

## ウイルスベクターワクチン抗原に対する免疫応答と HIV 感染制御

|       |       |             |       |
|-------|-------|-------------|-------|
| 研究分担者 | 横田 恭子 | 国立感染症研究所免疫部 | 第一室長  |
| 研究協力者 | 寺原 和孝 | 国立感染症研究所免疫部 | 研究員   |
| 研究協力者 | 石毛 真行 | 国立感染症研究所免疫部 | 協力研究員 |
| 研究協力者 | 渋沢謙太郎 | 国立感染症研究所免疫部 | 流動研究員 |
| 研究協力者 | 光木 裕也 | 国立感染症研究所免疫部 | 流動研究員 |

**研究要旨：**ヒト化マウスを用いた *in vivo* の X4 型と R5 型 HIV-1 同時感染において、CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>記憶 T 細胞への R5 優位の感染と R5 感染による強い CD4 発現抑制を認めた。一方、X4 は naïve CD4<sup>+</sup>T に多く感染するが、ウイルス産生量は memory に感染した方が高いことが特徴的であった。麻疹ウイルス envelope で被覆したレンチウイルスベクターは未刺激 T 細胞や SLAM 受容体陽性成熟樹状細胞に VSV-G 被覆よりも効率よく遺伝子導入可能であることから、ヒト化マウスでの細胞標的化による効率良いウイルス増殖抑制効果が期待された。

### A. 研究目的

抗原提示細胞である樹状細胞(DC)や記憶 T 細胞への潜伏感染およびウイルス再活性化を制御することはエイズ病態進行阻止に重要である。本研究では、記憶 T 細胞に選択的に感染する R5 型 HIV-1 が感染者体内で初期に優位となる分子機構、エイズワクチン候補である Gag 発現麻疹ウイルスや改良型 HIV 抑制性レンチウイルスベクターが DC 等の抗原提示細胞により活性化されて発揮する T 細胞の抗 HIV 応答について、ヒト化マウスモデルを利用した *in vivo/ex vivo* および *in vitro* の系で解析することを目的とする。

### B. 研究方法

#### 1) 蛍光マーカー発現 HIV-1 および組換えレンチウイルスの作製

NL432 をベースに X4(Lai)あるいは R5(AD8)型で異なる蛍光を発する組換え HIV-1 provirus (HIV-1<sub>NL-E</sub> あるいは HIV-1<sub>NLAD8-D</sub>)を 293T 細胞に transfect してウイルスを調整した。

EGFP を発現する組換えレンチウイルスベクターとして、Gag/PoL 発現プラスミド、VSV-G/Rev あるいは野生型麻疹ウイルスの envelope として N 末の一部を欠く Fusion (F)タ

ンパクと Hemagglutinin (H)タンパク発現 (九州大学・柳雄介教授より供与) 及び Rev 発現プラスミドを 293T 細胞に cotransfect してウイルスを調整した。GFP 発現麻疹ウイルスワクチン株 MV AIK-C/GFP は森川裕子教授(北里大学)より供与を受けた。

#### 2) 細胞の調製と培養

健康人より PBMC を調整し、磁気分離法により CD14 陽性細胞を positive selection で純化 (Miltenyi)した後、CD14 陰性細胞から T 細胞を negative selection kit でエンリッチした (StemCell Tech.)。分画した T 細胞は凍結保存し、CD14 陽性細胞は GM-CSF と IL-4 の存在下に 6 日間培養し、7 日目に LPS (100 ng/ml)を添加させて成熟 DC を得た。T 細胞は未刺激で 10% FCS と 5% human plasma 添加 RPMI1640 培地に IL-2 (40U/ml)を加えて培養維持した。

#### 3) HIV-1 および組換えレンチウイルスベクターの感染

HIV-1 感染は 10<sup>6</sup> 個の細胞に対して p24 Gag の量にして 200 ng 加え (MOI=0.2) (レンチウイルスベクターや HIV-1 の感染においては 10<sup>6</sup> 当たり 1 μg の p24 を MOI=1.0 とする)。室温で 2 時間 spinoculation した後 3 回洗浄して培養した。なお、組換えレンチウイルスベクター (Lenti)

の感染は MOI=1~10 で行った。

#### 4) ヒト化マウスの確立と感染実験

免疫不全(NOD/SCID Jak3KO; NOJ、熊本エイズ学術研究センター・岡田誠治教授より供与)マウスを繁殖させ、ヒト臍帯血由来造血幹細胞(CD133+)を新生マウスの肝臓に移植してヒト化マウスを作製した。移植 20 週前後で CD4 陽性 T 細胞が分化増殖してきたマウスに R5 型と X4 型 HIV-1 (200 ng の p24 量) を同時に経静脈的に感染させて約 3 週間後にマウスを殺処分し、血液、脾臓及び骨髓細胞を採取した。これらの細胞を T 細胞分化、活性化マーカー、ケモカイン受容体(CR)に対する抗体セットで染色し、FACSanto で解析した。

健康人 PBMC の利用に関しては感染研医学研究倫理委員会で承認され、献血者のインフォームドコンセントを得た。また、免疫不全マウスにヒト臍帯血幹細胞を移入して HIV-1 感染モデルを確立する研究に関しては、東京臍帯血バンクと感染医学研究倫理委員会および実験動物委員会の承認を得た。動物愛護の精神に則り、動物に与える苦痛の軽減と排除に努める。

### C. 研究結果

ヒト化マウスに X4 型と R5 型 HIV-1 を同時に同量感染させ、末梢血、脾臓、および骨髓を採取して T 細胞の分化・活性化状態と感染細胞分布を FACS で解析した。これらのマウス脾臓には多くの場合 X4 型(EGFP 陽性)と R5 型(DsRed 陽性)HIV-1 感染細胞の両者が混在していた。感染細胞におけるケモカイン受容体の発現を見ると、いわゆる CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>記憶 T 細胞分画では R5 感染細胞が多く、CD4 の downmodulation も強く誘導されており、X4 感染細胞はこの分画には少なかった(図 1)。この CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>記憶 T 細胞における R5 感染優位性は 6 匹のマウスに共通して認められ、統計学的にも有意であった (P<0.05)。即ち、X4 と R5 が同時に感染増殖している個体では、CCR5 陽性記憶 CD4<sup>+</sup>T 細胞には R5 型 HIV-1 が優先的に感染することが明らかとなった。従って、in vitro と in vivo の両方とも、CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>記憶 T 細胞には R5 型 HIV-1 が選択的に感染を成立させやすい細胞内機構が存在することが示唆さ

れた。一方、X4 感染細胞の多くは naïve phenotype であった。EGFP 陽性細胞の蛍光強度の解析から、X4 ウイルス産生量は memory 細胞の方が高いことが示唆された。

我々がこれまでに開発した、RNAi による HIV-1 抑制分子(shNef366)を発現する組換えレンチウイルス(Lenti)を特定の細胞指向性にするため、野生型麻疹ウイルスの変異 H と F タンパクを envelope として SLAM 陽性の活性化 T 細胞および樹状細胞(DC)を標的とする MV Lenti を作製した。VSV-G タンパクを envelope とする従来のレンチウイルス VSV Lenti と比較して p24 当たりの感染価は低いものの、SLAM 発現細胞への選択的感染が示された。MV Lenti が VSV Lenti と比較して優れている点は、MV Lenti が未刺激 T 細胞でも遺伝子導入、発現が可能であると報告されている(Frecha et al., Blood 112:4843, 2008)。そこで、末梢血 T 細胞に MV Lenti と VSV Lenti を p24 量にして同量感染させ(MOI=5)、IL-2 のみで維持して 3 日後の EGFP の発現を確認したところ、MV Lenti の感染では数%の CD4<sup>+</sup>T 細胞で EGFP 陽性細胞が検出されるのに対し、VSV Lenti ではほとんど感染が成立していなかった(図 2a)。

一方、単球由来 DC はレンチウイルスの感染は極低レベルに抑制されており、HIV-1 も感染によりその蛍光を検出することは困難である。そこで LPS 存在下で成熟化させて SLAM を誘導し、MV Lenti と VSV Lenti を感染させて 3 日後の EGFP をリアルタイム PCR で定量したところ、DC でも MV Lenti は VSV Lenti より遺伝子導入効率が良いことが確認された(図 2b)。そこで、DC を介した CD4<sup>+</sup>T 細胞への HIV-1 感染伝播抑制効果を比較するため、siRNA 発現 MV Lenti あるいは VSV Lenti を MOI=10 で DC に感染させ、翌日 HIV-1<sub>NLAD8D</sub> を MOI=0.2 で感染させ、24 時間培養した後、アロ CD4<sup>+</sup>T 細胞と共培養した(図 3a)。アロ刺激で活性化された CD4<sup>+</sup>T 細胞において HIV-1 感染細胞(DsRed 陽性)の頻度は MV rhNef366 では control MV Lenti と比較して低下していたが、VSV Lenti では control と比較して HIV-1 感染抑制効果は弱かった。代表的なドナーの結果を図 3b に示した。

