

200804008A

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
(国際医学協力研究事業)

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山本 直樹

平成21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 山本直樹（国立感染症研究所 エイズ研究センター長）	・・・ 1
II. 分担研究報告書	
1. BCG バクテールを用いた、中和抗体ならびに細胞性免疫を誘導可能な HIV ワク チンの研究 山本直樹（国立感染症研究所 エイズ研究センター長）	・・・ 9
2. ワクチンによる X4 指向性 SHIV 複製制御サルの解析 俣野哲朗（東京大学医科学研究所 教授）	・・・ 12
3. 粘膜免疫賦活による HIV 感染制御法の開発 高橋秀実（日本医科大学微生物学免疫学教室 教授）	・・・ 15
4. 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 満屋裕明（熊本大学医学薬学研究部血液内科学 教授）	・・・ 22
5. CTL エピトープに反応する CD8+T 細胞集団とその T 細胞受容体 (TCR) レパート リーの特定 岩本愛吉（東京大学医科学研究所 教授）	・・・ 26
6. 粘膜における HIV 感染のメカニズム 清野 宏（東京大学医科学研究所 教授）	・・・ 28
7. エイズウイルスに対する液性免疫応答誘導とその制御に関する研究 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）	・・・ 30
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	・・・ 35
IV. 研究成果の刊行物・別刷（抜粋）	・・・ 41

1. 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

研究代表者 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

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ワクチン、免疫、治療の観点から、その方策について包括的な検討を行い、以下の多くの重要な知見が得られた。ワクチン：1) 細胞性免疫とともに、多様な HIV 変異株に対し中和能を保持した中和抗体を誘導できるワクチン開発を企図して、改良型の Gag と Env 高発現型 BCG コンストラクトを作成した。2) CTL 誘導センダイウイルスワクチン接種サルにおいて、ある程度のレベルの抗 SeV (結合) 抗体存在下においても、SeV ベクター接種による抗原特異的 CTL 誘導は可能であると考えられた。3) 立体構造を理解するための研究を行い、エンベロープタンパク質は機能を保持しつつ多様なエンベロープ内アミノ酸変異を許容するが、アミノ酸変異は局所だけでなく容易にエンベロープタンパク質全体の体構造変化をもたらすことが示唆された。免疫：1) 消化管粘膜における樹状細胞について解析を行い、粘膜 CTL 誘導がピークとなる時期に、小腸粘膜における DEC-205 陽性 DC の有意な増加が見られたが、脾臓 DC において変化はみられなかった。2) HIV-1 陽性患者の末梢血単核細胞 (PBMCs) を用いて、エスケープ変異を持った人、そうでない人のキラー T 細胞受容体 (CTL) エピトープに反応する CD8+ T 細胞集団とそれに対応する T 細胞受容体 (TCR) レパートリーを特定した。3) 上皮細胞は通常の古典的 MHC 分子を介した抗原提示に加え、IEL に特異的な細胞である $\gamma\delta$ 型 IEL の刺激分子である非古典的 MHC 分子の発現をウイルス感染にตอบสนองし上昇させることで IEL の機能を制御していることが示された。治療：1) CCR5 結合能のある新規低分子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・同定を続けた。また新規の HIV-1 PI, GRL-02031 を開発、本剤における抗 HIV-1 活性発揮の機序や耐性獲得の機序について詳細な検討を行った。

研究分担者

俣野哲朗 (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)
満屋裕明 (熊本大学医学薬学研究部 教授)
岩本愛吉 (東京大学医科学研究所 教授)
清野 宏 (東京大学医科学研究所教授)
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)

A. 研究目的

HIV/AIDS の世界的拡大の中で、その克服のため総合的な観点からの検討を行う。本研究では、日米の研究者がアジアのエイズ問題に効果的に対処するため、免疫応答の解析とその臨床応用という立場から研究を行い、その克服の方策について

検討する。中でも、HIV/AIDS の感染・予防の観点から、ワクチン (中和抗体誘導型、細胞性免疫誘導型、自然免疫誘導型)、薬剤耐性、宿主因子)、サルなどの動物モデルの開発を中心課題とし、研究を遂行する。中でもウイルスの多少の変異に対しても幅広く反応できる中和抗体をいかにして誘導させるかという大きな問題を解決するために、rBCG/rVV ワクチンの免疫原性を増強するための改良研究、高い効率かつ高い抗体価で長期間維持できるような中和抗体誘導法の確立を行う。一方、すべての CTL の反応が機能的に同じでないことから、実際に HIV 複製を制御できる細胞反応がいかなるものかを知る必要がある。このため、Sendai ワクチンなどを用いて、自然免疫、獲得免疫、感染標的細胞ウイルス感染抵抗性について解析して、ウイルス制御に決定的な役割を果たして

いる免疫系細胞群を同定し、その性状を明らかにすることによって安全で有効なワクチン開発あるいはエイズ発症阻止技術の開発に応用する。またもっとも重要な感染ルートである、生殖器・消化器粘膜組織における HIV 感受性細胞群の相互作用を明らかにするとともに、粘膜免疫における自然・獲得免疫系の関与について検討を加える。

一方、薬剤耐性の問題に対処するためにウイルスの変異に左右されない抗 HIV 薬の標的として、コレセプターの阻害剤、などの開発を進める。同時にウイルスのライフサイクルで必須に宿主因子の同定を行い、新たな標的分子の発掘に努める。

本研究では、エイズと HIV の問題に取り組む日本の研究者がアジア諸国の専門家の参加を得て、エイズに関するアジア域内での問題を幅広い科学的側面からアプローチしている。アジアではその目覚ましい経済発展と並行して、エイズをはじめとする慢性、急性ウイルス感染症拡大が問題になっており、本研究の必要性は明らかである。アジアは世界の約 7 割を占める巨大な人口を擁し、今世紀のアジアが、エイズをはじめとする感染症との新たな闘いの場であるといわれている所以である。今日、アジアが地域としてこれらの感染症にどのような方策を講じるかが問われており、その成否が今後の世界の感染症対策の方向性を決めるといっても過言ではなく、日本人研究者が米国側ならびにアジア諸国研究者と効果的な共同研究体制を構築・発展させ、貢献していくことが必要である。

B. 研究方法

ワクチン

1) 山本 (1) 初回免疫後 30 週に追加免疫を行う方法で rBCG/opt-SIVgag 0.1mg/ rDIs-SIVgag 107PFU 3 頭のカニクイザルを免疫し、その後 3 年後に D. naive 3 頭を加えて、SIVmac239 (nef+) 2000TCID50 を直腸内接種により攻撃試験を行った。末梢血中の CD4 (+) 細胞数、effector memory / naive memory CD4 (+) 細胞比および plasma 中のウイルス RNA コピー数を指標として感染動態の解析を行った。SIVgag に対する免疫応答は、

