

厚生科学研究費補助金
エイズ対策研究事業

HIV 感染予防に関する研究

平成 12 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 竹森 利忠

平成 13 年 3 月

平成12年度厚生科学研究費補助金(エイズ対策研究事業)
「HIV感染予防に関する研究」班 報告書目次

I.	平成12年度研究組織	1
II.	総括研究報告 HIV感染予防に関する研究 主任研究者： 竹森 利忠 (感染研・免疫部)	2-11
III.	分担研究報告		
1.	新規ワクチンの手法に関する研究 狩野 宗英 (感染研・エイズ研究センター)	12-14
2.	エイズDNAワクチン及び併用ワクチン/マカクサルエイズモデル における検討 俣野 哲郎 (感染研・エイズ研究センター)	15-17
3.	SHIVを用いた弱毒生ワクチンに関する研究—SHIV-経鼻免疫サ ルにおける粘膜免疫誘導能と強毒ウイルス(SHIV-89.6P)に対する 経腔感染防御効果 速水 正憲 (京大ウイルス研・エイズ研究施設)	18-22
4.	SIV感染と宿主応答における糖鎖の意義に関する研究 森 一泰 (感染研・エイズ研究センター)	23-30
5.	エイズDNAワクチン開発に関する研究 奥田 研爾 (横浜市大医・細菌学)	31-35
6.	酵母スフェロプラストから出芽させたHIV Gag粒子の解析 森川 裕子 ((財)北里研・基礎研ウイルス) 後藤 俊幸 (大阪医科大・微生物学)	36-40
7.	リコンビナントウイルス様中空粒子(VLP)を用いたHIV経口ワク チンの開発に関する研究 保富 康宏 (三重大医・生体防御医学)	41-46
8.	ケモカインレセプターを介したHIV感染予防に関する研究 杉村 和久 (鹿児島大工・生体工学) 伊東 祐二 (鹿児島大工・生体工学) 橋口 周平 (鹿児島大工・生体工学) 中島 秀喜 (鹿児島大・歯学部) 中島 敏博 (財・化学及血清療法研究所)	47-65
9.	Cross-clade immunodeterminant CTLエピトープの同定とその解析 滝口 雅史 (熊本大医・エイズ研究センター)	66-71
10.	レトロウイルスgag抗原上の感染防御エピトープとペプチドワク チン投与マウスで誘導されるエフェクター機能の解析 宮澤 正顕 (近畿大医・免疫学) 岩波 礼将 (近畿大医・免疫学) 丹羽 淳子 (近畿大医・免疫学) 河原佐智代 (近畿大医・免疫学)	72-78

菅原 大輔 (近畿大医・免疫学)

11. 抗レトロウイルス粘膜免疫活性に関する研究 竹森 利忠 (感染研・免疫部) 吉澤いづみ (感染研・免疫部) 緒方 昭典 (感染研・免疫部) 高橋 宜聖 (感染研・免疫部) 横田 恭子 (感染研・免疫部)	79-84
12. HIVに対するペプチドワクチン作製のための基礎研究 小笠原一誠 (滋賀大医・病理学)	85-89
13. エイズワクチンアジュバント(リポソーム)に関する研究 水落 次男 (東海大工・生命科学) 中島 直也 (東海大工・生命科学) 中田 宗宏 (東海大工・生命科学)	90-94
14. 抗原提示とT細胞活性化に関する研究 水落 利明 (感染研・細菌血液製剤部) 笠井 道之 (感染研・細菌血液製剤部)	95-101
15. HIV感染モデルの作製 吉木 敬 (北大医院・病態分子病理)	102-103
16. HIV脳炎の発症病理に関する研究 佐多徹太郎 (感染研・感染病理部) 中島 典子 (感染研・感染病理部) 佐藤 由子 (感染研・感染病理部)	104-107
17. HIV-1持続感染成立機序と阻止に関する研究 神奈木真理 (東京医科歯科大院・免疫治療学)	108-111
18. エイズ日和見感染発症阻止のための免疫学的・細菌学的研究 牧野 正彦 (感染研・ハンセン病研究センター)	112-116
19. SHIV病原性に関する研究 阪井 弘治 (感染研・エイズ研究センター)	117-122
20. サルエイズ脳炎発症モデルに関する研究 向井鑑三郎 (感染研・筑波霊長類センター) 佐多徹太郎 (感染研・感染病理部) 小松原博文 (感染研・筑波霊長類センター) 菊池 俊彦 (感染研・筑波霊長類センター)	123-131
21. HIV由来浮遊抗原ペプチドによる特異的CTLのアポトーシス誘導 高橋 秀実 (日本医大・微生物免疫学) 高橋めぐみ (日本医大・微生物免疫学) 中川 洋子 (日本医大・微生物免疫学)	132-136
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	137-140

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）HIV 感染予防に関する研究班

平成 12 年度研究組織

- 主任研究者： 竹森 利忠（国立感染症研究所・免疫部・部長）
- 分担研究者： 狩野 宗英（国立感染症研究所・エイズ研究センター・研究員）
- 俣野 哲朗（国立感染症研究所・エイズ研究センター・主任研究員）
- 速水 正憲（京大ウイルス研・エイズ研究施設・感染病態研究領域・教授）
- 森 一泰（国立感染症研究所・エイズ研究センター・主任研究員）
- 奥田 研爾（横浜市大医・細菌学教室・教授）
- 森川 裕子（(財)北里研・基礎研ウイルス第 2 研究室・室長）
- 保富 康宏（三重大医・生体防御医学講座・助教授）
- 杉村 和久（鹿児島大工・生体工学科・教授）
- 滝口 雅文（熊本大医・エイズ研究センター・ウイルス制御分野・教授）
- 宮澤 正顯（近畿大医・免疫学教室・教授）
- 小笠原一誠（滋賀大医・病理学教室・教授）
- 水落 利明（国立感染症研究所・細菌血液製剤部・室長）
- 水落 次男（東海大工・生命科学科・教授）
- 吉木 敬（北大医院・病態分子病理・教授）
- 佐多徹太郎（国立感染症研究所・感染病理部・部長）
- 神奈木真理（東京医科歯科大院・免疫治療学分野・教授）
- 牧野 正彦（国立感染症研究所・ハンセン病研究センター・部長）
- 阪井 弘治（国立感染症研究所・エイズ研究センター・研究員）
- 向井鏝三郎（国立感染症研究所・筑波霊長類センター・室長）
- 高橋 秀実（日本医大・微生物免疫学教室・教授）

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
総括研究報告書

HIV 感染予防に関する研究

主任研究者 竹森 利忠 国立感染症研究所・免疫部長

研究要旨

HIV 感染予防に有用となる技術の開発・基礎研究並びに HIV 感染に伴う疾病の発症の解明とその予防に関する研究を行った。この結果、局限性 SIV DNA ワクチン/SIVgag 組み込みセンダイウィルス併用接種が強毒 SHIV 感染に対し、強い防御効果を示すことが明らかにされた。また nef 欠損 SHIV 及び糖鎖欠損 SIVmac が弱毒生ワクチンとして有効であることが明らかにされた。更にウィルス中空粒子(VLP)やアデノ随伴ウィルス(AAV)の粘膜免疫へのデリバリーとしての有効性が確認されるとともに、今後のワクチンデザインに有用となる HIV clade E, clade B 共通の細胞傷害性 T 細胞 (CTL) エピトープが同定された。一方、モデル動物実験系を用いて、レトロウィルス感染防御における NK 細胞の役割、粘膜産生 CTL 記憶細胞の局在と性状などが明らかにされた。また HIV 感染に伴う脳炎発症を正確に把握する新しい病理学的検査技術や潜伏感染を試験管内で再現するシステムが確立され、その他サルモデルでの脳炎発症ウィルスのトロピズムの確認、新たな SHIV クローンの確立等が行われた。

A. 研究目的

本研究は HIV 感染予防に関する手段を確立すること、また HIV 感染に伴う主要病因を明らかにし、その予防に有用となる手段を確立することを目的とする。またこれらの技術の改良、開発に必要な情報、材料、技術の整備に有用となる基礎的研究をこなう。このため、(1) 感染防御を可能にする新規ワクチンの開発、(2) HIV 感染を契機とする脳炎、免疫不全等の病態の解明、並びに日和見感染の予防法の確立、(3) HIV 及びレトロウィルス感染に対する細胞障害性 T 細胞 (CTL) や粘膜免疫反応の解明、動物モデルの作製を目標とする研究を行った。

