

た。したがって、SeV ベクター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が得られた。一方、抗原選択に関する研究では、ワクチン接種により HIV 曝露後誘導される CTL 反応の優位性が変わりうることを示すとともに、有効な CTL の標的抗原として、これまで示唆されてきた Gag 抗原に加え、新たに Vif 抗原も有力候補であることを示唆する結果を得た。

平成 23 年度は、CTL 誘導ワクチン抗原選択に関する研究をさらに推進することとし、ワクチンによる CTL 誘導が曝露後の CTL 反応の優位性に及ぼす影響を詳細に知る目的で、サルエイズモデルにおける解析を行った。

B. 研究方法

我々はこれまで、MHC-I ハプロタイプ 90-120-Ia (A) 共有アカゲサルでは、SIVmac239 感染後、Gag206-216 エピトープ (Gag206) 特異的 CTL 反応と Gag241-249 エピトープ (Gag241) 特異的 CTL 反応が優位に誘導されることを示してきた。本研究では、MHC-I ハプロタイプ A 共有サルを用い、予防ワクチンによる Gag206 特異的 CTL 誘導と Gag241 特異的 CTL 誘導の効果を比較検討した。

主に、これまでの研究に用いたサルも含めて、非ワクチン接種群 (Naive 群 6 頭)、Gag241 特異的 CTL 誘導ワクチン接種群 (Gag241 群 6 頭)、Gag206 特異的 CTL 誘導ワクチン接種群 (Gag206 群 5 頭) について、SIV チャレンジ後の血漿中ウイルス量、CTL 反応、ウイルスゲノム塩基配列等の解析を行った。Gag241 群は、Gag241 特異的 CTL 誘導ワクチンとして、Gag241-249 領域を含む Gag236-251 ペプチドと EGFP との融合蛋白を発現する DNA と SeV ベクターを用いたプライム・ブーストワクチン接種をうけたサル群である。同様に Gag206 群は、Gag206 特異的 CTL 誘導ワクチンとして、Gag206-216 領域を含む Gag202-216 ペプチドと EGFP との融合蛋白を発現する DNA と SeV ベクターを用いたプライム・ブーストワクチン接種をうけたサル群である。上記 3 群に加えて、Gag 発現 SeV ベクターを用いた Gag 特異的 CTL 誘導ワクチン接種群 (Gag 群 5 頭) の解析結果も適宜比較の対象に加えた。CTL 反応については、エピトープペプチド刺激後にインターフェロン γ 誘導が認められる細胞を免疫染色により検出することにより測定した。ウイルスゲノムの解析においては、血漿より RNA を抽出し SIV gag 塩基配列を調べた。

(倫理面への配慮)

動物実験については、倫理面も含めて、医薬基盤研究所および国立感染症研究所の動物実験委員会の審査をうけ、その承認を得てから、医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターにて開始した。用いた組換え生物等については、第二種使用等拡散防止措置確認申請承認 (大臣確認) および機関承認済みである。

C. 研究結果

SIV 曝露後 2 週目、Naive 群では Gag206 特異的 CTL・Gag241 特異的 CTL の両者の反応が認められたが、Gag241 群では Gag241 特異的 CTL 反応、Gag206 群では Gag206 特異的 CTL 反応のみが認められ、群間で CTL 反応の優位性に大きな違いがみられた (図 1)。6 週目には、Gag241 群・Gag206 群ともにおいて、Gag206 特異的 CTL・Gag241 特異的 CTL の両者の反応が認められた。

5 週目の血漿中ウイルス量の多群比較では、Gag241 群が Naive 群と比較して有意な低下を示したが、Gag206 群は有意な低下を示さなかった (図 2)。12 週目には、Gag241 群では全頭で SIV 複製が制御されていたが、Gag206 群では 2 頭が持続感染を呈した。

5 週目の血漿由来のウイルスゲノムの解析では、Gag206 群全頭で Gag206 特異的 CTL からの逃避変異が選択されていた。一方、Gag241 群では、Gag206 特異的 CTL からの逃避変異選択も Gag241 特異的 CTL からの逃避変異選択も認められなかった。この Gag241 群の 12 週目の血漿由来のウイルスゲノムの解析では、Gag241 特異的 CTL からの逃避変異選択は認められず、Gag206 特異的 CTL からの逃避変異選択が認められた。

なお、Gag 群においては、2 週目に Gag206 特異的 CTL・Gag241 特異的 CTL の両者の反応が認められ、12 週目には、全頭で SIV 複製が制御された。また、5 週目の血漿由来のウイルスゲノムの解析では、Gag206 特異的 CTL からの逃避変異選択が認められた。

D. 考察

我々は予防エイズワクチンとして、DNA プライム・SeV ベクターブーストワクチンの解析を進めてきた。平成 23 年度はまず、この CTL 誘導デリバリーシステム最適化に向けた研究として、平成 22 年度までに得られた SeV ベクター経鼻接種の優位性に関する結果を確認した。

一方、CTL 誘導エイズワクチンの至適抗原選択に向けた研究として、2つのエピトープ特異的

CTL メモリー誘導の効果を解析する目的で、サルエイズモデルにおいて、各々を単独で誘導するワクチンの SIV 複製防御効果を比較検討した。Gag206 特異的 CTL 誘導群では、SIV 曝露後 Gag206 特異的 CTL 反応が優位となるが、この CTL に対する逃避変異選択が加速され、SIV 複製の制御が困難になる現象が認められた。一方、Gag241 特異的 CTL 誘導群では、SIV 曝露後 Gag241 特異的 CTL 反応が優位となり、その後 Gag206 特異的 CTL 反応も加わって、SIV 複製制御に結びつくことが示された (図 3)。

本研究結果から、SIV 曝露後急性期には、ワクチン抗原特異的 CTL の 2 次反応が優位となり、非ワクチン抗原特異的 CTL 反応の誘導が遅れることが明らかとなった。さらに、ワクチンによる CTL メモリー誘導が曝露後の CTL 優位性に大きく影響し、CTL 逃避変異選択の促進・遅延に結びつきうることが示された。したがって、ワクチン抗原選択の仕方、ワクチン抗原特異的 CTL と非ワクチン抗原特異的 CTL の協調パターンに違いが生じ、ウイルス複製制御の有無を左右しうることが判明した。本研究結果は、CTL 誘導ワクチンの抗原選択において極めて重要な知見を与えるものである。

E. 結論

サルエイズモデルにおける解析から、ワクチンによる CTL メモリー誘導が、HIV 曝露後の CTL 反応の優位性および協調パターンに大きな影響を与えることを明らかにした。本研究結果は、CTL 誘導ワクチンで選択する抗原の違いが、HIV 曝露後のワクチン抗原特異的 CTL 反応と非ワクチン抗原特異的 CTL 反応の協調パターンに影響を与え、HIV 複製制御の有無を左右しうることを示しており、CTL 誘導エイズワクチンの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) Takahara Y, Matsuoka S, Kuwano T, Tsukamoto T, Yamamoto H, Ishii H, Nakasone T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Sakawaki H, Horiike M, Miura T, Igarashi T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Dominant induction of vaccine antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses after simian immunodeficiency virus challenge. *Biochem Biophys Res Commun* 408:615-619, 2011.
- 2) Naruse TK, Okuda Y, Mori K, Akari H, Matano T,

Kimura A. ULBP4/RAET1E is highly polymorphic in the Old World monkey. *Immunogenetics* 63:501-509, 2011.

- 3) Matsuoka S, Matano T. Strategy for prevention of HIV-1 transmission. *Journal of Disaster Research* 6:421-425, 2011.
- 4) Nakamura M, Takahara Y, Ishii H, Sakawaki H, Horiike M, Miura T, Igarashi T, Naruse TK, Kimura A, Matano T, Matsuoka S. Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses during primary simian immunodeficiency virus infection in Burmese rhesus macaques. *Microbiol Immunol* 55:768-773, 2011.
- 5) Moriya C, Horiba S, Kurihara K, Kamada T, Takahara Y, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Matano T. Intranasal Sendai viral vector vaccination is more immunogenic than intramuscular under pre-existing anti-vector antibodies. *Vaccine* 29:8557-8563, 2011.
- 6) Saito Y, Naruse TK, Akari H, Matano T, Kimura A. Diversity of MHC class I haplotypes in cynomolgus macaques. *Immunogenetics* 64:131-141, 2012.
- 7) Ishii H, Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Matsuoka S, Shiino T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Naruse TK, Kimura A, Takiguchi M, Matano T. Impact of vaccination on cytotoxic T lymphocyte immunodominance and cooperation against simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques. *J Virol* 86:738-745, 2012.
- 8) Seki S, Matano T. CTL escape and viral fitness in HIV/SIV infection. *Front Microbiol* 2:267, 2012.
- 9) Takeuchi H, Ishii H, Kuwano T, Inagaki N, Akari H, Matano T. Host cell species-specific effect of cyclosporine A on simian 1 immunodeficiency virus replication. *Retrovirology* 9:3, 2012.

