

サルエイズモデルを用いたワクチン開発



エイズワクチンについて

- ・不活化ワクチン
- ・サブユニットワクチン
- ・ペプチドワクチン
- ・ライブベクターワクチン
- ・DNAワクチン
- ・弱毒生ワクチン（遺伝子欠失H I V－1）

生ワクチン以外は積極的に研究されているが、有効な感染防御効果は得られていない。

一般的に弱毒生ワクチンが効果的であるが、H I V－1の場合ヒトへの臨床応用が難しいことからあまり研究されてこなかった。

エイズワクチンについては、これまでに種々のワクチンが開発され、その内の幾つかは臨床試験も行われているが、今のところ有効な感染防御効果は得られていない。麻疹、ポリオ、天然痘など、他の感染症におけるワクチン研究の歴史の中で、感染防御効果の点で弱毒生ワクチンが最も効果的であることが示されてきたが、その本当の理由は未だにわかっていない。HIV-1については、動物モデルによる評価が難しいこと、プロウイルスが宿主のゲノム中に入り込んでしまうこと、そして変異がはげしく強毒変異をおこす可能性があること等から感染性を保持した生ワクチンの臨床応用は非現実的であり、あまり研究されてこなかった。

種々のSHIV感染実験結果の分類

	急性発症型	慢性感染型	非発症型
Peak height	10 ⁸ /ml以上	10 ⁷ ~10 ⁸ /ml	10 ⁷ /ml未満
Set point	10 ⁶ /ml以上	10 ⁵ /ml以下	検出限界以下
抗体反応	無し	有り	有り
CD4細胞数	激減し回復しない	一過性の減少後回復	殆ど変化無し
組織病変	顕著	弱い	殆ど認められず
	89.6P 10 ⁷ TCID ₅₀ 静脈内接種(10例以上)	89.6P 10 ⁵ TCID ₅₀ 腹腔内3回接種(2例)	
		89.6P-分子クローン64 10 ² TCID ₅₀ 静脈内接種(2例) 10 ⁵ TCID ₅₀ 静脈内接種(2例)	
	KU-2 10 ⁵ TCID ₅₀ 静脈内接種(1/2例)	KU-2 10 ⁵ TCID ₅₀ 静脈内接種(1/2例)	KU-2 10 ⁷ TCID ₅₀ 静脈内接種(2例)
			NM-3rN 10 ⁵ TCID ₅₀ 静脈内接種(5例以上) 10 ⁷ TCID ₅₀ 静脈内接種(5例以上)

種々のSHIVの接種実験結果。我々の研究室で行った種々のSHIVの感染実験結果を分類すると、非常に病原性の強い劇症型、慢性経過をたどるもの、そしてほとんど病原性が認められないものとに分類できる。そして、同じウイルスでも接種ルートや接種量によって結果が異なるが、SHIV-NM-3rNは、10の5乗TCID₅₀という非常に高い力価のウイルスを静脈内に接種してもほとんど病原性が認められなかった。具体的に言うと、

(1) アカゲザルに感染後3年以上にわたる経過観察により病原性を示す臨床症状（CD4陽性細胞数）や病理組織所見（リンパ節における病変及びアポトーシス）が得られなかった。

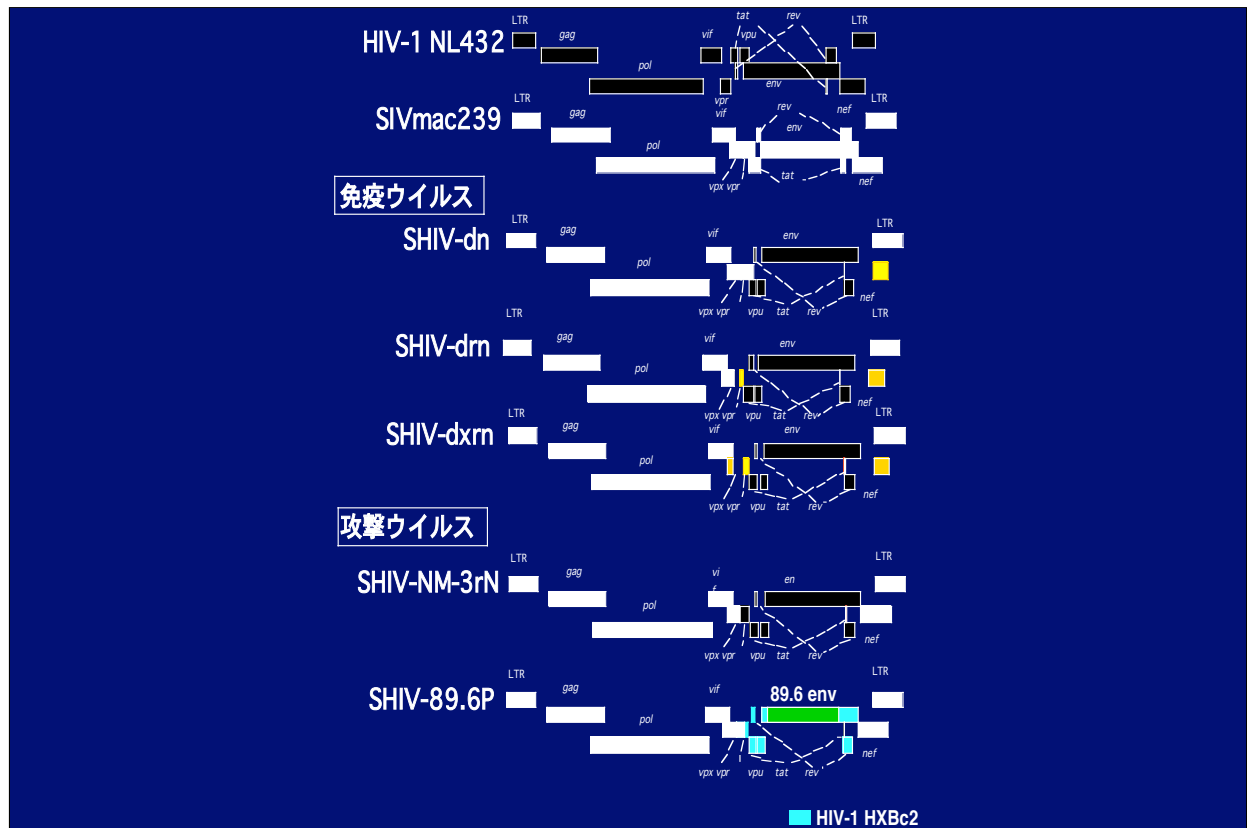
(2) 新生仔ザル（2頭）への実験感染および垂直感染（1頭）例において、1年以上の経過観察で発症しなかった。

(3) 5代にわたるサル個体継代を行ったところ、若干の増殖性の上昇が認められたものの強毒株への変異は観察されなかった。

遺伝子欠失SHIVの抗エイズ弱毒生ワクチンとしての可能性

1. 弱毒HIV-1ワクチンと異なり、サルを用いてワクチン効果や安全性を評価できる。
2. HIV-1 Envに対する免疫を誘導できる。
3. 遺伝子欠失SHIVは生ワクチンであり、特異的、非特異的防御機構双方を動員し、効果的に感染を防御できる。
4. 弱毒HIV-1と異なり、遺伝子欠失SHIVの親株は、非病原性であり、復帰変異による強毒化はなく、より安全である。

このようなことからSHIV-NM-3rNをベースとした遺伝子欠失SHIVの弱毒生ワクチンとしての可能性を考えた。



生ワクチンの実験に用いたウイルスの遺伝子構造を示す。ワクチン株のベースとなったSHIV-NM-3rNから病原性に関係が深いとされている*nef*遺伝子を欠失させたSHIV-dn、*nef*に加えて*vpr*遺伝子を欠失させたdrn、そしてさらに*vpx*を欠失させたdxrnをワクチンウイルスとして作製した。攻撃ウイルスとしては、親株であるSHIV-NM-3rNと、NM-3rNとは抗原性のことなる*env*遺伝子を持つ強毒株SHIV-89.6Pを用いた。

実験スケジュール

SHIV-dn

Vaccination
SHIV-dn
(10^5 TCID₅₀)



0 weeks

Challenge
NM-3rN
(100 TCID₅₀)



53 weeks

SHIV-drn and SHIV-dxrn

Vaccination

SHIV-drn or dxrn
(10^5 TCID₅₀)



0 weeks

SHIV-drn or dxrn
(10^7 TCID₅₀)



