

Table4 筑波B群 rVV-DIS SIVmac gag(gag-pol)免疫(I.V.)群  
SIVmacgag(gag-pol) specific cytotoxicity % (E:T ratio=100:1)

Monkey No.	Immunization	1st(9/7/00)			2nd(11/9/00)			3rd(8/22/01)		
		3	6	9	15	18	32	51	54	
	weeks post immunization									
	採血日									
Mf001	rVV-DIs-SIV gag(1st)	14.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
	rVV-DIs-SIV gag-pol(2nd)									
Mf036	rVV-DIs-SIV gag(1st) & rBCG/SIVgag-pol(3rd)	11.3	7.5	6.3	3.4	6.9	15.4 <sup>*1</sup>	0.0	0.0	
	rVV-DIs-SIV gag-pol(2nd)									
Mf040	rVV-DIs-SIV gag(1st) & rBCG/SIVgag-pol(3rd)	6.2	0.0	2.6	0.0	6.7	0.0	12.3	2.6	
	rVV-DIs-SIV gag-pol(2nd)									
Mf042	rVV-DIs-SIV gag(1st)	0.0	0.0	0.0	6.1	0.0	0.0	9.6		
	rVV-DIs-SIV gag-pol(2nd)									
Mf006	rVV-DIs-lacZ(1st,2nd) & rBCG/pSO246(3rd)	0.0	3.9	4.1	3.6	1.1	0.0	7.4	0.0	
Mf033	rVV-DIs-lacZ(1st,2nd) & rBCG/pSO246(3rd)	2.4	2.8	6.1	1.2	4.9	15.3	0.0	0.0	

\*1:E:T ratio=50:1

\*2:SIVgag-pol target

**Table5 Epitope analysis of SIV mac gag Specific CTL of Mf3977**

Effector cells (Antigen stimulation)	% Specific cytotoxicity					
	(Monkey No.)	Target cells	(100:1)	(25:1)	(6:1)	(1.5:1)
SIVmacgag群	(BLCL infected with)	Auto (E:T ratio)				
<b>Mf3977</b>	SIVmacgag - HA <sup>-</sup>	11.2	11.6	13.7	2.8	
(rVac-rDis-SIVmacgag)	SIVmacgag - BLCL(-)	9.2	26.0	13.7	12.5	
	HA <sup>-</sup> - BLCL(-)	0.0	13.7	0.0	9.7	
	peptide No.36-BLCL(-)	10.2	3.8	0.0	4.8	
	peptide No.37-BLCL(-)	9.4	1.4	0.9	0.8	
	peptide No.38-BLCL(-)	20.6	9.2	2.3	2.4	
	peptide No.39-BLCL(-)	5.2	0.0	0.0	9.2	
	peptide No.40-BLCL(-)	6.6	1.2	0.0	8.5	
	peptide No.41-BLCL(-)	6.6	0.0	0.0	0.2	
	peptide No.42-BLCL(-)	3.6	0.0	0.0	3.0	
	peptide No.43-BLCL(-)	0.0	15.2	6.8	0.0	
	peptide No.44-BLCL(-)	2.9	12.1	3.5	2.5	
	peptide No.45-BLCL(-)	0.0	12.6	0.0	0.0	

- \*1. 7/25/00 採血
- \*2. 7/27/00 Antigen stimulation (SIVmacgag)
- \*3. 8/17/00 CTL assay (D21)

Table6 HIV-E群 rBCG/rDIs HIV-E-gag免疫群  
HIV-E-gag specific cytotoxicity %(E:T ratio=100:1)

Monkey No.	Immunization		1st(10/16/00)		2nd(8/20/01)	
	weeks post immunization	採血日	2	5	46	
#31-009	rBCG/HIV-E-Gag(1st) & rDIs/HIV-E-Gag(2nd)		6.1			3.3
#32-059	rBCG/HIV-E-Gag(1st) & rDIs/HIV-E-Gag(2nd)		0.0			5.7
#35-106	rBCG/HIV-E-Gag(1st) & rDIs/HIV-E-Gag(2nd)			0.0		0.0
#36-019	rDIs/HIV-E-Gag(1st) & rBCG/HIV-E-Gag(2nd)			0.0		0.0
#37-075	rDIs/HIV-E-Gag(1st) & rBCG/HIV-E-Gag(2nd)			0.0		0.0
#40-009	rBCG/HIV-E-Gag(1st) & rDIs/HIV-E-Gag(2nd)		8.1**			0.0
#33-051	rDIs/LacZ(1st) 死亡					
#38-004	rBCG/pSO246(1st) & rDIs/LacZ(2nd)			14.7		8.6
#39-064	rBCG/pSO246(1st) & rDIs/LacZ(2nd)			0.0		

\*1:11/1/00採血のPBMCと11/22/00採血のPBMCをmixしてassayをおこなった。

Table 7a DNA Vaccine群

HIVenv specific cytotoxicity % (E:T ratio=100:1)

Monkey No.	Immunization weeks post immunization	1st(12/4/00), 2nd(2/5/01), 3rd(4/9/01)										5th(3/18/01)
		22	23	24	29	30	4th(2/14/01)	63	69			
	採血日 (1st, 2nd, 3rd) (4th, 5th)	5.7.01	5.14.01	5.21.01	6.25.01	7.2.01	2.18&20.02	2.18&20.02	4.1&3.02			
Mf B900	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA & rVV-DIs-SIVgag-pol				5.1		12.3		4.8			
Mf B911	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA & rVV-DIs-SIVgag-pol				8.5		6.4 <sup>2</sup>		5.5 <sup>2</sup>			
Mf B918	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA & rVV-DIs-SIVgag-pol	8.8 <sup>1</sup>			0.0		6.4		4.8			
Mf B924	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA & rVV-DIs-SIVgag-pol			5.0			18.2		20.3			
Mf B925	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA & rVV-DIs-SIVgag-pol			15.4			38.2		16.4			
Mf B903	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA & rVV-DIs-lacZ		0.0				0.0		15.0			
Mf B913	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA & rVV-DIs-lacZ			1.7			9.8		20.4			
Mf B899	Control DNA	0.0			9.6		25.1		0.0			
Mf B902	Control DNA	3.1			8.8		11.4 <sup>2</sup>		6.5			
Mf B904	Control DNA	4.6			0.0		0.3		16.6			
Mf B901	Control DNA			17.8			7.0 <sup>2</sup>		26.9			
Mf B907	Control DNA			9.8			0.0 <sup>3</sup>		0.0			
Mf B912	Control DNA			0.0 <sup>1</sup>		12.6	0.0 <sup>3</sup>		0.0 <sup>2</sup>			
Mf B917	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA			17.0								
Mf B905	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA		16.8									
Mf B906	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA					0.8						
Mf B908	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA		0.0									
Mf B909	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA		1.4									
Mf B910	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA		4.9									
Mf B922	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA			12.9								
Mf B914	Control DNA		15.4			0.0						
Mf B915	Control DNA		6.5			14.6						
Mf B919	Control DNA			0.0								
Mf B921	Control DNA			9.3								

\*1;E:T ratio=10:1

\*2;E:T ratio=50:1

\*3;E:T ratio=4:1

Table 7b DNA Vaccine群

SIVgag-pol specific cytotoxicity % (E:T ratio=100:1)

Monkey No.	Immunization weeks post immunization	1st(12/4/00), 2nd(2/5/01), 3rd(4/9/01)										4th(2/14/01)	5th(3/18/01)
		22	23	24	29	30	63	69	2.18&20.02	4.1&3.02			
	(1st, 2nd, 3rd)												
Mf B900	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DN/ & rVV-DIs-SIVgag-pol				5.6					7.8		7.3	
Mf B911	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DN/ & rVV-DIs-SIVgag-pol				0.0					0.0 <sup>2</sup>		0.0 <sup>2</sup>	
Mf B918	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DN/ & rVV-DIs-SIVgag-pol	0.0 <sup>1</sup>			0.0					1.4		4.5	
Mf B924	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DN/ & rVV-DIs-SIVgag-pol					12.0				11.2		19.7	
Mf B925	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DN/ & rVV-DIs-SIVgag-pol					0.0				11.7		11.0	
Mf B903	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DN/ & rVV-DIs-lacZ		18.7							0.0		8.0	
Mf B913	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DN/ & rVV-DIs-lacZ			9.1						8.2		14.6	
Mf B899	Control DNA & rVV-DIs-SIVgag-pol	1.0			6.5					12.8		6.2	
Mf B902	Control DNA & rVV-DIs-SIVgag-pol	9.3			2.8					9.8 <sup>2</sup>		0.1	
Mf B904	Control DNA & rVV-DIs-SIVgag-pol	0.6			0.0					3.4		4.4	
Mf B901	Control DNA & rVV-DIs-lacZ			0.7						2.3 <sup>2</sup>		11.6	
Mf B907	Control DNA & rVV-DIs-lacZ			0.0						0.0 <sup>3</sup>		0.0	
Mf B912	Control DNA & rVV-DIs-lacZ			2.2 <sup>1</sup>		0.0			0.0	0.0 <sup>3</sup>		3.8 <sup>2</sup>	
Mf B917	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA			8.0									
Mf B905	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA		0.0										
Mf B906	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA								2.8				
Mf B908	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA		0.0										
Mf B909	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA		14.2										
Mf B910	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA		11.3										
Mf B922	SIVgag-pol DNA+HIV89.6env DNA+IL-2 DNA			5.0									
Mf B914	Control DNA		14.3						0.0				
Mf B915	Control DNA		30.0						2.6				
Mf B919	Control DNA			0.0									
Mf B921	Control DNA			0.0									

\*1:E:T ratio=10:1

\*2:E:T ratio=50:1

\*3:E:T ratio=4:1

## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
O'Connor DH, Allen TM, Vogel TU, Jing P. DeSouza IP., Dodds E., Dunphy EJ., Melsaether C., Mothe B., Yamamoto H., Horton H., Wilson n., Hughes AL, and Watkins DI.	Acute Phase cytotoxic T lymphocyte escape is a hallmark of simian immunodeficiency virus infection.	Nature Medicine	8(5)	493-499	2002
山本博, 上坂浩美	サルとエイズワクチン—エイズワクチン開発における最近の進展	宮城県獣医師会会報	第 54 巻 3 号	77-86	平成 13 年 7 月
Yamamoto. H, Katsuyama. K, Ohsu. T, Matsuo. K, Ami. Y, Shinohara. K, Takahashi. E, Suzuki. Y, Sasaki. Y, and Honda. M	Induction of gag specific CTL activity in Cynomolgus Monkeys vaccinated with Rbcg(Tokyo strain)- and Rvv(Dis strain) SIVmac gag.	Exp. Anim.	50(3)	232(S36)	2001
山本博, 勝山一輝, 大洲竹晃, 松尾和浩, 網 康至, 篠原克明, 高橋栄治, 須崎百合子, 佐々木裕子, 本多三男	rBCG SIVmac gag および rW Dis SIVmac gag 接種カニクイザルにおける gag 特異的 CTL の誘導	第 48 回日本実験動物学会総会		p160	2001, 5, 横浜
O'Connor DH, Allen TM, Vogel TU, Jing P. DeSouza IP., Dodds E., Yamamoto H., Dunphy EJ. Melsaether C., Mothe B., Hughes AL, and Watkins DI.	Acute Cytotoxic T-Lymphocyte Escape is a Hallmark of Simian Immunodeficiency Virus Infection.	XIV International AIDS conference	TuorA1179	p346	July7-12, 2002
山本博, 坂上浩美, 勝山一輝, 染谷健二, 松尾和浩, 本多三男	サルエイズ動物モデルを用いた組み換えエイズワクチンの基礎研究	第 135 回日本獣医学会学術集会		p229	2003, 3

## ワクチン接種アカゲザルの病態薬理

分担研究者 網康至 国立感染症研究所 動物管理室 主任研究官

研究要旨：ワクチン接種における液性因子の誘導、特に抗 HIV 中和抗体の病態薬理として HIV-1 env 蛋白 V3 部分の冠部を認識する高親和性抗体は野生株プライマリーアイソレートを中和できる。さらに in vivo との相関において抗体濃度と防御免疫の関連性を血中抗体濃度の推移から推測できることを検討する。また、病態進行との関連性を検索するためにこの抗体をウイルス感染後投与しその病態進行への修飾を明らかにすることにより治療用ワクチンに対する中和抗体の意義を明らかにする。HIV の感染をコントロールできる中和抗体のワクチン応用のために能動免疫を行い、交差反応性中和抗体の産生、特に R5 ウイルスに対する中和能を指標にした能動免疫の可能性について明らかにする。

### 協力研究者

須崎百合子（国立感染症研究所・動物管理室）

関与が積極的なコントロールにつながる可能性についてサルエイズモデルを用いて検討する。

特に能動免疫による R5 ウイルスに反応する抗体産生を目的として研究を行う。その際、野生型 R5 ウイルスとしてこれまで抗体の反応性が難しいとされてきた V3 配列が GPGRV 配列を持つ R5 ウイルスの反応可能な多クローン抗体の産生を本年度の目標とする。

### A. 研究目的

HIV の感染は今なお増加し続けており、2003 年の WHO の報告ではこのままの状態では 1 億人を突破すると予想されており、取り組むべき重要な課題として問われている。本研究ではこの膨大な感染を液性免疫により有効にコントロールするための基礎データを得ることを目的とする。さらに、実際の野生株を中和できるヒト型化抗体を用いた HIV 感染の in vitro 及び in vivo における HIV 感染動物モデルを用いることにより効果的な HIV 感染モデルの病態進行を抑制するために中和抗体の

### B. 研究方法

1. 昨年度までの共同研究の結果で得られたヒト型化モノクローナル抗体 KD-247 受動免疫によるサルエイズモデルを用いた免疫不全ウイルスの完全な感染防御の成果に注目し、能動免疫により交差反応性

を示す中和抗体産生の可能性を検討する。  
その際 C3H マウスを 1 週間ごとに免疫した。

2. GPGRV 交差反応性抗体を作成する目的でペプチド免疫のデザインを変更し、1 の免疫法に準じて C3H マウスに免疫し、血清抗体の特性を ELISA 法で検出し、1 の結果と比較した。
3. 1、2 の結果で得られた成果をもとにしてサルにペプチド抗原を連続免疫法で免疫し得られた血清を用いて、マウスで得られた成果と比較検討する。
4. これらの免疫に際して今回の実験ではペプチドの 5' 末端に C4 コモンヘルパーエピトープを結合させたキメラペプチドをデザインしてペプチド合成を行い接種抗原として使用した。
5. 接種サルとして感染研より分与されたカニクイサルを用いマウスで得られたデータをもとにしてペプチドワクチン抗原の作成を試みた。その評価はまず、ELISA 法で交差反応性抗体を、特に GPGRV 反応抗体を産生できるかどうかを最初のエンドポイントとして実験を設定した。

(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

1. これまでの V3 ペプチド連続免疫法による交差反応中和抗体の特性
  - 1) Table 1 に示すペプチドを 1 週間ご

とに C3H マウスに接種し血清抗体を解析すると交差反応性の抗体が産生されていることを確認した。

- 2) 血清抗体を分離精製し、実験室株である HIV-1 MN 株と野生型 R5 ウイルスである JRCSF に反応させるとこの多クローン抗体は HIV MN 株のみでなく JRCSF 株を 0.1 マイクログラムオーダーの ID50 の濃度で中和することができた。しかし、単一ペプチドの連続免疫によって得られた多クローン抗体では JRCSF を中和することはできなかった。したがって連続免疫法による野生型 R5 株の交差反応中和抗体としての機能発現は明らかにされた。
2. ヘルパーエピトープとのキメラ分子の作成による MHC バリアの検討：ペプチド抗原の連続免疫法による実用化を考慮すると MHC のバリアを越えることが要求される。したがって MHC との結合サイトが集束していると予想されるコモンヘルパーエピトープを検索し C4 エピトープを同定した。さらに、このエピトープを 5' 末端に結合させた C4 結合 V3 ペプチドを作成した。その際、V3 部分のペプチドは GPGRV と結合できる抗体を産生することを期待してペプチド部分のアミノ酸配列を検索し連続免疫法の V3 配列をデザインし直した。



3. 想定した C4V3 ペプチド群を作成し、連続免疫法で BALB/c マウス(H-2<sup>d</sup>)、C3H マウス(H-2<sup>k</sup>)に接種すると交差反応性の抗体が産生されることがいずれのマウスの系においても確認された。さらに抗原として用いなかった GPGRV 配列を持つ V3 ペプチドを低濃度で反応する交差反応抗体を作成することができた。
4. サルを用いた GPGRV 交差反応性抗体の能動免疫による産生
  - 1) マウスで得られた成果をもとにして 2 週間隔で連続免疫法を行うと最終免疫後 1 週で 2<sup>17</sup>~2<sup>25</sup> の範囲の極めて高い抗体価を有する交差反応性抗体がいずれのカニクイサルにおいても認められた。この反応性は最終免疫後半年間において低下することなく持続している。
  - 2) このサルの副作用や、接種局所の反応は接種後 6 週間では殆ど認められない。
  - 3) これらのサルの中の抗体価について種々の R5 ウイルスとの反応性を検討中である。また、R5 ウイルスの中和能を確認した後 SHIV SF2 の R5 SHIV に対する感染防御能について可能性を検討する予定である。

#### D. 考察

本年度までの研究で免疫不全ウイルスの感染を防御できる感染防御抗体の存在を明ら

かにし、その抗体がサル HIV エイズモデルのウイルスによるチャレンジを高濃度の受動免疫で明らかにした。受動免疫に使った抗体は連続免疫投与方法によって得られたものであり、その多クローン抗体はサルに用いたヒト型化モノクローナル抗体と同様に R5 ウイルスの感染を *in vitro* で完全にコントロールすることが明らかとなった。具体的には、それまでの免疫法を実際の能動免疫を想定した MHC のバリアを超えるという目的で C4 ヘルパーエпитープを結合させ、キメラペプチドを合成し、その連続免疫法を行った。また、これまでの連続免疫法による R5 ウイルスによる反応性を増幅させるために GPGRV-R5 ウイルスに対する結合能を有する多クローン抗体を能動免疫法でマウス及びサルに産生させることができた。また、ヘルパーエピトープの効果はマウスレベルで BALB/c マウスのみでなく C3H マウスでも同様に交差反応性抗体が産生できること、さらに雑系である 3 頭のカニクイサルのいずれのサルにおいても極めて高い抗体価を示すことを明らかにした、これらの成果は現在計画している *in vitro*, *in vivo* における R5 ウイルスの感染防御能との関連を検索することによりさらに、その有用性が期待される。

#### E. 結論

本研究においてこれまで困難とされてきた能動免疫法による R5 ウイルスに対する交差反応性中和抗体を高力価で少なくとも 6 ヶ月間においては高い濃度を維持したままで免疫

継続が可能であることを明らかにした。この方法により細胞性免疫主導型ワクチンでは不可能である免疫不全ウイルスの完全な感染防御能をワクチン投与により付与することができる可能性を示唆した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

Kanekiyo, M., K. Matsuo, M. Hamatake, T. Hamano, Y. Ami, 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.

口頭発表

1) 滝澤万里、村上利夫、江田康幸、前田敏宏、網康至、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)

2) 村上利夫、前田敏宏、網康至、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)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

- 4) 特許取得 無し
- 5) 実用新案登録 無し
- 6) その他 無し

Peptide code	HIV strain derived	Amino acid sequence*
SP1	MN	YNKRKRIHIGPGRAFYTTCNC
SP17	NI18	N-T---TT---VY--GE-
SP11	NI54	N-T-G-RV---I-A-EK-
SP14	RF/HAT	N-T-S-TK---VI-A-GQ-
SP12	NI53	N-TK-A-RV---TL-A-RR-
SP13	—	GPGRAFGPGRAFPGRAFC

Table.1

分担研究報告書

ワクチンの安全性評価法に関する研究

分担研究者 青木陽一郎、小室勝利 国立感染症研究所 血液・安全性研究部

研究要旨

現在計画されている HIV 制御遺伝子 (Tat) ワクチンについては、免疫系への影響を主に、投与を受ける集団への影響を特に注意をはらっておく必要があるものと考えられる。その中でも、どうしても確認しておかなければならない項目として、『現在もしくは将来的に妊娠の可能性があるヒトにワクチン投与を行った場合、胎児への影響はないか』との問題がある。近年の報告によれば、HIV 感染を受けている母親から生まれた HIV 感染を受けていない胎児には、血液、免疫、神経学的異常が長期間継続するという。HIV ワクチンの使用が妊婦又は妊娠していても、それに気付いていないヒトに対して実施されるとすれば、この胎児毒性の問題は是非とも確認しておく必要がある。将来的に哺乳動物（マウス等）で確認しておかなければならない安全性確認法の確立を最終目標としているが、十分な基礎実験が必要なものと考えられる。現在のところ、上記の問題を個体レベルで解析、検討する小動物モデルの確立とその信頼性には限界があるものと考えられる。そこで HIV 制御遺伝子 (Tat) ワクチン使用に伴う胎児への影響を知る目的で、個体発生への影響を広範囲かつ短期間に解析可能なアフリカツメガエルの初期胚を用いた脊椎動物での個体実験系を確立し、その系を用いて Tat に影響を解析し、初期中胚葉形成時において形態学的、遺伝子レベルの解析において抑制的に作用する結果を得た。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

分担研究者；小室勝利（部長）

青木陽一郎（研究員）

所属機関名：国立感染症研究所

血液・安全性研究部

A. 研究目的

ワクチンをヒトに使用するに当たっては、種々の基準、ガイドラインその他 GLP 等、

多くの規制をクリアしなければならない。規制の方法は、ワクチンを使用する国、使用されるワクチンの性状、投与を受けるヒト集団（年齢、性、環境等）臨床的重要性等により異なるが、基本的にはワクチンの有効性と投与を受けるヒト集団への安全性が如何に保障されるのかのバランスを考慮したものとなっている。エイズワクチンについては、日本国内の種々

