

厚生労働科学研究費補助金
創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

課題番号 H16-創薬-003

エイズ発症機序・宿主防御免疫機構解析のための
動物モデルの確立およびその応用

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 俣野 哲朗

平成18（2006）年 3月

研究組織

研究者氏名		所属	職名
俣野 哲朗	主任研究者	東京大学医科学研究所	教授
森 一泰	分担研究者	国立感染症研究所エイズ研究センター	主任研究官
木村 彰方	分担研究者	東京医科歯科大学難治疾患研究所	教授
宮澤 正顕	分担研究者	近畿大学医学部	教授
本多 三男	分担研究者	国立感染症研究所エイズ研究センター	グループ長
保富 康宏	分担研究者	三重大学医学部	助教授
明里 宏文	分担研究者	医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター	研究リーダー

目 次

I. 総括研究報告書

- エイズ発症機序・宿主防御免疫機構解析のための動物モデルの確立
およびその応用 ----- 1
主任研究者：俣野哲朗（東京大学医科学研究所・教授）

II. 分担研究報告

1. MHC ハプロタイプの異なるサルにおいて誘導される SIV 特異的 CD8 陽性 T リンパ球の SIV 複製阻止能の比較解析 ----- 11
主任研究者：俣野哲朗（東京大学医科学研究所・教授）
2. SIV 感染制御サルにおける SIV 特異的 CD4 陽性 T リンパ球の役割 -- 17
分担研究者：森 一泰（国立感染症研究所エイズ研究センター・主任研究官）
3. 実験動物サルにおける MHC クラス I 及び KIR 遺伝子群を中心とする免疫制御
遺伝子の解析 ----- 26
分担研究者：木村彰方（東京医科歯科大学難治疾患研究所・教授）
4. ワクチン効果判定モデル系の確立と SIV 感染抵抗性遺伝子同定のための
アカゲサル MHC クラス II 遺伝子の解析 ----- 33
分担研究者：宮澤正顕（近畿大学医学部・教授）
5. 組換えワクチンにより誘導される抗原特異的免疫反応の解析 ----- 38
分担研究者：本多三男（国立感染症研究所エイズ研究センター・グループ長）
6. 抗原提示を効率よく行う新規ワクチンの開発に関する研究 ----- 43
分担研究者：保富康宏（三重大学医学部・助教授）
7. SIV 複製及び宿主免疫回避に関わるウイルス側・宿主側因子の作用機構に
関する解析 ----- 51
分担研究者：明里宏文（医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター・研究リーダー）

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 55

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 59

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）
総括研究報告書

エイズ発症機序・宿主防御免疫機構解析のための動物モデルの確立およびその応用

主任研究者 俣野 哲朗 東京大学医科学研究所教授

研究要旨

エイズ発症阻止法の開発には、動物モデルを用いたエイズ発症機序の解析が重要であるが、現状で最適のモデルであるサル免疫不全ウイルス（SIV）感染サルエイズモデルにおいては、エイズ発症に密接に関与する宿主因子の情報が不足している。そこで本研究では、評価系として有用であるだけでなく、抗エイズ薬開発に結びつくエイズ発症機序解明を可能とするサルエイズモデルの確立を目的とし、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）を中心とするサル宿主因子及びそのエイズ発症への関与についての解析を行うこととした。主対象は、ビルマ産アカゲサルで6頭の交配用雄サル由来の6家系とした。平成16年度には、サルMHCクラスI（MHC-I）Mamu-A・Mamu-BおよびMHCクラスII（MHC-II）DRB・DP・DQ遺伝子型同定法を確立し、6家系について各々2つずつ計12のMHC-I・MHC-IIハプロタイプを決定した。さらに、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）誘導ワクチン前臨床試験に用いたサルのMHCハプロタイプとワクチン効果との関係について検討し、ワクチン接種によりSIV複製制御にいたるMHCハプロタイプ90-120-a共有サル群を同定した。今年度は、MHCハプロタイプング法の精度を確認し、さらにマイクロサテライトマーカーを決定して、MHC-IあるいはMHC-IIの詳細なハプロタイプ構成の決定を進展させた。また、MHC関連遺伝子、特にNK細胞の機能に関わる遺伝子の多型解析法の樹立を進めた。MHCハプロタイプ90-120-a共有サル群の解析では、SIV複製制御に関与するCTL（Gag206-216特異的CTL、Gag241-249特異的CTLおよびGag373-380特異的CTL）の機能解析を開始し、また、主要MHC-Iアレルについて各々のcDNA単独発現細胞株を樹立して、CTLエピトープGag206-216を拘束するMHC-Iアレルを同定した。ビルマ産アカゲサルにおけるCTLエピトープ拘束MHC-I分子の同定も初めてであるが、SIV複製制御に関与するCTLのエピトープ拘束MHC-I分子の同定も初めてである。ワクチンによるSIV複製制御は、我々のグループ以外からは報告されておらず、今後、他のCTLエピトープを提示するMHC-I分子の同定を進めることにより、MHCハプロタイプ90-120-a共有サル群は、SIV複製制御機序の解明に極めて有用なサル群となることが期待される。

分担研究者

森 一泰 国立感染症研究所エイズ研究センター・
主任研究官
木村彰方 東京医科歯科大学難治疾患研究所・教授
宮澤正顕 近畿大学医学部・教授

本多三男 国立感染症研究所エイズ研究センター・
グループ長
保富康宏 三重大学医学部・助教授
明里宏文 医薬基盤研究所霊長類医学研究センター・
研究リーダー

A. 研究目的

HIV 感染自然経過では、宿主獲得免疫反応が誘導されるにもかかわらず HIV 複製が制御されず、慢性持続感染が成立し、エイズ発症へと進行する。エイズ発症阻止を目的とした抗エイズ薬開発研究においては、このエイズ発症機序の解明が不十分であることが大きな障害である。エイズ発症機序の解明には、動物モデルを用いた個体レベルでの解析が重要であるが、現状で最適のモデルであるサル免疫不全ウイルス (SIV) 感染サルエイズモデルにおいては、エイズ発症に密接に関与する宿主因子の情報が全く不足している。

HIV 感染に対する宿主獲得免疫系エフェクターとしては、CD8 陽性細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) が中心的役割を担っていることが知られている。実際、抗レトロウイルス薬による HIV 複製抑制においても CTL の助けが必須である。さらに、エイズワクチン開発研究においては、ワクチン誘導 CTL による HIV 複製制御の可能性が追求されている。したがって、エイズ発症阻止法の開発を考える際には、まず第一に、CTL の関与を検討しうるシステムが必要と考えられる。

そこで本研究では、評価系として有用であるだけでなく、抗エイズ薬開発につながるエイズ発症機序解明を可能とするサルエイズモデルの確立を目的とし、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)を中心とするサル宿主因子及びそのエイズ発症への関与について解析することとした。主な内容は以下の通りである。

- (1) MHC クラス I (MHC-I)・MHC クラス II (MHC-II) のハプロタイプレベルでの解析法の確立とその遺伝子型情報の整備。各ハプロタイプ共有サル群の樹立。
- (2) MHC によって拘束されるエピトープ特異的 CTL およびヘルパー-T リンパ球 (HTL) の同定。MHC 遺伝子型のエイズ発症への影響 (あるいは各々の CTL・HTL の SIV 複製抑制効果) の解析。
- (3) MHC 関連遺伝子の多型解析法の樹立とその遺伝子型情報の整備。これらの遺伝子型とエイズ発症との関連の解析。

主対象はビルマ産アカゲサルで 6 頭の交配用雄サル由来の 6 家系とした。ビルマ産アカゲサルの SIV

感染モデルは、欧米で用いられているインド産アカゲサル感染モデルと比較して、ヒト HIV 感染症に近いモデルであることが示唆されており、本研究の成果は最も優れたエイズモデルの確立に直結すると期待される。

平成 16 年度には、RSCA (reference strand-mediated conformation analysis) 法を用いたサル MHC-I (Mamu-A・Mamu-B) 遺伝子型同定法および DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) 法を用いたサル MHC-II (DRB・DP・DQ) 遺伝子型同定法を確立し、6 家系について各々 2 つずつ計 12 の MHC-I・MHC-II ハプロタイプを決定した。さらに、MHC ハプロタイプと CTL 誘導ワクチンの効果との関係について検討し、ワクチン接種により SIV 複製制御にいたる MHC ハプロタイプ 90-120-a 共有サル群を同定した。

平成 17 年度は、主に下記の検討を行った。

- (1a) これまでに確立したアカゲサル MHC ハプロタイプピンギングシステムの精度の確認、およびさらに詳細なハプロタイプ情報取得のためのマイクロサテライトタイピング用マーカーの決定。
- (1b) いくつかの詳細な MHC ハプロタイプ構成の決定。
- (2a) MHC ハプロタイプ 90120-a 共有サル群における SIV 複製制御に関与する CTL (Gag206-216 特異的 CTL、Gag241-249 特異的 CTL および Gag373-380 特異的 CTL) の機能解析の開始。
- (2b) MHC ハプロタイプ 90120-a 由来の主要 MHC-I アレル cDNA (Mamu-A90120-4、Mamu-A90120-5 および Mamu-B90120-6) を各々単独発現する細胞株の作成、および CTL エピトープ Gag206-216 を提示する MHC-I の同定。
- (2c) その他、抗原特異的宿主免疫反応に関する解析の継続。
- (3) MHC 関連遺伝子、特に NK 細胞の機能に関わる遺伝子の多型解析法の樹立。

B. 研究方法

- (1a) これまでに確立した RSCA 法を応用したアカゲサル MHC-I 遺伝子(Mamu-A および Mamu-B)群の

多型解析法を用いて、Bリンパ芽球様細胞株より抽出したRNAに由来するcDNAと、配列が既に決定されたcDNAクローンの多様性を比較検討した。さらに、マイクロサテライトマーカーを設定し、アカゲサルMHC遺伝子のマイクロサテライト多型解析法の樹立を進めた(図1)。(木村・宮澤)

(1b) RSCA法あるいはDGGE法に加え、マイクロサテライト多型解析法を用いて、いくつかのMHCハプロタイプ構成を詳細に調べた。(木村・宮澤)

(2a) MHCハプロタイプ90120-a由来のMHC-Iに拘束されるGag206-216特異的CTL、Gag241-249特異的CTLおよびGag373-380特異的CTLのエピトープ認識能を、ペプチド濃度別にペプチド特異的インターフェロン γ (IFN- γ)誘導を測定することにより調べた。(俣野)

(2b) MHCハプロタイプ90120-a由来の主要MHC-IアレルcDNA(Mamu-A90120-4、Mamu-A90120-5およびMamu-B90120-6)を各々発現するプラスミドベクターを作成し、HLA-ABC欠損ヒトBリンパ芽球株721.221に導入して、各々のMHC-I発現細胞株樹立を試みた。これらを用い、熊本大学滝口雅文先生の協力により、CTLエピトープGag206-216を提示するMHC-I分子のアレル同定を進めた。(木村・俣野)

(2c) 各種SIVあるいはサルヒト免疫不全ウイルスSHIV感染により誘導されるSIV特異的Tリンパ球反応を解析した。また、SIV NefタンパクによるMHC-I細胞表面発現抑制機序について検討した。(森・本多・保富・明里)

(3) MHC関連遺伝子、特にNK細胞の機能に関わるKIRおよびNKC遺伝子領域のマイクロサテライト多型解析法の樹立を試みた。(木村)

(倫理面への配慮)

動物実験については、倫理面も含めて、医薬基盤研究所など各施設の動物実験委員会の審査をうけ、その承諾を得てから開始した。

C. 研究結果

(1a) 2種のリファレンスを用いたRSCA法によるアカゲサルMHC-I(Mamu-A・Mamu-B)遺伝子型タイピング法の精度が極めて高いことを証明した。さらに、アカゲサルMHC遺伝子のマイクロサテライト多型解析法を樹立した。(木村・宮澤)

(1b) いくつかのMHCハプロタイプ構成を決定した。特に、これまで世界でも解析が進んでいなかったDPおよびDQ遺伝子座の解析を進展させ、DP/DQ領域に組換えの起こったハプロタイプが多く存在する可能性を示した(図2)。(木村・宮澤)

(2a) Gag206-216特異的CTLおよびGag241-249特異的CTLのエピトープ認識能は比較的鋭敏で、特に後者は極めて低いペプチド濃度においてもエピトープを認識可能であることを明らかにした。(俣野)

(2b) Mamu-A90120-4、Mamu-A90120-5およびMamu-B90120-6を各々発現する細胞株の樹立に成功した。さらに、CTLエピトープGag206-216を提示するMHC-IがMamu-A90120-4であることを明らかにした。(木村・俣野)

(2c) 野生型SIV Envでは提示されないが、糖鎖結合部位を欠損させたEnv(d5G Env)では提示されるエピトープの存在の可能性を示した。(保富)

(3) KIR遺伝子領域のマイクロサテライト多型解析では、ヒトとサルで多型を示すマーカーが異なっていた。一方、NKC遺伝子領域については、ヒト・サルともにマイクロサテライトマーカーを用いた多型解析が可能となった。(木村)

D. 考察

本研究のようにハプロタイプレベルでサルMHCタイピングを行っている例は他になく、本研究の成果は、エイズ発症機序解明に極めて有用なモデル確立に結びつくことが期待される。このMHCハプロタイプには、正確な家系情報に加えて、精度の高い多型解析システムの確立が必要となるが、本研究では、Mamu-A・Mamu-B(MHC-I)およびDRB・DP・DQ(MHC-II)遺伝子多型について、精度の高

い解析システムを確立することができたと考えられる。このシステムを用い、ビルマ産アカゲサルにおいて、エイズ発症に密接に関与する CTL・HTL 反応の解析に重要な MHC-I・MHC-II ハプロタイピングを進めている。なお、今年度示された DP/DQ 組換えハプロタイプの存在については、今後のハプロタイピングにおいても注意を継続し、検討を加える必要があると考えている。

昨年度の研究により、慢性エイズ発症を引き起こす SIV の複製制御には、高い SIV 複製抑制能を有する CTL の誘導が必要であることが示唆され、MHC ハプロタイプ 90-120-a 共有サル群では、ワクチンにて高い SIV 複製抑制能を有する複数のエピトープ特異的 CTL が誘導されることにより、SIV 複製制御にいたると考えられた。今年度開始した CTL の機能解析により、SIV 複製制御に中心的役割を担っていると考えられた Gag206-216 特異的 CTL および Gag241-249 特異的 CTL のエピトープ認識能は鋭敏であることが示された。

前者の CTL エピトープ Gag206-216 提示 MHC-I の同定は、ビルマ産アカゲサルの CTL エピトープ拘束 MHC-I 分子の初めての同定であるとともに、SIV 複製制御に関与する CTL のエピトープ拘束 MHC-I 分子の初めての同定でもある。この MHC ハプロタイプ 90-120-a を有するサルを用いたワクチン接種群と非接種群との比較実験は、感染自然経過における慢性持続感染成立やワクチン誘導 CTL による SIV 複製抑制の機序解明に結びつく。ワクチンによる SIV 複製制御は、我々のグループ以外からは報告されておらず、今後、他の CTL エピトープを提示する MHC-I 分子の同定を進めることにより、MHC ハプロタイプ 90-120-a 共有サル群は、SIV 複製制御機序の解明に極めて有用なサル群となることが期待される。

E. 結論

抗エイズ薬開発につながるエイズ発症機序解明を可能とするビルマ産アカゲサルエイズモデルの確立を目的とし、MHC 遺伝子型情報の整備に向けて昨年度までに確立した MHC ハプロタイピング法の精度を確認し、さらにマイクロサテライトマーカーを決定して、MHC-I および MHC-II の詳細なハプロタイプ構成の決定を進展させた。また、MHC 関連遺伝子、特に NK 細胞の機能に関わる遺伝子の多型解析法の樹立を進めた。

MHC ハプロタイプ 90-120-a 共有サル群の解析では、SIV 複製制御に関与する CTL の機能解析を開始し、また、主要 MHC-I アレルについて各々の cDNA 単独発現細胞株を樹立して、CTL エピトープ Gag206-216 を拘束する MHC-I を Mamu-A90120-4 と同定した。今後、他の CTL エピトープを提示する MHC-I 分子の同定を進めることにより、MHC ハプロタイプ 90-120-a 共有サル群は、SIV 複製制御機序の解明に極めて有用なサル群となることが期待される。

F. 健康危険情報

特になし。

図1

MHC領域の遺伝子構成とマイクロサテライトマーカーの位置

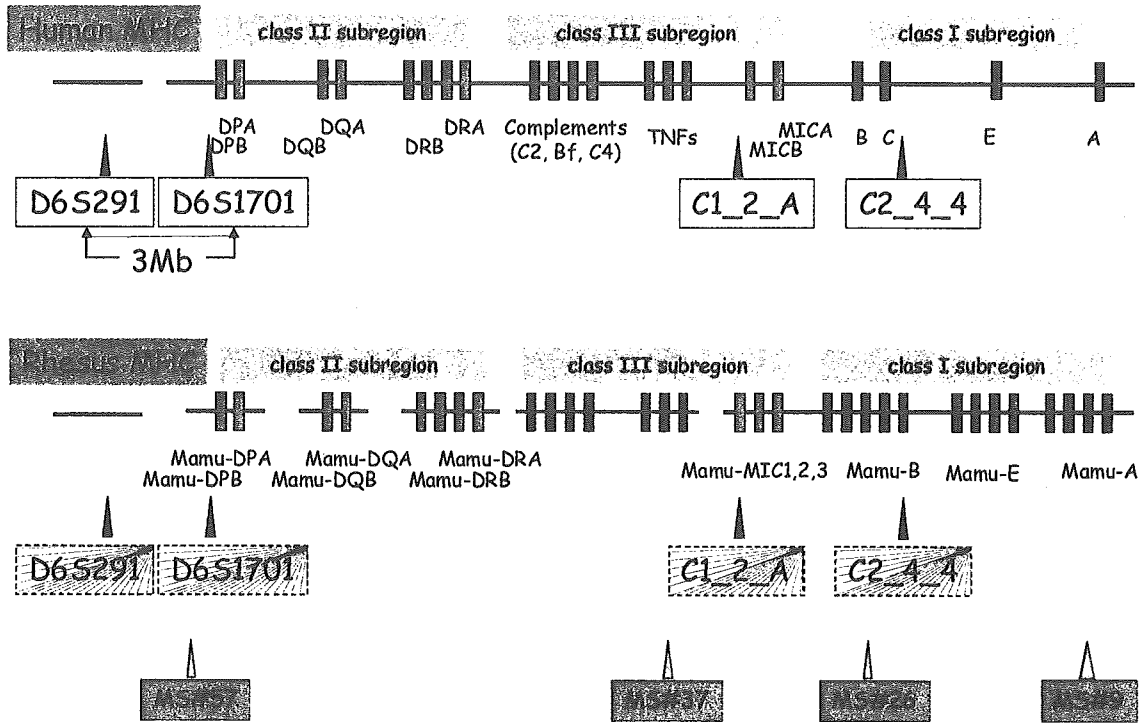
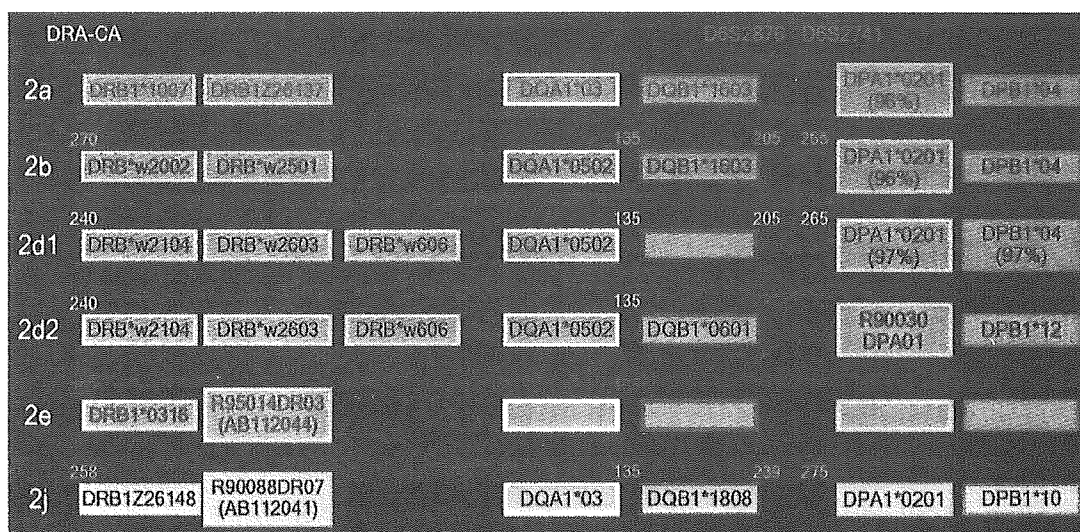


