

200908022A (1冊)

政策創薬総合研究事業

平成21年度

エイズ医薬品等開発研究

研究報告書

財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

平成21年度

エイズ医薬品等開発研究

研究報告書

目 次

課題番号

重点研究

A分野 抗エイズウイルス薬、エイズ付随症状に対する治療薬の開発に関する研究

KAA1551 エイズに付随する日和見原虫感染症に対する新規薬剤の実用化 野崎 智義 …… 1

C分野 抗エイズ薬開発のための基盤技術の開発等に関する研究

KAC1601 エイズの粘膜ワクチンの創製と評価系の基盤構築 三隅 将吾 …… 8

若手研究者奨励研究

A分野 抗エイズウイルス薬、エイズ付随症状に対する治療薬の開発に関する研究

KAA3701 HIVおよびその付随症に対する新規治療薬開発を目指した細胞内抗体（イントラボディ）の創製研究 向 洋平 …… 15

KAA3731 サルエイズウイルスのヒトへの異種間感染伝播に関わるウイルス側・宿主側制御因子の相互作用機構に関する解析 武内 寛明 …… 29

B分野 エイズ発症防止薬の開発に関する研究

KAB3732 Claudin-4 binderを利用したパイエル板標的型経口エイズワクチンの開発 磯田 勝広 …… 38

KAB3733 血液脳関門機能変容に着目したHAART療法下脳神経障害の発症機序解明と実践的治療法の開発 西奥 剛 …… 45

KAB3761 センダイウイルスベクターエイズワクチンの投与による免疫修飾がHIV-1慢性感染症の予防効果に与える影響の解析と論理基盤の解明 守屋 智草 …… 53

C分野 抗エイズ薬開発のための基盤技術の開発等に関する研究

KAC3702 HIVに対して効率的に免疫誘導可能な人工リンパ組織構築に向けた基盤技術の開発 吉岡 靖雄 …… 58

KAC3762 エイズ発症サルモデル確立のためのHIV-1病原性クローンの構築：遺伝子工学的改変と細胞馴化によるウイルスの変異・進化の戦略的利用 野間口雅子 …… 72

KAC3763 密着結合蛋白質を利用した経鼻エイズワクチン基盤技術の開発 近藤 昌夫 …… 77

KAC3764 新規多機能性キトサンによる遺伝子導入システムの開発とDNAワクチンへの応用 樋口ゆり子 …… 88

重点研究

エイズに付随する日和見原虫感染症に対する新規薬剤の実用化

所属 国立感染症研究所・寄生動物部
研究者 野崎 智義

研究要旨 エイズに伴う原虫感染症であるクリプトスポリジウム症および赤痢アメーバ症の新規創薬を実現するために、クリプトスポリジウムシアン耐性酸化酵素(AOX)、赤痢アメーバメチオニンガンマリアーゼ(MGL)を標的とした創薬研究を展開した。2年度は標的バリデーションとしてクリプトスポリジウム AOX の細胞内局在を精製されたミトソームを用いて証明した。また、ミトソーム分画の AOX 活性がアスコフラノンにより阻害されることを示した。また、赤痢アメーバ MGL が TFM の唯一の薬剤標的であることを、MGL 発現抑制変異体を用いて証明した。更に、MGL1 の結晶構造からメチオニンの分解の分子機構を詳細に明らかにした。同時に、初年度安全性が確認されたトリフルオロメチオニン誘導体に関して哺乳動物小核試験と染色体異常試験を終了した。以上2年度の研究は順調に展開した。

分担研究者

- (1) アリジェン製薬株式会社 山本 雅一
- (2) 東京大学・大学院医学系研究科 北 潔
- (3) 国立感染症研究所・寄生動物部 中野由美子

A. 研究目的

クリプトスポリジア症、赤痢アメーバ症、トキソプラズマ症などの寄生性原虫による感染症は、エイズに伴う感染症として重要である。クリプトスポリジウム症は、途上国では小児における感染率の高い下痢症の原因原虫のひとつとされるが、HIV/AIDS等免疫低下状態では劇症の下痢を起こす。劇症クリプトスポリジウム症に有効な特異的治療薬は存在しない。一方、赤痢アメーバ症も発展途上国を中心とする重要な下痢症の原因原虫であるが、国内において患者数は毎年増加傾向にあり、国内の原虫感染症の中で最も重要な寄生虫症である。また近年、女性、特にCommercial Sex Worker (CSW)への感染の拡大が報告されている他、知的障害者における感染も広く報告され、国内に浸淫する赤痢アメーバ症の問題は深刻である。言うまでもなく、アメーバ症はMen who have sex with men (MSM)に濃厚に感染し、HIV/AIDSとの混合感染が多い。現在、赤痢アメーバ症の治療は原則として、メトロニダゾール1剤のみで行われている。しかしながら、治療抵抗例の増加、薬剤耐性株の出現など様々な問題点が存在する。また、メトロニダゾールは変異原性・催奇形性をもつことが実験的に良く知られており、妊婦・乳幼児に対する投薬は不可能である。従って、クリプトスポリジウム症ならびに赤痢アメーバ症に対する新規化学療法剤の標的分子の基盤的研究、更にはそれに根ざした具体的な創薬研究が危急に必要である。

2年度は、クリプトスポリジウム創薬に関してミトソーム(ミトコンドリア関連オルガネ

ラ)の単離法を確立し、シアン耐性酸化酵素(Alternative oxidase, AOX)の局在解析、生化学的解析を行った。赤痢アメーバ創薬に関しては、標的酵素である赤痢アメーバ特異的酵素(メチオニンガンマリアーゼ、MGL)の標的酵素としてのバリデーションを目的として、MGL抑制形質転換体を作成し、トリフルオロメチオニン(TFM)感受性の消失を確認するとともに、トランスクリプトーム解析を行った。また、結晶構造解析により、これまで不明だったMGL1のメチオニン分解の詳細な分子機構を明らかにした。更に、初年度急性経口毒性試験と遺伝毒性試験により安全性の確認された薬剤に関して、マウスにおける小核予試験ならびに哺乳類培養細胞を用いる染色体異常予試験を実施した。

B. 研究方法

1. *Cryptosporidium parvum* ミトソームの調製法の確立

生化学的解析に十分な研究試料の調製法は昨年度までに最適化した方法に従い、 1×10^5 個の*C. parvum*オーシストを5週齢の免疫不全マウスに接種した。マウス糞便よりショ糖浮遊法及び塩化セシウム密度勾配法によりオーシストを精製した。脱囊処理後、スポロゾイトを得た。その後、破碎方法を指摘化し、Hsp70を指標に細胞分画を行った。

2. *Cryptosporidium parvum* ミトソーム AOX の生化学的解析

常法に従い AOX の発現及び局在をウェスタンブロットにより検討した。1次抗体には*C. parvum*組換え AOX を抗原としたポリクローナル抗体を用いた。また、オーシスト破碎液及び細胞分画後画分を用いてキノール酸化酵素活性を常法に従い測定した。アスコフラノンの感受性試験は終濃

度 500 nM のアスコフラノンで検討した。

3. MGL 発現抑制形質転換体の作と TFM のインビトロ殺アメーバ活性の評価

赤痢アメーバの 2 種の MGL1 アイソタイプを抑制する gene silence 株を作成した。赤痢アメーバの培養、形質転換などは常法に従った。

インビトロ薬剤効果は BI-S-33 培地を用いた無菌培養系で行った。TFM を 20 mM 添加した状態で、24-120 時間赤痢アメーバ HM1:IMSS c16 株を培養した。細胞数はデヒドロゲナーゼ活性をアッセイすることで推定した。

4. DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析

全 9230 の *E. histolytica* 特異的プローブセットを搭載した Affymetrix 社製の 11 ミクロンの 49-7875 を用いたプラットフォームを用いて発現解析を行った。RNA の抽出、cRNA の作成、ハイブリダイゼーションなどプロトコルは常法に従った。得られた強度データは主成分解析 (PCA)、ANOVA 解析により評価された。

