

図5. CypA および CypB を過剰発現させたサル T 細胞内におけるウイルス DNA 合成量の比較
 図4にて示した CypA および CypB 過剰発現サル T 細胞を感染標的細胞として用い、SIVagm 感染 24 時間後の感染細胞内にて合成されたウイルス DNA を、リアルタイム PCR 法にて測定した結果を示す。CypA 過剰発現サル T 細胞は、Exogenous CypA-HA+で示し、CypB 過剰発現サル T 細胞は、Exogenous CypB-HA+で示している。CsA 処理 (CsA treatment) は、CsA を 2.5 μ M の濃度で処理していることを示している。

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

所 属 帝京平成大学 薬学部

研究者 磯田 勝広

研究要旨

本研究は、腸管粘膜に存在する免疫誘導組織パイエル板（PP）表面に claudin-4 が高発現していることに着目し、独自の claudin-4 binder を基に経口投与したエイズ抗原を PP 特異的に送達する技術を創出することにより、経口エイズワクチンの開発を目指した。本年度は、昨年度作製した OVA-C-CPE の経口ワクチン活性解析、C-CPE を高分子修飾リポソームに付加した C-CPE 修飾リポソームの作製と指向性の解析を行った。さらに作製した OVA 含有 C-CPE 修飾リポソームの経口ワクチン活性解析を行った。

A. 研究目的

21世紀を迎えた現在、世界のボーダレス化と共に各国間の垣根は低くなり、ヒト、動物、植物などの交流が盛んに行われている。これは各種疾病を引き起こす病原体についても同様であり、様々な物流の移動に伴い世界規模での感染症、伝染病の爆発的な流布「パンデミック」が懸念されている。事実、1970年代後半より次々と新たな感染症（新興感染症）が発生した。まず HIV 感染症が出現し、この疾患は瞬く間に世界に広がり、現在ではアフリカ各国、中国、インドを含んだアジア全域で多くの患者を抱えている。さらに2002年、中国より SARS（重症急性呼吸器症候群）が突如出現し、その死亡率の高さに世界は震撼した。また数年前より家禽の間で流行している H5N1 型高病原性鳥インフルエンザウイルスがヒトに感染し世界的に大流行するかが話題となっている。一方、結核、コレラ、肺炎のような既知の感染症が再び流行し始める再興感染症も近年問題となっており、感染症に対する再認識が高まっている。このような背景のなか、予防医療の観点のもと、感染そのものを防げるワクチンが注目を集めている。現在、臨床応用されているワクチンは経口ポリオ生ワクチン、インフルエンザ経鼻ワクチンを除きそのすべては注射による免疫法である。

一方、我々の生体は外界に接している部分は皮膚ならびに呼吸器、消化管、生殖器といった粘膜面である。特に粘膜面は皮膚の200倍の表面積を持ち、食べる、飲む、吸う、また性交渉という生命の維持に必須の生理的行為を介して病原体の侵入という危険にさらされている。これらの病原体に対し生体は粘膜面に粘膜層などの物理的なバリアーに加え、MALTを中心とした粘膜免疫システムと呼ばれる独自の免疫システムを備えることで第一線の防御機構を有している。感染症に対するワクチン開発において、病原体の侵入門戸となっている粘膜面に抗原特異的免疫反応を誘導しようとする考えは、きわめて有効な効果を発揮すると考えられる。現在、粘膜面に効果的な抗原特異的反応を得るために、抗原を目的の免疫組織に送達する技術、すなわちドラッグデリバリー技術（DDS）を応用した粘膜ワクチンの開発が注目されている。

Claudin は細胞間隙を構成する分子量 23 kDa の 4 回膜貫通タンパク質であり、現在 24 種類のサブタイプが確認されている。Claudin の発現には組織特異性があり、本研究においては肺、腎臓、腸管に存在するとされる claudin-4 に着目した。Claudin-4 は粘膜面に発現していることが知られており、さらに特筆すべき点として腸管に存在す

る粘膜リンパ組織であるパイエル板に claudin-4 が大量発現していることが報告されている。このことより、claudin-4 binder を用いることで抗原の MALT への送達が可能となり、claudin-4 binder を用いた経口ワクチン開発の可能性を示唆している。現在、唯一の claudin-4 binder としてウエルシュ菌が産生する *Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE) の C 末断片の C-CPE が知られている。C-CPE は CPE の 184 番目から 319 番目に相当するポリペプチドであり、毒性発現領域である N 末端側を消失しているため CPE の有する下痢活性は消失しているが、受容体結合領域を有しているため claudin-4 結合性は保持している。C-CPE にタンパク合成阻害分子 PSIF を融合させた C-CPE-PSIF が、C-CPE を介して claudin-4 発現細胞に特異的に結合し、細胞障害性を発揮することが示されており、C-CPE を用いた claudin-4 発現部位指向性抗原 DDS が期待される。そこで、独自の claudin-4 binder を基に経口投与したエイズ抗原を PP 特異的に送達する技術を創出することにより、経口エイズワクチンの開発を目指した。昨年度は、C-CPE の安全性を解析し、卵白アルブミン (OVA) をモデル抗原として用いて C-CPE-OVA を作製し、経口粘膜ワクチン活性を検討した。引き続き今年度は、作製した C-CPE-OVA の経口ワクチン活性解析を行い、さらに C-CPE を修飾した抗原封入リポソームを作製し、経口投与によるワクチン活性を検討した。

B. 研究方法

1. C-CPE-OVA の経口粘膜ワクチン活性の検討

OVA-C-CPE の経口ワクチン活性解析においては、BALB/c マウス (♀、8W) へ day 0, 7, 14, 21, 28 の計 5 回、経口投与を行った。Control (PBS) 群、ovalbumin (OVA, Sigma Aldrich Co.,) 単独投与群、OVA+C-CPE 投与群、OVA-C-CPE 投与群、4 群とした (n=5)。すべての群において一匹、一回あたりの投与量は OVA として 100 μ g とし、投与 21, 28 日目 (day 21, 28) マウスより血清サンプル、鼻腔洗浄液、膣洗浄液、糞便抽出液を

回収した。OVA 特異的抗体価 (IgG, IgA) を ELISA 法により測定した。

2. ローダミン標識 C-CPE 修飾リポソームの作製

リポソームの脂質組成は POPC : コレステロール : DSPE-PEG(2K)-OMe = 63 : 31 : 3 mol/mol とし、さらに DSPE-PEG(2K)-COONHS : 3 mol%、ローダミン : 1 mol% となるように加え、エタノールにて 150 mg/ml となるように溶解した。続いて、エタノールの 40 倍量の PBS に bath 型ソニケーターで超音波処理しながら脂質を溶解したエタノールを加え、200 nm のフィルターを用いてサイジングを行なった。サイジング後のリポソームに C-CPE を DSPE-PEG(2K)-COONHS に対して 1/400 (m/m) となるように加え、4 °C で一晩攪拌した。翌日、4 °C、65,000 rpm で 30 分間超遠心し、沈殿物を PBS で再懸濁し、C-CPE 修飾リポソームを得た。各リポソームの粒子径は動的光錯乱法にて、総脂質濃度はリン脂質 C テストワコー (和光純薬) を用いて測定した。

3. 細胞培養

各種マウス線維芽由来 L 細胞は 10% FBS、20 mM NaHCO₃、2 mM L-gultamine を含む Eagle' s MEM 培地 (MEM 培地)、各種 CL 発現 L 細胞は 500 mg/ml G418 含有 MEM 培地を用いて 37 °C、5% CO₂ 条件下で培養した。

4. C-CPE-リポソームの結合性評価

培養用 24 穴プレートに細胞を 2×10⁴ cells/well で播種し、一晩培養した。翌日、PBS で洗浄後、培養液で希釈した各種リポソームを添加し、37 °C で 3 時間培養した。培養後、PBS で洗浄後、培地を加え、蛍光顕微鏡下でローダミンの蛍光シグナルを指標にリポソームの細胞内取り込みを解析した。