のガイドライン、世界的に共通する安全性に関する考え方、使用する予定国の法律、接種対象等を特に注意しておく必要があるものと考えられる。本研究班の開発しているワクチンについては、BCG、ワクシニアウイルスをコンポーネントワクチン作製に使用していることから、これらに対する通常の安全性試験が要求されるであろうし、また、使用する HIV 構造遺伝子、HIV 抑制遺伝子の生体への影響への検討が特に、要求されると思われる。有効性が充分確認されていれば、通常の安全性試験にはそれ程時間を要することはなく、それを実施するにあたっては、GLP 認可を持つ組織で行えば大きな困難は伴わない。

一方、HIV の遺伝子のもつ生体への影響については、充分な基礎実験を行った上で、必要な安全性試験を実施することが求められることになる。現在計画されている HIV 制御遺伝子 (Tat) ワクチンについては、免疫系への影響を主に、投与を受ける集団への影響を特に注意をはらっておく必要があるものと考えられる。その中で、どうしても確認しておかなければならない試験項目として、『妊婦にワクチン投与を行った場合、胎児への影響はないか』との問題がある。近年の報告によれば、HIV 感染を受けている母親から生まれた HIV 感染を受けていない胎児には、血液学的、免疫学的異常が長期間継続するという。HIV ワクチンの使用が妊婦又は妊娠していても、それに気付いていないヒトに対して実施されるとすれば、この胎児毒性の問題は是非とも確認しておく必要がある。本研究は、HIV 制

御遺伝子 (Tat) の胎児への影響を確認するためには、胎児に与える影響を短期間で広範な現象を解析し得る方法として、アフリカツメガエルの卵へ目的の遺伝子を接種し、各発生段階の胚 (embryo) を用いて解析し、将来、哺乳動物で確認しておかなければならない安全性確認法の確立を目指す目的で行われた。

## B. 研究方法

### 1. 発現ベクターへのクローニング

SHIV-C2/1 ( Similian/Human Immunodeficiency Viruses) -Tat (pGEM-C2/1Tat-Rev)、又は SHIV-C2/1-muTat-1 の各 cDNA (unpublished data. 阪井らがクローニング) が挿入されている、pGEM-C2/1 tat-rev、又は pGEM-muTat-1 から各々 Tat 及びその組換え体 muTat (Tat の transactivator 活性に必要なアミノ酸 30 番目の Cys を Ala へ、41 番目の Lys を Ala へ置換した。 Fig.4. )、さらに pcDNA3.1(+)-gagE (unpublished data. 松尾らがクローニング) を本多先生より分与していただいた。それらの遺伝子を効率良くアフリカツメガエル (*Xenopus Laevis*) の卵、及び胚 (embryos) で発現させるために、プラスミド発現ベクター、pCS2+ (PBR 系のプラスミドベクター) へサブクローニングを行った。

2. In vitro RNA 合成、及びタンパク質合成  
pCS2 + ベクター内の SP6、または T7 promoter を用いて、in vitro にて SP6、T7 RNA polymerase によりドライブし上記

muTat, Tat, gag のセンス、及びアンチセンス RNA を合成し、whole-mount in situ hybridization のプローブとして利用した。また、同様にして、5'側を cap analogue で修飾した各 RNA を合成し、下記のような条件で胚へのマイクロインジェクションを行った。また、上記クローニングした muTat, Tat, gag を鋳型にして <sup>35</sup>[S]でラベルしたタンパク質を、rabbit reticulocytes の in vitro 翻訳系を用いて SDS-PAGE にて解析を行った。

### 3. マイクロインジェクション (接種)

アフリカツメガエル (Fig. 1) の受精卵を得るために、実験前日に HCG 1000 unit を雌の腹部に接種し排卵誘発を行う。翌日、雄から抽出しホモジナイズした精巣と雌から排卵させた卵とを 10 cm シャーレ内で体外受精させる。受精後約 1 時間半後、2 細胞期の片方の 1 細胞へアンチセンス Sox9, muTat, Tat, gag 各 RNA の接種を行った (Fig. 2)。また、同時に接種における内部標準 (各卵への手技的な要因による接種効率のばらつきを補正するため) として beta-Gal 遺伝子 (RNA) も共に接種を行った。また、各遺伝子を接種した胚総数は各々 200 個であり、実験結果においてその 90% 以上 (180 個) 再現性があるものを有意とし結果に示した。

### 4. Whole-mount In situ Hybridization

SP6, または T7 promoter-polymerase にて試験管内で Slug (neural crest marker)、及び中胚葉形成 (原腸陥入、その際に伴う細

胞移動、及び胚の前後軸形成、notochord 形成) に必修の転写因子と考えられている Brachyury (Xbra) の各 RNA プローブを作成した。その際、非放射性 Digoxigenin (DIG) ラベルを行い、alkaline phosphatase (AP) で修飾した anti-DIG 抗体と反応させ、AP の基質である BM purple-AP で青色に発色させた。

### 5. アニマルキャップアッセイ法及び RT-PCR 法

外来遺伝子の mRNA を注入し、目的の蛋白質を目的の組織で効率良く発現させ、生化学的に解析を行った。その際に卵黄成分等を取り除くことで目的の蛋白質の回収を効率良く行うことが可能である。すなわち、受精後 1 細胞期に Tat, muTat, Gag 等の RNA を接種し、胞胚期 (stage8/9) まで成長させる (受精後 7-8 時間)。次に動物極側の細胞を切り出し、目的の発生段階 (原腸陥入期、stage10-12) まで培養液中で培養する (Fig.2)。その後、組織を回収し、total RNA 抽出し、oligo(dT)を用いて RT-PCR 行い、各プライマー EF-1 $\alpha$  (forward; 5' - CAGATTGGTGCTGGATATGC-3', Reverse; -5' ACTGCCTTGATGACTCCTAG-3'), Xbra ( forward; 5' - GCTGGAAGTATGTGAATGGAG-3', 5' - TTGAGTGCTGTAATCTCTTCA-3') を用いて PCR を行った。

(倫理面への配慮)

当該研究を行うにあたっては、実験動物として *Xenopus Laevis* (カエル) を用いたが、倫理面の問題は無いものと判断される。その

理由は、未受精卵の採取にあたっては、前日にヒトの性腺刺激ホルモン（HCG）の腹部接種を行い翌日に排卵させるが、一度接種を受けた雌のカエルは最低4ヶ月ホルモン接種は行わずに水槽内で休ませ、その後適宜実験に再利用を行うため、カエルへのストレスは最小に抑えられているからである。また、受精時期の設定には正確さを必要とするため、雄のカエルを切開し精巣を取り出す必要があるが、カエルに与える痛みを最低限にするために、氷水中で十分に冬眠状態（麻酔状態と同じ効果）にさせた後（約10分）、頸椎破壊により反射を抑え、腹部切開し精巣摘出を行い、冬眠状態が解除される前にフリーザーにて凍結させているからである。

### C. 研究結果

#### 1. 初年度（2001年度）

簡便かつ効率良く Tat 遺伝子の胎児への影響を解析できる系を確立するための第一歩として、その多様な現象を広範にかつ短期間に観察可能なアフリカツメガエル（*Xenopus laevis*）の受精卵の系での検討を行った。*Xenopus* から新規にクローニングした転写因子 Sox9（ヒトではその遺伝子の突然変異が、Neural Crest 由来の軟骨の形成不全と性逆転現象を引き起こすことが知られていたが、多分化能細胞集合体である Neural Crest の初期発生において必修の遺伝子）の遺伝子、蛋白質解析を行った。Whole-mount In situ hybridization 法により、初期発生における時間経過に伴う Sox9 遺伝子の発現、その局在を明らかにすることができた（Fig.3-(1)）。

また、その loss of function 解析するために、アンチセンス Sox9-RNA を2細胞期の片側へマイクロインジェクションを行うと、投与された側の細胞由来の個体、組織群、遺伝子群の一部のみ投与量に比例して knockout された（Fig.3-(2), (3)）。これらの得られた結果より、*Xenopus laevis* システムを用いることで内因性の目的遺伝子発現とその局在における広範な現象を一度に、かつ視覚的に解析することが可能であることを示した。

#### 2. 2年目（2002年度）

2001年度の内因性遺伝子発現の機能解析を基本に、今回は外因性遺伝子でかつトランス活性化因子である Tat による胎児へ与える影響を上記 *Xenopus* の個体胚を用いて解析を行った。

Tat 及びその組換え体 mu-Tat（Fig.4-A）、gag 各遺伝子を *Xenopus* で効率良く発現するプラスミド発現ベクター、pCS2+へのクローニングを行い、上記各タンパク質が期待される分子量であることを試験官内で確認しておいた（Fig.4-B）。外来性遺伝子として Tat, muTat, 及び gag の各 RNA を *Xenopus* の2細胞期胚の1細胞へマイクロインジェクションし、その後培養液中で develop させ、stage10.5, stage12（中胚葉形成時期）、stage13-19（神経形成期）、stage20-（organogenesis）の各発生段階で回収し、ホルムアルデヒド固定した後、形態学的な解析を行った（Fig.2）。中胚葉形成の初期（stage10.5; Fig.6-A）では Tat, muTat, 及び gag を接種し胚は全て形態学的な変化は

認められなかった (Fig.6-B, C, D)。また、その後期 (stage12; Fig.6-E) でも、muTat, 及び gag を接種した胚では同様に、形態学的な変化は認められなかったが、Tat を接種した胚では明らかな原腸陥入の遅延が認められた (Fig.6-G, H)。ところが、それらは死滅することはなくそのまま発生は継続され、神経形成期の中期 (stage17; Fig.6-I) では Tat を接種された側由来の組織群 (beta-Gal にて青色に染色された部位図) は blastpore の閉鎖が行われないうまま (原腸陥入の不完全; Fig.6-K, M) であったが、その他の組織は正常な形態を維持していた (Fig.6-J, L)。また、muTat, 及び gag を接種した同時期の胚では全て正常な形態を維持したままであった。さらに organogenesis の中期 (stage30; Fig.7-A) まで上記の胚発生は継続され、同様に Tat を接種された胚では、接種された側由来の組織群 (beta-Gal にて青色に染色された部位図) は blastpore の閉鎖が行われないうままに内胚葉が体外へ露出した状態であった (Fig.6-D, G, H)。この時期もまた、muTat, 及び gag を接種した同時期の胚では正常な形態を維持したままであった (Fig.6-B, E, C, F)。また、上記全てにおいて胚は正常発育であったが、Tat を接種した胚では、organogenesis の後期 (stage45 以降) では死亡率が 50% 以上となり、stage50 まで生き残った胚は 0% であった。

### 3. 3年目 (2003年度)

Tat の接種による blastpore 閉鎖不全の形態学的な変化が認められた原因とその特異性を

詳細に検討した。既にマウスをはじめとしてよく知られている、中胚葉形成に必修の転写因子と考えられている Brachyury (Xbra) を遺伝子マーカーとして用いて、上記 muTat, Tat, gag 各外来遺伝子または蛋白質が、Xbra 遺伝子発現へ与える影響を whole-mount in situ hybridization 法によって解析を行った。Xbra は presumptive な中胚葉が存在する部位で認められ stage10-12 にかけて blastpore (原腸陥入が行われる部位) の周囲にリング状に強く発現している (Fig.8-A)。muTat, 及び gag を接種した胚では、コントロールと同様に Xbra の発現が認められたが (Fig.8-B,D,E,F,H)、Tat を接種された側由来の組織群ではその発現は抑制されていた (Fig.8-C,G)。また、外来遺伝子が正常発生に与える影響をより簡便に解析するために (特に卵黄等を除く目的) 上記の各遺伝子を 1 細胞期にマイクロインジェクションした後、胚胞期 (stage8/9) にアニマルキャプアッセイ法 (Fig.10) を行った。さらにその組織を用いて RT-PCR を行った。その結果、Fig.11 に示すように Tat を接種したものだけが Xbra の発現が特異的に抑制されており、これはこれまでの形態学的解析、whole-mount in situ hybridization 法による解析の結果と一致している。一方、上記 notochord は原腸形成において形態形成運動の動的中心として、著しい伸長と集中を行い、胚内に陥入して外胚葉を裏打ちされる。さらに notochord の形成に Xbra が必須であることが知られている。実際に神経胚後期

(stage18/19) にもかかわらず Fig.9-E, H. で示されるように、blastopore 周囲で発現していた中胚葉が依然として胚後方で発現を続けているが、一方で Fig.9-A (緑の矢印) で示すように notochord (脊索) において Xbra の発現が認められる。神経形成期を通して、Tat を接種された側の組織群では blastopore は開放されたままで、抑制されていた Xbra 発現は多少その発現が回復されたように見受けられる (Fig.9-C, D, G, J)。ところが、興味深いことに notochord (脊索) の形態のみならず、Tat を接種された胚の notochord (脊索) での Xbra 発現は (Fig.9-C, D の緑の矢印)、muTat を接種された胚 (Fig.9-B 緑の矢印, F, I) 同様正常であった (gag の場合も同様の結果)。

また、他の組織への影響を検討するために各組織特異的遺伝子マーカーを用いた遺伝子発現への影響を検討中である。今後は、in vivo (embryos 内) での各タンパク質の発現を特異的な抗体を用いて確認するとともに、他の遺伝子マーカー、Goosecoid (前部中胚葉形成)、Slug, Sox9, Sox10 (神経冠: neural crest) 等を用いた whole-mount in situ hybridization を行い、Tat 発現により抑制される特異的な細胞、組織などを解析していく予定である。また、RT-PCR, Northern blot 等の生化学的手法を用いて、mRNA レベルでの解析も行なう予定である。

#### D. 考察

近年、HIV コンポーネントワクチンは env のみならず、gag, Tat を標的抗原とする開発

が進んでいる。一方で、早急に求められている成果は特異的な抗ウイルス作用、低い副作用、低コスト、これらの条件を満たすエイズ予防法の確立である。その際に問題となる第一歩が動物システムであろう。上記条件を満足するには、哺乳動物、特にサル、チンパンジー等が候補にあげられるが、その動物等を用いて上記条件を満たしかつ短期間に多数、広範囲に解析することは困難とされていた。そこで本法は、個体発生への影響を広範囲かつ短期間に解析可能な系であり、かつ同じ脊椎動物である哺乳動物との共通点が多いと考えられる初期発生における動物モデルとしては、非常に有効な手段になるものと考えられる。さらに目的の遺伝子を1細胞のみに接種し、もう一方の細胞を正常コントロールにすることで、その後各々の細胞由来の組織群から発生した同一個体の embryo でありながら、異なる正常発生組織 (個体) 群と被接種組織 (個体) 群を同時に解析できるといった利点もある。

今後、HIV 制御遺伝子である Tat 等を標的抗原としたワクチンの開発が進められることを考慮する場合に、HIV ビリオン、ゲノムによる生体への影響のみならず、各遺伝子コンポーネントが生体内へ与える影響、特に『現在もしくは将来的に妊娠の可能性のあるヒトにワクチン投与を行った場合、胎児への影響はないか』を考慮すべきものと考えられる。最近の報告によれば、そのメカニズムは不明にもかかわらず、HIV 陽性の母親から生まれた HIV 陰性の幼児は血液・免疫系、神経系によ



る異常が長期間持続することが明らかになってきている。

Serenella Venanziら(Analysis of HIV-1 Tat Effects in *Xenopus laevis* Embryos. *J. Biomedical Science*. 1998; 5: 211-220)が報告した結果と同様に、Tatの組換え体 mu-Tatの置換部位(彼等は37番目のCysをSerへ置換したが、我々はアミノ酸30番目のCysをAlaへ、41番目のLysをAlaへ置換した。)は異なるが、我々の実験においてもTatは原腸陥入を特異的に遅延させた。さらに、我々は、gagでも原腸陥入への影響は無いことを示した。ところが、接種したTat-RNAの量は同様(200pg)にもかかわらず、彼等とは異なり、我々の結果では前後体軸の変性(前後軸の区別がつかない)、前方(頭部)の体部形成不全は生じなかった。これは、HIV-1とSHIV-C/2の分離株間の違いであるものと考えられる。さらに今回我々は、Tatの接種による胚の原腸陥入の遅延を、より発生初期から時間経緯とともに詳細に解析を行った(Fig.6, 7,8)。それによりTatは神経形成期の脊索に発現するXbraには全く影響を与えないが、原腸陥入期におけるblastopore周辺に発現するXbraに対して特異的にその遺伝子発現を抑制することを明らかにした。中胚葉形成初期、原腸陥入でのTatによるXbraの抑制が、その後期、神経形成後期に一見回復しているように認められるが(Fig.9-C, D, G, J)上記に述べたように、原腸陥入後の中胚葉形成は非常にダイナミックで伸長性著しく、非Tat接種側由来の組織で

正常発現しているXbraがその際に移動してきたものと考えられる。興味深いことは、Tatが脊索でのXbra発現には全く影響を与えなかったことである。従って、Tatは中胚葉形成初期、原腸陥入期に特異的にXbraの発現を抑制していることが示唆される。

ところが、このTatによる抑制効果がXbraに対してどのようなメカニズムで作用しているのか(直接Tat蛋白質が、Xbra蛋白質とinteractしているのか、または、Xbraプロモーター領域に作用しているのか等)その特異性を検討するためにXbraのプロモーター領域を含めた解析を行っている。

全脊椎動物においては、原腸陥入は三胚葉形成(外胚葉、中胚葉、内胚葉)に必須で、それに伴う細胞移動(movement)、後部中胚葉形成、notochord(脊索。将来脳、脊髓形成に必修な細胞、組織)形成でXbra遺伝子が重要な役割を演じていることが知られている。ところが原腸陥入時におけるcell adhesion, cell movement, cell polarityにおけるXbraの機能はあまり良く分かっていない。従って、TatによるXbraへ与えるloss of functionを解析することにより、Xbra、Tat各々の機能を解明することが可能なものと考えられる。さらに、現在他の中胚葉遺伝子マーカー、Gooseoid(前部中胚葉形成)へ対するTatによる影響を検討中である。

また、先に述べたように神経系に対する影響を示唆する報告も考慮して、今後、既に我々が報告してきた神経系の遺伝子マーカーSlug、Sox9、Sox10(神経冠:neural crest)を用

いた検討も行う予定である。

以上のことから、Tat 遺伝子は、胎児の初期発生段階で最も critical なステップと考えられている、原腸陥入期（三胚葉形成に必修）に対する抑制作用を持つことが示唆された。今後この時期に必須かつ重要な転写因子、宿主因子等の検索により、Tat の標的遺伝子、蛋白質の解明が期待されるものと考えられる。当然のことながら、これらの検討をより詳細に進めることにより、次のステップであるマウス等哺乳動物を用いた解析が必要となり、現在マウスでの Tat による Brachyury へ与える影響を whole-mount in situ hybridization 法等で検討しているところである。

#### E. 結論

本研究班で、HIV 制御遺伝子 (Tat) ワクチンの安全性、特に妊婦投与等に際して、胎児にどのような影響を与えるのかを知る目的で、脊椎動物の個体（アフリカツメガエル）の受精卵へ Tat 遺伝子を接種し、胎児毒性を検索する方法が、使用し得るかさらに哺乳動物で確認すべき安全性確認法の一助となり得るのかの検討を行った。その結果、胎児発生に与える影響を短期間に、広範に検討することが可能であることを上記の系で明らかにした。さらに、正常個体の中胚葉形成に重要な転写因子、Brachyury の遺伝子発現に特異的に作用していることを明らかにした。今後はマウス等哺乳動物における胎児への影響、特に免疫系、神経系、血液細胞分化への影響、等を中心に検討を加える予定である。

#### F. 健康危険情報

特記すべき事無し。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Fuse, A, Aoki, Y., Sato, T, Kita, M, Yamamoto, T, Toriizuka, K, Sunohara, M, Takeoka, H. Effect of gravity change on the production of thrombopoietic growth factor. *Biol. Sci. Space.* 15(3): 302-303, 2001.

(2) Aoki Y., Spokony RF, Saint-Germain N, Magner-Fink E, Saint-Jeannet. The transcription factor Sox9 is required for cranial neural crest development in *Xenopus*. *Development.* 129(2): 421-32, 2002.

(3) Aoki, Y., Saint-Germain N., Gyda M., Magner-Fink E. K., Lee Y-H, Credidio C., and Saint-Jeannet, J-P. (2003). Sox10 regulates the development of neural crest-derived melanocytes in *Xenopus*. *Developmental Biology.* 259(1): 19-33, 2003.

(4) Suzukaki Y, Ami, Nagata N, Naito H, Taneichi M, Takahashi M, Komiya T, Satoh S, Gondaira F, Sugiyama J, Nakano Y, Mori M, Komuro K., Uchida T. Protection of monkeys against Shiga toxin induced by Shiga toxin-liposome conjugates. *Int Arch allergy Immunol.* 2002Apr; 127(4):294-8.

(5) Taneichi M, Nakano Y, Kato H, Tanaka Y, Mori M, Nakano Y, Yamamura H, Ishida H,

Komuro K, Uchida T. T cell-independent regulation of IgE antibody production induced by surface-linked liposomal antigen. J. Immunol 2002 Oct 15;169(8):4246-52.

(6) Naito S, Taneichi M, Kato H, Tanaka Y, Ami Y, Suzuki Y, Mori M, Nakano Y, Yamamura H, Morokuma K, Ohkuma K, Miyake H, Kiniwa M, Komuro K, Uchida T. Selective inhibition of systemic anti-OVA-IgE production in response to oralpre-treatment with OVA-liposome conjugates. Int. Arch allergy Immunol. 2002 Dec; 129(4): 314-9.

## 2.学会発表

無し。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

無し。

### 2. 実用新案登録

無し。

### 3. その他

無し。

Fig.1

