

の多様性を進化的に考察することを目的として、霊長類の ULBP 遺伝子群とともに系統樹を作成したところ、ULBP2.2 はアカゲザルとカニクイザルが分岐するより以前に、ULBP5 遺伝子とともに ULBP2.1 と分岐したものと考えられた。また、ULBP1, ULBP3, ULBP4 はいずれも ULBP2.1 から分岐したことが推定された。さらに、興味深いことに、ヒトにおける ULBP2 と ULBP6 の分岐は、ヒト ULBP2 とチンパンジーおよびゴリラの ULBP2 との分岐以降であると推定された。チンパンジーやゴリラのゲノム配列を探索したが ULBP6 遺伝子類似の配列が見出されなかったことから、ULBP6 はヒトがチンパンジー・ゴリラと分岐した以降に ULBP2 遺伝子の重複で生じたことが推定された (図 1)。

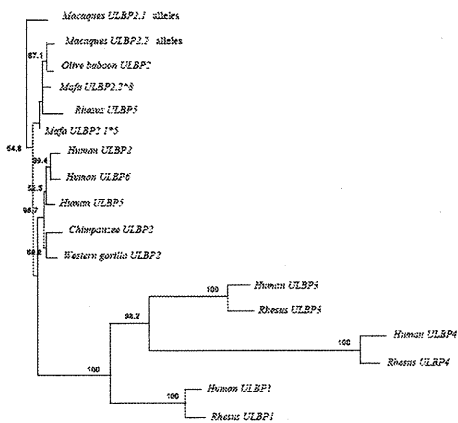


図 1 ULBP 遺伝子群の系統樹

ついで、ヒト ULBP3 と NKG2D 複合体の結晶解析から ULBP 分子上で NKG2D と結合するサイトが決定されていることから、ULBP2 の 3D モデルを作製し、結合サイトを推定したところ、22, 23, 70, 73, 77, 80, 83, 84, 165, 169, 170, 177 の 12 か所で結合すると考えられた (図 2)。

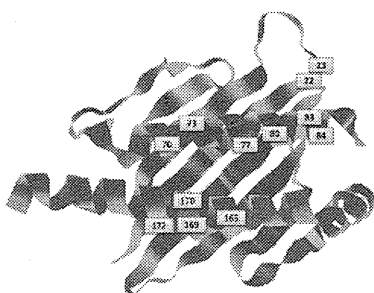


図 2 ULBP2 上の NKG2D 結合サイトマッピング

そこで、アカゲザル、カニクイザルの ULBP2.1 および ULBP2.2 について、それぞれ

3D モデルを作製し、多型部位をマップしたところ、アカゲザルでは ULBP2.1 で 73 位に多型が存在した (図 3) が、ULBP2.2 では NKG2D との結合サイトに多様性は認められなかった。

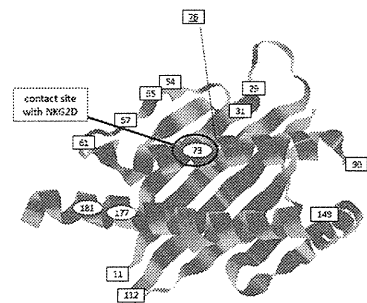


図 3 アカゲザル ULBP2.1 の多型部位

これに対して、カニクイザルでは ULBP2.2 で 172 位に多型が存在した (図 4) が、ULBP2.1 では NKG2D との結合サイトに多様性は認められなかった。

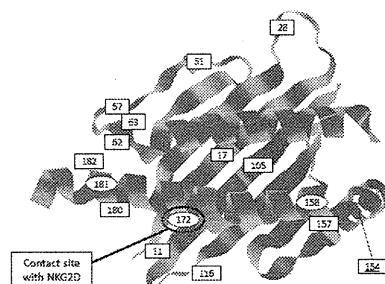


図 4 カニクイザル ULBP2.2 の多型部位

このことから、旧世界ザルでは ULBP2.1 と ULBP2.2 のいずれか一方のみに NKG2D との結合サイトに多様性があることが判明した。一方、ヒト ULBP2 および ULBP6 における多様性を 3D モデル上にマップしたところ、NKG2D との結合サイトの多型は ULBP6 のみに存在した (図 5)。

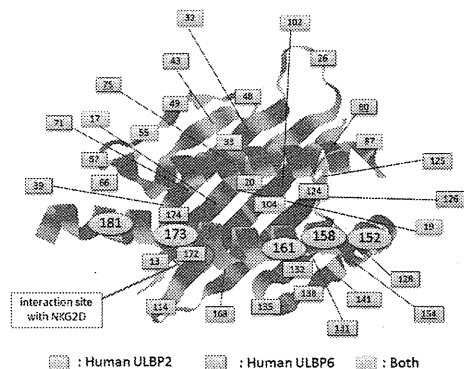


図 5 ヒト ULBP2 および ULBP6 の多型部位

2) NFKBIL1 遺伝子機能の検討: MHC クラス I-クラス III 境界部に存在する NFKBIL1 遺伝子 (IkBL 分子) が CLK1 と結合することから、IkBL と CLK1 との結合との結合に関わる IkBL ドメインを検討したところ、IkBL の C 末ドメインは結合に不要であることが判明した (図 5) が、これらのドメインは IkBL の核スペクトル局在に必須のドメインと一致した。

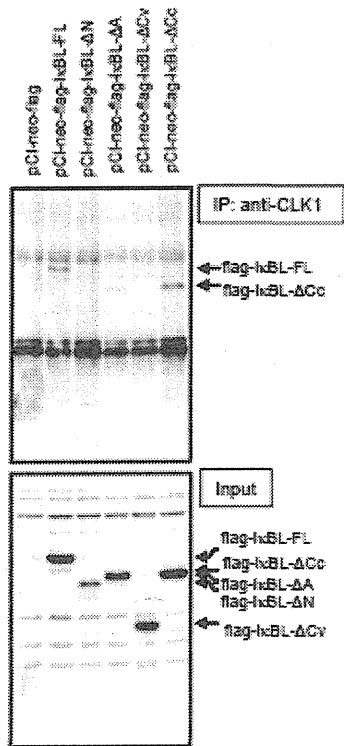


図 5 免疫沈降による IkBL の CLK1 結合ドメインの検討

また、CD45、CTLA4、CD72 のミニジーンを用いた系で CLK1 は選択的スプライシングを促進し、IkBL はこれを抑制することを昨年度に明らかにしていたが、今年度の解析で、CD45 の選択的スプライシングには CLK1 のキナーゼドメインは不要であること、また ASF/SF2 は CLK1 によってリン酸化されるが、このリン酸化は IkBL によって阻害されなかった (図 6)。

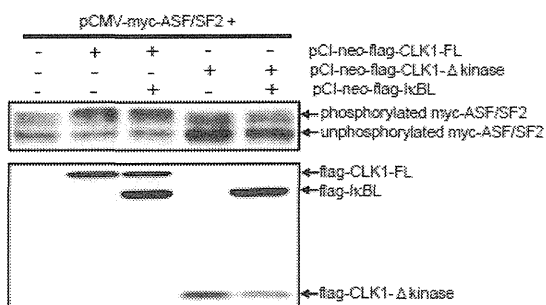


図 6 IkBL は CLK1 による ASF/SF2 リン酸化を阻害しない

さらに、JSL1 細胞を用いて、内因性 CD45 の選択的スプライシングの変化が確認された (図 7)。すなわち、JSL1 細胞で IkBL を高発現させると、PMA で処理した際のスプライシング促進が抑制されることが判明した。

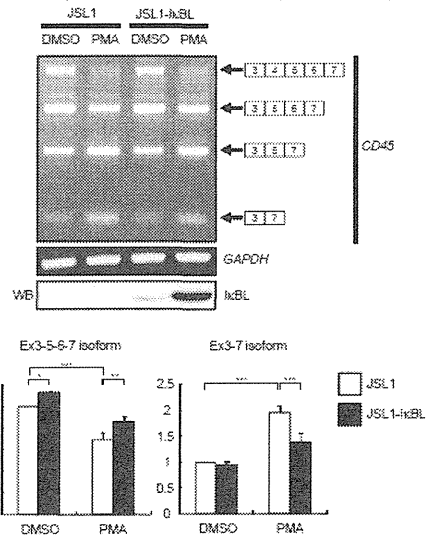


図 7 JSL1 細胞における CD45 スプライシングと IkBL

一方、インフルエンザウイルス M 遺伝子スプライシングについて、in vitro での再構築系を用いて検討したところ、IkBL は M 遺伝子の選択的スプライシングを抑制した (図 8)。

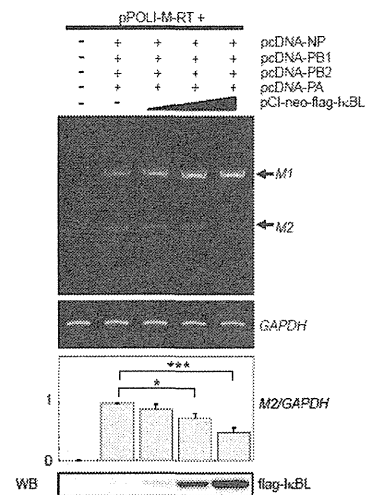


図 8 IkBL は M 遺伝子のスプライシングを抑制する

D. 考察

SIV ワクチン実験には主にアカゲザルが用いられているが、個々の実験個体の免疫遺伝学的背景は必ずしも明らかではない。我々はこれまでにワクチン実験における CTL 免疫応答の個体差を規定する最も重要な遺伝因子である MHC、ことに MHC クラス I について、多数の個体を解析し、実

験個体の繁殖集団における MHC クラス I レパートリーおよびハプロタイプ構造の全貌をほぼ明らかにした。

また、CTL 機能および NK 機能に関わる NKG2D レセプターのリガンド多様性についての解析を進め、昨年までに MIC、ULBP4 の多様性を明らかにした。本年は昨年までに明らかにした ULBP2 の多様性をさらに詳細に検討した。アカゲザルおよびカニクイザルでは、ヒトと比較して MHC クラス I 遺伝子座の遺伝子重複があり、さらに個々の遺伝子に多様性が大きいことが判明しているが、我々の研究によって、アカゲザルおよびカニクイザルでは ULBP 遺伝子座にも遺伝子重複があること、個々の ULBP 遺伝子の多様性がヒトより遥かに大きいことが明らかになった。また、系統樹解析から、ULBP 遺伝子群の祖先は ULBP2.1 であり、これから種々の ULBP 遺伝子群が分岐したことが推定された。ことに興味深いことは、ヒトでは ULBP6 によく類似した ULBP6 が存在するが、チンパンジーやゴリラを含めて、他の霊長類には ULBP6 が存在しないこと、ULBP6 はヒトと他の霊長類が分岐した後に ULBP2 から遺伝子重複したものと考えられた。

一方、3D モデルを作製して多型をマップしたところ、アカゲザル、カニクイザルともに ULBP2.1、ULBP2.2 とも著明な多様性を示すが、NKG2D との結合サイトにおける多型はアカゲザルでは ULBP2.1、カニクイザルでは ULBP2.2 にも認められた。さらに、ヒトにおいては NKG2D との結合サイトの多型は ULBP6 にしか認められなかった。ヒトでは ULBP6 が自己免疫性脱毛症の原因遺伝子であることが報告されているが、今後 ULBP6 多型と HIV/AIDS との関連を検討するとともに、アカゲザル実験個体について、ULBP2.1 多型と SIV ワクチン後の CTL 誘導性、中和抗体産生性を今後検討することで、ULBP2 遺伝子群におけるゲノム多様性の生物学的意義を推定できると考えられる。

さらに、本研究において MHC(ヒト HLA)領域内にマップされ、その発現の個体差が慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患と関連することが報告されている機能不明な NFKBIL1 遺伝子 (IkBL 分子) について、これがヒト免疫関連遺伝子の選択的スプライシングを制御すること、またインフルエンザウイルス M 遺伝子のスプライシングを制御することを明らかにした。HIV/SIV 遺伝子でも選択的スプライシングが生じているため、今後 IkBL による HIV/SIV ウイルス遺伝子のスプライシング制御を検討することで、ウイルス感染にお

ける宿主要因を解明する重要な情報を得る。

E. 結論

SIV ワクチンの効率に関わる宿主要因として、NKG2D レセプターのリガンドである ULBP2 の多様性を検討した。ULBP2 は、アカゲザルおよびカニクイザルでは著明な多様性を呈し、かつ NKG2D との結合部位にも多様性が存在した。これとは別に、MHC 領域内に存在する機能不明な遺伝子 NFKBIL1 がヒト免疫関連遺伝子およびインフルエンザウイルスの選択的スプライシングを制御するメカニズムを解明した。

F. 研究発表

1 論文発表

- (1) Nakane T, Nomura T, Shi S, Nakamura M, Naruse TK, Kimura A, Matano T, Yamamoto H. Limited impact of passive non-neutralizing antibody immunization in acute SIV infection on viremia control in rhesus macaques. PLoS ONE 2013; 8(9): e73453.
- (2) An J, Nakajima T, Shibata H, Arimura T, Yasunami M, Kimura A. A novel link of HLA locus to the regulation of immunity and infection: NFKBIL1 regulates alternative splicing of human immune-related genes and influenza virus M gene. J Autoimmun, 2013; 47: 25-33.
- (3) An J, Kimura A. IkBL mapped within the HLA region is a novel regulator of alternative splicing involved in the pathogenesis of immune-related diseases. MHC. 2013; 20(3):191-197.
- (4) Iwamoto N, Takahashi N, Seki S, Nomura T, Yamamoto H, Inoue M, Shu T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Control of SIV replication by vaccine-induced Gag- and Vif-specific CD8+ T cells. J Virol. 2014; 88(1): 425-433.
- (5) Naruse TK, Akari H, Matano T, Kimura A. Divergence and diversity of ULBP2 genes in rhesus and cynomolgus macaques. Immunogenetics, In Press (doi: 10.1007/s00251-014-0760-y)

2 学会発表

- (1) 成瀬妙子、森 一泰、明里宏文、俣野哲朗、木村彰方. 旧世界ザル ULBP2/RAET1H 遺伝子の種特異的多様性. 日本人類遺伝学会第 58 回大会.2013 年 11 月 21 日. 仙台.
- (2) 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. 2013年11月10～12日. 神戸.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1 特許取得

該当なし

2 実用新案登録

該当なし

3 その他

該当なし

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

各種 HLA クラス I 拘束性 CTL エピトープ候補の網羅的解析

研究分担者 立川 愛 東京大学医科学研究所
先端医療研究センター感染症分野 准教授

研究要旨

CTL エピトープの HLA クラス I 拘束性を同定するための手法について、検討を行った。既知の CTL エピトープとその変異体をモデルとして、実験的手法と HLA クラス I とペプチドの結合予測プログラムによる解析の結果を比較した。実験により得られた結果と予測プログラムによる結果は必ずしも一致せず、実験データに基づいた評価の重要性が明らかとなった。

A. 研究目的

HIV 感染症の克服には予防ワクチンの開発が必須である。HIV のコントロールには T 細胞による特異的免疫応答が重要であることが知られており、予防ワクチンにおいても HIV 特異的細胞傷害性 T リンパ球(CTL)を誘導することが効果的であると考えられ、サル/SIV モデルにおいてその有効性が確認されている。

CTL は、HIV 感染細胞上の HLA クラス I 分子 (HLA-I) により提示される抗原ペプチド (エピトープ) を認識し細胞傷害活性を発揮するため、その効果は宿主の HLA-I 型に依存する。実際に HIV 感染における病態進行と HLA-I 型には関連が見られ、特定の HLA-I を保有する HIV 感染者における病態進行の遅延、あるいは促進が疫学的解析により明らかとなっている。

HLA は最も多様性の高い遺伝子であり、人種間によってその分布は大きく異なる。そのため、HIV に対する T 細胞誘導型予防ワクチンの開発においては地域毎、あるいは人種毎に HLA-I 遺伝子型背景を考慮するべきである。すなわち、対象とする集団において高頻度に見られる HLA-I に

これまでに多数の CTL エピトープとその HLA-I 拘束性が明らかとされてきたが、限られた地域でのコホート研究が多く、いまだ網羅されているわけではない。また、近年 HIV タンパク質を網羅するオーバーラッピングペプチド (OLP) を用いることで CTL の標的となっている部位を同定することが可能となってきたが、実

験的にその HLA 拘束性を正確に決定することは容易ではない。一方で、蓄積しつつある各 HLA-I 型拘束性エピトープの配列情報をもとにコンピューターでのエピトープ予測も精度の向上が見られる。実験的手法とコンピューターによる各 HLA へのペプチド結合予測を融合させ、より正確で簡便な CTL エピトープとその HLA 拘束性を決定することができれば、HIV 感染症に限らず CTL 誘導型のワクチンや、細胞免疫療法の開発にも有益な情報をもたらすことができる。

本研究では、実験的手法とコンピューターによる予測法による CTL エピトープと HLA 拘束性の同定を試みる。本年度は既知のエピトープとその変異型に対して、実験的手法によるペプチド-HLA 結合能の解析と、インターネット上で公開されている入手可能なエピトープ予測ソフトによる解析を行い、その結果の比較を試みた。

B. 研究方法

既知のエピトープである HLA-A*24:02 拘束性 Nef134-10 (RYPLTFGWCF) とその変異体を用いて、1) 実験的手法と 2) エピトープ予測プログラムを用いて、HLA-A*24:02 との結合について解析を行った。

以前の研究で HIV 感染者血漿中ウイルス RNA の遺伝子解析により実際に観察された変異体、2F (RFPLTFGWCF)、10Y (RYPLTFGWY) を使用した。

1) 実験的手法

HLA-A*24 との結合能の測定：HLA-A*24:02 を発現する TAP 欠損細胞 T2-A24 細胞を用い、段階希釈した野生型(wt)、2F, 10Y 変異ペプチドの結合を解析した。

Nef134-10 特異的 CTL クローンによる認識：HLA-A*24:02 を発現する B-LCL に各ペプチドをパルスし、Nef134-10 特異的 CTL クローンの avidity を解析した。また、HLA-A*24:02 を遺伝子導入した CD4+ T 細胞株に実験株 HIV-1 である NL4-3 を感染させ、Nef134-10 特異的 CTL クローンと共培養を行い、ELISpot 法により、CTL クローンの抗原認識について解析した。

2) エピトープ予測プログラムによる検討

Immune Epitope Database (IEDB) Analysis Resource より公開されている MHC-I Binding Prediction tool (<http://tools.immuneepitope.org/mhci/>)を用いて、IC₅₀ を算定した。

C. 研究結果

1) 実験的手法による解析

Nef134-10(wt)、Nef134-10(2F)について、T2-A24 細胞を用いて HLA-A*24:02 との結合能を解析したところ、wt に比して 2F 変異体の結合は低濃度で若干の低下が見られたが、ほぼ同等の結合能を示した。また、Nef134-10 特異的 CTL クローンを用いて wt, 2F をパルスした B-LCL との avidity を解析したところ、wt, 2F 双方を同程度に認識する CTL クローンが存在した。これらの結果から、wt と 2F の HLA-A*24:02 との結合能には大きな違いがないことが示唆された。

それに対して、10Y 変異体については、Nef134-10 の配列が 10Y である NL4-3 株を感染させた A24 発現 CD4+T 細胞を用いて、Nef134-10 特異的 CTL クローンによる認識を確認した。その結果、共培養した CTL クローンによる IFN- γ 産生細胞は全く検出されなかった。他のエピトープ特異的 CTL クローンでは IFN- γ 産生が観察されていることから、Nef134-10 の配列が 10Y である NL4-3 感染細胞では、Nef134-10 はエピトープとして提示されていないことが明らかとなった。

2) エピトープ予測プログラムによる検討

Nef134-10(wt)の IC₅₀ が 9.59nM であったのに対して、2F では 135.12nM、10Y では 390.39nM で

あった。

D. 考察

Nef134-10(2F)に関して、実験的手法では wt とほぼ同程度に HLA-A*24:02 と結合している結果が得られたが、予測プログラムでは 10 倍以上結合能が低下しているとの結果であり、実験結果との間に乖離が見られた。それに対して、Nef134-10(10Y)変異に関しては、実験的手法では HLA-A*24:02 との結合が著明に低下、あるいは結合していない可能性を示唆するデータを得た。予測プログラムにおいても wt に比して 400 倍程度結合能が低下しており、実験結果と予測プログラムによる結果はある程度合致していると考えられる。

今回の検討により、現時点で入手可能な予測プログラムの精度ではペプチドの特定の HLA との結合能に関して、正確な情報を得ることはできないであろうと考えられる。実験的手法による測定を基軸に、他のアルゴリズムを使用するプログラムについても検討を行う予定である。また、より簡便に HLA 拘束性を同定する実験手法の開発も重要であろう。

