

Fig. 3 今回比較した強毒／弱毒SHIV分子クローン間の塩基配列の違いは全ゲノム中16ヶ所であったが、それらを部分的に入れ替えたウイルスをサルに接種したところ、各々強毒型と弱毒型の病態を示すものにわかれた。感染サルの4週目の血漿中のウイルスの全ゲノム解析によって、env-gp41の1カ所のアミノ酸変異(赤大矢印)とprimer binding site(紫矢印)の1ヶ所の塩基置換が弱毒cloneのsuboptimal siteとして特定され、in vivoでの病原性に重要であると考えられた。さらに、死亡時のサルのウイルス変異解析により逆転写酵素の1ヶ所(オレンジ小矢印)とgp41の他の1ヶ所(朱色小矢印)も病原性に関与することが示唆された。

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 BCG とワクシニア DIs HIV ワクチンの前臨床開発を行う。昨年度の研究でプロトタイプワクチンの評価を行い、タイ型ワクチンの構築と免疫誘導能のサル評価によるプロトタイプ BCG/DIs ワクチンの作成と、プロトタイプ BCG/DIs ワクチンのサルを用いた安全性、安定性評価が得られた。それを受け、本年度はプロトタイプ BCG/DIs ワクチンの実用化研究とこれまで開発されたワクチンとの比較研究を 1) ワクシニア DIs と MVA ベクターの有用性の比較、2) 組換え BCG ワクチンの有用性と安全性の比較、3) サル免疫不全病態の解析の 3 点で行った。その結果、1) DIs はほ乳類細胞では複製しないが MVA はかなりの株で複製する。しかし、HIV 抗原の発現は認められる。DIs はそれ自体でも感染防御能を示すがブースター抗原として用いると防御能を増幅する (Someya et al. J. Virol. 2004)。DIs は免疫不全動物に大量投与しても安全であるが、MVA は接種後期に体重減少を示す。2) 組換え BCG ワクチンの有用性をサルを用いて明らかにした (Someya et al. J. Virol. 2005)。BCG-Tokyo 株は HIV 感染者から生まれた新生児に接種しても副作用を示さない (Hesseling et al. Clin. Infect. Dis. 2003)。3) 初期ウイルス反応の CD4⁺ 細胞減少は骨髄幹細胞機能不全が関与することが明らかにされた (Yamakami et al. J. Virol. 2004)。来年度は免疫誘導能を増幅した第 2 世代 BCG・DIs ワクチン実用化のためのワクチン効果に焦点をあてて研究を行う予定である。

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-SIV Gag/Pol を作成する。さらに組換えワクシニア DIs-SIV Gag/Pol を作成する。

2. これまで報告された DNA 及び組換えワクシニア MVA ワクチンとの比較を行った。標的遺伝子を Gag, Pol にして、DNA と DIs の組み合わせ、MVA は単独比較検討を行った。MVA は米国 NIH, NIID Bernard Moss 博士からいただいた。
3. 組換えワクチンの使用については生ワクチンを投与することから HIV ワクチンは高度な安全性が要求される。MVA と DIs を免疫不全 NOD Scid マウスに大量投与することにより、安全性の比較検討を行った。
4. サルエイズモデルの解析の意義について HIV 感染の再現可能の程度が疑問視され始めている。国立感染症研究所で開発された SHIV C2/1 エイズモデル系における CD4⁺ 細胞の枯渇と骨髄幹細胞機能の相関を骨髄細胞コロニー形成法で観察する。

(倫理面への配慮)

HIV を用いた病原性ウイルス検討のための動物モデルの検体はすべて P3 レベルの病原体として扱い、個々の研究所、大学、病院のバイオハザード関連委員会において承認を得ている。動物実験に関しても、各機関での動物実験委員会の規定に従い、実験計画の許可を取って行っている。組換え DNA 実験に関しては、組換え DNA 実験指針に従い、各機関の委員会の許可を得て行っている。

C. 研究結果

1. ブースター抗原として用いる DIs ワクチンを *in vivo* レベルで検討した。

1) DIs ワクチンはマウスモデルで抗原特異的 IFN γ ELISPOT 及び抗原特異的 IFN γ 細胞内サイトカイン産生細胞を有意に誘導することから細胞性免疫能が誘導されることが示唆されるが、このワクチンの特徴として CD8 のみでなく CD4⁺細胞でも有意に誘導される。この DIs ワクチンの効果は DNA ワクチンよりも有意に細胞性免疫誘導能が高い。

2) MVA ワクチンと比較すると全身免疫誘導能が MVA より優れているが粘膜各所での免疫誘導能は MVA の方が高い。

3) DNA と MVA のプライムブーストレジメンで接種すると免疫誘導能がさらに亢進する。この免疫誘導能はマウスを用いた組換え野生型ワクシニア SIV Gag/Pol ウイルスのチャレンジを DIs 単独の場合よりも効果的に抑制する。

4) このマウスで見られた免疫誘導能と感染防御能は、サルを免疫動物として用いた場合でも再現することからプライムブーストレジメンによる DIs ワクチンの有用性が明らかになった。

2. 組換え BCG ワクチンの有用性と安全性の比較を行った。

1) 組換え BCG ワクチンは結核ワクチンとしての BCG ワクチンの世界的な使用によりその有用性が期待されている。しかし、実

用化のためには免疫能と安全性を科学的に明らかにする必要がある。そのモデルとして Gag 蛋白遺伝子を挿入した組換えワクチンを作成し、その有用性を明らかにしてきたが、本研究では液性免疫、特に中和抗体の意義について検討した。分泌型 α 抗原蛋白のループの先端部分に V3 遺伝子を挿入し発現させるとサルで抗体反応が認められ、その抗体は X4 ウイルスを中和することができる。少数ではあるが野生型の MNP ウイルスや、NHI ウイルスを中和した。しかし、R5 ウイルスの中和は困難であった。サルに SHIV_{89.6p} をチャレンジすると感染を防御することはできなかった。しかし、ホモログスウイルスである SHIV_{MN} を用いると少量接種の場合感染防御が可能であった。

2) BCG-Tokyo株の安全性については動物レベルで明らかにされているが HIV 感染者から生まれた新生児に接種しても副作用を示さないことが明らかとなった。

3. サル免疫不全病態の解析を行った。

SHIV C2/1 はサルエイズモデルで顕著な CD4⁺細胞の減少を誘導する。この減少は CD4⁺細胞のみでなく、他のリンパ球や血液細胞でも見られる。しかし、ウイルス反応の初期が過ぎると CD4⁺細胞以外の細胞は回復していく。さらに CD4⁺細胞はセットポイントとよばれる末梢血ウイルス量に落ち着く。この初期過程における全細胞減少を解析すべくウイルス感染の初期に経時的に骨髓細胞を採取し、血液幹細胞の分化をコロニー形成で観察した。幹細胞の分化は血液細胞が減少する極期 10 日目をピークとして機能不全に陥っており、その後次第に回復した。CD4 細胞が 10 以下/mm³ の状態でも機能不全は回復していた。さらに幹細胞への HIV 感染はほとんど認められなかった。

D. 考 察

2年度の研究でプロトタイプ BCG/DIs ワクチンの実用化研究を進め、これまで開発された代表的なワクチンである DNA 及び MVA の組換

えワクチンとの比較研究を行った。

初回免疫に用いる組換え BCG ワクチンは課題点として HIV 感染による免疫不全状態での安全性と防御免疫誘導能の2点が挙げられる。

本年度の研究で免疫誘導能の亢進を計るべく検討し、コドンの至適化が有効であることを明らかにした。その結果、これまで免疫誘導能の面からの欠点を *in vitro*, *in vivo* で克服することが可能となり、実用化への道が前進した。さらに、免疫不全状態における BCG の副作用について、パスツール株やコペンハーゲン株等を使用した報告がなされているが BCG-Tokyo 株は前者とは異なり、BCG 菌体自体も小さく、性質も異なっている。種々の BCG 株を比較し、HIV 感染母親から生まれた新生児に投与すると HIV に感染した状態でも BCG-Tokyo 株は全く副作用（進行性リンパ節炎など）を示さない。

これらのことから BCG-Tokyo 株をベクターに用いた組換え BCG ワクチンは HIV ワクチンとして実用化可能となった。この組換え BCG ワクチンを、広く初回免疫に用いられている DNA ワクチンと比較検討すると、マウス、サルレベルで BCG ワクチンは免疫誘導のみでなく、持続性においても優れており、この件については本年度の初めに発表した。

また、プースターワクチンとしての DIs ワクチンは、有効性と安全性の面で広く使用されている MVA と比較すると、免疫誘導効果については、全身免疫で極めて優れていることが明らかとなり、病変の全身への拡大を阻止できるのではないかと推測される。安全性については免疫不全動物に大量投与しても、MVA と異なり全く副作用を示さないことから、DIs ワクチンの HIV ワクチンとしての有用性が本年度の研究で初めて明らかとなった。

サル免疫不全病態の解析を行った結果、ウイルス感染の初期の細胞減少には血液幹細胞機能不全が関与されると予想されるが、初期を過ぎると CD4 細胞の減少は機能不全と全く相関しないことから造血機能の中枢部分は免疫不全ウイルスの感染においても比較的保たれた状態で機能していると推測される。このことはエイズ状態における CD4 細胞の減少を回復さ

せるのに中枢部分の機能が保持されることを考慮に入れた対応が可能であることを示唆している。

E. 結論

昨年度までに完成させたプロトタイプワクチンレジメン即ち組換え BCG/DIs プライムブーストワクチンの実用化研究を継続させ、これまで開発された代表的なワクチンである DNA, MVA ワクチンとの比較研究を行った。まず、組換え BCG ワクチンはコドンの至適化により、ワクチン抗原の発現が増幅し、さらに BCG-Tokyo 株をベクターに用いると HIV 感染でも進行性病変を示さないことからこのシステムにおける組換え BCG ワクチンの HIV ワクチンとしての有用性が明らかになった。次に、組換えワクシニア DIs ワクチンは誘導免疫能において全身免疫誘導能は MVA と比較してやや優れていた。しかし、粘膜局所での免疫誘導能は MVA よりやや劣った。そのメカニズムについては引き続き検討中である。安全性については DIs は免疫不全動物に大量接種しても長期にわたり素晴らしい安全性を示した。一方、MVA は初期は DIs と同様に副作用が無いが、後期になると免疫不全動物に病変と体重減少を示した。従って免疫不全状態における安全性は DIsの方が極めて優れていることが明らかになった。以上のことから、課題となっていたプライムブースト BCG/DIs ワクチンの有用性を明らかにすることができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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* 318: 493-506, 2004.
- 2) Nakasone T, Hara T, Yoshino N, Honda M. Update on HIV/AIDS in Japan, 2003. In AIDS

- in ASIA. Y. Lu and M. Essex ed. Kluwer Academic Publishers London, 73-81, 2004.
- 3) Matsuo K, Puthavathana P, Promkhatkaew D, Balachandra K, Ruxrungtham K, Hamano T, Suttthent R, Sittisombut N, Butraporn R, Sriwanthana B, Boonlong J, Izumi Y, Yamazaki S, Yamamoto N, Warachit P and Honda M. Japan's Collaboration with Thailand in the Development of HIV/AIDS Vaccine. In AIDS in ASIA. Y. Lu and M. Essex ed. Kluwer Academic Publishers London, 561-569, 2004.
 - 4) 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.
 - 5) Dewan Z, Watanabe M, Terashima K, Aoki M, Sata T, Honda M, Ito M, Yamaoka S, Watanabe T, Horie R, Yamamoto N: Prompt tumor formation and maintenance of constitutive NF-kB activity of multiple myeloma cells in NOD/SCID γ^{null} mice. Cancer Sci 95: 564-568, 2004.
 - 6) Takizawa M, Chiba J, Haga S, Asano T, Yamamoto N, Honda M. The normalization of guinea pig leukocyte fractions and lymphocyte subsets in blood and lymphoid tissues using a flow cytometric procedure. Experimental Animals 53:321-329, 2004.
 - 7) Someya K, Xin K Q, Matsuo K, Okuda K, Yamamoto N, Honda M. A consecutive prime-boost vaccination of mice with simian immunodeficiency virus (SIV) gag/pol DNA and recombinant vaccinia virus strain DIs elicits effective anti-SIV immunity. J. Virol. 78: 9842-9853, 2004.
 - 8) Takeda S, Shiosaki K, Kaneda Y, Nakasatomi T, Yoshizaki H, Someya K, Konno Y, Eda Y, Kino Y, Yamamoto N, Honda M. Hemagglutinating virus of Japan (HVJ) protein is efficient for induction of CD4⁺ T-cell response by a hepatitis B core particle-based HIV vaccine. Clin. Immunol. 112:92-105, 2004.
 - 9) Yamakami, K., M. Honda, M. Takei, Y. Ami, T. Nakasone, N. Kitamura, S. Nishinarita, S. Sawada, and T. Horie. Early bone marrow hematopoietic defect in SHIV C2/1-infected macaques and relevance to advance of disease. J. Virol. 78:10906-10910, 2004.
 - 10) Yoshino, N., F. X.-S. Lu K. Fujihashi, Y. Hagiwara, K. Kataoka, D. Lu, L. Hirst, M. Honda, F. W. van Ginkel, Y. Takeda, C. J. Miller, H. Kiyono, and J. R. McGhee. A Novel Adjuvant for Mucosal Immunity to HIV-1 gp120 in Nonhuman Primates. J. Immunol. 173: 6850-6857, 2004.
 - 11) Someya, K., D. Cecilia, Y. Ami, T. Nakasone, K. Matsuo, S. Burda, H. Yamamoto, N. Yoshino, M. Kaizu, S. Ando, K. Okuda, S. Zolla-Pazner, S. Yamazaki, N. Yamamoto and M. Honda. Vaccination of rhesus macaques with recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin Env V3 elicits neutralizing antibody-mediated protection against simian-human immunodeficiency virus with a homologous but not a heterologous V3 motif. J. Virol. 79:1452-1462, 2005
 - 12) 滝口雅文、上野貴将、俣野哲朗、松尾和浩、本多三男 エイズ免疫と日本におけるワクチン研究の進展 日本エイズ学会誌 6:82-90, 2004.
2. 学会発表
 - 1) 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 ワクチンの皮内接種による粘膜免疫誘導. 第 18 回日本エイズ学会総会 (12/9-11, 2004, 静岡)
 - 2) 泉 泰之、網 康至、松尾和浩、山本直樹、本多三男：CRF01_AE Gag を組み込んだ BCG/ワクシニア DIs プライムブーストワクチンのサルを用いた実用化研究. 第 18 回日本エイズ学会総会 (12/9-11, 2004, 静岡)

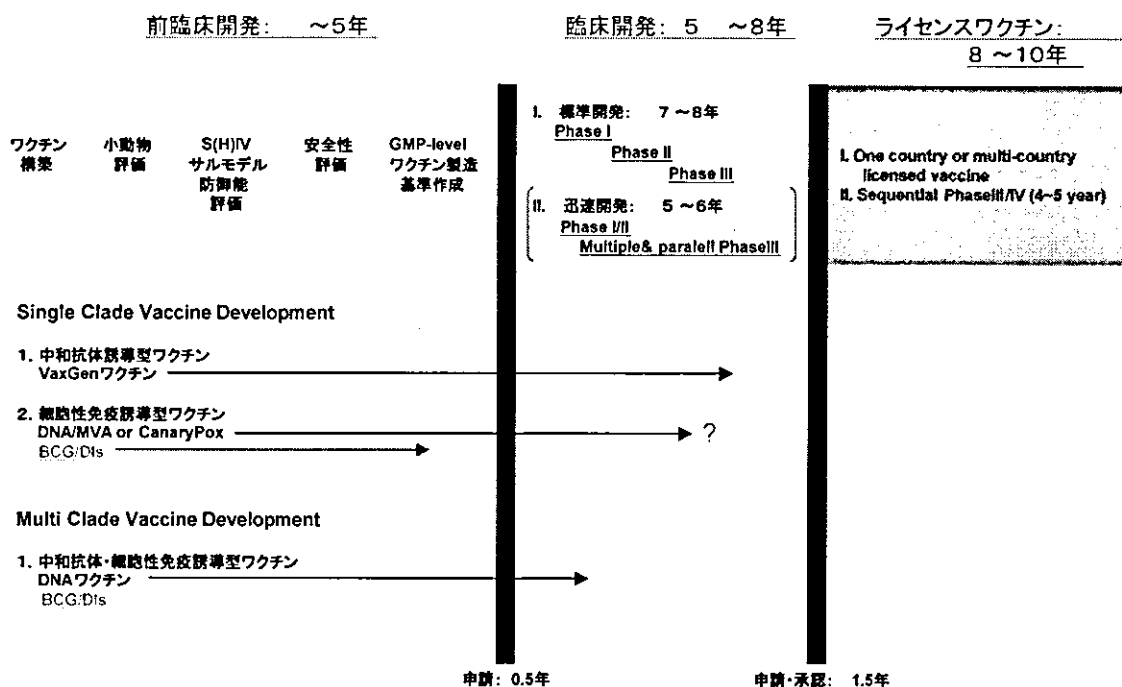
- 3) 山上賢治、武井正美、網 康至、仲宗根正、北村登、三田村巧、本多三男、澤田滋正：病原性 SHIV C2/I 感染カニクイザルにおける早期骨髄幹細胞コロニー形成の障害と病態進行への関連性。第 18 回日本エイズ学会総会（12/9-11, 2004, 静岡）
- 4) 原 敬志、坂本優子、照沼 裕、仲宗根正、本多三男、山本直樹、巽 正志：アフリカ由来 HIV-1 subtype C 感染性分子クローンの樹立と解析。第 18 回日本エイズ学会総会（12/9-11, 2004, 静岡）
- 5) Someya K, Matsuo M, Izumi Y, Ami Y, Nakasone T, Yamamoto N, Honda M. A novel recombinant vaccinia DIs is replication deficient and efficiently elicits virus-specific positive-immunity. 第18回日本エイズ学会総会（12/9-11, 2004, 静岡）

- 6) 兼清 優、網 康至、松尾和浩、染谷健二、須崎百合子、吉野直人、長谷川篤彦、山本直樹、本多三男：組換え BCG-および組換え DIs-HIV/SIV ワクチンのサルモデルによる評価。第 34 回日本免疫学会総会（12/1-3, 2004, 札幌）

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
「プライムブーストワクチン法」特願 2004-341283
2. 実用新案登録
特になし。
3. その他
特になし。

HIVワクチン開発の流れ



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

研究要旨 エイズワクチンに必要とされる有効な感染防御免疫は弱毒ウイルス感染（生ワクチン）により誘導されるが安全性の問題が解決されていない。そこで現在最も研究が行われている prime-boost ワクチンと生ワクチンの免疫応答の比較解析をサルを用いた Env ワクチンと糖鎖欠失変異ウイルス（d5G）感染実験により行った。Env ワクチン接種により homologous ウイルスに対して初期感染の抑制は 1/10 しか起こらなかったが慢性期では低レベルに感染が抑制された。宿主免疫として Env 特異的な細胞性免疫、抗体の重要性が明らかとなった。感染制御が維持された動物のリンパ節の傍皮質領域には CD3 弱陽性の細胞の集積が観察された。感染制御免疫と感染防御との関連を調べるために 1 頭のサルを用いて再度チャレンジ感染を行ったところ感染抑制が見られた。SIVmac239 長期未発症感染ザルにおいてもチャレンジ感染に対する強い抑制が観察された。すなわち、弱毒ウイルス感染だけでなくウイルスが感染制御されている状況下ではエイズウイルスに対する防御免疫が維持されている場合があることが示唆された。今後 d5G 感染との細胞性免疫、リンパ組織の比較解析から感染制御、感染防御免疫における細胞性免疫の違い、ウイルス感染の違いを明らかにし、prime-boost ワクチンを基本としたエイズワクチン開発の可能性について検討する。

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（d5G）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。d5G 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 18 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。すなわち、d5G は生ワクチンとしての機能を持つこと、ワクチンの効果ではこれまで研究された中で最も優れていると判断される。しかし、ワクチンの安全性から現時点ではエイズウイルスの弱毒化には高いハードルがあり、ウイルス遺伝子の一部だけを利用するワクチン研究が現在最も行われている。本研究では、後者として DNA ワクチンとワクシニアウイルスベクターを用いて Env を抗原とする prime-boost 法について、d-5G 感染により誘導される宿主応答と比較し、前者で誘導される免疫と何が違うのかを明らかにし、両ワクチンの長所を兼ねた安全性、有効性において基準を満たすワクチンの開発のための基礎研究を行う。

B. 研究方法

アカゲザル

ミャンマー原産の育成ザル、オス、2-3 才、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 d5G の gp120 の蛋白コード DNA 導入した Plasmid (pJWSUmac, pJWSUmac d5G) または pJW4303 ベクター 2 mg を 0, 4, 8 週に大腿部左右 2 カ所に筋肉内接種した。21 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

高病原性分子クローン SIVmac239 (アカゲザルに感染後 2-3 年に高率にエイズを発症させる) を prime-boost 免疫 28 週後に 10 TCID₅₀ を、感染制御ザルへの再チャレンジ感染においては 1000 TCID₅₀ をを静脈内接種した。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 (Cyft/HVS) を用いて測定した。

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種類のモノクロナー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。

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、d5G、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 細胞が認識する SIV タンパクペプチドの決定

サル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- γ 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

DNA-prime/vaccinia virus-boost Env ワクチンの効果

SIVmac239 感染に対する効果は、同一の Env (wt-Env) を発現するワクチンを接種したサルでは調べた全 4 頭で慢性感染期における感染制御が見られた (図 1)。しかし 5 カ所の糖鎖が欠失した糖鎖欠変異 Env (d5G-Env) を発現するワクチンを接種したサルでは、比較対照群 (ベクター接種群) と同様のウイルス増殖が見られた (図 1)。しかし初期感染のピーク値においては、wt-Env ワクチン接種群の viral load は比較対照群と比べて 1/10 低下させる効果が見られた。d5G-Env ワクチン接種群においては初期感染抑制効果は弱かった (図 1)。

DNA-prime/vaccinia virus-boost Env ワクチンの誘導した防御免疫

Env ワクチン効果と関連する Env 特異的な免疫について調べた。ウイルス接種 2 週前に採取した血液の解析から、wt-Env 免疫群では、d5G Env 接種群と比較して約 2 倍の Env 特異的 CD4+T 細胞、Env 特異的 CD8+T 細胞が誘導されていた (図 2)。SIVmac239 に対する中和抗体はいずれのワクチン接種群においても検出されなかったが、中和抗体に感受性であるマクロファージ指向性 SIV:239/envMERT に対する中和抗体価は、wt-Env 免疫群では、d-5G Env 接種群と比較して約 8 倍高い抗体価が誘導されていた (図 2)。

DNA-prime/vaccinia virus-boost Env ワクチン接種サルにおける SIVmac239 感染制御と関連するウイルス特異的 T 細胞

ウイルスチャレンジ後にはウイルス抗原を認識する特異的 CD4+ T 細胞、CD8+ T 細胞 (CTL) が誘導されたが、特に CD8+ T 細胞は感染制御されない場合においても誘導された。ワクチン接種の有無にかかわらず慢性感染におけるウイルス量が低い (感染制御されている) 動物に誘導されていたのは Gag 特異的 CD8+ T 細胞であった (図 3)。ウイルス特異的 CD4+ T 細胞は一般的に感染制御において誘導されている傾向が見られたが、統計学的に有意性が見られたのは Gag 特異的 T 細胞と Tat/Rev 特異的 T 細胞であった (図 3)。

感染制御サルリンパ節に特異的に見られた細胞の集積

Env ワクチン実験に用いたサル 12 頭は感染後 45-48 週に安楽殺後、リンパ節の病理解析を行った。高い viral load が持続していたサルにおいては、発症型感染で見られる典型的な多数の濾胞の形成と変形が見られた。一方、感染が制御されたサルでは、上記の濾胞の異常は見られず、さらに傍皮質領域に特徴的な性質を持つ細胞の集積が見られた。この細胞はこの領域の主要な細胞である T 細胞の表面抗原 (CD3) が低レベルに発現していた。この細胞の集積は感染が抑制されている動物に共通して見られた。

Prime-boost Env ワクチンによる感染制御と関連する宿主応答についての解析

d5G 感染サルでは感染が抑制された慢性感染期において、SIVmac239 感染に対する強い防御免疫が誘導されている。そこで Prime-boost Env ワクチンによる感染制御が誘導されている動物においてチャレンジ感染に対してどのような宿主応答が起こるのかを解析を開始した。図 4 に示される 1 頭 (Mm0136) では高い持続感染が見られるのに対し、別の 1 頭 (Mm0138) では感染が低レベルに維持されていた。この 2 頭に 1000 TCID50 に SIVmac239 を静脈内接種した。チャレンジ感染の前後に採血、リンパ節の生検を行い、再感染により誘導されるウイルス特異的 T 細胞

胞の同定を開始した。まず、viral load においては、再感染による変化が見られなかった。特に Mm0138 では、非感染ザルで見られる SIVmac239 の増殖は観察されなかった (図 4)。再感染前における維持されていたウイルス特異的 T 細胞のエピトープ数について解析したところ、まず CD4+T 細胞については Mm0138 で高頻度 (赤字) の Gag, Vpx, Rev エピトープ特異的の細胞の存在が明らかとなった (表 1)。CD8+T 細胞については、Gag エピトープ特異的細胞が Mm0138 だけに高頻度に観察された (表 1)。

SIVmac239 感染長期未発症ザルにおける感染制御免疫

Env ワクチン感染制御と同様の解析を行うために SIVmac239 を長期未発症感染ザル 2 頭 (Mm9702, Mm9715) に 1000 TCID₅₀ の SIVmac239 を静脈内接種した。この 2 頭においても SIVmac239 の増殖は抑制された (図 5)。

D. 考 察

d5G 感染により誘導される極めて強い感染防御免疫を安全なエイズウイルスタンパクを発現することにより誘導することが可能か?。そのためにはチャレンジ感染前後に誘導される免疫応答の解析が必須である。本研究では prime-boost ワクチンと d5G 感染との比較解析により d5G 感染で誘導される免疫を解明し、エイズワクチン開発への応用を目指していることから、今年度から SIV 感染制御ザルへのチャレンジ実験と、動物の主要な免疫器官での宿主応答の解析を開始した。血液の採取は容易で免疫の解析も最も末梢リンパ球を用いて行われている。しかし血液には、おもに末梢系リンパ組織 (リンパ節等) の一部の細胞が含まれることから、ウイルス感染、感染に対する宿主応答の解析に十分とは言えない。表層リンパ節は、生検が比較的容易であり、エイズウイルスの主要な感染組織を構成することからチャレンジ前の解析を行った。現時点では一部のみの解析しか行っていないが、

ELISPOT の解析では、リンパ節でより高頻度のエピトープ特異的 T 細胞が検出されたが、末梢リンパ球の結果とほぼ一致することが分かった。今後は、チャレンジ感染後の種々のリンパ節、脾臓、小腸粘膜固有層リンパ組織における解析から感染により誘導されるウイルス特異的 T 細胞の性質を明らかにし感染制御との関連について解析を行う。リンパ節に感染制御ザルに見られた CD3 弱陽性細胞は T 細胞領域に存在したことから、活性化した effector 細胞、存在する CD4+T 細胞のウイルス感染抵抗性との関連が推測される。今後 d5G 感染ザルを用いて同様の感染実験と解析を行うことからウイルス特異的 T 細胞については d5G 感染に特徴的な現象が明らかとなることが期待される。チャレンジ前後の viral load の結果からは d5G 感染と prime-boost ワクチンによる感染制御に違いがない可能性が示されたが、感染制御のレベル (viral load, 期間) の違いから感染制御の違いが予想される。

