

200830005A

200830005B

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

HIV 感染予防における経粘膜ワクチンの開発

平成20年度 総括・分担研究報告

平成18年～20年度 総合研究報告

主任研究者 廣井 隆親

平成21年（2009年）4月

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

HIV 感染予防における経粘膜ワクチンの開発

平成20年度 総括・分担研究報告

平成18年～20年度 総合研究報告

主任研究者 廣井 隆親

平成21年（2009年）4月

目 次

| | |
|---------------------------------------|----|
| I. 平成20年度総括研究報告 | |
| HIV 感染予防における経粘膜ワクチンの開発 | |
| 廣井隆親 | 1 |
| II. 平成20年度分担研究報告 | |
| 1. 脂質代謝関連分子による持続感染性ウイルス増殖の抑制 | |
| 高橋秀実 | 7 |
| 2. ヒト細胞導入マウスにおける HIV 感染と抗 HIV 免疫応答の解析 | |
| 横田恭子 | 11 |
| III. 平成18年～20年度 総括総合研究報告 | |
| 1. HIV 感染予防における経粘膜ワクチンの開発 | |
| 廣井隆親 | 15 |
| IV. 平成18年～20年度 分担総合研究報告 | |
| 1. HIV 感染予防における経粘膜ワクチンの開発 | |
| 高橋秀実 | 21 |
| 2. ヒト細胞導入マウスにおける HIV 感染と抗 HIV 免疫応答の解析 | |
| 横田恭子 | 25 |
| V. 全研究期間における研究成果刊行物一覧表 | 27 |
| VI. 研究成果の刊行物・別刷 | 37 |

Ⅲ. 平成18年～20年度
総括総合研究報告

HIV 感染予防における経粘膜ワクチンの開発

主任研究者 廣井 隆親 (東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所 副参事研究員)

分担研究者 高橋 秀実 (日本医科大学 教授)

横田 恭子 (国立感染症研究所 室長)

研究協力者 中川 洋子 (日本医科大学 助手)

横山 清司 (エイズ予防財団 リサーチレジデント)

研究要旨

現代において、HIV感染は主に性交渉による生殖器粘膜面を介した感染症である。粘膜感染の防御機構は感染初期の粘膜面でウイルスの粘膜上皮への進入を阻止するか、粘膜上皮に感染したウイルスを直接殺傷することが重要である。これまでのHIV感染防御に関する多くの研究で、中和抗体を利用した体液性免疫の誘導とウイルス特異的な細胞傷害活性を誘導する各々のシステムの有効性が全身免疫を用いた研究で明らかになっている。しかしながら、膣粘膜を含む生殖器粘膜には近接したリンパ器官が存在せず、一般に生殖器粘膜に細胞性と体液性免疫反応を誘導することは困難であると考えられてきた。近年、HIV感染初期において消化管臓器がHIVの増殖場所として問題視されている。HIV感染防御を目的としたワクチン開発において上記の中和抗体を利用した体液性免疫の誘導に加えて、腸管を加えた各組織に確実に免疫誘導を行うことが重要になってくると思われる。一方、最近のメルクのアデノウイルスを用いたワクチンに有効性が証明されなかったばかりか、むしろ感染率を高める可能性があるというニュースは大きな衝撃をもって受け取られている。

このように、HIVワクチン開発がさらに困難とされている中で、これまでに我々は研究で粘膜面に細胞性免疫と体液性免疫の両者を誘導する可能性がある液性因子としてIL-15を見出した。本研究の目的は、本来の生体が有するIL-15とHIV抗原を用いて膣粘膜にHIV特異的な体液性免疫である分泌型IgAと高い細胞傷害活性を有するCD8⁺T細胞の誘導法を開発することでワクチン開発の一助なると考えた。この場合、膣粘膜にHIV抗原の種類と粘膜免疫アジュバントであるIL-15を発現するベクターを導入したウイルスを用いて免疫誘導を試みる。使用するウイルスと抗原はModified Vaccinia Ankara (MVA)をベクターとして用い、HIV-1のGag, Env, Polをワクチン抗原とし、また当研究室で粘膜アジュバントとしての可能性を見出したヒトIL-15を共発現させるウイルスベースHIVワクチンを開発する。免疫誘導に上記ウイルスを用いる利点としては、MVAに関してヒト上皮細胞に感染はするが増殖しない点でありヒトへの影響の倫理的配慮がなされていることである。さらに研究期間中において抗原特異的CD8⁺T細胞中に含まれるmulti-functional CD8⁺T細胞の役割がHIV発症抑制に重要であることがヒトからの研究により示唆されたことにより、IL-15のアジュバント機能によって誘導される粘膜免疫ならびに全身免疫増強の効果を検討した。

一方、これらの経粘膜HIVワクチンの開発に伴い、よりヒトに近い検査モデルの開発が望まれている。これまでHIVやSHIVが感染するサルやチンパンジーを用いた研究が主であったが、大型動物を用いることによってコストと時間が多く浪費され経済的ではなかった。そこで我々は、将来のサルを用いたチャレンジ実験に効果的ならびに効率的に対応するためにも、マウスにヒトの免疫系を再構築したhu-SCIDマウスを用いることによりワクチンをヒトの免疫細胞を使って簡便に評価するシステムの構築に着手した。

