかで、かつ計画的に生産されている SPF カニクイザルを用いて新たな霊長類エイズモデルとして SIV とカニクイザルの感染系を検討した。SIVmac239 分子クローンを COS-1 にトランスフェクトさせ、培養上清のウイルスをカニクイザル胎児胸腺リンパ球由来の細胞 HSC-F に対する TCID<sub>50</sub> を測定した。このウイルスをカニクイザル由来末梢血単核球細胞(PBMC)で増殖させ SIV ストックを作製した。この SIV ストックをインドネシア産、フィリピン産、マレーシア産のカニクイザルそれぞれから分離した CD8 除去リンパ球に感染増殖させ、HSC-F に対する TCID<sub>50</sub> を測定したところ、インドネシア産は 10<sup>6.42</sup>/ml、フィリピン産は 10<sup>6.47</sup>/ml、マレーシア産は 10<sup>6.10</sup>/ml であった。以上のように本研究では系統維持されている SPF カニクイザル PBMC で調整されたウイルスならびに、その TCID<sub>50</sub> を決定した。今後これらを用いて感染実験を行う。

#### A. 研究目的

HIV は人以外ではチンパンジーにしか感染せず、そのチンパンジーもエイズを発症することがない。このためにエイズウイルス感染症では HIV と近縁ウイルスであり、エイズを発症する SIV、または SIV と HIV のキメラウイルス SHIV とアカゲザルの実験系を用いて、病態やワクチン開発研究等が行われてきた。実験動物を用いる場合、その系統や産地によって種々の反応性が異なることは、しばしば観察される。アカゲザルにおける病原性でもサルの産地による違いは良く知られている。わが国でよく使用されるラオス産等のアカゲザルはアメリカで通常使用されているインド産アカゲザルとエイズウイルス感染における病態が異なり、ラオス産等のアカゲザルは約 30% でエイズを発症せずにウイルスをコントロールすることが知られている。この様な状況下でアカゲザル以上に汎用されているカニ

クイザルを用いてのエイズウイルス研究が興味をもたれているが、未だ詳細な実験結果は示されていない。本研究ではサル D タイプレトロウイルス (SRV/D) 等の感染が無く、産地、系統が判明しているカニクイザルにおけるエイズウイルス感染症研究の可能性を検討する。

#### B. 研究方法

##### 1. SIVmac239 の調製

SIVmac239 cDNA を含む pBR233 ベクターを霊長類由来株化細胞 COS-1 にトランスフェクトさせ、培養上清のウイルスを回収した。ウイルスの感染価を測定するために、カニクイザル胎児胸腺リンパ球由来の細胞 HSC-F に対する TCID<sub>50</sub> を測定した。

##### 2. カニクイザル由来末梢血単核球細胞 (PBMC) への SIV mac239 の感染

SIV 感染実験で用いる同一の動物種を用

いてウイルスを増殖させた。カニクイザルの末梢血から密度勾配遠心法で分離した PBMC を CD8 除去し(Fig.1)、マイトジェンの PHA-P で 2 日間刺激し、IL-2 で 3 日間増殖させたのち、ウイルスに感染させ 6 日後の培養液を SIV のストックとして保存した。この SIV ストックをインドネシア産、フィリピン産、マレーシア産のカニクイザルそれぞれから分離した CD8 除去リンパ球に感染/増殖させ、HSC-F に対する TCID<sub>50</sub> を測定した。

### C. 研究結果

#### 1. SIVmac239 の感染価

Cos-1 にトランスフェクトさせ、回収したウイルスの HSC-F に対する TCID<sub>50</sub> は 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup>/ml であった。

#### 2. カニクイザル由来 PBMC への SIVmac239 の感染

Gag P27 は感染 6 日目に最大値となった(Fig.2)。カニクイザル由来 PBMC の原産地の違いによる SIVmac239 の感染価への影響は、HSC-F に対する TCID<sub>50</sub> においてインドネシア産は 10<sup>6.42</sup>/ml、フィリピン産は 10<sup>6.47</sup>/ml、マレーシア産は 10<sup>6.10</sup>/ml であった。