B. 研究方法

(1)DNA ワクチンウィルスベクター併用感作

において、局限性 SIV DNA ワクチン接種後 12 週後に SIVgag 組み込みセンダイウィルスベクターを接種した。接種後特異的に血中ウィルス量及び CD4 陽性 T 細胞数を測定するとともに、中和抗体及び gag 特異的キラー T 細胞の活性を測定した(俣野)。また対照として、各 SIV DNA ワクチン、gag センダイウィルス単独投与でのワクチン効果、免疫反応を測定した(狩野)。

(2)SIVmac 239 外被蛋白質アミノ基 79, 146, 171, 460, 479 のアスパラギン結合型糖鎖を欠く変異ウィルス(delta5G)を作製し、アカゲザルに接種後、経時的にウィルスの産生、中和抗体産生及び CTL 活性の測定を行った。また、感染 40 週後に親株 SIVmac239 ウィルスを接種し、ワクチン効果を SIVmac239 のウィルス量及び CTL 活性を測定することに

より判定した (森)。

(3)nef 欠損 SHIV をアカゲザルの鼻腔粘膜に感染させ、感染後のウイルス産生量、CD4 陽性 T 細胞数変動を計測した。さらに強毒株である SHIV89.6P を感染させウイルス産生量、CD4 陽性 T 細胞数を測定し、感染防御能を解析した (速水)。

(4)Gag 蛋白 cDNA をシャトルベクターの GAP プロモーターに組み込み酵母細胞を形質転換した。細胞壁を消化した後培養し、培養上清中の VLP を精製し、ウイルス学的、生化学的性状を解析した (森川)。

(5)E 型肝炎ウイルス ORF2 の C 末に HIVenv 中和エピトープを挿入し、組み換えバキュロウイルスを作製し、Fn5 細胞で培養し、上清中の VLP を回収した。VLP を BALB/c マウスに経口投与し、投与後の免疫活性及び HIVenv 発現ワクチニアウイルスを投与し、感染防御性を調べた (保富)。

(6)AAV に HIVenv 遺伝子を組み込みマウスへ感染させ、HIVenv 特異的免疫反応を解析した。また AAV ワクチンの有効性を検討する目的で、AAV にインフルエンザウイルス HA 遺伝子を組み込み感染させ、2ヶ月後にインフルエンザウイルス PR8/34 を感染させ防御効果を検討した (奥田)。

(7)抗ヒト CCR5 抗体を用い M13 ファージディスプレイライブラリーをバイオパンニングして抗体結合ファージクローンを単離した。

各クローンに含まれる7残基アミノ酸の配列を明らかにするとともに、各ファージクローン存在下で R5HIV-1 の感染阻害実験を行った (杉村)。

(8)HLA-A11 拘束性の HIV cladeB の CTL エピトープと一致する cladeE 特異的ペプチドを合成した。HLA-A11 ハプロタイプを示す日本人とタイ人の HIV 感染者末梢血をペプチドで刺激しそれぞれの CTL 活性を測定した (滝口)。

(9)フレンド白血病ウイルス (FLV) 外被蛋白上の CD4 陽性 T 細胞エピトープ合成ペプチドを (BALB/c × C57BL/6) F₁ マウスに1回免疫後、FLV を感染させ、感染後ウサギ抗 NK 細胞抗体、正常血清を投与し、感染活性を観察した。また、免疫マウス脾臓 T 細胞の活性を調べた (宮澤)。

(10)リコンビナント p24 とコレラトキシンをマウス鼻腔に投与し、投与後160日まで経時的に鼻腔内付随粘膜リンパ組織 (NALT)、その流入経路の深頸部リンパ節 (PCLN) 及び脾臓中 T 細胞の p24 特異的 CTL 活性を測定した。また腸管上皮を含む各組織より CTL クローンを確立し、各クローンの細胞受容体のサブタイプ及び細胞障害活性を解析した (竹森)。

(11)インフルエンザをリポソーム内に入れ抗 CD40 抗体とともに鼻腔に投与した。投与後インフルエンザウイルスを感染させ、肺内でのウイルス活性を MDCK 細胞を用いて測定した (小笠原)。

(12)オリゴマンノースを導入した人工糖脂質で被覆したリポソームにマウスレトロウイルス LP-BM5 の Gag ペプチドを封入した。このリポソームをマウス皮下に一回投与後、ウイルスを感染させ防御効果を検討した (水落・次)。

(13)胸腺より抗原提示細胞株を確立し、抗原提示能力に関与する細胞内小胞内 MHC クラス II 複合体のプロセッシングを解析した (水落・利)。

(14)ヒト CD4 及び CXCR4 または CCR5 遺伝子を発現するラット繊維芽細胞を確立し HIV-1 感染させた。感染後さらに、cyclinT1 および CIITA 遺伝子を導入しウイルスの産生を検討した (吉木)。

(15)5'末端にビオチン一個、3'末端に AT の繰り返し配列を付加した SIV および HIVgag, env, nef 等に対するオリゴヌク

レオチドプローブを作成し、病理切片と反応させた後 3 末端 AT 配列に多くのハプテンを取り込ませ、このハプテンを HRP 等の酵素で検出した（佐多）。

(16)SIVmac239 ウイルス株感染後脳炎を発症したサル脳組織よりウイルス産生細胞株由来ウイルスと脳炎発症サル血中、髄液中ウイルスの塩基配列の比較を行った（向井）。

(17)健常人末梢血より Raji 細胞刺激と IL-2 の存在下でアロ抗原特異的 T 細胞株を樹立した。一方末梢血を PHA で刺激し HIV で感染後 AZT と IL-2 を添加し培養した T 細胞を持続感染細胞として用いた（神奈木）。

(18)健常人末梢血より GM-CSF+IL-4 の添加培養により樹状細胞を樹立し、らい菌 Thai53 株あるいは BCG 菌を感染させた。感染後および T 細胞の増殖応答を測定した（牧野）。

(19)SHIV-C2/1 感染サル細胞より PCR によりプロウイルスゲノムを増幅後再構築して SHIV-C2/1 のクローンプラスミドを作製し COS7 に感染後培養上清中のウイルスを得た。ウイルス感染性はアカゲザル、カイカイザルを用いて解析した（阪井）。

(20)HIV-1env 蛋白 gp160 特異的 CTL クローンを標的細胞の存在下、非存在下で培養した後最小認識エピトープペプチドで再刺激し細胞死の有無を調べた（高橋）。

（倫理面への配慮）

健常人あるいは感染者からの血液は、研究の内容等を説明するなど十分なインフォームドコンセントを取った上で使用し、さらに個人が判別出来ない様に処理し、いかなる個人の情報も露出

しないよう細心の注意を払った。剖検材料に関して、診断の為に保存されているものであるから、その目的にのみ使用し、個人が特定出来ない様守秘義務を守った。また動物実験は各研究機関の実験指針に従って行った。

C. 研究結果

(1) 新規ワクチン開発研究

(イ) SIVgag 組み込みセンダイウイルスベクターと限局性 SIVDNA ワクチンとを組み合わせた併用接種により病原性 SHIV 感染に伴うウイルス血漿と AIDS 発症が強く抑制されることが明らかとなった（狩野・俣野）。

(ロ)弱毒性生ワクチン開発に関して、nef 欠損 SHIV の経鼻投与により膈粘膜を介した粘膜 SHIV 感染に対して防御効果を有することが示唆された（速水）。またウイルス外被蛋白上の 5 個の糖鎖を欠失した SIVmac の感染は継続的なウイルス産生を誘導せず、再度親株ウイルスを感染させてもウイルス量の増加は認められない。従って 5G SIVmac は新たなカテゴリーに属する弱毒生ワクチンとして有効な防御効果を有することが示唆された（森）。

(ハ)ウイルス様中空粒子 (VLP) を利用するワクチン開発で、ウイルス発現ベクターを用いずに酵母細胞で HIVgag 発現 VLP を作製する技術が確立された（森川）。また、HIVenv エピトープ組み込み E 型肝炎ウイルス由来 VLP が抗 env 特異的免疫反応を惹起し、HIVenv エピトープ組み込みワクチニアウイルス感染防御能に効果のあることが示唆された（保富）。

