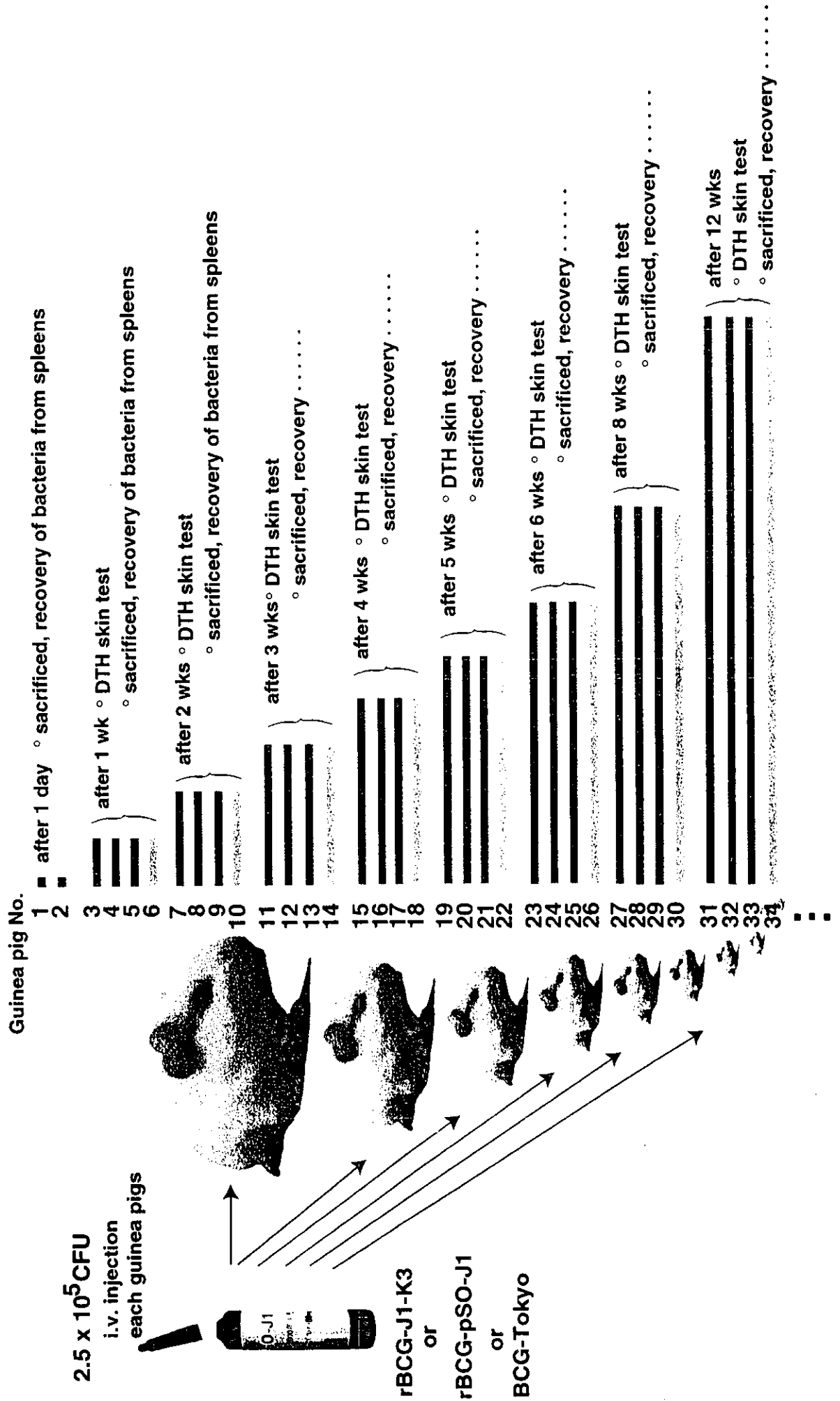


# MATERIALS AND METHODS

## EXPERIMENTAL SCHEDULE ON LYOPHILIZED BCG IMMUNE GUINEA PIGS



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 Gag ワクチンの構築

分担研究者 小島 朝人 国立感染症研究所感染病理部

研究要旨：コンビネーションワクチンの 2 次免疫に有効な組換えワクシニアウイルスワクチンの、安全性・有効性に最も大きな影響を与えるワクシニアウイルスベクターの性状について検討した。WHO/日本/英国で採用され痘瘡根絶実績を持つ Lister 原株、Lister 株から開発された LC16mO 弱毒変異原株、この株からさらに弱毒化され、世界各国のワクチン中最高の安全性評価を得ている痘瘡ワクチン LC16m8 株を種々の系統マウスに接種し、(I)Lister 関連株はマウス皮膚での増殖性が弱くマウス親和性が低いこと、(II)ワクシニアウイルス感受性には遺伝的要因が介在していること、(III)LC16m8 の B5R エンベロープ中和抗原遺伝子の欠失が生ワクチンベクターとして有効に作用する可能性があることを示唆し、種痘歴のあるヒト成人で免疫原性試験を実施する場合の留意点を考察した。

A. 研究目的

エイズワクチン開発は、HIV の組換え蛋白コンポーネントワクチン・ウイルスベクター生ワクチン・DNA ワクチン・合成ペプチドワクチン等多種多様な方策が世界各国で試みられてきたが、それぞれの試作ワクチン単独では十分な免疫が誘導されていない。そこで、これらの長所を組合せたコンビネーションワクチンの実現が 1 つの課題となっている。

我々は、HIV Gag 蛋白が HIV の排除に有効な免疫抗原の 1 つであることから、種々の Gag 抗原発現システムを開発し、一次免疫に DNA ワクチンを二次免疫に組換えワクシニアウイルスワクチンを接種するコンビネーションが、最も高い Gag 抗体免疫応答を誘導することを示してきた。そこで本年度は、安全性・有効性に最も大きな影響を与えるワクシニアウイルスベクターの性状について検討した。

B. 研究方法

過去に WHO/日本/英国で採用され痘瘡根絶に高い実績を持つ Lister 原株(LO 株)、我国で LO 株から温度感受性弱毒株として開発された LC16mO 変異原株(mO 株)は橋爪博士より分与を受けたウイルスを用いた。mO 株からさらに弱毒選別され、現在各国開発のワクチンを含めても最高の安全性評価を得ている第 2 世代痘瘡ワクチン LC16m8 株(m8 株)は厚生科学研究費により試験製造されたワクチンロットを、RK13 細胞で増殖させて用いた。強毒 WR 株も同様に RK13 細胞で増殖させた。マウスは 6 週齢・雌 BALB/c、C57BL/6、C3H/He を用いた。皮膚反応は種々の感染価の LO、mO、m8 各ウイルス株をマウス背部皮下 2 箇所に分けて接種し、発赤・丘疹を観察した。一部のマウスは皮膚を切除し、ホルマリン固定後、間接蛍光抗体法でウイルス抗原を検索した。また、尾静脈から接種し臨床症状を観察した。

(倫理面への配慮)

動物実験ガイドラインに従って、保定器

の使用、麻酔下での手術処置等、実験動物の苦痛を軽減できる方法で実施し、実験終了後は安楽死の処置を行なった。

### C. 研究結果及び考察

WHO 痘瘡根絶計画の成功で生ワクチンの役割を終えたワクシニアウイルスは、DNA 組換え生ワクチン実験のベクターとして汎用されてきた。しかし、その多くは強毒・向神経性のWR株をベクターにして、接種動物にマウスを用いて実験室的に検討された結果である。WR株はマウス脳で100代以上継代されたことから、マウスに極めて高い親和性を示し、且つ、神経親和性・神経病原性も高い株である。それ故、アンカラ株、コペンハーゲン株、NYBH株等各国で使用された痘瘡ワクチン株を基に構築された組換えワクシニアウイルスが、より安全性の高い組換えワクチンとして各国で研究が進められている。しかし、組換え生ワクチンとして単独での有効性には疑問を投げかけるヒトでの第I相、第II相試験の成績が相次いでいる。特に、過去に種痘歴のある成人での免疫効果が低いか、検出限界以下のレベルである。

