

图. 1

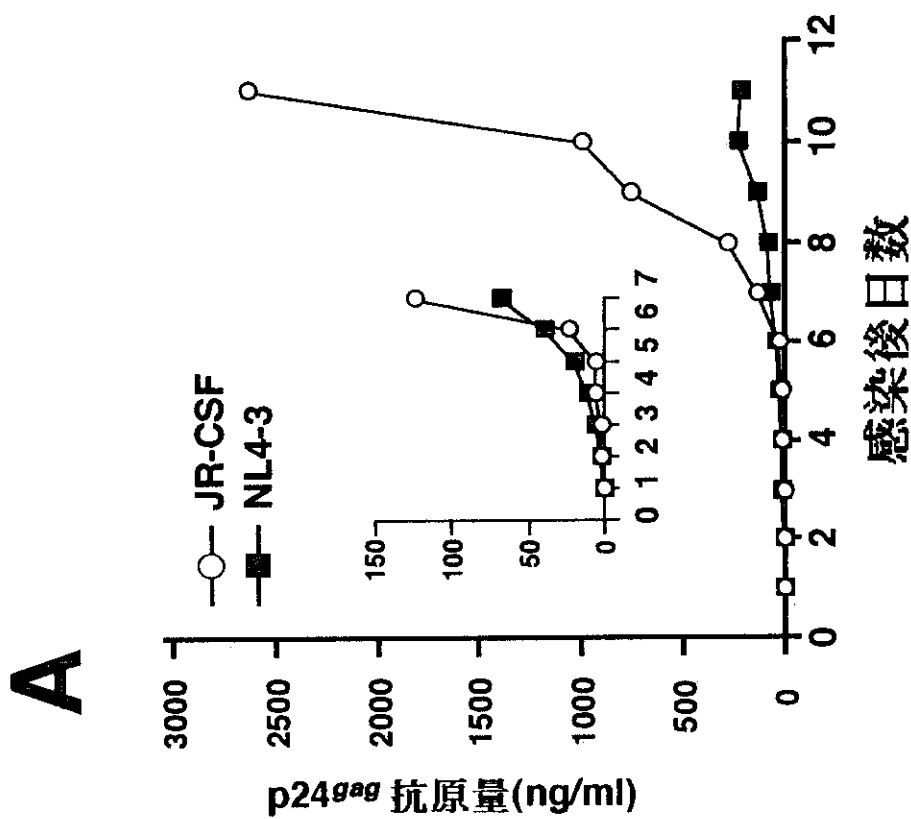
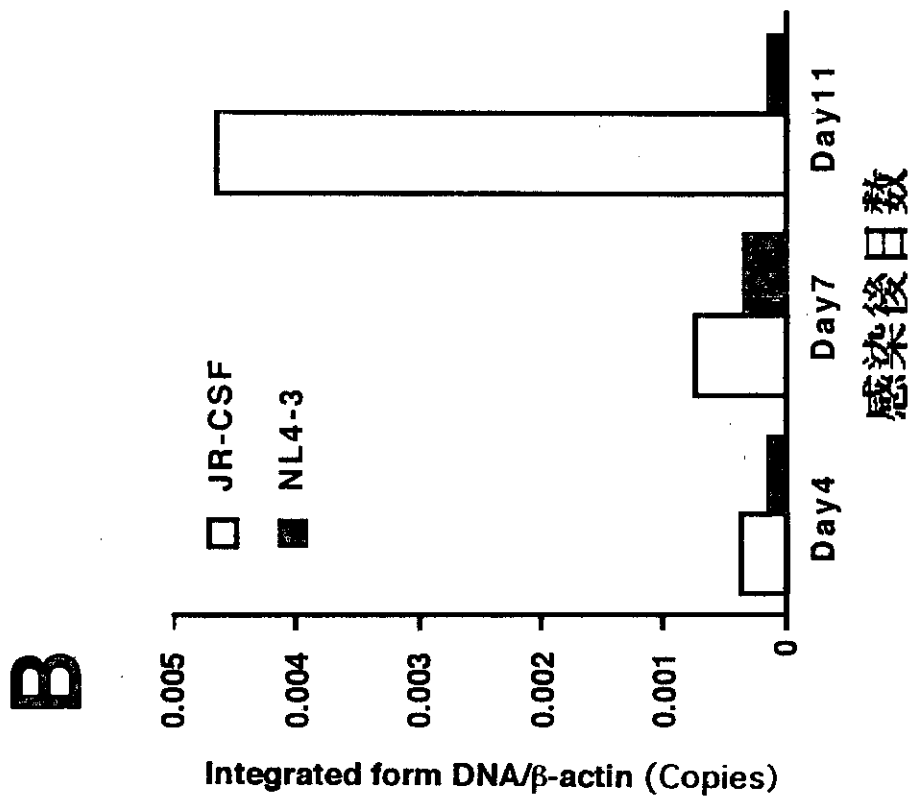


図. 2

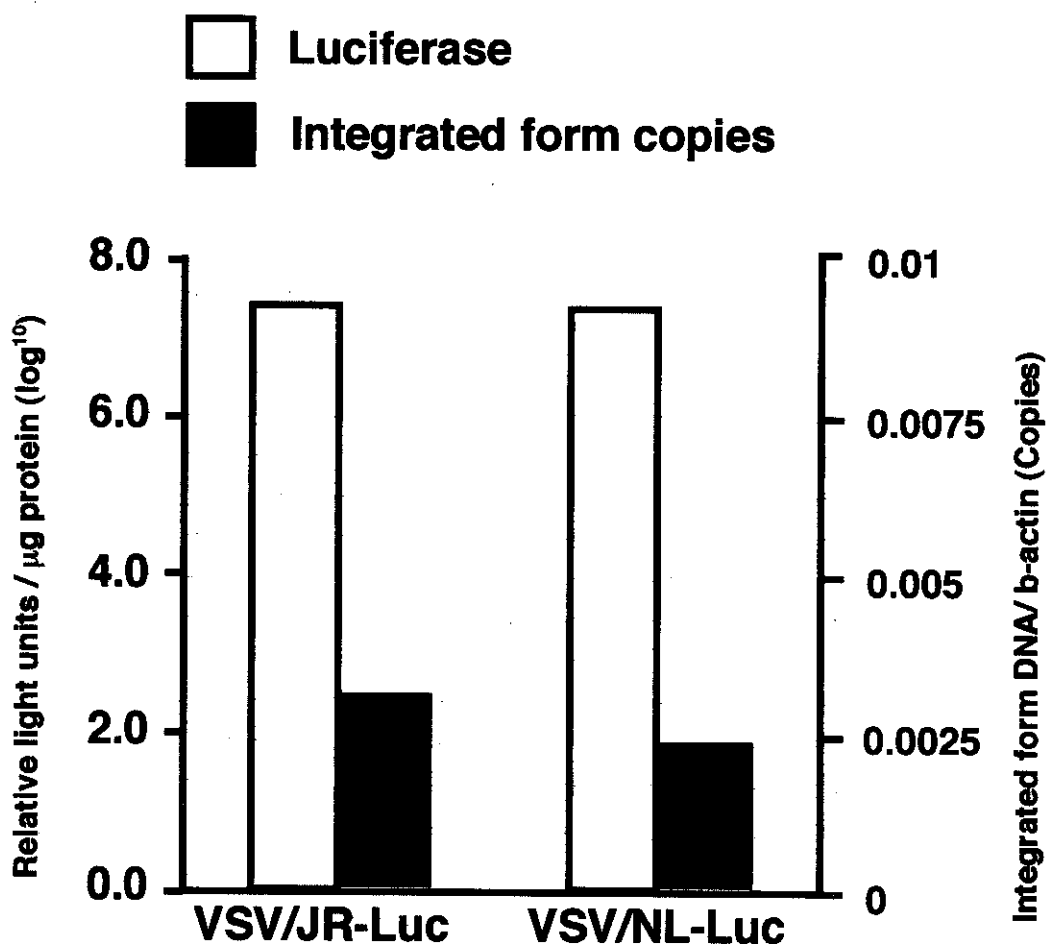
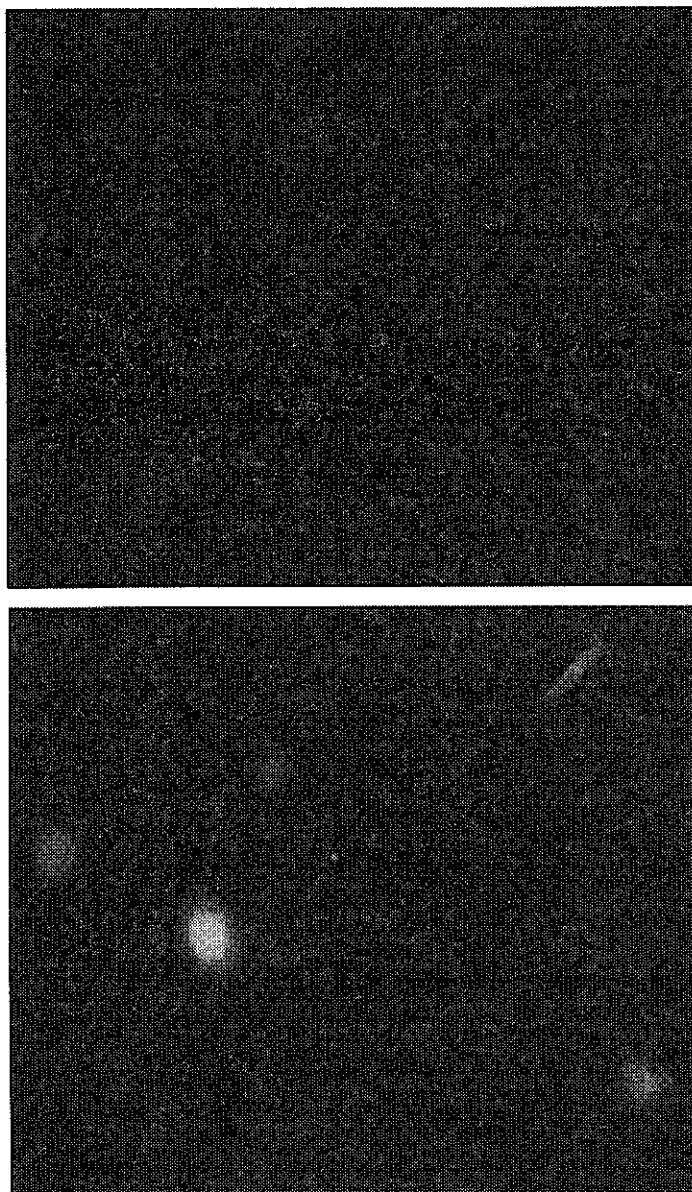


