

厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業

HIV 感染予防に関する研究班

平成17年度 総括・分担研究報告書

平成18年 3 月

主任研究者

佐多 徹太郎

(国立感染症研究所)

平成17年度エイズ対策研究事業
「HIV感染予防に関する研究」班
班員名簿

佐多徹太郎	国立感染症研究所・感染病理部	部長
俣野 哲朗	東京大学大学院・医学系研究科・微生物学講座	助教授
三浦 智行	京都大学ウイルス研究所・感染症モデル研究センター 霊長類モデル研究領域	助教授
本多 三男	国立感染症研究所・エイズ研究センター 第1研究グループ	グループ長
森 一泰	国立感染症研究所エイズ研究センター (独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター)	主任研究官
庄司 省三	熊本大学大学院・医学薬学研究部・薬学生化学分野	教授
石川 晃一	国立感染症研究所・エイズ研究センター	主任研究官
保富 康宏	三重大学医学部・生体防御医学講座	助教授
神奈木真理	東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科 免疫治療学研究室	教授
牧野 正彦	国立感染症研究所ハンセン病研究センター 病原微生物部	部長
横田 恭子	国立感染症研究所・免疫部	第1室長
横幕 能行	独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター 第1内科（臨床研究部）	
中島 典子	国立感染症研究所・感染病理部	主任研究官
高橋 秀実	日本医科大学・微生物学免疫学教室	教授

目 次

I. HIV 感染予防に関する研究	
総括研究報告書（平成 17 年度）	1
主任研究者：佐多徹太郎（国立感染症研究所・感染病理部）	
II. 分担研究報告書	
1. HGV のエイズ発症遅延機構の解明に関する研究	7
分担研究者：佐多徹太郎（国立感染症研究所・感染病理部）	
2. プライムブーストワクチンによる誘導免疫の慢性エイズ発症防御効果に関する研究	11
分担研究者：俣野 哲朗（東京大学大学院・医学系研究科・微生物学講座）	
3. 遺伝子改変 SHIV を用いた弱毒生ワクチンと半生 DNA ワクチンの開発	15
分担研究者：三浦 智行（京大ウイルス研・感染症モデル研究センター）	
4. BCG と DIs ワクチンの実用化に関する研究	23
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・第 1 研究グループ）	
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	27
分担研究者：森 一泰（国立感染症研究所・エイズ研究センター）	
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	33
分担研究者：庄司 省三（熊本大学大学院・医学薬学研究部・薬学生化学分野）	
7. IgA 誘導型 HIV-1 ワクチン開発のためのアジュバントおよび DDS の検討	39
分担研究者：石川 晃一（国立感染症研究所・エイズ研究センター）	

8. Ag85B を用いたワクチンの増強作用	4 2
分担研究者：保富 康宏（三重大学医学部・生体防御医学講座）	
9. T 細胞機能分子を介する HIV-1 感染防御	4 7
分担研究者：神奈木真理（東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科・免疫治療学研究室）	
10. 樹状細胞の DC-SIGN と感染防御機構	5 1
分担研究者：牧野 正彦（国立感染症研究所・ハンセン病研究センター・病原微生物部）	
11. 強力なワクチン効果を賦与するための T 細胞活性化因子の解析	5 5
分担研究者：横田 恭子（国立感染症研究所・免疫部）	
12. CTL による防御免疫の評価系に関する研究	5 9
分担研究者：横幕 能行（独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター）	
13. 神経幹細胞を用いた HIV 感染動態の解明	6 3
分担研究者：中島 典子（国立感染症研究所・感染病理部）	
14. 粘膜組織における CD8 α ⁺ CD4 ⁺ T 細胞を介した HIV 感染拡大の可能性	6 9
分担研究者：高橋 秀実（日本医科大学・微生物学免疫学教室）	

I. 総括研究報告書

HIV 感染予防に関する研究

主任研究者：佐多徹太郎（国立感染症研究所感染病理部 部長）

研究要旨 エイズ克服には HIV 感染の予防に優るものではなく、なかでもワクチン開発が最重要課題である。本研究班では、1) サルを用いた有効かつ安全なワクチン開発研究、2) ワクチン免疫による防御機構の解明、そして 3) いまだあきらかとなっていない HIV 感染病態の解析を 3 本柱として研究を行った。組換え BCG ワクチンのコドン至適化と DIs ワクチンのブーストワクチンの基礎的なコンセプトを確立することができた。DNA プライム・SeV ブーストワクチン接種サルに SIVmac239 チャレンジ後、3 頭ではウイルス複製制御が維持されており、セットポイント期以降 1 年までの濃縮血漿を用いた解析でもウイルスは検出されなかった。強毒 SHIV と弱毒株の違いとして gp41 の変異が感染力価を 40 倍上昇させた。腸管粘膜の CD4 T 細胞が標的と考えられた。ウイルス量が少ない状態では新たな感染を防御することができた。d-5G 感染ザルにおける d-5Genv 遺伝子に新たな変異は検出されなかった。新たに作成した M 細胞を標的とする化合物が経口投与で小腸粘膜内にとりこまれた。 α 抗原蛋白は HIVenv gp120 蛋白に対し非常に強い抗体の誘導と Th1 タイプのサイトカインの産生を誘導した。経鼻免疫では低分子のキトサンおよび HVJ env ベクターがアジュバントとして有望と考えられた。自然免疫系の解析を目的とした実験系で Nef 発現が NK 細胞の INF γ 産生を著しく低下させた。ほか、ワクチン開発研究、感染防御機構や病態解明に役立つ成果が得られ、今後のさらなる発展が期待される。

分担研究者：

俣野哲朗（東京大学医科学研究所 教授）、
三浦智行（京都大学ウイルス研究所感染症モデル研究センター 助教授）、
本多三男（国立感染症研究所エイズ研究センター 室長）、
森 一泰（国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官）、
庄司省三（熊本大学大学院医学薬学研究部 教授）、
石川晃一（国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官）、
保富康宏（三重大学医学部 助教授）、
神奈木真理（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 教授）、
牧野正彦（国立感染症研究所ハンセン病研究センター 部長）、
横田恭子（国立感染症研究所免疫部 室長）、
横幕能行（独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター 第1内科兼臨床研究部）、
中島典子（国立感染症研究所感染病理部 主任研究官）、
高橋秀美（日本医科大学医学部微生物免疫学 教授）

A. 研究目的

HAART の開発により HIV 感染者の予後は改善されたが、コンプライアンスやコストそして薬剤耐性などの問題があるため、エイズ克服には HIV 感染の予防に優るものではなく、なかでもワクチン開発が最重要課題である。一方で防御免疫機構やいまだ明らかではない HIV 感染病態の解明はワクチン開発のみならず HIV 感染予防にとって重要な課題である。本研究班ではわが国のサルを用いたエイズワクチン研究者や HIV 感染防御免疫機構や HIV 感染病態研究者による HIV 感染予防を目的とした研究を推進することにより、ヒトでの実用化に耐えるワクチンの開発研究を行うことを目的とする。

B. 研究方法

1) サルを用いた有効かつ安全なワクチン開発研究：組換えBCGワクチンと組換えDIsワクチ

ンについて至適化を行い、サルを用いて検討し、さらにワクチン抗原の製造や評価に関する基準を検討した(本多)。DNAプライム・SeVブーストワクチン接種サルにSIVmac239チャレンジ後、血漿中ウイルス量、ウイルスゲノム塩基配列、ウイルス特異的CTLレベル等を測定した。検出限界以下のサンプルについては、血漿を濃縮しウイルス定量を行った(俣野)。種々の組換えSHIVを用い、サルにおける病原性、感染制御に重要な免疫機構および非感染性粒子を産生する半生DNAワクチンの効果を検討した(三浦)。d-5G感染ザル、nef遺伝子欠損SIV感染ザル、SIV239感染を長期に抑制したサル、SHIV-RT感染後早期治療ザルにSIVmac239をチャレンジ感染し、血中ウイルスRNA量、env遺伝子の塩基配列を調べ、感染防御効果を検討した(森)。Cyclic dodecapeptide-multiple-antigen peptide conjugate (cDDR5-MAP)と同様の化合物を用い、粘膜ワクチン開発として新たに粘膜M細胞を介する標的分子の化学合成を行い、小腸粘膜内に取り込まれるかどうかの検討を行った(庄司)。マウスで粘膜免疫アジュバントの有用性を検討し、またカニクイサル6頭を用い、HIVのDNAワクチン候補としてHVJ envベクターとHIV-1env発現プラスミッドを経鼻投与し、SHIVの攻撃接種によりワクチン効果を検討した(石川)。

2) ワクチン免疫による防御機構の解明: 抗酸菌の分泌抗原 Ag85B 遺伝子を大腸菌でのリコンビナント蛋白の作成を試み、アジュバント効果を比較した(保富)。CD28 ファミリー分子を介する HIV-1 複製抑制効果について詳しく解析した(神奈木)。病原性との関連が指摘されている *M. avium* の菌体糖脂質 GPL の合成系を解析し、また *M. smegmatis* を用い GPL 合成系に関与する代謝酵素のノックアウト株を作製し *M. avium* の相同酵素遺伝子を導入しその性状を解析した(牧野)。種々の抗原刺激に反応する抗原特異的 T 細胞を HLA の制限なく解析するため IFN- γ プロモーター活性を検出する組換えレンチウイルスベクターシステムを構築し Jurkat 細胞あるいは末梢血単核細胞 (PBMC) に感染させ感染効率と IFN promoter 活性を測定した(横田)。臨床検体由来の HIV-1 遺伝子のうち gag(-pro)領域を移動可能な新規

HIV-1 vector 作成し、新規 CTL epitope 同定法を検討した(横幕)。

3) いまだあきらかとなっていない HIV 感染病態の解析: 全長 HGV DNA の改良型を構築した(佐多)。サル胎児脳由来ミクログリアと BPC 由来ニューロン・グリア培養系における SIV の感染性を比較しミクログリアを添加した影響を調べた(中島)。サル小腸粘膜組織由来の CD8 $\alpha\alpha$ 陽性 CD4 陽性 double positive 細胞株を不死化させた。また、NKT 細胞へ抗原を提示する CD1d 分子の種族的な特性を遺伝的に追跡した(高橋)。

(倫理面への配慮)

健常人の末梢血単核球や感染者の検体の利用に関しては研究倫理委員会の承認を受け、インフォームドコンセントを得た上で提供を受けた。動物実験は、各施設の動物実験委員会の審査を受け、その承認を得た。研究の実施にあたっては、動物愛護の精神で動物に与える苦痛の軽減と排除に勤めた。

C. 研究結果

1) サルを用いた有効かつ安全なワクチン開発研究: 組換え BCG ワクチンのコドン至適化と DIs ワクチンのブーストワクチンの基礎的なコンセプトを確立することができ、より低容量での効果が期待された。ワクチン接種後の感染実験で3頭中2頭で末梢の CD4 陽性 T 細胞が保たれ、血中ウイルス量も検出されなかった。Gag のワクチンで攻撃感染後に env の中和抗体が上昇した(本多)。チャレンジ後のセットポイント期以降、血漿中ウイルス量が検出下限以下となったサルが5頭いた。うち2頭では約1年でウイルス血症の再出現がみられたが、残り3頭ではウイルス複製制御が維持されており、セットポイント期以降1年までの濃縮血漿を用いた解析でもウイルスは検出されなかった(俣野)。強毒及び弱毒 SHIV の塩基配列上の違いは16カ所であるが M8166 細胞での検討から、そのうちの primer binding site や逆転写酵素の変異はウイルス産生量を2-3倍上昇させ、また gp41 の変異は感染力価を40倍上昇させることがわかった。またこれらウイルスによる感染初期における胸腺、腸管と深部リンパ系組織におけるウイルス動態と CD4 陽性 T 細胞に対

する障害性の違いについて明らかにし、幼若な T 細胞に対する障害性と分化増殖能の障害が病原性に重要であることを明らかにした。半生 DNA ワクチンの投与方法として坐薬を用いたところ細胞性免疫が誘導されたが、液性免疫は誘導されず、感染防御効果はみられなかった（三浦）。チャレンジ前のサルでは血中ウイルス量が検出限界前後（100 copy/ml）で感染は制御されていた。SIVmac239 を静脈内接種後血漿ウイルス量の増加は観察されなかった。増加した 1 頭では SIV 抗体価が非常に低かった。ウイルス量が少ない状態では新たな感染を防御することができた。d-5G 感染ザルにおける d-5Genv 遺伝子の変異は低く、新たな変異は検出されなかった（森）。新たに作成した M 細胞を標的とする化合物は小腸 M 細胞を標的とし、粘膜内に移動することを明らかにした（庄司）。経鼻免疫では低分子のキトサンおよび HVJ env ベクターがマウスで高い抗体価を示し、アジュバントとして有望と考えられた（石川）。

2) ワクチン免疫による防御機構の解明：ユビキチン結合蛋白として発現精製できたリコンビナント α 抗原蛋白は HIVenv gp120 蛋白に対し非常に強い抗体の誘導と Th1 タイプのサイトカインの産生が認められた（保富）。可溶性 CTLA-4 に量依存的な HIV-1 複製抑制が認められたが、マクロファージを介した細胞増殖抑制を伴う HIV-1 抑制であった。自然免疫系の解析を目的とした実験系で Nef 発現が NK 細胞の $\text{INF}\gamma$ 産生を著しく低下させ、Nef の病原性との関わりが示唆された（神奈木）。*M. avium* 代謝遺伝子を各ノックアウト株に導入したところ、合成初期は *M. smegmatis* と共通の経路を用い、後期は *M. avium* 特異的経路が働き、病原性に関与する GPL が形成されることが明らかになった。DC-SIGN には結合しなかった（牧野）。Jurkat 細胞でプロモーターの活性を検出できた。IFN- γ プロモーター活性化に伴う β -lactamase の活性測定は FACS の多重染色解析にも利用可能で、新しい抗原特異的 T 細胞活性化の評価系ができた（横田）。InFusion システムを用いて gag, pro 等遺伝子を簡易に移動できる construct の作成に成功した。患者の PBMC から抽出した RNA を用いると効率良く感染性ク

ローンが得られることが判明し、約 20 クローンの CTL 標的細胞を作製した（横幕）。

3) いまだあきらかとなっていない HIV 感染病態の解析：PCR によるエラーを修復した HGV 複製中間体であるマイナス鎖 RNA を細胞内および上清中で検出し、さらに培養上清中にも RNA ウイルスを検出した（佐多）。脳由来の培養ミクログリアを SIV 感染 BPC 由来ニューロン・グリア培養系に添加すると培養上清中の SIV gag 蛋白量が増大した。またミクログリアには β ケモカインが誘導された。エイズ脳症の in vitro モデルができた（中島）。サル小腸粘膜内に棲息する CD8aa 陽性 CD4 陽性の T 細胞群の方がウイルスの複製能が高く、感染初期から複製が開始されていた。小腸粘膜内の double positive T 細胞がウイルス感染を拡大していると考えられた。また CD1d 分子の種族的な特性を解明した（高橋）。

D. 考 察

組換え BCG および DIs ワクチンの臨床試行の可能性について検討できる段階にきた。ワクチンの実用化のためには臨床医学的、及び社会的な検討に基づく共同研究が必須である。一時的にも中和抗体が誘導できたので、今後の工夫が必要である。チャレンジ後のセットポイント期の血漿中ウイルス量を、血漿濃縮による感度の高い方法によっても検出されない程度に抑制することができれば、長期の SIV 複製制御維持・エイズ発症阻止につながることを示唆された。今後さらに長期のウイルス複製制御維持に必要な機序を解析し、ウイルス多様性に対する効果を検討する必要がある。SHIV 感染による CD4 陽性 T 細胞の増殖分化障害および小腸での CD4T 細胞の減少枯渇が明らかとなり、小腸の CD4 陽性 T 細胞が感染の標的であることが示唆され、エイズの病原性解明に向けて極めて重要な知見が得られた。自己抗体型ワクチンとして粘膜免疫ワクチン開発が必要と考え、新たに小腸 M 細胞を標的とする化合物が機能することが明らかとなった。今後の研究の発展が期待される。またアジュバントの開発や検討により、ワクチン開発の基盤が形成されつつある。またサルを用いた有効性ととともに、安全性や安定性についても検討していくことが必要

である。さらに基礎的な感染制御機構の解明およびその解析法の開発が進み、ワクチンの有効性を評価する方法ができてきた。いまだ明らかではない HIV 感染の病態について一部を明らかにすることができた。

E. 結論

組換え BCG ワクチンと DIs ワクチンのプライムブーストワクチンの基礎的なコンセプトを確立し、実用化への道を開くことができた。ワクチン接種により血漿中ウイルス量を極めて低い値に低下させることがエイズ発症阻止に結びつくことを示した。腸管や深部リンパ系組織における詳細なウイルス感染動態と免疫細胞動態の実験解析基盤を確立できた。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kinomoto, M., M. Yokoyama, H. Sato, A. Kojima, T. Kurata, K. Ikuta, T. Sata, and K. Tokunaga. Amino acid 36 in HIV-1 gp41 ectodomain controls fusogenic activity: Implications for the molecular mechanism of viral escape from a fusion inhibitor. *J Virol* 79, 5996-6004, 2005.
- 2) Kinomoto, M., R. Appiah-Opong, J. A. M. Brandful, M. Yokoyama, N. Nii-Trebi, E. Ugly-Kwame, H. Sato, D. Ofori-Adjei, T. Kurata, F. Barre-Sinoussi, T. Sata, and K. Tokunaga. HIV-1 proteases from drug-naïve West African patients are differentially less susceptible to protease inhibitors. *Clin Infect Dis* 41, 243-251, 2005.
- 3) Kawada, M., Igarashi, H., Takeda, A., Tsukamoto, T., Yamamoto, H., Dohki, S., Takiguchi, M., and Matano, T. Involvement of multiple epitope-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in vaccine-based control of simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques. *J Virol*, in press.
- 4) Kobayashi, M., Igarashi, H., Takeda, A., Kato, M., and Matano, T. Reversion in vivo after inoculation of a molecular proviral DNA clone of simian immunodeficiency virus with a cytotoxic-T-lymphocyte escape mutation. *J. Virol.* 79:11529-11532, 2005.
- 5) Kato M, Igarashi H, Takeda A, Sasaki Y, Nakamura H, Kano M, Sata T, Iida A, Hasegawa M, Horie S, Higashihara E, Nagai Y, and Matano T.: Induction of Gag-specific T-cell responses by therapeutic immunization with a Gag-expressing Sendai virus vector in macaques chronically infected with simian-human immunodeficiency virus. *Vaccine*, 23:3166-3173, 2005.
- 6) Miyake, A., Ibuki, K., Enose, Y., Suzuki, Y., Horiuchi, R., Motohara, M., Saito, N., Nakasone, T., Honda, M., Watanabe, T., Miura, T., and Hayami, M.: Rapid dissemination of a pathogenic simian/human immunodeficiency virus to systemic organs and active replication in lymphoid tissues following intrarectal infection., *J. Gen. Virol.*, in press.
- 7) Horiuchi, R., Akahata, W., Kuwata, T., Enose, Y., Ido, E., Suzuki, H., Miyake, A., Saito, N., Ibuki, K., Goto, T., Miura, T., and Hayami, M.: DNA vaccination of macaques by a full-genome SHIV plasmid that has an IL-2 gene and Produces non-infectious virus particles. *Vaccine*, in press.
- 8) Shimizu, Y., Miyazaki, Y., Ibuki, K., Suzuki, H., Kaneyasu, K., Goto, Y., Hayami, M., Miura, T. and Haga, T.: Induction of immune response in macaque monkeys infected with simian-human immunodeficiency virus having the TNF-alpha gene at an early stage of infection. *Virology*, in press.
- 9) Miyake, A., Ibuki, K., Suzuki, H., Horiuchi, R., Saito, N., Motohara, M., Hayami, M. and Miura, T.: Early virological events in various tissues of newborn monkeys after intrarectal infection with pathogenic simian human immunodeficiency virus. *J. Med. Primatol.*, 34: 294-302, 2005.
- 10) Kawahara M, Matsuo K, and Honda M. Intradermal and oral immunization with

recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the simian immunodeficiency virus Gag protein induces long-lasting, antigen-specific immune responses in guinea pigs. *Clin. Immunol.* in press.

- 11) Someya K, Ami Y, Nakasone T, Izumi Y, Matsuo K, Horibata S, Xin KQ, Yamamoto H, Okuda K, Yamamoto N, and Honda M. Induction of positive cellular and humoral immune responses by a prime-boost vaccine encoded with simian immunodeficiency virus gag/pol. *J. Immunol.* in press.
 - 12) 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.
 - 13) Kanekiyo, M., K. Matsuo, M. Hamatake, T. Hamano, T. Ohsu, S. Matsumoto, T. Yamada, S. Yamazaki, A. Hasegawa, N. Yamamoto, and M. Honda. Mycobacterial codon optimization enhances antigen expression and virus-specific immune responses in recombinant bacille Calmette-Guérin expressing the human immunodeficiency virus type 1Gag. *J. Virol.* 79:8716-8723, 2005.
 - 14) Ami Y, Izumi Y, Matsuo K, Someya K, Kenekiyo M, Horibata S, Yoshino N, Sakai K, Shinohara K, Yamazaki S, Yamamoto N, and Honda M. Vaccination with Recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin and a Non-replicating Vaccinia Virus Recombinant Leads to Long-lasting and Effective Immunity. *J. Virol.* 79: 12871-12879. 2005.
 - 15) Mori, K., Sugimoto, C., Ohgimoto S., Shioda T., Kusagawa S., Takebe Y., Kano M., Matano, T., Yuasa T., Kitagawa D., Miyazawa, M., Takahashi, Y., Yasunami, M., Kimura, A., Yamamoto N., Suzuki Y., and Nagai, Y. Influence of glycosylation on the efficacy of an Env-based vaccine against SIVmac239 in a macaque AIDS model. *J. Virol.*, 79, 10386-10396, 2005.
 - 16) Misumi S., Nakayama D., Kusaba M, Iiboshi T, Mukai R., Tachibana K., Nakasone T., Umeda M, Shibata H., Endo M., Takamune N., Shoji S. Effects of Immunization with CCR5-Based Cycloimmunogen on Simian/Human Immunodeficiency Virus SF162P3 Challenge *J. Immunol.* 176 : 463-471, 2006.
 - 17) Nakayama D., Misumi S., Mukai, R., Tachibana K., Umeda M., Shibata H., Takamune N., and Shoji S. Suppression of Multiclade R5 and X4 Human Immunodeficiency Virus Type-1 Infections by a Coreceptor-Based Anti-HIV Strategy *J. Biochem.* 138, 571-582, 2005.
 - 18) Takamura, S., Matsuo, K., Takebe, Y. and Yasutomi, Y.: Ag85B of mycobacteria elicits effective CTL responses through activation of robust Th1 immunity as a novel adjuvant in DNA vaccine. *J. Immunol.* 175:2541-2547, 2005.
 - 19) Satomi, M., Shimizu, M., Shinya, E., Watari, E., Owaki, A., Hidaka, C., Ichikawa, M., Takeshita, T., Takahashi, H. Transmission of macrophage-tropic HIV-1 by breast milk macrophages via DC-SIGN. *J. Infect. Dis.*, 191:174-181, 2005.
2. 学会発表
各分担研究者の報告書参照。
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)
1. 特許取得
出願番号：2005-317905 出願日：2005.11.01、腸管免疫賦活剤、発明者：庄司省三、三隅将吾、中山大介、出願人：国立大学法人熊本大学
 2. 実用新案登録
登録なし
 3. その他
なし

II. 分担研究報告書

1. HGVのエイズ発症遅延機構の解明に関する研究

分担研究者 佐多 徹太郎 国立感染症研究所感染病理部

研究協力者 徳永研三 (感染研・感染病理部 主任研究官)

研究要旨 G型肝炎ウイルス (HGV) 感染HIV/AIDS患者におけるAIDS発症遅延の原因を探るため、*in vitro*でのHGV感染実験系の確立を目指して、昨年度までにHGV遺伝子の全長クローニングを行った。本年度、Real-time RT PCRの系を確立して、ウイルスの増殖性を検討した。T7RNA ポリメラーゼアデノベクター感染とHGV cDNAのトランスフェクション後のHGV RNAを定量した結果、殆ど増殖が認められないことから、アデノウイルスベクターによる細胞毒性が考えられた。この問題を回避するためT7RNA ポリメラーゼ発現ベクターDNAを構築して、HGV全長cDNAと共に細胞株にトランスフェクトした結果、ウイルスRNAの経時的な細胞内増殖が認められ、また培養上清中にもウイルスが産生されていることが明らかになった。更に末梢血リンパ球においてもウイルスの感染が成立した。以上の様に、この産生ウイルスの生物学的活性が確認されたことにより、今回樹立したHGV cDNAクローンは、世界で2番目の感染性HGV分子クローンとなった。

A. 研究目的

1996年に肝炎患者から分離された第7番目の肝炎ウイルス、G型肝炎ウイルス (HGV/GBV-C) は、その名称に反して肝炎を起こすことなく何の病原性も持たないことが知られている。このウイルスに感染しているHIV/AIDS患者では、CD4陽性リンパ球数がHGV陰性患者と比較して極めて多く、またAIDSの発症が遅延すること、また*in vitro*でもHIV-1の増殖効率をHGVが低下させることが、欧米の複数のグループによって報告されている。欧米で流行しているHGVのゲノタイプは2型であるのに対し、我が国で流行しているタイプは主に3型である。そこで我々は、3型のHGVも2型同様にHIV-1増殖抑制効果を有するか否かを検討、その効果に関わるHGVのウイルス蛋白を検索することを研究目的とした。

B. 研究方法

1) DNAクローニング: i) T7 RNAポリメラーゼ発現ベクターの作製: 昨年作製したT7 RNAポリメラーゼ発現アデノベクターよりT7 RNAポリメラーゼ遺伝子部分を、マルチクローニングサイトのXhoIとEcoRVで切り出し、pCAGGSの同サイトに挿入して作製したベクターを、

pCAGGS-T7RNApolと命名した。

2) HGVのウイルス産生実験: 9 µgのpGBVc-IM71と1 µgのpCAGGS-T7RNApolを、FuGENE6 (ロシュ社)を用いて 3.5×10^6 個の293T細胞に、またリポフェクタミン (インビトロジェン社)を用いて 2.8×10^6 個のHeLa細胞にそれぞれトランスフェクションした。16時間後に細胞をPBSで洗浄してフレッシュな培養液を加え、その32時間後に培養上清と細胞を回収した。培養上清は一部感染実験用に保存し、残りを、High Pure Viral RNA Kit (ロシュ社)にてRNAを抽出し、更に残余トランスフェクションDNAをTURBO DNA-free (アンビオン社)を用いて除去した。細胞は上清回収後、PBSで洗浄、RNAqueous Kit (アンビオン社)にてRNAを単離し、上記DNaseで処理した。

3) Real-time RT PCRによるHGV RNAゲノムの定量: HGVのNS2領域をターゲットとしてABI PRISM 7900 sequence detector (アプライド・バイオシステム社)によりゲノムRNAを定量化した。forward及びreverse primersにはそれぞれGBVc-rtp-S: 5'-GTGGAATGT TGTGTGATGGC-3'(2916-2935)とGBVc-rtp-A: 5'-AGTCCGTCCTGGTGAATGAC-3'(3071-3090)を、また蛍光プローブにはGBVc-rtp-Prb:

5'-CGAGAGGGGCCTATTTGTTT-3'(2080-2099)を用いた。

4) **HGV 感染実験** : 1×10^6 個の健常人末梢血リンパ球を $3 \mu\text{g/ml}$ フィトヘマグルチニン (シグマ社) で 48 時間刺激後、 10 U/ml の IL-2 (R&D システムズ社) を添加した 10% 牛胎児血清入り RPMI1640 (インビトロジェン社) で 24 時間培養、HGV ウイルスストック (pGBVc-IM71-T7PT/hdvrz をトランスフェクトした 293T 細胞の培養上清) を感染させた。感染後 10 日目に細胞を回収して、上記キットを用いて RNA を抽出し、real-time RT PCR により、細胞内 HGV RNA コピーを定量化した。

C. 研究結果

昨年度までに作製した全長 HGV cDNA の細胞内導入では、RT-PCR により細胞・培養上清中とともにウイルス核酸が検出できたが、今回、新たに Real-time RT PCR の系を樹立して、HeLa 細胞への HGV cDNA トランスフェクション及び T7 RNA ポリメラーゼ発現アデノウイルス感染後のウイルス核酸の細胞内増加を定量的に解析したところ、むしろ経時的にコピー数が減少していることが判った (図 1)。この原因として我々は、T7 RNA ポリメラーゼを発現させる為を用いているアデノウイルスベクターの毒性が HGV の増殖を妨げている可能性を考えた。昨年度報告した様に、HGV 5'UTR の IRES 活性は、EMCV や HCV と比較して本質的に低いため、この低 IRES 活性を補うために T7 RNA ポリメラーゼ発現量を増やして代償的に転写量を高かめる必要

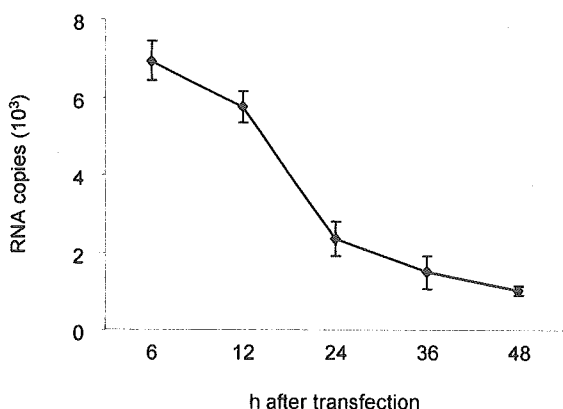


図 1. Real-time RT PCR による HGV DNA トランスフェクション後のウイルス核酸の定量

があった。したがって、T7 RNA ポリメラーゼ発現アデノウイルスをかなりの高 m.o.i.

(500~1,000) で用いなければならず、その結果、細胞自体の増殖性も実際少なからず低下していることが判った (データ非表示)。更に、アデノウイルスベクターを用いる場合は、トランスフェクション効率が非常に高い 293T 細胞を標的細胞として使用できない (アデノウイルスの初期遺伝子 E1A・E1B を発現する 293T 細胞は、アデノウイルスベクターのプレップにむしろ用いられ、ウイルスの lytic infection によって細胞は死滅する) ため、トランスフェクション効率があまり高くない HeLa 細胞等に頼らざるを得なかった。このこともトランスフェクション後の HGV の低コピー数に関係している可能性が考えられた。これらの問題を克服するために、T7 RNA ポリメラーゼ発現アデノベクターに代わって、哺乳類細胞用発現プラスミド DNA を利用した T7 RNA ポリメラーゼの発現を試みるため、そのベクター DNA の構築を行った。全長 HGV cDNA と T7 RNA ポリメラーゼ発現プラスミド DNA を 293T 細胞または HeLa 細胞にコトランスフェクションして 2.5、5、10、20、40、60 時間の細胞内における HGV RNA の複製を Real-time RT PCR により定量した。その結果、我々が期待した通り、アデノウイルスベクター感染の場合とは異なり、両細胞において明らかなウイルス RNA の経時的増加が観察された。特に 293T 細胞では、トランスフェクション効率の違いを反映して、HeLa 細胞より 4~5 倍高い増殖性を示した (図 2A)。次にトランスフェクション後の細胞の培養上清中にウイルスが産生されているか否かを、またそのウイルス産生が T7 RNA ポリメラーゼの発現依存的であるか否かを検討した。全長 HGV DNA と T7 RNA ポリメラーゼ発現プラスミド DNA または空ベクター DNA のコトランスフェクション後 60 時間目に培養上清を回収して、上清中の RNA を抽出し、real-time RT PCR によりウイルス RNA を定量した。その結果、T7 RNA ポリメラーゼの発現下でのみ、ウイルスが上清中に放出されており、細胞内増殖の結果と同様、HeLa 細胞に比べて 293T 細胞では 4.6 倍多くウイルスが産生されていることが判った (図 2B)。

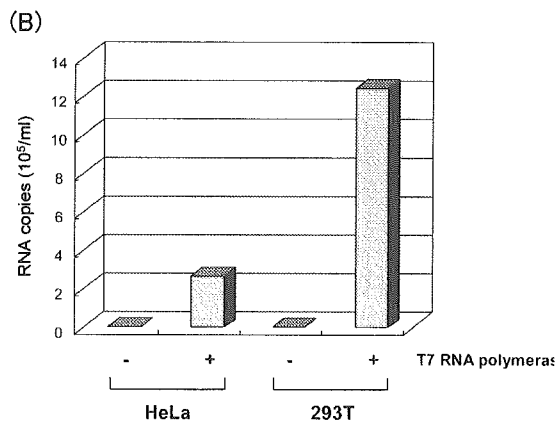
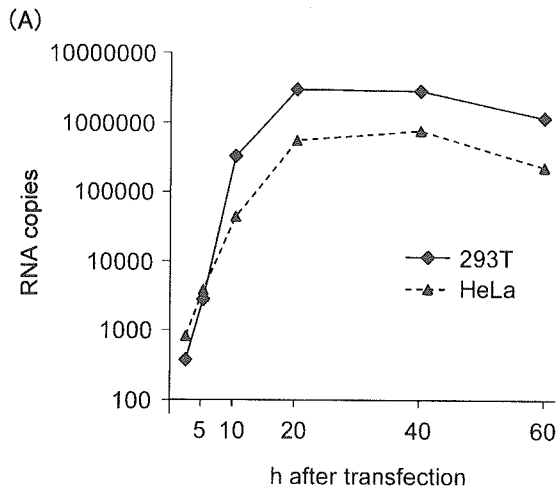


図2. 再構築 HGV のトランスフェクション後の(A)細胞内増殖及び、(B) 培養上清中へのウイルス放出

最後に、トランスフェクションにより産生された培養上清中のウイルスが、実際に末梢血リンパ球に対して感染性を示すか否かを検討した。1 x 10⁶ 個の健康人末梢血リンパ球をフィットヘマグルチニンで 48 時間刺激、更に IL-2 添加培地で 24 時間培養後、HGVC ウイルスストックを感染させた。感染 10 日後に末梢血リンパ球を回収して RNA を抽出し、real-time RT PCR によりウイルス RNA を定量したところ、確かに 6 万コピー程度のウイルスゲノム RNA を検出することができた (図 3)。以上の結果より、我々が構築した全長 HGVC cDNA は、明らかに生物学的活性を有する、すなわち感染性を有する増殖可能なウイルスであることが明らかになった。

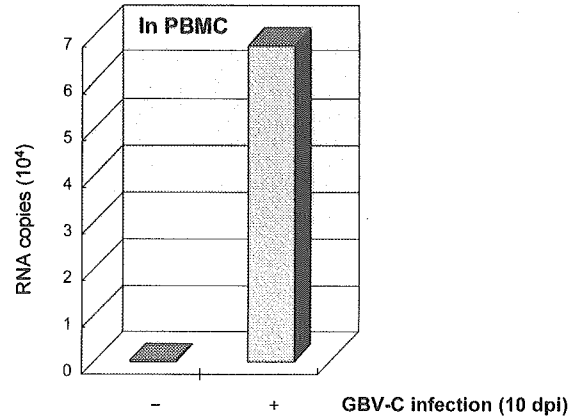


図3. 末梢血リンパ球における再構築 HGVC のウイルス複製

D. 考 察

昨年度、preliminary な実験結果として、ヒトリンパ球および HGVC 感受性 Daudi-CD4 における HGVC の HIV-1 複製阻害効果を報告したが、その実験における対照には HeLa 細胞培養上清を用いた一方で、HGVC ストックにはウイルス調整時に用いたアデノウイルスが含まれていた。再試験時に、対照としてアデノウイルス感染 HeLa 細胞培養上清を用いたところ、HGVC 感染の有無による HIV-1 増殖の差が消失したことから、前回の実験で見られた HIV-1 の産生低下は単にアデノウイルスの細胞毒性による可能性が示唆された。そこで昨年までに作製した全長 HGVC DNA からの経時的なウイルス複製を Real-time RT PCR により定量的に解析したところ、実際殆ど増殖性がないことが判った。このアデノウイルスベクターによる細胞毒性を回避するために、新たに T7 RNA ポリメラーゼ発現プラスミドを構築した。この系を用いて HGVC 全長 cDNA の生物学的活性を検討するために、2 種類の細胞を用いてトランスフェクション後の HGVC の細胞内 RNA コピー数を定量した結果、両細胞において明らかな経時的増殖が認められ、更に T7 RNA ポリメラーゼ依存的に培養上清中にウイルスが産生されていることが明らかになった。また産生されたウイルスの感染性を、末梢血リンパ球をターゲットとして、検討したところ感染後 10 日でも 4 乗レベルのウイルスコピーが検出できたことから、HGVC 全長 cDNA のトランスフェクションにより産生されたウイルスの生物学的活性が確認

された。この HGV 全長 cDNA は、世界で 2 番目の感染性 HGV 分子クローン (ゲノタイプ 3 型感染性クローンとしては世界初) となり、また今後の HGV-HIV の感染干渉実験を進めていく上で、パワフルなツールとなることが予想される。現在、HGV による HIV-1 複製阻害効果を検討中である。もしこの HGV クローンによる HIV-1 複製抑制効果が認められなければ、ゲノタイプ間の違いに言及するべく、2 型クローンとの組換えを行い HIV-1 複製阻害活性の規定領域を決定していくことが必要であろう。逆にもし阻害効果が認められれば、ゲノタイプ 3 型 HGV による HIV-1 複製阻害の初の報告となり、更にもその HIV-1 複製阻害活性について、既に報告されている共受容体ブロック以外のメカニズムが存在するか否かを検証していくことが重要な課題となるであろう。

E. 結論

T7 RNA ポリメラーゼ発現アデノベクターの細胞毒性を回避すべく、今回 T7 RNA ポリメラーゼ発現プラスミド DNA を構築してウイルス産生実験に用いた。新たに確立した Real-time RT PCR の系を用いて、ウイルス増殖性を検討した結果、HGV の細胞内増殖性、上清中へのウイルス産生性を確認することができた。更に、産生されたウイルスの感染性が認められたことにより、本 DNA クローンは、世界で 2 番目の感染性 HGV 分子クローンとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kinomoto M, Yokoyama M, Sato H, Kojima A, Kurata T, Ikuta K, Sata T, Tokunaga K: Amino acid 36 in the human immunodeficiency virus type 1 gp41 ectodomain controls fusogenic activity: implications for the molecular mechanism of viral escape from a fusion inhibitor. *J Virol* 79:5996-6004, 2005.
- 2) Kinomoto M, Appiah-Opong R, Brandful JA, Yokoyama M, Nii-Trebi N, Ugly-Kwame E, Sato H, Ofori-Adjei D, Kurata T, Barre-Sinoussi F, Sata T, Tokunaga K: HIV-1

proteases from drug-naive West African patients are differentially less susceptible to protease inhibitors. *Clin Infect Dis* 41:243-251, 2005.

2. 学会発表

- 1) 木ノ本正信、志村まり、石坂幸人、倉田 毅、佐多徹太郎、徳永研三 : Live cell imaging による HIV-1 粒子の細胞内動態解析. 第 53 回日本ウイルス学会総会 (横浜) 2005 年 11 月
- 2) Tokunaga K, Kinomoto M, Sakamoto Y, Tatsumi M, Shimura M, Ishizaka Y, Kurata T, Sata T: Differential anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif in a subtype-dependent manner. 2nd Dominique Dormont International Conference on "Host pathogen interactions in chronic infections". Paris, France, December, 2005.
- 3) 徳永研三、木ノ本正信、坂本優子、巽 正志、志村まり、石坂幸人、倉田 毅、佐多徹太郎 : HIV-1 Vif の細胞性因子 APOBEC3G に対するサブタイプ依存的抑制活性の解析. 第 28 回日本分子生物学会 (福岡) 2005 年 12 月
- 4) 志村まり、立和名博昭、徳永研三、木村圭志、依田欣哉、胡桃坂仁志、佐多徹太郎、花岡文雄、石坂幸人 : HIV-1 Vpr によるヘテロクロマチン蛋白消失と早期姉妹染色体分離. 第 28 回日本分子生物学会 (福岡) 2005 年 12 月
- 5) 田口 崇、志村まり、木ノ本正信、徳永研三、佐多徹太郎、石坂幸人 : HIV-1 アクセサリー遺伝子 *vpr* による M 期の異常. 第 28 回日本分子生物学会 (福岡) 2005 年 12 月
- 6) 田口 崇、Gruss OJ、木ノ本正信、志村まり、徳永研三、佐多徹太郎、石坂幸人 : HIV-1 アクセサリー遺伝子 *vpr* による M 期染色体の異常と Ran の機能解析. 第 23 回染色体ワークショップ (広島) 2006 年 1 月

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

2. プライムブーストワクチンによる誘導免疫の慢性エイズ発症防御効果に関する研究

分担研究者 俣野 哲朗 東京大学医科学研究所教授

研究要旨 HIV 感染症では、感染後に誘導される宿主獲得免疫反応によってもウイルスが排除されきらず慢性持続感染が成立することが重大な問題である。この慢性持続感染の成立阻止を目的とした予防エイズワクチンの開発は国際的最重要課題の一つであり、その開発の方向性を定めるための論理的基盤の確立が急務である。獲得免疫系のエフェクターとしては、細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) が HIV 複製抑制に中心的役割を担っていることが知られており、HIV 感染初期に CTL による血中ウイルス量の低下がみられるが、HIV 複製の制御には至らず慢性持続感染が成立する。そこで本研究では、予防エイズワクチン開発のための論理的基盤の確立に向けて、ワクチン誘導 CTL による HIV 複製制御の可能性の検証を行うことを目的とし、サル慢性エイズモデルにおける解析を行った。平成 15 年度は、DNA プライム・Gag 発現センダイウイルスベクターブーストワクチン接種サルへのサル免疫不全ウイルス SIVmac239 チャレンジ実験を行い、ワクチン誘導 CTL による SIV 複製制御の可能性を初めて示すことに成功した。さらに平成 16 年度は、ワクチン接種により SIV 複製制御が認められたサル 5 頭のうち、チャレンジ後約 1 年 2 ヶ月の時点でウイルス血症が再出現した 2 頭の解析から、SIV 複製制御における複数のエピトープ特異的 CTL の関与を明らかにした。今年度は長期解析を継続し、まず、SIV 複製を制御できなかったサル 7 頭全てが 3 年あまりの間にエイズ発症にいたることを確認した。一方、長期にわたって SIV 複製制御が維持されたサル 3 頭の解析から、ワクチンによりセットポイント期の血漿中ウイルス量が非常に低く抑えられれば、新たな CTL エスケープ変異出現も阻止され、長期の複製制御に結びつくことが示された。本研究は、CTL 誘導ワクチン接種による長期の HIV 複製制御およびエイズ発症阻止の可能性を初めて示し、エイズワクチン開発における有効な CTL 誘導の合理性を明らかにした点で極めて重要である。

A. 研究目的

1980 年代前半のエイズ症例の報告以来、HIV 感染者数は増加の一途をたどっており、エイズワクチン開発は国際的最重要課題の一つである。エイズワクチン開発研究が困難を極めていいる要因として、HIV 感染症が慢性持続感染症であることは重要なポイントである。つまり、自然感染経過において、宿主獲得免疫反応が誘導されるにもかかわらずウイルス複製の制御には至らず、ウイルス血症が継続してしまうことが問題である。そのため、予防エイズワクチン開発には、初感染の模倣を基本とする従来のワクチンを超えた新たな視点が必要である。したがって「どのような免疫誘導が HIV 複製制御につながりうるか」という基本的課題を解決し、

エイズワクチン開発のための論理的基盤を確立することが急務であり、開発への近道である。

1990 年代に、HIV 複製抑制におけるウイルス特異的細胞傷害性 T リンパ球(CTL)の重要性が指摘されたことから、CTL 誘導型エイズワクチン開発研究が進展し、2000 年代になって、サルヒトキメラ免疫不全ウイルス(SHIV89.6P)感染急性エイズモデルでの前臨床試験において、ワクチンによるウイルス複製制御が可能であることが報告された。しかしその後、同じワクチン手法を用いた研究にて、ヒト HIV 感染症をより反映すると考えられるサル免疫不全ウイルス(SIV)感染サル慢性エイズモデルでのウイルス複製制御は困難であることが報告され、元来宿主免疫が制御できない慢性ウイルス

持続感染症の制御の難しさがあらためて認識されたところである。

我々はこれまで、CTL 誘導を基本とするエイズワクチン開発に主眼をおき、国際的にも有数の CTL 誘導能を有する DNA プライム・センドライウイルス(SeV)ベクターブーストワクチンシステムを開発し、SHIV89.6P 感染サル急性エイズモデルにおける有効性を明らかにしてきた。本研究では、予防エイズワクチン開発のための論理的基盤の確立を目指し、ワクチン誘導 CTL による HIV 複製制御の可能性の検証を行うことを目的として、SIVmac239 感染サル慢性エイズモデルにおいて、DNA プライム・Gag 発現 SeV (SeV-Gag)ベクターブーストワクチンの SIV 複製抑制効果を解析することとした。

平成 15 年度には、DNA プライム・SeV-Gag ブーストワクチン接種サル 8 頭への SIVmac239 チャレンジ実験を行い、そのうち 5 頭において SIV 複製が制御されることを報告した。これら 5 頭では、チャレンジ後約 1 ヶ月という非常に早期に、各々 1 つの CTL エスケープ変異が選択されたことから、そのエスケープを選択した CTL が極めて有効で野生型 SIV の早期排除に中心的役割を果たしたと考えられた。

平成 16 年度には、これら SIV 複製制御が認められたワクチン接種サル 5 頭の観察を継続したところ、3 頭では SIV 複製制御が維持されたが(長期制御群)、2 頭ではチャレンジ後約 1 年 2 ヶ月の時点でウイルス血症が再出現した(短期制御群)。さらに後者の解析から、本研究で観察された SIV 複製制御における複数のエピトープ特異的 CTL の関与を明らかにした。

今年度はさらに長期の解析を継続するとともに、長期制御群と短期制御群の感染初期について比較検討した。

B. 研究方法

平成 15-16 年度に報告した SIVmac239 チャレンジ実験におけるワクチン非接種群 4 頭および DNA プライム・SeV-Gag ブーストワクチン接種群 8 頭について、チャレンジ後約 3 年間の長期解析を行った。末梢血液中の CD4 陽性 T リンパ球数、血漿中の SIV RNA コピー数等の定量を経時的に行った。エイズ発症が疑われ

るサルについては、末梢血液中の CD4 陽性 T リンパ球数の低下、全身状態の悪化、下痢、呼吸困難などを指標にして安楽殺した後解剖を行い、病理所見を検討したうえでエイズの診断を確定した。

また、ワクチン接種により SIV 複製制御が認められたサル 5 頭については、血漿中の SIV RNA 量が検出下限以下であったセットポイント期の血漿を濃縮した後 RNA を抽出し SIV RNA の定量を行った。この方法では、SIV RNA の検出感度を約 80 コピー/ml にあげることができた。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、倫理面も含めて、国立感染症研究所、医薬基盤研究所および東京大学大学院医学系研究科の動物実験委員会の審査を受け、その承認を得てから、医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターにて開始した。また、用いた組換え生物等については、第二種使用等拡散防止措置確認申請承認(大臣確認)済みである。

C. 研究結果

本実験にて SIV チャレンジを行った 12 頭は、SIV 複製が制御されない非制御群 7 頭(ワクチン非接種サル 4 頭およびワクチン接種サル 3 頭)、ワクチンにより約 1 年あまり SIV 複製が制御されその後ウイルス血症の再出現が認められた短期制御群 2 頭、ワクチンにより 2 年以上 SIV 複製が制御された長期制御群 3 頭に分かれた(図 1)。

非制御群の 7 頭は、いずれも 10^4 - 10^6 コピー/ml 程度の血漿中ウイルス量を維持し(図 1)、末梢血液中の CD4 陽性 T リンパ球数の低下を示しつつ(図 2)、3 年あまり以内にエイズを発症し安楽殺にいたった。

長期制御群 3 頭では、ほぼ 3 年の時点でも SIV 複製は制御されており、血漿中ウイルス量は検出下限以下であった(図 1)。短期制御群 2 頭のセットポイント期の血漿中ウイルスは、標準的な測定法では検出下限以下であったが、濃縮血漿を用いた感度の高い測定法では検出された(表 1)。一方、長期制御群 3 頭のセットポイント期の血漿中ウイルスは、感度の高い測定法でも検出下限以下であった(表 1)。

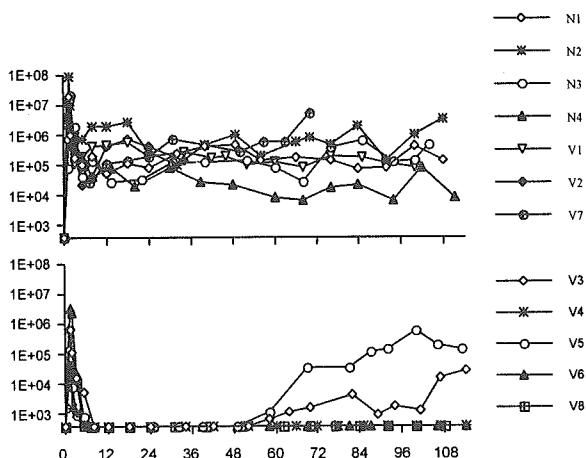


図 1. SIV チャレンジ後の血漿中ウイルス量の経時変化
ワクチン非接種群 4 頭 (N1-N4) および DNA プライム・SeV-Gag ブーストワクチン接種群 8 頭 (V1-V8) の SIVmac239 チャレンジ後の長期経過を示す。横軸はチャレンジ後の週数、縦軸は血漿中 SIV RNA コピー数(/ml)。上段は SIV 複製非制御群 7 頭 (ワクチン非接種群 4 頭およびワクチン接種群 3 頭)、下段はワクチンによる SIV 複製制御群 5 頭 (短期制御群 2 頭および長期制御群 3 頭)。

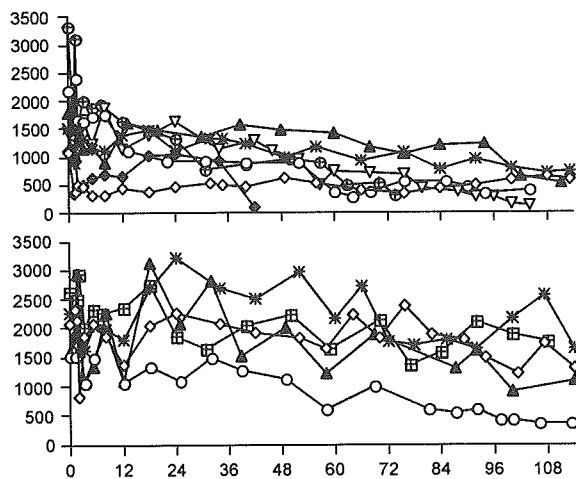


図 2. SIV チャレンジ後の末梢血液中 CD4 陽性 T リンパ球数の経時変化
図 1 と同様。非制御群 7 頭は全て 3 年あまりの間にエイズを発症した。

V5	wk 12 positive	wk 25 positive		
V3	wk 12 positive	wk 24 positive		
V4	wk 12 negative	wk 24 negative	wk 60 negative	wk 100 negative
V6	wk 12 negative	wk 25 negative	wk 58 negative	wk 100 negative
V8	wk 12 negative	wk 24 negative	wk 50 negative	wk 100 negative

表 1. SIV 複製短期制御群 2 頭 (V5, V3) と長期制御群 3 頭 (V4, V6, V8) における高感度の測定法による血漿中 SIV RNA 検出の有無

D. 考察

チャレンジ後 3 年あまりの経過観察にて、非制御群 7 頭が全てエイズ発症にいたったことから、本研究で用いている SIV 感染ビルマ産アカゲサルモデルは、慢性エイズモデルとして適していることが確認された。一方、長期制御群では、ウイルス血症は検出下限以下のままであったことから、これら 3 頭ではワクチンによりエイズ発症の阻止 (少なくとも遅延) につながったと考えられた。

短期制御群と長期制御群の感染初期のウイルス量の比較検討から、ワクチンにより、セットポイント期の血漿中ウイルス量を高感度の測定法でも検出不能なレベルにまで下げることができれば、新たな CTL エスケープ変異の出現を阻止し、長期の SIV 複製制御・エイズ発症阻止につながることが示唆された。

したがって、本研究により平成 15 年度からの 3 年間で得られた成果は以下のようにまとめられる。(1) ワクチン誘導 CTL による長期の HIV 複製制御およびエイズ発症阻止の可能性を初めて示し、CTL 誘導エイズワクチン開発の合理性を示した。(2) HIV 複製制御には、複数の有効なエピトープ特異的 CTL の誘導が重要であることを示し、エイズワクチン開発における抗原選択の重要性を示した。

