

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03728

研究課題名(和文) HIV感染症の機能的治癒を目指したアジュバント最適型新規免疫療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of therapeutic strategies toward a functional cure for HIV by the adjuvant immunotherapy

研究代表者

山本 拓也 (Yamamoto, Takuya)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 ワクチン・アジュバント研究センター・プロジェクトリーダー

研究者番号：60752368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本課題は、現行の多剤併用療法と併用可能な新規免疫療法を確立するために、STINGリガンドを抗原特異的免疫反応誘導のためのワクチンアジュバントとし、潜伏感染細胞排除に繋がるアジュバント最適型新規免疫療法を見出すことを目的としている。3つの柱として1)アジュバント活性評価、2)ワクチンモダリティ評価、3)広範囲中和抗体評価のそれぞれの要素について最適化・準備を進め、1)STINGリガンドの選定と投与ルート・投与量の最適化、2)モデルワクチンでの免疫原性の確認、3) in vivo投与用カニクイザル型広範囲中和抗体候補の選定を完了した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果と申請者が過去に樹立したカニクイザルcART治療モデルとにより、現実のcART治療下の患者に似た動態を示すカニクイザルモデルにてアジュバント最適型新規免疫療法を実際に検証できる準備が整った点は、HIV根治の可能性を見出す上で大きな一歩であると考えている。また、感染症のみならずがん免疫療法の分野でも注目されているSTINGリガンドのin vivoの安全性・有効性についての詳細な免疫学的プロファイルは、世界的に見ても稀有であり、特に投与前パラメーターから効果の一部が予測できる可能性が示唆された点は、創薬における非臨床のみならず臨床試験にも応用できる可能性があり、学術的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：In this project, in order to establish a novel immunotherapy that can be used with combination AntiRetroviral Therapy (cART), we use STING ligand as a vaccine adjuvant for inducing antigen-specific immune responses, and to find an adjuvant-optimized novel immunotherapy that leads to elimination of latent infected cells.

We have performed 1) adjuvant activity evaluation, 2) vaccine modality evaluation, and 3) broad neutralizing antibody evaluation. As the results, we archived 1) STING ligand selection and optimization of administration route and dosage, 2) confirmation of immunogenicity with model vaccine, 3) selection of a cynomolgus type broad neutralizing antibody candidate for in vivo administration.

研究分野：ワクチン学

キーワード：HIV 機能的治癒 ワクチン アジュバント 非ヒト霊長類 免疫療法

## 1. 研究開始当初の背景

HIV-1 感染者に対する治療として多剤併用療法(combination antiretroviral therapy (cART))を行った場合、多くの感染者において血中ウイルス量を検出限界以下にコントロールすることが可能である。しかしながら現在でも、cART のみで体内からウイルス潜伏感染細胞を完全に排除することは出来ない。つまり一度 cART を開始すると一生薬を飲み続けなければならず、根本的な治療には未だ至っていないのが現状である。エイズ根治へ向けた現在の課題はこの潜伏感染細胞の完全排除、いわゆる機能的治癒の実現である。近年、広範な HIV 臨床株を中和することのできる広範囲中和抗体が世界中で数多く単離されており、cART 治療下にて、これら抗体を単独で投与することにより機能的治癒を目指すという試みに大きな期待が寄せられていた。しかしながら最新の臨床試験の報告でも十分な治療効果は認められてはならず (Bar KJ. et al., *NEJM*. 2016)、「機能的治癒実現に向けた新しい概念に基づく新規治療法を研究開発することができるか」が、エイズ治療の大きな課題となっている。

過去の報告を総括すると、機能的治癒を達成するためには、1) 潜伏感染細胞を再活性化させ、細胞変性効果(CPE)による感染細胞死を誘導すること、2)抗 HIV-1 免疫反応の強力な活性化を誘導すること、の両者の重要性が示唆されている(Deng K et.al., *Nature*. 2015)。機能的治癒を目指した研究に関して、先に述べた抗 HIV 抗体単独投与による治療の試みの他には、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害薬を用いた治療が挙げられる。ただ、この HDAC 阻害薬を用いた場合、潜伏感染細胞の再活性化は認められるものの、CD8T 細胞機能を著しく低下させてしまうことが報告されており(Jones RB et.al., *Plos Pathogens*. 2014)、未だ十分な効果が得られていない。つまり現行の方法では、上記 1)、2)の両者を同時に実現することは難しい。

そのような背景の中、申請者はこれまで、ワクチンアジュバントとして開発が進められてきた STING リガンドを単剤で免疫賦活化剤として応用することで、本来の目的である免疫反応の活性化のみならず、感染個体由来末梢血単核球(PBMC)中の潜伏感染細胞の再活性化を誘導できることを *in vitro* 実験により見出している(Yamamoto T et.al., *Sci Rep*. 2019 Apr 11;9(1):5917.)。つまり STING リガンドは HIV-1 感染症に対する機能的治癒に向けた新規免疫療法において有望な候補薬剤であると考えられる。

本研究では、この STING リガンドを軸となる免疫賦活化剤(アジュバント)として用い、その上で、潜伏感染細胞排除に向けたより強力な抗 HIV-1 免疫反応の誘導を目指し、様々な免疫療法との併用の可能性を検証する。

## 2. 研究の目的

機能的治癒の達成には、cART 下において潜伏感染細胞を再活性化し細胞死を誘導するとともに、強力な抗 HIV 免疫応答による潜伏感染細胞を排除することが必要である。我々は自然免疫賦活化剤である STING リガンドに着目し、STING リガンドをアジュバントとして、ワクチンと併用することにより効率的に潜伏感染細胞を排除できる新規免疫療法の確立を目指している。計画開始時において、STING リガンドの *in vitro* における免疫賦活化能については我々の先行研究により知見を得ていたが、*vivo* における免疫賦活化効果、及び HIV 感染症に対する治療効果は不明であった。

本課題では、現行の cART と併用可能で、かつ「潜伏感染細胞を再活性化させ、細胞変性効果による感染細胞死を誘導すること」と「強力な抗 HIV-1 免疫反応誘導による潜伏感染細胞の排除」を併せて誘導する新規免疫療法を確立するために、STING リガンドを抗原特異的免疫反応誘導のためのワクチンアジュバントとし、潜伏感染細胞排除に繋がるアジュバント最適型新規免疫療法を見出すことを主題としている。

上記を達成するために必要な 3 要素、即ち、1)アジュバント活性評価、2)ワクチンモダリティ評価、3)広範囲中和抗体評価のそれぞれの要素について最適化・準備を進めた。

特に、ワクチンモダリティについては、計画当初は想定されていなかったコロナ禍において急速に進んだワクチン開発の状況を踏まえ、ペプチドプールを抗原とするのではなく、核酸ワクチンを用いる方が実用化に直結すると判断し、核酸ワクチンの可能性を追求することとした。

## 3. 研究の方法

本研究ではまず、先行研究で見いだした複数の STING リガンドのうちより免疫賦活可能の高いリガンドの選定、*in vivo* における投与ルートを検証を行うとともに、安全性及び免疫賦活化能について、通常血算や血漿サイトカインの評価に加え、マルチカラーフローサイトメトリーを用いた細胞サブセット毎の活性化等の評価による検証を行った。

並行して、選考して樹立したカニクイザルにおける SIV 慢性持続感染 ART カニクイザルモデ

ルにおける、広範囲中和抗体の効果を見るために、広範囲中和抗体クローンのカニクイザル型抗体への改変を行い、*in vivo* 投与に必要な IgG の精製をおこなった。さらに、新規ワクチンモダリティの評価を行うため、HIV Gag 及び Pol エピトープを含む複数のエピトープをタンデムに繋いだ DNA ワクチンの原型を作成し、ヒト HLA-Tg マウスを用いてその免疫原性を評価した。

#### 4. 研究成果

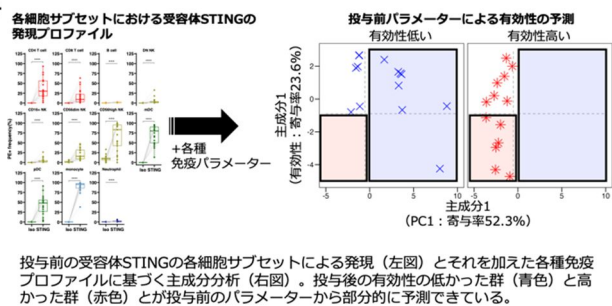
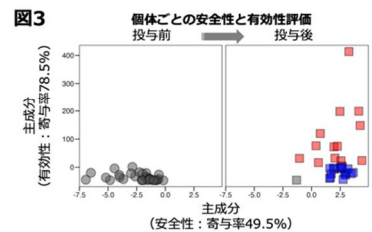
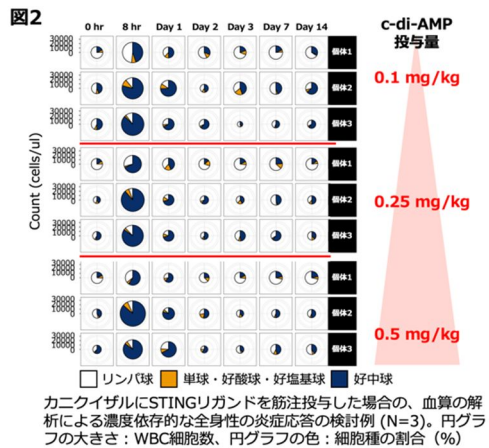
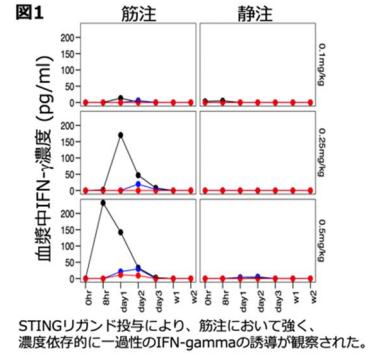
##### 1. STING リガンドの *in vivo* 投与実験

**初年度：**初年度には、STING リガンドの *in vivo* 投与について、少数の個体において、容量と投与ルートを検証を行った。結果として、静注、筋注いずれにおいても 0.5mg/kg までの投与における安全性に大きな問題は見られず、血漿中の機能的 サイトカインの誘導については、筋注のほうが顕著に強い誘導が起きることが明らかとなった（図 1）。

**2 年度目：**STING リガンドの投与ルート及び投与量については検討の余地が残っていたことから、2 年度目も引き続き STING リガンドの投与量・投与ルートの検証と、安全性・有効性に関する試験を進めた。また、c-di-AMP だけではなく、活性化能の高い類似体である 3' -3' -c-GAMP についても安全性・有効性評価を進めた。具体的には非感染カニクイザルに、0.1 mg/kg-1.0 mg/kg までの c-di-AMP 及び 3' -3' -c-GAMP を筋注にて投与し、その後 2 週間にわたり、採血と投与部位の観察、炎症スコアリングを行った。その結果、安全性に関しては投与箇所に一過性の炎症は見られたものの、重症なものもなく 14 日後にはおさまった。また、血液中の炎症性サイトカイン、血算による血液サブセットの推移、intermediate monocyte に代表される PBMC 中の炎症性サブセットに関して一過的な誘導と活性化が見られたが、7-14 日後には定常状態へと戻った（図 2）。このことから、STING リガンドの安全性には問題はないことが示唆された。有効性についても 0.5 mg/kg 以上の投与において、血漿中で Type I IFN や IFN-gamma が観察された。さらに、マルチカラーフローサイトメーターによる解析から PBMC 中の DC, NK, T 細胞の各サブセットにおいて 活性化マーカーの上昇が見られ、STING が免疫賦活化作用を示すことが示唆された。これらの結果を総合評価し、0.5 mg/kg の c-di-AMP を筋注にて投与する方法が ワクチン効果を最大化することが示唆された。

**最終年度：**最終年度には、血算やサイトカイン、マルチカラーフローサイトメーターによる各免疫細胞サブセットの活性化プロファイル等を組み合わせた経時的かつ多層的データセットを用い、機械学習などのバイオインフォマティクスを用いて多層的データセットを解析することにより、安全性指標と有効性指標に基づく個体ごとの分類により、免疫賦活化剤投与後の安全性と有効性を同時に評価できる系を樹立した。（図 3）更に、受容体である STING の発現を各細胞サブセット毎に収集し拡張した投与前データセットから、投与後の有効性を予測するモデルを樹立した（図 4）(Takahama et al. *Molecular Therapy Methods and Clinical Development*, 2023)。

##### 2. ワクチンモダリティ評価





**初年度：**計画当初はペプチドプールをワクチン抗原として用いる計画であった。そのため、SIV Gag に対するオーバーラッピングペプチドについて、*in vivo* 投与に必要な量を確保するための準備を進めていた。一方、コロナ禍において急速に進んだワクチン開発の状況を踏まえ、ペプチドプールを抗原とするのではなく、核酸を用いる方が実用化に直結すると考えられたため、核酸ワクチンの効果検証を行うこととして準備を進めた。

**2年度目：**核酸ベースの様々なワクチンモダリティ評価のために必要な、ヒト HLA 発現遺伝子改変マウスを輸入し、所属研究所での飼育を開始し、解析基盤を整備した。

**最終年度：**HLA-A\*02:01 に対するエピトープをモデルエピトープとし、複数の抗原に対する有効なエピトープをタンデムに搭載した DNA ワクチンシーズを作製し、HLA-Tg マウスを用いた免疫原性の評価を行った(図5)。具体的には、HLA-A02-Tg マウスに DNA ワクチンを投与し、3回のブースト後に解剖し、脾臓細胞を精製後、HIV Gag エピトープ (SLYNTVATL) 及び Pol エピトープ(ILKEPVHGV) 各々のペプチドで刺激し、ELISPOT による IFN-gamma の測定を行った。

その結果、HIV Gag エピトープ (SLYNTVATL) 及び Pol エピトープ(ILKEPVHGV)ともに、IFN-gamma 応答が確認された(図6)。今後 DNA ワクチンのみではなく、mRNA ワクチンとしての可能性も追求していく予定である。

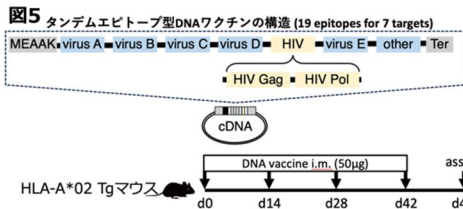


図5 HIV Gag/Polエピトープを搭載した、タンデムエピトープ型モデルDNA ワクチンシーズの作成とHLA-Tgマウスでの抗原性確認実験スキーム

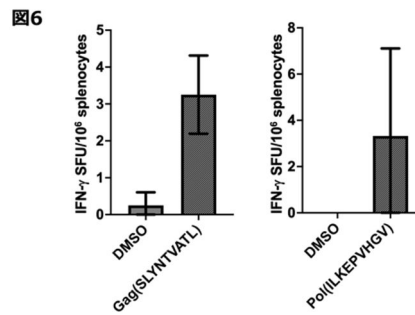


図6 モデルDNAワクチン投与後の脾臓細胞における免疫原性の評価。IFN-g ELISPOTにより検出したHIV Gagエピトープ (SLYNTVATL) 及びPol エピトープ(ILKEPVHGV)に対する応答を示す。

### 3. カニクイザル型 SIV Env 特異的広範囲中和抗体の準備

**初年度：**カニクイザル型 SIV Env 特異的広範囲中和抗体は、共同研究者より分与された認識エピトープの異なる7種類の SIV Env 特異的 bNab アカゲザル型コンストラクトを用い、まず、各コンストラクトから、アカゲザル型各 IgG を調整し、実際に SIVmac251 感染細胞の細胞表面 Env を認識できるのかを *in vitro* 実験により検討した。

その結果、MPER 抗体以外の7種類中6種類の抗体が実際に SIV 感染細胞表面の Env を認識することが明らかとなった。特に SIV Env2/3/5/6 が強く細胞表面 Env を認識した(図7)。

**2年度目：**選択したモノクローナル抗体のカニクイザル型への変換のために、カニクイザル型の各 IgG アイソタイプの配列選定を行った。また、抗 PD-1 ヒト抗体をモデル抗体として実際に、機能的カニクイザル型 IgG を Expi293T 細胞で作製・定量する系を確立した。

**最終年度：***In vitro* での検証により選択した SIV Env 特異的広範囲中モノクローナル抗体について、カニクイザル型への変換を行った。アカゲザル IgG1 の Fc 領域をカニクイザル型の各 IgG アイソタイプへ改変し、Exp293T 細胞による抗体産生・精製を行い、*in vivo* 投与実験に必要な量の IgG を確保した(図8)。今後実際の *in vivo* における効果を検証していく予定である。

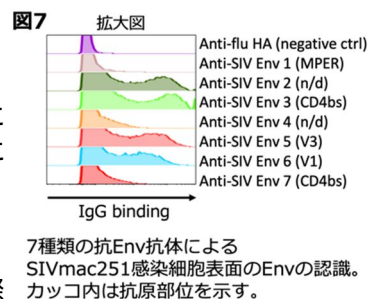


図7 7種類の抗Env抗体による SIVmac251感染細胞表面のEnvの認識。カッコ内は抗原部位を示す。

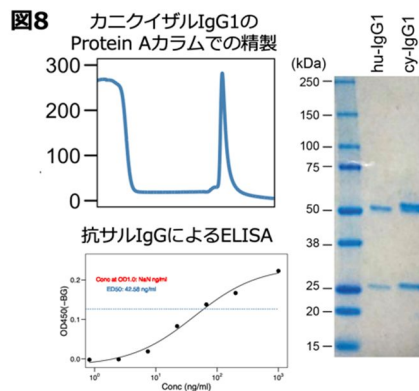


図8 カニクイザルIgG1のExpi293T細胞の大量合成、カラム精製、及び抗サルIgG抗体ELISAによる定量例。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takahama Shokichi, Nogimori Takuto, Higashiguchi Masaya, Murakami Hiroto, Akita Hirofumi, Yamamoto Takuya	4. 巻 571
2. 論文標題 Simultaneous monitoring assay for T-cell receptor stimulation-dependent activation of CD4 and CD8 T cells using inducible markers on the cell surface	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 53 ~ 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.07.037	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 -
1. 著者名 Nogimori Takuto, Sugawara Yuko, Higashiguchi Masaya, Murakami Hiroto, Akita Hirofumi, Takahama Shokichi, Tanaka Satoshi, Yamamoto Takuya	4. 巻 99
2. 論文標題 OMIP 078: A 31 parameter panel for comprehensive immunophenotyping of multiple immune cells in human peripheral blood mononuclear cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cytometry Part A	6. 最初と最後の頁 893 ~ 898
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cyto.a.24490	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nogimori Takuto, Moriishi Eiko, Ikeda Mami, Takahama Shokichi, Yamamoto Takuya	4. 巻 99
2. 論文標題 OMIP 075: A 22 color panel for the measurement of antigen specific T cell responses in human and nonhuman primates	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cytometry Part A	6. 最初と最後の頁 884 ~ 887
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cyto.a.24460	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takahama Shokichi, Yamamoto Takuya	4. 巻 10
2. 論文標題 Pattern Recognition Receptor Ligands as an Emerging Therapeutic Agent for Latent HIV-1 Infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2020.00216	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 -

1. 著者名 3.Eslamizar L, Petrovas C, Leggat DJ, Furr K, Lifton ML, Levine G, Ma S, Fletez-Brant C, Hoyland W, Prabhakaran M, Narpala S, Boswell K, Yamamoto T, Liao HX, Pickup D, Ramsburg E, Sutherland L, McDermott A, Roederer M, Montefiori D, Koup RA, Haynes BF, Letvin NL, Santra S.	4. 巻 6
2. 論文標題 Recombinant MVA-prime elicits neutralizing antibody responses by inducing antigen-specific B cells in the germinal center.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 NPJ vaccines	6. 最初と最後の頁 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41541-020-00277-1	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 5.Lu KT, Yamamoto T, McDonald D, Li W, Tan M, Moi ML, Park EC, Yoshimatsu K, Ricciardone M, Hildesheim A, Totsuka Y, Nanbo A, Putharoen O, Suwanpimolkul G, Jantarabekkul W, Paitoonpong L, Handley FG, Bernabe KG, Noda M, Sonoda M, Brennan P, Griffin DE, Kurane I.	4. 巻 555
2. 論文標題 U.S.-Japan cooperative medical sciences program: 22nd International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 71-77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virol.2020.12.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 3件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本 拓也
2. 発表標題 非ヒト霊長類モデルを用いたワクチン・アジュバントの免疫毒性研究
3. 学会等名 第48回日本毒性学会学術年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本 拓也
2. 発表標題 The non-human primate model for studying immunosenescence
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 升田 雄士, 野木森 拓人, 高濱 正吉, 山本 拓也
2. 発表標題 非ヒト霊長類モデルを用いた造血幹細胞の免疫老化現象の解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野木森 拓人, 升田 雄士, 高濱 正吉, 山本 拓也
2. 発表標題 非ヒト霊長類モデルを用いたT細胞老化を基軸とする免疫老化現象の本質的解明
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本拓也
2. 発表標題 SIV慢性感染期抗ウイルス薬治療下カニクイザルを用いた免疫学的マルチオミクス解析
3. 学会等名 第34回日本エイズ学会 学術集会・総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高濱正吉、岡村智崇、保富康宏、山本拓也
2. 発表標題 SIV抗原特異的CD4T細胞、及びCD8T細胞の高感度同時分取法の樹立
3. 学会等名 第34回日本エイズ学会 学術集会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村上弘大、秋田裕史、東口公哉、野木森拓人、高濱正吉、小林省吾、土岐祐一郎、江口英利、山本拓也
2. 発表標題 次世代型フローサイトメーターを用いた膀胱癌微小環境の解析
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東口公哉、秋田裕史、村上弘大、野木森拓人、高濱正吉、小林省吾、土岐祐一郎、江口英利、山本拓也
2. 発表標題 消化器癌における癌抗原特異性 CD8T 細胞反応の量的・質的評価
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東口公哉、秋田裕史、高濱正吉、村上弘大、小林省吾、土岐祐一郎、江口英利、山本拓也
2. 発表標題 ケモカイン/ケモカイン受容体を介した膀胱癌細胞と癌関連線維芽細胞間相互作用の解析
3. 学会等名 第24回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 清田 純、山本 拓也	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 320
3. 書名 新世代フローサイトメトリー活用スタンダード	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------