

- rhesus macaques. The 31st annual symposium on non-human primate models for AIDS, Atlanta, GA, USA, 11/4/2013.
- 11) 関紗由里、俣野哲朗. HIV/SIV Vif の抗原提示に関する研究. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、11/10/2013.
- 12) 石井洋、野村拓志、高橋尚史、松岡佐織、俣野哲朗. サルエイズモデルにおいて感染慢性期に誘導される SIV 特異的 CTL 反応の標的抗原とメモリーフェノタイプとの関連性についての解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、11/12/2013.
- 13) 野村拓志、俣野哲朗. SIV 感染制御群における制御維持への Vif および Nef 特異的細胞傷害性 T リンパ球反応の関与に関する研究. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、11/12/2013.
- 14) 中村碧、高原悠佑、松岡佐織、三浦智行、小柳義夫、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗. サルエイズモデルにおける抗 HIV 薬投与下の CTL 誘導治療ワクチン接種による SIV 増殖抑制能の増強効果の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、11/12/2013.
- 15) 石井洋、野村拓志、高橋尚史、松岡佐織、俣野哲朗. 感染慢性期において血漿中ウイルス量と相関・逆相関する各抗原特異的 CTL 反応および優位性についての解析. 第 27 回日本エイズ学会学術集会、熊本、11/20/2013.
- 16) 俣野哲朗. HIV 持続感染成立阻止に結びつく細胞性免疫機序：サルエイズモデルにおける解析. シンポジウム 2：エイズ分野における細胞性免疫研究の進展、第 27 回日本エイズ学会学術集会、熊本、11/20/2013.
- 17) Yamamoto H, Matano T. Selection of a survival signal-modulating CTL escape precedes neutralizing antibody induction against highly resistant SIV. Harnessing immunity to prevent & treat disease, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA, 11/21/2013.
- 18) 五領舞衣、原田恵嘉、石井洋、吉村和久、俣野哲朗. 細胞内ドメイン欠損 Env を有する HIV/SIV 粒子の作製. 第 27 回日本エイズ学会学術集会、熊本、11/22/2013.
- 19) Ishii H, Matsuoka S, Matano T. Association of Gag-specific CD28⁺CD95⁺ CD8⁺ T-cell responses in lymph nodes with lower viral loads. The 21th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, MA, USA, 3/4/2014.
- 20) Nomura T, Yamamoto H, Matano T. Association between broadening of CD8⁺ T-cell targets and accumulation of proviral escape mutations in SIV controllers. HIV Vaccines (X3), Keystone Symposia, Banff, Alberta, Canada, 3/10/2014.

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。

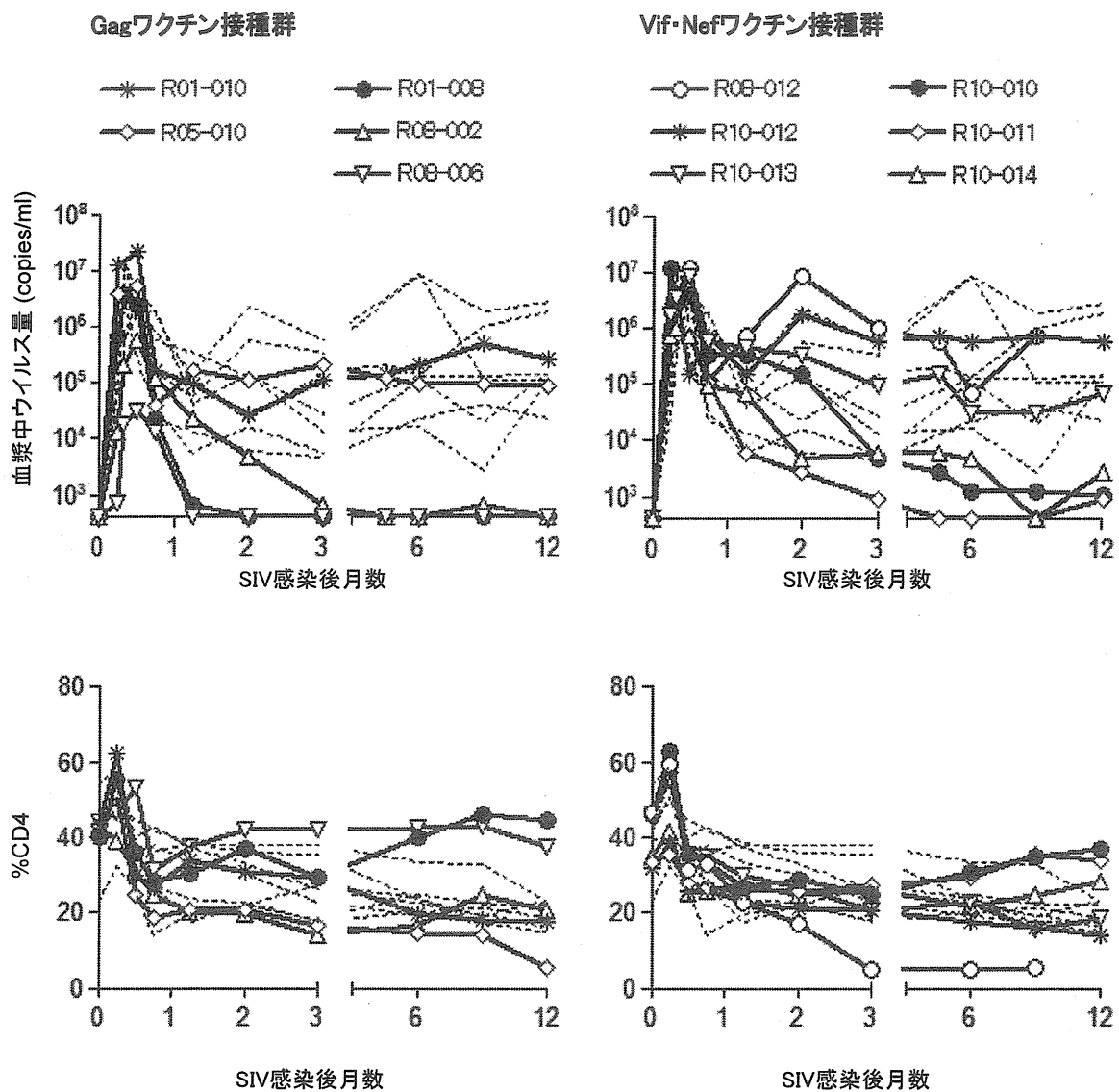


図1. ワクチン接種サルでのSIV感染後のウイルス量と%CD4の変化
 上段：血漿中ウイルス量 (SIV gagコピー数/ml)。下段：末梢血リンパ球中の%CD4陽性Tリンパ球数。左側：Gagワクチン接種群5頭。右側：Vif・Nefワクチン接種群6頭。いずれのパネルにおいても、非ワクチン接種群のデータを点線で示す。

