

図3. CypA/CypBを過剰発現させたヒトT細胞内におけるウイルスDNA合成量の比較

図2にて示したCypAおよびCypB過剰発現ヒトT細胞を感染標的細胞として用い、SIVagm(上段)およびHIV-1(下段)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過剰発現ヒトT細胞は、外来性CypA-HA+で示し、CypB過剰発現ヒトT細胞は、外来性CypB-HA+で示している。ウイルス標的細胞側へのCsA処理は、CsAを2.5 μMの濃度で処理していることを示している。1、5、9、13の各レーンは、熱処理(65°C、30min)を行って感染性を無くしたウイルスを用いて外来性ウイルスDNA混入の有無を確認した結果を示している。

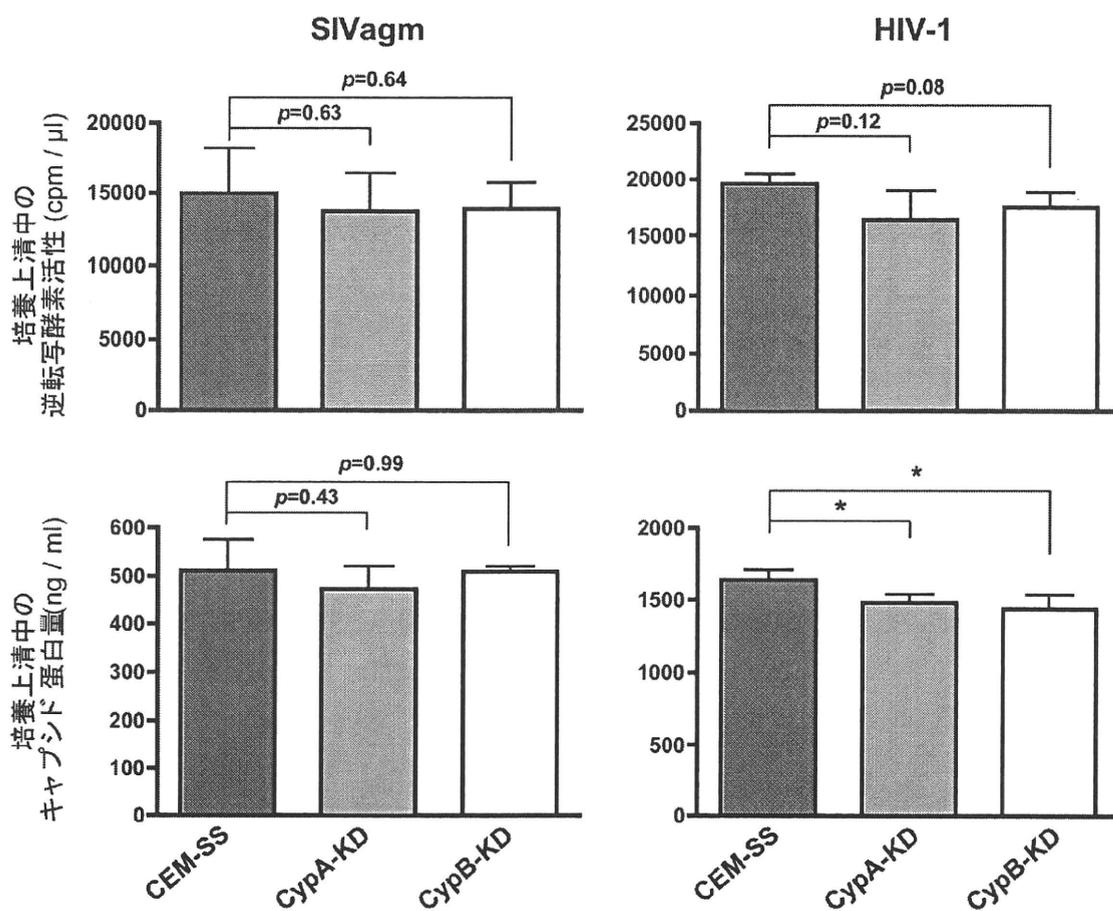


図4. ウイルス産生過程における CypA/CypB の影響

CEM-SS、CypA-KD および CypB-KD CEM-SS の各ヒト T 細胞株に、pSIVagm (左側) もしくは pNL4-3 (右側) を Nucleofection 法にて遺伝子導入し、72 時間後の培養上清中に産生された各ウイルス量を測定した。測定方法は、逆転写酵素活性 (上段) およびウイルス蛋白量 (下段) を定量する方法にて行った。

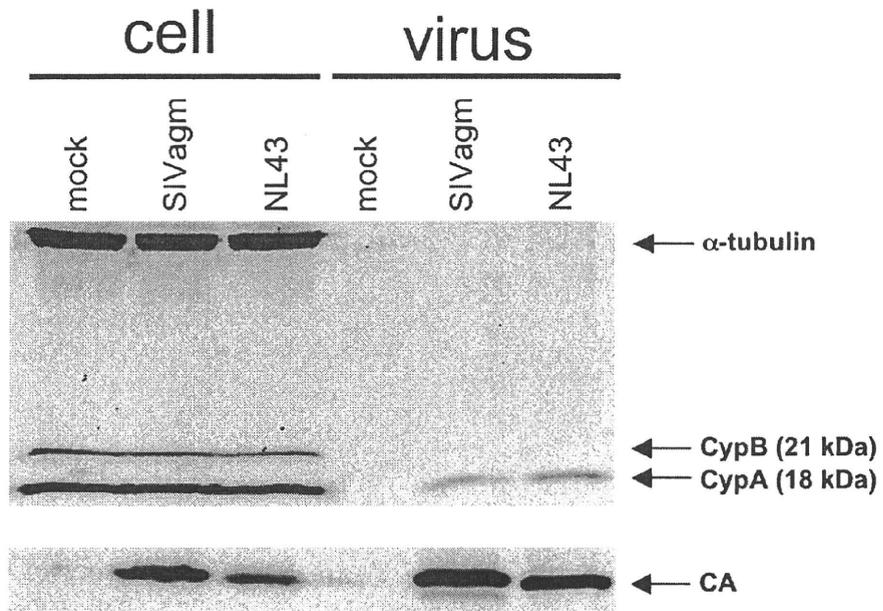


図5. ヒト T 細胞から産生されたウイルス粒子内への CypA/CypB 分子取り込みの有無

HIV-1 および SIVagm 感染 CEM-SS 細胞から産生されたウイルス粒子を回収し、20 % シュクロースを用いてウイルス粒子を精製した後、ウエスタンブロット法にて各蛋白を検出した。抗 HIV-1 および SIVagm キャプシド (CA) 抗体、CypA および抗 CypB 抗体は各々の蛋白発現レベルを検出し、 α -tubulin は内在性コントロールとして用いた。

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

研究期間 平成20年4月～平成23年3月

研究要旨

本研究は小腸上皮の粘膜表面のパイエル板（PP）にタイトジャンクション構成タンパク質の 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 PP 特異的に送達する技術により、経口エイズワクチン開発を目指した。