エイズウイルスの主要な感染組織は消化管粘膜等の常に外界の病原体に対する免疫が誘導されている免疫器官と考えられている。これまで材料採取が容易な末梢リンパ球を用いた解析が行われている。しかし末梢リンパ球には粘膜免疫組織のリンパ球はごく少数しか存在しないことからこの組織での情報は極めて少ない。リンパ球の採取方法等の技術的な問題が残されているが、今後の重要課題として解析を行う。

E. 結 論

d5G 感染ザルに誘導されている感染制御免疫とチャレンジ感染により誘導される防御免疫について prime-boost ワクチンによる感染制御ザル、SIVmac239 長期未発症感染ザルとの比較解析を開始した。viral load の測定からは、感染制御が成立している場合は、いずれの場合もチャレンジ感染が抑制されることが分かった。次はウイルス特異的 T 細胞の維持、誘導においての比較解析を行う。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matano, T., Kobayashi, M., Igarashi, H., Takeda, A., Nakamura, H., Kano, M., Sugimoto, C., Mori, K., Iida, A., Hirata, T., Hasegawa, M., Yuasa, T., Miyazawa, M., Takahashi, Y., Yasunami, M., Kimura, A., O'Connor, D. H., Watkins, D. I. and Nagai, Y. Cytotoxic T Lymphocyte based Control of Simian Immunodeficiency Virus Replication in a Preclinical AIDS Vaccine Trial. *J. Exp. Med.* 199:1709-1718, 2004.
- 2) Lun, W-H., Takeda, A., Nakamura, H., Kano, M., Mori, K., Sata, T., Nagai, Y. and Matano T. Loss of virus-specific CD4+ T cells with increases in viral loads in the chronic phase after vaccine-based partial control of primary simian immunodeficiency virus replication in macaques. *J Gen Virol.* 85:1955-1963,2004.
- 3) Ansari, A.A., Mayne, A.E., Onlamoon, N., Pattanapanyasat, K., Mori, K. and Villinger, F. Use of recombinant cytokines for optimized induction of antiviral immunity against SIV in the nonhuman primate model of human AIDS. *Immunol. Res.* 29:1-18, 2004.

2. 学会発表

国際学会

- 1) C. Sugimoto, S. Ohgimoto, T. Shioda, E. Nakayama, N. Yamamoto, Y. Nagai, Y. Suzuki, K. Mori. Viral properties of Deglycosylated SIVmac239 mutants: Implication for neutralization sensitivity, cell tropism and CD4 independency. 22nd annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, November, 2004, San Antonio, USA.
- 2) N. Saito, C. Sugimoto, N. Yamamoto, F. Villinger, A. Ansari, K. Mori. Magnitude of SIV specific CD4 T cells correlated to the control of SHIV-RT infection in the animals received post-exposure prophylaxis. 22nd annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, November, 2004, San Antonio, USA.

国内学会

- 1) 杉本智恵、塩田達雄、中山英美、扇本真治、山本直樹、永井美之、鈴木康夫、森 一泰：糖鎖欠損変異 SIV の弱毒化とウイルス学的性質の変化. 日本ウイルス学会 (横浜) 2004.11.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案特許 該当なし
3. その他 該当なし

図1

Prime-boost vaccineが誘導する防御免疫

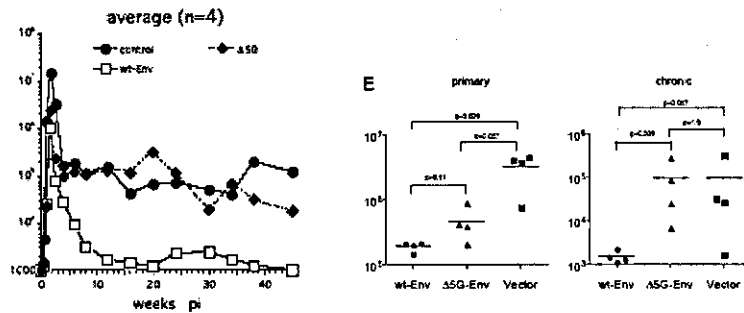


図2

Env specific T cells
By ELISPOT (IFN-g)

Humoral immunity

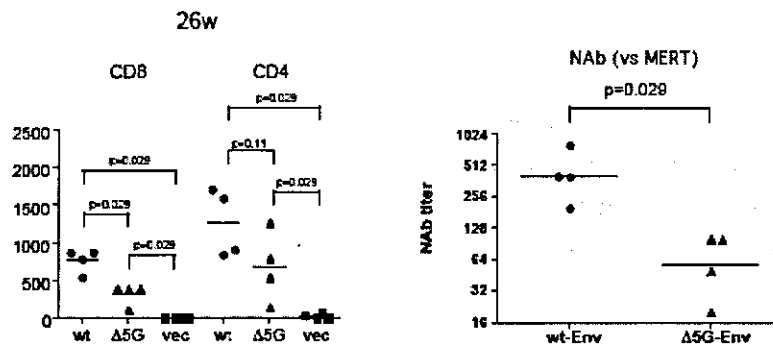


図3

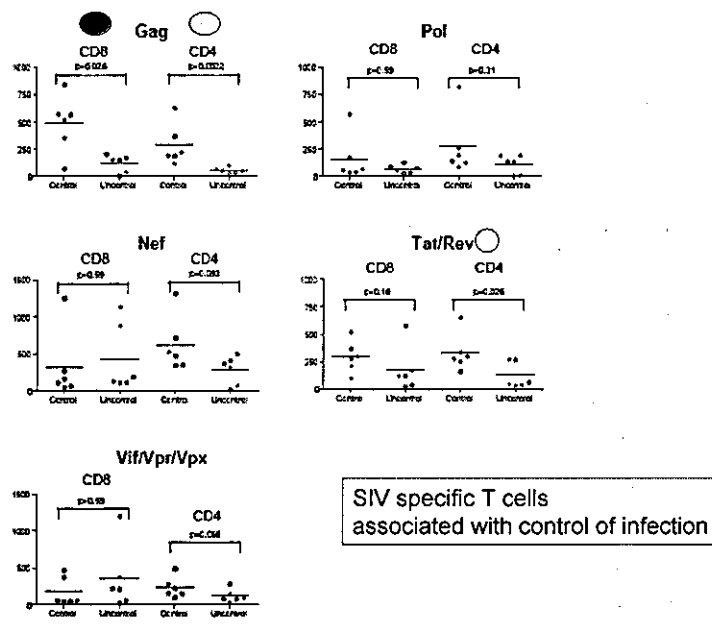


图4

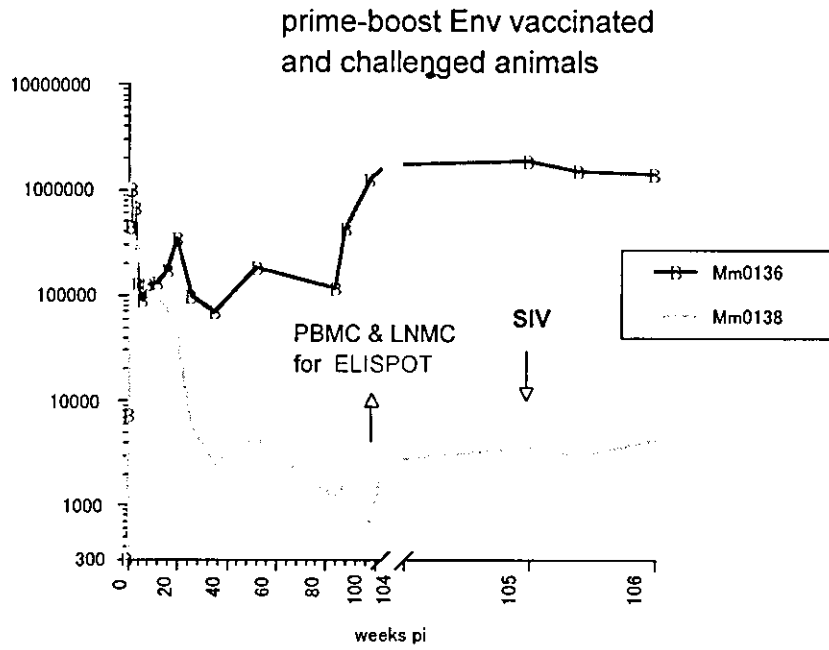


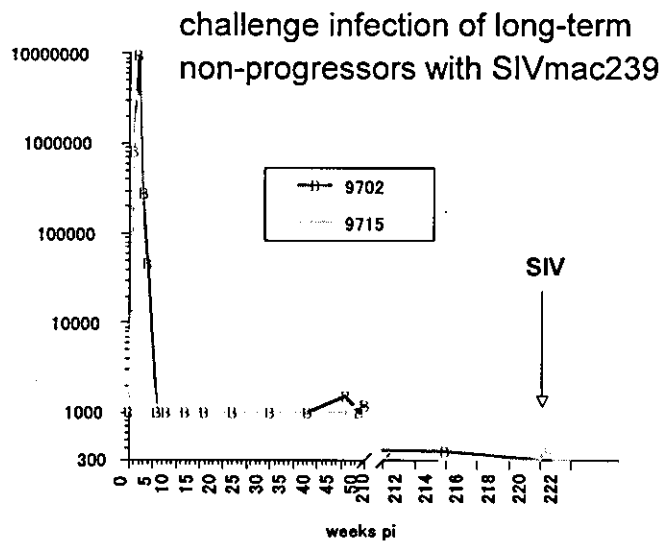
表1

Number of epitopes by ELISPOT (IFN- γ)

CD4+ T cells		Gag	Vif	Vifx	Rev	Nef
Mm0136	PBMC	0	0	0	1	1
	LNMC	0	0	0	0	0
Mm0138	PBMC	9	2	1	2	2
	LNMC	11	1	2	2	2

CD8+ T cells		Gag	Vif	Vifx	Rev	Nef
Mm0136	PBMC	2	0	0	2	2
	LNMC	2	0	0	4	2
Mm0138	PBMC	4	0	0	1	1
	LNMC	1	0	0	2	2

图5



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 Undecapeptidyl 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を明らかにしてきた。本年度は、よりヒトに近縁な霊長類のカニクイサルに免疫し、得られた抗血清の種々様々な HIV-1 に対する抗 HIV 効果を調べた。さらに、カニクイサルに適合させた SHIVsf162P3K 株をカニクイサルに静注して challenge した。その結果、3 頭とも、control に較べて、血中の Viral load が 2log-3log 低下する感染防御効果がみとめられてた。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した。次年度はアカゲサルを用いて、さらに、研究を進め、粘膜免疫・粘膜 challenge を行い、より完全な感染防御法の開発に向けて挑戦する予定である。

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ヒトにとって有益な自己抗体を誘導し、HIV-1 の感染を制御することを最終目標としている。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 (Undecapeptidyl arch : UPA、図 1 a) に注目し、1996 年に CCR5 の細胞外 domain の立体構造を図 1b のように推定した。おどろいたことに、この UPA domain は Liu らが報告した CD4-gp120-CCR5 の動的活性構造 (図 2) の UPA 構造と極めて良く一致した。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

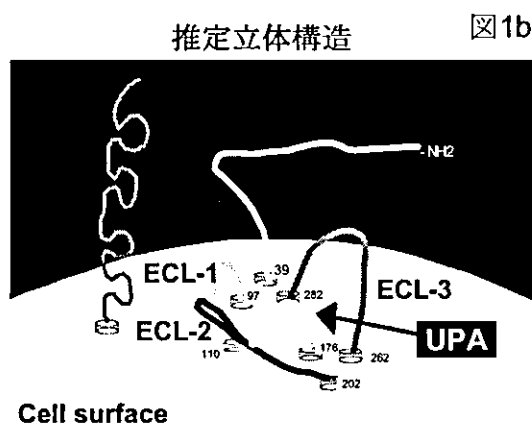
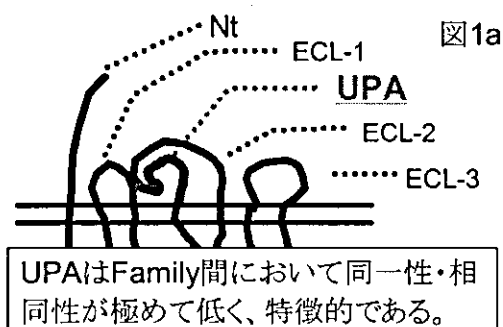


図 1. 当初、想定した UPA の立体構造は Lin らの動的立体構造とよく一致した。

て再構築し、multiantigen peptide (MAP) に結合させ、免疫抗原として用いた。この環状 dodecapapeptide 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。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。

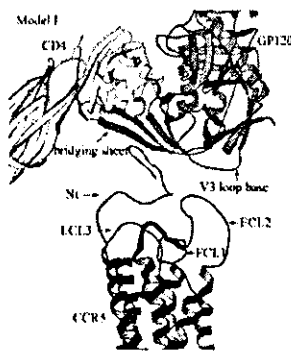


図2

1) Liu S., et al. *J. Mol. Model.* 2003; 9: 329-336

図2. CD4 が gp120 と結合し、gp120 から Bridging sheet が引きだされ、V3 ループが ECL2 の後半部に手をかけ、ECL domain が開かれ、UPA に接近しやすくなると考えられる。

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、9 頭 (予備実験として cDDR5-MAP 免疫サル 3 頭 [No.4, 5, and 6]、本実験として免疫サル 3 頭 [No.11, 13, and 16] 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 µg 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 300µg 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 0、2、4、6、8、及び 10 週後に採血を行い血清を分離し、抗血清として用いた。2 回目免疫から 5 週目に追加免疫をし、予備実験で得られて結果に基づき、さらに 5 週目に SHIVsf162P3 株を 10TCID50、静注に challenge した。Challenge 後、1 週、3 週、4 週、6 週、8 週、10 週目に採血し、viral load, CD4, CD8 数を測定した。なお、SHIVsf162P3 株は予め、カニクイサル PBMC に感染させ、適合させて用いた。