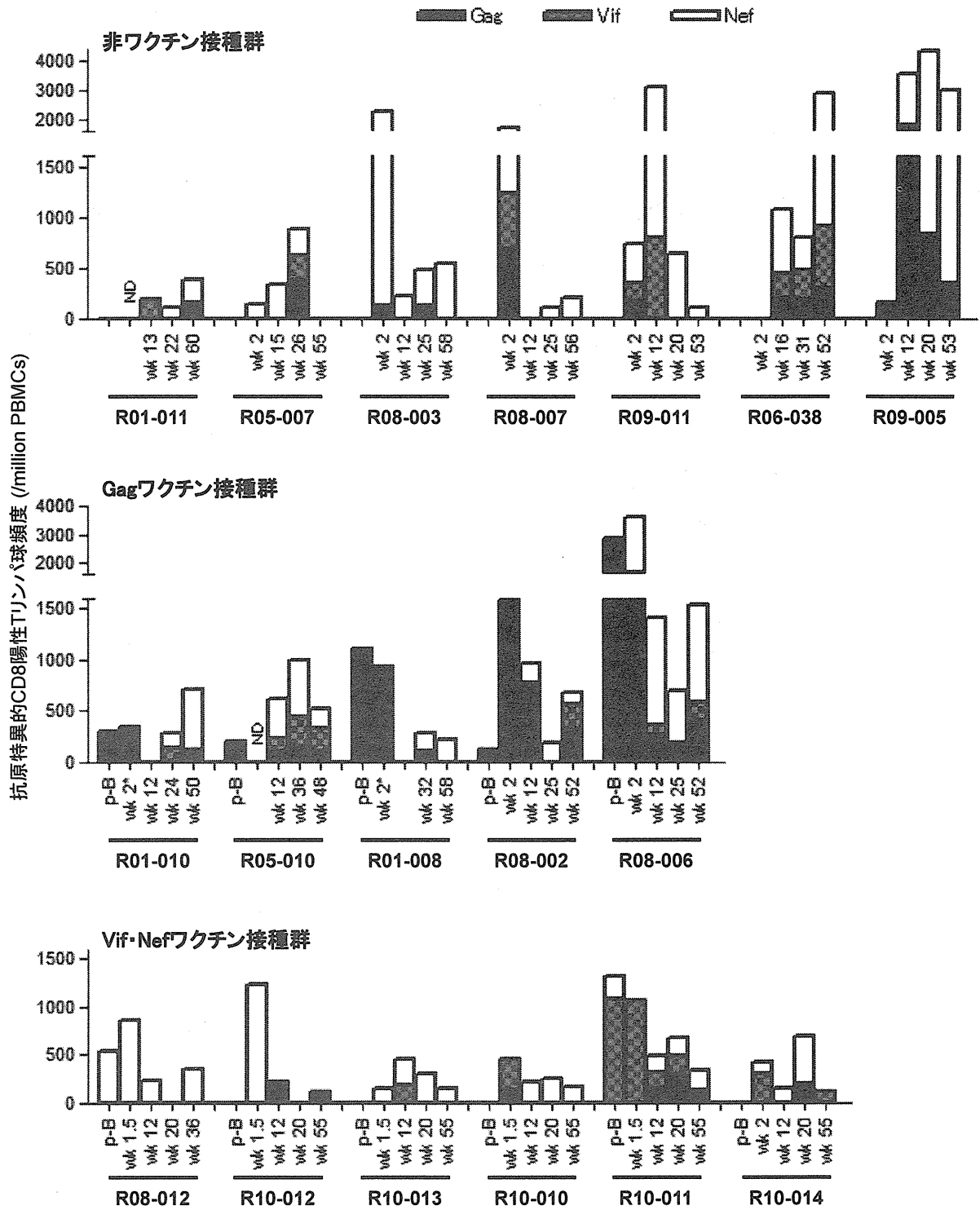


図2. ワクチン接種・SIV感染サルにおけるSIV特異的CTL反応

非ワクチン接種群7頭（上段）、Gagワクチン接種群5頭（中段）、Vif・Nefワクチン接種群6頭（下段）のSeVベクターワクチン接種後（p-B）、感染急性期・慢性期のデータを示す。

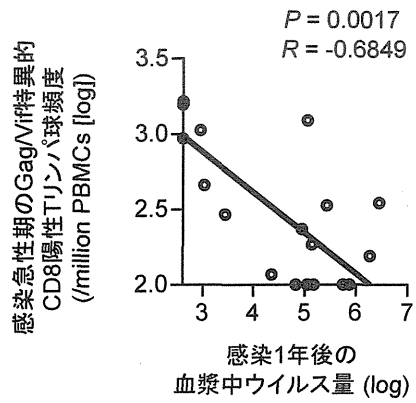


図3. 感染急性期のGag・Vif特異的CTL頻度と感染慢性期のウイルス量との逆相関
 感染急性期（2週目）のGagあるいはVif特異的CTL頻度と感染1年後の血漿中ウイルス量が有意な逆相関を示した。

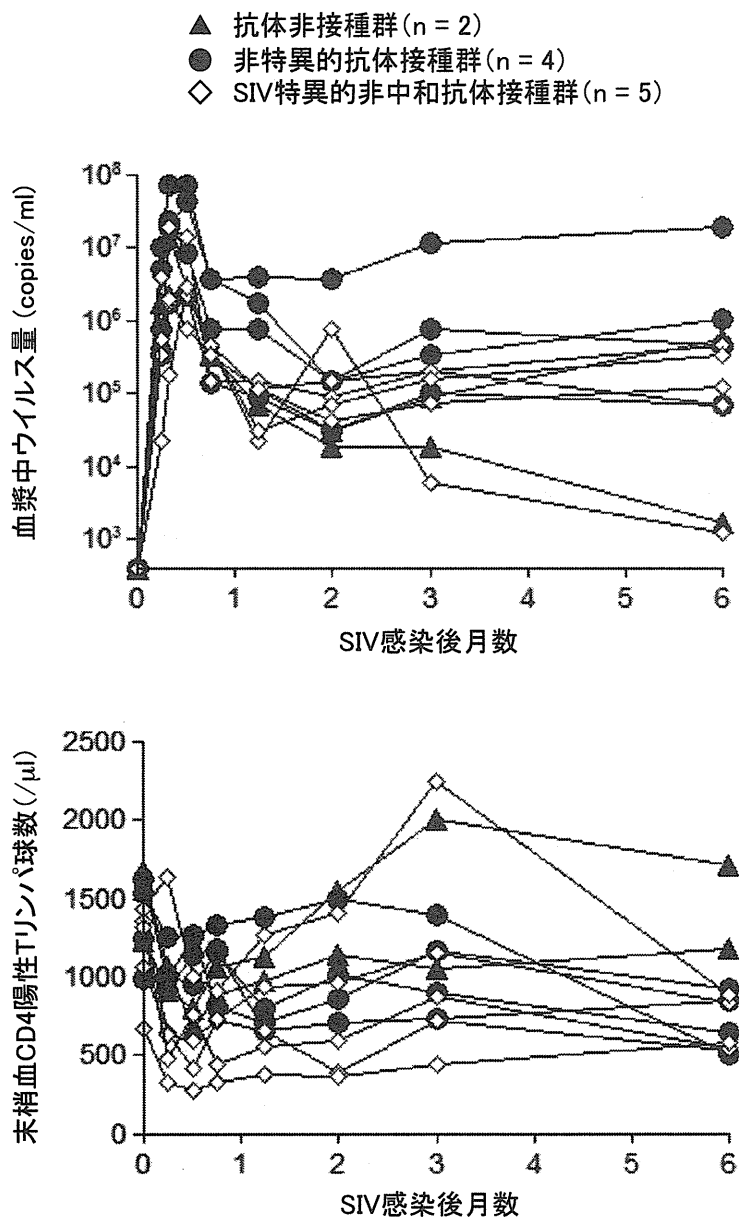


図4. 抗体接種サルでのSIV感染後のウイルス量と末梢血CD4陽性Tリンパ球数の変化
 上段：血漿中ウイルス量 (SIV gagコピー数/ml)。下段：末梢血CD4陽性Tリンパ球数。
 抗体非接種群2頭、非特異的抗体接種群4頭、SIV特異的非中和抗体接種群5頭の結果を示す。

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

免疫誘導法に関する研究

研究分担者 保富 康宏 独立行政法人医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター
センター長
協力研究者 柴田 宏昭 独立行政法人医薬基盤研究所 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питープを発現させ、抗原エпитープに対する特異的な免疫応答も誘導ができる。このシステムをサルを用いて有効性と安全性を検証する。本研究では、HEV-VLP+DNA ワクチンの大量調製法が臨床に向けての問題点の一つである事が示唆された。

A. 研究目的

HIV 感染の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考えて粘膜免疫は重要である。粘膜免疫を誘導 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 を用い HIV のエピトープを発現したリコンビナント VLP を作製し、さらに DNA ワクチンを封入したそのリコンビナント VLP についての経口投与可能で粘膜免疫誘導型のワクチン開発の基礎的研究を行った。

B. 研究方法

1) サルへの HEV-VLP+DNA ワクチン投与

HIV-1 Env エピトープ (P18 :

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 (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 (rVLP-Env) には、EDTA でキレートし SIV gag 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、カンクイザルを免疫するワクチンにより以下の 2 群に分けた。VLP に HIV-1 Env 抗原エピトープを表出させ、その VLP (rVLP-Env) に SIV gag DNA ワクチンを封入したものを免疫した群 (2 頭)、HIV-1 Env エピトープを持たないもとの DNA ワクチンを封入していない HEV-VLP (C52) を免疫した群 (1 頭)。サル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 9.5 mg、封入された DNA 量が約 3.0 mg 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。ワクチン投与後 0, 2, 4, 5, 6 週目に血液、糞便を採取した。血液を遠心し、上清の血漿を分離した。残った血球は常法によりより PBMC を単離した。採取した糞便 0.5 g と抽出溶液 1.5 mL (10 mM PB, 50 mM/L EDTA, 1% bovine serum albumin (BSA), 0.1% soybean trypsin inhibitor) と混合した後、フェニルメチルスルホンフッ素酸 (350 mg/L) 50 μ L を加

え、10,000 g で 20 分間遠心し、糞便抽出液として上清を回収した。単離した PBMC はセルバンカーに懸濁し、血漿及び糞便抽出液は測定時まで -80°C で保存した。血漿及び糞便抽出液中の抗原特異的な IgG 及び IgA の抗体価を測定するために ELISA を用いた。VLP、P18 又は SIV gag ペプチドを PBS(-) で 5 mg/mL に調製し、ELISA plate に 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ で蒔き、 4°C で over night し、plate に特異抗原を固相化した。Block Ace で段階希釈した血漿又は糞便抽出液を固相化した plate に 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加え、室温で 1.5hr 反応後、wash し、peroxidase conjugated 抗サル IgG 又は IgA 抗体を反応させ、wash 後、TMB Blue (DAKO) を 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 蒔き、5~20 min 反応させ、2M H_2SO_4 20 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加え反応を止め、Plate reader で 450 nm の波長を測定し、抗原特異的な抗体価を検討した。PBMC の VLP、P18 又は SIV gag に対する免疫応答を測定するため、VLP、P18 ペプチド、SIV gag ペプチドを用いて 24 時間抗原再刺激を行い、ELISpot 法 (U-CyTech Biosciences の kit の測定法に準じる) により抗原特異的な IFN- γ 産生細胞数を測定し、抗原特異的な免疫応答を検討した。細胞濃度は 3×10^5 cells/100 μL 、抗原量を 5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ とした。

