

**第18回日本エイズ学会シンポジウム記録****HIV/AIDSの病態進行とワクチン開発の進歩****Japanese Contribution to the Development of an HIV/AIDS Vaccine**

座長：高橋 秀実，本多 三男

基調講演：Gary J. Nabel (National Institute of Allergy and Infectious Diseases,  
National Institute of Health, USA)

滝口 雅文，田中 勇悦，俣野 哲朗，染谷 健二

日本エイズ学会誌 7: 83-92, 2005

**HIV/AIDS**の感染はなお世界的な拡がりを見せており、我が国でもその兆しが見られ、有効な予防治療法の開発が新たにできなければ爆発的な勢いの増加が予想されている。この状況の中で**HIV**ワクチン開発に向け科学的のみでなく社会的な問題としての国際共同研究の動きがとらえられ、**Global HIV Vaccine Enterprise**の実質的な設立に向けて、科学者のみでなく**HIV**関連の人々が結集し、ワクチン開発と実用化への活動をプロモートする動きが始まっている。

このような状況のもとで日本からの**HIV**ワクチンの開発への貢献を問うべく米国**NIH**ワクチン開発センターで進められている**HIV**ワクチン開発のこれまでの成果をもとにして、このシンポジウムを効果的に開催できるように三間屋先生にお願いし Gary J. Nabel 所長の出席が可能となった。

米国ワクチン開発センターのグループは**HIV**を初めとした新興再興感染症へのワクチン開発の実用化を目的としておりワクチン開発研究機関としてのみでなく、バイロットプロダクションの機能を合わせ持つ新しいタイプの研究所といえる。即ち、**HIV**ワクチン等の実用化は経済的な理由から営利企業に委ねることが難しいことから、社会的プライオリティーに応えるべくバイロットプロダクションの機能を備えて経済的效果のメドをつけることにより社会に還元しようとする試みと思える。

現在、ワクチン開発センターの目指している**HIV**ワクチンの方向性は最終的には効果的で安全なマルチクレードワクチンの開発にあり、その意味でワクチン効果と安全性、生産性さらにこれまで開発使用されているワクチンとの併用可能性の点から検討されるべきものとしてとらえられる<sup>1,2)</sup>。

著者連絡先：本多三男（〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1  
国立感染症研究所エイズ第一研究グループ）  
Fax : 03-5285-1183

2005年4月27日受付

彼らの目指しているマルチクレードワクチンの方向性として**DNA**ワクチン単独、あるいはアデノウイルスベクターワクチンとの併用によるプライムブーストワクチンの開発に期待を寄せている<sup>3)</sup>と思われる。その標的抗原遺伝子として細胞性免疫及び液性免疫の両方を誘導可能な**Gag**と**Env**のマルチエピトープワクチンであり、クレイドA, B, Cウイルスの蛋白遺伝子を組んでいる。この**Env**蛋白の研究は**Env**の構造の解析、免疫学的解析、あるいは薬理学的安全性研究をベースとしている。

現在**DNA**ワクチンとしてのマルチクレードワクチンの臨床試行が行われ、プライムブースト法の必要性が明らかにされつつある。その候補の一つとして自己複製をしないアデノウイルスをベクターに用いたブーストワクチンの開発、さらには**HIV**の**Gag**と**Env**遺伝子を組んだ**DNA**プラスミドを用いて得られるVLP (virus-like particles) の产生とその免疫原性について<sup>4)</sup>も明らかにしており、ブースターの可能性が示唆される。

現在の**HIV**ワクチンの開発が絶対的な動物モデルの欠落によるワクチン効果の評価法が渾沌としている中で臨床試行の意義がますます重要になっている。

本シンポジウムでは自然免疫から獲得免疫に至るワクチン開発に関連した免疫反応の意義を明らかにしながら、樹状細胞を用いた免疫ワクチンの可能性や日本で独自に開発されつつあるセンダイウイルス、ワクシニアDIsウイルスベクター、さらにBCG東京株を用いた細菌性ベクターワクチンの応用の現状についてワクチン開発の見通しを踏まえながら検討して頂く。

### 1. 自然免疫活性化による**HIV-1**特異的獲得免疫の制御

#### **Control of HIV-1-specific acquired/adaptive immunity by modulation of innate immunity**

高橋 秀実（日本医科大学微生物学免疫学教室）

Hidemi Takahashi (Department of Microbiology and Immunology, Nippon Medical School)

ウイルスは細胞内でのみ増殖可能な病原体であるため、通常ウイルス感染に伴って感染細胞そのものを制御する能力を獲得した特異的キラーT細胞(CTL: cytotoxic T lymphocytes)の誘導が感染個体内で認められる。このCTLは、感染細胞内で産生されたウイルス由来のペプチド断片がクラスI MHC分子とともに細胞表面に提示された複合分子を認識し、感染細胞内のウイルス遺伝子情報をApoptosisによって消去・破壊し、ウイルス感染を制御する。

こうしたCTLを誘導するためには、CTL活性化の鍵を握るB7などの共刺激分子を発現した樹状細胞が、ウイルス由来のペプチド断片であるCTLの認識エピトープを自身のクラスI MHC分子とともに提示することが必須である。ところが、クラスI MHC分子から提示されるペプチド断片は、細胞内で産生された蛋白由来のものであると考えられてきたため、樹状細胞内でウイルス蛋白が複製されることが、CTL誘発の原則であった。こうした原則は、樹状細胞に感染することがない様々なウイルスに対する特異的CTLの誘発が起こるメカニズムを研究する上での大きな障害となってきた。

筆者らはこれまで、ウイルス由来の蛋白を樹皮から採取したサポニンを基に作成したISCOMというアジュバントとともに皮内接種したところ、エピトープペプチド特異的なクラスI MHC拘束性を有するCTLが誘発されること<sup>5)</sup>、そしてその誘導の鍵を皮内の樹状細胞が握ること<sup>6)</sup>を見出してきた。そしてその過程で、ウイルス蛋白粒子を捕捉した樹状細胞が、通常はエンドゾームを介してクラスII MHC分子より提示する抗原を、その刺激状態によってはクラスI MHC分子を介して提示するcross-presentationの能力を有すること<sup>7,8)</sup>を示してきた。

こうした知見に基づき、図1に示したように、HIV-1由来のエンベロープ蛋白gp120を捕捉した未熟な樹状細胞が、ウイルス複製に伴って出現すると想定されるdsRNAを代表するpoly(I:C)によってその表面に発現したTLR3を介して刺激された場合cross-presentationが惹起され、ウイルスエピトープ特異的なCTLが誘発されるのではないかと考え研究を進めた。その結果予想した通り、捕捉されたgp120蛋白は樹状細胞内で断片化され、CTLのエピトープペプチドをクラスI MHC分子とともに提示していることが確認され(図2)、poly(I:C)とともにgp120蛋白をマウス皮内に接種したところ提示されたエピトープペプチド特異的なCTLが体内で誘導されることを見出した(図3)<sup>9)</sup>。なお、gp120蛋白を取り込んだ樹状細胞を細菌群を代表する物質であるLPSを用いてTLR4を介し刺激した場合には、全くクラスI MHC分子を介

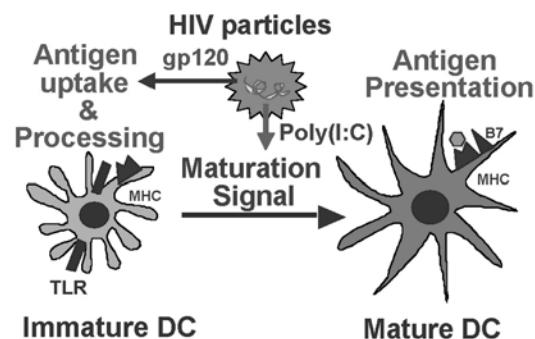


図1 抗原捕捉未熟樹状細胞のpoly(I:C)による活性化

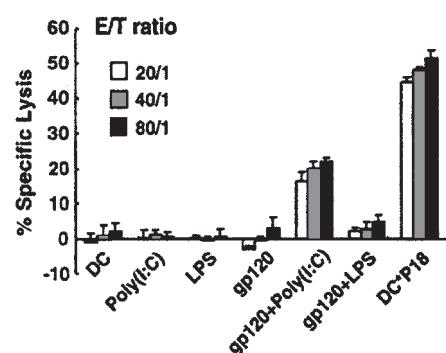


図2 Poly(I:C)で誘導されたCross-presentation

した抗原提示は惹起されず、また特異的なCTLの誘導も認められなかった。さらに、HIV-1とは別のウイルスとして、Influenzaウイルス由来のHA蛋白を同様にpoly(I:C)とともに皮内接種した場合にも、HA蛋白内のペプチドエピトープを特異的に認識するCTLの誘発が認められた。以上のことから、ウイルス特異的なCTLは、そのウイルス自身が樹状細胞に感染し細胞内で複製することのない場合にも、感染細胞破壊に伴って放散したウイルス蛋白を捕捉した未熟な樹状細胞が、ウイルス核酸を代表するpoly(I:C)などによってTLR3を介して刺激された場合、特異的なCTLを体内誘発することが明らかとなった。なお、この論文が発表されてから、1年以上を経過した後、類似のことが他のグループによっても発表された<sup>10)</sup>。

また、筆者らは遺伝子銃(Gene Gun)により皮内に打ち込まれた金コロイドにgp120蛋白をコードするプラスミドDNAを接種する場合、この金コロイドにTLR7を刺激するCpGモチーフを有したプラスミドDNAと一緒にコーティングすることによっても特異的なCTLが体内誘発されることを確認している<sup>11)</sup>。

以上、ウイルス蛋白を用いたワクチン開発においてはTLR3を介して抗原を捕捉した未熟樹状細胞を刺激・活性

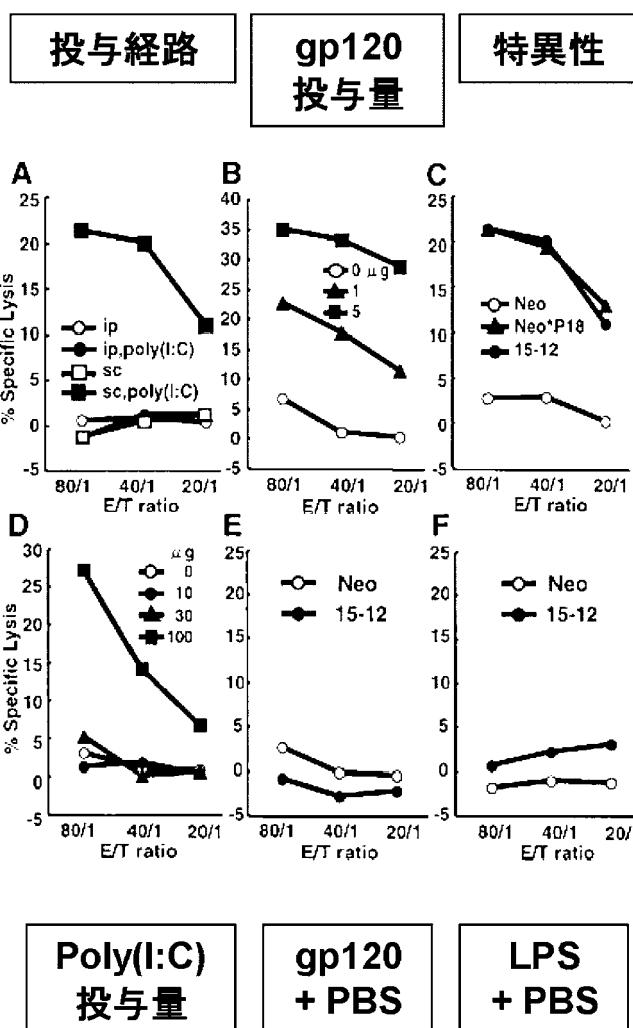


図 3 Poly (I : C)+gp120 皮内接種による特異的 CTL の誘導

化することが重要であり、ウイルス遺伝子を用いた場合には TLR7 からの刺激が大切であることが示唆される。なお、こうしたワクチンを皮下あるいは腹腔内に接種した場合には CTL がほとんど感作されなかったことから、体表面に配置された樹状細胞を介して抗原群が捕捉されることがウイルス特異的 CTL 誘導の鍵を握るものと考えられる。

## 2. HIV-1 特異的 CTL による HIV-1 増殖抑制

**Epitope-dependent effect of Nef-mediated HLA class I down-regulation on ability of HIV-1-specific CTLs to suppress HIV-1 replication**

滝口 雅文（熊本大学エイズ学研究センター ウィルス制御

分野）

Masafumi Takiguchi (Division of Viral Immunology, Center for AIDS Research, Kumamoto University)

