

201009001A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

多様なエイズウイルス株の感染を制御する
宿主応答の同定

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 森 一泰

平成23（2011）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

多様なエイズウイルス株の感染を制御する

宿主応答の同定

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 森 一泰

平成23（2011）年 3月

研究組織

研究者氏名		所属	職名
森 一泰	研究代表者	国立感染症研究所エイズ研究センター	主任研究官
木村 彰方	研究分担者	東京医科歯科大学難治疾患研究所	教授
宮澤 正顯	研究分担者	近畿大学医学部	教授
駒野 淳	研究分担者	国立感染症研究所エイズ研究センター	主任研究官
中村 紳一朗	研究分担者	滋賀医科大学動物生命科学センター	准教授
岡村 智崇	研究分担者	医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター	研究員

目 次

I. 総括研究報告	
多様なエイズウイルス株の感染を制御する宿主応答の同定 -----	1
研究代表者：森 一泰	
II. 分担研究報告	
1. 多様なエイズウイルス株の感染を制御する宿主応答の解析 -----	15
研究代表者：森 一泰	
2. 感染制御宿主応答の個体差と関連する宿主因子の解析 -----	23
研究分担者：木村 彰方	
3. 感染宿主の MHC II 遺伝子の解析 -----	29
研究分担者：宮澤 正顕	
4. 感染防御・制御と関連する宿主遺伝子の解析 -----	33
研究分担者：駒野 淳	
5. SIV 感染ザルの病理解析 -----	40
研究分担者：中村紳一郎	
6. カニクイザルを用いたワクチン評価系に関する研究 -----	44
研究分担者：岡村 智崇	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	49
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	53

I. 総括研究報告

多様エイズウイルス株の感染を制御する宿主応答の同定

研究代表者 森 一泰（国立感染症研究所 主任研究官）

研究要旨

高い多様性と変異性を示す HIV の感染を抑制するワクチン開発には、HIV 感染と感染制御に関する新たな知見が求められている。本研究では、低病原性糖鎖変異株が生ワクチンとして感染ザルに極めて高い感染防御能を誘導することから、感染防御の機序の解明、HIV ワクチンへの応用を目的に研究を行っている。糖鎖変異生ワクチンは、サブタイプが異なるチャレンジウイルス感染を初期感染において強く抑制した。しかし慢性感染期においては、感染制御を維持した群と防御免疫から逃避し持続感染を起こした変異ウイルスを出現した群に分かれた。両群の感染制御の違いと相関する免疫細胞として IL-15 応答性 CD8+細胞が発見された。IL-15 により IFN- γ 産生、細胞障害性 (CD107a 発現) を示す CD8+T 細胞と NK 細胞であり、感染ザルの MHC アリル等の遺伝的性質との関連性が確認された。ワクチン効果に影響を与える宿主遺伝子として MHC 以外にも多型性を示す免疫関連遺伝子が存在する。NK 細胞、CD8+T 細胞のエフェクター機能の調節に働く NKG2D のリガンドである ULBP 遺伝子はその候補である。マウスモデルにおいては、レトロウイルスに対する感染防御に働く免疫として NK 細胞が同定され、NKG2D のリガンドである RAE-1 の発現により感染防御免疫は制御されていた。

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

宮澤 正顯 近畿大学医学部 教授

岡村 智崇 医薬基盤研究所・霊長類医科学
研究センター 研究員

駒野 淳 国立感染症研究所
エイズ研究センター 主任研究官

中村紳一郎 滋賀医科大学・動物生命科学研究
センター 准教授

A. 研究目的

ワクチンにより感染症が制圧、あるいはコントロールされている病原体の多くは、急性感染症を起こす。宿主は、これらの感染に対する有効な感染制御免疫を備えている。この点が HIV と決定的に異なる。すなわち、HIV ワクチン開発の根本的問題は、ほとんどの人は HIV 感染を自然に制御することができず、ウイルス感染が持続することである。通常、感染者には中和抗体、CTL が誘導される。しかし多様性、高変異性を特徴とする HIV は、容易にそれらの免疫抑制から逃れる逃避変異ウイルスを出現する。ところが、HIV 感染においても感染制御が起こった例が報告されている。血友病 HIV 感染 cohort において、血液製剤に含まれていた弱毒性 HIV の感染が、その後の血液製剤に含まれていた病原性 HIV 感染を防御していた。SIV 感染動物モデルにおいては、生ワクチンの性質を持つ種々の弱毒性変異株が報告されている。本研究の目的は、SIV 動物モデルを用い、糖鎖修飾変異株生ワクチンが誘導する感染防御の機序、宿主応答を解明し、HIV ワクチンが誘導すべき免疫応答を明らかにすることである。

B. 研究方法

SIV感染エイズ発症モデルを用いた糖鎖変異生ワクチンの感染防御効果の解析

アカゲザル

ビルマ、ラオス原産、国内繁殖施設で育成された SPF(Bウイルス、SRV, STLV, SIV, SVV 等の抗体陰性)サルを用いた。

糖鎖欠失変異ウイルス生ワクチン

Δ 5G 系統 8 に分類される SIVsm、

SIVmac239 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。

Δ 5Gver1, Δ 5Gver2 Δ 5G の 179 の Gln を Asn に復帰変異させ、代わりに新たに 70 (Δ 5G ver1) または 377 (Δ 5G ver2) の N 型糖鎖付加部位の Asn を Gln に変異させた。

Δ 3G SIVmac239 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

SIVsmE543-3 系統 1 に分類される SIVsm、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。SIVmac239 と SIVsmE543-3 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。

CD8+細胞 depletion

SIV 感染制御における CD8+細胞の役割を調べるために CD8+細胞を消失させるために CD8 抗体(cM-T807)を静脈内接種した。定期的に採血し血中の CD8 細胞数を測定した。

