

図2 Gag241-249特異的CTLメモリー誘導の効果
 非ワクチン接種サル群6頭（白丸、N）と Gag241-249エピトープ発現ベクターワクチン接種サル群6頭（黒逆三角、V）（90-120-Ia陽性）のSIVチャレンジ後の血漿中SIV量の相乗平均(A)および5週目の比較(B)。ワクチン接種群のSIV量は有意に低値を示した。

サル MHC・MHC 関連分子およびそのレセプター遺伝子群の多型解析

研究分担者 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

SIV 実験アカゲザル個体（ミャンマー産、ラオス産）100 頭を対象とした Mamu-A および Mamu-B 遺伝子 cDNA 配列解析によって、175 アリルを検出したが、そのうち 107 アリル（60.8%）は新規アリルであった。また、既知アリルの多くは中国産アカゲザル集団において同定されていたものであり、インド産やフィリピン産アカゲザル集団との共通性は少なかった。このことは、アカゲザル集団が地理的に隔絶されてそれぞれが独自に MHC 多様性を獲得したことを示唆する。一方、NKG2D レセプターのリガンドである ULBP4 遺伝子にはアカゲザルでは大きな多様性があることが示された。さらに、比較ゲノム解析を用いた進化医学的手法によって、TRIM5 α 、TIM1 が HIV/AIDS 関連遺伝子であることが証明された。また、CD3E、CD3G 遺伝子は旧世界ザル分岐系列において独自の進化を遂げたことが解明された。

A. 研究目的

ヒトを始めとする高等動物では外来抗原に対する免疫応答性に個体差があり、このためウイルス感染に対する感受性・抵抗性やワクチン接種効果が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は生体の発達過程で形成されるが、そこには遺伝的背景が強く関与する。すなわち、免疫応答性は T 細胞、NK 細胞、抗原提示細胞、B 細胞などの協調によって形成されるが、これらの細胞間の機能連関には種々の分子、ことに MHC 分子群、MHC 関連分子群、NK レセプター群などの免疫応答関連分子群が関わるが、これらの分子群には個体差（遺伝的多型性ないしゲノム多様性）が存在し、このゲノム多様性が免疫応答性の個体差の形成に重要な機能を発揮する。従って、有効なワクチンを開発する上では、このような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必要である。

HIV ワクチン開発においてはヒトを対象とした実験が困難であることから動物モデルが用いられるが、マウスやラットなどは免疫応答関連分子群の構成自体がヒトとは大きく異なっており、その知見をヒトに生かす上では制約がある。一方、チンパンジーなどの高等霊長類では、MHC 遺伝子群の構成はヒトと類似しているが多様性が限られており、また希少種であることから、モデル動物としての有用性には限界がある。これに対して、アカゲザルを用いた研究は、これまでに 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を明らかにしたが、その他の分子群の多様性の関与については不明な点が多い。

ワクチンの *in vivo* 効果を最大限に発揮させるためには、多種多様な免疫応答関連分子群のうち、どの分子の機能的多様性に注目すべきかを明らかにすることが不可欠であるが、ヒトを用いた研究には制約があるため、まずはアカゲザルを対象としたワクチン開発系での解析を通じて情報を得て、その情報をヒト 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、ワクチン接種後に SIV 感染が生じた場合のサル個体の臨床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と考えられる。

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、MHC 分子群、MHC 関連分子群、NK レセプター群などの免疫応答関連分子群のゲノム多様性を検討し、これと CTL 誘導型ワクチンによる SIV ウイルス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) サル MHC クラス I 遺伝子群の解析：昨年度に引き続き、ワクチン効果検証実験に用いたア

カゲザル個体総計 100 頭について、MHC クラス I 遺伝子群の cDNA をクローニングし、塩基配列を決定した。得られた配列をデータベースと比較し、既報アレルと一致しないものについては、公的塩基配列データベースに登録するとともに、動物 MHC 命名委員会に登録して新たな命名を受けた。

- 2) MHC クラス I 様遺伝子群の解析：ワクチン効果検証実験に用いたアカゲザル個体総計 28 頭について、ULBP4 ゲノム遺伝子の第 2 および第 3 エクソンを PCR で増幅し、ダイレクトシーケンス法によって塩基配列を決定した。既報のアレルと比較し、多型領域の分布を明らかにするとともに、多型とワクチン効果との関連を検討した。
- 3) ヒト HIV/AIDS 感受性に係る宿主要因の解析：HIV 感染感受性や AIDS 発症感受性には個体差があるため、アカゲザルにおける SIV 感染抵抗性に関与することが知られている TRIM5 α 遺伝子のゲノム多様性について、日本人およびインド人集団の HIV 感染者ならびに一般健常者について解析し、多型頻度と HIV 感染感受性との関連について検討した。
- 4) 比較ゲノム手法を用いた進化的解析：ウイルスの塩基配列解析から、アカゲザル等の旧世界猿ウイルス (SIVmac) から高等霊長類 (チンパンジー) ウイルス (SIVchimp) を経由して HIV へと進化して来たと考えられる。一般に、旧世界猿は SIVmac 感染に比較的抵抗性であり、チンパンジーは SIVchimp に感染しても AIDS 発症に比較的抵抗性であることから、その宿主要因の解明が必要である。そこで、霊長類を対象とした比較ゲノム解析として、免疫・炎症に関与する遺伝子群について Bn/Bs を計算し、霊長類の進化過程において選択圧 (Bn/Bs>1 は正の選択、<1 は負の選択) がかった遺伝子を抽出した。また、それらの遺伝子のうち HIV/AIDS との関連が推定される遺伝子についてヒトにおけるゲノム多様性と HIV/AIDS 感受性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、以下のとおり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) サル MHC クラス I 遺伝子群の解析：本研究ではミャンマー産あるいはラオス産のアカゲザルを対象として、MHC クラス I 遺伝子 cDNA の多様性をシーケンスレベルで検討した。昨年度までの Mamu-A 遺伝子解析を継続したのに加えて本年度は Mamu-B 遺伝子解析を行った。100 頭を対象とした解析によって Mamu-A では 75 対立遺伝子、Mamu-B では 84 対立遺伝子、また Mamu-I では 17 対立遺伝子が同定された。これらのうち、それぞれ 46 (61.3%)、50 (59.5%)、11 (64.7%) 遺伝子はこれまでに報告のない新しい対立遺伝子であった(表 1)。また、既知の対立遺伝子との一致は、ほとんどが中国産アカゲザルとの一致であり、インド産あるいはフィリピン産アカゲザルとの一致はかぎられていた。このことは、わが国で用いられている実験用アカゲザルは、欧米で用いられているアカゲザルとは遺伝的背景が大きく (中国産) もしくは全く異なる (インド産、フィリピン産) ことを示す。また、昨年度までの検討でワクチン効果が高いアカゲザル MHC の a ハプロタイプを構成する Mamu-A および Mamu-B アレルの構成が判明していたが、本年度は a ハプロタイプ以外のワクチン効果が高いハプロタイプの遺伝子構成も判明したが、それらは a ハプロタイプ構成アレルとは全く異なっていた。このことは、ハプロタイプ毎に対応する抗原ペプチドが異なることを示す。

