

201124008A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 森 一泰

平成24（2012）年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
HIV の感染防止、AIDS 発症防止に関する免疫学的基礎研究	・・・ 1
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)	
II. 分担研究報告	
1. 生ワクチンにより誘導される感染防御の解析	・・・ 15
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)	
2. 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	・・・ 24
松尾 和浩	
3. 弱毒ワクシニアベクターによるエイズワクチン開発	・・・ 28
志田 壽利 (北海道大学遺伝子病制御研究所 教授)	
4. 汎 HIV-1 株中和能を有する抗体誘導に関する研究	・・・ 31
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)	
5. HIV-1 の中和抗体誘導	・・・ 37
高橋 秀宗 (国立感染症研究所 感染病理部室長)	
6. HIV の感染防止粘膜ワクチンの創製	・・・ 39
庄司 省三 (熊本大学 名誉教授、熊本保健科学大学 教授)	
7. 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	・・・ 44
玉村 啓和 (東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授)	
8. 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	・・・ 60
三浦 智行 (京都大学ウイルス研究所 准教授)	
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	・・・ 63
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	・・・ 70
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バキュロウイルス粒子の構築とその自然免疫 応答の誘導能	・・・ 76
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	・・・ 79
IV. 研究成果の刊行物・別刷 (抜粋)	・・・ 89

I. 総括研究報告

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 森 一泰（国立感染症研究所 主任研究官）

研究要旨

HIV-1 ワクチン開発研究における課題：エイズウイルス感染制御に働く宿主応答の解明、プライム・ブーストワクチンの開発、広域中和抗体誘導法、細胞性免疫誘導法、ワクチン評価モデル開発に関し、以下の研究を行った。

1. エイズウイルス感染制御モデルを用いた感染制御に関わる宿主応答の解析

糖鎖変異 SIV 感染が誘導する防御免疫に関し新たな知見が得られた。1) 多様な変異ウイルスに対する高い感染抑制効果が確認された。2) 慢性感染期の感染制御に働くエフェクター細胞について SIV 特異性に関する知見が得られた。3) HIV 感染防御に最も重要と考えられる初期感染期の防御免疫について、感染標的細胞の供給抑制が感染抑制の機構として働いている可能性を示唆する結果が得られた。

2. プライム・ブーストワクチンの開発

Gag、Env gp120 及び Rev-Tat-Nef を発現する BCG 株 3 種でプライミングし、同じ遺伝子を発現する組換えワクシニアウイルス LC16m8D 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した。免疫群 2 頭中 1 頭で、SIVmac 251 の低用量頻回チャレンジを完全に防御し、このレジメンの有用性が示唆された。m8Δenv prime/SeVenv boost 法は、細胞性と液性の両免疫を効率よく誘導した。hCD40Lm を priming 時の発現は、両免疫を増強した。

3. 広域中和抗体誘導の研究

V3 ループの先端をエピトープとする中和抗体 KD-247 の感受性と結合性の解析から、ワクチン標的として有望な V1/V2 ループと V3 ループ間にリガンド非結合—結合状態を通じた相互作用が存在し、これが定常状態における相互作用と質的に異なる事を明らかにした。

有機合成化学によるワクチン創製： 1) HIV 表面蛋白 gp41 の立体構造変化をターゲットとして設定し、gp41 の C 端側ヘリカル領域の断片ペプチド C34 を化学合成した。この C34 の 3 量体は単量体と比べ 100 倍高い阻害活性を有し、マウスで中和抗体を誘導した。gp41-N36 3 量体は HIV 感染モデルラットで免疫し、抗体を誘導した。2) 宿主細胞側のコレセプター CXCR4 の N 端領域および 2 種の細胞外ループ (Ecl1-Ecl2) を人工テンプレート上に構築した分子を合成し、マウスに免疫し、抗体は中和活性を示した。3) 宿主側の CD4 の小分子 mimic の構造活性相関研究を行った。その際、HIV 侵入の阻害活性と gp120 構造変化の誘起効果を評価した。

広域中和エピトープとして知られている gp41 の脂質膜に近い領域 (MPER) を標的とするために、HIV-1 様粒子から脂質膜を取り除いた Core-Env を抗原とした。ラット血清による中和アッセイでは、サブタイプ A, AG, B, D の env を有するシュードウイルスに対し、100 倍で中和能を示すものがあった。Core-Env 抗原は、広域中和抗体誘導抗原として有効な可能性がある。

Senju vaccine で基礎免疫後、Senju 抗原との一次構造、あるいは高次構造の類似性が存在すると思われる交叉免疫抗原 (Wobbling X protein) で免疫することによって、交叉免疫応答が誘導された。抗 ENV 抗体と抗 CCR5 抗体が常時誘導できることを ELISA よび FACS 分析により証明できた。

4. アジュバント・細胞性免疫誘導法の研究

BCG の分泌抗原 Ag85B について、サルを用いた SHIV 感染の制御効果から、細胞性免疫のアジュバント効果が示された。

HIV-1 に感染した樹状細胞は選択的に CD4 陽性 NKT 細胞の誘導を増加させた。CD4 陽性 NKT 細胞の存在が、R5-type HIV-1 の CD4 陽性 T 細胞への感染拡大に関与することを見いだした。粘膜組織内の樹状細胞-CD4 陽性 NKT 細胞内における R5-type HIV-1 を封じ込めることが、HIV-1 の制圧において重要であることが想定される。

HIV-1 gag 遺伝子組換えバキュロウイルスを Balb/c マウス骨髄由来樹状細胞(BMDC)に感染させ HIV-1 Gag 発現樹状細胞を作製し、樹状細胞が NK 細胞、T 細胞および B 細胞の活性化を *in vitro* と *in vivo* で評価した。rBV-gag はマウス樹状細胞を活性化させ自然免疫、適応免疫応答を發揮した。

5. ワクチン評価モデルの開発

CXCR4 指向性高病原性 SHIV-KS661 は、中和抗体に対して感受性であった(Tier1B 相当)。SHIV-KS661 の V3 領域の 5 アミノ酸を変異させて CCR5 指向性にした SHIV-MK1 も中和抗体感受性に変化はなかった。SHIV-MK1 をアカゲザルに順化させた SHIV-MK38 は、中和抵抗性(Tier2, 3 相当)であった。

分担研究者

松尾 和浩 (日本ビーシージー製造株式会社日本BCG研究所 部長)

志田 壽利 (北海道大学 遺伝子病制研究所 教授)

保富 康宏 (医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター センタ長)

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)

高橋 秀宗 (国立感染症研究所感染病理部 室長)

庄司 省三 (熊本大学医学薬学研究部 名誉教授)

玉村 啓和 (東京医科歯科大生体材料工学研究所 教授)

三浦 智行 (京都大学ウイルス研究所感染症モデル研究センター 准教授)

