

200932024A

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

HIV の感染防止、AIDS 発症防止に関する免疫学的基礎研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山本 直樹

平成22年3月

目 次

I.	総括研究報告書	
	HIV の感染防止、AIDS 発症防止に関する免疫学的基礎研究	・・・ 1
	山本 直樹 (国立感染症研究所 エイズ研究センター長)	
II.	分担研究報告書	
1	組換え BCG/弱毒ワクシニアによるプライム/ブースト型 HIV ワクチンの研究	・・・ 13
	山本 直樹 (国立感染症研究所 エイズ研究センター長)	
2	汎 HIV-1 株中和能を有する抗体誘導に関する研究	・・・ 17
	駒野 淳 (国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官)	
3	HIV 感染防止粘膜ワクチンの創製	・・・ 25
	庄司 省三 (熊本大学 名誉教授、熊本保健科学大学 教授)	
4	HIV の動的超分子機構をターゲットとした阻害剤・抗体の創製	・・・ 31
	玉村 啓和 (東京医科歯科大学学生体材料工学研究所 教授)	
5	弱毒ワクシニアベクターによるエイズワクチン開発	・・・ 47
	志田 壽利 (北海道大学遺伝子病制御研究所 教授)	
6	生ワクチンにより誘導される感染防御の解析	・・・ 51
	森 一泰 (国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官)	
7	霊長類エイズモデルの粘膜部位における感染動態と免疫応答	・・・ 59
	三浦 智行 (京都大学ウイルス研究所 准教授)	
8	サルエイズモデルにおける粘膜免疫に関する研究	・・・ 63
	守屋 智草 (東京大学医科学研究所 特任研究員)	
9	サルエイズモデルを用いたアジュバント遺伝子組み込みエイズウイルスの ワクチン効果に関する研究	・・・ 67
	保富 康宏 (医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター センター長)	
10	粘膜免疫活性化による粘膜棲息型 HIV 制御法の開発：NKT 細胞を介した 感染伝播の可能性	・・・ 75
	高橋 秀実 (日本医科大学微生物学免疫学教室 教授)	
11	エイズワクチンを目指した HIV-1 gag 発現組換えバキュロウイルス粒子の 構築と免疫応答の誘導能	・・・ 81
	高久 洋 (千葉工業大学工学部 教授)	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	・・・ 85
IV.	研究成果の刊行物・別刷 (抜粋)	・・・ 93

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
総括研究報告書

HIV の感染防止、AIDS 発症防止に関する免疫学的基礎研究

研究代表者 山本 直樹 国立感染症研究所エイズ研究センター長

研究要旨：HIV-1 感染に対する有効な感染予防、発症予防、さらには治療用ワクチンの開発を目的として研究を遂行し、以下の結果を得た：

1. 中和抗体誘導と抗原デザイン

コドン至適化した組換え BCG では組換えプラスミドが不安定で、液体培養中に速やかに欠失を起こしてしまうことから、実用化は難しいと考えられていた。今回、コドン至適化以外で外来抗原発現を増強できる方法を検討し、プラスミドのレプリコンに変異を導入した高コピー変異型プラスミドを用いると、オリジナルのプラスミドを用いた場合よりも BCG での HIV-1 Gag の発現レベルが約 10 倍上昇するにもかかわらず、組換えプラスミドが安定に保持されることがわかった。

SIVmac239 外被糖タンパク質 (gp140)、サル CCR5 の UPA に対する自己抗体を誘導する抗原 Rh-cDDR5、M 細胞標的分子 TGDK、及びアジュバントとして CpG-ODN を結合した Senju vaccine を接種したアカゲザルで誘導された抗体の *in vitro* におけるウイルス感染防止効果を検討した。その結果、誘導された抗体により、SIVmac239 の感染が阻害された。また興味深いことに HIV-1 の R5 株 (JR-FL) および X4 株 (LAV) の感染を防止することが示された。

gp41-N36 の 3 量体についてはマウスで中和抗体の創製を確認し、gp41-C34 の 3 量体の創製にも成功した。コレセプター CXCR4 の N 端、細胞外ループは効率的な合成法により、MAP に導入し、マウスでの評価も行った。gp120 エピトープもファージでの抗体作製に成功した。また、CD4 mimic 誘導体の gp120 の構造変化誘起能に関する構造活性相関を検討し、CXCR4 アンタゴニスト T140 誘導体とのハイブリッド分子の創製に成功した。

日本人血友病 HIV 感染者に見いだされた汎 HIV-1 株中和能の解析とワクチンデザインに必須であるエンベロープタンパク質の構造をワクチン標的となるエピトープ間相互作用を通じて理解するための研究を行った。その結果、汎 HIV-1 株中和能を持つ液性免疫には個体差があり、汎 HIV-1 株中和能を持つ液性免疫誘導の方法は限定されたものではないことが示唆された。エイズワクチンによる汎 HIV-1 株中和液性免疫誘導には複数の方法が可能であることが示唆された。

2. ワクシニアウイルスベクター

安全で免疫原性の高い HIV ワクチンを作成する為に、我々の開発したワクシニア m8Δ株と高発現プロモーター pSFJ1-10 を用いた組換えワクシニア (RVV) を作成した。とくに、CD40Lm と HIV env、Ag85B と SIVgag を共発現させることによるアジュバント効果を細胞性免疫・抗体誘導能の両面から検討した。

3. 生ワクチン、CTL、Immune correlates

異なるサブタイプに属する SIV によるチャレンジ実験から、慢性感染制御が異なる 2 群のアカゲザルの存在を明らかにし、細胞性免疫の解析を行った。SIV 特異的 T 細胞のレベルに有意な差は見られなかったが、IL-15 に対する反応性を持つ免疫細胞のレベルに違いを見いだした。細胞内サイトカインの解析から、CD8+T 細胞と NK 細胞において IL-15 刺激により IFN-gamma の産生、エフェクター機能を示す CD107a 陽性細胞を確認した。

腸管親和性があり、ヒトのモデルにより近いと期待される CCR5 指向性 SHIV を新規に作製し、アカゲザルに順化させることに成功した。

センダイウイルスを基盤とする CTL 誘導型エイズワクチンのプロトコールで使用してきた経鼻投与によるカニクイサルでの検討において、その免疫誘導効率を筋肉内接種の場合と比較し、さらに粘膜周辺のリンパ節内の抗原特異的免疫誘導を検討することにより、粘膜近傍での抗原特異的免疫反応を検討

した。全てのサルで抗原特異的またはベクター特異的な免疫誘導が確認され、センダイウイルスベクターの接種による粘膜免疫誘導の可能性が示唆され、さらに当該ワクチンの筋肉内投与の選択の可能性も示唆された。

4. 自然免疫とアジュバント

構築した SHIV-Ag85B は、in vitro においてヒトリンパ球系細胞株に感染させたところ、ウイルス構造タンパク (Gag、Env) および Ag85B の発現が確認された。また SHIV-Ag85B のウイルス複製能について、親株である SHIV-NI と比較検討したところ、同程度の増殖能を示した。さらに、組み込んだ Ag85B 遺伝子は、10 回のウイルス継代を行ってもウイルス内に保存されており、また Ag85B タンパクの発現も認められた。

粘膜組織内に棲息し、HIV-1 初期感染に関与する DC-NKT 細胞を主体とした CD1 分子に拘束された自然免疫システムが、HIV-1 の長期的な保護、ならびに感染拡大に強く関与することが判明した。この DC-NKT システムにおける HIV の制御はエイズ制圧のための新たな手だてを提供する可能性を秘めている。

HIV-1 Gag 発現バキュロウイルスはヒト樹状細胞を活性化させ、HIV-1 の抑制効果が認められたことから、この組み換えバキュロウイルスが新規の HIV-1 ワクチンとしての可能性が示唆された。

以上の結果はいずれも重要な新知見であり、今後の HIV-1 ワクチン開発研究に貢献するところ大と考える。

研究分担者

駒野 淳 (国立感染症研究所エイズ研究センター
主任研究官)

庄司省三 (熊本大学 名誉教授、熊本保健科学大学
教授)

玉村啓和 (東京医科歯科大学生体材料工学研究所
教授)

志田壽利 (北海道大学遺伝子病制御研究所 教授)

森 一泰 (国立感染症研究所エイズ研究センター
主任研究官)

三浦智行 (京都大学ウイルス研究所 准教授)

守屋智草 (東京大学医科学研究所 特任研究員)

保富康宏 (医薬基盤研究所霊長類医学研究
センター センター長)

高橋秀実 (日本医科大学微生物学免疫学教室
教授)

高久 洋 (千葉工業大学工学部 教授)

A. 研究目的

HIV/AIDS の世界的拡大の中で、ワクチンの必要性については説明を要しない。しかし 2008 年のメルク社の STEP Trial (組換えアデノウイルスワクチン)の失敗によって、HIV 特異的細胞性免疫

(主にキラーT 細胞) の誘導に主眼を置いたエイズワクチン開発の方向性が揺らいでいる。また、昨年 10 月に発表されたタイでの第三相臨床試験 (組換えカナリーボックス+gp120 プライムブーストワクチン) の結果は、有意な HIV 感染率抑制を示し、感染予防ワクチンの実現性に期待を持たせるものであったが、ワクチン接種による HIV 特異的免疫応答の誘導は微弱であり、疑問が残る結果となった。これらベクターワクチンによる細胞性免疫誘導と並び、Env 抗原を標的とするウイルス中和抗体産生を目指したワクチンの開発も極めて重要な課題であるが、broad な HIV 中和能を持つヒトモノクローナル抗体が HIV 感染者から分離できるものの、ワクチン接種によってこの種の抗体をドミナントに産生させることに成功した例はない。このため有識者からは、基礎研究の重要性とともに、これまでとは違う革新的な予防治療戦略が必要なことが改めて強調されている。本研究班では、まずウイルスの多少の変異に対しても幅広く反応できる中和抗体をいかにして誘導させるかという大きな問題を解決するために、rBCG/rVV ワクチンの免疫原性を増強するための改良研究、高い効率かつ高い抗体価で長期間維持

できるような中和抗体誘導法の確立、コレセプター-CXCR4 の阻害剤、CD4 ミミック、膜融合阻害剤や特異的抗体を誘導する抗原分子の創製、Senju-Vaccine 刺激により、HIV を粘膜で完全に防御する方法の確立を目指した。また新たなベクターとして、ワクシニアウイルス(VV)m8delta 株組み換えワクチンの開発とその免疫誘導能と感染制御/発症阻止効果の検討を行った。一方、すべての CTL の反応が機能的に同じでないことから、どれが実際に HIV 複製を制御できる細胞反応がいかなるものかを知る必要がある。このため、低病原性 SIV や糖鎖変異生ワクチンを用いて、自然免疫、獲得免疫、感染標的細胞ウイルス感染抵抗性について解析して、ウイルス制御に決定的な役割を果たしている免疫系細胞群を同定し、その性状を明らかにすることによって安全で有効なワクチン開発あるいはエイズ発症阻止技術の開発に応用することを試みた。また、SHIV の nef を欠損させ、その部位にアジュバント活性を持つ抗酸菌 Ag85B 遺伝子を挿入したアジュバント分子組み込み弱毒生ワクチンの開発や、組み換えバキュロウイルス粒子による自然および適応免疫応答の解析とエイズワクチンとしての開発を検討、さらには粘膜組織における HIV 感受性細胞群の相互作用を明らかにするとともに、自然免疫系の関与について検討を加えた。

B. 研究方法

1. 中和抗体誘導と抗原デザイン

BCG での Env 高発現系を確立するために、種々の改変型/env/遺伝子を作製し、BCG で安定に発現できるフォームを確定する。そのため BCG での外来遺伝子発現系の改良を、抗原分泌系の検討も含めて行った。また、Gag と Env を同時に発現する rBCG 株の構築も検討した。得られた rBCG および rVV 候補ワクチンそれぞれの単独およびプライムブーストによる免疫誘導能を、マウス、モルモット及びサルを用い中和抗体産生誘導能と細胞性免疫誘導能の評価を行った (山本)。

Senju ワクチンをアカゲザル(メス、総数 20 頭)に皮下注射して、血中及び膿粘液中に環状ペプチ

ド・gp140 に対する中和抗体の産生を確認し、さらに gp140 のない Escort protein Senju ワクチン刺激による中和抗体の誘導を確認した。また、腸溶カプセルにつめ、経口投与し、経口ワクチンの実験を継続中した (庄司)。

現在持っている阻害剤や抗体誘導の抗原分子の最適化を行った。そして、異なるステップをターゲットとする阻害剤同士で併用を試み、相乗効果を観察した。顕著な相乗効果が得られた組み合わせに関して、コンジュゲートの作製を検討した。また、我々が人工的に作製した CXCR4 や gp120, gp41 を認識する抗体と各種阻害剤との併用効果を調べた (玉村)。

gp41IMPER 認識中和抗体、V3 認識型中和抗体、CD4BS 認識型中和抗体、ヒト由来抗 CD4 認識型中和抗体等について抗体遺伝子、エピトープの性質、中和のメカニズムを詳細に解析した。さらに、上記研究結果をもとに抗原をデザインし小動物 (マウス、ウサギ) における中和抗体誘導法を確立を検討した (駒野)。

2. ワクシニアウイルスベクター

SIV Gag 発現 BCG と m8 をプライム/ブースト法でサルに接種し、T 細胞免疫を測定後、SIV を攻撃接種して体内ウイルス量を測定した。gag 以外の HIV/SIV 遺伝子を組み込み、小動物実験での免疫誘導能を評価した。免疫増強因子 CD40Lm や Ag85B と SIV 遺伝子共発現ベクターを作製し、小動物実験での免疫誘導能を評価した。最終年度に BCG ベクターとの prime-boost も行う予定である (志田)。

3. 生ワクチン、CTL、Immune correlates

MHC 等の遺伝的背景を考慮し、生ワクチン感作動物、病原性ウイルス感染後早期治療動物の自然免疫と獲得免疫応答について、ワクチン接種時、初期感染制御時、感染制御時、ウイルスチャレンジ後について自然免疫、細胞性免疫、液性免疫、感染標的細胞のウイルス感染感受性などを検討した (森)。

ゲノム改変により種々の病態を呈する

SIV/SHIV を得るべく検討を行った。異なる病態を示す霊長類エイズモデル系においてウイルス感染後の早期（1～2ヶ月）に、粘膜部位（腸管と肺）や深部リンパ系組織におけるウイルス感染動態と免疫細胞応答を経時的に詳細に解析することによって、ウイルス制御機構や病態制御機構が成立する過程を明らかにした（三浦）。

サルにおいて、SIV 感染実験あるいは DNA ワクチン接種実験を様々な経路で行い、誘導される粘膜免疫反応を解析した。SIV 感染あるいはワクチン接種後、比較的短期間の時点でサルを安楽殺後解剖し、腸管等の粘膜組織および粘膜下リンパ組織を採取し、抗原特異的 T リンパ球反応および IgA 反応の解析を行った（守屋）。

4. 自然免疫とアジュバント

SHIV の nef 領域に Ag85B 遺伝子を組み込んだ SHIV-A g 85B を作製した。in vitro でのウイルスの増殖に問題がないことを確認後、カニクイザルに接種し in vivo でのウイルスの増殖を検討した。これら SHIV-A g 85B 投与ザルにおいて強毒性 SHIV を投与し、防御効果を検討した（保富）。

HAART 治療により血中ウイルス量が検出感度以下となった患者の消化管粘膜組織を採取し、P24 抗原を指標として HIV 感染細胞の実態を Flow-cytometry を用いて解析した。次ぎに感染細胞を集め分画後、プロウイルス DNA を、HAART 治療前のウイルス株と比較検討した（高橋）。構築したバキュロウイルス粒子でヒト樹状細胞への感染を試み、細胞表面分子、サイトカインの発現等を確認する事で免疫細胞の活性化を検討した。また粒子による INF α の誘導および APOBEC ファミリー発現を検討するとともに抗 HIV-1 効果を検討した。さらにバキュロウイルス粒子による Hsp70 発現を通した NK 細胞の活性化機構を検討した（高久）。

（倫理面への配慮）

本研究では遺伝子組換え実験、病原体の使用、動物実験を用いることから、研究者が所属する機関の組換え DNA 実験安全委員会、バイオセーフ

ティ委員会、動物実験委員会、医学研究倫理委員会等の承認・認可を得て実験を行なった。また臨床サンプルの解析及びデータの公表にあたっては、倫理委員会の規則にのっとり、当該患者（感染者）の同意を得た上で行う予定である。動物実験は、「動物愛護の精神」を遵守し、極力動物の苦痛軽減を配慮して行った。細胞移植、採血、剖検の際は、必ず十分量の麻酔薬などにより、動物が眠っていることを確認してから行っている。

C. 研究結果

テーマと得られた結果は膨大かつ多岐にわたるため、個別に分類して述べる。

1. 中和抗体誘導と抗原デザイン

山本：

1) 高コピー変異型 BCG ベクターの構築

変異型 pSO246R は、元の pSO246 と比較して、*M. smegmatis* では約 5 倍、BCG では 3-4 倍にコピー数が増加していた。この値は、Bourn らの報告 [Tuberculosis (2007)] にほぼ一致していた。

2) Gag 発現レベルの比較・検討

コドンに至適化した gag 遺伝子を用いた場合、pSO246 では組換え体が得られたが、pSO246R では得られなかった。pNL4-3 由来の野生型 gag 遺伝子を antigen 85B 分泌シグナルに繋いだ場合、pSO246R を用いても組換え体が得られ、pSO246 を用いた場合よりも lysate および培養上清において約 10 倍の Gag を発現していることがわかった。これは、コドン至適化による発現増強に匹敵するレベルであった。

3) 組換え BCG でのプラスミド安定性評価

Gag 高発現株が得られた pSO-A717N-gagB (blaF signal + コドン至適化 gag 遺伝子)、及び pSOR-240S-NLgagB (antigen 85B signal + 野生型 gag) の二種の組換え BCG 株での、液体培養時のプラスミドの安定性を調べたところ、pSO-A717N-gagB で欠失が認められたが、pSOR-240S-NLgagB では欠失は見られず、高コピー型プラスミドを用いると、コドン至適化に匹敵する発現レベルが得られるにもかかわらず、組換えプラスミドは安定であることが判った。

庄司：

1) 皮下投与アカゲザルの血清中の抗 gp140 抗体価の測定

アカゲザル鼠径部へ Senju vaccine を皮下免疫したところ、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 辺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。

2) 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

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。また、12、及び 23 weeks のサンプルで感染阻害効果が観察され、23 weeks サンプルにおいて顕著であった。

3) 経口投与アカゲザルの糞便中の抗 Rh-cDDR5 IgA の抗体価の測定

採取した糞便中の抗 Rh-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 Repeated Measures 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 週の間有意差が認められた。一方、コントロール群では有意差は認められなかった。

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

糞便中に確認された抗 Rh-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。

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

糞便中の抗 Rh-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 Rh-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、さらに初回免疫後 20 weeks の血清中の抗 Rh-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。

玉村：

1) gp41 のヘリカル領域の合成ペプチド(N および C 端側)3 量体の合成と抗体誘導

マウスで免疫し N36 の 3 量体を認識する抗体が誘導できたことを ELISA で確認し、N36 の 3 量体で免役して得られた血清は 3 量体を特異的に認識することを見出している。得られた抗体の中和活性を評価したところ、単量体で免疫して得られた血清と比較したところ、強い中和活性が得られた。

2) gp120 の CD4 binding/コレセプター-binding 領域を抗原として抗体誘導の検討

この抗原分子に特異的に結合する抗体を得るため、ファージディスプレイライブラリーから in vitro アフィニティー選択を行った。その結果、アフィニティーを持ったクローンが得られた。現在、そのモノクローナル抗体を作製中である。

3) コレセプター CXCR4 の細胞外ループ(Ecl1-Ecl3 & N 端)を基にした抗原分子作製&抗体誘導

N 端の細胞外 CXCR4 に関しては 3 つの断片(Nt-1, Nt-2, Nt-3)に分割して(10 残基オーバーラップさせて)、合成した。Nt-2, Nt-3 に親水性領域を付加し、MAP テンプレート上に構築した。これらの抗原分子(Nt-2 と Nt-3 の 4 置換体)をマウスに免疫し、抗体誘導を行ったが、Nt-3 の 4 置換体の方が、効率よく抗体誘導されていることがわかった。その抗 HIV 活性に関して、現在検討中である。価数による N 末端抗原ペプチドの抗体誘導能の変化を比較すると 4 価型(テトラマー) Nt-3 で抗体誘導が示された。

4) CD4 mimic 誘導体の合成と抗 HIV 活性の評価および中和抗体等との併用効果および CD4 mimic と T140 との hybrid の合成

CD4 mimic 誘導体において、ピペリジン環および二級アミンを用いた gp120 構造変化誘起能に関

する構造活性相関を調べた。その結果、有意な gp120 構造変化誘起能が見られた誘導体は共通してピペリジン環構造を有していた。さらに、上記で得られた CD4 mimic と CXCR4 アンタゴニスト T140 誘導体 4F-benzoyl-TZ14011 とのハイブリッドの創製に関し 3 種の長さのリンカーで比較評価し、抗 HIV-1 活性が nM レベルまで向上したハイブリッド分子の創製に成功した。

駒野：

日本人血友病 HIV 感染者においてクレード A,B,C を中和する液性免疫を持つ症例を複数同定した。各血漿は SF162 に対して 4 万倍を超える 50% 中和血漿希釈倍率を示した。それぞれ Tire2 ウイルスに対する 50% 中和血漿希釈倍率は、数十から千倍の範囲だった。クレード B に対する中和能は他のクレードよりも高い傾向にあった。各ウイルスに対する中和プロファイルと 50% 中和血漿希釈倍率を比較する事により、長期間エイズ発症から免れている日本人血友病 HIV 感染者で検出される HIV 株中和能力は汎 HIV 株中和能として類似しているが、3 例の獲得した液性免疫は質的・量的に異なることが示唆された。

エンベロープの全長にわたって存在する 24 個の変異を検討した。この中で 2 倍以上中和感受性を上げるものは 9 個 (D163G, D163N, S186R, S248N, N297S, R300G, S302G, K428E, Q504R ; 27%) 存在した。これらの変異はエンベロープの V1/V2,C2,V3,C4,C5 の領域に存在し、V3 loop とエンベロープの各ドメインに steady-state 条件下で構造的・機能的な関係があることがわかった。