5. MGL1 の精製、結晶化、X 線構造解析

MGL1 (AB539797) を融合タンパク質として常法に従い発現、精製した。組換え MGL1 には N-末端ペクター由来の 10 残基 (GPLGSPEFPG) が存在する。

シッティング蒸気拡散法にて結晶化を行った。MGL1 の結晶は 1.8M 硫酸アンモニウム、0.1M カコジル酸バッファー、pH 6.2、0.01M ベタイン存在下で 277K、7 日間インキューベートすることにより 100mm の結晶を得た。結晶を液体窒素で凍結した後、播磨理化学研究所 SPring8 の BL44XU を用いて、X 線回折像を得た。データは Imaging Plate detector (DIP6040) で検出し、HKL2000 で解析を行った。

位相決定は、すでに構造解析した EhMGL2 をモデルとして CCP4 package の Morlep プログラムで分子置換法で行った。CCP4 package の REFMAC5 プログラムによる鋼体精密化と精密化、COOT プログラムによるモデルの検討と修正を行った。さらに各モノマーの Translation /Libration/Screw (TLS) groups を決定し、TLS 精密化を行って最終モデルとした。

6. 被験物質のマウスにおける小核予試験

マウスの骨髄細胞を用いて、HY-716 の生体内での染色体異常誘発性の有無について検索した。ICR 系雄マウスに HY-716 の 62.5, 125, 250 及び 500mg/kg を 2 日間連続で 2 回経口投与し、最終投与後約 24 時間にマウスを安楽死させ、大腿骨を摘出して骨髄塗末標本を作成し、顕微鏡下で観察した。1 群当たり 3 匹のマウスを用い、1 匹につき 1000 個以上 (1 標本当たり 500 個以上) の幼若赤血球 (多染性赤血球: PCE) を観察して、小核を有する多染性赤血球 (MNPCE) の出現頻度 (MNPCE/PCE) を求めた。また、骨髄細胞の増殖抑制の指標として、1 動物につき 400 個以上 (1 標本あたり 200 個以上) の赤血球を観察することにより、全赤血球 (TE) に対する多染性赤血球の出現頻度 (MNPCE/PCE) を求めた。

7. 被験物質の哺乳類培養細胞を用いる染色体異常予試験

HY-716 の変異原性をチャイニーズ・ハムスター-CHL 細胞の染色体異常誘発性を指標として検索した。試験は、短時間処理 (処理時間: 6 時間、回復: 18 時間) の代謝活性化法による場合 (+S9 mix) 及び代謝活性化系存在下での連続処理法 (24 時間処理) について検討した。

C. 研究結果

1. *C. parvum* マイトソーム画分調製法の確立

C. parvum をガラスビーズを含む 1.7 ml プラスチックチューブ内でのベッスルによるホモジナイズによる方法で細胞破碎し、5,000 × g 遠心することにより、*C. parvum* 粗マイトソームの調製法を確立した。

2. 粗マイトソーム画分による AOX の局在・生化学的解析

AOX の局在解析を目的として細胞分画後の標品によるウェスタンブロット解析を行った結果、28 kDa 及び 65 kDa のタンパク質は 5,000 × g 沈殿画分に検出された。続いて、*C. parvum* から AOX の活性であるユビキノール酸化酵素活性を測定したところ、粗マイトソーム画分より活性を検出し (比活性: 50 nmol/min/mg)、500 nM アスコフラノンによりその大部分が阻害された。

3. 赤痢アメーバ MGL1, MGL2 抑制株における増殖率低下と TFM 感受性の消失

Gene silence による発現抑制は MGL1, MGL2 にアイソタイプ非特異的に起こっていた。コントロール株と比較して MGL1, MGL2 発現抑制株では通常の培養条件下 (TFM 非存在下) での増殖率が低かった。120 時間後の細胞数はコントロールの 35-50% であった。更に、MGL1 並びに MGL2 の gene silence 株の TFM 存在下での増殖をコントロールと比較した。コントロール株が 20µM の TFM の存在下で、全く増殖を示さなかったのに対し、MGL1, MGL2 発現抑制株では、薬剤非存在下と同様の増殖を示した。

4. MGL1, MGL2 抑制形質転換体のトランスクリプトーム解析

MGL1, MGL2 発現抑制株でそれぞれ 7, 13 遺伝子が優位に変化していた。いずれの発現抑制株でも "methionine gamma lyase" と注釈付けされる 3 つのプローブセットで発現が 79-370 分の 1 に減弱していた。3 つのうち、2 つはそれぞれ MGL1, MGL2 に相当し、残りの 1 つは truncate 型であり、これらの結果は、いずれの MGL gene silence 株においても、両アイソタイプ共に発現抑制が起きていることを示していた。MGL 以外で大きな影響を受けていたプローブセットは、MGL1gs で 16 倍上昇した "hypothetical protein" が 1 種あるのみで、それ以外に 4 倍以上発現が優位に変化した遺伝子はなかった。このことは gene silence 法による遺伝子特異性を証明した。

5. MGL1 によるメチオニン分解機構の解明

昨年度までの解析で MGL1/メチオニン michaelis 複合体の結晶構造は明らかになっていた。本年度

は、MGL1/L-メチオニン複合体-酵素反応中間体として1-5の5種類の反応中間体構造が得られた。それぞれの反応中間体を得た結晶化条件は分担報告書による。

中間体1ではPLPと結合したL-メチオニンはMichaelis複合体と同様にC α -カルボキシル基が周囲のアミノ酸残基と相互作用して固定されている。C α -カルボキシル基はアミノ転移反応によりPLPのC $_{4A}$ と結合し、L-メチオニンとPLPの外部アルジミン酵素反応中間体が形成されている。PLPとシッフ塩基を形成していたLys205は、側鎖の ϵ アミノ基がTyr53*側鎖と相互作用する位置に移動していると共に、Lys205の側鎖の ϵ アミノ基の塩基性が高まる。このLys205の側鎖の移動と塩基性の上昇は、L-メチオニンのC α アミノ基からのプロトン引き抜きへの準備だと考えられる。

中間体2での酵素反応中間体の構造変化によりL-メチオニンのC α 炭素原子とC α プロトン、Lys205側鎖の ϵ アミノ基はピリジン環平面と直行するような形で一直線上にならぶ構造を取っている。また、C α カルボキシル基やピリジン環によりC α 炭素原子の電子が吸引されているため、プロトンが抜けやすくなっている。その結果Lys205側鎖の ϵ アミノ基によるL-メチオニンのC α プロトン引き抜きが起こり、カルボアニオンが生じる。このときカルボアニオンの π 軌道はピリジン環の π 軌道と重なるため、ピリジン環の電子吸引性がカルボアニオンの負電荷を安定化することができる。従って、反応中間体1から2への構造変化は次に起こるL-メチオニンのC α プロトン引き抜きの準備であると考えられる。

中間体3は外部アルジミン酵素反応中間体で、L-メチオニンのC α 炭素原子と窒素原子の間に二重結合が存在する。よってこの構造はLys205側鎖の ϵ アミノ基によってC α プロトンが引き抜かれた後の構造だと考えられる。PLPピリジン環が平面構造をとっており、かつC $_4$ とC $_{4A}$ の結合距離が1.5Åと単結合になっている。またC β 炭素原子は隣のC α 炭素原子と窒素原子間の二重結合によって酸性度が高まり、C β プロトンが引き抜かれる。

中間体4は外部アルジミン酵素反応中間体で、L-メチオニンのC α とC β 炭素原子間に二重結合が形成され、PLPピリジン環からL-メチオニンまでのC β 炭素原子までが同一平面上にある。Tyr108側鎖はイミノ転移反応時にL-メチオニンのC α アミノ基から引き抜かれたプロトンを持ち、かつArg55のグアニジン基によって酸性度が高められている。これはL-メチオニンの γ 脱離の際にTyr108側鎖のヒドロキシル基が γ 硫黄原子