2) ワクチン投与サルへの SHIV 感染

前述の HEV-VLP+DNA ワクチン又は HEV-VLP を投与したカニクイザル 3 頭に 3 回目の免疫後 26 週目に追加免疫を行い、その後 4 週目に 2×10^5 TCID₅₀ の cell-free SHIV 89.6P を経直腸接種し、直腸感染初期におけるウイルスと免疫の動態を解析した。コントロールとしてワクチンを投与しないカニクイザル 1 頭をおいた。SHIV 感染後経時的に採血し、血球数を測定し、血漿と PBMC を分離した。Real-time PCR 法により、血漿中のウイルス量を、Flow cytometry により血中の CD4 陽性細胞数の動態を検討した。

(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。

C. 研究結果

1) サルへの HEV-VLP 投与

カニクイザルに SIV gag DNA ワクチンを封

入した HEV-VLP (rVLP-Env) を経口投与し、VLP、HIV-1 Env (P18)、SIV Gag 特異的な免疫応答の誘導を試みた。血漿中に VLP 特異的な IgG 及び IgA 抗体は免疫 4 週目以降に認められた(図 1A, B)。Gag 特異的な IgG 抗体の産生が 1 頭見られたが、IgA 抗体の産生は見られなかった(図 1G, H)。P18 特異的な抗体産生は血漿中に見られなかった(図 1C, D)。なお、糞便抽出液中の特異抗体は見られなかった(図 1E, F. data not shown)。VLP 特異的な INF- γ 産生細胞を PBMC 中で免疫 4 週目以降に認められたが、P18、SIV Gag 特異的な INF- γ 産生細胞が 1 頭で僅かに認められた(図 2)。なお、免疫後のカニクイザルに有害事象は生じなかった。

2) ワクチン投与サルへの SHIV 感染

ワクチンを投与したカニクイザルに経直腸で SHIV を接種した。ウイルス感染後の血漿中のウイルス量の動態をみると、ウイルスを接種した全 4 頭とも血漿中のウイルス量はウイルス接種後 15 又は 21 日目にピークを迎え、28 日以降セットポイントに移行したが、ワクチン非投与群と比較して、ワクチンを接種したサルがウイルス量を明らかに抑えている状況は見られなかった(図 3)。ウイルス感染後の血液中の CD4 陽性細胞数の動態をみると、ウイルス感染後 15 日目には急激に減少し、4 頭中 2 頭はその後 200 cells/ μL 以下で推移したが、ワクチン接種群で CD4 陽性細胞の減少が抑制された状況は見られなかった(図 4)。

D. 考察

カニクイザルを用いて SIV gag DNA ワクチンの免疫誘導能とウイルス感染抑制能の有効性を評価した。HEV-VLP 経口投与により、VLP に対する特異的な液性、細胞性の両免疫が惹起されたことは確認できたが、VLP に付加した HIV-1 Env や VLP に包埋された SIV Gag に対する特異的な免疫の惹起がほとんど見られなかった。今回サルに投与した HEV-VLP+DNA ワクチン量は、マウスでの実験に用いた投与量から体重換算で決めた為、かなりの量となり、調製したものが DNA の粘性で HEV-VLP が DNA を包埋していると云うよりは HEV-VLP が DNA に絡まっている状態で、これを経口投与したため、粘膜を通じて取り込まれても、上手く抗原提示がなされなかった可能性が高い。実際、以前行った DNA ワクチンを包埋しない HEV-VLP を経口投与した際には、細胞性免疫では Env エピトープに対する特異的な免疫誘導が認められていたが、今回 Env エピトープに対する細胞性免疫能ですら認められなかったため、その可能性が高いと示唆される。ワクチン投与後、

エイズウイルスに対する特異的な免疫能が惹起されていない状況で、SHIV 感染を行っても十分なワクチン効果が得られなかったのは、ある意味妥当な結果だったと考えられる。

少量であれば問題が無いが、量が多くなると DNA の粘性により HEV-VLP+DNA ワクチンの調製に問題が生じるので、現在、粘性を持たないように調製をしたものをカニクイザルに経口投与し、特異的な Env 及び Gag エピトープの惹起を試みているので、それが上手くいけば、SHIV 感染に対するワクチン効果を誘導できるものと考えられる。

E. 結論

HEV-VLP に HIV-1 env エピトープ発現並びに SIV gag DNA ワクチンをを封入し、経口ワクチンの特異的免疫反応及び SHIV 感染防御能をカニクイザルを用いて評価した。しかしながら、HEV-VLP+DNA ワクチンの調製の問題により、予期した結果が得られなかったが、問題点がはっきりとしてるので、現在、経口投与可能な粘膜免疫誘導型エイズ DNA ワクチンの開発研究を推し進めている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watanabe K., Matsubara A, Kawano M, Mizuno S, Okamura T, Tsujimura Y, Inada H, Nosaka T, Matsuo K. and Yasutomi Y. Recombinant Ag85B vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed Mycobacteria-specific immune responses by intranasal immunization. Vaccine in press
- 2) Kobiyama K., Aoshi T., Narita H., Kuroda E., Hayashi M., Tetsutani K., Koyama S., Mochizuki S., Sakurai K., Katakai Y., Yasutomi Y., Saijo S., Iwakura Y., Akira S., Coban C. and Ishii KJ. A non-agonistic Dectin-1 ligand transforms CpG into a multitask nano-particulate TLR9 agonist. Proc.Natl.Acad Sci. USA in press
- 3) Wada T, Kohara M, Yasutomi Y.DNA vaccine expressing the non-structural proteins of hepatitis C virus diminishes the expression of HCV proteins in a mouse model. Vaccine 2013;31;5968-5974.
- 4) Kitagawa H, Kawano M, Yamanaka K, Kakeda M, Tsuda K, Inada H, Yoneda M, Sakaguchi T, Nigi A, Nishimura K, Komada H, Tsurudome M, Yasutomi Y, Nosaka T, Mizutani H. Intranasally administered antigen 85B gene vaccine in non-replicating human

Parainfluenza type 2 virus vector ameliorates mouse atopic dermatitis. PLoS One. 2013 8(7): e66614

- 5) Shimozawa N, Ono R, Shimada M, Shibata H, Takahashi I, Inada H, Takada T, Nosaka T, Yasutomi Y.Cynomolgus monkey induced pluripotent stem cells established by using exogenous genes derived from the same monkey species. Differentiation. 2013 85:131-139.
 - 6) Tajiri K, Shimojo N, Sakai S, Machino-Ohtsuka T, Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Tsujimura Y, Kimura T, Sato A, Yasutomi Y, Aonuma K.Pitavastatin regulates helper T-cell differentiation and ameliorates autoimmune myocarditis in mice. Cardiovasc Drugs Ther. 2013, 27:413-424.
 - 7) .Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Iwatani Y, Yokoyama M, Yasutomi Y, Sato H, Shioda T, Sugiura W, Matano T, Adachi A, Nakayama EE, Akari H.TRIM5 genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1. J Gen Virol. 2013 Jun;94(Pt 6):1318-24.
 - 8) Yoshida T, Omatsu T, Saito A, Katakai Y, Iwasaki Y, Kurosawa T, Hamano M, Higashino A, Nakamura S, Takasaki T, Yasutomi Y, Kurane I, Akari H.Dynamics of cellular immune responses in the acute phase of dengue virus infection. Arch Virol. 2013,158:1209-20.
 - 9) Tougan T, Aoshi T, Coban C, Katakai Y, Kai C, Yasutomi Y, Ishii KJ, Horii T.TLR9 adjuvants enhance immunogenicity and protective efficacy of the SE36/AHG malaria vaccine in nonhuman primate models. Hum Vaccin Immunother. 20139(2) 283-290.
 - 10) Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Saito A, Akari H, Yasutomi Y, Matano T, Sato H, Adachi A.Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. Microbes Infect. 2013 5:56-65.
- ### 2. 学会発表
- 1) Watanabe K, Matsuo K, Yasutomi Y. Intranasal immunization with recombinant vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed mycobacteria-specific immunity. 第42回日本免疫学会学術集会, 2013年, 千葉
 - 2) TSUJIMURA Yusuke, YASUTOMI Yasuhiro. The recognition mechanisms of Mycobacteria major secretion protein, Ag85B, in vivo 第42回日本免疫学会学術集会, 2013年, 千葉