本実験で用いたLO、mO、m8ワクチン株はBALB/cマウスでの皮膚反応は極めて弱く、 $10^7 \sim 10^5$  pfuの接種では発痘はおろか丘疹や発赤さえも観察されなかった。しかし、接種部位皮膚の抗-ワクシニアウイルス抗体を用いた間接蛍光抗体法では、ウイルス抗原が検出された。また、組換えウイルス接種部位では発現抗原とワクシニア抗原が一致して観察された。このことから、ウイルスは低レベルながら感染・増殖しているものと考えられる。これに対して、C57BL/6、C3H/Heマウスでは弱い小丘疹の形成が認められた。発赤については、皮膚の色素に阻害されて明瞭な判定は困難であった。

従って、ワクシニアウイルスは広い宿主域を持つウイルスであるものの、マウスにアダプトされた特殊な実験室株以外はマウ

ス親和性が低いものと考えられる。また、マウス系統差も存在する事が示された。事実、LO関連株ではなく、マウス親和性の強毒WR株 $10^7$  pfuを尾静脈から接種した場合でも、C57BL/6、C3H/Heマウスの臨床症状はBALB/cより体重減少・削瘦とも著しく、接種部位より先の尾部先端は発痘による壊死で脱落した。以上の結果は、組換えワクシニアウイルス生ワクチンのマウス免疫原性試験を実施する場合、ワクシニアウイルスに感受性の高いヒトにおける免疫効果を必ずしも反映しない事、又、その場合の留意点を示唆していよう。

本実験で用いた、LO株、及びこれに由来するmO、m8ワクチン株遺伝子の全容については現在解析中であるが、最も大きな相違点として、m8株はB5Rエンベロップ遺伝子に欠失を生じていることが挙げられる。このB5R欠失はm8ウイルス弱毒性の要因の1つである事も報告されている。しかし、B5Rは中和抗体誘導抗原の1つでもあり、組換えB5R蛋白単独免疫でも強毒ワクシニアウイルスの感染攻撃を防御できることが示されている。ポックスウイルスに対する感染防御は非特異免疫、細胞性免疫、液性抗体免疫等種々の生体防御機構が関与し、中和抗原もB5Rのみでなく複数存在する。しかし、B5RのインタクトなLO株の種痘を受けた世代においては、残存する抗-B5R免疫の影響を受けずに、組換えm8ワクチンが有効性を発揮できる可能性も考えられる。検討に値しよう。

### D. 健康危険情報

特になし。

### E. 研究発表

特になし。

### F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

## リコンビナント BCG ワクチンの大量生産法

分担研究者 戸井田一郎 BCG 研究所 特別顧問

研究要旨：これまで蓄積された膨大な BCG を用いた結核菌に対するワクチン開発研究のデータと経験をもとにしてリコンビナントワクチンとしての新しいタイプの HIV ワクチンの大量生産法を検討した。

協力研究者

橋本朗（BCG 研究所）

### A. 研究目的

rBCG-HIV ワクチン開発において全 Gag 遺伝子を標的遺伝子に用いて rBCG ワクチンを作製すると、ブースター抗原としてワクシニア Dis 抗原を用いて免疫を行うと防御免疫誘導能につながる事があきらかにされた。さらにコドンの至適化により外来抗原の発現が増強することで rBCG を用いた rBCG ワクチンの有用性が明らかになった。

これらの成果を踏まえて rBCG-HIV ワクチンの効果的なパイロットプロダクションさらには安全性等に関する実用化研究、大量製造に関する研究を行う。

### B. 研究方法

これまで日本 BCG 研究所において製造された BCG Tokyo 株の製造法を参考にして rBCG ワクチンの製造法を作成する。さらに、

その評価方法と、挿入された外来抗原の発現評価法を開発する。BCG を製造する際の「BCG 製造・製剤基準」に従い、GMP のラボで作製し、GLP の基準で製造する。製造されたものは生物学的製剤基準に従って GMP のラボで 1) ~ 8)) の検査項目を検査する。1) 含湿度試験、2) PH 試験、3) 染色試験、4) 無菌試験、5) 菌量測定試験、6) コッホ現象試験、7) 力価試験、8) 表示確認試験

その中で 1 番時間がかかり大変なのが 7 の力価試験である。その時に時間をセーブするためにファイナルバルクを使って 37℃・1 ヶ月、10℃・1 ヶ月でスタートする。有毒結核菌否定試験もできるようにしておく。

（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

結核症に対するワクチン株である BCG Tokyo 172 株をベクターに用いた rBCG-HIV

ワクチンを作製し、その実用化のための大量生産法を検討した。今年度の研究では前臨床研究を完成させる目的でパイロットプロダクション法の確立を検討し、以下の方法で生産方法を完成させた。

1. rBCG ワクチンのワクチン抗原としてこれまでの HIV-1 env V3 ペプチドを組込んだ rBCG からワクチンのデータをもとにして実用化のためのプロトタイプワクチンとして開発された HIV-1 clade E のフルレングスの gag 遺伝子を BCG Tokyo 172 株に組込んだ rBCG gag E を作製した。この候補差が十分な免疫誘導能を有することを明らかにした後、そのシード株を用いて大量生産法を検討した。

①カナマイシンの非存在下ではベクター欠損 BCG 株が増殖混在する。

②最終工程のソートン液体培地に 100  $\mu$  MKM のカナマイシンを添加して製造しても最終産物として生物製剤基準を満たすことはできない。

③ソートンポテト培地の段階からカナマイシンを添加した培地で製造すると生物製剤基準を満たすレベルの rBCG 株を生産することができた (図 1)。

2. これらの成果にもとづいてタイ国におけるパイロットプロダクションの計画を検討した。タイ国では BCG Tokyo 株をシードとして Vial 法によるタイ国赤十字のワクチン製造部門で BCG ワクチンが製造されている。その経験をもとにしてタイ国赤十字に技術移転を行い、BCG

Tokyo 172 gag E ワクチンをパイロットプロダクションする方向性でまずラボの設定を行った。新しいパイロットプロダクションのための製造設備は図 2 のように計画され、既にその再検討のもとに製造部門の構築が行われている。この設備はタイ国 FDA の監督、承認のもとに運営されることになっている。

#### D. 考察

結核ワクチンとしての BCG は世界で最も使用されているワクチンといえる。そのワクチン効果の実用化研究、具体的には、免疫誘導能の研究、安全性に関する研究、さらには安定性、毒性等に関する小動物からヒトにいたる膨大なデータを参考にしてあるいは応用して新しいタイプのワクチンを作ることができる利点がある。これらの利点を異なった病原体に対するワクチンとして応用することが可能となれば BCG ワクチンの新しい科学的発展につながる。例えば現在の最も大きな課題の一つといえる結核及び HIV をコントロールする可能性を秘めていることから社会的にも重要な取り組むべき課題といえる。今年度の研究ではこれまでの rBCG のテスト段階の成果を踏まえてヒトへの投与を目的とした実用化研究を試みた。その中でも基本的なファクターである候補ワクチンの大量生産法の開発は重要な課題として位置づけられる。今回これまでの BCG 製造法をもとにしてカナマイシンの存在下で生物製剤基準を満たすリコンビナントワクチンの製造の目処をつけることが

できた。生物製剤基準を満たすことが可能な図 1 の製造法で各段階におけるカナマイシンの存在下で BCG の製造を生物製剤基準にてらして検討するとソートン液体培地のみでなくソートンポテト培地にもカナマイシンを 100  $\mu$ M 添加した状態で rBCG 株を産生させると良好な最終産物を得ることができた。この最終産物は生菌数や生存率等の最終段階のチェックでも従来の BCG Tokyo 株と相違ないことを明らかにした。

これらの成果にもとづいてパイロットプロダクションの可能性について検討した。なおこの研究の一部はエイズ予防財団のサポートと一部重なっている。タイ国赤十字におけるこれまでの BCG Tokyo 株ワクチンの製造経験をもとにした新しいタイプの rBCG-HIV ワクチンのパイロット製造プラントの検討を行った。そのレイアウトの概要を紹介する。大前提として今回のパイロットプロダクションはタイにおけるタイ国主導の Phase I, II トライアルを行う前の安全性のチェックを目的としている。Phase I, II に関してはタイで行うことになっており、したがってタイ国の基準をまず満たすことが前提になる。その意味から考えて限られた時間と資金を有効に使う Phase I, II を行わなければならない。その点を考慮に入れ、タイ国赤十字の製造設備がパイロットプラントで、後に大規模生産を見込んだ規模のものと仮定してレイアウトの評価を行った。

#### E. 結論

BCG をベースに用いた HIV ワクチンの実用化研究を行いタイ国で伝搬している HIV-1 clade E 野生株のコンセンサスに最も近いと同定されたウイルス株より得られたフルレングスの gag 遺伝子を外来性抗原遺伝子として用い rBCG ワクチンを作製した。そのシードを用いて前臨床レベルでのワクチンの実用化研究を完成させるためにパイロットプロダクションの方法を確立した。この方法を用いると BCG を始めとした種々の BCG リコンビナントワクチンを実用化させることが可能となる。従って rBCG ワクチンの実用化の目処がついたと判断できる。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kawahara M., Hashimoto A., Toida I. and Honda M. **Oral recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) expressing HIV-1 antigen as a freeze-dried vaccine induces a long-term HIV-specific mucosal and systemic immunity.** (Clinical Immunology 2002 105(3):326-331.)

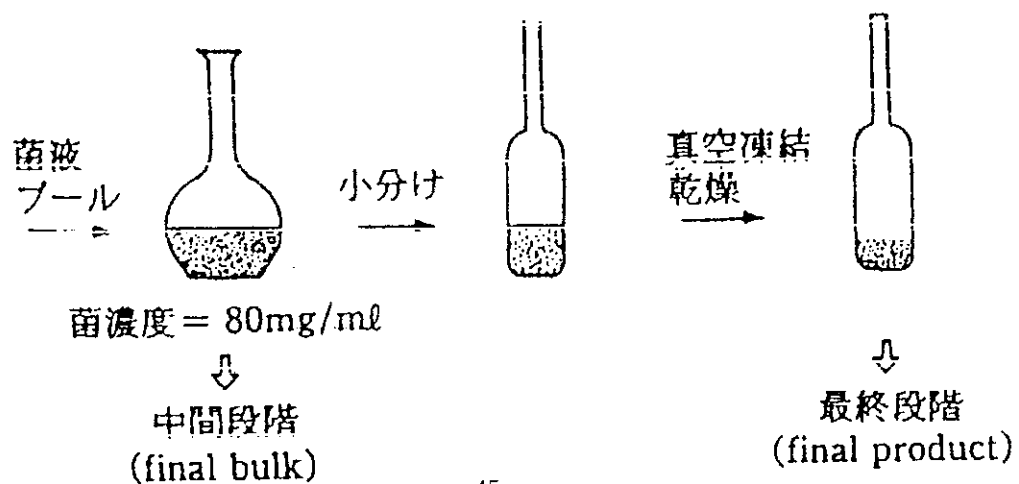
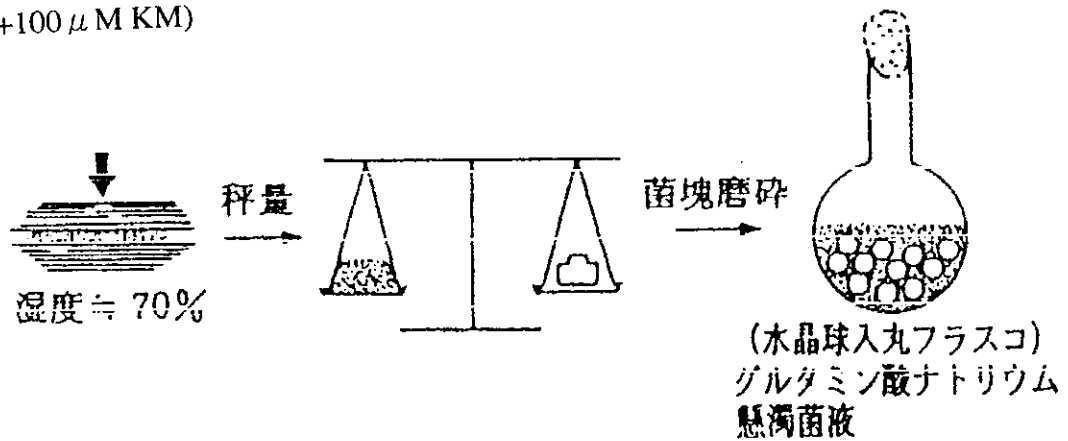
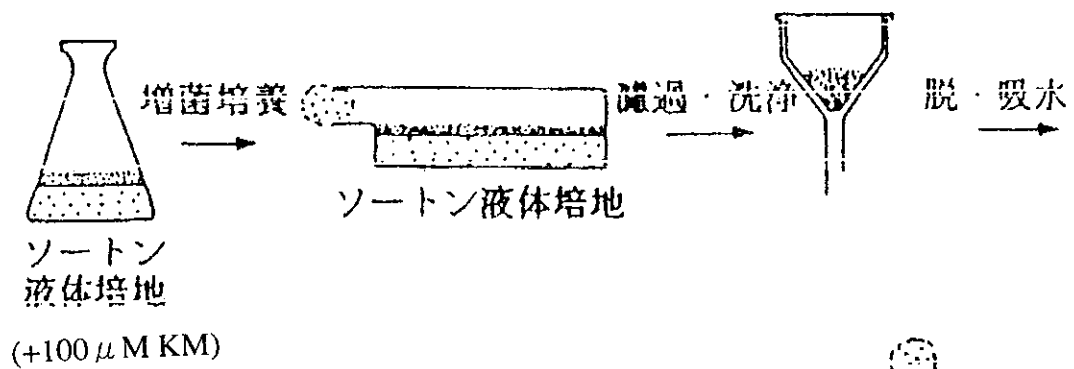
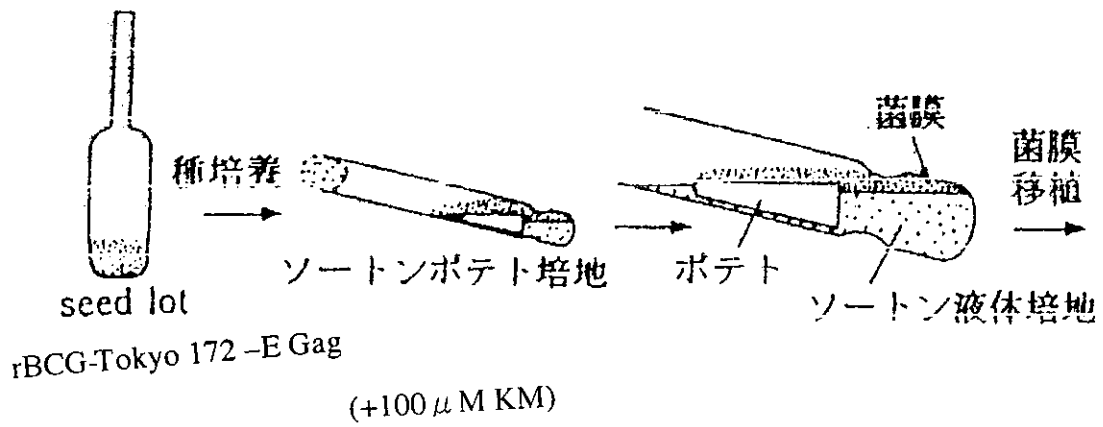
##### 2. 口頭発表

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

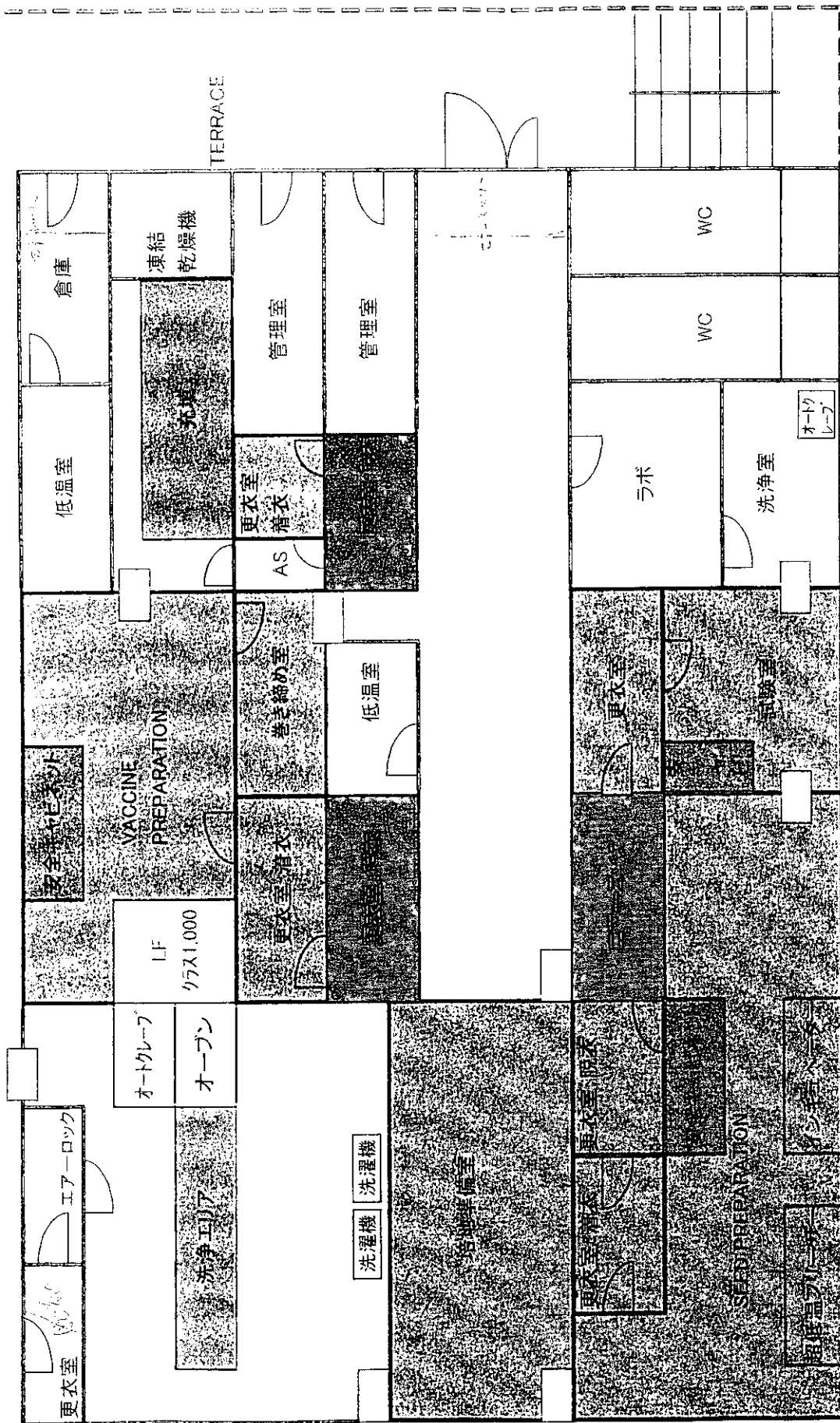
リコンビナント BCG-Tokyo 株-HIV ワクチン (HIV-1 Clade E Gag)





清浄度 クラス分け

クラス	
100	
1,000	
10,000	
50,000	



TERRACE

バスボックス

分担研究報告書

ワクチンの粘膜免疫能の解析

分担研究者 清野 宏 東京大学医科学研究所

協力研究者 廣井隆親 東京大学医科学研究所

研究要旨

本研究プロジェクトで実用化をめざしているワクチンレジメン(例えば BCG 及びワクシニア DIs 株)をベクターに用いたプライムブーストにおける、粘膜投与後のモデル動物に誘導されるウイルス特異的な粘膜免疫能を解析する。これまでエンベロープ蛋白、V3 領域遺伝子を組み込んだ rBCG ワクチンは、マウスの経鼻投与より長期に渡って粘膜及び全身免疫が誘導されることが明らかにされている。さらに実用化をめざすフルレングスの Gag 遺伝子を発現したワクチン抗原について、IgA 産生能を誘導できるかどうか検討する。特にベクターの面からも分泌型あるいは非分泌型ベクターを使用して検討する。さらに粘膜面における IEL(粘膜細胞管リンパ球)の抗原特異的機能においても検討する。

A. 研究目的

粘膜免疫システムの特徴として特定の IgA 誘導組織を感作するだけで生殖器を始めとする遠隔の粘膜面と全身系の血清中に抗原特異的免疫応答を誘導できることが挙げられる。本研究計画では、粘膜免疫のコンセプトを基本とした経粘膜 HIV ワクチンの可能性について検討する。例えば、これまで日本で結核菌のワクチンとして広く使用されてきた BCG を用いて抗原デリバリー法の開発に向けての基礎的研究を行う。

B. 研究方法

HIV の中和活性部位である V3 ループを BCG の $\alpha$ 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、膈、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。

C. 研究成果

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、経鼻投与方法は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(Fig1)。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、膈洗浄液、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<sup>+</sup> 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

(Figure 2)。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- $\gamma$  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。

#### D. 考察

本実験で 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なことが確認された。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- $\gamma$  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。

#### E. 結論

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。今回は、rBCG-V3J1 経鼻ワクチンは HIV に対して中和能を有する血清 IgG を長期間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。今後は HIV 抗原封入 rBCG 経鼻ワクチンによる粘膜免

疫応答誘導系の確立を目指していく方針である。例えば我々が開発してきた Th2 型誘導粘膜アジュバントである mCT やキメラ型 (mCT-A/LT-B) 遺伝子などを HIV ワクチン抗原遺伝子と一緒に rBCG に導入したものを本多班の協力を得て考えていく。また、本多班により開発された rBCG/pSO-gagE についても粘膜ワクチンへの応用性をマウスやサルの系を使って検討していく。特に粘膜系と全身系免疫における HIV 特異的細胞性免疫の誘導について解析を進める。

rBCG/pSO-gagE のマウス・サルでの経鼻免疫における検討を下記の検討法を併用して進めていく。

1. Conventional CTL assay
  2. ELISPOT による IFN-g 産生細胞の検出定量
  3. Intracellular Cytokine Staining による IFN- $\gamma$  産生細胞などの検出定量
  4. Proliferation
  5. Real-time RT-PCR による mRNA (IFN-g, etc) の検出定量
- などを検討する予定である。またサルで効果的なワクチニアベクターに於ける rBCG/pSO-gagE との併用法に於ける上記の検討も行う。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

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, 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.

3: Enose Y, Ui M, Miyake A, Suzuki H, Uesaka H, Kuwata T, Kunisawa J, Kiyono H, Takahashi H, Miura T, Hayami M.

Protection by intranasal immunization of a nef-deleted, nonpathogenic SHIV against intravaginal challenge with a heterologous pathogenic SHIV.

Virology. 2002 Jul 5;298(2):306-16.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし。

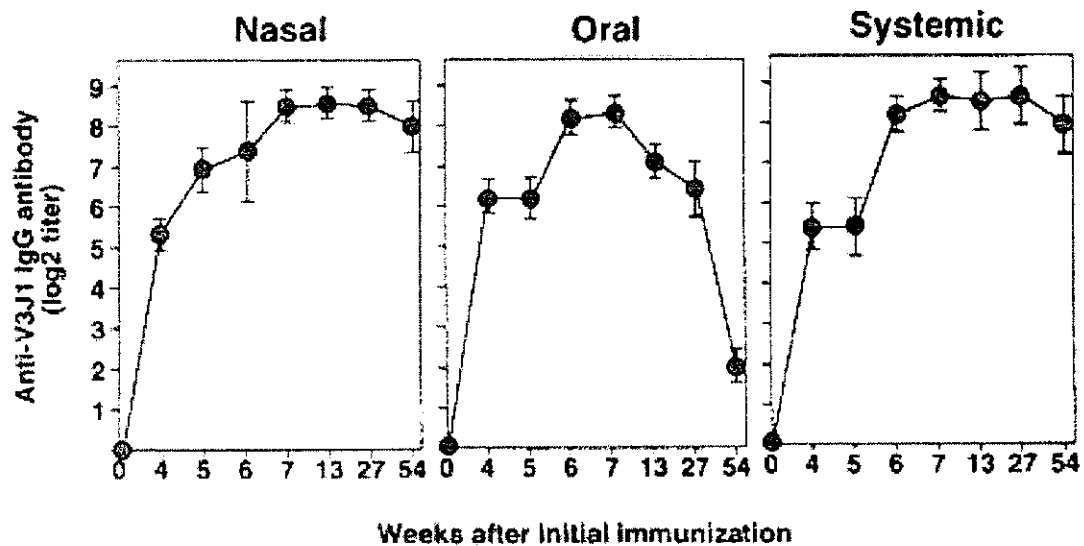


Figure 1.

HIV、エンベロープ蛋白 V3 領域を発現した BCG ワクチンの投与による抗体産生の検出: C57BL/6L マウスに経皮(10 $\mu$ g)、経口(100 $\mu$ g)、経鼻(100 $\mu$ g)の週 1 回で 3 回免疫し、血中の特異抗体化をモニターした。

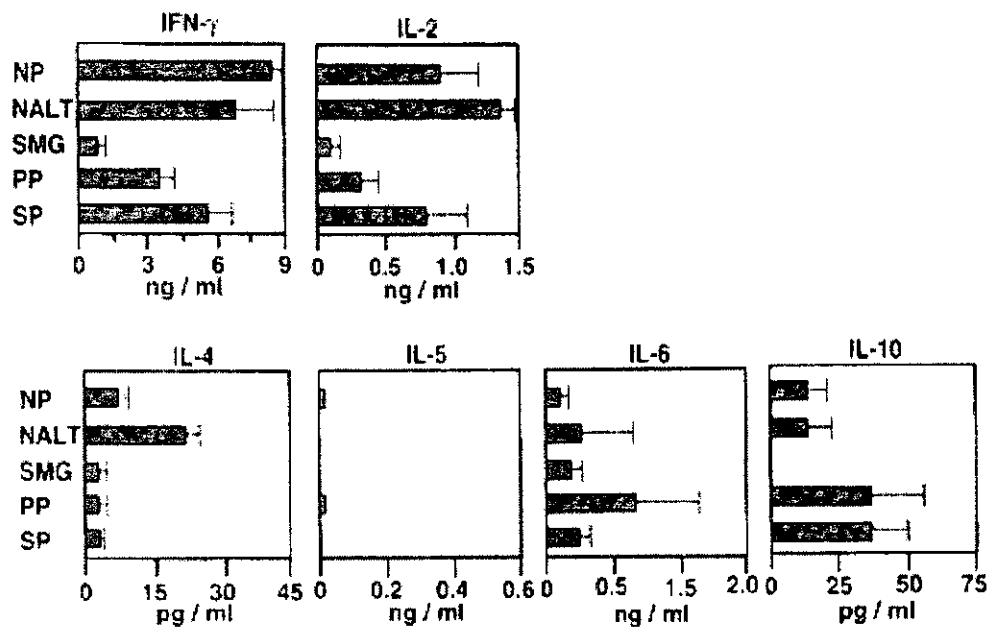


Figure.2.

RBCG V3 ワクチンの経鼻投与による Th1 タイプ特異的ヘルパー細胞活性の誘導: SP(脾臓)、NP(鼻洗浄液)、NALT(経鼻リンパ球)、SMG(顎下腺)、PP(パイエルパッチ)から分離して免疫後 27 週で測定した。それぞれの組織から分離したリンパ球を KLH に結合させた V3 抗原(10 $\mu$ g/cc)で 3 日間培養し、培養浄清中のサイトカインの濃度を ELISA 法で測定。

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

ワクチンの CTL 誘導能及び免疫学的交差性

-*nef* 欠損型 EGFP 標識 HIV 組み換えウイルスとヘルペスウイルスサイミリでトランスフォームした  
CD4 陽性 T 細胞を用いた新しい HIV-1 特異的 CTL 解析システムの作製-

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

(研究要旨)

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の感染長期未発症者の解析結果から、HIV 感染制御では細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を中心とした細胞性免疫応答の誘導、維持が重要であるといわれている。一方、我々は *Nef* 欠損型 simian human immunodeficiency virus (SHIV) で予め免役しておいたマカクサルにおける病原性 NM-3rN 株 simian human immunodeficiency virus (SHIV) に対する免疫応答の主体が CTL であることを、さらにこの場合 CTL の標的となる分子は *env* 領域ではなく *gag/pol* 遺伝子領域産物であることを見いだしている。また、長期未発症者 (long-term non-progressor) など HIV-1 抵抗性を有する患者において *Nef* 欠損型 HIV-1 株感染によって抵抗性を獲得した可能性が推測されている。以上に基つき、CTL が認識する *gag/pol* 領域由来分子を同定する目的で、*Nef* 欠損型組み換え HIV-1 を作製した。この際、*Nef* 欠損による感染性の低下を解決するため vesicular stomatitis virus glycoprotein (VSV-G) を envelope とし、同時に感染細胞を同定するためマーカー遺伝子として enhanced green fluorescent protein (EGFP) 遺伝子を *env* 遺伝子内に導入した。さらに、この組み換えウイルス感受性のある CTL アッセイの標的細胞として、ヒト末梢血より得た T 細胞を Herpesvirus saimiri virus (HSV) でトランスフォームした CD4 陽性細胞株 (HSV-TCD4<sup>+</sup>) を樹立した。その結果、作製した組み換えウイルスは *Nef* 欠損の有無に関わらず HSV-TCD4<sup>+</sup> に効率よく感染し、正常 *Nef* を持つ組み換えウイルスに感染した HSV-TCD4<sup>+</sup> では CD4 および class I MHC 分子の表面発現は抑制されていたものの、*Nef* 欠損型ウイルスが感染した HSV-TCD4<sup>+</sup> ではそれらの表面発現の抑制は認められず、CTL の認識抗原を Class I MHC 分子より提示しうることを示された。以上より、本研究で作成した *Nef* 欠損型組み換えウイルスと HSV-TCD4<sup>+</sup> を用いることによって新たなワクチン標的としての CTL 認識抗原が同定される可能性が示唆された。

A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の感染において、感染後 10 年以上経た後も無症状であるような長期未発症者 (long-term non-progressor) の存在が知られ注目をあつめている。こうした長期未発症者においては細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 応答が強いこと、又アフリカ、ガンビアの売春婦群では、抗体を持たないにもかかわらず、CTL 活性が検出されるという報告もあり、HIV 感染の制御において CTL を中心とした細胞性免疫応答の誘導、維持が重要であることを示している。特に CD8

分子陽性の CTL はウイルス感染細胞そのものを傷害、排除するのみならず、ウイルス粒子の増殖抑制因子 CAF (cell antiviral factor) やウイルスの CD4 分子陽性 T 細胞への感染を阻止する因子である MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTES など種々のケモカインを産生することにより HIV ウイルス排除の主体を担っていると考えられる。

一方、我々は、*Nef* 欠損型 simian human immunodeficiency virus (SHIV) で予め免役しておいたマカクサルにおける病原性 NM-3rN 株 simian human immunodeficiency

virus (SHIV)に対する免疫反応の主体は CTL であることを観察している。この場合 Nef 欠損型 simian human immunodeficiency virus (SHIV)で予め免役しておいたマカクサルは SIVmac239 および SHIV-89.6P という全く異なる envelope タンパクを持つウイルスに抵抗性であった。すなわち、CTL の標的となる分子は *env* 領域ではなく *gag/pol* 遺伝子領域由来と考えられた。

今回、我々はマカクサルにおける上記の実験結果を踏まえ、感染後 10 年以上経た後も無症状であるような長期未発症者 (long-term non-progressor) などは Nef 欠損型 HIV-1 株感染によって HIV 抵抗性を獲得した可能性もあると考え、ヒト長期未発症者など HIV-1 抵抗性を有する患者の CTL が認識する HIV-1 由来分子を同定する目的で、HIV-1 を基にした組み換えウイルスを作製した。作製に当たり、以下のような問題点が考えられた。1) HIV-1 Nefにより class I MHC 表面発現が抑制されることにより、特異的 CTL による抗原認識が抑制される。2) *nef* 遺伝子欠損ウイルスは感染性が低下する。3) CTL の標的細胞を作製する場合、感染した細胞と非感染細胞を区別することで、アッセイの精度をあげる必要がある。

今回の研究では、これらの問題点を解決しつつ、*gag/pol* 領域由来分子特異的な CTL を HIV-1 抵抗性患者から検出し、認識している分子を同定し、エイズの治療に役立てる目的で HIV-1 を基にした組み換えウイルスを作製した。さらに、それを感染させ CTL アッセイの標的細胞とする細胞として、ヒト末梢血より得た T 細胞を Herpesvirus saimiri virus (HSV)でトランスフォームした CD4 陽性細胞株を用いる方法を検討した。

## B. 研究方法

(ア) HIV-1 pNL4-3 株を基に、*env* 遺伝子を EGFP 遺伝子と置換したプラスミドを作製した。

(イ) 上記のプラスミドから、*nef* 遺伝子にフレームシフト変異を導入したプラスミドを作製した。

(ウ) (ア) (イ) のいずれかのプラスミドと、envelope として vesicular stomatitis glycoprotein(VSV-G)発現プラスミドと一緒にヒト細胞株に遺伝子導入し、組み換えウイルスを得た。

(エ) 組み換えウイルスヒト大腸ガン由来細胞株である HCT-116、さらにヒト末梢血より得た T 細胞を Herpesvirus saimiri virus (HSV)でトランスフォームした CD4 陽性細胞株に感染させ、感染効率、さらに各種の表面抗原の発現について解析した。

## C. 研究成果

(ア) amphotropic Moloney murine leukemia virus の envelope (Amph-ENV)あるいは VSV-G をエンベロープとし EGFP 標識遺伝子を持つ、非増殖性ウイルス。

① pNL4-3/EGFPenv と VSV-G あるいは Amph-ENV 発現プラスミドを同時にヒト HCT116 細胞にトランスフェクションし、得られたウイルスを 1,000,000 個/2 ng of HIV-1 p24 の割合で HCT116 細胞に感染させたところ、VSV-G を用いた方が感染効率は Amph-ENV の約 50 倍と、高い効率を示した (図 2A)。

② 100,000 個の HCT116 細胞に VSV-G を用いた組み換えウイルスをグラフで示された量を用いて感染させ、3 日後に解析したところ用量依存性を示した (図 2B)。

③ 非増殖細胞への感染を確認するため、5000 rad 照射して細胞周期が 70%以上の細胞

で G2/M 期にあることを確認した。

④ HCT116 細胞に VSV-G を用いた組み換えウイルス(p24 2 ng)を感染させ、2 日後に観察した (図 2C)。5000rad 照射細胞では非照射細胞とくらべ、感染効率は下がること

はなかった。

(イ) Nef 遺伝子の感染への影響

- ① 100000 個の HCT116 細胞に p24 で 2ng の正常 Nef 遺伝子をもつ組み換えウイルスあるいは Nef 遺伝子欠損組み換えウイルスを感染させ、3 日後に蛍光顕微鏡で観察した。感染細胞は緑色の蛍光を発するので、容易に同定可能である。VSV-G をエンベロープとした組み換えウイルスでは Nef 遺伝子の有無は感染効率には影響しなかった(図 3A)。
- ② 感染後の GFP 陽性細胞の比率を経時的に観察した。100000 個の HCT116 細胞に組み換えウイルス(p24 2 ng)を感染させ、fluorescein activated cell sorter (FACS)で解析した。Nef 遺伝子の有無は GFP 陽性細胞の比率の経時的变化に優位な影響は与えなかった(図 3B)。
- ③ 100000 個の HCT116 細胞に組み換えウイルス(p24 で 2 ng)を感染させ、感染三日後に細胞を PBS で 3 回洗浄し、新しい培養液とし、その 3 日後に培養上清中の p24 濃度を解析した。Nef 遺伝子の有無により感染細胞の p24 産生量に有意差はなかった(図 3C)。

(ウ) 感染した Herpesvirus transformed T cells (HVS-T)の p24 抗原産生に対する Nef の影響

- ① 100000 個の CD4 陽性 HVS-T 細胞に p24 で 2ng の正常 Nef 遺伝子(+Nef)あるいは Nef 遺伝子欠損(-Nef)組み換えウイルスを感染させ、感染 3 日後に細胞を PBS で 3 回洗浄し、新しい培養液とし、その 3 日後に培養上清中の p24 濃度を解析した。Nef 遺伝子の有無により感染細胞の p24 産生量に有意差はなかった(図 4)。

(エ) Nef の HVS-T 細胞表面抗原発現に対す

る影響

- ① CD4 陽性 HVS-T 細胞に正常 Nef 遺伝子組み換えウイルス(+Nef, filled histograms)あるいは Nef 遺伝子欠損(-Nef, broken lines)組み換えウイルスを感染させ、感染 4 日後に FACS で、CD4, HLA-abc, HLA-DR, B7-2, Fas の表面発現と EGFP を解析した。EGFP 陽性の感染細胞についてヒストグラムを示した。感染細胞では Nef による CD4 および class I MHC 表面発現の抑制が明らかである。

D. 考 察

(ア) 今回の研究で、HIV-1 を基にした、エンベロープとして VSV-G を用い、EGFP 蛍光タンパク遺伝子を env 領域にもつ組み換えウイルスが分裂増殖している細胞のみならず、非分裂細胞にも高い効率で感染することが示された。また、この組み換えウイルスは一度感染した後は、感染性ウイルス粒子を作ることではなく、従って比較的安全で、感染効率の比較が容易であった。さらに、感染細胞における EGFP 遺伝子のみならず HIV-1 p24 抗原の産生も確認され、感染細胞における env 以外のウイルス遺伝子の発現が EGFP 遺伝子発現と同様に起こっていることが示された。

(イ) Nef 遺伝子が野生型 HIV-1 の感染性に大きく影響することが知られているが、envelope を VSV-G とすることで、HIV-1 ウイルスの感染性は Nef 欠損型ウイルスでも保たれた。

(ウ) Class I MHC 拘束性 CD8 陽性 T 細胞が抗 HIV-1 免疫に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。HIV-1 特異的 CTL を検出するためには、各種の HIV 抗原遺伝子をワクシニアウイルスベクターで EB virus transformed B 細胞に導入して標的細胞とする方法が用いられている。しかし、HIV-1 の本来



の標的細胞は CD4 陽性 T 細胞である。さらに、粋シニアウイルスベクター感染標的細胞は HIV-1 抗原と共にワクシニアウイルス抗原も発現しているはずであり、このような方法で検出された CTL はほんの一部の HIV-1 抗原に対するものである可能性がある。このような問題点が、HIV-1 感受性 CD4 陽性 HSV-T 細胞を、HIV-1 を基にしたウイルスで HIV-1 抗原を発現させるシステムにはなく、あらたな HIV-1 特異的 CTL 検出法として有用であると考えられる。

#### E. まとめ

HIV-1 Nef は T 細胞において CTL の抗原認識に重要な役割を果たす class I MHC 表面発現を抑制することが知られている。同時に Nef は HIV-1 ウイルス粒子の感染性にも重要な役割を果たしており、Nef 欠損型ウイルスは感染効率が低下することも報告されている。今回エンベロープを VSV-G としたことで、Nef 欠損型ウイルスの感染効率は保たれ、しかも Nef 欠損型ウイルス感染で HSV-T 細胞の class I MHC, CD4 の発現が抑制されなかった。このことは、HIV-1 を基にした Nef 欠損型 EGFP 標識ウイルスで CD4 陽性 HSV-T 細胞を感染して HIV-1 抗原を提示する標的細胞を作製し、CTL を同定する方法が、実際に HIV-1 抵抗性を示す CTL が認識する HIV-1 抗原を同定することを可能にし、さらには抗 HIV-1 ワクチン開発につながるものと考えられる。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

① Takahashi M, Osono E, Nakagawa Y, Wang J, Berzofsky JA, Margulies DH, Takahashi H : Rapid induction of apoptosis in CD8+ HIV-1 envelope-specific murine CTLs by short exposure to antigenic peptide. *J Immunol.* 169(11) 6588-93, 2002

② Takahashi H : Protective immunity against HIV infection. *Nippon Rinsho.*60(4) 717-23, 2002

③ Yokosuka T, Takase K, Suzuki M, Nakagawa Y, Taki S, Takahashi H, Fujisawa T, Arase H, Saito T : Predominant role of T cell receptor (TCR)-alpha chain in forming preimmune TCR repertoire revealed by clonal TCR reconstitution system. *J Exp. Med.* 195(8) 991-1001, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし。

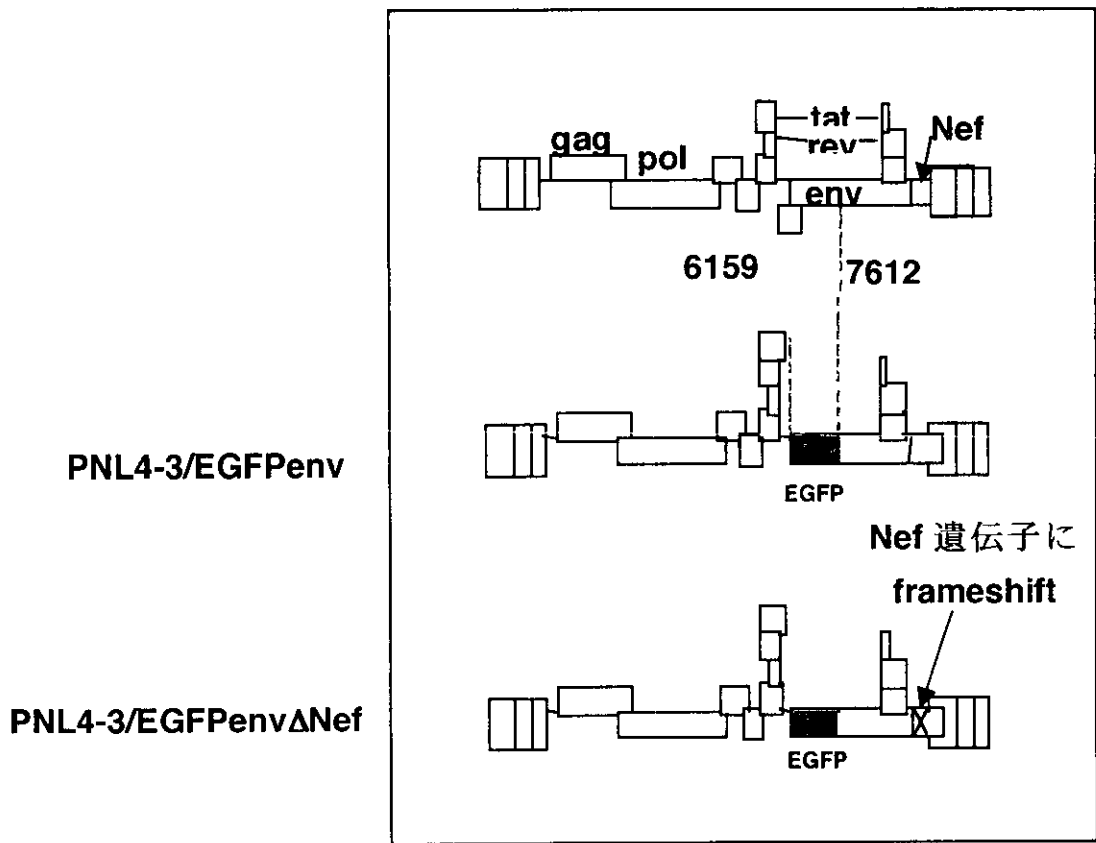


図1 組み換え HIV-1 ウイルス DNA コンストラクション

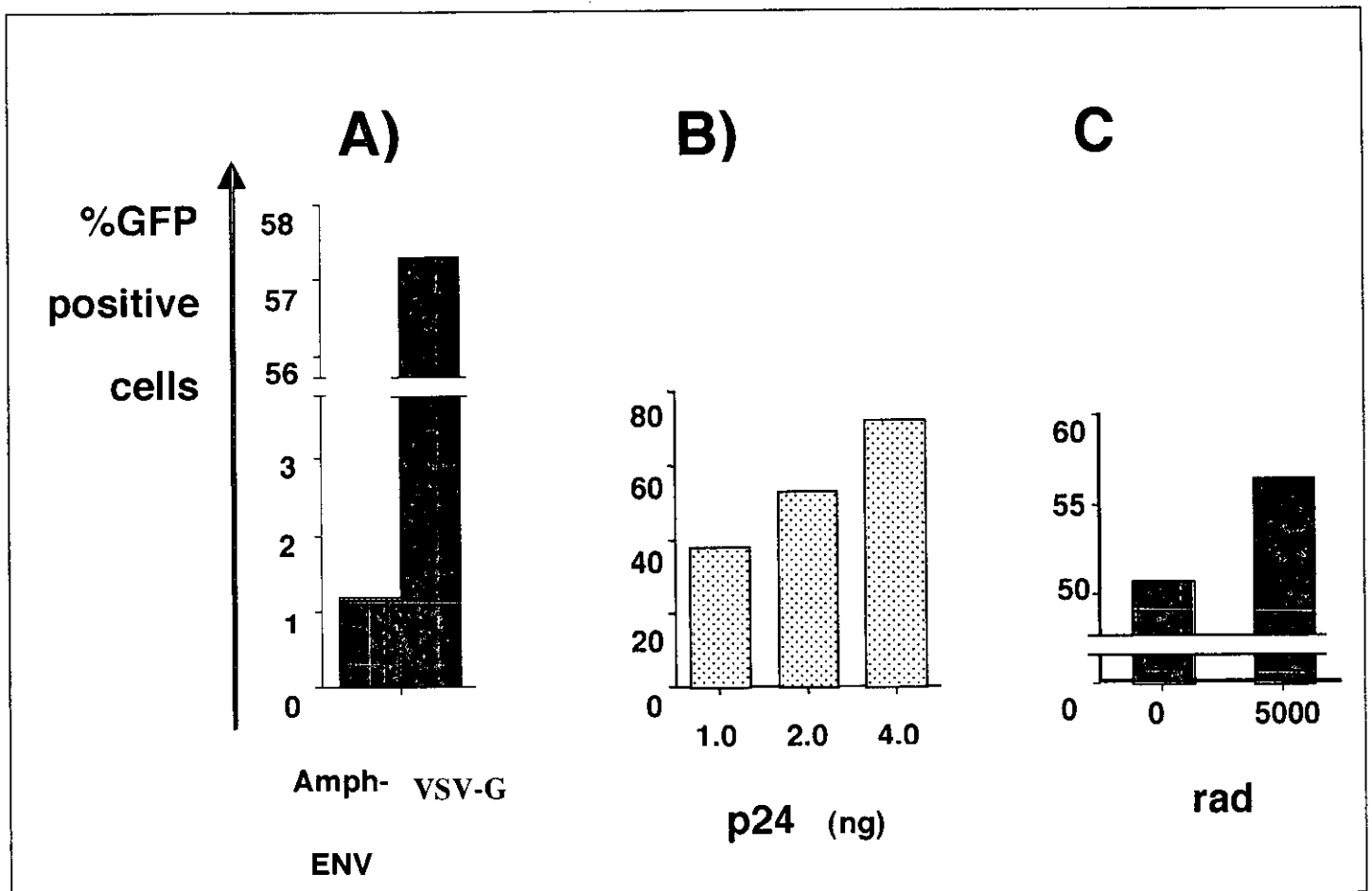


図2 組み換え HIV-1 ウイルスの感染性

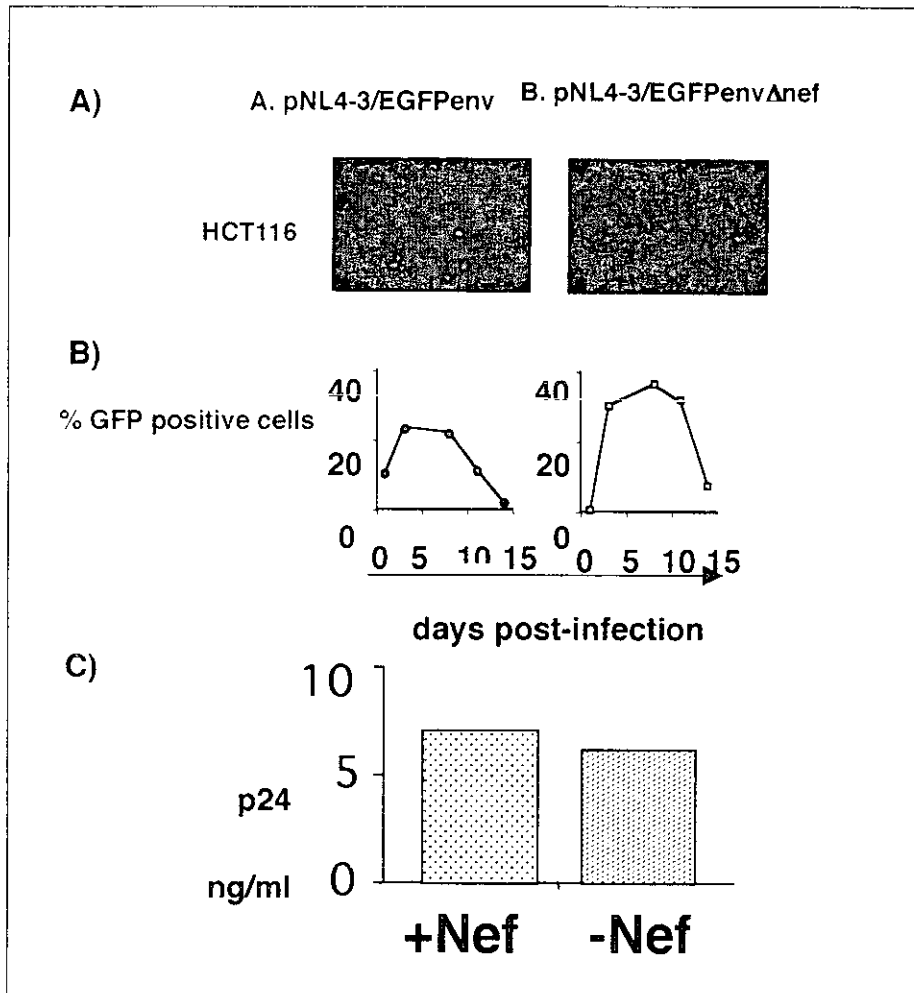


図3 Nef 遺伝子の HCT116 細胞感染に対する影響

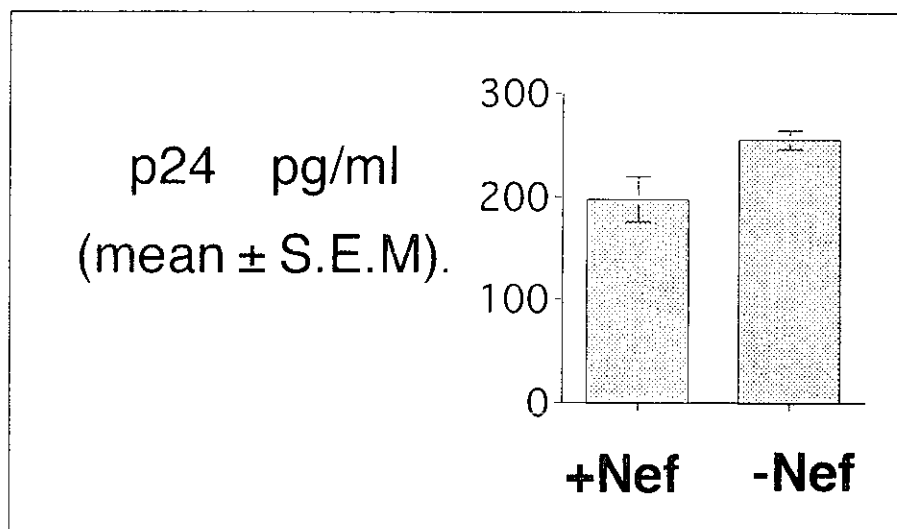


図4 感染 HVS-T 細胞の p24 抗原産生量への Nef の影響

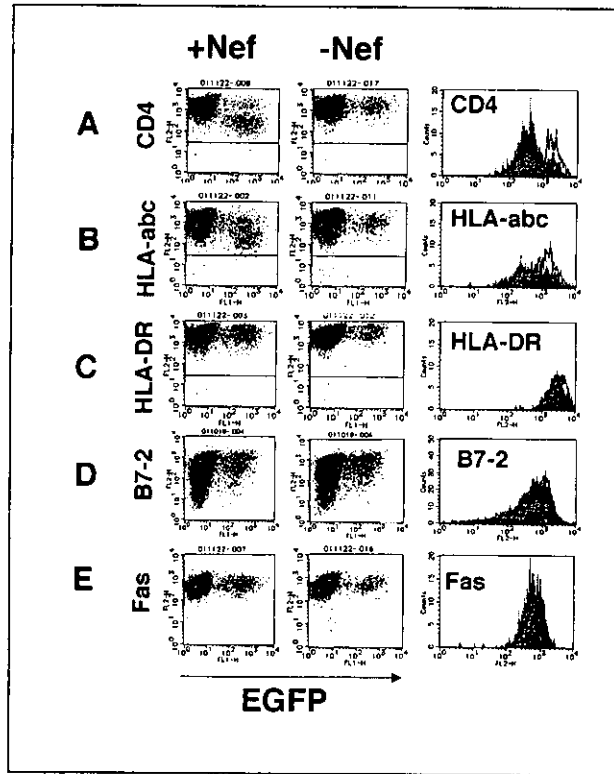


図5 Nef の HVS-T 細胞表面抗原発現への影響