5. OVA 封入 C-CPE 修飾リポソームの作製

C-CPE 未修飾リポソームの脂質組成は POPC : コレステロール : DSPE-PEG(2K)-OMe = 63 : 31 : 6 mol/mol とし、C-CPE 修飾リポソームの脂質組成は POPC : コレステロール : DSPE-PEG(2K)-OMe : DSPE-PEG(2K)-COONHS = 63 : 31 : 3 : 3 mol/mol とし、総脂質量 75 mg をエタノール 0.5 ml に溶解した。脂質を溶解したエタノールを 9%スクロース溶液 20 ml に室温にて攪拌しながら加え、200 nm のフィルターを用いてエクストルーダーで 2 回サイジングを行なった。サイジング後のリポソームに PBS を 20 ml を加え、さらに DSPE-PEG(2K)-COONHS : C-CPE = 50 : 1 mol/mol の割合で C-CPE を添加し、4 °C にて一晚攪拌した。翌日、4 °C、80,000 rpm で 30 分間超遠し、3 回繰り返すことで洗浄し、C-CPE 修飾リポソームを得た。各リポソームを 80,000 rpm で 30 分間遠心し、沈殿物を 9%スクロース溶液で全量 2 ml に懸濁し、ドライアイス・アセトンにて凍結させ、一晚凍結乾燥させた。凍結乾燥リポソームを 20 mg/ml OVA 溶液 2 ml で再懸濁し、80,000 rpm で 30 分間の遠心を 3 回繰り返す事で洗浄した。沈殿したりポソームを 9%スクロース溶液で再懸濁し、無菌フィルターを通し、OVA 封入りポソームを得た。各リポソームの粒子径は動的光散乱法にて、OVA 濃度は ELISA 法にて測定した。

6. OVA 封入 C-CPE 修飾リポソームの経口粘膜ワクチン活性の検討

6 週齢の雌性 BALB/c マウスに各リポソームを週 1 回、計 3 回経口投与した。尚、最初の 2 回は OVA 量として 100 µg/mouse 投与し、3 回目は OVA 量として 45 µg/mouse 投与し、最終投与 1 週間後に、血清、膣洗浄液、および糞便抽出液を調製した。

7. 各サンプル中の抗原特異的な抗体価の測定

OVA を炭酸緩衝液 (pH 9.6, 0.19 M Na₂CO₃, 1.67 M NaHCO₃) に溶解し、96 穴 Immuno plate に 100 µg/well となるように分注し、4 °C にて

一晚固相化した。4%ブロックエースを用いて、室温にて 2 時間ブロッキングした。TBS-T (0.05% Tween-TBS) にて 10 倍希釈したブロックエース (sample diluent) を用いて各サンプルを適宜希釈し、50 µl/well でプレートに添加し、室温にて 2 時間反応させた。その後、sample diluent にて HRP detection antibody (IgG, IgA) を 1/10,000 に希釈し、100 µl/well となるように加え、室温にて 1 時間反応させた。TMB solution を加え、室温で 20 分間反応させ、2 M 硫酸を加え反応を停止させた。マイクロプレートリーダーを用いて、主波長 450 nm、副波長 595 nm で吸光度を測定した。結果は吸光度を log₁₀ の力価として表記した。なお、プレートから各溶液を除去する際には、T-TBS による洗浄操作を 5 回行なった。

C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載。

D. 考察

1. C-CPE-OVA の経口粘膜ワクチン活性の検討

Fig.1 に OVA-C-CPE を経口投与した結果を示した。結果、OVA 量として 100 µg 投与しても OVA 特異的な抗体価の上昇は観察されなかった。この時、OVA-C-CPE を経鼻投与すると、血中、鼻・膣・腸管粘膜面において OVA 特異的な抗体価の上昇が観察されたことから、OVA-C-CPE が消化酵素によって分解されている可能性が示唆された。

2. C-CPE 修飾リポソームの作製および機能評価

脂質二重膜から成るリポソームの内相に封入された薬物は物理的および化学的分解を受けにくいことから、抗原デリバリーのキャリアとして広く用いられている。抗原を経口投与した場合、消化酵素による分解が危惧されることから、消化酵素耐性のポリエチレングリコール (PEG) 修飾リポソームを抗原キャリアとして

選択し、本リポソームへの C-CPE 修飾条件の検討を試みた。CL4 発現細胞へのターゲッティング能を解析するためにローダミン標識した脂質を加え、さらに分子量 2000 の PEG を付加した DSPE を添加しリポソームを作製した。リポソーム調整後、PEG 末端に C-CPE を化学的に結合し、C-CPE 修飾リポソームを作製したところ、平均粒子径 145 nm の C-CPE 未修飾リポソーム、162 nm の C-CPE 修飾リポソームが調整できた。作製したリポソームを L 細胞、CL1 発現 L 細胞、CL4 発現 L 細胞に添加したところ、CL4 発現 L 細胞に対して特異的に結合していた (Fig. 2)。尚、C-CPE を前処理することで C-CPE 修飾リポソームの CL4 発現細胞に対する取り込みは抑制されていた (data not shown)。以上の結果より、C-CPE はリポソーム粒子に対して CL4 指向性を付与できるものと推察される。そこで次に、モデル抗原として卵白アルブミン (OVA) を用い、OVA 封入 C-CPE 修飾リポソームを作製し、経口投与に伴う免疫活性化能を検討した。

3. OVA 封入 C-CPE 修飾リポソームの経口投与に伴う免疫活性化能

経口ワクチンは、投与が簡便であること、全身粘膜面のみならず全身性の免疫応答を惹起できることから、感染症、癌、アルツハイマー病などの治療用ワクチンとしての応用が期待されている。しかしながら、腸管粘膜免疫組織への抗原送達法が開発されておらず、経口ワクチンの実用化例は皆無に等しいのが現状である。上述したように、消化酵素耐性の PEG 修飾リポソームに C-CPE を付加したところ、リポソームに対して CL4 指向性が付与されていた。そこでモデル抗原としてワクチン研究に広く用いられている OVA を封入したリポソームの作製

を試み、平均粒子径 210.8 nm の C-CPE 未修飾リポソーム、194.8 nm の C-CPE 修飾リポソームの作製に成功した。本リポソームを経口投与したところ、今回の投与条件では OVA 特異的な抗体価の上昇は観察されなかった (Fig. 3)。

E. 結論

1. OVA-C-CPE を経口投与したところ、OVA 特異的な抗体価の上昇は観察されなかった。
2. Claudin-4 指向性高分子修飾リポソームの作製をした。
3. OVA 含有 C-CPE 修飾リポソームを経口投与したところ、OVA 特異的な抗体価の上昇は観察されなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

