

ウイルス粒子の感染価を定量した。また、両アレル間で多型を認めるアミノ酸配列から機能的に重要な部位を特定するため、site-directed mutagenesis により一残基置換を導入した変異 APOBEC3 cDNA を構築し、これを発現する細胞株を樹立した。

## 2) HIV-1 複製抑制に関わる Rac2 遺伝子多型の機能解析

昨年度までに HIV-1 曝露非感染者の末梢血単核球を HIV 抗原で刺激した際に発現上昇が認められる遺伝子として Rac2 が見出されていた。そこでこの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し、haplotype trend regression 法によって群間のハプロタイプ頻度を統計的に比較した。

ゲノム塩基配列解析の結果、Rac2 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ので、この領域の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上流に群間多型の認められない Rac2 遺伝子コアプロモーター領域を組み込み、下流に群間多型のあるイントロン領域を組換えて、Amara 法によりヒト細胞株に移入、ルシフェラーゼ発現を蛍光法により定量した。更に、曝露非感染者に集積するハプロタイプ型と HIV-1 感染者でより頻度の高いハプロタイプ型の間で塩基配列の異なる部分について、site directed mutagenesis により互いの塩基配列を置換し、変異型のイントロン領域を上記ルシフェラーゼ発現ベクターに組み込むことによって機能領域を絞り込むことを試みた。

### (倫理面への配慮)

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（「新型チップ等を用いた第 22 染色体新規 SNPs 多型の網羅的解析による HIV 感染防御ワクチン及び抗 HIV 治療薬の効果判定改善と新しい免疫治療法の開発」、平成 20 年 5 月 30 日承認、19-61）。

## C. 研究結果

### 1) マウス APOBEC3 分子の同種由来レトロウイルス複製抑制効果とそのアレル差

フレンド白血病ウイルス感染に抵抗性で、感染後 2 週間以内に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 マウスの間には APOBEC3 遺伝子の多型があり、同じく感染感受性の高い BALB/c マウスは A/WySn マウスと APOBEC3 遺伝子の塩基配列が完全に一致した。これら APOBEC3 の二つのアレルの間では遺伝子発現量及び転写産物のスプライシングパターンに差があり、B6/B10 由来アレルからは exon 5 を欠く Δ5 型の転写産物が大量に発現する一方、A/WySn 及び BALB/c に共通するアレルからは全長型の転写産物が低いレベルで発現していた (図 2 A~C)。B6/B10 における APOBEC3 発現量と A/WySn 及び BALB/c における同一遺伝子の発現量には、約 5 倍の差があった (図 2 B)。

両アレルの機能差を検定するため、B6 由来の Δ5 型 APOBEC3 cDNA を恒常的に発現する細胞株、BALB/c マウスで主に発現する APOBEC3 全長型アイソフォーム及び Δ5 型アイソフォームの cDNA を恒常的に発現する細胞株をそれぞれ複数、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樹立した (図 2 D)。これらの細胞株にフレンド白血病ウイルスの感染性分子クローン 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、同等量のウイルス抗原が発現すると共に、培養上清中にはほぼ同等の感染価でウイル

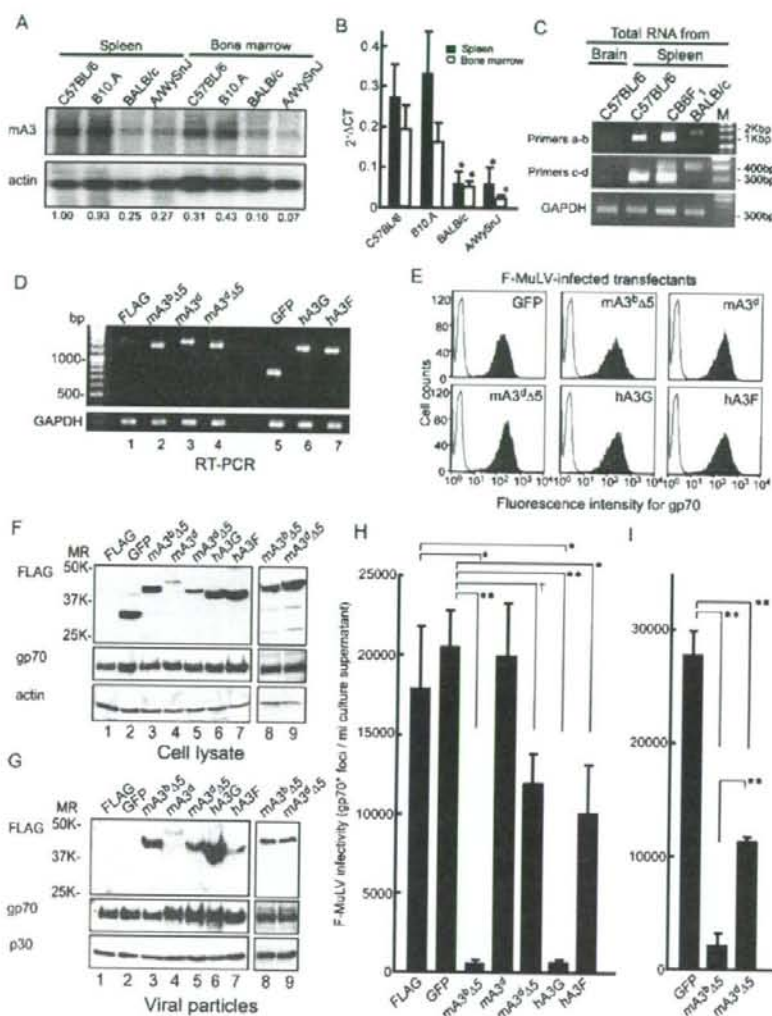


図2. マウス *APOBEC3* 遺伝子多型とマウスレトロウイルス複製抑制効果. A. Northern blot 法による *APOBEC3* 遺伝子発現の検出。最下段の数値は  $\beta$ -アクトン発現量との比率を画像解析により求めたもの。B. real-time PCR による *APOBEC3* 遺伝子発現量の系統間比較。C. RT-PCR による *APOBEC3* cDNA の検出。Primers a-b は exon 1 から exon 8 を、Primers c-d は exon 4 から exon 6 の半ばまでを増幅したもの。D. 遺伝子導入により樹立した細胞株における *APOBEC3* 遺伝子発現の検出。E. *APOBEC3* cDNA 恒常発現細胞株にフレンド白血病ウイルス (F-MuLV) 分子クローンを感染させた際の細胞表面における *env* 遺伝子産物発現量の比較。F. F-MuLV を感染させた *APOBEC3* cDNA 恒常発現細胞株における *APOBEC3* タンパク質の検出。*APOBEC3* 分子は発現ベクター構築時に導入した C-末端の FLAG に対する抗体で検出し、ウイルス構造タンパク質は F-MuLV *env* 遺伝子産物 gp70 に対する抗体で検出した。細胞タンパク質の対照としてはアクトンを用いた。G. F-MuLV を感染させた *APOBEC3* cDNA 恒常発現細胞株の培養上清中に芽生したウイルス粒子中の *APOBEC3* 分子の検出。上清中のウイルス粒子を濃縮し、構造タンパク質として *env* 遺伝子産物 gp70 と、*gag* 遺伝子産物 p30 を、それぞれに対する特異抗体で検出した。*APOBEC3* タンパク質の存在は、FLAG に対する抗体で検出した。H. および I. F-MuLV に感染した *APOBEC3* cDNA 恒常発現細胞株培養上清中のウイルス粒子の感染能。上清中のウイルス粒子を *Mus dunni* 細胞に感染させ、ウイルス感染細胞のフォーカス数を *env* 遺伝子産物 gp70 に対する抗体で染色することにより定量した。

ス粒子が産生された (図2 E~G)。

各細胞株の上清から精製したウイルス粒子について Western blot 法により *APOBEC3* 取り

込みの有無を検したところ、 $\Delta 5$  型の *APOBEC3* アイソフォームはアリルによらずウイルス粒子中に取り込まれていたが、全長型の

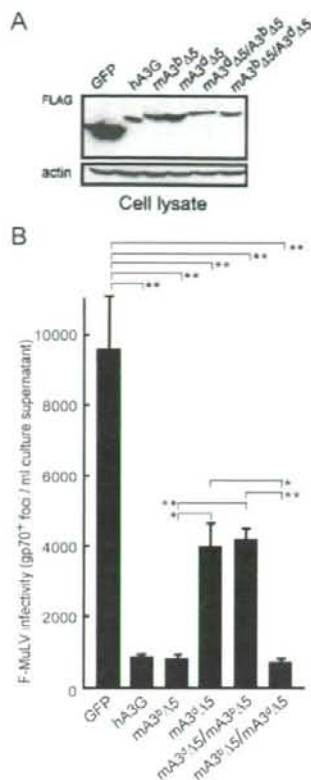


図3. マウス APOBEC3 アリル間キメラ分子の発現とレトロウイルス複製抑制活性の比較

マウス APOBEC3 はタンパク質発現量が低く、粒子への取り込みも少なかった (図2 G)。そこで、APOBEC3 cDNA 恒常発現細胞から産生されたウイルス粒子を *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ところ、B6 マウスで発現する  $\Delta 5$  型 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 APOBEC3 を含まない対照ウイルスの 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 マウス由来アリの発現産物は、全長型及び  $\Delta 5$  型アイソフォーム共に、レトロウイルス複製抑制活性が B6 由来  $\Delta 5$  型に較べ有意に弱かった (図2 H, I)。

## 2) レトロウイルス複製抑制に重要なマウス APOBEC3 分子の機能部位の解析

マウス APOBEC3 のレトロウイルス複製抑制活性にアリル間の差があることがわかったので、これを利用して機能部位を絞り込むため、複製抑制活性の強い B6 由来  $\Delta 5$  型アイソフォームの cDNA (mA3<sup>b</sup> $\Delta 5$ ) と、活性の弱い BALB/c 由来  $\Delta 5$  型アイソフォームの cDNA (mA3<sup>d</sup> $\Delta 5$ ) との間でキメラを作製した。その結果、B6 アリル由来の配列を N-末端側半分を持つ場合に、レトロウイルス複製抑制効果が強いことがわかった (図3)。

そこで、シチジンデアミナーゼ活性ドメイン CDD1 を含む N-末端側について、B6 アリルの産物と BALB/c アリルの産物間でアミノ酸配列の異なる部分を site-directed mutagenesis により一残基ずつ置換した。その結果、CDD1 よりも更に N-末端側の G<sup>34</sup> を BALB/c アリル型の R に置換した場合、及び K<sup>37</sup> と G<sup>38</sup> の組を I<sup>37</sup> と

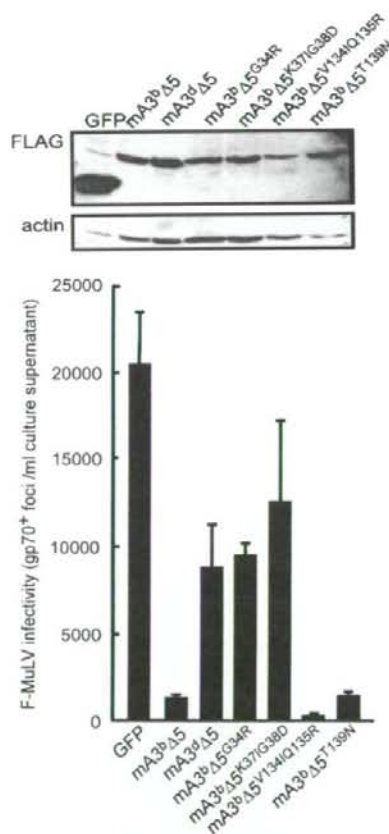


図4. B6 型アリの発現産物 mA3<sup>b</sup> $\Delta 5$  に BALB/c 型アリルに見られるアミノ酸を導入した場合のレトロウイルス複製抑制活性の変化

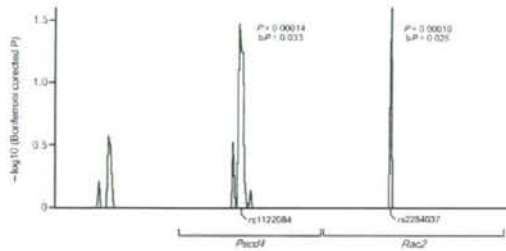


図5. Haplotype trend regression 法によるハプロタイプ頻度の群間比較 ESN 及び HIV-1 感染個体群の *Rac2* 領域ゲノム塩基配列を決定し、見出された SNPs の遺伝子型について連続する 7 座位から成るハプロタイプの頻度を群間で比較した。比較したハプロタイプの数により多重比較に対する補正を行ったところ、*Rac2* のイントロン領域に有意差のあるハプロタイプが見出された。

D<sup>38</sup> に置換した場合に、mA3<sup>b</sup>Δ5 産物の高いレトロウイルス複製抑制活性が失われることが明らかとなった (図4)。一方、CDD1 の内部に存在する多型である V<sup>134</sup>、Q<sup>135</sup> の組を I<sup>134</sup>、R<sup>135</sup> に置換しても、同様に T<sup>139</sup> を N<sup>139</sup> に置換しても、レトロウイルス複製抑制効果には変化がなかった。

### 3) HIV-1 感染抵抗性遺伝子 *Rac2* イントロン多型の機能部位解析

昨年度までに HIV-1 曝露非感染者の末梢血で HIV 抗原刺激後に発現が上昇する遺伝子として見出した *Rac2* は、そのイントロン領域に曝露非感染者群と HIV 感染者群でアレル頻度が異なる多数の塩基配列多型が集積していた。そこで、HIV-1 感染状態が不一致である ESN 個体とその感染パートナーの組について、それぞれのゲノム塩基配列を決定し、多型座位の遺伝子型頻度を統計的に解析した。近接する多型座位間には明らかなハプロタイプ形成が認められたので、多型座位間の連鎖を考慮して haplotype trend regression 法により多重比較の補正を行ったところ、*Rac2* のイントロン領域に Bonferroni 補正後も  $P = 0.025$  の有意な頻度差を認めるハプロタイプを発見した (図5)。そこで、このハプロタイプ領域に絞って更に多数例で遺伝子型の解析を行った結果、ESN 83 例、HIV-1 感染者 120 例による解析で  $P = 0.011$ 、Odds ratio = 2.74 (95% CI 1.22 ~ 6.14) をもって、イントロンハプロタイプ TTT が曝露非感染者に集積することを確認した。

曝露非感染者に集積するこのイントロンハプロタイプが、この遺伝子の機能と関係するかどうかを調べるため、多型のない *Rac2* コアプロモーターと共に多型部位イントロンのゲノム DNA 断片を挿入したルシフェラーゼ発現ベクターを構築し、Jurkat ヒト T 細胞株に導入、発現した酵素活性を定量した。その結果、曝露

非感染者に集積するハプロタイプ TTT を挿入した場合、HIV 感染者に集積するハプロタイプ CCC 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6)。

そこでこれら多型部位 SNPs についてそれぞれ単独で変異導入を行ったところ、最も上流側の SNP を HIV 感染者に有意に多い C から曝露非感染者に集積する T へと置換した場合、遺伝子発現の上昇が起こることが明らかとなった。

## D. 考察

### 1) 研究結果の考察

我々はこれまで、マウスレ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 染色体上にマッピングし、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阻害するシチジンデアミナーゼ APOBEC3 の遺伝子に系統間多型があり、その遺伝子発現量とアイソフォームの発現パターンが、レトロウイルス中和抗体早期産生性の B6/B10 系マウスと、中和抗体産生能を欠く A/WySn マウスとで異なることを見出した (図2)。そこで、*APOBEC3* 遺伝子各アレルの cDNA 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* 発現産物のうち、B6 マウスで選択的に高発現している exon 5 欠損型アイソフォームが、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。一方、マウスレトロウイルスに対する感染感受性が高い A/WySn 及び BALB/c マウスで発現している *APOBEC3* は、その発現量が B6/B10 マウスのそれと較べて低くだけでなく、全長型のアイソフォームも exon 5 欠損型も、レトロウイルス複製抑制効果が低いことが明らかとなった (図2)。

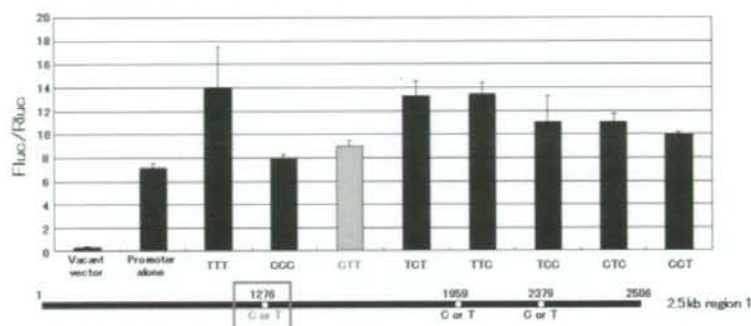


図6. ルシフェラーゼ発現ベクターによる *Rac2* インtron多型領域の機能解析。曝露非感染者に集積する TTT ハプロタイプは、HIV 感染者に集積する GGC ハプロタイプより強く遺伝子発現を誘導する。最上流の多型が T である場合に遺伝子発現が強い。

これまで、APOBEC3 タンパク質は、それら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来た。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。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、ガンマレトロウイルス群に対する世界で初めての報告である。

我々の発見と時を同じくして、米国 Gladstone Institute の Warner Greene らが、NIH, NIAID の Kim Hasenkrug らと共同で、マウス APOBEC3 がレトロウイルス中和抗体産生制御遺伝子 *Rfv3* の実体であるとの論文を発表した (Santiago, M. L. *et al. Science* 321: 1343-1346, 2008)。Greene らも我々と同じくマウス APOBEC3 遺伝子座に系統間の多型があることを記載しているが、彼らの発表によれば B6/B10 系のアイルと BALB/c 系のアイルで発現量に差はなく、BALB/c 系統でのみ exon 2 を欠くトランスクリプト ( $\Delta 2$ ) が大量に発現していることが、後者における APOBEC3 機能不全の主要な原因であるという。

我々の実験では BALB/c マウスで発現する APOBEC3 遺伝子転写産物は全長型が主体でごく少量の  $\Delta 5$  を伴っており、 $\Delta 2$  に相当する転写産物は明瞭には検出できていない。この点を検討するため exon 2 を挟むプライマーを用いて RT-PCR 反応を行ったところ、確かに BALB/c マウスで  $\Delta 2$  に相当する転写産物が検出されたが、その発現量はきわめて僅かであった (図7)。また、異なる方法で繰り返した実

験で、B6/B10 系の APOBEC3 遺伝子発現は常に BALB/c や A/WySn のそれと較べて5倍程度高かった。同様の結果は米国ペンシルバニア大学の Susan Ross らも観察しており (私信)、Greene らの報告には誤りがあると思われる。我々は更に進んでレトロウイルス複製抑制活性が強い B6/B10 型の APOBEC3 と、これが弱い BALB/c 型 APOBEC3 の機能差の原因となるアミノ酸残基を、N-末端側の G<sup>34</sup>, K<sup>37</sup>, G<sup>38</sup> に絞り込んだ (図4)。高折らはマウス APOBEC3 と相同なヒト APOBEC3G について詳細な機能解析を行い、同じく N-末端領域の RRNT 配列がタンパク質リン酸化の標的となること、この部のリン酸化の有無が HIV-1 Vif タンパク質との相互作用に重要であることを示している (Shirakawa, K. *et al. Nat. Struct. Mol. Biol.* 15:1184-1191, 2008)。我々が多型の機能差を証

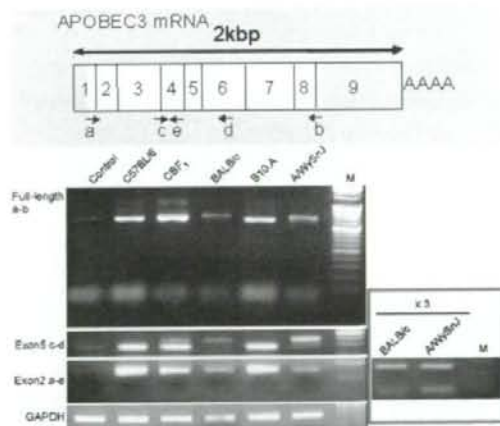


図7. APOBEC3 遺伝子転写産物の解析。exon 2 を欠く転写産物の有無を検討するため、新たに a-e で示すプライマーの組による反応を行った。a-b は全長型、c-d は exon 5 欠損型を検出するプライマーセット。赤線で囲んだゲルでは、微量な PCR 産物を検出するため3倍量の検体を用いた。

明した K<sup>37</sup>, G<sup>38</sup> のすぐ下流には、スレオニンリン酸化の標的配列となりうる RKDT モチーフが存在するが、今のところこの部位にリン酸化が起こるといふ証拠はない。但し、ヒト APOBEC3G でリン酸化される T から 8 残基上流の R<sup>24</sup> が N-末端ループの表面に露出し、分子機能に重要な役割を果たすことを、上記論文で高折らには指摘しており、我々が多型による機能差を証明した G<sup>34</sup>/R<sup>34</sup> は、まさに RKDT 配列中の T から 8 残基上流に相当する。

今後マウス APOBEC3 分子 N-末端部の機能性アミノ酸残基が、この分子によるレトロウイルス複製抑制にどのような役割を果たすかを明らかにすることにより、元々 Vif を発現する野生型 HIV-1 に対しても複製抑制活性を持つマウスの APOBEC3 を、抗 HIV-1 活性を持つ薬物の開発へと結びつけられる可能性がある。

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 2 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 *Rac2* 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。*Rac2* イントロンのハプロタイプ TTT が曝露非感染者に有意に集積しており (図 5)、ハプロタイプ TTT は遺伝子発現を強く誘導する活性を示す (図 6)。また、この領域にハプロタイプ TTT を持つ未感染健康者の末梢血では、CCR5 指向性 HIV-1 の複製が強く抑制されることを昨年度までに示している。

高機能性の TTT ハプロタイプのうち、遺伝子発現誘導機能に重要な役割を果たす多型座位は最も上流の T であり、この多型座位を HIV-1 感染者に多い C に置換すると、遺伝子発現は弱くなった (図 6)。この T/C 多型存在部位を含む領域の塩基配列モチーフを調べると、この多型が T である場合にのみ転写制御因子 GATA2 の結合モチーフに一致した。また、このイントロンハプロタイプを導入した場合に遺伝子発現調節機能が明瞭に認められる細胞株とそうでない細胞株の間で、GATA2 発現量が異なることがわかっており、現在核抽出物の pull-down 法を用いて、この T/C 多型を含む機能部位ゲノム DNA への GATA2 結合の有無を直接検証中である。

2) 達成度と学術的・国際的・社会的意義についてについて

HIV-1 曝露非感染者の原因遺伝子を明らかにし、これを HIV-1 感染防御法に応用する方策を探るといふ当初の目標は、曝露非感染者に有意に集積し、遺伝子高発現と CCR5 指向性 HIV-1 の複製抑制に働く *Rac2* 遺伝子の機能的イントロン多型を発見することによってかなりの程度達成することができた。既に国内の複数グループとの共同研究により、*Rac2* の高発現が確かに HIV-1 複製抑制に結び付くことが確認されている。今年度我々は、*Rac2* イントロンの遺伝子発現調節部位を塩基配列レベルで絞り込み、曝露非感染者に集積するハプロタイプのうち上流域に存在する T/C SNP が機能的に最も重要であることを明らかにした。この部に結合する転写制御因子も明らかになりつつあり、今後この転写制御因子及びその標的配列を用いて *Rac2* 高発現を誘導し、もって HIV-1 複製抑制を誘導する薬物の開発に結びつけていくことができるものと考えている。

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、昨年度までに我々が、マウス APOBEC3 によるマウスレトロウイルス複製抑制と、そのアリル差を見出した意義は大きかった。即ち、マウス APOBEC3 は Vif を発現する野生型 HIV-1 の複製を抑制できるので、マウスレトロウイルスの複製を強く抑制する APOBEC3 アイソフォームと、その活性が弱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 またはその機能的ホモログ分子を設計する可能性が拓かれたと言える。実際、我々の研究は国際的に注目され、*J. Virol.* に発表された論文は、掲載号の JVI Spotlight に採り上げられ (*J. Virol.* 82: 10963, 2008)、International AIDS Vaccine Initiative のニュースレターでも大きく紹介された (Research Brief. *LAVI REPORT 12(5)*)。

今年度我々は、マウス APOBEC3 の系統間多型を基に、レトロウイルス複製抑制効果に重要なアミノ酸残基をその N-末端配列中に同定した (図 4)。マウス APOBEC3 によるレトロウイルス複製阻害がシチジンデアミナーゼ活性に依存しないことは既に明らかにしているが、

今回見出した機能的アミノ酸残基はデアミナーゼ活性ドメインよりも N-末端側に存在し、酵素機能には直接関与しないと考えられる。今後、これら N-末端側アミノ酸残基の機能、特に標的となるウイルス或いは宿主側タンパク質を解明することにより、新たな HIV-1 複製抑制薬の開発へと結びつけて行けるものと考えられる。

#### E. 結論

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。HIV-1 複製抑制に関係する高発現型ハプロタイプで、機能的に特に重要なのは最も上流の T/C 多型であり、この部に結合する転写制御因子が感染抵抗性を左右する可能性がある。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、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強く抑制出来ることを示した。アレル間の機能比較により、レトロウイルス複製抑制活性に重要なアミノ酸残基を N-末端側ループ内に同定した。マウス APOBEC3 は野生型 HIV-1 の複製を抑制できるので、この部に結合するウイルスまたは宿主側タンパク質を明らかにすることにより、新たな HIV-1 複製抑制薬の開発に結びつけられる可能性がある。

#### F. 健康危険情報

該当するもの無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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) Miyazawa, M., S. Tsuji-Kawahara, and Y. Kanari. Host genetic factors that control immune responses to retrovirus infections. *Vaccine* 26: 2981-2996, 2008.
- 4) 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.
- 5) 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

- 1) Kanari, Y., M. Miyazawa, S. Irie, and M. Clerici, inventors. Method for diagnosis and induction of resistance to virus. Amendment for PCT/JP2007/068591, filed September 10, 2008. (国際特許 優先権主張修正申請)

## 4. 生体分子を介する HIV-1 感染抵抗性

研究分担者 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** T細胞応答の誘導を目標としたワクチンでは、HIV-1 感染防御が不完全である。その一方で、遺伝素因に依らない HIV-1 感染抵抗性を持つ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ることから自然免疫が関与するのではないかと考えた。本研究は、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。昨年度までに、我々は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 細胞株を用いて恒常的に HIV-1 と Luciferase を発現する細胞株を樹立した。これを用いて、自然免疫細胞の活性化に重要な役割を担う Toll-like receptor (TLR) 刺激による影響を調べたところ、TLR3 および TLR4 リガンドによる刺激が HIV-1 転写を抑制することが分かった。TLR2 刺激ではむしろ HIV-1 転写の増強が認められた。中和抗体を用いた検討の結果、TLR 刺激による HIV-1 転写の抑制はインターフェロン $\beta$ を部分的に介すると考えられた。同様の抑制効果を誘導する手段の一つとして種々の共生微生物の影響を検討したところ、HIV-1 転写は Escherichia coli の添加により有意に抑制されたが、Lactobacillus の添加では効果がなかった。その他の共生菌の中にも抑制活性を示すものがあった。以上から、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 感染抑制効果があり、共生微生物の応用はこのような効果を誘導する戦略の一つと考えられた。

### A. 研究目的

T細胞応答の誘導を目標としたワクチンでは、HIV-1 感染防御が不完全である一方で、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。我々は、このような HIV-1 感染抵抗性が自然免疫を介すると考え、HIV-1 感染防御の達成を目指し、自然免疫による HIV-1 防御の誘導方法を開発することを目的とした。昨年度までに、いくつかの Toll-like receptor (TLR) の刺激により HIV-1 複製が抑制されることを明らかにした。本年度は、これらの効果を検証するとともに、同様の効果を誘導する手段の一つとして、種々の共生微生物の HIV-1 複製への影響を検討した。

### B. 研究方法

#### 1) 標的マクロファージの調整

単球系 THP-1 細胞に恒常的に HIV-1 NL43/Luc  $\Delta$  env reporter gene を発現する THP-1/NL43luc 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。

#### 2) TLR リガンドおよび中和抗体

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: lipopolysaccharide (LPS) (Sigma), TLR5 リガンド: Flagellin, TLR7/8 リガンド R837、R848, TLR9 リガンド: 非メチル化 CpG DNA (Invivogen) を培養中に添加した。さらにヒトインターフェロン $\alpha$ ,  $\beta$  中和抗体 (SIGMA) の効果を検討した。



### 3) 共生微生物の調整

Lactobacillus, Prevotella, Neisseria, Mycobacterium, Escherichia 等の共生細菌株は、GAM, EG, Middle Brook, LB 培地を用いて調整した。

### 4) HIV-1 複製抑制の検定

THP-1/NL43luc の HIV-1 複製は、種々の刺激を加え培養後 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) TLR 刺激による HIV-1 抑制効果への I 型 IFN の関与

THP-1/NL43luc 細胞に種々の TLR リガンドを加えたところ、TLR3 リガンドおよび TLR4 リガンドは、有意に HIV-1 転写を抑制した。TLR2 刺激では HIV-1 転写の軽度の増強、TLR5 刺激では変化は認められなかった。TLR4 刺激による HIV-1 転写抑制は、抗ヒトインターフェロンβ中和抗体により部分的に阻害された。TLR3 刺激による HIV-1 転写抑制への影響は軽微であった。

### 2) 共生微生物の HIV-1 産生に対する影響

THP-1/NL43luc 細胞における HIV-1 転写は、Escherichia, Neisseria の添加により有意に減少したが、Lactobacillus, Prevotella, Mycobacterium の添加では変化は認められなかった。

## D. 考察

検出系として用いた THP-1/NL43luc 細胞では、マクロファージにおける HIV-1 複製の転写レベルの検定が可能であり、ケモカインの誘導による HIV-1 侵入抑制は反映しない。TLR3, TLR4 刺激はともに HIV-1 転写を抑制し、この抑制は部分的にインターフェロンβの効果を紹介すると考えられた。

TLR2 刺激ではむしろ HIV-1 転写が増強した。インターフェロン活性化を伴わない TLR 刺激によるシグナルは NF-κB 活性を介して HIV-1 LTR を活性化すると考えられる。

共生菌は非病原性であっても恒常的に TLR 刺激を入れることが知られている。HIV-1 転写

抑制効果は、グラム陰性菌の代表である Escherichia coli では認められ、グラム陽性の Lactobacillus では影響が認められなかったことから、菌体表面の LPS による効果と考えられる。しかし、グラム陰性であっても抑制活性が強いとは限らず、複数の TLR その他の刺激による抑制効果と刺激効果の総和が反映されるものと考えられる。今後、より抑制活性の高い菌株を検索する価値があると思われる。

自然免疫は感染初期のウイルス増殖拡大を制限できる可能性がある。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 感染抑制効果があり、共生微生物の応用はこのような効果を誘導する戦略の一つと考えられた。

## E. 結論

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を部分的に介して HIV-1 複製が抑制された。また、共生菌の中に類似の効果を示すものがあり、HIV-1 感染抵抗性の宿主環境形成への応用が示唆される。

Effect of TLR-ligands on THP-1/NL-Luc

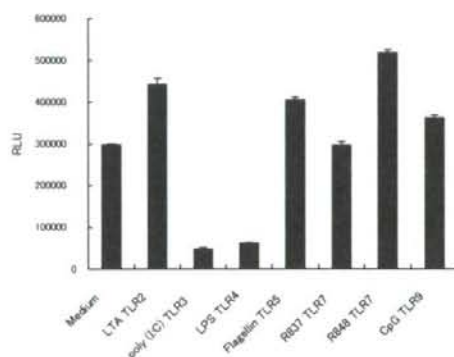


図1. HIV-1 転写に対する種々の TLR リガンドの影響。  
THP-1/NL43-luc 細胞をマクロファージ様に分化させた後、種々の TLR リガンドを添加し 24 時間後の Luciferase 活性を測定した

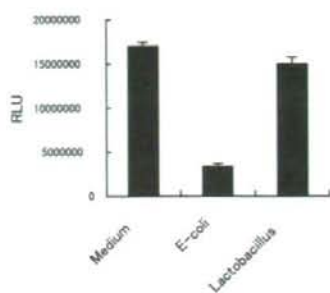


図2. HIV-1 転写に対する共生菌の影響。  
THP-1/NL43-luc 細胞をマクロファージ様  
に分化させた後、種々の共生菌の死菌を添  
加し24時間後の Luciferase 活性を測定し  
た。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Saeng-Aroon S, Yoshida LM, Ariyoshi K, Taguchi M, Pathipvanich P, Rojanawiwat A, Matsuda M, Kannagi M, Sawanpanyalert P, Sugiura W, Auwanit W. An efficient tool for surveying CRF01\_AE HIV type 1 resistance in Thailand to combined stavudine-lamivudine-nevirapine treatment: mutagenically separated PCR targeting M184I/V.AIDS Res Hum Retroviruses. 2007 Dec;23(12):1461-8.

#### 2. 学会発表

- 1) 林隆也、古川裕之、西辻裕紀、長谷川温彦、増田貴夫、神奈木真理. DAI(ZBP1/DLM1) が HIV-1 感染に与える影響. 第 56 回ウイルス学会学術集会、H20. 10. 26-28、岡山
- 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) 林隆也、古川裕之、西辻裕紀、長谷川温彦、増田貴夫、神奈木真理. HIV-1 感染における dsDNA 認識分子 DAI(ZBP1/DLM1) の影響. 第 22 回日本エイズ学会学術集会、H20. 11. 26-28、大阪
- 4) 西辻裕紀、高津哲、多々良恵美、神奈木真理、増田貴夫. HIV-1 インテグラーゼと宿主因子 Gemin2 との結合は HIV-1 複製に重要である. 第 22 回日本エイズ学会学術集会、H20. 11. 26-28、大阪

#### 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

## 5. 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

研究分担者 有吉 紅也 長崎大学熱帯医学研究所臨床医学分野 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 有効な CTL 誘導型ワクチン開発には CTL エピトープ情報が不可欠である。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、これらアジア流行株に対する CTL エピトープ情報を蓄積し、さらに HIV 感染増殖に対してより抑制効果の強いエピトープについて同定し、アジアにおける CTL 誘導型予防および治療ワクチンの開発に有用な情報を提供することにある。

2003 年 9 月 2 日から 2008 年 9 月 16 日までに北タイランパン病院 HIV 外来を受診した HIV 感染患者数 155 名について、オーバーラッピングペプチドを用いた Elispot 実験を実施した。感染者ひとりあたりの平均 Elispot 実験回数は 4.4 回、117 名 (75.5%) の感染者において最も強く認識するペプチドが 36 箇所同定された: p17 領域 (13 箇所)、p24 領域 (21 箇所)、p2 領域 (1 箇所)、p7 領域 (1 箇所)、p1 領域 (1 箇所)。さらに感染者の HLA アリールとの相関関係からこれらのペプチド認識と有意に相関する HLA アリールを 8 箇所同定することに成功した。興味あることに、この方法によって同定された HLA アリールはすべて B 遺伝子座にあり、いずれも CRF01\_AE の GagCTL エピトープとしては報告されたことのない領域であった。しかし、オーバーラッピングペプチドは 15 アミノ酸領域までの同定に過ぎない。そこで、今年度は MOE を用いた計算化学による最適長 CTL エピトープ推定方法を新たに改良し、その的中率を評価するために Los Alamos Data Base の Best-defined CTL をその領域を 15-mer オーバーラッピングペプチドシーケンスから推定したところ、CTL エピトープ候補 1 位でランク付けされていたものが 25%~67%、3 位以内にランク付けされていたものが 50%~75%、5 位以内にランク付けされていたものが 75%~100%であった。オーバーラッピングペプチドを用いた Elispot 実験と計算化学による最適長 CTL エピトープの推定が可能となれば、CTL エピトープの同定能力が飛躍的に向上することが期待できる。

### 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。これら CTL 免疫反応による HIV 感染予防および 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 class I) 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の情報、すなわち CTL エピトープ情報が不可欠である。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、これらアジア流行株に対する CTL

エピトープ情報を蓄積し、さらに HIV 感染増殖に対してより抑制効果の強いエピトープについて同定し、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情報を提供することにある。

そこで、本分担研究の具体的な研究目的は、A)CTL 誘導型 HIV ワクチン抗原として最も重要視される Gag 領域の CTL エピトープを同定すること； B)北タイ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。平成 19 年度には上記目的 C)の成果を中心に報告した。平成 20 年度は、A)の目的でこれまでに蓄積されたオーバーラッピングペプチドを用いた Elispot 実験による実験結果を報告する。一方で、オーバーラッピングペプチドを用いた CTL エピトープマッピングは、エピトープ領域を 15 アミノ酸領域まで絞ることが出来るが、最適化された CTL エピトープの長さは 8~11 アミノ酸である。目的 A)で得られた情報を、目的 C)の CTL 免疫圧とウイルス進化の相互関係を解明する研究へ活用するためには、最適化された長さの CTL エピトープ領域を同定しなければならない。しかし、15 アミノ酸領域から最適化 CTL エピトープまで Elispot 実験によって同定するには、ひとつのエピトープ領域を最適化するのに 26 種類のペプチドを合成し Elispot 実験しなければならない非常にコストがかかる。そこで、我々は Molecular Operating Environment (MOE)による統合計算化学を用いて、15 アミノ酸領域から同定された拘束 HLA に最適に結合するペプチドを In silico で推定する手法を開発した。今回その評価を行ったので報告する。

## B. 研究方法

### 1) オーバーラッピングペプチドを用いた Gag CTL エピトープのマッピング

北タイ HIV 感染者 38 名の Gag アミノ酸配列

情報を基に北タイ流行 HIV 株に最適化された 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 Matrix 法に従って、各プールにつき 10 本のペプチドプール 10 組を 2 パターン (ペプチド 10 本を横の列のペプチド番号で組み合わせたパターン、例えば 0-9、10-19、20-29、と縦の列の番号で組み合わせたパターン、例えば 0,20,30・・・90、1,11,21・・・91) を作成、これらのペプチドプールを認識して反応する  $\gamma$ IFN 産生リンパ細胞を Elispot 法にて定量測定した。実験はひとつのターゲットにつき 3 回行い、最も強く反応するペプチドひとつを同定した。対象者は北タイランパン病院にて HIV コホート研究に参加さひた抗 HIV 薬未治療で CD4 値 200  $\mu$ l 以上の HIV 感染者とした。

### 2) 計算化学を用いた最適エピトープの同定

新たな MOE 計算設定を加えた最適化 CTL エピトープ推定方法的中率を評価するために、次に述べる方法で例題を作成した。まず対象する最適化 CTL エピトープとして、Los Alamos Data Base の Best-defined CTL/CD8+ Epitope summary(Frahm, Linde, Brander)より Gag CTL エピトープを選び、その領域を含む 15-mer オーバーラッピングペプチドを例題として選んだ。

MOE の計算方法としては、まず 15-mer ペプチドの N' -末端および C' -末端より 3-mer ペプチドをそれぞれ 8 種類作成さらに 4 番目のアミノ酸の影響を考慮して N' -末端側のペプチドの C' 末端側をアセチル化、C' -末端側ペプチドの N' -末端側をアミド化した。これら N' -末端側 3-mer ペプチドを該当 HLA 分子の A,B ポケットへ、C' -末端側 3-mer ペプチドを F ポケットへ結合させ、両端の結合親和性 (U-dock 値) の総和が良いものから順に最適 CTL エピトープ候補と仮定し最適 CTL エピトープ領域を推定した。(図 2) さらに予測的中率を向上させるために、以下の MOE の計算設定を加えた：①3-mer ペプチドの初期構造をモデリングすること、②ペプチド結合部位を指定するために、HLA および 3-mer ペプチドの構造にあわせてダミー原子を配置すること、③ペプチド結合部位にあたる HLA 分子を周囲 (3.0~5.0 Å) の範囲内でバックボーンあるいは Heavy

atom に対して拘束の強度を設定すること。特に③の設定条件については、10 パターン以上の条件をつくり、それぞれについて例題を計算して最も成績のよい条件を見出した。

#### (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) オーバーラッピングペプチドを用いた Gag CTL エピトープのマッピング

2003 年 9 月 2 日から 2008 年 9 月 16 日まで北タイランパン病院 HIV 外来を受診し、本 CTL 研究へ参加した CD4 値 200/ul 以上の未治療 HIV 感染患者数は 155 名であった。これらの感染者から合計 682 回の Elispot 実験を実施、感染者ひとりあたりの平均 Elispot 実験回数は 4.4 回であった。117 名 (75.5%) の感染者において最も強く認識するペプチドが 36 箇所同定された：p17 領域 (13 箇所)、p24 領域 (21 箇所)、p2 領域 (1 箇所)、p7 領域 (1 箇所)、p1 領域 (1 箇所)。特に p17 領域の前半と p24 領域の後半が高頻度に CTL によって認識されていることが明らかになった (図 1)。

本年度は、さらにこれらのペプチド認識を拘束している HLA の同定を迅速かつ効率的に行うために Intra-cellular cytokine staining (ICS) method の確立を試みたが未だ成功していない。そこで、特定のペプチドを認識している感染者のもつ HLA アリールとの相関関係を Fisher's Exact Test によって統計的に解析し拘束 HLA を推定したところ、8 箇所のペプチドについて、それらのペプチド認識と有意に相関する HLA アリールを同定することに成功した。(表 1) 興味あることに、この方法によって同定された HLA アリールはすべて B 遺伝子座にあり、A 遺伝子座にある HLA アリールと有意に相関するペプチドは認めなかった。この新たに拘束性 HLA が推定されたペプチドの配列を調べたところ、2 つのペプチド 59 番

(YVDRFYKTLRAEQAT) と 84 番 (MKDCTERQANFLGKI) に、それぞれサブタイプ A,C,D の B\*15 拘束性 CTL エピトープ “YVDRFFKTL”、サブタイプ B の B\*40 拘束性エピトープ “TERQANFL” が含まれていることが判明した。しかし、これらを含め今回同定された拘束性 HLA と CTL 認識ペプチド領域は、すべて CRF01\_AE エピトープとしては報告されたことのない領域であった。

#### 2) 計算化学を用いた最適エピトープの同定

これまで A\*1101, A\*2402, B\*2705, B\*1501 の 4 つのアリールについて、MOE の最適設定条件が決定した。これらの MOE 設定条件による最適 CTL エピトープ的中率の評価を、例題を用いて行ったところ、Best-defined CTL が新たな MOE 設定条件によって CTL エピトープ候補 1 位でランク付けされていたものが 25%~67%、3 位以内にランク付けされていたものが 50%~75%、5 位以内にランク付けされていたものが 75%~100% であった。設定条件の最適化が未完成の A\*0201 の成績がいずれも 0% であったことから、今回の設定条件の最適化により、最適 CTL エピトープを推定する確立が飛躍的に改善したことが判明した。(図 3)

### D. 考察

メルク社によるアデノウイルスをベクターとする CTL 誘導型ワクチンの臨床試験の結果、同ワクチンによって誘導された CTL 免疫反応には HIV 感染予防効果や感染後の HIV ウイルス増殖抑制効果がないことが判明した。この結果は、将来 CTL 誘導型ワクチンを成功させるには、今回のワクチンが失敗したメカニズムについて、さらに詳しく調べる必要があることを示唆している。そのメカニズムを知るためにも、本分担研究の研究目的である宿主 CTL 免疫とウイルスの相関関係を分子レベルで解明する必要がある。

今回の分担研究により、CRF01\_AE に限れば、少なくとも新たに 8 箇所の CTL エピトープ領域が示された。これは一部であり、我々は全部で 36 箇所のオーバーラッピングペプチドが Dominant に認識されていることを発見してお

り、CRF01\_AE ではまだ報告されていないエピトープは、今後拘束性 HLA の同定方法が可能になるとさらに増えることが期待できる。

オーバーラッピングペプチドからエピトープ領域を 15-アミノ酸まで絞り、そこからさらに 8~11 アミノ酸の最適長の CTL エピトープを推定できる MOE を用いた計算化学手法を飛躍的に改善することに成功した。この方法は、純粋に計算化学に基づいて行っており、既知のペプチド結合モチーフ情報は一切用いることなく最適長 CTL エピトープを推定することができる。従って、未だペプチド結合モチーフの報告されていない HLA や結晶構造解析による HLA 分子の 3 次元構造がわかっていない HLA アリールについても応用可能である点において画期的なシステムである。今後は、上記オーバーラッピングペプチド実験から得られた情報を基に新たに最適化された CTL エピトープを実験レベルで証明してゆく予定である。

#### E. 結論

1) 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た Elispot 実験を実施することにより、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。

2) 15 アミノ酸領域から最適長の CTL エピトープを推定できる MOE による計算化学手法が開発された。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Rojanawiwat A, Ariyoshi K, Pathipvanich P, Tsuchiya N, Auwanit W, Sawanpanyaert P. Substantially Exposed but HIV-Negative Individuals Are Accumulated in HIV-Serology-Discordant Couples Diagnosed in a Referral Hospital in Thailand. *Jpn J Infect Dis.* 2009 Jan; 62(1):32-6.

#### 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 CRF01\_AE Gag オーバーラッピングペプチド認識  
117 名の未治療 HIV 感染者が最も強く認識したペプチド部位を示している。  
X 軸はペプチド番号、Y 軸は認識した感染者数

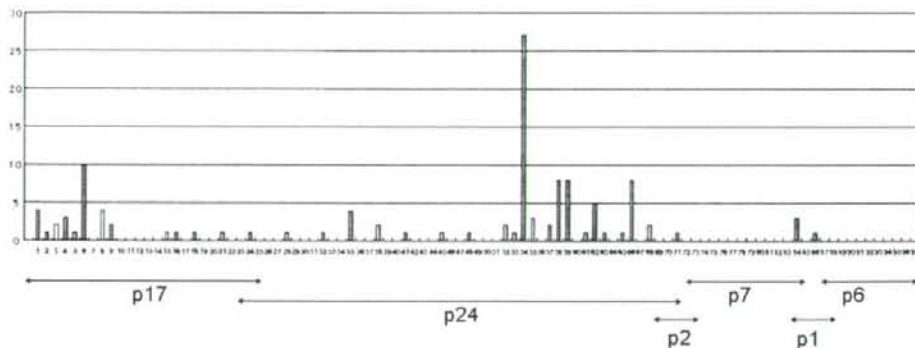


図2 MOEを用いた計算化学による最適長 CTL エピトープの推定方法

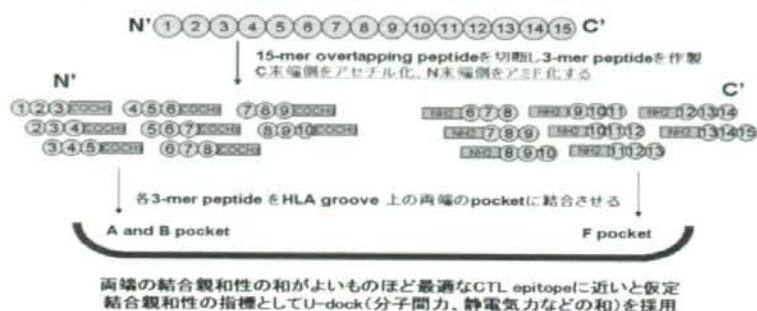


図3 MOE 計算化学手法による最適長 CTL エピトープの的中率

Los Alamos Data Base による Best-defined CTL が計算化学手法で1位候補であった割合(赤)、3位以内の候補であった割合(緑)、5位以内の候補であった割合(青)を示す。

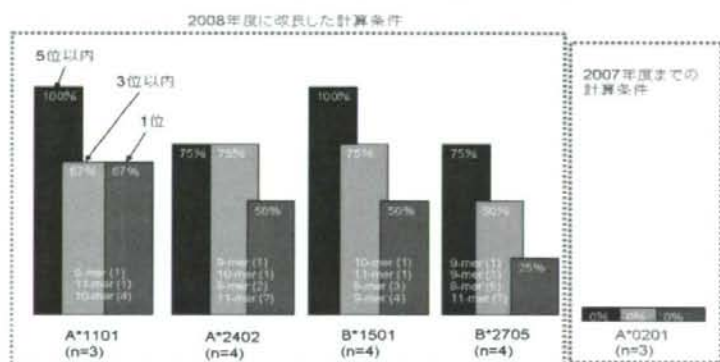


表1 ペプチド認識を拘束するHLAアレルの推定

特定のペプチドを認識している感染者のもつHLAアレルとの相関関係をFisher's Exact Testによって統計的に解析した

HLA	Peptide	HLA	Elispot+	Elispot-	Odds ratio	95%CI range	Fisher
E46	54	+	16	9	507	5.93	3.74E-09
		-	2	57		432.75	
E35	35	+	2	4	385	1.25	0.012
		-	1	77		1183.60	
B40	62	+	4	17	146	1.53*	0.013
		-	1	62		139.25	
E40	84	+	3	18	-	-	0.014
		-	0	63		-	
B15	6	+	5	26	10.0	1.11*	0.024
		-	1	52		90.08	
B15	59	+	3	28	-	-	0.047
		-	0	53		-	
E55	4	+	1	3	-	-	0.048
		-	0	80		-	
E55	96	+	1	3	-	-	0.048
		-	0	80		-	

\* 95%CI

## 6. HIV env 結合因子を利用したウイルス複製阻害

研究分担者 高橋秀宗 国立感染症研究所 感染病理部 第三室長

**研究要旨** 抗体、sCD4 等の HIV envelope 結合因子を利用して、複製阻害法を開発することにより、治療、ワクチン開発に役立てることを目的とした。Core と Env の結合は安定的に保たれており、Core-Env としてデタージェントにより精製可能であることが判明した。この結合は Env の cytoplasmic tail を通じ、非共有結合により保たれていた。精製した Core-Env は脂質二重膜および膜に関係する宿主因子が除外され免疫抗原として望ましいと考えられた。Core-Env の免疫マウスから得られた血清は中和抗体価を示した。Core-Env の免疫マウスから得られたいくつかのハイブリドマクローンは Env を認識する抗体を産生していることが判明した。Core-Env は envelope を標的とし、HIV-1 のライフサイクルでは出現しない抗原として、HIV-1 感染者が有している中和抗体とは異なる有効な抗体を誘導する可能性があると考えた。

### A. 研究目的

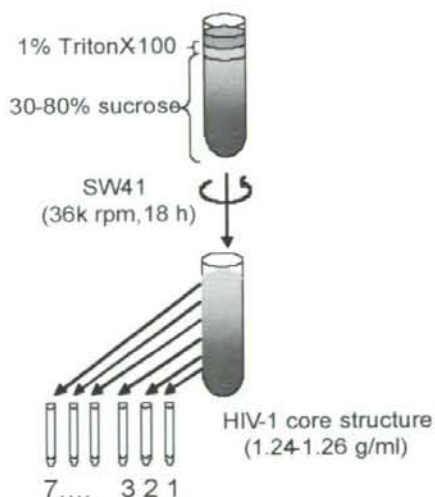
抗体、sCD4 等の HIV envelope 結合因子を利用して、複製阻害法を導く方法を開発することにより、治療、ワクチン開発に役立てることを目的とした。HIV-1 粒子にはネイティブな抗原であるという利点があるが、宿主因子、脂質二重膜を多量に含んでいるという短所もある。そこで粒子をデタージェントを含む蔗糖平衡密度勾配法で処理し、Core-Env を分離、抗原として利用し、中和抗体誘導を目標とした。Core-Env は宿主因子、脂質二重膜を除かれ、ネイティブな構造を保っている。また HIV-1 のライフサイクルでは出現しない側面も有しており、感染者の中和抗体とは異なる有効な中和抗体を誘導する抗原として有用である可能性があり、実験を行った。

### B. 研究方法

1. HIV-1 粒子から Core を精製する過程で Core と Envelope の結合の安定性を調べた。  
2. Core-Env の抗原性、中和抗体誘導能について調べた。

1) HIV-1 粒子から Core-Env を分離するため、293T 細胞へ Gag 及び、Env 発現ベクターをトランスフェクションした。HIV-1 粒子中の Core を解析するために、20%蔗糖をクッションに超遠心濃縮後、tritonX-100 を含む 30-80%蔗糖平

衡密度勾配法(下図)により、Core を分離し、抗 p24 抗体を使用したウェスタンブロットによって解析した。

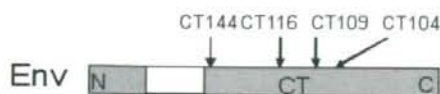


2) 上記で得られた精製 Core フラクシオンを電子顕微鏡によって観察した。

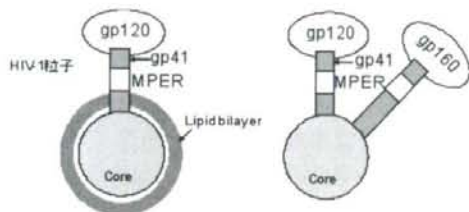
3) HIV-1 粒子中の Core と Env 蛋白の関係をさらに解析するために Env cytoplasmic tail (CT) の 144 アミノ酸を欠損させた発現させるコンストラクト CT144, または CT116, CT109, CT104 を作成した(下図)。TritonX-100 を含む



30-80%蔗糖平衡密度勾配法を使い、Core と Env または Env ミュータントの関係を抗 p24 抗体、抗 gp41 抗体を使用した。ウェスタンブロットによって解析した。



3) 上記で分離された脂質二重膜を除いた Core-Env (下図)、HIV 粒子、Core のみをそれぞれ Balb/c マウスへ CpG DNA をアジュバントとして、皮下に 3 回免疫した。



4) 免疫の終了後 10 日目に尾から血液を採取し、血清を抗原 ELISA、中和抗体アッセイによって解析した。

5) 中和抗体価はルシフェラーゼ遺伝子を nef 部分に組みこんだシュード HIV ウイルスを用いた。p24 ELISA で標準化後、血清と一時間インキュベートし、MAGIC5 に感染させ、ルシフェラーゼ値を計測した (下図)。PBS 免疫血清の値を 2 分の 1 以下とした希釈倍率を中和抗体価とした。

Pseudo HIV(NL43由来) sera in 250 ul

↓  
37 °C 1 hr

↓  
Infect MAGIC5 or M8166

↓  
Luciferase assay

6) 免疫マウスの脾臓細胞とミエローマ細胞 (SP2/0) を融合させ、ハイブリドマクローンを得た。

7) 精製 Env をコートしたプレートでハイブリドマクローンの上清をスクリーニングした。

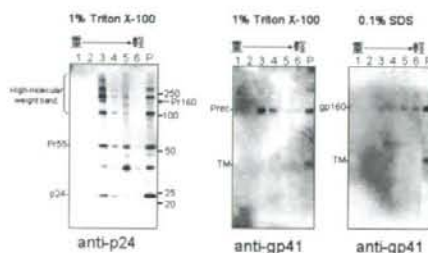
8) 陽性クローンの上清について、さらに精製 gp120、gp41 またはブロック剤をコートしたプレートに対する反応を調べた。

(倫理面への配慮)

本研究では特に臨床試料を使用していない。

### C. 研究結果

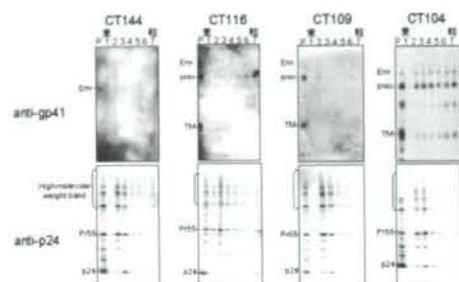
1) HIV-1 粒子の Core と Env 蛋白の関係を解析するために成熟コアを精製し、抗 p24 抗体、抗 gp41 抗体を使用した。ウェスタンブロットによって解析したところ、Core のフラクションに多量の非切断 Env 蛋白を検出した (下図中央)。ディタージェントを 0.1% SDS に変えると、Env 蛋白を Core フラクションに検出できなくなった (下図 右) ため Core と Env の結合は非共有結合であると考えた。



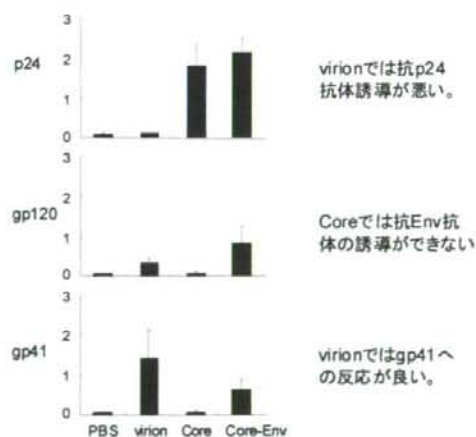
2) Core フラクションの電子顕微鏡による観察では 100 nm 程度の円錐状粒子を認め、コアの濃縮ができたと考えた。

3) Env の cytoplasmic tail ミュータントを使用し、上記と同様にそれぞれ Core を分離し、抗 p24 抗体、抗 gp41 抗体を使用した。ウェスタンブロットによって解析した。CT104 が成熟、

未成熟コアフラクションで検出されたものの、CT109で検出されなくなったため(下図)、この間のアミノ酸に Core と Env をつなぐ重要なシークエンスがあると考えた。



4) HIV-1 粒子の免疫では、脂質を除いた Core-Env にくらべ、p24 抗体誘導が悪いことが判明した(下図 上)。Core の免疫では抗 Env 抗体の誘導ができないことを確認した(下図中央、下)。また粒子の免疫では gp41 への反応が良いことが判明した(下図 下)。

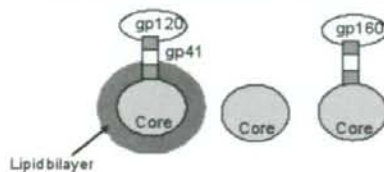


#### 5) 血清中和抗体

脂質を除いた Core-Env の免疫血清だけに 100 倍を超えた中和活性価が認められた(下図)。HIV-1 粒子または Core だけの免疫では 40 倍を超える中和活性価は得られなかった。

#### 免疫血清の中和活性(希釈倍率)

Inoculum	virion	Core	Core-Env
EC50	<40	≤40	120



6) ハイブリドーマクローンの上清は gp120 または gp41 を ELISA で認識したが、ブロック剤をコートしたプレートに反応しなかった。

#### D. 考察

HIV-1 の Core と Env は Env の cytoplasmic 領域を通じて、非共有結合によって保たれていることが判明した。結合は Cytoplasmic tail の長さに影響されるが、実際には数アミノ酸によって結合と解離が決まっていた。CT104 と CT109 間に重要なアミノ酸領域があることが示唆された。結合は Core-Env を免疫抗原として使用するための準備に十分な安定性を共有していると考えられる。

Core-Env のマウスへの免疫で精製 gp120、gp41、p24 抗体が誘導された。p24 の抗体が粒子により誘導されにくかった理由は不明である。このとき Core-Env のマウスへの免疫でのみ、シュードウイルスを用いた中和抗体アッセイ系で 100 倍以上の中和抗体価が得られたことが重要であると考えられる。抗体としては抗 env 抗体が誘導されているのにも関わらず、粒子がなぜ中和抗体を誘導できなかったのか、現在、不明である。

脂質二重膜を失った精製 Core-Env には疎水アミノ酸部分の会合エネルギーを通じてなんらかの変化が生じることが予測できるが、この変化が中和抗体誘導に有利に働いたのではないかと予測する。

HIV-1 の中和抗体のうち、特に広域な中和抗体 (broad neutralizing antibody) を誘導する抗原がヒトでは求められている。HIV-1 感染者に中和抗体は認められるが、病態の進行を抑制

することはないからである。Envのうち、gp120の広域中和抗体ではCD4結合領域への抗体CD4bs (b12)、糖鎖認識抗体 (2G12)が知られているが、通常の構造を有する抗体では誘導が難しいことが知られている。他にCD4i、抗V3抗体が比較的誘導が可能な中和抗体として知られているがCD4に結合し、Envの構造が変化することが中和活性に必要であることも知られている。gp41にも広域の中和抗体が知られており、MPER (membrane proximal external region, 2F5, 4E10)が報告されている。しかし両抗体ともに脂質二重膜を認識することが知られている。Core-Envは脂質を除いているために膜に含まれていた宿主因子を抗原として含むことがないという点で抗原としての利点がある。また脂質二重膜自体を除いているため蛋白抗原と共に脂質を抗原として認識させる危険が少ないという利点も有する。

Core-Envの特にEnvについてはHIV-1のライフサイクルでは決して出現しない構造が含まれていると考える。Envはリボソームで翻訳後、ERの脂質膜と速やかに関係し、粒子と感染のライフサイクルを通じて脂質膜との関係が消失することはないからである。ディタージェントにより脂質膜を除いたEnvの構造は生体内にはない構造を含んでおり、感染者では誘導されない有効な中和抗体誘導の可能性もある。

Core-Envが中和抗体を誘導する理由、得られた中和抗体は広域のEnvに有効であるかどうか、モノクロナール抗体が中和価を示すかどうかについては明かにされるべき課題であると考えられる。

#### E. 結論

HIV-1 Coreの安定性は保たれ、CoreとEnvの結合はEnvのcytoplasmic tailの長さによって保たれる非共有結合であることが判明した。Core-Envのマウスへの免疫で100倍を超える中和抗体価が得られた。免疫マウスから誘導したモノクロナール抗体の解析で精製gp120およびgp41を認識するものが多く誘導されていることが判明した。ディタージェントにより宿主膜蛋白、膜脂質を除いたCore-Envの免疫は抗Envモノクロナール抗体の誘導に有用であ

る。さらに宿主因子、脂質を認識しない抗体の誘導抗原として、またHIV-1のライフサイクルには出現しない抗原として感染者中の中和抗体にはない有効な中和抗体誘導の抗原として可能性を有すると考えた。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Takahashi, H. Kitagawa, Y. Maeda-Satoh, M. Hasegawa, H. Sawa, H. Sata, T. Monoclonal antibody and siRNAs for topoisomerase I suppresses telomerase activity. Hybridoma, in press.

##### 2. 学会発表

- 1) 高橋秀宗、飛梅 実、田中恵子、佐多徹太郎。マウスにおけるHIV-1中和血清の誘導。第56回日本ウイルス学会(岡山) 2008.10

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

特許第4144876号  
平成20年6月27日  
HIV-1複製抑制剤

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## 7. HIV-1 感染病態に関わる宿主因子の解析

研究分担者 塩田 達雄 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨 HIV 感染症に関わるウイルス側ならびに宿主側因子について検討し、二つの知見を得た。

(1) HIV-2 のカプシドタンパク質の 120 番目のアミノ酸はウイルスの TRIM5 $\alpha$  に対する感受性に大きく影響し、昨年度、西アフリカの HIV-2 感染者コホートでこのアミノ酸と血中ウイルス量との関係を検討したところ、120 番目がアラニンあるいはグルタミン酸の TRIM5 $\alpha$  耐性 HIV-2 を持つ感染者は、120 番目がプロリンの感受性 HIV-2 を持つ感染者に比べて血中ウイルス量が有意に低下していた。今年度は 120 番目のアミノ酸以外で血中ウイルス量の違いと相関していた 158 番目と 178 番目のアミノ酸変異の影響を検討した。その結果、158 番目と 178 番目のアミノ酸変異もウイルスのヒト TRIM5 $\alpha$  感受性に影響することが明らかになった。

(2) ヒト TRIM5 $\alpha$  の B-box ドメインのアミノ酸置換を伴う一塩基多型 Gly110Arg は 190 名の日本人 HIV-1 感染者では 2.7% の低頻度で認められるが、299 名の HIV-1 非感染者には全く認められない。また、176 番目の塩基 G を欠き RING ドメインのみを発現する多型 G176del は低頻度で HIV-1 非感染者に認められるが、HIV-1 感染者には認められない。これらの多型を持つ TRIM5 $\alpha$  を遺伝子工学的に発現させて機能解析を行ったところ、Gly110Arg の変異により TRIM5 $\alpha$  の抗 HIV 作用が減弱した。一方、G176del を持つ TRIM5 $\alpha$  のみでは抗 HIV 作用は全く検出されなかったが、野生型 TRIM5 $\alpha$  を同時に発現させたところ、野生型 TRIM5 $\alpha$  の抗 HIV 作用が増強された。従って Gly110Arg の TRIM5 $\alpha$  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る。

### A. 研究目的

HIV 感染症の病態進行は感染者ごとに大きく異なる。また、HIV 感染感受性自体にも個人差が存在する。本研究は病態進行や HIV 感染感受性の違いを決定する宿主側の因子を明らかにすることを目的とする。このような因子が明らかにできれば、各 HIV 感染者の予後予測に役立つだけでなく、その因子を標的とした新しい HIV 制御の戦略を提示できると考えている。本年度は以下の二つを具体的な研究目的とした。

1) HIV-2 のカプシドタンパク質の 120 番目のアミノ酸はウイルスの TRIM5 $\alpha$  に対する感受性に大きく影響し、昨年度、西アフリカの HIV-2 感染者コホートでこのアミノ酸と血中ウイルス量との関係を検討したところ、120 番目がアラニンあるいはグルタミン酸の TRIM5 $\alpha$  耐性 HIV-2 を持つ感染者は 120 番目が

プロリンの感受性の HIV-2 を持つ感染者に比べて血中ウイルス量が有意に低下していた。今年度は、120 番目のアミノ酸以外で血中ウイルス量の違いと相関していた 158 番目と 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ことを目的とした。

2) ヒト TRIM5 $\alpha$  の B-box ドメインのアミノ酸置換を伴う一塩基多型 Gly110Arg は 190 名の日本人 HIV-1 感染者では 2.7% の低頻度で認められるが、299 名の HIV-1 非感染者には全く認められない。一方、176 番目の塩基 G を欠き RING ドメインのみを発現する多型 G176del は低頻度で HIV-1 非感染者に認められるが、HIV-1 感染者には認められない(東京医科歯科大学、木村彰方教授、中島敏晶准教授との共同研究)。これらの変異により TRIM5 $\alpha$  の抗 HIV-1 効果を実際に変化するか否か、を明らかにすることを目的とした。