

2008 300|0A

厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業

HIV 感染とエイズ発症の阻止および 治療に関わる基礎研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

平成21年3月

研究代表者 佐多 徹太郎

(国立感染症研究所)

厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業

HIV 感染とエイズ発症の阻止および 治療に関わる基礎研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

平成21年 3 月

研究代表者 佐 多 徹太郎

(国立感染症研究所)

平成20年度エイズ対策研究事業
「HIV感染とエイズ発症の阻止および治療に関わる基礎研究」班
班員名簿

佐多徹太郎	国立感染症研究所・感染病理部	部長
横田 恭子	国立感染症研究所・免疫部第1室	室長
田中 勇悦	琉球大学医学部・感染免疫学	教授
宮澤 正顕	近畿大学医学部・免疫学教室	教授
神奈木真理	東京医科歯科大学大学院・歯学部総合研究科・免疫治療学研究室	教授
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
高橋 秀宗	国立感染症研究所・感染病理部	室長
塩田 達雄	大阪大学微生物病研究所	教授
石坂 幸人	国立国際医療センター研究所・難治性疾患研究部	部長
徳永 研三	国立感染症研究所・感染病理部	主任研究官
立川 愛	東京大学医科学研究所・先端医療研究センター	助教
小柳 義夫	京都大学ウイルス研究所	教授

目 次

I. HIV 感染とエイズ発症の阻止および治療に関わる基礎研究 総括研究報告書（平成 20 年度）	1
研究代表者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所・感染病理部）	
II. 分担研究報告書	
1. 抗 HIV 免疫応答を左右する抗原提示機能に関する解析	5
研究分担者：横田 恭子（国立感染症研究所・免疫部第 1 室）	
2. 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	9
研究分担者：田中 勇悦（琉球大学医学部・感染免疫学）	
3. 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	13
研究分担者：宮澤 正顕（近畿大学医学部・免疫学教室）	
4. 生体分子を介する HIV-1 感染抵抗性	23
研究分担者：神奈木 真理（東京医科歯科大学大学院・歯歯学総合研究科・ 免疫治療学研究室）	
5. CRF01_AE 株由来 Gag タンパクにおける細胞障害性 T 細胞(CTL)エピトープ に関する研究	27
研究分担者：有吉 紅也（長崎大学熱帯医学研究所・感染症予防治療分野）	
6. HIVenv 結合因子を利用したウイルス複製阻害	33
研究分担者：高橋 秀宗（国立感染症研究所・感染病理部）	
7. HIV-1 感染病態に関わる宿主因子の解析	37
研究分担者：塩田 達雄（大阪大学微生物病研究所）	

8. HIV-1 感染に伴うゲノム DNA 二重鎖切断の分子機構と潜伏感染細胞からの ウイルス再産生における自然免疫シグナル伝達の関与	41
研究分担者：石坂 幸人（国立国際医療センター研究所・難治性疾患研究部）	
9. ヒト宿主因子 APOBEC3G の HIV-1 感染病態制御と HIV-1 Vif による 回避機構の解明	47
研究分担者：徳永 研三（国立感染症研究所・感染病理部）	
10. HIV-1 の粒子形成を司る宿主因子の同定とその分子機構の解析	55
研究分担者：梁 明秀（国立感染症研究所・エイズ研究センター）	
11. エイズ発症阻止に関わる宿主因子・病態の研究	59
研究分担者：立川 愛（東京大学医科学研究所・先端医療研究センター）	
12. HIV 感染による中枢神経組織破壊メカニズムの解明	63
研究分担者：小柳 義夫（京都大学ウイルス研究所）	
13. HIV 脳症の病態の解析	73
研究代表者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所・感染病理部）	
III. 研究成果に関する刊行一覧表	79

I. 総括研究報告書

HIV 感染とエイズ発症の阻止および治療に関わる基礎研究

研究代表者 佐多徹太郎 国立感染症研究所 感染病理部 部長

研究要旨 本研究班では、HIV 感染病態の基礎的な解析に焦点をあて、そこから得られる情報をもとにして、感染防御免疫機構の増強、HIV 増殖抑制そして抗 HIV 薬剤やワクチン開発に役立てる。(1) HIV 感染免疫防御機構、(2) HIV 感染に関わる自然免疫等の宿主因子の解析、(3) HIV 感染病態の解明を3本の柱として、HIV 感染やエイズ発症の阻止、治療に繋がる基礎的研究を行う。本年度の研究成果は以下である。樹状細胞 (DC) から CD4 陽性 T 細胞への HIV 感染伝播には T 細胞活性化が低レベルである必要があることが明らかとなった。Poly I:C による DC への分化培養法を見出した。可溶性 OX40L により HIV-1 増殖を抑制した。HIV-1 曝露非感染者に集積する遺伝子多型を *Rac2* イントロンの機能的なハプロタイプ多型として同定した。共生細菌に TLR3、4 の刺激によるインターフェロン β を介した HIV-1 複製抑制類似の効果を見出した。CRF01_AE において報告されていない 8 箇所の CTL エピトープ領域を同定した。中和抗体誘導抗原の候補が得られた。HIV-2 カプシドタンパク質の変異はヒト TRIM5 α 感受性を変化させることでウイルス増殖に影響した。ヒト TRIM5 α の遺伝子多型に抗 HIV-1 活性を減弱させるもの、増強させると考えられるものを見出した。X-線照射によってウイルス感染効率は上昇し、ゲノム DNA 二重鎖切断サイトへウイルス DNA は挿入されることが判明した。サブタイプ C の Vif 蛋白は結合親和性により抗 APOBEC3G 活性を規定した。粒子形成に関与する新規の宿主因子 *BCA2/ Rabr17* を同定した。感染者では MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES 産生以外に、免疫機能が質的に大きく異なっていた。ラット脳海馬スライス培養系を用いて、HIV-1 感染マクロファージが誘導する特異的神経細胞障害過程を明かにした。グリア細胞ではウイルス遺伝子が核に組み込まれて持続感染し、ミクログリア細胞へのウイルス供給源となることがわかった。

