

トピックス

3. エイズ根治に関する研究

岡村 智崇¹⁾, 保富 康宏²⁾

1) 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 主任研究員

2) 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 センター長

1. HIV ワクチンについて

1981年に米国でエイズ症例の最初の報告がなされて以降40年あまり経過したが、グローバルなHIV感染の拡大は続いている。世界では、3,800万人がHIVとともに生き、2021年には68万人がHIV/AIDSによって命を落とし、治療と予防の進歩にもかかわらず、2021年には約150万人が新規にHIVに感染している。HIV感染拡大の抑制は、国際的重要課題である。

2003年、初のHIVワクチンは、遺伝子組換えCHO細胞で産生されたHIVエンベロープ(Env)抗原を免疫活性化物質(アジュバント)とともに投与し、ウイルス中和抗体の産生を期待するコンポーネントワクチンだったが、第3相臨床試験の結果、感染防御効果がないことが報告された¹⁾。その後、HIV抗原を組み込んだDNAワクチンやウイルスベクター(アデノウイルスやワクシニアウイルス)ワクチンが開発され、それらを組み合わせたプライムブーストワクチンが開発された。2009年、タイで実施されたHIV Env蛋白ワクチンにHIV Env抗原等を発現するカナリアボックスウイルスベクターを併用したエイズワクチン臨床試験RV144が行われ、一時的ではあるが対照群と比較して30%程度の感染頻度の低下を示す結果が報告された²⁾。その後、RV144臨床試験と同じワクチンレジメンを用いて南アフリカで臨床試験が実施されたが、効果は認められず臨床試験は中止となった。

2. アジュバント発現弱毒エイズウイルスの開発

弱毒エイズワクチンは安全性に問題点を抱えているが、ワクチンとして期待された実績がある³⁾。エイズウイルスの*nef*遺伝子を取り除いたエイズウイルスは弱毒になることが知られている。この*nef*遺伝子欠損弱毒エイズウイルスは、遺伝子欠損によりウイルス複製能が低下したことで安全性が高まり、弱毒エイズ生ワクチンとして期待されたが、強毒株に対する感染防御効果がなく、ワクチンとしての効果は不十分であった。その後、遺伝子欠損部位にサイトカイン遺伝子を組み込んだサイトカイン遺伝子組み込み弱毒エイズウイルスが開発されたが、その効果についても十分な結果は得られなかった^{4,5)}。

近年、弱毒ワクチンや不活化ワクチンの免疫増強効果を高めるため、アジュバントの活用が検討されている。Ag85Bは非定型抗酸菌群由来の分泌タンパクであり細胞性免疫指向性のアジュバント活性を持ち、これまでにDNAワクチンの免疫増強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^{6,7)}。また、Ag85BはBCGの事前接種によってアジュバント効果を増強することがマウスモデルで報告されている⁶⁾。

本研究では*nef*遺伝子欠損弱毒エイズウイルス(SHIV-NI)にアジュバント分子Ag85Bを組み込んだアジュバント分子組み込み弱毒エイズウイルス(SHIV-Ag85B)を構築し、このウイルスの免疫応答および感染防御効果についてカニクイザルを用いて検討した⁸⁾。

3. SHIV-Ag85Bの構築

遺伝子組換え技術を用いて、SHIV-NIの*nef*遺伝子欠損部位にAg85B遺伝子を組み込んだAg85B発現弱毒エイズウイルス(SHIV-Ag85B)を構築した。構築したウイルスは、Western Blotting法を用いて、Ag85Bタンパクの発現を確認した。このウイルスはウイルス複製と共にアジュバント分子Ag85Bを発現するウイルスである(図1)。構築したSHIV-Ag85Bの*in vitro*でのウイルス複製能について、カニクイザルPBMCやリンパ球系細胞株を用いて検討し

連絡先

〒305-0843

茨城県つくば市八幡台1-1

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

TEL: 029-837-2081, 029-837-2053

E-mail: tomo-oka-0721@nibiohn.go.jp,

yasutomi@nibiohn.go.jp

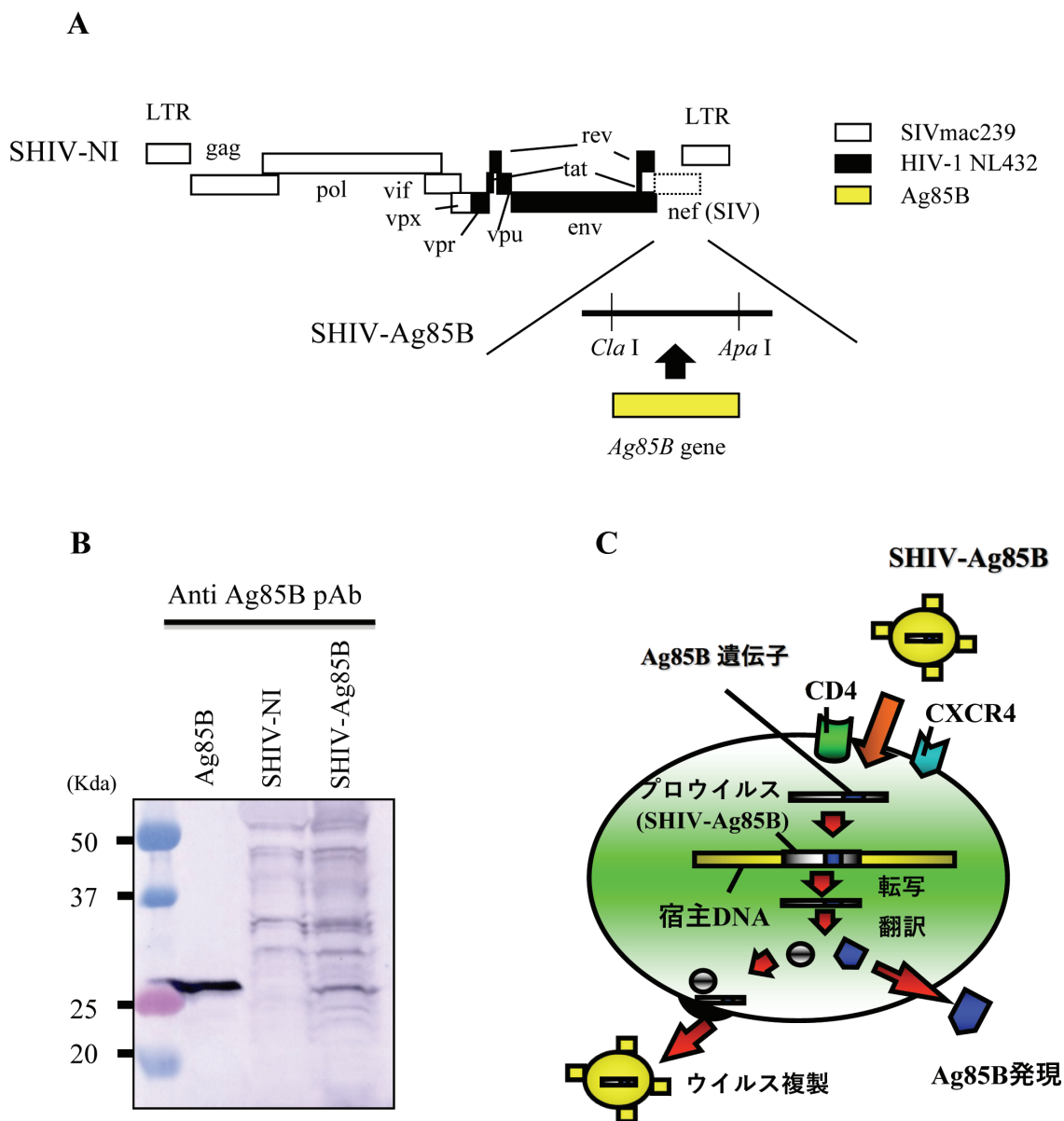


図1 アジュバント分子 Ag85B 発現弱毒エイズウイルスの構築. A. *nef* 遺伝子欠損弱毒エイズウイルスの遺伝子領域に Ag85B 遺伝子の挿入. B. Western blotting による Ag85B の発現. C. 感染細胞における SHIV-Ag85B 複製様式.

たところ、親株 SHIV-NI と同程度の複製能であることを確認した.

4. カニクイザルを用いた SHIV-Ag85B の免疫原性能の評価

SHIV-Ag85B の免疫誘導能を検討するため霊長類医学研究センターにて繁殖育成しているカニクイザルを用いて動物実験を行った. カニクイザルの静脈内より SHIV-Ag85B の接種を行ったところ、接種後 1 or 2 週においてウイルスピークを認めたが、接種後 4 週以降、血漿中のウ

イルス量が検出限界以下となった. また PBMC を用いたプロウイルスについては、接種後 8 週以降不検出であった. 一方、比較対象として用いた SHIV-NI 接種サルでは、接種後 12 週まで血漿中のウイルス量は検出され、プロウイルスは持続的に検出された. 一方で、CD4⁺T 細胞数については、全てのサルで大きな変化はなかった. SHIV-Ag85B 接種サルの細胞性免疫応答を解析したところ、接種後 2 週においてウイルス抗原特異的 IFN- γ 産生細胞数が強力に誘導されていることを確認した. また、これらの反応は接種後 8 週において減弱していることを確認した.

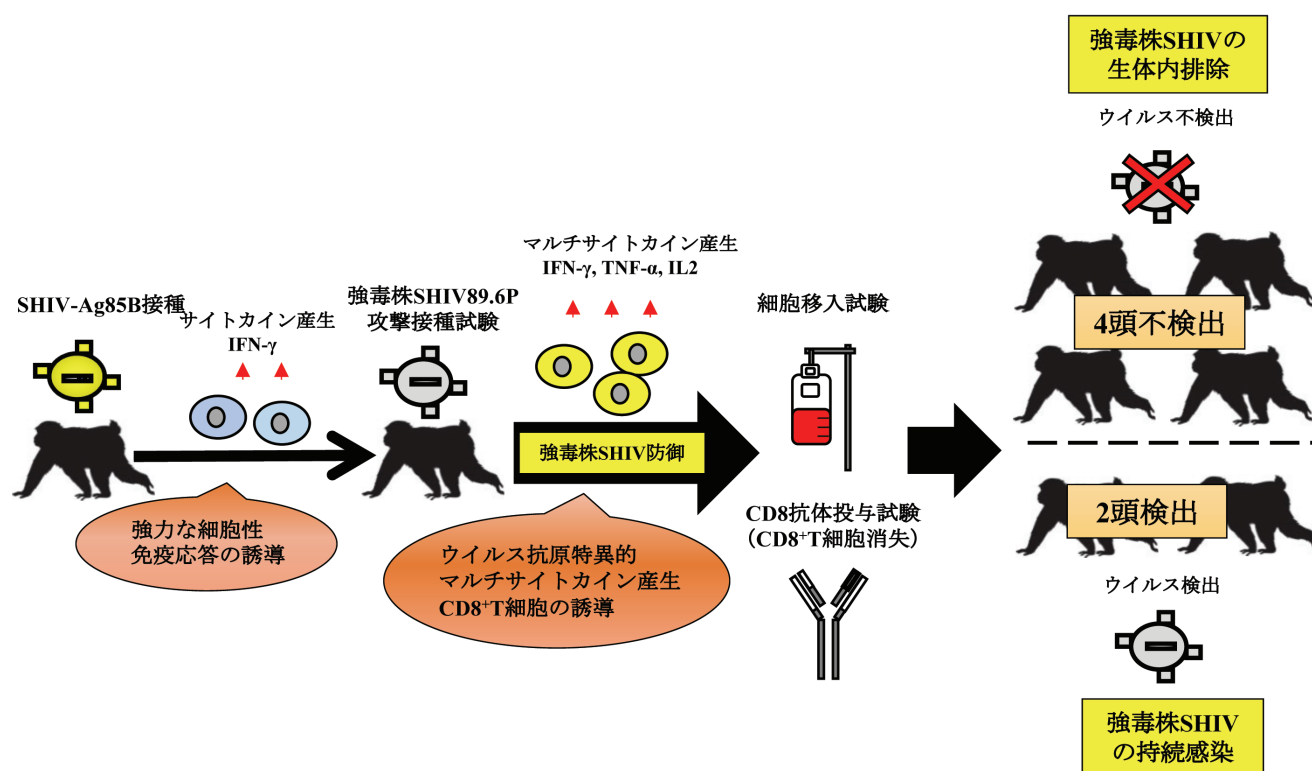


図2 SHIV-Ag85B 感染カニクイザルにおける細胞性免疫の誘導および強毒株 SHIV 防御効果の概要。

5. 強毒株 SHIV89.6P を用いた防御効果の検討

防御効果を解析するため、SHIV-Ag85B 接種後 37 週に強毒株 SHIV89.6P の攻撃接種試験を行った。SHIV-Ag85B および SHIV-NI をそれぞれ接種したカニクイザルに、強毒株 SHIV89.6P を静脈内より接種を行ったところ、全ての群において SHIV89.6P の感染が成立した。しかしながら、SHIV-Ag85B 接種サルでは、攻撃接種後 16 週以降、7 頭中 6 頭で血漿中のウイルス量は検出限界以下となった。また CD4⁺T 細胞数については大きな変化は認められなかった。一方で、SHIV-NI 接種サルでは、強毒株ウイルスを完全には制御できず、また CD4⁺T 細胞については減少傾向を認めた。次に PBMC および単径リンパ節における強毒株 SHIV のプロウイルスについてデジタル PCR 法を用いて詳細に検討したところ、攻撃接種後 36 週以降、SHIV-Ag85B 接種サルでは 7 頭中 4 頭が検出限界以下であった。一方で SHIV-NI 接種サルでは、すべてのサルで強毒株 SHIV のプロウイルスが検出された。強毒株に対する防御免疫応答を解析するため、液性免疫応答および細胞性免疫応答を解析した。SHIV-Ag85B 接種サルでは、強毒株を制御できなかった 1 頭において Env 抗体価の上昇を認めたが、他の 6 頭については中程度の反応を確認した。一方、SHIV-NI 接種サルでは、全てのサルで Env 抗体価の上昇を認めた。細胞性免疫応答について、攻撃接種後 0、

2、4、12 週の PBMC を用いて IFN- γ 産生細胞数を検討したところ、SHIV-Ag85B 接種サルは、攻撃接種後 2 週において極めて強い誘導を認め、その後、減少することを確認した。SHIV-NI 接種サルでは、攻撃接種 0 週にて、わずかな誘導を認め、その後、経時的な誘導を認めた。さらに詳細な T 細胞応答を解析するため、マルチサイトカイン産生 T 細胞の応答を解析したところ、SHIV-Ag85B 接種サルでは、攻撃接種後 2 週において抗原特異的マルチサイトカイン (IFN- γ , TNF- α , IL-2) 産生 CD8⁺T 細胞の強い誘導を確認した (図 2)。一方、マルチサイトカイン産生 CD4⁺T 細胞の誘導は認められなかった。SHIV-NI 接種サルにおいては、マルチサイトカイン産生 CD4⁺T 細胞および CD8⁺T 細胞の応答は確認されなかった。

6. 強毒株 SHIV 生体内排除機構の解析

これまでの研究で SHIV-Ag85B 接種サル 4 頭において、強毒株 SHIV プロウイルスが PBMC およびリンパ節において検出限界以下であることを確認した。そこで強毒株を制御した個体について強毒株の生体内排除を検討した。強毒株 SHIV を制御した 6 頭をドナーとし、健常カニクイザルをレシピエントに用いた細胞移入試験を実施した。ドナー 6 頭の血液およびリンパ節から分離したリンパ球細胞をレシピエント 6 頭に、それぞれ静脈内より細胞移入を実施し、強毒株 SHIV ウイルスの検出を試みた。細胞移入後、

レシピエント6頭中2頭において、血漿中に強毒株 SHIV ウイルスが検出された。この2頭は、すでにデジタル PCR 法にて強毒株 SHIV プロウイルスが検出された個体と同一であった。一方、4頭について、強毒株 SHIV ウイルスは不検出であった。

さらに、この6頭について CD8 抗体投与試験を実施し、血中の CD8⁺T 細胞を消失させる実験を実施した。CD8 抗体は攻撃接種後 252 週に皮下投与し、全てのサルで CD8⁺T 細胞の消失を確認した。強毒株 SHIV ウイルスについては、2頭のサルで血漿中にウイルスを検出した。一方、4頭のサルにおいて強毒株 SHIV ウイルスは不検出であった。これらの結果は細胞移入試験の結果と同一であった。

攻撃接種 264 週経過後、生存していた SHIV-Ag85B 接種サル6頭および SHIV-NI 接種サル2頭について安楽殺を実施し、リンパ臓器および腸管における強毒株 SHIV プロウイルスについてデジタル PCR 法を用いて検討した。すでに細胞移入試験や CD8 抗体投与試験においてウイルス不検出であった4頭について、脾臓、リンパ節、小腸、大腸において強毒株 SHIV プロウイルスは検出されなかった。一方、すでにウイルスが検出されていた個体について、各リンパ組織から強毒株 SHIV プロウイルスが検出された。これらの結果から、4頭のカニクイザルは、強毒株 SHIV ウイルスが生体内から完全に排除されている可能性が推測された。

7. まとめ

弱毒化した *nef* 遺伝子欠損弱毒エイズウイルスをモデルに、遺伝子欠損部位にアジュバント分子 Ag85B を組込んだ、Ag85B 発現弱毒エイズウイルスを開発した。開発したウイルスはカニクイザルに接種後、ウイルスに組み込んだアジュバント分子 Ag85B による細胞性免疫の増強効果を明らかにした。また、SHIV-Ag85B を接種したサル6頭は、強毒株 SHIV89.6P を制御し、さらに4頭において強毒株の生体内排除を確認した。制御した個体では、抗原特異的マルチサイトカイン産生 T 細胞応答の関連が推測された (図 2)。弱毒エイズワクチンは安全面の問題から、エイズワクチンとして利用されることは考えられないが、本研究をモデルとしてエイズウイルスの排除機構を解析することは、エイズ根治を目的とした新たな治療薬や治療用ワクチン開発の進展につながる事が期待される。

謝辞

本稿に関連し、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

参考文献

- 1) Flynn NM, Forthal DN, Harro CD, Judson FN, Mayer KH, Para MF; rgp120 HIV Vaccine Study Group. Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. *J Infect Dis* 191(5):654-65, 2005.
- 2) Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, Premisri N, Namwat C, de Souza M, Adams E, Benenson M, Gurunathan S, Tartaglia J, McNeil JG, Francis DP, Stablein D, Birx DL, Chunsuttiwat S, Khamboonruang C, Thongcharoen P, Robb ML, Michael NL, Kunasol P, Kim JH; MOPH-TAVEG Investigators. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med* 361(23):2209-20, 2009.
- 3) Wyand MS, Manson KH, Lackner AA, Desrosiers RC. Resistance of neonatal monkeys to live attenuated vaccine strains of simian immunodeficiency virus. *Nat Med* 3(1):32-6, 1997.
- 4) Shimizu Y, Miyazaki Y, Ibuki K, Suzuki H, Kaneyasu K, Goto Y, Hayami M, Miura T, Haga T. Induction of immune response in macaque monkeys infected with simian-human immunodeficiency virus having the TNF-alpha gene at an early stage of infection. *Virology* 343(2):151-61, 2005.
- 5) Shimizu Y, Inaba K, Kaneyasu K, Ibuki K, Himeno A, Okoba M, Goto Y, Hayami M, Miura T, Haga T. A genetically engineered live-attenuated simian-human immunodeficiency virus that co-expresses the RANTES gene improves the magnitude of cellular immunity in rhesus macaques. *Virology* 361(1):68-79, 2007.
- 6) Takamura S, Matsuo K, Takebe Y, Yasutomi Y. Ag85B of mycobacteria elicits effective CTL responses through activation of robust Th1 immunity as a novel adjuvant in DNA vaccine. *J Immunol* 175(4):2541-7, 2005.
- 7) Mori H, Yamanaka K, Matsuo K, Kurokawa I, Yasutomi Y, Mizutani H. Administration of Ag85B showed therapeutic effects to Th2-type cytokine-mediated acute phase atopic dermatitis by inducing regulatory T cells. *Arch Dermatol Res* 301(2):151-7, 2009.
- 8) Okamura T, Shimizu Y, Asaka MN, Kanuma T, Tsujimura Y, Yamamoto T, Matsuo K, Yasutomi Y. Long-term protective immunity induced by an adjuvant-containing live-attenuated AIDS virus. *NPJ Vaccines* 6(1):124, 2021.