図2

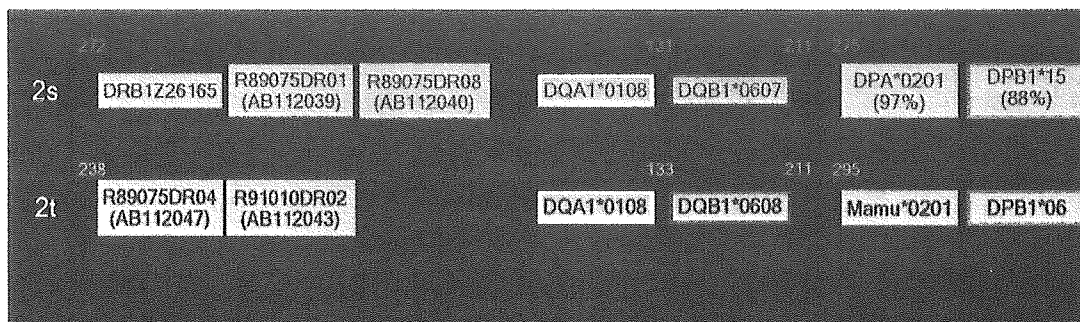
交配用雄サル6頭由来の
MHCハプロタイプ
主要MHC-IIハプロタイプ構成

交配用雄サル	MHC-I ハプロタイプ	MHC-II ハプロタイプ
R-90-120	90120-a 90120-b	90120-a 90120-b
R-90-010	90010-d 90010-e	90010-d 90010-e
R-90-030	90030-g 90030-h	90030 (90010) -d 90030-h
R-90-088	90088-j 90088-k	90088-j 90088-k
R-89-002	89002-p 89002-q	89002-p 89002-q
R-89-075	89075-s 89075-t	89075-s 89075-t

ミャンマー産家系MHC-IIハプロタイプ



ラオス産家系MHC-IIハプロタイプ



G. 研究発表

1 論文発表

- (1) Kato M, Igarashi H, Takeda A, Sasaki Y, Nakamura H, Kano M, Sata T, Iida A, Hasegawa M, Horie S, Higashihara E, Nagai Y, Matano T. Induction of Gag-specific T-cell responses by therapeutic immunization with a Gag-expressing Sendai virus vector in macaques chronically infected with simian-human immunodeficiency virus. *Vaccine* 23:3166-3173, 2005.
- (2) Kobayashi M, Igarashi H, Takeda A, Kato M, Matano T. Reversion in vivo after inoculation of a molecular proviral DNA clone of simian immunodeficiency virus with a cytotoxic-T-lymphocyte escape mutation. *J Virol* 79:11529-11532, 2005.
- (3) Kawada M, Igarashi H, Takeda A, Tsukamoto T, Yamamoto H, Dohki S, Takiguchi M, Matano T. Involvement of multiple epitope-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in vaccine-based control of simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques. *J Virol* 80:1949-1958, 2006.
- (4) Mori K, Sugimoto C, Ohgimoto S, Shioda T, Kusagawa S, Takebe Y, Kano M, Matano T, Yuasa T, Kitaguchi D, Miyazawa M, Takahashi Y, Yasunami M, Kimura A, Yamamoto N, Szuki Y, Nagai Y. Influence of glycosylation on the efficacy of an Env-based vaccine against SIVmac239 in a macaque AIDS model. *J Virol* 79:10386-10396, 2005.
- (5) Shichi D, Kikkawa FE, Ota M, Katsuyama Y, Kimura A, Matsumori A, Kulsky JK, Naruse KT, Inoko H. The haplotype block, NFKBIL1-ATP6V1G2-BAT1- MICB-MICA, within the class III-class I boundary region of the human major histocompatibility complex may control susceptibility to hepatitis C virus associated dilated cardiomyopathy. *Tissue Antigens* 66: 200-208, 2005.
- (6) Munkanta M, Terunuma H, Takahashi M, Hanabusa H, Miura T, Ikeda S, Sakai M, Fujii T, Takahashi Y, Oka S, Matsuda J, Ishikawa M, Takashima Y, Mimaya J, Ito M, Kimura A, Yasumani M. HLA-B polymorphism in Japanese HIV-1 infected long-term surviving hemophiliacs. *Viral Immunol* 18: 500-505, 2005.
- (7) Kanari Y, Clerici M, Abe H, Kawabata H, Trabattori D, Lo Caputo S, Mazzotta F, Fujisawa H, Niwa A, Ishihara C, Takei YA, Miyazawa M. Genotypes at chromosome 22q12-13 are associated with HIV-1-exposed but uninfected status in Italians. *AIDS* 19:1015-1024, 2005.
- (8) Kawabata H, Niwa A, Tsuji-Kawahara S, Uenishi H, Iwanami N, Matsukuma H, Abe H, Tabata N, Matsumura H, Miyazawa M. Peptide-induced immune protection of CD8⁺ T cell-deficient mice against Friend retrovirus-induced disease. *Int Immunol* 18:183-198, 2006.
- (9) Kida Y, Tsuji-Kawahara S, Ostapenko V, Kinoshita S, Kajiwara E, Kawabata H, Yuasa T, Nishide I, Yukawa S, Ichinose M, Miyazawa M. Increased liver temperature efficiently augments human cellular immune response: T cell activation and possible monocyte translocation. *Cancer Immunol Immunother*, online first: Feb 21, 2006.
- (10) Kanekiyo M, Matsuo K, Hamatake M, Hamano T, Ohsu T, Matsumoto S, Yamada T, Yamazaki S, Hasegawa A, Yamamoto N, Honda M. Mycobacterial codon optimization enhances antigen expression and virus-specific immune responses in recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin expressing the human immunodeficiency virus type 1 Gag. *J Virol* 79:8716-8723, 2005.
- (11) Ami Y, Izumi Y, Matsuo K, Someya K, Kenekiyo M, Horibata S, Yoshino N, Sakai K, Shinohara K, Yamazaki S, Yamamoto N, Honda M. Priming-boosting vaccination with recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin and a non-replicating vaccinia virus recombinant leads to long-lasting and effective immunity. *J Virol* 79:12871-12879, 2005.
- (12) Kawahara M, Matsuo K, Honda M. Intradermal and

