

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

SHIV を用いた弱毒生ワクチンに関する研究

～SHIV-dn 経鼻免疫ザルにおける粘膜免疫誘導能と強毒ウイルス

(SHIV-89.6P) に対する経膈感染防御効果～

分担研究者 速水正憲（京都大学ウイルス研究所）

<研究要旨>

異性間感染による HIV の感染がアジアを中心に爆発的な増加を示しており、HIV の感染防御ワクチンを考えるうえで、ウイルスの侵入部位である粘膜局所を中心とした防御機構の確立が重要であると考えられる。本研究では、nef 遺伝子を欠損させた SIV/HIV キメラウイルス (SHIV-dn) における粘膜免疫誘導能を検討するため、SHIV-dn を経静脈あるいは経鼻投与した個体から得られた血清および粘液中の抗 HIV-1Env 抗体を測定した。その結果、血清中の抗体応答は両感染個体共に高い抗体価を示したが、膈洗浄液中の抗体については経静脈接種した個体ではほとんど検出できなかったのに対し、経鼻投与した個体では、膈洗浄液および糞便中にウイルス特異的 IgG および IgA 抗体が検出された。そこで経鼻感染個体に抗原性の異なる強毒ウイルス (SHIV-89.6P) を経膈接種したところ、4 頭中 3 頭がその感染を完全に防御し、残りの 1 頭も感染はしたもののそのウイルス増殖を強力に抑制した。以上の結果から、SHIV-dn の経鼻投与により、末梢系の免疫応答だけでなく粘膜系の免疫も誘導されたと考えられ、誘導された免疫応答が攻撃接種に対する感染防御に関わった可能性が示唆された。

A. 研究目的

SHIV-dn の弱毒生ワクチンとしての可能性を調べるとともに、HIV の異性間感染の主要な感染経路である女性生殖器に、より効果的な免疫を誘導することを目的とし、SHIV-dn 経鼻感染ザルにおける粘膜免疫誘導能と、強毒ウイルスに対する粘膜感染防御効果を検討した。

B. 研究方法

本研究では、SIV/HIV キメラウイルス (SHIV-NM-3rN) から nef 遺伝子を欠損させ、より弱毒化させたキメラウイルス (SHIV-dn) をワクチンウイルスとして用いた (図 1)。メスのアカゲザル 4 頭の右鼻腔内に SHIV-dn を注入し、経時的に各個体から血液および粘液 (膈腔内洗浄液、糞便、唾液) を採取した。比較対象として、SHIV-dn を静

脈内接種したメスのアカゲザルを 4 頭おいた。接種後、PBMC 中のプロウイルス DNA を検出し、ウイルス感染の有無を確認した。また各個体におけるウイルス特異的な免疫応答を調べるために、得られた血清中の抗 HIV-1 抗体価を PA 法で、粘液中の HIV-1Env 特異的 IgG および IgA 抗体を ELISA 法で測定し、さらに検出された抗体の中和抗体価を調べた。細胞性免疫については、PBMC における NK 活性、HIV-1Env および SIVGag に対する CTL 活性を測定した。

SHIV-dn 経鼻感染個体における粘膜感染防御効果を調べるために、SHIV-dn を経鼻接種後 26 週あるいは 52 週目のサル各 2 頭に、強毒ウイルス SHIV-89.6P (図 1) を経膈接種した。攻撃接種後、血清中の SHIV-89.6P 特異的なウイルス RNA 量を定量し、末梢血中の CD4 陽性 T 細胞数を測定した。

本研究で行なわれたアカゲザルへの感染実験は、京都大学ウイルス研究所のウイルス感染動物実験施設使用指針、およびサル類を用いる実験のための基本指針に基づき、遂行された。

C. 研究結果

SHIV-dn の経鼻投与あるいは経静脈接種後、全ての個体において SHIV-dn の感染が成立した。両接種経路とも、感染ザルの血清中のウイルス RNA 量は感染初期に一過的に検出される程度であり、その後再び検出されることはなかった。接種後、各個体の抗体応答を調べた結果、接種経路に関わらず血清中の抗 HIV-1 抗体の上昇がみられ、持続的に高い抗体価を示した。一方、腔内洗浄液中のウイルス特異的 IgG および IgA 抗体については、経静脈接種した個体ではほとんど検出されなかったのに対し、経鼻投与した個体では、その程度に個体差がみられたものの、HIV-1Env 特異的 IgG および IgA 抗体が検出された (図 2)。また経鼻投与個体では糞便中にもウイルス特異的抗体が検出された。さらに経鼻投与個体の血清中の中和抗体価を調べたところ、SHIV-dn の親株である SHIV-NM-3rN に対する中和活性をもつことが全頭で確認された。同様に腔内洗浄液中の中和活性を調べた結果、4 頭中 1 頭で、親株だけでなく抗原性の異なるウイルス (SHIV-89.6P) に対しても中和活性があることがわかった (表 1)。経鼻投与後、PBMC における NK 活性、HIV-1 Env および SIV Gag に対する CTL 活性は、わずかに認められたものの顕著な上昇はみられなかった。

そこで、SHIV-dn 経鼻投与後 26 週あるいは 52 週目の個体に、抗原性の異なる強毒ウイルス (SHIV-89.6P) を経腔接種し、経鼻免疫による粘膜感染防御効果を検討した。その結果、4 頭中 3 頭において、血清中にウイルス RNA が全く検出されなかった (図 3)。さらに PBMC および感染初期に

摘出した腸管リンパ節や鼠経リンパ節においてもプロウイルス DNA の存在が認められなかった。また末梢血中の CD4 陽性 T 細胞の変動もみられなかったことから (図 4)、これら 3 頭はウイルスの粘膜感染を完全に防御したと考えられた。経鼻投与後 26 週目に攻撃接種を行なった 1 頭は、血清中に SHIV-89.6P のウイルス RNA が検出され、ウイルス感染を完全に防御することはできなかった (図 3)。しかしコントロールとして用いた SHIV-dn 非感染ザルと比較すると、血清中のウイルス RNA 量が 1/1000 以下に抑制されており (図 3)、CD4 陽性 T 細胞数の減少もみられなかった (図 4)。

D. 考察

SHIV-dn の経鼻投与により、感染個体における末梢系および粘膜系の免疫誘導が確認された。同じウイルスを経静脈接種した個体と比較すると、腔内洗浄液中に検出された抗 HIV-1Env 抗体量に差が見られ、投与経路によって誘導される免疫応答が異なる可能性が示唆された。さらに経鼻投与個体の 4 頭中 3 頭は、抗原性の異なる強毒ウイルスの粘膜感染を完全に防御したことから、誘導された粘膜免疫による防御効果の重要性が明らかになった。

E. 結論

粘膜感染の防御効果については、ウイルスの侵入部位における粘膜免疫の誘導が非常に重要であると考えられる。さらに SHIV-dn によって誘導された免疫が体内におけるウイルス増殖の抑制だけでなく、体内への侵入阻止に関わる可能性が示唆され、その詳細な解析が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表
発表準備中

2. 学会発表

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効果、第 14 回日本エイズ学会、京都、2000

榎瀬良美、三宅在子、上坂浩実、鈴木元、宇井雅博、速水正憲：nef 遺伝子欠損 SIVmac/HIV-1 キメラウイルス (SHIV) の免疫誘導能と粘膜感染防御効果、第 130 回日本獣医学会、大阪、2000

Enose, Y., A. Miyake, H. Uesaka, T. Miura and M. Hayami : Protection by intranasal immunization of a non-pathogenic SHIV with a deleted nef gene against intravaginal challenge with a pathogenic SHIV. Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Madison, October 4-7, 2000.

Enose, Y., A. Miyake, H. Uesaka and M. Hayami : Protection by intranasal immunization of a non-pathogenic SHIV with a deleted nef gene against intravaginal challenge with a pathogenic SHIV. First international conference on vaccine development and immunotherapy in HIV, Palm Beach, June 28-July 1, 2000.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

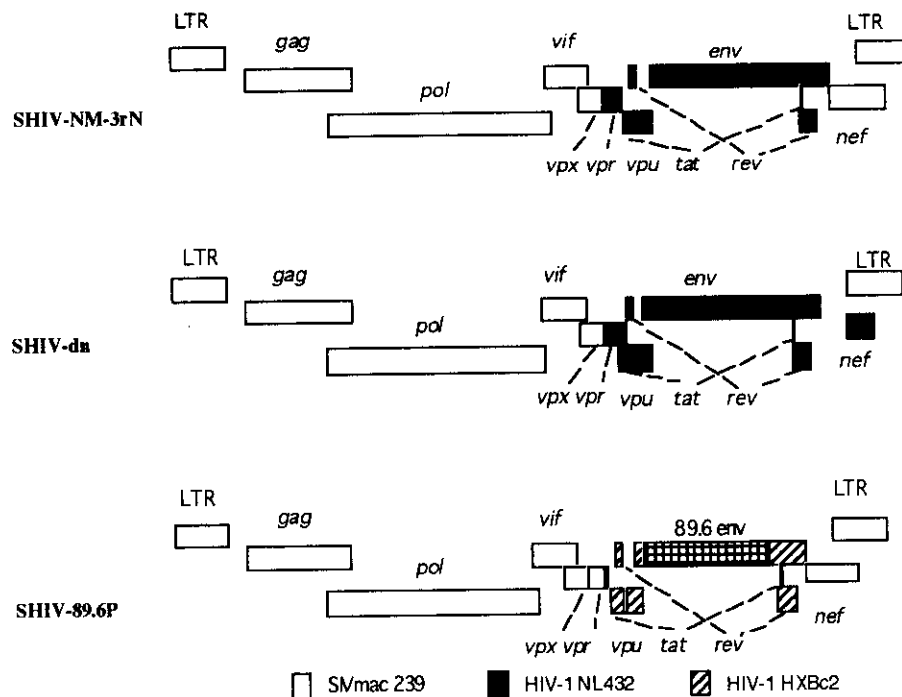


図1 SIV/HIV キメラウイルス (SHIV) の遺伝子構造

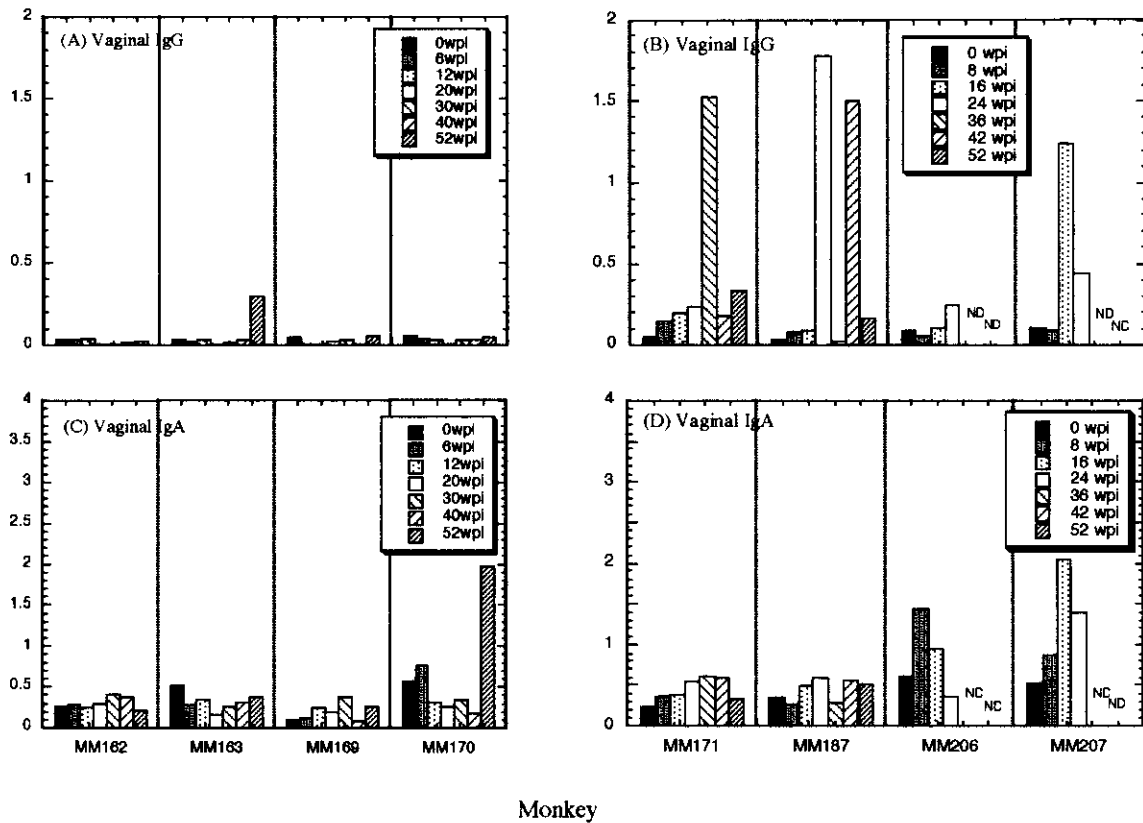


図2 SHIV-dn 経静脈接種個体 (A, C) および経鼻投与個体 (B, D) における
膣洗浄液中のHIV-1Env 特異的 IgG および IgA 抗体の検出

Monkey	virus	Weeks post inoculation					
		0		26		52	
		plasma	VW	plasma	VW	plasma	VW
MM171	NM3rN	<10	<1	40	<1	40	2
	89.6P	<10	<1	<10	<1	<10	1
MM187	NM3rN	<10	<1	80	<1	40	<1
	89.6P	<10	<1	<10	<1	<10	<1
MM206	NM3rN	<10	<1	640	<1		
	89.6P	<10	<1	<10	<1		
MM207	NM3rN	<10	<1	320	<1		
	89.6P	<10	<1	<10	<1		

表1 SHIV-dn 経鼻投与個体の血清および膣洗浄液における中和抗体価の測定

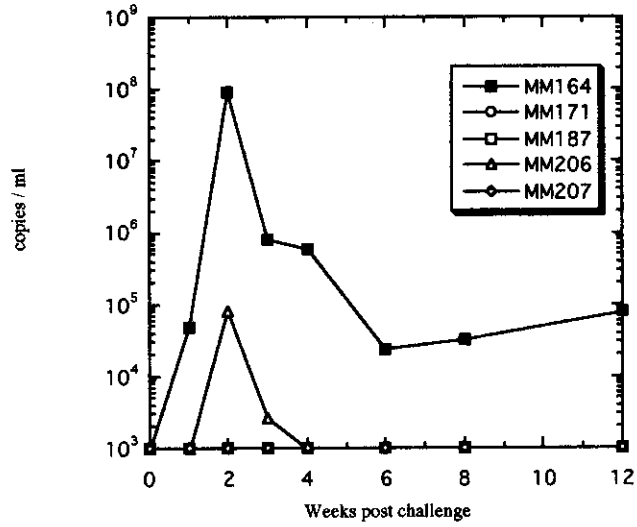


図3 SHIV-89.6P 経膣攻撃接種後の血清中のSHIV-89.6P 特異的ウイルスRNA量の測定
SHIV-dn 経鼻投与ザル (○□△◇)、SHIV-dn 非感染ザル (■)

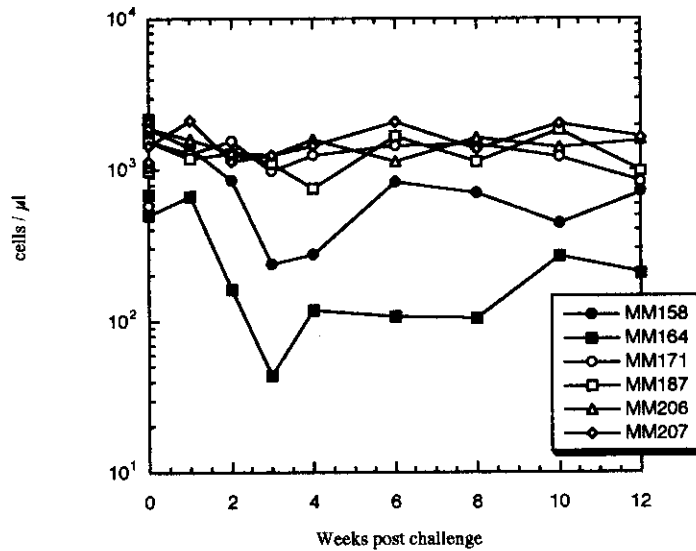


図4 SHIV-89.6P 経膣攻撃接種後の末梢血CD4陽性Tリンパ球数の測定
SHIV-dn 経鼻投与ザル (○□△◇)、SHIV-dn 非感染ザル (●■)