- 3) 加藤誠一 保富康宏 松尾和浩. BCGウレアーゼ欠損株を用いたエイズワクチン第3回感染症若手フォーラム 長崎 2014
- 4) 岡村 智崇、松尾 和浩、保富 康宏. 抗酸菌分泌抗原を組み込んだ弱毒エイズウイルスの霊長類カニクイザルにおける細胞性免疫反応の解析第61回日本ウイルス学会 神戸 2013年11月10日-12日
- 5) 岡村 智崇、松尾 和浩、保富 康宏. 産地別SPFカニクイザルを用いたサル免疫不全ウイルスのエイズ病態に関する研究第27回日本エイズ学会 熊本 2013年11月20 - 22日
- 6) 保富康宏 インフルエンザウイルス感染におけるヘルパーT細胞 (Th) の病態への関与 「シンポジウム: もっと効くインフルエンザワクチンを目指して」 第54回日本臨床ウイルス学会 2013年6月8-9日 倉敷
- 7) 保富康宏 教育講演: 「ワクチン開発のストラテジー: HIVワクチン・結核ワクチン開発の経験から」 ワクチン開発に必要な研究を取り巻く環境の重要性 第17回日本ワクチン学会 2013年11月30日-12月1日 津

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

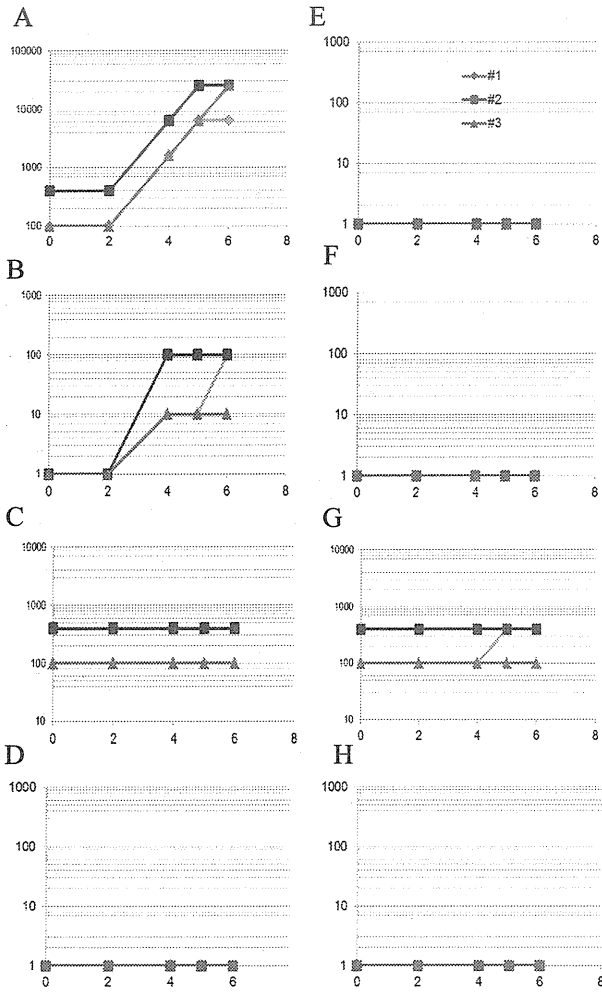


図1 ワクチン投与後の血清、糞便抽出液中の特異抗体価の推移。(A) 血清中の抗 VLP-IgG 抗体価。(B) 血清中の抗 VLP-IgA 抗体価。(C) 血清中の抗 P18-IgG 抗体価。(D) 血清中の抗 P18-IgA 抗体価。(E) 糞便抽出液中の抗 VLP-IgG 抗体価。(F) 糞便中液中の抗 VLP-IgA 抗体価。(G) 血清中の抗 SIV-Gag-IgG 抗体価。(H)血清中の抗 SIV-Gag-IgA 抗体価。横軸：ワクチン投与後の週、縦軸：抗体価。#1：HEV-VLP (P18) +DNAgag ワクチン投与個体。#3:HEV-VLP(C52)投与個体。

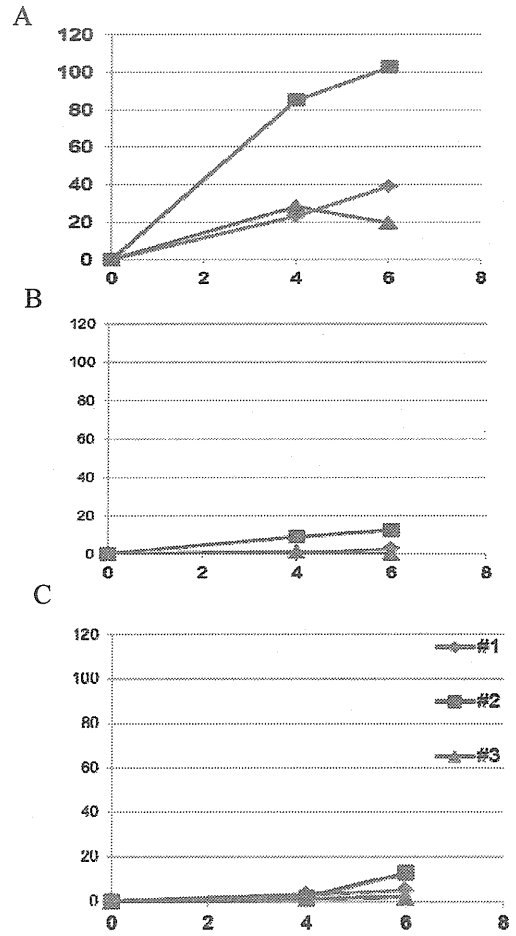


図2 ワクチン投与後の抗原特異的 $INF-\gamma$ 産生細胞数の推移。(A)抗 VLP。(B)抗 P18。(C)抗 SIV-Gag。横軸：ワクチン投与後の週、横軸： $INF-\gamma$ + cells/ 10^5 cells。#1：HEV-VLP (P18) +DNAgag ワクチン投与個体。#3:HEV-VLP(C52)投与個体。

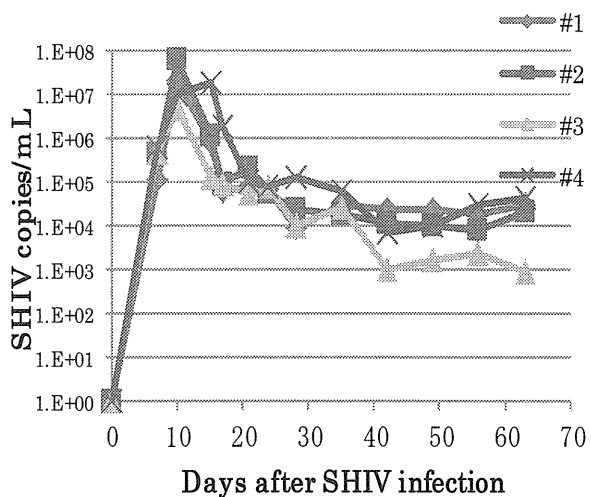


図3 SHIV 感染後の血漿中のウイルス量の推移。
 #1 : HEV-VLP (P18) +DNAgag ワクチン投与
 個体。#3:HEV-VLP(C52)投与個体。#4 ワクチン非
 投与個体。

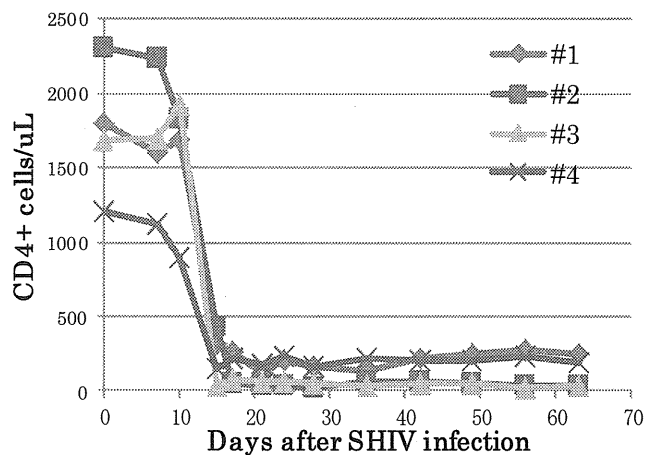


図4 SHIV 感染後の血中 CD4 陽性細胞数の推移。
 #1 : HEV-VLP (P18) +DNAgag ワクチン投与
 個体。#3:HEV-VLP(C52)投与個体。#4 ワクチン非
 投与個体。

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 抗原発現・分解と機能に関する研究

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 抗原の分解・抗原提示は HIV 感染防御免疫の誘導に重要である。抗原提示につながるよう、分解効率の良い HIV-1 Gag 抗原（ユビキチン化+開始コドン置換体、MA 膜結合領域の塩基性アミノ酸置換体）を設計してきた。本年度は、サル実験に向けて、SIVmac Gag 蛋白で相同の変異体（Ub-(R)-SIVmac Gag 蛋白と SIVmac Gag(K26/27/28/32E)蛋白）を作製し、その分解経路と分解効率を調べた。新規蛋白合成をサイクロヘキシミドで止めて分解効率を測定したところ、両者の変異体は野生型 SIVmac Gag 蛋白より効率良く分解された。特に後者の分解は速かった。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）を用いて分解経路を調べたところ、いずれの変異体もプロテアソーム経路で分解されることが判明した。Gag 抗原の細胞内局在を調べたところ、後者の変異体はエンドソームに集積することが明らかとなった。