なし

G-2 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 特許取得

なし

H-2 実用新案登録

なし

H-3 その他

なし

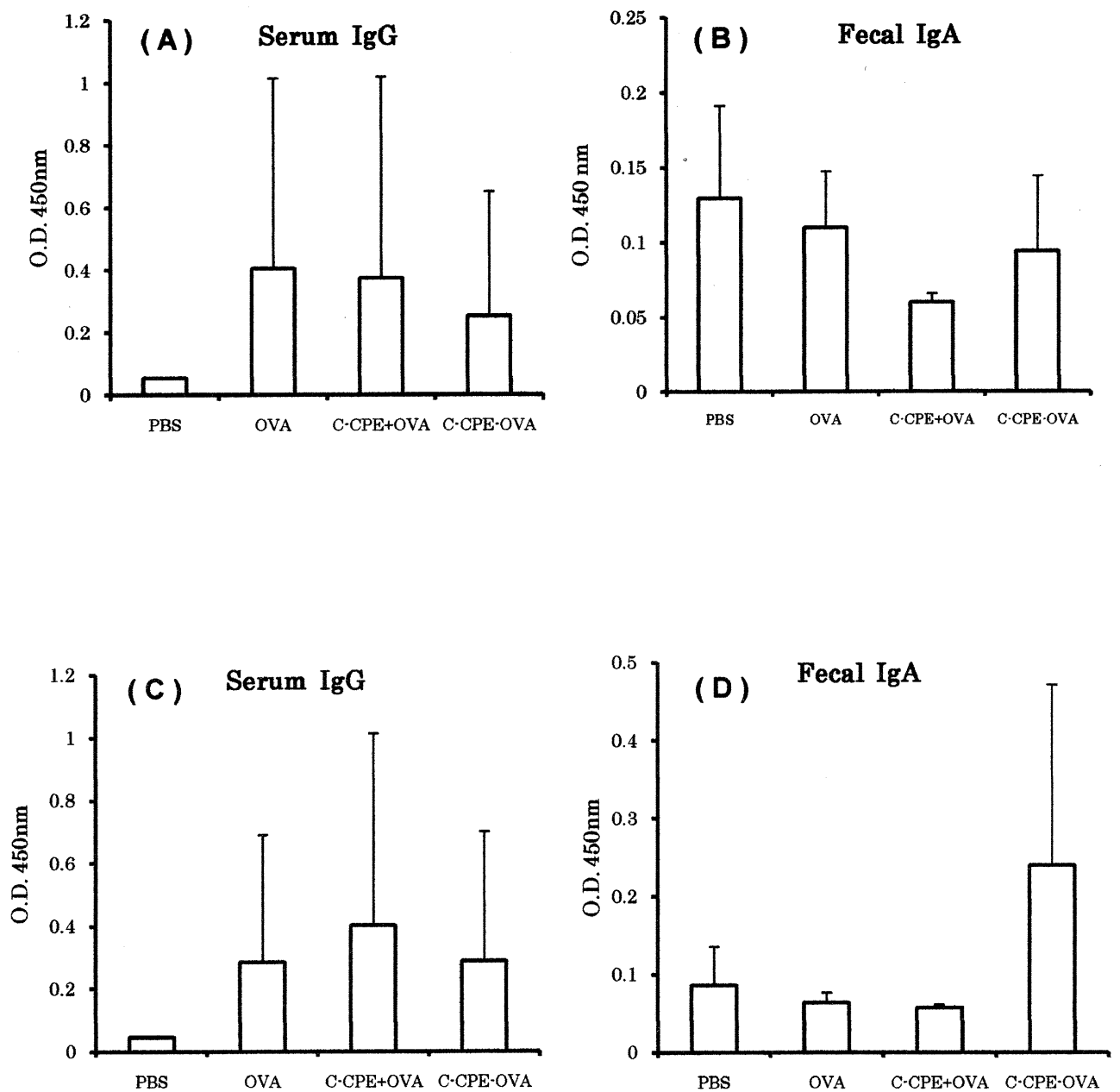


Fig.1 C-CPE-OVA の経口投与による免疫活性化能

マウスに溶媒、OVA 溶液、C-CPE と OVA、C-CPE-OVA を一週間に一回、5 回投与し、投与後、21 日後、28 日後の OVA 特異的 血中 IgG、糞便抽出液 IgA の抗体価を測定した。投与 21 日後 (A)、(B)、投与 28 日後 (C)、(D)である。Mean±S.D. n = 5.

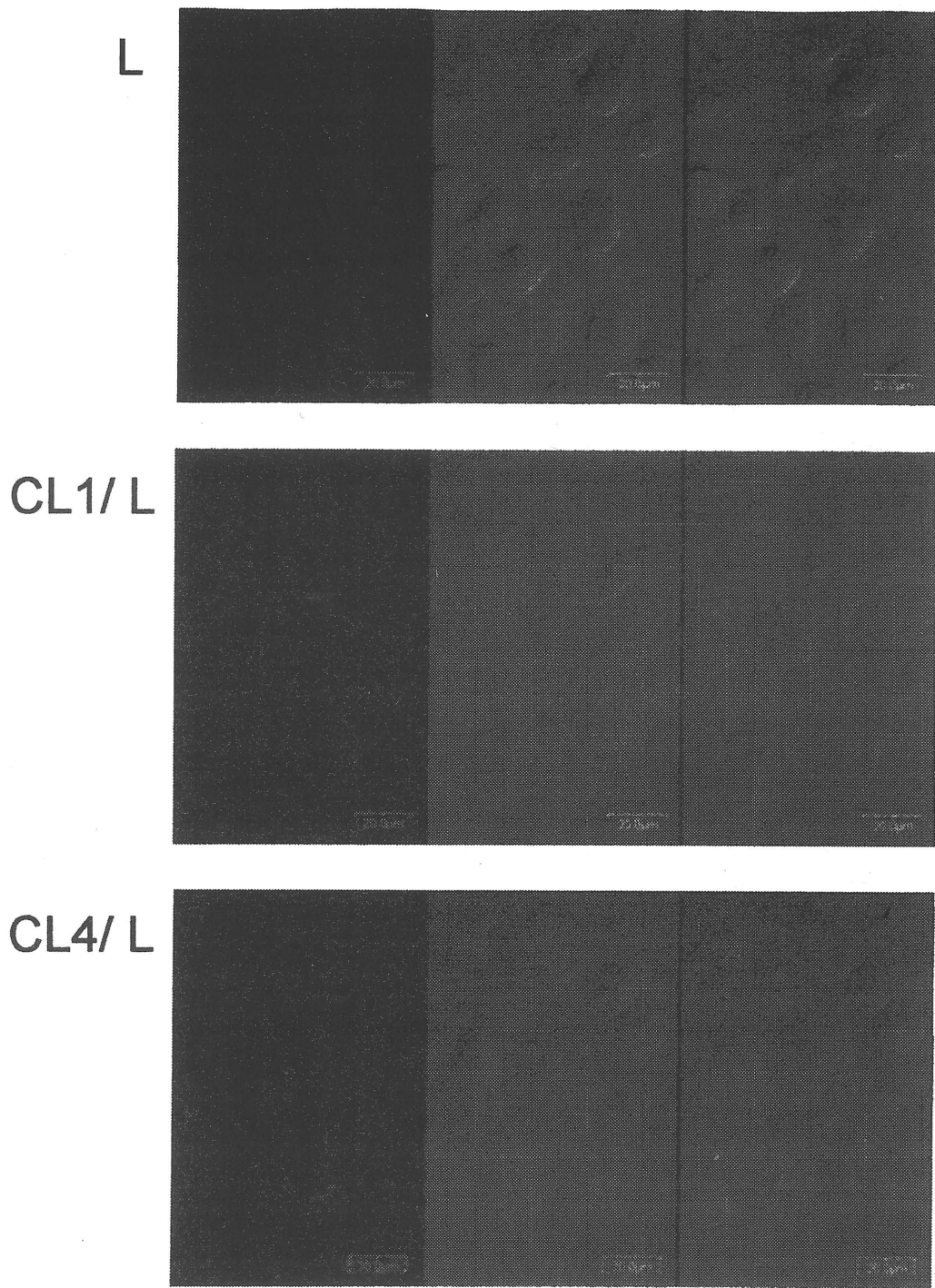


Fig.2 C-CPE 修飾リポソームの CL 発現細胞への取り込み

L 細胞、CL1 発現 L 細胞 (CL1/L)、CL4 発現 L 細胞 (CL4/L) を 24 穴プレートに播種し、その 24 時間後に C-CPE 修飾ローダミン標識リポソームを添加 3 時間後に細胞を培地で洗浄し、蛍光顕微鏡下でリポソームの取り込みを解析した。

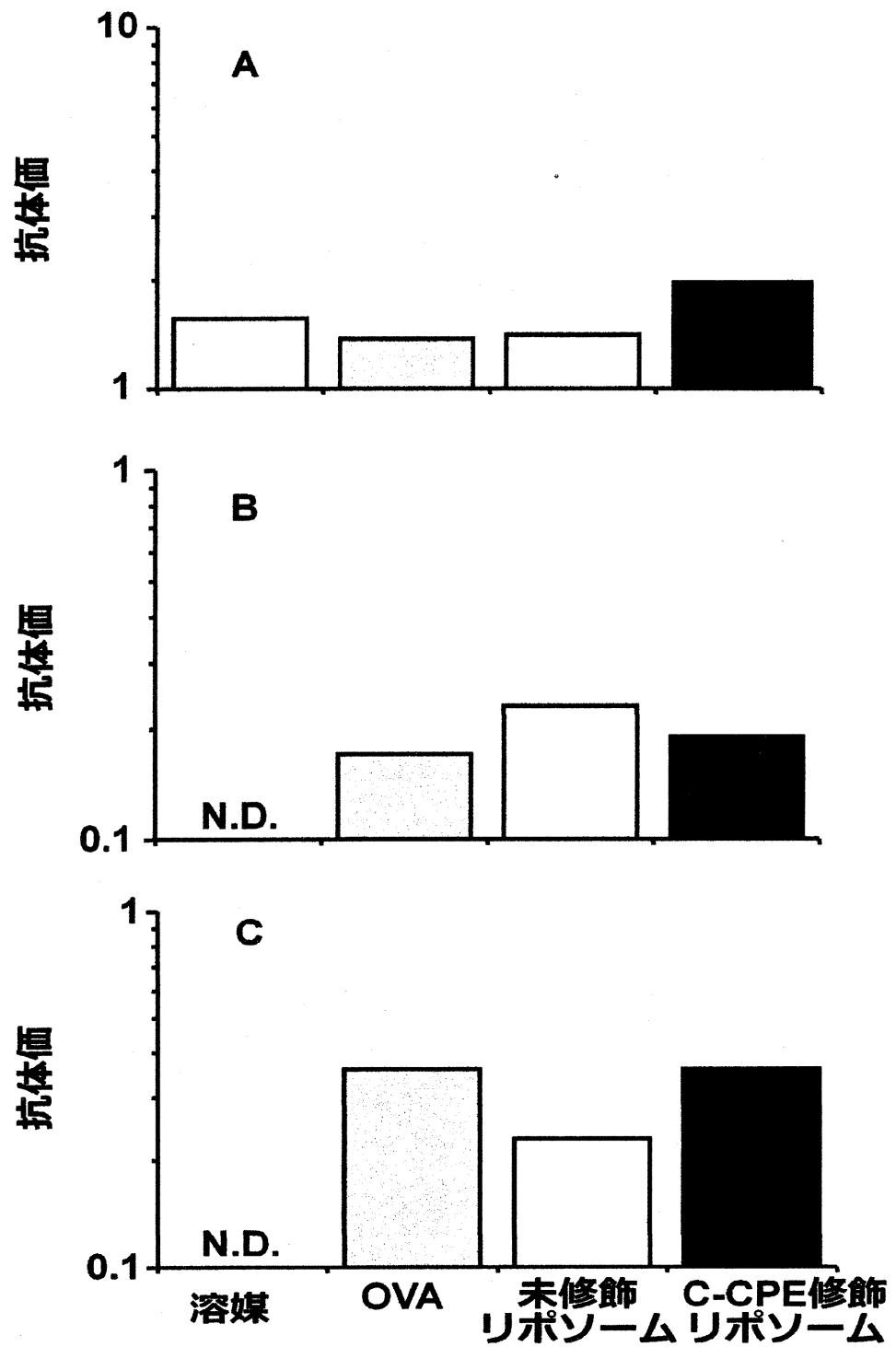


Fig.3 OVA 封入 C-CPE 修飾リポソームの経口投与による免疫活性化能

マウスに溶媒、OVA 溶液、OVA 封入リポソーム、OVA 封入 C-CPE 修飾リポソームを一週間に一回、三回投与し、最終投与の一週間後に OVA 特異的血中 IgG (A)、膺洗浄液 IgA (B)、糞便抽出液 IgA (C) 抗体価を測定した。N. D., 検出限界以下。

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

所 属 福岡大学 薬学部 薬学疾患管理学
研究者 西奥 剛
研究期間 平成 20 年 4 月～平成 22 年 3 月

研究要旨 HAART の導入によりエイズ患者の予後は著しく改善したが、脳神経障害は剖検組織でむしろ増加していると報告されており、エイズ脳症対策は慢性感染症となった HIV 関連疾患治療において重要である。我々は、HIV 感染あるいは HAART による血液脳関門(BBB)機能の変容に着目し、脳内 HIV 感染機序の解明と薬物療法の最適化を目的として本研究を企図した。

1. 研究目的

我々は現在までに血液脳関門(BBB) *in vitro* 再構築系を改良・開発し、薬物の脳移行および BBB 機能に対する作用を検定するスクリーニングシステム(BBB キット)を作製した。脳血管内皮細胞、脳血管周皮細胞、アストロサイトを組み合わせたラット型 BBB キットは、薬物の脳移行や BBB 機能に対する作用を評価し、BBB の生理学的制御機構を明らかにする上で有用であるとの成績を得た。これらの細胞はヒト由来のセルラインに置き換えることも可能であるため、HIV の BBB 機能に対する影響を解析する最適な手段である。そこで本研究では HAART 適応薬剤と血液脳関門の相互作用について着目し、以下の 3 点を明らかにすることを目的とする。

①HAART 療法に使用されている抗 HIV 薬それぞれについて、BBB 透過能を定量化することにより、HIV 感染時の脳神経障害時に推奨される抗ウイルス薬の組み合わせを提案する。

②HIV あるいは抗 HIV 薬を BBB キット™に適用し、BBB 構成細胞への影響、BBB バリア機能の変容について解析する。

③BBB キット™の脳側に HIV を添加し、疑似感染 BBB モデルを構築し、抗 HIV 薬単独処理および抗 HIV 薬とベラパミル等の

薬剤排出ポンプ阻害薬の併用処理など②の結果を踏まえた抗 HIV 薬脳移行性増強戦略によるウイルス増殖抑制効果を検証し、実践的な改良 HAART 療法を開発する。

上記のような多面的側面からの解析により、新規抗 HIV 療法を提唱し、罹患患者の QOL 向上に寄与することを目的に本研究を企図した。

ここまでの申請書で提案した研究目的であったが、福岡大学に設置予定であった P3 施設の設置許可が下りなかったため、③については行わず、その代り各抗 HIV 薬の BBB 透過性について、シミュレーションを用いた線形重回帰モデルにより、透過性予測を行うことをこととした。この結果に加え、①、②のデータを勘案することにより、薬物の生体内での動態を予測することにより、実践的な改良 HAART 療法を開発することを目的に研究を行った。

2. 研究方法ならびに結果

抗 HIV 薬は、主に 3 種類に分類される。体内動態は基本的には薬物の化学構造に依存しており、シミュレーションに使用する母集団の比較においても非常に重要になってくる。

①in silico BBB 透過性予測

抗 HIV 薬について、株式会社富士通九州システムエ

エンジニアリングの ADMWORKS V4.5 ModelBuilder & Predictor を用いて、BBB 透過性を予測する。このアプリケーションは、125 種類の化合物を母集団とし、線形重回帰モデル解析を行うことにより BBB 透過性を予測するものである。

in silico BBB 透過性予測により、Efanvirenz、Lopinavir、Zidovudine、Tenofovir の BBB 透過性が高いことが示唆された。ただし、ADMWORKS V4.5 ModelBuilder & Predictor においては、これら薬物の薬物間相互作用等、多剤併用を行った際の BBB 透過性への影響については、計算することができない。これらについては、BBB キットや実験動物を用いた実験によって検証を行わなければならない。

②血液脳関門 in vitro 再構成モデル及び実験動物を用いた BBB 透過性測定

BBB における複雑な物質移動の制御は、脳内の恒常性を維持する一方で、中枢神経作用薬の開発を困難にしている。また、中枢神経疾患における BBB 機能障害は、物質の輸送に影響を与え、脳内の恒常性を乱し、血管内皮細胞と、ニューロンやグリア細胞とのクロストークを障害する。生体の BBB の機能を試験管内で再現した in vitro BBB 再構成系モデルは、医薬品開発過程における、合理的な薬剤設計のための重要な情報を提供し、中枢神経作用薬候補の脳内移行性や薬物の BBB 保護作用を開発の早期段階で予測するための創薬支援ツールである。本研究では、①で求められた予測値を参考にしながら、この BBB キットを用いて、抗 HIV 薬の薬物透過性を測定する。BBB キットを用いて抗 HIV 薬の脳透過性を検討する際、透過した抗 HIV 薬の定量法を確立する必要がある。今回、抗 HIV 薬の多剤併用を考慮し、LC/MS/MS を用いて定量することとした。まずは抗 HIV 薬を分離・検出するため、各抗 HIV 薬の HPLC ならびに MS/MS の条件設定を行った。各薬剤ともナノ〜ピコグラム/mL の濃度で検出できるよう LC/MS/MS 測定条件を決定した。HPLC は日本ウォーターズの UPLC を使用した。カラムには、HSS C18 (粒径 1.8 μ m)を用いた。移動相には、水 (0.1%ギ

酸含有)とメタノールの 2 種類を用いた。溶離は、0.4mL/min の流速でメタノールの濃度を 5 分間で 5 から 95 vol%まで変化させる直線グラジエントで行なった。検出機の MS/MS には日本ウォーターズの Q-PremierXE を使用した。まず最初に各抗 HIV 薬を LC/MS/MS に注入し、precursor ion mass (m/z) の検出条件をシングル mass にて設定した。その後、product ion mass (m/z) の検出条件をタンデム mass にて設定した。

入手した 14 種類の抗 HIV 薬を LC/MS/MS にて検出することができた。次に、数種類の抗 HIV 薬を組み合わせ、薬剤の分離・検出する条件設定を行なった。抗 HIV 治療ガイドラインで推奨されている組み合わせ 16 組について検討を行ったところ、すべての組み合わせにおいて、分離分析が可能であることが示された。

