

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2008

課題番号：20890301

研究課題名（和文） 経口投与可能な粘膜免疫誘導型エイズDNAワクチン開発の基礎研究

研究課題名（英文） Development of an oral delivery vehicle for HIV-1 DNA vaccines to stimulate mucosal immune responses

研究代表者

清水 佑也（Shimizu Yuya）

独立行政法人 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター 研究員

研究者番号：70470200

研究成果の概要：

経口感染する E 型肝炎ウイルス（HEV）のウイルス用中空粒子（VLP）をエイズDNAワクチンのデリバリーに用いて、経口投与可能な粘膜免疫誘導型エイズDNAワクチンの開発を目指した。その結果、HEV-VLP を用いることで経口的に DNA ワクチンを粘膜面に送り込むことができ、さらに HEV-VLP の表面に別の抗原エピトープを発現させることで、これに対する免疫応答も同時に粘膜面に誘導できることが明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,120,000	336,000	1,456,000
年度			
総計	1,120,000	336,000	1,456,000

研究分野：実験動物学 ワクチン学

科研費の分科・細目：医歯薬学 ウイルス学

キーワード：ワクチン 粘膜免疫 HIV-1

1. 研究開始当初の背景

HIV-1 はエイズの原因ウイルスである。汎世界的な HIV-1 感染症の蔓延を制圧するためには効果的なワクチンの開発が望まれている。エイズに対するワクチン開発では、HIV-1 の主要な構造蛋白である Gag 蛋白に対する細胞障害性 T 細胞（CTL）を誘導すること、ウイルスの細胞侵入に重要なエンベロープ（Env）蛋白に対する中和抗体を誘導すること、HIV-1 の主要な感染経路である粘膜面に特異的な免疫反応を誘導することなどが重

要である。また、DNA ワクチンはウイルス抗原を発現するプラスミド DNA を筋肉内注射などで体内に投与する方法で、ウイルス排除に重要な CTL の誘導に効果的であることが明らかとなっている。

HIV-1 のみならず多くの病原体は粘膜面を介して感染することから、種々の感染症で経口投与可能な粘膜ワクチンが検討されている。しかし、ワクチン抗原を経口的に投与しても消化酵素による分解を受け、粘膜面に免疫原性を保持したまま抗原が到達せず、期待した免疫応答が誘導できない。特に CTL の誘

導に優れた DNA ワクチンを経口的に粘膜面に送り込む手法はいまだ確立されていない。

2. 研究の目的

粘膜感染を起こすエイズウイルスに対する効果的なワクチン開発をめざし、経口投与により粘膜免疫を誘導するエイズ DNA ワクチンの基礎研究を行った。

今回、経口投与によって粘膜に免疫物質 (DNA ワクチン) を送り込む手段として、経口感染する E 型肝炎ウイルス (HEV) 由来の非病原性構造蛋白からなるウイルス用中空粒子 (VLP) を用いた。これまでに、HEV-VLP は病原性が無く安全で、VLP の分子間を広げ DNA ワクチンを封入できること。経口投与により消化管粘膜に到達し、DNA ワクチンを粘膜面の細胞内に導入し、特異的な免疫反応を粘膜および全身に誘導できることが明らかとなっている (Gene Ther. **11**, 628)。

さらに、この HEV-VLP は構造蛋白質の一部に異種蛋白由来の遺伝子を組み込むことで、その表面に異種蛋白由来の抗原エピトープを発現でき、発現した抗原エピトープに対する免疫反応が誘導されることが明らかとなっている (Virology **293**, 273)。

そこで本研究では、DNA ワクチンを経口的に粘膜にデリバリーするツールとして、HEV-VLP の 2 つの利点 (封入 DNA ワクチンによる免疫応答と表出異種エピトープによる免疫応答) を生かし、HIV-1Env 抗原エピトープを表出させた HEV-VLP を作成し、これに CTL を誘導する HIV-1Gag 発現 DNA ワクチンを封入する。小動物モデルとしてマウスに経口投与し、誘導される免疫応答、特に HIV-1GagDNA ワクチンによる粘膜面の CTL 誘導と HIV-1Env エピトープによる中和抗体誘導を評価した。これにより粘膜免疫誘導型エイズ DNA ワクチン開発の検討を行った。

3. 研究の方法

HIV-1 Gag 発現ベクター

HIV-1 Gag タンパク発現ベクターとして、pKAL148 および pEF-148 を用いた (Vaccine. **19**, 2995)。pKAL は発現誘導に優れた CMV プロモーターを持ち、pEF-148 は安定発現系として EF-1 α をプロモーターとして持つ。

マウス

BALB/c (H-2^d)、DBA2J (H-2^d)、および BALB/c と C57BL/6 (H-2^b) の交雑系である C B 6 F 1 マウス (H-2^{b/d}) を用いた。

組換えバキュロウイルス

HEV の構造蛋白質 (HEV-ORF2) の N 末端から 111 アミノ酸、C 末端から 52 アミノ酸を

欠失した配列の C 末端側に HIV-1 Env エピトープ (308-322 : RIORGPGRAFTIGK) を中心とした部位を組み込んだリコンビナント HEV-VLP (rVLP-Env) を発現するバキュロウイルスを用いた。当該エピトープは Env の V3 領域をコードし、マウスレベルでは Class I MHC 拘束性の CD8 陽性 T 細胞 (CTL) 免疫応答および Class II MHC 拘束性の CD4 陽性 T 細胞 (Th) 免疫応答の両方を誘導することが知られている領域である。さらにコントロールとして HIV-1 Env エピトープを持たないもとの HEV-VLP (C52) を発現するバキュロウイルスを用いた。

組換えタンパク質調整

昆虫由来細胞である SF9 細胞にてバキュロウイルスの調整を行った。さらに別の昆虫由来細胞である Tn5 細胞に調整したバキュロウイルスを感染させ、組換えタンパクとして HEV ウイルス構造蛋白質のみからなる VLP を発現させた。同 HEV-VLP を含む昆虫由来細胞培養上清を超速心による濃縮後、塩化セシウムによる密度勾配にて、精製 HEV-VLP を得た。得られた HEV-VLP は蛋白濃度の測定を行うとともに SDS-PAGE による泳動にて分子量を確認し実験に用いた。

HEV-VLP への DNA ワクチンの封入

Ca イオン依存的に粒子を構成している HEV-VLP の Ca イオンを EDTA でキレートした。これにより VLP の分子間を広げ、HIV-1GagDNA ワクチンを取り込ませた。その後、Ca イオンを溶液に段階的に添加し DNA ワクチンを封入した HEV-VLP を再構築した。

マウスへの免疫

マウスへの DNA ワクチンの免疫は筋注および経口ゾンデによる経口投与により行った。DNA ワクチン単独の筋肉内注射は 1 回の免疫量は 30 または 50ug (DNA 量) に調整し、2 週間隔で合計 3 回の免疫を行った。さらに筋注時には免疫効果を高める目的で Electric pulse 処理 (T820; BTX 社) を行った。

DNA ワクチンの経口投与については、BALB/c マウスを免疫するワクチンにより以下の 4 群に分けた。VLP に HIV-1Env 抗原エピトープを表出させ、その VLP (rVLP-Env) に HIV-1gag DNA ワクチンを封入したものを免役した群 (E+G 群)、HIV-1 Env エピトープを持たないもとの HEV-VLP (C52) に HIV-1gag DNA ワクチンを封入したものを免役した群 (C+G 群)。それぞれに対して、DNA ワクチンを封入していない VLP (rVLP-Env 単独; E 群、または C52 単独; C 群) を免役した群の 4 群である。マウスへの免疫は経口ゾンデによる経口投与により行い、VLP タンパク質量換算で 100ug、封入された DNA 量が約 30ug と

なるように調整し、2週間隔で合計3回の免疫を行った。

合成ペプチドおよび精製抗原タンパク

抗原特異的な免疫応答を評価する目的で、抗原再刺激を行う精製リコンビナント抗原タンパクとして Env 抗原は rgp120 (Protein Science 社)、Gag 抗原は rp24 (Protein Science 社) を用いた。さらに HIV-1 Env CTL エピトープ (P18-I10; RGPGRFVTI) および Gag 抗原ペプチドとして報告のある既存の 8-13 mer の合成ペプチドを作製し (図 1)、抗原再刺激に供与した。

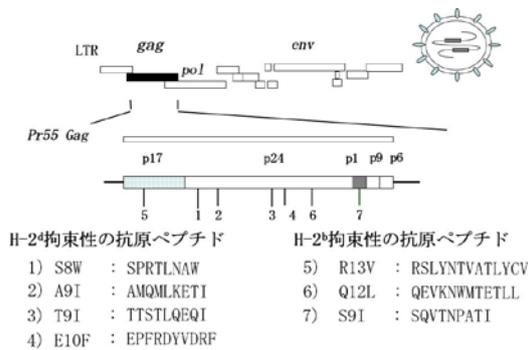


図1. HIV-1Gagタンパクの構成とGag抗原ペプチドとして報告のある配列

抗原特異的な CD8 陽性細胞免疫応答の解析 最終免疫から2週後の免疫マウスより腸間

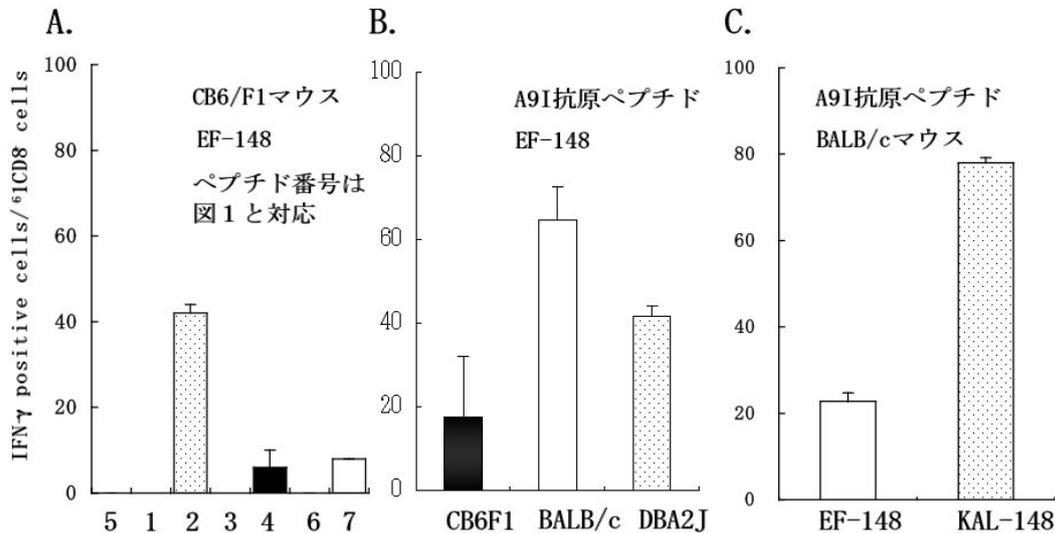


図2. HIV-1GagDNAワクチンの免疫原性の評価

抗原特異的な IFN- γ 産生 CD8 陽性細胞数を ELISpot 法により測定した。抗原ペプチドは A9I が反応に優れていた (A)。BALB/c マウスが評価系として適していた (B)。DNA ワクチンのプロモーターは CMV プロモーターが良好であった (C)。

膜リンパ節、パイエル板などの粘膜関連リンパ組織および全身免疫の指標として脾臓を採取し、常法により CD8 陽性細胞を単離した。それぞれの細胞を Env に対する免疫応答として P18-I10 CTL ペプチド、Gag に対する免疫応答として A9ICTL ペプチドを用いて 36 時間抗原再刺激を行い、ELISpot 法により抗原特異的な IFN- γ 産生 CD8 陽性細胞数を測定し、抗原特異的な CD8 陽性細胞の免疫応答を検討した。

抗原特異的な Th 細胞免疫応答の解析

上記と同様に、最終免疫2週後の免疫マウスから腸間膜リンパ節細胞を分離した。細胞を Env に対する免疫応答として rgp120、Gag に対する免疫応答として rp24 を用いて4日間抗原再刺激を行った。[³H]-TdR 取り込み能による抗原特異的なヘルパーT(Th)細胞増殖反応と培養上清中の抗原特異的なサイトカイン(IFN- γ および IL4)量を測定し、抗原特異的な Th 細胞の免疫応答を検討した。

4. 研究成果

DNA ワクチン免疫原性の評価系確立

条件検討として、DNA ワクチンを単独で通常のワクチン接種ルートである筋肉内投与により免疫し、脾臓細胞を回収し ELISpot 法により抗原特異的な免疫応答を評価した。

その結果、エイズ抗原タンパクを発現する DNA ワクチンとしては EF-1 発現プロモーター (pEF148) より CMV プロモーター

(pKAL-148)が効果的であること、供試マウスとしてはCB6/F1、DBA-2Jマウスと比較し、BALB/cマウスで免疫応答が顕著であること、Gag抗原ペプチドとして報告のある既存のペプチドのうち、H-2^d拘束性のA9Iが主要なエピトープペプチドであることが分かった(図2)。そこで、同条件(CMVプロモーター・BALB/Cマウス・A9IをGagに対する免疫応答の指標として用いる)に固定し、以降の実験を行った。

封入DNAワクチンによる免疫応答と表出異種エピトープによる免疫応答の評価

BALB/cマウスに4群(E+G群、C+G群、E群、およびC群)に分けたワクチンを経口投与し、各免疫マウスから脾細胞、腸間膜リンパ節細胞、およびパイエル板細胞を分離し、抗原特異的なIFN- γ 産生細胞数をELISpot法により測定し、抗原特異的なCD8陽性細胞の免疫応答を検討した。

E+G群のマウスでは、HEV-VLPに表出したEnvに対するEnvエピトープ特異的な免疫と、封入したGagDNAワクチンによるGagエピトープ特異的な免疫応答が認められた。C+G群では封入したGagDNAワクチンによるGagエピトープ特異的な免疫応答は認められたが、Envエピトープ特異的な免疫応答は認められなかった。E群ではEnvエピトープ特異的な免疫応答は認められたが、Gagエピトープ特異的な免疫応答は認められなかった。C群では、EnvおよびGagエピトープいずれに対する特異的な免疫応答も認められなかった(図

3)。

各群それぞれで、抗原エピトープに対する反応は腸間膜リンパ節細胞、およびパイエル板細胞では同程度に抗原特異的なIFN- γ 産生CD8陽性細胞が認められた。脾臓細胞においてもIFN- γ 産生細胞数は少ない傾向があるが、免疫応答は認められた。一方、GagDNAワクチンを通常のワクチン投与ルートである筋肉内接種した場合は、脾臓でGagエピトープ特異的な免疫応答が認められたが、腸間膜リンパ節細胞やパイエル板細胞ではGagエピトープ特異的な免疫応答は弱かった。同様に4群(E+G群、C+G群、E群、およびC群)に分けたワクチンをマウスに経口投与し、腸間膜リンパ節細胞を分離し、抗原特異的なTh細胞の増殖反応と培養上清中のサイトカイン産生を測定した。その結果、上記ELISpot法による抗原特異的なCD8陽性細胞の免疫応答と同様にして、各免疫群に対応するEnvおよびGag抗原タンパク再刺激に対する抗原特異的なTh細胞増殖反応とサイトカインの産生を認めた(図4)。

考察

HIV-1は直腸や生殖器等の粘膜を介して性行為により感染が成立するため、これらの粘膜部位での防御能を高めることがエイズワクチンの開発には必要と考えられている。また一般に、既存の経口型ワクチンで誘導される粘膜免疫はIgA(液性免疫)の誘導が中心であり、ウイルス排除に重要なCTLの誘導は困難である。CTLの誘導に有効なDNAワクチン

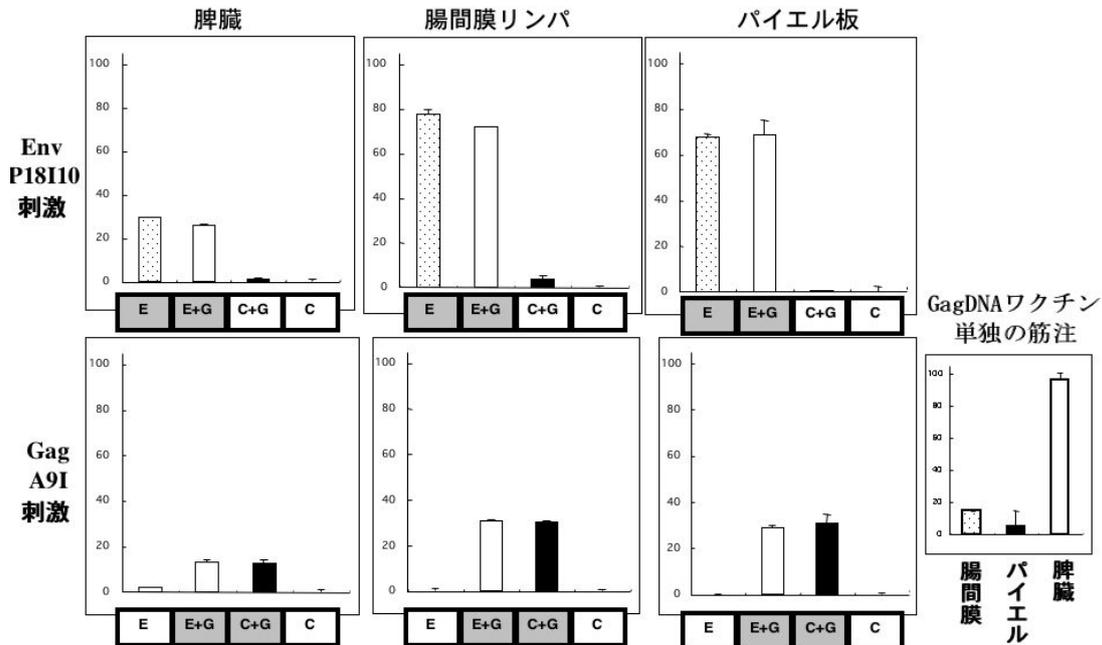


図3. 封入DNAワクチンと表出抗原によるCD8陽性細胞の免疫応答

抗原特異的なIFN- γ 産生CD8陽性細胞数をELISpot法により測定した。E+G群では、Env特異的なIFN- γ 産生細胞、Gag特異的なIFN- γ 産生細胞を腸管関連リンパ組織および脾臓にて認めた。

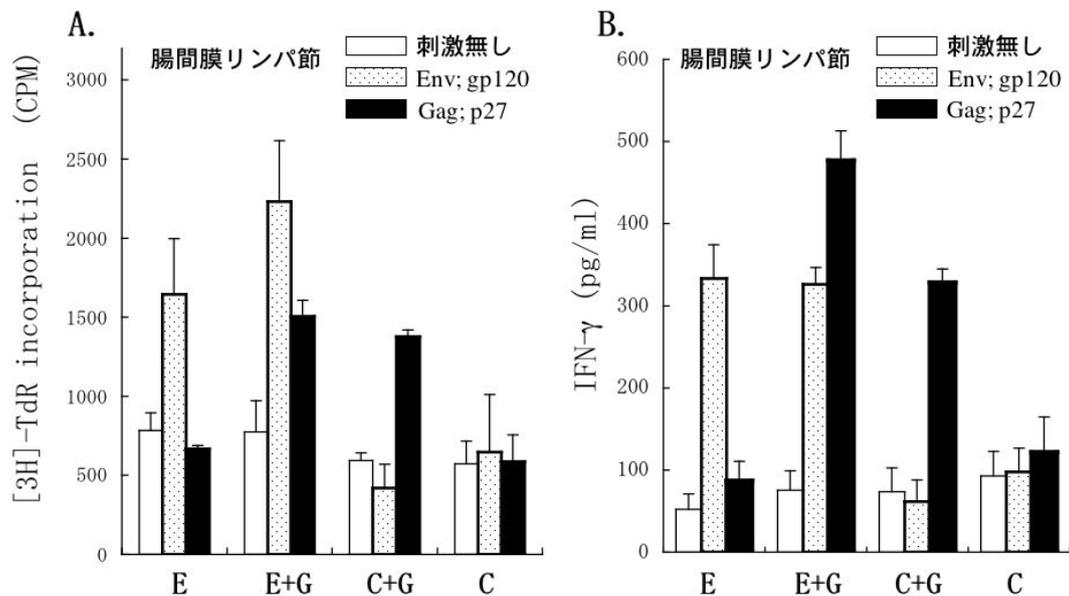


図4. 封入DNAワクチンと表出抗原によるTh細胞の免疫応答

抗原特異的なTh増殖反応(A)および培養上清中のサイトカン産生量(B)を測定した。E+G群では、ワクチンの経口投与により、Env特異的なTh細胞の免疫応答とGag特異的なTh細胞の免疫応答を腸間膜リンパ節細胞にて認めた。

の問題点として、既存のワクチン投与ルート（筋肉内注射）では全身性の免疫応答は誘導されるものの、十分な免疫反応を粘膜面に誘導することは困難である。これらのことから安全かつ有効な粘膜免疫誘導型エイズDNAワクチンの開発が特に急務となっている。

今回の研究成果により、HEVのVLPをDNAワクチンのデリバリーに用いることで、DNAワクチンの経口投与でもウイルス排除に重要な粘膜面および全身性の細胞性免疫を効果的に誘導できる事が明らかとなった。さらに、HEV-VLPに抗原エピトープを表出させることで、表出させた抗原エピトープに対する粘膜面の細胞性免疫応答も同時に経口的に誘導できる事が明らかとなった。

HIV-1に限らず、多くの感染症は経粘膜感染をおこす。今回の研究により、HEV-VLPに抗原エピトープを表出させ、さらにDNAワクチンを封入することで、通常では誘導困難な粘膜面の細胞性免疫応答を経口的に誘導できる事が明らかとなった。今回の研究内容は、封入するDNAワクチンや表出エピトープの組み合わせを換えることで、HIV-1のみならず種々の粘膜感染する感染症に対するワクチンにも簡単に応用可能である。また、粘膜面への遺伝子治療等の基盤となりうる可能性が示された。

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 5 件)

1) 清水佑也, 唐松克夫, 松原明弘, 保富康宏: アジュバントの工夫. 日本臨床 2008, 66:1915-1921

2) Huang L, Ikejiri A, Shimizu Y, Adachi T, Goto Y, Toyama J, Tanaka H, Akashi R, Uchida K, Miyata H, Haga T.: Immunoadjuvant activity of crude lectin extracted from Momordica charantia seed. J Vet Med Sci 2008, 70:533-535.

3) Huang L, Adachi T, Shimizu Y, Goto Y, Toyama J, Tanaka H, Akashi R, Sawaguchi A, Iwata H, Haga T: Characterization of lectin isolated from Momordica charantia seed as a B cell activator. Immunol Lett 2008, 121:148-156.

4) Haga T, Murayama N, Shimizu Y, Saito A, Sakamoto T, Morita T, Komase K, Nakayama T, Uchida K, Katayama T, Shinohara A, Koshimoto C, SatoH, Miyata H, Katahira K, Goto Y.: Analysis of antibody response by temperature-sensitive measles vaccine strain in the cotton rat model. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2009. In press.

5) 松原明弘, 清水佑也, 唐松克夫, 保富康宏 :
経口ワクチンの開発. 日本臨床
2008, 66:1873-1878

〔学会発表〕(計 5 件)

1) Haga T, Huang L, Adachi T, Shimizu Y,
Goto Y, Toyama J, Tanaka H, Akashi R,
Sawaguchi A, Iwata H : Lectin isolated from
Momordica charantia seed activates murine
B cell. American Society for Cell biology
48th Annual Meeting, San Francisco,
California, USA. December 14. 2008.

2) Haga T, Shimizu Y, Miura T, Hayami M,
Goto Y : Kinetics of soluble receptor for
tumor necrosis factor type II in the plasma
of rhesus macaques infected with simian
and human immunodeficiency virus.
Keystone Symposia, HIV Immunobiology:
From Infection to Immune Control. Keystone,
Colorado, USA. March 24. 2009.

3) 黄 莉, 足立 匠, 清水佑也, 後藤義孝, 外山
潤, 田中秀典, 明石 良, 岩田祐之, 芳賀 猛 :
Lectin isolated from Momordica charantia
seed is a B cell activator. 第146回
日本獣医学会学術集会. 宮崎. 2008年9月
25日.

4) 松原明弘, 清水佑也, 加藤翔太, 河岡義裕,
保富康宏 : IL4 アンタゴニストを用いた
helperT 細胞 (Th) 反応調整によるインフル
エンザウイルス感染の制御. 第56回日本ウ
イルス学会学術集会. 岡山. 2008年10月27
日.

5) 松原明弘, 高村史記, 清水佑也, 保富康宏 :
SIVmac239のEnvgp120アスパラギン結合糖鎖
欠損株を用いたSIVDNAワクチンの開発. 第
12回日本ワクチン学会学術集会. 熊本. 2008
年11月9日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 佑也 (Shimizu Yuya)
独立行政法人 医薬基盤研究所 研究員
研究者番号 : 70470200

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし