

## 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

研究分担者 森 一泰（国立感染症研究所 主任研究官）

研究協力者 齋藤 陽平（国立感染症研究所 協力研究員）

### 研究要旨

糖鎖欠失変異によって弱毒化した SIV を生ワクチンとして用い、その感染制御における防御免疫の解析を行った。チャレンジウイルスとしてサブタイプの異なる高病原性の SIVsmE543-3 を用いた。11 頭すべてのワクチン感作サルは、MHC の遺伝子型の多様性にもかかわらず初期感染を制御した。そのうち 7 頭では感染防御が 80 週以上維持された。しかしながら、4 頭では N 型糖鎖付加部位の増加が認められる変異ウイルスが出現した。7 頭の感染防御群と 4 頭の非感染防御群の解析から、感染防御群では、ワクチン接種前から慢性感染期を通して抗原非存在下で IL-15 に応答して IFN- $\gamma$  産生や CD107a を発現する CD8+T 細胞と NK 細胞数の頻度が高いという結果が得られた。CD8+細胞をエフェクターとした *ex vivo virus inhibition assay* でのウイルス増殖抑制は、IL-15 の添加により増強された。この増強は個体差に影響されるが、CD8+T 細胞に対してだけでなく、NK 細胞に対しても認められる結果となった。従って、生ワクチンによる感染防御免疫獲得とその維持には、IL-15 応答性 CD8+細胞（CD8+T 細胞、NK 細胞）が関与しており、その背景には宿主免疫の遺伝的素因が影響していることが示唆された。

### A. 研究目的

現在の HIV ワクチン開発は、中和抗体や CTL 誘導型の獲得免疫が中心であり、HIV の多様性・変異性に対し有効な広域中和抗体、ワクチン接種者の MHC I alleles の多様性、地域性に対応した CTL を誘導するワクチン、アジュバントの開発等が行われている。しかし現状は多くの課題が存在する。中和抗体については中和抗体を誘導する抗原の問題が存在する。CTL 誘導ワクチンについては、臨床研究の結果、高い CTL 誘導能を持つ Ad5 (Adenovirus vector) は HIV 感染の抑制を示す効果は見られなかった。現在の HIV ワクチン開発

において、HIV 感染制御に関わる免疫に関する情報が欠けていることは明白である。

本研究の目的は、SIV 動物モデルを用いて、HIV ワクチン開発に必要な HIV 感染制御に働く宿主応答を解明することである。糖鎖欠失変異し低病原性化した SIV は、生ワクチンとして個体差に関係なく高い防御免疫を誘導し、サブタイプの異なる SIV に対する感染防御を成立させた。しかしながら、一部の個体では持続的な感染防御の破綻が起り、結果として慢性感染期には組み換え変異ウイルスが出現した。チャレンジウイルスの初期感染期の viral peak を著しく抑制し得たにも関わ

らず、感染防御を持続することができなかった。この慢性感染期における感染防御の機序解明とその破綻の原因を解析することは、今後の HIV ワクチン開発にとって重要な指針となると考えられる。

## 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ザルを用いた。

### 糖鎖欠失変異ウイルス

#### Δ5G

系統 8 に分類される 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 型結合糖鎖付加部位の 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 (Δ5Gver1) または 377 (Δ5Gver2) の N 型結合糖鎖付加部位の Asn を Gln に変異させた。

#### Δ3G

SIVmac239 の gp120 の N 型結合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 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。

### 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 10 mg/Kg 体重を皮下接種、3、7 日後に 5 mg/Kg 体重を静脈内接種した。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。

### Ex vivo virus inhibition assay

SIVmac239 を CD4+T 細胞に感染させ、その後 CD8+細胞か CD8beta+細胞と IL-15 と共に培養し、培養上清中のウイルス量は 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) を用いて測定した。

### (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

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

HIV/SIV は、ウイルススパイクが糖鎖に覆われており、この糖鎖修飾はウイルスレセプターや抗体との親和性だけではなくウイルスの細胞及び組織指向性にも影響を与える。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おり、今年度は SIV の糖鎖修飾とワクチンが誘導する感染防御と宿主応答との関連を示す結果が得られた。

SIVmac239 と 4 つのワクチンウイルス株の N 型糖鎖欠失変異部位を示したものである(図 1-A)。これらのワクチンウイルスは、培養 CD4+細胞での増殖性は野生株 SIVmac239 と違いがないが、感染宿主での慢性感染は抑制される。

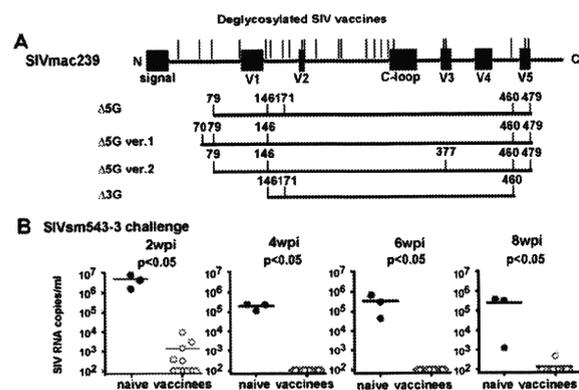


図 1. ワクチンウイルスの N 型糖鎖欠失変異部位とチャレンジ感染に対する効果

#### 糖鎖変異生ワクチンの SIVsmE543-3 に対する感染防御効果

1000 TCID<sub>50</sub> の SIVsmE543-3 を糖鎖変異ワクチン感作ザル 11 頭に静脈内接種した。ワクチン群は、チャレンジ後 2 週において一過性の初期感染が認められたが、全 11 頭で感染後 4 週から 8 週までは感染制御された(図 1-B)。その後、7 頭は感染後 80 週以上感染制御を維持していた(感染制御群)。しかしながら、残りの 4 頭は組み換え変異ウイルス等の変異ウイルスの出現により感染の再上昇が認められた(非感染制御群)。この感染制御群と非感染制御群の間の感染防御免疫にどのような差異があったのかを中心に解析を行った。

#### CD8+細胞 depletion

HIV/SIV の慢性感染期におけるウイルス感染制御に CD8+細胞が寄与することが明らかにされている。同様に慢性感染期において、この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 抗体を用いた 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(図 2)。従って、これらの結果はワクチン感作ザ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を示した。

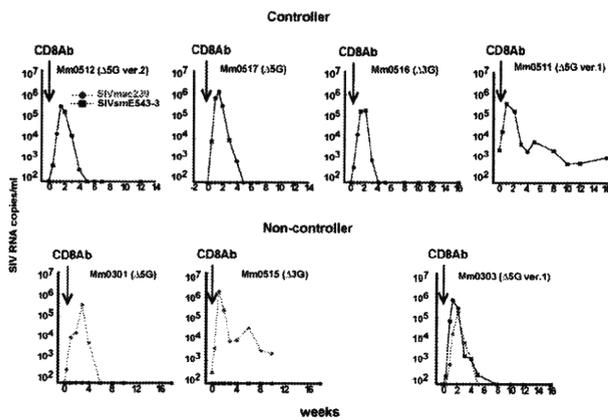


図2. 慢性感染期における CD8+細胞によるウイルス増殖抑制

### SIV 特異的 T 細胞の多機能性

前年度までの研究結果として、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が、感染後 0-60 週後までの間に抗体価は検出されず、また IFN- $\gamma$  の ELISPOT の実験において感染制御群と非感染制御群の間にウイルス特異的 T 細胞頻度に有意な相関が認められないことを示されている。

CD8+T 細胞の複数のサイトカインを同時に産生する多機能性が HIV/SIV の感染制御に寄与していることが報告されている。そこで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- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , 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- $\gamma$  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 (図 3 A, B)。

