

II. 分担研究報告

生ワクチンが誘導する感染防御へのウイルス多様性の影響

研究分担者 森 一泰（国立感染症研究所 主任研究官）

研究要旨 SIV 感染制御(Elite controller 等)との関連が報告されている MHC-I 遺伝子を持たないアカゲザルを用い、糖鎖修飾の減少により弱毒化した生ワクチン（糖鎖変異ワクチン）の効果と関連する宿主応答を解析した。感染地域における HIV 多様性を想定しチャレンジウイルスとしてワクチンとは異なるサブタイプ株 SIV_{smE543-3} を用いた。11 頭のワクチン感作ザルは 1000 TCID₅₀ の静脈内接種による感染を強く抑制した。チャレンジ感染後、一過性の初期感染が約半数で確認されたが、感染後 4 週から 10 週まで血中ウイルス量は検出限界以下となった。その後 7 頭では 80 週間以上感染制御が維持された。しかし 4 頭では感染防御免疫に抵抗性の変異ウイルスが出現し、3 頭は AIDS を発症した。変異ウイルスはワクチンウイルスとの組み換えまたはチャレンジウイルス由来であった。共通する性質として SIV_{smE543-3} の gp120 を持ち、感染の長期化により N 型糖鎖付加部位は増加していた。慢性感染における感染制御群と非感染制御群とは MHC 遺伝子型が異なっていた。慢性期の感染制御には MHC 拘束性を持つ CTL, NK 細胞の関与が推測された。初期感染制御に働く宿主応答は宿主多様性に影響されない性質から HIV-1 ワクチン研究における新たな重要な研究課題となることが示唆された。糖鎖変異ワクチンによるサブタイプが異なる SIV の感染防御の機序の解明と HIV ワクチン開発研究への応用が期待される。

A. 研究目的

HIV は高い変異性と多様性を持ち、感染地域には複数のサブタイプの HIV が確認されている。ワクチンは流行ウイルスとして対象となる複数のサブタイプに対する感染抑制が必要条件となる。一方、HIV 感染者の約 5%は抗 HIV 薬未治療にも関わらず長期間にわたって感染を制御する。宿主因子のひとつとして MHC 遺伝子の役割が明らかとなっている。サルエイズモデルにおいても感染制御

と関連する MHC 遺伝子が同定されている。我々は糖鎖欠失変異により低病原性化した SIV が生ワクチンとして非常に高い感染防御を個体差に関係なく誘導することを明らかにした。本研究では、MHC 遺伝子型を決定したアカゲザルを用い糖鎖修飾変異生ワクチンが誘導するサブタイプが異なる SIV に対する感染防御効果を検討し感染防御の機序を解明し HIV ワクチンへの応用を検討する。

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。

糖鎖欠失変異ウイルス

Δ5G

系統 8 に分類される SIV_{sm}、SIV_{mac239} 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）の N 型糖鎖付加部位の 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、代わりに新たに 70 (Δ5G ver1) または 377 (Δ5G ver2) の N 型糖鎖付加部位の Asn を Gln に変異させた。

Δ3G

SIV_{mac239} の gp120 の N 型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

SIV_{sm}E543-3

系統 1 に分類される SIV_{sm}、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。

血漿ウイルス RNA 量の測定

血漿ウイルス RNA は Roche Magnapure compact を用いて精製した。SIV_{mac239} と SIV_{sm}E543 のウイルス RNA 量は異なる gag 遺伝子配列から作成した

プライマー: (forward primer, reverse primer TaqMan probe) によるそれぞれの SIV を特異的に検出するリアルタイム PCR 法により測定した。

末梢リンパ球中の SIV DNA の塩基配列の決定

末梢リンパ球を用い SIV proviral DNA 全配列をカバーする複数の nested PCR により SIV DNA を増幅し塩基配列を決定した。

SIV 特異的 T 細胞の測定

末梢リンパ球中の SIV_{mac239}、または SIV_{sm}E543-3 特異的 T 細胞の頻度をそれぞれの全ウイルスタンパクをカバーするペプチドを用い反応性を IFN- γ 産生細胞を検出する ELISPOT キット (U-CyTech 社) を用いて測定した。

中和抗体の測定

SIV の中和抗体を高感度に測定する方法として、SIV Tat 依存的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 (SIV_{mac239} または SIV_{sm}E543) を補体活性不活化した感染ザル血漿と 37° C, 30 分反応し、中和後に残存した感染性ウイルスを SIV-LTR/CEMx174 により測定した。

(倫理への配慮)

本研究は動物実験を行うことから、動物実験については、倫理、動物愛護の観点から国立感染症研究所、医薬基盤研究所のそれぞれの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計画について両動物実験委員会による審査・承認を受けた。

C. 研究結果

糖鎖変異生ワクチンとチャレンジウイルスの糖鎖修飾

HIV/SIV のウイルススパイクは糖鎖に覆われている。我々は SIV の糖鎖修飾について感染と宿主応答における役割について研究を行っている。

SIV の糖鎖修飾は、細胞指向性、抗体結合に影響を与える(論文作成中)。感染宿主においては SIV の細胞・組織指向性に影響を与える(論文作成中)。本研究では糖鎖修飾の一部を欠失した SIV 生ワクチンが誘導する感染抑制効果の解析と関連する宿主応答の解析を行っているが、今年度の研究からは SIV の糖鎖修飾とワクチンが誘導する防御免疫に対する抵抗性との関連を示す結果が得られた。

表 1 と図 1 にチャレンジウイルス SIVsmE543-3 とワクチンウイルス株 SIVmac239 の違いを示す。SIVsmE543-3 と SIVmac239 は異なるサブタイプに分類される。各タンパクにおける違いは HIV-1 サブタイプとほぼ同じである(表 1)。Env では 18.2%の違いがあるが、N 型糖鎖付加部位は両ウイルス間で非常に一致している(図 1)。V1, V2, G-loop の 3 カ所に違いが見られる。アミノ酸配列の違いにも関わらず糖鎖修飾が保存されている原因として糖鎖修飾を与えるウイルスの性質はウイルス感染において必須な機能と密接に関係していることが推測される。

4 種類のワクチンウイルスの糖鎖欠失変異は両ウイルス間で保存されている 6 カ所(70, 79, 171, 377, 460, 479)と SIVmac239 の 146 である。ワクチンウイルスは培養 CD4+T 細胞での増殖性は野生株 SIVmac239 と変わらない。しかし感染宿主では慢性感染は抑制される。原因として初期感染における感染組織が異なる。このワクチンウイルスのト

ロピズムの性質は糖鎖修飾の欠失による。この性質はウイルスの低病原性の原因となり、感染宿主においては防御免疫誘導の原因となる。

表 1. 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

糖鎖変異生ワクチンの SIVsmE543-3 に対する感染防御効果

1000 TCID₅₀ の SIVsmE543 を糖鎖変異ワクチン感染ザル 11 頭に静脈内接種した。ワクチン未接種群では SIVsmE543-3 は高い増殖性を示し、2 頭は感染後 45 週には発症した(図 2-A 左上)。ワクチン群ではチャレンジ感染後 SIVsmE543-3 (黒四角)による一過性の初期感染が見られたが、すぐに制御された。感染制御は全 11 頭で感染後 4 週から 10 週まで継続した(図 2-C)。その後、7 頭では感染後 80 週以上感染は非常に低レベルに抑制された(感染制御群: 図 2-A)。しかし残り 4 頭ではウイルス感染が上昇し持続感染になった