#### D. 考察

これまでの *in vitro* と *in vivo* の解析から、CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>記憶 T 細胞は細胞レベルで R5 型 HIV-1 感染優位性を有することが明らかとなった。これは、R5 と X4 の単独感染系ではみられず、両ウイルスの同時感染時にのみ、その感染性の違いが明確になったという点は重要である。CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>記憶 T 細胞は末梢血中の大半を占める naïve 細胞とは異なり、一度活性化されて静止状態にある記憶細胞で、CCR5 からの細胞内シグナル伝播経路が確立されていると思われる。現時点では、R5 型 HIV-1 感染において、この CCR5 からのシグナル伝達系タンパクとウイルス RNA あるいはタンパクとの相互作用が逆転写あるいは核への移行を促進している可能性がある。

従来の VSV-G を envelope とするレンチウイルスベクターは endocytosis により感染するため、HIV-1 の envelope による膜融合感染に類似した麻疹ウイルス H/F タンパクを envelope とするベクターの方が導入効率がよい可能性を考えた。しかしながら、その手法は既に報告されており、未刺激の T 細胞への遺伝子導入効率が良いことが示されていた。実際、我々の実験でも、VSV Lenti では遺伝子発現が見られなかった EGFP が MV Lenti 感染では、SLAM 陽性細胞で検出された。この感染効率の増強 (EGFP 発現) 効果に SLAM を介した刺激が関与しているのかどうかは興味ある点である。今後、RNAi による HIV 抑制効果を有する Lenti shNef366 をヒト化マウス内の SLAM 陽性ヒト細胞に導入する方法として、この MV Lenti は有用である。

#### E. 結論

ヒト化マウスを用いた *in vivo* の X4 型と R5 型 HIV-1 同時感染において、CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>記憶 T 細胞における R5 優位の感染が認められ、X4 は naïve CD4<sup>+</sup>T に高頻度に感染していた。ただし、X4 ウイルスの産生量は memory に感染した方が多いことが特徴的であった。麻疹ウイルスで pseudotype した MV Lenti は VSV Lenti よりも未刺激 T 細胞や SLAM 受容体誘導 DC への遺伝子導入効率が高く、HIV-1 感染 DC から CD4<sup>+</sup>T 細胞へのウイルス伝播抑制効果も強か

った。従って、MV Lenti を用いてヒト化マウスでの効率良いウイルス増殖抑制効果が期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Terahara, K., Yamamoto, T., Mitsuki, Y-y., Shibusawa, K., Ishige, M., Mizukoshi, F., Kobayashi, K., and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Fluorescent reporter signals, EGFP and DsRed, encoded in HIV-1 facilitate the detection of productively infected cells and cell-associated viral replication levels. *Front. Microbiol.*, 2:1-11, 2012.
- 2) Fujii, H, Ato, M., Takahashi, Y., Otake, K., Hashimoto, S-I., Kaji, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Fujita, M., Adachi, A., Nakayama, T., Taniguchi, M., Koyasu, S., and Takemori, T.: HIV-Nef impairs multiple T cell functions in antigen-specific immune response in mice. *Int. Immunol.* 23:433-441, 2011.
- 3) Salaun, B., Yamamoto, T., Bardran, B., Tsunetsugu-Yokota, Y., Roux, A., Baitsch, L., Rouas, R., Fayyad-Kazan, H., Baumgaertner, P., Devevre, E., Ramesh, A., Braun, M., Speiser, D., Autran, B., Martiat, P., Appay, V., and Romero, P.: Differentiation associated regulation of microRNA expression *in vivo* in human CD8<sup>+</sup> T cell subsets. *J. Transl. Med.* 9:44-52, 2011.
- 4) Takeuchi, K., Nagata, N., Kato, S., Ami, Y., Suzaki, Y., Suzuki, T., Sato, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., Mori, K., Nguyen, V. N., Kimura, H., and Nagata, K. (2012). Wild-type measles virus with the hemagglutinin protein of the Edmonston vaccine strain retains wild-type tropism in macaques. *J. Virol.* in press, 2012.

##### 2. 学会発表

- 1) Mitsuki, Y-y., Shibusawa, K., Terahara, K., Kobayashi, K., Moriakwa, Y., Takeda, M., Yanagi, Y., and Tsunetsugu-Yokota, Y.: HIV-1 infection enhances the susceptibility of T cells to measles virus infection by upregulating signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) expression. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress XV International Congress of Virology. September, 2011, Sapporo.

- 2) Tsunetsugu-Yokota, Y.: HIV-1 transmission through immunological synapse and T-cell activation: How can we control virus replication? US-Japan AIDS Panel Meeting, September 21-23, 2011, Atlanta, USA.
- 3) Tsunetsugu-Yokota, Y., Ishige, M., Mitsuki, Y-y., Shibusawa, K., Okada, S., and Terahara, K.: Impact of selective infection and expansion of CCR5-utilizing HIV-1 in CD4+CXCR4high CCR5+ memory T cells in humanized mouse model. 8th German-Japanese HIV-Symposium, November 21-22, 2011, Bochum, Germany.
- 4) 渋谷謙太郎、寺原和孝、石毛真行、光木裕也、横田(恒次) 恭子。麻疹ウイルス偽型化 HIV-1 抑制性 shRNA 発現レンチウイルスベクターのヒト化マウスにおける in vivo 評価。第

- 25回日本エイズ学会学術集会・総会、12月、東京。
- 5) 石毛真行、寺原和孝、渋谷謙太郎、光木裕也、池野翔太、小林和夫、岡田誠治、横田(恒次) 恭子。R5 および X4 HIV-1 同時感染ヒト化マウスモデルによる感染早期のウイルス優位性の解析。第25回日本エイズ学会学術集会・総会、12月、東京。

## Ⅱ. 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

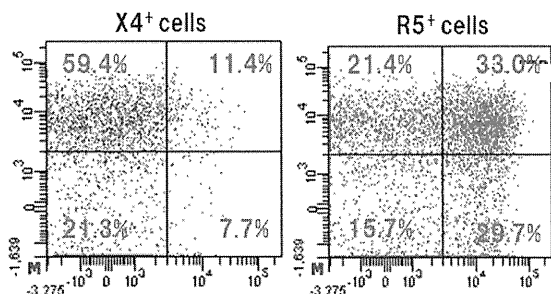


図1. X4型とR5型HIV-1に同時感染したヒト化マウスにおけるウイルス感染細胞のケモカイン受容体発現。ヒト化マウスにX4あるいはR5型HIV-1を同時感染させ、脾臓細胞中のR5(DsRed)型あるいはX4(EGFP)型HIV-1感染細胞のケモカインレセプター発現をFACSで解析した。横軸はCCR5 縦軸はCXCR4の発現を示す。CCR5陽性記憶CD4+T細胞(右上の分画)ではR5型HIV-1感染が優先的におき、X4感染細胞は少ない。

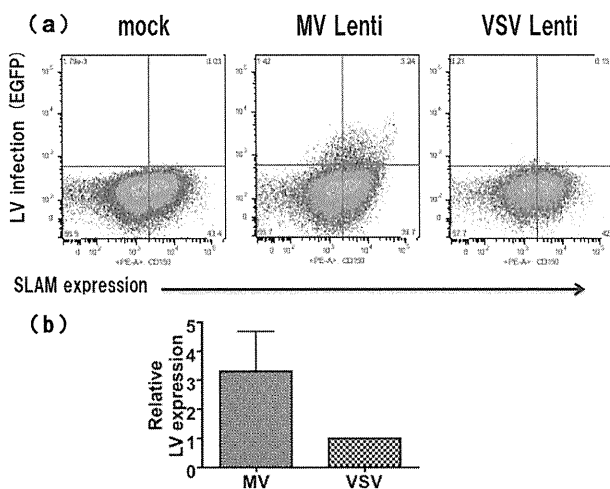


図2. MV Lenti と VSV Lenti の遺伝子導入効率の比較 (a)末梢血T細胞にMV Lenti と VSV Lenti をMOI=5で感染させ、3日後のEGFP陽性感染細胞をFACS解析した。横軸はSLAMの発現を示す。(b)MDDCにLPSを加えてSLAM陽性成熟DCを調整し、MV Lenti (MV) と VSV Lenti (VSV) をMOI=10で感染させて2日後のRNAを調整し、EGFP発現量を定量比較した(2ドナー)。縦軸はVSVでのEGFP発現量を1とした時の相対値を表す。

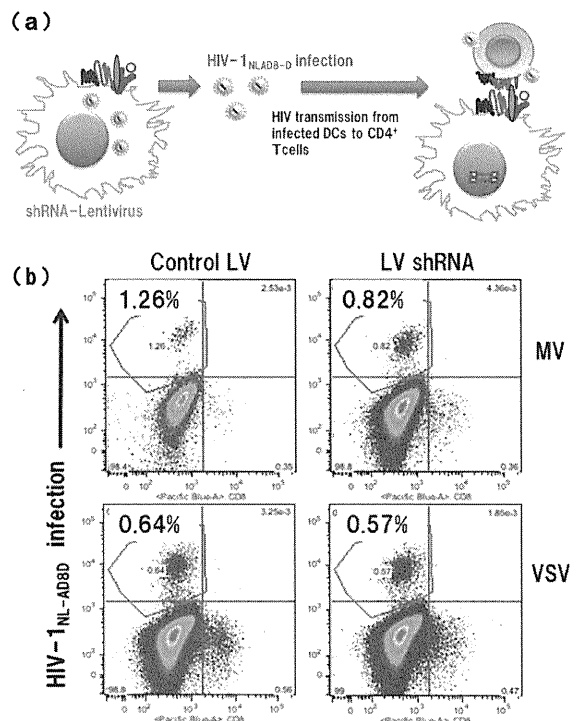


図3. siRNAを発現するMV Lenti と VSV Lenti によるDC-T細胞HIV-1感染伝播抑制効果 (a)実験の流れを示した。shRNA レンチウイルスベクターをMDDCに感染させ、翌日HIV-1を感染させた(MOI=0.1)。更に翌日DCを洗浄後エンリッチしたアロCD4+T細胞(>90%)と共培養し、5日後の感染細胞をFACS解析した。(b)代表的なドナーのCD4+T感染CD4+T細胞頻度。MV (MV Lenti、上段)、VSV (VSV Lenti、下段)によるHIV-1抑制効果はHIV-1<sub>NL-ADSB</sub>が発現するDsRedの陽性細胞頻度(図内の数値)で評価した。左のパネルがコントロールレンチウイルス、右側がshNef366発現レンチウイルスによる遺伝子導入群。横軸はCD8の発現。

## OX40L/OX40 を介する HIV 感染増殖抑制の研究

研究分担者 田中勇悦 琉球大学 大学院医学研究科 免疫学講座

研究要旨：OX40 刺激は、CCR5 指向性 (R5-)HIV-1 の感染を抑制するが、CXCR4 指向性 (X4-)HIV-1 の感染を助長する。そこで OX40 刺激による R5-HIV-1 感染抑制法をサポート方法として、ヒト CXCR4 に対する 3 種類の単クロン抗体の活用を試みた。A120 抗体は CXCR4 細胞外領域のループ (ECL) 1 および ECL-2 からなる立体構造依存性エピトープを認識するが、この抗体は、X4-HIV-1 のみならず、R5-HIV-1 感染に対しても高い抑制活性を示した。中和能のある抗  $\beta$  ケモカイン単クロン抗体を感染系に加えると、特に MIP-1 $\alpha$  に対する抗体が A120 の R5 HIV-1 抑制を有意に解除した。したがって、A120 により産生される MIP-1 $\alpha$  が R5-HIV-1 抑制のファクターであることが示唆された。A120 は調べた種々のクレード 17 株の HIV-1 全てに感染抑制活性を示した。

### A. 研究目的

我々は、TNF ファミリーの OX40L による活性化 T 細胞への刺激が  $\beta$  ケモカイン産生を促進させ、結果として CCR5 指向性 (R5-)HIV-1 の感染を抑制することを新たに発見し既に報告した。OX40L による T 細胞への刺激は、特に抗原特異的エフェクターメモリー T 細胞の長期生存に関与することから、OX40L 刺激は、HIV-1 感染者における免疫応答の増強にも寄与することと期待できる。

しかしながら、この刺激では CXCR4 指向性 (X4-)HIV-1 の感染を抑制できず、逆に NF $\kappa$ B 刺激を介して X4-HIV-1 の感染を助長することが問題である。したがって、OX40L 刺激の臨床応用には、CXCR4 を使用する X4-HIV-1 や両者を利用できる X4R5-HIV-1 感染に対する防御策が必要である。

そこで、本年度の研究では、CXCR4 を使用する HIV-1 感染を抑制する手段として、我々が開発した抗ヒト CXCR4 単クロン抗体に注目し、その HIV-1 感染抑制能を検討することを目的とした。

### B. 研究方法

健康人由来の新鮮末梢血単核球 (PBMC) を抗 CD3 (OKT-3) を固相したプレート内において抗 CD28 抗体 (可溶性) 存在下で活性化し、翌日、細胞を集めて R5-HIV-1 や X4-HIV-1 に低い感染度 (m. o. i.  $\sim$ 0.005、または p24 相当 10 ng) で 2 時間感染させた。洗浄後、抗ヒト CXCR4

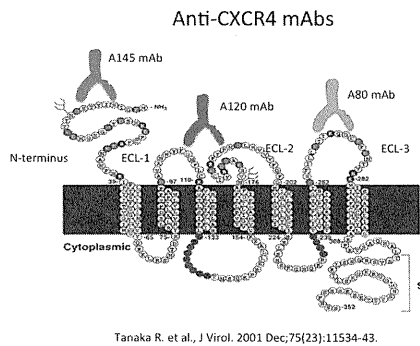
単クロン抗体を加えて 37 $^{\circ}$  C で培養した。HIV-1 の増殖は、培養上清中の p24 抗原を ELISA で測定することによりモニターした。感染細胞数の計測には、細胞内 p24 染色を特異的単クロン抗体で染色後、フローサイトメトリー用の細胞計測ビーズを用いた。サイトカインの定量は市販のキットで行った。 $\beta$  ケモカインに対する阻止抗体は、市販のものを用いた。

本研究は本学バイオハザード委員会、動物実験委員会、遺伝子組換え生物等使用実験安全委員会、臨床研究倫理委員会の承認を得て行った。ヒト細胞材料入手は提供者の同意を得て行いその人の利益ならびに人権保護の取り扱いに十分配慮した。

### C. 研究結果

OX40 を介する R5-HIV-1 感染抑制の際の X4-HIV-1 感染促進を解決する方法として、ヒト CXCR4 に対する 3 種類の単クロン抗体の活用を試みた。それぞれ異なるエピトープを認識するラット IgG 抗体であり、A120 抗体は CXCR4 細胞外領域のループ (ECL) 1 および ECL-2 からなる立体構造依存性エピトープを認識し、A145 抗体は N 末領域を、A80 抗体は ECL-3 領域を認識する。これら抗体の HIV-1 感染に対する影響を活性化した初期 PBMC 培養系で比較検討した。

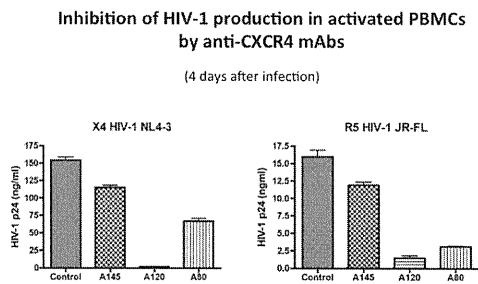
(以下にエピトープ領域の模式図を示す)



Tanaka R. et al., J Virol. 2001 Dec;75(23):11534-43.

活性化した PBMC を標的細胞としたのは、この系がより生体内に近い感染系だからであり、HIV-1 が好む活性化 CD4<sup>+</sup>T 細胞のみならず、R5-HIV-1 に感受性がある単球も含まれる。

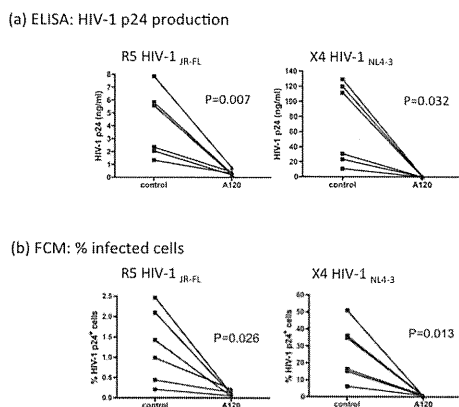
下図に示す様に、p24 産生でみると用いた抗 CXCR4 単クローン抗体は X4-HIV のみならず R5 HIV-1 の感染増殖を抑制した。



A120 mAb is the most potent among mAb tested.

抑制の程度は A120>A80>A145 であった。X4-、R5- HIV-1 感染に対して A120 が最も抑制度が高いので、A120 を選択し、次のように R5-HIV-1 抑制の詳細なメカニズムの検討を試みた。フローサイトメトリーでの解析により、A120 は HIV-1 の感染細胞での増殖抑制でなく、感染細胞を含む PBMC 内での新たな感染を抑制することが明らかとなった (次の図)。

The A120 mAb inhibits HIV-1 infection in activated PBMCs from 6 different donors

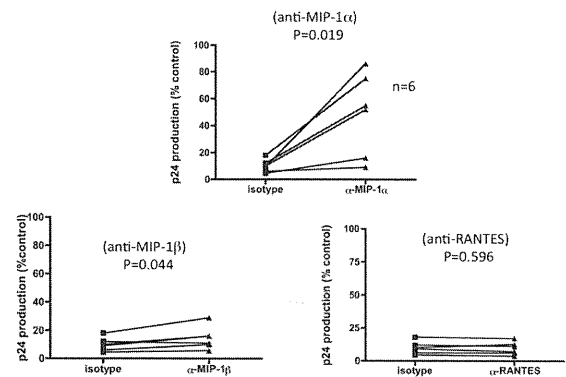


既に報告したように、X4 HIV-1 感染抑制は A120

の細胞結合が立体的にウイルスの感染初期段階を抑制することが明らかであるが、R5-HIV-1 の抑制は抗体の直接的な影響とは考えられない。さらに、A120 抗体液には細胞毒性はなく、感染細胞からのウイルス産生にも影響せず、またエンドトキシンの混入もなかった。

そこで、CCR5 への HIV-1 結合を抑制する  $\beta$  ケモカインの関与を次に調べた。中和能のある抗  $\beta$  ケモカイン単クローン抗体を感染系に加えると、特に MIP-1 $\alpha$  に対する抗体が A120 の R5 HIV-1 抑制を有意に解除した。MIP-1 $\beta$  抗体も弱い抑制解除効果を示したが、RANTES 抗体は何の効果も示さなかった。したがって、A120 により産生される MIP-1 $\alpha$  が R5-HIV-1 抑制のファクターであることが示唆された。

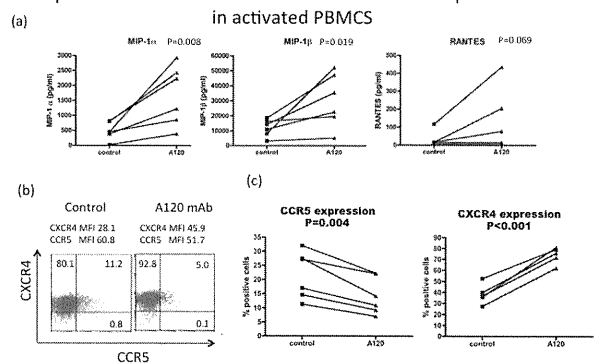
Involvement of CCR5-binding chemokines in the A120 mAb-mediated R5 HIV-1 suppression



次に実際に A120 抗体処理が PBMC に対して  $\beta$  ケモカイン産生を促すかを調べた。次の図にあるように A120 抗体により、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$  が有意に産生増強された。RANTES 産生には影響がなかった。

また、A120 抗体処理すると培養一日目において、CD4<sup>+</sup>T 細胞上の CCR5 の発現が抑制された。逆に CXCR4 の発現は増強された。

The A120 mAb-treatment induces production of CCR5 binding  $\beta$ -chemokines and down-modulation of CCR5 expression in activated PBMCs



どの細胞群が  $\beta$  ケモカイン産生をするかをマグネット細胞除去法で調べると、T 細胞のみならず、単球が  $\beta$  ケモカイン産生に関与す

ることが明らかとなった。

最後に、種々の HIV-1 クレードに属する X4-、R5-、X4R5-HIV-1 への感染抑制を調べた。表に示す様に、A120 は調べた 17 株の HIV-1 全てに感染抑制活性を示した。

Suppressive effect of the A120 mAb on various clades of HIV-1 strains

| Member    | HIV-1 Subtype | Isolate   | Country of Origin | Synonym | Co-receptor Usage | Inhibition of p24 production |
|-----------|---------------|-----------|-------------------|---------|-------------------|------------------------------|
| PRD320-01 | A             | UG275     | Uganda            | NSI     | CCR5              | 88.3%                        |
| PRD320-02 | A             | I-2486    | Ghana             | NSI     | CCR5              | 99.8%                        |
| PRD320-03 | CRF02_AG      | DJ263     | Djibouti          | NSI     | CCR5              | 94.7%                        |
| PRD320-04 | CRF02_AG      | PGC44351  | Liberia           | NSI     | CCR5              | 98.7%                        |
| PRD320-06 | B             | BZ107     | Brazil            | SI      | CXCR4             | 97.2%                        |
| PRD320-07 | C             | DJ259     | Djibouti          | NSI     | CCR5              | 91.5%                        |
| PRD320-08 | C             | ZAM18     | Zambia            | NSI     | CCR5              | 93.7%                        |
| PRD320-09 | D             | SE365     | Senegal           | SI      | CXCR4             | 98.5%                        |
| PRD320-10 | D             | UG270     | Uganda            | SI      | CXCR4             | 99.7%                        |
| PRD320-11 | CRF01_AE      | ID17      | Indonesia         | NSI     | CCR5              | 91.0%                        |
| PRD320-12 | CRF01_AE      | NPD3      | Thailand          | SI      | CXCR4             | 94.5%                        |
| PRD320-14 | F             | BCH-R07   | Romania           | SI      | CXCR4/CCR5        | 99.4%                        |
| PRD320-15 | G             | BCF-DIOUM | Zaire             | NSI     | CCR5              | 99.9%                        |
| PRD320-16 | G             | HR8793    | Kenya             | NSI     | CCR5              | 83.3%                        |
| PRD320-17 | H             | BCF-KITA  | Zaire             | NSI     | CCR5              | 92.5%                        |
| PRD320-18 | O             | BCF06     | Cameroon          | SI      | CXCR4/CCR5        | 98.3%                        |
| PRD320-19 | O             | I24798    | US                | NSI     | CCR5              | 65.6%                        |

#### D. 考察

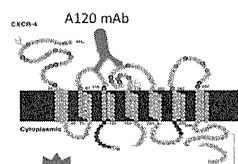
A120 によるエピトープ特異的 CXCR4 の架橋が、X4-HIV-1 のみならず、種々の R5-HIV-1 の感染に対して CCR5 結合性 β ケモカイン産生を介して抑制することを初めて明らかにした。β ケモカインはシスあるいはトランス的に CCR5 のダウンモジュレーションを起こすと考えられ、A120 による CXCR4 架橋が CCR5 のホモあるいはヘテロダイマーを形成させ、ウイルスの感染を防御していることも考えられる。

A120 による CXCR4 架橋と OX40L による OX40 の副刺激は、両者とも活性化 PBMC に β ケモカインの産生を促すが、シグナル伝達経路は異なることが推察される。相加または相乗効果が期待できる。CXCR4 抗体の中で CXCR4 N 末と ECL-3 領域に対する A145 と A80 抗体も弱いながら X4-および R5-HIV-1 感染を抑制した。これらの抗体による抑制については今後の研究課題である。本研究で新たな現象として見いだした CXCR4 抗体による X4-、R5-両 HIV-1 の感染増殖抑制を臨床的に応用するには抗体をヒト化することが必要であり、今後の課題である。

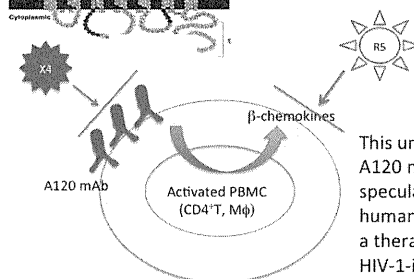
#### E. 結論

CXCR4 の抗体によるエピトープ依存的架橋は、X4-HIV-1 のみならず、R5-HIV-1 の感染も抑制し、OX40L 刺激と組み合わせることにより、X4-HIV-1 感染を抑え、より強い R5-HIV-1 抑制を期待できる。

#### Conclusions



Ligation of CXCR4 using anti-ECL-1/2 A120 mAb not only directly inhibits X4 HIV-1 but also indirectly inhibits the infection of R5 HIV-1 via the synthesis of natural CCR5 ligands.



This unique property of A120 mAb prompts us to speculate whether a humanized A120 may have a therapeutic potential for HIV-1-infected patients.

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Adachi T, Tanaka R, Kodama A, Saito M, Takahashi Y, Ansari AA, Tanaka Y. Identification of a unique CXCR4 epitope whose ligation inhibits infection by both CXCR4 and CCR5 tropic human immunodeficiency type-1 viruses. *Retrovirology*. 2011 8:84.
- Tsuruno C, Okuma K, Takahashi Y, Tanaka R, Tanaka Y, Takahama Y, Hamaguchi Y, Hamaguchi I, Yamaguchi K. A recombinant vesicular stomatitis virus encoding HIV-1 receptors and human OX40 ligand efficiently eliminates HIV-1-infected CD4-positive T cells expressing OX40. *Hum Immunol*. 2011 72(4):295-304.

##### 2. 学会発表

- 田中勇悦, 児玉晃, 西澤雅子, 杉浦互, 田中礼子. CXCR4 架橋による CXCR4 および CCR5 親和性 HIV-1 の感染制御. 第 25 回エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2011. 11. 30-12. 2:340 (164). 東京都.
- 大隈和, 深川耕次, 高馬卓也, 渡辺哲, 田中勇悦, 山本直樹, 浜口功. ヒト化 NOG マウスを用いた R5 HIV-1 標的組換え VSV の薬効性評価. 第 25 回エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2011. 11. 30-12. 2:365 (189). 東京都.
- 久保嘉直, 神山陽香, 鹿子木桂, 田中勇悦, 林 日出喜, 松山俊文, 佐藤裕徳, 山本直樹. エンドソームに局在する宿主自然免疫因子による HIV-1 増殖抑制. 第 25 回エイズ学会学術集会・総会抄録

- 集, 2011. 11. 30-12. 2:369(193). 東京都.
- 4) Tanaka Y. Epitope - specific Ligation of Human CXCR4 Blocks Infection of Activated Peripheral Blood Mononuclear Cells with Both CCR5 - and CXCR4 - tropic HIV - 1. US - Japan AIDS Panel Meeting - BTS - Atlanta. 2011. 9. 22. 米国 ジョージア州 アトランタ.
- 5) Takahashi Y, Villinger F, Ansari AA, Tanaka Y. Inhibition of X4-, R5- and R5X4-tropic HIV-1 and SHIV by a novel anti-CXCR4 monoclonal antibody in vitro. The 29th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS. 2011. 10. 26. 米国 ワシントン州 シアトル.

H. 知的所有権の出願・登録状況

琉球大学の知財部門を通して国内、国外への特許出願中である



## HIV-1 感染における調節性 T 細胞の意義

研究分担者 神奈木真理 東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 教授

**研究要旨：**抗ウイルス剤の多剤併用療法 HAART 施行中にも HIV-1 潜在感染細胞は生存し続け、治療を中止すればウイルス量は再び増加する。HIV-1 感染症の制圧には初感染の感染防御とともに、HIV-1 潜在感染細胞を標的とした治療戦略が必要である。潜伏感染細胞は静止期のメモリータイプの長命な T 細胞とされているが、試験管内実験系が無いいため研究アプローチが難しい。本研究では、このような潜在感染細胞の HIV-1 複製および発現調節機構の解明のため、HIV-1 潜在感染細胞株の実験系樹立を目標とした。メモリータイプの細胞として調節性 T 細胞 (Treg) に焦点を当て、健常人由来の末梢血単核球に CD3/CD28 および retinoic acid 刺激を加え、TGF-beta IL-2 存在下に CD4+CD25+Foxp3+ の inducible Treg (iTreg) 様細胞を樹立した。この T 細胞株は IL-2 存在下で長期培養が可能であり、長期培養中に Foxp3 は陰性になったが、無刺激では HLA-DR(-), CD45RO(+) のメモリーフェノタイプを示し、CD3/CD28 刺激により活性化し増殖する。これらの細胞にレポーター HIV-1 を感染させたところ有意な luciferase 活性が検出され、CD3 その他の免疫刺激に応じて HIV-1 発現の増減が認められた。以上のように、Luciferase レポーター遺伝子を持つ HIV-1 感染に感受性であり、様々の刺激に応じて HIV-1 発現の変化を調べることができる、ヒト由来メモリータイプの iTreg 様 CD4 陽性 T 細胞株の長期維持に成功した。今後、この細胞株は HIV-1 潜在状態や賦活化条件を解析する上で有用なツールとなり得る。

### A. 研究目的

HAART 施行中も存続する HIV-1 潜在感染細胞における HIV-1 複製および発現調節機構の解明を目指し、HIV-1 潜在感染細胞株の実験系を樹立することを目的とした。HIV-1 潜在感染細胞は静止期のメモリー T 細胞とされているが、一般に用いられている HIV-1 持続感染 T 細胞株は白血病由来の T 細胞株であるため持続的に増殖する。このため、非白血病の機能性 T 細胞である調節性 T 細胞を候補として、その長期維持を試み HIV-1 への感染感受性を調べた。

### B. 研究方法

#### 1) iTreg 様細胞株の樹立

調節性 T 細胞株を樹立するため、健常人由来の末梢血単核球 (PBMC) から CD4 陽性細胞を分離し、CD3/CD28 および retinoic acid 刺激を加え、TGF-beta IL-2 存在下に長

期培養した。

#### 2) T 細胞の形質

T 細胞の表面抗原 (CD3, CD4, CD8, CD25, HLA-DR, Foxp3, 他) はモノクロナル抗体で染色後フローサイトメトリーで評価した。培養上清中のサイトカイン産生量は ELISA 法で測定した。

#### 3) Pseudotype HIV-1 感染

293T 細胞に VSV-G 発現 plasmid と pNL43/Luc Δ env を cotransfection し、上清を VSV-G/HIV-1NL43 pseudotype virus として -80℃ に分注保存し、感染時に培養細胞に添加した。HIV-1 発現は細胞 lysate の luciferase 活性と cell counting kit による生細胞数により総合的に評価した。

### C. 研究結果

#### 1) ヒト iTreg 様細胞株の樹立と形質

健常ヒト末梢血 CD4 陽性 T 細胞から CD3/CD28、retinoic acid、TGF-beta により誘導された細胞株は、IL-2 存在下に長期生存し、刺激無しに少なくとも6ヶ月以上維持できた。

誘導した CD4(+)CD25(+)T 細胞株は初期には Foxp3(+)であり iTreg 様の形質であったが、その後 Foxp3 は陰性となった。その他、CD28(+), ICOS(+), CD27(+), CD45RA(-), CD45RO(+)のメモリーT 細胞の形質を示した。刺激の無い状態では HLA-DR 陰性であった。

#### 2) ヒト iTreg 様細胞株の HIV-1 感受性

この細胞株は VSV-G/NL4-3luc pseudotype HIV-1 感染後ルシフェラーゼ活性を示し、HIV-1 感受性であることが分かった。この活性は CD3 刺激で増加し、CD28,ICOS 刺激によって減少した。これは我々の以前の報告 (Virol. 325: 252-263, 2004) と一致する。

#### D. 考察

また、HAART 施行中にも維持される HIV-1 潜在感染細胞に関しては、静止期のメモリータイプの長命な T 細胞とされているが、試験管内実験系が無いため研究アプローチが難しかった。今回、HIV-1 感染感受性のヒト由来メモリータイプの iTeg 様 CD4(+)T 細胞株を in vitro で誘導できたことは、今後の HIV-1 潜在状態や賦活化条件を解析する上で有用なツールを提供するものである。

#### E. 結論

HIV-1 感染感受性のヒト由来メモリータイプ iTeg 様 CD4(+)T 細胞株を樹立した。

#### F.健康危険情報

無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

直接関係するもの無し

##### 2. 学会発表

1) Ahmed N, Hayashi T, Hasegawa A, Furukawa H, Okamura N, Chida T, Masuda T, and Kannagi M. Suppression of HIV-1 replication in macrophages by commensal bacteria through innate immune response.

IUMS2011 国際ウイルス学会、2011年9月、札幌

2) 神奈木 真理. 自然免疫による HIV-1 抵

抗性.

第 25 回 日本エイズ学会イブニングセミナー、2011年11月、東京

## HIV感染の病態進行に関わる免疫関連宿主因子の研究

研究分担者 立川 愛 東京大学医科学研究所 助教  
研究協力者 中山 香 エイズ予防財団 RR

研究要旨：病態進行の早い血中 HIV 量の高い感染者では血中 HIV 量の低い感染者に比して T 細胞刺激に対する初期反応としての IL-2 遺伝子発現が顕著に低下していた。刺激後時間経過とともに IFN- $\gamma$ 、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTES、IL-17 等の Th1、Th17 型免疫応答に関連するサイトカイン・ケモカインで発現低下が観察され、これらの発現低下はメモリー T 細胞の活性化・疲弊状態と関連していた。病態進行の早い感染者では、慢性感染期において持続的な活性化に伴うメモリー T 細胞の疲弊に関連した IL-2 に起因する Th1 型免疫応答全体の機能低下が起きていることが明らかとなった

### A. 研究目的

HIV 感染症において、AIDS 発症のメカニズムは未だ明らかとなっていない。HIV に感染してから AIDS 発症までの期間は感染者によって大きく異なっており、未治療の感染者でも感染後 1 年で AIDS を発症する場合もあれば、長期未発症者と呼ばれる感染者では 20 年以上 AIDS を発症しない場合もある。このような感染者間では宿主側あるいはウイルス側になんらかの相違があると考えられ、その相違を明らかにすることは AIDS 発症のメカニズムを明らかにすることとなる。

AIDS 発症までの期間と最も強い相関を示す臨床的指標が慢性期の血中 HIV 量 (VL) である。HIV 感染では感染直後に一過性の高ウイルス血症を示すが、その後特異的免疫応答の出現と共に VL は減少し、慢性期へと移行する。慢性期には比較的安定した VL が維持され、VL が低い程 AIDS 発症までの期間が長いことが明らかとなっている。そこで、本研究では VL に注目し、VL の高い感染者と低い感染者での免疫学的特性を明らかにすることで AIDS 発症の分子メカニズムを

