

令和 3 年 6 月 29 日現在

機関番号：92637
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2018～2020
 課題番号：18K06049
 研究課題名(和文) SIV感染サルモデルでのCTL増強型組換えBCG/ワクシニアエイズワクチンの評価

 研究課題名(英文) Evaluation of protective immune responses by recombinant BCG/vaccinia prime-boost AIDS vaccine in macaque model of SIV infection

 研究代表者
 松尾 和浩 (Matsuo, Kazuhiro)

 日本ビーシージー製造株式会社(日本BCG研究所)・研究開発部・部長(M職)

 研究者番号：70521095
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：抗原の細胞内でのプロセッシングが促進され免疫系に到達しやすくするために、PEST配列を組み込んだSIV抗原遺伝子を導入したBCGウレアーゼ欠損株(rBCG-SIVgag, SIVpol, SIVrtn, SIVenv)及び同様の抗原遺伝子を導入したワクシニアウイルスLC16m8株をそれぞれ構築した。インド産アカゲザルにrBCG混合物を接種後、ワクシニア混合物で2回ブーストを行った所、3頭の内1頭で強いキラーT細胞の活性を確認した。SIVmac攻撃接種の結果、活性が強かった1頭でセットポイントのウイルス量を検出限界に近いレベルまで抑制し、キラーT細胞応答と感染防御能の相関が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HIVの感染防御と各種免疫反応との相関は、未だに完全には解明されていない。本研究では、PEST配列付加SIV遺伝子を組み込んだ組換えBCGと組換えワクシニアウイルスを用い、人のHIV感染に最も近いモデルであるインド産アカゲザルでのSIVmac感染系におけるプライムブーストワクチンの評価を行って、SIV特異的細胞傷害性T細胞(キラーT細胞)の活性とSIV感染防御能の相関を示唆する結果を得た。キラーT細胞の誘導効率をさらに改善するためのベクター改良により、たとえ感染してもウイルス量を低く抑えられるような抗HIVワクチン開発が実現できれば、HIVが蔓延している途上国での医療に貢献することができる。

研究成果の概要(英文)：To accelerate antigen processing and facilitate it to reach host immune system, we introduced PEST sequences at both ends of SIV antigen gene and constructed recombinant urease deficient BCG or vaccinia virus LC16m8 expressing SIV genes such as gag, pol, rtn and env. Three Indian rhesus macaques were inoculated with the four recombinant BCG mixture followed by two injections of the four recombinant vaccinia mixture. One out of three animals showed strong SIV-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) possessing in vitro SIV suppression activity. After SIVmac 251 challenge, one animal, which exhibited high CTL activity, showed plasma viral load of almost undetectable level whereas two animals having low CTL activity showed high viral load. These results suggest the correlation between SIV-specific CTL and anti-SIV protective immunity.

研究分野：免疫学 細菌学

キーワード：エイズワクチン 細胞傷害性T細胞 サル免疫不全ウイルス BCG ワクシニアウイルス インド産アカゲザル

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エイズ予防ワクチンは、原因ウイルスである HIV の様々な特殊性 (易変異性、中和抵抗性、弱毒生ウイルスワクチンの毒性復帰変異危険性など) から、世界中の研究者の多大な努力にも関わらず、開発が難航している。しかし、近年の研究成果から、エイズワクチンとしての要件が明らかになりつつある。

まず、抗 HIV-1 抗体である。ウイルス表面タンパク質 (gp160) env 遺伝子などを持つカナリーボックスベクターでプライミングし、gp120/alum アジュバントでブーストする免疫法で約 30% の感染率の低下が報告され、抗 env 抗体によるものとされた (第 3 相臨床試験: RV144 trial) [1]。しかし、RV144 の結果は不十分でかつ短期間のみで有効であった。他方、細胞性免疫について有効な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 誘導法が明らかになって来た。増殖能を持ち体内に潜伏して抗原刺激を続けるサイトメガロウイルス (CMV) ベクターによるアカゲザルの免疫により、エフェクターメモリー T 細胞 (Tem) が維持され、サルエイズウイルス (SIV) の感染が約 50% 抑制されて、細胞性免疫だけでも感染防御が可能であることが示された [2]。しかし、CMV ベクターはヒトへの投与実績がなく、その毒性から実用化には高い壁が存在する。

このような背景の下、安全で実用化可能なベクターを組み合わせて、上記エイズワクチンの要件を満たす免疫誘導を実現し、実際にヒトでの HIV-1 感染に外挿可能な SIVmac 感染アカゲザルモデルで有効性を示す新たな候補ワクチンの開発が望まれている。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、人での安全性が証明されている BCG と弱毒ワクシニア LC16m8Δ, そして non-replicating センダイウイルスをプライムブースト法でカニクイザルに接種し、感染防御能を検討した。抗体抵抗性の SIVmac251 を攻撃接種した結果、6 頭中 1 頭で感染防御、1 頭で感染を受けたものの検出限界以下にウイルス量を抑制した。防御免疫を調べたところ、抗 Env 抗体は correlate せずに、CD8 陽性 T 細胞による SIV 抑制能が感染防御と関連していた [3]。この結果は、より効率良く CD8 陽性 T 細胞を誘導すれば、SIV の感染防御が可能であることを示唆している。

効率良く CD8 陽性 T 細胞を誘導するために、我々は PEST 配列に着目した [4]。PEST は短寿命の蛋白質に含まれている配列で、プロテアゾームに細胞質内蛋白質を導く機能を持つ。抗原が CD8 陽性 T 細胞に提示されるためには、プロテアゾームでペプチドに分解されて MHC-class I 分子と複合体を形成する必要がある。従って、PEST 配列を抗原蛋白質に付加すると CD8 陽性 T 細胞への提示の効率を上げて、効率的な CTL の誘導が期待できる。他方、CD4 陽性 T 細胞への提示は、リソゾームで分解されたペプチドが MHC-class II と複合体を作る必要がある。従って、PEST 配列は CD4 陽性 T 細胞の誘導には影響を与えないと考えられる。

本研究の目的は、PEST 配列を付加した SIV 抗原を発現する BCG でプライムし、LC16m8Δ でブーストする免疫法における、CTL 誘導と感染防御能への PEST 配列付加効果を調べることである。

3. 研究の方法

(1) SIV 蛋白質への PEST 配列の付加: PEST 配列 (KENSISMAPPASPPASPK) をコードする primer を用いて PCR を行い、SIVmac239 の gag, pol, rev-tat-nef (rtn) の 5' と 3' の両末端に PEST 配列を付加した。

(2) PEST-SIV 抗原を発現する BCG の作製: pS0246 shuttle vector に PEST-gag, PEST-pol, PEST-rtn 遺伝子発現カセットを組み込み、urease 欠損 BCG TOKYO172 (ΔUT-BCG) 株を transform して、カナマイシン耐性を指標に目的の組換え菌を得た。組換え抗原の発現は、SIVmac 感染サル血清及び抗 Nef モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法にて確認した。

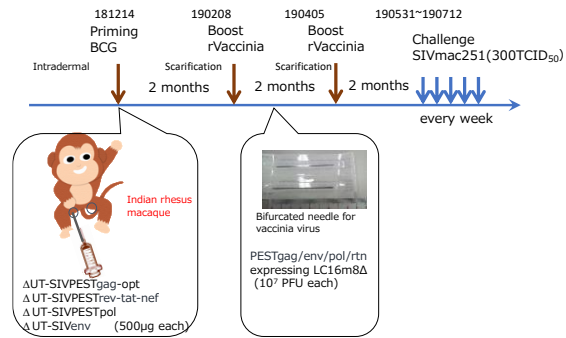
(3) PEST-SIV 抗原を発現する LC16m8Δ 株の作製: ワクシニアウイルス m8Δvnc110 株から抽出したゲノム DNA と PCR で増幅した PEST-gag, pol, rtn を ligation させて、カナリーボックスウイルス感染 BHK 細胞にトランスフェクションする。トランスフェクション 1 日後にウイルスを回収し、RK13 細胞上でプラークを作らせる。抗 HIV-1 抗体でプラークを染色する事によって組換えワクシニアを選択した。

(4) インド産アカゲザルの準備: 京都大学霊長類研究所飼育のインド産アカゲザル 6 頭の MHC を分析し、少ない SIV 抵抗性 MHC を持つ MM648, MM649, MM650 の 3 頭を選んだ。

(5) ワクチネーションと SIV 感染: アカゲザル 3 頭に 4 種の ΔUT-BCG (PEST-gag, PEST-pol, PEST-rtn, Env 発現) 0.5mg ずつの混合物を皮内接種し、8 週後に 10^7 PFU LC16m8Δ (PEST-gag, PEST-pol, PEST-rtn, Env 発現) を scarification で接種した。さらに同量の組換えワクシニアでブーストした。8 週後に 300TCID50 の SIVmac251 を経直腸感染した (図 1)。その後経時的に採血して定量 RT-PCR 法により、血中ウイルス量を測定した。

(6) in vitro SIV suppression 活性 (ISA) の測定：サル PBMC を、抗 CD8 抗体磁気ビーズを用いて CD8 陽性 T 細胞と CD4 陽性 T 細胞分画に分離した。CD4 陽性 T 細胞を IL-2/PHA で活性化して SIVmac239 を感染させた。翌日、CD8 陽性 T 細胞を加え、5 日間培養を続けて、培養液中の SIV 量を p27 ELISA によって測定した。免疫前の CD8 陽性 T 細胞を加えたサンプルと免疫後の CD8 陽性 T 細胞を加えたサンプル中の SIV の量比を ISA 活性とした。

図 1：SIV ワクチン接種スケジュール

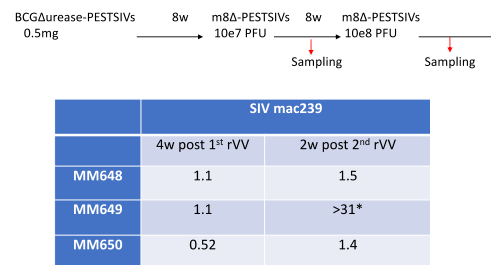


4. 研究成果

(1) ISA の測定：ワクシニア 1 回目ブースト 4 週後と 2 回目ブースト 2 週後に採血して、ISA を測定した。1 回ブースト後には 3 頭とも有意な ISA は認められなかったが、2 回目ブースト 2 週後には MM649 に高い ISA を認めた。MM648 は SIV 抵抗性 MHC を 1 個、MM649 と MM650 は 2 個持っているため、ISA と抵抗性 MHC とは相関しないことがわかった (図 2)。

(2) 感染防御能評価：図 3 は SIVmac251 の攻撃接種後の体内ウイルス量を示している。残念ながら、すべてのサルで感染は成立した。しかし、強い ISA を示していた MM649 は感染が最も遅く、かつ体内ウイルス量も最小であった。非免疫猿との比較では、どの値もサル数が少ないので有意差はないものの、set point でのウイルス量が低く抑えられている傾向が認められた。いかにして多くのサルで SIV (HIV) 特異的キラー T 細胞を強力に誘導できるかが、本レジメン改良のポイントと考えられる。

図 2：CD8 T 細胞のウイルス抑制活性 (ISA)



<引用文献>

[1] Rerks-Ngarm S, et al. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *New Engl J Med.* 361(23):2209-20 (2009)
 [2] Hansen et al. Profound early control of highly pathogenic SIV by an effector memory T-cell vaccine. *Nature* 473(7348):523-7 (2011)
 [3] Kato et al. CD8 T Cells Show Protection against Highly Pathogenic Simian Immunodeficiency Virus (SIV) after Vaccination with SIV Gene-Expressing BCG Prime and Vaccinia Virus/Sendai Virus Vector Boosts. *J Virol.* 95(4):e01718-20 (2021)
 [4] Tsukamoto et al. Enhanced protective efficacy against tuberculosis provided by a recombinant urease deficient BCG expressing heat shock protein 70-major membrane protein-II having PEST sequence. *Vaccine* 34(50):6301-6308 (2016)

図 3：攻撃接種後の体内ウイルス量

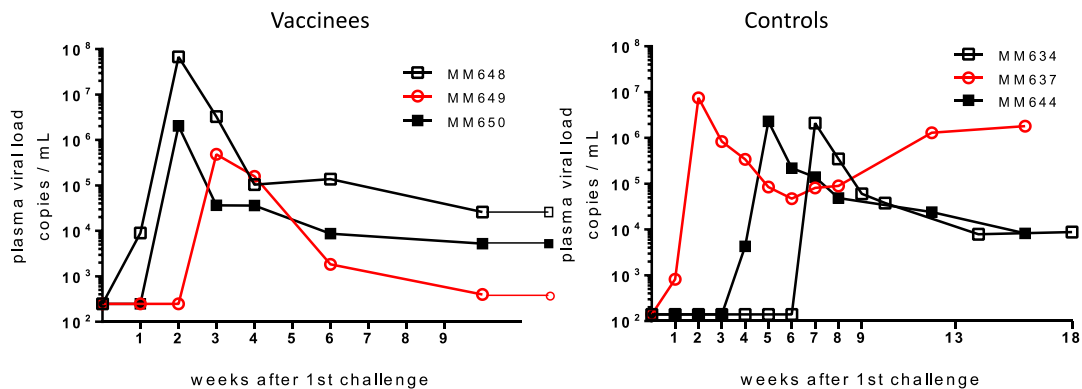


図4 : SIVの感染

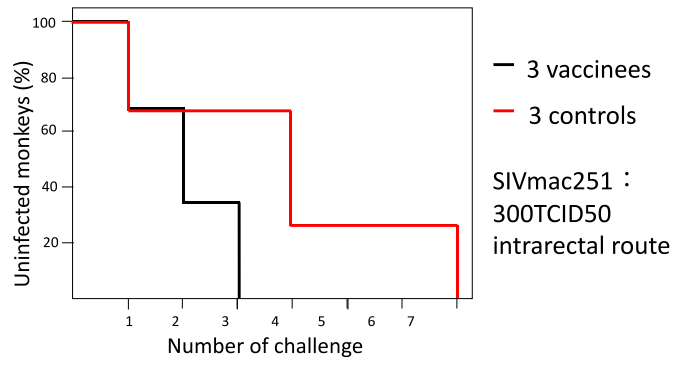


図5 : ピーク時の血中ウイルス量

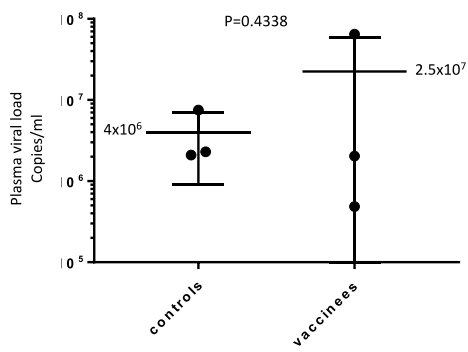
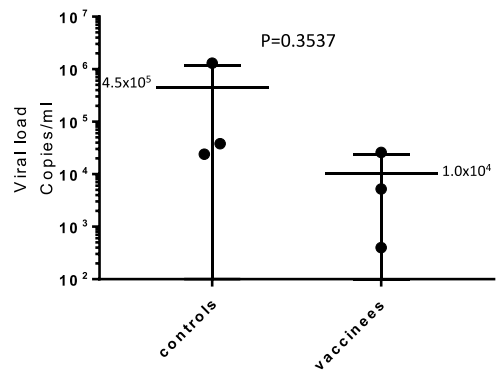


図6 : セットポイントでの血中ウイルス量



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Seiichi Kato, Hisatoshi Shida, Tomotaka Okamura, Xianfeng Zhang, Tomoyuki Miura, Tetsu Mukai, Makoto Inoue, Tsugumine Shu, Taeko K Naruse, Akinori Kimura, Yasuhiro Yasutomi, Kazuhiro Matsuo	4. 巻 95
2. 論文標題 CD8 T cells show protection against highly pathogenic simian immunodeficiency virus (SIV) after vaccination with SIV gene-expressing BCG prime and vaccinia virus/Sendai virus vector boosts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01718-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01718-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hisatoshi Shida, Seiichi Kato, Tomotaka Okamura, Tetsu Mukai, Makoto Inoue, Tsugumine Shu, Tomoyuki Miura, Yasuhiro Yasutomi, Kazuhiro Matsuo
2. 発表標題 Protective effects of immunization using urease-deficient BCG, vaccinia LC16m8delta;, and Sendai virus expressing SIV genes
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	志田 壽利 (Shida Hisatoshi) (00144395)	北海道大学・遺伝子病制御研究所・客員教授 (10101)	
研究分担者	三浦 智行 (Miura Tomoyuki) (40202337)	京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・准教授 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------