SIV p27 蛋白刺激による末梢血リンパ球の CD8 (+) 細胞中の IFN- γ 産生細胞の比率により評価を行った。(2) マルチエピトープ rDIs の構築のための抗原には、米国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 (gp145)、gp140V1V2 Δ CFI (gp140) および SIVgag-opt を用いた。gp140 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。これらを、サル動物モデルを用いて抹消血における ELISA 抗体価を経時的に解析を行った。

2) 俣野 SeV ベクターワクチン接種後、約 3 ヶ月の時点で CXCR4 指向性サルヒト免疫不全ウイルス (SHIV) チャレンジを行い、さらに慢性期に 2 回目の SeV ベクター接種を行ったアカゲザル 4 頭のサンプルを用いて実験を行った。そのうち 2 頭 (R011・R012) は、Gag 発現複製型 SeV (F[+]SeV-Gag) ベクター接種後、191 週目に Gag 発現非複製型 (F[-]SeV-Gag) ベクター接種を行ったもので、残りの 2 頭 (R003・R016) は、Tat 発現複製型 SeV (F[+]SeV-Tat) ベクター接種後、68 週目に F[+]SeV-Gag ベクター接種を行ったものである。これらのサルでは、SHIV 持続感染は阻止され、また 1 回目だけでなく 2 回目の SeV ベクター接種によっても効率よく CTL が誘導されていた。これらのサルのいくつかの時点における凍結血漿中の抗 SeV (結合) 抗体価を、ELISA (Denka Seiken) を用いて測定した。

3) 駒野 エンベロープタンパク質の立体構造を推測するため、V3 を標的とする中和抗体 KD-247 の感受性を利用した。中和抗体 KD-247 の感受性を IC50 にて評価した。ウイルスは AD8 株を使用し、これを MOLT-4 にて 50 代以上に継代して、人為的に試験管内で多様化させたウイルスを「機能的 Env 遺伝子プール」として用いた。IC50 計測は TZM-bl 細胞を使用し、常法に基づきウイルス感染の有無をウイルス感染後 3 日目の Luciferase にて算定した。

免疫

1) 高橋 C57BL/6 マウス (H-2b) に OVA 100 mg 単独、または OVA 100 mg と共に CT 10 µg を経口投与後、様々な日にちにおいて小腸上皮間リンパ球 (IEL) および脾臓細胞を採取した。これらの細胞を H-2b/OVA tetramer を用いて染色してフローサイトメトリーにより解析することにより、*ex vivo* OVA 特異的 CTL を検出する一方、⁵¹Cr-release 法を用い、OVA 特異的 CTL 活性を検討した。次に、マウスの皮内または胃に OVA 発現腫瘍 E. G7-OVA (H-2b) を移植し、腫瘍が着生する3日後に OVA 100 mg 単独、または OVA 100 mg と共に CT 10 µg を経口投与し、その後の腫瘍の成長を経時的に観察した。また、OVA と CT の経口投与により縮小した腫瘍組織よりリンパ球分画を分離し、H-2b/OVA tetramer で染色、解析し、OVA 特異的 CTL を検出した。更に、経口投与を施したマウスから、小腸上皮間樹状細胞 (DC) および脾臓 DC を採取し、DEC-205 や 33D1 といった MHC 抗原提示に関与する表面抗原の発現をフローサイトメトリーにより解析した。

2) 岩本 (1) 対象者: HLA-A*2402 (A24) 陽性患者、(2) ペプチド: HIV-1 Nef protein [Nef138-10 (wt)]、escape mutant with a Y to F (Y139F) substitution at the second position [Nef138-10 (2F)]、(3) 培養: PBMCs を Nef138-10 (wt) ならびに Nef138-10 (2F) 配列を持つ peptide-MHC tetramer で染色した。(4) TCR レパートリー: エピトープ特有の CD8⁺T 細胞集団の TCR レパートリーは、塩基配列により決定した。

3) 清野 粘膜系上皮細胞として A549 細胞と HeLa 細胞を用いた。ウイルス感染は人工二本鎖 RNA である poly I:C を用いた。Poly I:C を上皮細胞に作用させた際の古典的 MHC 分子 (HLA-I) と非古典的 MHC 分子 (MICA) の発現をフローサイトメーターで測定した。またサイトカインの影響を検討する目的で各種サイトカインに対する中和抗体を用いた実験を同時に行った。

治療

1) 満屋 (1) 化合物の抗 HIV-1 活性評価: 抗 HIV-1 活性の評価には MTT、MAGI アッセイなどを用

いる。(2) 抗 HIV-1 作用発現のメカニズム解析: 新規に同定された化合物がウイルス、あるいは生体 (細胞) へ与える変化、それがどのようにして抗 HIV-1 効果をもたらすかについて解析を進める。

(3) 薬剤耐性のメカニズム解析: X線結晶解析をはじめとするタンパクの微細構造研究の方法論を用いて、多剤耐性 HIV-1 株の発現機序の分子・原子レベルでの解析を行う。(4) CCR5 の微細構造学的解析・生理学的解析: コンピュータモデリングの手法を用いた。(5) HIV-1 PR 二量体形成 (dimerization) 阻害: CFP/YFP タグ付き PR を有する感染性組み換え HIV-1 クローンと FRET (fluorescence resonance emission transfer) の系を用いた。

(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が出漏ら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。候補物質の抗 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、免疫、治療に分け、それらを箇条書きにする。

ワクチン

1) 山本 今年度は細胞性免疫とともに、多様な HIV 変異株に対し中和能を保持した中和抗体を誘導できるワクチン開発を企図して、改良型の Gag と Env 高発現型 BCG コンストラクトを作成した。さらに、改変 HIVenv および SIVgag を挿入した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抗 HIVenv 抗体価の上昇を確認した。

2) 俣野 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いる。そこで、ウイルスベクターを用いた抗原特異的 CTL 誘導は、エイズワクチン開発研究の主要戦略の一つとして研究が進められている。われわれはこれまで、センダイウイルス (SeV) ベクターを用いた CTL 誘導型エイズワクチン開発を進め、現在、国際共同臨床試験計画が進展中である。この SeV ベクターを用いる方法について、抗原特異的 CTL 誘導効率に影響する因子を一つずつ明らかにしていく必要があるが、平成 20 年度は、その一つとして抗 SeV 抗体価の変動を調べることにした。SeV ベクターワクチン接種後、CXCR4 指向性サルヒト免疫不全ウイルス (SHIV) チャレンジを行い、さらに慢性期に 2 回目の SeV ベクター接種を行ったサル 4 頭のサンプルを用いて実験を行った。これらのサルでは、SHIV 持続感染は阻止され、また 1 回目だけでなく 2 回目の SeV ベクター接種によっても効率よく CTL が誘導されていた。今回、血漿中抗 SeV 抗体価を測定したところ、いずれのサルにおいても、1 回目の SeV 接種後 2 週目より、効率よい抗 SeV 抗体の誘導が認められた。さらに 2 回目の SeV 接種時にも抗 SeV 抗体価は維持され、2 回目の SeV 接種によるブースト反応も確認された。本研究では SeV 特異的中和抗体価については検討できなかったが、今回の結果より、ある程度のレベルの抗 SeV (結合) 抗体存在下においても、SeV ベクター接種による抗原特異的 CTL 誘導は可能であると考えられた。