图. 3

图.4 Expression of EGFP on MDM



NLCSEV3EGFP

NL-E

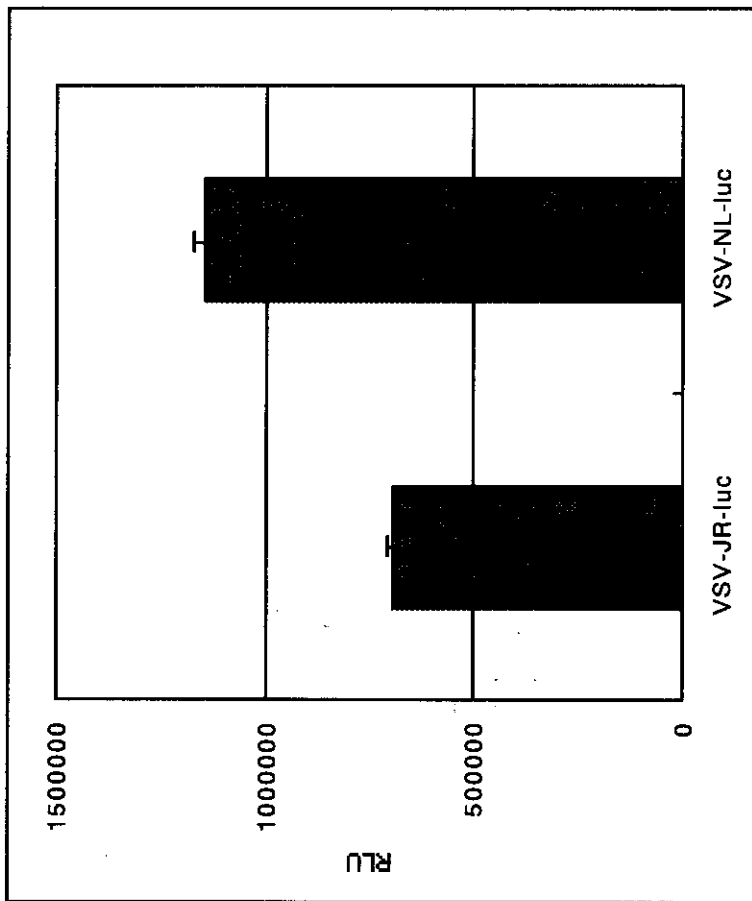


图. 5

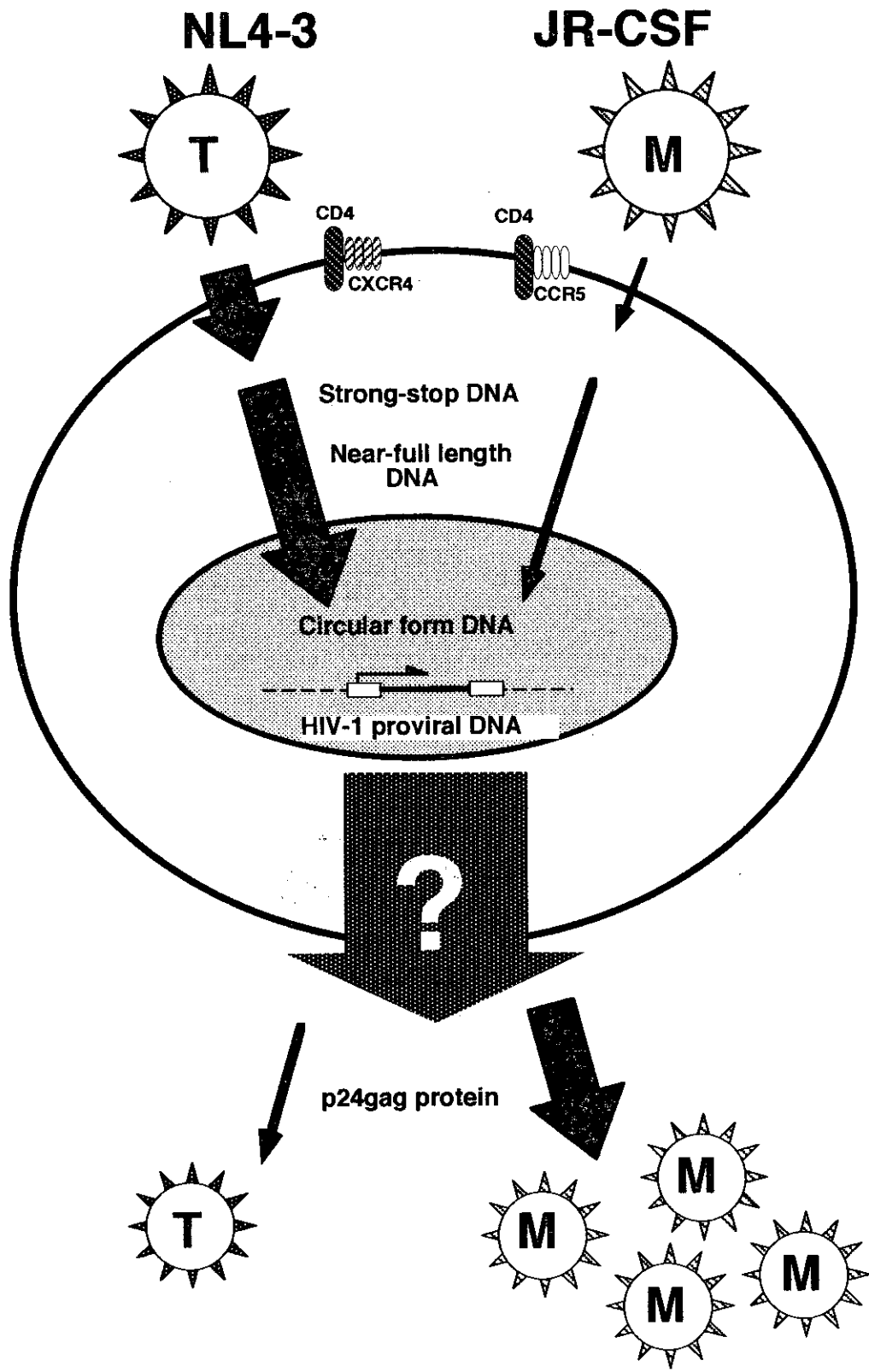


图. 6

11. SIVgag 蛋白を封入した人工糖脂質リポソームによるサル免疫とそのワクチン効果に関する研究

分担研究者	向井 鎌三郎	(国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター 主任研究官)
研究協力者	佐多 徹太郎	(国立感染症研究所エイズ研究センター室長)
	水落 次男	(東海大工学部生命化学科教授)
	馬場 信吉	(国立感染症研究所エイズ研究センター実習生/ 東海大)
	毒島 孝次	(筑波医学実験用霊長類センター/医薬品機構 派遣研究補助者)
	清野 慶太	(筑波医学実験用霊長類センター実習生/東海大)
	宇田 晶彦	(筑波医学実験用霊長類センター協力研究員)

研究要旨 現在、ヒトに対して使用できる安全なアジュバントが皆無であることから、我々は、最近マウスにおいて細胞性免疫を強く誘導する人工糖脂質リポソームをサルエイズ発症モデル系に用いて、毒性、そのアジュバント活性および抗エイズワクチンとしての有効性を検討することを目的とした。現在、実験の途中であるが、SIV 攻撃接種後の血中 Viral load に関し、4週目までの血漿を解析したところ、非免疫群・Alum gag p27(A G)免疫群に比べ、Man5-Liposome gag p27 (MG) 免疫群では急性期の Viremia のピークが1週間早く訪れ、その後急速に Viral load の低下傾向がみられた。今後、再検と、経過観察を継続して行うことが必要である。

A. 研究目的

現在、ヒトに対して使用できる安全なアジュバントが皆無であることからその開発が望まれている。最近マウスにおいて細胞性免疫を強く誘導することが明らかになった人工糖脂質リポソームに注目し、サルエイズ発症モデル系に用いて、毒性、そのアジュバント活性および抗エイズワクチンとしての有効性を検討することを目的とした。第一の目的は、人工糖脂質リポソーム；Man5-DPPE/liposome のサルにおける毒性試験であり、第二には組換え SIVgagP27 蛋白の Man5-DPPE/liposome への封入と免疫を行うことであり、第三には SIV の感染に対する防御効果を検討することである。