3. 考察

各抗 HIV 薬の BBB 透過性予測を行い、Efanvirenz、Lopinavir、Zidovudine、Tenofovir の BBB 透過性が高いことが示唆された。ただし各薬剤に関して透過性にばらつきが認められる。このことは、各薬剤間の相互作用は考慮されていないものの、多剤併用療法の各薬剤の選択をかえることにより、神経変性症状を引き起こさない組み合わせを構築できる可能性を示唆している。また、LC/MS/MS を用いて抗 HIV 薬の検出条件を検討したところ、数種類の抗 HIV 薬を同時に分離・検出することができた。このことより、LC/MS/MS によって抗 HIV 薬を数種類同時に定量可能であることが示唆された。今後、BBB キットを用いて、抗 HIV の透過性を測定していきたい。

4. 結論

抗 HIV 薬の BBB 透過性予測により、神経変性症状を引き起こさない組み合わせを構築できる可能性が示唆された。また LC/MS/MS によって抗 HIV 薬を数種類同時に定量可能であることが示唆された。今後、BBB キットならびにマウスを使用し、HAART 療法に使用されている抗 HIV 薬について、BBB 透過能を定量化することにより、HIV 感染の脳神経障害時に推奨さ

れる抗ウイルス薬の組み合わせを提案していきたい。

5. 研究発表・知的財産権の出願・登録状況

Nishioku T、Matsumoto J、Dohgu S、Sumi N、Miyao K、Takata F、Shuto H、Yamauchi A、Kataoka Y. Tumor necrosis factor- α mediates the blood-brain barrier dysfunction induced by activated microglia in mouse brain microvascular endothelial cells. J Pharmacol Sci. 2010;112(2):251-4.

Sumi N、Nishioku T、Takata F、Matsumoto J、Watanabe T、Shuto H、Yamauchi A、Dohgu S、Kataoka Y. Lipopolysaccharide-activated microglia induce dysfunction of the blood-brain barrier in rat microvascular endothelial cells co-cultured with microglia. Cell Mol Neurobiol. 2010; 30(2):247-53.

Nishioku T、Dohgu S、Takata F、Eto T、Ishikawa N、Kodama KB、Nakagawa S、Yamauchi A、Kataoka Y. Detachment of brain pericytes from the basal lamina is involved in disruption of the blood-brain barrier caused by lipopolysaccharide-induced sepsis in mice. Cell Mol Neurobiol. 2009; 29(3):309-16.

特願 2008-162214、発明者：児玉耕太、西奥剛、片岡泰文、安高勇氣、石橋正也、岸直人、特許の名称：ペプチド、出願日：平成20年6月20日、出願人：福岡大学

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

所属 福岡大学 薬学部 薬学疾患管理学
研究者 西奥 剛

研究要旨 HAART の導入によりエイズ患者の予後は著しく改善したが、脳神経障害は剖検組織でむしろ増加していると報告されており、エイズ脳症対策は慢性感染症となった HIV 関連疾患治療において重要である。我々は、HIV 感染あるいは HAART による血液脳関門(BBB)機能の変容に着目し、脳内 HIV 感染機序の解明と薬物療法の最適化を目的として本研究を企図した。

A. 研究目的

我々は現在までに血液脳関門(BBB) in vitro 再構築系を改良・開発し、薬物の脳移行および BBB 機能に対する作用を検定するスクリーニングシステム(BBBキット)を作製した。脳血管内皮細胞株、脳血管周皮細胞、アストロサイトを組み合わせたラット型 BBB キットは、薬物の脳移行や BBB 機能に対する作用を評価し、BBB の生理学的制御機構を明らかにする上で有用であるとの成績を得た。これらの細胞はヒト由来のセルラインに置き換えることも可能であるため、HIV の BBB 機能に対する影響を解析する最適な手段である。そこで本研究では HAART 適応薬剤と血液脳関門の相互作用について着目し、以下の点を明らかにすることを目的とする。

① HAART 療法に使用されている抗 HIV 薬それぞれについて、BBB 透過能を定量化することにより、HIV 感染時の脳神経障害時に推奨される抗ウイルス薬の組み合わせを提案する。

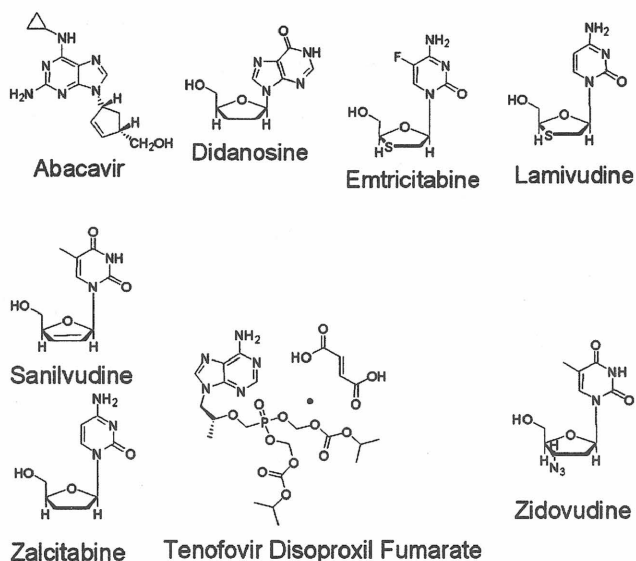
② HIV あるいは抗 HIV 薬を BBB キット™に適用し、BBB 構成細胞への影響、BBB バリア機能の変容について解析する。

上記のような多面的側面からの解析により、新規抗 HIV 療法を提唱し、罹患患者の QOL 向上に寄与することを目的に本研究を企図した。

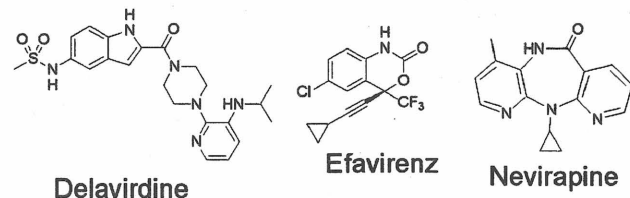
B. 研究方法ならびに結果

まず、ここに国内で使用されている抗 HIV 薬の構造を示す。抗 HIV 薬は、主に 3 種類に分類される。

核酸系逆転写酵素阻害剤



②非核酸系逆転写酵素阻害剤



③プロテアーゼ阻害剤

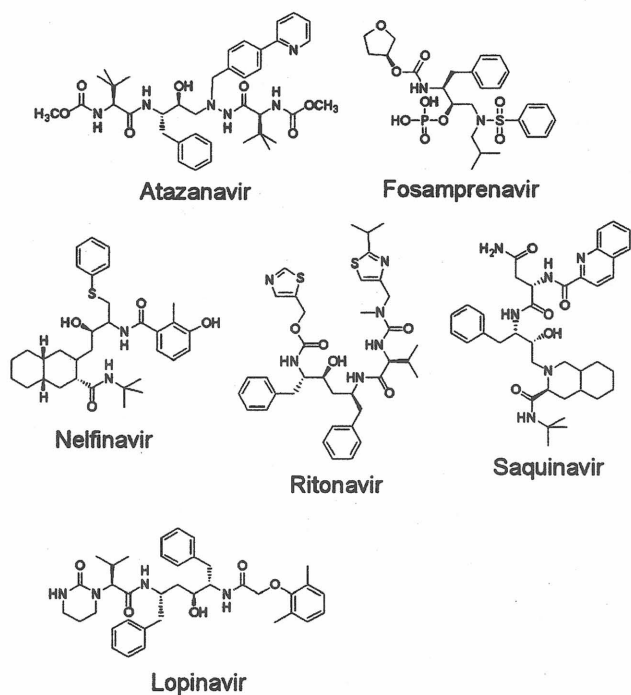


図1: 抗 HIV 薬

BBB における複雑な物質移動の制御は、脳内の恒常性を維持する一方で、中枢神経作用薬の開発を困難にしている。また、中枢神経疾患における BBB 機能障害は、物質の輸送に影響を与え、脳内の恒常性を乱し、血管内皮細胞と、ニューロンやグリア細胞とのクロストークを障害する。生体の BBB の機能を試験管内で再現した *in vitro* BBB 再構成系モデル (BBB モデル) は、医薬品開発過程における、合理的な薬剤設計のための重要な情報を提供し、中枢神経作用薬候補の脳内移行性や薬物の BBB 保護作用を開発の早期段階で予測するための創薬支援ツールである。本研究では、上記で紹介した抗 HIV 薬について、この BBB キットを用いて、薬物透過性を測定する。BBB キットを用いて抗 HIV 薬の脳透過性を検討する際、透過した抗 HIV 薬の定量法を確立する必要がある。今回、抗 HIV 薬の多剤併用を考慮し、