68 weeks

Challenge
NM-3rN
(100 TCID₅₀)



112 or 118 weeks

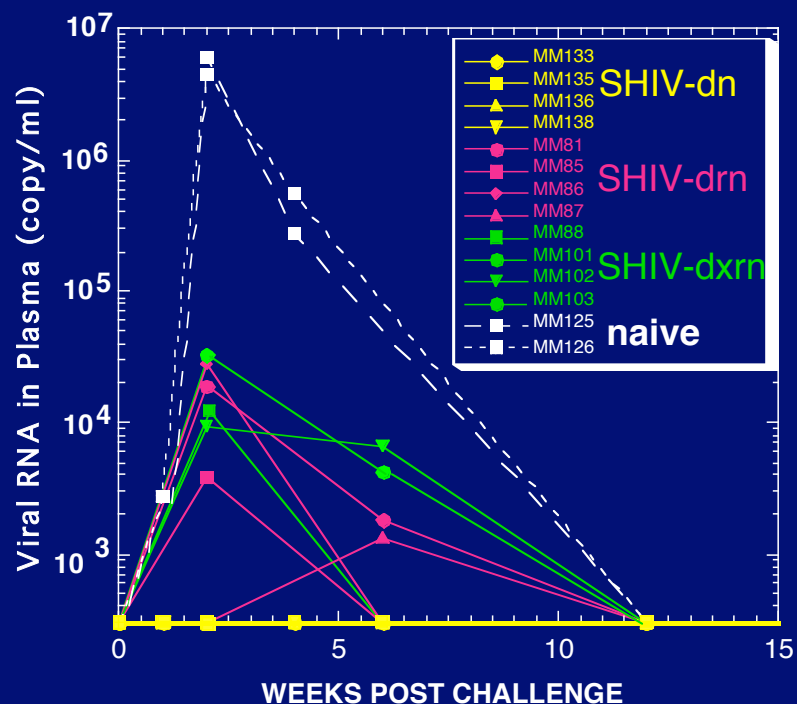
実験スケジュールを示す。dnは 10^5 TCID₅₀をワクチン接種し、53週後にSHIV-NM-3rNを100TCID₅₀攻撃接種した。drnとdxrnは、 10^5 TCID₅₀接種後、68週でさらに 10^7 TCID₅₀追加接種し、最初のワクチン接種から112ないし118週後に攻撃接種した。

ワクチン接種サルウイルス学のおよび免疫学的状況

ワクチン ウイルス	サル	ウイルス分離	抗NM-3rN 中和抗体	CTL活性		NK 活性
		2週（攻撃接種前）		HIV-1 Env	SIV Gag	
SHIV-dn	MM 133	+ (-)	40	24.8	0	29.6
	MM 135	+ (-)	< 20	5.8	9.4	1.4
	MM 136	+ (-)	20	17.8	17.7	18.2
	MM 138	+ (-)	< 20	0	0.6	13.3
SHIV-drn	MM 81	+ (-)	1024	6.8	0	20.4
	MM 85	+ (-)	< 20	11.1	27.6	6.0
	MM 86	+ (-)	< 20	11.7	0	25.8
	MM 87	+ (-)	< 20	32.0	0	19.2
SHIV-dxrn	MM 88	- (-)	20	13.0	28.8	19.2
	MM 101	- (-)	< 20	4.7	0	25.4
	MM 102	- (-)	< 20	9.2	8.5	17.4
	MM 103	- (-)	20	0	13.8	45.7

ワクチン接種サルウイルス学のおよび免疫学的状況を示す。dnとdrnは、接種後2週目に一過性にワクチンウイルスが分離されたが、その後は全く分離されなくなった。dxrnについては、全くウイルスが検出されなかった。免疫学的には、液性免疫として中和抗体、細胞性免疫としてCTL活性、NK活性がそれぞれ認められた。

Plasma virus loads after SHIV-NM-3rN challenge



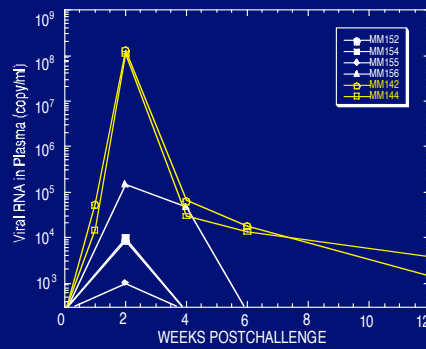
SHIV-NM-3rN攻撃接種の結果を示す。白のラインが免疫していないサルにおける血漿中ウイルス量の推移である。SHIV-dnワクチンサルでは、黄色のラインで示すようにウイルスは全く検出されなかった。drn、dxrnについては、完全防御はされなかったが、ピーク時のウイルス量が非ワクチンサルに比べ1/100～1/1000であり、感染抵抗性を示した。この他、末梢血単核球やリンパ節でのPCRやウイルス分離などで、SHIV-dnがSHIV-NM-3rN攻撃接種を完全防御したことが確認された。

SHIV-dnは親株であるSHIV-NM-3rNに対する免疫は誘導したが、異なるEnvを持つSHIV-89.6Pに対する免疫は誘導しなかった

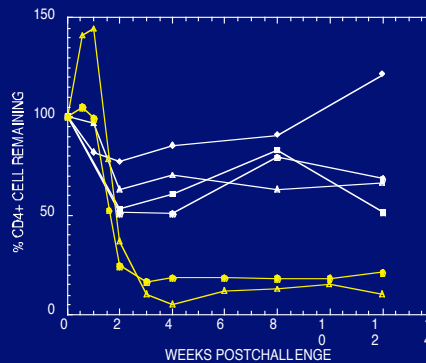
ワクチン ウイルス	サル	ウイルス 分離	中和抗体		CTL		NK cell activity
			3rN	89.6P	3rN Env	89.6P Env	
SHIV-dn	MM 152	+[⁻]	40	-	14.2	3.08	1.0
	MM 154	+[⁻]	-	-	4.9	-	8.3
	MM 155	+[⁻]	20	-	-	-	4.5
	MM 156	+[⁻]	-	-	14.5	1.4	2.9

別の実験で、SHIV-dnワクチンサル4頭についてSHIV-NM-3rNとSHIV-89.6Pに対する中和抗体、CTL活性を調べたところ、SHIV-NM-3rNに対する免疫反応は検出されたが、envの抗原性の異なるSHIV-89.6Pに対する免疫反応は検出されなかった。

SHIV-dn免疫ザルはSHIV-89.6Pの感染に抵抗性を示した



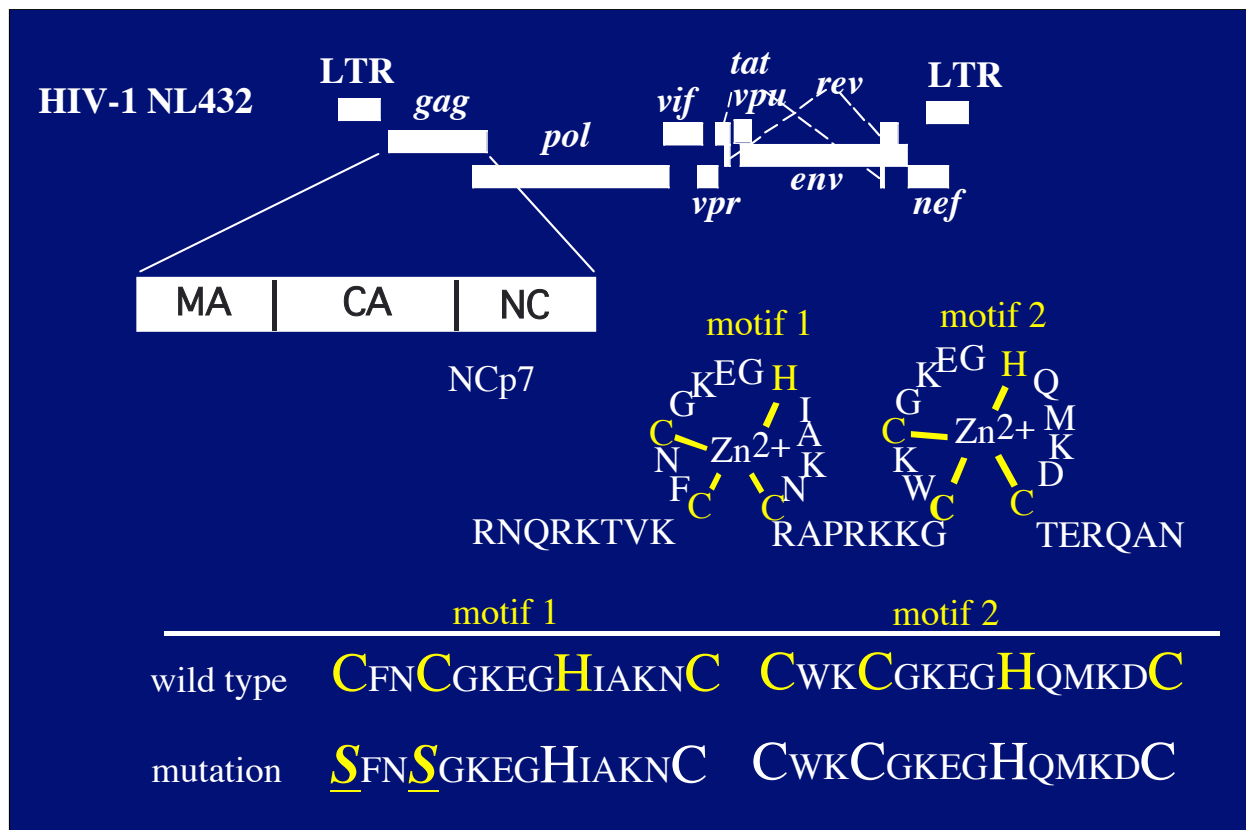
SHIV-dnはCD4陽性細胞の減少を抑制した



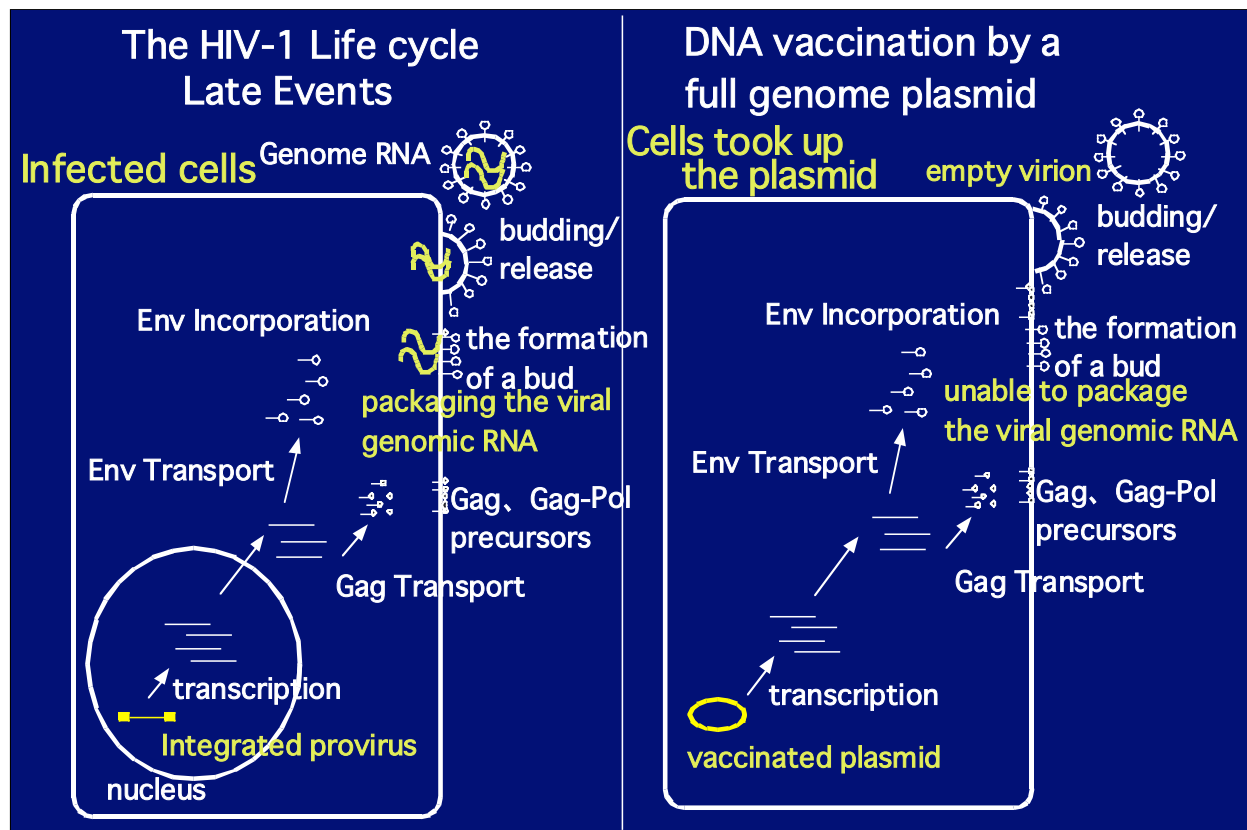
このサルに、SHIV-89.6Pを攻撃接種したところ、黄色で示すワクチン接種していないサルに比べて、白で示すSHIV-dnワクチン接種サルでは、感染を完全には防御しなかったが、かなり低くウイルス増殖を抑えた。また、SHIV-89.6Pは強毒株であり、ワクチン接種していないコントロールサルでは末梢血中のCD4陽性細胞が急激に減少し、劇症エイズを発症するが、SHIV-dnワクチンサルでは、CD4陽性細胞は殆ど減少せずエイズも発症しなかった。

まとめ

1. SHIV-アカゲザルを用いた抗HIV-1ワクチンの感染防御効果の評価系を確立した。
2. nef欠損SHIV(SHIV-dn)ワクチンは、接種ザルにHIV-1 Envに対する免疫を含む液性及び細胞性免疫を誘導した。
3. SHIV-dnワクチンは、同じHIV-1 Envを持つSHIV NM-3rNの感染を完全に防御した。
4. SHIV-dnワクチンは、抗原性の異なるSHIV-89.6Pの感染を完全には防御しなかったが、感染抵抗性を付与した。
5. SHIV-dnワクチンは、強毒SHIV-89.6PによるCD4陽性T細胞の減少を押さえたことから、感染を完全に防御出来なくとも発症を抑制できる可能性が示唆された。

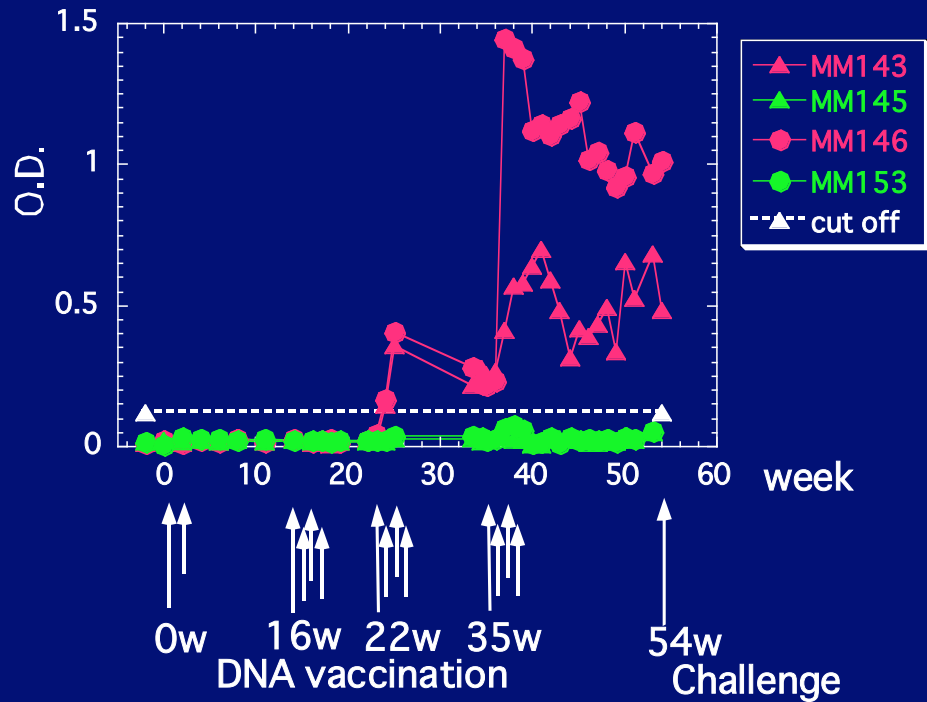


生ワクチンの感染防御効果については確認されたが、やはり安全性の確認という点で問題が残る。そこで、安全性を確保したプロウイルスDNAプラスミドによる半生DNAワクチンの研究について紹介する。ウイルスの複製サイクルにできるだけ近い状態で、しかし、安全性を確保するためにウイルスのgag遺伝子にコードされるヌクレオキャプシドのアミノ末端側のzinc finger motifの部分に変異を導入し、ゲノムRNAを取り込むことが出来ないようにしたHIV-1のプロウイルスDNAプラスミドを構築した。