研究分担者：

横田恭子 国立感染症研究所室長
田中勇悦 琉球大学医学部教授
宮澤正顯 近畿大学医学部教授
神奈木真理 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科教授
有吉紅也 長崎大学熱帯医学研究所教授
高橋秀宗 国立感染症研究所室長
塩田達雄 大阪大学微生物病研究所教授
石坂幸人 国立国際医療センター研究所部長
徳永研三 国立感染症研究所主任研究官
梁 明秀 国立感染症研究所エイズセンタ

ーグループ長

立川 愛 東京大学医科学研究所助教
小柳義夫 京都大学ウイルス研究所教授

A. 研究目的

全世界のみならず国内でも HIV 感染者およびエイズ患者は増加している。エイズ克服には感染予防をめざしたワクチン開発が最も重要ではあるが、多くの臨床試験が頓挫しているのが現状である。一方、HAART の開発により HIV 感染者の予後は著明に改善されたが、長期毒性の出現、服薬遵守の不徹底と薬剤耐性ウイルスの出現など、深刻な問題が生じている。

HIV 感染病態の基礎的な解析に焦点をあて、そこから得られる情報をもとにして、感染防御免疫機構の増強、ウイルス増殖抑制そして抗 HIV 薬剤やワクチン開発に役立てることが必要である。

1) HIV 感染免疫防御機構

樹状細胞と CD4 陽性 T 細胞の免疫シナプスを介したウイルス増殖制御により、抗 HIV 免疫応答の強化をめざす (横田)。DC の分化誘導法の検討と OX40L 発現による HIV 増殖抑制法の開発 (田中)。HIV-1 複製抑制における *Rac2* 遺伝子座イントロン多型の機能部位及びマウス *APOBEC3* の機能差を規定する多型領域の絞り込みを行う (宮澤)。自然免疫による HIV-1 防御機構を解明し、その誘導方法を開発する (神奈木)。HIV 感染増殖に対する抑制効果の強い宿主細胞傷害性 T 細胞 (CTL) エピトープを同定する (有吉)。抗体、sCD4 等の HIV env 結合因子を利用して、複製阻害法を導く方法を開発する (高橋)。

2) HIV 感染に関わる自然免疫等の宿主因子の解析

TRIM5 α の変異により抗 HIV-1 効果が変化するかどうか、および HIV-2 のカプシドタンパク質 158、178 番目のアミノ酸のウイルスに対する影響を明らかにする (塩田)。DSB: DNA double-strand breaks が静止マクロファージ (M ϕ) へのウイルス感染効率を上げることおよび Vpr 蛋白質の IL-6 産生における機序を明かとする (石坂)。C-Vif 蛋白などの抗 APOBEC3G、APOBEC3F 作用を解明する (徳永)。HIV の粒子形成に関与する宿主因子を同定し、HIV 粒子形成の分子機構を解明する (梁)。

3) HIV 感染病態の解明

「HIV 量」と「MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES 産生能」との因果関係について詳細に解析する (立川)。HIV 感染マクロファージがどのように、脳組織のどの細胞を障害するのかを解明する (小柳)。ミクログリア、アストロサイト、神経細胞における SIV の感染動態を詳細に解析する (佐多)。

B. 研究方法

1) HIV 感染免疫防御機構

蛍光マーカー発現 HIV-1 を作製し、FACSscalibur により T 細胞への感染、ケモカインレセプターの発現を解析した (横田)。DC の分化誘導法に検討を加え、OX40L による HIV-1 増殖への影響を調べた (田中)。HIV-1 複製抑制における *Rac2* 遺伝子多型の機能解析とマウス *APOBEC3* の機能差を規定する多型領域の解析 (宮澤)。標的マクロファージを調整し Toll-like receptor (TLR) 2、3、4、5、7/8 のリガンド刺激による HIV-1 複製への影響について検討した (神奈木)。オーバーラッピングペプチドを用いて Gag CTL のエピトープをマッピングした (有吉)。HIV-1 Core-Env を精製、マウスに免疫し、血清の中和アッセイを行い、ハイブリドーマを作製した (高橋)。

2) HIV 感染に関わる自然免疫等の宿主因子の解析

HIV-2 GH123 株のカプシドタンパク質に変異を導入し、ウイルス増殖を検討した。変異 TRIM5 α 発現における、HIV-1 ならびに HIV-2 の増殖を検討した (塩田)。X-線照射によるウイルス感染効率、DSB サイトとゲノム DNA の挿入過程との関係、rVpr による IL-6 産生を調べた (石坂)。in vivo ポリユベキチネーションアッセイ、in vitro トランスレーション、免疫沈降法、間接蛍光抗体法、リアルタイム RT-PCR、ウイルス感染性アッセイを組み合わせた (徳永)。HIV-1 粒子タンパク質 (Gag タンパク質) と機能的相互作用する宿主因子を無細胞タンパク質合成系および化学増幅型ルミネッセンス プロキシミティー ホモジニアスアッセイを用いて同定した (梁)。

3) HIV 感染病態の解明

感染者 PBMC を刺激し、サイトカイン・ケモカインを測定、または 9000 遺伝子について発現量を解析した。細胞分画の解析も行った (立川)。脳組織スライス培養実験、組織学的解析、TUNNEL 染色などを行った (小柳)。サル神経・グリア細胞培養系へ SIV を感染させ、抗原量、ケモカイン、サイトカイン、蛋白質酸化等の変化を測定した (佐多)。