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。

B. 研究方法

1. GFP-CPE の作製

C-CPE の標識として緑色蛍光タンパク質として知られる GFP を C-CPE に GS linker を挟んだ組換え plasmid を作製した。plasmid pET-16b に制限酵素サイト (*Kpn1/Pac1*) と GS linker 2 つと C-CPE を組み込んだ plasmid pET-16b-MCS-GS2-C-CPE を作製し、それを vector plasmid とした。また pEGFP-C2 を insert plasmid とし、PCR で GFP の両側に制限酵素サイト (*Kpn1/Pac1*) をつけ、組換えを行い GFP-C-CPE の plasmid を作製した。

次に GFP-C-CPE の plasmid を BL-21 に transformation し、コロニーを pick up し LA

液体培地で培養した。それを TB/Amp 液体培地に移し、浸透培養し、大腸菌を回収した。回収した大腸菌から上清を回収し、His-tag による affinity trap で精製し、その後 buffer 置換を行い GFP-C-CPE を精製した。精製確認を Anti-His-mAb を用いた Western Blot 法により行った。

2. C-CPE による肝毒性と腎毒性

BALB/c (♀ 7w) に C-CPE を経尾静脈内より 5mg/kg で投与し、24hr 後の血清を心採血により採取し、AST、ALT、BUN 値を測定した。

3. C-CPE-OVA の作製

C-CPE の遺伝子を pET16b に組み込んだ pET-H10PER プラスミドを用いた。遺伝子組み換え操作により His-OVA-C-CPE をコードしたプラスミドを得た。その後、C-CPE-OVA の発現条件、可溶化条件、imidazol 溶出条件の検討を CBB 染色法にて行った。C-CPE もしくは OVA-C-CPE は、PD-10 column にて精製し、BCA™ Protein Assay Kit を用いて、蛋白質の濃度を算出した。ウエスタンブロットにより発現を確認した。さらに OVA-C-CPE 蛋白質が claudin-4 結合性を持つかを pull down 法により検討した。claudin-4 を発現している caco-2 細胞を用い、caco-2 細胞ライセートと His-tag 融合タンパク質である OVA-C-CPE を混合した。混合物を Ni 樹脂に結合させ、claudin-4 との結合性を検討した。

4. 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、膺洗浄液、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。

5. OVA 封入 C-CPE 修飾リポソームの作製

C-CPE とリポソームの合成により C-CPE 未修飾リポソームを得た。C-CPE 未修飾リポソームは Claudin への結合性を評価し、結合性が確認された。さらに作製した C-CPE 未修飾リポソームを 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 封入リポソームを得た。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 μ g/mouse 投与し、3 回目は OVA 量として 45 μ g/mouse 投与し、最終投与 1 週間後に、血清、膺洗浄液、および糞便抽出液を調製した。調製した各サンプルより、ELISA 法により、OVA 特異的抗体価を測定した。

7. C-CPE 経鼻投与によるマウスへの免疫化およびサンプル回収

週 1 回 10 週間の計 10 回、BALB/c マウス (♀、6W) に経鼻投与を行った。PBS 投与群 (Control)、C-CPE 1mg 投与群、C-CPE 2mg 投与群、*Cholera toxin* (CT, List Biological Laboratories, Inc.) 投与群の 4 群とした (n=5)。C-CPE 1mg 群において一匹、一回あたりの投与

量は C-CPE として 1mg/kg、C-CPE 2mg 群において一匹、一回あたりの投与量は C-CPE として 2mg/kg になるように PBS に溶解した。最終投与より一週間後、マウスより血清サンプル、鼻腔洗浄液を回収した。回収したサンプルより、C-CPE 特異的 IgG、IgA を ELISA 法により測定した。さらに経鼻投与による肝傷害と腎障害を血清マーカーと組織染色により検討した。

C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載。

D. 考察

1. GFP-C-CPE の作製

作製した GFP-C-CPE の western blot 結果、分子量が 40~50 の間にバンドが観察できた。作製したタンパク質の分子量がおおよそ 45 kDa であることから GFP-C-CPE が精製できていると考えられる。

2. C-CPE による肝毒性と腎毒性

C-CPE 投与 24 時間後の AST、ALT、BUN 値の結果は有意な上昇は観察されなかった。これらのことから、C-CPE は経口投与により肝毒性、腎毒性を示さないと考えられる。

3. C-CPE-OVA の作製

作製した C-CPE-OVA を CBB 染色、もしくはウエスタンブロット法を用いて検討した。結果、OVA-C-CPE 蛋白質は分子量 62 kDa であり、CBB 染色、もしくは His-tag を用いたウエスタンブロットングにより目的の位置にバンドが検出された。OVA-C-CPE の作製は成功したと考えられる。さらに作製した OVA-C-CPE 蛋白質が claudin-4 結合性を持つかを pull down 法により検討した。claudin-4 を発現している caco-2 細胞を用い、caco-2 細胞ライセートと His-tag 融合タンパク質である OVA-C-CPE を混合した。混合物を Ni 樹脂に結合させ、

claudin-4 との結合性を見た。結果はポジティブコントロールの C-CPE と同様に、claudin-4 のバンドが検出され、OVA-C-CPE と claudin-4 間の相互作用が確認された

4. C-CPE-OVA の経口粘膜ワクチン活性の検討

OVA-C-CPE を経口投与した結果、OVA 量として 100・g 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。

5. C-CPE 修飾リポソームの作製および機能評価

作製した C-CPE 修飾リポソームを 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。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。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。

6. 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

作製した 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。C-CPE 修飾リポソームも OVA-C-CPE と同様に消化酵素により分解されたと考えられる。

7. C-CPE の経鼻粘膜ワクチン活性の検討

CPE を経鼻投与した結果、C-CPE 量として 1mg/kg と 2mg/kg 投与を投与した群は C-CPE 特異的な IgG 抗体価の上昇が観察された。特に C-CPE

2mg/kg 投与群においては、投与 4 週目より IgG 抗体価の上昇が観察された。また、最終投与より 1 週間後の鼻腔洗浄液から C-CPE 特異的な IgA 抗体価の測定を行った結果、C-CPE 2mg/kg 投与群において抗体価の上昇が観察された。しかし、IgA 抗体価の上昇はわずかであった。C-CPE 1mg/kg 投与群において C-CPE 特異的な IgA 抗体価は測定できなかった。また、C-CPE 経鼻投与により肝障害、腎障害、組織傷害は観察されなかった。以上より CPE を経鼻投与することにより、C-CPE 特異的な抗体価が上昇が観察された。これらのことより、C-CPE により Claudin-4 を介した粘膜ワクチンの創製が期待できる。

E. 結論

1. GFP-C-CPE の作製に成功した。
2. 経口投与により C-CPE は肝毒性、腎毒性を示さなかった。
3. OVA-C-CPE 蛋白質の作製およびその claudin-4 結合性に関する評価を行った結果、CBB 染色および His-tag 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、OVA-C-CPE の作製に成功した。さらに OVA-C-CPE は claudin-4 に結合することを確認した。しかし経口投与により特異的な抗体価の上昇は観察されなかった。
4. Claudin-4 指向性高分子修飾リポソームの作製をした。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。
5. CPE を経鼻投与したところ、C-CPE 特異的な抗体価の上昇が観察された。C-CPE 経鼻投与による肝傷害、腎障害と組織傷害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