HIV-1 感染症では、細胞性免疫、液性免疫が誘導されてもかかわらず、これらの免疫系により生体から HIV-1 は排除されることではなく、いずれ免疫系組織を破壊し、エイズを発症させる。しかしこのエイズ発症にいたる経過は個人差があることが知られており、感染後治療をしないまま約 25-30 年経過しても発症しない人も知られている。しかし多くの研究がなされているにもかかわらず、免疫系がなぜ HIV を排除できないか、またある特定の人が HIV の増殖をコントロールできるのか、未だ明らかになっていない。

HIV-1 の感染には個体差があると考えられている。アフリカの Sex worker の中には、HIV-1 に高頻度に暴露しているにもかかわらず、HIV-1 に感染しない人たちがいることが知られているが、これらの人たちがなぜ感染しないかはよく分かっていない。HIV-1 が細胞に感染するときは、細胞表面に発現している CD4 分子とケモカインレセプターである CXCR4 あるいは CCR5 を必要とするが、これら感染抵抗性がある人たちの中には、この CCR5 の 32 塩基が欠損している CCR5 $\Delta$ 32 を両方の遺伝子座に持っている人が知られている。この CCR5 $\Delta$ 32 の保有率は人種差があり、白人では多いがアジア人は極めて少ない。一方、HIV-1 に感染していても、無治療のまま長期間発症しない人（長期未発症者：long-term non-progressor）や発症が遅い人（slow progressor）がいることが知られている。これらの人たちの中には CCR5 $\Delta$ 32 を片一方の遺伝子座に持っている人がいることが知られている。また HLA のアリー爾とエイズ発症期間の相関を調べた結果、HLA-B35 はエイズ発症の促進に、一方 HLA-B57, B51, B27 はエイズ発症遅延と強い相関があることが明らかになった。

HIV-1 特異的 CD8T 細胞は、HLA クラス I 分子により提示される HIV-1 ペプチドを認識し、主に二つの機序で HIV-1 の増殖を抑制していると考えられる。第一に、抗原認識により TCR から刺激が入ると、perforin や granzyme を放出し、これにより HIV-1 感染細胞を傷害して HIV-1 の増殖の場を奪うことにより、生体内での HIV-1 増殖を抑制しようとするものである。もう一つは TCR から刺激が入ると HIV-1 特異的 CD8T 細胞からサイトカインを産生し、これらのサイトカインによって HIV-1 の細胞内への侵入を阻止したり、HIV-1 自体の増殖を抑制するものである。前者には、MIP-1 $\alpha$  や RANTES のようなケモカインがあり、後者には IFN- $\gamma$  などがある。主にこれらの二つの機序により、HIV-1 の増殖が抑制されると考えられる。実際長期未発症者では HIV-1 に対する高い CTL 活性が維持さ

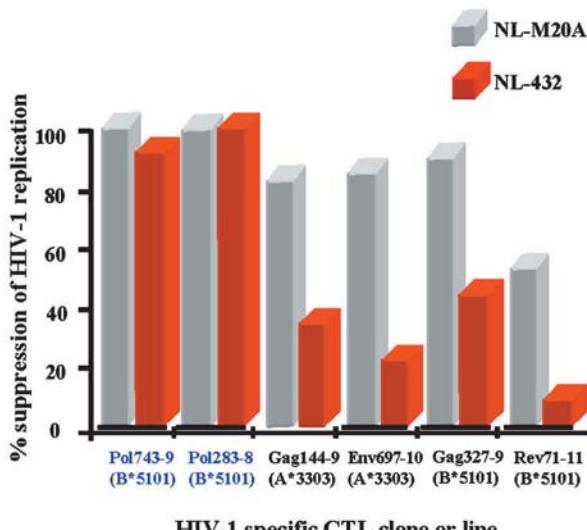
れているという事例やハイリスク集団の中に HIV の感染から免れているが高い HIV 特異的な CTL 活性が認められるケースがあり、またサルの SIV では、CD8T 細胞を取り除くとエイズが発症することが知られている。これらのことから、CTL が HIV-1 の増殖抑制に大きな役割を果たしていることは明らかである。

それでは、どうして HIV-1 は CTL からの逃避が可能であるのであろう。また、ある特定の HLA をもった人の中に、エイズ発症が遅延したり促進したりする人たちがいるのだろうか。この質問の答えを示唆する研究が報告された。その一つは、HIV に感染後、きわめて短時間（1年以内）にエイズを発症した患者のケースである。この患者では、感染してすぐに Env 蛋白質上のたった一つのエピトープに対して強い CTL 活性が見られた。しかし約 1 カ月後にこのエピトープ上に CTL が認識できなくなってしまう変異をもったウイルスが出現すると、CTL からの攻撃を逃れることができるためにウイルスは急速に増殖して、患者の免疫系を破壊してしまったのである。このように、エピトープ上の変異により、CTL の認識から HIV-1 が逃避する可能性を考えられている。一方 Nef 蛋白が欠損した HIV-1 に感染した細胞では、HLA クラス I 抗原の発現は感染していない細胞と比べても変わらないが、Nef 蛋白が欠損していない HIV-1 に感染した細胞では HLA クラス I

抗原の発現が低下することが知られている。HIV-1 の感染によって HLA クラス I 抗原が低下することにより、HIV-1 の抗原提示が低下し、これにより CTL から認識を HIV-1 は逃避するという研究が報告されている。

以前に我々は、二つの HLA-B3501 拘束性 CTL クローンが、HLA クラス I 分子の細胞表面での発現低下を起こさせない Nef を持った HIV-1 (NL-M20A) が感染した CD4T 細胞に対して細胞傷害活性を示すが、Nef 蛋白が正常に機能する HIV-1 (NL432) が感染した CD4T 細胞に対して細胞傷害活性を示さないことを明らかにした。さらに、これらの CTL クローンは、部分的であるが NL432 の増殖を抑制し、サイトカインを産生することから、NL432 感染細胞を認識していることを明らかにした<sup>12)</sup>。一方、エイズ発症遅延に相関する HLA である HLA-B\*5101 が提示する四つの HIV-1 エピトープと、相関しない HLA-A\*3303 が提示する二つのエピトープに対する CTL クローンの、NL432 の増殖抑制能と NL432 感染 CD4T 細胞に対する細胞傷害活性を調べた。その結果、エイズ発症遅延に相関する HLA である HLA-B\*5101 が提示する二つのエピトープを認識する CTL は、Nef による HLA クラス I の低下による認識能の低下の影響を受けずに、NL432 の増殖を強く抑制すること（図 4 A）、HIV-1 感染 CD4T 細胞を効率的に傷害することを明らかにした（図 4 B）。このような CTL は、

### A. HIV-1 増殖抑制能



### B. 細胞傷害活性

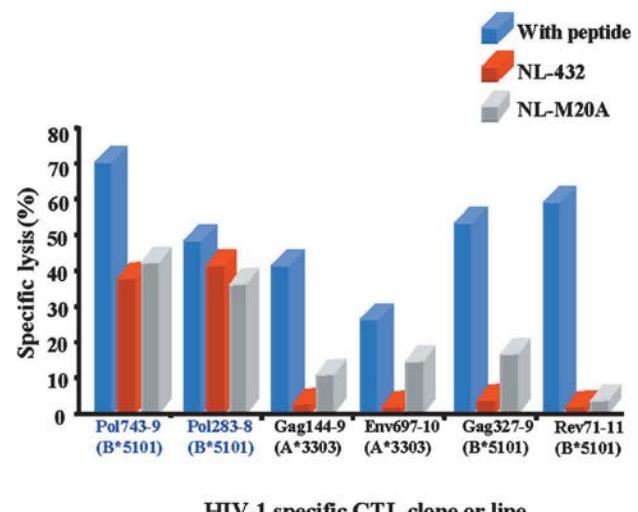


図 4 Pol 特異的、HLA-B\*5101 拘束性 CTL による細胞障害活性とウイルス増殖抑制活性

- A. 二つの Pol 特異的 HLA-B\*5101 拘束性 CTL は NL-432 の増殖を強く抑制した。一方、他の CTL は弱い増殖抑制能か全く増殖抑制能を示さなかった。
- B. 二つの Pol 特異的、HLA-B\*5101 拘束性 CTL は、NL-432 感染 CD4T 細胞に対して強い細胞傷害活性を示した。一方、他の CTL は、細胞傷害活性を示さなかった。

HIV-1 感染者の中で強い HIV-1 増殖抑制能を示す可能性は考えられる<sup>13)</sup>。実際 HLA-B\*5101 テトラマーを用いた解析で、3人の long-term non-progressor では、これら二つの Pol エピトープ特異的 CD8T 細胞が確認されたことから、体内での HIV-1 の増殖抑制に関与していると考えられる。

### 3. 樹状細胞を用いたエイズ免疫療法の可能性

#### **Protective immune response against HIV-1 in the hu-PBL-SCID mice induced by intra-splenic immunization with inactivated HIV-1-pulsed dendritic cells**

田中 勇悦（琉球大学大学院医学研究科免疫学分野）  
Yuetsu Tanaka (Department of Immunology, Graduate School and Faculty of Medicine, University of the Ryukyus)

樹状細胞 (dendritic cells : DC) とは、後天性免疫応答を強力に誘導し維持する抗原提示細胞である。DC は監視役として体内的種々の臓器、皮膚や粘膜に分布し、外から侵入した病原体を取り込み、免疫応答を開始する第二リンパ組織へ移動する。そして抗原特異的 T 細胞を活性化させ増殖させる。樹状細胞の働きが弱まっている患者の末梢血単球や骨髄細胞から DC 前駆体細胞を採取し、それを分化培養し、目的とする T 細胞が認識する抗原を感作させた後に、同じ患者に戻す方法は DC 免疫療法と呼ばれる。私たちの実験モデルにおいて、DC 細胞免疫療法は HIV-1 ウィルス制御に有効であることが示された。

HIV-1 感染者では、DC 数の減少と機能低下が報告されている。つまり、脾臓の DC の CD83 発現が弱いこと（未熟性が高い）、および SIV-1 感染サルの例では、リンパ節で

DC の供給と成熟がかなり阻害されている。これらの事実から HIV-1 感染者の第二リンパ組織では抗原提示細胞としての DC の総能力が低下していることが想像される。現在の最良の治療法である HAART によって HIV-1 量の低減と CD4<sup>+</sup> T 細胞数の復帰は実現するものの、一般の免疫能および HIV-1 に対する免疫の完全復活は難しいことから察すると、治療後も DC の機能低下は回復しない可能性がある。このような HIV-1 患者の免疫機構の脆弱性を解決するため DC 免疫療法が適すると考えられる。

DC は、末梢血単核細胞 (PBMC) 中の单球をヒトの GM-CSF と IL-4 で刺激培養することにより分化培養できる。この方法で得られる未熟 DC は抗原取り込みに優るので、この段階で不活化 HIV-1 に暴露し、同時に最終段階への成熟を目的として IFN-beta を加えて 2 日間培養する。私達は、ヒト免疫細胞移植マウスの感染実験系を用いて、分化誘導した DC の免疫により同時移植 PBMC から HIV-1 に対する T 細胞免疫応答が誘導されることを見いだした<sup>14)</sup> (図 5)。

非常に重要な発見は、この DC 免疫マウス体内では、ヒトリンパ球が CCR5 を使用する HIV-1 感染に対して防御されるのである。つまり、防御的免疫応答が誘導されるのである。主な免疫エフェクターは、DC 免疫により新たに誘導された HIV-1 応答性 CD4<sup>+</sup> T 細胞が HIV-1 の抗原刺激に反応して産生する抑制因子であると考えられる。この因子は免疫マウス血清中に存在する。免疫マウスから得られた CD4<sup>+</sup> T 細胞、CD8<sup>+</sup> T 細胞を試験管内で抗原提示細胞+HIV-1 で再刺激すると、CD4<sup>+</sup> T 細胞だけが、ベータケモカインとは異なる抑制因子を産生する。

この因子 (CD4 因子) は、X4 HIV-1 感染には無効であ

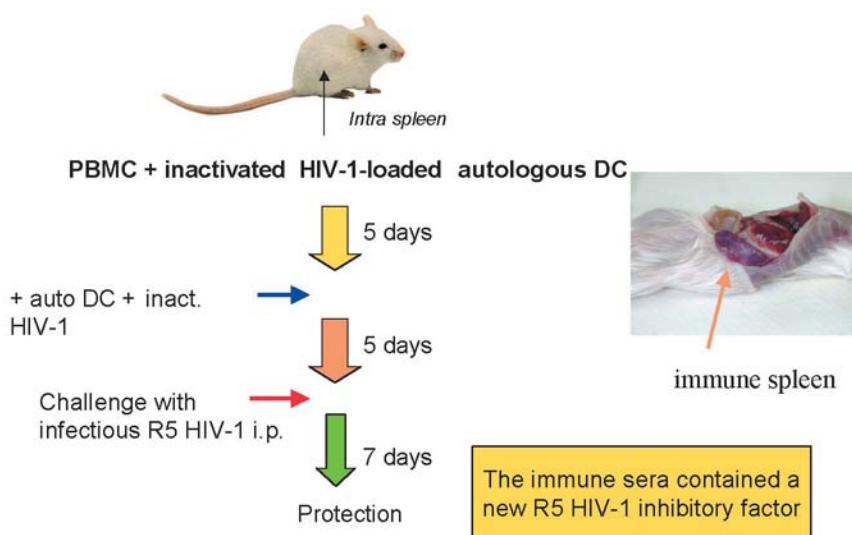


図 5 Immunization of hu-PBL-SCID against HIV-1

り、ゲルろ過では分子量 10 万 Da 以上の分画に流出する。その活性は既知の HIV-1 抑制サイトカインに対する中和抗体でブロックされない。新たな因子である。CD4 因子の作用機序は明らかにできていないが、マクロファージや活性化 T 細胞においては、CD4 因子による CD4 や CCR5 発現抑制は見られない。しかし、活性化 PBMC における R5 HIV-1 の感染初期、つまりウイルスの DNA 組み込み前の過程で抑制が見られる。また、この因子は CCR5 と CD4 を発現させた細胞株の R5 HIV-1 感染防御には全く効果を示さない。面白いことに R5 HIV-1 抑制活性は、ヒトマクロファージや単球で吸収されるが、他のヒト細胞では吸収されず、さらにマウスマクロファージでも吸収されない。つまり、CD4 因子の受容体はヒトの単球系の細胞に高く発現することが推察できる。現在、この CD4 因子を定常に産生する細胞株の樹立に力を入れている。長期培養はできないものの、免疫マウスから得られた CD4<sup>+</sup> T 細胞を HTLV-I でトランスフォーメーションすることにより、同様な因子を産生する CD4<sup>+</sup> T 細胞株が得られている。一方、種々の HIV-1 抗原ペプチドを用いた試験管内刺激法により、この因子を産生する CD4<sup>+</sup> T 細胞は、免疫 HIV-1 抗原の種々のエピトープを認識することを明らかにした。今後、CD8<sup>+</sup> T 細胞の免疫応答についても明らかにしてゆく必要があるが、DC がナイーブ T およびメモリー T 細胞からの強力な HIV-1 特異的 CTL 応答を誘導することからも、DC 免疫療法が HIV-1 感染を治療・予防を可能にすると考えられる。

現在の DC 免疫療法で克服すべき問題点は、十分な DC を少ない末梢血液から培養する方法を確立することである。また、どれだけの数の DC をどのような間隔で何回どこに移植すれば最高の防御的免疫応答が誘導されるかについても検討が必要である。マウスでの研究であるが、リンパ節に移動したマウス DC の寿命は短く、マウスのモデルでは 7 日間と報告されている。抗原で感作した DC で誘導された特異的 CTL が DC を攻撃するからである。つまり、ある程度の免疫応答が成立した後、特に抗原特異的 CTL が豊富にある状態では、DC の追加免疫は無意味であろう。また、HIV-1 を内在的に持っている T 細胞は DC との反応で刺激されることによりウイルスを産生するので、DC 免疫治療開始初期には、HARRT とのコンビネーションが必要かもしれない。さらに、分化成熟した DC を用いることで IL-10 産生や制御 T 細胞誘導を回避すること、また、DC 免疫で可能な限り多くの HIV-1 抗原エピトープに応答する T 細胞と B 細胞を誘導するために、DC はできる限り多種類の HIV-1 抗原を感作することが理想的であろう。

#### 4. CTL の HIV 複製抑制効果

##### CTL-based control of SIV replication

保野 哲朗 (東京大学大学院医学系研究科)

Tetsuro Matano (Graduate School of Medicine, The University of Tokyo)

HIV 感染症においては、感染後に誘導される宿主適応免疫反応によってもウイルスが排除されきらず、慢性持続感染が成立することが一つの大きな特徴である。適応免疫系のエフェクターとしては、細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) が HIV 複製抑制に中心的役割を担っていることが知られているが、HIV 感染自然経過においては、CTL が誘導されるにもかかわらず HIV 複製の制御に至らず慢性持続感染が成立する。したがって、HIV 複製が CTL による制御を逃れる機序の解明は、極めて重要な課題である。

我々は、この課題解決に向けて、ワクチン誘導 CTL による HIV 複製制御の可能性を検討している。これまでに、CTL 誘導型ワクチンとして、DNA プライム・センダイウイルス (SeV) ベクターブーストシステムを開発し、その優れた CTL 誘導能を示すとともに、SHIV89.6P 感染サル急性エイズモデルにおけるウイルス複製制御効果およびエイズ発症阻止効果を明らかにしてきた<sup>15)</sup>。一方、このサル急性エイズモデルと比較して、SIV を用いたサル慢性エイズモデルは、慢性持続感染を特徴とするヒト HIV 感染症をより反映するモデルと考えられているが、その複製制御はより困難であることが知られている<sup>16)</sup>。我々の SIVmac 239 チャレンジ実験では、DNA プライム・Gag 発現 SeV ベクターブーストワクチン接種サル 8 頭のうち 5 頭において SIV 複製制御が認められた。これらは、CTL 誘導ワクチン接種による初めての SIV 複製制御例であるが、面白いことに、この 5 頭のうち、ある主要組織適合性抗原 (MHC) ハプロタイプ 90-120-a を共有するサル 3 頭では、SIV チャレンジ後約 1 カ月という非常に早期に、ある共通のウイルスゲノム変異が選択されることが明らかとなった。この変異は、SIV Gag タンパクの 216 番目のロイシンからセリンへのアミノ酸置換 (Gag216S) に結びつくもので、Gag206-216 特異的 CTL に対するエスケープ変異であった (図 6)<sup>17)</sup>。

そこで、この SIV 複製制御の機序を解明することを目的として、Gag216S 変異体のさらなる解析を行なった。まず、Gag216S 変異を有する SIV 分子クローニング DNA を作成し、これを用いて Gag216S 変異 SIV を作成した。サル末梢血単核球への感染増殖実験にてウイルス複製レベルを調べたところ、Gag216S 変異 SIV は複製可能ではあるが、その複製能は野生型 SIV と比較して低下していることが明らかとなった。さらに、Gag206-216 特異的 CTL クローン存

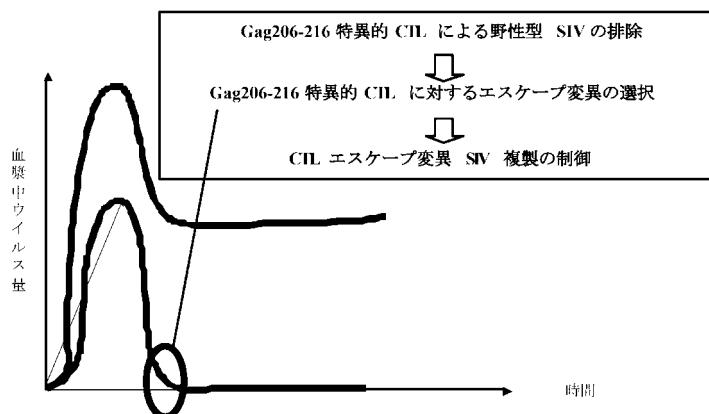


図 6 CTL 誘導ワクチン接種サルにおける SIVmac239 複製制御

在下において感染増殖実験を行なったところ、野生型 SIV の複製は抑制されるのに対し、変異 SIV の複製は抑制されず、Gag206-216 特異的 CTL 存在下では Gag216S 変異 SIV の方が優位となることが示唆された。

次に、MHC ハプロタイプ 90-120-a を有しないサル 2 頭に対し、野生型 SIV 分子クローニング DNA と G216S 変異 SIV 分子クローニング DNA の両者の混合接種実験を行なった。血漿中ウイルス RNA の解析では、接種後 1 週目には野生型・変異型ともほぼ同様に検出されたが、2 週目には野生型 SIV が優位となり、その後変異 SIV は検出できなくなった。

つまり、SIV 複製制御が認められたサルにおいては、複製能の劣った CTL エスケープ変異が早期に選択されたわけであるが、この結果は、Gag206-216 特異的 CTL による選択圧が非常に強く、そのため野生型 SIV が早期に排除されたことを意味しており、このような複製抑制能の強い CTL 存在下では SIV 複製制御に至る可能性があることを示唆している。

(本稿で紹介した我々の研究は、多くの方々の御協力のもと、主に東京大学大学院医学系研究科および国立感染症研究所にて行なわれたものである。特に、サル実験においては、国立感染症研究所・筑波医学実験用靈長類センター・予防衛生協会等の方々に御協力いただいた。また、SeV ベクター開発・供給においては、永井美之先生〔富山衛生研究所〕・加藤篤先生〔国立感染症研究所〕およびDNAVEC 社等の方々に、CTL クローン作成においては、滝口雅文先生〔熊本大学〕に、サル MHC 解析においては、木村彰方先生〔東京医科歯科大学〕・宮澤正顕先生〔近畿大学〕・日本野生動物研究所・日本エスエルシー社等の方々に御協力いただいた。心より感謝させていただく次第である。)

## 5. 複製欠損型リコンビナントワクチニアウイルス DIs は効果的な防御免疫能を誘導する Vaccinia DIs based HIV vaccine controls challenge virus infection

染谷 健二 (国立感染症研究所エイズ研究センター)  
Kenji Someya (AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases)

本邦で天然痘ワクチンとして承認されたワクチニアウイルス大連 I 株 (DIE) を 1 日齢発育鶏卵で連続継代することで作出された DIs 株<sup>18)</sup> は、ウイルス宿主に関与する遺伝子領域を含めた 15.4 kbp のゲノム DNA が欠損しており、鶏胚纖維芽細胞 (CEF) でのみ増殖でき、哺乳類株化細胞では増殖できないことが明らかになっている。HIV に対する予防、治療ワクチンにはその免疫誘導能のみならず安全性が求められており、本 DIs 株の特性はワクチンベクターとしての有用性を示唆している<sup>19)</sup>。我々は最近、DIs 株のゲノム欠損領域に外来遺伝子を導入する組換え技術を確立し、HIV 及び SIV 遺伝子を組み込んだリコンビナントベクター (rDIs) を作製した。本研究では、rDIs のウイルス学的、免疫学的特性を明らかにするとともに、DNA ワクチン、リコンビナント BCG ワクチン (rBCG) とのコンビネーションワクチンの免疫誘導能について評価を行った<sup>20)</sup>。

SIV gag/pol 遺伝子を組み込んだ rDIs を用いた *in vitro* でのウイルス増殖性及び SIV Gag 発現量の解析で、rDIs は親株同様に CEF で高い増殖性を示し、哺乳類株化細胞、BHK-21, CV-1, RK13 細胞では増殖はできないこと、SIV Gag タンパクは CEF のみならず、哺乳類株化細胞でも発現することが確認できた。rDIs の免疫原性、及び安全性の確認はマウスモデルを用い、免疫原性の評価は抗原特異的 IFN-g ELISPOT 法で、安全性は臨床観察と経時的な体重

測定で解析した。SIV *gag/pol* 遺伝子を組み込んだ rDI 及びリコンビナント MVA ベクター (rMVA) を Balb/C マウスに 1 回、または 2 回免疫し、免疫後 2 週目に SIV Gag 特異的 IFN-g 産生細胞を測定した。その結果、rDI は rMVA に比肩しうるレベルの免疫応答が誘導できることが明らかにできた。Scid マウスを用いた安全性の評価では、rDI ベクター接種マウスには異常な臨床症状及び体重の減少は確認することができなかった。一方、rMVA ベクター接種マウスでは臨床症状は確認されなかったが、一過性の体重減少が認められた。これらの結果から、rDI は rMVA と同等の免疫原性をもちながら、安全性に関しては rMVA に比べて高いことが示唆された。

rDI の防御免疫能はマウスモデル及びサルモデルを用い、強毒性ウイルスの攻撃試験で評価した。Balb/C マウスを SIV DNA ワクチン 3 回接種群、SIVDNA/rDI 接種群（プライム・ブースト群）、コントロール DI 群、SIV DNA 5 回接種群、コントロール DNA/コントロール DI 群接種群

の 5 群に分け、免疫後に SIV *gag/pol* 遺伝子を発現する強毒性ワクチニアウイルスで攻撃した。体内から分離される強毒性ウイルス量からその防御効果を判定した結果、DNA ワクチン接種群、rDI 接種群に比べてプライム・ブースト接種群が強い防御効果を示すことが明らかにできた（図 7A）。サルモデルを用いた評価では、SIV DNA 接種群、プライム・ブースト接種群、rDI 接種群、コントロール DNA/コントロール DI 群接種群の 4 群に分け、免疫後に強毒性 SHIV で攻撃して血漿中ウイルス RNA 量と CD4 陽性細胞数の解析から防御効果を判定した。経時的な血漿中ウイルス RNA 量と CD4 陽性細胞数の解析結果から、サルモデルにおいてもマウスモデル同様に DNA ワクチン接種群、rDI 接種群に比べてプライム・ブースト接種群が強い防御効果を示すことが明らかにできた（図 7B）。サルモデルを用いた rBCG と rDI のコンビネーションワクチンの SIV Gag 特異的免疫応答の解析結果では、rBCG, rDI 単独免疫群に比べ、rBCG/rDI 免疫群は強い

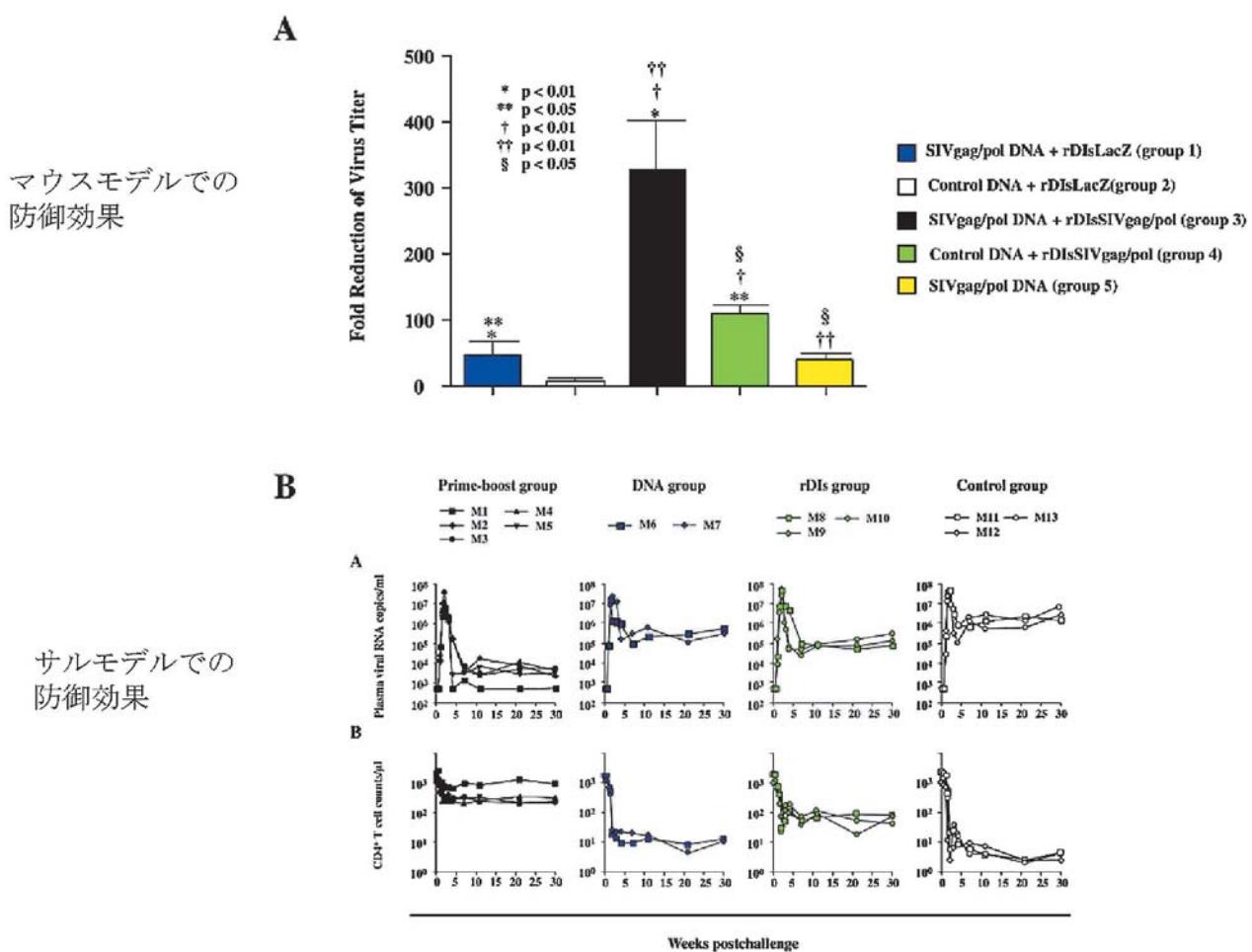


図 7 SIV DNA/rDI ワクチンの防御免疫効果

SIV Gag T 細胞応答が確認できた。以上の結果から、防御免疫応答に関しては、rDIs 単独では弱いものの、他のワクチンベクターとの組み合わせにより免疫増強効果のあることが示唆された。

さらに組換えBCG ワクチンのベクターとしてBCG-Tokyo174 株の安全性がHIV 垂直感染例を用いた検討から明らかとなり<sup>21)</sup>、ベクターの安全性が示唆された。これまで課題であった免疫誘導能に関してはサルを用いて免疫効果が証明された<sup>22)</sup>が、効果的な免疫を誘導するには大量接種の必要性があり、BCG の実用化に課題が残されていた。この点について、コドンの至適化を行うと解決できること<sup>23)</sup>が示唆され、実用化の可能性が出てきた。今後はrBCG/rDIs ワクチンの防御免疫効果、さらに様々なワクチンベクターとのコンビネーションによるワクチン効果を検討していく予定である。

## ま　と　め

HIV ワクチンの社会的なプライオリティーに伴って世界的な規模で効果的なワクチン開発に期待が寄せられている。現在約20 のプロジェクトが臨床試行に入っているがワクチン効果のメドは全くついておらず、新規ワクチンの開発が待たれている。HIV ワクチンの開発はHIV 感染のメカニズムのデータから中和抗体主導型ワクチンが開発されたが、ご存知の通り昨年の発表によりPhase III 試行の結果より液性免疫主導型から細胞性免疫主導型にシフトしている。しかし、効果的なHIV ワクチンの開発のためには、細胞性免疫のみでなく、液性免疫を誘導できるワクチン開発が有用であると示唆された。本学会での発表のように基礎的な研究において日本の貢献は認められているが、この成果を生かして実用化研究のための活動が期待される。

## 文　献

- 1) Nabel GJ : HIV vaccine strategies. *Vaccine* 20 : 1945–1947, 2002.
- 2) Nabel GJ : Challenges and opportunities for development of an AIDS vaccine. *Nature* 410 : 1002–1007, 2001.
- 3) Seaman MS, Xu L, Beaudry K, Martin KL, Beddall MH, Miura A, Sambor A, Chakrabarti BK, Huang Y, Bailer R, Koup RA, Mascola JR, Nabel GJ, Letvin NL : Multiclade human immunodeficiency virus type 1 envelope immunogens elicit broadcellular and humoral immunity in rhesus monkeys. *J Virol* 79 : 2956–2963, 2005.
- 4) Akahata W, Yang ZY, Nabel GJ : Comparative immunogenicity of human immunodeficiency virus particles and corresponding polypeptides in a DNA vaccine. *J Virol* 79 : 626–631, 2005.
- 5) Takahashi H, Takeshita T, Morein B, Putney S, Germain RN, Berzofsky JA : Induction of CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells by immunization with purified HIV-1 envelope protein in ISCOMs. *Nature* 344 : 873–875, 1990.
- 6) Takahashi H, Nakagawa Y, Yokomuro K, Berzofsky JA : Induction of CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes by immunization with syngeneic irradiated HIV-1 envelope derived peptide-pulsed dendritic cells. *Int Immunol* 5 : 849–857, 1993.
- 7) Nakagawa Y, Takeshita T, Berzofsky JA, Takahashi H : Analysis of the mechanism for extracellular processing in the presentation of human immunodeficiency virus-1 envelope protein-derived peptide to epitope-specific cytotoxic T lymphocytes. *Immunology* 101 : 76–82, 2000.
- 8) Takahashi H : Antigen presentation in vaccine development. *Comp Immunol, Microbiol & Infect Dis* 26 : 309–328, 2003.
- 9) Fujimoto C, Nakagawa Y, Ohara K, Takahashi H : Polyriboinosinic polyribocytidyl acid [Poly (I : C)]/TLR3 signaling allows class I processing of exogenous protein and induction of HIV-specific CD8<sup>+</sup> CTLs. *Int Immunol* 16 : 55–63, 2004.
- 10) Schultz O, Diebold SS, Chen M, Naslund TI, Nolte MA, Alexopoulou L, Azuma YT, Flavell RA, Liljestrom P, Reis e Sousa C : Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* 433 : 887–892, 2005.
- 11) Hidaka C, Norose Y, Nakagawa Y, Shimizu M, Ohwaki A, Nohtomi K, Toda M, Kusagawa S, Sakaguchi M, Kudo S, Takebe Y, Takahashi H : Dermal dendritic cells sensitized with plasmid DNA encoding immunostimulatory sequence by gene gun efficiently prime murine HIV-1-specific CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes. *Biomed Res* 25 : 83–91, 2004.
- 12) Tomiyama H, Akari H, Adachi A, Takiguchi M : Different effects of Nef-mediated HLA class I down-regulation on HIV-1-specific CD8<sup>+</sup> T cell cytolytic activity and cytokine production. *J Virol* 76 : 7535–7543, 2002.
- 13) Tomiyama H, Fujiwara M, Oka S, Takiguchi M : Cutting Edge : Epitope-dependent effect of Nef-mediated HLA class I down-regulation on ability of HIV-1-specific CTLs to suppress HIV-1 replication, *J Immunol* 174 :

- 36–40, 2005.
- 14) Yoshida A, Tanaka R, Murakami M, Takahashi T, Koyanagi Y, Nakamura M, Ito M, Yamamoto N, Tanaka Y : Induction of protective immune responses against R5 HIV-1 infection in the hu-PBL-SCID mice by intra-splenic immunization with HIV-1-pulsed dendritic cells : possible involvement of a novel factor of human CD4<sup>+</sup> T cell origin. *J Virol* 77 : 8719–8728, 2003.
  - 15) Matano T, Kano M, Nakamura H, Takeda A, Nagai Y : Rapid appearance of secondary immune responses and protection from acute CD4 depletion after a highly pathogenic immunodeficiency virus challenge in macaques vaccinated with a DNA prime/Sendai virus vector boost regimen. *J Virol* 75 : 11891–11896, 2001.
  - 16) Feinberg MB, Moore JP : AIDS vaccine models : challenging challenge viruses. *Nat Med* 8 : 207–210, 2002.
  - 17) Matano T, Kobayashi M, Igarashi H, Takeda A, Nakamura H, Kano M, Sugimoto C, Mori K, Iida A, Hirata T, Hasegawa M, Yuasa T, Miyazawa M, Takahashi Y, Yasunami M, Kimura A, O'Connor DH, Watkins DI, Nagai Y : Cytotoxic T lymphocyte-based control of simian immunodeficiency virus replication in a preclinical AIDS vaccine trial. *J Exp Med* 199 : 1709–1718, 2004.
  - 18) Tagaya I, Kitamura T, Sano Y : A new mutant of dermovaccinia virus. *Nature* 192 : 381–382, 1961.
  - 19) Ishii K, Ueda Y, Matsuo K, Matsuura Y, Kitamura T, Kato K, Izumi Y, Someya K, Ohsu T, Honda M : Structure analysis of vaccinia virus DIs strain : application as a new replication-deficient viral vector. *Virology* 302 : 433–444, 2002.
  - 20) Someya K, Xin KQ, Matsuo K, Okuda K, Yamamoto N, Honda M : A consecutive prime-boost vaccination of mice with simian immunodeficiency virus (SHIV) gag/pol DNA and recombinant vaccinia virus strain DIs elicits anti-SIV immunity. *J Virol* 78 : 9842–9853, 2004.
  - 21) Hesseling AC, Schaaf HS, Hanekom WA, Beyers N, Cotton MF, Gie RP, Marais BJ, van Helden P, Warren RM : Danish bacille Calmette-Guerin vaccine-induced disease in human immunodeficiency virus-infected children. *Clin Infect Dis* 37 : 1226–1233, 2003.
  - 22) Someya K, Cecilia D, Nakasone T, Ami Y, Matsuo K, Burda S, Yamamoto H, Yoshino N, Kaizu M, Ando S, Zolla-Pazner S, Okuda K, Yamazaki S, Yamamoto N, Honda M : Vaccination of rhesus macaques with recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG)-Env V3 elicits neutralizing antibody-mediated protection against simian-human immunodeficiency virus with a homologous but not a heterologous V3 motif. *J Virol* 79 : 1452–1462, 2005.
  - 23) Kanekiyo M, Matsuo K, Hamatake M, Hamano T, Ohsu T, Matsumoto S, Yamada T, Yamazaki S, Hasegawa A, Yamamoto N, Honda M : Mycobacterial codon optimization enhances antigen expression and virus-specific immune responses in recombinant bacille Calmette-Guérin expressing the human immunodeficiency virus type 1Gag. *J Virol* 79 : 8716–8723, 2005.