

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 正顕 ……	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

研究期間 平成16年4月～平成19年3月

研究要旨 HIV-1 coreceptor であるケモカインレセプターの特異構造 UPA をペプチドワクチンとして用いることにより、ウイルス感染防御効果がみとめられた知見を基礎にし、ウイルス性抗原 ENV、および免疫活性化物質 CpG DNA 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うことができた。

分担研究者

- (1) 国立感染症研究所 仲宗根 正
- (2) 国立感染症研究所 向井 隼三郎
- (3) 熊本大学大学院医学薬学研究部 庄司省三
- (4) 熊本大学大学院医学薬学研究部 三隅将吾
- (5) 熊本大学大学院医学薬学研究部 高宗暢暁

A. 研究の目的

エイズ患者のセックス・パートナーやアフリカの売春婦群の中には、HIV-1 感染者との明らかな性的接触がありウイルスの侵入を受けた形跡があるにもかかわらず、長期間にわたり体内での HIV-1 増殖が抑制され CD4 陽性 T リンパ球数の減少も認めない、感染抵抗性を獲得していると思われる群や長期未発症者の存在が明らかとなり、これらの人々から HIV-1 Env 特異的中和抗体が検出されている。このような、HIV-1 中和抗体のターゲットとして挙げられるものは、CD4 との結合領域に結合する抗体(CD4 binding domain; CD4bd)、CD4 と結合し立体構造が変化することで露出するエピトープに結合する抗体、V3 領域に結合する抗体、gp120 の糖鎖に結合する抗体、gp41 と結合し標的細胞との膜融合を阻害する抗体などがある。

さらに、HIV-1 の 80%は異性間性交渉で伝播していると言われており、生殖器や腸管粘膜固有層を介した感染が示唆される。実際、粘膜下には CCR5 陽性の活性化された CD4 陽性 T 細胞が数多く存在して、サル免疫不全ウイルス(simian immunodeficiency virus, SIV)の標的となることが知られていた。また、腸管の SIV 感染においてはこれら CCR5 及び CD4 ダブルポジティブ記憶 T 細胞の顕著な破壊が感染早期に起こり、末梢の CD4 陽性 T 細胞の減少が認められるよりもはるかに早く粘膜局所での CD4 陽性 T 細胞の枯渇が起きていることが示されている。したがって、感染初期からのウイルスによる細胞障害効果はその後の、CD4 陽性 T 細胞の減少をまねき、またこの時の腸管粘膜下での CD4 陽性 T 細胞の枯渇の程度に応じて血中ウイルス量のセットポイントが決まり、その後の免疫不全の進行が決定付けられると考えられている。

さらに、イタリアのコホート研究で、セックスパートナーが HIV(+)にもかかわらず感染が成立していない女性は、CCR5 に対する自己抗体を保有している、また膈内で HIV-1 gp41 に対する IgA を産生しているヒトが報告された。

さらに、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、本研究事業でCCR5のUPA構造に対する免疫を誘導することにより、ウイルスのGALTでの爆発的な増殖を抑制できることを証明することができたことをうけ、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提案した。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袍埋し、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) UPA を標的としたペプチドワクチン戦略

CCR5 UPA の構造解析の結果から、この特殊立体構造を酸アミド結合を介した安定な環状 peptide として再構築し、multiple-antigen peptide(MAP)を結合させ、抗原とした。cDDR5-MAP 抗原をカニクイサルに免疫し、その抗血清の抗 HIV-1 効果・抗体の力価・抗体の持続性・抗原特異性および receptor 特異性を、それぞれ BIAcore 法・Pin-ELISA 法および Flow cytometry 法により求めた。抗 HIV 活性は MAGIC-5、MAGI-CCR5 cell を用い、HIV-1 感染によって生じるブルーセルを顕微鏡下、計測して求めた。cDDR5-MAP 免疫カニクイサルに対し SHIV_{SP162P3} 株 10TCID₅₀ を静注して、Challenge し、感染防御効果を調べた。

(2) 経口ワクチン開発を目指して-M細胞標的分子の創製

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。McDS の M 細胞ターゲティング能の検証のため、Caco-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。さらに、*in vivo* M 細胞ターゲティング能確認試験のために、アカゲザル(雄、体重 5-6kg)をウレタン麻酔し、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。バイエル板の凍結切片を作製し蛍光顕微鏡によって観察した。

(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Vero細胞を用いてSIVmac239 Env の発現系の構築を試みた。

(4) 抗原の調製(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 McDS 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) cDDR5-MAP をカニクイサル 3 匹に免疫した結果、

HIV-1 の coreceptor (CCR5) の UPA に対する自己抗体が誘導され、HIV 感染を防止していると考えられた。実際に SHIV_{SF162P3} 株をに静注して 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た。このことは、イタリアの ESN の様に自己の抗原に対する免疫応答で HIV-1 の感染を防止できることを明らかにした。さらに、cDDR5-MAP 免疫群の腸管膜リンパ節は、コントロールと比較して保存されていたことからワクチン抗原により経口粘膜免疫を完成させることにより腸におけるウイルスの爆発的複製を阻止できると期待されたため、言研究事業のメンバーは、経口エイズワクチンの開発を目指した。

(2) 経口粘膜ワクチン創製の鍵は、M細胞標的

分子の創製にあると考え、その創製に全力を注いだ。その結果、ポリフェノール型低分子 M 細胞標的分子 McDS を調製することができた。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ことが明らかとなった。

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) 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) 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(1):463-471
- (3) 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) Daisuke Nakayama, Keiichi Tokunaga, Kohei Kiyonaga, Shogo Misumi, Nobutoki Takamune, Shozo Shoji Differential Inhibition of Multiclade HIV-1 and SIV Infections by Antibodies Capable of Recognizing CCR5 and CXCR4. 第78回日本生化学会抄録集 vol.77 No. 8. 2005, p1062
- (2) Keiichi Tokunaga, Shogo Misumi, Daisuke Nakayama, Masashi Kusaba, Ryouzaburo 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
- (3) Kohei Kiyonaga, Daisuke Nakayama, Keiichi Tokunaga, Shogo Misumi, Tadashi Nakasone, Ryouzaburo 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
- (4) 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

- (5) 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
- (6) 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
- (7) 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