

CTL 判定法の改良及びヒト CTL 交差性に関する研究

分担研究者 滝口 雅文 熊本大学エイズ学研究センター

研究要旨

リバーシ・イムノジェネテックス法を用いて、HLA-A*3303 拘束性 HIV-1CTL エピトープ同定をおこなった。99 個のペプチドから、3つの Pol 蛋白由来、1つの Gag 蛋白由来のエピトープペプチドを新たに同定した。以前に明らかにした HLA-A*3303 拘束性 Env エピトープ 1種類と、今回明らかにした Pol 及び Gag 由来のそれぞれ 1種類のエピトープペプチドを用いて、3種類の HLA-A*3303 テトラマーを作製した。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 HIV-1 特異的 CD8 T細胞が検出できた。HLA-A*3303 拘束性 HIV-1 エピトープ特異的 CD8 T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。

A. 研究目的

現在様々なエイズワクチンの開発がおこなわれているが、これらのワクチンは液性免疫だけでなく細胞性免疫を誘導する事が重要であると考えられている。よってこれらのワクチンの効果測定の為には、ワクチンを接種した実験動物やヒトの細胞性免疫能を、正確にかつ安易に評価するシステムの開発が必須である、しかし最も重要な細胞性免疫の一つである細胞傷害性 T細胞 (CTL) は、 ^{51}Cr で標識した標的細胞の傷害を調べる機能的なアッセイによって測定するために、アイソトープが使える施設でしか調べることができない。さらに機能的なアッセイであり、また材料が標準化されていないために、必ずしも信頼度が高い、安定したデータが得られるわけでもない。

今年度は HLA-A*3303 拘束性 HIV-1CTL エピトープを新たに同定しこれを用いて、エピトープペプチドと HLA クラス I 分子複合体を 4つ結合させた HLA-A*3303 テトラマーを作製した。これを用いて、HIV-1 感染者の HIV-1 特異的 CD8 T細胞を解析した。

B. 研究方法

1) HLA-A*3303 エピトープの同定:

HLA-A*3303 結合ペプチドモチーフ (2番目が Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, で C 末端は Arg) に一致するの HIV-1SF2 Pol, Gag および Nef 由来の 8-mer から 11-mer のペプチドを選択する。これらのシーケンスを持ったペプチドを合成して、RMA-S-A*3303 細胞を用いたアゼンブリング法でその結合を調べた。

HLA-A*3303 に結合したペプチドを、HLA-A*3303 を持った HIV-1 慢性患者の末梢血リンパ球を刺激して、ペプチド特異的 CTL を誘導

する。さらに特異的 CTL が誘導できたペプチドに対して CTL クローンを作製する。CTL クローンを用いて、HIV-1 リコンビナントワクチニアウイルスに感染した細胞の傷害活性を調べる

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

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。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。

(倫理面への配慮)

患者の血液の使用については、インフォームドコンセントをおこない承諾を得た。共同研究者の所属する国立国際医療センターの倫理委員会の承認を得た。また研究発表において、各個人が特定できないようにした。

C. 研究成果

① HLA-A*3303 エピトープの同定

HLA-A*3303 結合ペプチドモチーフに一致する 99 個の HIV-1 ペプチドの HLA-A*3303 への結合を調べた結果、52 ペプチドが結合した (Table 1)。これらの HLA-A*3303 結合ペプチドを用いて、HLA-A*3303 を持った HIV-1 慢性感染者の末梢血リンパ球を刺激して、特異的 CTL の誘導を試みた所、8つのペプチドによってペプチド特異的 CTL の誘導が見られた。こ

のうち3つのペプチドは、overlap しており、9-mer がエピトープと考えられた。そこでこれらの6つのペプチドに対する特異的 CTL クローンを作製して、これを用いて HIV-1 リコンビナントワクチニアウイルスに感染した細胞の傷害活性を調べた所、4つの Pol 蛋白由来、1つの Gag 蛋白由来のペプチドに対する CTL クローンは、特異的な細胞傷害活性を示した (Table 2)。このことからこれら4つのペプチドは、HLA-A*3303 によって提示される CTL エピトープであると考えられた

② 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:

以前に同定した Env 由来のエピトープ1種類、今回同定したエピトープのうち比較的多くの患者で特異的T細胞が検出される Pol 及びGag 由来のそれぞれ1種類のエピトープペプチドを用いて、3種類の HLA-A*3303 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 (Fig.1)。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。

D. 考察

我々は、以前に2種類の HLA-A*3303 拘束性 HIV-1 エピトープを明らかにした。今回さらに Gag,

Pol, Nef 由来の4種類のエピトープを明らかにした。これらのエピトープのうち、3種類のエピトープを用いて、テトラマーを作製し、これにより 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。既に我々は、A*0201, A*0206, A*2402, A*1101, B*3501, B*5101 tetramer を作製しており、さらに HLA-A*3303 テトラマーを作製することが可能になり、HIV-1 感染者の解析能力を拡大することができた。これによって日

本人の9割以上に HIV-1 感染者の解析が可能となった。

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。

E. まとめ

新たに4種類の HLA-A*3303 拘束性 HIV-1 エピトープを明らかにした。これを用いてテトラマーを作製し、HIV-1 慢性感染者の末梢血中にエピトープ特異的 CD8 T 細胞を検出できるようになった。既に作製できるようになったテトラマーとあわせて、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が可能になった。

F. 研究発表

- 1) Hossain MS., Tomiyama H., Inagawa T., Ida S., Oka S., and Takiguchi M. Identification and characterization of HLA-A*3303-restricted, HIV-1 Pol-and Gag-derived cytotoxic T cell epitopes. AIDS Res. Hum. Retroviruses. in press.
- 2) Ueno T., Tomiyama H., Takiguchi M. Single T cell receptor-mediated recognition of an identical HIV-derived peptide presented by multiple HLA class I molecules. J. Immunol. 169; 4961-4969, 2002.
- 3) Tomiyama H., Akari H., Adachi A., and Takiguchi M. Different effects of Nef-mediated HLA class I down-regulation on HIV-1-specific CD8⁺ T cell cytokine activity and cytokine production. J. Virol. 76; 7535-7543, 2002.
- 4) Tomiyama H., Matsuda T., and Takiguchi M. Differentiation of human CD8⁺ T cells from a memory to memory/effector phenotype. J. Immunol. 168; 5538-5550, 2002.
- 5) Fukada K., Sobao Y., Tomiyama H., Oka S., Takiguchi M. Functional expression of the chemokine receptor CCR5 on virus epitope-specific memory and effector CD8⁺ T cells. J. Immunol. 168; 2225-2232, 2002.
- 6) Fukada K., Tomiyama H., Chantapong W., Matsuda T., Kusagawa S., Sato H., Oka S., Takebe T.,

Takiguchi M. Cytotoxic T cell recognition of HIV-1 cross-clade and clade-specific epitopes in HIV-1-infected Thais and Japanese. AIDS. 16; 701-711, 2002.

