

論文の内容の要旨

論文題目 サルエイズモデルによる組換えセンダイウイルスベクターワクチンの開発研究

指導教官名 俣野 哲朗 助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成8年4月入学

医学博士課程

病因病理学専攻

氏名：狩野 宗英

後天性免疫不全症候群（エイズ）を引き起こすヒト免疫不全ウイルス 1 型（HIV-1）に対するワクチンの開発は、緊急かつ重要な課題である。近年の多くの研究により、HIV-1 感染防御における細胞性免疫の重要性が指摘されている。有効なワクチン開発のため、どのようにして効率的な細胞性免疫の誘導を促すかに関心が集まっている。本研究では、組換えセンダイウイルス（SeV）ベクターのエイズワクチンへの応用の可能性を検討することを目的として、サル免疫不全ウイルス（SIV）Gag 蛋白を発現する SeV ベクター（SeV/SIVgag）を作製し、マカクサルモデルにおいて安全性と有効性の検討をおこなった。

培養細胞実験 (1) Gag p27 モノクローナル抗体を用いたイムノブロットティングと免疫蛍光染色とによって SeV/SIVgag 感染細胞における良好な Gag 蛋白の発現が確認された。

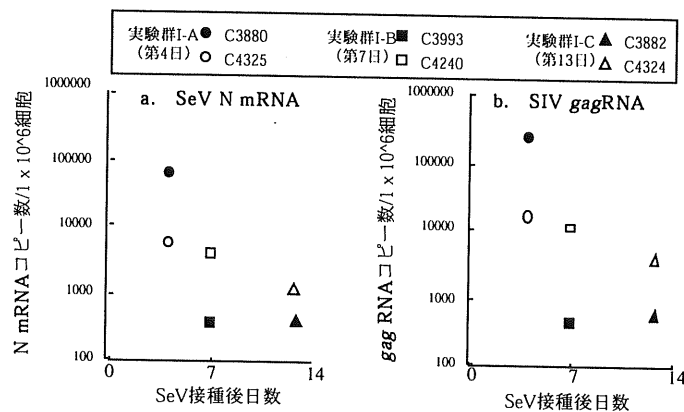
(2) SeV/SIVgag 感染細胞が、Gag 特異的 T リンパ球刺激能を有するかについて検討した。SIV 感染アカゲサルのリンパ球と SeV/SIVgag 感染 autologous B リンパ球 (B-LCL) を共培養することにより、Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球における interferon γ の誘導が確認された。

これらの培養細胞実験によって、SeV/SIVgag は抗原発現に優れ、Gag 特異的 T リンパ球刺激能を有することが示された。

動物（マカクサル）実験 サルにおける解析として、4つの実験をおこなった。

(1) 安全性検討の実験では、SeV 接種後の臓器分布を調べるために、6頭のカニクイサルに対して 10^8 CIU (cell infectious unit) の SeV/SIV_{gag} を1回経鼻接種し、接種後第4、7、13日に各2頭ずつ安楽殺解剖をおこなった。SeV 接種後、サルに特に異常所見は観察されなかった。鼻粘膜細胞サンプルにおける SeV N mRNA および gag RNA の定量的解析から、鼻腔における SeV の発現が示された (図1)。また後咽頭リンパ節と顎下リンパ節にも gag RNA の発現が認められた。しかし、他の組織からは、SeV の発現は認められなかった。RNA の定量解析から、SeV の複製は、鼻腔とその近傍リンパ節に局限し、1週間以内をピークとすると考えられた。

図1. SeV/SIV_{gag}接種マカクサルの鼻腔粘膜におけるベクター由来mRNAレベル



(2) SeV 接種後早期の免疫応答を調べるために5頭のアカゲサルに組換え SeV を1回経鼻接種した (SeV/control; 2頭、SeV/SIV_{gag}; 3頭)。SeV 接種後、サルに特に異常所見は観察されなかった。血漿中抗体価測定では、すべての動物において抗 SeV 抗体が第2週から検出可能となったが、抗 Gag 抗体は SeV/SIV_{gag} 接種群3頭を含めて検出レベル以下であった。抗原特異的 T リンパ球レベルの解析では、すべての動物において接種後第1週から高レベルの SeV 特異的 CD4 陽性 T リンパ球と SeV 特異的 CD8 陽性 T リンパ球が検出された (図2a)。SeV/SIV_{gag} 接種群3頭において Gag 特異的 CD8 陽性 T リンパ球の誘導も第3週から検出された (図2b)。以上の結果から、SeV/SIV_{gag} 感染は、SeV 特異的 T リンパ球の迅速な誘導によりコントロールされている可能性が示唆された。SeV 特異的 T リンパ球誘導が非常に強いにも関わらず、免疫に必要なレベルの Gag 特異的 T リンパ球も同時に誘導されることが明らかとなった。

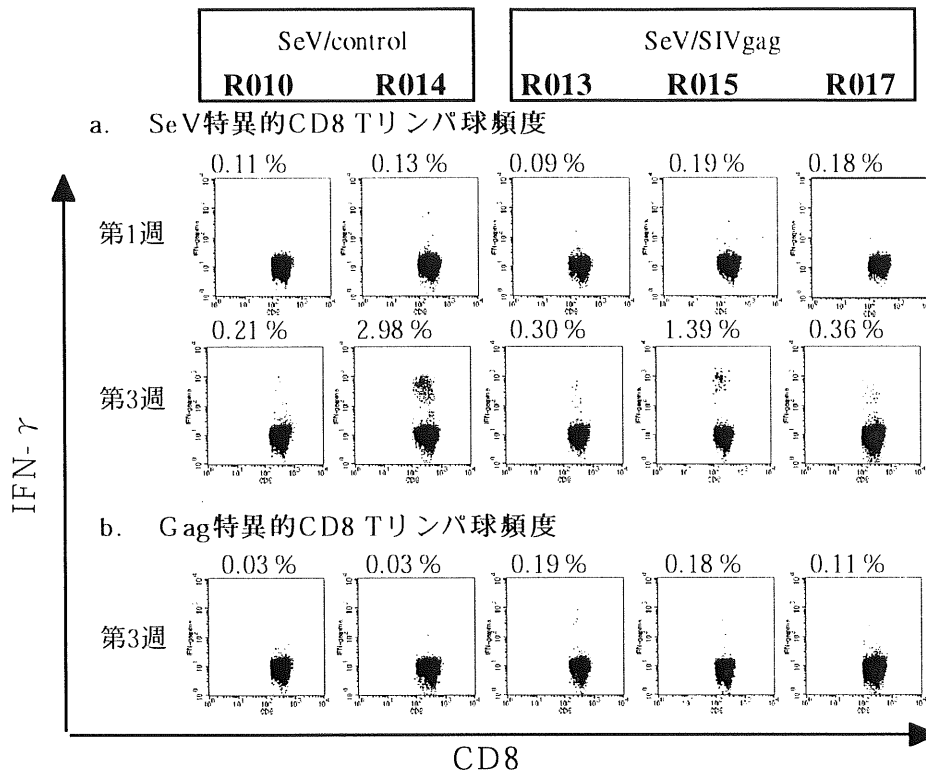


図 2. 組換えSeV接種後の抗原特異的CD8Tリンパ球誘導

SeV/SIVgag ワクチン接種による感染防御効果を検討するために、SIV/HIV キメラウイルス (SHIV) または SIV による攻撃感染実験をおこなった。

(3) 上記 (2) の 5 頭のアカゲサルに対して、SeV 接種後第 14 週に SHIV89.6PD (10 TCID₅₀) 経静脈接種をおこなった (図 3)。対照群 2 頭と比較して、SeV/SIVgag 接種群 3 頭のうち 2 頭では、set-point 期における血漿中 SHIV RNA 量の低下と、エイズ発症阻止が観察された。

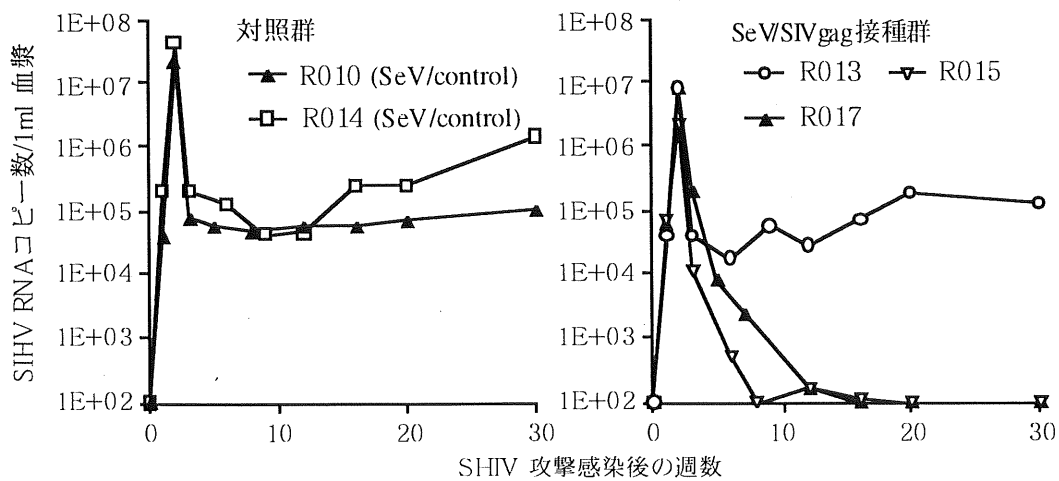


図 3. SHIV 攻撃感染後の血漿中 SHIV RNA コピー数の推移

(4) 4 頭のカニクイサルに対して SIVmac239 攻撃感染実験をおこなった (図 4)。SeV/SIV_{gag} 接種群 2 頭と対照群 2 頭 (SeV/control 接種 1 頭、SeV 未接種 1 頭) との 2 群に分け、SeV 未接種以外の 3 頭に対して 1×10^8 CIU の組換え SeV を 3 回 (第 0、4、14 週) 経鼻接種した。免疫開始後第 21 週までの経過観察では、SeV 接種を受けた 3 頭とも身体所見および末梢血所見に異常は観察されなかった。免疫開始後第 22 週に SIVmac239 経静脈接種 (100 TCID₅₀) を行った。対照群 2 頭と比較して、SeV/SIV_{gag} 接種群 2 頭では、set-point 期における血漿中 SIV RNA 量の低下が、また、そのうち 1 頭についてはエイズ発症阻止が観察された。ただし、SeV/SIV_{gag} 接種群の 1 頭については第 30 週以降 SIV 量の増加が認められた。

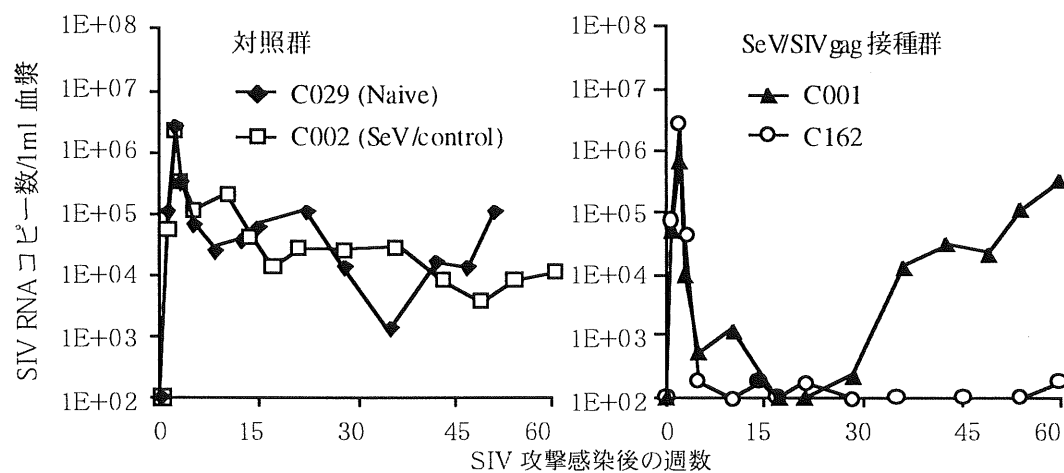


図 4. SIV 攻撃感染後の血漿中 SIV RNA コピー数の推移

以上のごとく、本研究では、組換え SeV ワクチンの有効性および安全性について、マカクサルエイズモデルにて検討した。Gag 発現 SeV 経鼻接種後、異常所見が認められなかったこと、ベクター発現が鼻腔近傍に限局されたこと、複製が迅速にコントロールされたこと、および迅速な SeV 特異的細胞性免疫反応を呈したことは、霊長類動物における組換え SeV ベクター接種の安全性を支持した。一方、Gag 発現 SeV 経鼻接種後 Gag 特異的 T リンパ球が誘導され、接種サルにおいて SHIV あるいは SIV 攻撃感染に対する感染防御効果が認められた。したがって、組換え SeV ワクチンシステムは、エイズワクチン戦略における有力な手法として期待される。