

SeV-Gag ベクター筋注実験では、第Ⅲ群で効率よい Gag 特異的 CTL 誘導が認められたものの、第Ⅳ群の 6 頭中 5 頭では Gag 特異的 CTL 誘導が認められなかった。SeV-Gag ベクター接種前に SeV 感染を行った pre-SeV 感染群の第Ⅱ群・第Ⅳ群とも、SeV-Gag ベクター接種時に 1:50 - 1:100 の抗 SeV 中和抗体価を示したが、誘導される Gag 特異的 CTL レベルは経鼻接種(第Ⅱ群)の方が筋注(第Ⅳ群)と比較して有意に高かった。

(2) SIV 抗原特異的 CTL レベルと CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能の相関の有無の検討: *in vitro* の SIV 複製抑制能の解析では、ワクチン接種後に SIV 複製抑制能を有する CD8 陽性細胞が誘導されていることが確認された(図 1)。SIV の各抗原について特異的 CTL レベルと SIV 複製抑制能との相関の有無を検討してみたところ、相関を示すものは限られていた。その中で Gag206-216・Gag241-249 特異的 CTL レベルおよび Vif 特異的 CTL レベルについては、SIV 複製抑制能との有意な相関を示した(図 2)。

(3) SIV 感染慢性期の CTL 逃避変異の解析: 90-120-Ia 陽性 SIV 感染サル R01-007 では、Gag206-216 特異的 CTL からの逃避変異として Gag L216S 変異が選択されていたが、感染 137 週目には L216S 変異が優位でなくなり、Gag D205E 変異が V340M 変異とともに優位となっていた。感染 150 週目には、この Gag206-216 特異的 CTL からの逃避変異 D205E が V340M 変異とともに選択され(D205・V340 は検出されず)、L216S 変異は検出されなくなっていた(L216 に復帰)(図 3)。

#### D. 考察

DNA プライム・SeV ベクターブーストワクチンにおいて、SeV-Gag ベクター経鼻接種だけでなく SeV-Gag ベクター筋注でも効率よく Gag 特異的 CTL 反応を誘導できることが示された。しかし、SeV-Gag ベクター筋注では、pre-SeV 感染群においては Gag 特異的 CTL 誘導が阻害され、抗 SeV 抗体の影響を受けると考えられた。一方、SeV-Gag ベクター経鼻接種では、pre-SeV 感染サルで 1:50 - 1:100 に抗 SeV 中和抗体存在下でも Gag 特異的 CTL 誘導は阻害されず、SeV ベクターワクチンの接種経路として経鼻接種が有利であることが示された。国際共同臨床試験計画を推進している IAVI およびディナベック社による世界各地の臨床検体を用いた研究より、SeV を交差認識する可能性が示唆されているヒトパラインフルエンザウイルス 1 型(hPIV-1)抗体の陽性者の解析から、抗 SeV 中和抗体価(50%阻害) 1:100 以下が 90%

以上を占めることが判明しており(AIDS Vaccine 2010)、本研究の結果は、臨床応用の障壁の一つとして留意すべき抗ベクター抗体の問題については克服できることを支持している。

本研究では、Vif 特異的 CTL レベルと CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能の相関が示されたが、このような抗原特異的 CTL レベルとウイルス複製抑制能の相関は初めての報告である。この結果は Vif 特異的 CTL の有効性を示唆するもので、有効な CTL の標的抗原として、これまで有望視されてきた Gag 抗原に加え、新たに Vif 抗原も候補として提示するものである。

CTL 逃避変異の解析では、感染慢性期に CTL 逃避変異の置換という現象を見出した。L216S 変異による SIV 複製能の低下はこれまでに報告してきた(J Exp Med 199:1709)が、Gag206-216 特異的 CTL からの逃避に結びつく D205E 変異(Microbes Infect 10:285)はさらに大きな SIV 複製能の低下を引き起こし、相補変異 V340M によって複製能回復に至ることが判明している。したがって、当初は L216S 変異が選択されるものの、慢性期に複製能の点で有利な D205E・V340M 変異に置換されたと考えられた。この結果は、CTL が逃避変異選択の後も複製能の低い変異の維持に関与していることを意味するもので、間接的にウイルス複製抑制に貢献しうること示すものとして注目される。

#### E. 結論

CTL 誘導エイズワクチンのデリバリーシステムとして SeV ベクターの接種経路の検討を行い、経鼻接種が有利であることを確認し、臨床応用の障壁の一つとして留意すべき抗ベクター抗体の問題については克服できることを支持する結果を得た。一方、サルエイズモデルにおける抗原特異的 CTL レベルと CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能の相関の有無の検討から、Gag 抗原特異的 CTL の有効性に加え、新たに Vif 抗原特異的 CTL の有効性を示唆する結果を得た。これらの結果は、CTL 誘導エイズワクチンのデリバリーシステムの最適化に結びつくとともに、至適抗原選択に向けた基盤確立に結びつく重要な成果である。

#### F. 研究発表

##### 1 論文発表

- (1) Yamamoto H, Matano T Neutralizing antibodies in SIV control: co-impact with T cells. Vaccine 28S:B13-B17, 2010.
- (2) 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 macaques. *Immunogenetics* 62:601-611, 2010.

- (3) Iwamoto N, Tsukamoto T, Kawada M, Takeda A, Yamamoto H, Takeuchi H, Matano T. Broadening of CD8<sup>+</sup> cell responses in vaccine-based simian immunodeficiency virus controllers. *AIDS* 24:2777-2787, 2010.
  - (4) Inagaki N, Takeuchi H, Yokoyama M, Sato H, Ryo A, Yamamoto H, Kawada M, Matano T. A structural constraint for functional interaction between N-terminal and C-terminal domains in simian immunodeficiency virus capsid proteins. *Retrovirology* 7:90, 2010.
  - (5) Saito A, Nomaguchi M, Iijima S, Kuroishi A, Yoshida T, Lee Y-J, Hayakawa T, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Yasutomi Y, Adachi A, Matano T, Akari H. Improved capacity of a monkey-tropic HIV-1 derivative to replicate in cynomolgus monkeys with minimal modifications. *Microbes Infect*, 13:58-64, 2011.
- 2 学会発表
- (1) 俣野哲朗. センダイウイルスベクターを用いたエイズワクチン開発. 第26回日本DDS学会、大阪、6/17/2010.
  - (2) Iwamoto N, Tsukamoto T, Kawada M, Takeda A, Yamamoto H, Takeuchi H, Matano T. Induction of broad CD8 cell responses effective against replication of a variant virus with multiple escape mutations in simian immunodeficiency virus controllers. XVIII International AIDS Conference, Vienna, Austria, 7/22/2010.
  - (3) Nomura T, Takahashi N, Yamamoto H, Naruse T, Kimura A, Matano T. The effect of MHC-I haplotypes on SIV replication in Burmese rhesus macaques. 9th International Veterinary Immunology Symposium, Tokyo, Japan, 8/19/2010.
  - (4) 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, Japan, 8/19/2010.
  - (5) Iwamoto N, Tsukamoto T, Kawada M, Takeda A, Yamamoto H, Takeuchi H, Matano T. Vaccine-based simian immunodeficiency virus controllers acquire broader CD8<sup>+</sup> cell responses able to suppress multiple escape mutant virus replication. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, 8/26/2010.
  - (6) Inagaki N, Takeuchi H, Matano T. Functional interaction between N-terminal and C-terminal domains in simian immunodeficiency virus capsid proteins. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 9/8/2010.
  - (7) Ishii H, Matano T. Risk of accelerating CTL escape mutant selection post-viral exposure by prophylactic AIDS vaccination. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 9/9/2010.
  - (8) Matano T. The effect of CTL memory induction by prophylactic vaccination on CTL dominance post-SIV exposure. US-Japan Cooperative Medical Science Program, 23th Joint Meeting of the AIDS Panels, Awaji, Japan, 9/10/2010.
  - (9) Ishii H, Matano T. Alteration of CTL dominance post-viral exposure by prophylactic AIDS vaccination. *AIDS Vaccine 2010*, Atlanta, GA, USA, 9/30/2010.
  - (10) Matano T, Matsuoka S, Ishii H, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M. Intranasal Sendai viral vector administration is more immunogenic than intramuscular in the presence of anti-vector antibodies. *AIDS Vaccine 2010*, Atlanta, GA, 9/30/2010.
  - (11) Matano T. The effect of prophylactic vaccination on CTL dominance post-SIV exposure in rhesus macaques. 11th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 10/7/2010.
  - (12) Inagaki N, Takeuchi H, Matsuoka S, Matano T. Critical amino acid residues for functional interaction between N-terminal and C-terminal domains in SIV capsid proteins. The 28th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, New Orleans, LA, USA, 10/20/2010.
  - (13) 武内寛明、俣野哲朗. ヒト細胞におけるサルエイズウイルス感染増殖能を規定するウイルス側領域. 第58回日本ウイルス学会学術集会 (O1-2-14)、徳島、11/7/2010.
  - (14) 稲垣奈都子、武内寛明、横山勝、佐藤裕徳、梁明秀、俣野哲朗. SIV CAのNドメインとCドメインの機能的相互作用に関わるアミノ酸残基の同定. 第58回日本ウイルス学会学術集会 (O1-2-15)、徳島、11/7/2010.
  - (15) 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 dominance の変化. 第58回日本ウイルス学会学術集会 (O2-2-24)、徳島、11/8/2010.
  - (16) 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 (O2-2-25)、徳島、11/8/2010.
  - (17) 高原悠佑、松岡佐織、石井洋、堀池麻里子、三浦智行、五十嵐樹彦、俣野哲朗. サルエイズモデルにおける HAART 実施前後の CTL 反応の比較. 第58回日本ウイルス学会学術集会

