

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業  
創薬等ヒューマンサイエンス総合研究推進事業

平成17年度

エイズ医薬品等開発研究

重点研究報告書

国際研究グラント事業 研究報告書

財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

平成17年度

エイズ医薬品等開発研究

重点研究報告書

国際研究グラント事業 研究報告書



# 目 次

## 重点研究

### 第1分野

KA11501	エイズに関連する日和見原虫感染症に対する新規創薬に関する研究	野崎智義 ……	1
KA11502	HIV-1 潜伏感染細胞からのウイルス再産生阻止薬の開発と応用に関する研究（総合研究報告）	石坂幸人 ……	11
KA11502	HIV-1 潜伏感染細胞からのウイルス再産生阻止薬の開発と応用に関する研究（平成17年度報告）	石坂幸人 ……	15

### 第2分野

#### 課題番号

KA21503	HIV-1 ディフェンスワクチンの創製・開発研究	梅田 衛 ……	21
---------	--------------------------	---------	----

### 第3分野

KA31504	ヒト型リンパ濾胞を持つエイズモデルマウスの作成とその応用	清水則夫 ……	27
KA31505	HIV-1 およびインフルエンザウイルスのゲノムRNA核外輸送機構の解明に基づく創薬	高橋秀宗 ……	35

## 国際研究グラント

SA14801	多剤耐性HIV-1 変異株に高い活性を発揮する「新世代のプロテアーゼ阻害剤」の研究・開発	満屋裕明 ……	43
SA14802	酵素との相互作用の解析に基づく耐性克服をめざしたエイズ治療薬の開発	木曾良明 ……	49
SA14803	HIV感染者のエイズ発症抑制に関与する遺伝的・免疫学的素因の解析	横田恭子 ……	59
SA14804	多剤耐性HIV-1 の克服に向けた新規核酸系逆転写酵素阻害薬の開発研究	馬場昌範 ……	67
SA14805	遺伝子発現制御を目的としたエイズ遺伝子治療用ベクターの開発及び実用化に関する研究（総合研究報告）	加藤郁之進 ……	76
SA14805	遺伝子発現制御を目的としたエイズ遺伝子治療用ベクターの開発及び実用化に関する研究（平成17年度報告）	加藤郁之進 ……	81
SA14806	HIV由来nefタンパク質の細胞形質転換作用を抑制する新規なAIDS脳症抑制剤の開発（総合研究報告）	赤川清子 ……	89
SA14806	HIV由来nefタンパク質の細胞形質転換作用を抑制する新規なAIDS脳症抑制剤の開発（平成17年度報告）	赤川清子 ……	96
SA14831	エイズ患者におけるカポジ肉腫、リンパ腫の発症機構の解明とその治療薬開発	片野晴隆 ……	104

SA24807	宿主感染抵抗性遺伝子の分子同定と発現解析によるエイズワクチン戦略の開発	宮澤 正 顯 …… 109
SA24808	細胞性免疫誘導型エイズワクチン開発の研究	滝口 雅 文 …… 118
SA24809	細胞性免疫誘導型prime/boostエイズワクチンの臨床評価系の確立	山本 直 樹 …… 128
SA24810	CD4+細胞機能を活性化するワクチン、免疫療法の開発	森 一 泰 …… 137
SA34811	エイズ抗酸菌症治療のための新しい化学療法システムの開発	森 亨 …… 144
SA34832	途上国における遺伝子多型に基づいたHIV治療法開発のための基盤整備	岡 慎 一 …… 148

エイズ医薬品等開発研究

重点研究報告書

## 第2分野

エイズワクチン等エイズ発症防止薬の  
開発に関する研究

## HIV-1 ディフェンスワクチンの創製・開発研究

所属 日本製薬株式会社イノベーションリサーチセンター

研究者 梅田 衛

研究要旨 HIV-1 の coreceptor (CXCR4, CCR5)のウイルスの吸着・侵入に必須なドメイン(Undecapeptidyl Arch, UPA: CXCR4、N<sub>176</sub>VSEADDRYIC; CCR5、R<sub>169</sub>SQKEGLHYTC)に基づく環状 dodecapeptide は、それぞれの coreceptor に対する conformational エピトープを認識できる抗体を誘導できることを明らかにしてきた。それらのうち CCR5 UPA 由来の cDDR5-MAP をカニクイザルに免疫し、SHIV<sub>SF162P3</sub> 株をに静注して challenge した。その結果、control に較べて、血中の viral loads が平均で 217.10 倍低下し、感染防御効果が認められた。そこで、HIV-1 coreceptor であるケモカインレセプターの特異構造 UPA を基礎にし、ウイルス性抗原、および免疫活性化物質を結合させた HIV-1 ディフェンスハイブリッドワクチン抗原の創製・開発のための基礎研究を行っている。