(非感染制御群: 図 2-B)。Mm0513 ではチャレンジウイルス(黒四角)、残り 3 頭ではワクチンウイルス(白三角)を示す血中ウイルスによる持続感染が確認された。

図1. SIVsmE543-3, SIVmac239 gp120 のN型糖鎖付加部位とワクチンウイルスの糖鎖欠失部位

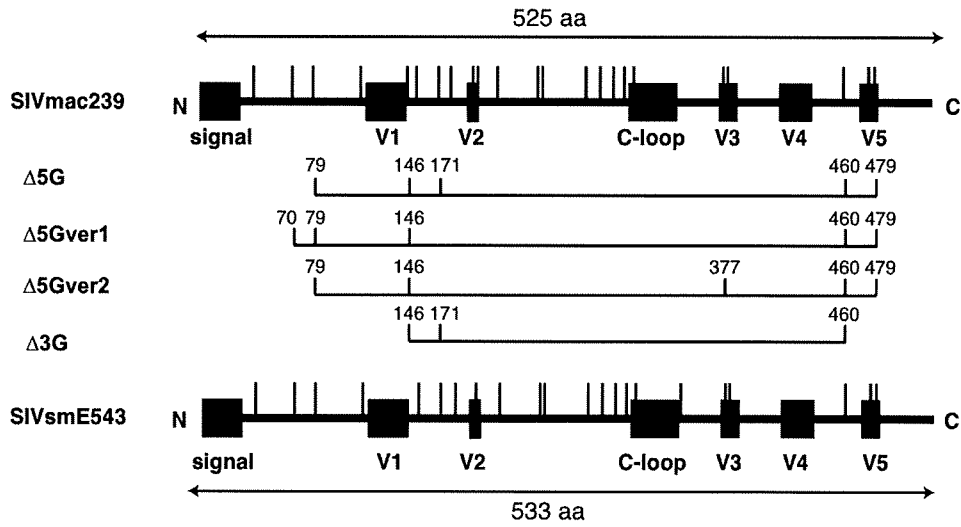
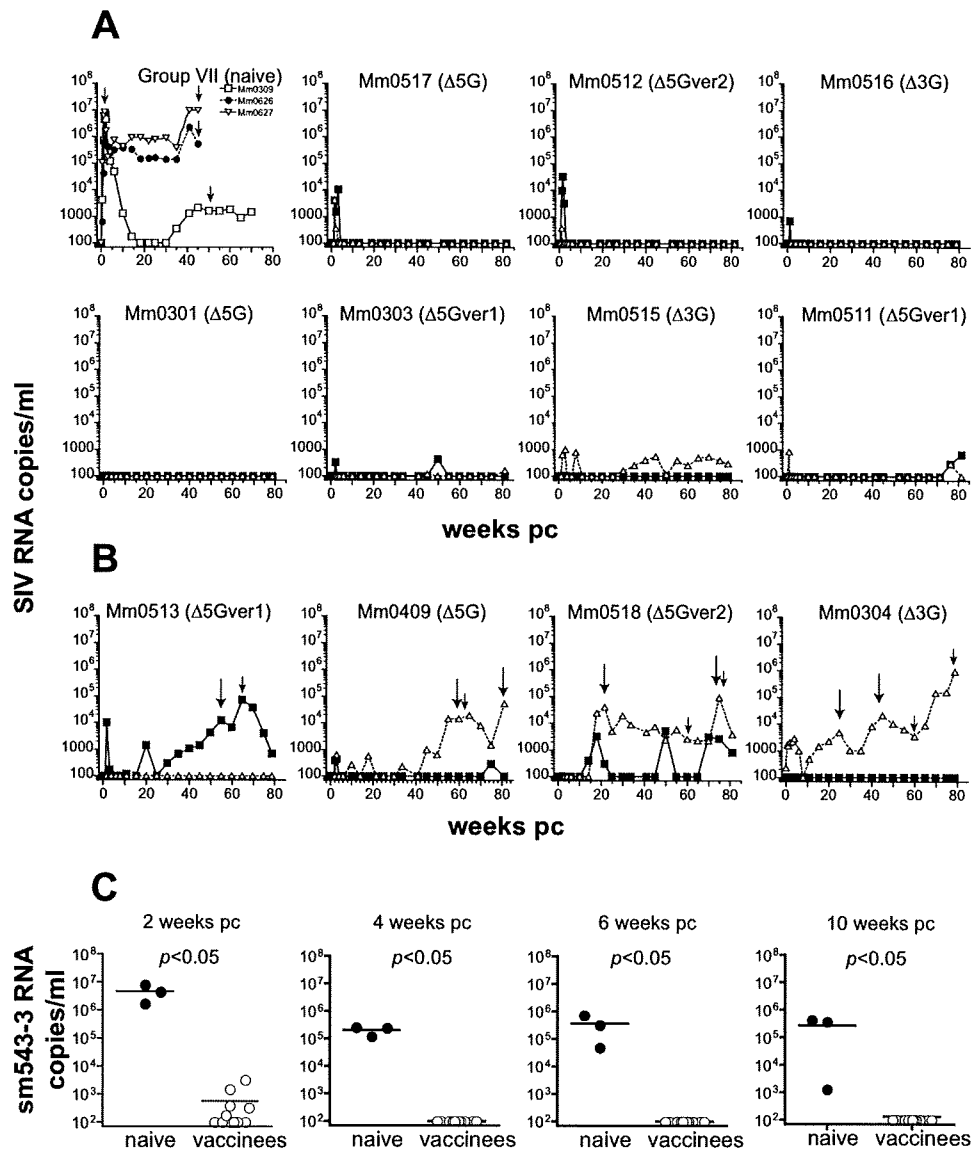


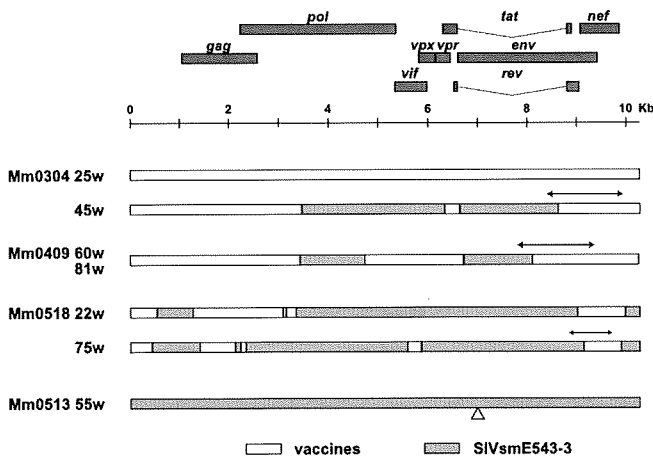
図2. 糖鎖変異生ワクチンの SIVsmE543-3 チャレンジ感染に対する効果



非感染制御群における変異ウイルスの出現

非感染制御群において持続感染したウイルスを同定するために矢印に示される血液から調製した末梢単核球を用いウイルス DNA の塩基配列を決定した(図 3)。Mm0304 からチャレンジ 25 週後に同定されたのはワクチンウイルスであったが、45 週ではワクチンウイルスとチャレンジウイルスの組み換えウイルスであった。Mm0409、Mm0518 からも組み換えウイルスが同定された。しかし Mm0513 からはチャレンジウイルス SIVsmE543-3 が確認された。Env 遺伝子には 9 bp の欠失があった。このように非感染群では変異ウイルスの出現が感染制御の破綻の原因となっていた。

