

200704008A

厚生労働科学研究費補助金
社会保障国際協力推進研究事業

HIV 感染症における免疫応答の解析と
その臨床応用に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山本 直樹

平成20年3月

目 次

- I. 総括研究報告書
 - HIV 感染症における免疫応答の解析とその臨床応用に関する研究 1
山本直樹 (国立感染症研究所 エイズ研究センター長)

- II. 分担研究報告書
 - 1. BCG/DIs ベクターを用いた中和抗体誘導型マルチクレイド HIV ワク
チン開発の試み 11
山本直樹 (国立感染症研究所 エイズ研究センター長)

 - 2. ワクチンによる X4 指向性 SHIV 複製制御サルの解析 15
俣野哲朗 (東京大学医科学研究所 教授)

 - 3. 粘膜組織における HIV-1 感染 CD4 陽性樹状細胞：
CD1a 分子拘束性 T 細胞からのエスケイプ 19
高橋秀実 (日本医科大学微生物学免疫学教室 教授)

 - 4. アジアにおける CRF07_BC 伝播の年代推定に関する研究 25
アジアにおけるエイズ流行のメカニズム・ダイナミックスの全容解明
に向けて
武部 豊 (国立感染症研究所エイズ研究センター 第一室長)

 - 5. 新規のエイズの化学療法剤の開発とそれによる免疫応答能の回復に関する研究 31
満屋裕明 (熊本大学医学薬学研究部血液内科学 教授)

 - 6. CTL エピトープを認識する抗体の作製に関する研究 37
岩本愛吉 (東京大学医科学研究所 教授)

 - 7. 樹状細胞や副刺激分子を介した HIV 免疫応答の誘導 41
田中勇悦 (琉球大学医学研究科免疫学分野 教授)

 - 8. CYP の人種差と EFV 治療に関する研究 45
岡 慎一 (国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター長)

 - 9. 薬剤耐性を獲得した CRF01_AE プロテアーゼの構造解析 49
杉浦 互 (国立感染症研究所エイズ研究センター 第二研究グループ長)

 - 10. 粘膜における HIV 感染のメカニズム解明に向けた粘膜免疫の基礎研究 55
清野 宏 (東京大学医科学研究所 教授)

11. ヒトゲノム多型性と HIV 感染に関する研究 塩田達雄 (大阪大学微生物病研究所 教授)	・・・ 57
12. HIVの複製に関わる宿主因子NF-κB p65に相互作用する新規蛋白の同定 岡本 尚 (名古屋市立大学大学院医学研究科細胞分子生物学 教授)	・・・ 61
13. HIV 抗原を保持したナノ粒子による免疫応答に関する研究 馬場昌範 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授)	・・・ 65
14. HIV 感染症罹患個体における特異的炎症マーカーの検索 服部俊夫 (東北大学大学院医学系研究科 教授)	・・・ 69
15. 結核 HIV 共感染の疫学に関する研究 山田紀男 (財団法人結核予防会結核研究所国際協力部 副部長)	・・・ 75
Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表	・・・ 79
Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷 (抜粋)	・・・ 95

1. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（社会保障国際協力推進研究事業）
総括研究報告書

HIV 感染症における免疫応答の解析とその臨床応用に関する研究

主任研究者 山本 直樹 国立感染症研究所エイズ研究センター長

研究要旨：

エイズの問題、とくにアジアのエイズを中心とした問題に効果的に対処するため基礎、臨床、疫学の観点から、その方策について以下の包括的な検討を行い、多くの重要な知見が得られた。ワクチン：1) BCG /DIs ベクターを応用し、Env 発現株の取得を試みた。2) CTL 誘導センダイウイルスワクチン接種サルにおいて、CXCR4 指向性 SHIV 感染をうけることにより、CCR5 指向性 SIV 複製を制御しうる免疫反応が誘導されることが示唆された。3) γ -PGA を主成分とする生分解性ナノ粒子を創成し、非常に強い抗原特異的細胞性免疫を誘導できることを明らかにした。免疫：1) HIV 侵入門戸である粘膜において最前線バリアを形成する上皮細胞層に存在する上皮細胞間リンパ球に焦点をあて、その遊走制御機構についての知見が得られた。2) HIV 感染樹状細胞制御における CD1a 拘束性 T 細胞あるいは CD1d 拘束性 NKT 細胞の関与を強く示唆する結果を得た。3) HLA-A24 分子上に CTL エピトープとして提示されるペプチド-主要組織適合抗原複合体 (p-MHC) に特異的な抗体の作製を試みた。4) OX40 や OX40L に対する刺激は、TGF-beta に拮抗し、T 細胞での HIV-1 感染増殖に影響を与えることが明らかにされた。治療：1) CCR5 阻害剤 AK602 のモデリングと構造学的解析を進めた。2) EFV の血中濃度に関連する CYP 2B6 の SNPs を世界に先駆け報告した。3) 変異を獲得した臨床検体由来のプロテアーゼ遺伝子から自己分解能を抑制した活性型プロテアーゼを作製し、その基質分解能を測定した。4) エイズを発症した結核患者の CRP 値と TBGL 抗体値の相関を検討した。分子疫学、遺伝子多型、ウイルス活性化：1) 台湾で発生しているウイルスを解析し、クラスター分析を行った。2) IL7 の 5'非翻訳領域内の 3 塩基を欠失する多型が IL7 の翻訳効率を変化させることを見出した。3) AKIP1 を NF- κ B の p65 サブユニットと相互作用する因子として初めて同定した。

分担研究者

侯野哲朗（東京大学医科学研究所 教授）
高橋秀実（日本医科大学微生物学免疫学教室 教授）
武部 豊（国立感染症研究所エイズ研究センター 第一室長）
満屋裕明（熊本大学医学薬学研究部血液内科学 教授）
岩本愛吉（東京大学医科学研究所 教授）
田中勇悦（琉球大学医学研究科免疫学分野 教授）
岡 慎一（国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター長）
杉浦 亙（国立感染症研究所エイズ研究センター 第二研究グループ長）
清野 宏（東京大学医科学研究所 教授）
塩田達雄（大阪大学微生物病研究所 教授）

岡本 尚（名古屋市立大学大学院医学研究科 細胞分子生物学 教授）
馬場昌範（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授）
服部俊夫（東北大学大学院医学系研究科 教授）
山田紀男（財団法人結核予防会結核研究所国際協力部 副部長）

A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) はすでに全世界の 1 % の人が感染したという証拠があり、今も着実に感染が広がっている。わが国では欧米諸国に比較し、感染者の数もエイズ患者の数も少ないためか教育効果が十分に上らず、世界の先進国の中では例外的に今も感染の増加に歯止めがかからない。これらのウイルスの持続感染機構と発症機序を

明らかにし有効な対策を立てることは重要かつ緊急の社会的要請となっている。

エイズワクチンの開発は、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手織り、一定の成果につながっている。しかし最大のポイントである、効果的な予防ワクチン開発については、めどが立っていない。したがって、現行でベストと考えられる、“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。それでは HIV からの感染を完全に防ぐ手立てはあるのだろうか。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、DNA/SeV ワクチンなどで特異的 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され、その immune correlates に関し、いくつかの重要な知見も示された。

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。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。要するに、Broadly-reactive な中和抗体の臨床応用が期待されるのである。

一方、治療面での研究の進展ぶりは著しい。現在臨床で使われている抗 HIV-1 薬は主に逆転写酵素阻害薬とプロテアーゼ阻害薬の 2 種類であるが、薬剤に対する耐性や副作用などの問題が指摘されて久しい。それらに対し、薬剤耐性ウイルスの進化、選択におけるウイルス遺伝子間の相互干渉やザンビアにおける抗 HIV 薬の代謝能力に対する研究も本班で行っている。

HIV 感染症の効果的な制御には、異なった作用機序を有し交差耐性がなく副作用の少ない新規薬剤の開発が待たれている。既存の薬剤より強力かつ副作用の少ない逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤の研究・開発とともにウイルスのコレセプターを標的とした新規の作用機序を有する侵入阻害剤

AVC は米欧で第 3 相臨床治試験下にある。TAK シリーズの CCR5 阻害薬も含め、それらの薬剤耐性機序の解明が重要である。

班ではさらに粘膜面での感染メカニズムや拡大とその阻止、樹状細胞を用いた免疫療法の試み、アジアのエイズ流行の分子疫学的な研究、ウイルスの増殖と転写制御の関連、ヒトゲノム多型と HIV 感染などに関する多彩な研究が行われている。

本研究の目的は、日米が共同で研究を進め、アジア諸国の研究者とともに、エイズの予防と治療について分子生物学、遺伝子工学レベルの研究の推進をおこなうことである。

B. 研究方法

1) DNA ワクチンあるいはセンダイウイルス (SeV) ベクターワクチン接種により、SHIV89. 6P 複製制御が認められた 3 頭のサルの長期解析を行った。血漿中ウイルス量、ウイルス特異的 CTL レベル、中和抗体レベル、プロウイルスゲノム塩基配列などを経時的に解析した。2) 免疫原であるマルチエピトープ BCG/rDIs の構築を行った。抗原には、米国立衛生研究所にて作製され分与を受けた HIV 改変型遺伝子を gp145 Δ CFI、gp140V1V2 Δ CFI および SIVGag-opt を用いた。また gp145 および SIVgag をそれぞれ単独で発現する rBCG と rDIs も作製した。発現の確認には、HIV Env ポリクローナル抗体と SIVGag 抗体をそれぞれ用いて Western blotting 法を行い、全て発現を確認した。3) CD1d 分子を介して抗原情報を受け取る NKT の活性化と HIV-1 あるいは SIV に対する感受性との間の関連性を調べるため、CD4T 細胞に X4-type の HIV-1 感染を惹起する際に、CD1d 分子を介して NKT 細胞を刺激する α-Galactocyl Ceramide (α-Gal Cer) を添加し、感染成立に伴う NKT 細胞の動態を観察した。4) 樹状細胞が T 細胞を刺激する際に用いる共刺激分子として OX40L について焦点をあてて研究を進めた。5) アジアにおけるエイズ流行を標的とするワクチン開発のための基盤となるアジア型 HIV 流行株の全塩基配列データベースの拡充と感染性分子クローンなどの基盤的研究試薬の整備を行った。さらに多重感染あるいはスーパーインフェクションに際する incoming virus と resident virus 間の相互作用、ウイルスの個体内進化の解析およびそれによるワクチ

ン開発戦略の考察を行った。

6) 新規の CCR5 阻害剤 AK602 (aplaviroc, AVC) の抗 HIV-1 作用発現の分子レベルでの機序の解明と AVC がケモカイン-ケモカイン受容体相互作用に及ぼす影響について構造的解析を進めた。7) EFV の血中濃度に関連する CYP2B6 の SNPs を世界に先駆け報告した。今年度は、この SNPs の人種差と副作用に関しザンビアにおいて検討した。

8) HIV-1 CRF01_AE (subtype E) プロテアーゼの結晶構造解析することを目的とし、CRF01_AE プロテアーゼ遺伝子を E. coli にトランスフォームしタンパクを精製・解析した。25 番目のアスパラギン酸をアスパラギンに置換した D25N 変異体のプロテアーゼの結晶構造解析を行い Subtype B のプロテアーゼ構造と比較検討した。9) HLA-A24 によって拘束される HIV-CTL エピトープが CTL 認識を回避する分子機構を明らかにした。10) ザンビアにおいて連続 100 名の EFV 投与群をコホートとして 1 年後の服薬率、CD4 増加率などを検討し、EFV 血中濃度が及ぼすこれら因子への関与を検討した。11) ポリ (γ -グルタミン酸) (γ -PGA) を主成分とする生分解性ナノ粒子を創成するとともに、種々のタンパク質やペプチドをナノ粒子の内部に封入し、免疫誘導を検討した。12) その他、分子疫学、遺伝子多型、ウイルス活性化などについて、定法に従い研究を行った。

(倫理面への配慮)

本研究に臨床材料が使用される場合には、血液など臨床材料提供者の個人情報漏れしないよう厳格にプライバシーを保護する。研究はすべて unlinked anonymous の手法によって行われる。研究方法による研究対象者に対する不利益について充分の説明を加え、起こりえる危険性の排除に可能なかぎりの方策をとる。またアジア・アフリカ各国エイズ研究機関との共同研究に関しては各国政府所轄機関の指示する倫理規程に従って遂行される。臨床材料の保存・使用に際しては、Informed consent を得ることとし、ヒトゲノム研究に関しては研究者の所属する機関の承認を得る。本研究の成果をヒトに応用する場合には、研究対象者の安全性に細心の注意を払い、研究担当者の所属する機関の IRB の承認を得る。動物を用いる実験に関しては、動物愛護の精神に則って研究を行う。AVC の第 3 相臨床試験は米国食品医薬品局の監察

の下に実施されており高い倫理性が保持されている。AVC の抗 HIV-1 作用発現の分子レベルでの機序解明等はヒト細胞を使用するものの、全て試験管内、または小動物を使うものでヒトへの直接の関連はない。

C. 研究結果

研究結果はワクチン、治療、病態、免疫、分子疫学など多岐にわたるので、それらを箇条書きにする。

ワクチン

1) HIV の多様性、すなわち世界的な広がりを見せる様々な HIV 亜株に対応するためには、少なくともクレイド A, B, C というメジャーの 3 種の Env 抗原に対する中和抗体産生を誘導できるワクチンが必要となる。本研究では、我々が開発したこれらの組換え BCG/DIs ベクターを応用し、まずクレイド B 由来の改変型 env (gp140 および gp145) 遺伝子の組み込みと Env 発現株の取得を試み、マウスとサルを用いた動物実験系においてその発現を探った。

2) 我々の開発した SeV・CTL 誘導ワクチン接種により CXCR4 指向性 SHIV 複製制御にいたったサルにおいて、誘導されている抗ウイルス免疫反応を知る目的で、CCR5 指向性 SIV スーパーチャレンジ実験の解析を行った。その結果、これらのサルは SIV 複製を制御することができることが明らかとなった。したがって、ワクチン接種サルにおいて、CXCR4 指向性 SHIV 感染をうけることにより、CCR5 指向性 SIV 複製を制御しうる免疫反応が誘導されることが示唆された。

3) ポリ (γ -グルタミン酸) (γ -PGA) を主成分とする生分解性ナノ粒子に、種々のタンパク質やペプチドをナノ粒子の内部に封入、あるいは表面に固定化した。その結果 γ -PGA ナノ粒子は非常に効率良く抗原提示細胞である樹状細胞に取り込まれること、またその後樹状細胞を活性化させることが証明された。さらに、HIV-1 の各種抗原を内包もしくは表面固定化した γ -PGA ナノ粒子を用いてマウスを免疫したところ、非常に強い抗原特異的細胞性免疫を誘導できることを明らかにした。

免疫

1) HIV 侵入門戸である粘膜において最前線

バリアを形成する上皮細胞層に存在する上皮細胞間リンパ球に焦点をあて、その遊走制御機構について検討し貴重な情報が得られた。

2) クラス IMHC 分子の発現低下を誘発し CTL からの逃避を促す HIV-1-nef 遺伝子に着目し、この遺伝子産物が樹状細胞表面の CD1 分子群発現に及ぼす影響を検討したところ、HIV 感染に伴い CD1a および CD1d の発現が著明に抑制されることを見出した。