- (1) Azusa Takahashi, Eriko Komiya, Hideki Kakutani, Takeshi Yoshida, Makiko Fujii, Yasuhiko Horiguchi, Hiroyuki Mizuguchi, Yasuo Tsutsumi, Shin-ichi Tsunoda, Naoya Koizumi, Katsuhiko Isoda, Kiyohito Yagi, Yoshiteru Watanabe and Masuo Kondoh. Domain mapping of a claudin-4 modulator, the C-terminal region of C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin, by site-directed mutagenesis. ***Biochem. Pharmacol.***, 75, 1639-1648 (2008).
- (2) Eri Arita, Masuo Kondoh, Katsuhiko Isoda, Hikaru Nishimori, Takeshi Yoshida, Hiroyuki Mizuguchi and Kiyohito Yagi. Evaluation of promoter strength in mouse and rat primary hepatocytes using adenovirus vectors. ***Eur. J. Pharm. Biopharm.***, 70, 1-6 (2008).
- (3) Etsuko Ikeda, Kiyohito Yagi, Midori Kojima, Takahiro Yagyuu, Akira Ohshima, Satoshi

Sobajima, Mika Tadokor, Yoshihiro Katsube, Katsuhiko Isoda, Masuo Kondoh, Masaya Kawase, Masahiro J Go, Hisashi Adachi, Yukiharu Yokota, Tadaaki Kirita, Hajime Ohgushi. Multipotent cells from the human third molar: feasibility of cell-based therapy for liver disease. ***Differentiation***, 76, 495-505 (2008).

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

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、粘膜表面に 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。

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免疫反応を得るために、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 G-CPE が知られている。G-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。G-CPE にタンパク合成阻害分子 PSIF を融合させた G-CPE-PSIF が、G-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、G-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。平成 20 年度は、G-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 G-CPE-OVA を作製し、経口粘膜ワクチン活性を検討した。平成 21 年度は、作製した G-CPE-OVA の経口ワクチン活性解析を行い、さらに G-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結果、経口投与による G-CPE-OVA のワクチン活性は得られなかった。本年度は Claudin-4 が発現している鼻腔粘膜面に G-CPE を投与することによりワクチン活性が得られるかどうか検討した。

B. 研究方法

1. G-CPE 蛋白の作製

G-CPE 発現 plasmid 1・1 を BL21 10・1 に加え、氷上で 15 分間なじませ、90 秒間 heat shock を行い 3 分間氷上で静置したのち、SOC 培地 100・1 を加え 37℃で 50 分間培養し、LA プレートに播種し一晩培養した。大腸菌 10 コロニー程度を LA 培地 100 ml に移し、37℃で一晩培養した。翌日 TA 培地 1 リットルに大腸菌培養液すべてを移し、37℃で 2 時間振盪培養した後、最適濃度の IPTG を添加し 37℃で 3 時間振盪培養した。その後 10000 rpm で 1 分間遠心分離して大腸菌を回収し、-20℃で凍結保存した。大腸菌を氷上で溶解した後、可溶性条件の検討結果に従い、buffer A を用いて G-CPE の可溶化を行った。buffer A を 1 ml/100 ml culture の割合で添加し、40 秒間の超音波処理を 3 回行った後、14000 rpm、15 分にて遠心分離を行い、上清を回収した。予め 6 M guanidine/EDTA、MilliQ、NiSO₄、buffer A を順に流して平衡化しておいた HiTrap™ Kit にサンプルを流し、G-CPE を吸着させた。溶出条件の検討結果に従い、低濃度の imidazol 溶液 10 ml で洗浄した後、高濃度の imidazol 溶液 10 ml で G-CPE を溶出させ、溶出液を 1 ml ずつ分取した。G-CPE が溶解している buffer を PBS (-) (137 mM NaCl、2.68 mM KCl、8.14 mM Na₂HPO₄、1.15 mM KH₂PO₄) に置換するため PD-10 column (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) を用いた。あらかじめ PD-10 column に PBS を 30 ml 流して平衡化しておき、HiTrap™ Kit で得た溶出液 1 ml を流した。PBS を 500・1 ずつ流して PD-10 column から溶出液を分取した。次にウシ血清アルブミン (PIERCE Biotechnology Inc., USA) を標準液として BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE Biotechnology Inc., USA) を用い、560 nm における吸光度を測定し、G-CPE 蛋白質の濃度を算出した。

2. マウスへの免疫化およびサンプル回収

週1回10週間の計10回、BALB/cマウス(♀、6W)に経鼻投与を行った。PBS投与群(Control)、C-CPE 1mg投与群、C-CPE 2mg投与群、*Cholera toxin* (CT, List Biological Laboratories, Inc.) 投与群の4群とした(n=5)。

C-CPE 1mg群において一匹、一回あたりの投与量はC-CPEとして1mg/kg、C-CPE 2mg群において一匹、一回あたりの投与量はC-CPEとして2mg/kgになるようにPBSに溶解した。最終投与より一週間後、マウスより血清サンプル、鼻腔洗浄液を回収した。

・血清サンプル (serum sample)

マウスから眼底採血により血液を回収し、6000rpm、10分にて遠心分離を行った。上清をPBSにて10倍に希釈し、-20℃で保存した。

・鼻腔洗浄液 (nasal wash)

頸椎脱臼して安楽死処分したマウスに対し、気道より鼻腔にむけて200・lのPBSを流し込み、その洗浄液を回収し、-20℃で保存した。

3. C-CPE 特異的抗体価 (IgG, IgA) の測定 (ELISA)

前日にC-CPEが10・g/mlとなるように炭酸緩衝液(pH 9.6, Na₂CO₃ 0.19M, NaHCO₃ 1.67M)に溶解し、96穴NUNC Immuno plateに100・l/wellで分注し、4℃で保存した。翌日、T-TBSにてプレートを3回washし、4%ブロックエースを200・l/wellで添加した。室温にて2時間インキュベートした後、T-TBSで5回washした。T-TBSにて10倍希釈したブロックエース(sample diluent)を用いて検体を1/10~1/100000希釈(血清)、原液~1/1000希釈(粘膜サンプル)し、50・l/wellにて添加した。室温にて2時間インキュベートした後、T-TBSで5回washした。sample diluentにてHRP detection antibody (IgG, IgG1, IgG2a, IgA) (BETHYL Laboratories, Inc.) を

1/10000に希釈し、100・l/wellにてプレートに添加した。室温で1時間インキュベートした後、T-TBSにて5回washした。TMB solutionを100・l/well添加し、20分インキュベート後、2Mの硫酸を100・l/well加え、吸光度を測定した。(450nm, ref 595nm)

4. C-CPEによる経鼻投与による肝・腎毒性

週1回10週間の計10回、BALB/cマウス(♀、6W)に経鼻投与を行った。最終投与より1週間後の血清を心採血により採取し、AST、ALT、BUN値を測定した。

5. C-CPEによる組織傷害性の検討

週1回10週間の計10回、BALB/cマウス(♀、6W)に経鼻投与を行った。最終投与より1週間後に各臓器を採取した。採取方法は、Salineを灌流して脱血させたマウスにシリンジで4% Paraformaldehyde Solutionにかん流し、固定した。その後4% Paraformaldehyde Solutionに浸した。採集した臓器は、肝臓、腎臓、脾臓であった。各臓器は胞埋固定後、ヘマトキシエオジン(HE)染色後に組織傷害性を観察した。

C. 研究結果

結果はD項にまとめて記載。

D. 考察

1. C-CPEの経鼻粘膜ワクチン活性の検討

Fig.1にCPEを経鼻投与した結果を示した。結果、C-CPE量として1mg/kgと2mg/kg投与を投与した群はC-CPE特異的なIgG抗体価の上昇が観察された。特にC-CPE 2mg/kg投与群においては、投与4週目よりIgG抗体価の上昇が観察された。また、最終投与より1週間後の鼻腔洗浄液からC-CPE特異的なIgA抗体価の測定を行った結果、C-CPE 2mg/kg投与群において抗体価の上昇が観察された。しかし、IgA抗体価の上昇はわずかであった。C-CPE 1mg/kg投与群においてC-CPE特異的なIgA抗体価は測定できな

かった。

CPE を経鼻投与することにより、G-CPE 特異的抗体価が上昇が観察された。これらのことより、G-CPE により Claudin-4 を介した粘膜ワクチンの創製が期待できる。

2. G-CPE による経鼻投与による肝毒性と腎毒性の評価

Fig. 2 に週 1 回 10 週間の計 10 回、BALB/c マウス（♀、6W）に経鼻投与した際の AST, ALT, BUN 値の結果を示した。G-CPE 投与によって AST, ALT, BUN 値の有意な上昇は観察されなかった。これらのことから、G-CPE は *in vivo* において、肝毒性、腎毒性を示さないと考えられる。

3. G-CPE による組織傷害性の検討

Fig. 3, 4, 5 に週 1 回 10 週間の計 10 回、BALB/c マウス（♀、6W）に経鼻投与した際の肝臓、腎臓、脾臓の HE 染色結果を示した。Fig. 3 の肝臓においては、G-CPE1mg と G-CPE2mg 投与群において肝細胞の壊死は観察しなかった。また、コレラトキシン群においても肝細胞の壊死は観察できなかった。これらのことより、肝臓においては傷害生のないことが示された。また、Fig4 の腎臓においては、コントロール群、G-CPE1mg と G-CPE2mg 投与の全てにおいて腎臓の傷害は観察されなかった。これらのことより、腎臓においては傷害生のないことが示された。さらに Fig5 の脾臓においては、G-CPE1mg と G-CPE2mg 投与群において脾臓組織の壊死は観察しなかった。コレラトキシン群においては、血球系細胞の浸潤が見られた。

これらのことより、脾臓においては傷害生のな

いことが示された。G-CPE の鼻腔長期投与において臓器障害は観察されなかった。

E. 結論

1. CPE を経鼻投与したところ、G-CPE 特異的な抗体価の上昇は観察されなかった。
2. G-CPE 経鼻投与による肝傷害と腎障害は観察されなかった。
3. G-CPE 経鼻投与したところ、組織傷害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

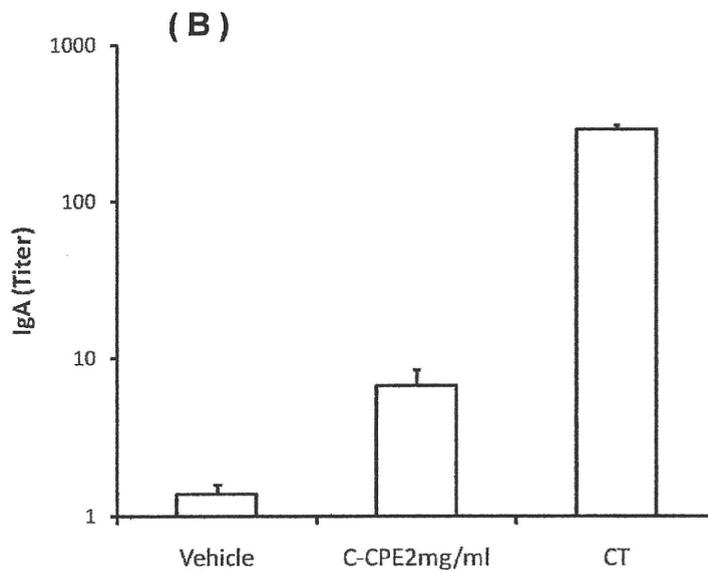
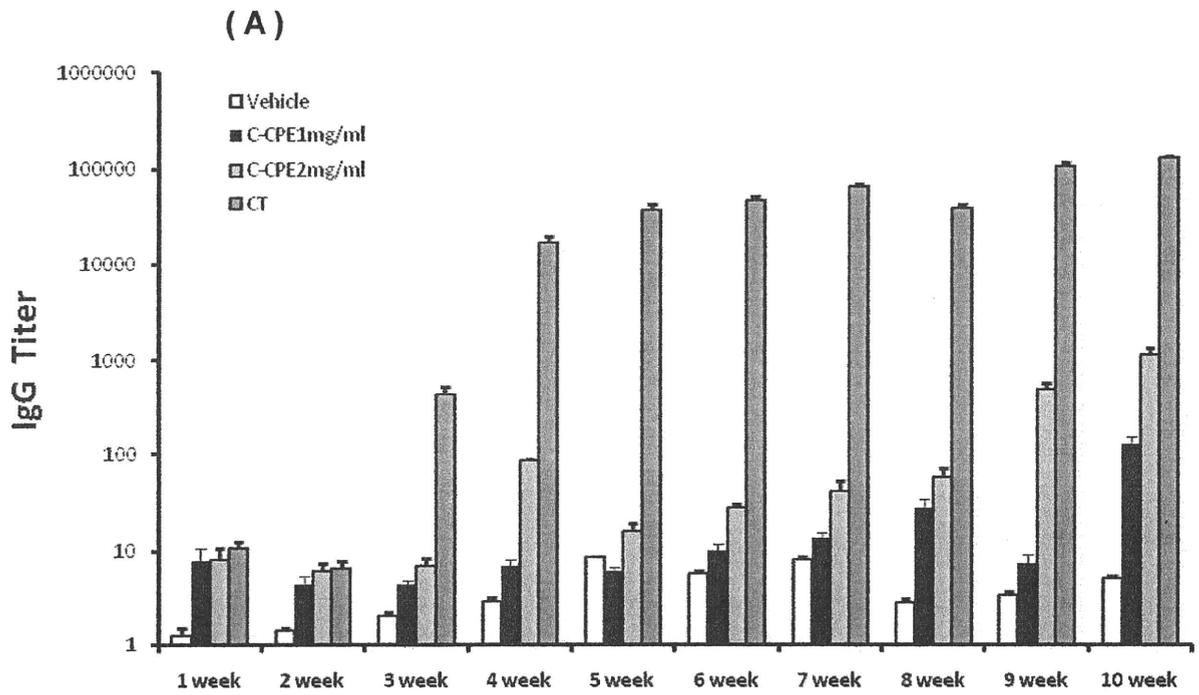


Fig.1 C-CPE の経鼻投与による免疫活性化能

マウスに溶媒、C-CPE 1mg/kg と C-CPE 2mg/kg、コレラトキシン (CT) を一週間に一回、10回投与し、投与7日後の C-CPE 特異的血中 IgG、鼻腔洗浄液中 IgA の抗体価を測定した。IgG (A)、IgA (B)。Mean±S.D. n = 5.

