

200830004A

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

HIV の感染予防に関する研究

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 の感染予防に関する研究	・・・ 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	HIV に対する中和抗体誘導とマルチクレイド HIV ワクチンの開発	・・・ 11
	山本 直樹 (国立感染症研究所 エイズ研究センター長)	
2	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	・・・ 17
	俣野 哲朗 (東京大学医科学研究所 教授)	
3	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	・・・ 25
	志田 壽利 (北海道大学遺伝子病制御研究所 教授)	
4	HIV-1 第2 受容体及び HIV タンパク質を基礎に HIV 飲むワクチンの創製	・・・ 29
	庄司 省三 (熊本大学 名誉教授)	
5	HIV 侵入の動的超分子機構を認識する特異的抗体作製に関する研究	・・・ 37
	玉村 啓和 (東京医科歯科大学生体材料工学研究所 教授)	
6	エイズウイルス感染を抑制する宿主応答の解析	・・・ 49
	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)	
7	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	・・・ 55
	三浦 智行 (京都大学ウイルス研究所 准教授)	
8	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	・・・ 59
	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)	
9	ワクチンアジュバント開発と動物実験	・・・ 67
	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)	
10	粘膜免疫賦活によるエイズウイルスの制御—母乳を介した感染伝播抑制の抑制	・・・ 71
	高橋 秀実 (日本医科大学微生物学免疫学教室 教授)	
11	rBCG/rDIs を用いたプライム・ブースト型エイズワクチンの開発	・・・ 77
	網 康至 (国立感染症研究所動物管理室 主任研究官)	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	・・・ 81
IV.	研究成果の刊行物・別刷 (抜粋)	・・・ 91

1. 総括研究報告書

HIV の感染予防に関する研究

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：

今年度は、真の感染予防ワクチンの開発を目指すため、新たな方法論を導入することにより、免疫原のデザイン、新規ベクター開発、感染防御免疫、小動物モデル、HIV の多様性、粘膜局所でおこる超早期の感染機序などの問題に総合的に迫り、DNA/SeV-Gag ワクチンで Gag 特異的 CTL が中心的役割を果たしていること（俣野）、改良型の Gag と Env 高発現型 BCG コンストラクトを作成した（山本）、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（網）、増殖型 m8ΔSIVgag の方が欠損型より 1 桁多くの IFN- γ 産生細胞を誘導した（志田）、Senju vaccine をアカゲザルに経口投与することにより、抗原特異的粘膜免疫・全身性免疫が誘導されること（庄司）、4 種のターゲットで、人工抗原分子を順調に合成できた（玉村）、糖鎖修飾の減少により SIV の組織・細胞指向性が変化した（森）、ウイルス感染に対して脆弱な腸管においても感染初期からウイルス増殖やメモリー CD4 陽性 T 細胞減少を抑制しうる免疫を誘導すること（三浦）、抗酸菌分泌タンパク Ag85B がワクチンのアジュバントとして有効であること（保富）、ワクチンアジュバントとしてキトサン誘導体による粘膜免疫誘導が有効であること（石川）、初乳中の BrMMΦ 表面に発現した HIV レセプター DC-SIGN の発現が、Poly(I:C) による TLR を介した細胞内への刺激により著明に抑制されること（高橋）、などの結果を得た。

研究分担者

- 俣野哲朗（東京大学医科学研究所 教授）
志田壽利（北海道大学遺伝子制御研究所 教授）
庄司省三（熊本大学 名誉教授）
玉村啓和（東京医科歯科大学生体材料工学研究所 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）
三浦智行（京都大学ウイルス研究所 准教授）
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）
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）
高橋秀実（日本医科大学微生物学免疫学教室 教授）
網 康至（国立感染症研究所動物管理室 主任研究官）

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。

HIV 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。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のほうがより効果的であること（プライム・ブースト法）、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（AAV-1, DNA plus IL12 or IL15, VSV, まれな血清型のアデノウイルス、またはそのリコンビナント）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（たとえばインターフェロン γ や Intracellular cytokines 測定法）。これらによりメモリー 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。

これまで本研究班の班員のそれも含め、報告されているように、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ている。また、長期未発症者 (long-term non-progressor, LTNP) では CD8+T 細胞のエピトープ逃避に選択性があることが報告された。また、液性免疫誘導で中和抗体によるコントロールが明らかにされたが、大部分の感染例で抗体によるウイルス中和からの逃避が報告されている。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。上記のように、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。

以上の知見から、今後期待される HIV ワクチン研究の成果と方向性として以下のことがあげられる；

- 1) HIV に対する抗体 (HIV-A b) は、ウイルス感染を予防できると予測される。その作用は細胞性免疫 (CMI) の誘導により増強される。
- 2) 中和抗体の誘導は、感染防御に必須となる。また、A b は、活性が高く、親和性が強くなければならない。しかし、すべてのクレイドのウイルス感染を防御するのは難しいのではないかと？
- 3) CMI ではウイルス感染を予防できない、しかし抑制は出来ると思われる。

4) 特異的 T ヘルパー細胞活性を強く誘導できれば、慢性感染症の発症や進行を予防できると思われる。その際、CD4+メモリー T 細胞機能が障害を受けていないことが重要である。

5) ワクチン開発には、プライミングを粘膜で、さらにブースティングを非経口的に行うことが効果的であり、粘膜感染を防ぐには、粘膜部位に特異免疫を誘導し粘膜で感染を阻止するのが必要となる。

本研究班では我が国の先端に行く研究者を結集して英知を絞り、エイズワクチン開発の実現に向け研究を行った。

B. 研究方法

分担研究者の数は 11 名と多く、しかもその研究方法は多岐かつ記述は膨大であるので、ここでは以下に各研究者のそれを項目のみあげるに留める。詳細については個別の研究報告を参照されたい。

俣野

- ・SIVmac239 感染 MHC-I ハプロタイプ 90120-1a 陽性サル
- ・CTL エスケープ gag 変異
- ・SIV 変異株 SIVmac239Gag216S244E および SIVmac239Gag216S244E247L312V373T
- ・血漿中ウイルス量定量
- ・末梢血中 CD4 陽性 T リンパ球数・セントラルメモリー (CD95 陽性 CD28 陽性) CD4 陽性 T リンパ球数測定等の解析
- ・抗原特異的インターフェロン γ (IFN- γ) 誘導測定

山本

- ・改変型 Env 抗原発現ベクターの構築
- ・DNA ワクチン
- ・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
- ・*Mycobacterium smegmatis* 由来 SP2 プロモーター
- ・*Mycobacterium fortuitum* 由来 blaF 分泌シグナル

- ・BCG への遺伝子導入
- ・rBCG のウエスタンブロット解析
- ・抗 Env C25 マウスモノクローナル抗体

網

- ・カニクイザルの免疫
- ・SIVmac239 (nef+) の攻撃試験
- ・effector memory / naive memory CD4(+) 細胞比
- ・plasma 中のウイルス RNA コピー数
- ・SIVgag に対する免疫応答
- ・マルチエピトープ rDIs の構築のための抗原
- ・gp145ΔCFI (gp145)
- ・マルチエピトープ rDIs (rDIs/gp140-SIVgag) の作製
- ・ELISA 抗体価の経時的解析

志田

- ・組み換えワクシニア株
- ・SIV Gag の発現
- ・SIV Gag の ELISPOT

庄司

- ・アカゲザルへの TGDK 及び poliovirus の投与と組織切片の採取
- ・アカゲザル回腸組織切片の TGDK の取り込みの検証
- ・アカゲザル回腸切片の EDS 解析
- ・Senju vaccine の調製
- ・HIV-1 粘膜ワクチンのアカゲザルへの経口免疫及び採取したサンプルの調整
- ・ELISA
- ・in vitro における SIVmac239 の感染阻害効果の検討

玉村

- ・gp41 のヘリカル領域の合成ペプチド (N および C 端側) 3 量体の合成と抗体誘導
- ・gp120 の CD4 binding/コレセプター-binding 領域を抗原として抗体誘導の検討
- ・コレセプター CXCR4 の細胞外ループ (Ecl1-Ecl3 & N 端) を基にした抗原分子作製 & 抗体誘導
- ・CD4 mimic 誘導体の合成と抗 HIV 活性の評価および中和抗体等との併用効果

森

- ・ミャンマー、ラオス原産の育成アカゲザル
- ・SIV 感染
- ・ウイルス
- ・血しょうウイルス RNA 量の測定
- ・フローサイトメトリーによる免疫細胞の細胞表面抗原の解析
- ・T 細胞パネル
- ・SIV 感染細胞のフローサイトメトリー解析
- ・免疫組織学的解析

三浦

- ・nef 欠失 SHIV 弱毒生ワクチン接種
- ・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解析
- ・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)
- ・投与方法 (デリバリー法やアジュバント)
- ・サル感染実験
- ・深部標的組織における感染防御効果

保富

- ・タンパクワクチンに対するアジュバント効果の測定
- ・特異的抗体の測定
- ・ELISPOT アッセイ
- ・HIVenv gp120 特異的 CTL の測定
- ・in vivo における抗ウイルス活性の測定

石川

- ・マウス
- ・カチオン化度による抗体産生能
- ・抗体検出
- ・免疫ルートの検討
- ・精製 HIV-1env タンパク質を用いた抗体産生能および中和活性の検討
- ・カニクイザルを用いた経鼻免疫実験

高橋

- ・EGFP 遺伝子を導入した HIV (HIV-EGFP/Nef(-)) の作成
- ・HIV-gp120 蛋白
- ・コレラトキシン(CT)
- ・H-2Kb/OVA-tetrame
- ・母乳マクロファージ (BrMMΦ) と末梢血単

核球 (PBMo) の単離

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、倫理面も含めて、所属施設および医薬基盤研究所の動物実験委員会の審査を受け、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. プライムブーストワクチン

ワクチンの有効性が認められた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 陽性サル群を用いた SIV 複製抑制機序解明を進め、平成 19 年度には、この群で Gag 特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 反応により選択された複数のエスケープ gag 変異を有する SIV の、90120-Ia 陰性サル群への感染実験を行い、その複製能が低下していることを報告した。今年度（平成 20 年度）は、これらのエスケープ変異選択に関与した CTL のワクチン効果への寄与を知る目的で、ワクチン接種 90120-Ia 陽性群に、この SIV 変異株のチャレンジ実験を行った。その結果、ワクチン接種 90120-Ia 陽性群では、SIV 野生株の複製は制御されるのに対し、より複製能の低い SIV 変異株の複製は制御されないことが明らかとなった。（俣野）

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っ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 (b1aF 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。（山本）

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 HIVenv 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 HIVenv ELISA 抗体の産生を認めた。（網）