3) HIV 感染症において CTL による細胞性免疫が重要な防御機構として働いており、治療ワクチン開発においても CTL を賦活化することが重要と考えられている。CTL に対する抗原提示については、これまでほとんど詳細な解析がされていないことから、本研究ではそのような解析を可能とするためのツールとして HLA-A24 分子上に CTL エピトープとして提示されるペプチド-主要組織適合抗原複合体 (p-MHC) に特異的な抗体の作製を試みた。

4) TGF-beta 存在下で刺激培養された PBMC での R5 および X4 HIV-1 の感染は顕著に抑制された。この抑制は OX40 に対するアゴニスト抗体で解除された。また、OX40L に対するアゴニスト抗体は TGF-beta による X4 HIV-1 の感染抑制を解除した。TGF-beta 存在下で刺激された CD4+T 細胞も CD8+T 細胞も OX40 と OX40L を発現することから、OX40 や OX40L に対する刺激は、TGF-beta に拮抗し、T 細胞での HIV-1 感染増殖に影響を与えることが明らかにされた。

治療

1) FRET の系を確立し、新たな機序である PR 二量体形成阻害による HIV-1 複製阻害について考察を行った。また CCR5 の微細構造学的解析系の確立、CCR5 阻害剤の結合モデル、分子レベルでの機序解析の研究も進めて、これらの解析結果を基にして、新たに見出された CCR5 阻害剤 AK602 (AVC) およびその周辺化合物のモデリングを行い、強力な抗 HIV 活性を有する新しい化合物の設計・同定を続けて、また AVC がケモカイン-ケモカイン受容体相互作用に及ぼす影響について構造学的解析を進めた。

2) ネルフィナビル (NFV) 投薬により L10F、N88S の変異を獲得した臨床検体由来のプロテアーゼ遺伝子をクローニングし、Q7K を導入して自己分解能を抑制した活性型プロテ

アーゼを作製し、プロテアーゼの基質分解能を測定した。この活性測定系を用いてプロテアーゼに対するプロテアーゼ阻害剤の阻害効果を見た。

3) HIV 感染者にとって結核感染の予知は極めて重要である。炎症マーカーと抗 TBGL 抗体価が相関することを見出したので、エイズを発症した結核患者の CRP 値と TBGL 抗体値の相関を検討した。TBGL 値は 1 例を除き低値であったが、これらの症例の TBGL 抗体値は、CRP 値と相関を示した。

分子疫学、遺伝子多型、ウイルス活性化、その他

1) HIV-1 CRF07_BC は 2002-2004 年になって、台湾南部ついで中北部地域で IDU 間で大流行が発生していることが報告された。その後、この流行の原因ウイルスは中国に由来する CRF07_BC であることが明らかにされた。われわれは東アジア地域における CRF07_BC の感染拡大の timescale を明らかにするために、最新のデータ解析技術を用いて解析した結果、中国新疆ウイグル自治区、台湾南部、中北部に流布する CRF07_BC が異なるクラスターを形成し、それぞれの共通祖先年代 (tMRCA) がそれぞれ、1993. 8 (95% 信頼区間: 1992. 3-1995. 3); 台南クラスター 1999. 8 (95% CR: 1998. 4-2001. 1); 台湾中北部クラスター 2002. 2 (95% CR: 2001. 3-2002. 8) と推定されることを明らかにした。

2) IL7 の 5'非翻訳領域内の 3 塩基を欠失する多型が IL7 の翻訳効率を変化させることを見出した。また、IL7 がマクロファージにおいては、HIV-1 の増殖を中程度であるが低下させることを見出した。

3) HIV と相互作用する宿主因子の同定を進め、AKIP1 を NF- κ B の p65 サブユニットと相互作用する因子として初めて同定した。AKIP1 は PKA シグナル伝達に密接に関与しており、その機能の解明は HIV の細胞内での複製機構を理解するために必須である。

4) 第 42 回日米医学協力研究会 結核・ハンセン病専門部会合同会議に出席し、Session5 TB/HIV Interaction; TB Drug Development において、タイ国北部の HIV 流行地域での結核疫学の推移 (演題「The Review of TB Trend in the Area which Experienced HIV Epidemic in a Province of Northern Thailand (Preliminary Analysis)」) について発表・討議した。

D. 考察

有効な感染予防ワクチンについて、我々はこれまで、安全性が極めて高い BCG 東京株とワクシニアウイルス DIs (DIs) という細菌・ウイルスによるワクチンベクターに用いて、HIVGag を発現するプライム・ブースト系を構築し、サルエイズモデルにおいて持続感染期の血中ウイルス量を抑制することを証明してきた。本研究では、我々が開発したこれらの組換え BCG /DIs ベクターを応用し、まずクレイド B 由来の改変型 env (gp140 および gp145) 遺伝子の組み込みと Env 発現株の取得を試み、マウスとサルを用いた動物実験系においてその発現を探るとともに、免疫誘導能、特に中和抗体産生誘導能の評価を小動物レベルで行い、近い将来に有用な結果が得られた。

HIV 感染症では、ウイルス特異的 CD8 陽性細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) がウイルス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、感染初期に CTL による血中ウイルス量の低下がみられるが、HIV 複製の制御には至らず慢性持続感染が成立し、ウイルス血症が持続してエイズ発症にいたる。CCR5 指向性サル免疫不全ウイルス (SIV) 慢性持続感染サルエイズモデルでは、ワクチンによる CTL 誘導が必ずしもウイルス複製制御に直結しないが、急性エイズモデルとして知られている CXCR4 指向性サル免疫不全ウイルス SHIV 感染モデルでは、ワクチンによる CTL 誘導がウイルス複製制御に比較的容易に直結する。今回、ワクチン接種サルにおいて、CXCR4 指向性 SHIV 感染をうけることにより、CCR5 指向性 SIV 複製を制御しうる免疫反応が誘導されることが示唆された。

γ -PGA を主成分とする生分解性ナノ粒子に、種々のタンパク質やペプチドをナノ粒子の内部に封入、あるいは表面に固定化した。 γ -PGA ナノ粒子は非常に効率良く抗原提示細胞である樹状細胞に取り込まれること、またその後樹状細胞を成熟化させることが証明された。さらに、HIV-1 の各種抗原を内包もしくは表面固定化した γ -PGA ナノ粒子を用いてマウスを免疫した所、非常に強い抗原特異的細胞性免疫を誘導できることを明らかにした。

HIV 感染ルートに関する昨今の世界的状況は性行為を介した粘膜がその主要な侵入門

戸であり、さらには腸管が同ウイルスの潜伏・増殖の場として注目されている。そこで、第一線のバリアとして存在する粘膜免疫機構は多種多様な自然・獲得免疫担当細胞の宝庫であり、その機構について感染阻止メカニズム、感染防御免疫誘導などの視点から詳細に解析する必要がある。粘膜免疫機構のユニーク性とその誘導制御機構の詳細について分子・細胞・個体レベルで解明し、AIDS 対策用ワクチン開発への基盤的情報を発信するため、HIV 侵入門戸である粘膜において最前線バリアを形成する上皮細胞層に存在する上皮細胞間リンパ球に焦点をあて、その遊走制御機構について検討している。

次に免疫研究に関してひとつは、HIV の侵入部位である粘膜組織において、粘膜下に棲息する樹状細胞群は HIV 感染の主要な初期標的であり HIV の reservoir として感染拡大の鍵を握る。今回、HAART 治療中の HIV-1 感染者の腸管粘膜を採取し、そこにおける HIV-1 感染細胞を P24 抗原陽性細胞を指標として追跡したところ、実際に CD4 陽性の樹状細胞が主たる HIV-1 感染細胞として存在することを確認した。さらに HIV 感染樹状細胞制御における CD1a 拘束性 T 細胞あるいは CD1d 拘束性 NKT 細胞の関与を強く示唆する結果を得た。今後はこれら CD1 拘束性 T 細胞群による HIV 感染樹状細胞制御の実体、及び認識抗原の解明へ向けて検討を重ねる予定である。

HIV 感染症において CTL による細胞性免疫が重要な防御機構として働いており、治療ワクチン開発においても CTL を賦活化することが重要と考えられている。CTL に対する抗原提示について解析するために、HLA-A24 分子上に CTL エピトープとして提示されるペプチド-主要組織適合抗原複合体 (p-MHC) に特異的な抗体の作製を試みた。

TGF-beta による免疫抑制活性とエイズ発症との関連性が注目されている。一方マウスの系において、OX40 刺激が Treg の作用に拮抗することが報告されている。Treg が存在することにより強い免疫応答が抑制され、また Treg が HIV の増殖をコントロールしている可能性もある。本年度の研究では、活性化 PBMC の HIV-1 感染に対する TGF-beta の影響とそれに対する OX40/OX40L 反応の効果を解明するため研究を行い、OX40 や OX40L に対する刺激は、TGF-beta に拮抗し、T 細胞での HIV-1 感染増殖に影響を与えることが明らか

にされた。

次に治療の面では、HIV-1 が耐性を獲得しにくく、獲得しても他薬剤との交差耐性を有しない新規のエイズ治療薬の開発を進め、プロテアーゼ阻害剤 (PIs)、PR 2 量体形成阻害剤、CCR5 阻害剤の研究開発を続けている。HIV-1 の増殖に重要である HIV-1 プロテアーゼ二量体形成を評価するために、CFP/YFP タグ付き PR を有する感染性組み換え HIV-1 クローンを用いた FRET で、新たな機序である PR 二量体形成阻害による HIV-1 複製阻害について考察を行った。また AVC がケモカイン-ケモカイン受容体相互作用に及ぼす影響について構造学的解析を進めた。

さらに我々は、EFV の血中濃度に関連する CYP 2B6 の SNPs を世界に先駆け報告した。今年度は、この SNPs の人種差と副作用に関しザンビアにおいて検討した。一方、HIV-1 CRF01_AE (subtype E) プロテアーゼの結晶構造解析することを目的とし、CRF01_AE プロテアーゼ遺伝子の 25 番目のアスパラギン酸をアスパラギンに置換したプロテアーゼの結晶構造解析を行い Subtype B のプロテアーゼ構造と比較検討した。

HIV 感染者にとって結核感染の予知は極めて重要である。以前よりある結核診断抗体法 (TBGL 抗体) は結核発症者の 60-90% が陽性になることが知られている。我々は炎症マーカーと抗 TBGL 抗体価が相関することを見出した。

最後に、分子疫学、遺伝子多型、ウイルス活性化であるが、まず疫学の部分では、HIV-1 CRF07_BC は中国北西部 (新疆ウイグル自治区) の注射薬物乱用者 (IDU) におけるエイズ流行の原因となった中国に特有な組換え型流行株 (circulating recombinant form, CRF) の一つである。最新のデータ解析技術を用いて解析した結果、中国新疆ウイグル自治区、台湾南部、中北部に流布する CRF07_BC が異なるクラスターを形成し、それぞれの共通祖先年代の推定をおこなった。

また、IL7 の 5' 非翻訳領域内の 3 塩基を欠失する多型が IL7 の翻訳効率を変化させることを見出した。さらに、IL7 がマクロファージにおいては、HIV-1 の増殖を負に制御することを見出した。IL7 は T 細胞の増殖を促すサイトカインで、HIV-1 感染者では血中の IL7 濃度は CD4 陽性 T 細胞数と逆相関し、その多型は治療開始後の CD4 陽性細胞数の回復速度に影響する可能性がある。

HIV 複製を転写レベルで正に制御する宿主転写因子 NF- κ B は潜伏感染細胞内のプロウイルス DNA からのウイルス遺伝子発現を誘導ことによってその複製を正に制御している。今回、AKIP1 を NF- κ B の p65 サブユニットと相互作用する因子として初めて同定した。AKIP1 は PKA シグナル伝達に密接に関与しており、その機能の解明は HIV の細胞内での複製機構を理解するために必須である。

E. 結論

細胞性免疫主導型ワクチンによりウイルス増殖の制御が達成されたサルでの免疫パラメーターの解析を行うとともに、液性免疫主導ワクチンの開発を試み、将来につながる結果が得られた。さらに新しい標的としての、コレセプター阻害薬の研究、粘膜面での感染メカニズムや拡大とその阻止、樹状細胞を用いた免疫療法の試み、アジアのエイズ流行の分子疫学的な研究、ウイルスの増殖と転写制御の関連、ヒトゲノム多型と HIV 感染などに関する多彩な研究が行われ多くの重要な知見が得られた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表 (抜粋)

山本直樹:

- 1) Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Kimura R, Komano J, Nishi M, Soeda H, Hattori S, Perrem K, Yamamoto M, Chiba J, Mimaya J, Yoshimura K, Matsushita S, Honda M, Yoshimura A, Sawasaki T, Aoki I, Morikawa Y, Yamamoto N. SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. PNAS 105: 294-299, 2008.
- 2) 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 γ^null mice develop human lymphoid system and induce long-lasting HIV-1 infection with

specific humoral immune responses. *Blood* 109: 212-218, 2007,

- 3) Watanabe S, Ohta S, Yajima M, Terashima K, Ito M, Mugishima H, Fujiwara S, Shimizu K, Honda M, Shimizu N, Yamamoto N. Humanized NOD/SCID/IL2R γ ^{null} mice transplanted with hematopoietic stem cells under nonmyeloablative conditions show prolonged life spans and allow detailed analysis of human immunodeficiency virus type 1 pathogenesis. *J Virol* 81: 13259-13264, 2007.

俣野哲朗 :

- 1) Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Takeda A, Igarashi H, Watkins DI, 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* 81: 5202-5211, 2007.
- 2) Tsukamoto T, Yuasa M, Yamamoto H, Kawada M, Takeda A, Igarashi H, Matano T. Induction of CD8⁺ cells able to suppress CCR5-tropic simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication by controlled infection of CXCR4-tropic simian-human immunodeficiency virus in vaccinated rhesus macaques. *J Virol* 81: 11640-11649, 2007.

高橋秀実 :

- 1) Takahashi M, Watari E, Shinya E, Shimizu T, Takahashi H. Suppression of virus replication via down-modulation of mitochondrial short chain enoyl-CoA hydratase in human glioblastoma cells. *Antiviral Res* 75: 152-158, 2007.
- 2) Wakabayashi A, Nakagawa Y, Shimizu M, Moriya K, Nishiyama Y, Takahashi H. Suppression of Already Established Tumor Growing through Activated Mucosal CTLs Induced by Oral Administration of Tumor Antigen with Cholera Toxin. *J Immunol* 2007, in press.

武部 豊 :

- 1) Takebe Y, Uenishi R, and Li X-J. Global molecular epidemiology of HIV: Understanding the genesis of AIDS pandemic. "HIV-1: Molecular biology

and pathogenesis" (ed. Kuan Teh Jeang). *Advances in Pharmacology* vol. 56: 1-25, 2008.

- 2) Tee KK, Pybus OG, Liao H, Uenishi R, Hase S, Kamarulzaman A, Li X-J, and Takebe Y. Chronology of the HIV-1 CRF07_BC expansion in East-Asia. *AIDS* 22: 156-158, 2007.

満屋裕明 :

- 1) Koh Y, Matsumi S, Das D, Amano M, Davis DA, Li J, Leschenko S, Baldrige A, Shioda T, Yarchoan R, Ghosh AK, Mitsuya H. Potent Inhibition of HIV-1 Replication by Novel Non-peptidyl Small Molecule Inhibitors of Protease Dimerization. *J Biol Chem* 282: 28709-28720, 2007.
- 2) Nakata H, Amano M, Koh Y, Kodama E, Yang G, Bailey CM, Kohgo S, Hayakawa H, Matsuoka M, Anderson KS, Cheng YC, Mitsuya H. Activity against human immunodeficiency virus type 1, intracellular metabolism, and effects on human DNA polymerases of 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 2701-2708, 2007.

岩本愛吉 :

- 1) Hoshino S, Sun B, Konishi M, Shimura M, Segawa T, Hagiwara Y, Koyanagi Y, Iwamoto A, Mimaya J, Terunuma H, Kano S, and Ishizaka Y. Vpr in plasma of HIV-1-positive patients is correlated with the HIV-1 RNA titers. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23:391-397, 2007.
- 2) Wichukchinda N, Kitamura Y, Rojanawiwat A, Nakayama EE, Song H, Pathipvanich P, Auwanit W, Sawanpanyalert P, Iwamoto A, Shioda T, and Ariyoshi K. The polymorphisms in *DC-SIGNR* affect susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23: 686-692, 2007.

田中勇悦 :

- 1) Okuma K, Tanaka R, Ogura T, Ito M, Kumakura S, Yanaka M, Nishizawa M, Sugiura W, Yamamoto N, and Tanaka Y. The IL-4-transgenic hu-PBL-SCID mice: a model for screening of anti-viral drugs and immunotherapeutic agents against X4 HIV-1 viruses. *J Infect Dis* 197(1): 134-141, 2008.

- 2) Kondo K, Okuma K, Tanaka R, Zhang LF, Kodama A, Takahashi Y, Yamamoto N, Ansari AA, and Tanaka Y. Requirements for the functional expression of OX40 ligand on human activated CD4+ and CD8+ T cells. *Hum Immunol* 68(7): 563-571, 2007.
- 岡 慎一 :
- 1) Yamanaka H, Gatanaga H, Kosalaraksa P, Matsuoka-Aizawa S, Kimura S, and Oka S. Novel mutation of human polymerase γ associated with mitochondrial toxicity induced by anti-human immunodeficiency virus treatment. *J Infect Dis* 195: 1419-1425, 2007.
- 2) Gatanaga H, Yazaki H, Tanuma J, Honda M, Genka I, Teruya K, Tachikawa N, Kikuchi Y, and Oka S. HLA-Cw8 primarily associated with hypersensitivity to nevirapine. *AIDS (correspondence)* 21: 264-265, 2007.
- 杉浦 瓦 :
- 1) Suzuki H, Fujino M, Matsuda M, Yan H, Iwatani Y, Sugiura W. Effects of Protease and reverse transcriptase inhibitor-resistance mutations on integrase polymorphism in multidrug resistance cases. *Antiviral Therapy* 12(1): S4, 2007.
- 2) Iwatani Y, Chan DS, Wang F, Maynard KS, Sugiura W, Gronenborn AM, Rouzina I, Williams MC, Musier-Forsyth K, Levin JG.: Deaminase-independent inhibition of HIV-1 reverse transcription by APOBEC3G. *Nucleic Acids Res* 35(21): 7096-7108, 2007.
- 清野 宏 :
- 1) Kunisawa J, Kurashima Y, Higuchi M, Gohda I, Ishikawa I, Ogahara I, Kim N, Shimizu M, and Kiyono H. Sphingosine 1-phosphate dependence in the regulation of lymphocyte trafficking to the gut epithelium. *J Exp Med* 204: 2335-2348, 2007.
- 2) Kunisawa J, Kurashima Y, Gohda M, Higuchi M, Ishikawa I, Miura F, Ogahara I, and Kiyono H. Sphingosine 1-phosphate regulates peritoneal B cell trafficking for subsequent intestinal IgA production. *Blood* 109: 3749-3756, 2007.
- 塩田達雄 :
- 1) Song H, Nakayama EE, Likanonsakul S, Wasi C, Iwamoto A, and Shioda T. A three-base-deletion polymorphism in the upstream non-coding region of human interleukin 7 (IL-7) gene could enhance levels of IL-7 expression. *International Journal of Immunogenetics* 34: 107-113, 2007.
- 2) Wichukchinda N, Rojanawiwat A, Kitamura Y, Nakayama EE, Pathipvanich P, Auwanit W, Sawanpanyalert P, Iwamoto A, Shioda T, and Ariyoshi K. The polymorphisms in *DC-SIGNR* affect the susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS Res Hum Retrovir* 23: 686-692, 2007.
- 岡本 尚 :
- 1) Tanaka K, Hasegawa J, Asamitu K, and Okamoto T. *Mabnolia ovoata* extract and its active component magnolol prevent skin photoaging via inhibition of nuclear factor κ B. *Eur. Journal of Pharmacology* 565: 212-219, 2007.
- 2) Gao N, Asamitsu K, Hibi Y, Ueno T, and Okamoto T. AKIP1 Enhances NF- κ B-dependent Gene Expression by Promoting the Nuclear Retention and Phosphorylation of p65. *J Biol Chem* 2008, in press.
- 馬場昌範 :
- 1) Uto T, Wang X, Sato K, Haraguchi M, Akagi T, Akashi M, Baba M. Targeting of antigen to dendritic cells with poly(γ -glutamic acid) nanoparticles induces antigen-specific humoral and cellular immunity. *J Immunol* 178: 2979-2986, 2007.
- 2) Wang X, Uto T, Akagi T, Akashi M, Baba M. Induction of potent CD8⁺ T-cell responses by novel biodegradable nanoparticles carrying human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J Virol* 81: 10009-10016, 2007.
- 服部俊夫 :
- 1) Inoue Y, Tanaka N, Tanaka Y, Inoue S, Morita K, Zhuang M, Hattori T, Sugamura K. Clathrin-dependent entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus into target cells expressing ACE2 with the cytoplasmic tail deleted. *J Virol* 81(16):

8722-8729, 2007.

- 2) Shishido Y, Mitarai S, Otomo K, Seki M, Sato A, Yano I, Koyama A, Hattori T. Anti-tuberculosis drug susceptibility testing of *Mycobacterium bovis* BCG. Int J Tuberc Lung Dis. 11(12): 1334-1338, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

高橋秀実：

- 1) 「Enoyl-CoA hydratase を特異的に阻害する ssRNA」(出願準備中) (文献高橋 1 参照)

武部豊：

- 1) 「HCV 阻害剤」(出願準備中)
2) 「新規 HCV エントリー阻害剤」(特願 2008-33598、平成 20 (2008) 年 2 月 14 日出願)
3) 「HIV-1 特異的 RNA 干渉分子」(特願 2007-156767、平成 19 年 6 月 13 日出願)
4) 「C 型肝炎ウイルス (HCV) 増殖阻害剤」(特願 2007-018145、平成 19 年 1 月 29 日) [PCT 出願：PCT/JP2008/51086 (Jan 25, 2008)]

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究協力者

鎌倉光宏 (慶応義塾大学大学院健康マネジメント研究科 教授)

木原正博 (京都大学大学院医学研究科社会疫学分野 教授)

佐多徹太郎 (国立感染症研究所感染病理部長)

原田信志 (熊本大学大学院医学薬学研究部感染防御学分野 教授)

松下修三 (熊本大学エイズ学研究センター病態制御分野 教授)

三輪正直 (長浜バイオ大学バイオサイエンス学部 教授)

三浦智行 (京都大学ウイルス研究所附属感染症モデル研究センター 准教授)

森 一泰 (国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官)

駒野 淳 (国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官)

II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（社会保障国際協力推進研究事業）
分担研究報告書

BCG/DIs ベクターを用いた中和抗体誘導型マルチクレイド HIV ワクチン開発の試み

主任研究者：山本直樹 国立感染症研究所エイズ研究センター長

我々はこれまで、安全性が極めて高い BCG 東京株とワクシニアウイルス DIs(DIs)という細菌・ウイルスによるワクチンベクターに用いて、HIVGag を発現するプライム・ブースト系を構築し、サルエイズモデルにおいて持続感染期の血中ウイルス量を抑制することを証明してきた。しかしながら、HIV の多様性に対応するためには、Env 抗原遺伝子をベクターに組み込み、ウイルス中和抗体の産生をも誘導できるワクチンの開発が極めて重要である。世界的な広がりを見せる様々な HIV 亜株に対応するためには、少なくともクレイド A, B, C というメジャーの 3 種の Env 抗原に対する中和抗体産生を誘導できるワクチンが必要となる。本研究では、我々が開発したこれらの組換え BCG /DIs ベクターを応用し、まずクレイド B 由来の改変型 env (gp140 および gp145) 遺伝子の組み込みと Env 発現株の取得を試み、マウスとサルを用いた動物実験系においてその発現を探るとともに、免疫誘導能、特に中和抗体産生誘導能の評価を小動物レベルで行った。

研究協力者：

網 康至 国立感染症研究所 主任研究官
本多三男 国立感染症研究所 客員研究員
松尾和浩 国立感染症研究所 協力研究員
岡村智崇 国立感染症研究所 協力研究員

A. 研究目的

これまでの HIV ワクチン研究の開発では、当然のことながらまず中和抗体誘導型ワクチンに注目が集まり、その後の本ウイルスの多様性と易変異性という問題が明らかになるにつれ、HIV 特異的細胞性免疫、特にウイルス感染細胞を排除する細胞障害性 T 細胞およびヘルパー T 細胞の誘導ワクチンに重きが置かれるようになってきた。しかし近年再び液性免疫エイズワクチンが復権し、細胞性免疫だけでなく、様々な HIV 変異株に対し中和能を保持した中和抗体の誘導が必要であると考えられている。

エイズワクチンで重要なのは、免疫原のデザインとそれを効率よく発現させるベクターの科発である。現在第二相以上の臨床試験まで進んだ HIV 候補ワクチンの多くは、HIV 特異的細胞性免疫（主にキラー T 細胞）の誘導に主眼が置かれたものであるが、このコンセプトでは HIV 感染後のウイルス複製を抑制して発症を予防することは可能でも、初感染を防ぎ完全な防御能を付与することは不可能である。したがって、Env 抗原を標的とし、細胞性免疫と同時にウイルス中和抗体産生をも誘導できるワクチンの開発が重要な課題となっている。そのためには、中和抗体

産生に適した Env 抗原のデザインと、その Env 抗原を安定に高発現できるベクターの開発が不可欠である。

最近、我々の共同研究者である米国 NIH ワクチン研究センター（VRC）のグループは、ヒト型に至適化した HIV 構造遺伝子を発現する DNA ワクチンとアデノウイルスベクターのコンビネーションワクチンが、サル接種時に中和抗体および細胞性免疫を効率的に誘導することが報告している。しかし、DNA ワクチンの費用の問題や免疫原性の不十分さ、さらにはアデノウイルスの毒性が問題視されている。また多くのヒトが、1 度はアデノウイルスに感染していることから、抗アデノウイルス抗体を保持していることが示唆され、この抗体がベクターの排除に働き、アデノウイルスベクターが有効な免疫原にはならないとも考えられている。

我々が開発した BCG ベクターは、安全な結核ワクチンとして世界中で広く用いられて来た。その細胞壁成分による自然免疫系の活性化、長期間の特異的 1 型ヘルパー T 細胞誘導という免疫学的な特徴とともに、安価に生産できるという実用面でのメリットがある。HIV 感染が広がっている発展途上国にも供給可能なワクチンベクターとして有用であろう。SIV Gag 抗原を発現する BCG をプライミングに用い、同じ抗原を発現するワクシニア DIs をブーストすることにより、サルエイズモデルでの有効性が既に明らかになっている。

そこで本研究では、現在 DNA ワクチンと組換えアデノウイルスベクターを用いたプ

ライムブーストワクチンの臨床試験 (Phase II) を行っている VRC と共同で、DNA ワクチンの代替として組換え BCG (rBCG) をプライミングに用いる、安価で有効なマルチクレイド HIV ワクチンを開発することを目的とした。そのためのポイントとなる、改変型 Env 抗原を BCG で安定に高発現できる系を確立し、その評価を行う。

一方、安全かつ安価で実用化の可能性が最も高いワクチンベクターとして考えられている DIs を用いて、将来的にブースターをアデノウイルスベクターから DIs に置換するという可能性も視野に入れた研究を平行して行った。今回の研究では、HIV 改変型遺伝子および SIV 改変型遺伝子の両方を発現するマルチエピトープ発現 rDIs を作製し、サル動物モデルにおいて免疫誘導能を解析した。

B. 研究方法

1) Env 抗原発現ベクターの改変と構築

用いた改変型 HIV-1 env 遺伝子は、VRC より供与された gp140 (V1V2 領域を欠失している) または gp145 (V1V2 を持つ) 遺伝子である。これらを用いた DNA ワクチンでは、V1V2 領域の欠失により、マウスでの中和抗体産生が増強されると報告されている。Gp140 および gp145 遺伝子断片を、BCG 由来 hsp60 プロモーター、Mycobacterium kansasii 由来 antigen 85B のプロモーターと分泌シグナル、あるいは Mycobacterium smegmatis 由来 SP2 プロモーターと Mycobacterium fortuitum 由来 blaF 分泌シグナルに繋ぎ、それぞれ得られた組み換えプラスミドから Env 発現カセットを制限酵素処理で切り出して、大腸菌—抗酸菌シャトルベクター pSO246 にクローニングし、種々の発現ベクターを得た。

2) BCG への遺伝子導入とウエスタンブロットによる rBCG の解析

上記の pSO246 をベースとした発現ベクターを電気穿孔法により BCG 東京株に導入し、カナマイシン (30 mg/ml) 含有 7H10-OADC 寒天培地で 3 週間培養することにより、形質転換体を選択した。コロニーをピックアップして 7H9-ADC 液体培地で 2 週間培養後に集菌し、菌体の超音波破碎により lysate を調製した。培養上清は 0.45 mm のフィルターで除菌して、サンプルを調製した。SDS-PAGE (4-20% グラディエントゲル) で分画後、PVDF

膜にブロットし、一次抗体として抗 Env C25 マウスモノクローナル抗体、二次抗体としてアルカリホスファターゼ標識抗マウス IgG を用いてウエスタンブロット解析を行った。

3) マルチエピトープを発現する rDIs の構築

発現ベクターに DIs を用いて、gp140V1V2 ΔCFI および SIVGag-opt を同時に発現するマルチエピトープ rDIs (rDIs/gp140-SIVgag) を作製した。また gp145 および SIVgag をそれぞれ単独で発現する rDIs (rDIs/gp145 および rDIs/SIVgag) も作製した。発現の確認には、HIV Env ポリクローナル抗体と SIVGag 抗体をそれぞれ用いて Western blotting 法を行い、全て発現を確認した。

4) マルチエピトープ rDIs の免疫応答解析

このため、サル動物モデルを用いて末梢血における細胞性免疫、抗体価および中和能を経時的に解析を行い、マルチエピトープ rDIs の免疫原性能を明らかにする。

免疫グループは 3 つに分け、免疫サルの内訳は、rDIs/gp140-SIVgag を 3 頭、rDIs/gp145 および rDIs/SIVgag を 3 頭、コントロールとして 2 頭に何も発現しない rDIs/gpt を接種した。投与量は、 2×10^7 PFU/monkey で 3 回接種し、投与間隔を 9 週間とした。免疫誘導能が十分であるかどうか IFN- γ ELISPOT 法、ELISA 抗体価および中和抗体価で検討する。

(倫理面への配慮)

動物実験、とくに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。マウスおよびモルモットでの免疫原性評価は共同研究先の VRC の規定に従って行われた。また、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

rBCG

1) Antigen 85B 発現系の検討

従来から Gag 抗原発現の際に用いていた hsp60 プロモーターによる菌体内発現系では全く BCG での改変型 Env の発現が認められなかった。Antigen 85B 遺伝子のプロモーターと分泌シグナルを用いた系 (rBCG-gp140 と rBCG-gp145) では、菌体内での改変型 env 遺伝子発現は見られたが、発現した Env 抗原

が不安定で菌体内での分解産物がメジャーであった。また分泌シグナルを付加したにもかかわらず、菌体外への分泌は認められなかった。

これら2種のrBCG株をプライミングに用い、gp140遺伝子を発現する組換えアデノウイルスベクターをブーストに用いた候補ワクチンの、マウスおよびモルモットでの免疫原性評価を行い、その結果、rBCGを用いたワクチン系は、有意なEnv特異的細胞性免疫誘導能はあるものの、中和抗体産生の誘導能は極めて低く (Dr. Honda, unpublished data)、さらなるEnv抗原発現系改良の必要性が示唆された。

2) SP2プロモーターとblaF分泌シグナルを用いた発現系の検討

近年、細菌の新たな蛋白質分泌系として、twin-arginine translocase (Tat) 分泌系の存在が明らかとなった。抗酸菌の類縁菌であるCorynebacteriaでは、通常Sec分泌系では分泌発現できない外来蛋白質が、Tat系では高発現、分泌できることが示されている。そこで、抗酸菌由来のTat依存性分泌シグナルであるblaF (βラクタマーゼ遺伝子) のシグナルペプチドをSP2プロモーターに繋いだベクターを構築し、これに改変型env遺伝子を導入してBCGでの発現を検討した。その結果、gp140遺伝子を用いた場合 (rBCG-blaFgp140)、BCGの菌体内で極めて高発現することがわかった。

このコンストラクトでは分解を受けない全長と思われるGp140抗原がメジャーな産物であり、安定性にも優れていた。同じ発現系にgp145遺伝子を繋いだ場合には (rBCG-blaFgp145)、発現レベルはgp140の場合ほど高くなかった。また、gp140、gp145の場合とも培養上清にはEnv抗原が検出できず、blaFシグナルペプチドとEnvの融合蛋白質として菌体内に留まっているものと推測された。

rDIs

1) マルチエピトープ rDIs の構築およびサル動物モデルにおける免疫誘導能の検討

構築した3種のrDIsは、Western blotting法によって発現が確認された。またin vitroの解析で、これらのrDIsはCEF細胞でのみ複製し、哺乳類細胞での複製は確認されなかった。

構築した rDIs/gp140-SIVgag および

rDIs/gp145、rDIs/SIVgag を免疫したサルは、抗体誘導能に差が確認されるものの、2回目の免疫後に抗 HIV Env 抗体価の上昇が認められた。今後は、この抗体の中和活性を検討する予定である。

D. 考察

Antigen 85Bのプロモーター、分泌シグナルを用いる外来抗原発現系は、世界的に多くのグループによって用いられており、特にIL-2、IL-18、GM-CSFなどのサイトカインについては、BCGから分泌発現させられることが報告されている。しかしながら、本研究で用いた改変型env遺伝子については、分泌発現は認められず、遺伝子産物は不安定で、分解物としてBCG菌体内に留まっていた。マウスおよびモルモットで十分な抗体産生応答が得られなかったのは、このEnv抗原の不安定性に起因するものと考えられる。

一方、SP2プロモーターとblaF分泌シグナルを用いた系では、gp140 (V1V2領域を欠失している) とgp145 (V1V2領域を持つ) で発現レベルが大きく異なることから、blaFシグナルペプチドに繋ぐenv遺伝子産物の構造が、BCGでの安定性、高発現に大きく関与しているものと考えられる。その構造的要因を探ることにより、菌体外への分泌も含めた、さらなる発現系の改良が可能であると思われる。今回得られたGp140高発現株については、顕著な分泌は認められなかったものの、免疫原性の増強が期待されるので、今後小動物での評価を行う。

これまでのHIV中和抗体の研究で、チンパンジーやサルによる感染実験において、中和抗体の投与によりSIV攻撃接種に対し完全阻止できる報告がなされていた。中和抗体の誘導は、HIV感染症のワクチンとして非常に注目を集めている。これまでのワクチンベクター用いたHIVワクチンでは、有効な中和抗体を誘導することが困難であることから、ワクチン投与量を大幅に増やすなど試行錯誤がとられてきた。しかし投与量の増加に伴い、ワクチンベクターの副作用の危険があるなど開発には難しい。今回使用したワクチニアウイルスDIsは、過去に痘瘡ワクチンとしてヒトに接種された経験があり、とても安全性が高い。

rDIs/gp140-SIVgag 免疫群と rDIs/gp145、rDIs/SIVgag 免疫群において、抗体に差が認

められている。しかしながら、どちらの免疫サルも抗体価の上昇が確認されたことから、今後はこれらの抗体の中和活性を解析し、有効な抗体を誘導できたかを検証していく予定である。また細胞性免疫の解析も合わせて検討する。

E. 結論

様々な遺伝子発現系での改変型 env 遺伝子発現を試み、antigen 85B 系では高発現できなかった Env gp140 抗原を、SP2 プロモーターと blaF 分泌シグナルの系で安定に高発現させることに成功した。今後この高発現株を用いた動物実験で、高い免疫誘導能が得られるものと期待される。

マルチエピトープワクチン発現 rDIs を作製し、サル動物モデルにおいて抗 HIVEnv 抗体価の上昇を確認した。今後は、誘導した抗体を解析していく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Kimura R, Komano J, Nishi M, Soeda H, Hattori S, Perrem K, Yamamoto M, Chiba J, Mimaya J, Yoshimura K, Matsushita S, Honda M, Yoshimura A, Sawasaki T, Aoki I, Morikawa Y, Yamamoto N. SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. PNAS 105: 294-299, 2008.
- 2) 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 γ ^{null} mice develop human lymphoid system and induce long-lasting HIV-1 infection with specific humoral immune responses. Blood 109: 212-218. 2007,
- 3) Watanabe S, Ohta S, Yajima M, Terashima K, Ito M, Mugishima H, Fujiwara S, Shimizu K, Honda M, Shimizu N,

Yamamoto N. Humanized NOD/SCID/IL2R γ ^{null} mice transplanted with hematopoietic stem cells under nonmyeloablative conditions show prolonged life spans and allow detailed analysis of human immunodeficiency virus type 1 pathogenesis. J Virol 81: 13259-13264, 2007.

- 4) Tsurutani N, Yasuda J, Yamamoto N, Choi BI, Kadoki M, Iwakura Y. Nuclear import of the preintegration complex is blocked upon infection by human immunodeficiency virus type 1 in mouse cells. J Virol 81(2): 677-688, 2007.
- 5) Kubo Y, Yokoyama M, Yoshii H, Mitani C, Tominaga C, Tanaka Y, Sato H, Yamamoto N. Inhibitory role of CXCR4 glycan in CD4-independent X4-tropic human immunodeficiency virus type 1 infection and its abrogation in CD4-dependent infection. J Gen Virol 88: 3139-3144, 2007.
- 6) Someya K, Xin KQ, Ami Y, Izumi Y, Mizuguchi H, Ohta S, Yamamoto N, Honda M, Okuda K. Chimeric adenovirus type 5/35 vector encoding SIV gag and HIV env genes affords protective immunity against the simian/human immunodeficiency virus in monkeys. Virology 367: 390-397, 2007.
- 7) Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Miyauchi K, Isogai M, Matsuda Z, Nohtomi K, Onogi T, Takebe Y, Yamamoto N, Komano J. Inhibiting lentiviral replication by HEXIM1, a cellular negative regulator of the CDK9/cyclin T complex. AIDS 21: 575-582, 2007.

G. 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

ワクチンによる X4 指向性 SHIV 複製制御サルの解析

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、ウイルス特異的 CD8 陽性細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) がウイルス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、感染初期に CTL による血中ウイルス量の低下がみられるが、HIV 複製の制御には至らず慢性持続感染が成立し、ウイルス血症が持続してエイズ発症にいたる。CCR5 指向性サル免疫不全ウイルス (SIV) 慢性持続感染サルエイズモデルでは、ワクチンによる CTL 誘導が必ずしもウイルス複製制御に直結しないが、急性エイズモデルとして知られている CXCR4 指向性サルヒト免疫不全ウイルス SHIV 感染モデルでは、ワクチンによる CTL 誘導がウイルス複製制御に比較的容易に直結する。そこで本研究では、慢性エイズモデルにおける CTL のウイルス複製抑制機序解明の一助とする目的で、急性エイズモデルにおける CTL のウイルス複製抑制機序を解析し、慢性エイズモデルと比較検討することとした。平成 19 年度は、我々の開発した CTL 誘導ワクチン接種により CXCR4 指向性 SHIV 複製制御にいたったサルにおいて、誘導されている抗ウイルス免疫反応を知る目的で、CCR5 指向性 SIV スーパーチャレンジ実験の解析を行った。その結果、これらのサルは SIV 複製を制御することができることが明らかとなった。したがって、ワクチン接種サルにおいて、CXCR4 指向性 SHIV 感染をうけることにより、CCR5 指向性 SIV 複製を制御しうる免疫反応が誘導されることが示唆された。

A. 研究目的

HIV 感染症では、感染後に宿主適応免疫反応が誘導されるにもかかわらず慢性持続感染が成立し、ウイルス血症が持続してエイズ発症にいたる。適応免疫系のエフェクターとしては、CD8 陽性細胞傷害性 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、HIV 感染初期に CTL による血中ウイルス量の低下がみられるが、HIV 複製の制御には至らず慢性持続感染が成立する。

この慢性持続感染成立を阻止するエイズワクチン開発のための動物モデルとしては、CCR5 指向性サル免疫不全ウイルス (SIV) 感染サルエイズモデルが最適と考えられている。この慢性エイズモデルでは、ワクチンによる CTL 誘導がウイルス複製抑制に直結するわけではない。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、優れた CTL 誘導能を有する Gag 発現センダイウイルス (SeV-Gag) ベクターを用いたワクチンシステムを開発した。さらに、CCR5

指向性 SIVmac239 慢性持続感染サルエイズモデルにて、ワクチンによる SIV 複製制御の可能性を初めて示すことに成功し、CTL による SIV 複製抑制機序の解析を進めている。

一方、CXCR4 指向性サルヒト免疫不全ウイルス SHIV 感染急性エイズモデルでは、CTL 誘導がウイルス複製抑制に比較的容易に直結する。そこで本研究では、慢性エイズモデルにおける CTL のウイルス複製抑制機序解明の一助とする目的で、急性エイズモデルにおいて CTL 誘導がウイルス複製抑制に結びつく機序を解析し、慢性エイズモデルと比較検討することとした。

これまでに、CTL 誘導ワクチン接種により SHIV89.6PD 複製制御に至ったサルの長期解析を進め、長期間ウイルス複製制御が維持されることを明らかにしてきた。平成 19 年度は、ワクチンにより長期の SHIV89.6PD 複製制御にいたったサルにおいて、誘導されている抗ウイルス免疫反応を知る目的で、CCR5 指向性 SIVmac239 スーパーチャレンジ実験を行った。

B. 研究方法

SeV-Gag ベクターワクチン接種後 CXCR4 指向性 SHIV89.6PD チャレンジ実験を行ったアカゲサル 2 頭の慢性期に (R00-017 は 203 週目、R00-020 は 151 週目)、CCR5 指向性 SIVmac239 スーパーチャレンジを行った。経時的に血漿中ウイルス量定量を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は、倫理面も含めて、国立感染症研究所、独立行政法人医薬基盤研究所および東京大学医科学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開始した。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

2 頭とも、SHIV89.6PD チャレンジ後セットポイント期以降、血漿中ウイルス量は検出限界以下であったが、サル R00-017 においては、SIVmac239 スーパーチャレンジ後も、血漿中ウイルス量は検出限界以下であった。もう 1 頭の R00-020 においては、SIVmac239 スーパーチャレンジ後、一過性に (スーパーチャレンジ後 1 週目および 2 週目 [SHIV89.6PD チャレンジ後 152 週目および 153 週目] のみ) 低いレベルのウイルス血症が認められたが、スーパーチャレンジ後 3 週目以降 (SHIV89.6PD チャレンジ後 154 週目以降)、血漿中ウイルス量は検出限界以下となった (図 1)。

D. 考察

いずれのサルにおいても、CCR5 指向性 SIVmac239 複製は制御され、持続感染は成立しなかった。ワクチン接種のみでは、SIVmac239 複製制御にいたる免疫反応を誘導することは容易ではないが、CXCR4 指向性 SHIV89.6PD チャレンジにより、SHIV89.6PD 複製は制御されるものの、CCR5 指向性 SIVmac239 複製をも制御しうる免疫反応が誘導されると考えられた。

E. 結論

SeV-Gag ベクターを用いたワクチン接種により CXCR4 指向性 SHIV 複製制御にいたったサルにおける、CCR5 指向性 SIV スーパーチャレンジ

実験にて、SIV 複製は制御されることが明らかとなった。したがって、ワクチン接種サルにおいて、CXCR4 指向性 SHIV 感染をうけることにより、CCR5 指向性 SIV 複製を制御しうる免疫反応が誘導されることが示唆された。

F. 研究発表

1 論文発表

- (1) Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Takeda A, Igarashi H, Watkins DI, 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* 81:5202-5211, 2007.
- (2) Tsukamoto T, Yuasa M, Yamamoto H, Kawada M, Takeda A, Igarashi H, Matano T. Induction of CD8⁺ cells able to suppress CCR5-tropic simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication by controlled infection of CXCR4-tropic simian-human immunodeficiency virus in vaccinated rhesus macaques. *J Virol* 81:11640-11649, 2007.

2 学会発表

- (1) Tsukamoto T, Yuasa M, Kawada M, Takeda A, Matano T. Effective CD8(+) cell responses against SIV superchallenge in SHIV-controllers. 4th IAS Conference on HIV pathogenesis, Treatment and Prevention, Sydney, Australia, 7/22-25/2007.
- (2) Matano T, Tsukamoto T, Yuasa M, Yamamoto H, Kawada M. Induction of CD8 cell responses able to suppress CCR5-tropic SIVmac239 replication by controlled SHIV infection in rhesus macaques. The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 9/1-5/2007.

G. 知的財産権の出願・登録状況
無し。