

本研究は、糖鎖欠損と細胞性免疫誘導能の関連性について明らかにした。アスパラギン結合型糖鎖を欠損した Env 抗原は、有意に高い細胞障害活性を示したことから、今後 Env 抗原をターゲットとした HIV vaccine 開発において、糖鎖欠損は極めて有効な手段であると考えられた。

#### E. 結論

本研究により、Env gp120 に存在する N 結合型糖鎖は、宿主の細胞性免疫の誘導に関与することが示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Mori, H., Yamanaka, K., Matsuo, K., Yasutomi, Y. And Mizutani, H. Administration of Ag85B showed therapeutic effects to Th2-type cytokine-mediated acute phase atopic dermatitis by inducing regulatory T cells. *Arch Dermatol. Res.* 2009 : 301 ; 151-157.
2. Okabayashi, S., Ohno, C. and Yasutomi, Y. Acute megakaryocytic leukemia (AMKL)-like disease in a Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *J. Comp. Pathol.* 2009 : 140 ; 212-216.
3. Morioka, T., Yamanaka, K., Mori, H., Omoto, Y., Tokime, K., Kakeda, M., Kurokawa, I., Gabazza, E., Tsubura A., Yasutomi, Y. and Mizutani, H. IL-4/IL-13 antagonist DNA vaccination successfully suppresses Th2 type chronic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* 2009 : 160 ; 1172-1179.

4. Takano, J.I., Tachibana, H., Kato, M., Narita, T., Yanagi, T., Yasutomi, Y. and Fujimoto, K. DNA characterization of simian *Entamoeba histolytica*-like strains to differentiate them from *Entamoeba histolytica*. *Parasitol. Res.* 2009 : 105 ; 929-937.

5. Yasuhiro Yasutomi. Establishment of specific pathogen-free macaque colonies in Tsukuba Primate Research Center of Japan for AIDS research. *Vaccine* 2009 *in press*

6. Fujimoto, K., Takano, J., Narita, T., Hanari, K., Shimozawa, N., Sankai, T., Yoshida T., Terao, K., Kurata, T. and Yasutomi, Y. Simian Retrovirus type D infection in a colony of cynomolgus monkeys. *Comp. Med.* 2009 *in press*

7. Cueno, M.E., Karamatsu, K., Yasutomi, Y., Laurena, A.C. and Okamoto, T. Preferential expression and immunogenicity of HIV-1 Tat fusion protein expressed in tomato plant. *Transgenic Res.* 2010 *in press*

##### 2. 学会発表

「国内」

- 1) 岡林佐知、大野智恵子、保富康宏：実験用カニクイザルに認められた急性巨核芽球性白血病(AMKL)の一例 第 147 回日本獣医病理学会、栃木、2009 年 4 月 2 日～4 日
- 2) 岡林佐知、小野文子、羽成光二、大野智恵子、加藤美代子、保富康宏：実験用カニクイザルに見られた下垂体腫瘍の一例 第 56 回日本実験動物学会総会、埼玉県、2009 年 5 月 14 日
- 3) 松原明弘、高村史記、加藤翔太、保富康宏：SIVmac239 Env gp120 アスパラギン(N) 結合型糖鎖の宿主免疫応答に対する影響 第 57 回日本ウイルス学会、東京、2009 年

10月25日～27日

4) 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: SIVmac239 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 第23回日本エイズ学会、名古屋、2009年11月26日～28日

5) Yusuke TSUJIMURA, Yasuhiro YASUTOMI : Administration of Ag85B showed therapeutic effects to allergic asthma by inducing Th1 response and Interleukin-17 第38回日本免疫学会、大阪、2009年12月1日～3日

「国際」

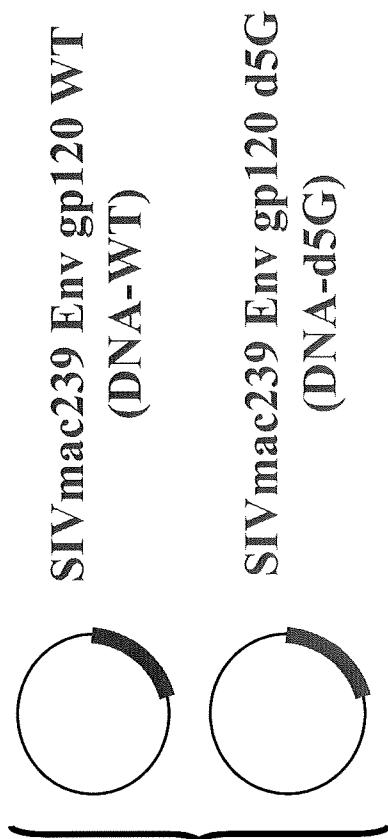
1) Nienke E. van Houten, Yasuhiro Yasutomi, and Masahiro Niikura : Protective Mucosal

Immunity against a Model Viral Enteric Infection by a Generic Chimeric Hepatitis E Virus-like Particle Vaccine System. The American Society for Virology 28<sup>th</sup> Annual Meeting, Vancouver, 2009, July 11-15.

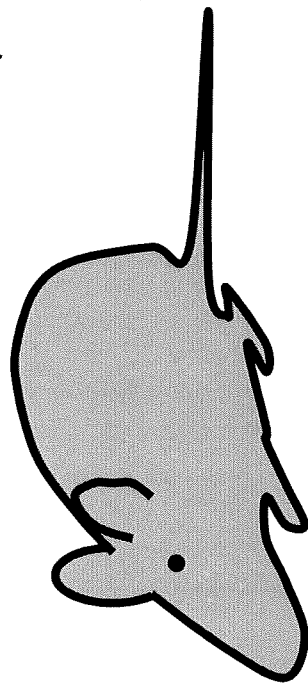
2) Yusuke TSUJIMURA, Yasuhiro YASUTOMI : Administration of Ag85B showed therapeutic effects to allergic asthma by inducing Th1 response and Interleukin-17. 9th International Conference on New trends in Immunosuppression & Immunotherapy 2010. February. 4-6.

