

**図3 2回目のSeV-Gag ( $10^8$ ) ブーストによるGag特異的CTL誘導**

- (左) DNAプライム・SeV-Gagベクターブースト後9週目に2回目のSeV-Gagベクター経鼻接種 ( $6 \times 10^8$  CIU) を行った後の末梢血リンパ球中のGag特異的CTLレベルを示す。  
naive群では2回目の接種によるGag特異的CTLブースト効果が認められたが、pre-SeV群ではブースト効果が明確ではなかった。
- (右) 2回目のSeV-Gagベクター経鼻接種直前の血漿中のSeV特異的中和抗体価を示す。  
naive群では 1:50以下、pre-SeV群では 1:200 - 1:800の中和抗体価が認められた。

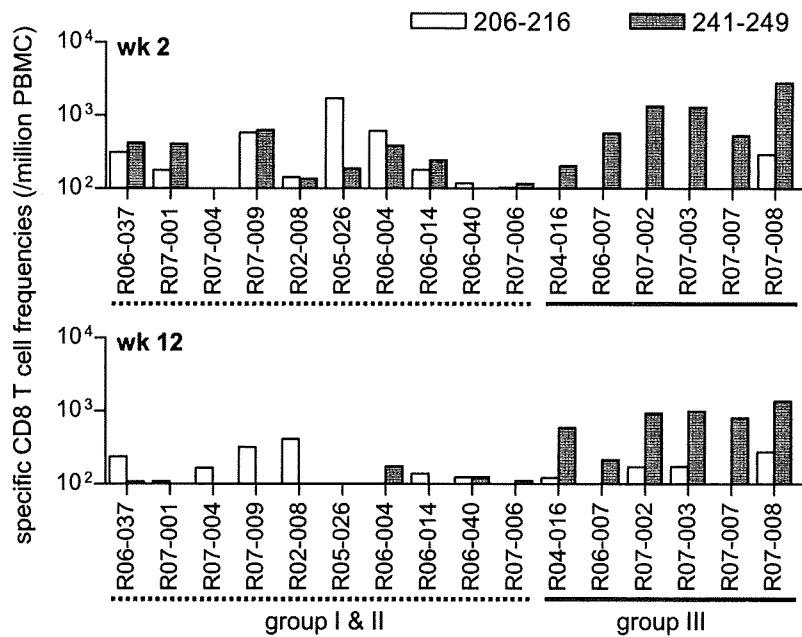


図4 単独エピトープ発現CTL誘導ワクチン接種サルでのSIV感染急性期のGag特異的CTL反応。SIV感染後2週目（上）と12週目（下）のGag206-216特異的CTLとGag241-249特異的CTLレベルを示す。非ワクチン接種群と対照ワクチン接種群（group I & II）では、Gag206-216特異的CTLがGag241-249特異的CTLとともに優位に誘導される傾向にあるが、単独エピトープワクチン接種では、Gag241-249特異的CTL反応が優位に誘導されていた。

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

経口 DNA ワクチンの開発に関する研究

研究分担者 保富 康宏 独立行政法人医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター  
センター長  
研究協力者 柴田 宏昭 独立行政法人医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター  
プロジェクト研究員

研究要旨

エイズウイルスに対する感染防御では粘膜免疫を誘導するワクチンが重要である。本研究では経口感染を示す E 型肝炎ウイルス (HEV) のウイルス様中空粒子 (VLP) を用いて経口投与にてエイズウイルス特異的粘膜免疫の誘導を検討した。このシステムは異種蛋白由来の遺伝子を組み込むことで、VLP 表面に異種蛋白由来抗原エпитープを発現させる事が出来、発現させた抗原エピトープに対する特異的な免疫応答も誘導できる利点がある。このシステムをマウス及びサルを用いて有効性と安全性を検証する。

マウスを用いた HIV-Gag 発現 DNA ワクチン投与実験で、HIV-Gag 特異的な免疫誘導を確認し、HIV-Env エピトープを表出する HEV-VLP に DNA ワクチンを封入したものを、経口投与で、免疫誘導能を検討した結果、筋注投与では誘導困難な腸管関連リンパ組織での抗原特異的な免疫応答を高めることに成功した。

A. 研究目的

HIV 感染の予防には液性免疫と細胞性免疫の両者が必要であると考えられている。更に、本ウイルスに対しては感染経路から考えて粘膜免疫は重要である。粘膜免疫を誘導する DNA ワクチンは感染防御ワクチンとして魅力的なツールではあるが、粘膜への投与方法で最も簡便な経口投与では粘膜免疫を誘導しない。ウイルス様中空粒子(VLP)は遺伝情報を持たず、そのウイルスとしての立体構造が保存されている。本研究では経口感染を示す E 型肝炎ウイルス(HEV)の VLP を用いその VLP に HIV のエピトープを組み込んだリコンビナント VLP に DNA ワクチンを封入した VLP についての経口投与可能で粘膜免疫誘導型のワクチン開発の基礎的研究を行った。

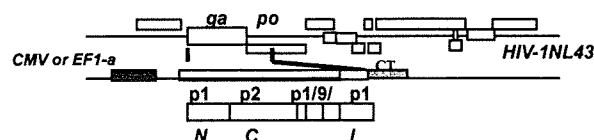
B. 研究方法

HIV-GagDNA ワクチンの免疫誘導能の評価

1) マウス種による免疫応答の比較

BALB/c(H-2K<sup>d</sup>)、DBA2J(H-2K<sup>d</sup>)及び BALB/c と C57BL/6(H-2K<sup>b</sup>)の交雑系である CB6F1 マウス

(H-2K<sup>b/d</sup>)に HIV-1 Gag タンパク発現ベクターとして、pEF-148 50 ug と pcDNA3.1(+) 50 ug を混合し、筋注。1 回の免疫量は 50ug+50ug (DNA 量) に調整し、2 週間隔で合計 3 回の免疫を行った。さらに筋注時には免疫効果を高める目的で Electric pulse 処理(T820;BTX 社)を行う。最終免疫から 2 週後の免疫マウスより脾臓細胞を採取し、常法に従い (MACS ビーズを用いた positive selection) CD8 陽性細胞を単離した。Gag に対する免疫応答として A9ICTL ペプチドを用いて 36 時間 抗原再刺激を行い、ELISpot 法により抗原特異的な IFN- $\gamma$  産生 CD8 陽性細胞数を測定し、抗原特異的な CD8 陽性細胞の免疫応答を検討した。細胞濃度は  $2.5 \times 10^5$  cells/100ul と  $5 \times 10^5$  cells/100ul の 2 段階、さらにペプチド量を 0、10、100ug の 3 段階とした。



CMV; KAL-148, EF-1a; EF-148

## 2) HIV-GagDNA ワクチンに対する Ag85B アジューバンドの検討

DBA2J(H-2d)、CB6F1(H-2b/d)マウスに HIV-1 Gag タンパク発現ベクターとして、pEF-148 (コントロールとして EF-Bos-Bsr) 50ug と pcDNA- $\alpha$  (コントロールとして pcDNA3.1(+)) 50ug を混合し、筋注。1回の免疫量は 50ug+50ug (DNA 量) に調整し、2週間隔で合計3回の免疫を行った。さらに筋注時には免疫効果を高める目的で Electric pulse 処理(T820;BTX 社)を行う。最終免疫から2週後の免疫マウスより脾臓細胞を採取し、常法に従い (MACS ビーズを用いた positive selection) CD8 陽性細胞を単離した。Gag に対する免疫応答として A9ICTL ペプチドを用いて 36 時間 抗原再刺激を行い、ELISpot 法により抗原特異的な IFN- $\gamma$  産生 CD8 陽性細胞数を測定し、抗原特異的な CD8 陽性細胞の免疫応答を検討した。細胞濃度は  $2.5 \times 10^5$  cells/100ul と  $5 \times 10^5$  cells/100ul の2段階、さらにペプチド量を 0、10、100ug の3段階とした。データは  $10^6$  cells に算術計算した。

## 3) エピトープの条件検討

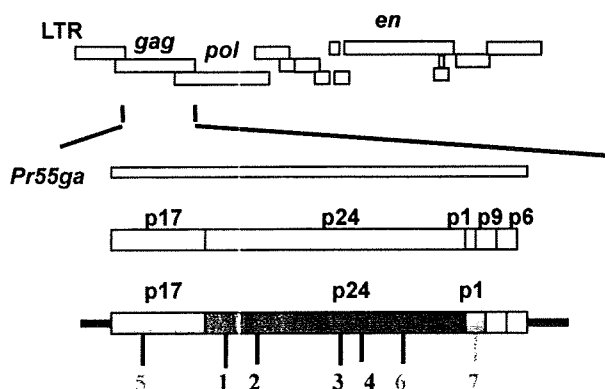
HIV-1Gag 抗原ペプチドとして以下の7つのエピトープを合成した。

### (d)-restricted

- ①S8W SPRTLNAW
- ②A9I AMQMLKETI
- ③T9I TTSTLQEQI
- ④E10F EPFRDYVDRF

### (b)-restricted

- ⑤R13V RSLYNTVATLYCV
- ⑥Q12L QEVKNWMTETLL
- ⑦S9I SQVTNPATI



BALB/c、DBA2J、CB6F1 マウスに HIV-1 Gag タンパク発現ベクターとして、pEF-148 50ug 単独 (あるいはと pcDNA- $\alpha$ を 50ug を混合し)、筋注。2週間隔で合計3回の免疫を行った。さらに筋注時には免疫効果を高める目的で Electric pulse 処理 (T820;BTX 社)を行う。最終免疫から2週後の免疫マウスより脾臓細胞を採取し、常法に従い (MACS ビーズを用いた positive selection) CD8 陽性細胞を単離した。Gag に対する免疫応答として、各抗原ペプチドを用いて 36 時間 抗原再刺激を行い、ELISpot 法により抗原特異的な IFN- $\gamma$  産生 CD8 陽性細胞数を測定し、抗原特異的な CD8 陽性細胞の免疫応答を検討した。細胞濃度は  $2.5 \times 10^5$  cells/100ul と  $5 \times 10^5$  cells/100ul の2段階、さらにペプチド量を 0、10、100ug の3段階とした。データは  $10^6$  cells に算術計算した。

## 4) DNA ワクチンプロモーターと免疫期間による免疫応答の比較

BALB/c に HIV-1 Gag タンパク発現ベクターとして、pKAL148 (CMV プロモーター) あるいは pEF-148 (EF1-a プロモーター) 30ug を筋注。さらに一部のマウスは pcDNA-a 30ug をさらに混合し、筋注。間隔で合計3回の免疫を行った。さらに筋注時には免疫効果を高める目的で Electric pulse 処理(T820;BTX 社)を行う。これまでは 50ug 筋注だったが、VLP の封入効率の関係で1回の免疫量が 30ug に近く。筋注についても 30ug に変更した。追加免疫の影響をみる目的で、各免疫から2週後の免疫マウスより脾臓細胞を採取し、常法に従い (MACS ビーズを用いた positive selection) CD8 陽性細胞を単離した。Gag に対する免疫応答として A9ICTL ペプチドを用いて 36 時間 抗原再刺激を行い、ELISpot 法により抗原特異的な IFN- $\gamma$  産生 CD8 陽性細胞数を測定し、抗原特異的な CD8 陽性細胞の免疫応答を検討した。細胞濃度は  $2.5 \times 10^5$  cells/100ul と  $5 \times 10^5$  cells/100ul の2段階、さらにペプチド量を 0、10、100ug の3段階とした。

## 5) マウスへの HEV-VLP+DNA ワクチン投与

HIV-1 Env エピトープ (308-322 : RIORGPGRAFVTIGK) を中心とした部位を組み込んだリコンビナント HEV-VLP (rVLP-Env) を発現するバキュロウイルスとコントロールとして HIV-1 Env エピトープを持たないもとの HEV-VLP (C52)を発現するバキュロウイルスを用いた。常法に従い、同 HEV-VLP を含む昆虫由来細胞培養上清を超遠心による濃縮後、塩化セシウ

ムによる密度勾配にて、精製 HEV-VLP を得る。得られた HEV-VLP は蛋白濃度の測定を行うとともに SDS-PAGE による泳動にて分子量を確認し実験に用いた。HEV-VLP を EDTA でキレートし DNA ワクチンの封入を行った。DNA ワクチンの経口投与については、BALB/c マウスを免疫するワクチンにより以下の 4 群に分けた。VLP に HIV-1 Env 抗原エピートプを表出させ、その VLP(rVLP-Env)に HIV-1 gag DNA ワクチンを封入したものを免疫した群 (E+G 群)、HIV-1 Env エピートプを持たないもの HEV-VLP (C52) に HIV-1 gag DNA ワクチンを封入したものを免疫した群 (C+G 群)。それぞれに対して、DNA ワクチンを封入していない VLP (rVLP- Env 単独; E 群、または C52 単独; C 群) を免疫した群の 4 群とした。マウスへの免疫は経口ゾンデによる経口投与により行い、VLP タンパク質量換算で 100ug、封入された DNA 量が約 30ug となるように調整し、2 週間隔で合計 3 回の免疫を行った。コントロールとして pKAL 30 ug の筋注 3 回免疫した。最終免疫から 2 週後の免疫マウスより腸間膜リンパ節、バイエル板などの粘膜関連リンパ組織および全身免疫の指標として脾臓を採取し、常法により CD8 陽性細胞を単離した。それぞれの細胞を Env に対する免疫応答として P18-H10 CTL ペプチド、Gag に対する免疫応答として A9ICTL ペプチドを用いて 36 時間 抗原再刺激を行い、ELISpot 法により抗原特異的な IFN- $\gamma$  産生 CD8 陽性細胞数を測定し、抗原特異的な CD8 陽性細胞の免疫応答を検討した。細胞濃度は  $2.5 \times 10^5$  cells/100ul の 1 段階、さらにペプチド量を 0、100ug の 2 段階とした。

また、最終免疫 2 週後の免疫マウスから腸間膜リンパ節細胞を分離した (MACS ビーズによる分離はしない)。細胞を Env に対する免疫応答として rgp120、Gag に対する免疫応答として rp24 を用いて 4 日間抗原再刺激を行った。[3H]-TdR 取り込み能による抗原特異的なヘルパー T(Th)細胞増殖反応と培養上清中の抗原特異的なサイトカイン (IFN- $\gamma$  および IL4)量を測定し、抗原特異的な Th 細胞の免疫応答を検討した。

(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の実施に関する基本指針」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、医薬基盤研究所組換え DNA 実験安全委員会の承認を

得て行った。

C. 研究結果

1) マウス種による免疫応答の比較

BALB/c、DBA2J 及び CB6F1 マウスに HIV-1 Gag タンパク発現ベクターを筋注した結果、今回調べたマウスストレインに関しては、HIV gag 特異的 INF- $\gamma$ 産生細胞を検出した。しかしながら、傾向としては BALB/c、DBA/2J、CB6F1 の順で抗原特異的 CD8 陽性細胞が多かった (図 1)。

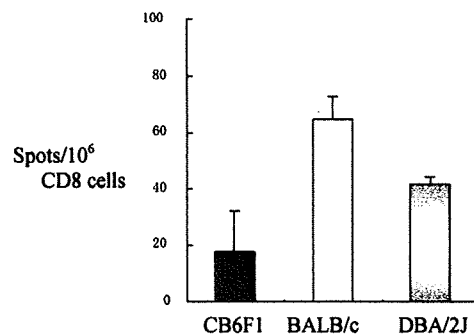


図 1. HIV-Gag 特異的 INF- $\gamma$ 産生細胞数

2) HIV-GagDNA ワクチンに対する Ag85B アジュバンドの検討

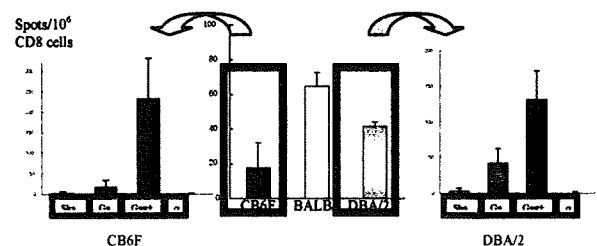


図 2. pcDNA- $\alpha$ の併用による HIV-Gag 特異的 INF- $\gamma$ 産生細胞数

Sham: EF-Bos-Bsr+ pcDNA3.1(+), Gag: Gag+ $\alpha$ : pEF-148+ pcDNA $\alpha$ ,  $\alpha$ : EF-Bos-Bsr+ pcDNA3.1(+)

DBA2J、CB6F1 マウスに HIV-1 Gag タンパク発現ベクターとして、pEF-148 (コントロールとして EF-Bos-Bsr) と pcDNA- $\alpha$  (コントロールとして pcDNA3.1(+)) を混合筋注した結果、DBA2J、CB6F1 マウス共に、pcDNA-a の併用により、HIV Gag 特異的 INF- $\gamma$ 産生細胞数が有意に増加した。1 回の免疫量は 50ug+50ug (DNA 量) に調整し、2 週間隔で合計 3 回の免疫を行った。さらに筋注時

