

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：17401
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21390035
 研究課題名（和文） HIV 感染自然抵抗者から学ぶ次世代エイズワクチンの創製
 研究課題名（英文） Development of the next generation of AIDS vaccine candidates based on the immune response of HIV-resistant individuals.
 研究代表者
 三隅 将吾 (MISUMI SHOGO)
 熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
 研究者番号：40264311

研究成果の概要（和文）：本研究では、以下のような成果を得た。

- 1) ウイルスの外被糖タンパク質に対する抗体や CCR5 に対する抗体を粘膜面に誘導できた。
- 2) CCR5 および外被糖タンパク質に対する抗体価を維持するための交叉免疫抗原を見つけることができた。
- 3) 本邦における HIV/AIDS 経膣感染霊長類モデルの構築を試みたところ、ヒトの性周期と類似するカニクイザルを用いて、SIV 10000 TCID₅₀/ml (1ml) を SIV 感染細胞及び精液とともに複数回接種するモデルが妥当であるという結論に至った。

研究成果の概要（英文）：In this research, the following results were obtained.

- 1) The antibodies against viral ENV or CCR5 were induced in the vagina and mucosal surface.
- 2) The cross-reacting antigen for maintaining the titer level of antibodies against ENV or CCR5 was found.
- 3) To develop nonhuman primate models for vaginal HIV-1 infection in Japan, it resulted in the conclusion that the nonhuman primate model was inoculated with the mixture of 10000 TCID₅₀/ml of free SIV (1 ml), SIV-infected cells, and semen because cynomolgus monkey shows similar estrous cycle like women.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2010 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2011 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：薬学、環境系薬学

キーワード：HIV、ワクチン、粘膜、交叉免疫

1. 研究開始当初の背景

歴史的にみて、世界レベルでの感染症制圧に最も重要な役割を果たしてきたのがワクチンであるが、HIV のワクチン開発をめぐる

状況は決して容易ではない。研究開始当初 2 つの世界規模の HIV ワクチントライアルが綿密な計画をもとに実施されたが、いずれも失敗に終わった。本研究では、HIV ワクチン開

発においては、これまでの感染症に対するワクチン開発の常識から逸脱することが求められると考え、**HIV 感染自然抵抗者から学ぶ次世代エイズワクチンの創製**を目指した。

2. 研究の目的

目的(1)：ウイルス抗原をワクチンの主要抗原としないワクチンを開発する。本研究では、ウイルス侵入に関与する宿主因子 **CCR5** に対するワクチンを開発する。

目的(2)：粘膜を介した HIV の感染を阻止できるワクチンを開発する。

3. 研究の方法

以下の点を発展展開させることにより、上記目的を達成できるように研究を実施した。

(1) CCR5 に対する抗体を長期誘導させる工夫
→これまで、CCR5 に対する抗体は、カニクイザルレベルで 12 週間誘導させることに成功していた。自己抗原であるため、長期誘導が困難と考えられたが、あらたに設計したワクチン基材(特許公開 2008-231343)を用いることにより、現在 56 週まで長期誘導できるようになった。ESN では、3 年間 CCR5 に対する抗体を維持できていたとの報告もある。したがって本研究では、**新規開発した基材を用いて CCR5 抗体長期誘導のためのワクチンレジュメ**を明らかにする。

(2) ウイルス侵入時に CCR5 に対する抗体を直ちに誘導させるための工夫
→CCR5 がウイルス粒子表面に取り込まれ、ワクチンで誘導された CCR5 に対する抗体がウイルス表面の CCR5 と反応できることを明らかにできた(*Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2008) Oct. 15, accepted)。したがって本研究では、**CCR5 に対する抗体を産生することができるメモリーB細胞がウイルス自身によって直接活性化されるか in vivo 霊長類モデルで明らかにする。**

(3) ウイルス侵入時に CCR5 に対する抗体を粘膜面に誘導させるための工夫
→ワクチン抗原をM細胞にデリバリーするシステムを構築し(国際公開番号 W02007052641)、実際にこのデリバリーシステムを用いて免疫されたアカゲザルの糞便中に CCR5 の抗体を誘導できた(*J. Immunol.* (2008) revised)。したがって本研究では、**新規M細胞にデリバリーシステムを駆使して、効果的に腔内に CCR5 に対する抗体を誘導するためのワクチンレジュメ**を明らかにする。

(4) 霊長類経腔感染モデルの確立と工夫
→現在、霊長類経腔感染モデルとしては、もっぱらフリーウイルスのみを用いるモデル

が多く、不十分である。したがって本研究では、**実際の性交渉ではフリーウイルスと感染細胞の両方が腔内で曝露されるので、実際の性交渉を反映させた経腔感染モデルを構築し、世界水準とし、本研究で開発を試みるワクチンの有用性を明らかにする。**

4. 研究成果

粘膜ワクチンについて：

HIV 感染抵抗性の女性には、CCR5 に対する抗体と HIV の ENV に対する抗体が腔内に誘導されているという報告(*Blood* (2004) 104: 2205-6)や、CCR5 に対する抗体がヒトの粘膜上皮細胞からの HIV の侵入を阻止しているという報告(*AIDS* (2007) 21:13-22)がなされていることから、粘膜ワクチンにより HIV 感染抵抗性の女性が有する免疫応答を粘膜面(腔及び腸管)に誘導することを試み、以下結論に至った。

- (1) 本研究グループで作製した粘膜ワクチンにより、腸管および腔内に抗 CCR5 抗体および抗 ENV 抗体を誘導できることを確認できた。
- (2) 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。
- (3) 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。

霊長類粘膜感染モデルについて：

本研究では、民間の新日本科学から霊長類を入手した。現時点で本邦に安定的に入手可能な霊長類として中国産のアカゲザル、カニクイザルが該当する。モデルを作製するにあたり、インド産と比べ中国産のアカゲザルが SIV に対して感染抵抗性を示すことを考慮して、以下結論に至った。

- (1) 性周期の観点から経腔感染モデル用霊長類としては、カニクイザルが適していると思われる。理由としてはヒトの性周期と類似することやアカゲザルのように限定的に発情期(11-2月頃)があるわけではないため。
- (2) 攻撃接種の条件としては、SIV に対す

る細胞性免疫を考慮して攻撃接種用の SIV 株として完全長の nef タンパク質が発現するように変異を導入した SIVmac239 open nef 株(10000TCID₅₀/ml) およびその持続感染細胞を 10⁷ 個混合し精液とともに接種することで経膣感染を模倣できると思われる。

- (3) Medroxyprogesterone acetate (15 mg) 筋注を行うことにより、個体の性周期を同調させ、さらに生理的内子宮口びらんが誘導した状態で攻撃接種を行う。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Misumi S, Inoue M, Dochi T, Kishimoto N, Hasegawa N, Takamune N, Shoji S. Uncoating of human immunodeficiency virus type 1 requires prolyl isomerase Pin1. *J. Biol. Chem.*, 査読有、2010, 25185-25195
- ② Anraku K, Fukuda R, Takamune N, Misumi S, Okamoto Y, Otsuka M, Fujita M. Highly sensitive analysis of the interaction between HIV-1 Gag and phosphoinositide derivatives based on surface plasmon resonance. *Biochemistry* 査読有、2010, 5109-5016
- ③ Ohya Y, Jono H, Nakamura M, Hayashida S, Ueda M, Obayashi K, Misumi S, Asonuma K, Ando Y, Inomata Y. Effect of recipient-derived cells on the progression of familial amyloidotic polyneuropathy after liver transplantation: a retrospective study. *Ann. Clin. Biochem.* 査読有、2010, 529-534
- ④ Takamune N, Kuroe T, Tanada N, Shoji S, Misumi S. Suppression of human immunodeficiency virus type-1 production by coexpression of catalytic-region-deleted N-myristoyltransferase mutants. *Biol. Pharm. Bull.* 査読有、2010, 2018-2023
- ⑤ Endo M, Gejima S, Endo A, Takamune N, Shoji S, Misumi S. Treatment of breast cancer cells with proteasome inhibitor lactacystin increases the level of sensitivity to cell death induced by human immunodeficiency virus type 1. *Biol. Pharm. Bull.* 査読有、2010, 1903-1906
- ⑥ Misumi S, Masuyama M, Takamune N, Nakayama D, Mitsumata R, Matsumoto H, Urata N, Takahashi Y, Muneoka A,

Sukamoto T, Fukuzaki K, Shoji S. Targeted delivery of immunogen to primate M-cells with tetragalloyl lysine dendrimer. *J. Immunol.*, 査読有、2009, 6061-6070

[学会発表] (計 16 件)

- ① 三隅将吾 HIV 感染を制御する細胞性因子の探索と経膣感染防止を目的とした HIV 粘膜ワクチン開発 日本薬学会第 132 年会 (招待講演) 2012/3/29-31 北海道大学 (札幌)
- ② 八城勢造、三隅将吾、高橋義博、大坪靖治、増山光明、杉本幸彦、高宗暢暁、庄司省三 HIV 感染抵抗者から学ぶ HIV ワクチン創製 平成 23 年度日本薬学会九州支部大会 2011/12/10-11 福岡大学 (福岡)
- ③ 八城勢造、三隅将吾、高橋義博、大坪靖治、増山光明、杉本幸彦、高宗暢暁、庄司省三 交叉免疫抗原を介した抗 CCR5 抗体と抗 Env 抗体の誘導 日本エイズ学会 2011/11/30-12/2 ハイアットリージェンシー東京 (東京)
- ④ 八城勢造、三隅将吾、高橋義博、大坪靖治、増山光明、杉本幸彦、高宗暢暁、庄司省三 HIV に対する粘膜免疫応答を誘導するワクチンの開発 第 10 回 次世代を狙う若手ファーマバイオフォーラム PBF2011 2011/10/8-9 東北大学 (仙台)
- ⑤ 甲斐光、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾 Tetragalloyl-D-Lysine Dendrimer (TGDK) の M 細胞標的能の検討 日本薬学会九州支部大会 2010/12/11 長崎大学 (長崎)
- ⑥ 松浦薫、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾 M 細胞標的 HIV 粘膜ワクチンの開発のための基礎研究 日本薬学会九州支部大会 2010/12/11 長崎大学 (長崎)
- ⑦ 工藤康史、城戸啓嗣、大坪靖治、杉本幸彦、高宗暢暁、庄司省三、三隅将吾 中国産アカゲザルへの馴化を目的とした SIV の増殖適応変異に関する研究 日本薬学会九州支部大会 2010/12/11 長崎大学 (長崎)
- ⑧ 三隅将吾、大坪 靖治、野崎清輝、八城勢造、高橋義博、増山 光明、宗岡 篤信、洲加本孝幸、福崎 好一郎、杉本 幸彦、高宗暢暁、庄司省三 HIV 感染防止粘膜ワクチンの創製-Absolute rejection vaccine を目指して 日本エイズ学会 2010/11/24 グランドプリンスホテル高輪 (東京)
- ⑨ 工藤康史、城戸啓嗣、大坪靖治、高橋義博、増山光明、宗岡篤信、杉本幸彦、高宗暢暁、庄司省三、三隅将吾 中国産アカゲザルへの馴化を目的とした SIV の増

- 殖適応変異の解析 日本エイズ学会
2010/11/24 グランドプリンスホテル高
輪(東京)
- ⑩ 八城勢造、野崎清輝、三隅将吾、高橋義
博、増山光明、杉本幸彦、高宗暢暁、庄
司省三 HIV defense vaccine により誘
導される抗 gp140 抗体の交叉免疫誘導
日本ウイルス学会学術集会 2010/11/7-
あわぎんホール(徳島)
- ⑪ 三隅将吾、野崎清輝、松本 浩和、甲斐
光、松浦 薫、高橋義博、増山光明、杉
本幸彦、高宗暢暁、庄司省三
Tetragalloyl-D-Lysine Dendrimer
(TGDK)を用いた粘膜ワクチン開発日本生
化学会九州支部例会 2010/05/22 鹿児
島大学(鹿児島)
- ⑫ 三隅将吾、野崎清輝、甲斐光、松浦薫、
松本浩和、高橋義博、増山光明、杉本幸
彦、高宗暢暁、庄司省三 M 細胞標的分子
Tetragalloyl-D-Lysine
Dendrimer (TGDK)を用いた H 粘膜ワクチ
ン創製 日本薬学会 2010/3/29 就実大学
(岡山)
- ⑬ 野崎清輝、三隅将吾、松本浩和、甲斐光、
松浦薫、高橋義博、増山光明、杉本幸彦、
高宗暢暁、庄司省三 M 細胞標的分子
Tetragalloyl Lysine dendrimer (TGDK)
を用いた HIV 粘膜ワクチン開発 日本エイ
ズ学会学術集会 2009/11/27 名古屋国
際会議場(名古屋)
- ⑭ 甲斐光、三隅将吾、松本浩和、松浦薫、
高橋義博、増山光明、杉本幸彦、高宗暢
暁、庄司省三 Tetragalloyl Lysine
dendrimer (TGDK)の M 細胞標的能の検討
とワクチンへの応用 日本ウイルス学会
学術集会 2009/10/26 都市センターホテ
ル(東京)
- ⑮ 松浦薫、三隅将吾、松本浩和、甲斐光、
高橋義博、増山光明、杉本幸彦、高宗暢
暁、庄司省三 Tetragalloyl Lysine
dendrimer (TGDK)を用いた新規 M 細胞標
的粘膜ワクチン戦略 日本生化学会大会
2009/10/24 神戸ポートピアアイランド
(神戸)
- ⑯ 三隅将吾、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省
三 霊長類 M 細胞標的分子を用いた HIV
経口ワクチンの開発 霊長類 M 細胞標
的分子を用いた HIV 経口ワクチンの開発
蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州
シンポジウム 2009/9/10 唐津シーサイ
ドホテル(唐津)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

名称：分子擬態粘膜エイズワクチン
発明者：三隅将吾、庄司省三、高宗暢暁
権利者：熊本大学
種類：特許
番号：特願 2011-177385
出願年月日：2011 年 8 月 15 日
国内外の別：国内

名称：腸管免疫制御剤
発明者：三隅将吾、庄司省三
権利者：熊本大学
種類：特許
番号：特願 2011-175781
出願年月日：2011 年 8 月 11 日
国内外の別：国内

名称：粘膜免疫賦活剤
発明者：三隅将吾、高宗暢暁、甲斐光
権利者：熊本大学
種類：特許
番号：特願 2009-239219
出願年月日：2009 年 10 月 16 日
国内外の別：国内

[その他]
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三隅 将吾 (MISUMI SHOGO)
熊本大学・大学院生命科学研究所・准教授
研究者番号：40264311

(2) 研究分担者

高宗 暢暁 (TAKAMUNE NOBUTOKI)
熊本大学・大学院生命科学研究所・助教
研究者番号：60322749

庄司 省三 (SHOJI SHOZO)
熊本大学・大学院生命科学研究所・名誉教授
研究者番号：60040317