

- 会、東京、平成 15 年 3 月 30 日～4 月 1 日
- 2) 鈴木元 他：強毒サル／ヒト免疫不全キメラウイルス感染初期における胸腺組織及び胸腺内 T 前駆細胞の解析、第 136 回日本獣医学会、青森、平成 15 年 10 月 3～5 日
 - 3) 伊吹謙太郎 他：強毒 SHIV の経直腸感染初期における腸管粘膜免疫細胞の動態、第 136 回日本獣医学会、青森、平成 15 年 10 月 3～5 日
 - 4) Suzuki, H. et al.: The effects of pathogenic SHIV infection on the thymus and intrathymic T cell progenitor in rhesus monkeys. 21st Annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, Seattle, Oct. 22-25, 2003.
 - 5) Kozyrev, Y. et al.: Comparative analysis of acute pathogenic and less pathogenic SHIV molecular clones. 21st Annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, Seattle, Oct. 22-25, 2003.
 - 6) Ibuki, K. et al.: Analysis of viral expansion and immune reaction at early phase of acute pathogenic SHIV intrarectal infection in macaques. 21st Annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, Seattle, Oct. 22-25, 2003.
 - 7) Akiyama, H. et al.: Construction and in vivo infection of a novel simian/human immunodeficiency chimeric virus containing the reverse transcriptase, integrase and the 3' half of the genomic region of HIV-1. 21st Annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, Seattle, Oct. 22-25, 2003.
 - 8) 三浦智行 他：サル／ヒト免疫不全キメラウイルス感染性クローンにおける塩基置換と病原性との関連、第 51 回日本ウイルス学会、京都、平成 15 年 10 月 27～28 日
 - 9) 三宅在子 他：強毒 SHIV の粘膜感染初期におけるウイルス動態の解析、第 51 回日本ウイルス学会、京都、平成 15 年 10 月 27～28 日
 - 10) 鈴木麻貴子 他：強毒 SHIV の感染初期における胸腺組織及び胸腺内 T 前駆細胞の解析、第 51 回日本ウイルス学会、京都、平成 15 年 10 月 27～28 日
 - 11) 秋山尚志 他：HIV-1 由来の逆転写酵素, インテグラーゼおよび env を含むゲノムの 3' 側遺伝子を持つ新しい SHIV のサル感染実験、第 51 回日本ウイルス学会、京都、平成 15 年 10 月 27～8 日
 - 12) 齋藤尚紀 他：SIV/SHIV 接種ザルにおける NKT 細胞の動態解析に向けて:サル CD1d 分子の解析と発現、第 17 回日本エイズ学会、神戸、平成 15 年 11 月 27～29 日
 - 13) 清水佑也 他：TNF- α 遺伝子組み込み SHIV 感染ザルにおける細胞死と免疫応答、第 17 回日本エイズ学会、神戸、平成 15 年 11 月 27～29 日
 - 14) Iouri Kozyrev 他：Genetic analysis of acute pathogenic and less pathogenic SHIV molecular clones to determine the responsive site for in vivo pathogenicity. 第 17 回日本エイズ学会、神戸、平成 15 年 11 月 27～29 日
 - 15) Kwofie T. B. 他：Increased virus replication and cytotoxicity of non-pathogenic SHIV-NM-3rN after serial passage on monkey derived cell line. 第 17 回日本エイズ学会、神戸、平成 15 年 11 月 27～29 日
 - 16) 石松美沙 他：サルの SHIV 感染に対する IL-15 投与効果の解析、第 17 回日本エイズ学会、神戸、平成 15 年 11 月 27～29 日
 - 17) 三浦智行：サルから学ぶレトロウイルス感染症－HTLV/HIV の起源・進化とエイズ病態モデル－、感染研学友会シンポジウム、東京、平成 15 年 12 月 17 日

4. BCG と DIs ワクチンの実用化に関する研究

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

研究要旨 エイズワクチンの開発においてはその効果が免疫学的パラメータの不在・不明瞭性、絶対的な評価動物モデルの欠落及び HIV ウイルスの多様性などの原因で有効性が極めて漠然としたものになっている。したがって現時点では HIV 相当ウイルス部位の SIV 遺伝子を用いて、現在得られるサルエイズモデルを用いたワクチンの防御免疫効果とヒトへのワクチン実用化で用いる HIV ウイルス遺伝子を用いたヒト HIV ワクチンのサルによる有意な免疫誘導能を解析し、その両方の結果を総合して標的とする HIV ワクチンの有効性の評価を検討した。その結果サル SIV Gag 遺伝子を組込んだ組換え BCG SIV ワクチンでプライミングし、組換えワクシニア DIs SIV Gag ワクチンでブースターをするプライムブーストワクチンで免疫すると病原性不全ウイルスの感染をコントロールすることができた。この際用いた組換え DIs SIV ワクチンはこれまで用いられているワクシニアウイルスベクターの中でもほ乳類細胞では増殖しない特徴を持つベクターであることが明らかとなり HIV/AIDS ワクチンとして有用性が高いことを証明した。さらに HIV-1 CRF01_AE Gag 遺伝子を組込んだプライムブーストワクチンを作成し、サルを用いて免疫誘導能を解析すると、SIV Gag を標的としたプライムブーストワクチンと類似の細胞性免疫主導型免疫効果が得られた。この際、ワクシニアブースター免疫は2度接種することが有効であることが明らかになった。これらの SIV 及び HIV Gag 遺伝子を用いたプライムブーストレジメンの解析結果から有効なワクチン効果を誘導するのに HIV Gag ワクチンでは組換え BCG-HIV gag を初回免疫後、組換えワクシニア DIs-HIV Gag ワクチンを皮内で2回接種する必要があることがわかった。

A. 研究目的

BCG をベースにした HIV ワクチンの免疫とワクシニア DIs ウイルス株を用いた HIV ワクチンのブースターによる防御免疫誘導能のヒトにおける十分なワクチン効果を誘導できることを目的とする。その際、サルにおける SIV を使ったワクチン効果と、HIV 遺伝子を用いた免疫効果の両者を総合したヒト試行を想定した効果的なワクチン効果の誘導を目的とし、安全性とその評価法の開発を含む。ここで検討するワクチンは東南アジアで伝搬しているクレイド E ウイルスを標的とし、HIV 感染予防ワクチンの臨床試行を目的とした前臨床レベルでのワクチン効果の完成をめざす。

B. 研究方法

組換えワクチンのプライムブースト法による HIV 感染の予防ワクチンの実用化研究を完成させることが目的であるので以下のような研究方法によりプロジェクトを推進する。

1. これまでのワクチン構築及びモデル動物を用いた免疫誘導の結果をもとにして組換え BCG-HIV-1 CRF01_AE を作成する。
2. さらに組換えワクシニア DIs-HIV-1 CRF01_AE を作成する。
3. 前臨床レベルの研究を完成させるためにヒトでの実用化をめざした BCG-ワクシニアのヒト投与可能量及びルートを検討し、プライムブーストワクチンのワクチン効果をカニクイサルを用いて評価する。ワク

チン接種のスケジュールは Fig. 1 に示す通りである。

4. 組換えワクシニア DIs ワクチンの特性を明らかにするためにワクチン効果に関しては SIV Gag 遺伝子を発現させた組換えワクチンをサルに接種しワクチン効果を検索する。一方、ベクターの特性の解析については米国 NIH, NIID Bernard Moss 博士の協力を得て MVA ベクターワクチンとのホストレンジの解析と外来性抗原の発現の相関性を明らかにする。

(倫理面への配慮)

国立感染症研究所・動物実験委員会の許可を得ている。

C. 研究結果

1. 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 ワクチンを作成した (Fig.2)
2. SIV Gag ワクチンのワクチン効果の成果をもとにして 1) で作成した HIV-1 CRF01_AE Gag ワクチンの効果を臨床試験を想定して投与量、ルートを検討した (Fig.3)。Fig.3 に見られるようにヒト投与可能量 0.1mg BCG 10^7 pfu DIs で細胞性免疫を解析すると抗原特異的 γ インターフェロン T 細胞の数が 400-600 ELISpot 検出された。以上のことから現時点での組換え BCG および組換え DIs のプライムブーストワクチンは有効な防御免疫の誘導が期待され、その効果は SIV を用いたワクチンの評価データを参考にすると HIV Gag E の遺伝子を発現させてもサルレベルと同様に有効な評価が得られるのではないかと推測された。
3. 我々が目的とするワクチン実用化実験に用いるベクターの一つはワクシニア DIs ウイルスベクターであり、その特性が Table 1 のように明らかになった。即ち DIs ウイルスベクターは親株である DIE や類似の MVA 株 (Table 2) がほ乳類細胞増殖しな

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。

D. 考察

本研究によってプライムブーストワクチンのワクチン効果に関して実用化のめどが初めて明らかになった。前年度までの研究で組換え BCG ワクチンと組換え DIs ワクチンのコンビネーションによるプライムブーストワクチンのレジメンが完成した。本年度そのワクチン効果で得られた成果をもとにしてヒト使用を目的とした HIV-1 CRF01_AE Gag 遺伝子を作成し、組換え BCG および組換え DIs ワクチンの構築を行いサルを用いてプライムブーストで免疫すると十分な免疫効果が得られることからヒトへの臨床試験の可能性が示唆された。

本プロジェクトで進めているプライムブーストワクチンはその実用化を考慮して従来のヒトに用いられるワクチンをベクターとして用いていることと、その中でも免疫不全動物に障害を及ぼさないことをワクチン開発の条件として実用化研究を行ってきた。その過程において組換え 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。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研究が行われ実用化に関して Clinical Investigator Brochure のドラフトを完成させた (安全性に関しては佐多先生の多大な協力によるものである)。これらの研究を迅速に進めることと急速に拡大しつつある野生型ウイルスの解析結果を考慮に入れたワクチン実用化レジメンの検討が必要になってくる。現在得られている膨大なワクチン効果及び安全性に対する成果を早急にまとめ、Investigator Brochure を完成させるとともに Journal に投稿し国際的評価を得るべく努力しているところである。

E. 結論

組換え BCG と組換え DIs のワクチン効果に関する実用化研究を行った。HIV-1 CRF01_AE

Gag を組込んだプライムブーストワクチンは本研究で明らかにした組換え BCG 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ことが示唆された。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakao R, Hanada N, Asano T, Hara T, Salam Md A, Matin K, Shimazu Y, Nakasone T, Horibata S, Aoba T, Honda M, Amagasa T, Senpuku H. Assesment of oral transmission using cell-free HIV-1 in mice reconstituted with human peripheral blood leucocytes. *Immunology* 2003 109:271-282.
- 2) 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.
- 3) Kaizu M., Sato H., Ami Y., Izumi Y., Nakasone T., Tomita Y., Someya K., Takebe Y., Kitamura K., Tochikubo O. and Honda M. Infection of macaques withan R5-tropuc SHIV bearing a chimeric envelope carrying subtype E V3 loop among subtype B framework. *Arch. Virol* (2003) 148:973-988.
- 4) Kaizu M., Ami Y., Nakasone T., Sasaki Y., Izumi Y., Sato H., Takahashi E., Sakai K., Shinohara K., Nakanishi K. and Honda M. Higher levels of IL-18 circulate during primary infection of monkeys with a pathogenic SHIV than with a nonpathogenic SHIV. *Virology* 313:8-12 2003.
- 5) Takizawa M, Chiba J, Haga S, Asano T, Yamamoto N, Honda M. Fractionation of

guinea pig leukocyte by flow cytometry using a novel MIL4/SSC parameter. *Cytometry Research*, 13(1):25-32, 2003.

- 6) Izumi Y., Ami Y., Matsuo K., Someya K., Sata T., Yamamoto N., and Honda M. Intravenous inoculation of replication-deficient recombinant Vaccinia DIs expressing SIV Gag controls highly pathogenic SHIV in monkeys. *J. Virol.* 2003. 77(24) :13248-13256.
 - 7) Hamano, T, P. Sawanpanyalert, H. Yanai, S. Piyaworawong, T. Hara, S. Sapsutthipas, J. Phromjai, S. Yamazaki, N. Yamamoto, P. Warachit, M. Honda and K. Matsuo. Determination of HIV-1 CRF01_AE gag p17 and env-V3 consensus sequences for HIV/AIDS vaccine design. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 20 (3):337-340, 2004.
 - 8) Gzyl J, Bolesta E, Wierzbicki A, Kmiecik D, Naito T, Kaneko Y, Honda M, Komuro K, Kozbor D. Effect of partial and complete variable loop deletions of the Human Immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein and the breadth of gp160-specific immune responses. *Virology* 2004 (in press).
 - 9) Nakasone T, Matsuo K, Yoshino N, Honda M. Update on HIV/AIDS in Japan, 2003. *AIDS in ASIA* 2004 (in press).
 - 10) Matsuo K, Promkhatkaew D, Balachandra K, Hamano T, Sutthent R, Ruxrungham R, Sittisombut N, Puthavathana P, Butraporn R, Sriwanthana B, Boon-Long J, Nakasone T, Warachit P, Rugpoa S, Yamazaki S and Honda M. Japan's Collaboration with Thailand in the Development of HIV/AIDS Vaccine. *AIDS in ASIA*, 2004 (in press).
- ##### 2. 学会発表
- 1) M. Honda. A Summary of the Five-year Thailand-Japan Cooperative Project / Preclinical Development of HIV-1 Clade E Vaccine with Equal Partnership. Japan-U.S. Cooperative Medical Science Program 14th Joint Meeting of AIDS Panal (March 5-7,

- 2003, Okinawa)
- 2) Nakasone T, Izumi Y, Matsuo K, Ami Y, Someya K, Kanekiyo M, Hamano T, Horibata S, Yoshino N, Hara T, Takizawa M, Kawahara M, Kaizu M, Hamatake M, Sakai K, Shinohara K, Yamazaki S, Yamamoto N, Honda M. Prime-boost vaccination with recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette Guérin in and vaccinia strain DIs elicits protective immunity against pathogenic SHIV infection in macaques. Japan-U.S. Cooperative Medical Science Program 14th Joint Meeting of AIDS Panal (March 5-7, 2003, Okinawa)
 - 3) Honda M, Nakasone T, Matsuo K, Hamano T, Someya K, Yoshino N, Izumi Y, Hara T, Kawahara M, Takizawa M, Kanekiyo M, Horibata S, Yamamoto N. A primeboost HIV vaccine development as a challenge project. International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim (Dec. 11-12, 2003, Dhaka)
 - 4) 吉野直人、兼清優、染谷健二、松尾和浩、網康至、佐藤成大、山本直樹、本多三男 リコンビナント DIs ワクチンの経粘膜接種への応用 第 17 回日本エイズ学会総会 (11/27-29, 2003, 神戸)
 - 5) 浜野隆一、岡本尚、野内英樹、日比悠里名、高橋なを子、原敬志、山本直樹、山崎修道、本多三男、松尾和浩 Gag p17 遺伝子変異による HIV-1 CRF01_AE 複製の制御 第 17 回日本エイズ学会総会 (11/27-29, 2003, 神戸)
 - 6) 滝澤万里、村上利夫、江田康幸、前田敏宏、本多三男 ヒトモノクローナル抗体 KD-247 における中和メカニズム 第 17 回日本エイズ学会総会 (11/27-29, 2003, 神戸)
 - 7) 村上利夫、前田敏宏、本多三男、松下修三 ヒト化抗 HIV-1 モノクローナル抗体 (KD-247) 治療対象症例選択法の開発 第 17 回日本エイズ学会総会 (11/27-29, 2003, 神戸)

Table 1. Clinical trials of AIDS vaccine in Thailand

Year	Phase	Candidate Vaccine	Manufacturers	Subject
1994	I	Synthetic peptide	United Biochemical Inc.	30 (normal)
1995	I/II	gp120 (B)	Genentech	33 (IDU)
1995	I	gp120 (B)	Biocine	54 (normal)
1996	I	HIV-1 immunogen (Remune)	Immune Response	30 (HIV+ve)
1997	II	HIV-1 immunogen (Remune)	Immune Response	297 (HIV+ve)
1997	I/II	gp120 (E)	Chiron	380 (normal)
1998	I/II	gp120 BE (AIDSVAX)	Vaxgen	92 (IDU)
1999	III	gp120 BE (AIDSVAX)	Vaxgen	2500 (IDU)
2000	I/II	vCP (ALVAC), gp120BE, gp160	Aventis Pasteur + Chiron	130 (normal)
2000	I/II	vCP + gp120BE (AIDSVAX)	Aventis Pasteur + Vaxgen	125 (normal)
2003	III	vCP + gp120BE (AIDSVAX)	Aventis Pasteur + Vaxgen	8000 (normal)

Table 2. Replication of rDIs-SIVgag and other vaccinia recombinants and production of SIV Gag p27 protein^a

Vaccinia	Virus replication ^b	p27 antigen (pg/ml in 10 ⁶ cells)	
		Supernatant	Cell lysate
1) CEF cells			
rWR-SIVgag	9500	6530	87300
rDIs-SIVgag	1860	2470	15800
rDIs-LacZ	1400	<20	<20
MVA	10327	<20	<20
2) BHK-21			
rWR-SIVgag	2500	970	34600
rDIs-SIVgag	< 1	<20	1375
rDIs-LacZ	<1	<20	<20
MVA	2250	<20	<20
3) RK13 cells			
rWR-SIVgag	1500	350	16300
rDIs-SIVgag	<1	<20	275
rDIs-LacZ	<1	<20	<20
MVA	1.25	<20	<20
4) CHO cells			
rWR-SIVgag	953	410	5320
rDIs-SIVgag	<1	<20	119
rDIs-LacZ	<1	<20	<20
MVA	92	<20	<20

^aChick embryo fibroblast, RK13 and BHK-21 cells were infected with rDIs or rWR strain viruses at *moi* of 0.05 for detection of virus replication and at *moi* of 1.0 for p27 antigen generation in culture supernatant and cells. p27 antigen was measured by ELISA in 10⁶ cells per ml of culture, and are presented as average value ± SD.

^bFor analysis of virus replication, mammalian cells were infected with each virus at a *moi* of 0.05. The cells were harvested at 0 and 48 hrs after absorption and sonicated. Virus replication was determined by dividing the virus yield at 48 hr by that at 0 hr. <1 and <20 pg/ml represent under detection limit of the virus replication and p27 antigen assays, respectively.

HIV gagE-specific T-cell responses by IFN- γ ELISPOT

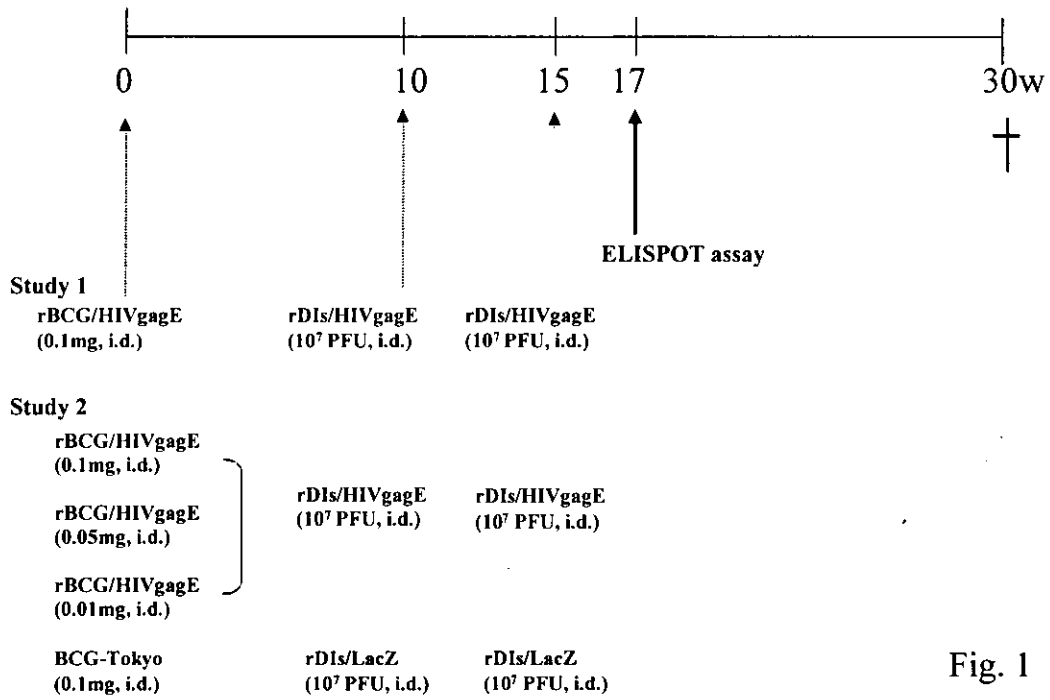


Fig. 1

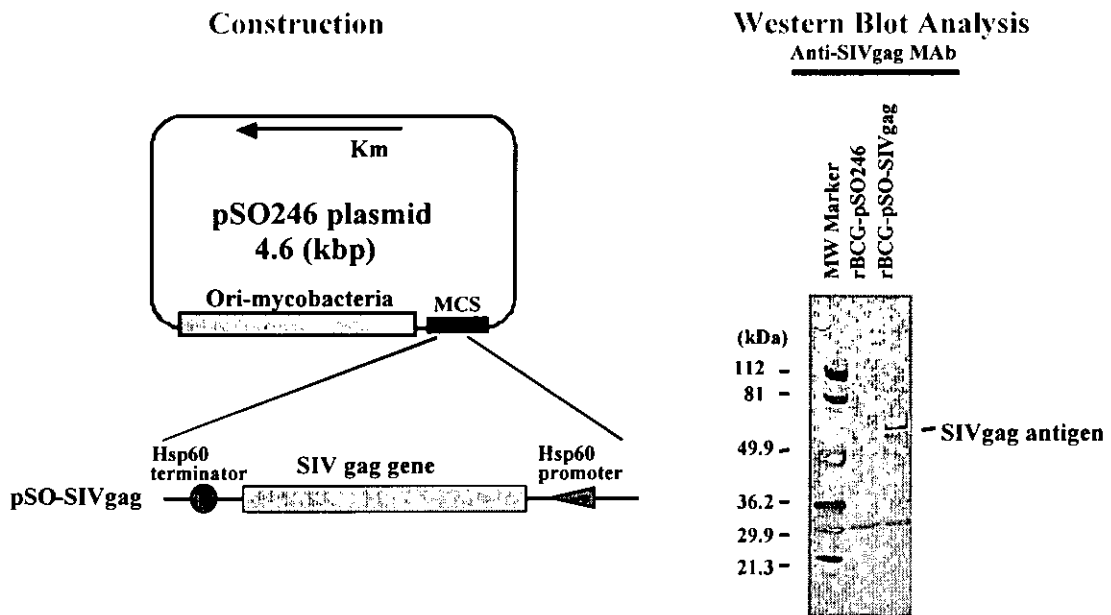


Fig. 2 (1)

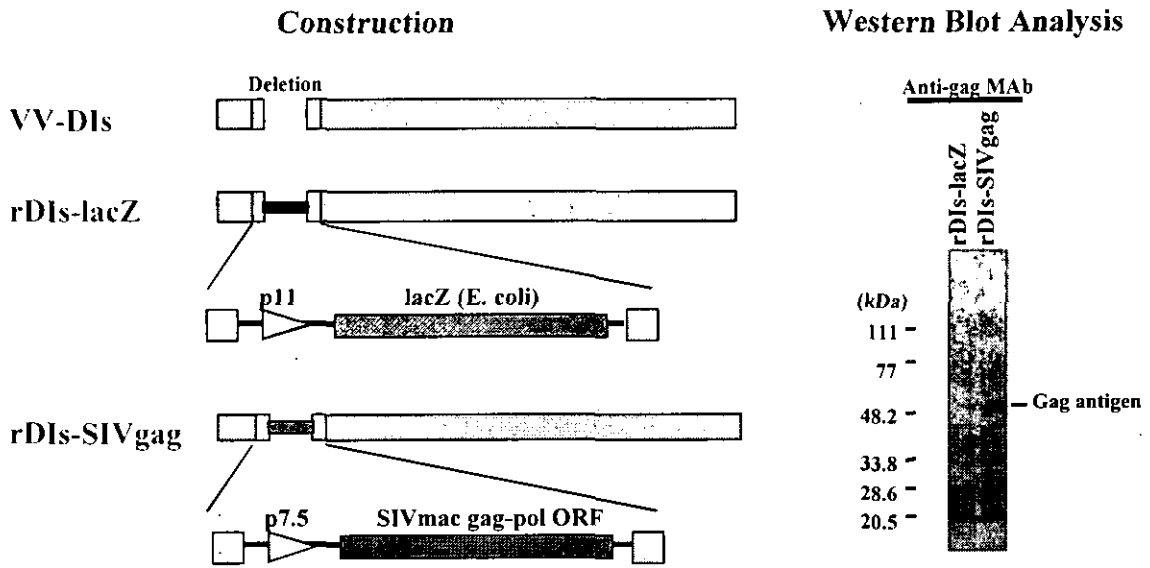
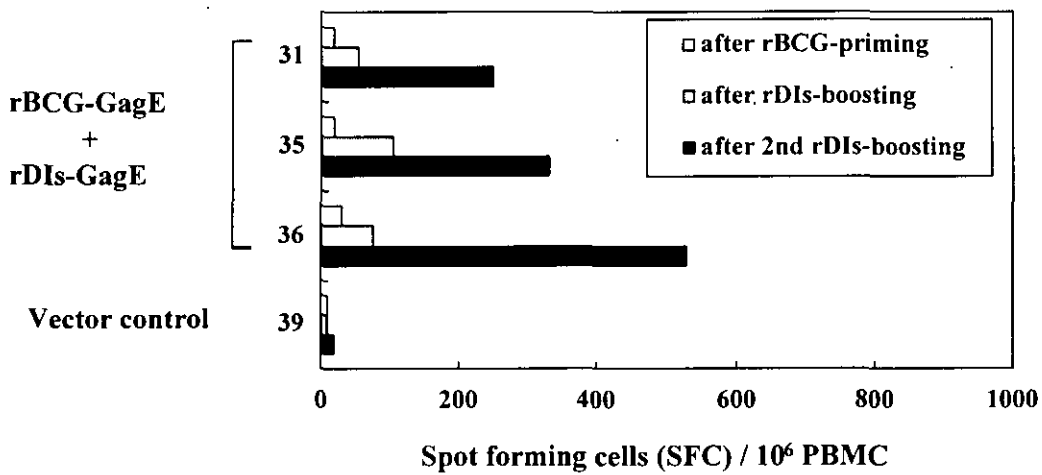


Fig. 2 (2)



1st immunization; rBCG-GagE (0.1mg, i.d.)
 2nd/3rd immunization; rDIs-GagE (10^7 PFU, i.d.)

Fig. 3

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

分担研究者 森 一泰 国立感染症研究所 主任研究官
研究協力者 杉本 智恵 国立感染症研究所 協力研究員

研究要旨 Prime-boost 法を用い Env を抗原とするワクチンの感染制御効果と Env 糖鎖修飾の影響について検討した。アカゲザル 8 頭を用い 4 頭に SIVmac239 Env または 5 本のアスパラギン結合型糖鎖を欠く d5G-Env を抗原として DNA ワクチンによる prime 免疫、組み換え vaccina による boost 免疫をおこなった。免疫後 8 週に各免疫群の 2 頭に SIVmac239、残り 2 頭に 5 本のアスパラギン結合型糖鎖を欠く変異ウイルス (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 低下した。d-5G 感染では非免疫ザル感染と比較して 1/10 - 1/100 に低下した。しかし両ワクチン群に抑制効果の差は見られなかった。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 d-5G Env ワクチン群に比べ viral load が 1/10 低かった。d-5G 感染では両ワクチン群に差は見られなかった。今後、以上の感染抑制がどのような免疫によるのか、特に感染組織であるリンパ節での解析を行い、感染制御と関連するウイルス特異的免疫の同定と糖鎖修飾の感染、宿主応答への影響を明らかにする。

A. 研究目的

エイズワクチン開発の困難さの根拠のひとつとして、ウイルス外膜蛋白 (Env) に存在する多数の糖鎖が本来は有効であるべき近傍の抗原エピトープを覆い無効にしていることが示唆されている。Env はウイルスの細胞指向性を決定する因子でもあることから糖鎖構造はウイルス感染の標的細胞、組織特異性に影響を与えている可能性も推測される。このような宿主応答、あるいはウイルス感染における糖鎖の役割を理解することはエイズウイルスに対する有効な免疫を誘導する方法あるいはエイズウイルス感染増殖を阻止する方法を開発する上で重要である。我々は SIV Env gp120 上の 23 個の糖鎖についての欠失変異体作成とそのウイルス増殖能から総計 5 個の糖鎖を欠くウイルス ($\Delta 5G$) を作成しサルにおける増殖性、病原性、免疫原性を親株 (SIVmac239) と比較した。 $\Delta 5G$ は感染後 3 週までの初期感染までは SIVmac239 と同様な感染増殖を示したが、親株と異なりウイルス感染は効率良く制御され感染後 8 週までには検出されなくなった。

さらに感染後 1 年に SIVmac239 をチャレンジ接種したがウイルス感染は防御された。これらの結果は 5 個の糖鎖欠失がウイルスの性質に変化を与え、特に宿主応答が変化することにより感染宿主がエイズウイルス感染を制御できるようになったことを意味する。

前年度は、Wt-Env ワクチンは d-5G Env ワクチンと比べて高い感染制御効果を示す。ワクチンで誘導された免疫 (細胞性免疫、液性免疫) においても Wt-Env ワクチンにより高い免疫が誘導されていることを報告した。しかしこれら免疫の解析は血液を材料とすることからこの結果がウイルス増殖の場であるリンパ組織での免疫を反映しているとはいえない。また防御免疫の効果は SIVmac239 感染に対する結果であることからワクチン抗原とチャレンジウイルスの一致が重要であった可能性は否定できない。

そこでチャレンジウイルスとして d-5G を用いること、リンパ節での免疫反応とウイルス感染制御との関係を調べるために再度動物実験を行った。

B. 研究方法

アカゲザル

ミャンマー原産の育成ザル、オス、2才、体重2Kg、Bウイルス、SRV、STLV、SIVに対する抗体が陰性、培養リンパ球におけるSIV増殖性に問題がないサルで、1群4頭、2群の合計8頭を用いた。

DNA prime 組み換えワクシニア Boost 法による Env 蛋白免疫

DNA ワクチン用に開発された pJW4303 ベクターに SIVmac239 または Δ5G の gp120 の蛋白コード DNA 導入した Plasmid (pJWSUmac, pJWSUmacΔ5G) または pJW4303 ベクター2mg を 0, 4, 8 週に大腿部左右2カ所に筋肉内接種した。24 週に SIVmac239 または Δ5G の gp160 を発現する組み換えワクシニアまたはワクシニアベクター (WR 株) 5×10^7 PFU を大腿部左右2カ所に皮内+筋肉内接種した。

ウイルス

SIVmac239 と糖鎖変異体 (d-5G) を用いた。Δ5G は SIVmac239DNA を元に env 上の N-glycosylation sites (79, 146, 171, 460, 479 アミノ酸残基) の Asn を Gln に置換することにより作成した。実際の糖鎖の減少は生化学的な方法で確認した。ウイルスストックはウイルス DNA クローンを培養細胞 (SW480 または COS-1) に transfection を行い作成した。Transfection 2-4 日後の培養上清を種ウイルスとしてアカゲザル培養リンパ球を用いてさらに増殖させ感染実験用ウイルスとした。ウイルス量は gag 抗原量については Coulter 社の p27 gag antigen assay kit により、TCID₅₀ はサル CD4 陽性 T 細胞 (CytT/HVS) を用いて測定した。

ウイルス接種

20 TCID₅₀ の SIVmac239 または d-5G を免疫開始後 32 週に静脈内接種した。

血しょうウイルス RNA 量の測定

血しょう中のウイルス RNA は Qiagen 製キッ

トを用い精製した。ウイルス RNA 量は SIV の gag 遺伝子配列から作成したプライマー:

the gag primers, forward primer: 697F
(5' GCAGAGGAGGAAATTACCCAGTAC 3'),
reverse primer: 764R

(5' CAATTTTACCCAGGCATTTAATGTT 3')
and TaqMan probe 740T:

(FAM- 5' TGTCCACCTGCCATTAAGCCCGA
3'-3'-TAMRA)を用い、RT-PCR キット (TaqMan
EZ RT-PCR kit) を用いてリアルタイム PCR 法
により測定した。

フローサイトメトリーによる末梢血リンパ球 の細胞表面抗原の解析

血中のリンパ球サブセット (CD3+, CD4+,
CD8+, CD16+, CD20+, CD29+リンパ球) の割合
についてそれぞれの2種類のモノクローナル
抗体の組み合わせにより解析した。血中の
CD4+細胞数は自動血球計算機によりリンパ球
数を測定し、フローサイトメトリーの結果を
用いて CD4+細胞数を算出した。

Env ペプチド ELISA

SIVmac239 Env をカバーする 72 個の 13 mer
overlapping 25mer ペプチドを用いて、まず 10
ペプチドずつをプールした 7 pooled ペプチド
をペプチド ELISA 用プレートに固定し、100
倍希釈した血漿を用いて ELISA 抗体価を測定
した。次に抗体価が高い pooled ペプチドにつ
いて個々のペプチドを用いて ELISA 抗体価を
測定した。

中和抗体価の測定

SIV tat 依存性に発現する分泌型アルカリフォ
スファターゼ遺伝子をレポーター遺伝子として
持つ CEMx174 を用いてウイルス感染量を高感
度に測定できる系を用いて、血しょう中のウ
イルス中和抗体価を測定した。

中和されるウイルスとしては SIVmac239、
Δ5G、マクロファージ指向性ウイルス、
"MERT", (4 個のアミノ酸置換 M,E,R,T を
持つ SIVmac239 の Env 変異ウイルス) を用い
た。

ELISPOT assay による末梢血中の SIV 特異的 CD4+ T 細胞または CD8+ T 細胞の頻度の測定から末梢リンパ球を分離後、抗 CD4 抗体結合磁気ビーズまたは抗 CD8 抗体結合磁気ビーズを用いて末梢リンパ球中の CD4+ T 細胞または CD8+ T 細胞を除き、SIV 抗原により刺激し活性化された T 細胞が産生する IFN-g を免疫学的に染色し SIV 抗原により活性化された T 細胞の頻度を算出した。抗原刺激の方法としては wt-Env と Δ5G Env の比較には Env SU を発現する組換えセンダイウイルスを BLCL に感染させ、psolaren UV 処理によりウイルス、細胞を不活性化したものを用いた。Env SU 以外の SIV タンパクについては全 SIV タンパクをカバーする over-lapping peptides を用いた。ペプチドを用いる場合は末梢リンパ球に直接パルスして抗原刺激を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では動物実験が中心であることから、動物実験方法については倫理上、動物愛護の問題の観点から感染研動物実験委員会が定めたルール、ガイドラインに従った。動物実験開始に際しては事前に感染研動物実験委員会による審査・承認を受けた。

C. 研究結果

実験 1 の結果

SIVmac239 Env (wt-Env) ワクチンと糖鎖欠失変異 Env (d-5G-Env) ワクチンの効果を SIVmac239 感染に対して調べた。wt-Env 免疫群では初期感染のピークは 1 log 低下し、set-point は検出限界以下となり、感染が抑制された。d-5G Env 免疫群では初期感染のピークは低下したが、ウイルス感染は抑制されなかった。

実験 2 の結果

実験 1 では SIVmac239 感染に対する効果のみ調べたことから、実験 2 では d-5G 感染に対する効果も調べた。血中ウイルス RNA 量の測定結果を図 1 に示した。まず SIVmac239 感染では初期感染のピークは実験 1 と同程度で両ワクチン群に差は見られなかった。初期感染

後のウイルス増殖でも実験 1 と一致した。wt-Env 免疫群では 1 頭で 1000 copy/ml 以下に下がり、1 頭では 10,000 copy/ml の持続感染を示した。d-5G Env 接種群の 2 頭は 100,000 copy/ml の持続感染を示した。d-5G 感染に対する効果では両群とも初期感染ピークは 2 頭がそれぞれ 10^6 , 10^5 copy/ml を示し、両群に差は見られなかった。これまで d-5G 感染では初期感染のピークは 10^7 copy/ml 前後であることからワクチン接種ザルでは初期感染のピークが 1/10 から 1/100 に低下したことになる。初期感染後は 4 頭とも感染後 6 週には検出限界以下 (100 copy/ml) となった。未免疫ザルでは初期感染のピーク後に検出限界以下になるのは感染後 16 週以降であることから両免疫の感染抑制効果は明らかであるが、両ワクチンの効果の差は示されなかった。

CD4+ T 細胞、CD8+ T 細胞、B 細胞の変化

図 2 に示されるようにウイルスチャレンジ後に末梢単核球中の CD4+ T 細胞、CD8+ T 細胞、B 細胞の割合の変化はウイルス感染の状態と関連していた。

SIVmac239 感染では感染後 1 週に CD4+ T 細胞が増加し CD8+ T 細胞は減少した。感染後 2 週では逆に CD4+ T 細胞が減少し CD8+ T 細胞は増加した。この感染後 1-2 週の CD4+ T 細胞、CD8+ T 細胞の増減の程度は SIVmac239 感染が d-5G 感染よりやや大きい傾向が見られた。初期感染後の感染レベルについては viral load が高い個体では CD4+ T 細胞が低下し CD4+ T 細胞が高く、viral load が低い個体では逆の関係が見られた。B 細胞レベルについては d-5G Env ワクチン接種群で SIVmac239 チャレンジの 1 頭で SIV 持続感染と関連する B 細胞の増殖が見られた。同じ現象は実験 1 でも 2 頭で観察された。

D. 考察

ワクチンにより誘導される感染防御はウイルス感染が拡大するウイルス接種直後から感染後 2-4 週までの初期感染時と感染後 4 週以降の初期感染が抑制され、感染と免疫による抑

制が平衡となる状態 (set point) で異なっていることが推測される。

前年度の実験 1 (wt-Env ワクチンと d-5G-Env ワクチンの SIVmac239 感染に対する効果) について振り返ると初期感染抑制効果においては両ワクチンはともに初期感染のピークを 1/10 程度抑制した。しかし set point での効果は両ワクチンで異なり、wt-Env ワクチンでは vector control と比べ viral load は 1/100 に抑制があったが、d-5G-Env ワクチンでは抑制効果が見られなかった。この 2 time points での感染制御の違いについてウイルス特異的免疫の結果から考察が可能だ。

初期感染抑制はチャレンジ前に誘導されている免疫に依存すると考えられる。Env 特異的な T 細胞 (CD4+ または CD8+) は平均で 2 倍の細胞が wt-Env ワクチン群で誘導されていた。中和抗体についてはいづれの群においても SIVmac239 に対する中和抗体は誘導されなかったが、中和されやすい SIV に対する中和抗体価では wt-Env ワクチン群が高かった。viral load のピークも wt-Env ワクチン群で少し低かったことからこの特異免疫誘導の差との関連が考えられる。しかし初期感染のウイルスレベル (10^6 copy/ml) が高いことから実用的なワクチンとなりえない。ワクチン群で誘導された細胞性免疫のレベルが不十分なのか、これらの T 細胞が感染部位 (リンパ組織) で十分に (機能的、量的) 誘導されたのか? この点について解析する必要がある。

set point の違いと関連する感染制御免疫については感染後に誘導される SIVmac239 に対する細胞性免疫誘導からその役割を考察することができる。まず両ワクチン群間で明らかな差が見られるのはウイルス特異的 CD4+T 細胞の維持の点だ。チャレンジ後に誘導維持は Wt-Env 群のすべてのサルと set point が低かった d-5G Env 群の 1 頭だけであった。ウイルス特異的 CD8+T 細胞の誘導では wt-Env 群の半数で低かったことから誘導の差で見ることにはできない。しかしこの結果についても末梢血の解析だけでは不十分だ。リンパ組織の細胞の解析が必要だ。

実験 1 のサルの解剖時のリンパ節の病理学的解析からは感染制御ザルに特異的に CD3 の発現が低い細胞の集積が見られることからこの細胞の関与についても解析が必要だ。

以上の課題についての解析を目的として今回の実験 2 を行った。本実験ではワクチン接種後ウイルスチャレンジ直前、感染後 8 週、安楽殺時にリンパ節を採取しこれらの細胞の誘導、性質を解析する予定だ。

もうひとつの実験 2 の目的は d-5G に対する感染防御について両ワクチンの効果を調べることだ。

結果に示されるように、両ワクチン群で差は見られなかった。しかし初期感染の抑制については非免疫ザルでの d-5G 感染と比較すると初期感染は 1/10 から 1/100 抑制された。d-5G が SIVmac239 と比べて誘導された免疫に感受性がある、あるいは d-5G が免疫機能障害性が低いことから誘導された免疫が感染後も維持されるためであることも重要な理由と考えられる。

E. 結論

糖鎖欠変異ウイルス d5G の Env と野生型の Env の防御免疫誘導能について SIVmac239 感染と d-5G 感染に対する効果を検討した。初期感染の感染抑制は SIVmac239 感染に対する効果が比べ d-5G 感染に対する効果より大きかったが、Env の糖鎖修飾の違いは影響はなかった。set point における感染特性効果については、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。今後この違いの原因について SIV 特異的免疫について解析を行う。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Villinger F, Miller R, Mori K, Mayne AE, Bostik P, Sundstrom JB, Sugimoto C, Ansari AA: IL-15 is superior to IL-2 in the generation of long-lived antigen specific memory CD4 and CD8 T cells in rhesus macaques. Vaccine, 2003. (in press)

- 2) Sugimoto C, Tadakuma K, Otani I, Moritoyo T, Akari H, Ono F, Yoshikawa Y, Sata T, Izumo S, Mori K: *Nef* gene is required for robust productive infection of Simian Immunodeficiency Virus in T-cell-rich paracortex in lymph nodes. *J Virol* 77: 4169-4180, 2003.
- 3) Xing HQ, Moritoyo T, Mori K, 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* 9: 508-518, 2003.
- 4) Villinger F, Mayne AF, Bostik P, Mori K, Jensen PE, Ahmed R, Ansari A: Evidence for antibody mediated enhancement of SIVgag antigen processing and cross presentation in SIV infected rhesus macaques. *J Virol* 77: 10-24, 2003.
- 5) 森 一泰、永井美之: 糖鎖と AIDS ウイルス. *Molecular Medicine*. 9: 1062-1069, 2003.

2. 学会発表

- 1) Sugimoto C, Shioda T, Yasutomi Y, Yamamoto N, Nagai Y, Mori K: Properties of a quintuple deglycosylated SIVmac239 mutant as a novel attenuated SIV. 21th annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, October, 2003, Seattle, USA.
- 2) Sugimoto C, Ohgimoto S, Kusakawa S, Takebe Y, Shioda T, Nagai Y, Mori K: Influence of Deglycosylation on efficacy of Env based vaccine. 21th annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, October, 2003, Seattle, USA.
- 3) 杉本智恵、保富康宏、塩田達雄、山本直樹、永井美之、森 一泰: 糖鎖欠損変異 SIV の新規 attenuated virus としての性質. 日本エイズ学会 (神戸) 2003.
- 4) 森 一泰、杉本智恵、中山英美、塩田達雄、草川 茂、武部 豊、保富康宏、永井美之: Env エイズワクチンにおける糖鎖の重要性. 日本エイズ学会 (神戸) 2003.

SIVmac239 challenge: Mm0133, Mm0134, Mm0136, Mm0138

d-5G challenge: Mm0133, Mm0134, Mm0136, Mm0138

图1 Viral load

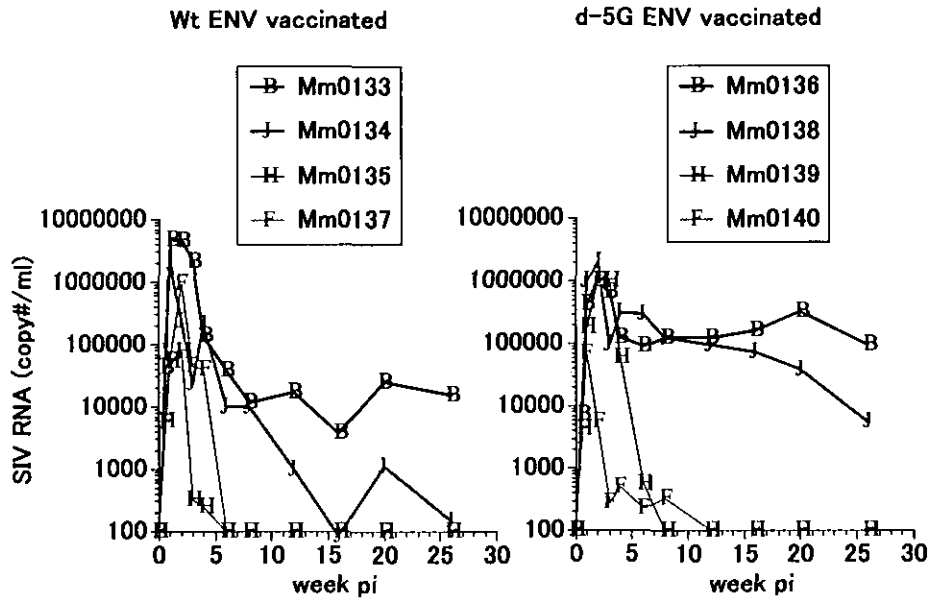
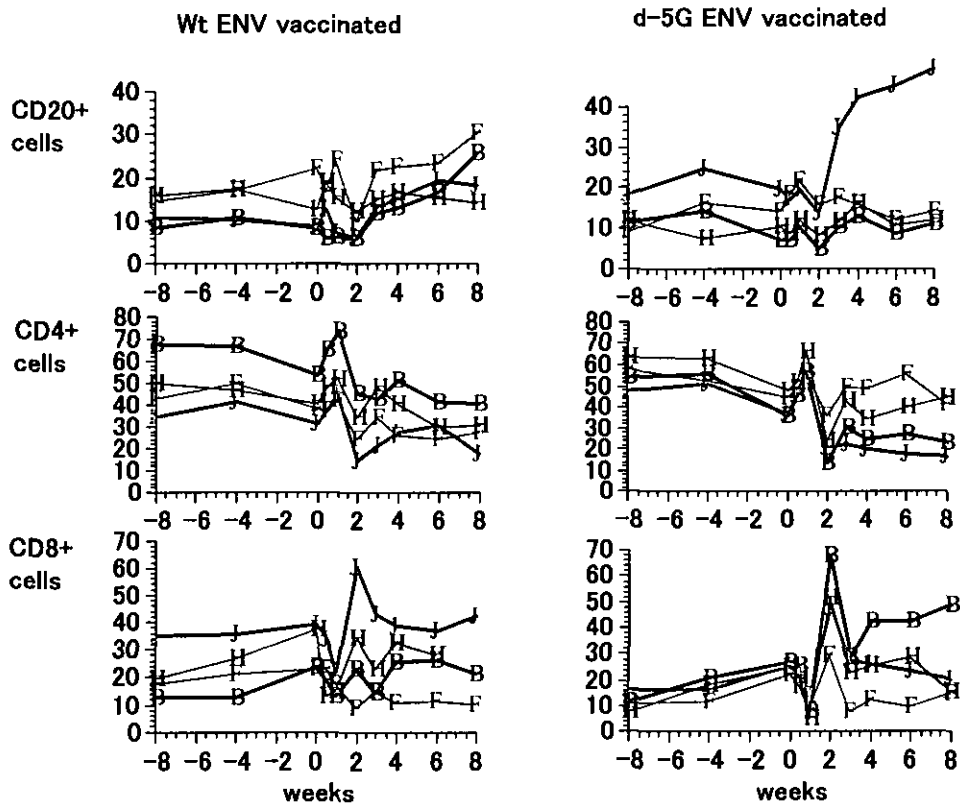


图2 CD4+ T cells, CD8+ T cells, and CD20+ B cells in PBMC



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

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 教授
研究協力者 三隅 将吾 熊本大学 大学院医学薬学研究部
高宗 暢暁 熊本大学 大学院医学薬学研究部

研究要旨 HIV-1 coreceptor CCR5 の Arg168-Cys178 から構成される特殊立体構造を Undeca-peptidyl arch (UPA) と名づけ、この特殊立体構造をミミックした Cyclic dodecapeptide-multiple-antigen peptide conjugate (cDDR5-MAP) を調製した。この cDDR5-MAP 抗原をマウスに免疫して誘導される抗体は、細胞表面の native な human CCR5 を特異的に認識し、HIV-1R5 ウイルスの感染防止効果を示すことが明らかになっている。本年度は、よりヒトに近縁な霊長類であり、AIDS の動物モデルとして用いられるカニクイサルにおける cDDR5-MAP の抗体誘導活性を検討した。その結果、カニクイサルにおいても cDDR5-MAP 抗原は細胞表面の native CCR5 を認識する特殊抗体を誘導することが認められた。さらに本血清は、clade B HIV-1R5 ウイルスだけでなく 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。従来の治療薬・ワクチンの概念を超越した cDDR5-MAP 抗原を用いた本ワクチン戦略は、HIV-1 の感染・発症制御に有効であると考えられる。

A. 研究目的

「HIV 感染予防に関する研究」の一貫として、分担研究者らは「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」を遂行している。分担研究者らは、HIV-1 の侵入に必須な HIV-1 の coreceptor (CCR5) の第2細胞外 domain の一部を構成する特異的立体特殊構造 (Undeca-peptidyl arch : UPA) に注目し (図1)、この UPA domain を HIV-1 の侵入に必須な domain と考え、従来のワクチンの基本概念を逸脱して、生体の守りを固め、ウイルス侵入を防止する手段を考案した。この特殊構造を構成する 11 アミノ酸残基から Cys 残基を除いた 10 アミノ酸残基に、スペーサーアームジペプチド (Gly-Asp あるいは Gly-Glu) を挿入して環状 dodecapeptide として再構築し、multiantigen peptide (MAP) に結合させ、免疫抗原として用いた (図2)。この環状 dodecapeptide は Molecular operating environment (MOE) を用いた計算化学的手法によって CCR5 の UPA 構造を形成しうることが示された (図2)。この抗原 (ワクチン) によって誘導される特殊抗体は HIV-1 の感染から生体を守る効果を発揮すると考えられ、

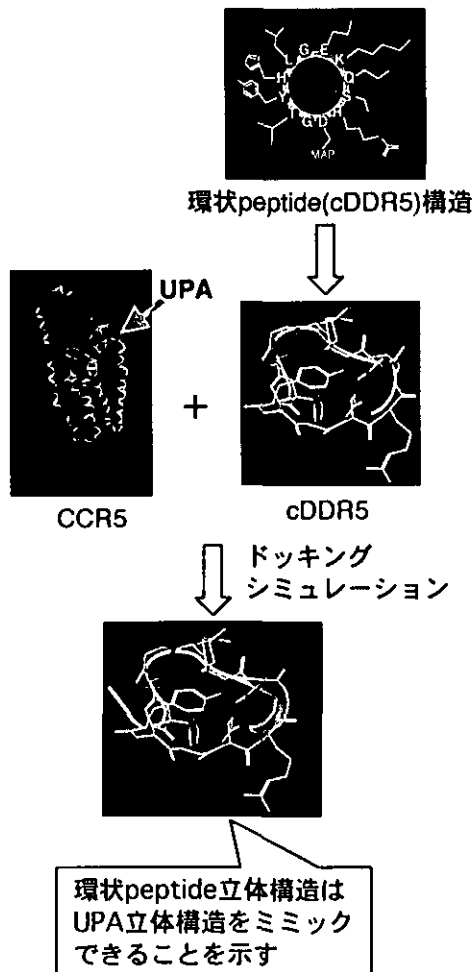
「HIV 感染予防に関する研究」の目的を達成することができる。

図1



The hypothetical structure model of CCR5 was based on its homology with rhodopsin, and energy minimized with Molecular Operating Environment, MOE.

Fig.2 計算化学を用いたcDDR5とCCR5のUPAの構造比較



B. 研究方法

1) cDDR5-MAP の調製

HIV-1 coreceptor CCR5 の Arg168-Cys178 から構成されペプチドから Cys を除き、スペーサーアームジペプチド (Gly-Asp あるいは Gly-Glu) を挿入してペプチド合成機で合成した後、同ペプチドの head and tail の酸・アミド結合を介して環化させ、スペーサーアームジペプチドのカルボキシル基と MAP のアミノ基を結合させたのち、脱保護をして cDDR5-MAP を調製した。

2) カニクイサルに対する免疫

B virus, SVV, SRV, STLV 抗体陰性カニクイサル (中国産) 4 歳、オス、体重 2.9-3.6 kg、6 頭 (cDDR5-MAP 免疫サル 3 頭 [No.4, 5, and 6]、コントロールとして MAP-免疫サル 3 頭 [No.7, 8, and 9]) を用いた。アジュバントは Freund

complete adjuvant (FCA) または Freund incomplete adjuvant (FIA) を用いた。0 および 1 週後に 300 μ g の cDDR5-MAP または MAP 抗原とアジュバントとして FCA を含むエマルジョンを腹腔に注射し、6 週後に 300 μ g の cDDR5-MAP または MAP 抗原とアジュバントとして FIA を含むエマルジョンを皮下に注射した。

初回免疫前 (pre)、初回免疫 2、4、6、8、及び 10 週後 (2w, 4w, 6w, 8w, and 10w, respectively) に採血を行い血清を分離し、抗血清として用いた。

3) 抗体の諸性質の検討

免疫サル血清の CCR5 に対する反応性

cDDR5-MAP 抗原を免疫した No.4, 5, 及び 6 サル抗血清 (pre and 8 weeks) および MAP 抗原を免疫したコントロール No.7, 8, 及び 9 サル抗血清 (pre and 8 weeks) を透析処理 (Mw100,000 cut off) したものを、MAGIC-5 細胞に処理し、洗浄後 FITC-conjugated goat anti-monkey IgG を反応させフローサイトメータで分析した。また CCR5 に対する特異的なりガンドとして知られる MIP-1 beta (100 ng/ml) を competitor として用いた。

HIV-1 感染防止効果測定

ウイルスは clade B として HIV-1 JRFL 株 (R5 ウイルス) または HIV-1 LAV 株 (X4 ウイルス) を用いた。また non-clade B HIV-1 として HIV-193RW004 (clade A), HIV-1MJ4 (clade C), および HIV-192TH009 (clade E) を NIH AIDS Research & Reference Regent Program から入手し、ヒト PBMC に感染させ propagate したウイルスを用いた。MAGIC-5 cell に対し、抗血清存在下あるいは非存在下 HIV-1 (R5, X4 ウイルス) を感染させ、感染を示すブルー細胞数を顕微鏡下計測した (MAGIC-5 assay)。

(倫理面への配慮)

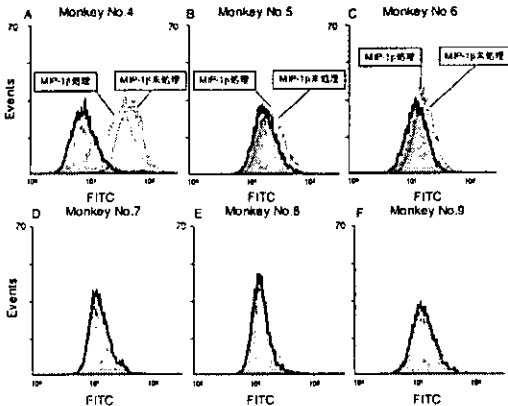
実験動物に対する動物愛護上の配慮については、必ず所属施設の倫理委員会等の規約に基づいて本実験を行った。

C. 実験結果

1) 抗血清の CCR5 への反応性に関する検討

cDDR5-MAP 抗原を免疫したサルに血清中に CCR5 に対する抗体が誘導されていることを調べるため、cDDR5-MAP 抗原免疫前 (pre) 後 (8 weeks) の血清および MAP 抗原免疫コントロールサル血清を透析処理後 CCR5 を高発現している MAGIC-5 細胞に処理した。さらに 2 次抗体として FITC-conjugated goat anti-monkey IgG を反応させフローサイトメータで分析した。その結果、cDDR5-MAP 抗原を免疫した No.4、5、および 6 サル血清 (pre) を反応させた MAGIC-5 細胞の蛍光強度と比較して、No.4、5、および 6 サル血清 (8 weeks) を反応させた MAGIC-5 細胞は明らかに蛍光強度の増大し、特に No.4 サル血清において著しかった (図 3 A, B, および C)。一方 MAP 抗原を免疫した No.7, 8, および 9 サル血清においては免疫前後で血清の反応性に変化はなかった (図 3 D, E, および F)。また CCR5 に対する特異性を確認するため、MIP-1beta を competitor として用いて反応させた場合、その反応性の低下が認められたことから (図 3 A, B, および C)、CCR5 に対する抗体の反応が裏付けられた。

図3. cDDR5-MAP免疫サル血清中の抗体のCCR5に対する反応性



2) HIV-1 感染防止効果測定

cDDR5-MAP 抗原を免疫した No.4, 5, 及び 6 サル抗血清 (pre, 8 weeks, and 10 weeks) および MAP 抗原を免疫したコントロール No.7, 8, 及び 9 サル抗血清 (pre, 8 weeks, and 10 weeks)、または各血清を透析処理 (Mw100,000 cut off) した後、clade B HIV-1 (JRFL, LAV-1) に対す

る感染防止効果を MAGIC-5 assay によって評価した。その結果、R5 virus である HIV-1 JRFL 株に対して pre 血清ではいずれのサルの pre 血清では抗 HIV 効果がないのに対し、免疫後 8 weeks および 10 weeks の血清において著しい感染防止効果を示した (図 5 A)。一方 X4 virus である LAV-1 株に対して、いずれのサル血清 (pre, 8 weeks, and 10 weeks) も感染防止効果を示さなかった (図 5 B)。この効果は各血清を透析処理 (Mw100,000 cut off) した場合でも同様であった (図 5 C and D)。また MAP 抗原免疫サルのいずれの血清も HIV-1 JRFL 株および HIV-1 LAV-1 株に対して感染防止効果を示さなかった (図 5 C and D)。

また、non-clade B HIV-1 (HIV-193RW004 (clade A), HIV-1MJ4 (clade C), および HIV-192TH009 (clade E)) に対する各血清の感染防止効果を MAGIC-5 assay によって評価した。上記 non-clade B HIV-1 は NIH AIDS Research & Reference Regent Program から入手し、図 4 の方法に従い各ウイルスを一度 propagate したものを使用した。その結果、cDDR5-MAP 抗原を免疫した No.4, 5, 及び 6 サル抗血清 (8 weeks, and 10 weeks) は各 pre 血清と比較して各ウイルスの感染防止を示した (図 6)。

図4 Preparation of Non-Clade B HIV-1

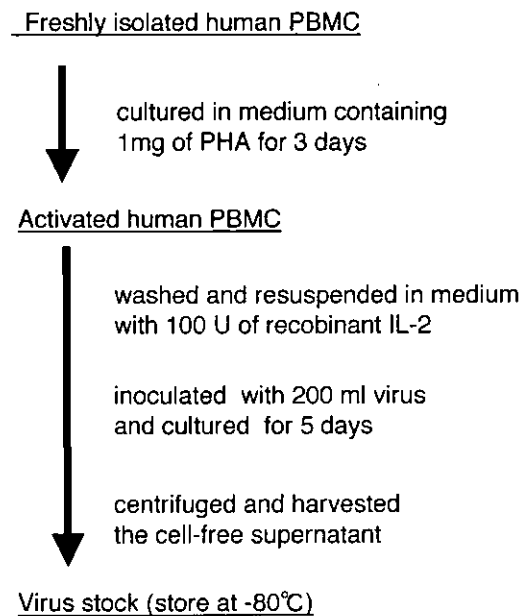


図5. Clade B HIV-1に対する抗HIV効果

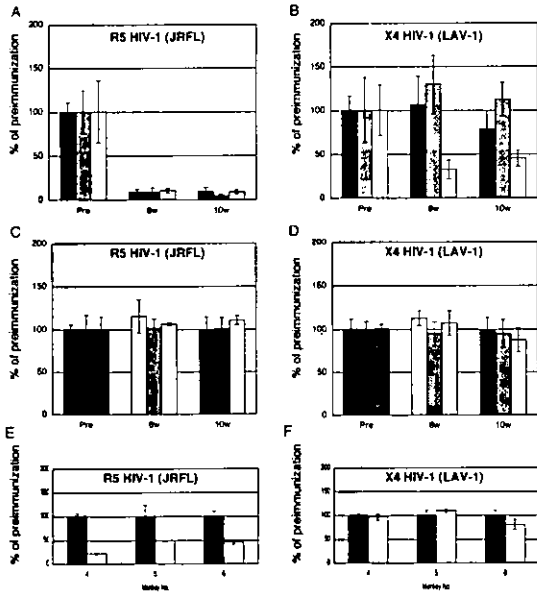
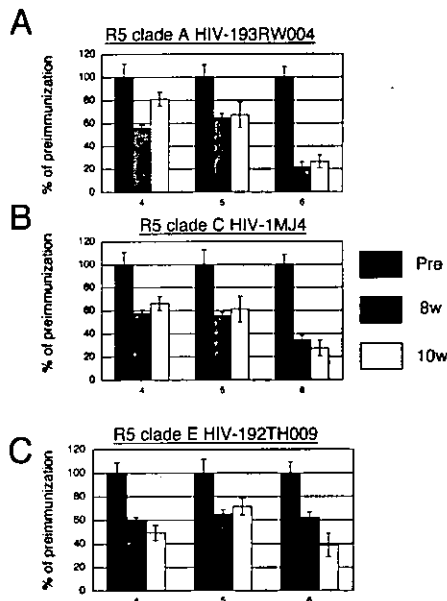


図6. Non-clade B HIV-1に対する抗HIV効果



D. 考 察

以前までに、分担研究者らは、CCR5 の UPA の立体構造をミミックした抗原ペプチド cDDR5-MAP を調製し、さらにこれを免疫抗原としマウスを用いて作出した単クローン抗体が、細胞表面の native な human CCR5 に特異的に結合し、HIV-1 R5 ウイルスである JRFL 株の感染を阻害する活性を有することを明らかにした。この結果から、cDDR5-MAP が、CCR5

を認識し HIV-1R5 ウイルス感染を防御する抗 CCR5 抗体を誘導する特性をもつ抗原であることが明らかになった。

本年度は、よりヒトに近い霊長類であり、AIDS のモデル動物として用いられるカニクイサルにおいて、cDDR5-MAP が、CCR5 を認識し、さらに clade を超えて HIV-1R5 (clade B, A, C, and E) の感染をブロックする抗体を誘導するかどうかを検討した。

FCA および FIA をアジュバントとして cDDR5-MAP を免疫したカニクイサルの透析処理抗血清 (Mw100,000 cut off) は、BIAcore 分析の結果、cDDR5 センサーチップと特異的に結合したことから、抗血清中には cDDR5 に対する抗体の存在が示唆された (data not shown)。また、この血清中に含まれる抗体が CCR5 の native 構造を認識するかどうかを検討した結果、MAGIC-5 細胞の CCR5 を認識する抗体を含むことが示唆された (図 3)。さらに、cDDR5-MAP 免疫で誘導された血清中の抗 CCR5 抗体が、clade を超えた R5 HIV-1 の感染をブロックする活性を有することが示唆された (図 4, 5)。この抗血清は、HIV-1R5 ウイルスの感染を著しく抑制したのに対し、HIV-1X4 ウイルスの感染を有意に抑制しなかった。以上の結果は、マウスを用いた実験と一致する結果であった。これらの結果から、cDDR5-MAP は、カニクイサルにおいてもマウスの場合と同様に、CCR5 を認識し HIV-1R5 ウイルス感染を防御する抗 CCR5 抗体を誘導する特性をもつ抗原であると考えられる。

1996 年 5 月に coreceptor の発見が報じられて以来、約 1 年後に HIV-1 coreceptor に変異を有するコーカサスの数%の人々は HIV-1 感染に対して抵抗性であることが遺伝子解析の結果判明した。また、イタリアにおけるコホート研究の結果、CCR5 に対する自己抗体保有者はセックスパートナーがエイズ患者にもかかわらず、HIV-1 に感染しないことが報告された。さらに、分担研究者らの報告に前後して、健康成人混合血清から CCR5 のペプチドに反応する IgG が HIV-1 の感染を防止したことが報告された。また、産経女性の血清には CCR5 に対す

る自己抗体が存在し、in vitro で HIV-1 R5 ウイルスの感染を防止することが報告され、CCR5 に対する自己抗体の誘導は HIV-1 R5 ウイルスの感染防止に極めて重要であると考えられる。

本年度は、よりヒトに近い霊長類であり、AIDS のモデル動物として用いたカニクイサルの実験において、分担研究者らは本抗原がサル個体の中で、HIV-1R5 の感染をブロックすることのできる特殊抗体の誘導を明らかにした。さらに、次年度はサルに適合する SHIV の調製、animal infectious dose の決定、免疫したサルにおける抗体の力価の測定等の生化学的基礎研究を遂行し、データを蓄積した上で、そのウイルスによるカニクイサルへの感染・エイズ発症を確認し、SHIV (R5 ウイルス) 感染抑制実験を行う予定である。また、SHIV (R5 ウイルス) がカニクイサルで、エイズが発症しない場合にはエイズ発症が確認されているアカゲサルを用いて本研究を遂行する。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Misumi, S., Endo, M., Mukai, R., Tachibana, K., Umeda, M., Honda, T., Takamune, N., Shoji, S. A novel cyclic peptide immunization strategy for preventing HIV-1/AIDS infection and progression. *J. Biol. Chem.* 278: 32335-32343, 2003.
- 2) 三隅将吾、高宗暢暁、庄司省三 HIV-1 感染および病態進行を阻止する新規環状ペプチドワクチンの開発に向かって—HIV-1 コレセプターに対する自己抗体誘導による HIV-1 感染阻害—*医学のあゆみ* 207: 67-72, 2003.
- 3) Misumi, S., Takamune, N., Ohtsubo, Y., Waniguchi, K., and Shoji, S. Zn²⁺ binding to cysteine-rich domain of extracellular human Immunodeficiency virus type-1 Tat protein is associated with Tat protein-induced apoptosis.

AIDS Res. Hum. Retroviruses. 20: 297-304, 2004.

- 4) Misumi, S., Morikawa, Y., Tomonaga, M., Ohkuma, K., Takamune, N., and Shoji, S. Blocking of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Virion Autolysis by Autologous p2gag Peptide. *J. Biochem.*, 2004. in press
- 5) Misumi, S., Takamune, N., and Shoji, S. Proteomics of HIV-1 virion. *BIOMEDICAL AND PHARMACEUTICAL APPLICATIONS OF PROTEOMICS* (Editor H. Hondermarck) Kluwer Academic Publisher, Netherlands. Chapter 14 (2003)

2. 学会発表

- 1) 庄司省三 et al. CXCR4 を基礎にした新規ペプチド免疫戦略とその抗 HIV-1 感染防御効果. 第 17 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集、日本エイズ学会誌 vol.5 No4. 2003, p372
- 2) 庄司省三 et al. CCR5 及び CXCR4 を mimic した環状キメラ抗原を免疫したカニクイサルの抗血清による cross-clade R5 及び X4 HIV-1 感染阻害効果. 第 17 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集、日本エイズ学会誌 vol.5 No4. 2003, p372
- 3) 庄司省三 et al. Chemokine receptor CCR5 の細胞外第 2 ループ(ECL-2)特異的認識自己抗体により種々の HIV-1 に対する感染防止効果. 第 17 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集、日本エイズ学会誌 vol.5 No4. 2003, p373

F. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

庄司 省三 環状ペプチド及びエイズワクチン
出願人：日水製薬株式会社
国際公開番号、出願番号：WO00/47609、
PCT/JP99/06174 出願日：1999年5月11日