

政策創薬総合研究事業  
政策創薬総合研究推進事業

平成18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

## 目 次

### 重点研究

#### 課題番号

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
KA21503	HIV-1ディフェンスワクチンの創製・開発研究	梅田 衛 …… 22
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 …… 32
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 …… 45

### 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 …… 57
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 …… 71
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 …… 88
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 …… 103
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 …… 116
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 …… 122
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 …… 157
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 …… 174
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 …… 193
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 …… 206
SAC4861	HIV転写制御機構の解明と新規治療法の開発	岡本 尚 …… 216
SAC4862	霊長類モデルを用いたエイズ腸管病態形成機構の解明と治療への応用	三浦 智行 …… 221

## HIV-1ディフェンスワクチンの創製・開発研究

所属 日水製薬株式会社

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 SIV coreceptor であるケモカインレセプターの特異的構造 UPA を基礎にし、ウイルス性抗原 ENV、および免疫活性化物質 CpGDNA を結合させた HIV-1 ディフェンスワクチン抗原の創製・開発のための基礎研究を行った。

### 分担研究者

- (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
- (3) 熊本大学大学院医学薬学研究部 三隅将吾
- (4) 熊本大学大学院医学薬学研究部 高宗暢暁

### A. 研究の目的

ウイルスの Env・Gag タンパク質を基礎とする中和抗体産生・CTL 誘導ワクチン、Prime-Boost DNA ワクチン、Poliovirus-vector 弱毒 virus による粘膜免疫ワクチン、CD4-gp120 架橋ワクチン等が開発されたが、必ずしも成功には至っていない。HIV-1 に対抗するためには1つの方法手段に固守するのではなく、人類の全叡知を注ぎ込んだ総力戦が肝要である。そこで、申請者等は HIV-1 の侵入の現場、粘膜組織において生体の守りを固め、HIV-1 に対する有効な免疫を経口を介して確立することを勘案した。以下に本研究事業の目的をまとめた。

1. 経口粘膜免疫を完成させるための方策として、小腸粘膜組織の M 細胞への生体に優しい Targeting Molecule の創製 (分担研究者 庄司)
2. 生体の守りを固める方策として、HIV-1 coreceptor に対する自己抗体を誘導し、ウイルス侵入を防止する方策 (分担研究者 三隅)
3. 膣粘膜組織を経口粘膜免疫を介して、HIV-1 ENV

特異的な分泌型 IgA の誘導させる-SIVmac239 由来 gp140 を調製- (分担研究者 三隅)

4. 上記3種の分子・抗原で修飾された高分子ポリマーからなるワクチン抗原をナノ粒子に抱埋し、腸溶カプセルに封入して経口投与できる飲む「HIV-1 ディフェンスワクチン」をつくることである。(主任研究者 梅田)

5. 現在開発中の HIV-1 ディフェンスワクチン抗原投与により得られる抗血清の抗 SIV 効果を評価するための既存の評価系の検討と新たな評価実験系の構築 (分担研究者 高宗)

6. 高等動物サルにおける HIV-1 のディフェンスワクチンの作用及び効果に関する研究 (分担研究者 仲宗根)

### B. 研究方法

#### (1) アカゲザルのスクリーニング

最終的に B virus, SVV, SRV, STLV 抗体陰性カニクイサル (中国産) 4歳、メスの月経の確認等を行った。

#### (2) McDSの調製

Gallic acidとD-Lysineからなる新規M細胞標的分子MCDS固層法を確立した。(Fmoc)4-D-MAP-Et hylendiamine-Trt-resinのFmoc基を脱保護し、洗浄後、3,4,5-trimethoxybenzoic acid chloride

を加え(MeO-Galloyl)4-D-MAP-ethylendiamine-T  
rt-resinを得た。次に、メトキシ基の脱保護によ  
りMcDSを得る。

### (3) *in vitro* M細胞ターゲティング能確認試験

McDSのM細胞ターゲティング能の検証のため、C  
aco-2とRaji B細胞の共培養によって誘導される  
M-like細胞modelを用いた。M-like細胞への分化  
に伴って、表面抗原等タンパク質の分布・発現量  
が変化する。現在までの報告によると、この分化  
に伴いintegrinβ1、ICAM-1、SLAA等の頂端膜側で  
の発現が促進されることが判っている。これらの  
抗原の発現を確認して実験に用いた。なお、McDS  
にFITCを結合させた分子を合成し実験に用いた。  
さらに、M-like細胞modelによる取り込みが既に  
確認されているポリオウイルスとの共局在も確  
認した。

### (4) ペプチド合成

ペプチドの合成はFmoc chemistryによる全自動ペ  
プチド合成機によった。SIVのcoreceptor (Rh-CCR5)  
の第2細胞外ループ(ECL-2)の Undecapeptidyl Arch  
(UPA): R<sub>169</sub>SQREGLHYTCの各々から Cys を除き、ス  
ペーサーアームジペプチド (Gly-Lys) を挿入して、  
C 末端から各種側鎖保護アミノ酸を用いて合成した。  
得られたペプチドのC-末端のカルボキシル基とN末  
端アミノ基を酸アミド結合を介して環状化し  
Rh-cDDR5 を調製した。スペーサーペプチドの Lys 側  
鎖は、コア抗原の活性エステルに直接結合させた。

### (5) 環状ペプチドの構造解析

環状ペプチドの構造解析はMALDI-TOF MSを用いて  
行った。

### (6) 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Vero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 (MS  
D)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-M  
AT tag を付けるようデザインした。このコン  
ストラクトをアルファウイルス由来のベクタ  
ーに挿入後、RNAを調製し、Vero細胞にエレクト  
ロポレーション後、培養上清中のgp140をNi  
カラム、レクチンカラムを用いて精製した。

### (7) 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、細胞をバラホ  
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。

### (8) Rh-CCR5 発現 SIVmac239 発現インジケータ細胞 系の構築

Rh-CCR5 mRNAを調製し、逆転写によりcDNAを得た後、PCRで増幅し、発現ベクターに組み込みCOS-7細胞及びVero細胞等にCD4発現ベクターとともに遺伝子導入を行った。CCR5のためのプライマーとして5'-CCC CCA ACA GAG CCA AGC TCT CCA TCT AG-3'と5'-CTG TGT ATG AAA ACT AAG CCA TGT G CA CAA C-3'を用いた。さらにCD4のためのプライマーとして5'-TAA GGA TCC GCC CTG CCT CCC TC A GCA AGG CCA CAA TG-3'と5'-TAG CTC GAG TGC AAT TGG GAT CTC CCT GGC CTC GTG CC-3'を用いた。

(9) 経口粘膜免疫による SIV の感染防御のためのワクチン抗原送達システムの評価 -*in vivo* M細胞ターゲティング能確認試験-

アカゲザル(雄、体重 5-6kg)をウレタン麻酔し、開腹して用いる。アカゲザルの盲腸部位から回腸15cm 部位に CHP-McDS-FITC を 0.5ml(12.5nmol)及び poliovirus 溶液(0.5ml、poliovirus 一人分)を注射して腸内に投与する。60 および 120 分後に投与した回腸部位 15cm を摘出し、腸管膜側を切り開き、パイエル板の存在する部位(1×10cm)及びパイエル板の存在しない部位(1×10cm)を、それぞれ 0.T.C-compound を用いて固定する。固定した組織切片をポリオウイルス抗体(II 型)/TRITC-Donkey anti-mouse IgG を用いて染色し、蛍光顕微鏡によって観察した。

(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) 株式会社 新日本化学において、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。

(10) 抗原の調製(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 50000D 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オ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、そのおよそ半減期は、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。

(11)高分子ポリマーによる抗原の調製

ポリエチレングリコール(polyethylene glycol: PEG)による新規基盤分子を合成した。原料として、末端に p-ニトロフェノール誘導体である活性化エステルを有する 8-arm type の PEG(HGEO-200NP)と末端に一級アミンを有する 8-arm type の PEG(HGEO-200PA)を使用した。

まず、HGEO-200PA に 14.4ml の DMF を加え、そこに 1ml の DMF に溶解させた HGEO-200NP 溶液をゆっくり

と滴下し、16時間反応させて2次水を外液として48時間透析を行った。透析終了後、凍結乾燥し目的とする新規基盤分子となる core antigen を得る。最終的にこの core antigen に MaDS および Rhsus-cDDR5、CpG-DNA を PEG を介して結合させてワクチン抗原とした。

## C. 研究結果

### (1) *in vitro* M細胞ターゲティング能確認試験

分担研究者庄司の研究結果---タイトジャンクションを形成したCaco-2のmonolayerとRaji B細胞との共培養によって誘導されるM-like細胞を用いて、既にM-like cellにより取り込まれることが報告されているポリオウイルスとMcDSは共局在していることを明らかにした。従って、McDSは*in vitro*においてM-like cellを認識する機能を有することが示された。

### (2) Rhesus-cDDR5 の調製

分担研究者三隅の研究結果---従来スパーサーペプチドとして利用していた Gly-Glu 配列から Gly-Lys 配列に変更することによりワクチン抗原用の CCR5 由来環状ペプチドの大量合成法を確立することができた。

### (3) SIVmac239 Env の調製

分担研究者三隅の研究結果---昨年度に構築した gp140 発現系をアルファウイルス由来のベクターを用いて再調製した。そのコンストラクトから RNA を調製し、Vero 細胞にエレクトロポレーション後、培養上清中の gp140 を Ni カラム、レクチンカラムを用いて精製した。Vero 細胞を用いて SIVmac239 gp140 の大量調製法を構築できた。

### (4) アカゲザル cell line を用いた SIVmac239 感染

実験系について

分担研究者高宗の研究結果---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。

### (5) Rhesus-CCR5 発現 SIVmac239 発現インジケータ一細胞系の構築について

分担研究者高宗の研究結果--- pBabe-puro 系の発現ベクターに CCR5 遺伝子を組み込み、Rhesus-CD4 および Rhesus-CCR5 高発現細胞のクローニングを現在進めている。この系は、これまでに構築した抗 SIV 効果の評価系よりも早く細胞等が調製できるメリットが期待されるとともに、ランニングコストを低下させることができる。

### (6) *in vivo* M細胞標的能確認試験

分担研究者仲宗根の研究結果--- パイエル板の Dome area 周辺において McDS が観察され、*in vivo* において McDS の M細胞標的能を確認することができた。

### (7) 高分子ポリマーによる抗原の調製

主任研究者梅田の研究結果---PEG を介して Rhesus-cDDR5、McDS、CpG-DNA、と gp140 を連続して結合させる合成を確立できた。また、core antigen に Rhesus-cDDR5、McDS、CpG-DNA、と gp140 がどれだけ結合したかも容易に定量できる方法も確立した。

## D. 考察

HIV-1 の初発感染部位である粘膜面に免疫応答を誘導し初発感染防止をおこなうことは、生体防

御の観点から見てきわめて理にかなった方法であると考えられ、創製した新規ポリフェノール型 M 細胞標的分子 McDS をもちいて、粘膜免疫システムを構成している誘導組織と実効組織に抗原特異的免疫応答を誘導し、HIV-1 の感染を防御できる経口ワクチンの開発を行っている。これまでに、M 細胞標的分子を作製する試みはいくつかの研究グループで進められてきたが、レクチンはそのままワクチン抗原として用いることができないために、低分子化をすることが望まれていた。本研究事業で作製された McDS は、分子量が 1000 ほどの低分子で、これまでのところ胚中心に集積して来ることが確認できているので、うまく DC を介して抗原がクロスプレアゼンテーションされれば、粘膜免疫だけでなく、液性免疫および細胞性免疫も誘導できる可能性がある。

## E. 結論

McDS による M 細胞ターゲティング能を利用して、生体に HIV-1 に対する二段構えの防御機構（粘膜（膣、直腸）における HIV-1 の中和及び GALT での HIV-1 の複製阻止）を構築できれば、有効な AIDS ワクチンを創出できる可能性がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Shogo Misumi, Nobutoki Takamune, and Shozo Shoji. Immunoreactive cycloimmunogen design based on conformational epitopes derived from human immunodeficiency virus type 1 coreceptors: cyclic dodecapeptides mimic undecapeptidyl arches of extracellular loop-2 in chemokine receptor and inhibit human immunodeficiency virus type 1 infection. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug*

*Targets* (2006) *in press*

### 2. 学会発表

- (1) 三隅将吾、庄司省三 ケモカインレセプター (CCR5 および CXCR4) の undecapeptidyl arch (UPA) 構造は AIDS ワクチン開発のための標的になりえるか? 平成 18 年度 日本生化学会九州支部例会要旨集 p.25
- (2) 浦田悟充、三隅将吾、三股亮太郎、清永康平、高宗暢暁、庄司省三 経口 AIDS ワクチン開発における HIV-1 envelope タンパク質の調製 第 23 回日本薬学会九州支部大会講演要旨集 p184
- (3) 衛藤あゆみ、三隅将吾、高宗暢暁、庄司省三 アカゲサル由来 HVS 不死化 T 細胞 MM133 を用いた SIVmac239 感染実験系の構築ー経口エイズワクチン開発における評価系の構築ー 第 23 回日本薬学会九州支部大会講演要旨集 p185
- (4) Ryotaro Mitsumata, Daisuke Nakayama, Shogo Misumi, Tadashi Nakasone, Ryouzaburo Mukai, Kuniomi Tachibana, Mamoru Umeda, Hideaki Shibata, Nobutoki Takamune, Shozo Shoji Mimotope peptide based on CCR5 and CXCR4 as HIV-1 coreceptors induces bifunctional antibodies. 20th IUBMB international Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006, abstract p.208

## 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 PCT/JP2006/321720



---

平成18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19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