- oral immunization with recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing the simian immunodeficiency virus Gag protein induces long-lasting, antigen-specific immune responses in guinea pigs. Clin Immunol 119: 67-78, 2006.
- (13) Eda Y, Takizawa M, Murakami T, Maeda H, Kimachi K, Yonemura H, Koyanagi S, Shiosaki K, Higuchi H, Makizumi K, Nakashima T, Osatomi K, Tokiyoshi S, Matsushita S, Yamamoto N, Honda M. Sequential immunization with V3 peptides from primary HIV-1 produces cross-neutralizing antibodies against primary isolates with matching narrow neutralization sequence motif. J Virol, in press, 2006.
- (14) Eda Y, Murakami T, Ami Y, Nakasone T, Takizawa M, Someya K, Kaizu M, Izumi Y, Yoshino N, Matsushita S, Higuchi H, Matsui H, Shinohara K, Takeuchi H, Koyanagi Y, Yamamoto N, Honda M. Anti-V3 humanized antibody KD-247 effectively suppresses ex vivo generation of human immunodeficiency virus type 1 and affords sterile protection of monkeys against a heterologous simian/human immunodeficiency virus infection. J Virol, in press, 2006.
- (15) Yasutomi Y. Chimeric recombinant hepatitis E virus-like particles presenting foreign epitopes as a novel vector of vaccine by oral administration. Holland CR and Miyamura T eds. Structure-based viral replication. World Scientific Publishing. in press.
- (16) 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 175:2541-2547, 2005.
- (17) Shirakawa K, Takaori-Kondo A, Kobayashi M, Tomonaga M, Izumi T, Fukunaga K, Sasada A, Abudu A, Miyauchi Y, Akari H, Iwai K, Uchiyama T. Ubiquitination of APOBEC3 proteins by the Vif-Cullin5-ElonginB-ElonginC complex. Virology 344:263-236, 2006.
- 2 学会発表
- (1) Kawada M, Tsukamoto T, Igarashi H, Takeda A, Matano T. Reappearance of plasma viremia with accumulation of CTL escape mutations after vaccine-based control of SIVmac239 replication. Keystone Symposium (X8): HIV Vaccines (Current Challenges and Futur Prospects), #320, Banff, Alberta, Canada, 4/12/2005.
- (2) Kawada M, Kobayashi M, Yamamoto H, Igarashi H, Takeda A, Matano T. Long-term analysis of rhesus macaques that showed prophylactic vaccine-based control of SIVmac239 replication. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, MoA03, Kobe, Japan, 7/4/2005.
- (3) Matano T. Contribution of vaccine-induced cellular immune responses to viral suppression: analysis in macaque AIDS models. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, MoS18-02, Kobe, Japan, 7/4/2005.
- (4) Matano T, Kawada M, Yamamoto H, Igarashi H, Takeda A. Long-Term Control of Simian-Human Immunodeficiency Virus 89.6P Replication in A Preclinical Trial of CTL-Based AIDS Vaccines. The International Congress of Virology, V-460, San Francisco, CA, USA, 7/26/2005.
- (5) 山本浩之、五十嵐博子、武田明子、川田真幹、俣野哲朗. CTL 誘導型予防エイズワクチンによる SIV/SHIV 複製制御における de novo 中和抗体の寄与の比較. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会、1B20、横浜、11/20/2004.
- (6) 川田真幹、俣野哲朗. ワクチンによる SIV 複製の初期制御後、CTL エスケープ変異の蓄積により複製能低下にもかかわらず再出現したウイルス血症. 第 18 回日本エイズ学会学術集会、#235、熊本、12/2/2005.
- (7) C. Sugimoto, S. Izumo, Y. Suzuki, Y. Nagai, and K. Mori. Influence of deglycosylated SIVmac239 on primary infection in lymphatic tissues.. 23nd annual