表 1 アカゲザル実験個体の MHC クラス I 遺伝子多様性

遺伝子座	解析個体数	観察されたアレル数	新規アレル(数、頻度)		既知アレル(数、頻度)	
Mamu-A	100	75	46	61.3%	29	38.7%
Mamu-B	83	84	50	59.5%	34	40.5%
Mamu-I	83	17	11	64.7%	6	35.3%
Others	83	2	0		AG:1 F:1	
合計		176	107	60.8%	69	39.2%

2) MHC クラス I 様遺伝子群の解析：NK 細胞は自然免疫のみならず獲得免疫の制御にも関わっている。本研究では、活性化 NK レセプターである NKG2D レセプターのリガンド(ULBP) についての解析を行っている。昨年度までに ULBP1, ULBP2, ULBP3 遺伝子を解析し、それらにおける多様性が小さいことを明らかにしたが、本年度はもう一つの ULBP である ULBP4 を解析した。28 頭の解析から、16 対立遺伝子が同定された(表 2)。うち 1 対立遺伝子は第 2 エクソン中に終止コドンが生じており、第 3

エクソン中にも多数の特異的変異が見出された(アレル 16、表2)ことから、この対立遺伝子は機能欠損アレルであると考えられた。また、SIV ワクチンへの応答性と ULBP4 対立遺伝子多様性との対応を検討したところ、同一アレルのホモ接合体が高応答個体、低応答個体のいずれにも見られることから、ULBP4 の多様性は SIV 免疫応答には大きな寄与はないと推定された。

表2 アカゲザル ULBP4 の多様性

Locus	D1					D3-A					D3-C				
	GA	AA	AA	AA	AA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3) ヒト HIV/AIDS 感受性の解析: TRIM5 α はアカゲザルにおける SIVmac 感染抵抗性を制御することが知られているため、日本人およびインド人集団を対象として多型解析を行った。その結果、10 種類の多型が検出された。また HIV/AIDS との関連性を検討したところ、His43Tyr はインド人、日本人のいずれにおいても HIV 感染抵抗性と関連することが判明した。一方、日本人集団で稀に認められる多型のうち G176del および Gly110Arg は、それぞれ HIV 感染抵抗性および感染感受性と関連することが推定された(表3)。そこで機能解析を実施したところ、G176del は共存する正常 TRIM5 α タンパクの発現レベルを増加させることによって HIV-1 感染抵抗性と関連すること、Gly110Arg は HIV-1、HIV-2 の増殖抑制機能が低下しているために感染感受性と関連することが明らかとなった。

表3 日本人およびインド人集団における TRIM5 α 多型性

Sequence Variations*	Japanese		Indian		Caucasian	African-American
	control (n=487)	HIV-1 infected subjects (n=94)	control (n=99)	HIV-1 infected subjects (n=101)	control (n=96)	control (n=96)
Gly31Ser	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.032
His43Tyr	0.184	0.133	0.227	0.134****	0.115	0.068
Cys58Tyr	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011
G175del	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Asp109Asp	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005
Gly110Arg	0.002	0.021***	0.000	0.000	0.000	0.000
Gly110Glu	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.005
Val112Phe	0.052	0.043	0.192	0.198	0.052	0.021
Thr128Thr	0.000	0.011**	0.000	0.000	0.000	0.000
Arg136Gln	0.105	0.144	0.177	0.173	0.349	0.177

4) 比較ゲノム手法を用いた進化的解析: 進化的な観点から HIV/AIDS ウイルスへの感受性・抵抗性の制御に関わる遺伝子を同定する

目的で比較ゲノム解析を実施している。昨年度までの解析で免疫関連遺伝子群のうち Bn/Bs が高い上位 50 遺伝子には、既知の HIV/AIDS 関連遺伝子である MHC, CCR5, CCL3L1 が含まれることが判明している。また、前記の TRIM5 α も上位 50 遺伝子に含まれていた。そこで、やはり上位 50 遺伝子に含まれる TIM1 遺伝子についてタイ人集団における HIV/AIDS との関連を検討したところ、TIM1 遺伝子 D3-A 型および D3-C 型は AIDS 関連症状の発生頻度がそれぞれ有意に低いおよび高いことが判明した(表4)。

表4 TIM1 遺伝子型と HIV/AIDS との関連

	D1		D3-A		D3-C	
	presence	absence	presence	absence	presence	absence
n =	8	238	204	42	52	194
Median viral load (b/g10)	5.45	5.06	5.05	5.11	5.20	5.02
[IQR]	[4.95-5.90]	[4.28-5.55]	[4.33-5.57]	[4.28-5.51]	[4.54-5.55]	[4.25-5.57]
p		0.0814		0.3975		0.2736
Median CD4 count	169	266	278	169	174	275
cell/ul [IQR]	[48-356]	[71-422]	[90-437]	[50-371]	[52-374]	[94-422]
p		0.3909		0.0615		0.067
HIV-1 related syms % (n)	62.5(5)	38.2(91)	35.8(73)	54.8(23)	50.9(27)	35.8(69)
p		0.155		0.021		0.05
Death (n)	3	62	49	16	18	47
PVO	12.58	511.93	443.47	81.03	105.60	418.90
Mortality rate (%)	23.85	12.11	11.05	19.75	17.05	11.22
(95%CI)	(-0.26,47.96)	(9.28,14.94)	(8.13,13.97)	(11.08,28.42)	(9.86,24.24)	(8.19,14.25)

また、D3-A 型は AIDS への進行性が有意に遅かった。さらに、D3-A 型は TIM1 の発現が他の遺伝子型に比較して高いことが判明した(図1)。なお、従来より TIM1 プロモーター多型と発現性との関連が報告されていたが、そのような関連は観察されなかった。

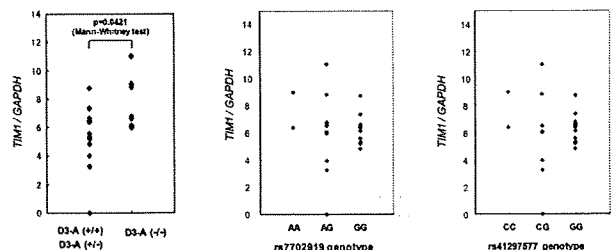


図1 Bリンパ芽球様細胞株における TIM1 遺伝子の発現性

一方、これとは別に、免疫関連遺伝子群を免疫グロブリンドメイン(Igドメイン)を有する群と有さない群と比較したところ、Igドメインを有する遺伝子群の方が Bn/Bs が高い(進化選択圧が高い)ことが判明した。そこで、Igドメインを有する遺伝子群について、Igドメイン部分とそれ以外で Bn/Bs を比較したところ、Igドメイン部分はむしろ Bn/Bs が有意に低いこと、すなわち進化的にはむしろ保存されていた。しかしながら、Igドメイン部分の Bn/Bs が例外的に高い遺伝子群が存在した。これらには前記の TIM1 が含まれるが、もっとも高い Bn/Bs を示した遺伝子は CD4E および CD4G で

あった (図 2)。

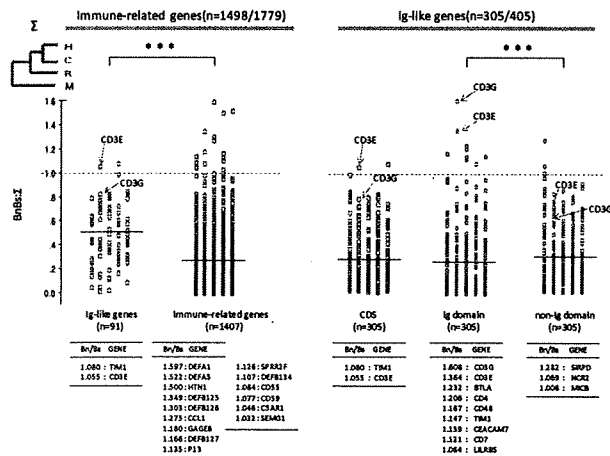


図 2 免疫関連遺伝子群における Bn/Bs の分布

そこで、CD4E および CD4G について進化系統解析を実施したところ、これらの遺伝子における Bn/Bs の高値は旧世界ザルの分岐において特異的に生じたものと考えられた。このため、CD4E および CD4G の立体モデル構造解析を行ったところ、旧世界ザルの分岐では複数の特異的な構造変化が生じているが、これらは立体構造上近接して生じていた (図 3)。このことは、進化選択圧は立体構造上の制約を受けて共進化を起こすことを示唆する。

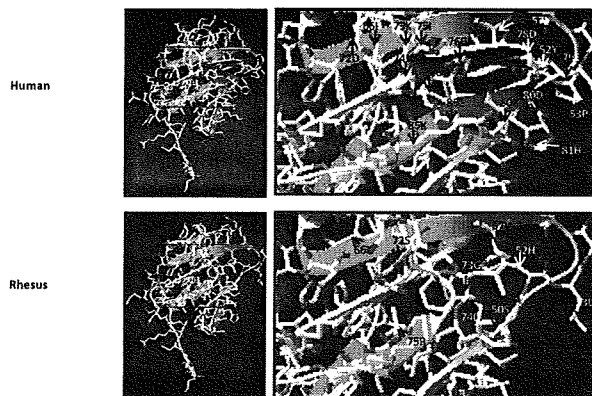


図 3 ヒトおよびアカゲザルの CD3E の立体構造

D. 考察

SIV ワクチン効果を規定する遺伝的背景としての MHC クラス I 遺伝子の多様性を実験アカゲザル集団を対象として解析した結果、わが国で使用されているアカゲザルは、欧米で使用されているアカゲザルとは遺伝的背景が大きく異なっていることが確認された。また、SIV ワクチン CTL 高応答を規定するハプロタイプは複数あるが、それらを構成する Mamu-A, Mamu-B アリルには共通

性はなかったため、それぞれのハプロタイプは異なる抗原ペプチドを提示するものと考えられた。一方、NKG2D レセプターのリガンドの多様性を検討したところ、ULBP4 の多様性が極めて大きいたことが判明したが、SIV ワクチンへの免疫応答性との関連は否定的であった。これらとは別に、進化医学的手法で SIV 感染抵抗性を担う候補遺伝子を選択し、これを対象にしてヒト集団における多型分布を検討することで TRIM5 α 、TIM1 などの多型が HIV/AIDS 感受性・抵抗性と関連することが証明された。また、アカゲザルでは CD3E、CD3G が独自の進化を遂げたことが判明したことから、今後その意義を SIV 感染との関連で検討することが必要である。

E. 結論

効率よい CTL 誘導性 SIV ワクチンの開発において必須である MHC クラス I 遺伝子群の多様性分布を解明した。また、NKG2D レセプターのリガンドである ULBP4 はアカゲザルでは著明な多様性を呈することが判明した。さらに、進化医学的手法によって HIV/AIDS 関連遺伝子が同定可能であることを証明した。

F. 研究発表

1 論文発表

- (1) Shichi D, Ota M, Katsuyama Y, Inoko H, Naruse T, Kimura A. Complex divergence at a microsatellite marker C1_2_5 in lineage of HLA-Cw/B haplotype. *J Hum Genet.* 2009; 54(4): 224-229.
- (2) Nakajima T, Nakayama EE, Kaur G, Terunuma H, Mimaya J, Ohtani H, Mehra N, Shioda Y, Kimura A. Impact of novel TRIM5 α variants, Gly110Arg and G176del, on the anti-HIV-1 activity and the susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS.* 2009; 23(16): 2091-2100.
- (3) Nakajima T, Kimura A. Comparative genomics: insight into human health and disease. In *The HLA Complex in Biology and Medicine: a resource book.* (Mehra N, ed), pp566-588, Jaypee Brothers Medical Publishers Ltd., New Delhi, 2010

2 学会発表

- (1) Takahashi N, Tsukamoto T, Iwamoto N, Takahara Y, Naruse T, Kimura A, Matano T: Mapping of cytotoxic T lymphocyte epitopes in rhesus macaques showing vaccine-based control of simian immunodeficiency virus replication. The 9th Awaji International Forum of Infection and Immunity. Awaji, September 8-11, 2009.

- (2) Nakajima T, Kimura A: Association of TRIM5-alpha with HIV/AIDS susceptibility. 12th Cardiovascular Genomics and Atherosclerosis Symposium. Seoul, October 16-17, 2009.
- (3) Naruse T, Yamashita T, Mori K, Chen Z, Saito Y, Matano T, Kimura A: MHC class I diversity and efficacy of vaccination against SIV (simian immunodeficiency virus in rhesus macaque 12th cardiovascular genomics and atherosclerosis symposium Korea, October 16-17 2009.
- (4) Kimura A, Nakajima T, Naruse T, Yanagida R, Ohtani H, Konishi M, Terunuma H, Mimaya J, Nakayama E, Shioda T, Kaur G, Mehra N: Evolutional aspects of human genome diversities controlling the susceptibility and/or resistance to HIV-1/AIDS. 33rd Australian and South East Asian Tissue Typing Association Conference. New Dehli, November 12-15, 2009.
- (5) Nakajima T, Kimura A: Natural selection in the TLR-related genes in the course of primate evolution. 33rd Australian and South East Asian Tissue Typing Association Conference. New Delhi, November 12-15, 2009.
- (6) Naruse T, Yamashita T, Mori K, Chen Z, Saito Y, Mamtano T, Kimura A: MHC class I diversity and efficacy of SIV vaccines. 33rd Australian and South East Asian Tissue Typing Association Conference. New Delhi, November 12-15, 2009.
- (7) 中島敏晶、中山英美、Gurvinder Kaur、三間屋純一、照沼裕、大谷仁志、Narinder Mehra、塩田達雄、木村彰方:日本人およびインド人集団における TRIM5 α 遺伝子多型と HIV 感受性の関わり. 第 54 回日本人類遺伝学会、東京、2009 年 9 月
- (8) 成瀬妙子、奥田裕紀子、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 54 回日本人類遺伝学会、東京、2009 年 9 月
- (9) 中島敏晶、中山英美、Gurvinder Kaur、三間屋純一、照沼裕、大谷仁志、Narinder Mehra、塩田達雄、木村彰方: 霊長類 SIV 感受性を制御する TRIM5 α 遺伝子とヒト HIV 感染感受性・抵抗性との関連. 第 18 回日本組織適合性学会大会、名古屋、2009 年 9 月.
- (10) 成瀬妙子、山下知子、森一泰、陳智勇、齋藤祐介、俣野哲朗、木村彰方: アカゲザル MHC クラス I 多様性と SIV(simian immunodeficiency virus)ワクチン効果. 第 18 回日本組織適合性学会大会、名古屋、2009 年 9 月.
- (11) 小西真紀子、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、HLA 遺伝子多型との関連. 第 18 回日本組織適合性学会大会、名古屋、2009 年 9 月.
- (12) 高橋尚史、塚本徹雄、岩本南、高原悠佑、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗: 細胞性免疫誘導エイズワクチンの有効性が認められたサルにおける SIV 特異的 CTL のエピトープ探索. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む.)
- 1 特許取得
該当なし
 - 2 実用新案登録
該当なし
 - 3 その他
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

センダイウイルスベクターを用いた CTL 誘導法に関する研究

研究分担者 朱 亜峰 ディナベック株式会社事業開発本部長

研究要旨

CTL 誘導能解析のための材料として、SIVagm 由来の第三世代 SIV ベクターについて。そのベクターの一部を SIVmac239 由来の配列に組換えたパッケージングベクターを用いた VSVG シュードタイプ SIV ベクターの生産を実施した。また、生産した SIV の粒子力価、機能力価、感染性等について調べた。

A. 研究目的

CTL 誘導エイズワクチン効果に関する解析において、細胞内で発現した gag と、細胞外から SIV 粒子として供給した gag 蛋白についての CTL 誘導能の違いを調べることは重要な解析項目の一つである。その反応の epitope による違いを調べることを目的として、その材料となる複数のキメラ SIV (ベクター) を作製した。

B. 研究方法

SIVagm 由来の第三世代 SIV ベクターについて、“gag CA 領域”を SIVmac239 の配列に組み換えた SIV (ベクター)、および“gag-pol 領域の大部分”を SIVmac239 の配列に組み換えた SIV の構築を試みた。

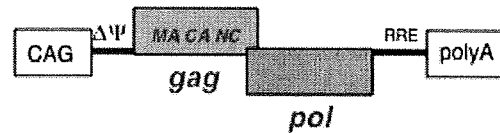
(1) SIV (ベクター) 構築

SIVagm 由来パッケージングプラスミド (pPV : 3rd = 第 3 世代 SIV vector packaging plasmid) の、Gag CA コード領域を SIVmac239 Gag CA コード領域に組換えた pPV (pPVmacCA)、および Gag-Pol コード領域の大部分を SIVmac239 Gag-Pol コード領域に組換えた pPV (pPVmacGP) を使用し、GFP 発現の gene transfer vector (GTV)、rev 発現プラスミド、および VSV-G 発現プラスミドと co-transfection することで、キメラ SIV (ベクター) を作製した。

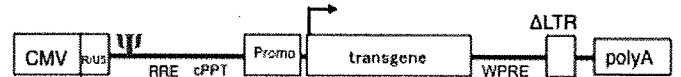
(2) 構築 SIV (ベクター) の評価

粒子力価は、ベクターゲノムを in vitro で cDNA にしてから Real-Time PCR で定量して、機能力価は、293 細胞への感染効率で測定した。

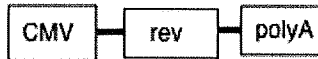
-- 第 3 世代 PV: packaging vector



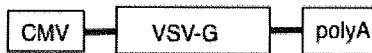
--- GTV: gene transfer vector



--- rev 発現プラスミド



--- VSV-G 発現プラスミド



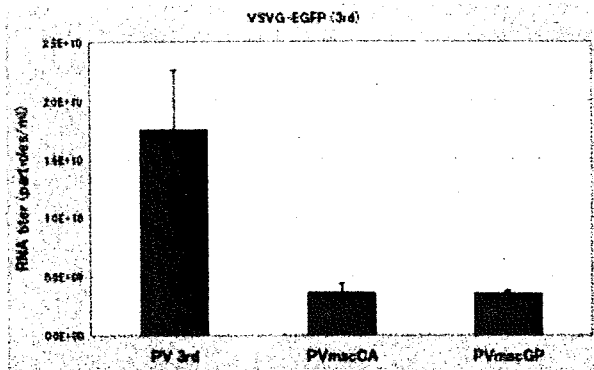
(倫理面への配慮)

SIV ベクターはアフリカモドリザルから単離した免疫不全ウイルスの一種であるが、サルやヒトにおいて病原性の報告はない。HIV に比べて安全性が高く、環境に与える影響は少ない。さらに安全性を高めるために SIV ゲノムで病原性に関与する可能性のある遺伝子領域は欠失させている。レンチウイルスベクターの取り扱いには P2 での取り扱いが認可されており、法令を遵守した実験操作法をおこなうこととする。ベクターの生産・精製は P2 クラス安全キャビネットを使用し、P2 実験室でおこなう。また本研究を実施するにあたり、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の

