

Autolysis by Autologous p2gag Peptide. J Biochem 2004, 135:447-453.

- 5) Misumi S, Takamune N, Shoji S: Proteomics of HIV-1 virion. Biomedical and Pharmaceutical Applications of Proteomics. (Ed H. Hondermarck) Kluwer Academic Publisher, The Netherlands, Chapter 14, 2004.
- 6) Misumi S, Endo M., Mukai R, Tachibana K, Umeda M, Honda T, Takamune N, 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

## H. 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

### 2. 特許出願

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

出願番号：特願 2005-317905

出願日：2005年11月1日

## 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

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 主任研究官

研究要旨 a) HIV ワクチン実現の為に持続的かつ効率的な粘膜免疫アジュバントおよびドリックデリバリーシステム (DDS) の検討を行った。使用したアジュバント候補および DDS 候補はマンノース被覆リポソーム、キトサンおよびその誘導体 (天然物由来)、HVJenv ベクター (市販、マウスでの安全性確認済み) 等である。マウスにおいて OVA、SIV gag タンパク、HIV-1env 発現プラスミッドおよび SIVgag 発現プラスミッドを上記アジュバントおよび DDS 候補と混合し経鼻免疫を行いその抗体反応を解析した。その結果キトサンおよび HVJenv ベクターがマウスで高い抗体価を示した。またキトサンの誘導体の内、低分子のキトサンに高いアジュバント活性を認めた。b) カニクイサル 6 頭を用い HIV の DNA ワクチン候補として HVJenv ベクターと HIV-1env 発現プラスミッドを混合し 3 回経鼻投与し、その後 SHIV の攻撃接種によりワクチン効果を検討した。その結果、現状ではワクチン投与群とコントロールに差が無く、効果が認められていない。

### A. 研究目的

性行為感染症においてワクチンが存在するのは B 型肝炎のみである。残念ながら HIV 感染を阻止しえるワクチンは未だ存在しない。大多数の HIV 感染は性行為感染とされ、ウイルスの侵入門戸である生殖器粘膜でウイルスが排除されれば感染阻止は可能と考えられている。しかしながら未だ粘膜組織上に感染阻止に有効な CTL および IgA を誘導したという報告は無い。近年、ワクチン開発の分野では DNA を直接個体に接種することで免疫を誘導する DNA ワクチンが脚光を浴びている。しかしながら、そのワクチン候補の抗原あるいは遺伝子配列の特定は未だ無し得ず有効な感染阻止ワクチンの作成にはいたっていない。また、現在の DNA ワクチンでは免疫誘導能が著しく低い。そのため、DNA ワクチン用の免疫誘導アジュバントあるいは標的細胞への DNA のデリバリー (DDS) 方法の開発が急務である。本研究では人工糖脂質の DNA ワクチン用アジュバントおよび DDS としての利用可能性の検討、センダイウイルス (HVJ) エンベロープによる DNA の DDS、さらに各種アジュバント (キトサン、CTB 等) との組合せによる粘膜免疫誘導能の解析を行う。本研究は単に HIV に止まらず、

種々の感染症に対する DNA ワクチンの基盤開発にもつながり、医療分野では HIV 感染症の予防・治療用医薬品の開発以外にも、他のウイルス感染症、細菌・寄生虫に対するワクチン、癌に対する免疫療法剤の開発が考えられる。また、従来型のワクチンと異なり、成分蛋白を大量製造、精製する必要がなくなるため、ワクチン開発期間の大幅な短縮が図れ、重要疾患に対するワクチンを極めて迅速に提供する事が可能となる。DNA ワクチンの開発は文献的にも世界中で多くの研究者が取り組んでいるものの、安全かつ効果的なアジュバントがない故に実用化に至っていない。アジュバントに関しては実験的には CT (コレラ毒素) が強い活性を示す事が知られているが、人への投与は不可能だと考えられている。

### B. 研究方法

1) マウス (BALB/c) における接種ルートの検討 (経鼻、経膣および経直腸の比較): SIV p27 蛋白とコレラトキシン (CT)、人工糖脂質被覆リポソーム、キトサン等を週 1 回、3 週にわたり経鼻、経膣および経直腸ルートで免疫し経時的に血中および膣洗浄液中の IgG 抗体を測定した。通常、マウスは 1 群 5 匹とした。

2) OVA を用いたキトサンのアジュバント活性の検討：市販のキトサン (和光 chitosan 500) および分子量、脱アセチル化度を変えたキトサン誘導体を使用し、経鼻接種における免疫誘導能を検討した。OVA は 5 $\mu$ g/5 $\mu$ l とし chitosan A-1% HCl 溶解、低粘度品、高脱アセチル化物、chitosan B-1% AcOH 溶解、低粘度品、高脱アセチル化物、chitosan C-1% HCl 溶解、極低粘度品、高脱アセチル化、chitosan D-1% AcOH 溶解、極低粘度品、高脱アセチル化物、chitosan E-1% HCl 溶解、中粘度品、中脱アセチル化、chitosan F-1% AcOH 溶解、中粘度品、中脱アセチル化物、chitosan 500-1% AcOH 溶解、高粘度品、標準脱アセチル化物を使用し、週 1 回、3 週にわたり免疫を行い経時的に血中および膣洗浄液中の IgG 抗体を測定した。

3) HIV-1 DNA ワクチン候補を用いた抗体産生能の検討：DNA ワクチンの可能性を検討するため SHIV rev+vpu+envgp160 領域発現プラスミッド (env729 pCAGGS-P7) や SHIV envgp160 領域発現プラスミッド (env734 pCAGGS-P7) を何種類か構築した。

これらプラスミッドと人工糖脂質被覆リポソーム (M3 リポソーム) および HVJenv ベクター (石原産業、大阪) を用いてマウスへの経鼻接種における血中の抗体産生能を検討した。DNA 量としては 20 $\mu$ g/head/shot とし週 1 回、3 週にわたり経鼻免疫を行った。

4) 抗体検出：ELISA 法により OVA および HIV env タンパク質特異的 IgG および IgA 抗体を検出した。

5) 中和抗体測定系の検討：ポリメリック Ig レセプター (pIgR) ノックアウト (KO) マウスを使用し、まず市販の HIV-1env タンパクとコレラ毒素 (CT) で経鼻免疫を 3 回行った。その後何回か採血した血清をプールし中和抗体の検出に用いた。pIgRKO マウスでは通常粘膜面に産生される IgA 抗体が血中に貯留する。

免疫マウス血清 (56 度 30 分処理) と NL43 ウイルスを 37 度 60 分反応させ LuSIV 細胞接種。37 度 60 分反応後細胞を洗い、24-48 時間培養を行った。細胞溶解液を処理し、ルシフェラーゼ活性をルミノメーターで測定し、血清中の中和抗体価を算定した。

6) HVJenv ベクターと HIV-1 env 発現プラスミッドを用いたカニクイサルでの免疫実験と感染防御試験：HIV env タンパク質 gp160 を発現する env734 pCAGGS-P7 を HVJenv ベクターと共にカニクイサルに毎週 1 回 3 週にわたり経鼻接種した。合計 6 頭のメスカニクイサル (2-3 kg) を使用し、2 頭は 1 回あたり DNA 量として 400  $\mu$ g、2 頭は 1 回あたり 800  $\mu$ g、1 頭は DNA 単独で 800  $\mu$ g および 1 頭は無処置とした。

最終免疫の 3 週後に強毒株である SHIV C2/1 株を 10MID50 直腸より接種した。

その後経時的に血液、膣洗浄液および新鮮便を採取し、リンパ球マーカー、抗体、生化学値およびウイルス量を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究ではマウスおよびサルを使用するため事前に研究計画を作成し実験手技および動物愛護に関し当研究所動物実験委員会の承認を得ている。

## C. 研究結果

### 1) 免疫ルートの検討

経鼻、経膣および経直腸の各ルートに同量の SIVp27 タンパクおよび CT を接種し経時的に血中および膣洗浄液中の抗体を測定した。その結果、経鼻免疫が最も個体間のバラつきが少なく比較的安定して抗体検出が可能であった。

### 2) OVA を用いたキトサンのアジュバント活性

図 1 および図 2 に示すように、低分子 (低粘度) あるいはマイクロパーティクル状のキトサンに高いアジュバント活性が認められた。

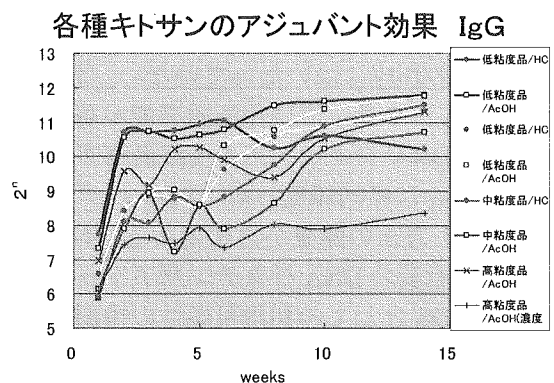


図 1

各種キトサンのアジュバント効果 IgG

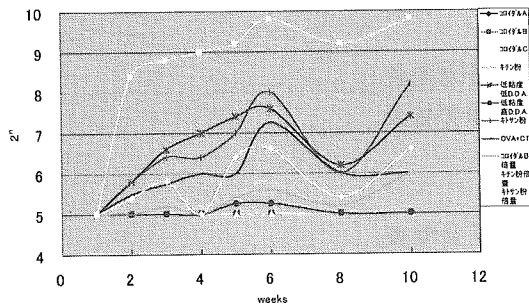


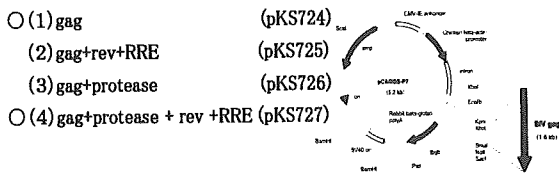
図2

3) DNA ワクチン候補の抗体産生能

図3にDNA ワクチン候補を示した。また図4に経鼻接種後の抗体価を示す。グラフから明らかかなようにHVJenvベクターを用いた場合に抗体上昇と抗体価の維持が確認できた。

図3 DNAワクチン候補

DNA SHIV-C2/1 clone pKS661



- (1) gag (pKS724)
- (2) gag+rev+RRE (pKS725)
- (3) gag+protease (pKS726)
- (4) gag+protease + rev +RRE (pKS727)
- (1) vpu+env gp160 (pKS728)
- (2) rev+vpu+env gp160 (pKS729)
- (3) vpu+env gp140 (pKS730)
- (4) env gp160 (pKS734)
- (5) env gp140 (pKS735)

env に対する抗体産生能(serum)

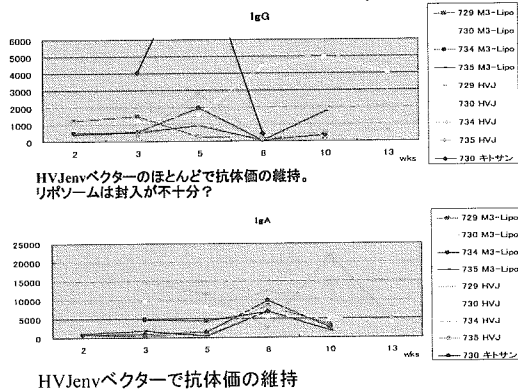
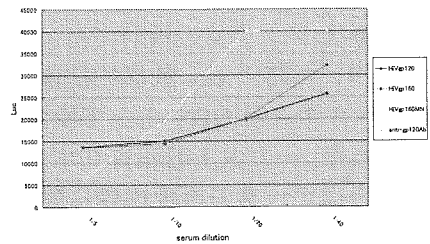


図4

4) 中和抗体の検出

図5に示すように、市販の HIV-1env タンパクを用いた場合血清濃度依存的にルシフェラーゼ活性の低下が見られ、血清中の IgA あるいは IgG の中和活性が検出可能である事が示唆された。

pIgRKOマウス血清を用いた中和試験



HIV-1env蛋白免疫KOマウス血清はNL43ウイルスを中和する

図5

5) HVJenv ベクターと HIV-1 env 発現プラスミッドを用いたカニクイサルでの免疫実験と感染防御試験

施設利用期限等の問題があり攻撃接種までに抗 env 抗体が検出されていなかった。結果的には図6および図7に示すように全てのサルの CD4CD3 値が接種後 2 週目から急激に減少し、ウイルス量も接種後 1 週目から検出され 2 週目でピークに達した。

D. 考察

粘膜免疫誘導を第一義と考え免疫ルートの検討を行った。経膈および経直腸においても抗体の産生は認められたが、群内での個体差が大きかった。これはメスの性周期による膈粘膜の変化によるものや、直腸内の便等による影響によるものと考えられる。一方、経鼻免疫においては、若干の個体差は見られるものの抗体価も大きな差異は見られず、サルやヒトへの応用を考えると最も現実的な免疫経路だと考えられる。また最近の報告では経鼻免疫が経膈免疫と同様に膈内への抗体産生を誘導し、さらに気道や肺胞内にも特異的抗体を誘導することが示され、呼吸器感染症と性行為感染症の両方のワクチン開発に経鼻免疫が有効である事が示唆されている。

OVA を抗原としてのキトサンのアジュバント活性の検討においては、幾つかのキトサン誘導体が高いアジュバント活性を示した。現時点で最も有効な誘導体を決定は出来ないが、今後さらに分子量、粘度、脱アセチル化度および粒子サイズ等を詳細に検討し、安全かつ安価なキトサン誘導体をアジュバントとして使用する可能性を検討した。また現在膣洗浄液および糞便中の抗 OVA-IgA 抗体の検出を行っている。

HIV-1 DNA ワクチンの検討では、HVJenv ベクターを用いた時に env 特異的抗体を検出し、HVJenv ベクターを DDS として使用する可能が示唆された。一方人工糖脂質リポソームを使用した場合はデータの再現性等に問題もあり、リポソーム内への封入効率やリポソーム作成等に何らかの問題があった可能性があり今後さらに検討の余地を残した。この結果より今年度は HVJenv ベクターを用いてサルへの免疫実験と感染阻止実験を行った。しかしながらサル使用期限、大臣確認実験の許可などの問題で十分に免疫期間を取ることが出来ずサルへの攻撃接種となり結果的には感染防止効果は 1 頭にも認める事が出来なかった。今後さらに原因を追究するとともに、DNA ワクチンによる粘膜免疫誘導能を検討していきたい。中和抗体測定ではコントロール実験ではあるが、市販の HIV-1 env タンパク質を使い plgRKO マウスを免疫した血清において 1—2 日間で中和活性が計測出来る事が示唆されたが、ルシフェラーゼ値がかなりの幅でブレる事がありその再現性に若干の問題を残している。また LuSIV 細胞が X4 ウイルス嗜好性であるため R5 ウイルスの中和アッセイには使用できない可能性もあり今後さらに検討を要すると考えている。

## E. 結 論

今回の研究より、ワクチンアジュバントとしてキトサン誘導体を経鼻免疫による粘膜免疫誘導に有効である可能性が示された。また DDS として HVJenv ベクターが DNA 発現プラスミッドと共に利用できる事が示された。今後さらに詳細を検討し、安全かつ効果的ワクチンアジュバントおよび DDS を確立していきたい。

F. 健康危険情報  
なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

- 1) Barnor JS, Miyano-Kurosaki N, Abumi Y, Hiroaki S, Yamaguchi K, Ishikawa K, Yamamoto N, Takaku H: Novel second-generation anti-HIV shRNA expressing vif and decoy TAR arrest the virus-breakthrough phenomenon associated with siRNA-escape variants. 18th International Conference on Antiviral Research, Barcelona Spain, April, 2005.
- 2) 羽生勇一郎、Jacob Barnor、黒崎直子、米田和弘、山口和也、石川晃一、山本直樹、Dabid Ofori-AAdjei、高久 洋：RNAi 耐性 HIV-1 株に対処する第 2 世代の RNAi 製剤. 第 19 回日本エイズ学会（熊本）2005 年 12 月

H. 知的所有権の出願・登録状況  
なし

## 8. Ag85B ( $\alpha$ 抗原) を用いたワクチンの増強作用

分担研究者 保富 康宏 三重大学大学院医学系研究科 助教授

**研究要旨** ワクチン開発におけるアジュバントの研究は多くの利点を備えており、広く世界的に行われている。しかしながら実際に使用できる新規のアジュバントは極めて少ない。結核菌ワクチンである抗酸菌 BCG は強い細胞性免疫(Th1)を誘導するアジュバント活性を持つことが知られているが、付随する強い副作用のためにヒトへの使用は認められていない。本研究ではこの抗酸菌の持つ Th1 反応誘導の本体である Ag85B を用い、副作用のない新規のアジュバント開発を行った。Ag85B 発現 DNA を HIVenv DNA ワクチンと混合接種すると強い Th1 タイプの HIVenv 特異的免疫反応が誘導された。この Ag85B をリコンビナントタンパクとして作成しリコンビナント HIVenv gp120 ワクチンおよびインフルエンザ HA ワクチンに対しアジュバントとして使用したところ、ワクチン特異的な免疫反応、特に Th1 タイプの免疫反応が誘導された。また、これらワクチン接種による副作用は認められなかった。以上のことから Ag85B は DNA として DNA ワクチンのアジュバントに、タンパクとしてタンパクワクチンのアジュバントとして有用であることが示唆された。

### A. 研究目的

HIV 感染を予防するためのワクチン開発は世界中で行われているが、未だ実用化されたものはない。HIV に対し十分に効果的な免疫反応が誘導されるワクチンの開発は必須であり、その中で現在研究されているワクチンを更に効果的にするための一つの方法としてアジュバントの開発がある。ワクチンとして安全性やコスト等の問題を克服しても免疫誘導効果が低いものはそのままでは使用されない。それらの問題を解決するためにアジュバントの開発がある。ワクチンアジュバントは新規ワクチンに限らず現行のワクチンに対しても非常に有用である。本研究では HIV 感染予防に必要な強い Th1 タイプの免疫反応を誘導するために新規ワクチンアジュバントとして抗酸菌 Ag85B の可能性を検討した。

### B. 研究方法

#### 1. DNA ワクチンにおけるアジュバント

BALB/C マウスを用いて HIVenv DNA ワクチンと Ag85B DNA を混合接種し、接種部位に electroporation を行った。免疫マウスの脾細胞を用いて HIVenv 特異的サイトカイン(IL-4、IFN- $\gamma$ )を ELISA 法にて測定した。

#### 2. リコンビナントタンパクの作製

Ag85B をユビキチン結合タンパクとして作製しユビキチン分解酵素にて切断し、精製タンパクを作製した。作製されたタンパクは Ag85B 特異的モノクローナル抗体にてウェスタンブロットティングにて確認した。

#### 3. タンパクワクチンに対するアジュバント効果の測定

タンパクワクチンに対するアジュバント効果の測定：リコンビナント HIVenv gp120 ワクチンまたはインフルエンザウイルス HA ワクチンと Ag85B をインコンプリートフロイントアジュバント(IFA)とともに混合し BALB/C マウスおよび DBA/2 マウスに皮下接種した。

#### 4. 特異的抗体の測定

HIVenv gp120 およびインフルエンザウイルス HA に対する特異抗体は ELISA 法にて IgG、IgG1、IgG2a を測定した。

#### 5. ELISPOT アッセイ

インフルエンザウイルス HA 特異的 ELISPOT アッセイは CD8+陽性脾細胞の IFN- $\gamma$  産生にて測定した。

(倫理面への配慮)

本研究はマウスのみを使用する基礎研究でヒトサンプル、情報等は一切用いていない。

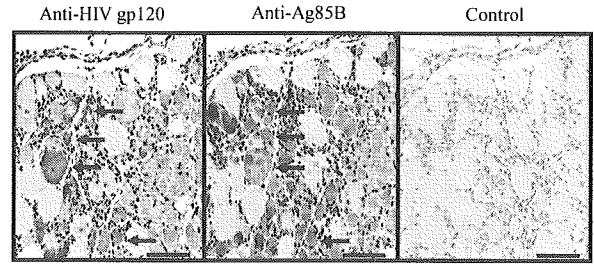
### C. 研究結果

1. Ag85B DNA の DNA ワクチンにおけるアジュバント効果 : electroporation により HIVenv と Ag85B の DNA を混合接種すると同一部位に HIVenv と Ag85B が発現していることが確認された (Fig. 1)。このマウスの脾細胞を HIVenv で刺激培養し培養上清中の IL-4 および IFN- $\gamma$  を測定したところ Ag85B 混合接種群では明らかに IFN- $\gamma$  の産生が増強され、IL-4 が減少していた。この反応はマウスを BCG で感作しているとより著明であった (Fig. 2)。

2. リコンビナント Ag85B(rAg85B)のタンパクワクチンにおけるワクチン特異抗体の誘導 : rAg85B と HIVenv gp120 ワクチンを IFA にて混合し、マウスに皮下接種したところ rAg85B 非添加群および BCG を含んだコンプリートフロイントアジュバント(CFA)以上に高い抗体を誘導した (Fig. 3)。同様の免疫方法でインフルエンザ HA ワクチンを免疫したところ rAg85B 添加群で同様に高い抗体誘導が認められ、特に IgG2a で著明であった (Fig. 4)。またこの抗体反応はマウスを BCG で感作してあることで更に著明であった (Fig. 5)。

3. HA 特異的 IFN- $\gamma$  の産生 : 免疫マウスの脾細胞をワクチン抗原で刺激しその上清中の IFN- $\gamma$  を測定したところ rAg85B を用いた群で優位に高い産生が認められ、更にこの産生はマウスを BCG で感作しているとより増強された (Fig. 6)。

4. HA 特異的 CTL : HA ワクチン免疫マウスにインフルエンザウイルスを接種し 3 日後の HA 特異的 CTL を HA エピトープペプチド刺激による CD8<sup>+</sup>細胞の IFN- $\gamma$  産生を指標とした ELISPOT として細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) を測定したところ rAg85B をアジュバントとして用いた群で感染後最も早期に高い CTL の誘導が認められた (Fig. 7)。



Bar : 150  $\mu$ m

Fig. 1 HIVenv と Ag85B 蛋白の in vivo での発現  
矢印は同一部位に HIVenv と Ag85B が発現していることを示している

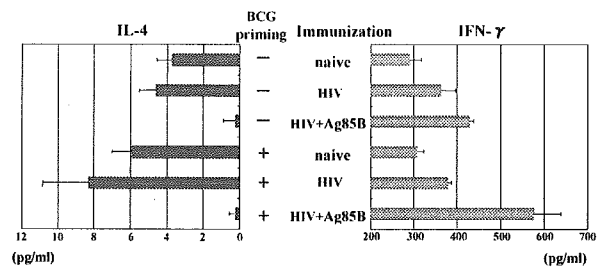


Fig. 2 Ag85B DNA を HIVenv DNA ワクチンにアジュバントとして用いたときの HIVenv 特異的サイトカインの産生

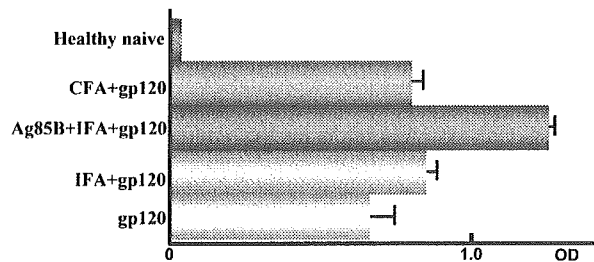


Fig. 3 HIV gp120 特異的抗体の誘導

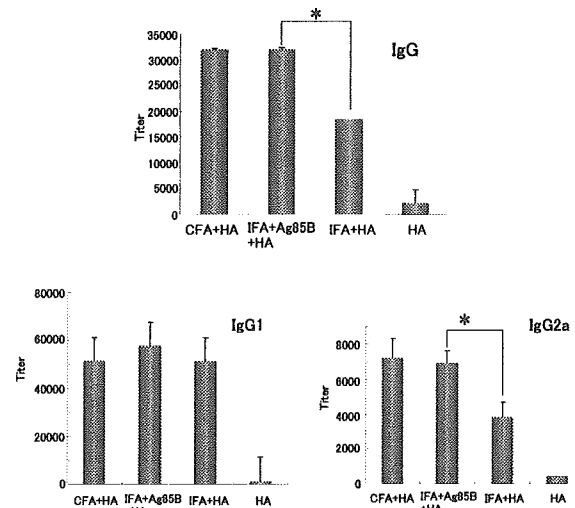


Fig. 4 インフルエンザ HA 特異的抗体とそのサブクラス  
\* :  $p < 0.01$

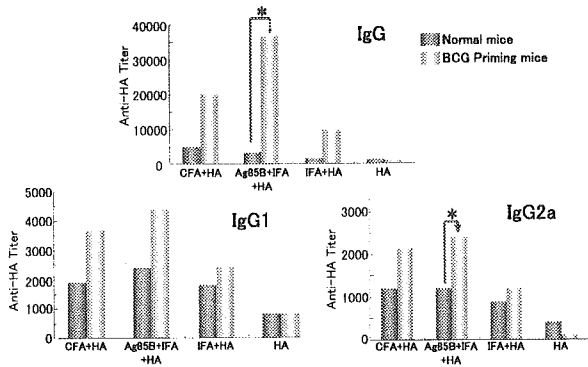


Fig. 5 BCG 感作マウスにおける Ag85B のアジュバント効果 \* : p < 0.01

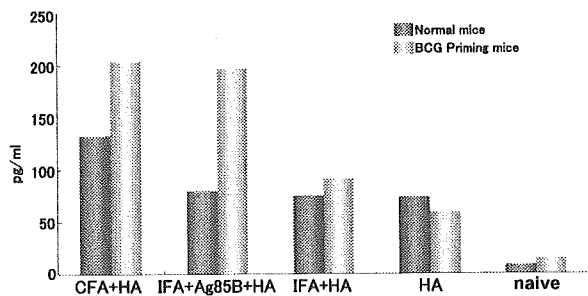


Fig. 6 BCG 感作マウスにおける Ag85B をアジュバントとして用いたときの IFN- $\gamma$  の産生

#### D. 考察

エイズウイルス感染予防には強力な免疫反応、特に細胞性免疫反応の誘導が必要である。通常、死菌ワクチンやコンポーネント・サブユニットワクチンでは効果的な中和抗体の誘導は認められるが細胞性免疫の誘導が認められない。しかしながらウイルス感染では初期の細胞性免疫の誘導が感染防御には重要であり、そのために細胞性免疫の誘導がしづらいワクチンにおいても感染直後には速やかに強力な特異的細胞性免疫を誘導するワクチンアジュバントが必要となる。本研究で用いた Ag85B は強力な免疫反応の誘導、特にその抗体反応においては Th1 タイプの抗体が誘導され、更にインフルエンザ HA ワクチン接種後のウイルスチャレンジでは明らかに早期に高いウイルス特異的 CTL が誘導されていたことから、Th1 タイプの免疫反応を誘導するためのリコンビナントタンパクワクチンに有効なアジュバントと考えられる。リコンビナント HIVenv gp120 は効果的な中和抗体は誘導できるが細胞性免疫の誘導が困難であったが、本研究で用いた Ag85B を用いることでウイルス暴露後の早期

の効果的な細胞性免疫の誘導が期待される。また、Ag85B は BCG 感作でそのアジュバント効果が増強されることから、世界中で広く BCG ワクチンが使用されることを考えると有効なワクチンアジュバントになりうると考えられる。

#### E. 結論

抗酸菌  $\alpha$  抗原がワクチンのアジュバントとして有効である可能性が示された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yasutomi Y: Chimeric recombinant hepatitis E virus-like particles presenting foreign epitopes as a novel vector of vaccine by oral administration. Holland, CR, and Miyamura, T Eds. Structure-based viral replication. World Scientific Publishing. (in press)
- 2) Takamura S, Matsuo K, Takebe Y, 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.

##### 2. 学会発表

- 1) 松原明弘、河岡義裕、保富康宏：インフルエンザ DNA ワクチン封入 E 型肝炎ウイルス様中空粒子 (HEV-VLP) による経口インフルエンザワクチン. 第 53 回に本ウイルス学会 (横浜) 2005 年 11 月
- 2) 河野光雄、保富康宏、唐松克夫、松原明弘、高村史記、駒田 洋、伊藤守弘、鶴留雅人、西尾真智子、伊藤康彦：マウスインターロイキン 4 を挿入したパラインフルエンザ 2 型ウイルスの性状解析. 第 53 回に本ウイルス学会 (横浜) 2005 年 11 月
- 3) 佐藤憲一、銭谷幹男、高橋宏樹、保富康宏、小原道法：HCV トランスジェニックマウスにおける初期免疫応答. 第 53 回に本ウイルス学会 (横浜) 2005 年 11 月
- 4) 唐松克夫、保富康宏：抗酸菌分泌抗原 Ag85B



- の新規アジュバントとしての可能性. 第 53 回日本ウイルス学会 (横浜) 2005 年 11 月
- 5) 唐松克夫、保富康宏：抗酸菌由来 Ag85B DNA ワクチンによる喘息の抑制効果. 第 35 回日本免疫学会 (横浜)
  - 6) 森 如、保富康宏、水谷 仁：Ag85B のマウス反復ハプテン誘発皮膚炎モデルへの効果の検討. 第 35 回日本免疫学会 (横浜)
  - 7) 保富康宏：教育講演「ワクチンとは」. 第 37 回日本小児感染症学会

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

- 1)  $\alpha$  抗原のワクチンにおけるアジュバント剤としての利用 (出願中、特開 2002-114708)
- 2)  $\alpha$  抗原のアレルギー性疾患治療剤としての利用 (出願中、PCT/JP/01459)

## 9. T細胞機能分子を介する HIV-1 感染防御

分担研究者 神奈木 真理 東京医科歯科大学医歯学総合研究科 教授

研究要旨 HIV-1 感染高危険群のヒトの一部に遺伝素因に依らない HIV-1 感染抵抗性を持つ個体がある。我々は、以前、アロ特異的 CD8+細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が HIV-1 抑制能を持つことを報告したが、この抑制は CTL の抗原特異性とは無関係である。また、Nef 欠損 SIV を接種したサルは Nef の回復変異がおこるまで発症しないが、CTL 誘導を目的としたワクチンの感染防御効果は不完全である。これらの背景から我々は、自然免疫の中に HIV-1 複製抑制機構があるのではないかと考えている。本研究では、まず、抗原提示細胞側から CD4 陽性 T 細胞の表面分子を介した HIV-1 複製の抑制機構シグナルの存在を仮定し、候補として B7-CD28 ファミリー分子について平成 15 年度から検討してきた。昨年までに、ヒト CD28 と ICOS に対するモノクロナル抗体により R5 あるいは X4 HIV-1 株の複製が有意に抑制されることを明らかにした。この抑制は、HIV-1 co-receptor の発現やサイトカインを介するものではなく、主に HIV-1 侵入から逆転写までの過程でおこる。今年度は B7-CD28 ファミリーの可溶性蛋白を用いて、ICOS リガンドの他、CTLA-4 の可溶性蛋白の HIV-1 抑制効果に付いて解析を加えた。この結果、末梢血単核球 (PBMC) での HIV-1 産生は CTLA4-Ig により量依存的に抑制されるが、抗原提示細胞側を介した T 細胞抑制を伴う間接的な効果と考えた。従って、明らかな細胞毒性や免疫抑制を伴わず HIV-1 を抑制する ICOS シグナルの方が、臨床応用には有利であると考えられる。これとは別に、自然免疫の HIV-1 に対する影響を調べるため、新たに、マクロファージ、NK 細胞を含む実験系を作成した。モデル標的の K562 細胞に HIV-1 Nef を発現させたところ、NK 細胞の細胞傷害に対する感受性に変化は無かったが、引き続いておこる NK 細胞のガンマ-インターフェロン産生を著しく低下させることが分かった。ガンマ-インターフェロン産生は、細胞傷害とならび NK 細胞の重要な機能の一つであり、特に Th1 型免疫応答の促進に意味を持つため、Nef の病原性との関係が示唆される。

### A. 研究目的

T 細胞と自然免疫細胞 (マクロファージ、DC、NK 細胞等) との相互作用を介した HIV-1 抑制機構を解明するため、i) B7-CD28 ファミリー分子の相互作用による HIV-1 複製の抑制、および ii) マクロファージ、NK 細胞への Nef の影響について調べた。

自然免疫が HIV-1 感染防御に重要なのではないかという発想に至った理由は、現段階での CTL 誘導ワクチンの感染防御効果が不完全である一方で、遺伝素因に因らない HIV-1 感染抵抗性のヒト集団が存在する事実からである。

B7-CD28 ファミリー分子の解析を行なった理由は、CD4 細胞上の何らかのレセプター分子から HIV-1 複製を抑制する negative signal が

伝わるのではないかという仮定に基づいており、CD28 ファミリー分子は CD4 細胞上に発現され、そのリガンドである B7 ファミリー分子はマクロファージ、DC 等の抗原提示細胞に発現しているからである。

NK、マクロファージと Nef の関係を調べた理由は、Nef が HIV-1 の病原性に重要な因子であることが分かっているため、Nef の有無により自然免疫機能に影響があれば、その機能が宿主防御にとって重要である可能性があると考えたからである

### B. 研究方法

1) 健常人末梢血単核球 (PBMC) および NK、マクロファージの調整

非感染健康人末梢血から Ficoll-Hypaque 密度勾配遠心により PBMC を分離し、PHA 刺激、IL-2 存在下に 1 週間培養したものを HIV-1 (NL4-3 株) 感染させたのち、種々の CD28-B7 ファミリー分子の可溶性抗原を添加し、HIV-1 複製抑制効果を調べた。CD4 陽性細胞の精製には、磁気ビーズ法 (MACS、第一化学) の精製キットを用い単球その他の細胞を除去した。

PBMC 中の付着細胞を 5% ヒト AB 血清入り培地で 7 日間培養したものをマクロファージとして用いた。非付着細胞に L-Leucine methyl ester hydrochloride (LME, Sigma) を添加し室温で 40 分処理することにより貪食細胞を除去したものを末梢血リンパ球 (PBL) として用いた。NK 細胞の精製は、磁気ビーズを用いた CD56 陽性細胞のポジティブセレクションにより行なった。

#### 2) 可溶性 B7-CD28 ファミリー蛋白

ヒト CD28 および B7 family 分子にヒト Ig の Fc 部分を融合させた可溶性蛋白、B7-1(CD80)=Fc, B7-2(CD86)=Fc, B7-H2(ICOS リガンド)=Fc, CD28=Fc, CTLA-4-Fc, PD-1=Fc は R&D 社より購入した。

#### 3) HIV-1 産生抑制の検定

HIV-1 感染させた PBMC あるいは CD4+細胞と種々の濃度の可溶性 B7-CD28 ファミリー蛋白を加え、培養 4 日後上清中の HIV-1 p24 量を ELISA により調べた。

#### 4) Nef 発現 K562 細胞の作成

HIV-1 nef 遺伝子 (pNL4-3 由来) をレンチウイルスベクターに挿入し、電気穿孔法により K562 細胞に導入した。選択培地で増殖したクローンを複数個とり、Nef 発現を確かめた。コントロールとして K562 親株または  $\beta$ -gal 発現ベクターを導入した K562 を使用した。

#### 5) NK 細胞機能の検定

PBMC あるいは分離したマクロファージ、NK 細胞を含む培養に HIV-1 Nef 発現 K562 細胞を加え共培養した。細胞傷害活性は 6 時間の  $^{51}\text{Cr}$ -release assay で、培養上清中へのガンインターフェロン (IFN- $\gamma$ ) 産生は ELISA 法により測定した。

### C. 研究結果

#### 1) 可溶性 CD28-B7 ファミリー蛋白による

#### HIV-1 抑制

前年度までに、CD28-B7 ファミリーのうち、ICOS と CD28 抗体および可溶性の ICOS リガンド (B7-H2, B7h) が HIV-1 複製を抑制することを報告した。本年度は、種々の CD28-B7 ファミリー分子にヒト Ig の Fc 部分と融合させた可溶性蛋白を用いて HIV-1 抑制効果を調べた。その結果、可溶性 ICOS リガンドの他に可溶性 CTLA-4 が量依存的に HIV-1 複製抑制を示した。しかし、この抑制は PBMC を用いた場合には認められるが、CD4+細胞を精製して用いた場合には消失した。また、細胞数の減少を伴うことから、可溶性 CTLA-4 による HIV-1 抑制は、マクロファージを介した T 細胞の細胞増殖抑制による、間接的効果であると考えられた。

#### 2) Nef 発現細胞の NK 感受性

感染細胞の NK 感受性が Nef により影響されるかどうかを調べるため、NK 感受性細胞株 K562 に Nef を発現させた K562/Nef 細胞クローンを健康人由来 PBMC と共培養し 6 時間の  $^{51}\text{Cr}$ -release 法で細胞傷害性試験を行ったが、親株の K562 あるいはコントロールベクターを導入した K562 細胞と比べ、K562/Nef の NK 感受性に大きな差は認められなかった。Nef が NK 感受性に影響しないことは、複数の K562/Nef クローンと精製した NK 細胞を用いて確認した。

#### 3) NK 細胞の IFN- $\gamma$ 産生に対する Nef の影響

NK 細胞の IFN- $\gamma$  産生について調べるため、まず PBMC とコントロール K562 細胞を共培養したところ、顕著な IFN- $\gamma$  産生が見られた。PBMC をさらに PBL とマクロファージに分けて検討した結果、IFN- $\gamma$  産生は、PBL とマクロファージが共存した場合にはじめて認められた。従って、NK 細胞の IFN- $\gamma$  産生はマクロファージとの協調が必要と考えられた。これに対して、PBMC と K562/Nef との共培養では IFN- $\gamma$  産生は著明に抑制された。Nef 発現による IFN- $\gamma$  産生の抑制効果は PBL とマクロファージの共培養条件でも確認された。

### D. 考察

現段階では不完全なワクチンの感染防御効果を改善する方策の一つとして、自然免疫による感染抵抗性の応用が考えられる。本研究で示

された ICOS を介した HIV-1 抑制は、T 細胞内の抑制シグナル経路の存在と、それが自然免疫細胞上にあるリガンドで刺激されることを意味する。可溶性 CTLA-4 も HIV-1 抑制効果を持つが、T 細胞活性の抑制を伴うものであり、臨床応用には不適である。これに対して ICOS は元来 T 細胞活性化に関与するレセプターであり有望である。

一方、自然免疫と HIV-1 の関係を調べるために試作した実験系では思わぬ現象が見つかった。当初、NK 細胞の傷害性に対する感受性に Nef が影響することを想定していたが、結果は否定的であった。しかし、もう一つの NK 細胞の機能であるサイトカイン産生に対し Nef 著明な抑制効果を示した。用いた実験系はモデルであり、今後 HIV-1 感染細胞を用いた検証をする必要があるが、病現性を左右する Nef が初感染時の自然免疫応答に影響する可能性を示唆する結果である。

## E. 結論

ICOS リガンドによる刺激は T 細胞に HIV-1 複製抑制シグナルを伝える。可溶性 CTLA-4 の HIV-1 抑制は細胞増殖抑制を伴う間接的機序による。HIV-1 Nef は自然免疫細胞からのサイトカイン産生を抑制する可能性がある。

## F. 健康危険情報 なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kubo M, Nishitsuji H, Kurihara K, Hayashi T, Masuda T, Kannagi M: Suppression of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication by arginine deiminase of *Mycoplasma arginini*. *J Gen Virol* 2006. (in press)
- 2) Harashima N, Tanosaki R, Shimizu Y, Kurihara K, Masuda T, Okamura J, Kannagi M: Identification of two new HLA-A\*1101-restricted tax epitopes recognized by cytotoxic T lymphocytes in an adult T-cell leukemia patient after hematopoietic stem cell transplantation. *J Virol* 2005, 79:10088-10092.
- 3) Kurihara K, Harashima N, Hanabuchi S, Masuda M, Utsunomiya A, Tanosaki R, Tomonaga M, Ohashi T, Hasegawa A, Masuda T, Okamura J, Tanaka Y, Kannagi M: Potential immunogenicity of adult T cell leukemia cells in vivo. *Int J Cancer* 2005, 114:257-267.
- 4) Kannagi M, Harashima N, Kurihara K, Ohashi T, Utsunomiya A, Tanosaki R, Masuda M, Tomonaga M, Okamura J: Tumor immunity against adult T-cell leukemia. *Cancer Sci* 2005, 96:249-255.
- 5) Zhou X, Kubo M, Nishitsuji H, Kurihara K, Ikeda T, Ohashi T, Azuma M, Masuda T, Kannagi M: Inducible co-stimulator (ICOS)-mediated suppression of human immunodeficiency virus type 1-replication in CD4+ T lymphocytes. *Virology* 2004, 325:252-263.

### 2. 学会発表

- 1) Kannagi M, Zhou X, Kubo M, Nishitsuji H, Kurihara K, Ikeda T, Ohashi T, Azuma M, Masuda T: Suppression of HIV-1-replication by inducible co-stimulator (ICOS)-ligands. 7th ICAAP (International Congress on AIDS in Asia and the Pacific), Kobe, July, 2005.
- 2) Kubo M, Nishitsuji H, Kurihara K, Hayashi T, Masuda T, Kannagi M: Anti- HIV-1 factor(s) derived from HIV-1-irrelevant CD8+ cytotoxic T lymphocytes. 7th ICAAP (International Congress on AIDS in Asia and the Pacific), Kobe, July, 2005.
- 3) Kannagi M: A Crossing of Infection and Tumor Immunity against Adult T-cell Leukemia. Japan-US collaborative meeting for cancer immunosurveillance and cancer vaccine clinical trials, Sapporo, August, 2005.
- 4) 増田貴夫、西辻裕紀、濱本誠二、小櫃冨美、神奈木真理：HIV-1 インテグラーゼ結合因子 Gemin2 のウイルス複製における機能的関与。第 53 回日本ウイルス学会シンポジウム（横浜）2005 年 11 月
- 5) 林 隆也、西辻裕紀、久保 誠、増田貴夫、神奈木真理：非特異免疫に対する HIV-1 Nef

- の影響. 第 53 回日本ウイルス学会 (横浜) 2005 年 11 月
- 6) 久保 誠、西辻裕紀、栗原 清、林 隆也、増田貴夫、神奈木真理: Mycoplasma 感染した細胞培養上清中の HIV-1 複製抑制因子. 第 53 回日本ウイルス学会 (横浜) 2005 年 11 月
  - 7) 西辻裕紀、久保 誠、林 隆也、小原道法、多比良和誠、神奈木真理、増田貴夫: shRNA による HIV-1 複製阻害と逃避変異ウイルスの解析. 第 53 回日本ウイルス学会 (横浜) 2005 年 11 月
  - 8) 増田貴夫、西辻裕紀、濱本誠二、小櫃冨美、神奈木真理: HIV-1 インテグラーゼ結合因子 Gemin2 の機能解析. 第 19 回日本エイズ学会 (熊本) 2005 年 12 月
  - 9) 久保 誠、西辻裕紀、栗原 清、林 隆也、増田貴夫、神奈木真理: HIV 複製抑制効果を有するマイコプラズマ由来の因子. 第 19 回日本エイズ学会 (熊本) 2005 年 12 月
  - 10) 西辻裕紀、久保 誠、林 隆也、神奈木真理、池田たま子、増田貴夫: shRNA による HIV-1 複製阻害と逃避変異ウイルスの解析. 第 19 回日本エイズ学会 (熊本) 2005 年 12 月
  - 11) 林 隆也、西辻裕紀、久保 誠、増田貴夫、神奈木真理: NK 活性とサイトカイン産生に対する HIV-1 Nef の影響. 第 19 回日本エイズ学会 (熊本) 2005 年 12 月
  - 12) 神奈木真理: 成人 T 細胞白血病の発症予防と免疫治療の展望. 第 19 回日本エイズ学会シンポジウム (熊本) 2005 年 12 月
  - 13) 原嶋奈々江、栗原 清、清水由紀子、神奈木真理: 同種造血幹細胞移植後の ATL 患者における CTL メジャーエピトープ. 第 64 回日本癌学会 (札幌) 2005 年 9 月
  - 14) 栗原 清、原嶋奈々江、神奈木真理: リコンビナント Tax 蛋白を用いた HTLV-I 特異的 T 細胞応答の検出. 第 64 回日本癌学会 (札幌) 2005 年 9 月
  - 15) 小森一哉、長谷川温彦、栗原清、原嶋奈々江、神奈木真理. HTLV-I 経口感染ラットにおける HTLV-I 特異的免疫応答制御とその回復. 第 64 回日本癌学会 (札幌) 2005 年 9 月

- 16) 神奈木真理、原嶋奈々江、田野崎隆二、清水由紀子、栗原 清、岡村 純、増田貴夫: 成人 T 細胞白血病 (ATL) への造血幹細胞移植によって活性化された Tax 特異的 CD8 陽性 T 細胞の HLA-A11 拘束性メジャーエピトープ. 第 53 回日本ウイルス学会 (横浜) 2005 年 11 月

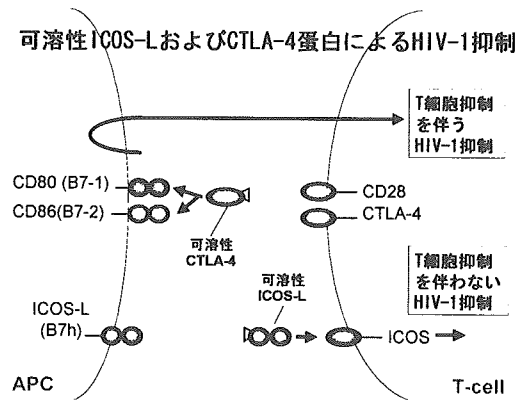


図 1 可溶性 B7-CD28family 蛋白による HIV-1 複製抑制  
可溶性 ICOS ligand は T 細胞上の ICOS を介して HIV-1 複製を抑制した。可溶性 CTLA-4 も HIV-1 抑制効果を示したが、抗原提示細胞側へのシグナルを介した T 細胞抑制を伴っていた。

標的細胞の Nef 発現による PBMC からの IFN- $\gamma$  産生低下

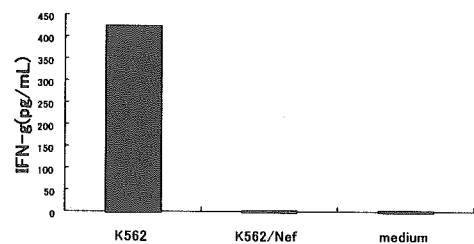


図 2 標的細胞の Nef 発現による PBMC からの IFN- $\gamma$  産生低下  
PBMC とコントロール K562 細胞を共培養したところ顕著な IFN- $\gamma$  産生が見られたが、PBMC と K562/Nef との共培養では IFN- $\gamma$  産生は PBMC 単独培養 (medium) と同レベルまで抑制された。

# 10. 樹状細胞の DC-SIGN と感染防御機構

分担研究者 牧野 正彦 国立感染症研究所病原微生物部 部長

協力研究者 向井 徹 (感染研・病原微生物部・室長)

研究要旨 *Mycobacterium avium* complex (MAC)に代表される非結核性抗酸菌は、一般的には自然界に存在する日和見感染菌であるが、免疫力の低下した AIDS 患者においては重篤な結核様症状を引き起こす。*M. avium* には、病原性との関連が指摘されている糖脂質 Glycopeptidolipid (GPL) が存在し、これらは糖鎖構造の違いにより数十種類の血清型に分別される。病原性にはこれらの糖鎖が深く関与するとされているが、その生合成機構はほとんどが解明されていない。そこで、同様に GPL を持つ非病原性抗酸菌 *Mycobacterium smegmatis* において GPL 生合成遺伝子の破壊株を作製し、これらを利用して *M. avium* の GPL 生合成遺伝子群の機能を解析した。その結果、*M. avium* GPL の骨格部分に関与する糖鎖転移酵素遺伝子の存在及び機能を明らかにした。*M. smegmatis* と *M. avium* は、GPL 生合成の初期段階においては共通の生合成経路を有しているが、後期には独自の経路を有していた。その後期経路が、*M. avium* の血清型の特異性を与え、かつエイズの日和見感染症と密接に関係する GPL を形成する可能性が示唆された。

## A. 研究目的

非結核性抗酸菌は病原性菌と非病原性菌に大別され、結核様肺炎を発症させる病原性菌の 70%は *Mycobacterium avium* complex (MAC) が起因菌であると報告されている。MAC は水中・土壌などに存在する環境菌であり、強い細胞性免疫応答誘導能を有しているため、感染してもその多くが効率よく体外へ排除される。MAC はその血清型により数十種に分類され、これらの中で病変発症と強く関係する血清型が存在することが明らかにされ、またエイズの日和見菌として重要な血清型も報告されている。血清型は、主に MAC 表層に存在する Glycopeptidolipid (GPL) の構造により規定されると考えられるが、実際どのような分子が病原性因子として機能しているのか現在まで不明である。GPL は、病原性を発揮する上で重要な役割を担うとされる多様な糖鎖を含むが、その構造は複雑であるため、生合成機構はほとんど明らかになっていない。これらの機構を明らかにすることは、糖鎖構造が病原性に与える影響の解明、さらには GPL の生合成阻害にターゲットを絞った薬剤の開発及びエイズの日和見感染に密接に関与する糖鎖の解明に繋がる可能性がある。

## B. 研究方法

*M. smegmatis* のゲノム上には糖転移酵素のモチーフを持つ機能未知の遺伝子が数多く存在する。これらの中から GPL 生合成への関与が予想される 4 遺伝子 (*gtf1-4*) を、抗酸菌ファージを利用した手法によりそれぞれの遺伝子破壊株を作製した。各破壊株から GPL 成分を単離・精製し、TLC, MALDI-TOF/MS 及び GC/MS によってそれらの構造を解析した。さらに、*M. avium* より上記の *gtf1-4* と高い相同性を示す機能未知の遺伝子 *gtfA* 及び *gtfB* をからクローニングし、それぞれの発現ベクターを構築した。各発現ベクターを *M. smegmatis* の破壊株に導入し、野生株型 GPL の生産回復を指標とした相補性試験によって *gtfA* 及び *gtfB* の GPL 生合成における機能を検討した。

ついで、血清型 1 および 2 の *M. avium* より、*gtfA* 遺伝子をクローニングし、*M. smegmatis* に導入発現させることで、*M. avium* 血清型 1 もしくは血清型 2 の GPL 末端糖鎖を持つ *M. smegmatis* を構築し、DC-SIGN 発現細胞へ感染させ結合能の検討を行った。

## C. 研究結果

*M. smegmatis* において 4 遺伝子の破壊株を作

製し GPL 成分の解析を行った結果、*gtf1*, *gtf2* 及び *gtf3* 遺伝子の破壊株で野生株型 GPL の生産が消失したことから、これらの 3 遺伝子が GPL 生合成に関与する糖転移酵素遺伝子であることが判明した。*gtf1* と *gtf2* 遺伝子産物は GPL の脂質ペプチド部分である LP core へ糖鎖を転移させ、また、*gtf3* は *M. smegmatis* に特異的な糖鎖構造の形成に関与することが明らかとなった。一方、*gtf1* 及び *gtf2* の遺伝子破壊株を利用した相補性試験の結果、*M. avium* の *gtfA* が *gtf1* 破壊株を、*gtfB* が *gtf2* 破壊株をそれぞれ野生株型へと回復させた。さらに、各破壊株の糖鎖解析から、機能未知であった *M. avium* の糖転移酵素遺伝子 *gtfA* 及び *gtfB* は 6-deoxy-talose 及び rhamnose をそれぞれ LP core へ転移させ、GPL の共通骨格 (nsGPL) を形成する機能を持つことが判明した。これらの結果は、GPL 生合成の初期段階では *M. smegmatis* と *M. avium* は共通の生合成機構を持っており、後期段階において種特異的な糖鎖構造を形成することを示している (図 1)。

DC-SIGN 結合能検討では、*M. avium* 血清型 1、血清型 2 GPL 発現 *M. smegmatis* の DC-SIGN 発現細胞内への取り込み効率において、親株 *M. smegmatis* と比較し有意な差は認められなかった。

#### D. 考 察

HIV-1 及び抗酸菌に対する生体防御反応は細胞性免疫を中心に営まれ、病原体を体外へ排除する際の直接的なメディエーターとして働く T 細胞の活性化は、樹状細胞を中心とする抗原提示細胞からのシグナルによって賦活される。HIV-1 及び抗酸菌の樹状細胞への取り込みに関与する細胞側のレセプターとして DC-SIGN 抗原が重要な役割を果たすことが明らかにされ、かつ DC-SIGN を介して抗原が樹状細胞内に取り込まれた場合、抗原特異的な T 細胞の活性化は抑制されることが報告されてきた。抗酸菌が樹状細胞に取り込まれる際、DC-SIGN に加え数種のレセプターが関与することもこれまでの多くの研究から明らかにされてきたが、エイズの日和見感染症として重要な非結核性抗酸菌 MAC と樹状細胞との相互作用については、ほとんど解析されずに今

日まで至っている。我々は昨年までに、MAC もまた BCG 等の抗酸菌と同様に、DC-SIGN をレセプターとして樹状細胞内に取り込まれることを明らかにしたが、MAC が DC-SIGN を介して樹状細胞に感染しても、HIV-1 の樹状細胞への感染に多くの影響を与えないことも見出ししてきた。一方、MAC はその血清型により数十種類にも分類され、それぞれの血清型により疾患起因性も異なることが近年報告されている。MAC の血清型の多くは GPL の糖鎖の差異により分類されると想定されるが、実際に病原性因子となる糖鎖を同定することは、GPL の構造上の複雑さから極めて困難と考えられている。そこで、MAC の病原性と密接に関与し、エイズの日和見感染症として重要な役割を果たす糖鎖を同定することを目的として、GPL の生合成代謝経路を解析した。*M. avium* の *gtfA* 及び *gtfB* は GPL の共通骨格に不可欠な糖鎖をそれぞれ転移させる機能を持つことが明らかとなった。従って、両遺伝子は GPL の生合成において、骨格形成という重要な機能を担っており、他の遺伝子が MAC の特異性及び血清型を与える重要な役割を担っていることが明らかになった。

#### E. 結 論

*M. avium* の *gtfA* 及び *gtfB* は、GPL 生合成における糖転移酵素遺伝子であることが明らかとなった。エイズ日 and 見感染症として重要な血清型を規定する糖鎖を同定し得る可能性が得られた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Maeda Y, Mukai T, Spencer J, Makino M: Identification of immunomodulating agent from *Mycobacterium leprae*. *Infect Immunity* 73:2744-2750, 2005.
- 2) Makino M, Maeda Y, Ishii N: Immunostimulatory activity of major membrane protein-II from *Mycobacterium leprae*. *Cell. Immunology* 233:53-60, 2005.

- 3) Miyamoto Y, Mukai T, Nakata N, Maeda Y, Kai M, Naka T, Yano I, Makino M: Identification and characterization of the genes involved in glycosylation pathways of mycobacterial glycopeptidolipids biosynthesis. *J Bacteriol* 188:86-95, 2006.
- 4) Mukai T, Miyamoto Y, Yamazaki T, Makino M: Identification of *Mycobacterium* species by comparative analysis of the *dnaA* gene. *FEMS Microbiol Lett*, 2006. (in press)

## 2. 学会発表

- 1) Makino M, Maeda Y, Mukai T: IL-1 at the early stage of monocyte differentiation to dendritic cells impairs functional activities of dendritic cells. Fortieth Annual U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program. 40<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Seattle, USA, July, 2005.
- 2) 宮本友司, 向井 徹, 中田 登, 甲斐雅規, 前田百美, 中 崇, 矢野郁也, 牧野正彦: 細胞内寄生に影響を与える抗酸菌糖脂質 Glycopeptidolipids の構造. 第 78 回日本細菌学会総会 (東京) 2005 年 4 月
- 3) 牧野正彦, 前田百美, 向井 徹: らい菌感染末梢血単球由来サイトカインの樹状細胞による生体防御反応に及ぼす影響. 第 78 回日本細菌学会総会 (東京) 2005 年 4 月
- 4) 前田百美, 石井則久, 向井 徹, 甲斐雅規, 福富康夫, 北田清悟, 小林和夫, 矢野郁也, 牧野正彦: MMP-II を用いたハンセン病血清診断法の開発. 第 78 回日本細菌学会総会 (東京) 2005 年 4 月
- 5) 甲斐雅規, Nguyen Phuc Nhu Ha, 松岡正典, 牧野正彦: リアルタイム PCR 法を利用した薬剤耐性変異検出の試み. 第 78 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 (青森) 2005 年 5 月
- 6) 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦: クロファジミンによる細胞死誘導. 第 78 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 (青森) 2005 年 5 月
- 7) 前田百美, 向井 徹, 山下康子, 牧野正彦: らい菌膜免疫調整性蛋白の同定. 第 78 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 (青

森) 2005 年 5 月

- 8) 向井 徹, 宮本友司, 松岡正典, 牧野正彦: LAMP 法によるらい菌遺伝子診断法の確立. 第 78 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2005 年 5 月 青森
- 9) 牧野正彦, 前田百美, 向井 徹: Analysis of mechanisms of multibacillary leprosy development: the role of IL-1 $\beta$ . 第 35 回日本免疫学会総会 (横浜) 2005 年 12 月

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得           なし
2. 実用新案登録   なし
3. その他            なし



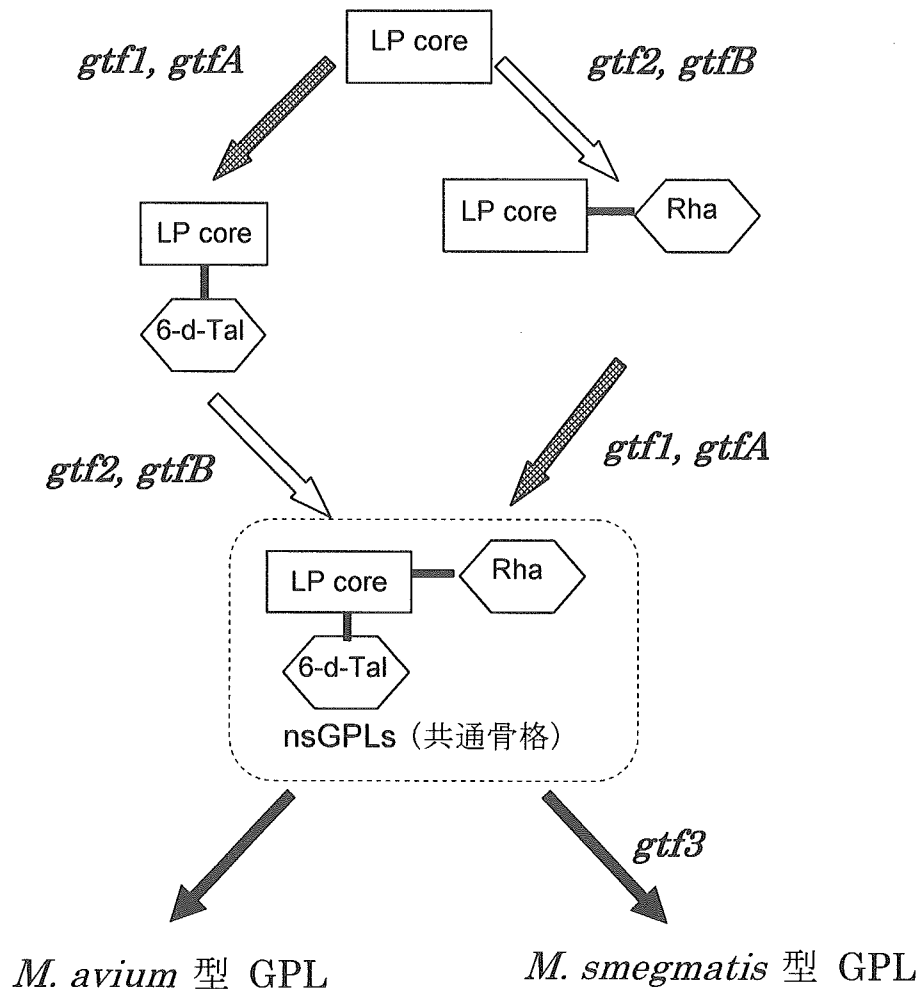


図1. GPLの糖鎖生合成経路. Rha; rhamnose, 6-d-Ta; 6-deoxytalose

# 1 1. 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

分担研究者 横田 恭子 国立感染症研究所免疫部第一室長

研究要旨 種々の抗原刺激に反応する抗原特異的な T 細胞を HLA の制限なく幅広く解析するため、T 細胞受容体刺激で誘導される IFN- $\gamma$  promoter の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た。これら組換えレンチウイルスはある程度活性化された初期培養 T 細胞にも効率よく感染し、特に IFN- $\gamma$  promoter 活性化に伴う  $\beta$ -lactamase の活性測定は、FACS を用いた多重染色解析にも応用可能である。このシステムはワクチンやウイルス感染における抗原特異的な T 細胞の活性化を評価する新しい手法であり、更に最適化してその実用化を計る。

## A. 研究目的

ワクチンがその効果を発揮するには、初期の T 細胞の活性化が量的および質的に強力で、しかも長期に存続する能力を誘導する必要があると思われる。しかしながら、その様な分子の実態は明らかではない。本研究は HIV 感染に対するワクチンの効果を十分に発揮するために必要な抗原提示細胞と T 細胞の相互作用に関わる因子を明らかにすることを目的とする。

## B. 研究方法

### 1) 細胞

末梢血単核細胞をファイコール密度勾配法で分離し PBMC を得た。PBMC より抗 CD14 標識磁気ビーズを用いて MACS で単球を分画し、GM-CSF と IL4 の存在下に 7 日培養して樹状細胞 (DC) を分化誘導した。CD14 陰性細胞は Negative selection により T 細胞を純化し (98%)、いったん凍結保存して使用時に解凍した。

### 2) 抗原

T 細胞刺激のため、スーパー抗原として知られる SEB (Sigma) は細胞に最終濃度 1  $\mu$ g/ml、PMA とイオノマイシンはそれぞれ 50 ng/ml と 500 ng/ml を加えた。

### 3) 培養

T 細胞を carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) 標識し、抗原を DC にパルスして T 細胞と混合培養した。抗原刺激 4 ~ 5 日後以降は IL-2 と IL-7 をそれぞれ 50 U/ml

と 10 ng/ml の濃度で加えた。培養 5 日後に増殖してくる (CFSE 陰性) 細胞を FACSaria でソートして、翌日レンチウイルスを感染させ、更に 5 日培養した。

### 4) レンチウイルスベクター

IFN- $\gamma$  mini promoter (distal あるいは proxy のエンハンサーをつないだもの) の下流に  $\beta$ -lactamase 遺伝子あるいは蛍光色素マーカーを挿入し、レンチウイルスベクター、pCS-EG/IFN $\gamma$ -dist(proxy)HcRed, pCD-EG/IFN $\gamma$ -dist(proxy)DsRed, pCE-EG/IFN $\gamma$ -dist(proxy)blazer 等を構築した (ベクター材料は理研・三好浩之博士より供与をうけた)。これらのベクターは感染効率を確認するため、EF-1 $\alpha$  promoter 下に GFP を発現するようにデザインされている。これらのベクターを HIV gag/pol, VSV-G/rev プラスミドとともに 293T 細胞にトランスフェクトし、培養上清を超遠心してウイルス濃縮液を調整した。導入効率を判断するため、293T 細胞に感染させて GFP 陽性細胞を計測し、MOI を計算した。

### 5) FRET

培養した細胞を洗浄後 0.5% BSA/PBS/25mM Hepes に浮遊させ、 $\beta$ -lactamase の基質である CCF2-AM を加え、室温に 1 時間放置して細胞にとりこませた。必要に応じて最後の 15 分間抗 CD8、抗 CD4、抗 CD69 抗体と反応させ、2% FCS/PBS/0.05% sodium azide (SB) で洗浄後に SB に PI (5  $\mu$ g/ml) を加え、FACSaria で解析

した。細胞表面抗原に対する蛍光標識抗体は Coulter-Immunotech 社あるいは e-Bio 社より購入した。

### C. 研究結果

IFN- $\gamma$  の産生は T 細胞受容体刺激初期に誘導され、抗原特異的な T 細胞活性化の指標となる。そこで種々の抗原刺激に反応する抗原特異的な T 細胞を幅広く解析するため、IFN- $\gamma$  の promoter の下流に蛍光色素あるいは  $\beta$ -lactamase をつないで、IFN- $\gamma$  promoter 活性を検出するレンチウイルスベクターを作製した。ウイルス感染やペプチド刺激による T 細胞活性化のレベルは個体差が大きく、解析可能なドナーに限られるため、今年度は T 細胞受容体刺激(PMA/IM あるいは抗 CD3/CD28 抗体)およびスーパー抗原 SEB 刺激により T 細胞を活性化した。DC と CFSE 標識 T 細胞に SEB 抗原を加えて共培養すると、5 日後に 20% 程度の T 細胞が増殖して CFSE (-) となる。この増殖期の細胞を CD4 と CD8 細胞においてソートし、翌日 IFN- $\gamma$  promoter の制御下に HcRed を発現するレンチウイルスを MOI=1.0 で感染させた。更に 5 日間培養して感染細胞の割合を FACS で解析すると、CD4、CD8T 細胞ともに 90% 以上の細胞が GFP を発現していたことから、増殖期の初期培養 T 細胞への導入効率は極めて高いことが示された (図 1)。しかしながら、こ

れらの細胞を PMA/IM で再刺激して IFN- $\gamma$  promoter の活性を調べたところ、細胞の多くは活性化によるアポトーシスが誘導され、最終的に HcRed 陽性細胞を FACS で検出することはできなかった。更に、HcRed のみあるいは DsRed のみを発現するレンチウイルスも初期培養細胞での蛍光が弱かったことから、主として  $\beta$ -lactamase による酵素活性を検出する組換えレンチウイルスベクターの有用性について検討した。

Jurkat T 細胞に IFN $\gamma$ -dist blazer を発現するレンチウイルスベクターを感染させ、GFP 陽性細胞をソートして IFN $\gamma$ -dist blazer がゲノムに組み込まれた Jurkat 細胞を作製した。細胞に CCF2-AM を取り込ませると、 $\beta$ -lactamase により細胞内の CCF2-AM が切断されて蛍光が緑 (520 nm) から青 (447 nm) に変化する (FRET)。図 2 に示すようにレンチウイルスが組み込まれた Jurkat 細胞 (B) はコントロール (A) と比較して定常状態の  $\beta$ -lactamase の活性が高くなっているが、PMA/IM 刺激により約 2 倍以上の  $\beta$ -lactamase の活性、即ち IFN- $\gamma$  promoter 活性化が検出された (C)。親株の Jurkat 細胞を PMA/IM 刺激しても細胞内 IFN- $\gamma$  染色ではその活性化を検出することはできなかった。従って、 $\beta$ -lactamase を指標に T 細胞の活性化を感度良く評価することが可能であると期待された。

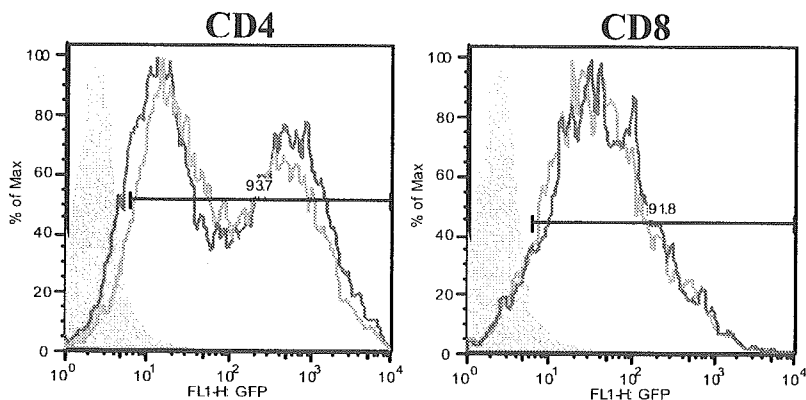


図1 増殖期にある初期培養 T 細胞へのレンチウイルスベクターによる遺伝子導入。

T 細胞を CFSE で標識した後 DC と SEB 抗原を加えて共培養し、5 日後に増殖期にある (CFSE negative) 細胞を CD4 と CD8 に分けてソートした。翌日組換えレンチウイルスベクターを感染させ、更に 5 日後 FACS でその感染効率を測定した。遺伝子のサイズが異なる EGFP のみのレンチウイルス (灰色実線) と、更に IFN $\gamma$  promoter 下に HcRed を発現するレンチウイルス (濃い実線) とでその感染効率に違いはなかった。しかしながらこれらの T 細胞を再刺激した時、HcRed の発現を確認することはできなかった。

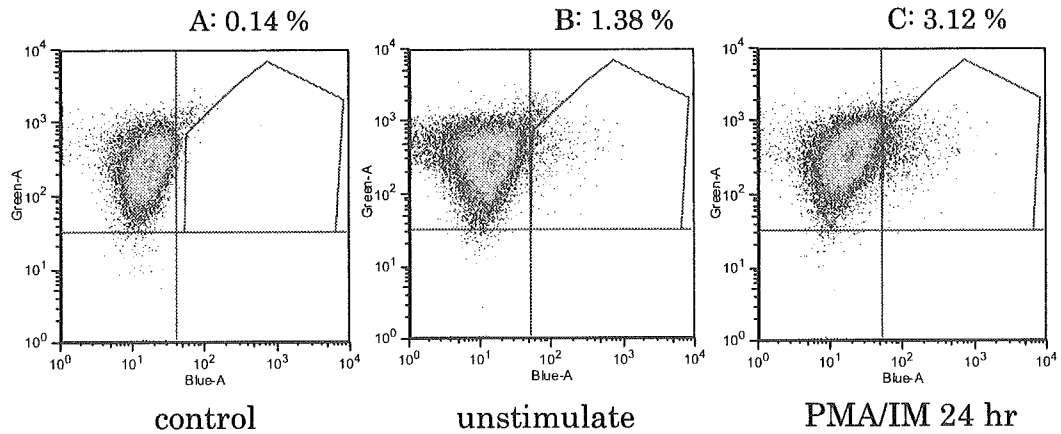


図2 IFN- $\gamma$  のプロモーター下に発現する $\beta$ -lactamase の検出。

Jurkat 細胞に IFN $\gamma$ -dist promoter 下に $\beta$ -lactamase を発現するレンチウイルスを感染させ、GFP 陽性細胞を増殖させた。この Jurkat 細胞を未刺激あるいは PMA/IM 刺激を加えて一晩培養し、翌日に CCF2-AM を細胞にとりこませた。これを 407-nm violet laser 搭載の FACSaria で解析した。A: コントロール Jurkat-EGFP 細胞。PMA/IM 刺激の有無に関わらず左から右にシフトする細胞の頻度は同じ。B: Jurkat-IFN $\gamma$ -dist-blazer-EGFP 未刺激。C: Jurkat-IFN $\gamma$ -dist-blazer-EGFP を PMA/IM で刺激した。

そこで、初期培養 T 細胞において IFN- $\gamma$  promoter の活性を検出可能かどうか確認するため、PBMC に組換えレンチウイルスを感染させ (MOI=0.2)、翌日 SEB で刺激した。更に翌日 CCF2-AM を細胞に取り込ませ、FACSaria で CD4 あるいは CD8 陽性細胞にゲートをかけて FRET 解析した。レンチウイルスの感染のみで細胞が活性化するため、刺激無しでも 1%程度 の IFN- $\gamma$  プロモーターの活性化があるもの

の、SEB 刺激により CD4 陽性 T 細胞では活性が 2 倍となった (図 3)。CD8 陽性細胞も低い値ながら 2 倍の活性を認めた (データ省略)。同じ細胞を細胞内 IFN- $\gamma$  染色すると、この刺激で約数%の細胞が IFN- $\gamma$  を産生していた。この時の感染効率は不明であるが、細胞数を多くしたため MOI が低かったことを考えると、更に最適化すれば初期培養 T 細胞の抗原特異的活性化を評価することは可能であると考えられた。

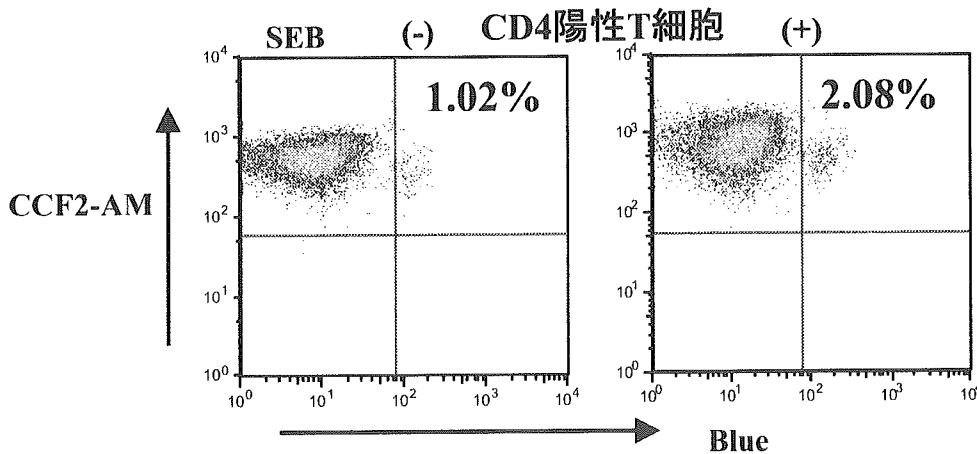


図3 PBMC の初期活性化の評価

新鮮な PBMC に MOI=0.2 で IFN $\gamma$ -dist-blazer-EGFP レンチウイルスを感染させ、翌日 SEB で刺激した。更に翌日細胞を回収して CCF2-AM を細胞に取り込ませ、図2と同様に緑から青への器質の変換を FACSaria で解析した。