SIV 特異的 T 細胞の測定

末梢リンパ球中の SIVmac239、または SIVsmE543-3 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-g 産生細胞を検出する ELISPOT キット (U-CyTech 社) を用いて測定した。

細胞内サイトカイン染色 (ICS)

PBMC を CD28/CD49d 抗体、IL-15 で刺激し、BFA/monensin を添加後、一晚培養し染色した。

感染制御宿主応答の個体差と関連する宿主因子の解析

MHC クラス I 遺伝子群多型の解析

本年度はアカゲザル 70 個体を対象とする解析を行った。また、カニクイザル 24 個体（インドネシア由来 1 家系 8 個体、マレーシア由来 2 家系 8 個体、フィリピン由来 2 家系 8 個体）について、Mamu-A 遺伝子および Mamu-B 遺伝子の cDNA をクローニングし、30-100 クローンの塩基配列を決定した。

ULBP4 遺伝子多型の解析

活性化 NK 細胞レセプターである NKG2D のリガンドとして知られている ULBP 遺伝子群のゲノム多様性を検討している。昨年度までにアカゲザル ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4 を解析したが、本年度はさらに解析アカゲザル個体数を増やす（計 40 個体）とともに、上記のカニクイザル 24 頭を対象として、ULBP4 の第 2～第 3 エクソンを PCR で増幅し、ダイレクトシーケンスによって塩基配列を決定した。

OAS1 遺伝子の解析

OAS1 遺伝子は HIV 感染に伴ってその遺伝子発現が誘導されることから、感染抵抗性に関わることが示唆される。そこで、日本人およびインド人集団を対象として、OAS1 の機能に影響することが知られている 2 か所の多型 (rs10774671 および rs1131454) をタイピングし、HIV/AIDS との関連性を検討した

糖鎖変異生ワクチン感染ザルの病理組織学的検索

SIV 感染ザル

実験群として感染後早期治療(PEP)により 病

原性 SHIV-RT 感染を制御した群：SIV239 をチャレンジした 3 例 (Mm9701、Mm9705、Mm9711)、非チャレンジ 1 例 (Mm9704)、D5G 感染群：SIV239 をチャレンジした 3 例 (Mm0135、Mm0139、Mm0140)、非チャレンジ 1 例 (Mm0137) について病理解析を行った。

免疫組織化学的検索

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 μm に薄切した切片を作製した。今回は脾臓の検索を行った。

抗体

抗 CD3 抗体、抗 CD4 抗体、抗 foxp3 抗体（制御性 T 細胞 Treg マーカー）、抗 CD20 抗体（B 細胞マーカー）、抗 granzyme B 抗体（NK/T 細胞マーカー）、抗 Ki-67 抗体（増殖細胞マーカー）、抗 SIV nef 抗体を用いた。

画像解析

白脾髄の濾胞構造と傍濾胞領域に相当する動脈周囲リンパ鞘（periarteriolar lymphoid sheath; PALS）がまんべんなく確認できる画像を DP-72（オリンパス）で取り込み、Image J で解析した。

MHC II 遺伝子型がレトロウイルス感染抵抗性に影響を与える機序の解析

感染実験

フレンド白血病レトロウイルスに対して高感受性の (BALB/c × C57BL/6)F₁ (CB6F₁) マウスを用い、フレンドウイルス複合体 (FV) を接種した。接種後は経過を追って一部の個体を屠殺し、脾重量を測定するとともに、別の一群を経時的に観察し、生存率を調べた。

ウイルス複製の定量

FV 感染マウス脾臓中のウイルス感染細胞は、蛍光セルソータを用いて env 遺伝子産物 gp70 (SU) を発現する細胞数を測定することにより、また感染性ウイルス粒子産生細胞数は *Mus dunni* 細

胞を標的とする infectious center assay により、それぞれ定量した。

遺伝子発現の定量

FV 誘発白血病細胞株など NK 標的細胞株、および FV 感染マウスの脾臓から全 RNA を抽出し、poly-A RNA を精製した。定法に従い、real-time PCR により mRNA 発現量を定量した。

細胞表面抗原

脾臓中の NK 細胞は NK-1.1 及び DC49b (DX5) 発現により同定した。NKG2D リガンドである RAE-1, H60, MULT-1 の発現は、それぞれに特異的な単クローン抗体により検出した。MHC class I の K 及び D 分子、及び抑制性 NK 細胞受容体の最も重要なリガンドとなる class Ib の Qa-1 分子については、それぞれ H2^b ハプロタイプに対応するアリの産物と反応する単クローン抗体で検出した。

細胞傷害試験

FV 感染マウスの脾細胞より、磁気ビーズ法により先ず CD4、CD8、及び CD45R (B220)陽性細胞を除去し、次いでそこから DX5 陽性細胞を精製した。

試験管内の細胞傷害試験は FV 誘発白血病細胞株 FBL-3 と Y57-2C を標的とし、YAC-1 を陽性対照、EL-4 を陰性対照として、⁵¹Cr 放出試験により行った。

エイズ動物モデルとしてのカニクイザルの研究

感染実験

当センター繁殖育成しているインドネシア産、フィリピン産カニクイザル各 2 頭に、それぞれ 10³TCID₅₀ を静脈内に接種を行った。

ウイルスコピー数および CD4+T 細胞数

ウイルスコピー数は、血漿からウイルス RNA

を抽出し、SIVgag 特異的 Primer および probe を用いて Real time PCR を行った。また CD4+T 細胞数の算定には、フローサイトメーターを用いて検討した。

細胞性免疫の解析

SIV 抗原発現組換えワクシニアウイルスを感染させた自己由来の B-LCL を APC として利用し、採取した血液から分離した PBMC と共培養することで、SIV 特異的 IFN- γ 産生細胞数を測定した。

液性免疫の解析 (抗体価)

SIV Gag 特異的な IgG 抗体価を測定するため、2 倍階段希釈した血漿を用いて ELISA 法を行った。

感染防御・制御と関連する宿主遺伝子の解析 サイトカインアッセイ

ヒトサイトカイン/ケモカインキット (#MPXHCYTO60KPMX42; Millipore) を利用した。

細胞

ヒト T 細胞株 Jurkat、MOLT-4、MT-4、健常人由来末梢血単核球 (PBMC)、健常人由来 CD4 陽性 T 細胞 P、健常人由来 B-LCL を対象とした。

HIV-1 感染

HIV-1 暴露後 3 日目の細胞培養上清を回収した。非感染細胞の培養上清を対照として、サイトカイン含有量を測定した。蛍光シグナルの検出には Luminex 200 system を、データの解析には xPONENT 3.1 software を用いた。

(倫理への配慮)

本研究では動物実験が中心であることから、動物実験方法については倫理上、動物愛護の問題の観点から所属機関、実験実施機関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。

C. 研究結果

1. SIV感染エイズ発症モデルを用いた糖鎖変異生ワクチンの感染防御効果の解析

CD8+細胞 depletion

慢性感染期において、糖鎖変異生ワクチンが誘導する感染制御にはCD8+細胞が寄与していることが推測されるため、CD8+細胞 depletion を行った。血中のCD8+細胞の消失と一致して血中のウイルス量が上昇し、CD8+細胞の回復と共に再びウイルス量は抗体投与前のレベルに低下した。ワクチン感作サル群の慢性感染期における感染制御にCD8+細胞が重要な役割を担っていることが明らかとなった。

SIV 特異的 T 細胞の多機能性

感染制御群と非感染制御群間の多機能性CD8+T細胞数の違いを調べるため、IFN- γ 、TNF- α 、IL-2を産生するSIV特異的CD8+T細胞数を細胞内サイトカイン染色(ICS)を用いて調べた。IFN- γ のみを産生するCD8+T細胞がサイトカイン産生細胞の大半を占めており、感染制御群と非感染制御群の間において、多機能性CD8+T細胞数や質に有意な差は認められなかった。

IL-15 応答性 CD8+細胞

感染制御群にはワクチン感作後において、抗原非存在下でIL-15/IL-7に応答しIFN- γ を産生する細胞が多い個体がいるのに対し、非感染制御群には、そのような個体がないことが明らかになった。感染制御群のこのIL-15応答性細胞は、ICSの結果により、CD8+T細胞とNK細胞であることが明らかとなった。これらのCD8+細胞を刺激する種々のサイトカインを用い抗原非存在下でICSを行った。TNF- α とIFN- α による刺激ではIFN- γ を産生されなかったが、IL-2、IL-7、IL-12、

IL-15ではIFN- γ が産生され、このうちIL-15が最も高くIFN- γ 産生を誘導することが示された。

慢性感染期(45週)において、感染制御群では、CD8+T細胞及びNK細胞にIL-15誘導性のIFN- γ とCD107aの発現(細胞障害性機能)が認められたのに対し、非感染制御群ではほとんど認められなかった。急性感染期(10週)においても同様の結果が得られた。これらの結果から、IL-15応答性CD8+細胞は、慢性感染期における感染制御において決定的な役割を担うことが示唆された。

感染制御宿主応答の個体差と関連する宿主因子の解析

MHCクラスI遺伝子群多型の解析

アカゲザルの追加70検体の解析では新規アリルが3件認められた。カニクイザルの解析から81アリルのうち44.4%(36アリル)は新規アリルであった。とくにマレーシア由来の個体群については、検出した34アリルのうち76.5%(26アリル)が新規であった。

MafaクラスIアリルについて、アカゲザル(Mamu)あるいはブタオザル(Mane)のクラスIアリルとの相同性を検討したところ、Mafa-Aでは20アリルのうち15%(3アリル)、Mafa-Bでは42アリルのうち28.6%(12アリル)がMamuあるいはManeアリルと同一の配列であった。このことはMHCクラスIアリルの形成は旧世界ザルの分岐(約230万年前)よりも以前に生じたことを強く示唆する。

カニクイザルのMHCクラスI解析結果で特記すべきことは、アカゲザルSIVmac感染において発見されたelite controllerアリルMamu-A1*001:01、と同一アミノ酸配列を持つアリルMafa-A1*001:01がマレーシア由来個体に検出された。同様に、Mamu-B*017と類似した構造

を有する Mafa-B*017:01 がフィリピン由来の個体に検出された。ワクチン実験におけるリファレンスアリルとなると考えられる。

ULBP4 遺伝子多型の解析

本年度に解析個体数を増やして合計 40 頭で検討したところ、少なくとも 25 種類のアリルが存在することが明らかとなった。カニクイザルについても 24 個体に少なくとも 15 種類の異なるアリルが検出された。また、アカゲザルに検出された 25 種のアリルとカニクイザルに検出された 16 種類のアリルに加えて、リファレンス配列としてヒト ULBP4、チンパンジー ULBP4 を合わせて系統樹を作成した。その結果、アカゲザル、カニクイザルのアリルが混在してクラスターを形成した。また、ヒトとチンパンジーの系統樹は、旧世界ザルの ULBP4*8 から分岐していると考えられた。なお、ULBP4 アリルと SIV ワクチン応答性との関連を検討したが、明確な関連性はなかった。

OAS1 遺伝子の解析

インターフェロンで誘導される OAS1 の発現増強は OAS1 遺伝子多型 rs3177979 によって制御されている。OAS1 遺伝子内にはアミノ酸置換多型 (rs1131454: Gly162Ser) やイントロンアクセプター多型 (rs10774671: Int5g(-2)a) があり、これらは OAS1 の機能に影響することが知られている。そこで、日本人集団およびインド人集団について、機能多型をタイピングした。いずれの多型についてもアリル頻度、遺伝子型頻度とも、HIV 感染者と一般健常人では有意な違いは認めなかった。しかしながら、HIV 感染者集団における感染初期の HIV ウイルス量との関連を検討したところ、rs10774671 の AA 型を有する個体では、AG 型あるいは GG 型の個体と比較して、HIV ウイルス量が低かった。この違いは日本人 HIV 感染者では有意でなかった ($P=0.18$) が、インド人

HIV 感染者では有意 ($p=0.05$) であった。

MHC II 遺伝子型がレトロウイルス感染抵抗性に影響を与える機序の解析

CB6F₁ マウスの脾臓では、FV 感染前から YAC-1 および FBL-3 白血病細胞に対する強い傷害活性を示す CD8 陰性・DX5 陽性細胞 (NK 細胞) が検出された。NK 細胞による細胞傷害活性は FV 感染後次第に上昇して、8 日目にピークに達した。傷害効果は YAC-1 細胞に対して最も強く起こり、次いで FV 関連白血病細胞株である FBL-3 が良く傷害されたが、Y57-2C は EL-4 と同様、NK 細胞による傷害に抵抗性を示した。NK 細胞による傷害に異なる感受性を示す細胞株の間で NK 受容体リガンド分子の発現を比較したところ、YAC-1 と FBL-3 は NKG2D のリガンドである RAE-1 の遺伝子 (*Rae1*) を強く発現していたが、NK 抵抗性の Y57-2C では EL-4 同様 *Rae1* の発現は見られず、IFN- γ 刺激によっても発現誘導は起こらなかった。また RAE-1 分子の発現の違いは flow 解析により確認された。

そこで、FV 感染マウス由来の NK 細胞による標的細胞傷害が RAE-1 と NKG2D の相互作用によることを直接検証するため、細胞傷害試験の実験系に NKG2D をブロックする抗体を添加したところ、FBL-3 細胞に対する傷害反応は陰性対照である EL-4 に対する反応と同程度にまで抑制された。

一方、FV 感染後に脾細胞に RAE-1 発現が誘導されるか否かを調べるため、経時的に脾臓を採取し、real-time PCR および蛍光セルソータにより解析した。その結果、FV 感染マウスの脾臓では、感染後次第に *Rae1* 遺伝子の発現が高まり、8 日目にピークとなることが明らかとなった。

FV 感染マウスに抗アシアロ GM1 抗体を投与して NK 細胞を除去すること、および NKD2D ま

たは RAE-1 のブロッキング抗体を投与して、NKG2D 受容体による標的の認識を阻害することを試みた。その結果、何れの処理によっても対照群と比較して脾臓内のウイルス産生細胞数或いはウイルス抗原陽性細胞数が有意に増加することが明らかとなった。

感染防御・制御と関連する宿主遺伝子の解析

HIV-1 感染によって変動するサイトカインは細胞株と PBMC で程度は異なるが共通するものと、共通しないものがあった。2 倍以上の変動を有意と考えた場合、T 細胞株で共通して増大するサイトカインは MCP-1 のみであった。このほか、CD4 陽性 T 細胞と T 細胞株 2 種類以上で共通する変化を示したのものには IP-10、IL-8 がある。これらは CD4 陽性 T 細胞に対する HIV-1 感染によるフットプリントとして有用と思われる。

Primary 細胞における変動に注目すると、CD4 陽性 T 細胞と PBMC で同程度の変動を示すサイトカインには G-CSF、GM-CSF、IL-1b、IL-6、RANTES、VEGF がある。なかでも IL-6 は 100 倍以上という著しい発現増強が認められ、CD4 陽性 T 細胞に対する HIV-1 感染を感度よく捉えるために有用であると思われる。

T 細胞株や CD4 陽性 T 細胞で見られない PBMC におけるサイトカイン変動は CD4 陽性 T 細胞以外の細胞集団に由来するサイトカイン発現と思われる。HIV-1 暴露に対する monocyte/macrophage 系細胞による反応を反映しているものと考えられる。その特徴的サイトカインとしては IL-5、IL-10、IL-17、MIP-1a、TGF-1 がある。

一方、ウイルス感染に伴って高濃度のレベルから発現が低下するサイトカインには CD4 陽性 T 細胞で IL-5、IL-13 がある。これらも CD4 陽性 T

細胞に対する HIV-1 感染を感度よく捉えるために有用であると思われる。

糖鎖変異生ワクチン感染ザルの病理学的検索

CD3 陽性エリアは PEP 群、Δ5G 感染群において SIVmac239 チャレンジザルにおいて減少していた。CD20 陽性エリアにおいても同様のチャレンジによる減少が認められた。CD4 陽性細胞数は、同様にチャレンジ群で少なかった。foxp3 陽性細胞数は、PEP 群ではチャレンジ群で微増、Δ5G 感染群ではチャレンジ群で減少が見られた。Granzyme B 陽性細胞数は、両群でチャレンジ感染による減少が見られた。Ki-67 陽性細胞数は、特に濾胞胚中心でチャレンジによる減少が認められた。SIV nef 陽性細胞数は少数であったが、同様にチャレンジによる減少が認められた。以上のように、ほとんどの項目が、チャレンジを行うと、細胞の分布エリアや細胞数は減少した。その中で唯一異なる挙動を示したのが foxp3 で検出される Treg だった。

エイズ動物モデルとしてのカニクイザルの研究

ウイルスコピー数および CD4+T 細胞

SIVmac239 を接種したインドネシア産およびフィリピン産カニクイザルは、それぞれ 1 頭ずつで非常に高いウイルスピーク (2.6×10^7 copies/ml、 4.7×10^7 copies/ml) が確認され、その後の持続感染 ($10^6 \sim 10^7$ copies/ml) も認められた。また CD4+T 細胞数では、感染ザル 2 頭は、接種後 30 週まで変化がみられなかったが、接種後 40 週から徐々に減少がみられ、接種後 50 週を超えると 500/ul 以下となりエイズ関連症候群 (ARC) レベルまで低下した。

SIV 特異的免疫反応

ウイルス接種後 23、42、52 週の PBMC を用いて IFN- γ ELISPOT assay を行ったところ、持続感染を示すカニクイザルでは、高い SIV 特異的細胞性免疫反応が誘導された。また SIV 特異的な Gag 抗体反応においても、持続感染カニクイザルにおいて誘導が確認された。

D. 考察

HIV 感染制御におけるウイルス特異的 CD8+T 細胞の重要性が示唆されていた。しかしウイルス特異的 CD8+T 細胞の頻度と感染制御との相関は認められないとの報告は多い。ところがワクチンによるウイルス特異的 CD8+T 細胞の誘導によるウイルス感染抑制は、特定の MHC I アリルを持つ個体において確認されている。本研究では、糖鎖変異生ワクチンにより誘導された防御免疫を構成する免疫として IL-15 応答性 CD8+細胞を明らかにした。この CD8+細胞の頻度は個体間に違いがあり、慢性感染の制御と相関を示した。MHC の解析から特定の MHC I アリル、MHC II アリルの有無と当該 CD8+細胞の頻度との間には明らかな相関が確認されている。HIV-1 感染者、SIV 動物モデルにおける CTL エピトープの解析から感染制御と関連する特定の MHC-I アリルに提示される Gag エピトープを認識する CTL との関連性が明らかとなっている。本研究において同定された感染制御群共通する MHC I アリルが提示する SIV CTL エピトープの解析結果が求められる。この場合、チャレンジウイルスはワクチン株とはサブタイプが異なることからワクチンにより誘導された CTL は二つのサブタイプに共通するエピトープの可能性が高い。

しかし IL-15 応答性 CD8+細胞は CD8+T 細胞と NK 細胞であったことから、MHC-I アリル以外の多型性を示す感染制御を調節する遺伝子である

可能性が高い。木村らは、CD8+T 細胞、NK 細胞のエフェクター機能を促進する NKG2D のリガンドである ULBP の遺伝子多型と SIV 感染制御との関連について解析を行っている。本年度解析を行った ULBP4 遺伝子と感染制御との間には相関は認められなかったが、今後 ULBP1-3 遺伝子について解析を行う。

一方、MHC II 遺伝子により調節されるレトロウイルス感染制御免疫として、宮澤らはマウスモデルを用いて、NK 細胞による感染制御を明らかにした。興味深いことに、この場合は NKG2D のリガンドである RAE-1 の発現が感染により誘導されていた。マウスにおいても異なる系統では RAE-1 発現が異なっていた。MHC とリンクする多型性を示す遺伝子が当該アカゲザルにおける慢性期における感染制御を IL-15 応答性 CD8+細胞誘導を通じて調節している可能性が示唆される。

IL-15 は、DC 等の抗原提示細胞により産生され、CD8+T 記憶細胞の増殖・維持、NK 細胞の細胞傷害活性の増強にも寄与することが知られている。ウイルス感染をまず自然免疫が認識し、その機能のひとつとして、IL-15 応答 CD8+細胞は獲得免疫を誘導することが推測される。

IL-15 応答 CD8+細胞は、生ワクチンが誘導する感染制御免疫を構成する免疫機能として同定された。現在、HIV ワクチン開発研究においては、プライム・ブーストワクチンにより CTL の誘導が可能となった。しかしその感染防御への寄与は十分でない。プライム・ブーストワクチンで免疫された動物における IL-15 応答性 CD8+細胞の解析は、プライム・ブーストワクチンを中心とした HIV ワクチン開発研究の再評価、新たな戦略の構築に役立つものと考えられる。

E. 結論

HIV ワクチンに必要とされる免疫として IL-15 応答性 CD8+細胞の重要性が見出された。IL-15 応答性 CD8+細胞の頻度は個体間の違いがあり、慢性感染における感染制御に影響を与える。プライム・ブーストワクチンにおけるレベルと感染制御効果との関連等、IL-15 応答性 CD8+細胞の性質、機能、役割等、今後の詳細な研究の必要性が明らかとなった。