2 学会発表

- 1) Nomura T, Iwamoto N, Inagaki N, Matsuoka S, Yamamoto H, Matano T. Dynamics of viral CTL escape mutations toward higher viral replicative ability in vivo. The 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention, Rome, Italy, 7/18/2011.
- 2) Takahashi N, Saito A, Nomaguchi M, Iwamoto N, Adachi A, Akari H, Matano T. Viral recovery from cynomolgus macaques controlling a simian-tropic HIV-1 challenge. The XVth International Congress of Virology (VI-PO21-7), Sapporo, Japan, 9/13/2011.
- 3) Takahara Y, Nakamura M, Higashi R, Horiike M, Miura T, Igarashi T, Naruse T, Kimura A, Matano T, Matsuoka S. Cytotoxic T lymphocyte responses

- during highly active antiretroviral therapy in simian immunodeficiency virus-infected macaques. The XVth International Congress of Virology (VI-PO35-37), Sapporo, Japan, 9/15/2011.
- 4) Nakane T, Matano T, Yamamoto H. Post-infection passive immunization of SIVmac239-specific, non-neutralizing antibodies does not control virus replication in vivo. The XVth International Congress of Virology (VI-PO51-16), Sapporo, Japan, 9/15/2011.
 - 5) Nomura T, Yamamoto H, Shi S, Iwamoto N, Matano T. Analysis of viral genome sequences in SIV controllers. The XVth International Congress of Virology (VI-SY41-4), Sapporo, Japan, 9/15/2011.
 - 6) Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Yoshida T, Yasutomi Y, Matano T, Adachi A, Akari H. Genotypic variation of cynomolgus monkey TRIM5alpha determines the susceptibility to monkey-tropic HIV-1 infection. The XVth International Congress of Virology (VI-SY41-5), Sapporo, Japan, 9/15/2011.
 - 7) Ishii H, Iwamoto N, Matsuoka S, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Naruse T, Kimura A, Matano T. Efficacy of single epitope-specific cytotoxic T lymphocyte induction by vaccination against a simian immunodeficiency virus challenge. The XVth International Congress of Virology (VI-SY51-3), Sapporo, Japan, 9/16/2011.
 - 8) Matano T. Post-challenge SIV-specific CTL responses in vaccinated macaques. Bridging the Sciences, the 25th Joint Meeting of the United States-Japan Cooperative Medical Science Program AIDS Panels, Atlanta, GA, USA, 9/23/2011.
 - 9) Matano T. Impact of prophylactic vaccination with Sendai viral vectors on post-challenge CTL responses in a macaque AIDS model. The 5th Vaccine and ISV Annual Global Congress, Seattle, WA, USA, 10/2/2011.
 - 10) 侯野哲朗. サルエイズモデル：MHC-I 遺伝子型と病態の関連について。難治疾患共同研究拠点研究集会「霊長類動物モデルを用いた難治疾患研究」、東京、10/7/2011.
 - 11) Matano T. Impact of prophylactic vaccination on post-exposure CTL cooperation against SIV replication in rhesus macaques. The 12th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 10/20/2011.
 - 12) Takahara Y, Nakamura M, Sakawaki H, Miura T, Igarashi T, Koyanagi Y, Naruse T, Kimura A, Matano T, Matsuoka S. Impact of therapeutic vaccination during HAART on CTL immunodominance in SIV infection. The 12th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 10/21/2011.
 - 13) Kurihara K, Takahara Y, Matano T. Combination of intranasal and intramuscular Sendai virus vector immunization. The 12th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 10/21/2011.
 - 14) Takahashi N, Saito A, Nomaguchi M, Iwamoto N, Adachi A, Akari H, Matano T. Virus recovery from cynomolgus macaques controlling viremia in the chronic phase after a simian-tropic HIV-1 challenge. The 29th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Seattle, WA, USA, 10/26/2011.
 - 15) Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Yoshida T, Yasutomi Y, Yakahashi N, Matano T, Adachi A, Akari H. Susceptibility of cynomolgus monkeys to monkey-tropic HIV-1 infection is determined by TRIM5α genotypes. The 29th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Seattle, WA, USA, 10/26/2011.
 - 16) 侯野哲朗. HIV 感染症の克服に向けて。練馬医師会学術部主催学術講演会、東京、11/17/2011.
 - 17) 高橋尚史、齊藤暁、野間口雅子、松岡佐織、足立昭夫、明里宏文、侯野哲朗. サル指向性 HIV-1 感染慢性潜伏期のカニクイサルからの感染性ウイルスの回収。第 25 回日本エイズ学会学術集会、東京、11/30/2011.
 - 18) 中村碧、高原悠佑、阪脇廣美、堀池麻里子、三浦智行、五十嵐樹彦、成瀬妙子、木村彰方、侯野哲朗、松岡佐織. サルエイズモデル感染初期における MHC クラス I ハプロタイプ別の CTL 反応優位パターンの解析。第 25 回日本エイズ学会学術集会、東京、11/30/2011.
 - 19) 栗原京子、高原悠佑、原裕人、井上誠、飯田章博、朱亜峰、長谷川護、侯野哲朗. センダイウイルスベクターワクチンの経鼻接種と筋肉内接種の併用効果の解析。第 25 回日本エイズ学会学術集会、東京、11/30/2011.
 - 20) 中根拓、山本浩之、侯野哲朗. サル免疫不全ウイルス感染急性期における非中和結合抗体の受動免疫の影響。第 25 回日本エイズ学会学術集会、東京、11/30/2011.
 - 21) 齊藤暁、河野健、中山英美、足立昭夫、野間口雅子、保富康宏、侯野哲朗、塩田達雄、明里宏文. サル指向性 HIV-1 への感受性に影響を与えるマカクサル TRIM5 遺伝子の多様性。第 25 回日本エイズ学会学術集会、東京、12/2/2011.

- 22) Nakamura M, Takahara Y, Matsuoka S, Matano T. Analysis of cytotoxic T lymphocyte responses under HAART in a macaque AIDS model. The 3rd Korea-Japan Joint Symposium on HIV/AIDS, Seoul, Korea, 12/10/2011.
- 23) 俣野哲朗. サルモデルを用いたエイズワクチン開発研究. 第4回滋賀医科大学サルシンポジウム「サル類と感染症、最近の話題」、大津、12/19/2011.
- 24) 俣野哲朗. HIV 感染症の克服に向けて. 市民公開シンポジウム「エイズ克服への挑戦—エイズの治療と予防の最先端—」、名古屋、1/28/2012.
- 25) Matano T. HIV vaccine development. Symposium on Research and Quality Control of Vaccines, Beijing, China, 2/20/2012.