- symposium on nonhuman primate models for AIDS, September, 2005, Portland, USA.
- (8) K. Mori, C. Sugimoto, E. Nakayama, T. Shioda, F. Villinger, A.A. Ansari and N. Yamamoto. Development of Sendai virus vector system for eliciting epitope specific CD4 T cells. 23rd annual symposium on nonhuman primate models for AIDS, September, 2005, Portland, USA.
- (9) 杉本智恵、鈴木康夫、山本直樹、永井美之、森一泰. 糖鎖欠損サル免疫不全ウイルスの細胞指向性と初期感染細胞の解析：低病原性との関連について. 日本ウイルス学会、横浜、2005年.
- (10) 杉本智恵、中山英美、塩田達雄、山本直樹、永井美之、森一泰. 糖鎖欠損 SIV の弱毒化のメカニズムの解析. 日本エイズ学会、熊本、2005年.
- (11) 森一泰、杉本智恵、中山英美、塩田達雄、保富康宏、山本直樹、永井美之. ウイルス特異的 CD4+T 細胞免疫誘導のための Sendai virus vector を用いた CD4+T 細胞エピトープ発現系の開発. 日本エイズ学会、熊本、2005年.
- (12) 安波道郎、高橋（田中）弓子、日野原邦彦、俣野哲朗、森一泰、本多三男、保富康広、宮澤正顕、木村彰方. アカゲザル MHC クラス I 領域の多型解析. 第 14 回日本組織適合性学会大会、熊本、2005年10月.
- (13) Miyazawa, M., T. Yuasa, T. Ogawa, and H. Matsumura. Natural killer cells recognize mouse retrovirus-infected cells through NKG2D receptor and Rael ligand. 17th International Workshop on Retroviral Pathogenesis. Saint-Malo, France, November 1-6, 2005. (Abstracts for the Workshop p51, 2005.)
- (14) Tsuji-Kawahara, S. and M. Miyazawa. MHC as immune resistance genes against mouse retroviral infections: their mechanisms of action. International Workshop on Animal Genome Analysis 2005: "Analysis of MHC, MHC-related genes and disease resistance for animal breeding and selection." November 9, 2005, Tokyo.
- (15) Miyazawa, M. Plenary Lecture: Host resistance genes in immunity against human and mouse retroviral infections. Virology Africa 2005. Cape Town, South Africa, November 8-11, 2005. (Abstracts p5, 2005.)
- (16) Kanekiyo, M., Y. Ami, K. Matsuo, K. Someya, Y. Suzuki, N. Yoshino, A. Hasegawa, N. Yamamoto, and M. Honda. Enhanced effects of codon optimization on HIV/SIV gene expression in recombinant BCG in macaques. The 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. MoA03-04. July 1-5, Kobe.
- (17) 松原明弘、河岡義裕、保富康宏. インフルエンザ DNA ワクチン封入 E 型肝炎ウイルス様中空粒子(HEV-VLP)による経口インフルエンザワクチン. 第 53 回日本ウイルス学会（横浜）.
- (18) 河野光雄、保富康宏、唐松克夫、松原明弘、高村史記、駒田洋、伊藤守弘、鶴留雅人、西尾真智子、伊藤康彦. マウスインターロイキン 4 を挿入したパラインフルエンザ 2 型ウイルスの性状解析. 第 53 回日本ウイルス学会（横浜）.
- (19) 佐藤憲一、銭谷幹男、高橋宏樹、保富康宏、小原道法. HCV トランスジェニックマウスにおける初期免疫応答. 第 53 回日本ウイルス学会（横浜）.
- (20) 唐松克夫、保富康宏. 抗酸菌分泌抗原 Ag85B の新規アジュバントとしての可能性. 第 53 回日本ウイルス学会（横浜）.
- (21) 唐松克夫、保富康宏. 抗酸菌由来 Ag85B DNA ワクチンによる喘息の抑制効果. 第 35 回日本免疫学会（横浜）.
- (22) 森如、保富康宏、水谷仁. Ag85B のマウス反復ハプテン誘発皮膚炎モデルへの効果の検討. 第 35 回日本免疫学会（横浜）.
- (23) 保富康宏. 教育講演「ワクチンとは」. 第 37 回日本小児感染症学会.
- (24) Yasutomi Y. Oral administration of DNA vaccine by using virus-like particles derived from orally transmissible virus. 4th International Gene Therapy Symposium.
- (25) 飯島沙幸、李永仲、明里宏文. HIV-1 Nef MHC-1 発現抑制機能における N 末端アミノ酸の

関与. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会、平成 17 年 11 月.

- (26) 飯島沙幸, 李永仲, 明里宏文. HIV-1 Nef MHC-1 発現抑制機能における N 末端アミノ酸の関与. 第 19 回日本エイズ学会学術集会、平成 17 年 12 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1 特許取得

- (1) Miyazawa, M., M. Clerici, and S. Irie, *inventors*. Resistance Genes. International Patent Application No. PCT/GB2005/005078 (Filed December 24, 2005).
- (2) 保富康宏: α 抗原のアレルギー性疾患治療剤としての利用 (出願中、PCT/JP/01459).
- (3) 保富康宏: リポソームワクチンの作製法 (出願中、PCT/JP2006/303371).
- ##### 2 実用新案登録 無し
- ##### 3 その他 無し

II. 分担研究報告

MHC ハプロタイプの異なるサルにおいて誘導される SIV 特異的 CD8 陽性 T リンパ球の
SIV 複製阻止能の比較解析

主任研究者 俣野 哲朗 東京大学医科学研究所教授

研究要旨

エイズウイルス感染に対する宿主防御免疫反応において、ウイルス特異的 CD8 陽性細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) は中心的役割を担っている。HIV-1 感染自然経過では、誘導された CTL は HIV-1 複製を抑制するものの充分には HIV-1 を排除できず慢性持続感染が成立する。そこでエイズワクチン開発においては、ワクチン誘導 CTL による HIV-1 複製制御の可能性が追求されている。近年の我々の研究により、優れたウイルス複製抑制能を有するエピトープ特異的 CTL の誘導が、エイズウイルス複製制御に結びつくことが明らかとなってきた。本研究では、個々のエピトープ特異的 CTL のウイルス複製抑制能の解析およびエイズ発症阻止への関与についての検討を可能とするサルエイズモデルの確立を目的として、ビルマ産アカゲサルにおいて、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) ハプロタイプ別に、その拘束性エピトープを同定し、エピトープ特異的 CTL のエイズウイルス複製抑制能について解析することとした。平成 16 年度には、まず、ワクチンによる Gag 特異的 CTL 誘導のエイズウイルス複製に対する効果を、MHC ハプロタイプ別に整理した。さらに、ワクチンによりサル免疫不全ウイルス (SIV) 複製制御にいたる MHC ハプロタイプ 90120-a 共有サル群の解析を進め、高い SIV 複製抑制能を有する 3 つのエピトープ特異的 CTL (Gag206-216 特異的 CTL、Gag241-249 特異的 CTL および Gag373-380 特異的 CTL) を同定した。今年度は、まず、この 3 つのエピトープ特異的 CTL のエピトープペプチドに対する反応を解析し、特に Gag241-249 特異的 CTL がかなり低い濃度のペプチドでも鋭敏に認識する能力があることを見出した。さらに、MHC ハプロタイプ 90120-a 由来の主要 MHC クラス I (MHC-I) アレル cDNA (Mamu-A90120-4、Mamu-A90120-5 および Mamu-B90120-6) を各々単独発現する細胞株を作成し、CTL エピトープ Gag206-216 が Mamu-A90120-4 遺伝子産物によって提示されることを明らかにした。この結果は、ビルマ産アカゲサルにおける初めての CTL エピトープ拘束 MHC アレルの同定であるだけでなく、高い SIV 複製抑制能を有する CTL のエピトープ拘束 MHC アレルの同定であるという点においても重要な成果であり、ワクチン誘導 CTL の SIV 複製抑制効果の解析に極めて有用である。

A. 研究目的

HIV-1 感染自然経過では、宿主獲得免疫反応が誘導されるにもかかわらず HIV-1 複製の制御には至らない。HIV-1 感染に対する宿主獲得免疫系エフェクターとしては、CD8 陽性細胞傷害性 T リンパ球

(CTL) が中心的役割を担っており、HIV-1 感染急性期から慢性期の移行期 (セットポイント期) に HIV-1 特異的 CTL の誘導により体内ウイルス量は低下するが、HIV-1 は排除されきらず慢性持続感染が成立し、エイズ発症へと進行する。そこで、エイズ

ワクチン開発研究においては、ワクチン誘導 CTL による HIV-1 複製制御の可能性が追求されている。

CTL は、標的細胞の主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 抗原クラス I (MHC-I) 分子によって提示されるエピトープを認識して細胞傷害性を発揮する。近年の我々の研究から、エピトープ特異的 CTL の違いによってエイズウイルス複製抑制能に大きな差異があることがわかってきた。したがって、個々のエピトープ特異的 CTL について、そのウイルス複製抑制能を検証し、エイズ発症阻止効果を検討することは、ワクチンを含めたエイズ発症阻止法の開発において極めて重要な戦略である。そこで本研究は、個々のエピトープ特異的 CTL について、そのウイルス複製抑制能の解析およびエイズ発症阻止への関与の検討を可能とするエイズモデルの確立を目的とする。そのため、ビルマ産アカゲサルエイズモデルにおいて、MHC ハプロタイプ別に、その拘束性エピトープを同定し、エピトープ特異的 T リンパ球のウイルス複製抑制能について解析することとした。

平成 16 年度には、まず、Gag を主抗原とするワクチン接種後のサルヒト免疫不全ウイルス (SHIV89.6PD) あるいはサル免疫不全ウイルス (SIV) チャレンジ実験結果を整理し、ワクチンによる Gag 特異的 CTL 誘導のエイズウイルス複製に対する効果を、MHC ハプロタイプ別に検討した。さらに、ワクチンにより SIV 複製抑制にいたる MHC ハプロタイプ 90120-a 共有サル群の解析を進め、高い SIV 複製抑制能を有する 3 つのエピトープ特異的 CTL (Gag206-216 特異的 CTL、Gag241-249 特異的 CTL および Gag373-380 特異的 CTL) を同定した。

今年度は、まず、この 3 つのエピトープ特異的 CTL のエピトープペプチドに対する反応を解析した。また、MHC ハプロタイプ 90120-a 由来の主要 MHC-I アレル cDNA (Mamu-A90120-4、Mamu-A90120-5 および Mamu-B90120-6) を各々単独発現する細胞株の作成を試み、さらに、CTL エピトープ Gag206-216 を提示する MHC-I 分子のアレル同定を進めた。

B. 研究方法

(1) Gag206-216 特異的 CTL、Gag241-249 特異的 CTL

および Gag373-380 特異的 CTL の解析

MHC ハプロタイプ 90120-a を有するアカゲサル R-209 の、DNA プライム・Gag 発現センダイウイルス (SeV-Gag) ベクターブースト後のリンパ球を用い、ペプチド刺激後のインターフェロニン γ 誘導を細胞内免疫染色により解析した。用いたペプチドは、CTL エピトープ Gag206-216、Gag241-249 および Gag373-380 に相当するペプチド、およびそれらのエスケープ変異を有するもので、以下の通りである。

IINEEAADWDL : Gag206-216

IINEEAADWDS : Gag206-216.L216S

SSVDEQIQW : Gag241-249

SSVEEQIQW : Gag241-249.D244E

SSVEQLQW : Gag241-249.D244E.I247L

APVPIPFA : Gag373-380

TPVPIPFA : Gag373-380.A373T

(2) MHC-I 発現細胞株作成および Gag206-216 エピトープを拘束する MHC-I アレルの同定

分担研究者の木村彰方先生がクローニングした MHC ハプロタイプ 90120-a 由来の主要 MHC-I (alpha 鎖) アレル cDNA (Mamu-A90120-4、Mamu-A90120-5 および Mamu-B90120-6) を各々発現するプラスミドベクターを作成した。HLA (alpha 鎖) 欠損ヒト B リンパ芽球株 721.221 に、各々のベクターを導入した後、G418 セレクションおよびクローニングを行い、各々の MHC-I 発現細胞株樹立を試みた。各々について、アカゲサル MHC-I を認識するヒト HLA-ABC 抗体を用いた FACS 解析により、導入した MHC-I の発現頻度を調べた。さらに、これらを用い、熊本大学滝口雅文先生の協力により、CTL エピトープ Gag206-216 を提示する MHC-I 分子のアレル同定を進めた。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、倫理面も含めて、国立感染症研究所、医薬基盤研究所および東京大学大学院医学系研究科の動物実験委員会の審査をうけ、その承認を得てから、医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターにて開始した。

C. 研究結果

(1) Gag206-216 特異的 CTL、Gag241-249 特異的 CTL および Gag373-380 特異的 CTL の解析 (図 1)

Gag206-216 特異的 CTL は、ペプチド濃度 10nM ではエピトープを充分認識することができたが、1nM では認識不能となった。Gag241-249 特異的 CTL は、ペプチド濃度 1nM でもエピトープを充分認識することができた。Gag373-380 特異的 CTL は、ペプチド濃度 100nM ではエピトープを充分認識することができたが、10nM では反応が大きく低下した。

変異ペプチドを用いた解析では、いずれの変異も対応する CTL の認識低下に結びつき、CTL エスケープ変異であることが確認できた。特に、D244E 変異に I247L 変異が加わると、Gag241-249 特異的 CTL による認識の低下は一層大きくなることが明らかとなった。

(2) MHC-I 発現細胞株作成および Gag206-216 エピトープを拘束する MHC-I アレルの同定

MHC ハプロタイプ 90120-a 由来の主要 MHC-I 単独発現細胞株 (Mamu-A90120-4 発現 721.221 細胞、Mamu-A90120-5 発現 721.221 細胞 および Mamu-B90120-6 発現 721.221 細胞) を樹立した。導入した MHC-I 発現頻度は図 2 の通りであった。CTL エピトープ Gag206-216 を提示する MHC-I は、Mamu-A90120-4 であることが判明した。

D. 考察

MHC ハプロタイプ 90120-a 共有サル群においてワクチンによる SIV 複製制御に関与する Gag206-216 特異的 CTL、Gag241-249 特異的 CTL および Gag373-380 特異的 CTL のうち、SIV 複製制御に中心的役割を担っていると考えられた前二者のペプチド認識能は比較的鋭敏で、特に Gag241-249 特異的 CTL は極めて低いペプチド濃度においてもエピトープを認識できることが明らかとなった。

今回、単独 MHC-I 発現細胞株樹立システムを確立することができたが、このシステムは今後の CTL エピトープ拘束 MHC-I の同定に重要である。本研究では、CTL エピトープ Gag206-216 を提示する MHC-I を明らかにしたが、この結果は、ビルマ産アカゲサ

ルにおける初めての CTL エピトープ拘束 MHC-I の同定であるだけでなく、ワクチンによる SIV 複製制御において中心的役割を果たす CTL のエピトープ拘束 MHC-I の同定であるという点においても重要な成果であり、ワクチン誘導 CTL の SIV 複製抑制効果の解析に極めて有用である。