### IL-15 応答性 CD8+細胞

しかしながら、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- $\gamma$  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 (図 4)。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 (図 5)。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- $\alpha$  と IFN- $\alpha$  による刺激では IFN- $\gamma$  を産生されなかったが、IL-2, IL-7, IL-12, IL-15 では IFN- $\gamma$  が産生され、このうち IL-15 が最も高く IFN- $\gamma$  産生を誘導することが示された (図 6)。

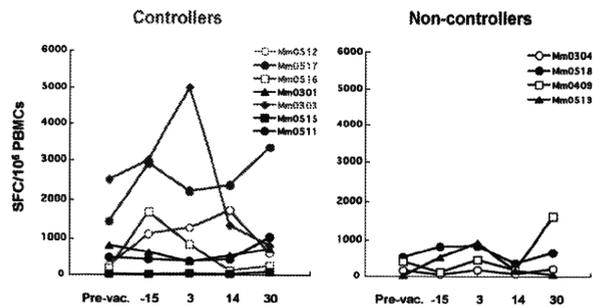


図4. PBMC 中の IL-15/IL-7 応答性 IFN- $\gamma$  産生細胞

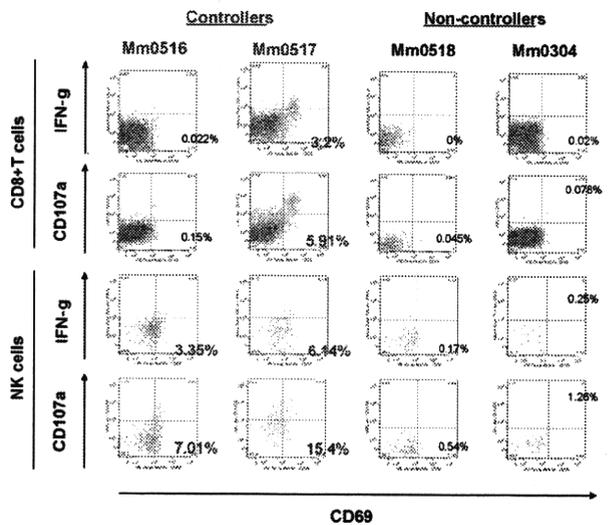


図5. 慢性感染期において IFN- $\gamma$  産生及び CD107a を発現する CD8+T 細胞と NK 細胞

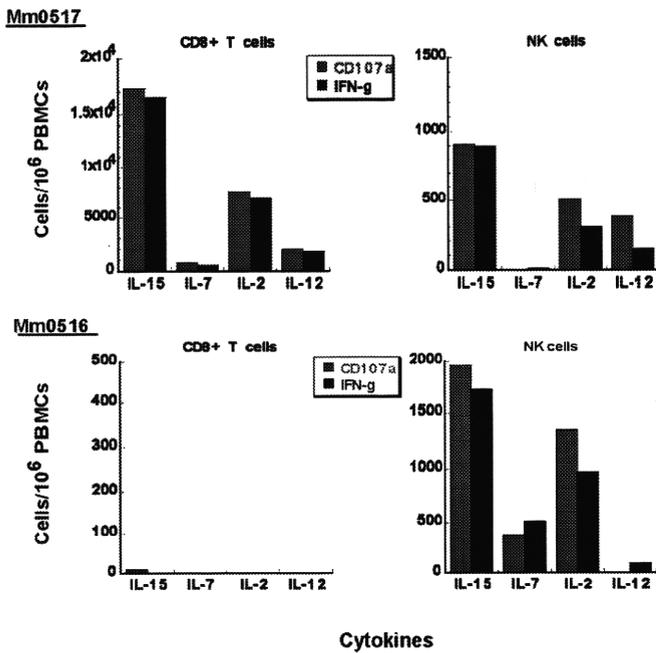


図 6. サイトカイン刺激による CD8+細胞のエフェクター機能発現

慢性感染期 (45 週) における IL-15 応答性 CD8+細胞の IFN- $\gamma$  と細胞傷害性に寄与する CD107a の発現細胞数を測定した。個体差はあるものの、感染制御群では、CD8+T 細胞及び NK 細胞に IL-15 誘導性の IFN- $\gamma$  と CD107a の産生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 (図 7A)。さらに、急性感染期 (10 週) においても同様の結果が得られた。ワクチン接種後において、感染制御群は同様に NK 細胞の IFN- $\gamma$ 、CD107a の産生細胞数が多い。しかしながら、CD8+T 細胞の IFN- $\gamma$ 、CD107a の産生は認められるものの、IFN- $\gamma$  の産生細胞数がチャレンジ後より少ない傾向にあることが明らかになった。さらにワクチン感作前においてもチャレンジ後と同様に感染制御群は、IFN- $\gamma$  と CD107a の産生 CD8+細胞数が多く、非感染制御群は、少ないことが明らかとなった (図 7B)。従って、糖鎖変異生ワクチンによる感染防御効果獲得には、宿主の IL-15 応答性 CD8+細胞の性質に影響される可能性があ

ると考えられる。

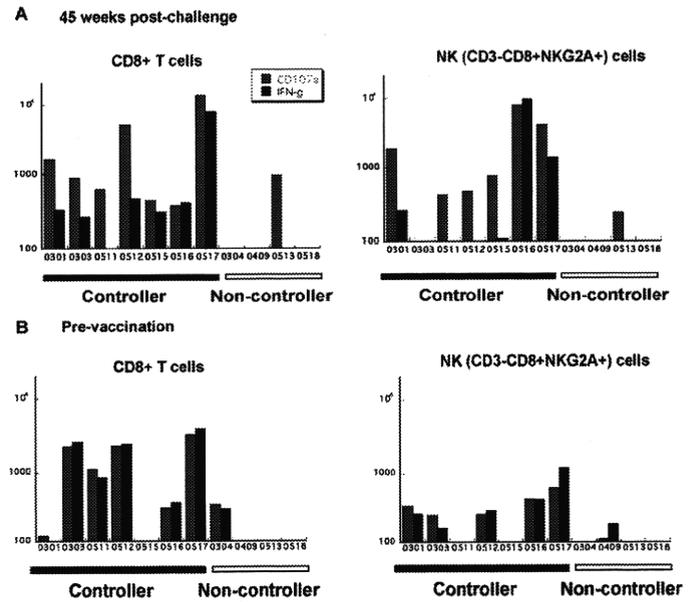


図 7. ワクチン感作サルでの IL-15 応答性 CD8+細胞

### Ex vivo virus inhibition assay

IL-15 は、CD8+T 記憶細胞の増殖と維持、NK 細胞の細胞傷害性増強などに寄与することが明らかとなっている。そこで、CD8+細胞によるウイルス複製・感染の抑制に対する IL-15 の効果を検討した。ワクチン接種後、CD8+細胞によるウイルスの増殖抑制が認められ、IL-15 はこの作用を更に増強させたが、感染制御との相関は認められなかった (表 1)。

次にこの IL-15 によって増強されるウイルス増殖抑制作用は、CD8+T 細胞によるものであるのかを検討した。このアッセイにおけるウイルス増殖抑制作用は、CD8+T 細胞(CD8beta 陽性)だけではなく、NK を含む CD8beta 陰性細胞群にもあり、個体間によって違うが、共に IL-15 により増強された (表 2)。更に CD20+細胞、CD8-細胞ともにこのアッセイでウイルスを抑制する効果も IL-15 刺激による影響も認められなかったことから、このアッセイでのウイルス増殖抑制の中心は、