2. ベクター開発

m8ΔSIVGag と増殖能欠損ワクシニア DIsSIVgag の免疫原性をマウスにおいて比較したところ、前者が約 10 倍高頻度の抗 Gag CTL を誘導した。又、Gag と CD40Lm を共発現する m8Δ組み換体を作成して、m8ΔSIVGag と比較したところ逆に抗 Gag CTL 誘導能が低下した。しかし、この現象には深い意味があると考え次回のための計画を立てた。（志田）

3. 免疫原デザイン

創製した M 細胞標的分子 TGDK に関して、*in vivo* で TGDK のアカゲザルにおける M 細胞標的能と、ヒト M 細胞モデルを用いて *in vitro* でヒトにおける M 細胞標的能を検討した。また、TGDK が結合した Senju vaccine の粘膜免疫誘導能を評価した。その結果、*in vivo* において TGDK が回腸のパイエル板内に取り込まれ胚中心にまで達していることが示された。*in vitro* ヒト M 細胞モデルを用いた系において、TGDK のヒト M 細胞標的能が確認され、そのヒトにおける有効性が示唆された。また Senju vaccine をアカゲザルに経口免疫したところ腸管内に抗原特異的 IgA の産生が確認され、粘膜免疫を誘導することが確認された。また一部のアカゲザルにおいて、血清中に Rh-cDDR5 に対する IgG が誘導が観察され、全身性の免疫の

誘導能が示された。得られた抗 CCR5 特異的 IgA を用いて *in vitro* で SIVmac239 の感染阻害効果を検討したところ有意にウイルスの感染を抑制した。(庄司)

今までのエイズワクチン創製研究であり取りあげられなかった以下の4種をターゲットとして設定し、有機合成化学を巧みに用い人工抗原分子を作製し、その評価を行っている。1) HIV が標的細胞へ侵入するときの HIV 表面蛋白 gp41 の立体構造変化をターゲットとして設定し、gp41 のヘリカル領域の断片ペプチド(N および C 端側)に親水性領域を付与した形で化学合成し、膜融合の中間体構造である 3 量体を形成するようにアッセムブリーシ抗原分子を作製した。N 端側のヘリカル領域の 3 量体ペプチドについては実際マウスに免疫し、中和抗体が誘導できていること、およびその血清に抗 HIV 活性があることを確認した。2) 長期未発症の HIV 感染者で高く保存されている HIV 表面蛋白 gp120 の CD4 binding/コレセプター-binding 領域をターゲットとし、効率的にエピトープを提示できるように構造固定化した環状ペプチドミメティクを作製した。マウスやウサギに免疫したが、効率よく抗体誘導されなかった。また、ファージディスプレイライブラリーからの *in vitro* アフィニティー選択による特異的抗体を創出した。3) 標的細胞側のコレセプター CXCR4 の N 端領域および 3 種の細胞外ループに親水性領域を付与したペプチドを合成し、人工テンプレート上に構築した分子を作製した。マウスに免疫し、抗体誘導を行った。4) HIV 侵入の際に最初に結合する宿主細胞の CD4 の小分子 mimic の細胞毒性を軽減した誘導体を合成した。HIV 侵入の動的超分子機構において構造変化を誘起することや、併用による抗 V3 抗体の中和活性を増強する効果があることを見出した。(玉村)

4. 弱毒生ワクチンと Immune correlates

糖鎖変異をくわえた d-5G は腸管粘膜組織、粘膜固有層 effector memory CD4⁺T 細胞を主要感染標的細胞としていたが、2 次リンパ組織での感染は少なかった。SIV239 は腸管粘膜組織孤立リンパ

小節、2 次リンパ組織の central memory CD4⁺T 細胞を主要感染標的細胞としていた。両者の違いは 2 次リンパ組織での感染レベルの違いが原因となっていた。SIV239 の性質は HIV の病原性、慢性感染における持続感染、さらに免疫機能障害と密接に関連していた。(森)

以前の研究で、エイズウイルスの病原性に関する *nef* 遺伝子を欠失させた SHIV-NI 弱毒生ワクチン免疫サルが攻撃接種ウイルスの増殖を強力に抑制することを明らかにしてきたが、それらは主に末梢血レベルでの解析であった。本研究では、SHIV-NI 免疫サルの増殖抑制機序を深部臓器レベルで明らかにするため、免疫サルおよび非免疫サルに急性発症型 SHIV-C2/1-KS661 (KS661) を経粘膜攻撃接種し、早期の全身臓器におけるウイルス感染動態および CD4 陽性 T 細胞の動態を詳細に比較検討した。生ワクチン接種後、早期に強毒ウイルスを攻撃接種し、腸管や全身の深部リンパ系組織におけるウイルス感染と免疫細胞の動態について解析を行なった結果、ウイルス感染に対して脆弱な腸管においても感染初期からウイルス増殖やメモリー CD4 陽性 T 細胞減少を抑制しうる免疫を誘導すること、また、免疫細胞の過度の活性化制御機構を解明することが、より有効なエイズワクチン開発に重要と考えられた。(三浦)

5. アジュバントと自然免疫

本研究では Th1 反応を誘導する抗酸菌の 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 ワクチン免疫マウスに HIVenv gp120 組み込みワクシニア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。さらにこれら誘導された Th1 を主体とする免疫反応は BCG の感作により著しく増強された。(保富)

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のうち、キトサン微粒子とカチオン化キトサンを主に使用し、カチオン化度の差異および免疫経路等に関して検討した。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。また env タンパク質に対する抗体の中和活性を検討した。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、カチオン化キトサンおよびキトサン微粒子に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（石川）