解明し、AIDS 発症を遅延させる治療法の開発への分子基盤を築くことを目的とした。

高 VL (HVL)、低 HIV (LVL) の感染者 PBMC を用いて、T 細胞の非特異刺激に対する多種類のサイトカイン産生量を調べ、刺激後長時間 (48 時間) 培養後では HVL 群でメモリー T 細胞による主に Th1、Th17 型免疫応答に関連するサイトカイン、ケモカイン (IFN- $\gamma$ 、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTES、IL-17) の産生が特異的に低下しており、この産生能低下とメモリー T 細胞の活性化・疲弊の程度との間に関連があることを明らかにした。また、IFN- $\gamma$ 、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTES 産生細胞と IL-17 産生細胞は異なる細胞集団であったにも関わらず、相互の産生量に強い相関関係が見られた。これらの結果を考え合わせると刺激後長時間培養後に見られた IFN- $\gamma$ 、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTES、IL-17 産生は産生過程の上流に位置する何らかの共通因子によって制御されており、HVL 群ではこの共通因子に何らかの異常が生じている可能性が考えられる。これまでに IFN- $\gamma$ 、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTES、

IL-17 について刺激後 18 時間で real-time PCR により遺伝子発現解析を行い、高 HIV 群で IFN- $\gamma$  の遺伝子発現が有意に低いことを明らかにした。本年度は刺激後さらに短時間 (2.5、5 時間) での遺伝子発現解析を行い、これらのサイトカイン・ケモカインの発現低下の原因となっている遺伝子の特定を試みた。また、より網羅的に関連遺伝子を特定するためにマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。

## B. 研究方法

### <研究対象>

東京大学医科学研究所附属病院を受診する HIV 慢性感染者を対象とした。未治療で VL が高い感染者 (HVL 群)、VL が低い感染者 (LVL 群) の末梢血単核球(PBMC)を用いた。また対照として健常人群についても解析を行った。

### <マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析>

HVL 群、LVL 群、対照として健常人群、各 5 名ずつの PBMC を用いた。PBMC を PHA で刺激し 18 時間培養した後、total RNA を抽出し逆転写を行い cDNA を作製した。さらに T7 RNA ポリメラーゼを用いて RNA 増幅を行い、PHA で刺激したサンプルを Cy5 で、未刺激のサンプルを Cy3 でラベルした後、マイクロアレイ法(二色法)を用いて免疫・代謝に関連する 9000 遺伝子について発現量解析を行った。

### <定量 RT-PCR によるサイトカイン・ケモカイン mRNA 発現量の解析>

未治療 HIV 感染者の LVL 群、HVL 群の PBMC を用いた。PHA にて刺激し、2.5、5、18 時間培養後に PBMC から RNA を抽出し逆転写反応を行い、目的のサイトカインをコードする遺伝子の mRNA 量を real-time PCR により定量した。

(倫理面への配慮)

臨床材料の提供を受ける場合には研究目的や必要事項を文書を用いて説明し、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審査委員会により承認されている。

## C. 研究結果

HVL 群、LVL 群、健常人群各 5 名ずつの PBMC を非特異的に刺激し 18 時間後に total RNA を回収しマイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を行った。解析対象とした 9000 遺伝子のうち、HVL 群-LVL 群間で発現量に有意差のあった遺伝子は 163 遺伝子、HVL 群と健常人群で有意差のあった遺伝子は 246 遺伝子あり、そのうちの 55 遺伝子が重複していた。我々はこの 55 遺伝子に焦点を絞り、HVL 群で発現異常が見られる遺伝子として特定した。この遺伝子群には IFN- $\gamma$ 、Granzyme B, IL-10, IL-17F が含まれており、いずれも LVL 群、健常人群と比較して HVL 群で有意に発現が低かった。これらの遺伝子と MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES をコードする遺伝子に関して、より正確性の高い real-time PCR により発現解析を行ったところ、IFN- $\gamma$ 、Granzyme B, IL-10, IL-17F ではマイクロアレイの結果と同様に HVL 群では有意に発現量が低かったのに対して MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES は群間で全く差が見られなかった (図 1)。この結果から刺激 48 時間後に HVL 群で見られた MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES の低下は逐次反応の結果であることが確認された。これらの遺伝子はいずれも IL-2 が発現制御に関連していることが知られていることから IL-2 遺伝子についても解析を行ったところ、HVL 群で発現が低い傾向が見られた。

T 細胞刺激後の免疫応答は刺激後数十分で反応する因子から数日かけて反応する因子まであり、IL-2, IFN- $\gamma$  は刺激後 1-2 時間で発現が開始される即応性遺伝子である。そこで IL-2, IFN- $\gamma$  遺伝子について HVL 群、LVL 群の PBMC を刺激後 2.5 時間、5 時間で real-time PCR により発現解析を行った。その結果、IL-2 の発現は刺激後 2.5 時間で有意に異なっており、発現量は HVL 群で LVL 群の 1/2 以下と、顕著に低下していた (図 2)。それに対して IFN- $\gamma$  では全く相違が見られなかった。5 時間後においても同様の傾向を示していた。

#### D. 考察

本研究により、病態進行の早い高 VL の HIV 感染者 T 細胞では非特異刺激に対する初期反応としての IL-2 産生が著しく低下していること、逐次反応の結果として T 細胞による IFN- $\gamma$ 、Granzyme B、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTES、IL-17 の発現が低下しており、これらの低産生はメモリーT細胞の活性化・疲弊状態と関連していることが明らかとなった。初期反応としての IL-2 産生低下と逐次反応による IFN- $\gamma$ 、Granzyme B、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTES、IL-17 産生低下の因果関係については明らかにできなかったが、いずれの遺伝子も IL-2 が発現制御に関連していることが明らかとなっていることから、高 VL の HIV 感染者における T 細胞機能の破綻は IL-2 遺伝子の発現低下が主たる原因であると考えられる。

IL-2 遺伝子発現低下のメカニズムとして IL-2 発現に関与する分子の発現あるいは機能異常の可能性と、IL-2 遺伝子自体のエピジェネティックな制御に関連する異常の可能性が考えられる。今後、IL-2 遺伝子発現低下の分子メカニズムを明らかにし、また IL-2 遺伝子発現低下と長時間培養後の MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTES 産生量低下の因果関係を明らかにする予定である。これらを明らかにできれば HIV 感染症におけるエイズ発症阻止を目指した治療法開発の分子標的を特定することができる。

#### E. 結論

病態進行の早い高 VL 量の HIV 感染者では一次反応として IL-2 の顕著な発現低下が見られ、逐次反応として IFN- $\gamma$ 、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTES、IL-17 産生が低下していることが明らかとなった。これらのサイトカイン・ケモカイン産生低下はメモリーT細胞の活性化・疲弊状態と関連しており、HIV による持続的な活性化が IL-2 発現低下を発端とする型特異的 T 細胞機能低下を引き起こしていることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

無し

#### G. 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 *in press*
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, 105-10. 2011

##### 2. 学会発表

1. Nomura S, Hosoya N, Kikuchi T, Koga M, Nakamura H, Koibuchi T, Fujii T, Kawana-Tachikawa A.: Iwamoto A, Miura T. 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 International AIDS Society Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention, July, 2011, Rome Italy
2. 立川 (川名) 愛: HIV 感染慢性期における T 細胞の免疫病態. 第 25 回日本エイズ学会学術集会. 2011 年 12 月. 東京
3. 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 年 12 月. 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

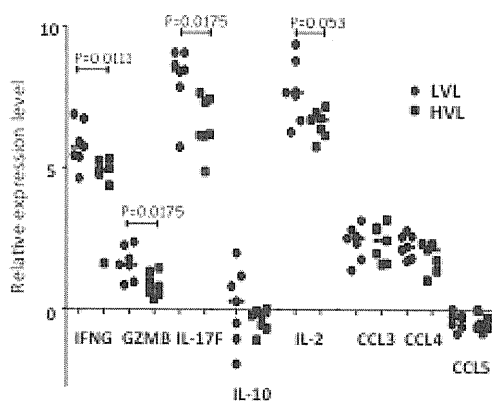


図1. 刺激18時間後の遺伝子発現

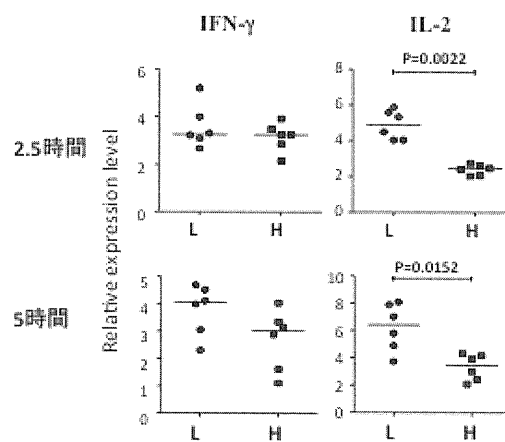


図2. 刺激2.5-5時間後の遺伝子発現

## 北タイ HIV-1 CRF01\_AE 感染長期未発症者における CTL 活性の分子レベルの研究

研究分担者 有吉 紅也 長崎大学熱帯医学研究所 臨床感染症学分野 教授

研究要旨：本分担研究は、アジア流行サブタイプ CRF01\_AE に感染したタイ人感染者コホートにおいて、宿主内ウイルス増殖を効率的に抑制する良質な CTL 免疫 (Good CTL) の特徴を分子レベルで明らかにすることにある。平成 23 年度は、Gag シーケンスの対象患者を 4 桁の HLA A, B, C 情報のあるすべての患者 627 名に増やし、うち 600 検体において gag シーケンスの編集が終了し、予備的解析を行ったところ、291 の HLA と Gag アミノ酸変異との相関が見つかり、これまでの情報量を飛躍的に（約 5 倍）増やすことに成功した。内訳は、A 遺伝子座 79 組、B 遺伝子座 118 組、C 遺伝子座 94 組である。なかでも以前のデータでは判明しなかった B\*3505 との相関が 4 か所において認められた。さらに詳しい臨床経過との相関についての解析は現在も進行中であるが、本年度は、これまで報告した CRF01\_AE ウイルスと CTL 免疫圧との相関に関する gag 遺伝子シーケンス情報量を量的および質的に飛躍的に拡大することに成功した。さらに、HLA 結合モチーフ非依存性に CTL エピトープを推定するドッキングシミュレーションモデルを開発し、公開されている HLA 結合モチーフ依存性の推定プログラムと比べてそのエピトープ推定正解率は非劣勢であることが判明した。

### A. 研究目的

近年、組換えアデノウイルスベクターによる細胞性免疫誘導型 HIV ワクチンが臨床試験で失敗したことから、ワクチンによって誘導される免疫反応の質が以前よりも増して問われるようになった。

細胞傷害性 T リンパ細胞 (Cytotoxic T-Lymphocyte, CTL) は、宿主内の HIV 増殖抑制に重要な役割を担っており、また有効な予防的もしくは治療的ワクチンの開発に不可欠な免疫反応であると考えられている。これら CTL 免疫反応による HIV 感染予防および HIV 増殖抑制効果は、HIV ウイルス蛋白の多様性や宿主遺伝子（特に HLA class I）の多様性によって決定されると考えられ、有効なワクチン開発には、特に HIV 感染後長期にわたって免疫不全が進行しない長期生存感染者の有する良質の免疫反応 (Good CTL) をより深く理解することが重要である。しかし、アジアに流行している CRF01\_AE サブタイプに感染したアジア人における臨床経過と相

関させた CTL エピトープ情報は限られている。また、長期生存者に特徴的な CTL エピトープに関しては殆どない。

そこで、本分担研究の最終目標は、アジア地域のエイズ流行最先端の北タイにおいて、HIV-1 CRF01\_AE 感染長期未発症者を含む HIV 感染自然経過コホートを立ち上げ、低ウイルス量と相関する良質な CTL 免疫反応を HLA 解析、HLA 関連 Gag タンパク変異、Gag 特異的 CTL エピトープの 3 つの側面から解析し、良質な CTL 免疫について分子レベルで明らかにすることにある。それにより、アジア型 HIV ワクチン開発に有用な情報を提供することにある。

具体的目標は：1) HIV 宿主内増殖・臨床経過に影響する HLA 遺伝子多型を明らかにする；2) HIV 宿主内増殖・臨床経過に影響する CTL 免疫からのエスケープ変異を明らかにする；3) HIV 宿主内増殖・臨床経過に影響する CTL 免疫反応をエピトープレベルで明らかにすることである。

我々は、先行研究より、HLA アリール情報 (2 桁) のある 144 名の系統樹上独立した関係にある感染者において Gag シーケンス情報と宿主 HLA 多型を比較解析することにより、56 組の頻度の高いメジャーHLA アリールと Gag アミノ酸変異との相関を同定してきた (Gesprasert G, et al., PLoS One. 5(6):e11179, 2010)。また、昨年度は、4 桁の A, B, C の 3 つの遺伝子座における HLA アリール情報のある 557 名未治療 HIV 感染者集団を解析し、B\*5701 が CRF01\_AE に感染したアジア人においても、低 HIV ウイルス量と相関する HLA アリールであることを解明し、さらに B\*5701 と同様に低ウイルス量と相関を示すアジア人特有の B\*3505 アリールを同定した (平成 22 年度成果報告書)。しかし、B\*3505 は頻度が低い為、有意に相関する Gag タンパクアミノ酸変異は見つけるに至らなかった。また HLA B15 など 2 桁内にペプチド結合モチーフのことなる多数のサブタイプがある HLA については、4 桁の情報をを用いることが不可欠であった。HLA Cw と相関する Gag アミノ酸変異はこれまで解析されていなかった。

そこで、平成 23 年度は、対象患者を 4 倍以上の 627 名に増やし、これまでに報告した CRF01\_AE ウイルスと CTL 免疫圧との相関に関する gag 遺伝子シーケンス情報量を飛躍的に拡大し、B\*3505 を含め、頻度の低いマイナーHLA アリールによって拘束される CTL 免疫圧とエスケープ変異の相互関係の理解をさらに深めることを目標とした。

また、我々は、CRF01\_AE の Gag タンパク 15-mer オーバーラッピング(olp)と Elispot 法を用いた北タイ HIV コホートの先行研究より、olp 認識と臨床経過との相関を明らかにし、また、これまでに CTL エピトープとして報告されていない領域の olp 認識と HLA アリールとの相関を少なくとも 6 か所同定してきた。しかし、同定された olp 領域は 15 アミノ酸であり、CTL エピトープの最適長である 8-11 アミノ酸ではない。一方、olp から最適 CTL エピトープを実験的に同定するには、さらに 11-mer から 8-mer の olp を作

製し細胞性免疫実験を施行しなければならず、多大な労力とコストを要する。そこで、本分担研究では、コンピュータープログラムを用いて、8-mer から 11-mer のペプチドをそれぞれの HLA 分子に仮想的にドッキングさせ、その親和度を計算することにより、最適 CTL エピトープを推定する新たな *in silico* ドッキング・シミュレーションモデルを開発し、その評価を行った。

## B. 研究方法

### B-1)

上記のとおり、平成 23 年度は、北タイ HIV コホート患者のうち、HLA アリール情報を有するすべての HIV 感染者 (627 名) を対象に、末梢血単核細胞(PBMC)より抽出した DNA から gag/pol 遺伝子を PCR 増幅し、ダイレクトシーケンスによって、Gag タンパクアミノ酸配列を推定した。さらに HLA アリールと相関する Gag アミノ酸変異を統計解析 (Fisher' s Exact Test)により同定した。

### B-2)

既知の最適 CTL が存在する olp アミノ酸配列より、4 アミノ酸配列のみのフラグメントを仮想的に作製し、対象 HLA 分子の A, B ポケット側および F ポケット側にそれぞれドッキングさせ、ドッキング親和度を U\_dock スコアとして計算した。A, B ポケット側と F ポケット側にドッキングした 4 アミノ酸フラグメントの位置関係より、当該 HLA 分子と最適にドッキングする 8 から 11-mer ペプチド (26 とおりから、上位 5 ペプチド) を推定した。コンピュータープログラムは、Molecular Operating Environment・(MOE) (CCG Inc., Montreal, Canada) および MOE-ASDock・(Ryoka System Inc., Tokyo, Japan)を用いた。新たに開発したドッキングシミュレーションモデルの評価は、ロスアラモスデータベースより 52 の最適化された HIV 特異的 CTL エピトープを含む olp を想定し評価した。(図 2) また、コントロールとして、ネット上で公開されている CTL エピトープ推定プログラム HLA restrictor 1.2 による推定率と比較した。



(倫理面への配慮)

本分担研究にて活用した北タイ HIV コホートは、2006年3月に新たにタイ政府保健省医学研究倫理委員会にて2015年まで研究することが承認されている。本研究の研究目的には、同承認内容の中に含まれている。本研究に協力したすべてのコホート参加者から署名入り同意書が得られている。

