

図1. SIV感染後1週目のSIV特異的CD4陽性T細胞の各subsetの頻度
 非ワクチン接種群 (unvac, n = 21)、ワクチン接種SIV複製非制御群 (v-NC, n = 7)
 およびワクチン接種SIV複製制御群 (v-C, n = 11) のSIV特異的CD107a、MIP-1β、
 IFN-γ、TNF-αあるいはIL-2陽性CD4陽性T細胞頻度を示す。(J Virol 88:14232)

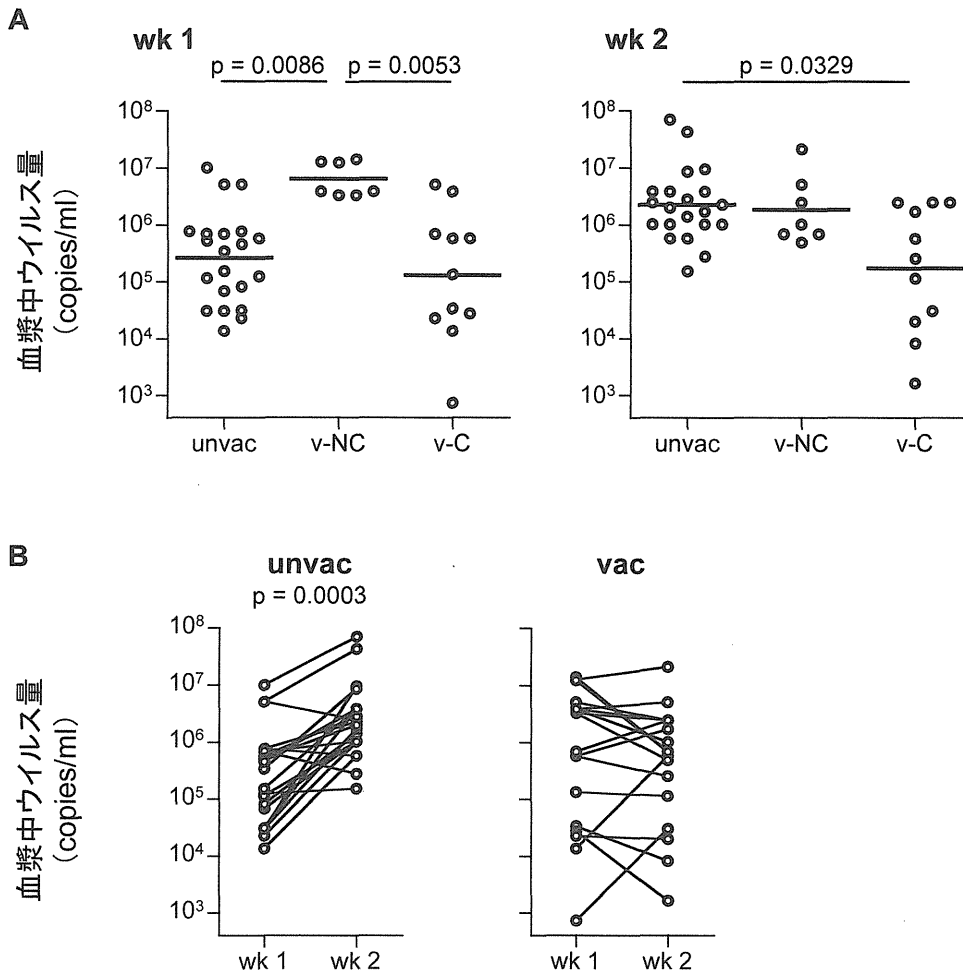


図 2. SIV感染後1・2週目の血漿中ウイルス量

(A) SIV感染後1週目(左)・2週目(右)における非ワクチン接種群(unvac, n = 21)、ワクチン接種SIV複製非制御群(v-NC, n = 7)およびワクチン接種SIV複製制御群(v-C, n = 11)の血漿中ウイルス量の比較。1週目はv-NCがunvacおよびv-Cと比べて有意に高く、2週目はunvacがv-Cと比べて有意に高かった(Kruskal-Wallis test & Mann-Whitney U test)。(B) 非ワクチン接種群(左)とワクチン接種群(右)における1週目と2週目の血漿中ウイルス量の比較。非ワクチン接種群では、1週目より2週目のウイルス量が有意に高値を示した(Wilcoxon signed-rank test) (J Virol 88:14232)

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ピトープを発現させ、抗原エピトープに対する特異的な免疫応答も誘導できる。このシステムをサルを用いて有効性と安全性を検証したところ、2 頭中 1 頭で効果が期待される結果が見られた。今後、実験頭数を増やし、有効性を検証していく必要が示唆された。

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 を用いてその VLP に HIV のエピトープを組み込んだリコンビナント VLP に DNA ワクチンを封入した VLP の大量調製法を改良し、そのワクチンを SHIV 感染ザルモデルを用いて評価をおこなった。

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超速心による濃縮後、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

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、カニ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ルッフ素酸 (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

μL/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 μL/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 μL/well 蒔き、5~20 min 反応させ、2M H₂SO₄ 20 μL/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 3x10⁵ cells/100 μL、抗原量を 5 μg/100 μL とした。

2) ワクチン投与サルへの SHIV 感染

サル 2 頭に HEV-VLP+DNA ワクチンをサル 1 頭に HEV-VLP を 2 週おきに 3 回目免疫後 26 週目に追加免疫を行い、その後 4 週目に 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。

(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) ワクチン投与サルへの SHIV 感染

コントロールワクチン投与ザルとワクチン投与ザルの内 1 頭は、コントロールが出来なかったが、もう 1 頭は血漿中のウイルス量を log で 1~2 桁低く推移し、CD4 陽性細胞数は 400 cells/μL 前後で推移した (図 1、図 2)。

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。ワクチン投与した 2 頭の内、1 頭が血漿中のウイルス量が抑えられ、CD4+T 細胞数の減少が抑えられた傾向が見られた。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前年度までに

確認できたが、SHIV チャレンジ接種猿における 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は解析中である。

粘膜免疫の誘導を想定して、SHIV の直腸からの感染を試みたが、SHIV のカニクイザルへの直腸内投与は報告が無く、SIV とカニクイザルの系と同様にカニクイザルの直腸内投与においても粘膜免疫の効果について知見が得られることが示された。今後は頭数を増やし、直腸内接種回数によるワクチン効果の検討を行っていく。

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な免疫反応及び SHIV 感染防御能をカニクイザルを用いて評価した。実験頭数が少なかった事もあるが、1 頭、効果が期待される結果が見られたので、今後、実験頭数を増やし、有効性の確認をおこない、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. Okabayashi S, Shimozawa N, Yasutomi Y, Yanagisawa K, Kimura N. Diabetes mellitus accelerates Aβ pathology in brain accompanied by enhanced GAB generation in nonhuman primates *PLoS One in press*

2. Onishi M, Ozasa K, Kobiyama K, Ohata K, Kitano M, Taniguchi K, Homma T, Kobayashi M, Sato A, Katakai Y, Yasutomi Y, Wijaya E], Igarashi Y, Nakatsu N, Ise W, Inoue T, Yamada H, Vandebon A], Standley DM], Kurosaki T, Coban C, Aoshi T, Kuroda E, Ishii KJ. Hydroxypropyl-β-cyclodextrin spikes local inflammation that induce Th2 and Tfh responses to the coadministered antigen *J. Immunol. in press*

3. 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* 2014;32;1727-1735.

4. 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 2014:111;3086-3091. USA 2014:111;3086-3091.
USA 2014:111;3086-3091.

5. Tsujimura Y, Inada H, Yoneda M, Fujita T, Matsuo K. and Yasutomi Y. Effects of Mycobacteria major secretion protein, Ag85B, on allergic inflammation in the lung. PLoS One 2014;9: E-pub

6. Saito N, Chono H, Shibata H, Ageyama N, Yasutomi Y. and Mineo J. CD4(+) T cells modified by the endoribonuclease MazF are safe and can persist in SHIV-infected rhesus macaques. Mol Ther. Nucleic Acids 2014:E-pub

7. Machino-Ohtsuka T, Tajiri K, Kimura T, Sakai S, Sato A, Yoshida T, Hiroe M, Yasutomi Y. Aonuma K, Imanaka-Yoshida K. Tenascin-C aggravates autoimmune myocarditis via dendritic cell activation and Th17 cell differentiation. J. Am. Heart Assoc. 2014 E-pub

8. Tachibana SI, Kawai S, Katakai Y, Takahashi H, Nakade T, Yasutomi Y. Horii T, Tanabe K. Contrasting infection susceptibility of the Japanese macaques and cynomolgus macaques to closely related malaria parasites, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium cynomolgi*. Parasitol. Int. 2014 E-pub

2. 学会発表

1. 加藤 誠一、岡村 智崇、張 險峰、向井 徹、井上 誠、五十嵐 樹彦、志田 壽利、松尾 和浩、保富 康宏

BCG ウレアーゼ欠損株を用いたエイズワクチンの評価

第 62 回 日本ウイルス学会学術集会

2014 年 11 月 10 日～12 日パシフィコ横浜 会議センター

2. Tsujimura Yusuke, Yasutomi Yasuhiro :

Suppressive effect of Mycobacteria major

secretion protein, Ag85B, to innate immune response is depending on the interaction with RIG-I. 第 43 回日本免疫学会総会

2014 年 12 月 10 日～12 月 12 日、京都国際会議場

3. 藤城 (伊藤) 康世、鯉江洋、柴田宏昭、岡林佐知、片貝祐子、Boran Osman、金山喜一、保富康宏、揚山直英：再生医療評価系としてのカニクイザル MSC を用いた細胞標識の解析。第 61 回日本実験動物学会学術総会。2014 年 5 月 15-17 日。北海道、札幌市

4. 塩釜ゆみ子、小原道法、保富康宏：新規実験動物としての *Tupaia Belangeri* の飼育および繁殖について 第 157 回 日本獣医学会学術集会 平成 26 年 9 月 9 日～9 月 12 日

北海道、札幌

5. 塩釜ゆみ子、小原道法、保富康宏：C 型肝炎ウイルスに対する DNA ワクチンと組み換えワクシニアウイルスを用いた Prime/Boost 法による肝炎ウイルス特異的免疫賦活化効果の検討第 18 回 日本ワクチン学会学術集会 平成 26 年 12 月 6 日～12 月 7 日 福岡国際会議場

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 2014 年 11 月 6 日

「NOVEL RECOMBINANT BCG VACCINE」

出願番号: 12832210.4

2. 2014 年 11 月 13 日

特許出願 : 特願 2014-229283

発明の名称：C 型肝炎の治療及び／又は予防用医薬組成物

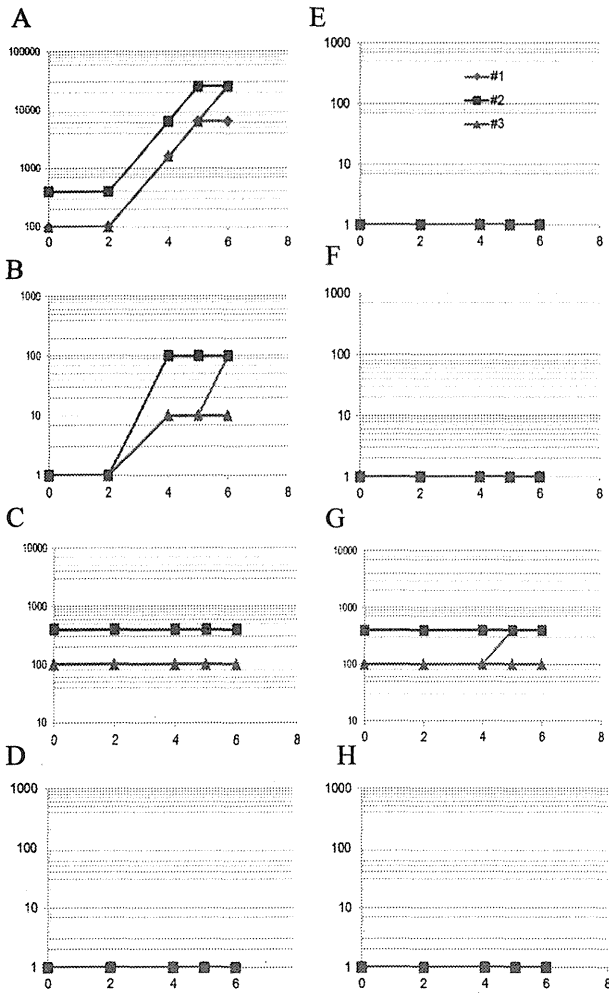


図1 ワクチン投与後の血清、糞便抽出液中の特異抗体価の推移。(A) 血清中の抗 VLP-IgG 抗体価。(B) 血清中の抗 VLP-IgA 抗体価。(C) 血清中の抗 P18-IgG 抗体価。(D) 血清中の抗 P18-IgA 抗体価。(E) 糞便抽出液中の抗 VLP-IgG 抗体価。(F) 糞便中液中の抗 VLP-IgA 抗体価。(G) 血清中の抗 SIV-Gag-IgG 抗体価。(H)血清中の抗 SIV-Gag-IgA 抗体価。横軸：ワクチン投与後の週、縦軸：抗体価。#1：HEV-VLP (P18) +DNAgag ワクチン投与個体。#3:HEV-VLP(C52)投与個体。

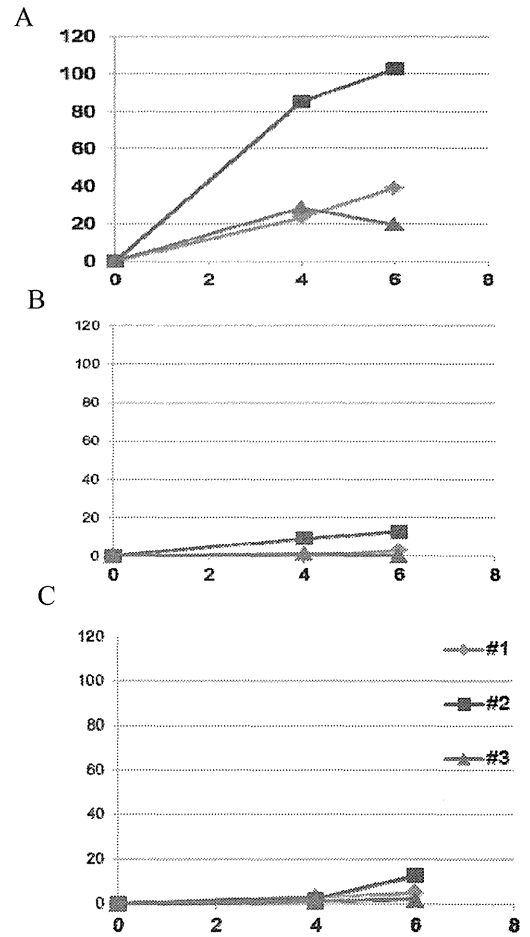


図2 ワクチン投与後の抗原特異的 $\text{INF-}\gamma$ 産生細胞数の推移。(A)抗 VLP。(B)抗 P18。(C)抗 SIV-Gag。横軸：ワクチン投与後の週、横軸： $\text{INF-}\gamma$ cells/ 10^5 cells。#1：HEV-VLP (P18) +DNAgag ワクチン投与個体。#3:HEV-VLP(C52)投与個体。

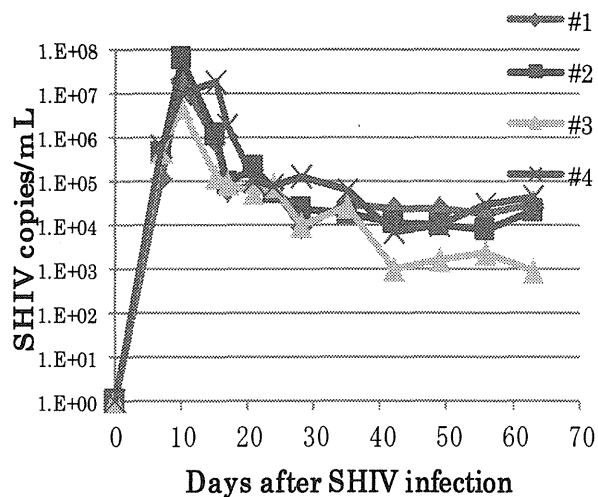


図3 SHIV 感染後の血漿中のウイルス量の推移。
 #1 : HEV-VLP (P18) +DNAgag ワクチン投与
 個体。#3:HEV-VLP(C52)投与個体。#4 ワクチン非
 投与個体。

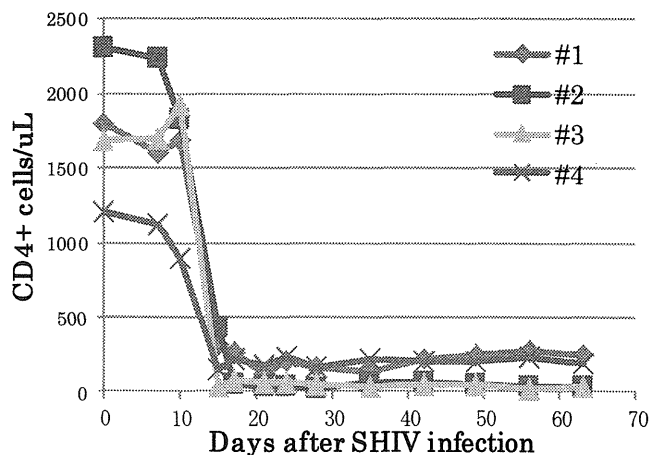


図4 SHIV 感染後の血中 CD4 陽性細胞数の推移。
 #1 : HEV-VLP (P18) +DNAgag ワクチン投与
 個体。#3:HEV-VLP(C52)投与個体。#4 ワクチン非
 投与個体。

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 と Env は HIV 粒子の主構造蛋白であり、それぞれ CTL と中和抗体の主抗原である。Gag 蛋白の発現と輸送・分解経路は HIV 感染防御免疫の誘導に重要である。Rab family 蛋白質を指標として Gag および Env 蛋白の輸送経路を調べたところ、Gag 蛋白は主にエンドソーム経路、特に Rab9 等陽性の後期エンドソームに局在したが、Golgi 体からの分泌経路にも分布が認められた。一方、Env 蛋白は、Golgi 体からの分泌経路、特に Rab14 陽性の輸送小胞と共局在を示したが、エンドソーム経路にも分布が認められた。次に、エンドソーム経路のマスター分子であり Gag 蛋白と競合する HRS の共発現について調べた。HRS を共発現させたところ、Gag 蛋白発現量は低下し HIV 粒子産生量が減少した。Gag 蛋白の分解、特にプロテアソーム分解は顕著に阻害された。Env 蛋白の gp160→gp120 への開裂、BST2/CD317/Tetherin の形質膜輸送が阻害されたが、Vpu に影響はなかった。HRS の強発現は Gag/Env 蛋白の発現や輸送を変化させると考えられた。

A. 研究目的

HIV 感染細胞では、Gag 蛋白はサイトゾルで合成された後、膜小胞によりエンドソームあるいは形質膜に輸送される。一方、Env 蛋白は輸送小胞により粗面小胞体 (ER) /Golgi 体から分泌経路を経て形質膜に輸送される。Gag/Env 蛋白はそれぞれ独立的に輸送され形質膜あるいはエンドソームに到達した後、粒子に組み立てられると考えられているが、両者が細胞質内の膜小胞や小器官で複合体を形成した後、出芽部位に輸送される可能性も示唆されている。

感染細胞あるいはウイルス抗原発現細胞では、合成された抗原の一部は、細胞質内プロテアソームで分解され、ER 内で MHC クラス I 分子と結合した後、細胞表面に提示され、CTL を誘導する (MHC クラス I 抗原提示経路)。一方、細胞外からの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、細胞外からの抗原が、エンドソームから細胞質内プロテアソーム分解を経て、ER 内の MHC クラス I 抗原提示経路に入る経路 (クロスプレゼンテーション経路) も存在する。このように、エンドソームから ER/Golgi 体への輸送経路や、逆に、Golgi 体からエンドソームへの輸送、また、ER/Golgi 体→形質膜→エンドソーム→

ER/Golgi 体といったサイクル輸送経路等が見出されている。Gag 蛋白と Env 蛋白は、それぞれ CTL エピトープと中和エピトープとなる重要な抗原である。従って、Gag や Env 抗原の発現細胞では、それらがどの輸送経路に分布するのかを知ることが、抗原提示に導くうえで情報を与えると思われる。そこで H26 年度は、HIV 発現細胞では Gag/Env 蛋白はどの輸送経路を経るのか、また、どの経路に分布するのかを Rab family 蛋白質を指標として調べることを 1 つの課題とした。

抗原を分子修飾することにより、分解経路を操作する方法が報告されている。例えば、ユビキチンを付加し N 末端メチオンを分解されやすいアミノ酸に置換した Gag 蛋白はプロテアソーム経路で分解されやすく (J Immunol, 180: 372-382, 2008)、形質膜からエンドサイトーシスされる LAMP1 を融合させた Gag 蛋白はリソソーム経路で分解されやすい (J Biol Chem, 278: 37926-37936, 2003) ことが報告されている。これらは、Gag 蛋白に宿主蛋白質を付加する、あるいは共発現させることにより、Gag 蛋白の細胞内分布を変化させる可能性を示唆する。

エンドソーム経路における cargo 蛋白質輸送には endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) と呼ばれる宿主複合体 I, II, III が連続的に関与・動員される。この一連の経路の初発には ESCRT-0 とされるマスター分子、hepatocyte

growth factor-regulated tyrosine kinase substrate (HRS) の存在が知られている。エンドサイトーシスされるユビキチン化 cargo 蛋白質にまず HRS が結合し、次にその HRS に ESCRT-I 複合体の TSG101 が結合する。さらに TSG101 に ESCRT-II と III 複合体が呼び込まれ、最終的にエンドソーム内腔に cargo 蛋白質を内包した小胞が出芽する。多くのウイルス粒子の出芽機構はこのエンドソーム内への出芽機構と酷似し、HIV-1 粒子出芽には Gag 蛋白と TSG101 との結合が必須であることが明らかとなっている (Cell, 107: 55-65, 2001)。従って、Gag 蛋白にとって HRS は TSG101 結合の competitor となる可能性が示唆されている (J Cell Biol, 162: 371-375, 2003)。そこで、HRS 発現により HIV 粒子産生が抑制されるか、またエンドソーム経路が促進するのかを解析した。MHC クラス分子や会合分子インバリアント鎖 Ii, LAMP1 等のように、抗原提示のための共発現分子としての可能性を調べた。

B. 研究方法

(1) DNA 構築

HIV-1 (pNL43 株) を用いた。また、その gag 遺伝子末端に mStrawberry 遺伝子あるいは FLAG タグを挿入した pNL derivative を作製した。

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、GFP を付加した Rab family 蛋白 (AcGFP-Rab) を発現させた。同様に、HA タグを付加した HRS (HA-HRS) と mCherry を付加した HRS (mCherry-HRS) を強発現させた。

(2) 細胞培養と阻害剤処理

HeLa 細胞に pNL derivative と AcGFP-Rab 発現プラスミド、または、pNL か pNL derivative と HA-HRS (あるいは mCherry-HRS) 発現プラスミドを transfection し、24 hr 後に細胞を回収した。蛋白質分解の解析には、18 hr 後に 33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ サイクロヘキシミド (蛋白質合成阻害剤) 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) 共焦点顕微鏡

細胞を固定し、抗体で免疫染色し、目的蛋白質の細胞内局在を共焦点顕微鏡で観察した。

(4) Western blotting

抗 gp120, 抗 p24, 抗 BST2/CD317, 抗 Vpu, 抗 HA タグ抗体を用いた。Gag 分解の定量には GagFLAG を発現させ、抗 FLAG 抗体を用いた。Image J で残存するバンド強度を測定した。

(倫理面への配慮)

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

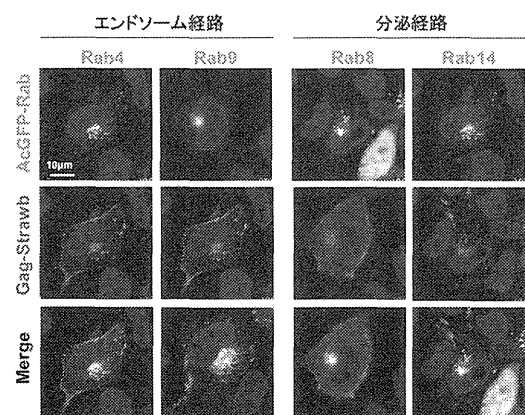
C. 研究結果

(1) Gag と Env 蛋白の細胞内局在

ヒト細胞では少なくとも 60 種以上の Rab 蛋白質が同定され、それぞれ異なる輸送経路において小胞輸送を制御している (Nat Rev Mol Cell Biol, 10: 513-525, 2009)。Gag/Env 蛋白はどの輸送経路に分布するのか、これらの Rab family 蛋白質をマーカーとして調べた。

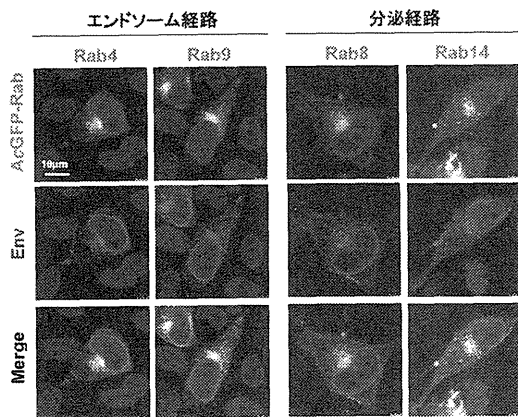
Gag 蛋白と Rab7 (Traffic, 7: 1177-1193, 2006; J Biol Chem, 284: 14572-14585, 2009; PLOS Path, 7: e1002347, 2011)、Rab9 (J Virol, 79: 11742-11751, 2005)、Rab11 (Microb Infect, 10: 471-480, 2008) の共局在が既に報告されている。それら報告と一致して、Gag-Strawberry 蛋白はエンドソーム経路の Rab 蛋白質とよく共局在を示した (図 1)。Rab7 と Rab9 (後期エンドソームに分布)、特に Rab9 とはよく共局在したが、Rab4 (初期リサイクリングエンドソームに分布) とも共局在が認められた。しかし、Rab5 (初期エンドソームに分布) や Rab11 (リサイクリングエンドソームに分布) との共局在は観察されなかった。一方、Gag 蛋白は分泌経路の Rab 蛋白質とも部分的に共局在することが判明した (図 1)。Rab8 や Rab14 (Golgi 体に分布) との共局在を認めたが、Rab10 や Rab22 (Golgi 体に分布) とは認められなかった。

図 1. Rab family 蛋白質を指標とした Gag 蛋白の細胞内分布の解析



次に、Env 蛋白の細胞内分布について調べた。Env 蛋白と分泌経路に分布する Rab14 (PLOS Path, 9: e1003278, 2013) の共局在が既に報告されている。Env 蛋白を免疫染色したところ、確かに Rab14 との強い共局在が認められたが、Rab8 との共局在も観察された。Rab10 との共局在は認められなかった (図 2)。ところが、Env 蛋白はエンドソーム経路の Rab 蛋白質とも部分的に共局在することが判明した (図 2)。Rab4 (初期エンドソームに分布) や Rab7 と Rab9 (後期エンドソームに分布) とも部分的に共局在を認めた。Rab10 と共局在しなかった。

図 2. Rab family 蛋白質を指標とした Env 蛋白の細胞内分布の解析



使用した Rab 蛋白質の細胞内局在と機能は以下の通りである (Nat Rev Mol Cell Biol, 10: 513-525, 2009)。

エンドソーム経路

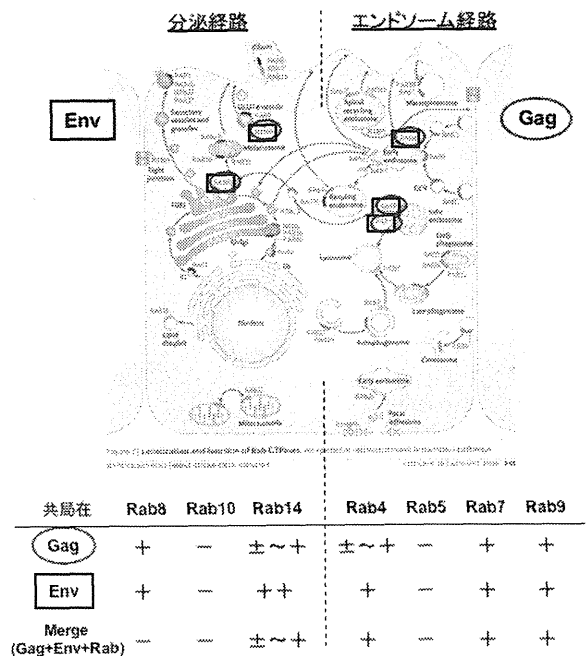
- Rab4: 初期リサイクリングエンドソームに分布
- Rab5: 初期エンドソームに分布
- Rab7: 後期エンドソームに分布し、初期エンドソーム→後期エンドソームの輸送を制御
- Rab9: 後期エンドソームに分布し、初期エンドソーム→Golgi 体の輸送を制御
- Rab11: リサイクリングエンドソームに分布

分泌経路

- Rab8: Golgi 体に分布し、Golgi 体→形質膜の輸送を制御
- Rab10: Golgi 体に分布し、Golgi 体→形質膜の輸送を制御
- Rab14: Golgi 体に分布し、Golgi 体→初期エンドソームの輸送を制御
- Rab22: Golgi 体 ⇄ 初期エンドソームの輸送を制御

以上の結果を図表にまとめた (図 3)。Gag 蛋白の多くは後期エンドソームに、一部は post-Golgi の分泌経路に分布し、一方、Env 蛋白のかなりは post-Golgi の分泌経路に、一部は後期エンドソームに分布することが判明した。また、Gag と Env 蛋白の一部はいくつかの Rab 陽性の膜小胞/小器官で共局在することが判明した。

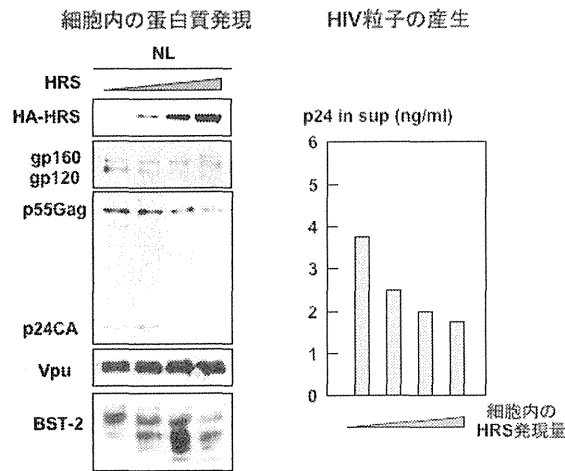
図 3. Gag と Env 蛋白の細胞内分布



(2) HRS 強発現による Gag 蛋白発現と分解の低下
 エンドソーム経路のマスター分子である HRS (ESCRT-0) の強発現について調べた。HRS は TSG101 (ESCRT-I の構成分子) と結合し、Gag 蛋白と競合する、その結果 HIV 粒子産生を阻害する可能性が示唆されている (J Cell Biol, 162: 371-375, 2003; J Virol, 81: 2909-2922, 2007)。しかしながら、HRS は BST2/Tetherin の down-regulation し、HIV 粒子産生を促進するという結果も報告されている (PLOS Path, 7: e1001265, 2011)。これらを含めて解析した。HRS を pNL43 と共発現させたところ、Gag 蛋白の発現量は低下し、HIV 粒子産生量が減少した。Env 蛋白の gp160 から gp120 への開裂も阻害された (図 4)。内在性の BST2/Tetherin について調べたところ、低分子量のものが多くなった。これを glycopeptidase F (GlcNAc-Asn 結合部位を切断する) を用いて調べたところ、低分子量のものは糖鎖付加が阻害された BST2/Tetherin であった。また、細胞表面の免疫染色で調べたところ、HRS 強発現により BST2/Tetherin の形質膜

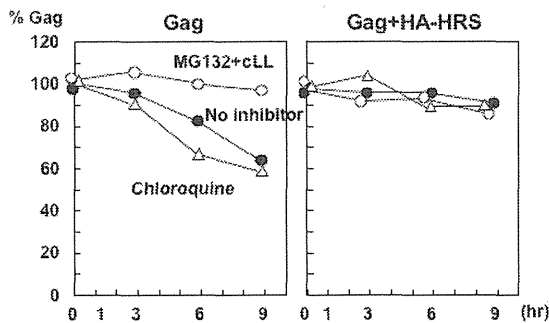
輸送が阻害されることが判明した（データ不掲載）。Vpu に影響はなかった。Gag 蛋白の発現量低下や HIV 粒子産生量の減少、Env 蛋白の開裂阻害は内在性 BST2/Tetherin の発現がない 293T 細胞でも観察された（データ不掲載）。従って、HRS の強発現は BST2/Tetherin を down-regulation するものの、独立的に Gag/Env 蛋白に対してその発現や輸送をブロックすると考えられた。

図4. HRS強発現下におけるHIV蛋白発現と粒子産生



HRS 強発現による Gag 蛋白の発現量低下が、Gag 蛋白の分解促進によるものか、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あるいはリソソーム阻害剤を用いてその分解を調べた。HRS 強発現のない条件では Gag 蛋白は主にプロテアソーム経路で分解された。これに対し、HRS を強発現下では、Gag 蛋白の分解が阻害された。特にプロテアソーム分解は顕著に阻害された（図 5）。

図5. HRS強発現下におけるHIV Gag蛋白の分解



D. 考察

(1) Gag/Env 蛋白の細胞内局在

Gag 蛋白はサイトゾルで合成された後、エンドソームあるいは形質膜に輸送され、Env 蛋白は ER で合成された後、Golgi 体から形質膜に輸送されると一般的に考えられている。本研究では、Gag と Env 蛋白の主な輸送経路は異なること（エンドソーム経路 vs 分泌経路）を確認した。しかしながら、Gag と Env 蛋白の輸送経路は完全に分離しているわけではなかった（図 1 と 2）。また、Gag/Env 蛋白の一部はいくつかの Rab 陽性の膜小胞/小器官で共局在したことから（図 3）、これら両者が 1 つの膜小胞や小器官に局在した後、出芽部位に輸送される可能性も考えられた。このように、Gag/Env 抗原の細胞質内分布には多少の偏り（preference）があるものの、広範囲に分布していた。細胞質内には ER/Golgi 体→形質膜→エンドソーム→ER/Golgi 体といったサイクル輸送経路等も存在することから、これらをうまく利用し抗原提示経路に導くことができれば、効率のよい免疫誘導が可能かと思われた。

(2) HRS 強発現における Gag 蛋白発現・分解

HRS はエンドシトシスの開始分子 (ESCRT-0) であり、その強発現とノックダウンはいずれもエンドソーム経路を阻害することが報告されている (J Cell Biol, 162: 435-442, 2003)。しかし、エンドソームから Golgi 体への逆輸送は阻害せず (Exp Cell Res, 314: 801-813, 2008)、一般的に HRS は Golgi 体から形質膜への輸送には影響を与えないと考えられている。本研究では、HRS の強発現により HIV の蛋白発現や輸送が変化するかを調べた。その結果、HRS 強発現により Gag 蛋白の発現量が低下し、HIV 粒子産生量も減少することが判明した（図 4）。この結果は既報の 1 つ (J Virol, 81: 2909-2922, 2007) と一致するものであった。しかしながら、HRS ノックダウン実験により HRS が HIV 粒子産生を促進すること (PLOS Path, 7: e1001265, 2011) を報告したものと一致しなかった。これは HRS が強発現とノックダウンのいずれでもエンドソーム経路を阻害するためと説明しようが、分担者はその可能性を否定する実験結果を得ている（不掲載）。

HRS 強発現下で観察された Gag 蛋白の発現量低下の原因として、HRS 強発現でエンドソーム経路が阻害され、Gag 蛋白がプロテアソーム経路に流れた（プロテアソーム経路で分解されるようになった）可能性を考え、Gag 蛋白の分解を調べた。しかし、HRS 強発現下では Gag 蛋白の分解は抑制されており（図 5）、また Env 蛋白の開裂も阻害

されていたことから (図4)、HRS の強発現はエンドソーム経路だけでなく、Golgi 体から形質膜への輸送経路をも阻害する可能性が考えられた。

E. 結論

①Gag 抗原はエンドソーム経路と一部は post-Golgi の分泌経路に局在した。逆に、Env 抗原は post-Golgi の分泌経路と一部はエンドソーム経路に分布した。②HRS 強発現により、Gag 蛋白発現量が低下し、粒子産生が減少した。Gag 蛋白のプロテアソーム分解は阻害された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Ohkura T, Momose F, Ichikawa R, Takeuchi K, Morikawa Y. Influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase mutually accelerate their apical targeting through clustering of lipid rafts. J Virol 88: 10039-10055, 2014.

2. 学会発表

- (1) 加茂真宏、立石大、岡本良成、森川裕子、大塚雅巳、藤田美歌子. Gag に作用する抗 HIV 化合物 BMMP の作用機序解析と活性改良の検討. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、11/10/2014.
- (2) 大倉喬、百瀬文隆、市川玲子、竹内薫、森川裕子. インフルエンザウイルス HA と NA の極性輸送は脂質ラフトのクラスタリングを介して相互促進される. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、11/10/2014.
- (3) 池野翔太、寺原和孝、駒瀬勝啓、竹田誠、森川裕子、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 (3). 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、11/11/2014.
- (4) 滝沢直己、百瀬文隆、原口日和、森川裕子、野本明男. インフルエンザウイルス膜タンパク質 HA および M2 のウイルス粒子形成における機能解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、11/11/2014.
- (5) 百瀬文隆、森川裕子. 自己開裂ペプチドを用いたインフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼのポリシストロニック発現. 第 62 回日本ウイ

ルス学会学術集会、横浜、11/11/2014.

- (6) 池田啓太郎、森川裕子、百瀬文隆. ストロマ細胞と HIV 感染 T 細胞の相互作用. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、11/11/2014.
- (7) 高木志門、森川裕子、百瀬文隆. HIV-1 Gag-GagPol 相互作用の FRET 解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、11/11/2014.
- (8) 奥富俊樹、森川裕子、百瀬文隆. 細胞接触による HIV-1 潜伏感染 T 細胞の再活性化. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、11/11/2014.
- (9) 百瀬文隆、森川裕子. 2A 自己開裂ペプチドを用いたインフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼのポリシストロニック発現. 第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、11/27/2014.
- (10) 森川裕子. HIV 粒子産生機構. 第 28 回日本エイズ学会学術集会、大阪、12/4/2014.
- (11) 加茂真宏、立石大、岡本良成、森川裕子、大塚雅巳、藤田美歌子. Gag に作用する抗 HIV 剤 BMMP の作用機序解析と改良の試み. 第 28 回日本エイズ学会学術集会、大阪、12/5/2014.

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

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ていたが、本年度はこの経路に関する Vif の新規基質の探索を行った。Vif によりユビキチン化されるタンパクを網羅的に LC/MS により解析し、いくつかの候補分子を得た。それらの分子については機能解析を進めている。

A. 研究目的

我々は昨年度までの成果として HIV-1 Vif が誘導する細胞周期 G2 停止が 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ていた。今年度は、この経路の詳細なメカニズムを明らかにするために、この経路にかかわる Vif の新規基質分子の同定を目的として研究を行った。

B. 研究方法

Vif のユビキチンリガーゼとしての新規基質を同定するために、Vif 遺伝子を細胞に導入し、プロテアソーム阻害剤で処理したのち、細胞蛋白抽出物を作成し、トリプシン処理後に抗 K-ε-GG 抗体で免疫沈降されるペプチドを LC/MS により解析した。また、候補分子については Vif 導入によるタンパク量の減少が見られるかをイムノブロット法により検討した。

(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

LC/MS 解析の結果としていくつかの分子が同定された。その中で、特に細胞周期との関連が報告されている CK2 および tubulin に着目し、Vif

の導入によるタンパク量の減少をイムノブロット法により検討したが、否定的な結果であった。

D. 考察

Vif の新規基質の存在に関しては、我々のみならず海外のグループからも Vif の誘導する細胞周期停止に関連して肯定的な報告がなされている。しかし、その具体的な分子の報告はこれまでになく、今後もしろいろな実験系により検索を続け、Vif による細胞周期停止メカニズムをより詳細に明らかにしていきたい。

E. 結論

HIV-1 Vif が誘導する細胞周期 G2 停止にかかわる Vif の新規基質の同定に向けて、研究が進行中である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Matsui, M., Shindo, K., Izumi, T., Io, K., Shinohara, M., Komano, J., Kobayashi, M., Kadowaki, N., Harris, R. S., Takaori-Kondo, A. Small molecules that inhibit Vif-induced degradation of APOBEC3G. *Virology*. 11: 122, 2014.

Sato, K., Takeuchi, J. S., Misawa, N., Izumi, T., Kobayashi, T., Kimura, Y., Iwami, S., Takaori-Kondo, A., Hu, W. S., Aihara, K., Ito, M., An, D.S., Pathak, V. K., Koyanagi, Y. APOBEC3D and APOBEC3F potently promote HIV-1 diversification and evolution in humanized mouse model. *PLoS Pathog.* 10(10): e1004453, 2014.

2. 学会発表

Matsui, Y., Shindo, K., Nagata, K., Yoshinaga, N., Maruyama, W., Shirakawa, K., Kobayashi M., and Takaori-Kondo, A. CBF β stabilizes HIV-1 Vif by inhibiting MDM2-mediated degradation. **Cold Spring Harbor Meeting on Retroviruses 2014.**

Yoshinaga, N., Matsui, Y., Shindo, K., Takiuchi, Y., Tada, K., Takeda, S., and Takaori-Kondo, A. A screening for DNA repair enzymes related to HIV-1 life cycle. **Cold Spring Harbor Meeting on Retroviruses 2014.**

松井佑亮、新堂啓祐、永田佳代子、吉永則良、丸山 亙、白川康太郎、小林正行、高折晃史。CBF β は MDM2 による Vif の分解を阻害することで Vif を安定化する。日本エイズ学会、2014 年、大阪。

吉永則良、松井佑亮、新堂啓祐、武田俊一、高折晃史。hRAD18 による HIV-1 の複製の抑制。日本エイズ学会、2014 年、大阪。

G. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）
該当なし。

HIV/SIV粘膜感染・免疫に関する研究

研究分担者 三浦 智行 京都大学ウイルス研究所 准教授

研究要旨 中和抗体に感受性のCXCR4指向性高病原性SHIV-KS661のV3領域の5アミノ酸を置換することでCCR5指向性にしたSHIV-MK1も中和抗体に感受性であったが、SHIV-MK1をアカゲザル個体で継代して順化して得られたSHIV-MK38株は中和抗体に抵抗性となったことを明らかにした。さらに中和抗体に抵抗性のSHIV-MK38クローンを得たことから、今後、エイズの病態解明や予防・治療法の評価のための攻撃接種ウイルスとしての活用が期待される。

A. 研究目的

米国をはじめとする先進諸国において種々の抗エイズ薬の開発が積極的に行われ、それらを組合せた多剤併用療法(cART)の導入によりエイズ感染者の血液中のウイルス量を検出限界以下にまで減少させることが可能となったが、ウイルスを完全に駆逐することはまだ出来ていない。すなわち、cARTによりエイズ発症遅延効果は得られたものの、エイズを根本的に治療する方法は未だ確立されていない。これまでは、基本的に感染者の末梢血中のウイルス量を減少させる効果を基準に治療法開発が行われてきた。しかし、エイズ根本治療法を開発する為には、エイズウイルスが体内のどこでいつどのように増殖しているのか、深部臓器でどんな免疫応答が起こっているのか、エイズウイルスの最も重要な標的部位がどこなのか、cART治療中にウイルスがどこに潜伏しているのか等を明らかにする必要がある。最近、HIV-1に類似のサルウイルス(SIV)を用いた研究によりエイズの標的臓器として腸管が重要であることが示され、エイズ患者においても腸管の重要性が示唆されている。一方、我々は外皮蛋白遺伝子を中心とした約半分のゲノム領域を HIV-1 のものと置き換えた SIV/HIV-1 キメラウイルス(SHIV)の作製により非ヒト霊長類エイズ感染・発症モデル系を確立し、これまでに様々な病態を呈する SHIV 感染性分子クローンを得ている。そこで本研究では、様々な病態を呈するエイズ霊長類モデルの粘膜部位におけるウイルス感染動態と免疫細胞応答について統合的に解析することにより、エイズウイルスの主要な標的臓器として注目されながらヒトでは解析が困難な粘膜部位における病態形成機構を解明すること、そしてエイズ霊長類モデルによる新規予防・治療法開発の為の粘膜感染病態に基づく評価基準を確立することを目的とした。

本研究により、エイズ霊長類モデルの前臨床試験としての有用性が高まり、新しい評価基準に基づくエイズ根本治療法の開発が促進されるものと期待される。

B. 研究方法

SIV/SHIV とアカゲザルを用いた感染モデル系の粘膜部位におけるウイルス感染動態と免疫細胞応答について、統合的な解析を行うことにより粘膜感染病態形成機構を解明し、サルエイズモデルにおける新規治療法開発の為の粘膜感染病態に基づく評価基準を確立する。具体的には、1) 感染サルの粘膜部位におけるウイルス増殖部位や潜伏部位等の感染動態について詳細に解析する。2) 感染サルの粘膜や深部リンパ系組織における免疫細胞応答について詳細に解析する。3) 感染サルの腸管をはじめとする全身の深部組織における病変の病理組織学的解析を行う。以上の解析を統合的に行うことにより、エイズウイルス感染サル個体の粘膜感染病態形成における最も重要な標的細胞群を特定し、ウイルス制御に有効に働く粘膜免疫機構を明らかにする。

(倫理面への配慮)

動物実験に当たっては、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に基づいた「京都大学における動物実験の実施に関する規定」を遵守する。当施設におけるアカゲザルの飼養については、「特定外来生物による生態系等に係わる被害の防止に関する法律」の規定に基づき、環境大臣より許可を受けている。また、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」の輸入禁止地域等を定める省令に基づき輸入サル飼育施設の指定を受けている。「動物の愛護及び管理に関する法律」も遵守する。また、組換え SHIV 感染実験については第二種使

用等をする間に執る拡散防止措置について大臣確認されている。

C. 研究結果

近年、HIV-1 の *env* 遺伝子により決定される共受容体指向性、すなわち CCR5 指向性や CXCR4 指向性、によって感染個体における標的細胞や病態が大きく異なることが明らかになっている。そして、従来 CXCR4 指向性 SHIV を用いた研究が多くなされてきたが、HIV-1 の感染伝播と感染後の病原性に深く関与しているのは CCR5 指向性であると考えられるようになった。そこで我々は、アカゲザルに安定的に感染する CCR5 指向性 SHIV を作製することによって、より有効なエイズ霊長類モデル系を確立することを試みた。

これまでに高病原性 CXCR4 指向性 SHIV-KS661 の V3 領域に 5 箇所のアミノ酸変異を導入することによって、共受容体指向性を CCR5 指向性に変えることに成功した。この新規に作製した CCR5 指向性 SHIV-MK1 の個体内での複製能は必ずしも高くなかったのでアカゲザル個体で継代することにより、アカゲザルに安定して感染し、複製する CCR5 指向性 SHIV-MK38 株を得た。

次に、これらウイルスの中和抗体に対する抵抗性について検討した。まず、HIV-1 感染者 6 名分の pool 血清による中和アッセイを行ったところ、元の SHIV-KS661 と馴化前の SHIV-MK1 は、ID50 が中和抗体感受性の国際標準株 (Tier1B) と同等の 500 倍以上であったのに対して SHIV-MK38 は、Tier2, 3 の国際標準株と同等の 100 倍以下であった。さらに SHIV-MK38 の *env* 遺伝子領域のシーケンス解析により、中和モノクローナル抗体 KD-247 に対する中和エピトープが保存されていることを確認した上で、KD-247 に対する中和感受性を調べたところ、SHIV-KS661 と SHIV-MK1 の IC50 は、5~10 μ g/ml 程度 (Tier1B 相当) であったのに対し、SHIV-MK38 の IC50 は、50 μ g/ml 以上 (Tier2, 3 相当) であった。SHIV-MK-38 は、アカゲザル継代により遺伝的多様性を獲得していたので *env* 遺伝子領域をクローニングして元の SHIV-KS661 の *env* 遺伝子領域と組み換えたクローンウイルスを 10 クローン作製した。このなかで SHIV-MK38 と同等の中和抵抗性を示すクローンが 2 クローン得られたことから、SHIV-MK38 の中和抗体抵抗性は *env* 遺伝子の多様性に依存せず、ウイルスクローンとして成立することを明らかにした。

D. 考察

今回の研究で中和抗体感受性の CCR5 指向性 SHIV-MK-1

をアカゲザルで継代して順化した SHIV-MK38 はウイルスクローンとして中和抗体抵抗性を獲得したことを明らかにした。元の CXCR4 指向性 SHIV-KS661 もカニクイザルで継代して順化したウイルスであるが、中和抗体抵抗性にはならなかったことから、共受容体指向性と中和抗体抵抗性獲得機構との関係が興味深い。また、感染個体における高いウイルス量での持続感染成立機序と中和抗体抵抗性との関連性も解析可能となった。今後、これらのウイルスが引き起こす病態の違いをアカゲザル感染実験により詳細に解析することで、共受容体指向性や中和抗体抵抗性と感染個体における病態との関係を明らかにできるものと期待される。

E. 結論

新規に作製した中和抗体感受性 CCR5 指向性 SHIV-MK1 をアカゲザル個体で継代・順化して得られた SHIV-MK38 はクローンウイルスのレベルで中和抗体に対する抵抗性を獲得したことを明らかにした。今後、エイズの病態解明や予防・治療法開発への活用が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Otsuki, H., Yoneda, M., Igarashi, T., and Miura, T.: Generation of a monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1 carrying *env* from a CCR5-tropic subtype C clinical isolate. *Virology*, 460-461: 1-10, 2014.
- (2) Adach, A. and Miura, T.: Animal model studies on viral infections. *Frontiers in Microbiology*, 5: Article 672, 2014.

2. 学会発表

- (1) Saito, A., Matsuoka, K., Ode, H., Otsuki, H., Yoshida, T., Iwatani, Y., Sugiura, W., Matano, T., Miura, T., and Akari, H.: A novel HIV-1mt encoding CCR5-tropic Env established persistent infection in *Cynomolgus* macaques. 2014 Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, March 3-6, 2014.
- (2) 米田舞、大附寛幸、松下修三、日紫喜隆行、五十嵐樹彦、三浦智行：新規 CCR5 指向性サルヒト免疫不全ウイルスのサルへの順化における *env* 遺伝子変異と中和抗体抵抗性の解析、日本動物遺伝育種学会第 15 回大会、和光、2014 年 10 月 31 日-11 月 1 日
- (3) 三浦智行、米田舞、大附寛幸、松下修三、日紫喜隆行、五十嵐樹彦：新規 CCR5 指向性 SHIV のサルへの順化と中和抗体抵抗性の解析、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10-12 日

(4) 渡部祐司、岩見真吾、森ひろみ、松浦嘉奈子、石田裕樹、日紫喜隆行、三浦智行、五十嵐樹彦：高病原性 SHIV 感染サルにおける感染マクロファージは感染リンパ球と同程度の半減期を示す、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10-12 日

(5) 芳田剛、齋藤暁、松岡和弘、大出裕高、岩谷靖雅、杉浦亙、保富康宏、俣野哲朗、三浦智行、明里宏文：サル個体におけるサル指向性 HIV-1 の増殖効率を上昇させる要因、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10-12 日

(6) 関紗由里、野村拓志、西澤雅子、横山勝、佐藤裕徳、團塚愛、三浦智行、小柳義夫、俣野哲朗：SIV の持続感染・伝播における変異蓄積に関する研究、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10-12 日

(7) 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：抗 HIV 薬投与下の治療ワクチン接種により誘導される CD8 陽性 T 細胞の SIV 複製抑制能の解析、第 28 回日本エイズ学会学術集会、大阪、2014 年 12 月 3-5 日

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

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

HIV持続感染成立機構とその防御機序に関する研究

研究分担課題名: Env抗原及び抗体に関する研究

研究分担者 吉村 和久 国立感染研エイズ研究センター 室長

研究要旨:

われわれは、これまでに *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。本年は *in vitro* で誘導した MVC 高度耐性ウイルスだけでなく、CCR5 発現の低い細胞で継代したウイルスの Env 組換えウイルスを作製し、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 高度耐性ウイルスと同様に低 CCR5 細胞馴化ウイルスも中和抗体に感受性となり、しかも MVC 高度耐性ウイルスとは感受性となる中和抗体の種類が違う事が分った。そこで、これらのウイルスを用いて、その他の HIV 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した。その結果、subtype B のみならず、subtype AE の血清の中和も測定することが出来た。これらのパネルで今後簡単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が測定可能となれば、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。

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及び低 CCR5 細胞馴化ウイルスの 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。それらの組換え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。また、感染症例の血清を用いた研究に関しては国立国際医療センターの倫理委員会でも審査を受けている。

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。また、低 CCR5 細胞馴化ウイルスも同時に樹立した。次に、それぞれのパッセージウイルスの Env シーケンスを行い、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、パッセージコントロールウイルスと比較して、CD4bs と CD4i 抗体に対して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。一方、CCR5 発現の低い細胞で継代したウイルスは、CD4bs 抗体や gp41 抗体 (MPER) に関しては、MVC 高度耐性ウイルスよりもやや感受性が高く、抗 V3 抗体や CD4i 抗体に関しては感受性が低かった。また一部の抗 glycan 抗体に関しても MVC 耐性ウイルスよりも感受性が低かった。

これら 3 種類のウイルスセットを用いて、

hetero の患者血清(Subtype B と CRF_01AE)に対する中和感受性を測定した。その結果、Subtype B の異なる患者血清の中和感受性を測定できただけでなく、Subtype AE の患者血清でも中和活性が測定できた (表 1)。

Plasmids	PC			MVC-R			Low-CCR5		
	81	82	1273	81	82	1273	81	82	1273
B	82	<100 (46)	<100 (30)	606	606	2112			
	1273	<100 (9)	<100 (3)	<100 (10)	<100 (3)	359			
	1276	<100 (9)	<100 (3)	<100 (3)	<100 (3)	<100 (6)			
	1277	<100 (7)	<100 (3)	271	271	2111			
	1286	<100 (6)	<100 (3)	476	476	433			
	1287	<100 (11)	<100 (6)	<100 (6)	<100 (10)	<100 (10)			
	1288	<100 (23)	<100 (31)	<100 (31)	<100 (31)	<100 (31)			
	1289	<100 (3)	397	397	397	397			
	1290	<100 (14)	<100 (29)	<100 (29)	<100 (37)	<100 (37)			
	1292	<100 (6)	153	153	261	261			
AE	1294	<100 (12)	<100 (13)	<100 (13)	<100 (17)	<100 (17)			
	1295	<100 (6)	385	385	385	385			
	831	<100 (4)	<100 (39)	<100 (39)	167	167			
	82	<100 (30)	100	100	545	545			
	571	<100 (31)	283	283	124	124			
	111	<100 (11)	349	349	780	780			
	105	<100 (4)	165	165	454	454			
	AE1	<100 (21)	<100 (23)	<100 (23)	162	162			
	AE2	143	<100 (47)	<100 (47)	<100 (41)	<100 (41)			
	AE3	<100 (27)	153	153	<100 (18)	<100 (18)			
AE4	<100 (13)	<100 (9)	<100 (9)	<100 (15)	<100 (15)				
AE5	<100 (7)	<100 (6)	<100 (6)	<100 (10)	<100 (10)				
1285	<100 (13)	<100 (6)	<100 (6)	<100 (11)	<100 (11)				

表 1. MVC 耐性、低 CCR5 馴化、およびパッセージコントロールウイルスの、Subtype B と AE 血清に対する中和感受性の違い

D. 考察

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、われわれが構築しているウイルスパネルは、ウイルスの感受性を調べるだけで、少なくとも Subtype B および AE においては、およその抗体の種類と力価が推定可能となることが分った。同じ Env バックボーンを持つ感染性ウイルスを用いて中和抗体力価を簡便に測定する系は世界的に見ても希有である。この点で、非常に独創的な研究結果であると言える。

E. 結論

高度 MVC 耐性変異及び低 CCR5 馴化 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、hetero の患者血清(Subtype B と CRF_01AE)に対する中和感受性を測定したところ、Subtype B の異なる患者血清の中和感受性を測定できただけでなく、Subtype AE の患者血清でも中和活性が測定できた。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)

1. Matsushita S, Yoshimura K, Ramirez K-P, Pisupati J, Jenkins J, Murakami T on behalf of the KD-1002 Study Group. Passive transfer of neutralizing monoclonal antibody KD-247 reduces plasma viral load in patients chronically infected with HIV-1. **AIDS**, 29, 453-462, 2015.
2. Ramirez K-P, Kuwata T, Maruta Y, Tanaka K, Alam M, Yoshimura K, Matsushita S. Complementary and synergistic activities of anti-V3, CD4bs and CD4i antibodies derived from a single individual can cover a wide range of HIV-1 strains. **Virology**, 475, 187-203, 2015.
3. Kirby KA, Ong YT, Hachiya A, Laughlin TG, Chiang LA, Pan Y, Moran JL, Marchand B, Singh K, Gallazzi F, Quinn TP, Yoshimura K, Murakami T, Matsushita S, Sarafianos SG. Structural basis of clade-specific HIV-1 neutralization by humanized anti-V3 monoclonal antibody KD-247. **The FASEB Journal**, 25, 70-80, 2015.
4. ○Yoshimura K†*, Harada S†, Boonchawalit S, Kawanami Y, Matsushita S*. Impact of maraviroc-resistant and low-CCR5-adapted mutations induced by in vitro passage on sensitivity to anti-envelope neutralizing antibodies. **Journal of General Virology**, 95, 1816-1826, 2014. *Corresponding author † These authors contributed equally.

学会発表

(国際学会)

1. Shigeyoshi Harada, Yu Irahara, Samatchaya Boonchawalit, Mai Goryo, Hirokazu Tamamura, Tetsuro Matano, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. Mutations at the bottom of the Phe43 cavity are responsible for cross-resistance to NBD analogues. The annual Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI) 2015, Seattle, USA, 2.23-26, 2015.
2. Kazuhisa Yoshimura. Impact of the Drug-Escaped HIV Envelope Mutations on Susceptibility to Neutralizing Antibodies. 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID), AIDS Panel Meeting, Taipei, Taiwan, 1. 28-29, 2015.
3. Shigeyoshi Harada, Masaru Yokoyama, Samatchaya Boonchawalit, Hironori Sato,

- Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. Resistance Profile of CD4 Mimic Small Compounds (CD4MCs) and the Structure Analysis by Molecular Dynamic (MD) Simulation. HIV Research For Prevention (HIVR4P) 2014, Cape Town, South Africa, 10.28-31 2014.
4. Shigeyoshi Harada, Masaru Yokoyama, Samatchaya Boonchawalit, Hironori Sato, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. Genetic and Structure-Function Analyses of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Escape from CD4 Mimic Small Compounds (CD4MCs). 15th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 10.1-3. 2014.
 5. Samatchaya Boonchawalit, Shigeyoshi Harada, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. Impact of maraviroc (MVC)-resistant mutations in the C1 and C4 regions of gp120 on sensitivity to antibody-mediated neutralization. 15th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 2014.10.1-3.
 6. Samatchaya Boonchawalit, Shigeyoshi Harada, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. Impact of Maraviroc (MVC)-resistant mutations in C1 and C4 regions of gp120 on sensitivity to antibody-mediated neutralization. 20th International AIDS Conference Melbourne, Australia, 2014.7.20-25.
1. 吉村和久. 代表的な薬剤耐性のメカニズム. 第28回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪, 2014.12.3-5.
 2. 泉福英信, 有家巧, 富永燦, 丸岡豊, 吉村和久. HIV感染者唾液を用いたに口腔疾患発症予測因子の検討. 第28回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪, 2014.12.3-5.
 3. Samatchaya Boonchawalit, 原田恵嘉, 松下修三, 吉村和久. Impact of maraviroc (MVC)-resistant mutations in the C1 and C4 regions of gp120 on sensitivity to antibody-mediated neutralization. 第28回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪, 2014.12.3-5.
 4. 原田恵嘉, 横山勝, Samatchaya Boonchawalit, 佐藤裕徳, 松下修三, 吉村和久. CD4 類似低分子化合物誘導体(CD4MCs)の耐性プロファイルと分子動力的機構解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014.11.10-12.
 5. 原田恵嘉, 横山勝, Samatchaya Boonchawalit, 佐藤裕徳, 松下修三, 吉村和久. 新規エントリー阻害剤の組み合わせによる抗ウイルス効果と耐性変異の解析. 第16回 白馬シンポジウム, 熊本, 2014.6.13-14.
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
US patent,
Patent No.: US 8,722,861 B2,
Date of Patent: May 13, 2014
"MONOCLONAL ANTIBODIES THAT BIND TO THE V3 LOOP OF HIV-1 GP120"

(国内学会)