SIV 感染と宿主応答における糖鎖の意義に関する研究

分担研究者 森 一泰 国立感染症研究所 主任研究官

研究要旨

SIVmac239 を用い Env gp120 の 22 個の糖鎖中 5 個 (79, 146, 171, 460, 479) のアスパラギン結合型糖鎖を欠くウイルス delta 5G のサルにおける感染性、ウイルスに対する免疫応答を検討した。delta 5G は初期感染期において SIVmac239 とほぼ同様の増殖能を示した。しかし血中ウイルスは感染後 3 週から急激に減少し感染後 8 週には測定感度以下に減少し、慢性感染期においても低レベルを維持した。このことから糖鎖はエイズウイルスの慢性感染期における活発な持続感染に重要な役割を果たすことがわかった。また感染後 4-6 週においてもウイルス変異は観察されなかったことから delta 5G の感染は潜伏感染に近い状態で感染細胞数が一定レベルに維持されていることが推測される。さらに delta 5G 感染サルへの親株 SIVmac239 のチャレンジ感染が防御されことから感染制御機構が機能していることが分かった。宿主免疫の解析からはチャレンジ感染により中和抗体は誘導されなかったが、gag-pol, nef, env に対する複数のウイルス抗原に対する強い CTL に対する 2 次反応が誘導されたことから細胞性免疫が感染制御に重要な役割を果たしている。これらの結果は 5 個の糖鎖変異を有する delta 5G が nef 遺伝子等が機能しない attenuated SIV と共通する性質をもつことを示す。以上の解析から Env 遺伝子の糖鎖がエイズウイルスの病原性を決定する因子であることが確認された。

A. 研究目的

エイズワクチン開発の困難さの根拠のひとつとして、ウイルス外膜蛋白(Env)に存在するおびただしい数の糖鎖が本来は有効であるべき近傍の抗原エピトープを覆い無効にしていることが示唆されている。われわれは、サルエイズウイルス Env gp120 サブユニット上の22個の糖鎖についての欠失変異体作成により、個々の糖鎖の試験管内細胞でのウイルス増殖能への貢献度を評価すると共にウイルス増殖を損なわず可及的多数の糖鎖を欠失させることを試みた。その過程で総計5個の糖鎖を欠くウイルスの作成に成功した。この変異体は糖鎖によるエピトープの被覆の実態、レセプター結合部位の糖鎖の生体レベルでの役割を解明する上で極めて有効であると考えられる。また、糖鎖付加反応は一般的には一様でなく、生成したEnv蛋白毎に糖鎖付加は不均一(必ずしも付加部位がすべてそのとおり使用されているわけではない)ことを考慮すると、この変異体は感染防御抗原として親株より優れている可能性がある。以上により糖鎖変異体のサルにおける増殖性、病原性、免疫原性を親株と比較する。さらに、感染からの回復、生存が見られる場合には、親株のチャレンジにより防御免疫が成立しているかを明らかにする。

B. 研究方法

ウイルス

SIVmac239 と糖鎖変異体(delta 5G)を用いた。delta 5GはSIVmac239DNAを元にenv上のN-glycosylation sites (79, 146, 171, 460, 479 アミノ酸残基)のAsnをGlnに置換することにより作成した。実際の糖鎖の減少は生化学的な方法で確認した。ウイルスストックはウイルスDNAクローンを培養細胞(SW480またはCOS-1)にtransfectionを行い作成した。Transfection 2—4日後の培養上清を種ウイルスとしてアカゲザル培養リンパ球を用いてさらに増殖さ

せ感染実験用ウイルスとした。ウイルス量はgag抗原量についてはCoulter社のp27 gag antigen assay kitにより、TCID₅₀はサルCD4陽性T細胞(Cyft/HVS)を用いて測定した。

アカゲザル

ミャンマー原産の育成ザル、オス、3—5才、体重2—4Kg、Bウイルス、SRV、STLV、SIVに対する抗体が陰性、培養リンパ球におけるSIV増殖性に問題がない10頭を用いた。

ウイルス接種

感染実験1においては100 TCID₅₀、感染実験2においては500 TCID₅₀のウイルスを静脈内接種した。

血しょうウイルスRNA量の測定

血しょう中のウイルスRNAはBoehringer Mannheim製キットを用い精製した。ウイルスRNA量はSIVのgag遺伝子配列から作成したプライマー: the gag primers, forward primer: 1224F (5'-AATGCAGAGCCCCAAGAAGAC-3'), reverse primer: 1326R (5'-GGACCAAGGCCTAAAAAACCC-3') and TaqMan probe 1272T: (FAM-5'-ACCATGTTATGGCCAAATGCCCAGAC-3'-TAMRA)を用い、RT-PCRキット(TaqMan EZ RT-PCR kit)を用いてリアルタイムPCR法により測定した。

抗SIV結合抗体価の測定

SIVmac239 virion lysateを抗原として作成したELISAプレートをを用いて血漿を100倍希釈し抗体価を測定した。

中和抗体価の測定

SIV tat依存性に発現する分泌型アルカリフォスファターゼ遺伝子をレポータ遺伝子として持つCE Mx174を用いてウイルス感染量を高感度に測定できる系を用いて、血しょう中のウイルス中和抗体価を測定した。

中和されるウイルスとして239/env5GとSIVmac23

9を用いた。

フローサイトメトリーによる末梢血リンパ球の細胞表面抗原の解析

血中のリンパ球サブセット (CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD20+, CD29+リンパ球)の割合についてそれぞれの2種類のモノクロナール抗体の組み合わせにより解析した。血中のCD4+細胞数は自動血球計算機によりリンパ球数を測定し、フローサイトメトリーの結果を用いてCD4+細胞数を算出した。

CTL 活性

⁵¹Cr release assay により末梢リンパ球の CTL 活性を測定した。Target 細胞は実験に用いたサル末梢リンパ球から B lymphoid blast cell line (BLCL)を作成し、この細胞に SIV gag-pol, or env 遺伝子を発現する recombinant vaccinia virus を感染させて作成した。末梢リンパ球は毎回の採血時にリンパ球分離後、-80℃冷凍庫に保存した。CTL 活性は凍結保存された末梢リンパ球を用い測定した。

SIV env specific proliferation

SIV env epitopes によるリンパ球増殖(CD4+ T cells が誘導される)は上記の CTL target cells をホルマリン固定したものを stimulator として末梢リンパ球を4日間培養し ³H Thymidine の取り込みを測定した。

倫理への配慮

本研究では動物実験が中心であることから、動物実験方法については倫理、動物愛護の観点から感染研動物実験委員会が定めたルール、ガイドラインに従っている。動物実験開始に際しては事前に国立感染症研究所動物実験委員会による審査・承認を受けた。

C. 研究結果

糖鎖変異ウイルス感染ザルにおける viral load
糖鎖付加部位が5個減少した delta 5G はサル末梢リンパ球培養において未変異の SIVmac239 とほ

ぼ同様なウイルス増殖性を示した。サル感染実験は実験1においては100 TCID₅₀のウイルスをサル6頭に、実験2においては500 TCID₅₀のdelta5GまたはSIVmac239をサル4頭に静脈内接種した。ウイルスの感染増殖の違いを血漿ウイルスRNA量の測定により比較した。初期感染期においてはdelta 5GはSIVmac239と同様に感染後2週にピークを示した(図1)。この結果から糖鎖変異は初期感染期におけるウイルス増殖に影響を与えなかった。delta 5Gは感染後3週から急激に減少し感染後8週には測定感度前後(1000 copy/ml)に減少し、慢性感染期においてもそのレベルが維持された(図1)。SIVmac239のウイルスRNA量はdelta 5Gと比較して約3 log高いレベルを示した。ただしSIVmac239感染ザルの2/5頭ではdelta 5Gと同様なウイルス感染を示した。

このウイルス感染の違いについて実験2においてさらに詳細に解析した。末梢リンパ球における感染リンパ球の頻度をSIV感受性の培養T細胞とのco-cultureにより調べた。感染後8週のSIVmac239感染ザルリンパ球では2頭のサルにおいてそれぞれ40000個、8000個のリンパ球が培養T細胞のSIV感染に必要な数であった。感染後8週のdelta 5G感染ザルにおいては2000,000個のリンパ球を用いてもSIV感染は起こらなかった。しかし感染後16週のリンパ球ではそれぞれ1,000,000個、2,000,000個リンパ球からSIV感染が見られた。また、delta 5G感染ザルリンパ球から分離されたSIV DNAのenv V1/V2領域には全く変異が見られなかった。これらの結果からdelta 5Gはサルにおいて感染が抑制されているが、完全に感染が除かれたのではないことが明らかとなった。

Delta 5G感染ザルへのSIVmac239のチャレンジ感染

実験1で用いた3頭のdelta 5G感染ザルを用いて感染後48週に500 TCID₅₀のSIVmac239を静脈内接種した。対照群として非感染ザルに500 TCID₅₀のSIVmac239を静脈内接種した。

delta 5G感染ザル2頭では明らかなウイルスRNAは検出できなかった(図2)。1頭ではチャレンジ感染によると思われるがわずかなウイルスRNAが一時的に検出された。対照群では>10,000,000 copies/mlのウイルスRNAのピークが感染後2週に見られた。検出感度が1000 copies/mlであることからdelta 5G感染ザルにおいては非感染の場合と比較するとウイルス感染が1/10,000以下に抑えられたことになる。

delta 5G感染ザルにおけるチャレンジ感染の抑制についてはPBMC中のウイルスDNAの解析によりさらに詳細に解析した。末梢リンパ球500,000個を用いnested PCRによりウイルスDNAを回収し、そのV1/V2領域の塩基配列から回収されたウイルスがdelta 5GかSIVmac239であるか判定した。delta 5G感染ザルにはチャレンジ感染前に末梢リンパ球500,000個中に10個以下のウイルスDNAが存在していた(表1)。チャレンジ後2頭においては感染後2週から20週の測定ではSIVmac239は検出されなかった。1頭においては感染後2-6週においてSIVmac239が検出されたが感染後16、20週には検出されなかった(表1)。以上の結果から1頭においてSIVmac239の重感染が確認されたが感染は低レベルでありは感染後6週以降には検出されなくなった。2頭においては重感染が確認されなかったことから3頭すべてのdelta 5G感染ザルにおいて重感染に対して抵抗性の免疫が働いていることが判明した。

Delta 5G 感染による免疫応答

ELISA法によるSIV結合抗体価を測定した。delta 5G感染ザルにおける抗体価の変化は

SIVmac239感染ザルと同様であった。さらに感染制御と関連する宿主免疫応答として中和抗体を測定した。delta 5G感染ザルでは感染後20週にSIVmac239感染ザルと比較して高い感染ウイルスに対する中和抗体が誘導されていた。

CTL活性はどちらのウイルス感染群においても検出されたが個体間の違い、感染時期による変動があり、両者に有意な違いは見られなかった。

チャレンジ感染における免疫応答

重感染に対する抵抗性と関連する免疫反応についてチャレンジ前後の変化を中心に解析した。

まず液性免疫についてSIV結合抗体価を測定した。明らかな上昇が観察されたのは重感染が確認された1頭のみで他の2頭では抗体価の変動は観察されなかった。次に中和抗体価を測定した。delta 5Gに対する中和測定では2頭においてチャレンジ後穏やかな上昇とその後の減少が観察されたがSIVmac239に対する中和抗体価は検出されなかった。1頭においてはいずれのウイルスに対する中和抗体も検出されなかった(表2)。

CTL活性についてはチャレンジ感染と関連する顕著な変動が観察された。感染後2、4週に顕著な上昇が観察されたが、20週ではチャレンジ前レベルに減少していた(図3)。対照群では感染後4週に有意なCTL活性が検出され感染後20週においても維持されていた。チャレンジ感染ザルでは明らかな感染ウイルス量は検出されなかったことからこのCTL活性の変動はチャレンジ感染による2次反応であると考えられる。

以上の結果から重感染に対する防御にCTLが重要な役割を果たしたことが推測される。

D. 考察

糖鎖変異ウイルス delta 5G は初期感染期においては野生株ウイルスと同程度のウイルス増殖能を保持するが viral load の set point、慢性感染期における viral load が検出感度以下のレベルであることから宿主免疫誘導によりウイルス感染が制御された推測される。糖鎖変異によるウイルスの感染性、病原性への影響については関連する報告がある。Desrosiers のグループは我々と同様に SIVmac239の糖鎖付加部位に種々変異を導入し、変異ウイルスのサルにおける増殖能と中和抗体誘導についてを調べている。彼らは我々と異なり V1, V2 領域に限定して変異を導入している。糖鎖が減少したウイルスでは set point、慢性感染における viral load が低下しているが合計 2 個の糖鎖の減少では viral load の低下は一時的で、その後、新たな糖鎖付加部位を持つ revertants が生じている。合計 5 個の糖鎖付加部位への変異導入では delta5G とほぼ同様な性質を示している。Overbaughらは SIVmne を用いて V1, V2 領域の糖鎖 (N-glycosylation と O-glycosylation) の減少がウイルスのサルにおける増殖パターンに影響を与えることを報告している。我々の結果はこれらの報告と一致しており env の糖鎖修飾がエイズウイルスの病原性の主因である慢性感染期における高いウイルス増殖性と密接な関係があることが判明した。ところが初期感染後のウイルス感染制御と関連する宿主側因子については一致した結果は得られていない。Desrosiers ら、Overbaugh らはウイルスに対する中和抗体が重要な関連する免疫であると結論している。今回の結果でも確かに中和抗体価の上昇が見られ、糖鎖数の減少によると推測される。実際 delta 5G は上記の 2 報告と共通の 146 アミノ酸残基の糖鎖に変異を持つことから、この変異が中和抗体の上昇を誘導したと推測される。ところが、

delta 5G による中和抗体の上昇はわずかであることから別の宿主応答の存在の可能性が考えられた。

我々は感染制御免疫を調べるために delta 5G 感染ザルへの病原性ウイルス(SIVmac239)のチャレンジ感染実験を行った。結果は 3 頭すべてにおいて重感染の防御が観察された。つまり糖鎖変異感染ザルにおいては感染制御免疫が維持されていることが確認された。一般的には感染防御に対し中和抗体が有効であることから高い中和抗体の誘導が予想されたが 3 頭すべてにおいて中和抗体は検出されなかった。対照的に強い CTL の誘導がすべてサルにおいて観察された。1 頭のサルにおいて一時的に重感染が観察され 6 週間には解消されたが、このような感染細胞の除去については CTL の役割が最も想定される。以上のことから delta 5G 感染ザルにおけるウイルス感染制御に CTL が重要な役割を果たしていることが推測された。今後の課題として初期感染後、重感染における、CTL 誘導の機序、慢性感染期における CTL の維持の機序、これらの現象とウイルス糖鎖修飾との関連についての解明が必要である。

E. 結論

SIVmac239 Env gp120 の 2 3 個の糖鎖中 5 個 (79, 146, 171, 460, 479) 糖鎖を欠損した delta 5G は初期感染期における増殖能は保持したが set point 以降では宿主応答により感染制御された。さらに病原性 SIV に対する防御免疫を維持していた。

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., 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.

2. Matano, T., Kano, M., Odawara, T., Nakamura, H., Takeda, A., Mori, K., Sata, T., and Nagai, Y. A novel effective DNA vaccine strategy inducing safer confined replication of engineered vaccine virus mediated by foreign receptor. *Vaccine*, **18**, 3310-3318. 2000.

3. Mori, K., Yasutomi, Y., Sawada, S., Villinger, F., Sugama, K., Rosenwith, B., Ueberla, K., Yamazaki, S., Ansari, A., and Ruebsamen-Weigmann, H. Suppression of acute viremia by short term post-exposure prophylaxis of SHIV-RT infected monkeys with a novel RT inhibitor (GW420867) allows for the development of potent anti-viral immune responses resulting in efficient containment of the infection. *J. Virol.* **74**, 5747-5753. 2000.

4. Dhar, S. K., Tadakuma, K., and Mori, K. Distinct variation pattern in env of macrophage-tropic simian immunodeficiency virus *in vivo* revealed by denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Virol. Methods*. **89**, 49-60. 2000

5. Mori, K., Rosenzweig, M., and Desrosiers, R. C. Mechanism for adaptation of simian immunodeficiency virus to replication in alveolar macrophages. *J. Virol.* **74**, 10852-10859. 2000.

6. 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.* 2001. (In press)

2. 学会発表

1. A ROLE OF THE N-GLYCANS OF ENV AS PATHOGENIC 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, 2000, Madison, Wisconsin, USA.

2. High viral replication of SHIV-RT *in vivo* leads to the emergence of mutants partially resistant to non-nucleosidic reverse transcriptase treatment. F Villinger, K Mori, S Sawada, S Sugama, H Ruebsamen-Waigmann and AA Ansari. 18th annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, October, 2000, Madison, Wisconsin, USA

3. SIVの細胞指向性のウイルスの組織局在、感染によるリンパ組織の障害、免疫機能不全の進行への影響、多田隈圭、森豊隆志、出雲周二、納光弘、佐多徹太郎、森一泰・日本エイズ学会、2000年、京都

4. 新規 RT inhibitor (GW420867)を用いた感染後早期治療動物モデルの開発と免疫機能の解析、齋藤紀子、保富康宏、澤田周三、洲鎌和茂、Francois Villinger, Aftab Ansari, Ruebsamen-Waigmann, 山崎修道、森一泰、日本エイズ学会、2000年、京都。

5. 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、向井鍬三郎、塩田達雄、永井美之、森一泰、日本エイズ学会、2000年、京都

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

国際特許出願中 発明の名称:逆転写酵素阻害薬 GW420867 またはその他の抗 HIV 薬によるウイルス暴露後の発症予防治療法

2. 実用新案特許 なし

3. その他 なし

图 1 plasma viral load

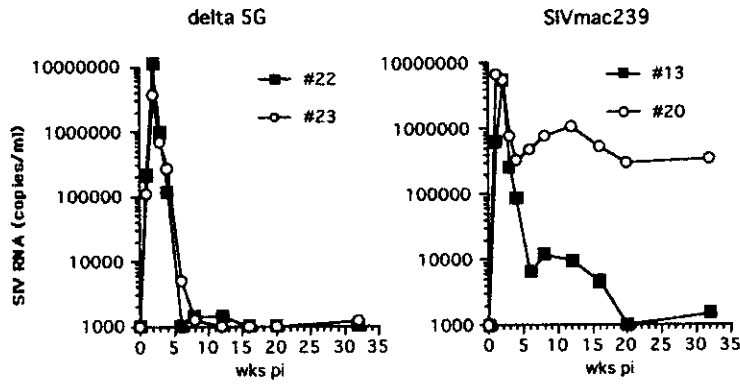


图 3 CTL

图 2 plasma viral loads with challenge infection

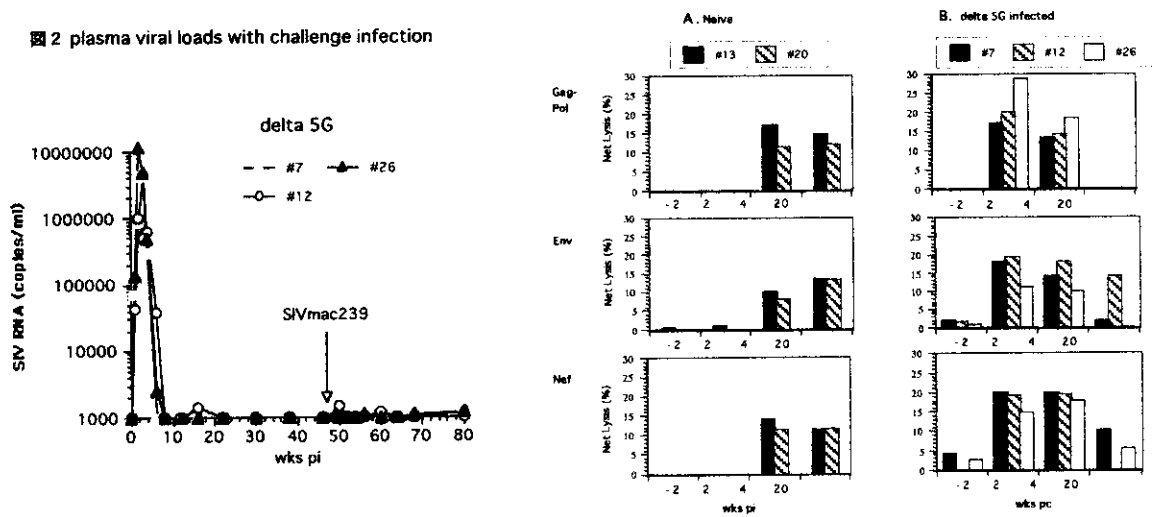


表 1. Detection frequency of delta 5G and SIVmac239 in PBMCs from the animals (#7, #12, #26) after challenge infection with SIVmac239

weeks post challenge	#7		#12		#26	
	delta 5G	mac239	delta 5G	mac239	delta 5G	mac239
-2	3 ^a	0	5	0	2	0
2	1	0	4	3	0	0
4	3	0	0	10	0	0
6	1	0	5	1	1	0
16	2	0	1	0	1	0
20	3	0	3	0	1	0

^a Number of cloned viral DNAs isolated from 500,000 PBMCs.

表 2. Neutralizing titers against SIVmac239 and delta 5G of rhesus macaques (#7, #12, #26) pre-infected with delta 5G and challenged with SIVmac239

weeks post challenge	#7		#12		#26	
	mac239	delta 5G	mac239	delta 5G	mac239	delta 5G
-2	<25 ^a	200	<25	25	<25	<25
1	<25	400	<25	50	<25	<25
2	<25	400	<25	50	<25	<25
4	<25	400	<25	25	<25	<25
6	<25	100	<25	25	<25	<25

^a Reciprocal of dilution of plasma giving 50% inhibition of SIV replication

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業） 分担研究報告書

エイズ DNA ワクチン開発に関する研究

研究者 奥田 研爾 横浜市立大学医学部細菌学

研究要旨

アデノ随伴ウイルス(AAV)は遺伝子導入用ベクターとしてよく研究されている。今まで、エイズの DNA ワクチン開発の研究を主に行ってきたが、追加免疫には、ウイルスベクターワクチンが有効であると言われつつある。そこで今回我々は安全性が確認されている AAV を用いたエイズワクチン作製して、その免疫原性を確かめた。

A. 研究目的

安全で免疫原性の強いエイズワクチンの開発を DNA ワクチン及びウイルスベクターワクチンを使用して検討している。

今回は DNA ワクチンを免疫した後、追加免疫としての AAV ウイルスベクターワクチンが免疫原性を示すか否かの検討を加えた。

B. 研究方法及び結果

AAV ベクターに HIV の env の遺伝子を挿入したものを、数回、マウスに免疫し、その免疫誘導能を検討した。Fig.1 では HIV-1 の env を組み込んだ AAV ベクターのワクチンを作製し BALB/c マウスの筋肉内に免疫し、誘導される抗体価を検討した。その結果、HIV-1 に対する特異的な抗体が約半年間かなり高いレベルで認められた。10 ヶ月後、追加免疫を行うことにより抗体価が更に上昇した。これらの現象は IL-2 の AAV ベクターを同時免疫するとわずかながら減少した。Fig.1 は筋肉への免疫の結果であるが、経鼻的、経皮的免疫でも同様な抗体価の上昇がみられた。一方、経鼻的

に投与した場合、IgA 抗体も持続的に糞便中及び膣洗浄液中で認められた。

次に、細胞性免疫能の検討を BALB/c マウスで行った。Fig.2 は、AAV ベクターワクチンを一度免疫した後、2 ヶ月後の細胞障害性 T 細胞 (CTL) レベルの検討を行ったものである。AAV- HIV env を免疫した場合、高い CTL の活性が認められた。次に、ELIspot 法にて AAV ベクターワクチンをマウスに免疫した後の IFN- γ , CD8⁺, T cell の定量を行った (Table1)。AAV- IL2 と AAV- HIV を同時投与したものが AAV- HIV 単独よりも CTL 活性が高かった。IFN- γ と CD8 をダブル染色した FACS のデータでも AAV-IL2 と AAV-HIV を同時に腹腔投与したものが優位に高かった。

最後に AAV ベクターワクチンの有効性の検討を行った。今回は、マウスで、HIV -1 のキメラウイルスよりも直接免疫能及び有効性が測定できる Influenza の系を使用して検討した (Fig.3)。AAV ベクターに Influenza の HA 遺伝子を挿入して作製した AAV- HA を免疫し、2 ヶ月後に Influenza A/PR/8/34 ウイルスをチャレンジところ

AAV-HA と AAV-IL2 を同時に免疫したものは同型ウイルスのチャレンジに抵抗性を示した。すなわち、AAV のベクターによるワクチンではウイルス challenge を防御し得る感染防禦免疫が出現していることを示した。一方、同様にワクチニアウイルスに HIV env を挿入したウイルスを使用し、BALB/c マウスに challenge して有効性の検討も行っており、このマウスを使用した HIV-1 の実験系でも有効性の検討が認められつつある。

C. 考察

我々はいくつかのウイルスベクターを使用して、エイズワクチンの開発の検討をしているが、今回は追加免疫としての AAV ベクターの免疫原性及び感染防禦免疫能の出現を検討した。

今回 AAV ウイルスベクターの有効性について検討したが、我々は今までワクチニ

アウイルス LC16m8 株を使用し、しかもガンシクロピールを挿入したものを作製しており、次ぎにこの MVV ウイルスベクターワクチンと今回の AAV ベクターのどれが追加免疫として最良かをも検討し、今までの DNA ワクチンとこれらのウイルスベクターワクチンとの複合投与による強力なエイズワクチンの検討を行う。

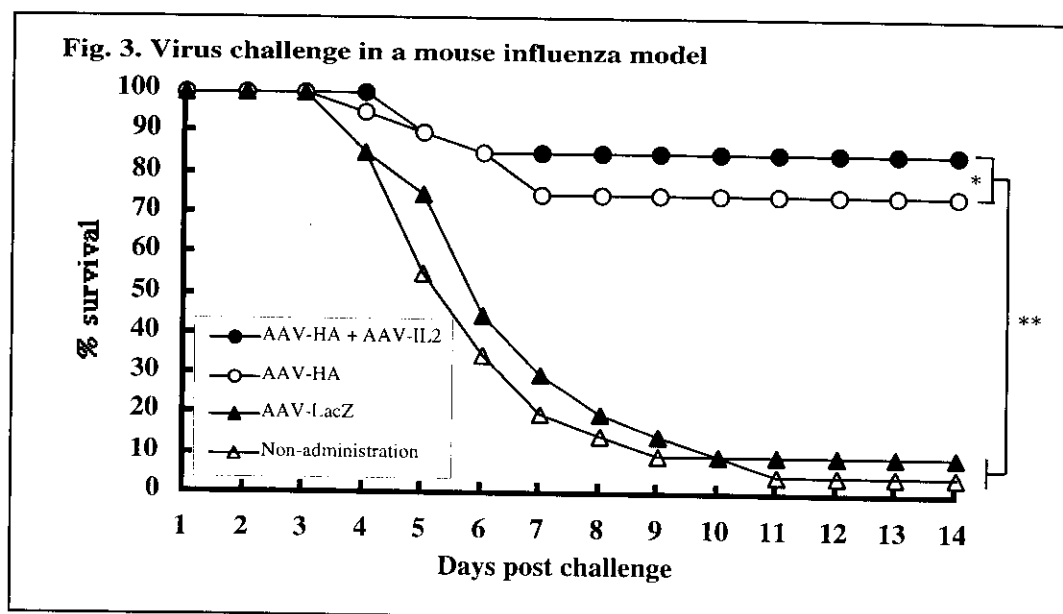
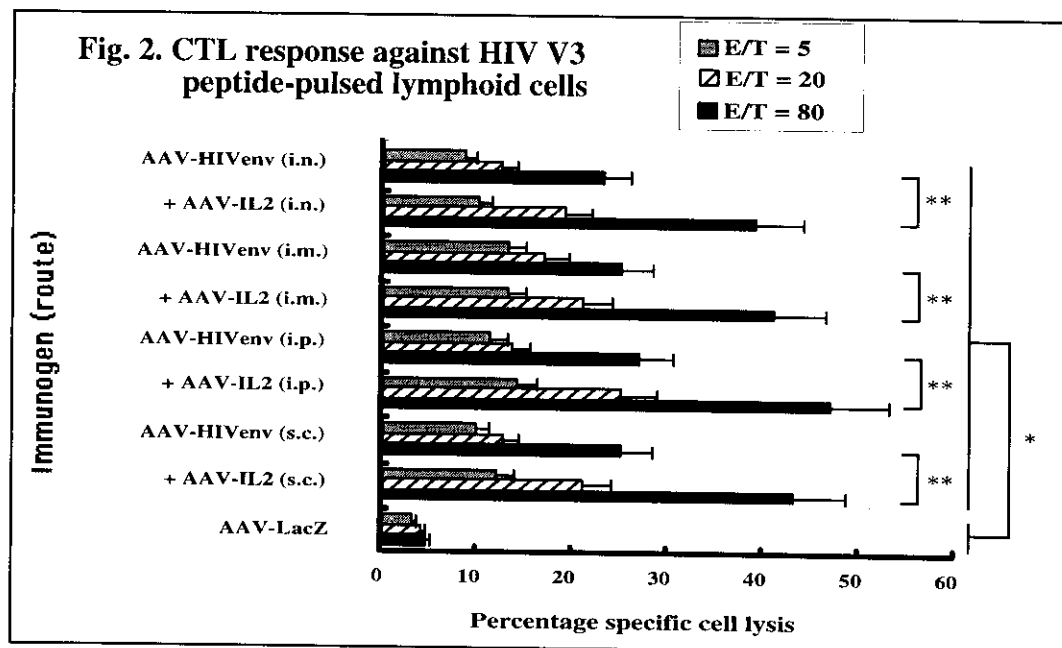
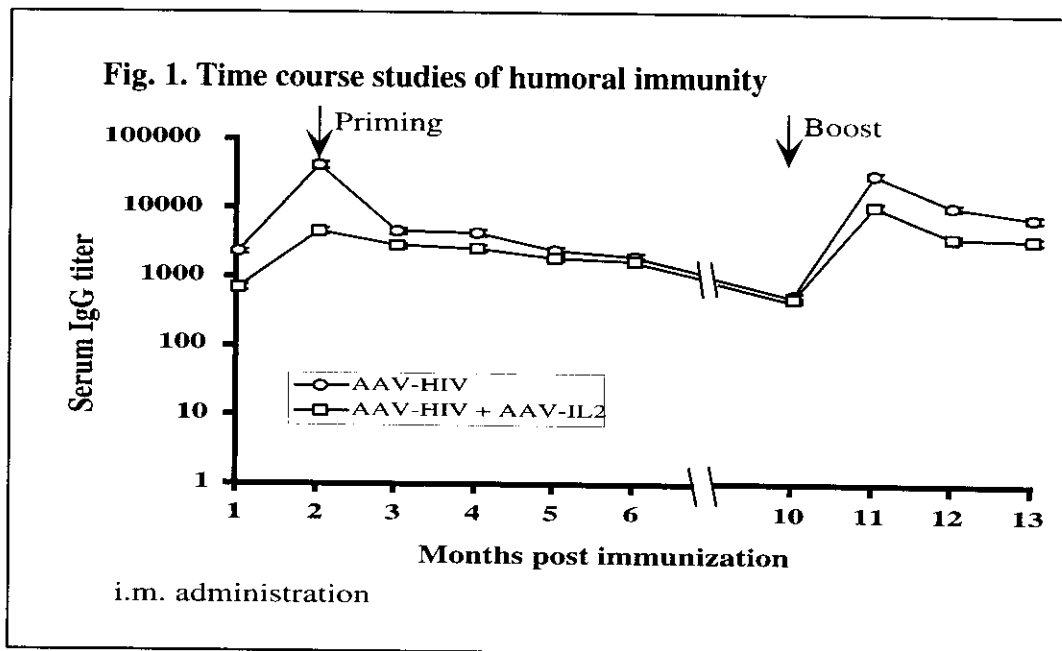
D. 結論

今回の AAV ベクターを使用したエイズワクチンは、病原性がないウイルスベクターを使用している点と、筋肉細胞において長期間発現する点から、使用方法によっては安全で有効なワクチン候補となりうると考えられた。今後、DNA ワクチンを免疫した後、このウイルスベクターワクチンを追加免疫し、SHIV の系でサルに免疫し、有効性の検討を行う。

Table 1. Spots/well assay for measuring HIV-1-specific IFN- γ -secreting CD8⁺ T cells

	P815 + peptide	P815	Peptide	Non	No. of peptide-responsive T cells (10 ⁵ CD8 ⁺)
AAV-HIV (i.n.)	39±0.9	4±0.5	7±0.5	3±0.3	35*
AAV-HIV +AAV-IL2 (i.n.)	53±0.7	2±0.7	6±0.8	4±0.2	51***
AAV-HIV (i.m.)	35±1	3±0.4	10±0.8	5±0.5	32*
AAV-HIV +AAV-IL2 (i.m.)	51±0.9	5±0.7	7±0.6	3±0.2	46***
AAV-HIV (i.p.)	30±0.6	2±0.3	6±0.3	2±0.5	28*
AAV-HIV +AAV-IL2 (i.p.)	45±0.7	4±0.3	9±0.6	4±0.2	41***
AAV-HIV (s.c.)	35±0.6	4±0.8	8±0.2	3±0.1	31*
AAV-HIV +AAV-IL2 (s.c.)	48±0.6	5±0.4	4±0.4	1±0.4	43***
AAV-LacZ	7±0.3	3±0.2	3±0.5	1±0.2	4

The assay was performed 2 months after immunization. * indicates a significant difference in mean values between an immune group and the AAV-LacZ vector-administered control group. **indicates a significant difference in mean values between groups co-administered the vaccine with or without AAV-IL2 vector ($p < 0.05$).



E. 研究発表

1) 論文発表

- 1) K-I Kusakabe, K-Q Xin, H Katoh, K Sumino, E Hagiwara, S Kawamoto, K Okuda, Y Miyagi, I Aoki, K Nishioka, D Klinman: The timing of GM-CSF expression plasmid administration influences the Th1/Th2 response induced by an HIV-1 specific DNA vaccine. *J Immunol*, 164(6):3102-3111, 2000
- 2) K Hamajima, K-Q Xin, J Fukushima, J Yang, A Honsho, M Nakazawa, S Yanoma, K Okuda: HIV-DNA vaccination following transfer of a large number of activated T cells enhances immunoresponses against HIV-1. *Viral Immunol*, 13(1):3-8, 2000
- 3) S Kawamoto, T Sonoda, A Ohtake, Y Suzuki, K Okuda, M Tatibana: Alteration in arginine activation of *N*-acetylglutamate synthetase in vitro by disulfide or thiol compounds. *J Mol Catal*, 10:191-197, 2000
- 4) 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(13):1151-1160, 2000
- 5) Y Asakura, L-J Liu, N Shono, J Hinkula, A Kjerrstrom, I Aoki, K Okuda, B Wahren, J Fukushima: Th1-biased immune responses induced by DNA-based immunizations are mediated via action on professional antigen-presenting cells to up-regulate IL-12 production. *Clin Exp Immunol*, 119(1):130-139, 2000
- 6) H Arai, K-Q Xin, K Hamajima, Y Lu, S Watabe, T Takahashi, S Toda, K Okuda, I Kudoh, M Suzuki, K Okuda: 8 Br-cAMP enhances both humoral and cell-mediated immune responses induced by an HIV-1 DNA vaccine. *Gene Therapy*, 7(8):694-702, 2000
- 7) E Hagiwara, T Okubo, I Aoki, S Ohno, T Tsuji, A Ihata, A Ueda, A Shirai, K Okuda, J Miyazaki, Y Ishigatsubo: IL-12-encoding plasmid has a beneficial effect on spontaneous autoimmune disease in MRL/MP-lpr/lpr mice. *Cytokine*, 12(7):1035-1041, 2000
- 8) K Tadokoro, Y Koizumi, Y Miyagi, Y Kojima, S Kawamoto, K Hamajima, K Okuda, SI Tanaka, K Onari, B Wahren, I Aoki, K Okuda: Rapid and Wide-Reaching Delivery of HIV-1 env DNA Vaccine by Intranasal Administration. *Viral Immunology*, (in press)
- 9) Y Ara, T Saito, T Takagi, E Hagiwara, Y Miyagi, M Sugiyama, S Kawamoto, N Ishii, T Yoshida, D Hanashi, T Koshino, H Okada, K Okuda: Zymosan enhances the immune response to DNA vaccine for human immunodeficiency virus type-1 through the activation of complement system. *Immunology*, (in press)
- 10) K Okuda, A Ihata, S Watabe, T Yamakawa, K Hamajima, J Yang, N Ishii, I Kudoh, M Nakazawa, K Okuda, K Nakajima, K-Q Xin: Protective immunity against influenza A virus induced by immunization with

DNA plasmid containing influenza M gene.
Vaccine, (in press)

2) 学会発表

- 1) 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, Durban (South Africa), 2000 7.
- 2) K-Q Xin, M Urabe, J Yang, K Hamajima, J Monohan, K Okuda, K Ozawa, K.Okuda: Adeno-associated virus vector-based vaccine induces long-term humoral and cell-mediated immunity against human immunodeficiency virus. 13th International AIDS Conference, Durban (South Africa), 2000 7.
- 3) K Hamajima, K-Q Xin, Y Kojima, L-J Liu, K.Okuda: Bacterial DNA containing multi-CpG motifs increases cell-mediated immunity of DNA vaccine against human immunodeficiency virus. 13th International AIDS Conference, Durban (South Africa), 2000 7.
- 4) 劉麗娟、渡部節子、毎川純子、浜島健治、忻克勤、奥田研爾: DNAワクチンの塗布に関する研究 第73回日本細菌学会総会, 2000 5.
- 5) 奥田研爾、渡部節子、戸田すま子、忻克勤、浜島健治: DNAワクチンにより新生児免疫能を誘導する方法 第14回日本エイズ学会学術集会総会, 2000 11.
- 6) 浜島健治、忻克勤、石井則久、奥田研爾: 活性化Tリンパ球はHIV-DNAワクチンによる免疫応答に強力な増強効果

を示した 第14回日本エイズ学会学術集会総会, 2000 11.

- 7) 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, 2000 11.
- 8) 石井則久、劉麗娟、渡部節子、浜島健治、忻克勤、萩原恵理、奥田研爾: HIV-1のDNAワクチンの塗布により免疫効果の検討 第14回日本エイズ学会学術集会総会, 2000 11.

F. 知的所有権の取得状況

- 1) エイズワクチン (特許願平 5-292257) 平成 5 年 11 月 22 日
- 2) DNA ワクチン (特許願平 7-7288) 平成 7 年 1 月 20 日
- 3) エイズワクチン (特許願平 7-38835) 平成 7 年 2 月 27 日
- 4) インフルエンザワクチン (特許願平 11-257253) 平成 11 年 9 月 10 日

酵母スフェロプラストから出芽させたHIV Gag粒子の解析

分担研究者 森川裕子 (北里研究所基礎研ウイルス第2研究室 室長)
共同研究者 後藤俊幸 (大阪医科大学微生物学教室 講師)

研究要旨

下等真核細胞である酵母細胞では、HIV Gag 蛋白は形質膜へtargeting するものの、粒子出芽はおこらない。ところが、このGag 蛋白発現酵母細胞から細胞壁を除去して培養したところ、GagVLP が自発的に出芽・放出された。この酵母スフェロプラスト細胞より出芽したVLP は、1) 高等真核細胞におけるGag 発現で得られるVLP と形態学的に酷似した。2) 高等真核細胞の形質膜より比重の重い酵母の形質膜で完全内包された粒子であった。3) Gag 蛋白のtruncation 実験からマッピングされたVLP 形成の必須領域は、高等真核細胞でのVLP 形成で示された必須領域と一致した。4) 細胞壁除去直後から出芽・放出が開始されるものの、その産生量は経時的に増加し、16 時間後において300 microgram of Gag VLP/liter of spheroplast culture に達した。5) Gag 蛋白にgp120 蛋白のV3 領域をつないだ、Gag-V3 蛋白からなるVLP の作製が可能であり、そのVLP は中和活性を有する抗V3 抗体と反応した。7) inactiveな Protease 領域をもつgag-pol 発現では、Gag およびGag-Pol 蛋白からなる未成熟型VLP が産生された。しかしながら、activeな Protease 領域を含む gag-pol 発現の場合にはVLP が産生されなかった。

A、研究目的

HIVの粒子形成は、その主たる構造蛋白である Gag 蛋白によって推進され、高等真核細胞ではGag 蛋白単独発現でウイルス様粒子 (VLP) が産生されることが明らかとなっている。しかしながら、下等真核細胞である酵母では、Gag 蛋白が形質膜へtargeting するものの、粒子出芽はおこらない。本研究では、HIV 粒子の形態発生を理解する目的で、Gag 蛋白発現の酵母から細胞壁を除去すると粒子出芽がおこるのか、また、gag-pol 発現の場合はどうか、などを検討した。

B、研究方法

1、DNA 構築

Gag 蛋白 (full-size, MA-CA-p2-NC, MA-CA-p2) に相当するcDNA 断片を、URA3遺伝子を選択マーカーとして有するYEp型 (ori 2 μ) シャトルベクターのGAPプロモーター下流に挿入した。野生型のgag-pol 領域および Protease 活性中心のアミノ酸すなわち25位アスパラギンをアスパラギン酸に置換した gag-pol (D25N) 領域を同ベクターのGAPプロモーター下流に挿入した。full-size のGag 蛋白カルボキシ末端にgp120のV3 領域をつないだ、Gag-V3 融合蛋白に相当するcDNA 断片も同様にGAPプロモーター下流に挿入した。これらの plasmid を *S. cerevisiae* の野生株 (Mat a/ α , ura/ura, leu/leu, his/his, trp/trp) に導入した。

2、酵母細胞のスフェロプラスト化

形質転換した酵母細胞をuracil dropout のSD 培地で培養した。細胞壁を常法に従ってDTT存在下でZymolyaseにより消化した後、1M Sorbitol 添加の等張YPD 培地で培養した。

2、GagVLP の精製

酵母スフェロプラストの培養上清から常法に従いVLP を精製した。高等真核細胞での発現で産生されるVLP (コントロール) として、組換え baculovirus を感染させた Sf9 細胞培養上清から同様にVLP を精製した。

3、脂質二重膜の除去とトリプシン消化

精製VLP から脂質二重膜を除去する目的で、1% TritonX-100で30分処理した。Triton存在下あるいは非存在下で、精製VLP にトリプシンを1 μ g/ml で添加し、30 $^{\circ}$ Cで30分反応させた。

4、勾配分析

精製VLP を20~70% 蔗糖密度勾配に乗せ overnight 遠心後、分画した。分画に含まれるVLP をWestern blotで検出し、その比重を求めた。脂質二重膜を除去したVLP すなわちGag shell は20~70% 蔗糖密度勾配に乗せ、2時間の沈降遠心を行った。分画後、Western blotでGag 抗原を検出した。

5、蛋白の検出と定量

Gag蛋白, Pol領域, V3領域の検出は、それぞれ抗 HIV-1 CA, Reverse transcriptase, V3 に対するモノクローナル抗体を用いたWestern blotで行った。Gag 蛋白の定量は、濃度が既知のGag蛋白を標準として用いたWestern blotおよびBSAを標準として用いたCoomassie brilliant blue 染色で行った。

6、電子顕微鏡観察

常法に従って固定し薄切後、観察した。

C、研究結果

1、酵母スフェロプラスト細胞からの未成熟型 GagVLP 出芽

Gag蛋白 (full size のもの) の恒常発現酵母から

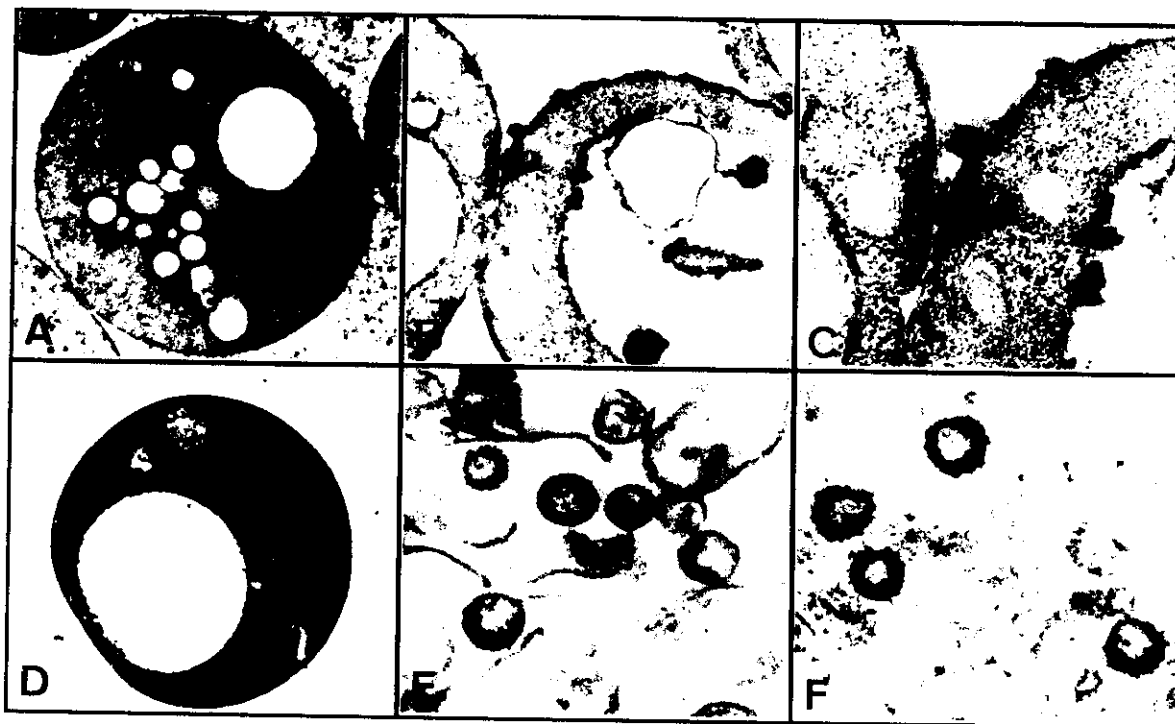


図1、Gag蛋白恒常発現の酵母スフェロプラスト細胞と精製したGagVLPの電顕観察。
Gag蛋白恒常発現の野生型酵母細胞から細胞壁を除去し、2時間培養した。その培養上清からGagVLPを蔗糖密度勾配遠心で精製した。(A) Gag蛋白発現の酵母細胞から細胞壁除去した直後のスフェロプラスト細胞、(BとC) (A)を2時間培養したもの、(D) 陰性コントロールとして、insertのはいっていないplasmidで形質転換させた酵母から細胞壁を除去し、2時間培養したもの、(E) (BとC)の培養上清から精製したVLP、(F) VLPコントロールとして、組換えbaculovirus感染Sf9細胞の培養上清から精製したGagVLP。

細胞壁を除去した直後の細胞を電顕で観察したところ、形質膜直下にelectron-denseなlayerが認められたが、出芽像は観察されなかった。ところが、このスフェロプラスト細胞を2時間培養したところ、形質膜からelectron-denseなlayerをもつ複数個の出芽像が認められた。そこで、ウイルス粒子精製の常法に従って、この培養液から粒子を精製したところ、直径100~120nmの球状粒子が確認された。このVLPは高等真核細胞でのGag発現で得られる未成熟型VLP(Gag蛋白発現の組換えbaculovirusを感染させたSf9細胞培養上清から精製したVLPを用いた)と比較すると、特徴的なelectron-denseなlayerを有しているものの、そのlayerはかなり開環状であった(図1)。

脂質二重膜に完全内包されたGag蛋白はトリプシンで分解されないことが知られている。そこで、この酵母スフェロプラスト細胞から出芽したVLPが脂質二重膜に内包されているかを調べる目的で、1% TritonX-100処理とトリプシン消化を行った。Tritonで脂質二重膜を除去したVLPのGag蛋白はトリプシンで完全分解されたが、Triton未処理のものではGag蛋白は全く消化されなかった。組換えbaculovirus感染Sf9細胞の培養上清から精製したGagVLPをコントロールとして用いた場合にも



図2、精製GagVLPのTritonX-100処理とトリプシン消化。

(A) Gag蛋白発現の酵母スフェロプラスト細胞培養上清から精製したVLP。(B) Gag蛋白発現の組換えbaculovirus感染Sf9細胞培養上清から精製したVLP。精製VLPの脂質二重膜を1% TritonX-100で除去し、トリプシンで消化した。Lanes: 1, 未処理; 2, TritonX-100処理; 3, トリプシン処理; 4, TritonX-100とトリプシンで処理。