### D. 考察

エイズウイルス感染症に対する病態解明やワクチン開発では未だ多くの不明な点が残されており、ワクチン開発においても実用化されているものはない。このような視点からの研究、開発には有用な動物モデルが必要であることは自明である。

アカゲザルと SIV、SHIV の感染系はエイズウイルス感染症研究には非常に重要であり、世界中で用いられている。しかしながら、アカゲザルの系統差による病態の差違や、この系のみで研究を行うことによる資源の安定的供給の問題、さらには生物学的

な質の向上、維持においても問題が生じている。このような状況で、近年カニクイザルと SIV を用いた研究が行われ始めた。これら研究では主にモーリシャス産のカニクイザルが用いられており、モーリシャスにはスマトラ島近辺からカニクイザルが持ち込まれたとされている。しかしながらこのカニクイザルを用いた研究では現在までに明確な病態は報告されていない。医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターでは麻疹、EBV、CMV 等のヘルペスウイルスおよびマカク属で問題となる SRV/D の感染がないカニクイザルを繁殖育成している。また、これらのカニクイザルはフィリピン、インドネシア、マレーシアの各地域で産出されたものであり、交雑せずに系統を保っている。このことから本研究で行う系統維持された SPF コロニーでのカニクイザルを用いた研究では新たな生物資源活用になるエイズ研究を行える可能性が示唆される。以上のことから今後、感染実験を行い、新たな生物資源としてエイズ研究におけるカニクイザルの検証を行う。

### E. 結論

カニクイザルを用いたエイズ研究の基盤を構築した。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Okabayashi, S., Ohno, C., Kato, M., Nakayama, H., Yasutomi, Y. Congenital cystic adenomatoid-like malformation in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Vet. Path.* 45:232-235, 2008.
- 2) Tsuchida, J., Yoshida, Y., Sankai, T. and Yasutomi, Y. Maternal behavior of

laboratory-born, individually reared long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*).

*J.Am.Assoc.Lab.Anim.* 47:29-34, 2008.

3) Mori,H., Yamanaka,K., Matsuo,K., Yasutomi,Y. and Mizutani,H. Administration of Ag85B showed therapeutic effects to Th2-type cytokine-mediated acute phase atopic dermatitis by inducing regulatory T cells. *Arch Dermatol.Res.* July Epub ahead, 2008.

4) Yasui,F., Kai,C., Kitabatake,M., Inoue, S., Yoneda M., Yokochi,S., Kase,R., Sekiguchi,S., Morita,K., Hishima,T., Suzuki,H., Karamatsu,K., Yasutomi Y., Shida,H., Kidokoro,M., Mizuno,K., Matsushima K. and Kohara,M. Prior immunization with SARS-CoV nucleocapsid protein causes severe pneumonia in mice infected with SARS-CoV. *J.Immunol.*:181:6367-6348,2008.

5) Morioka ,T., Yamanaka,K., Mori,H., Omoto,Y., Tokime,K., Kakeda,M., Kurokawa,I., Gabazza,E., Tsubura A., Yasutomi,Y. and Mizutani, H. IL-4/IL-13 antagonist DNA vaccination successfully suppresses Th2 type chronic dermatitis. *Br.J.Dermatol. in press*

6) Okabayashi, S., Ohno,C. and Yasutomi,Y. Acute megakaryocytic leukemia (AMKL)-like disease in a Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *J.Comp.Pathol. in press*

7) 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 study of viral replication. World Scientific. 2008;p539-p552.

8) 清水裕也、唐松克夫、松原明弘、保富康宏：ワクチンアジュバントの開発 日本臨床 66：1915-1921、2008.

9) 松原明弘、清水裕也、唐松克夫、保富康

宏：経口ワクチンの開発 日本臨床 66：1873-1878、2008.

