

図4 アカゲザルにおけるMIC多型のRSCA解析パターン

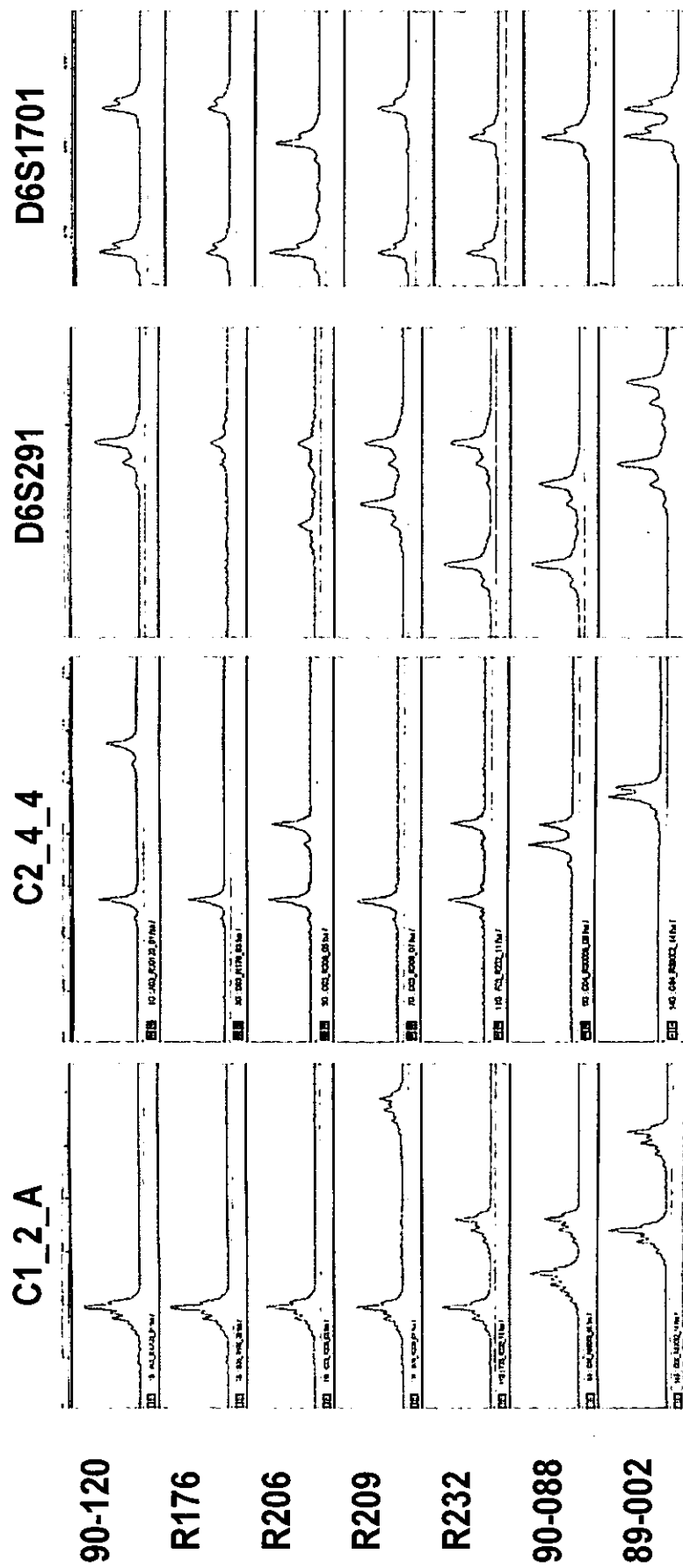


図5 サル MHC 領域のマイクロサテライト多型

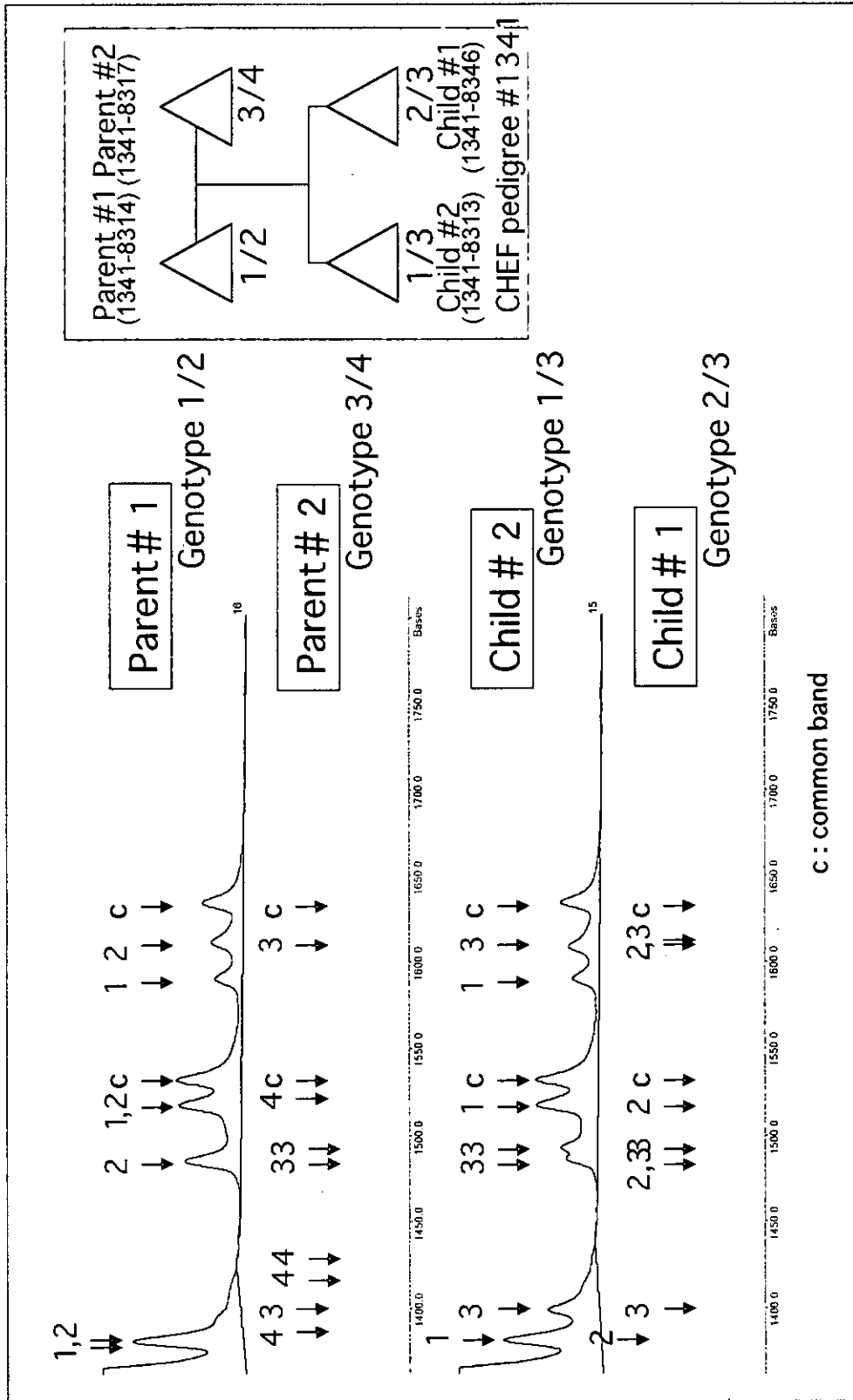


図6 ヒト KIR 遺伝子群の RSCA パターン

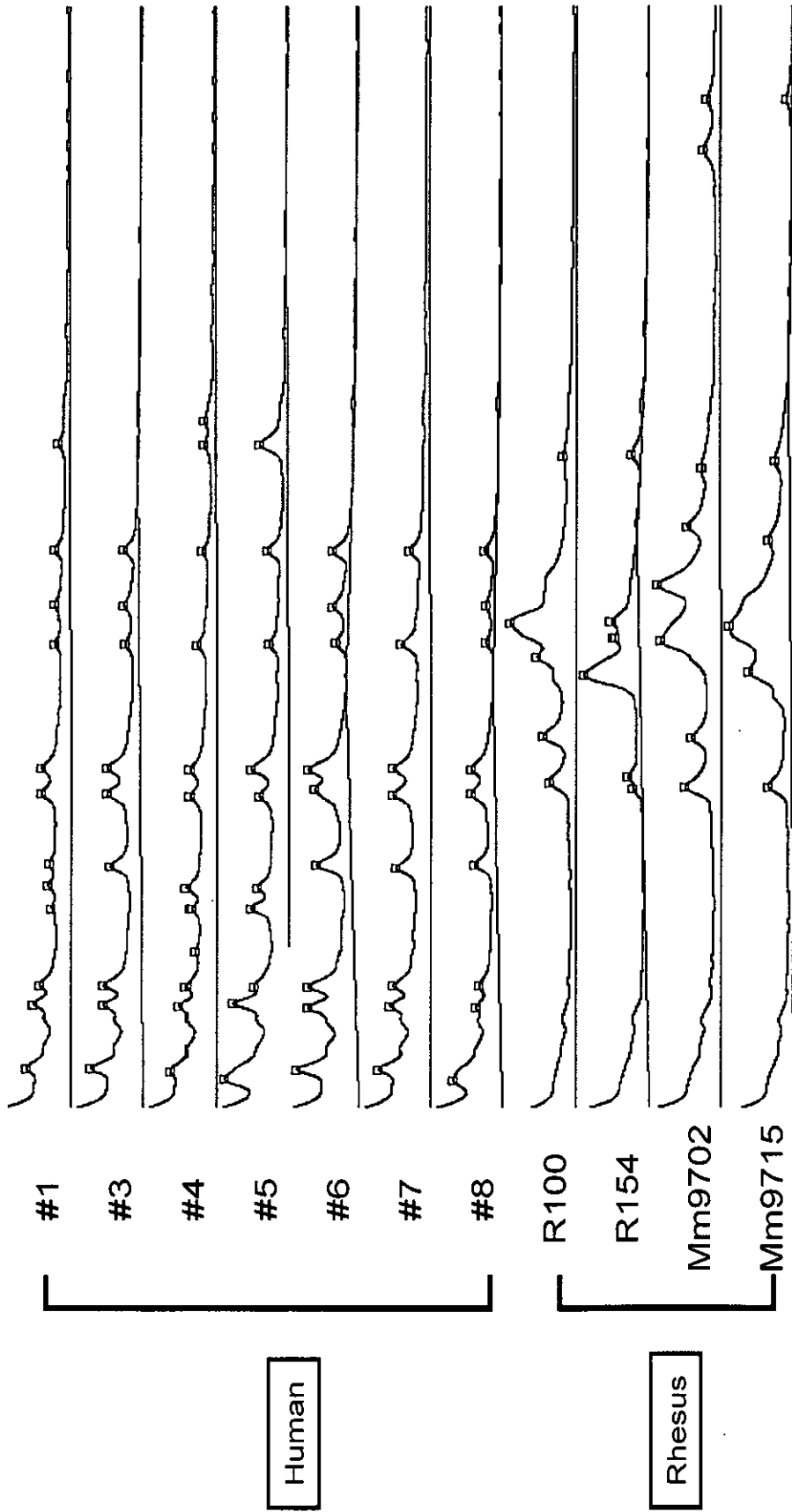


図7 ヒトおよびル KIR 遺伝子群の RSCA パターン

厚生労働省科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

ウイルス抗原の MHC への提示における糖鎖の影響に関する研究

分担研究者 保富康宏 三重大学医学部 助教授

エイズウイルスは宿主の免疫機構から回避しながらさらに免疫機構の中心的存在である CD4⁺ヘルパー T 細胞(Th)を破壊して宿主を死に至らしめる。このことからエイズウイルスに対する免疫系の認識機能、免疫回避機構を検討することはエイズウイルスの感染予防、治療、病態解明に必要である。本研究ではサルエイズウイルス(SIV) env の糖鎖結合部位 5 カ所を取り除いた SIV env (d5G)ウイルスの env DNA ワクチンと組み込みワクシニアウイルスを用いてマウスにおいての認識を野生型 env と比較した。糖鎖結合部位を取り除くと産生タンパク量は△5G と野生株 SIV においては同等であるが、env 蛋白の発現が野生株 SIV env に比べ感染細胞中に早期に認められ、d5G env 蛋白は感染細胞の膜に近く発現されていた。また MHC に提示される過程においては野生株と d5G では違う経路を利用していることが判明した。これらのことより d5G の env 蛋白はより大量に提示されることが示唆され、それにより細胞性免疫反応、特に細胞傷害性 T リンパ球(CTL)の誘導、認識の両者を強く引き起こすことを見いだした。

保富康宏 三重大学医学部 助教授

A.研究目的

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) や同じレクチウイルスであるサル免疫不全ウイルス (SIV) のエンベロープ蛋白 (env) gp120 には非常に密なアスパラギン (N) 結合型糖鎖付加部位が存在し、これらウイルスの一大特徴の一つとなっている。これらの N-結合型糖鎖は蛋白の高次構造の形成のみならず、ウイルスの感染性、増殖生、コレセプターとの結合、病原性、そして宿主免疫応答等様々な因子に影響を及ぼすことが報

告されている。本研究ではマウスを用いてこの糖鎖結合部位を除去した env ならびに野生型において env 抗原の発現と誘導される免疫反応を比較し糖鎖結合部位の存在意義を検討した。

B.研究方法

- 1) 野生型 SIVenv(WT) および SIV5Genv(d5G)をプラスミド(pJW)に組み込み DNA ワクチンを作製した。
- 2) DNA ワクチンを BALB/C x C57BL/6 F1 (CB6F1) マウス筋肉内に electroporation 法を用いて筋肉内に 1

週間隔で3回免疫した。

- 3) 免疫マウスの脾細胞の CD8⁺細胞を *in vitro* で SIVenv および SIVd5Genv 組み込みワクシニアウイルスで刺激した後 ELISPOT assay にてインターフェロン γ (IFN- γ)産製細胞を測定した。
- 4) 免疫マウスの脾細胞を用い野生型 SIVenv および SIVd5Genv 組み込みワクシニアウイルスを感染させ、マイトマイシン処理をした同型脾細胞を刺激細胞として細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) の誘導を測定した。
- 5) CTL 誘導時に種々の酵素阻害剤を用いてその効果を比較検討した。
- 6) 免疫マウスに野生型 SIVenv および SIVd5Genv 組み込みワクシニアウイルスをチャレンジし、3日後に卵巣からウイルスを回収し real time PCR にてウイルスカ価を測定した。
- 7) ウイルス抗原の発現は SIV env 特異的抗体を用いた FACS 分析で行った。

C. 研究結果

1. HIV 特異的免疫反応: 免疫マウスに SIV env WT および d5G 組み込みワクシニアウイルスを接種したところ d5G 免疫マウスがいずれのウイルスに対しても *in vivo* で WT 免疫に比べ高い抗ウイルス効果を誘導した(Fig. 1)。免疫マウスの脾細胞からの CD8⁺細胞をを組み換えワクシニアウイルスで刺激し γ -IFN 産生細胞を ELISPOT assay で調べたところ d5G 免疫マウス細胞を d5G 組み込みワ

クシニアウイルスで刺激した時が最も高い値を示した(Fig. 2a)。しかしながら SIV env に対する抗体産生は両免疫群に差は無く、中和活性も示さなかった(Fig. 2b、Table 1)。免疫マウスの脾細胞から特異的 CTL を誘導する際に、免疫、*in vitro* での刺激、標的細胞の標識にそれぞれ WT と d5G を用い全ての組み合わせにおいて CTL の誘導を試みたところ、免疫、刺激、標的のいずれにおいても d5G は WT に比べ高い CTL 活性を誘導した(Fig. 3)。この活性誘導がどの程度の抗原提示に差があるかを CTL の標的細胞に組み替えワクシニアウイルスを種々の MOI にて感染したところ d5G では野生株 env に比べ約 3 倍の提示がされているのではないかと考えられた(Fig. 4)。これらのことから抗原提示が d5G と WT で異なるのではないかと考え、種々の抑制剤を用いて標的細胞を処理し、CTL 誘導に対する影響を見たところ両者に違いが認められた(Fig. 5)。また変異部位が新たな CTL エピトープとして存在するために CTL 活性に影響を与えた可能性を変異部位の合成ペプチドにて CTL の誘導を行ったところいずれの変異も CTL エピトープとは関係がなかった(Fig. 6)。

2. SIV env 蛋白の細胞内発現: SIV env WT および d5G 組み込みワクシニアウイルス感染細胞において細胞表面への発現を比較したところ d5G の方が早期に大量に発現していた(Fig. 7a, c)。しかしな

がら細胞内の発現は両者に差は認められなかった(Fig. 7b)。MT-2 細胞に SIV env WT および d5G 組み込みワクシニアウイルスを感染させたところ細胞変性効果は d5G において著明に認められた(Fig. 8)。

D. 考察

エイズウイルスの免疫回避機構は様々あり、その中のひとつが env に存在する糖鎖であると考えられている。我々を含め等鎖変異ウイルスを接種したアカゲザルはいずれも発病や病原性を示さず病態に大きく影響していると考えられている。初期の発表では糖鎖を除去することにより中和抗体を効率よく誘導できると考えられていたが、我々の実験では抗体産制については影響がないと報告した。実際本実験におけるマウスでの解析においても抗体の産制には糖鎖の影響は認められなかった。しかしながら CTL の誘導には大きく関わり、特に in vivo での免疫、in vitro での刺激、標的細胞に対する細胞障害性のいずれもが糖鎖に変異を与えることで CTL の活性上昇を示した。この機能を解明すべく種々のタンパク合成阻害剤を用いた系では d5G と WT 間での差異が認められ、抗原提示経路の違い、依存性の差を示したが、これがどのような差なのかはさらに検討する余地がある。このことは env のタンパク合成にも関与していると考えられ、糖鎖を取り除くことで細胞膜近傍で早期に env タンパクの合成が行われることが抗原提示に影響していると示唆され

た。以上のことからエイズウイルスに存在する糖鎖を研究することは病態解明や予防、治療に深く関与しており、今後さらに詳細な研究が必要であると思われた。

E. 結論

SIV env の糖鎖を取り除くと感染細胞での発現が膜表面に近づき、そのことにより抗原提示が高進し強い細胞性免疫の誘導が高進する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Uno-Furuta, S., Matsuo, K., Kim, G., Tamaki, S., Takamura, S., Kamei, A., Kuromatsu, I., Kaito, M., Matsuura, Y., Miyamura, T., Adachi, Y., and Yasutomi, Y. Immunization with recombinant bacillus Calmette-Guerin (BCG)-hepatitis C virus (HCV) elicits HCV-specific cytotoxic T lymphocytes in mice. *Vaccine* 2003;21:3149-3156.
- 2) Takamura, S., Niikura, M., Li, T.C., Takeda, N., Kusagawa, S., Takebe, Y., Miyamura, T., and Yasutomi, Y. DNA vaccine-encapsulated virus-like particles from an orally transmissible virus stimulates immune responses by oral administration. *Gene Ther.* in press
- 3) Hayashi, T., Yasutomi, Y., Hasegawa, K., Sasaki, Y. and Onodera, T. Interleukin-4-expressing plasmid inhibits reovirus type-2-

triggered autoimmune insulinitis in DBA/1J suckling mice. *Int. J. Exp. Path.* 2003;84:101-106.

- 4) Nishikubo,K., Murata,Y., Tamaki,S., Sugama,K., Imanaka-Yoshida,K., Yuda,N., Kai,M., Takamura,S., Sebald,W., Adachi,Y. and Yasutomi,Y. A single administration of interleukin-4 antagonistic mutant DNA inhibits allergic airway inflammation in a mouse model of asthma. *Gene Ther.* 2003; 10:2119-2125.

2.学会発表

- 1) 糖鎖欠失 SIV の新規 attenuated virus と

しての性質：杉本知恵、保富康宏、塩田達雄、山本直樹、永井美之、森一秦・・・
第17回日本エイズ学会学術集会（神戸）

- 2) Env エイズワクチンへの糖鎖の重要性：森一秦、杉本知恵、中山英美、塩田達雄、草川茂、武部豊、保富康宏、永井美之・・・
第17回日本エイズ学会学術集会（神戸）

- 3) Oral administration of mucosal HIV vaccine by using virus-like particles derived from orally transmissible virus.: Yasuhiro Yasutomi・・・ Nobel Forum "Virus-Cell Interaction. Structure to Function."

(Karolinska Institut

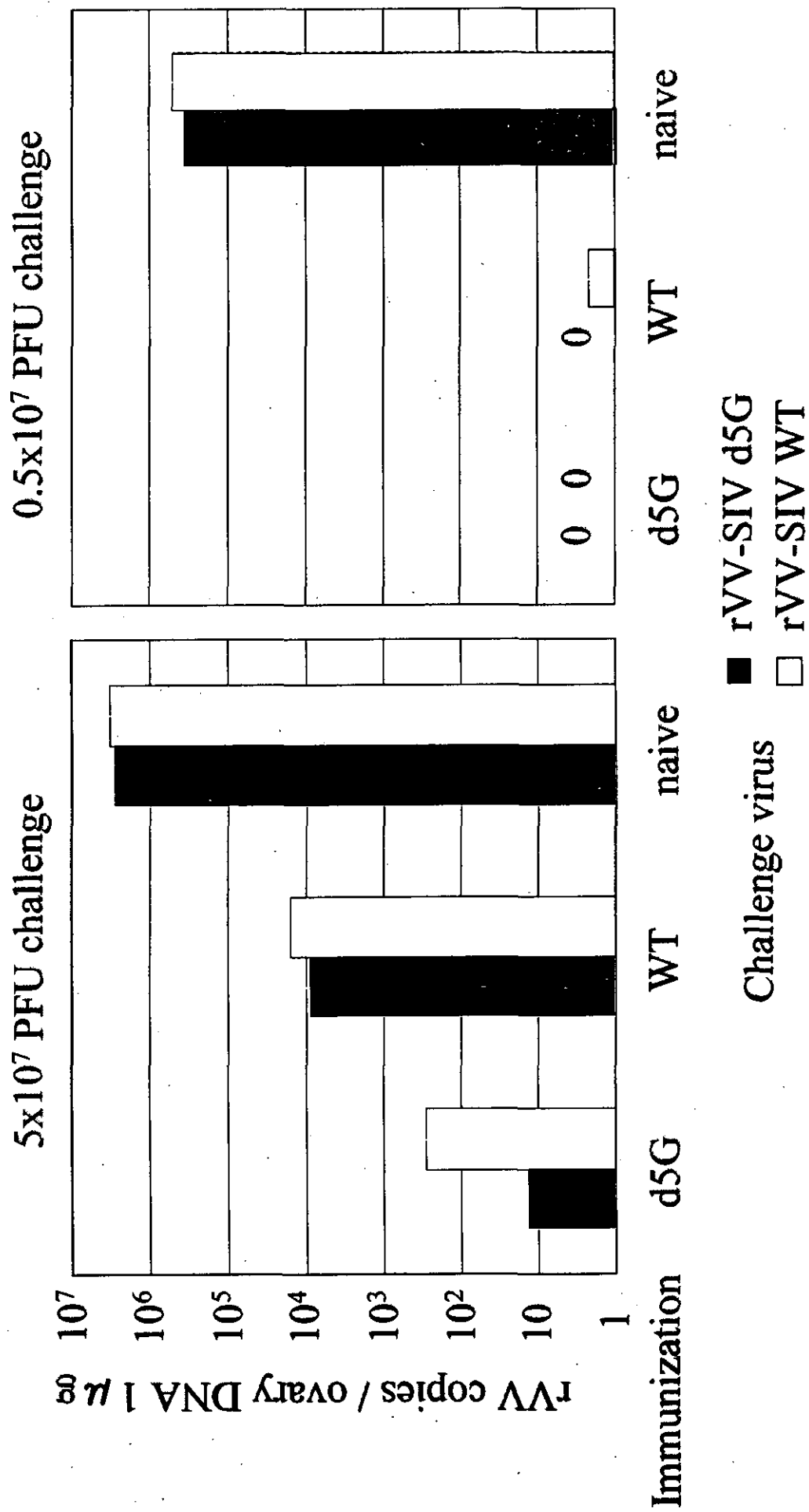
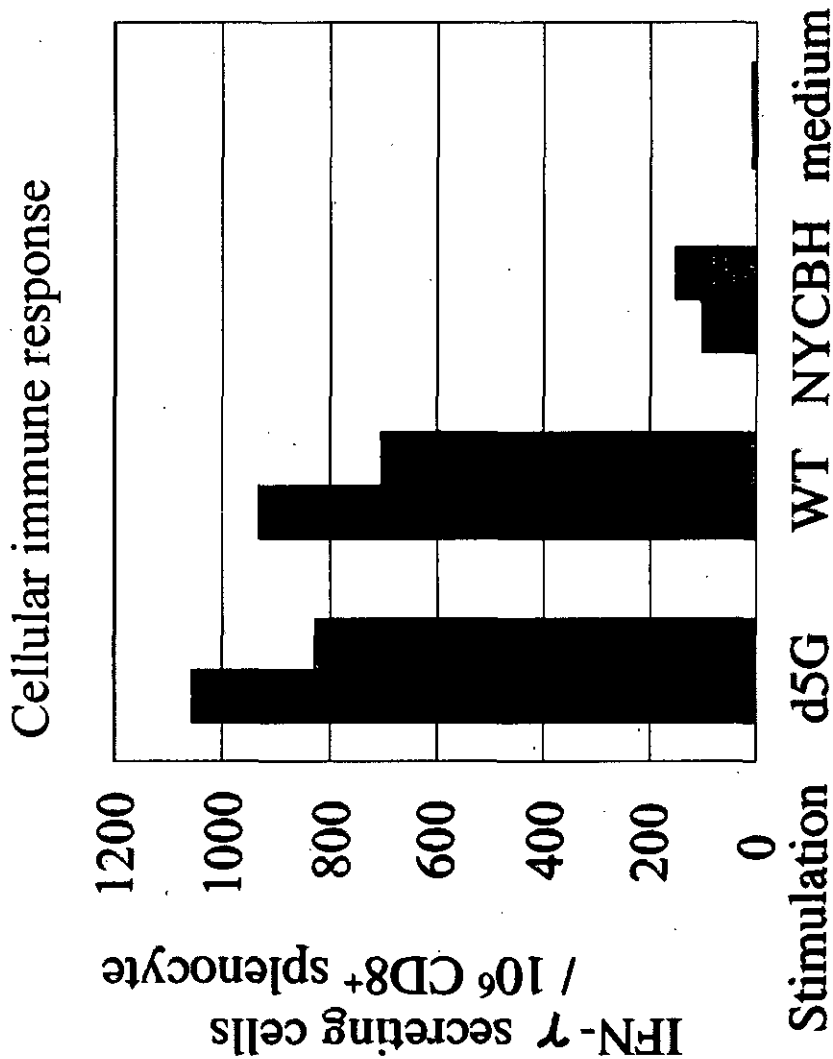


Fig. 1 DNAワクチン免疫マウスでのin vivoにおける抗ウイルス活性

a



b

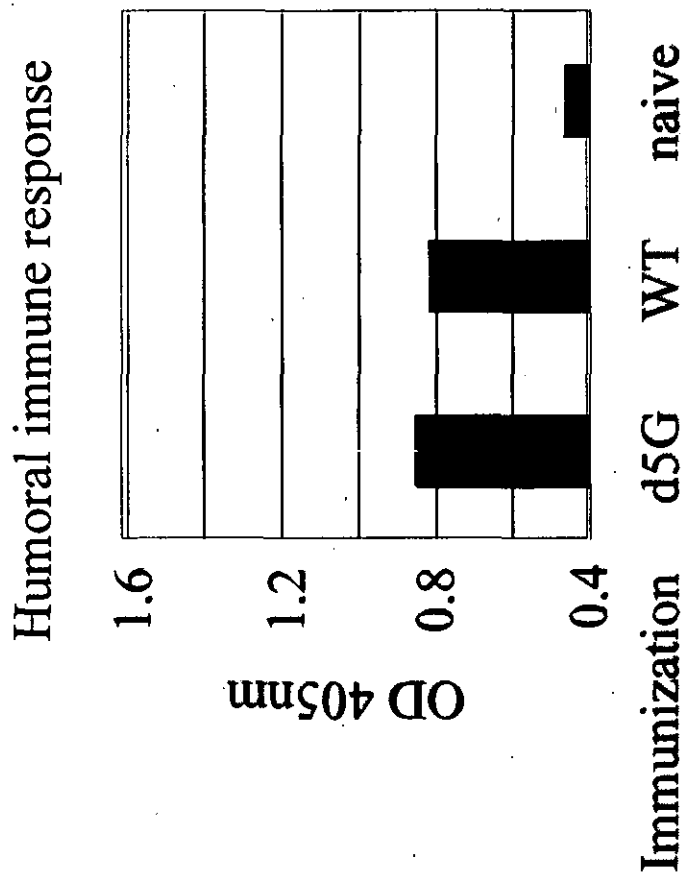


Table 1

Immunization	Neutralization Ab titer
d5G	< 20
WT	< 20

■ d5G immunized mice
 ▨ WT immunized mice

