

と逆転写酵素に変異を持つクローンは、gag-p27 抗原量あたりの感染力価に変化はないが、トランスフェクションされた provirus DNA 量あたりのウイルス産生量が 2~3 倍上昇することがわかった。4ヶ所の変異すべてを有するクローンは、強毒 SHIV-KS661 とほぼ同様の性質を示した (図 1)。

2) HIV 感染における特徴的な病態として CD4 陽性 T 細胞の減少が知られている。その原因の一つとして、胸腺機能の低下にともなう CD4 陽性 T 細胞の *de novo* 産生の抑制が示唆されている。我々は、感染による胸腺内成熟 T 細胞の直接破壊だけでなく、未成熟な T 細胞の分化増殖障害が *de novo* 産生の抑制に関与している可能性を考え、静脈内接種により一ヶ月以内に末梢血 CD4 陽性 T 細胞を枯渇させる急性発症型強毒 SHIV-KS661 と慢性経過をたどる弱毒 SHIV-cl64 について、より自然感染に近い粘膜感染初期の胸腺内 T 前駆細胞およびその分化増殖能を比較解析した。強毒 SHIV-KS661 と弱毒 SHIV-cl64 をアカゲザル 6 頭に経直腸感染させ、6、13、27 日目に剖検を行い、採取した胸腺のプロウイルス量の測定および FACS 解析を行った。さらに、胸腺内 T 前駆細胞 (CD3-/CD4-/CD8-) をソーティングし、デオキシングアノシン処理したマウスの胎児胸腺と共培養 (FTOC) を行なうことで、分化増殖能の検討を行った。接種後 4 週間では、血漿中ウイルス RNA 量の動態と血中 CD4 陽性 T 細胞の減少は KS661 と cl64 感染ザルで大差なかったが、胸腺組織での感染性ウイルス量とプロウイルス量は KS661 感染ザルの方が cl64 感染ザルよりかなり高かった。また、KS661 感染ザルでは CD4 陽性 T 細胞だけでなく CD4+/CD8+ 共陽性 (DP) 細胞の減少が見られたが、cl64 感染ザルでの減少は見られなかった。さらに、FTOC による CD3-/CD4-/CD8-細胞の分化増殖能を調べたところ、KS661 感染ザルから感染 6 日目以降に採取したものは、DP 細胞に殆ど分化増殖しなかったのに対して、cl64 感染ザルではいずれも DP 細胞に分化増殖した (図 2)。強毒/弱毒 SHIV 感染初期において見られた胸腺内の T 前駆細胞の分化増殖能の差が、その後の病態の違い (末梢血 CD4 陽性 T 細胞の枯渇の有無) に繋がるものと考えられた。

一方、同じサル感染実験において全身リンパ系組織と腸管を採取し、それらより分離したリンパ球のプロウイルス DNA を定量 PCR 法により定量、感染性ウイルス産生細胞数をプラークアッセイにより定量した。また、リンパ球中 CD4 陽性 T 細胞のポピュレーションの変化を解析した。その結果、強毒 SHIV-KS661 感染サルでは接種 13 日後に全身リンパ系組織と腸管においてプロウイルス DNA 量、ウイルス産生細胞数が同時多発的にピークをむかえ、27 日後ではプロウイルス DNA 量と共にウイルス産生細胞数は著減し、CD4 陽性 T 細胞は全身リンパ系組織と腸管で枯渇状態だった。これに対し、弱毒 SHIV-cl64 感染サルではプロウイルス DNA 量は全身リンパ系組織で 27 日後がピークであり、ウイルス産生細胞は 6 日後に腸管、13 日後に腸間膜リンパ節、27 日後には胸腺でピークが見られるといったように、接種部位から順に増殖部位が移行する様子が観察された。また、27 日後までに小腸でのみ CD4 陽性 T 細胞の著しい減少がみられた (図 3)。よって、これら両株は感染初期において全身への拡散速度、CD4 陽性 T 細胞障害作用が大きく異なり、それら差異がその後の病態に関与するものと考えられた。

3) 腸管粘膜に免疫反応を誘導することを目的として非感染性ウイルス粒子を産生するフルゲノム DNA ワクチンを坐薬基剤と混合してサルの直腸に投与したところ、最小 3~4 回の投与で効果的にウイルス抗原に反応して増殖する細胞が末梢血中に誘導されることを確認した。しかし、IgG、IgA 等の液性免疫の誘導には至らず、攻撃接種に対する感染防御効果は不十分であった。

D. 考 察

半生 DNA ワクチンの防御効果は未だ不十分であり、当初の目標である「3年間で具体的なワクチン候補を提案する」までに至らなかったのは残念である。しかし、着実に成果を積み重ね研究を進展させた。特に本年度、霊長類モデルを用いることによってはじめて可能な腸管や全身リンパ系組織における詳細な実験解析基盤を確立できたことにより、エイズウイルスの真の標的、すなわち防御すべき標的を明ら

かにする道が開けたと考える。これまで血中ウイルス量の減少と末梢血CD4の回復がエイズの治療目標とされてきたが、近年、SIVサルモデル研究やヒトのエイズ患者での研究により、腸管CD4の枯渇がエイズの主要な病態として注目されるようになってきており、本研究により、感染力の弱いSHIV感染において小腸のCD4のみが枯渇することが明らかとなったことから、腸管の中でも特に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。また、強毒/弱毒SHIVの感染初期における胸腺T前駆細胞に対する増殖分化障害が病原性に重要であることが示唆された。胸腺におけるCD4陽性T細胞の増殖分化機構については解明されていない点が多いことから、今後SHIV感染によるCD4陽性T細胞の増殖分化障害発生機序を追究することにより、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るものと期待される。

E. 結 論

霊長類モデルの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応答の実験解析基盤が確立でき、エイズウイルスの病原性解明に向けて大きく前進した。特に、小腸がエイズウイルスの標的臓器として重要であり、新たなエイズ予防・治療戦略の必要性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Motohara M, Ibuki K, Miyake A, Fukazawa Y, Inaba K, Suzuki H, Masuda K, Minato N, Kawamoto H, Nakasone T, Honda M, Hayami M, Miura T: Impaired T cell differentiation in the thymus at the early stages of acute pathogenic SHIV infection in contrast to less pathogenic SHIV infection. *Microb Infect.* (in press)
- 2) Miyake A, Ibuki K, Enose Y, Suzuki Y, Horiuchi R, Motohara M, Saito N, Nakasone T, Honda M, Watanabe T, Miura T, 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)
- 3) Horiuchi R, Akahata W, Kuwata T, Enose Y, Ido E, Suzuki H, Miyake A, Saito N, Ibuki K, Goto T, Miura T, 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)
- 4) Shimizu Y, Okoba M, Yamazaki N, Goto Y, Miura T, Hayami M, Hoshino H, Haga T: Construction and in vitro characterization of a chimeric simian and human immunodeficiency virus with the RANTES gene. *Microb Infect* 8:105-113, 2006.
- 5) Kaneyasu K, Kita M, Ohkura S, Yamamoto T, Ibuki K, Enose Y, Sato A, Kodama M, Miura T, Hayami M: Protective efficacy of nonpathogenic nef-deleted SHIV vaccination combined with recombinant IFN- γ administration against a pathogenic SHIV challenge in rhesus monkeys. *Microbiol Immunol* 49:1083-1094, 2005.
- 6) Shimizu Y, Miyazaki Y, Ibuki K, Suzuki H, Kaneyasu K, Goto Y, Hayami M, Miura T, 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* 343:151-161, 2005.
- 7) Saito N, Takahashi M, Akahata W, Ido E, Hidaka C, Ibuki K, Miura T, Hayami M, Takahashi H: Analysis of evolutionary conservation in CD1d molecules among primates. *Tissue Antigens* 66:674-682, 2005.
- 8) Suzuki H, Motohara M, Miyake A, Ibuki K, Fukazawa Y, Inaba K, Masuda K, Minato N, Kawamoto H, Hayami M, Miura T: Intrathymic effect of acute pathogenic SHIV infection on T-lineage cells in newborn macaques. *Microbiol Immunol* 49:667-679, 2005.

