

現を増強させるために、コドンの至適化の効果を動物レベルで検討した。rBCG-HIV ワクチンは他のベクター系に比べて免疫の持続能が極めて優れており、我々の観察した動物モデルでは観察を続けた数年において免疫が持続していることが明らかである。10 年以上の持続の報告もあり、抗原系として優れた特徴を有している。したがって、プライムブーストの系で用いることによりブースター抗原を選択できれば、現在の rBCG-HIV ワクチンでもその有用性が示されると理解できるが HIV ワクチンの開発は強い細胞性免疫誘導能を目的としていることから BCG をベクターに用いた rBCG-HIV ワクチンの完成のためにはいずれにしろ、挿入した外来抗原遺伝子の発現を増強させることが効果的な HIV ワクチンの開発につながると予測できる。本年度の研究により挿入した外来遺伝子を BCG のコドンに至適化することにより *in vitro* の培養系のみで約 30 倍の増強が認められた。このことは DNA ワクチンの至適化による効果が約 10 倍であることを報告されていることから BCG のコドンの至適化は抗原の発現において極めて優れた方法であるといえる。DNA ワクチンにおいて *in vivo* における防御効果の発現は *in vitro* の抗原発現に比べてさらに 10 倍増強すると示唆されていることから BCG 単独投与における防御免疫誘導能の増強が期待される。

昨年の研究によってマイコバクテリアコドンの至適化の有用性が示唆されたにも関わらず、問題点としてワクチン抗原の調整がその増殖速度や低下、あるいはベクター不安定性

から課題としてとらえられた。これらの点を解決するために膨大なクローンを解析検討し、増殖能に富む至適化コドンの発現に優れた rBCG 株の作製を行うことができた。このことは rBCG コドン至適化抗原を得る際の極めて重要なポイントになることが明らかになった。この抗原を用いると我々が期待した外来性抗原に対する発現をヒト投与量の 1/10 の投与量で免疫誘導が可能であることを明らかにした。このことは BCG リコンビナント HIV ワクチン単独投与における防御免疫誘導の可能性についても示唆しており、プライムブースト系の防御免疫増幅能と合わせて最終年度までに防御免疫の観点からコドン至適化の効果を明らかにする。

さらに上記のように、中国産赤毛サルの中に、インド産赤毛サルに認められる Mamu-A*08 がいることを明らかにし、コロニーの 2 群のなかでサル 7 匹を同定した。さらに、P9CD エピトープを組込んだ HBc コア粒子キメラ抗原を作製した。この抗原を Mamu-A*08 サル 5 匹に投与すると極めて強い CTL 活性の誘導が Mamu-A*08 特異的に認められた。しかし、病原性 SHIV の粘膜感染を全くコントロール出来なかった。このことは細胞性免疫の誘導が単一エピトープのみでは不足しているのか、あるいはこの誘導された CTL がメモリータイプの CTL であることから機能的に *in vivo* において不全状態であることが示唆された。今年度に用いたワクチン抗原はヘルパーエピトープを有していないことからウイルスチャレンジにおける P9CD 特異的な

CTL 機能の増幅がおきることができない免疫機構になっていたことがその一因である可能性が示唆された。したがって、メモリータイプの CTL の上昇のみで防御免疫を推測することは問題であり、“CTLの質”の重要性が示唆された。(本多)

E. 結論

「エイズ治療薬開発のためのサル評価スクリーニング系の開発とその応用」の研究班でサルを用いた効果的なワクチンの開発を目的にした評価系の確立を行った、その結果本年度の研究で以下のような結果が得られた。

- 1) これまで明らかであったインド産アカゲザルの解析法に準じて中国産赤毛サル MHC を解析することは困難である。従って、インド産アカゲザル MHC とヒト HLA の解析法を参考にして、中国産赤毛サル MHC の解析法を確立した。奄美大島のアカゲザルコロニーを用いて、確立した MHC class I, class II を解析すると、ヒトと異なり複数個のハプロタイプがあり、新しいアレルを含めたインド産アカゲザル特異的な MHC の結果が得られた。
- 2) Mamu-A* 及び Mamu-B* 遺伝子を増幅し、第 2 及び第 3 エクソン多型の RSCA パターンを解析したところ、個体毎に異なる遺伝子数を有することが判明した。1 ハプロタイプあたり、Mamu-A* 遺伝子は 1 ~ 3 個、Mamu-B* 遺伝子は 1 ~ 4 個発現すると推定される。また、ある個体に着目した RSCA パターンを比較すると、a ハ

プロタイプ (Mamu-A* 遺伝子が 3 個、Mamu-B* 遺伝子が 4 個) と b ハプロタイプ (Mamu-A* 遺伝子が 2 個、Mamu-B* 遺伝子が 5 個) を有していると推定された。あるサルの子孫で SIV_{geg207-216} ペプチドへの免疫応答が既知の個体の RSCA パターンを解析すると、免疫応答を示した個体はいずれも a ハプロタイプを有するのに対し、免疫応答を示さなかった個体は b ハプロタイプを有していた。

- 3) RSCA により、インド産サルで同定された Mamu-A*08 サルが中国産赤毛サルコロニーの 2 群に 7 匹いることを見出した。しかし、Mamu-A*01 サルは解析した約 50 匹中にはいなかった。
- 4) 新しいウイルス特異的 CTL 及び HTL エピトープを中国産赤毛サルでオーバーラッピングペプチドを用いたエリスポット法で推定した。さらに、新しいエピトープとして IL-10, CD9 ペプチドがメジャーエピトープの候補として同定された。それらのデータをもとにして真のエピトープであるかどうかについて生物学的に発現実験を行う。
- 5) 上記の解析結果と得られた cDNA を用いて MHC クラス I 及びクラス II テトラマーの作製が始められ、免疫能との相関データが期待される。
- 6) 効果的なワクチンを開発するために糖鎖欠損型 SIV あるいはその遺伝子を用いた DNA ワクチンの防御免疫誘導能の解析、あるいはセンダイウイルスベクターとの

コンビネーションによる防御免疫の誘導の免疫学的解析が明らかになり、細胞性免疫誘導能との関連性が確認された。

- 7) Mamu-A*08 サルを用いた P9CD エピトープに対する細胞性免疫誘導が可能となりヘルパーエピトープを誘導しないものではキラー活性が高くてもウイルスの感染をコントロールできないことが明らかにされた。CTL の質的な検討が重要であることが示唆された。

以上の結果から、わが国で、中国産アカゲザルの MHC の明らかなワクチン開発実験が可能となった。その成果をもとにして病原性ウイルス感染のコントロールのメカニズムを免疫学的に解析可能にした。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

1. Kano, M., Matano, T., Kato, A., Nakamura, H., Takeda, 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, T., 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., Kano, M., Takeda, A., Nakamura, H., Nomura, N., Furuta, Y., Shioda, T., and Nagai, Y. No significant enhancement of protection by Tat-expressing Sendai viral vector-booster in a macaque AIDS model. *AIDS*, in press.
4. Xing, H. Q., Moritoyo, T., Mori, K., Tadakuma, K., Sugimoto, C., Ono, F., Hayakawa, H. & Izumo, S. (2003) 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.
5. Sugimoto, C., Tadakuma, K., Otani, I., Moritoyo, T., Akari, H., Ono, F., Yoshikawa, Y., Sata, T., Izumo, S. & Mori, K. (2003) *Nef* gene is required for robust productive infection of Simian Immunodeficiency Virus in T-cell-rich paracortex in lymph nodes. *J Virol*,77:4169-
6. Villinger, F., Mayne A. F., Bostik P., Mori, K., Jensen P. E., Ahmed R. & Ansari, A. (2003) Evidence for antibody mediated enhancement of SIVgag antigen processing and cross presentation in SIV infected rhesus macaques. *J Virol* 77, 10-24.
7. Villinger, F., Brice, G. T., Mayne, A. F., Bostik, P., Mori, K., June, C. H. & Ansari, A. (2002) Adoptive transfer of SIV naïve autologous CD4⁺ cells to macaques chronically infected with SIV is sufficient to induce long term non progressor status.

- Blood 99, 590-599.
8. Matano, T. Recent advances in AIDS vaccine preclinical trials: challenges against the chronic disease. *Current Topics in Virology*, in press.
 9. Sugita, J., H. Ohtani, T. Mizoi, K. Saito, K. Shiiba, I. Sasaki, S. Matsuno, H. Yagita, M. Miyazawa, and H. Nagura. Close association of Fas ligand-positive tumor-associated macrophages and apoptotic cancer cells along invasive margin of colorectal carcinoma. *Jpn. J. Cance Res.* 93:320-328, 2002.
 10. Sakaguchi M, Nakayama T, Kaku H, Taniguchi K, Saito S, Kimura A, Inoue S: Analysis of HLA in children with gelatin allergy. *Tissue Antigens* 2002; 59: 412-416.
 11. Hori H, Hattori S, Inouye S, Kimura A, Irie S, Miyazawa H, Sakaguchi M: Analysis of the major epitope of the alpha 2 chain of bovine type I collagen in children with bovine gelatin allergy. *J. Clin. Allergy Clin Immunol.* 2002; 110: 652-658.
 12. Okamoto K, Makino S, Yoshikawa Y, Takaki A, Nagatsuka Y, Ota M, Tamiya G, Kimura A, Bahram S, Inoko H: Identification of IkBL as the second MHC-linked susceptibility locus for Rheumatoid Arthritis. *Am. J. Hum. Genet.* 2003; 72: 303-312
 13. Shao W, Yasunami M, Takahashi M, Shibata H, Hamaguchi K, Sakata T, Ota M, Katsuyama Y, Inoko H, Kimura A: Analysis of HLA-B polymorphism in insulin dependent diabetes mellitus in Japanese. *MHC.* 2003; 9: 163-169
 14. Niikura, M., Takamura, S., Kim, G., Kawai, S., Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I., Tian-Cheng Li, Takeda, N. and Yasutomi, Y. Chimeric recombinant hepatitis E virus -like particles as an oral vaccine vehicle presenting foreign epitopes. *Virology* 2002;293:273-280.
 15. Imanaka-Yoshida, K., Hiroe, M., Yasutomi, Y., Maki, S., Tsuchiya, T., Noda, N., Toyozaki, T., Nishikawa, T., Ishiyama, S., Sakakura, T. and Yoshida, T. Tenascin-C is a Useful Marker for Disease Activity in Myocarditis. *J. Pathol.* 2002;197:388-394.
 16. Mukai, K., Yasutomi, Y., Watanabe, M., Kenjo, A., Aota, T., Wang, L., Nishikawa, H., Fujita, T., Kuribayashi, K. and Shiku, H. HER2 peptide-specific CD8⁺ T cells are proportionally detectable long after multiple DNA vaccinations. *Gene Ther.* 2002;9:879-888.
 17. 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
 18. Takamura, S., Niikura, M., Li, T.C., Takeda, 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
19. Hayashi,T., Y.asutomi,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
 20. 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 170(1):495-502.
 21. 宮澤正顯. 内在性レトロウイルスと自己免疫病自然発症モデル動物. *リウマチ科* 27:218-226, 2002.
 22. 宮澤正顯. マウスレトロウイルス感染と発症: 宿主遺伝子による制御機構. *ウイルス* 52:69-76, 2002.
- 学会発表
1. Sugimoto, C., Yasutomi, Y., Ohgimoto, S., Shioda, T., Yamamoto, N., Nagai, Y. & Mori, K. (2002) Implication of deglycosylation of Env in pathogenicity of SIVmac239. 20th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS. (Monterey, CA, USA)
 2. Sugimoto, C., Ohgimoto, S., Kusakawa, S., Takebe, Y., Shioda, T. Nagai, Y. & Mori, K. (2002) DNA prime-vaccinia boost immunization of deglycosylated Env protein induced more frequent Env specific CD4 and CD8 T cells but less protective immunity against SIVmac239 in rhesus macaques. 20th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS. (Monterey, CA, USA)
 3. Matano, T., Kano, M., Lun, W. H., Nakamura, H., Takeda, A., Ami, Y., Nomura, N., Furuta, Y., Shioda, T., and Nagai, Y. Comparison of protective efficacies between Gag- and Tat-boosters in a DNA-prime/Sendai viral vector-boost vaccine system against AIDS. The XIVth International AIDS conference, Barcelona, Spain, 7/9/2002.
 4. Matano, T., Lun, W. H., Kano, M., Takeda, A., Nakamura, H., Mori, K., Sata, T., 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.
 5. Matsuo K., Nakasone T., Izumi Y., Ami Y., Ohsu T., Hamano T., Yamamoto N., Yamazaki S., and Honda M. SIV Gag-expressing recombinant BCG-prime and recombinant vaccinia virus DIs strain-boost regimen evokes protective immune response in monkey. International AIDS Conference,

- Barcelona, Spain TuOrA1222 (July 9, 2002)
6. 杉本智恵、佐多徹太郎、吉川泰弘、森一泰 (2002) 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。第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会 (札幌)
 7. 杉本智恵、保富康宏、塩田達雄、永井美之、森一泰 (2002) 糖鎖欠失 SIV 感染ザルに誘導された抗 Env 抗体エピトープの解析。第 16 回日本エイズ学会学術集会・総会 (名古屋)
 8. 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 (2002) Env エイズワクチンへの糖鎖欠失変異の効果。第 16 回日本エイズ学会学術集会・総会 (名古屋)
 9. Lun, W. H., Kano, M., Takeda, A., Nakamura, H., Mori, K., Sata, T., 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.
 10. 狩野宗英、中村浩美、武田明子、加藤篤、須崎百合子、網康至、永井美之、俣野哲朗。組換えセンダイウイルスベ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.
 11. 倫文輝、狩野宗英、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綻機構の解析。第 16 回日本エイズ学会、名古屋、11/30/2002.
 12. 安波 道郎、田中 弓子、本多 三男、森 一泰、俣野 哲朗、木村 彰方: アカゲザルクラス I 座位 Mamu-A および Mamu-B の解析。第 11 回日本組織適合性学会大会、川越、平成 14 年 9 月
 13. 高村史記、新倉昌浩、武田直和、宮村達男、保富康宏 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 第 50 回日本ウイルス学会学術集会 (札幌)
 14. 河野光雄、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 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 第 50 回日本ウイルス学会学術集会 (札幌)
 15. 保富康宏、高村史記、新倉昌浩、武田直和、宮村達男 E 型肝炎ウイルス(HEV) ウイルス様中空粒子(VLP)をベクターとして用いた HIV 経口ワクチンの開発 第 50 回日本ウイルス学会学術集会 (札幌)
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
- 1) 特許取得
Miyazawa, M. and M. Clerici. Marker Genes (HIV 曝露非感染状態と関連する遺伝的マーカーとその応用)。英国特許出願

(UK Patent Applied, October 16, 2002: No.
0223982.0)

- 2) 実用新案登録 無し
- 3) その他 無し

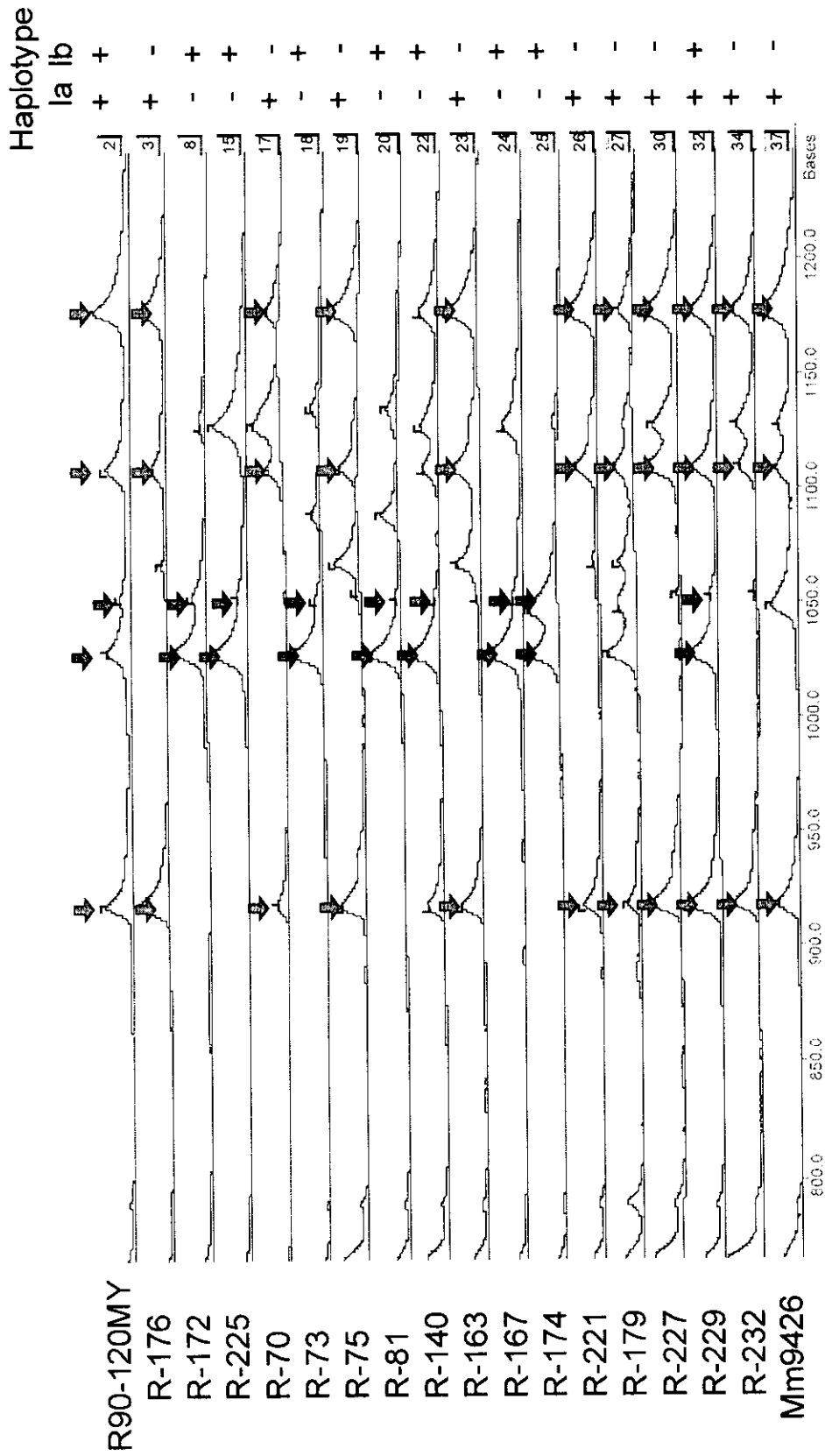


図1 アカゲザルクラスI MHC遺伝子 (Mamu-A) のRSCA解析

種オス個体 (R90-120MY) とその子由来のBLCLからのMamu-A cDNAを解析した。
 R90-120MYの3 allelesからなるhaplotype la、2 allelesからなるhaplotype lbが子に伝播している。

Haplotype la: ↘ Haplotype lb: ↘



a. TTSTTASAKVDMVNETSSCIAQDNCTGLEQEQMISCKFNMTGLKRDKKKEYNETWYSADLV

ENV12 TTSTTASAKVDMVNETSSCIAQDNC

ENV13 VNETSSCIAQDNCTGLEQEQMISCK

ENV14 CTGLEQEQMISCKFNMTGLKRDKKK

ENV15 KFNMTGLKRDKKKEYNETWYSADLV

V1V2-1 TTSTTASAKVDMVQE

V1V2-2 TASAKVDMVQETSSC

V1V2-3 KVDMVQETSSCIAQD → 5G, 239

V1V2-4 VQETSSCIAQDNCTG

V1V2-5 SSCIAQDNCTGLEQE

V1V2-6 AQDNCTGLEQEQMIS

V1V2-7 CTGLEQEQMISCKFQ

V1V2-8 EQEQMISCKFQMTGL

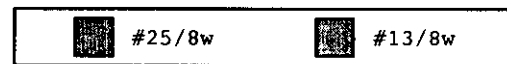
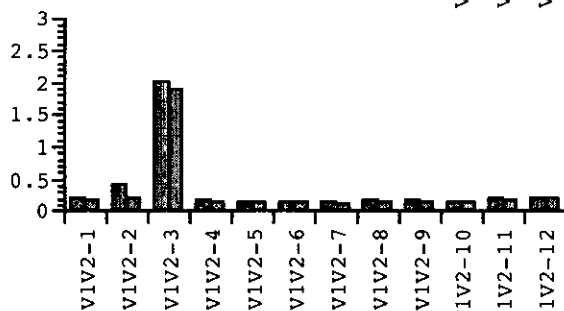
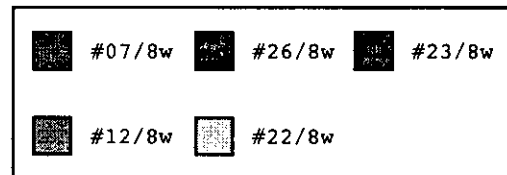
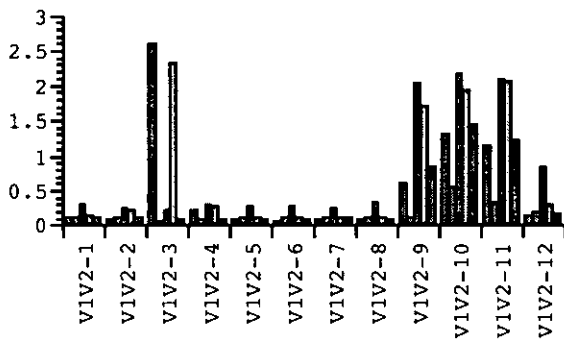


図2 V1V2領域に対する抗体反応性

a. V1V2のEnv12~15領域をさらに12本のペプチドV1V2-1~V1V2-12に分けた。V1V2-3(青で表示)はΔ5G感染、SIVmac239感染の一部のサルで見られたが、V1V2-9,10,11(緑で表示)はすべてのΔ5G感染サルで検出された。b. ELISAにおける反応性

Ⅱ. 分担研究報告書

サルエイズモデルの問題点の検討とワクチン開発への応用

主任研究者 永井美之 富山県衛生研究所・所長

研究要旨：HIV 予防治療を目的とした候補物質の評価にはサルの評価系の確立が望まれており、そのためにサルの遺伝的バックグラウンドを揃えた均一なサル集団の確保と利用が要求される時期になっている。さらに HIV/AIDS の病因が生体の免疫機能を破壊することから、HIV/AIDS 候補物質の免疫能に対する影響の詳細な解析が望まれている。それらの解析方法も世界的に急速に進展しつつある。したがって、エイズ治療薬開発のためのサルにおける評価系の改良と強化が緊急な課題の一つになっている。それに応えるべく MHC（主要組織適合抗原）の解析、サルの評価系の開発研究を行う。

A. 研究目的

有効な種々のエイズ治療薬が開発されているが HIV 感染者が増加し続けていることから HIV 感染をコントロールするには新しい抗エイズ物質の開発が重要な課題となる。そのためには基盤技術の開発、特にサルを用いた評価系の開発とその系を用いた候補物質の評価がある。このプロジェクトではこれまで、小動物やサルを用いた HIV 感染系の開発を行ってきたが今回それらの成果に基づき、さらに候補薬の臨床応用のために必須と考えられるサルを用いた基盤技術の開発を行い、それらを用いて候補物質の開発研究を行うことを目的とする。

それらの研究を効果的にするためにこれまで不明な点の多かったサルの MHC（組織適合抗原）の解析を行い、評価系の均一化を計

る。そのためにヒトの MHC の解析を行っている宮沢、木村研究員による解析が有効となる。木村、宮澤らは既にその解析を始めており、新しい MHC の存在があきらかになっている。それらの研究を発展させて免疫学的に抗原と免疫能の誘導が明らかにできるサル系の開発が期待できる。

サルの細胞性免疫能の解析法が一定化していないことから新しい抗エイズ物質の開発にはその定量化を計ることが必要と考えられる。その研究を保富研究員が行う。

つくばの P3 サル HIV エイズ研究施設において森、俣野、本多らはサルを用いた HIV 感染評価系の開発を行う。

B. 研究方法

これまでアカゲザルの MHC の解析方法は

インド産のアカゲザルを用いて確立されつつある。しかし、前実験で中国産のアカゲザルを摘要するとその解析法を充分応用できないことが明らかになった。インド産アカゲザルを入手することが現時点では極めて厳しい状況にあることを考えて、中国産がアカゲザルの MHC を明らかにすることにより、エイズ治療薬開発のための遺伝子的なバックグラウンドと、そのためのサルを用いた評価スクリーニング系を開発する方法を検討した。その解析はこれまで用いられたアカゲザルのゲノム遺伝子配列決定法を参考にして行った。

- 1) 評価モデルとして用いられるサル HIV/AIDS モデルの MHC の解析を行った。これまで明らかにされているアカゲザルを用いた MHC クラス I 及びクラス II 抗原の情報をもとにしてアカゲザルの遺伝的バックグラウンドを明らかにする。しかし、これまでに登録されたサルの MHC はほとんどインド産アカゲザルによるもののみであってその報告範囲も極めて狭いものであった。従って、サルの MHC と病原体の感染あるいは感染免疫の相関を明らかにするには極めて不十分なものであり、今後解決すべき課題になっている。まずこの点に関して日本でアカゲザルあるいはカニクイサルも含めて MHC の解明を行い、エイズ医薬品の開発に応用できるように整備する。
- 2) 具体的な防御能を示すリコンビナントワクチンの免疫誘導能の防御免疫能に至るまでの解析を行った。サルの遺伝的均一

化を計りながら、種々の HIV 感染や HIV 遺伝子を組込んだ免疫原に関するサルの評価系を開発する。具体的にはサルの細胞性免疫を中心として、例えばヘルパー機能の誘導、キラー細胞活性の誘導、遅延型反応の発現と、ウイルスの感染によるサルへの病態発現との関連性を明らかにする。

(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) 評価モデルとして用いられるサル HIV/AIDS モデルの MHC の解析については、中国産アカゲザルを用いた MHC class I, II 抗原の RSCA 解析法によりアカゲザルに MIC I, II, III の遺伝子群が存在することを明らかにした。HLA 領域内のマイクロサテライトマーカーを検索し、class I 領域あるいは近傍の C244, C12A TNF- α のマーカー、さらに class II 領域あるいは近傍の D6S1701, D6S1560, D6S291 のマーカーの存在が判明し MHC パプロタイプの構成に有用であることが明らかになった。
- 2) 具体的な防御能を示すリコンビナントワクチンの免疫誘導能の防御免疫能に至るまでの解析については
 - ①サルエイズモデルにおける Non-progresser の同定とその解析
 - ②エイズウイルスの糖鎖のウイルス感染、

免疫応答に関する研究

③DNA-センダイウイルスプライムブースト
ワクチンによるエイズ発症予防効果の誘
導

④BCG プライミング Dis ブーストによる病
原体キメラウイルスの感染のコントロー
ル

について研究し、これまで間接的な証拠か
ら推測されていた SIV 感染防御における
CD4 陽性 T リンパ球等の役割が実証され、
ワクチン開発の方向性決定に対して重要な
貢献を行えると共に、予め MHC 遺伝子型
の明らかなアカゲザルを感染実験に使用出
来ようになり、実験群個体数の大幅な縮
小及びそれによる動物資源の保護が実現で
きると示唆された。

D. 考察

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

的なホモログス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店として捉えられ始めている。

E. 結論

日本における遺伝的バックグラウンドが明らかでないサルを同定解析し、そのサルを用いた医薬品の開発あるいは病態の解析が必要となってきた。本プロジェクトの初年度にあたり、米国での Mamu-A*01、及び 02 のコロニーとは異ったコロニーである Mamu-A*08 の遺伝的バックグラウンドを持つサルを高率に有するサルコロニーを同定した。今後さらにクラス I のみならず、クラス II 抗原や MIC 抗原などについても明らかにすることによって、遺伝的バックグラウンドの明らかになったサルコロニーを用いてエイズ医薬品、ワクチン開発に資することにより欧米で開発されつつあるエイズワクチンとのデータの比較を行うことが可能になり、エイズ対策に寄与することができる。

F 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

- 1) 論文発表
- 2) 口頭発表

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

糖鎖変異 SIV 感染により誘導されるエイズウイルスに対する感染防御免疫に関する研究

分担研究者 森 一泰 国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官

研究要旨: SIVmac239 gp120 に存在する 23 個の N-結合型糖鎖のうちの 5 個を欠失した変異 SIV、 $\Delta 5G$ はアカゲザル感染において慢性感染期のウイルス増殖が極めて低く抑えられる。我々は $\Delta 5G$ 感染ザルに誘導された感染防御免疫の解析を昨年から引き続いて行った。その結果、それぞれの $\Delta 5G$ 感染ザルにおいて中和抗体誘導のレベルと細胞性免疫誘導のレベルには逆相関が見られることが明らかになった。また $\Delta 5G$ 感染後長期間経ったサルでは細胞性免疫誘導が極めて低くなっていることが示されたが、これは血漿ウイルス量が検出限界以下に長期間維持されていることと関連していると考えられた。さらに、 $\Delta 5G$ 感染ザルにおける結合抗体誘導を Env オーバーラッピングペプチドを用いた ELISA によって解析した結果、 $\Delta 5G$ 感染ザルでは SIVmac239 感染ザルとは異なる抗体誘導パターンが示され、 $\Delta 5G$ の糖鎖欠失は Env の構造変化を引き起こしたことが示唆された。この Env の構造変化は $\Delta 5G$ が attenuated virus であることと関与している可能性がある。

A. 研究目的

サル/SIV 感染モデルはヒトにおける HIV の感染病態と多くの共通点があるので、エイズの予防法や治療法を開発する上での評価系として、またエイズ病態を解明する動物モデル系として不可欠である。我々はサルにエイズをおこす SIVmac239 のエンベロープタンパク (Env) gp120 に多数存在する N-結合型糖鎖に着目し、糖鎖欠失 SIV のアカゲザルにおける感染病態と感染によって誘導された免疫応答を解析することにより、エイズウイルス感染防御に寄与するファクターを明らかにすることを目的として研究を行っている。

SIVmac239 をもとに 23 個の N-結合型糖鎖のうち 5 個の糖鎖を欠失させた変異 SIV 株、 $\Delta 5G$ はアカゲザル感染により、急性感染期では SIVmac239 と同等のウイルス増殖を示すにも関わらず、その後速やかに血中ウイルス量は検出限界以下にまで抑制され、長期間にわたって極めて低レベルに維持されることを報告した。また、昨年度の当研究班の分担研究により、 $\Delta 5G$ 感染防御に関与する細胞性免疫誘導を解析するため、ELISPOT アッセイによって Gag/Pol, Nef および Env に対するウイルス特異的 CD4+ T 細胞、CD8+ T 細胞の出

現頻度を調べた。しかし、個々のサルによって全く異なる免疫誘導状態を示すことが明らかになったので、 $\Delta 5G$ の Env 糖鎖欠失がよりよい免疫を誘導したというよりは、 $\Delta 5G$ が attenuated virus の性質を示すために結果として、防御免疫が誘導されたと考えられた。そこで本年度はさらに詳細に $\Delta 5G$ 感染防御免疫の状態を明らかにするため、1) 他のウイルスタンパク (Tat/Rev/Vif/Vpr/Vpx) に対する細胞性免疫誘導の解析、2) $\Delta 5G$ 感染後長期間 (2~3 年) 経た時点での細胞性免疫の解析、3) 中和抗体誘導と細胞性免疫誘導の相関性の解析を行った。さらに、 $\Delta 5G$ のウイルス学的性質を理解するひとつの手段として、4) Env オーバーラッピングペプチドを用いた ELISA による結合抗体のエピトープ解析を行った。

B. 研究方法

1. サル感染実験ならびに血液サンプルの採取

アカゲザルに $\Delta 5G$ または SIVmac239 を静脈接種し、感染後経時的に血液をクエン酸採血した。血漿は -80°C 保存、PBMC は細胞成分から Ficoll Hypaque 密度勾配遠心により分離し、 -160°C で保

存した。なお、本研究の動物実験はすべて「国立感染症研究所動物実験指針」に基づいて行われた。本指針は「動物の愛護及び管理に関する法律」「実験動物の使用及び保管等に関する基準」等に基づき、また「国立感染症研究所における動物実験の基本原則」に則って適正な動物実験を行うことを目的としているため、動物倫理に対する問題はない。

2. 中和抗体価の測定

中和抗体価の測定は Tat responsive LTR 制御下で SEAP (分泌型アルカリフォスファターゼ) を発現する CEMx174SIV-SEAP 細胞を用いて行った。段階希釈した血漿を SIVmac239 または $\Delta 5G$ と混ぜて室温 1 時間インキュベートした後、CEMx174SIV-SEAP 細胞を加えて 3 日間培養した。培養上清中に分泌される SEAP の活性を Phospha-Light assay kit (アプライドバイオシステムズ) で測定した。

3. ウイルス特異的細胞性免疫の解析

ウイルス特異的細胞性免疫の解析は IFN- γ ELISPOT アッセイにより行った。昨年度の報告では組み換えワクシニアウイルスを BLCL 細胞に感染させて抗原提示細胞としたが、ワクシニアウイルス WR 株をベクターとした Env の抗原提示があまりよくなかったので、Env 発現をセンダイウイルスベクターに変えて抗原提示 BLCL を作製し、再検討した。また、その他のウイルスタンパクに対する抗原提示細胞の調製は Tat/Rev/Vif/Vpr/Vpx のオーバーラッピングペプチドの混合ペプチドを autologous BLCL 細胞にパルスし、ソラレン-紫外線処理して不活化することにより行った。また感染ザル PBMC はマグネットビーズを用いることにより、CD4+ T 細胞と CD8+ T 細胞に分けた。抗原提示 BLCL と CD4+ T 細胞または CD8+ T 細胞を一晩混合培養し、定法により IFN- γ 産生細胞を検出・算定した。

4. T 細胞短期間培養後の ELISPOT アッセイ

$\Delta 5G$ 感染後約 3 年経ったザル 2 頭の血液から PBMC を分離し、マグネットビーズを用いることにより、CD4+ T 細胞と CD8+ T 細胞に分けた。それぞれの細胞を 42 のグループに分けた全 SIV ペプチドと 4 日間 37°C で培養した。4 日後、8 日後

に IL-2 を含む RPMI1640-10%FCS で培養液を交換し、12 日目に抗 IFN- γ 抗体固相化 ELISPOT プレートに細胞を移し、ペプチドとともに一晩培養し、定法により IFN- γ 産生細胞を検出・算定した。

5. ペプチド ELISA による抗 Env 抗体エпитオプの解析

Env 全領域をカバーする 72 本のオーバーラッピングペプチドを個々に 96well-ELISA プレートに固定化した。100 倍希釈した感染 8 週後のサル血漿を添加し、室温 1 時間反応させた後、洗浄し、POD 標識抗サル IgG 抗体を加えて、37°C 30 分間インキュベートした。洗浄後、o-フェニレンジアミン溶液を加えて発色させ、停止液として 2N-硫酸を加えた。490nm で吸光度を測定した。また、V1V2 領域をカバーする 12 本のオーバーラッピングペプチドを作製し、同様の方法でさらに詳細な抗体エピトプの解析を行った。

C. 研究結果

1. 中和抗体価の測定

$\Delta 5G$ 感染ザルにおける中和抗体の誘導についてはこれまでも報告しているが、感染後長期間にわたる中和抗体価の動向を調べるため、再度中和抗体価の測定を行った。

Table.1a に示すように、 $\Delta 5G$ に対する中和抗体は 5 頭中 4 頭で検出された。そのうちの 3 頭 (#07, #22, #23) は viral RNA load のセットポイントである感染後 8 週目までに中和抗体が出現した。しかし、#26 だけは $\Delta 5G$ に対する中和抗体価は全く検出されなかった。さらに SIVmac239 に対する中和抗体はいずれの $\Delta 5G$ 感染ザルにおいても検出されなかった。Table.1b に示すように、対照群である SIVmac239 感染ザルでは、2 頭では SIVmac239、 $\Delta 5G$ いずれのウイルスに対する中和抗体も検出されなかった。1 頭では両ウイルスに対する中和抗体が同レベルで検出された。

Table.1a $\Delta 5G$ 感染ザルにおける中和抗体価

		Neutralizing titer				
		8w	18/16w	38/31w	90w	154w
#07	vs239	<25	<25	<25	n.d.	n.d.
	vs5G	100	3200	400	n.d.	n.d.

#12	vs239	<25	<25	<25	n.d.	n.d.
	vs5G	<25	25	50	n.d.	n.d.
#26	vs239	<25	<25	<25	n.d.	n.d.
	vs5G	<25	<25	<25	n.d.	n.d.
#22	vs239	<25	<25	<25	<25	<25
	vs5G	100	400	200	100	200
#23	vs239	<25	<25	<25	<25	<25
	vs5G	50	100	50	50	100

Table.1b SIVmac239 感染ザルにおける中和抗体価

		Neutralizing titer		
		8w	18/16w	38/31/36w
#25	vs239	<25	<25	<25
	vs5G	<25	<25	<25
#20	vs239	<25	25	400
	vs5G	<25	50	400
#18	vs239	<25	<25	<25
	vs5G	<25	<25	<25

2. Δ5G 感染ザルにおけるウイルス特異的細胞性免疫の解析

Δ5G 感染ザルにおけるウイルス特異的細胞性免疫の誘導を IFN- γ ELISPOT アッセイにより行った。抗原提示細胞は autologous BLCL 細胞を用いた。Env はセンダイウイルスベクター、Gag と Nef

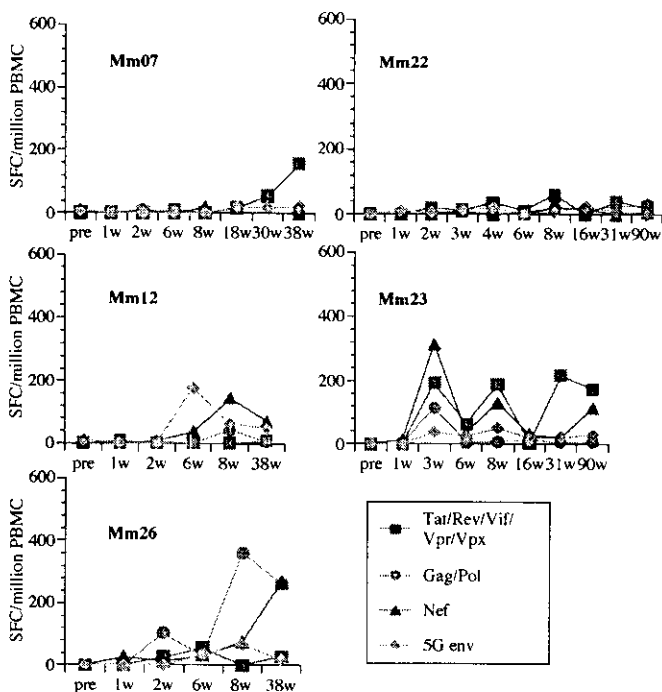


Fig.1 ウイルス特異的 CD8+ T 細胞 (CTL) の誘導

はワクシニアウイルスベクター (NYCBH 株)、Tat/Rev/Vif/Vpr/Vx は合成オーバーラッピングペプチドを用いて抗原を BLCL 細胞に導入した。Fig.1 にウイルス特異的 CD8+ T 細胞 (CTL)、Fig.2 にウイルス特異的 CD4+ T 細胞 (HTL) の結果を示した。中和抗体価が比較的高かった 2 頭、#07 と #22 はウイルス特異的 CTL、HTL とも非常に低いレベルであった。他の 3 頭はいずれも plasma viral RNA のセットポイントである 8 週目までに CTL、HTL の検出が確認された。特に、#23 では感染のピーク時のすぐ後である 3 週目に CTL の顕著な上昇が見られた。中和抗体が検出されなかった #26 は 5 頭の中で最も高い HTL と CTL レベルを示した。また、中和抗体が中程度検出された 2 頭では CTL、HTL とも中～高レベルの誘導を示した。

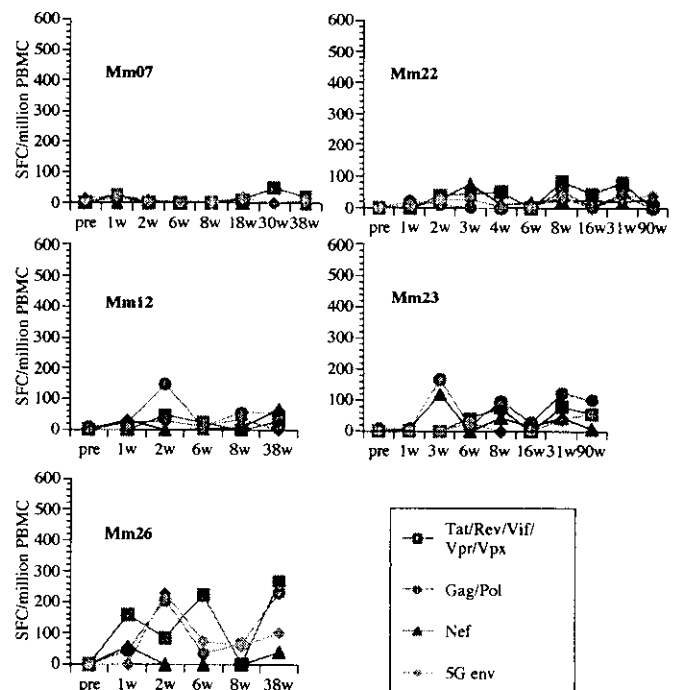


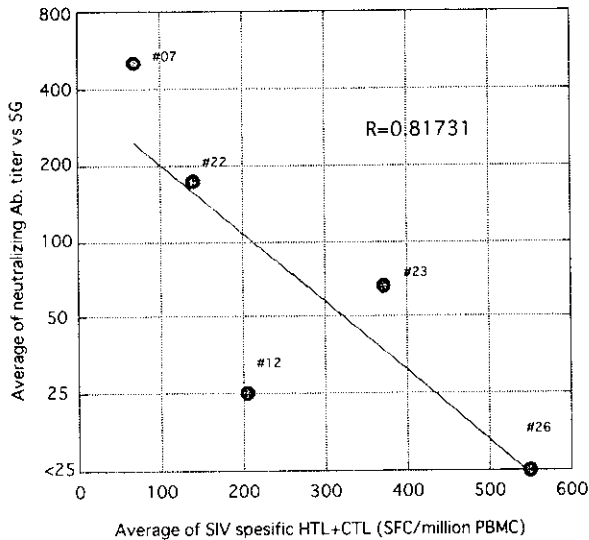
Fig.2 ウイルス特異的 CD4+ T 細胞 (HTL) の誘導

3. Δ5G 感染ザルに誘導された中和抗体価とウイルス特異的 IFN- γ 産生細胞数の関係

これまで Δ5G 感染ザルにおける感染防御免疫誘導の性質を調べてきたが、上述したように中和抗体価が高いサルは細胞性免疫が検出されず、中和抗体が検出されなかったサルでは細胞性免疫の誘導が顕著であることが明らかになった。そこで両免疫誘導の相関を Fig.3 に示した。この図は調べた全期間で検出された中和抗体価の平均値を縦軸に、細胞性免

疫誘導の平均値（全期間で検出されたウイルス特異的 IFN- γ 産生 CD4+ T 細胞と CD8+ T 細胞の合計値の平均）を横軸に各 Δ 5G 感染ザルの疫誘導をプロットしたものである。 Δ 5G 感染ザルにおける疫応答は中和抗体誘導と細胞性疫誘導が逆相関の関係にあった。 Δ 5G 感染によってどちらかの疫誘導が顕著になるという傾向は見られなかった。

Fig.3 中和抗体誘導と細胞性疫誘導の相関性



4. Δ 5G 感染後長期間（154 週）経た時点での細胞性疫の解析

Δ 5G 感染では感染後 2 週目に plasma viral load のピークを迎えるが、8 週目で検出限界以下にウイルス感染は制御され、その後その状態が維持されている。一方、同じく attenuated SIV の一種である Δ Nef の感染では 10^4 レベルの感染が続き、高い CTL ならびに HTL 誘導が感染後長期間経っても検出される。そこでウイルス増殖が低く抑えられている Δ 5G 感染ザルでは感染後長期間経った後でどのような細胞性疫応答が見られるのかを調べた (Table.2)。

Table.3 Δ 5G 感染後 154 週目の細胞性疫誘導

ペプタイド	#22/CD4+		#23/CD4+		#23/CD8+	
	ex ¹⁾	sti ²⁾	ex	sti	ex	sti
G-1	-	-	-	+++	-	++
G-2	-	-	-	+	-	+
G-3	-	-	-	++	-	-

G-4	-	-	-	-	-	-
G-5	-	++	-	++	-	-
G-6	-	-	-	++	-	-
G-7	-	-	-	-	-	-
G-8	-	-	-	-	-	-
PR	-	-	-	-	-	++
RT-1	-	-	-	+	-	-
RT-2	-	-	-	-	-	++
RT-3	-	-	-	-	-	++
RT-4	-	-	-	++	-	-
RT-5	-	-	-	-	-	+
RT-6	-	-	-	-	-	-
RT-7/int-1	-	-	-	-	-	-
int-2	-	-	-	-	-	+++
int-3	-	-	-	-	-	++
int-4	-	-	-	+	-	++
E-1	-	-	-	-	-	-
E-2	-	-	-	+	-	-
E-3	-	-	-	-	-	-
E-4	-	-	-	-	-	-
E-5	-	-	-	-	-	-
E-6	-	-	-	-	-	-
E-7	-	-	-	-	+	-
E-8	-	-	-	-	+	-
E-9	-	-	-	-	-	-
VF-1	-	-	-	-	-	-
VF-2	-	-	-	+	-	-
VF-3	-	-	-	-	+	+++
VR-1	-	-	-	-	-	-
VR-2	-	-	-	-	-	+
X-1	-	-	-	+	-	-
X-2	-	-	-	++	-	-
T-1	-	-	-	++	-	-
T-2	-	+	-	+	-	-
R-1	-	+	-	-	-	-
R-2	-	-	-	-	-	-
N-1	-	++	-	-	-	-
N-2	-	-	-	-	-	-
N-3	-	-	-	-	-	-

1) ex: ex vivo (18 時間抗原刺激)

2) sti: 抗原刺激後短期間 (12 日間) 培養後

3) #22/CD8+ T 細胞については実験を行っていない。

採血後直ちに分離したCD4+ T細胞またはCD8+ T細胞を用いて、ELISPOT アッセイを行う *ex vivo* アッセイ（表中 *ex* の項）で検出される IFN- γ 産生細胞はエフェクター細胞であると考えられる。 Δ 5G 感染 154 週後の 2 頭のサルでは *ex vivo* アッセイによってほとんど IFN- γ 産生細胞が検出されなかった。そこで、抗原刺激をした後短期間培養することによって増殖することができる細胞、すなわちメモリー細胞がどのくらい維持されているかを、ペプチド抗原で 4 日間培養した後、8 日間さらに増殖させた細胞を用いて、ELISPOT アッセイを行った（表中 *sti* の項）。その結果、#22/CD4+ T 細胞（#22/CD8+ T 細胞については実験していない）、#23/CD4+ T 細胞、CD8+ T 細胞とも複数のペプチドプールに対して多数の IFN- γ 産生細胞が検出された。

5. Δ 5G 感染ザルに誘導された抗 Env 抗体エピソードの解析

上述したように、 Δ 5G 感染ザルに誘導された感

染防御免疫は個体ごとに異なり、糖鎖欠失に特異的な免疫誘導は認められなかった。この結果から糖鎖欠失が感染防御免疫の誘導に作用したというよりは、Env は標的細胞との相互作用（ウイルスレセプター、標的細胞表面レセプターとの結合等）に重要であるので、糖鎖欠失によってウイルス側の結合部位が変化し、標的細胞との相互作用が変化した可能性が推測された。そこで Env の構造変化を調べる目的で Δ 5G 感染ザルに誘導された抗 Env 抗体の認識エピソードの解析を行い、SIVmac239 感染ザルと比較した。感染早期に出現する抗体は接種したウイルス粒子を反映するものであると考えられるので、感染後 8 週の血漿を使用した。

結果を Fig. 3 に示す。 Δ 5G 感染と SIVmac239 感染では、7 つのドメインに抗体の反応が集中して見られた。しかし、その反応性には両者に違いがあった。最も違いが顕著だったのは V1V2 領域に対する反応で、この部分は Δ 5G の 5 カ所の糖鎖欠失のうち 2 カ所を含む。この部位のペプチド、Env12~15 に Δ 5G 感染ザル 5 頭の血漿がすべて反応したのに対し、SIVmac239 感染ザルでは 2 頭

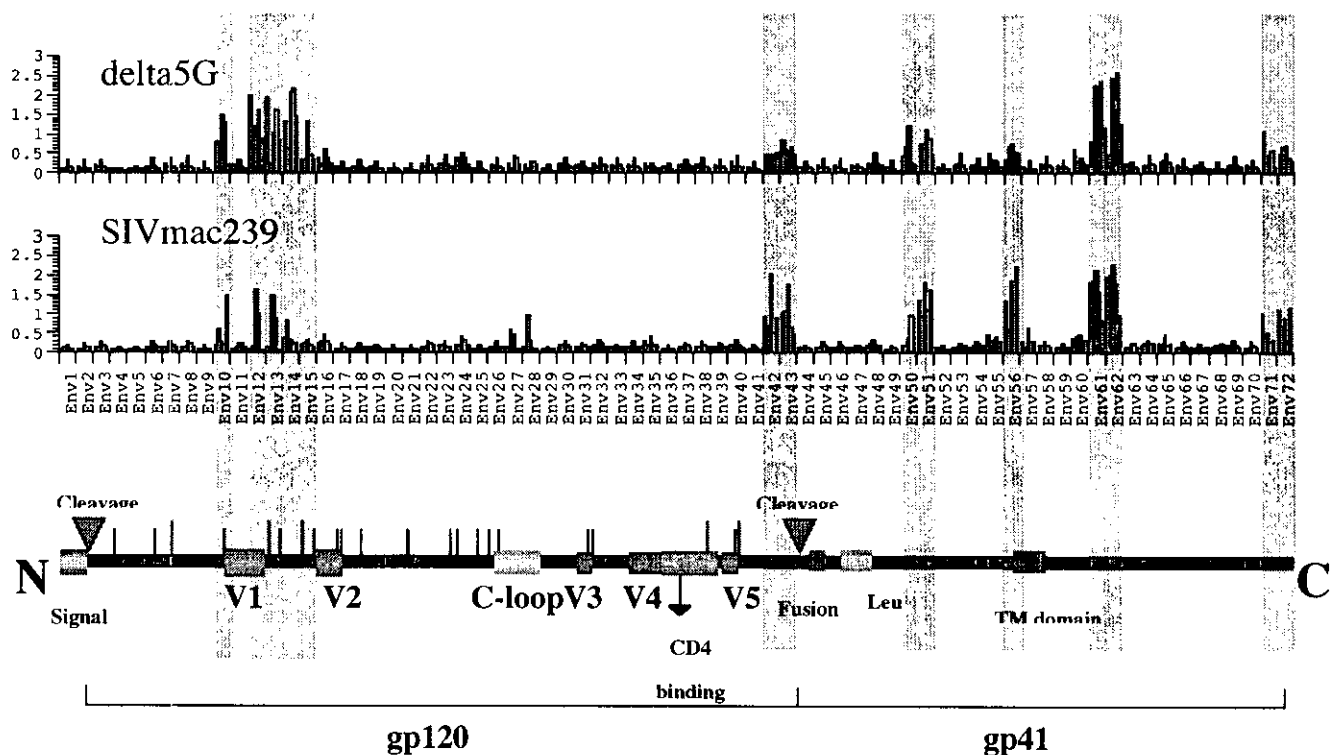


Fig. 4 Env ペプチド ELISA による抗体エピソードの比較

横軸に ELISA プレートに固相化した 72 本の Env オーバーラッピングペプチド、縦軸にそれぞれのペプチドに対する抗体反応性を ELISA における 490nm の吸光度を示した。7 カ所の抗体反応ドメイン（ブルー枠）が存在した。下段にはペプチド番号と対応するように Env の構造を示した。

だけしか反応しなかった。Δ5G の他の 3 カ所の糖鎖欠失部位には両感染ザルで抗体反応性の違いが見られなかった。また、gp120 の C 末から gp41 にわたる 3 つのドメインで Δ5G 感染は SIVmac239

感染より抗体反応性が低かった。

最も違いが顕著であった V1V2 領域について、さらに詳細に抗体エピトープの解析を行った (Fig. 4)。V1V2 の Env12~15 領域に対する 12 本のペ

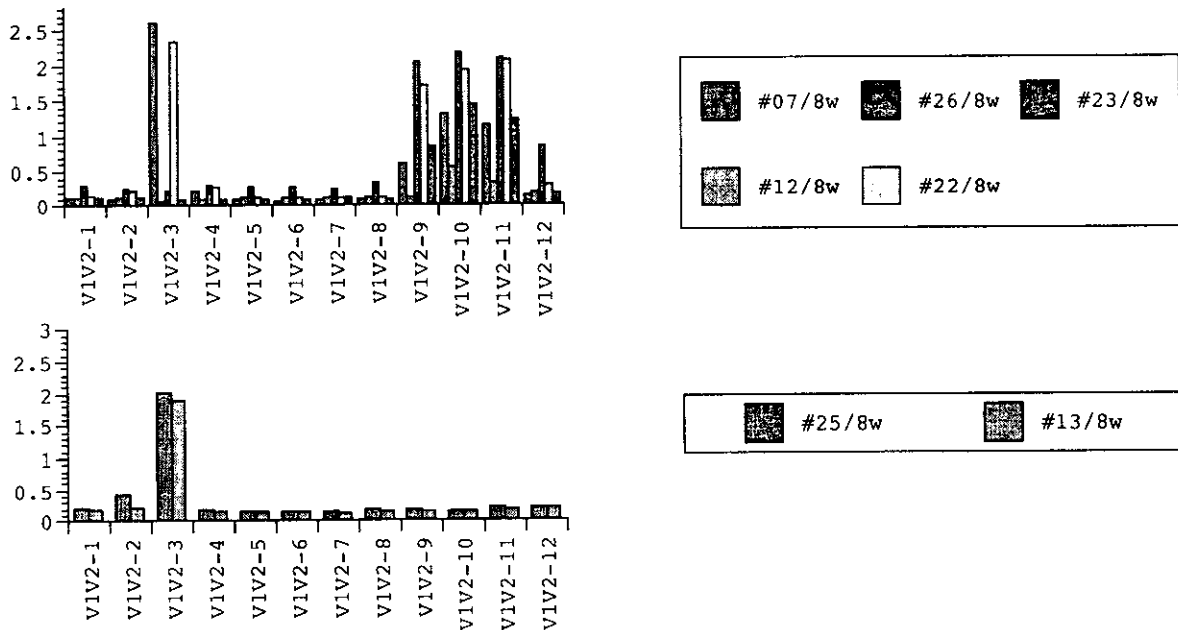
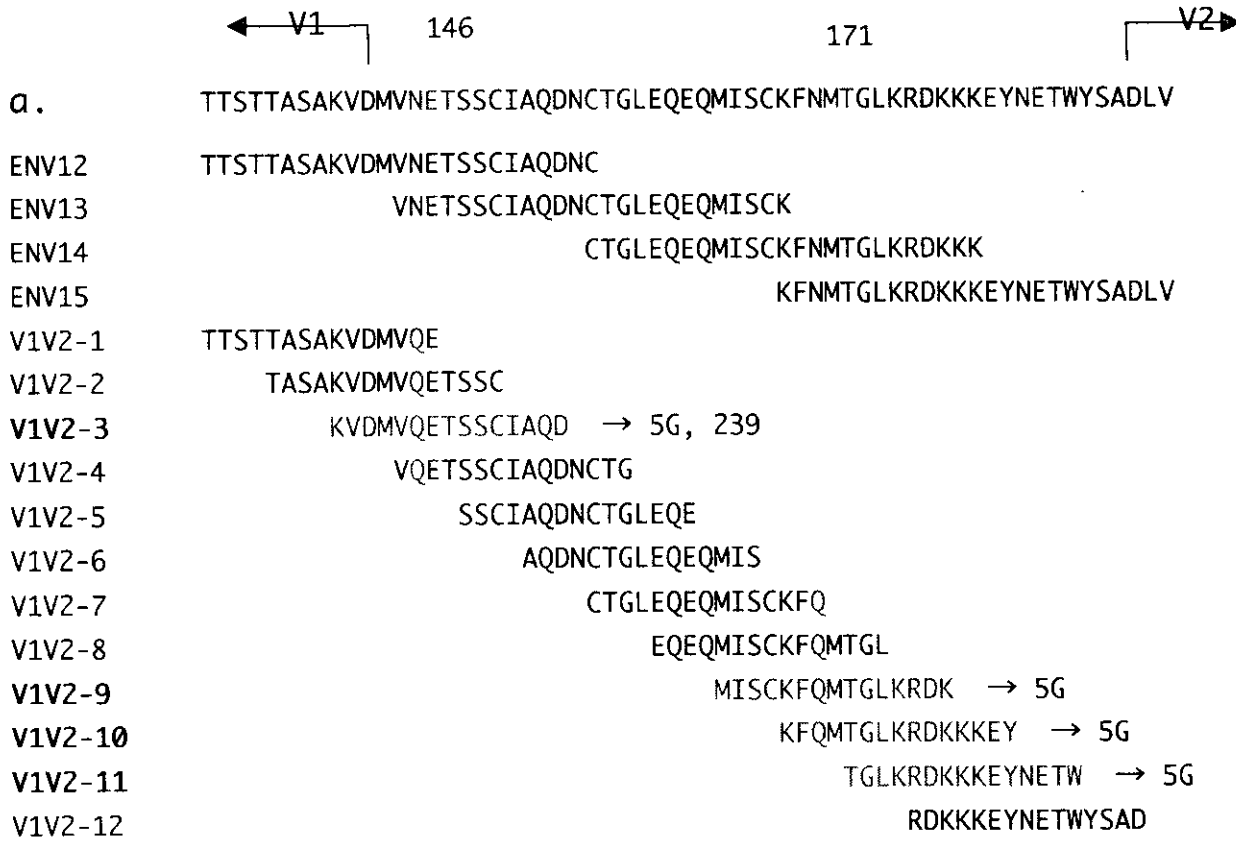


Fig.4 V1V2 領域に対する抗体反応性

a. V1V2 の Env12~15 領域をさらに 12 本のペプチド V1V2-1~V1V2-12 に分けた。V1V2-3 (青で表示) は Δ5G 感染、SIVmac239 感染の一部のサルで見られたが、V1V2-9,10,11 (緑で表示) はすべての Δ5G 感染ザルで検出された。b. ELISA における反応性