

201124008B

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～23年度 総合研究報告書

研究代表者 森 一泰

平成24（2012）年 3月

目 次

I. 総合研究報告	
HIV の感染防止、AIDS 発症防止に関する免疫学的基礎研究 -----	1
研究代表者：森 一泰（国立感染症研究所・主任研究官）	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	47
III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	65

I. 総合研究報告書

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 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

HIV-1 の多様性（サブタイプ間の相違は、タンパクレベルで 10-30%）、宿主側の遺伝的多様性は、ワクチン開発において最大の課題となっている。さらに、HIV は宿主応答等に対し容易にエスケープし持続感染することから、ワクチンには変異ウイルス出現を阻止するために感染初期から感染を非常に低レベルに抑制する宿主応答が求められる。糖鎖変異 SIV 感染が誘導する防御免疫は、これらの条件を満たす性質を備えていることが明らかとなった。糖鎖変異 SIV 感染ザルには、初期感染期と慢性感染期において性質が異なる感染抑制宿主応答が誘導されていた。慢性感染期の感染制御は、CD8+細胞依存性、MHC 等の宿主遺伝的多様性の影響を強く受け、IL-15 応答性のエフェクター細胞（CD8+T 細胞、NK 細胞）が主体であることが明らかとなった。初期感染期に誘導される防御免疫は、上記の HIV ワクチンに求められる防御免疫の性質を示す。感染防御のメカニズムとして以下の研究仮説が導かれた。SIVmac239 と糖鎖変異 SIV の初期感染の解析から、病原性 SIV 感染の特徴は、2 次リンパ組織に存在する Th1 細胞に選択的に感染・増殖することが明らかとなった。そこで、糖鎖変異 SIV（ワクチン株）感染は、Th1 細胞の供給あるいは感染性を低下させることにより、病原性 SIV 感染を抑制することが推測された。この仮説の証明が今後の課題となる。

2. プライム・ブースト ワクチンの開発

BCG ベクターとワクシニアベクターからなる、プライム・ブースト型エイズワクチン開発を目指し、3 年間に亘り BCG による、より強力なプライミング効果を得るための改良研究を行なった。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、有用性が示唆された。実用化に向けて、BCG ベクターの免疫原性増強、用量の低減化が重要な課題となる。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

日本人 HIV-1 感染者に見いだされた汎 HIV-1 株中和能を持つ症例を解析した結果、中和能を持つと予想される複数の抗体には germline 免疫グロブリン遺伝子の嗜好性が見いだされた。これは中和抗体が誘導されるためには特定の IgM 抗体が活性化をうける必要があることを示唆するものであり、中和抗体

が生体内でどのように変化していくかを理解する起点になる知見である。一方、Env のワクチン標的候補部位には定常状態とリガンド結合状態で質の異なるドメイン間相互作用が存在することを明らかにした。これは他の実験方法では得られない Env 構造特性であり、液性免疫誘導型ワクチン源の開発に大きな示唆を与えると考えられる。

創薬化学のテクニックを用い人工抗原分子を作製し、その評価を行った。1) gp41 のヘリカル領域の断片ペプチド(N および C 端側)に親水性領域を付与した形で化学合成し、膜融合の中間体構造である 3 量体を形成するようにアッセムブリーし抗原分子を作製した。N 端 3 量体ペプチドについてはマウスに免疫し、中和抗体が誘導を確認した。2) 長期未発症の HIV 感染者で保存されている gp120 の CD4 binding/ コレプター-binding 領域、効率的にエピトープを提示できるように構造固定化した環状ペプチドミメティックを作製した。ファージディスプレイライブラリーから特異的抗体を創出した。3) CXCR4 の N 端領域および 3 種の細胞外ループに親水性領域を付与したペプチドを合成し、人工テンプレート上に構築した分子を作製した。マウスに免疫し、抗体誘導を行った。4) HIV 侵入の際に最初に結合する宿主細胞の CD4 の小分子 mimic の細胞毒性を軽減した誘導体を合成した。HIV 侵入の動的超分子機構において構造変化を誘起することや、併用により抗 V3 抗体の中和活性を増強する効果があることを知見として得た。

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。誘導したモノクローナル抗体の中には、サブタイプ A, AE, AG, B, C, D の env を有するシュードウイルスに対し、1 ug/mL で中和能を示すものがあつた。ラット血清ではサブタイプ A, AG, B, D のシュードウイルスに対し中和能を示すものがあつた。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。

Glycerol-PEG 骨格に TGDK、環状ペプチド、CpGODN、SIV gp140 三量体タンパク質、BSA を共有結合させた粘膜免疫ワクチン (Senju-Vaccine) を創製した。TGDK は抗原を M 細胞へデリバリーするための有効な分子である。次に Senju-Vaccine 接種により粘膜に広域中和能を持つ抗 ENV 抗体と CCR5 に対する抗体を誘導させることによって、ウイルスの変異にも対抗可能な粘膜免疫応答を誘導できることを明らかにした。粘膜面に CCR5 および ENV に対する IgA を同時に誘導できた。本ワクチンによって SIVmac239 株、SIVsmH4 株、SIVsmE660 株だけでなく、CCR5 指向性の HIV の感染も阻害できた。粘膜ワクチン抗原によって誘導される抗 CCR5 抗体と ENV の糖鎖を認識する抗体によってこのような効果が見いだされていると考察している。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、抗 ENV 抗体と抗 CCR5 抗体が常時誘導できることを証明できた。Wobbling X protein を直接基礎免疫することによっても、ENV および CCR5 の第二細胞外ループに結合できる抗体が誘導できることを新たに見いだした。

4. アジュバント・細胞性免疫誘導法の研究

Nef 遺伝子欠損 SHIV-NI にアジュバント活性を持つ Ag85B 遺伝子を組み込んだ SHIV-Ag85B を構築し、アジュバントのウイルス感染、防御免疫への影響を検討した。SHIV-Ag85B は初期感染後より早期に検出されなくなった。さらに細胞性免疫が増強されていた。

HAART 治療を実施している多くの患者の体内で、この R5-typeHIV-1 が蔓延している事実は、R5-typeHIV-1 に感染した DC のみならず NKT 細胞を制御することの重要性を示している。自然免疫を

担う、樹状細胞群ならびに NKT 細胞群こそが HIV の主たる標的であり、これら細胞群における感染を制御することが、現在の抗 HIV 治療に加える新たな治療法を提供する可能性を示した。

バキュロウイルスベクターより産生させた HIV-1 gag-VLP および HIV-1 gag 発現組換えバキュロウイルス(rBV-gag)を作製し、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 *in vivo* で評価するとともに、HIV-1 に対して感染抑制効果があるか否かを *in vivo* の系にて評価した。その結果 HIV-1 gag-VLP および rBV-gag 感染 BMDC は樹状細胞ワクチンとしての優れた免疫誘導能を發揮し、感染制御がマウスレベルで確認できた。

5. ワクチン評価モデルの開発

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することによって、共受容体指向性を R5 型に変えることに成功した。この新規に作製した R5 型 SHIV-MK1 の個体内での複製能は必ずしも高くなかったが、アカゲザル個体で継代することにより、アカゲザルに安定して感染し、複製する R5 指向性 SHIV-MK38 株を得た。SHIV-MK38 は、中和抵抗性(Tier2、3相当)となったことから、今後エイズの病態解明やワクチン評価のための攻撃接種ウイルスとしての活用が期待される。また、相同組換えを利用して親株の持つ遺伝的多様性を再構築できる簡便で有用な新規組換えウイルス作製技術を確立した。これによりアカゲザルで良く増殖する CCR5 指向性クレード C 型臨床分離 HIV-1 株 Env を持つ新規 SHIV を短期間で作製することができた。

分担研究者

松尾 和浩 (日本ビーシ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

HIV-1 感染症のパンデミックは危機的状況にあり、エイズワクチン開発は世界的な要請である。実用性の点で未だ満足できるレベルの予防・治療ワクチンはなく重点的な研究開発が求められている。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。本研究では、弱毒性ウイルス感染が強毒性ウイルス感染に対する防御免疫を誘導するという未だに未解明のワクチンの基本原理の課題の解明を目標に、糖鎖変異 SIV 感染ザルが種々の病原性ウイルス感染に対し誘導した宿主応答を解析し、HIV 感染に対する有効性の検討、関連する宿主応答、遺伝子発現、生理活性物質、免疫組織、免疫細胞の同定を行う。

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)

我々が開発してきた 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ワクチン

チンベクターと考えている。BCG での発現系の改良や、変異株を用いた免疫誘導能増強により、抗 HIV (SIV) 細胞性免疫を強力にプライミングできる組換え BCG を構築して、ワクシニア等のウイルスベクターとのプライム・ブースト ワクチンの有効性をサルエイズモデルで明らかにすることを目的とした。

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 (志田)

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を検討することを目的とする。

有効な抗 HIV-1 ワクチンは格段に強い抗体と細胞性免疫の両方を誘導することが求められる。その為の方法として HIV-1 *nef* 発現 m8Δ とセンドライウイルス (SeV) ベクターの共免疫法を試み、さらに種々の免疫活性化因子の免疫増強効果を調べた。

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)

ウイルスの侵入部位である粘膜組織、ことにそこに棲息する R5-type HIV-1 の主たる標的である自然免疫を担う樹状細胞、あるいはその表面に発現した CD1d 分子によって統御されている NKT 細胞こそが、HIV-1 感染の主体であるという立場に立ち、独自の研究を展開してきた。

その中で、分泌型 IgA に富み粘膜の状況を反映するとともに母児感染を誘発する上で最も重要な因子と考えられる母乳中の細胞群を検討した結果、HIV 感受性を有する母乳中の CD4 陽性細胞の主体は T 細胞群ではなく、樹状細胞への分化段階にあるマクロファージ群であることを見出した。そしてこの母乳を介して伝播する HIV-1 の主体もまた R5-type であり、その伝播の鍵を握るのが DC-SIGN であることを見いだした。本研究班ではこの DC-SIGN を介した感染伝播を阻止するための方策を検討した。

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)

バキュロウイルスより産生させた gag タンパク質ウイルス粒子 (gag-VLP) および 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)

ヒトにおける液性免疫反応と Env の構造の本質を理解することを通じて、中和抗体誘導型エイズワクチンの可能性を追求するための研究を試

みた。我々は液性免疫誘導型エイズワクチンが目標とする強い液性免疫を持つ日本人HIV-1感染者を複数同定し、中和抗体レパートリー、抗原の構造的特徴、抗体の遺伝子的特徴を解析し、ワクチン抗原デザインに応用することにより液性免疫誘導型エイズワクチンの構築への貢献を図る。液性免疫誘導型エイズワクチンを成功させるためには、抗原の立体構造に対する理解が必須である。我々は機能的観点からEnvの分子構造を明らかにするための研究を行いワクチン開発研究へのフィードバックを試みる。

HIV侵入の動的超分子機構を認識する特異的抗体作製に関する研究 (玉村)

ワクチン作製のための抗原分子に関して4種類のターゲットを設定した。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 のペプチド N36, C34 の3量体、2) CD4 binding/コレセプターbinding 領域の中和抗体エピトープ(断片ペプチド)、3) 標的細胞側のコレセプター(第二受容体)であるケモカイン受容体 CXCR4 の細胞外ループ(Ecl1-Ecl3) & N 端、4) CD4 の小分子 mimic の誘導体、をもとにした人工抗原分子を合成し、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。

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マウス、ラット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)

ワクチンによって HIV の主な初感染部位である粘膜で HIV 感染を完全阻止する。

5. ワクチン評価モデルの作成 (三浦)

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

本研究の目的は、様々な病態を呈する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こと、そしてサルエイズモデルによる新規予防・治療法開発の為の粘膜感染病態に基づく評価基準を確立することである。近年、HIV-1 に類似のサルウイルス(SIV)を用いた研究によりエイズの標的臓器として腸管が重要であることが示され、エイズ患者においても腸管の重要性が示唆されている。一方、我々は外皮蛋白遺伝子を中心とした約半分のゲノム領域を HIV-1 のものと置き換えた SIV/HIV-1 キメラウイルス(SHIV)の作製によりサルエイズ感染・発症モデル系を確立し、これまでに様々な病態を呈する SHIV 感染性分子クローンを得ている。本研究により、サルエイズモデルの前臨床試験としての有用性が高まり、新しい評価基準に基づくエイズ根本治療法の開発が促進されるものと期待される

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

ビルマ・ラオス原産のアカゲザルを用い、ワクチン群(4群 11頭)として SIVmac239 を元に gp120 の N 型糖鎖付加部位の5カ所を欠失させた変異株、 $\Delta 5G$ 、 $\Delta 5Gver1$ 、 $\Delta 5Gver2$ 、3カ所を欠失させた変異株 $\Delta 3G$ を感染させた。各群1頭に糖鎖変異以外には変異がない親株 SIVmac239 をチャレンジ感染させた。すべて同じようチャレ

感染による血中ウイルスは検出限界以下であった (homologous challenge)。非ワクチン群 3 頭では SIVmac239 感染により持続感染を示した。次にワクチン群 11 頭に SIVmac239 とは各ウイルスタンパクにおいて 10-30% 相違がある SIVsmE543-3 (HIV-1 のサブタイプの違いに対応) を用いてチャレンジ感染を行った (heterologous challenge)。約半数で初期感染が検出されたが 4 週間にはすべてのサルで検出限界以下になり 10 週まで継続した (初期感染の感染制御)。ところが、4 頭ではウイルス感染が再上昇し、3 頭では持続感染、発症した (non-controller)。しかし 7 頭ではウイルス感染は 2 年以上制御された (controller)。非ワクチン群として 3 頭に SIVsmE543-3 を接種した。SIVmac239 と同様に発症型の持続感染を示した。これらの動物を用い、細胞性免疫、液性免疫の解析、CD8 抗体投与実験、末梢単核球中の免疫細胞の抗 SIV 活性の測定、末梢リンパ球の免疫細胞の性質、機能解析、末梢リンパ球の遺伝子発現の網羅解析等を行った。Controller に誘導されている防御免疫を解析するために non-controller から分離したウイルスを混合しウイルスストックを作成し、Controller に接種した。

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

(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

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 週間後、16 週間後、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 週間後、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。

各種 SIV 遺伝子を発現する BCG 株の確立

pBRmac239 を鋳型として、PCR 法で増幅した SIV env gp120 を pUC-hspK プラスミドにクローニング、得られた組換えプラスミドより gp120 発現カセットを切り出し、抗酸菌一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 を得た。SIVmac Rev-Tat-Nef を含む pTK-RTN プラスミドから、Rev の 78 番目のアミノ酸の下流と Tat, Nef をコードする DNA を切り出し、Rev の 1-77 番の配列をコードする合成遺伝子を介して 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。これらのプラスミドを BCG 東京株に導入し発現株 (rBCG-SIV gp120 および rBCG-SIV RTN) を得た。これら 2 種に rBCG-SIVgag-opt を加えた 3 種の組換え BCG 株を評価実験に用いた。

(2) 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

組換えワクシニア株の作成:

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株の HA 遺伝子内に p7.5 プロモーターと hCD40Lm を挿入。

m8Δenv(JR-CSF)/hCD40Lm: m8Δ株の HA 遺伝子内に pSFJ1-10-env と p7.5-hCD40Lm を挿入

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) m8ΔSIVgag; m8Δ株の HA 遺伝子内で pSFJ1-10 プロモーター下流に SIVgag を発現する。

m8Δ SIVgag-Ag85B:m8Δ SIVgag の gag 遺伝子の下流に p7.5 プロモーターと Ag85B を挿入。

m8Δ-Ag85B:m8Δの HA 遺伝子内に p7.5 プロモーターと Ag85B を挿入。

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、カニ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

結果を参照。

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 で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

長期間エイズ発症から免れている日本人血友病 HIV 感染者の血漿をモノグラム法にて解析した。広汎な HIV-1 株に中和活性を示す血清を有するドナーより末梢血単核球を分離し、EBV による B 細胞不死化を行い培養上清に HIV-1 感染阻害能を示す B-LCL クローンの抗体遺伝子解析を行った。ワクチン抗原 Env の機能・構造相関を評価した。プローブとして KD-247 を利用し複製可能な 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 非存在下および存在下で KD-247 によるウイルス捕捉実験を行った。KD-247 に対する中和感受性はモノグラム法に準じた手法で評価した。

HIV 侵入の動的超分子機構を認識する特異的抗体作製に関する研究

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

gp41 の N および C 端側に存在するヘリカル領域のペプチド N36, C34 を 3 量体にアッセムブリするための人工テンプレートを作成した。また、N36/C34 に親水性領域を付加したペプチドを合成した。これを合成したテンプレート上に構築し、3 量体とし抗原分子とした。合成した抗原分子を用いてマウス、ラットにて抗体誘導を検討し、中和活性を評価した。また、同じ化合物の抗 HIV 活性を評価した。

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

gp120 の CD4 binding/コレセプター-binding 領域の断片ペプチドを、環化と構造固定化のコンセプトを用いて、分子設計し、合成した。マウスおよびウサギを用い、抗体誘導を検討した。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。

3) CXCR4 の細胞外ループ(Ecl1-Ecl3) & N 末端領域を基にした抗原分子作製&抗体誘導

CXCR4 の細胞外ループ Ecl については親水性領域 Arg-Glu-Arg-Glu を天然型配列の両端に付与し2種の方法で環化し、MAP 等に導入した。N 端に関しては3つの断片に分割して合成した。各フラグメントは親水性領域を付加した多価抗原ペプチド(MAP)テンプレート上に構築し、抗原分子とした。これらをマウスに免疫した。

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

CD4 mimic NBD-556 に関して、芳香環の p-位に種々の置換基を導入した。また、2級アミンの窒素原子に種々の置換基を導入した。合成した化合物の各種 HIV 株に対する抗ウイルス活性を 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 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。この Core-Env 抗原は MPER が表出しており、宿主膜蛋白が少ない、脂質膜を認識させない、複製サイクルに提示されない中和エピトープを提示するという長所を有する。

1) 免疫抗原として NL4-3 由来の gag 及び各種 env 発現ベクターを 293T 細胞へトランスフェクションして HIV-1 様粒子を得た。

2) HIV-1 粒子中のコアを解析するために、20% 蔗糖をクッションに超遠心濃縮後、TritonX-100 を含む 30-80%蔗糖平衡密度勾配法により、Core-Env を分離した。

3) 脂質二重膜を除いた Core-Env、HIV 粒子、Core のみをそれぞれ Balb/c マウスまたはラットへ CpG DNA または titer Max をアジュバントとして、皮下に3回免疫した血清を得た。

4) Sp2/o ミエローマを使用して、免疫マウス脾臓よりハイブリドーマを誘導した。

5) ルシフェラーゼをゲノムとして有し、各サブタイプ env を有するシールドウイルスを作成した。

6) 各モノクローナル抗体、各ラット血清と各シールドウイルスについて、293T 細胞へヒト CD4、CCR5 を発現させ感染価を指標として中和試験を行った。

HIV 感染防止粘膜ワクチンの創製

- Senju vaccine の調製
- Senju vaccine の旧世界サルへの皮下免疫・経口免疫
- in vitro におけるウイルス感染阻害効果の検討
- サル膺-子宮組織の形態学的観察
- 交叉免疫抗原の探索と免疫原性評価

5. ワクチン評価モデルの作成 (三浦)

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

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の粘膜感染病態に基づく評価基準を確立する。また、エイズウイルス感染サル個体の粘膜感染病態形成における最も重要な標的細胞群を特定し、ウイルス制御に有効に働く粘膜免疫機構を明らかにする。

(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

慢性感染における感染制御

SIVsmE543-3 チャレンジ感染ザルは、慢性期(感染後20週以降)において、11頭中4頭においてSIV感染の再活性化が起こった(non-controller)。この慢性感染制御の違いの原因となる宿主応答の違いについて解析を行った。まず感染制御が持続した7頭のサル(controller)にCD8抗体を投与し、体内のCD8+細胞を一時的に減少させたところ、血中CD8+細胞の消失、その後の回復と対応する一時的なウイルス増殖が観察された。CD8+細胞が感染制御に鍵となる役割を担っていることを示す。しかしウイルス特異的CD8+T細胞の頻度、機能の多様性においてcontrollerとnon-controllerの間に違いは見られなかった。ところが、末梢血中のIL-15応答性のCD8+細胞の頻度がnon-controllerが有意に低レベルであることが明らかとなった。さらにその違いは、CD8+T細胞とNK細胞において観察された。これらの細胞は、細胞障害性の機能を持つ細胞であることが明らかとなった。controllerとnon-controllerはMHC遺伝子においてもそれぞれにおいて共通するMHC-Iアレルが同定されたことから、CTL, NK細胞の機能が関係していると思われる。最終年度ではCD8+細胞以外の免疫細胞の役割を示す結果が得

られた。

初期感染における感染制御

糖鎖変異SIV感染が誘導する防御免疫において最も重要な性質は、初期感染の感染制御である。ウイルス多様性、宿主多様性の影響が少ないことからHIV-1感染制御の実現において必須の宿主応答と考えられる。このメカニズムについては神秘のベールに包まれてきた。本研究により解明の糸口が見つかった。もう一つの未解明の現象である糖鎖変異SIVの初期感染後の感染制御に関する解析結果である。SIVmac239と糖鎖変異SIVΔ5Gは同レベルの初期感染を起こす。ところが感染組織、感染細胞が異なることが判明した。SIVmac239感染では2次リンパ組織のTh1細胞が感染の標的になっていたが、Δ5Gでは小腸粘膜組織のTh17細胞が感染標的細胞となっていた。関連する現象として、non-controllerでのウイルス感染再活性化がウイルス特異的CD4+T細胞の誘導と一致していることが明らかとなった。これらの結果は、Th1細胞が病原性SIV感染の標的になっていることを示唆する。この仮説を支持する遺伝子発現の結果も得られた。この仮説の証明は今後の重要課題となる。

多様な変異ウイルスに対する感染防御

糖鎖変異SIV感染が誘導する防御免疫がHIV-1の防御免疫の条件を満たすためには、多種多様な変異ウイルスに対する感染防御である。そこで、発症したnon-controller 3頭から感染ウイルスを分離し、チャレンジウイルスを作成し、controller 4頭のワクチン群へのチャレンジ感染実験を行った。Controllerはチャレンジ感染をほぼ検出限界以下に抑制した。

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

(1) SIV 遺伝子組換えBCG-組換えワクチニアプライムブーストワクチンの感染防御能評価：

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わかり、極めて長期にわたるワクチン効果が確認できた。

(2) BCG ベクターの開発：コドン至適化により抗原発現が約10倍増強された rBCG-SIVgag はを rVaccinia DIs とのプライム・ブーストにより極めて長期にわたるワクチン効果が確認できた。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-opt 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。BCG ベクターの低容量化と免疫原性の増強を目的に、ウレアーゼ欠損 BCG 東京株にコドン至適化 SIV gag 遺伝子を組み込み、発現株を得た。ウレアーゼ欠損により BCG が分解されやすくなり、発現した組換え蛋白質が免疫系に到達しやすくなることが期待される。予備的なマウス免疫実験の結果、SIV Gag p27 刺激により検出される IFN-g 産生細胞数が、野生株に比べ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

DNA prime/m8Δ boost における免疫誘導：マウスを pCAGGSenv で prime し、m8Δenv で boost して IFN-g 産生 CD8+ T 細胞と抗 Env 抗体の誘導を調べた。CD8+ T 細胞中 3.3% が Env 特異的に IFN-g を生産していた。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。hCD40Lm 発現 m8Δ と m8Δenv を混合して免疫すると、約2倍の IFN-g 産生 CD8+ T 細胞が誘導された。

M8Δ prime/SeV boost における免疫誘導： m8Δ と SeV ベクターを prime/boost して検討した。M8Δ は乱利法、SeV は経鼻接種した。6.5% の Env 特異的 IFN-g 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。SF162 シュードウイルスに対する中和抗体をも誘導していた。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。その結果、IFN-g 産生 CD8+ T 細胞の誘導を約2倍亢進させた。m8Δenv/hCD40Lm で prime した場合は細胞性免疫を亢進させなかったが、高い affinity の抗 Env 抗体を数倍効率よく誘導した。

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

SHIV-Ag85B, SHIV-NI 接種後のプロウイルスの検出： 両接種群の PBMC をそれぞれ用いて SHIV ウイルス DNA の遺伝子検出を試みたところ、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。

細胞性免疫の解析： 接種初期（2週および4週）PBMC を用いてウイルス構造タンパク（SIVGagPol、HIVEnv）特異的 T 細胞の解析を行った。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。

チャレンジ感染の結果： 免疫後37週において強毒株 SHIV89.6P 株の攻撃接種を行った。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、攻撃接種後2週において、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

1) HIV の母児感染は、主として母乳マクロファージの表面に発現した DC-SIGN 分子を介し

て誘発される。この母乳感染を阻止する方策を検討するため、正常分娩後の褥婦から初乳を採取し、その中の主体である母乳マクロファージ (BrMMΦ) と末梢血単核球 (PBMo) とを各種サイトカインで刺激しHIV 感染伝播の鍵を握る分子であるDC-SIGN の発現、ならびに細胞内における toll-like receptor (TLR) の発現を比較追跡するとともに、これら細胞群によるR5-type HIV-1 の感染伝播能をMAGIC-5 細胞を用いて追跡した。

PBMo とBrMMΦを詳細に比較検討したところ、PBMo にはTLR3 が全く発現していなかったのに対し、BrMMΦ にはTLR3 が発現していた。そこで、BrMMΦ にTLR3 のLigand である Poly(I:C)を添加培養したところ、DC-SIGN の発現が著明に抑制された。またPoly(I:C)刺激によるBrMMΦ 培養液中のインターフェロン(IFN)活性を測定したところ、IFN- α 、IFN- β ともに検出されたため、BrMMΦ にIFN- α/β を添加しDC-SIGN 発現に対する影響を追跡したところ、濃度依存性にDC-SIGN の発現が抑制された。こうした結果に基づき、IFN- IFN- α/β で処理したBrMMΦ をHIV-1 とともに培養し、HIV-1 感受性のあるMAGIC-V 細胞を添加培養したところ、HIV 感染伝播が著明に抑制された (Immunology,130:597,2010)。

2) キラーT 細胞誘発能を有するDEC-205 発現型DC は、①コレラ毒素 (J. Immunol. 180:4000,2008) , ② BCG 産物 (CancerImmunol.Immunother.58:1245,2009)、③性ホルモンのバランス (Immunobiol. 2012, in press) などによる刺激・増殖することを突き止めた。現在これらの因子が、自然免疫システムに直接作用し潜伏感染しているHIV-1 の増殖抑制を誘発するか検討中である。

3) HIV-1 感染初期において、粘膜感染型のマクロファージ指向性R5-type ウイルスがDC に潜入すると、その表面に発現した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ることを、実験的に確認することができた。また、CD4 陽性NKT 細胞の中でR5-type HIV-1は効率的に増幅するも見いだした。さらには、CD4 陽性NKT細胞の存在によって、R5-typeHIV-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 (論文投稿中)。このように、DC-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 細胞を含め全身に伝播される可能性が判明した。その結果、R5-type HIV-1 は現状のHAART 治療中の患者をみても、長期間に亘り体内に保持されるものと推測される。

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

HIV-1gag-VLP で標的抗原提示細胞、huMMDC を刺激したところ、未刺激の huMMDC に比べMHC I、II、CD80 およびCD86 の発現上昇が認められた。一方、ELISA にて培養上清中のサイトカインIL-6、IL-12p70 及びIFN- α の産生が認められ、DC が未成熟から成熟したと示唆された。また抗ウイルス因子 APOBEC3F/G の発現上昇が認められた。そこで、HIV-1 gag-VLP 刺激 huMDDC へ HIV-1 JR-CSF を感染させたところ、顕著なウイルス産生抑制が確認された。さらに、HIV-1gag-VLP 刺激 huMDDC へ HIV-1 NL4-3 を感染させ、CD4⁺T 細胞と共培養すると、CD4⁺T 細胞における HIV-1 産生抑制が認められた。

HIV-1gag-VLP をBALB/c マウスに投与した後、脾臓細胞をを摘出し、BMDC を分離し、再度BALB/c マウス投与した。その後BALB/c マウス脾臓細胞をを摘出し、Gag ペプチドで刺激した結果、NK 細胞およびCD8⁺T 細胞の活性化マーカー

一である CD69 の発現上昇及び IFN-g 産生、さらには HIV-1 Gag 特異的細胞障害活性が上昇した。

pAcCAGgag-Ph-gp64-gag バキュロウイルスベクター(BV)を用いて、rBV: AcCAG-gag/ Ph-gp64-gag を作製した。rBV を BMDC 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 の発現上昇が確認された。培養上清中のサイトカイン IL-6、IL-12p70 及び IFN-a の産生が認められた。また、rBV 感染 BMDC と脾臓細胞を共培養した結果、NK 細胞および CD8⁺T 細胞の IFN-g 産生が認められた。rBV 感染 BMDC を BALB/c マウスに投与した。その結果、CD8⁺T 細胞、CD4⁺T 細胞、及び NK 細胞の表面上に活性化が確認できた。また、活性化した CD8⁺T 細胞と NK 細胞から IFN-g の産生が認められた。ターゲット細胞を脾臓細胞と共培養した結果、CD8⁺T 細胞の HIV-1 Gag 特異的細胞障害性の上昇と B 細胞の活性化が確認された。最終的に rBV 感染 BMDC をマウスへ投与し、HIV-1 NL4-3-VSV-G を感染させると血清中の p24 量が未刺激 BMDC より rBV 感染 BMDC において優位な減少が認められた。

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

日本人 HIV 感染者の血漿中にクレードを超えた HIV-1 株中和能を持つ例を複数同定した。3 名のドナーから計 9 クローンの中和抗体遺伝子増幅に成功した。2 人の異なるドナーから得られた独立したクローンで抗体遺伝子座の中から同一のセグメントが使用されていることが判明した。これは中和抗体の遺伝子構成に一定の選択性が存在することを強く示唆する。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。

HIV 侵入の動的超分子機構を認識する特異的抗体作製に関する研究

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

人工テンプレートと親水性領域を付加した gp41 の N 末端側断片 N36 peptide の 3 量体、および C 末端側断片 C34 peptide の 3 量体を構築した。マウスで免疫し ELISA で抗体が誘導を確認し、中和抗体誘導も確認した。いずれの 3 量体も、顕著な膜融合阻害活性を有しており、とくに C34 peptide の 3 量体は単量体に比べて 100 倍高い抗 HIV 活性を示した。

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

本領域の環状ペプチドおよび鎖状ペプチドを用いて、抗体誘導能をマウス、およびウサギで評価したが、中和活性が検出できなかった。また、ファージディスプレイライブラリーからアフィニティーを持った抗体クローンが得られた。

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

CXCR4 の N 端に関しては 3 つの断片(Nt-1, Nt-2, Nt-3)に分割して合成し、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。Ecl に関しては、2 種類の合成法を用いて CXCR4 の細胞外ループを合成し、環化し、テン

プレートへ導入した。これらの抗原分子をマウスに免疫し、抗体誘導を行った。その血清の ELISA の結果、Nt-3 の 4 置換体、および直鎖状の Ecl-1,-2 が、効率よく抗体誘導されていることがわかった。直鎖状の Ecl-1,-2 の免疫で得られた血清に顕著な抗 HIV 活性が見られた。

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

種々の CD4 mimic 誘導体を合成し、化合物の MTT assay で評価したところ、細胞毒性を軽減した誘導体を得られた。また、FACS 解析により抗 V3 抗体(KD-247)の envelope への反応性の変化が見られた。本誘導体は抗 V3 抗体との併用により、顕著な相乗効果が見られた。また、新規高活性 CD4 mimic 誘導体を数種創製した。

HIV-1 中和モノクローナル抗体の誘導

- 1) マウスへの免疫により、env を認識するモノクローナル抗体産生クローンを 100 程度誘導することができた。
- 2) モノクローナル抗体中に、NL43 env 増殖欠損株に対する中和能を 1 ug/mL で示すものがあった。
- 3) さらに他のサブタイプ A, AE, AG, C, D のシュードウイルスに対する中和能を 1 ug/mL で示すものがあった。
- 4) ラットへの免疫により、得られた血清ではサブタイプ A, AG, B, D のシュードウイルスに対する中和能を示すものがあった。

HIV 感染防止粘膜ワクチンの創製

粘膜免疫を賦活のためのデリバリー分子の開発：TGDK が抗原を M 細胞へデリバリーするための有効な分子であることを霊長類レベルで明らかにすることができた。

抗 ENV 抗体及び抗 CCR5 抗体の誘導：Senju-Vaccine 接種により粘膜に広域中和能を持つ抗 ENV 抗体と CCR5 に対する抗体を誘導させ

ることによって、ウイルスの変異にも対抗可能な粘膜免疫応答を誘導できることを明らかにした。なお、粘膜面に CCR5 および ENV に対する IgA を同時に誘導できた例は、これが初の例と言える。

交叉免疫抗原によるブースト効果の評価とプライミング効果：交叉免疫抗原を接種した個体において抗 ENV 抗体と抗 CCR5 抗体が誘導できることを明らかにした

5. ワクチン評価モデルの作成 (三浦)

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

HIV-1 の感染伝播と感染後の病原性に深く関与しているのは CCR5 (R5)指向性であると考えられるようになった。そこで我々は、アカゲザルに安定的に感染する R5 指向性 SHIV を作製することによって、より有効なエイズ霊長類モデル系を確立することを試みた。

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することによって、共受容体指向性を R5 型に変えることに成功した。アカゲザル個体内での複製能は必ずしも高くなかったのでアカゲザル個体で継代することにより、アカゲザルに安定して感染し、複製する R5 指向性 SHIV-MK38 株を得た。次に、ウイルスの中和抗体に対する抵抗性について検討した。まず、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ところ、親株の SHIV-KS661 と馴化前の SHIV-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 SHIV-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 SHIV-MK38 の env 遺伝子領域のシーケンズ解析により、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た上で、KD-247 に対する中和感受性を調べたところ、SHIV-KS661 と SHIV-MK1 の IC50 は、5-10 μ g/ml 程度(Tier1B 相当)であったのに対し、SHIV-MK38 の IC50 は、50 μ g/ml

以上(Tier2, 3 相当)であった。以上の結果から、新規に作製した R5 型 SHIV-MK1 をサル個体に馴化して得られた R5 型 SHIV-MK38 は、HIV-1 臨床分離株と同レベルの中和抵抗性を獲得したことが明らかとなった。

これまでに作製された SHIV は分子クローン由来であるが、HIV-1 は元来、多様性を保持した変異集団であり、このことがウイルスの適応度を高める要因の一つと考えられる。また、世界中の HIV 感染者の約 60% が clade C ウイルスに感染しているが、現存する clade C の SHIV は数少ない。そこで本研究では感染伝播と病原性に深く関与している CCR5 指向性 clade C HIV-1 株の env 領域を持つ SHIV の作製を行った。細胞の相同組換え機構を利用した新規組換え技術を確認し、clade B SHIV-KS661 をバックボーンとして clade C HIV-1 臨床分離株の env 領域を持つ SHIV を作製した。シークエンス解析で組換え部位の特定を行い、本研究で確立した組換え技術により、clade C HIV-1 env を持つ新規 SHIV の生成を確認した。新規 SHIV は SIVmac239 と同程度に複製した。新規 SHIV は、CCR5 指向性であることを確認した。アカゲザル肺胞マクロファージでの複製能を評価したところ、新規 SHIV はマクロファージ指向性であることを明らかにした。3 頭のアカゲザルにこの SHIV を接種し、血漿中ウイルス RNA 量、末梢血中 CD4 陽性 T 細胞数、肺胞中 CD4/CD3 陽性 T 細胞の割合の変動から、個体レベルのウイルス複製及び病原性を評価した。(1) 新規 SHIV はサル個体内において高力価で複製した。(2) 感染サルの末梢血 CD4 陽性 T 細胞を減少させなかったが、CCR5 指向性ウイルスが標的とするエフェクターメモリー CD4 T 細胞が多数分布するエフェクターサイトの一つである肺胞において、顕著に CD4 陽性 T 細胞を減少させた。

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+T 細胞と NK 細胞の頻度、そのエフェクター機能と感染制御との関連が示された。今後の課題は、これらのエフェクター細胞が実際に SIV 感染細胞の排除に具体的にどのような働いているのか？その機能の制御がどのような機構で行われているか？を明らかにすることである。ワクチンは HIV 感染に対するリコールレスポンスを備える免疫記憶を形成する。どのような免疫細胞が関わるのかを先ず明らかにすることが必要ではないかと思われる。

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

インド産アカゲザルでの SIVmac 感染防御効果は極めて大きな意義がある。完璧にウイルス感染を防御したサルでは、BCG でプライミング後に既に有意な Gag 特異的 INF-g, TNF-a 陽性細胞の誘導が認められており、防御能を得る上で BCG ベクターのプライミング能が極めて重要であることがわかった。抗原発現レベルには限界があり、さらに実用化までポテンシャルをレベルアップするには、菌自身の性質を modify するしかないと考えられる。現在行なっているウレアーゼ欠損

株の利用等による免疫増強型の組換え BCG 構築とその評価が期待される。

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

細胞性と液性免疫の両免疫を誘導する為に、m8Δenv prime/SeVenv boost 法でマウスを免疫し、Env 特異的 IFN-g 産生 CD8⁺T 細胞と抗 Env 抗体を効率よく誘導することを見いだした。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った。

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

HIV-Ag85B 接種カニクイザルは、接種初期においてウイルスを検出限界以下に抑え、この機序にはウイルス特異的な強力な細胞性免疫反応の関連が示唆された。また SHIV89.6P 攻撃接種後においても強毒株ウイルスを制御し、また攻撃接種後 2 週における細胞性免疫反応は、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。今後、誘導されたメモリーT 細胞反応を詳細に解析するとともに、初期免疫反応についても明らかにすることで、防御免疫機構との関連性を検討する。最終的には、エイズウイルスを制御する免疫機構を解明したいと考えている。

粘膜免疫活性化による粘膜棲息型 HIV 制御法の開発

従来 HIV-1 の感染標的は獲得免疫の中心に位置する CD4 陽性 T 細胞群であると考えられてきたが、実際に現在蔓延している 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 DC-SIGN

を介した捕捉を含め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

活性化 DC 細胞を HIV ワクチンとして用いる研究を遂行した。ヒト DC 細胞へ gag-VLP で刺激することにより MHC 分子、共刺激分子の発現上昇、IFN- α の産生および抗ウイルス因子 APOBEC3F/G の発現上昇が認められた。また、NK 細胞および CD8⁺T 細胞の IFN-g 産生、HIV-1 Gag 特異的細胞障害活性が上昇が確認された。一方、BV が有する免疫賦活性効果と gag との相乗効果を持たせた rBV では CD8⁺T 細胞、CD4⁺T 細胞、及びメモリーNK 細胞の IFN-g の産生が認められた。さらに、ターゲット細胞を作製し、脾臓細胞と共培養した結果、CD8⁺T 細胞の HIV-1 Gag 特異的細胞障害性の上昇が認められた。最終的に HIV-1 NL4-3-VSV-G 感染マウスモデルでの HIV-1 感染制御を確認できた。

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

我々の研究は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ことを契機として液性免疫誘導型ワクチンの可能性を追求するための戦略的な基礎的研究の可能性を示している。ワクチンが誘導する抗体は IgM から生じる。どのような IgM クローンが潜在的に中和能を持つ IgG へ変化していくのか、そのエピトープは Env のどの領域か、等の重要な問いに対する回答は系統的な forward genetics により得られるかもしれない。

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、ワクチンの免疫源としての Env 立体構造の全体像に対する理解は十分とは言えない。我々の研究により、既法では極めて困難であった Env の機能・構造相関を明らかにできた。Env 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。この研究手法を複数の中和抗体と多様なウイルスの遺伝的背景で行う事により、Env の機能・構造相関に対する理解を著しく深める事が可能になると思われる。本研究アプローチは液性免疫誘導型ワクチンの免疫源をデザインするための重要な情報を提供すると期待される。

HIV 侵入の動的超分子機構を認識する特異的抗体作製に関する研究

4種のターゲットは革新的、斬新なアイデアに基づいている。創薬化学・ペプチド合成の技術を用い、抗原分子等を順調に合成した。

HIV-1 中和モノクロナール抗体の誘導

Core-Env のマウスへの免疫により 2F10, 4E10 など既存の広域ヒトモノクロナール抗体と比較可能な抑制効果を示すモノクロナール抗体が得られた。ラットへの免疫によっても中和能を得た。精製 HIV-1 env 糖蛋白や不活化ウイルスの免疫ではマウス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-1 感染者に中和抗体は認められるが、病態の進行を抑制するレベルに達していないと考えられている。MPER を標的とした既存の広域中和ヒトモノクロナール抗体 2F5, 4E10 には脂質二重膜を認識するという問題が指摘されている。Core-Env は脂質を除いているために膜に含まれていた宿主因子を抗原として含むことがないという利点がある。また脂質二重膜自体を除いているため蛋白抗原と共に脂質を抗原として認

識させる危険が少ないという利点も有していると考ええる。

HIV 感染防止粘膜ワクチンの創製

本研究グループで作製した粘膜ワクチンにより、腸管および膈内に抗 ENV 抗体および抗 CCR5 抗体を誘導できることを確認できた。さらに、基礎免疫により誘導された抗 CCR5 抗体および抗 ENV 抗体を、長期的に維持するための交叉抗原を特定できたために、この交叉抗原を日常生活の中で曝露されることにより、粘膜ワクチンによってワクチンによって誘導された免疫応答が長期間維持できることを確認できた。また、本研究で開発した粘膜ワクチンによって、CCR5 に対する抗体を誘導できるため、SIVmac239 株、SIVsmH4 株、SIVsmE660 株だけでなく、CCR5 指向性の HIV の感染も阻害できることを確認できた。現在、広域中和能を有する ENV に対する抗体の開発が世界レベルで推進されているが、本研究により、CCR5 と ENV を標的とした粘膜ワクチン戦略を提案できると思われる。

5. ワクチン評価モデルの作成 (三浦)

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

本研究により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ことから、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。今後、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詳細に解析することで、セカンドレセプター指向性や中和抵抗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。

今回確立した相同組換え現象を利用した新規 SHIV 作製技術は、操作が簡便で、ウイルスに適