- G. 知的所有権の所得状況
該当なし

Figure 1. A*3303テトラマーのHIV-1特異的CD8 T細胞クローンへの結合

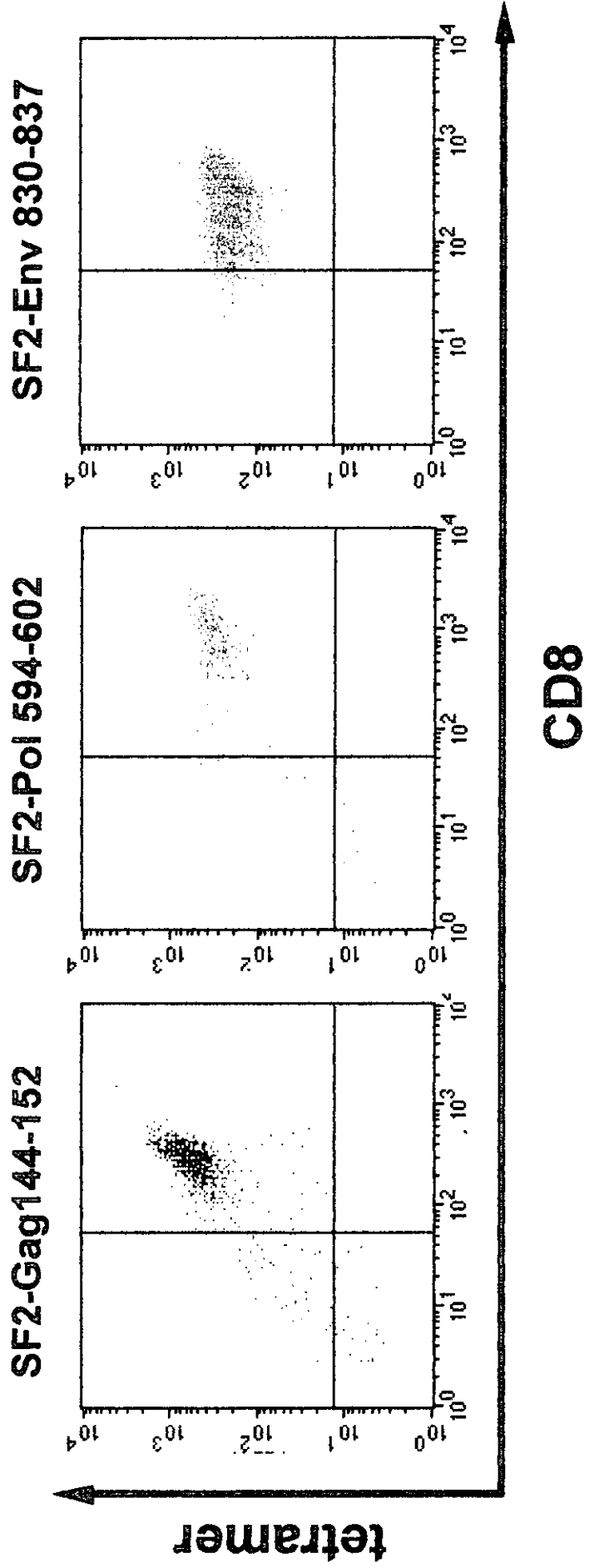


Table 2. Killing of HLA-A*3303-restricted CTL clones for C1R-A*3303 infected with HIV-1 recombinant vaccinia.

CTL clone	Percent lysis									
	C1R peptide(+)	C1R peptide(-)	C1R-A*3303 peptide(+)	C1R-A*3303 peptide(-)	C1R WT	C1R rVV	C1R-A*3303 WT	C1R-A*3303 rVV	C1R-A*3303 WT	C1R-A*3303 rVV
SF2-Pol 60-70-2	18.2	1.9	69.4	3.6	1.4	2.5	2.6	26.5	2.6	26.5
SF2-Pol 594-602-1	2.5	4.2	80.6	0.0	4.6	1.0	0.0	35.4	0.0	35.4
SF2-Pol 934-943-3	0.0	0.8	54.0	1.8	-2.5	-2.4	2.0	24.3	2.0	24.3
SF2-Gag 144-152-3	2.9	2.1	81.2	0.9	-4.5	-3.3	1.1	18.9	1.1	18.9
SF2-Gag 298-307-2	1.0	0.3	84.0	1.6	4.8	-0.4	-3.6	3.0	-3.6	3.0
SF2-Nef 192-200-5	2.8	0.0	44.1	-2.0	6.0	1.5	5.6	-2.6	5.6	-2.6

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

研究要旨

組換え BCG 及び VV エイズワクチンの誘導する CTL および NK 活性についてカニクイザルを用いて調べた。CTL 活性の確認されたサルについては、SIV mac gag の peptide を用いてエピトープの検索を行った。一部のサルの PBMC を用いて limiting dilution 法により CTL クローンの作製を試みた。

SIVmac239 の whole gag 領域、gag-pol 領域、あるいは HIV-E-gag 領域を含む rBCG(東京株)および rVV(DIs 株)ワクチンを各々作製し、単独及び組合せ免疫を行い、in vitro で抗原特異的二次刺激を行い培養した PBMC の gag または gag-pol 特異的 CTL(以下 CTL)活性を調べ、いくつかのサルに gag 特異的 CTL 活性が誘導された。サル No.3606、3977、3617、3978 については SIV mac gag の peptide を用いて epitope の検索を行った。また、サル No.3977 の PBMC を用いて CTL クローンの作製を試みたところ(表 10)、gag 特異的 CTL クローンが確認されたが、エピトープ解析等に用いるに十分な細胞数が増殖せず、詳しい実験は行えなかった。rBCG あるいは rVV DIs ワクチンを単独で接種した場合に比べて、rBCG に続いて rVV-DIs の順で免疫を行ったサルに CTL 活性が強く誘導された。

DNA(SIV gag-pol DNA, HIV 89.6 env DNA, IL-2 DNA) ワクチンおよび rVV DIs SIV mac gag-pol の組み合わせ免疫で、SIV mac gag-pol 特異的 CTL の誘導が確認された。

A. 研究目的

細胞障害性リンパ球 (CTL) を誘導できる HIV ワクチン開発のための基礎研究を行った。サル動物モデルを用いて rVV 及び rBCG を様々な組み合わせで免疫を行い、特異的 CTL 誘導能の検討を行うことでエイズワクチン候補の有用性を検討した。

- 1) rVV DIs SIV mac gag (以下 rVV gag) と rBCG SIV mac gag (以下 rBCG gag) ワクチンをカニクイザルに接種し、特異的 CTL 誘導能の検討を行う。
- 2) rVV DIs SIV mac gag-pol (以下 rVV gag-pol) と rBCG SIV mac gag-pol (以下 rBCG gag-pol) を組み合わせてカニクイザルに接種し、CTL 誘導能の検討を行う。
- 3) rVV DIs HIV subtype E gag (以下 rVV E-gag) と rBCG HIV subtype E gag (以下 rBCG E-gag) を組み合わせてカニクイザルに接種し、CTL 誘導能の検討を行う。
- 4) HIV 候補ワクチンの一つとして、DNA(SIV gag-pol DNA, HIV 89.6 env DNA, IL-2 DNA) と rVV DIs SIV mac gag-pol を組み合わせてカニクイザルに接種し、CTL 誘導能の検討を行う。

さらには、誘導された CTL の誘導能、エピトープ解析及び同定についても検討する。

B. 研究方法

- 1) SIVmac239 の whole gag 領域を含む rBCG(東京株)および rVV(DIs 株)を作製し、カニクイザル(Mf)を3群に分け接種した。
村山組合せ群: 組合せ接種群: rBCG gag 免疫静脈接種(IV) 2頭 経口2頭後に rVV gag 接種(IV) 4頭したもの、および rVV gag 免疫(IV) 2頭後に rBCG gag 接種(IV) 2頭 コントロール2頭の2通りで免疫したサル8頭の内、5頭については rVV gag で免疫後 SHIV 強毒株 (SHIV C2/1) を challenge、4週間後に剖検し、gag 特異的 CTL 活性を調べた。また、残りの3頭 (Mf3605, Mf3606, Mf3978) については、再度 rVV gag を接種し、その PBMC を分離し gag 特異的 CTL 活性を調べた (Fig1)。
筑波A群: 皮下接種(SC)群 (rVV gag, rVV gag-pol 1頭 rBCG gag, rBCG gag-pol 5頭 コントロール2頭)、
筑波B群: IV群: (rVV gag, rVV gag-pol 4頭 コントロール2頭)、接種後 PBMC の gag 特異的 CTL 活性を調べた (Fig2、3)。
- 2) SIVmac239 の gag-pol 領域を含む rBCG(東京株)および rVV(DIs 株)を作製し、前述のカニクイザル(Mf)筑波A群、B群に組み合わせて接種した。rVV

gag-pol 免疫 (衛府承認) および rBCG gag-pol 免疫 (皮内接種) 群: (rVV gag-pol / rBCG gag-pol 6 頭 コントロール 4 頭), 接種後 PBMC を分離して *in vitro* において抗原の二次刺激を行い, gag または gag-pol 特異的 CTL 活性を調べた (Fig2, 3)。

- 3) HIV-1 subtype E の gag 領域を含む rBCG(東京株) および rVV(DIs 株) を作製し, カニクイザル(Mf)9 頭に組み合わせて皮内投与した。接種後 PBMC を分離し, *in vitro* において抗原の二次刺激を行い, PBMC における HIV subtype E gag 特異的 CTL 活性を調べた (Fig4)。
- 4) DNA(SIV gag-pol DNA, HIV 89.6 env DNA, IL-2 DNA) をカニクイザル 24 頭に 3 回接種後, rVV Dis SIV mac gag-pol をカニクイザル 24 頭中 13 頭に 2 回接種した。接種後 PBMC を分離し, *in vitro* において抗原の二次刺激を行い, PBMC における SIV gag-pol および HIV env 特異的 CTL 活性を調べた (Fig5)。

C. 研究成果

- 1) 村山組合せ群(rBCG / rVV Dis SIV mac gag 免疫群)では2頭でCTL活性が見られた。これらの1頭でSIV mac gag peptide に反応がみられた (Table 1)。また、組合せ群のうち3頭 (Mf3605,3606,3978) については、4度目の免疫を行ったところ、Mf3606 に少し CTL 活性がみられた (Table1)。筑波 A 群: 皮下接種(S.C.)群については強いCTL活性がみられなかった。筑波 B 群: I.V.群では2頭でCTL活性が見られたが、gag peptides に対しては強い反応を示すものはなかった (Table2, Table3)。
- 2) SIV gag-pol 組み合わせ接種群 (筑波 A 群および B 群のうち10頭) では、Mf040 に gag-pol に対する CTL の出ている可能性が見られるが、それ以外は強い CTL 活性は見られなかった (Table2, Table3)。
- 3) HIV-E-gag 群 (rVV E-gag / rBCG E-gag 免疫群) では、特に強い HIV-1 subtype E の gag 特異的 CTL は誘導されていなかった (Table 4)。
- 4) DNA ワクチン接種群(SIV gag-pol DNA, HIV 89.6 env DNA, IL-2 DNA 免疫群)では、Control DNA を免疫接種したサルに比べて、特に強い HIV env, SIV mac gag-pol の特異的 CTL 活性は見られなかった (Table5a,5b)。また、DNA を3回接種後rVV Dis

SIV mac gag-pol を2回接種した群も、コントロール群に比べて、強い CTL 活性は見られなかった (Table5a,5b)。

D. 考察

種々の免疫群において特異的 CTL 誘導能の検討を行った結果、今回用いたワクチン候補では免疫ザルに強い CTL 活性を誘導する免疫方法は認められなかった。しかし、異なった免疫方法、特に DNA とワクシニアの組み合わせ免疫は強い抗体産生を誘導するという他の研究グループの報告もあることから、DNA ワクチン接種群については、rVV 接種後の CTL 活性の誘導が期待される。

いずれにせよ、さらに強い CTL 活性を誘導できる組換えワクチンの作製および接種方法の検討が必要と考えられた。

E. まとめ

- ・エイズの予防及び治療効果を示すワクチン開発において、細胞性免疫が重要と考えられている。細胞性免疫では、抗原特異性の細胞障害性リンパ球 (CTL) が誘導されることが必要であり、また、腫瘍細胞及びウイルス感染細胞を障害する Natural Killer(NK)細胞も大きな役割をすると考えられている。ワクチンの細胞性免疫誘導能を調べるため、これまでは主として functional assay による CTL 活性及び NK 活性を測定してきた。
- ・今後は、ワクチン接種したサルにおいて抗原が認識されていることをまず確認するため (ワクチンの免疫状況の確認)、CTL 活性の測定のみならず、INF- γ の測定 (産生細胞の確認のための、ICS および ELISpot assay) 及び抗原特異性の proliferation assay を平行して行い、組換えワクチン construct のサルにおける CTL 誘導能と共に、サルにおける抗原の認識を確認する事が必要と思われた。
- ・これらの assay により、ワクチン接種に対する体液性の反応に合わせて抗原特異的な細胞性の反応を検出し、CTL 活性に加えて、抗原特異的な認識を確認することにより、ワクチン開発における組換えワクチンの construct 作製や免疫方法の参考となると考えられる。

F. 研究発表

1) 原著

・ O' Connor DH., Allen TM., Vogel TU., Jing P.

DeSouza IP., Dodds E., Dunphy EJ., Melsaether C., Mothe B., Yamamoto H., Horton H., Wilson N., Hughes AL., and Watkins DI. Acute Phase cytotoxic T lymphocyte escape is a hallmark of simian immunodeficiency virus infection. Nature Medicine 8(5),493-499,2002

0) 総説

・山本博, 上坂浩実: サルとエイズワクチン -エイズワクチン開発における最近の進展- : 宮城県獣医師会会報 第54巻3号 平成13年7月

3) 学会発表

・山本 博, 勝山一輝, 大洲竹晃, 松尾和浩, 網 康至, 篠原克明, 高橋栄治, 須崎百合子, 佐々木裕子, 本多三男 : rBCG SIVmac gag および rVV DIs SIVmac gag 接種カニクイザルにおける gag 特異的 CTL の誘導. 第48回日本実験動物学会総会, 2001, 5, 横浜.

・O' Connor DH., Allen TM., Vogel TU., Jing P. DeSouza IP., Dodds E., Yamamoto H., Dunphy EJ. Melsaether C., Mothe B., Hughes AL., and Watkins DI. Acute Cytotoxic T-Lymphocyte Escape is a Hallmark of Simian Immunodeficiency Virus Infection. XIV International AIDS conference , TuorA1179, p346, Barcelona Spain July 7-12, 2002

・山本 博, 上坂浩実, 勝山一輝, 染谷健二, 松尾和浩, 本多三男 : サルエイズ動物モデルを用いた組換えエイズワクチンの基礎研究. 第135回日本獣医学学会学術集会, 2003, 3, 東京.

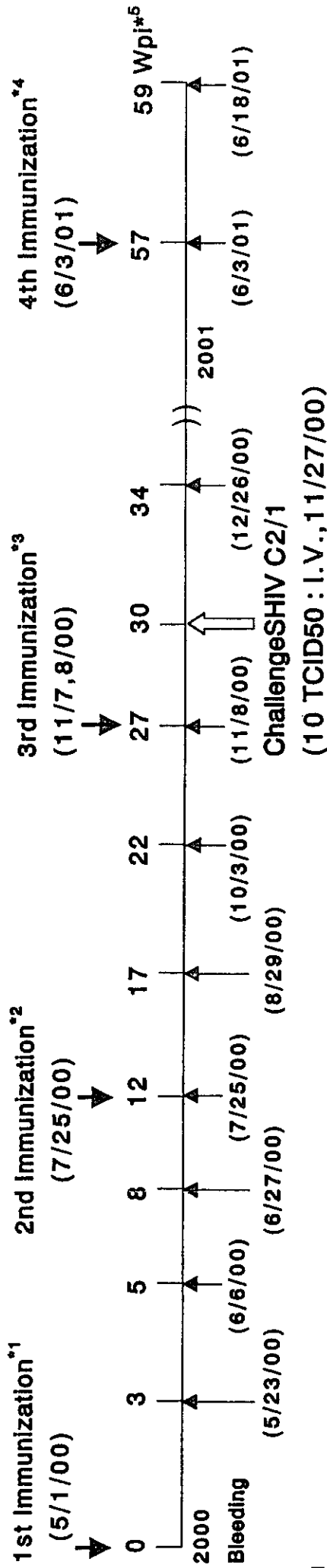
4) その他

・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.

G. 知的所有権の取得状況

なし

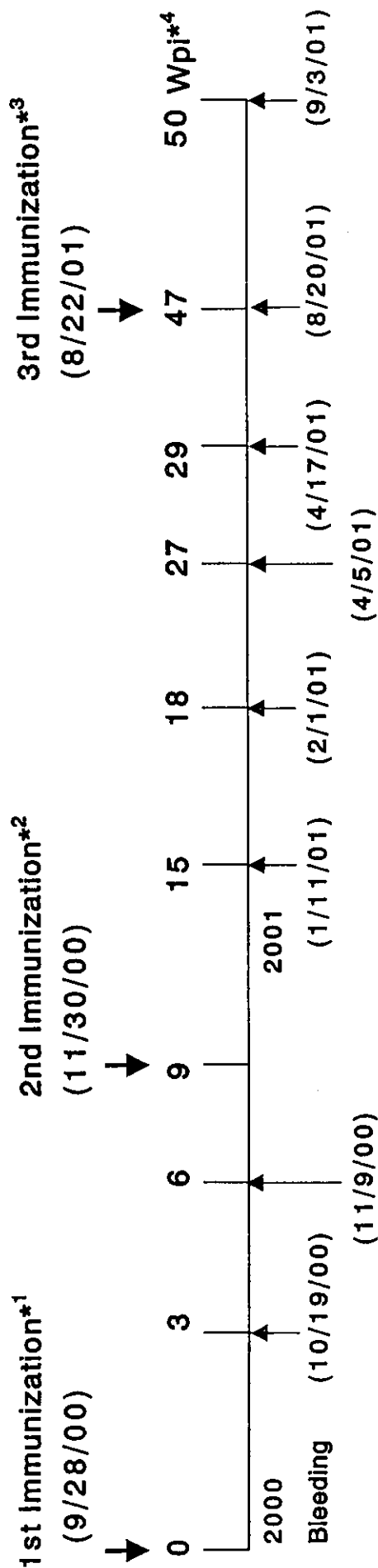
Fig1 rBCG & rDis : Protocol



Animal No.	Immunization				
	2 years ago	*1 : 1st (5/1/00)	*2 : 2nd (7/25/00)	*3 : 3rd (11/7,8/00)	*4 : 4th (6/3/01)
Mf3605	BCG	rBCG-SIVmacgag	rDis-SIVmac gag	rDis-SIVmac gag	rDis-SIVmac gag
Mf3606	BCG	rBCG-SIVmacgag	rDis-SIVmac gag	rDis-SIVmac gag	rDis-SIVmac gag
Mf3617	BCG	rBCG-SIVmacgag	rDis-SIVmac gag	rDis-SIVmac gag	12/26/00 に剖検
Mf3618	BCG	rBCG-SIVmacgag	rDis-SIVmac gag	rDis-SIVmac gag	12/26/00 に剖検
Mf3975	BCG	rDis-lacZ	rBCG-pSO246	rDis-lacZ	12/26/00 に剖検
Mf3976	BCG	rDis-SIVmac gag	rBCG-SIVmacgag	8/29/00 以前に死亡	
Mf3977	BCG	rDis-SIVmac gag	rBCG-SIVmacgag	rDis-SIVmac gag	12/26/00 に剖検
Mf3978	BCG	rBCG-pSO246	rDis-lacZ	rDis-lacZ	rDis-lacZ
Mf2623	BCG	Oral 80mg (×2)	rDis-SIVmacgag, pol	rDis-SIVmacgag, pol	12/26/00 に剖検

*5 : Weeks post immunization or challenge.

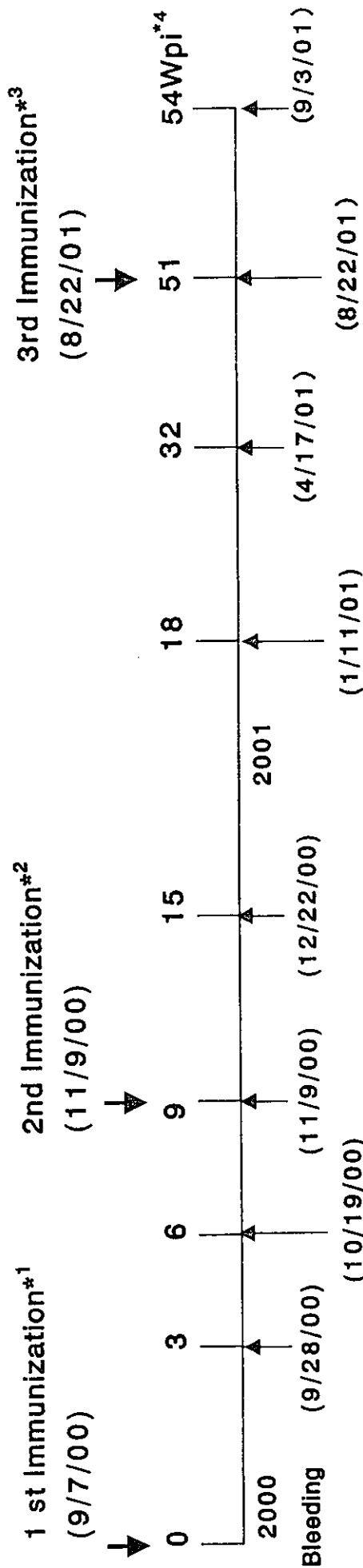
Fig2 SIVgag-pol(1) : Protocol



Animal No.	Immunization		
	*1 : 1st (9/28/00)	*2 : 2nd (11/30/00)	*3 : 3rd (8/22/01)
Mf008	rBCG/SIVmacgag (i.d./10mg)	rBCG/SIVmacgag-pol (i.d./10mg)	rDis/SIVmacgag-pol (i.v. 10 ⁹ PFU)
Mf010	rBCG/SIVmacgag (i.d./10mg)	rBCG/SIVmacgag-pol (i.d./10mg)	rDis/SIVmacgag-pol (i.v. 10 ⁹ PFU)
Mf029	rBCG/SIVmacgag (i.d./10mg)	rBCG/SIVmacgag-pol (i.d./10mg)	rDis/SIVmacgag-pol (i.v. 10 ⁹ PFU)
Mf046	rBCG/SIVmacgag (i.d./10mg)	rBCG/SIVmacgag-pol (i.d./10mg)	rBCG/SIVmacgag-pol (i.d./10mg)
Mf085	rDis/SIVmacgag (i.v. 10 ⁸ PFU)	rDis/SIVmacgag-pol (i.v. 10 ⁹ PFU)	rBCG/SIVmacgag-pol (i.d./10mg)
Mf090	rBCG/pSO246 (i.d./10mg)	rBCG/pSO246 (i.d./10mg)	rDis/LacZ (i.v. 10 ⁹ PFU)
Mf091	rBCG/pSO246 (i.d./10mg)	rBCG/pSO246 (i.d./10mg)	rDis/LacZ (i.v. 10 ⁹ PFU)
Mf093	rBCG/SIVmacgag (i.d./10mg)	rBCG/SIVmacgag-pol (i.d./10mg)	rDis/LacZ (i.v. 10 ⁹ PFU)

*4 : Weeks post immunization.

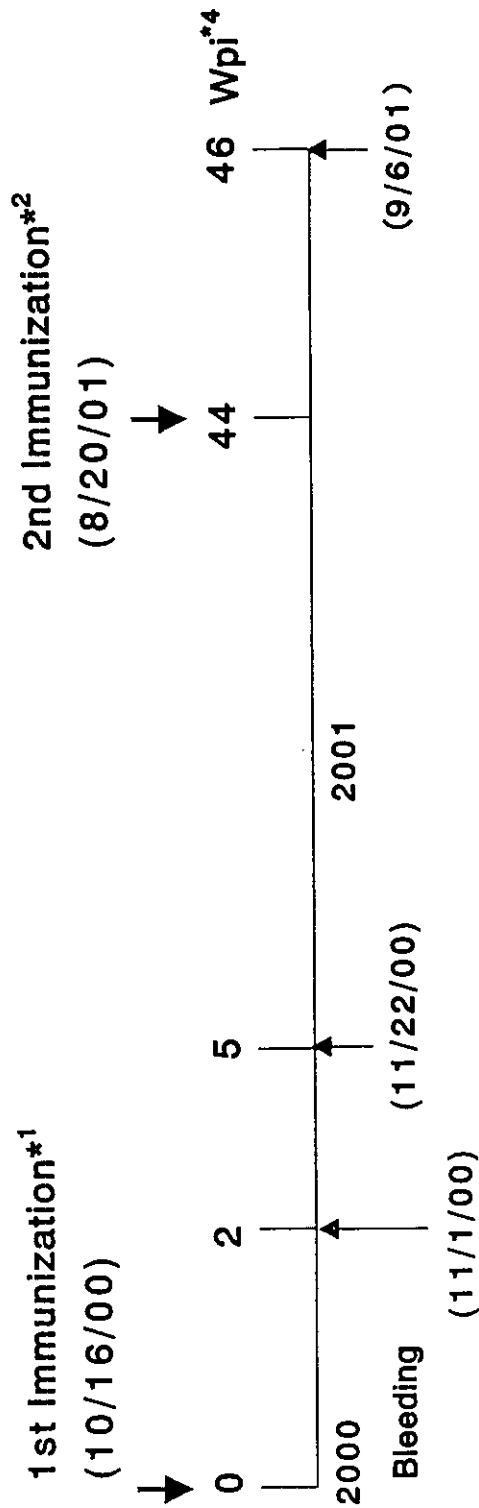
Fig3 SIVgag-pol(2) : Protocol



Animal No.	Immunization		
	*1 : 1st (9/7/00)	*2 : 2nd (11/9/00)	*3 : 3rd (8/22/01)
Mf001	rDis-SIVmac gag (i.v. 10 ⁸ PFU)	rDis/SIVmacgag-pol (i.v. 10 ⁹ PFU)	rBCG/pSO246 (i.d./10mg)
Mf006	rDis/LacZ (i.v. 10 ⁸ PFU)	rDis/LacZ (i.v. 10 ⁹ PFU)	rBCG/pSO246 (i.d./10mg)
Mf033	rDis/LacZ (i.v. 10 ⁸ PFU)	rDis/LacZ (i.v. 10 ⁹ PFU)	rBCG/SIVmacgag-pol (i.d./10mg)
Mf036	rDis-SIVmac gag (i.v. 10 ⁸ PFU)	rDis/SIVmacgag-pol (i.v. 10 ⁹ PFU)	rBCG/SIVmacgag-pol (i.d./10mg)
Mf040	rDis-SIVmac gag (i.v. 10 ⁸ PFU)	rDis/SIVmacgag-pol (i.v. 10 ⁹ PFU)	rBCG/SIVmacgag-pol (i.d./10mg)
Mf042	rDis-SIVmac gag (i.v. 10 ⁸ PFU)	rDis/SIVmacgag-pol (i.v. 10 ⁹ PFU)	rBCG/SIVmacgag-pol (i.d./10mg)

*4 : Weeks post immunization or challenge.

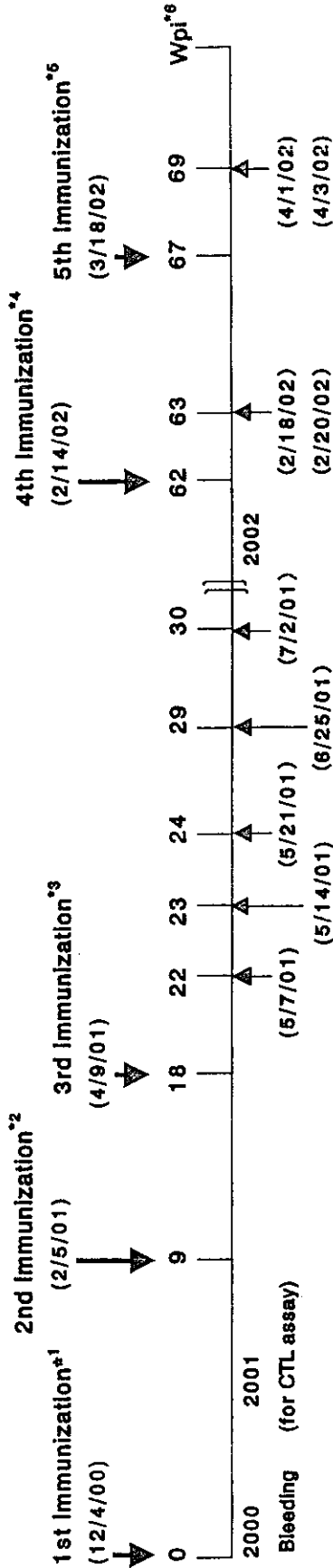
Fig4 HIV-E-gag : Protocol



Animal No.	Immunization	
	*1 : 1st(10/16/00)	*2 : 2nd(8/20/01)
Mf# 31-009	rBCG/HIV-E-gag (0.1mg,i.d.)	rDis/HIV-E-gag (10 ⁹ PFU,i.d.)
Mf# 32-059	rBCG/HIV-E-gag (80mg,oral)	rDis/HIV-E-gag (10 ⁹ PFU,i.d.)
Mf# 33-051	rDis/LacZ (10 ⁹ PFU,i.d.)	rDis/HIV-E-gag (10 ⁹ PFU,i.d.)
Mf# 35-106	rBCG/HIV-E-gag (0.1mg,i.d.)	rBCG/HIV-E-gag (0.1mg,i.d.)
Mf# 36-019	rDis/HIV-E-gag (10 ⁹ PFU,i.d.)	rBCG/HIV-E-gag (0.1mg,i.d.)
Mf# 37-075	rDis/HIV-E-gag (10 ⁹ PFU,i.d.)	rDis/LacZ (10 ⁹ PFU,i.d.)
Mf# 38-004	rBCG/pSo246 (80mg,oral)	rDis/LacZ (10 ⁹ PFU,i.d.)
Mf# 39-064	rBCG/pSo246 (0.1mg,i.d.)	rDis/LacZ (10 ⁹ PFU,i.d.)
Mf# 40-009	rBCG/HIV-E-gag (80mg,oral)	rDis/HIV-E-gag (10 ⁹ PFU,i.d.)

*4 : Weeks post immunization .

Fig5 DNA vaccine : Protocol



Animal No.	Immunization (Route:I.D.&I.M.)				Immunization (Route:I.D.)	
	*1:1st (12/4/00)	*2:2nd(2/5/01)	*3:3rd(4/9/01)	*4:4th(2/14/02)	*5:5th (3/18/02)	
Mf B- 899	Control DNA(6mg)	Same quantity of 1st time	Same quantity of 1st time	rVV-DIs-SIVgag pol(10 ⁷ PFU)	Same quantity of 4th time	
Mf B- 900	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA(各2.5mg)+IL-2 DNA(1mg)	"	"	rVV-DIs-SIVgag pol(10 ⁷ PFU)	"	
Mf B- 901	Control DNA(6mg)	"	"	rVV-DIs-lacZ(10 ⁷ PFU)	"	
Mf B- 902	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA(各2.5mg)+IL-2 DNA(1mg)	"	"	rVV-DIs-SIVgag pol(10 ⁷ PFU)	"	
Mf B- 903	Control DNA(6mg)	"	"	rVV-DIs-lacZ(10 ⁷ PFU)	"	
Mf B- 904	Control DNA(6mg)	"	"	rVV-DIs-SIVgag pol(10 ⁷ PFU)	"	
Mf B- 905	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA(各2.5mg)+IL-2 DNA(1mg)	"	"		"	
Mf B- 906	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA(各2.5mg)+IL-2 DNA(1mg)	"	"	rVV-DIs-lacZ(10 ⁷ PFU)	"	
Mf B- 907	Control DNA(6mg)	"	"		"	
Mf B- 908	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA(各2.5mg)+IL-2 DNA(1mg)	"	"		"	
Mf B- 909	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA(各2.5mg)+IL-2 DNA(1mg)	"	"		"	
Mf B- 910	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA(各2.5mg)+IL-2 DNA(1mg)	"	"		"	
Mf B- 911	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA(各2.5mg)+IL-2 DNA(1mg)	"	"	rVV-DIs-SIVgag pol(10 ⁷ PFU)	"	
Mf B- 912	Control DNA(6mg)	"	"	rVV-DIs-lacZ(10 ⁷ PFU)	"	
Mf B- 913	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA(各2.5mg)+IL-2 DNA(1mg)	"	"		"	
Mf B- 914	Control DNA(6mg)	"	"	rVV-DIs-lacZ(10 ⁷ PFU)	"	
Mf B- 915	Control DNA(6mg)	"	"		"	
Mf B- 917	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA(各2.5mg)+IL-2 DNA(1mg)	"	"		"	
Mf B- 918	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA(各2.5mg)+IL-2 DNA(1mg)	"	"	rVV-DIs-SIVgag pol(10 ⁷ PFU)	"	
Mf B- 919	Control DNA(6mg)	"	"		"	
Mf B- 921	Control DNA(6mg)	"	"		"	
Mf B- 922	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA(各2.5mg)+IL-2 DNA(1mg)	"	"		"	
Mf B- 924	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA(各2.5mg)+IL-2 DNA(1mg)	"	"	rVV-DIs-SIVgag pol(10 ⁷ PFU)	"	
Mf B- 925	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA(各2.5mg)+IL-2 DNA(1mg)	"	"	rVV-DIs-SIVgag pol(10 ⁷ PFU)	"	

*6 : Weeks post immunization .

Table1 rBCG/rDis組み合わせ群 rBCG/rDis SIVmacgag免疫群
SIVmac gag specific cytotoxicity %(E:T ratio=100:1)

Monkey No.	Immunization weeks post immunization	1st(5/1/00)										2nd(7/25/01)				3rd(11/7,8/00)				4th(6/3/01)				
		3	5	8	8	12	12	17	22	27	27	34	34	34	34	34	34	34	57	59				
Mf3605	rBCG/pSO-SIV gag(1st) & rVV-DIs-SIV gag(2nd,3rd,4th)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.0	8.2	
Mf3606	rBCG/pSO-SIV gag(1st) & rVV-DIs-SIV gag(2nd,3rd,4th)	0.0	0.7	0.0	0.0	5.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	13.8	0.6	
Mf3617	rBCG/pSO-SIV gag(1st) & rVV-DIs-SIV gag(2nd,3rd)	0.0	0.0	10.7	0.0	6.9	0.0	0.0	0.0	1.5	1.4	10.8												
Mf3618	rBCG/pSO-SIV gag(1st) & rVV-DIs-SIV gag(2nd,3rd)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.2	0.0	0.0	0.0	3.6	10.4												
Mf3976	rVV-DIs-SIVmac gag(1st) & rBCG/pSO-SIV gag(2nd)	0.0	0.0	0.0	0.0	4.8	死亡																	
Mf3977	rVV-DIs-SIVmac gag(1st,3rd) & rBCG/pSO-SIV gag(2nd)	7.9	4.0	6.0	12.3	12.6	12.6	0.3	2.0	8.1														
Mf3975	rVV-DIs-lacZ(1st,3rd) & rBCG/pSO246(2nd)	0.0	0.0	0.0	9.7	0.0	0.0	1.4	0.0	7.6														
Mf3978	rBCG/pSO246(1st) & rVV-DIs-LacZ(2nd,3rd,4th)	6.8	0.0	0.0	9.9	5.0	5.0	0.0	1.2	0.4														
Mf2623	naïve & rVV-DIs-SIVmac gag-poi(3rd)				2.6	5.3	4.2																	

*:11/27/00にchallenge後、4週目で剖検

Table2 筑波A群 rBCG SIVmac gag(gag-pol)免疫(S.C.)群
SIVmacgag(gag-pol) specific cytotoxicity %(E:T ratio=100:1)

Monkey No.	Immunization	1st(9/28/00)			2nd(11/30/00)			3rd(8/22/01)		
		3	6	18	6	18	47	6	18	50
		weeks post immunization								
		採血日								
Mf008	rBCG/SIVgag(1st) & rVV-DIs-SIV gag-pol(3rd)	6.1	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Mf010	rBCG/SIVgag-pol(2nd) rBCG/SIVgag(1st) & rVV-DIs-SIV gag-pol(3rd)	0.0	0.9	5.3	4.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Mf029	rBCG/SIVgag-pol(2nd) rBCG/SIVgag(1st)	0.0	5.0	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Mf046	rBCG/SIVgag-pol(2nd) rBCG/SIVgag(1st) & rVV-DIs-SIV gag-pol(3rd)	0.0	5.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.7
Mf085	rBCG/SIVgag-pol(2nd) rVV-DIs-SIV gag(1st)	4.3	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5 ^{*1}
Mf093	rVV-DIs-SIV gag-pol(2nd) & rBCG/SIVgag-pol(3rd) rBCG/SIVgag(1st)	0.0	2.1	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Mf090	rBCG/pSO246(1st,2nd) & rVV-DIs-lacZ(3rd)	0.0	6.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Mf091	rBCG/pSO246(1st,2nd) & rVV-DIs-lacZ(3rd)	3.1	0.0	7.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.7

*1;E:T ratio=25:1

Table3 筑波B群 rVV-DIS SIVmac gag(gag-pol)免疫(I.V.)群
SIVmacgag(gag-pol) specific cytotoxicity % (E:T ratio=100:1)

Monkey No.	Immunization weeks post immunization	1st(9/7/00)					2nd(11/9/00)					3rd(8/22/01)					
		3	6	9	15	18	32	51	54	9.28.00	10.19.00	11.9.00	12.22.00	1.11.01	4.17.01	8.22.01*2	9.3.01*2
Mf001	rVV-DIs-SIV gag(1st)	14.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	rVV-DIs-SIV gag-pol(2nd)																
Mf036	rVV-DIs-SIV gag(1st) & rBCG/SIVgag-pol(3rd)	11.3	7.5	6.3	3.4	6.9	15.4*1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	rVV-DIs-SIV gag-pol(2nd)																
Mf040	rVV-DIs-SIV gag(1st) & rBCG/SIVgag-pol(3rd)	6.2	0.0	2.6	0.0	6.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	12.3	2.6	2.6
	rVV-DIs-SIV gag-pol(2nd)																
Mf042	rVV-DIs-SIV gag(1st)	0.0	0.0	0.0	6.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	9.6	0.0	0.0
	rVV-DIs-SIV gag-pol(2nd)																
Mf006	rVV-DIs-lacZ(1st,2nd) & rBCG/pSO246(3rd)	0.0	3.9	4.1	3.6	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.4	0.0	0.0
Mf033	rVV-DIs-lacZ(1st,2nd) & rBCG/pSO246(3rd)	2.4	2.8	6.1	1.2	4.9	15.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

*1:E:T ratio=50:1

*2:SIVgag-pol target

Table4 HIV-E群 rBCG/rDIs HIV-E-gag免疫群
HIV-E-gag specific cytotoxicity %(E:T ratio=100:1)

Monkey No.	Immunization		1st(10/16/00)		2nd(8/20/01)	
	weeks post immunization	採血日	2	5	2	46
#31-009	rBCG/HIV-E-Gag(1st) & rDIs/HIV-E-Gag(2nd)		6.1			3.3
#32-059	rBCG/HIV-E-Gag(1st) & rDIs/HIV-E-Gag(2nd)		0.0			5.7
#35-106	rBCG/HIV-E-Gag(1st) & rDIs/HIV-E-Gag(2nd)			0.0		0.0
#36-019	rDIs/HIV-E-Gag(1st) & rBCG/HIV-E-Gag(2nd)			0.0		0.0
#37-075	rDIs/HIV-E-Gag(1st) & rBCG/HIV-E-Gag(2nd)			0.0		0.0
#40-009	rBCG/HIV-E-Gag(1st) & rDIs/HIV-E-Gag(2nd)		8.1 ^{*1}			0.0
#33-051	rDIs/LacZ(1st) 死亡					
#38-004	rBCG/pSO246(1st) & rDIs/LacZ(2nd)			14.7		8.6
#39-064	rBCG/pSO246(1st) & rDIs/LacZ(2nd)			0.0		

*1:11/1/00採血のPBMCと11/22/00採血のPBMCをmixしてassayをおこなった。

Table5a DNA Vaccine群

HIVenv specific cytotoxicity % (E:T ratio=100:1)

Monkey No.	Immunization weeks post immunization	1st(12/4/00),2nd(2/5/01),3rd(4/9/01)										4th(2/14/01)	5th(3/18/01)
		22	23	24	29	30	63	69	7.2.01	2.18&20.02	4.1&3.02		
		(1st,2nd,3rd)											
		(4th,5th)											
Mf B900	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA & rVV-Dis-SIVgag-pol				5.1						12.3	4.8	
Mf B911	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA & rVV-Dis-SIVgag-pol				8.5						6.4 ^{*2}	5.5 ^{*2}	
Mf B918	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA & rVV-Dis-SIVgag-pol	8.8 ^{*1}			0.0						6.4	4.8	
Mf B924	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA & rVV-Dis-SIVgag-pol					5.0					18.2	20.3	
Mf B925	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA & rVV-Dis-SIVgag-pol					15.4					38.2	16.4	
Mf B903	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA & rVV-Dis-lacZ		0.0								0.0	15.0	
Mf B913	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA & rVV-Dis-lacZ			1.7							9.8	20.4	
Mf B899	Control DNA	0.0					9.6				25.1	0.0	
Mf B902	Control DNA	3.1					8.8				11.4 ^{*2}	6.5	
Mf B904	Control DNA	4.6					0.0				0.3	16.6	
Mf B901	Control DNA						17.8				7.0 ^{*2}	26.9	
Mf B907	Control DNA						9.8				0.0 ^{*3}	0.0	
Mf B912	Control DNA						0.0 ^{*1}		12.6		0.0 ^{*3}	0.0 ^{*2}	
Mf B917	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA			17.0									
Mf B905	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA		16.8										
Mf B906	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA					0.8							
Mf B908	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA		0.0										
Mf B909	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA		1.4										
Mf B910	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA		4.9										
Mf B922	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA						12.9						
Mf B914	Control DNA		15.4								0.0		
Mf B915	Control DNA		6.5								14.6		
Mf B919	Control DNA						0.0						
Mf B921	Control DNA						9.3						

*1;E:T ratio=10:1

*2;E:T ratio=50:1

*3;E:T ratio=4:1

Table5b DNA Vaccine 群

SIVgag-pol specific cytotoxicity %(E:T ratio=100:1)

Monkey No.	Immunization weeks post immunization	1st(12/4/00),2nd(2/5/01),3rd(4/9/01)									
		22	23	24	29	30	4th(2/14/01)	5th(3/18/01)			
採血日		5.7.01	5.14.01	5.21.01	6.25.01	7.2.01	2.18&20.02	4.1&3.02			
(1st,2nd,3rd)		(4th,5th)									
Mf B900	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA & rVV-DIs-SIVgag-pol				5.6		7.8		7.3		
Mf B911	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA & rVV-DIs-SIVgag-pol				0.0		0.0 ^{*2}		0.0 ^{*2}		
Mf B918	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA & rVV-DIs-SIVgag-pol				0.0		1.4		4.5		
Mf B924	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA & rVV-DIs-SIVgag-pol					12.0	11.2		19.7		
Mf B925	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA & rVV-DIs-SIVgag-pol					0.0	11.7		11.0		
Mf B903	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA & rVV-DIs-SIVgag-pol		18.7				0.0		8.0		
Mf B913	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA & rVV-DIs-lacZ			9.1			8.2		14.6		
Mf B899	Control DNA	1.0					12.8		6.2		
Mf B902	Control DNA	9.3			6.5		9.8 ^{*2}		0.1		
Mf B904	Control DNA	0.6			2.8		3.4		4.4		
Mf B901	Control DNA			0.7	0.0		2.3 ^{*2}		11.6		
Mf B907	Control DNA			0.0			0.0 ^{*3}		0.0		
Mf B912	Control DNA			2.2 ^{*1}		0.0	0.0 ^{*3}		3.8 ^{*2}		
Mf B917	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA			8.0							
Mf B905	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA		0.0								
Mf B906	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA							2.8			
Mf B908	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA		0.0								
Mf B909	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA		14.2								
Mf B910	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA		11.3								
Mf B922	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA			5.0							
Mf B914	Control DNA		14.3					0.0			
Mf B915	Control DNA		30.0					2.6			
Mf B919	Control DNA			0.0							
Mf B921	Control DNA			0.0							

*1;E:T ratio=10:1

*2;E:T ratio=50:1

*3;E:T ratio=4:1

ワクチン接種アカゲザルの病態薬理

分担研究者 網康至 国立感染症研究所 動物管理室 主任研究官

研究要旨：ワクチン接種における液性因子の誘導、特に抗 HIV 中和抗体の病態の薬理として HIV-1 env 蛋白 V3 部分の冠部を認識する高親和性抗体は野生株プライマリーアイソレートと中和できる。さらに in vivo との相関において抗体濃度と防御免疫の関連性を血中抗体濃度の推移から推測できることを検討する。また、病態進行との関連性を検索するためにこの抗体をウイルス感染後投与しその病態進行への修飾を明らかにすることにより治療用ワクチンに対する中和抗体の意義を明らかにする。

協力研究者

須崎百合子（国立感染症研究所・動物管理室）

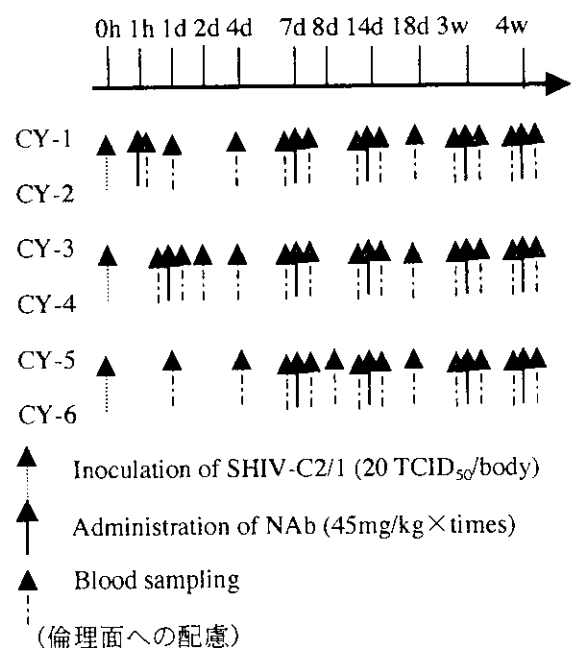
A. 研究目的

HIV の感染は今なお増加し続けており、2003 年の WHO の報告ではこのままの状態では 1 億人を突破すると予想されており、取り組むべき重要な課題として問われている。本研究ではこの膨大な感染を有効にコントロールするための基礎データを得ることを目的に実際の野生株を中和できるヒト型化抗体を用いた HIV 感染の in vitro 及び in vivo における HIV 感染動物モデルを用いることにより効果的な HIV 感染モデルの病態進行を抑制するために中和抗体の関与が積極的なコントロールにつながる可能性についてサルエイズモデルを用いて検討する。

B. 研究方法

ヒト型化 HIV モノクローナル抗体 NAb は

前投与によって 45mg/kg の濃度で完全にウイルス感染を阻止することができる。その情報をもとにして後投与におけるウイルス感染のコントロールの可能性を以下のような実験デザインで検討した。



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。