F. 健康危険情報

特に該当する情報はなかった。

G. 研究報告

論文発表

- 1 Chie Sugimoto, Satoru Watanabe, Taeko Naruse, Eiji Kajiwara, Teiichiro Shiino, Natsuko Umamo, Kayoko Ueda, Hiroataka Sato, Shinji Ohgimoto, Vanessa Hirsch, Francois Villinger, Aftab A. Ansari, Akinori Kimura, Masaaki Miyazawa, Yasuo Suzuki, Naoki Yamamoto, Yoshiyuki Nagai, Kazuyasu Mori. Protection of macaques with diverse MHC genotypes against a heterologous SIV by vaccination with a deglycosylated live-attenuated SIV. *Plos One*. 5, e11678, 2010.
- 2 Wichukchinda N, Nakajima T, Saipradit N, Nakayama EE, Ohtani H, Rojanawiwat A, Pathipvanich P, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P, Shioda T, Kimura A. TIM1 haplotype may control the disease progression to AIDS in a HIV-1-infected female cohort in Thailand. *AIDS*. 2010; 24(11): 1625-1631.
- 3 Itaya S, Nakajima T, Kaur G, Terunuma H, Ohtani H, Mehra N, Kimura A. No evidence of an association between the APOBEC3B deletion polymorphism and susceptibility to HIV infection and AIDS in Japanese and Indian populations. *J Infect Dis*. 2010; 202(5): 815-816.
- 4 Naruse TK, Chen Z, Yanagida R, Yamashita T, Saito Y, Mori K, Akari H, Yasutomi Y, Miyazawa M, Matano T, Kimura A. Diversity of MHC class I genes in Burmese-origin rhesus macaque. *Immunogenetics*. 2010; 62(9): 601-611.
- 5 Takamura, S., S. Tsuji-Kawahara, H. Yagita, H. Akiba, M. Sakamoto, T. Chikaishi, M. Kato, and M. Miyazawa. Premature terminal exhaustion of Friend virus-specific effector CD8⁺ T cells by rapid induction of multiple inhibitory receptors. *J. Immunol*. 184:4696-4707, 2010.
- 6 Tsuji-Kawahara, S., T. Chikaishi, E. Takeda, M. Kato, S. Kinoshita, E. Kajiwara, S. Takamura, and M. Miyazawa. Persistence of viremia and production of neutralizing antibodies differentially regulated by polymorphic *APOBEC3* and *BAFF-R* loci in Friend virus-infected mice. *J. Virol*. 84: 6082-6095, 2010.
- 7 Takamura, S. and M. Miyazawa. Response to comment on "Premature terminal exhaustion of Friend virus-specific effector CD8⁺ T cells by rapid induction of multiple inhibitory receptors." *J. Immunol*. 185: 1349-1350, 2010.
- 8 Aoki T, Miyauchi K, Urano E, Ichikawa R, Komano J. Protein transduction by pseudotyped lentivirus-like nanoparticles. *Gene Ther*. In press.

- 9 Yanagita H, Urano E, Matsumoto K, Ichikawa R, Takaesu Y, Ogata M, Murakami T, Wu H, Chiba J, Komano J, Hoshino T. Structural and biochemical study on the inhibitory activity of derivatives of 5-nitro-furan-2-carboxylic acid for RNase H function of HIV-1 reverse transcriptase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2011; 19, 816-25.
- 10 Suzuki S, Maddali K, Hashimoto C, Urano E, Ohashi N, Tanaka T, Ozaki T, Arai H, Tsutsumi H, Narumi T, Nomura W, Yamamoto Y, Pommier Y, Komano JA, Tamamura T. Peptidic HIV integrase inhibitors derived from HIV gene products: structure-activity relationship studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2010 Sep 15;18(18):6771-5.
- 11 Aoki T, Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Hamatake M, Tamamura H, Terashima K, Murakami T, Yamamoto N, Komano J. Improvement of lentiviral vector-mediated gene transduction by genetic engineering of the structural protein Pr55^{Gag}. *Gene Therapy*. 2010 Sep; 17(9):1124-33.
- 12 Suzuki S, Urano E, Hashimoto C, Tsutsumi H, Nakahara T, Tanaka T, Nakanishi Y, Maddali K, Han Y, Hamatake M, Miyauchi K, Pommier Y, Beutler JA, Sugiura W, Fuji H, Hoshino T, Itotani K, Nomura W, Narumi T, Yamamoto N, Komano JA, Tamamura H. Peptide HIV-1 integrase inhibitors from HIV-1 gene products. *J Med Chem*. 2010 Jul 22;53(14):5356-60.
- 13 Hamatake M, Komano J, Urano E, Maeda F, Nagatsuka Y, Takekoshi M. Inhibition of HIV replication by a CD4-reactive Fab of an IgM clone isolated from a healthy HIV-seronegative individual. *Euro J Immunol*. 2010 May;40(5):1504-1509.
- 14 Urano E, Ichikawa R, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi T, Komano J. T cell-based functional cDNA library screening identified SEC14-like 1a carboxy-terminal domain as a negative regulator of human immunodeficiency virus replication. *Vaccine*. 2010 May 26;28 Suppl 2:B68-74.
- 15 Kariya Y, Hamatake M, Urano E, Yoshiyama H, Shimizu N, Komano J. 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*. 2010 Apr;101(4):876-81.
- 16 馬場昌範, 中田浩智, 朝光かおり, 駒野 淳, 岡本実佳, 杉浦 亙. Perspectives of anti-HIV research (Review). *The Journal of AIDS Research*. 12(2);74-80, 2010
- 17 Ushitora M, Sakurai F, Yamaguchi T, Nakamura S, Kondoh M, Yagi K, Akitomo K, Kawabata K, Mizuguchi H. Prevention of hepatic ischemia-reperfusion injury by pre-administration of catalase-expressing adenovirus vectors. *J Control Release*. 142(3):431-437, 2010
- 18 Shimozawa N, Nakamura S, Takahashi I, Hatori M, Sankai T. Characterization of a novel embryonic stem cell line from an ICSI-derived blastocyst in the African green monkey. *Reproduction*. 139(3):565-573. 2010
- 19 1. Yoshino N, Kanekiyo M, Hagiwara Y, Okamura T, Someya K, Matsuo K, Ami Y, Sato S, Yamamoto N, Honda M. Intradermal delivery of recombinant vaccinia virus vector DIs induces gut-mucosal immunity. *Scand. J. Immunol*. 72(2):98-105. 2010.