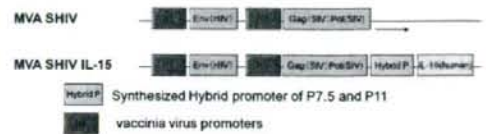
A. 研究目的

HIV 感染は主に性交渉による生殖器粘膜面を介した感染症である。粘膜感染の防御機構は感染初期の粘膜面でウイルスの粘膜上皮への進入を阻止するか、粘膜上皮に感染したウイルスを直接殺傷することが重要である。これまでの HIV 感染防御に関する多くの研究で、中和抗体を利用した体液性免疫の誘導とウイルス特異的な細胞傷害活性を誘導する各々のシステムの有効性が全身免疫を用いた研究で明らかになっている。これまでに我々は研究で粘膜面および全身免疫系に細胞性免疫と体液性免疫の両者を誘導する可能性がある液性因子として IL-15 を見出した。本研究の目的は、本来の生体が有する IL-15 と HIV 抗原を用いて膣粘膜に HIV 特異的な体液性免疫である分泌型 IgA と細胞傷害活性を有する CD8⁺T 細胞の誘導法を開発する。この場合、膣粘膜に HIV 抗原の種類と粘膜免疫アジュバントである IL-15 を発現するベクターを導入したウイルスを用いて免疫誘導を試みる。使用するウイルスと抗原は Modified Vaccinia Ankara (MVA) をベクターとして用い、HIV-1 の Gag, Env, Pol をワクチン抗原とし、また当研究室で粘膜アジュバントとしての可能性を見出したヒト IL-15 を共発現させるウイルスベース HIV ワクチンを開発する。免疫誘導に上記ウイルスを用いる利点としては、MVA に関してヒト上皮細胞に感染はするが増殖しない点でありヒトへの影響の倫理的配慮がなされている。これら一連の研究により困難とされている HIV ワクチン開発の一助と成り得るものと考えている。

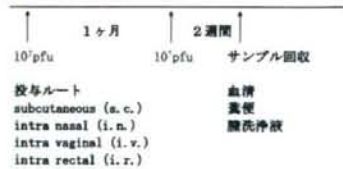
B. 研究方法

研究期間の3年間の初年度に作製した HIV の env 遺伝子、SIVMAC239 の gag 遺伝子、pol 遺伝子とヒト IL-15 遺伝子を挿入したウイルスベクター MVASHIVIL-15 と、コントロールとして同上の組み合わせのうち IL-15 遺伝子が挿入されていない MVASHIV を BALB/c マウスにそれぞれ、 10^7 pfu を投与ならびに接種した (図1)。

図1 ウイルスベクター構築図

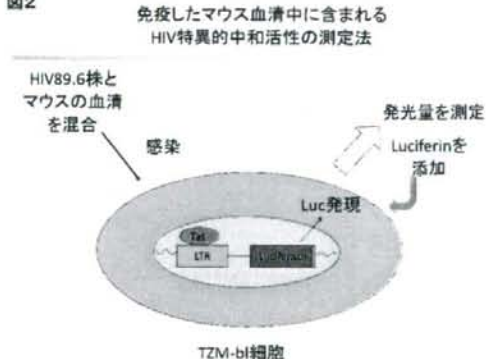


投与方法ならびに免疫スケジュール



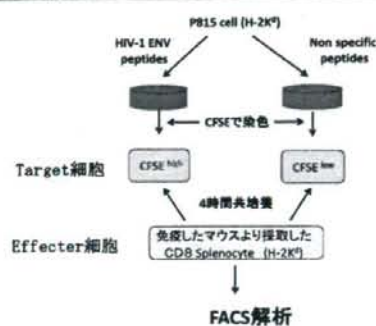
投与経路として皮下、経鼻、経膣、経肛門の4種類を検討した。一ヶ月後に同量のウイルスを各投与経路で再投与した。その後血清、糞便、膣洗浄液を回収してELISAにより HIV 特異的抗体価を測定した。採取した抗体の中和活性を *in vitro* の中和活性試験にて行った (図2)。

図2



一方、免疫したマウスから採取した末梢血単核球 (PBMC) や腸管粘膜固有層リンパ球 (LPL) を ENV ペプチドで刺激して、培養上清中の IFN- γ 量を測定した。さらに同細胞を ENV ペプチドで 5 時間 *in vitro* にて刺激し、細胞内のサイトカイン (IFN- γ , TNF- α , IL-2) 産生をフローサイトメトリーで解析し、抗原特異的 CD8T 細胞に含まれる multi-functional CD8T 細胞の出現頻度を計測することにより、IL-15 のアジュバント機能によって誘導される免疫増強の効果を検討した。さらに HIV の env に対する CTL 活性を *in vitro* の細胞傷害試験にて検討した (図 3)。

図3 CFSE染色を用いた抗原特異的CTLアッセイ法



(倫理面への配慮)

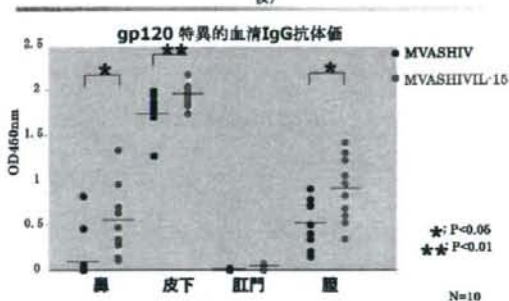
本研究では研究期間の3年間を通じて、主に実験用マウスならびに分離した細胞を使用して経粘膜 HIV ワクチンの開発を行った。実験用マウスの使用にあたっては、財団法人東京都臨床医学総合研究所動物実験施設指針や独立法人国立大学実験動物施設協議会指針ならびに厚生労働省国立感染症研究所動物実験施設指針などを厳守した。さらに本研究は HIV 菌体を使用するため国立感染症研究所において P3 レ

ベルの実験室にて施設安全基準を厳守して研究を遂行した。

C. 研究結果

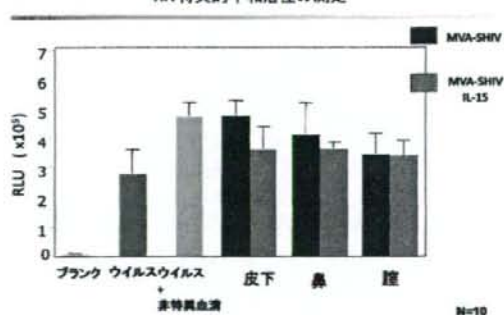
各投与ルートで免疫したマウスの血清中の抗原特異的 IgG を測定した場合、皮下免疫した実験群に強い免疫誘導を確認した (図 4)。また、経鼻、経膣に抗原特異的 IgG 免疫誘導が確認されたが、経肛門の投与では抗原特異的抗体の誘導は認められなかった (図 4)。経肛門を除く、すべての投与方法で IL-15 による抗原特異的抗体産生量の増強が確認された (図 4)。

図4 IL-15を挿入したワクシニアウイルスの経鼻(i.n)および経膣(i.v)投与による抗原特異的抗体価の増加(2週間後)



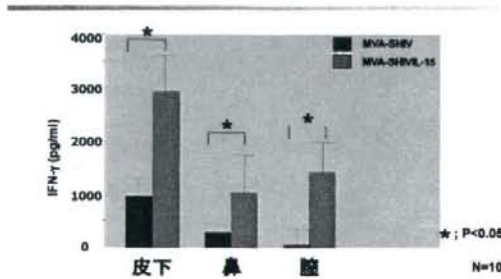
次に得られた血清を用いて HIV 感染に対する中和活性を検討した結果、いずれの投与群において有効な中和活性が認められなかった (図 5)。

図5 免疫したマウス血清中に含まれる HIV特異的中和活性の測定



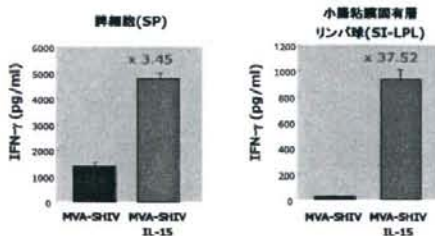
一方、免疫したマウスの脾臓細胞ならびに小腸 LPL を分離して、HIV-1 ENV ペプチドで刺激し、3 日後培養上清中に含まれる IFN- γ の産生量を ELISA 法によって検討したところ、皮下免疫した実験群がもっとも高い IFN- γ 産生を示し、その産生能は IL-15 によって顕著に上昇していた (図 6)。

図6 HIV ペプチド(env)特異的刺戟末梢血細胞からのIFN- γ の産生(8ヵ月後)



MVASHIV と比較した MVASHIVIL-15 の IFN- γ 産生の上昇は、脾臓細胞では 3 倍と有意に確認されたが、小腸 LPL では 10 倍以上の顕著な増加を確認した (図 7)。

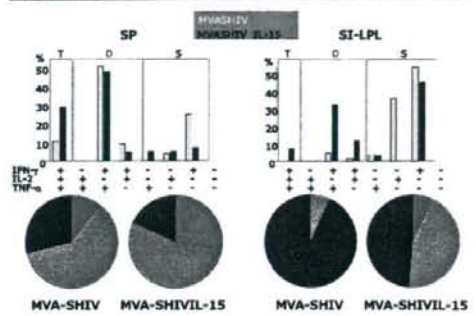
図7 IL-15を搭載した注射型ワクチンは脾臓細胞(全身免疫)のみならず、腸管細胞(粘膜免疫)も活性化する。



そこで、近年慢性的なウイルス感染症においてその CTL 活性の高さから注目を集めている multi-functional CD8T 細胞の頻度を皮下に免疫した実験群の脾臓細胞並びに小腸 LPL を用いて検討した。その結果 MVASHIVIL-15 を免疫した群の脾臓では、コントロールと比較して、multi-functional CD8T 細胞の頻度が上昇することが明らかになった (図 8)。

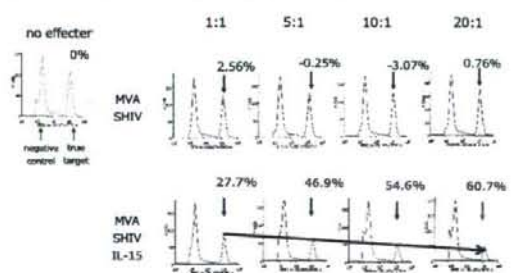
また小腸 LPL においては、コントロール群では multi-functional CD8T 細胞が検出できなかったが、MVASHIVIL-15 を免疫した群では multi-functional CD8T 細胞が顕著に増加していた (図 8)。

図8 IL-15は腸管でmulti-functional CD8T細胞数を増加させる



さらにこれら誘導された multi-functional CD8T 細胞が実際に抗原特異的 CTL 活性を有するかを検討した結果、MVASHIVIL-15 を免疫した群におけるマウスの脾臓より分離した CD8T 細胞は、IL-15 が挿入されていない MVA を免疫したマウスより分離した CD8T 細胞と比較検討した場合、env ペプチド特異的に優位に高い CTL 活性を有していた (図 9)。

図9 IL-15はmulti-functional腸管のCD8T細胞の強いCTL活性を誘導する



D. 考察

近年の研究成果より HIV が感染後、おもに腸管で活性型メモリーCD4T 細胞に感染し増殖するというこ

とが明らかになっており、腸管免疫の活性化は、今後のワクチン開発において非常に重要な基準になると思われる。今回の我々の研究結果である、皮下免疫+IL-15で小腸粘膜固有層リンパ球中に含まれるCD8T細胞を活性化するという結果は、粘膜免疫の誘導は全身性の抗原投与では困難であると考えられていた粘膜免疫の概念を刷新する知見であり非常に臨床的ならびに基礎学的に意義が高い。またmulti-functional CD8T細胞は、近年HIV患者でありながら長期間後天的免疫不全症候群(AIDS)を発症しない患者で増加が確認されており、今後のワクチン開発の新規の指標となり得る細胞群である。我々はIL-15によって全身でこのmulti-functional CD8T細胞が増加することを確認した。さらに腸管では通常誘導されないmulti-functional CD8T細胞がMVASHIVIL-15で誘導されたことは、腸管免疫の誘導によってHIV感染を予防するという開発概念においては非常に将来性のある結果であると思われた。またmulti-functional CD8T細胞を増加させる因子の探索は世界中で行われているが、我々の研究結果は世界に先駆けるものと考えられる。一方、今回のワクチンシステムでは有効な中和活性が認められなかったことに対して、組み込んだenv抗原の特性ならびにその立体構造に起因している可能性が考えられた。

E. 結論

第一に既存の概念として粘膜免疫は抗原の粘膜投与

を用いないと誘導が困難と考えられていたが、我々はIL-15をアジュバントに使用することで皮下投与という全身性の免疫法で小腸粘膜固有層のCTLを誘導した。この結果は学術的に非常に新規性の高い結果である。さらに世界中でmulti-functional CD8T細胞の増殖因子が検索されているが、IL-15によって同細胞群を増加させ、通常誘導されない腸管でmulti-functional CD8T細胞の誘導ができたという結果は世界に先駆ける発見である。この結果により急性期の腸管におけるHIVの増殖が抑制される可能性が示唆されたことは臨床ならびに基礎研究において非常に意義の高いことである。今後の展望として、当該研究で我々はIL-15をアジュバントとして用いることで腸管粘膜を効率よく誘導できることを示した。今後はその誘導した免疫反応により実際にHIVを排除できることをヒト化マウスを用いた実験で検討する必要がある。腸管はメモリー細胞の貯蔵庫といわれる組織であるので、HIVの感染初期に腸管でのHIVの増殖を抑制できれば、有効なワクチンとして働く可能性があり、またもし排除ができなくても、血中のウイルス量を低濃度で抑制制御できる可能性があるため、後天的免疫不全症候群の発症を遅らせることができる可能性がある。ワクチン開発の大きな問題点として、HIVの高度な変異が挙げられるがIL-15により誘導されるCTL活性が抗原の変異に対してオーバーテイクできる可能性を含めて、今後はヒト化マウスの実験ならびにマカクザルを免疫してSIVの感染実験を行う予定である。

IV. 平成18年～20年度
分担総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
総合研究報告書

HIV 感染予防における経粘膜ワクチンの開発

分担研究者 高橋 秀実 日本医科大学微生物学免疫学教室 教授

研究要旨

長期間に亘る HAART 治療をしても、粘膜組織に潜伏する HIV の除去は困難であることが判明してきた。こうした粘膜組織内細胞群に持続感染するウイルスを制御するためには、感染細胞そのものを制御する CD8 陽性キラー T 細胞 (CTL) を粘膜内で誘導し維持することが重要である。本研究班では、CTL による抗原ペプチド認識機構を、生体内での分解が極めて困難である D-体アミノ酸を含んだエピトープペプチドを用いて詳細に解析した結果、エピトープペプチドによりアナジー等に陥ることなくキラー活性を特に粘膜組織内で維持しうるような CTL 誘導法を試み、以下の結果を得た。

1) D-体のアミノ酸を含む特殊ペプチドを用いたマウスを免疫した結果、種々の置換ペプチドに交差傷害性を示すものの、エピトープペプチド処理による活性抑制は受けにくい新たな性状を持つ CTL が誘導された。2) 新たに樹立した CTL とオリジナルの CTL という特異性の異なる 2 種の CTL の持つ T 細胞レセプター (TCR) を解析し、抗原ペプチドとの相互作用を検討した結果、CTL の認識部位は従来報告されてきた TCR 中の相補性決定領域 3 (CDR3) ではなく CDR1 という特殊な領域に存在することを見いだした。3) また、こうした持続感染性ウイルスの感染成立機序を麻疹ウイルスとその持続感染株を用いて検討したところ、非感染細胞や野生株ウイルス感染細胞と比較して、持続感染細胞では脂質のβ酸化に関与する酵素である mitochondrial short chain enoyl-CoA hydratase (ECHS) という分子の発現が著明に低下していることが判明した。4) さらにウイルス蛋白抗原をコレラ毒素 (CT) とともに経口投与したところ、小腸上皮内に強い活性を有する CTL が誘導されることを見いだした。

以上の研究成果は今後 HIV に対する有効なワクチン開発上で重要な知見を提供するものと考えられる。

A. 研究目的

HIV のような粘膜組織に持続感染性を有するウイルス感染を制御する場合、ウイルス感染細胞そのものを認識、排除する CD8 陽性のキラー T 細胞 (CTL) を粘膜内で誘導し維持することが極めて重要である。こうした観点から我々は以前より HIV 外被糖蛋白 gp160、ならびにその中に存在する強い CTL 誘導能を有した抗原決定基 (P18) に着目し、マウスの系を用いて解析を行ってきた。一方、我々はこうして誘導した CD8 陽性 CTL の細胞傷害性が、CTL による標的細胞の破壊産物由来と考えられるウイルス由来ペプチド (P18) との短時間接触により、速やかに低下し Anergy の状態に陥る事を *in vitro* の系で見出し、報告してきた。この事実は、大量のウイルス由来ペプチドの存在下においても安定な細胞傷害活性を示す様な CTL を誘導することの重要性を示唆している。一方、CTL はその高い抗原特異性の為変異ウイルスを認識できない場合が多く、より広い交差

傷害性を持つ CTL の誘導がワクチンの開発上重要であり、その為には特異性をもたらす抗原認識機構の詳細な解析が必要と考えられる。更に HIV のような粘膜組織における持続感染性ウイルスに対する有効なワクチン開発のためには、ウイルスによる持続感染成立のメカニズムの解析、及び粘膜組織における効率的な CTL 誘導法の開発も重要である。以上の観点から、本研究班において以下に示す 4 つの研究 (1-4) を計画、実施した。

B. 研究方法

1) HIV 外被糖蛋白 gp160 中に CTL が特異認識する 10 個のアミノ酸から成るエピトープペプチド P18-I10(aa318-327:RGPGRAFVTI) を対象とし、CTL による認識にとって最も重要であることが判明している 325 番目の L-バリンを D-バリンに置換したペプチド I-10(325v) を合成した。このペプチドをパルスした樹状細胞でマウスを免疫し、*in vitro* で再刺激することにより、I-10(325v)

に特異的な CTL 株を樹立した。この新たに誘導した CTL の性状を調べ、オリジナルの P18-I10 特異的 CTL と比較検討した。

2) CTL の抗原ペプチド認識機構につき解析する目的で、オリジナルの P18-I10 特異的 CTL 及び前年度に樹立した I-10(325v) 特異的 CTL の 2 種類の CTL からそれぞれ限界希釈法を用いて CTL クローンを樹立した。誘導した CTL クローンの性状を調べると共に各クローンより mRNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて TCR α 鎖、 β 鎖の DNA 配列を決定し、更にこれよりアミノ酸配列を決定した。決定した TCR のアミノ酸配列を基に分子モデリング法により P18-I10 又は I-10(325v) と MHC クラス I 分子、TCR の 3 分子複合体モデルを作成し、バリンと相互作用する TCR 中の領域を決定した。

3) HIV 由来の抗原に対する特異的免疫応答について調べる一方、HIV 等の持続感染性ウイルスの感染成立に関与する宿主因子を同定する実験を行った。基礎的条件を決定する為に、当教室の保有する麻疹ウイルス持続感染ヒトグリオーマ細胞株を用いて検討した。ヒトのグリオーマ細胞 A172 に温度感受性麻疹ウイルス変異株 P-448 を感染させ、持続感染細胞株(448-A172)を樹立した。持続感染細胞特異的に発現が変動している分子を同定する為、非感染グリオーマ細胞(A172)、持続感染細胞、変異ウイルス野性株感染 A172 細胞(A172-WT MV)の 3 種類の細胞について細胞溶解液中の蛋白質を 2 次元電気泳動により分離し銀染色により分離された蛋白質スポットを検出した。3 種の細胞間で変動のあったスポットをゲルから切り出し LC/MS/MS にて蛋白質の同定を行った。同定した蛋白質に対する siRNA を作成し予め A172 細胞に transfection して蛋白質の発現を減少させた細胞に麻疹ウイルスを感染させ、ウイルス増殖の程度を調べた。さらに、粘膜アジュバントであるコレラ毒素(Chorela Toxin: CT)に着目し、CT とウイルス蛋白抗原を経口投与し、小腸粘膜内に強い活性を有した CTL の誘導が確認されるか否かを検討した。

C. 研究結果

1) D-アミノ酸を含むペプチドを用いた新たな性状を持つ CTL 誘導の試み: P18-I10 中 325 番の L-バリンを D-バリンにしたペプチド I-10(325v) をマウスに免疫することにより、I-10(325v) 特異的 CTL が樹立できた (LINE-IIIB(325D) と命名)。こ

の CTL はオリジナルの CTL (LINE-IIIB) 同様クラス I MHC 分子拘束性、CD8 陽性の CTL で最少認識部分は 10 個のアミノ酸より成るペプチド

I-10(325v) であった。CTL の他のペプチドに対する交差傷害性を調べたところ、325 番のアミノ酸が D-バリンであるものの他、いくつかの置換ペプチドに対し、交差傷害性を示した。又、我々が以前に見出しているようにオリジナルの P18-I10 特異的 CTL (LINE-IIIB) は遊離の P18-I10 で短時間処理すると著明に CTL 活性の低下が認められたが、今回樹立した D-体を含むペプチド特異的 CTL の活性は遊離のペプチド I-10(325v) では著明な抑制効果が見られたが、通常の生体内に存在すると予想されるオリジナルの P18-I10 による抑制は認められなかった。

2) エピトープ特異性を決定する D 型アミノ酸と L 型アミノ酸の CTL-TCR による判別: エピトープペプチド P18-I10 中、325 番のバリンについて特異性を異にする 2 種の CTL、オリジナルの LINE-IIIB と新たに樹立した LINE-IIIB(325D) よりそれぞれ 2 種ずつのクローンを樹立できた。これらのクローンはすべて MHC クラス I 分子拘束性、CD8 陽性の conventional な CTL で 325 番のバリンに関し、CTL 活性は逆相関の関係を示した。そこで CTL の抗原認識特異性の機構をそれぞれの CTL が持つ T 細胞レセプター (TCR) の構造と活性との関係から明らかにする目的で、各クローンの持つ TCR のアミノ酸配列を調べたところ、 α 鎖の配列は 2 種の CTL 間で類似していたが β 鎖の配列は大きく異なっていた。このことから TCR β 鎖が特異性に関与していることが示唆された。又 TCR のアミノ酸配列を基に分子モデリング法を用いて MHC 分子/ペプチド/TCR β の 3 分子複合体モデルを作成した結果、325 番のバリンと相互作用する TCR 中の領域は従来から T 細胞の抗原特異性に関与すると考えられて来た V β 鎖の CDR3 領域ではなく CDR1 領域であることが判明した。

3) 脂質代謝に関与する分子によるウイルス増殖の抑制: 非感染細胞、持続感染細胞、変異ウイルス野性株感染 A172 細胞の 3 種類の細胞について 2 次元電気泳動及び LC/MS/MS 法で解析した結果、非感染細胞や野生株ウイルス感染細胞と比較して持続感染細胞では脂質の β -酸化に関与する酵素である mitochondrial short chain enoyl-CoA hydratase (ECHS) という分子の発現が著明に低下していることが判明した。そこで持続感染における ECHS の関与を確認する為に、ECHS に対する

siRNA をトランスフェクションし、予め発現低下させた細胞に麻疹ウイルスを感染させたところ、細胞内外のウイルス量は減少し、細胞変性効果も認められなかった。ECHS の発現を低下させておくことと水疱性口内炎ウイルス (VSV)、セムリキ森林ウイルス (SFV) 等のウイルス増殖も抑制され、この抑制はインターフェロンを介するものではないことも確認した。

4) コレラトキシンとウイルス抗原の経口投与による効果的な粘膜 CTL 誘導法の開発：報告者らが開発した抗体を持たず CTL のみを有するトランスジェニックマウス(JEM, 2002)にウイルスを接種し検討を重ねた結果、マウス小腸粘膜内の上皮内リンパ球 (IEL) 中における特異的な CTL が、最も強く且つ特異的な抗ウイルス作用を示すことを確認した。こうした IEL 中の CTL を効率よく誘導する方策を検討する目的で、OVA とコレラトキシン(CT)を経口投与し IEL ならびに脾臓細胞中の CTL 誘導状況を及び細胞傷害活性を追跡した結果、強い細胞傷害性を有する CD8 α β 陽性の CTL が粘膜内 IEL 中に誘導されることを見出した。この活性化には CT そのものによる粘膜樹状細胞の活性化が必須であり、そのサブユニットである A-サブユニット(CTA)や B-サブユニット(CTB)では誘導されなかった。

D. 考察

HIV のようなウイルスに対する感染制御においては特異的抗体と共に抗原特異的な CD8 陽性 CTL の誘導、維持が重要であることが判明している。しかしながら、我々のマウスを用いた解析において、誘導した CTL が種々の原因により、一過性の活性抑制又は細胞死等に陥り、速やかにその標的細胞傷害活性が阻害される場合のあることが判明している。従ってワクチンの開発上からは、CTL の誘導法のみならず、誘導した CTL の活性維持が重要と思われる。又、ウイルスの抗原変異に対処しようとする交差傷害性の高い CTL 誘導の為に CTL の抗原認識機構の詳細な解析が必要である。こうした問題への解決に向けて、今研究班においていくつかの実験を実施した。この結果、本来生体には存在しない特殊なペプチドを使用することにより、交差傷害性を持ちながら、且つウイルス由来の産物による抑制は受けないという新たな性状を持つ CTL を誘導することが出来た。こうした方法はより安定で avidity の高い有効な CTL を誘導する上での新たな試みとして重要と考えられる。更にこの新たに誘導した CTL

と従来の CTL との認識レセプターの構造比較から HIV 外被糖蛋白に対する CTL の抗原認識領域が他の CTL のものとは異なっていることが判明したことから、この領域を中心とした検討が更に必要であると予想された。今回の研究は主として全身性免疫の中心である脾臓細胞を用いて行ったが、ここで得られた結果は同時に粘膜における有効な CTL 誘導にも充分応用可能と考えられる。さらに本研究を通じて、粘膜アジュバントとウイルス蛋白を経口投与することにより、ウイルス特異的な CTL が効率良く粘膜内に誘導されることを見いだした。

一方、HIV のような持続感染性ウイルスの場合、感染成立に対するメカニズムの解析は重要である。この為我々は、LC/MS を組み合わせたプロテオミクスの手法を用い、持続感染成立に関与する宿主因子の同定を試みた。基礎的条件決定の為に使用した麻疹ウイルス持続感染細胞の結果からは脂質の β -酸化に関与する酵素である ECHS が宿主因子のひとつとして同定でき、この蛋白の発現を抑制すると抗ウイルス活性が誘導されることを確認した。この酵素は脂質の β -酸化に関与する酵素であることから、 β -酸化が阻害されるとエネルギー代謝が低下し ATP が不足する為にウイルスの進行が遅くなり、持続感染状態が誘発される可能性が示唆された。

E. 結論

D-体アミノ酸を含む特種な置換ペプチド群を用いることにより、CTL の抗原認識についての詳細なメカニズムの解析及びウイルス由来の破壊産物に対しても活性抑制を受けず、安定に活性を維持しうる CTL を誘導することが可能となった。こうした結果は、ペプチドを主体としたワクチンの開発上、重要な知見であると考えられる。また、同時にプロテオミクスの手法を用いることにより、持続感染性ウイルスの感染成立に関与する因子の同定が可能であることが確認され、こうした脂質代謝に関わるような分子を標的とした副作用の少ない新しい抗ウイルス薬開発の可能性が示唆された。さらにウイルス蛋白抗原をコレラ毒素 (CT) とともに経口投与したところ、小腸上皮内に強い活性を有する CTL が誘導されることを見いだした。以上の研究成果は今後 HIV に対する有効なワクチン開発上で重要な知見を提供するものと考えられる。

HIV 感染予防における経粘膜ワクチンの開発

ヒト細胞導入マウスにおける HIV 感染と抗 HIV 免疫応答の解析

分担研究者 横田 恭子 国立感染症研究所・免疫部・第一室長

協力研究者 寺原 和孝 国立感染症研究所・免疫部・研究員

研究要旨

免疫不全マウスにヒト臍帯血由来 CD34 陽性幹細胞を導入したヒト化マウスおよび X4 と R5 型の赤色蛍光発現組換え HIV-1 を作製し、*in vitro* および *in vivo* における HIV-1 感染細胞集団をフローサイトメーターで確認可能なヒト化マウスの HIV-1 感染モデルを確立した。この系は今後ワクチンの有効性を評価するために有用である。

A. 研究目的

HIV-1 感染モデルとしてヒトの血液系幹細胞導入マウスを用い、マウス生体内で維持され増殖するヒトの免疫系細胞においてワクチンで誘導される抗 HIV 免疫応答と感染防御効果を評価するシステムを確立し、蛍光発現ウイルスを用いてその増殖を解析する。

B. 材料と方法

1. 組換え HIV-1 の作製

EGFP あるいは DsRed 遺伝子を IRES-Nef 遺伝子上流にコードするプロウイルスクローン pNL-E あるいは pNLAD8-D のプラスミドを 293T 細胞にトランスフェクトし、2 日後の培養上清を回収した。In house ELISA 法で上清中の p24 量を測定した後、分注して凍結保存した。作製したウイルスは HIV-1_{NL-E}(X4) と HIV-1_{NLAD8-D}(R5) である。

2. マウス

NOD/SCID/Jak-3 KO マウスは熊本大学エイズ学研究センター岡田誠治教授より供与をうけ、感染研で繁殖させた。

3. ヒト化マウスの作製

臍帯血よりファイコールで単核球を分離し、CD34 分離キット(StemCell Technology)を用いて血液幹細胞をエンリッチした。

(ヒト臍帯血は東京臍帯血バンクの倫理委員会の承認を受けて供与され、ヒト臍帯血を移入したヒト化マウスの作製は、平成 19 年 7 月 24 日に感染研のヒトを対象とする医学研究倫理委員会の承認を受けた)

4. HIV 感染と FACS 解析

健康人末梢血より PBMC を回収し、PHA 茂樹し

て PHA blast を調整、あるいは CD14 陽性細胞と T 細胞に分画した。CD14 陽性細胞より樹状細胞(DC)を培養分化させた。10⁶個の細胞あたり HIV-1_{NL-E}(X4) と HIV-1_{NLAD8-D}(R5) をそれぞれ p24 量にして 200 ng-400 ng 相当感染させ、ウイルスの増殖を FACS および p24 ELISA で測定した。CD4 陽性 T 細胞(99%以上)は DC と共培養あるいは抗 CD3/CD28 抗体で刺激して活性化 CD4 陽性 T 細胞とした。健康人の末梢血単核球細胞を使用する研究は、平成 19 年 7 月に感染研のヒトを対象とする医学研究倫理委員会の承認を受けた。

ヒト化マウスに上述の組換え HIV-1 を静脈注射し、感染約 3 週間後にマウスを安楽殺して赤血球を溶解後、PBMC を各種蛍光標識抗体(Pacific Blue 標識抗ヒト CD45, FITC 標識抗マウス CD45, PE-Cy7 標識抗ヒト CD3, AmCyan 標識抗ヒト CD4, APC-Cy7 標識抗ヒト CD8)で染色し、FACS Calibur (BD BioScience 社)で生細胞(PI 陰性)にゲートをかけて解析した。

C. 研究結果

新生 NOD/SCID/Jak-3 KO マウスの肝臓に臍帯血由来 CD34 陽性幹細胞を入れたヒト化マウスではヒトの T 細胞は言うまでもなく、単球や樹状細胞(DC)、マクロファージも増殖することが明らかにされている。まず FACS で解析可能な *in vitro* の感染系を確立するため、蛍光の異なる X4 型と R5 型 HIV-1 を作製した。これらの組換え HIV-1 を PHA blast や LTR プロモーターの制御下に蛍光蛋白遺伝子を発現する CEMx174 細胞に感染させ、その感染性が野生株とほぼ同等であることを確認した。次に、抗原提示細胞である DC

に感染したウイルスから CD4 陽性 T 細胞への感染伝播効率を比較した。即ち、等量感染させた DC とアロ T 細胞あるいは PPD 等の抗原とともに CD4 陽性 T 細胞を共培養し、増殖してくる HIV-1 を解析した結果、この DC-T の感染伝播系では主として R5 型のウイルスが増殖しやすいことが明らかとなった。一方、CD4 陽性 T 細胞の T 細胞受容体(TcR)を抗 TcR 抗体で弱く刺激するとやはり R5 型が優位となり、抗体量を多くして強力に刺激すると X4 型が効率よく増殖した。従って、生体内での通常の免疫応答で誘導される HIV-1 増殖は R5 型が主体となることが示唆され、このことは感染者からの初期分離株が多くの場合 R5 型であるという周知の事実をよく説明するものである。

同時に新生 NOD/SCID/Jak-3 KO マウスの肝臓に臍帯血由来 CD34 陽性幹細胞を移入してヒト化マウスを作製し、経時的にマウス体内で増殖維持されるヒト血液細胞を解析した。その結果、生後約 15 週齢以降には CD4 陽性のヒト T 細胞集団がフローサイトメトリー上でも明確に検出された。そこで 3 匹のマウスを用いて我々の作製した蛍光を発する X4 型、R5 型あるいは両方の HIV-1 を同量感染させ、感染後の血中ウイルス量の測定と感染細胞の検出を行った。そのうち 2 匹で感染後 2 週間目をピークとする血中ウイルス量の増大を観察した。感染後 1 週間のマウスの血液細胞を解析したところ、興味深いことに、両方のウイルスを同時に感染させた 1 匹のマウスにおいて明らかな R5 型 HIV_{NLAD8-D} 陽性感染細胞が検出された。マウスは感染 3 週間後に安楽殺させた。今後各リンパ系臓器での HIV-1 の感染様式を解析するとともに、マウス匹数を増やして X4 型と R5 型の増殖の違いを詳細に検討していく予定である。

D. 考察

生体内では高度に活性化された T 細胞に HIV-1 が直接感染するよりも静止期から抗原刺激を受

けて活性化する T 細胞に感染するケースが多いと思われる。ヒト化マウスの場合、マウス体内で分化成熟したヒト T 細胞はほとんどが静止期にあるヒトの末梢血と異なり、低いながらも活性化されている。従って外来からの免疫刺激の少ない環境で飼育されたマウスにおいては、X4 型よりも R5 型 HIV-1 の増殖が優位となることを想定していたが、実際にその傾向があることが確認された。X4 型と R5 型 HIV-1 のウイルス感染様式については更に詳細な検討が必要である。このようなヒト化マウスの HIV-1 感染系の確立は、多くのワクチンや薬剤をヒトの細胞でスクリーニングすることを可能にさせ、今後のエイズの治療法の開発に貢献することが期待される。

E. 結論

蛍光の異なる X4 型と R5 型の組換え HIV-1 を作製し、ウイルスの増殖を FACS でも解析可能な系を確立した。また、免疫不全マウスにヒト臍帯血 CD34 陽性幹細胞を導入したヒト化マウスの作製を行った。マウスの週齢とマウス体内でのヒト血液細胞の分化増殖を定期的に解析し、ほぼ 3-4 か月程度でヒト CD4 陽性 T 細胞が優位に増加してくるマウス個体が得られることを確認した。一部のマウスに X4 型と R5 型の蛍光発現組換え HIV-1 を感染させてその経過を観察し、感染後 1 週間目の末梢血リンパ球において R5 型 HIV-1 感染細胞集団を検出した。このような蛍光発現組換え HIV-1 を用いたヒト化マウスの HIV-1 感染系の確立は今後ワクチンの有効性を評価するモデルとして有用であろう。

V. 全研究期間における
研究成果刊行物一覧表

廣井隆親

平成 18 年度～ 20 年度の研究成果刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル | 発表誌名 | 巻名 | ページ | 出版年 |
|--|--|--|----|----------|------|
| Yokoyama, S., Watanabe, N., Sato, N., Filkoski, L., Tanaka, T., Miyasaka, M., Waldmann, TA., Hiroi, T. (corresponding author) and Perera, LP. | Antibody-mediated blockade of IL-15 signaling reverses autoimmune intestinal damage in transgenic mouse model of celiac disease. | <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA.</i> | | In press | 2009 |
| Suzuki, K., Kaminuma, O., Yang, L., Motoi, Y., Takai, T., Ichikawa, S., Okumura, K., Ogawa, H., Mori, A., Takaiwa, F., and Hiroi, T. | Development of transgenic rice expressing mite antigen for a new concept of immunotherapy. | <i>Int Arch Allergy Immunol.</i> | | In press | 2009 |
| Kaminuma, O., Kitamura, F., Miyatake, S., Miyoshi, H., Miyawaki, A., Inokuma, S., Tatsumi, H., Kitamura, N., Mori, A., and Hiroi, T. | T-bet is responsible for incomplete Th2 differentiation in human peripheral CD4+ T cells. | <i>J Allergy Clin Immunol.</i> | | In press | 2009 |
| Yamaoka, K., Okayama, Y., Kaminuma, O., Katayama, K., Mori, A., Tatsumi, H., Nemoto, S. and Hiroi, T. | Proteomic approach to study signal transduction of mast cell activation by Fcε RI aggregation. | <i>Int Arch Allergy Immunol.</i> | | In press | 2009 |

| | | | | | |
|---|--|----------------------------------|-----|-------------|------|
| Takagi, H., Hiroi, H., Yang, L., Takamura, K., Ishimitsu, R., Kawauchi, H., Takaiwa, F. | Efficient induction of oral tolerance by fusing cholera toxin B subunit with allergen-specific T-cell epitopes accumulated in rice seed. | <i>Vaccine</i> | 26 | 6027-6030 | 2008 |
| Suzuki, K., Kaminuma, O., Hiroi, T., Kitamura, F., Miyatake, S., Takaiwa, F., Tatsumi, H., Nemoto, S., Kitamura, N., Mori, A. | Downregulation of IL-13 gene transcription by T-bet in human T cells. | <i>Int Arch Allergy Immunol.</i> | 146 | 33-35 | 2008 |
| Kaminuma, O., Kitamura, F., Kitamura, N., Hiroi, T., Miyoshi, H., Miyawaki, A. and Miyatake, S. | Differential contribution of NFATc2 and NFATc1 to TNF- α gene expression in T cells | <i>J. Immunol.</i> | 180 | 319-326 | 2008 |
| Nochi, T., Takagi, H., Yuki, Y., Yang, L., Masumura, T., Mejima, M., Nakanishi, U., Matsumura, A., Uozumi, A., Hiroi, T., Morita, S., Tanaka, K., Takaiwa, F., and Kiyono, H. | From the Cover: Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination. | <i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i> | 104 | 10986-10991 | 2007 |
| Mori, A., Ogawa, K., Someya, K., Kunori, Y., Nagakubo, D., Yoshie, O., Kitamura, F., Hiroi, T., and Kaminuma, O. | Selective suppression of Th2-mediated airway eosinophil infiltration by low-molecular weight CCR3 antagonists. | <i>Int Immunol.</i> | 19 | 913-921 | 2007 |
| Tamagawa, H., Hiroi, T., Mizushima, T., Ito, T., and Kiyono, H. | Therapeutic efficacy of roxithromycin on colitis of interleukin-10 deficient mice. | <i>Inflamm Bowel Dis.</i> | 13 | 547-556 | 2007 |
| 横山清司、鈴木一矢、高岩文雄、廣井隆親 | スギ花粉症緩和米による予防効果 | アレルギーの臨床 | 27 | 17-23 | 2007 |
| 渡邊伸昌、清野宏、廣井隆親 | 花粉症対策－米国および日本における現状と将来 | 治療学 | 41 | 32-36 | 2007 |

| | | | | | |
|---|--|-------------------------------------|-----|-----------|------|
| 本井祐二、高田和子、平澤正知、廣井隆親 | アレルギー疾患のペプチド免疫療法と粘膜トレランス | Annual Review 免疫 2008 | | 122-131 | 2007 |
| 形山和史、高田和子、平澤正知、廣井隆親 | 経口トレランスと小腸由来樹状細胞 | 臨床免疫・アレルギー科 | 48 | 667-672 | 2007 |
| 廣井隆親、鈴木一矢、高岩文雄、清野宏 | 花粉症緩和米 | Medical Science Digest | 33 | 1143-1144 | 2007 |
| Jang, MH., Sougawa, N., Tanaka, T., Hirata, T., Hiroi, T., Tohya, K., Guo, Z., Umemoto, E., Yang, B., Seoh JY., Kiyono, H. and Miyasaka, M. | CCR7 is critically important for migration of immunomodulatory dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. | <i>J. Immunol.</i> | 176 | 803-810 | 2006 |
| Terahara, K., Takahashi, K.G., Nakamura, A., Osada, M., Yoda, M., Hiroi, T., Hirasawa, M., and Mori K. | Differences in integrin-dependent phagocytosis among three hemocyte subpopulations of the Pacific oyster "Crassostrea gigas" | Dev. Comp. Immunol. | 30 | 667-683 | 2006 |
| Hiroi, T. and Takaiwa, F. | Peptide immunotherapy for allergic diseases using a rice-based edible vaccine, | Curr. Opin. Allergy. Clin. Immunol. | 6 | 455-460 | 2006 |
| 廣井隆親、塚越百合子、清野宏 | 粘膜系好酸球様樹状細胞による免疫制御 | Annual Review 免疫 2007 | | 221-230 | 2006 |

高橋秀実

平成18年度～20年度の研究成果刊行に関する一覧表

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル | 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 |
|------|----------------------|-------------------|----------------------|------|-----|-----------|---------|
| 高橋秀実 | 特異免疫およびその賦活法に関する基本原理 | 林英生、岩本愛吉、神谷茂、高橋秀実 | ブラック微生物学 | 丸善出版 | 東京 | 2007.1.31 | 495-533 |
| 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 |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル | 発表誌名 | 巻名 | ページ | 出版年 |
|--|---|-----------------------|-----|-----------|------|
| Yamanishi, S., Iizumi, T., Watanabe, E., Shimizu, M., Kamiya, S., Nagata, K., Kumagai, Y., Fukunaga, Y., Takahashi, H. | Implications for induction of autoimmunity via activation of B-1 cells by Helicobacter pylori urease. | Infect. Immune. | 74 | 248-256 | 2006 |
| Wakabayashi A., Utsuyama, M., Hosoda, T., Sato., Takahashi, H., Hirokawa, K. | Induction of immunological tolerance by oral, but not intravenous and intraportal, administration of ovalbumin and the difference between young and old mice. | J. Nutr. Health Aging | 10 | 183-191 | 2006 |
| Watanabe Y, Watari E, Matsunaga I, Hiromatsu K, Dascher C D, Kawashima T, Norose Y, Simizu K, Takahashi H, Yano I, Sugita M. | BCG vaccine elicits both T-cell mediated and humoral immune responses directed against mycobacterial lipid components. | Vaccine | 24 | 5700-5707 | 2006 |
| Wakabayashi, A., Kumagai, Y., Watari, E., Shimizu, M., Utsuyama, M., Hirokawa, K., Takahashi, H. | Importance of gastrointestinal ingestion and macromolecular antigens in the vein for oral tolerance induction. | Immunology | 119 | 167-177 | 2006 |