にプロトンを供与する。この γ 脱離によって分解産物のメタンイオールが生じる。

中間体5は2-アミノクロトン酸とPLPとの外部アルジミンであり、L-メチオニンの γ 脱離後の酵素反応中間体の構造である。PLPのリン酸基とTyr53側鎖によって活性化されたLys205側鎖の ϵ アミノ基がC $_{4A}$ を求核攻撃し、内部アルジミンが再形成されると推察できる。このとき ϵ アミノ基のプロトンから2-アミノクロトン酸のC $_3$ を炭素原子にプロトンが渡り、 $H_3C-CH_2-C\alpha(COO^-)=NH_2$ としてMGLからはずれ、酵素外の水と反応して α ケト酸とアンモニアが生じる。以上、MGLによるメチオニン分解の反応機構が詳細に説明された。

6. 被験物質のマウスにおける小核スクリーニング試験

試験の結果、HY-716 500mg/kg/day投与群において、骨髄塗末標本作成前に全例が死亡した。骨髄塗末標本作成まで生存した最高投与量であるHY-716 250mg/kg/day投与群においてMNPCE出現頻度が有意に($p < 0.05$)上昇し、かつ用量依存した反応が認められたことから、HY-716は弱い小核誘導性を有する物質であると判定された。また、HY-716 62.5, 125及び250mg/kg/day投与群のいずれにおいても多染性赤血球の比率が有意($p < 0.01$)に減少し、かつ用量に依存した反応が認められたことから、HY-716は骨髄細胞の増殖を抑制する物質であると判定された。

7. 被験物質の哺乳類培養細胞を用いる染色体異常予試験

いずれの処理条件においても染色体構造異常及び数的異常細胞の増加は認められず、HY-716は哺乳類培養細胞に対し染色体異常誘発性を有しないと考えられた。

D. 考察

クリプトスポリジア症、赤痢アメーバ症等原虫性感染症は、有効な薬剤のない、エイズに伴う重要な感染症である。本研究はこれらの原虫感染症に対する新規薬剤を創出することを長期的目的として、リード化合物を臨床第I相試験に結びつけることを具体的な短期目標として、研究を展開している。抗クリプトスポリジウム症薬剤、抗赤痢アメーバ症薬剤開発それぞれに関して、若干展開速度に違いがあるものの、標的酵素の生物学的、生理学的重要性を証明するターゲットバリデーション、構造活性相関、標的酵素の構造理解に根ざした薬剤デザイン、薬剤安全性試験という一連の研究・開発の流れは一貫している。

本年度の赤痢アメーバ薬剤開発に関する成果の中で特に重要であったのは、TFM誘導体の薬剤標的を明瞭に示したことである。MGLがTFMの標的であることは薬剤の作用機序から予測されていたが、MGLの発現を特異的に抑制した株の作出、トランスクリプトーム解析、感受性試験によって、本研究によって初めて正式に、MGLが赤痢アメー

バ内で唯一の標的酵素であることが証明されたと言える。

また、X線構造解析によってMGL/メチオニンの反応中間体が複数得られ、この成果によって世界で初めてこれまで不明であった反応機構の詳細が明らかにされた。言うまでもなく反応機構の物理化学的な理解は新しい薬剤のデザインに極めて重要であり、今後のTFM誘導体の作成に生かされることが期待される。

一方、初年度のラット単回投与毒性試験と遺伝毒性予試験の結果を踏まえて、安全性の確認された最適薬剤に関して、本年度も安全性試験を継続したが、その結果は予想外のものであった。TFMのアニリド誘導体基本骨格にシクロヘキシルが付加された誘導体(TFM-14)は染色体異常試験で毒性なしと判断されたものの、小核試験で骨髄細胞に軽微な抑制を示した。従って、今後のTFM創薬はより強い殺原虫作用をもち、骨髄毒性を示さない新規誘導体を探索する方向転換を行う。同時に、3年時には、天然物から新しい抗赤痢アメーバ活性をもつ薬剤を探索する研究も同時に展開する必要があると考えている。我々は既に、哺乳動物に存在せず赤痢アメーバに選択的に存在するシステイン合成経路の2つの酵素に対する阻害剤の検索を始めている。

2年時のクリプトスポリジウム症創薬に係る成果としては、マイトソームの精製プロトコルを確立したこと、アスコフラノンにより阻害されるAOX活性をこの分画に確認したことが重要であった。AOXは膜タンパク質であり、これまで複数のグループが結晶化に取り組んでいるものの、植物由来のAOXを含め、未だ結晶化は達成されていない。しかし、トリパノゾーマのAOXの結晶化・回折像は現実化しており、最終年度の成果が期待される。

E. 結論

本研究はHAART療法を補完する、本邦初の抗原虫薬剤の実用化を目指している。2年度、クリプトスポリジウム創薬研究に関しては、オルガネラ精製プロトコルが確立され、AOXのマイトソーム局在、アスコフラノンによる阻害等ターゲット針デーションが達成された。赤痢アメーバ創薬研究に関しては、MGLがTFMの唯一の標的であることが証明されるとともに、MGLの作用機序が詳細に解明された。初年度安全性の示されたTFM誘導体に関し、小核試験・染色体異常試験を実施し、軽微な骨髄抑制が見られた。以上、2年度も抗クリプトスポリジウム症・赤痢アメーバ症新規薬剤の開発・実用化に向け、着実に成果を収めた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hussain, S., Ali, V., Jeelani, G., and Nozaki, T. (2009) Isoform-dependent feedback regulation of serine O-acetyltransferase isoenzymes involved in L-cysteine

biosynthesis of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 163, 39-47.

Nakada-Tsukui, K., Okada, H., Mitra, B. N., and Nozaki, T. (2009) Phosphatidylinositol-phosphates mediate cytoskeletal reorganization during phagocytosis via a unique modular protein consisting of RhoGEF/DH and FYVE domains in the parasitic protozoon *Entamoeba histolytica*. *Cell. Microbiol.* 11, 1471-1491.

Sato, D. and Nozaki, T. (2009) Methionine gamma-lyase: the unique reaction mechanism, physiological roles, and therapeutic applications against infectious diseases and cancers. *IUBMB Life*, 61, 1019-1028.

Mi-ichi, F., Yousuf, M. A., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. (2009) Mitosomes in *Entamoeba histolytica* contain a sulfate activation pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 106, 21731-21736.

Sato, D., Kobayashi, S., Yasui, H., Shibata, N., Toru, T., Yamamoto, M., Tokoro, G., Ali, V., Soga, T., Takeuchi, T., Suematsu, M., and Nozaki, T. (2010) Cytotoxic effect of amide derivatives of trifluoromethionine to the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 35, 56-61.

Escueta-de Cadiz, A., Kobayashi, S., Takeuchi, T., Tachibana, H., and Nozaki, T. (2010) Identification of an avirulent *Entamoeba histolytica* strain with unique tRNA-linked short tandem repeat markers. *Parasitol. Int.* 59, 75-81.

Maralikova, B., Ali, V., Nakada-Tsukui, K., Nozaki, T., van der Giezen, M., Henze, K., and Tovar, J. (2010) Bacterial-type oxygen detoxification and iron-sulphur cluster assembly in amoebal relict mitochondria. *Cell. Microbiol.* 12, 331-342.

Husain, A., Jeelani, G., Sato, D., Ali, V., and Nozaki, T. (2010) Characterization of two isotypes of L-threonine dehydratase from *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 170, 100-104.

津久井久美子、野崎智義 (2009) 腸管寄生性原虫の小胞輸送一病原機構における役割 実験医学 27, 1548-1556.

Chung Chau Hon, Kumiko Nakada-Tsukui, Tomoyoshi Nozaki and Nancy Guillén (2010) Dissecting the Actin Cytoskeleton of *Entamoeba histolytica* from a Genomic Perspective. In "Anaerobic Parasitic Protozoa: Genomics and Molecular Biology" Edited by C. Graham Clark,

- Patricia J. Johnson and Rodney D. Adam. Caister Academic Press, ISBN: 978-1-904455-61-5, March 2010.
- Mogi, T., Matsushita, K., Murase, Y., Kawahara, Miyoshi, H., Ui, H., Shiomi, K., Ōmura, S. and Kita, K. (2009) Identification of New Inhibitors for Alternative NADH Dehydrogenase (NDH-II). *FEMS Microbiol. Lett.* 291, 157-161
- Kawahara, K., Mogi, T., Tanaka, Q. T., Hata, M., Miyoshi, H. and Kita K. (2009) Mitochondrial Dehydrogenases in the Aerobic Respiratory Chain of the Rodent Malaria Parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. *J. Biochem.* 145, 229-237
- Mogi, T., Ui H., Shiomi, K., Ōmura, S., Miyoshi, H. and Kita, K. (2009) Antibiotics LL-Z1272 identified as novel inhibitors discriminating bacterial and mitochondrial quinol oxidases. *Biochim Biophys. Acta (Bioenergetics)* 1787, 129-133
- Sakakibara, I., Fujino, T., Ishii, M., Tanaka, T., Shimosawa, T., Miura, S., Zhang, W., Tokutake, Y., Yamamoto, J., Awano, M., Iwasaki, S., Motoike, T., Okumura, M., Inagaki, T., Kita, K., Ezaki, O., Naito, M., Kuwaki, T., Chohnan, S., Yamamoto, T., Hammer, R. E., Kodama, T., Yanagisawa, M. and Sakai, J (2009) Fasting induced hypothermia and reduced energy production in mice lacking Acetyl-CoA Synthetase 2. *Cell Metabolism*, 9, 191-202
- Morales, J., Mogi, T., Mineki, S., Takashima, E., Mineki, R., Hirawake, H., Sakamoto, K., Ōmura, S. and Kita, K. (2009) Novel Mitochondrial Complex II Isolated from *Trypanosoma cruzi* is Composed of Twelve Peptides Including a Heterodimeric Ip Subunit. *J. Biol. Chem.* 284, 7255-7263
- Osanai, A., Harada, S., Sakamoto, K., Shimizu, H., Inaoka, D. K., and Kita, K. (2009) Crystallization of mitochondrial rhodoquinol-fumarate reductase from the parasitic nematode *Ascaris suum* with specific inhibitor, flutolanil. *Acta Crystallographica*, F65, 941-944
- Mogi, T. and Kita, K. (2009) Identification of mitochondrial Complex II subunits SDH3 and SDH4 and ATP synthase subunits a and b in *Plasmodium* spp. *Mitochondrion*, 9, 443-453
- Matoba, K., Nara, T., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Inaoka, D.K., Kita, K. and Harada, S. (2009) Crystallization and preliminary X-ray analysis of aspartate transcarbamoylase from the parasitic protist *Trypanosoma cruzi*. *Acta Crystallographica*, F65, 933-936
- Maréchal, A., Kido, Y., Kita, K. Moore, A. and Rich, P. (2009) Three redox states of *Trypanosoma brucei* alternative oxidase identified by infrared spectroscopy and electrochemistry. *J. Biol. Chem.* 284, 31827-31833
- Sasaki, N., Hirai, M., Maeda, K., Yui, R., Itoh, K., Namiki, S., Morita, T., Hata, M., Murakami-Murofushi, K., Matsuoka, H., Kita, K., Sato, S., (2009) The *Plasmodium* HU homolog, which binds the plastid DNA sequence-independent manner, is essential for the parasite's survival. *FEBS Lett.* 583, 1446-1450
- Kido, Y., Shiba, T., Inaoka, D. K. Sakamoto, K., Nara, K., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Moore, A., Harada, S. and Kita, K. (2010) Crystallization and preliminary crystallographic analysis of cyanide-insensitive alternative oxidase from *Trypanosoma brucei brucei*. *Acta Crystallographica* F66, 275-278
- Balogun, O. E., Inaoka, D. K., Kido, Y., Shiba, T., Nara, T., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Michels, P. AM., Harada, S. and Kita, K. (2010) Overproduction, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of *Trypanosoma brucei gambiense* glycerol kinase. *Acta Crystallographica* F66, 304-308
- Kido, Y., Sakamoto, K., Nakamura, K., Harada, M., Suzuki, T., Yabu, Y., Saimoto, H., Yamakura, F., Ohmori, D., Moore, A., Harada, S. and Kita, K. (2010) Purification and kinetic characterization of recombinant alternative oxidase from *Trypanosoma brucei brucei*. *Biochim Biophys. Acta (Bioenergetics)* 1797, 443-450
- Paranagama, M. P., Sakamoto, K., Amino, H., Awano, M., Miyoshi, H. and Kita, K. (2010) Contribution of the FAD and quinone binding sites to the production of reactive oxygen species (ROS) from *Ascaris suum* mitochondrial complex II. *Mitochondrion*, 10, 158-165

2. 学会発表

- 野崎智義 赤痢アメーバ症新規創薬 第147回 日本獣医学会学術集会 宇都宮、April 2-4, 2009. (シンポジウム招待講演)
- 野崎智義 寄生虫と感染症 知の市場 早稲田大学、東京、June 30, 2009

- 古川敦、津久井久美子、野崎智義 システインプロテアーゼ輸送体の機能解析 第17回分子寄生虫ワークショップ 草津 August 6-9, 2009.
- Jeelani, G., Husain, A., Sato, D., Suematsu, M., Ali, V., and Nozaki, T. Biochemical and physiological function of a novel reductase from the microaerophilic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, September 8-11, 2009.
- Husain, A., Jeelani, G., Sato, D., Mi-ichi, F., Soga, T., Suematsu, M., Ali, V., and Nozaki, T. Metabolomic and transcriptomic analysis of sulfur-containing amino acid metabolism in enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, September 8-11, 2009.
- Furukawa, A., Nakada-Tsukui, K., Yamada, Y., and Nozaki, T. Functional analysis of a putative cysteine protease receptor from *Entamoeba histolytica*. The XXth Molecular Parasitology Meeting, Woods Hole, Sept 13-17, 2009.
- Nozaki, T. Rab small GTPases and phosphatidylinositides regulate phagocytosis and membrane trafficking of virulence factors: their roles in the pathogenesis of amebiasis. XVIIIth Congress of Parasitology, Aguascalientes, Mexico, September 21-26, 2009.
- 津久井久美子、野崎智義 イノシトールリン脂質シグナルを介した赤痢アメーバ貪食制御機構 第8回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 大阪, October 9-10, 2009.
- 見市文香、野崎智義 ミトコンドリア関連オルガネラの新規機能ー赤痢アメーバ原虫“sulfosome”に存在する硫酸活性化経路ー 第82回日本生化学会大会 神戸, October 21-24, 2009.
- 岡田麻美、見市文香、Nirianne Marie Q. Palacpac、野崎智義、狩野繁之、三田村俊秀 赤血球期熱帯熱マラリア原虫の脂質滴の生合成と輸送 第82回日本生化学会大会 神戸, October 21-24, 2009.
- 津久井久美子、Aleyla Escueta、中野由美子、野崎智義 赤痢アメーバ等における小胞輸送の多様性と進化 第82回日本生化学会大会 神戸, October 21-24, 2009.
- 唐木剛、村野祥子、亀井加恵子、佐藤暖、野崎智義、原田繁春 *Entamoeba histolytica* 由来メチオニンガンマリナーゼ1と2のX線結晶構造解析 第82回日本生化学会大会 神戸, October 21-24, 2009.
- 野崎智義 腸管寄生性原虫赤痢アメーバにおける酸化ストレス応答のメタボローム解析 第4回メタボロームシンポジウム 横浜 November 18-19, 2009.
- 黒田誠、野崎智義 赤痢アメーバの比較ゲノミクス 寄生虫ゲノム討論会：次世代シーケンサーによる新規寄生虫ゲノムの解読 大阪 December 4, 2009.
- Nakada-Tsukui, K., Picazzari, K., Tsuboi, K., and Nozaki, T. Unique role of the autophagic pathway in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. 第32回日本分子生物学会年会 横浜 December 9-12.
- 河津信一郎、野崎智義 宿主・組織特異性を規定する宿主・寄生体インターフェースの分子基盤 (ワークショップ) 第32回日本分子生物学会年会 横浜 December 9-12.
- 野崎智義 真核生物におけるミトコンドリアの多様性：腸管寄生原虫赤痢アメーバの新規オルガネラの解析 第9回日本ミトコンドリア学会年会 東京 December 17-19, 2009.
- Nozaki, T. Mitosomes in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contain a sulfate activation pathway. Adaptive and Innate Immune Response to Neglected Tropical Diseases. US-Japan Cooperative Medical Science Program. San Diego, January 10-11, 2010.
- 原田倫世、城戸康年、坂元君年、松崎素道、藪義貞、鈴木高史、笹原武史、中井裕、北潔 「ミトコンドリア」を持たない寄生原虫・クリプトスポリジウム：マイトソームの生化学解析に向けた実験系の確立 第69回日本寄生虫学会東日本支部大会 平成21年10月
- 原田倫世、藤本陽子、城戸康年、坂元君年、松崎素道、藪義貞、鈴木高史、笹原武史、中井裕、北潔 「ミトコンドリア」を持たない寄生原虫・クリプトスポリジウムにおける呼吸鎖の生化学的解析 第82回日本生化学会大会 平成21年10月
- 原田倫世、松崎素道、城戸康年、坂元君年、藪義貞、中井裕、北潔 *Cryptosporidium parvum* マイトソームの調製法の確立とシアン耐性酸化酵素 (AOX) の解析 第8回感染症沖縄ワークショップ 平成22年2月
- 津久井久美子、Aleyla Escueta、中野由美子、野崎智義 (2009) 赤痢アメーバ等における小胞輸送の多様化と進化、第82回日本生化学会大会
- 中野由美子 (2009) 原虫における膜輸送の特殊性と多様性：赤痢アメーバからの情報発信、つくばプロテオミストロジーフォーラム
- G. 知的所有権の出願・登録状況
1 特許取得
なし

