

図6. 抗原提示細胞関連遺伝子

\* Fold change>2.0. ANOVA p,<0.05

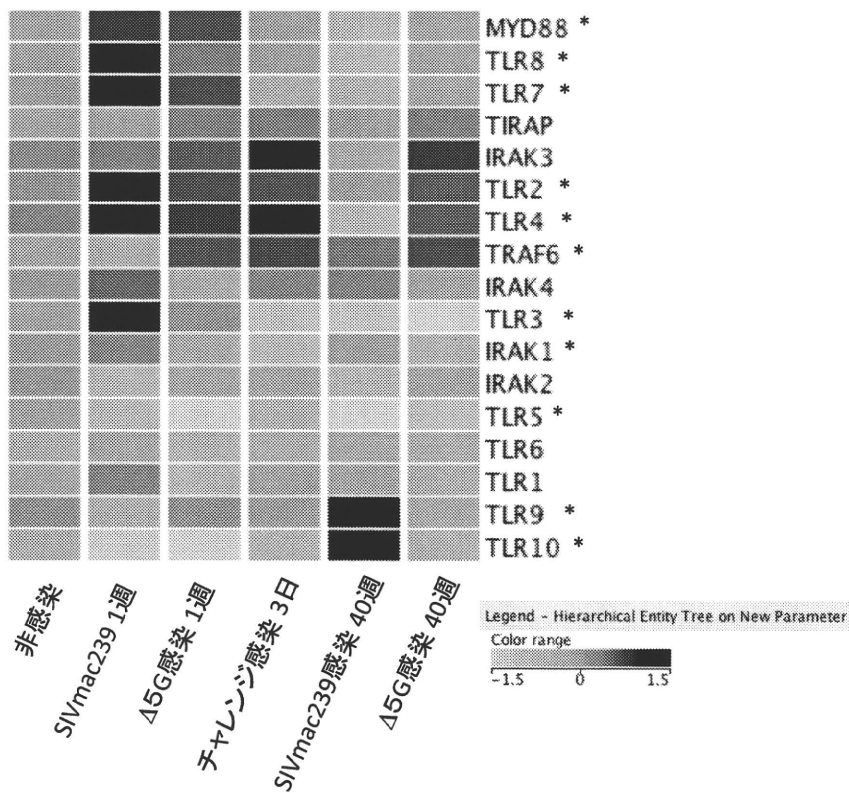


図7. Toll-like receptor関連遺伝子

\* Fold change>2.0. ANOVA p,<0.05

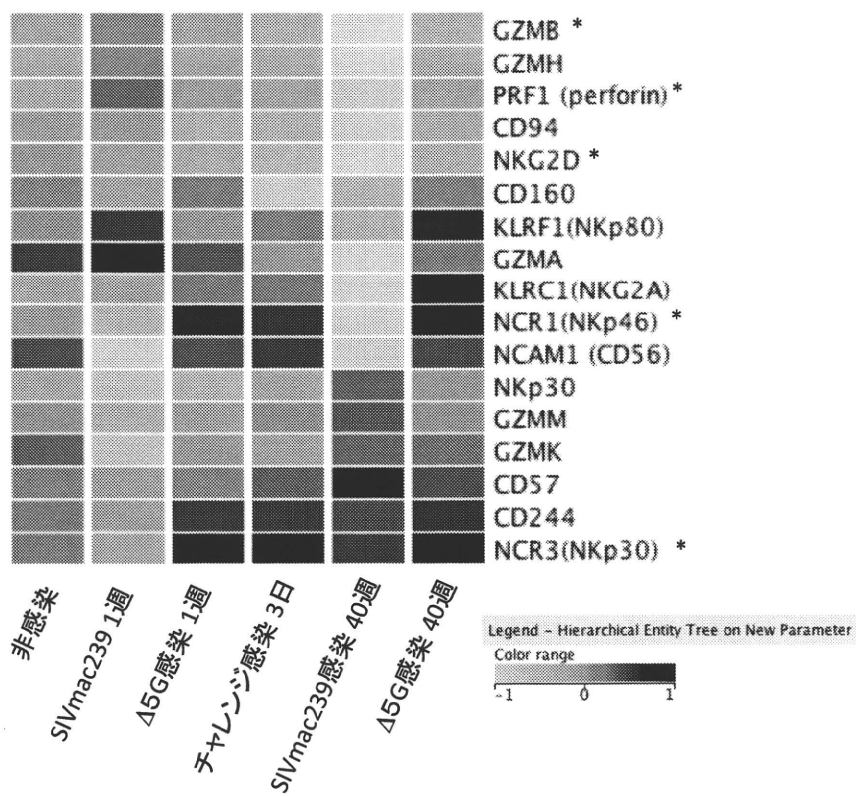


図8. NK細胞関連遺伝子

\* Fold change>2.0. ANOVA p,<0.05

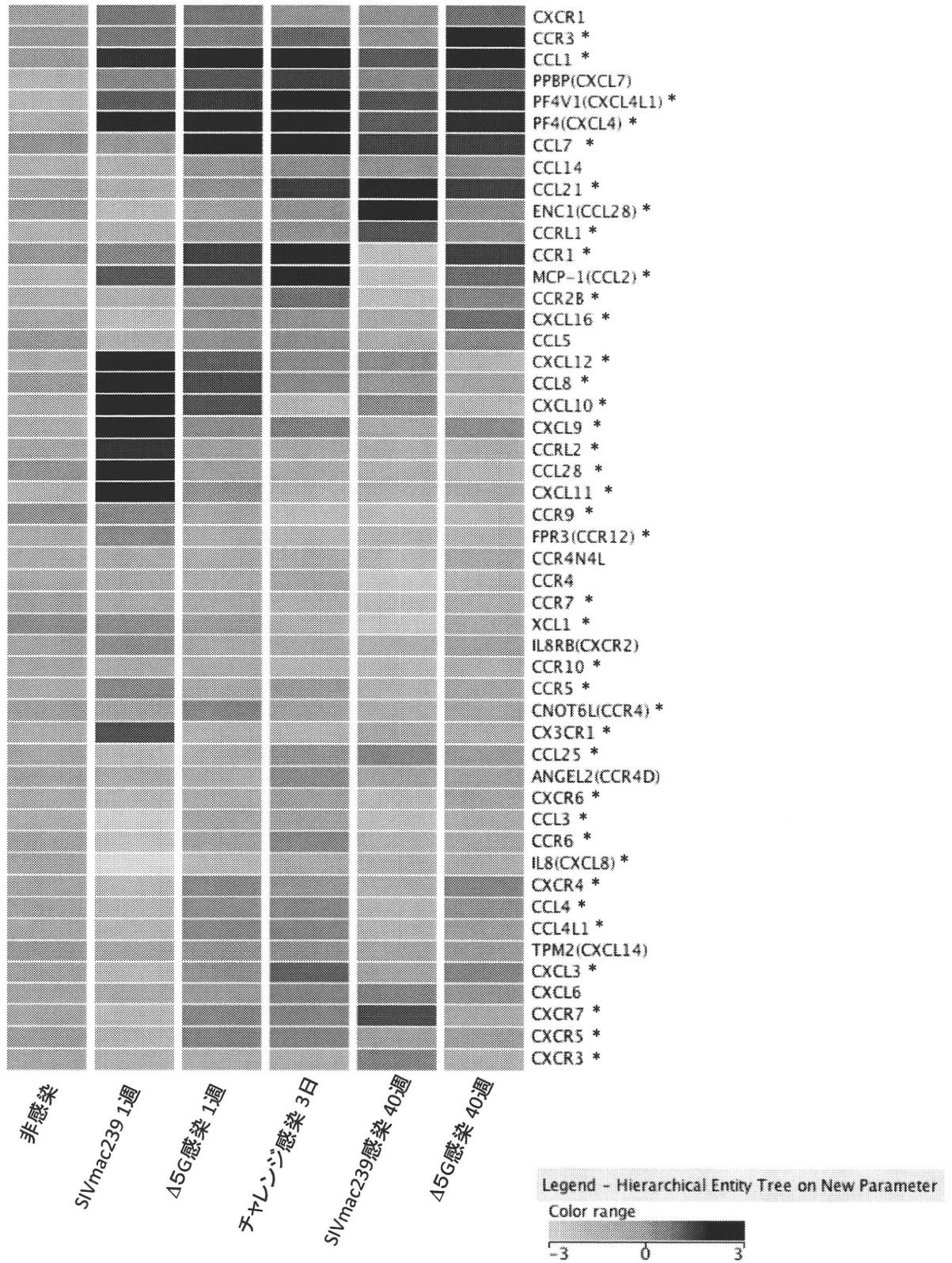


図9. ケモカイン関連遺伝子

\* Fold change>2.0. ANOVA p,<0.05

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

組換え BCG を用いたプライムブーストエイズワクチンの開発

分担研究者 松尾和浩 日本ビーシージー製造(株) 日本 BCG 研究所 研究開発部長

**研究要旨** BCG ベクターは、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、実用面での有用な性質を持っている上に、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を有することから、エイズワクチンへの応用が期待されている。昨年度、コドン至適化した 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 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を報告した。今回、さらに広範な CTL epitope に対する細胞性免疫誘導を期待して、コドン至適化 Gag に加え、SIV Env gp120 及び Rev-Tat-Nef 融合蛋白質を発現する BCG を構築した。これらの組換え BCG 株のカクテルでプライミングし、同じ遺伝子を発現する組換えワクシニアウイルス LC16m8Δ株でブーストするワクチンの感染防御能を、インド産アカゲザルで評価する実験が進行中である。また HIV-1 Gag および Env 特異的な CTL 評価系として、マウスでの MHC pentamer assay 系を確立した。この系で、Gag 高発現型組換え BCG の単独投与により、DBA/2 マウスで Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞誘導能を、免疫後早期に測定できることがわかった。今後改良型 BCG ベクターの評価を進める上で有用と考えられる。

**A. 研究の目的**

2009 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となった。また、Rouis Picker らのサルサイトメガロウイルスベクターワクチンによる、サルでのほぼ完璧な SIVmac 感染制御の結果は、ベクターワクチンによる細胞性免疫誘導型エイズワクチン開発を目指すものにとって、大いに勇気づけられる成果であった。

かねてより我々が開発中の BCG ベクターは、結核ワクチンとして多くの人に接種された実績から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、人でこそ試されるべき新規ワクチンベクターと考えている。昨年度、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および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を 100 倍弱程度抑制できることを報告し、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。

今年度は、さらに広範な CTL epitope に対する細胞性免疫誘導を期待して、コドン至適化 rBCG-SIVgag に加え、SIV Env gp120, Pol RT 及び Rev-Tat-Nef 融合蛋白質を発現する BCG を構築し、同じ遺伝子を発現する組換えワクシニアウイルス LC16m8Δ株（北海道大学遺伝子病制御研究所・志田壽利教授らが構築）とのプライムブーストワクチンを、インド産アカゲザルでの SIVmac low dose 経直腸頻回チャレンジの系で評価することを第一



の目的とした。また昨年度、高コピー数変異型プラスミド pSO246R を用いて構築した HIV-1 Gag 高発現株 rBCG/pSOR-NLgag のマウスでの細胞性免疫誘導能を、MHC pentamer を用いて解析することを第二の目的とした。