2. ワクシニアウイルスベクター

志田：

1) CD40Lm の抗 Env 免疫誘導への効果：

m8ΔHIVenv と m8ΔHIVenv-hCD40Lm の抗 EnvCTL 誘導能を比較する為に、Env 発現 plasmid とのプライムブースター法によってマウスを免疫し、ICS と CTL assay を行った。IFN- γ 産生 CD8 T 細胞数・細胞障害活性(CTL)共に CD40Lm 共発現によって有意な影響を受けなかった。また、抗 Env 抗体誘導に有意な変化がなかった。

2) Ag85B の抗 Gag 細胞性免疫誘導への効果

Ag85B の共発現によって IFN- γ 産生 CD8 T 細胞数、細胞障害活性ともに減少した。次いで、SIVgag 発現ワクシニアと Ag85B 単独発現ワクシニアを混ぜて接種することの効果調べたが、IFN- γ 産生 CD8 T 細胞数を減少させた。

3. 生ワクチン、CTL、Immune correlates

森：

1) 糖鎖変異生ワクチンの SIVsmE543 感染に対する効果

ワクチンとはサブタイプが異なる SIVsmE543 をチャレンジウイルスとして用いた。感染後 2 週をピークとする初期感染は 11 頭すべてで抑制された。7 頭では引き続きウイルス感染が抑制された。この群を制御群(Controller)とする。残り 4 頭では持続的なウイルス感染が起こった。この群を非制御群(Controller)とする。この 2 群について宿主応答の違いについて解析を行った。

2) ウイルス特異的細胞性免疫の解析

トータルの IFN- γ 産生細胞レベルでは、Controller は Non-controller と比べ高かった。しかし Mock (ペプチド刺激なしの条件) で IFN- γ を産生する細胞数が多い個体が 7 頭中 4 頭 (Mm0517, Mm0301, Mm0303, Mm0511) 確認された。これらの個体では Mock 細胞数を除いた結果であるウイルス特異的細胞数は Non-controller と比べて有意な違いは見られなかった。

3) IL-15, IL-7 反応性細胞の解析

Controller の 4 頭(Mm0303, Mm0517, Mm0516, Mm0512)は Non-controller と比べ IL-7, IL-15 レベルが高く、残り 3 頭は Non-controller と同程度のレベルであった。またチャレンジ感染による CD16+NK 細胞の上昇は Mm0516, Mm0301 において確認された。IL-15, IL-7 反応性細胞と CD16+NK 細胞との関連性は見られなかった。

三浦：

高病原性 X4 指向性 SHIV-KS661 の V3 領域に 5 箇所のアミノ酸変異を導入し、共受容体指向性を R5 型にしたウイルスを作製した。作製した変異体ウイルスは、試験管内でサル細胞で複製可能で

あり、R5 指向性を示すことが確認された。このことから、アカゲザルに安定して感染し、複製する R5 指向性 SHIV-MK38 株を樹立できた。

守屋：

1 回目の筋注後の末梢血の SIV Gag 特異的リンパ球反応のレベルは、これまで当研究室で行ってきた経鼻接種による検討で誘導されたレベルとほぼ同等であった。2 回目の接種経路を筋注または経鼻により行ったところ、両群のブースト効果の顕著な差は認められなかった。安楽死時の顎下リンパ節、扁桃、腸管粘膜組織リンパ節内に SIV Gag 特異的リンパ球反応が検出され、また SeV 特異的な反応も同様に検出された。2 回目のブースト時の血漿中の SeV 中和抗体の活性は、25 倍から 200 倍であったが、接種後の SIV Gag または SeV 特異的リンパ球反応のレベルとの相関は見られなかった。

4. 自然免疫とアジュバント

保富：

1) SHIV-Ag85B ウイルス構築

作製したプラスミドベクターを霊長類由来株化細胞にトランスフェクトし、SHIV-Ag85B ウイルスの回収を行った。回収したウイルスは、抗マウス p27 抗体、抗ヤギ gp120 抗体、抗ウサギ Ag85B 抗体をそれぞれ用いて、Western Blotting を行ったところ Gag、Env、Ag85B タンパクの発現をそれぞれ確認した。

2) SHIV-Ag85B ウイルス複製能

構築した SHIV-Ag85B のウイルス複製能を親株 SHIV-NI と比較検討したところ、ほぼ同じ複製能を有していることが明らかになった。

3) SHIV-Ag85B の挿入遺伝子の安定性

SHIV-Ag85B のウイルス継代を 10 代まで継代し、挿入した遺伝子の保存状況を RT-PCR 法で検討したところ、Ag85B 遺伝子の保存が確認された。また Ag85B タンパクの発現についても、Western Blotting で検討したところ、タンパクの発現が認められた。

高橋：

HIV-1 感染により CD4 陽性 NKT 細胞は、減少

もせずその細胞傷害性も残存することが明らかとなった、そこで、HIV-1 の存在下で末梢血単核球に α -GalCer を加え培養を試みた結果、R5-type である NL(AD8)株を添加した場合、X4-type の NL4-3 を添加培養した結果に比較し、選択的に HIV-1 に感染した CD4 陽性 NKT 細胞が増加していた。以上の結果は、CD4 陽性 NKT 細胞が R5-type HIV-1 へのより強い感受性を有していること、そして HIV-1 に感染することが、体内においては生存への道となることを強く示唆している。そこで、NKT 細胞上の CXCR5 と CCR5 との発現を検索したところ、末梢血にスーパー抗原を添加することによって誘導した CD4 陽性 T 細胞とは逆に、NKT 細胞上では CCR5 の優位な発現が認められた。

高久：

ウイルス粒子表面に HIV-1 gag タンパク質を提示した組み換えバキュロウイルス(Ac/gp64-gag)を作製し、ウエスタンブロットにて Gag タンパク質の発現を確認し AcCAG-gag-puro または AcCAG-PGKpuro をヒト抹消単核球由来樹状細胞に感染させ、活性化マーカーである MHC クラス I、II、CD80 及び CD86 の発現上昇が FACS にて確認された。また、ELISA にて培養上清中のサイトカイン IL-15、IFN- α 及び IFN- γ の産生が認められた。さらに、抗ウイルス因子である APOBEC3F 及び 3G の発現が RT-PCR 及びウエスタンブロットにて発現上昇が認められた。ヒト樹状細胞に AcCAGgag-puro または AcCAG-PGKpuro を感染させたのち、この細胞へ HIV-1 JR-CSF 株を感染させ、p24 タンパク質を定量し AcCAGgag-puro 感染樹状細胞において、非感染 AcCAG-PGKpuro 感染樹状細胞と比較して、優位に p24 量の減少が認められた。

D. 考察

本研究においては、我が国の HIV/エイズワクチンの専門家を多方面から動員し、幅広い中和能を有する抗体誘導についての研究、Immune correlates や T 細胞媒介性 HIV 制御についての問題研究、新しいベクター開発研究、自然免疫とアジュバントなどの研究を包括的に行った。

1. 中和抗体誘導と抗原デザイン

山本：

コドン至適化は BCG ベクターの免疫原性を高めるための有効な方法だが、発現レベルが BCG 菌体にとって不都合な程度にまで上昇してしまうとストレスにより、プラスミドを排除してしまう傾向にある。しかし、今回開発した多コピー変異プラスミドを用いると、コドン至適化に匹敵する Gag 発現増強効果が得られる上に、菌体内でプラスミドベクターも安定に保持されており、実用上極めて有用なツールになるものと期待される。

庄司：

Senju vaccine 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、Senju vaccine は優れた免疫原性を有していることが示唆された。また血清中の抗 gp140 抗体が SIVmac239 のみならず、HIV-1JR-FL 株および HIV-1LAV の感染も阻害したことから、誘導された抗体には、レンチウイルスの外皮糖タンパク質に共通の構造を認識する抗体が含まれていると考えられた。例えば糖鎖構造を認識する抗体による感染防止の可能性が考えられた。

