

厚生労働科学研究費補助金
創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

課題番号 H13-創薬-004

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

平成14年度 総括・分担研究報告書

平成15年 3 月

主任研究者

本 多 三 男

(国立感染症研究所・エイズ研究センター・第一研究グループ長)

目 次

I. 総括研究報告書

1. 総括研究報告書 1
主任研究者：本多 三男
(国立感染症研究所・エイズ研究センター・グループ長)

II. 分担研究報告書

1. 研究総括とサルを用いたワクチンの有効性評価研究 15
主任研究者：本多 三男
(国立感染症研究所・エイズ研究センター・グループ長)
2. サルを用いたワクチン評価系の開発研究 23
分担研究者：仲宗根 正 (国立感染症研究所・エイズ研究センター)
3. HIV 制御遺伝子 Tat ワクチンの構築 27
分担研究者：岡本 尚
(名古屋市立大学大学院・医学研究科細胞分子生物学)
4. rBCG ワクチンベクターの改良 33
分担研究者：山田 毅 (長崎大学歯学部・名誉教授)
5. HIV Gag ワクチンの構築 39
分担研究者：小島 朝人 (国立感染症研究所・感染病理部)
6. リコンビナント BCG ワクチンの大量生産法 41
分担研究者：戸井田 一郎 (BCG 研究所・特別顧問)
7. ワクチンの粘膜免疫能の解析 47
分担研究者：清野 宏 (東京大学医科学研究所・炎症免疫分野)

8. ワクチンの CTL 誘導能及び免疫学的交差性	51
分担研究者：高橋 秀実（日本医科大学医学部・微生物学免疫学教室）	
9. CTL 判定法の改良及びヒト CTL 交差性に関する研究	59
分担研究者：滝口 雅文（熊本大学エイズ研究センター）	
10. サルの CTL 活性の測定解析	65
分担研究者：山本 博（富山医科薬科大学・生命科学実験センター）	
11. ワクチン接種アカゲザルの病態薬理	79
分担研究者：網 康至（国立感染症研究所・動物管理室）	
12. ワクチンの安全性評価法	83
分担研究者：小室 勝利（国立感染症研究所・安全性研究部）	
13. ベクターを基盤とした HIV ワクチンの問題点とその実用化に関する研究	93
分担研究者：山本 直樹（国立感染症研究所・エイズ研究センター長）	
14. ワクチンの有効性、安全性に関する病理学的解析	97
分担研究者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所・感染病理部長）	
15. リコンビナントワクシニア HIV ワクチンのプロダクションリサーチに関する研究	101
分担研究者：杉本 正信（(株) ジーンケア研究所・副所長）	
16. ワクチンと先天性免疫の解析	125
分担研究者：若宮 伸隆（旭川医科大学医学部・微生物学講座）	

III. 業績一覧

研究成果の刊行に関する一覧表	129
----------------	-----

研究組織

研究者名	分担	所属	役職
本多 三男	主任	国立感染症研究所・エイズ研究センター	グループ長
仲宗 根正	分担	国立感染症研究所・エイズ研究センター	主任研究官
岡本 尚	分担	名古屋市立大学大学院・ 医学研究科細胞分子生物学	教授
山田 毅	分担	長崎大学・歯学部	名誉教授
小島 朝人	分担	国立感染症研究所・感染病理部	室長
戸井田 一郎	分担	BCG 研究所	特別顧問
清野 宏	分担	東京大学医科学研究所・炎症免疫分野	教授
高橋 秀実	分担	日本医科大学医学部・微生物学免疫学教室	教授
滝口 雅文	分担	熊本大学・エイズ学研究センター	教授

研究者名	分担	所属	役職
山本 博	分担	富山医科薬科大学・生命科学実験センター	助教授
網 康至	分担	国立感染症研究所・動物管理室	主任研究官
小室 勝利	分担	国立感染症研究所・安全性研究部	部長
山本 直樹	分担	国立感染症研究所・エイズ研究センター	センター長
佐多 徹太郎	分担	国立感染症研究所・感染病理部	部長
杉本 正信	分担	(株) ジーンケア研究所	副所長
若宮 伸隆	分担	旭川医科大学医学部・微生物学講座	教授

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）
総括研究報告書

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

主任研究者 本多 三男 国立感染症研究所・エイズ研究センター

研究要旨：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、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推定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 領域を標的にした。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変異型 mTat 遺伝子を組み込んだ mTat 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新規流行している clade E 及び B 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、プロトタイプของ ワクチン開発の目処をつけた。さらに次世代ワクチン開発のために 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。また、組み込んだ外来性 HIV 抗原の発現を強めるためにベクターの改良を行い単一抗原による防御免疫誘導能の可能性についても検討する。

今後、BCG 及び DIs をベースにしたリコンビナント HIV ワクチンのプロダクションとその GLP グレードワクチン抗原の評価法を開発した後、このワクチングループなりの生物製剤基準のドラフトを作成する。さらに、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。

A. 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。まず、HIV/AIDS サルモデルにおける防御免疫を誘導可能なワクチンレジメンを開発し、ヒトへの応用を目的として実用化研究を行う。次に、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至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 DIs 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至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。本プロジェクトは実用化を目指すことが可能な HIV ワクチンの開発を第一の目的とするので効果的で安全なワクチンの開発を行うのみならず今回作製したりコンビナントワクチンのパイロットプロダクションの方法やその実用化における製剤基準のドラフトを作製し臨床試行への橋渡しとする。

B. 研究方法

本研究では HIV ワクチン開発の実用化を目指して HIV ワクチン開発の概念を確立した後、そのレジメンをもとにした第 1 世代ワクチンのプロダクションに至る研究方法や製剤基準についても確立し、実用化の医学的側面について完了させる。さらに、第 2 世代ワクチンの開発を考慮に入れたプロジェクト研究を並行して行うことによりワクチン開発を有効に進める。そのために以下の 5 つの点に関して方法及び方法の開発の方向性を含めたプロジェクト研究を行う。

- 1) HIV/AIDS サルモデルの開発とワクチン評価への応用 (仲宗根、網、山本博) SHIV89.6 由来 SHIVC2/1 のモレキュラー クローンを作製し、SHIVKS661c を作製

した。このウイルスを使って粘膜感染モデルを作製した。このウイルスは X4, R5 ウイルスであるのでさらに R5 のみを使用する SHIV SF162P3 を入手しチャレンジウイルスを作製した。

2) サルエイズモデルによるワクチン効果を誘導できる HIV 候補ワクチンの開発

昨年度明らかにした防御免疫誘導を有する rBCG, rDIs プライムブーストレジメンのワクチン効果を以下の方法で解析した。

①rBCG, rDIs プライムブーストレジメンのワクチン開発 (本多)

ワクチンの投与量の検討: ヒトへの投与可能な量で免疫誘導が可能かどうかを検討した。さらに免疫誘導機能を今年のレジメンでウイルスチャレンジしたサルの経過を約 1 年半にわたって観察し、ワクチン効果の変化を検討した。

②構造遺伝子+制御遺伝子を外来性遺伝子として用いた防御免疫誘導促進型ワクチンの開発 (岡本、小島)

制御遺伝子として Tat を標的として実用化のために Tat 機能を消失させて変異型 Tat ワクチンを作製した。

③ベクターの改良による外来性遺伝子発現増強型ワクチンの開発 (山田)

BCG をベースにしたリコンビナントワクチンの外来性遺伝子の発現を強化するために α 抗原遺伝子のみでなく抗酸菌由来の他のプロモーター遺伝子等を組み

外来性遺伝子についてもコドンの最適化を行い、免疫誘導能の増強の可能性について検索した。

3) ワクチン効果評価法の改良 (高橋、滝口、清野、山本博)

(1)細胞性免疫の測定

①ウイルス特異的 Elispot 活性の検出

免疫動物の PBMC あるいは脾臓及びリンパ節細胞をウイルス抗原で刺激し、IFN- γ の産生の場合は 15 時間刺激後、プレートを変えさらに 6 時間刺激し、IFN- γ 産生細胞を検出した。刺激抗原として 11 アミノ酸オーバーラップ 15 アミノ酸ペプチド、10 アミノ酸オーバーラップ 20 アミノ酸ペプチド (オーバーラップペプチドは米国 NIAID AIDS Program より供与された)、あるいはウイルス蛋白を準備した。その後ペプチドを合成し、実験に用いた。

②ウイルス特異的細胞性サイトカインの検出

①で用いたオーバーラップペプチドで免疫動物のリンパ球を刺激し、報告されているように FITC 抗 IFN- γ 抗体で IFN 産生細胞を検出した。同時に細胞亜型を判別するためにリンパ球にゲートをかけた後、抗 CD4, CD8 抗体で細胞膜抗原を検出した。

③ワクシニアを用いたキラー活性の検出

リコンビナントワクシニア SIV gag あるいは HIV gag を米国 NIAID AIDS

Program より入手しヘルペスウイルスで不活化した B 細胞株に発現させ抗原刺激細胞として免疫標的細胞を刺激し ^{51}Cr 遊離法で細胞障害活性を測定した。

④class I 特異的なテトラマアッセイ

3 種類の HIV-1 epitope と HLA-A*3303 分子を用いて、HLA クラス I tetramer を作成した。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。

(2)ウイルス感染パラメータの解析

①プラズマウイルスコピー数の検索

サル血液中のウイルスコピー数の測定はコマーシャルに確立していないので Taqman PCR を応用したリアルタイム RT-PCR 法にもとづいて (仲宗根、塩先等が開発した方法) 解析した (Sasaki Y. et al. Clin & Exp Immunol, 122:381-389, 2000. Kaizu M. et al. Arch. Virol. in press. 2003)。

②末梢血 CD4 陽性細胞の検索

サルの CD4 陽性細胞の絶対数はワンステップで測定することが推薦された。したがって吉野等が特異抗体ビーズをコントロールしたワンステップ測定法を開発し、それにより測定した (Yoshino N. et al. Experimental Animals 2000, 49: 97-110)。

③血中ケモカインの定量

ワクチン接種マウス及びサルの β ケモカインをコマーシャルの kit を用いて血中レベルの変動を解析した。

- 4) ワクチン抗原の胎児への影響を検索するための発生段階の胚を用いた安全性研究

HIV-1 クレイド E gag 及び本プロジェクトで標的にした HIV 及び SIV 遺伝子を組込んだ pGM 発現ベクターを作製しアフリカツメガエルの受精卵に μ インジェクションを行った。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、1 細胞期の胚 (embryos) もしくは 2 細胞期の片方の 1 細胞へ muTat, Tat, gag 各 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。

Whole-mount In situ Hybridization : 既にマウスをはじめとしてよく知られている、中胚葉形成 (原腸陥入、その際に伴う細胞移動、及び胚の前後軸形成、notochord 形成) に必修の転写因子と考えられている Brachyury(Xbra), Goosecoid(gsc)を遺伝子マーカーとして、上記 muTat, Tat, gag 各遺伝子または蛋白質がこれらの遺伝子発現パターンへ与える影響を whole-mount in situ hybridization 法によって解析を行った。

C. 研究結果

昨年度の研究によって病原性ウイルスの感染

を防御できる HIV ワクチンのレジメンを開発し、HIV 感染に対する防御ワクチンの概念を確立した。本年度の研究においては同レジメンにおけるワクチン効果を確認し、ワクチンとして機能できるかどうかをフォローアップすることにより同レジメンの生存率の解析を良好な結果で終わることができた。このワクチンレジメンによる防御免疫誘導能は以下に示すように1年数ヶ月に渡って感染したウイルスを完全にコントロールすることからワクチンのエスケープが現在のところ問題にシなくともよいレジメンであることが判明した。このワクチンは従来の生ワクチンをベクターに用いたリコンビナントワクチンであるが新規のワクチンとしてとらえられることが要求されているのでその製造法や製剤基準についても班員としてワクチン製造のスペシャリストに参加していただき具体的なパイロットプロダクションの方法、製品の評価法等について検討をお願いした。

1) HIV/AIDS サルモデルの開発とワクチン評価への応用

サル HIV/AIDS モデルのチャレンジウイルスとして SHIV89.6 由来のウイルスが主に用いられているが最近の研究でこのウイルスは X4 ウイルスであることが示唆された。サルエイズモデルのチャレンジウイルスとしては不適當であると示唆された。本研究では SHIV89.6 由来の SHIV C2/I を分離しそのサルモデルとしての有用性を検討した。さらに R5 ウイルスを作製するため V3 部分の遺伝子をタイ型野

生株 R5 ウイルスと置換し、R5 型 SHIV-E を作製した。さらに JRCSF の遺伝子を発現した HIV クレイド B R5 SHIV の作製を SHIV-SF162 p3 を参考にしながら作製中である。サルエイズモデルとしては現在病原性 R5 SHIV が最も HIV 感染を再現できる優れた系としてとらえられていると確信した。

2) サルエイズモデルによるワクチン効果を誘導できる HIV 候補ワクチンの開発

サルエイズモデルによるワクチン効果を誘導できる HIV 候補ワクチンの開発：本プロジェクトでは免疫防御を示すことができる rBCG, rDIs ワクチンベクターの有用性と免疫誘導についてヒトへの応用を考慮に入れて検討した。

①SIV 及び HIV クレイド E の全遺伝子を組み込んだ rBCG をそれぞれ作製し、まずモルモットに 0.1mg, 10mg 経皮投与する。V3 のみを組み込んだものと異なり 1 μ g あるいは 10 μ g の p27 抗原あるいは p24 抗原特異的な DTH が見いだされツベルクリン反応と比較すると十分な細胞性免疫の誘導を検出することができた。さらに、免疫動物 PBMC をウイルス抗原で刺激すると IFN- γ の特異的な産生が認められた。これらの結果から 0.1mg の皮内投与で HIV 特異的な細胞性免疫の誘導が可能であることが明らかになった。

②サルを用いて同様に BCG gag を接種すると 0.1mg 皮内投与で明らかな細胞性免疫の誘導が、さらに粘膜投与として 80mg 経口投与でも PBMC を用いた解析を行い全身免疫の誘導が見られた。

(2) ワクシニア DIs gag 抗原免疫誘導の解析

① SIV gag 及び E gag の全遺伝子を発現させた rDIs ワクチンを作製し、ワクチン抗原としてマウス及びサルを用いて免疫誘導を行った。マウスに 2 回静脈接種すると非刺激 CTL の誘導が検出され、細胞性免疫の誘導に DIs ベクターを用いたワクチンがワクチン抗原として極めて優れていることを明らかにした。

② この DIs gag ワクチンはニワトリ線維芽細胞で増殖するが、BHK、RK 細胞等の哺乳類細胞株では全く増殖しないことが明らかになった。しかし、蛋白の発現が細胞内で認められた。その量は野生株の場合に比べて $10^4 \sim 10^5$ に低下しているが、 10^4 個細胞当りの割合でナノグラムレベルで蛋白抗原産生が認められ、ワクチン抗原として使用できることが示唆された。

③ サルに rDIs gag を接種すると 10^7 pfu/ml で強い Elispot 活性及び細胞性サイトカイン活性が認められ、陽性細胞の頻度が 600 ~ 1500 個 / 10^6 PBMC であるが免疫後約 6 ヶ月で活性は殆ど検出されなかった。従っ

て 3~4 ヶ月以内でウイルスチャレンジすると病原性ウイルス感染を有意にコントロールすることができた。

(3) プライムブースト系におけるウイルス特異的免疫の誘導

上記で得られたヒト投与可能量 rBCG-E gag でプライミングし、rDIs-E gag でブースターをかけるとこれまで得られた防御免疫誘導 Elispot 活性 600 ~ 1500 個 / 10^6 PBMC の陽性細胞が得られ細胞性免疫の誘導が HIV gag 抗原においても可能であることが認められた。SIV gag を組込んだプライムブースト系で免疫すると同様の細胞性免疫誘導のレベルが認められた。これらの動物の防御免疫能の誘導について計画中である。

3) HIV 感染の評価系の開発とその病態解析の応用

(1) マウスモロニー白血病ウイルスあるいは VSV-G ウイルスのエンベロープを持つ EGFP 標識遺伝子を組込んだキメラウイルスを作製し、感染を確認し非増殖性であることを明らかにした。

(2) HIV 感染における Nef 遺伝子の役割に関する研究：種々のキメラウイルスを感染させ、Nef 遺伝子の影響を遺伝子の有無で検索すると感染効率や p24 のマーカーにしたウイルス産生には影響を与えないことを明らかにした。ヒト末梢血 T 細胞に HSV を感染させ、CD4 陽性細胞株を作製し Nef 遺伝子を組込んだ組換えウイルスを感染させると

CD4 及び MHC class I の発現が抑制された。

(3)我々は、Tat 自体に抗原提示細胞機能を低下させ、免疫認識能を全般的に低下させる作用のあることを明らかにし、そのメカニズムが Tat による HIV 転写活性化機構に密接に関連することを見いだした。すなわち、Tat の転写伸長促進作用には cyclin T1 と CDK9 を含む複合体からなる P-TEFb が必須であるが、P-TEFb は先天性免疫不全症候群のひとつ bare lymphocyte syndrome (BLS) の責任遺伝子産物 class II transactivator (CIITA) による MHC クラス II(MHC II)遺伝子の転写活性化に必須でもある。我々は、AIDS においては HIV の APC への感染が Tat による CIITA の機能障害を引き起こし、その結果 BLS と同様に APC による抗原認識レベルでも免疫不全を引き起こしていることを明らかにした。また逆に、CIITA の発現が Tat の機能を抑え HIV の増殖を抑えること、さらに、 γ インターフェロンによる MHC II の発現誘導は CIITA の発現誘導に依存することを明らかにした。これらの結果より、Tat ワクチンを構築する際には、このような CIITA 抑制作用を完全になくした Tat 変異体を用い、BCG などのように γ インターフェロン誘導性に優れたバクテリアを用いることが必要であることを示した。

(4)HLA-A*3303 エピトープを明らかにし

た後、テトラマーを作製した。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。これらのテトラマーを用いて、HLA-A*3303 をもっている HIV-1 感染者の末梢血リンパ球中の特異的 CD8 T細胞を調べた所、2名の感染者で検出できた。このように HLA-A*3303 拘束性 HIV-1 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。

(5)ワクチン効果の発現と維持にウイルス特異的な防御免疫の誘導のみならず、生来免疫の関与が明らかにされてきた。具体的にはサルエイズモデルにおいてウイルス感染の防御能を生来免疫の因子である炎症性の β ケモカインが血中レベルで相関していることが明らかになり β ケモカインのウイルス感染を抑制することを明らかにした。従って HIV 感染は生来免疫がウイルスのコントロールに深く関与していることが明らかになった。本研究では生来免疫の因子であるマンナン結合ワクチンの血中レベルの解析を行い、日内変動は血中濃度が高い集団にみられた。ストレス時には全体の約60%が、血中 MBL 濃度が減少するが、それは血中濃度が高い集団に顕著に認められる事が明らか

- になった。
- 4) ワクチン抗原の胎児への影響を検索するための発生段階の胚を用いた安全性研究

Tat のトランス活性化因子としての作用が正常個体の細胞へ与える影響を *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、gag 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、解析を行った。Tat、muTat、及び gag の各 RNA を受精後、2細胞期のうちの1細胞のみへマイクロインジェクションを行い、stage10.5、stage12（中胚葉形成時期）、stage13-19（神経形成期）、stage20-（organogenesis）の発生段階で形態学的な解析を行った。中胚葉形成の初期（stage10.5）では Tat、muTat、及び gag を接種した胚でいずれも形態学的な変化は認められなかった。ところがその後期（stage12）では、muTat、及び gag を接種した胚では同様に、形態学的な変化は認められなかったが、Tat を接種した胚では明らかな原腸陥入の遅延が認められた。ところが、それらは死滅することではなくそのまま発生は継続され、神経形成期中期（stage17）では Tat を接種された側由来の組織群（beta-Gal にて青色に染色された部位図）は blastpore の閉鎖が行われないうまま（原腸陥入の不完

成）であったが、その他は正常な形態を維持していた。また、muTat、及び gag を接種した同時期の胚では正常な形態を維持したままであった。さらに organogenesis の中期（stage30）まで上記の胚発生は継続され、同様に Tat を接種された胚では、接種された側由来の組織群（beta-Gal にて青色に染色された部位図）は blastpore の閉鎖が行われないうままに内胚葉が体外へ露出した状態であった。この時期もまた、muTat、及び gag を接種した同時期の胚では正常な形態を維持したままであった。また、上記全てにおいて胚は healthy であったが、Tat を接種した胚では、organogenesis の後期（stage45-）では死亡率が50%以上となり、stage50 まで生き残った胚は0%であった。

- 5) ワクチン抗原の安全性、安定性、抗結核効果の確認の検索

(1)安全性研究

日本 BCG 研究所で GLP に従って rBCG gag E 抗原を作製した。ワクシニアのワクチン抗原は鶏卵線維芽細胞で作製し、超遠心法で精製し使用した。サル 41 頭を用いた安全性研究で上記のワクチン抗原の過剰量（生物製剤基準、WHO 製剤基準）を投与し、製剤基準に従って観察するとコントロールに用いた BCG-Tokyo 株及びワクシニア DIs 株と同一の所見が得られマウスやモルモットのみでなくサルにおいてもワクチン抗原の安全性が明らかに

なった。これらの結果はプライムブースト接種においても同様の結果であった。安全性及び毒性についてはさらに詳細な病理学的解析が行われ、全ての実験動物において進行性の病変が認められなかった。従って新生児サルを含めてサル等におけるBCGとDIsの安全性が確認された。

(2)安定性研究

4℃及び37℃で4週間放置した後BCGのコロニー数を計測すると4℃保存のもの、37℃保存のものでは殆ど差が無いことからrBCGの安定性がBCG-Tokyo株と同様に優れていることが明らかになった。

(3)抗結核効果

rBCGの実用化に際しては結核ワクチンとしての機能も求められており、即ち2つのワクチンを1つのワクチンでカバーすることになる。そこでrBCG gag E及びV3-J1の抗結核効果をモルモットを使った有毒結核噴霧法で検討した。その結果BCG-Tokyo株の0.1mg皮内接種群と同様の体重の増加が認められ、有毒結核菌の暴露においても病原性結核菌のモルモットへの感染を有意にLog₂以上のレベルで低下させることが明らかになった。

5) リコンビナント HIV ワクチンのパイロットプロダクション

(1)rBCG-HIV ワクチンのパイロットプロダクション

rBCG タイ E gag ワクチンのパイロットプロダクション：これまでの日本BCG研

究所・戸井田先生との共同研究でBCGの製造過程でソートン培地のみでなく、バレイショ培地の時からカナマイシンの存在下で培養するとシャトルベクターの欠損は無く、動物モデルにおける発現も高いレベルで認められた。これらのことからrBCGワクチンを製造するにはカナマイシンの存在下でrBCG抗原を作製することが重要であると明らかになった。

(2)rDIs-HIV ワクチンのパイロットプロダクション

感染性粒子は有精鶏卵の線維芽細胞では増殖可能であるが、哺乳類細胞では産生されない。従ってrDIsワクチンは安全性に富むことは明らかである。しかしながら、抗原の調整には問題点が残されている。しかも抗原の接種が皮内であることからこれまで日本で行われてきた二又針による穿刺法の場合と異なり、ウイルスの精製と保存剤の検討が必要となってくる。本研究ではrDIs製造の経験を有する杉本研究員、木所研究員に検討していただき、ロータリーカルチャーで10⁸pfuレベルのワクチン抗原を作製した。さらにシュクロース超遠心法で精製することにより、ヒトへの投与可能なワクチン抗原として調整することができた。

6) リコンビナント HIV ワクチンの実用化に関する研究

現在のHIV感染の拡大や感染地域を考慮に入れるとリコンビナントベクターをベースにしたワクチン開発が実際的であ

り第2世代候補 HIV ワクチンとして種々の生ワクチンが作製されている。これらの中で実際に使用可能な条件として防御免疫の誘導が期待されることであるが安全性に優れた候補ワクチンを作製することは重大な課題である。本研究ではヌードマウスや SCID マウス等の免疫不全動物を用いて大量投与によりベクターの安全性を確認した。

D. 考察

本研究プロジェクトの目的は実用化可能な HIV ワクチンの開発である。昨年度の研究で SIV のフルレングス gag 遺伝子を組込んだ rBCG SIV gag でカニクイザルを免疫し、さらに rDIs SIV gag でブースター免疫を行うと病原性 SHIV キメラウイルスの感染をコントロールすることができた。したがって、rBCG/rDIsのプライムブーストレジメンの HIV ワクチンとしてのワクチン効果のコンセプトを確立することができた。本年度の研究ではコンセプトの成果を基にしてワクチンの実用化に必要なミニマムリクワイアメントを検討しさらに臨床トライアルサイドからの要求に応じてサルを用いたオプションな安全性研究を行いワクチンコンセプトの安全性を確認することができた。

HIV ワクチンのヒューマントライアルが社会的にも第一のプライオリティとして捉えられており、欧米を中心に莫大なエネルギーが注がれている。最近、最初の第 III 相試行 VaxGen のリコンビナント 120 蛋白のワ

クチン効果が明らかになり、ワクチン効果が期待できないことが示された。従って、次世代のワクチン開発に期待が寄せられている。その主なものは不全型ウイルスあるいは不全型細菌をベクターに用いた生ワクチン、あるいはそれに DNA ワクチンを組み合わせたものが開発されつつある。これまで多くの総説で語られているが HIV ワクチン開発の抱える大きな問題点の一つに作製した候補ワクチンのワクチン効果を評価できる完全な動物モデルが無いことが挙げられる。さらにその開発の方向性、目処が全く無い。その大きな原因は御存知のように HIV ウイルスがサルに感染して病原性を示す事が出来ないからである。すなわちワクチン投与によって誘導される HIV 特異的な T 細胞、B 細胞などによるウイルス特異的免疫の評価が防御免疫に直結した評価を得ることができないことによる。従ってサルによるワクチン効果は直接には動物モデルの不完全性によりデータを得る事が出来ない状態にある。そのことをカバーする目的で病原性の SHIV というキメラウイルスが作成されてワクチン効果をみるサルモデル系と、さらに SIV の系が使用されている。この2つの系の特徴は病原性を示すサルエイズモデルとして捉える事ができるが、その感染病態をみると SIV のモデルの場合は主に HIV と同様の CCR5 レセプターを介してヒト、サルに感染する。しかし SHIV の場合の問題点は今評価に用いられている SHIV89.6P は主に CXCR4 を介して感染することが in vivo で示唆されている。従って、HIV の感染を担う R5 ウイル

スとは異なった性質を有することが予測される。その感染病態を推測すると以下の点が指摘される。

1. 上記のコレセプターの違いによるウイルス感染はワクチンに誘導されている免疫効果によってコントロールされ易いのではないか。従ってワクチン効果を過大視することにつながるのではないか。
2. HIV ワクチン開発のこれまでの苦い経験から細胞性免疫主導型ワクチンの開発、特に CTL 誘導型ワクチンの開発が行われているがこのワクチン効果を SHIV89.6P で評価するのは CD4 陽性 T ヘルパー細胞を急激に異常に減少させることから CD8 陽性 T 細胞の免疫を評価するのは妥当では無い可能性がある。
3. このチャレンジウイルスは免疫系によってコントロールされ易く、意外な事に液性免疫によってもコントロールされ易いウイルスである。従ってこのチャレンジウイルスによってワクチン効果を示した候補ワクチンはチャレンジウイルス特異的なホモログウイルスに対する中和抗体の産生と強く結びついている可能性があり、そのことは実際の HIV に対するワクチン効果とは異なっている可能性を示唆している。

最近のレポートで CTL 志向型ワクチンのエスケープが明らかにされ、そのサルモデルによる持続がウイルスチャレンジが 30 週過ぎると次第に消失してくることからこれまで報告されたワクチンの効果の持続性がさらなる

重要な課題点として捉えられ始めている。

しかし、このような解析はこれまでの種々の病原体に対するワクチン開発では検討されていない分野であり、HIV のようなサルに病原性を示さない病原体に対するワクチン開発にもこのような解析が今後応用できるのではないかと期待される。HIV ワクチン開発において、以上のことを総合するとこれまでのワクチン開発が目指して来た終着駅である T 及び B 細胞の免疫を有効に誘導することが HIV のコントロールにつながると示唆される。

本プロジェクトでは SIV のフルレングス gag を標的にしてワクチン効果を SIV 疑似ワクチンでみると病原性ウイルスの感染におけるセットポイントを検出限界以下におさえることが可能であることを確認した。従ってこのことはワクチン接種者における HIV 感染の進行を抑え、病態改善に結びつくものと予測される。本研究では SIV の疑似ワクチンの効果をもとにして HIV-1 クレイド B のフルレングス gag、クレイド E のフルレングス gag (野生株コンセンサスウイルスより分離した遺伝子を用いた) を作製した。さらに、HIV-1 クレイド B C2/I Tat 遺伝子及びその活性部位 2ヶ所に変異を入れて変異型 mTat ワクチンを作製した。SIV gag 遺伝子発現の疑似ワクチンで得られた免疫誘導能と比較して新しく作製した HIV ワクチンの免疫誘導能、特に細胞性免疫誘導能について解析した。

- 1) rBCG-HIV ワクチン接種によって得られた特異免疫の特徴

①全身免疫を誘導することができる。

0.1mg 皮内接種においてウイルス特異的全身免疫を有効に誘導することができる。

②経口投与を行うと粘膜免疫のみならず全身免疫の誘導が可能である。

③それらの免疫は観察した1年半にわたり持続する。

④以上より rBCG-HIV ワクチンは全身免疫の持続が優れているが免疫の強さは後述するワクシニアをベクターに使用したものと比較して明らかに低い。

2) ワクシニア DIs 株によって得られた免疫の特徴

①細胞性免疫の誘導能が極めて優れている。特にキラー活性の誘導においてはエフェクター細胞の活性化無しで有意な CTL の誘導が可能である。

②哺乳類細胞で増殖しないので接種法の選択をしなくても有意に免疫を上げることができる。例えば静脈内投与においても炎症性反応の関与を抑えた状態で特異免疫を上昇させることができる。

③従って静脈内接種あるいは皮内接種において細胞性免疫を強力に上げることが可能であり、このことは病原性 SHIV の感染を抑えることにつながると推測される。しかし、この DIs ワクチンの短所は哺乳類細胞の中で増殖できないことから特異免疫の持続期間が短いことである。

これらのベクターを組み合わせてプライムブ

ーストのワクチンを作製すると観察した1年半にわたって強い防御免疫を誘導することができた。

以上の結果から 0.1mg の rBCG E gag ワクチンを免疫し、 10^7 pfu の rDIs E gag ワクチンをサルに免疫すると SIV の場合に検出された 10^6 PBMC あたり 500 以上のウイルス特異的抗原 Elispot 陽性細胞を検出した。このことはクレイド E gag を組込んだプライムブーストレジメンが防御免疫につながるワクチンではないかと推測できる。

これら個々のワクチンとプライムブーストレジメンにおける安全性を生物製剤基準にしたがって検索した（日本 BCG 研究所、国立感染症研究所）。その結果はワクチンとして用いられる BCG-Tokyo ワクチン株、DIs ワクチン株と比して各検索項目で変化がないことからワクチンのミニマムリクワイアメントを満たしていると判断された。さらにワクチン株を使った rBCG-HIV ワクチンへの WHO、UNAIDS からの希望に沿って抗結核効果と、BCG の既往症反応を国立感染症研究所で解析した。その結果、抗結核効果が有毒結核菌の暴露実験で BCG-Tokyo 株と遜色無いことが明らかにされた。既往症反応についてもプライムブーストレジメンによりワクチン効果が確かめられた。以上の結果から rBCG 及び rDIs ワクチンのミニマムリクワイアメントは満たされていると判断された。

オプションな臨床サイドからの要求として子ザルを含むサルを用いた安全性、安定性、環境汚染の解析がある。それに応じ

るために子ザルを含むサル41頭で rBCG E gag 及び rDIs E gag の安全性研究を行った。国立感染症研究所・ワクチン評価グループ（感染病理・佐多博士ら）のもとで解析が行われ、プライムブーストレジメンにおいても病理学的解析を含めて rBCG 及び rDIs の安全性が明らかにされた。これらの結果から rBCG 及び rDIs のプロトタイプワクチンを前臨床レベルで完成することができたと判断された。これらの成果は今年度 2 月 5～6 日の International Symposium で International Advisor の出席のもとで検討され、了解された。

次のステップとしてより効果的な次世代ワクチンの開発のために前述のように

1. 変異型 Tat を追加したコンビネーションワクチン開発
2. rBCG のコドンの至適化による免疫増強を目的にしたワクチンの開発
3. Gag のみでなく Env 遺伝子を追加したワクチンの開発

の3つの方向性で第2世代 HIV ワクチンを完成させる。

E. 結論

本研究プロジェクトにおける第一の目的は、病原性ウイルスの感染をコントロールできるワクチンレジメンの開発を行い、そのレジメンをもとにしたワクチンの実用化研究である。本年度の研究では本プロジェクトで確立された rBCG/rDIs プライムブーストレジメンについてワクチン効果を解析することにより約1年半に渡るウイルスの完全なコントロールが

このレジメンで、可能なことがわかり臨床におけるワクチン効果が期待される。本プロジェクトではさらに実用化を目指したワクチン抗原のパイロットプロダクション、さらに、安全性の解析、ワクチン抗原の評価法の解析、生物製剤基準の検討が行われ、具体的には rBCG GagE ワクチンは GLP レベルで作製されている。このワクチンレジメンの安全性についても生物製剤基準におけるミニマムリクワイアメントとしての安全性の解析結果が既に得られている。さらにオプションなリクワイアメントとしてのサルによる安全性の評価についても国立感染症研究所ワクチン評価部門においてその安全性がサルレベルで確かめられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

業績一覧参照

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

- 1) 特許取得 無し
- 2) 実用新案登録 無し
- 3) その他 無し

Ⅱ. 分担研究報告書