

氏名	ほり うち れい い 堀 内 励 生
学位(専攻分野)	博 士 (人間・環境学)
学位記番号	人 博 第 321 号
学位授与の日付	平成 18 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	人間・環境学研究科 関連環境学専攻
学位論文題目	Development of DNA vaccine using full genome plasmids which produce non-infectious virus particles (非感染性ウイルス粒子を産生するフルゲノムプラスミドを用いた DNA ワクチンの開発)
論文調査委員	(主 査) 教授 速水正憲 教授 津田謹輔 教授 小松賢志

論 文 内 容 の 要 旨

HIV 感染は CD4 陽性 T 細胞数を減少させることにより、免疫能を低下させ、後天性免疫不全症候群 (AIDS) を引き起こす。現在効果的なエイズの治療薬が開発されているが、高価なことから発展途上国の貧しい人々は治療を受けられないのが現状であり、安価で効果的な抗エイズワクチンの開発が待ち望まれている。しかしながら、世界中の研究者がその開発研究に鋭意、取り組んでいるものの、現在、難航している。

このような状況下、申請者の属する研究室は、HIV とサル免疫不全ウイルス (SIV) とのキメラウイルス (SHIV) のフルゲノムプラスミドを用い弱毒生ワクチンの開発研究を行ってきている。本研究では、生ワクチンの有効性を保持し、より安全性を高める為に、非感染性粒子を産生する SHIV フルゲノムプラスミドを用いた DNA ワクチン開発の研究を行った。この DNA ワクチンの特徴は、ウイルスの *gag* 遺伝子の Zn finger motif に変異を導入されている為に、ウイルスゲノム RNA が産生粒子中に取り込まれず、空の非感染性ウイルス粒子が産生されることである。しかもこの DNA プラスミドは全てのウイルス蛋白を細胞表面から抗原提示する為に、生ワクチンと同様に強い防御効果が期待される。

本研究では、より安全性を確保する為に *gag* 変異導入プラスミドから病原性に関与する *nef* 遺伝子を欠損させたプラスミド (pSHIV NI ZF1*) を作製し、DNA ワクチンのベースとした。Part I では、免疫増強の為に *nef* 欠損領域にヒト IL-2 遺伝子を組み込んだプラスミド (pSHIV ZF1* IL-2) を作製し、マカク属サル動物モデルを用いてそのワクチン効果を検討した。pSHIV ZF1* IL-2 を 4 頭のアカゲザルに計 4 回筋肉内と皮下に接種したところ、4 頭中 1 頭でワクチン接種後 2 週目からウイルスの内部蛋白の Gag に対する抗原特異的細胞増殖活性が検出されはじめ、その後、攻撃接種時まで高い値を示した。ついでワクチン初回接種から 11 週目にウイルスの外被蛋白 (Env) の抗原性の異なる強毒ウイルスを用いて静脈内より攻撃接種し、感染防御効果を検討した。その結果、攻撃接種に使用した強毒ウイルスを接種された非免疫ザルでは、血中ウイルス RNA 量が高く維持され、感染後早期に CD4 陽性 T 細胞数が急激に減少した。それに対してワクチン接種ザル全 4 頭では攻撃ウイルス量はピーク時で非免疫ザルに比べ 1/10-1/100 であり、その後も早期に検出限界以下に抑制された。そのうち 1 頭では CD4 陽性 T 細胞数の減少が認められなかった。

このように、完全な感染防御効果は得られなかったものの、pSHIV ZF1* IL-2 の免疫により、Env の抗原性の異なる強毒ウイルスに対して防御効果が得られることが示された。

Part II では、HIV の主感染経路が経粘膜であることから、強い粘膜免疫を誘導する為に、pSHIV NI ZF1* を包埋した坐薬を作製して、その免疫誘導・防御試験を行った。まず始めに行った実験 1 では、4 頭のアカゲザルに計 14 回、pSHIV NI ZF1* を包埋した坐薬 DNA ワクチンを投与し、うち 2 頭には併せて pSHIV NI ZF1* を筋肉内と皮下に接種した。その結果、免疫ザル全 4 頭の末梢血リンパ球で細胞性免疫の指標となるウイルス Gag 抗原に対する特異的細胞増殖活性が認められ、そのうち 3 頭ではインターフェロン (IFN- γ) 産生細胞 (ELISPOT) が誘導された。しかしながら、Env の抗原性が同じウイルスを用いた経静脈からの攻撃接種に対しては、血中ウイルス RNA 量が非免疫ザルと同程度であったことから、

誘導された免疫がウイルス増殖の抑制に不十分であることが示された。そこで実験1の結果を踏まえて行った実験2では、pSHIV NI ZF1*を包埋した坐薬のみとし、接種回数を14回から4回に減らし、ワクチン投与の間隔をあける改良を行った。その結果、免疫ザル全4頭でGagに対する強い細胞増殖活性反応がみられ、うち3頭では弱いながらもEnvに対する細胞増殖活性が誘導された。さらに、うち1頭の免疫局所でEnvに対する抗体が誘導された。ワクチン接種後16週目に、経直腸でEnvの抗原性の異なる強毒ウイルスを用いて攻撃接種したところ、全4頭で初期のウイルス増殖とCD4陽性T細胞数減少の抑制がみられた。このことから、pSHIV NI ZF1*を包埋した坐薬は細胞性免疫と液性免疫を共に誘導可能であるが、ウイルスの感染増殖を完全に抑制するには不十分であることが示された。

