

II. 分担研究報告書

研究総括とサルを用いたワクチンの有効性評価研究

主任研究者 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：HIV ワクチン開発におけるワクチン効果を示す候補ワクチンを前臨床レベルで開発するために基礎的研究を完成させることを目的にして開発研究を進める。

協力研究者

仲宗根正、松尾和浩、浜野隆一、染谷健二、川原守、滝澤万里、泉泰之、原敬志、吉野直人、堀端重男、兼清優、山本直樹（国立感染症研究所・エイズ研究センター）

A. 研究目的

HIV ワクチンの臨床試行を目標として現在開発されているプライムブーストワクチンのレジメンの安全性及び実用化研究を行った。

病原性サルモデルにおいて efficacy を示すワクチンレジメンの開発を目的として本研究ではまず SIV Whole Gag 遺伝子を発現する組換え BCG ワクチンでプライミングし、ワクシニア DIs ベクターを用い rDIs-Gag ワクチンでブーストするプライムブーストレジメンを開発した。その結果、細胞性免疫の有意な上昇が認められた。このワクチンレジメンが efficacy を示すかどうかをみることに、さらに efficacy を示すことができれば、その防御免疫をアクセサリ遺伝子を標的にした Tat ワ

クチンを追加することによって防御免疫の増強を得ることができるかどうか検討することを目的とする。さらに構造遺伝子の標的を Env 遺伝子まで拡大して粘膜免疫等による有効な粘膜ワクチン開発を行うことを目的とする。

さらに組換えワクシニアベクターとしてこれまで使用されている MVA ベクターと比較して組換えワクシニア DIs ワクチンの in vivo における安全性を経時的に観察し、その有効性を明らかにする。

B. 研究方法

1. カニクイザルを用いたサル HIV/AIDS モデルの評価法として当研究で開発された組換え BCG、組換え DIs のプライムブーストワクチン、及び単独における免疫誘導能を実用化をめざしてヒト投与ルート、量で免疫し、特に免疫の誘導が十分であるかどうかを IFN γ ELISPOT 法、細胞内サイトカイン、リンパ球増殖反応でモニターした。

2. 組換えワクシニアベクターの免疫原性と安全性の関連を検索するために米国 NIH の Bernard Moss 博士の研究室で作成し、定量された組換え MVA gag ワクチンを DIs ワクチンと比較してその安全性と免疫誘導能を検索する。
3. BCG リコンビナントワクチンの実用化を検討するために、先行する BCG 免疫により組換え BCG ワクチンの免疫誘導に対する既往症反応を検討するために、ヒトに投与される BCG ワクチンの量 0.1mg BCG Tokyo 株を皮内接種し、2 年後に組換え BCG と組換え DIs のプライムブーストレジメンで免疫誘導し、その HIV 免疫誘導に対する先行する BCG 免疫の影響を検討する。

(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. 研究成果と考察

本年度の研究ではヒト投与量及びルートを参考にしてサルモデルにおけるワクチン抗原及び投与動物の安全性及び免疫原性についてモニターし、その成果をヒトの臨床試行に応用することを目標に研究し以下の成果が得られた。

1. 組換え DIs Gag ワクチンは安全性に優れているが防御免疫を誘導するのに 10^6 pfu の経静脈接種で防御免疫が得られることを明らかにしている。本年度の研究ではヒト接種可能な $10^6 \sim 10^7$ のワクチン抗原

で皮内接種し、昨年度得られた経静脈接種の例との比較を試みた。さらに粘膜チャレンジにより感染防御能を解析するとウイルスチャレンジ後観察した 4 ヶ月から約半年にわたって経静脈接種で得られたのと同程度即ちウイルスコピー数が数 10 倍から数 100 倍のレベルで低下させることができた。さらに CD4 の減少を抑制することができた。これらの結果から組換え DIs Gag ワクチンは皮内接種においても経粘膜ウイルスチャレンジをコントロールすることが明らかになった。

2. 1 の成果をもとにしてプライムブーストワクチンのヒト投与量及びルートにおける検索を行った。組換え BCG ワクチンはヒト投与量である 0.1mg を皮内接種し、ブースターワクチンとして組換え DIs ワクチンを 10^7 pfu 皮内接種し、免疫誘導能を観察すると Elispot 及び細胞内サイトカインの検出で抗原特異的なインターフェロン産生細胞の有意な上昇が認められ、臨床試行における投与ルート及び量の基礎データが得られた。
3. 既に膨大なデータが得られている組換え MVA Gag ワクチンコントロールサンプルとして組換えワクシニア DIs Gag をほ乳類細胞における抗原の産生とウイルスの複製の点で比較検討した。MVA では CV1, ハムスター-BHK などの細胞でウイルスの著明な複製が認められる。しかし、RK13 ではその増殖が減弱していた。一方組換え DIs ワクチンを接種するとそれらの細

胞では全く増殖能が認められない、しかし、挿入した Gag 抗原の発現が有意に認められ、MVA と異なり複製を伴わない蛋白の発現が蛍光抗体法やフローサイトメータを使った細胞内蛋白検出法によって確認された。さらに in vivo での発現がマウス免疫により有意に認められた。この DIs ベクターの特性はほ乳類動物への DIs 接種におけるウイルス複製時の病原性復帰を否定できることに結びつくと考えられる。

4. ヒトへの実用化の可能性をより明らかにするために上記の組換え BCG 0.1mg 皮内接種、さらに組換え DIs 10^7 pfu 皮内接種で免疫の誘導が著明がおきることが明らかになった。しかし組換え BCG ワクチンの実用化に関して、結核ワクチンとしての BCG ワクチン接種の既往症反応の影響をみるために、プライムブースト免疫に先行して2年前に BCG 東京株を免疫し、その動物を用いた HIV 免疫誘導能を解析中である。これらの成果は次年度の8月までには得られる予定になっており、本プライムブーストワクチンの基本的データが出揃うことになる。これまでの安全性及びワクチン効果の成果を総合して臨床試行のデザインやその評価方法を計画する。その際、臨床試行によって得られるワクチン免疫効果を有効に判定するための本プライムブーストワクチンの抗原特異的免疫誘導能解析法を検討中である。

D. 結論

組換え BCG Gag ワクチンと組換え DIs Gag ワクチンのコンビネーションによるプライムブーストレジメンがサルレベルで安全性に優れ、ワクチン効果を誘導できることを明らかにした。