A. 研究目的

細胞内で新規合成された抗原の一部は、ユビキチン化を受けて細胞質内プロテアソームで分解され（Nature, 404: 770-774, 2000）、粗面小胞体内で MHC クラス I 分子と結合した後、細胞表面に提示され、細胞傷害性 T 細胞を誘導する（MHC クラス I 抗原提示経路）。一方、外界から取り込まれた抗原はエンドソーム内で分解され、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（MHC クラス II 抗原提示経路）。また、外界から取り込まれた抗原が、エンドソームから細胞質内プロテアソーム分解を経て、粗面小胞体内の MHC クラス I 抗原提示経路に入る経路も知られている（クロスプレゼンテーション経路）。いずれの場合も、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重要であり、それらを操作できれば抗原提示効率の上昇が期待できる。

抗原を積極的に MHC 抗原提示経路へ導くことを目的としていくつかの分子修飾が考案されている。PEST 配列の付加（Science, 234: 364-368, 1986）、ユビキチン（Ub）付加、「N-end rule」（Trends Cell Biol, 17: 165-172, 2007）に基づく N 末端メチオニンのアミノ酸置換（J Immunol, 180: 371-382, 2008）によりクラス I 提示経路への抗原誘導が、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

鎖の付加（Immunol Rev, 172: 87-96, 1999; EMBO J, 27: 1-5, 2008）によりクラス II 提示経路への抗原誘導が報告されている。また、クロスプレゼンテーション経路への抗原誘導には、低 pH 応答性の膜融合ペプチド GALA 配列の付加（Biochem, 43:5618-5628, 2004）やアデノウイルス VI 蛋白の利用等が考案されている。

分担者は、クラス I 提示経路に誘導する目的で、HIV-1 Gag 蛋白の N 末端に Ub を付加し開始コドンメチオニンをアルギニンに置換した Ub-(R)-HIV-1 Gag を作製した。また、クラス II 提示経路に誘導する目的で、Gag 蛋白に LAMP1 を融合させた LAMP1-HIV-1 Gag を作製した。これらを HeLa 細胞で発現させ、プロテアソーム阻害剤とリソソーム阻害剤を用いてそれぞれの経路における分解速度を調べたところ、Ub-(R)-HIV-1 Gag 蛋白はプロテアソーム経路で効率良く分解され、LAMP1-HIV-1 Gag 蛋白はリソソーム経路で分解されることが判明した（H21-23 年度）。

次に、こうした無関係の分子（Ub や LAMP1）を付加せず、Gag 蛋白を抗原提示の特定コンパートメントに導く方法がないか、検討を開始した。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） HIV-1 Gag 蛋白変異体が報告されていたことから、これらを参考に、MA 領域の膜結合変異体 Gag(K26/27/30/32E)を作製して、その分解を調べたところ、野生型の HIV-1 Gag 蛋白より

効率良くプロテアソーム経路で分解された (H24年度)。本年度は、この Gag(K26/27/30/32E)変異体蛋白の細胞内局在を解析するとともに、サル個体での免疫誘導実験に向けて SIVmac Gag 蛋白で同様の変異体を作製して解析した。

B. 研究方法

(1) DNA 構築

プラスミド: 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) と SIV (Mac239 株) の Gag 蛋白をそれぞれ発現させた。Western blotting での検出のためには、Gag 蛋白の C 末端に FLAG 配列を付加した。細胞内局在の解析には、C 末端に EGFP を付加した。

Gag 蛋白変異体: N 末端に Ub を付加し開始コドンメチオニンをアルギニンに置換した Ub-(R)-SIVmac Gag 蛋白と、MA 塩基性領域 (膜結合領域) のアミノ酸置換体 Gag (K26/27/30/32E) 蛋白を発現させた。

(2) 細胞培養と阻害剤処理

HeLa 細胞に上記の Gag-FLAG および Gag-EGFP 発現プラスミドを transfection した。18 hr 後、33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ サイクロヘキシミド (蛋白合成阻害剤) と 10 μM MG-132+10 μM Clasto-lactacystin β -lactone (プロテアソーム阻害剤) あるいは 100 μM クロロキン (リソソーム阻害剤) を添加して培養し、経時的 (0, 3, 6, 9 hr) に細胞を回収した。

(3) Gag 抗原の局在

Gag-EGFP 発現細胞を固定した。オルガネラマーカーに対する抗体で免疫染色し、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 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。

(倫理面への配慮)

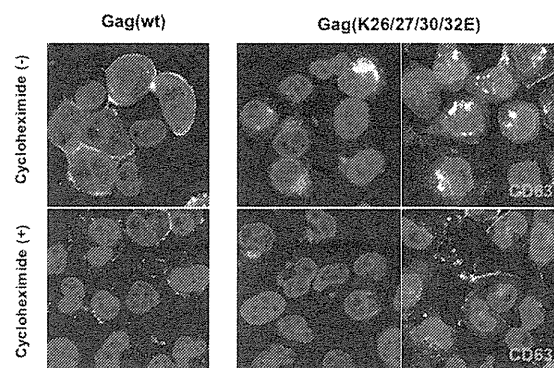
臨床材料を用いた実験を含まないため、生命倫理に対する措置を講じなかった。遺伝子組換え実験については二種省令・二種告示に従った。

C. 研究結果

(1) HIV-1 Gag (K26/27/30/32E)蛋白の細胞内局在 HIV-1 MA の N 末端は塩基性アミノ酸に富み、

細胞膜の酸性脂質と静電的に結合することが知られている。この膜結合領域の 26, 27, 30, 32 位塩基性アミノ酸 K を E に置換した Gag(K26/27/30/32E)蛋白を作製し、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) あるいはリソソーム阻害剤 (クロロキン) を用いてその分解を調べたところ、HIV-1 Gag(K26/27/30/32E)蛋白は野生型 Gag 蛋白に比べ、プロテアソーム経路で速く分解されることを見いだした (H24 年度)。本年度は、この HIV-1 Gag(K26/27/30/32E)蛋白の細胞内局在を調べる目的で、C 末端に EGFP を付加した Gag-EGFP を作製し、共焦点顕微鏡で観察した。サイクロヘキシミド未処理の場合には、野生型 Gag 蛋白は形質膜に粒状に集積して局在した。これに対し、Gag (K26/27/30/32E)蛋白はもっぱら核周辺領域に粒状に集積し、形質膜への局在は認められなかった (図 1)。サイクロヘキシミドを添加して新規蛋白合成を止めると、細胞内局在は変化しないものの、EGFP 蛍光のかなりが消失した。Gag(K26/27/30/32E)蛋白の細胞内局在を明らかにする目的で、オルガネラマーカー (粗面小胞体として PDI; トランスゴルジネットワークとして TGN46; エンドソームとして CD63 と LAMP1) に対する抗体で免疫染色し、共焦点顕微鏡で観察した。Gag(K26/27/30/32E)蛋白は CD63 や LAMP1 と共局在したが (図 1)、PDI や TGN46 とは共局在しなかった。従って、Gag(K26/27/30/32E)蛋白はエンドソームに集積することが判明した。

図 1. HIV Gag-EGFP (野生型および変異体) の細胞内局在

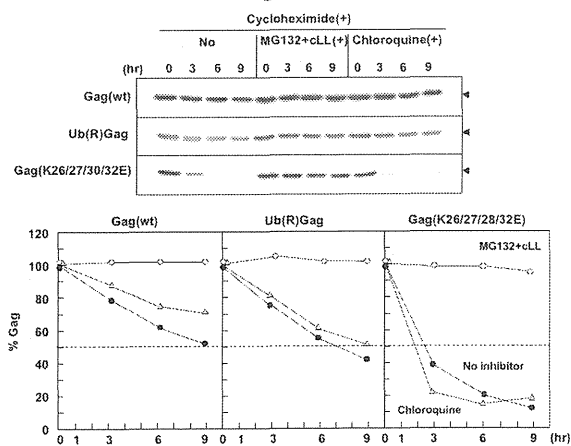


(2) SIVmac Gag 蛋白変異体 (Ub-(R)-SIVmac Gag 蛋白と SIVmac Gag(K26/27/30/32E)蛋白) の分解

HIV-1 Gag 蛋白の変異体、すなわち、N 末端に Ub を付加した Ub-(M)-HIV-1 Gag 蛋白や、さらに開始コドンメチオニンをアルギニンに置換した Ub-(R)-HIV-1 Gag 蛋白 (H23 年度)、非ミリストイ