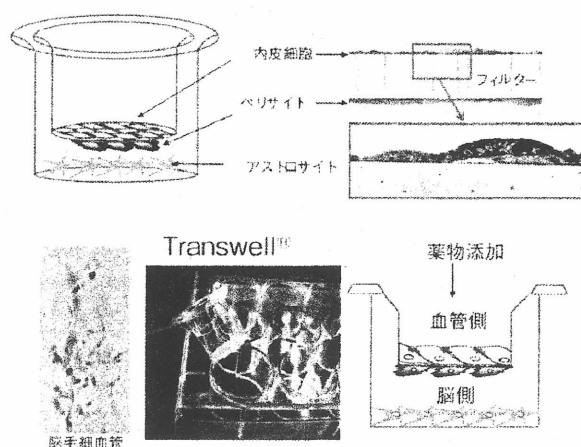


図2 血液脳関門 *in vitro* 再構成モデル: BBB キット

図2: BBB キット (日薬理誌 131, 392 (2008) より抜粋)

LC/MS/MS を用いて抗 HIV 薬の定量法を確立することとした。

— 昨年の段階では、上記で紹介した抗 HIV 薬の原本は、国内で Lamivudine、Sanilvudine、Didanosine、Zidovudine、Zalcitabine の 5 剤のみしかそろえることができなかったが、残りの抗 HIV 薬も海外の業者より輸入購入し、すべてそろえることができた。まずは抗 HIV 薬を分離・検出するため、各抗 HIV 薬の HPLC ならびに MS/MS の条件設定を行った。HPLC は日本ウォーターズの UPLC を使用した。カラムには、HSS C18 (粒径 $1.8 \mu\text{m}$) を用いた。移動相には、水 (0.1% ギ酸含有) とメタノールの 2 種類を用いた。溶離は、0.4 mL/min の流速でメタノールの濃度を 5 分間で 5 から 95 vol% まで変化させる直線グラジエントで行なった。検出機の MS/MS には日本ウォーターズの Q-PremierXE を使用した。まず最初に各抗 HIV 薬を LC/MS/MS に注入し、precursor ion mass (m/z) の検出条件をシングル mass にて設定した。その後、product ion mass (m/z) の検出条件をタンデム mass にて設定した。基礎検討により決定した各抗 HIV 薬の precursor ion mass (m/z)、product ion mass (m/z) ならびに collision energy を表 1 にまとめた。

	Precursor ion mass (m/z)	Product ion mass (m/z)	Collision energy (V)
Lamivudine	230.1	112.0	15
Zidovudine	268.1	127.0	10
Sanilvudine	223.1	126.9	12
Didanosine	237.1	137.0	15
Zalcitabine	212.0	111.9	12
Lopinnavir	629.4	447.0	15
Saquinavir	671.1	570.1	25
Delavirdine	457.3	221.1	25
Efanvirenz	313.9	243.9	20
Nevirapine	267.0	226.2	31
Emtricitabine	248.0	130.1	10
Abacavir	287.2	191.0	20
Tenofovir	288.1	176	25
Atazanavir	705.6	168.0	36

表1: 抗 HIV 薬の MS/MS 検出条件

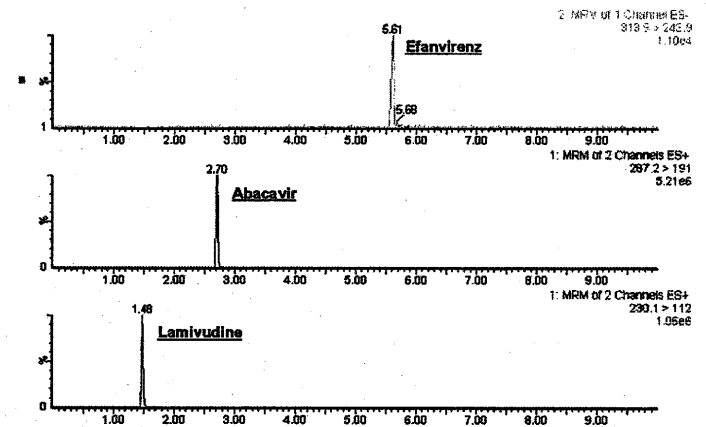
次に、数種類の抗 HIV 薬を組み合わせ、薬剤の分離・検出する条件設定を行なった。まずは抗 HIV 治療ガイドラインで推奨されている組み合わせについて検討を行った。検討した組み合わせを下記に示す。

- Efanvirenz ・ Abacavir ・ Lamivudine
- Efanvirenz ・ Didanosine ・ Lamivudine
- Efanvirenz ・ Emtricitabine ・ Tenofovir
- Nevirapine ・ Didanosine ・ Lamivudine
- Nevirapine ・ Didanosine ・ Emtricitabine
- Nevirapine ・ Zidovudine ・ Lamivudine
- Atazanavir ・ Abacavir ・ Lamivudine
- Atazanavir ・ Didanosine ・ Emtricitabine
- Atazanavir ・ Zidovudine ・ Lamivudine
- Atazanavir ・ Tenofovir ・ Emtricitabine
- Saquinavir ・ Didanosine ・ Lamivudine
- Saquinavir ・ Didanosine ・ Emtricitabine

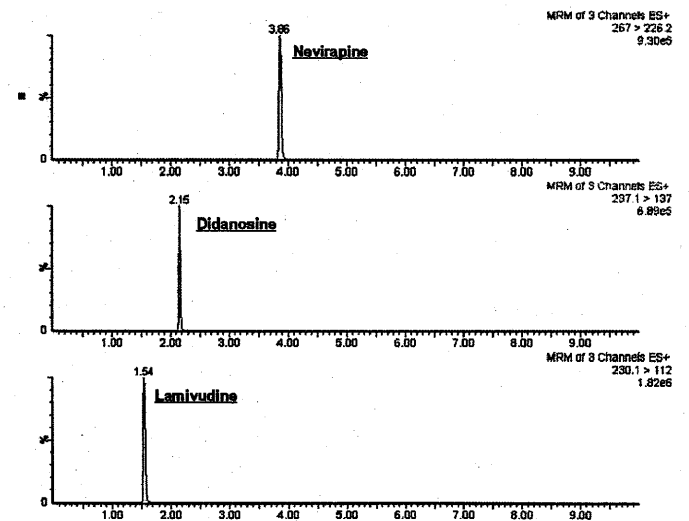
- Saquinavir ・ Zidovudine ・ Lamivudine
- Lopinnavir ・ Abacavir ・ Lamivudine
- Lopinnavir ・ Tenofovir ・ Emtricitabine
- Lopinnavir ・ Zidovudine ・ Lamivudine