図 3. 非感染制御群に出現した変異ウイルス



変異ウイルスにおける糖鎖修飾の増加

慢性感染非制御群に出現した変異ウイルスの共通する SIV 配列として Env 遺伝子 gp120 部分は SIVsmE543-3 由来となっていた(図 3)。そこで gp120 のアミノ酸配列と N 型糖鎖付加部位を確認した。病原性の SIVmac239 と SIVsmE543-3 の gp120

にはそれぞれ 23 と 22 カ所の N 型糖鎖付加部位が存在する(図 4)。ワクチンウイルスには糖鎖付加部位欠失により gp120 には 18 または 20 カ所の N 型糖鎖付加部位が存在する。出現した変異ウイルスでは組み換えによりワクチンウイルスの N 型糖鎖修飾は SIVsmE543-3 の 22 カ所に置換され、さらに感染の経過により N 型糖鎖付加部位は増加した(図 4)。生ワクチン感作ザルはチャレンジウイルス感染を感染後 10 週までは制御したが、糖鎖修飾増加を含む変異を獲得したウイルスはこの感染防御免疫に対する抵抗性を獲得していた。

糖鎖変異生ワクチン感作ザルにおける獲得免疫

ワクチン感作ザルの血液に含まれるチャレンジウイルス SIVsmE543-3 に対する中和抗体価を測定した。全 11 頭において感染後 0, 2, 6, 15, 40, 60 週後に抗体価 (>20) は検出されなかった。

次に、感染防御に働く宿主応答として細胞性免疫を測定した。SIVmac239、SIVsmE543-3 タンパクを網羅するペプチドをウイルスタンパク単位で混合しウイルスタンパク特異的 T 細胞をワクチン接種前、ワクチン感作後チャレンジ感染前、チャレンジ後 3, 14, 30, 60 週後に末梢単核球を用いて測定した(図 5)。すべてのワクチン感作ザルにおいて Gag 特異的 T 細胞が優位に誘導されていた。しかし感染制御群と非感染制御群との間にはウイルス特異的 T 細胞頻度において有意な違いは見られなかった。Mm0409 (非感染制御群)、Mm0511 (感染制御群)、Mm0515 (感染制御群) ではウイルス特異的 T 細胞の頻度は実験期間を通じて低レベルであった(図 5)。

図4. 糖鎖変異生ワクチン、SIVmac239, SIVsmE543-3, 非感染制御群に出現した変異ウイルスの gp120 に存在する N 型糖鎖付加部位

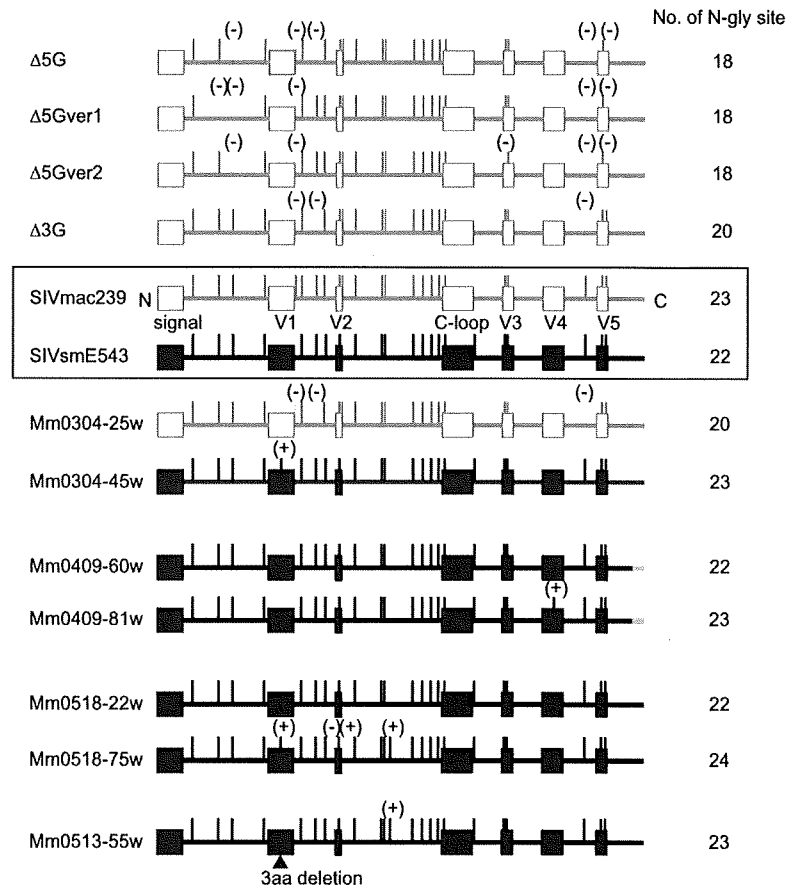
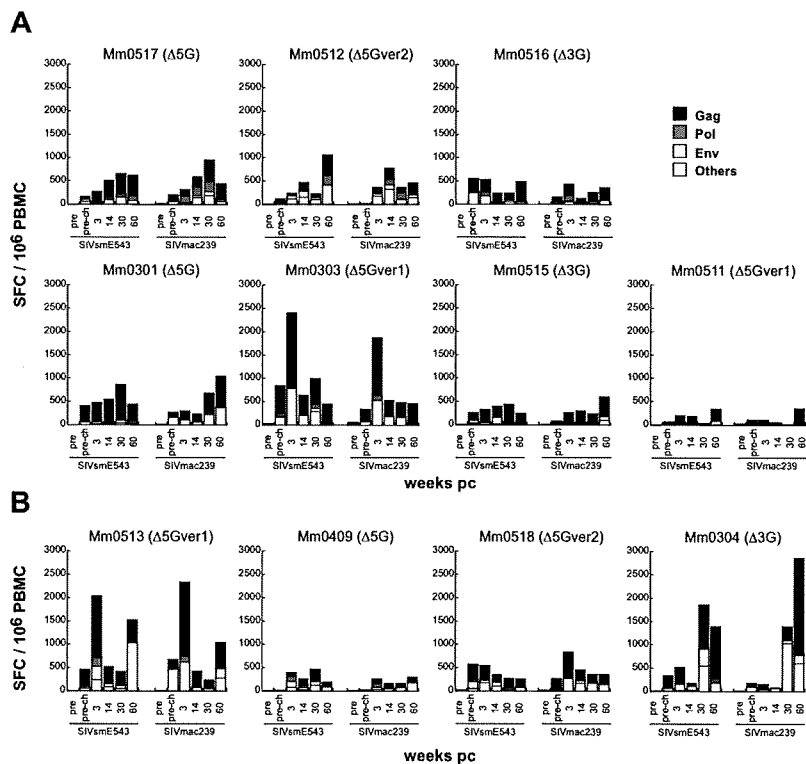


図5. 糖鎖変異ワクチン接種ザルへの SIVsmE543 チャレンジ感染前後に誘導された SIV 特異的 T 細胞



感染制御群と非感染制御群の MHC の相違

HIV 感染と同様に SIV 感染も MHC の影響を受ける。そこで感染制御群と非感染制御群の MHC 遺伝子について感染制御との関連について調べた。感染制御群と非感染制御群においてそれぞれに共通する MHC 遺伝子が確認された。感染制御群（7 頭）では A1*0040102, A1*11001, A1*03202 がそれぞれ 4, 3, 2 頭に検出されたが非感染制御群では検出されなかった。非感染制御群（4 頭）では A1*0560202, A1*01807 がそれぞれ 2 頭に検出されたが感染制御群では検出されなかった。MHC II 遺伝子、ハプロタイプにおいても MHC-I 遺伝子と関連した感染制御群、非感染制御群で共通する遺伝子、ハプロタイプが検出された。この結果は MHC 遺伝子あるいは関連する遺伝的性質が慢性感染期における SIV 感染制御と密接に関連することを示唆する。

