

感染による木梢リンパ球 subset の変化について flow cytometry により解析した。エイズウイルスはメモリー-CD4+ T細胞を感染の標的細胞とすることまたメモリー-CD4+ T細胞には防御免疫の誘導に重要な役割を果たすウイルス特異的ヘルパー-1細胞が含まれることから、木梢リンパ球中のメモリー-CD4+T細胞の変化は感染に対する防御免疫誘導に影響を与える。図5に示されるように向 Env 免疫群は対照的な変化を示した。wt Env 免疫群では初期感染後増加が見られたのに対し d-5G Env 免疫群では4頭中3頭で減少した。この減少は対照群に比べても顕著であった。

SIV 特異的 CTL

エイズウイルスに対する感染防御免疫として CTL は重要である。初期感染時において CTL 誘導は抗原量すなわちウイルス感染量により影響される。図6に示されるように vector control 群において比較的高い CTL が誘導されていた。d-5G Env 免疫群では vector control 群と同程度の viral load であったが SIV 特異的 CTL は対照群と比べて顕著に低かった。wt-Env 接種群では初期感染後、感染は制御されたが、2頭では有意に高い CTL が誘導、維持されていた。(図6)

D 考察

wt Env 免疫と d-5G Env の違いは5個の N-glycosylation site のアミノ酸置換と対応する糖鎖の有無が異なる。まず糖鎖が液性免疫、細胞性免疫に必要な抗原 epitope を覆うことを予想していたが少なくとも糖鎖の欠失が免疫誘導を促進することはなかった。Env に対する linear 抗体 epitope を72個の overlapping peptides (25mer with 13mer overlapping)を用いた解析結果からはほぼ同じ部分 (V1-V2-V3 IM の一部) が epitope となってい

た。ほぼ同様な立体構造をし、同程度の発現かおこったのではないかと推測される。しかし中和抗体の結果からも推測されるように、チャレンシ前において wt Env が高い中和抗体を誘導したことから抗原提示において wt Env が d-5G Env より効率が良かった可能性が推測される。中和抗体 (TL) とちらの免疫誘導でも wt Env 免疫が良かった理由として helper T 細胞誘導の重要性も示唆される。これまで糖鎖は免疫誘導に障害を与えていると推測していたが、むしろ糖鎖が免疫誘導を促進している可能性も報告されている。

糖鎖欠失 Env あるいは中和抗体誘導に重要な糖鎖付加部位を含む V1-V2 の欠失した Env をワクチンにより中和抗体を誘導するワクチン開発が米国を中心に進められている。我々の糖鎖欠失 Env は wt Env に比べ防御免疫誘導が顕著に弱いこと、さらに防御免疫誘導を妨げる宿主応答が観察されたことから、糖鎖欠失 Env を用いたワクチン開発に対し問題を提起した。

これまで Env independent の防御免疫誘導 Env の高頻度の変異から Env がワクチン抗原として適当でないことも報告されている。しかし、最近の報告では Env をワクチン抗原として加えることの重要性が指摘されている。今回の研究から我々は Env のみ免疫で強い感染制御免疫が誘導できることを明らかにした。

当初の研究課題である糖鎖欠失変異 SIV (d-5G) 感染における感染宿主の感染制御と強い防御免疫誘導については d-5G が attenuated virus であることによる可能性が高くなった。d-5G の糖鎖欠失がウイルスの性質にどのような変化を与えたのか、さらに感染宿主の免疫応答にどのような影響を与えたのか、今後の解析が重要である。

E 結論

エイズウイルスに対する防御免疫を誘導する糖鎖欠失変異ウイルス d5G の Env は野生型の Env と比べて防御免疫誘導能が低下していた。野生型の Env のみでも有効な防御免疫を誘導した。相関する免疫として Env 特異的な CD4+T 細胞、CD8+T 細胞の誘導が重要であった。さらに d5G Env は感染防御に不利益な宿主応答を誘導していた。

F 健康危険情報

G 研究発表

1 論文発表

1 C Sugimoto, Tadakuma K, Otani I, Montoyo T, Akan H, Ono F, Yoshikawa Y, Sata T, Izumo S, and Mori K. *Nef* gene is required for robust productive infection of Simian Immunodeficiency Virus in T-cell-rich paracortex in lymph nodes J Virol in press 2003

2 H Q Xing, T Montoyo², K Mori, K Tadakuma, C Sugimoto, F Ono, H Hayakawa, S Izumo Simian immunodeficiency virus encephalitis in the white matter and degeneration of the cerebral cortex occur independently in simian immunodeficiency virus-infected monkey J Neurovirol in press 2003

3 Villinger, F, Mayne A F, Bostik P, Mori K, Jensen P E, Ahmed R and Ansari, A Evidence for antibody mediated enhancement of SIVgag antigen processing and cross presentation in SIV infected rhesus macaques J Virol 77 10-24 2003

4 Villinger, F, Brice G T, Mayne A F, Bostik P, Mori K, June C H, and Ansari, A Adoptive transfer of SIV naive autologous CD4+ cells to macaques chronically infected with SIV is sufficient to induce long term non progressor status Blood 99 □ 500-599 □ 2002

2 学会発表

1 C Sugimoto, S Ohgimoto, S Kusakawa, Y Takebe, T Shuda, Y Nagai, and K Mori DNA prime-vaccina boost immunization of Deglycosylated Env protein induced less protective immunity against SIVmac239 than wt Env in rhesus macaques 20th annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, September 2002, Monterey, USA

2 C Sugimoto², Y Yasutomi³, S Ohgimoto¹, T Shuda⁴, N Yamamoto¹, Y Nagai⁵, and K Mori¹ Implication of deglycosylation of Env in pathogenicity of SIVmac239 20th annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, September 2002 Monterey, USA

3 CD4+ T cell mediated and antibody mediated enhancement of SIVgag antigen processing and cross presentation in SIV infected rhesus macaques Ansari A, Mayne A F Bostik P, Mori K, Ahmed R Jensen P E, and Villinger, F 20th annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, September, 2002 Monterey, USA

1 Nef 遺伝子欠損変異 SIV はリンパ節において B 細胞領域であるリンパ濾胞の CD4+ T 細胞に感染していた 杉本智恵、保富康宏、扇本真治 永井美之、森一泰、日本ウイルス学会、2002 年、札幌

2 Env エイズワクチンへの糖鎖変異の効果、森一泰、杉本智恵、保富康宏、草川茂 武部豊、中山英美、塩田達雄、永井美之、日本エイズ学会、2002 年、名古屋

3 糖鎖欠損変異 SIV 感染ザルに誘導された抗 Env 抗体エピトープの解析 杉本智恵、保富康宏 塩田達雄、永井美之、森一泰、日本エイズ学会、

2002年、名古屋

- 4 サル免疫不全ウイルス糖鎖欠損エンペローフ蛋白の免疫誘導能の解析 高村史記、森 泰 武部豊 早川茂 永井入之 保田康弘 日本エイズ学会 2002年 名古屋
- 5 エイズ脳症における人脳白質病変と皮質病変の比較 -サルエイスマデルを用いた神経病理学解析 Xin Hui Qiu、森 泰 森豊隆志 多田隼斗 早川 出雲周 日本エイズ学会 2002年 名古屋

H 知的所有権の取得状況

1 特許取得

Method and Medicaments for post exposure prophylaxis of an HIV infection

USA 国内出願番号 09/988,798

FPC EPC 出願番号 FP 00 938 669 9

2 未用新案特許 なし

3 その他 なし

图 1

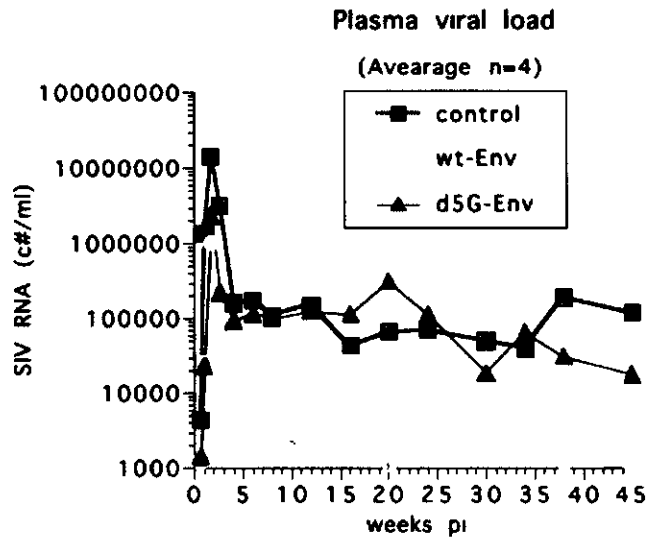


图 2

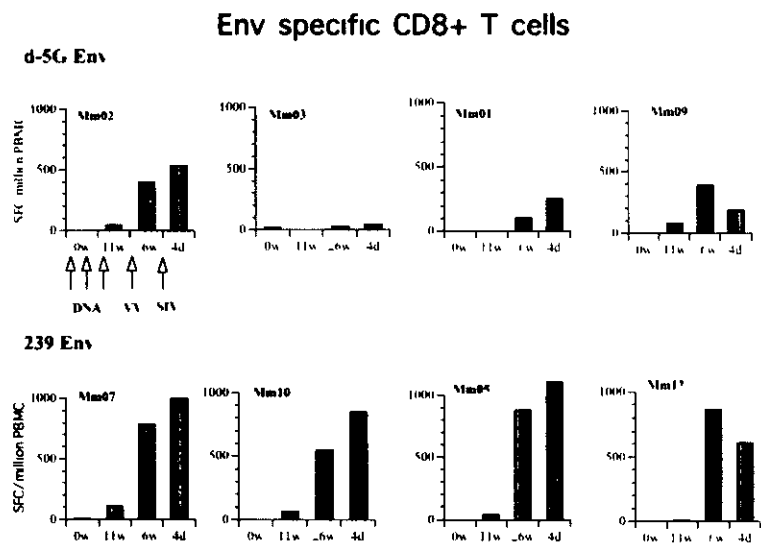
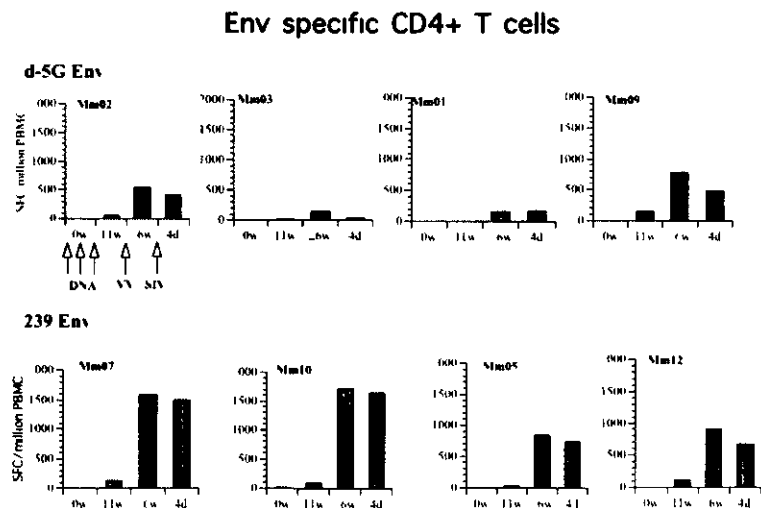


图 3

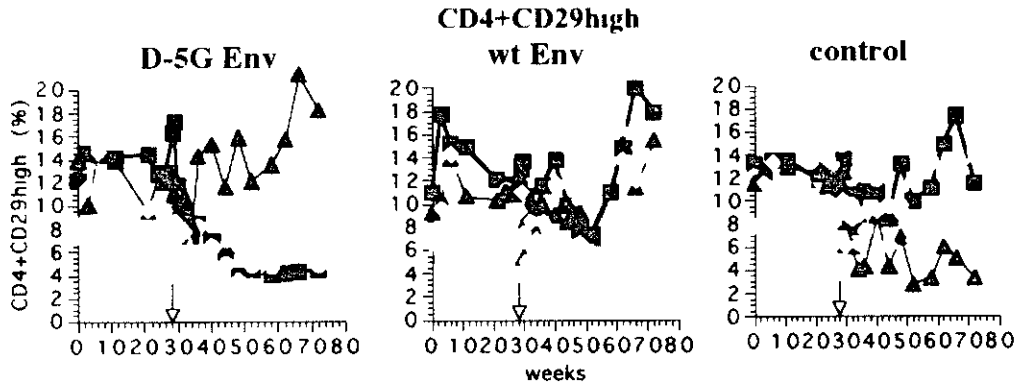


☒4

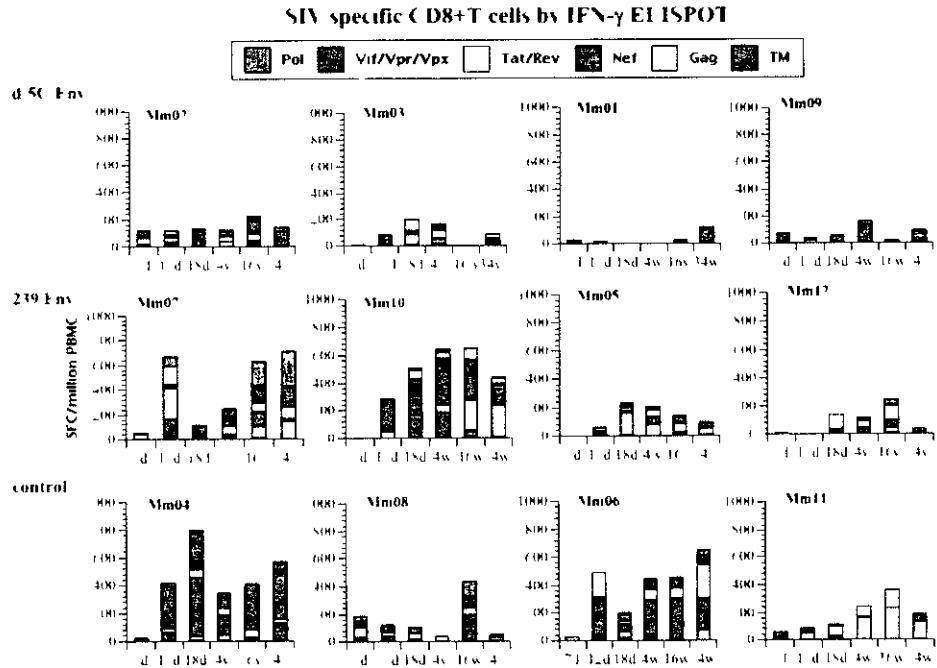
Neutralizing Antibody titer at 26 w p Imm (2 w before challenge)

Animal #	Immunization	Neut. Ab titer		
		SIVmac239	d5G	MERT
#01		<20	<20	100
#02	d5G Env	<20	<20	20
#03		<20	<20	100
#09		<20	<20	50
#05		<20	<20	800
#07	239 Env	<20	<20	400
#10		<20	<20	400
#12		<20	<20	200

☒5



☒6



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 東京大学大学院医学系研究科微生物学講座助教授

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。われわれは、エイズ発症を予防するワクチンの開発を目的として、マカクサルエイズモデルにて、ウイルス特異的細胞性免疫誘導型ワクチンについての解析をおこなってきた。本研究において、昨年度までに、DNA ワクチンと Gag 発現センダイウイルス(SeV)ヘクターワクチンを併用した DNA/SeV-Gag プライム ブースト法を開発し、SHIV (サル ヒト免疫不全ウイルス) 感染マカクサル急性エイズモデルの感染初期の解析にて、このワクチンシステムの非常に優れた細胞性免疫誘導効果および感染 発症防御効果を明らかにした。今年度は、以下に示すとおり、安全性を高めた実用的システムを確立し、その有効性を示すとともに、SHIV モデルにおけるワクチン効果の長期評価および防御免疫機構の解析をおこなった。(1) 安全性を高めた手法の確立 DNA/SeV-Gag とも複製能のないタイプを用いたプライム ブースト法 (DNA/SeV-Gag version 2) を確立し、その細胞性免疫誘導能および感染 発症防御効果を明らかにした。(2) SHIV モデルにおける各種ワクチン効果の長期解析 これまでおこなってきた各種ワクチン接種群のうち、SeV-Gag 単独投与の1頭を除いた他 15 頭では、Set-point ウイルス量の低下が認められ、エイズ発症が阻止された。さらに、1年以上にわたる解析でもエスケープは認められず、感染のコントロールは維持された。これらのうち、最も高いレベルの防御効果を示したDNA/SeV-Gag (version 1)接種群を含む8頭では急性期の末梢血 CD4 陽性 T 細胞 depletion も阻止されたが、残り 7 頭では急性期に一過性の CD4 陽性 T 細胞 depletion が認められた。(3) 防御免疫機構の解析 計 20 頭のサルを用いた解析から、SHIV チャレンジ時の末梢血ウイルス特異的 CD8 陽性 T 細胞レベルと、感染防御レベルとの相関が明らかとなった。また、末梢血ウイルス特異的 CD4 陽性 T 細胞レベルは、CD4 depletion が阻止された群では感染急性期も含め維持された。一方、一過性 CD4 depletion を呈したものの多くでは、末梢血ウイルス特異的 CD4 陽性 T 細胞が、感染急性期には失われ、その後回復することが示された。以上の結果より、ウイルス特異的 CD8 陽性 T 細胞の誘導はエイズ発症防御の一戦略として重要であり、そのためのワクチン手法としてわれわれの開発した DNA/SeV プライム ブースト法は極めて有力な方法であると考えられる。

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。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。そこでわれわれは、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。

われわれは、これまでに、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開発し、マカクサルエイズモデルに検討してきた。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 をフレント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 ヘ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)を用いてきた。さら

に、本研究において昨年度までに、この両者を併用して DNA/SeV-Gag プライム ブースト法を開発し、SHIV (サル ヒト免疫不全ウイルス) 感染マカクサル急性エイズモデルの感染初期の解析にて、このワクチンシステムの非常に優れた細胞性免疫誘導効果および感染 発症防御効果を明らかにした。

これまでのエイズワクチン研究では、マカクサルモデルにおける発症を防御する手法の開発が第一段階の目標であったか、近年、われわれを含めた4グループが、各々独自のプライム ブースト法を開発して、SHIV 感染マカクサルモデルにおける急性エイズ発症防御に初めて成功したわけである。今年度は、このシステムの実臨床応用への第一歩として、安全性を高めた実用的手法を確立した。さらに SHIV モデルでの評価確立のため、長期的有効性の検証、防御免疫機構の解析をおこなった。

B 研究方法

1 安全性を高めた手法の確立 安全性を高

る手段としては、DNA、SeV ヘクターとも複製能のないタイプを用いたプライム フースト法 (DNA/SeV-Gag version 2) を確立した。限局的複製誘導 DNA ワクチンの安全性のレベルは、すでに遺伝子治療に利用されているレトロウイルスヘクターと同程度であり、理論的には臨床応用可能であると考えられる。しかし、さらに安全性を高める手段として、一般的なプロモーターにより抗原を発現する DNA を用い、一般的な DNA ワクチンと同じレベルの安全性を確保した。具体的には env⁻nc1 欠損 SHIV フロウイルス DNA の 5'-LTR をサイトメガロウイルス (CMV) プロモーターに組み換え、3-UTR を SV40 polyA に組み換えた (MV-SIVGP DNA (昨年度作成)) をプライムに用いた。

一方、SeV ヘクターについても、サルにおける解析から、臨床応用可能なレベルの安全性を有すると考えられるか。さらに安全性を高める手段として、複製能のない 1 欠損型 SeV (F(-)SeV) システムを用いた。したがって DNA/SeV-Gag version 2 システムとしては、CMV-SIVGP DNA ワクチンを 1 回接種後、6 週目にフーストとして F(-)SeV-Gag を 1 回経鼻接種した。赤毛サル 3 頭に、この DNA/SeV-Gag version 2 接種をおこない、誘導される SHIV 特異的 T 細胞レベルについて、従来の限局的複製誘導 DNA ワクチンと SeV-Gag との併用プライム フースト (DNA/SeV-Gag version 1) 接種群と比較検討した。

2 防御レベルの長期解析 以上の 6 群 (赤毛サル計 20 頭) について、SHIV89 6PD チャレンจ์後約 80 週間の長期にわたり、血漿中ウイルス量 (SHIV RNA copy 数) および末梢血 CD4 陽性 T 細胞数を計測した。

第 I 群 ナイフ対照群 (4 頭)

第 II 群 限局的複製誘導 DNA ワクチンのみ接種 (3 頭)

第 III 群 SeV-Gag のみ接種 (3 頭)

第 IV 群 DNA/SeV-Gag version 1 接種 (4 頭)

第 V 群 DNA/SeV-Fat 接種 (3 頭)

第 VI 群 DNA/SeV-Gag version 2 接種 (3 頭)

3 防御免疫機構の解析 防御レベルと特異的 T 細胞レベルとの相関について解析した。SHIV 特異的 T 細胞レベルは、SHIV 特異的刺戟後誘導される細胞内インターフェロン γ (IFN- γ) 陽性細胞の検出により測定した。

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受け、その承諾を得てから開始した。

(C) 研究結果

1 安全性を高められた手段の確立 (図 1、図 2、図 3) DNA/SeV-Gag version 2 接種群では、効きをよく SHIV 特異的 T 細胞が誘導され、SHIV チャレンจ์後の感染防御効果も認められた。DNA/SeV-Gag version 1 接種群と比較すると

誘導される SHIV 特異的 T 細胞レベルはやや低い傾向にあり、3 頭中 1 頭では、一過性の末梢血 CD4 陽性 T 細胞 depletion が認められた。しかし、3 頭全てにおいてエイズ発症は阻止された。

2 防御レベルの長期解析 (図 2、図 3) 第 I 群では、4 頭中 3 頭で、急性期においても viremia をコントロールできず、うち 2 頭は 10 ヶ月以内にエイズを発症した。第 III 群のうち 1 頭がエイズを発症したか、残りのワクチン接種サル計 15 頭では、エイズ発症が阻止された。これらのサルでは、1 年以上の観察期間中において、エスケープも認められず、血漿中のウイルスは検出限界レベル以下で、感染のコントロールは維持された。このうち、第 IV 群の全て (4 頭) を含む 8 頭では、感染急性期の末梢血 CD4 陽性 T 細胞 depletion も阻止された。

3 防御免疫機構の解析 (図 4、図 5) チャレンจ์時の末梢血 SHIV 特異的 CD8 陽性 T 細胞レベルと、チャレンจ์後 2 週目の末梢血 CD4 陽性 T 細胞数との間に正の相関関係が認められた。また、チャレンจ์時の末梢血 SHIV 特異的 CD8 陽性 T 細胞レベルと、チャレンจ์後 2 週目の血漿中ウイルス量との間に負の相関関係が認められた。

感染急性期の末梢血 CD4 陽性 T 細胞 depletion も阻止されたサル (代表例 R020 を図 5 に示す) では、SHIV 特異的 CD4 陽性 T 細胞は、感染急性期にも保たれていた。一方、感染急性期に一過性に末梢血 CD4 陽性 T 細胞 depletion を呈したサル (代表例 R024 を図 5 に示す) では、SHIV 特異的 CD4 陽性 T 細胞レベルが、感染急性期に検出限界以下となり、set-point 期に回復してくることか明らかとなった。

D 考察

本研究では、SHIV モデルにおける長期解析をまとめることにより、われわれの確立した DNA/SeV プライム フーストワクチンの長期的エイズ発症防御効果を確認することかできた。特に本研究において確立した安全性を高められた手段は、臨床応用に向けた実用的な手法である。この複製のない DNA/SeV-Gag version 2 ワクチンと、これまでの複製のある DNA/SeV-Gag version 1 ワクチンとについて、誘導免疫の分布や維持期間など検討すべき点は残されているか、今回の結果から、この実用的な手法についても、有効性の点で充分期待しうることか示された。

SHIV を用いた急性エイズモデルにおける検討は、特に感染初期の防御免疫の解析に有用である。本研究では、計 20 頭のサルを用いて、誘導免疫と感染初期の防御効果との相関について検討した。サルを用いた実験は頭数の確保が難しく、このような頭数をそろえた解析は数少ない。この解析により、ワクチンにより誘導されたウイルス特異的 CD8 陽性 T 細胞レベルと急性期の感染防御レベルとの相関が示され、感染防御におけるウイルス特異的 CD8 陽性 T 細胞の重要性が小さくない。

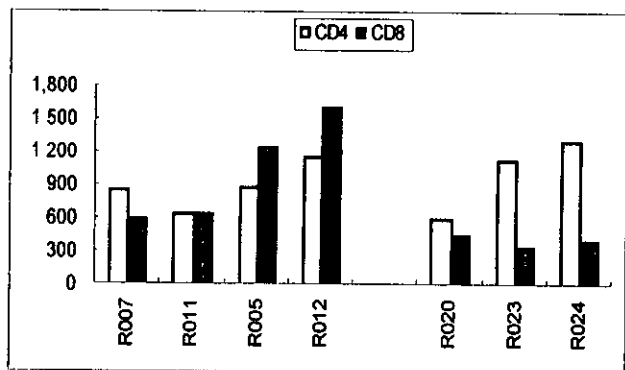


図1 末梢血 SHIV 特異的 T 細胞レベル DNA/SeV-Gag version 1 接種群 (左 4 頭) と version 2 接種群 (右 3 頭) との比較

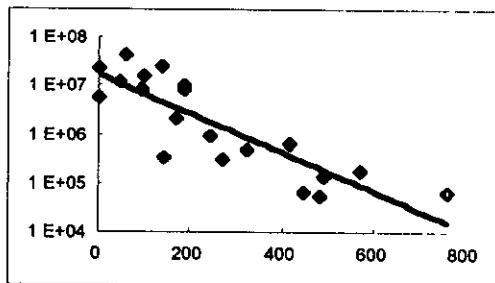
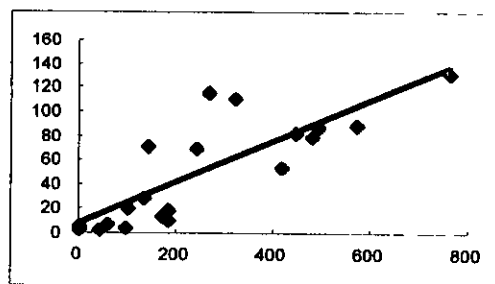


図4 チャレンジ時の末梢血 SHIV 特異的 CD8 陽性 T 細胞レベルと感染防御レベルとの相関 上段 2 週目の末梢血 CD4 陽性 T 細胞数との相関、下段 2 週目の血漿中ウイルス量との相関

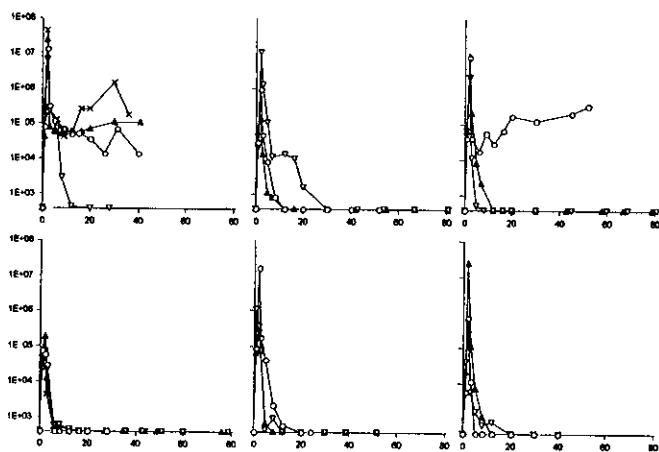


図2 SHIV チャレンジ後の血漿中 SHIV RNA コピー数 (copy/ml) 横軸は週数 左上 第 I 群、中上 第 II 群、右上 第 III 群、左下 第 IV 群、中下 第 V 群、右下 第 VI 群

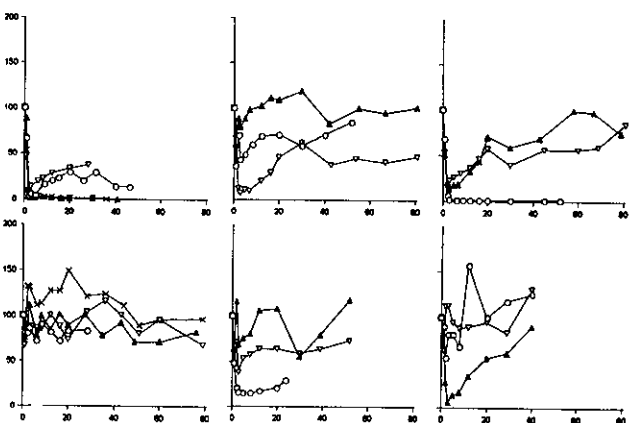


図3 SHIV チャレンジ後の末梢血 CD4 陽性 T 細胞数 (チャレンジ時 100 とした相対値) 横軸は週数 左上 第 I 群、中上 第 II 群、右上 第 III 群、左下 第 IV 群、中下 第 V 群、右下 第 VI 群

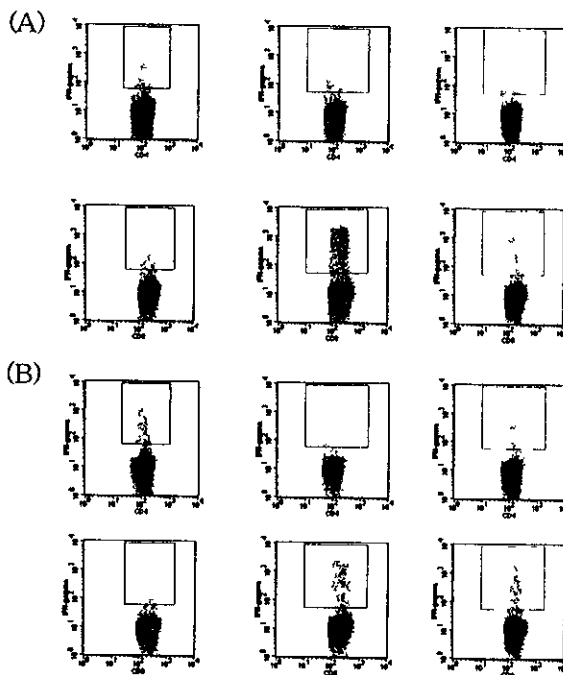


図5 SHIV チャレンジ後の末梢血 SHIV 特異的 T 細胞レベルの変化 (A) R020、(B) R024 上段 SHIV 特異的 CD4 陽性 T 細胞、下段 SHIV 特異的 CD8 陽性 T 細胞 左、チャレンジ時、中 第 2 週、右 第 20 週

このウイルス特異的 CD8 陽性 T 細胞の誘導において、われわれが開発した DNA/SeV フライム-ブースト法は有力な手法と考えられる。一方、その抗厚-エпит-の選択については、今後の課題の一つである。さらに、慢性期の感染コントロールの維持が重要であるか、それに関連して、ウイルス特異的 CD4 陽性 T 細胞の喪失やエスケ-フの問題など、検討課題が残されている。本研究では、ワクチン接種サルにおけるウイルス特異的 CD4 陽性 T 細胞の維持あるいは回復を小したか、その影響についての解析は、課題解決の第一歩として重要であると考えられる。

1 結論

ウイルス特異的 CD8 陽性 T 細胞の誘導は、エイズウイルス感染防御の戦略として重要であり、そのためのワクチン手法として、われわれが開発した DNA/SeV フライム-ブースト法は極めて有力な方法であることが小された。さらに、このエイズワクチンシステムの臨床応用を目的として、安全性を高めた実用的な手法を確立した。このシステムは、SIV 感染マカクサルモデルにおけるエイズ発症防御効果を小し、有効性の点で充分期待しうると考えられた。

1 健康危険情報

特になし

(1) 研究発表

1 論文発表

- (1) Kano, M, Matano T, Kato A, Nakamura H, Iakeda, A, Suzaki Y, Ami, Y, Terao K, and Nagai Y. Primary replication of a recombinant Sendai viral vector in macaques. *J Gen Virol* 83:1377-1386, 2002
- (2) Kano M, Matano T, Kato A, Shioda I and Nagai, Y. Induction of HIV-1-specific neutralizing antibodies in mice vaccinated with a recombinant Sendai virus vector. *Jpn J Infect Dis* 55:59-60, 2002
- (3) Matano T. Recent advances in AIDS vaccine preclinical trials: challenges against the chronic disease. *Current Topics in Virology* in press
- (4) Matano T, Kano M, Iakeda A, Nakamura H, Nomura N, Furuta Y, Shioda I and Nagai, Y. No significant enhancement of protection by Tat-expressing Sendai viral vector-booster in a macaque AIDS model. *AIDS* in press

2 学会発表

- (1) Matano T, Kano M, Lun W H, Nakamura H, Iakeda A, Ami Y, Nomura N, Furuta Y, Shioda I and Nagai Y. Comparison of protective efficacies between Gag- and Tat-booster in a DNA-prime/Sendai viral vector-boost vaccine system against AIDS. *The XIVth International AIDS conference*

Barcelona Spain 7/9/2002

- (2) Matano T, Lun W H, Kano M, Iakeda A, Nakamura H, Mori K, Sata I and Nagai Y. Loss of viremia control without losing specific CD8+ T cells in vaccinated macaques after showing CTL-based partial protection against SIV infection. *The XIIth International Congress of Virology*, Paris, France 7/29/2002
- (3) Lun W H, Kano M, Iakeda A, Nakamura H, Mori K, Sata I, Nagai Y, and Matano T. Loss of AIDS vaccine-based viremia-control without loss of virus-specific CD8+ T cells in macaque preclinical trials. 第 50 回日本ウイルス学会、札幌、10/16/2002
- (4) 狩野テ英、中村浩美、武田明子、加藤篤、須崎百合子、網康幸、水井美之、俣野哲朗、網換エモン、タイウイルスヘクターワクチンのマカクサルエイズモデルによる安全性および有効性の検討。第 50 回日本ウイルス学会、札幌、10/16/2002
- (5) 倫文輝、狩野テ英、中村浩美、武田明子、俣野哲朗。サルエイズモデルにおける細胞性免疫破壊機構の解析。第 16 回日本エイズ学会、名古屋、11/30/2002

H 知的所有権
特許申請中。

<研究要旨>

これまでに我々は、遺伝子欠損 SHIV が HIV-1 に対するワクチンとして効果的であることをサル系の系で示してきた。この弱毒生ワクチンの強力な抗 HIV-1 効果を確保しつつ、より安全性を追求するために、テトラサイクリン依存性のプロモーター（pTet-On）を用い、テトラサイクリン(Dox)投与中のみ増殖可能なウイルスの作製を試みた。SIV の LTR プロモーター領域を pTet-On と入れ換えた 4 種の変異 LTR は、いずれも Dox（テトラサイクリン類似体）依存性に活性化し、Dox によって転写活性を完全に制御できることが示された。また変異 LTR を組み込んだウイルスは Dox 依存性にウイルス産生が制御されており、ウイルスの産生から感染までの 1 回の増殖サイクルを確認することができた。この結果は、弱毒生ワクチンの安全性を高める方法として、薬剤依存性のプロモーターによるウイルスの増殖制御が有効であることを示唆している。

A 研究目的

弱毒生ワクチンの強力な抗ウイルス効果を確保しつつ、より安全性を追求するために、テトラサイクリン依存性のプロモーター（pTet-On）をウイルスに組み込み、テトラサイクリン（Dox）投与中のみ増殖するウイルスを作製する。

B 研究方法

SIVmac239 株の LTR プロモーター領域のなかの TATAbox、SP1、NFkB 等を欠失し、pTet-On と入れ換えた 4 種の変異 LTR を作成し、その下流に CAT 遺伝子をつないだ (Fig 1)。4 種の変異 LTR は、LTR のプロモーター領域の上流の欠失部位の長さが異なり、プロモーター領域を含めて 85bp 欠失しているものを MLTR 1F/1R、173bp 欠失しているものを MLTR 1F/2R、369bp 欠失しているものを MLTR 1F/4R、420bp 欠失しているものを MLTR 1F/5R とした。これらの変異 LTR-CAT プラスミドを、pTet-On の活性化に必要な rtTA を

発現する Hela 細胞にトランスフェクションして、CAT 活性の上昇により転写活性を決定した。この際、Dox 添加による転写活性上昇を調べ、変異 LTR の Dox 依存性をみた。また、HIV-1 *tat* 遺伝子発現プラスミドを同時にトランスフェクションすることによって、Tat による転写活性への影響を調べた。

次に、4 種の変異 LTR のうち 3 種を SIV に組み込んだ変異 SIV 株を 3 種類作成した。これらの変異 SIV 株を rtTA 発現 Hela 細胞にトランスフェクションして上清中の SIV p27 を測定することにより、ウイルス産生量を決定した。転写活性測定時と同様に、Dox, Tat の有無によるウイルス産生量を比較し、Dox 依存性と Tat による影響を調べた。産生されたウイルスをリンパ球系の M8166 細胞株に加え、24 時間後に細胞を回収して DNA を抽出し、PCR によるウイルス検出を行った。PCR は、逆転写の初期に作られる R/U5 領域、後期に作られる LTR-gag 領域、そしてプロウイルスが核内に移行後に環状になったものを検出する 2-LTR 領域

について行い、ウイルス感染の各段階におけるウイルス DNA の有無を調べた。

作成した変異 SIV 株は、pTet-On の転写因子である rtTA を必要とするため、変異 SIV の *nef* 遺伝子部分に rtTA 遺伝子を挿入した。rtTA 遺伝子と pTet-On の挿入のために *nef* 遺伝子および LTR の U3 領域が欠失するため、対照として *nef* 遺伝子と U3 領域を欠失した SIV ΔU3 を作成した。また rtTA 遺伝子挿入による影響を調べるために LTR は野生型のままで、rtTA 遺伝子のみを挿入した SIV rtTA も作成した。これらの変異ウイルス DNA を COS-1 細胞にトランスフェクトして逆転写活性を測定し、ウイルス産生量を比較した。また、Dox の添加によるウイルス産生量の変化を調べた。

C 研究結果

SIVmac239 株の LTR からプロモーター領域をさせ、pTet-On を挿入した 4 種の変異 LTR を作成し、その下流に CAT 遺伝子をつなぎ、各変異 LTR の転写活性を DOX, Tat の有無で比較した (Fig 2)。その結果、いずれの変異 LTR も Dox の添加により転写活性が上昇し、Dox 非添加では活性がほとんどみられなかった。また、Dox 添加によって上昇した転写活性は、Tat を加えることによってさらに上昇した。野生型 LTR は Tat を加えたときのみ転写活性が上昇し、Dox の有無による活性の上昇はみられなかった。このことから、変異 LTR は Dox 依存性に転写が活性化されることが示された。

次に、この変異 LTR を SIV mac239 株のゲノムに組み込み、Dox 依存性のウイルス産生を調べた (Fig 3)。転写活性測定時と同様に、ウイルス産生は Dox 依存性にみられ、Tat を加えることにより産生量がさらに上昇した。SIV p27 の産生量は Dox 添加時で SIVmac239Δ*nef* の 30-50%、Dox と Tat 添加時で 50-100%に達し、ほぼ野生型と同様のウイルス産生が示唆された。

産生されたウイルスの感染性を調べるために、変異ウイルス DNA のトランスフェクション上清を M8166 細胞に加え、細胞の DNA を抽出して PCR によるプロウイルスの検出を行った。3 種の変異ウイルスすべてで、野生型 SIV と同様に逆転写初期、後期、及び環状のプロウイルスが検出された。このことから、変異ウイルスは細胞に侵入、逆転写し、核内移行して環状の DNA を作成するところまで感染が進んでいることが示唆された。

変異ウイルスの産生には rtTA が必要であるため変異ウイルスの *nef* 遺伝子部分に rtTA 遺伝子を挿入した。しかしながら pTet-On と rtTA の両方を組み込んだ SIV pTet rtTA は、Dox を添加してもウイルス産生がみられず、持続的なウイルス増殖も確認できなかった。LTR は野生型のままで rtTA 遺伝子のみを挿入した SIV rtTA 株の M8166 細胞での増殖能及び COS-1 細胞での一過的なウイルス産生能は、野生型と比較して著しく低下しており、rtTA 遺伝子挿入がウイルス増殖に悪影響を及ぼしていることが示された。

D 考察

弱毒生ワクチンの強力な抗 HIV-1 効果を確保しつつ、より安全性を高める方法として、薬剤依存性のプロモーターによるウイルスの増殖制御が有効であることを示唆することができたが、薬剤依存性に増殖が持続可能であるウイルスの作成には、さらに改良が必要である。

E 結論

pTet-On システムによってウイルス産生を制御できたことから、強力な感染防御能を誘導できる弱毒生ワクチンの安全性を高める可能性を示すことができた。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

Enose, Y, M Ui, A Miyake, H Suzuki, H Uesaka, T Kuwata, J Kunisawa, H Kiyono, H Takahashi, T Miura, and M Hayami 2002 Protection by intranasal immunization of a nef-deleted, nonpathogenic SHIV against intravaginal challenge with a heterologous pathogenic SHIV *Virology* 298 306-16

Kozyrev, I L, T Miura, T Takemura, T Kuwata, M Ui, K Ibuki, T Iida, and M Hayami 2002 Co-expression of interleukin-5 influences replication of simian/human immunodeficiency viruses in vivo *J Gen Virol* 83 1183-8

Kuwata, T, T Takemura, J Takehisa, T Miura, and M Hayami 2002 Infection of macaques with chimeric simian and human immunodeficiency viruses containing Env from subtype F *Arch Virol* 147 1121-32

Kwofie, T B, T Miura, K Ibuki, Y Enose, H Suzuki, M Ui, T Kuwata, and M Hayami 2002 Characterization of simian and human immunodeficiency chimeric viruses re-isolated from vaccinated macaque monkeys after challenge infection *Arch Virol* 147 1091-104

Miyazaki, Y, T Kuwata, J Takehisa, and M Hayami 2002 Analysis of a primary isolate-like virus from simian and human immunodeficiency virus-infected macaque having broad neutralizing activity *AIDS Res*

Hum Retroviruses 18.469-75

2 学会発表

桑田岳夫、Yong Xiao、堀内励生、三浦智行、志田壽利、速水正憲 テトラサイクリン存在下でのみ増殖する SIV の作製、第 50 回日本ウイルス学会、札幌、10 月 16-18 日、2002

榎瀬良美、山本俊朗、宇賀神秀樹、横山京子、鈴木元、桑田岳夫、坂井弘治、高橋栄治、篠原克明、三浦智行、喜多正和、速水正憲 弱毒 SHIV 感染免疫ザルにおける早期の強毒ウイルス攻撃接種に対する防御効果、第 50 回日本ウイルス学会、札幌、10 月 16-18 日、2002

堀内励生、赤畑 渉、鈴木 元、斉藤尚紀、井戸栄治、桑田岳夫、榎瀬良美、速水正憲 非感染性ウイルス粒子を産生する IL - 2 遺伝子組み込みフルゲノム SHIV プラスミドを用いた DNA ワクチンの開発、第 16 回日本エイズ学会、名古屋、11 月 28-30 日、2002

榎瀬良美、赤木隆美、上野真路、河村正輝、三宅在子、堀内励生、平石勝也、芹澤 武、明石 満、馬場昌範、三浦智行、速水正憲 不活化 SHIV 捕捉ナノスフェア経鼻免疫ザルにおける SHIV KU - 2 の経粘膜感染防御、第 16 回日本エイズ学会、名古屋、11 月 28-30 日、2002

H 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

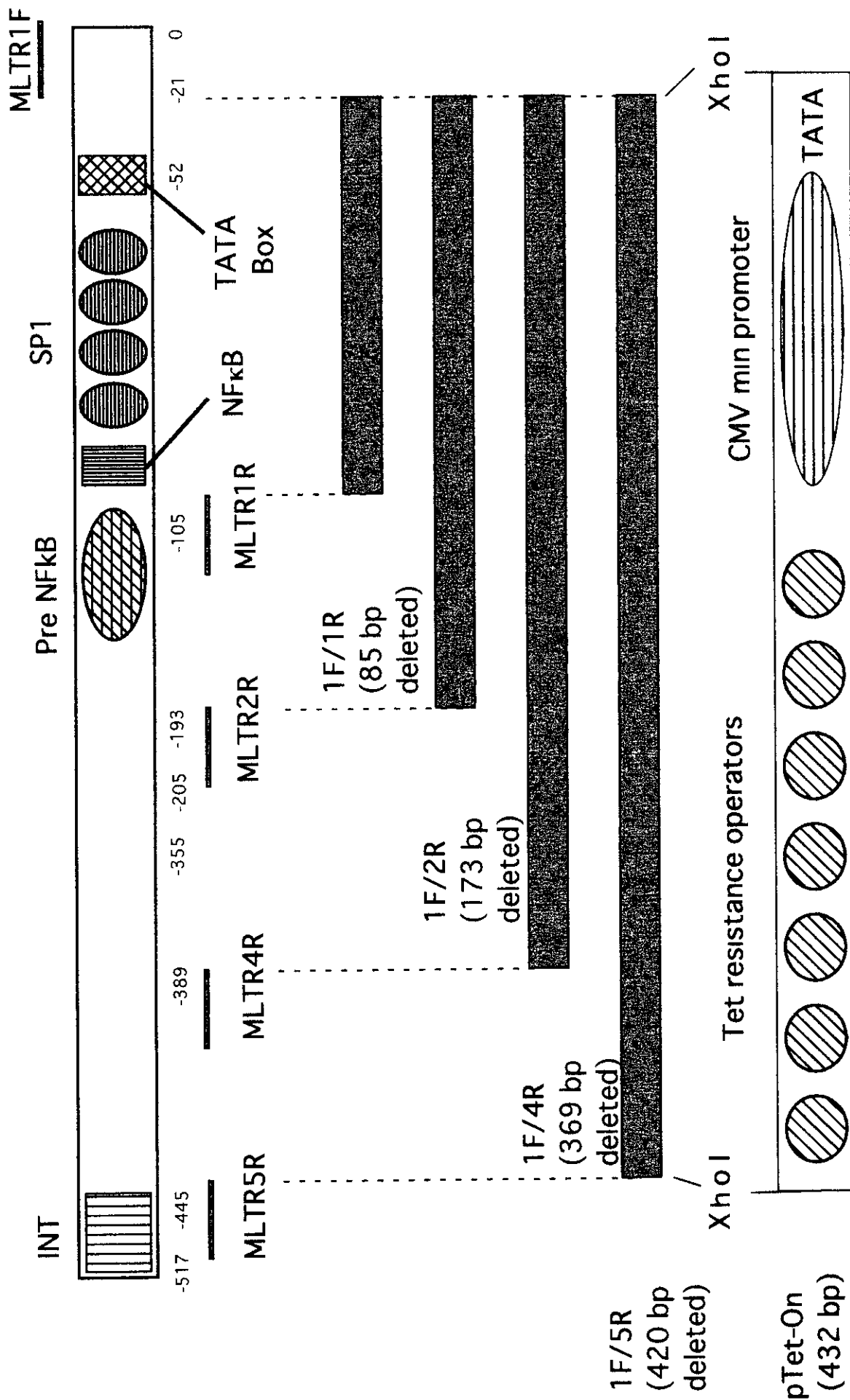


Fig. 1. Schematic representation of the location of the transcriptional elements in SIVmac239 LTR U3 region and the primers to make mutant LTRs. The length of U3 transcriptional elements deletion and the site of pTet-On insertion are indicated.

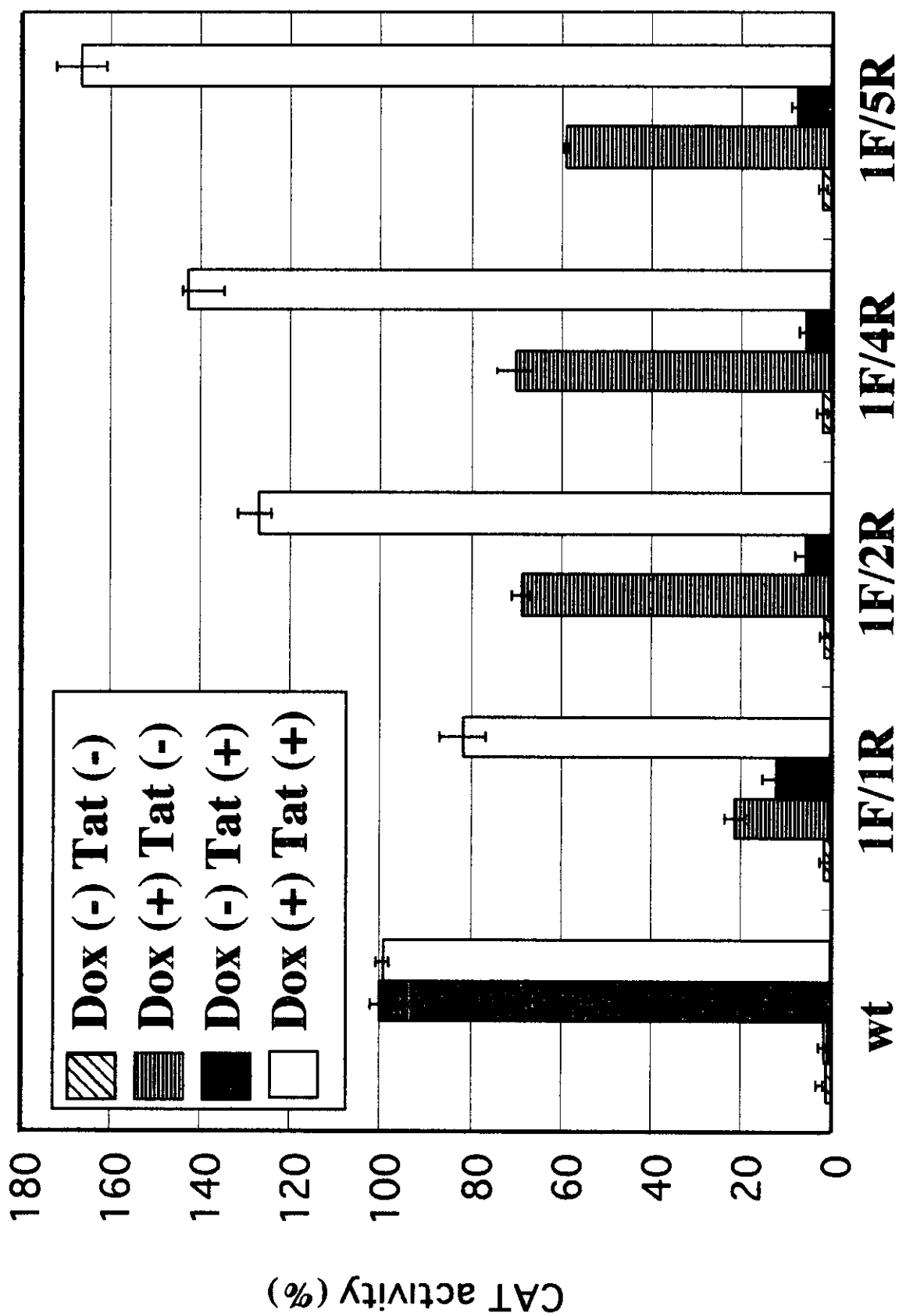


Fig. 2. Relative percentage CAT activity produced by pMLTRTET in comparison with that of pUCLTR-CAT in HeLa rtTA cell line.

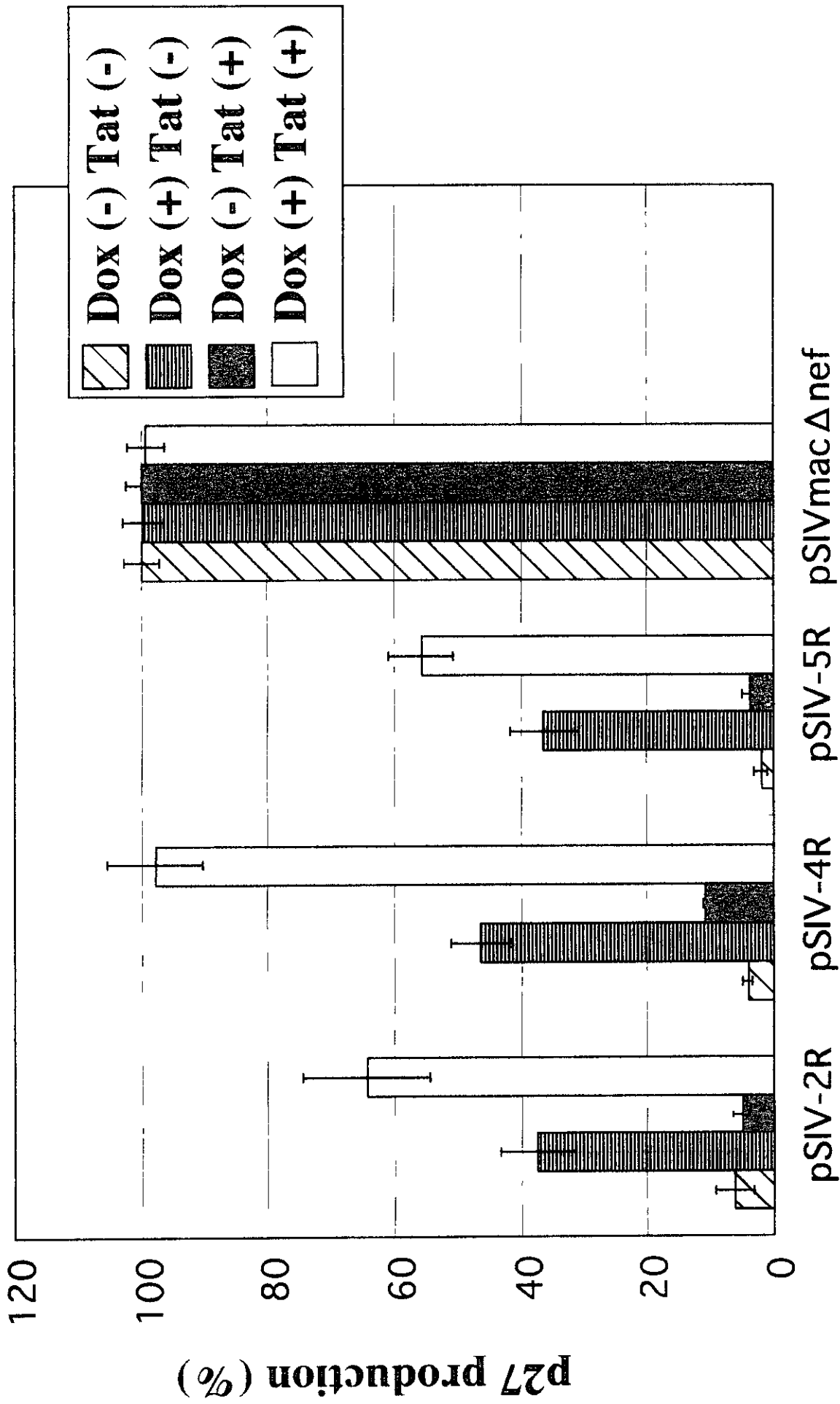


Fig 3. Relative p27 core antigen expression activated from SIVmac239 mutants with pTet-On in comparison with that of pSIVmacΔnef in HeLa rtTA cells

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

分担研究者 保富康宏 三重大学医学部 助教授

マウスを用いて経口的に投与でき、粘膜免疫誘導可能な2つのタイプのワクチン開発の基礎的研究をE型肝炎ウイルス(HEV)より樹立されたウイルス様中空粒子(VLP)を用いて行った。その一つはVLPに HIVenv 中和エピトープ(308-322, RIQRGPGRAFVTIGK)を組み込んだリコンビナント HIV-VLP であり、もう一つは HIVenv DNA ワクチン封入 VLP(HIV-VLP)の作製である。この2種類のワクチンはともにマウスに経口投与したところ消化管内溶液および血清中にエピトープ特異的抗体が誘導され、更にこの特異抗体は消化管内では IgA が主であり血清中よりも高濃度であった。HIVenv に対する細胞傷害性 T リンパ球(CTL)の誘導を検討したところ CD8+の CTL が脾臓、腸管膜リンパ節およびパイエル板より認められた。現在既にこの VLP にアジュバント活性を持つ Th エピトープを含むを挿入したものを作製しており、また封入する DNA を HIV gag-pol および種々のサイトカイン遺伝子を用い2種類の今回の手技を組み合わせることにより、その免疫反応増強効果を検討している

A 研究目的

HIV 感染の予防には液性免疫と細胞性免疫の両者が必要であると考えられている。更に、本ウイルスに対しては感染経路から考えて粘膜免疫は重要である。ウイルス様中空粒子(VLP)は遺伝情報を持たず、そのウイルスとしての立体構造が保存されている。本研究では経口感染を示す E 型肝炎ウイルス(HEV)の VLP を用いその VLP に HIV のエピトープを組み込んだリコンビナント VLP、VLP に DNA ワクチンを封入した VLP の2種類についての経口投与可能で粘膜免疫誘導型のワクチン開発の基礎的研究を行った。

B 研究方法

1 組み替え VLP の作製 HEV-ORF2 内の過去に報告した外向きに発現し免疫誘導が可能な C 末に HIVenv 中和エピトープ (308-322, RIQRGPGRAFVTIGK)およびこのエピトープに抗酸菌 α 抗原のヘルパー T 細胞(Th)を組み込んだ VLP を作製した。VLP の形成は電子顕微鏡観察で、抗原の発現はウェスタンブロット法および免疫沈降法似て確認した(Fig 1)。

2 VLP への DNA ワクチン封入 VLP をプラスミド DNA 溶液(2mg/ml)内で EGTA にて Ca をキレートし、その後 Ca を加えることにより VLP

を再構築した。VLP の変化は電子顕微鏡観察で確認した。

3 免疫 BALB/C マウスを用い経口ソテにて2週間隔で3~4回経口投与した。

4 抗体の側定 抗体はエピトープペプチドを用いた ELISA 法にて測定した。

5 CTL の誘導 脾細胞、腸管膜リンパ節細胞およびパイエル板細胞をエピトープペプチドにて刺激培養し、Cr 遊離試験にて側定した。

C 研究結果

1 HIV 特異的抗体の誘導 HIVenv エピトープ組み込み VLP を経口投与したところ血清中には HIV env 特異的 IgA と IgG が、糞便中には特異的 IgA のみのみが認められた(Fig 2)。プラスミド DNA 封入 VLP を経口投与したところ同様に血清中には HIV env 特異的 IgA と IgG が、糞便中には特異的 IgA のみのみが認められた(Fig 3)。

2 HIVenv 特異的 CTL の誘導 HIVenv 特異的 CTL の誘導を見たところ HIVenv エピトープ組み込み VLP およびプラスミド DNA 封入 VLP を経口投与のどちらにおいても脾臓、腸管膜リンパ節およびパイエル板から誘導が見られた(Fig 4, 5)。

D 考察

HIV に対する粘膜免疫誘導型のワクチン開発は急務であると考えられており、幾つかの試みかなされている。粘膜免疫を誘導するためのワクチンとしては経口的に消化管免疫を刺激するものか簡便さや安全性の面で最も有用であると考えられるか、消化管内の厳しい環境を乗り越えることは困難であるために多くは上部気道の咽喉頭リンパ器官を刺激し粘膜免疫を誘導する方法かとられている。本研究では VLP をヘクターとして用いるワクチンが特殊な技術を必要とせず、安全な経口投与において粘膜免疫と全身免疫の両者を誘導することか可能であることを示した。さらに VIP に他の分子を表面上に表出することか可能であることから今後特定細胞への遺伝子導入、また種々のサイトカイン遺伝子を用いることかワクチンのみならず遺伝子治療やその他の感染症に対するヘクターとして VIP を用いることか可能であると考えられる。

E 結論

HIV の VLP に HIV_{env} エピトープ発現ならびに DNA ワクチンをを封入し、経口ワクチン開発の基礎的検討を行った。これらの経口投与で HIV 特異的免疫反応を誘導した。

F 研究発表

1 論文発表

- 1) Nukura M, Takamura S, Kim G, Kawai, S, Saijo M, Morikawa S, Kurane I, Tian-Cheng Li, Iakeda N and Yasutomi, Y. Chimeric recombinant hepatitis E virus-like particles as an oral vaccine vehicle presenting foreign epitopes. *Virology* 2002 293: 273-280
- 2) Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Yasutomi, Y, Maki S, Isuchiya, T, Noda, N, Toyozaki, T, Nishikawa T, Ishiyama, S, Sakakura, F and Yoshida, F. Tenascin-C is a Useful Marker for Disease Activity in Myocarditis. *J Pathol* 2002 197: 388-394
- 3) Mukai K, Yasutomi, Y, Watanabe, M, Kenjo, A,

Aota, T, Wang, L, Nishikawa, H, Fujita I, Kurabayashi K and Shiku H. HLR2 peptide-specific CD8⁺ T cells are proportionally detectable long after multiple DNA vaccinations. *Gene Ther* 2002 9: 879-888

4) Uno-Furuta, S, Matsuo K, Kim, G, Tamaki S, Takamura S, Kamei, A, Kuromatsu, I, Kaito M, Matsuura, Y, Miyamura T, Adachi, Y and Yasutomi, Y. Immunization with recombinant bacillus Calmette-Guerin (BCG)-hepatitis C virus (HCV) elicits HCV-specific cytotoxic T lymphocytes in mice. submitted

5) Takamura, S, Nukura, M, Li, F, C, Iakeda N, Kusagawa, S, Takebe, Y, Miyamura T and Yasutomi, Y. DNA vaccine-encapsulated virus-like particles from an orally transmissible virus stimulates immune responses by oral administration. submitted

6) Hayashi, T, Yasutomi, Y, Hasegawa, K, Sasaki Y and Onodera, T. Interleukin-4-expressing plasmid inhibits reovirus type-2-triggered autoimmune insulinitis in DBA/1J suckling mice. submitted

2 学会発表

1) サル免疫不全ウイルス糖鎖欠損エンペロフ蛋白の免疫誘導能の解析 高村史記、森 泰、武部豊、草川茂、永井美之、保高康宏・・・第 16 回日本エイズ学会学術集会 (名古屋)

2) 糖鎖欠失 SIV 感染サルに誘導された抗 Env 抗体エピトープの解析 杉本知忠、保高康宏、塩田達雄、永井美之、森 泰・・・第 16 回日本エイズ学会学術集会 (名古屋)

3) Env エイスワクチンへの糖鎖欠失変異の効果 森一泰、杉本知忠、保高康宏、齋藤紀子、杉本知忠、草川茂、武部豊、中山英夫、塩田達雄、永井美之・・・第 16 回日本エイズ学会学術集会 (名古屋)