には免疫効果を高める目的で Electric pulse 処理 (T820;BTX 社)を行う。最終免疫から2週後の免疫マウスより脾臓細胞を採取し、常法に従い(MACS ビーズを用いた positive selection) CD8 陽性細胞を単離した。Gag に対する免疫応答として A9ICTL ペプチドを用いて 36 時間 抗原再刺激を行い、ELISpot 法により抗原特異的な IFN- $\gamma$  産生 CD8 陽性細胞数を測定し、抗原特異的な CD8 陽性細胞の免疫応答を検討した (図2)。

### 3) エピトープの条件検討

HIV-1 Gag タンパク発現ベクターを筋注したマウスの HIV-1Gag の各抗原ペプチドによる細胞性免疫の誘導を行った結果、本実験系では、H-2K<sup>d</sup> 拘束性の A9I; AMQMLKETI が主要なエピトープであった。CB6F1(H-2K<sup>b/d</sup>) の系でも H-2K<sup>d</sup> 拘束性の A9I; AMQMLKETI が主に反応したが、H-2K<sup>d</sup> 拘束性の S9I; SQVTNPATI がまれに反応した (図3)。

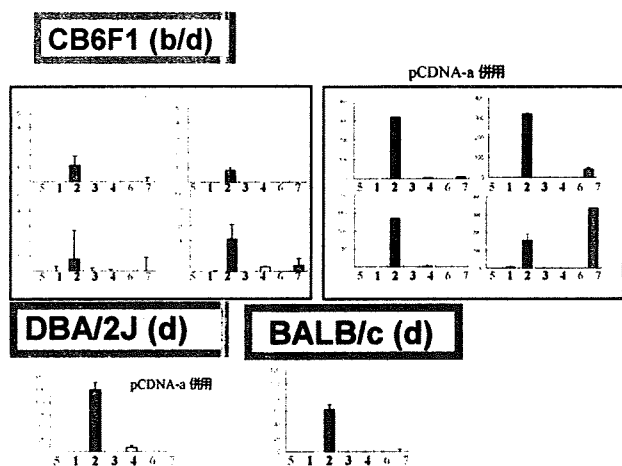


図3. Gag 抗原ペプチドに対する特異的 IFN- $\gamma$ 産生細胞数の比較

### 4) DNA ワクチンプロモーターと免疫期間による免疫応答の比較

BALB/c マウスに CMV プロモーター発現系 DNA ワクチンと EF1-a プロモーター発現系 DNA ワクチンの免疫誘導性を比較した結果、CMV プロモーター発現系 DNA ワクチン (KAL148) で免疫誘導が高い傾向を認めた。また、CMV プロモーターでは、Ag58B アジュバントの併用がなくとも免疫応答が検出できた。免疫応答の解析には、prime+boost 処理及び初回免疫からの十分な免疫増強期間が必要であることが示唆された (図4)。

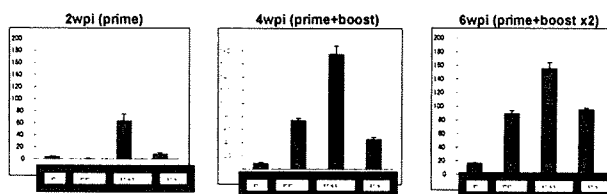


図4. DNA ワクチンプロモーターと免疫期間による免疫応答の比較

EF; EF148, EF+ $\alpha$ ; EF148+pcDNA- $\alpha$ , KAL+ $\alpha$ ; KAL148+pcDNA- $\alpha$ , KAL; KAL148

### 5) マウスへの HEV-VLP+DNA ワクチン投与

マウスに GagDNA ワクチンを封入した HEV-VLP (rVLP-Env) を経口投与し、Env、Gag 特異的な免疫応答の誘導を試みた。Env、Gag 特異的な IFN- $\gamma$ 産生細胞を腸管関連リンパ組織で認められた (図5A)。筋注によるワクチン投与では、腸管関連リンパ組織での特異的免疫応答は低いままであった (図5B)。

また、Env、Gag 特異的な Th 細胞の増殖も腸管膜リンパ組織で認められた (図6)。

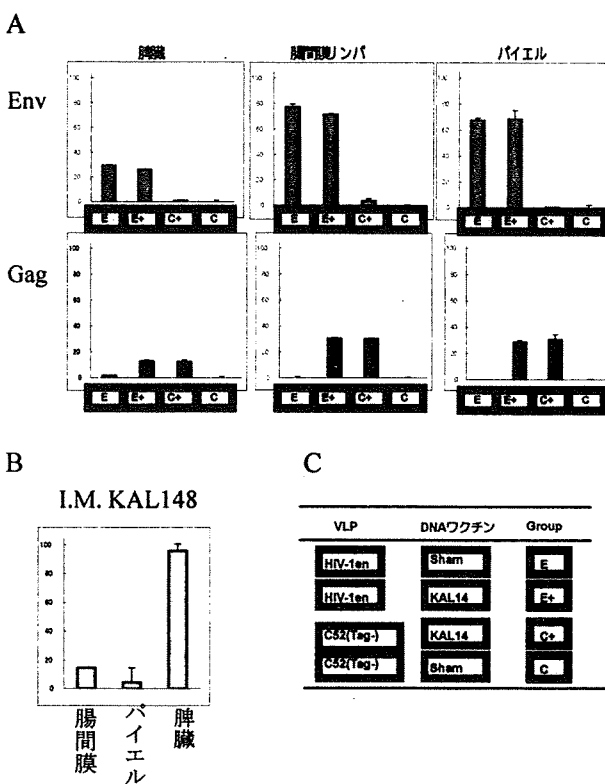


図5. 免疫マウスの各リンパ組織中の Env、Gag 特異的 IFN- $\gamma$ 産生細胞数の比較。A:ワクチン経口投与マウス B:ワクチン筋注投与マウス、C:A のグループ名の説明一覧

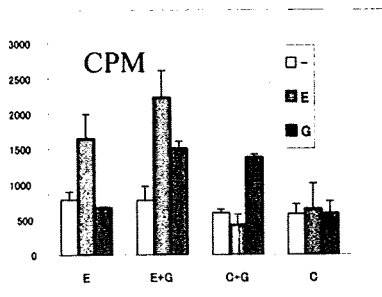


図6. 免疫マウスの腸間膜リンパ組織中の Env、Gag 特異的 Th 増殖反応の比較

#### D. 考察

HIV-GagDNA ワクチンの免疫誘導能をマウスを用いて、有効性を評価した。マウスのストレインによらず HIV-Gag 特異的な細胞性免疫を誘導を確認できたが、種によって免疫応答の強さに違いがある傾向が見られた。これは、HIV-Gag に対する主要エピトープは、H2-Kd 拘束性の A9I であったので、マウスの MHC class I ハプロタイプの違いによる影響が示唆された。

HIV-GagDNA ワクチンに対する Ag85B アジュバンドを検討した結果、Ag85B アジュバンドの併用がなくても特異的な HIV-Gag 特異的な細胞性免疫を誘導出来たが、Ag85B アジュバンドを併用した方がより強く免疫応答を誘導できた。また、DNA ワクチンプロモーターの比較を検討した結果、CMV プロモーターを用いた方が、HIV-Gag 特異的な細胞性免疫の誘導の立ち上がりが高く、高い傾向が見られたので、DNA ワクチンのプロモーターとしては、CMV を使い、Ag85B アジュバンドの併用により、ワクチンの有効性が更に高くなるものと示唆された。

以上の様にマウスを用いた GagDNA ワクチンを封入した HEV-VLP (rVLP-Env) の経口投与は、筋注では誘導困難な腸管関連リンパ組織における抗原特異的な免疫応答を明らかに高めており、感染防御に重要な粘膜面の免疫応答の誘導が強く示唆された。

今後、誘導が困難な HIV-1 に対する中和抗体の誘導の確認も行う必要がある。

また、今回のマウスでの結果をもとに、臨床応用へのトランスレーショナルとして、サルを用いた DNA ワクチンの免疫誘導能の評価にも着手しており、次年度の報告では、サルのデータを中心に報告を予定している。

#### E. 結論

HEV の VLP に HIVenv エピトープ発現ならびに DNA ワクチンを封入し、経口ワクチン開発の基礎的検討を行った。これらの経口投与で HIV 特異的免疫反応を誘導した。

#### F. 研究発表

##### 1 論文発表

- (1) Morioka T, Yamanaka K, Mori H, Omoto Y, Tokime K, Kakeda M, Kurokawa I, Gabazza E, Tsubura A, Yasutomi Y, Mizutani H. IL-4/IL-13 antagonist DNA vaccination successfully suppresses Th2 type chronic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* 160:1172-1179, 2009.
- (2) Takano JI, Tachibana H, Kato M, Narita T, Yanagi T, Yasutomi Y, Fujimoto K. DNA characterization of simian *Entamoeba histolytica*-like strains to differentiate them from *Entamoeba histolytica*. *Parasitol. Res.* 105:929-937, 2009.
- (3) Yasutomi Y. Establishment of specific pathogen-free macaque colonies in Tsukuba Primate Research Center of Japan for AIDS research. *Vaccine, in press.*
- (4) Fujimoto K, Takano J, Narita T, Hanari K, Shimozawa N, Sankai T, Yoshida T, Terao K, Kurata T, Yasutomi Y. Simian Retrovirus type D infection in a colony of cynomolgus monkeys. *Comp. Med., in press.*
- (5) Cueno ME, Karamatsu K, Yasutomi Y, Laurena AC, Okamoto T. Preferential expression and immunogenicity of HIV-1 Tat fusion protein expressed in tomato plant. *Transgenic Res., in press.*

##### 2 学会発表

- (1) 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、10/25-27/2009.
- (2) 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、11/26-28/2009.
- (3) Tsujimura Y, Yasutomi Y. 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、12/1-3/2009.
- (4) Nienke EH, Yasutomi Y, Niihara M. 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 28th Annual Meeting, Vancouver, 7/11-15/2009.