本年度の研究では、特に本研究に使用しているワクチンベクターのヒト投与量、及びルートを参考にして実用化研究を行い、これまで得られた SIV の遺伝子疑似ワクチンにおけるワクチン効果に類する免疫誘導能を得ることができることを明らかにした。今後、BCG ワクチンの先行免疫の影響を詳細に検討するために、プライムブーストワクチンの効果と BCG の既往症反応の影響を次年度の8月までに明らかにし、ヒトでの臨床試行を視野に入れたワクチンの免疫プロトコルを作成する。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kanekiyo, M., K. Matsuo, M. Hamatake, T. Hamano, T. Ohsu, S. Matsumoto, T. Yamada, S. Yamazaki, A. Hasegawa, N. Yamamoto, and M. Honda. (2004) Codon Optimization of the HIV Gene in *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin Recombinant Elicits Effective Virus-Specific Immunity. Submitted.
- 2) 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 with an R5-tropic SHIV bearing a chimeric envelope carrying subtype E V3 loop among subtype B framework. *Arch. Virol* (2003) 148:973-988.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Assawawitoontip S, Puthavathana P, Pattanapanyasat K, Sukpanichnant S, Thammataksin S, Honda M., Warachit P. Lymphocyte and NK cell subpopulations in HIV seronegative Thais. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2003 Jun;21(2):95-103.
- 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. 2004. 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* 318:493-506.
- 9) Matsuo K, Puthavathana P, Promkhatkaew D, Balachandra K, Ruxrungtham K, Hamano T, Sutthent R, Sittisombut N, Butraporn R, Sriwanthana B, Boonlong J, Izumi Y, Yamazaki S, Yamamoto N, Warachit P and Honda M. (2004) Japan's Collaboration with Thailand in the Development of an HIV/AIDS Vaccine. *AIDS in ASIA* in press.
- 10) Takizawa M, Chiba J, Haga S, Asano T, Yamamoto N, Honda M. 2004. The normalization of guinea pig leukocyte fractions and lymphocyte subsets in blood and lymphoid tissues using a flow cytometric procedure. *Experimental Animals* in press.

1. 口頭発表

1.M. Honda. A Summary of the Five-year Thailand-Japan Cooperative Project for Preclinical Development of HIV-1 Clade E Vaccine with Equal Partnership. Japan-U.S.

- Cooperative Medical Science Program 14th Joint Meeting of AIDS Panel (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 Panel (March 5-7, 2003, Okinawa)
3. 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)
4. 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)
5. 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)

G. 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

サルを用いたワクチン評価系の開発研究

分担研究者 仲宗根 正 国立感染症研究所・エイズ研究センター

研究要旨：HIV ワクチン開発におけるワクチン効果を示す候補ワクチンを前臨床レベルで開発するために基礎的研究を完成させることを目的にして開発研究を進める。

協力研究者

本多三男、松尾和浩、浜野隆一、染谷健二、川原守、海津雅彦、滝澤万里、泉泰之、原敬志、吉野直人、堀端重男、兼清優、浜武牧子、田中陽子、山本直樹（国立感染症研究所・エイズ研究センター）

KS661) の感染性・病原性を以下の実験で検討した。

実験 1：初代クローン SHIV-C2/1 KS661(KS661)・120TCID₅₀ をカニクイサル 1 頭に経静脈接種。

実験 2：KS661・15000TCID₅₀ をカニクイサル 3 頭に経直腸接種。

実験 3：次代クローン SHIV-C2/1 KS661(KS661C)をカニクイサル 17 頭に経直腸接種（それぞれ 2, 2, 20, 20, 200, 200, 200, 200, 200, 200, 2000, 2000, 2000, 2000, 2000, 2000, 20000TCID₅₀）。

実験 4：次代クローン KS661C 感染 CEMx174 細胞（400 万個）をサル血液 3ml あるいは血漿 3ml に浮遊させ、それぞれをカニクイサル 2 頭に経直腸接種。

いずれも経時的に末梢血 CD4 細胞数と血漿ウイルス量を測定した。なお、初代クローンは transfection 後 COS7 細胞から回収された培養上清で、次代クローンはそれを CEMx174 細胞に感染させて得られた培養上

A. 研究目的

我々は、HIV-1 病態解析および抗 HIV-1 ワクチン・薬剤評価を最終目的に、SHIV/サル感染発症モデルを開発した。

B. 研究方法

親ウイルス：ハーバードエイズ研究所・Yichen Lu 博士より提供された SHIV-89.6p を用い、これをカニクイサルで 2 継代することにより SHIV-C2/1 を得た。

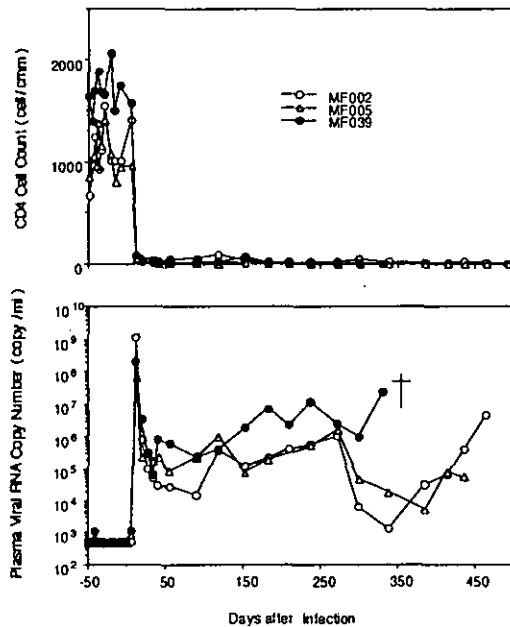
クローン作成：この SHIV-C2/1 はカニクイサルにおいて強い病原性を示したことから、同ウイルスを遺伝子工学的にクローン化した。作成したクローンウイルス（SHIV-C2/1

潜である。

C. 研究結果

実験 1 : 感染成立(1/1)、実験 2 : 感染成立(3/3)、実験 3 : 感染成立(10/17)、実験 4 : 感染成立(2/2)。感染が成立した全ての個体で、親ウイルス(SHIV-C2/1)と同等の CD4 消失と急激なウイルス血症およびその持続が観察された。

Intra-rectal Challenge of SHIV C2/1 KS661 to Cynomolgus Monkeys



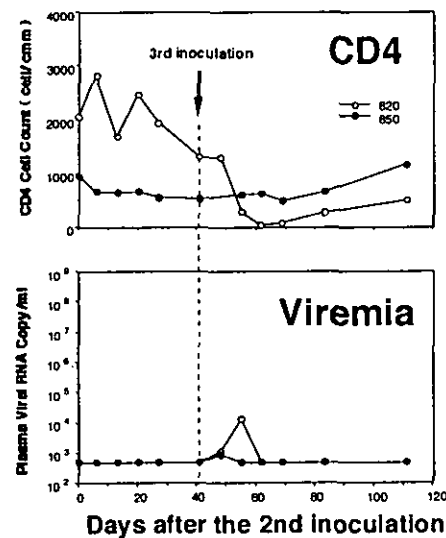
上図は実験 2 の結果である。上段が感染後の CD4 細胞数、下段が血漿ウイルス量の推移を表している。特筆すべきは 1 頭が感染後 1 1ヶ月後に AIDS 死したことである。カニクイサルは赤毛サルに比べて、AIDS を発症しにくいとされており、本症例はカニクイサルでは世界初の AIDS 死と思われる。

下表は、実験 3 の結果をまとめたものである。20TCID50 でも 1 頭が感染したことを考

慮し、1MID50(Monkey Infectious Dose 50%)は 200TCID50 近辺にあると判断した。

Titer for challenge	No. of Infected/Challenged (%)
2 TCID50	0/2 (0)
20	1/2 (50)
200	2/6 (33)
2000	6/6 (100)
20000	1/1 (100)

なお、実験 3 実行中、ウイルス曝露非感染サルと思われる 2 症例を経験した。次項左図はその 2 症例の CD4 細胞数と血漿ウイルス量の推移を表している。2 頭のサルは低力価ウイルスの直腸接種を 2 回受けたが感染せず、3 回目の 2000TCID50 接種により感染した。すなわち、検出感度ぎりぎりの低ウイル



ス血症が一時的に見られ、CD4 細胞は 1 頭では完全に保持され、もう 1

頭では一時的に消失するも接種後 4 週目以降回復した。

D. 考察

初代クローン KS661 は 15000TCID50

で経直腸的に感染性を示したが、それ以下の量 (25, 250, 2500) を用いた別の実験では感染不成立であったことから、1MID50 が 2500TCID50 以上であることが示唆された。感染性を増強させるべく作成した次代クローン KS661C は、実験 3 の結果より 1MID50 が 200TCID50 近辺であることが確認された。いずれのクローンでも、感染個体では親ウイルス同様の病原性が再現されており、分子クローン SHIV/サル感染発症モデルが確立されたと考えられる。本モデルでは感染ルートとして経粘膜 (直腸) を用いており、HIV-1/ヒト・エイズモデルにより近いモデルと考えられる。KS661C に関しては、経直腸接種量として 3000 頭分のウイルスストックがあり、今後のサル動物実験への安定供給量が確保された。さらに、本クローンは 10MID50 をチャレンジ量として、実際に候補ワクチンの評価実験に用いられ、その評価系としての有効性も確認された。

本研究中偶然観察されたウイルス曝露非感染サル (疑い) は、今後の研究課題として非常に興味深い。ヒトにおいても既に HIV 曝露非感染例がいくつか報告されている。このような症例では粘膜面において防御免疫が誘導されている、あるいは遺伝子学的にウイルス耐性遺伝子を持っている、と考えられており、そのいくつかは証明されている。特に、先行するウイルス曝露により防御免疫が誘導されている場合、その誘導された免疫能そのものが、ワクチンが誘導すべき目標であることから、その解析は最重要課題となっている。し

かしながらヒトにおいては、1) 症例が少ない、2) 粘膜のサンプリングが困難である、3) 感染実験が不可能なためその免疫が防御免疫かどうか検討できない、などの問題があり、解析は進んでいない。一方、ウイルス曝露非感染サルモデルが存在すれば、それらの問題は解決され、防御免疫能の解析が一挙に進む。従って、ウイルス曝露非感染サルモデル開発は、防御免疫能解明についてはワクチン開発にとって極めて重要かつ緊急課題である。今後積極的にその開発を進めたい。

SHIV/サル経粘膜感染発症モデル (cell free virus) の完成に対して、Cell-associated virus による SHIV/サル経粘膜感染発症モデルは世界でも未だに開発されていない。本モデルを開発するべく実験 4 を行ったところ、培養液ではなく、自己由来血液あるいは自己由来血漿に KS661C 感染 CEMx174 細胞を浮遊させて接種することにより感染の成立と CD4 細胞の消失が確認できた。この感染が接種溶液中に残っている cell free virus によるものでない事の確認作業が現在進行中である。ワクチン開発では、Cell free virus と Cell-associated virus 両者を防御できる能力が求められており、SHIV/サル経粘膜感染発症モデル (cell-associated virus) 開発も重要課題として、今後取り組んで行きたい。

E. 結論

- 1) HIV-1 病態解析および抗 HIV-1 ワクチン・薬剤評価が可能な HIV-1/ヒト・エイズモデルに近い SHIV/サル経粘

膜感染発症モデル (cell free virus) が完成した。

- 2) 本系では、SHIV は分子クローン SHIV-C2/1 KS661c、サルはカニクイサルを用い、経直腸感染で約 3000 頭分の実験が可能なウイルスストックが確保されている。
- 3) SHIV/サル経粘膜感染発症モデル (cell free virus) は、実際に候補ワクチンの評価実験に用いられ、その評価系としての有効性も確認された。
- 4) 防御免疫能解明ひいてはワクチン開発にとって極めて重要と思われる、ウイルス曝露非感染サルモデル開発の糸口がつかめた。
- 5) SHIV/サル経粘膜感染発症モデル (cell free virus) の完成に対して、SHIV/サル経粘膜感染発症モデル (cell-associated virus) 開発に着手した。

F. 健康危険情報

特になし。

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) 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.
- 3) 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.
- 4) 富田康浩、横山勝、仲宗根正、永井美之、佐藤裕徳. 2003. SIV gp120 コアの機能領域に付加する糖鎖の役割. 日本エイズ学会誌、5:89-91.