## B. 研究方法

(1) SIV Env, 逆転写酵素 (RT), および Rev-Tat-Nef融合蛋白質発現ベクターの構築

SIVmac239のプロウイルス全長を含むプラスミド pBRmac239 (New England Primate Research Center, Dr. Desrosiersより供与) を鋳型としてPCR法で増幅したSIV env gp120とRT遺伝子をそれぞれ、BCGのhsp60 promoterおよびterminatorを含むpUC-hspKプラスミドにクローニングする。得られた組換えプラスミドよりgp120およびRT発現カセットを切り出し、*Mycobacterium fortuitum*由来プラスミド pAL5000のレプリコンを含む抗酸菌-大腸菌シャトルプラスミドpSO246にクローニングして、発現ベクターpSO-SIV gp120およびpSO-SIV RTを得た (図1)。一方、SIVmac由来 Rev-Tat-Nef融合蛋白質遺伝子を含む pTK-RTNプラスミド (Harvard Medical School, Dr. Knipeより供与) から、Revの78番目のアミノ酸の下流とTat, NefをコードするDNA (*Pst*I-*Avr*II断片)を切り出し、Revの1-77番の配列をコードする合成遺伝子 (*Mun*I-*Pst*I断片)を介してpUC-hspKプラスミドに導入する。発現カセットをpSO246にクローニングして、pSO-SIV RevTatNefを得た (図1)。

(2) BCGへの遺伝子導入と抗原発現の解析

上記3種のpSO246をベースとしたSIV遺伝子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膜にブロッ

トした。Gp120およびRTコンストラクトには一次抗体としてSIVmac感染サル血清を、RevTatNefコンストラクトには抗SIV Nefマウスモノクローナル抗体を用い、二次抗体としてそれぞれ対応する種のアルカリホスファターゼ標識抗IgG抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。

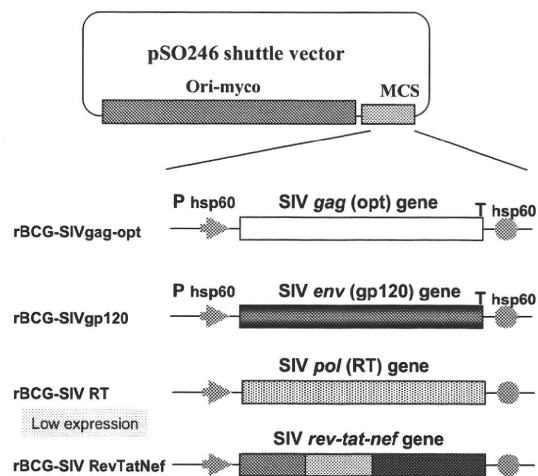


図1 種々のSIV遺伝子発現ベクターの構造

(3) HIV-1 GagおよびEnv特異的MHC pentamer assay法の確立

マウスMHC class I-H2d拘束性のEnv V3 epitope (IGPGRAFYA)およびGag p24 epitope (AMQMLKETI)のMHC pentamer (いずれもPE標識)は、Proimmune社より購入した。6-8週齢のBalb/cマウスにGag DNAワクチン (pVRC3900)およびEnv gp140 DNAワクチン (pVRC2824)を2週おきに50 µgずつ3回、筋肉注射により接種し、最後の接種の2週後に末梢血を採取して、CD3陽性、CD8陽性、MHC pentamer反応性の細胞をフローサイトメトリーで解析した。

(4) Gag高発現型組換えBCGのマウスにおける細胞性免疫誘導能の解析

6-8週齢のBalb/cマウスまたはDBA/2マウス (いずれもH2d) に、Gag発現型組換えBCG, 0.5 mgを皮内接種し、2週後の末梢血を用いて上記(3)と同様に、Gag特異的MHC pentamer反応性の細胞をフローサイトメトリーによ

り解析した。

(5) 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。動物実験は、国立感染症研究所動物実験実施規定に従って行った。

C. 研究結果

(1) SIV Env, RT および Rev-Tat-Nef 融合蛋白質の BCG での発現

pSO-SIV gp120, pSO-SIV RT および pSO-SIV RevTatNef をそれぞれ導入した BCG 東京株の菌体 lysate をウエスタンブロット法で解析した結果を図 2 に示す。RT 遺伝子を組み込んだクローンでは発現が弱く、免疫実験には使用困難と思われる (data not shown)。gp120 および RevTatNef 遺伝子を組み込んだクローンでは特異的なバンドが認められ、コドン最適化 Gag 発現クローンと同様に発現株が得られた。これら 3 種のクローンは組換えワクシニア LC16m8Δ とのプライムブーストワクチンのプライミングワクチンとして、サルでの感染防御能評価実験のため、京大ウイルス研に供与した。

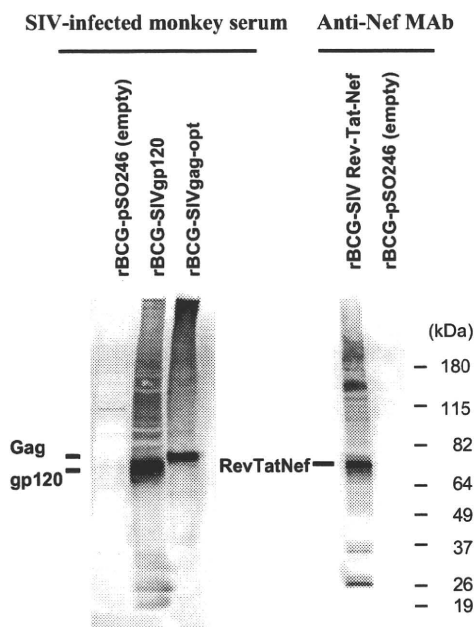
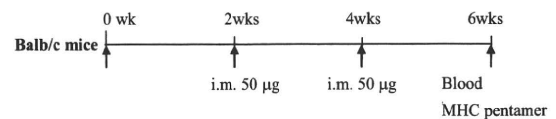