C. 研究結果

1) HIV 感染免疫防御機構

DC から CD4 陽性 T 細胞への免疫シナプスを介した効率よい HIV 感染伝播は T 細胞の活性化が低レベルであり、R5 型 HIV-1 が増殖しやすい条件であることが明らかとなった (横田)。Poly I:C が DC 分化誘導因子であることを確認し、可溶性 OX40L に R5 HIV-1 の抑制効果を認めた (田中)。HIV 曝露非感染者の持つ第 2 染色体領域の遺伝的特徴を、*Rac2* イントロンの機能的なハプロタイプ多型として同定した。特定アレルのマウス APOBEC3 はマウスレトロウイルスの複製を抑制出来た (宮澤)。マクロファージへの TLR3、4 の刺激によりインターフェロン β を介して HIV-1 複製が抑制された。共生細菌の中に類似の効果を示すものがあった (神奈木)。北タイの HIV コホート患者においてオーバーラッピングペプチドを用いて、CRF01_AE においてはこれまで報告されていない 8 箇所の CTL エピトープ領域を同定した (有吉)。Core-Env の免疫により中和抗体が誘導され、Env 認識抗体を産生するハイブリドーマが得られた (高橋)。

2) HIV 感染に関わる自然免疫等の宿主因子の解析

HIV-2 のカプシドタンパク質 158、178 番目のアミノ酸変異はヒト TRIM5 α 感受性に影響した。TRIM5 α Gly110Arg の変異は抗 HIV 作用を減弱させ、G176del は野生型 TRIM5 α の同時発現下に増強させた。(塩田)。X-線照射によってウイルス感染効率率は上昇、DSB サイトへウイルス DNA は挿入された。TLR4 のノックダウンで rVpr 誘発 IL-6 産生が阻害された。(石坂)。B-Vif、C-Vif のユビキチン化に差はなく APOBEC3G の翻訳に影響しなかった。C-Vif の抗 APOBEC3G 活性は結合親和性の強さによって規定された (徳永)。粒子形成に関与する新規の宿主因子として BCA2/ Rabring7 を同定した (梁)。

3) HIV 感染病態の解明

治療開始後 1-2 ヶ月で、MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES 産生能が回復していた。高、低 HIV

群で 100 遺伝子に有意差が見られた。(立川)。HIV 誘導神経組織障害領域を同定し、HIV 誘導神経組織再生不全を明かした (小柳)。サル神経・グリア・ミクログリア培養細胞系で HIV 感染により、ERK が活性化し、リン酸化 P53 が蓄積した (佐多)。

D. 考察

1) HIV 感染免疫防御機構

CD4 陽性 T 細胞のみならず DC にも HIV 感染抵抗性を賦与することにより、HIV 特異的 CD4 陽性記憶 T 細胞の活性化に伴う HIV 増殖を制御しつつワクチンによる抗 HIV 免疫応答を強化することの重要性が再確認された (横田)。LPS に比べ Poly I:C は HLA-DR と CD86 を高く発現させる点がユニークであり DC の分化培養法として有用である (田中)。*Rac2* 転写制御因子が感染抵抗性を左右する可能性があり、マウス APOBEC3 に結合する因子は HIV-1 複製抑制薬の開発につながる可能性がある (宮澤)。TLR3、4 の刺激に類似した複製抑制効果が共生菌の中に認められ、HIV-1 感染抵抗性の宿主環境形成への応用が示唆される (神奈木)。エイズ進行遅延型に関係する CTL とウイルスとの関係が明らかになりつつあり、効果的なワクチン開発に向けて進行している。(有吉)。HIV-1 Core-Env は広域中和血清の誘導に有効である可能性がある (高橋)。

2) HIV 感染に関わる自然免疫等の宿主因子の解析

HIV-2 カプシドタンパク質の変異はヒト TRIM5 α 感受性を変化させることにより HIV-2 増殖に影響する。ヒト TRIM5 α の遺伝子多型 Gly110Arg は HIV-1 感染感受性を上昇させ、G176del は逆に感染抵抗性を付与する可能性が考えられた。(塩田)。ウイルス DNA の染色体へのインテグレーションの過程に DSB、DSB 誘発細胞内シグナルが「正」の因子として作用していた。潜伏感染細胞からのウイルス産生誘導に関する IL-6 産生は活性酸素産生と自然免疫シグナルに関与する受容体の機能が重要な役割を担っていることが示唆された (石坂)。C-Vif の抗 APOBEC3G 活性は結合親和性により規定され、核局在性との相関性が示唆された。APOBEC3F

の機能的役割は低いと考えられた(徳永)。BCA2は新規のtetherin結合タンパク質であり、重要なrestriction factorである可能性が高い(梁)。

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

3) HIV感染病態の解明

HIV量が低下するとMIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES産生は回復する。高、低HIV群の差はMIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES産生細胞の質的異常によるものであると考えた(立川)。脳組織スライス培養はHIV誘導神経系障害の評価系として応用可能であり、神経破壊と再生不全の蓄積の結果、HIV感染による中枢神経障害が誘発されていると考えた(小柳)。SIV感染によって神経・グリア細胞培養系および神経・グリア・ミクログリア細胞培養系の細胞で持続的にERKが活性化し、リン酸化p53が蓄積すると考えられた(佐多)。

E. 結論

DCからCD4陽性T細胞への効率よいHIV感染伝播の阻害法、DCの分化誘導法、自然感染抵抗性を示す遺伝要因、TLR3、4の刺激によるHIV-1防御法、CTLとウイルスの相関関係、中和抗体誘導法について知見が得られた。HIV感染感受性を決定する宿主因子、ゲノムDNAの二重鎖切断の役割、抗APOBEC3G活性を説明する分子機構について説明がなされた。粒子形成に関与する宿主因子を同定した。HIV感染による中枢神経組織破壊機構の理解が進んだ。

F. 健康危険情報

各分担者の報告書参照。

G. 研究発表

1. 論文発表

各分担者の報告書参照。

2. 学会発表

各分担者の報告書参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

各分担者の報告書参照。

II. 分担研究報告書

1. 抗 HIV 免疫応答を左右する抗原提示機能に関する解析

研究分担者 横田 恭子 国立感染症研究所免疫部 第一室長

研究要旨: DC から CD4 陽性 T 細胞への免疫シナプスを介した効率よい R5 型選択的 HIV 感染伝播は T 細胞の活性化が低レベルであることに依存し、これは生体内で R5 型 HIV-1 が増殖しやすい条件であることが明らかとなった。この様な DC から CD4 陽性 T 細胞への効率よい HIV 感染伝播を阻止することはエイズ発症制御に重要であり、両細胞に HIV 感染抵抗性を賦与するレンチウイルスの開発が今後の治療・ワクチン戦略の要となると思われる。

