

論文の内容の要旨

論文題目 ワクチン接種およびウイルス感染によって誘導される抗 HIV 抗体応答の解析

氏 名 野村 柚仁

ヒト免疫不全ウイルス（HIV）は後天性免疫不全症候群（エイズ）を発症させるウイルスである。HIV は一度感染が成立すると体内でウイルスが複製・増殖し続ける慢性持続感染症である。今までに多くの抗 HIV 薬が開発され、エイズ発症阻止が可能となったが、現状では体内から HIV を排除できないことに加え、世界では毎年 150 万人近くが新規に感染しており、これ以上の感染拡大を防ぐことが重要である。早期診断・治療に加え、予防ワクチンの開発が切望されているが、HIV 感染防御に効果的な中和抗体の誘導は容易ではなく、HIV ワクチン開発は難航している。そのため、抗 HIV 中和抗体の誘導機序の解明は重要な課題である。

HIV 感染症においては、誘導される抗体の多くが中和能を有しておらず、中和抗体誘導効率が低いことが知られている。その一つの要因としては、中和抗体の標的となる HIV Envelope 蛋白質（Env）が、受容体結合部位等の機能ドメインに抗体がアクセスしにくい構造を有していることがあげられる。さらに、HIV は非常に多様であり、中和抗体に比較的感受性を有するものから抵抗性が高いものまで知られている。したがって、抗体誘導 HIV ワクチン開発においては、中和抗体抵抗性株を中和可能な抗体あるいは多様な HIV に対して防御能を有する広域交差性中和抗体の誘導が必要と考えられており、そのような中和抗体誘導に結びつく機序の解明は重要である。

このような有効な抗 HIV 中和抗体誘導機序の評価・解析のため、100 種類以上の代表的な HIV 株が、世界各地の HIV 感染者検体由来の血漿パネルに対する交差性にに基づき、中和感受性が高い tier 1 から、中和抵抗性の tier 2、さらに非常に抵抗性の tier 3 までカテゴライズされている。現時点での HIV ワクチン開発研究においては、tier 2 に対する中和抗体誘導法を確立することが当面の目標である。抗 HIV 中和抗体誘導に最適な抗原は確立されていないが、Env 三量体抗原は有望な抗原の一つとされている。このような抗原を考える際、中和抗体感受性株由来抗原と中和抗体抵抗性株由来抗原のいずれの可能性も考えられる。本研究は、中和抗体抵抗性株由来抗原の抗 HIV 中和抗体誘導能の検証を目的とした。

- (1) 中和抗体抵抗性 SIV 感染サルにおいて、免疫グロブリン遺伝子多型が中和抗体誘導に及ぼす影響の解析

先行研究において、中和抗体感受性 SIVsmH635FC を感染させたアカゲザルより、中和抗体感受性 SIV 株だけでなく、一部の中和抗体抵抗性 SIV 株に対する中和活性も持つ B404 という抗 SIV 中和抗体が単離された。B404 は抗体重鎖可変領域（Variable Heavy Chain、VH）に VH3.33 を有し、epitope と相互作用する第 3 相補性決定領域（Complementarity determining region 3、CDR3）のアミノ酸配列が 20 アミノ酸と長いことが特徴である。この中和抗体感受性 SIV 感染による B404 クラス抗体誘導については、germline VH3.33 の遺伝子多型に関連し、38 番アミノ酸が E、65 番アミノ酸が T である ET アレルを有する個体のみで認められることが見出された。本研究では、このような抗体遺伝子多型依存的な中和抗体誘導が、中和感受性株でなく、中和抗体抵抗性株である SIVsmE543-3 感染によっても生じるかどうかを解析した。

過去の研究で得られた SIV 感染アカゲサル 7 頭の血漿を用いた中和抗体価の測定と、B 細胞受容体（B Cell Receptor、BCR）遺伝子配列の解析を行った。7 頭中 5 頭が VH3.33 ET アレルを有していた。中和抗体感受性 SIVmac316、SIVsmH635FC に対する中和活性は全頭で認められたが、中和抗体抵抗性 SIVsmE543-3 に対する中和活性は VH3.33 ET アレルを持つ個体でのみ認められた。末梢血単核細胞（Peripheral Blood Mononuclear Cell、PBMC）およびリンパ節由来リンパ球の BCR の次世代シーケンス（NGS）解析では、先行研究で得られた B404 クラス抗体（参照配列）の B404 cluster に属する配列は、VH3.33 ET アレルを有する 5 頭にのみ認められた。本研究結果は、中和抗体感受性 SIVsmH635FC 感染だけでなく、中和抗体抵抗性 SIVsmE543-3 感染によっても VH3.33 遺伝子多型依存的 B404 クラス抗体誘導が認められることを示している（図 1）。

