

に安定して得ることが出来るために B 型肝炎ウイルスワクチン等では実用的に使用されている。エイズウイルスに対しては env タンパクである gp120 のリコンビナントタンパクがワクチンとして作製されており、DNA ワクチン等では誘導が困難な中和抗体も高い活性を持って誘導することが出来る。しかしながら通常の不活化ワクチンと同様に細胞性免疫の誘導が困難であり実用化はされていない。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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

Vet. Path. 45:232-235, 2008.

2) Tsuchida, J., Yoshida, Y., Sankai, T. and Yasutomi, Y. Maternal behavior of laboratory-born, individually reared long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*).

J. Am. Assoc. Lab. Anim. 47:29-34, 2008.

3) Mori, H., Yamanaka, K., Matsuo, K., Yasutomi, Y. and Mizutani, H. Administration of Ag85B showed therapeutic effects to Th2-type cytokine-mediated acute phase atopic dermatitis by inducing regulatory T cells. *Arch Dermatol. Res. July Epub ahead*, 2008.

4) Yasui, F., Kai, C., Kitabatake, M., Inoue, S., Yoneda, M., Yokochi, S., Kase, R., Sekiguchi, S., Morita, K., Hishima, T., Suzuki, H., Karamatsu, K., Yasutomi, Y., Shida, H., Kidokoro, M., Mizuno, K., Matsushima, K. and Kohara, M. Prior immunization with SARS-CoV nucleocapsid protein causes severe pneumonia in mice infected with SARS-CoV. *J. Immunol.*:181:6367-6348, 2008.

5) Morioka, T., Yamanaka, K., Mori, H., Omoto, Y., Tokime, K., Kakeda, M., Kurokawa, I., Gabazza, E., Tsubura, A., Yasutomi, Y. and Mizutani, H. IL-4/IL-13 antagonist DNA vaccination successfully suppresses Th2 type chronic dermatitis. *Br. J. Dermatol. in press*

6) Okabayashi, S., Ohno, C. and Yasutomi, Y. Acute megakaryocytic leukemia (AMKL)-like disease in a Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *J. Comp. Pathol. in press*

7) Yasuhiro Yasutomi Chimeric recombinant hepatitis E virus-like particles presenting foreign epitopes as a novel vector of vaccine by oral administration. Holland, CR., and Miyamura, T. Eds. Structure-based study of viral replication. World Scientific. 2008; p539-p552.

8) 清水裕也、唐松克夫、松原明弘、保富康宏：ワクチンアジュバントの開発 日本臨

床 66 : 1915-1921, 2008.

9) 松原明弘、清水裕也、唐松克夫、保富康宏 : 経口ワクチンの開発 日本臨床 66 : 1873-1878, 2008.

10) 辻村祐佑、加藤翔太、保富康宏 : アレルギー性疾患に対するワクチン開発 PHARMASTAGE 8 : 14-21, 2009.

2.学会発表

1) 松原明弘、清水裕也、加藤翔太、河岡義裕、保富康宏 : IL-4 アンタゴニストを用いた Th 反応調節によるインフルエンザウイルス感染の制御 第 56 回日本ウイルス学会 岡山 10 月 26 日-28 日

2) 松原明弘、高村史記、清水裕也、保富康宏 : SIVmac239 の Env gp120 アスパラギン結合型糖鎖欠損株を用いた SIV DNA ワクチンの開発 第 12 回日本ワクチン学会 熊本 11 月 8 日-9 日

3) 千代智子、関口敏、松原明弘、保富康宏、脇田隆字、村井深、小原道法 : HCV 遺伝子組み換えワクチニアウイルスの作製とワクチンとしての検討 第 12 回日本ワクチン学会 熊本 11 月 8 日-9 日

4) 関口敏、千代智子、飛田良美、松原明弘、保富康宏、村井深、小原道法 : HCV 遺伝子組み換えワクチニアウイルスの治療ワクチン効果第 12 回日本ワクチン学会 熊本 11 月 8 日-9 日

5) Marni Cueno、唐松克夫、保富康宏、Antonio Laurena、岡本尚 : Immunogenicity of HIV-1 Tat protein expressed in tomato. 第 56 回日本ウイルス学会 岡山 10 月 26 日-28 日

H.知的財産の出願・登録状況

本年度新規は無し

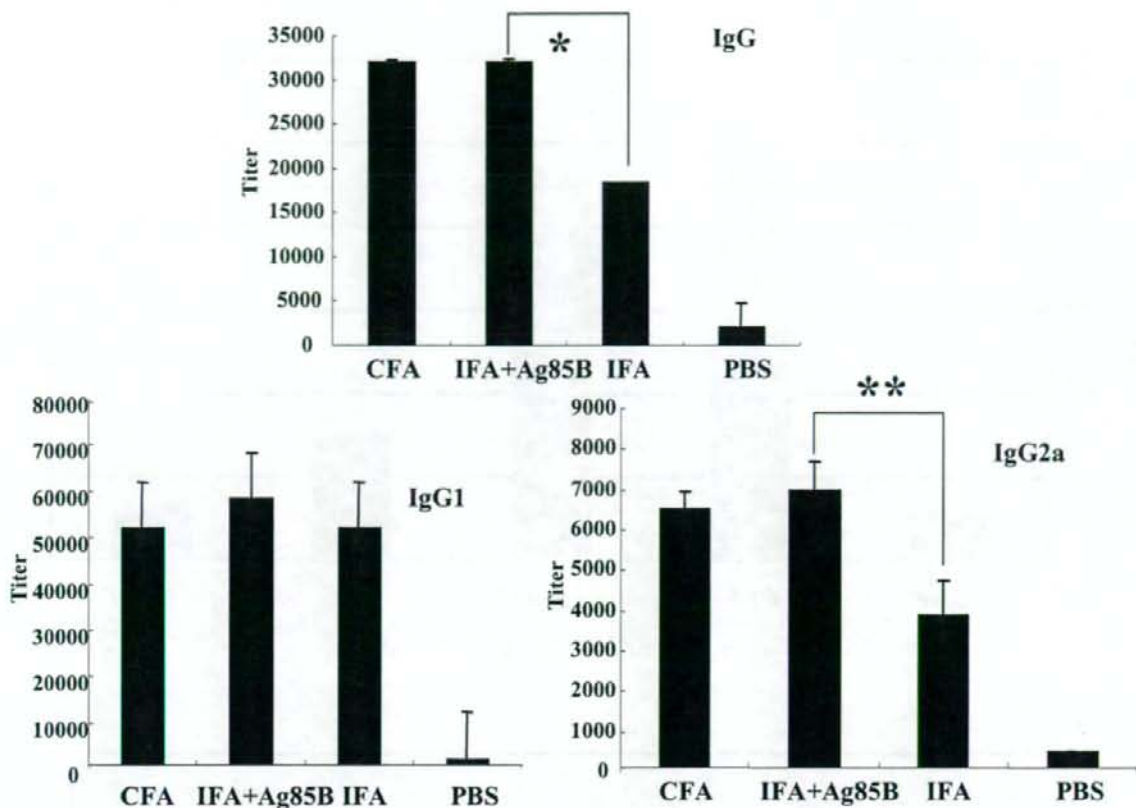


Fig. 1 gp120特異的IgG抗体サブクラス

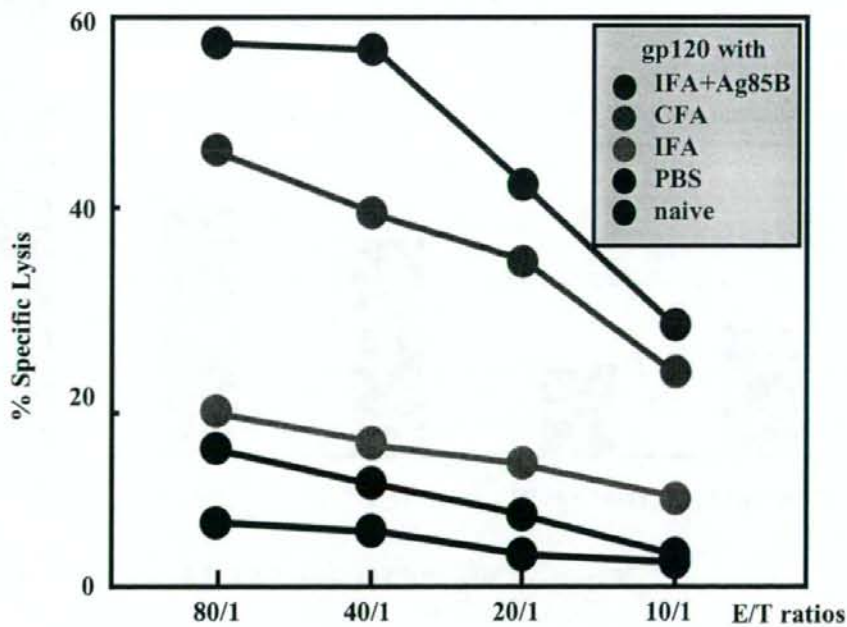


Fig. 2 gp120特異的CTLの誘導

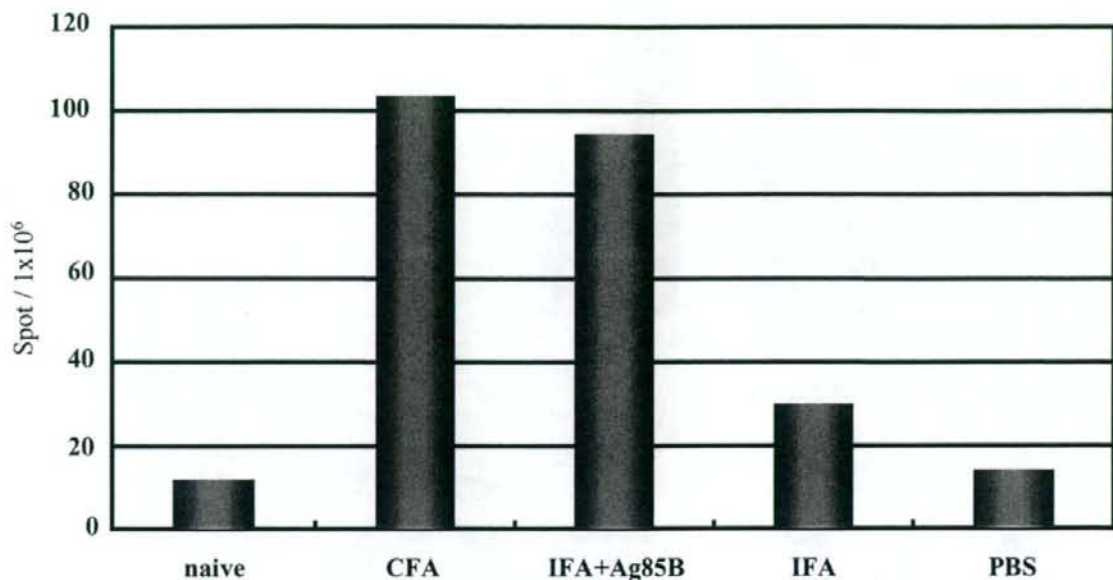


Fig. 3 gp120特異的ELISPOTの誘導

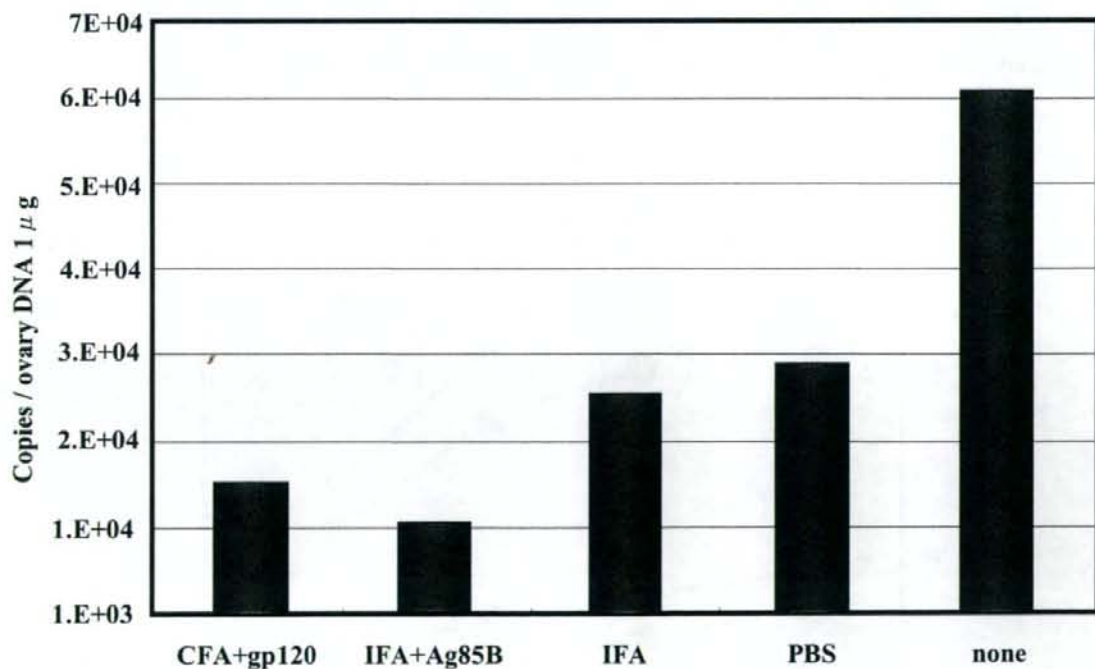
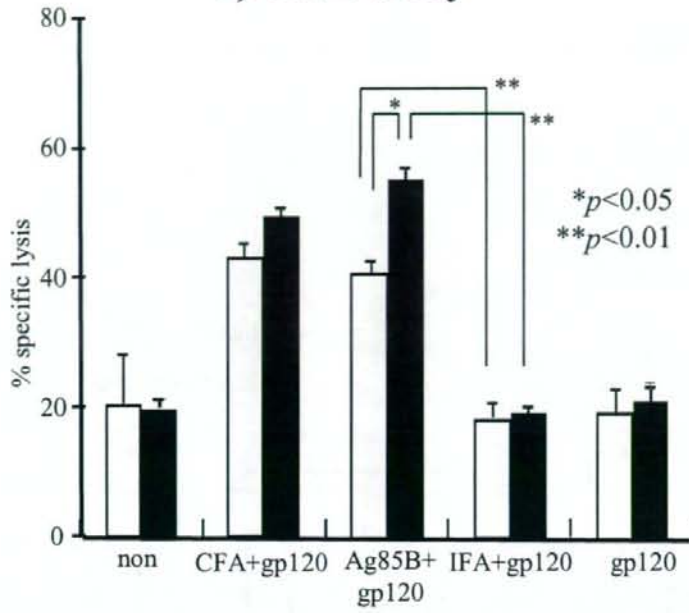