H. 知的財産の出願・登録状況  
本年度新規は無し

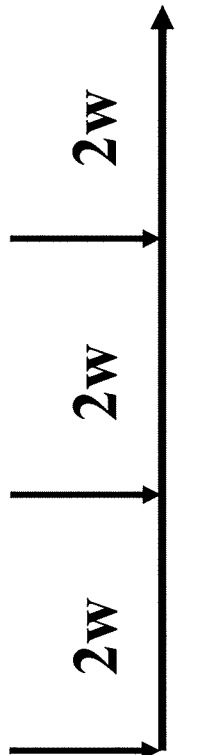
**DNA vaccine (vector: pJW4303)**



**Inoculation\* (i.m.)  
with Electroporation  
(100µg/head)**



**Mice: CB6F1 (H-2<sup>b/d</sup>) ♀**



**解析**

**Fig. 1 免疫スケジュール**

# Overlapping peptides SIV mac239 WT Env gp120 (Total 42 peptides, 6 peptides/group)

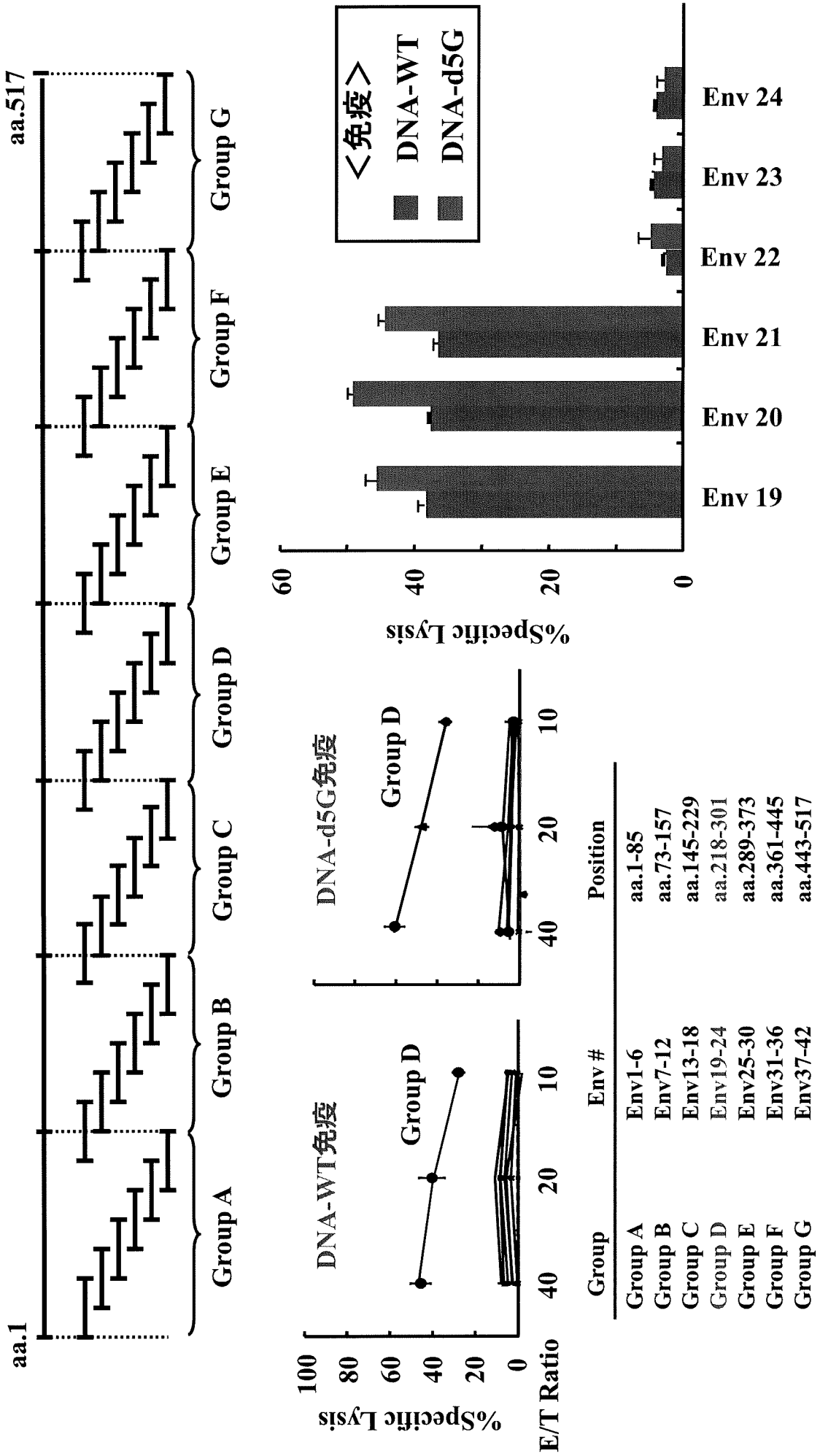
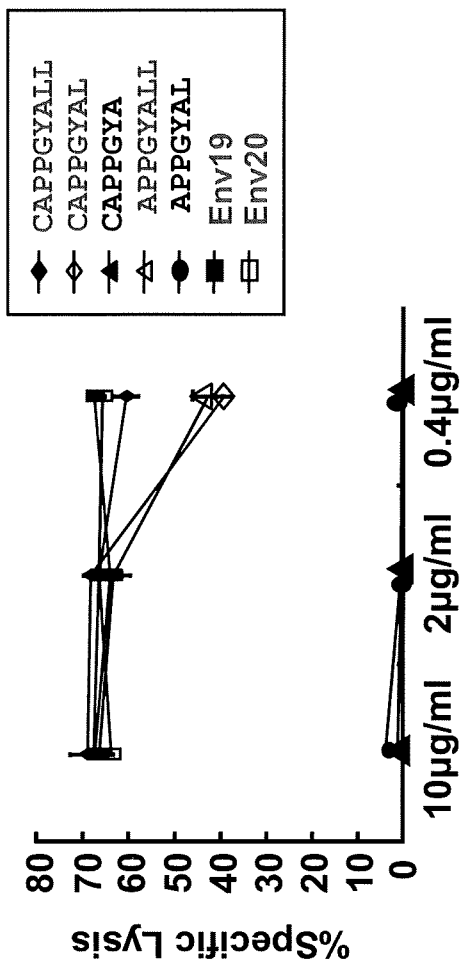
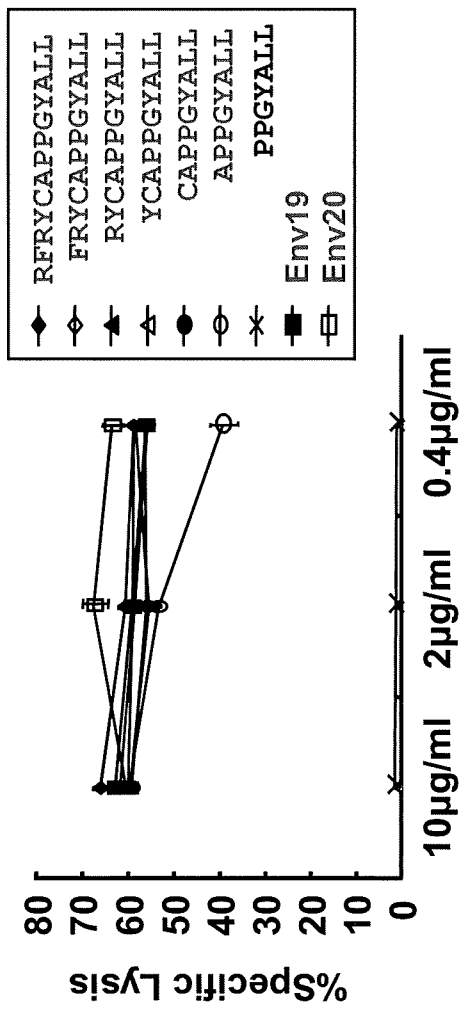