本研究では母児感染を防ぐための母乳細胞上の DC-SIGN 発現を抑制する方策を検討した。まず末梢血単核球 (PBMo) と BrMMΦ を再度詳細に比較検討したところ、PBMo には TLR3 が全く発現していなかったのに対し、BrMMΦ には TLR3 が発現していること、そしてこの TLR3 の発現は IL-4 の添加により変化しなかったことを見出した。そこで、BrMMΦ に TLR3 の Ligand である Poly(I:C) を添加培養したところ、DC-SIGN が強発現した IL-4 添加群、ならびに少量発現した非添加群ともに DC-SIGN の発現が著明に抑制された。この際、Poly(I:C) 刺激で刺激した BrMMΦ 培養液中のインターフェロン (IFN) 活性を測定したところ、IFN- α 、IFN- β ともに検出された。そこで、BrMMΦ を IL-4 添加により刺激する際に IFN- α あるいは IFN- β を添加し DC-SIGN 発現に対する影響を追跡したところ、IFN- α あるいは IFN- β ともに濃度依存性に DC-SIGN の発現が抑制され、その抑制効果は IFN- β の方が IFN- α に比べ若干高かった。こうした結果に基づき、IFN- α あるいは IFN- β で処理した BrMMΦ を HIV-1 とともに培養し Free ウイルスを洗浄除去し、HIV-1 感受性のある MAGIC-V 細胞を添加培養したところ、HIV-1 の感染伝播が著明に抑制された。（高橋）

D. 考察

今年度（平成 20 年度）は、これらのエスケープ変異選択に関与した CTL のワクチン効果への

寄与を知る目的で、ワクチン接種 90120-1a 陽性群に、この SIV 変異株のチャレンジ実験を行った。その結果、ワクチン接種 90120-1a 陽性群では、SIV 野生株の複製は制御されるのに対し、より複製能の低い SIV 変異株の複製は制御されないことが明らかとなった。この結果は、この 90120-1a 陽性サル群での DNA/SeV-Gag ワクチンによる SIV 持続感染成立阻止に、Gag 特異的 CTL が中心的役割を果たしていることを証明するものとして極めて重要である。（俣野）

改良型の Env 高発現型 BCG コンストラクトのペトラマーアッセイでの評価を進めている。また 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 を食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。（山本）

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。(網)

今年度、増殖型 m8ΔSIVgag と増殖能欠損型 rDIs/PSFJ/SIVgag の抗 Gag CTL 誘導能をマウスで比較したところ、m8ΔSIVgag の方が1桁多くの IFN- γ 産生細胞を誘導する事が分かった。既に、チンパンジーにおける C 型肝炎ウイルスの感染制御が増殖能欠損型ワクシニア/アデノバクターではなし得ず、増殖型ワクシニア WR ワクチンでしか成就できなかった事が報告されている。又、抗体の affinity maturation が増殖型ワクチン接種によって引き起こされる事が報告されている。これらの結果は、増殖型 m8Δ ワクチンワクチンが増殖能欠損型の MVA や NYVAC ワクチンよりもヒトでより強力な抗 HIV 免疫を誘導する事を期待させる。一方、CD40Lm 共発現ワクシニアは意に反して、CTL 誘導能が低かった。この原因として次の2つの可能性が考えられる。①CD40Lm の発現によって、抗ワクシニア免疫が早期に誘導された。②誘導された免疫が抗体誘導に偏った。この両方の可能性を検討する事はワクシニアワクチンによる免疫誘起機構を理解する上で、重要であり興味深い。(志田)

Senju vaccine をアカゲザルに経口免疫したところ腸管内に抗原特異的 IgA の産生が確認され、粘膜免疫を誘導することが確認された。また一部のアカゲザルにおいて、血清中に Rh-cDDR5 に対する IgG が誘導が観察され、全身性の免疫の誘導能が示された。得られた抗 CCR5 特異的 IgA を用いて *in vitro* で SIVmac239 の感染阻害効果を検討したところ有意にウイルスの感染を抑制した。以上のことから、Senju vaccine は、その分子中に含まれる TGDK による粘膜面での M 細胞への特異的な標的と、GALT における抗原感作により、粘膜免疫と全身性免疫の両方を誘導することが示唆された。Senju vaccine は、粘膜面で病原体の侵入を防ぎ、万一体内に侵入したとしても全身性免疫

によって病原体を駆逐する二重の防衛線を構築することができると期待できる。(庄司)

エイズワクチン開発のため、本研究でアプローチした4種のターゲットはいずれも革新的、斬新なアイデアに基づいている。創薬化学・ペプチド合成の巧みな技術を用い、抗原分子等を順調に合成できた。実際のマウスでの免疫による抗体誘導の実験に加え、ファージディスプレイライブラリーを使った抗体のセレクションも行った。

1) gp41 のヘリカル領域の合成ペプチド

親水性領域を付加した N36 の抗原ペプチドの3量体の構築に成功した。マウスでの中和抗体誘導、血清の抗 HIV 活性も確認しており、今後最適化を検討することにより、有用なワクチンになる可能性がある。C34 に関しても同様に進行中である。

2) gp120 の CD4 binding/コレセプター-binding 領域

構造を固定化した環状抗原ペプチドの抗体誘導能をファージディスプレイライブラリーでのセレクションを用いて、アフィニティーの高い抗体を得た。今後中和活性の評価等を検討する。

3) コレセプター CXCR4 の細胞外ループ (Ecl1-Ecl3 & N 端)

N 端ペプチドについては抗原分子 (Nt-2 と Nt-3 の4置換体) を構築し、マウスに免疫し、抗体誘導を行った。効率よく抗体誘導されているものもあり、抗 HIV 活性に関して、現在検討中である。Ecl1 に関しては、親水性領域を付加することにより、環化を効率的に進行させることができた。MAP-テンプレートに導入も成功したので、マウスに免疫する予定である。

4) CD4 mimic 誘導体

構造活性相関により毒性の軽減した誘導体を得た。また、CD4 mimic 誘導体が gp120 のコンフォメーション変化を誘起した。抗 V3 抗体との併用は抗ウイルス活性を増強し、相乗効果を示した。gp120 の構造変化を誘起し抗体との反応性を向上させることは、今後の抗体・ワクチン療法において有用な知見を与える。(玉村)

d-5Gは小腸粘膜固有層に存在する effector memory T細胞に感染し、喪失させる。これらの細胞は腸内病原体に対する感染防御に働くことから、感染による effector memory T細胞の喪失は、腸での病原体感染に影響を与えることが推測される。しかし d-5G 感染ザルは、病原性 SIV に対する効果的な防御免疫が誘導したことから、effector memory T細胞の一時的な消失はサルの免疫機能への影響は小さいと考えられる。対照的に SIV239 の 2 次リンパ節中の central memory CD4+T 細胞の感染は、SIV 感染に対する防御免疫に重大な障害を与え、持続感染の原因となっていると推測される。HIV/SIV の病原性と免疫の活性化との関係が注目されているが、central memory CD4+T 細胞の感染が宿主応答の活性化 (T 細胞活性化) が HIV/SIV の持続感染の原因となっていることが推測される。

d-5G 感染における末梢リンパ球中の CCR5+CD4+T 細胞の誘導と維持に関し、CD4+CCR5+CD4+T 細胞の頻度は、SIV239 感染では感染後 14 日には感染前の 1/10 以下に減少した。ところが、d-5G 感染では逆に誘導・維持されていた。d-5G 感染では、2 次リンパ節での SIV 感染が抑制されているが、この抑制は d-5G 感染ザルにおける有効な防御免疫誘導の原因となっていることが示唆される。我々は d-5G 感染が誘導する防御免疫が多様な HIV 感染に対する有効性を示すことを明らかにしている。CCR5+CD4+T 細胞の誘導と維持と防御免疫との関係を明らかにする研究の必要性が強く示唆される。(森)

感染後早期からウイルス増殖を抑制し、且つ、全身のメモリーCD4陽性T細胞の減少を防ぎ、ウイルス感染に対して脆弱な腸管においてもウイルス増殖・細胞傷害を抑制しうる免疫を誘導することがエイズ病態進行を防御する有効なワクチンに必要と考えられる。また、免疫誘導機構(アクセル)だけでなく、免疫細胞の過度の活性化を制御する機構(ブレーキ)を解明することも、より有効なエイズワクチン開発に重要と考えられた。(三浦)

エイズウイルス感染の予防には細胞性免疫は

必須であり、また感染直後のウイルスをコントロールすることは予後に対しても大きく影響する。今回用いた Ag85B は安全であり、強い免疫反応を誘導することが出来る。さらに BCG 等の抗酸菌で感作されているとその効果はより著明であること、更に世界中の多くの国で結核ワクチンとして BCG が用いられ、多数のヒトが抗酸菌感作を受けていることから Ag85B のワクチン増強効果は現実的なアジュバントとして使用されうると考えられる。本研究においても Ag85B 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。(保富)

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の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膈免疫と同様に膈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。またマウスにおいては腹腔免疫が2回の免疫で高い抗体価を示すとともにアジュバント使用量も減じられる可能性が示された。今後より詳細に検討し、経鼻と注射の併用によるアジュバントおよびワクチン抗原の減量を試みたい。

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、カチオン化度が高いほど抗体産生が高い傾向が認められたが、今後さらに詳細な検討が必要である。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ていると考えている。精製 HIV-1 env タンパク質とカチオン化キトサンを用いた中和活性試験では、gp160 に対する抗体が認められ、その抗体を含む血清に中和活性が認められた。こんごさらに細胞性免疫の解析をマウスで行う予定である。(石川)

本研究では、まず末梢血単核球 (PBMo) と BrMMΦ を再度詳細に比較検討したところ、PBMo には TLR3 が全く発現していなかったのに対し、BrMMΦ には TLR3 が発現していること、そしてこの TLR3 の発現は IL-4 の添加により変化しなかったことを見出した。そして、TLR3 の Ligand である Poly(I:C) で BrMMΦ を刺激した場合、IL-4 で活性化した場合も、また非活性化時においても DC-SIGN の発現が著明に抑制されることを見いだした。また、こうした状況下において BrMMΦ より IFN- α 及び IFN- β が放出されることから、DC-SIGN の発現抑制に IFN 群が関与することを想定し、実際にそのことを証明するとともに、IFN 処理により IL-4 で活性化した BrMMΦ による HIV-1 の感染伝播が阻害されることを見いだした (論文投稿中: 発表論文 5)。また一方において、樹状細胞の亜分画を選択的に活性化することにより、体内環境を IL-4 産生が抑制されるような Th1 型優位の状態に出来るだけ保つことなどが、HIV の母乳感染を抑制する上で非常に重要である示唆している。我々はこのような視点から、Th1 型優位の状況を形成するための鍵を握る細胞として DEC-205 陽性 DC の選択的活性化法を検討し興味深い知見を得ている (論文投稿中: 発表論文 6)。こうした知見より得られた方法が DC-SIGN の発現を抑制し、新たな HIV 母乳感染阻止への道を拓くことになるものと考え現在さらに研究を進めている。(高橋)

E. 結論

DNA/SeV-Gag ワクチンで SIV 複製抑制効果が認められた 90120-1a 陽性サル群において、そのワクチン効果に、Gag 特異的 CTL が中心的役割を果たしていることを明らかにした。(俣野)

BCG ベクターが DNA ワクチンに置き換えられるかどうかを、マウスの実験で比較するのは困難である。その点で BCG には極めて不利な状況だが、サルの実験へステップアップするためには BCG のコンストラクトをグレードアップさせることと、なるべく BCG の効果が positive に出るマウスの strain を使うことが重要と思われる。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アッセイでの評価を進める。(山本)

蛋白発現量を高めた rBCG/opt-SIVGag と rDIs-SIVGag による細胞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。(網)

増殖型 m8 Δ SIVgag と増殖能欠損型 rDIs/PSFJ/SIVgag の抗 Gag CTL 誘導能をマウスで比較したところ、m8 Δ SIVgag の方が 1 桁多くの IFN- γ 産生細胞を誘導した。CD40Lm 共発現ワクチニアは CTL 誘導能が低かった。しかし、この現象は深い意味を持つと考える。(志田)

TGDK は霊長類 M 細胞標的能を有することが示された。さらに TGDK と各種免疫抗原を共有結合した Senju vaccine をアカゲザルに経口投与することにより、抗原特異的粘膜免疫・全身性免疫が誘導されることが確認された。(庄司)

4 種のターゲットで、人工抗原分子を順調に合成できた。gp41-N36 の 3 量体についてはすでにマウスで有効性を確認した。コレセプター CXCR4 の N 端、細胞外ループは効率的な合成法により、MAP に導入した。N 端についてはマウスでの評価も行った。gp120 エピトープもファージでの抗体作製に成功した。また、CD4 mimic 誘導体により、gp120 の構造変化を誘起し抗体との反応性を向上させた。これらの結果は今後の HIV 抗体・ワクチン療法の研究において、重要な知見となると思われる。(玉村)

糖鎖修飾の減少により SIV の組織・細胞指向性が変化したことが、d-5G の低病原性と生ワクチンとしての機能と関連することが明らかとなった。(森)

ウイルス感染に対して脆弱な腸管においても感染初期からウイルス増殖やメモリー CD4 陽性 T 細胞減少を抑制しうる免疫を誘導すること、また、免疫細胞の過度の活性化制御機構を解明することが、より有効なエイズワクチン開発に重要と考

えられた。(三浦)

抗酸菌分泌タンパク Ag85B 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。

(保富)

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による粘膜免疫誘導が効である可能性が示された。(石川)

本研究により初乳中の BrMMΦ 表面に発現した HIV レセプター DC-SIGN の発現が、Poly(I:C) による TLR を介した細胞内への刺激により著明に抑制されること、そしてその DC-SIGN 発現抑制作用には、Poly(I:C) による刺激を受けた BrMMΦ から放出される IFN-α 及び IFN-β が関与することが示唆された。また、IFN-α 及び IFN-β の添加により IL-4 刺激による DC-SIGN の発現が抑制され、DC-SIGN を介した HIV-1 の感染伝播が抑制される可能性が明らかとなった。(高橋)

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

各研究分担者の項を参照のこと

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

庄司省三

- 1) 腸管免疫賦活剤 (国際公開番号: WO2007/052641 A1)
- 2) ワクチン剤 (特開 2008-231343)

玉村啓和

- 1) 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 (特許出願番号: CT/JP2008/055399)

石川晃一

- 1) 免疫アジュバント① (特願 2007-192362)
- 2) 免疫アジュバント② (特願 2007-192363)
- 3) IgA 抗体測定方法 (特願 2007-192364)

11. 分担研究報告書

HIV に対する中和抗体誘導とマルチクレイド HIV ワクチンの開発

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：

組換え BCG (rBCG)によるブ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を DNA ワクチンと比較評価した。また 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。

A. 研究目的

ヒト免疫不全症ウイルス (HIV-1) は世界規模での感染拡大を続けており、2010 年頃には全世界で HIV 感染者の数は 8000 万人にもおよぶと推定されている。わが国でも 2004 年には、感染者とエイズ患者の合計が年間で初めて 1000 件を超え、2005 年には累計で 1 万人を突破した。エイズの世界的な流行の問題を解決するためには、感染予防と治療の良い科学技術ツールの研究・開発が重要である。HAART がかなりの成功をおさめているが、現在の治療薬は、ヒトへの感染源となる患者の感染血液細胞から HIV を除去することは不可能で、患者は一生治療と向き合って生きていかねばならない。従って、治療薬対策は将来的に顕性患者を減少させるが、数は減少させない。これは、治療が感染源を減少させる他の感染症とは異なった重大な不利点である。このような状況に対し、教育、啓蒙、予防活動などのきめ細かいサービスの提供や正しい知識を持って社会的偏見をなくしていくことがもっとも有効であるが、このような社会的予防の徹底にはまだ道のりは遠い。したがって包括的なエイズ対策の中で、エイズワクチンの開発は根本的な解決法であり、不可欠である。

本研究においては、BCG/ DIs あるいは BCG/ Ad ブライムブーストワクチンの実用化を最終のゴ

ールとして、まずプライミング・ベクターとしての BCG と Ad の比較を行うとともに、その免疫原性増強のため、BCG における Gag および Env 抗原の新たな分泌発現系を検討し、抗原発現レベルの向上、抗原発現の最適化による接種量の軽減を行い実用性の評価などについて小動物での評価を行った。

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 (VIV2 を欠失している) または gp145 (VIV2 を持つ) 遺伝子である。これらを用いた DNA ワクチンでは、VIV2 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 pSOR246 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 rBCG のウエスタンブロット解析

上記の pS0246 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 (30mg/ml) 含有 7H10-0ADC 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、菌体の超音波破砕により lysate を調製した。培地上清は 0.45mm 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 膜にプロットし、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。

(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。動物実験については倫理面も含め、国立感染症研究所の審査を受け、その承認を得てから行った。

C. 研究結果

1. 組換え BCG (rBCG)/rAd5 プライムブーストワクチン開発のため、Env 抗原を標的としたワクチンを用いて以下の比較検討を行った。

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評価試験を行った。rBCG の評価に関する得られたポイントは以下の二点である。

- ① 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。PA9 テトラマー (IGPGRFYA) を用いると DNA/rAd5 の反応性が高くピークは 14 日目ごろだが、PI10 テトラマー (IGPGRFYTI) では BCG/rAd の方が高く、応

答のピークが 4 日目と早かった。

- ② 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。

現在行っている Env についての改良研究のウス実験の結果を待って、有望な組み換え BCG 株が確立できたら、米国 VRC 側に供与して評価をお願いすることを確認した。

2. 抗原の分泌と高発現についても以下の研究を行った。

Gag については、Ag85B シグナルに繋ぐことにより BCG からの分泌発現が可能であることが判った。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 (コピー数が pS0246 の 3-5 倍) 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。これらのクローンについても、マウスでの Gag 特異的な免疫応答を評価して行く予定である。しかし抗原は細胞外にほとんど分泌されていないことがわかり今後の課題となった。

D. 考察

2007 年に発表された Merck 社の rAd5/gag ワクチンの、臨床試験 Phase IIB における失敗の影響で、VRC が行う予定だった DNA/rAd5 のプライムブーストワクチンの Phase IIB 臨床試験の施行が pending になっている。VRC では Ad5 に代わる他の血清型のアデノウイルスのベクターとしての開発を進めてきたが、現在までに Ad5 ベクターほど強力な細胞性免疫誘導能を持つものは見出されていない。これまでに多額の研究費をかけて行ってきた rAd5 ベクターワクチンの開発をやめてしまうことは、上層部の責任問題にもなりかねず、やめる訳にはいかないというのが内情のようだ。当面は DNA/rAd5 プライムブーストワクチンの小規模な臨床試験を抗 Ad5 抗体価の低い人を対象に行うようである。

rBCG ベクターに対する現在のところの評価は、DNA ワクチンを完全には凌駕できなかった Env 発現株のマウス実験の結果から、可もなく不可もなくと言うところである。多額の費用を投入して DNA ワクチンを GMP grade で生産するためのパイロットプラントまで建設した VRC としては、そこそこの効果では DNA ワクチンの代替品として採用しないだろう。人で機能するのが確実な BCG ベクターと、マウスの実験ではすばらしい結果が出るが人では免疫原性が弱いことが明白になった DNA ワクチンを、マウスの実験で比較するのは BCG には極めて不利な状況だが、サルの実験へステップアップするためにマウスのデータで判断されるのが通例という世界なので、この段階を突破するためには今取り組んでいるように BCG のコンストラクトをグレードアップさせることと、なるべく BCG の効果が positive に出るマウスの strain を使うことが重要と思われる。現在は、BCG-sensitive な Balb/c マウスを用いているが、BCG-resistant な DBA/2 マウスを用いた方が、細胞性免疫誘導能が高いという示唆もあるので、その検討も急いで行わなければならない。

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る。また 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。

E. 結論

DNA ワクチンを、マウスの実験で比較するのは BCG には極めて不利な状況だが、サルの実験へステップアップするためには BCG のコンストラクトをグレードアップさせることと、なるべく BCG の効果が positive に出るマウスの strain を使うことが重要と思われる。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る。また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。

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 I strain elicits effective mucosal and systemic immunity. *Scand J Immunol* 68 (5): 476-483, 2008.
- 2) Dewan MZ, Takamatsu N, Hidaka T, Hatakeyama K, Nakahata S, Fujisawa J, Katano H, Yamamoto N, Morishita K. Critical role of TSLC1 expression in the growth and organ-infiltration of adult T-cell leukemia cells in vivo. *J Virol* 82 (23): 11958-11963, 2008.
- 3) Tanaka T, Tsutsumi H, Nomura W, Tanabe Y, Ohashi N, Esaka A, Ochiai C, Sato J, Itotani K, Murakami T, Ohba K, Yamamoto N, Fujii N, Tamamura H. Structure-activity relationship study of CXCR4 antagonists bearing the cyclic pentapeptide scaffold: identification of the new pharmacophore. *Org Biomol Chem* 6 (23): 4374-4377, 2008.
- 4) Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang BG, Satoh T, Omori H, Noda T, Yamamoto N,

- Komatsu M, Tanaka K, Kawai T, Tsujimura T, Takeuchi O, Yoshimori T and Akira S. Loss of Atg16L1, an autophagy regulator, enhances endotoxin-induced IL-1 β production *Nature* 456 (7219): 264-268, 2008.
- 5) Yajima M, Imadome KI, Nakagawa A, Watanabe S, Terashima K, Nakamura H, Ito M, Shimizu N, Honda M, Yamamoto N, Fujiwara S. A New Humanized Mouse Model of Epstein-Barr Virus Infection That Reproduces Persistent Infection, Lymphoproliferative Disorder, and Cell-Mediated and Humoral Immune Responses. *J Infect Dis* 198 (5): 673-682, 2008.
 - 6) Haga S, Yamamoto N, Nakai-Murakami C, Osawa Y, Tokunaga K, Sata T, Yamamoto N, Sasazuki T, Ishizaka Y. Modulation of TNF- α -converting enzyme by the spike protein of SARS-CoV and ACE2 induces TNF- α production and facilitates viral entry. *Proc Natl Acad Sci USA* 105 (22): 7809-7814, 2008.
 - 7) Kubo Y, Yoshii H, Kamiyama H, Tominaga C, Tanaka Y, Sato H, Yamamoto N, Ezrin, Radixin, and Moesin (ERM) proteins function as pleiotropic regulators of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Virology* 375 (1): 130-140, 2008.
 - 8) Saitoh Y, Yamamoto N, Dewan MZ, Sugimoto H, Martinez Bruyn VJ, Iwasaki Y, Matsubara K, Qi X, Saitoh T, Imoto I, Inazawa J, Utsunomiya A, Watanabe T, Masuda T, Yamamoto N, Yamaoka S. Overexpressed NF- κ B-inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells. *Blood* 111 (10): 5118-5129, 2008.
 - 9) Takahashi Y, Tanaka R, Yamamoto N, Tanaka Y. Enhancement of OX40-Induced Apoptosis by TNF Coactivation in OX40-Expressing T Cell Lines in Vitro Leading to Decreased Targets for HIV Type 1 Production. *AIDS Res Hum Retroviruses* 24 (3): 423-435, 2008.
 - 10) 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.
 - 11) Koyanagi Y, Tanaka Y, Ito M, and Yamamoto N. Humanized mice for human retrovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 324, vol. 34, ppl38-148, 2008. Springer-Verlag (Eds. Nomura, Watanabe, and Habu).
 - 12) 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.
 - 13) Okuma K, Tanaka R, Ogura T, Ito M, Kumakura S, Yanaka M, Nishizawa M, Sugiura W, Yamamoto N, Tanaka Y. Interleukin-4-Transgenic hu-PBL-SCID Mice: A Model for the Screening of Antiviral Drugs and Immunotherapeutic Agents against X4 HIV-1 Viruses. *J Infect Dis* 197 (1): 134-141, 2008.
 - 14) 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.

- 15) 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

(研究協力者：松尾和浩)

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ず慢性持続感染が成立し最終的にエイズ発症に至る。HIV 特異的 T 細胞反応は、HIV 持続感染を阻止できないものの HIV 複製抑制に中心的役割を担っていることから、T 細胞反応を誘導するエイズワクチン開発が試みられてきた。しかし、ワクチンによる T 細胞反応誘導が必ずしも HIV 感染後の有効な T 細胞反応に結びつくわけではなく、これまでのエイズワクチン臨床試験では有効性を示す結果は得られていない。臨床試験の有効性検証の段階に進むためには、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において、ワクチンの SIV 複製抑制効果および抑制機序を明らかにすることが重要であると考えられる。そこで本研究では、T 細胞誘導エイズワクチン開発に向け、我々がこれまで開発を進めてきた 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）ワクチンについて、サルエイズモデルでの SIV 複製抑制効果・抑制機序の解析を進めることとした。平成 18 年度には、ワクチンによる長期の SIV 複製抑制およびエイズ発症阻止の可能性を報告した。さらに、ワクチンの有効性が認められた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 陽性サル群を用いた SIV 複製抑制機序解明を進めることとし、平成 19 年度には、この群で Gag 特異的細胞傷害性 T リンパ球（CTL）反応により選択された複数のエスケープ gag 変異を有する SIV の、90120-Ia 陰性サル群への感染実験を行い、その複製能が低下していることを報告した。今年度（平成 20 年度）は、これらのエスケープ変異選択に関与した CTL のワクチン効果への寄与を知る目的で、ワクチン接種 90120-Ia 陽性群に、この SIV 変異株のチャレンジ実験を行った。その結果、ワクチン接種 90120-Ia 陽性群では、SIV 野生株の複製は制御されるのに対し、より複製能の低い SIV 変異株の複製は制御されないことが明らかとなった。この結果は、この 90120-Ia 陽性サル群での DNA/SeV-Gag ワクチンによる SIV 持続感染成立阻止に、Gag 特異的 CTL が中心的役割を果たしていることを証明するものとして極めて重要である。

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 T 細胞反応の重要性が指摘されたことから、T 細胞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）感染サル急性エイズモデルにおいて、ワクチンによるウイルス複製抑制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 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 慢性持続感染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 慢性持続感染モデルにおけるワクチンによる SIV 複製抑制例は、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。

このように、前臨床試験での有効性が確立していない状況であるにもかかわらず、エイズワクチンの必要性を鑑み、わずかな有効性の可能性を期待した数々の臨床試験が行われてきた。しかし、これまで、有効性を示した報告は無く、その反省から、SIV 慢性持続感染モデルにおけるワクチン有効性の検証とその効果発現機序の解明の重要性が強く再認識されるに至っている。

我々はこれまで、T 細胞、特に CTL 誘導を基本