分担研究者

チンをつくる]ための基礎研究である。

(1) 国立感染症研究所

仲宗根 正

(2) 熊本大学大学院医学薬学研究部

庄司省三、三隅将吾、高宗暢暁

B. 研究方法

(1)カニクイザルに対する免疫

B virus, SVV, SRV, STLV 抗体陰性カニクイザル(中国産)4歳、オス、体重 2.9~3.6 kg、9 頭(予備実験として cDDR5-MAP 免疫サル3頭[No.4, 5, and 6]、本実験として免疫サル3頭[No.11, 13, and 16]コントロールとして MAP-免疫サル3頭[No.7, 8, and 9])を用いた。アジュバントは Freund complete adjuvant (FCA)または Freund incomplete adjuvant(FIA)を用いた。0 および 1 週後に 300 μg の cDDR5-MAP または MAP 抗原とアジュバントとして FCA を含むエマルジョンを腹腔に注射し、6 週後に 300μg の cDDR5-MAP または MAP 抗原とアジュバントとして FIA を含むエマルジョンを皮下に注射した。

A. 研究の目的

2001年2月にヒトのゲノム分析が終了し、解読、解析が始まり、生命情報(バイオインフォマテクス)が刻々と蓄積してヒト生命現象が克明に解き明かされ始めている、にもかかわらず、エイズワクチンの開発の困難さが改めて再認識されている。そこで主任研究者らは、ワクチンの基本的な理論を逸脱し、生体の守りを固め、ウイルス侵入を防止する手段を自己抗体に求めた。研究代表者等の究極の目標は HIV-1 の侵入に備え、適応免疫が発動するまでの Death time(6~12 時間)、この無防備の時間を、M細胞および B 細胞に標的させるための分子を同一抗原内にもつ、HIV-1 ディフェンスハイブリッドワクチン抗原によって、HIV-1 coreceptor、特に CCR5 の UPA に対する自己抗体で守り、自己抗体を常時誘導させ、ウイルスに対する IgA を粘膜局所に誘導させる経口粘膜免疫法を確立すること、すなわち、「飲むエイズワク

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<sub>SF62P3</sub> 株を 10TCID<sub>50</sub> 静注に challenge した。Challenge 後、1 週、3 週、4 週目に採血し、viral load, CD4(+), CD8(+), 細



胞数を測定した。なお、SHIV<sub>SF62P3</sub>株は予め、カニクニサル PBMC に感染させ、適合させて用いた。

## (2) 抗体及び抗血清の諸性質の検討

### 1) 免疫サル血清の CCR5 に対する反応性

まず、始めに予備実験としてサル No.4, 5, 及び6を用い、cDDR5-MAP 抗原を免疫し、抗体の産生をしらべた。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)及び透析処理 (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。

### 2) HIV-1 感染防止効果測定

ウイルスは clade B として HIV-1 JRFL 株 (R5 ウイルス) または HIV-1 LAV 株 (X4 ウイルス) を用いた。また non-clade B HIV-1 として HIV-193RW004 (clade A), HIV-1MJ4 (clade C), および HIV-192TH009 (clade E) を NIH AIDS Research & Reference Regent Program から入手し、ヒト PBMC に感染させ増や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)。

## (3) HIV-1 ディフェンスハイブリッドワクチン抗原の調製

### 1) 6-アミノ-ヘキシル-CpG-DNA(S)の大量調製

免疫活性化物質として CpG DNA を調製した。全てのアカゲザルを用いた実験に必要な量を確保するために最低 5000OD を目標に合成した。生体内での安定性・有効性を向上させるために CpG DNA 内のホスホジエステル結合をホスホエチオエート結合に変えることにより、生体内での安定性を確保している。ホスホロジエステル結合オリゴを治療薬として用いるには、そのヌ

クレアーゼ分解が一つの限界となっていた。たとえば、10%のヒト血清中で、そのおおよその半減期は、30 分といわれている。一方、ホスホロチオエートは、オリゴヌクレオチドのヌクレアーゼ分解に対する感受性を大幅に減らし、オリゴとしての活性はそのまま保持される化学修飾であるとして注目されている。また、疎水性があがっているために、体内からの排出速度が遅くなると考えられている。そこで合成は、自動合成機で合成し、さらに 5' 末端に C6 amino linker を結合させ、ハイブリッドワクチン合成の際のリンカーにする。合成後、逆相カラムで精製後、純度を 90%以上になるように精製し、保存した。

### 2) 経口粘膜免疫による HIV-1 の感染防御のための分子化学的方策

経口粘膜免疫による HIV-1 感染防御を目指すためには小腸粘膜上皮組織の M 細胞にいかにか targeting させるかにかかる。現在、targeting 分子をバイオインフォマテクスにより検索し、化学的合成法を確立した。