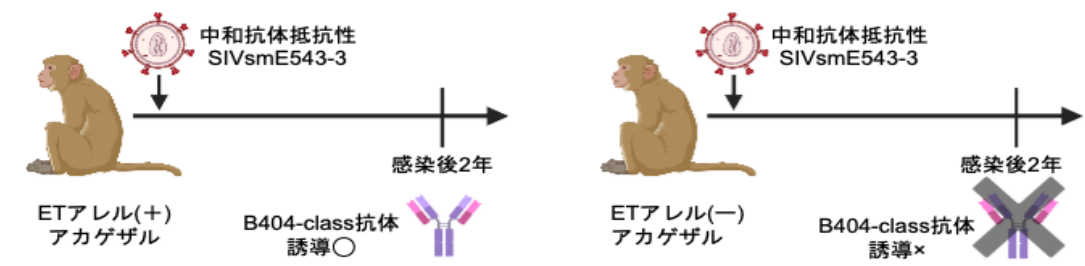


図 1 中和抗体抵抗性 SIVsmE543-3 感染における VH3.33_ET アレル依存的 B404 クラス抗体誘導解析

(2) 抗体誘導ワクチン接種後に SHIV 感染させた際に誘導される抗体の解析

所属研究室では、センダイウイルス（SeV）ベクターの粒子上に搭載される改変 HIV Env 抗原 EnvF を発現あるいは搭載する SeV ワクチンを第一世代型ワクチンとして開発した。先行研究において、このワクチンをカニクイザルに接種し、その後 HIV と SIV とのキメラウイルスであるサル・ヒト免疫不全ウイルス（SHIV）で中和抗体抵抗性株である SHIV AD8-EO を接種し、ワクチンによる感染防御効果を評価したが、ワクチン接種により有効な抗 SHIV AD8-EO 中和抗体は誘導されず、有意な感染防

御効果は得られなかった。このワクチンは中和抗体抵抗性株由来の EnvF 抗原を用いているが、本研究では、この実験で得られた SHIV AD8-EO 感染サルへの感染後 20 週までの凍結検体を用い、ワクチン接種が SHIV 感染後の抗体反応に及ぼす影響について解析を行った。

ELISA 法により HIV Env の gp120 に結合する抗体価を測定し、感染後の結合抗体価においてワクチン接種群とワクチン非接種群で比較したところ、感染後早期において、ワクチン接種群における結合抗体価は、非接種群と比較して有意に高値を示した。次に、中和抗体感受性株 SF162、BaL と中和抗体抵抗性株 AD8EO に対する中和活性を調べた。中和抗体抵抗性株に対する中和活性については、ワクチン接種群・非接種群とも認められなかった。一方、中和抗体感受性株に対する中和活性については、ワクチン接種群において非接種群より有意に高値を示した。本研究結果は、中和抗体抵抗性株由来の EnvF 抗原を用いたワクチンの、抗 HIV 中和抗体プライム能を示唆している（図 2）。

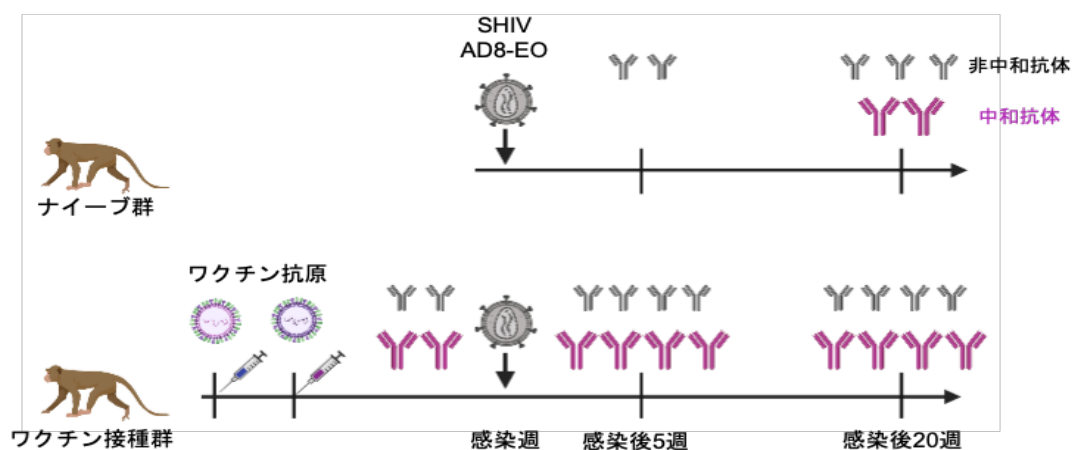


図 2 中和抗体抵抗性株由来抗原を用いたワクチンの中和抗体プライム効果の解析

(3) ウサギでのワクチンによる抗 HIV 中和抗体誘導研究

HIV の抗体誘導ワクチンの有用性を評価するモデル動物としてウサギはよく使用される。ウサギは、HIV チャレンジ実験等は困難であるものの、①解析に必要な血清採取が可能であること、②産生される抗体の CDR3 が長いこと等から、ワクチンの抗 HIV 中和抗体誘導解析に有用とされている。本研究では、ウサギにおいて、中和抗体抵抗性株由来抗原を用いたワクチンの抗 HIV 中和抗体誘導能を検討した。中和抗体抵抗性株の BG505 と AD8EO 由来の EnvF 抗原を発現する SeV ワクチンを用い、6 週ごとに 3 回経鼻接種した（図 3）。

ELISA 法による gp120 に対する結合抗体価の解析では、ワクチン接種群全個体で上昇が認められた。中和抗体抵抗性 BG505、あるいは中和抗体感受性 SF162 に対する中和抗体は 1/3 の個体で検出された。これらの個体では、BG505 に対する結合抗体が他の群よりも有意に早期に誘導された。本研究結果は、

中和抗体抵抗性株由来 EnvF 抗原を用いたワクチンの抗 HIV 中和抗体誘導能を示している。

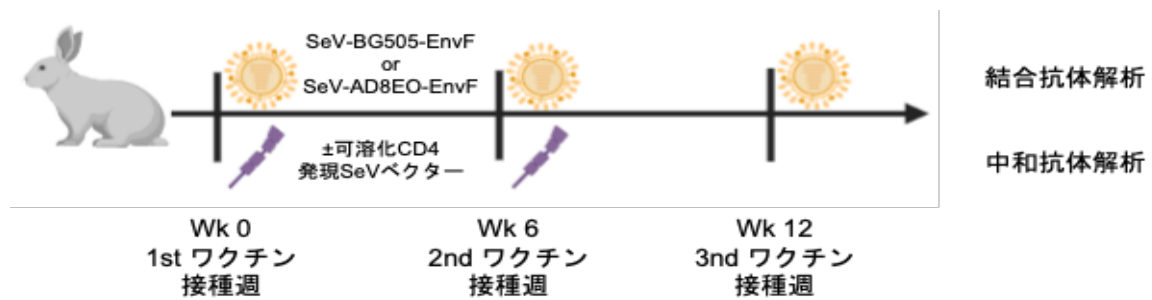


図3 中和抗体抵抗性株由来 EnvF 抗原を用いたワクチンによる抗 HIV 中和抗体誘導解析

以上、第一実験では、SIV 感染サル検体を用いた解析で、中和抗体の誘導効率が低い中和抗体抵抗性 SIV 株の感染でも、抗体遺伝子多型依存的に中和抵抗性 SIV 株に対する中和抗体が誘導されることを見出した。第二実験では、ワクチン接種後の SHIV 感染サル検体を用いた解析で、中和抗体抵抗性株由来の抗原を用いたワクチンの中和抗体プライム効果を示した。第三実験では、ウサギへのワクチン接種実験で、中和抗体抵抗性株由来の抗原を用いたワクチンの中和抗体誘導能を示した。本研究は、中和抗体抵抗性株由来 Env 抗原の中和抗体抵抗性株に対する中和抗体誘導能を示し、中和抗体誘導ワクチン抗原となりうることを示唆するものである。