Fig. 2 DNAワクチン接種マウスにおけるSIV特異的細胞性免疫(a)と液性免疫(b)反応

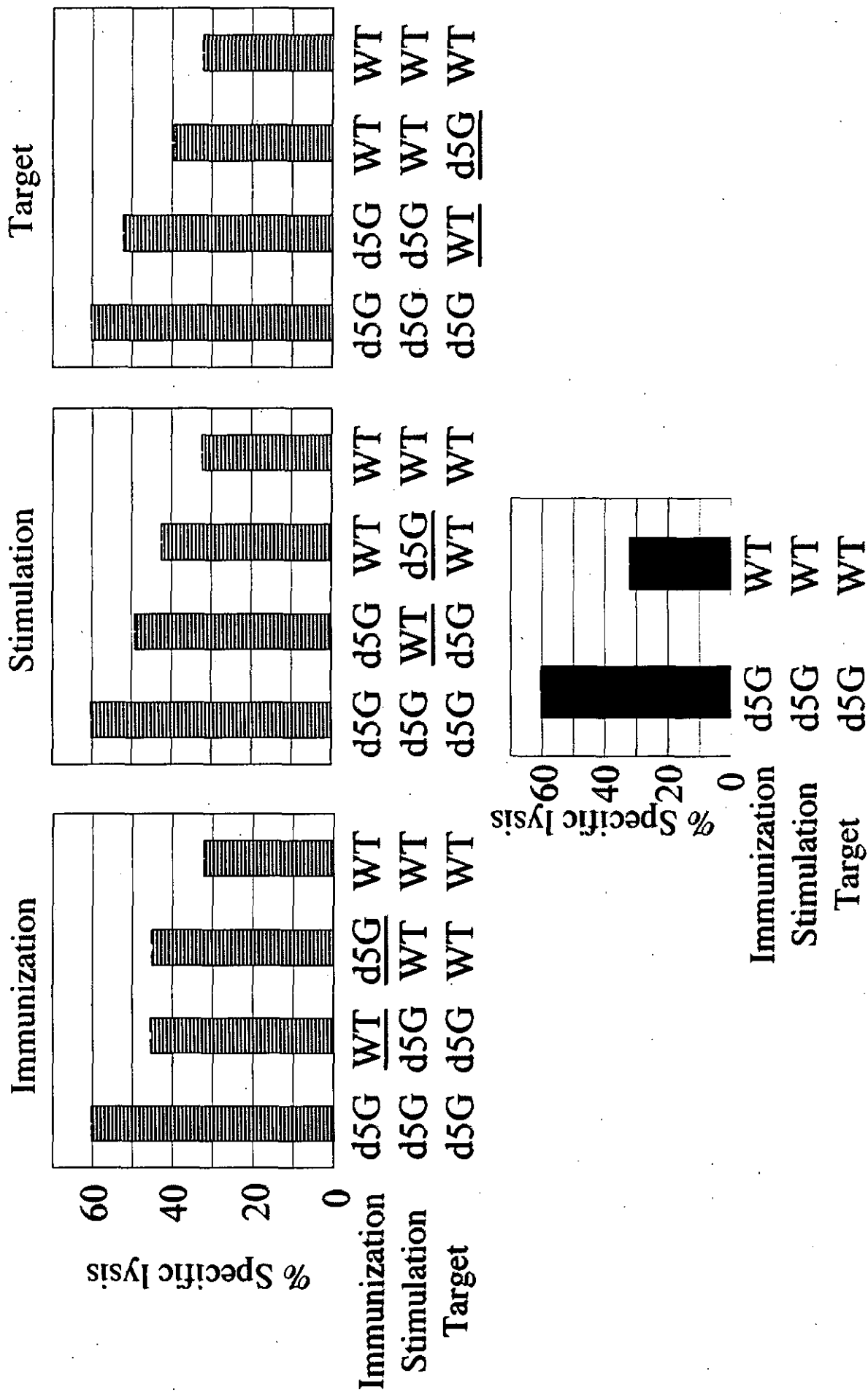


Fig. 3 DNAワクチン接種マウスにおけるCTLの誘導

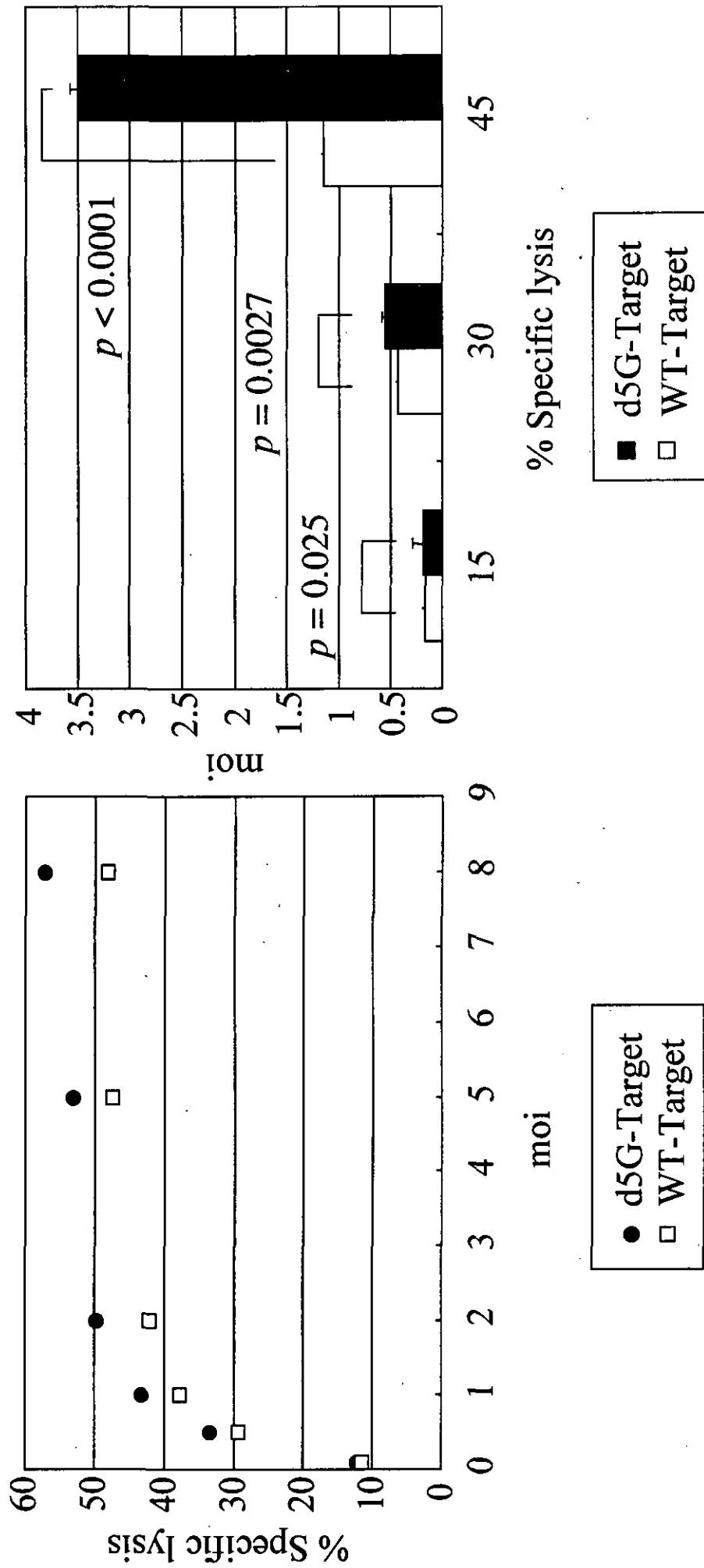
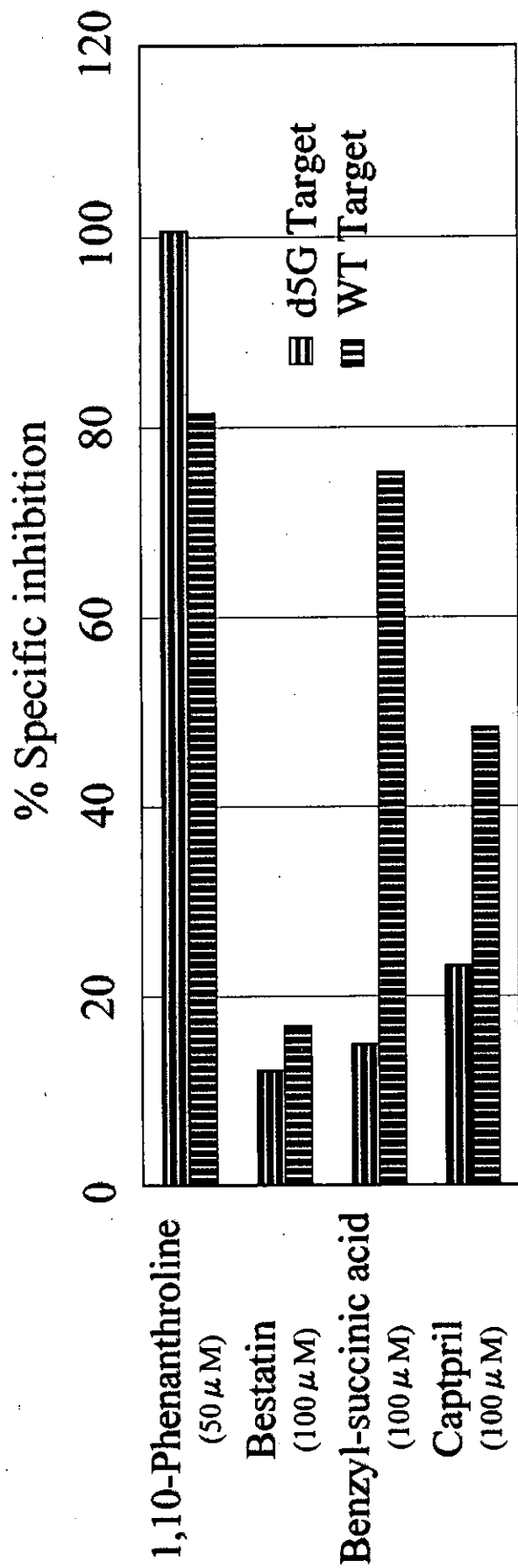


Fig. 4 遺伝子組み込みワクシニアウイルス感染MOIを変化させたときのCTLの細胞障害活性



Inhibitor	Specificity
1,10-Phenanthroline	All metalloproteases and caspase-1
Bestatin	Metallo-aminopeptitases
Benzyl-succinic acid	Metallo-carboxypeptidases A and B
Captpril	ACE and ACE-like metalloprotease

Fig. 5 タンパク合成阻害剤を用いた抗原提示の比較

Name	Position	WT sequence	d5G sequence
Peptide 1	70-87	NVTESEFD <u>AW</u> NTVTEQNI	NVTESEFD <u>AWQ</u> NTVTEQNI
Peptide 2	137-154	TASAKVDMV <u>NE</u> TSSCIAQ	TASAKVDMV <u>Q</u> ETSSCIAQ
Peptide 3	162-179	QEQLSCKFN <u>MT</u> GLKRDK	QEQLSCKF <u>Q</u> MTGLKRDK
Peptide 4	451-468	PPREGDLTCN <u>S</u> TVTSLIA	PPREGDLTC <u>Q</u> STVTSLIA
Peptide 5	470-487	IDWIDGN <u>Q</u> TNITMSAEVA	IDWIDGN <u>Q</u> TQITMSAEVA

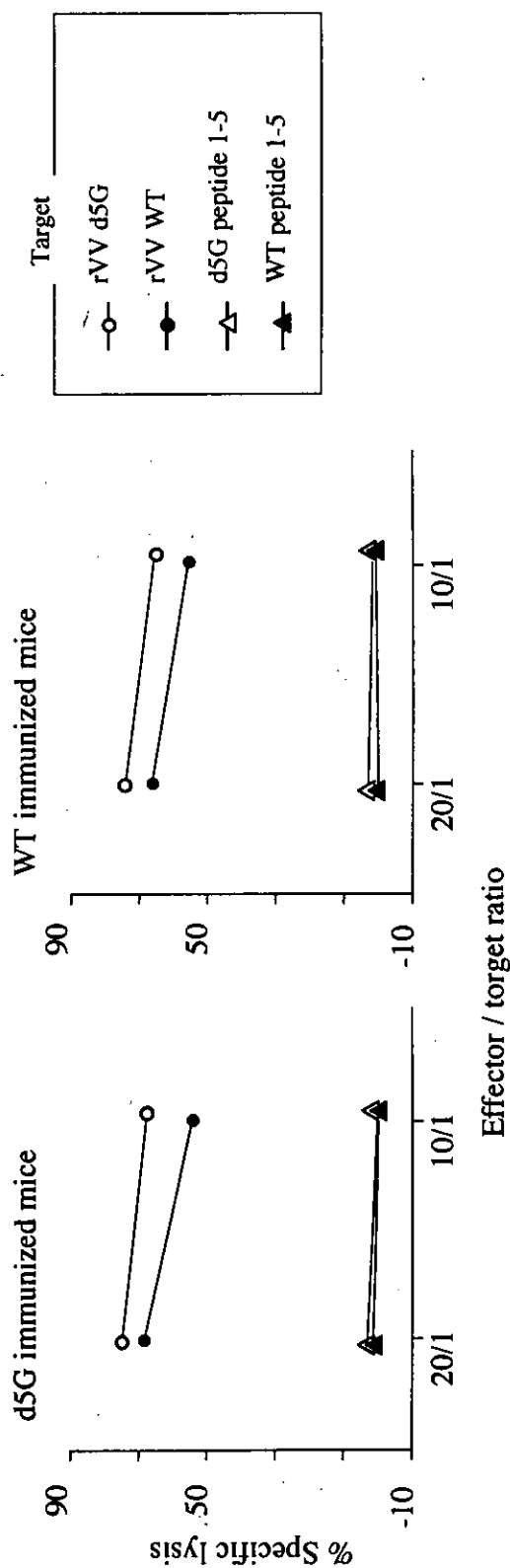


Fig. 6 変異エピトープに対するCTLの誘導

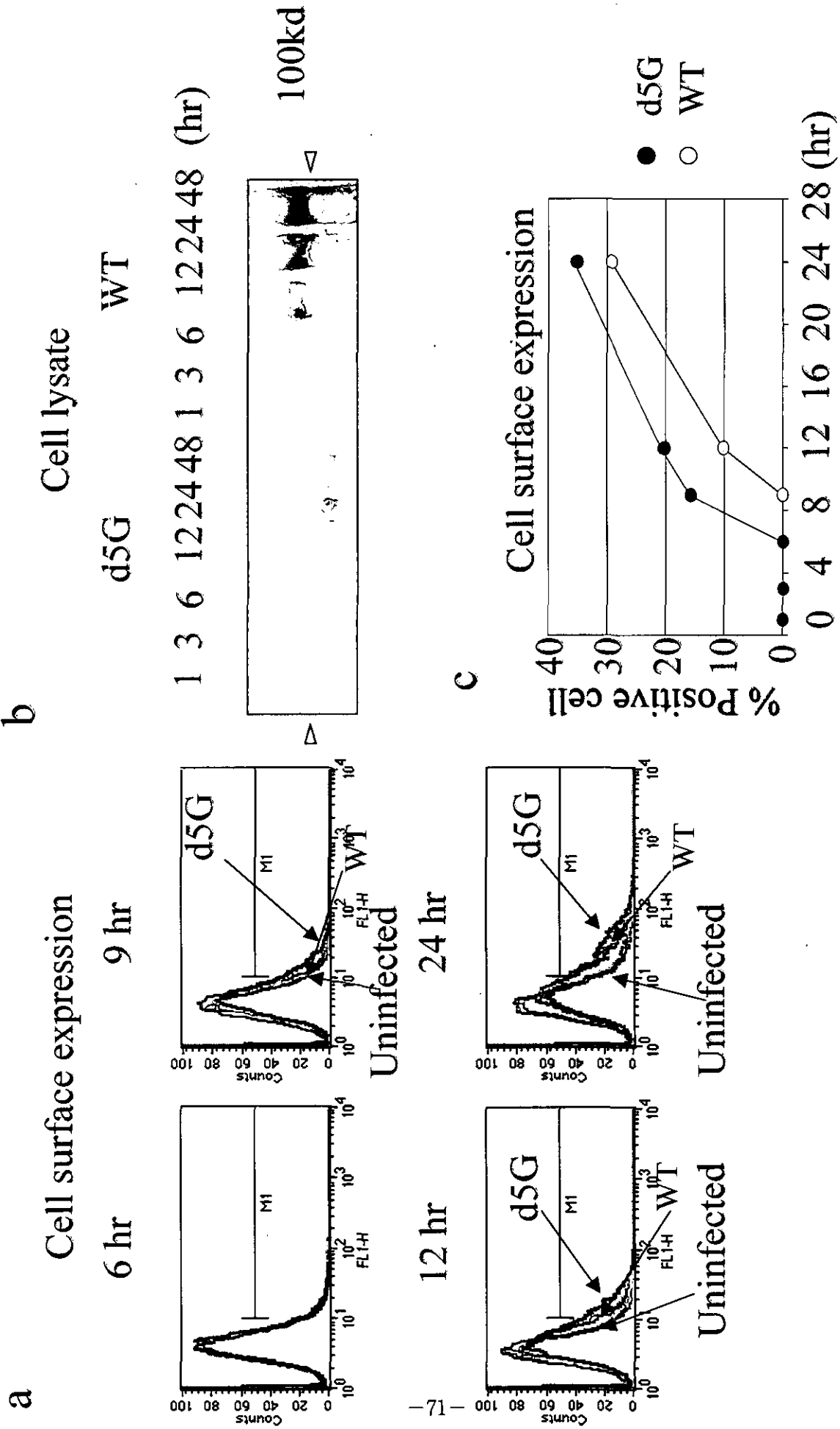
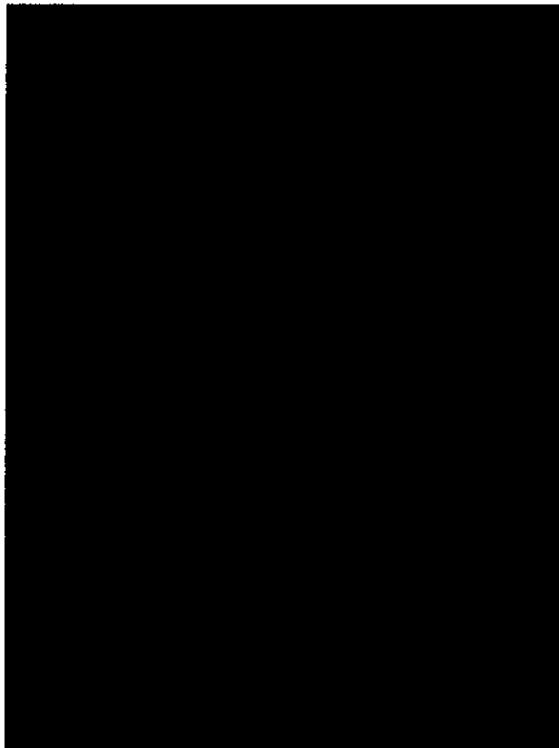


Fig. 7 d5GとWTの細胞での発現の比較

MT-2 cell infected with
rVV-SIV d5G (MOI 0.5)



MT-2 cell infected with
rVV-SIV WT (MOI 0.5)



(24hr)

Fig. 8 遺伝子組み込みワクシニアウイルス感染細胞における細胞変性効果

リコンビナントベクターを用いた SIV 抗原の特異的免疫誘導法に関する研究

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：HIV 感染の特徴からそのコントロールにはベクターを用いた組換えワクチンの開発が有用であると推測されている。本研究では HIV 感染に対する防御免疫を誘導できるワクチン開発を目的として免疫不全ウイルス遺伝子の発現を増強させ、防御免疫にいたる系を構築する。そのために本年度の研究では BCG をベクターに用いた組換え BCG ワクチンのコドンの至適化を *in vitro* 及び *in vivo* における発現の増強を確認し、免疫誘導がコドンの至適化を反映して著明に増強することを明らかにした。

協力研究者

松尾和浩、兼清優、仲宗根正、染谷健二、堀端重男、泉泰之、浜野隆一、原敬志、川原守、滝澤万里、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

効果的なワクチンを作製するにはワクチンの有効性のみでなく安全性や安定性さらに易入手性が要求されている。これらの課題に対応することを目的にして安全でかつ免疫誘導能に優れたワクチンとしてリコンビナントベクターを用いた HIV 候補ワクチンを開発する。

本研究では特に BCG のリコンビナントベクターとしての有効性と問題点を検討し、HIV ワクチンのベクターとして実用化が可能かどうかを検討する。さらに上記の目的を満たす

他のリコンビナントベクターの有用性についても検討する。

結核ワクチンとしての BCG は世界で最も使用されているワクチンであり、その有用性や問題点については既に明らかになっている。HIV ワクチンのリコンビナントベクターとしての BCG については約 20 年前からその開発が進められているが HIV に対する有用性については明らかにされていない。その理由として挿入した外来抗原に対する免疫の持続に関しては他のベクターより優れており、少なくとも数年は持続する事が明らかになっている。しかし rBCG 単独では外来抗原の発現が他のベクターに比べてやや劣るのではないかと懸念されており、単独投与による防御免疫の誘導は成功していない。しかし、BCG の有用性を考慮してその発現を上昇させることができ

るかどうかについて外来抗原の発現のためのプロモーターエンハンスの改良とともにコドンの至適化を検討し、HIV ワクチンとしての BCG の有用性を高めることができるかどうかを検討する。

さらに感染防御に結びつく細胞性免疫能の特性をサル MHC の情報を加味しながら検討する。

B. 研究方法

BCG のコドンの至適化による影響を検討した。方法的抗原遺伝子として、アッセイ系の構築のし易さからまず p24 抗原遺伝子を標的にした。次に SIV の whole Gag 遺伝子を標的にして至適化を検討した。

1) ウイルス抗原の遺伝子をマイコバクテリア、オプティマルコドンに読みなおし、全遺伝子を人工的に作製した。

2) 構築した遺伝子を pSO シャトルベクターに挿入して BCG に発現させ rBCG を作製した。

3) 発現の検討

①ネイティブコドンとオプティマイズコドンをもつベクターを用いて発現させた rBCG を培養し挿入した遺伝子の発現と BCG の増殖を p24 抗原の ELAISA 法と発光測定による菌数の変化について検討した。

②in vivo による発現系として外来抗原特異的な DTH の誘導と T 細胞増殖反応、抗体産生の面から検討した。

(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. 研究結果

1) rBCG におけるマイコバクテリアコドン至適化による *in vivo* での免疫誘導能発現の増幅について検討した。

挿入外来性遺伝子として HIV-1 clade B p24 抗原遺伝子をマスターコドンに至適化し、BCG Tokyo 株に発現させた。標的とする HIV-1 クレイド B p24 Gag 抗原遺伝子はコドンの至適化により Fig.1 に示すように G+C の含量がワイルドタイプで 43.4%のものが 67.4%に著明に増強する。

したがって両方の遺伝子を pSO246 ベクターに組込んだ。この際、hsp60 プロモーターを使用した。それぞれ、rBCG-p24Mu, rBCG-p24Wt を作製し、クローニングした (Fig.2)。これら 2 種のクローン化組換え BCG を液体培地で増殖させると約 2 週間前後で菌の増殖が最大に達し、次第に低下した。これらの組換え BCG は親株である BCG-Tokyo 株と殆ど変わりのない増殖力を有するものを選択した。増殖能が最も強く認められる 2 週間目の菌液を回収した。

p24 抗原の発現を Western Blot 法で検出するとワイルドタイプの Gag を発現する組換え BCG はコドンに至適化した BCG に比べると約 40 倍の p24 抗原の増幅が認められ、*in vitro* における外来性抗原の発現がコドンの至適化によって著明に増幅することが明らかとなった。1mg 相当菌量すなわち 5×10

⁷cfuBCG-Tokyo 株あたりの p24 抗原の産生量はコドンの至適化によって 40 倍の増幅が認められ、産生量は約 207ng となった。

2) BALB/c マウスを 3 つのグループに分け (Fig.3)、rBCG p24Mu, rBCGWt, rBCG pSO246 (ベクターコントロール) をそれぞれ 0.1mg, 0.01mg の組換え体で免疫した。腔内接種 10 週間後の免疫動物における抗原特異的免疫反応を解析し、以下の結果が得られた。

①リンパ球反応の増殖は 0.01mg 免疫動物でも認められ、その活性は 16~20 のプールしたペプチド抗原の刺激によってあるいは全ペプチドのプールした抗原の刺激によって有意に認められた。さらに、免疫量を 0.1mg に増加させるとそれぞれのリンパ球増殖反応の値は 10.08 及び 8.05 にまで増加した、しかし、ワイルドタイプのものではこれらの免疫量の増幅反応は認められなかった(Fig. 4A)。

さらに、 γ インターフェロン Elispot アッセイをプールしたペプチドと p24 組換え精製蛋白で刺激すると、0.1mg 刺激のコドン至適化組換え BCG p24 とワイルドタイプ p24Wt 免疫動物で 10^6 当り 375 及び 483 の著しい Elispot の強い活性が認められた。しかし、ワイルドタイプ組換え BCG 免疫では 93 及び 227 の活性を示した。PPD ではコドンの至適化による差は認められず、 10^6 当り 670 の活性が認められた。さらに、コドン至適化 BCG0.1mg

免疫マウスの免疫持続能を解析すると実験に用いた少なくとも 6 ヶ月までは Elispot 活性が 400 台をキープすることから免疫持続能に優れたワクチン抗原となることが示唆された(Fig 4B)。

②次に液性免疫誘導能について p24 特異的な抗体産生を ELISA 法で解析した。

0. 1mg の組換え BCG p24Mu, BCGWt, BCG pSO246 を免疫し、10 週間後の血清中の抗体価を測定するとコドン至適化 BCG 免疫動物及びワイルドタイプの BCG 免疫動物による抗体価はそれぞれ 2^8 及び $2^{6.75}$ であった。さらに PPD 特異的な抗体産生能が明らかに認められ、約 2^{10} レベルの抗体価が得られた。これらの結果から免疫不全ウイルス特異的な細胞性免疫の誘導は著明に認められるが、抗体産生能は低いことがわかった(Fig. 4C)。

1.

D. 考察

本研究において BCG の組換え技術を用いて外来性抗原の発現が著明に上昇することを *in vitro* 及び *in vivo* のレベルで明らかにした。BCG ワクチンの組換え技術は 1987 年 Bloom のグループによる HIV 遺伝子の発現によって可能となったが、多大な努力にもかかわらず、種々の HIV、ボレリア、マラリアなどに対するワクチン開発の実用化に至っていない。そ

の主な原因の一つは外来性抗原の発現が難しいことである。その発現の増強のための組換え BCG の技術の改良が行われ、プロモーターエンハンサーの改良、高発現型 BCG の開発、組換え遺伝子の選択が検討された。その結果本研究で明らかになったように比較的短いアミノ酸 15~20 の組込みの範囲はコドンの至適化によって 1mg 菌体あたりマイクログラムレベルの蛋白の分泌が可能である。しかし、長鎖のペプチドの発現に関しては本研究でも明らかのように、ワイルドタイプで長くても 10~20+1g/lmg 組換え BCG の発現であり、DTH の発現の抗体の発現が極めて弱いことが明らかになっている。

世界各国の BCG に関する研究室の努力にもかかわらず今まで長鎖の遺伝子の高発現型組換え BCG の開発は現在の組換え BCG ワクチンの大きな課題となっている。今回 p24 抗原遺伝子の発現を有意に増強させることができる組換え技術を開発することができた。本技術の開発により組換え BCG のワクチンの実用化への可能性ができた。これまでコドンの至適化によりウイルス性ワクチンの改良が成功裏に行われており、DNA ワクチンや一部のワクシニアワクチンなどでその効果が既に明らかにされている。DNA ワクチンの場合 *in vitro* における抗原発現は 10 倍から 50 倍の免疫増殖が認められていることから本研究における組換え BCG の発現の増殖は DNA ワクチンの場合と類似のレベルであると予想される。

既に本研究グループでは野生型の組換え

BCG をプライミング抗原に用いたワクシニアをブースターに用いたプライムブーストワクチンを作製した。この研究の成果を応用した第 2 世代ワクチンとしてのプライムブーストワクチンの開発が期待される。具体的には SIV Gag の抗原を至適化した組換え BCG-SIV Gag の開発が行われ、類似の外来性抗原の発現が認められている。単独投与群及び、プライムブースト群の防御免疫効果を詳細に検討することにより、BCG をベースにした HIV ワクチン開発の実用化をコドン至適化技術の防御免疫誘導に関する有用性をさらに検討する予定である。

E. 結論

HIV ウイルス感染の拡大の現状からそのコントロールに寄与することを目的にした安全性、免疫持続性、ワクチン効果に優れたワクチン開発が期待されている。本研究ではそれらの要求を満たすものとして安全なベクターを用いた組換えワクチンの実用化研究を主にベクターの改良による HIV 抗原の発現の状況に焦点をあてて行った。その結果これまで不可能であった組換え BCG のコドンの至適化による HIV p24 抗原の発現を *in vitro* 及び *in vivo* で著明に増強することができた。この成果により組換え BCG ワクチンの実用化への道を開くことができた。

F. 健康危険情報

特になし。