### 3) SIVmac239 Env の調製

ENV タンパク質の特異的三量体構造を認識する中和抗体を誘導するため、サル腎臓由来の COS-7 細胞を用いて SIVmac239 Env の発現系の構築を試みた。Env gp160 から furin により切断された gp120/gp41 三量体は非共有結合で連結されているがその結合は相対的に脆弱なものである。そこで、この gp120/gp41 の三量体構造を維持するために、gp120 と gp41 の切断部位を二ヶ所のアミノ酸を置換させることにより欠失させ、Env 複合体の三量体構造を維持させた。さらに Env タンパク質を発現させる際に、gp120/gp41 すなわち gp160 として発現させると gp41 の membrane-spanning domain (MSD) と呼ばれる膜貫通領域も含まれ、細胞膜に貫通した状態で発現する。そこで Env 回収の際の利便性を図るべく、gp120 と gp41 の MSD より N 末端側の ectodomain までを gp140 とし、回収並びに機能解析のために gp140 の C 末端に FLAG-MAT tag を付けるようデザインした。さらに gp140 の発現を促進するために



rev コンストラクトも作製し、rev と gp140-FLAG-MAT を共発現させるための発現ベクターの構築を行い、COS-7 細胞にトランスフェクトし培養上清中に得られた gp140 の精製並びに機能解析を行った。

#### 4) M細胞標的分子の評価

庄司博士により開発された M細胞標的分子を Caco-2 cell を Raji B cell と共培養することにより分化させ調節した M細胞に targeting するかを確認した。

#### 5) 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)。

#### 6) アカゲザル cell line を用いた SIVmac239 感染実験系の構築

高橋秀実博士 (日本医科大学医学部微生物免疫学) が樹立されたアカゲザル由来の cell line に SIVmac239 を感染させ、感染成立後、細胞をパラホルムアルデヒドで固定化後、SIVgp130 に対する抗体で intracellular staining を行った。感染の有無は FACS で確認した。

(倫理面への配慮)

- (1) 日水製薬において実験動物倫理会の規則に従い、動物愛護上の諸問題に配慮して行う。
- (2) 熊本大学において熊本大学実験動物倫理会の規則に従い、動物愛護上の諸問題に配慮して行う。
- (3) ハムリー株式会社において、同社内に設置されてある実験動物倫理委員会の規則

に従ってサルに対する実験を行う。

### C. 研究成果

#### (1) 6-アミノ-ヘキシル-CpG-DNA(S) の大量調製

今回合成した 6-アミノ-ヘキシル-CpG-DNA(S) は、24 mer から構成されており、分子量が 7876、 $T_m=62.9$  のものである。一回の合成で平均で 23.7OD の収量であった。数回の合成後、トリエチルアミンアセテートを含むアセトニトリルで緩衝化させた逆相カラムに 6-アミノ-ヘキシル-CpG-DNA(S) 吸着させ、10% アンモニアで十分に洗浄し、10% TFA をもちいてアミノ基の保護基で使用している Mmt を除去し、40% アセトニトリルを用いて分離精製した。

合成された 6-アミノ-ヘキシル-CpG-DNA(S) を HPLC で分離したところ、得られたメジャーピーク由来のフラクションを 3-hydroxypicolinic acid を用いて MALDI TOF-MS で解析を行ったところ、質量数 7877.2136 に  $[M+H]^+$  の分子イオンピークが検出された。従って高純度の 6-アミノ-ヘキシル-CpG-DNA(S) が合成可能となった。

#### (2) 経口粘膜免疫による HIV-1 の感染防御のための分子化学的方策

HIV-1 感染が主に性感染であり、最近になり感染初期には GALT (Gut-associated lymphoid tissue) の CD4+T cell の減少が見られることがわかってきた。そこで、ワクチンの標的組織として GALT を選択し、腸管粘膜における抗原取り込みを行なう M細胞にターゲットングする新規化合物を調製した。細胞内での分解を回避するために、基本骨格部分は D 体のアミノ酸を使用しており、大量合成にも成功した。

本研究で合成した M細胞標的分子が本当に M細胞にターゲットングできるか否かを検討するために、培養している Caco-2 cell の細胞懸濁液を  $3 \times 10^5$  cells/100  $\mu$ L になるように調製し、この細胞懸濁液を Transwell™ に載せて、乾燥しないように注意して 24 時間培養した。

そして、Transwell™をひっくり返し upper-chamber に 100  $\mu\text{L}$  の Caco-2 の passage medium、lower-chamber に 600  $\mu\text{L}$  の Caco-2 の passage medium を加えて培養し、培養に用いない 24-well には乾燥防止のために 1000 $\mu\text{l}$  のメディアムを加えた。3 日に 1 度メディアムの交換を行ないながら、抵抗値が基準値である 600  $\Omega \cdot \text{cm}^{-2}$  を超えるまで 21 日間培養した。次に、upper-chamber に  $1 \times 10^6$  cells に調製した Raji B cell を新たなメディアム(Caco-2 の passage medium:Raji B cell の passage medium=1:1) 100  $\mu\text{L}$  で加えて、upper-chamber で 3 日間培養した。そのようにして得られた M 細胞に本研究で分子設計をした M 細胞標的分子を作用させた。なお、M 細胞標的分子には FITC で蛍光ラベルすることにより顕微鏡下追跡できるようになっている。その結果、M 細胞特異的に結合していることが観察された。

### (3) SIVmac239 ENV protein の調製

COS-7 細胞に pBICEP Rev-exon I-Rev-exon II SIVmac239p140(R512E, K523E) FLAG-MAT 発現ベクターをトランスフェクションしたところ、トランスフェクション後 48 時間から COS-7 細胞内で SIVmac239 gp140 の発現が見られた。SIVmac239gp140 は PFO-PAGE による解析の結果、主に三量体構造を維持していた。

### (4) M細胞標的分子の評価

#### M 細胞標的分子の評価

粘膜免疫組織への M 細胞を介する標的分子を *in vitro* で分化させた M 細胞に摂取し、摂取後固定化し、レーザー顕微鏡で観察した。M 細胞を介する標的分子は、あらかじめ FITC で標識されている。その結果、本分子が *in vitro* で M 細胞を標的としていることが明らかとなった。

### (5) アカゲザル cell line を用いた SIVmac239 感染実験系の構築

アカゲザル cell line は CD4、CCR5、BONZO、BOB を発現しており、SIV の感染を FACS で検出できる。すでに、RANTES、MIP-1 beta、TAK-779 等

を用いて SIV の感染を防止するとコントロールと比べて gp130 抗体によって染色されている強度が低下することも確認した。

## D. 考察

研究代表者等は HIV-1 の coreceptor (CXCR4, CCR5) の UPA に対する自己抗体を常時、粘膜免疫組織に誘導し、さらに HIV-1 の ENV protein に対する抗体を粘膜局所に誘導するために、ハイブリッドワクチンを創製している。そのハイブリッドワクチン創製のために必要な因子は、細胞性因子として HIV-1 coreceptor の UPA 由来の環状ペプチド、ウイルス性因子として Env protein、B 細胞標的分子である CpG DNA、さらに M 細胞標的分子であるが、いずれも合成に成功している。現在それらの大量合成と経口粘膜免疫するための指摘条件を検討している。

## E. 結論

HIV-1 ディフェンスハイブリッドワクチンの創製・開発する上で、カニクイザルの実験において、cDDR5-MAP 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、さらに、SHIV<sub>SF162P3</sub> 株をカニクイザルに静注して challenge した結果、control に較べて、血中の viral loads が平均で 217.10 倍低下する感染防御効果がみとめられた知見は、我々が現在進めているプロジェクトの基本コンセプトを支える重要なものであった。同時に HIV-1 Env protein に対する抗体を粘膜局所に誘導できれば、性的接触によるウイルスの伝播を完全に阻止できる予防ワクチンになりえると思われる。

## F. 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<sub>162P3</sub> challenge. *J.*  
*Immunol.* (2006) 176(1):463-471

- (2) 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.*  
(2005)138(5):571-582

## 2. 学会発表

- (1) Keiichi Tokunaga, Shogo Misumi, Daisuke  
Nakayama, Masashi Kusaba, Ryozauro Mukai,  
Kuniomi Tachibana, Tadashi Nakasone, Mamoru  
Umeda, Hideaki Shibata, Nobutoki Takamune,  
Shozo Shoji Effects of Immunization with  
CCR5-Based Cycloimmunogen on Simian/Human  
Immunodeficiency Virus SF162P3 Replication. 第78  
回日本生化学会抄録集 vol.77 No. 8. 2005, p1062
- (2) Kohei Kiyonaga, Daisuke Nakayama, Keiichi  
Tokunaga, Shogo Misumi, Tadashi Nakasone,  
Ryouzauro Mukai, Kuniomi Tachibana, Mamoru  
Umeda, Hideaki Shibata, Nobutoki Takamune,  
Shozo Shoji. Immunogenic properties of  
CCR5-CXCR4 chimera cycloimmunogen  
(cCD-MAP) in cynomolgus monkey. 第78回日本生  
化学会抄録集 vol.77 No. 8. 2005, p1062

## G. 知的所有権の出願・登録状況

### 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



---

平成17年度

エイズ医薬品等開発研究  
重点研究報告書  
国際研究グラント事業 研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社