高橋 秀実 (日本医科大学微生物免疫学教室 教授)

高久 洋 (千葉工業大学工学部・分子生物学 教授)

A. 研究目的

有効な HIV ワクチンを開発するために、基礎研究から臨床研究まで様々な研究が行われている。1) 安全性が確認された種々のベクターを用いた候補ワクチンの臨床研究、2) 霊長類等を用いた候補ワクチンの有効性、安全性についての前臨床研究、3) HIV 感染制御コホート、動物モデルを用いたエイズウイルス感染防御に働く宿主応答の解明、4) HIV 感染者の細胞性免疫、中和抗体の解析等。

根本的かつ基本的な問題として、HIV はこれまでワクチン開発された病原体と異なる。通常ヒトは HIV 感染を自然に制御することができず、宿主応答にもかかわらず HIV は持続的ウイルス増殖を特徴とする慢性感染となる。HIV は宿主応答による感染抑制から回避する性質を備えている。その一つは、HIV の逆転写酵素の複製エラーに基づく高変異性とその結果である多様性である。第2の問題は、HIV は抗体による中和を受けにくいウイルススパイクを持つ。これまでワクチンの開発された方法、知識だけでは HIV ワクチン開発はできない。

しかし、これまでの研究から難問を解く糸口が見つかっている。感染制御の実例が HIV 感染者、動物モデル研究で見いだされている。HIV 感染後早期、あるいは感染前に抗 HIV 治療薬を服薬することにより感染制御する可能性が高くなる。この現象は動物モデルで確認されている。生ワクチン感染ではさらに強力な感染制御免疫が誘導される。しかもこの防御免疫は、HIV の多様性、変異性に対しても有効であることが示された。

次に、中和抗体研究の進展である。NIAID, VRC グループ、Scripps Institute グループは、それぞれ HIV 感染者から、新たな広域中和抗体を分離した。注目される点は、これまで発見された広域中和抗体と比べ 100 倍高い中和抗体価があること、さら

に、これまでの全 HIV 分離株の 90%に対する中和能が確認された。また約 30%の HIV 感染者から広域中和抗体が検出されたことから、ワクチンによる広域中和抗体の誘導の可能性が示唆された。

本研究班では、このような世界の HIV 研究の動向、情報を元に、独創性の高い研究を行い、HIV ワクチン開発研究への貢献を目標とする。

1. エイズウイルス感染制御モデルを用いた感染制御に関わる宿主応答の解析 (森)

病原性株 SIVmac239 の糖鎖欠失変異株 Δ 5G は生ワクチンとして極めて強力な感染防御能を誘導し、HIV ワクチンに求められる多様なウイルスに対する感染防御効果を示した。感染防御に働く宿主応答は、初期感染期と慢性感染期で異なった。本年度は、慢性期、初期感染期に働く感染制御の機構について解析を行った。また懸案となっていた多様な変異ウイルスに対する感染防御について検討した。

2. プライム・ブーストワクチンの開発

組換え BCG を用いたエイズワクチンの開発 (松尾)

前年度に広範な CTL epitope に対する細胞性免疫誘導を期待して構築した、コドン最適化 rBCG-SIVgag、SIV Env gp120 及び Rev-Tat-Nef 融合蛋白質を発現する BCG 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 LC16m8D 株でブーストするワクチンレジメンの、インド産アカゲザルでの SIVmac 感染防御能評価を行う。安定に Env gp120 を発現する組換え BCG の、液性及び細胞性免疫のプライミング能をマウスで確認する。BCG ベクターのポテンシャルを向上させる試みを行なう。

弱毒ワクシニアベクターを用いたエイズワクチンの開発 (志田)

種痘ワクチンとして安全性が確認された LC16m8 株を改良し、さらに安全な LC16m8Δ株を作成した。LC16m8Δ株は MVA 株と比べ 1000 倍強い抗強毒ワクチンシニア抵抗力を付与した。そこで LC16m8Δ株をベクターして HIV/SIV タンパクを発現する HIV ワクチンを作成した。本研究では、細胞性免疫と抗体の両方の誘導するために m8Δとセンダイベクター(SeV)とのプライム・ブースト法、免疫活性化因子 CD40Lm の免疫増強効果について検討した。

3. アジュバント・細胞性免疫誘導法の研究

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 (保富)

nef 遺伝子を欠損することで弱毒化したエイズウイルス (SHIV-NI) に細胞性免疫主導型アジュバント活性をもつ Ag85B を組込んだ Ag85B 発現エイズ弱毒生ウイルス(SHIV-Ag85B)の免疫誘導能および防御免疫機構についてカニクイザルを用いて評価する。

粘膜免疫活性化による粘膜棲息型 HIV 制御法の開発： HIV の初期感染標的である樹状細胞と NKT 細胞 (高橋秀実)

HIV-1、特に R5-type HIV-1 の感染標的である樹状細胞ならびに NKT 細胞における R5-type HIV-1 感受性の誘発、ならびに粘膜組織における CD4 陽性 T 細胞への感染伝播・拡大の可能性に対し、樹状細胞上の CD1d 分子の発現低下の影響を含め検討し、現在の HAART 治療との併用を念頭においた、新たな治療法の開発を目的とする。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 (高久)

HIV-1 gag 発現組換えバキュロウイルスをマウス骨髄由来樹状細胞(BMDC)へ感染させ、自然免疫および適応免疫応答を評価し、エイズワクチンとしての新規 HIV-1 gag 発現バキュロウイルス感

染樹状細胞ワクチンの開発を目指す。

4. 中和抗体

汎 HIV-1 株中和能を有する抗体誘導に関する研究 (駒野)

研究班の初年度の研究にて複製可能な AD8 ウイルス変異体の Env を NL4-3 に移入したウイルスクローンを用いて、V3ループの先端をエピトープとする中和抗体 KD-247 の感受性と結合性を解析した。その結果、定常状態の Env と KD-247 相互作用を制御するアミノ酸が V3ループ以外の多くの Env 領域に数多く見出された。V3ループに独立した“なわとび様”の大きな分子動態があると仮定すれば、V3ループ以外の Env 領域における変異が V3ループ構造に与える影響は非常に低いと思われる。したがって、このデータは逆説的に定常状態における V3ループの分子 dynamics は Env 各ドメインとの相互作用によって制約された状況にあることを示している。本年度は、Env の liganded conformational dynamics の解析を行い、初年度に行った steady-state dynamism との比較検討を行った。

有機合成化学手法による人工抗原分子、ワクチン創製 (玉村)

(1) 標的細胞への HIV の侵入時の立体構造変化に関わる蛋白 gp41 を認識する抗体を作製する。
(2) コレセプターであるケモカイン受容体 CXCR4 の細胞外ループ(Ecl1-Ecl2)を取りあげ、環化&構造固定化したペプチドミメティックを合成し、効率的な抗体誘導をはかる。(3) 長期未発症の HIV 感染者の間で保存されている CD4 binding/コレセプター-binding 領域が中和抗体のエピトープとして鎖状を環状にし、立体構造を固定化したペプチドミメティックを合成した。(4) CD4 の小分子 mimic 誘導体を合成し、HIV 侵入の動的超分子機構への影響や中和抗体等との併用の効果を検討した。

(2) HIV-1 中和モノクローナル抗体の誘導 (高橋秀宗)

HIV-1 を中和する抗体の誘導を小実験動物において可能とする抗原の開発を目的とした。HIV-1 の広域中和エピトープの一つ、membrane proximal external region (MPER)は粒子脂質膜に埋まっております。容易に免疫系への提示が難しい。そこで粒子をディタージェントを含む蔗糖平衡密度勾配法で処理し、Core-Env を分離、抗原として利用した。

HIV 感染防止粘膜ワクチンの創製 (庄司)

抗 ENV 抗体および抗 UPA 抗体を誘導できる交叉免疫抗原を用いてブーストすることにより、個体へのスピーディなウイルス感染への対応が可能であるかを検討した。

5. ワクチン評価モデルの作成 (三浦)

サルエイズ発症モデルの粘膜部位におけるウイルス感染動態と免疫細胞応答について統合的に解析することにより、エイズウイルスの主要な標的臓器として注目されながらヒトでは解析が困難な粘膜部位における病態形成機構を解明する。

B. 研究方法

1. エイズウイルス感染制御モデルを用いた感染制御に関わる宿主応答の解析

Δ 5G 感染ザルは極めて高い感染防御免疫を誘導する。多種多様な変異ウイルスに対する感染防御を調べるために、SIVsmE543-3 チャレンジ感染後、慢性期に感染制御が破綻した3頭からウイルスを分離し、感染制御群へチャレンジ感染を行った。慢性期における感染制御と関連するエフェクター細胞の解析をCD8+細胞以外の免疫細胞についても細胞内サイトカイン法により行った。初期感染期における感染制御と関連し、糖鎖変異 SIV が初期感染後に感染制御される機構を明らかにするために初期感染における感染組織、感染細胞の解析を行った。

2. プライム・ブーストワクチンの開発 組換え BCG を用いたエイズワクチンの開発

(1) SIV 遺伝子組換え BCG-組換えワクシニア
ライムブーストワクチンの感染防御能評価
2頭のサルに3種の組換え BCG

(rBCG-SIVgag-opt, rBCG-SIV gp120, rBCG-SIV RevTatNef)をそれぞれ 0.5 mg ずつ混合し、皮下接種した。その8週後、16週後に、SIV gag, env (gp160), reverse transcriptase, rev-tat-nef を発現する組換えワクシニアウイルス LC16m8D 株4種を、それぞれ 10^7 pfu ずつ混合して scarification 法により接種した。2回目のブーストの8週後に、SIVmac 251, 300 TCID50 を1週おきに5回、経直腸投与し、その後定期的に血漿中のウイルス量をリアルタイム PCR 法により定量した。

(2) Env 安定発現型組換え BCG のマウスにおける液性及び細胞性免疫プライミング能の解析

6-8 週齢の Balb/c マウスに、Env gp120 発現型組換え BCG, 0.5 mg を皮下接種し、5週及び8週後に Env 発現組換えワクシニアウイルス DIs, 10^7 pfu を皮下接種した。

(3)ウレアーゼ欠損 BCG への遺伝子導入、SIV Gag 抗原発現とマウスでの免疫原性の解析
コドン最適化 SIV Gag 発現ベクターを BCGDUT に電気穿孔法で導入し、既報と同様にウエスタンブロット法によるスクリーニングにより、SIV Gag 発現株を得た (rBCGDUT-SIVgag-opt)。
弱毒ワクシニアベクターを用いたエイズワクチンの開発

ワクチン：m8 Δ HIVenv(JR-CSF)、HIV JR-CSF の gp160 を発現する。SeV-env(JR-CSF): HIV JR-CSF の gp160 を発現する増殖型 SeV (ディナベックより供与)

1×10^7 PFU の組換え m8 Δ を乱利法で接種し、8週後に 4×10^7 CFU SeV-env を経鼻接種した。

3. アジュバント・細胞性免疫誘導法の研究 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

Ag85 の効果を調べるために SHIV-NI に Ag85 遺伝子を組み込んだ SHIV-Ag85B を構築した。SHIV-Ag85B の免疫誘導能を解析するため、カンクイザルを用いて評価した。比較対照群として、親株 SHIV-NI を用いた。これらの生ワクチンにより誘導される防御免疫を評価するために、ワクチン接種後 37 週において、強毒株 SHIV89.6P を静脈内より接種した。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。

粘膜免疫活性化による粘膜棲息型 HIV 制御法の開発

ヒト末梢血に α -GalCer を添加培養し、誘導されてくる細胞の中で抗 V α 24 抗体により検知される細胞を NKT 細胞であるとし、FACS-vintage を用いて V α 24 陽性 NKT 細胞を集積し、誘導されてきた NKT 細胞の中に CD4 陽性細胞が存在するかを抗 CD4、抗 CD8 抗体を用い Flow cytometry で追跡した。HIV-1 に対する NKT 細胞の感受性を検討するため、X4-type の HIV-1 として NL432 株を、R5-type の株として NL(8AD)を用いて研究を進めた。また、HIV-1 に感染した細胞を p24 抗原陽性細胞数を指標として同定した。

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

gag タンパク質をウイルス粒子表面および感染細胞内で発現する rBV-gag は HIV-1 NL4-3 株の全長 gag 遺伝子を導入した pAcCAGgag-Ph-gp64-gag とバキュロウイルスゲノムを sf9 細胞に形質導入し HIV-1gag 発現組換えバキュロウイルス (rBV-gag) を作製した。構築したバキュロウイルス粒子で BMDC への感染を試み、細胞表面分子を FACS で解析し、サイトカインの産生を ELISA で測定することで細胞性免疫の活性化を検討した。また、バキュロウイルス感染 BMDC と脾臓細胞を共培養し、NK 細胞、CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞及び B 細胞の活性化(CD69 発現と IFN-g 産

生細胞)を FACS で解析した。さらにバキュロウイルス感染 BMDC をマウスへ投与し、in vivo の各免疫細胞の活性化および IFN-g 産生を測定した。

4. 中和抗体

汎 HIV-1 株中和能を有する抗体誘導に関する研究

我々が前回の研究で作出した複製可能な AD8 の変異体の Env を NL4-3 に導入した種々のウイルスクローンに対して、sCD4 存在下で KD-247 によるウイルス捕捉実験を行った (Takizawa et al. AIDS 2011)。エライザプレートに KD-247 を固層化し、sCD4 と事前に 30 分間 37°C で反応させたウイルス (p24 換算にて 100 ng 分) と 37°C で 30 分間結合反応を行った。結合したウイルスはウイルスを溶解した後に p24 の量として定量した。この値を sCD4 非存在下で行った実験の値と既報の IC₅₀ 値と比較した。

有機合成化学手法による人工抗原分子、ワクチン創製

(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
N 端側 N36 の 3 量体はおよび C34 3 量体は前年度までに合成を終了している。合成した抗原分子を用いてマウスにて抗体誘導を検討する。その血清の抗 HIV 活性を評価する。(2) コレセプター CXCR4 の N 末端領域と細胞外ループ (Ecl1-Ecl2) を基にした抗原分子作製 & 抗体誘導
環化 Ecl-1 および 2 と、その比較実験として直鎖の Ecl-1 および 2 に関しても同様にマウスに投与し、得られた血清を用いて ELISA を行った。

(3) 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: 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い、アフィニティーを持ったク

ローンが得た。モノクローナル抗体の作成を行った。

(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

合成した化合物の各種 HIV 株に対する抗ウイルス活性を CCR5/PM1 細胞を用いて MTT assay で評価した。FACS 解析により抗 V3 抗体(KD-247)や CD4 induced 抗体の envelope への反応性の変化を sCD4 と NBD-556 で比較した。また、細胞毒性を MTT assay で調べた。

HIV-1 中和モノクローナル抗体の誘導

HIV-1 の env は糖鎖に富み、抗体の接近を阻害し、さらに膜融合における env の構造変化により、env 自体の変異に加え、中和を難しくしている。gp41 の MPER は既存の広域中和ヒトモノクローナル抗体 2F5, 4E10 の標的であるが、MPER は脂質膜に埋没しているところが多く、抗原提示が難しい。そのため、HIV-1 様粒子からディタージェントにより脂質膜を取り除き、抗原とした。

HIV 感染防止粘膜ワクチンの創製

鼠径部へ Senju vaccine を皮下免疫した雌アカゲザルに、交叉免疫抗原を接種し(Day 742)、血清中に誘導された抗 gp140 抗体の誘導を western blotting で確認した。

5. ワクチン評価モデルの作成 (三浦)

アカゲザルを用いたエイズ発症モデル系の粘膜部位におけるウイルス感染動態と免疫細胞応答について、統合的な解析を行うことにより粘膜感染病態形成機構を解明し、サルエイズモデルによる新規治療法開発の為に粘膜感染病態に基づく評価基準を確立する。

(倫理への配慮)

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およびデータの公表にあつては、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った。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行った。

C. 研究結果

1. エイズウイルス感染制御モデルを用いた感染制御に関わる宿主応答の解析

多様な変異ウイルスに対する感染防御

慢性感染を制御している4頭のワクチン群(controller)に多様な変異ウイルスのmixtureを接種したところ、4頭中3頭で、血中ウイルスは検出限界以下であった。1頭でも非ワクチン群と比べ顕著に低い感染を示した。

慢性感染における感染制御

controller はnon-controller と比べIL-15応答性のCD8+細胞を高頻度に誘導していることが確認されたことから、今年度は、末梢単核球中のCD8+細胞以外についてもIL-15応答性細胞の頻度を解析した。CD4+CD8+T細胞、CD4+T細胞、DC/monocyteにCD107a+細胞が含まれるが、その割合は個体毎で異なっていた。SIV応答性を示す細胞の割合は、IL-15応答性と異なっていた。次にCCR7+細胞についてCD107a+細胞の頻度を調べたところDC/monocyteにおける頻度が高くなり、特にSIV応答性細胞の割合は、DC/monocyteにおいて最大であった。いずれの場合においてもcontrollerはnon-controllerと比べ有意に高頻度であった。

初期感染における感染制御

初期感染制御の機構として組織におけるウイルス感染標的細胞の頻度、あるいは感染感受性が感染抑制の重要な要因となっている可能性が示唆された。その根拠のひとつとしてSIVmac239感染ではTh1細胞が感染の標的になっているが、 $\Delta 5G$ ではTh17細胞が感染標的細胞となっていることが明らかとなった。

2. プライム・ブーストワクチンの開発 組換え BCG を用いたエイズワクチンの開発

(1) SIV 遺伝子組換え BCG-組換えワクシニアプライムブーストワクチンの感染防御能評価
免疫群の1頭 (MM549) で観察期間中、全くウイルスが検出されなかった。このサルは CD8 陽性 T 細胞は、ウイルスチャレンジ前の *in vitro* SIV suppression assay において、強力なウイルス産生抑制効果を有していた。1頭 (MM547) も、感染はしたものの set point でのウイルス量は、コントロールの2頭と比較して顕著に抑制されていた。この結果は、BCG/増殖型ワクシニアのプライムブーストワクチンコンセプトが、SIV 感染防御に有効であることを示唆する。

(2) Env 安定発現型組換え BCG のマウスにおける液性及び細胞性免疫プライミング能の解析
Env 発現型組換え BCG のプライミングにより、ワクシニアブースト後の Env 特異的な細胞性免疫 (CD8 陽性 T 細胞) の増強効果が観察された。

(3) ウレアーゼ欠損 BCG での SIV Gag 抗原発現とマウスでの免疫原性評価
SIV Gag p27 刺激により検出される IFN-g 産生細胞数が、rBCG-SIVgag-opt よりも rBCGDUT-SIVgag-opt で免疫したマウスで多い傾向が認められた。

弱毒ワクシニアベクターを用いたエイズワクチンの開発

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、HIV-1 Env 発現

m8 Δ と SeV ベクターを prime/boost して検討した。m8 Δ は乱利法、SeV は経鼻接種した。Prime の時に m8 Δ env と m8 Δ -p7.5-hCD40Lm の混合、env と hCD40Lm 共発現 m8 Δ (m8 Δ env/hCD40Lm)を用いて CD40Lm の効果を検討した。本免疫法は CD40Lm の発現のない場合でも全 CD8+T 細胞中の 6.5%に及ぶ Env 特異的 IFN-g 産生 CD8+ T 細胞を誘導した。m8 Δ env と m8 Δ -p7.5-hCD40Lm を混合した場合は 12%の IFN-g 産生 CD8+ T 細胞が誘導された。

3. アジュバント・細胞性免疫誘導法の研究 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

SHIV-NI 接種群では、接種後 12 週において全頭で血漿中のウイルス量は検出限界以下となった。一方で SHIV-Ag85B を接種群では、血漿中のウイルス量は SHIV-NI 群と比較して低く、さらに接種後 4 週以内に全頭のウイルス量は検出限界以下となった。SHIV ウイルス DNA の遺伝子検出を試みたところ、SHIV-NI 接種群では接種初期から 28 週まで全ての PBMC からウイルス遺伝子が検出され持続感染が確認された。一方 SHIV-Ag85B 接種群では感染初期のみウイルス遺伝子が検出され、接種後 8 週以降では全て検出限界以下となった。ウイルス構造タンパク (SIVGagPol、HIVEnv) 特異的な IFN- γ ELISPOT 反応を行ったところ、SHIV-Ag85B 接種群では SHIV-NI 接種群と比較し極めて強い細胞性免疫反応が確認された。強毒株 SHIV89.6P 株の攻撃接種を行ったところ、SHIV-Ag85B 接種群では、4 頭中 3 頭で強毒株接種後 6 週以内に強毒ウイルスを検出限界以下に抑えた。また、この 3 頭の攻撃接種後 2 週における IFN- γ 産生細胞数は、SHIV-NI 接種群と比較して極めて強い反応を示した。

粘膜免疫活性化による粘膜棲息型 HIV 制御法の開発

ヒト末梢血に α -GalCer を添加培養し、抗 V α 24 抗体により V α 24 陽性 CD4 陽性 NKT 細胞を Sort した。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 細胞と比較検討した。その結果、CD4 陽性 NKT 細胞上では CCR 5 の優位な発現が認められ、CD4 陽性 T 細胞上には CXCR4 の優位な発現が観察された。R5-type である NL(AD8)株を添加した場合と X4-type の NL4-3 株とを比較したところ、どちらも、選択的に HIV-1 に感染した CD4 陽性 NKT 細胞の割合が優位に増加していた。HIV-1 存在下において、CD4 陽性 NKT 細胞の割合が優位に増加していたことから、HIV-1 の初期感染標的である樹状細胞が CD4 陽性 NKT 細胞の増加に関与することが想定される。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

BMDC に野生型バキュロウイルス(wBV)または rBV-gag を感染させ、実際に BMDC が活性化し、活性化マーカーである MHC クラス I、II、CD80 及び CD86 の発現が未刺激の BMDC と比較して顕著に上昇していることが確認された。rBV-gag 感染 BMDC 投与 BALB/c マウスにおける Gag 特異的な CD8⁺T 細胞と NK 細胞の活性化の確認を rBV-gag 感染 BMDC を BALB/c マウスに投与し、脾臓細胞を回収、Gag ペプチドにより再刺激し、活性化マーカーの確認を行った結果、未刺激の脾臓細胞より各細胞 (CD8⁺T、CD4⁺T 細胞、NK 細胞) の活性化が確認された。rBV 感染 BMDC と脾臓細胞を共培養した結果、NK 細胞、CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞及び B 細胞の活性化マーカーである CD69 の発現上昇及び NK 細胞と CD8⁺T 細胞での IFN-g 産生が認められた。さらに rBV 感染 BMDC をマウスへ投与すると、NK 細胞、CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞及び B 細胞の活

性が確認された。rBV 感染 BMDC を投与したマウスの脾臓細胞を用いて、HIV-1 Gag 特異的な細胞障害性を解析したところ、組換えバキュロウイルス感染樹状細胞投与したマウスでは Gag 特異的な細胞障害性が確認された。

4. 中和抗体

汎 HIV-1 株中和能を有する抗体誘導に関する研究

野生型 AD8 Env とそれに 1-6 箇所のアミノ酸変異を持つ変異体 Env をもつ NL4-3 を背景とする計 23 種類のウイルスについて、捕捉効率を飽和させる量の sCD4 存在下で KD-247 に補足されたウイルス量を測定した。詳細な解析の結果、liganded form になっても自由な V3 ループ構造可塑性が他の変異体より強く制限されており、KD-247 が認識できるエピトープ立体構造をとる事を阻害しているためと考えられる。163 番目のアミノ酸は V1/V2 ループの中に存在する。従って、この実験データは CD4 と結合したエンベロープの V3 ループが V1/V2 ループ、C2、C3 領域との間で相互作用を維持させている可能性を示唆している。

有機合成化学手法による人工抗原分子、ワクチン創製

1) コレセプター CXCR4 の細胞外ループ (Ecl1-Ecl2) を基にした抗原分子作製&抗体誘導

Linear Ecl-1-induced antibodies²⁴ assay においてマウス血清が HIV-1 侵入阻害活性を有することを確認した。CXCR4 の細胞外領域 (Ecl) を合成し、MAP に導入した Ecl-1 が抗体誘導能を示し、抗体は中和活性を示した。

2) 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

C34 単量体の抗体誘導試験において C34 単量体は十分な抗体誘導能を示した。C34 trimer の構造特異的な抗体誘導を確認した。また、C34

monomer から誘導された抗体より、C34 timer から誘導された抗体の方が約 3 倍強い侵入阻害活性を有することが明らかとなった。

3) gp120 の CD4 binding/コレセプター

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。また、gp120 のヘアピン領域については Fab ファージディスプレイライブラリーから、これを認識するモノクローナル抗体を得た。

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。ピペリジン環上の窒素原子を修飾したところ、すべてにおいて毒性の低下が見られた。また、窒素原子自体は修飾せず、その周りを嵩高くしたところ、毒性が低下した。

HIV-1 中和モノクローナル抗体の誘導

AG シュードタイプウイルスに対して、血清を入れない場合と比較し、モノクローナル抗体 2F5, 4E10 による抑制効果が明らかに認められた。また core または免疫前の血清(pre-core)の感染価への影響は血清を入れない場合と同等であった。これらと比較し、core-env を免疫した血清の感染価に対する抑制効果はあったと考えられた。他にラットへ core-env を免疫した血清中にサブタイプ A, AG, C, D のシュードウイルスに対する中和能を 100 倍で示すものがあった。

HIV 感染防止粘膜ワクチンの創製

1) 交叉免疫抗原による抗 ENV 抗体の誘導

交叉抗原は、基礎免疫抗原とは構造的に全く異なる特徴を有するが、SIVmac239 Envelope protein

に反応する抗体が交叉免疫抗原による boost によって誘導された。2) 交叉免疫抗原によるプライミングとその効果 コア抗原 (高分子 PEG) に TGDK と交叉抗原を共有結合によってコンジュゲートさせた抗原を調製し、免疫し、交叉免疫抗原を接種した個体において抗 ENV 抗体と抗 CCR5 抗体が誘導されていた。

5. ワクチン評価モデルの作成 (三浦)

病原性 X4 指向性 SHIV-KS661 をベースに種々の R5 指向性 SHIV を作成した。今年度は、中和抗体に対する抵抗性について検討した。HIV-1 感染者 6 名分の pool 血清による中和アッセイを行った。親株の KS661 と馴化前の MK1 は、ID50 が中和感受性の国際標準株(Tier1B)と同等の 500 倍以上であったのに対して MK38 は、Tier2,3 の国際標準株と同等の 100 倍以下であった。さらに MK38 の env 遺伝子領域のシーケンス解析により、中和抗体 KD-247 に対する中和エピトープが保存されていることを確認し、KD-247 に対する中和感受性を調べた。KS66 と MK1 の IC50 は、5-10 μ g/ml 程度(Tier1B 相当)であったのに対し、MK38 の IC50 は、50 μ g/ml 以上(Tier2, 3 相当)であった。

D. 考察

1. エイズウイルス感染制御モデルを用いた感染制御に関わる宿主応答の解析

HIV ワクチン研究における有用性

多種多様な変異ウイルスに対する感染防御が確認されたことから糖鎖変異ウイルス感染が誘導する防御免疫の重要性が確認された。

慢性期に誘導される感染防御

CD8 抗体投与実験により感染防御に働く CD8+T 細胞と NK 細胞の重要性、さらに CD107a 発現により示されるエフェクター機能と感染制御との関連が示された。今年度は、さらに CCR7+

のエフェクター細胞の存在が確認された。その中でも DC/monocyte に高頻度に存在するエフェクター細胞が今度の研究課題となる。

初期感染期に誘導される感染防御

糖鎖変異 SIV 感染が誘導する感染防御の一番の特徴は、宿主遺伝的性質あるいはウイルスの多様性に影響されないこと、極めて高い感染抑制効果である。その機構としてウイルス感染標的細胞の供給の抑制、あるいは感染感受性の低下であることを示す結果が得られた。今後の HIV 研究の方向性を決定する重要な問題である。

2. プライム・ブーストワクチンの開発

組換え BCG を用いたエイズワクチンの開発

SIV Env gp120, Rev-Tat-Nef およびコドン最適化 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 LC16m8D 株を 2 回ブーストしたインド産アカゲザル 1 頭で、SIVmac 251 の経粘膜低用量頻回チャレンジを完璧にブロックした。さらにサル頭数を増やして実験を行なう必要があるが、本候補ワクチンのコンセプトの有用性を証明することができた。

弱毒ワクシニアベクターを用いたエイズワクチンの開発

細胞性免疫と液性免疫の両方を誘導する m8Δ prime/SeV boost について解析を行った。Env 特異的 IFN-g/CD107a 産生 CD8+ T 細胞と抗 Env 抗体を効率よく誘導することを確認した。さらに、CD40Lm を priming 時に発現させることによってさらに効率よく免疫を誘導できることが分かった。CD40Lm を Env と別のワクシニアで発現させると細胞性免疫と high affinity の抗体を増強したのに対し、同じワクシニアによって共発現させると細胞性免疫の増強は見られなかったが抗体誘導の大幅な増強が見られた。

3. アジュバント・細胞性免疫誘導法の研究

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

アジュバント活性をもつ Ag85B 遺伝子を組込んだエイズ弱毒生ウイルスは、ウイルス複製に伴って Ag85B 分子を発現する。このウイルスはウイルス感染部位でアジュバント活性を持つ分子を発現するため、より効果的に抗原特異的な免疫応答を誘導させることが可能である。SHIV89.6P 攻撃接種後においても強毒ウイルスを制御し、またこの制御した個体の攻撃接種後の細胞性免疫反応は、攻撃接種前と比較して、極めて強い反応が確認された。本研究の結果から、エイズウイルスの制御機構には、強力な細胞性免疫反応が重要であることが推測された。

粘膜免疫活性化による粘膜棲息型 HIV 制御法の開発

HIV-1 感染初期において、粘膜感染型の R5-type ウイルスが樹状細胞に潜入すると、CD1d 分子の発現低下が引き起こされる。この CD1d 分子の発現低下により、R5-type HIV-1 に対する感受性の高い CD4 陽性 NKT 細胞が選択的に誘導され、R5-type HIV-1 は効率的に増幅する。CD4 陽性 NKT 細胞の存在によって、R5-type HIV-1 に対する感受性の低い CD4 陽性 T 細胞に対しても感染の拡大が認められた。このように、樹状細胞-CD4 陽性 NKT 細胞の中で、粘膜より侵入した R5-type HIV-1 が、選択的に保持され、さらには感受性の低い CD4 陽性 T 細胞を含め組織内に伝播される。HIV-1 の主体が R5-type であることを勘案すると、粘膜組織内の樹状細胞-CD4 陽性 NKT 細胞内における R5-type HIV-1 を封じ込めることが、HIV-1 の制圧において非常に重要であり、そのためにはウイルスを保持する HIV-1 感染樹状細胞のみならず、ウイルスを増幅し伝播する CD4 陽性感染 NKT 細胞を制圧することが肝要である。

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

r BV 感染 BMDC を投与したマウスでは Gag 特異的な細胞障害性が確認されたことから、バキュロウイルス感染 BMDC から産生されたサイトカイン及び Gag タンパク質が NK 細胞、T 細胞及び B 細胞を活性化することを見出した。最終的に HIV-1 NL4-3-VSV-G 感染マウスモデルでの HIV-1 感染制御をも確認できたことから、これらの知見が今後の樹状細胞ワクチン開発につながる事が期待される。

4. 広域中和抗体

汎 HIV-1 株中和能を有する抗体誘導に関する研究

種々の汎 HIV-1 株中和抗体クローンが分離同定された。抗体と抗原の共結晶構造により中和エピトープの立体構造や抗体の作用機序が徐々に明らかになってきた。しかし、これらは限られた抗体クローンによる情報であり、ワクチンの免疫源としての Env 立体構造の理解は十分とは言えない。また免疫源の構造と機能及び中和抗体の作用機序がまだ十分に明らかになっていない。我々が確立した抗体-ウイルスパネル戦略を利用することによって抗原の立体構造に対する理解がさらに深まり、ワクチン源を科学的根拠に基づいて戦略的にデザインすることが可能になると思われる。

有機合成化学手法による人工抗原分子、ワクチン創製

エイズワクチン開発のためアプローチした 3 種のターゲットはいずれについても、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、感染ラットモデルを使った免疫も行った。

HIV-1 中和モノクローナル抗体の誘導

Core-Env のラットへの免疫によりモノクローナル抗体 2F10, 4E10 など既存の広域中和ヒトモノクローナル抗体に比較可能な感染への抑制効果が得られた。精製 HIV-1 env 糖蛋白や不活化ウイルスの免疫では小動物において中和抗体誘導が難しいことが知られていたが、Core-env 抗原は広域中和抗体誘導において有効性があったと考える。

HIV 感染防止粘膜ワクチンの創製

分子量約 55kDa で 3 つの N-linked glycosylation site, と 3 つの O-linked glycosylation site, さらに 4 つの Ser-phosphorylation site を有する交叉免疫抗原を見だし、実際 Senju vaccine によって基礎免疫された個体から抗 gp140 抗体を誘導させることに成功した。交叉抗原は、日常生活の中でも食事等により接種する可能性があることから、Senju vaccine によってプライミング後、定期的にブーストされる可能性がある。

5. ワクチン評価モデルの作成 (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。特に CCR5 指向性 SHIV は、従来の CXCR4 指向性 SHIV とは異なり、HIV-1 臨床分離株と同様に中和抗体に対して抵抗性であることが明らかとなった。HIV-1 の病態をより忠実にサルで再現することが期待される。

E. 結論

1. エイズウイルス感染制御モデルを用いた感染制御に関わる宿主応答の解析

糖鎖変異 SIV 感染が誘導する防御免疫について HIV ワクチン研究への波及効果が期待される結果が得られた。まず多様な変異ウイルスに対する高い感染抑制効果が確認された。次に防御免疫に関し、慢性感染期の感染制御に働く CD8+ 細胞依存性のエフェクター細胞について IL-15 応答性に加え得、SIV 特異性について新たな知見が得

られた。HIV 感染防御に最も重要と考えられる初期感染期の防御免疫については、感染標的細胞供給が新たな課題となった。これらの課題の解明が HIV ワクチン・治療法の開発研究の飛躍的推進に繋がると思われる。

2. プライム・ブーストワクチンの開発

組換え BCG と組換えワクシニアウイルス

LC16m8D 株のプライムブーストワクチンにより、インド産アカゲザルでの SIVmac 低用量経粘膜頻回チャレンジによる感染を完璧に防御できることを明らかにした。抗体産生増強効果は限定的であるものの、細胞性免疫による感染防御能への BCG ベクターによるプライミングの効果は顕著であり、BCG ベクターの免疫原性増強が、本レジメン実用化への極めて重要な課題である。

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 法を確立した。さらに、hCD40Lm を priming 時に発現させることによって、両免疫を増強できることを見いだした。

3. アジュバント・細胞性免疫誘導法の研究

Ag85B 発現エイズ弱毒生ウイルスを免疫したカニクイザルは、強毒株 SHIV89.6P 攻撃接種ウイルスをコントロールした。

HIV-1 初期感染標的としての粘膜免疫を担う樹状細胞-CD4 陽性 NKT 細胞を主体とした CD1d 分子に拘束された自然免疫システムが、R5-type HIV-1 の長期的な保持、ならびに CD4 陽性 T 細胞を含めた感染の拡大に大きく関与することが明らかとなった。HIV-1 が免疫の中枢を担う樹状細胞に感染することによって、その増幅システムである CD4 陽性 NKT 細胞を選択的に増大することが明らかとなってきた現在、粘膜自然免疫システムにおける HIV-1、特に R5-type HIV-1 の制御法を開発することがエイズ制圧のために必須であると考えられる。

rBV-gag はマウス樹状細胞を活性化させ多彩

な自然免疫および適応免疫応答を発揮し、HIV-1 感染制御がマウスレベルでも確認され、新規 HIV-1 樹状細胞ワクチンの開発に対し有用な結果が得られた。

4. 広域中和抗体

CD4 と結合した Env では V3 ループがより分子表面に曝露されるような位置へと構造変化する。ところが、この立体構造変化は V1/V2 ループと V3 ループとが常に相互作用を保った状態で挙動している可能性が示唆された。V3 ループにおける自由な構造変化の制約は CD4 に結合する前と後では質的に異なる制御下にある。この物理学的特性は V3 ループがコレセプター認識機能を発揮するために理にかなっている。これは中和抗体を利用した研究アプローチで初めて判明した構造特性であり、ワクチン源の開発に大きな貢献が期待される。

合成した gp41 N36 trimer を用いて、HIV-1 感染ラットモデルに免疫し抗体誘導実験を行った。合成した gp41 C34 trimer はマウスで中和抗体を誘導した。C34 trimer は monomer よりも 100 倍強い HIV 侵入阻害活性を示した。CXCR4 の細胞外領域由来のペプチド：細胞外ループの配列を基に抗原分子設計の最適化を行うことにより、宿主タンパク質由来のエイズワクチンを開発することができると考えられる。

HIV-1 様粒子からディタージェントにより宿主膜蛋白、膜脂質を除いた Core-Env 抗原は、ラットにおいて広域中和血清を誘導し、抗原として有効な可能性がある。

個体へのスピーディなウイルス感染への対応として交叉免疫の誘導を利用し、ENV 抗体および CCR5 抗体を粘膜面に維持することが現実的に可能な戦略であることを示すことができた。

5. ワクチン評価モデルの作成

CXCR4 指向性高病原性 SHIV-KS661 は、中和抗体に対して感受性であった(Tier1B 相当)。

SHIV-KS661 の V3 領域の 5 アミノ酸を変異させて CCR5 指向性にした SHIV-MK1 も中和抗体に対して感受性であった(Tier1B 相当)。しかし、SHIV-MK1 をアカゲザルに順化させることによって得られた SHIV-MK38 は、中和抵抗性(Tier2 相当以上)となった。

F. 健康危険情報

特に該当する情報はなかった。

G. 研究報告

各研究分担者の項を参照のこと。

H. 知的所有権の取得状況

特許取得

1. 松尾和浩、水野 悟、川原 守、保富康宏、渡邊健太. 新規な組換え BCG ワクチン. 特願 2011-199422
2. 保富康宏、遺伝子導入用ウイルスベクターの製造方法(特願 2011-025234)
3. 玉村啓和、HIV 立体構造認識抗体誘導ペプチド：特願 2011-082813
4. 玉村啓和、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 2011-51432、
5. 玉村啓和、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：米国出願番号：13/319,813
6. 玉村啓和、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：EP 出願番号：10777543.9
7. 庄司省三、Wobbling X protein (Molecular Mimicry Antigen)：特願 2011-177385
8. 庄司省三、M 細胞標的分子 TGDK の大量合成法：特願 2011-175781

実用新案特許 該当なし

その他 該当なし

II. 分担研究報告

生ワクチンにより誘導される感染防御の解析

研究分担者 森 一泰（国立感染症研究所 主任研究官）

研究協力者 Ahmed Nursarat（国立感染症研究所 流動研究員）

研究要旨

糖鎖修飾変異株Δ5Gは、野生株 SIVmac239 によるチャレンジ感染をほぼ完全に制御する防御免疫を誘導する。そのワクチン効果は、ウイルスの多様性および変異性にも対応することから、Δ5G 感染モデルは HIV ワクチン開発研究に必要な防御免疫の解明に貢献することが期待される。本研究は、Δ5G 感染により誘導される宿主応答を解析し、SIV 感染防御に関わる免疫応答を理解することを目的とする。本年度は、糖鎖変異 SIV 感染が誘導する防御免疫に関し新たな知見が得られた。1) 多様な変異ウイルスに対する高い感染抑制効果が確認された。2) 慢性感染期の感染制御に働くエフェクター細胞について SIV 特異性に関する知見が得られた。3) HIV 感染防御に最も重要と考えられる初期感染期の防御免疫について、感染標的細胞の供給抑制が感染抑制の機構として働いている可能性を示唆する結果が得られた。これらの研究を進展させることにより HIV ワクチン・治療法の開発研究に新たな方向性・戦略を提案することが可能となる。

A. 研究目的

HIV ワクチン臨床研究では、ワクチンの安全性の観点から、種々のベクターに HIV 抗原を発現し、HIV 特異的獲得免疫を誘導するワクチンの開発研究が重点的に行われている。しかしワクチンによる感染抑制を示す結果は、タイ臨床研究 (RV144) に限られている。感染防御に働く免疫として、抗体、細胞性免疫が推測されているが、感染制御を実現する宿主応答の詳細は最重要課題となっている。このような状況から、HIV 感染を制御する免疫、宿主応答の理解が求められている。実際、HIV 感染制御と相関する免疫の研究は、HIV ワクチン基礎研究の柱となっている。HIV 暴露非感染コホート、長期未発症 HIV 感染コホートの研究、SIV 自然感染における低病原性の機構、エイズ動物モデルにおける低病原性株生ワクチンの研究等が行われている。我々は、高病原性株 SIVmac239 と糖鎖欠失変異株Δ5G を用いた感染実験からΔ5G は生ワクチンとして極めて強力な感染防御能を誘導することを明らかにした。さらに、サブタイプが異なるウイルス株を用いたチャレンジ感染

研究から、HIV ワクチンに求められる感染防御免疫の存在を明らかにした。ワクチンにより誘導された感染防御宿主応答の解析から、感染防御の主体が初期感染期と慢性感染期で異なることを明らかにした。本年度は、慢性期、初期感染期に働く感染制御の機構に関しさらに詳細な解析を行った。多様な変異ウイルスに対する感染防御について検討した。

B. 研究方法

糖鎖変異 SIV 感染が誘導する防御免疫の解析

4 種類の糖鎖変異 SIV ワクチンを各群 3 頭に接種、SIVsmE543-3 等によるチャレンジ感染実験を行い、感染防御、関連する宿主応答について解析を行った。

アカゲザル

ビルマ、ラオス原産の育成ザル、オス、B ウイルス、SRV、STLV、SIV に対する抗体が陰性、培養リンパ球における SIV 増殖性が確認されたサルを用いた。

糖鎖欠変異ウイルス（ワクチン株）

Δ5G

系統 8 に分類される SIVsm、SIVmac239 の gp120 には 23 カ所の N 型結合糖鎖付加部位が存在する。その中で 5 カ所（アミノ酸残基 79、147、179、460、479）の N 型結合糖鎖付加部位の Asn を Gln に置換し関連する糖鎖を欠失させた。

Δ5Gver1、Δ5Gver2

Δ5G の 179 の Gln を Asn に復帰変異させ、代わりに新たに 70（Δ5Gver1）または 377（Δ5Gver2）の N 型結合糖鎖付加部位の Asn を Gln に変異させた。

Δ3G

SIVmac239 の gp120 の N 型結合糖鎖付加部位の中で 3 カ所（147、179、460）の Asn を Gln に置換し関連する糖鎖を欠失させた。

チャレンジウイルス

SIVsmE543-3

系統 1 に分類される SIVsm。NIH, Vanessa Hirsch から供与された。アカゲザル培養リンパ球を用いて増殖し感染実験用ウイルスとした。

多様な変異 SIV

non-controller 3 頭の PBMC から CD4+T 細胞との共培養により分離したウイルスを混合しウイルスストックとした。

血漿ウイルス RNA 量の測定

血漿ウイルス RNA は、Roche Magpure compact を用いて精製した。SIVmac239 と SIVsmE543 のウイルス RNA 量は異なる gag 遺伝子配列から作成したプライマー：（forward primer, reverse primer TaqMan probe）によるそれぞれの SIV を特異的に検出するリアルタイム PCR 法により測定した。

CD8+細胞 depletion

SIV 感染制御における CD8+細胞の役割を調べるために CD8+細胞を消失させるために CD8 抗体（cM-T807）を 10 mg/Kg 体重を皮下接種、3、7 日後に 5 mg/Kg 体重を静脈内接種した。定期的に採血し血中の CD8 細胞数を測定した。

SIV 特異的 T 細胞の測定

末梢リンパ球中の SIVmac239、または SIVsmE543-3 特異的 T 細胞の頻度をそれぞれの全ウイルスタンパクをカバーするペプチドを用い反応性を IFN-g 産生細胞を検出する ELISPOT キット（U-CyTech 社）を用いて測定した。

細胞内サイトカイン染色（ICS）

PBMC を CD28/CD49d 抗体、IL-15 で刺激し、BFA/monensin を添加後、一晚培養し染色した。蛍光標識抗体により種々の免疫細胞を染色し、BD Aria による 10 カラー-flowcytometry により解析を行った。

倫理への配慮

本研究では動物実験が中心であることから、動物実験方法については倫理上、動物愛護の問題の観点から国立感染症研究所、医薬基盤研究所、両動物実験委員会が定めたルール、ガイドラインに従った。動物実験開始に際しては事前に関連する動物実験申請について国立感染症研究所、医薬基盤研究所、両動物実験委員会による審査・承認を受けた。

C. 研究結果

初期感染と慢性期に誘導される性質が異なる感染防御免疫

世界で流行している HIV-1 は約 10 種類のサブタイプと組み換えウイルスに分類される。各地域では複数の異なるウイルス型が流行していることから、HIV ワクチンは流行している複数のウイルス（各ウイルス型間にはタンパクレベルで 10-30%の相違性が存在する）に有効な防御免疫を誘導する性質が求められる。そこで、我々は、糖鎖変異 SIV ワクチンの感染制御効果を調べるために、ワクチン株とは別種のサブタイプに属する SIVsmE543-3（タンパクレベルで 10-30%の相違）をチャレンジウイルスとして用いた。チャレンジ感染後 2 週では、約半数で初期感染が検出されたが、すべてのサル（11 頭）で感染後 4-10 週に亘って血中ウイルス量は検出限界以下であった（図 1）。ところが、感染後 20 週以降に 4 頭でウイルス感染は再上昇、持続感染となった（non-controller）。しかし残り 7 頭では感染後 100 週以上の期間において血中ウイルス量は検出限界以下となった（controller）。以上の結果とサルの MHC 解析結果から初期感染と慢性感染における感染防御免疫の違いが明らかとなった。

多様な変異ウイルスに対する感染防御

non-controller 4 頭から分離されたウイルスの解析から、3 頭においてはワクチンとチャレンジウイルスの組み換えウイルスが増殖していることが確認された（図 2）。4 頭すべてにおいて gp120 において糖鎖付加部位が増加していることが確認された。これらのウイルスは糖鎖変異 SIV 感染