

研究総括とサルを用いたワクチンの有効性評価研究

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：HIV ワクチン開発におけるワクチン効果を示す候補ワクチンを前臨床レベルで開発するために基礎的研究を完成させることを目的にして開発研究を進める。

協力研究者

仲宗根正、松尾和浩、浜野隆一、染谷健二、川原守、海津雅彦、滝澤万里、泉泰之、原敬志、吉野直人、堀端重男、兼清優、浜武牧子、田中陽子、山本直樹（国立感染症研究所・エイズ研究センター）

A. 研究目的

病原性サルモデルにおいて efficacy を示すワクチンレジメンの開発を目的として本研究ではまず SIV Whole Gag 遺伝子を発現する rBCG ワクチンでプライミングし、ワクシニア DIs ベクターを用い rDIs-Gag ワクチンでブーストするプライムブーストレジメンを開発した。その結果細胞性免疫の有意な上昇が認められた。このワクチンレジメンが efficacy を示すかどうかをみること、さらに efficacy を示すことができれば、その防御免疫をアクセサリ-遺伝子を標的にした Tat ワクチンを追加することによって防御免疫の増強を得ることができるかどうか検討すること

を目的とする。さらに構造遺伝子の標的を Env 遺伝子まで拡大して粘膜免疫等による有効なワクチン開発を作ることを目的とする。

B. 研究方法

1. 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。
2. BCG リコンビナントワクチンの実用化を

検討するために先行する BCG 免疫の rBCG ワクチンの免疫誘導に対する既往症反応を検討するためにヒトに投与するためにヒトに投与される BCG ワクチンの量 0.1mg BCG Tokyo 株を接種し、2 年後に rBCG と rDIs のプライムブーストレジメンで免疫誘導し、その HIV 免疫誘導に対する先行する BCG 免疫の影響を検討する。

3. 制御遺伝子例えば Tat 遺伝子を標的として rBCG 及び rDIs のプライムブーストレジメンによる免疫誘導の強度を検索し、Gag 遺伝子を標的とした場合と比較、あるいはコンビネーションを行い再検討する。

(倫理面への配慮)

所内に設置された動物実験委員会の承認を得て行われた。

C. 研究結果

1. 昨年度の研究報告で明らかにしたように SIV gag 遺伝子を標的遺伝子として rBCG 及び rDIs のプライムブーストレジメンで免疫すると防御免疫が誘導されることを明らかにした。その実験群を 1 年間フォローアップし、防御免疫の推移について検討した。その結果、防御免疫を示したプライムブーストの群は 3 頭中 2 頭はウイルスコピー数が検出限界以下を持続し約 400 日が経過した現在もなお検出限界以下のコピー数を持続している。残りの 1 頭はコピー数が高いレベルを前

後しながら生存中である。他のプライムブースト群、単独群、さらにベクターコントロール群は生存率が 50%以下となった。

2. BCG ワクチンの先行免疫の影響を検討するために rBCG Tokyo 株ワクチンを 0.1mg 皮内接種し BCG 免疫の成立を確認した後、上記のプライムブーストレジメンで HIV ワクチン効果を検討した。その際細胞性免疫の指標とした Elispot 活性の有意な静注 rBCG 群と、経口 rBCG 投与群を比較すると Elispot の活性とは全く相関がなく、経口免疫群でのみ防御免疫の誘導がみられ、2 頭中 1 頭は測定限界以下に低下した。従って既往症反応の影響は本レジメンにおける防御免疫の誘導では克服できることが明らかであると示唆された。しかし、細胞性免疫誘導能を解析すると防御免疫を誘導した経口投与群では細胞性免疫のレベルが有意に低下しており、先行する BCG 免疫はそれに引き続く rBCG の細胞性免疫の誘導を有意に低下させることが示唆された。したがってこれらのことから HIV ワクチン開発におけるプライムブーストレジメンの重要性が示唆された。
3. HIV Tat ワクチンの開発を行った。制御遺伝子として Tat はその生物活性の重要性からワクチン標的として機能することが示唆されている。本プロジェクトにおいて構造遺伝子のみでなく、制御遺伝子のワクチンの誘導能に着目し、Tat 遺伝子発

現のみにおける免疫誘導能を上記で得られた防御免疫をさらに増幅する機能があるかどうかを我々のワクチン構築系で検討中である。本年度は昨年度に引き続いてワクシニア DIs にヒト HIV-1 89.6 由来である SHIV C2/1 Tat 蛋白遺伝子を組み込みさらに Tat の生物活性機能をポイントミュータントで 2 箇所潰した変異型 Tat 遺伝子発現リコンビナントワクチン株を製作した。現在その免疫誘導能を解析中である。

D. 考察

本研究班では、HIV ワクチンの実用化につながるワクチン効果を有する研究を行ってきた。本年度はワクチン効果を評価するために SIV のフルレングス gag 遺伝子を標的としてワクチン効果を検討し rBCG プライミング rDIs ブースターのプライムブーストレジメンによって gag 蛋白のみで有効な防御免疫を誘導させることができるかどうかを解析し、サルを用いた病原性エイズモデルでその効果を確認した。最近のワクチン開発研究で DNA ワクチン+ワクシニア MVA を組み合わせたプライムブーストレジメンが引き続く SHIV 89.6p のウイルスチャレンジを有効に防御できることが報告された。しかし、その防御免疫効果は約半年の持続力であり、その原因として組込んだ外来性遺伝子蛋白である Gag 特異的な CTL に対するエスケープミュータントの出現がその原因であると示唆され、細胞性免疫誘導型の HIV ワクチン開発が容易でない

ところが示唆された。しかし、本研究で得られた細胞性免疫主導型ワクチンの防御免疫効果は彼らの報告の 2 倍の経過に達しウイルス血症が検出限界以下を維持していることを示しており、本レジメンの HIV ワクチンにおける有用性が示唆される。その差については解析が始まったところであるがエスケープミュータントの存在等を比較するにはサルの MHC を揃えた解析の検討が必要となりその方向性からサルの選出が始まっている。さらに彼らが用いたサルは SIV Gag への反応性が極めて高い Mamu-A*01 のサルであり、我々が用いているカニクイザル雑系の差がエスケープミュータントの出現のしやすさに関連があるかもしれないと推測され今後の検討が必要である。