Fig. 2 糖鎖欠損とCTLエピソードの関係

**Env19-20**



**Env20-21**

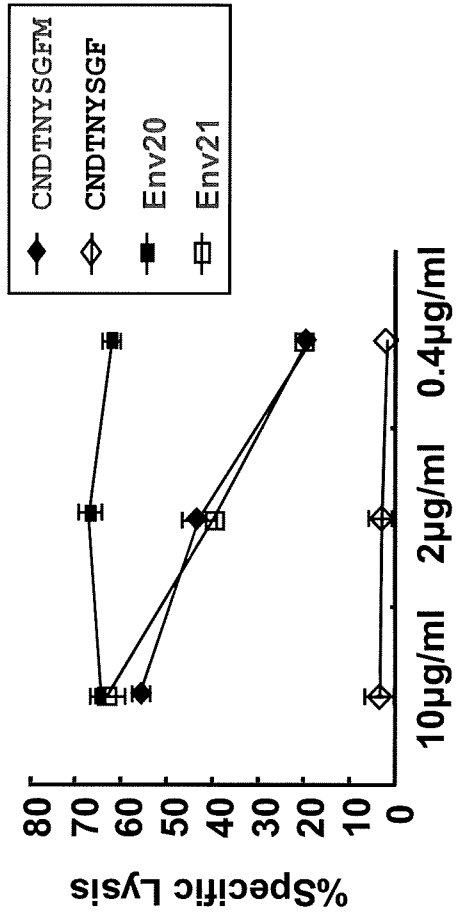
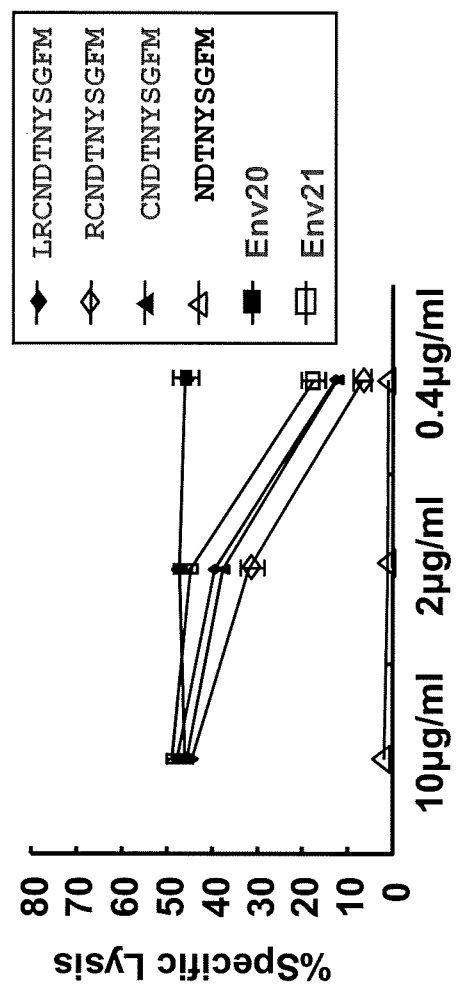