2 実用新案登録  
特になし。

3 その他  
特になし。

**G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）**

1 特許取得

(1) パラミクソウイルスベクターを用いた経鼻噴霧型結核ワクチン（特願 2009-252218）

(2) パラインフルエンザ 2 型ウイルスベクター (hPIV2)を用いたアトピー性皮膚炎治療薬 (特願 2009-235915)



厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

CTL エスケープ変異の HIV 複製能に及ぼす影響に関する研究

研究分担者 三浦 聡之 東京大学医科学研究所 准教授

**研究要旨** 現在研究されている多くの HIV ワクチンは、特異的細胞傷害性 T 細胞(CTL)誘導を目指している。一方で、HIV は多様性が高く、世界の異なった流行地域では遺伝子配列の大きく異なったウイルスが流行しており、ワクチン開発が難しくなっている原因のひとつとされている。ウイルスがアミノ酸変異を獲得し CTL 反応から逃避する際には、変異の種類によっては、ウイルス側に不利益（複製能の低下）をもたらす場合がある。本分担研究では、これら CTL 逃避変異のウイルス複製能力に与える影響を解析することを目的にする。平成 21 年度は基盤となる情報の収集に努め、日本人 HIV 感染者の HLA クラス I の分布が欧米のそれとは大きく異なっており、また日本人の間で流行するサブタイプ B ウイルスのアミノ酸配列は、欧米で流行しているものと大きく異なっていることを明らかにした。

**A. 研究目的**

日本人の間で流行している subtypeB ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) のアミノ酸配列の特徴を理解し、邦人で頻度の高い HLA に関連する変異(推定的な細胞傷害性 T 細胞逃避変異)を同定し、それらがウイルスの複製能に与える影響と、HIV の自然コントロールへの寄与を解析し、CTL ワクチンの有効標的部位を検討する。

**B. 研究方法**

対象：東京大学医科学研究所附属病院感染免疫内科に 1992 年 4 月から 2009 年 1 月までに通院した日本人慢性 HIV 感染症患者。

材料：上記対象患者で、未治療時で CD4 陽性 T 細胞数  $\geq 200/\mu\text{l}$  の時期から EDTA 血を採取。血漿と PBMC を分離。前者からウイルス RNA、後者からヒトゲノム DNA を抽出した。

HLA タイピング：WAKFlow HLA typing kit (Wakunaga, Hiroshima, Japan) を用いて Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotide probes (PCR-SSOPs) 法で施行した。

ウイルス遺伝子配列の決定：抽出したウイルス RNA より、nested RT-PCR によりウイルスの gag 領域を増幅し標準的な方法により、ウイルスの population sequence を得た。ウイルスのサブタイプは web 上の Rega HIV subtyping tool を用いて決定した。コンタミネーションは分子系統樹解析 (Maximum-Likelihood method) を行うことに

よりチェックした。

北米で流行するサブタイプ B ウイルスとのアミノ酸配列の違い：Gag 遺伝子配列において、各コドンにおける使用アミノ酸頻度を、日本と 500 以上にのぼる北米のサンプルの間で Fisher's exact probability test を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

研究目的等を文書によって患者に説明し、書面でインフォームドコンセントを得た。本研究内容は東京大学医科学研究所倫理委員会による倫理審査を受け、承認済みである。また患者情報の保管に関しては個人情報保護法に基づき漏洩のないように管理を徹底する。

**C. 研究結果**

(1) 東大医科学研究所附属病院に通院していた計 183 名の未治療日本人慢性 HIV-1 感染症患者が対象となった。このうち現在までに HLA class I アリルは 159 人で決定されている。得られた邦人 HIV 感染患者の HLA class I アリルの頻度を表 1 に示す。表から明らかなように、欧米で比較的頻度が高く、病気遅延と関連すると言われている HLA-B27 や B57 を持っている日本人は全く認められなかった。

(2) RT-PCR によるウイルス gag 領域の増幅とシーケンシングは 170 人から可能であった。サブタイプ解析の結果、93% (163/170) がサブタイプ

Bに感染していた。残る7人のうち、CRF\_01AEが5人、CRF\_02AGが1人、サブタイプA1が1人であった。興味深いことに、異性間性交渉が感染経路であることが自己報告されている患者のうち、女性患者では9名中5名(55.6%)が非サブタイプBに感染していたが、男性では16名中0名であり、実際は男性同性愛者であるのに、偽って報告しているものが、相当数含まれている可能性が示された。

(4) サブタイプBの配列のみを用いて、Los Alamos National Laboratory HIV databaseに登録されている相当数の米国及び中国からサンプリングされたサブタイプBの配列を含めて分子系統樹解析を行った。その結果、多くの日本人HIV感染者では、米国や中国で流行するサブタイプBと遺伝的に大きく異なった株に感染していることが判明した。

(5) コドン毎のアミノ酸使用頻度を、北米の未治療HIV感染者から増幅された500以上のサブタイプB Gagアミノ酸配列と比較検討したところ、Gag全体500コドンのうちの28%にあたる142ヶ所で統計学的に有意な違いを認めた。これは、全HIVタンパクの中でも比較的よく保存され、HIV特異的CTLの最も有効な標的と考えられているGagタンパクにおいても、同じサブタイプで、流行地によって大きく異なっていることを意味し、HIVの多様性を考慮したCTLワクチンの開発においても影響を与える可能性が示唆された。

#### D. 考察

現在開発段階にあるHIVワクチンの多くは、HIV特異的細胞傷害性T細胞の誘導を目指したものである。しかしながらHIV-1では、世界の流行する地域により配列の大きく異なった9つのサブタイプと30以上に上る流行組み換え体が確立しており、ワクチンによっては、多様性を考慮し、3つ程度のサブタイプをカバーするようにデザインされているものもある。しかしながら、本研究において現時点までに分かっただけでも、日本で流行しているサブタイプBは北米で流行しているもの、あるいはコンセンサスB配列(最大公約数的な配列)とは大きく異なっており、ワクチン開発において、本邦特有のウイルスアミノ酸配列を考慮する必要性が示された。グローバルには、各流行地域レベルでの、サブ-サブタイプの解析とCTL標的部位の選択が重要になる可能性が示された。一方、このようなHIVの多様性やサブタイプを形成する主な原動力として、人種間での異なったHLAクラスIタイプの分布があげられる。CTL

の標的アミノ酸配列は、感染個体が発現するHLAクラスIタイプにより拘束されており、ウイルスがCTL反応から逃避する際に獲得するアミノ酸変異はこのHLAクラスIタイプにより異なってくる。従って、異なった人種集団では異なった変異がウイルス配列に蓄積していくことが考えられている。本研究では引き続いて、今回得られた患者のHLAクラスIタイプとウイルスアミノ酸配列から統計学的手法を用いて、各HLAクラスIタイプに特異的なアミノ酸変異を検出することを試みる。検出されたアミノ酸変異は、推定的なCTL逃避変異の可能性が高く、それらがウイルスの複製能に与える影響について解析する。

#### E. 結論

日本人のHLAクラスIタイプの分布は、欧米のそれとは大きく異なっており、流行しているサブタイプBのアミノ酸配列も大きく異なっている。同じHIVサブタイプでも、地域に流行するウイルス配列を加味したCTL反応の解析、及びワクチンデザインが必要となることが示唆される。

#### F. 研究発表

##### 1 論文発表

- 1) Koga, M., Tachikawa, A., Heckerman, D., Odawara, T., Nakamura, H., Koibuchi, T., Fujii, T., Miura, T., Iwamoto, A. Transition of impact of HLA class I allele expression on HIV-1 plasma virus loads at a population level over time. *Microbiology and Immunology*, In press
- 2) Oka, Y., Tashiro, H., Mizutani-Noguchi, M., Koga, I., Sugao, Y., Shirasaki, R., Miura, T., Akiyama, N., Kawasugi, K., Fujimori, S., Shirafuji, N. Successful unrelated bone marrow transplantation for a human immunodeficiency virus type-1-seropositive acute myelogenous leukemia patient following HAART. *Int J Hematol.* 91, 140-145, 2010.
- 3) Pereyra, F., Palmer, S., Miura, T., Block, B., Wiegand, A., Rothchild, A., Baker, B., Rosenberg, R., Cutrell, E., Seaman, M., Coffin, J., Walker, B. Persistent low level viremia in HIV-1 elite controllers and relationship to immunologic parameters. *Journal Infect Dis.* 200:984-990, 2009.
- 4) Chen, H., Piechocka-Trocha, A., Miura, T., Brockman, M., Julg, B., Baker, B., Rothchild, A., Block, B., Schneidewind, A., Koibuchi, T., Pereyra, F., Allen, T., Walker, B. Differential neutralization of human immunodeficiency virus (HIV) replication in autologous CD4 T cells by HIV-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Virol*

83:3138-3149, 2009.

- 5) Miura, T., Brumme, C., Brockman, M., Brumme, Z., Pereyra, F., Block, B., Trocha, A., John, M., Mallal, S., Harrigan, PR., Walker, B. HLA-associated viral mutations are common in human immunodeficiency virus type 1 elite controllers. J Virol 83:3407-3412, 2009.
- 6) 三浦 聡之. HIV Elite Controllers –HIV感染症の自然制御―. 感染症. Vol 39. 219-223. 2009

## 2 学会発表

- (1) 鯉渕智彦、今井健太郎、菊地正、古賀道子、中村仁美、三浦聡之、藤井毅、岩本愛吉. HAART 導入一年半後に CD4 数の減少を来たし、diffuse large B-cell lymphoma と診断された一例. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、名古屋、11/26-28/2009.
- (2) 菊地正、古賀道子、鯉渕智彦、今井健太郎、中村仁美、三浦聡之、小田原隆、藤井毅、岩本愛吉. ART 初回導入した ABC、TDF 使用症例の血清脂質の経時的変化について. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、名古屋、11/26-28/2009.
- (3) 今井健太郎、前田卓也、菊地正、宮崎菜穂子、鯉渕智彦、古賀道子、中村仁美、三浦聡之、藤井毅、岩本愛吉. ペンタミジンによる低血糖が長期間遷延した AIDS 患者の一例. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、名古屋、11/26-28/2009.
- (4) 今井健太郎、菊地正、鯉渕智彦、古賀道子、中村仁美、三浦聡之、藤井毅、岩本愛吉. ニ

ューモシスチス肺炎と肺ノカルジア症を合併した AIDS 患者の一例. 第 58 回日本感染症学会東日本地方会学術集会、東京、10/30-31/2009.

- (5) Koga, M., Tachikawa, A., Heckerman, D., Odawara, T., Nakamura, H., Koibuchi, T., Fujii, T., Miura, T. and Iwamoto, A. The impacts of HLA class I alleles on HIV-1 plasma virus loads in a unique Asian population with a narrow spectrum of HLA, and their changes at the population level over time. 5th IAS Conference on HIV pathogenesis, Treatment and Prevention, Capetown, South Africa, 19-22 July 2009.
- (6) Miura, T., Brumme, ZL., Brumme, CJ., Block, B., Brockman, MA., Trocha, A., Pereyra, F., Kaufmann, D., Iwamoto, A., Rosenberg, E., Jessen, H., Kelleher, A., Markowitz, M., Little, S., Walker, BD and AIEDRP network. Characterization of HIV-1 from Acute/Early Infection in Individuals who Subsequently become Viremia Controllers. 5th IAS Conference on HIV pathogenesis, Treatment and Prevention, Capetown, South Africa, 19-22 July 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

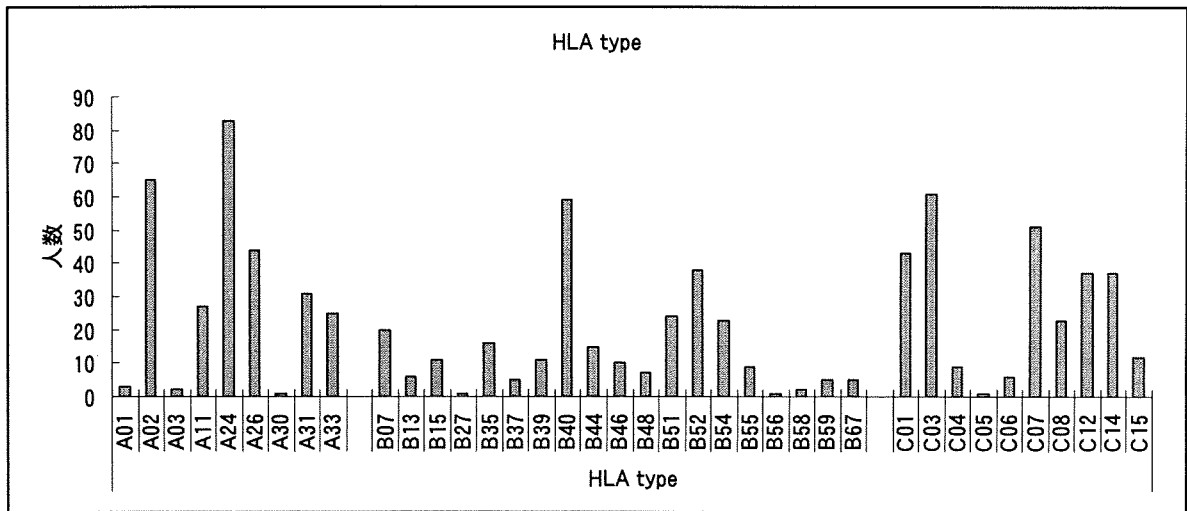


図1. 日本人 HIV 感染症患者における HLA クラス I の分布

表1. 日本ー北米間におけるサブタイプBHIV-1 の Gag コドン毎のアミノ酸配列の違い

サブドメイン名	日本ー北米間で有意に異なるコドン数	左記%
Gag 全体	142/500 コドン	28%
マトリックス	55/132 コドン	42%
キャップシド	31/231 コドン	13%
ヌクレオキャンド～p6	55/137 コドン	40%

[テキストを入力してください]

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

Gag 抗原に関する研究

研究分担者 森川 裕子 北里大学北里生命科学研究所教授

研究要旨

Gag 抗原発現量や粒子への取り込み効率を定量的に解析する目的で、まず Gag 蛋白（His タグ付 MA-CA-p2-NC）を大腸菌で発現・精製し、定量用の Gag 蛋白標準液を作製した。この Gag 蛋白標準液の希釈列を用いた Western blotting 法で、HIV-1 分子クローンを transfection した HeLa 細胞における Gag 蛋白発現量を定量したところ、単位細胞あたりの Gag 蛋白発現量は 7-10 pg であり、約  $0.7-1 \times 10^8$  分子に相当すると概算された。次に、その細胞と培養上清から精製した粒子の希釈列を作製し Western blotting を行ったところ、産生された粒子量は細胞内 Gag 蛋白量の約 15-20% に相当することが判明した。細胞の希釈列を作製し、細胞内における Gag と GagPol 蛋白の発現比率を半定量したところ、Gag:GagPol=10-20:1 であることが確認された。精製粒子の希釈列を作製し、同様に Gag と GagPol 蛋白の比率を半定量したところ、Gag:GagPol=7-10:1 であり、GagPol 蛋白はやや優先的に粒子への取り込まれているように思われた。

A. 研究目的

HIV 感染に対する有効な CTL 抗原を考案するためには、その抗原の細胞内での発現や分解のプロファイルを把握する必要がある。本研究では主たる CTL 抗原である Gag 抗原について、その抗原提示効率に基づく有効な CTL 抗原を選択することを最終目標に、本年度は細胞内での Gag 蛋白発現量や粒子への取り込み効率などの基礎情報を得ることを試みた。

B. 研究方法

(1) Gag 蛋白標準液の調製

His タグ付の MA-CA-p2-NC を大腸菌で発現させ、Ni<sup>2+</sup>カラムで精製した。硫酸沈殿で濃縮後、透析した。

(2) DNA 構築

HIV-1 cDNA クローン pNL43 株 (WT)、PR の触媒中心アミノ酸を置換 (D25N) した分子クローン (PR(-))、gag 遺伝子の p6 領域と pol 遺伝子の IN 末端にそれぞれ in frame で HA タグを挿入した分子クローン (Gag-HA/GagPol-HA)。pol 遺伝子の RT/IN 間に GFP を挿入した分子クローン (Gag/GagPol(GFP)) を用いた。

(3) Transfection と HIV 粒子精製

Lipofectamine2000 (Invitrogen 社) を用いて HeLa 細胞に上記の DNA を transfection した。2日後、

細胞を回収するとともに、培養上清をフィルター濾過し 20% sucrose cushion を用いて粒子を精製した。

(4) 半定量的 Western blotting

細胞および精製粒子の希釈列を作製し Western blotting を行った。Gag および GagPol 蛋白の検出には抗 p24CA 抗体と抗 HA 抗体、また抗 GFP 抗体を用いた。Image J でバンドの intensity を測定した。

(倫理面への配慮)

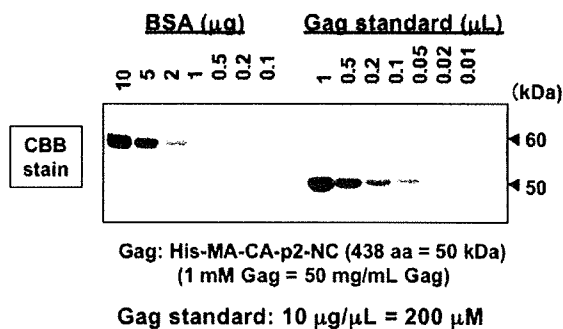
臨床材料を用いた実験を含まないため、生命倫理に対する措置を講じなかった。遺伝子組換え実験については二種省令・二種告示に従った。

C. 研究結果

(1) Gag 蛋白標準液の調製

まず Gag 蛋白 (His タグ付 MA-CA-p2-NC) を大腸菌で発現させ、精製した。この精製 Gag 蛋白溶液の希釈列を作製し、1 mg/mL BSA 標準液の希釈列とともに SDS-PAGE で展開し CBB で染色した (図 1)。得られた精製 Gag 蛋白溶液の濃度は約 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  であった。分子量 50 kDa であることから、約 200  $\mu\text{M}$  溶液であると計算された。この精製 Gag 蛋白溶液を Gag 蛋白定量の標準液として用いた。

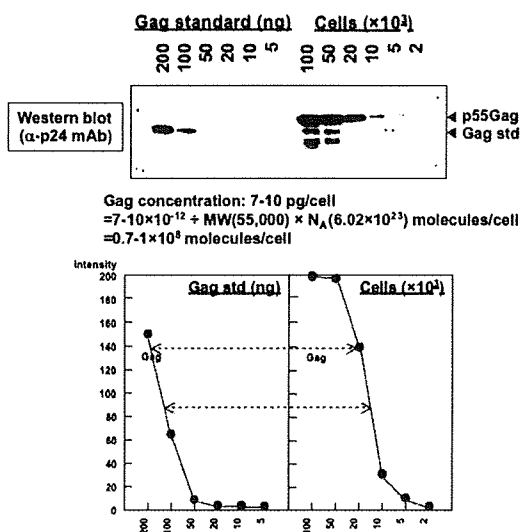
図1. Gag蛋白標準液の調製と定量



(2) 細胞内の Gag 蛋白濃度の定量

HeLa 細胞に PR(-) の分子クローンを transfection し、その細胞の希釈列を作製し、上記で検定された Gag 蛋白標準液の希釈列とともに、定量的 Western blotting を行った。検出には抗 p24CA 抗体を用いた (図 2 上)。Image J でバンドの intensity を測定し、グラフを作成した (図 2 下)。Gag 蛋白標準液の希釈列との比較により (破線矢印)、HeLa 細胞の単位細胞あたりの Gag 発現量は 7-10 pg であると判断された (7-10pg Gag/cell)。分子量 55 kDa であることから、単位細胞あたり約  $0.7-1 \times 10^8$  分子の Gag 蛋白が存在すると概算された。

図2. 細胞内Gag蛋白濃度(単位細胞内Gag分子数)の定量

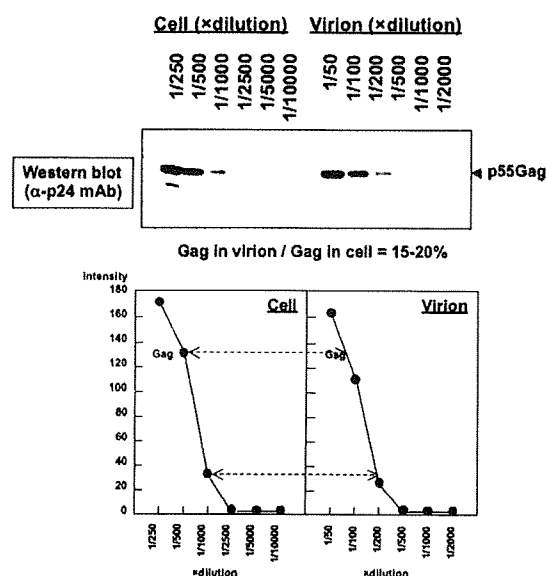


(3) 細胞内 Gag 蛋白発現量と粒子への取り込み効率の測定

HeLa 細胞に PR(-) の分子クローンを transfection し、2日後、細胞を回収するとともに、培養上清

から粒子を精製した。その細胞および精製粒子の希釈列を作製し、抗 p24CA 抗体を用いた Western blotting を行った (図 3)。Image J でバンドの intensity を測定し、グラフを作成した (図 2 下)。同じ Intensity を示す細胞と精製粒子の希釈濃度を比較したところ (破線矢印)、產生された粒子量は細胞内 Gag 蛋白量の約 15-20% に相当することが判明した。

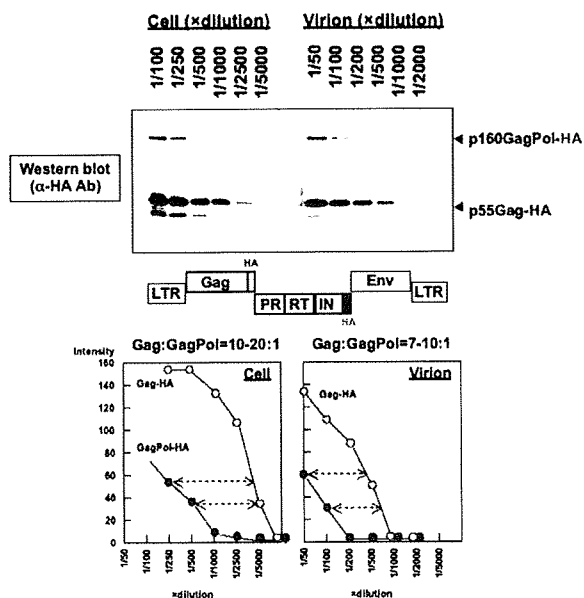
図3. 細胞内Gag蛋白の粒子への取り込み効率の測定



(4) GagPol 蛋白の発現比率と粒子への取り込み効率

HeLa 細胞に PR(-) の Gag-HA/GagPol-HA 分子クローン (Gag 蛋白と GagPol 蛋白の両者にそれぞれ in frame で HA タグを挿入したもの) を transfection し、2日後、細胞を回収するとともに、培養上清から粒子を精製した。その細胞および精製粒子の希釈列を作製し、抗 HA 抗体を用いた Western blotting を行った (図 4 上)。Image J でバンドの intensity を測定し、グラフを作成した (図 4 下)。同じ Intensity を示す Gag と GagPol 蛋白の希釈濃度を比較したところ (破線矢印)、細胞内では Gag 蛋白と GagPol 蛋白の発現比率は 10-20:1 であると概算された。一方、粒子内における Gag:GagPol 比率は 7-10:1 であり、GagPol 蛋白はやや優先的に粒子への取り込まれているように思われた。

図4. GagPol蛋白の発現比率と粒子への取り込み効率



#### D. 考察

Influenza virus の NP をモデル蛋白として、その蛋白合成、分解、抗原提示を定量的に解析した報告が知られている (Immunity, 18:343-354, 2003)。その報告では NP 合成と分解の kinetics を定量的に測定しており、(ワクチニアウイルスで発現させたものではあるが) NP は  $3-4 \times 10^6$  分子/分/単位細胞で合成され、2 時間以内にその約 1/10 が放出され、約 1/3 がプロテアソームで分解されることが示されている。その報告ではまた、細胞内の全蛋白量から (平均的な蛋白 (500 アミノ酸長) で概算するならば) 単位細胞あたり約  $3 \times 10^9$  蛋白分子が存在することを算出している。その報告では L929 細胞を用いており、ウイルス・細胞・発現系など諸々の条件が異なるため単純な比較はできないが、本研究で概算された単位細胞あたりの Gag 蛋白分子数 ( $0.7-1 \times 10^8$  分子/単位細胞) や粒子への取り込み効率 (15-20%) は、その値が単位時間あたりでなく積算値であることを考慮すると、納得できる値であると思われる。本研究は、ある時点における Gag 蛋白発現量と粒子産生量を定量した snapshot であり、真の Gag 蛋白合成量はこれより数割程度高いものと思われる。これを定量するため、現在、プロテアソーム阻害剤とリソソーム阻害剤を用いた Gag 蛋白分解を停止条件を検討している。また、Gag 蛋白合成や分解の kinetics を簡便にモニターできるよう、Gag-GFP 発現分子クローンを作製した。

#### E. 結論

HIV-1 分子クローンを transfection した HeLa 細胞における Gag 蛋白発現量は、7-10 pg Gag (約  $0.7-1 \times 10^8$  分子) / 単位細胞であった。産生された粒子量は細胞内 Gag 蛋白量の約 15-20% に相当した。細胞内の Gag/GagPol 蛋白の発現比率は Gag:GagPol=10-20:1 であったが、精製粒子内での比率は Gag:GagPol=7-10:1 であった。

#### F. 研究発表

##### 1 論文発表

- (1) Nishi M, Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Sawasaki T, Morishita R, Perrem K, Aoki I, Morikawa Y, Yamamoto N. Requirement for microtubule integrity in the SOCS1-mediated intracellular dynamics of HIV-1 Gag. FEBS Let 585:1243-1250, 2009.
- (4) Suyama M, Daikoku E, Goto T, Sano K, Morikawa Y. Reactivation from latency displays HIV particle budding at plasma membrane, accompanying CD44 upregulation and recruitment. Retrovirology 6:63, 2009.
- (3) Urano E, Ichikawa R, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi Y, Komano J. T cell-based functional cDNA library screening identified SEC13-like 1a carboxy-terminal domain as a negative regulator of human immunodeficiency virus replication. Vaccine (in press).

##### 2 学会発表

- (1) Urano E, Okunaga H, Morikawa Y, Komano J. Inhibition of HIV-1 replication by the co-chaperone DNAJ/HSP40 protein family. CSH Retrovirus Meeting, New York, 5/2/2009.
- (2) Haraguchi H, Morikawa Y. Live-cell imaging of human immunodeficiency virus Gag-Pol trafficking. 第 9 回感染症免疫フォーラム、淡路島、9/10/2009.
- (3) 原口日和、森川裕子. HIV-1 Gag-Pol 蛋白の膜結合と細胞内トラフィック. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、10/26/2009.
- (4) 周東翔、原口日和、百瀬文隆、渦永博之、森川裕子. 非ヌクレオチド系逆転写酵素阻害剤エファビレンツによる HIV 粒子形成阻害機構. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、10/26/2009.
- (5) 星野悠、奥長浩之、森川裕子. HIV-1 の粒子遊離抑制宿主因子 BST-2 はエンドソーム HRS の強発現により優先的に分解される. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、10/26/2009.
- (6) 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構解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、10/26/2009.

(7) 鈴木陽一、山元誠司、大川克也、増田貴夫、森川裕子、小柳義夫. レトロウイルスインテグラーゼ結合性因子 Huw1 の同定と HIV-1 感染における役割. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、10/25/2009.

(8) 光木裕也、水越文徳、渋谷謙太郎、寺原和孝、竹田誠、柳雄介、森川裕子、横田(恒次)恭子. HIV-1 感染と麻疹ウイルス感染が相互に及ぼす影響及びその機構の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、10/26/2009.

(9) 浦野恵美子、倉持紀子、供田洋、武部豊、駒野淳、森川裕子. 酵母膜結合 Gag-Gag 反応系で同定された HIV-1 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、11/28/2009.

(10) 山元誠司、大川克也、増田貴夫、森川裕子、小柳義夫、鈴木陽一. HIV-1 インテグラーゼ相互作用因子 Huw1 による HIV-1 の感染抑制. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、名古屋、11/26/2009.

(11) Hoshino Y, Okunaga H, Morikawa Y. Overexpression of HRS induces preferential degradation of BST-2, an anti-HIV-1 host factor. 第 32 回日本分子生物学会学術集会、横浜、12/10/2009.

(12) Urano E, Ichikawa R, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi Y, Komano J. SEC14-like 1a carboxy-terminal domain negatively regulated the infectivity of human immunodeficiency virus replication. 第 32 回日本分子生物学会学術集会、横浜、12/10/2009.

#### 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。



厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

ヘルパーT細胞反応に関する研究

研究分担者 寺原 和孝 国立感染症研究所免疫部 研究員

研究要旨

抗原特異的 CD4 陽性ヘルパーT細胞 (HTL) は中和抗体や細胞傷害性 T細胞 (CTL) の誘導に重要であり、特に多種類のサイトカインを同時に産生できる多機能性を備えた HTL 誘導制御は新たなエイズワクチン開発戦略において重要であると考えられる。本研究は、新たなエイズ予防ワクチンとして注目を浴びているセンダイウイルス (SeV) ベクターを用いた CTL 誘導型ワクチンの多機能性 HTL 誘導効果について明らかにすることを目的とする。本年度は抗原特異的 HTL 反応の解析系を確立することを目標とし、特に SIV Gag 導入 B lymphoblastoid cell line (BLCL) による抗原刺激についての検討を行った。DNA プライム・SeV-Gag ブーストワクチン後の SIVmac239 チャレンジで SIV 複製が制御されたサル慢性期の PBMC を用いて抗原特異的 HTL 反応を解析した結果、抗原刺激に応じて MIP-1 $\beta$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , CD107 a の産生・発現が認められ、多機能的な SIV Gag 特異的 HTL が誘導されていることが示唆された。これらの結果は、適切な抗原特異的 HTL 反応の解析系が確立できたことを意味する。

A. 研究目的

HIV ワクチンで誘導すべきエフェクターとして、中和抗体と細胞傷害性 T細胞 (CTL) が挙げられ、これらエフェクターの効果的誘導には抗原特異的 CD4 陽性ヘルパーT細胞 (HTL) の関与が重要であると考えられる。特に近年、HTL の多機能性 (同一細胞において産生されるサイトカインの種類の高さ) と HIV 複製制御との関連性が、血中ウイルス量が低く保たれている長期未発症者や抗レトロウイルス薬投与患者で示唆されている。これらのことから、多機能性を有する HTL を如何に誘導し得るかが今後のエイズワクチン開発戦略において重要であると考えられる。

これまで、センダイウイルス (SeV) をベクターとして用いた CTL 誘導型ワクチンの有用性がサルエイズモデルにおいて示されている。本研究は、その免疫学的機序を解明するにあたり、ワクチン効果と機能的 HTL の誘導との関連性を明らかにすることを目的とする。本年度は、抗原提示細胞として SIV Gag を導入したサル B lymphoblastoid cell line (BLCL) を用いることで、抗原特異的 HTL の多機能性について高感度で安定的な解析系の確立を目指した。

B. 研究方法

SHIV (MD14YE) molecular clone DNA から HIV-1

の env と nef を欠損させた SIVGP1 DNA プラスミドと、VSV-G 蛋白発現プラスミドである pCMV-VSV-G プラスミドを COS7 細胞にコトランスフェクションし、VSV-G シュードタイプ SIV を調製した。この VSV-G シュードタイプ SIV を BLCL に感染させた後、同一個体のサル PBMC と共培養した。なお、抗原刺激の陰性対照として mock BLCL、陽性対照として Staphylococcus enterotoxin B (SEB) を用いた。その後、MIP-1 $\beta$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , CD107 a の産生・発現をフローサイトメトリーにて解析し、SIV Gag 特異的 HTL 反応について評価した。

(倫理面への配慮)

DNA 組み換え実験に関して機関承認を受けた。

C. 研究結果

予備実験として、VSV-G シュードタイプ SIV をサル BLCL に感染させて SIV Gag が発現するか確認した。その結果、MOI = 10 で感染させた場合、感染後 2 日目に SIV Gag の発現を認めた。しかし、SIV Gag 発現細胞の頻度、および、蛍光強度に基づく SIV Gag の発現量に関しては、MOI = 2.5 と 10 の間で相違を認めなかった。この結果を基に、実際には VSV-G シュードタイプ SIV を MOI = 40 で感染させた 2 日目の BLCL を抗原提示細胞として用いることとした。

そこで次に、DNA プライム・SeV-Gag ブーストワクチン後のSIVmac239 チャレンジで、SIV 複製が制御されたサル(2個体;R0202、R0206)の慢性期のPBMCを用いて抗原特異的HTL反応を解析した。その結果、R0202については、SIV-Gag導入BLCLによる刺激により、各種サイトカイン・CD107aを発現するSIV Gag抗原特異的HTL反応が認められた。一方、R0206についてもSIV Gag抗原特異的HTL反応は認められたものの、その誘導はR0202より低く、SEB刺激においてもHTLの誘導はR0206より低かった。

#### D. 考察

本年度は抗原特異的 HTL 反応の解析系を確立することが目標であり、特に SIV Gag 導入 BLCL による抗原刺激についての検討を行った。これまで我々のグループでは、Gag 抗原を PBMC に添加することで抗原刺激を行っており、SIV 中和抗体を受動免疫した SIV 感染サルにおいて多機能性 HTL が誘導されることを示してきた (Yamamoto et al., 2009, J. Virol.) が、その時の各種パラメータの発現結果 (表 2) と照らし合わせると、SIV Gag 導入 BLCL による抗原刺激の方がバックグラウンド (それぞれの mock に相当) が低い傾向にあった。このことは、抗原刺激による HTL の反応性について信頼性を高めるものである。サンプル調製の都合上、解析に供することのできるサンプル数が今回は 2 個体に留まったため、統計解析は行っていないが、ワクチン投与により SIV 複製制御された個体群において、多機能性を有する抗原特異的 HTL が誘導されていることが示唆された。

また、R0202 と R0206 での SEB 刺激に示されるように、サンプルによって細胞の活性 (vitality) が異なる可能性が示唆された。したがって、仮に抗原刺激を Gag 抗原の添加のみで行った場合、抗原提示能は PBMC 中に含まれる抗原提示細胞の活性に大きく依存すると思われるが、SIV Gag 導入 BLCL を抗原提示細胞として用いることで、均質な抗原刺激が可能であると考えられる。

今後はワクチン投与・非投与、ウイルス複製制御・非制御群等様々なサルについて個体数を増やして解析を行っていく予定である。

#### E. 結論

SIV Gag 導入 BLCL を抗原刺激に用いることで、高感度かつ安定的な抗原特異的 HTL 反応の解析系が確立された。

#### F. 研究発表

##### 1 論文発表

なし

##### 2 学会発表

- (1) 光木裕也、水越文徳、渋谷謙太郎、寺原和孝、竹田誠、柳雄介、森川裕子、山岡昇司、横田 (恒次) 恭子. HIV-1 感染と麻疹ウイルスが相互に及ぼす影響およびその機構の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月.
- (2) 渋谷謙太郎、光木裕也、寺原和孝、柳雄介、小林和夫、横田恭子. 樹状細胞を標的とした HIV-1 増殖抑制 shRNA 発現レンチウイルスの開発. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、2009 年 12 月.
- (3) 土屋貴嗣、光木裕也、寺原和孝、渋谷謙太郎、小林和夫、横田 (恒次) 恭子. CD4 標的レンチウイルスベクターの開発. 第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、2009 年 12 月.

#### 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。

表 1 SIVmac239 複製制御群の慢性期における Gag 特異的 HTL 反応(Gag 導入 BLCL による刺激)

Sample ID	Antigen	% CD4+ T cells expressing each protein				
		MIP-1 $\beta$	IL-2	TNF- $\alpha$	INF- $\gamma$	CD107a
R0202	Mock BLCL	0.11	0.87	0.02	0.09	0.28
	SIV Gag-BLCL	0.28	1.33	0.30	0.21	0.76
	SEB	5.37	6.26	5.36	3.50	7.70
R0206	Mock BLCL	0.26	1.70	0.12	0.28	0.35
	SIV Gag-BLCL	0.29	1.79	0.15	0.23	0.38
	SEB	2.93	1.54	1.19	2.16	2.98

表 2 SIVmac239 チャレンジおよび SIVmac239 チャレンジ/中和抗体投与群の急性期における Gag 特異的 HTL 反応(Gag 抗原添加による刺激)

Group	Antigen	% CD4+ T cells expressing each protein $\pm$ SD				
		MIP-1 $\beta$	IL-2	TNF- $\alpha$	INF- $\gamma$	CD107a
SIVmac239	Mock	0.40 $\pm$ 0.19	1.04 $\pm$ 0.55	0.57 $\pm$ 0.28	0.25 $\pm$ 0.09	0.34 $\pm$ 0.10
	Gag protein	0.38 $\pm$ 0.26	0.94 $\pm$ 0.63	0.57 $\pm$ 0.23	0.16 $\pm$ 0.07	0.47 $\pm$ 0.21
SIVmac239/neutralizing Ab	Mock	0.33 $\pm$ 0.10	1.70 $\pm$ 1.11	0.44 $\pm$ 0.41	0.11 $\pm$ 0.06	0.87 $\pm$ 0.59
	Gag protein	0.28 $\pm$ 0.16	1.94 $\pm$ 1.18	0.44 $\pm$ 0.27	0.11 $\pm$ 0.06	0.94 $\pm$ 0.52

Yamamoto T., et al., 2009; 83: 5514-5524, J. Virol.

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

中和抗体誘導に関する研究

研究分担者 横山 勝 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター 研究員

研究要旨

ウイルスが抗 V3 抗体中和を逃避するメカニズムを知るために、HIV-1 Env gp120 の構造解析により、V3 配列の荷電量の gp120 構造への影響を検討した。HIV-1 Env V3 配列の荷電量が+7 の gp120 は、+3 の gp120 よりも CD4 結合部位が広いことが示された。多様性解析により、荷電量+7 では+3 よりも CD4 結合ループ周辺のアミノ酸がより多様であることが判明した。HIV-1 Env gp120 は、V3 配列の荷電量が大きくなると CD4 結合部位が広がったことから、荷電量が大きいと CD4 結合部位を認識する中和抗体による感受性が大きいと考えられる。多様性解析結果も、CD4 結合ループ周辺のアミノ酸が抗体による選択圧をかけていることを示唆しており、上記の結果を支持している。

A. 研究目的

HIV-1 gp120 の V3 は、感染受容体との相互作用に中心的役割を担う。そのため本来は、機能的制約が強く作用し、アミノ酸変異は抑制されるはずである。ところが V3 は高変異領域として知られる。これは、V3 は免疫原性が高く、持続感染には抗原変異を必要とするため、とされる。

これまで、V3 配列を糖鎖付加部位の有無と荷電量の違いで分類して多様性解析により、V3 の荷電量の低下によって、V3 配列の多様性が低下することが示されている。さらに、HIV-1 感染者由来の V3 をもつ V3 組換えウイルスを用いて、V3 荷電量の低下により抗 V3 結合抗体による中和感受性は低下することが明らかにされた。

本研究は、ウイルスが抗 V3 抗体中和を逃避するしくみを解析し、抗 V3 抗体の中和能を人為的に高める方法を研究し、成果をワクチン開発に還元することを目的とする。

今年度は、ウイルスが抗 V3 抗体中和を逃避するメカニズムを知るために、HIV-1 Env gp120 の構造解析を行うことで、V3 配列の荷電量の gp120 構造への影響を検討した。

B. 研究方法

(1) HIV-1 Env gp120分子モデルの構築

HIV-1 Env gp120 分子モデルはホモロジーモデリング法および分子動力学計算により構築した。V3 配列の荷電量の影響を調べるため、gp120コアは同じでV3配列が異なる2つの分子モデルを構

築した。ホモロジーモデリングの鋳型は、gp120 とCD4および抗体との複合体 (pdb code:2B4C) の gp120 outer domainのみを用いた。HIV-1 Env gp120 outer domain はCD4結合前後で同じ構造であり、CD4が結合していない環境でモデルを構築しているため、得られた分子モデルはCD4結合前を表していると考えられる。配列はgp120コアはLAI、V3にはCRF01\_AE TH09またはNH1を用いた。TH09はV3配列の荷電量が+3、NH1はV3配列の荷電量が+7である。分子動力学計算にはamber9を用いた。ホモロジーモデリング法により得られた初期構造を用いて、310KにおけるEnv gp120の平衡構造を求めた。

(2) HIV-1 Env gp120の多様性解析

解析に用いたHIV-1 Env gp120のアミノ酸配列 (CRF01\_AE、V3配列の荷電量が+3: 18配列、V3配列の荷電量が+7: 9配列) はHIV sequence database (<http://www.hiv.lanl.gov/>) より得た。HIV-1 Env gp120の多様性はShannonの式を用いたエントロピー解析により調べた。アミノ酸配列が完全に保存されていると、エントロピーは0であり、より多様であれば値は大きくなる。アミノ酸の場合、エントロピーの最大値は4.4となる。結果はHIV-1 Env gp120構造に示した。

C. 研究結果

(1) HIV-1 Env gp120の構造解析

はじめに、V3配列の荷電量がV3の配置に及ぼす影響を検討するため、荷電量が+3の gp120分子モ