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。

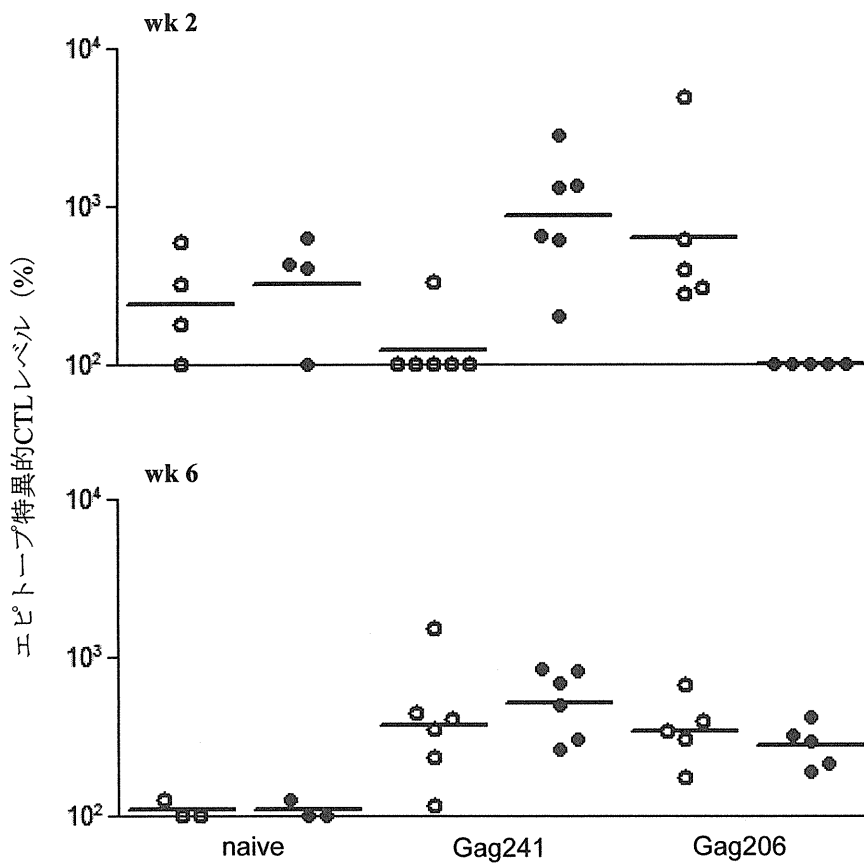


図1. 単独エピトープ特異的CTLメモリー誘導のSIV曝露後のCTL反応への影響。非ワクチン接種群 (naive)、Gag241-249エピトープ特異的CTL誘導ワクチン接種群 (Gag241)、Gag206-216エピトープ特異的CTL誘導ワクチン接種群 (Gag206) について、SIVチャレンジ後2週目および6週目のGag206-216特異的CTL反応 (白丸) とGag241-249特異的CTL反応 (黒丸) を調べた。2週目には、Gag241群ではGag241特異的CTL反応が優位となり、Gag206特異的CTL誘導の遅延が認められ、Gag206群ではGag206特異的CTL反応が優位となり、Gag241特異的CTL誘導の遅延が認められた。

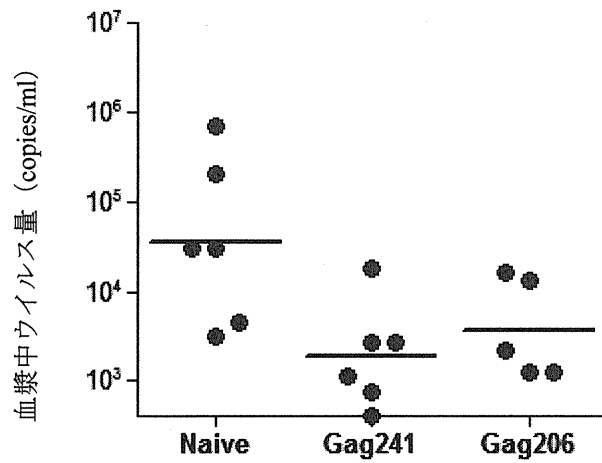


図2. 単独エピトープ特異的CTLメモリー誘導のSIV複製抑制効果。
Naive群、Gag241群およびGag206群のSIVチャレンジ後5週目の血漿中ウイルス量を示す。Gag241群ではNaive群と比較して有意な低下が認められた ($p < 0.05$ by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test)。

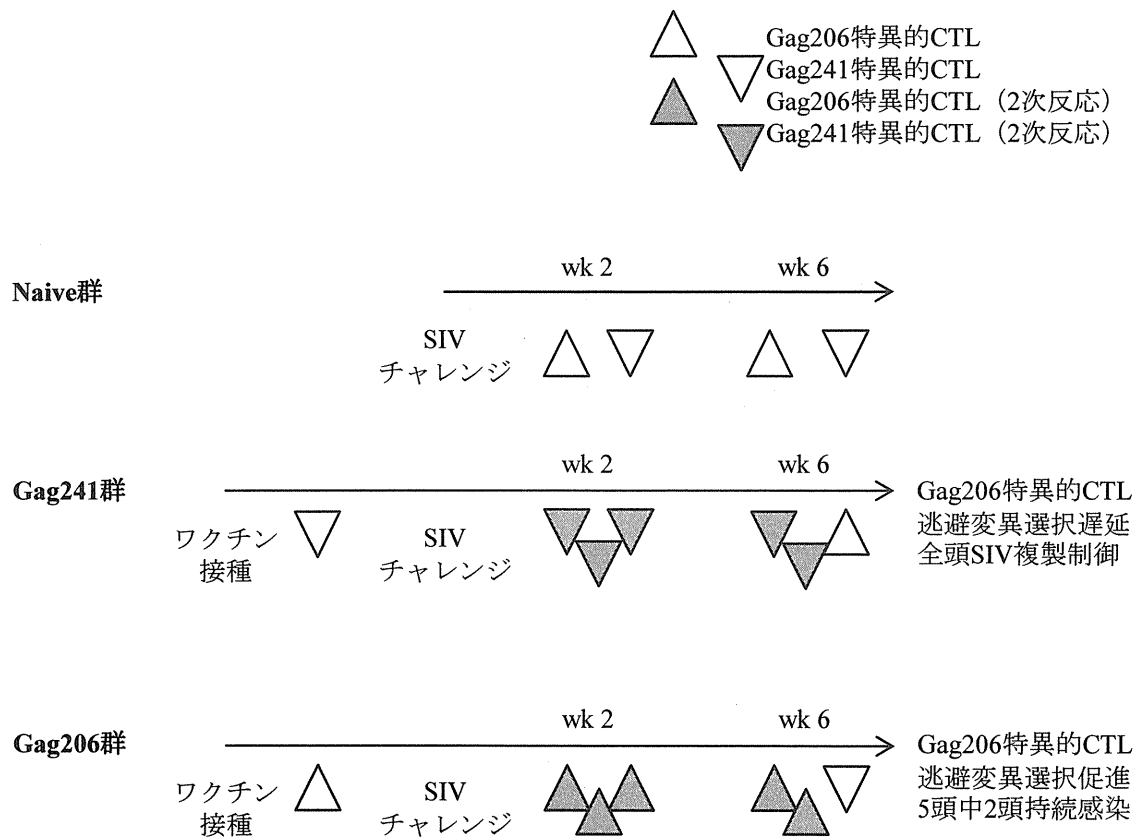


図3. エピトープ特異的CTLメモリー誘導効果を示すシエーマ。
 SIV曝露後、Gag241群では、メモリー由来のGag241特異的CTL反応が優位となり、さらにナイーブ由来のGag206特異的CTL反応も加わってSIV複製制御にいたる。Gag206群では、メモリー由来のGag206特異的CTL反応が優位となるが、Gag206特異的CTL逃避変異選択が加速されることもあり、SIV複製制御にいたらない頻度が比較的高い。

厚生労働省科学研究補助金（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

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

HEV-VLP 経口投与実験で、特に有害事象を生じず、HEV-VLP 特異的な液性及び細胞性免疫応答両者の誘導を確認した。また、HIV-Env エピトープを表出する HEV-VLP の経口投与実験でも、HIV-Env エピトープ特異的な免疫応答を確認し、経口投与による粘膜免疫の誘導が示唆された。

A. 研究目的

HIV 感染予防には、液性免疫と細胞性免疫の両者が必要であると考えられている。更に、本ウイルスに対しては感染経路から粘膜免疫は重要であると考えられる。粘膜免疫を誘導する DNA ワクチンは感染防御ワクチンとして魅力的なツールではあるが、粘膜への投与方法で最も簡便な経口投与では粘膜免疫を誘導しない。ウイルス様中空粒子(VLP)は遺伝情報を持たず、そのウイルスとしての立体構造が保存されている。本研究では、経口感染を示す E 型肝炎ウイルス(HEV)の VLP に HIV のエピトープを組み込んだリコンビナント (rVLP-Env) に DNA ワクチンを封入させ、その VLP についての経口投与可能な粘膜免疫誘導型のワクチン開発の基礎的研究を行った。本報告では、カニクイザルを用いた HEV-VLP 経口投与実験を行い、経口投与による粘膜免疫応答の誘導の有効性及び安全性を評価した。