- 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) Takahashi M, Ido E, Uesaka H, Fukushima T, Ibuki K, Miura T., Hayami M, Takahashi H: Comparison of susceptibility to SIVmac239 infection between CD4+ and CD4+8+ T cells. *Arch Virol* 150:1517-1528, 2005.
- 11) Takemura T, Ekwalanga M, Bikandou B, Ido E, Yamaguchi-Kabata Y, Ohkura S, Harada H, Takehisa J, Ichimura H, Parra H-J, Nende M, Mubwo E, Sepole M, Hayami M, Miura T.: A novel SIV from black mangabey (*Lophocebus aterrimus*) in Democratic Republic of Congo. *J Gen Virol* 86:1967-1971, 2005.
- 12) Kurbanov F, Tanaka Y, Fujiwara K, Sugauchi F, Mbanya D, Zekeng L, Ndembu N, Ngansop C, Miura T., Ido E, Hayami M, Ichimura H, Mizokami M: A new subtype (subgenotype) Ac (A3) of hepatitis B virus and recombination between genotype A and E in Cameroon. *J Gen Virol* 86:2047-2056, 2005.
- 13) Okura S, Yamashita M, Ishida T, Babu P-G, Koyanagi Y, Yamamoto N, Miura T., Hayami M: Phylogenetic heterogeneity of new HTLV type 1 isolates from southern India in subgroup A. *AIDS Res Hum Retrovir* 21:325-330, 2005.
2. 学会発表
- 1) Kozyrev, Y., Sakai, K., Takahashi, E., Shinohara, K., Takemura, T., Inaba, K., Suzuki, H., Ibuki, K., Hayami, M. and Miura, T.: Investigation of acute pathogenesis of simian and human immunodeficiency chimeric virus (SHIV) by comparison of its molecular clones with different pathogenic abilities. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, Kobe, July, 2005.
- 2) Motohara, M., Ibuki, K., Miyake, A., Masuda, K., Minato, N., Kawamoto, H., Nakasone, T., Honda, M., Hayami, M. and Miura, T.: Impaired T cell differentiation in thymus at the early stage of highly pathogenic SHIV infection in monkeys in comparison to low pathogenic SHIV infection. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, Kobe, July, 2005.
- 3) Ido, E., Akiyama, H., Suzuki, H., Ibuki, K., Ishimatsu, M., Miura, T. and Hayami, M.: Generation of novel SHIVs having HIV-1-derived pol genes and their potential usefulness in AIDS studies. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, Kobe, July, 2005.
- 4) Ibuki, K., Miyake, A., Horiuchi, R., Saitou, N., Suzuki, H., Motohara, M., Fukaszawa, Y., Inaba, K., Miura, T. and Hayami, M.: The effects of low-pathogenic SHIV intrarectal infection on immune cell population of the intestinal tract in comparison to acute-pathogenic SHIV infection. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, Kobe, July, 2005.
- 5) Horiuchi, R., Ido, E., Akahata, W., Enose, Y., Ibuki, K., Miura, T., Goto, T., Takahashi, H. and Hayami, M.: DNA vaccination of macaques by full-sized SHIV plasmids that produce non-infectious virus particles. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, Kobe, July, 2005.
- 6) 三浦智行: SHIV の遺伝子と病原性、「サルを用いた感染症研究の現状と今後」会議、京都、平成 17 年 9 月
- 7) 三浦智行: 京大ウイルス研 P3 サル感染実験施設の紹介、「サルを用いた感染症研究の現状と今後」会議、京都、平成 17 年 9 月
- 8) Kozyrev, Y., Sakai, K., Takahashi, E., Shinohara, K., Takemura, T., Inaba, K., Suzuki, H., Ibuki, K., Hayami M. and Miura, T.: Investigation of acute pathogenesis of simian and human immunodeficiency chimeric virus by comparison of its molecular clones with different pathogenic abilities. 23rd Annual symposium on nonhuman primate models for

- AIDS, Portland, September, 2005.
- 9) Motohara, M., Ibuki, K., Miyake, A., Fukazawa, Y., Inaba, K., Suzuki, H., Masuda, K., Minato, N., Kawamoto, H., Nakasone, T., Honda, M., Hayami, M. and Miura, T.: Impaired T cell differentiation in the thymus at the early stages of acute pathogenic SHIV infection in monkeys in comparison to low pathogenic SHIV infection. 23rd Annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, Portland, September, 2005.
 - 10) Ishimatsu, M., Ido, E., Suzuki, H., Akiyama, H., Miura, T. and Hayami, M.: Generation of a novel SHIV that possesses HIV-1-derived protease gene and its infection to macaque monkeys: a useful tool for *in vivo* efficacy tests towards HIV protease inhibitors. 23rd Annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, Portland, September, 2005.
 - 11) Ibuki, K., Miyake, A., Horiuchi, R., Saitou, N., Suzuki, H., Motohara, M., Fukazawa, Y., Inaba, K., Miura, T. and Hayami, M.: The effects of low-pathogenic SHIV intrarectal infection on immune cell population of the intestinal tract in comparison to acute-pathogenic SHIV infection. 23rd Annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, Portland, September, 2005.
 - 12) Saitou, N., Takahashi, M., Akahata, W., Ido, E., Hidaka, C., Ibuki, K., Miura, T., Hayami, M. and Takahashi, H.: Evolutional conservation of the CD1d molecules among primates. 23rd Annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, Portland, September, 2005.
 - 13) 松山めぐみ、小勝史子、堀内励生、深澤嘉伯、三宅在子、稲葉一寿、伊吹謙太郎、速水正憲、三浦智行：強毒 SHIV 感染サル の全身臓器におけるウイルス変異の解析。第 53 回日本ウイルス学会(横浜)平成 17 年 11 月
 - 14) 稲葉一寿、深澤嘉伯、堀内励生、三宅在子、松田健太、松山めぐみ、姫野愛、伊吹謙太郎、速水正憲、三浦智行：強毒 SHIV の経粘膜・経静脈感染アカゲザルの感染病態および腸病変の比較解析。第 53 回日本ウイルス学会(横浜)平成 17 年 11 月
 - 15) 石松美沙、井戸栄治、鈴木 元、秋山尚志、三浦智行、速水正憲：SIVmac に HIV-1 のプロテアーゼ(PR)遺伝子を組み込んだ SHIV-pr 感染アカゲサルにおける PR 阻害剤投与実験とその遺伝子変異解析。第 53 回日本ウイルス学会(横浜)平成 17 年 11 月
 - 16) 秋山尚志、井戸栄治、三浦智行、速水正憲：HIV-1 の逆転写酵素、インテグラーゼおよび 3'側遺伝子を持つ SHIV のサル細胞順化機序の解析。第 53 回日本ウイルス学会(横浜)平成 17 年 11 月
 - 17) 石田尚臣、伊吹謙太郎、濱野章子、三宅在子、鈴木一雄、三浦智行、Cooper David、速水正憲、渡邊俊樹：HIV-1 プロウイルス LTR のメチル化解析。第 53 回日本ウイルス学会(横浜)平成 17 年 11 月
 - 18) 三宅在子、石田尚臣、深澤嘉伯、伊吹謙太郎、三浦智行、速水正憲、渡邊俊樹：SHIV 感染サル検体を用いた感染初期および後期におけるプロウイルス LTR 上のヒストン化学修飾状態の解析。第 53 回日本ウイルス学会(横浜)平成 17 年 11 月
 - 19) 元原麻貴子、伊吹謙太郎、三宅在子、深澤嘉伯、稲葉一寿、鈴木元、増田恭子、河本宏、仲宗根正、本多三男、速水正憲、三浦智行：強毒・弱毒 SHIV の感染初期における胸腺組織及び胸腺内 T 前駆細胞の解析。第 19 回日本エイズ学会(熊本)平成 17 年 12 月
 - 20) 深澤嘉伯、三宅在子、伊吹謙太郎、鈴木元、堀内励生、斉藤尚紀、元原麻貴子、稲葉一寿、姫野愛、渡邊俊樹、三浦智行、速水正憲：強毒、弱毒 SHIV 粘膜感染初期の全身臓器におけるウイルス動態の解析。第 19 回日本エイズ学会(熊本)平成 17 年 12 月
 - 21) 兼安健太郎、伊吹謙太郎、大倉定之、姫野愛、喜多正和、山本俊郎、佐藤彰彦、三浦智行、速水正憲：nef 欠損弱毒 SHIV のワクチン効果に対する rIFN- γ 投与の増強効果。第 19 回日本エイズ学会(熊本)平成 17 年 12 月
 - 22) 高橋秀実、高橋めぐみ、齋藤尚紀、守屋慶一、上坂浩実、福島達伸、井戸栄治、伊吹謙太郎、三浦智行、速水正憲：サル CD4+T 細胞と CD4+CD8+T 細胞の SIVmac239 に対する感受性の差異。第 19 回日本エイズ学会(熊本)

平成 17 年 12 月

- 23) 井戸栄治、石松美沙、秋山尚志、三浦智行、速水正憲：逆転写酵素とインテグラーゼ遺伝子が HIV-1 由来の SHIV-rti のサル感染実験. 第 19 回日本エイズ学会(熊本)平成 17 年 12 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称：「アポトーシス誘導物質を含む医

薬組成物」

出願番号：特願 2004-298188 (平成 16 年 10 月 12 日出願)

出願人：(独) 理化学研究所 (発明者持分 20% を理化学研究所に承継)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

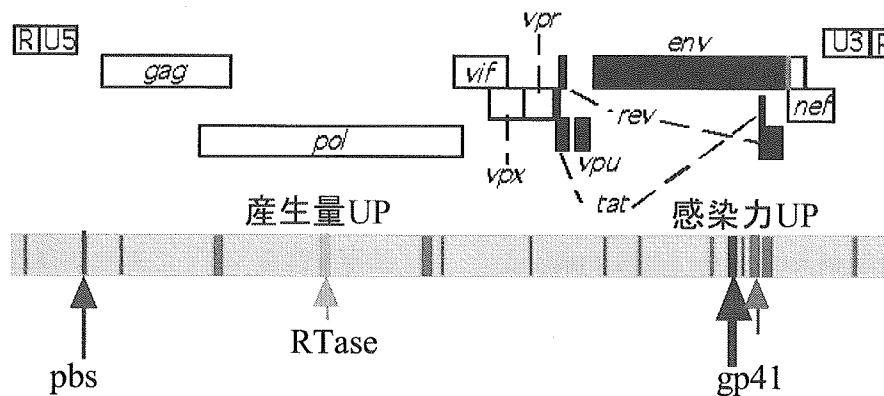
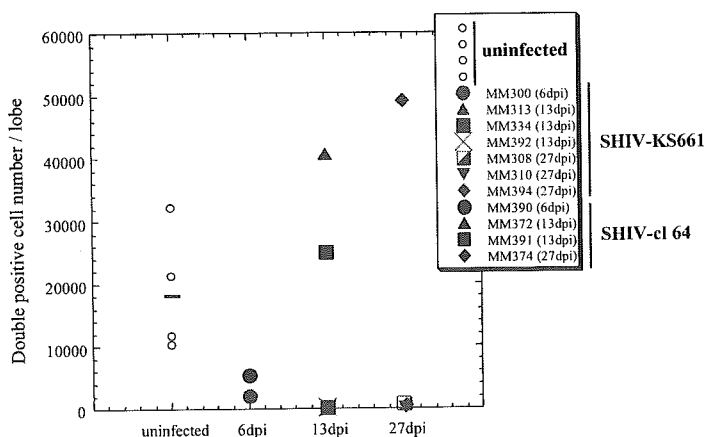


図1. 強毒 SHIV-KS661 と弱毒 SHIV-cl64 のゲノム上の塩基配列の違いは 16 ケ所であり、このうち primer binding site、逆転写酵素および *env*-*gp41* (2 ケ所) の計 4 ケ所が感染サル個体における病原性に関わることが示唆されており、ウイルスの感染力価を約 40 倍高める *env*-*gp41* の変異が特に重要と考えられた。

SHIV-KS661 は、胸腺の増殖・分化能を障害するが
SHIV-cl64 は障害しない。



Motohara, M. et al, Microbes & Infection, in press.

図2. 感染初期における胸腺 T 前駆細胞の分化増殖能の解析。
2000 個の CD3-/CD4-/CD8-T 前駆細胞をデオキシグアノシン処理したマウスの胎児胸腺と 14 日間共培養を行なうことにより CD4+/CD8+細胞に分化増殖した細胞数をプロットしたもの。非感染サルでは、10000~32000 個に分化増殖する。強毒 SHIV-KS661 感染サルでは感染 6、13、27 日後の全てにおいて殆ど分化増殖しないが、弱毒 SHIV-cl64 感染サルでは非感染サルと同等もしくはそれ以上に分化増殖する。

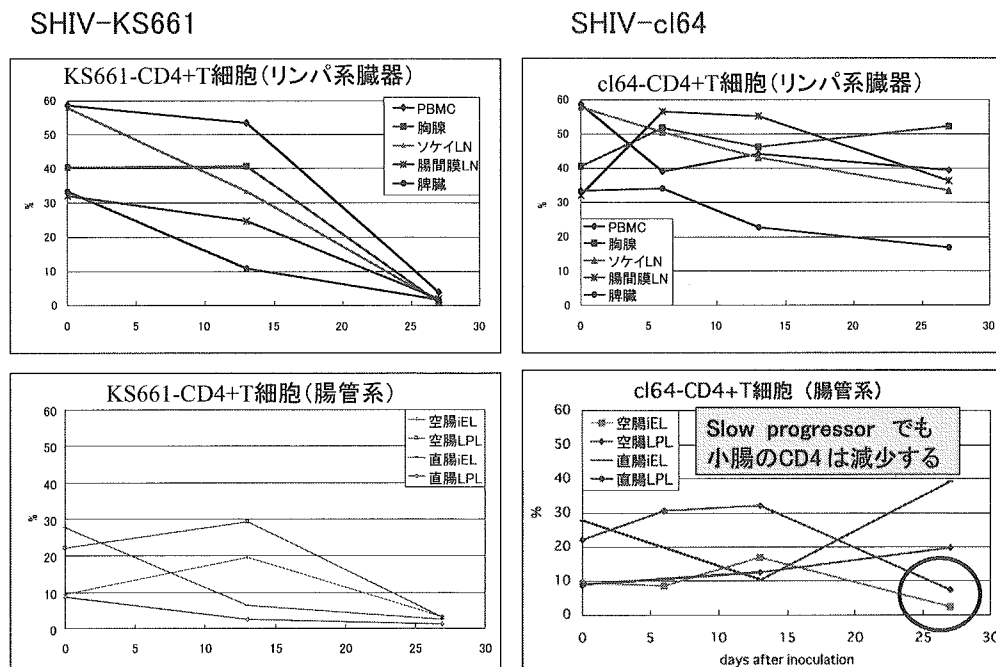


図3. 感染初期における全身リンパ系組織と腸管におけるCD4陽性T細胞数の変化。強毒SHIV-KS661感染サルでは感染27日後までに全身のCD4陽性T細胞が枯渇する。弱毒SHIV-cl64感染サルでは、小腸のCD4陽性T細胞のみが急速に減少する。

4. BCG と DI_s 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 コドンの至適化と免疫誘導能を増幅した第2世代 BCG・DI_s 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い、既往症反応を超えてこのプライムブーストワクチンが免疫誘導を有効に惹起することをマウス、サルモデルで見いだした。さらに R5 ウイルスのチャレンジによるワクチン効果を検討するために SIV mac239 と SHIV SF2 ウイルスを用いたカニクイザル感染系モデル系を確立した。現在そのチャレンジのためにサルのケージ待ちである。具体的にはこれまで行われた3年間の成果として組換え BCG ワクチンと DI_s 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することができた。DI_s ワクチンの安全性の特徴を生かすべく DNA ワクチンとのコンビネーションにおいて著明なブースター効果を誘導することが可能となり、治療用ワクチンの可能性を示唆した。従ってこの3年間の研究において前臨床レベルでのワクチン効果と安全性・安定性評価をほぼ終了することができた。今後第2世代ワクチンの実用化を計るとともに第3世代ワクチンとしての感染防御を目的とした細胞性免疫及び液性免疫主導型ワクチンの開発を行う。既に前実験で有効な中和抗体の受身免疫による完全な感染防御と、*in vitro* における能動免疫による中和抗体産生の基礎データを得ており、これらの成果に基づいて上記の細胞性及び抗体主導型ワクチンのコンセプトの確立を目指した研究を行う計画である。

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 DI_s 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実用化を行うことを目的として、前臨床レベルの開発を完成させ、その有用性について評価を受けることを目的とする。

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) 16年度までに開発することができた改良型プライムブーストワクチンのワクチン効果を得るためのレジメンの至適化をサルの系で計る
- 2) ワクチン抗原の製造や評価に関する基準を作成し、それにもとづきパイロットプロダクションの可能性を検討する。

(倫理面への配慮)

サル及び動物実験については全ての各研究者の研究施設における倫理規定に従って研究を行う。感染研における臨床サンプルの取扱いについては感染研の倫理規定に従って研究を行うが、既に医学研究倫理審査会の承認を得ている。また、動物実験に関しては動物の倫理問題を含めて実験計画が動物実験委員会で検討されるので全ての動物実験は動物実験委員会の承認を得て行う。さらに、ワクチンの構築等に関しては倫理問題も加味して、科学技術庁、感染研の組換え DNA 安全委員会の承認が得られておりそれに従って遂行する。

C. 研究結果

1. 組換え BCG ワクチンと DI_s 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することができた (Ami et al. J. Virol. 2005)。

2. DI_s ワクチンの安全性の特徴を生かすべく

DNA ワクチンとのコンビネーションにおいて著明なブースター効果を誘導することが可能となり、治療用ワクチンの可能性を示唆した (Someya et al. J. Immunol. 2006)。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。

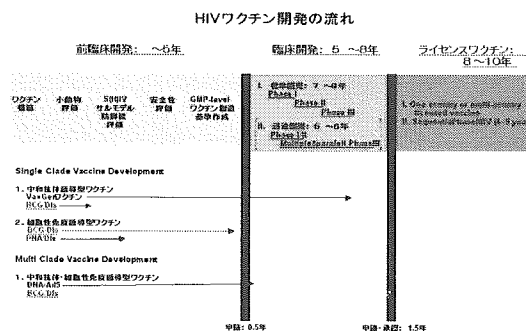
3. DNA/DIs 免疫マウスで見られた免疫誘導能と感染防御能は、サルを免疫動物として用いた場合でも再現することからプライムブーストレジメンによる DIs ワクチンの有用性が明らかになった。

4. 組換え BCG ワクチンの有用性と安全性の比較を行った。

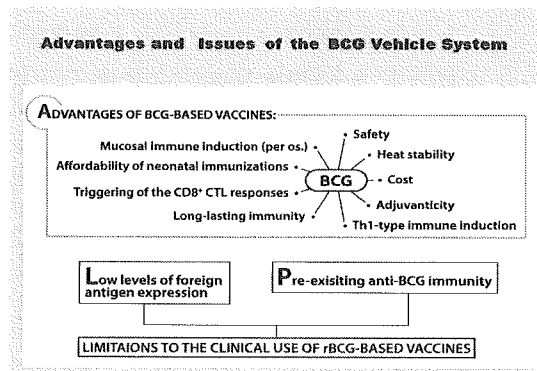
1) 組換え BCG ワクチンは結核ワクチンとしての BCG ワクチンの世界的な使用によりその有用性が期待されている。しかし、実用化のためには免疫能と安全性を科学的に明らかにする必要がある。そのモデルとして Gag 蛋白遺伝子を挿入した組換えワクチンを作成し、その有用性を明らかにしてきたが、本研究では液性免疫、特に中和抗体の意義について検討した。分泌型 α 抗原蛋白のループの先端部分に V3 遺伝子を挿入し発現させるとサルで抗体反応が認められ、その抗体は X4 ウイルスを中和することができる。少数ではあるが野生型の MN_P ウイルスや、NHI ウイルスを中和した。しかし、R5 ウイルスの中和は困難であった。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。

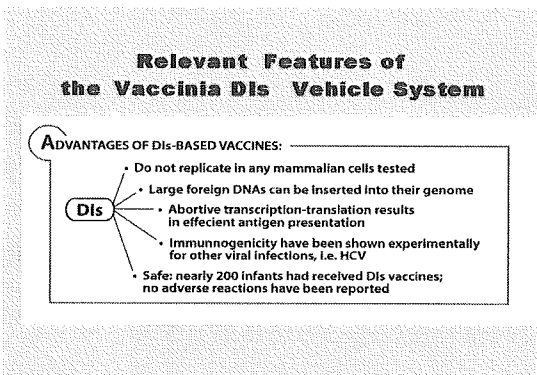
(1)



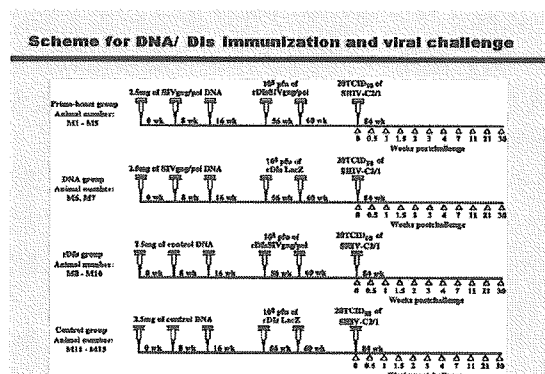
(2)



(3)



(4)



D. 考 察

本年度の研究で BCG-DIs のプライムブーストワクチンの前臨床レベルでの開発のメドをつけることができた。実用化研究を進めてワクチンレジメンの至適化を計り、ワクチンの臨床試行の可能性について検討の必要性が示唆された。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。

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。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、組換えワクチニア 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。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. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kanekiyo, M., K. Matsuo, M. Hamatake, T. Hamano, T. Ohsu, S. Matsumoto, T. Yamada, S. Yamazaki, A. Hasegawa, N. Yamamoto, and M. Honda 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(14):8716-8723, 2005.
- 2) 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.
- 3) 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.* 179: 1784-1795, 2006.
 - 4) 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, 2006.
 - 5) Takizawa M, Chiba J, Haga S, Asano T, Yamazaki T, Yamamoto N, Honda M. Novel two-parameter flow cytometry (MIL4/ SSC followed by MIL4/CT7) allows for identification of five fractions of guinea pig leukocytes in peripheral blood and lymphoid organs. *J. Immunol. Methods* in press, 2005.
2. 学会発表
- 1) 本多三男、兼清優、松尾和浩、網康至、山本直樹 リコンビナントワクチンによるサルエイズモデルのコントロール因子の解析「サルを用いた感染症研究の現状と今後」会議 (9/16-17, 2005, 京都)
 - 2) Mitsuo Honda, Naoki Yamamoto and other AIDS Vaccine Development Group New Collaborative Japan Vaccine against HIV/AIDS 第18回日米エイズ会議/第10回汎太平洋新興感染症国際会議 (11/14-18, 2005, ハノイ)
 - 3) 岡村智崇、志田壽利、長谷川篤彦、山本直樹、本多三男 高発現型ワクシニア Promoter を用いた高度弱毒化ワクシニア DIs の至適化 第53回日本ウイルス学会学術集会 (11/20-22, 2005, 横浜)
 - 4) 渡辺哲、寺嶋一夫、太田信頼、矢島美彩子、塩沢容子、渡邊健、清水則夫、本多三男、山本直樹 NOG マウスで確立された全身性HIV-1感染系 第53回日本ウイルス学会学術集会 (11/20-22, 2005, 横浜)
 - 5) 吉野直人、兼清優、萩原由加利、染谷健二、松尾和浩、網康至、佐藤成大、山本直樹、本多三男 リコンビナント DIs ワクチンの経皮接種による粘膜免疫誘導 第19回日本エイズ学会学術集会 (12/1-3, 2005, 熊本)
 - 6) 岡村智崇、松尾和浩、兼清優、堀端重男、長谷川篤彦、山本直樹、本多三男 修飾型 HIV Env 発現ワクシニア DIs による抗 HIV 抗体誘導について 第19回日本エイズ学会学術集会 (12/1-3, 2005, 熊本)
 - 7) 村上利夫、滝澤万里、前田敏宏、松下修三、本多三男 R5 臨床分離株を中和可能なヒト化抗 HIV-1 モノクローナル抗体(KD-247)の開発 第19回日本エイズ学会学術集会 (12/1-3, 2005, 熊本)
 - 8) 太田信頼、兼清優、網康至、相澤志保子、山本直樹、奥田研爾、本多三男 免疫不全ウイルスの感染における血球細胞の経時的な病的変化の解析 第19回日本エイズ学会学術集会 (12/1-3, 2005, 熊本)
 - 9) 元原麻貴子、伊吹謙太郎、三宅在子、深澤嘉伯、稲葉一寿、鈴木元、増田恭子、河本宏、仲宗根正、本多三男、速水正憲、三浦智行 強毒・弱毒 SHIV の感染初期における胸腺組織及び胸腺内 T 前駆細胞の解析 第19回日本エイズ学会学術集会 (12/1-3, 2005, 熊本)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
特になし
 2. 実用新案登録
特になし。
 3. その他
特になし。

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。同様の強い防御免疫が感染後早期治療により病原性 SHIV-RT 感染を制御している動物にも誘導されていた。糖鎖欠失ウイルス d-5G の低病原性について、感染後 6 年間観察から CD4+T 細胞メモリーCD4+T 細胞レベルが正常レベルに、血中ウイルス RNA が非常に低レベルに維持されていること、感染 2 年後に安楽殺した 4 頭の組織の SIV DNA の解析から糖鎖欠失変異の復帰変異が見られないことが判明した。チャレンジ感染後の宿主応答の解析から感染防御と関連する宿主応答のひとつとして NK 細胞の役割が推測された。

A. 研究目的

エイズワクチン開発研究は DNA 等でプライム免疫し、ウイルスベクター（ワクシニアウイルス、アデノウイルス等）でブースト免疫する方法を中心に行われている。この方法は、末梢リンパ中に高頻度のウイルス特異 CD8+ T 細胞を誘導することから強い感染防御が期待された。しかしワクチンの標的とされる HIV のモデルとなる R5 型 SIV を用いた動物実験の結果から、現時点ではこの方法には解決すべき問題があることが明らかとなった。まず感染後数週間に起こる激しいウイルス増殖をほとんど抑えることができない。ワクチンは初期感染後に一旦ウイルス増殖を低レベルに抑制することからエイズ症状の発症の遅延する効果が期待できるが、条件として特定の CTL エピトープを認識する MHC I allele を持つ場合に限られる。しかし HIV 感染では多種のウイルスの重感染が起こることから、すべてのウイルスに対する有効な CTL を誘導することが難しい。さらに CTL に抵抗性の変異ウイルス出現への対応が困難であることが分かっている。このような理由から CTL 以外の防御免疫をワクチンで誘導することが必要と考えられている。我々は HIV/SIV の特徴である多数の糖鎖による修飾が病原性と関連すると考え、糖鎖修飾を少なくした SIV(d-5G)を作成した。d-5G は感染後 3 週までは SIV239 と同様の感染増殖を示したが、その後、親株と異なりウイ

ルス感染は効率良く制御された。さらに感染後 1 年に 3 頭に SIV239 をチャレンジ接種したところ、ほぼウイルス感染は防御された。つまり糖鎖欠失変異により SIV は弱毒化し、生ワクチンとして働いた。

本研究では、生ワクチンが誘導するエイズウイルスに対する感染防御免疫の解析をプライムブーストワクチンとの比較を通じて行い、プライムブーストワクチンに欠けている性質を明らかにし、プライムブーストワクチンを補完する免疫法の開発、安全性が備えた生ワクチンの開発のための基礎研究を行う。

B. 研究方法

1. アカゲザル

ミャンマー原産の育成ザル、オス、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。

2. 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 SIV239 または d-5G 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 SIV239 または d5G 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。

3. d-5G 感染

2 頭 (Mm0135, Mm0137) は SIV239Env を用いた DNA-prime/vaccinia-boost で免疫、2 頭 (Mm0139, Mm0140) は SIV239Env を用いた DNA-prime/vaccinia-boost で免疫、d-5G を用いてチャレンジ感染を行った。2 頭のサルでは 10^6 copy/ml、残りの 2 頭では 10^5 copy/ml のピーク値とする初期感染が起こったが慢性感染期では血中ウイルス量は検出感度以下に抑制された。118 週後に Mm0137 を除く 3 頭に 1000 TCID₅₀ の SIV239 を静脈内接種した。Mm0139, Mm0135, Mm0140 をそれぞれ感染後 1,2,8 週後に安楽殺した。

4. 感染後早期治療 post-exposure prophylaxis (PEP)

2 頭 (Mm9703, Mm9711) は 100 TCID₅₀ SHIV-RT (SIV239 を鋳型に RT 遺伝子を HIV-1 の遺伝子と組み換えたウイルス、高病原性で HIV-1 に対する逆転写酵素阻害薬により感染が抑制される) の静脈内接種後、8 時間後から 4 週間の非核酸型逆転写酵素阻害薬 (NNRTI) の投与を受けた。2 頭 (Mm9701, Mm9705) は NNRTI の治療開始が感染後 24 時間である点のみ異なる。投薬中止後一時的な血中ウイルス RNA が 1 頭 (Mm9701) では検出され 3 頭では検出されなかった。以後血中ウイルス RNA は測定感度以下に抑制された。感染後 394 週に Mm9704 を除く 3 頭に 1000 TCID₅₀ の SIV239 を静脈内接種した。Mm9701, Mm9705, Mm9711 をそれぞれ感染後 1,2,8 週後に安楽殺した。

5. ウイルス (challenge infection)

高病原性分子クローン SIV239 (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。

6. 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。

7. 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種類のモノクローナ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。

8. 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-g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。

(倫理面への配慮)

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

1. プライム・ブーストワクチンと弱毒生ワクチンの感染防御効果の違い

図1にこれまで行った Env タンパクを抗原とする DNA-prime/vaccinia-boost ワクチン接種ザルと糖鎖欠失変異ウイルス d5G 感染ザルへの SIV239 感染の結果を示した。両者の大きな違いは初期感染抑制効果に見られた。DNA-prime/vaccinia-boost ワクチン接種群では初期感染のピークが 1/10 低下したのに対し、d5G 感染群では感染直後に一時的にウイルス RNA が検出されたのみであった。この結果はウイルス感染に対する防御免疫の誘導の早さに両者に違いがあることを示唆している。

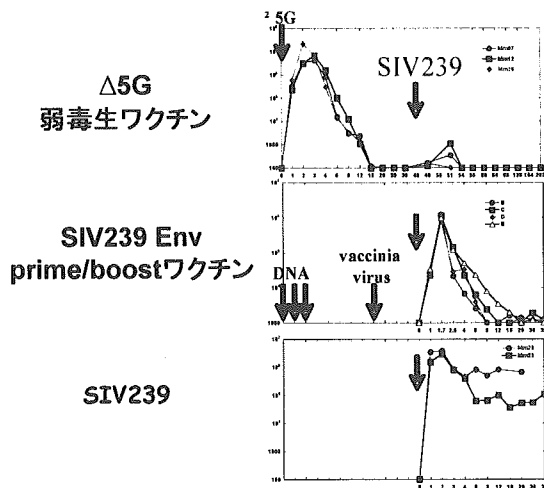


図 1. ワクチン効果の比較

2. 弱毒ウイルス感染ザルへの SIV239 チャレンジ感染の解析

1) d-5G 感染ザル

表 1 に SIV239 感染ザルチャレンジ前後の血中ウイルス RNA 量を示す。d-5G 感染後 118 週チャレンジ後 3 頭を 1,2,8 週に安楽殺を行った。その間、測定した血中ウイルス量はすべて測定感度以下であった。

SIV239 Challenge of delta 5G-infected animals

time	2 w		no challenge		1 w	8 w
	Mm0135	Mm0137	Mm0139	Mm0140		
96 w	<100	<100	<100	<100		<100
101 w	1100	<100	1200	<100		<100
117 w	<100	<100	<100	<100		<100
challenge						
118 w						
3 d	<100		<100	<100		<100
5 d	<100		<100	<100		<100
7 d	<100		<100	<100		<100
14 d	<100			<100		<100
21 d		<100				
27 d						<100
41 d						<100
53 d						<100

Plasma viral load (copy#/ml)

表 1

2) d-nef 感染ザル

表 2 に SIV239 感染ザルチャレンジ前後の血中ウイルス RNA 量を示す。d-nef 感染後 509 週チャレンジ後 2 頭を 1,2 週に安楽殺を行った。その間、測定した血中ウイルス量はすべて測定感度以下であった。

SIV239 challenge of Δ Nef infected animals

time	1 w		2 w	
	Mm9414	Mm9416		
508 w	<100	<100		
challenge				
509 w				
3 d	<100	<100		
7 d	<100	<100		
14 d			<100	

Plasma viral load (copy#/ml)

表 2

3. 感染後早期治療 (PEP) ザルへの SIV239 チャレンジ感染の解析

1) 感染制御ザル

表 3 に SIV239 感染ザルチャレンジ前後の血中ウイルス RNA 量を示す。PEP 治療後 394 週チャレンジ後 3 頭を 1,2,8 週に安楽殺を行った。

SIV239 challenge of PEP-treated animals

time	1 w	no challenge		2 w	8 w
	Mm9701	Mm9704	Mm9705	Mm9711	
371 w	<100	<100	<100	<100	<100
379 w	<100	<100	<100	<100	<100
393 w	<100	190	<100	<100	<100
challenge					
394 w					
3 d	<100		12850	<100	<100
5 d	<100		411000	<100	<100
7 d	<100		1735000	<100	<100
14 d	<100		8950000	<100	<100
21 d		<100			
27 d					<100
41 d					<100
53 d					<100

Plasma viral load (copy#/ml)

表 3

感染後 1,8 週後に安楽殺してサルでは測定した血中ウイルス量はすべて測定感度以下であった。ところが感染後 2 週後に安楽殺した Mm9705 では非感染ザルへの感染と同様の激しい SIV 感染が見られた。Mm9705 には SIV に対する感染防御免疫が誘導されていなかったことが明らかとなった。Mm9705 と感染が防御された 2 頭に誘導されていた獲得免疫について調べた。細胞性免疫 (SIV 特異的 CD4+ T 細胞、CD8+ T 細胞) は感染後 209 週までは誘導されていた。ところが SIV に対する抗体価は SHIV-RT 感染後 15 週以降検出感度以下となっていた。その他のサルでは抗体価は陽性であった。(図 2)

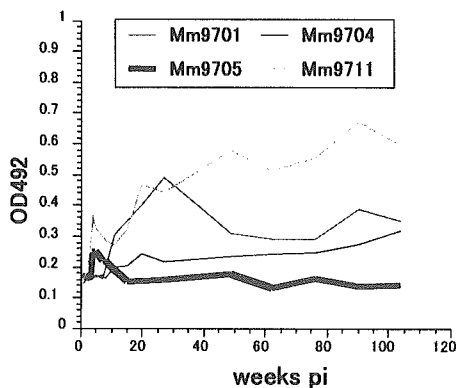


図 2

2) 感染制御が破綻したサル

図 3 に PEP 治療後 319 週に同様に SIV239 チャレンジを行った 1 頭 (Mm9703) の血中ウイルス RNA 量を示す。このサルはチャレンジ前すでに SHIV-RT の感染制御が破綻し、高いウイルス増殖が起こっていた。チャレンジ後も高いウイルス量が確認された。

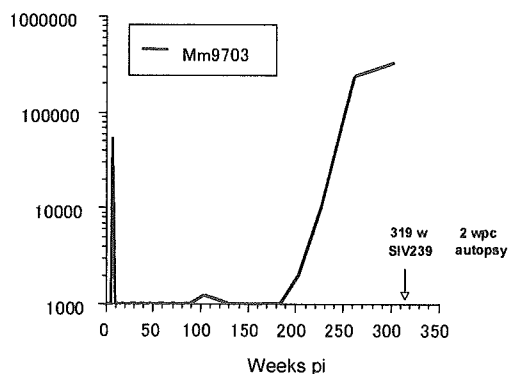


図 3 PEP: 24 h - 4 w

SIV239 感染に対する感染制御効果を調べるために感染 2 週後の組織の SIV DNA に占める SIV239 DNA の割合を調べた。表 4 に示されるように SIV239 DNA は特に脾臓に多く存在し、60%以上が SIV239 であった。

Frequency of challenge virus (SIVmac239) sequence

	gag	vpx-tat	env
Mes.LN	0/10	0/10	1/10
Ing.LN	0/7	0/6	2/9
PBL	0/10	0/8	0/9
Spleen	3/11	5/8	5/8