4) HIV CTL エピトープ表出 E 型肝炎ウイルス様中空粒子の経口投与による粘膜面におけるエピトープ特異的細胞性免疫の誘導 高村史記、

新倉昌浩、武田直和、宮村達男、保富康宏・・・
第 50 回日本ウイルス学会学術集会（札幌）

5)パラインフルエンザ 2 型ウイルス(PIV2)による外来遺伝子発現及び M 蛋白を改変/失活させた PIV2 の増殖能解析 何野光雄、保富康宏、高村史記、玉置繁憲、西久保公映、垣内雅彦、駒田洋、小塚祐司、山下恭史、鶴留雅人、伊藤

守弘、西尾真智子、伊藤康彦・・・第 50 回日本ウイルス学会学術集会（札幌）

6)E 型肝炎ウイルス(HEV)ウイルス様中々粒子(VLP)をヘクターとして用いた HIV 経口ワクチンの開発 保富康宏、高村史記、新倉昌浩、武田直和、宮村達男・・・第 50 回日本ウイルス学会学術集会（札幌）

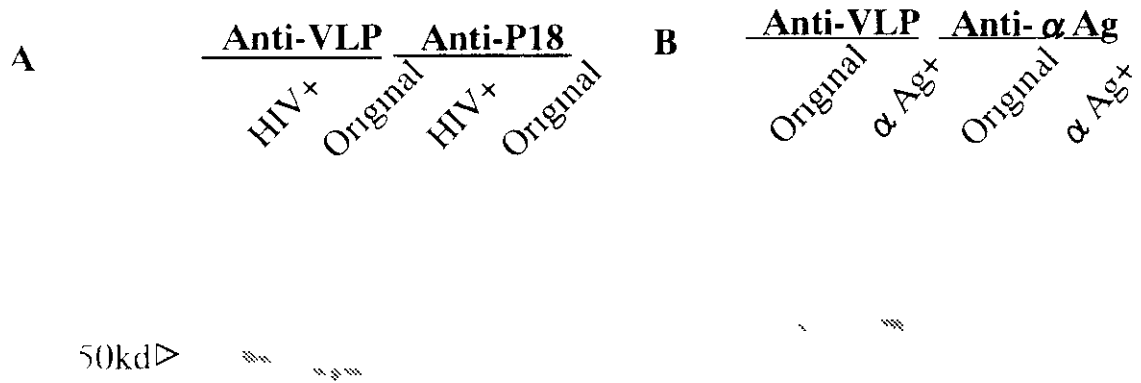


Fig 1 エピトープ組み込みVLPの作製 (A)HIV env (B) 抗酸菌 α 抗原

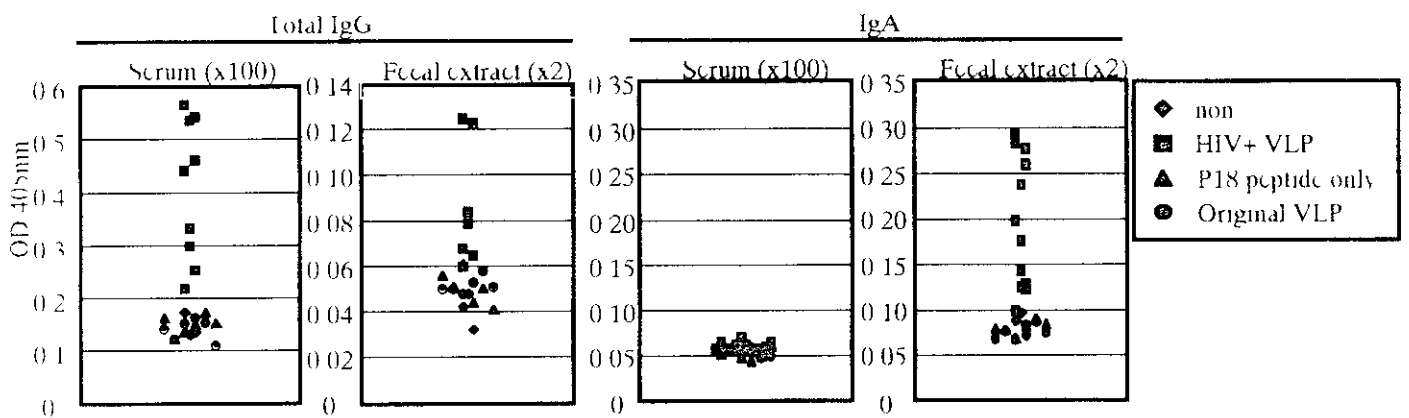


Fig 2 エピトープ組み込みVLPの経口投与によるHIV envエピトープ特異的抗体の誘導

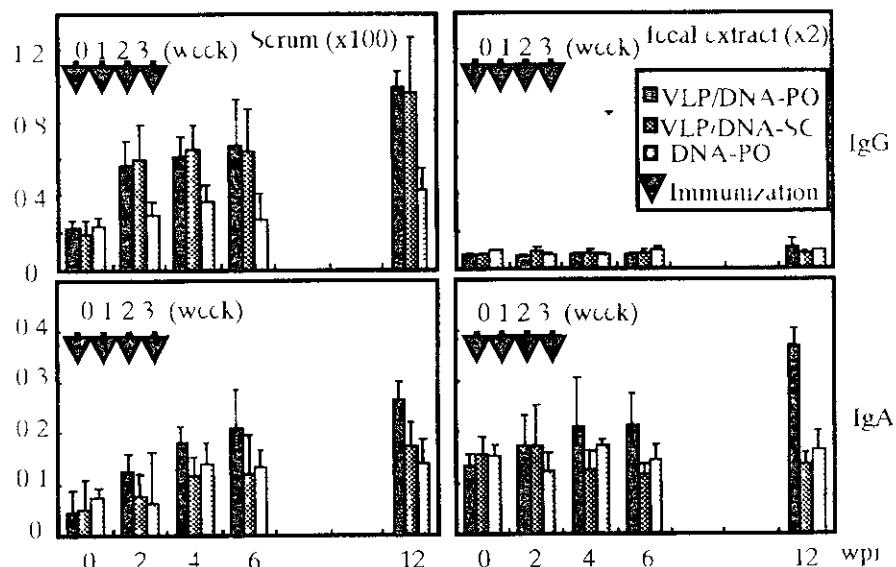


Fig 3 HIV env DNAワクチン封入VLPの経口投与によるHIV envエピトープ特異的抗体の誘導

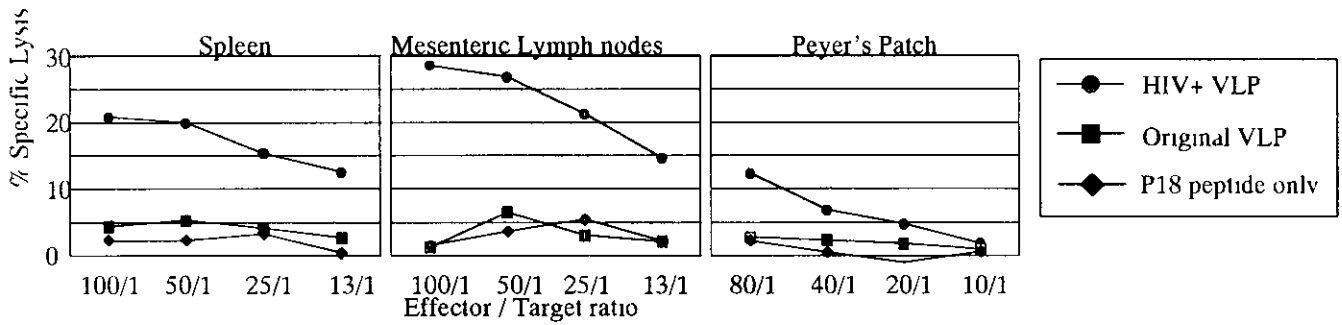


Fig 4 HIV envエピトープ組み込みVLPの経口投与による HIV envエピトープ特異的CTL誘導

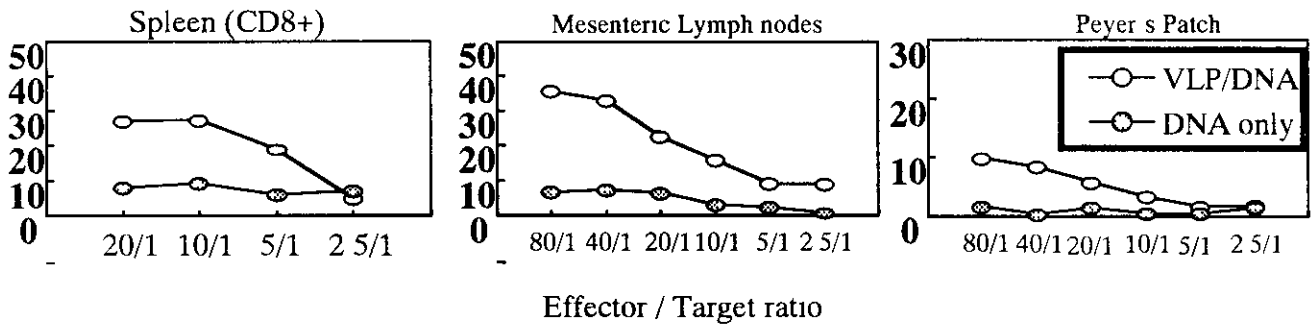


Fig 5 HIV env DNAワクチン封入VLPの経口投与による HIV envエピトープ特異的CTLの誘導