

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

## HIV 侵入の動的超分子機構を認識する特異的抗体作製に関する研究

分担研究者 玉村 啓和 東京医科歯科大学学生体材料工学研究所教授

研究要旨 今までワクチン創製のターゲットとしてあまり取りあげられなかった以下の3種をターゲットとして設定し、ペプチド化学および有機合成化学を巧みに用い人工抗原分子を作製している。1) HIV が標的細胞へ侵入するときの HIV 表面蛋白 gp41 の立体構造変化をターゲットとして設定し、gp41 のヘリカル領域の断片ペプチド(NおよびC端側)を化学合成し、膜融合の中間体構造である3量体を形成するようにアッセンブリーし抗原分子を作製している。2) 長期未発症の HIV 感染者で高く保存されている HIV 表面蛋白 gp120 の CD4 binding/ コレセプター-binding 領域をターゲットとし、効率的にエピトープを提示できるように構造固定化した環状ペプチドミメティックを作製し、抗体誘導を検討している。3) 標的細胞側のコレセプターの細胞外ループのみを合成し、人工テンプレート上に構築した分子を作製している。

**A. 研究目的**

現在までにエイズワクチンに関する研究はかなり精力的に行われてきたが、根本的な感染予防・治療法の確立には至っていない。我々のワクチン作製のターゲットとして、図1に挙げた3種類を考えた。1) これまでにワクチンのターゲットとしてあまり研究されていなかった HIV の標的細胞への侵入時の立体構造変化に関わる蛋白を認識する抗体を作製することにした。以前は、HIV 表面蛋白 gp120 上の表面に露出した領域、エピトープとして認識されやすい領域を抗原としていることが多かったが、ここ数年の HIV の標的細胞への侵入機構、特に動的超分子機構とよばれるメカニズムが明らかになってきたことにより、立体構造変化を起こす蛋白をターゲットとし、構造変化の中間体(3量体ヘリカル構造)を有機化学的に再構成した人工分子を抗原とすることにした。2) これまで何種類ものワクチンを作製し、根本的に成功に至らなかった原因のひとつとして、HIV 表面蛋白 gp120 のある領域の

断片ペプチドを抗原として用いていたために、この断片ペプチドがもとの gp120 上での本来の立体構造を再現できていなかった(もとの折りたたみ構造を保持していなかった)ということが考えられる。これにより効率的に抗体を誘導できなかった可能性がある。そこで、いままで鎖状ペプチドをベースに抗原として用い、うまく抗体誘導できなかったワクチンを例に取りあげ、鎖状を環状にし、立体構造を固定化したペプチドミメティックを合成する。具体的には、長期未発症の HIV 感染者の間で、CD4 binding/ コレセプター-binding 領域が中和抗体のエピトープとして高く保存されている断片ペプチドを取りあげる。また、この領域は beta-hairpin のループ構造にあたる領域であり、これまで鎖状のペプチドでは効率的に抗体が誘導できなかったため、beta-hairpin 構造を提示できるように環状構造に固定化したペプチドミメティックを合成し、より効率的な抗体誘導をはかる。3) ワクチンと言えば、抗原分子を設計する場合ウイルス

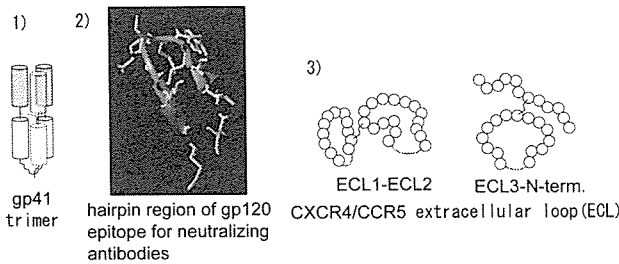


図1 ワクチン創製の3種のターゲット

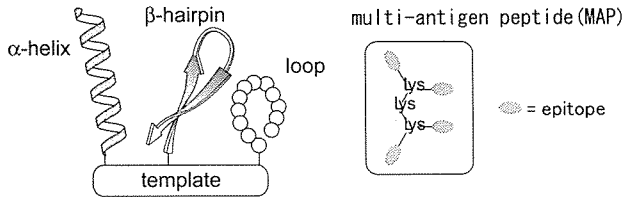


図2 テンプレート上でのエピトープ領域の構築と MAP 構造による抗原の提示

側の因子(表面蛋白等)を基にするのが常識であるが、我々の第三のワクチンのターゲットは標的細胞側のコレセプター(第二受容体)に設定した。この利点としては HIV のようなウイルスは非常に変異しやすいので、ワクチンによって誘導される抗体は変異してしまった抗原を効率よく認識できなくなるかもしれないが、標的細胞側を抗原としてワクチンを作製した場合、ホストの方は変異しないと考えられるので、ワクチンが徐々に効かなくなるといったことがない。しかし、本来の生理的な作用を阻害するために副作用が生じる可能性があることに十分注意しなければいけない。実際、具体例としてコレセプターであるケモカイン受容体 CXCR4, CCR5 の細胞外ループ(Ec11-Ec13 & N 端)のみを取りあげ、環化&構造固定化したペプチドミメティクにより効率的な抗体誘導をはかる。このように上記の3種をワクチン創製のターゲットとして設定し、図2のようなテンプレート上でのエピトープ領域の構築と multi-antigen peptide (MAP) 構造による抗原の提示などのテクニックを用い、研究をスタートした。

B. 研究方法

1) gp41 のヘリカル領域の合成ペプチド(NおよびC 端側)3 量体を抗原として設定

まず、gp41 の N および C 端側に存在するヘリカル領域のペプチドを3 量体にアッセムリーするための人工テンプレートを合成した(図3)。また、別に gp41 の N および C 端側断片(N36/C34) ペプチドを Fmoc 型固相合成法により合成した(図4)。これを図3で合成したテンプレート上に構築し、三量体とし、MAP 等に導入し抗原分子とする。

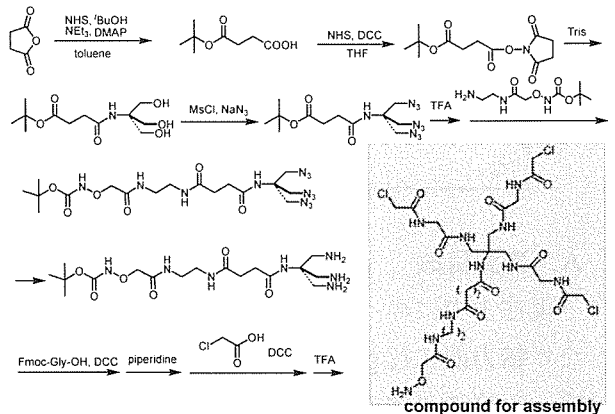


図3 gp41 の N および C 端側断片ペプチドの3 量体アッセムリーのための人工テンプレートの合成

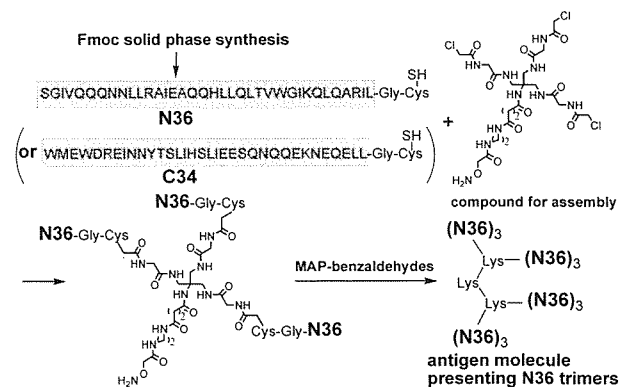


図4 gp41 の N36(N 端側断片ペプチド)/C34(C 端側断片ペプチド) 3 量体を提示する人工抗原分子の合成

2) gp120 の CD4 binding/コレセプターbinding 領域を抗原として設定

長期未発症の HIV 感染者の間で中和抗体のエピトープとして高く保存されている、gp120 の CD4 binding/コレセプターbinding 領域の断片ペプチドを、環化と構造固定化のコンセプトを用いて分子設計した(図 5)。