3) 駒野 ウイルスの免疫抗原としてのエンベロープタンパク質の立体構造を理解するための研究を行った。その結果エンベロープタンパク質は機能を保持しつつ多様なエンベロープ内アミノ

酸変異を許容するが、アミノ酸変異は局所だけでなく容易にエンベロープタンパク質全体の体構造変化をもたらすことが示唆された。これはウイルスが非エピトープ変異による中和抗体エスケープ機能を有している事を示していると同時に、エイズワクチン抗原のデザインにはウイルス抗原を注意深く安定化化する必要があること、また実際の抗原デザインには中和抗体との相互作用を並行して機能的に検証する必要があると考えられる。

免疫

1) 高橋 卵白アルブミン (OVA) をコレラトキシシン (CT) と共に経口投与した場合、マウスの消化管粘膜に OVA 特異的 CD8 陽性 CTL が *ex vivo* で著しく誘導されること、および消化管や皮膚に移植し定着した OVA 発現腫瘍がこの経口投与処置により有意に縮小することを見出した (J Immunol, 180:4000-4010, 2008)。この経口処置により縮小した腫瘍組織においては、抗原特異的な CD8 陽性 CTL の浸潤が観察された。更に本研究においては、粘膜における抗原特異的 CTL の誘導の機構を調べるために、消化管粘膜における樹状細胞について解析を行った。クラス I MHC 分子による抗原のクロスプレゼンテーションへの関連が示唆されている DEC-205 分子の発現について解析したところ、粘膜 CTL 誘導がピークとなる時期に、小腸粘膜における DEC-205 陽性 DC の有意な増加が見られたが、脾臓 DC において変化はみられなかった。

2) 岩本 HIV-1 陽性患者の末梢血単核細胞 (PBMCs) を用いて、エスケープ変異を持った人、そうでない人のキラー T 細胞受容体 (CTL) エピトープに反応する CD8+T 細胞集団とそれに対応する T 細胞受容体 (TCR) レパートリーの特定に成功した。

3) 清野 本年度の研究においては HIV の主要感染経路である粘膜組織の最前線を覆う上皮細胞層に存在する上皮細胞間 T 細胞 (IEL) に焦点を当て、上皮細胞を介した抗原認識機構を解明することで HIV 感染防御を担う生体免疫応答を明らかにすることを目的に研究を行った。本研究から、

上皮細胞は通常の古典的MHC分子を介した抗原提示に加え、IELに特異的な細胞である $\gamma\delta$ 型 IELの刺激分子である非古典的MHC分子の発現をウイルス感染にตอบสนองし上昇させることでIELの機能を制御していることが示された。

治療

1) 溝屋 新規開発中の HIV-1 逆転写酵素阻害剤 (RTI) である 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine の抗 HIV 活性について、NOG-SCIDマウスやSIV感染サルを用いて評価を行った。更に HIV-1 の細胞侵入時にコレセプターとして機能する CCR5 の微細構造学的解析系の確立、また 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おり、これらの解析結果を基にして、CCR5 結合能のある新規低分子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・同定を続けている。また我々は 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プロテアーゼ阻害剤 (PIs) の開発を米国の研究グループと共同で続けており、新規の HIV-1 PI, GRL-02031 を開発、本剤における抗 HIV-1 活性発揮の機序や耐性獲得の機序について詳細な検討を行った。

D. 考察

ワクチン研究においては、1) 蛋白発現量を高めた rBCG/opt-SIVGag と rDIs-SIVGag による細胞性および液性免疫誘導を目的としたプライムブースト型ワクチンは、SIVmac239 による攻撃試験で、対照群に比べて血漿中のウイルス量を有意に低減させることが可能であった。改変 HIVenv および SIVgag を挿入した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抗 HIVenv 抗体価の上昇を確認した。2) 1 年間以上の間隔において、2 回の SeV ベクター接種により CTL 誘導が認められたサルにおける抗 SeV 抗体価を経時的に測定した。その結果、ある程度のレベルの抗 SeV 抗体存在下においても、SeV ベクター接種による抗原特異的 CTL 誘導は可能であると考えられた。3) HIV/AIDS の流行拡大を完全にコントロールするため感染予防法の開発が行われているが

未だエイズワクチン開発は難渋を極めている。液性免疫主導型および細胞免疫誘導型エイズワクチン開発のためにはさらに基礎的なウイルス学的・免疫学的理解が欠かせない。このためエンベロープタンパク質立体構造を理解するため、多様なエピトープ外変異による網羅的なアミノ酸変異解析を行い、抗原の構造は機能を損なわずに著しく多様な立体構造を持つことが明らかになった。中和抗体誘導型エイズワクチンの抗原をデザインするにはこの事実に基づいて注意深く行う必要がある。

免疫研究においては、1) 抗原と CT 粘膜アジュバントを経口投与することで、著しい細胞障害活性を有する粘膜 CTL が誘導されることが明らかとなった。この誘導された抗原特異的 CTL は、皮膚や粘膜に移植し定着した腫瘍組織に浸潤し、腫瘍の成長を著しく抑制し腫瘍を縮小させた。また、粘膜における抗原特異的 CTL の誘導には、粘膜の局所免疫を Th1 型にシフトさせる作用を有する DEC-205 陽性 DC が関与することが示唆された。この研究により、経口ワクチンによる抗有効な HIV 粘膜ワクチンの可能性が明らかとなった。HIV は、直腸、肛門、膣などの粘膜から感染するため、粘膜において抗 HIV 免疫反応を誘導することは、HIV 感染を制御する鍵となり得る。今回、経口免疫によって誘導される抗原特異的 CTL が粘膜や皮膚といった体表面組織のウイルス感染細胞や腫瘍を効果的に制御する可能性、および、これらの CTL が粘膜局所の DC によって誘導されている可能性が示唆された。経口免疫法は抗 HIV ワクチンの有効な方法のひとつに発展すると考え、現在更に研究を進めている。2) HIV-1 陽性患者の末梢血単核細胞 (PBMCs) を用いて、エスケープ変異を持った人、そうでない人のキラー T 細胞受容体 (CTL) エピトープに反応する CD8+ T 細胞集団とそれに対応する T 細胞受容体 (TCR) レパートリーの特定を試みた。ウイルスからの逃避における、抗原提示の障害が拘束されたレパートリーの基礎となるかもしれない。本研究はエイズのワクチン開発に貢献すると考える。3) 上皮細胞はウイルス感染に対し、速やかに自然免疫型、獲得免疫型抗原提

示分子の発現を増強することが示され、粘膜組織における HIV 感染防御免疫経路の一端を明らかにすることが出来た。

最後に治療においては、HIV-1 が耐性を発現しにくい薬剤、発現しても他薬剤との交差耐性を有しない新規の RTIs, PIs の開発を米国グループとの共同研究で継続している。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おり、これらの解析結果を基にして、CCR5 結合能のある新規低分子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・同定を続ける。

E. 結論

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ワクチン、免疫、治療の観点から、その方策について包括的な検討を行った。ワクチン研究においては、細胞性免疫とともに、多様な HIV 変異株に対し中和能を保持した中和抗体を誘導できるワクチン開発を企図して、改良型の Gag と Env 高発現型 BCG コンストラクトの作成、抗 SeV (結合) 抗体存在下における、SeV ベクター接種による抗原特異的 CTL 誘導の可能性、エンベロプタンパク質のアミノ酸変異が局所だけでなく容易にエンベロプタンパク質全体の体構造変化をもたらすこと、などが示唆された。免疫研究においては、粘膜 CTL 誘導がピークとなる時期に、小腸粘膜における DEC-205 陽性 DC の有意な増加が見られたが、脾臓 DC において変化はみられないこと、HIV-1 陽性患者の末梢血単核細胞 (PBMCs) を用いて、エスケープ変異を持った人、そうでない人のキラー T 細胞受容体 (CTL) エピトープに反応する CD8+ T 細胞集団とそれに対応する T 細胞受容体 (TCR) レパートリーを特定、さらに上皮細胞が通常の古典的 MHC 分子を介した抗原提示に加え、IEL に特異的な細胞である $\gamma\delta$ 型 IEL の刺激分子である非古典的 MHC 分子の発現をウイルス感染に応答し上昇させることで IEL の機能を制御していること、などが示された。治療においては、CCR5 結合能のある新規低分子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・同定とともに新規の HIV-1 PI, GRL-02031 を開発した。

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) Yoshino N, Kanekiyo M, Hagiwara Y, Okamura T, Someya K, Matsuo K, Ami Y, Sato S, Yamamoto N, Honda M. Mucosal administration of completely non-replicative vaccinia virus recombinant Dairen I strain elicits effective mucosal and systemic immunity. *Scand J Immunol* 68(5): 476-483, 2008.

2) Sugimoto C, Nakayama EE, Shioda T, Villinger F, Ansari AA, Yamamoto N, Suzuki Y, Nagai Y, Mori K. Impact of glycosylation on antigenicity of simian immunodeficiency virus SIV239: induction of rapid V1/V2-specific non-neutralizing antibody and delayed neutralizing antibody following infection with an attenuated deglycosylated mutant. *J Gen Virol* 89(Pt 2): 554-566, 2008.

俣野哲朗:

1) Moriya C, Horiba S, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Matano T. Antigen-specific T-cell induction by vaccination with a recombinant Sendai virus vector even in the presence of vector-specific neutralizing antibodies in rhesus macaques. *Biochem Biophys Res Commun* 371: 850-854, 2008.

2) Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Iwamoto N, Kurihara K, Takeda A, Moriya C, Takeuchi H, Akari H, Matano T. Gag-specific cytotoxic T lymphocyte-based control of primary simian immunodeficiency virus replication in a vaccine trial. *J Virol* 82: 10199-10206, 2008.

高橋秀実:

- 1) 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* 180: 4000-4010, 2008.
- 2) Fukazawa Y, Miyake A, Ibuki K, Inaba K, Saito N, Motohara M, Horiuchi R, Himeno A, Matsuda K, Matsuyama M, Takahashi H, Hayami M, Igarashi T, Miura T. Small intestine CD4+ T cells are profoundly depleted during acute simian-human immunodeficiency virus infection, regardless of viral pathogenicity. *J Virol* 82: 6039-6044, 2008.

満屋裕明 :

- 1) Ghosh AK, Gemma S, Baldrige A, Wang YF, Kovalevsky AY, Koh Y, Weber IT, Mitsuya H. Flexible cyclic ethers/polyethers as novel P2-ligands for HIV-1 protease inhibitors: design, synthesis, biological evaluation, and protein-ligand X-ray studies. *J Med Chem* 51: 6021-6033, 2008.
- 2) Maeda K, Das D, Yin PD, Tsuchiya K, Ogata-Aoki H, Nakata H, Norman RB, Hackney LA, Takaoka Y, Mitsuya H. Involvement of the second extracellular loop and transmembrane residues of CCR5 in inhibitor binding and HIV-1 fusion: insights into the mechanism of allosteric inhibition. *J Mol Biol* 381: 956-974, 2008.

岩本愛吉 :

- 1) Komuro I, Sunazuka T, Akagawa KS, Yokota Y, Iwamoto A, Omura S. Erythromycin derivatives inhibit HIV-1 replication in macrophages through modulation of MAPK activity to induce small isoforms of C/EBPbeta. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(34): 12509-12514, 2008.
- 2) Mizukoshi F, Yamamoto T, Mitsuki YY, Terahara K, Kawana-Tachikawa A, Kobayashi K, Iwamoto A, Morikawa Y, Tsunetsugu-Yokota Y. Activation of HIV-1 Gag-specific CD8(+) T cells by

yeast-derived VLP-pulsed dendritic cells is influenced by the level of mannose on the VLP antigen. *Microbes Infect* 11(2): 191-197, 2009.

清野 宏 :

- 1) Terahara T, Igarashi O, Yoshida M, Nochi T, Kurokawa S, Takayama N, Yuki Y, Low AW, and Kiyono H. Comprehensive gene expression analysis among Peyer's patch M cells, villous M cells and intestinal epithelial cells by DNA microarray analysis. *J Immunol* 180: 7840-7846, 2008.
- 2) Uematsu S, Fujimoto K, Jang MH, Yang BG, Jung YJ, Nishiyama M, Sato S, Tsujimura T, Yamamoto M, Yokota Y, Kiyono H, Miyasaka M, Ishii KJ, and Akira S. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol* 9: 769-776, 2008.