表 4

4. 感染制御と関連する末梢単核球の解析

SIVmac239 感染制御と関連する宿主応答の解析の項目のひとつとして末梢単核球の flowcytometry 解析を行った。図 1 に示されるように生ワクチンにより誘導される感染防御はチャレンジ感染後短時間に誘導されることが予想されることから、チャレンジ感染後 3、7 日の末梢単核球について種々の細胞表面抗原について解析を行った。図 4 に示されるように CD16+細胞がチャレンジ感染後 3 日に増加していることが分かった。また CD16+細胞

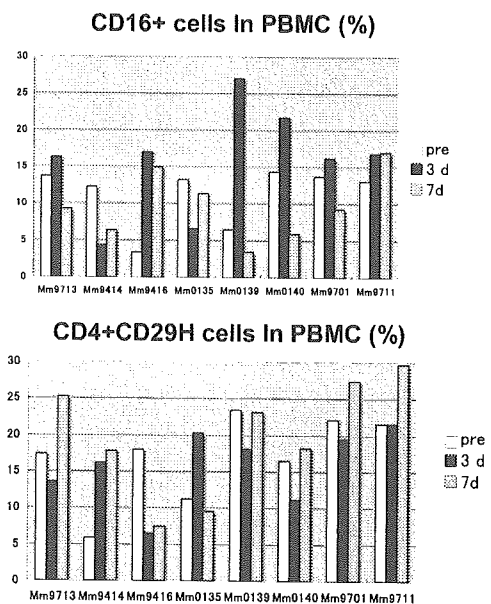


図 4 Protected animals

の変化がすくない動物では CD4+CD29H 細胞

が増加していた。感染制御との関連を調べるために、チャレンジ感染が抑制されなかった動物についても解析を行った。図 5 に示されるように CD16+細胞、CD4+CD29H 細胞の変化は見られなかった。

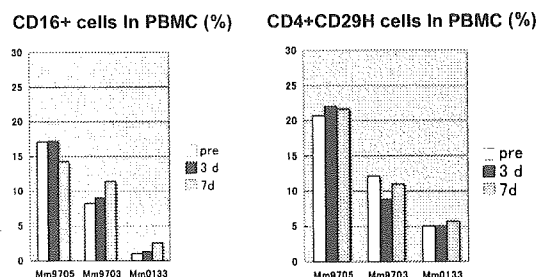


図 5 Unprotected animals

5. d-5G 感染ザルにおける糖鎖欠失変異の維持について

d-5G 感染後 119-126 週のサル 4 頭について種々の免疫組織中の SIV DNA の env 遺伝子の塩基配列を決定した。SIV DNA 量が少ない組織については V1-V2 領域の 2 カ所の deglycosylation について、全 env 遺伝子を増幅可能であった組織については全 5 カ所の deglycosylation について確認した。解析した全 4 頭で deglycosylation が N-glycosylation site に戻る変異は検出されなかった。また Env 遺伝子における変異もすくないことが判明した。

D. 考 察

d-5G 感染により誘導される極めて強い感染防御免疫を安全性が高いワクチンで誘導することが可能か？または安全な生ワクチンを開発することが可能か。現時点では前者がより実現可能と考えられている。すなわちエイズウイルス感染を防御する免疫を解明しエイズウイルス感染以外の方法でエイズウイルスに対する防御免疫を誘導することが課題となっている。そこで今年度は種々の SIV 感染ザルへの高病原性 SIV239 を用いたチャレンジ感染実験を行った。予想されたように感染後 2 年の d-5G 感染ザルはすべてほぼ完全に SIV239 感染を防御した。次に感染後 10 年の d-nef 感染ザルにおいても同様に感染防御した。次に高病原性の SHIV-RT 感染後短期間の RT 阻害薬投与により感染を制御した 3 頭に上記 2 実

験と同様に SIV239 チャレンジを行ったところ、2 頭では感染が防御されたが、1 頭ではほとんど感染の抑制が見られなかった。昨年度報告した SIV239 感染長期未発症ザルにおいても SIV239 チャレンジ感染が防護された結果も加えるとウイルスの性質の違いに関わらず宿主が SIV 感染を制御している場合、新たに SIV 接種を行った場合、ほぼ完全に感染が抑制されるという結果が得られた。PEP 治療群で感染抑制が起こらなかった例は感染制御を考察する上で重要である。チャレンジ前の測定が必要だが細胞性免疫が感染後 209 週まで検出されていたことから、prime/boost ワクチンでは初期感染の抑制効果が低い結果との関連が注目される。さらにチャレンジ前に SIV 抗体価が検出されなかったことは、SIV 感染がほぼ完全に消失していた可能性が予想される。これらの結果は、弱毒生ワクチンが誘導する強い感染防御免疫の維持に低いレベルの SIV 感染が必要であることを暗示している。実際に、感染後 120 週の d-5G 感染ザルには 10^6 PBMC 当たり 0.1-10 コピーの SIV DNA が存在していた。次にチャレンジ感染後に誘導される感染防御と関連する免疫として自然免疫と獲得免疫が挙げられるが、今回の結果解析からは CD16+細胞、NK 細胞の重要性が示唆された。また活性化 CD4+細胞の役割も注目された。これらの細胞の誘導は感染後 3 日目に見られたことから自然免疫系の重要性が示唆された。今後さらに獲得免疫、自然免疫の網羅的な解析を行い、感染防御に必要な免疫反応を明らかにする。

E. 結 論

d-5G 感染ザル、d-nef 感染ザル、感染後早期治療による感染制御ザルには同様の強い防御免疫が誘導されていることが明らかとなった。感染防御と関連する宿主応答のひとつとして NK 細胞の役割が推測された。

F. 健康危険情報

特に該当する情報はなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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, 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.

2. 学会発表

- 1) Sugimoto C, Izumo S, Suzuki Y, Nagai Y, Mori K: Influence of deglycosylated SIVmac239 on primary infection in lymphatic tissues. 23rd annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, Portland, USA, September, 2005.
- 2) Mori K, Sugimoto C, Nakayama E, Shioda T, Villinger F, Ansari AA, Yamamoto N: Development of Sendai virus vector system for eliciting epitope specific CD4 T cells. 23rd annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, Portland, USA, September, 2005.
- 3) 杉本智恵、鈴木康夫、山本直樹、永井美之、森 一泰: 糖鎖欠損サル免疫不全ウイルスの細胞指向性と初期感染細胞の解析: 低病原性 t の関連について. 日本ウイルス学会 (横浜) 2005 年 11 月
- 4) 杉本智恵、中山英美、塩田達雄、山本直樹、永井美之、森 一泰: 糖鎖欠損 SIV の弱毒化のメカニズムの解析. 日本エイズ学会 (熊本) 2005 年 12 月
- 5) 森 一泰、杉本智恵、中山英美、塩田達雄、保富康宏、山本直樹、永井美之: ウイルス特異的 CD4+T 細胞免疫誘導のための Sendai virus vector を用いた CD4+T 細胞エピトープ発現系の開発. 日本エイズ学会 (熊本) 2005 年 12 月

H. 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

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 薬学生化学教室

研究協力者 三隅将吾・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 の特殊立体構造 (Undecapeptidyl arch, UPA) をミミックした Cyclic dodecapeptide-multiple-antigen peptide conjugate(cDDR5-MAP)を調製した。この cDDR5-MAP 抗原をカニクイサルに免疫して誘導される自己抗体は、細胞表面の native な human 及びサル CCR5 を特異的に認識し、HIV-1R5 ウイルスの感染を防止した。さらに本抗血清は、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なった。次に、カニクイサルに適合させた SHIV_{SF162P3} 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を示すことを明らかにした。本年度はアカゲサルを用いて、「HIV/AIDS の飲むワクチンの開発・創製」のための基礎研究を進め、粘膜免疫組織への M 細胞を介する Targeting Molecule の化学合成を行い、本化合物が in vitro 及び in vivo で小腸の M 細胞への Targeting を明らかにし、次年度は本化合物に UPA 自己抗原・gp140env 抗原・CpGDNA アジュバンドの共有結合抗原を調製し、ナノ粒子 (コレステロールプルラン) に抱埋・腸溶カプセル封入ワクチンを創製し、粘膜免疫・粘膜 challenge の基礎研究を行い、より完全な感染防御法の開発に向けて挑戦する。

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) の立体構造をロドプシンを基礎に計算化学的求め、その第 2 細胞外 domain (ECL-2) の一部を構成する特異的立体特殊構造 (Undecapeptidyl arch : UPA、図 1) に注目した。当時推定した構造はおどろいたことに、2003 年に 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、スパ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

dodecapeptide 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 (図 1C)。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。

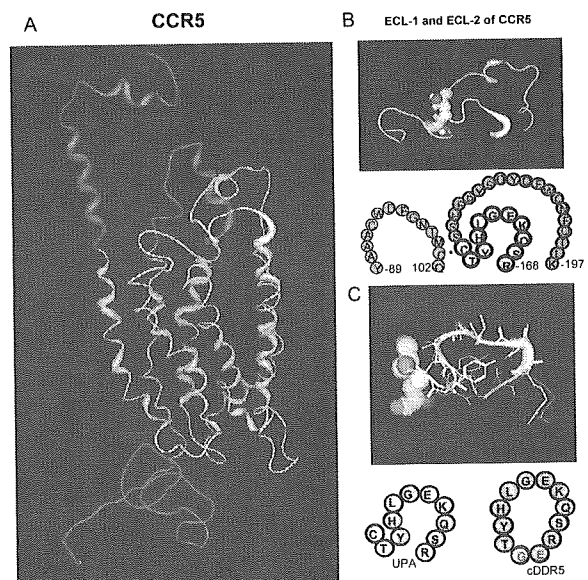


図1

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、スパ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、スパ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。

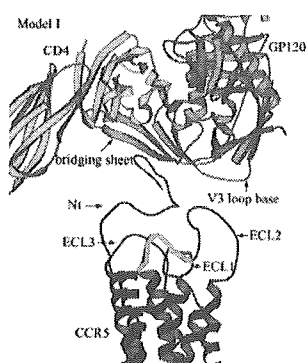


図2

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。

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 μ g 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 300 μ g 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 SHIV_{SF162P3} 株を 10TCID₅₀ 静注

して 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、SHIV_{SF162P3} 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 に対する特異的なリ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) 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. 研究結果

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。

図3に免疫・challengeのTime Schedule及び抗体価並びにFacs分析の結果を示した。

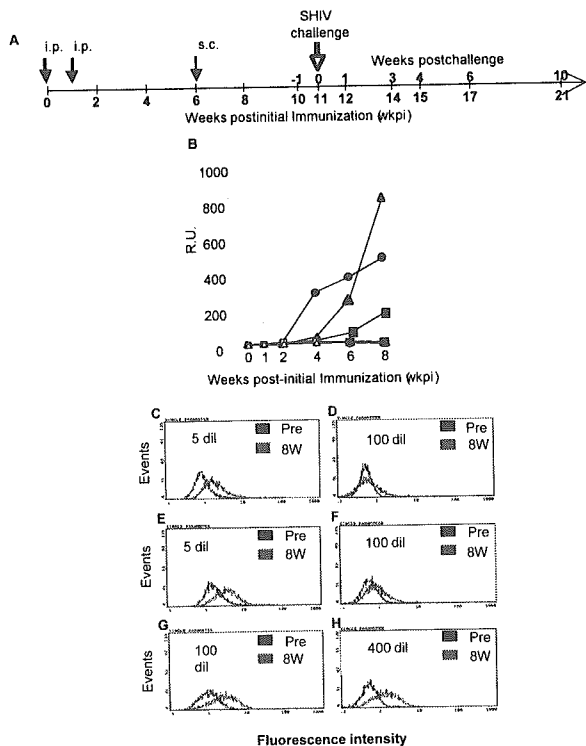


図3

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3H)。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SHIV_{SF162P3}(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SHIV_{SF162P3}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(図4A-C)。

そ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抗原免疫サルのおよび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。

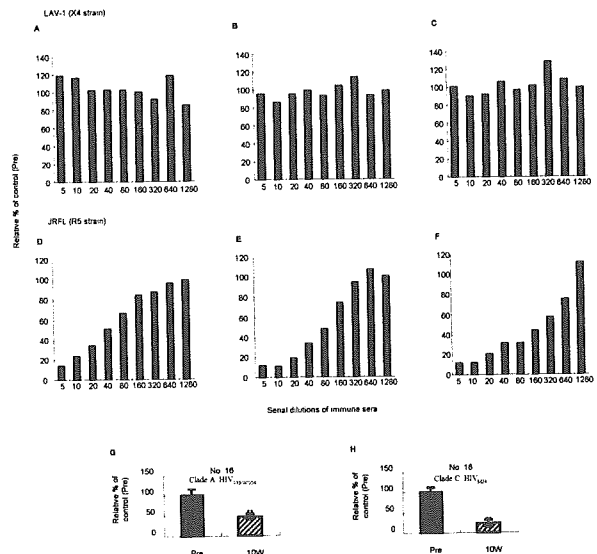


図4

また、non-clade B HIV-1 (HIV93RW004, clade A)及びHIV-1 (MJ4, clade C)に対するサル16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、各pre血清と比較して各ウイルスの感染防止を示した(図4G, H)。なお、non-clade B HIV-1はNIH AIDS Research & Reference Regent Programから入手し、常法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、SHIV_{SF162P3}(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challenge後1週間において、2log-3log低下する感染防御効果が認められ、また血中CD4値の有意な低下はchallenge 10週以後では認められなかった(図5)。

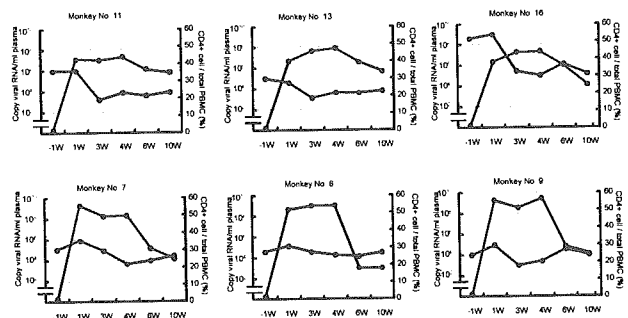


図5

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-1R5 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¹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-1R5 ウイルスの感染を著しく抑制したのに対し、HIV-1X4 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-1R5 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、しばらくして 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-1R5 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。SHIV_{SF162P3} 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てた。この報告書では述べていないが、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. 健康危険情報

とくになし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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/HIVSF_{162P3} challenge. *J Immunol* 2006, 176:463-471.
- 2) Nakayama D, Misumi S, Mukai R, Tachibana K, Umeda M, Shibata H, Takamune N, Shoji S: Suppression of multiclade R5 and X4 human immunodeficiency virus type-1 infections by a coreceptor-based anti-HIV strategy. *J Biochem* 2005, 138:571-582.
- 3) Misumi S, Takamune N, Ohtsubo Y, Waniguchi K, 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 Retrovir* 2004, 20:297-304.
- 4) Misumi S, Morikawa Y, Tomonaga M, Ohkuma K, Takamune N, Shoji S: Blocking of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Virion