学会発表

1. Kazuyasu Mori¹, Satoru Watanabe¹, Yohei Saito¹, Hirotaka Sato¹, Chie Sugimoto. A critical role of NK cells and effector CD8+ T cells for protective host response against heterologous SIV infection in rhesus macaques vaccinated with deglycosylated live attenuated SIV. 28th annual symposium on nonhuman primate models for AIDS. October, 2010, New Orleans, USA.
2. 糖鎖欠失変異による SIV の低病原性化のメカニズム 佐藤洋隆、杉本智恵、渡辺哲、齋藤陽平、永井美之、森 一泰 日本ウイルス学会、2010 年、徳島
3. ウイルススパイクの糖鎖修飾の減少は SIV の細胞・組織トロピズムを変化させ生ワクチンとして防御免疫を誘導する 森 一泰、杉本智恵、横田恭子、鈴木康夫、山本直樹、永井美之、日本エイズ学会、2010 年、東京
4. 糖鎖変異生ワクチンが誘導する防御免疫における CD8+細胞の役割 齋藤陽平、渡辺哲、杉本智恵、佐藤洋隆、山本直樹、永井美之、森 一泰 日本エイズ学会、2010 年、東京
5. Naruse T, Kimura A. Genetic diversity of ULBP gene family in human and macaques. 13th Cardiovascular Genomics and Atherosclerosis Symposium. Seoul, Korea. Oct. 2. 2010.
6. Nomura T, Takahashi N, Yamamoto H, Naruse T, Kimura A, Matano T. Vaccine-based SIV control in a group of Burmese rhesus macaques sharing a MHC class I haplotype. 9th International Veterinary Immunology Symposium. Tokyo. Aug. 16, 2010.
7. 中島敏晶、Nuanjun Wichukchinda、Nongluk Saipradit、中山英美、大谷仁志、Archawin Rojanawiwat、Panita Pathipvanich、有吉紅也、Pathom Sawanpanyalert、塩田達雄、木村彰方. Th1/Th2 バランス調節因子 TIM1 と HIV-1 感染感受性および予後との関わり. 第 19 回日本組織適合性学会 2010 年 9 月 18 日、東京
8. 中島敏晶、木村彰方. HIV/AIDS 感受性、抵抗性とゲノム多様性 (教育講演) 第 19 回日本組織適合性学会、東京、2010 年 9 月 19 日
9. 中島敏晶、Nuanjun Wichukchinda、Nongluk Saipradit、中山英美、大谷仁志、Archawin Rojanawiwat、Panita Pathipvanich、有吉紅也、Pathom Sawanpanyalert、塩田達雄、木村彰方. タイ人女性 HIV-1 感染集団における TIM1 遺伝子多型と HIV-1 感染感受性および予後との関わり. 第 55 回日本人類遺伝学会、大宮、2010 年 10 月 29 日
10. 成瀬妙子、陳智勇、柳田梨紗、山下智子、齋藤祐介、森一泰、保富康宏、宮澤正顕、俣野哲朗、木村彰方. 実験動物アカゲザルの MHC クラス I 多様性解析. 第 19 回日本組織適合性学会大会. 東京. 2010 年 9 月 18 日.
11. 成瀬妙子、奥田裕紀子、俣野哲朗、明里宏文、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 RAET1/ULBP 遺伝子群の多様性. 日本人類遺伝学会第 55 回大会. 大宮. 2010 年 10 月 28 日.
12. 齋藤祐介、成瀬妙子、明里宏文、俣野哲朗、木村彰方. カニクイザル産地別家系調査による MHC クラス I 遺伝子(Mafa-A, Mafa-B) 遺伝子のハプロタイプの決定. 第 19 回日本組織適合性学会大会. 東京. 2010 年 9 月 18 日.
13. 奥田裕紀子、成瀬妙子、俣野哲朗、森一泰、保富康宏、宮澤正顕、木村彰方. アカゲザル ULBP4 遺伝子の多様性. 第 19 回日本組織

- 適合性学会大会. 東京. 2010年9月18日.
14. 野村拓志、山本浩之、成瀬妙子、木村彰方、侯野哲朗. ビルマ産アカゲザルにおける MHC クラス I ハプロタイプの SIV 感染への影響の解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会. 徳島. 2010年11月7-9日.
 15. 高橋尚史、石井洋、高原悠佑、成瀬妙子、木村彰方、侯野哲朗. 自然感染で優位な Gag 特異的 CTL が誘導されない MHC- I ハプロタイプ共有サル群における Gag 特異的 CTL 誘導ワクチン効果の解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会. 徳島. 2010年11月7-9日.
 16. 石井洋、岩本南、成瀬妙子、木村彰方、侯野哲朗. 予防エイズワクチンによる CTL dominancy の変化. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会. 徳島. 2010年11月7-9日.
 17. 宮澤 正顯. レトロウイルス遺伝子発現と糸球体病変: 拡大するヒトレトロウイルスの世界 (特別講演). **第 45 回日本小児腎臓病学会学術集会**、2010年7月、大阪.
 18. Kanari, Y., Hakata, Y., Wichukchinda, N., Irie, S., Biasin, M., Sakamoto, M., Tsuji-Kawahara, S., Takeda, E., Trabattoni, D., Piacentini, L., Fasano, F. R., Naddeo, V., Lo Caputo, S., Mazzotta, F., Rojanawiwat, A., Pathipvanich, P., Auwanit, W., Kohara, S., Sawanpanyalert, P., Ariyoshi, K., Clerici, M. and Miyazawa, M. High-level *Rac2* expression associated with novel intron polymorphisms restricts HIV-1 replication in exposed seronegative individuals. **NEKKEN Research Conference "Ten years' achievements of the Lampang HIV cohort in Northern Thailand."** October 27, 2010, Nagasaki, Japan.
 19. 宮澤 正顯. 性感染症の最近の動向: HIV と性器クラミジアを中心に (教育講演).
 - 第 19 回日本口腔感染症学会総会・学術大会. 2010年11月. 大阪.
 20. 宮澤 正顯、博多 義之、金成 安慶、河原 佐智代. HIV 感染移行性の分子機構: *Rac2* と APOBEC3 (シンポジウム). **第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会**. 2010年11月. 東京.
 21. 1) Jun Komano, Emiko Urano, Hiroshi Yanagita, Yuko Morikawa, Tyuji Hoshino. Novel HIV-1 inhibitors targeting the last viral enzymatic activity and the structural protein. The 24th Joint meeting of the AIDS panels, HIV Resistance Impact in Asia. Singapore, Dec 8-10, 2010
 22. 2) Jun Komano. Cytokine signatures of transformed B cells with distinct EBV latency. National Taiwan University, College of Medicine, Room 202, Taiwan, Oct 6, 2010
 23. 3) Jun Komano, Toru Aoki, Emiko Urano, Reiko Ichikawa, Kosuke Miyauchi. Production of GFP-incorporated infectious pseudovirion by the N-terminal modification of HIV-1 Gag. CSHL meeting on Retroviruses, Cold Spring Harbor, NY, USA May 24-29, 2010.
 24. 4) Emiko Urano, Noriko Kuramochi, Hiroshi Tomoda, Yutaka Takebe, Kosuke Miyauchi, Jun Komano, Yuko Morikawa. A novel post-entry inhibitor of HIV-1 replication targeting the capsid domain of Gag. CSHL meeting on Retroviruses, Cold Spring Harbor, NY, USA May 24-29, 2010
 25. 5) Emiko Urano, Noriko Kuramochi, Kosuke Miyauchi, Reiko Ichikawa, Hiroshi Tomoda, Yutaka Takebe, Jun Komano, Yuko Morikawa. A novel postentry inhibitor of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication

- Screened by Yeast Membrane-associated Two-hybrid Systemt. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity Awaji 2010, Awaji Island, Hyogo, Japan, Sept 7-10, 2010
26. 6) Jun Komano. Study on neutralizing antibodies against two highly variable viruses. The US-Japan Cooperative Medical Science Program 23rd Joint Meeting of AIDS Panel. Awaji Island, Hyogo, Japan, Sept 10, 2010
 27. Emiko Urano, Kosuke Miyauchi, Jun Komano. The analysis of novel cyclin T1 splice variant lacking exon 7. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 12月7-10日,2010
 28. Kosuke Miyauchi, Toru Aoki, Emiko Urano, Reiko Ichikawa, Jun Komano. Protein transduction by pseudo-lentiviral nano particles. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 12月7-10日,2010
 29. 山吉 麻子, 林 里衣, 福本 裕之, 小柳 義夫, 駒野 淳, 小堀 哲生, 村上 章. Non-coding RNA (7SK) の機能解析と機能性人工核酸としての応用. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 12月7-10日,2010
 30. 尾崎 太郎, 田中 智博, 橋本 知恵, 宮内 浩典, 鳴海 哲生, 山本 直樹, 駒野 淳, 玉村 啓和. gp120のCD4結合サイトを模倣した新規抗原分子の創製. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 11月24-26日,2010
 31. 柳田 浩志, 松元 輝礁, 尾瀨 将一, 高江州 善寿, 浦野 恵美子, 市川 玲子, 村上 努, 駒野 淳, 星野 忠次. 新規HIV-1逆転写酵素RNase H 活性阻害剤開発における構造活性相関. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 11月24-26日,2010
 32. 滝澤万里, 草川 茂, 北村勝彦, 長縄 聡, 本田三男, 村上利夫, 山本直樹, 駒野 淳. 非エピトープ変異による中和抗体感受性制御を指標にしたHIV Env定常状態の構造解析. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 11月24-26日,2010
 33. 宮内 浩典, 浦野 恵美子, 駒野 淳. HIV複製を増強するEBV感染B細胞由来のサイトカイン. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 11月24-26日,2010
 34. 橋本 知恵, 田中 智博, 浦野 恵美子, 尾崎 太郎, 新井 啓之, 鳴海 哲夫, 野村 渉, Kasthuraiah Maddli, Yves Pommier, 山本直樹, 駒野 淳, 玉村 啓和. HIV-1遺伝子産物由来のインテグラーゼ阻害剤の創出. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 11月24-26日,2010
 35. 宮内 浩典, 浦野 恵美子, 駒野 淳. ハイスルーットディスプレイアセンブリーアッセイの構築. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 11月7-9日,2010
 36. 今留 謙一, 矢島 美沙子, 川野 布由子, 市川 紗弓, 清水 則夫, 中村 浩幸, 松田剛, 駒野 淳, 山本 直樹, 藤原製悦. EBウイルス関連血球貪食症候群モデルマウスの作製と解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 11月7-9日,2010
 37. 星野 忠次, 柳田 浩志, 松元 輝礁, 尾瀨 将一, 高江州 善寿, 浦野 恵美子, 市川 玲子, 村上 努, 駒野 淳. 新規HIV-1逆転写酵素Rnase H 活性阻害剤の開発. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 11月7-9日,2010
 38. 浦野 恵美子, 倉持 紀子, 市川 玲子, 宮内 浩典, 供田 浩, 武部 豊, 駒野 淳,

森川 裕子. HIV-1Gagを標的とする低分子化合物BMMPによるウイルスエントリー阻害機構. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 11月7-9日, 2010

39. 星野忠次, 柳田浩志, 松元輝礁, 尾湯将一, 浦野恵美子, 村上 努, 駒野 淳. 抗HIV薬RNaseH活性阻害剤の開発. 第8回ナノ学会大会, 岡崎市, 5月14日, 2010
40. 萩原晶代, 岡村智崇, 新井陽子, 斉藤守弘, 伊藤誠一. 地方病型牛白血病の血清学および遺伝子学的検討. 平成22年度関東・東京合同地区獣医師大会日本獣医公衆衛生学会, 宇都宮, 2010年9月12日

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

Tetsuo Narumi, Wataru Nomura, Chie Hashimoto, Aki Ohya, Jun Komano, et al. HIV外被蛋白質gp41のC34領域ペプチドの三量体の創製と阻害剤およびワクチンとしての開発(出願2010年11月4日).

2. 実用新案特許 該当なし

その他 該当なし

II. 分担研究報告