(ニ)DNA ワクチン併用ウイルスベクターとしてのウイルスベクター (AAV) が検討され、インフルエンザ HA 遺伝子組み込み AAV がインフルエンザ感染防御に有効であることが示唆された。また、HIVenv 遺伝子組み込

み AAV が env に対する液性、細胞性免疫を惹起することが確かめられた(奥田)。

(ホ)抗ヒト CCR5 抗体を用い M13 ファージディスプレイライブラリーより 2D7/m6 と呼んだ7残基アミノ酸モチーフを提示するファージクローンを単離し、このクローンが濃度依存的に R5 HIV-1 感染を阻害することが明らかにされた(杉村)。

(2)抗 HIV またはレトロウイルス免疫反応研究

(イ)日本人およびタイ人間で高頻度に発現する組織適合成抗原 HLA-A-11 拘束性の HIV clade B 及び clade E 共通の細胞傷害性 T リンパ球(CTL)のエピトープが同定された(滝口)。

(ロ)マウスフレンド白血病ウイルス(FLV) env 領域には CD4 陽性 T 細胞活性エピトープが提示される。このエピトープの合成ペプチドを免疫すると NK 細胞を介した FLV 感染防御が誘導され、なんらかの CD4 陽性 T 細胞と NK 細胞のネットワークが示唆された(宮澤)。

(ハ)粘膜由来抗 p24 特異的記憶 CTL が粘膜局所及び全身のリンパ組織に分布し、特に所属リンパ節で長期に維持されることが明らかとなった。これらの細胞集団は多様な T 細胞受容体サブクラスを発現するとともに異なった CTL 活性を有することが示唆された(竹森)。

(ニ)粘膜樹状細胞を活性化すると MHC class I 非拘束性に CTL を介した感染防御が誘導されることが示唆された(小笠原一誠)。

(ホ) LP-BM5 の Gag ペプチドを封入したリポソームをマウス皮下に一回投与すると、ウイルス感染死に対する延命効果が得られた(水落・次)。

(ハ)抗原提示の活性分子探索のための細胞株が確立された(水落)。

(ト)ヒト CD4/CXCR4 発現ラット繊維芽細胞に HIV-1 を感染させるとプロウイルスのゲノム内への組み込みが確認された。この細胞に cyclinT1 と CIITA 遺伝子を同時に発現させると微量ながら p24 蛋白の発現が認められた(吉木)。

(3)HIV 感染における脳炎、免疫不全等の発症の解明と予防法の確立

(イ)HIV 感染脳炎発症解析のために鋭敏な新規病理学的遺伝子発現解析システムが確立された(佐多)。

(ロ)HIV 持続感染阻止のためのモデル系が確立された。またアロ抗原特異性 T 細胞が感染抑制を誘導する因子を分泌することが示唆された(神奈木)。

(ハ)樹状細胞を介したライ菌免疫反応活性が他の抗酸菌と比較し低いことが示唆された(牧野)。

(ニ)SHIV 病原性検討のため SHIV-C2/1 クローンウイルスが樹立された(阪井)。

(ホ)SIV 感染脳炎発症サル由来脳組織より確立した細胞が産生するウイルスには R5SIV に特徴的な点変異が蓄積することが示唆された(向井)。

(ハ)試験管内で Gag 特異的に活性された CTL に最少エピトープペプチドを添加することにより細胞死が誘導された(高橋)。

D. 考察

本年度の研究において、SIVgag 組み込みセンダイウィルスベクターと限局性 SIV DNA ワクチンとを組み合わせた併用ワクチン接種が強毒 SHIV 感染防御効果において極めて優れていることが示された。安全性、有効性の向上について今後さらに技術改良が必要とされるが、現時点で、その効果、簡単なワクチンスケジュールから考え臨床応用へ有望視される。また弱毒生ワクチンもその効果において

強力であることが確認された。この範疇のワクチンの最も大きな問題はどのように安全性を証明できるかにある。しかし今後のベクター技術革新を視野にいれば、本研究の追求は必要である。一方、酵母細胞をもちいた HIVgagVLP の産生技術は、ワクチン開発技術の位置付けながら、酵母からの変異体の獲得が容易であり、このシステムを利用したウイルス出芽の分子機構の解明が期待される。また新規技術を用いて R5HIV-1 感染を阻害するペプチドモチーフが同定された。しかしこの阻害効果は抗 CCR5 抗体と比較すると弱く、新たな探索が必要とされた。

HIV 感染防御では CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の役割が重要視されている。HIV 感染者では、CTL が機能的に不全である場合が多く、この原因を明らかにすることは感染防御の手段を考慮する上で重要となる。本研究では、HLA-A-11 ハプロタイプを有する感染者の HLA-A-11 拘束性エピトープに対する CTL 活性が調べられ、その結果、無反応を示す症例が少なからず存在することが示唆された。この原因が、各感染者における CTL の異なったダイナミクスに依存するのか、あるいは各感染者における CTL の機能的差に由来するか、今後の解析が必要とされる。ネズミ粘膜由来 gag 特異的 CTL 記憶細胞クローンにおいても、再活性の際に CTL 活性に強弱が生じることが認められているが、調節要因は不明である。今後の検討が必要とされる。

レトロウイルス CD4 陽性 T 細胞活性エピトープの刺激で、感染防御 NK 細胞が賦活された結果は、NK 細胞と CD4 陽性 T 細胞間の相互作用の介在による防御機構の成立を示唆し興味深い。NK 細胞の活性分子 NKp46 の標的が、センダイウイルス HN、インフルエン

ザ、パラインフルエンザウイルスの HA であることが報告されている。これまでに HIV 感染防御での NK 細胞の関与について総合的に解析された例は少なく、他の NK 活性分子がレトロウイルス遺伝子産物を認識するか否か今後検討に値すると思われる。

E. 結論

本研究において DNA ワクチン/センダイウイルスベクター併用接種により強いワクチン効果が得られることが明らかとなった。また弱毒生ワクチンの有効性が確認されるとともに、その他新しい技術を用いたワクチンあるいは防御技術の開発が行われ、今後の発展が期待された。また基礎研究において感染防御における NK 細胞の役割が認められるとともに、粘膜免疫活性と維持等について新しい知見を得た。更に HIV 感染の新しい病理学的診断法や潜伏感染解析のための新しいシステムが確立された。

F. 研究発表

(1) 国内

1. 総説発表

桑田岳夫、宇井雅博、速水正憲 遺伝子欠損 SHIV を用いた AIDS 弱毒生ワクチンの開発
エイズ学会誌, 2, 49-57, 2000

杉村 和久、吉満 正明、御手洗 睦和、新村 靖彦 感染症における最近のトピックス : HIV-1 エントリーインヒビター, 臨床免疫, *in press*, 2001 国外

宮澤正顕 抗 gp70 自己抗体の病変誘発能と抗原エピトープ特異性の解析. 細胞科学, 11, 63-76, 2000

高橋秀実 HIV エピトープとキラー T 細胞
臨床免疫, 34, 204-213, 2000

2. 学会発表(本研究に関わる主なもの)

俣野哲郎、狩野宗英、加藤 篤、網 康至、森 一泰、佐多徹太郎、永井美之：DNA ウイルスベクター併用エイズワクチン：マカクサルモデルでの解析。第 48 回日本ウイルス学会総会。津。2000 年 10 月。

狩野宗英、加藤篤、網康至、森一泰、佐多徹太郎、永井美之、俣野哲郎 Gag 特異的細胞性免疫誘導ワクチン：マカクサルエイズモデルでの解析 第 48 回日本ウイルス学会総会。津市 2000 年 10 月 12-14 日

宇井雅博、鈴木 元、桑田岳夫、榎瀬良美、上坂浩実、宮崎恭行、伊吹謙太郎、高橋秀実、速水正憲：nef 欠損 HIV-1/SIVmac キメラウイルス (SHIV) 接種アカゲザルにおける抗原性の異なる SHIV-89.6P の静脈及び経膈攻撃接種に対する感染防御。第 14 回日本エイズ学会、京都、11 月 28 日-30 日, 2000.

