

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 准教授

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、nef 遺伝子欠失部位に RANTES 遺伝子を組込んだ SHIV-RANTES を作製し、免疫誘導能および感染防御能を解析した。その結果、RANTES 遺伝子を組み込むことにより、免疫誘導能が増強され、強毒 SHIV による攻撃接種後のリンパ系組織におけるプロウイルス量が抑制される傾向が示された。すなわち、RANTES はエイズワクチンにおける免疫アジュバントの候補となりうると考えられた。

A. 研究目的

SIV/ HIV-1 キメラウイルス (SHIV) とアカゲザルの感染・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最終目的とする。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、弱毒生ワクチンによる感染防御機構を解析し、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ことが期待される。

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深部標的組織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

ケモカイン RANTES は、R5 型 HIV-1 のセカンドレセプターとして知られる CCR5 のリガンドの一つであり、ヒトの感染初期に優位に認められる

R5 型 HIV-1 の感染を競合的に阻害する。さらに免疫担当細胞の走化活性等により、免疫増強効果が期待できる。本年度は、RANTES により増殖が抑制されない X4 型の HIV-1 env 遺伝子をもつ SHIV の nef 遺伝子欠失部位にヒト RANTES 遺伝子を組み込んだ SHIV-RANTES を作製し (図 1)、その免疫誘導能および防御効果を調べ、RANTES の HIV-1 ワクチンアジュバントとしての可能性をサル個体レベルにて検討した。

SHIV-RANTES を 4 頭、コントロールとして RANTES を組み込まない nef 遺伝子欠失 SHIV (SHIV-NI) を 5 頭のアカゲザルに 10^5 TCID₅₀ 静脈内接種し、経時的に抹消血中の CD4 陽性細胞数およびウイルス量の推移を調べたところ、免疫期間中、両群共に CD4 陽性細胞数の変動は認められず、ウイルスロードの推移に接種群による差は認められなかった。鼠径リンパ節のバイオプシーを行い感染局所での RANTES 発現を調べたところ、SHIV-RANTES 免疫群では感染局所での RANTES-mRNA の発現量が上昇するとともに、CCR5 発現が減少する傾向が認められた。免疫応答として抗原特異的 T 細胞増殖活性、および IFN- γ 産生細胞数について検討したところ、SHIV-RANTES 接種群ではより強い抗原特異的な T 細胞増殖活性 (図 2) および IFN- γ 産生細胞の増加が認められた。また、免疫 8 週目に抗原性の異なる強毒 SHIV (SHIV-C2/1) を攻撃接種し、その防御効果を検討したところ、SHIV-C2/1 の攻撃接種では両群で感染抑制を認めた (図 3)。特に SHIV-RANTES 免疫群では抗原特異的な T 細胞増殖反応 (図 2) や IFN- γ 産生細胞の誘導が強く、さらに接種後 6-8 週における剖検時、各リンパ系組織における攻撃ウイルスのプロウイルス量がより低い傾向が認められた (図 4)。

D. 考察

SHIV-NI 免疫群と SHIV-RANTES 免疫群において、ワクチン非接種群に比較して、攻撃接種ウイルスの増殖は明らかに抑制されたものの、SHIV-NI 免疫群と SHIV-RANTES 免疫群の間では、攻撃接種後の末梢血における CD4 陽性細胞数やウイルス量の推移に大きな違いは認められなかった。これは SHIV-NI 免疫により既に強力な感染防御能が誘導されているため、今回用いた強毒 SHIV 攻撃接種による実験系では RANTES の効果が見えにくかったものと考えられる。しかし、より詳細な解析によりサル個体において SHIV-RANTES は SHIV 特異的な細胞性免疫応答を増幅し、さらに攻撃接種後においても強い二次免疫応答を誘導することが明らかとなった。しかも攻撃接種後の深部リンパ系組織におけるプロウイルス量が SHIV-NI 免疫群と比較して低く抑制される傾向が示されたことから、RANTES は HIV ワクチン効果の増強に有効である可能性が示唆された。これまで安全性を高めるためのゲノム改変により免疫誘導能が低下してしまったワクチン候補において、RANTES は免疫誘導能を高めるためのアジュバント候補となりうると考えられた。

E. 結論

SHIV の nef 遺伝子欠失部位に RANTES 遺伝子を組み込むことにより、免疫誘導能が増強され、攻撃接種後のリンパ系組織におけるプロウイルス量が抑制される傾向が示されたことから、RANTES はエイズワクチンにおける免疫アジュバントの候補となりうると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Akiyama, H., Ishimatsu, M., Miura, T., Hayami, M., Ido, E.: Construction and infection of a new simian/human immunodeficiency chimeric virus (SHIV) containing the integrase gene of the human immunodeficiency virus type 1 genome and analysis of its adaptation to monkey cells. *Microbes and Infection*, in press.
- (2) 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*, 23: 372-380, 2007.
- (3) 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*, 361: 68-79, 2007.
- (4) 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*, 9: 475-482, 2007.

2. 学会発表

- (1) Ibuki, K., Inaba, K., Fukazawa, Y.,

Matsuyama, M., Hayami, M., Miura, T.: Virological and immunological analysis of systemic lymphoid tissues in SHIV-infected monkeys. 25th annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Sep. 10-13, 2007, Monterey, U.S.A.

(2) Saito, N., Takahashi, M., Shinya, E., Akahata, W., Shimizu, M., Owaki, A., Watanabe, E., Hidaka, C., Kaneko, A., Ibuki, K., Hayami, M., Miura, T., Takahashi, H.: Studies on CD1d-NKT system conserved among species: Importance of primate models for human disease analysis. 25th annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Sep. 10-13, 2007, Monterey, U.S.A.

(3) Matsuda, K., Ibuki, K., Inaba, K., Matsuyama, M., Hirai, K., Yamaguchi-Kabata, Y., Hayami, M., Miura, T.: Construction and in vivo analysis of R5 single tropic virus that shares the same genetic backbone with dual tropic SHIV-KS661. 25th annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Sep. 10-13, 2007, Monterey, U.S.A.

(4) Ibuki, K., Inaba, K., Fukazawa, Y., Matsuyama, M., Hayami, M., Miura, T.: Virological and immunological analysis of systemic lymphoid tissues in SHIV-infected monkeys. US-Japan Cooperative Medical Science Program: 20th Joint Meeting of the AIDS Panels, Sep. 13-14, 2007, Monterey, CA, U.S.A.

(5) Haga, T., Shimizu, Y., Okoba, M., Yamazaki, N., Goto, Y., Ibuki, K., Hayami, M., Miura, T.: Genetically engineered simian-human immunodeficiency viruses that co-express TNF-alpha and RANTES genes

modulate immunity in rhesus macaques. 8th AIDS Seminar in Kumamoto, Sep. 13-14, 2007, Kumamoto, Japan.

(6) 三浦智行、稲葉一寿、深澤嘉伯、松山めぐみ、伊吹謙太郎、速水正憲：「エイズの標的組織は小腸である—霊長類エイズモデルの全身深部組織解析から見えてきたこと、第143回日本獣医学会学術集会、2007年4月3日-5日、つくば。

(7) 松田健太、伊吹謙太郎、稲葉一寿、松山めぐみ、平井郁、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 ウイルスの作成と in vivo 解析、第55回日本ウイルス学会学術集会、2007年10月21日-23日、札幌。

(8) 姫野愛、赤木隆美、伊吹謙太郎、松山めぐみ、平井郁、堀池麻里子、宇都倫史、王欣、馬場昌範、明石満、三浦智行：抗原固定化生分解性ナノ粒子ワクチンのサル免疫実験および SHIV 攻撃接種による感染防御能の評価、第55回日本ウイルス学会学術集会、2007年10月21日-23日、札幌。

(9) 井戸栄治、石松美沙、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 SHIV-prti のサルにおける in vivo 継代、第21回日本エイズ学会学術集会、2007年11月28日-30日、広島。

(10) 石松美沙、鈴木元、秋山尚志、三浦智行、速水正憲、井戸栄治：SIVmac に HIV-1 のプロテアーゼ遺伝子を組み込んだ SHIV-pr の in vivo 継代によって生じた遺伝子変異の解析、第21回日本エイズ学会学術集会、2007年11月28日-30日、広島。

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

SHIV-NI

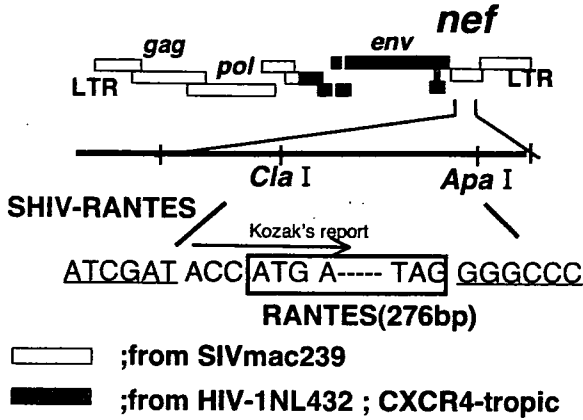


図1 SHIV-RANTES の作製。RANTES により増殖が抑制されない X4 型の HIV-1 env 遺伝子をもつ SHIV の nef 遺伝子欠失部位にヒト RANTES 遺伝子を組み込んだ SHIV-RANTES を作製した。

SHIV-C2/1 チャレンジ後の CD4⁺ T細胞数およびウイルスロードの推移

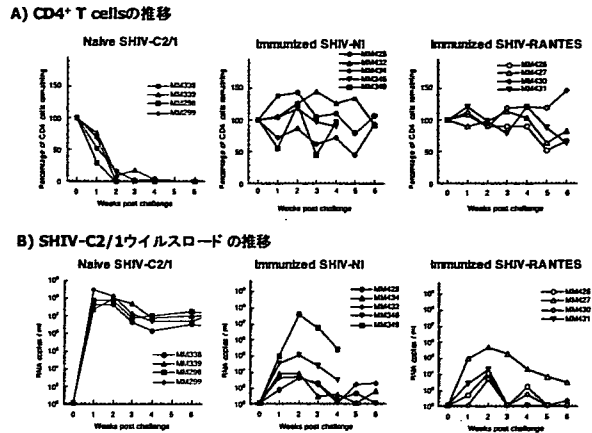


図3 強毒 SHIV-C2/1 攻撃接種後の末梢血 CD4 陽性 T 細胞数および血漿中ウイルス量の推移。ワクチン接種群では、ワクチン非接種群に比較して同程度の感染抑制効果を認めた。

抗原特異的なT細胞増殖反応

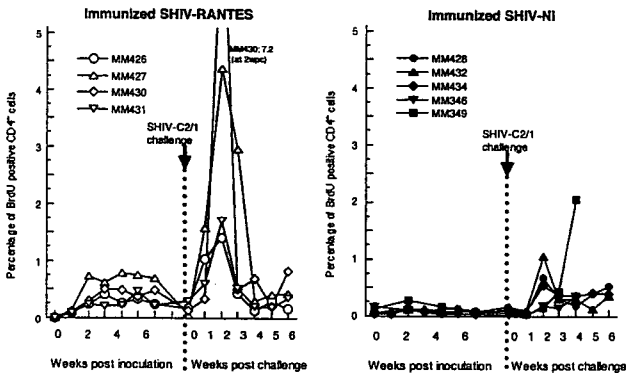


図2 弱毒生ワクチン接種サルにおけるウイルス抗原 (gag-p27) 特異的な T 細胞増殖反応。SHIV-RANTES 接種群では、ワクチン接種後および攻撃接種後に、SHIV-NI 接種群よりも強い抗原特異的な T 細胞増殖活性が認められた。

各臓器におけるプロウイルス量の比較

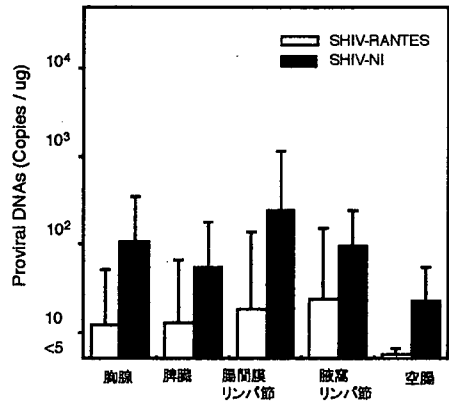


図4 ワクチン接種群の各リンパ系臓器におけるプロウイルス DNA 量の比較。SHIV-RANTES 接種群では、攻撃接種後 6~8 週後の剖検時、各リンパ系臓器における攻撃ウイルスのプロウイルス量が低い傾向が認められた。

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 医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター センター長

研究要旨 新規アジュバントの開発はワクチンの有効利用において多くの利点を備えており、その研究の必要性は周知であるが、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 BCG 等の抗酸菌は強い細胞性免疫(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強い副作用のためにヒトへの使用は禁忌である。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強く誘導された。さらに gp120 ワクチンおよびインフルエンザ HA ワクチン免疫マウスに HIVenv gp120 組み込みワクシニアウイルスもしくはインフルエンザウイルスを投与したところ著明なウイルス抑制効果が *in vivo* で認められ、その効果は細胞性免疫に関連していることが示された。本研究では Ag85B は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を示唆された。

A.研究目的

HIV の感染を予防するためのワクチン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須である。通常リコンビナントタンパクや死菌ワクチンは生ワクチンに比べ極めて安全であり、ワクチンとしては最初に考慮されるものであるが細胞性免疫の誘導は極めて困難である。HIV に対しては gp120 を用いたリコンビナントタンパクワクチンが高い抗ウイルス活性を持つ中和抗体を誘導すること知られており、ワクチンとして期待されたが、HIV 特異的細胞性免疫の誘導が困難であるために現実には使用されていない。

ワクチンによる免疫反応をより効果的に誘導するための一つの方法としてアジュバントがある。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の利用に対しても非常に多くの利点を備えている。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. 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 ワクチンとリコンビナント Ag85B (rAg85B)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。さらに BCG による rAg85B のアジュバント効果に対する影響を検討するために DBA/2 マウスはワクチン投与前に BCG で感作して同様に免疫を行った。

2. 特異的抗体の測定：HIVenv gp120 お

よびインフルエンザウイルス HA に対する特異抗体は ELISA 法にて IgG、IgG1、IgG2a を測定した。

3. ELISPOT アッセイ：HIVenv およびインフルエンザウイルス HA 特異的 ELISPOT アッセイは CD8⁺陽性脾細胞の IFN- γ 産生にて測定した。

4. HIVenv gp120 特異的 CTL の測定：免疫マウスの脾細胞を HIVenv の CTL エピトープペプチドで刺激培養し、エピトープ特異的細胞傷害活性を ⁵¹Cr 遊離法にて測定した。

5. *in vivo* における抗ウイルス活性の測定：免疫マウスに HIVenv gp120 組み込みリコンビナントワクシニアウイルス (HIVenv/rVV) を投与し、5 日後に卵巣より rVV を Real Time PCR (RT-PCR) にて測定した。また、インフルエンザウイルス HA ワクチン免疫マウスにおいてはインフルエンザウイルス PR8 株を 20LD50 投与し、生存率を測定した。

6. 倫理面への配慮：本研究はマウスのみを使用する基礎研究でヒトサンプル、情報等は一切用いていない。

C. 研究結果

1. rAg85B のタンパクワクチンにおけるワクチン特異抗体の誘導：rAg85B と HIVenv gp120 ワクチンを IFA にて混合し、マウスに皮下接種したところ rAg85B 添加群は BCG を含んだコンプリートフロイントアジュバント(CFA)群と同等の高い抗体を誘導した (Fig. 1)。この誘導された特異抗体の IgG のサブクラスを調べたところ、Th2 タイプの抗体である IgG1 では CFA、IFA および IFA に rAg85B を加えたものでは優位な差が認められなかったが、Th1 タイプの抗体である IgG2a は rAg85B により明らかに増強された (Fig. 2)。

2. HIVenv/rVV 投与マウスにおける特異

的 CTL の測定：免疫マウスに HIVenv/rVV を投与し、5 日後に脾細胞での CTL の誘導を検討したところ、CFA 群および IFA に rAg85B を加えたものにおいてのみ高い HIVenv エピトープ特異的 CTL の誘導が認められた (Fig. 3)。同様に免疫マウスの脾細胞中の CD8⁺細胞をエピトープペプチドで刺激し、IFN- γ 産生細胞を ELISPOT にて測定したところ、CFA 群および IFA に rAg85B を加えたものにおいて高い反応が認められた (Fig. 4)。

3. *in vivo* におけるウイルス抑制効果：免疫マウスに HIVenv/rVV を投与し、5 日後に卵巣における HIVenv/rVV を測定したところ IFA に rAg85B を加えたものを免疫したマウスにおいてウイルス抑制が最も著名であり、つぎに CFA を用いたものであった (Fig. 5)。

4. BCG 感作マウスにおける rAg85B アジュバントの効果：マウスを BCG にて感作し、その後同様にリコンビナント gp120 を上述のアジュバントを用いて免疫し、rAg85B アジュバントに対する BCG 感作の影響を検討した。免疫マウスでは γ -IFN 産生を指標とした ELISPOT および *in vivo* での HIVenv/rVV 排除能のいずれにおいても BCG 感作により rAg85B アジュバントの効果は増強された (Fig. 6)。

5. インフルエンザウイルス HA ワクチンにおけるアジュバント効果：インフルエンザウイルス HA ワクチンを gp120 免疫と同様の方法にて免疫し rAg85B のアジュバント効果を検討した。免疫マウスにインフルエンザウイルス PR8 株を 20LD50 チャレンジしたところ生存率は rAg85B 添加 IFA 群および CFA 群で優位に上昇し、その効果は BCG 感作で更に増加した (Fig. 7)。また、免疫マウスでの HA 特異的抗体は BCG 感作にて増強され、その増強効果は Th1 タイプの抗体である IgG2a で著明であった (Fig. 8)。

免疫マウスの脾細胞における HA 特異的 IFN- γ の産生を見たところ BCG 感作で著しく増強されていることが認められた (Fig. 9)。さらにこれら免疫マウスの脾細胞では IFN- γ のみならず Th1 タイプのサイトカインであるインターロイキン (IL)-2 および IL-12 の誘導も認められた (Fig. 9)。これら免疫マウスにウイルスチャレンジをし、HA 特異的 CTL 活性を ^{51}Cr 遊離法および ELISPOT アッセイにて測定したところ、rAg85B 添加アジュバントで最も活性が高くその活性は BCG 感作にて増加されていた (Fig. 10)。

D. 考察

エイズウイルス感染症に対するワクチンでは液性免疫に加え細胞性免疫の誘導が必要であると考えられており、そのために細胞性免疫誘導型のワクチン開発が主に行われている。細胞性免疫誘導が行われる代表的なワクチンは弱毒化した生ワクチンが考えられるが、エイズウイルス感染症では安全性が保障されないことから現在までに使用はされていない。死菌ワクチンであるリコンビナントタンパクワクチンは分子生物学的技術により精製度の高い蛋白が安全かつ大量に安定して得ることが出来るために B 型肝炎ウイルスワクチン等では実用的に使用されている。エイズウイルスに対しては env タンパクである gp120 のリコンビナントタンパクがワクチンとして作製されており、DNA ワクチン等では誘導が困難な中和抗体も高い活性を持って誘導することが出来る。しかしながら通常の死菌ワクチンと同様に細胞性免疫の誘導が困難であり実用化はされていない。rAg85B アジュバントはワクチン抗原に対する免疫反応を増強し特に強く Th1 に誘導する。本研究ではエイズウイルス gp120 およびインフルエンザウイルス HA ワクチン免疫マウスにおいてウ

イルスの攻撃接種時において速やかに強い細胞性免疫を誘導することが示された。このことからリコンビナントタンパクワクチンの免疫でも実際のウイルスに接した時に細胞性免疫が誘導され感染防御に有効に働くと考えられた。本研究においても rAg85B アジュバントを用いると生体内でのウイルスの産生が細胞性免疫によって抑制されていることが示された。本研究で行った Ag85B を用いた新規ワクチンアジュバントは効果が不十分であるために使用されていない既存のワクチンに対して新たな可能性を示した。今後、他のワクチンと組み合わせで中和抗体を誘導し、かつ、細胞性免疫の誘導も可能なワクチンの開発に結び付けるべく研究を推進していく必要が示唆された。

E. 結論

抗酸菌 α 抗原がワクチンのアジュバントとして有効である可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tanaka-Takahashi, Y., Yasunami, M., Naruse, T., Hinohara, K., Matano T., Mori, K., Miyazawa, M., Honda, M., Yasutomi, Y., Nagai, Y. and Kimura, A. Reference strand-mediated conformation analysis (RSCA)-based typing of multiple alleles in the rhesus macaque MHC class I Mamu-A and Mamu-B loci. *Electrophoresis* 2007;28:918-924.