玉村：

前年度からエイズワクチン開発のためアプローチした4種のターゲットはいずれも革新的、斬新なアイデアに基づいている。創薬化学・ペプチド合成の巧みな技術を用い、抗原分子等を順調に合成できた。実際のマウスでの免疫による抗体誘導の実験に加え、ファージディスプレイライブラリーを使った抗体のセレクションも行った；

1) gp41 のヘリカル領域の合成ペプチド

親水性領域を付加した N36 3 量体のマウスでの中和抗体誘導に成功し、今後最適化を検討することにより、有用なワクチンになる可能性がある。C34 についても親水性領域を付加した C34 の抗原ペプチドの 3 量体の構築に成功した。

2) gp120 の CD4 binding/コレセプター-binding 領域

構造を固定化した環状抗原ペプチドの抗体誘導能をファージディスプレイライブラリーでの

セレクションを用いて、アフィニティーの高い抗体を得、モノクローナル抗体の創製等を検討している。

3) コレセプター CXCR4 の細胞外ループ (Ecl1-Ecl3 & N 端)

N 端ペプチドについては抗原分子(Nt-2 と Nt-3 の 4 置換体)を構築し、マウスに免疫し、抗体誘導を行った。Nt-3 の 4 置換体は効率よく抗体誘導された。Ecl に関しては、親水性領域を付加することにより、環化を効率的に進行させることができた。MAP-テンプレートに導入も成功し、現在マウスに免疫している。

4) CD4 mimic 誘導體

構造活性相関により、CD4 mimic 誘導體のピペリジン環部のテトラメチル基除去による gp120 構造変化誘起能への影響は見られなかった。また、有意な gp120 構造変化誘起能が見られた誘導體は共通してピペリジン環構造を有していた。gp120 の構造変化を誘起し抗体との反応性を向上させることは、今後の抗体医薬・ワクチン療法において有用な知見を与える。さらに、抗 HIV-1 活性が nM レベルまで向上した CD4 mimic と CXCR4 アンタゴニスト T140 誘導體のハイブリッド分子の創製に成功した。

駒野：

近年 V3 loop を認識してクレードを超えたウイルス株を中和できる抗体が分離された(Gorny et al, 2002 J Virol; Zolla-Pazner et al, 2004 AHR; Gorny et al, 2006 J Virol)。これは中和エピトープとしての V3 loop を再評価すべきであることを示唆している。その背景の一つは、V3 loop に対する中和抗体は他の中和エピトープに対する抗体よりも比較的容易に誘導ができるためである(ex. Eda et al, J Virol 2006)。これを新たな抗原構造の理解に基づき注意深く改良すれば汎 HIV 株中和能力を持つ液性免疫を誘導する事ができるかもしれない。また V3 loop に対する中和抗体の作用機序はエンベロープタンパク質を CD4 または co-receptor に結合させなくすると考えられてきたが、その作用機序の詳細は不明である。我々の研究結果により、V3 loop への結合を介して CD4SB の構造に影響し、

エンベロープと CD4 との結合を阻害する可能性が新たに示唆された。

さらに我々は中和抗体の感受性を指標として液性免疫誘導型ワクチン抗原であるエンベロープタンパク質の機能・構造相関を明らかにした。我々の研究アプローチが抗原の理解にとって重要な位置づけにあるのは、既法では極めて困難であった定常状態で native conformation における中和エピトープ間の機能・構造相関を明らかにできたことにある。エンベロープタンパク質の構造は不定形であり、各ドメインが自由な動的特性を持つと考えられてきた。しかし、実際にはタンパク質の機能を保存するためある程度動的挙動は制約されなければならない。我々の研究結果によりエンベロープタンパク質の各ドメインが定常状態で互いに密な相互作用を持っており、これが立体構造を維持するために重要である事が示された。これはエンベロープタンパク質の立体構造が想像以上に rigid であり、局所の自由な動的振舞いは極めて限定的である事を示唆している。さらに、仮に一本のポリペプチド鎖にある抗原アミノ酸配列でも、V3 loop の中和エピトープは conformational epitope であり、これまで考えられてきたような linear epitope ではないことが示唆される。

2. ワクシニアウイルスベクター

志田：

今年度、DNA ワクチンの系では細胞性と体液性免疫の両方に著しい増強効果を示した CD40Lm と Ag85B を共発現する組換えワクシニアを作製して、その効果を調べた。しかし、CD40Lm、Ag85B 共発現ワクシニアは意に反して免疫増強効果を示さなかった。特に Ag85B は共発現、混合免疫の両方のワクチネーションにおいて免疫抑制効果を示した。他方、CD40Lm には免疫抑制効果もなかった。この原因として CD40L はプライミングの段階で作用することが、班会議の場で指摘された。今後、免疫スケジュールを変えて、さらに CD40Lm の効果を検討したい。

3. 生ワクチン、CTL、Immune correlates

森：

生ワクチンが誘導する極めて高い感染防御のメカニズムはエイズワクチン開発研究のブレークスルーとなることが期待される。我々は糖鎖修飾変異生ワクチンがウイルス多様性に対応可能な防御免疫を誘導する可能性を明らかにした。とくに感染宿主にはウイルス特異的 T 細胞が誘導されるが、controller と Non-controller の比較解析から IL-15 等のリンパ球の活性化・増殖に働くサイトカインに反応する細胞が controller に誘導されていることが明らかとなった。IL-15 はウイルス感染により活性化された DC/マクロファージ等の自然免疫系細胞により分泌され、NK 細胞、CD8+T 細胞を活性化しエフェクター機能を誘導する。感染制御グループにおいて IL-15 反応性細胞の頻度が高いことは、これらの細胞が感染制御に働いていることを示す。NK 細胞誘導、IL-15 レセプターの発現等による慢性感染制御の機序が推測される。

エイズウイルス慢性感染における CTL の役割は CD8 抗体による CD8+細胞消失によるウイルス感染上昇が証拠となっている。しかし CD8+細胞の消失実験の結果は Controller から IL-15 反応性細胞が消失した状態、すなわち Non-controller になったことを意味する。ウイルス特異的 T 細胞が維持されている条件においても IL-15 反応性細胞のレベルが低下すると感染制御ができなくなることが推察される。

三浦：

同一の遺伝的バックボーンを持つ CXCR4 指向性 SHIV と CCR5 指向性 SHIV が得られた。これらのウイルスが引き起こす病態の違いをアカゲザル感染実験により解析することで、セカンドレセプター指向性と感染個体における病原性の関係を明らかにできるものと期待される。特に CCR5 指向性 SHIV は HIV-1 の病態をより忠実にサルで再現すると考えられ、候補ワクチン評価に有用なモデルとなると期待される。

守屋：

センダイウイルスベクターでは、筋肉内接種に

より経鼻接種と同レベルの Gag 特異的免疫反応誘導が末梢血で見られたこと、また2回の接種後に粘膜周辺のリンパ節組織内に Gag 特異的リンパ球の誘導が確認できたことにより、当該プロトコールは筋注により行うことも可能であることと、また当該プロトコールによる粘膜免疫反応誘導の可能性が示唆された。今後、経鼻投与による局所での免疫誘導の直接的な検討、すなわち腸管組織内のリンパ球での同様の検討や、鼻腔粘膜の抗原特異的 IgA 誘導の検討等を行うことが必要である。

ウイルスベクターを基盤とするワクチンの使用に於いては、ウイルスベクターに対する宿主の免疫応答の、2回目以降の接種によるワクチン効果への修飾について留意する必要がある。今回の検討では1回目の接種で誘導された抗ベクター抗体の影響は確認できなかったが、末梢血抗ベクター中和抗体価が200倍以上で末梢血血漿中の抗原特異的 CTL 誘導に影響が認められる結果も他の検討で得ており、接種量を増大させたり、接種回数を増やす等、中和抗体価が200倍以上での検討が肝要である。また粘膜局所での抗ベクター抗体の質および量の分布の詳細は未知であり、検討が必要である。さらにセンダイウイルスはマウスを自然宿主とするが、類縁のウイルスであるヒト1型パラインフルエンザウイルスに対する抗体のヒト集団での保有率、抗体のレベルを掌握し、本研究の結果とあわせて、当該ワクチンの効果を検討することが極めて重要であると考えられた。

4. 自然免疫とアジュバント

保富：

エイズウイルスに対する宿主の免疫誘導能を高めることを目的に、Ag85B アジュバントを結合したエイズ弱毒生ウイルスを作製し、エイズサルモデルにおいて誘導される免疫応答を解析することを目的とした。構築されたウイルスを *in vitro* での解析を行ったところ、構築したウイルスの複製能は、親株 SHIV-NI と同じであり、またウイルス Stock やウイルス Titer (SHIV-NI ; 10^6 TCID₅₀, SHIV-Ag85B ; 5×10^5 TCID₅₀) についても親株と同程度であることが認められた。ワクチンの安定性

についても、10代まで継代したウイルス内に Ag85B 遺伝子が保存され、さらにタンパクレベルでの発現が確認された。これらの結果から、構築したウイルスは、極めて安定な弱毒ウイルスであり、生ワクチンになりうる可能性が示唆された。今後は、カニクイザルを用いた動物接種試験を行い、誘導される細胞性免疫および液性免疫について詳細に解析し、さらに強毒株の攻撃接種を行う。高橋：

HIV-1 感染初期において、CD4 陽性 T 細胞にとっては比較的感受性の低い R5-type ウイルスが蔓延する理由は、NL(AD8)株などの粘膜より侵入した R5-type HIV-1 が、DC-SIGN 等を介して DC に捕捉された後、DC の表面に発現した種特異的な CD1d 分子を介し、その配下として働く NKT 細胞、特に CD4 陽性の NKT 細胞に選択的に伝播され、保持される。この R5-type HIV-1 はおそらく長期間に亘り DC-NKT 間を介して体内に保持されるものと推測される。一方 HAART 治療により、末梢血中のウイルス量が検出感度以下となっても、治療の中断によってウイルス量は速やかに元の状態となってしまう。この事実は、末梢血中のウイルスを制御できたとしても、どこかに HIV-1 が残存しており、それが治療の中断に伴って感染拡大を起こす可能性を示している。事実我々は、HAART 治療中の患者において、その粘膜組織内に棲息する DC-NKT 内に p24 抗原を発現した細胞群が残存していることを確認している。また本研究の結果、DC-NKT 内 X4-type の HIV-1 が潜入した場合、NKT は強烈な CD4 陽性 T 細胞への感染拡大を誘発する可能性があることが判明した。こうした粘膜組織に棲息する HIV-1 感受性のある CD4 陽性 NKT 細胞を制御するための手法の開発は、今後のエイズ制圧のための新たな手法を提供するものと考えられる。

高久：

HIV-1 gag 遺伝子及びピューロマイシン耐性遺伝子を導入した組み換えバキュロウイルス (AcCAGgag-puro、AcCAG-PGKpuro 及び Ac/gp64-gag) を作製し、ウエスタンブロットにより Gag タンパク質の発現を確認した。作製した組

み換えバキュロウイルスをヒト樹状細胞に感染させることにより、MHC 分子及び共刺激分子の発現上昇、IL-15、IFN- α 及び IFN- γ の産生が認められた。さらに抗ウイルス因子である APOBEC3F 及び 3G の発現上昇をウェスタンブロットにより確認した。上記の結果は組み換えバキュロウイルスの感染により樹状細胞から産生された IFN によるものと推測される。さらに AcCAGgag-puro 感染樹状細胞に HIV-1 JR-CSF を感染させると p24 量の減少が認められた事から AcCAGgag-puro 感染樹状細胞から産生された IFN 及び APOBEC3F、3G の発現上昇により抗 HIV-1 効果が表れたものと考察される。

E. 結論

HIV-1/エイズワクチンの開発は現在、人類が直面する、おそらくもっとも困難な医学的問題のひとつである。その有効な感染予防、発症予防、さらには治療用ワクチン開発を最終ゴールとして研究を遂行し、以下の貴重な情報が得られた。

1. 中和抗体誘導と抗原デザイン

—多コピー変異型プラスミドを用いることにより、安定にかつコドン最適化とほぼ同程度の増強効果で Gag 抗原を高発現できる BCG 株を得ることができた。今後、SIV Gag 発現株の改良に応用し、ワクシニアベクターとのプライムブーストワクチンの、サルエイズモデルでの防御能評価を行う予定である。

—Senju vaccine 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。

—各種のターゲットにおいて、人工抗原分子を順調に合成できた。gp41-N36 の 3 量体についてはマウスで中和抗体の創製を確認し、gp41-C34 の 3 量体の創製にも成功した。コレセプター CXCR4 の N 端、細胞外ループは効率的な合成法により、MAP に導入し、マウスでの評価も行った。gp120 エピトープもファージでの抗体作製に成功した。また、CD4 mimic 誘導体の gp120 の構造変化誘起能に関する構造活性相関を検討し、CXCR4 アンタゴニ

スト T140 誘導体とのハイブリッド分子の創製に成功した。これらの結果は今後の HIV 抗体・ワクチン療法の研究において、重要な知見となると思われる。Vpr 断片から IN 阻害活性を有するペプチドを見出し、Matrix 断片ペプチドより抗 HIV 活性を有する配列を見出した。これらは新規抗 HIV 剤創製に役立つと思われる。

—日本人で液性免疫誘導型エイズワクチンのモデルになる症例を同定した。汎 HIV-1 株中和能を持つ液性免疫には個体差があり、汎 HIV-1 株中和能を持つ液性免疫を誘導するための方法には複数のアプローチがあることが示唆された。中和エピトープとして知られる CD4 レセプター結合部位と V3 ループには定常状態で相互作用があり、中和感受性を相互に規定している可能性が示唆された。これらの研究結果は液性免疫誘導型エイズワクチン開発に大きな示唆を与えると考えられる。

2. ワクシニアウイルスベクター

—DNA ワクチンの系では細胞性と体液性免疫の両方に著しい増強効果を示した CD40Lm と Ag85B を共発現する組換えワクシニアを作製して、その効果を調べた。しかし、CD40Lm、Ag85B 共発現ワクシニアは意に反して免疫増強効果を示さなかった。

3. 生ワクチン、CTL、Immune correlates

—サブタイプが異なるチャレンジウイルスによる慢性感染の制御に働く細胞として IL-15 反応性 CD8+T 細胞、NK 細胞の役割が示唆された。

—腸管親和性があり、ヒトのモデルにより近いと期待される CCR5 指向性 SHIV を新規に作製し、アカゲザルに順化させることに成功した。

—SeV-Gag ベクターワクチン経鼻接種後、顎下リンパ節および扁桃中に、Gag 特異的 T リンパ球反応を確認することができ、粘膜免疫反応誘導の可能性が示唆された。

4. 自然免疫とアジュバント

—抗酸菌分泌タンパク Ag85B を発現する SHIV を

構築した。

—粘膜組織内に棲息し、HIV-1 初期感染に関与する DC-NKT 細胞を主体とした CD1 分子に拘束された自然免疫システムが、HIV-1 の長期的な保護、ならびに感染拡大に強く関与することが判明した。この DC-NKT システムにおける HIV の制御はエイズ制圧のための新たな手だてを提供する可能性を秘めている。

