

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/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 慢性持続感染サル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 T 細胞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。この効果はワクチン接種個体全頭にみられるものではないが、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 相計画が、国際エイズワクチン推進構想 (IAVI) との共同研究で進展中である。

そこで本研究では、SIV 慢性持続感染モデルにおいて、DNA/SeV-Gag ワクチンの有効性を確立し、その効果発現機序を検討することを目的とした。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。さらに、ワクチンの有効性が認められた MHC-I ハプロタイプ 90120-1a 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、この群で選択された複数の CTL エスケープ gag 変異を有する SIV の、90120-1a 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、SIV 野生株複製を制御できるワクチン接種 90120-1a 陽性群に、この SIV 変異株のチャレンジ実験を行った。

B. 研究方法

SIVmac239 感染 MHC-I ハプロタイプ 90120-1a 陽性サルで選択された複数の CTL エスケープ gag 変異を有する SIV 変異株 SIVmac239Gag216S244E および SIVmac239Gag216S244E247L312V373T の、培養 HSC-F 細胞 (サル T 細胞株) における感染増殖能を、感染細胞培養上清中の逆転写酵素活性を経時的に測定することにより、SIVmac239 野生株と比較検討した。さらに、90120-1a 陽性アカゲサルに SIVmac239 Gag を主抗原とする DNA/SeV-Gag ワクチンを接種した後、SIV 変異株をチャレンジし、経時的に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を行った。ワクチン接種後および SIV チャレンジ後の末梢血リンパ球を用いて、細胞内免疫染色による抗原特異的インターフェ

ロン γ (IFN- γ) 誘導測定を行い、Gag 特異的および SIV 特異的 CD8 陽性 T リンパ球レベルを調べた。これらの結果を、ワクチン接種 90120-1a 陽性サルに SIV 野生株をチャレンジした結果と比較検討した。

(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

培養 HSC-F 細胞における SIV 変異株の複製能は、SIV 野生株と比較して低下していることが確認された (図 1)。特に 5 つの gag 変異を有する SIVmac239Gag216S244E247L312V373T の方が 2 つの gag 変異を有する SIVmac239Gag216S244E より、低い複製能を示した。

ワクチン接種 90120-1a 陽性サルへの SIV チャレンジ実験では、SIV 野生株の複製は全頭 (4 頭) で制御され、セットポイント期 (8 週目) 以降の血漿中ウイルス量は検出限界以下となったが、SIV 変異株の複製は全頭 (5 頭) で制御不能で、セットポイント期でもウイルス血症が認められた (図 2)。2 つの SIV 変異株間の比較では、SIVmac239Gag216S244E247L312V373T の方が複製能はより低いにもかかわらず、高い血漿中ウイルス量で、ワクチン非接種サルと同様なウイルス血症を示した。一方、SIVmac239Gag216S244E の複製は制御されなかったものの、やや低い血漿中ウイルス量を示した (図 2)。

ワクチン接種 90120-1a 陽性サルへの SIV チャレンジ後約 3 ヶ月の末梢血中のセントラルメモリー CD4 陽性 T リンパ球数については、SIV 野生株チャレンジと比較して、SIV 変異株チャレンジでは、有意に大きなチャレンジ前よりの低下が認められた (図 3)。

SIV 野生株チャレンジ群と SIV 変異株チャレンジ群の Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球レベルの比較では、チャレンジ前 (ワクチン接種後) については、両者とも効率よい Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球反応が誘導され、有意な差は認められなかった (図 4)。一方、チャレンジ後 2 週目については、SIV 野生株チャレンジ群で効率よい Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球の 2 次反応が認めら

れたが、SIV 変異株チャレンジ群ではその2次反応は認められず、有意に低い Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球レベルを示した (図4)。

SIV 変異株チャレンジ後2週目と12週目の Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球レベルおよび SIV 特異的 CD8 陽性 T リンパ球レベルをみると、後者の SIV 特異的 CD8 陽性 T リンパ球反応が経過とともに優位となっていく傾向が認められた (図5)。

D. 考察

これまでの我々の研究にて、DNA/SeV-Gag ワクチン接種 90120-Ia 陽性サル群は、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、CTL エスケープ gag 変異を有する SIV 変異株の複製を制御できないことが示された。この gag 変異により SIV 変異株の複製能は低下するにもかかわらず、その複製が制御できなくなることから、このエスケープ変異選択に関与した Gag 特異的 CTL が、ワクチン接種 90120-Ia 陽性サルにおける感染初期の SIV 野生株の複製制御に中心的役割を担っていることが明らかとなった。SIV 慢性持続感染サルエイズモデルにおいて、このような SIV 複製抑制機序を示したワクチン効果の報告は初めてであり、本研究の結果は、エイズワクチン開発において極めて重要な成果である。

5つの gag 変異を有する SIV チャレンジでは、ワクチン効果が認められなくなった。2つの gag 変異を有する SIV チャレンジでも、SIV 複製が制御できなくなったことから、この2つのエスケープ変異選択に関与した Gag エピトープ特異的 CTL が、感染初期の SIV 複製制御に中心的役割を担っていることが示されたが、5つの gag 変異を有する SIV チャレンジより若干低いウイルス量を呈したことから、他の Gag エピトープ特異的 CTL の SIV 複製抑制への関与も考えられた。

SIV 変異株チャレンジ群での、セントラルメモリーCD4陽性 T リンパ球数の低下は、SIV 変異株複製が制御できなかった結果を支持するものである。Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球反応および SIV 特異的 CD8 陽性 T リンパ球反応の解析結果は、ワクチン誘導 Gag 特異的 CTL が SIV 変異株を認識できず、チャレンジ後、Gag 以外の SIV 由来抗原特異的 CTL 反応が誘導されていることを示すものである。しかし、この SIV 変異株チャレンジ後に誘導された SIV non-Gag 特異的 CTL では、SIV 変異株持続感染を阻止することは難しいと考えられた。

E. 結論

DNA/SeV-Gag ワクチンで SIV 複製制御効果が認められた 90120-Ia 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。

G. 研究発表

1 論文発表

- (1) Seki S, Kawada M, Takeda A, Igarashi H, Sata T, Matano T. Transmission of simian immunodeficiency virus carrying multiple cytotoxic-T-lymphocyte escape mutations with diminished replicative ability can result in AIDS progression in rhesus macaques. *J Virol* 82:5093-5098, 2008.
- (2) 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* 22:993-994, 2008.
- (3) 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.
- (4) 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.
- (5) Takeda A, Igarashi H, Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Inoue M, Iida A, Shu T, Hasegawa M, Matano T. Evaluation of the immunogenicity of replication-competent V-knocked-out and replication-defective F-deleted Sendai virus vector-based vaccines in macaques. *Vaccine* 26:6839-6843, 2008.

2 学会発表

- (1) Matano T. A CTL-based AIDS vaccine using a Sendai virus vector. The 7th Japan-China International Conference of Virology, Tokyo, Japan, 6/2/2008.
- (2) 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.
- (3) 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.
- (4) Kuwano T, Kawada M, Tsukamoto T, Iwamoto N, Matano T. Influence of MHC-I polymorphisms on the efficacy of a T cell-based vaccine in a macaque AIDS model. The 9th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 9/18/2008.
- (5) Matano T. Impact of vaccine-induced Gag-specific CTL responses on SIV control. The 9th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 9/19/2008.
- (6) 桑野哲矢, 川田真幹, 塚本徹雄, 岩本南, 井上誠, 飯田章博, 朱亜峰, 長谷川護, 侯野哲朗. サルエイズモデルにおける宿主 MHC 遺伝子多型の細胞性免疫誘導ワクチン効果への影響の解析. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会, 岡山, 10/28/2008.
- (7) 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. 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.
- (8) 堀場聡, 川田真幹, 武内寛明, 侯野哲朗. サル細胞とヒト細胞で複製能への影響が異なる gag 変異を有する SIV. 第 22 回日本エイズ学会学術集会, 大阪, 11/28/2008.
- (9) 石井洋, 川田真幹, 武内寛明, 明里宏文, 上野貴将, 滝口雅文, 侯野哲朗. Gag 特異的 CTL クローンの SIV 複製抑制能の解析. 第 22 回日本エイズ学会学術集会, 大阪, 11/28/2008.
- (10) Matano T, Yamamoto T, Iwamoto N, Yamamoto H, Kawada M. Induction of functional T-cell responses in neutralizing antibody-triggered SIV control. The 26th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, San Juan, Puerto Rico, 12/12/2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況

無し。

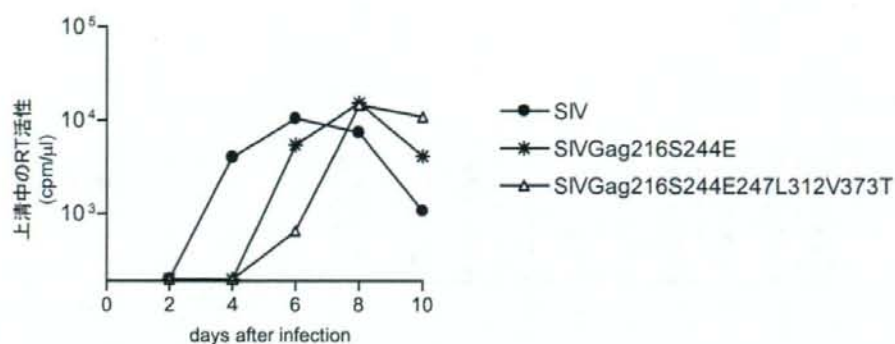


図1 サルT細胞株HSC-F培養系におけるSIVmac239野生株および2つの変異株の複製能の解析
ウイルス感染後、経時的に培養細胞上清を回収し、その逆転写酵素活性を測定した。
変異の多いものほど複製能が低下していることを示す結果が得られた。(J. Virol. 82:10199, 2008)

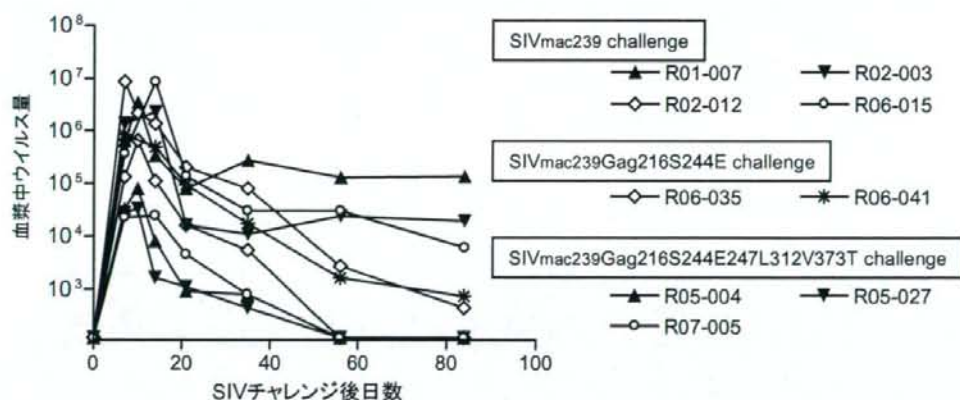


図2 ワクチン接種サルへのSIV野生株あるいは変異株チャレンジ後の血漿中ウイルス量の経時変化
MHC-I/ハプロタイプ90120-1a共有サル群にDNAプライム・SeV-Gagブーストワクチン接種後
SIVmac239、SIVmac239Gag216S244E、あるいはSIVmac239Gag216S244E247L312V373Tを
チャレンジした後の血漿中SIV RNA量 (コピー/ml) を示す。野生株の複製は制御されたが、
変異株の複製は制御されなかった。(J. Virol. 82:10199, 2008)

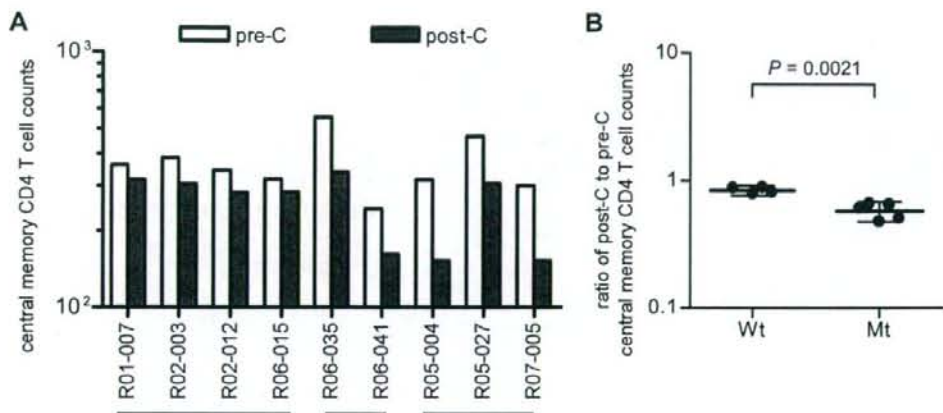


図3 ワクチン接種サルへのSIV野生株・変異株チャレンジ後のcentral memory CD4 T細胞数の変化
A ワクチン接種90120-1a共有サルへのSIV野生株・変異株チャレンジ前 (pre-C) ・後約3ヶ月時 (post-C) の末梢血中central memory (CD95陽性CD28陽性) CD4陽性T細胞数
B チャレンジ前に対するチャレンジ後のcentral memory CD4陽性T細胞数の比
 野生株 (Wt) と比較して変異株 (Mt) チャレンジ群で有意な低下が認められた。
 (J. Virol. 82:10199, 2008)

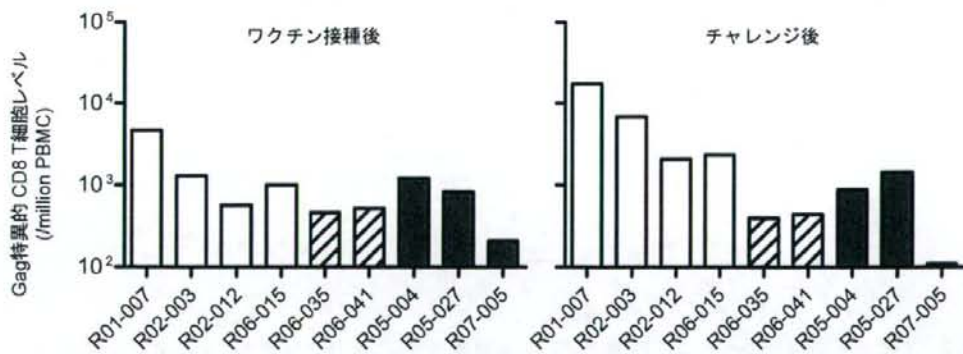


図4 ワクチン後およびSIV野生株・変異株チャレンジ後のGag特異的CD8 T細胞レベル
 90120-1a共有サルへのワクチン接種後2週目およびSIV野生株・変異株チャレンジ後2週目のGag特異的CD8 T細胞レベルを示す。チャレンジ後のGag特異的CD8 T細胞レベルは、野生株と比較して変異株チャレンジ群で有意に低値を示した。
 (J. Virol. 82:10199, 2008)

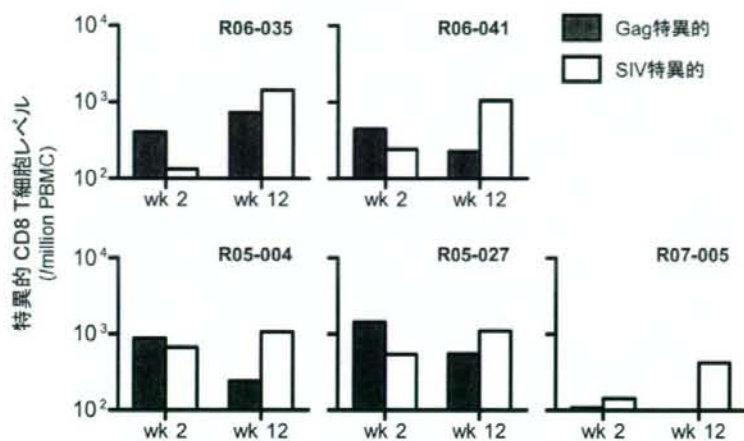


図5 SIV変異株チャレンジ後のGag特異的およびSIV特異的CD8 T細胞レベル
 ワクチン接種90120-1a共有サルへのSIV変異株チャレンジ後のGag特異的およびSIV特異的CD8 T細胞
 レベルを示す。変異株感染後、SIV特異的CD8 T細胞反応が優位になっていく傾向がみられた。
 (J. Virol. 82:10199, 2008)