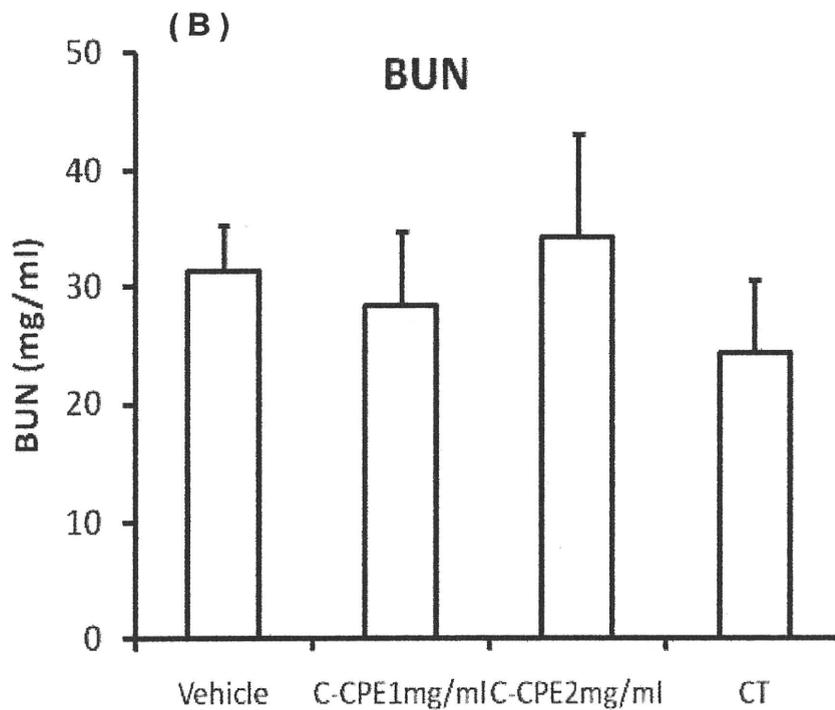
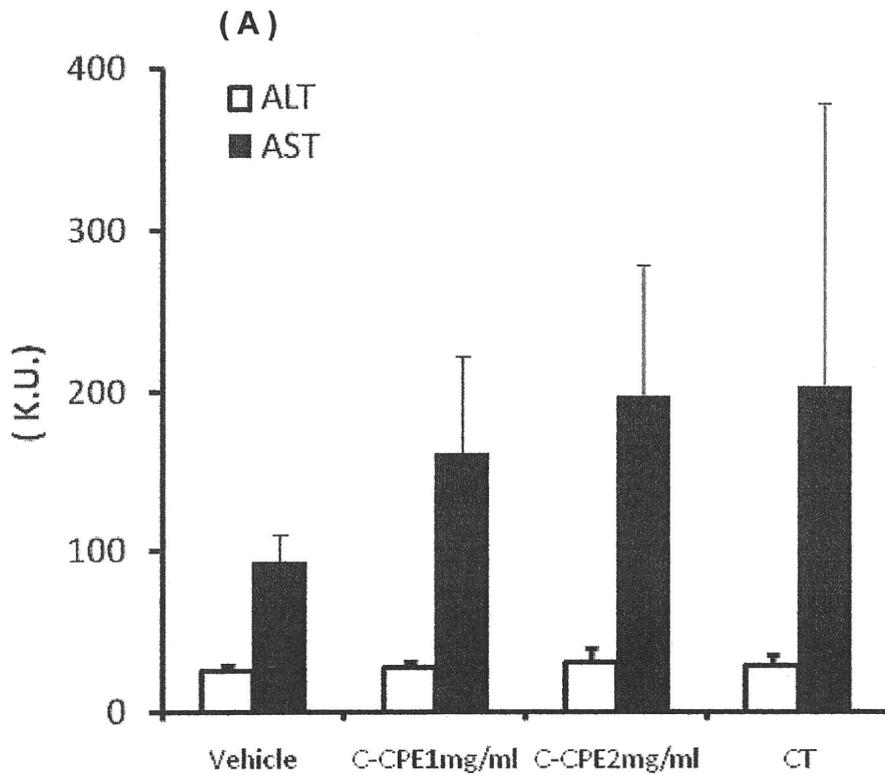


Fig.2 C-CPE 経鼻投与による肝・腎毒性の評価

マウスに溶媒、C-CPE 1mg/kg と C-CPE 2mg/kg、コレラトキシンを一週間に一回、10回投与し、最終投与7日後の血清中のALT/ASTとBUNを測定した。ALT/AST(A), BUN(B)

Mean±S.D. n = 5.

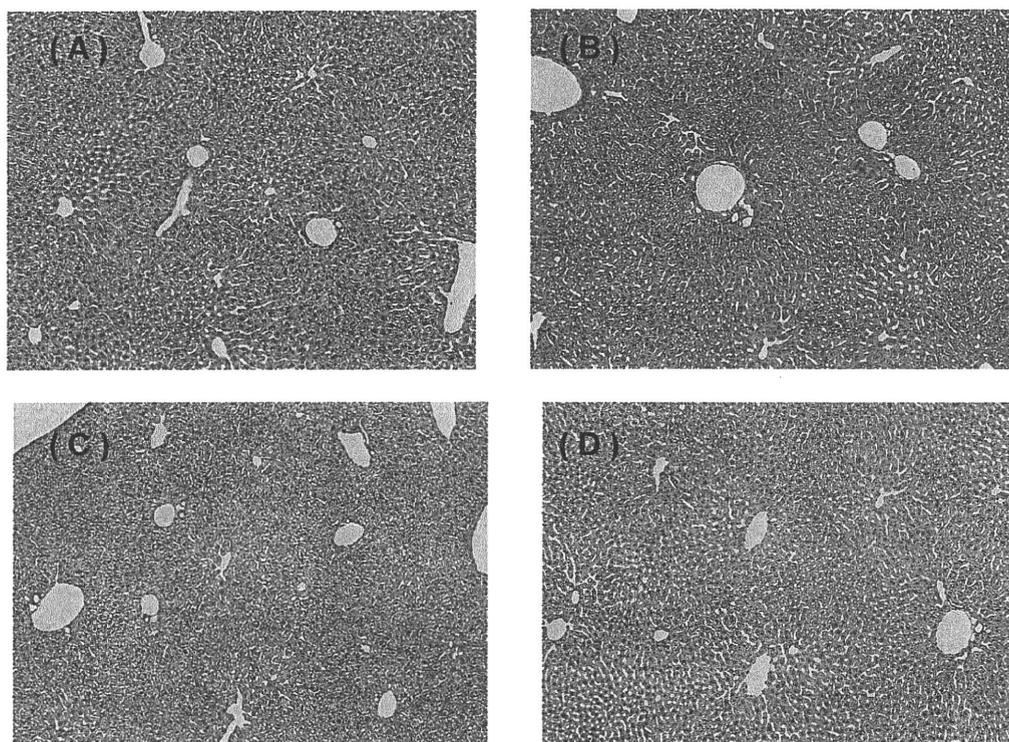


Fig.3 C-CPE 経鼻投与の肝組織像

マウスに溶媒、C-CPE 1mg/kg と C-CPE 2mg/kg、コレラトキシンを一週間に一回、10 回投与し、最終投与 7 日後の肝臓の組織傷害を観察 ($\times 100$) した。Control (A), C-CPE 1mg/kg (B), C-CPE 2mg/kg (C), コレラトキシシ (D), Mean \pm S. D. n =3.