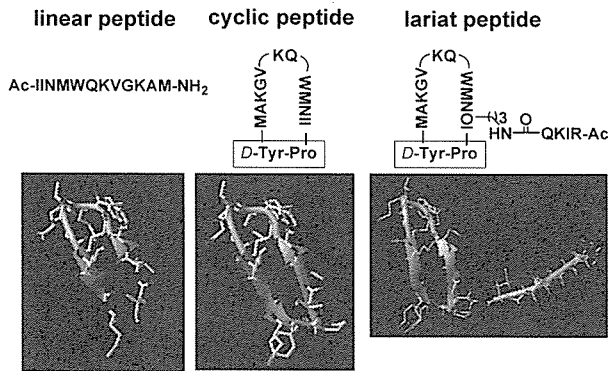


図 5 gp120 の CD4 binding/コレセプターbinding 領域を環化&構造固定化した分子構造

図 5 に示した 3 種を(コントロールとして鎖状ペプチドも)合成し(図 6)、抗原分子を作製し、抗体誘導を検討する。

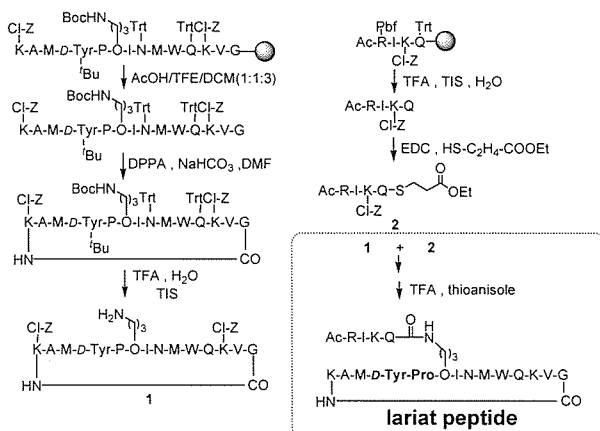


図 6 環化&構造固定化した分子の合成スキーム

3) コレセプターCXCR4, CCR5 の細胞外ループ (Ecl1-Ecl3 & N 端) を抗原として設定

コレセプターであるケモカイン受容体 CXCR4, CCR5 の細胞外ループ (Ecl1-Ecl3 & N 端) のみを

合成し、Ecl1 については環化し、MAP 等に導入する。

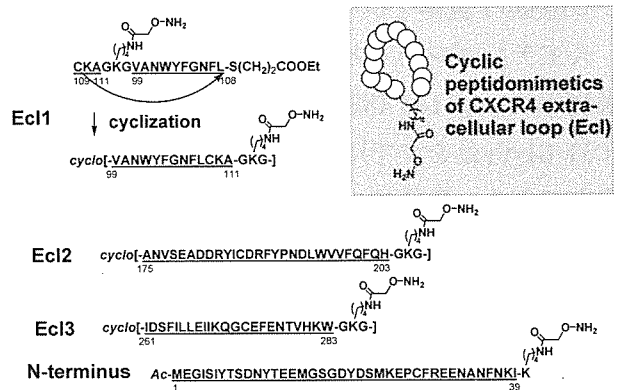


図 7 CXCR4 の細胞外ループ (Ecl1-Ecl3) & N 端ペプチドの合成と環化

まず、ペプチド鎖は図 7 のように天然型配列をリンクするスパーサー領域にオキシアミノ基を有する Lys を導入し、Ecl1 についてはネイティブケミカルライゲーション法という方法を用い環化する。また、これらの細胞外ループ (Ecl1-Ecl3) & N 端ペプチドを導入するための MAP-benzaldehydes を別途合成する(図 8)。

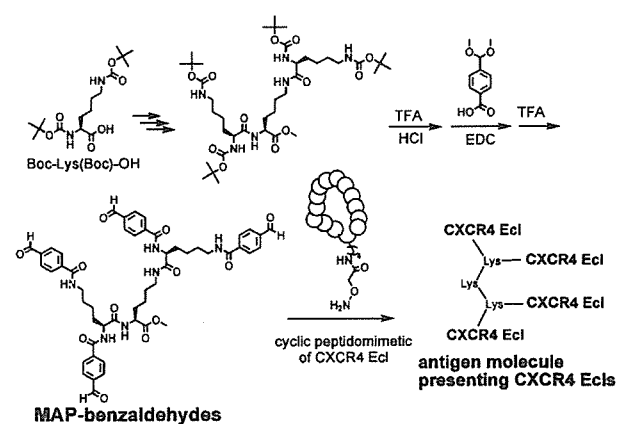


図 8 CXCR4 の細胞外ループ (Ecl1-Ecl3) & N 端ペプチドを提示する人工抗原分子の合成

MAP-benzaldehydes のアルデヒド基にオキシアミノ基を有する Ecl1-Ecl3&N 端ペプチドを導入する。

C. 研究結果

1) gp41 のヘリカル領域の合成ペプチド(NおよびC端側)3量体を抗原として設定

人工テンプレートと gp41 の断片(NおよびC端側)N36 peptide (N36-GlyCys)と C34 peptide (C34-GlyCys)をすでに化学合成し、三量体を構築中である。最終品の HPLC チャートとマスペクトルを図9, 10に示した。

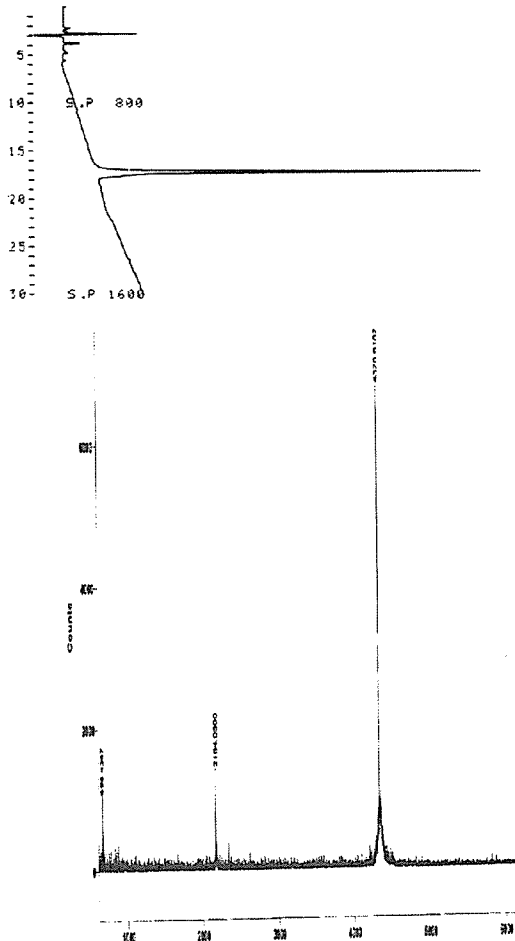


図9 N36 peptide の HPLC チャート(35-65% CH3CN/30 min, containing 0.1%TFA)とマスペクトル(MALDI-TOF-MS Voyager DE-STR,  $m/z$ : 4326.61, C191H321N59O53S Mol. Mass: 4324.02)

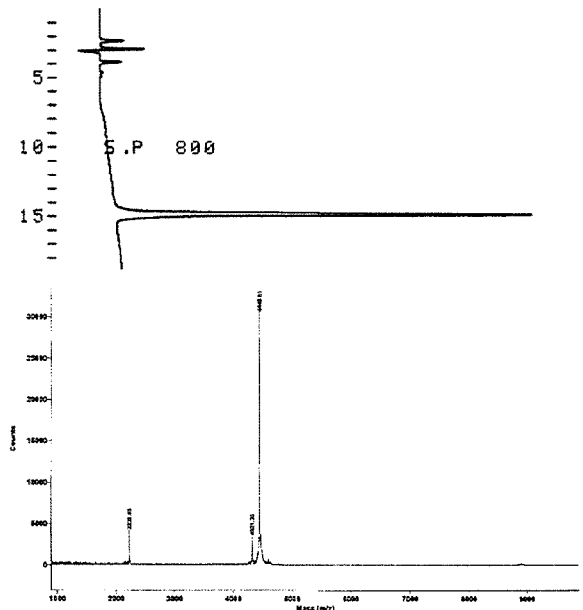


図10 C34 peptide の HPLC チャート(35-50% CH3CN/45 min, containing 0.1%TFA)とマスペクトル(MALDI-TOF-MS Voyager DE-STR,  $m/z$ : 4449.81, C191H291N53O66S2 Mol. Mass: 4449.80)