図 2 ウエスタンブロットによる SIV 抗原発現の解析

(2) HIV-1 Gag および Env 特異的 MHC pentamer assay 法の確立

BCG ベクターの免疫原性をさらに改良していくためには、BCG 単独接種で HIV 特異的な CTL 応答を簡便に測定できる高感度アッセイ系が必要である。米国 NIH ワクチン研究センターより供与された HIV-1 Gag および Env gp140 の DNA ワクチンをポジティブコントロールとして Balb/c マウスに接種し、末梢血中の Gag または Env 特異的 CD8 陽性 T 細胞を MHC pentamer assay で検出できるかどうかを検討した。図 3 に Gag 特異的 pentamer assay の結果を示す。DNA ワクチンを 3 回接種することにより、2%程度の CD8 陽性 T 細胞が pentamer 反応性の細胞として検出された。データは示さないが、Env の場合は 3 回の接種で数%の CD8 陽性 T 細胞が pentamer 陽性となり、アッセイ系を確立できた。

A. Experimental design



B. Pentamer assay (6 weeks)

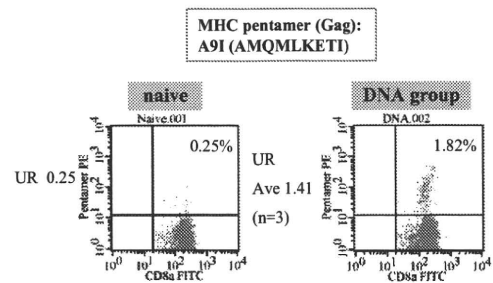


図 3 DNA ワクチンによる Gag 特異的 MHC pentamer 反応性細胞の誘導 A: 免疫およびサンプリングスケジュール、B: CD8 陽性 pentamer 陽性 T 細胞の検出

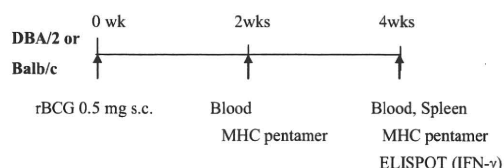
(3) Gag 高発現型組換え BCG のマウスにおける CTL 誘導能の解析

昨年度報告したように、高コピー型変異プラスミドを用いると BCG での Gag 発現レベ

ルが約 10 倍上昇し、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。そこで、野生型プラスミドに antigen 85B のプロモーター、シグナル配列を介して pNL-43 由来の gag 遺伝子を導入した pSO-NLgag と、同じ発現ユニットを高コピープラスミドに導入した pSOR-NLgag をそれぞれ形質転換した BCG を Balb/c および DBA/2 マウスに接種し、2 週後の Gag 特異的 CTL 誘導能を、上記 MHC pentamer assay により解析した。

Balb/c マウスでは有意な pentamer 反応性細胞の誘導は見られなかったが、DBA/2 マウスでは BCG/pSO-NLgag 接種群で 0.1-0.2%、BCG/pSOR-NLgag 接種群で 0.2-0.3% の CD8 陽性 T 細胞が pentamer 反応性細胞として検出された。その他のアッセイ (interferon- $\gamma$  ELISPOT assay 等) については現在検討中である。

#### A. Experimental Design



#### B. MHC pentamer assay (2 weeks)

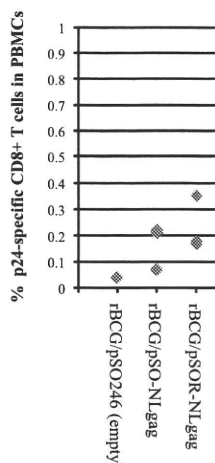


図4 組換え BCG 単独接種による Gag 特異的 MHC pentamer 反応性細胞の誘導 A: 免疫およびサンプリングスケジュール、B: CD8 陽性 pentamer 陽性 T 細胞の検出

#### D. 考察

SIV Env gp120, RT および Rev-Tat-Nef 融合

蛋白質の BCG での発現を試み、gp120 および Rev-Tat-Nef 融合蛋白質については著量発現する BCG 株を得たが、RT については発現が極めて弱く、動物実験に使用できる株は得られなかった。HIV-1 CRF01\_AE 由来の RT は大腸菌や BCG で発現できることがわかっていたので、今回の低発現は予想外の結果であった。Hsp60 promoter 以外の発現系を検討してみる必要がある。今回得られた gp120, Rev-Tat-Nef およびコドン至適化 Gag 発現の 3 種の組換え BCG 株をカクテルにしてプライミングし、同じ抗原を発現する組換えワクシニア LC16m8 $\Delta$ 株を 2 回ブーストするスケジュールでインド産アカゲザルを免疫し、SIVmac 251 の経粘膜低用量頻回チャレンジ系で感染防御能を評価する実験が進行中である。

BCG ベクターのポテンシャル増強のための改良研究を行う際に、マウスでの CTL 誘導能を簡便に評価するために、HIV-1 Gag および Env 特異的 MHC pentamer assay 系を立ち上げた。このアッセイ系を用いて、多コピー変異プラスミドを用いた Gag 高発現型 BCG 株の評価を行ったところ、BCG を単独接種した Balb/c マウスでは有意な反応が見られなかったのに対し、同じ MHC class I (H2d) を持つが、Balb/c と異なり抗酸菌に対する自然抵抗性遺伝子 (Nramp 遺伝子) を持つ DBA/2 マウスでは pentamer 陽性細胞が検出できた。DBA/2 マウスでは Balb/c マウスよりもマクロファージ中での菌の分解活性が強く感染早期に BCG が分解されることによって、発現した抗原のプロセッシングおよび抗原提示が起こるために、免疫誘導が起こりやすいのではないかと考えられる。これまでは、BCG ベクターのプライミング能を、ブースター後の細胞性免疫応答で評価していたため、実験が長期に渡っていたが、DBA/2 マウスを用いた pentamer assay を用いることにより、早期 (2 週間で) の評価が可能になる点で極めて有用と思われる。

## E. 結論

BoradなCTL epitopeに対する細胞性免疫誘導を期待して、コドン最適化 rBCG-SIVgagに加え、SIV Env gp120 及び Rev-Tat-Nef 融合蛋白質を発現する BCG を構築し、それぞれ高発現株を得た。これらの組換え BCG 株のカクテルでプライミングし、同じ遺伝子を発現する組換えワクシニアウイルス LC16m8Δ株でブーストするプライムブーストワクチンの感染防御能を、インド産アカゲザルでの SIVmac low dose 経粘膜頻回チャレンジ系で評価する実験が進行中である。

HIV-1 Gag および Env 特異的な CTL 誘導能評価系として、マウスでの MHC pentamer assay 系を確立した。この系を用いて、Gag 高発現型組換え BCG の単独投与により、DBA/2 マウスで Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞誘導能を、免疫後早期に測定できることがわかった。今後改良型 BCG ベクターの評価を進める上で有用である。

## F. 論文発表

1. Yoshino N, Kanekiyo M, Hagiwara Y, Okamura T, Someya K, Matsuo K, Ami Y, Sato S, Yamamoto N, Honda M. Intradermal delivery of recombinant vaccinia virus vector DIs induces gut-mucosal immunity. Scand. J. Immunol. 72: 98-105 (2010)
2. Matsuo K, Yamamoto N. Paradigm change in immune correlation: cellular or humoral? Expert Rev. Vaccines 9: 985-987 (2010)

## G. 学会発表

1. Matsubara A, Watanabe K, Kawano M, Mizuno S, Tsujimura Y, Inada H, Fukumura M, Nosaka T, Matsuo K, Yasutomi Y. Intranasal immunization with replication-deficient recombinant human parainfluenza type 2 virus-Ag85B showed protective effects against *Mycobacterium tuberculosis* infection. The Second Global TB Vaccine Forum, Tallin,

H. 知的財産権の出願・登録状況なし。

厚生労働省科学研究補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

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に関する研究

研究者分担者 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  
研究協力者 岡村智崇 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター 研究員