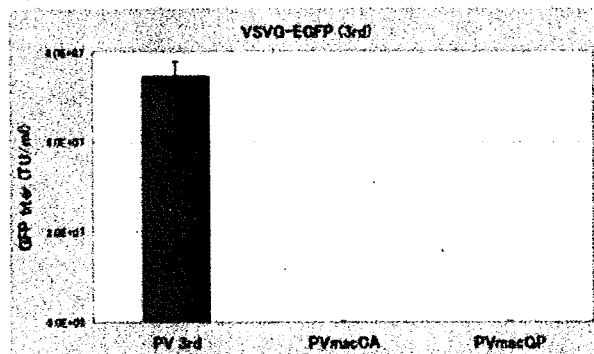
多様性の確保に関する法律およびその関連法規を遵守するものとする。

C. 研究結果

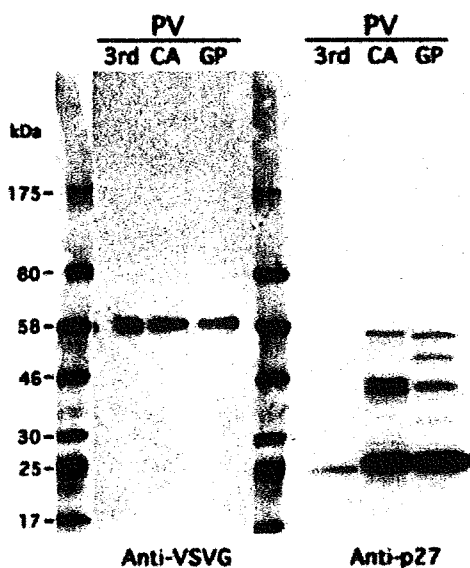
(1) 粒子力価



(2) 機能力価



(3) 粒子上の蛋白確認 (Western Blotting)



VSV-G : シュードタイプ envelope

p27 : カプシド (CA)

第3世代 SIV (PV 3rd)、Gag CA コード領域を SIVmac239 Gag CA コード領域に組換えた SIV (PVmacCA)、および Gag-Pol コード領域の大部分を SIVmac239 Gag-Pol コード領域に組換えた SIV (PVmacGP) の3種類について、SIV (ベクター) の構築を行い、その粒子力価、機能力価を測定するとともに、粒子上の VSV-G および CA (p27) について Western Blotting により、蛋白の存在を確認した。

機能力価の確認は出来なかったが、粒子力価とともに粒子上の VSV-G および p27 (CA : カプシド) 蛋白の存在が確認され、PVmacCA および PVmacGP ともに粒子形成がなされていることが確認された。

D. 考察

PVmacCA、PVmacGP ともに粒子形成がなされ、粒子としての目的物は確認された。機能力価については、integration などについて詳細に調査し、機能的な構造物の完成を目指す。

E. 結論

CTL 誘導エイズワクチン効果に関する解析のための重要な材料である複数種のキメラ SIV (ベクター) について、粒子としての調製・構築に成功した。

F. 研究発表

1 論文発表

なし。

2 学会発表

- (1) 守屋智草、鎌田健男、栗原京子、高原悠佑、井上誠、朱亜峰、長谷川護、俣野哲朗. センダイウイルスベクターワクチン接種経路の検討. 第57回日本ウイルス学会学術集会 (2C24)、東京、10/26/2009.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1 特許取得

なし。

2 実用新案登録

なし。

3 その他

なし。

SIV 複製に関与する宿主因子に関する研究

研究分担者	明里 宏文	京都大学霊長類研究所・教授
研究協力者	武内 寛明	東京大学医科学研究所・特任助教
	飯島 沙幸	医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター・流動研究員
	佐藤 裕徳	国立感染症研究所ゲノム解析センター・室長

研究要旨

本研究では、SIV 複製に関与するサル宿主因子を、培養細胞レベルで検索同定およびその個体レベルへの還元を目的として、アカゲザルおよび同属であるカニクイザル、プタオザル由来の3種類のT細胞株を用いて、ウイルス増殖複製に関わるサル宿主因子の解析を行った。昨年度は cyclophilin family (Cyp) の機能阻害剤である Cyclosporine A (CsA) が、サル細胞内の SIV 複製過程において、感染直後の逆転写反応過程に影響を及ぼしている可能性が示唆され、ヒト細胞への HIV 感染に対する効果と同様であることが示された。本年度は、CsA に影響を受ける Cyp 分子である Cyclophilin A (CypA) が SIV 感染に及ぼす効果を検討した結果、サル CypA 分子が SIV 感染に必須な宿主因子であることを明らかにした。次に CTL によるエイズウイルス認識の回避に寄与する Nef 蛋白について、MHC-I 発現制御機能領域のアミノ酸変異体とその宿主因子である μ 1A 鎖との結合性に関する詳細な解析を行なった。その結果、新たに発見された Nef WVM motif は μ 1A 鎖との特異的結合により MHC-I 発現制御を規定する事が実証された。

A. 研究目的

HIV 感染増殖において、ヒト細胞内には、それを促進する宿主因子と抑制する宿主因子とが混在している。cyclophilin family (Cyp) の一つであるヒト cyclophilin A (CypA) は、それを促進する宿主因子であり、ヒト CypA の HIV 感染増殖促進機能は、Gag 領域内のキャプシド (CA) 蛋白との相互作用によってウイルス粒子内に取りこまれた CypA と、感染標的細胞内の CypA が脱殻後の CA 蛋白と相互作用することによって発揮されることが明らかとなっている。我々のこれまでの研究により、SIV がヒトへ感染伝播する際に、ヒト CypA が SIV 増殖抑制因子として作用しており、SIV Vif 蛋白がその機能を抑制してい

ることを明らかにしている。そこで、サル T 細胞群におけるサル Cyp の機能を解析することを目的とした。昨年度までに、Cyp の機能阻害剤である cyclosporine A (CsA) を用いて、サル細胞内での SIV 複製過程における CsA の影響を解析した結果、感染直後の逆転写反応効率が低下していることが認められた。本年度は、Cyp の一つである CypA 分子が SIV 感染に対する影響を検討した。

ところでアクセサリ遺伝子産物の一つである Nef 蛋白は宿主免疫の制御機能を司っていることが知られており、ウイルス感染細胞における MHC class-I 発現を抑制することで CTL による抗原認識を回避する。このような Nef 機能は HIV,

SIV 共に認められ、霊長類エイズウイルスの長期持続感染における免疫回避能を担っている。現在我々はサル指向性 HIV-1 のサル感染実験を進めており、将来的には本モデルを用いた抗 HIV-1 ワクチンの評価研究が可能になるものと期待される。我々のこれまでの研究により、HIV-1 Nef N 末端領域の Trp13、Val16、Met20 が MHC-I 発現抑制に関与していることを見出した。昨年度までの細胞レベルでの機能解析で、これらのアミノ酸残基は機能発現に関わる宿主因子 AP-1 mu1A 鎖との相互作用部位であることが示唆された。今回は、これらの結果をふまえ、さらに in silico による分子動態シミュレーション解析および免疫共沈解析を行なった。