2) gp120 の CD4 binding/コレセプター-binding 領域を抗原として設定

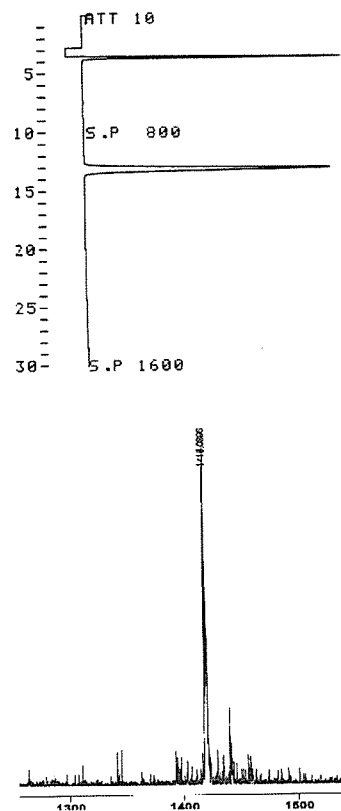


図 11 gp120 の CD4 binding/コレセプター binding 領域環化 peptide の HPLC チャート (28-38% CH3CN/30 min, containing 0.1%TFA) とマススペクトル (MALDI-TOF-MS Voyager DE-STR,  $m/z$ : 1418.09, C64H108N18O14S2 Mol. Mass: 1417.78)

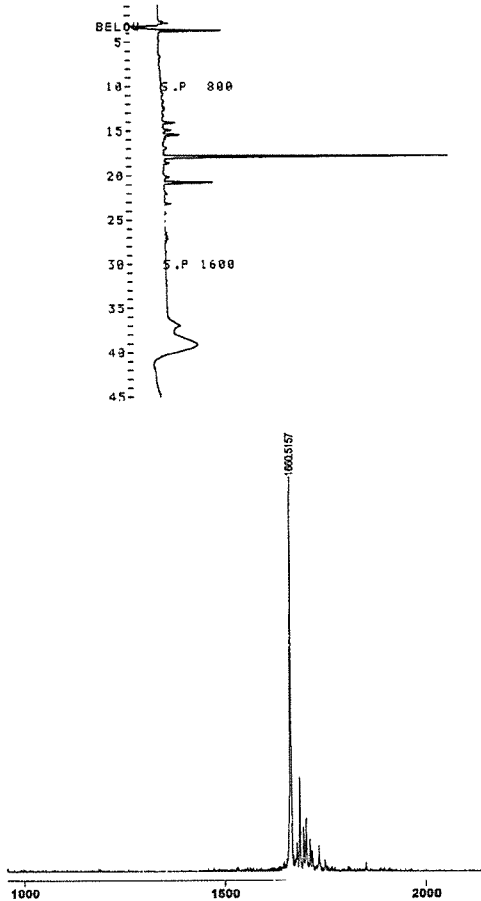


図 12 gp120 の CD4 binding/コレセプター binding 領域の鎖状 peptide の crude, HPLC チャート (20-40% CH3CN/30 min, containing 0.1%TFA) とマススペクトル (MALDI-TOF-MS Voyager DE-STR,  $m/z$ : 1660.52, C78H121N19O17S2 Mol. Mass: 1661.04)

gp120 の CD4/コレセプター-binding 領域の環状ペプチドを図6のスキームに従って合成した。コントロールとして鎖状ペプチドも合成した。最終品の HPLC チャートとマススペクトルを図

11, 12 に示した (図 12 は crude sample)。現在、それぞれのペプチドミメティックを用いて、抗体誘導能をマウスで評価している。鎖状を環化&構造固定化することによる効果を考察する。

3) コレセプターCXCR4, CCR5 の細胞外ループ (Ecl1-Ecl3 & N端)を抗原として設定

CXCR4 の細胞外ループを合成し、環化およびエピトープ提示のためのテンプレートへ導入中である。Ecl3 領域の環化 peptide のマススペクトルを図 13 に示した。

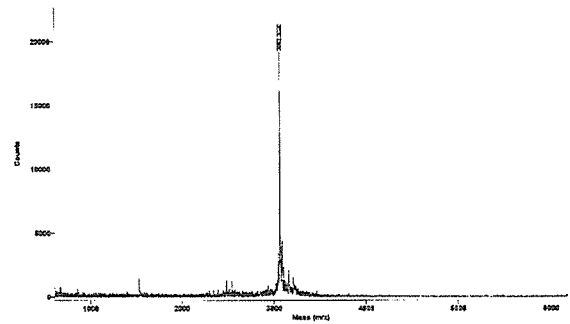


図 13 CXCR4 の Ecl3 領域の環化 peptide のマススペクトル (MALDI-TOF-MS Voyager DE-STR,  $m/z$ : 3062.30, C140H215N35O40S2 Mol. Mass: 3060.48)

D. 考察

上述の3種の人工抗原分子は有機合成・ペプチド合成のターゲットとしても魅力的な目的物であり、巧みな合成技術を用い、順調に合成できている。

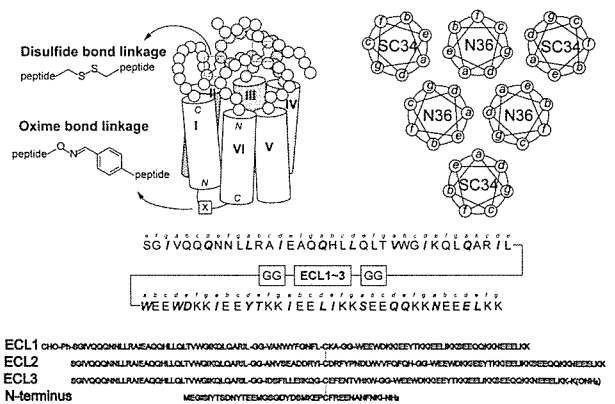


図 14 CXCR4 の細胞外ループ Ecl1-Ecl3 & N 端のすべてを提示する人工抗原分子

また、6 ヘリカルバンドルテンプレートを用い CXCR4 の細胞外ループ Ecl1-Ecl3 & N 端のすべてを提示する人工抗原分子をデザインし、作製を進めている。

## E. 結論

初年度では人工抗原分子の合成を順調に進めているが、gp120 の CD4 binding/コレセプター-binding 領域の鎖状および環状ペプチドに関しては大量合成も終了し、現在抗体誘導能を調べている。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. A. Niida, H. Tamamura, N. Fujii et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16(1), 134-137 (2006)
2. H. Tamamura & H. Tsutsumi *Chem. Biol.*, 13(1), 8-10 (2006)
3. S. Oishi, H. Tamamura, N. Fujii et al. *Tetrahedron*, 62, 1416-1424 (2006)
4. A. Kasyanov, H. Tamamura, N. Fujii et al. *Eur. J. Neuroscience*, 23, 1120-1128 (2006)
5. H. Hanaoka, H. Tamamura, N. Fujii et al. *Nucl. Med. Biol.* 33 (4), 489-494 (2006)
6. E. Menu, N. Fujii, H. Tamamura et al. *Haematologica/the Hematology Journal*, 91(5), 605-612 (2006)
7. H. Tamamura, N. Yamamoto et al. *J. Med. Chem.*, 49 (11), 3412-3415 (2006)
8. H. Tamamura et al. *Mini-Rev. Med. Chem.*, 6, 989-995 (2006)
9. H. Tamamura et al. *Org. Biomol. Chem.*, 4, 2354-2357 (2006)
10. A. Niida, H. Tamamura et al. *J. Org. Chem.*, 71 (10), 3942-3951 (2006)

11. H. Tamamura et al. *Curr. Med. Chem.*, 14 (1), 93-102 (2007)
12. H. Tsutsumi, H. Tamamura & N. Fujii *Lett. Drug Design Discovery*, 4, 20-26 (2007)
13. S. Ueda, H. Tamamura et al. *J. Med. Chem.*, 50(2), 192-198 (2007)
14. H. Tsutsumi, H. Tamamura et al. *Biopolymers: Peptide Science*, in press.
15. S. Kubonishi, H. Tamamura et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press.
16. Y. A. Berchiche, H. Tamamura et al. *J. Biol. Chem. (Commun.)*, 282, 5111-5115 (2007)