- (O2-2-26)、徳島、11/8/2010.
- (18) 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 (O3-2-02)、徳島、11/9/2010.
- (19) 岩本南、石井洋、山本浩之、武内寛明、俣野哲朗. CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能と抗原特異的 CTL レベルの相関の解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (O3-2-03)、徳島、11/9/2010.
- (20) 中根拓、山本浩之、俣野哲朗. サル免疫不全ウイルス全粒子を抗原とする ELISA 法を用いた液性免疫応答の解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (P3-093)、徳島、11/9/2010.
- (21) 俣野哲朗. エイズワクチン開発：国際共同臨床試験プロジェクト. 第 13 回ヒューマンサイエンス総合研究ワークショップ、東京、11/25/2010.
- (22) 齊藤暁、河野健、黒石歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、保富康宏、俣野哲朗、明里宏文. カニクイザルにおける第 3 世代サル指向性 HIV-1 の増殖の解析. 第 24 回日本エイズ学会学術集会、東京、11/25/2010.
- (23) 齊藤暁、河野健、黒石歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、保富康宏、俣野哲朗、明里宏文. カニクイザル TRIM5 allele がサル指向性 HIV-1 の増殖に与えるインパクト. 第 24 回日本エイズ学会学術集会、東京、11/25/2010.
- (24) 俣野哲朗. エイズワクチン開発：HIV 感染症克服への挑戦. 第 24 回日本エイズ学会学術集会、東京、11/26/2010.
- (25) 石井洋、岩本南、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗. CTL 誘導型予防 AIDS ワクチンの抗原選択が CTL エスケープ変異出現に与える影響. 第 24 回日本エイズ学会学術集会、東京、11/26/2010.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

- 1 特許取得  
なし。
- 2 実用新案登録  
なし。
- 3 その他  
なし。

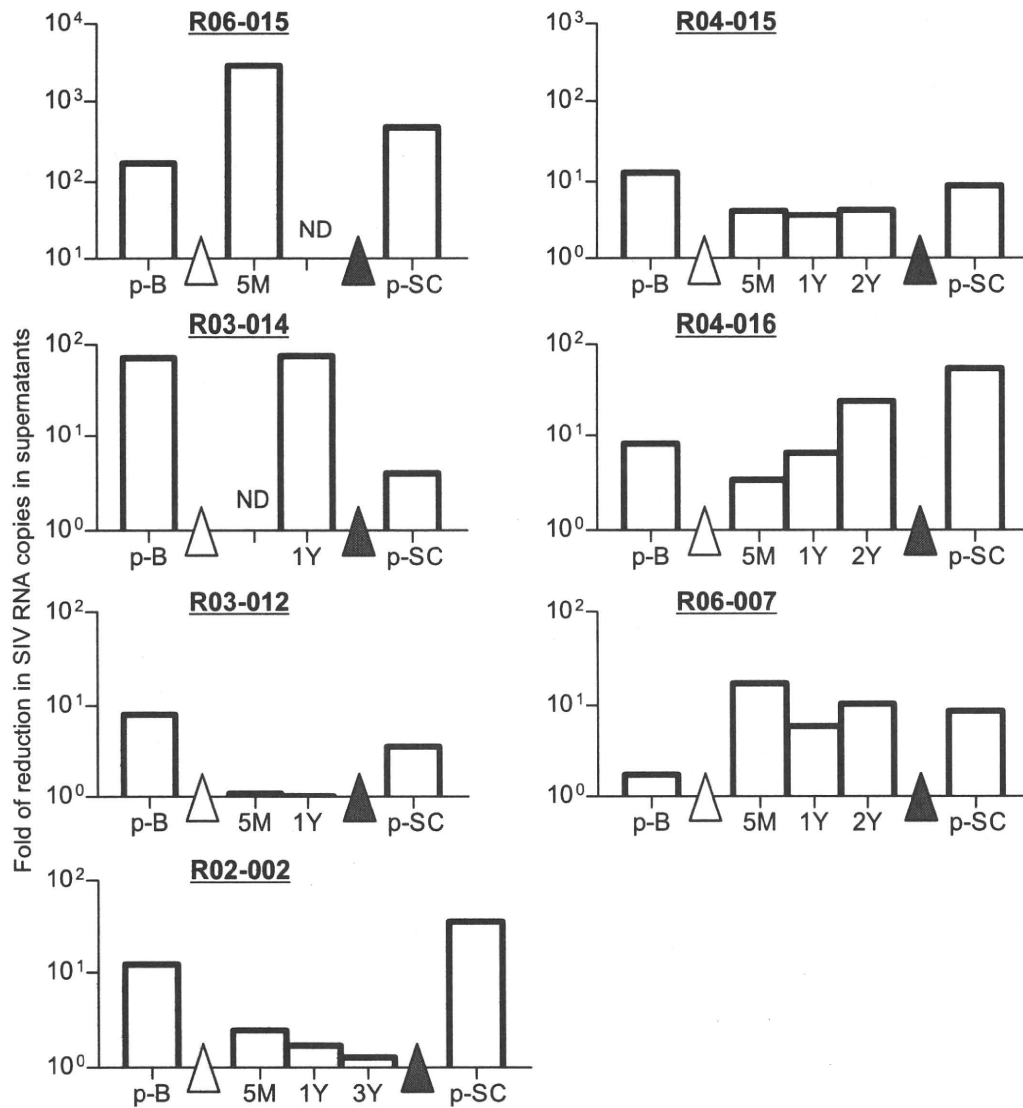


図1. SIV複製制御群のCD8陽性細胞のin vitroでのSIV複製抑制能の経時変化

Gag (R06-015, R03-014, R03-012, R02-002) あるいはGag206-216・Gag241-249エピトープ (R04-015, R04-016, R06-007) を主抗原とするワクチン接種後のSIVチャレンジ実験で、SIV複製制御に至ったハプロタイプA共有サル群の各タイムポイント (p-B: ワクチン[ブースト]接種後、5M・1Y等: チャレンジ後5カ月・1年等、p-SC: 変異SIVスーパーチャレンジ後) の末梢血より分離したCD8陽性細胞のin vitroでのSIV複製抑制能を示す。末梢血より分離しCD8陽性細胞を除外したCD8陰性リンパ球にSIVを感染させた後、CD8陽性リンパ球を加えた共培養の上清中に産生されるSIV量 (SIV gag RNAコピー数) が、CD8陽性リンパ球を加えない培養系で上清中に産生されるSIV量と比べて何倍低下するかを表示した。

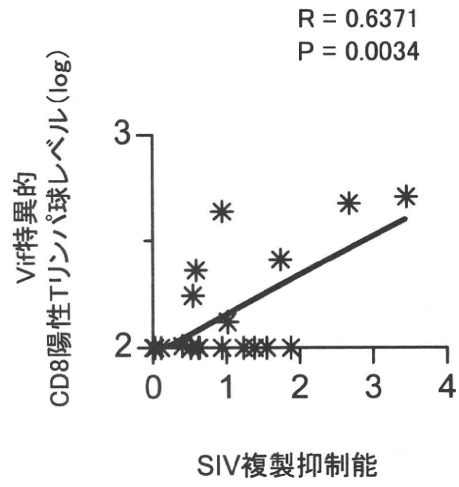
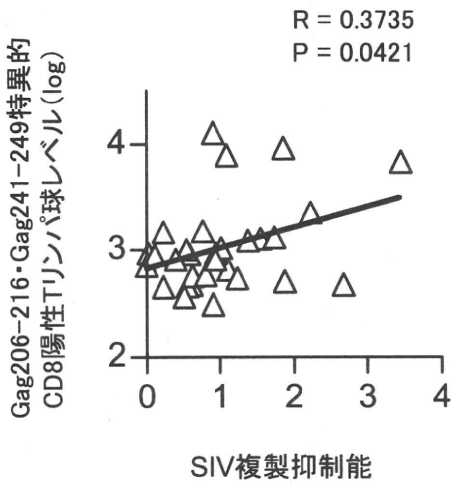


図2. 抗原特異的CTLレベルとCD8陽性細胞のin vitroでのSIV複製抑制能との相関  
SIV複製制御サル群の感染初期と慢性期の各タイムポイントの末梢血リンパ球を用い、各種SIV抗原特異的CD8陽性Tリンパ球レベルおよびCD8陽性細胞のin vitroでのSIV複製抑制能を測定し、両者の相関の有無を調べた。Gag206-216・Gag241-249特異的CD8陽性Tリンパ球レベルおよびVif特異的CD8陽性Tリンパ球レベルがSIV複製抑制能との有意な相関を示した。



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

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

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

多くの感染病原体は呼吸器や消化器等の粘膜より感染し、粘膜のみならず全身の病態を左右する。このために最も初期の粘膜面での免疫反応の誘導が感染防御に重要である。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) をベクターとし、経口投与可能な粘膜免疫誘導型エイズワクチンの開発を試みた。HEV の VLP に HIVenv の V3 の中和抗体誘導領域を発現させるキメラ VLP を作製し (HEV-VLP/HIVenv)、これを経口投与ベクターとした。この HEV-VLP/HIVenv 内部にカルシウムキレート法により、HIVgag および SIVgag DNA ワクチンを封入した (HEV-VLP/HIVenv-HIVgag、HEV-VLP/HIVenv-SIVgag) これらをマウスに経口投与したところ、粘膜ならびに全身での HIVenv ならびに SIVgag 特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) の誘導が確認された。また、これらの結果からこの系をカニクイザルを用いた系でも行っており (HEV-VLP/HIVenv-SIVgag)、現在検討中である。

A. 研究目的

多くの感染症が粘膜より感染を示すが、エイズウイルスにおいても性交渉を主とした粘膜感染が最も問題となっている。感染を防ぐためにはウイルス進入経路である粘膜面での免疫反応が最も重要となるが、粘膜の免疫誘導は粘膜面に直接抗原を運び誘導することが必要である。また、粘膜の免疫反応は一箇所の粘膜で誘導された免疫反応が全身の粘膜に誘導されるという特徴を持つ。このことから最も簡便な粘膜免疫の誘導ワクチンは経口投与可能なものであると推察される。しかしながら経口投与では種々の酵素や極端な酸性状態等により、ワクチン抗原が抗原性を保持したまま免疫担当器官に到達させることは極めて困難である。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) をベクターとし、経口投与可能な粘膜免

疫誘導型エイズワクチンの開発を試みた。

B. 研究方法

1. マウスへの HEV-VLP/HIVenv-HIVgag 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 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-1env 抗原エピトープを表出させ、その VLP に HIV-1gag DNA ワクチンを封入したものを免役した群 (HEV-VLP/HIVenv-HIVgag : E+G 群)、 HIV-1env エピトープを持たないもとの HEV-VLP に HIV-1gag DNA ワクチンを封入したものを免役した群 (HEV-VLP/-HIVgag 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 (HEV-VLP/HIVenv ; E 群、または HEV-VLP ; C 群) を免役した群の 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-I10 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。(図 1、2)。

### 2. カニクイザルに対する経口ワクチン (HEV-VLP/HIVenv-SIVgag) 投与実験

SPF カニクイザルに HEV-VLP-SIVgag および HEV-VLP/HIVenv-HIVgag を HEV-VLP/HIVenv-HIVgagVLP 量として 10mg 投与した(図 3)。

### 3. 倫理面への配慮

本研究では動物実験申請等の必要な委員会での承認は既に得ており、ヒトサンプル、情報等は一切用いていない。

## C. 研究結果

### 1. 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 INF- $\gamma$  産生細胞を腸管関連リンパ組織で認められた (図 4 A)。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 4 B)。

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 5)。

### 2. カニクイザルに対する経口ワクチン (HEV-VLP/HIVenv-SIVgag) 投与実験

SPF カニクイザルに HEV-VLP-SIVgag および HEV-VLP/HIVenv-HIVgag を HEV-VLP/HIVenv-HIVgagVLP 量として 10mg 投与し、現在観察中である。

## D. 考 察

粘膜免疫を誘導するためには抗原を直接、適切な形態で伝達しなければならず、それに加えて細胞性免疫を誘導するためには細胞質内での抗原発現が必要となる。これらのことから報告の最も多いのは呼吸器粘膜にウイルスベクターを用いてワクチンとする方法である。経口投与ワクチンは呼吸器粘膜を標的とした径鼻ワクチンに比べ、安全性や簡便性、多くのヒトを用いた治験が可能、乳幼児でも用意等の数多くの利点を持つ。しかしながら経口投与は数多くの酵素等の存在による消化器の状態から安定的に抗原を消化器粘膜に発現させることが極めて困難であると考えられてきた。本研究ではこの点を経口感染を示すウイルスである HEV を用いることで消化器粘膜に抗原を発現させることに成功した。また、ウイルスを使用せず VLP を用いることで、



生体内での複製が無く安全性が極めて高いことも大きな利点となっている。さらに VLP に抗原を発現させたキメラ VLP により抗原を認識させるという独自の手法も用いられている。また、通常経口投与では免疫誘導効果の無い DNA ワクチンを経口投与にて粘膜および全身的に免疫誘導を行った。以上のことから本研究では抗原発現キメラ VLP を用いた粘膜免疫誘導型経口ワクチンの可能性が示された。今後の霊長類を用いた確認も期待される。

#### 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. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yoshida, T., Saito, A., Iwasaki, Y., Iijima, S., Kurosawa, T., Katakai, Y., Yasutomi, Y., Reimann, K.A., Hayakawa, T. and Akari, H. Characterization of natural killer cells in tamarins: a technical basis for studies of innate immunity. *Frontiers Microbiol.* 2011 in press
2. Xing, Li., Wang, J.C., Li, T-C., Yasutomi, Y., Lara, J., Khurdyakaov, Y., Schofield D., Emerson, S., Purcell, R., Takeda, N., Miyamura, T. and Holland, R.C. Spatial configuration of hepatitis E virus antigenic domain. *J. Virol.* 2011;85:1117-1124.
3. Chono, H., Matsumoto, K., Tsuda, H., Saito, N., Lee, K., Kim, S., Shibata, H., Ageyama, N., Terao, K., Yasutomi, Y., Mineno

J., Kim, S., Inoue, M. and Kato, I. Acquisition of HIV-1 resistance in T lymphocytes using an ACA-specific E.coli mRNA interferase. *Human Gene Ther.* 2011;22:35-43.

4. Saito, A., Nomaguchi, M., Iijima, S., Lee, Y-J., Kono, K., Nakayama, E.E., Shioda, T., Yasutomi, Y., Adachi, A., Matano, T., Akari, H. A novel monkey-tropic HIV-1 derivative encoding only minimal SIV sequences can replicate in cynomolgus monkeys. *Micorbes Infect.* 2011;13:58-64.
  5. Naruse, T.K., Zhiyong, C., Yanagida, R., Yamashita, T., Saito, Y., Mori, K., Akari, H., Yasutomi, Y., Matano, T. and Kimura, A. Diversity of MHC class I genes in Burmese-origine rhesus macaques. *Immunogenetics* 2010;62:601-611.
  6. Okabayashi, S., Uchida, K., Nakayama, H., Ohno, C., Hanari, K., Goto, I. and Yasutomi, Y. Periventricular Leucomalacia (PVL)-like lesions in two neonatal cynomolgus monkeys (macaca fascicularis). *J.Comp.Pathol.* 2010 Epub
  7. Yasuhiro Yasutomi. Establishment of Specific Pathogen-Free Macaque Colonies in Tsukuba Primate Research Center of Japan for AIDS research. *Vaccine* 2010;B75-B77.
  8. Fujimoto, K., Takano, J., Narita, T., Hanari, K., Shimozawa, N., Sankai, T., Yoshida T., Terao, K., Kurata, T. and Yasutomi, Y. Simian Retrovirus type D infection in a colony of cynomolgus monkeys. *Comp.Med.* 2010;60:51-53.
  9. Cueno, M.E., Karamatsu, K., Yasutomi, Y., Laurena, A.C. and Okamoto, T. Preferential expression and immunogenicity of HIV-1 Tat fusion protein expressed in tomato plant. *Transgenic Res.* 2010;19:889-895.
- ##### 2. 学会発表
- 「国内」
- 1) 塩釜ゆみ子、松原明弘、河岡義裕、保富康宏：ヘルパーT細胞(Th)制御によ

るインフルエンザ感染病態とワクチン効果の検討第 13 回日本ワクチン学会 東京 2010 年 12 月 11 日-12 日

2) 保富康宏: アジュバント分子組み込みエイズウイルスの開発 (シンポジウム) 第 24 回日本エイズ学会、東京、2010 年 11 月 24 日~26 日

3) 齊藤暁、河野健、黒石歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、保富康宏、俣野哲朗、明里宏文: カニクイザル TRIM5 allele がサル指向性 HIV-1 の増殖に与えるインパクト第 24 回日本エイズ学会、東京、2010 年 11 月 24 日~26 日  
4) 下澤律浩、高橋一郎、柴田宏昭、伊奈田宏康、野阪哲哉、保富康宏: カニクイザル体細胞に由来する人工多能性幹細胞の作製第 57 回日本実験動物学会、京都、2010 年 5 月 12 日~14 日

「国際」

1) Yusuke TSUJIMURA, Yasuhiro YASUTOMI: Therapeutic effects of Ag85B in allergic asthma by inducing not only Th1 response but also Interleukin-17, -22 production. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology. Kobe Japan, August 22-27, 2010.

2) Akihiro Matsubara, Kenta Watanabe, Mitsuo Kawano, Satoru Mizuno, Yusuke Tsujimura, Hiroyasu Inada, Masayuki Fukumura, Isamu Sugawara, Tetsuya Nosaka, Kazuhiro Matsuo, Yasuhiro Yasutomi: Intranasal immunization with replication-deficient recombinant human parainfluenza type 2 virus-Ag85B showed protective effects against *Mycobacterium tuberculosis* infection. TB Vaccines. A Second Global Forum, Tallinn, Estonia September 21-24, 2010.

3) Yasuhiro Yasutomi: Gene delivery of suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) showed therapeutic effects to autoimmune myocarditis in mice. 2<sup>nd</sup> Annual

International Congress of Cardiology, Shanghai, China, December 7-9, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特許出願

(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 (PCT/JP2010/069435)