E. 結論

ワクチンにより SIV 複製制御にいたる MHC ハプロタイプ 90120-a 共有サル群において SIV 複製制御に関与する 3 つのエピトープ特異的 CTL (Gag206-216 特異的 CTL、Gag241-249 特異的 CTL および Gag373-380 特異的 CTL) のエピトープペプチドに対する反応を解析し、特に Gag241-249 特異的 CTL が鋭敏なエピトープ認識能を有することを明らかにした。

また、MHC ハプロタイプ 90120-a 由来の主要 MHC-I アレル cDNA (Mamu-A90120-4、Mamu-A90120-5 および Mamu-B90120-6) を各々単独発現する細胞株を樹立し、CTL エピトープ Gag206-216 を提示する MHC-I が Mamu-A90120-4 であると決定した。この成果は、今後の CTL の SIV 複製抑制能の解析に極めて有用である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1 論文発表

- (1) Kato M, Igarashi H, Takeda A, Sasaki Y, Nakamura H, Kano M, Sata T, Iida A, Hasegawa M, Horie S, Higashihara E, Nagai Y, Matano T. Induction of Gag-specific T-cell responses by therapeutic immunization with a Gag-expressing Sendai virus vector in macaques chronically infected with simian-human immunodeficiency virus. *Vaccine* 23:3166-3173, 2005.
- (2) Mori K, Sugimoto C, Ohgimoto S, Shioda T, Kusagawa S, Takebe Y, Kano M, Matano T, Yuasa T, Kitaguchi D, Miyazawa M, Takahashi Y, Yasunami

M, Kimura A, Yamamoto N, Szuki Y, Nagai Y. Influence of glycosylation on the efficacy of an Env-based vaccine against SIVmac239 in a macaque AIDS model. *J. Virol.* 79:10386-10396, 2005.

- (3) Kobayashi M, Igarashi H, Takeda A, Kato M, Matano T. Reversion in vivo after inoculation of a molecular proviral DNA clone of simian immunodeficiency virus with a cytotoxic-T-lymphocyte escape mutation. *J. Virol.* 79:11529-11532, 2005.
- (4) Kawada M, Igarashi H, Takeda A, Tsukamoto T, Yamamoto H, Dohki S, Takiguchi M, Matano T. Involvement of multiple epitope-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in vaccine-based control of simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques. *J. Virol.* 80:1949-1958, 2006.

2 学会発表

- (1) Kawada M, Tsukamoto T, Igarashi H, Takeda A, Matano T. Reappearance of plasma viremia with accumulation of CTL escape mutations after vaccine-based control of SIVmac239 replication. Keystone Symposium (X8): HIV Vaccines (Current Challenges and Future Prospects), #320, Banff, Alberta, Canada, 4/12/2005.
- (2) Kawada M, Kobayashi M, Yamamoto H, Igarashi H, Takeda A, Matano T. Long-term analysis of rhesus macaques that showed prophylactic vaccine-based control of SIVmac239 replication. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, MoA03, Kobe, Japan, 7/4/2005.
- (3) Matano T. Contribution of vaccine-induced cellular immune responses to viral suppression: analysis in macaque AIDS models. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, MoS18-02, Kobe, Japan, 7/4/2005.
- (4) Matano T, Kawada M, Yamamoto H, Igarashi H, Takeda A. Long-Term Control of Simian-Human Immunodeficiency Virus 89.6P Replication in A Preclinical Trial of CTL-Based AIDS Vaccines. The International Congress of Virology, V-460, San Francisco, CA, USA, 7/26/2005.
- (5) 山本浩之、五十嵐博子、武田明子、川田真幹、俣野哲朗. CTL 誘導型予防エイズワクチンによる SIV/SHIV 複製制御における de novo 中和抗体の寄与の比較. 第53回日本ウイルス学会学術集会、1B20、横浜、11/20/2004.
- (6) 川田真幹、俣野哲朗. ワクチンによる SIV 複製の初期制御後、CTL エスケープ変異の蓄積により複製能低下にもかかわらず再出現したウイルス血症. 第18回日本エイズ学会学術集会、#235、熊本、12/2/2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

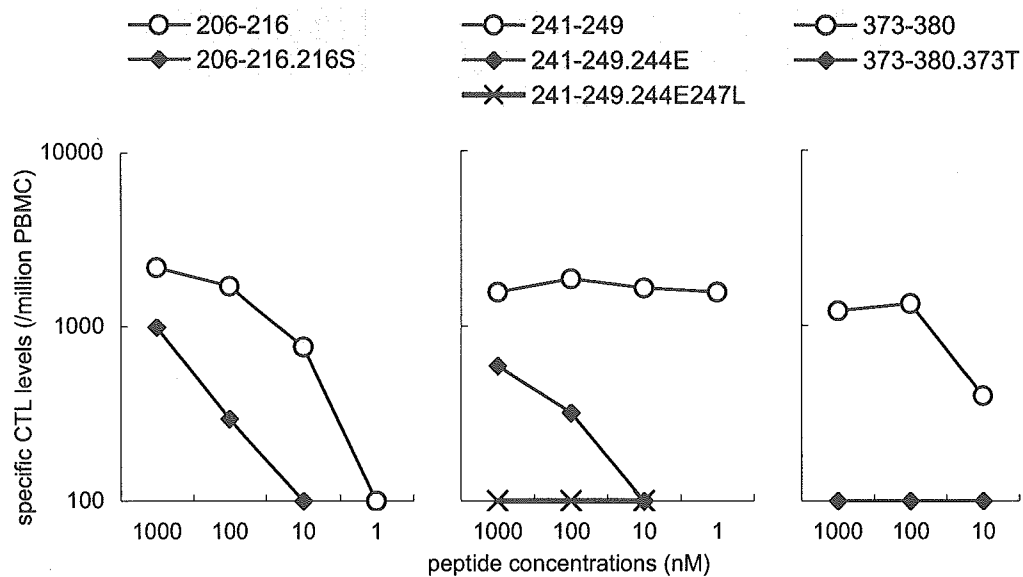


図1. CTLエスケープ変異の同定
 MHC-Iハプロタイプ90120-aを有するサルにて同定された3つのSIV Gag CTLエピトープ (Gag206-216、Gag241-249、Gag373-380) について、各々のエピトープペプチド特異的CTLの頻度と、そのエピトープ領域内の変異を有するペプチド特異的CTLの頻度を比較検討した。その結果、各々のCTLエピトープ領域内の変異 (GagL216S、GagD244E、GagI247L、GagA373T) は、各々のCTLからのエスケープ変異体であることを確認した。