

その機能は p24 ペプチド群の No.1 フラクシオンに認められた。他のフラクシオンでは有意なデータは得られなかった。この結果は抗原特異的な Elispot 活性においても確認されつつある。

2) 細胞性免疫 P9CD エピトープのサルにおける発現と防御能との関連性の評価

①HBC コア粒子遺伝子ベクターに P9CD エピトープ遺伝子を組み込み *in vivo* で Mamu-A*08 サルに接種しその機能を解析すると極めて強いエピトープ特異的なキラー活性が得られた。

②この活性が誘導されたサルに SHIV を接種するとコントロールとしてのベクター投与群では強いウイルス血症と細胞の減少がみとめられたが P9CD キラー活性を示すサルの群ではその防御能が全く認められなかった。

D. 考察

HIV ワクチンの開発はその社会的なプライオリティーの高さに関わらず HIV のウイルスがこれまで人間が経験したことのないワクチン機能発現の中核である免疫組織を破壊することから困難な課題としてとらえられている。最近のワクチン開発の研究では液性免疫ワクチンの開発が臨床ウイルスの中和能を誘導することが難しいことから細胞性免疫誘導にその標的がシフトしている。現在第 2 世代ワクチンの開発としてリコンビナントベクターを組み込んだワクチンが開発されているが細胞性免疫によるチャレンジウイルスのコント

ロールがサルエイズモデルにおいて可能となったが、その持続が極めて短いことから細胞性免疫指向型ワクチンの有用性が疑問視され始めている。しかし、我々が rBCG をプライミングし、rDIs でブースターを賭けて得られた防御免疫誘導能はサル 14 頭用いたうちの 3 頭の群ではあるがウイルスの産生を完全に制御しているサルは 1 年以上にわたってウイルス血症を完全にコントロールしていることから我々のワクチン開発の有用性が示唆されている。しかし、このサルの 3 頭のうち 1 頭はウイルス血症のレベルが変化しながら認められることからウイルス特異的な免疫能を増幅させることがより効果的な防御能の誘導につながるかと予想される。したがって本研究では免疫増強に直結するワクチン抗原の発現の増強とその免疫学的特異性を明らかにすることにより防御免疫につながるウイルス抗原特異的なワクチン効果の誘導を至適化することを目的とする。

rBCG-HIV ワクチンの課題点として挿入外来遺伝子の発現が他の系に比べて比較的弱いことが指摘されており、これらの膨大な rBCG-HIV ワクチンの開発への努力にかかわらず、防御免疫を誘導できるような強発現の rBCG-HIV ワクチンの開発が成功していない。しかし、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示唆する。

さらに今回キラー活性の防御免疫との関わりについて P9CD エピトープに着目しエピトープ抗原提示に効果的な HBC コア粒子に組込んだキメラ抗原を作製した。この抗原を Mamu-A*08 サルに投与すると強い CTL 活性の誘導が Mamu-A*08 特異的に認められた。このことは細胞性免疫の誘導が単にエピトープに対する高い誘導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 CTL エピトープのみを発現しており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も示唆された。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点が残されていることを示している。今後これらの免疫能を詳細に検討することにより防御免疫能に直結した免疫能を検索可能にするように検討する。

E. 結論

効果的な HIV ワクチン開発における防御免疫の誘導に直結したウイルス特異的な免疫の誘導能について解析した。その結果ワクチン抗原としての有用性が明らかになっている BCG をベクターにして HIV リコンビナントワクチンを作製すると免疫の持続性に優れたワクチン抗原を作製することができるが、強い強い特異免疫を誘導することがそのみでは難しいことが課題として残されていた。本年度の研究でワクチン抗原の調整法を工夫することにより外来性抗原の発現を増強し、免疫誘導能の発現増強につながることを明らかにした。さらに細胞性免疫の誘導に関して防御免疫との関連性について研究し、細胞性免疫能のマーカーとしてのキラー活性がそのみで感染防御能を推測するのが問題であるのではないかと示唆され、今後の研究によってそのメカニズムを解析する。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

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. 口頭発表

Kazuhiro Matsuo, Tadashi Nakasone, Yasuyuki Izumi, Yasushi Ami, Takeaki Ohsu, Takaichi Hamano, Naoki Yamamoto, Shudo Yamazaki, and Mitsuo Honda. 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)

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

Ⅲ. 業績一覽

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
永井美之					
Kano, M., Matano, T., Kato, A., Nakamura, H., Takeda, A., Suzaki, Y., Ami, Y., Terao, K., <u>Nagai, Y.</u>	Primary replication of a recombinant Sendai viral vector in macaques.	J. Gen. Virol.	83	1377-1386	2002
Kano, M., Matano, T., Kato, A., Shioda, T., <u>Nagai, Y.</u>	Induction of HIV-1-specific neutralizing antibodies in mice vaccinated with a recombinant Sendai virus vector.	Jpn. J. Infect. Dis.	55	59-60	2002
Matano, T., Kano, M., Takeda, A., Nakamura, H., Nomura, N., Furuta, Y., Shioda, T., <u>Nagai, Y.</u>	No significant enhancement of protection by Tat-expressing Sendai viral vector-booster in a macaque AIDS model.	AIDS	in press		
森一泰					
Xing, H. Q., Moritoyo, T., <u>Mori, K.,</u> Tadakuma, K., Sugimoto, C., Ono, F., Hayakawa, H., Izumo, S.	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		

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sugimoto, C., Tadakuma, K., Otani, I., Moritoyo, T., Akari, H., Ono, F., Yoshikawa, Y., Sata, T., Izumo, S. <u>Mori, K.</u>	Nef gene is required for robust productive infection of Simian Immunodeficiency Virus in T-cell-rich paracortex in lymph nodes.	J Virol	77	4169-	2003
Villinger, F., Mayne A. F., Bostik P., <u>Mori K.,</u> Jensen P. E., Ahmed R. Ansari, A.	Evidence for antibody mediated enhancement of SIV gag antigen processing and cross presentation in SIV infected rhesus macaques	J Virol	77	10-24	2003
Villinger, F., Brice, G. T., Mayne, A. F., Bostik, P., <u>Mori, K.,</u> June, C. H. Ansari, A	Adoptive transfer of SIV naive autologous CD4+ cells to macaques chronically infected with SIV is sufficient to induce long term non progressor status.	Blood	99	590-599.	2002
俣野哲朗					
Kano, M., <u>Matano, T.,</u> Kato, A., Nakamura, H., Takeda, A., Suzaki, Y., Ami, Y., Terao, K., Nagai, Y.	Primary replication of a recombinant Sendai viral vector in macaques.	J. Gen. Virol.	83	1377-1386	2002

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kano, M., <u>Matano, T.</u> , Kato, A., Shioda, T., 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
<u>Matano, T.</u> , Kano, M., Takeda, A., Nakamura, H., Nomura, N., Furuta, Y., Shioda, T., Nagai, Y.	No significant enhancement of protection by Tat-expressing Sendai viral vector-booster in a macaque AIDS model.	AIDS	in press		
<u>Matano, T.</u>	Recent advances in AIDS vaccine preclinical trials: challenges against the chronic disease.	Current Topics in Virology	in press		
宮澤正顕					
Sugita, J., Ohtani H., Mizoi T., Saito K., Shiiba K., Sasaki I., Matsuno S., Yagita H., <u>Miyazawa M.</u> , Nagura H.	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
<u>宮澤正顕</u>	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
<u>宮澤正顕</u>	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

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
木村彰方					
Sakaguchi M, Nakayama T, Kaku H, Taniguchi K, Saito S, <u>Kimura A,</u> Inoue S.	Analysis of HLA in children with gelatin allergy.	Tissue Antigens	59	412-416	2002
Hori H, Hattori S, Inouye S, <u>Kimura A,</u> 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.	110	652-658	2002
Okamoto K, Makino S, Yoshikawa Y, Takaki A, Nagatsuka Y, Ota M, Tamiya G, <u>Kimura A,</u> Bahram S, Inoko H.	Identification of IkBL as the second MHC-linked susceptibility locus for Rheumatoid Arthritis.	Am. J. Hum. Genet.	72	303-312	2003
Shao W, Yasunami M, Takahashi M, Shibata H, Hamaguchi K, Sakata T, Ota M, Katsuyama Y, Inoko H, <u>Kimura A:</u>	Analysis of HLA-B polymorphism in insulin dependent diabetes mellitus in Japanese.	MHC.	9	163-169	2003

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
保富康宏					
Niikura, M., Takamura, S., Kim, G., Kawai, S., Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I., Tian-Cheng Li, Takeda, N. <u>Yasutomi, Y.</u>	Chimeric recombinant hepatitis E virus -like particles as an oral vaccine vehicle presenting foreign epitopes.	Virology	293	273-280	2002
Imanaka Yoshida, K. Hiroe, M., <u>Yasutomi, Y.,</u> Maki, S., Tsuchiya, T., Noda, N., Toyoaki, T., Nishikawa, T., Ishiyama, S., Sakakura, T. Yoshida, T.	Tenascin-C is a Useful Marker for Disease Activity in Myocarditis.	J.Pathol.	197	388-394	2002
Mukai, K., <u>Yasutomi, Y.,</u> Watanabe, M., Kenjo, A., Aota, T., Wang, L., Nishikawa, H., Fujita, T., Kuribayashi, K. Shiku, H.	HER2 peptide-specific CD8+ T cells are proportionally detectable long after multiple DNA vaccinations.	Gene Ther	9	879-888	2002

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
本多三男					
Sakaue G, Hiroi T, Nakagawa Y, Someya K, Iwatani K, Sawa Y, Takahashi H, <u>Honda M.</u> 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	170	495-502	2003