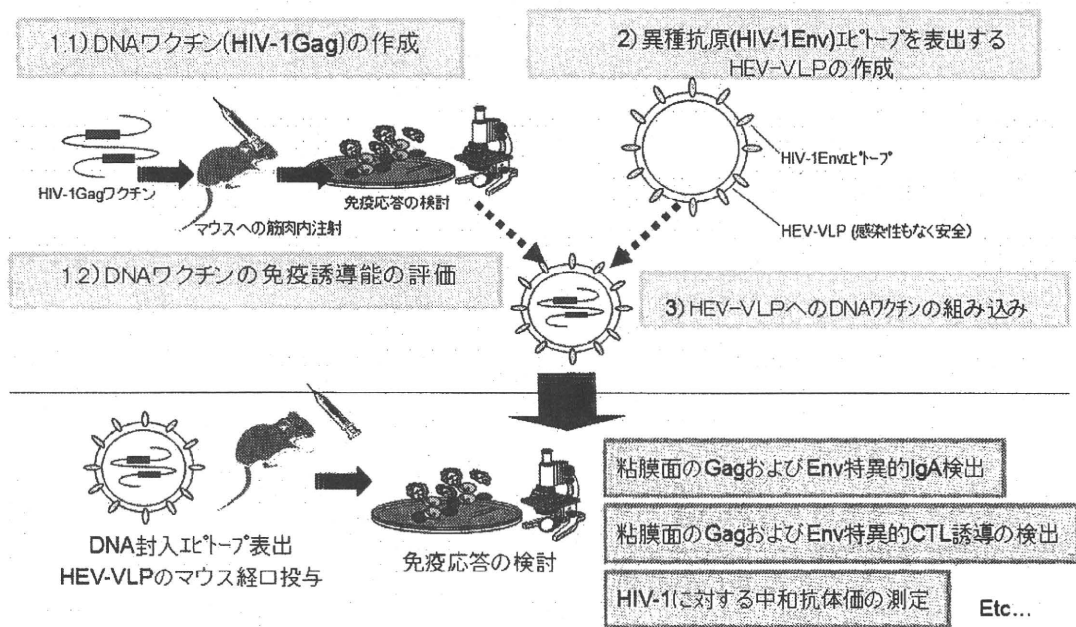


図1. HEV-VLP/HIVenv-HIVgag 作製法

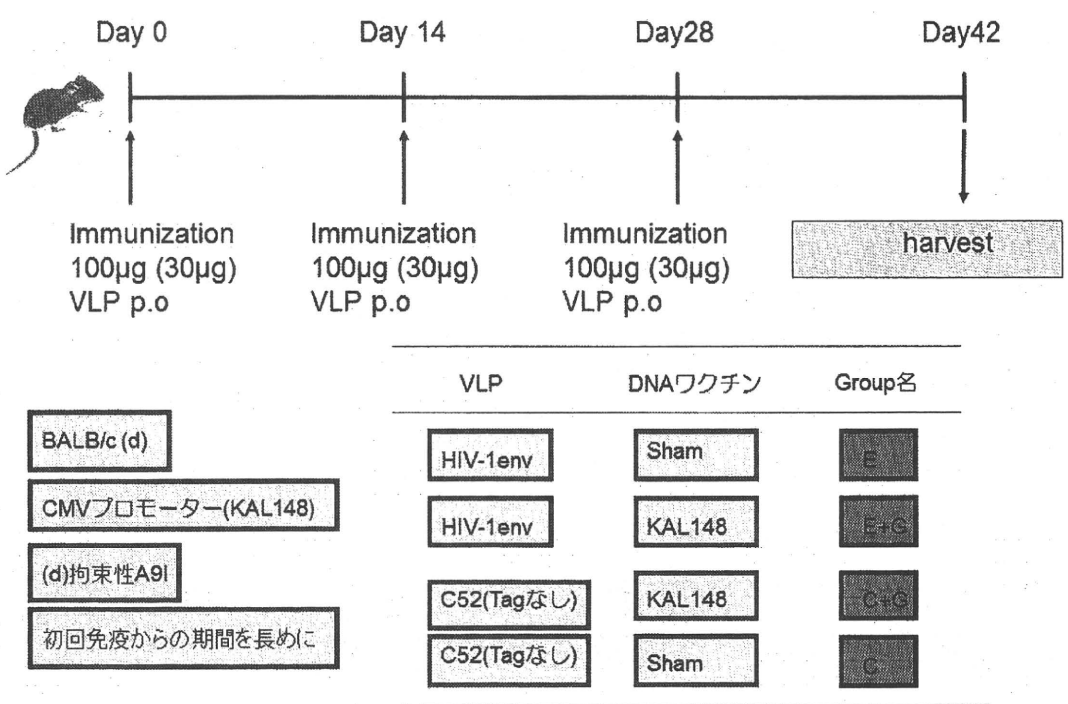


図2. 経口投与ワクチン免疫スケジュール

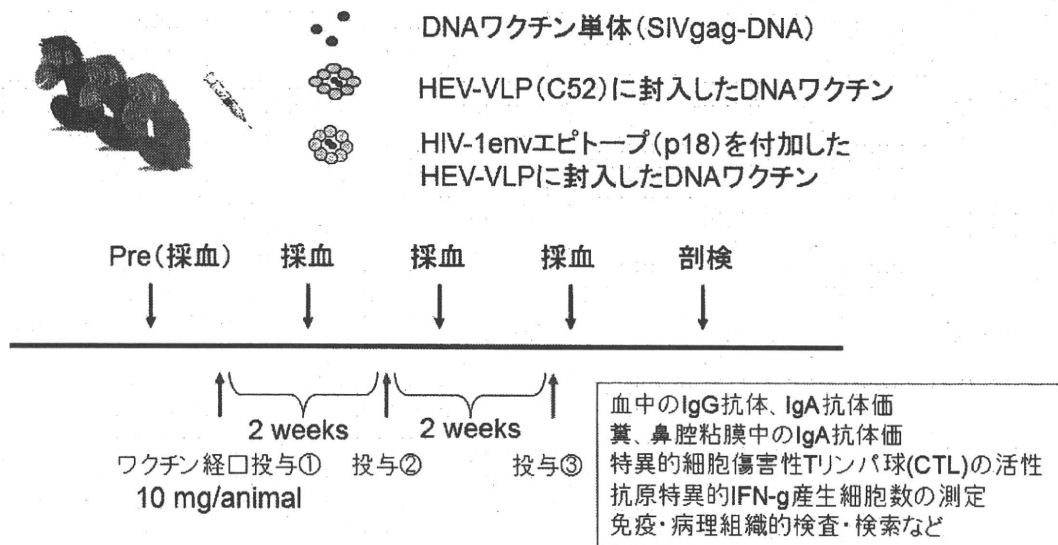


図3. カニクイザルへの経口ワクチン投与スケジュール

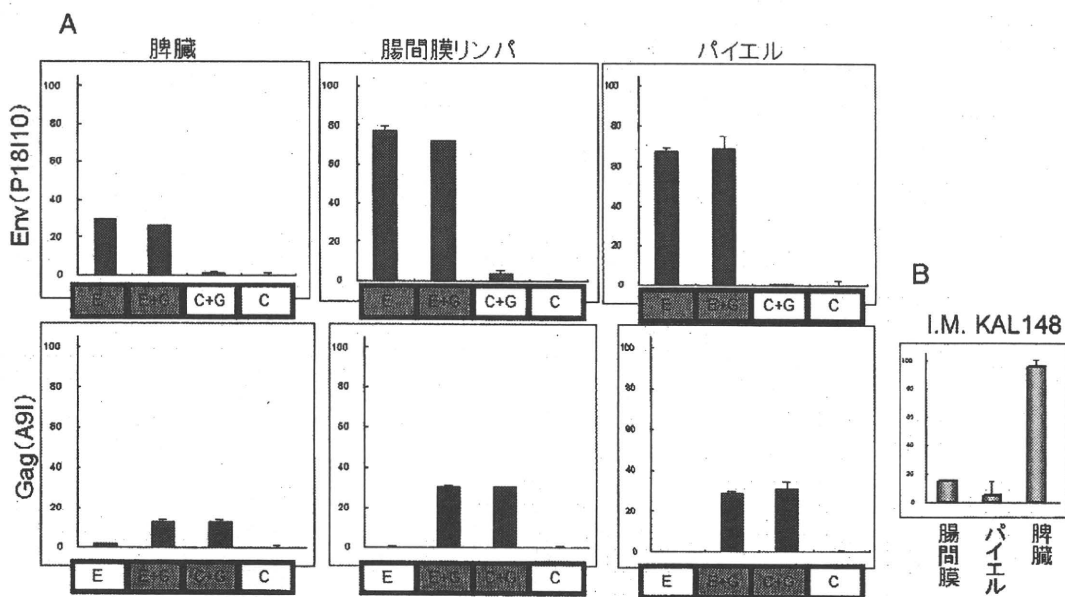


図3. ワクチン投与におけるELISPOT assay (A)VLPを用い経口投与ワクチン (B)DNAワクチンの筋肉内接種

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とする。平成 22 年度は、日本人感染者の HLA クラス I タイプと Gag タンパク質アミノ酸配列を統計学的に解析することにより、HLA 関連変異（推定的 CTL 逃避変異）を同定した。

#### 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) のアミノ酸配列と患者の HLA 情報から統計的手法を用いて、各 HLA アリル特異的ウイルスアミノ酸変化を検出し、それらを推定的 CTL エスケープ変異として定義し、日本人 HLA に特異的なエピトープ、及びそれからのエスケープ変異の同定に役立てる。

#### 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。

(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されている。

#### C. 研究結果

医科研病院に通院する HIV-1 サブタイプ B に感染している未治療の日本人 163 人の血漿から得られたウイルス Gag タンパク質のアミノ酸配列とそれぞれの HLA クラス I タイプから、統計学的手法により HLA 関連アミノ酸変異を同定した。Table 1 に示すように計 21 個同定され、そのうち 13 個は adapted mutations (対応する HLA を発現する患者で有意に多く観察された) と表現され、逆に対応する HLA タイプの患者に明らかに少ない変異は nonadapted mutations と表現され、8 個同定された (従って、位置として重複する場合がある)。したがって、これらが仮想的な CTL エスケープ変異 (または位置) となる。これら同定された HLA 関連変異のうち、Los Alamos National Laboratory HIV database 上で報告されている CTL エピトープ部位に一致しているものは約半数も (adapted では 6/13、nonadapted では 5/8) あり、table 内では赤字で示した。この手法により検出された HLA 関連変異は、比較的高率に実際の CTL エスケープ変異を反映している可能性が示唆された。

## D. 考察

ウイルスのアミノ酸変異が実際に CTL 反応からの逃避であるかは、インターフェロンガンマ ELISPOT アッセイなどによる実験的証明が必要だが、そのようなアプローチではエスケープ変異を系統立てて HIV タンパク質全体に渡って検出することは困難である。代わりに、エスケープ変異を見つけるために近年行われるようになってきた手法では、これらエスケープ変異が各 HLA アリル特異的に出現することを利用し、数百の患者さんの HLA 情報とその体内のウイルスアミノ酸配列から統計学的手法を用いて、各 HLA アリル特異的に関連するウイルスアミノ酸変化を検出し、それらを推定的 CTL エスケープ変異として定義し、ウイルスアミノ酸配列上にマッピングしている。各 HLA アリルの頻度は人種間で大きく異なっているため、HIV アミノ酸配列の変異パターンは人種間で大きく異なっていることは必ずである。実際に今回同定された HLA 関連変異を欧米の研究から同定されたリストと比較すると、21 個のうち半数しか報告されておらず、CTL ワクチンの開発を考えた時に、各地域のヒト集団に応じたエピトープ同定の重要性が示唆された。

## E. 結論

日本人の間で流行するサブタイプ B ウイルスの Gag タンパク質内の推定的 CTL 逃避変異 (HLA 関連変異を同定した。欧米 (主に白人及び黒人) のデータを用いて定義された HLA 関連変異との比較を通じ、人種間での HLA アリル頻度の差が各地域で流行するウイルス上の HLA 関連変異の蓄積に与える影響について検討し、CTL ワクチンデザインに与える影響についても検討していく。

## F. 研究発表

### 1 論文発表

1. Brumme, ZL., Li, C., Miura, T., Sela, J., Rosato, PC., Brumme, CJ., Markle, T., Martin, E., Block, BL., Trocha, T., Kadie, CM., Allen, TM., Pereyra, F., Heckerman, D., Walker, BD., Brockman, MA. Reduced replication capacity of NL4-3 recombinant viruses encoding RT-Integrase sequences from HIV-1 elite controllers. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome*.56(2), 100-108, 2011.
2. Nakamura, H., Miyazaki, N., Hosoya, N., Koga, M., Odawara, T., Kikuchi, T., Koibuchi, T., Kawana-Tachikawa, A., Fujii, T., Miura, T., Iwamoto, A. Long-term successful control of super-multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 infection by a

novel combination therapy of raltegravir, etravirine, and boosted-darunavir. *J Infect Chemother*.17(1),105-110, 2011.

3. Gesprasert G, Wichukchinda N, Mori M, Shiino T, Auwanit W, Sriwanthana B, Pathipvanich P, Sawanpanyalert P, Miura T, Auewarakul P, Thitithanyanont A, Ariyoshi K. HLA-associated immune pressure on Gag protein in CRF01\_AE-infected individuals and its association with plasma viral load. *PLoS One*. 5(6):e11179. 2010.
  4. Miura, T., Z. L. Brumme, M. A. Brockman, P. Rosato, J. Sela, C. J. Brumme, F. Pereyra, D. E. Kaufmann, A. Trocha, B. L. Block, E. S. Daar, E. Connick, H. Jessen, A. D. Kelleher, E. Rosenberg, M. Markowitz, K. Schafer, F. Vaida, A. Iwamoto, S. Little, and B. D. Walker. Impaired replication capacity of acute/early viruses in persons who become HIV controllers. *J Virol* 84:7581-91, 2010.
  5. Wright, JK., Brumme, ZL., Carlson, JM., Heckerman, D., Kadie, CM., Brumme, CJ., Wang, B., Losina, E., Miura, T., Chonco, F., van der Stok, M., Mncube, Z., Bishop, K., Goulder, PJ., Walker, BD., Brockman, MA., Ndung'u, T. Gag-protease-mediated replication capacity in HIV-1 subtype C chronic infection: associations with HLA type and clinical parameters. *J Virol* 84:10820-31. 2010.
  6. Julg, B., Pereyra, F., Buzon, MJ., Piechocka-Trocha, A., Clark, MJ., Baker, BM., Lian, J., Miura, T., Martinez-Picado, J., Addo, MM., Walker, BD. Infrequent recovery of HIV from but robust exogenous infection of activated CD4(+) T cells in HIV elite controllers. *Clin Infect Dis* 51:233-8.2010.
  7. Brockman, M. A., Brumme, ZL., Brumme, CJ., Miura, T., Sela, J., Rosato, PC., Kadie, CM., Carlson, JM., Markle, TJ., Streeck, H., Kelleher, AD., Markowitz, M., Jessen, H., Rosenberg, E., Altfeld, M., Harrigan, PR., Heckerman, D., Walker, BD., Allen, TM. Early selection in Gag by protective HLA alleles contributes to reduced HIV-1 replication capacity that may be largely compensated in chronic infection. *J Virol*. 84(22):11937-49. 2010.
- ### 2 学会発表
- 1) 菊地正、堀本研子、藤井毅、安達英輔、今井健太郎、清水少一、古賀道子、中村仁美、鯉渕智彦、立川愛、三浦聡之、河岡義裕、岩本愛吉 HIV 感染者における 2009 パンデミックインフルエンザワ (H1N1) ワクチン接種後の

中和抗体価の推移. 第 24 回日本エイズ学会学術集会 2010 年、東京.

- 2) 清水少一、菊地正、古賀道子、安達英輔、今井健太郎、中村仁美、鯉淵智彦、三浦聡之、藤井毅、岩本愛吉 テノホビルの骨代謝に及ぼす影響. 第 24 回日本エイズ学会学術集会 2010 年、東京.
- 3) 菊地正、安達英輔、清水少一、古賀道子、今井健太郎、中村仁美、鯉淵智彦、三浦聡之、藤井毅、岩本愛吉. ART 初回導入後の血清脂

質の長期的な変化について. 第 24 回日本エイズ学会学術集会 2010 年、東京.

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

Table 1.

## HLA-associated mutations generated from 163 cladeB HIV-1 in Japanese patients

	PredictorVariable	TargetVariable	TT	TF	FT	FF	PValue	qValue
adapted	B15	26@R	12	17	5	129	2.13E-07	0.000942
adapted	C14	81@A	19	19	21	101	6.33E-06	0.008948
adapted	B07	357@G	24	0	82	55	1.32E-05	0.013319
adapted	B40	482@D	18	40	8	96	3.71E-05	0.029931
adapted	B35	372@N	16	0	83	52	0.000121	0.075704
adapted	A24	362@I	15	73	2	73	0.000191	0.097903
adapted	A31	397@R	8	20	8	126	0.000236	0.102499
adapted	C08	207@D	6	19	3	134	0.000303	0.112929
adapted	A26	487@A	45	1	88	25	0.00032	0.112929
adapted	B35	90@K	4	13	1	143	0.000371	0.11766
adapted	C07	147@I	52	3	80	28	0.000375	0.11766
adapted	C14	82@L	4	34	0	125	0.000618	0.170922
adapted	C07	479@K	5	49	0	107	0.000635	0.170922
nonadapted	C14	81@T	14	24	89	33	3.33E-07	0.000942
nonadapted	B15	26@K	12	17	95	39	5.49E-06	0.008948
nonadapted	B40	482@E	34	22	86	18	1.41E-05	0.013319
nonadapted	B07	357@S	0	24	47	90	4.56E-05	0.032233
nonadapted	A24	362@V	73	15	73	2	0.000191	0.097903
nonadapted	A31	397@K	20	8	126	8	0.000236	0.102499
nonadapted	C08	207@E	19	6	134	3	0.000303	0.112929
nonadapted	C07	147@L	3	52	27	81	0.000614	0.170922

Highlighted: within CTL epitopes described in LANL

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 蛋白の発現と分解量、粒子産生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/cell であり、約  $0.7-1 \times 10^8$  分子/細胞に相当すると概算された。その細胞と培養上清から精製した粒子の希釈列を用いて定量したところ、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。サイクロヘキシミドで新規蛋白合成を止めるとともに、プロテアソーム阻害剤 MG-132 とリソソーム阻害剤クロロキンをを用いて蛋白分解を阻害し、残存 Gag 蛋白量を経時的に調べたところ、細胞内 Gag 蛋白の半減期は約 8 時間であり、単位時間/単位細胞あたりの Gag 蛋白分解量は 0.4-0.6 pg/hr/cell、すなわち約  $4-6 \times 10^6$  分子/時間/細胞と概算された。分解の主な経路はプロテアソーム経路であった。次に、Gag 蛋白の抗原提示を誘導する目的で、ユビキチン付加 Gag 蛋白発現プラスミドと LAMP1 融合 Gag 蛋白発現プラスミドを作製した。

A. 研究目的

HIV 感染防御免疫を効率よく誘導するためには、抗原提示効率の高い Gag 抗原を設計することが 1 つの方法であると思われる。こうした効率の高い Gag 蛋白の考案するには、まず HIV 感染/発現細胞における Gag 蛋白の発現や分解のプロファイルを把握する必要がある。本年度は Gag 蛋白の発現/分解や粒子への取り込み効率を定量的に解析し、基礎情報を得るとともに、抗原提示効率の高い Gag 蛋白の設計に着手した。

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(-)) を用いた。

ヒトユビキチン付加 Gag 蛋白 (hUb-M/R-Gag) 発現プラスミドと LAMP1 融合 Gag (hLAMP1-Gag) 蛋白発現プラスミドを作製した。

(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。48 hr 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。また、24 hr 後、50 μg/mL サイクロヘキシミド (蛋白合成阻害剤)、15 μM MG-132、10 μM Clasto-lactacystin β-lactone (プロテアソーム阻害剤)、50 μM クロロキン、100 nM Concanamycin A (リソソーム阻害剤) を添加して培養し、経時的に細胞を回収した。

(4) 定量的 Western blotting

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。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