ル化の HIV-1 Gag(G2A)蛋白やアセンブリー能がない Gag(W184A/M185A)蛋白、また、膜結合変異体 HIV-1 Gag(K30/32E)蛋白や Gag(K26/27/30/32E)蛋白 (H24 年度) を作製して、分解を調べたところ、Ub-(R)-HIV-1 Gag 蛋白と膜結合変異体 HIV-1 Gag(K30/32E)や Gag(K26/27/30/32E)蛋白の分解効率が高かった。そこで、SIVmac Gag 蛋白でこれらの変異体を作製し、同様の結果が得られるか、Gag 蛋白の分解を解析した。発現細胞に蛋白合成阻害剤サイクロヘキシミドを添加して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) あるいはリソソーム阻害剤 (クロロキシン) を添加して培養した。経時的に (0, 3, 6, 9 hr) 細胞を回収し、Western blotting で Gag 抗原を検出した後、バンド intensity を Image J で定量した。新規蛋白合成を止めると、野生型 SIVmac Gag 蛋白の細胞内抗原量は経時的に減少した。その半減期は約 9 時間であった。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が、クロロキシン処理では減少をほとんど止められなかった。これらの結果から、SIVmac Gag 蛋白の主な分解経路もプロテアソーム経路であると結論された (図 2)。次に、Ub-(R)-SIVmac Gag 蛋白と SIVmac Gag(K26/27/28/32E) 蛋白について同様に調べたところ、Ub-(R)-SIVmac Gag 蛋白は野生型 SIVmac Gag 蛋白に比べ、プロテアソーム経路でやや速く分解されることがわかった。一方、SIVmac Gag(K26/27/30/32E)蛋白はプロテアソーム経路で極めて速く分解されることが判明した (半減期は約 2 時間)。

図2. SIV Gag変異体蛋白の分解

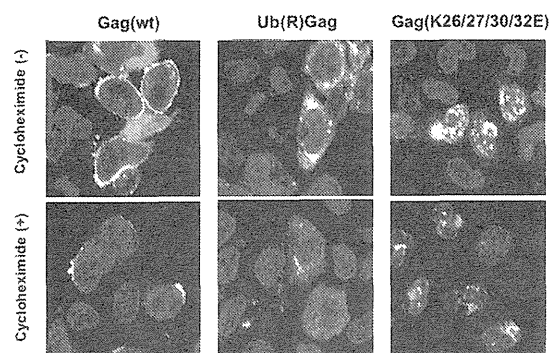


(3) SIVmac Gag 蛋白変異体 (Ub-(R)-SIVmac Gag 蛋白と SIVmac Gag(K26/27/28/32E)蛋白) の細胞内局在

上述の野生型および変異体の SIVmac Gag 蛋白

の C 末端に EGFP を付加し、共焦点顕微鏡で細胞内局在を調べた。サイクロヘキシミド未処理の場合には、野生型 Gag 蛋白は形質膜に粒状に集積して局在した。これに対し、Ub-(R)-SIVmac Gag 蛋白は核周辺領域だけでなく細胞質においても粒状に集積し、形質膜への局在は認められなかった (図 3)。SIVmac Gag(K26/27/28/32E)蛋白はもっぱら核周辺領域に粒状に集積し、形質膜への局在は認められなかった。この細胞内局在を明らかにするため、オルガネラマーカー (粗面小胞体として PDI ; トランスゴルジネットワークとして TGN46 ; エンドソームとして CD63 と LAMP1) に対する抗体で免疫染色したところ、この核周辺領域はエンドソームであることが明らかとなった。従って、SIVmac Gag(K26/27/28/32E)蛋白はエンドソームに集積することが判明した。また、核内にも Gag-GFP 抗原が観察された。

図3. SIV Gag-EGFP(野生型および変異体)の細胞内局在



D. 考察

細胞内での HIV-1 Gag 蛋白の半減期は約 6.5 時間と報告されている (J Virol, 82: 9937-9950, 2008)。本研究での野生型 SIVmac Gag 蛋白の半減期 (約 9 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、野生型 SIVmac Gag 蛋白の分解は HIV-1 Gag 蛋白と同様に、主にプロテアソーム経路であった。

HIV-1 MA の膜結合領域の塩基性アミノ酸を置換した Gag(K26/27/30/32E)蛋白は、効率良くプロテアソーム経路で分解された (H24 年度)。MHC クラス I の抗原提示に利用される蛋白質は、合成後にプロテアソーム分解を受け、粗面小胞体内に送り込まれる。不思議なことに、本研究で作製した HIV-1 Gag(K26/27/30/32E)蛋白はエンドソームに局在し、プロテアソームに富む粗面小胞体には

ほとんど局在しなかった。推測ではあるが、クロスプレゼンテーション経路のように、エンドソームに集積したものの、細胞質内でプロテアソーム分解を受けている可能性が考えられる。今後の解析課題であると思われる。この HIV-1 Gag(K26/27/30/32E)蛋白と相同の SIVmac Gag(K26/27/28/32E)蛋白を作製し、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、SIVmac Gag(K26/27/28/32E)蛋白は HIV-1 のものよりさらに効率良くプロテアソーム経路で分解された。細胞内局在を調べたところ、主たる集積部位はエンドソームであったことから、HIV-1 Gag(K26/27/30/32E)蛋白と同様の性状をもつ可能性が示唆された。

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。マクロファージ系やリンパ球系での検討が必要と思われた。

E. 結論

①N 末端に Ub を付加し、開始コドンメチオニンをアルギニンに置換した Ub-(R)-SIVmac Gag 蛋白は野生型 Gag より効率良くプロテアソーム経路で分解された。②一方、MA 膜結合領域の塩基性アミノ酸を置換した SIVmac Gag(K26/27/28/32E) 蛋白は、エンドソームに集積し、極めて効率良くプロテアソーム経路で分解された。

F. 研究発表

1 論文発表

(1) Urano E, Morikawa Y, Komano, J. Novel role of HSP40/DNAJ in the regulation of HIV-1 replication.

J AIDS 64: 154-162, 2013.

(2) Ikeno S, Suzuki M, Mahmood M, Ishige M, Kobayashi M, Ohno S, Takeda M, Nakayama T, Morikawa Y, Terahara K, Okada S, Takeyama H, Tsunetsugu-Yokota Y. Sensitive detection of measles virus infection in the blood and tissues of humanized mouse by one-step quantitative RT-PCR. *Frontiers in Microbiol* 4: 1-8, 2013.

2 学会発表

(1) 林浩司、竹村太地郎、藤野真之、百瀬文隆、森川裕子、村上努. HIV-1 複製における Rab7 の機能解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、11/10/2013.

(2) 池野翔太、鈴木基臣、寺原和孝、石毛真行、駒瀬勝啓、竹田誠、森川裕子、中山哲夫、柳雄介、竹山春子、横田恭子. ヒト化マウスの麻疹ウイルスベクター評価系への応用. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、11/10/2013.

(3) 百瀬文隆、森川裕子. 感染細胞内インフルエンザウイルス vRNP の非変性検出を可能とする手法改良の試み. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、11/11/2013.

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

Vif 抗原発現・分解と機能に関する研究

研究分担者 高折 晃史 京都大学医学研究科 教授

研究要旨 我々は昨年度までの研究で、HIV-1 Vif が誘導する細胞周期 G2 停止とそれに伴う HIV-1 複製の増強にとって、TP53 のセリン 15 のリン酸化が必須であることを見出していたが、今年度の研究ではこの経路に必須の因子として AMPK を同定した。さらに、この経路には、Vif によるユビキチンリガーゼ複合体の形成およびプロテアソーム活性が必要であることを示唆する結果を得た。

A. 研究目的

我々は HIV-1 Vif が誘導する細胞周期 G2 停止が TP53 依存性であることおよび感染を促進することを報告した (Izumi ら、PNAS 2010)。さらに、昨年度までの成果として、Vif は TP53 のセリン 15、20、37、46 のリン酸化を増強し、そのなかでも HIV-1 Vif が誘導する細胞周期 G2 停止とそれに伴う HIV-1 複製の増強にとって、TP53 のセリン 15 のリン酸化が必須であることを証明した。今年度はさらにその上流の分子について検索を行った。

B. 研究方法

TP53 のセリン 15 をリン酸化するキナーゼとしては、DNAPK、ATM、ATR、ERK、CDK、AMPK、p38 などが知られている。今回、そのうちの 5 種類の阻害剤を用いて Vif による TP53 のセリン 15 のリン酸化が抑制されるかを抗リン酸化セリン TP53 特異抗体を用いたイムノブロット法により検討した。リン酸化の抑制が見られた阻害剤についてはその効果をウイルス感染実験でも検討した。また、Vif による TP53 のセリン 15 のリン酸化について、プロテアソーム阻害剤や、ユビキチンリガーゼ複合体を形成しない Vif 変異体を用いて、ユビキチン/プロテアソーム系の関与を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では、組み換え DNA や病原体を用いるため、拡散の防止や種の多様性に関する配慮が必要であり、「組み換えヒト免疫不全ウイルスを用いたエイズ発症機構の解明と抗 HIV-1 宿主因子 APOBEC3 ファミリー蛋白によるウイルスの感

染制御機構に関する研究」として第二種使用等拡散防止処置確認申請を行い、平成 23 年 2 月 10 日付けで承認済である。

C. 研究結果

AMPK 阻害剤の添加により、Vif による TP53 のセリン 15 のリン酸化が抑制された。一方、DNAPK、ATM、ATR、CDK の阻害剤ではこのリン酸化は抑制されなかった。また、感染実験においては AMPK 阻害剤は Vif 欠損ウイルスの感染性には影響しなかったが、Vif を持つウイルスの感染増強を抑制した。さらに、この現象は TP53 導入細胞で見られたが、S15A 変異体を導入した細胞では見られなかった。また、Vif による TP53 のセリン 15 のリン酸化はプロテアソーム阻害剤により抑制され、ユビキチンリガーゼ複合体を形成しない Vif 変異体ではリン酸化が誘導されなかった (*Retrovirology, in revision*)。

D. 考察

Vif の誘導する G2 停止やウイルス感染の増強のメカニズムに関して、研究を進め、成果を得た。これらの結果は Vif に未知の細胞内標的因子があることを示唆しており、来年度はその探索を行う予定である。これらの研究はウイルス治療の新たな標的を見出すだけにとどまらず、現在治療中の HIV-1 患者に対しても、抗炎症薬アスピリンや糖尿病治療薬メトフォルミンの使用がウイルス感染に与える影響を示唆するものである。

E. 結論

HIV-1 Vif が感染性を増強するメカニズムの一

部を明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

Matsui, Y., Shindo, K., Nagata, K., Io, K., Tada, K., Iwai, F., Kobayashi, M., Kadowaki, N., Harris, R., Takaori-Kondo, A. Defining HIV-1 Vif residues that interact with CBF β by site-directed mutagenesis. *Virology* 449: 82-87, 2014.

Sato, T., Kitawaki, T., Fujita, H., Iwata, M., Iyoda, T., Inaba, K., Ohteki, T., Hasegawa, S., Kawada, K., Sakai, Y., Ikeuchi, H., Nakase, H., Niwa, A., Takaori-Kondo, A., Kadowaki, N. Human CD1c⁺ myeloid dendritic cells acquire a high level of retinoic acid-producing capacity in response to vitamin D₃. *J Immunol.* 191(6): 3152-60, 2013.

Yoshioka S, Miura Y, Yao H, Satake, S., Hayashi, Y., Tamura, A., Hishita, T., Ichinohe, T., Hirai, H., Takaori-Kondo, A., Maekawa, T. C/EBP β expressed by bone marrow mesenchymal stromal cells regulates early B-cell lymphopoiesis. *Stem Cells* (in press).

Arai, Y., Nishinaka, Y., Arai, T., Morita, M., Mizugishi, K., Adachi, S., Takaori-Kondo, A., Watanabe, T., Yamashita, K. Uric acid induces

NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation. *Biochem Biophys Res Commun.* (in press).

Mori, F., Ishida, T., Ito, A., Sato, F., Masaki, A., Narita, T., Suzuki, S., Yamada, T., Takino, H., Ri, M., Kusumoto, S., Komatsu, H., Hishizawa, M., Imada, K., Takaori-Kondo, A., Niimi, A., Ueda, R., Inagaki, H., Iida, S. Antitumor effects of bevacizumab in a microenvironment-dependent human adult T-cell leukemia/lymphoma mouse model. *Eur J Haematol.* (in press).

2. 学会発表

Yusuke Matsui, Keisuke Shindo, Kayoko Nagata, Katsuhiko Io, Masanobu Shinohara, Reuben S Harris and Akifumi Takaori-Kondo. Identification of a novel region of HIV-1 Vif to interact with CBF β . **Cold Spring Harbor Meeting on Retroviruses 2013**

吉永則良、松井佑亮、新堂啓祐、武田俊一、高折晃史 HIV-1 複製に関与する DNA 修復系宿主因子の探索 第 27 回日本エイズ学会

G. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）
該当なし。

研究要旨:

われわれは、昨年度までに *in vitro* の薬剤及び中和抗体逃避ウイルス誘導を、様々な臨床分離ウイルスを用いて行って来た。特に、CCR5 inhibitor[maraviroc (MVC)]からの逃避ウイルスが anti-Env 中和抗体に感受性になる一群の変異を同定してきた。そこで *in vitro* で誘導した MVC 高度耐性ウイルスの Env 組換えウイルスを多数作製し、詳細に gp120 の変異と中和抗体の感受性の関連性を調べた。その結果、MVC 高度耐性付与のために新たに獲得された Env の耐性変異部位、V200I, T297I, M434I, K305R のなかで、M434I が中和抗体感受性付与に重要な場所である事が分った。この変異を持つ組換えウイルスは、感染症例のどの時期の plasma IgG に対しても高度感受性を維持していた。今年度でそれぞれの変異を順番に野生株に戻した組み換えウイルスと、単独で持っているウイルスの作製が終了し、それぞれのウイルスの抗体に対する感受性の違いがある程度判明したため、今後は、このウイルスパネルを用いて、その他の感染症例から得た血漿中に含まれる中和抗体の種類が同定可能かどうかを検討する。これらのパネルで今後簡便に感染者の血中に含まれる中和抗体の大まかな種類と力価を知る事ができれば、ウイルスシーケンスと中和抗体産生の関係を知る事が出来るだけでなく、ワクチン抗原の探索に有用な知見を得られるといえる。

A. 研究目的

AIDS ワクチン開発を阻む最も大きな問題点は、決定的なワクチン抗原が見つかっていない事に尽きる。特に、液性免疫は Env の多様性により、同一サブタイプのウイルス株に有効な抗原の開発すら困難を極めている。我々の研究室では、これまで *in vitro* の薬剤及び中和抗体逃避ウイルス誘導を、様々な臨床分離ウイルスを用いて行って来た。特に、entry inhibitor からの逃避ウイルスが anti-Env 中和抗体に感受性になる一群の変異を複数同定している。そこで Env の立体構造と抗体の感受性の関係を、独自に構築した感染ウイルスクローンパネルを用いて詳細に検討していくことで、抗体誘導ワクチンの抗原選択に新たな道筋を付けていく事を目的とする。

B. 研究方法(倫理面への配慮)

CCR5 高発現 T 細胞株である PM1/CCR5 細胞を用い、*in vitro* R5 ウイルスの CCR5 阻害剤 (maraviroc; MVC) に対する耐性誘導を行い、得られたそれぞれの継代ウイルスを用いて、これらのウイルスの envelope のシーケンスを行い、耐性能付与責任変異部位を同定する。また、MVC 耐性変異を持つウイルスの Env を pNL43 ベースの plasmid に組み込み、感染性クローンウイルスを作製する。それをもとに、site-directed mutagenesis 法を用いて、耐性変異部位と予測されるアミノ酸部位を一つずつ組み込んだクローンを作成し、中和抗体感受性の異なる感染性クローンパネルを構築する。それらの組換えパネルウイルスの単クローン抗体や患者血清 IgG

に対する感受性を比較検討した。

(倫理面への配慮)

本研究のウイルス分離に関しての倫理的・科学的妥当性は熊本大学附属病院の先進医療審査委員会で審査され、了承されている。また、遺伝子組み換え生物等を用いる実験については、必要に応じた国立感染症研究所の機関承認を取得済みである。

C. 研究結果

われわれは前年度までに R5 臨床分離株を用いて *in vitro* で高度 MVC 耐性ウイルスを誘導してきた。次に、それぞれのパッセージウイルスの Env シークエンスを行い、比較検討した。その結果、MVC 耐性誘導ウイルスの C2, V3 及び C4 領域に新たに認められた、V200I, T297I, K305R, M434I の耐性変異であった。これにより樹立された、MVC 高度耐性ウイルス、およびコントロールウイルスの Env を pNL43 ベースの plasmid に組み込み、それぞれの感染性クローンウイルスを作製した。これらの組換えウイルスを用いて、gp120 の変異と中和抗体感受性との関連性を調べた結果、高度 MVC 耐性変異 Env を持つウイルスは、低 CCR5 馴化 Env を持つウイルスよりも CD4bs と CD4i 抗体に対してより感受性になっただけでなく、抗 V3 中和抗体に対しても高度感受性へと変化する事が分かった。

次に、このウイルスを分離した症例から治療開始後 1-3 ヶ月ごとに定期的に採血 (7 ポイント) し、血清から IgG を精製した。精製した血清 IgG に対する中和感受性を Env 組換えウイル

スを用いて調べた結果、驚くべき事に MVC 耐性ウイルスはそれまで全く中和されなかった自己の血清 IgG 抗体に対して全てのポイントで高度中和感受性を示した。これらの事実から、新たに獲得された Env の耐性変異アミノ酸部位、V200I, T297I, M434I, K305R が抗体感受性に深く関わっている可能性が強いと予想された。

そこで、それぞれの変異を順番に抜いていった組み換えウイルスと、単独で持っているウイルスの作製を試み (図 1)、それぞれの耐性変異と血清中の抗 HIV 抗体の感受性との関係を検討した。