2) Nishikubo, K., Imanaka-Yoshida, K., Tamaki, S., Hiroe, M., Yoshida, T., Adachi, Y. and Yasutomi, Y. Establishment of a novel animal

model of myocarditis by utilizing different immune responses to Bacillus Calmette-Guérin (BCG) in mice. *J.Autoimmun.* 2007 ; 29:146-153.

3) Yasuhiro Yasutomi. Chimeric recombinant hepatitis E virus-like particles presenting foreign epitopes as a novel vector of vaccine by oral administration. Holland,CR. and Miyamura,T Eds. Structure-based viral replication. World Scientific Publishing,2007.

4) Okabayashi,S., Ohno,C., Kato,M., Nakayama H., Yasutomi,Y. Congenital cystic adenomatoid-like malformation in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*).

Vet. Path. in press.

2.学会発表

1) 唐松克夫、清水佑也、松原明弘、石川豊数、保富康宏：

抗酸菌分泌抗原 Ag85B の新規アジュバントとしての可能性. 第 11 回日本ワクチン学会 (横浜)

2) 松原明弘、唐松克夫、保富康宏：IL-4 変異体を用いたヘルパーT 細胞(Th)反応調節によるインフルエンザウイルス感染の制御. 第 11 回日本ワクチン学会 (横浜)

3) 岡林佐知、中山裕之、保富康宏：実験用カニクイザルに認められた新生仔奇形の一例・・・第 114 回日本獣医学会

4) 保富康宏：特別講演「粘膜に対する遺伝子免疫療法による疾患制御」日本臨床化学会

H.知的財産の出願・登録状況

1) α 抗原のワクチンにおけるアジュバント剤としての利用 (出願中、特開

2002-114708)

2) α 抗原のアレルギー性疾患治療剤としての利用 (出願中、PCT/JP/01459)

3) リポソームワクチンの作製法 (出願中、PCT/JP2006/303371)

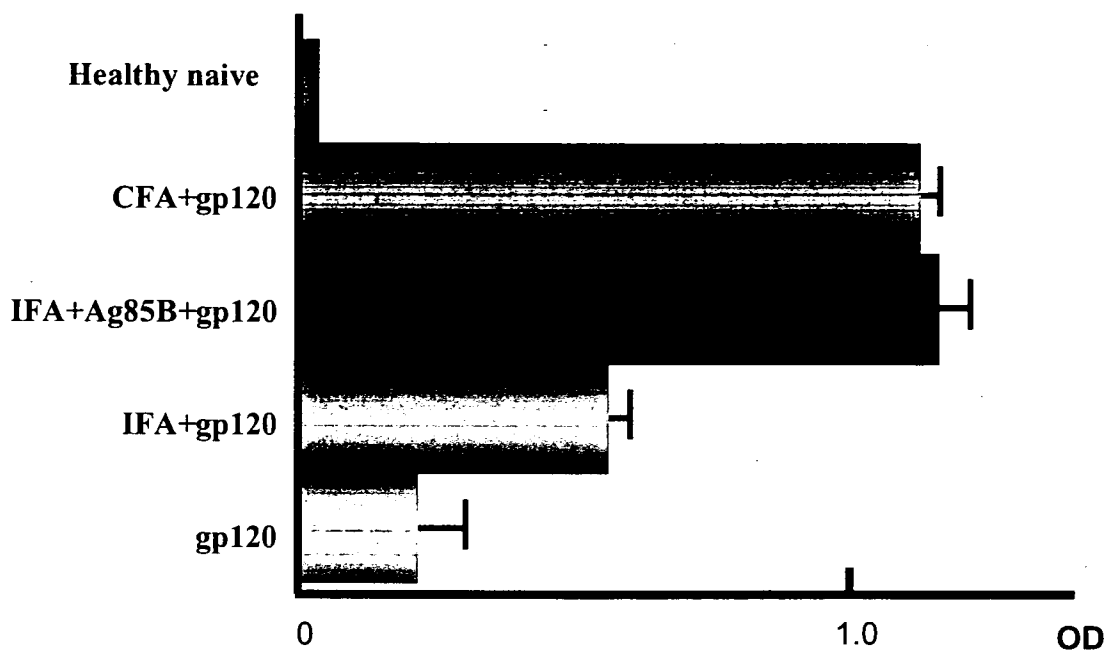


Fig. 1 gp120特異的抗体誘導

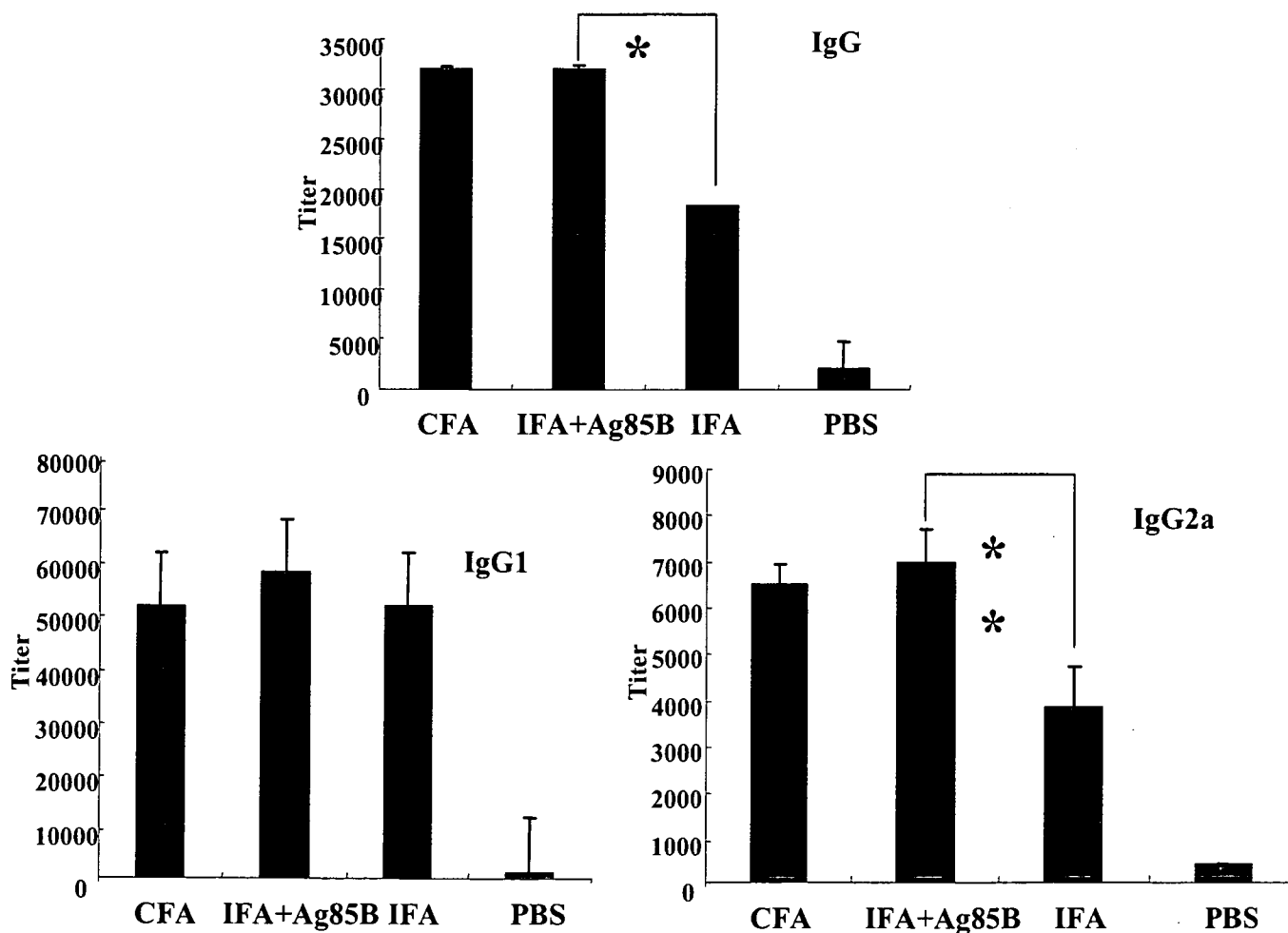


Fig. 2 gp120特異的IgG抗体サブクラス

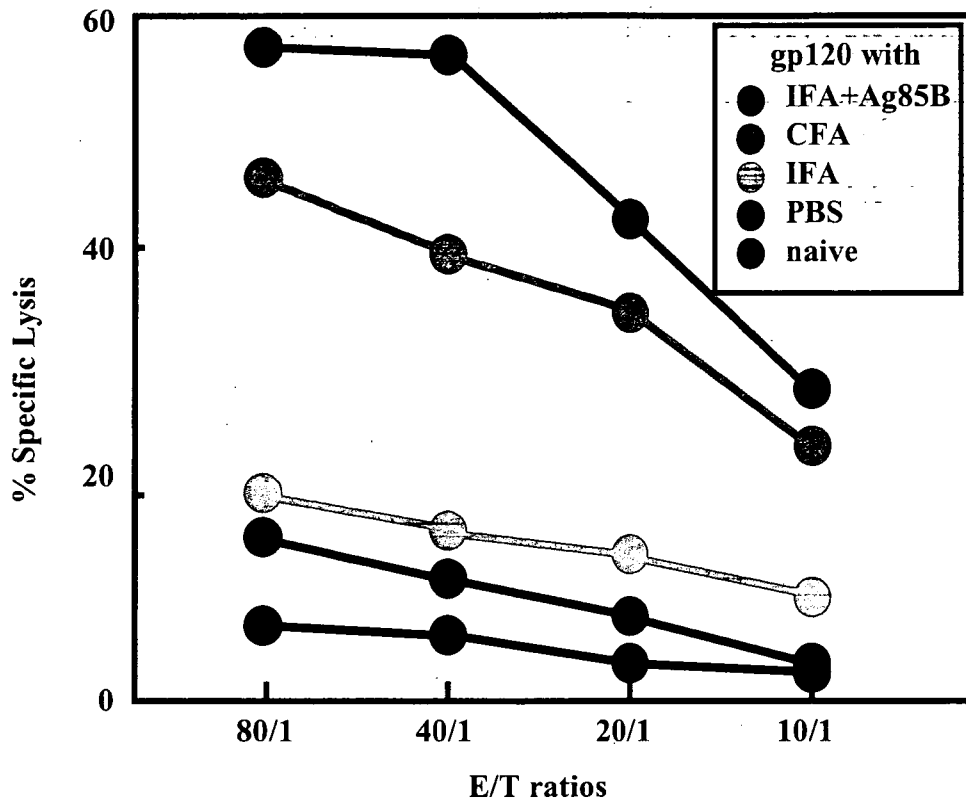


Fig. 3 gp120特異的CTLの誘導

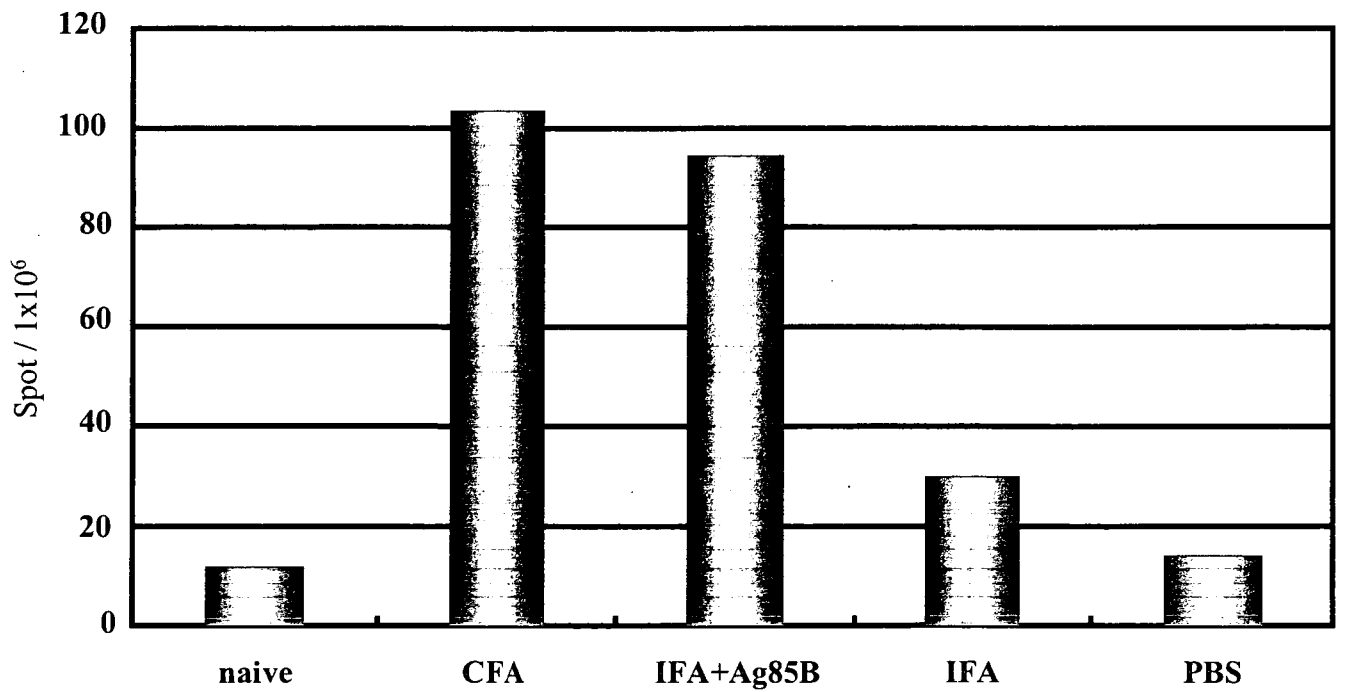


Fig. 4 gp120特異的ELISPOTの誘導

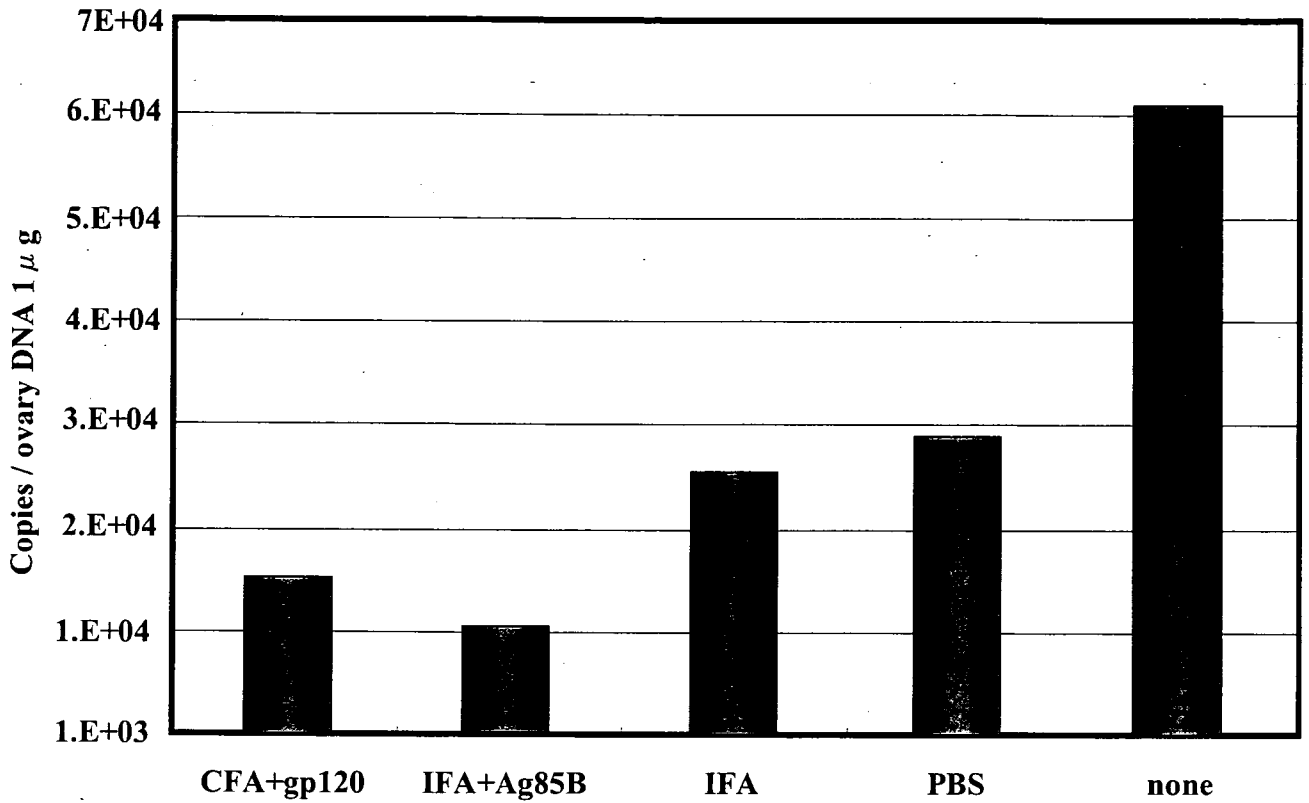


Fig. 5 in vivoでのHIVenv/rVV排除

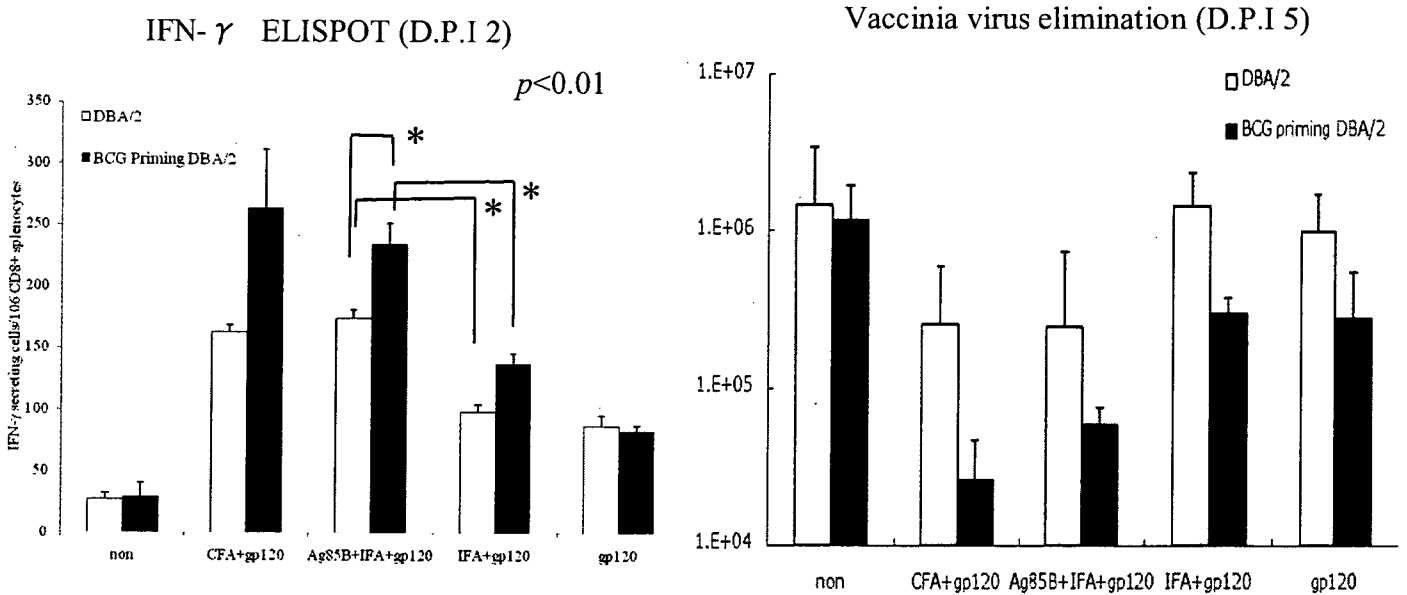


Fig. 6 gp120特異的細胞性免疫反応およびHIVenv/rVV排除能に対するBCG感作の影響

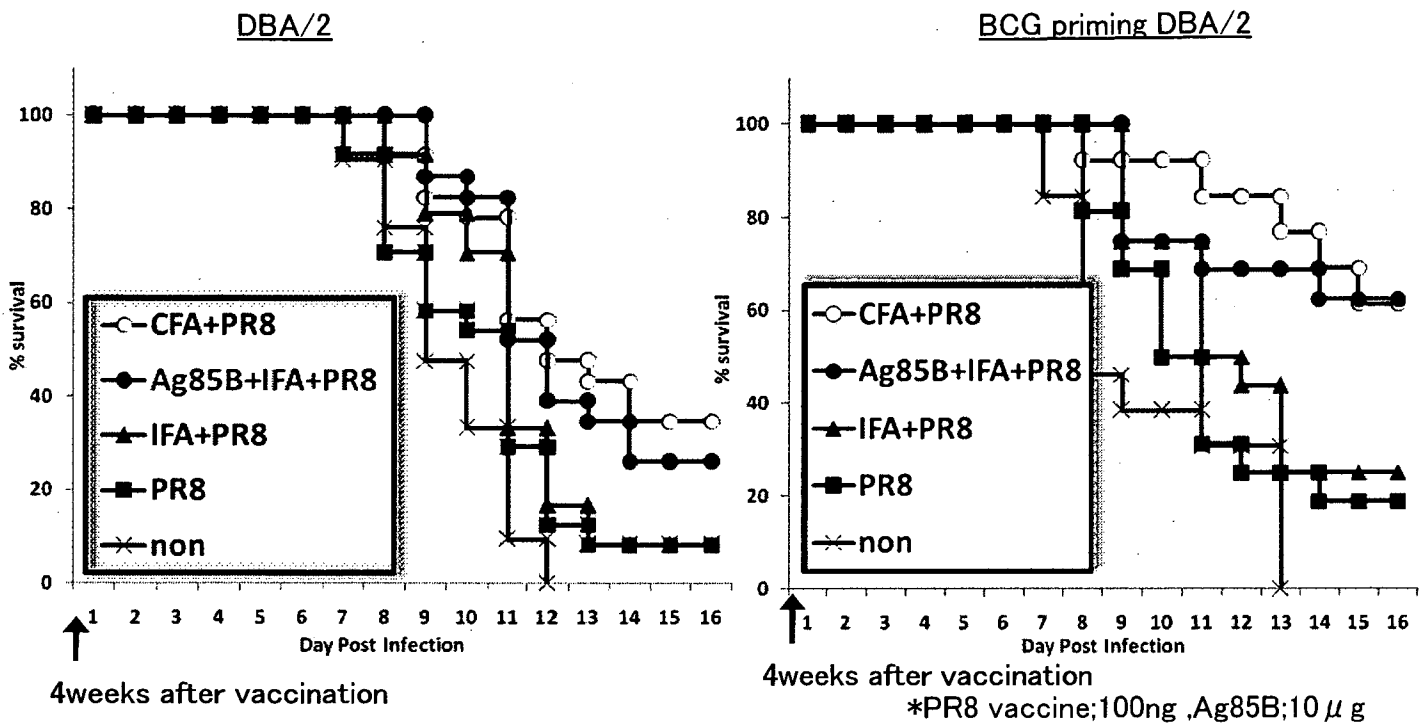


Fig. 7 インフルエンザウイルスHAワクチンにおけるアジュバント効果

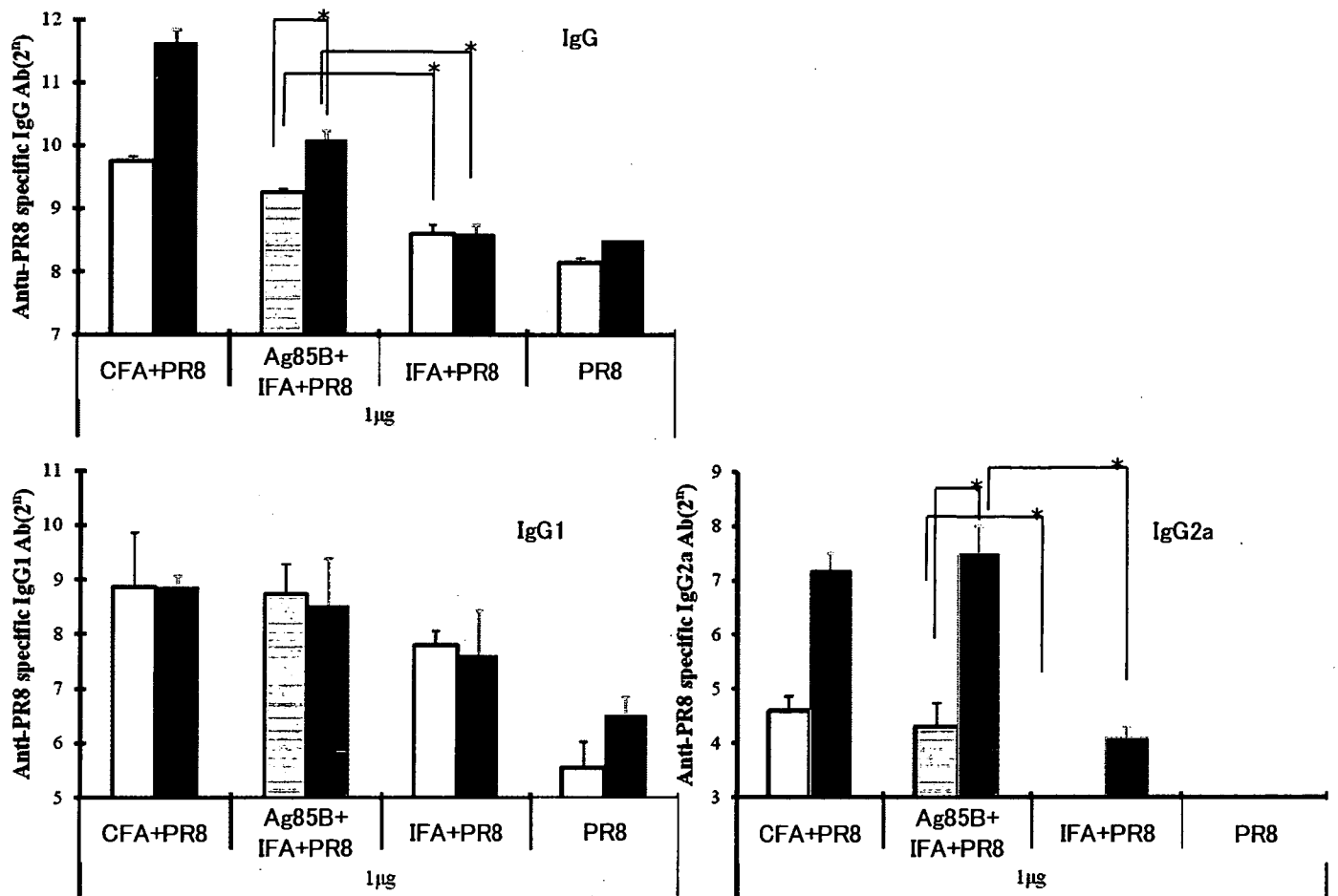
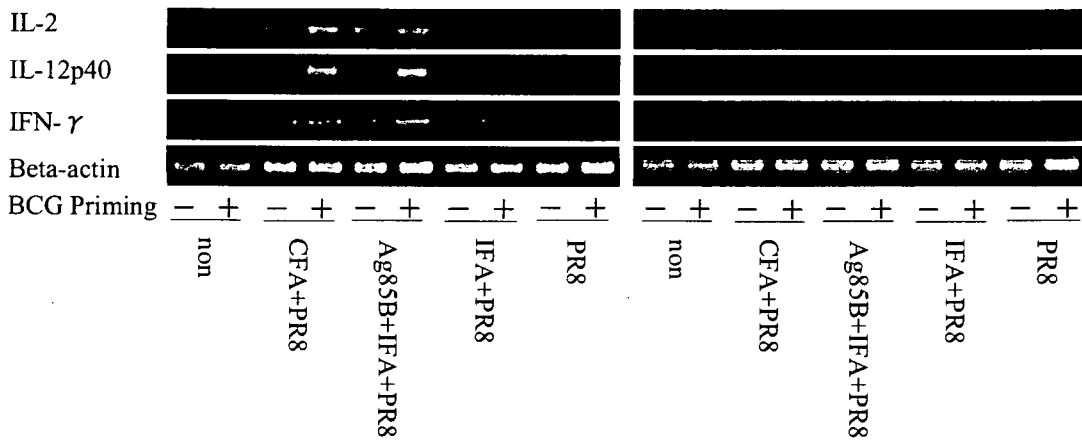
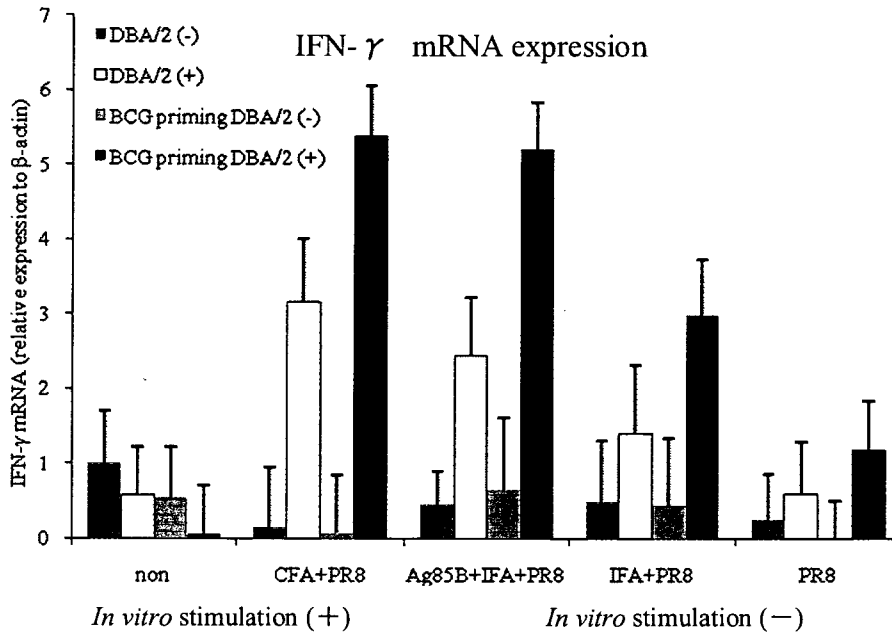
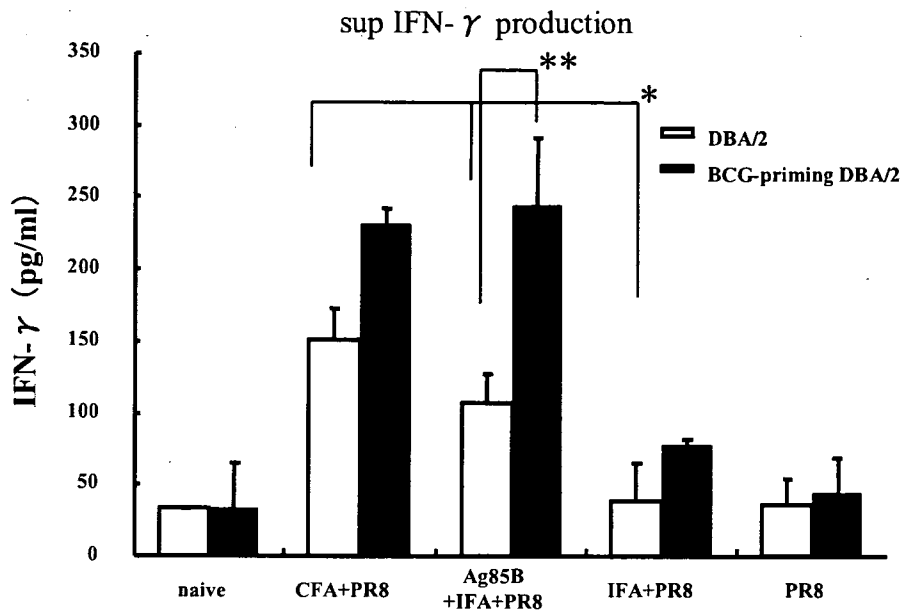


Fig. 8 インフルエンザウイルスHAワクチン免疫におけるIgGサブクラス



*PR8 vaccine; 1 μ g, Ag85B; 10 μ g

Fig. 9 インフルエンザウイルスHA特異的サイトカインの産生

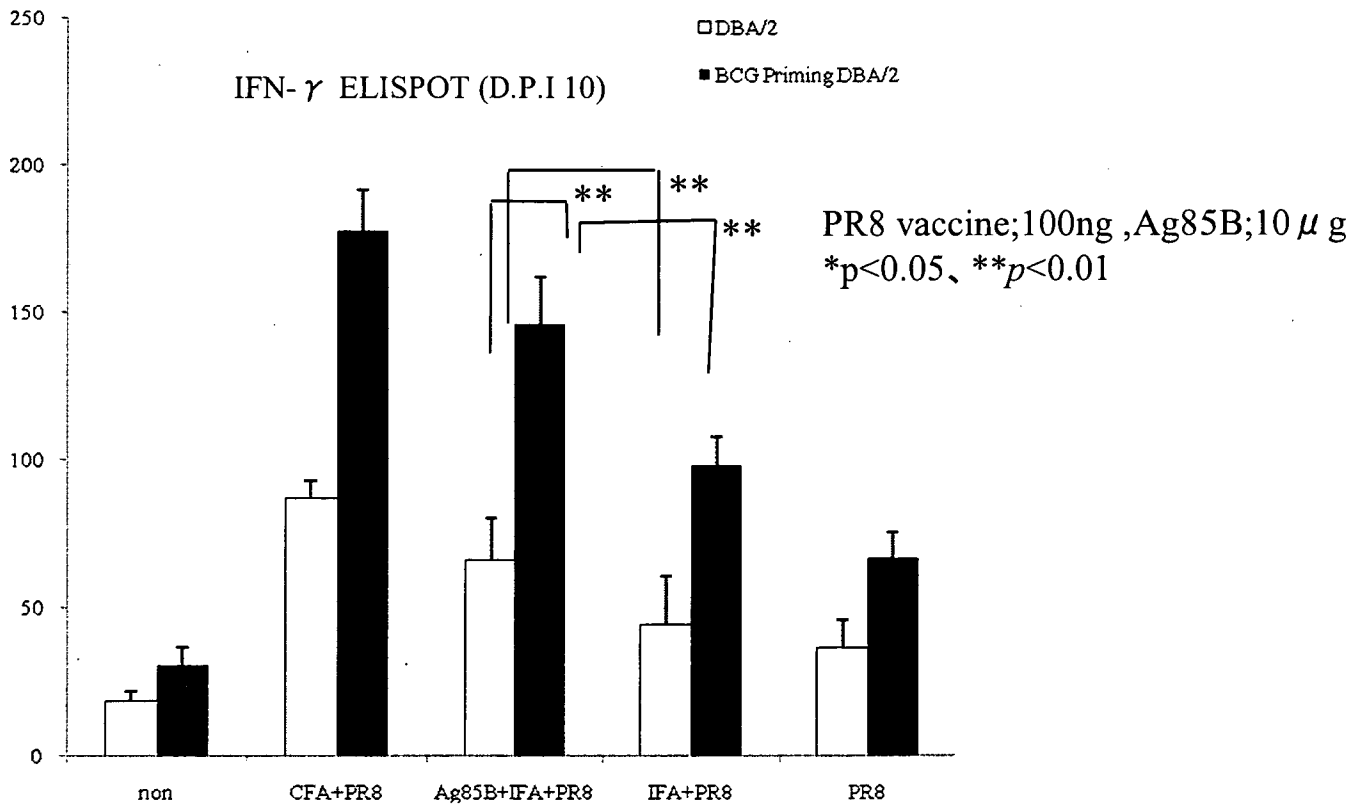
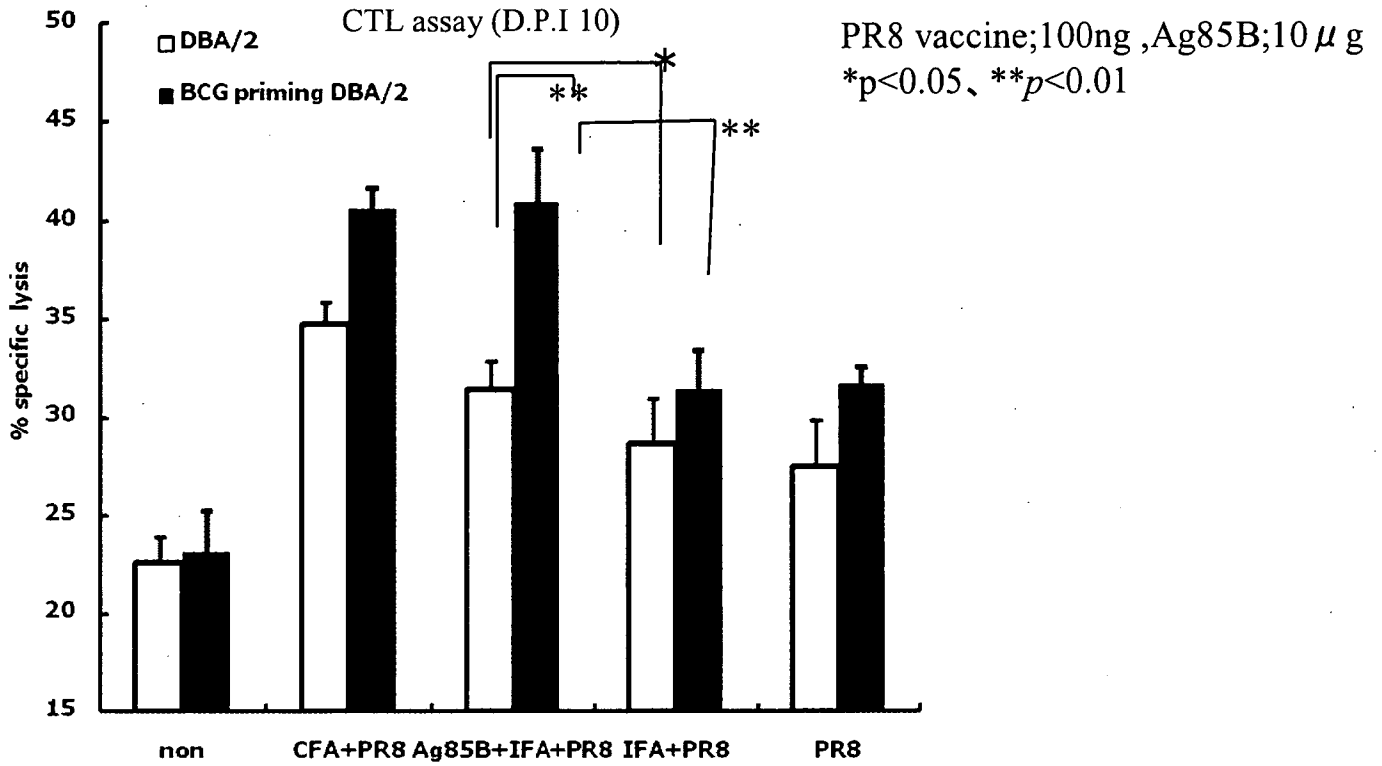


Fig. 10 インフルエンザウイルスHA特異的CTLの誘導

厚生労働省科学研究費補助金（エイズ対策事業） 分担研究報告書

ワクチンアジュバント開発と動物実験

分担研究者 石川 晃一 国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官

研究要旨 HIV ワクチン実現の為に持続的かつ効率的な粘膜免疫アジュバントの検討を行った。昨年度までに同定したキトサン関連物質を主に使用し、マウスにおいて OVA あるいは HIV-1env タンパク質をアジュバント候補と混合し経鼻免疫を行いその抗体反応を解析した。その結果ある種のキトサンが粘膜免疫アジュバントとして知られているコレラ毒素と同等の抗体価を示した。キトサンの誘導体のうち、キトサン微粒子とカチオン化キトサンに高いアジュバント活性を認めた。またカニクイサルを使用した基礎検討においても副作用を認めず、個体差があるものの経鼻投与によるアジュバント活性を抗体産生能により確認した。

A. 研究目的

性行為感染症においてワクチンが存在するのは B 型肝炎のみである。残念ながら HIV 感染を阻止しえるワクチンは未だ存在しない。大多数の HIV 感染は性行為感染とされ、ウイルスの侵入門戸である生殖器粘膜でウイルスが排除されれば感染阻止は可能と考えられている。しかしながら未だ粘膜組織上に感染阻止に有効な CTL および IgA を誘導したという報告は無い。近年、ワクチン開発の分野では DNA を直接個体に接種することで免疫を誘導する DNA ワクチンが脚光を浴びている。しかしながら、そのワクチン候補の抗原あるいは遺伝子配列の特定は未だなし得ず有効な感染阻止ワクチンの作成にはいたっていない。また、現在の DNA ワクチンでは免疫誘導能が著しく低いため、DNA ワクチン用の免疫誘導アジュバントあるいは標的細胞への DNA のデリバリー (DDS) 方法の開発が急務である。本研究では各種アジュバント (キトサン、CT 等) との組合せによる粘膜免疫誘導能の解析を行う。本研究は単に HIV のみならず、種々の感染症に対するワクチンの基盤開発にもつながり、医療分野では HIV 感染症の予防・治療用医薬品の開発以外にも、他のウイルス感染症、細菌・寄生虫に対するワクチン、癌に対する免疫療法剤の開発が考えられる。また、DNA ワクチンの場合従来型のワクチンと異なり、成分蛋白を大量製造、精製する必要がなくなるため、ワクチ

ン開発期間の大幅な短縮が図れ、重要疾患に対するワクチンを極めて迅速に提供する事が可能となる。DNA ワクチンの開発は文献的にも世界中で多くの研究者が取り組んでいるものの、安全かつ効果的なアジュバントがない故に実用化に至っていない。アジュバントに関しては実験的には CT (コレラ毒素) が強い活性を示す事が知られているが、人への投与は不可能だと考えられている。

B. 研究方法

1) マウス: BALB/c マウス♀6-8 週齢およびポリメリックイミュノグロブリンレセプター (pIgR) ノックアウト (KO) マウス (以後 pIgRKO マウス) を用いた。pIgRKO マウスは粘膜上に分泌されるべき IgA が血中に滞留するマウスである。通常、マウスは 1 群 5 匹とした。

2) OVA および HIV-1 タンパク質を用いたキトサンのアジュバント活性の検討: 表 1 に示すようなキトサン誘導体等を作成し使用した。OVA は 5 μ g/2 μ l とし HIV-1 env タンパク質 (g p 41、g p 120 の c 末を含む。PTT 社製) は 10 μ g/10 μ l とし、週 1 回、3 週にわたり免疫を行い経時的に血中および腔洗浄液中の IgG 抗体および IgA 抗体を測定した。pIgRKO マウスに関しては血液のみの採取を行った。

3) 抗体検出: ELISA 法により OVA および HIV-1

env タンパク質特異的 IgG および IgA 抗体を検出した。

4) 免疫ルートの検討: 経鼻および経皮のルートを検討した。経鼻に関してはエーテルを用いた軽麻酔下でマイクロピペットにより鼻腔内へ滴下した。経皮免疫実験ではパッチテスト用テープ (レギュラーサイズ) を用い、OVA 溶液とアジュバント溶液を混合し、剃毛および脱毛したマウス背側部へ 24 時間貼付した。その後不定期に同様な操作を行い血中抗体価の推移を観察した。

5) カニクイサルを用いた経鼻免疫実験
メスのカニクイサル (5-10 歳) 6 頭を使用した。抗原として OVA を 300 μ g アジュバントはキトサンおよび PolyIC とともに 1mg とし、カチオン化キトサン 2 頭、キトサン微粒子 2 頭、PolyIC 誘導体 1 頭および OVA 単独コントロール 1 頭に経鼻投与を毎週 1 回、3 週にわたりおこなった。

(倫理面への配慮)

本研究ではマウスおよびサルを使用するため事前に研究計画を作成し実験手技および動物愛護に関し当研究所動物実験委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1) OVA を用いたキトサンのアジュバント活性

図 1 に示したマイクロパーティクル状のキトサン (CFP) およびカチオン化キトサン (CC) に高いアジュバント活性が認められた (図 2、図 3)。またこれまで粘膜免疫アジュバントとしての効果がよく知られているコレラ毒素 (CT) より高いアジュバント活性が認められた。また 4 回目の免疫によるブースター効果も顕著に認められた。腔洗浄液および糞便において IgA の検出を試みたが (BALB/c)、腔洗浄液ではデータのばらつきが多く、糞便においては抗体は検出されなかった。

2) 経皮免疫効果

図 4 に経皮免疫による抗体産生の経時変化を示した。CT およびコレラ毒素 B サブユニット (CTB) が少量で高い抗体価を誘導したがキトサン系は低い抗体価であり OVA 単独の場合よりも低い値であった。

3) HIV-1env タンパク質を用いたキトサンのアジュバント活性

先に得られた結果より、CC および CFP を用いて市販されている HIV-1env タンパク質とを混合して経鼻接種を pIgRKO マウスを用いて行った。その結果 IgA に関しては CT よりも抗体産生能は低かったが IgG に関しては CC が CT より高い活性を示した。図 5

4) カニクイサルを用いた経鼻免疫実験

個体差はあるもののキトサンおよび PolyIC 誘導体にアジュバント活性を認めた。図 6

また血液生化学的検査で特に免疫前と免疫後に副作用等を示す異常は認められなかった。

D. 考察

粘膜免疫誘導を第一義と考え免疫ルートの検討を行ってきたが、経鼻免疫においては、若干の個体差は見られるものの抗体価は大きな差異は見られず、サルやヒトへの応用を考えると最も実際的な免疫経路だと考えられた。また最近の報告では経鼻免疫が経腔免疫と同様に腔内への抗体産生を誘導し、さらに気道や肺胞内にも特異的抗体を誘導することが示され、呼吸器感染症と性行為感染症の両方のワクチン開発に経鼻免疫が有効である事が示唆されている。またより簡便で安全性があると考えられる経皮免疫に関して今年度は若干の検討を行った。その結果、これまでの報告通りコレラ毒素に強いアジュバント活性が認められた。しかしながらキトサンにはそれを認めなかった。コレラ毒素の粘膜への投与はその安全性が危惧されているが皮膚への応用は追加免疫での使用等の応用への検討に値するかもしれない。

OVA を抗原としてのキトサンのアジュバント活性の検討においては、カチオン化キトサンとキトサン微粒子が高いアジュバント活性を示した。ただしその使用量は CT の数十倍であることから、今後さらにカチオン化度や粒子径の検討を行いより少量でアジュバント活性を示す本態を検討したい。カニクイサルを使用した投与実験においてもキトサンおよび PolyIC 誘導体にアジュバント活性が認められ、副作用も認めなかった。アジュバントの条件とされる安全性、価格、有効性を現時点はクリアできると考えている。来年度は中和エпитープを含

むHIV-1 envタンパク質の免疫を行い、中和活性および細胞性免疫の解析をマウスで行う予定である。

E. 結論

今回の研究より、ワクチンアジュバントとしてキトサン誘導体および PolyIC 誘導体が経鼻免疫による粘膜免疫誘導に有効である可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第11回日本ワクチン学会学術集会 2007年12月8-9日横浜

1)キトサン関連物質の粘膜免疫アジュバント活性

2)粘膜免疫アジュバントを用いた抗 HIV 抗体産生能の検討

第21回日本エイズ学会 11月28-30日広島

1)各種アジュバント候補を用いた抗 HIV 抗体産生能の検討

2)shRNA,Decoy RNA 共発現レンチウイルスベクターによる HIV-1 複製阻害効果の検討

H. 知的所有権の出願・登録状況

免疫アジュバント①特願2007-192362

免疫アジュバント②特願2007-192363

IgA抗体測定方法特願2007-192364

図1

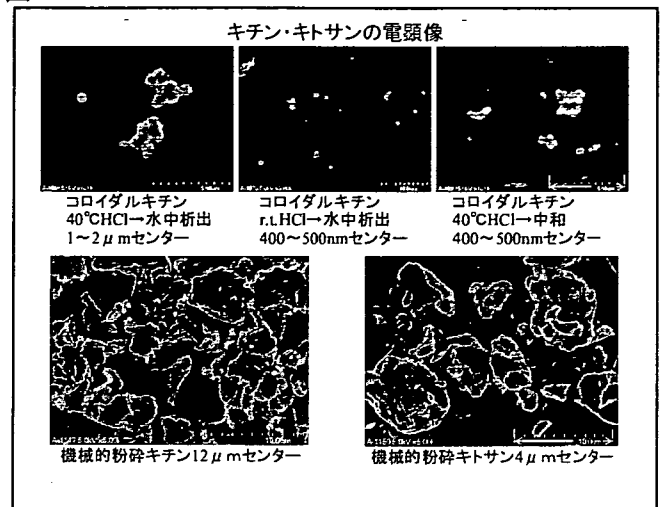


図2

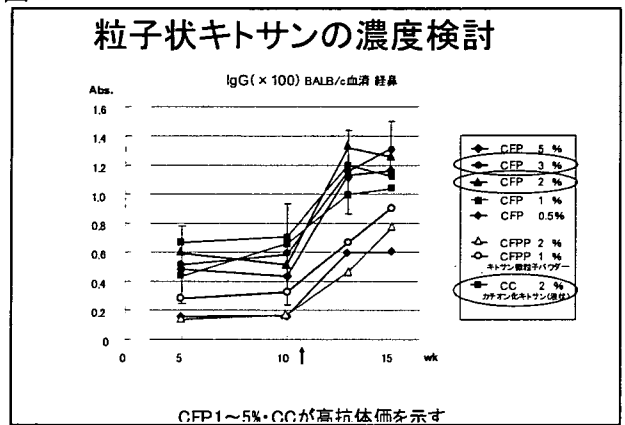


図3

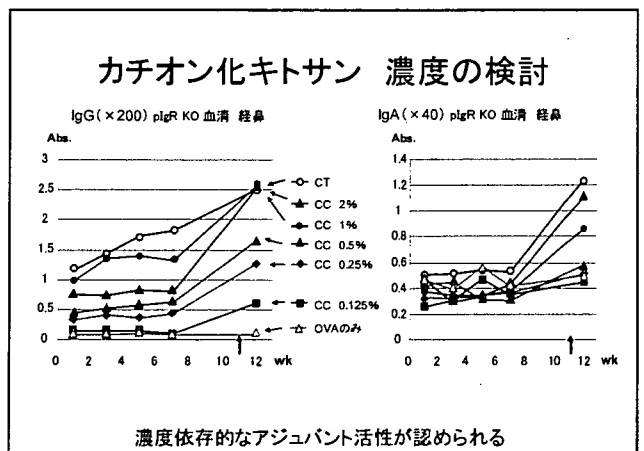


図 4

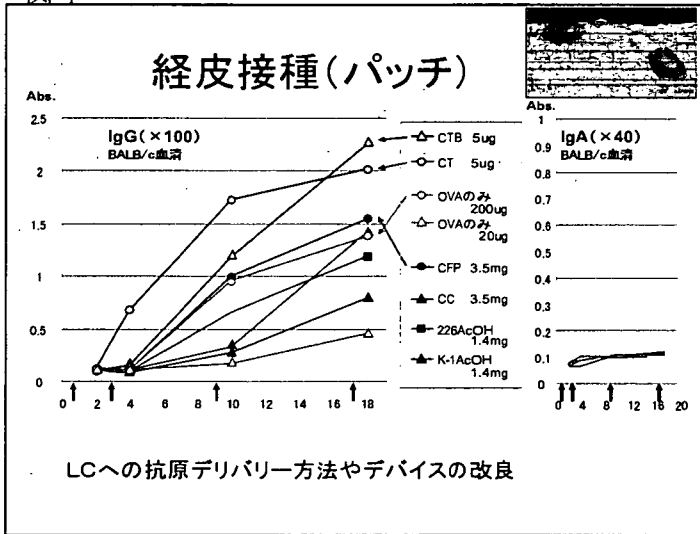


図 5

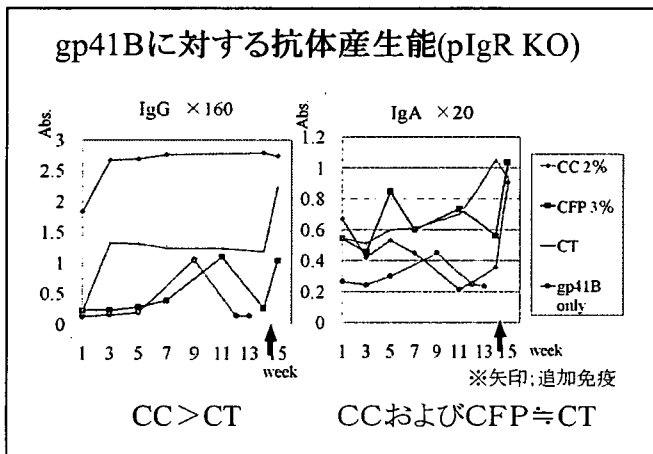
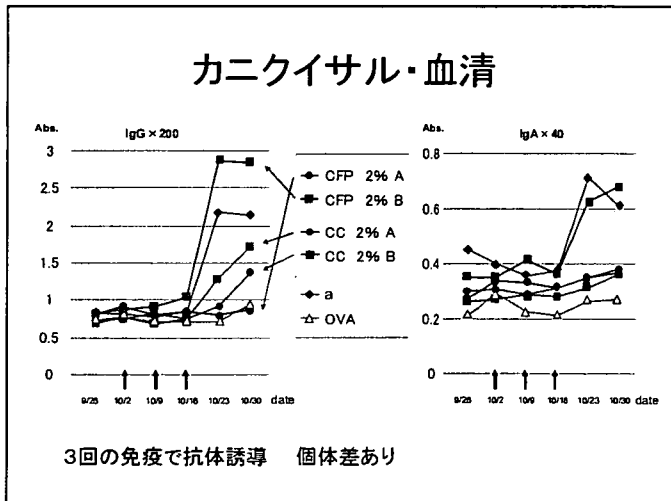


図 6



粘膜免疫賦活によるエイズウイルスの制御：
活性型 CTL の粘膜誘導とその作用

分担研究者 高橋 秀実 日本医科大学微生物学免疫学教室 教授

研究要旨

HIV 感染の制御において、ウイルス感染細胞そのものを傷害、排除する CD8 陽性キラーT 細胞(CTL)を誘導することは非常に重要である。抗体を持たず CTL のみを有するマウスを作成しウイルスを接種し検討を重ねた結果、マウス小腸粘膜内の上皮内リンパ球 (IEL) 中における特異的な CTL が、最も強く且つ特異的な抗ウイルス作用を示すことを確認した。こうした IEL 中の CTL を効率よく誘導する方策を検討する目的で、OVA とコレラトキシン(CT)を経口投与し小腸粘膜内の IEL ならびに脾臓細胞中の CTL 誘導状況を及び細胞傷害活性を同系腫瘍を標的として測定したその結果、強い細胞傷害能を有する CD8 α β 陽性の CTL が粘膜内 IEL 中に誘導されることを見出した。この活性化は CT のサブユニットである A-サブユニット(CTA)と B-サブユニット(CTB)との併用では誘導されなかった。こうした IEL 内 CTL の個体内における作用を検討するため、胃粘膜に OVA エピトープを発現した同系腫瘍 E. G7-OVA を接種した後、CT と OVA を経口投与したところ、腫瘍の発育が強く抑制されるとともに、この E. G7-OVA を皮内に接種した場合にも、同様の経口投与により顕著な腫瘍抑制効果を確認した。このような皮膚・粘膜における腫瘍抑制効果は、OVA 抗原を CT とともに経口投与した場合に最も顕著に認められ、腹腔内投与 (i. p.) あるいは皮下投与 (s. c.) 投与ではほとんど認められなかった。こうした結果は、CT などのアジュバントとウイルス抗原の経口投与による粘膜 IEL 内の特異的 CTL の活性化こそが、体表面からのウイルス侵入に対する防御網構築の要であることを示している。

A. 研究目的

HIV 感染の制御において、ウイルス感染細胞そのものを傷害、排除する CD8 陽性キラーT 細胞(CTL)を誘導することは非常に重要である。CTL によって実際にウイルスそのものを制御出来るか否かを検討する目的で、我々は HIV 外被糖蛋白 gp160 内の V3 領域内に存在する CTL エピトープ P18: RGPGRFVTI)に着目し、P18 特異的な CTL クローン (RT-1) の T 細胞レセプターを発現したトランスジェニックマウスを作成し (図 1)、この抗体を持たず CTL のみを有するマウスに、P18 を発現させた組み換えワクチニアウイルス (rVV-EA2) を接種し、検討を重ねてきた。その結果、マウス小腸粘膜内の上皮内リンパ球 (IEL) 中における P18 特異的な CTL が、最も強く且つ特異的な抗ウイルス作用を示すこと (図 2)、ならびにこの CTL によってトランスジェニックマウスに接種した rVV-EA2 の卵巣内における増殖性が、特異的に抑制されることを確認した。

そこで本研究では、小腸粘膜 IEL 中に特異的 CTL を効率よく誘導するための方策を検討する目的で、当初 HIV-1-gp120 蛋白をコレラトキシン(CT)と共に経口投与し、P18 特異的な CTL が IEL 中に誘導されるための要件を探ったが、この HIV-1-gp120 蛋白自体が非常に高価であり、且つ大量の入手が困難であったことより、安価で特異的 CTL の誘導が可能であること、ならびにその認識エピトープのアミノ酸配列および MHC 拘束性が判明している OVA を用いて、CT を利用した経口免疫法による IEL 中の CTL 誘導状況を追跡した。この際、コントロールアジュバントとしてコレラトキシンのサブユニットである A-サブユニット(CTA)と B-サブユニット(CTB)を用いるとともに、誘導された OVA 特異的 CTL の個体内における機能を確認する目的で、OVA 特異的 CTL によって傷害される腫瘍細胞 (E. G7-OVA) を同系の C57BL/6 マウスに接種し、その増殖抑制効果を追跡した。