- 2 実用新案登録
なし
- 3 その他

エイズの粘膜ワクチンの創製と評価系の基盤構築

所属 国立大学法人 熊本大学大学院生命科学研究部

研究者 三隅 将吾

研究要旨 組織学的な解析により、ウイルスの経膣感染に重要になると考えられる内子宮口組織における特徴的な形態を見出した。さらに、現在開発中の粘膜ワクチンはモデルウイルスの感染を防止する抗体を誘導できる優れた免疫原性を有していることが示唆された。

研究分担者

- (1) 国立感染症研究所 仲宗根 正
- (2) 国立大学法人 熊本大学大学院生命科学研究部 庄司省三
- (3) 国立大学法人 熊本大学大学院生命科学研究部 高宗暢暁
- (4) 株式会社 新日本科学 高橋義博

A. 研究目的

HIV 初発感染部位である粘膜を標的とした粘膜ワクチンの評価系の基盤構築を目指し、実際に構築した霊長類モデルで粘膜を標的とした新規治療戦略開発を試みることを目的とする。その背景として、最近の研究で従来血液を循環する獲得免疫系の主役である CD4 陽性 T 細胞のみならず、粘膜に局在する CD4 陽性マクロファージ・樹状細胞や CD4 陽性 NKT 細胞等もまた重要な HIV の標的であり、これらの細胞における HIV 感染を制御することもエイズワクチン開発のためには重要であると考えられていることや HIV 感染伝播の大半が異性間性交渉による感染であるためである。しかし、HIV の初発感染部位である粘膜における HIV 感染標的の実態に関する研究は十分であるとはいえないため、粘膜を標的とした抗エイズ薬開発のための基盤技術の開発が望まれている。実際、粘膜を標的としたワクチン開発にあたり、それら

を評価する霊長類モデルは、一般的なワクチンに対する霊長類モデル評価系と比べ十分整備されていない。例えば、SIV をモデルウイルスとして用いた場合の感染条件の検討（ウイルス摂取量・回数等・感染の種類）、使用する霊長類の種類と生息地の違いによるチャレンジウイルスの感染効率の差違、粘膜感染ルートの実態把握、粘膜における感染標的の解明等を含めた早期基盤整備が求められるといえる。したがって、本研究では中国産アカゲザルを用いて HIV 初発感染部位である粘膜を標的とした粘膜ワクチンの評価系の基盤構築と粘膜を標的とした新規ワクチン開発を試みた。

B. 研究方法

1) 経膣感染用感染源の調製（仲宗根）

サル 1 回の射精量を考慮し、cell-associated virus として SIV 感染細胞と cell free virus (SIVmac239 およびその変異体) を混合し、経膣接種に用いた。

2) 組織学的解析（三隅・仲宗根・高橋）

従来 HIV の感染の重要な部位と考えられている膣および子宮における扁平上皮組織と円柱状上皮組織の境界部位の特定を明確にするために、粘膜部位（膣および子宮）の組織を得た後、光学顕

微鏡・蛍光顕微鏡・電子顕微鏡により組織の解析を行った。なお、粘着フィルム法（川本法）を新たに導入し、霊長類の膣および子宮を同一切片内に含む標本の作製に取り組んだ。

さらに、異性間性交渉による HIV 感染モデルを想定し、精液を予め膣内に投与し、24 時間後投与個体より膣および子宮を含む大型切片を作製した。なお、非投与個体の膣および子宮を含む大型切片の作製も同時に行った。それぞれの切片を CD3, CD4, CD20, p55, CD1a, GP2 抗体を用いて染色を行った。

3) M 細胞標的分子 TGDK 化学合成(庄司)

Gallic acid と D-Lysine からなる新規 M 細胞標的分子 TGDK を固層法により独自の方法で作製した。(Fmoc)₄-D-MAP-ethylendiamine-Trt-resin (0.51mmol/ml) から Fmoc を脱保護し、DMF で 5 回洗浄し、7mmol の Triethylamine (TEA) を加えて攪拌しながら、1mmol の 3,4,5-trimethoxybenzoic acid chloride を加え 40°C で 120 分間攪拌した。さらに、1% の TEA を含む DMF、および DMF で洗浄することにより (MeO-Galloyl)₄-D-MAP-ethylendiamine-Trt-resin を得た。次に、メトキシ基の脱保護と resin からの切り出しを行うことにより、TGDK を得ることができた。この一連の反応を TGDK の合成の反応系として確立した。

4) CCR5 をミミックした環状抗原 cDDR5、外被糖タンパク質及び粘膜アジュバントを結合させた新規粘膜ワクチン抗原の創製 (庄司)

