

図 10 Ecl1-Ecl3 & N 端ペプチドを提示する人工抗原分子の合成

4) 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

NBD-556 に関して、以前芳香環の p-位に種々の置換基を導入した誘導体を合成したので、今年度は 2 級アミンの窒素原子に種々の置換基を導入した(図 11)。合成した化合物の各種 HIV 株に対する抗ウイルス活性を CCR5/PM1 細胞を用いて MTT assay で評価した。FACS 解析により抗 V3 抗体 (KD-247) や CD4 induced 抗体の envelope への反応性の変化を sCD4 と NBD-556 で比較した。また、細胞毒性を MTT assay で調べた。

Present Synthetic CD4 Mimic Analogues

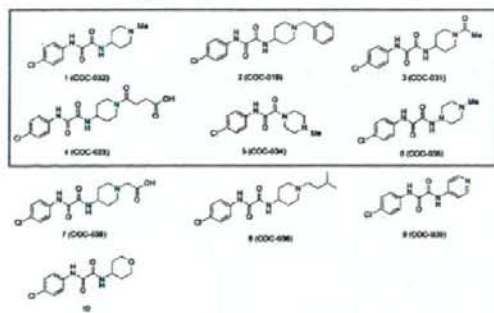


図 11 合成 CD4 mimic 誘導体の構造

(倫理面への配慮)

動物実験は、各施設の諸内規や作業方式に従って、動物愛護の精神で動物に与える苦痛の軽減と

排除に努めた。

C. 研究結果

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

人工テンプレートと親水性領域を付加した gp41 の断片 (N および C 端側) N36 peptide (CysGly-ArgGluArgGluArgGlu-N36) と C34 peptide (CysGly-ArgGluArgGluArgGlu-C34) をすでに化学合成し、N36 peptide の 3 量体の構築に成功した。MAP に導入した抗原分子 (三量体形成) を同定した(図 12)。また、CD スペクトルを測定し、3 量体は単量体よりもヘリックス性が高くなることを確認した(図 13)。

N36ペプチド誘導体NP104の同定

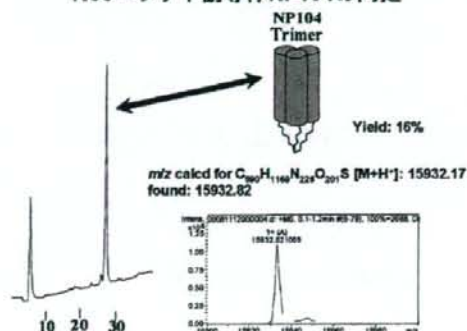
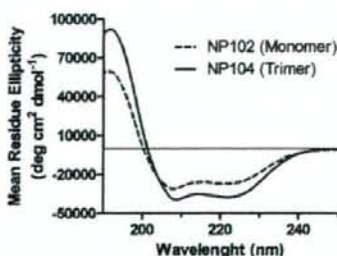


図 12 合成した N36 の 3 量体を提示する人工抗原分子の化合物同定 (HPLC チャートとマススペクトル)

CD spectra for the NP102 and NP104



peptide	$[\theta]_{208}^a$	$[\theta]_{222}^b/[\theta]_{208}^a$	α -Helicity ^c
NP102 (Monomer)	-30957	0.87	73%
NP104 (Trimer)	-38998	0.96	95%

図 13 N36 単量体 NP102 と 3 量体 NP104 の CD スペクトルの比較

これらを実際マウスで免疫し N36 三量体を認識する抗体が誘導できたことを ELISA で確認した (図 14)。また、N36 の 3 量体で免疫して得られた血清は 3 量体を特異的に認識することがわかった (図 15)。

Serum Titer Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

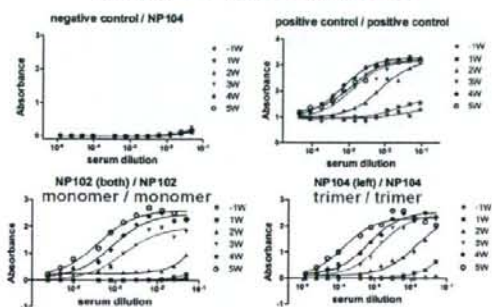


図 14 N36 誘導体で免疫したマウスの血清の ELISA

血清の特異性の評価 (No.2)

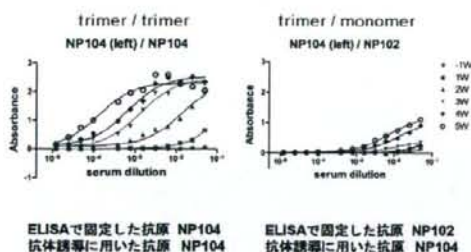


図 15 N36 の 3 量体で免疫したマウスの血清の ELISA (3 量体に対する特異性)

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
前年度、gp120 の CD4/コレセプター binding 領域の環状ペプチドおよび、コントロールとし

ての鎖状ペプチドを用いて、抗体誘導能をマウス、およびウサギで評価したが、採取した血清に中和活性が検出できなかった。そこで、別法として、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った (図 16)。その結果、アフィニティーを持ったクローンが得られた (図 17)。

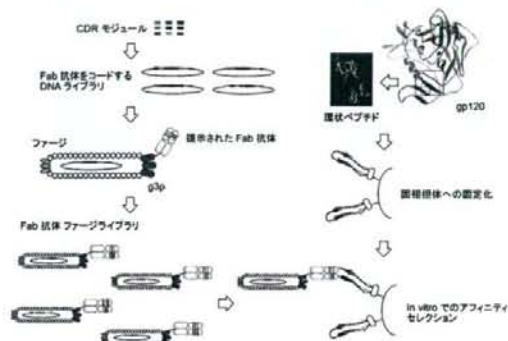


図 16 ファージディスプレイライブラリーによる *in vitro* アフィニティー選択

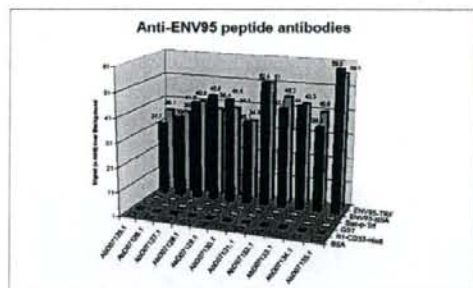


図 17 *in vitro* アフィニティー選択によるファージクローンの探索

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

CXCR4 の N 端に関しては図 6 のように 3 つ

の断片 (Nt-1, Nt-2, Nt-3) に分割して (10 残基オーバーラップさせて)、合成した。Nt-2, Nt-3 に親水性領域を付加し、MAP テンプレート上に構築した (図 7) 合成結果を 図 18, 19 に示した。

抗原分子 (Nt-2 4置換体) の合成

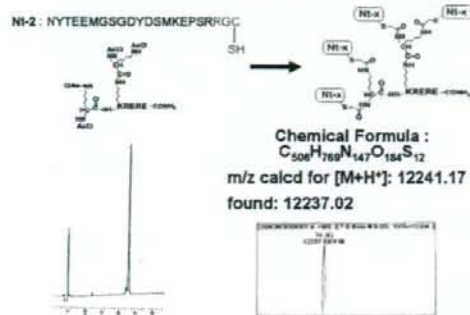


図 18 CXCR4 の N 端ペプチド Nt-2 を提示した抗原分子の合成結果 (HPLC チャートとマスペクトル)