E. 結論

CTL エピトープの HLA-I 拘束性を明らかにするためには、現時点では実際に実験的手法を用いて測定し、予測プログラムを補助的に利用するべきである。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. [Kawana-Tachikawa A](#), Llibre JM, Bravo I, Escrig R, Mothe B, Puig J, Puertas MC, Martinez-Picado J, Blanco J, Manzardo C, Miro JM, Iwamoto A, Pozniak AL, Gatell JM, Clotet B, Brander C; MARAVIBOOST investigators. Effect of Maraviroc Intensification on HIV-1-Specific T Cell Immunity in Recently HIV-1-Infected Individuals. PLoS One. 9:e87334, 2014.
2. Shimizu A, [Kawana-Tachikawa A](#), Yamagata A, Han C, Zhu D, Sato Y, Nakamura H, Koibuchi T, Carlson J, Martin E, Brumme CJ, Shi Y, Gao GF, Brumme ZL, Fukai S, Iwamoto A. Structure of TCR and antigen complexes at an immunodominant CTL

- epitope in HIV-1 infection. *Sci Rep.* 3:3097, 2013
3. Teeranaipong P, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Fujii T, Koibuchi T, Nakamura H, Koga M, Kondo N, Gao GF, Hoshino H, Matsuda Z, Iwamoto A. Development of a rapid cell-fusion-based phenotypic HIV-1 tropism assay. *J Int AIDS Soc.* 16:18723, 2013.
2. 学会発表
1. Nakayama-Hosoya K, Ishida T, Hosoya T, Nakamura H, Koga M, Koibuchi T, Iwamoto A, Kawana-Tachikawa A. Low IL-2 expression by epigenetic modification is associated with immunosenescence in HIV non-controllers. Keystone symposia, HIV Pathogenesis – Virus vs Host. Banff, Alberta, Canada, Mar 2014.
 2. Meribe SC, Hasan Z, Gatanaga H, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Oka S, Ueno T. Linkage between disease status and a naturally-arising mutation in functional region of HIV-1 Nef. 21th conference on retroviruses and opportunistic infections. Boston, USA. Mar 2014.
 3. Kawana-Tachikawa A. The 9th China-Japan Laboratory Workshop: Pathogenesis, Gene regulation, and signal transduction. “Interaction between virus and host immune response during chronic HIV-1 infection.”, Beijing, China, Nov 2013.
 4. Meribe SC, Kawana-Tachikawa A, Takamasa Ueno T. Naturally arising amino-acid polymorphisms within functional regionso of HIV-1 Nef influence viral persistence in vivo. 第 42 回日本免疫学会学術集会, 千葉, 2013 年 12 月.
 5. 石坂彩、立川 (川名) 愛、中村仁美、古賀道子、細谷紀彰、鯉渕智彦、野本明男、岩本愛吉、水谷荘利. HIV-1 陽性者末梢血からの HIV-1 短鎖 RNA の検出および定量法の確立. 第 27 回日本エイズ学会学術集会, 熊本, 2013 年 11 月.
 6. 立川 (川名) 愛、韓忠勇、清水晃尚、細谷紀彰、中村仁美、古賀道子、鯉渕智彦、いわ本愛吉. 重複する CTL エピトープ部位に生じた 1 アミノ酸変異によるエピトープの消滅と出現. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013 年 11 月.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
特になし
 2. 実用新案登録
特になし

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
universal HLA クラス I 拘束性 CTL 反応と関連変異に関する研究

研究分担者：小柳 円 熊本大学エイズ学研究センター 特任助教

研究要旨

世界中で普遍的にみられる HLA 抗原により拘束された CTL エピトープの同定を行い、その中でもアフリカで流行しているウイルス株に対しても認識できる CTL を明らかにするため下記の研究を行った。

ルアンダ、ガーナを含むサハラ以南および日本に於いて共通して 5%以上の頻度で見られる HLA の内、9%の頻度で見られた HLA-B*07:02 に拘束性された 16 種類のエピトープに対する CTL 反応を HLA-B*07:02 陽性 HIV-1 サブタイプ B および C 慢性感染者の PBMC を用いて、IFN- γ Elispot 法にて検出した。当該地域で流行しているサブタイプ A、AG と B もしくは C、またはすべての 4 サブタイプで保存されていた 7 種類の HLA-B*07:02 拘束性エピトープを確認した。さらに、それぞれ 10%以上のサブタイプ B、C 感染者群で CTL 反応がみられたエピトープは 4 種類であった。以上のことから、これらのエピトープは当該地域のサブタイプ A、AG 感染者においても CTL エピトープとして機能する可能性が示唆された。今後は、これらの CTL エピトープの HLA 関連ゲノム変異の有無を解析し、変異型エピトープに対する CTL 反応を検討し、CTL 逃避変異について解析する予定である。

A. 研究目的

世界の HIV 感染はアフリカサハラ以南に集中しており、70%を占める。アフリカでの感染拡大を抑制するためには、ウイルス増殖抑制能に優れた CTL を誘導する予防エイズワクチンの開発が重要である。この予防ワクチン開発は日本における感染拡大の抑制にも必要である。本研究ではアフリカのルアンダ、ガーナでの T 細胞誘導ワクチン臨床試験に向けた最適化抗原設計を行うため、世界中で普遍的にみられる HLA 抗原により拘束された CTL エピトープの同定を行い、その中でもアフリカで流行しているウイルスに対しても認識できる CTL を明らかにする。

B. 研究方法

ルアンダ、ガーナを含むサハラ以南および日本に於いて共通して 5%以上の頻度で見られる HLA を NCBI dbMHC データベースにより選出した。これらの HLA の内、当該地域で 9%の頻度で見られた HLA-B*07:02 に拘束性された 16 種類のエピトープに対する CTL 反応を日本、ヨーロッパで流行している HIV-1 サブタイプ B の HLA-B*07:02 陽性慢性感染者(日本人を含む 58 人)およびアフリ

カ南部で流行しているサブタイプ C の HLA-B*07:02 陽性慢性感染者 (11 人) の PBMC を用いて IFN- γ 産生を Elispot 法にて検出した。

(倫理面の配慮)

本研究は、国立国際医療研究センター、エイズ治療・研究開発センターより提出されている末梢血検体について、ヘルシンキ宣言に基づいたインフォームドコンセントを患者から取得し、末梢血の提供を受けており、本人の承諾なく実験に使用・遺伝子解析されることはない。検体提供者はすべて番号により管理しており、個人情報管理について、検査伝票は鍵のかかる棚に保管し、電子媒体はネットワークに接続されていない個人情報管理専用のパソコンで厳重に管理され、そのパソコンは研究室内でも限られた者しか利用できないようパスワードで使用が制限されている。

本研究内容は熊本大学と国立国際医療研究センターの倫理委員会で承認を受けている。

C. 研究結果

16 種類 HLA-B*07:02 拘束性エピトープの内、サブタイプ B もしくは C 感染者群で、それぞれ 10%以上の感染者が CTL 反応を示したエピトープ

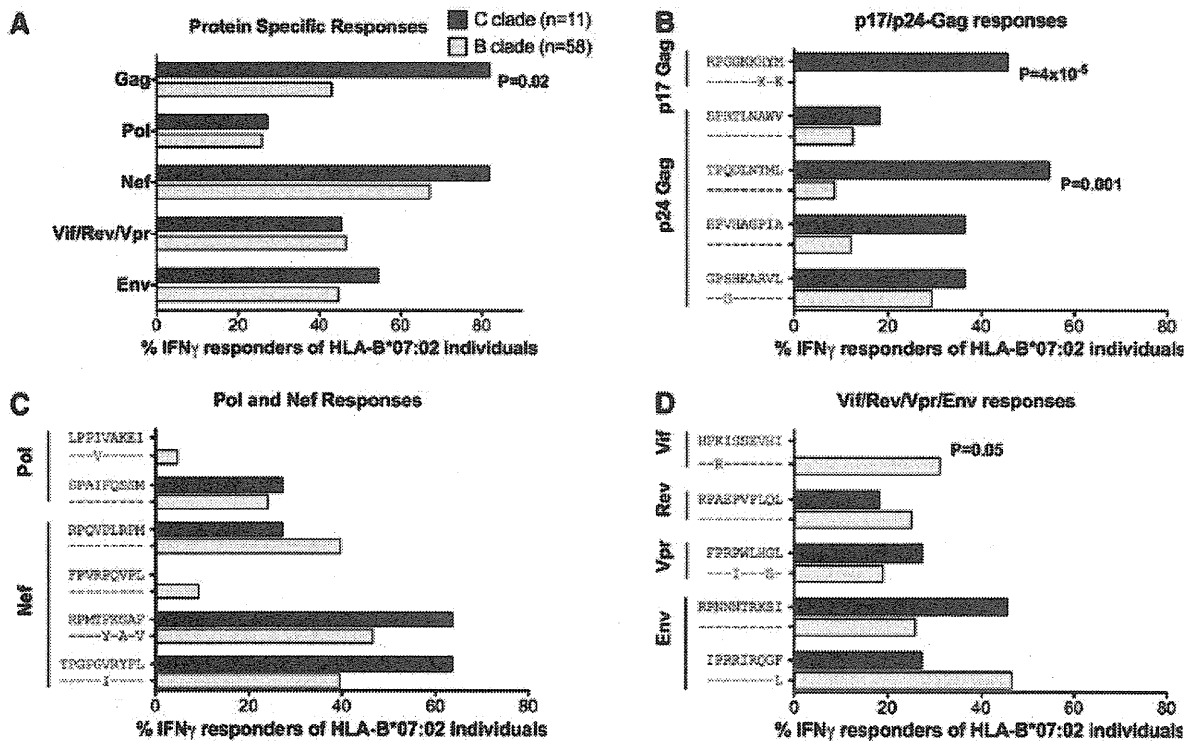


図 1 HLA-B*07:02 拘束性エピトープに対する CTL 反応

は 12 種類見つかった(図 1)。サブタイプ B もしくは C と当該地域で流行しているサブタイプ A、AG で保存されていたエピトープはそれぞれ 2 種類(p24 GL9, Env IF 9, Vif HI10, Int LI9)あり、またはすべての 4 サブタイプで保存されていたエピトープは 3 種類(Nef RM9, Nef FL9, p24 SV9)であった(表 1)。この 7 種類のエピトープの内、10%以上のサブタイプ B, C 各感染者群で CTL 反応がみられたエピトープは 4 種類 (Nef RM9, p24 SV9, p24 GL9, Int LI9)であった。これらのエピトープの内、サブタイプ C 感染者群において、p24 GL9 に対する CTL 反応を示した感染者は反応を示さない感染者に比較し有意に血中ウイルス量が低く ($p = 0.001$, 図 3)、この反応は HIV 増殖抑制に関与していることが示唆された。しかしながら、サブタイプ B 感染者群では有意差は認められなかった。さらに、サブタイプ C 感染者群ではサブタイプ B 型のアミノ酸配列に相当する GL9-3G 型の変異の蓄積が HLA-B*07:02 陽性感染者群で検出された ($p = 3 \times 10^{-27}$)。

D. 考察

保存されていた 4 種類 HLA-B*07:02 拘束性エピトープに対する CTL 反応は 10%以上の各サブタイプ B, C 感染者群で見られたことから、当該地

clade	Nef RM9	Nef FL9	p24 SV9
B	RPQVPLREM	FPVRQVFL	SPRTLNAWV
C	-----	-----	-----
A	-----	-----	-----
AG	-----	-----	-----

clade	Int LI9	p24 GL9	Vif HI10	Int LI9
B	LPPVAKEL	GGGKARVL	HPRISSEVHI	IPRRIRQGL
C	---I----	--s-----	--KV-----	-----F
A	---I----	-----	--KV-----	-----
AG	---I----	-----	--KV-----	-----

表 1 当該地域で流行するウイルス株の HLA-B*07:02 拘束性エピトープアミノ酸配列

域のサブタイプ A, AG 感染者においてもこれらの CTL 反応はウイルス増殖抑制に関与する可能性が示唆された。平成 26 年度は、これらの CTL エピトープの HLA 関連ゲノム変異の有無を詳細に解析し、変異型エピトープに対する CTL 反応を検討し、CTL 逃避変異について解析する予定である。

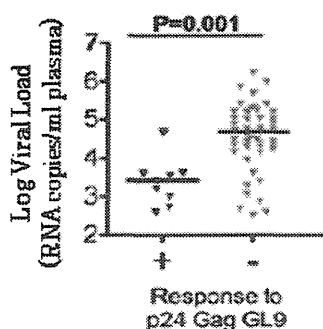


図 2 サブタイプ C 感染者における Gag GL9 に対する反応とウイルス量の関係

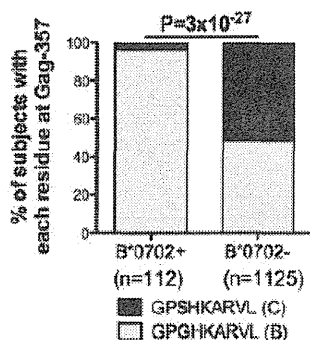


図 3 サブタイプ C 感染群での p24 GL9 エピトープ内での変異の蓄積

E. 結論

世界中で普遍的にみられる HLA-B*07:02 抗原により拘束された CTL エピトープの同定を行い、アフリカで流行しているサブタイプ A,AGC ウイルス株に対しても認識できる CTL に関して順調に解析が進展している。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kløverpris HN, Adland E, Koyanagi M, Stryhn A, Harndahl M, Matthews PC, Shapiro R, Walker BD, Ndung'u T, Brander C, Takiguchi M, Buus S, Goulder P. HIV Subtype Influences HLA-B*07:02-Associated HIV Disease Outcome. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2013 (In press)
2. Koji Watanabe, Hayato Murakoshi, Yoshiko Tamura, Madoka Koyanagi, Takayuki Chikata, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, and Masafumi Takiguchi, Identification of cross-clade CTL epitopes in HIV-1 clade A/E-infected individuals by using the clade B overlapping peptides, *Microbes and Infection*, 15:874-886, 2013

2. 学会発表

1. Tran Van Giang, Tomohiro Akahoshi, Hayato Murakoshi, Nozomi Kuse, Madoka Koyanagi, Takayuki Chikata, Yoshiko Tamura, Nguyen T. Hoai Dung, Nguyen Vu Trung, Junko Tanuma, Keiko Sakai, Shinichi Oka, Nguyen Van Kinh and Masafumi Takiguchi, Establishment of a cohort of treatment-naive patients chronically infected with HIV-1 in Hanoi, 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会 (熊本), 2013 年 11 月
2. Zhansong Lin, Madoka Koyanagi and Masafumi Takiguchi, Inhibition of human NK cell function by an HLA-Cw*12:02-restricted HIV-1 CTL epitope peptide and its escape mutant peptide, 第 42 回日本免疫学会学術集会 (千葉), 2013 年 12 月
3. Koji Watanabe, Hayato Murakoshi, Madoka Koyanagi, Takayuki Chikata and Masafumi Takiguchi, Cross-clade CD8+ T cell responses in chronically HIV-1 clade A/E-infected individuals, 第 42 回日本免疫学会学術集会 (千葉), 2013 年 12 月
4. Hayato Murakoshi, Madoka Koyanagi and Masafumi Takiguchi, Control of HIV-1 by HIV-1-specific CD8+ T cells in chronically HIV-1-infected Japanese individuals, 第 42 回日本免疫学会学術集会 (千葉), 2013 年 12 月
5. Madoka Koyanagi, Hayato Murakoshi and Masafumi Takiguchi, Synergistic CTL responses effect on viraemia control of HIV-1 infection in Japanese individuals carrying HLA-B*35:01 allele associated with rapid disease progression, 第 42 回日本免疫学会学術集会 (千葉), 2013 年 12 月

H. 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。

T 細胞誘導エイズワクチン臨床試験に向けた最適化抗原設計に関する研究

分担研究者 松岡 佐織 国立感染症研究所 エイズ研究センター 研究員

研究要旨

細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 誘導エイズワクチン開発においては、ウイルス多様性を考慮した抗原設計が必要となる。現在、CTL 誘導を目的としたワクチンの国際共同臨床試験として、ルワンダ等における第 1 相試験が進められており、次の有効性評価のステップ（第 1-2 相）への進展に向け、抗原の最適化が求められている。そこで本研究は、この抗原設計に必要な当該地域の流行 HIV ゲノム情報の集積を目的とした。平成 25 年度は、ガーナ HIV 感染者由来検体を用いて、ウイルスゲノム多様性への関与が大きい宿主 HLA クラス I 遺伝子の多型解析を行った。その結果、ガーナにおいて A*30:01、A*33:03 など、西アフリカを含む比較的限定された地域に分布する HLA アレルが検出され、地域特異的 HLA 関連変異の存在が推測された。来年度以降は、HLA 遺伝子型情報およびウイルスゲノム情報の蓄積を継続するとともに、HLA 関連 HIV 変異の解析を推進する予定である。

A. 研究目的

細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 誘導エイズワクチン開発において、ウイルスの多様性を考慮した抗原設計が必要となる。CTL 標的抗原のアミノ酸配列は宿主 HLA クラス I 拘束性であることから、抗原設計のためにはその集団に蔓延する HIV ゲノム情報と並んで集団を構成する宿主 HLA クラス I 遺伝子型の分布情報の把握が重要である。現在 IAVI 主導の国際共同臨床試験第 1 相が、ルワンダ等にて進行中であるが、当該地域におけるゲノム情報、HLA 分布に関する大規模調査報告はない。そこで本研究は、次の有効性評価のステップ（第 1-2 相）への進展に向け、対象地域の HIV 感染者の HLA 関連変異同定を進めることを目的とする。平成 25 年度は、ガーナ HIV 感染者サンプルを用いて、HLA 遺伝子型の頻度およびその遺

伝子型の世界的分布に関する情報収集を行い、当該地域特異的な CTL 逃避変異の可能性について考察した。

B. 研究方法

HLA 遺伝子同定：ガーナ野口記念医学研究所の協力により、ガーナ HIV 感染者（抗 HIV 薬未治療）血液から抽出された DNA 検体を用いて、PCR-rSSO（PCR-Reverse-Sequence Specific Nucleotide）法にて HLA クラス I アレルのタイピングを行った。高頻度に検出されたアレルについては、Loyal Riverpoor and Broadgreen 大学提供の MHC データベース Allele Frequency Net Database (AFND*)を基に対象の HLA 遺伝子の世界的分布を調査した。

(*<http://www.allelefrequencies.net/default.asp>)

(倫理面への配慮)

本研究については、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年3月29日、平成20年12月1日一部改正)に基づき、国立感染症研究所およびガーナ野口記念医学研究所の倫理委員会の承認のもと推進した。

C. 研究結果

(1) ガーナにおける HLA アレルのタイピング：結果を図1に示す。解析した105件のうち、2桁表記による血清型的 HLA アレルグループは全件判定可能であった。更に4桁表記によるアミノ酸置換を伴うサブタイプ同定を進めた。判別できない HLA アレルが2種類以上ある場合には、日本組織適合学会 HLA 標準化委員会制定の表記法に従い、可能性のある HLA アレルをすべて表記した。HLA-A では A*23:01/03 (32%) が高頻度に検出された。

(2) ガーナで高頻度に検出された HLA アレルの世界的分布：ガーナで高頻度に検出された HLA アレルに関して AFND に登録されている情報を基に世界的分布を調査した。結果を表1、表2に示す。4桁表記によるタイピング判別を保留した HLA アレルのうち HLA-A で最も高頻度に検出された A23 に関して、A*23:01 が西アフリカで高頻度に検出され、A*23:03 の頻度が世界的に低いことから、A*23 のサブタイプは A*23:01 であると推測された。同様に A2 に関しては A*02:01 であると推測された。

ガーナ国内で高頻度に検出される HLA アレルの世界的分布の調査では、高頻度に検出された HLA-A アレルのうち A*30:01 および A*33:03 はアジアおよび西アフリカに高頻度に分布するものであった。一方、A*23:01、A*03:01 および A*02:01 は世界で広範囲に分布するユニバーサル HLA であった。

D. 考察

CTL 標的抗原エピトープのアミノ酸配列は、宿主の HLA クラス I 拘束性である。HLA 遺伝子型に特異的に生じる HIV ゲノム変異については、CTL 標的エピトープ領域のアミノ酸置換を生じ CTL の攻撃からの逃避に結びつくものや、CTL 逃避変異によるウイルス増殖能低下を補うような相補変異などが考えられる。従って、HLA クラス I 遺伝子型分布は、HIV 流行地域における HIV 多様化に大きな影響を与えるものである。言い換えると、異なる人種の集団において異なる HLA 関連変異が蓄積してくると考えられる。本年度解析対象とした西アフリカのガーナでは、A*30:01 や A*33:03 など西アフリカを含む比較的限定された地域に分布する HLA アレルが検出されたことから、本地域特異的な HLA 関連変異が蓄積されている可能性が示唆された。本研究結果を基に、来年度以降も HLA 遺伝子型情報およびウイルスゲノム情報を蓄積し、HLA 関連変異の同定を推進する予定である。本研究で得られる HIV および宿主ゲノム情報は、ワクチン対象地域における抗原設計に必要な基礎情報として重要である。

E. 結論

ガーナ HIV 感染者由来 DNA を用いて HLA タイピングを行い、A*30:01 および A*33:03 など西アフリカを含む比較的限定された地域で高頻度に分布する HLA アレルを確認した。平成26年度以降も HLA 遺伝子型情報およびウイルスゲノム情報を蓄積し、HLA 関連 HIV 変異の解析を推進する予定である。

F. 研究発表

- 1 論文発表
なし

2 学会発表

- 1) 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回日本ウイルス学術集会、神戸、2013年11月.
- 2) 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. 日本エイズ学会学術集会、熊本、2013年11月.

1 特許取得

- なし。
- 2 実用新案登録
なし。
- 3 その他
なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

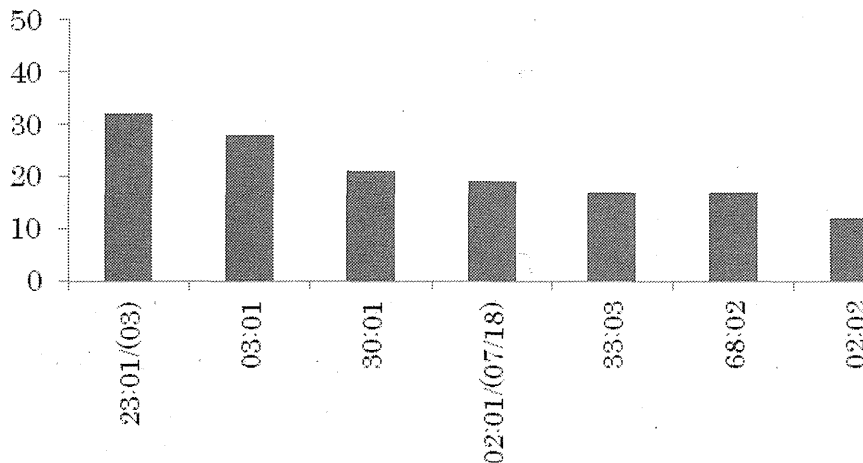


図1. ガーナ HIV 感染者サンプルを用いた HLA クラス I 保有頻度

解析したガーナ由来検体(n=105)に占める HLA-A 分子保有人数を表記した。4 桁表記によるアミノ酸置換を伴うサブタイプ同定を進め、判別できない HLA アレルが 2 種類以上ある場合には日本組織適合学会 HLA 標準化委員会制定の表記法に従い可能性のある HLA アレルをすべて表記した。更に HLA データベース上で世界的分布を調査し (表 1 参照)、可能性の低いアレルに関してはカッコ書きとした。

表 1. ガーナで高頻度に検出された HLA-A アレルの世界的分布

	アフリカ	アジア オーストラリア	北米	中南米	ヨーロッパ
A*23:01	ガーナ (29.8) モロッコ (14.8)			キューバ (14.3)	イタリア (11.5)
A*03:01	ガーナ (19.1)	パキスタン (26.0)		ブラジル (19.7) キューバ (16.7) チリ (13.0)	ベルギー (30.2) イギリス (25.5) フランス (23.8)
A*30:01	ガーナ (19.9) ギニア (19.9)	インド (16.0) 中国 (12.5)			
A*02:01	カメルーン (13.8)	中国 (44.7)		アルゼンチン (60.0) ブラジル (50.0)	オーストリア (48.0) ベルギー (50.0)
A*33:03	カメルーン (46.0)	インドネシア (29.7) 韓国 (29.6)			

Allele Frequency Net Database ; AFND (<http://www.allelefrequencies.net/default.asp>)
を基に対象の HLA 遺伝子の世界的分布を調査し、比較的頻度の高い国を列挙した。

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

経鼻センダイウイルスベクターワクチンの粘膜免疫誘導に関する研究

研究分担者 寺原 和孝 国立感染症研究所 免疫部 主任研究官

研究要旨：

腸管粘膜におけるウイルス感染・増殖を如何に抑制できるかが新規予防エイズワクチン開発に求められる課題であると考え。本分担研究では、予防エイズワクチンとして開発が進行中のセンダイウイルスをベクターとしたワクチンについて、腸管粘膜における免疫誘導能を評価することを目的とする。そこで H25 年度は、サル腸管（小腸）から白血球を分取する方法の確立を目指した。エイズ期の SIV 感染アカゲサルの空腸および回腸剖検（それぞれ 15cm 長）に対して EDTA やコラゲナーゼ処理を施した後、得られた分散細胞画分についてフローサイトメトリー解析を行った結果、空腸では $2.3 \times 10^5 \sim 1.9 \times 10^6$ cells、回腸では $1.3 \times 10^6 \sim 6.4 \times 10^6$ cells の範囲で T リンパ球の回収が見積もられた。また、T リンパ球における CD4/CD8 サブセットの構成を解析した結果、空腸・回腸ともに CD4 サブセットの割合は非常に少なく（1%程度）、エイズ期の病態を反映していた。さらに、CD45 を標的とした磁気分離法による小腸白血球の精製についても検討し、その有効性が示された。以上のことから、サル小腸粘膜固有層から白血球を分取する方法が確立され、細胞レベルでの詳細な解析が今後可能であると考えられた。

A. 研究目的

近年の最たる HIV 感染経路は経粘膜であること、また、体内における HIV の主たる増殖の場は感染経路を問わず腸管粘膜であることから、腸管粘膜におけるウイルス感染・増殖を如何に抑制できるかが新規予防エイズワクチン開発に求められる課題であると考え。そこで本分担研究では、予防エイズワクチンとして開発が進行中のセンダイウイルスをベクターとしたワクチンの腸管粘膜における免疫誘導効果について、サルモデルを中心に評価することを目的とする。初年度にあたる H25 年度はサル腸管（小腸）から白血球を分取する方法の確立を目指した。

B. 研究方法

エイズ期の SIV 感染アカゲサルの空腸および回腸剖検（それぞれ 15cm 長）を EDTA を含む培養液中にて攪拌してある程度の上皮層を除去後、コラゲナーゼを含む培養液中にて攪拌して細胞分散を行った。その後、不連続密度勾配遠心分離法により白血球画分の濃縮を行った。このようにして得られた分散細胞画分に対して CD3, CD4, CD8 の染色を行い、T リンパ球サブセットの組成パタ

ーンについてフローサイトメトリーにて解析した。また、一部の分散細胞画分を用いて、白血球マーカーである CD45 を標的とした磁気分離法による精製についても検討した。

（倫理面への配慮）

遺伝子組換え生物等を用いる実験については国立感染症研究所の承認あるいは文部科学大臣の承認を得ている。動物実験については国立感染症研究所および医薬基盤研究所の動物実験委員会の承認を得てから開始し、動物実験等の実施に関する基本指針を遵守した。

C. 研究結果

1) 小腸粘膜固有層からの T リンパ球回収成績

空腸（3個体）および回腸（5個体）由来の分散細胞画分についてフローサイトメトリー解析を行い、回収された CD3 陽性 T リンパ球数について評価したところ、回腸でより多くの細胞数が回収された（空腸： $2.3 \times 10^5 \sim 1.9 \times 10^6$ cells、回腸： $1.3 \times 10^6 \sim 6.4 \times 10^6$ cells、図1）。

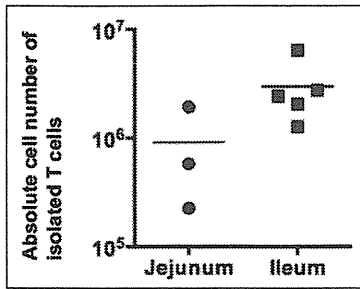


図1. 空腸および回腸剖検から回収されたCD3陽性T細胞数。

2) 小腸Tリンパ球におけるCD4/CD8サブセットの構成

続いて、小腸Tリンパ球におけるCD4/CD8サブセットの構成を解析したところ、まさにエイズ期の病態を反映する結果となった。すなわち、CD4陽性サブセットは非常に少ない頻度であった（空腸：0.93% [n=3]、回腸：0.89% [n=6]、図2A）。なお、同一個体での空腸と回腸におけるCD4/CD8サブセットの構成比はほぼ同一であった（図2B）。

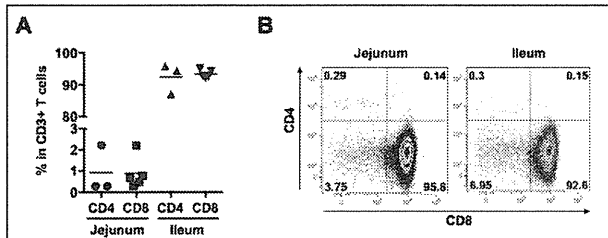


図2. 小腸Tリンパ球におけるCD4/CD8サブセットの構成。A: 空腸 (n=3) および回腸 (n=6) におけるCD3陽性Tリンパ球に占めるCD4/CD8サブセットの割合。B: CD3陽性Tリンパ球におけるCD4/CD8発現プロファイルの代表例。

3) CD45を標的とした磁気分離法による小腸白血球の精製

エイズ期における小腸粘膜固有層の白血球数は非常に少ないことから、不連続密度勾配遠心分離法を行ってはいらぬものの、調製された分散細胞画分において上皮・ストローマ・筋細胞等の夾雑細胞の占める割合が高いケースが見受けられた。そこで、更なる小腸白血球の精製法として、抗CD45抗体磁気ビーズを用いた磁気分離法について検討した。その結果、分離前は16%であったCD45陽性白血球が、分離後は92%となり、本精製法の有効性が示された。また、分離前は不明瞭であった顆粒球系細胞（SSC high）が分離後では明瞭となり、小腸における炎症状態を示唆しているものと考えられた（図3）。

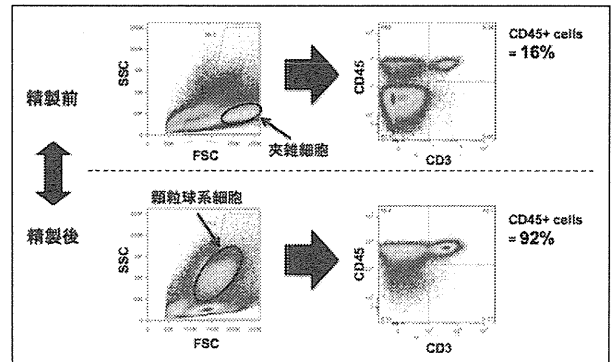


図3. 抗CD45抗体磁気ビーズを用いた磁気分離法による小腸白血球の精製。

D. 考察

本年度はサル小腸粘膜固有層から白血球を分取する方法の確立を目的としており、サルやマウスでの既報の方法、また、研究分担者自身のマウスでの経験を参考にしながらプロトコルを組み立てた。対象検体はエイズ期の小腸であり、Tリンパ球、特にCD4陽性サブセットが非常に少ない状態であるものの、回腸からは少なくとも 10^6 レベルのTリンパ球が回収され、得られた分散細胞画分に対するフローサイトメトリー解析はエイズ期病態を反映していた。つまり、このようなTリンパ球が少ない条件下でも、本分離法により解析可能なTリンパ球を回収出来た。

また、本研究では、小腸白血球の精製法として、抗CD45抗体磁気ビーズを用いた磁気分離法の有効性も示すことが出来た。このことは、例えばex vivoでの培養試験や多重染色フローサイトメトリー解析の際に有用であると考えられる。

E. 結論

サル小腸粘膜固有層から白血球を分取する方法を確立した。

F. 研究発表

1 論文発表

- (1) Ikeno, S., Suzuki, M., Muhsen, 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. *Front. Microbiol.* 4: 298, 2013.

2 学会発表

- (1) 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、中川哲夫、柳雄介、竹山春子、横田（恒次）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、2013 年 11 月

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。

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Iwamoto N, Takahashi N, Seki S, Nomura T, Yamamoto H, Inoue M, Shu T, Naruse TK, <u>Kimura A</u> , <u>Matano T</u> .	Control of SIV replication by vaccine-induced Gag- and Vif-specific CD8 ⁺ T cells.	J Virol	88	425-433	2014
Burwitz BJ, Wu HL, Reed JS, Hammond KB, Newman LP, Bimber BN, Nimiyoungskul FA, Leon EJ, Maness NJ, Friedrich TC, Yokoyama M, Sato H, <u>Matano T</u> , O'Connor DH, Sacha JB.	Tertiary mutations stabilize CD8 ⁺ T lymphocyte escape-associated compensatory mutations following transmission of simian immunodeficiency virus.	J Virol		in press	
Nakane T, Nomura T, Shi S, Nakamura M, Naruse TK, <u>Kimura A</u> , <u>Matano T</u> , Yamamoto H.	Limited impact of passive non-neutralizing antibody immunization in acute SIV infection on viremia control in rhesus macaques.	PLoS ONE	8	e73453	2013
An J, Nakajima T, Shibata H, Arimura T, Yasunami M, <u>Kimura A</u> .	A novel link of HLA locus to the regulation of immunity and infection: NFKBIL1 regulates alternative splicing of human immune-related genes and influenza virus M gene.	J Autoimmun	47	25-33	2013
An J, <u>Kimura A</u> .	IκBL mapped within the HLA region is a novel regulator of alternative splicing involved in the pathogenesis of immune-related diseases.	MHC	20	191-197	2013
Naruse TK, Akari H, <u>Matano T</u> , <u>Kimura A</u> .	Divergence and diversity of ULBP2 genes in rhesus and cynomolgus macaques.	Immunogenetics		in press	
Shimizu A, <u>Kawana-Tachikawa A</u> , Yamagata A, Han C, Zhu D, Sato Y, Nakamura H, Koibuchi T, Carlson J, Martin E, Brumme CJ, Shi Y, Gao GF, Brumme ZL, Fukai S, Iwamoto A.	Structure of TCR and antigen complexes at an immunodominant CTL epitope in HIV-1 infection.	Sci Rep	3	3097	2013
Teeranaipong P, Hosoya N, <u>Kawana-Tachikawa A</u> , Fujii T, Koibuchi T, Nakamura H, Koga M, Kondo N, Gao GF, Hoshino H, Matsuda Z, Iwamoto A.	Development of a rapid cell-fusion-based phenotypic HIV-1 tropism assay.	J Int AIDS Soc	16	18723	2013