駒野 淳 :

- 1) Urano E, Aoki T, Futahashi Y, Murakami T, Morikawa Y, Yamamoto N, Komano J. Substitution of the myristoylation signal of human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag with the phospholipase C delta 1 pleckstrin homology domain results in infectious pseudovirion production. *J Gen Virol* 89 (Pt12): 3144-3149, 2008.
- 2) Urano E, Shimizu S, Futahashi Y, Hamatake M, Morikawa Y, Takahashi N, Fukazawa H, Yamamoto N, Komano J. Cyclin K/CPR4 inhibits primate lentiviral replication by inactivating Tat/positive transcription elongation factor b-dependent long terminal repeat transcription. *AIDS* 22(9): 1081-1083, 2008.

II. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) The Name of the Patent: Fitness assay and associated methods

Date of Issuance: December 30, 2008

US Patent Number: 7,470,506

Erickson; John W. (Frederick, MD), Gulnik; Sergei V. (Frederick, MD), Mitsuya; Hiroaki (Chevy Chase, MD), Ghosh; Arun K. (River Forest, IL)

Assignee: The United States of America as represented by the Department of Health and Human Services (Washington, DC) and Board of Trustees of the University of Illinois.

Appl. No.: 09/720,276

Filed: June 23, 1999

PCT Filed: June 23, 1999

PCT No.: PCT/US99/14119

371(c)(1),(2),(4) Date: March 07, 2001

PCT Pub. No.: WO99/67417

PCT Pub. Date: December 29, 1999

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究協力者

速水正憲 (京都大学 名誉教授)

岡本 尚 (名古屋市立大学大学院医学研究科 教授)

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 教授)

佐多徹太郎 (国立感染症研究所 感染病理部長)

塩田達雄 (大阪大学微生物病研究所 教授)

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)

武部 豊 (国立感染症研究所エイズ研究センター第一室長)

田中勇悦 (琉球大学大学院医学研究科教授)

服部俊夫 (東北大学大学院医学系研究科 教授)

原田信志 (熊本大学大学院医学薬学研究部 教授)

馬場昌範 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授)

松下修三 (熊本大学エイズ学研究センター 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)

II. 分担研究報告書

BCG ベクターを用いた、中和抗体ならびに細胞性免疫を誘導可能な HIV ワクチンの研究

研究代表者 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

今年度は細胞性免疫とともに、多様な HIV 変異株に対し中和能を保持した中和抗体を誘導できるワクチン開発を企図して、改良型の Gag と Env 高発現型 BCG コンストラクトを作成した。さらに、改変 HIVenv および SIVgag を挿入した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抗 HIVenv 抗体価の上昇を確認した。

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保健医療分野における、国際的最重要課題の一つである。HIV に限らず感染予防で理想的な方法は、ワクチンを置いて他にはないことは明白であるが、エイズではその開発は難渋を極めている。エイズワクチンについて明らかになってきたことは、いかなるワクチンも単独というよりは組み合わせ（プライム・ブースト法）のほうがより効果的であること、新たなベクターや adjuvanted DNA がヒトでのトライアルに急速に移行していることである。さらにワクチンの効果を検出する免疫反応のアッセイ法がその感度、方法論の進歩により急速に進展したことによりメモリー T 細胞の重要性などが認識されるようになって来た。

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

以上の問題点に対応するために、細胞性免疫誘導型プライム・ブーストワクチンとして現在開発している、rBCG-SIVgag/rDIs-SIVgag は、カ

ニクイザルへの SHIV 感染による急性エイズモデルにおいて CD4 T 細胞の減少抑制、血中からのウイルス排除に効果を示すことが判っているが、接種量による副反応の解決と、慢性型エイズモデルとして認知される、SIV-マカクサル感染系においての評価がされなければならないと考えられる。

また、有効なエイズワクチンは、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おり、ワクシニアの特徴である 2 つ以上の遺伝子を同時に発現させることが可能という利点をいかし、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する。

B. 研究方法

初回免疫後 3 0 週に追加免疫を行う方法で rBCG/opt-SIVgag 0.1mg/ rDIs-SIVgag 107PFU 3 頭のカニクイザルを免疫し、その後 3 年後に D. naive 3 頭を加えて、SIVmac239(nef+) 2000TCID₅₀ を直腸内接種により攻撃試験を行った。末梢血中の CD4 (+) 細胞数、effector memory / naive memory CD4(+) 細胞比および plasma 中のウイルス RNA コピー数を指標として感染動態の解析を行った。SIVgag に対する免疫応答は、SIV p27 蛋白刺激による末梢血リンパ球の CD8 (+) 細胞中の IFN- γ 産生細胞の比率により評価を行った。

マルチエピトープ rDIs の構築のための抗原には、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 (gp145)、gp140VIV2 Δ CFI (gp140) および SIVgag-opt を用いた。gp140 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。これらを、サル動物モデルを用いて抹消血における ELISA 抗体価を経時的に解析を行った。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、倫理面も含めて、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

組換え BCG (rBCG)/rAd5 プライムブーストワクチン開発のため、改変型 env gp140 および gp145 遺伝子を組み込んだ rBCG をプライミングに用い、同じ遺伝子を組み込んだ rAd5 (組換えアデノウイルス 5 型) でブーストするワクチンレジメンのマウスでの免疫誘導能の比較評価試験を行った。その結果、rBCG/rAd5 系は有意に HIV Env 特異的細胞性免疫を誘導できるが、DNA ワクチン (3 回接種) /rAd5 系と比較して確実に優れているとは言えなかった。また DNA/rAd5 系と rBCG/rAd5 系で誘導される CD8 陽性キラー T 細胞のサブポピュレーションが異なっていた。さらに Gag 発現を最適化するため、上記 Tat 分泌系 (blaF シグナル) や新たに構築した高コピー変異型 pSOR246 プラスミドを用いて抗酸菌での発現を調べたところ、いずれの場合も Ag85B シグナルを用いた場合より発現レベルの有意な上昇が認められた。

蛋白発現量を高めるように至適化した rBCG/opt-SIVgag および rDIs-SIVgag による細胞性免疫誘導型プライム・ブーストエイズワクチン候補は、rBCG 接種による副反応を低下させ、かつ SIV mac239 の感染に対して有効性を示した。また、ブースターとして使用しているワクシニアウイルス DIs を用いて、2 つ以上の構造遺伝子を同時に発現させるマルチエピトープワクチ

ンの開発を目的として作成した、中和活性誘導を目的とする改変型 HIV Env および SIVgag を発現する rDIs により、サル動物モデルにおいて抗 HIV Env ELISA 抗体の産生を認めた。

D. 考察

今年度は、さらに改良型の Env 高発現型 BCG コンストラクトのテトラマーアッセイでの評価を進めた。また米国 NIH のワクチン開発センター (VRC) のほうでは BCG 東京株の代わりに AERAS が開発した Danish 株にウェルシュ菌由来の perfringolysin (pfo, hemolysin の一種) を導入した株を用いて組み換え体を作製し、そのマウスでの評価に焦点をあてている。pfo 遺伝子を Danish 株のゲノムに組換えで導入すると、その BCG を貪食したマクロファージの中で perfringolysin の作用により、ファゴソーム膜に孔があき、BCG から分泌された Gag 抗原が細胞質に移行する。その結果、Gag 抗原が MHC class I 経路で分解・抗原提示されやすくなり、キラー T 細胞の誘導が増強されるのではないかと期待されている。我々も東京株の有用性を明らかにするために、AERAS 株と同等の LLO 発現型 BCG の構築と、それを用いた Gag または Env 発現株の構築を急ぎ行う必要があると考える。

rBCG/opt-SIVgag を用いた rBCG/rDIs プライム・ブーストワクチンでは、SIV-マカク属サル感染系において、感染 12 週間では、他の現在有効と考えられている候補ワクチンと比べてもほぼ同様のウイルス量抑制効果を示したと考えられる。effector memory CD4(+) T 細胞の減少抑制効果についても、体表リンパ節において対照群に比べて有意に高く、その局所における effector memory CD4(+) T 細胞の減少を低減させていたものと考えられる。また、これらの効果がワクチン接種後 3 年という長期間であっても認められたことから、このワクチン候補が実用性の点において優れていることを示している。rDIs/gp140-SIVgag 免疫群と rDIs/gp145、rDIs/SIVgag 免疫群において抗 HIV Env ELISA 抗体価の上昇が認められたことは、安全性の高いワクシニアウイルス DIs を用いた液性免疫誘導型を加えたマルチエピトープワクチンの可能性を示唆するものと考えられる。

E. 結論

蛋白発現量を高めた rBCG/opt-SIVGag と rDIs-SIVGag による細胞性および液性免疫誘導を目的としたプライム・ブースト型ワクチンは、SIVmac239 による攻撃試験で、対照群に比べて血漿中のウイルス量を有意に低減させることが可能であった。改変 HIVenv および SIVgag を挿入した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抗 HIVenv 抗体価の上昇を確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshino N, Kanekiyo M, Hagiwara Y, Okamura T, Someya K, Matsuo K, Ami Y, Sato S, Yamamoto N, Honda M. Mucosal administration of completely non-replicative vaccinia virus recombinant Dairen 1 strain elicits effective mucosal and systemic immunity. *Scand J Immunol* 68 (5): 476-483, 2008.
- 2) Terunuma H, Deng X, Dewan MZ, Fujimoto S and Yamamoto N Potential role of NK cells in the induction of immune responses: Implications for NK cell-based immunotherapy for cancers and viral

infections. *International Reviews of Immunology* 27 (3): 93-110, 2008.

- 3) Sugimoto C, Nakayama EE, Shioda T, Villinger F, Ansari AA, Yamamoto N, Suzuki Y, Nagai Y, Mori K. Impact of glycosylation on antigenicity of simian immunodeficiency virus SIV239: induction of rapid V1/V2-specific non-neutralizing antibody and delayed neutralizing antibody following infection with an attenuated deglycosylated mutant. *J Gen Virol* 89 (Pt 2): 554-566, 2008.
- 4) Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Kimura R, Komano J, Nishi M, Soeda H, Hattori S, Perrem K, Yamamoto M, Chiba J, Mimaya JI, 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 294-299, 2008.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ワクチンによる X4 指向性 SHIV 複製制御サルの解析

研究分担者 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いる。そこで、ウイルスベクターを用いた抗原特異的 CTL 誘導は、エイズワクチン開発研究の主要戦略の一つとして研究が進められている。われわれはこれまで、センダイウイルス (SeV) ベクターを用いた CTL 誘導型エイズワクチン開発を進め、現在、国際共同臨床試験計画が進展中である。この SeV ベクターを用いる方法について、抗原特異的 CTL 誘導効率に影響する因子を一つずつ明らかにしていく必要があるが、平成 20 年度は、その一つとして抗 SeV 抗体価の変動を調べることとした。SeV ベクターワクチン接種後、CXCR4 指向性サルヒト免疫不全ウイルス (SHIV) チャレンジを行い、さらに慢性期に 2 回目の SeV ベクター接種を行ったサル 4 頭のサンプルを用いて実験を行った。これらのサルでは、SHIV 持続感染は阻止され、また 1 回目だけでなく 2 回目の SeV ベクター接種によっても効率よく CTL が誘導されていた。今回、血漿中抗 SeV 抗体価を測定したところ、いずれのサルにおいても、1 回目の SeV 接種後 2 週目より、効率よい抗 SeV 抗体の誘導が認められた。さらに 2 回目の SeV 接種時にも抗 SeV 抗体価は維持され、2 回目の SeV 接種によるブースト反応も確認された。本研究では SeV 特異的中和抗体価については検討できなかったが、今回の結果より、ある程度のレベルの抗 SeV (結合) 抗体存在下においても、SeV ベクター接種による抗原特異的 CTL 誘導は可能であると考えられた。

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、ウイルスベクターを用いた抗原特異的 CTL 誘導は、エイズワクチン開発研究の主要戦略の一つである。

われわれはこれまで、センダイウイルス (SeV) ベクターを用いた CTL 誘導型エイズワクチン開発を進め、現在、国際共同臨床試験第 1 相計画が進展中である。今後、有効性検証のための第 2 相・第 3 相への進展に向け、この SeV ベクターによる抗原特異的 CTL 誘導効率に影響する因子を一つずつ明らかにしていく必要がある。その検討課題の一つとして、SeV ベクター自体に対する免疫反応の影響が挙げられる。平成 20 年度は、その SeV 特異的免疫反応のうち、抗 SeV 結合抗体価に焦点

を絞り解析することとした。

B. 研究方法

SeV ベクターワクチン接種後、約 3 ヶ月の時点で CXCR4 指向性サルヒト免疫不全ウイルス (SHIV) チャレンジを行い、さらに慢性期に 2 回目の SeV ベクター接種を行ったアカゲザル 4 頭のサンプルを用いて実験を行った。そのうち 2 頭 (R011・R012) は、Gag 発現複製型 SeV (F[+]SeV-Gag)ベクター接種後、191 週目に Gag 発現非複製型 (F[-]SeV-Gag)ベクター接種を行ったもので、残りの 2 頭 (R003・R016) は、Tat 発現複製型 SeV (F[+]SeV-Tat)ベクター接種後、68 週目に F[+]SeV-Gag ベクター接種を行ったものである。これらのサルでは、SHIV 持続感染は阻止され、また 1 回目だけでなく 2 回目の SeV ベクター接種によっても効率よく CTL が誘導されていた。これらのサルのいくつかの時点における凍結血漿中の抗 SeV (結合) 抗体価を、ELISA (Denka Seiken) を用いて測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、倫理面も含めて、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

いずれのサルにおいても、1回目のSeV接種後2週目より、効率よい抗SeV抗体の誘導が認められた。その後、経時的な抗SeV抗体価の減少がみられたが、2回目のSeV接種時においても抗SeV抗体価は維持されていた。さらに、この2回目のSeV接種による抗SeV抗体価の上昇(ブースト反応)も確認された。(図1)。

D. 考察

本研究ではSeV特異的中和抗体価の検討の前に、まず、抗SeV(結合)抗体価の検討を行った。また、SeVベクターによる抗原特異的CTL誘導効率に対するSeV特異的細胞性免疫反応の影響についても、今後の課題である。本研究で、2回目のSeVベクター接種時に抗SeV抗体が維持されていることが明らかとなったが、この2回目のSeVベクター接種により、いずれのサルにおいても効率よくGag特異的CTLが誘導されていたことから、ある程度のレベルの抗SeV抗体存在下においても、SeVベクター接種による抗原特異的CTL誘導は可能であると考えられた。

E. 結論

1年間以上の間隔において、2回のSeVベクター接種によりCTL誘導が認められたサルにおける抗SeV抗体価を経時的に測定した。その結果、ある程度のレベルの抗SeV抗体存在下においても、SeVベクター接種による抗原特異的CTL誘導は可能であると考えられた。

F. 研究発表

1 論文発表

- (1) Moriya C, Horiba S, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Matano T. Antigen-specific T cell induction by vaccination with a recombinant Sendai virus vector even in the presence of vector-specific neutralizing antibodies in rhesus macaques. *Biochem Biophys Res Commun* 371:850-854, 2008.
- (2) Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Iwamoto N, Kurihara K, Takeda A, Moriya C, Takeuchi H, Akari H, Matano T. Gag-specific cytotoxic T lymphocyte-based control of primary simian immunodeficiency virus replication in a vaccine trial. *J Virol* 82:10199-10206, 2008.

2 学会発表

- (1) Moriya C, Horiba S, Kurihara K, Inoue M, Iida A, Shu T, Hasegawa M, Matano T. CTL induction by low-dose Sendai viral vector immunization even in the presence of anti-vector neutralizing antibodies. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 9/9/2008.
- (2) Matano T. The impact of T-cell and antibody responses on SIV replication. US-Japan Cooperative Medical Science Program, 21th Joint Meeting of the AIDS Panels, Tokyo, Japan, 9/12/2008.
- (3) 守屋智草、堀場聡、井上誠、飯田章博、朱亜峰、長谷川護、俣野哲朗。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既存抗体の影響の解析。第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、10/28/2008。

G. 知的財産権の出願・登録状況

無し。

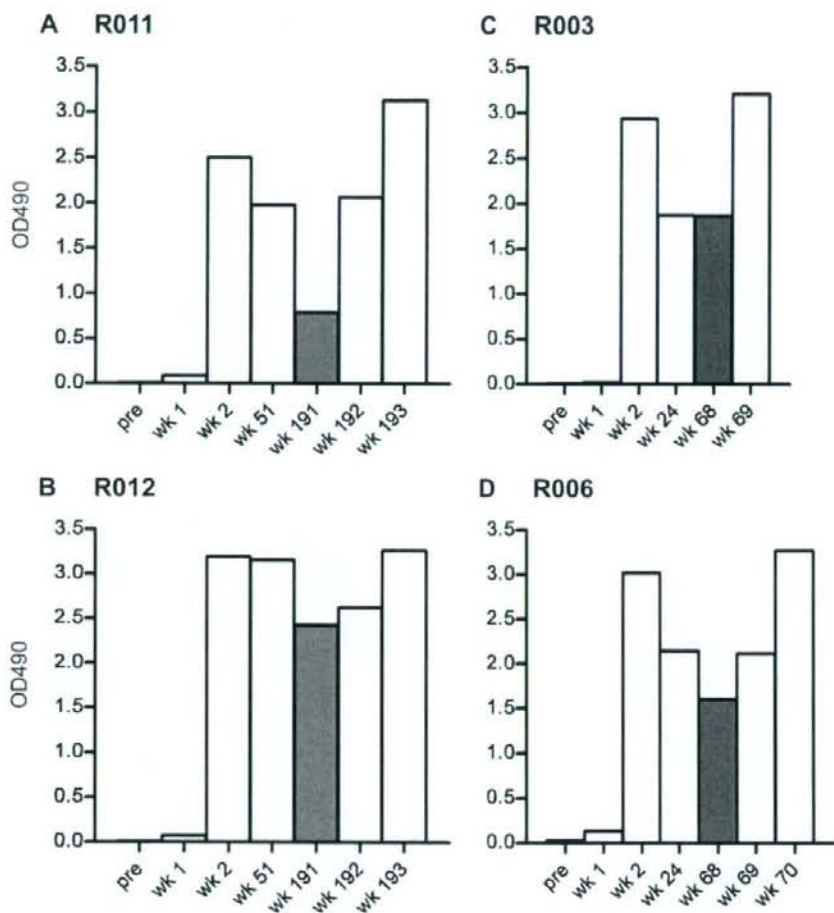


図1 SeVベクター接種サルにおける血漿中抗SeV抗体価
 SeVベクター接種後、191週目（R011・R012）あるいは68週目（R003・R006）に
 2回目のSeVベクター接種を行ったサルの血漿中抗SeV抗体価の推移を示す。

粘膜免疫賦活による HIV 感染制御法の開発

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 は、直腸、肛門、膣などの粘膜から感染するため、粘膜において抗 HIV 免疫反応を誘導することは、HIV 感染を制御する鍵となり得る。免疫細胞の中でも、細胞障害性 T 細胞 (CTL) とそれらを誘導する樹状細胞 (DC) は、HIV を含む抗ウイルス免疫において特に重要である。こうした中我々は、卵白アルブミン (OVA) をコレラトキシン (CT) と共に経口投与した場合、マウスの消化管粘膜に OVA 特異的 CD8 陽性 CTL が *ex vivo* で著しく誘導されること、および消化管や皮膚に移植し定着した OVA 発現腫瘍がこの経口投与処置により有意に縮小することを見出した (J Immunol, 180:4000-4010, 2008)。この経口処置により縮小した腫瘍組織においては、抗原特異的な CD8 陽性 CTL の浸潤が観察された。更に本研究においては、粘膜における抗原特異的 CTL の誘導の機構を調べるために、消化管粘膜における樹状細胞について解析を行った。クラス II MHC 分子による抗原のクロスプレゼンテーションへの関連が示唆されている DEC-205 分子の発現について解析したところ、粘膜 CTL 誘導がピークとなる時期に、小腸粘膜における DEC-205 陽性 DC の有意な増加が見られたが、脾臓 DC において変化はみられなかった。以上、経口免疫によって誘導される抗原特異的 CTL が粘膜や皮膚といった体表面組織のウイルス感染細胞や腫瘍を効果的に制御する可能性、および、これらの CTL が粘膜局所の DC によって誘導されている可能性が示唆された。経口免疫法は抗 HIV ワクチンの有効な方法のひとつに発展すると考え、現在更に研究を進めている。

A. 研究目的

HIV は性交渉により、直腸、肛門、膣などの粘膜を介して感染する。一方、感染した HIV は小腸粘膜に集積することが報告されており、以前の我々の研究でも、HIV-1 ペプチド発現リコンビナントワクチン rVv を感染させたマウスの小腸粘膜に、ウイルスの集積が観察された (Biochem Biophys Res Commun, 316: 356-363, 2004)。この事実は、粘膜組織において抗 HIV 免疫反応を誘導することが、HIV 感染を制御する上で非常に重要なファクターであることを示唆している。また、免疫担当細胞の中でも、細胞障害性 T 細胞 (CTL) とそれらを誘導する樹状細胞は、HIV 感染細胞を制御する上において特に重要であると考えられている。こうした中我々は、卵白アルブミン (OVA) をコレラトキシン (CT) と共にマウスに経口投与した場合、OVA 特異的な血中 IgG および糞便中 IgA 産生の誘

導 (Immunology 119: 167-177, 2006) のみならず、消化管粘膜組織内において強い活性を有した OVA 特異的 CTL が誘導されること、および消化管や皮膚に移植し定着した OVA 発現腫瘍がこの経口投与処置により縮小することを見出した (J Immunol, 180:4000-4010, 2008)。こうした抗原特異的 CTL の誘導には、DC が関与することが知られていたが、近年 DEC-205 陽性 DC が抗原のクロスプレゼンテーションに、33D1+DC は Th2 反応の誘導に重要であることが報告された。最近我々は、通常のマウスの脾臓には DEC-205+CD11c+DC と 33D1+CD11c DC が同様な割合で存在するのに対し、小腸上皮間には 33D1 を発現する DC が多く、DEC-205 陽性 DC が少ないことを見出している (論文投稿中)。本研究では、前述の経口ワクチンにより粘膜に抗原特異的 CTL を誘導したマウスにおける DC、特に DEC-205 陽性 DC 活性化の可能性を解析

し、粘膜における DC の効果的な活性化と抗原特異的 CTL の誘導による、HIV 感染防御防粘膜ワクチンの開発を模索した。

B. 研究方法

C57BL/6 マウス (H-2^b) に OVA 100 mg 単独、または OVA 100 mg と共に CT 10 μ g を経口投与後、様々な日にちにおいて小腸上皮間リンパ球 (IEL) および脾臓細胞を採取した。これらの細胞を H-2^b/OVA tetramer を用いて染色してフローサイトメトリーにより解析することにより、*ex vivo* OVA 特異的 CTL を検出する一方、⁵¹Cr-release 法を用い、OVA 特異的 CTL 活性を検討した。次に、マウスの皮内または胃に OVA 発現腫瘍 E.G7-OVA (H-2^b) を移植し、腫瘍が生着する 3 日後に OVA 100 mg 単独、または OVA 100 mg と共に CT 10 μ g を経口投与し、その後の腫瘍の成長を経時的に観察した。また、OVA と CT の経口投与により縮小した腫瘍組織よりリンパ球分画を分離し、H-2^b/OVA tetramer で染色、解析し、OVA 特異的 CTL を検出した。更に、経口投与を施したマウスから、小腸上皮間樹状細胞 (DC) および脾臓 DC を採取し、DEC-205 や 33D1 といった MHC 抗原提示に関する表面抗原の発現をフローサイトメトリーにより解析した。

(倫理面への配慮)

マウスへの経口投与や開腹手術といった処置は、全て麻酔下に行った。腫瘍の直径が 2 cm を越えた場合、および実験後のマウスは麻酔により安楽死させた。

C. 研究結果

1) OVA と CT を経口投与したマウスの脾臓細胞を *in vitro* で刺激すると、OVA 特異的な CTL が観察されることは従来から知られていた。我々は、生体における本来の CTL の活性状態を調べるために、*in vitro* での刺激なしに、生体から採取したばかりの細胞における抗原特異的 CTL の検出を、OVA テトラマーを用いて試みた。そうしたところ、OVA と CT を経口投与したマウスにおいては、脾臓よりもむし

ろ小腸粘膜の IEL において優位に、OVA テトラマー陽性の抗原特異的 CTL が誘導されていることが分かった。この生体から採取したばかりの細胞における CTL 活性を、以下 *ex vivo* CTL と呼ぶ (図 1)。

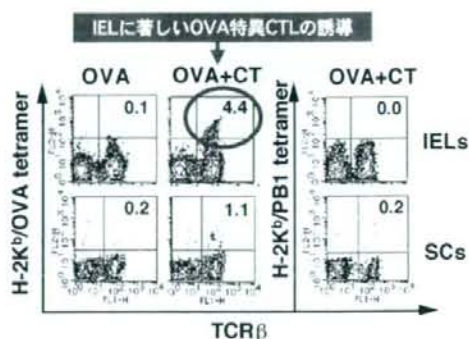


図 1. OVA と CT の経口投与による IEL における *ex vivo* OVA 特異的 CTL の誘導

2) 次に、OVA と CT を経口投与後の OVA 特異的 CTL 誘導のカイネティクスについて調べた。IEL において優位にみられる OVA テトラマー陽性の CTL は TCR β CD8 $\alpha\beta$ 陽性であり、経口投与の 7 日後に誘導のピークを迎え、かつ、抗原特異的なサイトトキシク機能を有した (図 2)。

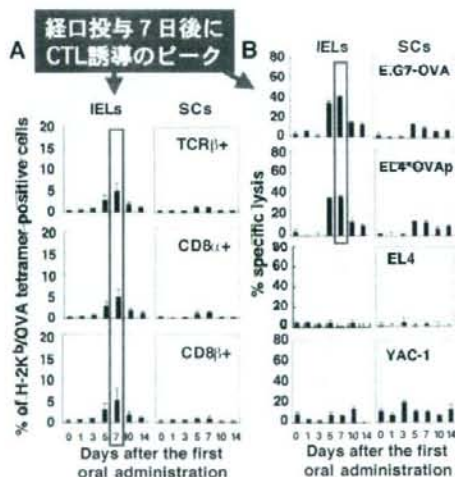


図 2. OVA と CT の経口投与後の *ex vivo* OVA 特異的 CTL 誘導のカイネティクス