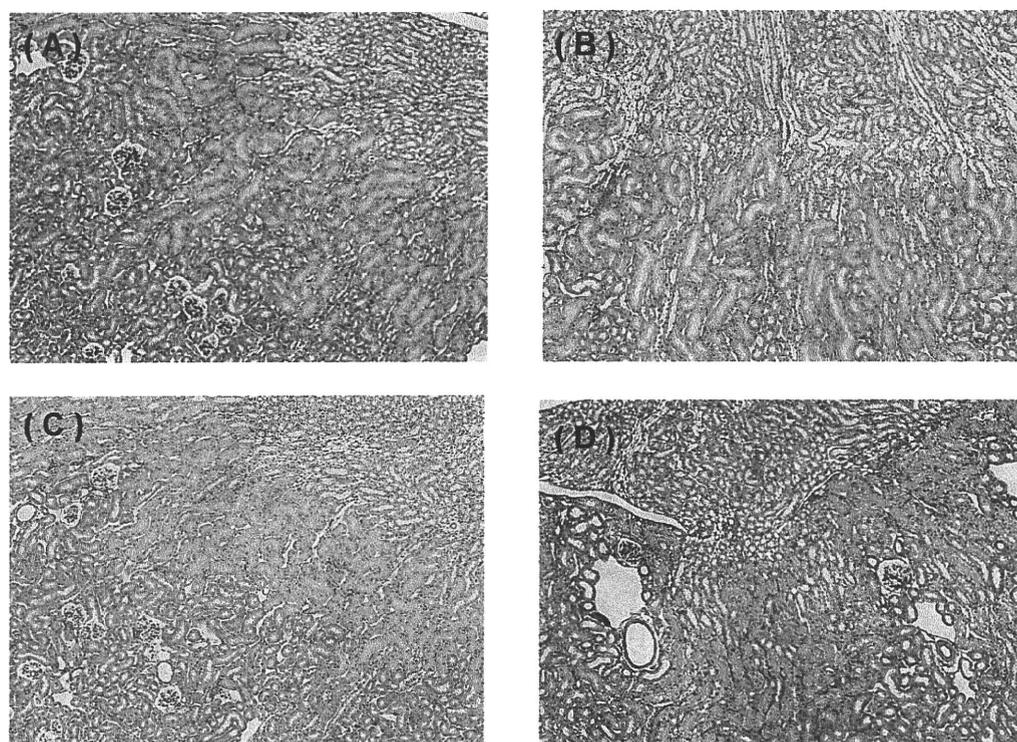


Fig.4 C-CPE 経鼻投与の腎組織像

マウスに溶媒、C-CPE 1mg/kg と C-CPE 2mg/kg、コレラトキシンを一週間に一回、10 回投与し、最終投与 7 日後の腎臓の組織傷害を観察 ($\times 100$) した。Control (A), C-CPE 1mg/kg (B), C-CPE 2mg/kg (C), コレラトキシシ (D), Mean \pm S. D. n =3.

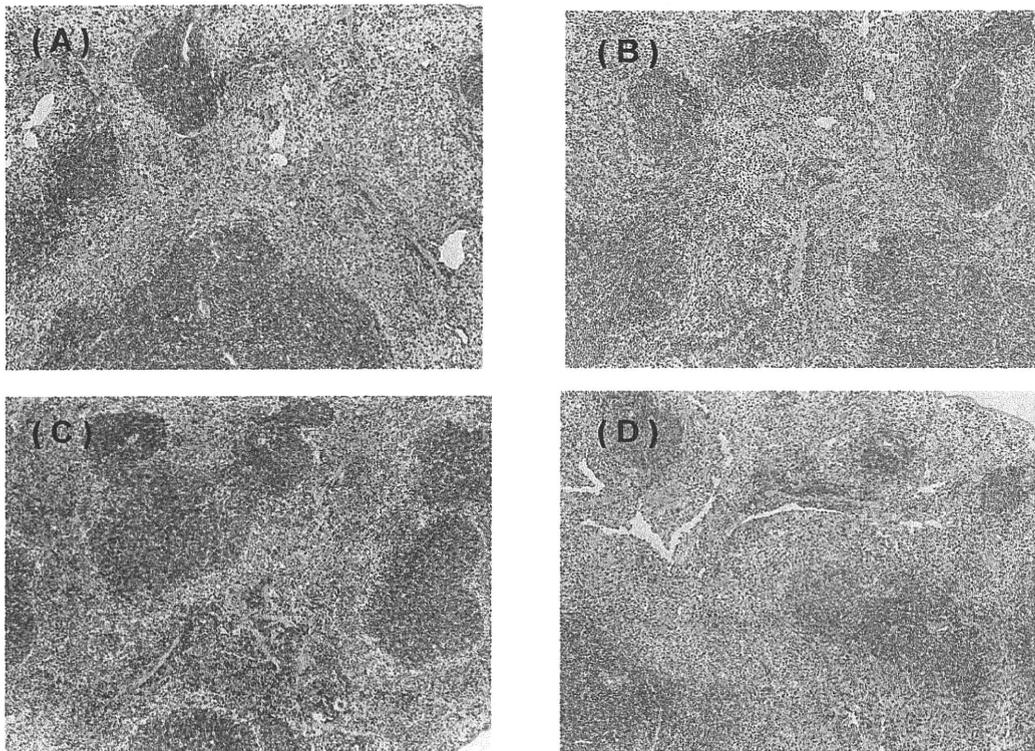


Fig.5 C-CPE 経鼻投与の脾臓組織像

マウスに溶媒、C-CPE 1mg/kg と C-CPE 2mg/kg、コレラトキシンを一週間に一回、10 回投与し、最終投与 7 日後の脾臓の組織傷害を観察 (×100) した。Control (A), C-CPE 1mg/kg (B), C-CPE 2mg/kg (C), コレラトキシシ (D), Mean±S.D. n =3.

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

所 属 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
研究代表者 野間口 雅子
研究期間 平成 21 年 4 月～平成 23 年 3 月

研究要旨

サル病原性 HIV-1 の構築は、動物モデルの確立に必須である。本研究では、ウイルスの変異・進化を利用してサル指向性 HIV-1 の改良に取り組み、増殖効率が著しく向上したウイルスクローンを得た。これは、動物モデル確立の基盤材料になると期待される。

A. 研究目的

HIV-1 は宿主域が狭く実用的な動物モデルが存在しない。HIV-1/エイズ霊長類モデルは、(1) 個体レベルでの HIV-1 複製および病原性発現機構の解析や、(2) HIV-1 感染制御のためのワクチン・新薬の評価のため、その確立が望まれている。本研究室では、プロトタイプサル指向性 HIV-1 (NL-DT5R; *vif* の全遺伝子と *CA* の helix 4/5 loop をサル病原性標準株 SIVmac239 の対応領域に置換) を世界に先駆けて作製した。NL-DT5R はブタオザルおよびカニクイザル細胞・個体で増殖可能となったが、SIVmac239 よりもサル細胞での増殖効率が悪く、サル個体でのウイルス血症は一過性で病原性を示さなかった。HIV-1 病原性分子クローン構築のためには、まず、SIVmac239 のサル細胞での複製レベルを指標として、これに匹敵する増殖能を有するクローンを取得する必要がある。そこで、本研究では、実験用霊長類として汎用される 2 種のサル種(カニクイザルおよびアカゲザル) 由来の細胞での馴化、遺伝子工学的改変や構造解析を適宜組み合わせ、サル細胞で効率良く増殖する HIV-1 分子クローンの構築を目指した。

B. 研究方法

1. ウイルス馴化、馴化型 HIV-1 クローンの構築とウイルスゲノムの遺伝子工学的改変：ウイルス馴化は、ウイルスを感染させたカニクイザル由来 HSC-F 細胞およびアカゲザル由来 HSR5.4 細胞の長期培養により行った。長期培養中に出現した馴化型ウイルスは、PCR 法にて分子クローニングし

た。構築したクローンは、サル細胞での増殖速度を指標としてスクリーニングした。選択したクローンについては、ウイルスゲノム全長をシーケンスした。増殖効率の向上に寄与する増殖適応変異は、親株への変異導入後、サル細胞での感染実験により同定した。遺伝子工学的改変は定法に従った。

2. ウイルス調製とウイルス量の測定：ウイルスストックは、ヒト 293T 細胞へのリン酸カルシウム法によるトランスフェクションで調製した。ウイルス量は逆転写酵素活性により測定した。
3. ウイルス感染実験：HSC-F 細胞、HSR5.4 細胞およびアカゲザル由来 M1.3S 細胞を使用した。HSC-F 細胞は 10%FCS 加 RPMI 培地、HSR5.4 細胞と M1.3S 細胞とは 10%FCS/IL-2 加 RPMI 培地で培養した。サル細胞での感染実験は IL-2 存在下で行った。
4. TRIM5 α 感受性試験：TRIM5 α (*Mamu-3* と *Mamu-4*) はアカゲザル由来 HSR1.4 細胞から PCR 法で増幅した。TRIM5 α 恒常発現細胞株は、ネコ由来 CRFK 細胞に遺伝子導入後 G418 による選択とクローニングを行い樹立した。カニクイザル TRIM5 α 恒常発現 CRFK 細胞は本研究室で既に樹立されていたものを用いた。これらの細胞に対するウイルス感染価は VSV-G シュードタイプウイルスを用いたルシフェラーゼアッセイで定量した。リコンビナントセンダイウイルスを用いた TRIM5 α 発現系による感受性試験は、大阪大学微生物病研究所/塩田教授、中山博士らとの共同研究により行った。
5. CA の構造解析は、MOE ver. 2008.10 を用い

てホモロジーモデリングにより行った(国立感染症研究所/佐藤博士、横山博士との共同研究)。

(倫理面への配慮)

ヒトおよび動物対象の実験は含まれていない。組換えウイルスを用いる実験については、徳島大学遺伝子組換え実験安全管理規則を遵守してその安全管理に充分配慮するとともに、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いた手続きを行なった。

C. 研究結果

1. 二種のサル細胞でのウイルス (X4-tropic の NL-DT5R および R5-tropic の NL-DT562) 馴化実験の結果、増殖適応変異は IN の C 末端領域 (CTD) および Env-gp120 に集中して起こることが分かった。サルおよびヒト細胞での感染実験により、これらの変異は HIV-1 種特異性に関わるものではなく、HIV-1 自体の増殖能を向上させるものであることが示された。感染実験や構造解析の結果、Env-gp120 の増殖適応変異は CD4 や CCR5 との結合性を増大させ、ウイルス複製を亢進することが示唆された。IN-CTD 変異は領域内の狭い範囲 (13 アミノ酸) に集中して起こり、これらの変異が全て、アミノ酸配列ではなくコドン配列依存的にウイルス産生を増強させることを見出した。
2. IN-CTD および Env-gp120 の増殖適応変異を有し、かつ、CA の helix 6/7 loop を SIVmac239 の対応領域に置換した HIV-1 クローン (MN4-5S) は、NL-DT5R よりもカニクイザル PBMC での増殖効率が向上しており、カニクイザル個体でも持続感染を成立させた (京都大学/明里教授らとの共同研究)。
3. HSR5.4 細胞での MN4-5S 馴化実験において、適応変異を有する馴化型ウイルスが出現した。解析の結果、CA 内に増殖適応変異を見出した。CA の構造解析により、増殖適応変異とは別に、サル細胞での増殖効率向上に寄与する CA の 1 アミノ酸を新たに同定した。MN4-5S にこの変異を導入した HIV-1 クローン (MN4Rh-3) は、HSC-F 細胞

および HSR5.4 細胞での増殖効率が著しく向上していた。

4. MN4Rh-3 の TRIM5 α および TRIMCyp (サル細胞に存在する抗 HIV-1 CA 因子群) に対する感受性を二種類の方法で調べた。その結果、MN4Rh-3 はカニクイザル TRIM5 α に抵抗性を示すが、その抑制を完全には回避していないこと、カニクイザル TRIMCyp の抑制は完全に回避していることが分かった。これらの結果はカニクイザル個体感染実験でも反映された。TRIM5 α ホモ個体群では MN4Rh-3 の増殖はほとんど認められなかった。しかし、MN4Rh-3 を接種した TRIMCyp ホモ個体群では、急性感染ピーク時のウイルス量が MN4-5S と比較すると 10 倍程度上昇しており (京都大学/明里博士との共同研究)、MN4Rh-3 の増殖効率の向上が in vivo でも確かめられた。
5. 以上の結果は、TRIM5 α が in vivo でのウイルス増殖を規定する因子の 1 つであることを示している。そこで、サル TRIM5 α に抵抗性を示す HIV-1 CA の構築を試みた。HIV と SIVmac239 の CA のアミノ酸配列および構造を比較し、MN4Rh-3 の CA を遺伝子工学的に改変した。その結果、カニクイザルおよびアカゲザルの TRIM5 α の抑制に対して強い抵抗性を示す二種の CA の構築に成功した。これらの CA を持つ HIV-1 クローン (CA+3/4Rh および CA+4/4Rh) は、HSC-F 細胞や M1.3S 細胞での増殖効率が著しく向上していた。

D. 考察

本研究により、サル病原性 HIV-1 クローンの構築は大きく進展した。構築の過程で、サル細胞での増殖が強く制限されているクローン (NL-DT5R と NL-DT562) では、IN-CTD と Env-gp120 での変異獲得によりウイルスが適応することを見出した。興味深いことに、IN-CTD 変異は IN 蛋白質の機能ではなく、その核酸配列に応じてウイルス産生を向上させることが分かった。このことは、ウイルスが蛋白質の機能・構造変化に依らず、核酸レベルでも変異・進化することが可能であることを示している。本研究において、サル TRIM5 α に強い抵抗性を示す CA を構築できたことは特筆に値する。これにより、不明な点の多い TRIM5 α によ

る抑制機構の解析と、作用機序に基づく HIV-1 複製制御に向けた臨床応用への展開も可能になると考えられる。

E. 結論

細胞での馴化によるウイルスの変異・進化という自然に起こる現象と遺伝子工学的改変・構造解析の活用により、サル TRIM5 α の抑制を回避し、サル細胞での増殖効率が格段に向上した CA+3/4Rh および CA+4/4Rh の構築に成功した。しかし近年、種間バリアとなる他の抗 HIV-1 因子 (テザリンなど) が報告されている。今後は、世界初の HIV-1/エイズ霊長類モデルの確立を目指し、CA+3/4Rh および CA+4/4Rh の改変を進めるとともに、感染個体での HIV-1 複製・病原性発現機構および HIV-1 の個体内進化・多様性に関する実験的解析に取り組んでいきたいと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nagao, T., Hatcho, K., Doi, N., Fujiwara, S., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2009. Amino acid alterations in Gag that confer the ability to grow in simian cells on HIV-1 are located at a narrow CA region. *Journal of Medical Investigation* 56: 21-25.
- 2) Kamada, K., Yamashita, T., Hatcho, K., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2009. Evasion from CypA- and APOBEC-mediated restrictions is insufficient for HIV-1 to efficiently grow in simian cells. *Microbes and Infection* 11: 164-171.
- 3) Kuroishi, A., Saito, A., Shingai, Y., Shioda, T., Nomaguchi, M., Adachi, A., Akari, H., and Nakayama, E.E. 2009. Modification of a loop sequence between α -helices 6 and 7 of virus capsid (CA) protein in a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) derivative that has simian immunodeficiency virus (SIVmac239) *vif* and CA α -helices 4 and 5 loop improves replication in cynomolgus monkey cells. *Retrovirology* 6: 70.
- 4) 野間口雅子 2009. HIV-1 の病原性: 細胞から個体へ. *Journal of AIDS Research* 11: 94-95.
- 5) 野間口雅子、足立昭夫 2009. アクセサリー蛋白質と抗 HIV 細胞因子. *ウイルス* 59: 67-74.
- 6) Jere, A., Fujita, M., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2010. Role of HIV-1 Nef protein for virus replication *in vitro*. *Microbes and Infection* 12: 65-70.
- 7) Yamashita, T., Nomaguchi, M., Miyake, A., Uchiyama, T., and Adachi, A. 2010. Status of APOBEC3G/F in cells and progeny virions modulated by Vif determines HIV-1 infectivity. *Microbes and Infection* 12: 166-171.
- 8) Fujita, M., Otsuka, M., Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2010. Multifaceted activity of HIV Vpr/Vpx proteins: the current view of their virological functions. *Reviews in Medical Virology* 20: 68-76.
- 9) Nagao, T., Yamashita, T., Miyake, A., Uchiyama, T., Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2010. Different interaction between HIV-1 Vif and its cellular target proteins APOBEC3G/APOBEC3F. *Journal of Medical Investigation* 57: 89-94.
- 10) Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2010. Virology as biosystematics: towards understanding the viral infection biology. *Frontiers in Microbiology* 1: 2. doi: 10.3389/fmicb.2010.00002.
- 11) Doi, N., Fujiwara, S., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2010. Growth ability in various macaque cell lines of HIV-1 with simian cell-tropism. *Journal of Medical Investigation* 57: 284-292.
- 12) Nomaguchi, M., Doi, N., Fujiwara, S., Fujita, M., and Adachi, A. 2010. Site-directed mutagenesis of HIV-1 *vpu* gene demonstrates two clusters of replication-defective mutants with distinct ability to down-modulate

cell surface CD4 and tetherin. *Frontiers in Microbiology* 1: 116. doi: 10.3389/fmicb.2010.00116.

- 13) Saito, A., Nomaguchi, M., Iijima, S., Kuroishi, A., Yoshida, T., Lee, Y.-J., Hayakawa, T., Kono, K., Nakayama, E. E., Shioda, T., Yasutomi, Y., Adachi, A., Matano, T., and Akari, H. 2011. Improved capacity of a monkey-tropic HIV-1 derivative to replicate in cynomolgus monkeys with minimal modifications. *Microbes and Infection* 13: 58-64.

2. 学会発表

- 1) Kuroishi, A., Saito, A., Shingai, Y., Shioda, T., Nomaguchi, M., Adachi, A., Akari, H., and Nakayama, E. E. Modification of a loop between α -helices 6 and 7 of virus capsid protein improves human immunodeficiency virus type 1 replication in cynomolgus monkey cells. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Sept. 10, 2009, Awaji, Japan.
- 2) 三宅在子、野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、足立昭夫 HIV-1 インテグラーゼ (IN) C 末端領域 (CTD) における 1 アミノ酸変異によるウイルス増殖促進機構の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 25 日、東京.
- 3) 土肥直哉、野間口雅子、藤原佐知、三宅在子、足立昭夫 サル細胞指向性 HIV-1 の増殖適応変異の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 26 日、東京.
- 4) 野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、三宅在子、横山 勝、大出裕高、佐藤裕徳、足立昭夫 HIV-1 Env の 1 アミノ酸変異による増殖促進機構の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 26 日、東京.
- 5) 齊藤 暁、飯島沙幸、岩崎優紀、黒石 歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、俣野哲朗、明里宏文 SIV 由来 CA h6/7 loop を持つ第 2 世代サル指向性 HIV-1 クローンはカニクイザル個体で効率よく増殖する. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 26 日、東京.
- 6) 黒石 歩、齊藤 暁、塩田達雄、野間口雅子、足立昭夫、明里宏文、中山英美 サル指向性 HIV-1 のサル細胞でのウイルス増殖におけるカプシド α -ヘリックス 6-7 間のループの重要性. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 26 日、東京.
- 7) 横山 勝、大出裕高、野間口雅子、神田忠仁、足立昭夫、佐藤裕徳 HIV-1 Env V3 ループ構造の安定性を制御するアミノ酸. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 27 日、東京.
- 8) 三宅在子、野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、足立昭夫 HIV-1 増殖過程におけるインテグラーゼ (IN) C 末端領域 (CTD) の影響. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、2009 年 11 月 26 日、名古屋.
- 9) 黒石 歩、齊藤 暁、新開泰宏、塩田達雄、野間口雅子、足立昭夫、明里宏文、中山英美 サル指向性 HIV-1 のサル細胞でのウイルス増殖におけるカプシド α -ヘリックス 6-7 間のループの重要性. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、2009 年 11 月 26 日、名古屋.
- 10) 横山 勝、大出裕高、野間口雅子、神田忠仁、足立昭夫、佐藤裕徳 HIV-1 Env V3 ループ構造の安定性を制御するアミノ酸. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、2009 年 11 月 26 日、名古屋.
- 11) 野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、三宅在子、横山 勝、大出裕高、佐藤裕徳、足立昭夫 サル細胞指向性 HIV-1 の細胞馴化による増殖適応変異の解析. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、2009 年 11 月 28 日、名古屋.
- 12) 齊藤 暁、飯島沙幸、岩崎優紀、黒石 歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、俣野哲朗、明里宏文 第 2 世代サル指向性 HIV-1 クローンはカニクイザル個体において効率よく増殖する. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、2009 年 11 月 28 日、名古屋.
- 13) Miyake, A., Doi, N., Fujiwara, S., Adachi, A., and Nomaguchi, M. Analysis of growth adaptive mutations in HIV-1 genome identifies a pol-integrase region that enhances