Fig. 4 in vivoでのHIVenv/rVV排除

a) CTL assay



b) IFN- γ ELISPOT (D.P.I 2)

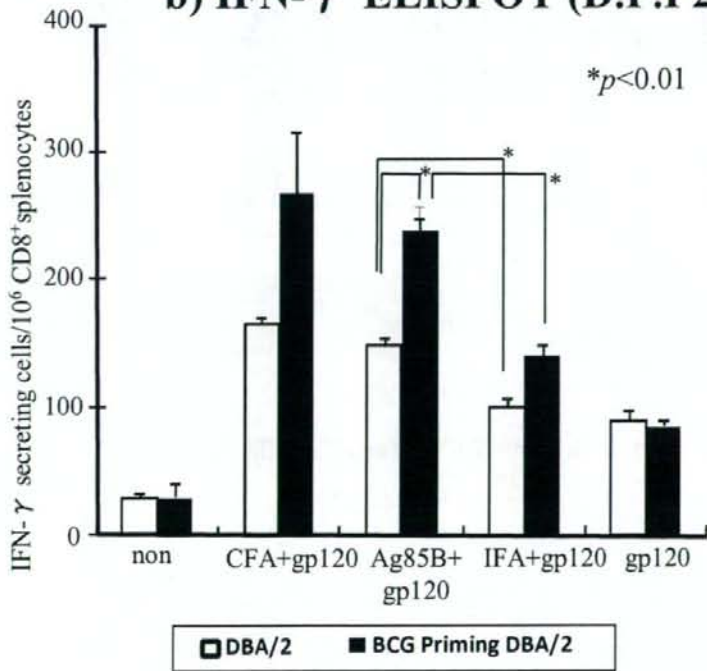


Fig. 5 gp120特異的CTLの誘導(a)およびELISPOT反応(b)

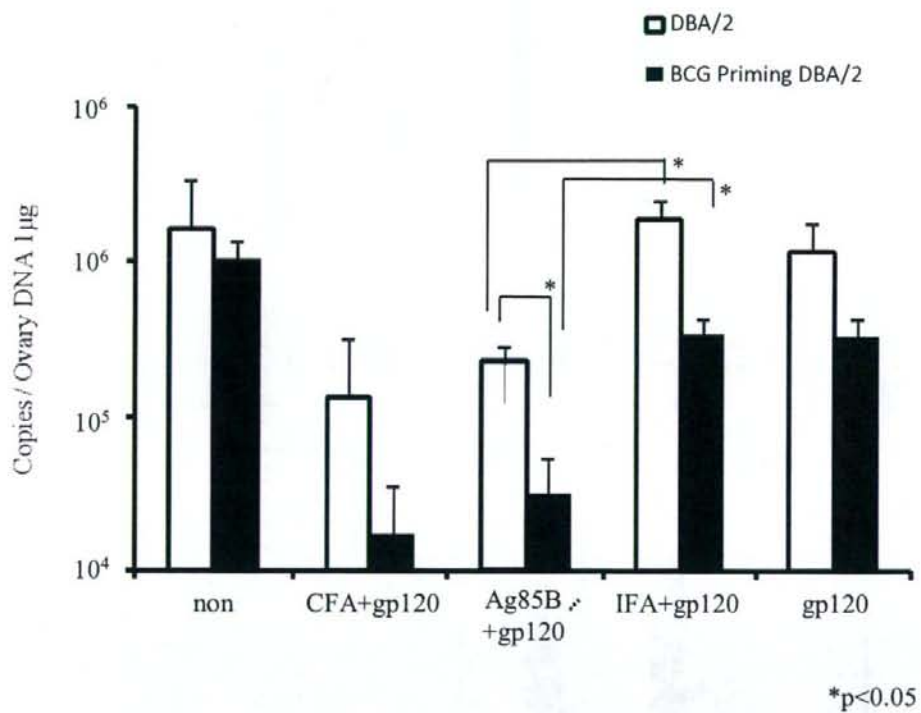


Fig. 6 in vivoでのHIVenv/rVV排除

厚生労働省科学研究費補助金（エイズ対策事業） 分担研究報告書

ワクチンアジュバント開発と動物実験

分担研究者 石川 晃一 国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官

研究要旨 HIV ワクチン実現の為に持続的かつ効率的な粘膜免疫アジュバントの検討を行った。昨年度までに同定したキトサン関連物質のうち、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。

A. 研究目的

性行為感染症においてワクチンが存在するのは B 型肝炎のみである。残念ながら HIV 感染を阻止しえるワクチンは未だ存在しない。大多数の HIV 感染は性行為感染とされ、ウイルスの侵入門戸である生殖器粘膜でウイルスが排除されれば感染阻止は可能と考えられている。しかしながら未だ粘膜組織上に感染阻止に有効な CTL および IgA を誘導したという報告は無い。本研究では各種アジュバント（キトサン、CT（コレラ毒素）等）との組合せによる粘膜免疫誘導能の解析を行う。本研究は単に HIV のみならず、種々の感染症に対するワクチンの基盤開発にもつながり、医療分野では HIV 感染症の予防・治療用医薬品の開発以外にも、他のウイルス感染症、細菌・寄生虫に対するワクチン、癌に対する免疫療法剤の開発が考えられる。アジュバントに関しては実験的には CT が強い活性を示す事が知られているが、人への投与は不可能だと考えられている。

B. 研究方法

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

2) カチオン化度による抗体産生能: 図 1 に示すようなカチオン化度を变化させ試料 (50 μ g) を使用した。pIgRKO マウスを用い OVA は 5 μ g/2 μ l とし、週 1 回、3 週にわたり経鼻免疫を行い、その後 1 回の追加免疫を行った。経時的に血中の IgG 抗体および IgA 抗体を測定した。

3) 抗体検出: ELISA 法により OVA および HIV-1 env タンパク質特異的 IgG および IgA 抗体を検出した。また一部に関してはウエスタンブロット法 (WB) および粒子凝集法 (PA) により確認した。

4) 免疫ルートの検討: 経鼻および腹腔のルートを検討した。エーテルを用いた軽麻酔下でマイクログリッドにより鼻腔内へ滴下あるいは腹腔に注射した。経鼻は週 1 回、3 週にわたり免疫を行い、その後 1 回の追加免疫を行った。腹腔免疫は 2 回おこなった。

4) 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

カチオン化キトサン (25 μ g) と env タンパク質 (5 μ g) を混合し週 1 回、3 週にわたり免疫を行った。得られた血清の経時的抗体産生能を上記の方法で測定した。また pseudo HIV-Luc ウイルスと得られた血清 (9 週目) を混合し、ウイルス感受性細胞との混合培養によるルシフェレ

ーズ活性により中和能を検討した。

5) カニクイサルを用いた経鼻免疫実験

メスのカニクイサル (5-10 歳) 6 頭を使用した。抗原として OVA を 300 μ g アジュバントはキトサン 1mg とし、カチオン化キトサン 2 頭、キトサン微粒子 2 頭、および OVA 単独コントロール 1 頭に経鼻投与を毎週 1 回、3 週にわたりおこなった。また免疫開始 21 週目に追加免疫を行った。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1) OVA を用いたカチオン化キトサンのアジュバント活性

図 1 に結果を示した、当初カチオン化度が 1 付近の試料において抗体価が高いような傾向をしめしたが、試料の溶媒等の検討も行った結果、優位差を示すような結果は得られなかった。

2) 腹腔免疫効果

図 2 および図 3 に腹腔免疫による抗体産生の経時変化を示した。図 2 は抗原に OVA を、図 3 は抗原に env タンパク質を用いた。図からも明らかなように、腹腔免疫はカチオン化キトサン、キトサン微粒子とも 2 度の免疫で十分な抗体産生が確認された。

3) HIV-1 env タンパク質を用いたキトサンのアジュバント活性および中和活性の検討

図 4 および図 5 にカチオン化キトサン等を用いた時の抗 env 抗体価を示した。ELISA 法により抗体産生が認められ、PA 法および WB 法とともに HIV-1 gp160 に対する抗体が確認された。

また図 6 に示すように、プレリミナリーではあるが免疫血清が中和活性を示すことが認められた。

4) カニクイサルを用いた経鼻免疫実験

図 7 に観察期間中の 1 頭の血液学的解析結果を示した。免疫前後で他の個体同様に異常値を示さなかった。

個体差はあるもののカチオン化キトサンおよびキトサン微粒子にアジュバント活性を認めた。図 8

また尿、糞便、膣洗浄液からの抗体検出を濃縮等の処理により試みたが手技上の問題か検出できなかった。

D. 考察

粘膜免疫誘導を第一義と考え免疫ルート of the 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ーできると考えている。

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。

E. 結論

今回の研究より、ワクチンアジュバントとしてキトサン誘導体による粘膜免疫誘導が効である可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第22回キチン・キトサンシンポジウム 新潟
キトサンの粘膜アジュバント活性 (ワクチン
開発へのアプローチとして) 2008 8月5-6
日

H. 知的所有権の出願・登録状況

免疫アジュバント①特願2007-192362

免疫アジュバント②特願2007-192363

IgA抗体測定方法特願2007-192364

図1

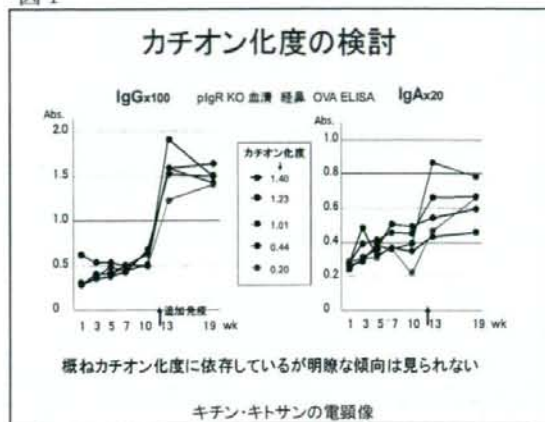


図2

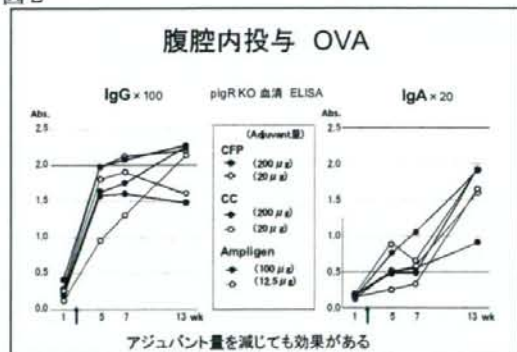


図3

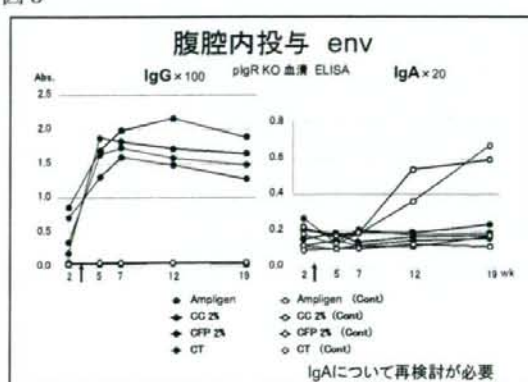


図4

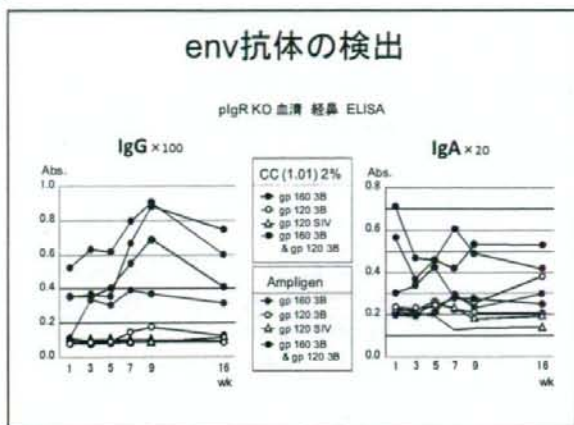


図5

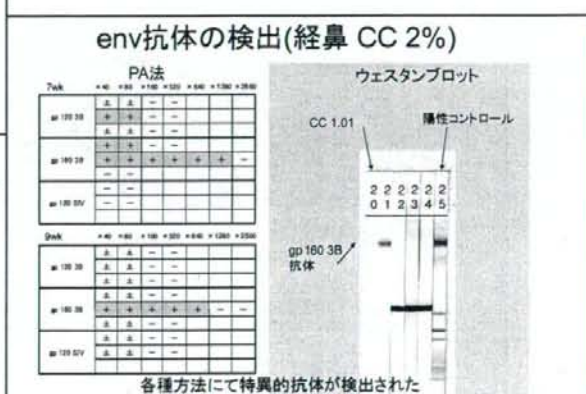


図6

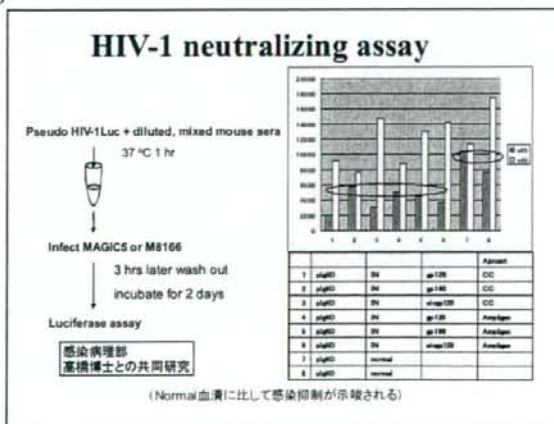


図7

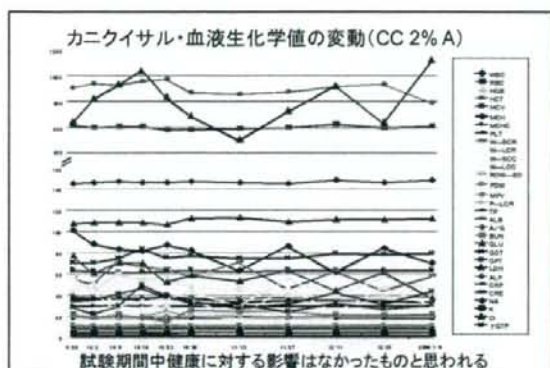
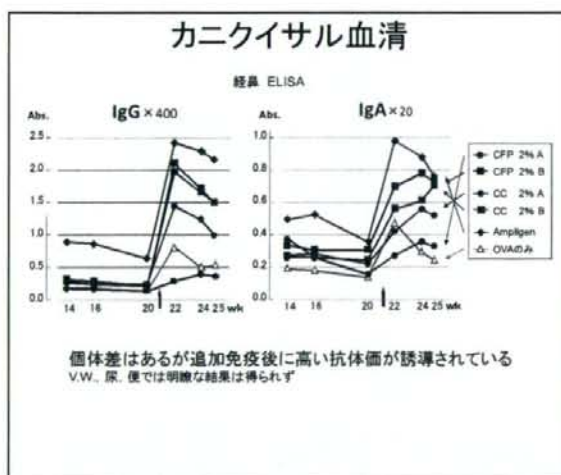


図8



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

分担研究者 高橋 秀実 日本医科大学微生物学免疫学教室 教授

研究要旨

これまで報告者らは、HIV 母児感染の鍵を握る細胞が乳汁中の樹状細胞への分化段階にあるマクロファージ（母乳マクロファージ：BrMMΦ）であり、細胞上の DC-SIGN 分子発現が感染時などに出現する IL-4 の添加により増強すること、そしてこの DC-SIGN により捕捉された HIV が乳汁中の Free Virus より遥かに高率に感染伝播することを報告してきた(Immunology 2003, JID 2005)。そこで、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。以上の結果は、Poly(I:C) などのウイルス核酸刺激あるいはその結果放出される IFN-α あるいは IFN-β によって母乳を介した HIV-1 感受性細胞への母児感染が有意に抑制されることを強く示唆している。

A. 研究目的

アフリカなどの HIV 浸淫地域では母児感染の拡大が続いており、およそ 30-50% の HIV 母児感染者は母乳を介したものであることが判明しているが、こうした母乳感染が成立するメカニズムに関しては不明な点が多い。我々はこれまでの研究で、HIV 母乳感染がことに生直後に分泌される初乳を介しての感染率が高いとの報告に着目し、初乳をターゲットして母乳感染が成立する機序を探ってきた。その結果、初乳中に多数含有される母乳マクロファージ(BrMMΦ)表面に発現した DC-SIGN によって捕捉された HIV-1 粒子の方が、母乳中の HIV-1 感染細胞から放出される Free Virus よりも遙かに高い感染伝播能を有することを見出し報告した(J Infect Dis, 191:174-181, 2005)。そこで、本研究では HIV-1 の母児感染を防ぐため母乳細胞上の DC-SIGN 発現を抑制する方策を検討したところ、母乳細胞の新たな特性を見出すと共に、母児感染伝播防止策に対する新たな知見を見出した。

B. 研究方法

正常分娩後の褥婦からインフォームドコンセントを得た上で初乳を採取し、検体を得た。初乳から、Ficoll-Hypaque 法により母乳細胞を採取し、その表面マーカーを Flow Cytometry にて解析した。また母乳細胞をサイトカインで刺激し培養しその表面マーカーの変化を比較した。次に母乳マクロファージ(BrMMΦ)より mRNA を抽出し発現している TLR 群を末梢血単核球 (PBMo) と比較した結果、PBMo より誘導した樹状細胞(DC)に発現し TLR3 が BrMMΦ には発現しているものの、PBMo には発現していないことを見出した。そこで、DC-SIGN が強発現した IL-4 添加 BrMMΦ 群、ならびに少量発現した非添加群を TLR3 の Ligand である Poly(I:C) によって刺激し、DC-SIGN 発現への影響を検討するとともに、その結果放出される IFN-α あるいは IFN-β の量を ELISA 法にて追跡した。また、IFN-α あるいは IFN-β 添加による BrMMΦ 上の DC-SIGN 発現への影響を Flow Cytometry で検

討するとともに、HIV-1 の感染伝播能を NLAD8 に感受性を有する MAGIC-5 細胞を用いて追跡した。

C. 研究結果

1) 末梢血単核球 (PBMo) と BrMMΦ より mRNA を抽出し各種 primer を用いて TLR の発現状況を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 PBMo に GM-CSF と IL-4 を添加培養した結果得られた樹状細胞(DC)には常時発現している TLR3 が発現していることを見出した (図 1)。

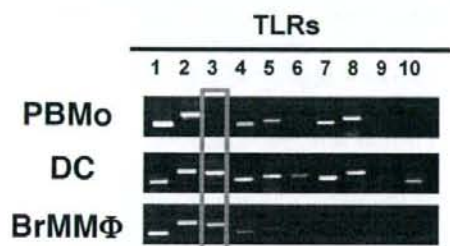


図 1. BrMMΦ における TLR3 の発現

2) そこで TLR3 の Ligand である Poly(I:C) を用いて BrMMΦ を刺激し 4-5 日間培養したところ、IL-4 添加群のみならず非添加群においても DC-SIGN の発現が有意に抑制された (図 2)。

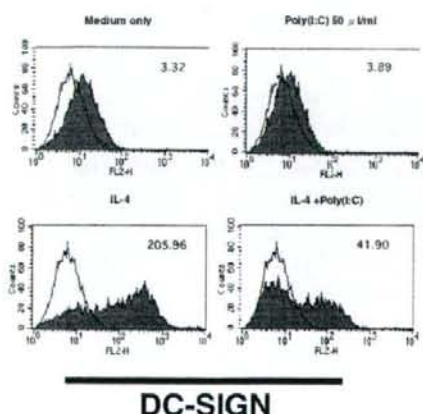


図 2. IL-4 の添加培養が母乳細胞表面分子発現へ及ぼす影響

3) 次に Poly(I:C) を用いて BrMMΦ を刺激し 4-5 日間培養した際の培養上清中に果たしてインターフェロン (IFN- α , IFN- β) が産生・放出されるか否かを検討したところ、IFN- α ならびに IFN- β の放出が ELISA 法により確認された (図 3)。

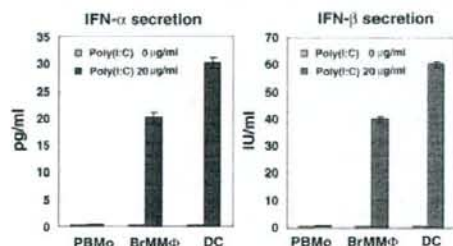


図 3. Poly(I:C) の添加刺激による BrMMΦ からの IFN- α ならびに IFN- β の放出

4) そこで、BrMMΦ を IL-4 添加により刺激する際 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 (図 4)。

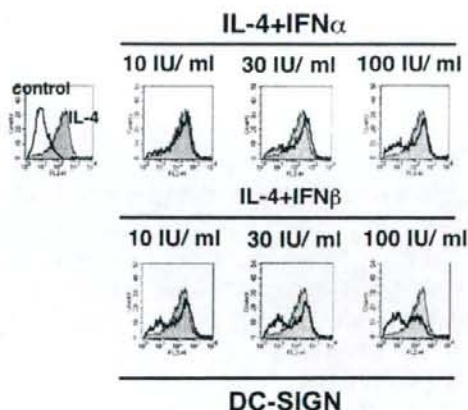


図 4. IFN- α ならびに IFN- β 添加による DC-SIGN 発現低下の誘導

5) 以上の結果に基づき、IL-4 で活性化する際に IFN- α あるいは IFN- β を添加した BrMMΦ

を HIV-1 とともに培養し、Free ウイルスを洗浄除去後、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 (図 5)。

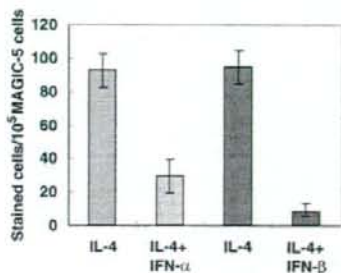


図 5. IFN 群処理による母乳細胞を介した HIV-1 感染伝播の阻害

D. 考察

これまでの研究で、母乳中には HIV-1 感受性のある Tリンパ球はごく僅かしか存在しないこと、また感受性ある CD4 陽性母乳細胞の主体は樹状細胞への分化能を有したマクロファージ系細胞 (BrMMΦ) であることを明らかにしてきた (Immunology, 108:189-195, 2003)。また、我々はこの BrMMΦ は IL-4 の添加培養により、容易に DC-SIGN を強発現した樹状細胞へと分化し、この DC-SIGN により捕捉されたウイルス粒子が、感染細胞より放出された Free Virus 粒子よりも遙かに高い感染伝播力を有することを見だし報告してきた (J Infect Dis, 191:174-181, 2005)。

以上の知見は、これまで感染細胞より放出された Free Virus Particle ではなく、DC-SIGN を介した感染伝播こそが、母乳感染を防ぐための標的であることを示している。また、IL-4 を添加することによって BrMMΦ 上の DC-SIGN の発現が増強する事実は、母乳中の IL-4 の分泌が引き金となって母乳感染が増大することを示唆している。従って、IL-4 の分泌・遊離に関与する母乳中の炎症反応を出来るだけおさえることが、DC-SIGN の発現ならびに感染伝播能を有する樹状細胞の出現を抑制するものと推測される。

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。

E. 結論

以上、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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Wakabayashi, A., Nakagawa Y., Shimizu, M., Moriya, K., Nishiyama, Y., Takahashi, H. Suppression of an already established tumor growing through activated mucosal CTLs induced by oral administration of tumor antigen with cholera toxin.

J. Immunol. 180(6):4000-4010, 2008.

- 2) Fukazawa, Y., Miyake, A., Ibuki, K., Inaba, K., Saito, N., Motohara, M., Horiuchi, R., Himeno, A., Matsuda, K., Matsuyama, M., Takahashi, H., Hayami, M., Igarashi, T., Miura, T. Small intestine CD4+ T cells are profoundly depleted during acute simian-human immunodeficiency virus infection, regardless of viral pathogenicity. *J. Virol.* 82:6039-6044, 2008.
- 3) Yamashita, T., Tamura, H., Satoh, C., Shinya, E., Takahashi, H., Chen, L., Kondo, A., Tsuji, T., Dan, K., Ogata, K. Functional B7.2 and B7-H2 molecules on myeloma cells are associated with a growth advantage. *Clin. Cancer Res.* 15(3): 770-777, 2009.
- 4) Higuchi, T., Shimizu, M., Owaki, A., Takahashi, M., Shinya, E., Nishimura, T., Takahashi, H. A possible mechanism of intravesical BCG therapy for human bladder carcinoma: involvement of innate effector cells for the inhibition of tumor growth. *Cancer Immunol. Immunother.* Published on line 13 January, 2009.
- 5) Yagi, Y., Watanabe, E., Satomi, M., Watari, E., Takeshita, T., Takahashi, H. Inhibition of DC-SIGN-mediated HIV-1 transmission via breast-feeding by IFNs released through TLR3 mediated signaling. *J. Infect. Dis.*, 2009 (submitting).
- 6) Moriya, K., Wakabayashi, A., Shimizu, M., Tamura, H., Dan, K., Takahashi, H. Selective stimulation of DEC-205-positive dendritic cells in vivo results in the suppression of already established tumors and their metastasis in 33D1-positive dendritic cell-depleted mice. *Cancer Res.*, 2009 (submitting).
- 7) 高橋めぐみ、高橋秀実：遊離抗原による CD8+T 細胞のアポトーシス誘導、臨床免疫・アレルギー科、49(2):373-380, 2008.
- 8) 高橋秀実：HIV に対する防御・細胞性免疫の役割、治療、42(5):72-76, 2008.
- 9) 高橋秀実：HIV 感染伝播における母乳中細胞の役割、血液フロンティア、18(5):45-51, 2008
- 10) 若林あや子、高橋秀実：感染症と栄養・機能性食品、日本機能性食品学会誌、4(6):373-380, 2008.
- 11) 高橋秀実：HIV：ヒト免疫不全ウイルス感染と樹状細胞、実験医学 26(20):157-163, 2008.
- 12) 高橋秀実：日本医科大学微生物学・免疫学講座、ウイルス 58(2):232-234, 2008.
- 13) 高橋秀実：漢方薬の解表作用：細胞膜上に局在化した脂質の融解と再分配の誘発。漢方医学, 33(1):285-290, 2009.
- 14) 高橋秀実：BCG による自然免疫の活性化。泌尿器外科, 2009 (印刷中)
- 15) 高橋秀実：細胞制免疫 (CTL) の誘導と樹状細胞。臨床粘膜免疫学, 2009 (印刷中)。
2. 学会発表
- 1) 高橋秀実：アレルギー疾患誘発における新たなメカニズム
第 32 回日本小児東洋医学会学術集会。
2008 年 4 月 26 日 (東京)。
- 2) Takahashi H: Inhibition of DC-SIGN-mediated HIV-1 transmission via breast-feeding by IFN-β released through TLR3 mediated signaling. Japan-US Cooperative Medical Science Program: The 21st Joint Scientific Meeting of AIDS Panels. September 13-14, 2008 (Tokyo, Japan).
- 3) 樋口智江、清水真澄、野呂瀬嘉彦、近藤幸尋、西村泰治、高橋秀実：BCG 膀胱注入療法におけるサイトカイン、自然免疫を中心とする作用機序の考察
第 96 回日本泌尿器科学会総会
2008 年 4 月 27 日 (横浜)
- 4) 高橋秀実：BCG 膀胱内注入療法と自然免疫
第 96 回日本泌尿器科学会総会
2008 年 4 月 27 日 (横浜)
- 5) 高橋秀実：エイズってどんな病気？
免疫不思議未来 2008
2008 年 5 月 3 日 (東京)
- 6) 高橋秀実：漢方薬の効果に関する免疫学的な考察。
第 7 回お茶の水東洋医学フォーラム
2008 年 6 月 11 日 (東京)
- 7) 高橋秀実：自然免疫システムと生薬成分：作用解明における新たな視点。
第 8 回日本臨床中医薬学会学術大会
2008 年 9 月 27 日 (大宮)。
- 8) 中塚雄久、高橋秀実、坂本長逸：Rivavirin による T-Helper 1/2 細胞バランス調節の免疫学的機序と慢性 C 型肝炎に対する Interferon 治療効果の関連
第 12 回日本肝臓学会大会 (シンポジウム)
2008 年 10 月 1-4 日 (東京)。

9) 高橋めぐみ、渡邊恵理、渡理英二、高橋秀実: 脂質代謝阻害剤 etomoxir の SIV 及びその宿主細胞に及ぼす影響。
第 56 回日本ウイルス学会学術集会。
2008 年 10 月 26-28 日 (岡山)。

10) 高橋秀実: BCG による自然免疫活性化。
第 1 回 BCG 注入療法研究会
2008 年 11 月 21 日 (東京)。

11) 新谷英滋、大脇敦子、清水真澄、渡邊恵理、松村次郎、八木幸恵、高久千鶴乃、高橋秀実: Down-regulation of CD1 lipid/glycolipid antigen presentation by HIV-1 Nef in immature dendritic cells。
第 22 回日本エイズ学会学術集会
2008 年 11 月 26-28 日 (大阪)。

12) 高久千鶴乃、渡邊恵理、大脇敦子、清水真澄、松村次郎、渡理英二、新谷英滋、高橋秀実: 樹状細胞と NKT 細胞の相互作用による HIV-1 感染拡大の可能性。
第 22 回日本エイズ学会学術集会
2008 年 11 月 26-28 日 (大阪)。

13) 松村次郎、大脇敦子、清水真澄、近江恭子、秋山純一、本田元人、菊池嘉、新谷英滋、岡慎一、高橋秀実: HIV 患者の腸管粘膜における感染細胞とプロウイルス DNA の検索。
第 22 回日本エイズ学会学術集会
2008 年 11 月 26-28 日 (大阪)。

14) Higuchi T, Shimizu M, Owaki A, Mayumi N, Ohmi K, Takahashi H: Possible involvement of innate alert cells activated by the live BCG-infected DCs for intravesical BCG therapy。
第 38 回日本免疫学会総会
2008 年 12 月 1-3 日 (京都)。

15) Yagi Y, Watanabe E., Satomi M, Watari E, Takeshita T, Takahashi H: Inhibition of DC-SIGN-mediated HIV-1 transmission via breast-feeding by IFN- β 。
第 38 回日本免疫学会総会
2008 年 12 月 1-3 日 (京都)。

16) Kumagai Y., Takahashi H.: Analysis of the interaction between HIV-1-gp120 and b-chemokine receptor by using multivalent V3 epitopes grafted at the immunoglobulin hyper-variable regions。
第 38 回日本免疫学会総会
2008 年 12 月 1-3 日 (京都)。

17) Shinya E, Owaki A, Shimizu M, Watanabe E, Takaku C, Watari E, Takahashi H.: A quick and easy method of laboratory-scale production for mutimeric human GM-CSF towards

PBMC-derived DCs。
第 38 回日本免疫学会総会
2008 年 12 月 1-3 日 (京都)。

18) Katakura T, Nakatsuka K, Shimizu M, Atsukawa M, Harimoto H, Tamura H, Takahashi H, Sakamoto C: Ribavirin interfered conversion of CD4⁺CD25⁻FOXP3⁻ T-helper cells into CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T-regulatory cells in an Interleukin 10-dependent manner。
第 38 回日本免疫学会総会
2008 年 12 月 1-3 日 (京都)。

19) Wakabayashi A, Moriya K, Harimoto K, Watari E, Takahashi H: Enhancement of expression of DEC-205 and co-stimulatory molecules in intraepithelial DCs after oral administration of an antigen and its involvement in mucosal CTL induction。
第 38 回日本免疫学会総会
2008 年 12 月 1-3 日 (京都)。

20) Kobayashi F, Watanabe E, Takeuchi H, Nakagawa Y, Takahashi H: A role of TLR2 in the activation of B-1 cells to produce autoantibodies by Helicobacter pylori urease。
第 38 回日本免疫学会総会
2008 年 12 月 1-3 日 (京都)。

21) Takaku S, Terabe M, Ambrosino E, Peng J, Takahashi H, Berzofsky J: Blockade of TGF- β enhances tumor vaccine efficacy independent of CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells, NKT cells, IL-13, and IL4R-STAT-6 immunoregulatory pathway。
第 38 回日本免疫学会総会
2008 年 12 月 1-3 日 (京都)。

22) Negishi Y, Inagaki S, Kumagai Y, Takeshita T, Takahashi H: Analysis of dendritic cell in pregnant mice。
第 38 回日本免疫学会総会
2008 年 12 月 1-3 日 (京都)。

23) Nakagawa Y, Shimizu M, Matsumura J, Norose Y, Takahashi M, Takahashi H: Rapid loss of CD8⁺ HIV-1 gp160-specific murine CTLs by free antigenic peptide in vivo was mediated through apoptosis。
第 38 回日本免疫学会総会
2008 年 12 月 1-3 日 (京都)。

24) 高橋秀実: 自然免疫と東洋医学
第 8 回大阪漢方研究会 (特別講演)
2009 年 2 月 21 日 (大阪)。

G. 知的財産権の出願・登録状況

本年度は特にございません。

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

研究分担者 網 康至 国立感染症研究所 主任研究官

協力研究者 岡村 智崇、兼清 優、染谷健二、松尾和浩、山本直樹 国立感染症研究所

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。

A. 研究目的

細胞性免疫誘導型プライム・ブーストワクチンとして現在開発している、rBCG-SIVgag / rDIs-SIVgag は、カニクイザルへのSHIV感染による急性エイズモデルにおいてCD4 T 細胞の減少抑制、血中からのウイルス排除に効果を示すことが判っているが、接種量による副反応の解決と、慢性型エイズモデルとして認知される、SIV-マカクサル感染系においての評価がされなければならないと考えられている。

また、有効なエイズワクチンは、細胞性免疫だけでなく、様々なHIV変異株に対し中和能を保持した中和抗体の誘導が必要であると考えられており、ワクシニアの特徴である2つ以上の遺伝子を同時に発現させることが可能という利点をいかし、HIV改変型遺伝子およびSIV改変型遺伝子の両方を発現するマルチエピトープ発現rDIsを作製し、サル動物モデルにおいて免疫誘導能を解析する

B. 研究方法

初回免疫後30週に追加免疫を行う方法でrBCG/opt-SIVgag 0.1mg/ rDIs-SIVgag 107PFU 3頭のカニクイザルを免疫し、その後3年後にD. naive 3頭を加えて、SIVmac239(nef+) 2000TCID₅₀ を直腸内接種により攻撃試験を行った。末梢血中のCD4 (+) 細胞数、effector memory / naive memory CD4(+) 細胞比およびplasma 中のウイルス RNA コピー数を指標として感染動態の解析を行った。SIVgag に対する免疫応答は、SIV p27 蛋白刺激による末梢血リンパ球のCD8 (+) 細胞中のIFN- γ 産生細胞の比率により評価を行った。

マルチエピトープ rDIs の構築のための抗原には、米国立衛生研究所にて作製され分与を受けたHIV改変型遺伝子をgp145 Δ CFI (gp145)、gp140V1V2 Δ CFI (gp140) および SIVgag-opt を用いた。gp140 および SIVgag-opt を同時に発現するマルチエピトープ rDIs (rDIs/gp140-SIVgag) を作製した。また gp145 および SIVgag をそれぞれ単独で発現する rDIs (rDIs/gp145

および rDIs/SIVgag) も作製した。これらを、サル動物モデルを用いて抹消血における ELISA 抗体価を経時的に解析を行った。

(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、rDIs 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

接種後2週における SIV Gag 蛋白に対する免疫応答は、ワクチン群のうち2頭で高い誘導を示したが、CD4(+) T 細胞数及び effector memory / naive memory CD4(+) T 細胞比の推移は、実験期間中、差が認められることはなかった。

血漿中のウイルスコピー数は、その peak 値を示す接種2週後において、対照群に比べてワクチン群では3頭中1頭が有意に低値を示し、接種12週後では、全頭が約 1/100 の値を示した。解剖時では、下顎リンパ節、そ径リンパ節において effector memory / naive memory CD4(+) T 細胞比が明らかに高かった。

構築した3種の rDIs は、Western blotting 法によって発現が確認された。また *in vitro* の解析で、これらの rDIs は CEF 細胞でのみ複製し、哺乳類細胞での複製は確認されなかった。

構築した rDIs/gp140-SIVgag および rDIs/gp145、rDIs/SIVgag を免疫したサルは、抗体誘導能に差が確認されるものの、2回目の免疫後に抗 HIV Env ELISA 抗体価の上昇が認められた。

D. 考察

rBCG/opt-SIVgag を用いた rBCG/rDIs プラ

イム-ブーストワクチンでは、SIV-マカク属サル感染系において、感染12週間では、他の現在有効と考えられている候補ワクチンと比べてもほぼ同様のウイルス量抑制効果を示したと考えられる。effector memory CD4(+) T 細胞の減少抑制効果についても、体表リンパ節において対照群に比べて有意に高く、その局所における effector memory CD4(+) T 細胞の減少を低減させていたものと考えられる。

また、これらの効果がワクチン接種後3年という長期間であっても認められたことから、このワクチン候補が実用性の点において優れていることを示している。

rDIs/gp140-SIVgag 免疫群と rDIs/gp145、rDIs/SIVgag 免疫群において抗 HIV Env ELISA 抗体価の上昇が認められたことは、安全性の高いワクシニアウイルスDIsを用いた液性免疫誘導型を加えたマルチエピトープワクチンの可能性を示唆するものと考えられる。

E. 結論

蛋白発現量を高めた rBCG/opt-SIVgag と rDIs-SIVgag による細胞性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 HIV Env 抗体価の上昇を確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshino N, Kanekiyo M, Hagiwara Y, Okamura T, Someya K, Matsuo K, Ami Y, Sato S, Yamamoto N, Honda M. Mucosal

administration of completely
non-replicative vaccinia virus
recombinant Dairen I strain elicits
effective mucosal and systemic immunity.
Scand J Immunol 68 (5): 476-483, 2008.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
山本直樹							
Koyanagi Y, Tanaka Y, Ito M, <u>Yamamoto N.</u>	Humanized mice for human retrovirus infection.	Eds. Nomura, Watanabe, and Habu	Curr Top Microbiol Immunol 324, vol.34	Springer-Verlag		2008	138-148
玉村啓和							
<u>H. Tamamura</u> , et al.	Identification of Sequential Motifs Relevant to Inhibitory Activity against HIV Integrase.	Saburo Amimoto and Shin Ono	Peptide Science 2007	The Japanese peptide Society	Osaka	2008	335-336
<u>H. Tamamura</u> , et al.	Development of Peptide Tools for Fluorescence Imaging of Proteins in Living Cells.	Saburo Amimoto and Shin Ono	Peptide Science 2007	The Japanese peptide Society	Osaka	2008	95-96
<u>H. Tamamura</u> , et al.	Identification of Sequential Motifs Relevant to Inhibitory Activity against HIV Integrase.		4th International Peptide Symposium, Oct21-25, 2007		Cairn, Australia	in press	
<u>H. Tamamura</u> , et al.	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, Oct21-25, 2007		Cairn, Australia	in press	
保富康宏							
<u>Yasutomi, Y.</u>	Chimeric recombinant hepatitis E virus-like particles presenting foreign epitopes as a novel vector of vaccine by oral administration.	Holland, CR., and Miyamura, T.	Structure-based study of viral replication.				
高橋秀実							
高橋秀実	書籍全体	矢田純一、高橋秀実	リップンコット・イラストレイテッド免疫学	丸善出版	東京	2009.1.10	1-353