B. 研究方法

1) サルへの HEV-VLP 投与

HIV-1 Env エピトープ (HIV V3 Loop P18 ; 308-322 : RIORGPGRAFVTIGK) 部位を組み込んだ rVLP-Env を発現するバキュロウイルスとコントロールとして HIV-1 Env エピトープを持たないもとの HEV-VLP (C52) を発現するバキュロウイルスを用いた。常法に従い、同 HEV-VLP を含む昆虫由来細胞培養上清を超遠心による濃縮後、塩化セシウムによる密度勾配にて、精製 HEV-VLP を得る。得られた HEV-VLP は蛋白濃度の測定を行うとともに SDS-PAGE による泳動にて分子量を確認し実験に用いた。

カニクイザルに免疫する HEV-VLP は以下の 2 群に分けた。VLP に HIV-1 Env エピトープを表出させた rVLP-Env (P18) 群、HIV-1 Env エピトープを持たない元の

HEV-VLP (C52) 群。雄 5 歳齢の健常なカニクイザルへの免疫は、経口ゾンデを用いて胃内投与した。カニクイザルは 3 頭を用い、2 頭 (#1、#2) に P18 を、1 頭 (#3) に C52 を免疫した。VLP タンパク質量換算で 28.6 mg を 2 週間隔で合計 3 回免疫を行った。初回免疫から 0、2、4、5、6、10 週目に免疫サルから血液、落下新鮮便を採取した (図 1)。

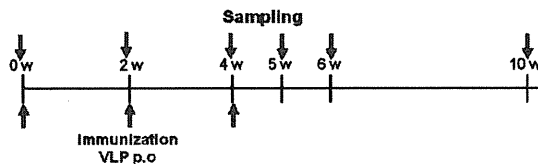


図 1. 実験スケジュール

採取したヘパリン血は 2,500 rpm、20min 遠心し、上清の血漿を分取し、沈殿した血球を PBS(-) で再懸濁後、比重遠心分離法にて末梢血リンパ球 (PBMC) を分離した。落下新鮮便は、protease inhibitor cocktail (Roche)-0.1% NaN₃-cold PBS(-) で 20% 浮遊液に調製後、3,000 rpm、60min 遠心し、上清を回収し、0.45 μm のフィルターを通した。血漿、PBMC、糞上清液は、各種測定までは -80 度で保存した。

2) 抗体価の測定

HEV-VLP(C52) 又は P18 ペプチドを PBS(-) で蛋白質質量換算 5 μg/mL に調製した溶液を 96 穴 ELISA plate に 100 μl/well で蒔き、4 度で一晩置いた。0.05% Tween20-PBS(-) で洗浄後、Block Ace でブロッキングし、洗浄後、段階希釈した血漿又は糞上清液を 100 μl/well 蒔き、37 度で 1.5hr 反応させた。洗浄後、10,000 倍希釈した horseradish peroxidase 標識の抗サル IgG 又は IgA 抗体を 100 μl/well で蒔き、37 度で 1hr 反応させた。洗浄後、3,3',5,5'-tetramethylbenzidine を含む基質発色剤を 100 μl/well で蒔き、5~15min 反応させ、2M H₂SO₄ を 20 μl/well 加え反応を止め、

plate reader で 450nm の OD 値を測定した。OD₄₅₀ ≥ 0.15 を陽性と判断し、陽性となった一番高い希釈倍率を抗体価とした。

3) INF-γ 産生細胞の測定

HEV-VLP(C52) 又は Env に対する免疫応答に対して C52 又は P18 ペプチドを用いて、PBMC に 48hr 抗原再刺激を行い、ELISpot 法により抗原特異的な IFN-γ 産生細胞数を測定した。細胞濃度は 1*10⁵ cells/well で蒔き、パルスするペプチド量を 0、100 μg/ml の 2 段階とした。

倫理面への配慮)

動物実験の実施に当たっては、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管に関する基準」、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験棟の実施に関する基本指針」を遵守し、医薬基盤研究所動物実験委員会の承認を得て行った。

組換え DNA 実験については、医薬基盤研究所組換え DNA 実験安全委員会の承認を得て行った。

ヒトサンプル、情報等は一切用いていない。

C. 研究結果

カニクイザルに HEV-VLP (P18 又は C52) を経口投与し、HEV-VLP、Env 特異的な免疫応答の誘導を試みた。免疫後のカニクイザルの日常観察や一般血液検査値に異常は無く、経口投与に伴う有害事象は生じなかった。血中に HEV-VLP 特異的な IgG、IgA 抗体が初回免疫後 4 週以降に検出され、特に IgG 抗体価が高かった (図 2 A、B)。糞中の HEV-VLP 特異的な IgG 抗体は検出されなかったが、IgA 抗体の産生は 3 頭中 2 頭で検出された (図 2 C、D)。P18 を免疫したカニクイザルの血中及び糞中には、Env 特異的な IgG、IgA 抗体は初回免疫後 6 週までは検出されなかった (図 3 A、B、C、D)。

PBMC中にHEV-VLP特異的なINF- γ 産生細胞が一時的に認められた(図4A)。P18を免疫したカニクイザルの内1頭でEnv特異的なINF- γ 産生細胞が一時的に認められた(図4B)。

D. 考 察

カニクイザルを用いたDNAワクチン封入HEV-VLPの経口投与実験に先立ち、HEV-VLP単独、抗原エピトープを組み込んだrHEV-VLPの経口投与実験を行い、HEV-VLP、抗原エピトープに対する粘膜免疫の誘導能を評価した。2もしくは3回の免疫後、血中のHEV-VLPに対する特異的なIgG、IgA抗体の産生が認められた。糞中のHEV-VLPに対する特異的なIgG抗体は、最終免疫2週間までは検出されなかったが、血中の特異抗体に遅れて検出される可能性があるため、最終免疫4週目以降のサンプルでの測定を引き続き行う予定である。P18を免疫したカニクイザル2頭はEnvに対する特異的な抗体産生が血中、糞中共に認められなかった。これはHEV-VLPの蛋白量に対してEnvエピトープの量はわずかと考えられるので、今回接種したP18の量では、Envエピトープに関しては十分な免疫原性を示せなかった可能性がある。一方、Envに対する抗体は遅れて産生される可能性もあり、こちらも最終免疫4週目以降のサンプルでの測定を引き続き行う予定である。最終的にはDNAワクチンを封入したHEV-VLPを投与するので、DNAワクチンが封入されていた場合、DNAワクチンがアジュバンド効果を示し、今回検出されなかった抗Env特異抗体が検出される可能性が考えられる。

HEV-VLP及びP18特異的INF- γ 産生細胞も検出されたが、一時的な検出であった。これは予め免疫されていない個体であったので、急速に特異的INF- γ 産生細胞が減少したとも考えられた。従って、メモリー細胞として存在している可能性が有り、追加

免疫をすることによって、エフェクター細胞の誘導が可能では無いかと考えている。

以上の事からカニクイザルを用いたHEV-VLPまたはrVLP-Envの経口投与は、液性、細胞性免疫応答の両者を誘導し、感染防御の重要な粘膜面での免疫応答の誘導を示唆した。

今後、誘導が困難なHIV-1に対する中和抗体の誘導の確認も行う必要がある。また、今回の結果を踏まえ、サルを用いたSIV Gag-DNAワクチン封入HEV-VLPの経口投与実験を行い、Gag特異的な免疫誘導、特にCTLの誘導等も評価する予定である。

E. 結 論

HIV Env エピトープ発現させたHEV-VLPをカニクイザルに経口投与し、特に有害事象を生じず、HEV-VLP特異的な液性、細胞性免疫応答の両者を誘導した。HIV Env特異的な細胞性免疫応答の誘導も認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Uchida, A., Sasaguri, H., Kimura, N., Tajiri, M., Ohkubo, T., Ono, F., Sakaue, F., Kanai, K., Hirai, T., Sano, T., Shibuya, K., Kobayashi, M., Yamamoto, M., Yokota, S., Kuboddera, T., Tomori, M., Sakaki, K., Enomoto, M., Hirai, Y., Kumagai, J., Yasutomi, Y., Mochizuki, H., Kuwabara, S., Uchihara, T., Mizusawa, H. and Yokakota, T. Non-human primate model of ALS with cytoplasmic mislocalization of TDP-43. *Brain* in press
- 2) Iwasaki, Y., Mori, K., Ishii, K., Maki, N., Iijima, S., Yoshida, T., Okabayashi, S., Katakai, Y., Lee, J., Saito, A., Fukai, H., Kimura, N., Ageyama, N., Yoshizaki, S., Suzuki, T., Yasutomi, Y., Miyamura, T., Kannagi, M. and Akari, H. Long-term persistent GBV-B infection and

- development of a chronic and progressive hepatitis C-like disease in marmosets. *Frontiers Microbiol.* in press
- 3) Hirata, H., Kawai, S., Maeda, M., Jinnai, M., Fujisawa, K., Katakai, Y., Hikosaka, K., Tanabe, K., Yasutomi, Y. and Ishihara, C. Identification and Phylogenetic Analysis of Japanese Macaque Babesia-1 (JM-1) Detected from a Japanese Macaque (*Macaca fascicularis*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* in press
- 4) Saito, A., Kono, K., Nomaguchi, M., Yasutomi, Y., Adachi, A., Shioda, T., Akari, H. and Nakayama, E. E. Geographic, Genetic, and Functional Diversity of Antiretroviral Host Factor TRIM5α in Cynomolgus Macaque (*Macaca fascicularis*) *J. Gen. Virol.* in press
- 5) Matsuo, K. and Yasutomi, Y. Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guérin as a vaccine vector for global infectious disease control. *Tuberculosis Res. Treat.* 2011 Epub
- 6) Chono, H., Saito, N., Yasutomi, Y., Mineno, J., and Kato, I. In vivo safety and persistence of endoribonuclease gene-transduced CD4+ T cells in cynomolgus macaques for HIV-1 gene therapy model. *PLoS One* 2011; 6: Epub
- 7) Xing, Li., Wang, J. C., Li, T. C., Yasutomi, Y., Lara, J., Purcell, R., Takeda, N., Miyamura, T. and Holland, R. C. Spatial configuration of hepatitis E virus antigenic domain. *J. Virol.* 2011; 85: 1117-1124.
- 8) 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.
- 9) Okabayashi, S., Uchida, K., Ohno, C., Hanari, K., Goto, I. and Yasutomi, Y. Periventricular Leucomalacia (PVL)-like lesions in two neonatal cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J. Comp. Pathol.* 2011; 144: 204-211.
- 10) 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. *Micobes and Infection* 2011; 13: 58-64.
2. 学会発表
「国内」
- 1) 渡邊健太、松尾和浩、保富康宏：ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスをベクターとした新規結核ワクチンの開発 第15回日本ワクチン学会 東京 2011年12月10日-11日
- 2) 塩釜ゆみ子、保富康宏：Th制御とインフルエンザ感染の関係 第40回日本免疫学会 千葉 2011年11月27日-29日
- 3) 岡村智崇、保富康宏：カニクイザルを用いたアジュバント組み込みサルヒト免疫不全ウイルスの効果 第40回日本免疫学会 千葉 2011年11月27日-29日
- 4) 和田剛、小原道法、保富康宏：C型慢性肝炎モデルマウスを用いた治療用DNAワクチンの評価 第40回日本免疫学会 千葉 2011年11月27日-29日
- 5) 辻村佑祐、保富康宏：好酸菌分泌抗原Ag85Bは局所にインターロイキン-17、-22を誘導することでアレルギー喘息の治療効果を促す 第40回日本免疫学会 千葉 2011年11月27日-29日
- 6) 渡邊健太、保富康宏：ヒトパラインフル

エンザ2型ウイルスベクターを用いた新規結核ワクチンの開発 第40回日本免疫学会 千葉 2011年11月27日-29日

- 7) 田尻和子、保富康宏：SOCS1遺伝子治療による自己免疫性心筋炎の制御効果の検討 第40回日本免疫学会 千葉 2011年11月27日-29日
- 8) 塩釜ゆみ子、河岡義裕、保富康宏：ヘルパーT細胞反応制御によるインフルエンザウイルス感染に対する免疫反応 第152回日本獣医学会 大阪 2011年9月19日-21日

「国際」

- 1) Akatsuki SAITO, Masako NOMAGUCHI, Ken KONO, Emi E. NAKAYAMA, Tatsuo SHIODA, Tomoyuki YOSHIDA, Yasuhiro YASUTOMI, Naofumi TAKAHASHI, Tetsuro MATANO, Akio ADACHI, Hirofumi Akari: Susceptibility of cynomolgus monkeys to monkey-tropic HIV-1 infection is determined by TRIM5 α genotypes. Non-Human Primate model for AIDS Oct. 25-28, 2011, Seattle, WA.
- 2) Kenta WATANABE, Akihiro MATSUBARA, 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. Interantional Union of Microbiological Societies 2011Sep. 11-17, 2011, Sapporoo.

3) Tomotaka OKAMURA, Yuya SHIMIZU, Kazuhiro MATSUO, Yasuhiro

YASUTOMI: Adjuvant molecule Ag85B cDNA insertion into live attenuated simian

-human immunodeficiency virus enhances the SHIV-specific immune responses in

Cynomologous monkeys. Interantional Union of Microbiological Societies 2011Sep. 11-17, 2011, Sapporoo.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特許出願

1) 遺伝子導入用ウイルスベクターの製造方法(特願 2011-025234)

2) 新規な組換え BCG ワクチン(特願 2011-199422)

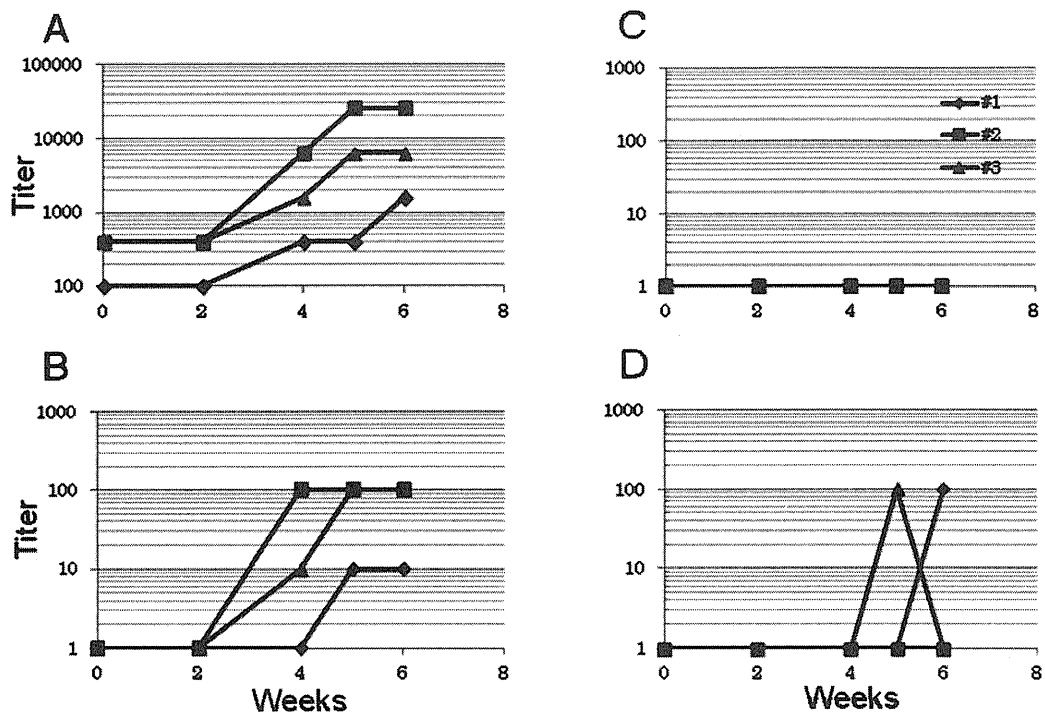


図 2. 抗 HEV-VLP 特異抗体価の推移
 血中の抗 HEV-VLP-IgG 抗体価 (A) 抗 HEV-VLP-IgA 抗体価 (B)
 糞中の抗 HEV-VLP-IgG 抗体価 (C) 抗 HEV-VLP-IgA 抗体価 (D)

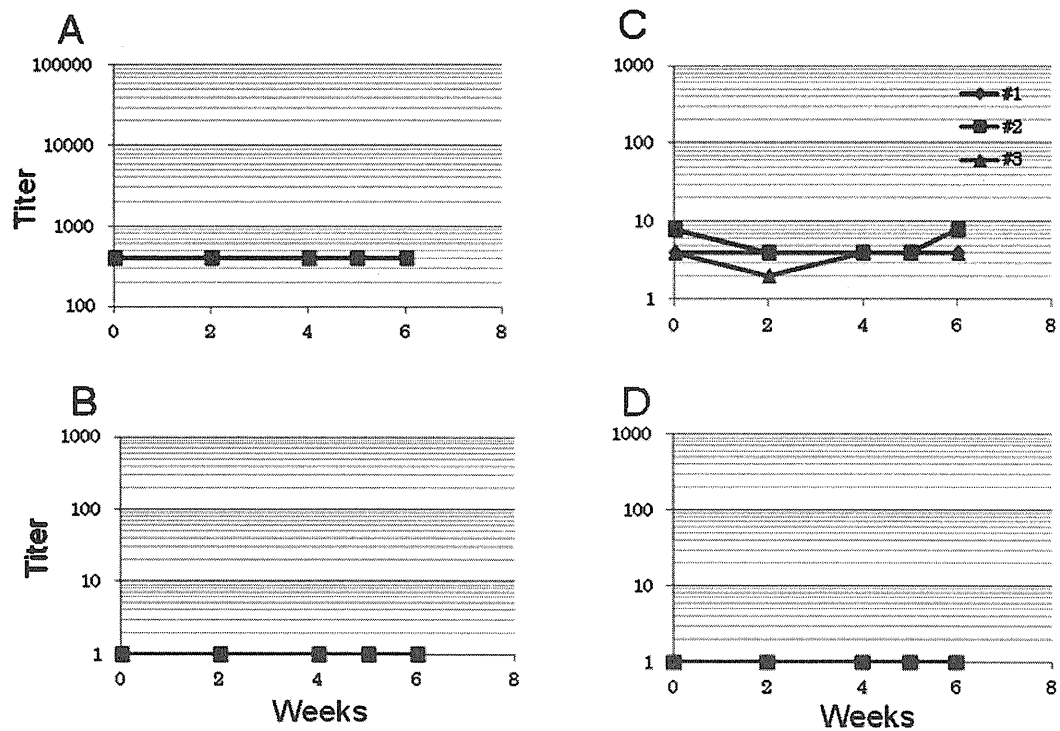


図 3. 抗 Env 特異抗体価の推移
 血中の抗 Env-IgG 抗体価 (A) 抗 Env-IgA 抗体価 (B)
 糞中の抗 Env-IgG 抗体価 (C) 抗 Env-IgA 抗体価 (D)

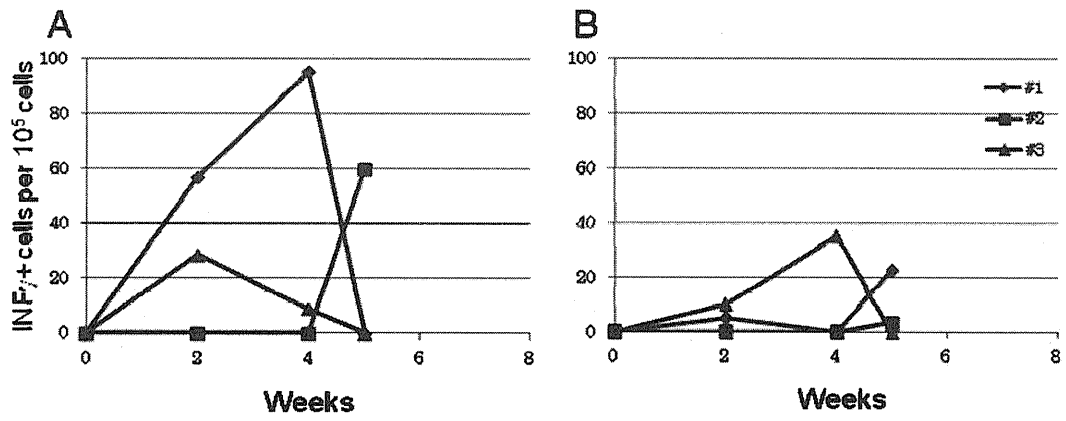


図4. 抗原特異的 $INF\gamma$ 産生細胞の推移
 HEV-VLP 特異的 $INF\gamma$ 産生細胞 (A) Env 特異的 $INF\gamma$ 産生細胞 (B)

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 23 年度は、日本人の間で流行する HIV-1 の複製能力の時代的变化について検討し、HIV-1 複製能が時代とともに低下してきている可能性を見出した。

A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) の流行が始まってからおよそ 30 年になるが、その間変異しやすいウイルス配列は大きく変化してきている。それにともないウイルス複製能も変化してきている可能性がたかい。本年度の研究では、日本人の間で流行している HIV-1 の複製能の時代的变化について調べ、その細胞傷害性 T 細胞反応からの逃避との関連について検討する。

B. 研究方法

対象：東京大学医科学研究所附属病院感染免疫内科に 1992 年 4 月から 2009 年 1 月までに通院した未治療日本人慢性 HIV 感染患者で AIDS 発症の既往がない者。

材料：初診時に近い EDTA 血を採取。血漿と PBMC を分離し、前者からウイルス RNA、後者からヒトゲノム DNA を抽出。

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。ウイルス遺伝子配列の決定：ウイルス RNA より、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 population sequence を得た。

キメラウイルスの作製：*gag-protease* 領域を増幅し、実験株ウイルス NL4-3 に挿入しキメラウイルスを作製し、これらを GFP reporter T cell line (CEM 由来) に感染させ、その GFP 発現細胞の

比率を FACS Calibur により経時的に測定し、増幅曲線の傾きをそれぞれのウイルスについて求め比較する。

(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

サブタイプ B HIV-1 に感染している患者のうち、計 156 人からキメラウイルスが作製できた。Gag-protease に関連したウイルス複製能は、患者の初診年と有意な負の相関関係を示した (図 1)。多変量解析によると、この負の相関関係は、患者の CD4 陽性 T 細胞数と血中ウイルス量とは無関係であることがわかった。また、世界各国の subtype B を含めて系統樹を描いたところ、日本人からのウイルスのみからなるクラスター (n=55) が認められた。この日本クラスターのみに限った解析でも、キメラウイルスと初診年の間には有意な負の相関関係が認められたため、遺伝的に大きく異なったサブタイプ B 同士を、流行初期と後期の間で比較しているわけではないことが示唆さ

れた。また、2000年以前の患者では、その HLA-A24 の発現の有無により、キメラウイルスの複製能力に差が認められたが (A24 陽性 < A24 陰性)、その違いは近年のウイルス間では認められなくなっていることが分かった。

D. 考察

日本で流行している HIV-1 の複製能が低下してきていることが示唆されたが、調査されたのは Gag-protease に関してのみであり、完全ウイルス (whole virus) の複製能力ではない。完全ウイルスに含まれる envelope は急性感染期から進行感染期までの間、一感染個体内で大きく変化していくことが分かっているため、真の HIV-1 複製能の変化を捉えるために、理想的には急性感染期の完全ウイルスを流行初期と後期で比較することが必要かもしれない。また、手法上の問題点として、キメラウイルスのバックボーンとなっている NL4-3 と臨床株由来の gag-protease の相性 (compatibility) があげられる。NL4-3 は古い実験株であるため近年のウイルスとは遺伝的距離が長く相性が悪いため、このような結果を得た可能性は否定できない。複製能低下の機序としては、仮説通り CTL 反応からの逃避変異の蓄積が原因となっているかは明らかでないが、約 70% もの日本人が発現している HLA-A24 に関して、間接的に示唆する所見が得られたことを考えると、今後、より大きなスケール、長期間、別のヒト集団での確認が必要であろう。

E. 結論

日本で流行する HIV-1 の Gag-protease に関連した試験管内複製能が近年低下している可能性が示唆された。邦人で最も頻度の高い HLA-A24 に拘束される CTL 応答からの Gag-protease 内の逃避変異がウイルス複製能力を減弱させると仮定すると、それら逃避変異体が A24 陰性の邦人集団内にも広がり、近年の優勢なウイルス株になっている可能性が示唆された。

F. 研究発表

1 論文発表

1. Nakayama, K., Nakamura, H., Koga, M., Koibuchi, T., Fujii, T., Miura, T., Iwamoto, A., Kawana-Tachikawa, A. Imbalanced Production of Cytokines by T Cells Associates with the Activation/Exhaustion Status of Memory T Cells in Chronic HIV Type 1 Infection. AIDS Res Hum Retroviruses. 2011 Sep 23. [Epub ahead of print]
2. Mori, M., Sriwanthana, B., Wichukchinda, N.,

Boonthimat, C., Tsuchiya, N., Miura, T., Pathipvanich, P., Ariyoshi, K., Sawanpanyalert, P. Unique CRF01_AE Gag CTL epitopes associated with lower HIV-viral load and delayed disease progression in a cohort of HIV-infected Thais. PLoS One. 2011;6(8):e22680.

3. Huang, KH., Goedhals, D., Carlson, J.M., Brockman, M.A., Mishra S, Brumme, Z.L., Hickling, S., Tang, C.S., Miura, T., Seebregts, C., Heckerman, D., Ndung'u, T., Walker, B., Klenerman, P., Steyn, D., Goulder, P., Phillips, R., Bloemfontein-Oxford Collaborative Group, van Vuuren, C., Frater, J. Progression to AIDS in South Africa is associated with both reverting and compensatory viral mutations. PLoS One. 2011 Apr 22;6(4):e19018.
4. Dahirel, V., Shekhar, K., Pereyra, F., Miura, T., Artyomov, M., Talsania, S., Allen, T.M., Altfeld, M., Carrington, M., Irvine, D.J., Walker, B.D., Chakraborty, A.K. Coordinate linkage of HIV evolution reveals regions of immunological vulnerability. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jul 12;108(28):11530-5.

2. 学会発表

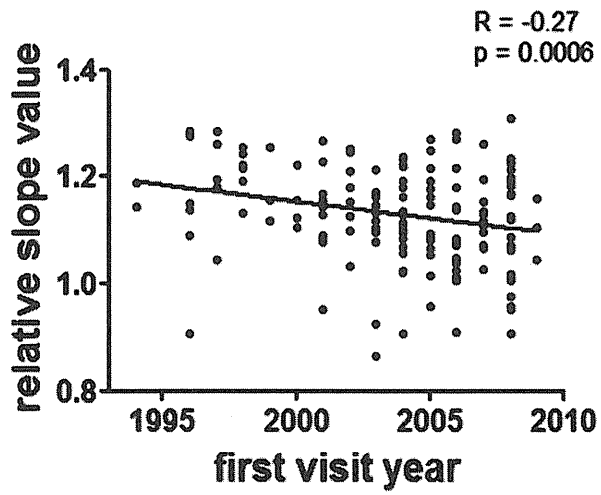
- 1) S. Nomura, N. Hosoya, T. Kikuchi, M. Koga, H. Nakamura, T. Koibuchi, T. Fujii, A. Kawana-Tachikawa, A. Iwamoto, T. Miura. Replication capacities of chimeric NL4-3 encoding gag-protease from modern HIV-1 isolates are significantly reduced compared to those derived from isolates in the early days of epidemic in Japan. 6th IAS Conference on HIV pathogenesis, Treatment and Prevention. July 17-22, 2011. Rome, Italy.
- 2) 野村滋、菊地正、細谷紀彰、古賀道子、中村仁美、鯉渕智彦、藤井毅、立川愛、岩本愛吉、三浦聡之. 無症候慢性 HIV-1 陽性者由来 gag-protease を発現するキメラ NL4-3 ウイルス複製能の患者初診年による変化. 第 25 回日本エイズ学会学術集会. 2011.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

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

図1.

キメラHIV-1の複製能と患者初診年 (cladeB: n=156)



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 蛋白の分解を解析する目的で、サイクロヘキシミドで Gag-GFP の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+ Clasto-lactacystin β -lactone) とリソソーム阻害剤 (クロロキン) を用いて蛋白分解を阻害し、残存 Gag-GFP 蛍光を経時的に調べたところ、細胞内 GagGFP の半減期は約 8 時間であり、分解の主な経路はプロテアソーム経路であることが確認された。次に、Gag 蛋白を抗原提示経路へ誘導する目的で、Gag 蛋白の N 末端開始コドンメチオニンをアルギニンに置換するとともに、Gag 蛋白を LAMP1 と融合させた。これら 2 つの分子修飾した Gag 蛋白の新規蛋白合成を止め、かつプロテアソーム阻害剤とリソソーム阻害剤で蛋白質分解を阻害し、それぞれの分解経路を調べたところ、開始コドンアルギニンの Gag 蛋白はプロテアソーム経路で効率良く分解され、一方 LAMP1 融合 Gag 蛋白はリソソーム経路で分解されることが判明した。

A. 研究目的

細胞内で新規合成された endogenous 抗原の一部は、プロテアソームですみやかに分解された後 (Nature, 404: 770-774, 2000)、粗面小胞体内で MHC クラス I 分子と結合し、細胞表面に輸送され細胞傷害性 T 細胞に提示される。一方、exogenous 抗原はエンドサイトーシスにより取り込まれて分解された後、エンドソーム内で MHC クラス II 分子に結合し、細胞表面に逆輸送されヘルパー T 細胞に提示される。いずれの経路も、抗原が特定コンパートメントへ輸送され分解されることが必須であり、それらを制御できれば抗原提示効率の上昇が期待できる。

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。そのためには Gag 蛋白を抗原提示の特定コンパートメント (粗面小胞体やエンドソーム) に効率良く導く工夫が必要である。粗面小胞体 (J Virol, 67: 4972-4980, 1993) やエンドソーム (J Virol, 83: 5375-5387, 2009; PLoS Biol, 4: e435, 2006) に局在する Gag 蛋白変異体が報告されていることから、これらの Gag 蛋白変異体をさらに改変することも検討に値する。一方、抗原を MHC 抗原提示経路へ導く方法としていくつかの分子修飾が知られている。例えば、MHC クラス I 経路への誘導法として PEST 配列の付加 (Science, 234: 364-368, 1986) や N 末端メチオニンのアミノ酸置換が、クラス II 経路への誘導法としてクラス II 分子と共局在する LAMP1 (Proc Natl

Acad Sci USA, 92: 11671-11675, 1995) やインバリアント鎖への付加 (Immunol Rev, 172: 87-96, 1999; EMBO J, 27: 1-5, 2008) が報告されている。

本研究では、まず HIV-1 Gag 発現細胞における Gag 抗原の分解を経時的かつ定量的に測定する方法を確立するとともに、MHC 抗原提示経路へ導く分子修飾として、N 末端アミノ酸置換 Gag 蛋白と LAMP1 融合 Gag 蛋白コンストラクトを作製しそれら Gag 蛋白の分解を解析することとした。

B. 研究方法

(1) DNA 構築

真核細胞発現 pCAGGS プラスミド (Actin プロモーター、スプライシング配列、SV40 ori をもつ) を用いて、HIV-1 pNL43 株 Gag 蛋白に EGFP を付加した (Gag-GFP) 発現プラスミドを作製した。

MHC クラス I 経路への誘導を目的に、開始コドンメチオニン Gag 蛋白と開始コドンアルギニン Gag 蛋白 (いずれも、N 末端にヒトモノユビキチンを、C 末端に FLAG 配列を付加) (Ub-MGagFL、Ub-RGagFL) の発現プラスミドを pCAGGS を用いて作製した。クラス II 経路への誘導を目的に、LAMP1 融合 Gag (LAMP1-Gag) 蛋白発現プラスミドを作製した。

(2) 細胞培養と阻害剤処理

HeLa 細胞に Lipofectamine2000 (Invitrogen 社) を用いて上記の発現プラスミドを transfection した。18 hr 後、33 μ g/mL サイクロヘキシミド (蛋

白合成阻害剤) と 10 μ M MG-132+10 μ M Clasto-lactacystin β -lactone (プロテアソーム阻害剤) あるいは 100 μ M クロロキン (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。

(3) Gag 抗原の局在

発現細胞を固定し、FLAG 抗体あるいは p24CA 抗体で免疫染色した (Gag-GFP 発現細胞は固定のみ)。細胞内局在を共焦点顕微鏡で観察した。

(4) Gag 分解の定量

細胞内 Gag 抗原を抗 FLAG あるいは抗 p24CA 抗体を用いた Western blotting で調べた。Image J でバンドの intensity を測定した。Gag-GFP 発現細胞は GFP 蛍光をプレートリーダーで経時的に測定した。