抗原分子 (Nt-3 4置換体) の合成

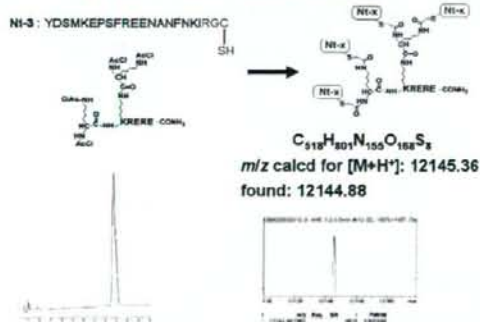


図 19 CXCR4 の N 端ペプチド Nt-3 を提示した抗原分子の合成結果 (HPLC チャートとマスペクトル)

次に、これらの抗原分子 (Nt-2 と Nt-3 の 4 置換体) をマウスに免疫し、抗体誘導を行った。その血清の ELISA の結果を 図 20 に示した。Nt-3 の 4 置換体の方が、効率よく抗体誘導されていることがわかった。その抗 HIV 活性に関して、現在検討中である。

抗体誘導実験結果

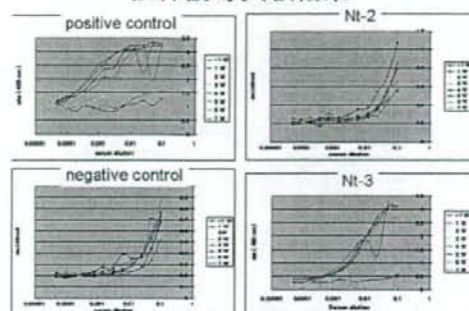


図 20 Nt-2 と Nt-3 の 4 置換体で免疫したマウスの血清の ELISA

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。研究方法の 3) で述べた、2 種類の合成法を用いて、CXCR4 の細胞外ループを合成し、環化し、エピトープ提示のためのテンプレートへ導入した。それぞれの方法で合成した Ecl1 1&2 領域の環化ペプチドの HPLC チャートとマスペクトルを 図 21-23 に示した。

Synthetic Data of Cyclic Ecl1(SH)

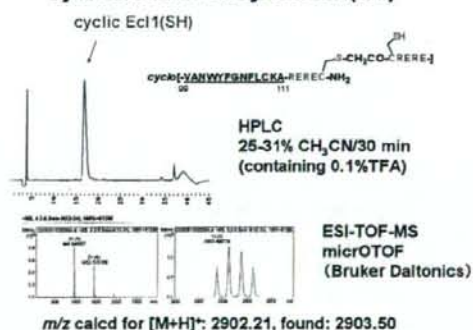


図 21 環化 Ecl1 ペプチドの HPLC チャートとマスペクトル

Synthetic Data of MAP-Cyclic Ecl1 x 4

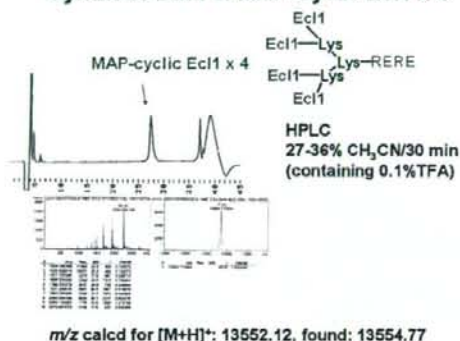


図 22 Ecl1 を提示した抗原分子(4 置換体)の合成結果(HPLC チャートとマスペクトル)

Synthetic Data of Cyclic Ecl2(SH)

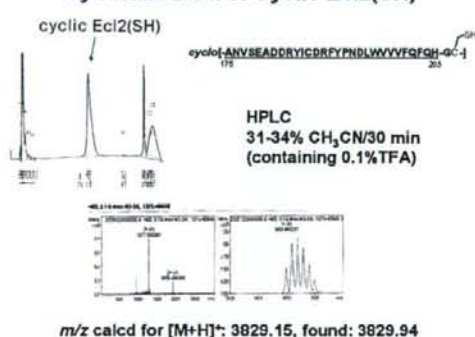


図 23 環化 Ecl1 ペプチドの HPLC チャートとマスペクトル

4) 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

CD4 mimic 誘導体に関して、2 級アミンの窒素原子に種々の置換基を導入した(図 11)。合成した化合物の各種 HIV 株に対する抗ウイルス活性を CCR5/PM1 細胞を用いて MTT assay で評価した(図 24)。FACS 解析により抗 V3 抗体(KD-247)や CD4 induced 抗体の envelope への反応性の変化を sCD4 と NBD-556 で比較した(図 24)。細胞毒性を軽減した誘導体、および抗 V3 抗体との顕著な相乗効果が見られた誘導体が得られた。

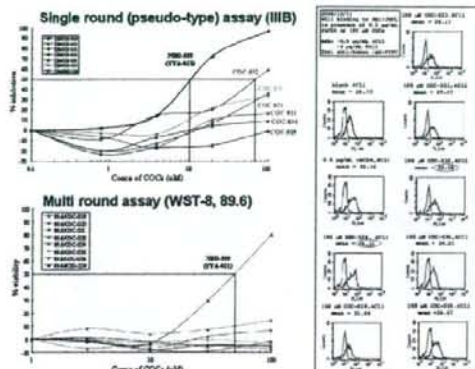


図 24 CD4 mimic 誘導体の MTT assay と FACS 解析

D. 考察

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 につい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。Ec1 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。

E. 結論

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。

F. 謝辞

抗体誘導の実験に関して、国立感染症研究所エイズ研究センター、山本直樹センター長、村上 努主任研究官、駒野 淳主任研究官、大庭賢二博士にお世話になりました。抗ウイルス活性の測定実験に関して、熊本大学エイズ学研究センター、吉村和久講師、松下修三

教授にお世話になりました。厚く御礼申し上げます。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kasiyanov A, Fujii N, Tamamura H & Xiong H. Modulation of Network-driven, GABA-mediated Giant Depolarizing Potentials by SDF-1 in Developing Hippocampus. *Developmental Neuroscience* 30(4): 285-292, 2008.
2. Driessen W.H.P, Fujii N, Tamamura H & Sullivan S.M. Development of Peptide-targeted Lipoplexes to CXCR4-expressing Rat Glioma Cells and Rat Proliferating Endothelial Cells. *Mol. Ther.* 16(3): 516-524, 2008.
3. Tamamura H, Tsutsumi H, Nomura W & Fujii N. Exploratory Studies on Development of the Chemokine Receptor CXCR4 Antagonists toward Downsizing. *Perspectives in Medicinal Chemistry* 2: 1-9, 2008.
4. Nakata H, Steinberg S.M, Koh Y, Maeda K, Takaoka Y, Tamamura H, Fujii N & Mitsuya H. Potent Synergistic Anti-Human Immunodeficiency Virus (HIV) Effects Using Combinations of the CCR5 Inhibitor Aplavirac with Other Anti-HIV Drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52(6): 2111-2119, 2008.
5. Tamamura H, Tsutsumi H, Nomura W, Tanaka T & Fujii N. A Future Perspective on the Development of Chemokine Receptor CXCR4 Antagonists. *Expert Opin. Drug Discovery* 3(10): 1155-1166, 2008.
6. Nomura W, Tanabe Y, Tsutsumi H, Tanaka T,

- Ohba K, Yamamoto N & Tamamura H. Fluorophore Labeling Enables Imaging and Evaluation of Specific CXCR4-Ligand Interaction at the Cell Membrane for Fluorescence-Based Screening. *Bioconjugate Chem.* 19: 1917-1920, 2008.
7. 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.
8. Mizukoshi F, Baba K, Goto-Koshino Y, Setoguchi-Mukai A, Fujino Y, Ohno K, Tamamura H, Oishi S, Fujii N & Tsujimoto H. Inhibitory Effect of Newly Developed CXC-Chemokine Receptor 4 Antagonists on the Infection with Feline Immunodeficiency Virus. *J. Vet. Med. Sci.*, 71(1), 121-124, 2009.

著書

1. Tamamura H, Komano A, Nakahara T, Ohashi N, Tanaka T, Tsutsumi H, Nomura W, Urano E, Hua Y, Fuji H, Hamatake M, Miyauchi K, Morikawa Y, Hoshino T, Sugiura W & Yamamoto N. Identification of Sequential Motifs Relevant to Inhibitory Activity against HIV Integrase. *Peptide Science 2007*, Saburo Amimoto and Shin Ono (Eds.), The Japanese peptide Society, Osaka, 335-336, 2008.
2. Tsutsumi H, Tanabe Y, Abe S, Mino T, Ohashi N, Tanaka T, Nomura W & Tamamura H. Development of Peptide Tools for Fluorescence Imaging of Proteins in Living Cells. *Peptide Science 2007*, Saburo Amimoto and Shin Ono, (Eds.), The Japanese peptide Society, Osaka, 95-96, 2008.
3. Tamamura H, Komano A, Nakahara T, Ohashi N, Tanaka T, Tsutsumi H, Nomura W, Urano E, Hua Y, Fuji H, Hamatake M, Miyauchi K, Morikawa Y, Hoshino T, Sugiura W & Yamamoto N. Identification of Sequential Motifs Relevant to Inhibitory Activity against HIV Integrase. 4th International Peptide Symposium, Cairn, Australia, Oct21-25, 2007, in press.
4. Ohashi N, Kato M, Matsumoto H, Tanaka T, Tsutsumi H, Masuno H, Nomura W, Yoshida K, Ikura T, Ito N & Tamamura H. Chemical Synthesis of a PKC C1b Domain by a Peptide Ligation Method and Expression of the Protein in E. coli and Their Application. 4th International Peptide Symposium, Cairn, Australia, Oct21-25, 2007, in press.

2. 学会発表

1. 野村 涉, 玉村啓和, Carlos F. Barbas, III. 亜鉛フィンガーの DNA 配列認識を用いた分割型メチル化酵素による配列特異的シトシンメチル化反応. 日本薬学会第 128 年会. 横浜, 2008 年 3 月 26 - 28 日.
2. 田中智博, 田部泰章, 大橋南美, 長谷山正樹, 堤 浩, 野村涉, 糸谷恭子, 玉村啓和, 江坂 藍, 上田 聡, 大石真也, 藤井信孝, S.C. Peiper, Z. Wang, B. Evans. 新規 pharmacophore を有する CXCR4 アンタゴニストの構造活性相関. 日本薬学会第 128 年会. 横浜, 2008 年 3 月 26 - 28 日.
3. 山田裕子, 吉村和久, 田中智博, 堤 浩, 野村 涉, 糸谷恭子, 増野弘幸, 柴田潤二, 畑田万紀, 松下修三, 玉村啓和. HIV 侵入の動的超分子機構を標的とした CD4 mimic small molecule の創製. 日本薬学会第 128 年会. 横浜, 2008 年 3 月 26 - 28 日.
4. 大橋南美, 加藤 舞, 松本洋典, 田中智博, 堤 浩, 増野弘幸, 野村 涉, 吉田清

- 嗣, 伊藤暢聡, 伊倉貞吉, 玉村啓和. PK-C 調節領域 C1B ドメインの化学合成と新規スクリーニング法への応用. 日本薬学会第 128 年会. 横浜, 2008 年 3 月 26 - 28 日.
5. 酒巻雄太, 吉本暢子, 稲葉有香, 玉村啓和, 吉田有紀, 山本恵子. 26, 27-ジノル及び 25, 26, 27-トリノル活性型ビタミン D₃ 誘導体の合成. 日本薬学会第 128 年会. 横浜, 2008 年 3 月 26 - 28 日.
 6. 富安亜矢子, 山之上 裕, 稲葉有香, 玉村啓和, 吉田 有, 山本恵子. PPAR α / γ デュアルアゴニスト活性を有する DHA 誘導体の創製. 日本薬学会第 128 年会. 横浜, 2008 年 3 月 26 - 28 日.
 7. 堤 浩, 田部泰章, 阿部清一郎, 養 友明, 大橋南美, 田中智博, 野村 渉, 玉村啓和. タンパク質の蛍光イメージングを目的としたペプチドツール. 日本化学会第 88 春季年会. 東京, 2008 年 3 月 26-30 日.
 8. 野村 渉, 玉村啓和, BARBAS C. F., III. 亜鉛フィンガー融合による DNA 修飾酵素の配列特異性の変換と機能の最適化. 日本化学会第 88 春季年会. 東京, 2008 年 3 月 26-30 日.
 9. 田部泰昭, 野村 渉, 堤 浩, 田中智博, 大庭賢二, 駒野 淳, 山本直樹, 藤井信孝, 玉村啓和. 蛍光性アンタゴニストを用いた CXCR4 のイメージングと阻害剤のスクリーニング法の確立. 日本化学会第 88 春季年会. 東京, 2008 年 3 月 26-30 日.
 10. 野村 渉, 玉村 啓和, Carlos F. Barbas, III. 標的遺伝子を特異的にメチル化する分割型酵素の開発. 日本ケミカルバイオロジー研究会第 3 回年会. 東京, 2008 年 5 月 19-20 日.
 11. 大橋南美, 堤 浩, 野村 渉, 加藤 舞, 松本洋典, 田中智博, 増野弘幸, 吉田清嗣, 伊倉貞吉, 伊藤暢聡, 玉村啓和. 蛍光標識した PKC C1B ドメインの化学合成とその応用. 日本ケミカルバイオロジー研究会第 3 回年会. 東京, 2008 年 5 月 19-20 日.
 12. 田中智博, 野村渉, 堤 浩, 田部泰章, 大橋南美, 糸谷恭子, 大石真也, 藤井信孝, Barry Evans, Zi-xuan Wng, Stephen C peiper, 玉村啓和. 新規ファルマコフォアを有するケモカインレセプター CXCR4 アンタゴニストの構造活性相関研究. 日本ケミカルバイオロジー研究会第 3 回年会. 東京, 2008 年 5 月 19-20 日.
 13. 落合千裕, 山田裕子, 吉村和久, 田中智博, 堤 浩, 野村 渉, 増野弘幸, 糸谷恭子, 柴田潤二, 畑田万紀子, 松下修三, 玉村啓和. HIV 侵入の動的超分子機構をターゲットとした CD4 mimic 小分子の創製. 日本ケミカルバイオロジー研究会第 3 回年会. 東京, 2008 年 5 月 19-20 日.
 14. 野村 渉, 加藤 舞, 増田朱美, 堤 浩, 玉村啓和. 分子進化法による配列特異的 DNA 組換え 酵素の機能最適化. 第 3 回バイオ関連化学合同シンポジウム. 東京, 2008 年 9 月 18-20 日.
 15. 芹澤雄樹, 野村 渉, 大橋南美, 奥田善章, 松本洋典, 堤 浩, 玉村啓和. ケージドジアシルグリセロール-ラク톤の合成と機能評価. 第 3 回バイオ関連化学合同シンポジウム. 東京, 2008 年 9 月 18-20 日.
 16. 野村 渉, 玉村啓和, Carlos F. Barbas, III. Site Selective Cytosine Methylation by a Split DNA Methylase. 第 45 回ペプチド討論会. 東京, 2008 年 10 月 29-31 日.
 17. 大橋南美, 野村 渉, 加藤 舞, 堤 浩, 糸谷恭子, 伊倉貞吉, 伊藤暢聡, 吉田清嗣, N. E. Lewin, P. M. Blumberg. PKC C1b domain の蛍光修飾およびそのセンシングバイオロジー的応用. 第 45 回ペプチド討論会. 東京, 2008 年 10 月 29-31 日.
 18. 阿部清一郎, 堤 浩, 養 友明, 長谷山正樹, 大橋南美, 田中智博, 野村 渉, 玉村啓和. タンパク質の蛍光イメージングを目指した新規ターゲットプローブシステムの開発. 第 45 回ペプチド討論会. 東京, 2008 年 10 月 29-31 日.
 19. 中西勇太, 駒野 淳, 堤 浩, 中原 徹, 柳澤貴之, 鈴木慎太郎, 大橋南美, 田中智博, 野村 渉, 浦野恵美子, 巖馬華, 藤 秀義, 濱武牧子, 宮内浩典, 森川裕子, 星野忠次, 杉浦 互, 山本直樹, 玉村啓和. HIV-1 インテグラーゼ阻害活性ペプチドの創製. 第 45 回 ペプチド討論会. 東京, 2008 年 10 月 29-31 日.
 20. 田中智博, 堤 浩, 野村 渉, 田部泰章, 大橋南美, 江坂 藍, 落合千裕, 佐藤

- 淳, 糸谷恭子, 村上 努, 大庭賢二, 山本直樹, 藤井信孝, 玉村啓和. 環状ペプチド骨格を有する CXCR4 アンタゴニストの構造活性相関研究: 新規ファルマコフォアの同定. 第 45 回ペプチド討論会. 東京, 2008 年 10 月 29-31 日.
21. 田中智博, 野村 渉, 田部泰章, 堤 浩, 落合千裕, 佐藤 淳, 糸谷恭子, 大庭賢二, 山本直樹, 玉村啓和. 蛍光性 CXCR4 特異的プローブのスクリーニング及びイメージングへの応用. 第 45 回ペプチド討論会. 東京, 2008 年 10 月 29-31 日.
 22. 芹澤雄樹, 野村 渉, 大橋南美, 奥田善章, 松本洋典, 堤 浩, 古田寿昭, 玉村啓和. 光分解性保護基を用いたジアシルグリセロールラクトン誘導体の合成と機能評価. 第 45 回ペプチド討論会. 東京, 2008 年 10 月 29-31 日.
 23. 落合千裕, 山田裕子, 吉村和久, 田中智博, 堤 浩, 野村 渉, 増野弘幸, 糸谷恭子, 柴田潤二, 畑田万紀子, 松下修三, 玉村啓和. HIV-1 侵入の動的超分子機構を標的とした低分子 CD4 mimic の創製. 第 45 回ペプチド討論会. 東京, 2008 年 10 月 29-31 日.
 24. 大橋南美, 芹澤雄樹, 野村 渉, 堤 浩, 松本洋典, 奥田善章, 田中智博, 古田寿昭, 玉村啓和. 蛍光標識 PKC および光制御型ケージドジアシル, グリセロール誘導体の合成と機能評価. 第 34 回反応と合成の進歩シンポジウム. 京都, 2008 年 11 月 4-5 日.
 25. 山田裕子, 吉村和久, 落合千裕, 田中智博, 柴田潤二, 畑田真紀子, 堤 浩, 野村 渉, 松下修三, 玉村啓和. HIV 侵入の動的超分子機構を標的とした CD4 mimic. 第 27 回メディシナルケミストリーシンポジウム. 大阪, 2008 年 11 月 26-27 日.
 26. 玉村啓和. 抗 HIV 剤を中心とした創薬基礎研究. 日本薬学会関東支部 第 22 回シンポジウム. 東京, 2008 年 11 月 15 日.
 27. 玉村啓和. 種々の作用点をターゲットとした抗 HIV 剤の創製. 第 22 回エイズ学会. 大阪, 2008 年 11 月 26-28 日.
 28. Tsutsumi H, Tamamura T. New Tag-probe Systems for Specific Detection of Target Proteins. 第 12 回日独ペプチド赤堀コンフェランス. 京都, 2008 年 5 月 16-17 日.
 29. Yamada Y, Yoshimura K, Ochiai C, Tanaka T, Tsutsumi H, Nomura W, Shibata J, Hatada M, Matsushita S & Tamamura H. Development of CD4 mimic small molecules targeted for dynamic supramolecular mechanism of HIV entry. The 22 回 内藤コンフェランス. 札幌, 2008 年 9 月 9-12 日.
 30. 堤 浩, 阿部清一郎, 養 友明, 長谷山正樹, 野村 渉, 玉村啓和. 蛍光応答性ロイシンジッパーペプチドペアの合成と機能評価. バイオ高分子シンポジウム. 東京, 2008 年 7 月 25-26 日.
 31. Yoshimura K, Shibata J, Honda A, Yamada Y, Masuno H, Tamamura H, Matsushita S. In Vitro Induction of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Variants Resistant to a Low-Molecular CD4 Mimic Compound, *N*-(4-Chlorophenyl)-*N'*-(2,2,6,6-tetramethyl piperidin-4-yl)-oxalamide (NBD-556). 15th Conference on Restoviruses and Opportunistic Infections. Boston, USA, Feb3-6, 2008.
 32. Aoki T, Shimizu S, Urano E, Futahashi Y, Hamatake M, Tamamura H, Terashima K, Morikawa Y, Murakami T, Yamamoto N & Komano J. Substitution of the Myristoylation Signal of HIV-1 Pr55Gag with PLC delta 1 Pleckstrin Homology Domain Results in Fully Infectious Pseudovirion Production. Cold Spring Harbor Laboratory Meetings & Courses Retroviruses. New York, USA, May19-24, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

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

エイズウイルス感染を抑制する宿主応答の解析

研究分担者 森 一泰 国立感染症研究所 主任研究官

研究要旨 糖鎖欠失ウイルス (d-5G) は生ワクチンに必要な低病原性と強い感染防御誘導能を示した。初期感染の解析から腸管粘膜組織での感染組織、感染細胞が野生株 SIV239 と異なることが明らかとなった。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。d-5G の central memory CD4+T 細胞での低感染性は、2 次リンパ組織での CD4+CCR5+T 細胞の誘導と維持、防御免疫誘導との関連性を示唆した。

A. 研究目的

エイズワクチン開発研究は、細胞性免疫を誘導するブライムブーストワクチンの臨床実験の失敗により、これまでの臨床研究重視から基礎研究へのシフトが明らかとなった。動物モデルを用いた生ワクチンが誘導するエイズウイルスに対する防御免疫の研究は重要なテーマとなっている。本研究では、糖鎖修飾変異ウイルス d-5G (SIV239 から 5 糖鎖を欠失させた変異株) が生ワクチンの性質を示すメカニズムの解明を目的とする。初期感染において、d-5G は野生株 SIV239 と同レベルの高い増殖を示すが、SIV239 と異なり宿主により感染が防御される。そこで初期感染における感染様式、感染組織、感染細胞の解析を行い、d-5G の低病原性の原因を探った。

B. 研究方法

アカゲザル

ミャンマー、ラオス原産の育成ザル、オス、B ウイルス、SRV, STLV, SIV に対する抗体が陰性、SIV 感受性 (培養リンパ球の SIV 増殖性) に問題がないサルを用いた。

SIV 感染

アカゲザル 15 頭 (2 頭は非感染) を用い、200 TCID₅₀ の SIV239 または d-5G を静脈内接種した。定期的に採血後、感染後 7, 9, 12, 14, 21 日に安楽死処置し、SIV 感染組織を採取、組織からの免疫細胞の分離後、凍結保存と病理解析用標本を作製した。

ウイルス

ウイルスストックはウイルス DNA クローンを培養細胞 (SW480 または COS-1) に transfection を行い作成した。Transfection 2-4 日後の培養上清を種ウイルスとしアカゲザル培養リンパ球を用いてさらに増殖させ感染実験用ウイルスとした。

ウイルス量は gag 抗原量については Coulter 社の p27 gag antigen assay kit により、TCID₅₀ はサル CD4 陽性 T 細胞 (CyfT/HVS) を用いて測定した。

血しょうウイルス RNA 量の測定

血しょう中のウイルス RNA は Qiagen 製キットを用いて精製した。ウイルス RNA 量は SIV の gag 遺伝子配列から作成したプライマー: the gag primers, forward primer: 697F (5' GCAGAGGAGGAAATTACCCAGTAC 3'), reverse primer: 764R (5' CAATTTTACCCAGGCATTAATGTT 3') and TaqMan probe 740T: (FAM- 5' TGTCACCTGCCATTAAGCCCGA 3'-3'-TAMRA) を用い、RT-PCR キット (TaqMan EZ RT-PCR kit) を用いてリアルタイム PCR 法により測定した。

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

末梢リンパ球、組織から分離されたリンパ球の性状について細胞表面抗原の発現を各種蛍光色素標識抗体で染色し、マルチカラー解析を行った。

T細胞パネル: CD3, CD4, CD8, CD20, CD28, CD95, CCR5 CCR7; CD4パネル: CD3, CD4, CXCR3, CCR6, DR, $\alpha\beta\gamma$ を用い、B細胞、T細胞サブセット、CD4+T細胞、CD8+T細胞については naïve, central memory, effector memory、ケモカインレセプター (CCR5, CCR6, CCR7, CXCR3) 等の表面抗原を解析した。

SIV感染細胞の解析

フローサイトメトリー解析により組織内の細胞構成頻度を解析後、それぞれのCD4+T細胞サブセットを cell sorting により分取後、DNAを調製し、リアルタイムPCR法によりSIV DNA量を測定した。

免疫組織学的解析

感染ザルから得た組織は、蛍光標識による検出を用いた免疫組織染色法により、SIV感染と感染細胞の

同定を行った。抗体は以下を用いた。SIV 検出 (抗体 gag 抗体、Nef 抗体 Env 抗体)、細胞の同定 CD3 抗体、CD4 抗体、CD68 抗体、CD20 抗体)、アポトーシスの検出 (ssDNA 抗体、抗活性化カスパーゼ-3 抗体)、細胞傷害性細胞の検出 (グランザイム-B 抗体、TIA-1 抗体)、細胞増殖性の検出 (PCNA 抗体) 細胞は DAPI による核染色により同定した。

倫理への配慮

本研究では動物実験が中心であることから、動物実験方法については倫理上、動物愛護の問題の観点から感染研動物実験委員会が定めたルール、ガイドラインに従った。動物実験開始に際しては事前に感染研動物実験委員会による審査・承認を受けた。

C. 研究結果

I. 腸管粘膜組織における SIV 感染

SIV 感染組織の解析

主要感染組織である空腸 (小腸)、回腸 (小腸)、結腸 (大腸) について免疫組織染色法により感染細胞の頻度について解析を行った。糖鎖修飾変異 SIV (d-5G) 感染では、感染後 7, 9, 12 日に、多数の感染細胞が腸管組織に検出された。多数の感染細胞が空腸、回腸に検出されたが、12 日には減少、感染後 14 日以降は検出されなかった。SIV239 感染では、感染後 7 日から検出され、9 日、12 日に多数の感染細胞が空腸、回腸に加え、結腸においても検出された。

SIV 感染細胞の感染組織における局在

腸管粘膜組織では多数の感染細胞が検出されたが、その局在は両 SIV 感染で異なっていた。回腸粘膜組織において T 細胞は、粘膜固有層 (Lamina propria: LP)、孤立リンパ小節 (lymphoid follicle: LF) に多数存在するが、感染細胞の分

布は SIV239 感染と d-5G 感染で違っていた。d-5G 感染 9 日のサルでは、感染細胞は LP に多数存在していたが、LF では少数であった。対照的に、SIV239 感染では、LF が主要な感染部位であった。しかし、両 SIV 感染でほとんどの感染細胞は CD3+T 細胞で、CD68+マクロファージの感染は確認されなかった。

感染による CD4+T 細胞サブセットの変化

SIV 感染による CD4+T 細胞サブセットの変化を調べるために、まず d-5G 感染ザル (Mm0624、感染 12 日) と SIV239 感染ザル (Mm0519、感染 9 日) の空腸から分離されたリンパ球についてマルチカラーフローサイトメトリー解析を行った。CD95-CD28+: naïve (N), CD95+CD28+: central memory (CM), CD95+CD28-: effector memory (EM) サブセットの頻度を比較すると、d-5G 感染ザルでは、CD4+T 細胞 (43.8%/CD3+), N/CM/EM: 4.7%/92.5%/2.3%/CD4+。SIV239 感染ザルでは CD4+T 細胞 (53.8%/CD3+), N/CM/EM: 3.3%/78%/18.4%/CD4+であった。EM の頻度が d-5G 感染で著しく少なかった。腸管粘膜組織では CD4+CD8+T 細胞の頻度が高いことが特徴であることから、CD4+CD8-T 細胞と CD4+CD8+T 細胞において同様の解析を行った。その結果、d-5G 感染における違いは CD4+CD8+T 細胞にあることが判明した。effector memory 細胞は多様な機能をもつことから次にケモカインレセプター等の細胞表面タンパクの発現について CD4+CD8+T 細胞について調べた。両 SIV 感染に違いがあったのは、CXCR3-, CCR5+, CCR6+, DR-のサブセットであった。

この違いは SIV 感染を原因とすることが推測されたので、非感染ザル、感染 9 日、12 日について CD4+T 細胞サブセットについて調べた。d-5G 感染では CD4+T 細胞 EM サブセットの頻度は感染 9 日では非感染ザルと同レベルであったが、感染 12 日に減少していた。SIV239 感染では、CD4+T 細胞

CM サブセットが感染 12 日において減少していた。CD4+CCR5+T 細胞が感染標的細胞となっていると推測されているが、d5G 感染では感染 9 日に、SIV239 感染では感染後 12 日に非感染に比べ有意に低値であった。