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)。

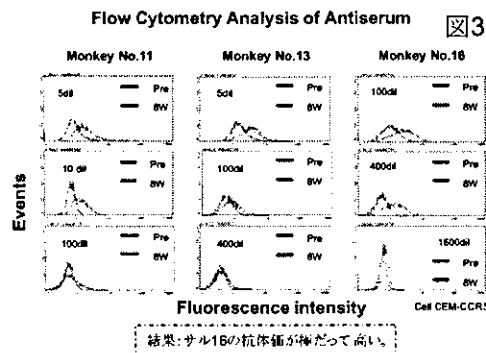
(倫理面への配慮)

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

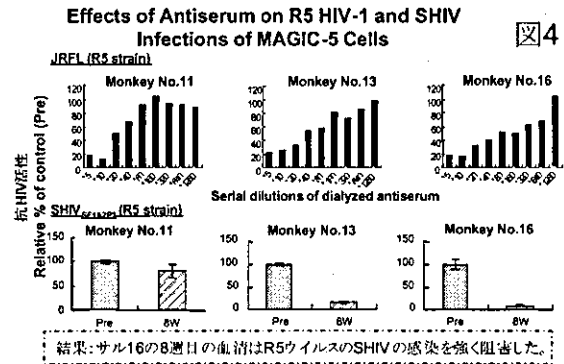
cDDR5-MAP 抗原を免疫したサルに血清中に CCR5 に対する抗体が誘導されていることを調べるため、cDDR5-MAP 抗原免疫前 (pre) 後 (8 weeks) の血清および MAP 抗原免疫コントロールサル血清を透析処理後 CCR5 を高発現している CEM-CCR5 細胞に処理した。さらに 2 次抗体として FITC-conjugated goat anti-monkey IgG を反応させフローサイトメータで分析した。その結果、cDDR5-MAP 抗原を免疫した No.11、13、および 16 サル血清 (8 weeks) を反応させた CEM-CCR5 細胞は明らかに蛍光強度が増大し、特に No.16 サル血清においては 400 倍以上希釈しても、有意の反応が認められた (図 3)。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認められなかった (data not shown)。



2) HIV-1 感染防止効果測定

cDDR5-MAP 抗原を免疫したサル血清 (8 w, No.11,13,16) および MAP 抗原を免疫したコントロール血清 (No.7, 8, 9) または各血清を透析処理 (Mw100,000 cut off) した後、clade B HIV-1 (JRFL,R5) 及び SHIVsf162P3 (R5) 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

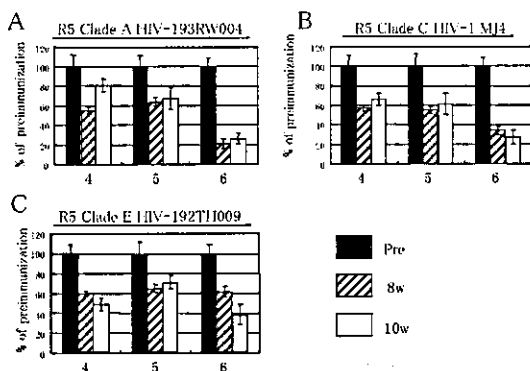
株及び SHIVsf162P3 株に対していずれのサルの pre 血清では抗 HIV 効果が認められないのに対し、免疫後 8 weeks の血清において著しい感染防止効果を示した (図 4)。



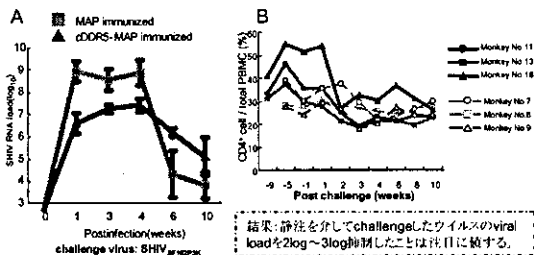
一方 X4 virus である LAV-1 株に対して、いずれのサル血清 (pre, 8 w, 10 w) も感染防止効果を示さなかった (data not shown)。この効果は各血清を透析処理 (Mw100,000 cut off) した場合でも同様であった。また MAP 抗原免疫サルのいずれの血清も HIV-1 JRFL 株および HIV-1 LAV-1 株に対して感染防止効果を示さなかった。

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。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 5)。なお、non-clade B HIV-1 は NIH AIDS Research & Reference Regent Program から入手し、常法にに従い各ウイルスを一度 propagate したものを使用した。サルに適合する SHIV の調製し、SHIVsf162P3 (R5 ウイルス) を challenge した結果、3 頭とも、control に較べて、血中の Viral loads が 2log-3log 低下する感染防御効果が認められ、また血中 CD4 値の著しい低下は challenge 10 週以後では認められなかった (図 6)。

Non-clade B HIV-1に対する抗HIV効果 図5



Determination of SHIV RNA Viral Loads and CD4⁺ cell (%) in cDDR5-MAP and MAP Immunized Macaques 図6



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-1 R5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、CEM-CCR5細胞のCCR5を認識する抗体を含むことが確認された。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認められた。この抗血清は、HIV-1 R5ウイルスの感染を著しく抑制したのに対し、HIV-1 X4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-1 R5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。

E. 結論

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-1 R5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。SHIVsf162P3K株をカニクイサルに静注してchallengeした結果、3頭とも、controlに較べて、血中のViral loadsが2log-3log低下する感染防御効果がみとめられた。次年度はアカゲサルを用い、感染防御をより完全にするために、粘膜免疫・粘膜challengeの研究を遂行する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakayama, D., Misumi, S., Mukai, R., Tachibana, K., Umeda, M., Shibata, H., Takamune, N., and Shoji, S. Suppression of multiclade R5 and X4 HIV type 1 infections by their coreceptor-based on a broad range of antibodies. *submitted to AIDS Res. Hum. Retroviruses* (2005)
- 2) Endo, M., Misumi, S., Inatsu, A., Hashimoto, K., Takamune, N., and Shoji, S. Human immunodeficiency virus type 1 induces apoptosis of breast cancer cells via chemokine receptor CXCR4. *submitted to J. Virol.* (2005)
- 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.* (2004) 20, 297-304
- 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) 135, 447-453
- 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, The Netherland. Chapter 14 (2004)
- 6) Misumi, S., Endo, M., Mukai, R., Tachibana, K., Umeda, M., Honda, T., Takamune, N., and Shoji, S. A novel cyclic peptide immunization strategy for preventing HIV-1/AIDS infection and progression. *J. Biol. Chem.* (2003) 278, 32335-32343

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

G. 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

7. SAIDS 脳炎発症動物モデルを用いたワクチン開発 (SAIDS ウイルスによる免疫修飾)

分担研究者	向井 謙三郎	国立感染研・筑波霊長類センター	室長
研究協力者	原 正幸	国立感染研・筑波霊長類センター	協力研究員
	菊池 俊彦	国立感染研・筑波霊長類センター	協力研究員
	田中 恵子	国立感染研・感染病理部	協力研究員
	中島 典子	国立感染研・感染病理部	主任研究官
	永田 典代	国立感染研・感染病理部	主任研究官
	佐多 徹太郎	国立感染研・感染病理部	部長

研究要旨 世界的なエイズの蔓延とともに発症の予防・治療法の開発が待たれている。HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) 療法を行っても、エイズ脳炎の発症を見る場合があり、患者のQOLの観点からもその発症機構の解明は必須である。T細胞指向性 SIVmac239 接種によってエイズ脳炎を発症したカニクイザル脳組織から、モノサイト系 SIV 産生細胞株 2 株 (CM1, CM5) を樹立した。この CM 細胞株の諸特性と CM 細胞が由来したサル脳炎組織の病理組織学的解析結果とを合わせて考察することにより、SIV を産生する骨髄系 (CM 様) 細胞の集簇巣が脳血管周囲に形成されることがエイズ脳炎発症病因の一つであるという可能性を示唆してきた。一方、サルエイズ (SAIDS; Simian AIDS) を発症させる原因ウイルスには、SIV 以外に Simian Retrovirus type D (SRV/D) が知られている。最近、筑波霊長類センターで繁殖・育成されたカニクイザルを用いた実験で、通常は見られない、節外性リンパ組織やリンパ球の集簇・過形成がワクチンを接種したカニクイザルの全身の臓器に認められる例や抗体産生低応答例を経験した。本研究課題のエイズ発症動物モデルを用いたワクチンの有効性を検討するにあたり、これらの事実は重大な障害となるので、免疫学的異常を示したサルについて、当センターサル繁殖コロニーに常在し、可能性の高いウイルス感染と本免疫異常との相関を検討しその原因究明を試みた。その結果、これら免疫異常の一部は SRV/D とサル EB ウイルス感染により生じる可能性が示唆された。

A. 研究目的

世界的なエイズの蔓延とともに最近ではアジア、アフリカ大陸にもその流行がみられ、HIV の感染予防とともにエイズ発症の予防・治療法の開発が待たれている。複数の抗エイズ薬を同時投与する HAART (Highly Active Anti Retroviral Therapy) 療法により、患者の延命を期待できるようになったが、依然として、耐性ウイルスやリポジストロフィーなど薬物の副作用が問題となっている。また、投薬により、中枢神経系、脳脊髄液中のウイルス量を低下さ

せる薬剤は AZT と我々の報告した 6-Cl-ddG を含めてもまだ少ない。

エイズ脳炎・痴呆症は HIV 感染者のうち約 30% にみられ HIV 感染に特徴的である。従って、サルエイズ脳炎発症モデルの開発とその発症機構の解明は、HIV 感染とその予防にとって重要な意義をもつ。

T細胞指向性 SIVmac239 接種によってエイズ脳炎を発症した 2 頭のカニクイザル脳組織から、モノサイト系 SIV 産生細胞株 2 株 (Cerebral Monocytic cells; CM1、CM5) を樹立

した。この CM 細胞 2 株はいずれも M ϕ 様細胞表面抗原及び M ϕ 、モノサイト系エステラーゼを持ち、CD4 陰性で SIV を産生する無限増殖性細胞であり、エイズ脳炎発症サル脳炎組織を構成する M ϕ 系細胞に多くの類似点を持つ。この CM 細胞の諸特性と CM 細胞が由来したサル脳炎組織の病理組織学的解析結果とを合わせて考察することにより、SIV を産生し且つ増殖マーカーである PCNA 抗原や Ki67 抗原をもつ CM 様細胞の集簇巣が脳血管周囲に形成されることがエイズ脳炎発症病因の一つという作業仮説を立てている。

また、昨年度の実験により、SIVcm 感染サル骨髄細胞において、SIV を産生し、数ヶ月間増殖性を保ったことから、エイズ脳炎組織の血管周囲にみられるマクロファージ系細胞の集簇巣の由来に関して骨髄系の細胞が 1 つの候補となる可能性を示唆した。

本年度は、当センター産のカニクイザルを用いた実験で、通常は見られない、節外性リンパ組織やリンパ球の集簇・過形成が、ワクチン接種実験を行ったサルの全身の臓器に認められる例やワクチンに対する抗体産生低応答例を数例経験した。これらの事実は、サルを用いた抗エイズワクチンの有効性を検討するにあたり、重大な障害となるので、サル繁殖コロニーに常在するウイルスの感染と本免疫異常との相関を検討しその原因を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

筑波霊長類センターカニクイザルから SRV/D-Tsukuba 株の分離と遺伝子検出系の開発

貧血と薬剤投与無効の長期下痢症状を示した 2 頭のカニクイザルより、SRV/D-Tsukuba 株を分離した。SRV/D-T 遺伝子配列を決定することにより、SRV/D-T が既知の株とは異なる新型 SRV/D であることを明らかにした (1)。また、全塩基配列を基に SRV/D-T 株特異的超高度 PCR 検出系を確立した (2)。一方、抗体検査は SRV/D-2 もしくは、SRV/D-T 株を用いたウェスタンブロット法(WB)を用い、gag, pol, env などのウイルス特異的バンドが 2 以上検出さ

れた場合を抗体陽性とし、1 本の場合は、不確定 (indeterminant) とした。

サル EB ウイルスの検出系の検討

カニクイザルの EB ウイルス産生 B 細胞株 (Ts-B6) は、当センターで 1988 年に偶然に分離された。本細胞を用い、IFA 法にてサル EBV の VC 抗原に反応する抗体の検出を行った。

免疫組織化学

すべてのサル組織は 4%パラフォルムアルデヒド・PBS にて固定後、常法に従ってパラフィン包埋して保存した。使用にあたっては、キシレンで脱パラフィン化し、1 mM EDTA (pH 8.0) 121 °C 10 分、glycine-HCl buffer (pH 2.2) 25°C 90 分、処理後 0.3% H₂O₂/methanol 30 min、5% 正常ヤギ血清処理を 20 分行ってから、SRV/D および、EBV に対する単クローン抗体との反応を行った。用いた抗体は、それぞれ、SRV/D-1 env transmembrane 領域(gp20)に対する抗体と、抗 EBNA2 抗体 (clone: PE2) である。2 次抗体は biotin 化ヤギ抗マウス IgG 抗体を用い、検出系は、SA-HRP、DAB を用いた。また、電子顕微鏡は、2.5%グルタルアルデヒド固定後、Epon812 に包埋し、クエン酸鉛・酢酸ウラニウム染色して、検鏡した。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立感染症研究所動物実験委員会による審査の結果承認を受けた。また、研究の実施にあたっては、筑波医学実験用霊長類センター諸内規、作業方式に従って繁殖育成サルを用い、動物に与える苦痛の軽減と排除に勤めた。

C. 研究結果

組織病変と免疫反応に異常がみられたサル

筑波霊長類センターで繁殖・育成されたカニクイザルを用いた実験で、通常は見られない、節外性リンパ組織やリンパ球の集簇・過形成が、弱毒化生ワクチンを接種したカニクイザルの脳、下垂体、甲状腺、胸腺、顎下腺、肺、肝臓、腎臓、子宮頸管等の全身の臓器や腺組織の間葉系結合織に認められる例 (図 1) に加えて抗体産生低応答例を経験した。図 1 には、その例として、生ワクチン接種後 3 日目の唾液腺 (上)