B. 研究方法

(1) CypA の機能的解析

- SIV 感染細胞内におけるウイルス DNA 合成量の解析：SIV 感染 24 時間後のサル T 細胞である HSC-F 細胞内で、逆転写反応を経て合成されたウイルス DNA 量を、SIV gag 領域を特異的に検出するリアルタイム PCR 法にて測定した。

- CypA 発現コンストラクトの作製

CypA 分子を発現するコンストラクトとして、pMACS Kk. HA (C) (Miltenyi Biotec GmbH) に CypA 配列を組み込んだものを作製した (pMACS Kk. HA (C) -CypA)。

- サル T 細胞への遺伝子導入法

Nucleofector Device (Lonza Walkersville Inc.) を用いた Nucleofection 法にて、サル T 細胞への遺伝子導入を行った。

- CypA 過剰発現サル T 細胞の選択法

上記の方法にて遺伝子導入した細胞を選択するために、pMACS Kk. HA (C) -CypA から細胞表面に発現す

るマウス H-2K 分子を利用した細胞分離法を用いた。具体的には、マウス H-2K 分子に対する抗体を結合させた磁気ビーズ (MACSelect Kk MicroBeads) を用いて磁気分離を行い、H-2K 発現細胞を選択した。

(2) Nef および mu1A 鎖の結合解析

- HIV-1 Nef N 末端領域変異体および mu1A 鎖の免疫共沈解析：nef 遺伝子あるいは変異体を導入した env 欠損型 HIV-1 分子クローン pNL43Δenv と VSV-G 発現ベクターを Jurkat 細胞へ共導入し、24 時間後に細胞ライセートを回収した。ライセートを anti-γ 鎖抗体で免疫沈降後電気泳動し、Nef および μ1A 鎖に対する抗体により共沈蛋白検出を行なった。

- in silico 解析：AMBER 9 ソフトウェアにより分子動態シミュレーションおよび結合エネルギー解析を行なった。

C. 研究結果

(1) CypA の機能的解析

- CypA 発現コンストラクトの作製：pMACS Kk. HA (C) -CypA を PCR 法にて作製した。また、細胞内 CypA 分子との差異を見極めるために、C 末端に HA タグを付加した。その後、HA タグを Western blot 法にて検出し、CypA 分子を発現していることを確認した。

- サル T 細胞への遺伝子導入法の検討：Nucleofection 法にて pMACS Kk. HA (C) -CypA のサル T 細胞への遺伝子導入条件を検討した。具体的には、まず GFP 発現コンストラクト (pmaxGFP) を用いて条件検討を行い、GFP 発現効率をフローサイトメトリー (FACS) にて検討した。その際、SIV 感染に必要な CD4 分子が細胞膜表面上に維持される条件検討も

同時に行った。最終的には、pMACS Kk. HA (C) -CypA によって細胞膜表面上に発現されるマウス H-2K 分子の発現効率も FACS を用いて確認した。その結果、サル T 細胞内への遺伝子導入かつ SIV 感染標的細胞として機能し得る条件を見出す事が出来た。

- CypA 過剰発現サル T 細胞の選択：サル T 細胞である HSC-F 細胞へ pMACS Kk. HA (C) -CypA の遺伝子導入を行い、24 時間後にマウス H-2K 分子を発現する細胞を MACSelect Kk MicroBeads を用いた磁気分離法にて選択した。その結果を図 1 に示す。

- CypA 過剰発現サル T 細胞を用いた SIV 感染実験：
(3) にて選択された HSC-F 細胞を CsA 存在下 (2.5 μ M) もしくは非存在下において SIV を感染させた。24 時間後の感染細胞から DNeasy tissue kit (QIAGEN) を用いて Total DNA を抽出し、逆転写反応を経て合成されたウイルス DNA 量を、リアルタイム PCR 法にて測定した。その結果、CypA を過剰発現させることにより、SIV cDNA 合成効率が上昇することが認められた。この結果を図 2 に示す。

(2) Nef および μ 1A 鎖の結合解析

- HIV-1 野生型 Nef (WT) もしくは M20A 変異体を発現した Jurkat 細胞由来ライセートを anti- γ 鎖抗体で免疫沈降を行なったところ、 γ 鎖と同様に AP-1 複合体のコンポーネントである μ 1A 鎖は同程度検出された。一方、野生型 Nef は共沈するが M20A 変異体は検出されなかった (図 3)。

- in silico 分子動態シミュレーションおよび結合エネルギー解析を行なった結果、野生型 Nef と比較して、M20A および W13A 変異体は μ 1A 鎖への結合エネルギーが顕著に低下していることが示された。以上の結果より、WVM モチーフが Nef 蛋白と μ 1A 鎖の結合ドメインであることが実証さ

れた (table 1)。

D. 考察

本年度は、サル T 細胞への SIV 感染に対する CypA 分子の影響について解析を行った。CypA 過剰発現サル T 細胞内での SIV cDNA 合成効率は、通常サル T 細胞内のそれと比較すると上昇することが認められた。更には、CsA 存在下で CypA 分子を過剰発現させることで SIV cDNA 合成効率が上昇することが認められた。これらの結果から、サル CypA 分子は SIV 感染に必須な宿主因子であることが示された。

Nef 蛋白による MHC class-I 発現抑制機能は HIV, SIV 共に認められ、霊長類エイズウイルスの長期持続感染における免疫回避能を担っている。我々のこれまでの研究により、HIV-1 Nef N 末端領域の Met20、Trp13、Val16 が MHC-I 発現抑制に寄与していることを見出した。特にこれらの残基はアラニンに置換することにより、細胞レベルでの MHC-I 発現解析 (FACS, 共焦点レーザー解析) および生化学的解析 (免疫共沈解析)、in silico 解析の何れの解析手法においても機能的欠失が見られた。従って、今回新たに発見された WVM motif は、 μ 1A 鎖との特異的結合により MHC-I 発現制御を規定する機能ドメインであることが実証された。トリプトファンをベースとしたいわゆる「タイロシンモチーフ」およびメチオニン側鎖構造との分子間相互作用が μ 1A 鎖との特異的結合を規定しているという知見はこれまで知られていなかったものであり、HIV 研究のみならず生化学分野においてもその意義は高いと考えられる。また抗 HIV ワクチン開発における Nef 機能の制御に本知見は重要と考えられる。

B. 結論

本年度は、サル CypA 分子が SIV 感染に必須な宿主因子であることを示した。このことは、HIV 感染におよぼすヒト CypA の作用機序と同様であることが示された。次に Nef 蛋白およびその宿主因子 μ 1A 鎖との結合について解析を行ない、Nef 蛋白は我々が新たに発見した WVM motif を介して μ 1A 鎖との特異結合することにより MHC-I 発現を制御する事が実証された。これらの結果は抗 HIV ワクチン開発において重要な基盤的情報となるものと考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Iwasaki Y, Akari H, Murakami T, Kumakura S, Dewan MZ, Yanaka M, Yamamoto N: Efficient inhibition of SDF-1 α -mediated chemotaxis and HIV-1 infection by novel CXCR4 antagonists. **Cancer Science** 100, 778-781, 2009.