コア抗原 (高分子 PEG) に TGDK、アカゲザル CCR5 をミミックした cDDR5、CpG-ODN、SIVmac239 gp140 をコンジュゲートさせた。経口投与させるために、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。TGDK の合成に関しては、研究方法 3) にしたがって行った。アカゲザル CCR5 をミミックした cDDR5 の合成に関しては、CCR5 の細胞外第二ドメインを mimic するように設計し、Cys₁₇₈ を除いた R₁₆₈S₁₆₉Q₁₇₀R₁₇₁E₁₇₂G₁₇₃L₁₇₄H₁₇₅Y₁₇₆T₁₇₇ 配列に spacer-armed dipeptide (Gly-Lys) を挿入し CCR5 の細胞外第二ドメインの立体構造を模倣した。cDDR5 の合成は、Fmoc chemistry に従い合成し、得られた側鎖保護直鎖の C 末端 Gly のカルボキシル基と N 末端 Lys のアミノ基を酸アミド結合により縮合し、環状化した。環状側鎖保護は、Peptide 約 1mg に 12 μl の m-cresol、72 μl の thioanisol、及び 400 μl の TFA を加え水中で 5 時間攪拌して、その後さらに 36ml の ethane dithiol、80ml の TMBS (Trimethylbromosirane) を加えて 2 時間攪拌し、脱保護を行った。CpG-ODN の合成に関しては、アミノ末端に一級アミンを有するように 6-aminohexanol を結合させたものを使用した。最後に組換え SIVmac239 gp140 に関しては、SIVmac239 の molecular clone を鋳型として、エンベロープ gp160 から細胞外領域の部分である gp140 を PCR で増幅しサブクローニング後、SIVmac239gp140 コンストラクトを作製した。gp160 は宿主性因子 furin により切断されることにより maturation することが知られ、また、エンベロープを発現させて調製する際に収量が低下することが知られている。したがって、調製した SIVmac239gp140 コンストラクトの 2 ヲ所 (R512E, K523E) の点突然変異により組換え体 gp140 を調製し、さらに、発現後の精製のため FLAG 及び MAT の配列をタグとして加えた変異導入 SIVmac239gp140 を用いた。最終的に調製した組換え体エンベロープ gp140 を African green monkey の腎上皮由来の培養細胞を用いて発現させ、培養上清から組換え体エンベロープ gp140 を精製し、

ワクチン抗原として使用した。

5) 粘膜ワクチンのアカゲザルへの投与及び採取したサンプルの調製 (高宗)

4)で調製した粘膜ワクチンの免疫原性を確認するために、雌アカゲザルの鼠径部への皮下注射に行なった。対照群として PEG3, 500 Da を使用した。0、1、および6 weeks の3回投与した。

経口投与は、調製した経口用粘膜ワクチンと対照群として 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3 g をアセトンパウダー化しそれぞれ-80℃で保存した。得られたアセトンパウダーから、1% MPC を含む PBS (-)を用いて抗体画分を調製した。

6) ELISA (高宗)

アカゲザルから回収したサンプルの Rh-cDDR5 及び gp140 に対する抗体の解析は ELISA を用いて行なった。ELISA には、一次抗体として採取した血清および糞便抽出液を用いた。

7) *in vitro* におけるウイルス感染阻害効果の検討 (高宗)

SIVmac239 を、分子量 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前処理し、カニクイザル由来 HSC-F 細胞またはインジケーター細胞である MAGIC-5 細胞に接種した。なお、抗 Rh-cDDR5 抗体のみの効果を検討するために gp140 抗原を、一方抗 gp140 抗体のみの効果を検討する場合は Rh-cDDR5 を前処理した。感染阻害の評価は proviral DNA 量を qPCR assay で行う方法と、MAGIC-5 細胞を X-gal で染色してカウントする方法で行った。

(倫理面への配慮)

1. 国立感染症研において、同研究所内に設置されてある実験動物倫理委員会の規則に従ってサルに対する実験を実施した。
2. 新日本科学において、同研究所にある動物実験倫理指針の規則に従い、実験動物倫理委員会の指導のもと、実験を実施した。
3. 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なった。

C. 実験結果

膣-子宮組織の組織形態学的観察

膣-子宮組織の HE 染色切片を Fig. 1 に示した。

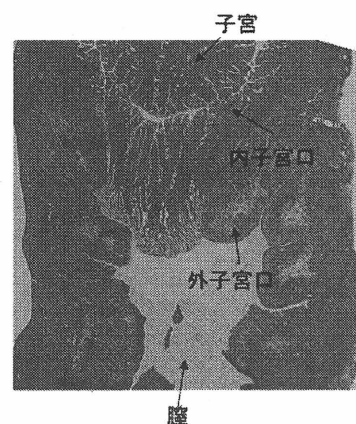


Fig. 1 霊長類膣-子宮組織 HE 染色

興味深いことに、円柱上皮組織からなる内子宮口組織がヘルニア様に外子宮口付近へ露出している(内子宮口ヘルニア)様子が観察された。さらに、膣、外子宮口および内子宮口の上皮組織の詳細な観察を行なった。膣から外子宮口は、扁平上皮組織であり、その上層は何十にもなるケラチンの多層構造からなる角化組織であった。一方、内子宮口付近では単層円柱上皮組織であった。外子宮口と内子宮口の間部位付近に、多層構造の角化組織からなる扁平上皮組織と角化組織が存在しない単層円柱上皮の融合部位を観察できた。

さらに、蛍光顕微鏡を用いた検討により、精液を膣に摂取することで、SIV の標的細胞の分布が変動する可能性が示唆された。特に CD4 陽性 CCR5 陽性細胞の単層上皮直下における分布は異なっ

ており、また GP2 陽性細胞数の増加が認められた。

鼠径部ワクチン皮下投与アカゲザルの血清中の抗 gp140 抗体価の測定

本研究で調製した粘膜ワクチンを皮下免疫した雌アカゲザルの血清中に誘導された抗 gp140 抗体価の測定を ELISA で行った (Fig. 2)。その結果、免疫後 4 weeks で抗体価の上昇が観察されはじめ、7 weeks でピークに達した。12 weeks あたりから抗体価の漸減が認められるようになり、およそ 60 weeks でバックグラウンド程度にまで抗体価の低下が観察された。本結果より本研究で用いられたワクチンの免疫原性が確認できた。

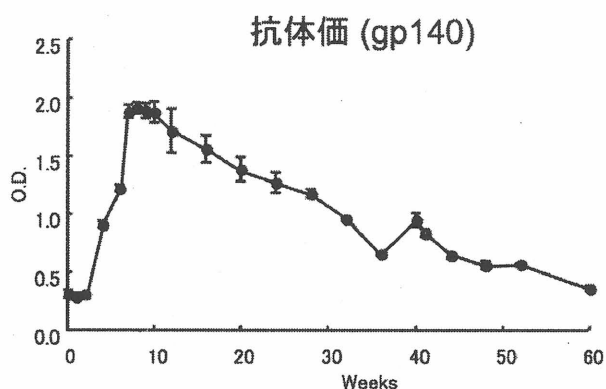


Fig. 2 ワクチンの免疫原性の確認

In vitroにおける血清中の抗 gp140 抗体によるウイルス感染阻害効果の検討

本研究で調製した粘膜ワクチンを皮下投与した雌アカゲザルの 0、12、及び 23 weeks の血清中に含まれる gp140 抗体によるウイルス感染阻害効果を検討することにより、ワクチン抗原により誘導される抗体のレパートリーを確認した。SIVmac239 に対して、12 weeks および 23 weeks 血清により有意な感染防止効果が観察され、抗体価がピーク時に近い 12 weeks サンプルより、抗体価が漸減し始めている 23 weeks のサンプル中の gp140 抗体がより効果的に感染を阻害した (Fig. 3)。

SIVmac239

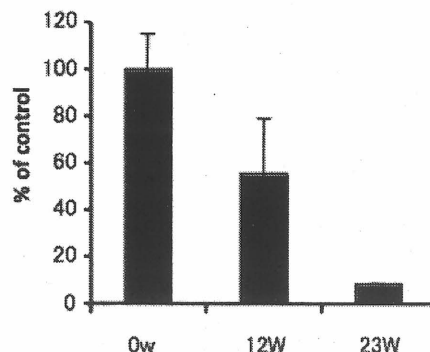


Fig. 3 粘膜ワクチンを皮下投与したアカゲザル血清中の抗 gp140 抗体の感染防止効果

経口投与アカゲザルの糞便中の抗 cDDR5 IgA の抗体価の測定

本研究で調製した粘膜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経口投与した。初回免疫前から糞便を回収しサンプリングした。採取した糞便中の抗 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 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 週の間には有意差が認められた (Fig. 4B)。一方、コントロール群では有意差は認められなかった (Fig. 4A)。

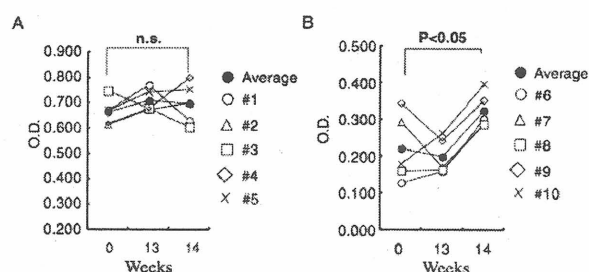


Fig. 4 粘膜ワクチンを経口投与したアカゲザルにおける糞便中 anti-cDDR5 抗体 (IgA) の誘導
A: 対照群, B: ワクチン投与群

In vitroにおける経口投与アカゲザル糞便中の抗 cDDR5 IgA による SIVmac239 の感染阻害効果

糞便中に確認された抗 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 weeks の糞便とコントロールとして 0 weeks 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. 5)。

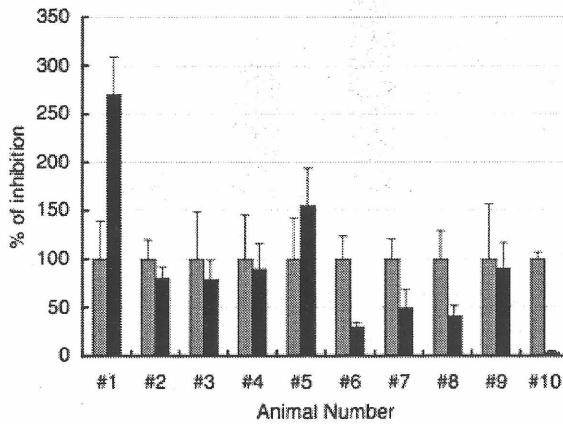


Fig. 5 ワクチンを経口投与したアカゲザルにおける糞便中 anti-cDDR5 抗体による SIVmac239 感染阻害効果
#1-5 対照群; #6-10 ワクチン群;
灰色 0 週、黒 14 週

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

糞便中の抗 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 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 weeks で抗体価の上昇が認められ (Fig. 6A)、さらに初回免疫後 20 weeks の血清中

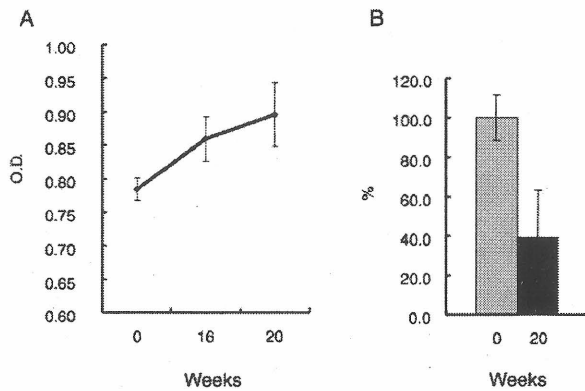


Fig. 6 ワクチンを経口投与したアカゲザル#10 における血清中 anti-cDDR5 抗体の誘導と SIVmac239 感染防止効果
A: 抗体誘導の推移、B: 感染防止効果
灰色 0 週、黒 20 週

の抗 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. 6B)。

D. 考察

霊長類の膣-子宮粘膜感染を達成するため、膣-子宮組織切片の詳細な形態学的観察を行った。本年度の技術的収穫は、粘着フィルム法 (川本法) を新たに導入できた点である。この方法により霊長類の膣および子宮を同一切片内に含む巨大標本の作製が可能となった。巨大大切片を用いた解析結果より、膣-外子宮口においては、物理的な障壁となる多重のケラチン層からなることから、SIV 感染のためには出血を伴う裂傷あるいは出血を伴わない分子裂傷が必要不可欠であると考えられる。一方、内子宮口 (子宮頸部) では単層円柱上皮組織からなることから、裂傷を伴わずとも SIV の感染は、単層の上皮細胞等を介して、粘膜直下に侵入し、成立するであろうと予想され、SIV 感染は、主にこの領域で起こることが考えられる。また、内子宮口組織の外子宮口付近への露出 (内子宮口ヘルニア) が観察されたことから、この現象はウイルス感染に極めて重要であると考えられる。安定的な膣-子宮粘膜感染を達成するためには、ホルモンによって内子宮口の性的な活動を高めることが肝要であると考えられる。さらに、膣内への精液の曝露は SIV の感染を容易にしていると考えられ、異性間性交渉による HIV 感染を霊長類モデルで評価するためには、HIV free virus、HIV 感染細胞、精液の 3 要素が、経膣感染用感染源として用いられるべきであることが示唆された。

本研究で調製した粘膜ワクチンを皮下投与および経口投与し血清および粘液中に誘導された抗体は、ウイルス感染防止効果を示したことから、本ワクチンは優れた免疫原性を有していることが示唆された。さらに、血清中の抗 gp140 抗体が SIVmac239 の感染を阻害したことから、gp140 の高次構造を認識している抗体と gp140 のグリカンシールドを構成する糖鎖構造を認識している抗体が誘導されていると考えられる。これらの知見とこれまでの経膣感染の多くの研究を総合的に考慮すると、ウイルスが膣から侵入し、腸管で爆発的に増殖するのを抑えるために、腸管での免疫

誘導が有意に誘導できる経口免疫が有効な手段になり得ると考えられる。

E. 結論

サル膺-子宮組織の形態学的な詳細な観察により、内子宮口組織がウイルス感染に重要な領域であると考えられた。

本研究で開発している粘膜ワクチンのアカゲザルへの免疫によって誘導される抗体には、ウイルス感染防止効果を示すことが明らかになり、優れた免疫原性を有していることが示唆された。

F. 研究発表

論文発表

1. Misumi S, Masuyama M, Takamune N, Nakayama D, Mitsumata R, Matsumoto H, Urata N, Takahashi Y, Muneoka A, Sukamoto T, Fukuzaki K, Shoji S., Targeted delivery of immunogen to primate M-cells with tetragalloyl lysine dendrimer. *J. Immunol.* 182, 6061-6070 (2009)
2. Murakami T, Eda Y, Nakasone T, Ami Y, Someya K, Yoshino N, Kaizu M, Izumi Y, Matsui H, Shinohara K, Yamamoto N, Honda M. Postinfection passive transfer of KD-247 protects against simian/human immunodeficiency virus-induced CD4+ T-cell loss in macaque lymphoid tissue. *AIDS* 23, 1485-1494 (2009)

学会発表

1. 松浦薫、三隅将吾、松本浩和、甲斐光、高橋義博、増山光明、杉本幸彦、高宗暢暁、庄司省三 Tetragalloyl Lysine dendrimer (TGDK) を用いた新規 M 細胞標的粘膜ワクチン戦略

第 82 回日本生化学会大会 プログラム p. 396 (2009)

2. 甲斐光、三隅将吾、松本浩和、松浦薫、高橋義博、増山光明、杉本幸彦、高宗暢暁、庄司省三 Tetragalloyl Lysine dendrimer (TGDK) の M 細胞標的能の検討とワクチンへの応用 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 プログラム抄録集 p. 218 (2009)
3. 三隅将吾、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三 霊長類 M 細胞標的分子を用いた HIV 経口ワクチンの開発 第 33 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム 講演要旨集 p. 37 (2009)
4. 野崎清輝、三隅将吾、松本浩和、甲斐光、松浦薫、高橋義博、増山光明、杉本幸彦、高宗暢暁、庄司省三 M 細胞標的分子 Tetragalloyl Lysine dendrimer (TGDK) を用いた HIV 粘膜ワクチン開発 第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集. p. 493 (2009)
5. 三隅将吾、野崎清輝、甲斐光、松浦薫、松本浩和、高橋義博、増山光明、杉本幸彦、高宗暢暁、庄司省三 M 細胞標的分子 Tetragalloyl-D-Lysine Dendrimer (TGDK) を用いた H 粘膜ワクチン創製 第 130 回日本薬学会抄録集 p. 124 (2010)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