(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。

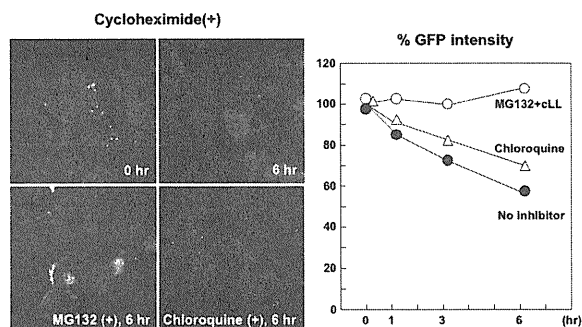
C. 研究結果

(1) 細胞内 Gag 抗原の分解の経時的解析 (Gag-GFP の利用)

HeLa 細胞に Gag-GFP を発現させ、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 β -lactone) あるいはリソソーム阻害剤 (クロロキン) を添加して培養した。経時的に (0, 1, 3, 6 hr) GFP 蛍光量をプレートリーダーで測定した。新規蛋白合成を止めると細胞内の Gag-GFP 蛍光量は経時的に減少し、その半減期は約 8 時間と概算された。ところが、プロテアソーム阻害剤を処理するとこの減少は見られなくなった。一方、クロロキン処理では Gag-GFP 減少を止められなかった (図 1 右)。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。

0 hr と 6 hr 後の細胞を共焦点顕微鏡で観察し残存する Gag-GFP を調べたところ、相関する結果が得られた。すなわち、新規蛋白合成を止めると、形質膜に集積した Gag-GFP のかなりが消失した。クロロキン処理細胞でも同じであった。一方、プロテアソーム阻害剤で処理した場合、Gag-GFP は残存するものの、核周辺領域に集積する像がしばしば認められた (図 1 左)。

図 1. 細胞内Gag-GFPの分解

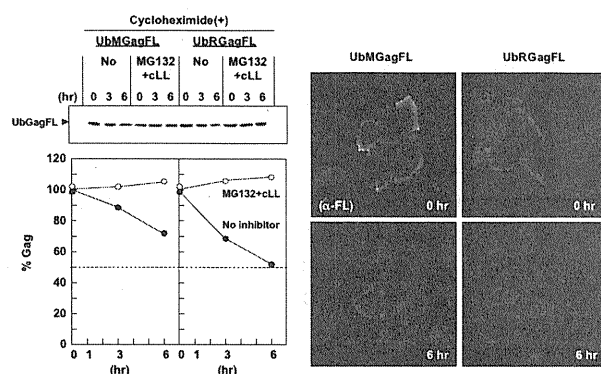


(2) 開始コドンアルギニン Gag 抗原の分解経路の解析

ユビキチンとガラクトシダーゼの融合蛋白質 (Ub-X- β galactosidase) を用いた実験により、蛋白質 N 末端のユビキチンが翻訳と共にユビキチン加水分解酵素により除去され、融合させたガラクトシダーゼの N 末端アミノ酸が露出することが報告され (Biochemistry, 37: 3358-3368, 1998)、またこの N 末端のアミノ酸の種類によりガラクトシダーゼの半減期が異なる N 末端法則が見いだされている。真核細胞では塩基性アミノ酸 (R, K, H) と大きな疎水性アミノ酸 (F, L, W, Y, I) は不安定性を与えるアミノ酸である (Genes Cells, 2: 13-28, 1997)。これらの性質を利用し、開始コドンメチオニンとアルギニンの Gag 蛋白 (いずれも、N 末端にユビキチン、C 末端に FLAG 配列を付加した Gag 蛋白) すなわち Ub-MGagFL と Ub-RGagFL の発現プラスミドを作製した。HeLa 細胞で発現させた後、蛋白合成阻害剤サイクロヘキシミドとプロテアソーム阻害剤 (MG-132+Clasto-lactacystin β -lactone) を添加して培養し、経時的に (0, 3, 6 hr) 細胞を回収した。Western blotting で調べたところ、Ub が除去された M/R-GagFL に相当するバンド (約 56 kDa) が検出された。そのバンド intensity を Image J で測定したところ、Ub-RGagFL は Ub-MGagFL より速く分解された。プロテアソーム阻害剤を処理するといずれの GagFL でもこの減少は見られなくなった (図 2 左)。従って、開始コドンアルギニンの Gag 蛋白はメチオニンの Gag 蛋白より、効率良くプロテアソーム経路で分解されると考えられた。

0 hr と 6 hr 後の細胞を共焦点顕微鏡で観察したところ、RGagFL は 6 hr 後にはほとんど認められなかったのに対し、MGagFL ではわずかには確認できたことから、RGagFL の方が分解されやすいと判断された (図 2 右)。

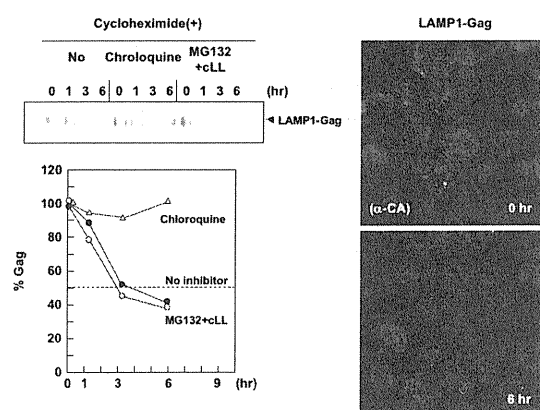
図2. M/R-Gag蛋白の分解



(3) LAMP1 融合 Gag 抗原の分解経路の解析

LAMP1 は I 型膜貫通糖蛋白質であり、粗面小胞体で合成されゴルジを経て形質膜に到達した後、取り込まれエンドソームで MHC クラス II 分子と共局在することが知られている。クラス II 分子と共局在する性質を利用する目的で、LAMP1 融合 Gag (LAMP1-Gag) 蛋白発現プラスミドを作製した。HeLa 細胞に発現させた後、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 β -lactone) あるいはリソソーム阻害剤 (クロロキン) を添加して培養した。経時的に (0, 1, 3, 6 hr) 細胞を回収し Western blotting で調べたところ、新規蛋白合成を止めた場合には細胞内 LAMP1-Gag は経時的に減少した。この減少はクロロキン処理で阻止されたが、プロテアソーム阻害剤では止められなかった (図 3 左)。これらの結果から、LAMP1 との融合により Gag 抗原の輸送経路がプロテアソーム経路からリソソーム経路に変化したと考えられた。

図3. LAMP1-Gag蛋白の分解



0 hr と 6 hr 後の細胞を共焦点顕微鏡で観察したところ、0 hr の時点では LAMP1-Gag は細胞質内

に粒状に認められたが、6 hr 後には少なくなった (図 3 右)。

D. 考察

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 Gag 蛋白半減期 (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、本研究で用いた細胞は transfection 24 hr 前後のものであり、もっと時間が経過した細胞では形質膜に到達した Gag 抗原がエンドサイトーシスされることが報告されていることからリソソーム経路での分解もおこると推測される。

MHC クラス I 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を経て 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 蛋白の約 30% が蛋白合成後 10 分以内に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)。本研究では、DRiP として認識される効率を上げる目的で、文献 (J Immunol, 180: 372-382, 2008) を参考に、開始コドンアルギニンの Gag 蛋白 (RGagFL) を作製し、開始コドンメチオニンの Gag 蛋白 (MGagFL) と比較したところ、RGagFL は MGagFL より効率良くプロテアソーム経路で分解されることが示唆された。しかし、クラス I 分子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 を用いた実験より RI を用いた pulse-chase 実験が必要であると思われる。

一方、MHC クラス II の抗原提示を目的に、文献 (J Biol Chem, 278: 37926-37936, 2003) を参考に、LAMP1-Gag を作製した。共焦点顕微鏡で観察したところ、LAMP1-Gag が細胞質内小器官に蓄積し、また分解経路がプロテアソーム経路からリソソーム経路に変化したことから、LAMP1 との融合により Gag 抗原の標的器官が変化したと考えられた。LAMP1 は I 型膜貫通蛋白質であり、粗面小胞体で合成され形質膜に到達した後、エンドサイトーシスされることが知られている。これらの局在シグナル、すなわち、LAMP1 の N 末端小胞体膜貫通シグナル配列や C 末端エンドサイトーシスシグナル配列 YQTI を保存し不要な領域を除いた LAMP1 断片の検討も改善事項の 1 つと思われる。また、本研究で用いた細胞は HeLa 細胞であり、MHC クラス II 分子の発現を欠く細胞である。マ