A. 研究目的

樹状細胞や記憶 T 細胞には HIV が潜伏感染し、抗原(特に HIV)特異的 T 細胞活性化の際に HIV の再活性化が促進されることが抗 HIV 免疫応答を低下させる要因である。本研究では、樹状細胞と CD4 陽性 T 細胞の免疫シナプスを介したウイルス増殖制御により、抗 HIV 免疫応答の強化をめざす。

B. 材料と方法

1) 蛍光マーカー発現 HIV-1 の作製

NL432 をベースに X4(Lai)あるいは R5(AD8) 型 env と nef 遺伝子の間に DsRed あるいは EGFP に IRES つないだ遺伝子を挿入し、感染により蛍光を発する組換え HIV-1 provirus (HIV-1_{NL-D} あるいは HIV-1_{NLAD8-D})を構築した。293T 細胞にトランスフェクトしてウイルスを調整した。

2) 細胞の調製と HIV 感染

健康人 PBMC より CD14 陽性単球を分画して樹状細胞(DC)に分化させ、CD14 陰性細胞より CD4 陽性 T 細胞を調整した。DC に、 10^6 細胞あたり 200 ng づつの HIV-1_{NL-D} と HIV-1_{NLAD8-D} を同時に感染させた後、細胞を洗浄して 1 日培養した。翌日、0.05%トリプシン処理(RT 5 分)して洗浄した後細胞数を数え、PPD 抗原(25 μ g/ml)と未刺激の autologous CD4 陽性 T 細胞を加えて混合培養した。感染 9 日後の細胞を回収して APC 標識抗 CD3 抗体で染色し、FACScalibur で感染 T 細胞の頻度を解析した。

CD4 陽性 T 細胞にも両ウイルスを同時に感

染させ、洗浄後弱い刺激条件(0.5 μ g と 1 μ g/ml)あるいは強い刺激条件(5 μ g と 10 μ g/ml) で抗 CD3 と CD28 抗体を加えて IL-2 存在下で一週間培養し、FACScalibur で感染 T 細胞の頻度を解析した。なお、健康人 PBMC 利用に関しては感染研医学研究倫理委員会の承認を受け、インフォームドコンセントを得ている。

3) ケモカインレセプターの発現解析

樹状細胞あるいは T 細胞受容体抗体のクロスリンクにより活性化させた T 細胞表面の CCR5 CXCR4 の発現はそれぞれ蛍光標識した抗体を用いて FACScalibur で解析した。

C. 研究結果

HIV の初期感染および免疫応答刺激にともなうウイルス増殖は DC を代表とする抗原提示細胞が HIV 特異的 T 細胞を活性化する時に誘導され、そのことが病態進行の重要な要因であると考えられる。DC は CD4 およびケモカインレセプターの発現は低レベルで、X4 あるいは R5 型 HIV-1 の感染効率に違いはないことを確認した。両ウイルスに感染させた樹状細胞のウイルス産生はごくわずかであるが、抗原提示を介して CD4 陽性 T 細胞を活性化すると同時に誘導されるウイルス伝播・増殖は R5 型ウイルス優位であることが明らかとなった(図 1 a, b)。一方、未刺激の静止期にある CD4 陽性 T 細胞が X4 と R5 型 HIV-1 に同時に感染した場合、T 細胞の活性化レベルに応じて増殖してくるウイルスに違いがあった。即ち、図 1 (d)に示すように、R5 型 HIV-1 (HIV-1_{NLAD8-D})は弱い T 細胞受容体刺激で有意に増殖し、X4 型

HIV-1(HIV-1_{NL-D})は強力に活性化された T 細胞で増殖しやすいことが明らかとなった。この時、CXCR4 および CCR5 の発現レベルは同じであった。従って生体内での抗原刺激により活性化をうける CD4 陽性 T 細胞は R5 型 HIV-1 が増殖しやすい活性化状態であることが示唆された。

D. 考察

HIV 感染者の体内に潜伏する HIV は、抗 HIV 免疫応答を担う HIV 特異的記憶 T 細胞に高率に存在することが知られている。これは、HIV に感染あるいはウイルス抗原を取り込んだ抗原提示細胞(DC)による HIV 抗原提示の際に DC と T 細胞とで形成される免疫シナプスを介した HIV 特異的な記憶 T 細胞への効率よい感染が関与していると考えられる。この条件で増殖しやすいのは R5 型 HIV-1 であり、抗原提示を介したウイルス伝播・増殖を制御可能なレンチウイルスベクターの開発は理にかなっている。我々の開発した Lenti shNef366 を感染させて細胞内 HIV-1 増殖を抑制した樹状細胞では HIV-1 の CD4 陽性 T 細胞への感染伝播能が低下することは昨年示した。この様な HIV 抑制性レンチウイルスの効果を更に確実にするため、CD4 細胞(DC と T)に targeting 可能な envelope の組換え蛋白を作製し、現在その選択的導入効率を確認している。また、発現させる HIV 抑制分子として shRNA 以外に、ウイルスの遺伝子配列に依存しない細胞内 microRNA 分子によるウイルス抑制が可能かどうか検討中である。図 2 に示すように今後レンチウイルスベクターの開発・更なる改良を進めることにより、新たな治療法を確立していくことが重要であると考えている。

E. 結論

DC から CD4 陽性 T 細胞への免疫シナプスを介した効率よい HIV 感染伝播は T 細胞の活性化が低レベルであり、R5 型 HIV-1 が増殖しやすい条件であることが明らかとなった。従って、CD4 陽性 T 細胞のみならず DC にも HIV 感染抵抗性を賦与することにより、HIV 特異的 CD4 陽性記憶 T 細胞の活性化に伴う HIV 増殖を制御しつつワクチンによる抗 HIV 免疫応答

を強化することの重要性が再確認された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamamoto, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Mitsuki, Y-Y, Mizukoshi, F., Terahara, K., Inagaki, Y., Yamamoto, N., Kobayashi, K. and Inoue, J-I.: Selective transmission of R5 HIV-1 over X4 HIV-1 at the dendritic cell-T cell infectious synapse is determined by the T cell activation state. *PLoS Path.* 5:e1000279, 2009
- 2) Mizukoshi, F., Yamamoto, T., Mitsuki, Y-y., Terahara, K., Kawana-Tachikawa, A., Kobayashi, K., Iwamoto, A., Morikawa, Y., and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Activation of HIV-1 Gag-specific CD8⁺ T cells by yeast-derived VLP-pulsed dendritic cells is influenced by the level of mannose on the VLP antigen. *Microbes Infect.* in press, 2009
- 3) Komuro, I., Sunazuka, T., Akagawa, S.K., Tsunetsugu-Yokota, Y., Iwamoto, A., and Omura, S.: Erythromycin-derivatives inhibit HIV-1 replication in macrophages through modulation of MAPK activity to induce small isoform of C/EBP β . *Proc Natl Acad Sci USA.* 105:12509-14, 2008
- 4) Yamamoto, T and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Prospects for the therapeutic application of lentivirus-mediated gene therapy to HIV-1 infection. *Curr Gene Ther.* 8:1-8, 2008

2. 学会発表

- 1) Yamamoto, T., Iwamoto, N., Yamamoto, H., Tsukamoto, T., Kuwano, T., Takeda, A., Kawada, M., Tsunetsugu-Yokota, Y. and Matano, T.: SIV-specific functional T-cell induction after passive neutralizing antibody immunization postinfection. The 8th Awaji International Forum of Infection and Immunity, September 7-11, 2008
- 2) Terahara, K., Mizukoshi, F., Yamamoto, T., Mitsuki, Y-Y, Tsuchiya, T., Kobayashi, K. and

Tsunetsugu-Yokota, Y.: HIV-1 Nef dysregulates the innate immune function of macrophages, The 8th Awaji International Forum of Infection and Immunity, September 7-11, 2008

- 3) Mitsuki, Y-Y, Yamamoto, T., Tsunetsugu-Yokota, Y.: Selective transmission of R5 HIV-1 over X4 HIV-1 at the dendritic cell? T cell infectious synapse is determined by the T cell activation state. The 9th Seminar in Kumamoto, Kumamoto, September 16-17, 2008
- 4) 山本拓也、光木裕也、水越文徳、寺原和孝、稲垣好雄、山本直樹、横田(恒次)恭子: 樹状細胞の抗原提示に伴う感染シナプス

を介した R5 型 HIV-1 選択的伝播機構の解析。第 56 回ウイルス学会、岡山、平成 20 年 10 月

- 5) 水越文徳、山本拓也、光木裕也、寺原和孝、小林和夫、横田(恒次)恭子: Nef 蛋白質発現に伴うマクロファージの自然免疫機能異常に関する解析。第 22 回日本エイズ学会、大阪、平成 20 年 11 月。

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

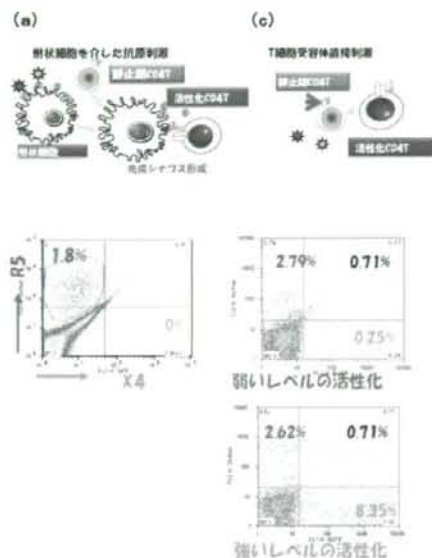


図 1 樹状細胞から静止期記憶 CD4T 細胞への R5 選択的感染伝播

(a) 樹状細胞 (DC) に R5 (DsRed) 型と X4 (GFP) 型 HIV-1 を同量感染させ、洗浄後に PPD 抗原を加えて CD4T 細胞を活性化させる系。(b) 培養後 9 日目に HIV-1 感染 T 細胞を FACScalibur で解析した。(c) 未刺激 CD4T 細胞に R5 (DsRed) 型と X4 (GFP) 型 HIV-1 を同量感染させ、TcR を抗 CD3/CD28 抗体 (弱く 0.5/1.0 あるいは強く 5/10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) でクロスリンクして活性化させる系。(d) IL-2 存在下で 7 日培養し、HIV-1 感染 T 細胞を FACScalibur で解析した。

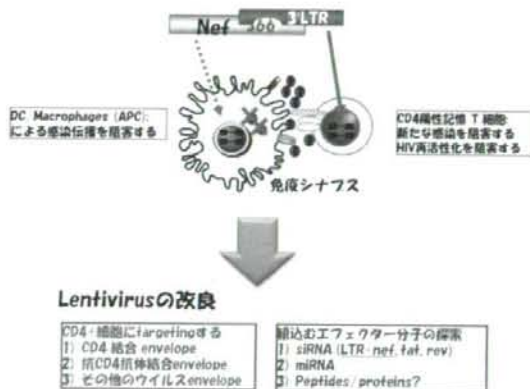


図 2 樹状細胞と CD4 T 細胞の免疫シナプスを介したウイルス伝播の制御に向けて: 今後の方針

DC から CD4T 細胞への HIV 感染伝播は生体内でのウイルス増殖とそれによる免疫不全に深く関わっていると考えられる。我々の開発した Lenti shNef366 レンチウイルスは HIV 増殖阻害効果を有し、慢性感染者の CD4T 細胞機能を改善すること、樹状細胞から CD4T 細胞への HIV 感染伝播を抑制することが明らかとなった。現在更に HIV 増殖阻害レンチウイルスを CD4 陽性の DC と T 細胞に target することが可能な envelope の開発およびレンチウイルスに発現させる小分子や miRNA の探索をすすめている。エイズ発症を阻止するためには、このような戦略にもとづいた治療法やワクチンの開発が必要であろう。

2. 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

研究分担者 田中 勇悦 琉球大学医学部免疫学 教授

研究要旨 機能的ヒト樹状細胞(DC)の分化培養方法を検討する経過で、ヒト単球を IL-4 と IFN-beta で1日培養し、その後 LPS や Poly I:C を加えて培養することにより、計2日間で成熟DCが得られることを見いだした。これらのDCには、CD40、OX40 や CD25 の強い発現が見られた。この培養系に CD40L を添加することによりさらに DC の寿命を長くすることが分かったが、OX40L や IL-2 の添加では特別な効果は見られなかった。これらの DC は IL-12 を産生し、アロ PBMC との混合培養では、IFN-gamma をメインに産生する CD4+T と CD8+T 細胞を分化させた。そこで健康な HIV-1 陰性のドナーから DC を誘導し、同じドナーの PBMC を HLA-class I 拘束性 HIV-1 抗原ペプチドを感作した DC と試験管内で混合培養をすることにより HIV-1 特異的 CTL の誘導を試みた。3人中1人のドナーで HIV-1 env と反応し IFN-gamma を産生する CD8+T 細胞の誘導を確認した。一方、OX40L を用いる R5 HIV-1 の増殖抑制法の研究において、組換え可溶性 OX40L が弱いながらも活性化 PBMC における R5 HIV-1 の感染増殖を抑制した。

A. 研究目的

エイズは HIV がヒトの体内で過度に増殖する病気であり、増殖抑制はエイズ発症阻止につながる。本研究の目的は、樹状細胞(DC)を用いて免疫を調節することにより過度の HIV 増殖を抑制する方法論を確立することであり、特にヒトの機能的 DC の分化培養方法を確立することがテーマである。

本研究を進めるにあたり、考慮すべきことは、HIV 感染前期と感染後期とでは HIV 増殖のメカニズムが異なることであり、免疫でウイルスを封じ込めるにはそれに応じた方策を立てる必要がある。つまり、感染初期において HIV は外来抗原として強く免疫応答を惹起させ、CD4 陽性の T 細胞やマクロファージの活性化に乗じて爆発的に感染を広げ、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最重要と考えられる。一方、感染中期～後期に入ると、HIV が HIV 非感染 CD4 細胞の慢

性的な活性化を引き起こすために、HIV が感染していない CD4+T 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。つまり、この期間では T 細胞の沈静化が求められる。サルエイズウイルス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(パイレミア)が起きても免疫応答は抑制されている。

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。昨年度までの研究では、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の分化誘導法を見出したが、今回はその改良と HIV-1 特異的 CD8+T 細胞の誘導と、OX40L の HIV-1 感染に及ぼす影響をさらに検討した。

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

昨年度の研究では、ヒト単球を IFN-beta と IL-4 存在下で刺激培養し LPS 等で成熟させて得られた DC は、精製したアロ CD8+T 細胞と混合培養すると、一般の方法で調製した DC と比較して著明に CD8+T 細胞の増殖を誘導することを報告した。

今回、DC の成熟法として PGE-2、TNF-alpha や Poly I:C の効果を LPS と比較検討した、IL-12 産生面では LPS が群を抜いて効果的であった。逆に PGE2 は、IL-12 の産生を低下させた。Poly I:C は LPS と比較して IL-12 の産生が低い DC を誘導したが、LPS-DC よりも IL-10 の産生は低かった。Poly I:C は、アジュバントとして実際にヒトに用いられているので安全な DC 成熟因子として用いることができる。LPS-DC と比較すると Poly I:C-DC は HLA-DR と CD86、CD83 の発現がやや高かった。また、両 DC とも OX40 と IL-2R (CD25)を発現したが、それぞれのリガンドの培養系への添加では特に影響は見られなかった。この培養系に CD40L を添

加することにより LPS-DC の寿命を長くすることが分った。

両 DC ともアロ CD8+T 細胞を刺激する活性があることから、今回は、HIV-1 反応性 CD8+T 細胞の誘導を検討した。つまり、3 名の HIV-1 陰性のドナーから Poly I:C-DC を分化誘導し、予め合成した HLA-class I 拘束性 HIV-1 抗原ペプチドを感作させ、同じドナーの PBMC と試験管内で混合培養した。1 週間おきにさらに 2 回の DC 刺激を繰り返した PBMC から HIV-1 特異的 CD8+T 細胞の誘導を試みた。ペプチド抗原刺激後の IFN-gamma 産生を指標にして判定すると、1 名のドナーから env 反応性 CD8+T 細胞の誘導が確認された。しかし、他の 2 名のドナーでは特異的な CD8+T 細胞は誘導されなかった。今後、さらなる DC 培養の工夫が必要と考えられる。

一方、OX40-OX40L の反応が活性化 PBMC における R5-HIV-1 の感染増殖を抑制することを把握しているが、昨年度は、自己細胞に発現させた OX40L が R5 HIV-1 の産生が有意に阻害することを報告した。今回、市販の OX40L の可溶性の標品が活性化 PBMC における R5 HIV-1 の感染増殖をある程度阻止することを見いだした。今後、HIV の抑制を目的とした OX40/OX40L のさらなる研究が必要である。

D. 考察

本年度の研究では、CD8+T 細胞免疫を誘導するより新しい DC の分化培養法を開発した。最終成熟方法として LPS や KLH あるいは不活化 HIV-1 を用いてきたが、今回はすでにヒト応用がなされているアジュバントである Poly I:C が優れた DC 分化誘導因子であることを確認した。特に LPS の場合よりも HLA-DR と CD86 を高く発現させることがユニークであった。Poly I:C-DC は、アロ刺激において CD8+T 細胞と CD4+T 細胞ともに刺激する活性を持ち合わせ、細胞増殖と IFN-gamma 産生を誘導したことから、今後は、Poly I:C-DC を中心に HIV-1 特異的 T 細胞の誘導法の条件を検討したいと考えている。

本研究では、Poly I:C-DC も LPS-DC のように細胞表面に T 細胞の活性化マーカーである OX40 と CD25 を発現することが分かった。こ

これらの抗原の機能は不明であるが、DC自身の活性化あるいは抑制よりも、その後のT細胞との反応になんらかの機能を持つ可能性もあると考えられる。なぜならDC培養系にそれらに対応するリガンドを添加しても顕著な変化が見られなかったからである。

一方、昨年度は可溶性OX40LがR5 HIV-1の増殖抑制がないと報告したが、今回、活性化初期のPBMCにおいて約50%の抑制効果が見られた。X4 HIV-1には効果が無かったことからこれまでに分かっている細胞性OX40Lと同様な抑制様式であった。今後、さらにそ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

Poly I:Cを成熟因子として用いるDCの分化培養法を開発した。このDCはCD8+TとCD4+T細胞を同様に活性化するDCであり、1名のドナーであるがin vitroにおいてHLA class I拘束性HIV-1 env反応性CTLを誘導することが示された。可溶性OX40LはR5 HIV-1の感染増殖抑制活性を有する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kondo K, Okuma K, Tanaka R, Matsuzaki G, Ansari A A, Tanaka Y. Rapid induction of OX40 ligand on primary T cells Activated under DNA-damaging conditions. *Human Immunology* 69:533-42, 2008..
 - 2) Zhang LF, Okuma K, Tanaka R, Kodama A, Kondo K, Ansari AA, 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* 233(6):721-31, 2008.
 - 3) Yoshida T, Kawano Y, Sato K, Ando Y, Aoki J, Miura Y, Komano J, Tanaka Y, Koyanagi Y. A CD63 mutant inhibits T-cell tropic HIV-1 entry by disrupting CXCR4 Trafficking to the plasma membrane. *Traffic* 9(4):540-58, 2008.
- ##### 2. 学会発表
- 1) 村上 勉, 大隈 和, 田中礼子, 濱武牧子, 駒野 淳, 田中勇悦, 山本直樹. KRH-3955:新規CXCR4アンタゴニストは経口投与可能な高活性抗HIV-1剤である. 第56回日本ウイルス学会学術集会プログラム・抄録, 2008.10.26-28:岡山.218.
 - 2) 小柳義夫, Chuanyi Nie, 佐藤 佳, 三沢尚子, 田中勇悦, 伊藤 守. 生体内における主要なHIV-1持続産生細胞はエフェクターメモリーCD4陰性T細胞である. 第56回日本ウイルス学会学術集会プログラム・抄録集, 2008.10.26-28:岡山.251.
 - 3) 神山陽香, 吉居廣朗, 田中勇悦, 佐藤裕徳, 山本直樹, 久保嘉直. X4-tropic HIV感染におけるCXCR4のラフト局在の重要性. 第56回日本ウイルス学会学術集会プログラム・抄録集, 2008.10.26-28:岡山.323.
 - 4) 吉居廣朗, 神谷陽香, 佐藤裕徳, 田中勇悦, 山本直樹, 久保嘉直. カテプシン群蛋白質分解酵素のCD4非依存性HIV-1感染における役割. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2008.11.26-28:大阪.401(179).
 - 5) 村上 努, 大隈 和, 田中礼子, 仲宗根正, 濱武牧子, 駒野 淳, 谷中幹郎, 田中勇悦, 山本直樹. KRH-3955は経口投与可能な高活性抗X4 HIV-1阻害剤である. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2008.11.26-28:大阪.403(181).
 - 6) 佐藤 佳, Chuanyi Nie, 三沢尚子, 田中勇悦, 伊藤 守, 小柳義夫. ヒト化マウスにおけるHIV-1の感染指向性と持続産生細胞の同定. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2008.11.26-28:大阪.430(208).
 - 7) 田中礼子, 山本直樹, 田中勇悦. 常温保存可能な第5世代HIV血液検査ELISAキットの開発. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2008.11.26-28:大阪.454(232).

- 8) 篠田康彦, 鈴木陽一, 田中勇悦, 小柳義夫. インターフェロンオメガ 1 による HIV-1 感染抑制機構の解析. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2008.11.26-28: 大阪.474 (252) .
- 9) 児玉 晃, 田中礼子, 田中勇悦. HIV-1 による単球の樹状細胞への分化阻害における血小板 CD40L の関与. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2008.11.26-28:大阪.475 (253) .
- 10) 高橋良明, 村上 努, 駒野 淳, 吉田篤司, 田中礼子, 山本直樹, 田中勇悦. 宿主由来タンパク OX40L, OX40 の HIV-1 感染に与える影響. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2008.11.26-28:大阪.505 (283) .
- 11) 大隈 和, 田中礼子, 田中勇悦. R5 HIV-1 感染細胞を標的とし感染を制御する組換えウイルス VSV. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2008.11.26-28:大阪.540 (318) .
- 12) Kondo K, Matsuzaki G, TANAKA R, TANAKA Y. ヒト細胞上の OX40L 発現調節 / Regulation of OX40L expression on human T cells. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会記録, 2008 12.1-3:京都.169

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

3. 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

研究分担者 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 (元・近畿大学医学部 助教、
現・キャノン財団ヨーロッパ フェロー)
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)
博多 義之 (近畿大学医学部 助教)

研究要旨 ウイルス感染に自然抵抗性を示す個体群の遺伝要因を明らかにすることは、有効な感染防御法および治療法開発の早道である。特定の HIV-1 感染者と継続的に非防御的な性的接触を繰り返していながら、HIV-1 ゲノムも血清抗 HIV-1 抗体も検出されない HIV-1 曝露非感染者は、HIV-1 感染に対する免疫学的抵抗性を自然に獲得した例と考えられる。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 染色体上にマッピングし、これと相同なヒト遺伝子が HIV-1 曝露非感染者における抵抗性要因となっている可能性を追求してきた。その結果、今年度までの研究でマウス *Rfv3* 遺伝子の実体を *APOBEC3* 遺伝子多型として同定すると共に、*Rfv3* 遺伝子マッピング領域とシンテニーのあるヒト第 22 染色体領域に HIV-1 曝露非感染者に集積する遺伝子多型を見出すことに成功した。後者の分子実体は、造血・免疫系細胞で発現する small GTPase、*Rac2* をコードする遺伝子の新規イントロン多型であり、HIV-1 曝露非感染者に集積するハプロタイプが、この遺伝子の高発現と CCR5 指向性 HIV-1 の複製抑制に関係していた。*Rac2* 発現制御部位の絞り込みにより、コアとなる多型が明らかになり、これに結合する転写制御因子を同定することにより、*Rac2* 発現誘導による HIV-1 感染抵抗性賦与の可能性が示された。また、マウス *APOBEC3* が同種由来レトロウイルスに対して生理的な感染抵抗性因子として機能することを明確に示し、レトロウイルス複製抑制機能に重要なアミノ酸残基を、デアミナーゼドメインより上流の N-末端領域に絞り込んだ。

A. 研究目的

有効な HIV 感染防御法および治療法を開発するには、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 感染の成立後に初期のウイルス複製を制御する因子として宿主 MHC 遺伝子多型の重要性が明らかにされる一方で、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、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: ESN) の多くは、CCR5 発現欠損ではその感染抵抗性を説明できない。

我々はマウスレトロウイルス感染時に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

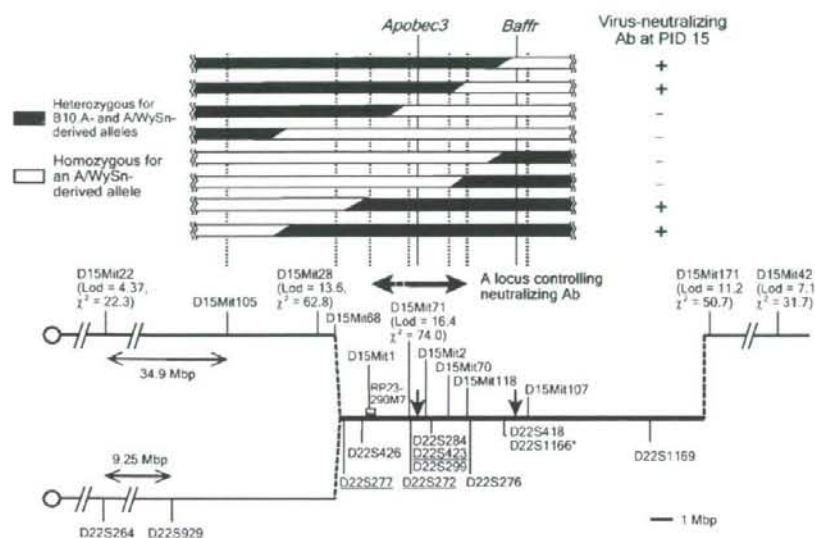


図1. レトロウイルス中和抗体産生制御遺伝子 *Rfv3* の染色体マッピング 上段は退交配マウスを用いた第15染色体マーカー遺伝子型と中和抗体価の連鎖解析の結果。 *Rfv3* 遺伝子座マッピング領域の中央に *APOBEC3* 遺伝子座がある。Miyazawa, M., et al. *Vaccine* 26: 2981-2996, 2008 より引用。

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 *Rfv3* の実体は *APOBEC3* 遺伝子多型である可能性が高いこと、ヒト第22染色体の *Rfv3* マップ部位相同領域に ESN 個体に集積する遺伝子多型が存在することを見出し、ESN 個体末梢血単核球を HIV 抗原で刺激後に発現が上昇する遺伝子の検索と候補領域塩基配列多型の頻度比較によって、ESN 群に集積する *Rac2* 遺伝子座の新規イントロン多型が、この遺伝子の高発現と CCR5 指向性 HIV-1 の複製抑制に結び付くことを明らかにした。

本年度は、我々の発見を HIV-1 感染防御に関わる宿主応答の増強法に結びつけることを目指して、*Rac2* 遺伝子座イントロン多型の機能部位を絞り込むとともに、マウス *APOBEC3* 遺伝子多型について、抵抗性アレルの産物が高機能である理由をアミノ酸レベルまで絞り込むことを目的とした。

B. 研究方法

1) マウス *APOBEC3* の機能差を規定する多型領域の解析

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を阻害するシチジンデアミナーゼ *APOBEC3* の構造遺伝子が存在する (図 1)。我々はフレンド白血病レトロウイルス感染後早期にウイル

ス中和抗体を産生する C57BL/6 系のマウスでは *APOBEC3* の発現量が高く、中和抗体産生能を欠く BALB/c および A 系統のマウスでは *APOBEC3* の発現量が低いことを見出していた (Miyazawa, M., et al. *Vaccine* 26: 2981-2996, 2008)。今年度は Northern blot 法および real-time PCR 法を用いて、系統間における *APOBEC3* 発現量の差を確認した。

そこで、*APOBEC3* 遺伝子の多型によりマウスレトロウイルス複製抑制能に差が生じる可能性を追求するため、*APOBEC3* 発現が極めて低い BALB-3T3 細胞株を基盤に *APOBEC3* 遺伝子座の各アレルに由来する cDNA 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を感染させて、上清中に得られたウイルスの複製能を *Mus dunni* 細胞での免疫染色による focus assay (Robertson, M. N., M. Miyazawa, et al. *J. Virol. Methods* 34:255-271, 1991) により定量した。更に、同じ実験系を用いてウイルス産生細胞上清中から精製したレトロウイルス粒子中の *APOBEC3* タンパク質を Western blot 法で検出し、粒子内への *APOBEC3* タンパク質取り込みを検討した。

また、系統間の *APOBEC3* 分子アミノ酸配列多型がその機能に与える影響を検討するため、C57BL/6 由来、および BALB/c 由来 *APOBEC3* cDNA 間でキメラ遺伝子を作製し、これを恒常的に発現する遺伝子導入細胞を用いて産生ウ