## C. 研究結果

### C-1)

平成23年度に新たに対象とした627名由来のDNA検体のうちgag/pol PCR増幅に成功したのは、608(97%)検体であった。このうち600検体においてgagシーケンスの編集が終了した。加えて予備的解析を行ったところ、291のHLAとGagアミノ酸変異との相関が見つかり、これまでの情報量を飛躍的に(約5倍)増やすことに成功した。(図1)内訳は、A遺伝子座79組、B遺伝子座118組、C遺伝子座94組である。サンプルサイズが増えることにより、以前のデータでは判明しなかった頻度の低いマイナーアレルにおける相関が多数明らかになった。なかでもB\*3505との相関が4か所において認められた。(表1)さらに、変異の有無とウイルス量との相関を調べたところ、S499L(p6)においてのみ、変異の有無とウイルス量との間に相関が認められた。しかし、この相関は、B\*5701 TW10 エピトープにおけるT242N変異のように、ウイルスフィットネスを落とすものではなく、変異のある感染者において、ウイルス量が高くなっていた。Cwアレルとアミノ酸変異との相関は94組認められたが、内22組については、Bアレルとの相関の方が強くこれらは、Cwアレルとの独立した相関ではなく、Bアレルと連鎖した連鎖不均衡によるものと考えられた。51組については、連鎖するBアレルが存在しないか、存在したとしてもCアレルとの相関の方が明らかに強くCwアレルと独立した関係にあった。以前のデータでは、不確かであった相関のうち、約2割においてその相関が消失する一方で、残りの相関関係はより確実なものとなっ

た。

### C-2)

新たに構築したドッキングシュミレーションモデルを用いて既存の最適エピトープを推定したところ、52か所のうち今回のモデルによって43(82.7%)が、5位以内に推定されていた。(図3)一方、ウェブ上で公開されているHLA restrictor 1.2を用いて同じ条件で推定させたところ、37(71.3%)において、同プログラムが推定する複数のペプチドに含まれていた。11(21.2%)のエピトープは、今回のモデルによってのみ推定が可能であった。一方、HLA restrictor 1.2によってのみ推定が可能であったエピトープは5(9.6%)であった。また、双方のプログラムを組み合わせることにより、エピトープ推定の精度がより高まることが判明した。

## D. 考察

### D-1)

今年度の最も大きな成果は、HLAとGagアミノ酸変異との相関に関する情報量を量的のみならず、質的においても、飛躍的に増やすことに成功したことにある。すなわち、HLAと相関するGagアミノ酸変異の数が増え、Cwアレルとの相関が判明したといった情報量を増やすのみならず、4桁のHLAアレルとの相関解析を可能にしたことや、これまで不確かであった相関の信頼度を上げたなど、情報の質的向上にもつながった。

HLAとGagシーケンス情報量を飛躍的に増大させた最も重要な点のひとつは、B\*3505を含めたマイナーHLAアレルによるCTL免疫圧について考察を深めることにある。その理由は、頻度の多いメジャーHLAアレルと相関するアミノ酸変異は、対象集団のなかで容易に蓄積し、ウイルスはその集団のなかで順化してゆく一方で、そのHLA免疫圧による影響は減弱してゆくものに対して、ウイルス側にとって遭遇する頻度の少ないマイナーHLAアレルによるCTL免疫圧が臨床経過に与える影響はより大きいと考えたからである。今回、シーケンス量を5倍に増やすことにより、アミノ酸変異との相関情報も約5倍増や

すことに成功し、そのことにより、これまで判明してこなかったマイナーHLAアレルとの相関が多数見つかった。しかし、シーケンス完了に予想以上の時間がかかり、B\*3505 以外のマイナーHLA アレルと相関するアミノ酸変異と臨床経過との相関を調べる解析は現在も進行中である。最も興味があった B\*3505 との相関については、4 か所認めしたが、B\*5701 の TW10 CTL エピトープにおける T242N のように変異によってウイルスフィットネスがおちて低ウイルス量となるような関係は、未だ見つかっておらず、B\*3505 による CTL 免疫圧が、どのようなメカニズムによって低ウイルス量と結びつくかについては、未だ、仮説をたてるに至っていない。もちろん、中核的な CTL エピトープは Gag の外にある可能性は否定できない。今後の解析結果が待たれる一方で、今回の情報量の飛躍的増加が、CRF01\_AE に感染したアジア人における良質の CTL 免疫反応を分子レベルで解明する本分担研究の目的に大いに役立つことが期待できる。

D-2)

今回新たに開発したドッキングシミュレーションモデルを用いて、既存の最適 CTL エピトープを試験的に推定させてみたところ、ネット上で公開されている CTL エピトープ推定プログラムと比べて、感度・特異度ともに正解頻度が非劣勢であることが証明された。また、少なくとも数のエピトープが、どちらかのプログラムによってのみ推定が可能であった。これは、新たなモデルが、HLA 結合モチーフをベースにプログラムがつけられた HLA restrictor 1.2 とはことなるエピトープ推定原理を用いていることを反映していると考えられる。さらに今回のドッキングシミュレーション法と従来の HLA restrictor 1.2 法を組み合わせることにより、正解に導く Positive Predictive Value (PPV) が、付加的に改善することが判明した

## E. 結論

E-1)

HLA と Gag アミノ酸変異との相関に関する情報量を量的のみならず、質的においても、飛躍的に増やすことに成功した。これらの情報は、CRF01\_AE に感染したアジア人における良質の CTL 免疫反応を分子レベルで解明する本分担研究の目的に大いに役立つことが期待できる。

E-2)

HLA 結合モチーフに非依存性の CTL エピトープを推定するためのドッキングシミュレーションモデルを開発した。このモデルは、公開されている HLA 結合モチーフ依存性の CTL エピトープ推定プログラムと比べてそのエピトープ推定正解率は非劣勢であり、また、両者を組み合わせることにより、より精度の高い推定が可能であることが判明した。

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Mori M, Sriwanthana B, Wichukchinda N, Boonthimat C, Tsuchiya N, Miura T, Pathipvanich P, Ariyoshi K, and 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 6: e22680, 2011
- 2) Rojanawiwat A, Tsuchiya N, Pathipvanich P, Pumpradit W, Schmidt WP, Honda S, Auwanit W, Sawanpanyalert P, Ariyoshi K.: Impact of the National Access to Antiretroviral Program on the incidence of opportunistic infections in Thailand. International Health 3: 101-107, 2011

### 2. 学会発表

- 1) N Tsuchiya, P Pathipvanich, A Rojanawiwat, K Ariyoshi, P Sawanpanyalert. Frequency and Determinants of Modifying the First Antiretroviral Drug Regimen in Northern Thailand. The 10<sup>th</sup> International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. Busan, Republic of Korea, 26-30 August, 2011 (Oral presentation).

- 2) P Pathipvanich, N Tsuchiya, A Rojanawiwat, P Sawanpanyalert, K Ariyoshi. Fifteen years of experience in treating HIV-infected patients at a single HIV center of a government hospital in northern Thailand. The 10<sup>th</sup> International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. Busan, Republic of Korea, 26-30 August, 2011 (Poster presentation).
- 3) 土屋菜歩、P Pathivanich、A Rojanawiwat, P Sanwayanwalert、有吉紅也。北タイ政府系病院 HIV 外来における。15年間の死亡率の変化と患者数の推移。日本熱帯医学会・日本国際保健医療学会合同大会 2011年11月、東京（口頭発表）
- 4) 土屋菜歩、P Pathivanich、N Wichukchinda, P Sanwayanwalert、有吉紅也。北タイ政府系病院 HIV 外来における多剤併用療法の薬剤変更率とその原因について。日本エイズ学会、2011年12月、東京。（口頭発表）
- 5) 土屋菜歩、K Ruchsawat, P Pathipvanich、田中靖人、P Sanwayanwalert、有吉紅也。北タイ政府系病院 HIV 外来通院 B 型肝炎重複感染者におけるラミブジン耐性ウイルスの出現状況について。日本エイズ学会 2011年12月、東京。（口頭発表）
- 6) 有吉紅也 HIV 治療の進歩からエイズ流行制圧へ。第 296 回日本内科学会九州地方会 生涯教育講演会。2012年1月、福岡。（招待講演）
- 7) N Tsuchiya, P Pathipvanich, A Rojanawiwat, W Auwanit, K Ariyoshi, P Sawanpanyalert. HLA-B\*3505 and female gender were strong predictive factors of modifying the first antiretroviral drug regimen due to adverse effect in Thailand. CROI, Seattle, USA, March, 2012 (Oral presentation)
- 8) P Pathipvanich, N Tsuchiya, A Rojanawiwat, W Auwanit, P Sawanpanyalert, K Ariyoshi. Impact of the national antiretroviral program on mortality and the duration of access to treatment among HIV-infected patients in northern Thailand. CROI, Seattle, USA, March, 2012 (Poster presentation)
- 9) M Mori, N Wichukchinda, R Miyahara, M Yasunami, K Ariyoshi. Viral adaptation against KIR2D-associated Gag immune pressure & their effect on clinical outcome among HIV-1 CRF01\_AE-infected Thais. CROI, Seattle, USA, March, 2012 (Poster presentation)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし

図1 HLA A, B, C アリール保有頻度と Gag アミノ酸変異との相関

Gag アミノ酸変異との相関を解析した 600 名における HLA A, B, C の各アリール(4 桁)を保有する感染者の頻度を棒グラフで表した。()内の数字は、各アリールと相関する Gag アミノ酸変異数を示している。

