

様式 C-19

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390135

研究課題名（和文） 抗原多様な HIV に働く中和抗体の誘導と感染ラットモデルの開発

研究課題名（英文） Elicitation of broad neutralizing antibodies to HIV-1 and development of infection rat model

研究代表者

志田 壽利 (Shida Hisatoshi)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授

研究者番号：00144395

研究成果の概要（和文）：

抗 HIV ワクチンを開発するためには CTL と抗体の両方を誘導することが必要である。本研究課題において、Env を発現するワクシニア LC16m8Δ株ベクターでプライムし、センダイウイルスベクターでブーストすることにより、従来の常識を覆して、CTL と抗 HIV-1 抗体の両方を誘導できることを示した。

研究成果の概要（英文）：

To develop HIV-1 vaccine, it is required to elicit both anti HIV-1 CTL and antibodies. In this study we unexpectedly found that vaccination regimen including priming with vaccinia LC16m8Δ expressing the env gene followed by boosting with sendai vector expressing the env gene elicited both anti HIV-1 CTL and antibodies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2012年度	0	0	0
2013年度	0	0	0
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：ワクチン、ウイルスベクター、ラットモデル、HIV-1

1. 研究開始当初の背景

2006年のMerck社の失敗にも見られるように、HIV-1 ワクチンの開発は困難を極めている。そこで、HIV-1 ワクチンの不可能性を論じる研究者もいる。しかし、レトロウイルスの感染防御の良い先例である、フレンドウイルス(FV) (Nature Med. 2001)を元に、HIV-1 のワクチン開発の現状を分析すると、未だ不十分な検討しかされていない事が分かる。マウス-FVの系では、弱毒 FV による免疫によって病原性 FV の感染を防げる。(この点 SIV-猿の系と同様である。) 免疫したマ

ウスから B,CD4⁺T, CD8⁺T 細胞を単離して、naive マウスに移植する事によって、感染防御を担う免疫細胞を同定したところ、B,CD4⁺T, CD8⁺T 細胞の全てが必要である事が分かった。この事から、レトロウイルスの感染防御には細胞性と体液性免疫の両方が必要であり、HIV の場合には、さらに、抗原多様性への対応能が必要と考えられる。

つまり、CTL 誘導ワクチンと抗体誘導ワクチンを組み合わせて初めて有効であるはずである。しかし、現在主に検討されているワクチンは細胞性免疫(CTL)誘導ワクチン

である。CTL 誘導ワクチンが主流になった理由は、伝播を担う HIV が抗体で中和されにくく、また、多様な抗原性を有しているために、感染防御に有効な中和抗体の誘導が難しい事が挙げられる。

しかし、抗体誘導ワクチンの可能性とその方法を示唆する種々の事象がある。まず、非常に力価の高い中和抗体を有している長期未発症者が存在し、その抗体は自身のウイルスを含む広範囲な HIV-1 株を中和する。又、広範囲な HIV-1 株を中和できる単クローン抗体が分離されている。興味深い事に、これらの単クローン抗体は CD4 存在下でより効率よく働く。このことは、CD4 と反応して Env がコンフォメーションを変えた時に標的エピトープ構造が作成されるか、又は、露出する事を示唆している。また、この構造は HIV-1 株間で高度に保存されている事を示している。これらの事は、HIV が細胞へ侵入する際に取る、Env と受容体である CD4/CCR5 との反応中間体をうまく提示してやれば、目的とする中和抗体を誘導できる事を示唆している。

Env 反応中間体を調製する方法として、Env と CD4 をクロスリンクしたものや、Env 発現細胞と CD4/CXCR4 発現細胞を混合後、固定して抗原とする方法が発表されている。しかし、再現性のある十分な成果を出していない。最も効率よく Env 反応中間体を提示する方法は、受容体を発現する個体内で Env を発現させる事である。今迄抗体誘導のために使われてきた動物（マウス、ウサギ）はヒト受容体を発現しておらず、Env 反応中間体が生じるはずが無かった。しかし、我々は、既に、ヒト CD4/CCR5/CXCR4 を発現するトランスジェニック (Tg) ラットを作製しており、免疫動物として本研究に使用可能である。

2. 研究の目的

本申請者チームは2種類の強力なウイルス発現ベクターの開発者より構成されている。井上・塩田らが開発したセンダイベクター (SeV) は効率よく HIV/SIV 蛋白質をマウスや猿で発現させ、強い CTL を誘導させる事に成功している。又、志田の開発したワクシニア m8Δ株は、ヒトに対して安全であり、かつ、国際的に頻用されている MVA 株よりも 30-1000 倍強い免疫を誘起した。これらのことから、広範囲な臨床 HIV-1 株に対する中和抗体を誘導するために、Env 発現センダイベクターと他の Env を発現する発現 m8Δベクターを組み合わせるとヒト CD4/CCR5/CXCR4 発現 Tg ラット (また、マウス) を免疫し、抗 HIV-1 の CTL と中和抗体を共に効率よく誘導することを目的とする。

我々は、既に、ラットで HIV-1 の増殖を促

す因子として Tat のコファクターのヒト CyclinT1 と、Rev のコファクター CRM1 を発現する Tg ラットを作成し、primary マクロファージと T 細胞においてヒト細胞に近い量のウイルスが産生される事を示した。さらに、ラット細胞で産生される HIV は感染性を有していること、細胞からの放出効率も低い事を示した。VSV G 蛋白質でコートした HIV の侵入効率はラットとヒトマクロファージで差はなかった。そこで、本申請の第2の目的はヒト CyclinT1/CRM1 発現 Tg ラットと受容体発現ラットを交配する事によって、ヒト CD4/CCR5/CXCR4/CyclinT1/CRM1 発現 Tg ラットを作成し、HIV-1 感染モデルになるか検定する事である。

3. 研究の方法

1. Env を発現するセンダイウイルスベクターの作成：まず、Env 遺伝子に SeV の転写複製に必須の EIS 配列を付加し、SeV ベクターの cDNA に挿入することで、Env 発現 SeV ベクター cDNA を構築する。ベクターの再構成は T7 RNA ポリメラーゼでドライブして調製し、増殖および生産には F 蛋白質を持続発現するパッケージング細胞株を利用する。

2. Env を発現する m8Δワクシニアウイルスの作成：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 env DNA 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 1-2 日後にウイルスを回収し、RK13 細胞上でブランクを作らせる。抗 HIV-1 抗体でブランクを染色する事によって Env 発現組換えワクシニアを選択する。

3. 免疫：ヒト CD4/CCR5/CXCR4 発現ラット (又は、マウス) に、Env 発現センダイベクターとワクシニアベクターを順次免疫する。最終免疫 2-4 週後に採血して、gp160 結合抗体、中和抗体を ELISA と TZM-b1 細胞を用いて測定する。膣洗浄液、糞を採取し、粘膜に分泌される IgA と IgG を調べる。また、CTL の誘導を測定するために、Intracellular cytokine assay (ICS) を行う。最終免疫 2 週後に、免疫マウスの脾臓細胞を HIV gp160 の 15mer overlapping peptide library とともに培養し、抗 CD4/CD8/IFN- γ /CD17a 抗体で標識後 FACScalibur を用いて分析する。

4. ヒト CD4/CCR5/CXCR4/CyclinT1/CRM1 発現 Tg ラット Ex vivo での HIV-1 感染：CD4+T 細胞とマクロファージを Tg ラットから調製して、HIV-1 を感染させて、感染サイクルの各段階の効率を調べる。p24 ELISA, Western blotting, FACS によって、HIV-1 の生産量をヒト細胞と比較する。又、ラット細胞から生産されたウイルスの感染価を TZM-b1 を用い

て測定する。

5. ラット個体への感染:HIV-1をTgラットに、静脈ルートで接種する。また、ex vivoで感染させたラット細胞を接種する事によっても感染を試みる。感染後、1〜4週おきに採血して血中のウイルス量を定量PCRで測定する。

4. 研究成果

1. DNA prime/m8Δ boost スケジュールにおける免疫誘導: DNA ワクチン prime/ウイルスベクターboostによる免疫法は最も詳しく調べられている。そこで、SeVとm8Δとの組み合わせ免疫と比較するために、マウスをpCAGGSenvでprimeし、m8ΔenvでboostしてIFN-γ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-γを生産していた。他方、抗Env抗体はいずれの方法で測定しても、全く検出されなかった。また、免疫活性化因子hCD40Lmの効果を調べた。hCD40Lm発現m8Δとm8Δenvを混合して免疫すると、約2倍のIFN-γ産生CD8+ T細胞が誘導された。しかし、抗体は誘導されなかった。

2. M8Δ prime/SeV boost スケジュールにおける免疫誘導: 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、m8ΔとSeVベクターをマウスにprime/boostして検討した。M8Δは乱利法、SeVは経鼻接種した。M8Δでprimeし、SeVでboostする方が、逆の免疫法よりも効率よく免疫を誘導することをまず見いだした。M8Δ prime/SeV boostによって、6.5%のEnv特異的IFN-γ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。さらに、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。膣洗浄液中に抗Env IgGが検出された。IgAは検出できなかった。ついで、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-γ産生CD8+ T細胞の誘導を約2倍亢進させた。envとhCD40Lmを共発現する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抗体と中和抗体を10倍効率よく誘導した。CD4/CCR5/CXCR4発現Tgラットに免疫した場合もSF162シュードウイルスに対する中和抗体を効率よく誘導した。

これらのことから、m8Δenv prime/SeVenv boost法はEnv特異的IFN-γ産生CD8+ T細胞と抗Env抗体を効率よく誘導することが分った。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。しかし、抗体抵抗性(Tier2)HIV-1に対する中和抗体誘導は十分に

は無く、今後の課題である。

3. ヒトCD4/CCR5/CXCR4/CycT1/CRM1 TgラットへのHIV-1感染: CD4/CCR5/CXCR4 TgラットとCycT1/CRM1 Tgラットを掛け合わせる事によってCD4/CCR5/CXCR4/CycT1/CRM1 Tgラットが作製でき、安定した匹数を確保できることが明らかとなった。HIV-1のマクロファージへの感染は比較的効率よく起るが、CD4+ T細胞へは非効率であった。同Tgラット個体への静脈内接種によってHIV-1を感染させたが、血中ウイルス量は急速に消失し、体内でのウイルス増殖の証拠は得られなかった。CD4+ T細胞への効率的な感染方法の開発が今後の課題である。

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13件)

- (1) Mika Nagai-Fukutaki, Takashi Ohashi, Iwao Hashimoto, Tominori Kimura, Yoshiyuki Hakata, Hisatoshi Shida (2011): Nuclear and Cytoplasmic Effects of Human CRM1 on HIV-1 Production in Rat Cells. *Genes to Cells* 16:203-216.
- (2) Mina Hikichi, Minoru Kidokoro, Takeshi Haraguchi, Hideo Iba, Hisatoshi Shida, Hideaki Tahara, Takafumi Nakamura (2011): MicroRNA Regulation of Glycoprotein B5R in Oncolytic Vaccinia Virus Reduces Viral Pathogenicity without Impairing its Antitumor Efficacy. *Mol. Ther.* 19:1107-15
- (3) Fofana IB, Colantonio AD, Reeves RK, Connole MA, Gillis JM, Hall LR, Sato S, Audin CR, Evans DT, Shida H, Johnson RP, Johnson WE (2011): Flow cytometry based identification of simian immunodeficiency virus Env-specific B lymphocytes. *J Immunol Methods.* 370:75-85
- (4) Xianfeng Zhang, Mariko Kondo, Jing Chen, Hiroyuki Miyoshi, Hajime Suzuki, Takashi Ohashi, Hisatoshi Shida (2010): Inhibitory effect of human TRIM5α on HIV-1 production. *Microbes and Infection* 12:768-777
- (5) Hajime Suzuki, Minoru Kidokoro, Ismael Ben Fofana, Takashi Ohashi, Tomotaka Okamura, Kazuhiro Matsuo, Naoki Yamamoto, Hisatoshi Shida (2009): Immunogenicity of newly constructed attenuated vaccinia strain LC16m8Δ that expresses SIV Gag protein. *Vaccine*

27:966-971

- (6) Hiroyuki Okada, Xianfeng Zhang, Ismael B Fofana, Mika Nagai, Hajime Suzuki, Takashi Ohashi and Hisatoshi Shida (2009): Synergistic effect of human CytT1 and CRM1 on HIV-1 propagation in rat T cells and macrophages. *Retrovirology* 6:43

[学会発表] (計 8 件)

1. Xianfeng Zhang, Tomoyoshi Sobue, Hisatoshi Shida: Enhancement of CD40Lm on Vaccine Elicited Anti-HIV-1 Immunity. July 2011, 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. Rome, Italy.
2. Tomoyoshi Sobue, Shun-Ichi Makino, Xianfeng Zhang, Takashi Ohashi, Kazunori Kato, Tatsuo Shioda, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa, Hisatoshi Shida: Immunogenicity of Lc16M8Δ Vaccinia Prime/Sendai Virus Vector Boost Targeting the Envelope Glycoprotein of HIV-1 and Contribution of CD40Lm. September 2011, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan.
3. H. Shida: Immunogenicity of LC16m8Δ Vaccinia Virus/Sendai Virus Vector Expressing the gp160 of HIV-1 and Effect of CD40Lm AIDS VCCINE 2011 September 2011 Bangkok Thailand

[産業財産権]

特許出願状況 (計 1 件)

名称: ワクシニアウイルスベクターおよびセンダイウイルスベクターからなるプライム/ブーストワクチン用ウイルスベクター

発明者: 志田壽利、井上誠他

権利者: 北海道大学他

種類: 特許

番号: 特願2010-237954号、
PCT/JP2011/074349

出願年月日: 2010年10月22日

2011年10月21日

国内外の別: 国内及び国外

[その他]

ホームページ等

<http://www.igm.hokudai.ac.jp/molvir>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

志田 壽利 (Shida Hisatoshi)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授

研究者番号: 00144395

(2) 研究分担者

井上 誠 (Inoue Makoto)

ディナベック株式会社・研究開発部長

研究者番号: 30373541

塩田 達雄 (Shioda Tatsuo)

大阪大学・微生物病研究・教授

研究者番号: 00187329

(3) 連携研究者

無し ()

研究者番号: