

学 位 論 文 題 名

ヒト免疫不全ウイルス1型（HIV-1）の
持続感染成立機序及び持続感染細胞の排除に
有効なワクチン開発に関する基礎的研究

学位論文内容の要旨

HIV-1の感染からAIDS発症までの期間は、平均10年と言われている。この期間、生体の免疫とHIV-1は闘っている。生体の免疫が勝っている期間は無症状ですごすことができることから、無症候期と呼ばれているが、この間は、細胞とウイルスは共存状態、すなわちウイルスが持続感染した状態と考えられる。しかし、HIV-1が免疫担当細胞に感染することが原因となって生体の免疫力、特に細胞性免疫が徐々に低下し、これと逆相関してウイルスは活性化し、AIDS発症へと進行する。従って、生体の免疫力を支えるような治療法の開発と、その背景となるHIV-1の持続感染機構の解明は、現在AIDS研究において最も解決が求められている課題の一つであり、本研究の目的でもある。本論文の要旨は、以下の5項目である。

1. *in vitro*で作製した遺伝子変異領域が明らかな各種HIV-1変異株を用いて、ヒトリンパ球株化細胞（M10）への感染を行ったところ、*nef*変異株は、野生型と同様、完全に細胞を破壊した。それに対し、*vif*、*vpr*、及び*vpu*変異株は野生型なみの感染・複製速度を示すにもかかわらず、HIV-1抗原の発現後も生き残り、持続感染細胞の出現を許した。その際、持続感染細胞の出現頻度は、*vif*、*vpu*、*vpr*変異株の順に高かった。しかし、いずれの場合も一過性の細胞傷害を引き起こした後、持続感染細胞が出現した。また、得られた持続感染細胞の産生するウイルスの細胞傷害性は、ほぼ消失していた。従って、これらのアクセサリー遺伝子の変異箇所以外の、何れかの遺伝子領域に変異が生じ、その結果、ウイルスは持続感染できる性状に変化したと考えられた。
2. 前述の生き残り細胞の性状を調べるため、*vif* 及び *vpu* 変異株の感染により得られた持続感染細胞（M10/*vif*⁻、M10/*vpu*⁻）から分離したクローン細胞を解析した。その結果、いずれのクローン細胞も染色体に1コピーの遺伝子（プロウイルス）を

組み込んでいたが、HIV - 1 表現型は多様であった。すなわち、I 型；産生ウイルスの感染性が全くないもの、II 型；感染性はあっても複製速度の遅いもの、III 型；野生型 HIV-1 なみの複製速度を示すものに分かれた。このうち、感染性を示す II 及び III 型でも、その細胞傷害活性は、元の *vif*、*vpu* 変異株の細胞傷害性に比べると、大きく低下していた。しかし、このようなウイルスの細胞傷害性の変化の原因となる新たな遺伝子変異領域は、サザンブロット解析では明らかにできなかったことから、小規模の変異であることが示唆された。

3. HIV-1 の遺伝子変異は、他のレトロウイルスと同様に、ウイルス遺伝子の逆転写過程での読み違いが主な原因と考えられる。そこで、ウイルス複製中に自然に起こる遺伝子変異の頻度を高くするために、強毒 HIV - 1 および *nef* 変異 HIV - 1 を M10 細胞で継代培養を繰り返し、ウイルスの細胞傷害性の低下現象を調べた。その結果、野生型各継代株は、少なくとも 4 代継代後から持続感染の成立が認められ、この細胞傷害性の程度は、感染・複製速度は同程度であるにもかかわらず継代が進むに従い低下する傾向が観察された。一方、*nef* 変異 HIV - 1 継代株では、50 代継代したウイルスにおいても完全な細胞破壊が認められ、野生型 HIV - 1 が継代とともに弱毒化するのとは対照的であった。
4. HIV-1 粒子を免疫した BALB/c マウスから得られた、Gag p24 認識単クローン抗体 (V107 及び V10) の認識領域を調べたところ、HIV-1 の各分離株のみならず、HIV - 2、サル免疫不全ウイルス (SIV_{agm}、SIV_{mac}) の Gag においても認識領域が保存されていた。実際、SIV_{agm} とは血清学的にも交叉性が認められた。一方、ネコ免疫不全ウイルス (FIV) にも同領域に対応する領域が存在し、実際、同じ BALB/c マウスへの FIV 抗原免疫により、その対応領域を認識する単クローン抗体 (F17、F13 及び F48) を分離することができた。この抗体は、V10 及び V107 と同様に、FIV 感染細胞の表面に発現する Gag 抗原と反応した。このことから、これらの抗体の認識領域はウイルス持続感染細胞の排除のための標的抗原の候補と考えられた。
5. 前述の Gag p24 内の高保存性アミノ酸領域の免疫原性を BALB/c マウスを用いて検討するために、同領域の関連合成ペプチド (Gag-23mer) をフロイント型完全アジュバントとともに皮下免疫した。対照として、強いキラー T 細胞誘導能がある

ことが知られているエンベロープ蛋白質の関連合成ペプチド (Env-15mer) を免疫した。その結果、Gag-23mer ペプチドは、免疫したマウスにMHCクラスI拘束性のCD8陽性T細胞によるCTL反応を誘導した。また同ペプチドのヘルパーT細胞誘導能を調べた結果 *in vitro* 再刺激による抗原特異的な増殖能はGag-23mer免疫マウスの脾細胞で顕著であり、またモルモットにおいても遅延型過敏反応を誘導し得ることが明らかになった。さらに、Gag-23mer ペプチド免疫マウスでは、ウイルス由来の蛋白質であるGag p24に反応する抗体の産生も認められた。このように、Gag p24内に同定されたアミノ酸領域は、高保存性領域であるにもかかわらず、マウスにおけるキラーT細胞、ヘルパーT細胞エピトープを含み、液性、細胞性免疫を誘導し得ること、また、モルモットに遅延型過敏反応を誘導し得ることが明らかになった。このような免疫応答は、HIV-1持続感染細胞を生体から排除するうえで有効と考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 東 市 郎

副 査 教 授 杉 本 和 則

副 査 教 授 生 田 和 良 (医学研究科)

学 位 論 文 題 名

ヒト免疫不全ウイルス1型 (HIV-1) の 持続感染成立機序及び持続感染細胞の排除に 有効なワクチン開発に関する基礎的研究

後天性免疫不全症候群 (AIDS) と呼ばれる疾患が報告されてから12年、その原因ウイルスとしてヒト免疫不全ウイルス1型 (HIV-1) が分離されてから10年が経過した。これまでに HIV-1 に関する膨大な情報が得られてきたが、HIV-1 感染や AIDS 発症を予防できるワクチンあるいは特効薬はいまだ開発されていない。申請者は、現在 HIV-1 研究の中でも緊急に要望されている2つの課題に関する基礎的研究を行い、次の結果を得た。

1. in vitro で作製した各種 HIV-1 変異株によるヒトリンパ球株化細胞 (M10) への感染を行ったところ、nef 変異株は、野生型と同様、完全に細胞を破壊したのに対し、vif、vpr、vpu 変異株は野生型なみの感染・複製速度を示すにもかかわらず持続感染した。しかし、いずれの場合も一過性に細胞傷害性を示した。一方、得られた持続感染細胞の産生するウイルスの細胞傷害性は、ほぼ消失していた。従って、複製の過程でこれらのアクセサリ遺伝子の変異に加え、何らかの遺伝子変異が誘導され、その結果、持続感染可能なウイルスに変化すると考えられた。
2. 持続感染細胞の性状を調べるため、vif、vpu 変異株に持続感染した細胞から分離したクローン細胞を解析した。その結果、いずれのクローン細胞も染色体に1コピーのウイルス遺伝子を組み込んでおり、また、HIV-1 表現型は多様であった。すなわち、I型；産生ウイルスの感染性が全くないもの、II型；感染性はあっても複製速

度の遅いもの、III型；野生型 HIV-1 などの複製速度を示すものに分かれた。このうち、感染性を示す II 及び III 型でも、その細胞傷害活性は、元の vif、vpu 変異株の細胞傷害性に比べると、大きく低下していた。しかし、このようなウイルスの細胞傷害性の変化の原因となる新たな遺伝子変異領域はサザンブロット解析では不明であり、小規模の変異であることが示唆された。

3. HIV-1 の持続感染に必要な遺伝子変異を細胞での複製中に自然に起こさせる目的で、強毒 HIV-1 を M10 細胞で継代培養を繰り返した。その結果、アクセサリー遺伝子変異株感染時に見られたような持続感染細胞の出現は、野生型継代株では 4 代継代ウイルスから認められたが、nef 変異 HIV-1 継代株では、50 代継代したウイルスにおいても認められなかった。
4. Gag p24 認識単クローン抗体 (V107) の認識領域について調べたところ、HIV-1 の各分離株のみならず、HIV-2、サル免疫不全ウイルス (SIV_{mac}、SIV_{sm}) においても高保存性の領域であった。一方、ネコ免疫不全ウイルス (FIV) にも対応する領域が存在し、その領域を認識する単クローン抗体は、V107 の場合と同様に、FIV 感染細胞の表面に発現する Gag 抗原と反応した。このことから、これらの抗体の認識領域はウイルス持続感染細胞の排除のための標的抗原の候補と考えられた。
5. 前述の V107 の認識領域の免疫原性を BALB/c マウスを用いて検討した。同領域 (Gag-23mer) の関連合成ペプチドをフロイント型完全アジュバントとともに皮下接種した。その結果、Gag-23mer ペプチド免疫マウスは、MHC クラス I 拘束性の CD8 陽性 T 細胞による CTL 反応を誘導した。また同ペプチドはヘルパー T 細胞誘導能も認められた。一方、モルモットにおいても遅延型過敏反応を誘導し得た。さらに、同ペプチド免疫は、抗体産生能も有していた。このように、Gag p24 内に同定されたアミノ酸領域は、高保存領域であるにもかかわらず、マウスにおけるキラー T 細胞およびヘルパー T 細胞エピトープを含み、液性、細胞性免疫を誘導し得ること、またモルモットに遅延型過敏反応を誘導し得ることが明らかになった。このような免疫応答は、HIV-1 持続感染細胞の生体からの排除に有効と考えられる。

審査員一同は、申請者が博士（理学）の学位を得るに十分な資格を有するものと認定した。