2) 口頭発表

- 1) 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 and vaccinia strain DIs elicits protective immunity against pathogenic SHIV infection in macaques. International Symposium on “Research and Development of Recombinant BCG and Vaccinia Virus-Based HIV Vaccine” (Feb 5-6, 2003, Tokyo)
- 2) Nakasone T, Yamamoto N, Izumi Y, Matsuo K, Ami Y, Yamazaki S, Honda M. Prime-boost vaccination with recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin and vaccinia strain DIs elicits protective immunity against pathogenic SHIV infection in macaques. 10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (Feb 10-14, 2003, Boston, USA)
- 3) 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 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 Panel (March 5-7, 2003, Okinawa)
- 4) Ibuki K, Enose Y, Miyake A, Suzuki H, Takahashi M, Horiuchi R, Saito N, Nakasone T, Ami Y, Izumi Y, Honda M, Takahashi H, Miura T, Hayami M. Analysis of viral expansion and immune reaction at early phase of acute pathogenic SHIV intrarectal infection in macaques. 21th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS (Oct. 22-25, 2003, Seattle, USA)
- 5) Suzuki H, Suzuki M, Ibuki K, Masuda K, Minato N, Kawamoto H, Nakasone T, Honda M, Hayami M, Miura T. The effects of pathogenic SHIV infection on the thymus and intrathymic T cell progenitor in rhesus monkeys. 21th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS (Oct. 22-25, 2003, Seattle, USA)
- 6) 伊吹謙太郎、榎瀬良美、三宅在子、鈴木元、高橋めぐみ、堀内励生、斉藤尚紀、仲宗根正、本多三男、高橋秀美、速水正憲、三浦智行 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 (10/3-5, 2003, 青森)

- 7) 鈴木元、鈴木麻貴子、三宅在子、伊吹謙太郎、増田恭子、伊川友活、河本宏、仲宗根正、本多三男、速水正憲、三浦智行 強毒サルノ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 (10/3-5, 2003, 青森)
- 8) 伊吹謙太郎、榎瀬良美、三宅在子、鈴木元、高橋めぐみ、堀内励生、斉藤尚紀、仲宗根正、本多三男、高橋秀美、速水正憲、三浦智行 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 51 回日本ウイルス学会 (10/27-29, 2003, 京都)
- 9) 鈴木元、鈴木麻貴子、三宅在子、伊吹謙太郎、増田恭子、伊川友活、河本宏、仲宗根正、本多三男、速水正憲、三浦智行 強毒サルノ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 51 回日本ウイルス学会 (10/27-29, 2003, 京都)

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

研究課題名： HIV ワクチン開発のための基礎研究

分担研究者： 岡本 尚 名古屋市立大学大学院医学研究科細胞分子生物学・教授

研究要旨

この3年間で以下のことを明らかにした。① Tat 分子作用機構の研究より Tat が CIITA 作用を抑制することにより抗原提示細胞 APC 機能を抑えることを初めて明らかにした。② Tat ワクチンの細胞レベルでの副作用評価を遺伝子発現プロファイル解析によって行った。③ リンフォトキシンβレセプター(LTβR)シグナルによる NF-κB 活性化機構を明らかにした。

A. 研究目的

HIV 構造遺伝子と HIV 制御遺伝子のコンビネーションワクチン開発の妥当性に関する基礎医学的検討を実施した。特に Tat をワクチンとして投与した際の免疫応答系に及ぼす効果を検証し、Tat を細胞内で発現したときの副作用発現について予めゲノムワイドに検索した。また、HIV 感染者におけるワクチン効果誘導においてウイルス感染に伴う免疫装置自体の廃絶が大きな障害となっている。そこで、特に2次リンパ装置など免疫組織の再構築に重要な役割を演じている LTβR シグナルについて分子機構を解析した。

B. 研究方法および結果

(1) Tat による抗原提示細胞機能の障害とそのメカニズムについて。Tat 自体に抗原提示細胞機能を低下させ、免疫認識能を全般的に低下させる作用のあることを初めて明らかにし、そのメカニズムが Tat による HIV 転写活性化機構に密接

に関連することを見いだした。Tat による HIV 転写伸長促進作用には cyclin T1 と CDK9 を含む複合体からなる P-TEFb が必須であるが、P-TEFb は先天性免疫不全症候群のひとつ bare lymphocyte syndrome (BLS) の責任遺伝子産物 class II transactivator (CIITA) による MHC クラス II(MHC II)遺伝子の転写活性化にも必須である。我々は、Tat により APC での CIITA の機能障害が引き起こされ、その結果 BLS と同様に APC による抗原認識レベルでも免疫不全を引き起こすことを明らかにした。また逆に、CIITA の発現が Tat の機能を抑え HIV の増殖を抑えること、γインターフェロンによる MHC II の発現誘導は CIITA の発現誘導に依存することを明らかにした。これらの結果は、Tat ワクチンを構築する際には、このような CIITA 抑制作用を完全になくした Tat 変異体を用い、BCG などのようにγインターフェロン誘導性に優れたベクターを用いることが必要であるこ

とを示唆した。

(2) HIV-1 Tat 蛋白による細胞機能への影響のゲノムワイドでの検証。野性型およびトランス活性化能のない変異型 Tat 遺伝子をそれぞれ inducible に細胞内で発現させ、遺伝子発現プロファイル解析を実施し、Tat によって誘導もしくは発現抑制される細胞遺伝子を網羅的に解析した。これらの結果を個々の遺伝子に関する RT-PCR によって判定量的に確認した。その結果、野性型 Tat の発現により p53 がん抑制因子によって制御される遺伝子の発現が系統的に抑制されていることが明らかになった。このことは以前より示唆されていた野性型 Tat による発がん促進効果の分子論的背景を解明した。また、Tat によって発現誘導される遺伝子として OGG1 を初めて同定した。OGG1 は、酸化ストレスによって生じる DNA damage を修復する際の律速段階を担う酵素であり、8-Oxo-dG の切断を行い、その結果酸化修飾を受けた G:C が T:A へと transversion するために起こる遺伝子変異を阻止する。興味深いことに、細胞に Tat を発現させることにより実際に酸化ストレスが生じることが種々の実験法で確認されたが、8-Oxo-dG を実際に EC-HPLC 法で測定すると、その量は Tat 非発現細胞の baseline level よりもむしろ低値であった。このことは、Tat は DNA の酸化ストレス・ダメージを起こす前に OGG-1 を発現させることによって、あらかじめゲノム変異の生成を予防するという feed-forward 制御を行っていることを示唆した。他方、トランス活性化能を失った変異型 Tat 遺伝子