Fig.3 CTLエピソードの決定

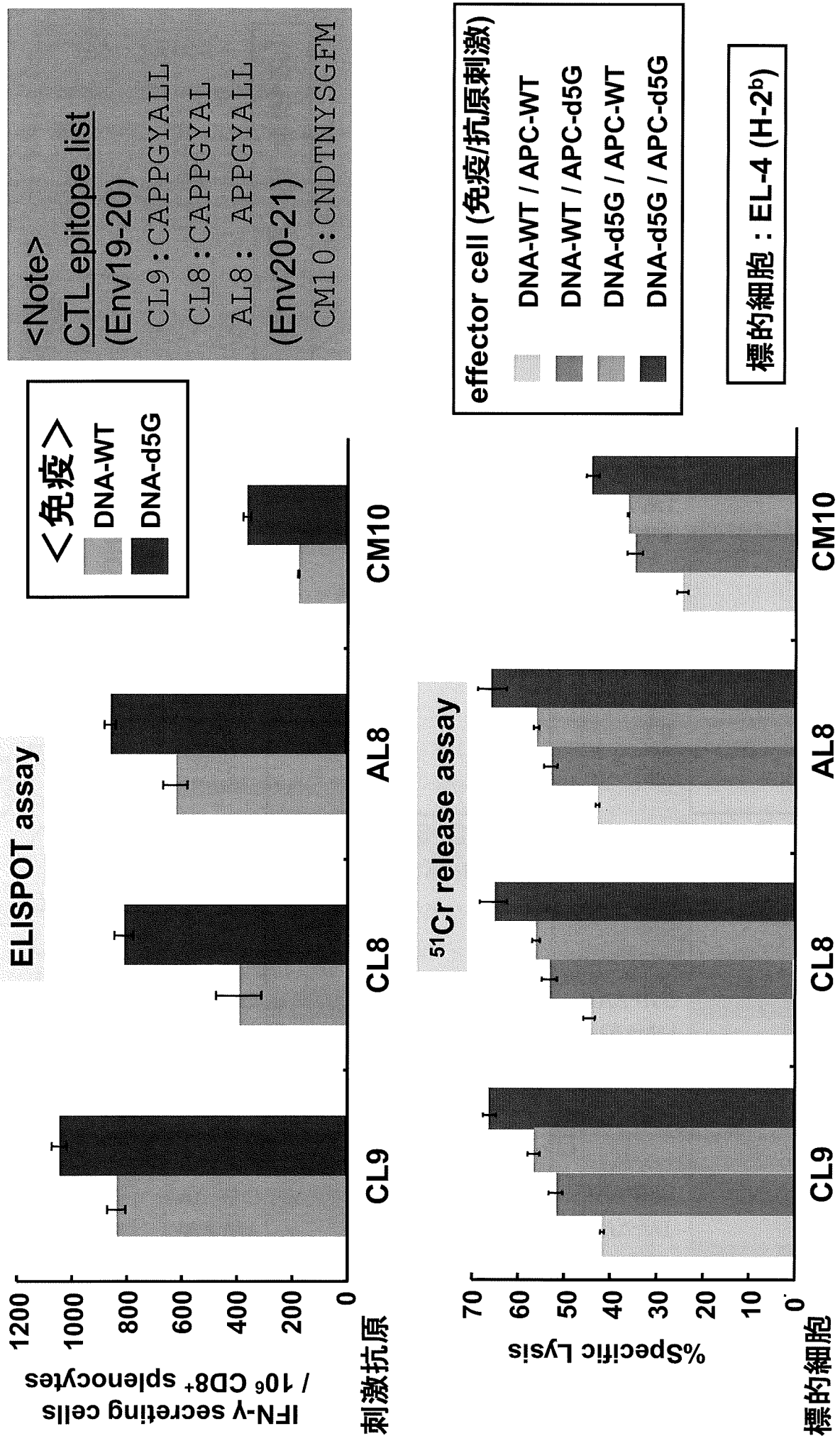


Fig. 4 各CTLエピートープに対する細胞性免疫応答の比較-1  
 ELISPOT assay & CTL assay

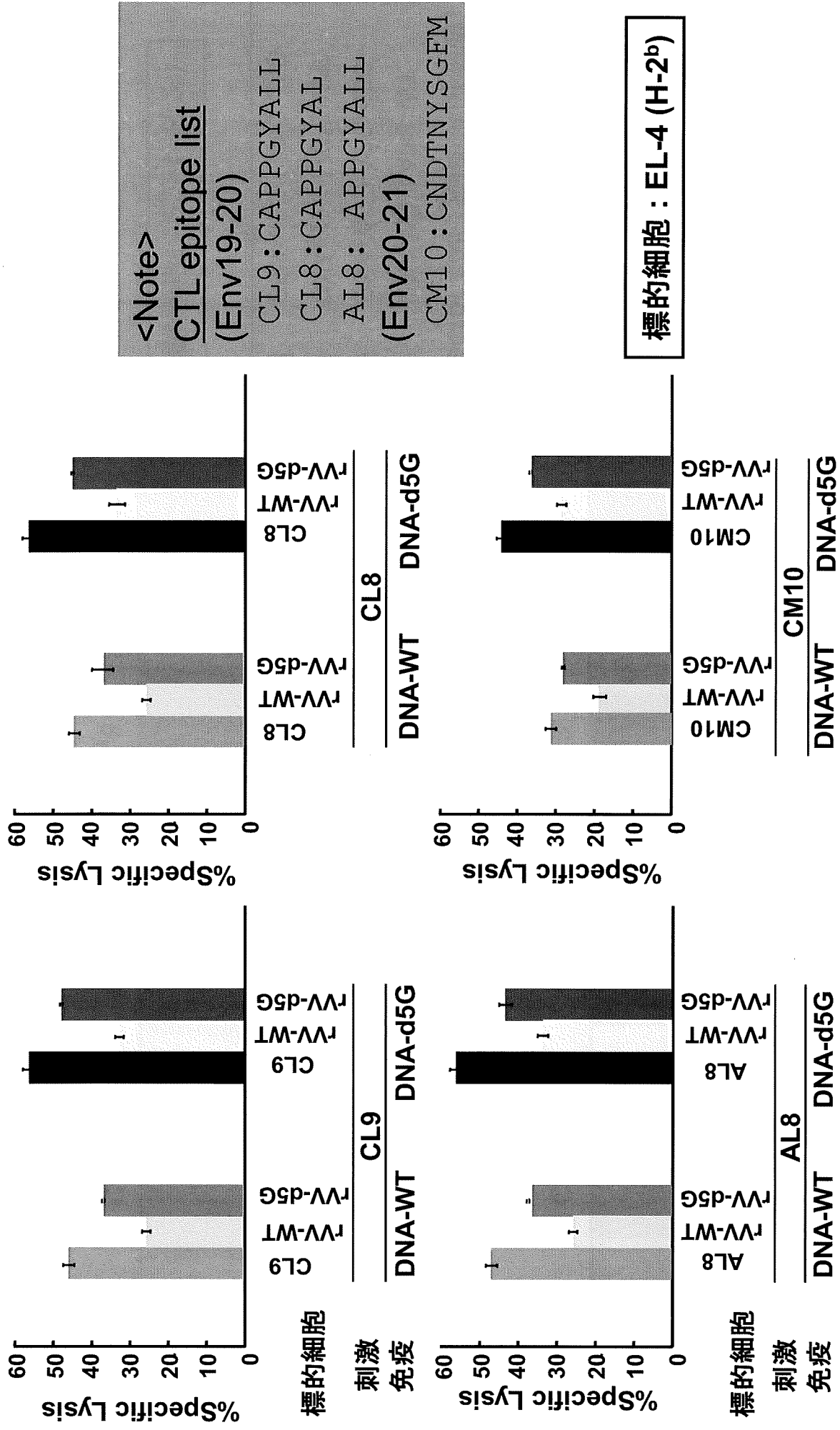


Fig. 5 各CTLエピートープに対する細胞性免疫応答の比較 -2  
 CTL assay

厚生労働科学研究費補助金（政策創薬総合研究事業）  
分担研究報告書

研究課題：エイズウイルスのサブタイプ間を越えて感染を制御する宿主応答の同定  
分担研究者：駒野 淳（国立感染症研究所 エイズ研究センター 第3室 主任研究官）  
分担研究課題：感染防御・制御と関連する宿主遺伝子の解析価

**研究要旨**

HIV 感染症を克服するためには、抗 HIV 薬開発だけでなく免疫療法や感染予防ワクチンの開発が必要である。弱毒ウイルスの感染制御ならびに弱毒ウイルスによるワクチン効果誘導メカニズムを同定することによりワクチン開発の基礎が築けると期待される。本研究では弱毒 SIV としての deglycosilation SIV mutant によって誘導される優れたワクチン効果の原因となる実行因子の同定を機能的な方法にて試みる。本年度は昨年度までに樹立したタンパク質発現による表現型スクリーニングを利用した霊長類レンチウイルス複製阻害因子同定系に内在する潜在的リスクについて系統的な評価を行った。その結果、ウイルス複製阻害因子が標的とするウイルス複製サイクルの作用点には大きな偏りは見られなかったが、cDNA が由来する試料やウイルスベクターを利用するために誘発される cDNA バイアスの存在が明らかになった。本法を応用して heterologous challenge 抵抗性のサル個体に存在すると期待されるエフェクター分子を同定するために極めて有用な基盤情報を得る事ができた。

**A. 研究目的**

HIV 感染症を克服するためには、抗 HIV 薬開発だけでなく免疫療法や感染予防ワクチンの開発が必要である。そのためにはウイルス感染に対する免疫をより根本的に理解することが重要である。これまでのエイズウイルスに対する宿主免疫の研究は主に獲得免疫、特に中和抗体とウイルス感染細胞特異的細胞傷害活性を持つ CTL を中心に行われてきた。ところが予防ワクチンにて最も有望であると考えられていた CTL 誘導型の DNA プライム-ウイルスベクターブーストワクチンがヒトでほとんど効果が見られないことが最近判明した。ワクチン開発を成功させるためには CTL 以外でウイルスを制御するメカニズムを発見することが求められる。

弱毒 SIV は病原性 SIV の感染に対して非常に

強くかつ最も効果的な感染防御能を示すことがサルエイズ発症モデルによって明らかにされている。現在 HIV ワクチンとして弱毒生ワクチンを投与することは安全性の面から高いハードルがあるが、弱毒ウイルスの感染制御ならびに弱毒ウイルスによるワクチン効果誘導メカニズムを解析することは、現在最も注目されている重要な研究課題である。

我々は弱毒 SIV としての deglycosilation SIV mutant によって誘導される抗 SIV 反応の本態を解析するため多様なアプローチを試みている。抗 SIV 反応の獲得についていくつかの仮説が提唱されているが、“live attenuated vaccine”活性により、ワクチンサル個体のリンパ組織において内在性ウイルス耐性遺伝子の発現が誘導されているために heterologous challenge ウイルスに抵抗