以上の結果より、*nef* 遺伝子を欠損させたSHIVのDNAフルゲノムプラスミドをDNAワクチンのベースとして用いる可能性があることが示された。今後、その有効性の増強の為に投与方法やブースターのさらなる検討が必要であるとしている。

論文審査の結果の要旨

いまだなお世界中に拡大しつつあるHIV感染を予防する有効なワクチンは未だ開発されていない。申請者の属する研究室はウイルスワクチンの開発史上、最も効果があるとされる弱毒生ワクチンの開発研究を行っている。今迄に、サル免疫不全ウイルス(SIV)をベースとしたHIVとのキメラウイルス(SHIV)を用いることにより、有効かつ安全な弱毒生ワクチン開発にサルを用いた実験室レベルで成功している。しかしヒトへの応用にあたっては、安全性についてさらに万全を期さねばならない。そこで申請者は、生ワクチンとしての有効性を維持して、より安全性を高める為に、非感染性ウイルス粒子を産生するDNAワクチン開発の研究を行ってきた。このDNAワクチンのねらいは、感染性ウイルス粒子の産生に重要な*gag*領域の*zinc finger motif*に変異を導入することで、産生されたウイルス粒子中にウイルスゲノムRNAが取り込まれず、空粒子を産生させることにより安全性を確保することである。一方、ウイルスの全ゲノムプラスミドを用いることにより生ワクチンと同様に全てのウイルス蛋白が細胞表面から抗原提示されることから、生ワクチンと同様な強いワクチン効果が期待された。

本論文はPart IとPart IIから成り立っており、いずれも非病原性SHIVから病原性に関与するとされている*nef*遺伝子をさらに欠損させた弱毒生ワクチン候補株に*zinc finger motif*変異を導入したフルゲノムプラスミドをDNAワクチンのベースとして使用している。まず始めにPart Iでは、*nef*遺伝子を欠損させた領域にヒトIL-2遺伝子を組み込んで免疫原性を高めることを試みている。作製したプラスミドpSHIV ZF1* IL-2をアカゲザル4頭に接種したところ、その半数で抗原特異的細胞増殖活性が誘導されて、強い防御効果が期待された。そこで、強毒ウイルスを静脈内より攻撃接種し、ワクチンとしての効果を検討したところ、ワクチン接種ザル全頭で血中の攻撃ウイルスRNA量が非免疫ザルに比べ抑制された。しかしながら、エイズの主徴とされているCD4陽性T細胞数の減少を4頭中3頭で抑制できなかった。一方、非免疫ザルでは高い血中ウイルスRNA量が持続して感染後早期にCD4陽性T細胞数が減少した。このように、pSHIV ZF1* IL-2免疫により強毒ウイルスに対して完全でないながらも防御効果がみられた。このことは今迄に他研究室から報告されたDNAワクチンの成功例はブースター(蛋白による追加免疫)が必要であったことを考えると、大きな前進と評価できる。Part IIにおいては、より効果を高める為にDNAワクチンの新しい投与方法の開拓を行っている。すなわち、HIV感染は主に経粘膜であることから、特に粘膜局所に有効な免疫を誘導する為に坐薬を用いることを試みている。*nef*遺伝子欠損pSHIV NI ZF1*を坐薬に包埋して、その免疫誘導・防御試験を行ったところ、免疫ザル全頭で、細胞性免疫の指標である抗原特異的細胞増殖活性とELISPOT(インターフェロン産生細胞誘導能)、さらに免疫局所で抗原特異的抗体の産生が確認された。しかしながら、攻撃接種を経静脈で行った為か、その防御効果は不十分であった。このことから、申請者は新たな実験で経直腸感染が可能な強毒ウイルスで経直腸攻撃接種を行った。その結果、全4頭で攻撃ウイルス量が非免疫ザルと比べて抑制されて、4頭中1頭でCD4陽性T細胞数の減少が防止された。このようにある程度の有効性は認められたものの、まだ十分とは言えず、今後、投与方法やブースターとの併用など、さらなる検討が必要と申請者は結論づけている。エイズワクチン開発にあたって、その投与方法として坐薬を用いた報告はまだなく、申請者による初めての試みは、申請者の研究への積極的姿勢をうかがわせる。

以上、申請者が本学位論文において、非感染性粒子を産生するフルゲノムプラスミドを今後、改善の余地があるものの

DNA ワクチンとして用いる可能性を示したことは高く評価できる。本研究の成果は今後のエイズワクチン開発の上で重要な知見と考えられる。なお Part I と Part II に記載された研究成果は、いずれもエイズワクチン開発研究分野の研究者に高く評価されている。このように本論文は、人間および環境問題を総合的に考察し、現在人類の直面している困難な諸問題の根本的解決に資する創造的研究をめざして創設された人間・環境学専攻自然環境論講座にふさわしい内容を備えたものと言える。

よって本論文は博士（人間・環境学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成18年1月27日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。