

- 本エイズ学会学術集会 2007年11月28-30日(広島)。
83. 高久千鶴乃、渡邊恵理、大脇敦子、清水真澄、松村次郎、高久俊、渡理英二、新谷英滋、高橋秀実。CD4陽性NKT細胞とHIV-1による感染拡大への相互作用。第21回日本エイズ学会学術集会 2007年11月28-30日(広島)。
84. 松村次郎、清水真澄、高久千鶴乃、近江恭子、吉田岳市、秋山純一、新谷英滋、岡慎一、高橋秀実。HIV患者の腸管粘膜組織における感染細胞の探索。第21回日本エイズ学会学術集会 2007年11月28-30日(広島)。
85. Higuchi T, Takahashi M, Kobayashi F, Inagaki S, Nakagawa Y, Kumagai Y, Takahashi H. Study on a possible mechanism of intravesical BCG therapy for human bladder carcinoma. 第37回日本免疫学会総会 2007年11月20-22日(東京)。
86. Takeuchi H, Shimizu M, Mayumi N, Norose Y, Takahashi H. Characterization of virus-producing breast milk monocytes transformed with HTLV-1. 第37回日本免疫学会総会 2007年11月20-22日(東京)。
87. Kumagai Y, Takahashi H. Analysis of the interaction between HIV-1-gp120 V3 region and b-chemokine receptor by using multivalent V3 epitopes grafted at the immunoglobulin hyper-variable regions. 第37回日本免疫学会総会 2007年11月20-22日(東京)。
88. Shinya E, Owaki A, Shimizu M, Watanabe E, Matsumura J, Negishi Y, Takaku C, Takahashi H. Down-regulation of CD1 lipid/glycolipid antigen presentation by HIV-1 Nef in immature dendritic cells. 第37回日本免疫学会総会 2007年11月20-22日(東京)。
89. Takahashi H, Saito N, Shimizu M, Owaki A, Watanabe E, Takahashi M, Ohmi K, Takaku C, Shinya E. Cross-reactive cytotoxicity of CD1d-NKT cell system between primates and rodents. 第37回日本免疫学会総会 2007年11月20-22日(東京)。
90. Moriya K, Wakabayashi A, Shimizu M, Watanabe E, Takaku S, Dan K, Takahashi H. Effects of 33D1+ or DEC-205+ dendritic cell depletion on cytokine secretion and tumor growing in mice. 第37回日本免疫学会総会 2007年11月20-22日(東京)。
91. 高橋秀実。自然免疫システムと疾病：慢性関節リウマチに対する新たなアプローチ。第7回小児感染免疫研究会 2008年2月16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. 腸管免疫賦活剤：国際公開番号:WO2007/052641 A1
  2. ワクチン剤：特願2007-076165
  3.  $\alpha$ 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)
  4.  $\alpha$ 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)
  5. リポソームワクチンの作製法(出願中、PCT/JP2006/303371)
  6. 新規CXCR4拮抗剤及びその用途：国際出願番号 PCT/JP2006/326069
  7. 標的物質の検出方法、並びに、これに用いるタグ、DNA、ベクター、プローブ及び検出キット：特願2007-007916
  8. 免疫アジュバント：特願2007-192362
  9. 免疫アジュバント：特願2007-192363
  10. IgA抗体測定方法：特願2007-192364

## II. 分担研究報告書

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

マルチクレイド HIV ワクチンと中和抗体誘導

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

研究要旨

これまでの HIV 感染予防ワクチン研究の主流は、DNA ワクチンと組み換えウイルスベクターを組み合わせたプライムブースト法による、HIV、特に Gag 抗原特異的細胞性免疫誘導を狙ったワクチンであった。しかしながら、防御免疫誘導能をさらに増強するためには、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 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理想的である。本研究では、我々が開発した組換え BCG 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た。抗酸菌由来 antigen 85B 由来のプロモーターと分泌シグナルに改変型 env 遺伝子を繋いだコンストラクトでは、発現した Env 抗原が不安定で BCG のプロテアーゼによる分解が起っていた。これら2種の組換え BCG 株をプライミングに用い、同じ env 遺伝子を組み込んだ5型アデノウイルスをブーストに用いたプライムブーストワクチンの免疫誘導能を小動物で解析したところ、中和抗体産生のレベルは高くなかった。そこで、BCG において Env 抗原をより安定に、高発現できるように発現系の改良を試み、SP2 プロモーターと blaF 分泌シグナルを用いることにより、gp140 遺伝子を極めて安定に高発現できることがわかった。今後、その高発現の要因を探るとともに、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う予定である。

A. 研究目的

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ろう。その意味において、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、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。

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。

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）を行っている米国 NIH ワクチン研究センター（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。

B. 研究方法

(1) 改変型 Env 抗原発現ベクターの構築

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。その構造の一例を図1 Aに示す。

## (2) BCGへの遺伝子導入とrBCGのウエスタンブロット解析

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) 倫理面への配慮

遺伝子組換え体の第二種使用における拡散防止措置については、国立感染症研究所の機関承認済みである。

## C. 研究結果

### (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 (図1)。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。

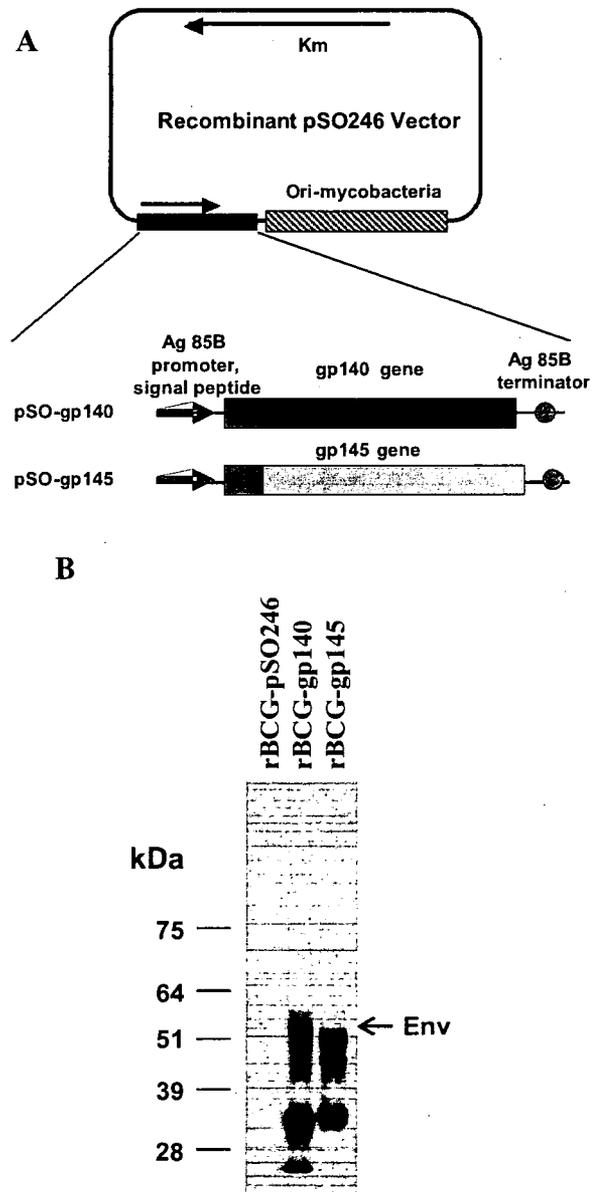


図1 A 改変型 Env 発現ベクターの構造

B rBCG-gp140 及び rBCG-gp145 lysate のウエスタンブロット解析

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が共同研究先の VRC で行われた。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、通常の 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 ( $\beta$ 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 (図2)。

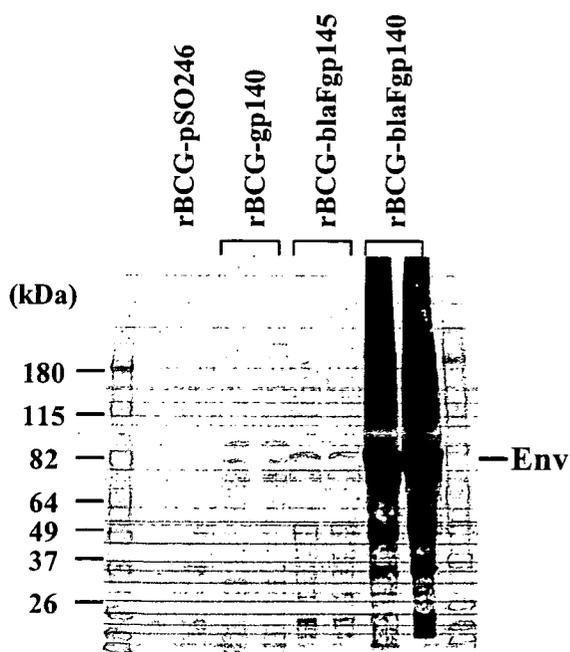


図2 Env 発現型組換え BCG 株のウエスタンブロット解析 (SP2 promoter と blaF シグナルによる Gp140 の高発現)

このコンストラクトでは分解を受けてい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 (図2)。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。

## C. 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。

## 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。

## F. 研究発表

### 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, 2008, 151:294-9.
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  $\gamma$  null mice develop human lymphoid system and induce long-lasting HIV-1 infection with specific humoral immune responses. Blood. 2007, 109:212-8.
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  $\gamma$  (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. 2007, 81:13259-64.
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. 2007 Jan;81(2):677-88.
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. 2007, 88:3139-44.
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. 2007, 367:390-7.
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. 2007, 21:575-82.

### 学会発表

なし。

### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

(研究協力者:松尾和浩)

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、CTL 誘導ワクチンによる SIV 複製制御の可能性を世界で初めて明らかにしてきた。さらに、平成 18 年度には、この 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報告した。平成 19 年度には、この SeV ベクターを用いたワクチンの臨床試験第 1 相計画に向け、ウイルス多様性を考慮した抗原選択に関する研究を、サルエイズモデルにて行った。まず、主要組織適合遺伝子複合体クラス I (MHC-I) ハプロタイプ 90120-Ia 共有サル群にて Gag 特異的 CTL 反応により選択された複数のエスケープ変異を有する SIV を、90120-Ia を有さないナイーブサル群にチャレンジした。その結果、4 頭中 2 頭ではエイズ発症にいたったものの、残りの 2 頭では持続感染成立が阻害された。この結果は、Gag 特異的 CTL により SIV 複製能を低下させることができる可能性を個体レベルにて示すものであり、ワクチンによる Gag 特異的 CTL 誘導の合理性を支持するものである。一方、SIVmac239 Gag を主抗原とするワクチン接種により SIVmac239 複製制御にいたる 90120-Ia 共有ワクチン接種サル群に、異なる株である SIVsmE543-3 をチャレンジした実験では、慢性持続感染が成立した。さらなる解析から、ワクチンで誘導された Gag 特異的 CTL が、エピトープ領域だけでなくその周辺のアミノ酸配列の違いから SIVsmE543-3 を認識できないことが明らかとなった。この結果は、多様な HIV に対する CTL 誘導ワクチンの効果を検討する際、CTL エピトープ配列だけでなく、エピトープ近傍のアミノ酸配列にも注意を払う必要があることを確認した点で、ワクチン実用化の際の重要な知見である。

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の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 CTL 誘導予防ワクチン接種による SIV 複製制御の可能性を明らかにした。平成 18 年度には、サルエイズモデルにおける長期解析から、この 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報告した。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とともに、これまで得られた有効性をもとに、HIV 感染拡大抑制を目的として、SeV ベクターを用いた予防エイズワクチン臨床試験第 1 相計画を進める予定である。そこで平成 19 年度の本研究では、その臨床試験第 1 相計画に向け、ウイルス多様性を考慮した抗原選択に関する研究を、サルエイズモデルにて行った。

## B. 研究方法

(1) ナイーブサルへの変異 SIV 感染実験：主要組織適合遺伝子複合体クラス I (MHC-I) ハプロタイプ 90120-Ia 共有アカゲサル群にて選択された複数の CTL エスケープ gag 変異を有する SIV (SIVmac239Gag216S244E247L312V373T) を、90120-Ia を有さないアカゲサル 2 頭にチャレンジした。さらに、この変異 SIV を有する SIV 慢性感染サルの血漿を、90120-Ia を有さないアカゲサル 2 頭にチャレンジした。これらの 4 頭について血漿中ウイルス量定量を中心とした解析を行った。

(2) 90120-Ia 共有ワクチン接種サル群への SIVsmE543-3 チャレンジ実験：MHC ハプロタイプ 90120-Ia を有するアカゲサル 2 頭に、SIVmac239 Gag を主抗原とする DNA/SeV-Gag ワクチンを接種した後、SIVsmE543-3 をチャレンジした。経時的に血漿中ウイルス量定量、末梢血リンパ球中の CD4 陽性 T リンパ球パーセント (%CD4) 測定等の解析を行った。細胞内免疫染色による抗原特異的インターフェロン $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 誘導測定を行い、Gag 特異的 CTL および Gag206-216 特異的 CTL レベルを調べた。

(3) Gag206-216 特異的 CTL の SIVsmE543-3 認識

能の解析：MHC ハプロタイプ 90120-Ia を有するアカゲサルのワクチン接種後の末梢血リンパ球と、SIVmac239 由来 Gag202-216 ペプチドあるいは SIVsmE543-3 由来 Gag202-216 ペプチド (Gag202-216.205E) で刺激した autologous BLCL 細胞との共培養を行った後、特異的に誘導される IFN- $\gamma$  を細胞内染色により測定した。さらに、同様のリンパ球と、SIVmac239 由来 Gag202-216 発現プラスミド DNA あるいは SIVsmE543-3 由来 Gag202-216.205E 発現プラスミド DNA を導入した autologous BLCL 細胞との共培養を行った後、特異的に誘導される IFN- $\gamma$  を細胞内染色により測定した。

(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研究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

(1) ナイーブサルへの変異 SIV 感染実験：変異 SIV チャレンジをうけたサル 4 頭のうち 2 頭では、慢性持続感染が成立し、エイズ発症にいたった。これら 2 頭では、5 箇所の変異のうちいくつかで復帰変異が認められた。一方、残りの 2 頭では、持続感染成立が阻害された (図 1)。

(2) 90120-Ia 共有ワクチン接種サル群への SIVsmE543-3 チャレンジ実験：SIVsmE543-3 チャレンジをうけた 2 頭ともにおいて、ウイルス複製は制御されず慢性持続感染が成立し、%CD4 の低下が認められた (図 2)。2 頭とも、ワクチン接種後、効率よい Gag 特異的 CTL および Gag206-216 特異的 CTL 誘導を示したが、SIVsmE543-3 チャレンジ後の Gag206-216 特異的 CTL の 2 次反応は認められなかった (図 3)。