を同様に inducible に細胞内で発現させ、遺伝子発現プロファイル解析を実施したところ、以上の遺伝子の発現誘導および抑制は見られなかった。このことより、変異型 Tat をワクチンに用いる限り副作用は見られない、と考えられた。

(3) LT β R シグナルによる NF- κ B 活性化機構の解明。まず、LT β R シグナリングでの NF- κ B 活性化は I κ B リン酸化および p65 の核移行に依存しないことを明らかにした。TNF は I κ B のリン酸化を誘導したが、LT β R シグナリングでは I κ B リン酸化を誘導しないことがわかった。細胞免疫組織化学染色法で p65 の核移行を解析した結果、LT β R シグナリングにおける NF- κ B 活性化においては p65 の核移行を伴わないで NF- κ B 依存性転写を活性化することがわかった。TNF により誘導された NF- κ B 活性は NIK、IKK α また IKK β の dominant negative 変異体によって抑制されたが、LT β R シグナリングにより誘導された NF- κ B 活性は NIK と IKK α の変異体によって抑えられたが、IKK β 変異体では抑えられなかった。さらに、NIK-IKK α の作用機構をさらに確認するため、p65 と様々な p65 変異体の Gal4 融合蛋白の発現プラスミドを作成した。その結果、p65 の TA1 領域だけが含まれた Gal4-TA1 融合蛋白は NIK に対して一番高い反応性を示した。TA1 領域の 529 番また 536 番セリンをアラニンに変換した変異体を細胞に導入し、NIK により誘導される転写活性を比較したところ、TA1 の転写活性は 536 番セリンの変異によって明らかに抑制された。これらの結果から p65 の C-末端 TA1 領域、

特にセリン 536 が NIK と IKK α の標的であることが示唆された。LT β R シグナリングで誘導した p65 セリン 536 のリン酸化が起こることは、ウエスタンブロット法で p65 セリン 536 リン酸化抗体を用いて実際に確認することができた。また、このリン酸化は NIK、IKK α 変異体また I κ B の発現によって抑制された。以上より、LT β R シグナリングにおける NF- κ B 活性化は p65 セリン 536 の NIK および IKK α を介したリン酸化に依存していることが明らかになった。

C. 考察および結論

以上の結果より、ワクチンとして Tat を野性型で用いることにより抗原提示細胞の機能障害を惹起し、ワクチン効果が得られないこと、また、少なくとも細胞レベルでの効果において種々の遺伝子発現を抑制または誘導することによって何らかの副作用をもたらす可能性が示唆された。実際に、野性型 Tat をワクチンに用いた欧米の研究では、十分な Tat に対する免疫応答が得られていないことは我々の結果を支持している。従って、Tat をワクチンに用いる場合には少なくともその機能を失わせたものを用いる必要があることが示唆される。

他方、HIV 感染によって著しく障害を受ける 2 次リンパ装置の再生に関わる LT β R シグナリングにおける NF- κ B 活性化は、p65 セリン 536 の NIK および IKK α を介したリン酸化に依存していることが明らかになった。このシグナルがむしろ活性化型 T 細胞を呼び寄せ、HIV 感染の播種に関わっている可能性もあるので、

LT β R シグナルの選択的抑制は AIDS の進展阻止のためにも重要な標的となると考えられた。

D. 研究発表

1. 英文原著論文

Uranishi, H., Tetsuka, T., Yamashita, M., Asamitsu, K., Shimizu, M., Itoh, M., and Okamoto, T. : Involvement of the oncoprotein TLS (Translocated in liposarcoma) in nuclear factor- κ B p65-mediated transcription as a coactivator. *J. Biol. Chem.* 276: 13395-13401, 2001.

Senoo, M., Tsuchiya, I., Matsumura, Y., Mori, T., Saito, Y., Kato, H., Okamoto, T., and Habu, S.: Transcriptional dysregulation of the p73L/p63/p51/p40/KET gene in human squamous cell carcinomas: expression of Δ Np73L, a novel dominant-negative isoform, and loss of expression of the potential tumour suppressor p51. *Br. J. Cancer* 84: 1235-1241, 2001.

Ando, T., Kawabe, T., Ohara, H., Ducommun, B., Itoh, M., and Okamoto, T.: Involvement of interaction between p21 and PCNA for the maintenance of G2/M arrest after DNA damage. *J. Biol. Chem.* 276:42971-42977, 2001.

Matsumoto, S., Imaeda, Y., Umemoto, S., Kobayashi, K., and Okamoto, T.: Cimetidine increases survival of colorectal cancer patients with high levels of sialyl Lewis-X and sialyl Lewis-A epitope expression on tumor cells. *Br. J. Cancer*, 86:161-167, 2002.

Kawabe, T., Suganuma, M., Ando, T., Kimura, M., Hori, H., and Okamoto, T.: Cdc25C interacts with PCNA at G2/M transition. *Oncogene* 21: 1717-1726, 2002.

Maki, M., Matsukawa, N., Yuasa, H., Otsuka, Y., Yamamoto, T., Akatsu, H., Okamoto, T., Ueda, R., and Ojika, K.: Decreased expression of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein mRNA in the hippocampus in Alzheimer's disease. *J.*

- Neuropathol. Exp. Neurol.* 61: 176-185, 2002.
- Sarol, L.C., Imai, K., Asamitsu, K., Tetsuka, T., Barzaga, N.G., and Okamoto, T.: Inhibitory effects of IFN- γ on HIV-1 replication in latently infected cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291: 890-896, 2002.
- Tozawa, K., Okamoto, T., Hayashi, Y., Sasaki, S., Kawai, N., and Kohri, K.: N-acetyl-L-cysteine enhances chemotherapeutic effect on prostate cancer cells. *Urol Res.* 30:53-58, 2002.
- Takada, N., Sanda, T., Okamoto, H., Yang, J.-P., Asamitsu, K., Sarol, L., Kimura, G., Uranishi, H., Tetsuka, T., and Okamoto, T.: RelA-associated inhibitor blocks transcription of human immunodeficiency virus type 1 by inhibiting NF- κ B and Sp1 actions. *J. Virol.* 76: 8019-8030, 2002.
- Watanabe, N., Ando, K., Yoshida, S., Inuzuka, S., Kobayashi, M., Matsui, N., and Okamoto, T.: Gene expression profile analysis of rheumatoid synovial fibroblast cultures revealing the overexpression of genes responsible for tumor-like growth of rheumatoid synovium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294: 1121-1129, 2002.
- Takahashi, N., Tetsuka, T., Uranishi, H., and Okamoto, T.: Inhibition of NF- κ B transcriptional activity by protein kinase A. *Eur. J. Biochem.* 269:1-7, 2002.
- Matsumoto, S., Imaeda, Y., Umemoto, S., Kobayashi, K., and Okamoto, T.: Cimetidine increases survival of colorectal cancer patients with high levels of sialyl Lewis-X and sialyl Lewis-A epitope expression on tumor cells. *Br. J. Cancer*, 86:161-167, 2002.
- Jiang, X., Takahashi, N., Matsui, N., Tetsuka, T., and Okamoto, T.: The NF- κ B activation in the lymphotoxin beta receptor signaling depends on the phosphorylation of p65 at serine 536. *J. Biol. Chem.* 278: 919-926, 2003
- Jiang, X., Takahashi, N., Ando, K., Otsuka, T., Tetsuka, T., and Okamoto, T.: NF- κ B p65 transactivation domain is involved in the NF- κ B-inducing kinase (NIK) pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301:583-590, 2003
- Matsumura, T., Degawa, T., Takii, T., Hayashi, H., Okamoto, T., Inoue, J., and Onozaki, K.: TRAF6-NF- κ B pathway is essential for IL-1-induced TLR2 expression and its functional response to TLR2 ligand in murine hepatocytes. *Immunology* 109:127-136, 2003
- Okano, A., Usuda, N., Furihata, K., Nakayama, K., Tian, Q. B., Okamoto, T., and Suzuki, T. : Huntingtin-interacting protein-1-related protein of rat (rHIP1R) is localized in the postsynaptic regions. *Brain Res.* 967: 210-225, 2003
- Ohata, H., Tetsuka, T., Hayashi, H., Onozaki, K., and Okamoto, T.: 3-Methylcholanthrene activates human immunodeficiency virus type 1 replication via aryl hydrocarbon receptor. *Microbiol. Immunol.* 45: 363-370, 2003
- Teranishi, F., Liu, Z.-Q., Kunimatsu, M., Imai, K., Takeyama, H., Manabe, T., Sasaki, M., and Okamoto, T.: Calpain is involved in the HIV replication from the latently-infected OM10.1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303: 940-949, 2003
- Asamitsu, K., Kanazawa, S., Tetsuka, T., and Okamoto, T.: RING finger protein AO7 supports the NF- κ B-mediated transcription by interacting with the transactivation domain of p65 subunit. *J. Biol. Chem.* 278 : 26879-26887, 2003
- Kanazawa, S., Soucek, L., Evan, G., Okamoto, T., and Peterlin, B. M. : c-Myc recruits P-TEFb for transcription, cellular proliferation and apoptosis. *Oncogene* 22: 5707-5711, 2003
- Torigoe, T., Izumi, H., Yoshida, Y., Ishiguchi, H., Okamoto, T., Itoh, H., and Kohno, K.: Low pH enhances Sp1 DNA binding activity and interaction with TBP. *Nucleic Acids Res.* 31: 1-8, 2003
- Ando, K., Kanazawa, S., Tetsuka, T., Ohta, S., Jiang, X., Tada, T., Kobayashi, M., Matsui, N., and Okamoto, T.: Induction of Notch signaling by tumor necrosis factor in rheumatoid synovial fibroblasts.

Oncogene 22 : 7796-7803, 2003

Tozawa, K., Kawai, N., Hayashi, Y., Sasaki, S., Kohri, K. and Okamoto, T. : Gold compounds inhibit adhesion of human cancer cells to vascular endothelial cells. *Cancer Lett.* 196:93-100, 2003

2. 学会発表

Hidetaka Kobayashi, Masashi Suganuma, Tomoaki Ando, Toshiki Matsubara, Masahiro Ochiai, Youichi Sakurai, Takahiko Funabiki, Takashi Okamoto, Takumi Kawabe. : Selective Cancer Cell Killing by a Novel G2 Checkpoint Abrogating Peptide. 92nd Annual Meeting of American Association for Cancer Research (AACR) 2001年 March 24-28 New Orleans, LA, USA.

Okamoto, T. : Oxidative Stress and Signal Transduction Pathways of Redox Sensor Proteins. Second International Conference on Oxidative Stress and Aging : Technologies for Assessment and Intervention Strategies. 2001年 4月 2日~5日 Maui, Hawaii 教育講演

渡邊宣之、安藤喜一郎、種田陽一、松井宣夫、岡本 尚: cDNA arrayを用いた慢性関節リウマチ培養滑膜細胞における遺伝子発現プロファイル解析 第45回日本リウマチ学会学術集会 2001年 5月 14日~16日 東京

安藤喜一郎、渡邊宣之、種田陽一、松井宣夫、岡本 尚: TNF α 刺激下での慢性関節リウマチ培養滑膜細胞における包括的遺伝子発現プロファイル解析の試み 第45回日本リウマチ学会学術集会 2001年 5月 14日~16日 東京

Watanabe, N., Ando, K., Yoshida, S., Taneda, Y., Matsui, N. and Okamoto, T. : Comprehensive gene expression analysis of synovial fibroblast cultures derived from rheumatoid arthritis(RA) using cDNA array technology, The Fourth Korea-Japan Combined Meeting of Rheumatology (KJCMR) 2001年 5月 25日 東京 講演

岡本 尚 : サイトカインシグナルのレ

ドックス制御 第66回日本インターフェロン・サイトカイン学会 2001年 7月 13-14日 神戸国際会議場

岡本 尚 : 転写因子 NF- κ B の基礎と臨床 第19回内分泌・代謝学サマーセミナー 社団法人日本内分泌学会主催 2001年 7月 12日~14日 名古屋 特別講演

Uranishi, H., Tetsuka, T., Yamashita, M., Asamitsu, K., Itoh, M. and Okamoto, T. : Reciprocal regulation of the transcriptional activity of NF- κ B by grouchorelated genes and TLS. Cold Spring Harbor Laboratory Mechanisms of Eukaryotic Transcription 2001年 8月 29日~9月 2日 Cold Spring Harbor, New York

Tetsuka, T., Yamashita, M., Uranishi H. and Okamoto, T. : RNA helicase A mediates nuclear factor κ B transcription as a coactivator for REL A(p65). Cold Spring Harbor Laboratory Mechanisms of Eukaryotic Transcription 2001年 8月 29日~9月 2日 Cold Spring Harbor, New York

Okamoto, T., Takada, N., Sanda, T., Okamoto, H., Yang, J-P., Asamitsu, K. and Tetsuka, T. : A novel transcriptional inhibitor, RelA-associated inhibitor (RAI), that blocks the DNA-binding of NF- κ B p65 and SPI. Cold Spring Harbor Laboratory Mechanisms of Eukaryotic Transcription 2001年 8月 29日~9月 2日 Cold Spring Harbor, New York

Asamitsu, K., Tetsuka, T. and Okamoto, T. : Ring-finger protein A07 activates NF- κ B though directly interacting with NF- κ B subunit p65. Cold Spring Harbor Laboratory Mechanisms of Eukaryotic Transcription 2001年 8月 29日~9月 2日 Cold Spring Harbor, New York

Watanabe, N., Ando, K., Yoshida, S., Taneda, Y., Matsui, N. and Okamoto, T. : Comprehensive gene expression analysis of synovial fibroblast cultures derived from rheumatoid arthritis(RA) using cDNA array technology. The 20th Congress of the International League of Associations for Rheumatology 2001年 8月 26日~30

日 Edmonton, Alberta, Canada

手塚俊文、浦西宏明、山下真有実:
TLS/FUS is a coactivator for NF- κ B 阻
害因子 RAI による HIV 増殖抑制機構 第
44 回日本腎臓学会学術総会 2001 年 5
月 27 日~29 日 東京

高田統夫、岡本 尚: 新規 NF- κ B 阻害
因子 RAI による HIV 増殖抑制機構 第 15
回日本エイズ学会学術集会 2001 年 11
月 29 日~12 月 1 日 東京 シンポジ
ウム

Lilen C. Sarol, 朝光かおり、手塚俊文、
岡本 尚: The effect of simvastatin on
HIV-1 replication in latently infected
OM 10.1 cells 第 15 回日本エイズ学会
学術集会 2001 年 11 月 29 日~12 月 1
日 東京

Jiang Xu, Takahashi N, Tetsuka T,
Matsui N, Okamoto T: NF- κ B
activation by NIK: involvement of the
TA1 domain of p65 subunit. 第 24 回
日本分子生物学会 2001 年 12 月 9 日
~12 日 横浜

安藤朝章、河邊拓己、大原弘隆、伊藤 誠、
岡本 尚: Involvement of the
interaction between p21 and PCNA for
the maintenance of G2/M arrest after
DNA damage. 第 24 回日本分子生物学会
2001 年 12 月 9 日~12 日 横浜

Okamoto, T: Reciprocal negative
regulation between HIV Tat and CII TA
through interaction with a common
factor cyclin T1. 日米エイズ会議
2002 年 3 月 18 日~23 日 シアトル,
USA

岡本 尚: 慢性関節リウマチ滑膜細胞の
遺伝子発現プロファイル解析 第 46 回
日本リウマチ学会総会・学術集会 (第 11
回国際リウマチシンポジウム併催) 2002
年 4 月 22 日-24 日 神戸 シン
ポジウム

安藤喜一郎、渡邊宣之、手塚俊文、松井宣
夫、岡本 尚: 慢性関節リウマチ培養滑
膜細胞における Notch シグナルの関与
第 46 回日本リウマチ学会総会・学術集
会 2002 年 4 月 22 日-24 日 神戸 ワ
ークショップ

手塚俊文、山下真有美、浦西宏明、犬塚
佐和子、岡本 尚: RNA helicase A は NF-
 κ B の coactivator として働く. 第 45 回

日本腎臓学会学術集会 2002 年 5 月 23
日~25 日 大阪国際会議場

小林真哉、高橋なを子、梶野真一、大原
弘隆、伊藤 誠、岡本 尚:
53BP2/Bbp/ASPP2 によるアポトーシ
ス誘導と NF- κ B による抑制機構の解析.
第 61 回日本癌学会総会 2002
年 10 月 1 日~3 日 東京 ワークショッ
プ

安藤朝章、河邊拓己、手塚俊文、大原弘
隆、伊藤 誠、岡本 尚: p21 タンパク
による G2/M チェックポイント制御機構.
第 61 回日本癌学会総会 2002 年 10 月
1 日~3 日 東京 ワークショップ

金澤 智、岡本 尚: MYC の転写制御に
おける機能解析および細胞増殖、アポト
ーシスに対する機能の検討. 第 61 回日
本癌学会総会 2002 年 10 月 1 日~3 日
東京 ワークショップ

梶野真一、小林真哉、高橋なを子、寺西
太、手塚俊文、清水重臣、伊藤 誠、岡
本 尚: 53BP2/ASPP2 によるアポト
ーシスにおけるミトコンドリアの関与. 第
61 回日本癌学会総会 2002 年 10 月 1
日~3 日 東京

岡本 完、高田統夫、三田貴臣、Yang
Jian-Ping, 朝光かおり、Lilen Sarol, 浦
西宏明、手塚俊文、岡本 尚: RelA -
associated inhibitor block
transcription of HIV-1 by inhibiting NF-
 κ B and SP1 action. The Ninth West
Coast Retrovirus Meeting 2002 年 10
月 3 日~5 日 California, USA

Imai, K., Okamoto, T.: Induction of
oxidative stress-responsive genes by
Tat as revealed by gene expression
profile analysis. Ninth West Cost
Retrovirus Meeting 2002 年 10 月 3 日
~6 日 Palm Spring, CA

安藤朝章、岡本 尚、伊藤 誠: p21 と
PSNA との相互作用による細胞周期
G2/M 期チェックポイント制御. 第 44
回日本消化器病学会 2002 年 10 月 24
日~26 日 パシフィコ横浜

岡本 尚: レトロウイルスのヒトへの病
原性 第 16 回日本エイズ学会 2002 年
11 月 28 日~30 日 名古屋 会長講演

手塚俊文、岡本 尚: NF- κ B 相互作用分
子の同定と HIV 転写制御. 第 16 回日本
エイズ学会 2002 年 11 月 28 日~30 日

名古屋 シンポジウム

金澤 智、岡本 完、岡本 尚: HIV による MHC クラス II の発現抑制機構と AIDS 発症機構. 第 16 回日本エイズ学会 2002 年 11 月 28 日~30 日 名古屋 シンポジウム

今井健一、手塚俊文、岡本 尚: 誘導型 Tat 発現細胞を用いた遺伝子発現プロファイル解析. 第 16 回日本エイズ学会 2002 年 11 月 28 日~30 日 名古屋 一般講演

手塚俊文、高橋なを子、浦西宏明、岡本 尚: cAMP/PKA は NF- κ B を介して HIV1-LTR 活性化を抑制する. 第 16 回日本エイズ学会 2002 年 11 月 28 日~30 日 名古屋

寺西 太、劉 正秋、手塚俊文、佐々木寛、岡本 尚: Ca シグナルは calpain を介して NF- κ B を活性化し潜伏感染細胞からの HIV 複製を誘導する. 第 16 回日本エイズ学会 2002 年 11 月 28 日~30 日 名古屋

朝光かおり、Sarol Lilien、金澤 智、手塚俊文、岡本 尚: 新規 NF- κ B 結合分子による HIV LTR 活性化機構. 第 16 回日本エイズ学会 2002 年 11 月 28 日~30 日 名古屋

今井健一、金澤 智、高田統夫、手塚俊文、岡本 尚: RAI による Tat および heterologous RNA エンハンサーの阻害効果. 第 16 回日本エイズ学会 2002 年 11 月 28 日~30 日 名古屋

大畑広和、手塚俊文、林 秀敏、小野寄菊夫、岡本 尚: 環境汚染物質の HIV-1 複製への影響とその作用機序の解析. 第 16 回日本エイズ学会 2002 年 11 月 28 日~30 日 名古屋

Tetsuka, T., Uranishi, H., Oohata, H., Nakata, K., Asamitsu, K., Okamoto, T.: Inhibition of NF- κ B p65 transactivation by association with c-Myc binding protein, MM-1. 第 25 回日本分子生物学会 2002 年 12 月 11 日~14 日 横浜

大畑広和、手塚俊文、林 秀敏、小野寄菊夫、岡本 尚: 環境汚染物質の HIV-1 複製への影響. 第 25 回日本分子生物学会 2002 年 12 月 11 日~14 日 横浜

岡本 尚、手塚俊文、浦西宏明、朝光かおり、小林真哉、金澤 智: NF- κ B による転写制御とがん化促進機構. 第 62 回日本癌学会総会 2003 年 9 月 25 日~27 日 名古屋 シンポジウム

林 秀敏、塩谷和昭、瀧井猛将、岡本 尚、小野寄菊夫: ヒトメラノーマ細胞からの構成的 IL-1 α 発現機序の解析-GC rich 領域の関与. 第 62 回日本癌学会総会 2003 年 9 月 25 日~27 日 名古屋

朝光かおり、本田三男、岡本 尚: Tat 分子内でより保存されている領域の特定とその意義. 日本ウイルス学会第 51 回学術集会・総会 2003 年 10 月 27 日~29 日 京都

今井健一、岡本 尚: HIV-1 Tat による OGG1 遺伝子のフィードフォワード活性化. 日本ウイルス学会第 51 回学術集会・総会 2003 年 10 月 27 日~29 日 京都

今井健一、岡本 尚: HIV Tat による OGG1 遺伝子のフィードフォワード活性化. 第 17 回日本エイズ学会学術集会 2003 年 11 月 27 日~29 日 神戸

Kenichi Imai, Takashi Okamoto: Feedforward Activation of 8-oxoguanine DNA Glycosylase 1 by HIV-1 Tat. 第 26 回日本分子生物学会年会 2003 年 12 月 10 日~13 日 神戸

Kaori Asamitsu, Kenji Nakata, Toshifumi Tetsuka, Takashi Okamoto: RING finger protein A07 supports the NF- κ B-mediated transcription by interacting with the transactivation domain of p65 subunit. 第 26 回日本分子生物学会年会 2003 年 12 月 10 日~13 日 神戸

Takashi Okamoto, Naoko Takahashi, Shinya Kobayashi, Hiroaki Uranishi: 53BP2/ASPP2 and RAI as novel interacting proteins of NF- κ B p65. 第 26 回日本分子生物学会年会 2003 年 12 月 10 日~13 日 神戸 シンポジウム

金澤 智、Matija Peterlin, 岡本 尚: 転写制御機構における転写活性化因子と転写伸長因子 (P-TEFb) の相互作用. 第 26 回日本分子生物学会年会 2003 年 12 月 10 日~13 日 神戸 シンポジウム

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

組み換えBCGワクチン（rBCG）の開発、改良

分担研究者：山田 毅 長崎大学名誉教授

分担研究者 大原直也 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 助教授

研究要旨

組み換えBCGワクチンの土台となる現行のBCGワクチンに遺伝子操作を行ない、新規の著効なワクチンの開発を目指し、研究を行なった。結核菌の蛋白質の中で防御抗原とされる抗原の遺伝子を組み入れ、その抗原を親株よりも過剰発現させることにより、現行のBCGワクチンよりも著効なBCGワクチンを作成できることが示された。またBCG菌へ組み入れるためのプラスミドの改良を試み、低分子ストレス蛋白質のプロモーターも有力な候補であることが示された。

A. 研究目的

様々な疾患に対する rBCG の開発が行なわれているが、いずれも現行の BCG 菌を遺伝子操作で改変したものである。しかし、現行の BCG ワクチンの結核に対する効果そのものに疑問がもたれている。そこで、本来のターゲットである抗酸菌の感染を指標に著効な rBCG を作成し、その改良を目標として本研究を行なった。

B. 研究方法

これまでの研究により結核菌抗原の中で感染防御抗原とされるものが明らかになってきた。そこで、これらの抗原遺伝子を大腸菌—抗酸菌シャトルベクターに組み入れ、

このプラスミドでBCG菌を形質転換した。具体的にはBCG菌 α 抗原群のうち85A、85B、MPB51をコードする遺伝子を使用した。これらの遺伝子がBCG菌体に導入された際に発現量が上昇するように85Aのプロモーターを *M. kansasii* 85Bのプロモーターに、85Bのプロモーターを *M. avium* 85Bのプロモーターに変換した。そして、作成した85A、85B、MPB51のそれぞれの発現カセットをタンデムに抗酸菌—大腸菌シャトルベクターに挿入し、このプラスミドでBCG菌を形質転換した。こうして得られたrBCGをrBCG/BA51とした。