2. Hassan R, Suzu S, Hiyoshi M, Takahashi-Makise N, Ueno T, Agatsuma T, Akari H, Komano J, Takebe Y, Motoyoshi K, Okada S: Dys-regulated activation of a Src tyrosine kinase Hck at the Golgi disturbs N-glycosylation of a cytokine receptor Fms. **Journal of Cellular Physiology** 221, 458-468, 2009.

3. Kuroishi A, Saito A, Shingai Y, Shioda T, Nomaguchi M, Adachi A, Akari A, Nakayama EE: Modification of a loop sequence between alpha-helices 6 and 7 of virus capsid (CA) protein in a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)

derivative that has simian immunodeficiency virus (SIVmac239) vif and CA alpha-helices 4 and 5 loop improves replication in cynomolgus monkey cells.

Retrovirology 6, 70, 2009.

2) 学会発表

1. 齊藤暁、飯島沙幸、岩崎優紀、黒石歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、俣野哲朗、明里宏文：SIV 由来 CA h6/7 loop を持つ第 2 世代サル指向性 HIV-1 クローンはカニクイザル個体で効率よく増殖する

第 57 回ウイルス学会（東京）平成 21 年 10 月 25-27 日

2. 齊藤暁、飯島沙幸、岩崎優紀、明里宏文：第 2 世代サル指向性 HIV-1 クローンはカニクイザル個体において効率良く増殖する

第 23 回日本エイズ学会学術集会（名古屋）平成 21 年 11 月 26-28 日

H. 知的財産の出願・登録状況

なし。

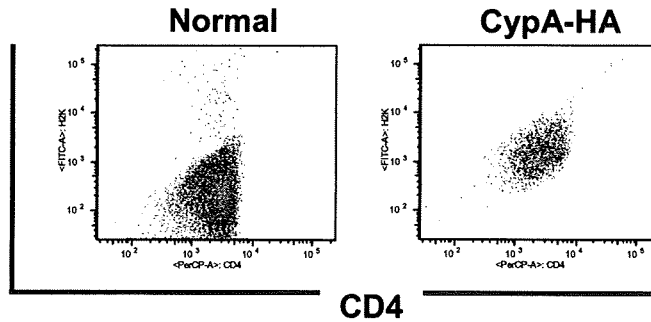


図1. サルT細胞 (HSC-F) への CypA 発現コンストラクトの導入効率

HSC-F 細胞への pMACS Kk. HA (C)-CypA コンストラクトを Nucleofection 法にて遺伝子導入を行い、24 時間後の細胞表面マウス H-2K 分子の発現効率をフローサイトメトリーにて解析した。横軸は細胞表面 CD4 分子の発現効率を表し、縦軸は H-2K 分子の発現効率を示している。

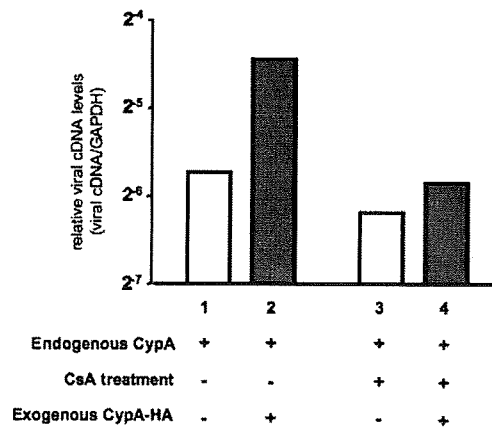


図2. HSC-F 細胞および CypA 過剰発現 HSC-F 細胞内における SIV cDNA 合成量の比較

SIV を HSC-F 細胞および CypA 過剰発現 HSC-F 細胞に感染させ、24 時間後の感染細胞内にて合成されたウイルス DNA をリアルタイム PCR 法にて測定した結果を示す。縦軸は感染細胞内における SIV cDNA 合成量を示している。横軸については、CsA treatment は、CsA 非存在 (-) もしくは存在下 (+) であることを示し、Exogenous CypA-HA は、HSC-F 細胞 (-) および CypA 過剰発現 HSC-F 細胞 (+) であることを示している。

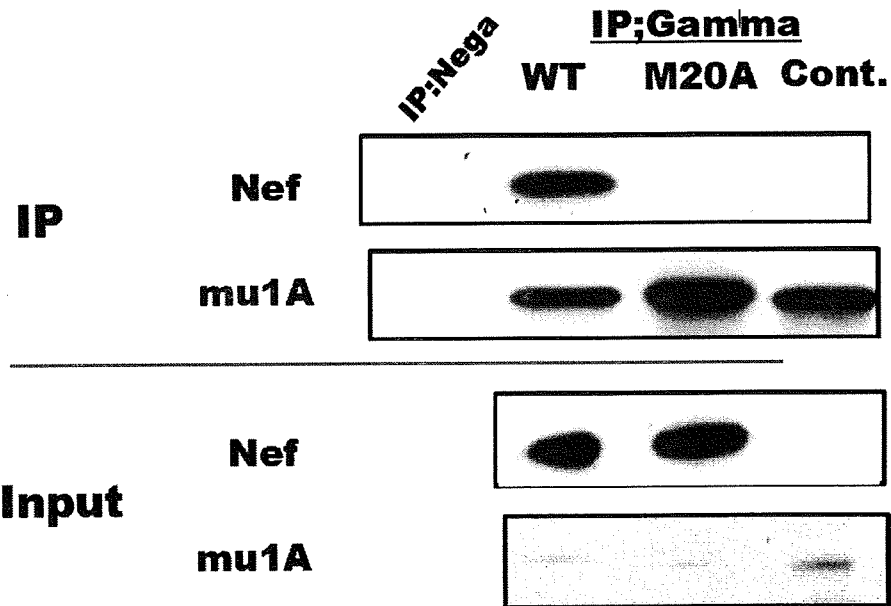


図3. Nef および mu1A 鎖の免疫共沈解析

nef 遺伝子あるいは変異体を導入した env 欠損型 HIV-1 分子クローン pNL43 Δ env と VSV-G 発現ベクターを Jurkat 細胞へ共導入し、24 時間後に細胞ライセートを回収した。ライセートを anti- γ 鎖抗体で免疫沈降後電気泳動し、Nef および μ 1A 鎖に対する抗体により共沈蛋白検出を行なった。

Table 1. molecular modeling法による μ 1Aと各種Nef変異体の結合エネルギー解析

	wild-type	W13A	M20A
ΔG	-79.0 \pm 16.3 \dagger	-19.8 \pm 9.8	-9.0 \pm 9.3
$\Delta\Delta G^*$	-	+59.2	+70.0

Unit is kcal/mol.

* $\Delta\Delta G = \Delta G(\text{mutant}) - \Delta G(\text{wild-type})$

\dagger The more negative value means the more binding affinity.

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Nakajima T, <u>Kimura A</u>	Comparative genomics: insight into human health and disease	Mehra N	The HLA Complex in Biology and Medicine: a resource book	Jaypee Brothers Medical Publishers Ltd	New Delhi	2010	566-588

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamamoto T, Iwamoto N, Yamamoto H, Tsukamoto T, Kuwano T, Takeda A, Kawada M, Tsunetsugu-Yokota Y, <u>Matano T</u>	Polyfunctional CD4 ⁺ T-cell induction in neutralizing antibody-triggered control of simian immunodeficiency virus infection	J Virol	83	5514-5524	2009
Tsukamoto T, Takeda A, Yamamoto T, Yamamoto H, Kawada M, <u>Matano T</u>	Impact of cytotoxic-T-lymphocyte memory induction without virus-specific CD4 ⁺ T-cell help on control of a simian immunodeficiency virus challenge in rhesus macaques	J Virol	83	9339-9346	2009
Shichi D, Ota M, Katsuyama Y, Inoko H, Naruse T, <u>Kimura A</u>	Complex divergence at a microsatellite marker C1_2_5 in lineage of HLA-Cw/-B haplotype	J Hum Genet	54	224-229	2009
Nakajima T, Nakayama EE, Kaur G, Terunuma H, Mimaya J, Ohtani H, Mehra N, Shioda Y, <u>Kimura A</u>	Impact of novel TRIM5alpha variants, Gly110Arg and G176del, on the anti-HIV-1 activity and the susceptibility to HIV-1 infection	AIDS	23	2091-2100	2009
Iwasaki Y, <u>Akari H</u> , Murakami T, Kumakura S, Dewan MZ, Yanaka M, Yamamoto N	Efficient inhibition of SDF-1α-mediated chemotaxis and HIV-1 infection by novel CXCR4 antagonists	Cancer Sci	100	778-781	2009
Hassan R, Suzu S, Hiyoshi M, Takahashi-Makise N, Ueno T, Agatsuma T, <u>Akari H</u> , Komano J, Takebe Y, Motoyoshi K, Okada S	Dys-regulated activation of a Src tyrosine kinase Hck at the Golgi disturbs N-glycosylation of a cytokine receptor Fms.	J Cell Physiol	221	458-468	2009

Kuroishi A, Saito A, Shingai Y, Shioda T, Nomaguchi M, Adachi A, <u>Akari A</u> , Nakayama EE	Modification of a loop sequence between alpha-helices 6 and 7 of virus capsid (CA) protein in a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) derivative that has simian immunodeficiency virus (SIVmac239) vif and CA alpha-helices 4 and 5 loop improves replication in cynomolgus monkey cells	Retrovirology	6	70	2009
Yamamoto H, <u>Matano T</u>	Neutralizing antibodies in SIV control: co-impact with T cells	Vaccine		in press	

IV. 研究成果の刊行物・別刷

21 *Comparative Genomics: Insight into Human Health and Disease*

Chapter

Toshiaki Nakajima, Akinori Kimura

INTRODUCTION

Comparative genomics is an approach of extraordinary promise for studying the biological significance of the genome from the evolutionary points of view, because genome sequence is a record of the evolutionary history of organisms. It also has a crucial role in furthering our understanding of the pathophysiological mechanisms operated by human disease genes. The functional analyses of a homologue of disease gene in model organisms can provide important information in understanding the biochemical function of the human disease gene.

The comparative genomic analysis consists of 4 main processes, including the following steps. Step 1: Generation of sequence data; Step 2: Identification of homologue sequences among related genomes; Step 3: Multiple-sequence alignment; and step 4: Analyses to determine the biological significance of the homologue sequences (Fig. 21.1).¹ The number of species available for genomic comparison has been rapidly increasing. The human genome project, which was started in the late 1980s and ostensibly "completed" in 2003, has actively stimulated the development of genome projects for model organisms, such as *C. elegans*, fruit fly, and mouse. Furthermore, the rapid progress in sequence technology, such as massive parallel sequencing technology,² has further accelerated the increase in the number of complete or semi-complete genome sequences of other organisms. These sequences serve as the material for large-scale analysis of comparative genomics. Moreover, rapid progress in the field of bioinformatics, which provides useful tools to reconstruct homologous sequences among related species and to generate base-pair alignment, has advanced studies of comparative genomics. There are several data-bases that are available for large-scale comparative sequence analyses (Table 21.1).¹

Table 21.1: Main features of the data bases available for large-scale comparative genomics

<i>Data base</i>	<i>Web site</i>	<i>Main feature</i>
Ensembl Genome Browser ⁶³	http://www.ensembl.org/index.html	Joint project between EMBL-EBI and the Sanger Center to develop a software system which produces and maintains automatic annotation on eukaryotic genomes.
Galaxy ⁶⁴	http://g2.bx.psu.edu	Interactive system that combines the power of existing genome annotation databases with a simple Web portal to enable users to search remote resources, combine data from independent queries, and visualize the results.
UCSC Genome Browser ⁶⁵	http://genome.ucsc.edu/	The UCSC Genome Browser was created by the Genome Bioinformatics Group of UC Santa Cruz. The UCSC Genome Browser website contains the reference sequence and working draft assemblies for a large collection of genomes. It also provides a portal to the ENCODE project.
VISTA ⁴⁹	http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml	The VISTA site includes computational tools for comparative genomics and provides whole-genome alignments of large vertebrate genomes

In this chapter we will focus on the methods used to evaluate the biological significance of homologous sequences (step 4 in Fig. 21.1). In particular, we focus on the methods based on the theory of natural selection, but we will not touch on other steps of comparative genomics (Fig. 21.1). The underlying principle behind the identification of the biological significance is that the genomic regions, which have been evolving more rapidly (positive selection) or more slowly (negative selection) than the local rate of neutral evolution, are tightly linked to biological significance. Human diseases are occasionally linked to human evolutionary process and population history, so that comparative genomics will also provide insight into human health and disease.

HUMAN DISEASE AND EVOLUTION

The molecular evidence that the human evolutionary process is tightly linked to human disease has been steadily accumulating during the last decades. For example, the evolutionary processes, especially natural selection, affect the frequency of disease-related mutations in the general population. Disease-related mutations, which had been introduced through errors in DNA replication, are believed to be rapidly removed by natural negative selection triggered by the deleterious consequences induced by