10) 辻村祐佑、加藤翔太、保富康宏：アレルギー性疾患に対するワクチン開発 PHARMASTAGE 8：14-21、2009.

## 2.学会発表

1) 松原明弘、清水裕也、加藤翔太、河岡義裕、保富康宏：IL-4 アンタゴニストを用いた 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 56 回日本ウイルス学会 岡山 10 月 26 日-28 日

2) 松原明弘、高村史記、清水裕也、保富康宏：SIVmac239 の Env gp120 アスパラギン結合型糖鎖欠損株を用いた SIV DNA ワクチンの開発 第 12 回日本ワクチン学会 熊本 11 月 8 日-9 日

3) 千代智子、関口敏、松原明弘、保富康宏、脇田隆宇、村井深、小原道法：HCV 遺伝子組み換えワクチニアウイルスの作製とワクチンとしての検討 第 12 回日本ワクチン学会 熊本 11 月 8 日-9 日

4) 関口敏、千代智子、飛田良美、松原明弘、保富康宏、村井深、小原道法：HCV 遺伝子組み換えワクチニアウイルスの治療ワクチン効果第 12 回日本ワクチン学会 熊本 11 月 8 日-9 日

5) Marni Cueno、唐松克夫、保富康宏、Antonio Laurena、岡本尚：Immunogenicity of HIV-1 Tat protein expressed in tomato. 第 56 回日本ウイルス学会 岡山 10 月 26 日-28 日

H.知的財産の出願・登録状況

無し

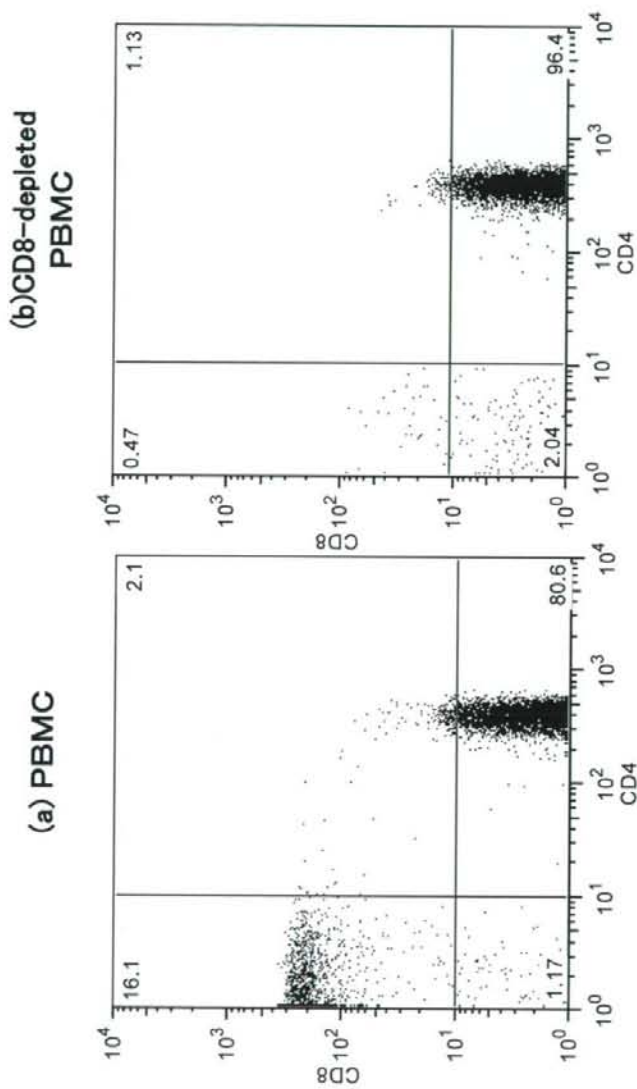


Fig.1 Distribution of CD4 and CD8 among PBMC. CD8 was indicated in (a). After the depletion of CD8 from PBMC, CD8 was not indicated in (b).