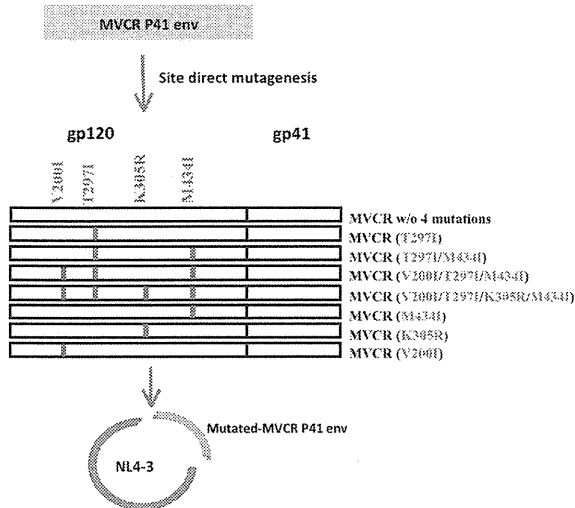


図 1. 中和抗体感受性の異なるウイルス Env を持つ感染性クローンプラスミドの作製

その結果、MVC 存在下で select された M434I が中和抗体感受性付与に重要な場所である事が分った。この変異を持つ組換えウイルスは、どの時期の感染症例の plasma IgG に対しても高度感受性を維持していた (図 2)。来年度以降は、これらのウイルスパネルを用いて、ヘテロの感染症例から得られた血漿においても、これらの組換えウイルスが感受性を維持しているかどうかを検討していく。

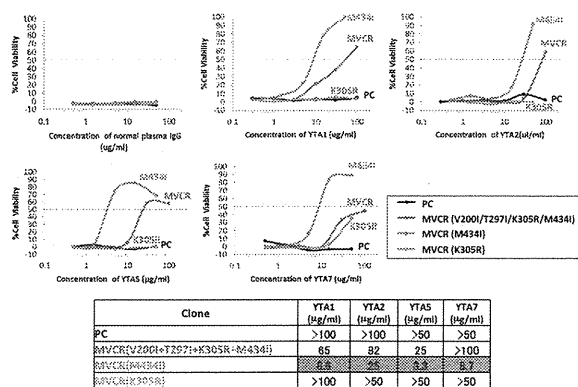


図 2. 各組換えウイルスの自己血清 IgGs に対する感受性の違い

D. 考察

今回、中和抗体への感受性が著しく変化した MVC 高度耐性ウイルスの Env を pNL43 ベースの plasmid に組み込み、感染性クローンウイルスを作製し、種々の抗体に対するアッセイを行った。その結果、MVC に高度耐性を付与する Env の変異のうち特に M434I が Env 全体の 3 量体での立体構造を変化させて、V3 に対する中和抗体のアクセスを良くすることが示唆された。また、この MVC に耐性を付与する Env の変異が、自己の血清 IgG に対する感受性も回復させる事が分かった。このことは、薬剤により変異した Env の特定部位が抗体の中和感受性を劇的に変化させる事を示している。

これまで、感染者の血清中の抗体の種類は特定抗原領域に対する結合性や、V3 ペプチドや sCD4 との拮抗阻害などを、ELISA や FACS 等非常に煩雑な方法で決定する必要があった。しかし、われわれの構築しているウイルスパネルが実用化できれば、ウイルスの感受性を調べるだけで、およその抗体の種類と力価が推定可能となる。

最終年度は、今年度作製した抗体感受性の異なる感染性クローンウイルスパネルを用いて、その他の感染症例から得た血漿中に含まれる中和抗体の種類が同定可能かどうかを検討する予定である。

E. 結論

中等度~高度 MVC 耐性変異 Env をもつ組換えウイルスを作製し、抗体に対する中和感受性の異なるウイルスパネルの構築を行った。このパネルを用いて、患者血清 IgG の感受性を調べたところ M434I 変異が中和抗体感受性に関与している事が判明した。これらのパネルで今後簡便に感染者血清に含まれる中和抗体の大まかな種類と力価を知る事が可能となれば、ウイルスシーケンスと中和抗体産生の関係を知る事が出来るだけでなく、ワクチン抗原の探索に有用な知見を得られるといえる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表 (*corresponding author)

- Harada S, Yoshimura K*, Yamaguchi A, Yusa K, Matsushita S. Impact of antiretroviral pressure on selection of primary HIV-1 envelope sequences in vitro. J Gen Virol, 94:933-943, 2013.
- Kuwata T, Takaki K, Yoshimura K, Enomoto I, Wu F, Ourmanov KI, Hirsch VM, Yokoyama M, Sato H, Matsushita S. Conformational Epitope Consisting of the V3

- and V4 Loops as a Target for Potent and Broad Neutralization of Simian Immunodeficiency Viruses. *J Virol*, 87: 5424-5436, 2013.
- Narumi T, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Hirota Y, Ohashi N, Hashimoto C, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H.: CD4 mimics as HIV entry inhibitors: lead optimization studies of the aromatic substituents. *Bioorg Med Chem*, 21:2518-2526, 2013.
 - Kuwata T, Takaki K, Enomoto I, Yoshimura K, Matsushita S. Increased infectivity in human cells and resistance to antibody-mediated neutralization by truncation of the SIV gp41 cytoplasmic tail. *Frontiers in Microbiology/Virology*, 4:1-7, 2013.
 - Hashimoto C, Narumi T, Otsuki H, Hirota Y, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Ohashi N, Nomura W, Miura T, Igarashi T, Matsushita S, and Tamamura H. A CD4 mimic as an HIV entry inhibitor: Pharmacokinetics. *Bioorg Med Chem*, 21: 7884-7889, 2013.
 - Otsuki H, Hishiki T, Miura T, Hashimoto C, Narumi T, Tamamura H, Yoshimura K, Matsushita S, and Igarashi T. Generation of a replication-competent simian-human immunodeficiency virus, the neutralisation sensitivity of which can be enhanced in the presence of a small molecule CD4 mimic. *J Gen Virol*, 94: 2710-2716, 2013.

学会発表
(国際学会)

- Shigeyoshi Harada, Samatchaya Boonchawalit, Tetsuo Narumi, Hirokazu Tamamura, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. Impact of CD4 mimetics-resistant mutations on susceptibilities to anti-Env nMAbs. 21th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI2014), Boston, MA, U.S.A., 2014.
- Shigeyoshi Harada, Samatchaya Boonchawalit, Tetsuo Narumi, Hirokazu Tamamura, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. In vitro selection of bifunctional CD4 mimic small compounds (NBD analogues) using bulk and cloned primary isolates. 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 2013.
- Samatchaya Boonchawalit, Shigeyoshi Harada, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. Analysis of relationships between Maraviroc (MVC) resistant mutations and sensitivity to antibody-mediated neutralization. 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 2013.
- Yuki Hirota, Tetsuo Narumi, Kazuhisa Yoshimura, Shigeyoshi Harada, Chie Hashimoto, Wataru Nomura, Tatsuhiko Igarashi, Shuzo Matsushita, Hirokazu Tamamura. Indole-type small CD4 mimic molecules targeting an HIV envelope protein gp120. 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 2013.
- Shigeyoshi Harada, Samatchaya Boonchawalit, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. Analysis of interaction between gp120 and CD4 mimic small compounds that enhance the activity of anti-HIV neutralizing antibodies. AIDS Vaccine 2013, Barcelona, Spain, 2013.
- Samatchaya Boonchawalit, Shigeyoshi Harada, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. Characterization of highly neutralizing antibody sensitive HIV-1 gp120 induced under high concentrations of maraviroc (MVC) in vitro. AIDS Vaccine 2013, Barcelona, Spain, 2013.
- Shigeyoshi Harada, Samatchaya Boonchawalit, Tetsuo Narumi, Hirokazu Tamamura, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. CD4 mimic small compounds, NBD-556 and its analogues bind at 3 amino acid positions in the gp120 CD4 cavity. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2013), Atlanta, GA, U.S.A., 2013.
- Kazuhisa Yoshimura, Shigeyoshi Harada, Samatchaya Boonchawalit, Shuzo Matsushita. Impact of maraviroc-resistant and low CCR5-adapted mutations induced in vitro passage on sensitivity to anti-Env neutralizing antibodies. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2013), Atlanta, GA, U.S.A., 2013.

(国内学会)

- 原田恵嘉, 鳴海哲夫, Samatchaya Boonchawalit, 玉村啓和, 松下修三, 吉村和久; バルクおよびクロンウイルスを用いた CD4 類似低分子化合物誘導体に対する in vitro 耐性ウイルス誘導 第 27 回 日本エイズ学会学術集会・総会, 熊本, 2013
- 大附寛幸, 丸田泰広, 橋本智恵, 鳴海哲夫, 廣田雄樹, 原田恵嘉, 三浦智行, 吉村和久, 玉村啓和, 松下修三, 五十嵐樹彦; 抗 V3 抗体