II. 2 次リンパ組織

SIV 感染組織の解析

HIV/SIV の主要感染組織である 2 次リンパ組織 (各種リンパ節、脾臓、扁桃等) における感染細胞数について解析した。

d-5G 感染では感染 9 日に少数の組織で他の組織と比べ多数の感染が検出されたが、感染 12 日以降では極めて少数であった。これとは対照的に SIV239 感染では感染 9, 12 日にほとんどの組織で多数の感染が検出された。感染細胞数の頻度は d-5G 感染と比べ 10 倍以上であった。

SIV 感染による CD4+T 細胞サブセットの変化

SIV 感染による CD4+T 細胞サブセットの変化を調べるために、d-5G 感染ザル (Mm0624、感染 12 日) と SIV239 感染ザル (Mm0519、感染 9 日) の脾臓から分離されたリンパ球分画についてマルチカラーフローサイトメトリー解析を行った。CD4+CD8-T 細胞 naïve (N), central memory (CM), effector memory (EM) サブセットの頻度を比較した。d-5G 感染ザル: CD4+ T 細胞 (27.1%/CD3+), N/CM/EM: 61%/32%/4.4%/CD4+に対して、SIV239 感染ザル: CD4+ T 細胞 (19.7%/CD3+), N/CM/EM: 52%/43%/3.4%/CD4+であった。CM の頻度が SIV239 感染で著しく少なかった。さらにケモカインレセプター等の細胞表面での発現について CD4+ T 細胞 CM について調べた。両 SIV 感染に違いがあったのは、CXCR3+, CCR5+サブセットであった。

末梢リンパ球における SIV RNA+ と CD4+CCR5+細胞

のレベル

血液循環にはリンパ組織から流出した種々の免疫細胞が存在するが、末梢血には2次リンパ組織由来の細胞が大部分を占める。病理解析からd5G感染はSIV239感染の1/10以下であることが示されているが、末梢単核球中のSIV RNAの量の比が同様にd-5G感染はSIV239感染の1/10以下であることが判明した。CD4+CCR5+細胞の頻度についても脾臓での感染と一致した。SIV239感染では、感染後14日に感染前の10%以下に低下したが、d-5G感染では、感染後逆にCD4+CCR5+T細胞の頻度が上昇した。

D. 考察

糖鎖修飾変異による組織特異性の変化

本研究は、d-5Gの低病原性の原因として、糖鎖修飾の変化がSIVの感染組織、感染細胞を変化させたためであることを明らかにした。d-5G感染では小腸粘膜固有層のCD4+T細胞が多数感染していることが免疫染色により明らかになった。さらに組織から分離された細胞のフローサイトメトリー解析からd-5G感染によるeffector memory CD4+T細胞の減少が明らかとなった。粘膜固有層は腸内細菌感染に対する宿主免疫が対峙するeffector部位であることから、ローサイトメトリー解析によるeffector memory CD4+T細胞の減少は病理解析による感染細胞の検出結果と一致した。

SIV239感染では、小腸粘膜固有層での感染は少数であったが、近接するリンパ節様部位である孤立リンパ小節に多数の感染細胞が集積していた。この組織は2次リンパ組織に属し、獲得免疫誘導の部位となっている。大部分のCD4+T細胞はcentral memoryの性質を持つ。フローサイトメトリー解析により、感染後12日においてcentral memory CD4+T細胞の減少が確認された。

このSIVの組織特異性の違いは2次リンパ組織の解析によりさらに明確に示された。2次リンパ組織はSIV239感染では主要な感染組織であったが、d-5G感染では、感染初期(9日)において少数のリンパ節での感染が確認されたのみであった。フローサイトメトリー解析によるCD4+T細胞サブセット解析もSIV239感染による2次リンパ組織の主要サブセットであるCXCR3+ CCR5+ central memory CD4+T細胞の減少を確認した。

HIV/SIVは、ウイルス表面を覆う糖鎖修飾が抗体(特に中和抗体)による認識と感染制御の障害となっていることから、糖鎖の減少は宿主による有効な中和抗体の誘導がウイルスの低病原性と関連付けられていた。しかし我々はd-5Gについて中和抗体の関与が低いことを報告した。本研究は、糖鎖修飾の変化がウイルスの細胞指向性:異なるCD4+T細胞サブセット感染が低病原性化の主原因であることを示した。

ウイルスの細胞・組織特異性と病原性

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ザ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

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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

特に該当する情報はなかった。

G. 研究発表

論文発表

1. Xing, H. Q., Mori, K., Sugimoto, C., Ono, F., Izumo K., Kubota, R., Izumo, S. Impaired Astrocytes and Diffuse Activation of Microglia in the Cerebral Cortex in Simian Immunodeficiency Virus-Infected Macaques Without Simian Immunodeficiency Virus Encephalitis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67, 600-6111, 2008.
2. Xing, H. Q., Moritoyo, T., Mori, K., Sugimoto, C., Ono, F., Izumo, S. Expression of proinflammatory

cytokines and its relationship with virus infection in the brain of macaques inoculated with macrophage-tropic simian immunodeficiency virus. *Neuropathology*. in press, 2008.

3. Onlamoon, N., Rogers, K., Mayne, A. E., Pattanapanyasat, K., Mori, K., Villinger, F., and Ansari, A.A. Soluble PD-1 rescues the proliferative response of simian immunodeficiency virus-specific CD4 and CD8 T cells during chronic infection. *Immunology*. 124, 277-293. 2008.
4. Sugimoto, C., Nakayama E. E., Shioda T., Villinger, F., Ansari, A.A., Yamamoto N., Suzuki Y., Nagai, Y. and 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, 554-566, 2008.

学会発表

1. K. Mori, C. Sugimoto, Nakamura, F. Ono, Y. Nagai, Y. Suzuki, and N. Yamamoto. Tropism of SIV infection determines pathogenicity and induction of protective response against pathogenic SIV infection. 26th annual symposium on nonhuman primate models for AIDS. December, 2008, San Juan, Puerto Rico.
2. heterologous SIV 感染モデルによる多様性ウイルス感染を防御する宿主応答の解析 森一泰、杉本智恵、成瀬妙子、椎野禎一郎、武部豊、木村彰方、山本直樹、永井美之、日本エイズ学会、2008 年、大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案特許 該当なし
3. その他 該当なし

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

研究分担者 三浦 智行 京都大学ウイルス研究所 准教授

既に霊長類モデルで強力な感染防御効果が確認されている nef 欠失 SHIV による弱毒生ワクチンの実験系において、その防御機構を成立させている感染初期の決定因子を明らかにし、ワクチン開発に応用することを目的とする。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。

A. 研究目的

SIV/HIV-1 キメラウイルス (SHIV) とアカゲザルの感染・発症モデル系における解析により、生ワクチンの強力な感染防御効果を保持しつつ安全性も確保されたヒト用エイズワクチンを開発することを最終目的とする。ワクチンの歴史において特異的及び非特異的防御反応を強力に誘導できる弱毒生ワクチンが最も有効であることが証明されてきたが、HIV では変異による強毒化の可能性から生ワクチンについては危惧視され、殆どその開発は進められていない。SHIV はサルとヒトの両方で増殖可能であり、サルで有効性と安全性を確認できることから、弱毒生ワクチンによる感染防御機構を解析し、より実用化に近い形でワクチン候補を開発し、また、その過程で SHIV の強毒性・弱毒性についても明らかにすることが期待される。

B. 研究方法

nef 欠失 SHIV 弱毒生ワクチン接種後、早期に

強毒ウイルスを攻撃接種する実験系において、腸管や深部リンパ系組織におけるウイルス動態と免疫細胞動態を経時的に詳細に解析することによって、ウイルス制御機構が成立する過程を明らかにする。そこから得られる知見を新規ワクチンのデザイン（遺伝子構成や発現プロモーター）や投与方法（デリバリー法やアジュバント）に反映させ、サル感染実験により深部標的組織における感染防御効果を確認する。

（倫理面への配慮）

本研究所では霊長類委員会によってサルを用いた実験の妥当性の検討とサルの適切な飼育と使用の監視がなされている。また、組換え SHIV 感染実験については第二種使用等をする間に執る拡散防止措置について大臣確認されている。

C. 研究結果

以前の研究で、エイズウイルスの病原性に関与する 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。攻撃接種 0、2、4 週後にそれぞれ 2~3 頭の剖検を行い、全身臓器における各ウイルスのプロウイルス DNA 量および CD4 陽性 T 細胞数を亜集団のレベルまで解析した。非免疫サルでは血漿中ウイルス RNA 量が攻撃接種 2 週後で 10 の 8~9 乗 copies/ml まで上昇し、3 週後には末梢血中 CD4 陽性 T 細胞が枯渇するのに対し、免疫サルではウイルス RNA 量が検出限界以下に抑制された個体群 (CP) と、10 の 5 乗 copies/ml 程度に抑制された個体群 (PP)、更にウイルス増殖があまり抑制されなかった個体 (NP) に別れた (図 1)。CP では、全ての組織において攻撃接種ウイルスは検出されず、CD4 陽性 T 細胞の減少も起きていなかった。PP では、末梢血のみならず全身組織でのウイルス増殖を著減させていた。さらに、これらサル群では、非免疫サルのような CD4 陽性 T 細胞の枯渇は攻撃接種後 4 週間では見られず、免疫機能の実行部隊として働くメモリー CD4 陽性 T 細胞の感染初期からの減少を全身組織で防御していた (図 2)。また、NP では、ウイルス増殖があまり抑制できず、非免疫サルのような急激な CD4 陽性 T 細胞の減少が引き起こされていた。NP では他のサル群と比較し顕著な T 細胞の活性化が腸管で観察されたことから、免疫細胞の過度の活性化が起ってしまうと生ワクチン免疫の防御効果が抑制され、且つ CD4 陽性 T 細胞の減少が起こりうる事が示唆された。

D. 考察

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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 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., and Miura, T. (2008) Small intestine CD4+ T-cells are profoundly depleted during acute infection of simian-human immunodeficiency virus regardless of its pathogenicity. *J. Virol.*, 82, 6039-6044.
- (2) 三浦智行 (2008) エイズウイルスの起源と進化. *VIRUS REPORT*, 5, 82-89.
- (3) Akiyama, H., Ishimatsu, M., Miura, T., Hayami, M., and Ido, E. (2008) Construction

and infection of a new simian/human immunodeficiency chimeric virus (SHIV) containing the integrase gene of the human immunodeficiency virus type 1 genome and analysis of its adaptation to monkey cells. *Microbes and Infection*, 10, 531-539.

(4) Morita, D., Katoh, K., Harada, T., Nakagawa, Y., Matsunaga, I., Miura, T., Adachi, A., Igarashi, T., and Sugita, M. (2008) Trans-species activation of human T cells by rhesus macaque CD1b molecules. *BBRC*, 377, 889-893.

(5) Ishikawa, M., Okada, M., Baba, K., Shojima, T., Shimojima, M., Miura, T., and Miyazawa, T. (2008) Establishment of a feline astrocyte-derived cell line (G355-5 cells) expressing feline CD134 and a rapid quantitative assay for T-lymphotropic feline immunodeficiency viruses. *J. Virol. Methods*, 151, 242-248.

2. 学会発表

(1) 姫野愛、赤木隆美、伊吹謙太郎、松山めぐみ、平井郁、堀池麻里子、宇都都史、王欣、馬場昌範、明石満、三浦智行: 抗原固定化生分解性ナノ粒子ワクチンのサル免疫実験およびSHIV攻撃接種による感染防御能の評価、第6回感染症沖縄フォーラム、2008年2月14-16日、沖縄。

(2) 稲葉一寿、深澤嘉伯、堀内励生、松田健太、姫野愛、松山めぐみ、伊吹謙太郎、五十嵐樹彦、速水正憲、三浦智行: SHIV-KS661長期感染アカゲサルにおけるウイルス増殖、CD4陽性T細胞の減少およびenteropathyについて、第11回京都免疫ワークショップ、2008年3月22日、京都。

(3) 深澤嘉伯、伊吹謙太郎、稲葉一寿、齋藤尚紀、

姫野愛、平井郁、松田健太、松山めぐみ、速水正憲、五十嵐樹彦、三浦智行: 弱毒生ワクチン株 (*Nef* 遺伝子欠損SHIV) 免疫ザルに対する急性発症型SHIV攻撃接種後早期の全身臓器におけるウイルス動態、第11回京都免疫ワークショップ、2008年3月22日、京都。

(4) Miura, T.: Investigation of acute pathogenesis of simian and human immunodeficiency chimeric virus by comparison of its molecular clones with different pathogenic abilities. The Second China-Japan Colloquium of Mathematical Biology, Aug. 4-7, 2008, Okayama.

(5) 稲葉一寿、深澤嘉伯、堀内励生、松田健太、姫野愛、松山めぐみ、伊吹謙太郎、速水正憲、五十嵐樹彦、三浦智行: SHIV-KS661長期感染アカゲサルにおけるウイルス増殖、CD4陽性T細胞の減少およびEnteropathyについて、第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月26-28日、岡山。

(6) 井戸栄治、石松美沙、三浦智行、多田哲子、多田秀子、伊吹謙太郎: HIV-1の逆転写酵素とインテグラーゼ遺伝子を持つSHIV-rtiはアカゲサルに持続感染しエイズ様症状を引き起こす、第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月26-28日、岡山。

(7) 深澤嘉伯、伊吹謙太郎、稲葉一寿、齋藤尚紀、姫野愛、平井郁、松田健太、松山めぐみ、元原麻貴子、速水正憲、五十嵐樹彦、三浦智行: *nef*欠損弱毒生ワクチン免疫ザルに対する急性発症型SHIV攻撃接種後早期でのウイルス動態および免疫細胞の解析、第22回日本エイズ学会学術集会、2008年11月26-28日、大阪。

(8) 松田健太、稲葉一寿、伊吹謙太郎、深澤嘉伯、松山めぐみ、齋藤尚紀、堀池麻里子、平井郁、姫

野愛、速水正憲、五十嵐樹彦、三浦智行：ワクチン評価に有用な R5 指向性 SHIV の作製、第 22 回日本エイズ学会学術集会、2008 年 11 月 26-28 日、大阪。

(9) 堀池麻里子、松山めぐみ、佐藤彰彦、稲葉一寿、深澤嘉伯、松田健太、三浦智行、五十嵐樹彦：サル/エイズモデルにおける HAART 療法の確立に向けて、第 22 回日本エイズ学会学術集会、2008 年 11 月 26-28 日、大阪。

(10) 井戸栄治、石松美沙、三浦智行、多田哲子、多田秀子、伊吹謙太郎：HIV-1 由来の pol 遺伝子を持つ SHIV-prti のアカゲザル *in vivo* 継代による感染増殖能の増加、第 22 回日本エイズ学会学術集会、2008 年 11 月 26-28 日、大阪。

(11) 岩見慎吾、竹内康博、三浦智行：SHIV 感染実験への数理モデルによるアプローチ、第 22 回日本エイズ学会学術集会、2008 年 11 月 26-28 日、大阪。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

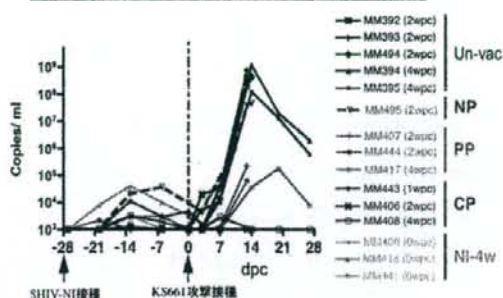
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

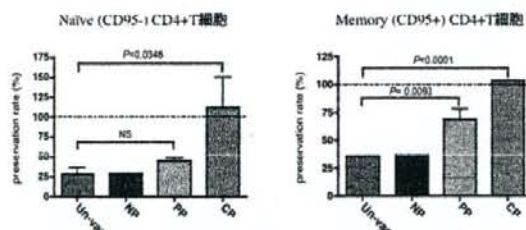
SHIV-NIによるPlasmaウイルスRNA量の増殖抑制



NPサル (Non protection) : ウイルスロードの低下がみられなかったサル
PP群 (Partial Protection) : 顕著なウイルス増殖抑制
CP群 (Complete protection) : 攻撃接種ウイルスが検出限界以下

図1 弱毒生ワクチン免疫サルと非免疫サルにおける末梢血中ウイルス RNA 量の比較。免疫サルではウイルス RNA 量が検出限界以下に抑制された個体群 (CP) と、 10^5 乗 copies/ml 程度に抑制された個体群 (PP)、更にウイルス増殖があまり抑制されなかった個体 (NP) に別れた。

感染2週目での末梢血 Memory CD4陽性T細胞減少の防御



非免疫ザル、NPザル: Naive, Memory CD4+T細胞が共に30%程度までに減少

PP群: Naive CD4+T細胞は半減, Memory CD4+T細胞は75%保持

図2 攻撃接種2週目のサルの末梢血における naive CD4 陽性 T 細胞数と memory CD4 陽性 T 細胞数の非感染サルに対する割合。CP と PP では memory CD4 陽性 T 細胞が有意に保持されていた。

研究要旨 ワクチンの有効利用において新規アジュバントの開発は既存のワクチンを利用できるため、その研究の必要性は周知であるが、新規に開発されるアジュバントは極めて少ない。結核菌ワクチンである BCG 等の抗酸菌は強い細胞性免疫(Th1)を誘導するアジュバント活性を持つことが知られているが著しい副作用のためにヒトへの使用は禁忌である。本研究では 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。本研究では Ag85B は通常細胞性免疫の誘導が困難なリコンビナントワクチンにおいてウイルス暴露後に有効な細胞性免疫の誘導が期待できるワクチンアジュバントになりうることを示唆された。

A. 研究目的

HIV の感染予防には中和抗体を主とした液性免疫反応に加え、細胞性免疫の誘導が可能であるワクチンが必要である。リコンビナントタンパクや不活化ワクチンは生ワクチンに比べ極めて安全であり、ワクチンとしては最初に検討されるものであるが細胞性免疫の誘導は困難である。HIV に対しては gp120 を用いたリコンビナントタンパクワクチンが高い抗ウイルス活性を持つ中和抗体を誘導すること知られているが、ワクチンとしては HIV 特異的細胞性免疫の誘導が困難であるために感染防御効果が期待できず、使用されていない。

ワクチンによる免疫反応をより効果的に誘導するための一つの方法としてアジュバントがある。ワクチンアジュバントは新規ワクチンに限らず現行のワクチンの利用に対しても非常に多くの利点を備えている。本研究では通常細胞性免疫の誘導が困難であるリコンビナントタンパクワクチン、サブユニットワクチンに対し HIV 感染予防に

必要な強い Th1 タイプの免疫反応を誘導する新規ワクチンアジュバントとして抗酸菌 Ag85B の可能性を検討した。

B. 研究方法

1. タンパクワクチンに対するアジュバント効果の測定：リコンビナント HIVenv gp120 ワクチンとリコンビナント Ag85B (rAg85B) をインコンプリートフロイントアジュバント(IFA)とともに混合し BALB/C マウスおよび DBA/2 マウスに皮下接種した。さらに BCG による rAg85B のアジュバント効果に対する影響を検討するために DBA/2 マウスはワクチン投与前に BCG で感作して同様に免疫を行った。

2. 特異的抗体の測定：HIVenv gp120 に対する特異抗体は ELISA 法にて IgG、IgG1、IgG2a を測定した。

3. ELISPOT アッセイ：免疫マウスに HIVenv gp120 組み込みリコンビナントワクシニアウイルス(HIVenv/rVV)を投与マウス

において CD8⁺ 脾細胞をエピトープペプチドで刺激し、IFN- γ 産生を指標とした ELISPOT アッセイを行った。

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

5. *in vivo* における抗ウイルス活性の測定：HIVenv/rVV 投与後、5日の卵巣より rVV を Real Time PCR (RT-PCR)にて測定した。

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

C. 研究結果

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

2. HIVenv/rVV 投与マウスにおける特異的 CTL の測定：免疫マウスに HIVenv/rVV を投与し、5日後に脾細胞での CTL の誘導を検討したところ、CFA 群および IFA に rAg85B を加えたものにおいてのみ高い HIVenv エピトープ特異的 CTL の誘導が認められた (Fig. 2)。同様に免疫マウスの脾細胞中の CD8⁺細胞をエピトープペプチドで刺激し、IFN- γ 産生細胞を ELISPOT にて測定したところ、CFA 群および IFA に

rAg85B を加えたものにおいて高い反応が認められた (Fig. 3)。

3. *in vivo* におけるウイルス抑制効果：免疫マウスに HIVenv/rVV を投与し、5日後に卵巣における HIVenv/rVV を測定したところ IFA に rAg85B を加えたものを免疫したマウスにおいてウイルス抑制が最も著名であり、つぎに CFA を用いたものであった (Fig. 4)。

4. BCG 感作マウスにおける rAg85B アジュバントの効果：マウスを BCG にて感作し、その後同様にリコンビナント gp120 を上述のアジュバントを用いて免疫し、rAg85B アジュバントに対する BCG 感作の影響を検討した。免疫マウスではエピトープ特異的 CTL を測定したところ rAg85B アジュバントを用いた免疫マウスで最も活性の高い CTL の誘導が認められ、この活性は BCG 感作にて増強された (Fig. 5a)。 γ -IFN 産生を指標とした ELISPOT においても同様に高い活性は BCG 感作にて増強された (Fig. 5b) *in vivo* での HIVenv/rVV 排除能においても BCG 感作により rAg85B アジュバントの効果は増強された (Fig. 6)。

D. 考察

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。このことからエイズウイルス感染症に対するワクチンは初回ウイルス暴露時に強力な免疫反応、特に細胞性免疫を誘導する試みが数多く報告されている。細胞性免疫誘導が行われる代表的なワクチンは弱毒化した生ワクチンが考えられるが、エイズウイルス感染症では安全性が保障されないことから現在までに使用はされていない。死菌ワクチンであるリコンビナントタンパクワクチンは分子生物学的技術により精製度の高い蛋白が安全かつ大量