CD8+T 細胞と NK 細胞の両方であることが推察された。

R10		Pre-challenge	Post-challenge	
Animal#			6wpc	50wpc
Mm0301	Controller	< 0.125	1.1	0.29
Mm0516	Controller	2.1	1.5	< 0.0625
Mm0517	Controller	0.46		
Mm0409	Non-Controller	0.52	0.52	0.96
Mm0518	Non-Controller	1.1	0.42	0.068

+ IL-15		Pre-challenge	Post-challenge	
Animal#			6wpc	50wpc
Mm0301	Controller	< 0.125	0.36	0.17
Mm0516	Controller	< 0.125	0.18	<0.0625
Mm0517	Controller	< 0.25		
Mm0409	Non-Controller	< 0.125	< 0.125	0.14
Mm0518	Non-Controller	< 0.125	< 0.125	<0.0625

80% virus inhibition (E/T ratio)

表 1. In vitro における CD8+細胞のウイルス増殖抑制に対する IL-15 の効果

**Virus inhibition assay**

Pre-challenge: CD8beta+ (E/T ratio 0.5 : 1)		(Inhibition of virus growth (%))					
Controllers	Effector	Ctrl.			IL-15		
		Whole CD4-	CD8+T	CD8beta-	Whole CD4-	CD8+T	CD8beta-
	Mm0301	59.8	98.2	58.2	98.9	98.4	93.2
	Mm0303	54.3	28.9	77.6	79.7	99.0	93.8
	Mm0516	82.6	86.1	89.0	95.9	98.9	98.9
	Mm0517	67.3	60.0	77.1	82.2	64.4	97.9

表 2. In vitro における感染制御群の CD8+T 細胞と NK 細胞のウイルス増殖抑制に対する IL-15 の効果

**D. 考察**

HIV/SIV 感染制御に働く CD8+細胞としてこれまでウイルス特異的 CD8+T 細胞の重要性が示唆されていた。しかし本研究でも確認されたように、ウイルス特異的 CD8+T 細胞の末梢血における頻度と感染制御との間には相関は認められなかった。感染制御群の 7 頭中 5 頭のウイルス特異的 CD8+T 細胞の頻度は高くなく、非感染制御群の 1 頭と比べ低い。この結果は、ウイルス特異的 CD8+T 細胞の頻度は慢性感染期における感染制御の決定因子ではないことを示す。その代わりに、

本研究は、新たな感染制御を決定する細胞として IL-15 応答性 CD8+細胞の存在を明らかにした。IL-15 応答性 CD8+細胞の頻度は、非感染制御群において非常に低レベルであった。感染後 45 週において CD107a+発現細胞が検出された 1 頭は、このあとで感染を抑制している。組み換えウイルスの出現も無かった。IL-15 応答性 CD8+細胞の慢性感染期における感染制御における役割を確認することができた。

CD8+細胞 depletion による感染制御の一時的な破綻は、ウイルス特異的 CD8+T 細胞だけでなく、IL-15 応答性細胞の消失も重要な要因と思われる。この感染制御群と非感染制御群の違いは、ワクチン接種前から認められ、宿主の免疫の遺伝的素因が原因の一つになっている可能性が考えられる。HIV/SIV 感染制御に関わる遺伝的因子として特定の CTL エピトープの提示する MHC I アリルが報告されている。CTL エピトープの解析が必要となるが、抗原刺激なしでの IL-15 応答性 CD8+細胞を決定する遺伝的性質は、MHC アリルとは異なる可能性が示唆される。遺伝的性質の解明は、今後の課題となる。

IL-15 応答性 CD8+細胞は、エフェクター機能と IFN- $\gamma$  産生能を持つ CD8+T 細胞と NK 細胞である。ワクチン接種前においても末梢血に検出されたことから、ワクチン接種前の免疫機能により誘導・維持される免疫細胞ではないかと考えられる。感染制御の機序としてウイルス感染に対する迅速な細胞傷害機能が必要となる。IL-15 応答性細胞は、CTL 等のエフェクター機能の迅速性を高める働きがあるのかも知れない。

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。IL-15 応答 CD8+細胞は、感染に対する自然免疫系細胞の迅速な宿主応答を獲得免疫にリレーする

役割が推測される。

生ワクチンによる感染防御免疫は、サブタイプ  
の異なるチャレンジ株においても初期感染時  
においては、全ての個体で感染防御効果があり、そ  
の維持には IL-15 応答性 CD8+細胞の役割が考え  
られる。IL-15 応答性 CD8+細胞の性質、機能につ  
いて今後の詳細な解析が求められる。

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

糖鎖変異 SIV 感染により誘導される感染防御に  
働く宿主応答を構成する免疫のひとつとして  
IL-15 応答性 CD8+細胞を介するによる細胞障害  
性免疫の重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. 研究発表

### 論文発表

1. Chie Sugimoto, Satoru Watanabe, Taeko Naruse, Eiji Kajiwara, Teiichiro Shiino, Natsuko Umamo, Kayoko Ueda, Hirotaka 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. Taeko K. Naruse, Zhiyong Chen, Risa Yanagida, Tomoko Yamashita, Yusuke Saito, Kazuyasu Mori, Hirofumi Akari, Yasuhiro Yasutomi, Masaaki Miyazawa, Tetsuro Matano, Akinori Kimura. Diversity of MHC class I genes in Burmese-origin rhesus macaques. Immunogenetics. 62, 601, 2010.

### 学会発表

1. Kazuyasu Mori<sup>1</sup>, Satoru Watanabe<sup>1</sup>, Yohei Saito<sup>1</sup>, Hirotaka Sato<sup>1</sup>, 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

## 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

その他 該当なし

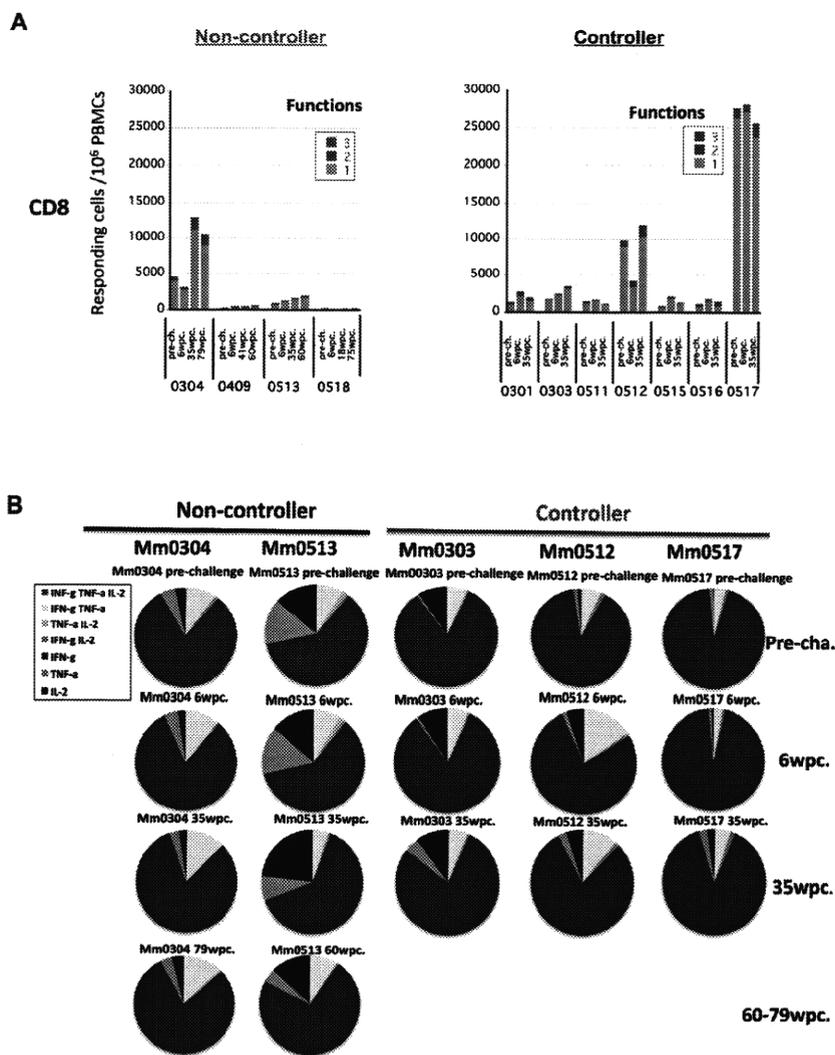


図 3. SIV 特異的 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 産生 CD8T 細胞の多機能性

## 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

アカゲザルと同様にワクチン開発研究に用いることが可能かどうかを検討するために、インドネシア、フィリピン、マレーシアで捕獲されたカニクイザルのコロニー由来の個体について Mafa-A および Mafa-B 遺伝子 cDNA の多様性を遺伝子配列レベルで解析し、カニクイザル Mafa クラス I はアカゲザル Mamu クラス I 同様に多様性に富んでいること、15~30%程度の Mafa アリルがアカゲザルの Mamu アリルと同一配列であることが判明した。また、検出された 81 の Mafa アリルのうち 36 アリル (44.4%) は新規アリルであった。なかでも、従来あまり解析されていなかったマレーシア由来の個体では 76.5%が新規アリルであり、産地による多様性分布の違いが大きいことが示された。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 25 アリル、カニクイザルでは少なくとも 15 アリルが存在することが明らかになった。これとは別に、HIV 感染 CD4 細胞において遺伝子発現が誘導されることから HIV 感染制御に関わると考えられる OAS1 遺伝子について、多型を日本人集団およびインド人集団で検討し、イントロンの機能的多型が感染初期の HIV-1 ウイルス量と関連することを見出した。

### 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かな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ゲノム多様性に関する有用な情報が得られる。これとは逆に、ヒト HIV 感染後の臨床所見や予後と関連するゲノム多様性を明らかにし、その情報をサルを用いたワクチン実験にも取り入れることが必要である。

そこで本研究では、アカゲザルやカニクイザルを対象として、免疫応答関連分子群のゲノム多様性を検討し、これと弱毒化ウイルス型ワクチンによる感染制御効果との関連を評価しつつ、新たなワクチン開発戦略を得ることを目的とする。

## B. 研究方法

(1) 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 クローン塩基配列を決定した。

(2) 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。

(3) 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。

(倫理面への配慮)

本研究にはヒト遺伝子解析研究が含まれるが、東京医科歯科大学難治疾患研究所倫理審査委員会に研究計画を申請し、審査を受けた後、研究機関長による実施承認を受けている。研究課題「HIV ウイルス感染防御機構の究明に関わる研究」(実施責任者 木村彰方) (平成 18 年 7 月 6 日付承認)

## C. 研究結果

(1) 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レルが 3 件認められた。一方、カニクイザル 24 個体について、Mafa-A および Mafa-B cDNA の塩基配列を決定したところ、表 1 に示すとおり観察された 81 アレルのうち 44.4% (36 アレル) は新規アレルであった(表 1)。とくにマレーシア由来の個体群については、検出した 34 アレルのうち 76.5% (26 アレル) が新規であった。

表 1 カニクイザル MHC クラス I 遺伝子の多様性

遺伝子座	検出されたアレル数	新規アレル数/検出アレル数 (%)		
		インドネシア由来 (n=8)	マレーシア由来 (n=8)	フィリピン由来 (n=8)
Mafa-A	29	3/9 (33.3%)	8/12 (66.7%)	0/8 (0%)
Mafa-B	42	5/13 (38.5%)	14/18 (77.8%)	0/11 (0%)
Mafa-I	6	1/2 (50.0%)	2/2 (100%)	0/2 (0%)
Mafa-AG	3	0/0 (0%)	2/2 (100%)	1/1 (100%)
計	81	9/25 (36.0%)	26/34 (76.5%)	1/22 (4.5%)

n: 親個体のハプロタイプ数

また、Mafa-A アレルの系統樹を作成したところ、マイナーアレルはクラスターを形成するが、新規アレルがクラスターを形成する訳ではなかった(図 1)。このことは、Mafa の多様性は地域分布より先に生じていたことを示唆する。

さらに、得られた Mafa クラス I アレルについて、アカゲザル (Mamu) あるいはブタオザル (Mane) のクラス I アレルとの相同性を検討したところ、表 2 に示すとおり、Mafa-A では 20 アレルのうち 15% (3 アレル)、Mafa-B では 42 アレルのうち 28.6% (12 アレル) が Mamu あるいは Mane アレルと同一の配列であった。このことは MHC クラス I アレ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。

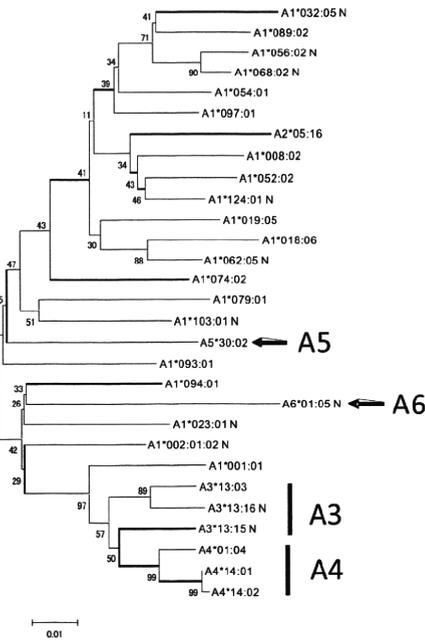


図1 Mafa-A 遺伝子アレルの系統樹

表2 本研究で検出された Mafa-A および Mafa-B アレル

Locus	Allele name	Novelty *	Accession Number	Region *	Identity to <i>Mamu</i> or <i>Mere</i> alleles *
A1	A1*054:01		AB154771	Malaysia	
A1	A1*070:01		AB154773	Malaysia	
A1	A1*020:02	Novel	AB599214	Indonesia	
A1	A1*010:01		AB599208	Malaysia	<i>Mamu-A1*020:01</i>
A1	A1*019:05		AB447616	Indonesia	
A1	A1*023:01	Novel	AB599216	Malaysia	
A1	A1*020:05	Novel	AB599215	Malaysia	
A1	A1*020:02	Novel	AB599218	Malaysia	
A1	A1*020:05	Novel	AB599219	Malaysia	
A1	A1*020:02	Novel	AB599217	Malaysia	
A1	A1*074:02		AB447608	Philippine	
A1	A1*020:02		EL320109	Philippine	
A1	A1*020:01		AB447676	Indonesia	<i>Mamu-A1*020:01</i>
A1	A1*020:02		EL320104	Philippine	
A1	A1*020:01		EL320103	Philippine	
A1	A1*020:01		EL320110	Philippine	
A1	A1*020:01	Novel	AB599208	Indonesia	
A1	A1*124:01	Novel	AB593227	Malaysia	
A1	A1*018:05		FM64949	Indonesia	
A1	A1*020:02		EL320105	Philippine	<i>Mamu-A1*020:01</i> , <i>Mamu-A1*020:02</i> , <i>Mamu-A1*020:03</i>
A2	A2*018:16		AM95976	Indonesia	
A3	A3*13:03		EL320112	Philippine	
A3	A3*13:15	Novel	AB593230	Malaysia	
A3	A3*13:16	Novel	AB593240	Indonesia	
A4	A4*14:01		AM95980	Indonesia	
A4	A4*14:02		AM95981	Malaysia	
A5	A5*30:02	Novel	AB593239	Malaysia	
A5	A5*30:03	Novel	AB599221	Malaysia	
A5	A5*30:01	Novel	AB599229	Malaysia	
A5	A5*14:01		AB154643	Indonesia	
B	B*020:01	Novel	AB599237	Malaysia	
B	B*020:01		AY169913	Indonesia	<i>Mamu-B*020:01</i>
B	B*020:02		EL320136	Philippine	<i>Mamu-B*020:01</i>
B	B*020:02		AY169914	Malaysia	<i>Mamu-B*020:01</i>
B	B*020:01		AY169917	Philippine	<i>Mamu-B*020:01</i> , <i>Mamu-B*020:02</i>
B	B*020:01		EL320135	Philippine	
B	B*020:01		AY169918	Indonesia	<i>Mamu-B*020:01</i>
B	B*020:01	Novel	AB599230	Malaysia	<i>Mamu-B*020:01</i>
B	B*020:01		EL320136	Philippine	
B	B*020:01		EL320135/AY169918	Philippine	
B	B*020:01	Novel	AB599231	Malaysia	<i>Mamu-B*020:01</i>
B	B*020:01		EL320137	Indonesia	
B	B*020:01		EL320117/EL320132	Indonesia,Philippine	
B	B*020:01	Novel	AB599228	Indonesia	
B	B*020:01	Novel	AB599233	Malaysia	
B	B*020:01		EL320118	Philippine	
B	B*020:01		EL320114	Indonesia,Philippine	
B	B*020:01	Novel	AB599238	Malaysia	<i>Mamu-B*020:01</i>
B	B*020:01	Novel	AB599228	Malaysia	<i>Mamu-B*020:01</i> , <i>Mamu-B*020:02</i>
B	B*020:01	Novel	AB599235	Malaysia	
B	B*020:01	Novel	AB599225	Indonesia	
B	B*020:01		EL320131	Philippine	
B	B*020:01		EL320122	Philippine	
B	B*020:01		EL320123	Philippine	
B	B*020:01		EL320125	Philippine	
B	B*020:01	Novel	AB599240	Malaysia	<i>Mamu-B*020:01</i> , <i>Mamu-B*020:02</i> , <i>Mamu-B*020:03</i>
B	B*020:01		EL320126	Philippine	
B	B*020:01	Novel	AB599242	Philippine	<i>Mamu-B*020:01</i>
B	B*020:01	Novel	FM612942	Malaysia	
B	B*020:01	Novel	AB599235	Malaysia	
B	B*13:04	Novel	AB599239	Malaysia	
B	B*13:02	Novel	AB599234	Malaysia	
B	B*13:02:02	Novel	AB599232	Indonesia	
B	B*13:02	Novel	AB599238	Malaysia	
I	I*01:15 like-1	Novel	AB599241	Indonesia, Malaysia	
I	I*01:03:01:08		AB159465/AB159464	Indonesia	
I	I*01:15 like-2	Novel	AB599242	Malaysia	<i>Mamu-I*020:01</i> , <i>Mamu-I*01:01</i>
I	I*01:15 like	Novel	AB599243	Malaysia	
I	I*01:15 like		FM649493	Philippine	<i>Mamu-I*01:05</i>
I	I*01:01:01		EL320139	Philippine	

\*New alleles are indicated in bold  
 \*Accession numbers were submitted to public database and can be obtained with the indicated accession number. 1: the accession numbers in the parentheses indicated that the Mhc class I sequences were identical to those numbers which had been deposited in GenBank.  
 \*Asterisks indicate three different regions (Indonesia, Malaysia, Philippines).  
 \*Identical sequences found in *Mamu* or *Mere* alleles.

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、従来のアカゲザルを用いたワクチン実験から、SIVmac への感染制御が高率に得られるエリートコントローラーアレルであることが明らかにされている Mamu-A1\*001:01 アレルと同一アミノ酸配列を持つアレルがマレーシア由来のカニクイザルに検出 (Mafa-A1\*001:01) されたこと、また同様にエリートコントローラーである 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ことである。Mamu-B\*017 と Mafa-B017:01 は 46 位のアミノ酸残基が Arg と Ser の違いのみであるが、46 位は抗原ペプチドの結合に関与しないと考えられる位置にある。従って、カニクイザルにおける Mafa-A\*001:01 および Mafa-B\*017:01 はエリートコントローラーアレルであることが強く示唆されるため、ワクチン実験におけるリファレンスアレルとなると考えられる。

(2) ULBP4 遺伝子多型の解析: 昨年度までの解析でアカゲザルの ULBP4 には少なくとも 16 種類のアレルがあることが判明していたが、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 種類のアレルが存在することが明らかとなった。

一方、カニクイザルについても ULBP4 遺伝子の多型解析を行ったところ、24 個体に少なくとも 15 種類の異なるアレルが検出された。また、アカゲザルに検出された 25 種類のアレルとカニクイザルに検出された 16 種類のアレルに加えて、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 (図 4)。その結果、アカゲザル、カニクイザルのアレ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。これらのことは、MHC クラス I 多型と同様に、ULBP4 多型も旧世界ザルの分岐以前から存在していたことを強く示唆する。

ヒトでは ULBP4 に 7 アレルが報告されているが、我々の解析でアカゲザルでは 25 アレル、カニクイザルでは 15 アレルが検出されていることから、旧世界

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。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。

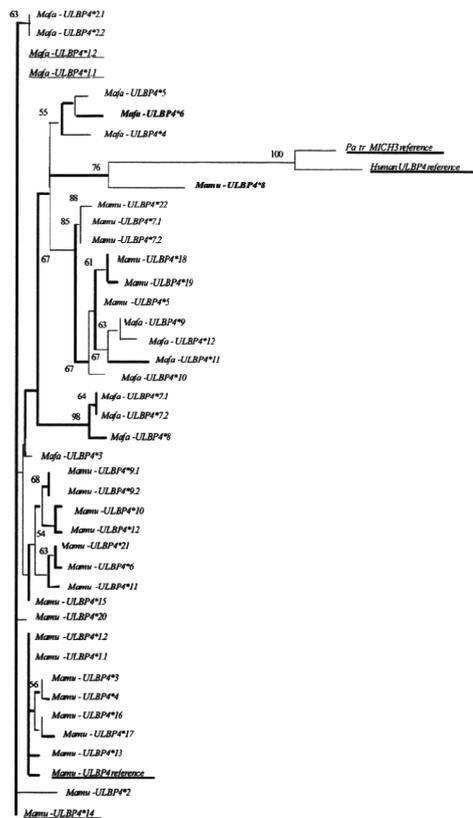


図2 アカゲザル、カニクイザルの ULBP4 系統樹

(3) OAS1 遺伝子の解析：最近 HIV 感染後の CD4 陽性 T 細胞の網羅的遺伝子発現解析から、インターフェロンで誘導される OAS1 は、感染後にその発現が増強する遺伝子として同定されている。また、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が、この多型と HIV 感染後のウイルス量との明確な関連は認められなかったと報告されている。一方、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が、HIV 感染との関連は明確ではない。

そこで、日本人集団 (HIV 感染者 95 名、一般健常人 281 名) およびインド人集団 (HIV 感染者 254 名、一般健常人 286 名) について、これらの機能多型を

タイピングした。その結果、表 3 に示すとおり、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。

表 3 日本人およびインド人集団における OAS1 多型解析

	Japanese				Indian			
	HIV-1 infected (n = 95)	Control (n = 281)	Odds ratio	p-value	HIV-1 infected (n = 254)	Control (n = 286)	Odds ratio	p-value
rs10774671								
AA	54 (57%)	168 (60%)	0.89	0.614	133 (52%)	145 (51%)	1.07	0.700
AG	39 (41%)	97 (34%)			99 (39%)	120 (42%)		
GG	2 (2%)	16 (6%)	0.36	0.157	22 (9%)	21 (7%)	1.20	0.572
Mixed A&G	41 (23%)	129 (23%)	0.98	0.927	143 (28%)	162 (28%)	0.99	0.950
rs1131454								
AA	38 (40%)	108 (38%)	1.07	0.77	85 (34%)	109 (38%)	0.84	0.34
AG	47 (49%)	129 (46%)			113 (45%)	135 (47%)		
GG	10 (11%)	45 (16%)	0.62	0.195	51 (21%)	42 (15%)	1.5	0.078
Mixed A&G	67 (35%)	219 (39%)	0.86	0.381	215 (43%)	219 (38%)	1.22	0.104

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、図 3 に示すとおり、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。

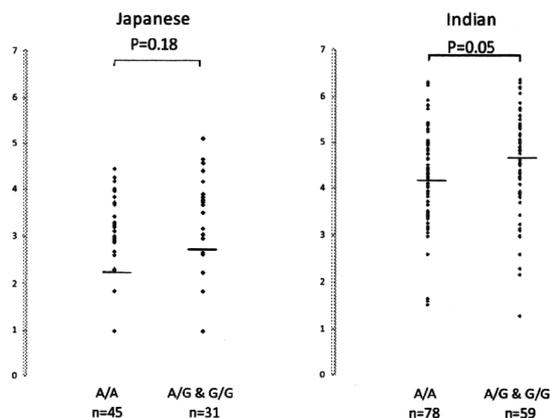


図 3 rs10774671 多型と HIV 感染者でのウイルス量との関連

#### D. 考察

昨年度までに引き続き、ワクチン実験アカゲザル集団について Mamu-A および Mamu-B 遺伝子 cDNA の配列解析を行った結果、新規アリルが 3 件見出され、アカゲザルの MHC 多様性データがさらに充実された。

一方、カニクイザル Mafa-A 遺伝子および Mafa-B 遺伝子についての cDNA 解析でも、アカゲザルと同様に MHC クラス I 遺伝子の多様性が明らかになった。また、カニクイザルの Mafa アリルの 15~30% 程度はアカゲザル配列の Mamu アリルと同一の塩基

配列を有すること、特にアカゲザルでエリートコントロールアレルとされている Mamu-A1\*001、Mamu-B1\*017 とほぼ同一配列のアレルも検出されたことから、MHC の多様性から考える限り、カニクイザルはアカゲザルと同様にワクチン実験に用いることが可能と考えられる。さらに、活性型 NK レセプターNKG2D のリガンドである ULBP4 にはアカゲザル、カニクイザルとも著明な多様性が存在することが判明したため、感染個体における CTL 誘導性と Mamu-A (もしくは Mafa-A)、Mamu-B (もしくは Mafa-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 OAS1 多型との関連について解析した。白人では HIV-1 ウイルス量と OAS1 のスプライシングバリエントの産生をたらしイントロン多型 (rs10774671) との明確な関連は観察されなかったと報告されているが、本研究では日本人、インド人ともに AA 遺伝子型の個体では HIV-1 ウイルス量が低く、インド人では有意な違いが観察された。昨年度の研究で、白人では HIV-1 ウイルス量と関連すると報告されている APOBEC3B の欠損多型が日本人、インド人ともに全く関連を示さなかったことから、ウイルス量を制御する遺伝的背景は白人集団とアジア人集団では大きく異なっている可能性もある。今後、旧世界ザルについても、OAS1 の多様性を含めて検討することで、ワクチン開発実験における宿主の遺伝的背景の関与を明確にすることが必要である。

## E. 結論

カニクイザル 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。本年度の研究成果で特記すべきことは、アカゲザルにおいてエリートコントロールアレルとして報告されている Mamu-A\*01 および Mamu-B\*017 と類似した構造をとる Mafa-A1\*001:01 および Mafa-B\*017:01 が、それぞれマレーシア由来およびフィリピン由来のカニクイザルに見出されたことである。これらのアレルは

アカゲザルにおけるワクチン実験のリファレンスとなっていることから、カニクイザルにおけるワクチン実験のリファレンスとして使えると思われる。また、アカゲザル、カニクイザルともに MHC クラス I 遺伝子群の多様性は従来知られていたより遥かに大きいことが判明したことから、MHC の多様性をあらかじめ決定した個体を実験群、対照群として用いることがワクチン実験における必須事項となると考えられる。さらに、本年度のヒト集団の解析で明らかになったように、ヒトにおいては OAS1 多型が HIV 感染後のウイルス量と関連することなどが判明している。今後、実験サルにおいても 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) 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.
- (2) 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.
- (3) 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.
- (4) Sugimoto C, Watanabe S, Naruse T, Kajiwara E,

Shiino T, Umamo N, Ueda K, Sato H, Ohgimoto S, Hirsh V, Villinger F, Ansari AA, Kimura A, Miyazawa M, Suzuki Y, Yamamoto N, Nagai Y, Mori K. Protection of macaques with diverse MHC genotypes against a heterologous SIV by vaccination with a deglycosylated live-attenuated SIV. PLoS ONE. 2010; 5(7): e11678.

## 2 学会発表

- (1) 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.
- (2) 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.
- (3) 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
- (4) 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
- (5) 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
- (6) 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.
- (7) 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.
- (8) 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.
- (9) 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.
- (10) 野村拓志、山本浩之、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗. 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.
- (11) 高橋尚史、石井洋、高原悠佑、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗. 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.
- (12) 石井洋、岩本南、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗. 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.

## 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、河原 佐智代（近畿大学医学部 免疫学教室）

**研究要旨** ウイル感染に対する自然抵抗性やワクチン効果が、宿主の MHC 遺伝子型により影響を受けることはよく知られている。体内からのウイルス感染細胞排除に CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞が重要な役割を果たすという観点からは、レトロウイルス感染抵抗性と MHC class I 遺伝子型との相関は説明しやすい。しかし MHC class II 遺伝子型がレトロウイルス感染抵抗性に影響を及ぼすしくみは十分には明らかにされていなかった。我々はこれまで、我が国でワクチン開発等に用いられているアカゲザル個体の MHC class II 遺伝子型とハプロタイプ構成を網羅的に解析してきたが、今年度は主にマウスモデルを用い、レトロウイルス感染初期過程における細胞性免疫応答の役割を解析した。その結果、感染初期にナチュラル・キラー (NK) 細胞が活性化され、NK 細胞による感染細胞認識を抗体により阻害すると、病態が悪化することが明らかとなった。ペプチドワクチンによる防御効果の解析と併せ、ワクチン効果の一部は、感染ごく初期の CD4 陽性 T 細胞による NK 細胞活性化が担っている可能性が示唆された。

### 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には、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пит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、MHC class II 遺伝子多型がレトロウイルス感染防御に与える効果を検証するため、マウスモデルを用いて感染初期の細胞性免疫応答を解析した。過去の解析から、MHC class II 分子により提示され、CD4 陽性 T 細胞によって認識される単一の抗原エピトープを用いて、強力なレトロウイルス感染防御免疫を誘導出来ることがわかっているが、このペプチドワクチンによる防御効果には、意外にも CD8 陽性 T 細胞の存在は必要なく、NK 細胞の存在が必須であると考えられた。そこで、レトロウイルス感染細胞が如何にして NK 細胞により認識されるか、またその認識を抑制すると感染病態にどのような

変化が起こるかを分子レベルで解析した。

### B. 研究方法

#### 1) 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)F<sub>1</sub> (CB6F<sub>1</sub>) 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。