上記に示した 3 種の抗 HIV 薬の混合液を LC/MS/MS に注入し、分離分析を行なった。代表的なクロマトグラムを示す。

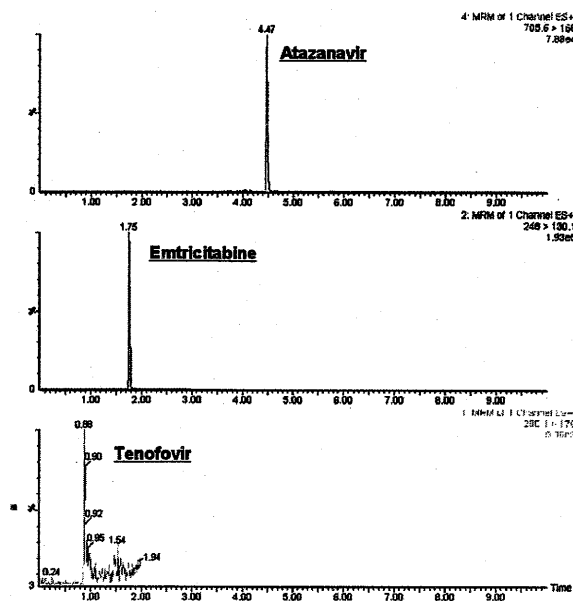
Efanvirenz ・ Abacavir ・ Lamivudine



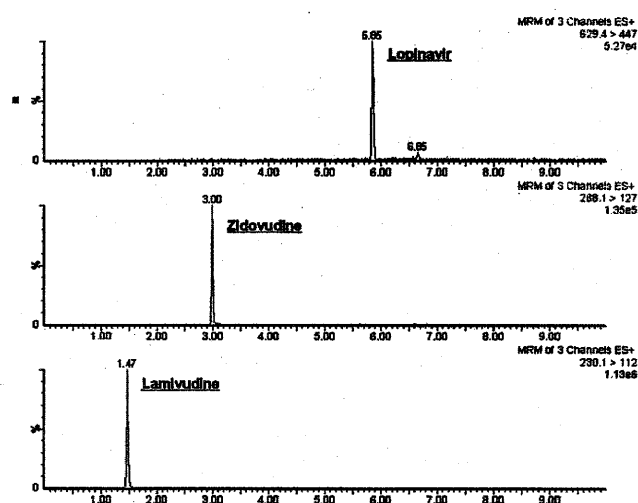
Nevirapine ・ Didanosine ・ Lamivudine



Atazanavir · Tenofovir · Emtricitabine

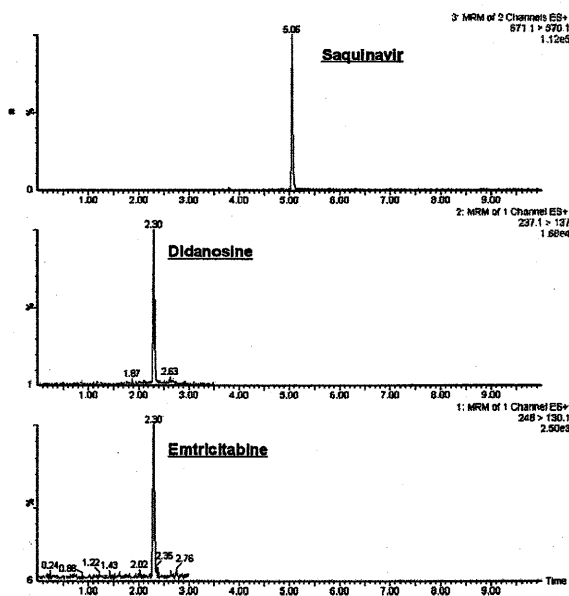


Lopinavir · Zidovudine · Lamivudine



検討したすべての組み合わせにおいて、分離分析が可能であることが示された。

Saquinavir · Didanosine · Emtricitabine



C. 考察

本年度は、LC/MS/MS を用いて抗 HIV 薬の検出条件を検討した。さらに数種類の抗 HIV 薬を同時に分離・検出することができた。このことより、LC/MS/MS によって抗 HIV 薬を数種類同時に定量可能であることが示唆された。今後、BBB キットを用いて、抗 HIV の透過性を測定していきたい。

D. 結論

本年度は、LC/MS/MS を用いて抗 HIV 薬の分離分析を行い、抗 HIV 薬を数種類同時に定量可能であることが示唆された。今後、BBB キットならびにマウスを使用し、抗 HIV 薬の脳移行量を測定し、脳神経障害時に推奨される抗ウイルス薬の組み合わせを提案していきたい。

E. 研究発表・知的財産権の出願・登録状況

Nishioku T, Matsumoto J, Dohgu S, Sumi N, Miyao K, Takata F, Shuto H, Yamauchi A, Kataoka Y. Tumor necrosis factor- α mediates the blood-brain barrier dysfunction induced by activated microglia in mouse brain microvascular endothelial cells. J

Pharmacol Sci. 2010;112(2):251-4.

Sumi N, Nishioku T, Takata F, Matsumoto J, Watanabe T, Shuto H, Yamauchi A, Dohgu S, Kataoka Y. Lipopolysaccharide- activated microglia induce dysfunction of the blood-brain barrier in rat microvascular endothelial cells co-cultured with microglia. Cell Mol Neurobiol. 2010; 30(2):247-53.

Nishioku T, Dohgu S, Takata F, Eto T, Ishikawa N, Kodama KB, Nakagawa S, Yamauchi A, Kataoka Y. Detachment of brain pericytes from the basal lamina is involved in disruption of the blood-brain barrier caused by lipopolysaccharide- induced sepsis in mice. Cell Mol Neurobiol. 2009; 29(3):309-16.

特願 2008-162214, 発明者: 児玉耕太, 西奥剛, 片岡泰文, 安高勇氣, 石橋正也, 岸直人, 特許の名称: ペプチド, 出願日: 平成20年6月20日, 出願人: 福岡大学

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

所属 東京大学医科学研究所 感染症国際研究センター
研究者 守屋 智草

研究要旨 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宿主免疫の活性化、SIV 標的細胞率の上昇がどの程度であるか、そしてそれが既存免疫の存在によりどのような影響を受けるかについてカニクイサルを用いて検討した。

A. 研究目的

HIV-1 は活性化した CCR5+メモリーCD4+T 細胞に感染するため、ワクチン接種により誘導されるメモリーT細胞すなわち HIV 標的細胞の増加によりワクチンの効果を相殺する可能性がある。実際 Merck 社の臨床試験 (STEP study) ではベクターの基盤として用いられているアデノウイルスに対する既存免疫を保持している集団は、むしろ HIV-1 への感受性が上昇したという報告がされている。このことは抗ベクター抗体とワクチンベクターの複合体形成による樹状細胞 (DC) への取り込み促進に伴う DC の活性化、その結果おこる CD4+および CD8+T 細胞のさらなる活性化等による、HIV-1 感受性の増強がおこった可能性等が指摘されているが直接的な証拠は得られていない。

センダイウイルスベクターに関しては、これまでに、血漿サンプル存在下での GFP 発現 SeV 感染効率を培養細胞で検討する系を確立し、過去に得られていた CTL 誘導の結果と総合的に判断することにより、既存免疫のワクチンによる CTL 誘導への影響は他のウイルスベクターで問題となっているように深刻ではないと思われることを示してきた。しかしながらこの検討ではサンプル量の制限があり免疫の活性化と SIV 標的細胞の増加がどの程度であったか、それは存在した抗ベクター免疫の存在によりいかに修飾されたか、実際に SIV チャレンジを行うとそれはどう影響するのか

等々論理基盤の解明は出来なかった。

このような背景から、STEP studyの結果の論理的根拠を解明するとともに、当該ベクターについてもその根拠がどこまで適用され得るか否かの検討を加えることは極めて重要な課題と考えられた。ベクター投与による活性化機構がいかなる規模でおこるか、ベクターに対する既存免疫によってそれはいかに修飾されるのか、上記の要因がワクチンの効果にどのように影響を与え得るのかを霊長類エイズモデルと試験管内検討で明らかにすることを目的とし、平成21年度は、カニクイサルにセンダイウイルスベクターを接種後、リンパ球を分離、ワクチン投与における免疫の活性化とSIV標的細胞の変化を免疫染色により検出することにより検討した。

B. 研究方法

(1) カニクイサルへのセンダイウイルスベクターエイズワクチンの投与

カニクイサル6頭にSIVのGag, Pol, Vif, Vpxを発現するDNAワクチンを接種後、非伝播型のSIV Gag 発現センダイウイルス (SeV) ベクター (SeV-Gag) 接種によるブーストを行った。うち3頭はブースト15週前に 1×10^8 CIUのSeVを接種することによりSeV抗体をあらかじめ誘導した。

接種は従来の接種量の1/10量、1頭あたり6 x 10⁸ CIUの接種量で行った。この低減した量の接種によりサル末梢血中で、従来量の接種による場合とほぼ同レベルでのGag特異的CTLの誘導が得られることは既に過去の検討で確認されている。

既存免疫

C06-002	-
C06-018	-
C06-078	-
C06-001	+
C06-003	+
C06-041	+

表1 使用したカニクイサル個体一覧

(2) SeVベクターの投与により誘導されるCTLおよび免疫活性化の解析

ベクター投与前（ブースト2週前）および後（ブースト1週後）の末梢血を分離し、Gag特異的CTL反応を、個体毎に樹立したB-LCLにSIV Gag発現ワクシニアウイルスを感染させこれを標的細胞として共培養した後、細胞内IFN- γ 染色を行いフローサイトメトリーで検出した。Ki-67は分離した末梢血について直ちに固定とともに細胞内染色を行い、同様に陽性細胞をフローサイトメトリーで検討した。

(3) SIV標的細胞の検出

末梢血を分離し、直ちにCCR5+CD4+細胞を染色の後フローサイトメトリーで検出した。

(4) 血漿中の抗SeV抗体価の測定

ELISA. Z株センダイウイルスを固定したプレート（デンカ生研）とHRP標識抗サルIgG抗体（SIGMA）を用い、プロトコールに従いPBSで5,000倍希釈した非働化済血漿中の抗SeV IgG抗体を検出した。

中和活性測定. 血漿中のSeV中和抗体の活性をEGFP発現センダイウイルスの感染抑制効果をLLCMK2細胞で検討する事により測定した。3 x 10⁴個のLLCMK2細胞にあらかじめ1%BSA-PBSで2倍希釈系列で調製した血漿と37°C1時間インキュベートしたEGFP発現センダイウイルスをmoi = 3.0で感染させた。48時間後細胞を回収し、固定の後フローサイトメトリーでGFP陽性細胞

率を検討した。血漿を加えない場合のGFP陽性細胞率を100%とし、差を%中和とし、90%中和を与える最大の血漿の希釈倍率を中和活性とした。

(倫理面への配慮)

動物実験については、所属機関において動物実験委員会の承認を得ている。遺伝子組換え生物等を用いる実験については、必要に応じて所属機関の承認および文部科学大臣の承認を得ている。

C. 研究結果

(1) Gag 特異的 CTL 誘導

ブースト時に既存免疫を有している個体3頭のうち2頭は血漿中のSeV中和活性が100倍と比較的高い値を示していたが（図1）これらの個体はGag特異的CTL誘導の誘導が検出されなかった（図2）。ナイプの個体3頭はC06-002以外はGag特異的CTLの誘導が確認できた。

(2) SIV 標的細胞の変化

CCR5+CD4+T細胞はSIVおよびR5型HIVの標的細胞であるが、末梢血中の当該細胞の割合は6頭中4頭が上昇していた（図3）。

(3) 免疫の活性化

図2で示されたブースト時の血漿中のSeV中和活性が比較的高い個体C06-001およびC06-041は、ワクチン接種後のKi-67陽性CD4およびCD8陽性細胞率の上昇が見られなかった（図4）。検討した個体の中で最もGag特異的CTLが高く誘導されたC06-018は特にCD8+T細胞でのKi-67陽性細胞率が上昇していた。既存免疫を有するがCTL誘導が確認されたC06-003では活性化および標的細胞の上昇も比較的高い傾向にあった。その他の個体では緩やかな上昇が確認された。またCD25+CD4+T細胞陽性率の変動も、ほぼ同様の傾向を示した（図5）。

D. 考察

当該プロトコールを用いたセンダイウイルスベクターエイズワクチンのカニクイサルへの投与では、全身の免疫活性化は比較的穏やかに起こることが示唆されたが、ワクチン効果との相関性は未知である。

末梢の SIV 標的細胞率のワクチン接種による上昇は比較的低い傾向にあったが、この陽性細胞率の変化の程度が実際 SIV 感染の際にどの程度、感染増幅に関与されるのか否かは不明である。また、今回の検討は末梢血の検討にとどまったが、感染局所での標的細胞の分布は調べておらず、今後腸管や生殖器といった粘膜局所等の検討が肝要であると思われる。

既存免疫の有無と免疫の活性化の相関は調べた範囲では見られなかった。

CD25 は T 細胞活性化のマーカーとして知られているが、CD25+CD4+T 細胞は免疫抑制に関与する細胞集団を含むとして知られている。Fox P3 陽性率の検討等による、さらなる詳細な検討により、制御性 T 細胞のサブセットがどの程度存在、もしくはワクチン接種により誘導されたか、今後解析を行うべきである。

E. 結論

センダイウイルスベクターエイズワクチンのカニクイサルへの投与後に、穏やかな全身の免疫活性化が起こることが示唆された。Gag 特異的 CTL 誘導が比較的効率よく行われた個体では活性化の程度も比較的高い傾向にあることが分かった。

F. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

(1) Chikaya M., Kyoko K., Takeo K., Yusuke T., Makoto I., Tsugumine S., Mamoru H., and Tetsuro M. Immunogenicity of a Sendai virus vector vaccine expressing SIV Gag in the presence of anti-vector antibodies. 27th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Boston, USA, Oct 29, 2009

(2) 守屋智草、鎌田健男、栗原京子、高原悠佑、井上誠、朱亜峰、長谷川護、俣野哲朗

センダイウイルスベクターワクチン接種経路の検討第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 26 日

(3) 守屋智草、栗原京子、鎌田健男、井上誠、朱亜峰、長谷川護、俣野哲朗 抗ベクター抗体存在下におけるセンダイウイルスベクターエイズワクチンの CTL 誘導効率の解析 第 13 回日本ワクチン学会、札幌、2009 年 9 月 27 日

(4) Chikaya M., Kyoko K., Takeo K., Yusuke T., Makoto I., Tsugumine S., Mamoru H., and Tetsuro M. Immunogenicity of intranasal and intramuscular immunization with a Sendai virus vector. The 9th Awaji international Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, Sep 10, 2009

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

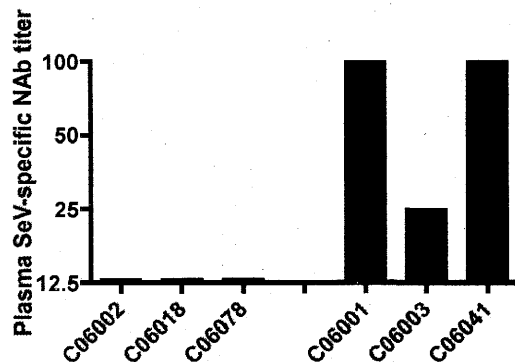


図 1. ブースト時の血漿中抗 SeV 中和活性

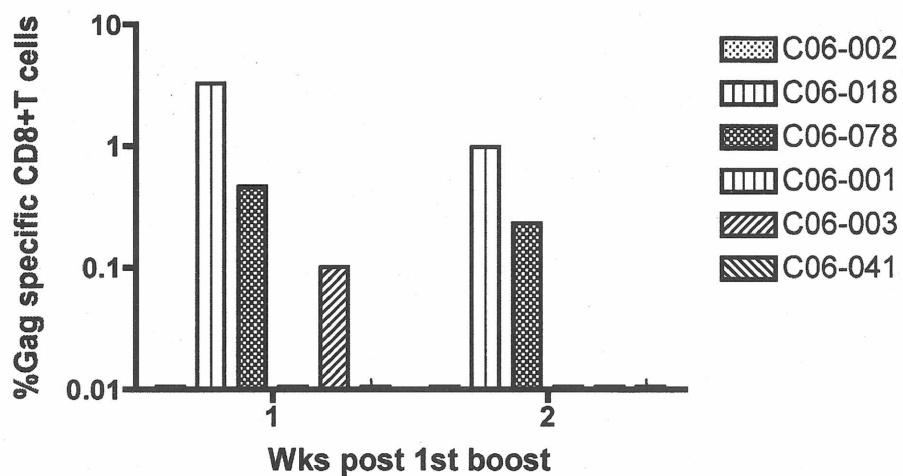


図2. ワクチン投与後の Gag 特異的 CD8+T 細胞レベル
SeV-Gag 投与 1 週および 2 週後の末梢血 CD8+細胞中の Gag 特異的 IFN- γ 陽性細胞率を示す。

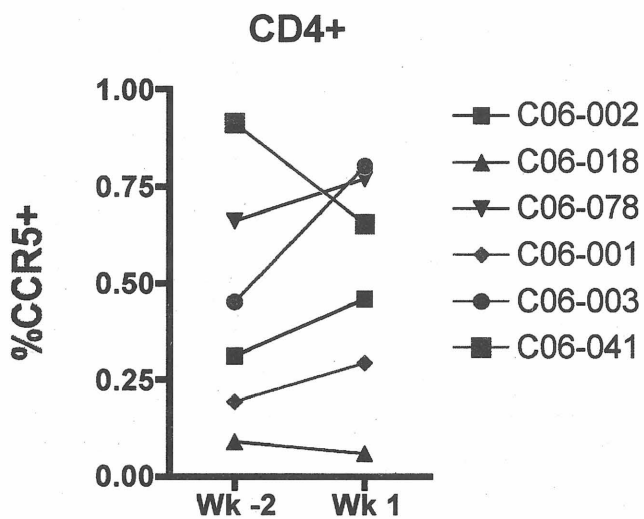


図3. 末梢血中 SIV 標的細胞率の、ワクチン投与による変化
CD4 陽性細胞中の CCR5 陽性細胞率の、SeV-Gag 投与 2 週前および 1 週後の比較を示す。