研究要旨

エイズウイルスに対する免疫反応を増強し、ウイルス制御の機構を知る目的で SHIV の *nef* 遺伝子を欠如させた SHIV-NI の *nef* 領域に強いアジュバント活性を示す分子である抗酸菌の分泌抗原 Ag85B 遺伝子を組み込んだ SHIV-Ag85B を作製し、カニクイザルに接種した。SHIV-NI は接種後 2 週目に血漿中のウイルス量はピークを示し、6~8 週で検出限界以下になったが SHIV-Ag85B は 1~2 週でピークを示したが、その値は SHIV-NI に比べ遥かに低く、感染後 2~4 週で検出限界以下となった。また、感染後 8 週目の抹消血 CD4+細胞では SHIV-NI 感染ではウイルスが検出されたが、SHIV-Ag85B では検出されなかった。また、SHIVgag 特異的 ELISPOT および抗体反応を検討したところ、これらのウイルス制御には細胞性免疫が大きく関わっていることが示唆された。以上のことから、エイズウイルスの制御には細胞性免疫が重要であると思われ、初期の細胞性免疫の誘導でウイルス制御が可能であることが示唆された。

A. 研究目的

エイズウイルスは生体の免疫反応を巧みに回避して慢性感染状態を維持し、最終的には宿主を免疫系の破綻を引き起こし、生体を死に導く。このような過程を踏まえるとエイズウイルスを制御するためには感染初期からの強力な免疫反応が必要と考えられ、このことはワクチン開発においても重要であると思われる。一方、エイズウイルスに対するワクチン開発では中和抗体を誘導する液性免疫に加え細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) の誘導を中心とした細胞性免疫の誘導が必須である。本研究では *nef* 遺伝子を取り除くことにより病原性が低下し、さらにそれにより弱毒ワクチンとして機能をも失った弱毒ウイルス SHIV-NI を用い、このウイルスの *nef* 部分に強力なアジュバント活性を持つ抗酸菌分泌抗原 Ag85B 遺伝子を組み込み、免疫誘導能の極めて低い弱毒ウイルスの免疫原性を高め、ウイルス

制御と免疫反応の解析を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1. 免疫スケジュール

構築した SHIV-Ag85B の免疫誘導能を解析するため、当センターで繁殖しているカニクイザルを用いて評価した。比較対照群として、Ag85 遺伝子を持たない親株 SHIV-NI を用いる。投与量は  $10^6$ TCID<sub>50</sub>、静脈内接種を用いた。接種後、経時的に採血を行い、血漿中のウイルスコピー数や CD4+T 細胞数の算定および各種免疫実験を行った (図 1)。

2. ウイルスコピー数および CD4+T 細胞数

ウイルスコピー数は、血漿からウイルス RNA を抽出し、SIVgag 特異的 Primer および probe を用いて Real time PCR を行った。CD4+T 細胞数の算定およびメモリー T 細胞分画の解析には、血液を各種 CD

抗体 (CD3/CD4/CD8/CD28/CD95) にて染色し、フローサイトメーターを用いて算定した。

### 3. 細胞性免疫の解析 (IFN- $\gamma$ 産生細胞数の測定)

採取した血液から PBMC を分離し、SIVgag-Pool peptide にて再刺激を行い、Monkey IFN- $\gamma$  ELISPOT Kit を用いて、SIVgag 特異的 IFN- $\gamma$  産生細胞数を測定した。

### 4. 液性免疫の解析 (抗体価)

SIVgag 特異的な IgG 抗体価を測定するため、2 倍階段希釈した血漿を用いて ELISA 法を行った。

### 5. 免疫動物におけるアジュバント遺伝子保存状況およびプロウイルス遺伝子の検索

免疫動物の PBMC より DNA の抽出を行い、Ag85B 特異的 primer および SIVgag 特異的 Primer を用いて PCR 法を行った。

### 6. 倫理面への配慮

本研究では動物実験申請等の必要な委員会での承認は既に得ており、ヒトサンプル、情報等は一切用いていない。

## C. 研究結果

### 1. 血漿中ウイルス量

血漿中のウイルスコピー量を Real time PCR にて測定したところ、SHIV-NI では接種後 2 週目にピークを示し、6~8 週までウイルスが検出されたのに対し、SHIV-Ag85B 接種群では 3 頭中 2 頭が 1 週目にピークを示し、その値は SHIV-NI の数十分の一であった。また、感染後 2~4 週で検出されないようになった (図 2)。

### 2. SIVgag 特異的 ELISPOT assay

感染ザルの末梢血を用いて SIVgag に対する ELISPOT assay を行ったところ、SHIV-Ag85B 感染カニクイザルは SHIV-NI 感染に比べ早期に非常に高い反応が誘導されており、末梢血からのウイルスが検出限界以下となつてからも認め

られた (図 3)。また、この ELISPOT assay を CD8+T 細胞において CTL として感染後 2 週目に測定したところ、SHIV-Ag85B 感染群では明らかに高い活性が認められた (図 4)。

### 3. 抗体反応

SIVgag 特異的抗体反応を検討したところ、SHIV-NI 感染群において SHIV-Ag85B 以上に高い抗体反応が認められた (図 5)。また、Ag85B に対する抗体も同時に測定したところ、SHIV-Ag85B 感染カニクイザルにおいても低い値、もしくは検出限界以下であった (図 6)。

### 4. CD4+T 細胞の変化

感染ザルにおける末梢血 CD4+T 細胞および CD4+ Naïve T 細胞数を調べたところ、観察期間中ではいずれのウイルスの感染でも差は認められず、病原性は示されなかった (図 7、8)。

### 5. 感染ザルにおけるウイルス遺伝子の検出

感染 8 週後に両群において Ag85B および SIVgag 遺伝子を末梢血リンパ球より検出したところ、SIVgag は SHIV-NI 感染群では認められたが、SHIV-Ag85B では認められず、Ag85B 遺伝子はいずれの群においても認められなかった (図 9)。また、感染後 40 週時点においても同様の結果であった。このことより SHIV-Ag85B は慢性感染を示さず、排除されたと考えられた。

## D. 考 察

感染症ワクチンにおけるアジュバントは通常、死菌や合成タンパク等に添加し免疫増強効果をもたらす。本研究では他に類を見ない、弱毒ウイルスにアジュバント遺伝子を挿入し、ウイルスに対する免疫誘導効果を高めるという手法を用いた。このことは現時点で実用化はもちろん、研究レベルでも殆ど報告の無い全



く新規の試みである。

抗酸菌分泌抗原 Ag85B は強力なアジュバント活性を持つことが知られている。本研究においても Ag85B 組み込み SHIV はコントロールに比べ、極めて早期にウイルスが排除された。また、ウイルス特異的な細胞性免疫誘導も強力に誘導されていることが示されており、Ag85B によるアジュバント効果が明瞭に示された。

本研究の結果からエイズウイルスの制御には細胞性免疫が重要であることが示され、この制御メカニズムを検討することがエイズウイルス感染症の病態やワクチン開発研究等に有効であると考えられた。今後、アジュバント分子組み込み SHIV 投与ザルに対し、ホモまたはヘテロのウイルスを攻撃接種し、そのウイルス制御効果を検討する。

#### E. 結論

抗酸菌分泌タンパク Ag85B を発現する SHIV の免疫増強効果をカニクイザルにおいて確認した。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yoshida, T., Saito, A., Iwasaki, Y., Iijima, S., Kurosawa, T., Katakai, Y., Yasutomi, Y., Reimann, K.A., Hayakawa, T. and Akari, H. Characterization of natural killer cells in tamarins: a technical basis for studies of innate immunity. *Frontiers Microbiol.* 2011 in press

2. Xing, Li., Wang, J.C., Li, T-C., Yasutomi, Y., Lara, J., Khurdyakaov, Y., Schofield D., Emerson, S., Purcell, R., Takeda, N., Miyamura, T. and Holland, R.C. Spatial configuration of hepatitis E virus antigenic domain. *J. Virol.*

2011;85:1117-1124.

3. Chono, H., Matsumoto, K., Tsuda, H., Saito, N., Lee, K., Kim, S., Shibata, H., Ageyama, N., Terao, K., Yasutomi, Y., Mineno J., Kim, S., Inoue, M. and Kato, I. Acquisition of HIV-1 resistance in T lymphocytes using an ACA-specific E.coli mRNA interferase. *Human Gene Ther.* 2011;22:35-43.

4. Saito, A., Nomaguchi, M., Iijima, S., Lee, Y-J., Kono, K., Nakayama, E.E., Shioda, T., Yasutomi, Y., Adachi, A., Matano, T., Akari, H. A novel monkey-tropic HIV-1 derivative encoding only minimal SIV sequences can replicate in cynomolgus monkeys. *Micorbes Infect.* 2011;13:58-64.

5. Naruse, T.K., Zhiyong, C., Yanagida, R., Yamashita, T., Saito, Y., Mori, K., Akari, H., Yasutomi, Y., Matano, T. and Kimura, A. Diversity of MHC class I genes in Burmese-origine rhesus macaques. *Immunogenetics* 2010;62:601-611.

6. Okabayashi, S., Uchida, K., Nakayama, H., Ohno, C., Hanari, K., Goto, I. and Yasutomi, Y. Periventricular Leucomalacia (PVL)-like lesions in two neonatal cynomolgus monkeys (macaca fascicularis). *J.Comp.Pathol.* 2010 Epub

7. Yasuhiro Yasutomi. Establishment of Specific Pathogen-Free Macaque Colonies in Tsukuba Primate Research Center of Japan for AIDS research. *Vaccine* 2010;B75-B77.

8. Fujimoto, K., Takano, J., Narita, T., Hanari, K., Shimozawa, N., Sankai, T., Yoshida T., Terao, K., Kurata, T. and Yasutomi, Y. Simian Retrovirus type D infection in a colony of cynomolgus monkeys. *Comp.Med.* 2010;60:51-53.

9. Cueno, M.E., Karamatsu, K., Yasutomi, Y., Laurena, A.C. and Okamoto, T. Preferential expression and immunogenicity of HIV-1 Tat fusion protein expressed in tomato plant.

Transgenic Res. 2010;19:889-895.

## 2. 学会発表

### 「国内」

1) 塩釜ゆみ子、松原明弘、河岡義裕、保富康宏：ヘルパーT細胞（Th）制御によるインフルエンザ感染病態とワクチン効果の検討第13回日本ワクチン学会 東京2010年12月11日-12日

2) 保富康宏：アジュバント分子組み込みエイズウイルスの開発（シンポジウム）第24回日本エイズ学会、東京、2010年11月24日～26日

3) 齊藤暁、河野健、黒石歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、保富康宏、俣野哲朗、明里宏文：カニクイザル TRIM5 allele がサル指向性 HIV-1 の増殖に与えるインパクト第24回日本エイズ学会、東京、2010年11月24日～26日

4) 下澤律浩、高橋一郎、柴田宏昭、伊奈田宏康、野阪哲哉、保富康宏：カニクイザル体細胞に由来する人工多能性幹細胞の作製第57回日本実験動物学会、京都、2010年5月12日～14日

### 「国際」

1) Yusuke TSUJIMURA, Yasuhiro YASUTOMI : Therapeutic effects of Ag85B in allergic asthma by inducing not only Th1 response but also Interleukin-17, -22 production. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology. Kobe Japan, August 22-27, 2010.

2) Akihiro Matsubara, Kenta Watanabe, Mitsuo Kawano, Satoru Mizuno, Yusuke Tsujimura, Hiroyasu Inada, Masayuki Fukumura, Isamu Sugawara, Tetsuya Nosaka, Kazuhiro Matsuo, Yasuhiro Yasutomi:

Intranasal immunization with replication-deficient recombinant human parainfluenza type 2 virus-Ag85B showed protective effects against *Mycobacterium tuberculosis* infection. TB Vaccines. A

Second Global Forum, Tallinn, Estonia September 21-24, 2010.

3) Yasuhiro Yasutomi: Gene delivery of suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) showed therapeutic effects to autoimmune myocarditis in mice. 2<sup>nd</sup> Annual International Congress of Cardiology, Shanghai, China, December 7-9, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

特許出願

(1) パラミクソウイルスベクターを用いた経鼻噴霧型結核ワクチン (PCT/JP2010/069435)

Monkey (age, Sex)	Antigen	Dose
#501006	SHIV-Ag85B	$10^6$ TCID <sub>50</sub>
#509108		
#508096		
#505060	SHIV-NI	$10^6$ TCID <sub>50</sub>
#511128		

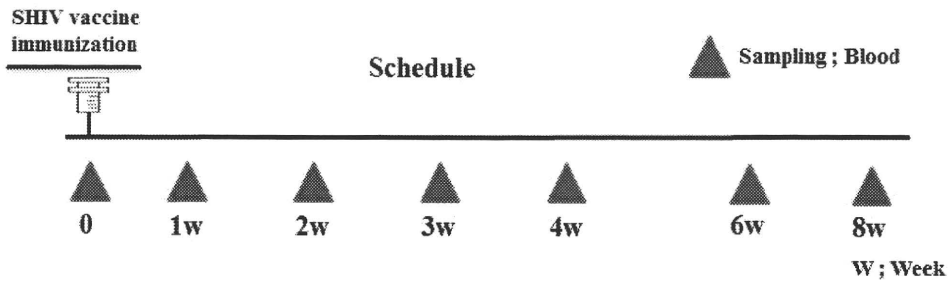


図1. カニクイザルへのSHIV-NIおよびSHIV-Ag85B接種

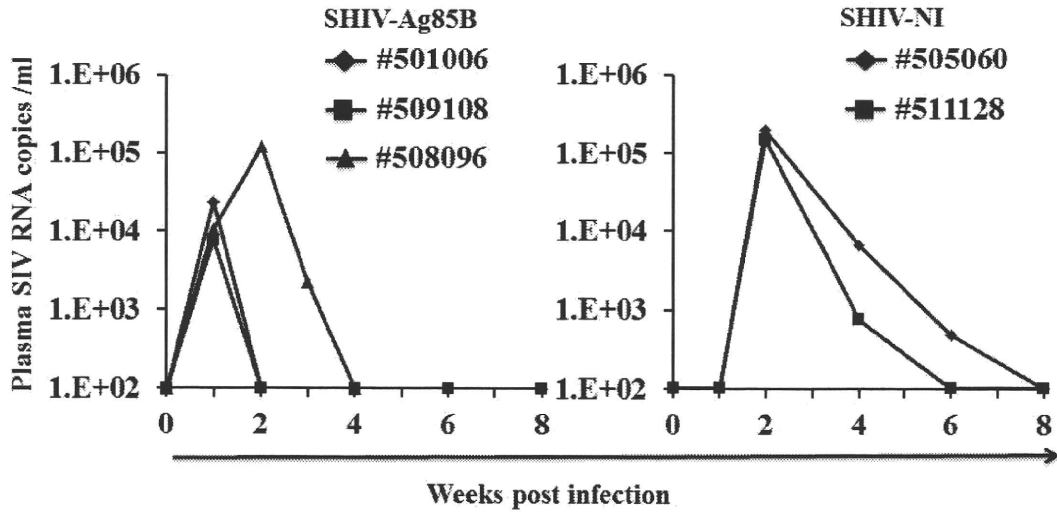


図2. SHIV接種カニクイザルの血漿中ウイルスコピー数

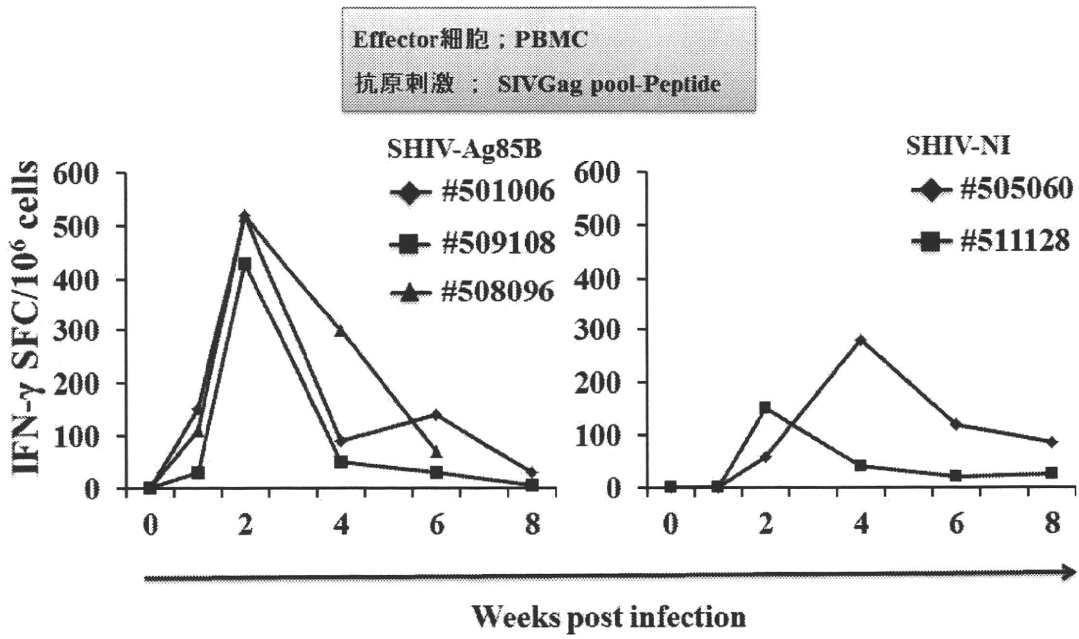


図3.SIVGag特異的IFN-γ産生細胞

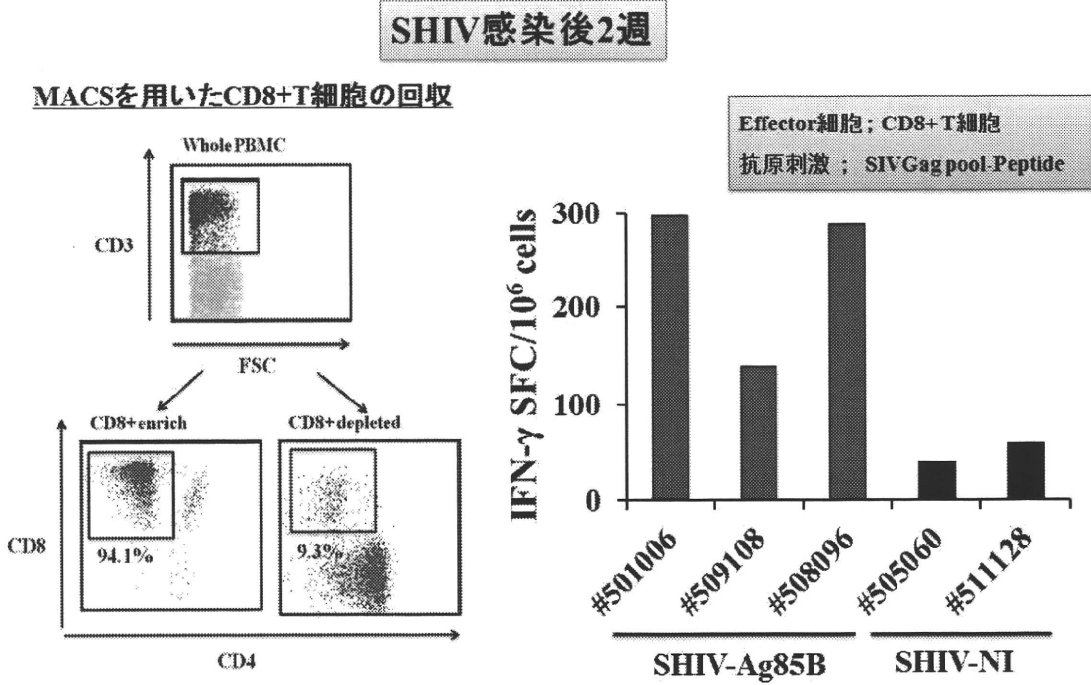


図4. CD8+ T細胞を用いたSIVGag特異的IFN-γ産生細胞

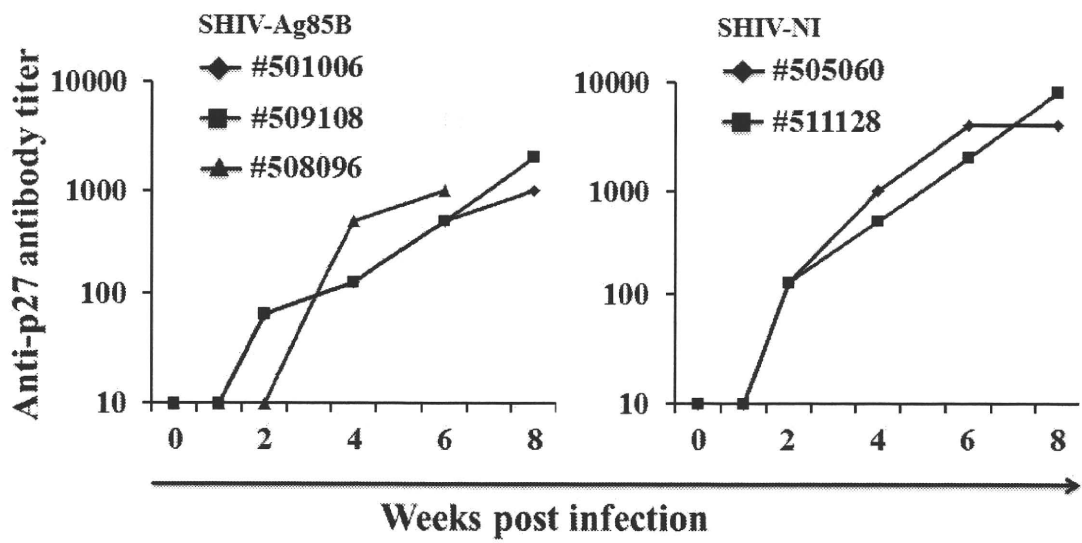


図5. SIVgag特異的IgG抗体

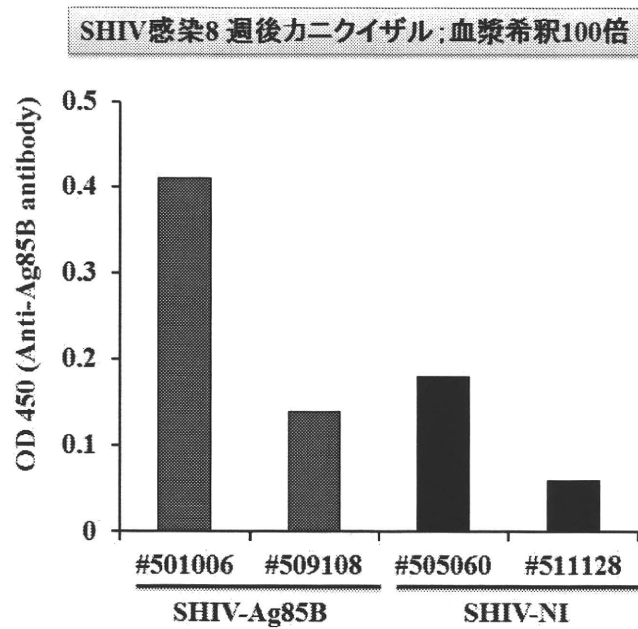


図6. Ag85B特異的IgG抗体

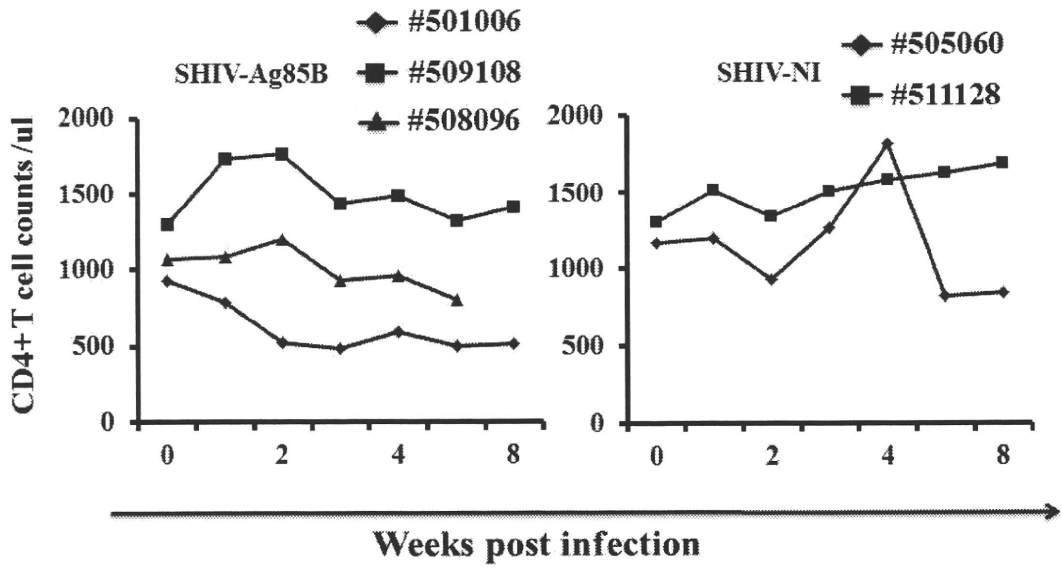


図7. SHIV感染カニクイザルのCD4+T細胞数

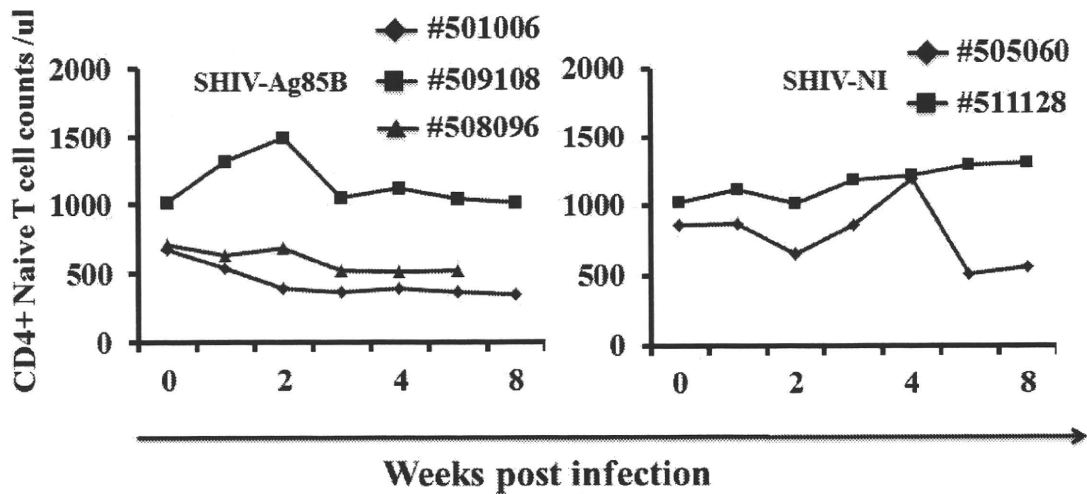


図8. SHIV感染カニクイザルのCD4+Naive T細胞の推移



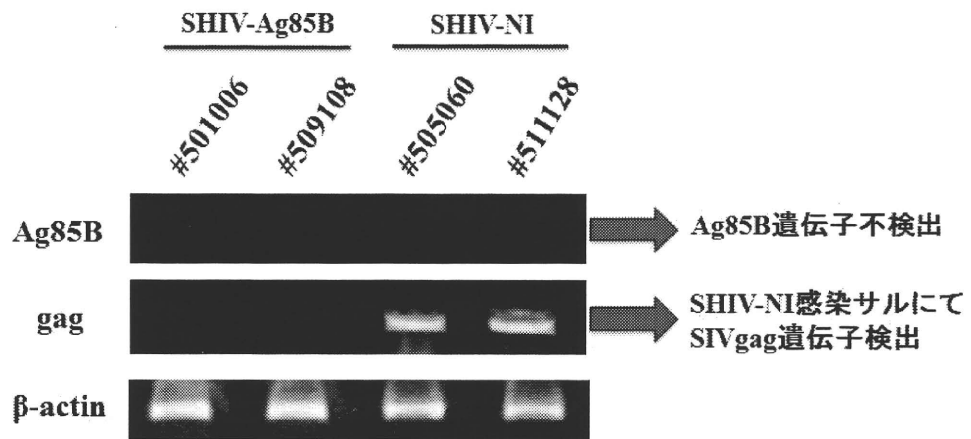


図9. SHIV感染8週間後、感染細胞内における遺伝子保存状況

弱毒ワクシニアベクターによるエイズワクチン開発

分担研究者 志田壽利 北海道大学遺伝子病制御研究所

研究要旨 今年度、HIV-1 特異的細胞性と抗体の両免疫を効率よく誘導する方法として m8Δenv prime/SeVenv boost 法を見いだした。さらに、至適量を発現する m8Δ-p7.5-hCD40Lm が両免疫を増強することを見いだした。

## A 研究目的

HIV に対するワクチン用のベクターとして、増殖するがまだ安全なワクシニア株は、格段に強い抗 HIV 免疫を誘導する為のベクターとなりうる。以前に、我々は日本の種痘株として 10 万人に接種され、重篤な副作用の報告がなかった LC16m8 株を改良し、より安全な LC16m8Δ株を作成した。本株は世界中で頻用されている MVA 株より約 1000 倍強い抗強毒ワクシニア抵抗力を付与した。そこで、本株をベクターとして HIV/SIV の種々のコンポーネントを発現する組換えウイルスを作製して免疫原性と感染制御能を検討している。

従来ウイルスベクターは抗 HIV-1 細胞性免疫の誘導の為に用いられてきた。特に世界標準の免疫法である DNA ワクチン prime/ウイルスベクター boost のスケジュールでは抗体の誘導は微弱である。しかし、有効な抗 HIV-1 ワクチンとして抗体と細胞性免疫の両方を誘導することが望ましいと考えられている。そこで、今年度は両免疫を誘導する為の方法として m8Δとセンダイウイルス(SeV)ベクターの共免疫法を試みた。また、ワクシニアウイルスの接種法の検討、免疫活性化因子 CD40Lm 免疫増強効果を引き続き調べた。

## B 研究方法

### 組換えワクシニア株:

m8ΔHIVenv(JR-CSF); m8Δ株の HA 遺伝子内に pSFJ1-10 プロモーターを組み込み、その下流に HIVenv を発現する。

m8Δ-p7.5-hCD40Lm:m8Δの HA 遺伝子内に p7.5 プロモーターと hCD40Lm を挿入。

m8Δ-pSFJ1-10-hCD40Lm: m8Δの HA 遺伝子内に pSFJ1 プロモーターと hCD40Lm を挿入。

pCAGGS-env(JRCSF):pCAGGS の EcoRI site に JR-CSF の gp160 遺伝子を挿入した。

SeV-env(JRCSF):JRCSF 株の gp160 を発現する非増殖型センダイウイルスベクター (ディナベック社より供与)

蛋白質の検出: 各種組換えウイルスに発現する蛋白質は、RK13 又は 293T 細胞に moi3 で感染させて、24 時間後に各種抗体、血清を用いた Western blotting によって検出した。

### マウスのワクチネーション:

スケジュール 1 : マウス C57BL6 (8 週令)に 50ug pCAGGS-env を 2 週間隔で 2 回筋肉注射し、さらに 8 週後に  $1 \times 10^7$  PFU の組換え m8Δを皮内又は乱利法でブーストした。

スケジュール 2 :  $1 \times 10^7$  PFU の組換え m8Δを乱利法で接種し、8 週後に SeV-env を経鼻接種した。Intracellular cytokine assay (ICS): 最終免疫 2 週後に、免疫マウスの脾臓細胞を HIV gp160 の 15mer overlapping peptide library とともに培養し、抗 CD4/CD8/IFN- $\gamma$  抗体で標識後 FACScalibur を用いて分析した。

### 抗 Env 結合抗体の測定:

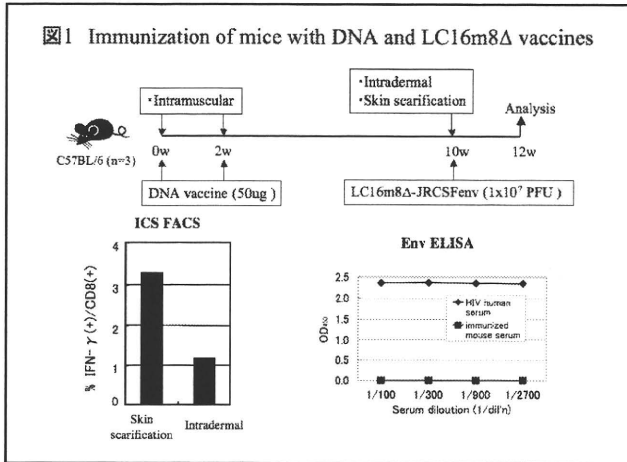
ELISA:pCAGGS-env(JRCSF)を transfection した 293T 細胞を detergent で溶解し、96 well ELISA plate に加えて保温した。洗浄と blocking 後、免疫マウス血清を段階希釈後加え、さらに HRP 標識-抗マウス IgG 抗体を反応させた。発色後、OD495 で吸光度を測定した。対照として空の pCAGGS を transfection した 293T 細胞を用いた。

中和アッセイ: 段階希釈したマウス血清を SF162env シュードウイルスと混合して、37C 60 分保温した。そして、TZM-bl 細胞と混合 3 日培養後、ルシフェラーゼ活性を測定した。非免疫マウス血清の半分のルシフェラーゼ活性を示す血清の希釈を中和力価の指標とした(ID50)。

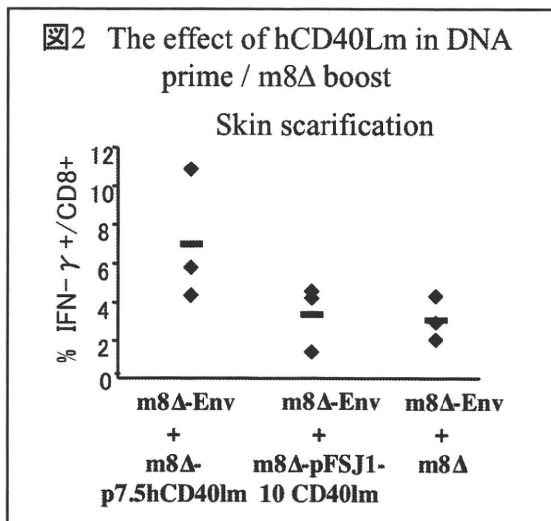
## C 研究成果

DNA prime/m8Δ boost スケジュールにおける免疫誘導: DNA ワクチン prime/ウイルスベクター boost による免疫法は最も詳しく調べられている。そこで、m8Δenv の免疫誘導能を調べる為にマウスを pCAGGSenv で prime し、m8Δenv で boost して IFN- $\gamma$  産生 CD8+ T 細胞と抗 Env 抗体の誘導を調べた。Boost の際に、皮内と乱利接種法の比較をした (図 1)。乱利法で接種した場合 CD8+ T 細胞中 3.3% が Env 特異的に IFN- $\gamma$  を生産していた。一方、皮内接種では 1.2% の CD8+T 細胞が生産していた。このことは乱利法の方が効率の良い免疫法であることを示している。他方、抗 Env 抗体はいずれの方法でも、全く誘導されていなかった。このことは、DNA prime/ウイルスベクター boost による免疫法に関する多くの報告と一致し

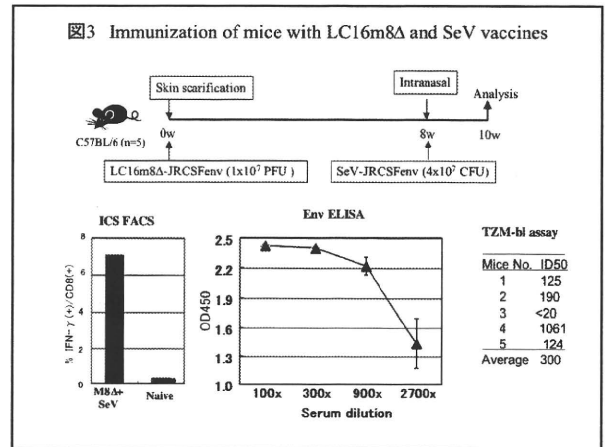
ている。



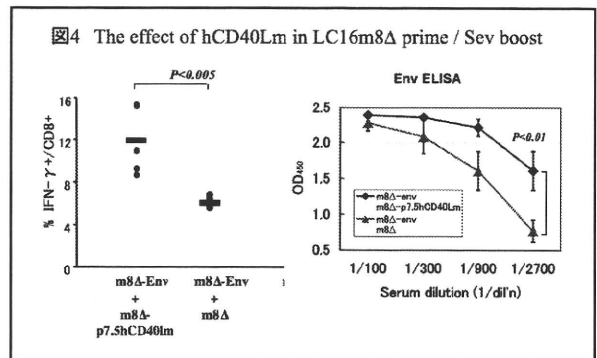
ついで、hCD40Lm の効果を調べる為に hCD40Lm 発現 m8Δ と m8Δenv を混合して免疫した。この際に、hCD40Lm 低発現の m8Δ-p7.5-hCD40Lm と高発現の m8Δ-pSFJ1-10-hCD40Lm を比較した。図2に示すように m8Δ-p7.5-hCD40Lm と混合免疫すると、約2倍の IFN-γ 産生 CD8+ T 細胞が誘導された。しかし、m8Δ-pSFJ1-10-hCD40Lm は効果がなかった。



**M8Δ prime/SeV boost スケジュールにおける免疫誘導**：HIV-1 に対する細胞性免疫と抗体の両方を誘導できる免疫法を開発する為に、m8Δ と SeV ベクターを prime/boost して検討した。M8Δ は乱刺法、SeV は経鼻接種した。図3に示すように、本免疫法は 6.5% に及ぶ Env 特異的 IFN-γ 産生 CD8+ T 細胞を誘導した。この値は DNA prime/m8Δ boost を上回る。また、ELISA で測定したところ、高力価の抗 Env 抗体を誘導していた。さらに、中和抗体をも誘導していた。これらのことは m8Δ prime/SeV boost ワクチネーション法は細胞性と液性両免疫を誘導できることを示している。



ついで、hCD40Lm の効果を調べる為に m8Δ-p7.5-hCD40Lm と m8Δenv を混合して prime し、SeV で boost した (図4)。その結果、本免疫法においても m8Δ-p7.5-hCD40Lm は IFN-γ 産生 CD8+ T 細胞の誘導を約2倍亢進させた。抗 Env 抗体も有意に効率よく誘導した。



#### D 考察

今年度、細胞性と液性免疫の両方の免疫を誘導する為に、m8Δenv prime/SeVenv boost の免疫法を試みた。期待通り、Env 特異的 IFN-γ 産生 CD8+ T 細胞と抗 Env 抗体を誘導した。Env 特異的 IFN-γ 産生 CD8+ T 細胞の誘導能は DNA prime/m8Δ boost 以上であった。細胞性液性両免疫を効率よく誘導できる HIV-1 ワクチンの報告はこれがはじめてである。ついで、細胞性液性両免疫に対する CD40Lm の免疫増強効果を見いだした。興味深いことに CD40Lm 低発現の m8Δ-p7.5-hCD40Lm が効果を示したのに対し、高発現の m8Δ-pSFJ1-10-hCD40Lm は効果を示さなかった。このことは免疫増強には至適量の CD40Lm が要求されることを示唆している。

#### E 結論

今年度、HIV-1 特異的細胞性と液性の両免疫を効率よく誘導する免疫法として m8Δenv prime/SeVenv boost 法を見いだした。さらに、至適量を発現する m8Δ-p7.5-hCD40Lm が両免疫を増強することを見いだした。

## F 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Mika Nagai-Fukataki, Takashi Ohashi, Iwao Hashimoto, Tominori Kimura, Yoshiyuki Hakata, Hisatoshi Shida (2011): Nuclear and Cytoplasmic Effects of Human CRM1 on HIV-1 Production in Rat Cells. *Genes to Cells* In press
- (2) Makoto Abe, Hitoshi Suzuki, Hironori Nishitsuji, Hisatoshi Shida, Hiroshi Takaku (2010): Interaction of human T-cell lymphotropic virus type I Rex protein with Dicer suppresses RNAi silencing. *FEBS Lett.* 584:4313-4318.
- (3) Xianfeng Zhang, Mariko Kondo, Jing Chen, Hiroyuki Miyoshi, Hajime Suzuki, Takashi Ohashi, Hisatoshi Shida (2010): Inhibitory effect of human TRIM5 $\alpha$  on HIV-1

production. *Microbes and Infection*  
12:768-777

### 2. 学会発表

1. 祖父江友芳、大橋貴、志田壽利：抗 Env 免疫誘導に対する CD40Lm の効果 第24回日本エイズ第学会学術総会 平成22年11月 グランドプリンスホテル 東京

## G 知的所有権の取得状況

1. 特許出願：「ワクシニアウイルスベクターおよびセンダイウイルスベクターからなるプライム/ブーストワクチン用ウイルスベクター」出願番号：特願2010-237954号
2. 特許取得：「高度安全性痘瘡ワクチンウイルスおよびワクシニアウイルスベクター」出願番号 2006-511272