

平成13年度

エイズ医薬品等開発研究

重点研究報告書

第2分野

エイズワクチン等エイズ発症防止薬の
開発に関する研究

HIV構造遺伝子とHIV制御遺伝子のコンビネーション ワクチンの開発に関する研究

所属 国立感染症研究所

研究者 本多 三男

分担研究者

- | | |
|----------------------|-------|
| (1) 国立感染症研究所 | 仲宗根正 |
| (2) 名古屋市立大学分子医学研究所 | 岡本尚 |
| (3) 長崎大学歯学部 | 山田毅 |
| (4) 国立感染症研究所 | 小島朝人 |
| (5) 日本 BCG 研究所 | 戸井田一郎 |
| (6) 大阪大学微生物病研究所 | 清野宏 |
| (7) 日本医科大学微生物学・免疫学教室 | 高橋秀実 |
| (8) 熊本大学エイズ学研究センター | 滝口雅文 |
| (9) 富山医科薬科大学動物実験センター | 山本博 |
| (10) 国立感染症研究所 | 佐多徹太郎 |
| (11) 国立感染症研究所 | 網康至 |
| (12) 国立感染症研究所 | 小室勝利 |
| (13) 国立感染症研究所 | 山崎修道 |

要旨

発展途上国を中心として世界的に拡大し続けている HIV の予防対策としては、HIV に対するワクチンの開発が最も有効な手段と推察されている。従って、本研究では HIV 病原性株の感染を有意に制御することができるリコンビナントベクターワクチンを作製することを試みた。HIV の標的遺伝子としては、既に HIV の構造遺伝子のなかで、最も cross-reactive な強い CTL 誘導能が明らかになっている Gag を標的にした。さらに防御免疫誘導能を増幅させるために制御遺伝子に着目し、特に Tat 蛋白の生物活性を変異により除去した mTat 遺伝子を組み込んだ Tat ワクチンを作製した。

HIV ワクチンの開発は clade specific に行う必要性のあることから日本で流行している clade B 及び E を選択した。具体的には病原性ウイルスの開発とその粘膜感染によるサルエイズモデルを確立し、強い防御免疫を誘導するために、これまでのワクチンで用いられてきた単一ワクチンを用いる考え方を発展させて混合免疫ワクチン法の開発を行った。さらに HIV の感染は粘膜感染によることから粘膜局所における防御免疫の誘導を行い、免疫学的パラメータとして、CTL を中心とした細胞性免疫の誘導、IgA 産生などの液性

免疫についても検討した。さらに、HIV ワクチンの開発は HIV の病態進行を考えるとこれまで用いられているワクチン以上の安全性に富むものを開発する必要性が明らかである。従って本研究に用いるベクターは安全性に富むベクターであるかどうかを HIV 遺伝子に組み込んだ後に検討し、明らかにした。さらに Tat が免疫系を障害する可能性が示唆されることから産生される変異 Tat 蛋白の生物作用についても *in vitro* で明らかにした。今後、ワクチンの接種対象者の選択及び接種のスケジュールや投与ルートについて詳細な解析を行う。特に BCG 免疫保有者と rBCG ワクチンについてはサルや小動物モデルを用いて詳細な解析を行うことにより、サルでの防御免疫誘導能を最適化し、そのデータをベースにして臨床試験の可能性を検討する。

1. 研究目的

これまでの種々の HIV ワクチンの開発研究が欧米を中心に行われてきたが、このプロジェクトでは日本において開発が可能と思われる HIV ワクチンの実用化研究に重点を置く。特に HIV 感染が粘膜感染によるものが主であることに着目し、HIV 特異的な粘膜免疫の誘導効果を示すワクチン開発と、粘膜チャレンジによるワクチン効果評価系の開発を行う。具体的にはこれまで開発された細菌性ベクターを用いた rBCG HIV ワクチン、さらにワクシニアウイルスベクター株 (DIs) HIV ワクチンの構築と、その防御免疫誘導能の最適化を行い実用化を目指す。そのために以下のサブプロジェクトを用いて検討し、その成果をもとにしてワクチン開発を行う。さらにワクチンの防御免疫能の増幅を目的として、HIV 構造遺伝子に加えて、制御遺伝子を標的としたワクチンを構築することによりその効果を検討する。具体的には、リコンビナント BCG/ワクシニアワクチンの技術を応用し、Tat 遺伝子発現ワクチン rBCG-HIV Tat、rDIs-HIV Tat (野生型 Tat および変異型 Tat) の単独でのワクチン効果を検定する。さらに本ワクチン研究グループによって作成されているワクシニアワクチン rDIs-HIV Gag あるいは rDIs HIV/(Gag+mTat)でプライミングし、mTat (変異型 Tat) 発現 BCG/ワクシニアワクチンをブースターに用いた混合ワクチンの防御免疫能を rDIs-HIV Gag 単独接種の場合と比較する。また、予備実験として細胞レベル実験で蛋白発現および機能発現効果の最適化を行うとともに、動物を用いた前臨床試験を完了する。

2. 研究方法

HIV ワクチン開発の課題点はこれまでの HIV 感染の病態解析の結果から HIV 抗原を高いレベルで発現させ、MHC を超えて細胞性免疫を高いレベルで誘導することにある。しかし、発現や誘導のレベルと防御免疫とのかかわりが全く明かになっていない。さらに発現させる HIV 標的遺伝子の選択についても全く不明のままである。これらの問題に対応しながら感染防御能に優れた HIV ワクチンを作る事を目的として以下のような方法を使用した。

1) ワクチンコンストラクション：

- ①本年度は細胞性免疫を誘導するのに優れているといわれている Gag 遺伝子を標的としてリコンビナントベクターたとえば BCG あるいはワクシニア DIs 株を用いたリコンビナントベクター Gag ワクチンを作製し免疫誘導能を解析した。
- ②HIV ワクチン研究の防御能を示すコントロールとして生ワクチンの使用が明らかとなっている

SHIV-NM-3rN 株 (SIVmac239 の env 部分を HIV の HIV-1-NM-3rN 株の env 遺伝子に置換した組み換えウイルス)、ならびにこの株よりさらに Nef 遺伝子を欠損させた弱毒株 SHIV-dNef、そして HIV-1-89.6 株の env 遺伝子に組み換え、その中より選択した強毒株 SHIV-89.6P 株を用いた。すでに速水研究室では、この SHIV-dNef を皮下接種したアカゲザルに親株の SHIV-NM-3rN を攻撃接種した場合、そのウイルスの増殖が非免疫群に比べ著明に低下することを報告しているが、この感染抵抗性獲得ザルの個体内には、殆ど中和抗体活性は検出できず、また NK 活性も認められていない。そこでまず、この個体内にウイルス特異的な細胞性免疫が誘導されているか否かを、NM-3rN 株の env V3 部分 RIQRGPGRAFVTIGK、SIVmac239 株の gag 領域 p27 部分 CTPYDINQM)、そして同株 pol 領域の RT 部分 QVPKFHLPV を合成 ELISPOT 法を実施した。さらに、細胞性免疫活性の存在が確認された個体内において、SHIV 特異的な CTL が誘導されているか否かを検討するため、まず個々のサル由来 SHIV 感受性 T 細胞株の樹立を試みた。従来、特異的 CTL の細胞傷害活性を測定するためには、それぞれのサルより B 細胞を Herpes papio を用いて不死化させ、それに目的とする SHIV 遺伝子を組み込んだワクチニアウイルスを感染させたものを標的細胞として使用してきたが、この方法では実際の SHIV 感染細胞そのものに対する傷害活性を測定しているのではない。そこで、本研究では、ヒト CD4 陽性 T 細胞株を不死化すると同時に、ケモカインレセプターや CD4 分子をはじめ様々な分子発現が保存される可能性を有した Herpes Virus Saimiri (HVS)を用い、末梢血単核球細胞 (PBMC) より CD4 陽性 T 細胞株を樹立し、以下の実験を実施した。

2) 免疫能及び防御免疫誘導能の評価: カニクイサルを用いて実験を行った。ベクターコントロール、rBCG のみ、rDIs のみ、rDIs プライミング・rBCG ブースティング、rBCG プライミング・rDIs ブースティングの4つのグループに分けて行った。接種量は rBCG は 10mg、rDIs は 10^6 PFU である。それぞれプライミングしてから約 47 週間後にブースティングを行い SHIV-KS661 を 2000TCID₅₀ チャレンジしたネイティブサルに 2000TCID の KS661 を粘膜感染させると CD4 が約 2 週間後に 1 桁から 2 桁に落ちそれに反してウイルス血中コピー数は $10^8 \sim 10^9$ レベルに増加し速やかにセットポイントに達し、 $10^5 \sim 10^6$ レベルを行き来した。

① HIV-1 epitope peptide-HLA class I tetramer の作製:

15 種類の HIV-1 epitope と 6 種類の HLA クラス I 分子を用いて、15 種類の HLA クラス I tetramer を作成した (Table1)。

② tetramer を用いた HIV-1 抗原特異的 T 細胞の検出:

作製した tetramer は、それぞれ特異的な CTL クローンあるいは CTL 細胞株を用いて、その特異性を確認した。HIV-1 感染患者の末梢血単核球 (PBMC) を、抗 CD8 抗体と tetramer で染色して HIV-1 特異的 CD8 T 細胞の数を flowcytometry で測定した。

③ HIV-1 抗原特異的 T 細胞の抗原の測定:

抗 CD8 抗体、抗 CD28 抗体、抗 CD45RA 抗体とテトラマーを用いて、HIV-1 感染患者の末梢血単核球 (PBMC) を染色して、フローサイトメトリーにて 4 color analysis をおこなった。さらに HIV-1 感染患者の末梢血単核球 (PBMC) から抗 CD8 抗体がついたビーズを用いて CD8 陽性細胞

を精製し、この CD8 陽性細胞を抗 CD28 抗体、抗 CD45RA 抗体、抗 CCR5 抗体とテトラマーを用いて染色してフローサイトメトリーにて 4 color analysis をおこなった。HIV の中和活性部位である V3 ループを BCG の α 抗原プロモーターで発現するベクターに挿入し BCG 東京株に組み込んだ (rBCG-V3J1)。この rBCG-V3J1 をマウスに経鼻、経口ならびに全身免疫法で投与し異なる投与方法による有用性を確認する。さらに各種免疫法で誘導されてくる抗原特異的な免疫抗体反応を全身系ならびに粘膜系各組織(唾液腺、膺、腸管)について検討する。また誘導された抗体が HIV に対して中和活性能を有しているかを検討する。さらにこれまでの予防用ワクチンと違い、治療用ワクチンの開発を考慮に入れ HIV 感染に即した免疫不全状態での抗体誘導応答の検討を行う。

3) ワクチンの安全性・安定性に関する検討：発現ベクターへのクローニング：stage17 の embryos から Sox9 (SRY-related HMG box, SRY; Sex-determining region Y) の cDNA をクローニングし、それらの遺伝子を効率良くアフリカツメガエル (*Xenopus Laevis*) の卵、及び胚 (embryos) で発現させるために、プラスミド発現ベクター、pCS2+ (PBR 系のプラスミドベクター) ヘサブクローニングを行った。同様にして、SHIV-C2/1 (Similian/Human Immunodeficiency Viruses) -Tat (pGEM-C2/1Tat-Rev)、又は SHIV-C2/1-muTat-1 の各 cDNA (阪井らがクローニング) が挿入されている、pGEM-C2/1 tat-rev、又は pGEM-muTat-1 から各々 Tat 及びその組換え体 muTat (Tat の transactivator 活性に必要なアミノ酸 30 番目の Cys を Ala へ、41 番目の Lys を Ala へ置換した) を制限酵素で切り出し、上記発現ベクター、pCS2+ (PBR 系のプラスミドベクター) ヘサブクローニングを行った。モルフォリノーアンチセンスオリゴヌクレオチド (Morpholino antisense oligonucleotides) : Sox9 の発現を抑制または阻害するために 5'側の非翻訳翻訳領域から遺伝子開始コドンの領域に 25 mer のモルフォリノーアンチセンスを設計した。

マイクロインジェクション (接種) : アフリカツメガエルの受精卵を得るために、実験前日にヒトの性腺刺激ホルモン (HCG) 1000 unit で排卵誘発を行った雌から得られた卵と雄から摘出した精巣 (十分にホモジナイズしておく) とを 10 cm シャーレ内で体外受精を行う。室温で受精後約 1 時間 30 分後、2 細胞期の胚 (embryos) の片方の 1 細胞だけにモルフォリノーアンチセンス RNA の接種を行った。また、同時に接種における内部標準 (各卵への手技的な要因による接種効率のばらつきを補正するため) として beta-Gal 遺伝子 (RNA) も共に接種を行った。遺伝子発現パターンの解析 : Sox9 又は既に良く知られている neural crest 形成の遺伝子マーカー Slug をプローブに用いて、モルフォリノーアンチセンス Sox9 による機能阻害の影響を whole-mount in situ hybridization 法によって解析を行った。

4) Second generation ワクチンの開発 :

- ①ウイルス遺伝子を発現したワクチンの構築。Env, Gag, Tat の遺伝子を組換えたワクシニアに関して作製が終了し、BCG に関して作製中である。
- ②細胞株およびウイルス : HIV-1 潜伏感染細胞株である OM10.1 以外に HL60, Jurkat, THP1 および Tat を構成的に産生する THP1/Tat 細胞株 (Merin et al. FEBS Lett. 394:9-13, 1996) を用いた。HIV-1 full-length proviral DNA を含むプラスミッドとしては pNL4-3 を用いた。細胞からのウイルス産生量は、培養細胞上清中のウイルス p24 抗原量を p24 antigen capture ELISA assay

(RetroTek 社)により定量した。

③細胞表面 MHC II 抗原の測定：細胞表面での MHC II (HLA-DR, HLA-DP)の発現は FACS によって解析した。

④luciferase 検定：種々の luciferase (luc)遺伝子発現プラスミッドとエフェクタープラスミッドの細胞への導入には lipofectamine を用いた。24 時間後、細胞から蛋白を抽出し、luc 活性を測定した。

⑤Gag VLP を発現するワクチンシステム：Gag 抗原遺伝子を発現する組換えワクシニアウイルス、同じ Gag 遺伝子を発現する DNA ワクチン用 plasmid、および、組換えバキュロウイルスは前年度報告したものをを用いた。この組換えバキュロウイルス由来 Gag VLP 抗原は、感染 High-5 昆虫細胞培養上清から超遠心で精製した物を用いた。Gag 蛋白の抗原性：これらの Gag 抗原発現システムで細胞内に産生された、あるいは培養上清中に放出された Gag VLP 蛋白は、抗-Gag モノクローナル抗体あるいは HIV-1 感染者血清を用いたウェスタンブロット法、及び、ELISA 法で確認した。免疫原性試験：免疫動物としてマウス(BALB/c、6 週齢、雌)を用いた。上記 Gag 抗原発現ワクチンシステムを種々のコンビネーションで免疫したマウスから経時的に採取した血清中の抗-Gag 抗体を、大腸菌発現系から精製した組換え GST-p24 Gag 蛋白を固相化抗原に用いた ELISA 法で測定した。

5) コホート研究に至るまでのワクチン開発の総合的検討：臨床試験実施体制については、タイがこれまで行ってきた HIV ワクチン臨床試験の実施体制を聞き取り等により調査するとともに、わが国の臨床試験実施キャパシティも考慮して最も適切な協力方法を考察する。ワクチンを含む予防活動の社会経済的評価に基づく有効利用についてタイの既存の予防活動及び HIV ワクチン接種とその効果の可能性は図のようになる。社会経済的評価として公衆衛生上の効果、経済的効果、費用負担などを評価するのに、必要なデータ、解析方法について検討した。

3. 研究成果

本プロジェクトは実用化を目指したワクチン開発研究プロジェクトであるのでそのためにはサルによる病原性ウイルスの感染を防御できる免疫能を誘導する HIV ワクチンの開発を行う。ヒトへの投与を目的とするので、実用化の目処がたつ安全性及び安定性に優れたワクチンであること。HIV ワクチンの使用は発展途上国を主な対象とするので安価で手に入りやすいワクチンであること。ワクチンのトライアルに向けた評価に耐えるワクチン評価システムの開発と前臨床レベルまでのワクチン製造のための可能性の研究以上のことを目的にして今年度はまず、病原性サルモデルでウイルスの感染を防御できるワクチンレジメンを開発した。したがってそのレジメンの至適化を行うとともにその実用化を目指すことを第一の目的とした。さらにより優れた防御能が期待できる second generation のワクチンについても研究を展開した。

1) ワクチンコンストラクション

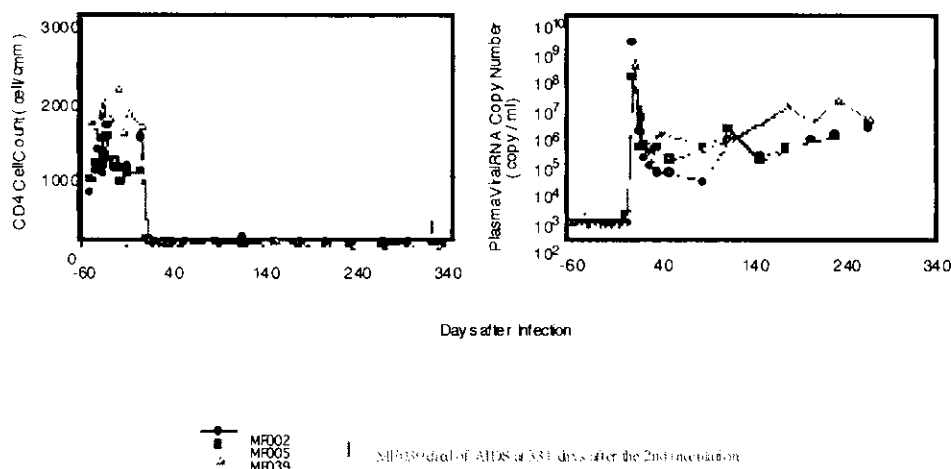
ELISPOT 法による抗原特異的免疫応答の検出：感染抵抗性サルの末梢 PBMC 中にウイルス抗原特異的に IFN- γ を産生する細胞が存在するかどうかを ELISPOT 法を用い調べたところ、SHIV 由来ペプチドに対する特異的免疫応答が MM133、MM135、MM136 において観察されたが、コントロールである非免疫ザル MM51、MM262 の PBMC においてこれらのペプチドに対する反応性は認められなかった。

HSV で不死化したT細胞表面抗原の確認： 以上より、親株である SHIV-NM3rN 株の攻撃接種に対する感染防御能を保有した感染抵抗性獲得ザル個体内には、中和抗体や NK 活性が殆ど検出されないものがあるが、ELISPOT 法によるペプチド特異的な IFN- γ 産生細胞の存在が確認された。通常 10 個程度のペプチドに対し特異的な IFN- γ 産生を開始する細胞群の主体は、CD8 陽性の CTL と推測される。そこで、この特異的な CTL が個体内に存在するか否かを検討するため、HVS で誘導した CD4T細胞株がこうした CTL の標的細胞として SHIV に対する感受性を有するための CD4 あるいはケモカインレセプター分子を発現しているかを調べた。

樹立T細胞株への SHIV 感染性の確認： 表2に示す様に、各感染抵抗性獲得ザルより HVS を用いて樹立したT細胞株は CXCR4 ならびに CCR5 の双方が陽性であった。そこで、これらの細胞が、CXCR4 を利用すると推測される NM-3rN 株、あるいは CCR5 を利用する SIVmac238 株、そして CXCR4 ならびに CCR5 の双方を利用するとされる 89.6P 株に感染するか否かを検討した。その結果、樹立したT細胞株は SHIV-NM3rN, SHIV-89.6P, SIVmac239 の全てのウイルスに感染し、増殖することが確認された。SIVmac239 の p27 抗原を指標として追跡した増殖曲線を示す。以上より、HVS により個々の感染抵抗性獲得ザルより樹立したT細胞株が SHIV ならびに SIV に感染しその内部でウイルスが複製することが確認された。そこで、この SHIV 感染細胞をによって抵抗性獲得ザル由来の末梢血 PBMC を再刺激した場合、この感染細胞特異的な CTL が誘導されるかを chromium 51-release 法により追跡した

2) 免疫能及び防御免疫誘導能の評価

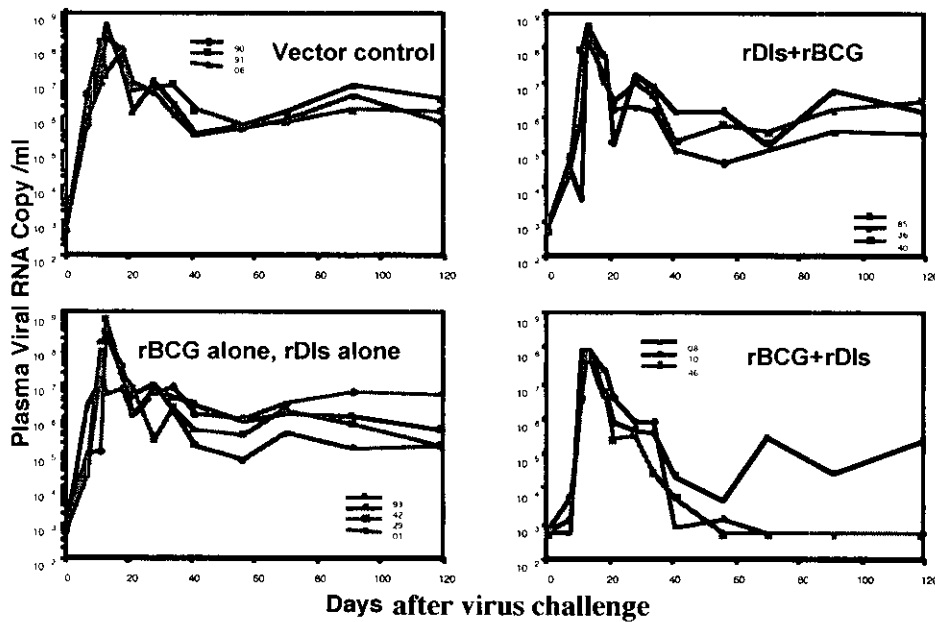
プロトタイプワクチンの防御免疫誘導能：SIV の Gag 遺伝子を標的として rBCG をベクターに用いた rBCG-SIV Gag ワクチンで免疫し、rDIs-SIV Gag ワクチンでブーストすると強い Gag 特異的免疫が誘導された。さらに免疫サルに感染性ウイルスを粘膜感染させると血中ウイルス量のセットポイントが著明に低下し、3 匹中 2 匹は検出限界以下を持続しており、3 匹中 1 匹は低レベルで振幅している。CD4 の減少は有意に抑制されている。このサルは現在感染後 4 ヶ月に入っていて経時的に観察中である。



efficacy の結果はベクターコントロール、rBCG のみ、rDIs のみ、rDIs プライミング・rBCG ブースティン

グ、rBCG プライミング・ rDIs ブースティングの4つのグループで図のようになる。

Control of viral load in a SHIV model by rBCG/rDIs vaccine



テトラマーを用いた慢性 HIV-1 感染症患者の PBMC 中の HIV-1 特異的 CD8 T 細胞の測定 : 15 種類のエピトープペプチドを用いて、テトラマーを作製した。それぞれのテトラマーの特異性は、特異的 CTL クローンを用いて確認した。FITC 標識抗 CD8 抗体と PE 標識テトラマーを用いて HIV-1 非感染者 PBMC を染色し、テトラマーの非特異的結合を調べたところ、総 CD8T 細胞の 0.01~0.03%であった。各テトラマー結合 CD8T 細胞の数は、各 HIV-1 感染者によって異なっており、1%をこえるものもあった。このように 15 種類のエピトープ特異的 CD8T 細胞を、テトラマーを用いて flowcytometry で検出する方法を確立した。

HIV-1 特異的 CD8 T 細胞の CD28CD45RA phenotype 解析 : HIV-1 に感染していない人と HIV-1 慢性感染者の PBMC を、抗 CD8、抗 CD28 および抗 CD45RA 抗体で染色し、比較した。その結果、HIV-1 感染者は非感染者と比べて、memory/effector (CD28⁺CD45RA⁻) 分画が増加していた。HIV-1 特異的 CD8 (tetramers⁺CD8⁺) T 細胞の CD28CD45RA phenotype の解析をおこなった所、CD28⁺CD45RA⁻および CD28⁻CD45RA⁻の effector T 細胞の増加がみられた。特に CD28⁻CD45RA⁻ phenotype をもった分画の増加は著しかった。

HAART 療法後の HIV-1 特異的 CD8T 細胞の変化 : HAART 療法後著しく HIV-1 RNA 量が低下した 2 人の患者の HIV-1 特異的 CD8T 細胞の数を、tetramer を用いて調べた。HAART 療法後、HIV-1 RNA 量の低下に比例して、HIV-1 特異的 CD8T 細胞の数は低下した。この低下は増加していた CD28⁻CD45RA⁻分画の低下によるものであった。

HIV-1 特異的 CD8T 細胞上の CCR5 の発現 : HIV-1 感染者と非感染者の CD8T 細胞上の CCR5 発現細胞

の数を比較した所、HIV-1 感染者の方がはるかに多く、さらにその数は HIV-1 特異的 CD8T 細胞で上昇した (Fig.1)。これらの結果から、memoryCD8T 細胞あるいは effector CD8T 細胞には CCR5 が発現していることが推測された。そこで 3 人の HIV-1 感染者の末梢血から分離した CD8T 細胞を、抗 CD28 抗体、抗 CD45RA 抗体、抗 CCR5 抗体とテトラマーを用いて染色して、フローサイトメトリーにて 4 color analysis をおこなった。その結果、memory CD8T 細胞と考えられる CD28⁺CD45RA⁻を持った CD8T 細胞で強く発現していた。この発現は、memory/effector(CD28⁻CD45RA⁻)から effector (CD28⁻CD45RA⁺) と分化するにしたがってその発現は低下した。同様な結果は、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) 特異的 CD8T 細胞上でも見られた。また naive CD8 (CD28⁺CD45RA⁺)は、CCR 5 の発現が見られないことから memoryCD8T 細胞になってから発現すると考えられた。

粘膜免疫誘導能：始めに rBCG-V3J1 を経鼻、経口ならびに全身免疫を行い血清中の抗原に対する抗体価を測定したところ、経鼻投与方法が投与抗原が少ないにも関わらず抗体誘導が最も効果的であった(図 1)。そこで以後の実験を経鼻免疫投与方法で行うこととした。rBCG-V3J1 を経鼻免疫することで V3 抗原特異的な血清 IgG は誘導されたが、膣洗浄液、鼻腔洗浄液、糞便といった粘膜面および血清中に抗原特異的 IgA 抗体は誘導されなかった。また脾臓組織より分離した単核球中に V3 特異的 IgG 抗体を産生する細胞が ELISPOT 法にて確認されたが、IgA 抗体は検出されなかった。興味深いことにこれらの抗体産生維持は 1 週間ごと 3 回の免疫で少なくとも観察期間の 1 年間は維持することが明らかとなった。抗原特異的な抗体の誘導を助けるサイトカインの産生パターンを検討したところ、各種臓器において V3 特異的な Th1 型のサイトカイン産生が CD4⁺ T 細胞に認められ、Th2 型のサイトカインはほとんど認められなかった。誘導された血清中の IgG は *in vitro* での p24 リリース試験で臨床分離株 HIV-MNp や標準株 HIV-MN に対する中和能が濃度依存的に認められた。HIV の感染による Th1 型、Th2 型免疫不全状態を想定して、IFN- γ 欠損マウスや IL-4 欠損マウスを用いて同様の実験を行ったところ、野生型マウスと同様に全身系のみ HIV に対する中和能を持つ IgG 抗体が長期間誘導された。

3) ワクチンの安全性・安定性に関する検討

転写因子である Sox9 は、ヒトではその遺伝子の突然変異が、Neural Crest 由来の軟骨の形成不全と性逆転現象を引き起こすことが知られていたが、多分化能細胞集合体（これらは発生運命は軟骨、色素細胞、Ganglion、muscle cells、skeletal elements に分化することがわかっている）である Neural Crest の初期発生における Sox9 の役割はいまだ明らかにされていなかった。そこで、我々はヒト、マウスに homologous な *Xenopus* の Sox9 をクローニングしたところ、ヒト、マウスとの間でも各々 79%、80%と種を超えて高率に保存されていることがわかった。また、アフリカツメガエルにおける Sox9 の遺伝子発現を whole-mount in situ hybridization 法によって解析を行ったところ、neural crest progenitors neural crest 形成予定領域、さらに neural crest が branchial arch へ migration していく様子を経時的に示すことができた。また、同じく neural crest 形成に必須であることが知られている他の転写因子 Slug との発現様式が一致していた。

以上の結果より、このシステムを用いることで目的遺伝子の発現とその局在における広範な現象を一度に、かつ視覚的に解析することが可能であることを示した。また、その遺伝子発現パターンは、前後の体軸対

して左右対称に非常に強く認められることを利用して、体部の片側だけに Sox9 遺伝子の loss of function による影響を再現させ、もう片方を正常コントロールにすることで、同一個体内で同時期に様々な外来遺伝子による影響を検討した。今回は、アンチセンス Sox9 を、受精後の 2 細胞期の embryos の片側、すなわち 1 細胞のみに接種し、そのまま発生を継続させ、アンチセンスによる影響を各発生段階で遺伝子マーカー slug の発現を指標に解析を行った。その結果、アンチセンス Sox9 の接種量に比例して接種した側の slug の発現は抑制、または阻害された。また、2 細胞期へのアンチセンスによる接種は、興味深いことに発生後期 (stage45) まで影響を与えており、neural crest 由来の muscle elements のみが特異的に阻害されることがわかった。また、現在は上記の xenopus の系を用いて、HIV の抑制遺伝子 Tat が初期発生の胎児にどのような影響を与えるかを解析することを目的に、Tat 及びその組換え体 mu-Tat の各遺伝子を xenopus で効率良く発現するプラスミド発現ベクター、pCS2+へのクローニングを行い、解析を進めているところである。

モデル動物の病理学的解析法を以下のように確立した。1) *in situ* HybrAT (ISH-AT) 法 : HybrAT 法は 5' 末端に Biotin を 1 個、3' 末端に 20 塩基の AT の繰り返し配列(AT)₁₀ を付加した合成 oligonucleotide probe (HybrAT プローブ) を用いる。probe の 5' 側は標的核酸と相補的なハイブリダイゼーション部分(約 40 塩基)で、この部分を特異的にハイブリダイズさせた後、過剰のプローブを通常よりもさらに high stringency 条件下で洗い流す。次に 3' 末端の AT 配列を多くのハプテン (Digoxigenin や Biotin) を取り込ませながら特異的に *with* DNA polymerase により伸長(AT tailing 反応)させることでラベルし、このハプテンを Alkaline phosphatase や HRP 等の酵素反応で検出する。次に、pSIVmac239 の塩基配列から gag と nef の HybrAT プローブを作成した。SIV gag 及び nef 領域の PCR 産物を精製し、4 倍希釈系列をフィルターにドットプロットし、アルカリ変性後 UV cross link して固定した。gag と nef のプローブを用いてフィルターハイブリダイゼーションし、種々の条件 (ハイブリダイゼーションの温度、洗いの条件など) で反応を試み、感度、プローブの特異性などについて検討した。また実際にホルマリン固定パラフィン包埋したサル組織切片を用いて ISH-AT 法を試みた。すなわち脱パラ、前処理後、50°C、O/N で hybridization し、強力な洗浄後、AT tailing 反応し、洗浄、ブロッキング後 LSAB 法による HRP の酵素反応でシグナルを検出した (ISH-AT 法)。2) ISH-AT-CSA 法 : CSA 法は近年開発された tyramide を用いたシグナル増幅法である。まず、この CSA 法と AT tailing 法の検出感度上昇率をフィルタードットハイブリダイゼーションを用いて比較した。この際 HIV 感染者の末梢血中の HIV クローンの gag PCR 産物とこの塩基配列に特異的な HybrAT プローブを使用した。SH-AT 法と CSA 法を合わせた ISH-AT-CSA 法はともすれば非特異的なシグナル (バックグラウンド) も増強してしまい、signal/noise (S/N) 比が減少してしまうこともあるが、ISH-AT-CSA 法の場合、プローブ量を 1/10 に減少させ、洗いを強化し、標識時間 (AT tailing 反応時間) を 1/2 に短縮することでバックグラウンドの増強を抑え、ISH-AT 法と比較して、より優れた S/N 比の検出系とすることが可能であった。また CSA 法の 2 次抗体を蛍光標識し、シグナルを共焦点レーザー顕微鏡下で観察することも可能であった。また、ISH-AT-CSA 法と免疫染色の二重染色により ISH-AT-CSA シグナル陽性細胞を同定した。SHIV 感染組織として SHIV86.9PD を 10TCID50 静注し、8 ヶ月後に安楽死させたカニクイザルの剖検脳組織およびリンパ節を解析した。

4) Second generation のワクチン開発

① Tat 遺伝子を使ったワクチン：まず IFN γ による HIV-1 潜伏感染細胞 OM10.1 からのウイルス産生に対する効果を検定した。OM10.1 細胞に TNF α 刺激を加えることにより著しいウイルス産生の誘導が起こった。しかしながら、種々の濃度の IFN γ であらかじめ細胞を処理することにより TNF α によるウイルス産生が濃度依存性に低下した。また、STAT1 およびその活性化型であるリン酸化された STAT1 をウエスタンブロット法により見たところ、IFN γ 刺激 5 分後より STAT1 の活性化が認められ、しかも IFN γ の濃度に依存していた。他方、cyclin T1 の量には変化が見られなかった。さらに、IFN γ による CIITA 誘導は CIITA に対する良い抗体がないため MHC II の発現をモニターした。ヒト単球系細胞株 THP-1 に IFN γ を作用させたところ MHC II の発現は約 15 倍に増加したことから CIITA 活性の誘導が確認された。次に、これらの IFN γ の効果が Tat 作用を抑制するためによって起こっているかを見るために HIV-1 LTR をプロモーターに持つ luciferase reporter プラスミッドからの遺伝子発現の Tat によるトランス活性化に対する IFN γ の効果を検定した。HL60 および Jurkat いずれの細胞株においても、IFN γ による Tat のトランス活性化に対する著明な抑制作用が確認された。Kwak ら (Swiss Med. Wkly 131:41-46, 2001) および Sadeghi ら (Transplantation 71: 1262- 1268, 2001) により少なくとも血管内皮細胞では HMG CoA reductase 阻害剤である statin 系化合物が CIITA の誘導を障害することを報告している。そこで、まず IFN γ 処理に伴う STAT1 活性化と MHC II 誘導に対する simvastatin の効果を検定したが、種々の濃度の simvastatin による効果は認められなかった。同様に OM10.1 において simvastatin の効果を検定した。上記の実験と同様 IFN γ 投与による TNF α 刺激に伴うウイルス産生誘導の抑制に対して、simvastatin は最大 5 μ M 投与しても作用を認めなかった。

② DNA とのコンビネーション：一次免疫による Gag 抗体免疫応答の誘導については、DNA ワクチン<精製 Gag 蛋白抗原ワクチン>組換えワクシニアウイルスワクチンの順に効率がよく、同一ワクチンで一次・二次免疫を共に実施した場合においても免疫誘導効率は同様の順位であった。しかし、最も効率の悪かった DNA ワクチンを一次免疫に用いて、精製 Gag 蛋白抗原ワクチンあるいは組換えワクシニアウイルスワクチンを二次免疫に用いるコンビネーションワクチンでは、最も効率の高かった組換えワクシニアウイルスワクチンだけで一次・二次免疫を共に行った場合よりも約 5 倍高い抗体価が誘導された。しかも、上記コンビネーションの順番を逆にして第一次免疫に組換えワクシニアワクチン；第二次免疫に DNA ワクチンを用いると、抗体価の誘導は約 1/20 に低下した。以上の結果は、一次免疫に DNA ワクチンを用いるコンビネーションワクチンが最も優れていることを示唆している。そこで、二次免疫に用いる組換えワクシニアワクチンの投与量を一定にした条件下で、DNA ワクチン一次免疫の DNA 投与方法および投与量を検討した。その結果、多くの報告で実施されている筋肉注射法では 100 μ g 以上の DNA 量が必要であったのに対して、電気パルス法では 10 μ g の DNA で 100 μ g 筋肉注射法と同等の一次免疫効果が得られた。次に、電気パルス法による一次免疫の DNA 投与量を一定にして、二次免疫における組換えワクシニアワクチン接種量を 10⁵ から 10⁸ PFU まで種々に変動させて Gag 抗体誘導効果を検討したところ、10⁷ PFU の組換えワクシニアウイルス量で最大効果に達することが明らかになった。

5) 臨床試験の可能性の検討：臨床試験実施体制について HIV ワクチン開発研究プロジェクトがサルレベルでも評価の結果が得られたのでパイロットプロダクション、臨床試行の準備に入る。

- 1) もちろん基礎的研究は続行し、Phase I, II, III, IV に備えてサンプルの解析、動物レベルで得られたデータをもとに解析する。
- 2) より効果的なワクチンを作製するために現在のワクチンの効果を評価モニターし、よりよいワクチンを作製する必要がある。前臨床レベルで得られた成果をもとに Phase I, II, III のワクチン効果、安全性のヒトに対する評価法の開発を行う。

4. 考察

「HIV 構造遺伝子と HIV 制御遺伝子のコンビネーションワクチン開発に関する研究」プロジェクトの第一年度はまず、サルを用いた病原性ウイルスの感染を防御できるワクチンレジメンの開発をおこなった。本年度の研究により SIV の Gag 遺伝子を標的として rBCG をベクターに用いた rBCG-SIV Gag ワクチンで免疫し、rDis-SIV Gag ワクチンでブーストすると強い Gag 特異的免疫が誘導された。さらに免疫サルに感染性ウイルスを粘膜感染させると血中ウイルス量のセットポイントが著明に低下し、この実験群のグループ 3 匹中 2 匹は検出限界以下を持続しており、3 匹中 1 匹は低レベルで振幅している。CD4 の減少は有意に抑制されている。このサルは現在感染後 4 ヶ月に入っていて経時的に観察中である。したがって BCG とワクチンニア Dis をベクターに用いたプライムブーストの系でワクチンレジメンを作製すると Gag 遺伝子を標的とするだけで有意な防御免疫能を誘導できることがわかった。この系をもとにしてより強い防御免疫能の誘導の至適化を試みる。さらに、ヒトへの投与を考慮してヒト投与可能な量とルートの実用化研究を行う。もちろん、ワクチンの実用化のためには安全性の研究、パイロットプロダクションの研究さらにはコホートの作成の可能性の検討等、多くの問題が考えられるのでそれらについてもこの班を母体として検討する意向である。

SHIV-dNef によりアカゲザル個体内に誘導される SHIV の攻撃接種に対する感染防御能の実体が、中和抗体や NK 細胞によるものか、それとも従来から指摘されているような SHIV 特異的な CTL によるものか、あるいは $\gamma\delta T$ 細胞などそれ以外の要素によるものか不明な点が多い。また、その CTL が従来の方法では本当に SHIV 感染細胞そのものを破壊・排除するのかもはっきりしない。本研究では、こうした点を明らかにする目的で、SHIV-dNef 接種を受けた感染抵抗性獲得ザル 4 匹を対象とし、まずその体内に中和抗体が存在するかを ELISA 法で調べ、全てのサルにおいて中和活性が検出限界以下であることを確認した。また、抗ウイルス活性を有するとされる NK 活性も追跡したが、その活性はバラバラであり、殆ど活性が検出されないサルの存在(MM135)を確認した。一方、こうしたサル末梢血細胞に SHIV 由来のクラス I MHC 分子から提示される可能性のある合成ペプチドを添加し、その後の IFN- γ 産生状況を ELISPOT 法を用いて追跡したところ、env, gag 由来のペプチドを加えた場合、多数の産生細胞が検出された。このことは、SHIV-dNef 接種によってサル個体内に 10 残基程度のアミノ酸からなるペプチド抗原に特異的に応答する細胞、即ちクラス I MHC 分子から提示された SHIV ペプチドに応答し IFN- γ を産生する CD8 陽性の CTL の存在を強く示唆している。

そこで、感染抵抗性獲得ザルにおけるこうした SHIV 感染細胞特異的な CTL の存在確認を試みた。従来サルにおける CTL の標的細胞は、transform した B 細胞に組み換えワクチニアウイルスを感染させたものを使用してきたが、一般にサル B 細胞には全くレトロウイルスは感染しないことから、こうした方法では本当に SHIV 感染細胞に対する特異的 CTL が誘導されているのかを確認することには困難があった。我々は、ヒト T 細胞の transformation を可能とする HVS に着目し、この HSV によって transform されたサル T 細胞が果たして CTL の標的細胞となりうるのかを検討した。その結果、HVS で transform した CD4 陽性 T 細胞表面には、CXCR4 のみならず CCR5 が発現しており、さらには CTL 誘導には必須の共刺激因子 (co-stimulation molecule) である B7-1(CD80) や B7-2(CD86) が発現していた。そこで、この SHIV 感染 T 細胞を stimulator とし、ELISPOT 陽性であった感染抵抗性獲得ザルの末梢血細胞を再刺激したところ、SHIV 感染 T 細胞を特異的に傷害排除する CTL の存在が確認された。

特に、先述したように中和抗体も NK 活性もないにも関わらず、SHIV-NM3rN の攻撃接種に対する抵抗性を有する MM135 において、この CTL の存在が確認された事実は、この CTL が感染抵抗性の本体を構築する主たる因子であることを強く示唆している。一方において、我々はこのサルが強毒株である SHIV-89.6P の攻撃接種に対しても強い防御能を示す事を観察しているが、HVS-transformed T 細胞は 89.6P 株にも感染するため、今回誘導された CTL が強毒株感染細胞に対し交差傷害性を有するか否かを現在検討中である。また、この CTL の認識抗原を同定することにより、その抗原特異的な CTL を体内誘発させるようなワクチンによって、感染抵抗性が構築されるかを今後検討する予定である。

ベクターをベースとしたリコンビナントワクチンは、サルの病原性モデルによる評価で感染性のウイルスを CD4 の減少とウイルスコピー数の上昇に関して防御効果がある。このレジメンでわかったことは BCG をプライミングしたもののみにも効果があり、ワクチニアをプライミングしたものはその効果が見られない。その理由については誘導免疫能とも相関しており、それらの結果を合わせて考えると、BCG のプライミング効果が極めて長く維持されることにある。逆に DIs のプライミング効果は一過性のものであり、本研究に用いた DIs ワクチンの細胞内からのウイルスを複製することができないことと相関している。したがって BCG でプライミングを行うと免疫が持続しており、ワクチニアのブースティングによって免疫の増強が行われたと推測される。しかし、ワクチニアのプライミング効果は一過性なので免疫して半年以上経つと免疫力はほとんど無くなり、BCG のブースティングでブースター効果は認められない。したがって防御効果が認められないと推測される。今後、標的遺伝子の拡大とワクチン抗原の発現の増強を目的にして遺伝子効果の増強を計りたいと計画している。

15 種類の HIV-1 CTL エピトープを結合させた tetramer を作製し、すべての tetramer が、それぞれのエピトープ特異的な T 細胞に結合する事を明らかにした上で、これらの tetramer を用いて、HIV-1 慢性感染者の末梢血中にエピトープ特異的 CD8 T 細胞を検出できる事を示した。tetramer を用いた HIV-1 特異的 CD8 T 細胞の検出は、欧米では主に HLA-A2 (A*0201) tetramer を用いておこなわれている。日本人では 3 種類 (A*0201, A*0206, A*0207) の HLA-A2 がほぼ均等にあり、それぞれ人口の約 10% 程度しか持っておらず、A*0201 tetramer を用いた解析は必ずしも効率的でない。今回我々は A*0201, A*0206 tetramer に加えて、A*2402, A*1101, B*3501, B*5101 tetramer を作製したが、それぞれ日本人の約 10%、

5%, 65%, 40%, 20%, 20%がもっており、これによって9割以上の日本人のHIV-1感染者の解析が可能となった。HIV-1慢性感染者では、総CD8 T細胞の1~数%にテトラマーが結合する事が明らかになった。この事は今回検出できていない他のエピトープに対する特異的CD8 T細胞が、この数倍存在すると推定される事から、AIDSを発症していない慢性感染症の患者では、おおよそ10%程度のCD8 T細胞がHIV-1特異的CD8 T細胞であると考えられる。これらのHIV-1特異的CD8 T細胞では、CD28⁻CD45RA⁺の分画が増加しており、この分画のCD8 T細胞はHIV-1蛋白と反応して増加するeffector CTLを考えられる。実際HAART療法によって血中HIV-1 RNAが低下した患者では、この分画のHIV-1特異的CD8 T細胞が大幅に低下した。HIV-1特異的CD8 T細胞上あるいはHCMV特異的CD8 T細胞上のCCR5発現の解析から、Th1の細胞性免疫に関与するT細胞上にはCCR5が発現していることが確認された。このことは、CCR5のリガンドになるケモカインがTh1の細胞性免疫に重要役割を果たしている事を示唆している。テトラマーを用いる事で、CTLアッセイでは解析できないような、質の高い解析が可能となってきた。今後、この解析法がエイズワクチン開発のために重要な貢献をすると期待される。

rBCG-V3J1の経鼻免疫により抗原特異的なTh1型サイトカインの産生を促してHIVに対して中和抗体が血清中に誘導可能ことが確認された。さらにrBCG-V3J1の経鼻免疫は長期に渡って中和抗体の誘導維持が示された。本研究計画によりrBCG-V3J1は有効な経鼻ワクチンキャリアーであることが明らかとなった。またHIV感染により引き起こされるTh1型、Th2型免疫不全状態におけるrBCG-V3J1経鼻免疫システムの有効性についてIFN- γ 欠損マウスやIL-4欠損マウスを用いて野生型マウスと同様の実験を行った。両遺伝子欠損マウス群では全身系のみHIVに対する中和能を持つ抗体が誘導され、長期に渡って抗体産生が維持されていた。これらの結果は、HIV感染に対する予防用粘膜ワクチンの開発のみならず、治療ワクチンの可能性も示唆している。今後は実用化に向けてサル-SHIVの系を用いてより臨床応用を見据えた詳細な検討を加えていく必要がある。

ヒトやマウスでの神経冠及びそれ由来の細胞、組織、臓器の発生に重要と考えられているSox9は、これらの動物システムの限界のため、ごく発生初期のneural crest形成における役割を解析することが非常に困難とされていた。ところが、今回我々がクローニングしたxenopus Sox9及びxenopusシステムにより効率良く体外受精と接種を行うことで、目的の遺伝子の発現とその機能を短期間に多数(100-200 embryos)広範に解析することが可能であることを示すことができた。もちろん一個体へ与える影響を解析していくことが基本だが、このシステムを用いることで、目的の遺伝子を1細胞のみに接種し、もう一方の細胞を正常コントロールにすることで、その後の各発生段階で同一個体のembryoでありながらコントロールと陽性反応を同時に解析できるといった利点もある。このような特徴を考慮したうえで、我々の最終目標であるHIV制御遺伝子(Tat)ワクチン使用に伴う胎児毒性を検討するための哺乳動物で確認しておかなければならない安全性確認法の確立への第一歩として、このxenopus受精卵への接種法が有効であるものとする。哺乳動物と両生類xenopus間には動物モデルとしての違いはあるものの、このシステムは、2-3日でorganogenesisが終了するといった、非常に短期間で広範な現象の解析を行うことが可能だけでなく、哺乳動物との共通点が多いと考えられる初期発生における動物モデルとしては、非常に有効な手段と考えられる。また、Serenella Venanziら(Analysis of HIV-1 Tat Effects in Xenopus laevis Embryos.

J. Biomedical Science. 1998; 5: 211-220) によれば、HIV-1 の制御遺伝子 Tat を卵へ接種し、その後の各発生段階を解析すると原腸形成の遅延、前後体軸の変性（前後軸の区別がつかない）、前方（頭部）の体部形成不全などを生じるが、Tat の組換え体 mu-Tat（37番目の Cys を Ser へ置換したもの）を接種した卵、及びその後発生した embryo に対しては全く影響を与えることがなかった。以上のことから、Tat 遺伝子は初期発生においては、胎児への何らかの影響を与えることが予測される。当然のことながら、哺乳動物で確認しておかなければならない検査項目は早急に検討すべきだが、そのためにはまず安全性確認法を確立することが第一条件と考えられる。そのような確認法の一つとして、今回我々が用いたアフリカツメガエルの受精卵への接種法が有効な解析法として考えられる。今後は、形態学、組織学的な解析だけでなく、各発生段階に必須な遺伝子マーカー、もしくは抗 Tat 抗体などを用いた分子生物学、生化学的な解析も加えてより詳細に検討していくことが必要なものと考えられる。

pSIVmac239 の gag 及び nefPCR 産物を精製したのち copy 数に換算し、4 倍段階希釈して filter にドットプロットし、アルカリ変性後 UV cross link して固定し標的核酸とした。AT tailing を 60°C で行い、gag 及び nef のプローブを用いて hybridization と洗いの温度を検討した。酵素反応は streptavidine-HRP を反応させたのち、DAB で呈色反応を行った。それぞれの probe 配列と反応液の組成（塩濃度、ホルムアミド%）から Tm 値を算出できるが、実際の Tm 値はそれぞれの反応段階で用いられる反応液の組成（塩濃度及びホルムアミド%）が異なるごとに変化する。どの probe においても hybridization、洗いは Tm 値よりも高い温度、すなわち high stringency 条件下で反応を行った。特異的反応には probe の hybridization における Tm 条件次第であることが明らかとなった。つまり一部でも hybridization が起こり、しかもかなり厳しい条件で wash しても probe が残っていれば、AT tailing 反応により、かなり特異的に検出できることが分かった。gag 及び nef のプローブはそれぞれ gag 及び nefPCR 産物を特異的に検出し、AT tailing 反応を 60 分行うことにより、行わない場合と比較して 64 倍検出感度が増加した。実際に SHIV 感染サル の剖検リンパ節にはいずれのプローブを使用しても単独で ISH-AT シグナルが得られたが、nef プローブを用いた場合の方が強いシグナルが得られた。フィルターハイブリダイゼーションで比較検討した結果、1 分子のビオチンで標識されたプローブ使用し、従来法で検出した場合と比較して、CSA 法による検出では 4~16 倍、AT tailing 法では 64 倍、AT-tailing&CSA 法で 1000 倍感度が上昇することがわかった。SHIV 感染カニクイザルの剖検リンパ節は granulomatous lymphadenitis の像を呈し、リンパ節全体に多数のマクロファージと多核巨細胞がみとめられた。特に皮膜下辺縁洞はこれらの細胞で満たされていた。ISH-AT-CSA のシグナルは多核巨細胞の 1~数個の核と細胞質に一致して検出された(図 2A)。Sense probe では反応が得られないことにより、SHIV-RNA 特異的シグナルと考えられた。本症例のサルリンパ節内には濾胞構造はなく、ISH-AT-CSA のシグナルはマクロファージと一部の T 細胞に検出された(図 2B)。脳の病理所見は大脳灰白質直下の白質の小血管周囲に多数のマクロファージの浸潤が認められ、ときに多核巨細胞を形成していた。SIVp27 抗原は免疫染色で CD68 陽性であるマクロファージに陽性であった。ISH-AT-CSA シグナルも同様にマクロファージの細胞質内に陽性となることが分かった(図 2C)。Sense probe では反応が得られないことにより、SHIV-RNA 特異的シグナルと考えられた。さらに SIVp27 抗原陽性細胞内に SIVnef ないし SIVgag の mRNA を同時に検出することができた。多核巨細胞だけでなく、他の脳細胞

にもシグナルが観察できたが、特異性については、より検討が必要である。

今回の一連の実験から、IFN γ による HIV 複製抑制作用が Tat のウイルス遺伝子発現トランス活性化作用の抑制によることが明らかになった。このことは IFN γ もしくはその inducer が HIV-1 感染者に対して発症予防の作用をするであろうことを強く示唆した。他方、simvastatin による IFN γ 作用の抑制効果は少なくとも HIV の自然宿主である T 細胞株や単球系細胞株では見られなかった。このことより、HAART 療法に伴ってしばしば出現する dyslipidemia の治療に対する statin 系化合物の使用によってウイルス複製を促進する可能性は否定的である。しかしながら、これらの実験結果はいずれも培養細胞を用いての結果に過ぎないため、今後以上の可能性を考慮に入れて臨床観察を行う必要がある。以前に報告した結果とあわせて考えると、ウイルス増殖と免疫不全の病態進行には Tat が重要な作用をしているとともに、CIITA の過剰発現もしくは活性誘導によりこれらの病態の逆行が可能であることが示された。実際に、HIV-1 感染者の血清中の γ IFN の濃度とウイルス負荷量が逆相関し、長期未発症例では γ IFN 濃度の高い患者が多い(Bailer et al., J. Immunol. 162: 7534-7542, 1999)ことからこれらの可能性が裏付けられる。

エイズワクチン開発における近年の報告では、HIV 蛋白を発現する組換えワクシニアウイルスあるいは他のウイルスベクターを用いた組換え生ワクチンでも、バキュロウイルスあるいは哺乳動物細胞発現系から精製された HIV 蛋白ワクチンでも、さらには近年登場した DNA ワクチンでも、それぞれ単独では未だ有効なワクチンになり得ていない。この点に関して、アカゲザルの SIV 感染系における報告では、DNA ワクチン一次免疫/rFPV (組換えカナリアポックスウイルス) 二次免疫のコンビネーションワクチンで感染をある程度防御できることが近年示された。また、HIV とは異なるものの、マラリアにおいても、DNA 一次免疫/組換えワクシニア二次免疫のコンビネーションワクチンが、一定程度の感染防御効果を誘導することが報告されている。従って、エイズワクチン開発では、最適なコンビネーションを明らかにすることは現時点での 1 つの焦点になっている。本研究では、HIV 感染防御に重要であることが指摘されている Gag 抗原について、既に開発していた発現系を組合せて、最も効果的な免疫のコンビネーションを検討した。その結果、上記 SIV 及びマラリア感染系で示されたコンビネーションの感染防御効果と、本研究における Gag 抗体免疫応答の誘導結果とは、ほぼ一致していた。従って、HIV 感染の成立しないマウスを用いた本研究のアプローチでも、有効なエイズワクチン評価系として活用できるものと考えられる。他方、本研究では Gag 抗体免疫応答を指標に検討を加えたが、単一ワクチンシステムでは、Th.1 タイプの IgG2a、Th.2 タイプの IgG1 何れかの免疫が優勢に誘導されることを既に見出している。一般に、IgG2a 抗体は Th.1 タイプ細胞性免疫応答誘導の指標とされている。Gag 抗原の免疫では中和抗体の関与は考え難い。むしろ、Gag 抗原で CTL を効率よく誘導できたとする幾つかの報告を考え合わせると、Gag 抗原の細胞性免疫誘導効果の検討が必要であろう。本実験のコンビネーションワクチンによる IgG2a/IgG1 誘導の変化と共に、CTL 活性や T 細胞増殖反応等を検討したい。

ワクチン臨床開発について、タイ国は治験実施医療機関としての経験は積んでいるが、治験依頼者としての経験は乏しいのではないかとと思われる。治験医療機関としての経験が、治験依頼者として有効に機能するよう外部専門家の協力が必要と考えられる。具体的にどの面の補完が必要であるかはさらに精査する必要がある。ワクチンの有効な実施には、他の予防活動との組み合わせが不可欠であり、今後具体的データによっ

て社会経済的評価や、予防プログラムの優先度評価を行い、施策の参考に供す。なお、ワクチン免疫下に感染した HIV の増殖能や二次感染能についてさらなる研究の進展が待たれる。

5. まとめ

本年度の研究により前臨床レベルへのワクチン実用化に必要な HIV/AIDS サルモデルを用いた病原性ウイルスの感染を防御できるワクチンレジメンを開発することができた。さらにこのレジメンの長所はこれまで用いられてきた結核ワクチンとしての BCG と天然痘ワクチンとして用いられてきたワクシニア DIs をベクターとして用いるので安全性や安定性、易入手性について極めて優れている。さらにワクチンベクターの中でもこの2つのベクターはそれぞれ最も安全で副作用の少ないベクターとして捉えられているので HIV 遺伝子を組込むことによってもその性質を有していることを明らかにした。したがってこのレジメンをもとにしてワクチンの実用化をはかるとともにより有効なワクチンの開発を試みる。

SHIV-dNef の接種によってアカゲザル個体内に構築される SHIV 攻撃接種に対する感染抵抗性は、中和抗体や NK 活性によってではなく、ペプチド抗原を用いた ELISPOT 法によってその存在が示唆される、SHIV 感染細胞を特異的に認識・排除する CTL によって担われていることが推測された。

SIV の Gag 抗原を標的遺伝子として細胞性免疫誘導型ワクチンを rBCG プライミング、rDIs ブースティングの系により免疫誘導を行うと病原性ウイルスの粘膜チャレンジに対して防御効果を示すことを明らかにした。エイズワクチンの細胞性免疫に対する効果判定を、正確にかつ安易におこなえる方法の開発を試みた。HIV-1 特異的 CD8T 細胞を測定するために、15 種類の HIV-1 epitope と 6 種類の HLA クラス I 分子を用いて、15 種類の HLA クラス I tetramer を作成した。これらのテトラマーを用いて、HIV-1 感染者の末梢血単核球を CD8 抗体と伴に染色し、HIV-1 特異的 CD8T 細胞を検出した。また、これらの HIV-1 特異的 CD8T 細胞の分化度を調べるために、抗 CD28 抗体と抗 CD45RA 抗体を用いて 4 次元解析したところ、memory/effectorCD8T 細胞と思われる分画の増加が見られたが、memoryCD8T 細胞及び effectorCD8T 細胞と考えられる分画も見られた。これらの HIV-1 特異的 CD8 T 細胞は CCR5 を発現しており、RANTES のような CCR5 のリガンドが HIV-1 感染症における Th1 の細胞性免疫に重要な役割を果たしている事が推測された

エイズ対策用ワクチンとしての rBCG-V3J1 経鼻ワクチンは HIV に対して中和能を有する血清 IgG を誘導するが粘液分泌物中には抗原特異的な IgA は認められなかった。この rBCG-V3J1 の全身系投与は以前の報告で HIV 特異的な CTL 活性を誘導することより、今回の中和能を有する抗体の誘導と合わせて考えると将来の経粘膜 HIV ワクチンとして期待されるものである。

IFN γ は Tat 作用を抑制することによって抗 HIV 作用を示す。また、Tat による APC 抑制効果は抗原提示細胞での抗原提示に関わる MHC II 遺伝子の免疫応答に伴う発現誘導を阻止する事によって先天性の重症免疫不全症のひとつである bare lymphocyte syndrome (BLS)と同様の状態を引き起こすことが明らかにされているが、IFN γ やその inducer などにより CIITA の活性化を促進することにより HIV 感染に伴う AIDS の発症を遅らせる、もしくは病態を逆行させて治癒に向かわせることが可能なことが、今回の研究結果から理論的に示唆された（これらの関係を図に表した）。

HIV Gag 抗原を発現する組換えワクシニアワクチン、DNA ワクチン、組換えバキュロウイルス由来精製 Gag 抗原ワクチンを用いて、コンビネーション Gag ワクチンの構築に着手した。マウスを用いて一次免疫と二次免疫のコンビネーションを検討した結果、一次免疫には 10 μ g 以上の DNA ワクチンを電気パルス法で、二次免疫には組換えワクシニアワクチンを 10⁷PFU 接種するコンビネーションワクチンが、最も高い Gag 抗体免疫応答を誘導できることが示された。

HIV 制御遺伝子 (Tat) ワクチンの安全性、特に妊婦投与等の際して、胎児にどのような影響を与えるのかを知る目的で、アフリカツメガエルの卵へ HIV 遺伝子を接種し、胎児毒性を検索する方法が、使用し得るからさらに哺乳動物で確認すべき安全性確認法の一助となり得るのかの検討を行った。本法は、目的とする遺伝子の胎児発生に与える影響を短期間に、広範に検討することが可能で、哺乳動物との共通点が多いと考えられる初期発生における動物モデルとしては、非常に有効な手段と考えられる結果を得た。本研究班で、ワクチンとして使用する HIV 制御遺伝子の胎児への影響、特に免疫系への発生、血液細胞分化への影響、等を中心に検討を加えている。これらの結果を基に、哺乳動物で確認すべき検査項目の選択を行う予定である。ワクチンの有効性及び安全性を評価する際、組織内のウイルス関連核酸の検出系が望まれるが、*in situ* PCR 法ないし RI で標識した ISH 法は非特異的反応の問題や簡便に行えないなどの弱点があり、実際のでなかった。我々の開発した ISH-AT-CSA 法は高感度で特異性にすぐれ、かつ非常に簡便な ISH 法である。今後、ワクチンの有効性及び安全性を評価する際の有力な手法となると考えている。

6. 研究発表

- 3) Uranishi, H., Tetsuka, T., Yamashita, M., Asamitsu, K., Shimizu, M., Itoh, M. and Okamoto, T. : Involvement of the pro-oncoprotein TLS (Translocated in liposarcoma) in nuclear factor- κ B p65-mediated transcription as a coactivator. *J. Biol. Chem.* 276: 13395-13401, 2001.
- 4) Senoo, M., Tsuchiya, I., Matsumura, Y., Mori, T., Saito, Y., Kato, H., Okamoto, T. and Habu, S. : Transcriptional dysregulation of the p73L / p63 / p51 / p40 / KET gene in human squamous cell carcinomas : expression of Δ Np73L, a novel dominant-negative isoform, and loss of expression of the potential tumour suppressor p51. *Br. J. Cancer* 84:1235-1241, 2001.
- 5) Ando, T., Kawabe, T., Ohara, H., Ducommun, B., Itoh, M. and Okamoto, T. : Involvement of interaction between p21 and PCNA for the maintenance of G2/M arrest after DNA damage. *J. Biol. Chem.* 276:42971-42977, 2001.
- 6) Kitaura H, Ohara N, Kobayashi K, Yamada T. TNF-alpha-mediated multiplication of human immunodeficiency virus in chronically infected monocytoïd cells by mycobacterial infection. *APMIS.* 109:533-540,2001;
- 7) Kitaura H, Ohara N, Kobayashi K, Yamada T. TNF-alpha-mediated activation of HIV-1 LTR in monocytoïd cells by mycobacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 31:97-103, 2001
- 8) Aoki Y, Spokony RF, Saint-Germain N, Magner-Fink E, Saint-Jeannet. The transcription factor Sox9 is required for cranial neural crest development in *Xenopus*. *Development,* 129(2): 421-32,

- 9) Oshio Nakano, Masahito Mori, Shouichi Nishinohara, Yusaku Takita, Seishiro Naito, Hiroshi Kato, Maiko Taneichi, Katsutoshi Komuro, and Tetsuya Uchida. Surface-Linked Liposomal Antigen Induces IgE-Selective Unresponsiveness Regardless of the Lipid components of Liposomes. *Bioconjugate Chemistry*, volume 12, Number 3, Page 391-395, 2001
- 10) Hachiya, A., Aizawa-Matsuoka, S., Tanaka, M., Takahashi, Y., Ida, S., Gatanaga, H., Hirabayashi, Y., Kojima, A., Tatsumi, M., and Oka, S.: Rapid and simple phenotypic assay for drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 by using CCR5-expressing HeLa/CD4 cell clone 1-10 (MAGIC-5). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**, 495-501(2001).
- 11) Ohba, H., Soga, T., Tomozawa, T., Nishikawa, Y., Yasuda, A., Kojima, A., Kurata, T. and Chiba, J.: An immunodominant neutralization epitope on the thumb subdomain of HIV-1 reverse transcriptase revealed by phage display antibodies. *J. Gen. Virol.* **82**, 813-820(2001).
- 12) Hiroi, T., Goto, H., Someya, K., Yanagita, M., Honda, M., Yamanaka, N. and Kiyono, H. 2001. HIV mucosal vaccine : nasal immunization with rBCG-V3J1 induces a long-term V3J1-peptide-specific neutralizing immunity in Th1 and Th2 deficient conditions. *J. Immunol.* **167**: 5862-5867.
- 13) Kunisawa, J., Nakanishi, T., Takahashi, I., Okudaira, A., Tsutsumi, Y., Katayama, K., Nakagawa, S., Kiyono, H., and Mayumi, T. 2001. Sendai virus fusion protein-mediates simultaneous induction of MHC class I/II-dependent mucosal and systemic immune responses via the nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue immune system. *J. Immunol.* **167**: 1406-1412.
- 14) Byun Y., Ohmura, M., Fujihashi, K., Yamamoto, S., McGhee, J.R., Udaka, S., Kiyono, H., Takeda, Y., Kohsaka, T. and Yuki, Y. 2001. Nasal immunization with *E. coli* verotoxin 1 (VT1)-B subunit and a nontoxic mutant of cholera toxin elicits serum neutralizing antibodies. *Vaccine* **19**: 2061-2070.
- 15) Ohmura, M., Yamamoto, M., Kiyono, H., Fujihashi, K., Takeda, Y. and McGhee, J.R. 2001. Highly purified mutant E112K of cholera toxin elicits protective lung mucosal immunity to diphtheria toxin. *Vaccine* **20**: 756-762.
- 16) Jones, H.P., Hodge, L.M., Fujihashi, K., Kiyono, H., McGhee, J.R. and Simecka, J.W. 2001. The pulmonary environment promotes Th2 cell responses after nasal-pulmonary immunization with antigen alone, but Th1 responses are induced during instances of intense immune stimulation. *J. Immunol.* **167**: 4518-4526.
- 17) Saito, M., Otake, S., Ohmura, M., Hirasawa, M., Takeda, K., Mega, J., Takahashi, I., Kiyono, H., McGhee, J.R., Takeda, Y. and Yamamoto, M. 2001. Protective immunity to *Streptococcus mutans* induced by nasal vaccination with surface protein antigen and mutant cholera toxin