性を示している可能性が考えられる。サル個体からウイルス耐性遺伝子を同定するためには RNA やタンパク質レベルで遺伝子の発現上昇を捕捉することを契機にする方法も有用であるが、実際に遺伝子発現増強がウイルス感染抵抗性を与えるかどうかを検証する phenotype screening を行うことができれば直接的に抗ウイルス状態を与えている宿主実行因子を同定することができる。昨年度までに我々はほ乳類細胞発現 cDNA ライブラリーを使用して機能的なスクリーニング法で HIV/SIV 抵抗性遺伝子を同定する方法を確立し、いくつかの遺伝子活性について報告してきた。本年度はこれまでに得られた研究結果を統合して、我々が構築した実験系の評価を系統的に行い、heterologous challenge に抵抗性のサル由来のリンパ球組織等に由来する cDNA library から SIV 耐性に直接関与する実行因子を同定するための可能性と潜在的問題点の抽出と対処法に関する解析を行った。

## B. 研究方法

ヒト T 細胞株 MT-4 細胞にヒト末梢血リンパ球またはウサギ RK13 細胞由来の cDNA ライブラリーをレンチウイルスまたは MLV ベクターにて導入し、GFP 発現を指標に cDNA を安定に発現する細胞を樹立した。この細胞に HIV-1(HXB2 株)を感染させた。その後、ウイルス感染耐性となって生存してくる細胞を選択し、DNA を抽出し、PCR によって導入された cDNA を増幅し核酸配列を決定することによりウイルス感染抵抗性遺伝子候補を同定した。この候補遺伝子を再び MLV ベクターにて MT-4 細胞に導入し、HIV-1 を感染させ、ウイルス耐性遺伝子であるかを評価する。候補遺伝子の同定およびウイルス複製サイクルにおける複製阻害作用点の解析は以下の論文に詳述されている： Shimizu S et al., AIDS

2007, Urano E et al., FEBS Lett 2008, Kawano Y et al., J Virol 2004, Yoshida T et al., Traffic 2008, Urano E et al., Vaccine, in press。これまでに得られた cDNA 候補遺伝子の中で機能解析が行われた 8 種類の遺伝子を主な対象とし、以下の解析を行った。

- (i) スクリーニングから得られた遺伝子断片が mRNA や ORF のどの領域と overlap するかを系統的に評価する。
- (ii) ウイルス複製サイクルにおける作用点を初期と後期の二つに大別して、得られた候補遺伝子の作用点に偏りがあるかを評価する。
- (iii) 上記の解析項目に対し、2つの異なる cDNA ライブラリーで共通して同定された候補遺伝子と単独のライブラリーで同定された候補遺伝子の頻度をそれぞれ解析した。機能解析が十分でない遺伝子は分類しなかったため、一部の解析は 7 種類となっている。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

## C. 研究結果

- (i) 候補遺伝子の中で全長の ORF でウイルス複製を負に制御するものは、CD14, CD63, CD5, HSP40B6, ARHGDIB の 5 種類であった (5/7,71.4%)。ORF の C 末端領域によりウイルス複製を負に制御されたものは Brd4, SEC14L1a の 2 種類であった (2/7,28.6% ; 表 1)。
- (ii) ウイルス複製配列の初期過程を阻害するものは CD14, CD63, ARHGDIB の 3 種類であった (3/6,50%)。ウイルス複製の後期課程を阻害するものは HSP40B6, Brd4, SEC14L1a の 3 種類であった (3/6,50%)。それぞれの因子が標的とする複製ステップは異なっており、特定の作用点が標的になりやすいということではなかった。
- (iii) 2種類の cDNA ライブラリーに共通して同定された候補遺伝子は SEC14L1a, Brd4, RIPK2 の

3種類で(3/7,42.9%)、片方にしか見出されなかったものはCD14, CD63, ARHGDI, HSP40B6の4種類であった(4/7,57.1%)。生理活性を持つORF位置とウイルスの複製阻害標的部、ライブラリーの種類とウイルスの複製阻害標的部関係には有意な相関を認めなかった。

#### D. 考察

ORFが3'非翻訳領域を加えて比較的長い遺伝子の場合、回収される遺伝子はC末端領域であることが多かった。これが短い場合に全長ORFが回収される傾向があった。これはfirst strand cDNA合成の手順がoligo dTを使用してmRNAのC末端側poly A部分から起こるためと思われる。長いORFが回収されない原因としては、プラスミドベクターへのクローニング、ウイルスベクターへのパッケージング、逆転写プロセスでの遺伝子組み換えによる核酸配列の一部欠落の可能性が考えられる。特に反復配列を持つ遺伝子は核酸が不安定でしばしばプラスミドベクターから欠損することが知られている。また、ウイルスの逆転写においては、核酸配列により合成が効率よく進まない現象や組み換えを起こしやすいシス配列が知られている。これらが誘発された場合にはN末端領域や、ORFの中間部分だけが同定される可能性もある。実際、未同定の遺伝子の中で、ORFの中間部分だけが回収されているものもある。しかし、実際にはこの頻度は低く、むしろ全長ORFが欠落したり、遺伝子導入がうまく行かない可能性の方が高いと思われる。以上をまとめると、本実験系を使ってウイルス複製阻害形質の実効因子を同定しようとする場合、候補遺伝子が全長ORFで形質を顕在化させるがORFや3'非翻訳領域が長い場合には同定が困難となる可能性を考慮する必要がある。

RK13由来のcDNAライブラリーには、細胞生理学的に必須の遺伝子でヒトの細胞と共通して発現が見られるものと、分化した上皮細胞に特異的に発現して見られる遺伝子と、ウサギ種特異的でヒトには発現しない遺伝子が存在すると予想される。今回ヒトとウサギ由来の2つのcDNAライブラリーで同定された遺伝子は、細胞生理学的に必須の遺伝子でヒトの細胞と共通して発現が見られるものと思われる。ヒト由来のcDNAライブラリーでのみ同定された候補遺伝子は、リンパ球系組織に発現するが上皮系細胞には発現しない遺伝子である可能性があり、CD14はその一例と考えられる。RK13を選択した背景にはこの細胞がウイルスレセプターを発現させてもHIVの複製が困難であるため、内在性の抵抗因子が存在すると予想したためである。RK13からのみ同定された遺伝子は、種特異的なHIV複製阻害遺伝子か、上皮細胞に特異的な遺伝子のどちらかであると考えられる。この2つの可能性を区別するためにはより多くのライブラリーを使用する必要がある。例えば、RK13と同じ組織由来で上皮系の293細胞由来のライブラリーを使えば2つの可能性を分離する事が可能と思われる。

以上の知見をもとに、サル由来のリンパ組織に由来するcDNAライブラリーからheterologous challengeに抵抗する内在性抵抗因子を同定する実験の注意すべき点を考察すると次のようになる。実行因子が比較的小さなORFで3'非翻訳領域が短い場合には同定できる可能性は高い。ただし反復配列が多く、プラスミド等での安定性が担保できない場合は同定が困難と思われる。autocrineに作用してSIV耐性を誘導する間接的な作用機序を持つ実行因子も検出できる可能性も高い。しかし、標的遺伝子のORFや3'非翻訳領域が長く、全長ORFとして機能する場合、T

細胞以外の細胞に働きかけるトランス因子として機能する遺伝子、ヒト細胞に対して autocrine に作用しない遺伝子の場合には検出が困難と思われる。霊長類の遺伝子配列が 99%以上相関性を有しているため、種の壁を越えて遺伝子が機能することは十分期待できるが、トランス因子の場合には同定するのは困難と予想される。heterologous challenge 抵抗性に直接関与しないが、SIV 耐性に直接関与する内在性ウイルス抵抗因子を確実に除くためには、cDNA ライブラリーを正常のサル個体に由来するリンパ組織の RNA でサブストラクションした上でスクリーニングに供するか、正常なサル個体に由来するリンパ組織を使ったスクリーニングを並行して行い、結果を相互に比較する必要があると思われる。トランス因子等の可能性が強く示唆される場合には、proteome や microarray 法等による手法にて絞り込みをかける必要がある。この場合にも直接実効因子ではなく、それが発現誘導する副産物を検出しているリスクがあるため、これらの手法で得られた候補遺伝子も本法の機能的解析法による検討を行う事により heterologous challenge 抵抗性に直接関与する遺伝子を同定できると期待できる。

## E. 結論

我々が樹立した「タンパク質発現による表現型スクリーニングによる霊長類レンチウイルス複製阻害因子同定系」で得られた研究結果を系統的に分析する事により、heterologous challenge に抵抗性のサル個体でサルエイズウイルス耐性に直接関与するエフェクター分子を本実験系で同定するために極めて有用な基盤情報を得る事ができた。

## F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

## G. 研究発表

### 論文発表

- 1) Yumi Kariya, Makiko Hamatake, Emiko Urano, Hironori Yoshiyama, Norio Shimizu, Jun Komano. A dominant-negative derivative of EBNA1 represses EBNA1-mediated transforming gene expression during the acute phase of Epstein-Barr virus infection independent of rapid loss of viral genome. *Cancer Sci.* In press.
- 2) Emiko Urano, Reiko Ichikawa, Yuko Morikawa, Takeshi Yoshida, Yoshio Koyanagi, Jun Komano. T cell-based functional cDNA library screening identified SEC14-like 1a carboxy-terminal domain as a negative regulator of human immunodeficiency virus replication. *Vaccine.* In press.
- 3) Makiko Hamatake, Jun Komano, Emiko Urano, Fumiko Maeda, Yasuko Nagatsuka, Masataka Takekoshi. Inhibition of HIV replication by a CD4-reactive Fab of an IgM clone isolated from a healthy HIV-seronegative individual. *Euro J Immunol.* In press.
- 4) Ranya Hassan, Shinya Suzu, Masateru Hiyoshi, Naoko Takahashi-Makise, Takamasa Ueno, Tsutomu Agatsuma, Hirofumi Akari, Jun Komano, Yutaka Takebe, Kazuo Motoyoshi and Seiji Okada. Dys-regulated activation of a Src tyrosine kinase Hck at the Golgi disturbs N-glycosylation of a cytokine receptor Fms. *Journal of Cellular Physiology.* 2009 Nov;221(2):458-468.
- 5) Tsutomu Murakami, Sei Kumakura, Toru Yamazaki, Reiko Tanaka, Makiko Hamatake, Kazu Okuma, Wei Huang, Jonathan Toma, Jun Komano, Mikiro Yanaka, Yuetsu Tanaka, and Naoki Yamamoto. The Novel CXCR4 Antagonist, KRH-3955 Is an Orally Bioavailable and Extremely Potent Inhibitor of

Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection: Comparative Studies with AMD3100. Antimicrobe Agents and Chemotherapy. 2009 Jul;53(7):2940-2948.

学会発表

(国際学会)

1) Tsutomu Murakami, Kei Miyakawa, Cecilia Bucci, Jun Komano, Naoki Yamamoto. Role of Rab7 and its effector protein in HIV-1 assembly. CSHL meeting on Retroviruses, Cold Spring Harbor, NY, USA 2009

2) Emiko Urano, Hiroyuki Okunaga, Yuko Morikawa, Jun Komano. Inhibition of HIV-1 replication by the co-chaperone DnaJ/Hsp40 protein family. CSHL meeting on Retroviruses, Cold Spring Harbor, NY, USA 2009

(国内学会、抜粋)

1) 駒野 淳. オーミクス解析手法が次世代エイズ治療・予防法開発に与えるインパクトシンポジウム「これからのHIV研究の進むべき方向」第23回日本エイズ学会, 名古屋, 11月27日 2009

2) 濱武牧子, 宮内浩典, 青木 徹, 浦野恵美子, 駒野 淳. Higher-order homotypic oligomerization determines the steady-state cell surface levels of CXCR4. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009

3) 上原大輔, 坂本真衣子, 吉川治孝, 泉川圭一, 早川俊哉, 駒野 淳, 高橋信弘. Proteomic search for the function of HIV-1 Rev protein in human cells. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009

4) 青木 徹, 清水佐紀, 浦野恵美子, 濱武牧子, 寺嶋一夫, 玉村啓和, 村上 努, 山本直樹, 駒野 淳. Development of 5th generation lentiviral vector. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009

5) 浦野 恵美子, 市川 玲子, 森川 裕子, 芳田剛, 小柳 義夫, 駒野 淳. SEC14-like 1a carboxy-terminal domain negatively regulates the infectivity of

human immunodeficiency virus replication. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009

6) 村上 努, 呉 鴻規, 富田香織, 伯川冬美, 駒野 淳, 千葉 丈, 山本直樹. Rab蛋白質とそのエフェクター蛋白質のHIV-1粒子形成における役割 (Rab7を中心に). 第23回日本エイズ学会学術集会, 名古屋, 2009

7) 浦野 恵美子, 倉持紀子, 供田 洋, 武部 豊, 駒野 淳, 森川 裕子. 酵母の膜結合Gag-Gag反応系で同定されたHIV-1 Gagアセンブリー阻害剤. 第23回日本エイズ学会学術集会, 名古屋, 2009

8) 浦野 恵美子, 市川 玲子, 森川 裕子, 芳田剛, 小柳 義夫, 駒野 淳. T細胞におけるHIV-1抵抗性遺伝子のスクリーニング-SEC14L1a C末端ドメインの同定とその機能解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009

9) 濱武牧子, 駒野 淳, 前田 史子, 長塚靖子, 竹腰 正隆. HIV-1複製抑制能を有する健常人由来CD4反応性IgM抗体クローンの分離: HIV-1に対するnatural humoral resistance. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009

10) 滝澤 万里, 草川 茂, 北村克彦, 長縄 聡, 村上 利夫, 本多 三男, 山本 直樹, 駒野 淳. Diversified HIV-1を利用した中和抗体KD-247感受性を規定するEnv アミノ酸残基の網羅的解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009

## H. 知的所有権の出願・取得状況

### 1. 特許取得

Hideto Chono, Jun Komano, et al. Inventory of high-titer lentivirus production system by modifying the amino-terminus of Gag (出願2009年11月19日 特願2009-263587).

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

表1. 機能的cDNAライブラリースクリーニングにより同定された抗HIV遺伝子

遺伝子名	ORF長 (kb, a)	3' 非翻訳領域長 (kb, b)	a+b (kb)	抗HIV活性	作用点#1	cDNA library 共通性#2
ARHGD1B	0.6	0.5	1.1	全長	初期過程	無
CD63	0.7	0.1	0.8	全長	初期過程	無
HSP40B6	0.8	1.4	2.2	全長	後期過程	無
CD14	1.1	0.1	1.2	全長	初期過程	無
CD5	1.5	1.6	3.1	全長	N/A #3	無
RIPK2	1.6	0.2	1.8	全長	N/A #3	有
SEC14L1a	2.1	3.1	5.2	C末端	後期過程	有
Brd4	4.1	2.2	6.3	C末端	後期過程	有

#1 : HIV複製サイクルを阻害する主な作用点を示す。

#2 : 2種類のcDNA libraryから同定されたものを有とする。

#3 : まだ十分に解明されていないことを示す。

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

多様なエイズウイルス株の感染を制御する宿主応答：病理組織学的検索

分担研究者 中村 紳一郎 滋賀医科大学准教授

研究要旨 低病原性の糖鎖欠損変異 Simian Immunodeficiency Virus (SIV)をアカゲザルに実験感染させることによるワクチン効果が期待されている。この効果を確かなものとするためには、その際に起こる宿主応答を正確に理解する必要がある。今年度は糖鎖欠損変異 SIV ( $\Delta 5G$ ) に対する病理組織学的変化について検索、正確な宿主応答を検討する足がかりとした。 $\Delta 5G$  を接種したあと高病原性 SIV239 をチャレンジした場合、脾臓の白脾髄で濾胞構造はやや退縮、辺縁帯の退縮が大きく、胚中心明調帯の大きさは保たれていた。リンパ節では皮質全体が萎縮し、胚中心明調帯は退縮し、辺縁帯が明瞭化していた。両群の差異が見られるところに、ワクチン効果の鍵を握る責任細胞がいると考え、今後はそれぞれに反応している細胞の違いを免疫組織化学的に検討する予定である。

#### A.研究目的

AIDS の予防のために様々な方法が考えられており、弱毒生ワクチンが有効とされている。一方で実験的には、低病原性のウイルスによる免疫の誘導も、有効な手段の一つと考えられている。Human Immunodeficiency Virus (HIV)、Simian Immunodeficiency Virus (SIV)はともにそれぞれの外膜を覆う Env には多量の糖鎖が付加しており、他のウイルスとは異なる特徴的な構造を持っている。糖鎖欠損変異 SIV ( $\Delta 5G$ ) は、高病原性株と同様に感染初期にウイルス量のピークを迎えるが、その後、検出できなくなり、終世にわたって持続感染を示す高病原性株とは異なる挙動を示す。一方で $\Delta 5G$  を投与、その後高病原

性 SIV239 をチャレンジ投与すると、その感染を防御することが明らかになっており、 $\Delta 5G$  のワクチン効果が期待されている。本研究では、 $\Delta 5G$  のワクチン効果の中で誘導される宿主応答、特にいかなる免疫細胞が誘導されているのかを検索するための、組織学的変化の基礎的検討を行った。

#### B.研究方法

（材料）低病原性の糖鎖欠損変異 SIV ( $\Delta 5G$ ) を接種の後、高病原性 SIV239 をチャレンジ接種されたオスのアカゲザル 3 頭 ( $\Delta 5G$ +SIV239; Mm0135、Mm0139、Mm0140)、 $\Delta 5G$  の接種のみが行われたオスのアカゲザル 1 頭 ( $\Delta 5G$ +Non; Mm0137) について、病理解剖を行った。

(病理組織学的検索) 脾臓、鼠径リンパ節、腸間膜リンパ節および小腸をパラホルムアルデヒド固定、パラフィン包埋ブロックを作製し、約 4  $\mu$ m に薄切した切片を作製、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

(免疫組織化学的検索) 今年度は基本的な細胞分布の違いを検討することとし、抗 CD3 抗体 (汎 T 細胞マーカー)、抗 CD20 抗体 (B 細胞マーカー)、抗 CD68 抗体 (マクロファージ系細胞マーカー) を一次抗体とする免疫染色を行った。ポリマーに HRP が標識された抗マウスグロブリン抗体を二次抗体とし、DAB で発色した。

### C. 研究結果

$\Delta 5G+SIV239$  の脾臓は  $\Delta 5G+Non$  のそれに比べ、白脾髄の胚中心暗調帯と辺縁帯の境界が不明瞭で、両者の幅も狭い傾向にあった。両群の胚中心暗調帯の大きさはほとんど変化が見られなかった。胚中心暗調帯から辺縁帯にかけてはほとんど CD3 陽性の T 細胞に占められ、少数の CD20 陽性の B 細胞が混じていた。胚中心の明調帯はほとんど CD20 陽性の B 細胞で、少数の CD68 陽性細胞のマクロファージ系細胞が確認された。赤脾髄には CD68 陽性のマクロファージ系細胞が散在していた。

$\Delta 5G+SIV239$  の鼠径および腸間膜リンパ節は  $\Delta 5G+Non$  のそれに比べ、皮質が拡張、胚中心明調帯の明瞭化が認められた。 $\Delta 5G+Non$  の皮質は、ほとんどが辺縁帯の構造を示していた。 $\Delta 5G+SIV239$  の胚中心明調帯はほとんど CD20 陽性の B 細胞に占められていた。周囲の辺縁帯はほとんどが CD3 陽性の T 細胞だったが、少数の CD20 陽性の B 細胞が混じていた。髄質はほとん

ど CD68 陽性のマクロファージ系細胞だった。

小腸の固有リンパ装置では  $\Delta 5G+SIV239$  と  $\Delta 5G+Non$  との間に、大きな組織学的な差違は認められなかった。いずれも胚中心の明調帯にあたる構造は不明瞭で、ほとんどが辺縁帯にあたる構造に占められていた。構成細胞はほとんどが CD3 陽性の T 細胞で、少数の CD20 陽性の B 細胞を混じていた。

両群の間では、脾臓の辺縁帯の大きさ、リンパ節の胚中心明調帯の有無、といった違いが見られたが、それぞれの領域に分布する細胞の割合には大きな違いは見られなかった。

### D. 考察

$\Delta 5G$  の糖鎖欠損によって期待される効果は、不完全なウイルスであることによる低病原化と、糖鎖に被覆されていた抗原の露出に伴う、液性免疫の活性化が主たるものと考えられるが、細胞性免疫の活性化が考えられる。

組織学的に、 $\Delta 5G+Non$  では脾臓、リンパ節ともにリンパ装置の大きさが非常に良く保たれており、活発に機能していると考えられた。かつ、液性免疫を司る胚中心、細胞性免疫を司る辺縁帯、ともに大きさが保たれていた。 $\Delta 5G$  に対する免疫応答は、免疫系の細胞の枯渇化へと働く、高病原性 SIV の免疫応答とかなり異なると考えられた。

$\Delta 5G+SIV239$  で退縮したリンパ装置は、高病原性 SIV239 のチャレンジ接種によるものであり、高病原性 SIV239 単回投与による枯渇とは異なる像であった。ワクチン効果のキーとなる変化が、両群で差の見た

れた領域に標榜されるものと予測される。なし。  
すなわち脾臓の辺縁帯、リンパ節の胚中心と辺縁帯に出現する細胞が、両群の間でいかに異なるかを検討することが重要である。今回の免疫組織化学的検索では、大まかな細胞の分布の違いを見るにとどまり、それぞれの領域での細胞分布は標準の組織学的な分布と変わらなかった。今後はヘルパー、細胞傷害性、メモリー、機能性など異なった種の T 細胞を免疫組織化学的に染め分け、群間の相違について検討していく予定である。

#### E. 結論

Δ5G の投与で免疫系組織での活動的な反応が起こっていた。SIV239 チャレンジ接種に伴うワクチン効果は脾臓の辺縁帯、リンパ節の胚中心と辺縁帯に出現する細胞に標榜されており、同領域に出現する細胞を、SIV239 単回投与群ならびに非接種群の出現細胞と比較することで、宿主応答に鍵を握る細胞が特定できると思われる。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Sakurai F, Nakamura S, Akitomo K, Shibata H, Terao K, Kawabata K, Hayakawa T, Mizuguchi H. Adenovirus serotype 35 vector-mediated transduction following direct administration into organs of nonhuman primates. Gene Ther. 16 (2):297-302, 2009

##### 2. 学会発表

なし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況



### 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
宮澤 正顕	総論第5章 免疫	青笹 克之	解明 病理学: 病気のメカニズムを解く	医歯薬出版(株)	東京	2009	84-129

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
Pereira LE, Onlamoon N, Wang X, Wang R, Li J, Reimann KA, Villinger F, Pattanapanyasat K, <u>Mori K</u> , <u>Ansari AA</u>	Preliminary in vivo efficacy studies of a recombinant rhesus anti-alpha(4)beta(7) monoclonal antibody.	Cell Immunol	256	165-176	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(4)	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(16)	2091-2100	2009
<u>Miyazawa, M.</u> and M. Clerici.	The 'immunologic advantages' of HIV-exposed seronegative individuals : authors' reply.	AIDS	23	1612	2009
<u>Miyazawa, M.</u> , 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)	09	2009
Takakuwa, H., T. Maruoka, T. Hata, <u>M. Miyazawa</u> , 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
Takamura, S., Tsuji-Kawahara, S., Yagita, H., Akiba, H., Sakamoto, M., Chikaishi, T., Kato, M., and <u>Miyazawa, M.</u>	Premature terminal exhaustion of Friend virus-specific effector CD8 <sup>+</sup> T cells by rapid induction of multiple inhibitory receptors.	J. Immunol.	in press		2010
Mori, H., Yamanaka, K., Matsuo, K., <u>Yasutomi, Y.</u> And Mizutani, H.	Administration of Ag85B showed therapeutic effects to Th2-type cytokine-mediated acute phase atopic dermatitis by inducing regulatory T cells.	Arch. Dermatol. Res.	301	151-157	2009
Okabayashi, S., Ohno, C. and <u>Yasutomi, Y.</u>	Acute megakaryocytic leukemia (AMKL)-like disease in a Cynomolgus monkey (Macaca fascicularis).	J. Comp. Pathol.	140	212-216	2009

Morioka ,T., Yamanaka,K., Mori,H., Omoto,Y., Tokime,K., Kakeda,M., Kurokawa,I., Gabazza,E., Tsubura A., <u>Yasutomi,Y.</u> and <u>Mizutani, H</u>	IL-4/IL-13 antagonist DNA vaccination successfully suppresses Th2 type chronic dermatitis.	Br.J.Dermatol.	160	1172-1179	2009
Takano, J.I., Tachibana, H., Kato, M., Narita, T., Yanagi, T., <u>Yasutomi, Y.</u> and Fujimoto	DNA characterization of simian Entamoeba histolytica-like strains to differentiate them from Entamoeba histolytica.	Parasitol.Res.	105	929-937	2009
<u>Yasuhiro Yasutomi</u>	Establishment of specific pathogen-free macaque colonies in Tsukuba Primate Research Center of Japan for AIDS research	Vaccine	In press		2009
Fujimoto,K., Takano,J., Narita, T., Hanari,K., Shimozawa,N., Sankai,T., Yoshida T., Terao,K., Kurata,T. and <u>Yasutomi,Y.</u>	Simian Retrovirus type D infection in a colony of cynomolgus monkeys.	Comp. Med.	In press		2009
Cueno,M.E., Karamatsu,K., <u>Yasutomi, Y.</u> , Laurena,A.C. and Okamoto.T.	Preferential expression and immunogenicity of HIV-1 Tat fusion protein expressed in tomato plant.	Transgenic. Res.	In press		2010
Urano E, Ichikawa R, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi T, <u>Komano J.</u>	T cell-based functional cDNA library screening identified SEC14-like 1a carboxy-terminal domain as a negative regulator of human immunodeficiency virus replication	Vaccine		(in press)	2010
Makiko Hamatake, <u>Jun Komano</u> , Emiko Urano, Fumiko Maeda, Yasuko Nagatsuka, Masataka Takekoshi.	Inhibition of HIV replication by a CD4-reactive Fab of an IgM clone isolated from a healthy HIV-seronegative individual	Euro J Immunol		(in press)	2010
Kariya Y, Hamatake M, Urano E, Yoshiyama H, Shimizu N, <u>Komano J.</u>	A dominant-negative derivative of EBNA1 represses EBNA1-mediated transforming gene expression during the acute phase of Epstein-Barr virus infection independent of rapid loss of viral genome	Cancer Sci		(in press)	2010
Hassan R, Suzu S, Hiyoshi M, Takahashi-Makise N, Ueno T, Agatsuma T, Akari H, <u>Komano J.</u> , Takebe Y, Motoyoshi K and Okada S.	Dys-regulated activation of a Src tyrosine kinase Hck at the Golgi disturbs N-glycosylation of a cytokine receptor Fms	J Cell Physiology	221(2)	458-468	2009
Murakami T, Kumakura S, Yamazaki T, Tanaka R, Hamatake M, Okuma K, Huang W, Toma J, <u>Komano J.</u> , Yanaka M, Tanaka Y, Yamamoto N.	The Novel CXCR4 Antagonist, KRH-3955 Is an Orally Bioavailable and Extremely Potent Inhibitor of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection: Comparative Studies with AMD3100	AAC	53(7)	2940-2948	2009
Sakurai F, <u>Nakamura S.</u> , Akitomo K, Shibata H, Terao K, Kawabata K, Hayakawa T, Mizuguchi H	Adenovirus serotype 35 vector-mediated transduction following direct administration into organs of nonhuman primates.	Gene Ther.	16 (2)	297-302	2009

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