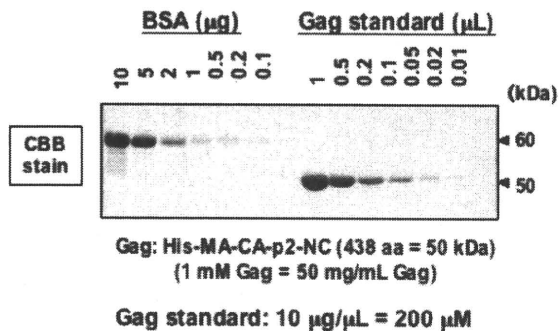
(1) Gag 蛋白標準液の調製

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 μg/μL であった。分子量 50 kDa であることから、約 200 μM 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。

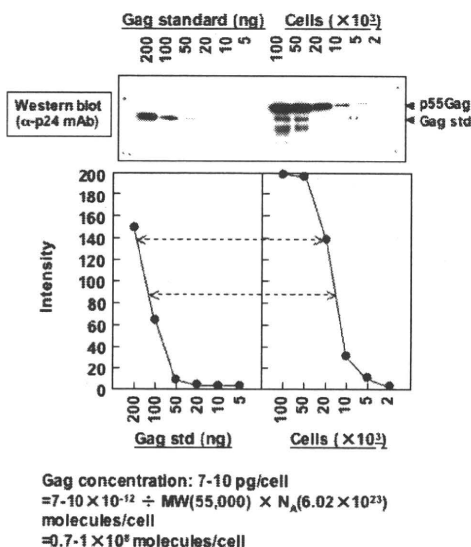
図 1. Gag 蛋白標準液の調製と定量



(2) 細胞内 Gag 蛋白量の定量

HeLa 細胞に PR(-)の分子クローンを transfection し培養した。回収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、p24CA 抗体を用いた定量的 Western blotting を行った (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 (7-10 pg 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

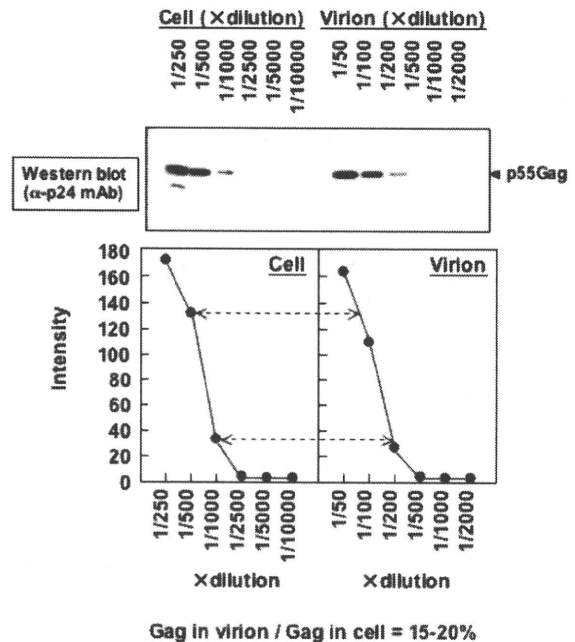


(3) 細胞内 Gag 蛋白量と産生粒子量の定量

HeLa 細胞に PR(-)の分子クローンを transfection し培養した。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)、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。

図 3. 細胞内 Gag 蛋白量と粒子産生効率の定量



(4) 細胞内 Gag 蛋白の分解量の定量

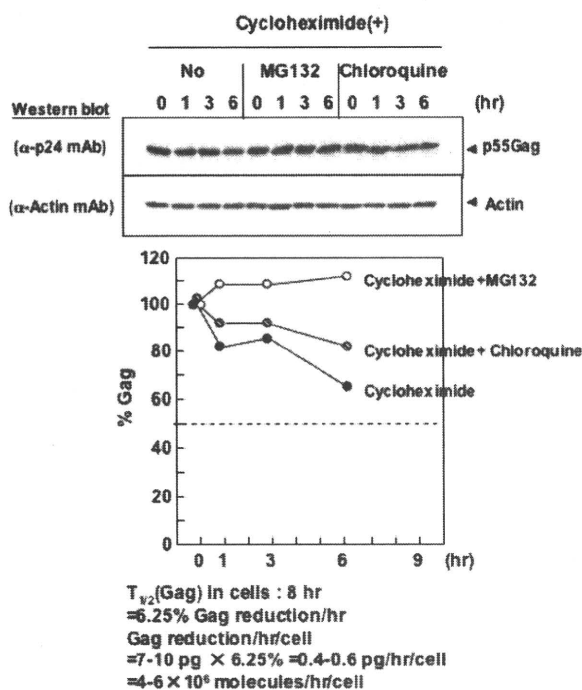
HeLa 細胞に PR(-)の分子クローンを transfection した。翌日、蛋白合成阻害剤サイクロヘキシミドを添加し、経時的に (0, 1, 3, 6 hr) 細胞を回収した。抗 p24CA 抗体と抗アクチン抗体を用いた Western blotting を行った後 (図 4 上)、Image J で両バンドの intensity を測定し、値を p24CA/アクチンで normalize した (図 4 下)。細胞内 Gag 蛋白量は経時的に減少し、その半減期は約 8 時間と計算された。単位細胞あたりの Gag 発現量は 7-10 pg Gag/cell =  $0.7-1 \times 10^8$  Gag/cell であったことから (図 2)、単位時間/単位細胞あたりの Gag 蛋白分解量は 0.4-0.6 pg Gag/hr/cell であると概算された。すなわち、単位細胞あたり 1 時間に約  $4-6 \times 10^6$  分子の Gag 蛋白が分解されると考えられた。

(5) 細胞内 Gag 蛋白の分解経路の解析

上述と同様に、PR(-)を transfection した HeLa 細胞に蛋白合成阻害剤サイクロヘキシミドを添加するとともに、プロテアソーム阻害剤 MG-132/Clasto-lactacystin  $\beta$ -lactone、あるいはリソソーム阻

害剤クロロキン/Concanamycin A を添加して培養した。経時的に (0, 1, 3, 6 hr) 細胞を回収し、抗 p24CA 抗体と抗アクチン抗体を用いた Western blotting を行った (図 4 上)。Image J で測定したバンドの intensity を先と同様に p24CA/アクチンで normalize した (図 4 下)。新規蛋白合成を止めると細胞内の Gag 蛋白量は徐々に減少した。しかし、プロテアソーム阻害剤 MG-132 で処理するとこの現象は見られなくなった。一方、クロロキン処理では Gag 蛋白減少を止められなかった。これらの結果から、分解の主な経路はプロテアソーム経路であると考えられた。

図 4. 細胞内Gag蛋白の分解



#### (6) 抗原提示効率の高い Gag 蛋白の設計

HLA/MHC クラス I 拘束性の抗原提示を増強する目的で、文献 (J Immunol 180:372-382, 2008) を参考に、N-end rule に従って N 末端にヒトユビキチンを付加した Gag (hUb-R-Gag) 蛋白発現プラスミドを作製した。一方、クラス II 拘束性の抗原提示を目的に、文献 (J Biol Chem 278:37926-37936, 2003) を参考に、ヒト LAMP1 融合 Gag 蛋白を発現するプラスミドを作製した。LAMP1 は ER→ゴルジ→形質膜と輸送された後、エンドサイトーシスで取り込まれ、クラス II 分子と共局在することが知られている。

#### D. 考察

ワクチニアウイルスを用いて L929 細胞で発現

させた Influenza virus NP の合成、分解、抗原提示の定量的解析が報告されている (Immunity, 18:343-354, 2003)。それによると、NP は  $3\text{-}4 \times 10^6$  分子/分/単位細胞 ( $1.8\text{-}2.4 \times 10^8$  分子/時間/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。ワクチニアウイルスによる発現系は transfection による発現系よりずっと高発現である。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 ( $0.7\text{-}1 \times 10^8$  分子/単位細胞) や粒子産生効率 (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 (分解された Gag 蛋白を含めたもの) はこれより多いと思われる。