SIV Env の糖鎖は持続感染、病原性の決定因子である、森 一泰、保富康宏、扇本真治、仲宗根正、本多三男、向井鏡三郎、塩田達雄、永井美之、日本エイズ学会、2000 年 11 月 28-30 日、京都

高村史記、武部豊、松尾和浩、保富康宏：ウイルス様中空粒子を用いた HIV 経口ワクチンの開発 第 14 回日本エイズ学会総会、2000 年 11 月 28-30 日 (京都)

杉村和久、御手洗睦和、新村靖彦、橋口周平、吉永圭介、吉満正明、伊東祐二、中島秀喜、吉崎和幸 HIV-1：エントリーインヒビターとスキン免疫 日本臨床免疫学会誌 23, 592-596, 2000

シンポジウム口演 日本臨床免疫学会 2000 年 9 月 東京

忻克勤、浜島健治、奥田研爾：AAV を用いたエイズワクチンの開発 第 14 回日本エイズ学会学術集会総会：京都 2000 年 11 月

森川裕子、後藤俊幸、佐野浩一：ヒト免疫不全ウイルス粒子の試験管内成熟。第 48 回日本ウイルス学会、三重、平成 12 年 10 月 12-14 日

深田勝彦、富山宏子、岡慎一、武部豊、滝口雅文：HIV-1 cross-clade CTL エピトープの同定 第 14 回日本エイズ学会学術集会・総会 (京都) 平成 12 年 11 月 28 日-30 日 口頭

丹羽淳子、阿部弘之、宮澤正顕、フレンド白血病レトロウイルス感染マウスの中和抗体産生に影響する non-MHC 遺伝子の解析、第 23 回日本分子生物学会年会、神戸、2000 年 12 月 13 日-16 日

佐藤裕樹、大橋一寛、清水佳隆、中田宗宏、小島直也、水落次男：マンノペンタオース被覆リポソームによるマクロファージへの物質移入、第 73 回日本生化学会大会 (横浜) 2000 年 10 月

笠井道之、水落利明 (口頭発表)：「胸腺髄質部上皮細胞と皮質部上皮細胞における MHC クラス II 分子に結合する CLIP (class II-associated invariant chain peptide) の相違」：第 30 回日本免疫学会学術集会 仙台：2000 年 11 月

庄谷祐子、上野智規、巽 正志、高橋秀宗、佐多徹太郎：サル細胞における HIV-1 複製制

御機構の解析。第 48 回日本ウイルス学会総会。津。2000 年 10 月。

小松原博文、菊池俊彦、佐多徹太郎、松田基夫、宇田晶彦、山田章雄、向井鏡三郎：中枢神経指向性 SIV の解析。第 14 回日本エイズ学会総会。2000 年 11 月。京都。

久保誠、増田貴夫、鶴谷直美、大橋貴、岩本愛吉、神奈木真理。HIV キャリア CD8 陽性細胞の HIV-1 抑制効果に対する MHC-I 発現低下の影響。第 48 回ウイルス学会、津、2000、10 月、口演

高橋めぐみ、中川洋子、新谷英滋、高橋秀実：浮遊ペプチド抗原によるキラー T 細胞のアポトーシス誘導。第 30 回日本免疫学会総会。2000 年 11 月 14-16 日（仙台）。

阪井弘治、篠原克明、高橋栄治、網康至、佐々木裕子、吉野直人、須崎百合子、仲宗根正、本多三男、「カニクイザルに病原性を示す SHIV-C2/1 株の分子クローニング」、第 14 回日本エイズ学会（口頭）：京都、平成 12 年（2000 年）11 月 28 日

(2) 海外

1. 論文発表(本研究に関わる主なもの)

Yoshizawa I., Soda, Y., Mizuochi, T., Yasuda, S., Rizvi, T. A., Mizuochi, T., Takemori, T. and Tsunetsugu-Yokota Y. Enhancement of mucosal Immune response against HIV-1 Gag by DNA immunization. *Vaccine, in press, 2001*

Xiao, Y., Kuwata, T., Miura, T., Hayami, M., Shida, H. Dox-dependent SIVmac with tetracycline inducible promoter in the U3 promoter region. *Virology, 269, 268-275, 2000*

Mori, K., Yasutomi Y., Ohgimoto S., Nakasone T., Takamura S., Shioda T. and Nagai N. A quintuple deglycosylated mutant of SIV in rhesus macaques. Robust primary replication, tightly contained chronic infection and elicitation of potent immunity against the parental wild-type strain. *J. Virol., in press, 2001*

Kano, M., Matano, T., Nakamura, H., Takeda, A., Kato, A., Ariyoshi, K., Mori, K., Sata, T., and Nagai, Y. Elicitation of protective Immunity against simian immunodeficiency virus infection by a recombinant sendai virus expressing the gag protein. *AIDS, 14, 1281-1282, 2000*

Matano T., Kano M, Odawara T, Nakamura H, Takeda A, Mori K, Sata T, Nagai Y. Induction of protective immunity against pathogenic simian immunodeficiency virus by a foreign receptor-dependent replication of an engineered avirulent virus. *Vaccine, 18, 3310-3318, 2000*

H Kato, H Bukawa, E Hagiwara, K-Q Xin, K Hamajima, S Kawamoto, M Sugiyama, M Sugiyama, E Noda, M Nishizaki, K Okuda. Rectal and vaginal immunization with a macromolecular multicomponent peptide vaccine candidate for HIV-1 infection induces HIV-specific protective immune responses. *Vaccine, 18, 1151-1160, 2000*

Kamei,A., Tamaki,S., Taniyama,H., Takamura,S., Nishimura,Y., Kagawa,Y., Uno-Furuta,S., Kaito,M., Kim,G., Toda,M., Matsuura,Y., Miyamura,T., Adachi,Y. Yasutomi,Y. Induction of hepatitis C virus specific cytotoxic T lymphocytes in mice by an intrahepatic inoculation with an expression plasmid. *Virology, 273, 120-126, 2000*

Iwanami, N., Niwa, A., Yasutomi, Y., Tabata, N., and Miyazawa, M. Role of natural killer cells in resistance against Friend retrovirus-induced leukemia. *J. Virol.*, *in press*, 2001

Yuko Morikawa, Mikiko Shibuya, Toshiyuki Goto, and Kouichi Sano. In vitro processing of human immunodeficiency virus type 1 Gag virus-like particle. *Virology*, 272, 366-374, 2000

M. Kaji, M. Ikari, S. Hashiguchi, Y. Ito, R. Matsumoto, T. Yoshimura, J. Kuratsu and K. Sugimura. Peptide mimics of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) with an antagonistic activity. *J. Biochem.*, *in press*, 2001

Hiroko Tomiyama Naoyuki Yamada Hiroki Komatsu Kazuo Hirayama Masafumi Takiguchi
A single CTL clone can recognize a naturally processed HIV-1 epitope presented by two different HLA class I molecules.
Eur. J. Immunol., 30, 2521-2530, 2000

Iwanami, N., A. Niwa, Y. Yasutomi, N. Tabata, and M. Miyazawa. Role of natural killer cells in resistance against Friend retrovirus-induced leukemia. *J. Virol.*, 75, *in press*, 2001

Ito, D., Ogasawara, K., Iwabuchi, K., Inuyama, Y., and Onoe, K. Induction of CTL responses by simultaneous administration of liposomal peptide vaccine with anti-CD40 and anti-CTLA-4 mAb. *J. Immunol.*, 164, 1230-1235, 2000

Shimizu, Y., Nakata, M., Matsunuma, J., Mizuochi, T. Simultaneous quantification of components of neoglycolipid-coated liposomes using high-performance liquid chromatography

with evaporative light scattering detection. *J. Chromatogr. B.*, *in press*, 2001

Kasai, M., H. Kropshofer, A. B. Vogt, B. E. Kominami C. T. Mizuochi. CLIP-derived self peptides bound to MHC class II molecules of medullary thymic epithelial cells differ from those of cortical thymic epithelial cells in their diversity, length, and C-terminal processing. *Eur. J. Immunol.*, 30, 3542-3551, 2000

Tanaka M, Endo K, Suzuki T, Kakita A, Takahashi H, Sata T. Parkinsonism in HIV encephalopathy. *Mov. Disord.*, 15, 1032-1033, 2000

N. Tsurutani, M. Kubo, Y. Maeda, T. Ohashi, N. Yamamoto, M. Kannagi, T. Masuda. Identification of critical amino acid residues in human immunodeficiency virus type 1 IN required for efficient proviral DNA formation at steps prior to integration in dividing and nondividing cells. *J. Virol.*, 74, 4795-4806, 2000

Takahashi, M., Nakagawa, Y., Berzofsky, J.A., Takahashi, H. Counter-regulation of cytolytic activity and cytokine production in human immunodeficiency virus (HIV) -1 -specific murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes by free antigenic peptide. *Int. Immunol.*, *in press*, 2001

Fujita, M., Sakurai, A., Doi, N., Miyaura, M., Yosida, A., Sakai, K. and Adachi, A. Analysis of the cell-dependent replication potentials of human immunodeficiency virus type 1 *vif* mutants. *J. Virol.*, *in press*, 2001

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

M. Makino, S. Wakamatsu S. Shimokubo N. Arima M. Baba. Production of Functionally Deficient Dendritic Cells from HTLV-I-Infected Monocytes: Implication for the Dendritic Cell Defect in Adult T Cell Leukemia. *Virology*, **274**, 140-148, 2000

Kannagi, M., Ohashi, T., Hanabuchi, S., Kato, H., Koya, Y., Hasegawa, A., Masuda, T., Yoshiki, T. Immunological Aspects of Rat Models of HTLV Type 1-infected T Lymphoproliferative Disease. *AIDS Res. Hum. Retrovir.*, **16**, 1737-1740, 2000

2. 学会発表

Matano, K., Kano, M., Takeda, A., Nakamura, H. and Nagai Y. SIV-Specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell response in macaques immunized with proviral DNA vaccine. Keystone Symposium : AIDS Vaccine in the New Millenium. March, 2001

K Okuda, L-J Liu, S Watabe, K Hamajima, B Wahren, K-Q Xin: Various routes of application of new type HIV-1 DNA vaccine induces strong antigen-specific immune responses. 13th International AIDS Conference

Fukada, K., H. Tomiyama, K. Miwa, Yutaro Kaneko, S. Oka, Y. Takebe, C. Wasi, and M. Takiguchi. CTL recognition for HLA-A*1101-restricted HIV-1 cross-clade epitopes. Keystone Symposium "Novel biological approaches to HIV-1 infection based on new insights into HIV biology" (Keystone, Colorado, USA) April 4-10, 2000

Ui, M., Kuwata, K., Suzuki, H., Miyazaki, Y.,

Uesaka, H., Hayami, M.: Potential use of nef-deleted SHIV derived from a nonpathogenic SHIV as a live-attenuated vaccine, that protected macaques against challenge infection of a heterologous pathogenic SHIV. 1st International Conference on Vaccine Development and Immunotherapy in HIV, Palm Beach, USA.

A role of the n-glycans of env as pathogenic thogenic determinants of SIV. K. Mori, Y. Yasutomi, S. Ohgimoto, T. Nakasone, M. Honda, R. Mukai, T. Shioda and Y. Nagai. 18th annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, October 4-7, 2000, Madison, Wisconsin, USA.

Miyazawa, M., Niwa, A., Iwanami, N., Uenishi, H., and Tabata, N. Multiple effector mechanisms induced by a single-epitope CD4⁺ T-cell vaccine acting against immunosuppressive Friend retrovirus infection. 12th International Workshop on Retroviral Pathogenesis. Annapolis. October 29 - November 1, 2000.

Maeda Y., B. V. Hoang, S. Shrisungngam, S. Maeda, P. J. Brennan, Y. Kashiwabara, and M. Makino. Molecular and immunological analysis of a protein against leprosy. International Symposium on Mycobacterial Diseases: Pathogenesis, Protection and Control. Bose Institute, Calcutta, India. Jan. 10, 2001

First HIV Drug Resistance Program: Yokomaku, Y., Matsuda, Z., Sugiura, W., Matsuda, M., Sakai, K., and Nagai, Y., "Phenotypic analysis of HIV-1 protease by virus like particle (VLP) ELISA", Virginia, USA, Dec. 4, 2000.

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

1) 森川裕子

ウイルス様粒子及びその製造法

特願 2000-239903 平成 12 年 8 月 8 日出願

2) 阪井弘治

後天性免疫不全症候群の非ヒト霊長類モデル

特願 2000-360274 平成 12 年 11 月 27 日出願

3) 俣野哲郎

申請中

新規ワクチンの手法に関する研究

分担研究者 狩野 宗英 国立感染症研究所エイズ研究センター研究員

研究要旨

近年、HIV-1 感染防御における宿主細胞性免疫の役割が注目され、その重要性が指摘されている。そこで本研究では、安全にかつ効率よくウイルス特異的細胞性免疫を誘導するエイズワクチンの開発を目的として、限局的複製誘導 DNA ワクチンとセンダイウイルス(SeV)ベクターワクチンという2つの新規ワクチン手法について、マカクサルエイズモデルにて解析を行った。前者は、サル免疫不全ウイルス(SIV)の env を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 DNA と FMLV レセプター DNA とを接種することにより、FMSIV の FMLV レセプター依存的限局的複製を誘導するものである。後者は、SIV Gag 発現組換え SeV ベクター(SeV-Gag)を接種するものである。動物実験では、限局的複製誘導 DNA ワクチン接種により、従来の DNA ワクチンと比較してより効率よく SIV 特異的 CD8 陽性 T 細胞が誘導された。また SeV-Gag 接種によっても Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞の誘導が確認された。さらに SIV challenge 後の長期観察結果から、各手法ともエイズ発症防御あるいは遅延効果を有することが明らかとなった。以上より、これら2つの方法は、ウイルス特異的細胞性免疫を誘導する新規エイズワクチン手法として有用であることが示された。

A. 研究目的

近年、HIV-1 感染防御における宿主細胞性免疫の役割が注目され、その重要性が指摘されている。従って、エイズワクチン研究においても、ウイルス特異的細胞性免疫を誘導する手法の開発が期待されている。ワクチン手法としては、抗原を投与するものと抗原を発現させるものがあるが、細胞性免疫誘導には後者の方が有利である。後者では、DNA ワクチンとウイルスベクターワクチンとが代表的であるが、未だ有効性の点で満足できるものは得られていない。そこで本研究では、安全にかつ効率よくウイルス特異的細胞性免疫を誘導するエイズワクチンの開発を目的として、限局的複製誘導 DNA ワクチンとセンダイウイルス(SeV)ベクターワクチンという、2つの新規ワクチン手法について、サル免疫不全ウイルス(SIV)感染マカクサルエイズモデルにて解析を行った。

前者の限局的複製誘導 DNA ワクチンシステムは、SIV の env を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 DNA と FMLV レセプター DNA とを接種するものである。FMSIV の FMLV レセプター(mCAT1)依存的限局的複製が誘導されることにより、安全性の点で弱毒化生ワクチンより優れ、さらに有効性の点で従来の DNA ワクチンより優れることが期待される。後者の SeV ベクターワクチンシステムは、SIV 抗原を発現する組換え SeV ベクターを接種するものである。培養細胞レベルでの高い遺伝子導入・発現効率が見られる SeV ベクターを用いることにより、サルレベルにおいても、他のベ

クターと比較して効率よい抗原発現および免疫誘導が期待される。本研究では、まず抗原として SIV Gag を使用し、Gag 発現組換え SeV ベクター(SeV-Gag)接種実験を行った。

各々のワクチン手法について、その有効性を検討する目的で、まずワクチン接種後の SIV 抗原特異的細胞性免疫誘導効率を解析した。さらに、ワクチン接種サルの SIV challenge に対する抵抗性について長期的に検討した。

B. 研究方法

(1) ワクチン接種後の抗原特異的細胞性免疫誘導効率の解析： 以下の2つのワクチン接種実験において、抗原特異的刺激後のインターフェロン γ (IFN- γ)陽性細胞を検出することにより、末梢血リンパ球中の抗原特異的 CD8 陽性 T リンパ球の頻度を定量した。

(1-1) サルへの限局的複製誘導 DNA ワクチン接種実験： 赤毛サル6頭を、FMSIV DNA のみ接種する対照群2頭（複製のない従来の DNA ワクチンに相当）と FMSIV + mCAT1 DNA ワクチン接種群4頭（限局的複製誘導 DNA ワクチン）の2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4回（0, 0.5, 1, 6 週目）行った。ワクチン接種開始後8週目および12-14週目の血液から分離したリンパ球について、SIV 特異的 CD8 陽性 T リンパ球の頻度を定量した。

(1-2) サルへの SeV-Gag ワクチン接種実験： 赤毛サル5頭を、コントロール SeV を接種する対

照群 2 頭と SeV-Gag 接種群 3 頭の 2 群に分けた。SeV 接種は経鼻的に 1 回行った。接種開始後 3 週目の血液から分離したリンパ球について、Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球の頻度を定量した。

(2) ワクチン接種サルへの SIV challenge 後の長期的検討：以下の 2 つのワクチン接種実験において、SIV challenge 後の長期経過を観察し、エイズ発症防御効果を検討した。具体的には、plasma 中の SIV RNA コピー数、末梢血中の CD4 陽性 T リンパ球数などを検討した。発症は、末梢血中の CD4 陽性 T リンパ球数、体重変化などから判断した。

(2-1) サルへの限局的複製誘導 DNA ワクチン接種実験：赤毛サル 5 頭を、ナイーブ対照群 1 頭、FMSIV DNA のみ接種する対照群 1 頭、限局的複製誘導 DNA ワクチン接種群 3 頭の 3 群に分けた。ワクチン接種開始後 24 週目に、病原性 SIVmac239 (100 TCID₅₀) を静注した。

(2-2) サルへの SeV-Gag ワクチン接種実験：カニクイサル 4 頭を、ナイーブ対照群 1 頭、コントロール SeV 接種対照群 1 頭、SeV-Gag 接種群 2 頭の 3 群に分けた。ワクチン接種開始後 22 週目に、病原性 SIVmac239 (100 TCID₅₀) を静注した。

なお、全ての動物実験は、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た。

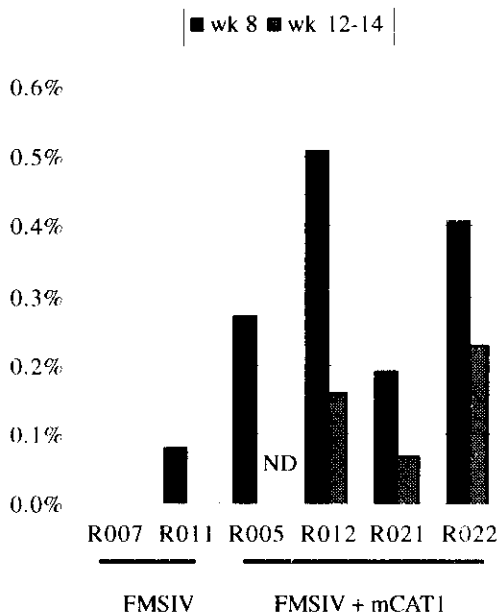


図 1 DNA ワクチン接種サルにおける SIV 特異的 CD8 陽性 T リンパ球の頻度 (SIV 特異的抗原刺激後の CD8 陽性 T リンパ球中の IFN- γ 陽性細胞の頻度)

C. 研究成果

(1) 抗原特異的細胞性免疫誘導効率の解析：

(1-1)

(図 1) 対照群 2 頭 (従来の DNA ワクチン) と比較して、限局的複製誘導 DNA ワクチン接種群 4 頭では、有為に高頻度の SIV 特異的 CD8 陽性 T リンパ球が認められた。

(1-2)

(図 2) Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球は、対照群 2 頭では認められなかったが、SeV-Gag 接種群では 3 頭ともに検出された。

(図 3) 一方、SIV 感染サルへのリンパ球を用いた解析で、SeV-Gag 感染細胞が、Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球刺激能を有することを確認した。

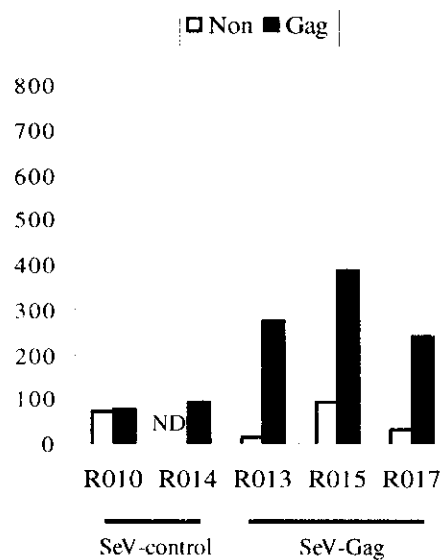


図 2 SeV ワクチン接種サルにおける Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球の頻度 (Gag 特異的抗原刺激後の 1×10^6 PBMC 中の CD8 陽性 IFN- γ 陽性 T 細胞数)

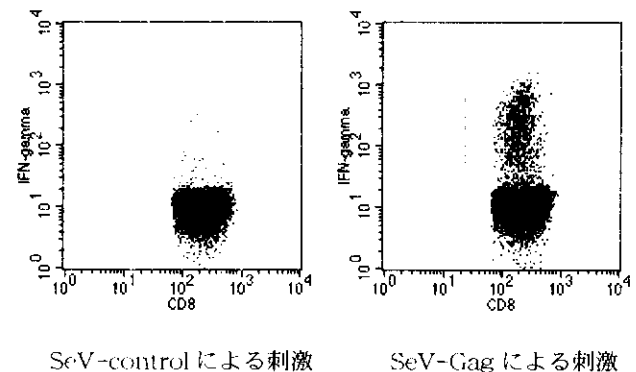


図 3 SeV-Gag 感染細胞との共培養による Gag 特異的 CD8 陽性 IFN- γ 陽性 T 細胞の誘導

(2) SIV challenge 後の長期的検討:

(2-1)

(図4) ナイーブ対照サルは、高い plasma SIV 量を維持しエイズ様所見を呈して17週目に死亡した。FMSIV DNAのみ接種した対照サルも、高い plasma SIV 量を維持し、30週目よりエイズ様所見を呈して、45週目に全身状態の悪化のため安楽死させた。一方、限局的複製誘導 DNA ワクチン接種群3頭の plasma SIV 量はピーク時より有為に低値を示し、SIV 投与後1年以上健在である。

(2-2)

(図5) ナイーブ対照サル、コントロール SeV 接種サルとも、半年以内に発症した。一方、SeV-Gag 接種群2頭の set-point plasma SIV 量は有為に低値を示した。しかし、2頭とも1年前後で発症した。

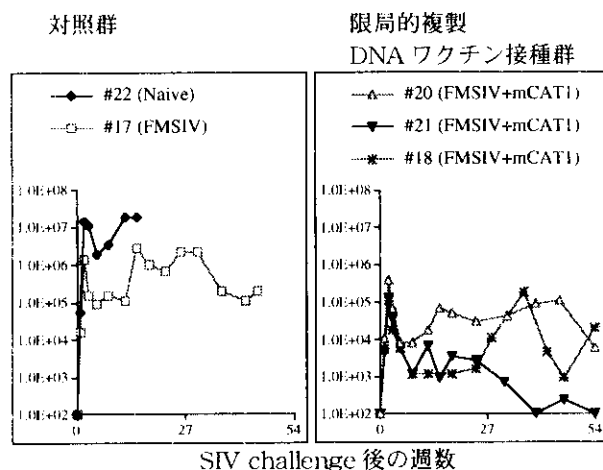


図4 DNA ワクチン接種サルにおける SIV challenge 後の plasma SIV RNA コピー数の変化

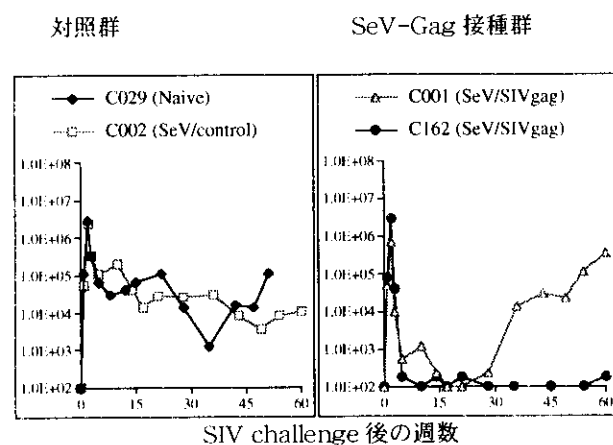


図5 SeV ワクチン接種サルにおける SIV challenge 後の plasma SIV RNA コピー数の変化

D. 考察

限局的複製誘導 DNA ワクチン、SeV-Gag ワクチンともに、SIV 抗原特異的細胞性免疫誘導能が優れていることが明らかとなった。さらに、各々のワクチン接種により、エイズ発症防御あるいは遅延効果が認められた。以上より、これら2つの方法は、ウイルス特異的細胞性免疫を誘導する新規エイズワクチン手法として有用であると考えられる。

E. 結論

我々の開発した2つの新規エイズワクチン手法について、サルエイズモデルでの解析をおこなった。限局的複製誘導 DNA ワクチン、SeV-Gag ワクチンともに、ウイルス抗原特異的細胞性免疫誘導能に優れ、エイズ発症の防御あるいは遅延効果を有することが明らかとなった。

F. 研究発表

1 論文発表

- (1) 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* 14:1281-1282, 2000.
- (2) Matano T, Kano M, Odawara T, Nakamura H, Takeda A, Mori K, Sata T, Nagai Y. Induction of protective immunity against pathogenic simian immunodeficiency virus by a foreign receptor-dependent replication of an engineered avirulent virus. *Vaccine* 18:3310-3318, 2000.

2 学会発表

- (1) 狩野宗英、中村浩美、武田明子、加藤篤、網康至、森一泰、佐多徹太郎、永井美之、俣野哲朗. Gag 特異的細胞性免疫誘導ワクチンのマカクサルエイズモデルにおける解析. 第1回熊本エイズセミナー. 9/1/2000.
- (2) 狩野宗英、加藤篤、網康至、森一泰、佐多徹太郎、永井美之、俣野哲朗. Gag 特異的細胞性免疫誘導ワクチン: マカクサルエイズモデルでの解析. 第48回日本ウイルス学会(津). 10/13/2000.

G. 知的所有権

特許申請中。

エイズ DNA ワクチン及び併用ワクチン/マカクサルエイズ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

エイズワクチン開発は世界的レベルの重要課題であるにもかかわらず、未だ有効なものは得られていない。中和抗体誘導の難しさが指摘される一方、HIV-1 感染防御における宿主細胞性免疫の役割が注目されている。本研究では、エイズ発症を予防するウイルス特異的細胞性免疫誘導ワクチンの開発を目的として、DNA ワクチンとセンダイウイルス(SeV)ベクターワクチンとの併用効果について、マカクサルエイズモデルにて解析を行った。DNA としてはサル免疫不全ウイルス(SIV)の欠損型 provirus DNA を用い、SeV ベクターとしては SIV Gag 発現組換えベクター(SeV-Gag)を用いた。challenge virus としては、急性の末梢血 CD4 陽性 T リンパ球減少(エイズ)を引き起こす強毒 SIV-HIV-1 キメラウイルス SHIV89.6PD を用いた。まず、pseudotype virus を用いた抗原刺激による SHIV 特異的 T リンパ球定量法を確立し、この方法により細胞性免疫を解析した。動物実験では、DNA ワクチン接種後の SeV-Gag 接種により顕著な booster 効果が認められ、高頻度の SHIV 特異的 CD4 陽性 T および CD8 陽性 T リンパ球が誘導された。SHIV challenge に対し、併用ワクチン接種群は顕著な抵抗性を示し、4 頭すべてにおいてエイズ発症が阻止された。一方、DNA あるいは SeV-Gag 単独接種群ではエイズ発症を充分には防御できなかった。以上より、この併用法は、ウイルス特異的細胞性免疫を誘導するエイズワクチンとして、有効性の点で非常に優れていることが示された。

A. 研究目的

エイズワクチン開発は世界的レベルの重要課題であるにもかかわらず、未だ有効なものは得られていない。その理由としては、中和抗体誘導が困難であること、および弱毒化生ワクチンの臨床応用が安全性の問題から困難であることが挙げられる。一方、近年、HIV-1 感染防御における宿主細胞性免疫の重要性が指摘されてきていることから、エイズワクチン研究においても、ウイルス特異的細胞性免疫を誘導する手法の開発が期待されている。そこで我々は、感染防御の key となる免疫機構を特定し、エイズ発症を予防するワクチンを開発することを目的として、効率よいウイルス特異的細胞性免疫誘導法を検討することとした。

ワクチン手法としては、我々がこれまでに開発し検討中の、限局的複製誘導 DNA ワクチンとセンダイウイルス(SeV)ベクターワクチンという、2つの新規ワクチン手法を併用した。限局的複製誘導 DNA ワクチンシステムは、サル免疫不全ウイルス(SIV)の env を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 DNA と FMLV レセプター DNA とを接種するものである。SeV ベクターワクチンとしては、SIV Gag 発現組換え SeV ベクター(SeV-Gag)を用いた。本年度は、この併用ワクチンによるエイズ発症予防効果を知る目的で、SIV-HIV-1 キメラウイルス(SHIV)感染マカクサルエイズモデルにて解析を行った。

B. 研究方法

1 SHIV 特異的 T リンパ球定量法の確立: SHIV の env, nef 領域を欠損させた provirus DNA (SIVGP1)を作成した。COS 細胞に SIVGP1 DNA と VSV-G 発現ベクター DNA とを co-transfection した後、上清を pseudotype virus SIVGP1(VSV-G)として回収した。サルより樹立した autologous B 細胞に SIVGP1(VSV-G)を感染させた後、サル血液より分離したリンパ球と共培養することにより、SHIV 特異的リンパ球刺激を行った。コントロール(非特異的刺激)には pseudotype virus MLV(VSV-G)を用いた。6 時間の共培養後、flow cytometry にて、細胞内インターフェロン γ (IFN- γ)陽性細胞を検出することにより、SHIV 特異的 CD4 陽性 T あるいは CD8 陽性 T リンパ球の頻度を定量した。

2 ワクチン接種後の SHIV 特異的細胞性免疫誘導効率の解析: 赤毛サル 14 頭を用い 4 群に分け実験を行った(表 1)。第 1 群の 4 頭はナীব对照群とした。第 2 群の 3 頭には、SeV-Gag 経鼻接種のみを 1 回行い、第 3 群の 3 頭には、限局的複製誘導 DNA ワクチンのみを接種した。第 4 群の 4 頭を併用ワクチン接種群とし、DNA ワクチン接種開始後 12 週目に SeV-Gag 経鼻接種を 1 回行った。ワクチン接種後経時的に採取したリンパ球中の SHIV 特異的 T リンパ球の頻度を定量した。

表1 サルワクチン実験プロトコール

Group	Vaccination	
第1群	4頭	Naive control
第2群	3頭	SeV-Gag ワクチン
第3群	3頭	DNA ワクチン
第4群	4頭	DNA + SeV-Gag ワクチン

3 SHIV challenge 後のエイズ発症防御の解析：
 前述の14頭に病原性SHIV89.6PDを10TCID50
 静注にてchallengeした。challenge inoculumに
 用いたlotは、これまで全例で急性の末梢血CD4
 陽性Tリンパ球減少(エイズ)が認められたものであ
 る。第2群・第3群にはワクチン接種開始後14週
 目、第4群にはワクチン接種開始後26週目(SeV-
 Gag接種後14週目)にchallengeした。経時的に、
 plasma中のSHIV RNAコピー数、末梢血中のCD4
 陽性Tリンパ球数などを検討した。

なお、全ての動物実験は、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た。

C. 研究成果

1 SHIV 特異的Tリンパ球定量法の確立： ウエ
 スタンプロットによりSIVGP1(VSV-G)感染B細
 胞におけるGag発現を確認した。次に、SIVGP1
 (VSV-G)感染B細胞上清中のGag p27量をELISA
 により定量し、数頭のサル由来のB細胞間で比較
 したところ、有意な差は認められなかった。従って、
 B細胞におけるSIVGP1(VSV-G)の感染発現効率
 は比較的安定しており、SHIV 特異的Tリンパ球定
 量のための抗原刺激に適していると考えられた。
 SIV慢性感染サルのリンパ球を用いて、この系で抗
 原刺激を行ったところ、CD4陽性IFN- γ 陽性T
 細胞およびCD8陽性IFN- γ 陽性T細胞のSHIV
 特異的誘導が検出された(図1)。

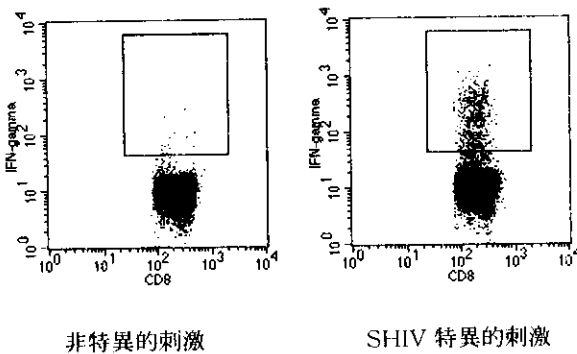


図1 SHIV 特異的CD8陽性T細胞の検出

2 ワクチン接種後のSHIV 特異的細胞性免疫誘
 導効率の解析： 第1群では、SHIV 特異的Tリ
 ンパ球は認められなかった。第2群では、ピーク
 時には良好なSHIV 特異的Tリンパ球誘導が認め
 られたが、challenge直前にはその頻度は検出限界
 レベルあるいはそれ以下まで低下していた。第3
 群では、第2群と比較して高頻度のSHIV 特異的
 Tリンパ球が検出された。第4群では、SeV-Gag
 接種後2週目に顕著なSHIV 特異的Tリンパ球誘
 導が認められ、challenge直前のその頻度も高値を
 示した。

3 SHIV challenge 後のエイズ発症防御の解析：
 第1群・第2群はすべて急性の末梢血CD4陽性T
 リンパ球減少を呈した。第3群では、3頭中1頭は
 CD4陽性Tリンパ球減少を呈し、他の1頭は中程
 度のCD4陽性Tリンパ球減少を呈したが、残り1
 頭にはCD4陽性Tリンパ球減少は認められなかつ
 た。一方、第4群の4頭すべてにおいてCD4陽性
 Tリンパ球減少は認められずエイズ発症は阻止され
 た(図2)。challenge後2週目(ピーク時)のplasma
 SHIV RNAコピー数については、CD4陽性Tリン
 パ球減少を示さなかったサルは、対照群と比較して
 顕著に低い値を示した(図3)。

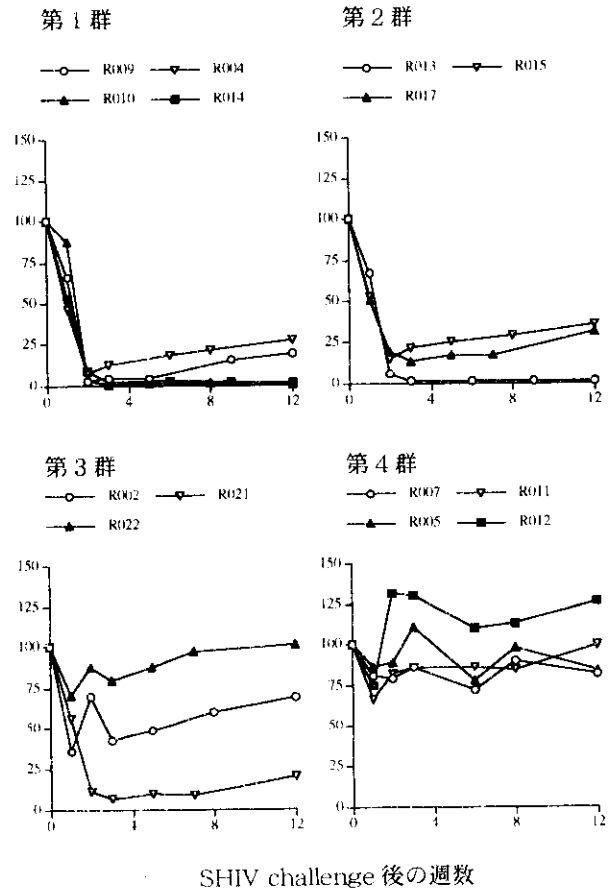


図2 SHIV challenge 後の末梢血CD4陽性Tリ
 ンパ球数の変化 (challenge時を100とした相対値)

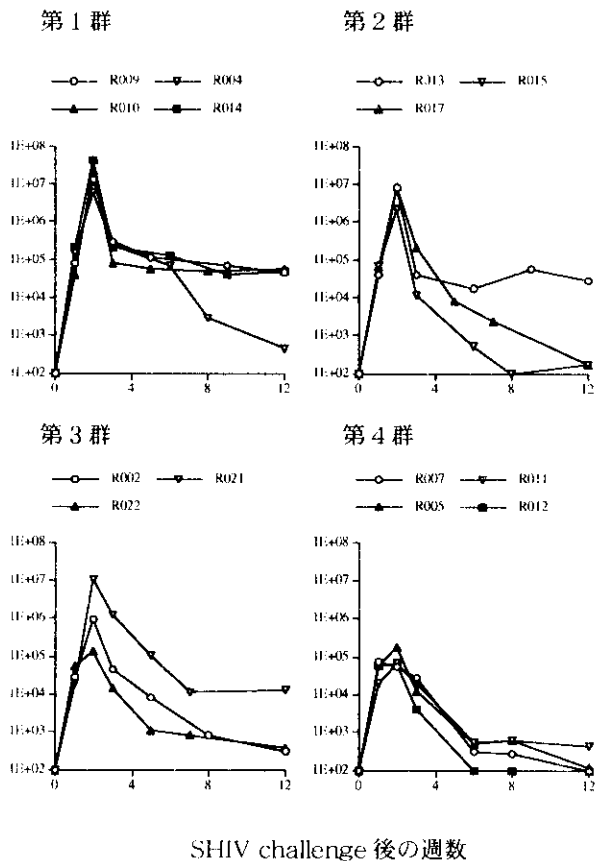


図3 SHIV challenge 後の plasma 中 SHIV RNA コピー数の変化

D. 考察

今回確立した SIVGP1(VSV-G)感染細胞による SHIV 特異的抗原刺激法は、SHIV 特異的 CD4 陽性 T および CD8 陽性 T リンパ球の定量に有用である。DNA ワクチンと SeV-Gag ワクチンとの併用では、SeV-Gag 接種による顕著な booster 効果の結果、高頻度の SHIV 特異的 CD4 陽性 T および CD8 陽性 T リンパ球が誘導されることが示された。SHIV challenge に対し、DNA あるいは SeV-Gag 単独接種ではエイズ発症防御に充分ではなかったが、併用ワクチン接種により顕著な抵抗性が誘導され、エイズ発症が防御されることが明らかとなった。以上より、この併用ワクチンシステムは、ウイルス特異的細胞性免疫誘導およびエイズ発症防御効果の点で非常に優れていると考えられた。

E. 結論

マカクサルエイズモデルでの細胞性免疫の解析のため、pseudotype virus を用いた抗原刺激による SHIV 特異的 T リンパ球定量法を確立した。この方法を用いて、proviral DNA ワクチンと SeV-Gag ワクチンとの併用効果について解析を行ったところ、優れたウイルス特異的細胞性免疫誘導能が認められた。さらに、この併用ワクチン接種による顕著なエ

イズ発症防御効果が明らかとなった。以上より、この併用法は、ウイルス特異的細胞性免疫を誘導するエイズワクチンとして、有効性の点で非常に優れていることが示された。

F. 研究発表

1 論文発表

- (1) Matano T, Kano M, Odawara T, Nakamura H, Takeda A, Mori K, Sata T, Nagai Y. Induction of protective immunity against pathogenic simian immunodeficiency virus by a foreign receptor-dependent replication of an engineered avirulent virus. *Vaccine* 18:3310-3318, 2000.
- (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* 14:1281-1282, 2000.
- (3) Takeda A, Nakamura H, Matano T. Confined replication of a chimeric simian immunodeficiency virus. *Jpn J Infect Dis* 53:209-211, 2000.
- (4) Nakamura H, Takeda A, Matano T. Postbinding fusion function contributed by a chimeric murine leukemia virus envelope protein. *Arch Virol*, in press.

2 学会発表

- (1) 俣野哲朗、狩野宗英、加藤篤、網康至、森泰、佐多徹太郎、永井美之。DNA・ウイルスベクター併用エイズワクチン：マカクサルモデルでの解析。第48回日本ウイルス学会(津)。10/13/2000.
- (2) Matano T, Kano M, Takeda A, Nakamura H, Nagai Y. SIV-specific CD4+ and CD8+ T cell responses in macaques immunized with a proviral DNA vaccine. *Keystone symposium: AIDS Vaccines in the New Millennium*. Keystone, CO, USA. 3/28/2001.

G. 知的所有権
特許申請中。