—HIV-1 Gag 発現バキュロウイルスはヒト樹状細胞を活性化させ、HIV-1 の抑制効果が認められたことから、この組み換えバキュロウイルスが新規の HIV-1 ワクチンとしての可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

各研究分担者の項を参照のこと

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

駒野 淳

- 1) Inventory of high-titer lentivirus production system by modifying the amino-terminus of Gag. Hideto Chono, Jun Komano, et al. (特願 2009-263587、出願 2009 年 11 月 19 日)

玉村啓和

- 1) HIV 立体構造認識抗体誘導ペプチド抗原、及びその合成方法. (特願 2009-120352)
- 2) CXCR4 多量体を認識する多価型 CXCR4 リガンド、及びその合成方法. (特願 2009-159771)

高久 洋

- 1) 医薬組成物を製造する方法. 高久 洋、鈴木 友幸、チャン ミン ウー他 2 名. (特願 2009-209318)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告書

組換え BCG/弱毒ワクシニアによるプライム/ブースト型 HIV ワクチンの研究

研究代表者 山本 直樹 国立感染症研究所エイズ研究センター長

研究協力者 松尾 和浩 国立感染症研究所エイズ研究センター 協力研究員

日本ビーシージー製造株式会社日本 BCG 研究所研究開発部 部長

研究要旨：

BCG ベクターは、その菌体自身のアジュバント作用や強力かつ持続的な Th1 型細胞性免疫誘導能に加え、安全かつ低価格で供給できることや新生児にも接種できるなど、実用面での極めて有用な性質を持っている。昨年度までの研究により、コドンに至適化した SIV gag 遺伝子を発現する組換え BCG でプライミングし、同じ抗原を発現する組換えワクシニア DIs で 2 回ブーストしたサルでは、ブースト後 3 年を経過しても SIV Gag 特異的なメモリー T 細胞を維持しており、その recall response により SIVmac 239 の high dose 経粘膜チャレンジを、部分的にはあるがコントロールできることが明らかとなった。しかしながら、コドン至適化した組換え BCG では組換えプラスミドが不安定で、液体培養中に速やかに欠失を起こしてしまうことから、実用化は難しいと考えられていた。今回、コドン至適化以外で外来抗原発現を増強できる方法を検討し、プラスミドのレプリコンに変異を導入した高コピー変異型プラスミドを用いると、オリジナルのプラスミドを用いた場合よりも BCG での HIV-1 Gag の発現レベルが約 10 倍上昇するにもかかわらず、組換えプラスミドが安定に保持されることがわかった。このベクターは、組換え BCG ベースの HIV ワクチン開発において、極めて有用であると期待される。

A. 研究目的

2008 年のメルク社の STEP Trial (組換えアデノウイルスワクチン)の失敗によって、HIV 特異的細胞性免疫 (主にキラー T 細胞) の誘導に主眼を置いたエイズワクチン開発の方向性が揺らいでいる。また、昨年 10 月に発表されたタイでの第三相臨床試験 (組換えカナリーボックス + gp120 プライムブーストワクチン) の結果は、有意な HIV 感染率抑制を示し、感染予防ワクチンの実現性に期待を持たせるものであったが、ワクチン接種による HIV 特異的免疫応答の誘導は微弱であり、疑問が残る結果となった。これらベクターワクチンによる細胞性免疫誘導と並び、Env 抗原を標的とするウイルス中和抗体産生を目指したワクチンの開発も極めて重要な課題であるが、broad な HIV 中和能を持つヒトモノクローナル抗体が HIV 感染者から分離できるものの、ワクチン接種によってこの種の抗体をドミナント

に産生させることに成功した例はない。

このような停滞した状況の中での我々が開発した BCG ベクターの位置づけは、より HIV 感染をコントロールするのに有効な細胞性免疫をプライミングできる可能性を持った、人で試されるべき新規ワクチンベクターということだろう。結核ワクチンとして安全性が担保されていることに加え、マウスやサルなどの実験動物よりも人の方が BCG に対する感受性が高いことから、人で用いてこそそのワクチンベクターである。昨年度までの結果から、コドン至適化を施して抗原発現が約 10 倍増強された rBCG-SIVgag をプライミングに用い、同じ抗原を発現する rVaccinia DIs で 2 回ブーストしたサルは、2 回目のブーストから 3 年後の SIVmac 239 high dose 経粘膜チャレンジに対して顕著な recall response を示し、少なくとも 3 年間はメモリー T 細胞を維持できることが判った。コントロールと比較してセットポイント

での血中ウイルス量は 100 倍弱程度抑制され、リンパ節での effector memory T 細胞の loss も抑制されていたことから、これまでに例を見ない長期間のワクチン効果が確認できた。

しかし、このコドン至適化 BCG-SIVgag では組換えプラスミドが極端に不安定で、初代の液体培養中に速やかに DNA 欠失が起こってしまうため、実用化が難しいと考えられていた。本研究では、この問題を克服するため、コドン至適化以外の方法で、それに匹敵する HIV Gag 高発現株を得ることを目的とした。

B. 研究方法

(1) 高コピー変異型プラスミドベクターの構築

Mycobacterium fortuitum 由来プラスミド pAL5000 のレプリコンを含む抗酸菌-大腸菌シヤトルプラスミド pSO246 から 1.4 kbp *BglIII-XbaI* 断片を切り出し、pUC系プラスミドにサブクロニングする。このプラスミドの *DraIII-NcoI* 小断片を除いたベクターに、*RepA* 遺伝子中の 3塩基 (1アミノ酸) の欠失変異を導入した合成 *DraIII-NcoI* DNA断片 (88 bp) を連結する。そのプラスミドから 1.4 kbp *BglIII-XbaI* 断片を切り出し、元の pSO246 に戻すことにより、変異型 pSO246R プラスミドを得た (図 1)。

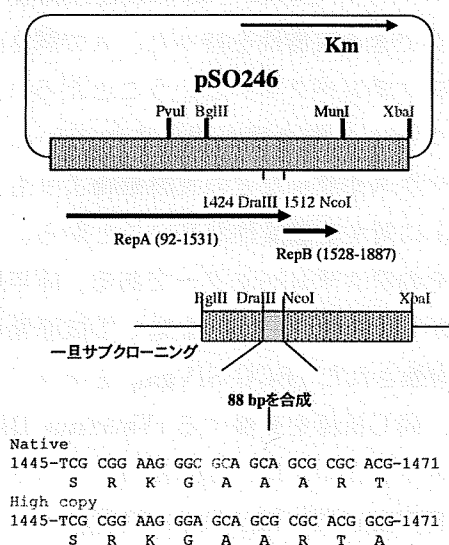


図 1 多コピー変異型プラスミドの構築

(2) HIV-1 Gag抗原の発現ベクター構築

*Mycobacterium kansasii*由来 antigen 85B のプロモーターと分泌シグナル、あるいは *Mycobacterium smegmatis* 由来 SP2 プロモーターと *blaF* 分泌シグナルに HIV-1 gag 遺伝子 (pNL4-3由来の野生型または VRC3900由来のコドン至適型) を繋いだ発現カセットを、pSO246 及び pSO246R にそれぞれ組み込み、種々の発現ベクターを得た。

(3) BCGへの遺伝子導入とGag抗原発現の解析

上記の pSO246 及び変異型の pSO246R をベースとした Gag 発現ベクターを電気穿孔法により BCG 東京株に導入し、カナマイシン (30 µg/ml) 含有 7H10-OADC 寒天培地で 3 週間培養することにより、形質転換体を選択した。コロニーをピックアップして 7H9-ADC 液体培地で 2 週間培養後に集菌し、菌体の超音波破碎により lysate を調製した。SDS-PAGE (4-20% グラディエントゲル) で分画後、PVDF 膜にプロットし、一次抗体として抗 HIV-1 Gag V107 マウスモノクローナル抗体を、二次抗体としてアルカリホスファターゼ標識抗マウス IgG を用いてウエスタンブロット解析を行った。