B. 研究方法

略号：(図1参照)

DPPE: di-Palmitoyl-Phosphatidyl

Ethanolamine

Man5-DPP: Mannopentaose(Man5)が DPPE に共有結合したもの

DPPC: di-Palmitoyl-Phosphatidyl Choline

Liposome: DPPC+Cholesterol

Man5-DPPE/Liposome:

Man5-DPPE が Liposome に突き刺さったもの

Man5-Liposome-p27: SIVgag p27 蛋白を封入

1) 人工糖脂質リポソームの毒性試験

体重 1.72~2.15kg、年齢 2 才のカニクイザル 4 頭を使用し、通常動物の免疫に用いる量の 10 倍量の人工糖脂質を用いて、毒性試験を行った。そのうち、2 頭には Man5-DPPE を 1 mg/0.5 ml を、別の 2 頭には Man5-DPPE/liposome を 8.4 mg/1.4 ml を皮下投与し 3 週間にわたって観察し、合計 2 回くり返した。

2) SIVgagP27 蛋白のリポソームへの封入と免疫

2a) SIVgagP27 蛋白の調製

ヒト生体内に広く存在する糖蛋白質糖鎖の一部であるマンノペンタオースとやはりヒトの生体内にあまねく存在する脂質である DPPE から還元アミノ化反応を用いて人工糖脂質である Man5-DPPE を合成し、シリカゲルカラムや C18 逆相カラムを用い高純度の人工糖脂質 (リポソーム) を調製した。また、抗原を封入した糖鎖被覆リポソームの作製のために、tac プロモーターを使用した組換え大腸菌発現ベクター (pKK223-3 (pharmacia) -p27) を用いて、SIVmac239 の gag p27 抗原を大量に発現させ、gag p27 抗原をイオン交換クロマトグラフィー (DEAE-, CM-cellulose, ゲル口過カラムクロマトグラフィー及び、自作の SIVgag p27 抗原に対するモノクローナル抗体を使用したアフィニティカラムクロマトグラフィーにより SDS-PAGE ゲルで単一バンドの gag p27 抗原を調製した。

2b) SIVgag-p27 蛋白の Liposome への封入と免疫

SIVgag p27 抗原を封入した Man5-DPPE /liposome-p27 (Man5-DPPE を 100ug, Liposome を 0.83 mg 含む) の接種は 4 頭のカニクイザルに行い、対照として、2 頭のカニクイザルにはアジュバントとして Alum を用いて SIVgag p27 抗原を接種した。接種した gag p27 抗原量はいずれのサルも 100 µg である。

免疫は合計 5 回行ったが、免疫後 2 週目と 4 週目に gag p27 抗原に対する遅延型アレルギー反応 (DTH) を観察した。DTH の解析は、SIVgag p27 抗原による免疫後 2 週間と 4 週間目にサルのまぶたに SIVgag p27 抗原を 20 µg/0.1 ml の濃度で Alum・PBS に溶解したものを皮内接種し、3, 6, 12, 24, 48, 72 時間後にまぶたの発赤を測定し、Alum PBS のみを接種した対照まぶたの発赤との差を DTH 反応による発赤として求めた。

また、免疫後の抗体価は SIVgag p27 抗原を用いた通常の EIA 法にて測定した。CTL の測定は、Yasutomi Y. ら (J Virol, 67(3) :1707-11 1993) の方法に従い、サル由来 PBMC を ConA 刺激 1 週間後、Cr51 で標識した組換え SIVgag ワクチニアウイルスを感染させた自己 B 細胞株 (Target) と 5 時間混合培養することによる Cr51 の

培養上清中への遊離を測定した。

$$\text{Spec. Lysis \%} = \frac{\text{Exp. Lysis} - \text{Min. Lysis}}{\text{Max. Lysis} - \text{Min. Lysis}} \times 100$$

の計算式を用いて CTL による Cr51 の遊離率を求めた。

3) p27 蛋白封入りポソームの SIV 感染防御効果

Man5-Liposome-p27 で免疫した 4 頭および Alum をアジュバントとして用いて SIVgag p27 抗原を免疫した 2 頭のカニクイザルに、5 回免疫終了 2 週後に、SIVmac239 を 1 頭あたり ~400(TCID₅₀) 静脈内接種にて感染させた。感染後定期的に採血し、抗体価、ウイルス分離、血中ウイルス量の定量、血液生化学的解析、リンパ球サブセットなどの検討を行った 2), 3)。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立感染症研究所動物実験委員会による審査の結果承認を受けた。また、研究の実施にあたっては、筑波医学実験用霊長類センター諸内規、作業方式に従って繁殖育成サルを用い、動物に与える苦痛の軽減と排除に勤めた。

C. 研究成果

1) 人工糖脂質リポソームの毒性試験

人工糖脂質リポソーム自体のサルにおける毒性試験では免疫に用いる量の 10 倍量をサルに皮下投与し、3 週間の継続観察を行った。3 週目に再度人工糖脂質リポソームを皮下投与し、合計 2 回くり返した。全身所見、局所症状、体温に関しては 3 日、7 日、14 日、21 日目に観察・測定した。Man5-DPPE を投与した 2 頭と Man5-DPPE/Liposome を投与した 2 頭共に、全身症状は特に異常を認めず、局所症状に関し、Man5-DPPE/Liposome (8.4 mg/1.4 ml) を投与した 2 頭にのみ、投与 3 日目に腫脹が見られたが、3 週目にはほとんど吸収されていた。体温に関し多少の変動は見られたものの、特に異常な値は示さなかった。白血球数や赤血球に関しても正常範囲内での変動であった。従って、全身所見、局所症状、体温、血液学的所見において、その副作用は認められなかったといえる。

2) SIVgagP27 蛋白封入りポソームによる免疫

用いたカニクイザルは 8 頭であり、S1, S2

は PBS を 0.3ml ずつ 2 個所に皮下注射した対照群である。S3, S4, S5, S6 にはサル 1 頭あたり Man5-Liposome-p27 を SIVgag p27 蛋白として 100ug/ 0.6ml を 0.3ml ずつ 2 ヶ所に皮下接種した。S7, S8 には、ヒトへの投与が認可されているアジュバントである Alum を用い、1 頭あたり 100ug の SIV gag p27 蛋白を 2 ヶ所に皮下接種した。免疫は合計 5 回行ったが、初回免疫前後の SIV gag p27 蛋白に対する抗体価の測定結果を図 2 に示す。S1, S2 を含めて、S7, S8 では抗体価が低値を示しているが、Man5-Liposome-p27 による免疫群の S3~S6 では 2 週目から抗体価の上昇がみられた。特に、カニクイザル S4 では顕著な抗体の上昇がみられた (図 2)。図 3 は SIVgag p27 蛋白による 5 回免疫後、SIV 感染 4 週目までの抗体価を限界希釈率で示したものである。免疫を行わなかった S1, S2 では図 3 の縦軸の関係上、抗体価上昇は明らかでないが、SIV 感染後 4 週目から初めて抗体産生がみられた 3)。ところが M5-Liposome や Alum を用いて免疫した場合、感染後 2 週目に抗体の上昇が見られた。特に、S3, S4 では感染後 2 週目からの著しい抗体価の上昇が認められた。人工糖脂質リポソームに封入した SIVgag p27 抗原を 4 頭のカニクイザルに接種し免疫を行ったあと、経時的に SIV 抗原に対する遅延型アレルギー反応 (DTH) を調べた。図 4、図 5 はそれぞれ 2 回目の免疫後 2 週目と 3 回目の免疫後 2 週目の DTH 反応の測定結果を発赤部分の面積として表してある。免疫をくり返すことにより DTH 反応の経時的パターンとその強さに変化がみられた。DTH 反応の強さは 3 回免疫以降、S4, S3≒S5, S6, S7, S8 の順であった。また、Man5-Liposome-p27 による 3 回目の免疫の後、CTL の測定を行った。図 6 には S3 と S4 のカニクイザルの CTL の結果は、E/T ratio 40 で 7~9%であった。

3) P27 蛋白封入りポソームの SIV 感染防御効果

SIV (Viral load) に関し、4 週目までの血漿を RTPCR にて解析したところ、非免疫群と Alum をアジュバントとして用いた免疫群に比べ、Man5-Liposome-p27 免疫群では感染後の急性期の Viremia が 1 週間早く訪れ、その後急速に Viral load の低下傾向がみられた。Viral load の低下傾向は、S4, S5≒S6, S3, S7, S8, の順であった。

今後、再検と、継続経過観察が必要であると思われる。

D. 考察

我々は、最近マウスにおいて細胞性免疫を強く誘導する人工糖脂質リポソームに注目し、サルエイズ発症モデル系を用いて、毒性、そのアジュバント活性およびヒトに使用できる、抗エイズワクチンとしての有効性を検討することを目的とした。サル 4 頭を用い、人工糖脂質リポソーム (Man5-Liposome) の毒性試験を 2 回行った。その結果、発熱、発赤、肉芽形成等の観察を 3 週間にわたって行ったが、顕著な毒性は認められなかった。

人工糖脂質を用いて HIV や SIV 由来の各蛋白質・糖蛋白質を封入したリポソームを作成し、抗エイズウイルス免疫賦活療法剤としての可能性を検討する研究は開始されたばかりであるが、SIVgag p27 抗原に関し、組換え大腸菌発現系と各種カラムクロマトグラフィーの組み合わせにより、SIVmac239 の gag p27 抗原を大量に調製する精製系ができ、これを人工糖脂質リポソーム (Man5-Liposome) に封入して用いる系を確立した。

また、100ug の精製 SIVgag p27 蛋白を Man5-Liposome に封入し、皮下接種により免疫を行った。免疫は合計 5 回行ったが、免疫後 2 週目と 4 週目に gag p27 抗原に対する遅延型アレルギー反応 (DTH) を観察した。

DTH 反応に関し、個体差はあるものの、Man5-Liposome-p27 で免疫した 4 頭のサルの方が Alum をアジュバントとして用いた 2 頭のサルよりも高値の DTH を示し、その強さは 3 回免疫以降、S4, S3≒S5, S6, S7, S8 の順であった。

我々が発表したように 3)、SIV 感染後 4 週目から抗体の上昇がみられるが、Liposome-p27 免疫群では 2 週目から抗体価の上昇が見られるので、液性免疫に関して強力な記憶が誘導されたものと思われる。

今回、SIVgag p27 蛋白封入人工糖脂質リポソームによるサルの免疫の感染早期における防御効果の 1 部を検討した。SIVgag p27 抗原のみによる免疫では SIV の感染を阻止できなかったが、感染後の血中ウイルス量や、リンパ節の感染細胞数を 1/10 程度低下させる傾向が見られた。また、Viral load の低下傾向は、S4, S5≒S6, S3, S7, S8, の順であった。

今後、データに関し再検と、継続経過観察により、本人工糖脂質リポソームによる免疫効果に関し検討が必要であると思われる。

E. 結論

1) 人工糖脂質リポソームの毒性試験

発熱、発赤、肉芽形成等の観察を 3 週間にわたって行ったが、顕著な毒性は認められなかった。

2) SIVgagP27 蛋白のリポソームへの封入と免疫

組換え大腸菌発現系と各種カラムクロマトグラフィーの組み合わせにより、SIVmac239 の gag p27 抗原を大量に調製する精製系ができたので、これを人工糖脂質リポソーム (Man5-Liposome) に封入して用いる系を確立した。

3) P27 蛋白封入リポソームの SIV 感染防御効果

SIV の感染を阻止することはできなかったが、感染後の血中ウイルス量を 1/10 程度低下させる傾向が見られた。

今後、データに関し再検と、継続経過観察により、本人工糖脂質リポソームによる免疫効果に関し検討が必要であると思われる。

F. 研究発表

- 1) Hirano M, Nakamura S, Okada M, Ueda M, Mukai R.: Rapid Discrimination of monkey B virus from human herpes simplex viruses by PCR in the presence of betain. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1225-1257 (2000)
- 2) Murayama Y, Mukai R, Inoue-Murayama M, Yoshikawa Y.: An African

green monkey lacking peripheral CD4 lymphocytes that retains helper T cell activity and coexists with SIVagm. *Clin. Exp. Immunol.* 117, 504-512 (1999)

- 3) Fujii Y, Mukai R, Akari H, Machida M, Mori K, Takasaka M, Kojima E, Murakami K, Yoshikawa Y.: Antiviral effects of 6-chloro-2', 3'-dideoxyguanosine in rhesus monkey acutely infected with SIV. *Antivir. Chem. Chemother.* 9, 85-92 (1998)
- 4) Akari H, Ono F, Sakakibara I, Murayama Y, Hiyaoka A, Terao K, Otani I, Mukai R, Adachi A, Yoshikawa Y.: Simian T cell leukemia virus type I-induced malignant adult T cell leukemia like disease in a naturally infected African green monkey: implication of CD8+ T cell leukemia. (1998) *AIDS. Res. Hum. Retroviruses*, 14, 367-371
- 5) Shoji S, Furuishi K, Ogata A, Yamataka K, Tachibana K, Mukai R, Uda A, Harano K, Matsushita S, Misumi S.: An allosteric drug, α , α' -bismyristoyl thiamine disulfide suppresses HIV-1 replication through prevention of nuclear translocation of both HIV-1 Tat and NF-kappa B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249, 745-53 (1998)

G. 知的所有権の所有状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

図 1

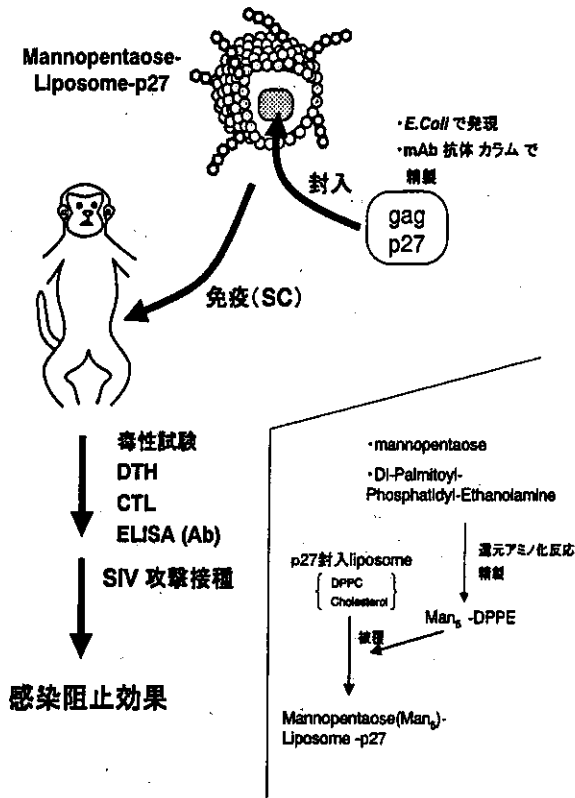


図 3

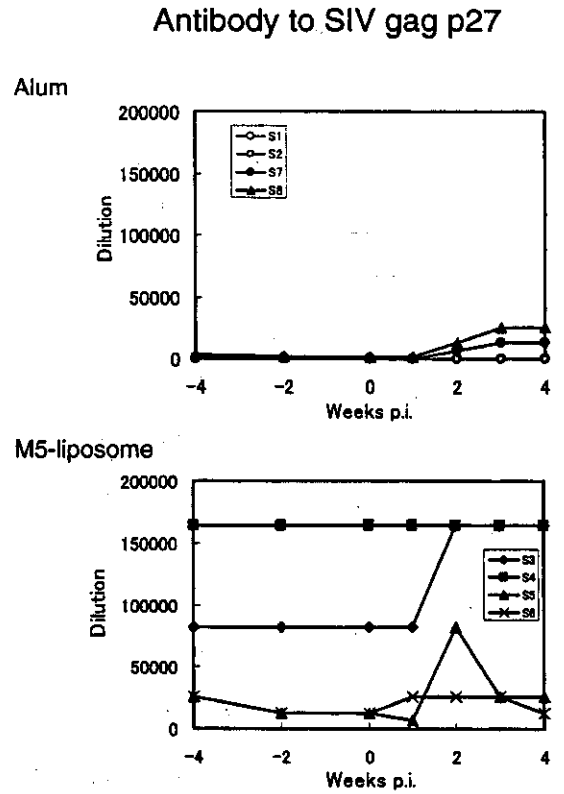


図 2

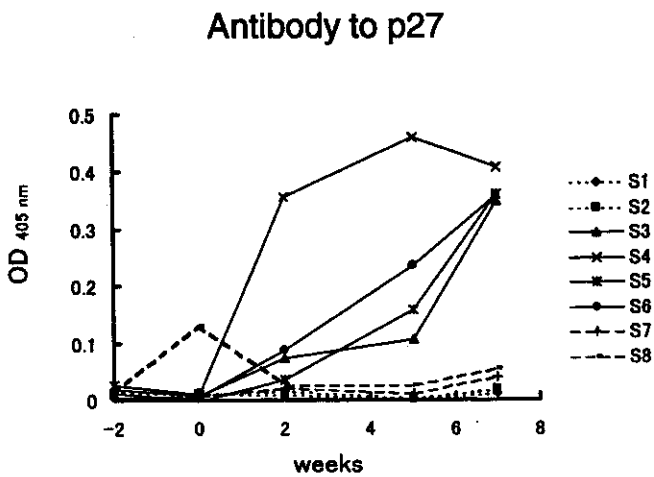
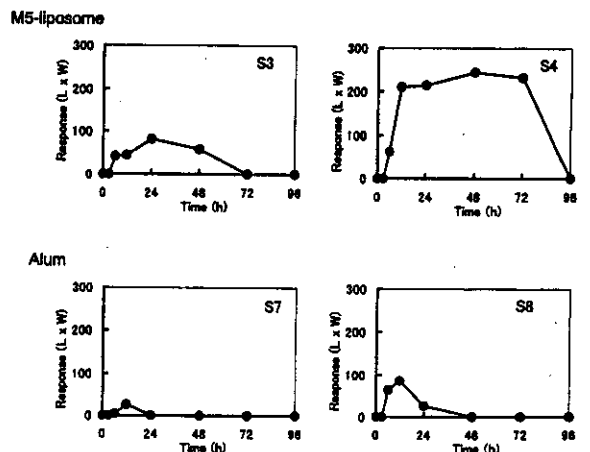


図 4

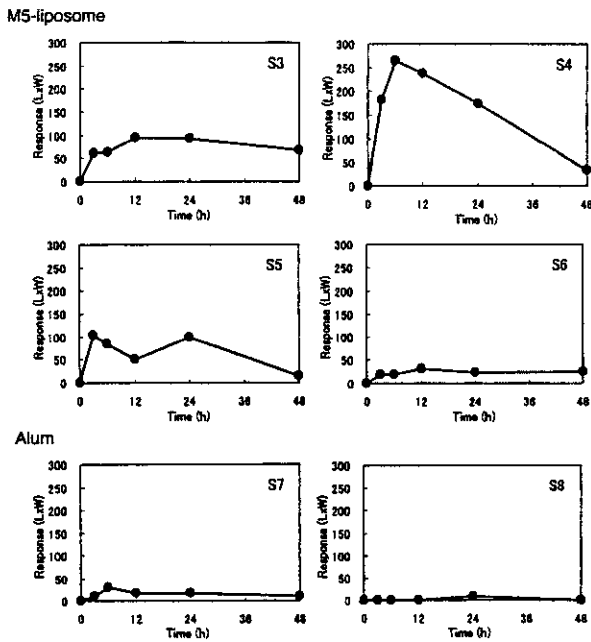
Effect of immunization with SIV gag p27 enclosed in oligomannose-coated liposome on DTH response (1st)



SIV gag p27Ag (37.5 μg) was injected to Monkeys (SC). DTH reaction was observed from 12 days after immunization.

Figure 5

Effect of immunization with SIV gag p27 enclosed in oligomannose-coated liposome on DTH response (2nd)



SIV gag p27Ag (37.5 μg) was injected to Monkeys (SC)
DTH reaction was observed from 12 days after immunization

Figure 7

Plasma viral (RNA) load

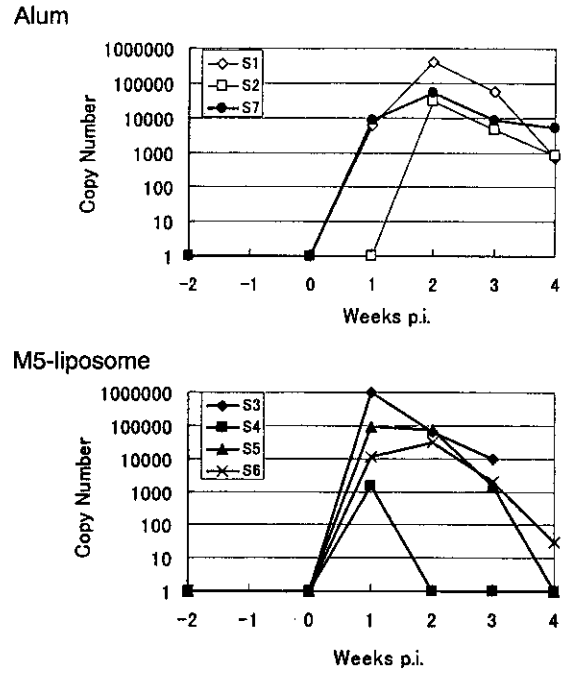
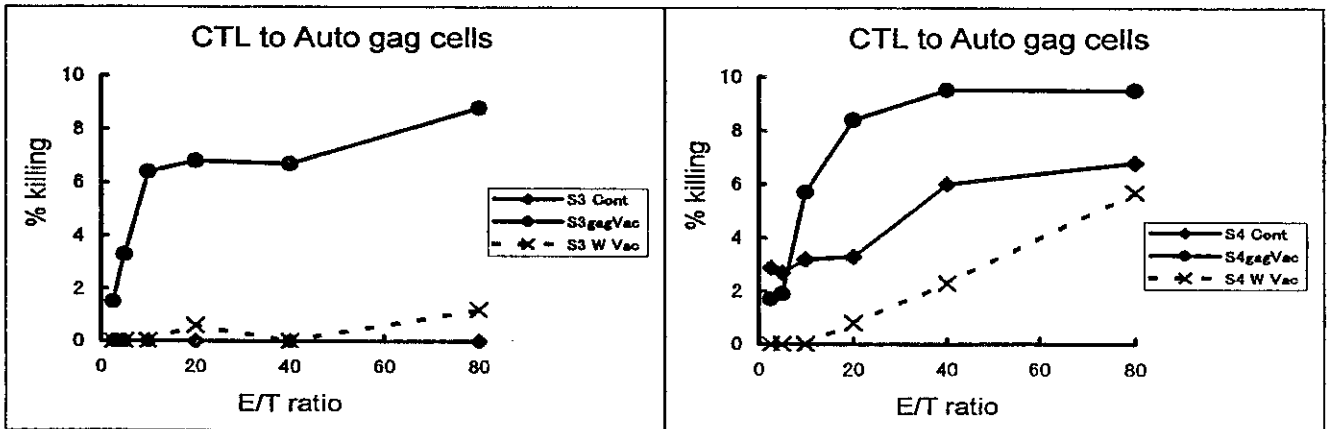


Figure 6



12. 限局的複製を誘導するエイズ DNA ワクチンに関する研究／マカクサル SIV 感染モデルにおける検討

分担研究者 俣野 哲朗（国立感染症研究所エイズ研究センター主任研究官）

研究要旨 エイズワクチン研究において、有効性の点で唯一コンセンサスが得られている弱毒化生ワクチンは、安全性の問題のため臨床応用が考えられていない。本研究では、安全かつ有効なエイズワクチンの開発を目的として、弱毒化ワクチンウイルスの限局的複製を誘導する DNA ワクチンシステムを考案し、マカクサル AIDS モデルにて検討した。弱毒化ワクチンウイルスとして、サル免疫不全ウイルス(SIV)の env を、マウスのみ感染するフレンドマウス白血病ウイルス(FMLV)の env に組み換えた、キメラウイルス FMSIV を作成した。FMLV レセプター発現のない霊長類動物細胞を用いた FMLV レセプター DNA 導入実験では、FMLV レセプター発現細胞のみに限局的に FMSIV が感染することが確認された。動物実験では、FMSIV DNA および FMLV レセプター DNA の両者（限局的複製誘導ワクチン）を接種したサルにて、(1)FMLV レセプター依存性の FMSIV 複製、(2)複製誘導のない従来の DNA ワクチンと比較して、より効率よい SIV Gag 特異的細胞性免疫誘導、(3)病原性 SIV 感染に対する抵抗性が認められた。以上の結果は、この限局的複製誘導 DNA ワクチンが、従来の DNA ワクチンと比較してより有効であることを示している。

A. 研究目的

近年の化学療法の進歩にもかかわらず HIV-1 感染は致死性感染症であり、感染者の増加が続いている現状において、予防を目的としたエイズワクチン開発は最重要課題である。

エイズワクチン研究は、HIV-1 に対する細胞性免疫誘導および中和抗体誘導の両方向から研究されてきた。I 最近我々は、サル AIDS モデルにて CD8 depletion 実験をおこない、急性期の感染抑制に宿主 CD8 細胞が重要であることを明らかにした(J. Virol. 72:164, 1998)。この結果は他のグループによっても確認され (Science 283:857, 1999; J Exp Med 189:991, 1999)、HIV 感染防御における細胞性免疫誘導ワクチンの有効性の理論的根拠の一つとなっている。

エイズワクチンとして有効性の点で唯一コンセンサスが得られている弱毒化生ワクチンは、安全性の問題のため臨床応用が考えられていないが、この感染防御には細胞性免疫の関与が重要と考えられている。一方、細胞性免疫誘導型のエイズワクチンとして、ウイルスベクターワクチン・DNA ワクチン等が試み

られてきたが、未だ十分な有効性は得られていない。そこで本研究では、弱毒化ワクチンウイルスの複製を限局化することにより安全に誘導する DNA ワクチンシステムを開発し、より有効な感染防御免疫誘導を試み、マカクサル AIDS モデルにて検討した。つまり、本研究の目的は、弱毒化ワクチンウイルスの限局的複製を誘導する安全かつ有効なエイズ DNA ワクチンの開発である。

具体的には、弱毒化ワクチンウイルスとして、サル免疫不全ウイルス(SIV)の env をマウスのみ感染するフレンドマウス白血病ウイルス(FMLV)の env に組み換えたキメラウイルス FMSIV を作成し、FMSIV DNA と FMLV レセプター(mCAT1)発現 DNA とを DNA ワクチン (FMSIV + mCAT1 DNA ワクチン) として投与することとした。霊長類動物では mCAT1 発現は認められないことが知られており、FMLV envelope 蛋白(Env)を有する FMSIV は感染しえない。よって、FMSIV + mCAT1 DNA ワクチン接種により、mCAT1 DNA 導入細胞に限局した安全な FMSIV 複製が誘導され、従来の DNA ワクチンより高い

SIV 抗原発現および有効な感染防御免疫が誘導されることが期待される。

B. 研究方法

FMSIV DNA 作成：SIV の env を FMLV の env に組み換えたとき FMSIV DNA を作成した。

サル由来の COS 細胞を用いた培養細胞実験：FMSIV DNA 導入細胞の培養上清中 SIV Gag 蛋白(p27)濃度を ELISA により定量した。FMSIV ウイルス粒子への FMLV Env の取り込みを免疫沈降法にて調べた。mCAT1 発現 DNA 導入 COS 細胞への FMSIV 感染実験をおこなった。

マカクサルにおける FMSIV 複製誘導実験：カニクイサル 1 頭を用い、左側そけいリンパ節に FMSIV DNA と mCAT1 DNA の両者を、対照として右側そけいリンパ節に FMSIV DNA のみを注入した。1 週間後各リンパ節から DNA を抽出し、複製を示す 2-LTR circular DNA の有無を PCR にて調べた。

マカクサルへのワクチン接種実験(I)：赤毛サル 4 頭を、ナイーブ対照群（ワクチン接種なし/1 頭）、FMSIV DNA のみ接種する対照群（複製誘導のない従来の DNA ワクチンに相当/1 頭）、FMSIV + mCAT1 DNA ワクチン接種群（2 頭）の 3 群に分けた。DNA 接種は、筋肉内注射および遺伝子銃を併用し、計 5 回（0, 1, 2, 6, 12 週目）おこなった。ワクチン接種開始後 14 週目の血液から分離したリンパ球を用いて SIV Gag 特異的細胞性免疫の解析（SIV Gag 発現細胞との混合培養におけるインターフェロン γ [IFN γ] 産生量の定量、および SIV Gag 特異的細胞傷害性 T リンパ球 [CTL] 活性測定）をおこなった。24 週目に、病原性 SIVmac239 (100 TCID₅₀) を静注し、その後の生体内 SIV 量 (ELISA による plasma 中の p27 濃度定量・RT-PCR による plasma 中の SIV RNA コピー数定量)、および免疫不全発症についての検討をおこなった。

マカクサルへのワクチン接種実験(II)：赤毛サル 5 頭を、ナイーブ対照群（mCAT1 DNA のみ接種/1 頭）、FMSIV DNA のみ接種する対照群（2 頭）、FMSIV + mCAT1 DNA ワクチン接種群（2 頭）の 3 群に分けた。DNA 接種は、筋肉内注射および遺伝子銃を併用し、計 3 回（0, 0.5, 1 週目）おこなった。ワクチン接種開始後 3 週目の血液から分離したリンパ球を用いて SIV Gag 特異的細胞性免疫の解析をおこなった。

動物実験は、倫理面も含めて、国立感染症研究所動物実験委員会の審査をうけ、その承

諾を得てから開始している。

C. 研究成果

昨年度までに培養細胞実験を完了し、FMSIV DNA 導入細胞からは FMLV Env を有するキメラ SIV (FMSIV) が産生されること、及び FMSIV 感染が mCAT1 導入細胞に限局することが確認された。

今年度の研究では、マカクサル動物実験にて、以下の結果が得られた。

- (1) FMSIV 複製誘導：マカクサルにおける FMSIV 複製誘導実験にて、FMSIV 複製を示す SIV 2-LTR circular DNA は、FMSIV DNA 単独投与では検出されなかったが、FMSIV + mCAT1 DNA 投与側では検出された。
- (2) SIV Gag 特異的細胞性免疫誘導：ワクチン接種実験(I)・(II)の両方において、FMSIV + mCAT1 DNA ワクチン接種群全頭においてのみ、SIV Gag 特異的細胞性免疫誘導が認められた。
- (3) SIV 感染に対する抵抗性：SIV challenge 後、ナイーブ対照サルは、高い plasma SIV 量を維持し、体重減少・末梢血 CD4(+)CD29(+)リンパ球数の減少を呈して、17 週目に死亡した。FMSIV DNA のみ接種した対照サルは、ナイーブ対照サルの約 1/10 の SIV 量を示した。体重減少・末梢血 CD4(+)CD29(+)リンパ球数の減少を呈し、全身状態の悪化のため 45 週目に安楽死させた。一方、FMSIV + mCAT1 DNA ワクチン接種群の 2 頭の plasma SIV 量は、ナイーブ対照サルの約 1/100 以下であった。体重減少は認められず、末梢血 CD4(+)CD29(+)リンパ球数は急性期に一過性に減少したものの 12 週目には回復し、SIV 投与後 1 年以上生存している。

D. 考察

- (1) このシステム (FMSIV + mCAT1 DNA 投与) により、FMSIV の mCAT1 依存的複製が誘導されることが示された
- (2) この限局的複製誘導 DNA ワクチンは、複製誘導のない従来の DNA ワクチンと比較して、より効率よく SIV Gag 特異的細胞性免疫を誘導することが明らかとなった。
- (3) この限局的複製誘導 DNA ワクチンは、病原性 SIV 感染に対する抵抗性を誘導

することが示された。

E. 結論

我々の開発した限局的ワクチンウイルス複製誘導ワクチンシステム (FMSIV + mCAT1 DNA ワクチン) は、従来の DNA ワクチンと比較して、より効率よく SIV 特異的細胞性免疫を誘導し、有効な SIV 感染防御免疫を誘導した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Igarashi T, Endo Y, Englund G, Sadjadpour R, Matano T, Buckler C, Buckler-White A, Plishka R, Theodore T, Shibata R, Martin MA. Emergence of a highly pathogenic simian/human immunodeficiency virus in a rhesus macaque treated with anti-CD8 mAb during a primary infection with a nonpathogenic virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14049-14054, 1999.
- (2) Kano M, Matano T, Nakamura H, Takeda A, Kato A, Ariyoshi K, Mori K, Sata T, Nagai Y. Elicitation of protective immunity against simian immunodeficiency virus infection by a recombinant Sendai virus expressing the Gag protein. *AIDS* in press.

2. 学会発表

- (1) Odawara T, Matano T. Functional interaction between amphotropic and ecotropic MLV envelope proteins. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Retroviruses (NY, USA). 5/25/1999.
- (2) Matano T, Kano M, Odawara T, Mori K, Ami Y. An attempt to induce restricted replication of an FMLV-SIV chimeric virus in macaques for protection against SIV infection. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Retroviruses (NY, USA). 5/28/1999.
- (3) 俣野哲朗、狩野宗英、小田原隆、森一泰、佐多徹太郎、永井美之、網康至。マカクサルモデルにおける抗エイズ DNA ワクチン開発研究。第 47 回日本ウイルス学会 (横浜)。11/7/1999.
- (4) 俣野哲朗。異なるレセプターと結合する

MLV エンベロープ蛋白間の機能的相互作用。第 47 回日本ウイルス学会 (横浜)。11/9/1999.

- (5) Matano T, Kano M, Odawara T, Nakamura H, Takeda A, Mori K, Sata T, Nagai Y. A novel vaccine strategy inducing safer confined replication of an engineered vaccine virus mediated by a foreign receptor. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Molecular Approaches to Vaccine Design (NY, USA). 12/3/1999.
- (6) Matano T, Kano M, Odawara T, Nakamura H, Takeda A, Mori K, Sata T, Nagai Y. Protection by a confined live vaccine against simian immunodeficiency virus Challenge. 7th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CA, USA). 2/2/00.

G. 知的所有権

特許申請中。

13. 天然物を用いた HIV 遺伝子発現の抑制

研究協力者 田沼 靖一（東京理科大学薬学部生化学教室教授）

研究要旨 本研究では HIV 遺伝子発現を抑制する効果を持つ天然の化合物を探索した。その結果、イソフラボンやクマリン骨格を有する化合物が特に効果的であることが明かとなった。現在までに様々な AIDS 治療薬が開発されているが、副作用や薬剤耐性ウイルスの出現などの問題が残っている。このように本研究では、これまでに開発された薬物とは全く異なる概念、即ちウイルスの潜伏期間を無期限に延長するという新規の治療、あるいは予防法の確立を目標としている。

A. 研究目的

HIV 遺伝子の発現誘導は、細胞側の受容体にリガンドが結合することによってキナーゼが活性化され、次に NF- κ B が核へ移行しプロモーター中のエレメントが応答することによって起こると説明されている。培養細胞に対してトランジェントに HIV プロモーター活性のレポータープラスミドをトランスフェクションし、TPA 刺激によって NF- κ B の活性化を引き起こす系は一般的に HIV 遺伝子発現を研究する上で有効な手段である。本研究ではこの活性化された HIV プロモーター活性を抑制する作用のあるものをタンニンやイソフラボンなど天然の化合物の中から探索し、将来的に HIV 遺伝子発現を抑制する薬物を化学合成するための手掛りを得ることを目的とした（図 1）。

B. 研究方法

まず、HIV プロモーター領域約 500-bp をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだ発現ベクター (pHIVLuc) を作製した（図 2）。このレポータープラスミドをヒト T 細胞株 Jurkat にトランスフェクションし、24~48 時間後に TPA (5 ng/ml) 及び種々の天然化合物 (25~100 μ g/ml) をその培地に添加した。さらに 15 時間培養後、細胞を回収し、抽出液を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。

C. 研究結果

1. HIV プロモーター活性検出系の確立
ヒトサイトメガロウイルスプロモーターの組み込まれたルシフェラーゼ発現ベクター pCMVLuc (ポジティブコントロール) を Jurkat 細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、 1×10^6 の細胞に対して 1 ~ 32 μ g のプラスミドを用いてプロモーター活性を定量化できることが示された。このように HIV プロモーター活性の増減ともに示す実験に適当量である 2.5 μ g をトランスフェクションに用いて、ルシフェラーゼアッセイを行うという条件を定めた（図 3）。
2. TPA により増大した HIV プロモーター活性に対するタンニン酸の効果
TPA により増大した HIV プロモーター活性はタンニン酸を培地に添加することによって抑制されることが示された。一方ネガティブコントロールベクターの導入された細胞でも TPA に対して正の応答をするが、これはタンニン酸の存在によって全く影響しなかったためタンニン酸感受性の負の応答性エレメントは HIV プロモーター中に存在することが示唆された（図 4）。
3. 種々の天然化合物による HIV プロモーター活性に及ぼす効果
2. と同様の実験系において、タンニン酸の代わりに構造決定された種々の天然の化合物を用いて、TPA により活性化される

HIV プロモーター活性に及ぼす影響について検討した。低分子ポリフェノールのなかにはタンニン酸と同程度の HIV プロモーター活性抑制効果を示すものも認められた。また特筆すべきことに、イソフラボン、カルコン系に分類される化合物はタンニン酸よりも強い効果を示した。また、フラボン、キノン系化合物には全く抑制効果が認められなかった (図 5)。

4. HIV プロモーター活性を抑制する活性を持つ化合物の共通分子構造

HIV プロモーター活性を抑制する効果のあるものとして本研究において同定された天然の化合物は特徴的な構造を有しており、図 6 では Basic structure A と B として示してある。この基本分子骨格をリード化合物として、より効果的な薬物を開発する手掛りが得られるものと考えられる。このように、HIV 遺伝子発現を抑制する化合物の探索と作用機序の解明はエイズ発症の予防及び治療薬の開発に資するものである。

D. 考察

本研究では特に HIV プロモーター活性をより効果的に抑制する天然化合物の探索を進めた。その結果ポリフェノール系の化合物以外にもイソフラボン、クマリン、そしてカルコン骨格を有する化合物が HIV 遺伝子発現抑制に効果的であることが示された。フラボン骨格を持つ化合物にはむしろ HIV プロモーター活性を増強する効果のあることが示されたことは興味深い。いずれにせよ、これらの天然化合物がいかなるメカニズムを通して HIV プロモーター活性に影響を及ぼすかについて示す必要がある。例えばこれら化合物が HIV プロモーター中のエレメントに結合する因子に直接作用する可能性、あるいは細胞内のリン酸化反応や NF- κ B の核への移行に対する影響などを詳細に検討し、分子メカニズムを見据えたうえでの新規薬物開発を目指している。

E. 結論

昨年度までの研究では、HIV の他にレトロウイルスであるマウス乳癌ウイルス (MMTV) 遺伝子のプロモーター内にもタンニン酸感受性領域が存在することが示されていた。そしてプロモーター活性を抑制する効果のあるエレメントとして両者に共通の配列、ACTGモチーフを見い出している。現在このエレメン

トに結合する可能性のあるタンパク質をコードする cDNA クローニングも行っており、動物細胞内で発現するベクターを作製している。

現在までに HIV 治療薬として逆転写酵素やプロテアーゼ阻害剤が用いられているが、本研究はそれらとは全く発想が異なるものである。最終的には HIV のキャリアーに対し、天然化合物とある特定の遺伝子導入を行うことによってその遺伝子発現を効果的に抑制し、しかも副作用の少ない方法を確立することを目指している。また本研究成果は、HIV キャリアーの発症の長期間抑制に応用され、薬害エイズ問題に対する解決策になり得るものと期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表
 1. Uchiyumi, F., Ohta, T., & Tanuma, S.: Replication factor C recognizes 5'-phosphate ends of telomeres. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229: 310-315, 1996.
 2. Uchiyumi, F., Sato, T., & Tanuma, S.: Identification and characterization of a tannic acid-responsive negative regulatory element in the mouse mammary tumor virus promoter. *J. Biol. Chem.* 273: 12499-12508, 1998.
 3. Uchiyumi, F., Watanabe, M., & Tanuma, S.: Characterization of telomere-binding activity of replication factor C large subunit p140. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258: 482-489, 1999.
2. 学会発表
 1. タンニン酸のマウス乳癌ウイルス遺伝子発現抑制・第 57 回日本癌学会総会 (横浜) 1998 年 10 月 2 日、内海 文彰、田沼 靖一
 2. マウス乳癌ウイルス MMTV 遺伝子プロモーターに結合する DNA ヘリカーゼ様タンパク質の機能の解析・第 21 回日本分子生物学会年会 (横浜) 1998 年 12 月 17 日、内海 文彰、小室 真人、水田 龍信、田沼 靖一
 3. MMTV プロモーター中のタンニン酸感受性エレメント結合性 DNA ヘリカーゼ S μ bp-2 cDNA のクローニング・日本薬学会第 119 年会 (徳島) 1999 年 3 月 31 日、内海 文彰、小室 真人、田沼 靖一

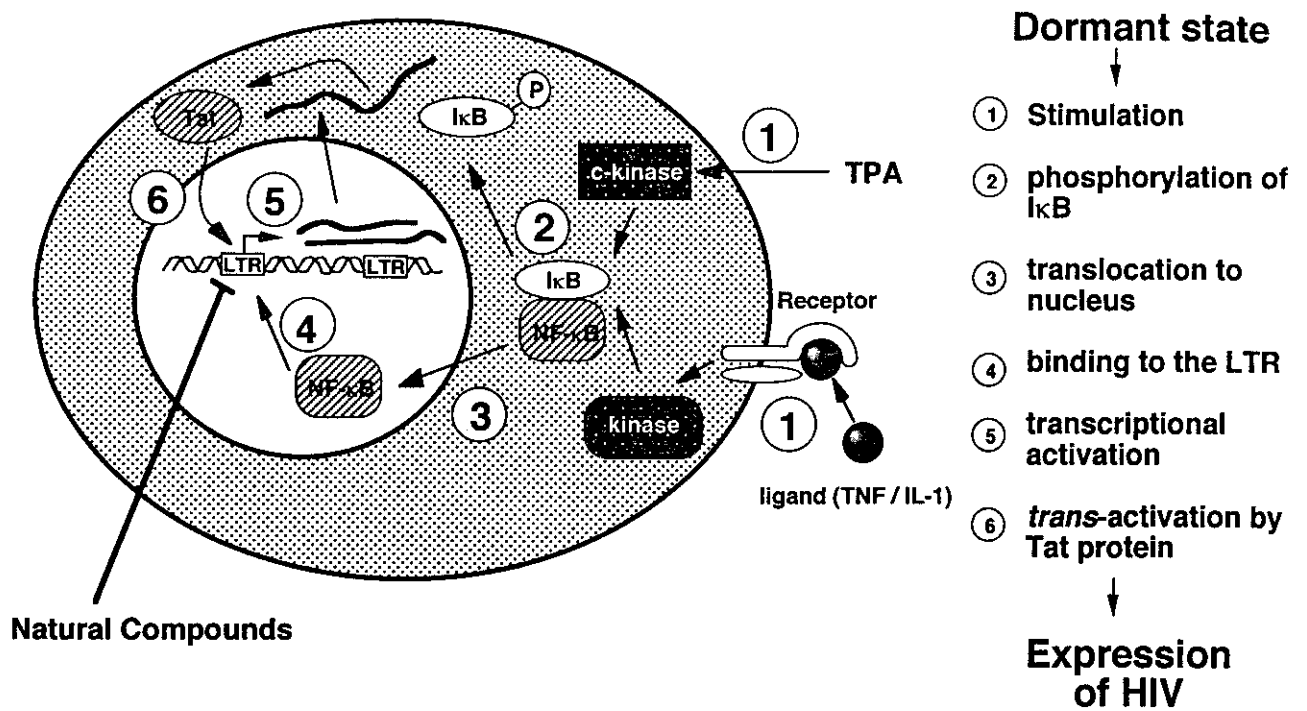


図1 HIV 遺伝子発現のメカニズム

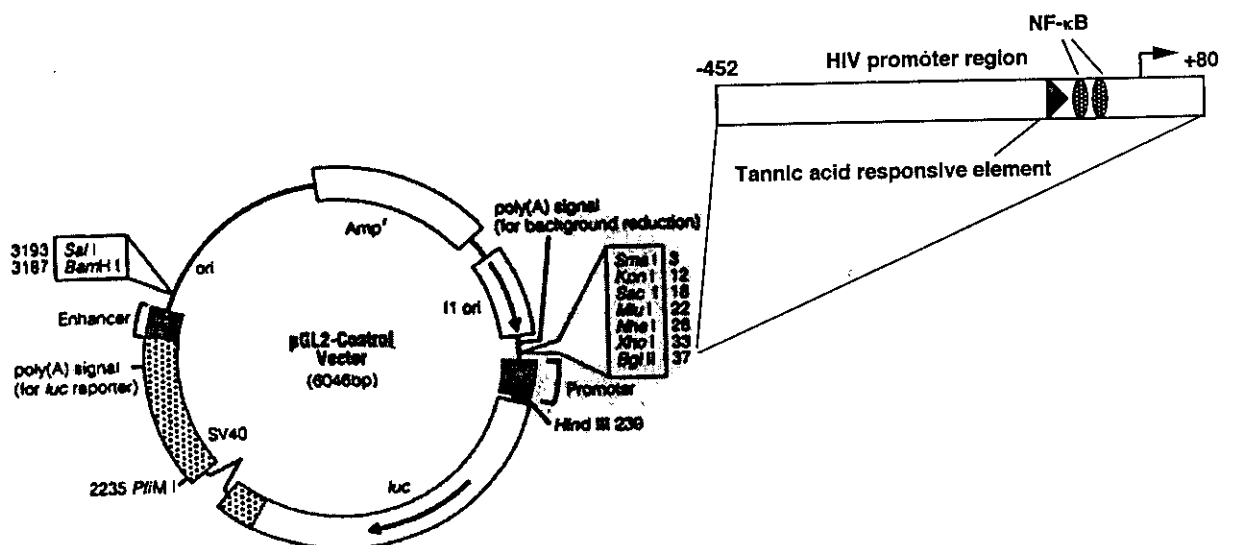


図2 本研究で用いた HIV プロモーター活性のレポータープラスミド pHIVLuc の構造

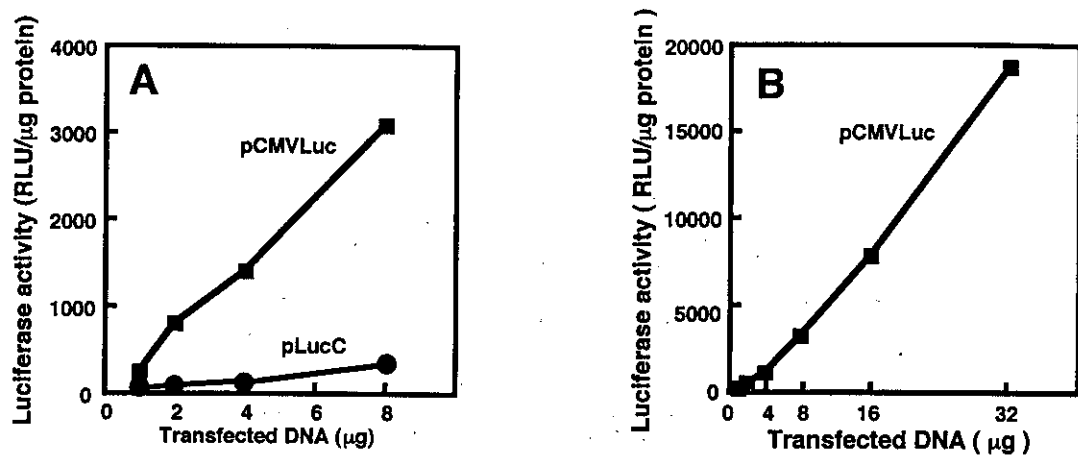


図3 DEAE-dex トランスフェクションによるルシフェラーゼ発現ベクターの Jurkat 細胞への導入

- A. 0~8 µg の pCMVLuc (サイトメガロウイルスプロモーターを持つ) 及び pLucC (ネガティブコントロールベクター) を Jurkat 細胞にトランスフェクションし、Luc アッセイを行った。
- B. 0~32 µg の pCMVLuc による結果

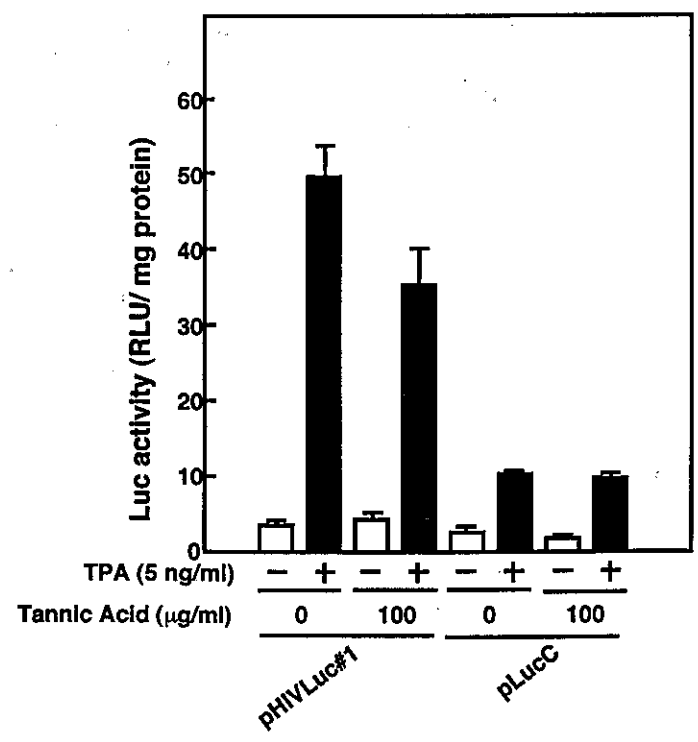


図4 タンニン酸による HIV プロモーター活性の抑制
pHIVLuc をトランスフェクトした Jurkat 細胞の培地に TPA 及びタンニン酸を添加し 15 時間後にサンプルを調整し、Luc アッセイを行なった。3 回の独立の実験を行い、結果は平均値と SEM は示してある。

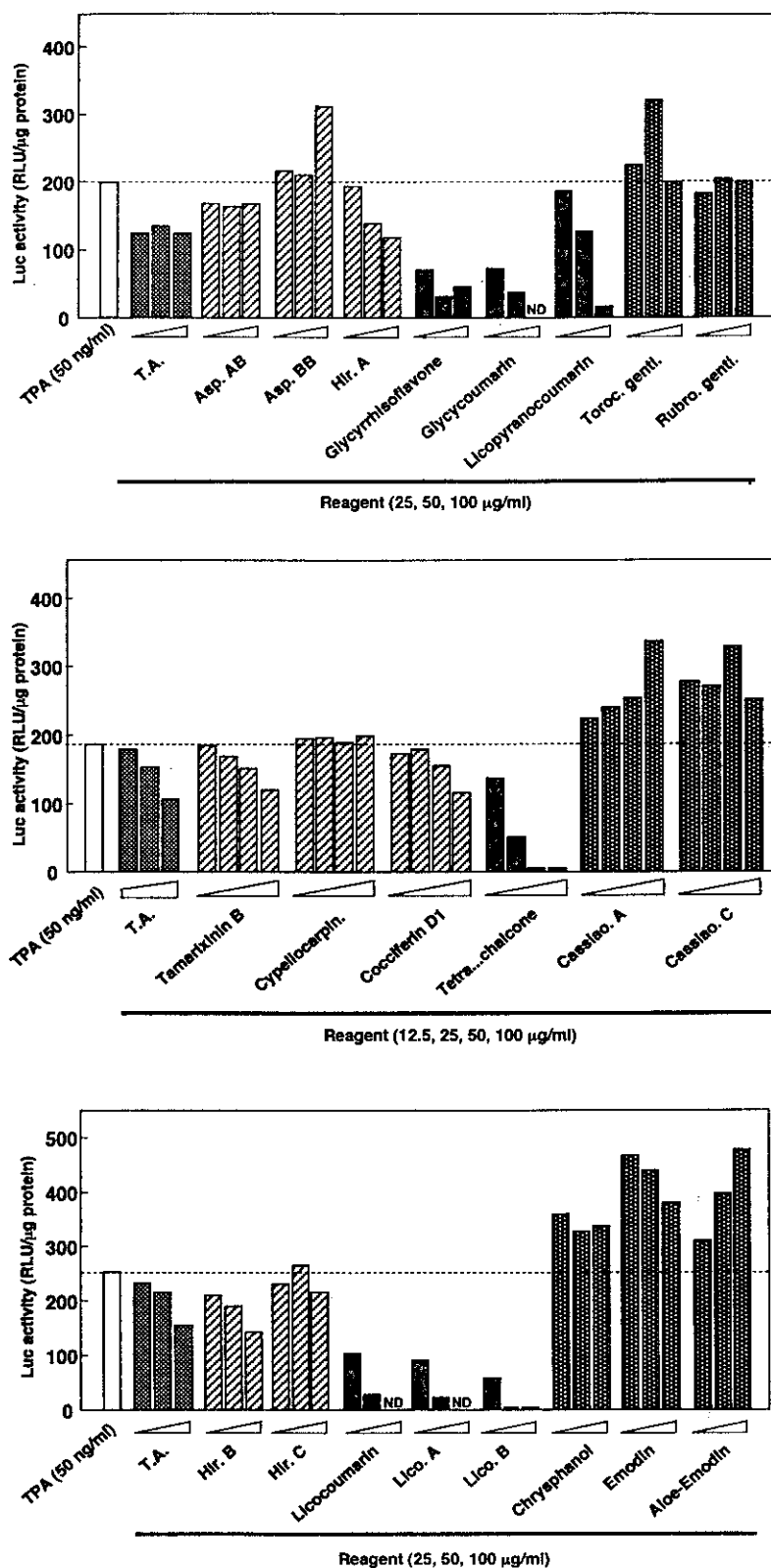


図5 種々の天然物による HIV プロモーター活性に対する効果

タンニン酸の代わりに種々の天然化合物を用いて図1C脚注に記したものと同様の実験を行った。上段、中段、そして下段の実験はそれぞれ独立のものである。グラフに示されている値はルシフェラーゼ活性(化学反応)を表している。

▨は低分子ポリフェノール系化合物を、■はイソフラボン及びクマリン系化合物を、そして▤はキノン系化合物による結果を表す。NDは実験していないものを示す。点線はTPAだけの処理で、天然化合物を加えていない場合のルシフェラーゼ活性を示す。