

厚生労働科学研究費補助金  
エイズ対策研究事業

# HIV 感染予防に関する研究班

平成15年度 総括・分担研究報告書

平成16年 3 月

主任研究者

佐多 徹太郎

(国立感染症研究所)

平成15年度エイズ対策研究事業  
「HIV感染予防に関する研究」班  
班員名簿

研究者名	所属機関	職名
佐多徹太郎	国立感染症研究所感染病理部	部長
俣野 哲朗	東京大学大学院医学系研究科・微生物学講座	助教授
三浦 智行	京都大学ウイルス研究所・感染症モデル研究センター	助教授
本多 三男	国立感染症研究所エイズ研究センター 第一研究グループ	グループ長
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
庄司 省三	熊本大学大学院・医学薬学研究部・薬学生化学分野	教授
向井鏡三郎	国立感染症研究所・筑波医学実験用霊長類センター 第1室	室長
保富 康宏	三重大学医学部・生体防御医学講座	助教授
神奈木真理	東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科 免疫治療学研究室	教授
牧野 正彦	国立感染症研究所・ハンセン病研究センター 病原微生物部	部長
横田 恭子	国立感染症研究所・免疫部第1室	室長
横幕 能行	千葉大学医学部附属病院・感染症管理治療部	助手
中島 典子	国立感染症研究所感染病理部	主任研究官
高橋 秀実	日本医科大学医学部・微生物学免疫学教室	教授

# I. 総括研究報告書

## 目 次

1. HIV 感染予防に関する研究  
総括研究報告書（平成 15 年度） . . . . . 1  
主任研究者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所感染病理部）
  
2. プライムブーストワクチンによる誘導免疫の慢性エイズ発症防御効果  
に関する研究 . . . . . 7  
分担研究者：俣野 哲朗（東京大学大学院医学系研究科微生物学講座）
  
3. 遺伝子改変 SHIV を用いた弱毒生ワクチンと半生 DNA ワクチンの開発 . . . . . 15  
分担研究者：三浦 智行（京都大学ウイルス研究所）
  
4. BCG と DIs ワクチンの実用化に関する研究 . . . . . 19  
分担研究者：本多 三男（国立感染症研究所エイズ研究センター）
  
5. 糖鎖変異ウイルス感染に対する免疫応答の解析とワクチンへの応用 . . . . . 27  
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）
  
6. HIV-1 coreceptor の特殊立体構造に対する自己抗体誘導による  
HIV-1 感染防止法の開発 . . . . . 33  
分担研究者：庄司 省三（熊本大学大学院医学薬学研究部薬学生化学）
  
7. SAIDS 脳炎発症動物モデルを用いたワクチン開発に関する研究 . . . . . 39  
分担研究者：向井 鏡三郎（国立感染症研究所筑波霊長類センター）
  
8.  $\alpha$  抗原を用いたワクチンの増強作用に関する研究 . . . . . 45  
分担研究者：保富 康宏（三重大学医学部）

9. T細胞機能分子を介する HIV-1 感染防御	5 1
分担研究者：神奈木 真理（東京医科歯科大学医歯学総合研究科）	
1 0. 樹状細胞の DC-SIGN と感染防御機構	5 5
分担研究者：牧野 正彦（国立感染症研究所病原微生物部）	
1 1. 強力なワクチン効果を賦与するための T細胞活性化因子の解析	5 9
分担研究者：横田 恭子（国立感染症研究所免疫部）	
1 2. CTL による防御免疫の評価系に関する研究	6 5
分担研究者：横幕 能行（千葉大学医学部附属病院）	
1 3. 神経幹細胞を用いた HIV 感染動態の解明	7 1
分担研究者：中島 典子（国立感染症研究所感染病理部）	
1 4. HGV のエイズ発症遅延機構の解明に関する研究	7 5
分担研究者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所感染病理部）	
1 5. 粘膜組織における感染伝播と CTL を主体とした感染制御の解明 に関する研究	7 9
分担研究者：高橋 秀実（日本医科大学微生物学免疫学教室）	

## 1. HIV 感染予防に関する研究

主任研究者 佐多 徹太郎（国立感染症研究所感染病理部）

研究要旨 エイズ克服には HIV 感染の予防に優るものではなく、なかでもワクチン開発が最重要課題である。一方で防御免疫機構やいまだ明らかではない HIV 感染病態の解明はワクチン開発のみならず HIV 感染予防にとっても重要な課題となる。本年度の研究結果として、DNA/SeV-(SIVmac239)Gag プライムブーストワクチン用いて CTL 誘導型エイズワクチン開発の合理性が示唆された。タイ型 HIV-1Gag を組込んだ BCG-DIs プライムブーストワクチンのヒトへの投与方法が検討された。弱毒生ワクチンの安全性が検討され、弱毒 SHIV にサイトカイン遺伝子を組込むことについては詳細な検討が必要となった。d-5G ウイルスを用いた糖鎖の影響は初期感染防御では差はなかったが攻撃後の set point における感染抑制効果は低かった。cDDR5-MAP 抗原を用いた自己抗体誘導ワクチンは HIV-1 の感染・発症制御に有効であると考えられた。自己細胞を用いるワクチン作製に使うウイルス増殖細胞の候補がみつかった。抗酸菌  $\alpha$  抗原がワクチンのアジュバントとして有効である可能性が示された。HIV-1 感染の初期過程の抑制につながるシグナルは CD28 と ICOS の刺激を介し下流に伝達することが分かった。変異導入 DC-SIGN 発現細胞株を樹立し解析した結果、抗酸菌は DC-SIGN を介して樹状細胞に感染することが明らかとなった。Yeast VLP とウイルスベクターを組み合わせることにより、T 細胞の *in vitro* でのプライミングが樹状細胞により可能であることが明らかとなった。臨床検体の CTL 逃避機構の解析が可能となった。エイズ発症遅延機構解明を目的として HGV の感染性クローンを作製したが、蛋白発現はみられなかった。HIV 脳炎の *in vivo* モデルとして神経向性 SIV クローンを感染する培養細胞系が確立できた。HIV 感染防御に関わる小腸上皮内リンパ球の役割を検討し、活性化した粘膜上皮内のリンパ球が全身へのウイルス拡散防御の主役で、直接的にウイルス感染細胞の制御を担うのが、CD8 $\alpha\beta$ 陽性の CTL と CD8 $\alpha\alpha$ 陽性 $\gamma\delta$  T 細胞である可能性が強く示唆された。来年度の成果がより期待できる結果が得られた。

分担研究者	保富康宏 三重大学医学部生体防御医学講座 助教授
俣野哲朗 東京大学大学院医学系研究科微生物 学講座助教授	神奈木真理 東京医科歯科大学大学院医歯学 総合研究科教授
三浦智行 京都大学ウイルス研究所感染症モデ ル研究センター助教授	牧野正彦 国立感染症研究所ハンセン病研究 センター部長
本多三男 国立感染症研究所エイズ研究センタ ー第一研究グループ長	横田恭子 国立感染症研究所免疫部室長
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	横幕能行 千葉大学医学部附属病院助手
庄司省三 熊本大学大学院医学薬学研究部教授	中島典子 国立感染症研究所感染病理部主任 研究官
向井鎌三郎 国立感染症研究所筑波霊長類セン ター室長	高橋秀実 日本医科大学医学部微生物学免疫 学教室教授

## A. 研究目的

HAARTの開発によりHIV感染者の予後は改善されたが、コンプライアンスやコストそして薬剤耐性などの問題があるため、エイズ克服にはHIV感染の予防に優るものはなく、なかでもワクチン開発が最重要課題である。一方で防御免疫機構やいまだ明らかではないHIV感染病態の解明はワクチン開発のみならずHIV感染予防にとっても重要な課題である。本研究班ではわが国のサルを用いたエイズワクチン研究者やHIV感染防御免疫機構やHIV感染病態研究者によるHIV感染予防を目的とし研究を推進することにより、ヒトでの実用化に耐えるワクチン開発研究を行うことを目的とする。

## B. 研究方法

### (1) サルを用いた有効かつ安全なワクチン開発

DNA/SeV-(SIVmac239)Gagプライムブーストワクチン接種サルにSIVチャレンジ実験を行い、防御効果および誘導免疫およびCTLエピソードを解析する(俣野)。タイ型ワクチン投与サルにおける細胞性及び液性免疫の確認と防御免疫に最小必要量の検討を行う(本多)。弱毒生ワクチン株のサルにおける安全性の確認実験、各種サイトカイン挿入SHIVやHIV-1Envの糖鎖欠損SHIVおよび半生DNAワクチンの改良による感染性・免疫誘導能・感染防御能について調べる(三浦)。Env vaccineをもとにその他の遺伝子を加えたワクチン、d-5Gをtemplateとした糖鎖欠失変異ウイルスおよび抗原性の異なるチャレンジウイルスを作成し、防御効果を検討した(森)。HIV-1 coreceptorの特殊立体構造peptide(cDDR5-MAP)の構築と単クローン抗体の作出そして抗HIV活性やケモタキシス活性を調べるとともにサルへの免疫を行う(庄司)。サル由来細胞にSIVcm株を感染させ増殖細胞を同定し、抗原となる細胞株を探索する(向井)。

### (2) ワクチン免疫による防御機構の解明

アジュバント開発として抗酸菌 $\alpha$ 抗原遺伝子とエイズウイルスDNAワクチンをマウスに混合接種し抗体産生やCTL誘導能を検討する(保富)。HIV-1抑制シグナルを伝えるCD4陽

性T細胞上の表面分子を検索し、これを介したHIV-1抑制機序を解明する(神奈木)。DC-SIGN発現をHIVおよび抗酸菌のリガンドを用いてブロックしたとき病原体の樹状細胞内侵入に及ぼす影響をFACSで検討する(牧野)。種々のHIVのワクチン候補を用いて樹状細胞とT細胞の相互作用を阻害あるいは修飾するT細胞の活性化能や誘導サイトカイン等を細胞レベルおよびDNAアレイで解析する(横田)。CTL逃避機構の解明を目的として多くの臨床検体由来のgag-polを組み込むHIV-1ベクターを用いて標的細胞を作製する(横幕)。

### (3) いまだ明らかとなっていないHIV感染病態の解析

HGV全長DNAクローンを作製し、またHIV感染者でのHGVの存在を調べ、HGVによるエイズ発症遅延機構を解明する(佐多)。HIV脳炎の病態解明を目的としin vitroで分化させたサルの神経幹細胞培養系のSIVないしSHIVに対する感受性評価および神経幹細胞への感染性に影響を及ぼす因子を解析する(中島)。HIV感染防御に関与する小腸上皮内リンパ球の役割を検討する目的でCTL-TCR発現遺伝子改変マウスの粘膜組織におけるTCR発現細胞を解明し、TCRの認識抗原発現組み換えワクチニアウイルスの接種によるTCR発現細胞の動態を探る(高橋)。

### (倫理面への配慮)

健康人や感染者の末梢血単核球の利用に関しては研究者の所属する機関の倫理委員会で承認され、また動物実験についても、各施設の動物実験委員会の承認を受けてから行った。また、研究の実施にあたっては、各施設の諸内規や作業方式に従って、動物愛護の精神で動物に与える苦痛の軽減と排除に勤めた。

## C. 研究結果

### (1) サルを用いた有効かつ安全なワクチン開発

ワクチン接種後のチャレンジ実験では、8頭中5頭においてSIV複製制御が認められた。これら5頭と感染制御が認められなかった3頭の間では、末梢血中Gag特異的CTLレベルには有意差はなかった。しかし、チャレンジ後5週

目の血漿由来 SIV genome の gag 領域塩基配列の解析では、前者 5 頭においてのみ、各々 1 つの CTL エスケープ変異が dominant となっており、そのエピトープ特異的 CTL が wild-type SIV の迅速な排除に中心的役割を果たしたことが明らかとなった (俣野)。HIV-1 CRF01\_AE Gag 遺伝子を組込んだ組換え BCG ワクチンと組換え DIs ワクチンを作成し検討したところ、ヒトへの投与可能量 0.1mg BCG と  $10^7$  pfu DIs で抗原特異的  $\gamma$  インターフェロン T 細胞の数が 400~600 ELISpot 検出された。DIs ウイルスベクターはほ乳類細胞では増殖しないが外来性遺伝子の発現は充分に行えることを明らかにした (本多)。弱毒生ワクチン元株をサルで 5 代個体継代行ったが強毒化しなかった。nef 欠失弱毒 SHIV 接種によりワクチン接種後 4 週で強毒 SHIV 攻撃接種に対してある程度の防御効果が誘導されていた。nef 欠失部位へのインターフェロン  $\gamma$  遺伝子組込みにより、攻撃接種ウイルスに対して増殖抑制ないし増幅の両面が明らかとなった。インターロイキン 2 遺伝子を挿入した SHIV 半生 DNA ワクチンは強毒 SHIV 攻撃接種に対してある程度の感染防御効果があることを示した (三浦)。アカゲザル 4 頭に SIVmac239 Env または 5 本の糖鎖を欠く d5G-Env を抗原として DNA ワクチンによる prime 免疫、組み換え vaccinia による boost 免疫をおこない、8 週後、各 2 頭に SIVmac239 と d-5G を静脈内接種した。初期感染のピークは SIVmac239 感染では非免疫ザル感染に比べて約 1/10 低下し、d-5G 感染では 1/10-1/100 に低下したが、抑制効果の差はみられなかった。set point における抑制効果については SIVmac239 感染に対して、Wt-Env ワクチン群は viral load が 1/10 低かったが、d-5G 感染に対しては両ワクチン群に差はみられなかった (森)。HIV-1 coreceptor CCR5 の特殊立体構造をミミックした cDDR5-MAP を調製し、カニクイサルで抗体誘導活性を検討した。cDDR5-MAP 抗原は細胞表面の native CCR5 を認識する特殊抗体を誘導し、さらに non-clade B HIV-1 R5 ウイルス対しても感染防止効果を示すことが明らかになった (庄司)。サルエイズ脳炎脳組織から樹立したモノサイト系 SIV 産生細胞株 2 株

(CM1,CM5) 由来のウイルスは、サル骨髄細胞に感染させると CM 様細胞のコロニーが形成され、分裂増殖し、培養上清中に SIVcm の産生が確認された (向井)。

### (2) ワクチン免疫による防御機構の解明

DNA 導入により HIVenv 抗原と  $\alpha$  抗原の発現は同一組織にみられた。 $\alpha$  抗原添加群では IL-4 産生が低下し IFN- $\gamma$  が増加を示し、また CTL が誘導され、BCG の感作でより明らかとなった。免疫マウスに HIVenv 組み込みワクシニアウイルスを接種したところ、 $\alpha$  抗原遺伝子添加、BCG 感作群でウイルスをコントロールしていることが示され、その接種時の脾細胞は HIVenv 特異的に高い細胞傷害活性を示した (保富)。HIV-1 抑制シグナルを伝える CD4 陽性 T 細胞上の表面分子として、CD28 ファミリー分子として知られている CD28, CTLA-4, ICOS, PD1 について解析を行った。ヒト CD28 と ICOS に対するモノクローナル抗体が R5 あるいは X4 HIV-1 株の急性感染に引き続くウイルス産生を有意に抑制し、細胞増殖抑制や細胞毒性を示さなかった (神奈木)。DC-SIGN 変異発現細胞株を樹立し GFP 標識 BCG 菌を感染させると感染し、細胞内ライソゾームまで侵入していた。末梢血由来の DC を BCG 菌で刺激すると活性化した。またらい菌でパルスすると自己の T 細胞を活性化した。菌膜に存在する MMP-II と DC-SIGN が結合することが示唆された (牧野)。樹状細胞を成熟化させる活性を有する Yeast VLP とウイルスベクターを組み合わせるにより、T 細胞の *in vitro* でプライミングが可能であることが明らかとなった (横田)。臨床検体由来 gag-pol を効率よく感染性クローンにクローン化する方法を確立し、実際にタイ流行株を 6 クローン樹立した (横幕)。

### (3) いまだ明らかとなっていない HIV 感染病態の解析

HGV のエイズ発症遅延機構を調べるため HGV の感染性クローンの作製を行ったが、ゲノムは検出できたが蛋白レベルでの発現はみられなかった (佐多)。HIV 脳症の動物モデルである SIV 脳症の病態を解析できる *in vitro* の培養系をサル胎児脳由来の神経幹細胞を用いて確立



した。マクロファージ向性 SIV の中でも神経向性の SIV17E/Fr の感染性が最も高く、EGFP 遺伝子を挿入したクローンを感染させると GFP 陽性細胞は SIVp27 抗原陽性で経時的に増加した。アストロサイトのほか、ニューロンでも GFP 陽性細胞が認められた (中島)。H-2D<sup>d</sup>/P18-I10 テトラマーを用いて、特異的 CTL を発現した細胞数を解析したところ、未免疫 Tg-RT1 の脾臓や腸管膜リンパ節 (MLN) における T 細胞は全て  $\alpha\beta$  型 TCR を発現しているのに対し、粘膜免疫を反映する IEL は CD8 $\alpha\alpha$  と CD8 $\alpha\beta$  型双方からなる  $\alpha\beta$ TCRT 細胞と CD8 $\alpha\alpha$  型  $\gamma\delta$ TCR 発現 T 細胞によって構成されることが判明した (高橋)。

#### D. 考察

ワクチン抗原エピトープ選択の理論的基盤の確立には、SIV 複製制御の鍵をにぎる有能な CTL の本体についての検討が必要である (俣野)。組換え BCG-HIV ワクチンと組換え Dis-HIV ワクチンのプライムブーストによるワクチン効果が得られることを明らかにしたので、その実用化に向けてワクチンレジメンの至適化と安全性について検討する (本多)。弱毒生ワクチン接種による初期誘導される基本免疫系の重要性和獲得免疫系まで誘導される時間が必要であると考えられた。個々のサイトカイン導入ワクチンでは個体レベルでの今後の詳細な解析の必要性ある (三浦)。攻撃後の set point における感染抑制効果は、SIVmac239 感染に対しては wt-Env ワクチンが d-5G ワクチンより強い感染抑制効果があったので、この原因について SIV 特異的免疫の解析を行う (森)。cDDR5-MAP 抗原がサル個体の中で HIV-1RS の感染をブロックすることのできる特殊抗体を誘導することを明らかにした (庄司)。サルエイズ脳炎脳組織から樹立したモノサイト系 SIV 産生細胞株 2 株 (CM1, CM5) 由来のウイルスは、サル骨髄細胞において SIV を産生し約 2 ヶ月間増殖性を保っていることから、エイズ脳炎脳組織の血管周囲にみられるマクロファージ系細胞の集簇の由来に関して、骨髄系の細胞が 1 つの候補となる可能性が示唆された (向井)。

抗酸菌由来  $\alpha$  抗原は安全で、BCG 感作により

ワクチン増強作用があり現実的なアジュバントとなりうるので、組換え蛋白の作製を進める (保富)。CD28 および ICOS 抗体による HIV-1 抑制は、少なくとも HIV-1 レセプター発現変化によるものでなく、その詳細は今後の解析が必要である (神奈木)。HIV-1 と抗酸菌はともに DC-SIGN に結合したので感染発症を阻止する新しい予防法の開発が可能と考えられた (牧野)。樹状細胞による交差提示による CD8 陽性 T 細胞の *in vitro* の系はワクチン抗原の免疫誘導能の評価およびその効率の改善を図る方法として有用であると考えられる (横田)。CTL エピトープ領域のアミノ酸変異を検討することが可能となった (横幕)。

HGV 感染性クローン構築に新たな方法が必要である (佐多)。マイクログリアフリーの培養系でも SIV は脳固有細胞に感染することがわかった (中島)。直接にウイルス感染細胞の制御を担うのが、ペプチド抗原特異的な CD8 $\alpha\beta$  陽性の CTL と、隣接する CD8 $\alpha\alpha$  陽性  $\gamma\delta$  T 細胞であることが強く示唆された。HIV 感染を制御するためには、粘膜組織における従来の CTL のみならず  $\gamma\delta$  T 細胞を活性化するようなワクチンを開発することが重要であることが明らかとなった (高橋)。

#### E. 結論

CTL 誘導型エイズワクチン開発および構造タンパク Gag 由来のエピトープをワクチン抗原とすることの合理性が示唆された (俣野)。HIV-1 CRF01\_AE Gag を組込んだプライムブーストワクチンは組換え BCG を初回免疫、組換え Dis 2 回皮内接種をすることによってヒト使用ワクチンとして機能する可能性がある (本多)。弱毒生ワクチンの安全性の一つが示唆され、また弱毒 SHIV にサイトカインを組込むことの是非については、今後も詳細に検討する必要がある (三浦)。ウイルスの糖鎖による影響は感染初期防御では差異はなかったが set point における感染抑制効果は d-5G ワクチンは低かった (森)。cDDR5-MAP 抗原を用いたワクチン戦略は HIV-1 の感染・発症制御に有効であると考えられる (庄司)。自己細胞を使うワクチンに用いる

ウイルス増殖細胞の候補が見つかった（向井）。抗酸菌 $\alpha$ 抗原がワクチンのアジュバントとして有効である可能性が示された（保富）。CD28とICOSの刺激は、HIV-1感染の初期過程の抑制につながるシグナルを下流へ伝達することが分かった（神奈木）。変異導入DC-SIGN発現細胞株を樹立し解析した結果、抗酸菌との関わりがDC-SIGNを介して樹状細胞に感染することが明らかとなった（牧野）。樹状細胞の成熟活性を有するYeast VLPとウイルスベクターを組み合わせることにより、T細胞の*in vitro*プライミングが可能であることが明らかとなった（横田）。臨床検体のCTL逃避機構の解析が可能となった（横幕）。HGVの感染性クローンを作製したが、蛋白発現はみられなかった（佐多）。*In vivo*でNeurovirulentなSIVクローンが感染する*in vitro*の培養系を確立できた（中島）。活性化した粘膜上皮内のリンパ球IELが全身へのウイルス拡散防御の主役で、直接的にウイルス感染細胞の制御を担うのが、CD8 $\alpha\beta$ 陽性のCTLとCD8 $\alpha$ 陽性 $\gamma\delta$ T細胞である可能性が強く示唆された（高橋）。

#### F. 健康危険情報

とくになし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

各分担研究者の報告書の項を参照。

##### 2. 学会発表

各分担研究者の報告書の項を参照。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

各分担研究者の報告書の項を参照。

##### 2. 実用新案登録

各分担研究者の報告書の項を参照。

## II. 分担研究報告書

## 2. プライムブーストワクチンによる誘導免疫の慢性エイズ発症防御効果に関する研究

分担研究者 俣野 哲朗 東京大学大学院医学系研究科微生物学講座助教授

研究要旨 エイズワクチン開発は、国際的最重要課題の一つである。しかし現状では、エイズ発症阻止のためにどのような免疫反応を誘導すべきかという基本的課題が解決していない。本研究は、HIV 複製制御に重要と考えられているウイルス特異的細胞傷害性 T リンパ球(CTL)に主眼をおく。近年、CTL 誘導型エイズワクチン開発研究が進展し、サルヒトキメラ免疫不全ウイルス(SHIV89.6P)感染急性エイズサルモデルでの前臨床試験において、ワクチンによるウイルス複製制御が可能であることが報告された。しかし最近、同じワクチン手法を用いた研究にて、ヒト HIV-1 感染症をより反映すると考えられるサル免疫不全ウイルス(SIV)感染慢性エイズサルモデルでのウイルス複製制御は困難であることが報告され、元来宿主免疫が制御できない慢性ウイルス感染症の制御の難しさがあらためて認識されたところである。さらに、CTL 誘導のためのワクチンデリバリーシステムの進歩にもかかわらず、用いるべき抗原・エピトープについては結論がでていない。我々はこれまで、国際的にも有数の CTL 誘導能を有する DNA プライム・センダイウイルス(SeV)ベクターブーストワクチンシステムを開発し、SHIV 感染急性エイズモデルにおける有効性を明らかにしてきた。本研究では、慢性エイズを引き起こすエイズウイルスの複製を、CTL 誘導ワクチンにより制御することが可能であるかどうかを検証することを目的として、SIVmac239 感染サル慢性エイズモデルにおいて、DNA プライム・Gag 発現 SeV (SeV-Gag)ブーストワクチンの感染初期の防御効果について解析した。ワクチン接種後のチャレンジ実験では、8 頭中 5 頭において SIV 複製制御が認められた。感染制御が認められた 5 頭と認められなかった 3 頭の間では、末梢血中 Gag 特異的 CTL レベルには有意な差は認められなかった。しかし、チャレンジ後 5 週目の血漿由来 SIV genome の gag 領域塩基配列の解析では、前者 5 頭においてのみ、各々 1 つの CTL エスケープ変異が dominant となっており、そのエピトープ特異的 CTL が wild-type SIV の迅速な排除に中心的役割を果たしたことが明らかとなった。本研究は、「ワクチンにより有能な CTL を誘導することができれば SIV 複製制御が可能であること」を、世界に先駆けて示すものであり、したがって CTL 誘導ワクチンの合理性を意味するものである。さらに、構造上保存されるべき領域が広いと考えられる Gag タンパクは、CTL 誘導ワクチン抗原として有利である可能性が示唆された。

### A. 研究目的

1980 年代前半のエイズ症例の報告以来、HIV-1 感染者数は増加の一途をたどっており、エイズワクチン開発は国際的最重要課題の一つである。これまでのエイズワクチン開発研究では、ワクチン手法の開発に重点がおかれ、論理的根拠を軽視した trial が先行してきた。「自

然経過において、なぜ宿主免疫が HIV-1 複製を制御できないのか」あるいは「エイズ発症阻止のためにどのような免疫反応を誘導すべきか」という重要かつ基本的課題は、現在においても解決していない。

1990 年代に、HIV 複製制御におけるウイルス特異的細胞傷害性 T リンパ球(CTL)の重要性

が指摘されたことから、CTL 誘導型エイズワクチン開発研究が進展し、2000 年代になって、サルヒトキメラ免疫不全ウイルス(SHIV89.6P)感染急性エイズサルモデルでの前臨床試験において、ワクチンによるウイルス複製制御が可能であることが報告された。しかし最近、同じワクチン手法を用いた研究にて、ヒト HIV-1 感染症をより反映すると考えられるサル免疫不全ウイルス(SIV)感染慢性エイズサルモデルでのウイルス複製制御は困難であることが報告され、元来宿主免疫が制御できない慢性ウイルス感染症の制御の難しさがあらためて認識されたところである。

我々はこれまで、CTL 誘導を基本とするエイズワクチン開発に主眼をおき、国際的にも有数の CTL 誘導能を有する DNA プライム・センドライウイルス(SeV)ベクターブーストワクチンシステムを開発し、SHIV 感染急性エイズモデルにおける有効性を明らかにしてきた。本研究では、「慢性エイズを引き起こすエイズウイルスの複製を、CTL 誘導ワクチンにより制御することが可能かどうか」を検証することを目的として、SIVmac239 感染サル慢性エイズモデルにおいて、DNA プライム・Gag 発現 SeV (SeV-Gag)ブーストワクチンの感染初期の防御効果について解析した。つまり、感染の自然経過において、CTL は HIV 増殖抑制に中心的役割を担っているものの、HIV 複製制御・排除には至らないが、「ワクチンによる CTL 増強により、感染初期の HIV 複製制御・排除が可能となりうるか」ということに着目して研究を行った。

CTL 誘導ワクチンの手法としては、デリバリーシステムの選択と使用抗原の選択とに分けて考えることができる。前者については、DNA ワクチンと各種組換えウイルスベクターとを併用したプライム・ブースト法により、高い CTL 誘導効率が得られている。しかし、このようなデリバリーシステムの進歩にもかかわらず、後者の抗原エピトープの選択法については、研究が進んでおらず結論がでていない。そこで本研究は、ワクチン抗原エピトープ選択のための論理的基盤の確立も目的としている。

## B. 研究方法

アカゲサル 8 頭に、DNA プライム・SeV-Gag ブーストワクチン接種を行った後、SIV チャレンジ実験を行った。DNA ワクチンプライムとしては、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーターにより SIVmac239 の Env・Nef 以外の抗原を発現する DNA を筋注し、ブーストとしては、DNA ワクチン接種後 6 週目に SeV-Gag を経鼻接種した。さらに、ブースト後 13 週目に、1000 TCID50 の SIVmac239 を静注にてチャレンジした。ナীব对照群として、ワクチン接種を行っていないアカゲサル 4 頭に、同様に SIVmac239 を静注した。

なお、使用したサルのうち、8 頭 (ナীব 2 頭、ワクチン接種 6 頭) はアカゲサル R90-120 の子孫、2 頭 (ナীব 1 頭、ワクチン接種 1 頭) はアカゲサル R90-088 の子、2 頭 (ナীব 1 頭、ワクチン接種 1 頭) はアカゲサル R90-010 の子である (表 1)。

ブースト後 1 週目、ブースト後 2 週目、チャレンジ直前、チャレンジ後 2 週目の末梢血 Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球レベル、およびブースト後 1 週目の末梢血 Gag 特異的 CD4 陽性 T リンパ球レベルを測定した。抗原特異的 T リンパ球レベルの測定は、抗原刺激後誘導されるインターフェロン  $\gamma$  の細胞内染色検出により行った。

チャレンジ後、血漿中 SIV RNA コピー数定量を行った。さらに、全 12 個体について、5 週目の血漿中 SIV RNA gag 領域を RT-PCR にて増幅し、各々数クローンについて塩基配列を調べた。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、倫理面も含めて、国立感染症研究所動物実験委員会の審査をうけ、その承諾を得てから、国立感染症研究所筑波霊長類センターにて開始した。

## C. 研究結果

ワクチン接種サル全 8 頭において、SeV-Gag ブースト後、高レベルの Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球および Gag 特異的 CD4 陽性 T リンパ球の誘導が認められた。さらに、チャレンジ

後 2 週目においても全 8 頭で、Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球の 2 次反応が認められた (図 1)。

SIVmac239 チャレンジ後、対照群 4 頭の血漿中 SIV RNA コピー数は、1.5 週目にピークとなり、その後の set-point 期には  $10^4$  代- $10^6$  代の値を維持して、典型的な SIVmac239 感染パターンを示した。一方、ワクチン接種サル SIVmac239 チャレンジ実験では、3 頭は SIV 複製を制御できず対照群と同様のウイルス量を示したが、ワクチン接種サル 8 頭中 5 頭においては、感染初期の SIV 複製制御が認められ、setpoint 期以降の血漿中 SIV RNA は検出限界以下となった (図 2)。

複製制御できた 5 頭とできなかった 3 頭との間では、Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球レベルあるいは Gag 特異的 CD4 陽性 T リンパ球レベルに有意な差は認められなかった (図 1)。

チャレンジ後 5 週目の SIV genome gag 領域の塩基配列解析では、SIV 複製を制御できなかったサル (対照群 4 頭、ワクチン接種群 3 頭) においては、各クローンに共通したアミノ酸変異は認められず、wild-type SIV が dominant であった。一方、複製制御できた 5 頭では、各々の個体において各クローンに共通した 1 つの CTL エスケープ変異が認められた。つまり、その CTL エスケープ変異体のみが選択され、wild-type SIV が排除されていた (図 3)。

#### D. 考 察

SIV 複製制御が認められたサル全 5 頭では、チャレンジ後 5 週目の時点で、各々あるエピトープ特異的 CTL に対するエスケープ変異のみが選択されていたことから、血漿中より SIV RNA が検出できなくなる直前の時点 (5 週目) において、wild-type SIV はすでに排除されており、その排除 (つまり SIV 複製制御) において、そのエピトープ特異的 CTL が中心的役割を担っていることが明らかとなった。

HIV 複製抑制における CTL の重要性が指摘されて以来、CTL 誘導型エイズワクチン開発研究が精力的に進められてきた。しかし、「ワクチン誘導 CTL による HIV/SIV 複製制御は可能か」という重要課題に対しては、答が得られ

ていなかった。このような状況下において、本研究は、「ワクチンにより有能な CTL を誘導することができれば、SIV 複製制御が可能であること」を、世界に先駆けて証明するものである。

また、タンパク構造上保存されるべき領域は、エスケープ変異により複製効率の低下につながる可能性が高いので、ワクチン抗原エピトープ候補として有望であると考えられる。本研究は、この考えを支持し、構造上保存されるべき領域が広いと考えられる Gag タンパクが CTL 誘導ワクチン抗原として有利である可能性を示唆している。今後、ワクチン抗原エピトープ選択の理論的基盤の確立には、SIV 複製制御の鍵をにぎる有能な CTL の本体についての検討が必要である。

以上のように、本研究は、CTL による SIV 複製制御の可能性を明らかにし、CTL 誘導型エイズワクチン開発の合理性を示すとともに、構造タンパク Gag 由来のエピトープをワクチン抗原とすることの合理性をも示唆している。

#### E. 結 論

本研究により、「ワクチンにより有能な CTL を誘導することができれば、慢性エイズを引き起こす SIV の複製制御が可能であること」が明らかとなり、「CTL 誘導型エイズワクチン開発の合理性」が示された。また、「構造タンパク Gag 由来のエピトープをワクチン抗原とすることの合理性」が示唆された。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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, AIDS 17:1392-1394, 2003.
- 2) Takeda, A., Nakamura, H., and Matano, T. Evaluation of simian immunodeficiency

virus-specific immune responses induced by a defective proviral DNA vaccine in macaques. *Jpn. J. Infect. Dis.* 56:172-173, 2003.

- 3) Takeda, A., Igarashi, H., Nakamura, H., Kano, M., Iida, A., Hirata, T., Hasegawa, M., Nagai, Y., and Matano, T. Protective efficacy of an AIDS vaccine, a single DNA-prime followed by a single booster with a recombinant replication-defective Sendai virus vector, in a macaque AIDS model. *J. Virol.* 77:9710-9715, 2003.

## 2. 学会発表

- 1) 俣野哲朗. HIV ワクチンの展望. 第 26 回日本医学会総会、福岡、4/5/2003.
- 2) Matano, T. Cytotoxic T lymphocyte-based pressure against immunodeficiency virus infections in a macaque AIDS model. 第 76 回日本生化学会大会、横浜、10/16/2003.
- 3) 小林政博、五十嵐博子、武田明子、野本明男、俣野哲朗. SIV Gag における CTL エピトープの同定. 第 51 回日本ウイルス学会学術集会、京都、10/28/2003.
- 4) 俣野哲朗、五十嵐博子、武田明子、小林政博、飯田章博、永井美之. Gag 特異的 CTL 誘導ワクチンによる SIV 複製抑制効果. 第 51 回日本ウイルス学会学術集会、京都、10/29/2003.
- 5) 俣野哲朗. 慢性エイズモデルにおける Gag 特異的 CTL 誘導ワクチンの効果. 第 17 回日本エイズ学会学術集会、神戸、11/28/2003.
- 6) Matano, T., Kobayashi, M., Igarashi, H., Takeda, A., Sugiura, W., Mori, K., Kano, M., Iida, A., Hasegawa, M., Miyazawa, M., Yasunami, M., Kimura, A., O'Connor, D., Watkins, D., and Nagai, Y. Containment of simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques by vaccine-induced cytotoxic T lymphocytes. The 11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, San Francisco, USA, 2/11/2004.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願：DNA ワクチン、出願番号 2000-291792、公開番号 2001-169784.

表1. 本研究に使用したアカゲサル

サル番号	父サル <sup>a</sup>	チャレンジ後ウイルス量 <sup>b</sup>
(ナイーブ対照群)		
N1	R90-088	高レベル
N2	R90-120	高レベル
N3	R94-027	高レベル
N4	R90-010	高レベル
(ワクチン接種群)		
V1	R90-088	高レベル
V2	R90-120	高レベル
V3	R90-120	低レベル
V4	R94-027	低レベル
V5	R94-027	低レベル
V6	R94-027	低レベル
V7	R94-027	高レベル
V8	R90-010	低レベル

<sup>a</sup> R94-027 は、R90-120 の子である。

<sup>b</sup> SIV チャレンジ後 setpoint 期の血漿中 SIV 量が検出限界レベル以下となったもの(つまり SIV 複製制御が認められたもの)を、低レベルとした。

図1. ワクチン接種サルの末梢血 Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球レベル(/million PBMC)

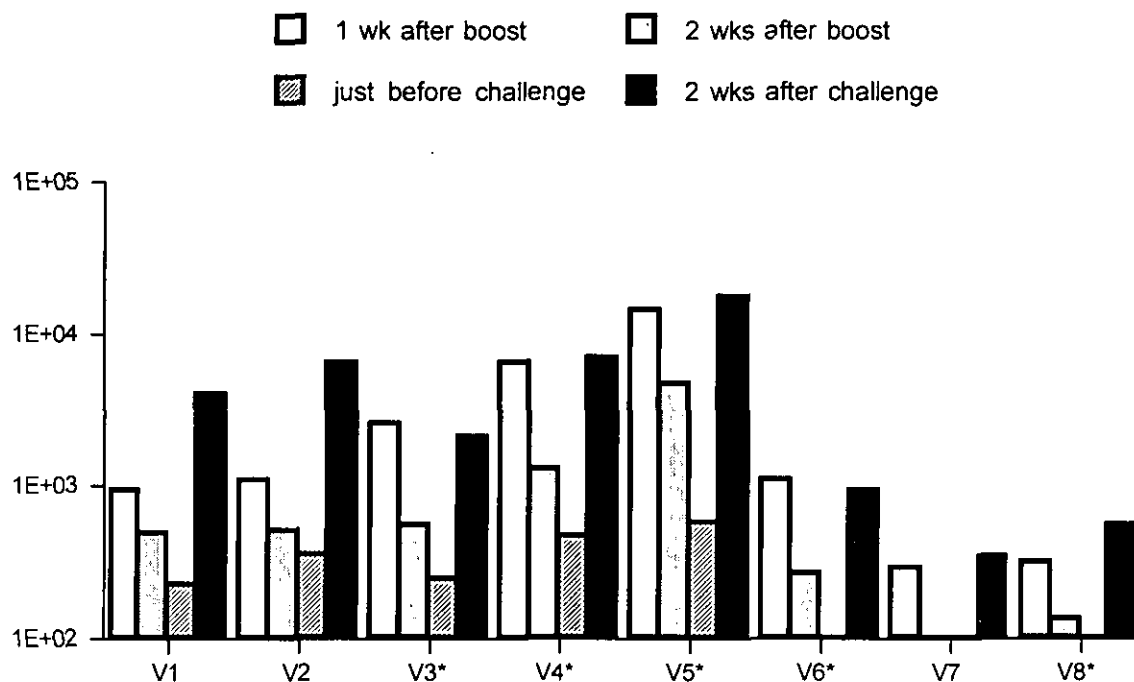




図2. SIVmac239 チャレンジ後の血漿中 SIV RNA コピー数(/ml)

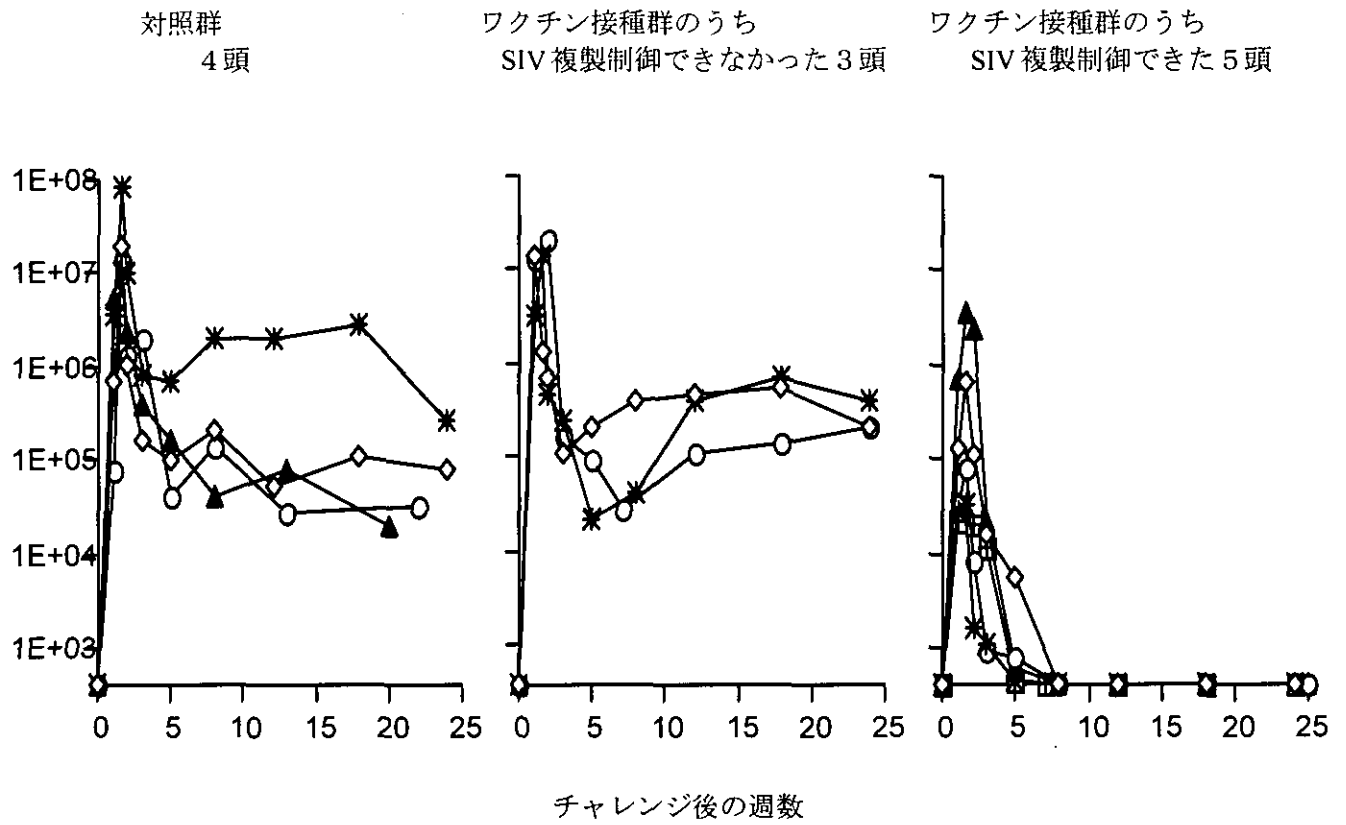


図 3. チャレンジ後 5 週目の SIV genome gag 領域の塩基配列解析結果 (アミノ酸変異部位)

V1 (11 changes / 9 clones)

17	200		
17	200		
26	191	283	
40			
	158		
	216		
	250		

V5\* (11 changes / 7 clones)

	216		
	216		
	216	322	
	216	365	
	216P		432
	216		451

V2 (15 changes / 9 clones)

53	182	234		
	96	176	228	348
		172		
		219	250	409
			292	377
				359
				473

V6\* (17 changes / 10 clones)

	122			
		235		
		235		
26			377	
26			377	
	134		377	
	167	198	377	
			377	378
			377	415
			377	430

V3\* (20 changes / 8 clones)

	216		
	216		
5	216	406	
5	216	406	
5	216	406	417
8	216		459
59	216		
	172	216	315

V7 (10 changes / 9 clones)

41		198	379	416
	92			
	104			
		135		
		161		
			264	293

V4\* (21 changes / 9 clones)

	216		
	216		
	216		
11	216	314	
12	216		
20	216	251	269
48	216	269	
72	216	230	
	216		488

V8\* (17 changes / 9 clones)

	58		
	58		
	58		
32	58		
	58	96	
	58	97	
	58	201	
	58		288
	58		360
	58		311
			323

### 3. 遺伝子改変 SHIV を用いた弱毒生ワクチンと半生 DNA ワクチンの開発

分担研究者 三浦 智行 京都大学ウイルス研究所助教授

研究要旨 SHIV のゲノム改変と投与法の検討により生ワクチンの強力な感染防御効果を保持しつつ安全性も確保されたヒト用エイズワクチンを開発することを目的とする。本年度は、ワクチンに用いている元株について、サル個体継代を5代行ったが、強毒化しなかったことから、更にそこから nef 遺伝子を欠失させたワクチン株の安全性が支持された。nef 欠失弱毒 SHIV 接種により、早期においても（ワクチン接種後4週）強毒 SHIV 攻撃接種に対してある程度の防御効果が誘導されていること、また、nef 欠失部位へのインターフェロン $\gamma$  遺伝子組込みにより、攻撃接種ウイルスに対して増殖抑制に働く面と増幅に働く面があることが明らかとなった。インターロイキン2 遺伝子を挿入した SHIV 半生 DNA ワクチンの免疫誘導能を確認し、強毒 SHIV 攻撃接種に対してある程度の感染防御効果があることを示した。

#### A. 研究目的

SHIV のゲノム改変と投与法の検討により生ワクチンの強力な感染防御効果を保持しつつ安全性も確保されたヒト用エイズワクチンを開発することを目的とする。ワクチンの歴史において特異的及び非特異的防御反応を強力に誘導できる弱毒生ワクチンが最も有効であることが証明されてきたが、HIV では変異による強毒化の可能性から生ワクチンについては危惧視され、殆どその開発は進められていない。SHIV はサルとヒトの両方で増殖可能であり、サルで有効性と安全性を確認できることから、より実用化に近い形でワクチン候補を開発し、また、その過程で SHIV の強毒性・弱毒性についても明らかにする。

#### B. 研究方法

- 1) 弱毒生ワクチン株のサルにおける安全性の確認。ワクチン株の元株について、サル個体継代を行い強毒化の有無を調べる。
- 2) 弱毒生ワクチン株の免疫原性と感染防御効果。各種サイトカイン挿入 SHIV や HIV-1Env の糖鎖欠損 SHIV についてサル接種実験を行い、感染性・免疫誘導能・感染防御能について調べる。
- 3) 半生 DNA ワクチンの改良。安全性と免疫

原性を高めるために nef 遺伝子を欠失させ、サイトカイン遺伝子を挿入する等のゲノム改変を施した SHIV について、複製能を壊したプロウイルス DNA を作製し、そのワクチン効果を調べる。

（倫理面への配慮）

以上の研究は、京都大学ウイルス研究所の「サル類を用いる実験のための基本指針」に基づいて霊長類委員会による倫理審査を受けた上で行う。

#### C. 研究結果

ワクチンに用いている元株について、サル個体継代を5代行ったが、強毒化しなかった。nef 欠失弱毒 SHIV 接種により、早期においても（ワクチン接種後4週）強毒 SHIV 攻撃接種に対してある程度の防御効果が誘導されていること、また、nef 欠失部位へのインターフェロン $\gamma$  遺伝子組込みにより、攻撃接種ウイルスに対して増殖抑制に働く面と増幅に働く面があることが明らかとなった。インターロイキン2 遺伝子を挿入した SHIV 半生 DNA ワクチンの免疫誘導能を確認し、強毒 SHIV 攻撃接種に対してある程度の感染防御効果があることを確認した。

## D. 考 察

遺伝子を欠失していない元株をアカゲザルで個体継代しても強毒化しなかったことから、更にそこから *nef* 遺伝子を欠失させた SHIV の安全性がある程度評価できた。弱毒 SHIV 接種後 4 週目という早期にもかかわらず部分的な防御効果があることが確認された。このことは、生ワクチン接種により初期に誘導される基本免疫系の重要性を示すと同時に、より強力に感染防御するためには獲得免疫系まで誘導される時間が必要であることを示している。個々のサイトカインの分子機構や機能はかなり研究されているが、生体内では発現する場所と時期によってその効果が大きく異なる場合が多く、今回の結果からも個体レベルでの今後の詳細な解析の必要性を痛感した。

## E. 結 論

サル個体継代実験により弱毒 SHIV の非病原性が支持されたが、今後 SHIV の強毒/弱毒性の本体について明らかにすることが重要である。強毒 SHIV 感染防御には、弱毒 SHIV 感染初期に誘導される基本免疫系の重要性が示唆されたが、同時に、より強力に感染防御するためには、その後、獲得免疫系まで誘導される時間が必要であることも確認された。今後、特に半生 DNA ワクチン手順を考える上で参考となる。弱毒 SHIV にサイトカインを組込むことの是非については、今後も詳細に検討する必要がある。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Enose, Y. et al.: Protection by intranasal immunization of a *nef*-deleted, nonpathogenic SHIV against intravaginal challenge with a heterologous pathogenic SHIV. *Virology*, 298: 306-316, 2002.
- 2) Haga, T. et al.: Construction and in vitro properties of chimeric simian and human

immunodeficiency virus with the human TNF- $\alpha$  gene. *Microbiol. Immunol.*, 46: 849-855, 2003.

- 3) Shimada, T. et al.: Comparative histopathological studies in the early stages of acute pathogenic and nonpathogenic SHIV-infected lymphoid organs. *Virology*, 306(2): 334-346, 2003.
  - 4) Haga, T. et al.: Characterization of vpr vector constructed from chimeric simian and human immunodeficiency virus. *J. Vet. Med. Sci.*, 65(5), 633-636, 2003.
  - 5) 喜多正和 他: IFN- $\gamma$  遺伝子組込み弱毒 SHIV のワクチン効果. *J. AIDS Res.*, 5(2), 86-88, 2003.
  - 6) Ndambi, N. et al.: HIV type 1 infection in Pygmy hunter gatherers is from contact with bantu rather than from nonhuman primates. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 19(5), 000-000, 2003.
  - 7) Akiyama, H. et al.: Construction and in vivo infection of a new simian/human immunodeficiency virus chimera containing the reverse transcriptase gene and the 3' half of the genomic region immunodeficiency virus type 1. *J. Gen. Virol.*, 84:1663-1669, 2003.
  - 8) Iida, T. et al.: Augmentation of antigen-specific cytokine responses in the early phase of infection with a live-attenuated simian/human immunodeficiency chimeric virus expressing IFN- $\gamma$ . *Arch. Virol.*, in press.
  - 9) Yamaguchi-Kabata, Y. et al.: Amino acid variation and evolution of human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein (subtype B) linked with usage of the second receptor. *J. Mol. Evol.*, in press.
- ### 2. 学会発表
- 1) 三浦智行 他: サル/ヒト免疫不全キメラウイルス強毒・弱毒分子クローンの塩基配列と増殖能との関連、第 135 回日本獣医学