#### 2) 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。

#### 3) Real-time PCR による遺伝子発現の定量

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、以下のプライマーとプローブを用いて、real-time PCR により mRNA 発現量を定量した：  
*Rae1* forward, CGCCATCATTTTATGATTCAGAAG, reverse, TGGTCAAGTTGCACCTAAGAGAGT, probe, TACTGAGCTATGGATACACCAACGGGCTZ;  
*Qa-1<sup>b</sup>* forward, AGATCTCTAAGCACAAGTCAGAGGC, reverse, TCATTTCCCAGCCGTAGGTATC, probe, TGAGGCCACCAACAGAGGGCATZ;  
*F-MuLV env* forward, GCTGCGAGACAACCGGTAGA, reverse,

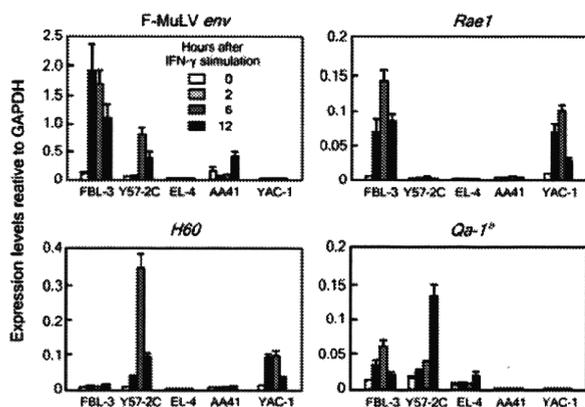


図1. 精製NK細胞による傷害試験の標的とした細胞株の各種NK受容体リガンド発現

GCATACCTGAACAGCCTGGTTA, probe, TTCTTGGGACTACATCACAGTZ.

#### 4) 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。マウスのRAE-1には $\alpha$ から $\epsilon$ までのアイソフォームがあり、系統により発現する分子が異なるが、今回用いた抗RAE-1抗体は全てのアイソフォームと反応する。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<sup>b</sup>ハプロタイプに対応するアレルの産物と反応する単クローン抗体で検出した。

#### 5) 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。得られたDX5陽性画分は95%以上DX5陽性で85%以上がNK-1.1とDX5にともに陽性であった。

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、<sup>51</sup>Cr放出試験により行った。

#### 6) NK細胞除去および受容体ブロッキング

試験管内細胞傷害試験、およびFV感染個体の生体内でのNK細胞とレトロウイルス感染標的細胞との相互作用を阻害するため、NKG2D受容体またはRAE-1リガンドに対するブロッキング抗体を添加または投与した。また、生体内でNK細胞を除去するため、抗アシアロGM1抗体の投与を行った。

#### (倫理面への配慮)

今年度の研究はマウスを用いた感染実験で

あり、動物個体の取り扱いに当たっては疼痛の防止に配慮し、動物愛護の精神に則り行った。ここに報告する動物実験については、近畿大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

#### C. 研究結果

CB6F<sub>1</sub>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陽性細胞が検出された。精製NK細胞によるYAC-1およびFBL-3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。精製NK細胞による傷害効果は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、同じFV誘発白血病細胞株でもY57-2CはEL-4と同様、精製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- $\gamma$ 刺激によっても発現誘導は起こらなかった(図1)。また、蛍光セルソータによる解析でも、YAC-1とFBL-3の表面にはRAE-1分子が強く発現していた。

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、精製NK細胞を用いた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(図2)。

一方、FV感染後に脾細胞にRAE-1発現が誘

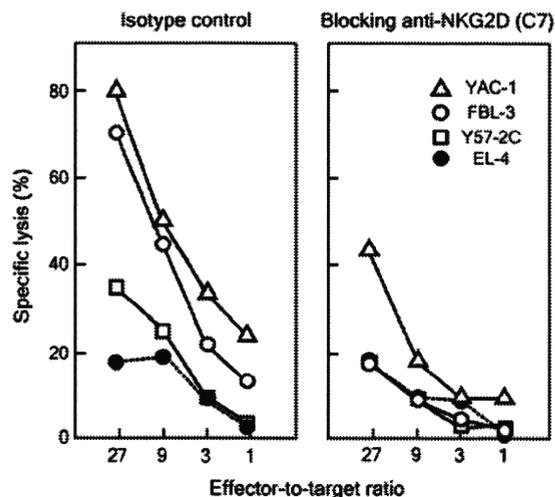


図2. NKG2D受容体のブロッキングによる標的細胞傷害の抑制

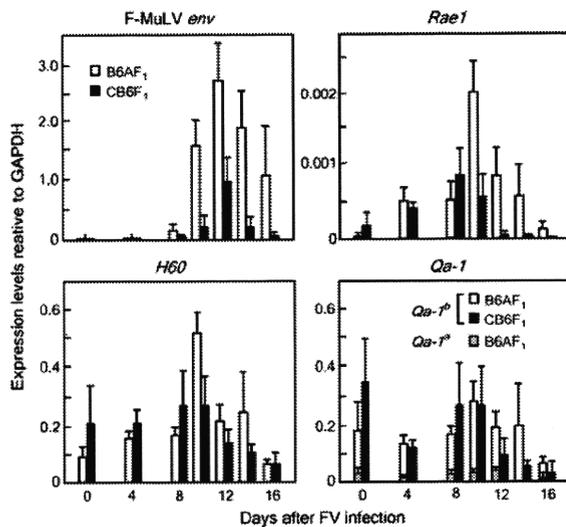


図3. FV感染後の脾臓におけるNK受容体リガンド分子の発現。

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(図3)、これに一致して、蛍光セルソータ解析でウイルスenv遺伝子産物gp70が陽性の細胞にRAE-1分子の発現が検出できるようになることが明らかとなった。

そこで、生体内で実際にNK細胞がレトロウイルス感染細胞の排除に働いていることを証明するため、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

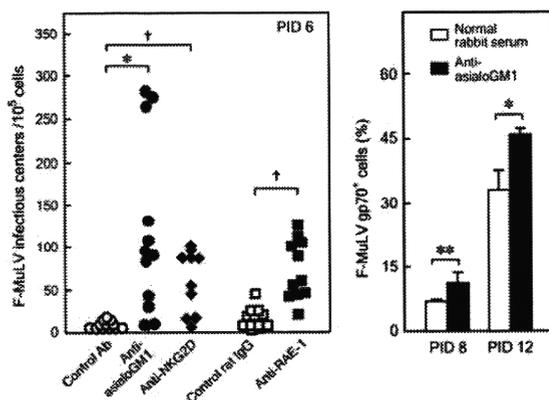


図4. NK細胞の除去またはNK受容体のブロッキングによるレトロウイルス感染病態の変化。左は感染後6日における脾臓中のウイルス産生細胞数。右は蛍光セルソータにより定量した感染細胞の割合。\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.001$ ; †,  $P < 0.0005$ 。

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(図4)。

#### D. 考察

ウイルス感染防御には一般にCD8陽性細胞傷害性T細胞(CTL)と中和抗体が主要な役割を果たすと考えられ、ワクチン開発に当たってもCTLの誘導や中和抗体産生誘導能が重視されている。ところが、我々が以前に行った解析では、CD4陽性T細胞の認識エピトープを単独で含むペプチドワクチンによるたった1回の免疫操作でレトロウイルスの感染防御が可能であり(Miyazawa, M. et al. *J. Immunol.* 155:748-758, 1995)、その際ペプチドワクチンによる感染防御にCD8陽性T細胞の存在は必要でない(Kawabata, H. et al. *Int. Immunol.* 18:183-198, 2006)。一方、同じペプチドワクチンで免疫されたマウスから抗体によってNK細胞を除去すると、CD4およびCD8陽性T細胞の数や機能に全く影響を与えないにも関わらず、感染防御能が完全に失われた(Iwanami, N. et al. *J. Virol.* 75:3152-3163, 2001)。これらの結果は、レトロウイルス感染防御に果たすNK細胞の役割を示すとともに、ワクチンによるCD4陽性T細胞の感作が、レトロウイルス感染初期にNK細胞活性化を介してウイルス産生細胞の排除を促進する可能性を示す。実際、ペプチドワクチン免疫マウスではFV感染初期にIFN- $\gamma$ 産生が亢進し、IFN- $\gamma$ に対する中和抗体を投与すると、感染防御効果が失われる(宮澤ら: 未発表データ)。しかしながら、レトロウイルス感染細胞をNK細胞がどのように認識するかは、明らかでなかった。

今回我々は、FV感染マウスから精製したCD8陰性・DX5陽性細胞が試験管内で強いNK活性を示すこと、精製NK細胞で傷害され易いYAC-1およびFBL-3細胞は、共通してNKG2DリガンドであるRAE-1を発現しているが、傷害を受けにくいY57-2CやEL-4はRAE-1発現を欠くこと、NKG2D受容体をブロックする抗体は、FV感染マウスから精製したNK細胞による標的細胞傷害を強く阻害することを明らかにした。即ち、NK細胞によるレトロウイルス感染細胞の認識と傷害には、主にNKG2DとそのリガンドであるRAE-1が関与していると考えられる。

更に、FV感染宿主からNK細胞を除去すると感染早期のウイルス産生細胞数が有意に増加し、NKG2D受容体やRAE-1リガンドのブロッキングによっても同様の効果が得られた。このことから、NK細胞は確かに、生体内でNKG2Dと

RAE-1 の相互作用を介してレトロウイルス感染細胞の排除に働いていることが証明された。

FV 感染マウスの脾臓では、感染後の経過に伴って RAE-1 の発現が上昇した。HIV-1 感染細胞でも NKG2D リガンドの発現が上昇することが知られており、これには少なくとも部分的に Vpr による感染細胞の染色体 DNA 傷害が関与すると言われている。FV 感染において RAE-1 の発現誘導が起こるしくみは今のところ不明であるが、予備的な実験でウイルスの複製過程そのものが RAE-1 発現を誘導することを示すデータが得られている。

今後ワクチン開発に当たっては、ウイルス感染初期に NK 細胞を活性化するようなサイトカイン産生を誘導する方策も重要になると考える。

## E. 結論

マウスレトロウイルスの感染初期には NK 細胞が活性化され、NK 細胞は主に NKG2D 受容体を介して、感染細胞上の RAE-1 分子を認識する。レトロウイルス感染宿主から精製した NK 細胞による標的細胞傷害は NKG2D をブロックすることで阻害され、ウイルス感染マウスから NK 細胞を除去したり、NKG2D または RAE-1 に対するブロッキング抗体を投与したりすると、感染細胞数が有意に増加する。

CD4 陽性 T 細胞を単独で活性化させるペプチドワクチンによる感染防御能は、NK 細胞を除去することで失われることがわかっており、今後のワクチン開発に当たっては、細胞傷害性 T 細胞や中和抗体産生の誘導だけでなく、感染初期に NK 細胞を活性化させるようなサイトカイン環境を生み出すことも考慮されるべきである。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 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<sup>+</sup> T cells by rapid induction of multiple inhibitory receptors. *J. Immunol.* **184**:4696-4707, 2010.

2) 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.

3) Takamura, S. and M. Miyazawa. Response to comment on "Premature terminal

exhaustion of Friend virus-specific effector CD8<sup>+</sup> T cells by rapid induction of multiple inhibitory receptors." *J. Immunol.* **185**: 1349-1350, 2010.

4) Naruse, T. K., Z. Chen, R. Yanagida, T. Yamashita, Y. Saito, K. Mori, H. Akari, Y. Yasutomi, M. Miyazawa, T. Matano, and A. Kimura. Diversity of MHC class I genes in Burmese-origin rhesus macaques. *Immunogenetics* **62**: 601-611, 2010.

5) Sugimoto C., S. Watanabe, T. Naruse, E. Kajiwara, T. Shiino, N. Umano, K. Ueda, H. Sato, S. Ohgimoto, V. Hirsch, F. Villinger, A. A. Ansari, A. Kimura, M. Miyazawa, Y. Suzuki, N. Yamamoto, Y. Nagai, and K. 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. 学会発表

1) 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。

2) 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.

3) 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。

4) 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。

## 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

**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免疫学的実行因子をタンパク質レベルで同定するための方法について、サイトカインアレイ法の評価を行った。マイクロビーズ上で免疫学的に液性因子を捕捉して蛍光シグナルを有する抗体を利用してこれを定量する方法を利用し、T 細胞に対する HIV-1 感染系を評価モデルに使用した。本研究により本法が感度と再現性に優れた液性因子評価系であり、本法を利用すれば heterologous challenge 抵抗性のサル個体に存在すると期待される抗ウイルス表現型を規定する免疫因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ると期待される。

**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おい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の同定が可能になると期待される。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。

本年度はこれまでの遺伝的スクリーニングとは異なり、タンパク質レベルでの免疫学的因子探索系について評価を試みた。プロテオミクスアプローチでは細胞や血清タンパク質を網羅的に解析するが、その中から我々が理解したい病態には免疫学的因子が密接に関連するため、最も有用と思われ、かつ感度と操作性に優れたサイトカインプロファイリング法を試行した。SIV 感染系からのサンプルは量が極めて限られているため、本研究ではヒト T 細胞に対する HIV-1 感染系をモデルとした。本研究により、heterologous challenge に抵抗性のサル由来の血清を利用すれば SIV 耐性を規定する免疫因子を突き止めるために有用なサイトカインプロファイルを得る事ができると期待される。

## B. 研究方法

サイトカインアッセイはヒトサイトカイン/ケモカインキット (#MPXHCYTO60KPMX42; Millipore) を利用した。このシステムは 42 種類の液性因子を同時に高感度に検出する実験系で、原理は蛍光サンドイッチ ELISA であるが、ビーズ上で反応を行ってフローサイトメトリーを模

した検出系で高感度な検出を行うものである。各サイトカインの検出下限は overnight protocol を利用すれば一桁の pg/ml レベルになる。サンプル量は 20 ul 程度で測定可能であるため、量が限られているサンプルへの応用には非常に適している。細胞にはヒト T 細胞株 Jurkat、MOLT-4、MT-4、健常人由来末梢血単核球 (PBMC)、PBMC から MACS 磁気ビーズを利用して CD4 陽性 T 細胞を収集した細胞集団と、健常人由来 PBMC を EBV で不死化して得られた B-LCL を対象とした。RPMI1640 培養液に 10%の胎児ウシ血清を添加したものにペニシリン・ストレプトマイシンを加えたものを水蒸気で飽和した 5%炭酸ガス存在下で 37°Cにて培養した。これに 293T にプロウイルス DNA をトランスフェクションして得られた HIV-1 を暴露して、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。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

## C. 研究結果

HIV-1 暴露前の状況で各細胞における特徴的なサイトカインとして、MOLT-4 が VEGF、MT-4 が MIP-1 アルファ、RANTES、sIL-2Ra をそれぞれ ng/ml レベルで産生した。一方 PBMC は複数の細胞腫が混在する事から T 細胞株とは異なる複数のサイトカイン産生プロファイルが観察された。特徴的なサイトカインとしては、IL-8 と MCP-10 が ng/ml レベルで産生されていた。CD4 陽性 T 細胞では IL-1ra、IL-8、MCP-1、MDC、sIL-2Ra が、B-LCL では MDC、RANTES が ng/ml レベルで産生されていた。