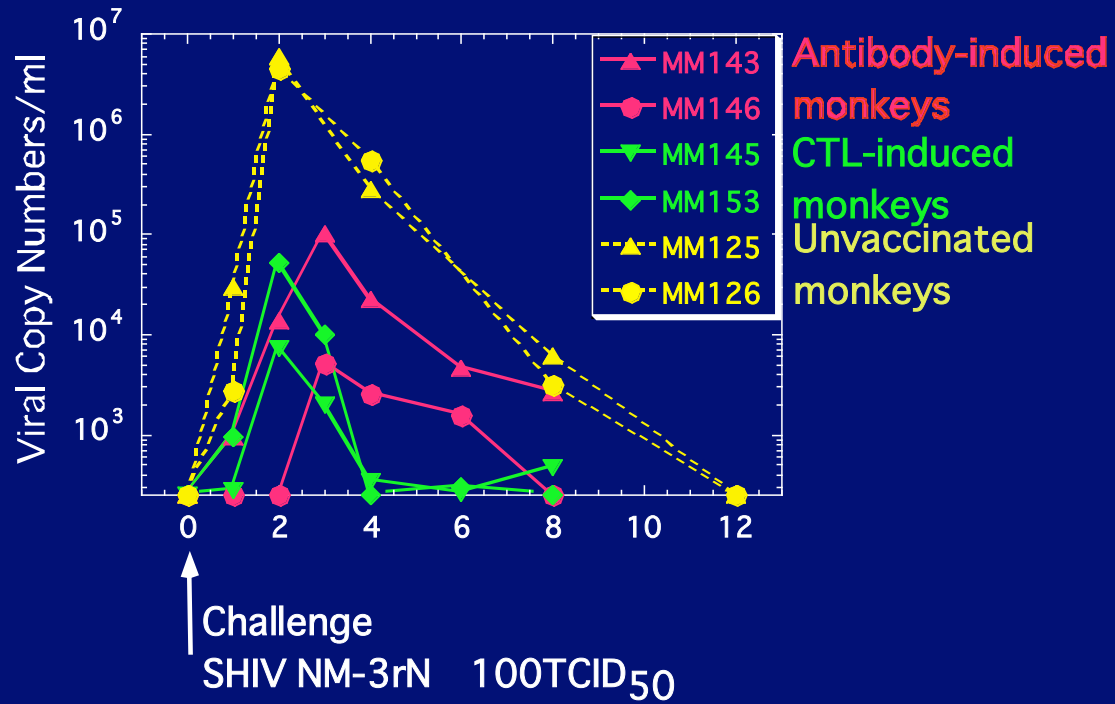
生ワクチンの場合は、感染後インテグレーションされたプロウイルスDNAから、左側に示した過程を経て感染性のウイルス粒子が放出される。ゲノムRNAを取り込むことが出来ないようにgag遺伝子変異を導入したプロウイルスDNAから放出される空のウイルス粒子は感染性を持たない。

Antibody responses in the vaccinated monkeys

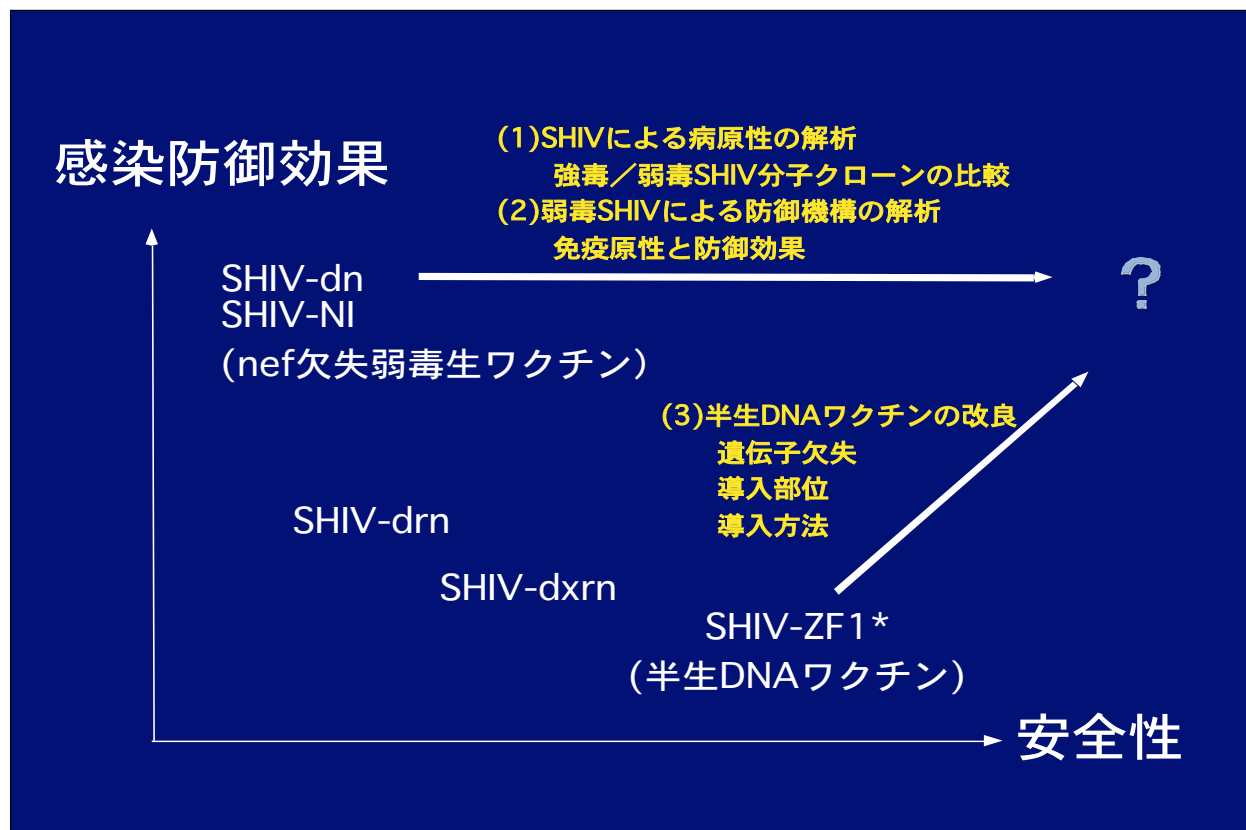


このプロウイルスDNAをアカゲザル4頭にそれぞれ1回あたり500マイクログラムを40週間に計14回筋肉内接種した。4頭中2頭で抗体反応が認められた。他の2頭は、抗体は上昇しなかったが、HIV-1のenvやgagに対するCTL反応が検出された。攻撃接種は、54週目にSHIV-NM-3rNで行った。

Plasma viral load



SHIV-NM-3rN攻撃接種の結果を示す。感染を完全には防御できなかったが、免役してないサルに比べて1/100から1/1000のウイルス量に抑制できることがわかった。



SHIV-dnによる弱毒生ワクチンは感染防御効果は充分であるが、感染性を保持しているため安全性に問題がある。半生DNAワクチンは、非感染性なので安全性はある程度確保されているが、まだ、防御効果は十分とは言えないし、さらに安全性を高める工夫も必要である。そこで、今後は、生ワクチンの防御効果を保持しつつ安全性を確保するために、以下のアプローチを考えている。

(1) 強毒／弱毒SHIV分子クローンの詳細な比較解析によりSHIVの強毒性／弱毒性について見極める。

(2) 弱毒生ワクチン接種サルや、種々のゲノム改変SHIV接種サルについて詳細に解析し、ウイルスの増殖制御に真に重要な免疫機構を解明する。

(3) 半生DNAワクチンについて、構造改変や、投与方法、アジュバント等を検討し、免疫誘導能、感染防御効果、安全性を高める。

以上の研究は、サルエイズモデルを用いることによって可能であり、安全で効果的なエイズワクチン開発へ向けて有益な基礎情報が得られるものと期待される。