D. 考察

SIVmac239 と SIVsmE543-3 はウイルスタンパクのアミノ酸配列において 10-30%の違いがあり HIV-1 のサブタイプ間の違いとほぼ等しい。このようなウイルスの多様性は感染性、感染抵抗性が異なる宿主におけるウイルスの選択の結果と考えられる。ウイルススパイクは感染標的細胞への感染（侵入）に必要なウイルス機能部位であることから宿主免疫のターゲットとなっている。持続感染は宿主応答に対する抵抗性を獲得した変異ウイルス増殖により成立する。変異ウイルスは感染・増殖に必要な性質は保持しながら宿主免疫からの認識からの回避のための変異を蓄積する。両ウイルスの間でウイルススパイクのアミノ酸配

列の違い、N 型糖鎖付加部位の一致も宿主免疫回避と感染性の保持の結果と考えられる。

SIVmac239 と SIVsmE543-3 はいずれも中和抗体に対する抵抗性が高い。逆に糖鎖修飾生ワクチンは SIVmac239 と比べて中和されやすい。組み換えウイルスの出現の原因としてワクチンウイルスに対する中和抗体による選択が考えられる。実際に慢性感染制御群は非制御群を比較すると高い SIV 抗体価が検出された。抗体が組み換えウイルス出現の原因のひとつになっている可能性は否定できない。

HIV/SIV 感染は宿主の遺伝的性質の影響を受ける。自然に SIV 感染を制御する宿主 (elite controller 等) が存在する。関連する遺伝的因子のひとつとして MHC アリルが報告されている。アカゲザル MHC-I 遺伝子については B*08, B*17 は elite controller との関連、A*01, A1*06501 はワクチン制御との関連が報告されている。本研究で用いたサルは種々の MHC 遺伝子を持つがこれらの遺伝子を持つサルは除外されている。糖鎖変異生ワクチンの効果と MHC 遺伝子との関連についてはチャレンジ感染後 10 週まで（初期感染制御）とそれ以降（慢性感染）では異なっていた。初期感染制御においては、すべての個体で感染制御が確認された。初期感染制御と関連する宿主応答に関しては MHC の拘束性がないことから CTL, NK 以外の自然免疫系の宿主応答が重要な役割を果たしていることが推測される。

慢性期においては、SIV 感染が制御された群（7 頭）と変異ウイルスが出現した群（4 頭）に分かれた。MHC-I 遺伝子、MHC-II ハプロタイプは両群で異なっていた。この結果は、慢性感染の制御に

おける宿主遺伝的性質、特に MHC 遺伝子の影響が推察された。感染制御に働く宿主応答として CTL、NK 細胞の役割が予想される。前述の中和抗体の関与を含め獲得免疫の誘導の違いが慢性感染期における SIV 感染制御に大きな影響を与えていることが推測される。

E. 結論

糖鎖変異生ワクチンはサブタイプが異なる

SIV_{smE543} に対しサル MHC 遺伝子タイプの違いにも関わらず初期感染を制御する宿主応答を誘導した。しかし慢性感染制御には個体差があり、MHC を含む遺伝子的性質の関連が示唆された。

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

Pereira LE, Onlamoon N, Wang X, Wang R, Li J, Reimann KA, Villinger F, Pattanapanyasat K, Mori K, Ansari AA. Preliminary in vivo efficacy studies of a recombinant rhesus anti-alpha(4)beta(7) monoclonal antibody. Cell Immunol. 259,165-176, 2009

学会発表

- ① K. Mori, C. Sugimoto, Teiichiro Shiino, Akinori Kimura, Masaaki Miyazawa, Vanessa

Hirsch, Naoki Yamamoto, Yoshiyuki Nagai. Long-term control of heterologous challenge infection in rhesus macaques vaccinated with live attenuated deglycosylated SIV by CD8+ cells mediated response. 27th annual symposium on nonhuman primate models for AIDS. October, 2009, Boston, USA.

- ②. 糖鎖修飾による組織・細胞指向性はエイズウイルスの病原性・感染防御免疫誘導を決定する。森一泰、杉本智恵、横田恭子、鈴木康夫、山本直樹、永井美之 日本ウイルス学会、2009年、東京
- ③. 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 2 森一泰、杉本智恵、渡辺哲、佐藤洋隆、成瀬妙子、椎野禎一郎、宮澤正顯、木村彰方、山本直樹、永井美之、日本エイズ学会、2009年、名古屋
- ④. 長期感染における糖鎖欠失変異 SIV の病原性 森一泰、杉本智恵、佐藤洋隆、渡辺哲、山本直樹、永井美之、日本エイズ学会、2009年、名古屋
- ⑤. SIV_{mac239} Env gp120 アスパラギン結合型糖鎖の宿主免疫応答に対する影響 松原明弘、高村史記、草川茂、武部豊、森一泰、永井美之、保富康宏 日本エイズ学会、2009年、名古屋

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-A および Mamu-B 遺伝子 cDNA の多様性を遺伝子配列レベルで解析し、ハプロタイプを構成する Mamu-A 遺伝子ではアレル間の発現性が大きく異なるのに対し、Mamu-B 遺伝子の発現性はアレルによらずほぼ同程度であることを確認した。また、検出された 175 アレルのうち 107 アレル（60.8%）は新規アレルであったことから、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が示唆された。一方、NKG2D レセプターのリガンドである ULBP4 遺伝子を解析し、アカゲザルでは少なくとも 14 のアレルが存在すること、うち 1 アレルは機能欠損アレルであることが明らかになった。一方、SIV/HIV ウイルス感染抵抗性に関わるとされている APOBEC3 遺伝子群のゲノム多様性をヒト集団において解析し HIV/AIDS との関連を検討したが、APOBEC3B 遺伝子欠損型は HIV-1 感染感受性との関連は日本人集団、インド人集団のいずれにおいても観察されなかった。

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よ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

(2) ULBP4 遺伝子多型の解析：ULBP4 遺伝子の多型解析を行ったところ、アカゲザル集団に 16 種類の異なるアリルが検出された (表 2)。ことに、多型の半数以上はアミノ酸置換を伴うものであることから、ULBP4 遺伝子の多様性形成には進化選択圧が存在したものと考えられる。ULBP 遺伝子群には複数の遺伝子があるが、ヒトにおいても ULBP4 が最も多様であることが知られている。昨年度までの解析でアカゲザルでは ULBP4 遺伝子に極めて類似した偽遺伝子が存在するが、今回の検討で用いたプライマーは偽遺伝子は増幅しないように設定しているため、今回得られたアリルデータはいずれも ULBP4 に対応するものと考えられる。ヒトでは 7 アリルが報告されていることを考慮すると、アカゲザルにおける多様性はヒトよりもはるかに大きいと言える。ULBP4 アリルと SIV ワクチン応答性との関連を検討中であるが、現在のところ明確な関連性は得られていない。

表 2 アカゲザル ULBP4 遺伝子の多様性

Genotype	Allele 1	Allele 2	Allele 9	Allele 14	Allele 4	Allele 5	Allele 15	Allele 10	Allele 11	Allele 7	Allele 13	Allele 3	Allele 6	Allele 8	Allele 12	Allele 16
1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
4	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
5	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
6	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
7	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
8	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
9	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
10	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
11	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
12	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
13	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
14	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
15	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
16	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

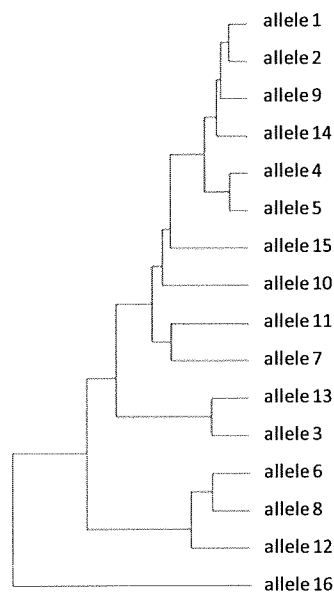


図 2 アカゲザル ULBP4 アリルの進化系統樹

アカゲザル ULBP4 アリル群における特徴は、途中に終止コドンが出現するアリル (アリル 16) が存在することである。系統樹を作成するとアリル 16 は早期に分岐しているが、これは終止コドンの出現以外にも多数の特異的な変異が存在するためである (図 2)。なお、アリル 16 を除いて検討した場合でも ULBP4 遺伝子多型の半数以上はアミノ酸置換を伴うものであることから、機能的な進化選択圧の存在が考えられる。

(3) APOBEC3 遺伝子領域の解析：アカゲザルにおける SIV 抵抗性に関わる宿主要因として TRIM5 α や APOBEC3 が報告されているが、進化学的な解析から APOBEC3 による感染防御の方が古くから発達したものと考えられる。本研究でヒトにおける APOBEC3B 遺伝子欠損型 (D 型アリル) の頻度を検討したところ、日本人一般集団 (0.314) (表 3)、インド人一般集団 (0.171) (表 3) とともに白人集団や黒人集団に比較して著しく高いことが判明した。

表 3 日本人集団における APOBEC3B 欠損頻度

Genotype	HIV		Control		D allele OR= 0.937 95% CI 0.653-1.343	D/D genotype OR= 0.650 95% CI 0.275-1.538	I/D or D/D genotype OR= 1.031 95% CI 0.645-1.647
	I/I	I/D	D/D	I			
I	45	47.4%	128	48.1%	P= 0.722 chi-square test	P=0.426 Fisher's exact test (two-sided test)	P= 0.900 chi-square test
I/D	43	45.3%	109	41.0%			
D/D	7	7.4%	29	10.9%			
allele	I	133	70.0%	365	68.6%		
	D	57	30.0%	167	31.4%		

表 4 インド人集団における APOBEC3B 欠損頻度

Genotype	HIV		Control		D allele OR=0.907 95% CI 0.637-1.291	D/D genotype OR=1.215 95% CI 0.425-3.472	I/D or D/D genotype OR=0.853 95% CI 0.569-1.280
	I/I	I/D	D/D	I			
I	181	72.1%	139	68.8%	P=0.587 chi-square test	P=0.796 Fisher's exact test (two-sided test)	P=0.443 chi-square test
I/D	61	24.3%	57	28.2%			
D/D	9	3.6%	6	3.0%			
allele	I	423	84.3%	335	82.9%		
	D	79	15.7%	69	17.1%		

さらに、白人では DD 型は HIV 感染感受性と有意に関連する (患者集団に有意に高頻度である) と報告されているが、日本人集団では HIV 患者で 7.4%、一般健常者で 10.9% であり、インド人集団でも患者で 3.6%、一般健常者で 3.0% となっており、有意な関連は認められなかった。患者集団中での DD 型頻

度はむしろ低いことから、少なくとも日本人やインド人においては APOBEC3B 欠損は HIV 感染感受性を規定する因子とはなっていないと考えられた。

D. 考察

ワクチン実験アカゲザル集団について、昨年度までに引き続いて Mamu-A および Mamu-B 遺伝子 cDNA の配列解析を行った結果、同定されたアレルの 60%は新規アレルであった。また、既知アレルの多くは中国産アカゲザルにおいて報告されているものと一致しており、アカゲザルの MHC 多様性は集団の分離以前から存在するが、分離後にはそれぞれの地域で独自に進化したものと考えられる。ワクチン後の感染防御効果との関連では、エリートコンローラーと類似した構造の Mamu-B アレルは、むしろ早期防御効果が低い個体に多く観察されており、抑制性 NK レセプターである KIR-3D のリガンド周辺の構造が関与している可能性がある。一方、活性化型 NK レセプター NKG2D のリガンドである ULBP4 にも著明な多様性が存在することが判明したため、今後は感染個体における CTL 誘導性と Mamu-A、Mamu-B アレルとの関連を検討するとともに、ULBP4 多型との関連を検討することが必要である。

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的要因の検索を行った。本年度はヒト HIV 感染と APOBEC3 多型との関連についての解析したが、白人で報告されている欠損多型との関連は、日本人、インド人ともに観察されなかった。なお、これとは別に TRIM5 α や TIM1 多型とヒト HIV 感染との関連性について検討したが、これらの遺伝子におけるゲノム多様性はいずれも HIV/AIDS との有意な関連が観察されている。

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 遺伝子群およびクラス I 様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可能となる。また、ULBP4 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) 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- α 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

感染宿主の MHC II 遺伝子の解析

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 宿主 T リンパ球によるウイルス抗原の認識は、MHC 分子による抗原提示に依存する。CD4 陽性 T 細胞による抗原認識は MHC class II 分子による抗原提示に依存し、class II 分子の多型に応じて、特定のウイルス抗原に対するヘルパー T 細胞の応答能や、サイトカイン産生パターン、あるいは中和抗体産生能が変化する。エイズウイルス感染個体における血中ウイルス動態や発症経過が、MHC により変化することは良く知られている。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。本年度は、これまで解析が不完全であった DP, DQ 領域の遺伝子型をほぼ完全に決定することに成功し、これまで親子関係から推定してきた class II ハプロタイプについて見直しを行うとともに、新たな組換え型の存在を明らかにした。

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、エイズウイルス感染後のセットポイントウイルス価が極端に低く保たれる個体群では、ヒトとアカゲザルで相同な MHC 遺伝子型が集積すること、感染初期の T 細胞応答において認識されるウイルス抗原エピトープにも、相同領域のアミノ酸配列が見出されることが明らかにされている。

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、領域内での組換えの有無を解析してきた。

今年度は、これまで解析が不完全であった DP, DQ 領域の遺伝子型をほぼ完全に決定し、全個体の class II ハプロタイプをほぼ確定することを目的とした。

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及び東京大学医科学研究所で 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 II 領域の多型性マイクロサテライトマーカール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

Feeder	F/M	class I	class II haplotype																
R-94-027F1	R-90-122MY	90122-Ia	90122-IIa2		DRB1*0309	DRB*W2307			DQA1*05 = DQA1*2601									New 90010DPA-e	DPB1*18
R-95-014F1	R90-120MY	90120-Ia	90120-IIa		DRB1*1007	DRB1*0303			DQA1*05										
R-95-014F1	R-90-158MY	90158-Ia	90158-IIa		DRB1*0309	DRB*W2307			DQA1*01										
R90-010MY		90010-Ia	90010-IIa	240	DRB*W2104	DRB*W2603	DRB*W606		DQA1*0502	133	135							mamu-008DPA01	DPB1*21
R90-010MY		90010-Ia	90010-IIa	252	DRB1*0309	DRB*W2307			DQA1*0501									New 90010DPA-a	DPB1*18
R-96-063F2	R90-010MY	90010-Ia	90010-IIa1		DRB*W2104	DRB*W2603			DQA1*0502									mamu-008DPA01	DPB1*21
R-96-063F2	R-91-015F1	96063-Ia	96063-IIa		DRB*W610	DRB1*0306			DQA1*03									89075DPA01 (182/189)	IF
R89-003LA		89003-Ia	89003-IIc		DRB1*0306	DRB*W2603			DQA1*0105	137								DPA*0201 (0205) = Mamu*0201	DPB1*10
R89-003LA		89003-II	89003-IIr																
R90-030MY		90030-Ia	90030-IIa2	240	DRB*W2104	DRB*W2604	DRB*W606		DQA1*0502	133	135							R90030DPA01	DPB1*09
R90-030MY		90030-IIa	90030-IIb	266	DRB1*0323	DRB1*0321			DQA1*0104 = DQA1*11	141	143							R90030DPA02	DPB1*12
R90-088MY		90088-Ij	90088-IIj		DRB1*0403	DRB*W302			DQA1*03									Mamu*0201	DPB1*10
R90-088MY		90088-IIc	90088-IIj																
R89-002LA		89002-Ip	89002-IIp	278	DRB1*07032	DRB*W203			New 89002DQA-p	135	131							DPA1*0601	DPB1*04
R89-002LA		89002-Iq	89002-IIq	240	DRB5*0305	R170DR8			DQA1*0404	137	137							89002DPA01	DPB1*06
R89-075LA		89075-Iw	89075-IIw (s)	272	DRB*W101	DRB*W3602	DRB3*0410		DQA1*0108	131	131							89075DPA01	New 89075DPB-s
R89-075LA		89075-Iw	89075-IIw (t)	238	DRB1*0320	DRB*W3601			DQA1*0108	?	135							Mamu*0201	DPB1*06
R-91-010F1	R89-075LA	89075-Iw	89075-IIw (s)		DRB*W101	DRB*W3602	DRB3*0410		DQA1*0108									89075DPA01	New 89075DPB-e
R-91-010F1	R-88-006LA	90010-Ia	91-010-IIa (t)		DRB1*0320	DRB*W3601			DQA1*0108	?	135							New Mafa-DPA1*0401	New Mafa DPB1-irolate: M25

図 1. アカゲザル MHC class II ハプロタイプ解析結果の纏め

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。

(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。

C. 研究結果

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、親子間共通アレル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1に示す。また、研究代表者の森らが感染実験に用いてきた個体群の class II ハプロタイプ解析結果を、ウイルス学的な表現型とともに次頁の図2に示す。

我々がミャンマー系と呼んできた個体群で、最も頻りに交配に用いられてきたオス個体の一つである R90-120 に由来するハプロタイプ IIa については、これまでその子孫の DP/DQ 遺伝子型について互いに矛盾する解析結果が多数得られてきた。今年度の解析結果でも、DR と DQ の遺伝子型は IIa と完全に一致するが、DP の遺伝子型が互いに異なる個体が複数見出された。そこで、現在 R90-120 個体そのものの末梢血に由来する細胞株に立ち返って、その class II 遺伝子型を網羅的に決定し直す作業を続けている。

これら以外の class II ハプロタイプについても、これまで未決定であった DP/DQ 領域の遺伝子型を網羅的に決定するとともに、過去の解析データを全面的に見直した。その結果、特に DP 領域に関しては未登録の新規対立遺伝子が多数見出され、これらをデータベースに登録した。

以上の結果を踏まえて、これまでに解析してきた class II ハプロタイプのデータを整理し直した結果、木村らの決定した class I ハプロタイプとの間に殆ど矛盾のない結果が得られるようになった(図1)。

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。今年度の解析ではこれまで決定が遅れていた DP/DQ 領域の遺伝子型決定に重点を置いたが、その結果は予想以上に DQ/DP 間での組換え型ハプロタイプが多いことを示していた。従って、従来行ってきた DR/DQ 遺伝子型決定によるハプロタイプの推定は不十分であり、DP 領域までの網羅的解析により親子関係を分析することが不可欠であることがわかった。その結果として、特に DP 領域に多数の新規対立遺伝子型が見つかったが、ハプロタイプ構成を考察し直した結果は、class I のハプロタイプと矛盾することが無くなってきた。

SIV 感染個体のウイルス学的動態と class II ハプロタイプの相関については、個体数が多くないこともあり、現在明瞭な関連は見出されていない。しかし、各対立遺伝子産物により提示されるウイルス抗原ペプチドについては未解明のままであり、遺伝子型として異なる class II 分子であっても、そのペプチド結合溝の構造上は、共通の抗原ペプチドを効率的に提示出来るものが存在する可能性はある。これらを実証的に検定するには、各 class II 分子発現細胞株の樹立が不可欠であり、今後昨年度に報告した発現ベクター系の完成を急いで行きたい。

Set-point	BLOK	ID	MHC class II haplotypes													
AIDS	SP	<10 ³	Mm9112	New? 90120-2		DRB1*1007	DRB1*0303		DQA1*05 + DQA1*2601		DQB1*1801			New 90120PA-3	New DPB1 from E.347	
AIDS	P	10 ⁴	Mm9418	90010-41		DRB*W2603			DQA1*0302		DQB1*1801			Mm9008DPA01	DPB1*21	
			Mm9418	New		DRB*W101	DRB*W302	DRB*G410	DQA1*0108		DQB1*0607			New 89075DPB-3	New 89075DPB-3	
			Mm9418	90075-3		R278DR05	New = M66-DRB*W2101		DQA1*03		DQB1*1808			New M66-CPA1*0401 (188189)	DPB1*13 (239760)	
AIDS	P	10 ⁴	Mm9424	90075-3					DQA1*0108		DQB1*0607					
			Mm9424	New					DQA1*03		DQB1*1808			DPB1*0206+DPB1*0204	DPB1*09	
	SP	<10 ³	Mm9424	New? 90088-2		DRB1*0403	DRB*W502		DQA1*0108		DQB1*0607			Mm9010DPB-3	DPB1*18	
			Mm9424	New		NEW M66-DRB*W203	DRB*W401	DRB*W405	DQA1*0108		DQB1*1802			New 90010DPB-3	DPB1*19	
	SP	<10 ³	Mm9715	90010-3		DRB1*0309	DRB*W2107		DQA1*0102		DQB1*0605			DPB1*001 + 0205 + Mm900201	DPB1*19+DPB1*150102	
			Mm9715	New					DQA1*0105		DQB1*0608			DPB1*08		
			Mm9715	New? 93-0671-2-3		New? DRB1*0322 (261270)			DQA1*0105		DQB1*0608			DPB1*001 + 0205 + Mm900201	DPB1*10	
			Mm9715	New? 93-0671-2-3		DRB1*0306	DRB*W203		DQA1*0105		DQB1*0602			Mm9008DPB1		
	P	10 ⁵	Mm9920	90099-y	274	Mm0006DR02	Mm0006DR09		DQA1*2404	133	DQB1*1803	205	263	Mm9008DPB1	9703DPB01	
			Mm9920	90099-y	268	DRB*W2205	DRB1*0704		DQA1*0301		DQB1*2401	199	273	Mm900201	Mm900201	
	SP	<10 ³	Mm9713	90088-j	233	DRB1*0325	DRB1*1025		DQA1*05 + DQA1*2602	133	DQB1*1811	199	199		DPB1*04	
			Mm9713	90088-j	238	DRB1*0403	DRB*W502		DQA1*03	135	DQB1*1808	239	239	275	Mm900201	DPB1*10
	SP	<10 ³	R353	90075-2	240	DRB*W2104	DRB*W204		DQA1*0302	135	DQB1*1803	221	221	275	90010DPB1	DPB1*09
			R353	90075-2	234	DRB*W502	DRB*W410		DQA1*0108	131	DQB1*0607	197		275	New 93110PA01 (239760)	New 93110PA01 (239760)
	P	10 ³	R347	89-002p		New 89022DRB-1	DRB*W203		New 89022DQA-1		DQB1*1812			DPB1*0601	DPB1*04	
			R347	90120-2		DRB1*1007	DRB1*0303		DQA1*03		DQB1*1801			New 90120DPB-3	New DPB1*	
	P	10 ⁴	R352	89-002q	240	R170DR03=DRB*0305	R170DR08		DQA1*2404	137	New 89022DQB-4	217	255	89022DPB1	DPB1*06	
			R352	90088-j	258	DRB1*0403	DRB*W502		DQA1*03	135	DQB1*1808	239	275	DPB1*001 + 0205 + Mm900201	DPB1*10	
			R160	89-002q		R170DR03=DRB*0305	R170DR08		DQA1*2404		New 89022DQB-4			89022DPB1	DPB1*06	
			R160	90075-3		DRB*W3602	DRB*W3602		DQA1*0108		DQB1*0607			New 0004DPA + Mm9008DPB1 (234235)	New 0004DPB1	
	P	10 ⁵	R174	90120-5	270	DRB*W2002	DRB*W201		DQA1*0302	133	DQB1*1803	205	205	265	90120PA01	DPB1*04
			R174	90010-41	239	DRB*W2104	DRB*W2603		DQA1*0302	133	DQB1*1803	205	205	265	9008DPB1	DPB1*21
	P	10 ⁴	R185	90099-y		DRB1*1035	DRB1*1039		DQA1*05		DQB1*1811			DPB1*0901	DPB1*04	
			R185	90099-y		Mm0006DR02	Mm0006DR09		DQA1*2404		DQB1*1803			Mm9008DPB1	9703DPB01	
	SP	<10 ³	R166	90010-41		DRB1*0329	DRB*W2607		DQA1*01		DQB1*1802			New 90010DPB-3	DPB1*18	
			R166	90010-41		DRB1*0329	DRB*W2607		DQA1*01		DQB1*1802			New 90010DPB-3	DPB1*18	
	P	10 ⁵	R171	New? 99118-41-2		DRB*W2104	DRB*W2603		DQA1*05		DQB1*1811			DPB1*0901	DPB1*04	
			R171	90010-41		DRB1*0329	DRB*W2607		DQA1*01		DQB1*1802			New 90010DPB-3	DPB1*18	
	P	10 ⁴	R182	90010-41		DRB1*0316	DRB*W2607		DQA1*01		DQB1*1802			New 90010DPB-3	DPB1*18	
			R182	90010-41		DRB1*0329	DRB*W2607		DQA1*01		DQB1*1802			New 90010DPB-3	DPB1*18	
			Mm0003	892-0047-1/7		DRB*W2104	DRB*W2603		DQA1*0108		DQB1*1802			New 8925DPB1 (181189)	New 8925DPB-3	
	P	10 ⁵	R167	90120-5	278	DRB*W2002	DRB*W2601		DQA1*0302	133	DQB1*1803	205	205	268	90120PA01	DPB1*04
			R167	90088-j	270	DRB1*0403	DRB*W502		DQA1*03	133	DQB1*1808	240	239	275	Mm900201 + 0205 + Mm900201	DPB1*10
	P	10 ⁵	R194	89-002q		R174DR03=DRB*0305	R174DR08		DQA1*2404		New 89022DQB-4			89022DPB1	DPB1*06	
			R194	89-018		DRB*W181	DRB1*0310	DRB*W667	DQA1*2302		DQB1*1804			DPB1*0701	DPB1*19+DPB1*150102	
	P	10 ³	R198	90010-41		DRB1*0305	DRB1*1033		DQA1*04 + DQA1*2602		DQB1*1804			DPB1*0601	DPB1*04	
			R198	90048-2		New DRB*0184 (245546)	DRB*W610	New DRB1*0326 (224239)	DQA1*03		DQB1*1808			DPB1*0701	DPB1*19+DPB1*150102	
AIDS	P	10 ⁵	Mm9708	90010-41		DRB*W2104	DRB*W2604	DRB*W666	DQA1*0302		DQB1*1803			90120DPB1	DPB1*09	
			Mm9708	90010-41					DQA1*05 + DQA1*2602		DQB1*1811			DPB1*0601	DPB1*04	
AIDS	P	10 ⁵	Mm9709	90088-j		DRB1*0403	DRB*W502		DQA1*03		DQB1*1808			DPB1*001 + 0205 + Mm900201	DPB1*10	
			Mm9709	90010-41		DRB1*0305	DRB1*1033		DQA1*05		DQB1*1811			Mm9008DPB1	DPB1*19+DPB1*150102	
AIDS	SP	<10 ³	Mm9713	89-002p		DRB1*0702	DRB*W203		New 89022DQA1	135	DQB1*1812	217	276	DPB1*0601	DPB1*04	
			Mm9713	New? 93-0671-2-3		DRB1*0305+0326	DRB*W203		DQA1*0105	137	DQB1*0614+0602	211	267	DPB1*001 + 0205 + Mm900201	DPB1*10	

図 2. 研究代表者・森らが SIV 感染実験に用いたアカゲザル個体の class II 遺伝子型とハプロタイプ

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、親子関係からハプロタイプ構成を推定した。

DQ/DP 間にはこれまでの予想以上にハプロタイプ間での組換えが多く、従来 DR/DQ の遺伝子型から推定してきたハプロタイプ構成にはしばしば誤りがあった。DP 迄の全領域で遺伝子型を決定した結果からハプロタイプ構成を見直すことにより、別に決定された class I ハプロタイプとの矛盾が解消された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyazawa, M. and M. Clerici. The 'immunologic advantages' of HIV-exposed seronegative individuals: authors' reply. *AIDS* 23:1612, 2009.
- 2) Miyazawa, M., S. Tsuji-Kawahara, T. Chikaishi, M. Kato and S. Takamura. Mouse APOBEC3 affects the production of virus-neutralizing antibodies by restricting

early retroviral replication, not by altering the B-cell repertoire. *Retrovirology* 6 (Suppl. 2):O9, 2009.

- 3) Takakuwa, H., T. Maruoka, T. Hata, M. Miyazawa, T. Hata, H. Toshimori, H., and K. Otsuki. Development of a new disinfectant with very strong anti-influenza viral activity: a preliminary report. *Environ. Health Prev. Med.* 15:121-123, 2010.
- 4) Takamura, S., Tsuji-Kawahara, S., Yagita, H., Akiba, H., Sakamoto, M., Chikaishi, T., Kato, M., and Miyazawa, M. Premature terminal exhaustion of Friend virus-specific effector CD8⁺ T cells by rapid induction of multiple inhibitory receptors. *J. Immunol. in press*, 2010.

2. 学会発表

- 1) Miyazawa, M., Takamura, S., Tsuji-Kawahara, S., Chikaishi, T., Kato, M., Takeda, E., and Yagita, H. Mechanisms of immune evasion by Friend virus: T-cell exhaustion, B-cell hyperactivation, and their genetic control. 21st International Workshop on Retroviral Pathogenesis. September 13-17, 2009. Castelnovo Garfagnana, Lucca, Italy.

- 2) Sitbon, M., Mongellaz, C., Touhami, J., Montel-Hagen, A., Lavanya, M., Abe, H., Giovannini, D., Petit, V., Castelnau, P., Lagrue, E., Kim, F., Kinet, S., Manel, N., Miyazawa, M., Taylor, N., and Battini, J.-L. New metabolic markers derived from gamma and deltaretrovirus envelope glycoproteins. 21st International Workshop on Retroviral Pathogenesis. September 13-17, 2009. Castelnuovo Garfagnana, Lucca, Italy.
- 3) Miyazawa, M., Tsuji-Kawahara, S., Chikaishi, T., Kato, M., and Takamura, S. Mouse APOBEC3 affects the production of virus-neutralizing antibodies by restricting early retroviral replication, not by altering the B-cell repertoire. *Frontiers of Retrovirology*. September 21-23, 2009. Montpellier, France.
- 4) Miyazawa, M., Kanari, Y., Clerici, M., Wichukchinda, N., and Auwanit, W. Genetic factors that confer resistance to HIV-1 acquisition in HIV-1-exposed but seronegative individuals in Italy and Thailand. 4th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases. November 26-28, 2009. Nagasaki.

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

抗原提示を効率よく行う新規ワクチンの開発に関する研究

分担研究者 保富康宏 医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター センター長

研究要旨

本研究は、SIVenv delta 5G(d5G)発現 DNA ワクチンが誘導する細胞性免疫応答とアスパラギン(N)結合型糖鎖との関連性について解析を行った。まず d5G 発現 DNA ワクチンが誘導する CTL 反応の epitope の mapping を行ったところ、4つの CTL エピトープ(CAPPGYALL ; CL9, CAPPGYAL ; CL8, APPGYALL ; AL8, CNDTNYSGFM ; CM10)を同定した。これら epitope に対する特異的細胞性免疫応答について、野生型 SIVenv 免疫マウスと比較検討したところ、d5G 免疫マウスは全ての epitope に対し有意に高い特異的細胞性免疫応答を誘導した。本研究により Env gp120 に存在する N 結合型糖鎖は、宿主の細胞性免疫誘導に関与することが示唆された。

A.研究目的

HIV や SIV のエンベロープ蛋白 (Env)gp120 には、他のウイルスと比較しアスパラギン (N) 結合型糖鎖が非常に多く存在し、蛋白の高次構造形成のみならず、ウイルスの感染性、病原性、宿主免疫応答など様々な因子に影響を及ぼすことが報告されている。これまで SIVgp120 に存在する 23 個の N 結合型糖鎖のうち特定の 5 個の糖鎖をアミノ酸変異により欠失させた SIV delta 5G は、*in vitro* でのウイルスの増殖性は親株(SIV)と同等であるが、アカゲザルを用いた感染実験では親株と比較し、著しく増殖が抑制されることが報告された。

我々は、これまでの研究で野生型 SIVenv(WT)および SIVenv delta 5G (d5G)の免疫応答についてマウスを用いて検討したところ、Env 特異抗体の誘導では両免疫群に差は認められなかったが、Δ5G 免疫マウスは WT 免疫マウスに比べ有意に高い特異的細胞障害性 T リンパ球(CTL)を誘導した。

本研究では、Δ5G の gp120 N 結合型糖鎖と宿主免疫応答についてマウスを用いて詳細に検討した。

B.研究方法

1) 免疫スケジュール

野生型 WT および d5G をプラスミド (pJW)に組み込んだ DNA ワクチンを BALB/C x C57BL/6 F1 (CB6F1)マウスの筋肉内に Electroporation 法を用いて1週間隔で3回の免疫を行った。最終免疫から2週間後に各種解析を行った(Fig. 1)。

2) CTL エピトープの探索

SIVenv(gp120)をコードする overlapping peptide 計 42 種を作製し、まず 6 種の overlapping peptide を1グループとし、計7つ(Group A-G)のグループそれぞれの抗原を用いて CTL 活性を検討した。次に活性の認められたグループ内 6 種の overlapping peptide をそれぞれ用いて、さらに詳細な epitope の mapping を行った。

3) 同定した CTL エピトープを用いた細胞性免疫応答の検討

今回同定した4つのCTLエピトープを用いて、IFN- γ 産生 ELISPOT Assay および CTL 活性を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験の実施に当たっては、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管に関する基準」「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験棟の実施に関する基本方針」を遵守し、医薬基盤研究所動物実験委員会の承認を得て行った。

組換え DNA 実験については、医薬基盤研究所 DNA 実験安全委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

2) CTL エピトープの探索

CTL エピトープの mapping を行うため、gp120 overlapping peptide を用いて CTL 活性を検討したところ、グループ D Env 19-24 (aa.218-301)に対して、d5G 免疫群が WT 免疫群よりも高い CTL 活性を示した(Fig. 2)。さらに詳細な解析の結果、4つの CTL エピトープ(CAPPGYALL ; CL9, CAPPGYAL ; CL8, APPGYALL ; AL8, CNDTNYSGFM ; CM10) を同定した(Fig. 3)。

3) 同定した CTL エピトープを用いた細胞性免疫応答の検討

今回同定した4つのCTLエピトープを用いて、各エピトープに対する細胞性免疫応答の比較を行った。各免疫マウスから CD8 陽性脾細胞を分離し、各 CTL エピトープで刺激したところ、いずれのエピトープに対して、d5G 免疫群の方が有意に多くの IFN-

γ 産生 CD8 陽性脾細胞を検出した(Fig. 4)。さらに、各 CTL エピトープをパルスした標的細胞を用いて CTL 活性を行ったところ、d5G 特異的 effector cell は WT 特異的 effector cell に比べ、有意に高い特異的 CTL 活性を示した(Fig. 4)。次に各免疫群から CTL エピトープ特異的 effector cell を作製し、d5G もしくは WT を組み込んだワクシニアウイルス感染細胞を標的細胞として CTL 活性を測定したところ、エピトープ特異的 effector cell の活性は d5G 免疫群の方が高く、また、d5G を組み込んだワクシニアウイルス感染細胞の方がより強い細胞障害活性を示した(Fig. 5)。

D. 考察

これまでに d5G 免疫マウスは、野生型免疫マウスよりも有意に強い細胞性免疫を誘導することが報告されている。糖鎖の有無による免疫誘導能への影響を明らかにするため、まず CTL 反応の epitope mapping を行ったところ、4つの CTL エピトープが確認され、それらは新規に認められたエピトープではなく、すでに報告されているものであった。これらのエピトープを用いて、細胞性免疫誘導能を検討したところ、これまでの報告と同様に野生型免疫マウスと比較して 5G 免疫マウスは、強力な細胞性免疫を誘導することを明らかにした。これらの結果から、アスパラギン結合型糖鎖の欠損によって既存の gp120 CTL epitope が、宿主の Class-1 に効率よく抗原提示され、細胞性免疫が増強されたと推測され、SIV Env に多く存在する糖鎖は、ウイルスに対する特異的細胞性免疫に関与することが考えられた。