

53. Matsuyama, M., Inaba, K, Fukazawa, Y., Horiuchi, R., Ibuki, K., Hayami, M., Miura, T.: Full genome sequence analysis in systemic tissues of acute pathogenic SHIV-infected monkeys. US-Japan Cooperative Medical Science Program 19th Joint Meeting of the AIDS Panels, Dec. 6-7, Kagoshima.
54. 松原明弘、唐松克夫、保富康宏：ヘルパーT細胞(Th)反応調節によるインフルエンザウイルス感染の制御. 第54回日本ウイルス学会(名古屋)
55. Matsubara, A., Yasutomi, Y. : Oral administration of DNA vaccine by using virus-like particles derived from HEV. 第36回日本免疫学会(大阪)
56. Naruse, T., Matano, T., Mori, K., Miyazawa, M., Honda, M., Yasutomi, Y., Kimura, A. : Diversity of MHC class I and immune related genes in human and rhesus macaque. 第36回日本免疫学会(大阪)
57. 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57回日本アレルギー学会
58. Yasuhiro Yasutomi: Oral administration of DNA vaccine by using virus-like particles derived from orally transmissible virus. 4th International Gene Therapy Symposium.
59. 保富康宏：E型肝炎ウイルス(HEV)のウイルス様中空粒子(VLP)を用いた経口ワクチンの開発. 日本発ワクチン開発シンポジウム.(東京)
60. 山西慎吾、神谷茂、高橋秀実：ピロリ菌ウレアーゼによるB-1細胞活性化作用と自己免疫疾患誘導の可能性. 第12回日本ヘリコバクター学会 2006年6月22-23(神戸).
61. 古賀実芳、日高千鶴乃、廣田薫、平馬直樹、高橋秀実：玉屏風散の合方が奏功した3例. 第57回日本東洋医学会学術総会 2006年6月23-25日(大阪).
62. 高橋秀実、日高千鶴乃、廣田薫、古賀実芳、平馬直樹：ウイルス感染症における解表作用の意義に対する一考察. 第57回日本東洋医学会学術総会 2006年6月23-25日(大阪).
63. 日高千鶴乃、古賀実芳、廣田薫、平馬直樹、高橋秀実：腸管パーチェット病に対する発熱、下血に対し生薬治療を試みた一例. 第57回日本東洋医学会学術総会 2006年6月23-25日(大阪).
64. 高橋秀実、山西慎吾、飯泉匡、坂本長逸：ピロリ菌ウレアーゼによるB-1細胞活性化を介した自己免疫疾患誘導. 第48回日本消化器病学会大会 2006年10月11-14日(札幌).
65. 山西慎吾、高橋秀実：ピロリ菌ウレアーゼによるB-1細胞活性化作用と自己免疫疾患誘導の可能性. 多摩小児アレルギー臨床懇話会 2006年10月14日(多摩).
66. 高橋秀実：HIV感染細胞の制御をめざしたワクチンの開発. 第10回日本ワクチン学会学術集会 2006年10月21-22日(大阪).
67. 高橋めぐみ、渡理英二、新谷英滋、高橋秀実：麻疹ウイルス変異株の持続感染に關与する宿主因子・その2. 第54回日本ウイルス学会総会. 2006年11月19-21日(名古屋).
68. 渡理英二、高橋めぐみ、高橋秀実：Nordihydroguaiaretic acid (NDGA)の麻疹ウイルス感染グリオーマ細胞におけるウイルス増殖とサイトカイン産生. 第54回日本ウイルス学会総会. 2006年11月19-21日(名古屋).
69. 齊藤尚紀、高橋めぐみ、清水真澄、伊吹謙太郎、速水正憲、三浦智行、高橋秀実：SIV/SHIV感受性IL-2 independent アカゲザル細胞株”MT-IL2I”の樹立とその性状解析. 第20回日

- 本エイズ学会学術集会 2006年11月30日-12月2日(東京)。
70. 新谷英滋、清水真澄、大脇敦子、渡邊恵理、日高千鶴乃、高橋秀実 : HIV-1 Nef down-regulates lipid antigen presentation by CD1a on immature dendritic cells: implications for the lipid antigen as AIDS vaccine candidates. 第20回日本エイズ学会学術集会 2006年11月30日-12月2日(東京)。
71. 日高千鶴乃、渡邊恵理、清水真澄、山西慎吾、新谷英滋、高橋秀実 : NKT細胞によるX4-type HIV-1の感染拡大. 第20回日本エイズ学会学術集会 2006年11月30日-12月2日(東京)
72. Takahashi, H. : CD1d-NKT system and HIV. Japan-US Cooperative Medical Science Program: The 19th Joint Scientific Meeting of AIDS. December 6-7, 2006 (Kagoshima).
73. 高橋秀実 : 脂質と粘膜免疫. 第12回癒しの療法研究会 2006年12月16日(東京)。
74. Nakagawa Y., Shimizu M., Noorose Y., Higuchi T., Takahashi M., Takahashi H. : Effect of antigenic peptide on CD8+ HIV-1 gp160-specific CTLs in vivo. 第35回日本免疫学会総会 2005年12月13日-15日(横浜)。
75. Yamanishi S., Watanabe E., Shimizu M., Kobayashi F., Takeuchi H., Iizumi T, Kumagai Y., Takahashi H. : Activation of B-1 cells by *Helicobacter pylori* urease: implications for induction of autoimmunity via *Helicobacter pylori* infection. 第36回日本免疫学会総会 2006年12月11日-13日(大阪)。
76. Kumagai Y., Yamanishi S., Iizumi T, Norose Y., Watanabe E., Fukunaga Y., Takahashi H. : Local immune response to *H. pylori* infection in murine lymph nodes adjacent to the stomach. 第36回日本免疫学会総会 2006年12月11日-13日(大阪)。
77. Katakura T., Katsuhisa N., Shimizu M., Harimoto H., Atsukawa M., Tamura H, Takahashi H., Sakamoto C.: Ribavirin interfered the inhibitory activity of human CD4+CD25+ T-regulatory lymphocytes mainly in a cytokine dependent manner. 第36回日本免疫学会総会 2006年12月11日-13日(大阪)。
78. Hidaka C., Watanabe E., Shimizu M., Yamanishi S., Negishi Y., Komiya N., Shinya E., Takahashi H. : Expansion of T-cell tropic X4-type HIV-1 infection via CD4-positive NKT cells. 第36回日本免疫学会総会 2006年12月11日-13日(大阪)。
79. Wakabayashi A., Kumagai Y., Watari E., Shimizu M., Moriya K., Utsuyama M., Hirokawa K., Takahashi H. : Importance of gastrointestinal ingestion and macromolecular antigens in the vein for oral tolerance induction. 第36回日本免疫学会総会 2006年12月11日-13日(大阪)。
80. Shinya E., Owaki A., Shimizu M., Watanabe E., Yagi Y., Hidaka C., Takahashi H. : Hiv-1 Nef down-regulates both CD1a and CD1d surface expression in immature dendritic cells. 第36回日本免疫学会総会 2006年12月11日-13日(大阪)。
81. 高橋秀実 : 漢方と免疫. 第7回東京大学実践漢方セミナー 2007年2月7日(東京)

H.知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

1) 特許取得

1. TGDK(M細胞標的分子(特許:PCT/JP2006/321720))

2. PCT 出願予定発明の名称：新規 CXCR4 拮抗剤及びその用途（特願 2005-379167）発明者：藤井 信孝、浜地 格、王子田彰夫、玉村 啓和、中島秀喜
3. 出願予定発明の名称：新規バイオイメージングプローブ整理番号：P06-057（東京医科歯科大学知的財産本部）発明者：堤 浩、玉村 啓和
4. α 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）
5. α 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）
6. リポソームワクチンの作製法（出願中、PCT/JP2006/303371）
7. 出願準備中：アジュバント活性を有するキット関連物質

II. 分担研究報告書

液性及び細胞性免疫誘導を標的とした組換え BCG/増殖能欠損型組換えワクシニアウイルス DI_s のプライムブーストワクチン

分担研究者	山本 直樹	国立感染症研究所エイズ研究センター	センター長
研究協力者	本多 三男	国立感染症研究所エイズ研究センター	グループ長
研究協力者	松尾 和浩	国立感染症研究所エイズ研究センター	客員研究員
研究協力者	岡村 智崇	国立感染症研究所エイズ研究センター	協力研究員

研究要旨

我々は HIV-1 gag または SIV gag を発現する recombinant BCG/vaccinia DI_s によるプライム・ブースト法を開発し、サルで Gag 特異的な細胞性免疫が効率よく誘導されることを示してきた。しかしながら現行のワクチンデザインでは液性免疫とくに HIV Env に対するその視点が欠けている。そこで本研究では HIV-1 env 遺伝子も含む rBCG/r DI_s のワクチンをデザインすることを試みた。Env については、共同研究者の VRC/NIH の G.Nabel 博士らのグループで開発された modified env genes を用いた。その結果、Gag を共発現させた rDI_s-Env/Gag を投与すると、Env 抗体の誘導が増強された。一方、rBCG-Env でプライミングし、rDI_s-Env で2回ブーストすることにより、Env 抗体価と MN 株中和能の顕著な増強が認められた。これらの結果から、rBCG/rDI_s プライム・ブースト法は、細胞性免疫のみならず液性免疫をも誘導できることがわかった。

A. 研究目的

AIDS ワクチンの開発は、これまで細胞性免疫誘導を目的としたT細胞ワクチンの開発が行われてきたが、効果的な予防ワクチン開発のめどが立たず、ウイルス量を減らして非感染者への感染率を減少させることが当面の目的の一つとなると思われる。しかし、現在のAIDS ワクチン開発が目指しているものは、他のワクチンの場合と同じように、HIV ウイルスからの感染を防ぐ事である。そのためには、HIV Env蛋白の極度の多様性と中和抗体などの液性免疫からの逃避機構の解析と対応が求められている。

これまで報告されているように、特異的T細胞反応を効果的に誘導すると、体内のウイルス量が減少し病期の進行が抑制される事につながる事が、サルエイズモデルで示唆された。また、長期未発症者 (long term non-progressor, LTNP) ではCD8+T細胞の

エピトープ逃避に選択性があることが報告された。

また、液性免疫誘導で中和抗体によるコントロールが明らかにされたが、大部分の感染例で抗体によるウイルス中和からの逃避が報告されている。

これらの事から、ワクチン開発の目標は、広範に反応出来る交差反応性中和抗体の産生が可能で、強いCD8陽性細胞およびCD4陽性細胞反応誘導能を併せ持つものである。上記のように、これまでのワクチンは、HIV 遺伝子を組み込んだベクターを主体としたものであり、後者の CD8+ T細胞反応誘導を目標にしてきたが、今後は、液性免疫誘導を目的とし、更には細胞性免疫誘導能を併せ持つワクチン開発が行われると思われる。

我々は既に、HIV や SIV の gag 遺伝子を高発現する組換え BCG (rBCG) でプライミングし、同じ gag 遺伝子を発現する組換えワクシニアウイルス DI_s

(rDIs) でブーストするワクチン法により、Gag 特異的細胞性免疫が極めて有効に誘導されることを報告した (Ami et al., J. Virol. 2005)。しかしながら、現在のエイズワクチンデザインの動向として、細胞性免疫とともに、いかに有効な HIV Env 特異的な中和抗体を誘導できる免疫原を構築するかという課題がある。この課題に取り組むため、BCG 及び DIs ベクターに HIV env 遺伝子を組み込み、それらのプライムブーストワクチンによる免疫応答を解析した。

B. 研究方法

1) ベクターの構築

BCG ベクターに HIV subtype B 由来の env 遺伝子を組み込んだもの (rBCG-Env)、DIs ベクターに env 単独及び env と gag の両方の遺伝子を組み込んだもの (rDIs-Env 及び rDIs-Env/Gag) をそれぞれ構築した。図 1 に modified HIV-1 env 遺伝子の構造を示す。

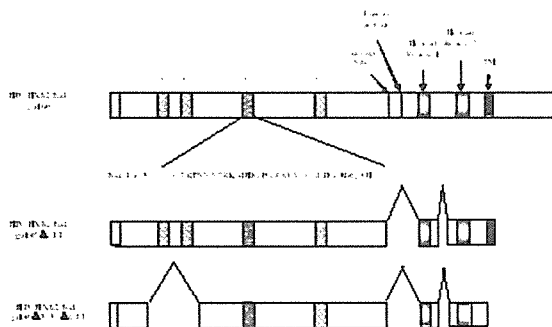


図 1 modified HIV-1 env 遺伝子の構造

2) 動物への免疫

抗原発現を確認後、Balb/c マウスに図 2 に示す方法で免疫した(図 2)。

3) 抗体産生と細胞性免疫

抗 Env 抗体産生は V3 ペプチド ELISA と GHOST 細胞を用いた MN 株中和アッセイで、細胞性免疫は脾細胞を用いた Env 特異的インターフェロン γ ELISPOT 法とリンパ球増殖反応によりそれぞれ解析した。さらに V3 peptide に対する中和のパターンを Peptide inhibition assay を用いて行った。

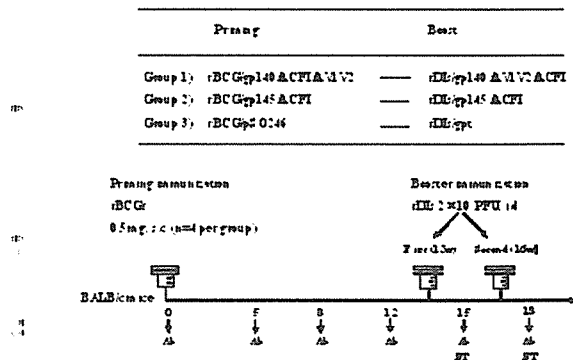


図 2 BALB/c マウスへの免疫スケジュール

C. 研究結果

modified env (gp140DV1V2DCFI and gp145DCFI) 遺伝子は rDIs-CEF システムで効率よく発現された。さらにさまざまな量での rDIs-Env を用いたマウスでの免疫は Env-specific binding antibody と cross-reactive neutralizing antibody レスポンスを誘導することがわかった。

またグループ 1 (gp140DV1V2DCFI-immunized) の動物では、グループ 2 の gp145DCFI 免疫群に比べ Env に対する低レベルの binding antibodies が見られたが、グループ 1 では逆に強い cross-reactive neutralization antibody が誘導された(図 3)。

Peptide inhibition assay の結果、グループ 1 の動物は V3 peptide に対する中和のパターンがグループ 2 のそれに比べ、非常に異なっていた。V3 peptide はグループ 1 の中和活性を一部吸収したが、グループ 2 のそれはほとんど吸収された。

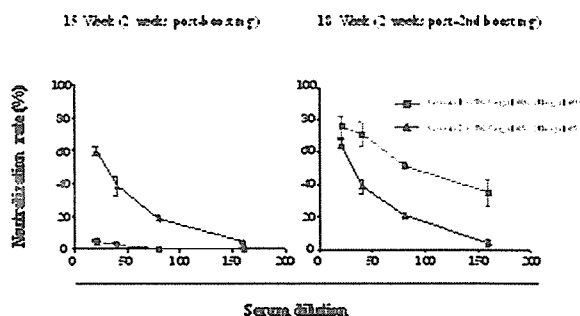


図3 rBCG/rDIs-modified Env プライム・ブースト法による免疫マウスにおける中和抗体の検出

rBCG/rDIs-modified Env によるプライム・ブーストにより、マウスに免疫したところ、図3に見られるように、著明な抗 Env 抗体の上昇が見られた。18週ではとくに gp140(グループ1)のほうが gp145(グループ2)よりも優れていた。これは rBCG/rDIs によるプライム・ブースト法での最初の報告である。

さらに、BCG ベクター改良の試みとして、コドン最適化 SIV gag 遺伝子(図4)を組み込んで抗原発現を増強した rBCG を用い、rBCG/rDIs ワクチンの免疫応答をカニクイザルで解析した。その結果、0.1 mg という低用量(結核ワクチンと同用量)で、しかも BCG 先行免疫した個体においても有効な SIV Gag 特異的細胞性免疫が誘導できることがわかった。