菌体 lysate あるいは培養上清の一部を用いて HIV-1 p24 ELISA キット (Zepto Metrix) により Gag 蛋白質の発現・分泌量を定量した。サンプルを lysing buffer と混合し、既に抗 HIV-1 p24 抗体がコートされたプレートで反応させた。さらに抗 HIV-1 p24 Detector 抗体、Streptavidin-Peroxidase の順で反応させ、基質液および反応停止液を入れた後、OD₄₅₀ の測定を行った。標準液の値を用いて作成した検量線をもとにサンプル中の Gag 濃度を算出した。

(4) 組換えプラスミドの抽出と安定性評価

形質転換菌のコロニーを滅菌したガラス棒でピックアップ後、新しい 7H10-OADC 寒天培地に植えついで一定期間、37°C で培養する。増殖した菌体を遠心分離で集菌後、Tris-EDTA-Glucose 溶液 50 µl に suspend し、20 mg/ml のリゾチーム溶液 50 µl を加えて、37°C で 3 時間インキュベート後、アルカリ SDS 法によりプラスミドを抽出した。各プラ

スミドは1%アガロースゲル電気泳動で分析し、明白なバンドが見られないものについては、大腸菌 HB101 コンピテントセルに導入して増幅後に再度、電気泳動で分析した。プラスミドコピー数の比較は、BCGから抽出したDNAを形質転換した大腸菌のコロニー数をカウントすることにより行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え体の第二種使用における拡散防止措置については、国立感染症研究所の機関承認済みである。

C. 研究結果

(1) 高コピー変異型プラスミドベクターの構築

変異型 pSO246R は、元の pSO246 と比較して、*M. smegmatis* では約 5 倍、BCG では 3-4 倍にコピー数が増加していた。この値は、Bourn らの報告 [Tuberculosis (2007)] にほぼ一致していた。

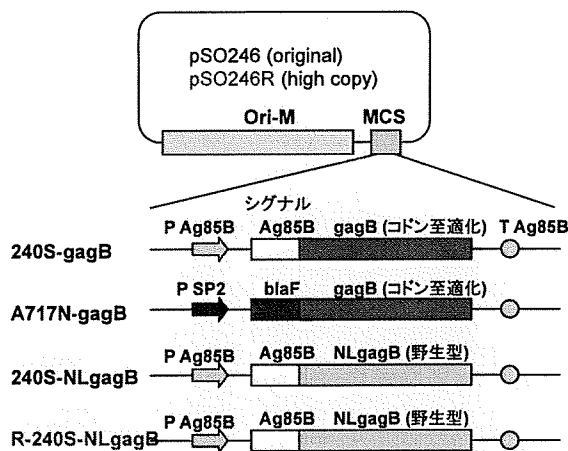


図2 種々の Gag 分泌発現ベクターの構造

(2) Gag 発現レベルの比較・検討

細菌には、一般的な Sec 分泌系と twin-arginine translocase (Tat) 分泌系の二種の蛋白質分泌系が存在する。Sec 分泌系依存性の *M. kansasii* 由来 antigen 85B 分泌シグナル (own promoter) と Tat 分泌系依存性の *blaF* (β ラクタマーゼ遺伝子) シグナル (SP2 promoter) にそれぞれ *gag* 遺伝子を繋いだ発現カセットを構築し、これらを pSO246 及び pSO246R に導入した発現ベクター

(図2)を保持する BCG 東京株での Gag 発現レベルを、ウエスタンブロット (図3) と Gag p24 ELISA 法で比較・検討した。コドンに至適化した *gag* 遺伝子を用いた場合、pSO246 では組換え体を得られたが、pSO246R では得られなかった。pNL4-3 由来の野生型 *gag* 遺伝子を antigen 85B 分泌シグナルに繋いだ場合、pSO246R を用いても組換え体を得られ、pSO246 を用いた場合よりも lysate および培養上清において約 10 倍の Gag を発現していることがわかった。これは、コドン至適化による発現増強に匹敵するレベルであった。

Anti-Gag MAb

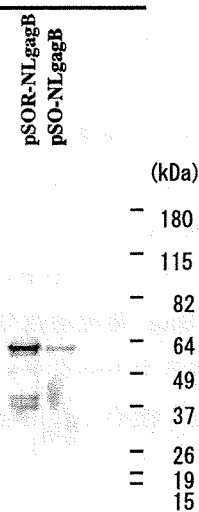


図3 ウエスタンブロットによる Gag 抗原発現の比較

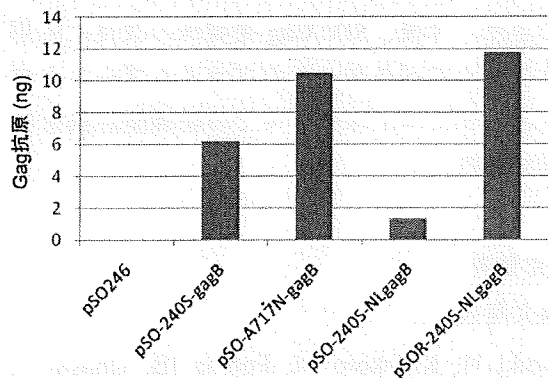


図4 ELISA による各クローン菌体内の Gag 抗原レベルの比較 (培養 21 日目の菌体蛋白質 1 mg 中の Gag 蛋白質量)

(3) 組換えBCGでのプラスミド安定性評価

Gag 高発現株が得られた pSO-A717N-gagB (*blaF* signal+ コドン至適化 *gag* 遺伝子)、及び pSOR-240S-NLgagB (antigen 85B signal+ 野生型 *gag*) の二種の組換え BCG 株での、液体培養時のプラスミドの安定性を調べたところ、pSO-A717N-gagB で欠失が認められたが、pSOR-240S-NLgagB では欠失は見られず、高コピー型プラスミドを用いると、コドン至適化に匹敵する発現レベルが得られるにもかかわらず、組換えプラスミドは安定であることが判った。

D. 考察

コドン至適化は BCG ベクターの免疫原性を高めるための有効な方法だが、発現レベルが BCG 菌体にとって不都合な程度（ストレスがかかってしまう）にまで上昇してしまうと、プラスミドを排除してしまう傾向にある。しかし、今回開発した多コピー変異プラスミドを用いると、コドン至適化に匹敵する Gag 発現増強効果が得られる上に、菌体内でプラスミドベクターも安定に保持されており、実用化上極めて有用なツールになるものと期待される。

E. 結論

多コピー変異型プラスミドを用いることにより、安定にかつコドン至適化とほぼ同程度の増強効果で Gag 抗原を高発現できる BCG 株を得ることができた。今後、SIV Gag 発現株の改良に応用し、ワクシニアベクターとのプライムブーストワクチンの、サルエイズモデルでの防御能評価を行う予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki H, Kidokoro M, Fofana IB, Ohashi T, Okamura T, Matsuo K, Yamamoto N, Shida H: Immunogenicity of newly constructed attenuated vaccinia strain LC16m8Delta that expresses SIV Gag protein. **Vaccine** 27: 966-971, 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.
- 3) Murakami T, Kumakura S, Yamazaki T, Tanaka R, Hamatake M, Okuma K, Huang W, Toma J, Komano J, Yanaka M, Tanaka Y, Yamamoto N: The novel CXCR4 antagonist KRH-3955 is an orally bioavailable and extremely potent inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 infection: comparative studies with AMD3100. **Antimicrob Agents Chemother.** 53: 2940-2948, 2009.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし