

平成 2 8 年 6 月 1 0 日現在

機関番号： 8 4 4 2 0

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2014 ~ 2015

課題番号： 2 6 8 7 0 9 2 4

研究課題名 (和文) アジュバントエイズウイルスを用いた強毒株SHIV生体内排除機構の解析

研究課題名 (英文) Analysis of protective immune responses against pathogenic SHIV infection in monkeys infected with non-pathogenic SHIV carrying an adjuvant molecule.

研究代表者

岡村 智崇 (Okamura, Tomotaka)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・霊長類医科学研究センター・研究員

研究者番号： 2 0 5 4 9 7 0 3

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 2,900,000 円

研究成果の概要 (和文) : 抗酸菌の抗原タンパクの一つであるAg85B は、細胞性免疫指向性のアジュバント活性をもつことが明らかである。これまでの研究で、アジュバントAg85Bを発現する弱毒エイズウイルス (SHIV-Ag85B) を開発した。このウイルスをカニクイザルに接種すると細胞性免疫誘導能を強力に誘導することを明らかにした。さらに、SHIV-Ag85B接種サルに、強毒株エイズウイルス (強毒株SHIV) の攻撃接種を行ったところ、直ちに抗原特異的IFN- γ 産生T細胞を再誘導し、強毒株SHIVを完全に制御することを明らかにした。

研究成果の概要 (英文) : The Ag85B can induce strong Th1-type immune responses in mice as an adjuvant. We previously reported that the cDNA of Ag85B was inserted into simian-human immunodeficiency virus (SHIV) eliminated nef gene of SHIV (SHIV-Ag85B). In the present study, immune responses in cynomolgus monkeys infected with the SHIV-Ag85B were analyzed, and also examined immune responses in those monkeys after infection with pathogenic SHIV (SHIV89.6P). The SHIV-Ag85B infected monkeys elicited Gag-specific T cell responses. When monkeys infected with SHIV-Ag85B were challenged with pathogenic SHIV89.6P, those monkeys showed protective effects for the intravenous challenge of pathogenic SHIV89.6P. The monkeys pre-infected with SHIV-Ag85B showed the enhancement of Gag-specific IFN- γ producing T cells after SHIV89.6P intravenously injection. These results suggest that the SHIV-Ag85B elicited strong immune responses against SHIV and could provide protective effects to pathogenic SHIV89.6P infection.

研究分野： ウイルス学

キーワード： 免疫不全ウイルス 細胞性免疫 アジュバント

1. 研究開始当初の背景

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染症は、世界的流行の続く慢性持続感染症の一つである。抗 HIV 治療薬の進歩により、エイズによる致死状況回避できるようになったものの、エイズウイルスを生体内から排除することはできないため、一度開始した治療は中断することは出来ない。また長期的な薬剤の服用は高額な治療費用および副作用の問題が生じるが、一番の問題点は治療中も絶えずウイルス感染が持続することで、長期的な慢性炎症状態を生じ体内において様々な問題が引き起こされる点にある。HIV による慢性炎症は心血管系疾患、骨代謝異常、高血圧、脂質異常を引き起こし、また近年報告された HAND (HIV-associated neurocognitive dysfunction) と呼ばれる認知機能の低下は、脳内に残存するウイルスの持続感染が起因すると考えられている。このように HIV 慢性炎症は、命の別状はないものの様々な病態を引き起こすことから、エイズウイルスを生体内から排除する仕組みを理解することは、今後のワクチンや治療薬の開発において極めて重要である。