(3) Gag206-216 特異的 CTL の SIVsmE543-3 認識能の解析：SIVmac239 と SIVsmE543-3 の Gag アミノ酸配列をみると、Gag206-216 エピトープ領域は両者とも同じ IINEEAADWD であるが、その近傍では、Gag206-216 エピトープ N 末端の 1 アミノ酸 N 側の 205 番目のアミノ酸に違い (SIVmac239 では Gag205D、SIVsmE543-3 では Gag205E) があることがわかった (図 3)。

ペプチド刺激実験では、SIVmac239 由来



Gag202-216 ペプチド特異的 IFN- $\gamma$ 誘導および SIVsmE543-3 由来 Gag202-216.205E ペプチド特異的 IFN- $\gamma$ 誘導とも検出された (図4)。一方、ペプチド発現細胞を用いた抗原刺激実験では、SIVmac239 由来 Gag202-216 発現細胞刺激による特異的 IFN- $\gamma$ 誘導は認められたが、SIVsmE543-3 由来 Gag202-216.205E 発現細胞刺激による特異的 IFN- $\gamma$ 誘導は認められなかった (図5)。

#### D. 考察

ナイーブサルへの変異 SIV 感染実験では、Gag 特異的 CTL により選択された変異を有する SIV の複製能の低下が示され、さらには、エイズ発症能が完全に失われるわけではないものの、病原性の低下の可能性が示された。この結果は、Gag 特異的 CTL により SIV 複製能を低下させることができる可能性を個体レベルにて示すものであり、ワクチンによる Gag 特異的 CTL 誘導の合理性を支持するものである。

これまでの我々の研究にて、90120-Ia 共有ワクチン接種サル群は SIVmac239 複製を制御できることが示されていたが、本研究により、別の株である SIVsmE543-3 複製を制御することはできないことが判明した。このサル群では、ワクチンにより高い SIVmac239 複製抑制能を有する Gag206-216 特異的 CTL が誘導されるが、本研究により、この Gag206-216 エピトープ領域において SIVmac239 と同じアミノ酸配列を有する SIVsmE543-3 感染に対して、Gag206-216 特異的 CTL は反応しないことが明らかとなった。

SIVmac239 由来 Gag202-216 ペプチドおよび SIVsmE543-3 由来 Gag202-216.205E ペプチドを用いた実験では、Gag206-216 特異的 CTL は、Gag202-216 ペプチド刺激細胞、Gag202-216.205E ペプチド刺激細胞とも認識できることが示された。しかし、これらのペプチド発現細胞を用いた実験では、Gag206-216 特異的 CTL は、Gag202-216 発現細胞を認識するものの、Gag202-216.205E 発現細胞を認識することができないことが明らかとなった。したがって、このエピトープ近傍の Gag205D (SIVmac239)と Gag205E (SIVsmE543-3) の違いにより、SIVsmE543-3 感染細胞においては Gag206-216 エピトープが提示されず、その結果、SIVsmE543-3 は Gag206-216 特異的 CTL の認識から逃避できると考えられた。エピトープ近傍のアミノ酸の違いが CTL エスケープに結びつく可能性については、これまでにも報告されていたが、このような違いがワクチン誘導 CTL の有効性破壊に結びつきうることを確認したのは、本研究が

初めてである。この結果は、多様な HIV に対する CTL 誘導ワクチンの効果を検討する際、CTL エピトープ配列だけでなく、エピトープ近傍のアミノ酸配列にも注意を払う必要があることを確認した点で、ワクチン実用化の際の重要な知見であると考えられる。

#### E. 結論

本研究は、Gag 特異的 CTL により SIV 複製能を低下させることができる可能性を個体レベルにて示した。この結果は、ワクチンによる Gag 特異的 CTL 誘導の合理性を支持するものである。

一方、SIVmac239 Gag を主抗原とするワクチン接種サルへの SIVsmE543-3 チャレンジ実験から、ワクチン誘導 CTL の効果が、エピトープ領域だけでなくその周辺のアミノ酸配列の違いによっても失われる可能性が示された。この結果は、多様な HIV に対する CTL 誘導ワクチンの効果を検討する際、CTL エピトープ配列だけでなく、エピトープ近傍のアミノ酸配列にも注意を払う必要があることを確認した点で、ワクチン実用化の際の重要な知見である。

#### G. 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<sup>+</sup> T-cell preservation after non-sterile protection by a cytotoxic T lymphocyte-based vaccine. *J Virol* 81:5202-5211, 2007.
- (2) Yamamoto H, Kawada M, Takeda A, Igarashi H, Matano T. Post-infection immunodeficiency virus control by neutralizing antibodies. *PLoS ONE* 2:e540, 2007.
- (3) Tsukamoto T, Yuasa M, Yamamoto H, Kawada M, Takeda A, Igarashi H, Matano T. Induction of CD8<sup>+</sup> 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.
- (4) Moriya C, Igarashi H, Takeda A, Tsukamoto T, Kawada M, Yamamoto H, Inoue M, Iida A, Shu T, Hasegawa M, Nagai Y, Matano T. Abrogation of AIDS vaccine-induced cytotoxic T lymphocyte efficacy in vivo due to a change in viral epitope flanking sequences. *Microbes Infect*, in press.

- (5) Tsukamoto T, Dohki S, Ueno T, Kawada M, Takeda A, Yasunami M, Naruse T, Kimura A, Takiguchi M, Matano T. Determination of a major histocompatibility complex class I restricting simian immunodeficiency virus Gag241-249 epitope. AIDS, in press.
- 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.
- (3) Moriya C, Horiba S, Matano T. Efficient antigen-specific CTL induction by a recombinant Sendai virus vector vaccine in rhesus macaques with pre-existing anti-vector antibodies The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 9/1-5/2007.
- (4) Matano T, Kawada M, Kuwano T, Naruse T, Kimura A. Association of AIDS vaccine efficacy with MHC haplotypes in rhesus macaques. The 25th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Monterey, CA, USA, 9/10-13/2007.
- (5) 守屋智草、井上誠、飯田章博、朱亜峰、長谷川護、侯野哲朗. センダイウイルスベクターエイズワクチンの免疫誘導効率に対する抗ベクター抗体の影響の解析. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、3D14、札幌、10/23/2007.
- (6) 守屋智草、井上誠、飯田章博、朱亜峰、長谷川護、侯野哲朗. 抗原特異的細胞性免疫誘導に必要なセンダイウイルスベクターワクチン接種量の解析. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、3D14、札幌、10/23/2007.
- (7) 塚本徹雄、侯野哲朗. CD8 陽性細胞集団のエイズウイルス抑制能を評価する. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、3WSB3、札幌、10/23/2007.
- (8) Matano T. CD8 cell responses against SIV replication. International Symposium on Basic and Applied Immunobiology, Beijing, China, 10/29/2007.
- (9) Matano T. SIV replication under CD8 cell responses. Center for AIDS Research, Kumamoto University, 10th Anniversary Symposium, Kumamoto, Japan, 11/15/2007.
- (10) Matano T. The Current Progress in AIDS Vaccine Development. International Forum of Crisis Management for Infectious Disease, Tokyo, Japan, 11/18/2007.
- (11) 川田真幹、侯野哲朗. CTL 誘導エイズワクチン接種サルへのエスケープ変異ウイルス感染実験. 第 21 回日本エイズ学会学術集会、OS07-53、広島、11/28/2007.
- (12) 守屋智草、堀場聡、井上誠、飯田章博、朱亜峰、長谷川護、侯野哲朗. 抗ベクター抗体存在下におけるセンダイウイルスベクターエイズワクチンの CTL 誘導能の解析. 第 11 回日本ワクチン学会学術集会、横浜、12/9/2007.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

無し。

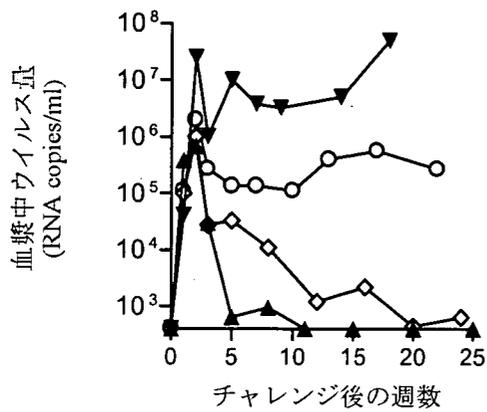


図1 ナイーブサル4頭への変異SIVチャレンジ後の血漿中ウイルス量の経時変化

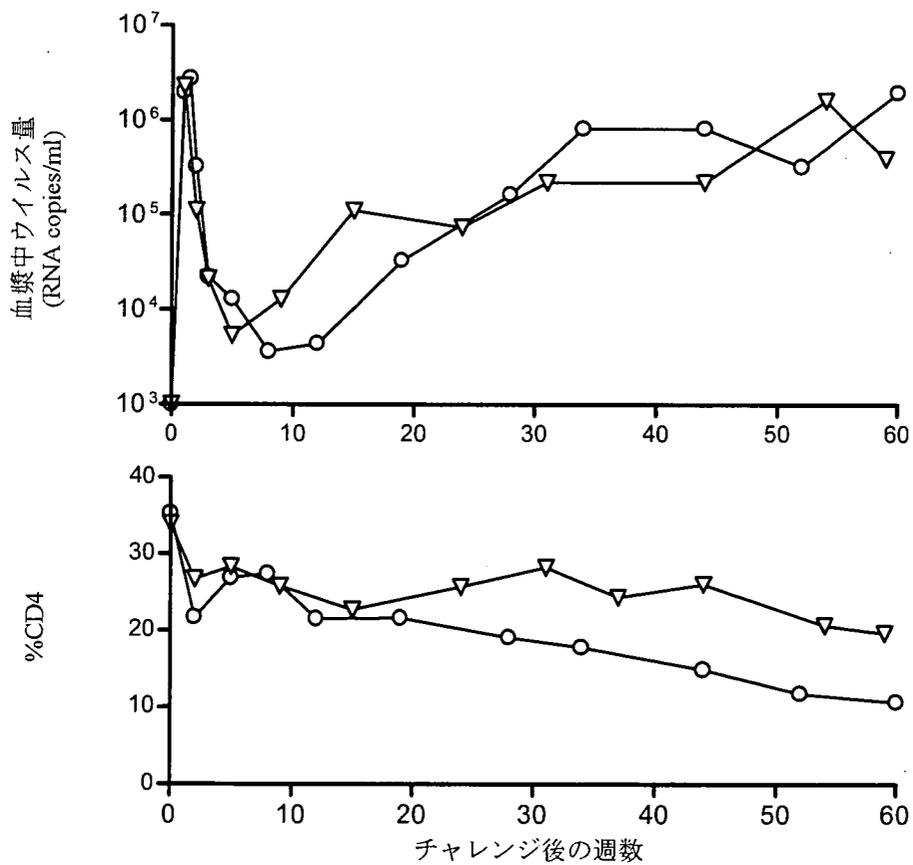


図2 DNA/SeV-Gagワクチン接種サル2頭(90120-1a[+])へのSIVsmE543-3チャレンジ実験  
 上段：血漿中ウイルス量、下段：末梢血単核球中CD4陽性Tリンパ球パーセント

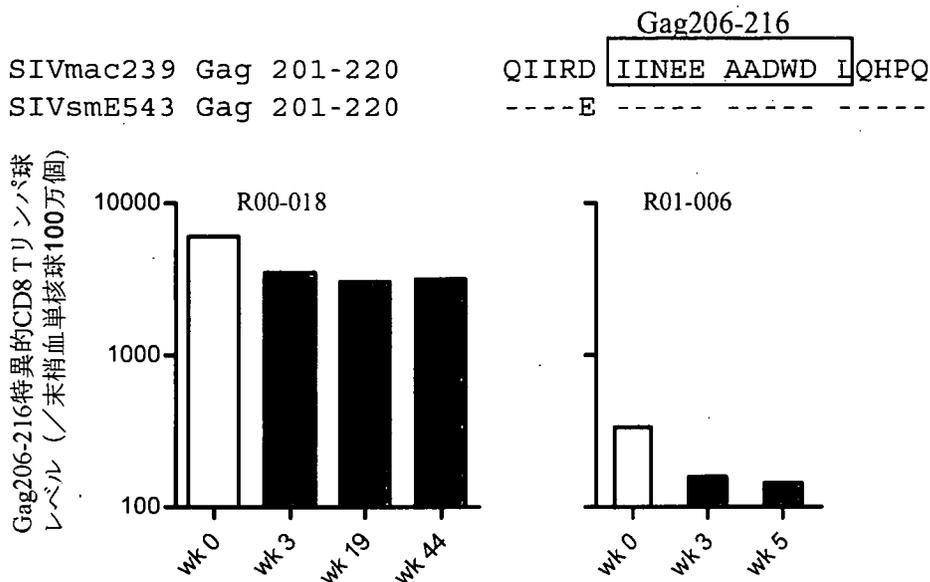


図3 Gag206-216特異的CTLレベルの経時変化  
 上段：SIVmac239およびSIVsmE543-3のGag206-216領域付近のアミノ酸配列  
 下段：DNA/SeV-Gagワクチン接種サル2頭におけるチャレンジ前後の末梢血リンパ球中Gag206-216特異的CTLレベル

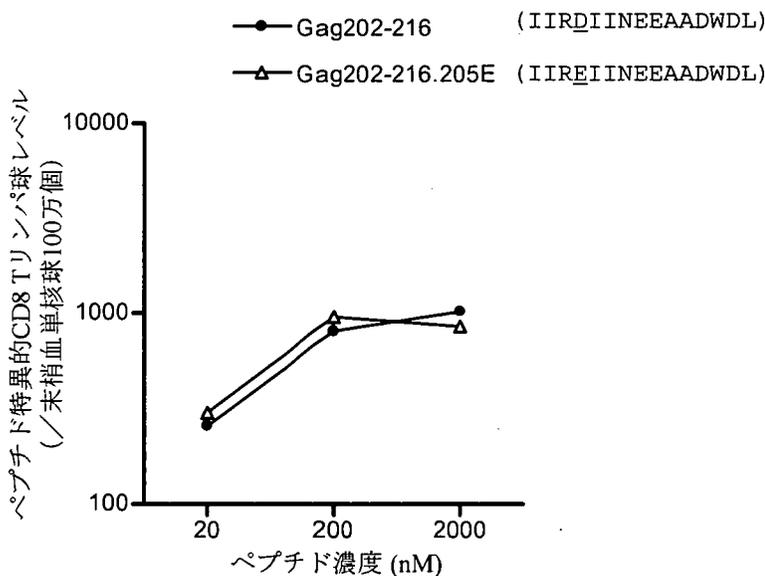
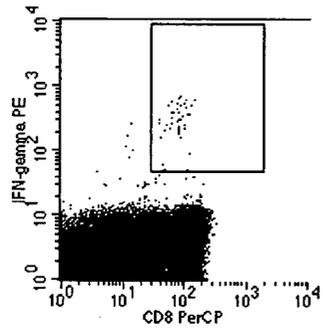


図4 Gag202-216およびGag202-216.205Eペプチドに対するGag206-216特異的CTLの反応  
 MHCハプロタイプ90120-1aを有するサルのDNA/SeV-Gagワクチン接種後の末梢血リンパ球中のGag202-216ペプチドおよびGag202-216.205Eペプチド特異的CD8 T細胞レベル

Gag202-216  
(IIRDIINEEAADWDL)  
発現細胞による刺激



Gag202-216.205E  
(IIREIINEEAADWDL)  
発現細胞による刺激

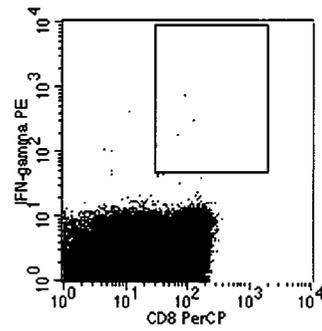


図 5 Gag202-216およびGag202-216.205E発現細胞に対するGag206-216特異的CTLの反応  
MHCハプロタイプ90120-Iaを有するサルのDNA/SeV-Gagワクチン接種後の末梢血リンパ球を、Gag202-216あるいはGag202-216.205Eを発現するプラスミドベクターを導入した autologous BLCL細胞と共培養した後、細胞内免疫染色を行いFACSでインターフェロン $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 誘導を解析したdot plot図を示す。横軸はCD8、縦軸はIFN- $\gamma$ 発現レベル。

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

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、SIVgag-m8Δ を作成し、マウスで抗 Gag CTL の誘導を確認した。又、昨年度からの継続として免疫活性化因子 CD40Lm の効果を検討した。

A 研究目的

HIV に対するワクチン用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、重篤な副作用の報告がなかった 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。又、私は以前に外来抗原を非常に効率よく発現するプロモーターpSFJ1-10 を開発している。さらに、昨年度本株をベースに効率の良い組み換えウイルス作製法を開発した。今年度はこれらを組み合わせて、SIV Gag を発現する m8Δ 組み換えワクシニアを作成し、免疫原性を調べる事を目的とした。又、昨年度に続いて、免疫活性化因子 CD40L を補助因子として発現させることによる効果も調べた。

B 研究方法

In vitro ligation 法による SIVgag 発現 m8Δ 株の作成 : m8Δ 株に pSFJ1-10 プロモーターを組み込んだワクシニアウイルス、VNC110 株、のゲノム DNA を抽出した。その DNA の MCS を切断する制限酵素で消化し、pSIVmac239 を鋳型に PCR で増やした gag 領域と in vitro で ligation した。ついで、Canary pox 感染 BHK 細胞に transfect して、2 日後にウイルスを収穫した。子孫ウイルスのプラークをランダムに選んでウイルスを回収して、SIV 感染猿の血清と反応するウイルスを SIV gagΔ 株とした。

SIV Gag の発現 : SIV gagΔ 株からの Gag 蛋白の発現を調べるために、HeLa, RK13 又はニワトリ繊維芽細胞 (CEF) に moi3 で感染させて、24 時間後に細胞と培養液を回収した。SIV 感染猿の血清を用いた Western blotting によって Gag 蛋白を検出

した。

SIV Gag の ELISPOT : 免疫したマウス (C57BL6) から脾臓細胞を調製し、SIV p27 の 15mer の overlapping peptide library (計 60 種) で刺激し (ug/peptide/10<sup>5</sup> cells)、24 時間後にインターフェロンガンマ (IFN-γ) を産生する細胞数を mouse ELISPOT kit (R&D Systems) を使い、ELISPOT アナライザー Immunoscan (CTL 社) によってカウントした。

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、1x10<sup>8</sup> 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 ENV ELISA 法によって抗 Env 抗体価を測定した。

C 研究成果

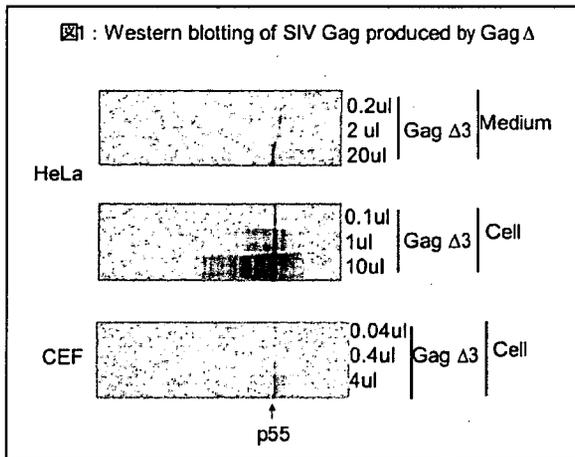
In vitro ligation 法による組み換えワクシニア作成効率 : 本法の効率を調べるために、SIV Gag 以外に A, B 2 種類の遺伝子を発現する組み換えワクシニアを作成し、ランダムにプラークからウイルスを回収して、組み換えワクシニアの占める割合を計算した。表 1 に示すように、全プラーク中の 36% が組み換えワクシニアであった。また、SIVgag 発現 m8Δ 株は従来の方法では作成できず、本方法でのみ成功した事から、本法は効率の良い組み換えワクシニア法であると言える。

表 1 : In vitro ligation 法による  
組み換えワクシニア作成効率

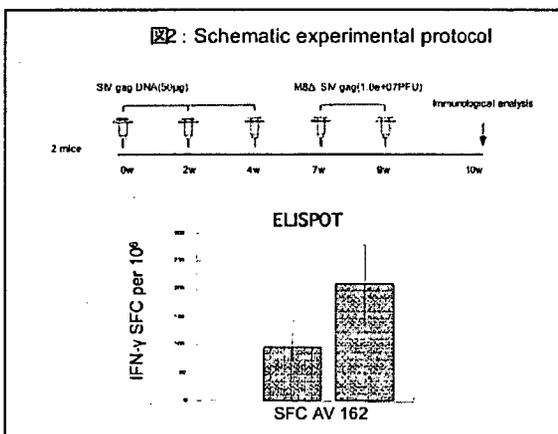
挿入遺伝子	＋プラーク数	全プラーク数	(%)
A	1	1	
B	2	4	
SIV gag	1	6	
合計	4	11	36%

SIV gagΔ 株の性質 : SIV gagΔ の増殖効率は親株の約 1/10 しか無く、Gag 蛋白の大量発現がワクシ

ニアウイルスの増殖に悪影響を与えている事が推察された。図1は SIV gag $\Delta$  株を感染させた HeLa と CEF の細胞と培養上清中の Gag の Western blotting を示している。Protease 領域が含まれていないために、前駆体である p55 が作られている。

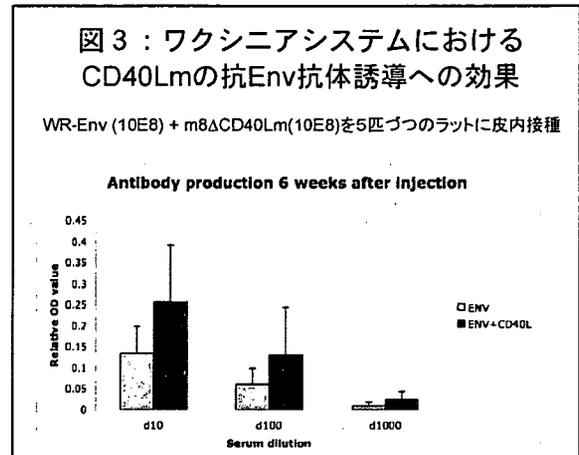


**SIV gag $\Delta$  の免疫原性：**SIVgag $\Delta$  株が Gag に対する CTL を誘導できるかどうかを調べるために、gag 発現 plasmid, pSIVgag とのプライムブスター法によってマウスを免疫し、ELISPOT 分析を行った。pSIVgag 50ug を 2 週おきに 3 回筋注し、2 回 10<sup>7</sup> PFU の SIVgag $\Delta$  を皮内接種する事によりブスターした。免疫したマウスから調製した脾臓細胞を Gag ペプチドで刺激し、Gag 特異的にインターフェロンガンマ (IFN- $\gamma$ ) を産生する細胞数を ELISPOT 法によって調べた。図 2 に示されているように、多数の細胞が IFN- $\gamma$  を生産しており、CTL が誘導されている事が分かった。



**CD40Lm 発現ワクシニアの性質：** 昨年度、免疫活性化因子 CD40 リガンド膜結合型 (CD40Lm) を発現する m8 $\Delta$  CD40Lm を作製した。今年度はその効果をはっきりと調べるために、HIV-1 Env を発現する WR-Env と共にラットに免疫して、抗 Env 抗体価の誘導を Env ELISA を用いて測定した。図 3 に示すように、m8 $\Delta$  CD40Lm をコワクチネーションしたラットは WR-Env 単独接種群よりも、高い

抗体を産生する傾向にあったが、P value を計算したところ有意差は無かった。さらに、ワクチン接種 2 週、又は 10 週後に脾臓細胞、CD4+T 細胞を調製し、gp120 刺激あり又は無しの条件で培養後、IL2, IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-4, IL-10 の生産量を測定したが、有意差は無かった。



#### D 考察

昨年度、in vitro ligation 法によって m8 $\Delta$  株由来の組み換えウイルスを作成する方法を開発した。今年度は同法によって 3 種類の RVV を作成し、効率の良い方法であることを証明した。作成した SIVgag $\Delta$  はニワトリ繊維芽細胞、ヒト細胞共に効率よく Gag を発現し、マウスにおいて抗 Gag CTL を誘導した。今後、頻用されている MVA や DI<sub>s</sub> 株由来の組み換えウイルスとの免疫原性の比較を行い、猿での SIV 感染抑制能を調べたい。

CD40Lm 発現 m8 $\Delta$  は抗体誘導を増強する傾向にはあったが、効果はミニマムであった。DNA ワクチンにおいては CD40Lm は抗体、CTL 両方の誘導に効果的であった。両者の違いの理由として以下が考えられる。①ワクシニア自身が既に十分のアジュバント効果を有しているために、CD40Lm の免疫活性化能を必要としない。②班会議で御教唆をいただいたものであるが、Env と CD40Lm を別々のワクシニアで発現させているために、同じ細胞で両者が発現していない事が効果を減弱させている。②の場合は両者を dual の発現するワクシニアを作成すれば良い事になる。御示唆に感謝して、そのワクシニアを作成して試したい。

#### E 結論

in vitro ligation 法によって 3 種類の組み換えワクシニアを作成し、効率の良い方法であることを証明した。SIVgag $\Delta$  はニワトリ繊維芽細胞、ヒト細胞共に効率よく Gag を発現し、マウスにおいて抗 Gag CTL を誘導した。CD40Lm 発現 m8 $\Delta$  の免疫活性化能はミニマムであった。

## F 研究発表

### 1. 論文発表

Ryo Takayanagi, Takashi Ohashi, Eizaburo Yamashita, Yohei Kurosaki, Kumiko Tanaka, Yoshiyuki Hakata, Yasumasa Komoda, Satoru Ikeda, Yasuko Tsunetsugu-Yokota, Yuetsu Tanaka, Hisatoshi Shida (2007): Enhanced Replication of Human T-cell Leukemia Virus Type 1 in T Cells from Transgenic Rats Expressing Human CRM1 That Is Regulated in a Natural Manner. *J. Virol.* 81: 5908-5918

### 2. 学会発表

高柳亮、大橋貴、志田壽利：HTLV-1 感染ラット細胞株での Foxp3 発現維持における IL-2 の役割、日本ウイルス学会 2007, 札幌

岡田 紘幸. 大橋 貴. 志田 壽利：ラット primary T 細胞での HIV-1 増殖におけるヒト Cyclin T1 と CRM1 の相乗効果、日本ウイルス学会 2007, 札幌

近藤真理子, 鈴木元、大橋貴、志田壽利：ラット TRIM5a 様タンパクの HIV-1 感染阻害作用、日本ウイルス学会 2007, 札幌

毛利友香、鈴木等、志田壽利、高久洋：HTLV-1 Rex タンパク質による RNaseIII-Dicer の活性阻害、日本ウイルス学会 2007, 札幌

鈴木元、大橋貴、志田壽利：ラット T 細胞における HIV-1 複製の前期過程の解析、日本エイズ学会 2007, 広島

高柳亮、大橋貴、志田壽利：Analysis of immunosuppressive function of Foxp3 expressing HTLV-I-infected cells in a rat model, 13<sup>th</sup> Int'l conference on Human Retrovirology HTLV and related VIRUSES. 2007 箱根

## G 知的所有権の取得状況

無し



**研究要旨** Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)の主要な伝播経路が粘膜組織であること、そして感染直後、特に腸管関連リンパ組織 (gut-associated lymphatic tissue : GALT)においてウイルスの爆発的な増殖と T 細胞の消失がおこると考えられていることから、HIV-1 の伝播阻止と GALT におけるウイルスの爆発的な増殖を抑えることを視野に入れた粘膜免疫を誘導するワクチンの開発は重要であると考えられる。分担研究者は、HIV-1 外被糖タンパク質 (ENV) に対する抗体と HIV-1 セカンドレセプター-CCR5 に対する自己抗体を誘導する、HIV-1 の個体への侵入阻止を目指した経口型の HIV-1 defense vaccine の開発を進めている。

本年度は、アカゲザルにおいて、SIV<sub>mac239</sub> Env に対する中和抗体と CCR5 に対する抗体を粘膜及び全身に誘導する経口型の免疫抗原を創出することを目的とする。三量体を形成する SIV<sub>mac239</sub> 由来組換え gp140、アカゲザル CCR5 に対する抗体を誘導させるためのペプチド抗原 cDDR5、M 細胞標的分子 TGDK、そしてアジュバント分子 CpG-ODN をコア抗原 glycerol PEG を介して結合させたコンジュゲート抗原 (Senju vaccine) を免疫抗原としてアカゲザルに皮下注射で鼠径部に 0、1、及び 6 週に免疫した。その結果、SIV<sub>mac239</sub> に対する中和能を有する抗 gp140 IgG 抗体および cDDR5 に対する抗体が血清中に誘導された。興味深いことに、この免疫サルにおいて膺分泌液と糞便中にもそれぞれ抗 gp140 IgA 抗体を検出することができ、膺分泌液中の抗 gp140 IgA 抗体が中和活性を有していることが明らかになった。さらに、その中和作用が長期持続していることも明らかにした。また、同様の抗原を腸溶性カプセルに封入し、アカゲザルに 0、1、及び 6 週に経口投与による免疫を行った。その結果、ワクチン接種群中に膺分泌液中に抗 gp140 IgA が誘導されている個体を検出した。以上の結果より、Senju vaccine が、皮下及び経口投与経路による免疫によって gp140 に対する全身性免疫と粘膜免疫応答を誘導することが明らかになった

## A. 研究目的

HIV-1 初期感染を防止する新規経口 HIV-1 defense vaccine の開発を目指すにあたり、本研究では、アカゲザルにおいて、SIV<sub>mac239</sub> Env に対する中和抗体と CCR5 に対する抗体を粘膜及び全身に誘導する経口型の免疫抗原を創出することを目的とする。

## B. 研究方法

### 1. HIV-1 defense vaccine (Senju vaccine) の調製

多 1 級アミンをもつ glycerol-polyethylene glycol (PEG) polymer (約 168 kD) をコア抗原 (Core-antigen) といい、これに 4 分枝活性エステ

ル PEG の 1 分枝に各種抗原・機能分子 (cDDR5, TGDK, 及び CpG-ODN) を、別々にカルバメート結合を介して調製した各種 Appendix-antigen を時差・連続的に加え、活性エステル基を保持しているコンジュゲート抗原を Multi-antigen とした。これに Vero 細胞発現系より調製した furin 抵抗性変異導入型で C 末端側に MAT-tag 配列を持つ組換え SIV<sub>mac239</sub> gp140 を共有結合および Ni 結合を介して調製した抗原を Senju vaccine (Fig. 1) とした。

乳糖を加えて凍結乾燥してえられた Senju vaccine 粉末を腸溶性カプセルにつめて、カプセルのつなぎ目を紅色糊で塗った。このカプセルを経口用 Senju vaccine とした。

なお、1 回分の抗原量以下に示す通りである。

タンパク質: 183 µg; cDDR5: 90 nmoles; TGDK: 56 nmoles; AB-NTA: 36 nmoles; CpG-ODN: 20 nmoles.

## 2. Senju vaccine のアカゲザルへの免疫

実験動物: 本実験では、メスの中国産アカゲザルを用いた。

皮下注射投与: 調製した Senju vaccine をアカゲザル 1 頭に 1.25 mL ずつ左右の鼠径部に皮下注射で投与した。また、対照群として 1 頭のサルに 3500 kDa の PEG を投与した。0, 1 週に基礎免疫とし投与し、6 週にブーストした。Fig. 2 に示すような採取スケジュールで血清、糞便、膈分泌物をアカゲザルから採取した。

経口投与: 調製した経口用のワクチン抗原をアカゲザル 1 頭に 1 回あたりカプセル 2 個ずつ計 5 頭に経口投与した。また、対照群として 5 頭のアカゲザルに BSA 及び 3,500 kDa PEG を含むカプセルで経口的に投与した。0, 2, 6 週に投与し、Fig. 4 に示すような採取スケジュールでそれぞれのサンプルを採取した。

## 3. 試料の調製法

本実験において免疫・対照アカゲザルのそれぞれから血清、糞便、膈分泌物を採取し、抗体価測定のために用いた。血清の希釈は 0.5% BSA 含有 PBS(-) で行った。糞便はアセトンパウダーを 100 mg 量り、400 µL の 1% MPC 含有 PBS(-) で懸濁後、37°C で 30 分間インキュベートし水中で 1 時間静置した。その後、15,000 rpm で 5 分間遠心して得られた上清を原液として 0.5% BSA 含有 PBS(-) で希釈した。膈分泌物サンプル中には protease が混入している恐れがあるので protease inhibitors を加えた 0.5% BSA 含有 PBS(-) で希釈した。

## 4. 抗 SIV<sub>mac239</sub> gp140 抗体価の測定

ELISA plate の調製は以下のように行った。COVALINK™ NH MODULE (nunc) に PEG を用いて AB-NTA を結合させ、さらに AB-NTA と Ni の錯体形成を利用して三量体 SIV<sub>mac239</sub> gp140 を結合させた。ELISA plate 表面のマスキングにはバックグラウンドを抑えるためにスキムミルクを用いた。ELISA は常法に従い行った。但し、2 次抗体として、POD-conjugated anti monkey IgG antibody、POD-conjugated anti-monkey IgA antibody を用い、IgG および IgA 抗体の検出を行った。

## 5. 中和活性の測定

血清および膈分泌物中に誘導されているケモカインなどによって SIV<sub>mac239</sub> の感染性への影響を除くために、予め血清、膈分泌物を約 24 時間 4°C で透析外液に PBS(-) を用いて Spectra pore: MW cut 100,000 で透析した。中和活性測定には透析後サンプルが目的の希釈倍率になるように 10 mM cDDR5 溶液で希釈した。cDDR5 溶液による希釈は抗 cDDR5 抗体の感染防止効果を除外するために用いた。

中和活性測定は SIV<sub>mac239</sub> を用いた MAGIC5 assay および total virus DNA 測定による post-entry assay により行った。MAGIC-5 assay は常法に従い、post-entry assay は以下の手順で行った。まず、SIV<sub>mac239</sub> (25 ng 量) に serum-free RPMI を加え、cDDR5 溶液で希釈した各サンプル溶液と混合して 30 分間インキュベートした。その後、サル由来の HSC-F 細胞 ( $1 \times 10^6$  cells) に加え 4 時間ウイルスを曝露した。その後 culture media を添加して 24 時間培養し、phenol / chloroform 抽出により viral DNA を抽出した。gag 領域を増幅するプライマーペア及び SYBR Green I を利用した定量的 PCR を行い感染細胞内の total viral DNA を測定した。

## C. 研究結果

### 1. Senju vaccine の調製

調製した Senju vaccine のモデル図を Fig. 1 に示す。ゲルろ過による分子量の測定を行った結果、Senju vaccine がおよそ 500 kDa の高分子であることが確認された (data not shown)。さらに Senju vaccine に共有結合及び MAT-tag を介して SIV<sub>mac239</sub> gp140 がコンジュゲートしていることが、SIV<sub>mac251</sub> gp130 antibody を用いた Dot blot assay によって確認された (data not shown)。

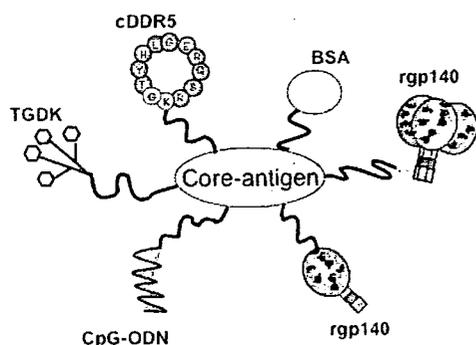


Fig. 1 Senju vaccine のモデル

cDDR5 : Cycloimmunogen for inducing anti-CCR5 antibody;  
TGDK : M cell targeting molecule; CpG-ODN : Mucosal adjuvant and TLR9 ligand. rgp140; SIV<sub>mac239</sub> envelope protein.

### 2. Senju vaccine の免疫原性

調製したワクチン抗原 (Senju vaccine) の免疫原性を検討するため、アカゲザル 1 頭に皮下注射で投与した (Fig. 2)。

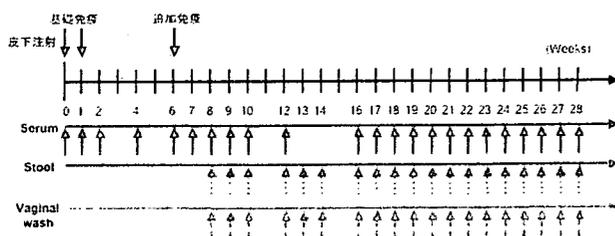


Fig. 2. Immunization and sampling schedule

初回免疫開始後得られた血清、糞便、膣分泌物に

ついてそれぞれ抗 SIV<sub>mac239</sub> gp140 抗体価を ELISA により測定した。その結果、血清サンプル (100 倍希釈) において、4 週目から抗体価 (IgG) の上昇が観察され、3 回目の免疫後にあたる 7 週以降に強い抗体価の上昇が確認された (Fig. 3A)。

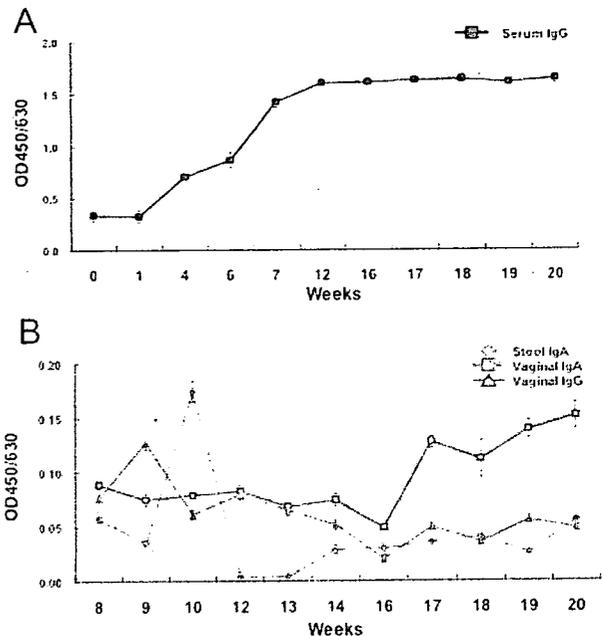


Fig. 3. ELISA for SIV<sub>mac239</sub> gp140 specific antibody

A: SIV<sub>mac239</sub> gp140 specific IgG in serum. B: SIV<sub>mac239</sub> gp140 specific stool IgA and vaginal IgA and IgG.

免疫サルの 0, 7 週の血清を段階希釈で、1, 000、5, 000、及び 10, 000 倍に希釈したサンプルを調製し同様に抗体価を測定したところ、10, 000 倍希釈においても 0 週と比較して高く、7 週の血清のエンドポイントは 10, 000 倍以上であった (data not shown)。糞便サンプル (10 倍希釈) において、10 週において一過性の抗体価 (IgA) の上昇が検出された (Fig. 3B)。抗 CCR5 抗体に関しても同様に 10 週において一過性の抗体の誘導が ELISA によって確認されている (data not shown)。膣分泌物サンプル (10 倍希釈) においては、IgG が 9 週において検出され、IgA については 17 週以降抗体価の上昇が確認された (Fig. 3B)。

### 3. 経口用 Senju vaccine の免疫原性

経口用 Senju vaccine および対照として PEG 3,500 kDa および BSA 含む腸溶性カプセルを、それぞれ雌のアカゲザル 5 頭ずつ経口的に投与し (Fig. 4)、初回免疫前から回収し調製した糞便および膣分泌物サンプル中の抗 SIV<sub>mac239</sub> gp140 抗体価 (IgA) を ELISA により測定した。

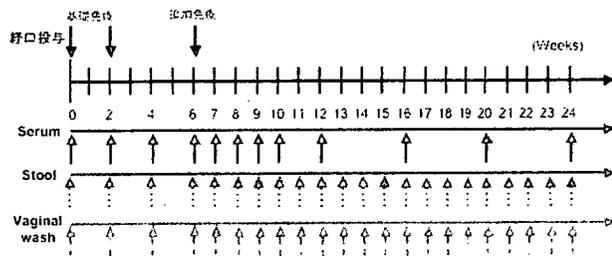


Fig. 4. Immunization and sampling schedule

その結果、糞便サンプルに関しては、免疫群においてそれぞれのサルで異なる抗体価の検出パターンが認められた。Vaccine 接種群において Non-repeated Measures ANOVA 検定で有意差があり Dunnett' s-test の結果、有意差が認められた週は、#6 サル: 10 週において、#7 サル: 8, 10 週において、#10 サル: 6 週において 0 週と比較して有意な抗体価の上昇が検出された。ただし、#8, #9 サルの二頭については今回の抗体価測定方法において検出されなかった (Data not shown)。膣分泌物サンプルに関しては、免疫群において、IgA の抗体価が、①早期から抗体価の上昇が見られ、維持するタイプ (#6 サル)、②一定期間を経て抗体価が上昇するタイプ (#7, #9 サル)、③早期に抗体価があらわれるタイプ (#8, #10 サル)、に大別された (Data not shown)。以上、糞便サンプルおよび膣分泌物サンプルの抗体価に関する概略を述べたが、詳細については現在解析中である。

### 4. 中和活性の測定

免疫原性を確認するために Senju vaccine を皮下注射したサルの血清及び膣分泌物サンプルに

含まれる抗 SIV<sub>mac239</sub> gp140 抗体の SIV<sub>mac239</sub> に対する中和活性を MAGIC-5 assay 及び、post-entry assay により評価した。MAGIC-5 assay の結果、7 週目の血清において、SIV<sub>mac239</sub> に対する中和能が検出され (Fig. 5A)、また 17 週の膣分泌物においても SIV<sub>mac239</sub> に対する中和能が確認された (Fig. 5B)。また Post-entry assay の結果、血清 (Fig. 6A) と膣分泌物 (Fig. 6B) の両方で、それぞれコントロール週の 0 週および 8 週サンプルと比較して有意に proviral DNA copy 数の減少が観察された。

### D. 考察

HIV-1 初期感染を防止する新規経口 HIV-1 defense vaccine の開発を目指すにあたり、本研究では、アカゲザルにおいて、SIV<sub>mac239</sub> Env に対する中和抗体と CCR5 に対する抗体を粘膜及び全身に誘導する経口型の免疫抗原を創出することを目指とした。そのため本研究で調製した経口 HIV-1 defense vaccine (Senju vaccine) の抗原には、以下の 5 つの特徴を備えさせた。1) CCR5 に対する抗体を誘導させるためにアカゲザル CCR5 由来の環状ペプチド cDDR5 をコア抗原 (高分子 PEG) に共有結合させていること。2) 経口により投与されたワクチン抗原をパイエル板の M 細胞から効率よく取り込ませるために、M 細胞標的分子 TGDK (昨年度報告) をコア抗原に共有結合させていること。3) 粘膜アジュバンドとして CpG-ODN をコア抗原に共有結合させていること。4) 三量体 SIV<sub>mac239</sub> gp140 が MAT-tag を介してコア抗原に結合できるようにするために *N*-(5-Amino-1-carboxypentyl) iminodiacetic acid (AB-NTA) を結合させていること。5) 三量体および単量体 SIV<sub>mac239</sub> gp140 をコア抗原に結合させていること。