細胞内での HIV Gag 蛋白の半減期は約 6.5 時間と報告されており (J Virol, 82:9937-9950, 2008)、本研究での半減期 (約 8 時間) はそれに近似するものであった。プロテアソーム阻害剤とリソソーム阻害剤を用いて調べたところ、Gag 蛋白の分解は主にプロテアソーム経路であった。しかしながら、それは、顕微鏡で観察する限り Gag 蛋白のエンドサイトーシスがまだ観察されない transfection 24 hr 後のものであり、もっと時間が経過した (エンドサイトーシスが散見されるようになった) 細胞ではリソソーム経路での分解もおけると推測される。

HLA/MHC クラス I 拘束性の抗原提示に利用される蛋白質は、合成直後に defective ribosomal product (DRiP) としてユビキチン化され、プロテアソーム分解→ERAD 分解を経て、HLA/MHC クラス I に提示される。プロテアソーム阻害剤と RI を用いた pulse-chase 実験から、Gag 蛋白はその蛋白合成後 10 分以内に約 30% がユビキチン化され分解されると報告されている (Nature, 404:770-774, 2000)。このように、クラス I に提示される蛋白質は、合成直後に分解されるため、Western blotting や GFP を用いた実験は不適であり、RI を用いた pulse-chase 実験が必要である。

本研究では、HIV 発現細胞のモデルとして、HIV-1 分子クローンを transfection した HeLa 細胞を用いたが、リンパ球系・マクロファージ系細胞における基礎情報も有用であると思われる。これらとともに最終年度は、抗原提示効率の高い Gag 蛋白の作製とその検証を試みる。

## E. 結論

HIV-1 分子クローンを transfection した HeLa 細胞では、①Gag 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。②Gag 蛋白分解量は、0.4-0.6 pg Gag (約  $4-6 \times 10^6$  分子) / 時間 / 単位細胞であった。主に、プロテアソーム経路で分解された。③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。

## F. 研究発表

### 1 論文発表

- (1) 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* 28(S2): B68-B73, 2010.
- (4) Haraguchi H, Sudo S, Noda T, Momose F, Kawaoka Y, Morikawa Y. Intracellular localization of human immunodeficiency virus type 1 Gag and GagPol products and virus particle release: Relationship with the Gag-to-GagPol ratio. *Microbiol Immunol* 54(12):734-746, 2010.
- (3) Yamamoto SP, Okawa K, Nakano T, Sano K, Ogawa K, Masuda T, Morikawa Y, Koyanagi Y, Suzuki Y. Huw1, a novel cellular interactor of Gag-Pol through integrase binding, negatively influences HIV-1 infectivity. *Mcirobes Infect* (in press).

### 2 学会発表

- (1) Urano E, Kuramochi N, Tomoda H, Takebe Y, Miyauchi K, Komano J, Morikawa Y. Inhibitor of HIV-1 Gag assembly screened by yeast membrane-associated system. CSH Retrovirus Meeting, New York, 5//2010.
- (2) Yamamoto SP, Okawa K, Masuda T, Morikawa Y, Koyanagi Y, Suzuki Y. Modulation of HIV-1 infection at late phase by an integrase-interactor Huw1. CSH Retrovirus Meeting, New York, 5//2010.
- (3) Haraguchi H, Morikawa Y. Live-cell imaging of

human immunodeficiency virus Gag and Gag-Pol trafficking. 第 10 回感染症免疫フォーラム、淡路島、9/9/2009.

- (4) Hoshino Y, Okunaga H, Morikawa Y. Overexpression of HRS induces BST-2 downregulation through its clathrin-binding domain. 第 10 回感染症免疫フォーラム、淡路島、9/9/2009.
- (5) Urano E, Kuramochi N, Miyauchi K, Ishikawa R, Tomoda H, Takebe Y, Komano J, Morikawa Y. A novel postentry inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 replication screened by yeast membrane-associated two-hybrid system. 第 10 回感染症免疫フォーラム、淡路島、9/8/2009.
- (6) 原口日和、周東翔、森川裕子. HIV-1 Gag/GagPol 蛋白の発現比率と相関する成熟産物の細胞内局在と粒子形成効率. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、11/8/2009.
- (7) 星野悠、奥長浩之、森川裕子. ESCRT-0 エンドソーム因子 HRS の共発現により、BST-2 はエンドサイトーシスされる. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、11/8/2009.
- (8) 浦野恵美子、倉持紀子、市川玲子、宮内浩典、供田洋、武部豊、駒野淳、森川裕子. HIV-1 Gag 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、11/7/2009.
- (9) 福間藍子、阿部真澄、宮沢孝幸、森川裕子、安田二郎. ネコ Tetherin/BST-2 による RD-114 ウイルスの産生抑制. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、11/9/2009.

## 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  
研究協力者 光木 裕也 国立感染症研究所 免疫部 エイズ予防財団 RR

### 研究要旨

HIV 感染制御におけるヘルパーTリンパ球 (HTL) の役割を明らかにするためには正確な機能評価を行うことが重要である。本研究では、SIV 感染サル慢性持続感染期の末梢血リンパ球を用いて MIP-1 $\beta$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , CD107 a の発現誘導能を指標とした多機能性評価を行い、ウイルス特異的 HTL の多機能性とウイルス複製制御およびウイルス特異的 CTL の誘導との関連性について検討した。その結果、血中ウイルス量に対する SIV 特異的細胞頻度については、CD4 陽性、CD8 陽性 T リンパ球ともに有意な相関は認められなかったが、多機能性については、CD4 陽性、CD8 陽性 T リンパ球ともに血中ウイルス量に対して有意な逆相関が認められた。また、SIV 複製抵抗性を示すハプロタイプ A 共有群では HTL・CTL ともに多機能性レベルは高く、SIV 複製抵抗性を示さないハプロタイプ J 共有群では HTL・CTL ともに多機能性レベルは低いことが示された。以上の結果から、HTL の多機能性レベルは、ウイルス複製制御レベルならびに CTL の多機能性レベルと関連することが示された。

### A. 研究目的

細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) は、慢性持続感染を成立させる HIV および SIV の体内複製制御において中心的役割を担う。CTL は MHC-I に結合したエピトープを認識するが、効果的な CTL 誘導およびウイルス制御についてハプロタイプレベルで異なる。このことはビルマ産アカゲサルを用いたサルエイズモデルでも示されている。一方、ヘルパーTリンパ球 (HTL) は、これら CTL の誘導・維持に重要であるとされつつも、HIV 感染制御における役割についてはいまだ不明な点が多い。そこで本研究では、HIV 感染制御における HTL の免疫学的機能を明らかにすることを目的とする。このことは、CTL 誘導型エイズワクチンの有効性に対する科学的根拠を提示するうえでも重要な課題であると考えられる。

本年度は、ワクチン非接種 SIV 感染サル群の慢性持続感染期の末梢血リンパ球を用いて、SIV 特異的 HTL の多機能性を評価し、ウイルス複製制御および CTL 誘導との関連性について検討した。

### B. 研究方法

ワクチン非接種 SIV 感染サル群 (90-120-Ia (ハプロタイプ A); n=5, 90-120-Ib (ハプロタイプ B);

n=2, 90-122-Ie (ハプロタイプ E); n=6, 90-088-Ij (ハプロタイプ J); n=3) の慢性持続感染期の末梢血リンパ球を用い、VSV-G シュードタイプ SIV を感染させた同一個体の B lymphoblastoid cell line (SIV-BLCL) との共培養 (抗原刺激) 後、CD4 陽性および CD8 陽性 T リンパ球中の MIP-1 $\beta$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , CD107 a の発現を細胞内免疫染色によりフローサイトメトリー解析を行った。上記エフェクター因子 (MIP-1 $\beta$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , CD107 a) のうち、少なくとも 1 種類以上の発現誘導が認められた細胞を“SIV 特異的細胞”とした。さらに、SIV 特異的細胞集団における多機能性レベル (何種類のエフェクター因子を発現し得るか) を数値化した。(倫理面への配慮)

遺伝子組換え生物等を用いる実験については、国立感染症研究所の承認あるいは文部科学大臣の確認を得て行った。

### C. 研究結果

1) 血中ウイルス量に対する SIV 特異的細胞頻度および多機能性レベルの関連

解析した全個体 (n=16) の CD4 陽性、CD8 陽性 T リンパ球における SIV 特異的細胞頻度はそれぞれ