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、m8Δ SIVGag 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 組み換え体を作成して、m8Δ SIVGag 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ている。

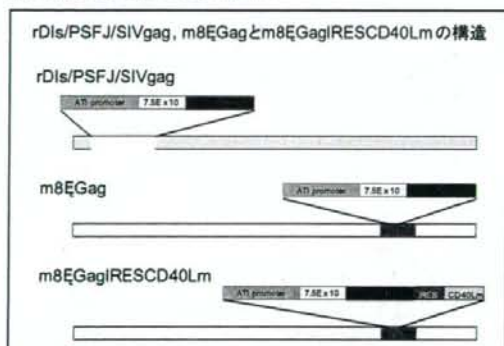
A 研究目的

HIV に対するワクチン用のベクターとしてアデノウイルスとワクシニアウイルスがよく研究されている。特に、安全性の観点から、哺乳動物で増えないと考えられているアデノ株やワクシニア MVA 株、NYVAC 株が頻用されている。しかし、Merck 社のアデノワクチンは HIV の感染制御に失敗し、MVA.NYVAC ワクチンはそれと同等又は以下の免疫しか誘導できない事が報告されている。

増殖するがまだ安全なワクシニア株は、格段に強い抗 HIV 免疫を誘導する為のベクターとなりうる。以前に、我々は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 株を改良し、より安全な LC16m8Δ株を作成していた。そこで、昨年度、SIV の Gag を発現する m8ΔSIVgag を作成した。今年度は m8Δ SIVGag 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する事を目的とした。又、免疫活性化因子 CD40Lm を共発現させることによる効果も調べた。

B 研究方法

組み換えワクシニア株：



m8ΔSIVgag; m8Δ株の HA 遺伝子内に pSFJ1-10 プロモーターを組み込み、その下流に SIVgag を発

現する。

rDis/PSFJ/SIVgag:DIs 株のゲノム左端領域に pSFJ1-10 プロモーターを組み込み、その下流に SIVgag を発現する。(感染研、山本直樹博士より分与)

m8ΔSIVgagIRESCD40Lm: m8ΔSIVgag の gag 遺伝子の下流に IRES と CD40Lm を挿入。CD40Lm の発現は plaque ELISA と Western で確認。

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, L 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(C57BL/6)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/10⁵ 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)を用い、ELISPOT アナライザー-Immunoscan(CTL 社)によってカウントした。

C 研究成果

Vitro における SIV gag の発現: SIV Gag の in vitro での発現効率を比較する為に、m8ΔSIVgag と増殖能欠損型 DIsSIVgag をマウス L と CEF 細胞に感染させて、細胞と培養上清中の Gag 蛋白質の Western blotting を行った。

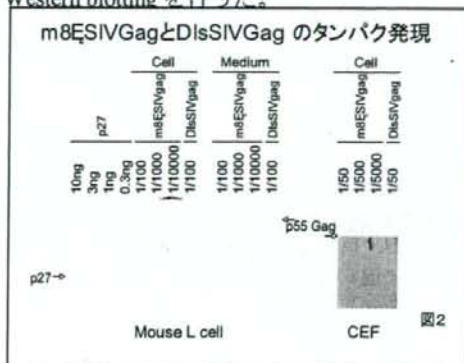
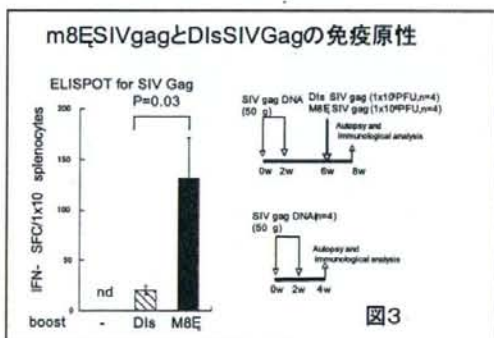


図2に示されているようにL細胞ではm8ΔSIVgagがrDIs/PSFJ/SIVgagよりも約100倍多くのGagタンパクを産生した。他方、両ウイルスが増殖できるCEFではm8ΔSIVgagの方が数倍多くのGagを作った。両ウイルスは同じプロモーターを使っているため、ウイルスが増殖できる条件が各遺伝子の発現効率に影響している事が推察できる。

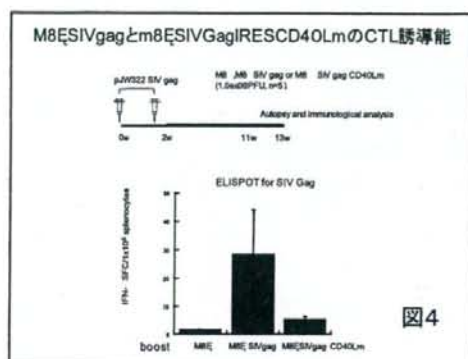
SIVgagΔの免疫原性：m8ΔSIVgagとrDIs/PSFJ/SIVgagの抗Gag CTL誘導能を比較するために、gag発現plasmid, pSIVgagとのプライムブスター法によってマウスを免疫し、ELISPOT分析を行った。pSIVgag 50ugを2週おきに2回筋注し、1回10⁶ PFUのm8ΔSIVgag又はrDIs/PSFJ/SIVgagを皮内接種する事によりブスターした。2週後に免疫したマウスから調製した脾臓細胞をGagペプチドで刺激し、Gag特異的にインターフェロンガンマ(IFN-γ)を産生する細胞数をELISPOT法によって調べた。図3に示されているように、m8ΔSIVgagの方が約7倍多数の細胞がIFN-γを産生していた。



次に、pSIVgag 50ugを2週おきに3回筋注し、1回10⁶ PFUのm8ΔSIVgag又はrDIs/PSFJ/SIVgagを皮内接種する事によりブスターした。3週後にIFN-γ産生細胞を調べたところ、rDIs/PSFJ/SIVgagは4匹中3匹でIFN-γ産生細胞を検出できないのに対し、全てのm8ΔSIVgag接種マウスで検出された。これらの事から、m8ΔSIVgagの方がはるかに免疫原性が高い事が分かった。

CD40Lm発現ワクシニアの性質：昨年度、免疫活性化因子CD40Lmを発現するm8ΔCD40LmとHIV-1 Envを発現するWR-Envを同時にラットに免疫して、抗Env抗体価の誘導を調べたところ、有意な違いを検出できなかった。今回は抗原(SIVgag)とCD40Lmを共発現する

m8ΔgagIRESCD40Lmを作成して、その効果を調べた。やはり、pSIVgagとのプライムブスター法によってマウスを免疫し、ELISPOTによって抗Gag CTLを測定した。図4に示すようにCD40Lm共発現m8ΔはCTL誘導能が低かった。



D 考察

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/アデノベ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ワクシニア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。

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。

E 結論

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産生細胞を誘導した。CD40Lm共発現ワクシニアは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。

F 研究発表

1. 論文発表

- (1) Takashi Ohashi, Mika Nagai, Hiroyuki Okada, Ryo Takayanagi and Hisatoshi Shida (2008): Activation and Detection of HTLV-I Tax-specific CTLs by Epitope expressing Single-Chain Trimers of MHC Class I in a rat model. *Retrovirology* 5: 90.
- (2) Fumihiko Yasui, Chieko Kai, Masahiro Kitabatake, Shingo Inoue, Misako Yoneda, Shoji Yokochi, Ryoichi Kase, Satoshi Sekiguchi, Kouichi Morita, Tsunekazu Hishima, Hidenori Suzuki, Katsuo Karamatsu, Yasuhiro Yasutomi, Hisatoshi Shida, Minoru Kidokoro, Kyosuke Mizuno, Kouji Matsushima, Michinori Kohara (2008): Prior immunization with SARS-CoV nucleocapsid protein causes severe pneumonia in mice infected with SARS-CoV. *J. Immunol.* 181:6337-48.
- (3) Hajime Suzuki, Minoru Kidokoro, Ismael Ben Fofana, Takashi Ohashi, Tomotaka Okamura, Kazuhiro Matsuo, Naoki Yamamoto, Hisatoshi Shida: Immunogenicity of newly constructed attenuated vaccinia strain LC16m Δ that expresses SIV Gag protein. *Vaccine In press*

2. 学会発表

- 高柳亮、大橋貴、田中勇悦、志田壽利：
HCRM1g ラットモデルを用いた抗 HTLV-1 抗体
産生誘導の解析 第 56 回日本ウイルス学会学
術総会 平成 20 年 10 月 岡山コンベンシ
ョンセンター (岡山県)
- 岡田紘幸、大橋貴、志田壽利：ラット細胞での
HIV-1 増殖におけるヒト CyclinT1 と CRM1 の効
果、第 56 回日本ウイルス学会学術総会 平成
20 年 10 月 岡山コンベンションセンター (岡
山県)
- 永井美佳、大橋貴、木村富紀、橋本岩雄、志田
壽利：ラット細胞における HIV 複製への RNA 輸
送因子 hCRM1 の効果 第 8 回分子生物学会春期
シンポジウム 平成 20 年 5 月、札幌
- 鈴木元、松尾和浩、山本直樹、大橋貴、志田
壽利：SIV Gag 発現ワクシニア m8 Δ 株の免疫原
性の検討 第 22 回日本エイズ学会 平成 20
年 12 月 大阪

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、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。このことを踏まえ、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粘膜組織及び全身性に誘導する、経口型の HIV-1 defense vaccine (Senju vaccine) の開発を進めている。本年度は、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。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できると期待できる。

A. 研究目的

HIV-1 の伝播阻止と GALT におけるウイルスの増殖を抑えることを視野に入れた粘膜および全身性免疫を誘導する新規経口 HIV-1 defense vaccine の開発を目指すにあたり、本研究では、創製した TGDK の M細胞標的能の評価、TGDK と各種免疫抗原 (ENV 及び Rh-cDDR5) を結合した Senju vaccine の、アカゲザルにおける抗原特異的粘膜免疫・全身性免疫の誘導能の評価、さらには誘導された抗体の中和活性を評価することを目的とする。

B. 研究方法

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 (雄) をウレタン麻酔し開腹後、アカゲザルの盲腸部位から口腔側の回腸 15cm 部位に TGDK-FITC、Au ラベルした TGDK 及び poliovirus を注射により回腸内に投与した。60 分後に盲腸部位から投与部位まで 15cm を摘出し腸間膜側を切り開き、パイエル板の存在する部位を、O.T.C.compound を用いて固定し凍結した。さらに組織切片を hematoxylin-eosin 染色しパイエル板を確認した。

アカゲザル回腸組織切片のTGDKの取り込みの検証 作製した組織切片を冷アセトンで10分間固定化し、PBS (-)で洗浄する。その後、1%スキムミルクでマスキングした後、first antibody sol.で15分間インキュベートしPBS (-)で洗浄後、second antibody sol.で15分間インキュベートし洗浄した。精製水に置換して、mounting mediumを適量載せ、蛍光顕微鏡による観察を行なった。

アカゲザル回腸切片のEDS解析 本実験はJEOL Datum Ltd. に委託して行なった。

Senju vaccineの調製 コア抗原(高分子PEG)にTGDK、cDDR5、CpG-ODN、SIVmac239 gp140をコンジュゲートさせた(Fig. 6)。すべてをコンジュゲート後、溶液中に賦形剤として乳糖を加え凍結乾燥し得られた粉末を腸溶性カプセルに封入した。

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 調製したワクチンとコントロールとしてBSA、PBS (-)由来の塩を含有した3,500kDaのPEGをそれぞれメスのアカゲザル五頭ずつにFig. 7に示すスケジュールで経口投与した。初回免疫前から血清、糞便を回収し、血清は血液を採取後分離し、糞便は約3gをアセトンパウダー化しそれぞれ80℃で保存した。アセトンパウダー100mgを400 µlの1%MPCを含むPBS (-)に溶かし、37℃で30分間インキュベートした後、on iceで1時間静置し、15,000 rpmで5分間遠心して上清を回収した。

ELISA アカゲザルから回収したサンプルのRh-cDDR5及びBSAに対する抗体の解析はELISAを用いて行った。ELISAには、一次抗体として採取した糞便抽出液を用いた。なお、糞便抽出液はそれぞれのタンパク質濃度を一定にしPBS (-)で10倍希釈した。二次抗体としてペルオキシダーゼ(POD)標識抗体(糞便はanti-IgA)を用いた。発色基質としてTMBZ及び、発色停止液として0.3 N H₂SO₄を用い、主波長450 nm、参照波長630 nmの吸光度を測定し

た。

in vitroにおけるSIVmac239の感染阻害効果の検討 HSC-F細胞及びDEAE dextranを含むSIVmac239(p27量で50 ng)を、100,000 cutの透析膜で透析したアカゲザルの血清または糞便抽出溶液を10倍希釈したもので前処理した。なお、抗Rh-cDDR5抗体のみの効果を検討するために透析した糞便抽出液にはgp140抗原を加えた。細胞とウイルスを混合後、40時間培養後にHSC-F細胞を回収、洗浄し0.25%のトリプシンを含むPBS (-)で5分間処理した。その後、洗浄を経てProteinase K(100 µg/ml)を含むDigestion bufferで18時間、50℃でインキュベーションした後、フェノール・クロロホルム抽出法によりDNAを回収した。DyNAmo HS SYBR® Green qPCR kitを用いてqPCR assayを行なった。

(倫理面への配慮) 動物実験は熊本大学実験動物倫理委員会の指針に則って動物愛護の精神で動物に与える苦痛の軽減と排除に最大限努力し行う。

C. 研究結果

M細胞標的分子TGDKの合成 Gallic acidとD-Lysineからなる新規M細胞標的分子の候補としてtetragalloyl-D-lysine dendrimer (TGDK) (Fig. 1)を固層法による方法で作製し、TGDK合成はMALDI TOF-MSにて確認した。その結果、分子量1054.2にTGDKのピークが得られた(data not shown)。

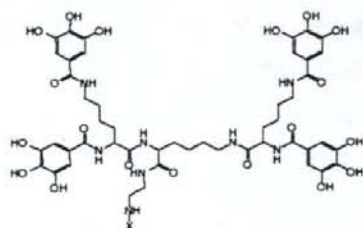


Fig. 1 Structure of tetragalloyl-D-lysine dendrimer (TGDK).

アカゲザルパイエル板におけるTGDKの取り込み
 TGDKのアカゲザルパイエル板からの取り込みを調べた。TGDKが回腸の投与した部位からの距離がそれぞれ違う組織切片を用いて抗FITC抗体で組織切片を染色した。その結果、Fig. 2に示すようにTGDKの取り込みが投与部位から近いものは胚中心まで達し、遠いものはFAEの直下に留まっていることから *in vivo* でTGDKが取り込まれていることが示唆された。

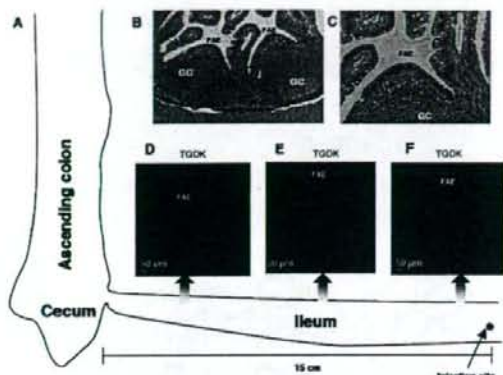


Fig. 2 Association of TGDK with rhesus PP FAE.
 (A) Schematic diagram of rhesus ileum. (B, C) Hematoxylin-eosin staining of rhesus PPs. One hour after TGDK inoculation, the portion between the inoculation site and the ileocecal valve was excised and subjected to immunofluorescence analysis. TGDK was stained (D-F, red).

アカゲザルパイエル板 M 細胞への TGDK の標的
 TGDKがアカゲザルのパイエル板 M 細胞を標的としているかを検討するため TGDK-FITC もしくは poliovirus を投与したアカゲザルの組織切片を用いて解析を行なった。現在のところ霊長類において有効な M 細胞マーカーは報告されていないが、近年、GP2 がマウスの M 細胞で発現が特異的に上昇することが報告されたが、霊長類においても M 細胞で特異的に発現しているかを検討するため、M 細胞によって取り込まれることが報告されている poliovirus を投与したアカゲザルのパイエル板の組織切片を抗 poliovirus 抗体と抗 GP2 抗体で染色し、DAPI で核を染色した結果、poliovirus と GP2 の共局在が確認され霊長類においてもパイエル板 M 細胞で GP2 の特異的発現が示された (Figs. 3A-C)。次に

TGDK-FITC を投与したアカゲザルのパイエル板の組織切片を抗 FITC 抗体、抗 GP2 抗体で染色し、さらに DAPI で核を染色し蛍光顕微鏡による観察をおこなった。その結果、TGDK と GP2 の共局在が確認され、TGDK がパイエル板 M 細胞を標的としていることが示された (Figs. 3D-F)。

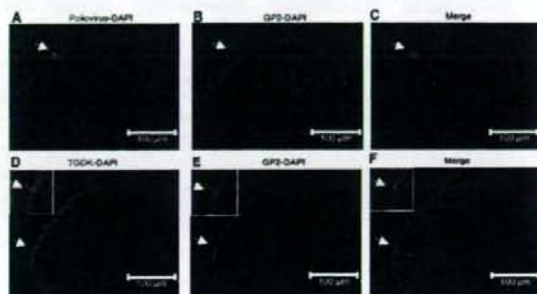


Fig. 3 Immunofluorescence analysis of Rhesus ileum tissue.
 Poliovirus, FITC-labeled TGDK was inoculated into the lumen of the ileum. After the inoculation, the portion between the inoculation site and the ileocecal valve was excised and subjected to immunofluorescence analysis. Frozen sections of rhesus macaque PPs were labeled with mAbs (anti-PV antibody (A) and anti-GP2 antibody (B, E)) and TGDK was stained (D). Merged images are shown (C, F).

TGDK-Au の M 細胞内への取り込み アカゲザルのパイエル板 M 細胞によって TGDK が取り込まれるかを検討するために、アカゲザルの回腸に TGDK-Au を接種し、透過型電子顕微鏡で観察し EDS 解析を行なった。EDS 解析の結果、M 細胞の断面内の Nanogold の存在が gold からの特徴的な X 線のピーク (AuL α : 約 9.712keV) によって確認された。このことから、TGDK-Au が M 細胞に取り込まれていることが示された (data not shown)。

TGDK の胚中心への集積 次に、TGDK がアカゲザルのパイエル板から取り込まれた後、どのような挙動をとっているかを検討した。TGDK-FITC を投与したアカゲザルの組織切片を用い、組織切片を抗 FITC 抗体 (Figs. 4B, F)、及び B 細胞マーカーである CD20 に対する抗体 (Fig. 4C) もしくは FDC マーカーである CD54 に対する抗体 (Fig. 4G) で染色した。その結果、TGDK と CD20 及び CD54 との共局在が確認され (Figs. 4D, H)、TGDK は取り込まれた後、胚中心にまで達していることが示された。

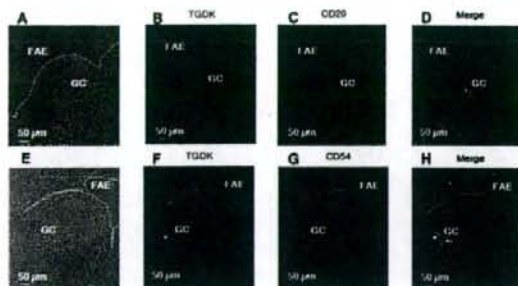


Fig. 4 Accumulation of TGDK within the GCs.
Frozen sections of rhesus macaque PPs were labeled with mAbs (anti-CD20 antibody (C) and anti-CD54 antibody (G), red), and TGDK was stained (green) (B, F). Differential interference contrast (DIC) (A, E) and merged (D, H) images are shown.

TGDK のヒト M 細胞モデルによるトランスサイトosisの検討 次に TGDK がヒト M 細胞モデルによってトランスサイトosisされるかを検討するために、lower compartment に TGDK-FITC を加え、upper compartment に移行した TGDK-FITC (Fig. 5A) を CORONA Multi Microplate Reader によって FITC の濃度を測定した。その結果、コントロールと比べて TGDK-FITC がヒト M 細胞モデルによってトランスサイトosisされ (Fig. 5B)、さらに TGDK-FITC が FITC よりもヒト M 細胞モデルによって有意にトランスサイトosisされる (Fig. 5C) ことが確認された。

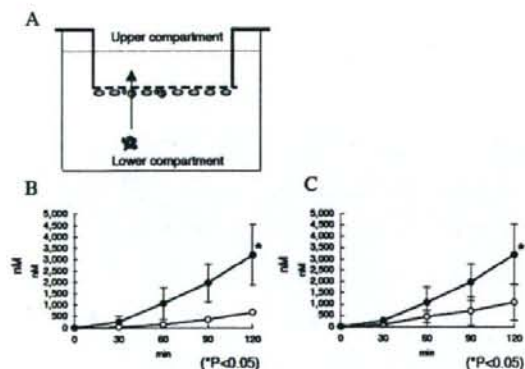


Fig. 5 Transcytosis of TGDK.
(A) Model of transcytosis. (B) To investigate the transcytosis activity of TGDK, the monolayers including M-like cells (closed circle) or Caco-2 control monolayers (open circle) were incubated with FITC-labeled TGDK. (C) To investigate the transcytosis efficacy of TGDK, the monolayers including M-like cells were incubated with FITC-labeled TGDK (closed circle) or FITC (open circle). FITC-labeled TGDK or FITC transported from the lower compartment to the upper compartment was quantified by a CORONA Multi Microplate Reader.

アカゲザルの糞便中の抗 BSA IgA の抗体価の測定 調製した Senju vaccine (Fig. 6) とコントロールとして BSA、PBS (・)由来の塩を含有した 3,500kDa の

PEG をそれぞれメスのアカゲザル五頭ずつに Fig. 7 に示すスケジュールで経口投与した。初回免疫前から血清、糞便を回収し、血清は血液を採取後分離し、糞便は約 3g をアセトンパウダー化しそれぞれ 80°C で保存した。サンプルの採取スケジュールは Fig. 7 に示す。採取した糞便中の抗 BSA IgA 抗体を ELISA によって解析をおこなった。その結果、免疫群において Repeated Measures ANOVA 検定で有意差があり、Dunnett's-test の結果免疫群において 0 週と初回免疫後 14 週の間有意差が認められた (Fig. 8A)。一方、コントロール群では有意差は認められなかった (Fig. 8B)。

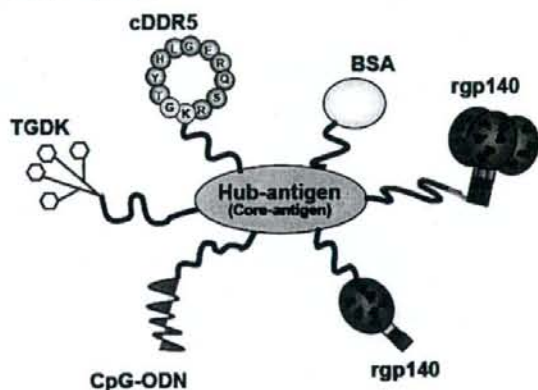


Fig. 6 Model of Senju vaccine

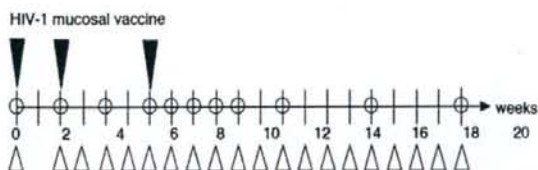


Fig. 7 Immunization schedule.
Serum and stool were collected according to the immunization schedule. Serum marked with open circle and stool marked with open triangle have been collected.

アカゲザルの糞便中の抗 Rh:cDDR5 IgA の抗体価の測定 採取した糞便中の抗 Rh:cDDR5 IgA 抗体を ELISA によって解析をおこなった。その結果、免疫群において Repeated Measures ANOVA 検定で有意差があり、Dunnett's-test の結果免疫群において 0 週と初回免疫後 14 週の間有意差が認められた (Fig. 9A)。一方、コントロール群では有意差は認め

られなかった(Fig. 9B)。

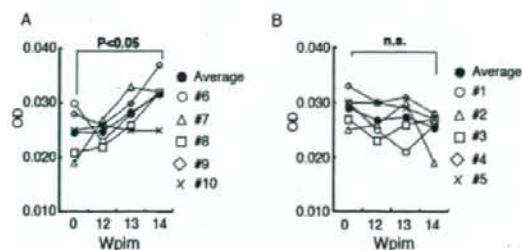


Fig. 8 Detection of anti-BSA Abs in rhesus macaques. Stool samples (1/10 dilution) obtained after immunization with HIV-1 mucosal vaccine (A) or control antigen (B) were examined to investigate whether the anti-BSA mucosal IgA can be raised in rhesus macaques.

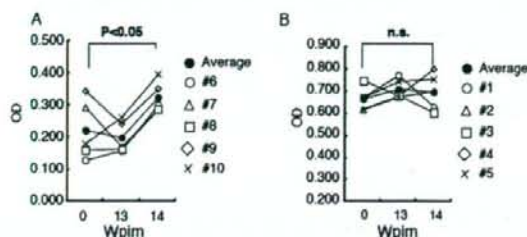


Fig. 9 Detection of anti-Rh-cDDR5 Abs in rhesus macaques. Stool samples (1/10 dilution) obtained after immunization with HIV-1 mucosal vaccine (A) or control antigen (B) were examined to investigate whether anti-Rh-cDDR5 mucosal IgA (A, B) can be raised in rhesus macaques by the Rh-cDDR5-coupled multipin ELISA.

In vitroにおける糞便中の抗 Rh-cDDR5 IgA による SIVmac239 の感染阻害効果の検討 糞便中に確認された抗 Rh-cDDR5 IgA 抗体の SIVmac239 に対する感染阻害効果を *in vitro* で検討した。抗体価の上昇が確認された初回免疫後 14 週の糞便とコントロールとして 0 週の糞便を用いて検討した。その結果免疫群である #6, #7, #8, #10 のアカゲザルにおいて有意に SIVmac239 の感染が抑制された(Fig. 10)。

アカゲザルの血清中の抗 Rh-cDDR5 IgG の抗体価の測定と感染阻害効果の検討

糞便中の抗 Rh-cDDR5 IgA 抗体の抗体価が最も上昇し、感染阻害効果も強かった #10 のアカゲザルについて、血清中の抗 Rh-cDDR5 IgG 抗体について解析した。ELISA によって抗体価を測定したところ初回免疫後 20 週で抗体価の上昇が認められ(Fig. 11A)、さらに初回免疫後 20 週の血清中の抗 Rh-cDDR5

IgG 抗体の SIVmac239 の感染阻害効果を *in vitro* で検討したところ、感染を有意に抑制することがわかった(Fig. 11B)。

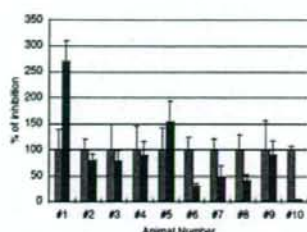


Fig. 10 Effects of stool on SIVmac239 infection. The inhibitory effect of the stool samples from vaccinated (#6-10) and control groups (#1-5) on *in vitro* SIV infection was also investigated. Percent of copies in HSC-F infected with SIVmac239 in the presence of the 14 wpim stool sample (black bar) is expressed relative to that in the presence of the 0 wpim stool sample (gray bar), which is considered 100%.

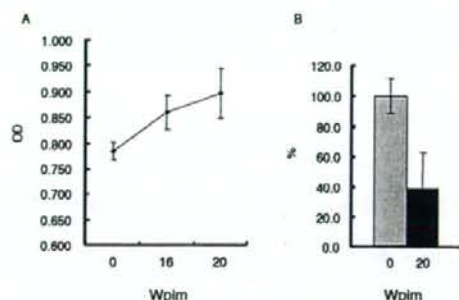


Fig. 11 Detection of anti-Rh-cDDR5 IgG in antiserum and effect anti serum on SIVmac239 infection. (A) Antiserum (1/10 dilution) obtained after immunization with HIV-1 mucosal vaccine were examined to investigate whether anti-Rh-cDDR5 IgG can be raised in rhesus macaques by the Rh-cDDR5-coupled multipin ELISA. (B) The inhibitory effect of the antiserum from vaccinated (#10) on *in vitro* SIV infection was also investigated. Percent of copies in HSC-F infected with SIVmac239 in the presence of the 20 wpim antiserum (black bar) is expressed relative to that in the presence of the 0 wpim antiserum (gray bar), which is considered 100%.

D. 考察

合成した TGDK の M 細胞標的能を検討するために *in vivo* で実験を行なった。アカゲザルの回腸のパイエル板において、TGDK がパイエル板内に取り込まれ、B 細胞マーカーの CD20、FDC マーカーの CD54 との共局在し、胚中心にまで達していることが示された。また、poliovirus と GP2 の共局在により GP2 の霊長類 M 細胞での特異的発現を確認し、TGDK が GP2 と共局在していることから TGDK が霊長類パイエル板 M 細胞を標的としていることが明らかになった。さらに EDS 解析の結果、TGDK が M 細胞に取り込まれていることが確認された。こ

これらの結果から、TGDKによりラベル化された抗原はM細胞によって取り込まれた後、抗原提示細胞にTGDKが受け渡され、胚中心でT細胞やB細胞に抗原情報が受け渡されると期待できる。

TGDKのヒトM細胞標的能を検討するために *in vitro* で実験を行なった。その結果、TGDKとGP2, CD54, Integrin β 1などの、M細胞マーカーとの共局在が観察された(data not shown)。また、FACS解析の結果、TGDKがヒトM細胞に選択的に結合していることが示唆された(data not shown)。さらに、TGDKの取り込みがコントロールと比較して有意に上昇していることがわかり、TGDKがM細胞を特異的に標的とし、さらにトランスサイトーシスされていることが示唆された。これらの結果はTGDKがヒトにおいてもM細胞によって取り込まれ、アカゲザルにおける粘膜免疫の誘導がヒトにおいても起こりうることを示唆している。

霊長類M細胞の標的能が確認されたTGDKを用いて粘膜免疫を誘導するために、Senju vaccine を作製しアカゲザルに経口投与後、得られたサンプルを解析したところ免疫群の糞便中に抗BSA IgA及び抗Rh-cDDR5 IgAの存在が確認された。またvaginal wash中に抗ENV抗体が分泌されていることを確認している(data not shown)。さらに抗体価の上昇が確認された14週の糞便中の抗Rh-cDDR5 IgAによるSIVmac239の感染阻害効果を *in vitro* で検討したところ、0週の糞便と比較して免疫群の#6, #7, #8, #10のアカゲザルにおいて有意にSIVmac239の感染を抑制した。つまりTGDKによって粘膜免疫を誘導することができ、さらに誘導された抗体はSIVmac239に対する感染阻害効果も有していることが明らかになり、TGDKは粘膜免疫の誘導のためのワクチン戦略において非常に有効なツールになりうると思われる。さらに#10のアカゲザルにおいては血清中にRh-cDDR5に対するIgGも誘導でき、感染阻害効果も確認でき全身性の免疫

も誘導することが確認された。

以上の結果から、Senju vaccineはHIVの侵入を粘膜面で防御し、さらに粘膜面から体内に侵入したとしても全身性の免疫によってHIV-1の複製を阻害できるような粘膜免疫を誘導できることが期待される。

興味深いことに、Complete Senju-vaccineを皮下免疫し、その抗体価がinitial状態に戻ったサルに Δ ENV-Senju-vaccineでreboostすると、ENV抗原が無いにもかかわらず抗ENV抗体の力価が上昇し、それはウイルスを中和した(data not shown)。この結果は、交叉免疫誘導による抗体価の維持が可能になり得ることを示唆している。抗体価が低下した間隙にHIV-1の侵入が起こったとき、2次免疫応答惹起時間内にHIV-1の感染が成立してしまう可能性が高まるが、交叉免疫誘導による抗体価の維持がこの問題を解決する突破口になると考えている。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Misumi, S., Shoji, S. et al. Targeted delivery of immunogen to primate M-cells with tetragalloyl lysine dendrimer. J. Immunol. Acceptable.
2. Misumi, S., Eto, A., Mitsumata, R., Yamada, M., Takamune, N., and Shoji, S. Development of cell-expressed and virion-incorporated CCR5-targeted vaccine. Biochem Biophys Res Commun. 2008 ;377:617-621.
3. Takahashi, Y., Misumi, S., Muneoka, A.,

Masuyama, M., Tokado, H., Fukuzaki, K., Takamune, N., and Shoji, S. Nonhuman primate intestinal villous M-like cells: An effective poliovirus entry site. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 ;368:501-507.

4. Endo E, Inatsu A., Hashimoto K., Takamune N, Shoji S. and Misumi S. Human immunodeficiency virus-induced apoptosis of human breast cancer cells via CXCR4 is mediated by the viral envelope protein but does not require CD4 *Curr. HIV Res.* 2008 ;67:34-42.
5. Takamune N, Gota K, Misumi S, Tanaka K, Okinaka S, and Shoji S. HIV-1 production is specifically associated with human NMT1 long form in human NMT isozymes *Microbes and Infection.* 2008; 10: 143-150.

2. 学会発表

1. Misumi, S., Takahashi, Y., Muneoka, A., Masuyama, M., Tokado, H., Fukuzaki, K., Takamune, N., and Shoji, S. Tetragalloyl-D-trilylsinyldiethylamine (TGDK)-mediated vaccine delivery system represents a potential approach for enabling M-cell-targeted mucosal vaccine in primates. 9th Kumamoto AIDS Seminar, Abstract p12
2. 野崎清輝、浦田悟充、高橋義博、増山光明、高宗暢暁、庄司省三、三隅将吾. 経口 HIV ワクチン開発のための SIVmac239 gp140 の大量調製とワクチン調製 第 61 回日本細菌学会九州支部総会、第 45 回日本ウイルス学会九州支部総会. プログラムおよび抄録 p33
3. 松本浩和、衛藤あゆみ、高橋義博、増山光明、高宗暢暁、庄司省三、三隅将吾. アカゲザル CCR5 細胞外ループ由来環状ミモトープを用いた特異的抗体の誘導とワクチンへの応用. 第 61

回日本細菌学会九州支部総会、第 45 回日本ウイルス学会九州支部総会. プログラムおよび抄録 p56

4. 三隅将吾、高橋義博、宗岡篤信、松本浩和、戸門洋志、福崎好一郎、洲加本孝幸、高宗暢暁、庄司省三. ポリオウイルスの霊長類 M 細胞侵入機構. 第 56 回 日本ウイルス学会学術集会プログラム・抄録集 p 243
5. 松本浩和、衛藤あゆみ、三隅将吾、高橋義博、増山光明、高宗暢暁、庄司省三. 宿主細胞及びサルエイズの原因ウイルス (SIVmac239) 外被に存在するケモカインレセプターCCR5 を標的とした HIV ワクチン戦略. 第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会合同大会 BMB2008 講演要旨集 p660
6. 野崎清輝、浦田悟充、三隅将吾、高橋義博、増山光明、高宗暢暁、庄司省三. HIV 初発感染部位である粘膜を標的としたワクチンの創製. 第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会合同大会 BMB2008 講演要旨集 p660

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 腸管免疫賦活剤
国際公開番号: W02007/052641 A1
2. ワクチン剤
特開 2008-231343

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

分担研究者 玉村 啓和 東京医科歯科大学生体材料工学研究所教授

研究要旨 今までのエイズワクチン創製研究であま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ックを作製した。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。

A. 研究目的

他のウイルス感染症と同様に、これまでにエイズに関してもワクチン創製の研究がかなり精力的に行われてきた。しかし、未だ根本的な治療法の確立には至っていない。そこで、我々はワクチン作製に対して、従来の概念とは全く異なる方向から図 1 に挙げた 4 種類のアプローチすることにした。1) 今までにあまり研究されていなかった標的細胞への HIV の侵入時の立体構造変化に関わる蛋白 gp41 を認識する抗体を作製することにした。これまでは、HIV 表面蛋白 gp120 上の表面に露出した領域を抗原としていることが多かった。しかし、ここ数年の HIV

の標的細胞への侵入機構、種々の蛋白質が複雑に相互作用する動的超分子機構とよばれるメカニズムが明らかになってきたことにより、立体構造変化を起こす蛋白をターゲットとし、構造変化の中間体を有機化学的に再構成した人工分子を抗原とすることにした。具体的には gp41 の 3 量体ヘリカル構造である。2) 今まで多大な数のワクチンを作製したが、成功しなかった原因のひとつとして、gp120 のある領域の部分ペプチドを抗原として用いていた(中和抗体のエピトープは β -ヘアピンループ構造を取っていることが多い)ために、この部分ペプチドがもとの gp120 上での本来の立体構造を再現

できていなかった(もとのヘアピン構造を保持できなかった)ということが考えられる。このことが主たる原因で、効率的に抗体を誘導できなかったかもしれない。そこで本研究では、いままでも鎖状ペプチドをベースに抗原として用い、うまく抗体誘導できなかったワクチンを例に取りあげ、鎖状を環状にし、立体構造を固定化したペプチドミメティックを合成した。具体的には、長期未発症の HIV 感染者の間で、CD4 binding/コレセプター-binding 領域が中和抗体のエピトープとして高く保存されている断片ペプチドを取りあげた。また、この領域は β -ヘアピンループ構造にあたる領域であり、これまで鎖状のペプチドでは効率的に抗体が誘導できなかったため、 β -ヘアピンループ構造を提示できるように環状構造に固定化したペプチドミメティックを合成した。

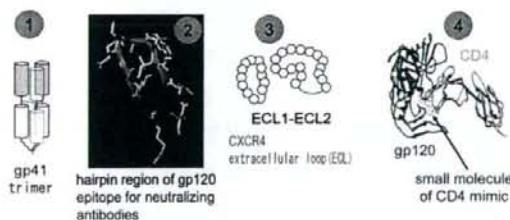


図1 4種のアプローチによるエイズワクチン作製

3) 一般のワクチンの常識では、抗原分子のターゲットとしてウイルス外皮蛋白等を基盤とするのが普通であるが、我々のワクチン創製のターゲットとしては常識にこだわらなかった。すなわち、標的細胞側のコレセプター(第二受容体)にターゲットを設定した。この利点として、レトロウイルスは非常に変異しやすいので、ワクチンによって誘導される抗体は変異してしまったウイルスを効率よく認識することができなくなるが、標的細胞側(宿主ヒト側)を抗原としてワクチンを作製した場合、宿主蛋白質は変異しないと考えられるので、ワクチン

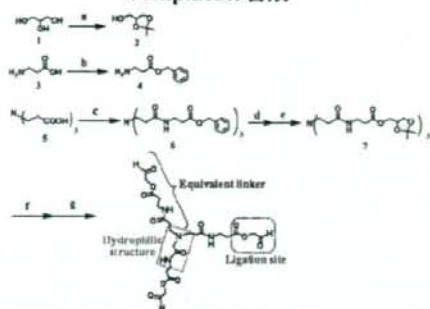
が徐々に効かなくなるということがない。しかし、レセプターの生理的な作用をブロックすることによる副作用の可能性に十分注意しなければいけない。実際、具体例としてコレセプターであるケモカイン受容体 CXCR4 の細胞外ループ(Ecl1-Ecl3 & N 端)を取りあげ、環化&構造固定化したペプチドミメティックを合成し、効率的な抗体誘導をはかることにした。4) HIV-1 の外被糖タンパク質 gp120 が宿主細胞の CD4 と、ケモカインレセプター-CCR5 もしくは CXCR4 のいずれかへ結合することにより、HIV は宿主細胞へ侵入する。そこで、CD4 の小分子 mimic である NBD-556 とその誘導体を合成し、HIV 侵入の動的超分子機構への影響や中和抗体等との併用の効果を検討した。以上これら 4 種のアプローチによりワクチン創製することを目標とした。

B. 研究方法

1) 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

前年度より改良した合成スキームにより gp41 の N および C 端側に存在するヘリカル領域のペプチド N36, C34 を 3 量体にアセンブリーするための人工テンプレートを作成した(図 2)。また、別に gp41 の N および C 端側断片(N36/C34)に親水性領域を付加したペプチドを Fmoc 型固相合成法により合成した(図 3)。これを図 2 で合成したテンプレート上に構築し、三量体とし抗原分子とする(図 4)。そして、合成した抗原分子を用いてマウスにて抗体誘導を検討する。その血清の抗 HIV 活性を評価する。

Templateの合成



(a) acetone, 1; (b) EtOH, TcOH, H₂O, toluene; (c) 4. EDCI-HCl, HOBT, NEt₃, DMF, r.t.; (d) 10% Pd/C, H₂, MeOH; (e) 2. WBCl, 4. DMAP, CH₂Cl₂; (f) 80% TFA aq; (g) NaIO₄, H₂O, MeOH.

図2 位相が完全に等価な3量体アセンブリーのためのテンプレートの合成スキーム

N36ペプチド誘導体NP103の合成

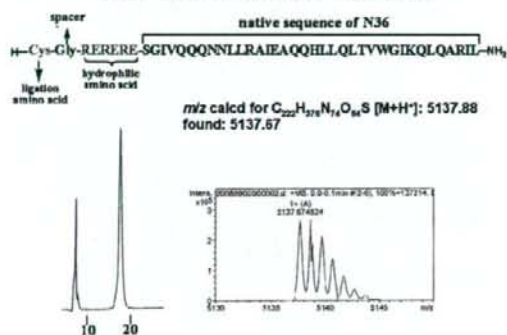


図3 親水性領域を付加したgp41のN36誘導体の合成

N36 3量体(NP104)の構築

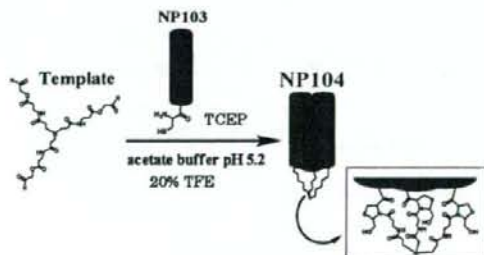


図4 親水性領域を付加したgp41のN36の3量体を提示する人工抗原分子の合成

2) 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

長期未発症の HIV 感染者の間で中和抗体のエピトープとして高く保存されている、gp120 の CD4 binding/コレセプター-binding 領域の断片ペプチドを、環化と構造固定化のコンセプトを用いて、分子設計し、合成した(図5右)。コントロールとして鎖状ペプチドも合成し、抗原分子を作製している(図5左)。前年度にマウスおよびウサギを用い、抗体誘導を検討したが、効率よく抗体誘導できなかった。そこで、この抗原分子に特異的に結合する抗体を得るため、ファージディスプレイライブラリーから in vitro アフィニティー選択を行う。

linear peptide

cyclic peptide

Ac-IINMWQKVGKAM-NH₂

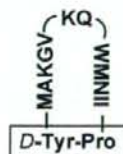


図5 化学合成した gp120 の CD4 binding/コレセプター-binding 領域の鎖状ペプチド(左)とそれを環化した分子構造(右)

3) 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

コレセプターであるケモカイン受容体 CXCR4 の細胞外ループ (Ecl1-Ecl3 & N 端) のみを合成し、Ecl1 については環化し、MAP 等に導入する。

まず、CXCR4 の N 端に関しては図6のように3つの断片に分割して(10 残基オーバーラップさせて)、合成した。各フラグメントは親水性領域を付加した MAP テンプレート上に構築し、抗原分子とした(図7)。これらをマウ

スに免疫する。

Development of Artificial Antigen Molecules Presenting CXCR4 N-Terminal Region & Extracellular Loop (Ecl)s

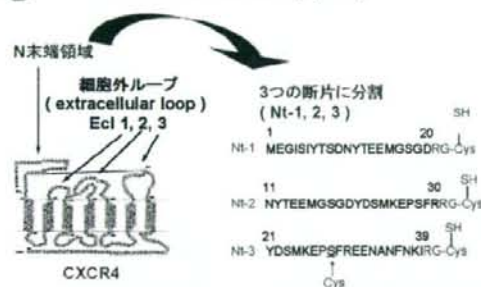


図6 CXCR4の細胞外ループ(Ecl1-Ecl3) & N端ペプチド

N末端断片を提示した抗原分子の合成

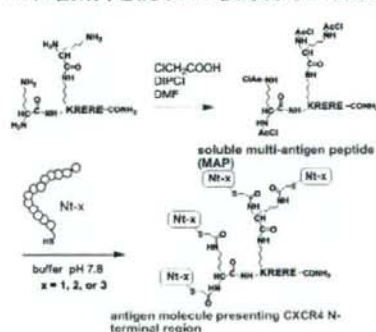


図7 CXCR4のN端ペプチドを提示した抗原分子の合成

Ecl1 に関しては、水溶性の低さを改善するため、図8のように親水性領域 Arg-Glu-Arg-Glu を天然型配列の両端に付与した。また、合成法は2種の方法を採用した。一つめの方法は、Fmoc 固相合成法でペプチド鎖を構築し、脱樹脂後、アミド結合により環化し、側鎖の保護基の脱保護をした。生成した環状ペプチドには、導入しておいた Cys のチオール基があり、これを用いて MAP-テンプレートに導入する(図9)。二つめの方法は、Cys を2個導入し、1個は通常の脱保護条件で

切断されないように AcM 基で保護した。N 末端にクロロアセチル基、C 末端に Cys(Trt) を導入する形でペプチド鎖を構築し、脱樹脂と脱保護後、Cys のチオール基とクロロアセチル基の反応により環化し、AgOTf によりもう1個の Cys の AcM 基を脱保護し、チオール基が1個フリーの形の環状ペプチドを生成する。これを用いて同様に MAP-テンプレートに導入する(図8)。

MAP の各先端のアミノ基にクロロアセチル基を導入し、チオール基を有する環状ペプチドを導入する(図10)。

Synthesis of Cyclic Peptides of CXCR4 Extracellular Loop (Ecl1)

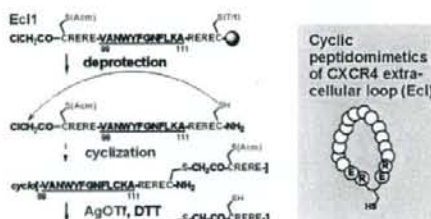


図8 親水性領域を付加した CXCR4 の細胞外ループの合成

Synthesis of Cyclic Peptides of CXCR4 Extracellular Loop (Ecl2)

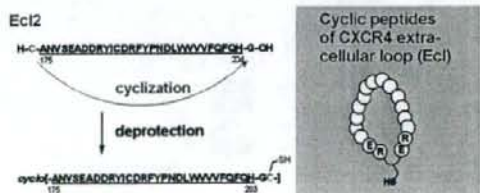


図9 アミド結合により環化した CXCR4 の細胞外ループの合成