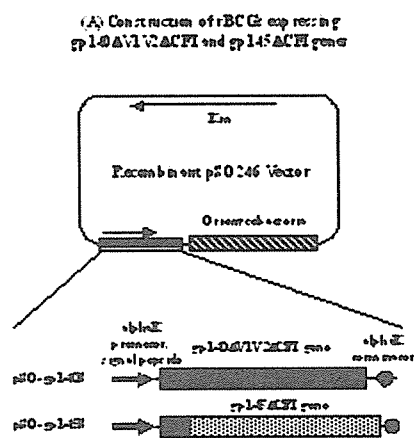


図4 HIV-1modified gp140 および gp145 遺伝子を発現する rBCG ベクターの構築

D. 考察

rDIs-Env 単独では、有意の Env 特異的結合抗体と中和抗体を誘導するのに数回の投与を必要とした。また Gag を共発現させた rDIs-Env/Gag を投与すると、Env 抗体の誘導が増強されるという興味深い現象が見られた。一方、rBCG-Env でプライミングし、rDIs-Env で2回ブーストすることにより、Env 抗体価と MN 株中和能の顕著な増強が認められた。この結果から、rBCG/rDIs プライム・ブースト法は、細

胞性免疫のみならず液性免疫をも誘導できることがわかり、より有効な抗 HIV ワクチン開発への応用が期待される。

さらに、BCG ベクター改良の試みとして、コドン最適化 SIV gag 遺伝子を組み込んで抗原発現を増強した rBCG を用い、rBCG/rDIs ワクチンの免疫応答をカニクイザルで解析した。その結果、0.1 mg という低用量(結核ワクチンと同用量)で、しかも BCG 先行免疫した個体においても有効な SIV Gag 特異的細胞性免疫が誘導できることがわかり、このワクチン法の実用化に向けての大きな課題の一つをクリアできたと考えられる。

E. 結論

以上の結果は、modified env gene を有する prime-boost BCG/DIs vaccine レジメンが液性、細胞性免疫の両方にとり有望であることを示している。今後さらに中和抗体の解析を進めることにより、中和抗体指向型ワクチンの開発への理解が深まるものと考えられた。

F. 論文発表

1. Watanabe S, Terashima K, Ohta S, Horibata S, Yajima M, Shiozawa Y, Dewan MZ, Yu Z, Ito M, Morio T, Shimizu N, Honda M, Yamamoto N. Hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2R{gamma}null mice develop human lymphoid system and induce long-lasting HIV-1 infection with specific humoral immune responses. *Blood*. 2007 Jan 1;109(1):212-8.
2. Yamamoto M, Okamoto T, Takeda K, Sato S, Sanjo H, Uematsu S, Saitoh T, Yamamoto N, Sakurai H, Ishii KJ, Yamaoka S, Kawai T, Matsuura Y, Takeuchi O, Akira S. Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. *Nat Immunol*. 2006 Sep; 7(9):962-70.

3. Yamamoto T, Miyoshi H, Yamamoto N, Yamamoto N, Inoue JI, Tsunetsugu-Yokota Y. Lentivirus vectors expressing short hairpin RNAs against the U3-overlapping region of HIV nef inhibit HIV replication and infectivity in primar macrophages. *Blood*. 2006 ,in press.
 4. Fukuhara T, Hosoya T, Shimizu S, Sumi K, Oshiro T, Yoshinaka Y, Suzuki M, Yamamoto N, Herzenberg LA, Herzenberg LA, Hagiwara M. Utilization of host SR protein kinases and RNA-splicing machinery during viral replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jul 25; 103(30):11329-33.
 5. Saitoh T, Tun-Kyi A, Ryo A, Yamamoto M, Finn G, Fujita T, Akira S, Yamamoto N, Lu KP, Yamaoka S. Negative regulation of interferon-regulatory factor 3-dependent innate antiviral response by the prolyl isomerase Pin1. *Nat Immunol*. 2006 Jun; 7(6):598-605.
 6. Eda Y, Murakami T, Ami Y, Nakasone T, Takizawa M, Someya K, Kaizu M, Izumi Y, Yoshino N, Matsushita S, Higuchi H, Matsui H, Shinohara K, Takeuchi H, Koyanagi Y, Yamamoto N, Honda M. Anti-V3 humanized antibody KD-247 effectively suppresses ex vivo generation of human immunodeficiency virus type 1 and affords sterile protection of monkeys against a heterologous simian/human immunodeficiency virus infection. *J Virol*. 2006 Jun; 80(11):5563-70.
 7. Someya K, Ami Y, Nakasone T, Izumi Y, Matsuo K, Horibata S, Xin KQ, Yamamoto H, Okuda K, Yamamoto N, Honda M. Induction of positive cellular and humoral Immune responses by a prime-boost vaccine encoded with simian immunodeficiency virus gag/pol. *J Immunol*. 2006 Feb 1; 176(3):1784-95.
 8. Ami Y, Izumi Y, Matsuo K, Someya K, Kanekiyo M, Horibata S, Yoshino N, Sakai K, Shinohara K, Matsumoto S, Yamada T, Yamazaki S, Yamamoto N, Honda M. Priming-boosting vaccination with recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin and a nonreplicating vaccinia virus recombinant leads to long-lasting and effective immunity. *J Virol*. 2005; 79:12871-9.
- G. 学会発表**
1. Kazuhiro Matsuo, Tomotaka Okamura, Masaru Kanekiyo, Shinichiro Hattori, Shigeo Horibata, Naoki Yamamoto, and Mitsuo Honda. Humoral and cellular immune-targeted prime-boost HIV vaccine consisted of recombinant BCG and replication-defective vaccinia virus DIs. XVI International AIDS Conference – 13-18 August 2006 - Toronto Canada
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
- 特になし。

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

CTL 誘導型 DNA/SeV ワクチンのエイズウイルス複製抑制効果の長期解析

分担研究者 俣野 哲朗 東京大学医科学研究所教授

研究要旨

HIV 感染症では、感染後に誘導される宿主適応免疫反応によってもウイルスが排除されきらず慢性持続感染が成立し最終的にエイズ発症に至る。適応免疫系のエフェクターとしては、細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) が HIV 複製抑制に中心的役割を担っていることが知られており、CTL 誘導は予防エイズワクチン開発の主要戦略の一つである。CTL 誘導ワクチンは慢性持続感染成立阻止を目的とするが、HIV 感染自然経過では CTL 誘導が認められるにもかかわらず慢性持続感染が成立することから、ワクチンによる CTL 誘導が容易に HIV 複製制御に直結するとは考えられていない。そこで我々は、CTL 誘導予防エイズワクチン開発のための論理的基盤の確立に向けて、ワクチン誘導 CTL による HIV 複製制御の可能性の検証を行うことを目的とし、これまでに、DNA プライム・Gag 発現センダイウイルスベクターブースト (DNA/SeV-Gag) ワクチンシステムを開発して、サル免疫不全ウイルス SIVmac239 チャレンジ感染サルエイズモデルにて、ワクチン誘導 CTL による SIV 複製制御の可能性を世界で初めて明らかにしてきた。本研究では、このワクチンによる SIV 複製制御が認められたサルの長期解析を行うことにより、慢性エイズモデルにおける長期のウイルス複製制御機序について検討することとした。ワクチン後の SIV チャレンジ実験にて、2 年間以上 SIV 複製制御が維持されたサルのうちの 2 頭の慢性期では、ワクチンにより誘導され感染初期の SIV 複製制御に中心的役割を果たしたと考えられる Gag 特異的 CTL が検出下限以下となり、代わって感染後に誘導されたと考えられる non-Gag 特異的 CTL が優位となっていた。さらにチャレンジ後 3 年の時点での一過性の CD8 depletion 実験により、2 頭ともに一過性のウイルス血症再出現が認められたことから、この non-Gag 特異的 CTL が SIV 複製抑制に重要な役割を担っていることが示唆された。したがって、ワクチン誘導 CTL により感染初期のウイルス複製が制御されれば、感染後にウイルス複製抑制能を有する CTL が新たに誘導され、これらが長期のウイルス複製制御維持に貢献しうる可能性が考えられた。一方、SIV チャレンジ実験にて SIV 複製制御に至らなかった 7 頭 (non-controllers) と SIV 複製制御に至った 5 頭 (controllers) の比較から、SIV 複製制御の維持により、感染初期だけでなく慢性期にいたるまでセントラルメモリー CD4 陽性 T リンパ球が維持されることが明らかとなった。この結果は、CTL 誘導ワクチンによる長期の HIV 複製制御およびエイズ発症阻止の可能性を示すものである。

A. 研究目的

1980 年代前半のエイズ症例の報告以来、HIV 感染者数は増加の一途をたどっており、エイズワクチン開発は国際的最重要課題の一つである。HIV 感染症の重要な特徴は慢性持続感染症であることであり、自然感染経過において、宿主適応免疫反応が誘導されるにもかかわらずウイルス複製の制御には至らず、ウイルス血症が継続しエイズ発症に至る。

1990 年代に、HIV 複製抑制におけるウイルス特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) の重要性が指摘されたことから、CTL 誘導型エイズワクチン開発研究が進展し、2000 年代になって、CXCR4 指向性サルヒトキメラ免疫不全ウイルス (SHIV89.6P)

感染急性エイズモデルでの前臨床試験において、ワクチンによるウイルス複製制御が可能であることが報告された。しかしその後、ヒト HIV 感染症における感染急性期の腸管メモリー T リンパ球の喪失を含めた慢性持続感染を反映する CCR5 指向性サル免疫不全ウイルス (SIV) 感染サル慢性エイズモデルと、CXCR4 指向性 SHIV 感染急性エイズモデルとの本質的違いが明らかとなるにつれ、前者の SIV 感染慢性エイズモデルにおけるワクチン有効性の評価が重要視されてきている。ところが、SIV 感染慢性エイズモデルにおけるワクチンによる SIV 複製制御例は、我々の報告以外にはなされておらず、欧米では一過性のウイルス量減少例が報告されているのみである。

我々はこれまで、CTL 誘導を基本とするエイズワクチン開発に主眼をおき、国際的にも有数の CTL 誘導能を有する DNA プライム・Gag 発現センダイウイルスベクターブースト (DNA/SeV-Gag) ワクチンシステムを開発し、SHIV89.6P 感染サル急性エイズモデルにおける有効性を明らかにしてきた。さらに、SIVmac239 感染サル慢性エイズモデルにおける SIV 複製制御例を報告し、世界で初めてワクチン誘導 CTL による SIV 複製制御の可能性を明らかにした。今後、ワクチン接種個体全頭におけるウイルス複製制御をめざすにあたっては、その複製制御機序を明らかにしていく必要がある。そこで本研究では、このワクチンによる SIV 複製制御が認められたサルの長期解析を行うことにより、慢性エイズモデルにおける長期のウイルス複製制御機序について検討することとした。

B. 研究方法

以前に行ったアカゲサル SIVmac239 チャレンジ実験におけるワクチン非接種群 4 頭および DNA/SeV-Gag ワクチン接種群 8 頭について、チャレンジ後約 3 年間以上の長期解析を行い、血漿中 SIV RNA コピー数を経時的に定量した。いくつかのタイムポイントにおいて、FACS により CD95 陽性 CD28 陽性セントラルメモリーCD4 陽性 T リンパ球数を定量した。ワクチン接種により SIV 複製制御が認められたサル 5 頭のうち、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) ハプロタイプ 90120-a を有しない 2 頭 V6・V8 について、Gag 発現ワクシニアウイルスベクター感染細胞および VSV-G シュードタイプ SIV 感染細胞を用いた抗原刺激特異的インターフェロン γ 誘導を測定することにより、各々、Gag 特異的 CTL レベルおよび SIV 特異的 CTL レベルを経時的に測定した。また、この 2 頭について、チャレンジ後 156 週日より抗 CD8 抗体 cM-T807 (Centocor 社より供与) 接種実験 (週 2 回、計 4 回) を行った。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、倫理面も含めて、東京大学医科学研究所、国立感染症研究所および医薬基盤研究所の動物実験委員会の審査をうけ、その承認を得てから医薬基盤研究所霊長類医科学センターにて開始した。用いた組換え生物等については、第二種使用等拡散防止措置確認申請承認 (大臣確認) 済みである。

C. 研究結果

サル V6・V8 の 2 頭とも、セットポイント期以降 3 年間にわたってウイルス血症は検出されず、長期間にわたって SIV 複製制御が維持された。CTL の解析では (図 1)、両者ともににおいて、感染初期に高値を示した Gag 特異的 CTL レベルが、経過とともに減少し、感染 1 年後より検出されなくなった。一方、SIV 特異的 CTL レベルは維持され、3 年経過した時点でも検出された。したがって、SIV 由来の non-Gag 特異的 CTL が感染後に誘導され優位となったと考えられた。

この 2 頭における感染 3 年の時点での抗 CD8 抗体接種実験では、一過性に末梢血 CD8 陽性 T リンパ球が deplete され、それに呼応して一過性にウイルス血症の再出現が認められた (図 2)。

一方、セントラルメモリーCD4 陽性 T リンパ球数について、SIV チャレンジ直前 (wk 0) と約 70 週 (wk 70) の時点の比をとり、SIV 複製制御に至らなかった 7 頭 (non-controllers) と SIV 複製制御に至った 5 頭 (controllers) について比較検討した。その結果、感染約 70 週の時点のセントラルメモリーCD4 陽性 T リンパ球数は、前者では減少が認められるのに対して、後者では維持されていた (図 3)。

D. 考察

SIV 複製制御が維持されたサル V6・V8 の慢性期では、ワクチンにより誘導され感染初期の SIV 複製制御に中心的役割を果たしたと考えられる Gag 特異的 CTL が検出下限以下となり、代わって感染後に誘導されたと考えられる non-Gag 特異的 CTL が優位となっていた。さらにチャレンジ後 3 年の時点での一過性の CD8 depletion 実験により、2 頭ともににおいて一過性のウイルス血症再出現が認められたことから、この non-Gag 特異的 CTL が SIV 複製抑制に重要な役割を担っていることが示唆された。したがって、ワクチン誘導 CTL により感染初期のウイルス複製が制御されれば、感染後にウイルス複製抑制能を有する CTL が新たに誘導され、これらが長期のウイルス複製制御維持に貢献しうる可能性が考えられた。

一方、近年の研究で、CTL 誘導ワクチンによる感染初期の一過性ウイルス量減少が、感染初期のセントラルメモリーCD4 陽性 T リンパ球の喪失緩和に結びつく可能性が示唆されたが、本研究では、ウイルス複製制御が維持されれば、感染初期だけでなく慢性期にいたるまでの長期間のセントラルメモリーCD4 陽性 T リンパ球の維持に結びつくことが初めて示された。この結果は、CTL 誘導ワ

クチンによる長期の HIV 複製制御およびエイズ発症阻止の可能性を示すものである。

E. 結論

本研究では、長期の HIV/SIV 複製制御維持機序として、ワクチン誘導 CTL により感染初期のウイルス複製が制御されれば、感染後にウイルス複製抑制能を有する CTL が新たに誘導される可能性を示した。また、エイズ発症阻止に結びつくデータとして、CTL 誘導予防エイズワクチン接種が、長期間のセントラルメモリーCD4陽性Tリンパ球の維持に結びつく可能性を明らかにした。

G. 研究発表

1 論文発表

- (1) Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Takeda A, Igarashi H, Watkins DI, and Matano T. Long-term control of simian immunodeficiency virus replication with central memory CD4⁺ T-cell preservation after non-sterile protection by a cytotoxic T lymphocyte-based vaccine. *J Virol*, in press.
- (2) Yamamoto H, Kawada M, Tsukamoto T, Takeda A, Igarashi H, Miyazawa M, Naruse T, Yasunami M, Kimura A, and Matano T. Vaccine-based long-term stable control of simian-human immunodeficiency virus 89.6PD replication in rhesus macaques. *J Gen Virol* 88:652-659, 2007.
- (3) Takahashi-Tanaka Y, Yasunami M, Naruse T, Hinohara K, Matano T, Mori K, Miysazawa M, Honda M, Yasutomi Y, Nagai Y, Kimura A: Reference strand-mediated conformation analysis (RSCA)-based typing of multiple alleles in the rhesus macaque MHC class I Mamu-A and Mamu-B loci. *Electrophoresis*, in press.

2 学会発表

- (1) Matano T. Control of viral replication by vaccine-induced CTL in macaque AIDS models. The 13th East Asia Symposium on Biomedical Research: From Genes to Therapeutics, Seoul, Korea, 7/19/2006.
- (2) Moriya C, Takeda A, and Matano T. A single amino acid change in CTL epitope flanking region can abort efficacy of vaccine-induced CTL responses against simian immunodeficiency virus infection. The 6th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 9/5/2006.
- (3) Matano T. Long-term CTL-based control of simian immunodeficiency virus replication in vaccinated rhesus macaques. The 6th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan,

9/7/2006.

- (4) 関紗由里, 川田真幹, 侯野哲朗. Gag 特異的 CTL からのエスケープ変異を蓄積した SIV の複製能. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 1B13, 名古屋, 11/19/2006.
- (5) 守屋智草, 五十嵐博子, 井上誠, 飯田章博, 朱亜峰, 長谷川護, 永井美之, 侯野哲朗. ワクチン誘導 CTL に対する異種株サル免疫不全ウイルスのエスケープ機序. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 1P148, 名古屋, 11/19/2006.
- (6) 川田真幹, 山本浩之, 塚本徹雄, 関紗由里, 五十嵐博子, 侯野哲朗. 細胞傷害性 T リンパ球誘導型予防エイズワクチンによる長期のサル免疫不全ウイルス複製制御の可能性. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 3WSA4, 名古屋, 11/21/2006.
- (7) 侯野哲朗. エイズウイルス感染に対する獲得免疫反応. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, L5-3, 名古屋, 11/21/2006.
- (8) 山本浩之, 川田真幹, 侯野哲朗. サル免疫不全ウイルス感染に対する細胞傷害性リンパ球と中和抗体の相乗的な複製抑制効果. 第 20 回日本エイズ学会学術集会, O-106, 東京, 12/1/2006.
- (9) Matano T. Multiple epitope-specific CTL responses in control of immunodeficiency virus replication. 20th Annual Meeting of the Japanese Society for AIDS Research, S15-1, Tokyo, Japan, 12/2/2006.
- (10) Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Takeda A, Watkins DI, and Matano T. Long-term CTL-based SIV control by Vaccine-based non-sterile protection in rhesus macaques. 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, #463, Los Angeles, CA, USA, 2/26/2007.
- (11) Moriya C, Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Takeda A, and Matano T. Abrogation of in vivo efficacy of vaccine-induced CTL against heterologous SIV challenge by a single amino acid change in viral epitope flanking region. 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, #468, Los Angeles, CA, USA, 2/26/2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況

無し。

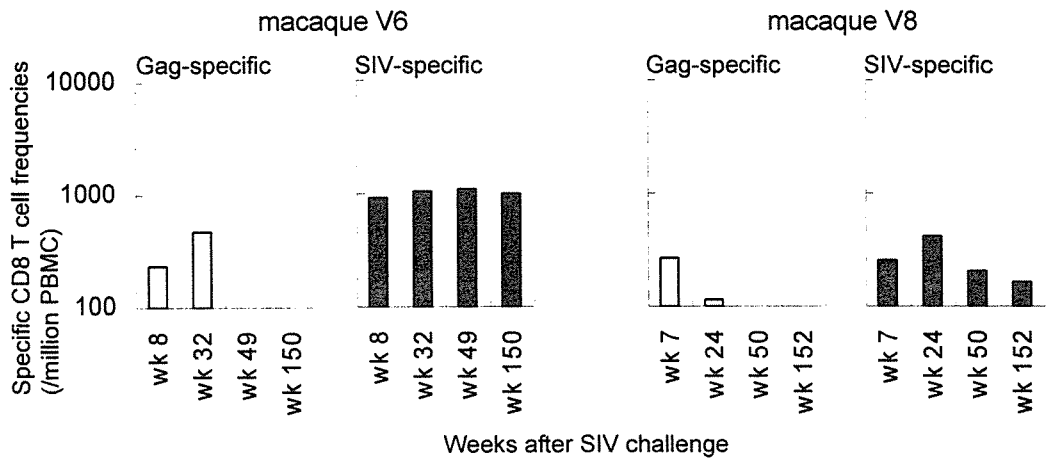


図1 Controllers V6・V8におけるGag特異的CTLレベルおよびSIV特異的CTLレベル

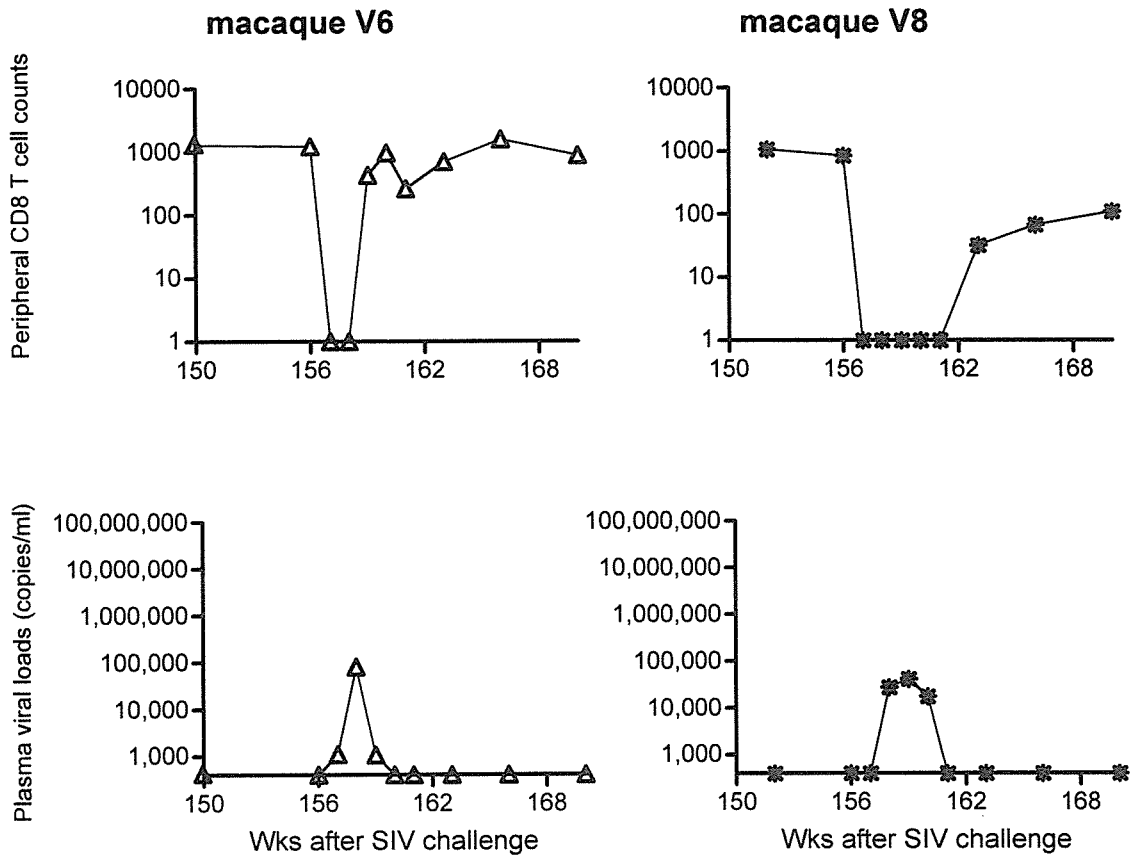


図2 Controllers V6・V8におけるCD8 depletion実験（第156週開始）
上段：末梢血CD8陽性Tリンパ球数。 下段：血漿中SIV量。

wk 70 / wk 0

Non-controllers (n = 6)
Means: 0.2614
95% confidential intervals: 0.1470 – 0.4647
Controllers (n = 5)
Means: 0.8892
95% confidential intervals: 0.7822 – 1.0109
Non-controllers vs Controllers
Unpaired T-test $P = 0.0031$
Mann Whitney U-test $P = 0.0043$

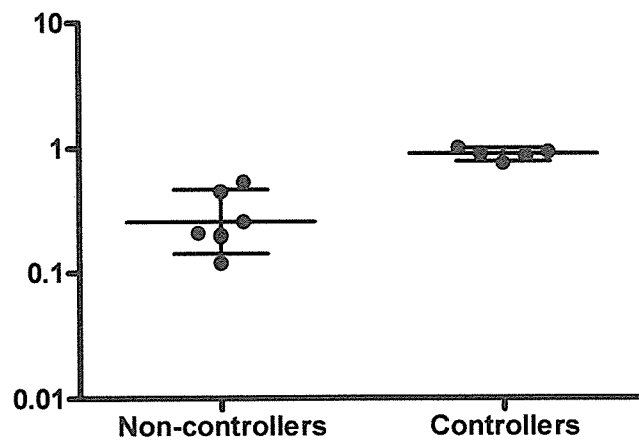


図3 末梢血CD95陽性CD28陽性セントラルメモリーCD4陽性Tリンパ球数の
チャレンジ直前 (wk 0) と70週時点での比についてNon-controllersとControllersとの比較

免疫増強遺伝子と弱病原性ワクシニアを用いたアフリカエイズワクチン開発

分担研究者 志田壽利 北海道大学遺伝子病制御研究所

研究要旨 安全で免疫原性の高いアフリカ型 HIV ワクチンを作成する為に、我々の開発したワクシニア m8Δ株と高発現プロモーターpSFJ1-10 を用いた組み換えワクシニア (RVV) を作成する。今年度は、免疫原性を高める為に、CD40Lm を発現する RVV を作成した。また、効率的な RVV 作製法を開発した。

A 研究目的

HIV-1 の最流行地はアフリカであり、アフリカ型 HIV に対するワクチン開発が強く望まれている。そのワクチンのベクターとしてワクシニアウイルスが長年研究されている。特に、哺乳動物で増えないと考えられている MVA 株は安全性の観点から欧米で頻用されている。実際、マウスやサルでの動物実験においては強い抗 HIV/SIV 免疫を誘起している。しかし、ヒトにおける免疫誘導能は不十分であるとの指摘もされている。

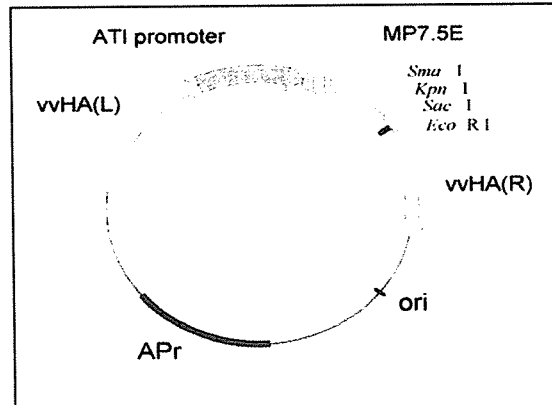
日本の種痘株として 10 万人に接種され、重篤な副作用が報告されなかった LC16m8 株を、我々は改良し、より安全な LC16m8Δ株を作成した。本株はマウスにおいて MVA 株より約 1000 倍免疫原性が高い。そこで、本ワクシニアをベクターにしてアフリカ型 HIV ワクチンを作製する事を本プロジェクトの最終目的とする。

HIV 抗原の高発現のもとで、強い免疫を誘導する為に、以前に我々が開発した強力プロモーターである pSFJ1-10 の下で抗原を発現させる事にした。本プロモーターは感染細胞の全蛋白質の 10% に及ぶ外来抗原を発現し、挿入部位である HA 遺伝子中において特に良く働く。又、免疫活性化因子として CD40L を補助因子として発現させることによる効果も調べる。

まずは、SIV の m8Δワクチンを作成し、他のワクシニアワクチンと免疫原性を比較する事から始める。

B 研究方法

CD40Lm 組み換えワクシニア (RVV) の作成 : pSFJ1-10 の下流に CD40Lm cDNA をつなぎ、その外側に HA 遺伝子で囲んだ insertion vector を作成した。次いで、canarypox 感染 BHK 細胞に m8Δ ゲノム DNA と cotransfection した。翌日ウイルスを回収して 30° C で RK13 細胞上にプラークを形成させた。ニトリ赤血球と反応しないプラークからウイルスを回収して、抗 CD40L 抗体と反応

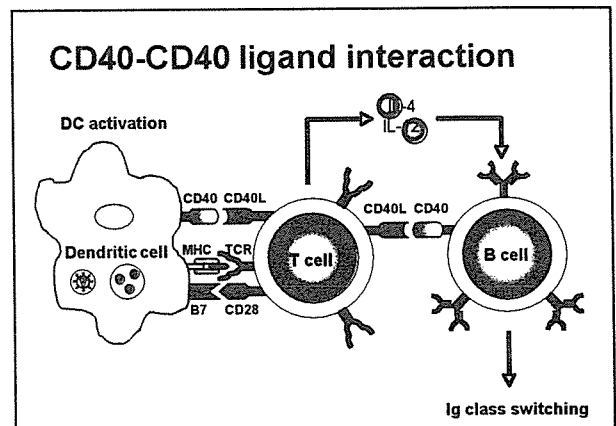


する事をプラーク ELISA 法によって確認した。下図に本 insertion vector の構造を示す。

CD40Lm-m8Δの抗体誘導増強能の測定 : CD40Lm 発現ワクシニアの免疫増強効果を調べるために、 1×10^8 PFU 量を同量の HIV Env 発現ワクシニアと一緒に 4 週令のラットに皮下接種した。6 週間後に採血して particle agglutinin 法によって抗 Env 抗体価を測定した。

C 研究成果

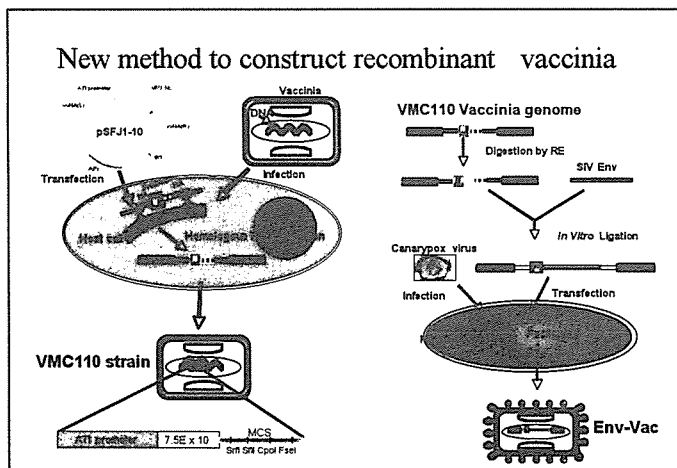
CD40Lm 発現ワクシニアの性質 : CD40 リガンドは活性化 T 細胞に一過性に発現する細胞表面分子であり、樹状細胞の成熟化、B 細胞からの抗体産生、インターロイキン 12 産生促進等の様々な機能を有し、成体の免疫反応には不可欠な分子である。既に、DNA ワクチンの形で癌の免疫療法に用いられている。下に CD40L の作用の概念図を示す。



しかし、CD40 リガンドは MMP プロテアーゼによって切断されて可溶化体になり易いために、活性が低下する。そこで、我々は酵素切断部位に変異を導入して、細胞膜上に安定して発現する CD40Lm を作製して今回使用した。作成した CD40Lm-m8Δ は感染細胞膜上に CD40Lm を発現している事を、FACS と蛍光抗体法で確認した。次いで、免疫活性化能を調べる為に、HIV-1 Env を発現する RVV と一緒にラットに接種して、抗 Env 抗体価を Particle agglutinin 法で測定した。CD40Lm-m8Δ と coinjection したラットの方が高い抗体価を有していた。しかし、まだ preliminary な結果であり、今後ラット数を増やして確認する必要がある。

効率的な組み換えワクシニア作製法の開発: 上述の m8Δ の組み換えワクシニアの作製過程で、我々は効率の悪さに悩まされた。通常の組み換えワクシニアの作製方法では、目的とする外来遺伝子をワクシニアの配列で挟んだ insertion plasmid をワクシニア感染細胞にトランスフェクションする。すると、細胞内でワクシニアゲノムと plasmid のワクシニア配列部分との間で homologous recombination が起こり、外来遺伝子がウイルスゲノム内に挿入される。m8Δ の場合この過程の効率が悪いと考えられる。

そこで、効率よく組換え体を作製するための工夫をした。まず、pPSFJ1-10 プロモーターの下流に、ワクシニアゲノムを切断しない rare cutter の制限酵素部位を持つ insertion plasmid を作製した。そして、通常の方法でこの配列を有する組換えワクシニアを作製した。次いで、ゲノム DNA を抽出して、in vitro で外来 DNA と ligation して、哺乳類細胞では子孫ウイルスを作製しない canarypox 感染細胞に transfection する。この方法で、SIV env の組換えワクシニアを作製したところ、子孫ウイルスの約 90% が env を発現していた。本方法の概念図を下に示す。



D 考察

LC16m8 株は対天然痘の十分な免疫を誘起できる一方、十万人の乳幼児に接種されて重篤な副作用がなかった優れた株である。MVA 株が不十分な免疫しか誘導できなかった為に、天然痘ワクチンとして放棄された事実と好対照である。しかし、m8 株の継代を重ねると、large plaque variant が生じる。Large plaque variant は一旦生じると、その割合を急速に増加させるので、現在 m8 の安全性に疑問が生じている。我々の開発した m8Δ 株では、その原因遺伝子を欠失させてあるので variant は生じない。しかし、マウスでの実験においては免疫原性は m8 株と変わらず、ヒトに強い免疫を誘起できる事が期待できる。

さらに免疫原性を高める為に、DNA ワクチンとして実績のある免疫活性化因子 CD40Lm を発現する m8Δ を作成して HIV Env 抗体誘導への影響を調べた。Preliminary な結果では positive な結果であったが、今後確認をする必要がある。又、細胞性免疫への効果も検討する予定である。

m8Δ 株の欠点は組み換え能が低く、RVV 作成率が非常に悪い事である。この点を克服する為に、in vitro ligation によって RVV を作製する新しい方法を開発した。今後、組み換えワクシニア作成の speed up が期待できる。

E 結論

安全で免疫原性の高いアフリカ型 HIV ワクチンを作成する為に、我々の開発したワクシニア m8Δ 株と高発現プロモーター pSFJ1-10 を用いた組み換えワクシニア (RVV) を作成する。今年度、免疫原性を高める為に、CD40Lm を発現する RVV を作成した。また、in vitro ligation 法を用いた効率的な RVV 作製法を開発した。

F 研究発表

1. 論文発表

- (1) Masahiro Kitabatake, Shingo Inoue, Fumihiko Yasui, Shoji Yokochi, Masaaki, Arai, Kouichi Morita, Hisatoshi Shida, Minoru Kidokoro, Fukashi Murai, Mai, Quynh Le, Kouji Matsushima, and Michinori Kohara (2007): SARS-CoV spike protein-expressing recombinant vaccinia virus efficiently induces neutralizing antibodies in rabbits pre-immunized with vaccinia virus. *Vaccine* 25: 630-637.

(2) Zhang, X, Hakata, Y, Tanaka, Y, and Shida H. (2006): CRM1, an RNA transporter, is a major species-specific restriction factor of human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) in rat cells. *Microbes and Infection*. 8: 851-859

2. 学会発表

高柳亮、大橋貴、志田壽利 : Foxp3 発現 HTLV-1 感染ラット細胞株における免疫抑制機能の解析、日本ウイルス学会 2006, 名古屋

岡田 紘幸、大橋 貴、志田 壽利 : ラット T 細胞での HIV-1 増殖におけるヒト CyclinT1 と CRM1 の相乗効果、日本ウイルス学会 2006, 名古屋

鈴木元、藤澤文絵、大橋貴、志田壽利 : ラット細胞における HIV-1 複製の前期過程を阻害する宿主因子の解析、日本エイズ学会 2006, 東京

永井美佳、大橋貴、志田壽利 : ラット細胞における HIV 複製への RNA 輸送因子 hCRM1 の効果、日

本分子生物学フォーラム 2006, 名古屋

木所 稔、西條政幸、網 康至、須崎百合子、永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、緒方もも子、福士秀悦、水谷哲也、志田壽利、田代真人、佐多徹太郎、倉根一郎、倉田 毅、森川 茂 : 改良型痘そうワクチン株 m8Δ のカニクイザルにおけるサル痘発症予防効果、日本ウイルス学会 2006, 名古屋

高柳亮、大橋貴、志田壽利 : Analysis of immunosuppressive function of Foxp3 expressing HTLV-1-infected cells in a rat model, The 2006 International Workshop on Retroviral Pathogenesis. カリフォルニア

大橋貴、高柳亮、志田壽利 : Dissemination of HTLV-1 in human CRM1 transgenic rats, The 2006 International Workshop on Retroviral Pathogenesis. カリフォルニア

G 知的所有権の取得状況
無し

HIV-1第2受容体及びHIVタンパク質を基礎にHIV飲むワクチンの創製

—小腸粘膜 M 細胞標的分子の化学合成及び腸管粘膜免疫抗原の調製—

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 教授

研究要旨：新規経口ワクチンとして、抗原のコアにあたる Hub 抗原に、抗原性強化のための Appendix 抗原 (TGDK (M 細胞標的分子 (特許:PCT/JP2006/321720))、UPA 抗原 (CCR5 細胞外ドメインミミック抗原)、CpGDNA (粘膜免疫アジュバンド)、NTA (3 量体 SIVgp140 結合のための官能基)) を段階的に結合させ、最終的に SIVgp140 を結合させた Macro Multiple Antigen (MMA) の調製を試みている。最終的に MMA を腸溶カプセルに封入して経口ワクチンとすることを計画しており、アカゲサル (♀) を用いて経口ワクチンとしての有効性を調べる予定である。本年度は、新規合成 M 細胞標的分子である TGDK の *in vitro* および *in vivo* における M 細胞標的能を検討した。Caco-2 を分化させることにより調製した M 細胞の培養上清に FITC 標識した TGDK (TGDK-FITC) を加え、TGDK がトランスサイトーシスされることを明らかにした。さらに、アカゲザルの回腸に TGDK-FITC を接種したところ、TGDK-FITC がパイエル板から取り込まれることを明らかにした。さらに、Au ラベルした TGDK (TGDK-Au) を用いてアカゲザルの M 細胞に取り込まれていることも透過型電子顕微鏡像としてもとらえており、TGDK が M 細胞標的能を有していることが明らかとなった。一方、Hub 抗原に全ての Appendix 抗原を段階的に結合させるパイプライン合成法を確立し (特許申請予定)、各 Appendix 抗原の結合量を明らかにした。現在、最終的に SIVgp140 を結合させるための最終段階にあり、MMA の調製が終了次第、アカゲザルに経口ワクチンとして投与する予定である。

A. 研究目的

これまでのエイズワクチン戦略では全身系免疫システムに免疫応答を誘導することはできるが、粘膜面に十分な免疫応答を誘導することが難しいという弱点があった。そのためウイルスが侵入した後の増殖を抑えることが主作用となり、ウイルスの侵入そのものを抑えることは十分にできない。一方、一般に粘膜ワクチンは、初発感染防御機構である粘膜免疫システムと、万一、ウイルスが体内に侵入した際の防御機構である全身系免疫システムの両免疫システムに抗原特異的免疫応答が誘導できるため、生体内に二段構えの防御機構を構築できる。分担研究者はこれまでに、HIV-1 coreceptor CCR5 の特異的立体構造ドメイン (UPA ドメイン:R₁₆₉SQKEGLHYTC) の立体化学的基礎に立脚して調製された UPA 抗原を multiantigen peptide (MAP) に結合させて得られた免疫抗原をカニクイサル 3 頭に免疫し、SHIV_{SF162P3} を静注して challenge した結果、control 群がピークウイルス血症に至る時点で、ワクチン接種群は血中の viral load が 2-3log 低下するという感染防御効果を得た。したがって、次のステップでは、粘

膜局所及び全身性に CCR5 の UPA ドメインに対する自己抗体及びウイルス外被糖タンパク質 (ENV) 特異的抗体を誘導できる経口ワクチンを開発することを目的とする。これにより、粘膜局所に CCR5 および ENV に対する抗体を誘導させる粘膜免疫応答を誘導させ、HIV-1 が万一体内に侵入し、HIV が消化管関連リンパ組織 (GALT) の CD4 陽性 CCR5 陽性 T 細胞に感染しようとする際には、全身系免疫システムにより HIV-1 の感染増殖を阻止させようと考えている。分担研究者は、経口ワクチンの抗原のコアにあたる Hub 抗原に、消化管関連リンパ組織 (GALT) の M 細胞にワクチン抗原をデリバリーするための M 細胞標的分子 TGDK、UPA 抗原および CpG DNA を結合させたのち SIVgp140 を結合させた MMA をナノ粒子に封入し、アカゲサルを用いて新規エイズ粘膜ワクチン開発を行うことを目的としている。

B. 研究方法

1) TGDK の調製

Gallic acid と D-Lysine からなる新規 M 細胞 targeting 分子の候補として tetragalloyl-D-trilysinyll diethylamine 固層法による独自の方

別紙 3

法で作製した。(Fmoc)4-D-MAP-Ethylendiamine-Trt-resin(0.51mmol/ml)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-Trt-resin を得た。次に、メトキシ基の脱保護と resin からの切り出しのため BBr₃ を加え、TGDK を得ることができた。

2) *in vitro* 細胞ターゲティング能確認試験

TGDK 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。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、TGDK 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。

3) *in vivo* 細胞ターゲティング能確認試験

TGDK の M 細胞 targeting 機能の *in vivo* での評価のため、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-TGDK-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。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 O.T.C-compound を用いて固定する。最終的に共焦点レーザー顕微鏡によって局在を確認した。また、Au-ラベルしたポリオウイルスを調製し、同様にアカゲザルを用いて TGDK-Au の M 細胞への取り込みを電子顕微鏡により解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は熊本大学実験動物倫理委員会の指針に則って動物愛護の精神で動物に与える苦痛の軽減と排除に最大限努力し行う。

4) パイプライン合成

ポリエチレングリコールによる段階的基盤分子合成法を確立した (パイプライン合成と命名)。原料として、末端に活性化エステルを有する 8-

arm type の PEG と末端に一級アミンを有する 8-arm type の PEG を使用した。末端に一級アミンを有する 8-arm type の PEG に DMF を加え、そこに末端に活性化エステルを有する 8-arm type の PEG 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 Hub 抗原を得た。次に種々の Appendix 抗原を連続的に加えた。

C. 実験結果

1) *in vitro* 細胞ターゲティング能確認試験

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 細胞における ICAM-1 や integrinβ1 は確認した。さらに、ポリオウイルスと TGDK との局在を共焦点レーザー顕微鏡により確認した (Fig. 1)。その結果、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も共局在していた。従って、TGDK 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。

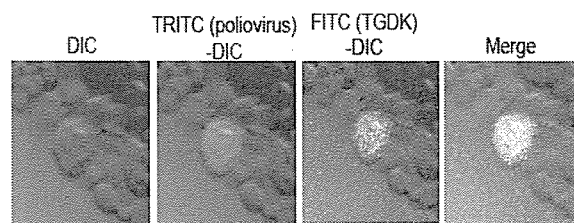
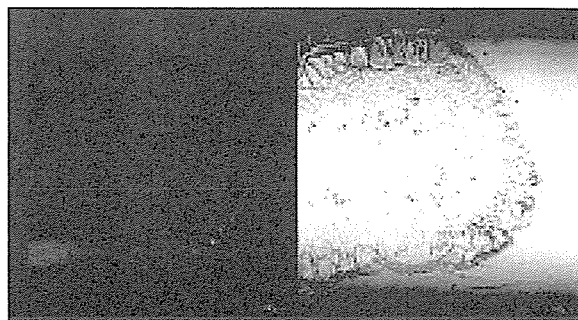


Fig. 1 TGDK の M 細胞ターゲティング

2) *in vivo* 細胞ターゲティング能確認試験

TGDK の M 細胞 targeting 機能の *in vivo* での評価のため、アカゲザルをウレタン麻酔し、開腹して用いた。アカゲザルの盲腸部位から回腸 15cm 部位にコレステロールプルランに封入した TGDK-FITC を注射して腸内に投与した。その結果、パイエル板の Dome area 周辺において TGDK が観察され、*in vivo* においても TGDK の M 細胞ターゲティング能を確認することができた (Fig. 2)。



別紙 3

Fig. 2 アカゲザルを用いた TGDK のM細胞ターゲットティングの検討

さらに透過電子顕微鏡像でも明らかに TGDK-Au が M 細胞に存在していることを確認した (Fig. 3)。

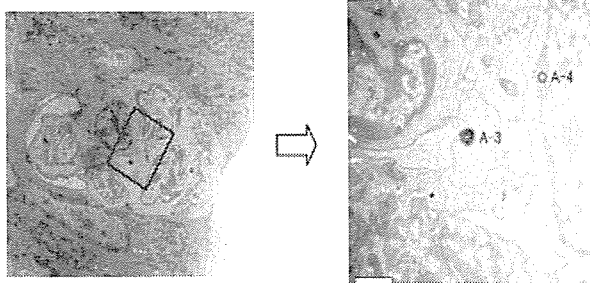


Fig. 3 アカゲザルを用いた TGDK のM細胞ターゲットティングの検討 (Au ラベルされた TGDK が確認された)

3) パイプライン合成法の確立

合成した Hub 抗原 168mg に活性化した UPA 溶液を加え室温で 2 分間攪拌し、次に調製した活性化 TGDK 溶液を加え、さらに室温で 2 分間攪拌した。そこへ活性化 NTA 溶液を加えて室温で 12 時間反応させた。12 時間の反応後、1.1mmol の CpG-ODN 溶液を加え、室温で 48 時間反応させた。反応終了後、反応溶液に等量の二次水を加え、外液を二次水として 48 時間透析の後、凍結乾燥しこれら 4 つの Appendix 抗原を結合した MMA が得られた。Hub 抗原への UPA、TGDK、NTA の結合の確認は Pico-Tag アミノ酸分析により確認した。UPA の結合量はその配列に含まれるチロシンを指標とし、TGDK は構造の中に含んでいるリシンを指標とし、NTA は NTA の溶出時間に基づき、CpG-ODN は加水分解により分解してくる 6-アミノヘキサノールの溶出時間に基づいて定量を行った。この定量の結果、それぞれのコンポーネントの結合が確認された (Fig. 4)。

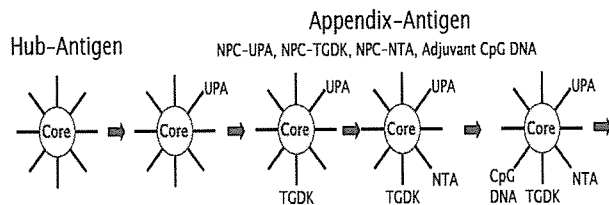


Fig. 4 パイプライン合成 (Hub 抗原への Appendix 抗原の段階的結合)

D. 考察

ウイルスの Env・Gag タンパク質を標的とする中和抗体産生・CTL 誘導ワクチンが開発中であるが、必ずしも成功には至っていない。そこで、申請者等は HIV-1 の侵入の現場である粘膜組織において生体の守りを固めるために初発感染防御機構である粘膜免疫システムと、万一、ウイルスが体内に侵入した際の防御機構である全身系免疫システムの両免疫システムに抗原特異的免疫応答が誘導できる新規エイズ粘膜ワクチンを開発することを目的とし、以下の 5 つの点に開発研究を行っている。

1. 粘膜免疫を完成させるための方策として、粘膜組織の M 細胞へワクチン抗原をデリバリーするための生体に優しい新規ポリフェノール型 M 細胞標的分子 (TGDK) の創製を行った (特許出願: 国際特許 PCT/JP2006/321720)。
2. 粘膜局所および全身において生体の守りを固める方策として、宿主因子である HIV-1 coreceptor CCR5 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として UPA 抗原の調製を行った (今までの研究より確立している)。
3. 粘膜免疫の効果を上げるために粘膜アジュバントとしてホスホエオチオエート化した CpG DNA の使用。すでに Hub 抗原に結合させた。
4. 粘膜局所および全身においてウイルスを直接中和する方策として、ウイルス因子である外被糖タンパク質に対する特異的な分泌型 IgA および IgG を誘導するために SIVmac239 由来三量体 gp140 の調製を行っており、現在大量調整中である。
5. 上記 1-3 を Hub 抗原に結合させる行程はすでに完了しており、gp140 を結合させるための最終工程を行っており、最終的に MMA 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よう計画している。

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 TGDK 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

別紙 3

御できる経口ワクチンの開発を行いたい。

E. 結論

TGDK 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（粘膜免疫：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

論文発表

- 1) Effects of Immunization with CCR5-Based Cycloimmunogen on Simian/HIVSF162P3 Challenge. Daisuke Nakayama, Shogo Misumi, Ryouzaburo Mukai, Kuniomi Tachibana, Mamoru Umeda, Hideaki Shibata, Nobutoki Takamune and Shozo Shoji. *J. Immunol.*, 176, 463-471, (2006)
- 2) 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. Shogo Misumi, Nobutoki Takamune, and Shozo Shoji. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* 2006 *in press*

G. 知的財産権の出願・登録状況

1) 特許取得

TGDK (M 細胞標的分子

(特許:PCT/JP2006/321720))