これまでヒトに使われる生ワクチンをベクターに用いるワクチン開発は多くの利点をもたらすが同時にその実用化のためには先行するワクチンベクターに対する免疫能の誘導をどのようにコントロールするかが大きな課題となる。このワクチンが実用化される Trial Site は発展途上国でありワクチン対象者が新生児以外では BCG 免疫を受けていることになる。その影響を検討するために本研究では約 2 年前にワクチン株である BCG Tokyo 株を皮内接種し、rBCG, rDIs のプライムブースト HIV ワクチンの防御免疫能に対する影響を検討した。結果に示すように後続する HIV ワクチンの細胞性免疫誘導能が経口免疫において明らかに低下することがわかった。しかし、この細胞性免疫の低下はブースター免疫の rDIs の投与

によりほとんど克服できる。さらにウイルスのチャレンジによる防御免疫の誘導にほとんど影響しないことがわかった。したがって BCG 先行免疫のみを既往症反応の標的としてとらえなければならない発展途上国におけるワクチン開発はこのワクチンレジメンで対応できることが明らかに示された。しかし、ワクシニア接種者における免疫誘導に関しては本研究では現在のところ検討していない。したがって、ワクシニア接種を積極的に行う必要がある地域における本 HIV ワクチン接種は今後研究課題として残されている。

Tat ワクチンおよびミュータント Tat ワクチンの構築は現在完了しつつあり、その免疫能の評価が始められている。最終年度にあたる次年度ではこれまで得られた防御免疫誘導能の増幅効果について検討する予定である。

E. 結論

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。

さらに防御免疫の効果を 1 年間にわたって観察すると防御免疫の効果が著明に持続しており本ワクチンの有用性が期待できる。このプライムブースト系において rBCG 免疫における細胞性免疫の誘導は有意に低下していたが、BCG 免疫の既往症反応を検討すると防御免疫の誘導能に関してはほとんど問題とならないことが明らかになった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakaue G, Hiroi T, Nakagawa Y, Someya K, Iwatani K, Sawa Y, Takahashi H, Honda M, Kunisawa J, Kiyono H. **HIV mucosal vaccine: nasal immunization with gp160-encapsulated hemagglutinating virus of Japan-liposome induces antigen-specific CTLs and neutralizing antibody responses.** J Immunol. 2003 Jan 1;170(1):495-502.
- 2) Kawahara M, Hashimoto A, Toida I, Honda M. **Oral recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin expressing HIV-1 antigens as a freeze-dried vaccine induces long-term, HIV-specific mucosal and systemic immunity.** Clin Immunol. 2002 Dec;105(3):326-31.
- 3) Kawahara M, Matsuo K, Nakasone T, Hiroi T, Kiyono H, Matsumoto S, Yamada T, Yamamoto N, Honda M. **Combined intrarectal/intradermal inoculation of recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) induces enhanced immune responses against the inserted HIV-1 V3 antigen.** Vaccine. 2002 Dec 13;21(3-4):158-66.

- 4) Ishii K, Ueda Y, Matsuo K, Matsuura Y, Kitamura T, Kato K, Izumi Y, Someya K, Ohsu T, Honda M, Miyamura T. **Structural analysis of vaccinia virus DIs strain: application as a new replication-deficient viral vector.** *Virology*. 2002 Oct 25;302(2):433-44.
- 5) Balachandra K, Matsuo K, Sutthent R, Hoisanka N, Boonsarthorn N, Sawanpanyalert P, Warachit P, Yamazaki S, Honda M. **Characteristic of HIV-1 in V3 loop region based on seroreactivity and amino acid sequences in Thailand.** *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2002 Jun;20(2):93-8.
- 6) Naganawa S, Sato S, Nossik D, Takahashi K, Hara T, Tochikubo O, Kitamura K, Honda M, Nakasone T. **First report of CRF03_AB recombinant HIV type 1 in injecting drug users in Ukraine.** *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2002 Oct 10;18(15):1145-9.
- 7) Senpuku H, Asano T, Matin K, Salam MA, Tsuha Y, Horibata S, Shimazu Y, Soeno Y, Aoba T, Sata T, Hanada N, Honda M. **Effects of human interleukin-18 and interleukin-12 treatment on human lymphocyte engraftment in NOD-scid mouse.** *Immunology*. 2002 Oct;107(2):232-42.
- 8) Yamaguchi K., Honda M., Ikigai, H. Hara Y., Shimamura T. **Inhibitory effects of (-)-epigallocatechin gallate on the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1).** *Antiviral Research* 2002 53:19-34.
- 9) Tsunetsugu-Yokota Y., Tamura H., Tachibana M., Ogata K., Honda M., and Takemori T. **Selective expansion of perforin-positive CD8+ T cells by immature dendritic cells infected with live *Bacillus Calmette-Guerin* mycobacteria.** *J. Leukocyte Biology*, 2002 72: 115-124
- 10) Kawahara M., Nakasone T., and Honda, M. **Dynamics of Gamma Infection, Interleukin-12 (IL-12), IL-10, and Transforming Growth Factor γ mRNA Expression in Primary *Mycobacterium bovis* BCG Infection in Guinea Pigs Measured by a Real-Time Fluorogenic Reverse Transcription-PCR Assay.** *Infect Immun*. 2002 Dec; 70(12) :6614-20.
- 11) Yamamoto.H, Katsuyama.K, Ohsu.T, Matsuo.K, Ami.Y, Shinohara.K, Takahashi.E, Suzaki.Y, Sasaki.Y, and Honda.M. **Induction of gag specific CTL activity in Cynomolgus Monkeys vaccinated with rBCG(Tokyo strain)- and rVV (DIs strain) SIVmac gag.** *Exp.Anim*. 50(3), 232(S36), 2001.
- 12) Nakasone T., Izumi Y., Matsuo K., Ami Y., Someya K., Kanekiyo M., Hamano T.,

- Horibata S., Yoshino N., Hara T., Takizawa N., Kawahara M., Kaizu M., Hamatake M., Shinohara K., Sakai K., Yamazaki S., Yamamoto N. and Honda M. **Protective anti-immunodeficiency-virus-immunities to *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin vector elicited by boosting with a replication-deficient recombinant vaccinia DIs.** (in preparation)
- 13) Takizawa M., Haga S., Chiba J., Asano T., Yamamoto N. and Honda M. **Fractionation of guinea pig leukocyte by flow cytometry using novel MIL4/SSC parameter.** Cytometry Research in press.
- 14) Kaizu M., Ami Y., Izumi Y., Sato H., Takebe Y., Nakasone T., Someya K., Kitamura K., Tochikubo O. and Honda M. **Infection of macaques with an R5-tropic SHIV bearing a chimeric envelop carrying subtype E V3 loop among subtype B framework.** Archives Virology in press
- 15) Nakao R, Hanada N, Asano T, Hara T, Salam Md A, Matin K, Shimazu Y, Nakasone T, Horibata S, Aoba T, Honda M, Amagasa T, Senpuku H. **Assesment of oral transmission using cell-free HIV-1 in mice reconstituted with human peripheral blood leucocytes.** Immunology In press
- 16) Someya K., Cecilia D., Ami Y., Nakasone T., Matsuo K., Burda S., Yamamoto H., Yoshino N., Kaizu M., Ando S., Okuda K., ZolLa-Pazner S., Yamazaki S., Yamamoto N. and Honda M. **Vaccination with recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG)-Env V3 elicits neutralizing antibody-mediated protection against simian-human immunodeficiency virus (SHIV)_{MN} but not SHIV 89.6PD in rhesus macaques.** Submitted for publication
- 17) Matsuo K., Minamitani M., Kitamura T, Izumi Y., Ami Y., Someya K., Hamano T., Ohsu T., Ishii K., Kato K., Ueda Y., Miyamura T., Yamazaki S., Yamamoto N. and Honda M. **A recombinant vaccine based on the replication-deficient vaccinia strain DIs and expressing HIV-1 clade B gag induces high levels of CD4⁺ T cell responses in mice and monkeys.** Submitted for publication
- 18) Izumi Y., Ami Y., Nakasone T., Matsuo K., Someya K., Sata T., Nakasone T. Yamamoto N. and Honda M. **Intravenous inoculation of completely replication-deficient recombinant Vaccinia DIs-based vaccine expressing SIV Gag control highly pathogenic SHIV in monkey.** Submitted for publication
- 19) Nakasone T., Izumi Y., Matsuo K., Ami

Y., Someya K., Kanekiyo M., Hamano T.,
Horibata S., Yoshino N., Hara T.,
Takizawa N., Kawahara M., Kaizu M.,
Hamatake M., Shinohara K., Sakai K.,
Yamazaki S., Yamamoto N. and Honda M.

**Protective anti-immunodeficiency-
virus-immunities to *Mycobacterium
bovis* bacillus Calmette-Guérin vector
elicited by boosting with a replication-
deficient recombinant vaccinia DIs.**

Submitted for publication

2. 口頭発表

Matsuo K. 国際エイズ学会

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

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)
分担研究報告書

サルを用いたワクチン評価系の開発研究

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

A 研究目的

我々は、HIV-1 病態解析および抗 HIV-1 ワクチン・薬剤評価を最終目的に、SHIV/サル感染発症モデルを開発した。

B. 研究方法

親ウイルス：ハーバードエイズ研究所・Yichen Lu 博士より提供された SHIV-89.6p を用い、これをカニクイサルで2継代することにより SHIV-C2/1 を得た。

クローン作成：この SHIV-C2/1 はカニクイサルにおいて強い病原性を示したことから、同ウイルスを遺伝子工学的にクローン化した。作成したクローンウイルス (SHIV-C2/1 KS661) の感染性・病原性を以下の実験で検討した。

実験 1：初代クローン SHIV-C2/1 KS661(KS661)・120TCID₅₀ をカニクイサル1頭に経静脈接種。

実験 2：KS661・15000TCID₅₀ をカニクイサル3頭に経直腸接種。

実験 3：次代クローン SHIV-C2/1 KS661(KS661C)をカニクイサル 17 頭に経直腸接種 (それぞれ 2, 2, 20, 20, 200, 200, 200, 200, 200, 200, 2000, 2000, 2000, 2000, 2000, 20000TCID₅₀)。

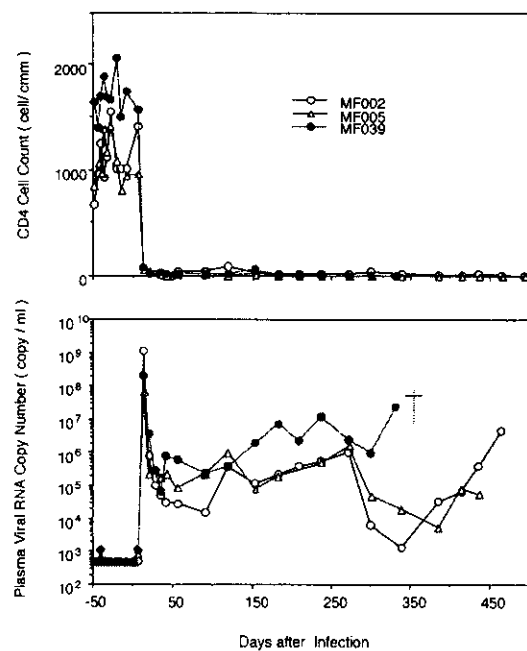
いずれも経時的に末梢血 CD4 細胞数と

血漿ウイルス量を測定した。なお、初代クローンは transfection 後 COS7 細胞から回収された培養上清で、次代クローンはそれを CEMx174 細胞に感染させて得られた培養上清である。

C. 研究成果

実験 1：感染成立(1/1)、実験 2：感染成立(3/3)、実験 3：感染成立(10/17)。

Intra-rectal Challenge of SHIV C2/1 KS661 to Cynomolgus Monkeys



感染成立した全ての個体で、親ウイルス (SHIV-C2/1)と同等の CD4 消失と急激な

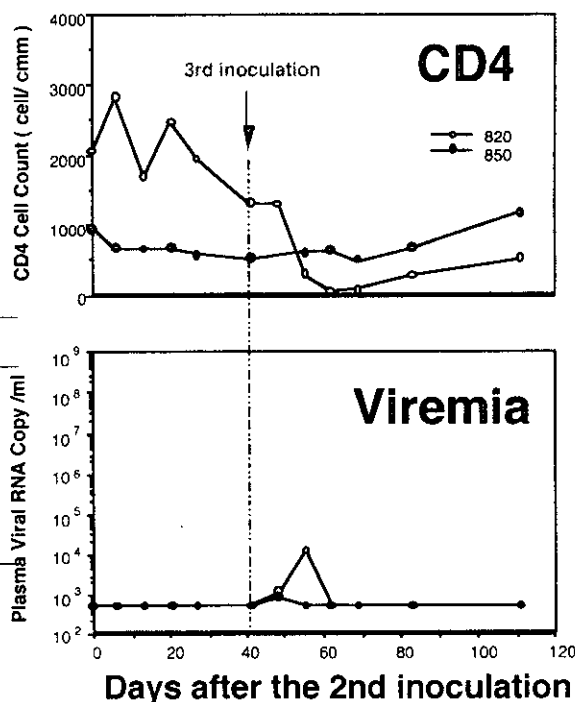
ウイルス血症およびその持続が観察された。上図は実験2の結果である。上段が感染後のCD4細胞数、下段が血漿ウイルス量の推移を表している。初代クローン15000TCID50の直腸接種により3頭全て感染が成立した。CD4細胞は接種後2週目でほぼ0となり以後回復することは無かった。血中ウイルス量は、やはり接種後2週目にピークを迎え 10^9 copy/mlに達した。ウイルスはその後消失することなく、 10^5 copy/ml前後で推移している。特筆すべきは1頭が感染後11ヶ月後にAIDS死したことである。カニクイサルは赤毛サルに比べて、たとえCD4細胞が0になったとしてもAIDSを発症しにくいとされており、本症例はカニクイサルでは世界初のAIDS死と思われる。

Titer for challenge	No. of Infected/Challenged (%)
2TCID50	0/2(0)
20	1/2(50)
200	2/6(33)
2000	6/6(100)
20000	1/1(100)

上表は、実験3の結果をまとめたものである。20TCID50でも1頭が感染したことを考慮し、1MID50(Monkey Infectious Dose 50%)は200TCID50近辺にあると判断した。

なお、実験3実行中、ウイルス曝露非感染サルと思われる2症例を経験した。右図はその2症例のCD4細胞数と血漿ウイルス量の推移を表している。2頭のサルは低力価ウイルスの直腸接種を2回受けたが感染せず、3回目の2000TCID50接種により感染した。前述のように2000TCID50は

10MID50に相当し、この量のウイルス接種を受けたサルはほぼ100%感染し、急激なCD4消失と急激なウイルス血症を呈するのが通常である。しかしながら右図の2頭は急激なCD4消失と急激なウイルス血症が見られない。すなわち、検出感度ぎりぎりの低ウイルス血症が一時的に見られ、CD4細胞は1頭では完全に保持され、もう1頭では一時的に消失するも接種後4週目以降回復した。



D. 考察

初代クローンKS661は15000TCID50で経直腸的に感染性を示したが、それ以下の量(25, 250, 2500)を用いた別の実験では感染不成立であったことから、1MID50が2500TCID50以上であることが示唆された。感染性を増強させるべく作成した次代クローンKS661Cは、実験3の結果より1MID50が200TCID50近辺であることが

確認された。いずれのクローンでも、感染個体では親ウイルス同様の病原性が再現されており、分子クローン SHIV/サル感染発症モデルが確立されたと考えられる。本モデルでは感染ルートとして経粘膜（直腸）を用いており、HIV-1/ヒト・エイズモデルにより近いモデルと考えられる。KS661C に関しては、経直腸接種量として 3000 頭分のウイルスストックがあり、今後のサル動物実験への安定供給量が確保された。さらに、本クローンは 10MID50 をチャレンジ量として、実際に候補ワクチンの評価実験に用いられ、その評価系としての有効性も確認された。

本研究中偶然観察されたウイルス曝露非感染サル（疑い）は、今後の研究課題として非常に興味深い。ヒトにおいても既に HIV 曝露非感染例がいくつか報告されている。このような症例では粘膜面において防御免疫が誘導されている、あるいは遺伝子学的にウイルス耐性遺伝子を持っている、と考えられており、そのいくつかは証明されている。特に、先行するウイルス曝露により防御免疫が誘導されている場合、その誘導された免疫能そのものが、ワクチンが誘導すべき目標であることから、その解析は最重要課題となっている。しかしながらヒトにおいては、1)症例が少ない、2)粘膜のサンプリングが困難である、3)感染実験が不可能なためその免疫が防御免疫かどうか検討できない、などの問題があり、解析は進んでいない。一方、ウイルス曝露非感染サルモデルが存在すれば、それらの問題は解決され、防御免疫能の解析が一挙に進む。従って、ウイルス曝露非感染サルモデル開

発は、防御免疫能解明についてはワクチン開発にとって極めて重要かつ緊急課題である。今後積極的にその開発を進めたい。

E. まとめ

HIV-1 病態解析および抗 HIV-1 ワクチン・薬剤評価が可能な HIV-1/ヒト・エイズモデルに近い SHIV/サル経粘膜感染発症モデルが完成した。本系では、SHIV は分子クローン SHIV-C2/1 KS661c、サルはカニクイサルを用い、経直腸感染で約 3000 頭分の実験が可能なウイルスストックが確保されている。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表（サルエイズモデル関連）

- 1) Shinohara, K., K. Sakai, S. Ando, Y. Ami, N. Yoshino, E. Takahashi, K. Someya, Y. Suzaki, T. Nakasone, Y. Sasaki, M. Kaizu, Y. Lu, and M. Honda. A highly pathogenic simian/human immunodeficiency virus with genetic changes in cynomolgus monkey. *Journal of General Virology*, 80, 1231-1240, 1999.
- 2) Nakasone, T., Shinohara, K., Ami, Y., Yoshino, N., Kaizu, M., Takahashi, E., Touzjian, N., Lu, Y., Nagai, Y. and Honda, M. SHIV carrying C1-V3 of HIV-1 subtype E infected to a cynomolgus monkey. *Journal of Medical Primatology*, 29, 294, 2000.
- 3) Sasaki, Y., Y. Ami, T. Nakasone, K. Shinohara, E. Takahashi, S. Ando, K. Someya, Y. Suzaki and M. Honda. Induction of CD95 ligand

expression on CD8+ T-lymphocyte correlates with HLA-DR expression and contributes to apoptosis of CD95-upregulated CD4+ T-cells in macaques by infection with a pathogenic simian/human immunodeficiency virus. *Clinical Experimental Immunology*, 122, 381-389, 2000.

4) K. Shinohara, K. Sakai, E. Takahashi, Y. Ami, Y. Sasaki, N. Yoshino, Y. Suzaki, T. Nakasone and M. Honda. A pathogenic SHIV-C2/1-cynomolgus monkey model for valuation of HIV vaccine candidates. XIII international AIDS conference. *Basic Science Clinical Science Epidemiology Prevention and Public Health*, A709/C/6357 P.247-250, 2000.

5) K. Mori, Y. Yasutomi, S. Ohgimoto, T. Nakasone, S. Takamura, T. Shioda and Y. Nagai. A quintuple deglycosylation mutant of SIVmac239 in rhesus macaques. Robust primary replication, tightly contained chronic infection and elicitation of potent immunity against the parental wild type strain. *Journal of Virology*, 75, 4023-4028, 2001.

6) Nakasone T., Sakai K., Ami Y., Izumi Y., Takahashi E., Sasaki Y., Takizawa M., Suzaki Y., Shinohara K., and Honda M. Genetic and biological characterization of a highly pathogenic molecular clone, SHIV-C2/1 KS661. *Journal of Medical Primatology*, 31:252, 2002.

7) Kaizu, M., Ami, Y., Izumi, Y., Sato, H., Takebe, Y., Nakasone, T., Someya, K., Kitamura, K., Tochikubo, O., and Honda, M. Infection of macaques with an R5-tropic SHIV bearing a chimeric envelop carrying subtype E

V3 loop among subtype B framework. *Arch. Virol.* (in press) 2003.

8) Nakasone T., Ami Y., Sakai K., Izumi Y., Hara T., Takahashi E., Sasaki Y., Shinohara K., and Honda M. A possible virus-exposed but uninfected monkey model for HIV infection. *Journal of Medical Primatology*, (submitted), 2003.

H. 知的所有権の取得状況

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

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

HIV 制御遺伝子 Tat ワクチンの構築

HIV ワクチン開発のための基礎研究：
リンフォトキシンβレセプター・シグナルによるNF-κB活性化機構

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

研究要旨

Tat は、HIV の転写活性化を通してウイルスの複製において必須の役割をしているばかりでなく、HIV 感染症に付随する多くの病態、例えばカポシ肉腫の形成・CD4 細胞傷害・神経障害など、に関与する。これらの理由より、Tat に対するワクチン開発はその有効性が強く期待されるのであるが、その安全性に関しては十分な検討がなされなければならない。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、というおそるべき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ベクターを用いることが必要であることを示した。

A. 研究目的

HIV 感染者におけるワクチンの問題点のひとつに HIV 感染に伴って免疫装置自体が廃絶され、有効な免疫応答が惹起されにくいことが挙げられる。すなわちウイルスは感染者体内の樹状突起細胞やマクロファージ、および静止期 CD4 陽性 T 細胞など

に潜伏感染している。最近、Izmailova ら (Nat. Med. 9:191-197, 2003)は、樹状突起細胞に感染している HIV から作られる Tat が IRF7 などの転写因子を誘導し、MCP1-3 などのケモカインを産生し、非感染 T 細胞を呼び寄せることによって感染を拡大していることを報告した。他方、LTBR

からのシグナルは2次リンパ装置の再生など免疫組織の再構築において重要な働きをしている。LT β RからのシグナルによるNF- κ B活性化のメカニズムについて、NF- κ B inducing kinase (NIK)およびI κ B kinase α (IKK α)を介することがノックアウトマウス等の実験から強く示唆される。そこで、本研究ではHIV感染者における免疫組織再構築に関わっているLT β RシグナリングによるNF- κ B活性化機構におけるNIKとIKK α の役割について検討した(詳細は次の論文に報告した:Jiang et al, J. Biol. Chem. 278:919-926, 2003)。

B. 研究方法

(1) 発現プラスミッドの作成: 発現プラスミッド pM-p65、pM-p65(1-286)、pM-p65(286-551)、pM-p65(286-551: Δ 443-476)、pM-p65(286-520)、pM-p65(431-551)、pM-p65(521-551)、pM-p65(521-551:S529A)、pM-p65(521-551:S536A)、pcDNA3.1(-)-FLAG-p65、pcDNA3-NIK、pcDNA3-NIK(KM)、pcDNA3-I κ B Δ 、pcDNA3-I κ B(S32A/S36_)、pCR-2FL-IKK α 、pCR-2FL-IKK α (KM)、pCR-2FL-IKK β およびpCR-2FL-IKK β __ __を作成した。

(2) 細胞株およびトランスフェクション: 293細胞とLT β Rを発現するHT29細胞を用いた。プラスミッドを細胞への導入にはFuGENE6 transfection reagent(Roche Molecular Biochemicals)およびLipofectAMINE(Invitrogen)を用いた。

(3) Luciferase 検定: 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を細胞へ導入し、48時間後、細胞から蛋白を抽出、Luc活性を測定した。

(4) 免疫組織化学染色法: p65の核移行を解析するため、HT29細胞を10ng/ml濃度のTNFで15分にまた2ug/ml濃度のLT β R agonistic抗体で40分に刺激し、細胞を固定し、p65に対する抗体(Santa Cruz Biotechnology)で染色した。

(5) ウエスタンブロット法: 細胞抽出液の作成およびウエスタンブロット法は既に報告した方法(Jiang et al, J. Biol. Chem. 278:919-926, 2003)に拠った。

(6) 共免疫沈降法: p65のLT β Rシグナリングにより誘導したリン酸化を確認するため、HT29細胞にFLAG標識したp65(FLAG-p65)を発現した後、FLAGに対する抗体(anti-FLAG M2 affinity gel (Kodak))で共免疫沈降し、沈降された蛋白をp65の536番セリンのリン酸化に認識する特別抗体(anti-phospho-p65 NF- κ B (ser536) antibody (Cell Signaling))を用いてウエスタンブロット法で解析した。

C. 研究結果

まず、LT β RシグナリングでのNF- κ B活性化はI κ Bリン酸化およびp65の核移行に依存しないことを明らかにした。293とHT29細胞に様々のNF- κ B活性因子(TNF、LT β R、NIK、IKK α 、IKK β など)を導入し、これらの因子により誘導された κ B転写活性をみたところ、TNF、LT β RおよびNIKは κ B転写活性を誘導したが、IKK α またIKK β 単独では κ B転写活性を誘導することできないことがわかった。さらに、TNF、LT β RシグナリングにおいてI κ Bのリン酸化をウエスタンブロット法で調べたところ、TNFはI κ Bのリン酸化を誘導したが、LT β RシグナリングではI κ Bリン酸化を誘導しないことがわかった。この結

果を確認するため、細胞免疫組織化学染色法で p65 の核移行を解析した。その結果、LT β R シグナリングにおける NF- κ B 活性化においては p65 の核移行を伴わないで NF- κ B 依存性転写を活性化することがわかった。

次いで、NF- κ B 活性化に関わる因子の相互作用：293 と HT29 細胞に様々な NF- κ B 活性化因子とそれらの dominant negative 変異体を導入し、Luciferase assay でその作用を解析した。TNF により誘導された NF- κ B 活性は NIK、IKK α また IKK β の dominant negative 変異体によって抑制された。しかし、LT β R シグナリングにより誘導された NF- κ B 活性では NIK と IKK α の変異体によって抑えられたが、IKK β 変異体では抑えられなかった。次いで、これらの因子の共同作用をみたところ、TNF は NIK、IKK β との間で共同作用がみられたが、IKK α とではみられなかった。一方、LT β R シグナリングは IKK β ではなく、IKK α および NIK との間で共同作用がみられた。以上の結果から、TNF シグナリングは主に IKK β 、すなわち I κ B リン酸化 cascade を使うが、LT β R シグナリングは主に NIK、IKK α cascade を使っていることがわかった。さらに、NIK で誘導した NF- κ B 活性における IKK α 、IKK β とその変異体の作用を確認した。NIK は IKK α 、IKK β 両方とも共同作用がみられた。他方、NIK で誘導した NF- κ B 活性は IKK α 変異体によって抑制されたが、IKK β によっては抑制されなかった。これらの結果から NIK の作用は IKK β でなく主に IKK α と連携していることが示された。

NIK-IKK α の作用機構をさらに確認するため、p65 wild-type と様々な変異体の

Gal4 融合蛋白の発現プラスミドを作成した。これらプラスミドを細胞に導入し、Luciferase assay でこれら Gal4 融合蛋白の NIK により誘導される転写活性を比較した。その結果、p65 の TA1 領域だけが含まれた Gal4-TA1 融合蛋白は NIK に対して一番高い反応性を示した。さらに TA1 領域の 529 番また 536 番セリンをアラニンに変換した変異体を細胞に導入し、NIK により誘導される転写活性を比較したところ、TA1 の転写活性は 536 番セリンの変異によって明らかに抑制された。これらの結果から p65 の C-末端 TA1 領域、特にセリン 536 が NIK と IKK α の標的であることが示唆された。

そこで、LT β R シグナリングに伴って実際に p65 サブユニットの 536 番セリンのリン酸化が起こるか否かを検証した。細胞に FLAG 標識した p65 (FLAG-p65) を発現し、LT β R シグナリングで誘導した p65 セリン 536 のリン酸化を共免疫沈降法で p65 を沈降しウエスタンブロット法で p65 セリン 536 リン酸化抗体を用いて確認することができた。また、このリン酸化は NIK、IKK α 変異体また I κ B の発現によって抑制された。以上より、LT β R シグナリングにおける NF- κ B 活性化は p65 セリン 536 の NIK および IKK α を介したリン酸化に依存していることが明らかになった。

D. 考察

今回の研究から、まず HIV 感染によって著しく障害を受ける 2 次リンパ装置の再生に関わる LT β R シグナリングにおける NF- κ B 活性化は、p65 セリン 536 の NIK および IKK α を介したリン酸化に依存していることが確認された。しかしながら、こ

のシグナルがむしろ活性型 T 細胞を呼び寄せ、HIV 感染の播種に関わっている可能性があるため、LTβR シグナルの選択的抑制は AIDS の進展阻止のためにも重要な標的となる。なお、最近の報告から、LTβR シグナリングは我々が今回研究対象とした NIK-IKKα を介した p65 のリン酸化 cascade 以外に、もうひとつの cascade、すなわち NIK-IKKα を介した p100-p52 processing、を誘導することが明らかになった。これらの一連の研究から、有効な抗 HIV ワクチン開発における NIK-IKKα cascade の重要性が改めて注目された。

E. 研究発表(英文原著論文)

- Jiang X, Takahashi N, Matsui N, Tetsuka T, Okamoto T: The NF-κB activation in the lymphotoxin beta receptor signaling depends on the phosphorylation of p65 at serine 536. *J Biol Chem* 278: 919-926, 2003.
- Jiang X, Takahashi N, Ando K, Otsuka T, Tetsuka T, Okamoto T: NF-κB p65 transactivation domain is involved in the NF-κB-inducing kinase (NIK) pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 301:583-590, 2003.
- Takahashi N, Tetsuka T, Uranishi H, Okamoto T: Inhibition of NF-κB Transcriptional Activity by Protein Kinase A. *Eur J Biochem* 269 : 4559-4565, 2002.
- Matsumoto S, Imaeda Y, Umemoto S, Kobayashi K and Okamoto T: Cimetidine increases survival of colorectal cancer patients with high levels of sialyl Lewis-X and sialyl Lewis-A epitope expression on tumor cells. *Br J Cancer* 86:161-167, 2002.
- Kawabe T, Suganuma M, Ando T, Kimura M, Hori H and Okamoto T: Cdc25C interacts with PCNA at G2/M transition. *Oncogene* 21: 1717-1726, 2002.
- Maki M, Matsukawa N, Yuasa H, Otsuka Y, Yamamoto T, Akatsu H, Okamoto T, Ueda R, Ojika K: Decreased expression of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein mRNA in the hippocampus in alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 61: 176-185, 2002.
- Sarol L C, Imai K, Asamitsu K, Tetsuka T, Barzaga N G and Okamoto T: Inhibitory effects of IFN-γ on HIV-1 replication in latently infected cells. *Biochem Biophys Res Commun* 291: 890-896, 2002.
- Tozawa K, Okamoto T, Hayashi Y, Sasaki S, Kawai N, Kohri K: N-acetyl-L-cysteine enhances chemotherapeutic effect on prostate cancer cells. *Urol Res* 30:53-58, 2002.
- Takada N, Sanda T, Okamoto H, Yang J-P, Asamitsu K, Sarol L C, Kimura G, Uranishi H, Tetsuka T, Okamoto T: RelA-associated inhibitor blocks transcription of HIV-1 by inhibiting NF-κB and Sp1 actions. *J Virol* 76: 8019-8030, 2002.
- Watanabe N, Ando K, Yoshida S, Inuzuka S, Kobayashi M, Matsui N, Okamoto T: Gene expression profile analysis of rheumatoid synovial fibroblast cultures revealing the overexpression of genes responsible for tumor-like growth of rheumatoid synovium. *Biochem Biophys Res Commun* 294: 1121-1129, 2002.

Okano A, Usuda N, Furihata K,
Nakayama K, Tian Q B, Okamoto T,
Suzuki T : Huntingtin-interacting
protein-1-related protein of rat
(rHIP1R) is localized in the

postsynaptic regions. Brain Res 2003
(in press)

F. 知的所有権の取得状況
該当するものなし。

rBCG ワクチンベクターの改良

分担研究者 山田 毅 長崎大学 歯学部

研究要旨：rBCG-HIV ワクチンの実用化を目指して in vitro におけるベクターの安定性と、in vivo における病原性の変化の有無に関する研究を行い、pSO ベクターを用いた HIV-1 E gag あるいは HIV-1 クレイド E Env V3 遺伝子を組み込んだリコンビナントワクチンは従来の大型のベクターである PSI ベクターの場合よりは長期に渡って抗原情報が存在し、結核菌に対する防御免疫誘導能についても従来の BCG ワクチンと遜色ないことが明らかにされた。

協力研究者

芳賀伸治、山崎剛、相澤知恵子（国立感染症研究所・細菌部）

A. 研究目的

リコンビナントワクチンは科学的問題点として挿入した外来抗原の発現を安定した形でベクター内に保持できるかどうか、免疫誘導能の強さと直結した重要な課題である。さらに従来のワクチンをベースにしたリコンビナントワクチンの実用化にはベクターの機能として求められるワクチン機能を保有することは実用化を左右する大きな因子となっている。これらの課題を今回開発した rBCG-HIV ワクチンの実用化に際して検討する。

B. 研究方法

1. ハートレイ系クリーンのモルモット(約 350g, 雌) は日本 SLC 社から購入した。モルモットは随時市販のモルモット用飼料と滅菌水を摂取できるポリカーボネート製飼育箱に 2 匹ずつ入れて、気温、湿度および明暗を一定に保持し、国立感染症研究所実験動物管理運営規程に基づき、倫理面等を含めて管理運営委員会の許可を受けて、戸山庁舎内 BSL3（バイオセーフティーレベル 3）動物実験区内の動物飼育用安全キャビネット内で飼育した。
2. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC27294) 株は 0.05% Tween 80 を含む Middlebrook 7H9 培地で 37℃、15 日間前後培養し、単個菌に調整した後分注して -80℃ に保存した。噴霧感染直前に

冷凍菌液を融解し使用した。

M.tuberculosis H37Rv 株の生菌数は 1%小川培地で培養して確認した。ツベルクリン反応測定の日、Glas-Col 社製エアロゾル噴霧感染装置にモルモットを入れ、*M.tuberculosis* H37Rv 株 7×10^4 /ml, 2.5ml を噴霧し経気道感染させた。解剖時の結節数から肺に定着した結核菌数は 10-20 個と推定した。

3. 10%ホルマリン液で固定した肺、脾臓、肝臓は定法に従い各々パラフィン包埋後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、病理組織学的に観察した。

(倫理面への配慮)

所内に設置された動物実験委員会の承認を得て行われた。

C. 研究結果

感染 5 週後のモルモットの体重増加量(g) は実験 2 で 98.4 ± 23.8 (rBCG/pSO-gagE 群)、 130.0 ± 12.9 (BCG-Tokyo 群)で有意差は認められなかった。解剖時における肺表面のスカナーによる観察結果は、PBS 群ではすべての個体で直径約 3mm の白色結節病変が認められたが rBCG/pSO-gagE 群では結節は小さくその直径は 1mm 程度であった。更に、Fig.1. に肺切片のヘマトキシリン・エオジン染色像を示した。PBS 群には中心に壊死を伴う結節が認められたが、rBCG/pSO-gagE 群には壊死は認められず、結節の大きさも抑えられていた。病理学的観察では rBCG/pSO-gagE 群と BCG-Tokyo

群で差は認められなかった。

D. 考察

リコンビナント BCG ワクチンの実用化の難点の一つである外来抗原の発現の安定性について、リコンビナント BCG-J1-K3 はモルモット体内で導入プラスミドが早期に 83.8%脱落する成績が得られたので、この改善のために pSO246 ベクターを使用すると、in vivo においても安定であることがわかった。これまで外来抗原の発現に大型のベクターが使用され、in vivo 投与が試みられてきたが、本研究では大型の pLJK-1 ベクターから小型の pSO246 ベクターに変えることにより、ベクター自体の安定性の課題を克服する事ができた。このことはリコンビナント BCG-HIV ワクチンの開発における特記すべきことであると考えられる。

E. 結論

pSO ベクターの HIV-1 クレイド E ウイルスフルレングスの gag 遺伝子を組み込んだ rBCG ワクチンを作製し、ワクチン抗原として使用した。このワクチンの目的は HIV 候補ワクチンとして作製したが同時に結核ワクチンとして機能するかどうかを検討した。このことは rBCG ワクチンにとって極めて重要な課題としてとらえられていた。昨年度の研究において rBCG-pSO gag ワクチンは防御免疫能を誘導するための重要なプライミング抗原として機能することを明

らかにした。したがってこのリコンビナントワクチンが結核ワクチンとして機能するかどうかをモルモットを用いた病原性結核菌 137RV の暴露実験による防御効果を検討するとこれまで結核ワクチンとして使用されてきた BCG Tokyo 株と同様の防御効果が得られた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

無し

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

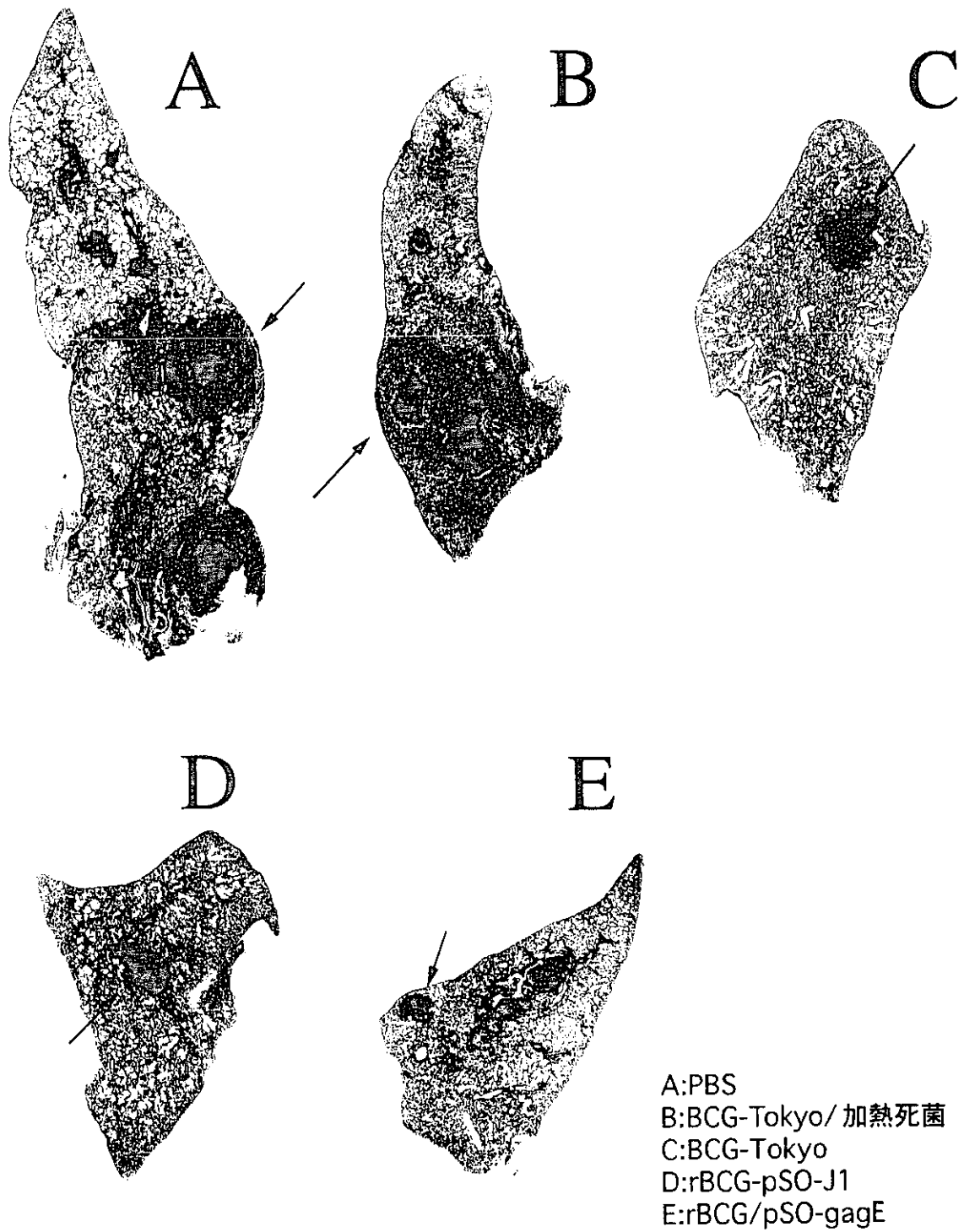


Fig.1 モルモット肺切片の HE 染色像