### 2. 学会発表

1. H. Tamamura et al.: Synthesis and biological evaluation of CXCR4 antagonists as pharmaceutical agents. 29th European Peptide Symposium, Gdansk, Poland, Sep 3-8, 2006
2. H. Tamamura: Chemokine receptor CXCR4 antagonists identified as multi-functional agents. 11th Akabori Conference 2006: Japanese-German Symposium on Peptide Science, Kloster Banz, Germany, Sep 10-12, 2006
3. H. Tamamura et al.: Development of the chemokine receptor CXCR4 antagonists as multi-pharmaceutical agents involving a new class of low molecular weight antagonists. The International Conference of 43rd Japanese Peptide Symposium/4th Peptide Engineering Meeting, Yokohama, Nov 5-8, 2006
4. H. Tamamura et al.: Development of chemical probes for the chemokine receptor CXCR4 involving radiolabeled T140 analogs. The International Conference of 43rd Japanese Peptide Symposium/4th Peptide Engineering Meeting, Yokohama, Nov 5-8, 2006
5. H. Tamamura: Chemical biology based on

- biomimetics. The 3rd International Chemical Biology Frontier Symposium, Tokyo, Feb 22, 2007
6. 増野弘幸、堤 浩、小川哲平、藤井信孝、松本洋典、大橋南美、Peter M. Blumberg、Victor E. Marquez、玉村啓和. PK-C をターゲットとした diacylglycerol の構造固定化誘導体の創製. 日本ケミカルバイオロジー研究会第1回年会. 東京、2006年5月8日
  7. 堤 浩、増野弘幸、溝上智子、平松健一、上田 聡、玉村啓和、越智元輝、田部泰章、山本直樹、大石真也、藤井信孝. ケモカインレセプターCXCR4 の低分子アンタゴニストの創製. 日本ケミカルバイオロジー研究会第1回年会. 東京、2006年5月8日
  8. 増野弘幸、平松健一、堤 浩、玉村啓和、上田 聡、田中智博、Zixuan Wang、John O. Trent、Stephen C. Peiper、山本直樹、大石真也、藤井信孝. [L-Arg, L/D-3-(2-naphthyl)alanine]—タイプ(E)—アルケン型ジペプチドイソスターの立体選択的合成とケモカイン受容体CXCR4 アンタゴニストFC131 のペプチドミメティック誘導体の創製. 日本ケミカルバイオロジー研究会第1回年会. 東京、2006年5月8日
  9. 堤 浩、増野弘幸、玉村啓和、山本直樹、上田 聡、大石真也、藤井信孝. ケモカインレセプターCXCR4 をターゲットとした低分子アンタゴニストの創製. 日本ケミカルバイオロジー研究会第1回年会. 東京、2006年5月9日
  10. 小川哲平、玉村啓和、王子田彰夫、堤 浩、増野弘幸、中島秀喜、山本直樹、大石真也、大野浩章、浜地 格、藤井信孝. 二核亜鉛錯体構造を有するケモカインレセプターCXCR4 の新規アンタゴニストの創製. 第56回日本薬学会近畿支部総会・大会. 京都、2006年10月28日
  11. 小川哲平、玉村啓和、王子田彰夫、堤 浩、中島秀喜、大石真也、大野浩章、浜地 格、藤井信孝. 二核亜鉛錯体構造を有する新規ケモカインレセプターCXCR4 アンタゴニストの創製. 第25回メディシナルケミストリーシンポジウム. 名古屋、2006年11月29-30日
- G. 知的財産権の出願・登録状況**  
(予定を含む。)
1. 特許取得
    1. PCT出願予定  
発明の名称：新規CXCR4拮抗剤及びその用途  
出願番号：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
    2. 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

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

エイズウイルス感染を抑制する宿主応答の解析

分担研究者 森 一泰 国立感染症研究所 主任研究官

研究要旨 糖鎖欠失ウイルス d-5G は生ワクチンに必要な低病原性と強い感染防御誘導能を示す。これらの性質との関連性から、初期感染について病理学的、ウイルス学的、免疫学的手法で解析した。感染宿主全体での感染レベルは d-5G 感染は SIV239 感染と同様であったが、感染細胞の分布、組織内での局在、免疫系への影響において、両ウイルス感染は顕著に異なることが明らかとなった。SIV239 感染は主要免疫組織で広範囲に見られ、全身的な CD4+CCR5+T 細胞の急激な減少が起こった。ところが、d-5G 感染では、感染は腸管粘膜組織に限局され、粘膜固有層など機能的に分化活性化した CD4+T 細胞が標的となっていた。また全身性リンパ組織での CD4+CCR5+T 細胞の減少は見られなかった。腸管粘膜組織においても SIV239 感染は lymphoid follicle が主要感染組織であり d-5G 感染と異なった。この感染様式の違いが、病原性、防御免疫誘導の違いと関連していると推測された。

A . 研究目的

エイズワクチン開発研究は、プライムブーストワクチンが CTL を指標とした細胞性免疫を効率良く誘導することから、HIV 感染防御効果についての臨床実験が開始された。しかし、このことはエイズワクチン開発が実用化に向けて順調に進んでいることを示す訳ではない。残念ながら HIV 感染を防御する宿主応答についての解答は得られていないからである。動物実験からは、SIV 特異的な CTL を高頻度に誘導しても感染抑制は不十分であり、エイズ発症の遅延効果が確認されたのみであった。CTL は感染細胞を細胞死させるが、ウイルス産生抑制効果は不十分であるためである。ウイルスと結合し感染を抑制する中和抗体の感染防御効果は高いが、現時点では HIV に対する有効な中和抗体を誘導するワクチンの開発は実現していない。さらにワクチン開発を困難にする HIV の性質は、高変異性に起因するウイルスの多様性である。ワクチンで誘導される CTL は認

識ウイルスタンパク配列（エピトープ）特異的に感染細胞を障害することから、その効果は感染ウイルスのごく一部に限られる。また CTL のエピトープ認識が特定 MHC I アリルに限定されることから、感染が抑制されない変異ウイルスが高頻度に出現する。このようにワクチン開発の問題点は明らかとなったが、その解決法は得られていない。SIV エイズ動物モデル研究からは、弱毒生ワクチンとして低病原性 SIV が感染ザルに極めて有効な感染防御を誘導することが明らかとなっている。本研究では、生ワクチンとしての性質を備えている d-5G（SIV239 から 5 糖鎖を欠失させた変異ウイルス）が誘導する感染防御の機序、高いウイルス増殖を伴う初期感染にもかかわらず低病原性を示す機序の解明から、安全なワクチン開発のための戦略を確立することを目指す。



## B. 研究方法

### アカゲザル

ミャンマー、ラオス原産の育成ザル、オス、Bウイルス、SRV, STLV, SIV に対する抗体が陰性、SIV 感受性（培養リンパ球の SIV 増殖性）に問題がないサルを用いた。

### SIV 感染

アカゲザル 12 頭を用い、200 TCID<sub>50</sub> の SIV239 または d-5G を静脈内接種した。感染後 7 日から 21 日まで定期的に採血し安楽殺した。

### ウイルス

ウイルスストックはウイルス DNA クローンを培養細胞 (SW480 または COS-1) に transfection を行い作成した。Transfection 2-4 日後の培養上清を種ウイルスとしアカゲザル培養リンパ球を用いてさらに増殖させ感染実験用ウイルスとした。ウイルス量は gag 抗原量については Coulter 社の p27 gag antigen assay kit により、TCID<sub>50</sub> はサル CD4 陽性 T 細胞 (CyfT/HVS) を用いて測定した。

### 血しょうウイルス RNA 量の測定

血しょう中のウイルス RNA は Qiagen 製キットを用い精製した。ウイルス RNA 量は SIV の gag 遺伝子配列から作成したプライマー: the gag primers, forward primer: 697F (5' GCAGAGGAGGAAATTACCCAGTAC 3'), reverse primer: 764R (5' CAATTTTACCCAGGCATTTAATGTT 3') and TaqMan probe 740T: (FAM- 5' TGTCCACCTGCCATTAAGCCCGA 3' -3' -TAMRA) を用い、RT-PCR キット (TaqMan EZ RT-PCR kit) を用いてリアルタイム PCR 法により測定した。

フローサイトメトリーによる末梢血リンパ球の細胞表面抗原の解析

末梢リンパ球、組織から分離されたリンパ球の性状について細胞表面抗原の発現を各種蛍光色素標識抗体を用いて解析した。細胞表面抗原としては、CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD29, CD28, CD95, CCR5 を対象とし、B 細胞、T 細胞、NK 細胞の頻度、CD4+T 細胞、CD8+T 細胞については naïve, memory 細胞、CCR5 発現細胞の頻度について解析した。血中の CD4+ 細胞数は自動血球計算機によりリンパ球数を測定し、フローサイトメトリーの結果を用いて CD4+ 細胞数を算出した。

### 免疫組織学的解析

各ウイルス感染ザルから得た組織の免疫組織染色により、SIV 感染細胞の検出 (抗 gag 抗体、抗 Nef 抗体、抗 Env 抗体)、細胞の同定 (抗 CD3 抗体、抗 CD4 抗体、抗 CD68 抗体、抗 CD20 抗体)、アポトーシスの検出 (抗 ssDNA 抗体、抗活性化カスパーゼ-3 抗体)、細胞傷害性細胞の検出 (抗 グランザイム-B 抗体、抗 TIA-1 抗体)、細胞増殖性の検出 (抗 PCNA 抗体) を行った。

### 倫理への配慮

本研究では動物実験が中心であることから、動物実験方法については倫理上、動物愛護の問題の観点から感染研動物実験委員会が定めたルール、ガイドラインに従った。動物実験開始に際しては事前に感染研動物実験委員会による審査・承認を受けた。

## C. 研究結果

### 糖鎖欠変異 SIV (d-5G) の初期感染

SIV239 はサルエイズモデルで用いられる分子クローンウイルスでアカゲザルへの感染実験では感染後 1-2 年でエイズを発症した。その viral loads は図 1 に示されるように、血中ウイルス RNA は感染後 2 週にピークとなり、その後も高いウイルス増殖が持続的し、エイズ関連疾患の発症に至る。これに対して d-5G 感染ザルでは、感染後 4 週までの初期感染前期で SIV239 とほぼ同

様の viral loads を示したが、その後、急激に低下し感染後 18 週には検出限界以下となった。

(図 1) さらに感染後 48 週に d-5G 感染ザルに SIV239 をチャレンジ感染したところ、一過性のウイルス増殖後、検出限界以下に抑制したことから、d-5G は生ワクチンとして働くことが明らかとなった。

このように d-5G は SIV239 と異なり、感染後 4 週以降ウイルス感染が制御される。さらに SIV239 に対する有効な免疫が誘導される。感染 4 週後の viral loads の低下の原因として感染に対して誘導された宿主応答、獲得免疫が推測される。もう一つの原因は、ウイルス感染の違いが推測された。今年度は後者の可能性について研究を行った。

#### 初期感染解析の概要

図 2 に示されるように、アカゲザルに 200TCID50 の SIV239 または d-5G を静脈内接種し、感染後 7 日から 21 日までに安楽殺した。血液と安楽殺時にはリンパ組織(種々のリンパ節、脾臓、小腸、大腸等)を中心に採材し、リンパ球分離と病理解析用の組織標本を作製した。分離されたリンパ球はフローサイトメトリーによる表面抗原の解析、SIV DNA, RNA の定量を行った。組織標本については感染細胞の同定、アポトーシス、細胞障害反応等の解析を行った。コントロールとして非感染ザル 2 頭を用いた。

#### ウイルス増殖の確認

個体間の多少のウイルス増殖の違いは見られたが、初期感染のピーク値は両群とも  $10^7$  copy/ml 前後となった。ピーク値に達する日数は SIV239 感染では感染後 12 日、d-5G 感染では感染後 14 日であった。(図 3)。

#### SIV 感染組織の解析

主要感染組織である空腸(小腸)、回腸(小腸)、結腸(大腸)、腸間膜リンパ節、ソケイリンパ節について免疫組織染色法により感染細胞の頻度について解析を行った。SIV239 感染では、感染後 7, 9, 12 日に、多数の感染細胞が腸管組織、ソケイリンパ節に検出された。d-5G 感染では感染後 9 日に多数の感染細胞が空腸、回腸、腸間膜リンパ節に検出されたが、ソケイリンパ節では少数みられただけであった。SIV239 感染と d-5G 感染の違いは、ソケイリンパ節と結腸での感染が SIV239 感染と比べ d-5G 感染では顕著に少なかった。感染細胞は両ウイルス感染とも CD3+ T 細胞であった。

#### SIV 感染細胞の感染組織における局在

##### (1) 腸間膜リンパ節

T 細胞領域、B 細胞領域における感染細胞の局在について調べた。SIV239 感染では、両領域区別なく感染細胞が全体に分布していた。d-5G 感染では、感染細胞は特に T 細胞領域と B 細胞領域の境界に集中して分布していた。

##### (2) 空腸

空腸粘膜において T 細胞は、粘膜固有層(Lamina propria)、孤立リンパ小節(lymphoid follicle)に多数存在するが、感染細胞の分布は SIV239 感染と d-5G 感染で違っていた。SIV239 感染では、感染細胞は lymphoid follicle に、d-5G 感染では、感染細胞は Lamina propria に集中して分布していた。

末梢リンパ球における SIV DNA, RNA レベル SIV DNA レベルは感染細胞数と対応するが、viral loads と相関して感染後 12 日にピークとなり減少した。SIV239 感染では感染後 21 日には 1 log 以上低下した。d-5G 感染では感染後 9 日以降は微増し感染後 21 日までほぼ同レベルを維持した(図

4)。SIV DNA レベルにおいて両感染は異なっていた。d-5G 感染ザルの SIV DNA レベルは SIV239 感染と比較するとピークで 1 log 以下であった。SIV RNA レベルは SIV DNA レベルと同様の違いが両ウイルス感染間に見られた。

末梢リンパ球における CD4+ T 細胞のレベル  
SIV 感染による CD4+ T 細胞の減少は通常、慢性感染期に免疫機能の低下と相関して起こるが、感染後 21 日までの初期感染では、図 5 に示されるように、SIV239 感染で感染後 21 日にわずかな減少が見られたのみであった。しかし CD4+CCR5+T 細胞では両感染に違いが見られた。SIV239 感染では、感染後 7 日から減少が始まり、感染後 14 日には感染前の約 10% に減少した。しかし d-5G 感染では減少はなく、逆に感染後 3, 12, 14 日では増加していた。

#### D. 考察

一部の糖鎖を欠失した d-5G はウイルス増殖性に関しては SIV239 のレベルを保持していることから、宿主感染においても初期感染の viral loads のピークは同様であった。しかし感染動物内でのウイルス感染が質的に顕著に異なることが明らかとなった。まず感染組織については d-5G 感染は主要標的組織が限られていた。SIV239 感染では、主要なリンパ節、消化管粘膜リンパ組織において多数の感染細胞が検出された。対照的に d-5G 感染では消化管リンパ組織(小腸、大腸、腸間膜リンパ節)に感染が集中していた。両ウイルス感染細胞の分布の違いが、共通に感染が見られた空腸、腸間膜リンパ節で明らかとなった。リンパ節では、SIV239 感染が T 細胞領域全体に、d-5G 感染では T/B 細胞領域に限定されていた。この結果は、Nef 遺伝子欠損 SIV 感染の結果と類似している。T 細胞領域では大部分の細胞が naive

細胞または休止期にある memory T 細胞であることから Nef タンパクが T 細胞を活性化し SIV 感染増殖が起こると推測される。この T 細胞活性化は抗原特異的であり獲得免疫の基本となる宿主応答である。HIV/SIV の病原性の機序から見ると、HIV/SIV は獲得免疫誘導を利用して CD4+T 細胞を活性化、感染し消失させる。このような理由から Nef 遺伝子欠損は低病原性化の原因の一つと考えられる。糖鎖欠失との関連性については今後の課題となるが、d-5G 感染が d-nef SIV 感染と同様の現象が見られたことは、この感染細胞の分布の違いが d-5G の低病原性においても重要と推測される。空腸における感染細胞の局在の相違も同じメカニズムと考えられる。SIV239 感染は、リンパ節と対応する lymphoid follicles で多数の感染細胞が検出された。一方、d-5G 感染は lymphoid follicles では感染は少なく、lamina propria で多数の感染が見られた。lamina propria には、病原体を攻撃する effector 細胞が存在する。CD4+T 細胞についても機能的に分化、活性化しており、CCR5 を高発現し d-5G 感染の標的となっている。しかし lamina propria で SIV239 感染が少ない理由の説明は難しい。SIV239 は低マクロファージ指向性を示す、原因はマクロファージでの CD4+分子の細胞表面での発現が低いためである。lamina propria の CD4+T 細胞は CCR5 の発現は高が、CD4 の発現が PBMC の CD4+T 細胞と比べて低い、このことが SIV239 感染に抵抗性を示すのかもしれない。d-5G が CD4 非依存性に CCR5 を介して感染する性質がこの違いと関連しているのかもしれない。全身性リンパ組織での感染においても両ウイルス感染間に違いが見られた。d-5G は PBMC での SIV DNA 量から低レベルの感染が確認された。この腸管粘膜組織と全身性リンパ組織での感染レベルの違いの原因の解明も今後の課題となる。

## E. 結論

d-5G の初期感染の感染組織、感染細胞の分布、CD4+CCR5+T 細胞数の変化の解析から d-5G の低病原性と感染防御免疫誘導と関連性が明らかとなった。

## F. 健康危険情報

特に該当する情報はなかった。

## G. 研究発表

### 論文発表

- 1) Pereira, L.E., Villinger, F., Onlamoon, N., Bryan P., Cardona A., Pattanapanyasat, K., Mori, K., Hagen S., Picker L., and Ansari, A.A., SIV infection influences the level and function of Tregs in SIV-infected rhesus macaques but not SIV-infected sooty mangabeys. *J. Virol.* In press
- 2) Ansari, A.A., Pereira, L.E. Mayne, A.E., Onlamoon, N., Pattanapanyasat, K., Mori, K. and Villinger, F. The role of disease stage, plasma viral load and regulatory T cells (Tregs) on autoantibody production in SIV-infected non-human primates. *J. Autoimmunity.* In press
- 3) Tanaka-Takahashi Y., Yasunami M., Naruse T., Hinohara K., Matano T., Mori K., Miyazawa M., Honda M., Yasutomi Y., Nagai Y., Kimura A. Reference strand-mediated conformation analysis (RSCA) - based typing of multiple alleles in the

rhesus macaques MHC class I Mamu-A and I Mamu-B loci. *Electrophoresis.* In press.

### 学会発表

- 1) C. Sugimoto, F. Ono, S. Nakamura, S. Izumo, N. Yamamoto, Y. Nagai, Y. Suzuki and K. Mori. Clues for the attenuation of deglycosylated mutant of SIV239 in the primary infection  
24th annual symposium on nonhuman primate models for AIDS. October, 2006, Atlanta, USA.
  - 2) K. Mori, C. Sugimoto, F. Ono, S. Nakamura, Y. Nagai, Y. Suzuki, F. Villinger, A. Ansari and N. Yamamoto. Suppression of SIV239 challenge infection in the animals controlling pre-existing SIV infections with attenuated viruses or pathogenic viruses. October, 2006, Atlanta, USA.
  - 3) 新規糖鎖欠損 SIV の性質とアカゲザルでの感染  
杉本智恵、中山英美、塩田達雄、山本直樹、永井美之、森 一泰、日本エイズ学会、2006 年、東京
  - 4) Immune correlates: Lessons from a novel attenuated mutant virus. 森 一泰. 日本エイズ学会、2006 年、東京
- ## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）
1. 特許取得 該当なし
  2. 実用新案特許 該当なし
  3. その他 該当なし

图1. Plasma viral RNA loads of wild-type

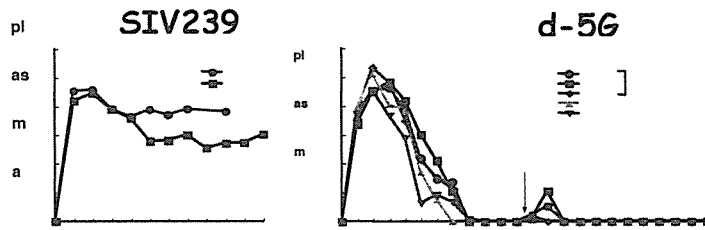


图2.

Outline of this study

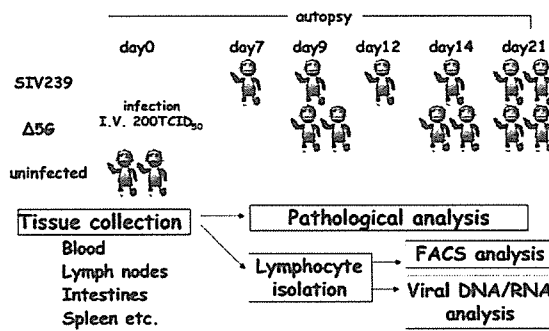


图3.

Plasma viral RNA loads

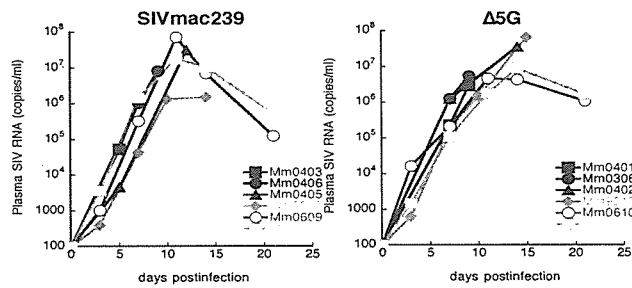


图4. SIV DNA and RNA levels in PBMC

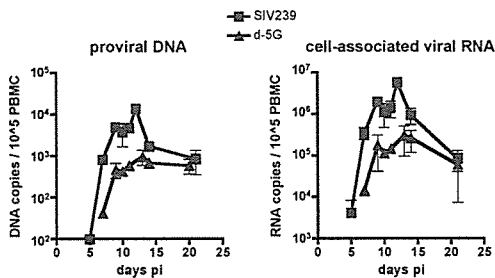
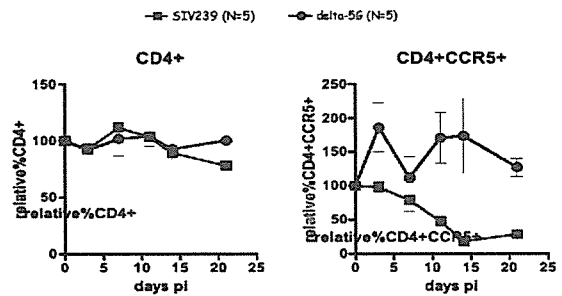


图5. CD4+ cell depletion in PBMC



弱毒 SHIV による感染防御効果成立機序の解析とワクチンへの応用

分担研究者 三浦 智行 京都大学ウイルス研究所 助教授

既に霊長類モデルで強力な感染防御効果が確認されている nef 欠失 SHIV による弱毒生ワクチンの実験系において、その防御機構を成立させている感染初期の決定因子を明らかにし、ワクチン開発に応用することを目的とする。本年度は、生ワクチン接種後、早期に強毒ウイルスを攻撃接種し、腸管や全身の深部リンパ系組織におけるウイルス感染と免疫細胞の動態について解析を行なった。その結果、腸管リンパ球のウイルス感受性は他の組織のリンパ球と大きく異なること、腸管内で感染初期にウイルス増殖が起きても組織中の CD4 陽性 T 細胞を減少させないメカニズムが存在すること等が明らかとなった。

**A. 研究目的**

SHIV-アカゲザルの感染・発症モデル系における解析により、生ワクチンの強力な感染防御効果を保持しつつ安全性も確保されたヒト用エイズワクチンを開発することを目的とする。ワクチンの歴史において特異的及び非特異的防御反応を強力に誘導できる弱毒生ワクチンが最も有効であることが証明されてきたが、HIV では変異による強毒化の可能性から生ワクチンについては危惧視され、殆どその開発は進められていない。SHIV はサルとヒトの両方で増殖可能であり、サルで有効性と安全性を確認できることから、より実用化に近い形でワクチン候補を開発し、また、その過程で SHIV の強毒性・弱毒性についても明らかにする。

**B. 研究方法**

nef 欠失 SHIV 弱毒生ワクチン接種後、早期に強毒ウイルスを攻撃接種する実験系において、腸管や深部リンパ系組織におけるウイルス動態

と免疫細胞動態を経時的に詳細に解析することによって、ウイルス制御機構が成立する過程を明らかにする。そこから得られる知見を新規ワクチンのデザイン（遺伝子構成や発現プロモーター）や投与方法（デリバリー法やアジュバント）に反映させ、サル感染実験により腸管標的細胞における感染防御効果を確認する。

**（倫理面への配慮）**

本研究所では霊長類委員会によってサルを用いた実験の妥当性の検討とサルの適切な飼育と使用の監視がなされている。また、組換え SHIV 感染実験については第二種使用等をする間に執る拡散防止措置について大臣確認されている。

**C. 研究結果**

これまでの研究で、nef 遺伝子を欠失させた SHIV-NI 弱毒生ワクチン免疫ザルが攻撃接種ウイルスの増殖を強力に抑制することを明らかにしてきたが、それらは末梢血レベルでの解析であった。本年度は、SHIV-NI 免疫ザルの増殖抑

制機序を深部臓器レベルで明らかにするため、免疫ザルおよび非免疫ザルに急性発症型 SHIV-C2/1-KS661 (KS661) を経粘膜攻撃接種し、早期の全身臓器におけるウイルス動態および CD4 陽性 T 細胞数を比較検討した。アカゲザルに SHIV-NI を静脈内接種し、その 4 週後に KS661 を経直腸攻撃接種した。攻撃接種 0、2、4 週後にそれぞれ 2~3 頭の剖検を行い、全身臓器における各ウイルスのプロウイルス DNA 量、感染性ウイルス産生細胞数および CD4 陽性 T 細胞数を解析した。非免疫ザルでは血漿中ウイルス RNA 量が攻撃接種 2 週後で 10 の 8~9 乗 copies/ml まで上昇し、3 週後には末梢血中 CD4 陽性 T 細胞が枯渇した。一方、免疫ザルではウイルス RNA 量が検出限界以下に抑制された個体群 (CP 群) と、10 の 5 乗 copies/ml 程度に抑制された個体群 (PP 群) に別れた (図 1) が、いずれも末梢血中 CD4 陽性 T 細胞の減少は見られなかった。CP 群では、全臓器において攻撃接種ウイルスは検出限界以下であった。PP 群では非免疫ザル群と比較して、末梢リンパ節、脾臓、胸腺においてウイルス増殖が著しく抑制されたが、腸管では同程度のウイルス増殖が見られた (図 2)。ウイルス増殖に顕著な抑制が見られた腸管以外のリンパ系臓器において、攻撃接種 1 ヶ月以内では CD4 陽性 T 細胞の減少は見られなかった。また、非免疫ザルと同等なウイルス増殖が見られた腸管においても CD4 陽性 T 細胞の減少は見られなかった。(図 3)。

#### D. 考察

CP群の結果から、SHIV-NI免疫により粘膜感染に対し完全な感染防御を示す個体が認められた。またPP群の結果より、腸管と他のリンパ系組織とはウイルス感受性が大きく異なることが明らか

かとなった。PP群と非免疫ザル群の末梢血における10の3~4乗倍のウイルスRNA量の差異は、主に腸管以外のリンパ系組織でのウイルス増殖抑制を反映していると考えられた。一方、非免疫ザルと同様なウイルス増殖が見られた腸管を含め、全ての臓器においてCD4陽性T細胞の著しい減少は見られなかったことから、腸管内で感染初期に顕著なウイルス増殖が起きても組織中のCD4陽性T細胞の減少を抑える機構が誘導されていると考えられた。

#### E. 結論

弱毒生ワクチン免疫ザルの末梢血におけるウイルスロードの減少は腸管以外のリンパ系組織におけるウイルス増殖抑制が寄与しており、腸管リンパ球のウイルス感受性は他の組織のリンパ球と大きく異なる。腸管内で感染初期にウイルス増殖が起きても組織中の CD4 陽性 T 細胞を減少させないメカニズムが存在する。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Kuwata, T., Kodama, M., Sato, A., Suzuki, H., Miyazaki, Y., Miura, T., and Hayami, M.: Contribution of monocytes to viral replication in macaques during acute infection with simian immunodeficiency virus. AIDS Res. Hum. Retroviruses, in press.
- (2) Shimizu, Y., Inaba, K., Kaneyasu, K., Ibuki, K., Himeno, A., Okoba, M., Goto, Y., Hayami, M., Miura, T., and Haga, T.: A genetically engineered live-attenuated

simian-human immunodeficiency virus that co-expresses the RANTES gene improves the magnitude of cellular immunity in rhesus macaques. *Virology*, in press.

(3) Ishimatsu, M., Suzuki, H., Akiyama, H., Miura, T., Hayami, M., and Ido, E.: Construction of a novel SHIV having an HIV-1-derived protease gene and its infection to rhesus macaques: a useful tool for in vivo efficacy tests of protease inhibitors. *Microbes and Infection*, in press.

(4) Motohara, M., Ibuki, K., Miyake, A., Fukazawa, Y., Inaba, K., Suzuki, H., Masuda, K., Minato, N., Kawamoto, H., Nakasone, T., Honda, M., Hayami, M., Miura, T.: Impaired T-cell differentiation in the thymus at the early stages of acute pathogenic chimeric simian-human immunodeficiency virus (SHIV) infection in contrast to less pathogenic SHIV infection. *Microbes and Infection*, 8:1539-1549, 2006

(5) Miyake, A., Ibuki, K., Enose, Y., Suzuki, H., Horiuchi, R., Motohara, M., Saito, N., Nakasone, T., Honda, M., Watanabe, T., Miura, T., Hayami, M.: Rapid dissemination of a pathogenic simian/human immunodeficiency virus to systemic organs and active replication in lymphoid tissues following intrarectal infection. *J. Gen. Virol.*, 87:1311-1320, 2006

(6) Horiuchi, R., Akahata, W., Kuwata, T., Enose, Y., Ido, E., Suzuki, H., Miyake, A., Saito, N., Ibuki, K., Goto, T., Miura, T., and Hayami, M.: DNA vaccination of macaques by a full-genome SHIV plasmid that has an IL-2 gene and produces non-infectious virus particles.

*Vaccine*, 24:3677-3685, 2006

(7) Shimizu, Y., Okoba, M., Yamazaki, N., Goto, Y., Miura, T., Hayami, M., Hoshino, H., Haga, T.: Construction and in vitro characterization of a chimeric simian and human immunodeficiency virus with the RANTES gene. *Microbes and Infection*, 8:105-113, 2006.

(8) Haga, T., Kumabe, S., Ikejiri, A., Shimizu, Y., Li, H., Goto, Y., Matsui, H., Miyata, H., and Miura, T.: In vitro and in vivo stability of plasmids in attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium used as a carrier of DNA vaccine is associated with its replication origin. *Experimental Animals*, 55(4): 405-409, 2006.

(9) Miura, T., Matsuyama, M., Ogatsu, F., Hayami, M.: Whole genome sequence data of an infectious molecular clone of the SIVagm TYO-1 strain. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 22(11):1183-1185, 2006

## 2. 学会発表

(1) Shimizu, Y., Okoba, M., Ibuki, K., Kaneyasu, K., Goto, Y., Miura, T., Hayami, M., Haga, T.: In vitro and In vivo properties of chimeric simian and human immunodeficiency viruses having human RANTES genes. *Keystone Symposia HIV Vaccines*, March 27- April 2, 2006, keystone, Colorado, USA.

(2) Miura, T.: Virological and immunopathological analysis of systemic lymphoid tissues in SHIV-infected monkeys: Importance of small intestine as target organ of AIDS. *The 7th Kumamoto AIDS Seminar*, Sep.



21-22, 2006, Kumamoto.

(3) Fukazawa, Y., Miyake, A., Ibuki, K., Inaba, K., Saito, N., Motohara, M., Horiuchi, R., Himeno, A., Matsuda, K., Nakamura, M., Matsuyama, M., Hayami, M., Miura, T. : Even low pathogenic SHIV lead to decrease CD4+ T-cell of the small intestine significantly from early phase of infection. The 7th Kumamoto AIDS Seminar, Sep. 21-22, 2006, Kumamoto.

(4) 伊吹謙太郎、深澤嘉伯、姫野愛、齊藤尚紀、元原麻貴子、稲葉一寿、松田健太、松山めぐみ、速水正憲、三浦智行 : 遺伝子欠損サル/ヒト免疫不全キメラウイルスワクチン接種による感染防御効果の検討—腸管粘膜免疫細胞群の動態解析を主体として—、第 142 回日本獣医学会学術集会、2006 年 9 月 22 日-24 日、山口。

(5) 稲葉一寿、深澤嘉伯、堀内励生、松田健太、松山めぐみ、姫野愛、齊藤尚紀、中村仁美、伊吹謙太郎、速水正憲、三浦智行 : ウイルス血症が抑制されている SHIV 感染アカゲサルでも小腸では絨毛萎縮と CD4 陽性 T 細胞の減少が認められる、第 142 回日本獣医学会学術集会、2006 年 9 月 22-24 日、山口。

(6) Matsuyama, M., Horiuchi, R., Fukazawa, Y., Inaba, K., Ibuki, K., Hayami, M., Miura, T. : Full genome sequence analysis in systemic tissues of acute pathogenic SHIV-infected monkeys. 24th annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS. Oct. 4-7, 2006, Atlanta.

(7) Inaba, K., Fukasawa, Y., Horiuchi, R., Matsuda, K., Matsuyama, M., Himeno, A., Saito, N., Nakamura, M., Ibuki, K., Hayami, M., Miura, T. : CD4 reduction and villous atrophy in small intestinal tract are caused by even controlled

simian/human immunodeficiency virus infection. 24th annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Oct. 4-7, 2006, Atlanta.

(8) Fukazawa, Y., Miyake, A., Ibuki, K., Inaba, K., Saito, N., Motohara, M., Horiuchi, R., Himeno, A., Matsuda, K., Nakamura, M., Matsuyama, M., Hayami, M., Miura, T. : Even low pathogenic SHIV lead to decrease CD4+ T-cell of the small intestine significantly from early phase of infection. 24th annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Oct. 4-7, 2006, Atlanta.

(9) 伊吹謙太郎、深澤嘉伯、姫野愛、稲葉一寿、齊藤尚紀、松田健太、松山めぐみ、速水正憲、三浦智行 : nef 遺伝子欠損サル/ヒト免疫不全キメラウイルス (SHIV) 接種による感染防御メカニズムの解析 第 54 回日本ウイルス学会学術集会、2006 年 11 月 19 日~21 日、名古屋

(10) 稲葉一寿、深澤嘉伯、堀内励生、松田健太、松山めぐみ、姫野愛、齊藤尚紀、中村仁美、伊吹謙太郎、速水正憲、三浦智行 : ウイルス血症が抑制されている SHIV 感染アカゲサルでも小腸では絨毛萎縮と CD4 陽性 T 細胞の減少が認められる、第 54 回日本ウイルス学会学術集会、2006 年 11 月 19 日~21 日、名古屋。

(11) 松山めぐみ、堀内励生、深澤嘉伯、稲葉一寿、伊吹謙太郎、速水正憲、三浦智行 : 強毒 SHIV 感染サルの全身臓器におけるウイルス変異の解析、第 54 回日本ウイルス学会学術集会、2006 年 11 月 19 日~21 日、名古屋。

(12) 清水佑也、稲葉一寿、兼安健太郎、姫野愛、伊吹謙太郎、三浦智行、速水正憲、芳賀 猛 : RANTES 遺伝子組み込み SHIV による細胞性免疫応答の増強、第 54 回日本ウイルス学会学術集会、

2006年11月19日～21日、名古屋.

(13) 深澤嘉伯、伊吹謙太郎、齊藤尚紀、姫野愛、稲葉一寿、松田健太、松山めぐみ、元原麻貴子、速水正憲、三浦智行：*nef* 遺伝子欠損サル／ヒト免疫不全キメラウイルス (SHIV-NI) 免疫ザルに対する急性発症型 SHIV 攻撃接種早期の全身臓器におけるウイルス動態、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.

(14) 松田健太、松山めぐみ、伊吹謙太郎、山口由美、速水正憲、三浦智行：Dual tropic SHIV-KS661 をバックボーンとした R5 single tropic ウイルスと X4 single tropic ウイルスの作製、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.

(15) 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.

(16) 井戸英治、石松美沙、速水正憲、三浦智行：プロテアーゼ、逆転写酵素、およびインテグラーゼの各遺伝子が HIV-1 由来である新規 SHIV のサル感染実験、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.

(17) Tomoyuki Miura: Importance of small intestine as a target organ of AIDS ,Virological and immunopathological analysis of systemic lymphoid tissues in SHIV-infected monkeys. 第 14 回サル類疾病国際ワークショップ、2006年12月6日、つくば.

(18) 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.

#### 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

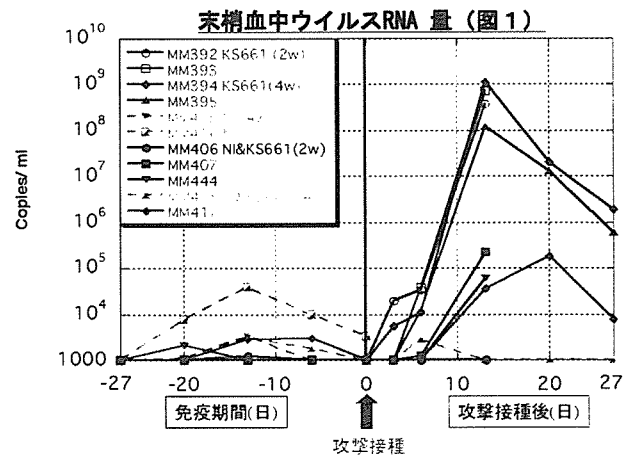


図1 弱毒生ワクチン免疫ザルと非免疫ザルにおける末梢血中ウイルス RNA 量の比較。免疫ザルではウイルス RNA 量が検出限界以下に抑制された個体群 (CP 群) と、 $10^5$  copies/ml 程度に抑制された個体群 (PP 群) に別れた。

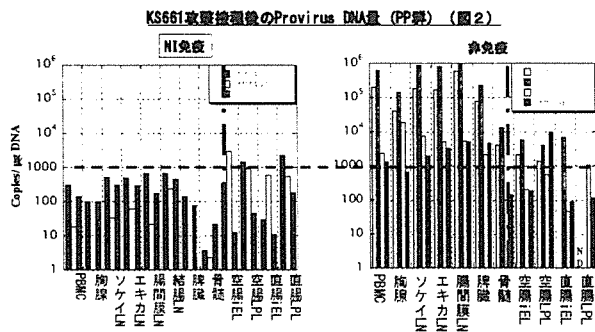


図2 PP群における攻撃接種後の provirus DNA 量。非免疫ザルと比較した結果、接種後2週において腸管以外のリンパ系臓器では著しく Provirus DNA 量が抑制されていたが、腸管ではほぼ同等な Provirus DNA 量が検出された。

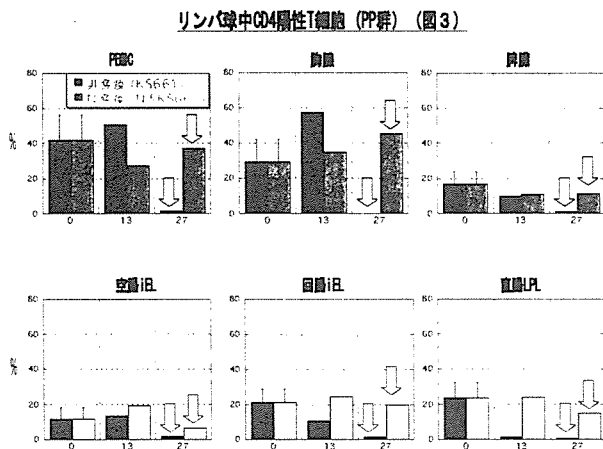


図3 PP群の各組織におけるリンパ球中 CD4 陽性 T 細胞の割合。免疫ザル群では、腸管を含めた全臓器で非免疫ザルのような CD4 陽性 T 細胞の枯渇は見られなかった。

厚生労働省科学研究補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

ワクチンにおける新規アジュバントの開発に関する研究

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 ワクチン開発において新規アジュバントの開発は多くの利点を備えており、研究の必要性は周知である。しかしながら新規に開発される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 をアジュバントとして有効に利用するためにリコンビナントタンパクを作製した。このリコンビナント Ag85B を 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、この Th1 タイプの免疫反応はウイルス接種後に著明に認められ、通常細胞性免疫の誘導が困難なリコンビナントワクチンにおいてウイルス暴露後に有効な細胞性免疫の誘導が期待できるワクチンアジュバントになりうることが示唆された。

A.研究目的

HIV 感染に対するワクチン開発は急務である。HIV に対しては中和抗体を主とした液性免疫反応に加え、細胞性免疫の誘導が必要である。HIVgp120 を用いたリコンビナントタンパクワクチンは高い抗ウイルス活性を持つ中和抗体を誘導することは可能であるが、HIV 特異的細胞性免疫の誘導が困難である。ワクチンを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。本研究では通常細胞性免疫の誘導が困難であるリコンビナントタンパクワクチン、サブユニットワクチンに対し 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. 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を用いてウェスタンブロッティングにて確認した(Fig. 1)。

2. 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。BCG による Ag85B のアジュバント効果に対する影響を検討す