E. 結論

本研究は、CTL 誘導ワクチン接種による長期の HIV 複製制御・エイズ発症阻止の可能性を初めて示すものである。この長期のウイルス複製制御の維持には、セットポイント期の血漿中ウイルス量を極めて低いレベルに抑制し、新たな CTL エスケープ変異の出現を抑制することが重要であると考えられる。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kato, M., Igarashi, H., Takeda, A., Sasaki, Y., Nakamura, H., Kano, M., Sata, T., Iida, A., Hasegawa, M., Horie, S., Higashihara, E.,

- Nagai, Y., and Matano, T. Induction of Gag-specific T-cell responses by therapeutic immunization with a Gag-expressing Sendai virus vector in macaques chronically infected with simian-human immunodeficiency virus. *Vaccine* 23:3166-3173, 2005.
- 2) Mori, K., Sugimoto, C., Ohgimoto, S., Shioda, T., Kusagawa, S., Takebe, Y., Kano, M., Matano, T., Yuasa, T., Kitaguchi, D., Miyazawa, M., Takahashi, Y., Yasunami, M., Kimura, A., Yamamoto, N., Suzuki, Y., and Nagai, Y. Influence of glycosylation on the efficacy of an Env-based vaccine against SIVmac239 in a macaque AIDS model. *J. Virol.* 79:10386-10396, 2005.
 - 3) Kobayashi, M., Igarashi, H., Takeda, A., Kato, M., and Matano, T. Reversion in vivo after inoculation of a molecular proviral DNA clone of simian immunodeficiency virus with a cytotoxic-T-lymphocyte escape mutation. *J. Virol.* 79:11529-11532, 2005.
 - 4) Kawada, M., Igarashi, H., Takeda, A., Tsukamoto, T., Yamamoto, H., Dohki, S., Takiguchi, M., and Matano, T. Involvement of multiple epitope-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in vaccine-based control of simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques. *J. Virol.* 80:1949-1958, 2006.
2. 学会発表
- 1) Kawada, M., Tsukamoto, T., Igarashi, H., Takeda, A., and Matano, T. Reappearance of plasma viremia with accumulation of CTL escape mutations after vaccine-based control of SIVmac239 replication. Keystone Symposium (X8): HIV Vaccines (Current Challenges and Futur Prospects), Banff, Alberta, Canada, April, 2005.
 - 2) Kawada M, Kobayashi M, Yamamoto H, Igarashi H, Takeda A, Matano T: Long-term analysis of rhesus macaques that showed prophylactic vaccine-based control of SIVmac239 replication. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, MoA03, Kobe, Japan, 7/4/2005.
 - 3) Matano T: Contribution of vaccine-induced cellular immune responses to viral suppression: analysis in macaque AIDS models. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, Kobe, Japan, July, 2005.
 - 4) Matano T, Kawada M, Yamamoto H, Igarashi H, Takeda A: Long-Term Control of Simian-Human Immunodeficiency Virus 89.6P Replication in A Preclinical Trial of CTL-Based AIDS Vaccines. The International Congress of Virology, San Francisco, CA, USA, July, 2005.
 - 5) Matano T: Multiple epitope-specific CTL-based control of SIV replication in rhesus macaques. International Symposium: The Cooperative Research Project on Clinical and Epidemiological Studies of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases. Kumamoto, Japan, September, 2005.
 - 6) 俣野哲朗:サルモデルにおけるエイズワクチンの解析. 霊長類モデルでのバイオメディカル研究の新展開-2005(犬山) 2005.10.
 - 7) 俣野哲朗:Correlation between MHC genotype and viral control: protective efficacy of MHC-restricted epitope-specific CTL responses against simian immunodeficiency virus infection in macaques. 家畜ゲノム国際ワークショップ(東京) 2005.11.
 - 8) Moriya C, Matano T: DNA/Sendai prome-boost vaccines. 第10回汎太平洋新興感染症国際会議、ハノイ、ベトナム、November, 2005.
 - 9) 山本浩之、五十嵐博子、武田明子、川田真幹、俣野哲朗:CTL誘導型予防エイズワクチンによるSIV/SHIV複製制御における de novo 中和抗体の寄与の比較. 第53回日本ウイルス学会学術集会(横浜) 2005.11.
 - 10) 川田真幹、俣野哲朗:ワクチンによるSIV複製の初期制御後、CTLエスケープ変異の蓄積により複製能低下にもかかわらず再出現したウイルス血症. 第18回日本エイズ学会学術集会(熊本) 2005.12.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
無し

3. 遺伝子改変 SHIV を用いた弱毒生ワクチンと半生 DNA ワクチンの開発

分担研究者 三浦 智行 京都大学ウイルス研究所 助教授

本年度は、強毒／弱毒SHIV分子クローンの感染初期の全身リンパ系組織と腸管におけるウイルス感染動態と免疫細胞応答を解析した。まず、強毒SHIV-KS661は、胸腺でよく増殖し、胸腺T前駆細胞に対して分化増殖障害を引き起こすが、弱毒SHIV-cl64は、胸腺への病原性が弱く、T前駆細胞に対して分化増殖障害を起こさないことを明らかにした。また、これら両株は感染初期において全身への拡散速度やCD4陽性T細胞に対する障害作用が大きく異なり、それら差異がその後の病態に深く関与するものと考えられた。しかし、弱毒SHIV感染においても小腸のCD4陽性T細胞だけは感染初期から急速に減少することが明らかとなったことから、小腸がエイズウイルスの標的臓器として重要であることが示唆された。半生DNAワクチンの投与方法として坐薬を用いたところ、効果的に細胞性免疫が誘導されることを確認したが、感染防御効果は不十分であった。

A. 研究目的

SHIV-アカゲザルの感染・発症モデルにおける感染個体レベルでの病原性を解析することにより、生ワクチンの強力な感染防御効果を保持しつつ安全性も確保されたヒト用エイズワクチンを開発することを目的とする。ワクチンの歴史において特異的及び非特異的防御反応を強力に誘導できる弱毒生ワクチンが最も有効であることが証明されてきたが、HIV では変異による強毒化の可能性から生ワクチンについては危惧視され、殆どその開発は進められていない。SHIVはサルとヒトの両方で増殖可能であり、サルで有効性と安全性を確認できることから、より実用化に近い形でワクチン候補を開発し、また、その過程でSHIVの強毒性・弱毒性についても明らかにする。

B. 研究方法

- 1) 強毒／弱毒 SHIV 分子クローンについて比較ゲノム解析を行い、サル感染実験により塩基配列の違いと病原性との関係を明らかにする。
- 2) 強毒／弱毒 SHIV 接種サルにおける体内深部組織における感染動態と免疫応答について比較解析し、感染制御に重要な免疫機構を明らかにする。
- 3) 半生 DNA ワクチンの投与部位やデリバリ

一法について検討し、それらの免疫誘導能及び感染防御効果を解析する。

(倫理面への配慮)

本研究所では霊長類委員会によってサルを用いた実験の妥当性の検討とサルの適切な飼育と使用の監視がなされている。また、組換えSHIV感染実験については第二種使用等をする間に執る拡散防止措置について大臣確認されている。

C. 研究結果

- 1) 昨年度の研究でクローズアップされた 4ヶ所の変異(primer binding site、逆転写酵素、env-gp41 の 2ヶ所)の意義について確認するため、一つ一つの変異を弱毒クローン SHIV-cl64 に導入した分子クローンあるいはいくつかの変異を組合せた分子クローンを作製し、in vitro における感染性や増殖能を検討した。その結果、env-gp41 の変異により ELISA で測定した gag-p27 抗原量あたりのウイルス感受性 M8166 細胞株に対する感染力価が 40 倍程度上昇することを明らかにした。しかし、ウイルス非感受性の 293T 細胞株に provirus DNA をトランスフェクションすることにより一過性に培養上清中に産生されるウイルス gag-p27 抗原量に変化はなかった。これに対して、primer binding site