2. 研究の目的

アルミニウム塩を主体とするアジュバント (Alum) は、様々なワクチンのアジュバントとして世界で最も汎用されてきた。Alum は、主に不活化ウイルス等の非複製抗原タンパクに混和することで用いられ、その作用は液性免疫反応を誘導する 2 型 T helper(Th2) 細胞に働き、1 型 T helper(Th1) 細胞による細胞性免疫の増強効果は期待できない。そのため、液性免疫でコントロールできない感染症ワクチンに対して効果は望めなかった。近年、自然免疫機構の研究から、Toll like receptor (TLR) を介し、TLR のリガンドを利用したアジュバント開発が進められている。Monophosphoryl lipid A (MPL) は、ヒトパピローマウイルスワクチンの新規ワクチンアジュバントとして、日本でも認可されている。MPL は TLR4 のリガンドである Lipopolysaccharide (LPS) の毒性を減弱したもので、Th1 型の免疫反応を誘導可能である (J. Immunol. 2009)。また他にも TLR3 のリガンドである Poly(I:C) の毒性を減弱した二本鎖 RNA の Ampligen (Poly I) (Vaccine 2009) や TLR9 のリガンドである CpG ODN も細胞性免疫誘導型ワクチンアジュバントとしての応用が期待されている。しかし、これらのアジュバントについても、不活化ワクチンやウイルスコンポーネント等の非複製抗原との併用が考えられている。

Ag85B は非定型抗酸菌群由来の分泌タンパクであり、ワクチン抗原特異的に細胞性免疫応答を増強することが可能である。また、これまでに DNA ワクチンのアジュバント効果やアトピー性皮膚炎の治療効果について報告実績がある (J. Immunol. 2005、Arch.

Dermatol. Res. 2009)。弱毒ウイルスには、遺伝子欠損弱毒サルヒトエイズウイルス (SHIV-NI) を用い、この遺伝子欠損部位に Ag85B 遺伝子を組み込んだ世界初のアジュバント発現弱毒ウイルスを開発した (SHIV-Ag85B)。本研究では SHIV-Ag85B 接種後、カニクイザルを用いて免疫反応を解析し、次に強毒株 SHIV89.6P の攻撃接種を行い、防御効果および防御免疫機構を検討した。

3. 研究の方法

(1) HIV-Ag85B を接種したカニクイザルにおける免疫反応および防御免疫反応の解析。

実験スケジュール。当センターで繁殖育成している SPF カニクイザルを用いる。投与量は 10^6 TCID₅₀、静脈内接種を行う。接種後約 36 週目 (約 9 カ月) に、強毒株 SHIV89.6P を静脈内より攻撃接種を行う。採血は急性期で 1 週、慢性期で 4 週の間隔で行った (図 1)。

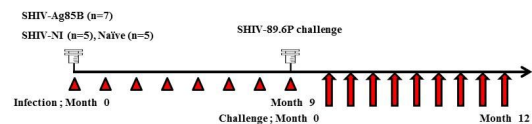


図 1. 実験スケジュール

強毒 SHIV 接種後のウイルス量および CD4+T 細胞の動態。血漿中のウイルスコピー数は血漿からウイルス RNA を抽出し、SIVgag 特異的 Primer および probe を用いて Real time PCR 法により測定した。組織中 SHIV プロウイルス量は、上記 Primer および probe を用いて、デジタル PCR 法を行った。CD4+T 細胞数は末梢血を CD3、CD4、CD8 抗の染色を行い、フローサイトメーターを用いて算定した。

細胞性免疫反応の解析。末梢血から PBMC の分離を行う。抗原刺激には、各個体より事前に樹立した B-LCL 細胞にウイルス構造タンパク (SIVGag-pol、HIVEnv) を発現する組換えワクシニアウイルスを感染させた細胞を抗原提示細胞とし、PBMC との共培養を行う。培養後 Monkey IFN- ELISPOT Kit を用いて、SIVGag 特異的 IFN- 産生細胞数を測定した。またフローサイトメーターを用いて、Th1 サイトカイン (IFN-、TNF、IL2) を産生する細胞の算出を行った。

液性免疫の解析。血液より採取した血漿を用いて、抗体産生について ELISA 法を行った。

(2) 強毒株 SHIV 制御カニクイザルにおける生体内排除の解析。強毒株 SHIV を制御したカニクイザルをドナーとし、血液およびリンパ節を採取した。採取した血液およびリンパ節より調整した細胞溶液を、ドナーとなる Naïve カニクイザル (SHIV 陰性) にシリンジポンプを用いて静脈内投与を行った。投与後のウイルスの残存量を検討するため、血漿中および組織中のウイルス量を測定し、また CD4+T 細胞の算定を行った。

(3) *in vitro* における、SHIV-Ag85B 感染リンパ球を用いて初期免疫反応の解析。PBMC より調整した CD4⁺ T 細胞に SHIV-Ag85B を感染させ、経時的に培養上清を回収し、サイトカイン ELISA 法を行った。

4. 研究成果

(1) SHIV-Ag85B を接種したカニクイザルにおける免疫反応および防御免疫反応の解析。

SHIV-Ag85B 接種後の細胞性免疫反応の解析。開発した SHIV-Ag85B をカニクイザルに接種すると、IFN- γ 産生細胞を誘導し強力な細胞性免疫を誘導することを確認した。その数値は、親株 SHIV-NI 接種後の細胞性免疫反応よりも高値を示した (図 2)。

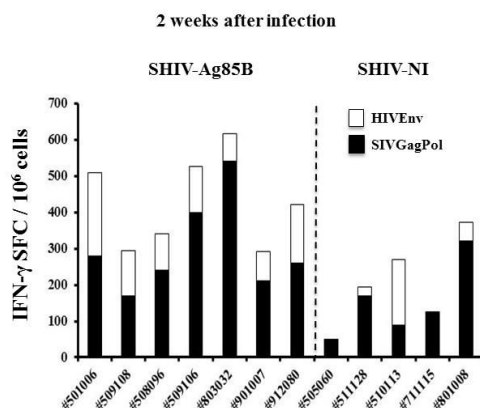


図 2. SHIV-Ag85B 接種後 2 週における IFN- γ 産生細胞数

SHIV89.6P 攻撃接種後の血漿中ウイルス量および CD4⁺T 細胞数。SHIV-Ag85B 接種カニクイザルに強毒株 SHIV89.6P の攻撃接種を行ったところ、攻撃接種 50 週後 7 頭中 6 頭で、血漿中のウイルス量を検出限界以下に抑え完全な制御がみられた (図 3)。

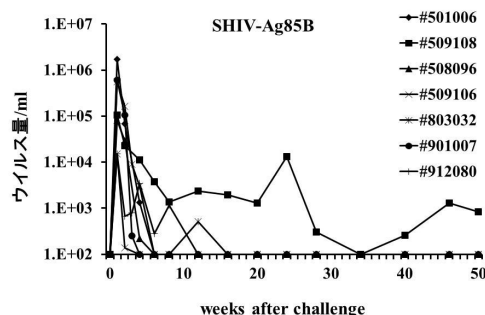


図 3. SHIV-Ag85B 接種サルにおける強毒株 SHIV 攻撃接種後のウイルス量

また、CD4⁺T 細胞数に大きな変化はなかった。一方、比較対象株として用いた SHIV-NI 接種カニクイザルでは、強毒株 SHIV の完全な制御個体は認められず、また接種後、徐々に CD4⁺T 細胞の減少が認められた。コントロールとして用いた Naïve カニクイザルでは、強

毒株 SHIV の高ウイルス血症を認め、CD4⁺T 細胞は、顕著な減少を確認した。組織中のプロウイルス量を検出するため、攻撃接種後 34 週目の PBMC DNA を用いて、デジタル PCR 法を行った。強毒株制御群 6 頭中 3 頭において、強毒株 SHIV プロウイルス量についても検出限界以下となった。強毒株非制御群では、強毒株 SHIV プロウイルスが全頭で検出された。

強毒株 SHIV89.6P 攻撃接種前後の細胞性免疫反応の解析。SHIV 強毒株 SHIV の制御個体について防御免疫反応を検討したところ、攻撃接種後、直ちにウイルス抗原特異的な IFN- γ 産生細胞が、ELISPOT 法によって確認された (図 4)。また、フローサイトメーターを用いて細胞内サイトカイン (IFN- γ 、TNF、IL2) 産生細胞の検出を行ったところ、IFN- γ と TNF を産生する CD8⁺T 細胞が多く検出された。これらの免疫反応は、ウイルス不検出と共に消失した。

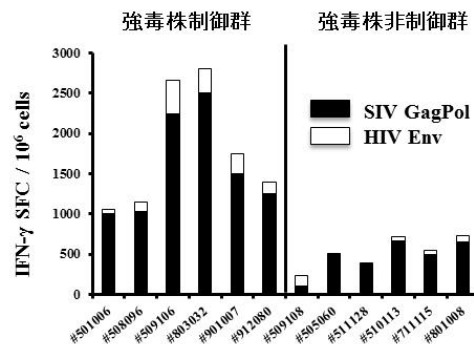


図 4. 強毒株接種後 2 週における IFN- γ 産生細胞数

一方で CD4⁺細胞における免疫反応は認められなかった。一方、強毒株非制御群において、上述した細胞性免疫反応は、強毒株制御群と比較して低値を示した (図 4)。

液性免疫を検討するため、ウイルス抗体価の測定を行ったところ、強毒株制御群および非制御群共に、ウイルス抗体価の検出を認めた。しかしながら、制御群の抗体価は、非制御群と比較して抗体価は低値を示した。これらの結果から強毒株制御の免疫反応は、細胞性免疫主体であることが推測された。

(2) 強毒株 SHIV 制御個体における生体内排除を検討した。ドナーとなる強毒株制御群 6 頭およびコントロールとして非制御群 3 頭について、強毒株接種後 150 ~ 200 週目に血液およびリンパ節を採取した。採取した細胞の一部より DNA を抽出し、デジタル PCR 法を用いて、強毒株 SHIV プロウイルスの検出を試みた。強毒株制御群では 6 頭中 2 頭でわずかに検出され、強毒株非制御群では全頭で検出された。制御群 6 頭および非制御群 3 頭より、それぞれ採取した細胞をレシピエント Naïve カニクイザル 9 頭に、それぞれ細胞移入を行った。強毒 SHIV 不検出であった制御

群 4 頭のドナーについて、レシピエント側の細胞においてもウイルスは、検出されなかった(図 4)。ドナーでわずかに検出された 2 頭については、レシピエントにおいても検出された。非制御群のドナーより細胞移入されたレシピエントでは、高ウイルス量が検出された(図 4)。

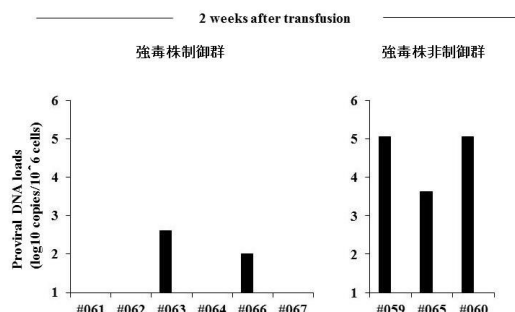


図 4. 細胞移入 2 週後における、レシピエント細胞内プロウイルス量

(3) *In vitro* における SHIV-Ag85B 感染リンパ球における初期免疫反応を検討したところ TNF- α の産生が認められ、産生量は SHIV-NI 感染リンパ球よりも高値を示した。その他のサイトカイン産生で有意な反応を認められなかった。

これら結果、強毒株 SHIV を制御した SHIV-Ag85B 接種サル 6 頭のうち、4 頭は細胞移入実験の結果、残存ウイルスの検出を認めず、生体内より排除されている可能性を示唆した。この排除を導く免疫反応を解析した結果、攻撃接種初期において、細胞性免疫の再誘導が確認され、これらの反応は、SHIV-Ag85B 接種に認められた反応時よりも数倍高い再誘導であり、また、ウイルスの消失と共に免疫反応は消失した。しかし、血漿中および細胞内の強毒株 SHIV を完全に制御した 4 頭と血漿中ウイルス量のみ制御した 2 頭との間で、細胞性免疫誘導能の差は認められなかった。一方、強毒株を制御できなかった 6 頭 (SHIV-NI 接種サル 5 頭および SHIV-Ag85B 接種サル 1 頭) より誘導された IFN- γ 産生細胞数は低値を示し、強毒株ウイルスの完全な制御には至らなかった。これらの結果、強毒株接種初期における強力な細胞性免疫反応の再誘導が、強毒株 SHIV の制御に重要であることが推測された。今後は、初期免疫反応で認められた TNF- α と細胞性免疫誘導への役割について検討したいと考えている。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡村 智崇 (OKAMURA Tomotaka)
国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所・霊長類医科学研究センター・研究員
研究者番号：20549703