発明名称：粘膜免疫賦活剤

出願番号：特願 2009-239219

若手研究者奨励研究

HIVおよびその付随症に対する新規治療薬開発を目指した細胞内抗体（イントラボディ）の創製研究

所属 大阪大学 薬学研究科 薬剤学分野
研究者 向 洋平
研究期間 平成19年4月～平成22年3月

研究要旨

本研究は、HIV 由来蛋白質やエイズ関連蛋白質の機能を制御できる細胞内抗体(イントラボディ)を効率よく創製する基盤技術の開発を目指し、ファージ抗体ライブラリを用いた方法論を独自に改良・最適化しようとするものである。

1. 研究目的

細胞内蛋白質の機能をモノクローナル抗体で制御しようとするイントラボディ・テクノロジーは、細胞内蛋白質の「表現型」を高度に制御することで、細胞内蛋白質が関与する難治性疾患の病態解析や治療に貢献可能な夢のテクノロジーとして、近年、大変注目されている。しかしながら、大多数の抗体分子が細胞内で安定に機能し得ないという事実から、イントラボディの創製には、多種類のモノクローナル抗体を揃え、その中から細胞内でも可溶性に発現し、機能する抗体をスクリーニングしなければならない。しかし、従来のモノクローナル抗体の作製に用いられるハイブリドーマ法では、一つのモノクローナル抗体を得るのにさえ半年以上もの多大な時間と労力を必要としてしまい、イントラボディのスクリーニングは困難を極めていた。また、近年、ファージ表面提示法を応用し、ナイーブファージ抗体ライブラリから細胞内のフォールディング効率に優れたイントラボディを探索する方法論が考案されているが、ライブラリ中に含まれる抗体の多様性が少ないために、実際イントラボディ創製に成功した例はごく僅かではない。この点、我々は、これまでに、生体の有する抗体多様性を増幅するために用いるプライマーセットを独自に改良し、品質の向上したファージ抗体ライブラリを構築可能な技術の確立に成功している。そこで、本申請研究では、この独自の技術を免疫抗体ライブラリ作製に応用

展開することで、さらに多様に富んだファージ抗体ライブラリを構築し、イントラボディの効率的な創製に叶う方法論を確立することを目的とする。

2. 研究方法

2-1. モデル抗原に対する多様な抗体を含む免疫ファージ抗体ライブラリの構築とイントラボディ候補抗体の単離とその特性評価

モデル蛋白質として、アポトーシス関連細胞内蛋白質である proCASP8 を免疫したマウス脾臓中の遺伝子情報をもとにマウス生体内の抗体の多様性をファージ表面上に再現した免疫ファージ抗体ライブラリを作製した。また、抗原に結合するクローンのみを選択的に回収するアフィニティーパンニングと呼ばれる操作を繰り返すことにより、proCASP8 高親和性抗体を単離した。単離した抗体はそれぞれその可溶性発現能を評価した。

2-2. 多様な高親和性抗体を含む HIV 関連蛋白質 (Nef, Vif, gp120)免疫抗体ライブラリの構築

2-1 項のライブラリ作製法を HIV 創薬標的として有望視されている HIV 関連蛋白質(Nef, Vif, gp120)に適応し、それに対する免疫抗体ライブラリの構築を行った。

2-3. イントラボディ単離に必要な多様な種類の抗体の単離を目指したライブラリの質的向上

2-1, 2-2 項の結果から、イントラボディ探索にはさらに多様な種類の抗体を含みかつ質の優れた免疫ファージ

ジ抗体ライブラリの構築が必要不可欠であることが示唆された。そこで、各抗原蛋白質の免疫量、免疫期間を最適化することによりライブラリの質的向上を試みた。その結果はライブラリ中のクローンの scFv の遺伝子長 (colony direct PCR)、及び抗原結合性(phage ELISA)により評価した。

(倫理面への配慮)本研究計画は「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づき、所属機関安全委員会の承認を得た上で、適切な拡散防止措置を執って実施した。

3. 研究結果

3-1. proCASP8 をモデル標的分子とした免疫ファージ抗体ライブラリからのイントラボディ単離法の確立

proCASP8 に対する結合性に優れた抗体を数多く単離すべく、2-1 項に示した方法で、約 300 万種類の抗体を含む proCASP8 免疫抗体ライブラリを構築した。作製したライブラリに対し、アフィニティーパンニングを繰り返すことにより、proCASP8 に対し親和性を有するクローンを濃縮することに成功した(Fig.1)。また、proCASP8 に高親和性を示したクローンのシーケンス解析の結果から、7 種類の異なる抗体を同定した。

得られた計 7 種類の抗 proCASP8 抗体をそれぞれ Venus との融合蛋白質として 293-T 細胞に発現させ、蛍光顕微鏡で観察したところ、全てのクローンでドット状の蛍光が観察された。次にそれぞれの細胞を可溶性画分と不溶性画分に分画し、その中に含まれる抗体量を Western Blotting 法にて比較検討を行った。その結果、蛍光顕微鏡像に相関し、全てのクローンで不溶化している割合が高いものの、クローン IC-4 で若干の可溶性発現が認められた (Fig.2)。本検討では細胞内で効率よく機能するイントラボディの単離は困難であったものの、若干の可溶性発現が認められた IC-4 と、全く可溶性発現が認められなかった IC-1, 2, 3 とは非常に似た配列を有しており、僅かな配列の差異が、可溶性発現効率に影響を与えうるという非常に興味深い知見を得た。

3-2. 多様な高親和性抗体を含む HIV 関連蛋白質 (Nef, Vif, gp120)免疫抗体ライブラリの構築

3-1 項の方法を HIV 創薬標的として有望視されている

Nef, Vif, gp120 に適用し、免疫ファージ抗体ライブラリの構築を試みたところ、Nef 及び Vif に対する免疫ファージ抗体ライブラリの構築に成功した。しかしながら、gp120 においては、免疫マウス生体内に抗体が誘導されず、その構築を行うことが出来なかった。これは gp120 が高度に糖鎖で修飾された糖タンパク質であることから、糖修飾により抗原性が低下した結果と考察した。さらに作製した Nef, Vif に対する免疫ファージ抗体ライブラリからアフィニティーパンニングにより高親和性抗体の単離を試みたところ、多数の抗原結合性を有するクローンが確認された (Fig.3)。しかしながら、それらクローンのシーケンス解析を行ったところ、その抗体配列中には遺伝子配列に部分的な欠損が見られ、今回作製したライブラリの質が低い可能性が示唆された。そこで、イントラボディの単離には更に多様に富み、質的にも優れたライブラリ作製が必要であるものと考えられた。

3-3. イントラボディ単離に必要な多様な種類の抗体の単離を目指したライブラリの質的向上

ライブラリの質的向上を目指し、抗原の免疫量の増加と免疫期間の短縮といった、scFv 遺伝子ライブラリ増幅法を改変することによって、ライブラリの質的向上を図った。その結果、部分的に欠損した遺伝子配列を有する抗体が観察されなくなり(Fig.4)、ライブラリ全体の抗原親和性も増大し(Fig. 5a,b)、ライブラリの質が向上したことが確認された。また、同時に 3-1-1 項で免疫マウス生体内に抗体の誘導が確認されなかった gp120 については、バキュロウイルスを用いて作製した gp120 リコンビナント蛋白質を免疫することにより抗体を誘導することができ、同様に免疫ファージ抗体ライブラリの構築に成功した (Fig. 5c)。

さらに、作製した各免疫ファージ抗体ライブラリについてアフィニティーパンニングを 3 回繰り返した結果、各抗原に強い親和性を有するクローンが濃縮されていることが示された。また、これらのシーケンス解析の結果、いずれも多数の異なる配列を有する抗体を同定することができた (Table.1)。

4. 評価

1)達成度について