

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

課題番号 H19-政策創薬-一般-006

宿主ゲノム多様性を考慮した
CTL 誘導エイズワクチン開発戦略

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 俣野 哲朗

平成20（2008）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
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
朱 亜峰	分担研究者	ディナベック株式会社	事業開発本部長
明里 宏文	分担研究者	独立行政法人医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター	室長

目 次

I. 総括研究報告書	
宿主ゲノム多様性を考慮した CTL 誘導エイズワクチン開発戦略	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. CTL 誘導エイズワクチン効果へのサルMHC・MHC 関連遺伝子多様性の 影響に関する研究	9
主任研究者：俣野哲朗（東京大学医科学研究所・教授）	
2. サルMHC・MHC 関連分子およびそのレセプター遺伝子群の多型解析 . . .	16
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）	
3. センダイウイルスベクターを用いた CTL 誘導法に関する研究	21
分担研究者：朱 亜峰（ダイナベック株式会社・事業開発本部長）	
4. SIV 複製に関与する宿主因子に関する研究	23
分担研究者：明里宏文（独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医科学 研究センター・室長）	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	29
IV. 研究成果の刊行物・別刷	31

I . 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総括研究報告書

宿主ゲノム多様性を考慮した CTL 誘導エイズワクチン開発戦略

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

世界における HIV 感染者数増大は極めて深刻な問題であり、この問題克服の切り札となるエイズワクチン開発は国際的重要課題である。我々はこれまで、センダイウイルス (SeV) ベクターを用いた細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 誘導型予防エイズワクチン (DNA プライム・Gag 発現 SeV ベクターブースト [DNA/SeV-Gag] 法) を開発し、サルエイズモデルにて、世界で唯一のワクチンによるサル免疫不全ウイルス (SIV) 複製制御例を報告してきた。この効果は、ワクチン接種サル全頭に認められるわけではなく、宿主主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 等の遺伝子多様性の影響をうけると考えられ、その宿主ゲノム多様性を考慮したワクチン効果の解析は、集団におけるワクチン有効性を知るうえで極めて重要である。そこで本研究では、我々の CTL 誘導型予防エイズワクチンの臨床応用に向け、宿主ゲノム多様性のワクチン有効性への影響を明らかにすることを目的として、ビルマ産アカゲサルエイズモデルにて、MHC・MHC 関連分子等の宿主遺伝子多型のワクチン効果への影響を解析することとした。具体的には、(1)主に細胞性免疫に関与する MHC 遺伝子多型のワクチン有効性への影響の解析、(2)主に自然免疫に関与する MHC 関連遺伝子多型のワクチン有効性への影響の解析、(3)SIV 複製に関与するその他の宿主因子の解析の 3 つを骨子とする。平成 19 年度には、(1)これまで特定してきた MHC クラス I (MHC-I) ハプロタイプのうちの 4 つについて、各々を有するサル群における予防 DNA/SeV-Gag ワクチンの抗 SIVmac239 効果を検討し、CTL 誘導型予防エイズワクチンの MHC-I ハプロタイプ依存性の有効性を初めて明らかにした。(2) T 細胞や NK 細胞に広く発現する活性型 NK レセプター NKG2D のリガンドである RAET/ULBP について、ヒトとサルの遺伝子群の構造解析を行い比較検討した。また、SIV 複製に対する自然免疫の影響についても検討することを目的として、培養細胞系においてナイーブ CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能を解析した結果、個体によっては高い SIV 複製抑制能を示す CD8 陽性細胞を有していることが示され、CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能に影響する宿主因子の存在の可能性が考えられた。(3)ヒト HIV 感染への関与が知られている cyclophilin A について、サル細胞での SIV 複製においても重要な役割を担っていることが示された。本研究の進展は、CTL 誘導型予防エイズワクチン開発戦略の方向性を示すとともに、現在計画中のワクチン臨床試験第 1 相に引き続く第 2・3 相への進展に向けてのさらなる根拠の提示に結びつくことが期待される。

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
朱 亜峰 ディナベック株式会社・事業開発本部長
明里宏文 独立行政法人医薬基盤研究所 霊長類
医科学研究センター・室長

A. 研究目的

HIV 治療薬により HIV 感染制御がある程度可能となった現時点においても、世界における HIV 感染者数は増すばかりである。HIV 感染者数の増大は、薬剤耐性 HIV や新興再興感染症の出現に結びつきうることも危惧されており、この問題克服の切り札となる予防エイズワクチン開発は、社会的

貧困な地域のみでなく先進国も含めた国際的重要課題である。我々はこれまで、センダイウイルス (SeV) ベクターを用いた CTL 誘導型予防エイズワクチンを開発し、サルエイズモデルにて、その優れた CTL 誘導能を明らかにしてきた。このワクチンについては、接種サル全頭ではないものの世界で唯一の SIV 複製制御効果が認められたため、国際エイズワクチン推進構想 (IAVI) と共同で、臨床試験第 1 相 (安全性試験) 計画を進展中である。この臨床試験の有効性評価の段階に進むにあたっては、集団におけるワクチン有効性に関するサルエイズモデルでの情報が有用であり、集団を構成する個々の宿主ゲノム多様性を考慮したワクチン効果の解析が極めて重要である。さらに、より有効なワクチン開発に向けて、免疫応答に関わる宿主ゲノム多様性の関与を理解し、その知見を生かすことが肝要である。

そこで本研究では、我々の CTL 誘導型予防エイズワクチンの臨床応用に向け、宿主ゲノム多様性のワクチン有効性への影響を明らかにすることを目的として、ビルマ産アカゲサルエイズモデルにて、宿主遺伝子多型のワクチン効果への影響を解析することとした。特に、CTL 反応に直接関与する MHC および自然免疫に関与する MHC 関連分子については自然感染における HIV 複製への影響が示唆されていることもあり、その遺伝子多型のワクチン有効性への影響の解析を重点的に進めることとした。主な内容は以下の通りである。

- (1) 主に細胞性免疫に関与する MHC 遺伝子多型のワクチン有効性への影響の解析。
- (2) 主に自然免疫に関与する MHC 関連遺伝子多型のワクチン有効性への影響の解析。
- (3) SIV 複製に関与するその他の宿主因子の解析。平成 19 年度は、主に以下の検討を行った。
 - (1) 4 つの MHC クラス I (MHC-I) ハプロタイプについて、各々を有するサル群における DNA プライム・Gag 発現 SeV ベクターブースト予防エイズワクチンの抗 SIV 効果を検討した。
 - (2) T 細胞や NK 細胞に発現する活性型 NK レセプター NKG2D のリガンド RAET/ULBP 遺伝子群の構造解析を行った。また、SIV 複製に対する自然免疫の影響について検討することを目的として、培養細胞系においてナイーブ CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能の解析を開始した。
 - (3) ヒト HIV 感染に関与する宿主因子として知られている cyclophilin A について、サル細胞での SIV 複製への影響に関する研究を行った。

B. 研究方法

- (1a) 我々がこれまで同定してきたビルマ産アカゲサル MHC-I ハプロタイプのうちの 4 つ (90-120-Ia、90-010-Id、90-010-Ie、90-088-Ij) について、各々を有するサル群に SIVmac239 チャレンジ実験を行い、ワクチン非接種群とワクチン接種群との比較検討を行った。(俣野・朱)
- (1b) アカゲサル MHC-I 遺伝子多型の解析を進展させた。(木村)
- (2a) RAET/ULBP 遺伝子群等のアカゲサル MHC 関連遺伝子多型の解析を進展させた。(木村)
- (2b) 培養細胞系におけるナイーブ CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能の解析を開始した。(俣野)
- (3) サル細胞での SIV 複製への cyclophilin A の影響を知る目的で、アカゲサルおよび同属であるカニクイサル、ブタオサル由来の 3 種類の T 細胞株における解析を行った。(明里)

(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。用いた組換え生物等については、第二種使用等拡散防止措置確認申請承認 (大臣確認) 済みである。

C. 研究結果

- (1a) ワクチン非接種サルでは、全て持続感染が成立し、血漿中ウイルス量は高値 (10^4 - 10^6 コピー/ml) を示した。一方、90-120-Ia 共有ワクチン接種サルでは、全て持続感染成立が阻止され、血漿中ウイルス量は検出限界以下であった。また、90-010-Id 共有ワクチン接種サル 2 頭のうち 1 頭でも持続感染成立が阻止されウイルス量は検出限界以下となり、もう 1 頭も比較的低いウイルス量 (10^4 コピー/ml 以下) を示した。90-010-Ie 共有ワクチン接種サル 2 頭のうち 1 頭でも持続感染成立が阻止されウイルス量は検出限界以下となったが、もう 1 頭は高いウイルス量 (10^4 コピー/ml 以上) を示した。90-088-Ij 共有ワクチン接種サルは 2 頭とも持続感染を呈し、高いウイルス量を示した。以上のように、MHC-I ハプロタイプの違いにより、ワクチンによる SIV 複製抑制効果に違いがあることが明らかとなった (図 1)。(俣野)
- (1b) Mamu-A アリルはおおむね 3-8 群に、Mamu-B は 5-10 群にクラスタリングされるため、アカゲサル個体は複数の異なるアリル群を発現することが確定した。また、これまでの研究で高い

SIV 複製抑制能を有することが示されている SIV Gag241-249 特異的 CTL は、高い HIV-1 複製抑制能を有することが示唆されている HLA-B*5701 拘束性 HIV TW10 エピトープ特異的 CTL とほぼ同じ Gag 領域を認識するが、この Gag241-249 エピトープを拘束する Mamu-A90120-5 と HLA-B*5701 との構造を比較したところ、全体としては相同性が低かった。しかし、抗原ペプチド結合ドメインのみの構造比較では、ペプチド結合に関わる位置のアミノ酸配列は相同性が高いことが判明した。(木村)

(2a) アカゲサルとヒトについて RAET1/ULBP 領域遺伝子群の構造解析を行い比較検討し、以下の知見を得た。(i) ULBP1 遺伝子・ULBP2 遺伝子はヒトとはかなり異なっているが、アカゲサル集団内での多様性は検出されなかった。(ii) ULBP3 遺伝子もヒトとはかなり異なる上にアカゲサル個体間で多様性が存在する。(iii) アカゲサルの ULBP4 遺伝子は複数存在する。(iv) アカゲサルの RAET1/ULBP 領域にはヒトとは異なる遺伝子重複が生じていた (図 2)。また、その他の遺伝子多型についても新たな知見を得た。(木村)

(2b) SIV 複製に対する自然免疫の影響についても検討することを目的として、培養細胞系においてナイーブ CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能を解析した結果、個体によっては高い SIV 複製抑制能を示す CD8 陽性細胞を有していることが示された。(俣野)

(3) 3 種類の T 細胞株全てにおいて cyclophilin A が同定され、そのアミノ酸配列はヒトと同一のものであることが判明した。サル T 細胞株における SIV 感染増殖に対する cyclophilin A 機能阻害剤 (cyclosporine A) の影響を調べたところ、この阻害剤により SIV 感染増殖効率が顕著に低下する結果が得られた (図 3)。(明里)

D. 考察

MHC-I ハプロタイプ別のワクチン有効性の解析において、ワクチンによる SIV 複製抑制効果が認められる群と認められない群とが示された。この結果は、MHC-I ハプロタイプ依存的なワクチン効果を初めて明示するものであり、CTL 誘導型予防エイズワクチン開発戦略の方向性を示すものとして極めて重要である。

MHC ハプロタイプごとに発現する Mamu-A および Mamu-B 遺伝子 cDNA の配列解析を行った結果、個体ごとに発現するアレル数が異なることが

確認された。また、同一ハプロタイプ上の Mamu アレルは異なるハプロタイプ上の Mamu アレルと同程度に配列が異なっていた。このことは、Mamu ハプロタイプの成立は Mamu アレルの分岐と同様に古いことを示唆する。また、決定したアレルの大半はデータベースに登録されていない新規アレルであったことから今後さらに Mamu-A、Mamu-B アレルの構造を決定し、詳細なハプロタイプ解析を行うことが必要である。

活性型 NK レセプター NKG2D のリガンド RAET/ULBP の遺伝子群の解析においては、ヒトでは一部の ULBP 遺伝子にのみ多型が存在するが、アカゲサルにおいても同様であり、MHC 分子と比較して RAET/ULBP 分子の多様性は小さいことが判明した。しかし、アカゲサル RAET/ULBP 領域はヒトとは異なった遺伝子重複を来しており、より複雑な構造をとっていることから、多様性をさらに詳細に解析する必要がある。これらの解析は NK 細胞レセプターの意義の解明につながることを期待される。

ナイーブ CD8 陽性細胞の培養細胞レベルでの SIV 複製抑制能の解析においては、個体によっては、高い SIV 複製抑制能を示す CD8 陽性細胞を有していることが示された。したがって、CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能に影響する宿主因子の存在の可能性が考えられ、今後、その同定に努める予定である。

サル細胞株での cyclophilin A 機能阻害剤を用いた SIV 感染実験から、サル cyclophilin A は SIV 感染に必須な宿主因子であることが示唆された。ヒト cyclophilin A が HIV 感染に必須な宿主因子であることを考慮すると、同種間におけるエイズウイルス感染には、cyclophilin A は必須な宿主因子であることが考えられる。このことは、ヒト HIV 感染症を反映するためのモデルとしての SIV 感染サルモデルの有用性を支持するものである。

E. 結論

ワクチンにより SIV 持続感染成立阻止にいたる MHC ハプロタイプ共有サル群および持続感染成立が阻止できない MHC ハプロタイプ共有サル群を見出した。この結果は、MHC-I ハプロタイプ依存的なワクチン効果を初めて明示するものであり、CTL 誘導型予防エイズワクチン開発戦略の方向性を示すものとして極めて重要である。

アカゲサルにおける SIV ワクチン接種後の CTL 免疫応答の個体差形成に関わる MHC-I 遺伝子群の多様性の遺伝子配列レベルでの解明を進展さ

せた。また、アカゲサルについて、NKG2D レセプターのリガンド RAET/ULBP 領域遺伝子群を初めとする MHC 関連遺伝子群の解析を進展させた。さらに、サル宿主因子として、cyclophilin A の SIV 複製への関与を明らかにした。

このような宿主因子の解析は、CTL 誘導型予防エイズワクチンの有効性を検討するうえで重要である。本研究の進展は、CTL 誘導型予防エイズワクチン開発戦略の方向性を示すとともに、現在計画中のワクチン臨床試験第 1 相に引き続く第 2・3 相への進展に向けてのさらなる根拠の提示に結びつくことが期待される。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1 論文発表

- (1) Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Takeda A, Igarashi H, Watkins DI, Matano T. Long-term control of simian immunodeficiency virus replication with central memory CD4⁺ T-cell preservation after non-sterile protection by a cytotoxic T lymphocyte-based vaccine. *J Virol* 81:5202-5211, 2007.
- (2) Nagai Y, Inoue M, Iida A, Zhu Y-F, Hasegawa M, Kato A, Matano T. Sendai virus engineering: From reverse genetics to vector development. *Virus Expression Vectors* (Ed.: Hefferon KL), *Trasworld Research Network*, 123-146, 2007.
- (3) Yamamoto H, Kawada M, Takeda A, Igarashi H, Matano T. Post-infection immunodeficiency virus control by neutralizing antibodies. *PLoS ONE* 2:e540, 2007.
- (4) Morikawa Y, Goto T, Yasuoka D, Momose F, Matano T. Defect of human immunodeficiency virus type 2 Gag assembly in *saccharomyces cerevisiae*. *J Virol* 81:9911-9921, 2007.
- (5) Tsukamoto T, Yuasa M, Yamamoto H, Kawada M, Takeda A, Igarashi H, Matano T. Induction of CD8⁺ cells able to suppress CCR5-tropic simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication by controlled infection of CXCR4-tropic simian-human immunodeficiency virus in vaccinated rhesus macaques. *J Virol* 81:11640-11649, 2007.
- (6) Takeda A, Matano T. Inhibition of infectious murine leukemia virus production by Fv-4 env gene products exerting dominant negative effect on viral envelope glycoprotein. *Microbes Infect*, 9:1590-1596, 2007.
- (7) Moriya C, Igarashi H, Takeda A, Tsukamoto T, Kawada M, Yamamoto H, Inoue M, Iida A, Shu T, Hasegawa M, Nagai Y, Matano T. Abrogation of AIDS vaccine-induced cytotoxic T lymphocyte efficacy in vivo due to a change in viral epitope flanking sequences. *Microbes Infect*, in press.
- (8) Tsukamoto T, Dohki S, Ueno T, Kawada M, Takeda A, Yasunami M, Naruse T, Kimura A, Takiguchi M, Matano T. Determination of a major histocompatibility complex class I restricting simian immunodeficiency virus Gag241-249 epitope. *AIDS*, in press.
- (9) Takeuchi H, Matano T. Host factors involved in resistance to retroviral infection. *Microbiol Immunol*, in press.
- (10) Nakajima T, Ohtani H, Naruse T, Shibata H, Mimaya J, Terunuma H, Kimura A. Copy number variations of CCL3L1 and long-term prognosis of HIV-1 infection in asymptomatic HIV-infected Japanese with hemophilia. *Immunogenetics* 59:793-798, 2007.
- (11) Shichi D, Matsuzawa Y, Ota M, Katsuyama Y, Matsumori A, Takahashi M, Naruse TK, Inoko H, Kimura A. HLA-DP beta chain may confer the susceptibility to hepatitis C virus-associated hypertrophic cardiomyopathy. *Int J Immunogenet* 35:37-43, 2008.
- (12) Hiyoshi M, Suzu S, Yoshidomi Y, Hassan R, Harada H, Sakashita N, Akari H, Motoyoshi K, Okada S. Interaction between Hck and HIV-1 Nef negatively regulates cell surface expression of M-CSF receptor. *Blood* 111, 243-250, 2008.

2 学会発表

- (1) Tsukamoto T, Yuasa M, Kawada M, Takeda A, Matano T. Effective CD8(+) cell responses against SIV superchallenge in SHIV-controllers. 4th IAS Conference on HIV pathogenesis, Treatment and Prevention, Sydney, Australia, 7/22-25/2007.
- (2) Matano T, Tsukamoto T, Yuasa M, Yamamoto H, Kawada M. Induction of CD8 cell responses able to suppress CCR5-tropic SIVmac239 replication by controlled SHIV infection in rhesus macaques. The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 9/1-5/2007.
- (3) Moriya C, Horiba S, Matano T. Efficient antigen-specific CTL induction by a recombinant Sendai virus vector vaccine in rhesus macaques with pre-existing anti-vector antibodies. The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 9/1-5/2007.
- (4) Matano T, Kawada M, Kuwano T, Naruse T, Kimura A. Association of AIDS vaccine efficacy with MHC haplotypes in rhesus macaques. The 25th Annual Symposium on Nonhuman Primate

- Models for AIDS, Monterey, CA, USA, 9/10-13/2007.
- (5) 守屋智草、井上誠、飯田章博、朱亜峰、長谷川護、俣野哲朗。センダイウイルスベクターエイズワクチンの免疫誘導効率に対する抗ベクター抗体の影響の解析。第55回日本ウイルス学会学術集会、3D14、札幌、10/23/2007。
- (6) 守屋智草、井上誠、飯田章博、朱亜峰、長谷川護、俣野哲朗。抗原特異的細胞性免疫誘導に必要なセンダイウイルスベクターワクチン接種量の解析。第55回日本ウイルス学会学術集会、3D14、札幌、10/23/2007。
- (7) 塚本徹雄、俣野哲朗。CD8陽性細胞集団のエイズウイルス抑制能を評価する。第55回日本ウイルス学会学術集会、3WSB3、札幌、10/23/2007。
- (8) Matano T. CD8 cell responses against SIV replication. International Symposium on Basic and Applied Immunobiology, Beijing, China, 10/29/2007.
- (9) Matano T. SIV replication under CD8 cell responses. Center for AIDS Research, Kumamoto University, 10th Anniversary Symposium, Kumamoto, Japan, 11/15/2007.
- (10) Matano T. The Current Progress in AIDS Vaccine Development. International Forum of Crisis Management for Infectious Disease, Tokyo, Japan, 11/18/2007.
- (11) 川田真幹、俣野哲朗。CTL誘導エイズワクチン接種サルへのエスケープ変異ウイルス感染実験。第21回日本エイズ学会学術集会、OS07-53、広島、11/28/2007。
- (12) 守屋智草、堀場聡、井上誠、飯田章博、朱亜峰、長谷川護、俣野哲朗。抗ベクター抗体存在下におけるセンダイウイルスベクターエイズワクチンのCTL誘導能の解析。第11回日本ワクチン学会学術集会、横浜、12/9/2007。
- (13) 俣野哲朗。予防エイズワクチン開発：HIV感染拡大阻止への期待。ワクチン開発の研究・評価に関するフォーラム：日本発のワクチン開発をめざしてII、東京、1/21/2008。
- (14) Naruse T, Terunuma H, Mimaya J, Kimura A: Polymorphisms in the loci for NKG2 receptors and their ligands in HIV/AIDS. The 7th Awaji International Forum of Infection and Immunity. Awaji, September 1-5, 2007.
- (15) 中島敏晶, 大谷仁志, 成瀬妙子, 三間屋純一, 照沼裕, 木村彰方: HIV感染とAIDSの進行におけるCCL3L1遺伝子コピー数の関連。第16回日本組織適合性学会大会, 京都, 2007年9月9-11日。
- (16) 成瀬妙子, 照沼裕, 三間屋純一, 木村彰方: 血友病患者のHIV感染制御個体差とNK細胞機能関連の免疫応答遺伝子群多型性。第16回日本組織適合性学会大会, 京都, 2007年9月9-11日。
- (17) 志知大輔, 成瀬妙子, 日野原邦彦, 森一泰, 俣野哲郎, 本多三男, 保富康広, 宮澤正顯, 木村彰方: エイズウイルスワクチンに対する免疫応答に関わるMamu-B遺伝子多型の探索。第16回日本組織適合性学会大会, 京都, 2007年9月9-11日。
- (18) 志知大輔, 松森昭, 高橋めぐみ, 成瀬妙子, 猪子英俊, 木村彰方: HLA-DP遺伝子はC型肝炎ウイルス陽性肥大型心筋症と関連する。第16回日本組織適合性学会大会, 京都, 2007年9月9-11日。
- (19) 中島敏晶, 大谷仁志, 成瀬妙子, 柴田宏樹, 三間屋純一, 照沼裕, 木村彰方: HIV感染とAIDSの進行におけるCCL3L1遺伝子コピー数の関連。日本人類遺伝学会第52回大会, 東京, 2007年9月12-15日。
- (20) 成瀬妙子, 俣野哲郎, 森一泰, 本多三男, 保富康広, 宮澤正顯, 木村彰方: ヒトおよび実験動物サルにおけるNKG2Dレセプター関連遺伝子多型性解析。日本人類遺伝学会第52回大会, 東京, 2007年9月12-15日。
- (21) Naruse T, Kimura A, Terunuma H, Mimaya J: Polymorphisms in the loci for NKG2 receptors and their ligands in HIV/AIDS. 第37回日本免疫学会総会・学術集会, 東京, 2007年11月20-22日。

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1 特許取得 無し
- 2 実用新案登録 無し
- 3 その他 無し

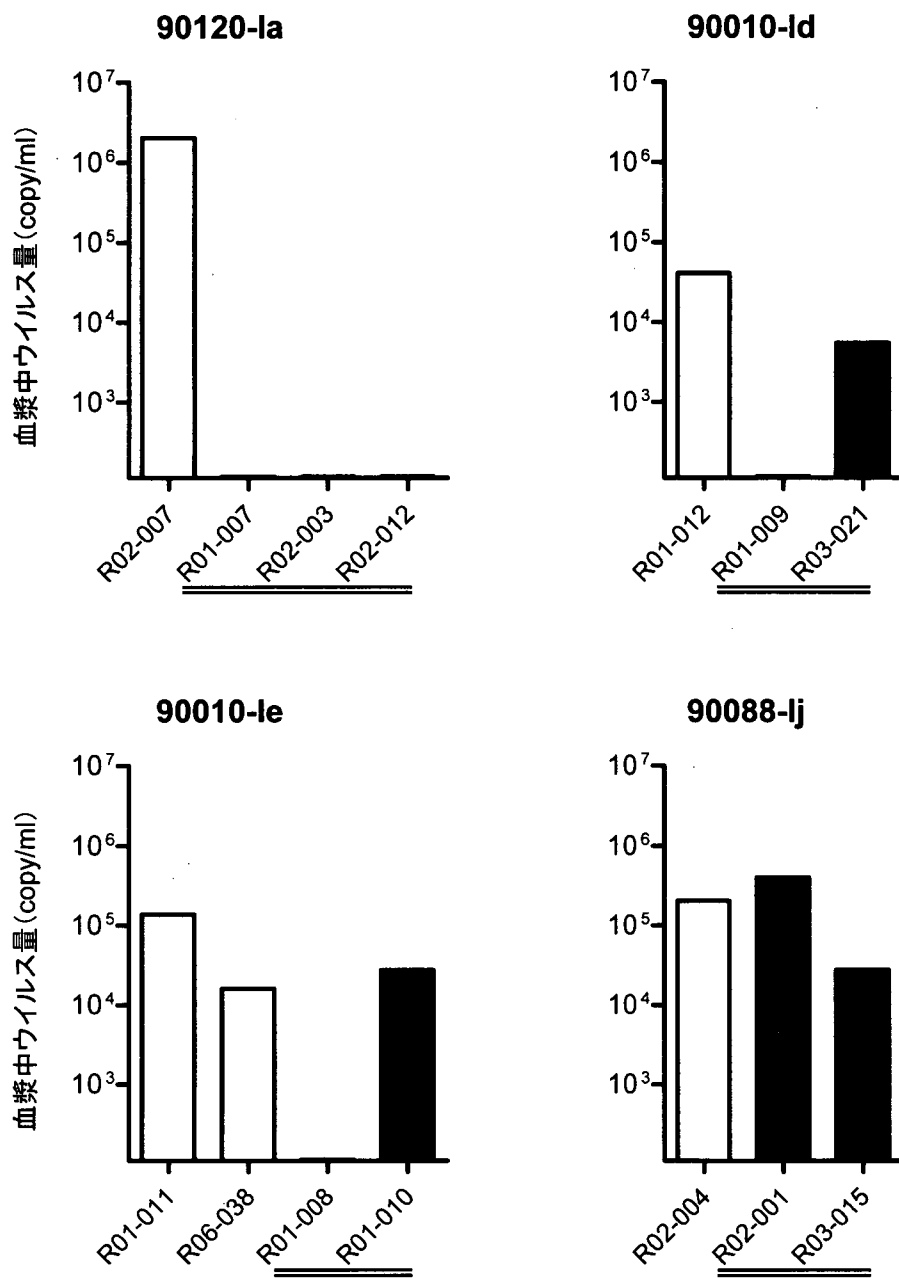
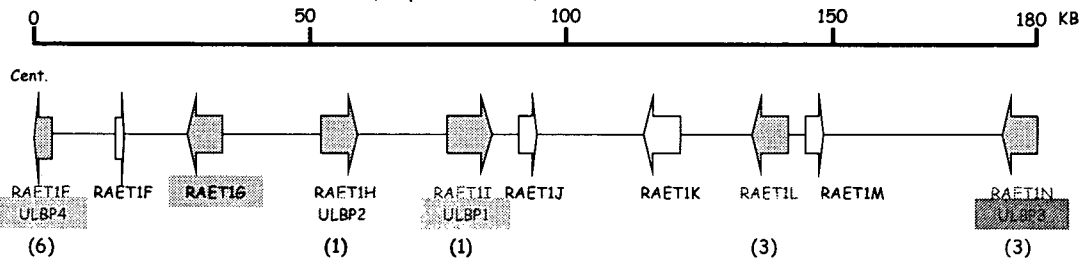


図1 MHC-Iハプロタイプ別のSIVチャレンジ後2ヶ月の血漿中ウイルス量
各ハプロタイプ共有群のうち二重線を引いたものはワクチン接種群である。

ヒトULBP/RAET1 遺伝子ファミリー (6q24.3-25.2)



アカゲザルULBP/RAET1 遺伝子ファミリー (Chr.4)

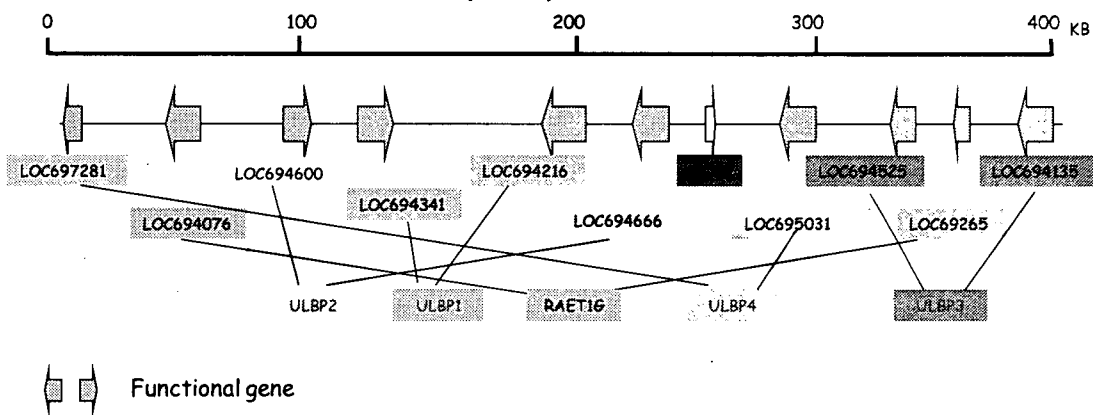


図2 ヒト (上段) とアカゲザル (下段) のRAET/ULBP領域遺伝子構造比較

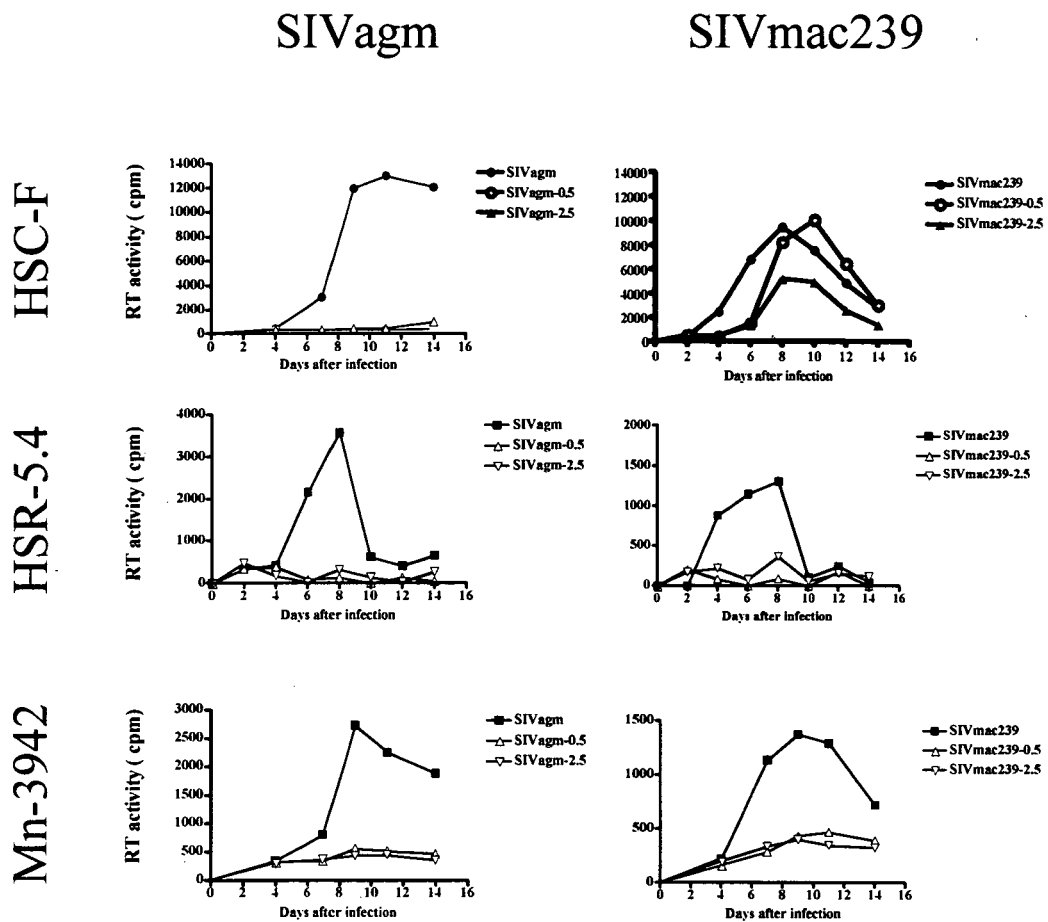


図3 マカク属3種のT細胞株を用いたSIV感染実験
 SIVagm (右側) およびSIVmac239 (左側) をHSC-F (上段)、HSR-5.4 (中段)、HSMn-3942 (下段) T細胞株に感染させ、2日毎の培養上清中のRT活性を経時的に測定した結果を示す。各曲線は、0: CsA(-)、0.5: CsA (0.5 μM)、2.5: CsA (2.5 μM) 存在下でのSIV増殖曲線を示している。

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

CTL 誘導エイズワクチン効果へのサル MHC・MHC 関連遺伝子多様性の影響に関する研究

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

我々はこれまで、センダイウイルス (SeV) ベクターを用いた細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 誘導型予防エイズワクチン (DNA プライム・Gag 発現 SeV ベクターブースト [DNA/SeV-Gag] 法) を開発し、サルエイズモデルにて、世界で唯一のワクチンによるサル免疫不全ウイルス (SIV) 複製制御例を報告してきた。この効果は、ワクチン接種サル全頭に認められるわけではなく、宿主主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 等の遺伝子多様性の影響をうけると考えられ、その宿主ゲノム多様性を考慮したワクチン効果の解析は、集団におけるワクチン有効性を知るうえで極めて重要である。そこで本研究では、宿主ゲノム多様性のワクチン有効性への影響を明らかにすることを目的として、サルエイズモデルにて、MHC・MHC 関連分子等の宿主遺伝子多型のワクチン効果への影響を解析することとした。平成 19 年度には、これまで特定してきた MHC クラス I (MHC-I) ハプロタイプのうち 4 つ (90-120-Ia、90-010-Id、90-010-Ie、90-088-Ij) について、各々を有するサル群における予防 DNA/SeV-Gag ワクチンの抗 SIVmac239 効果を検討した。ワクチン非接種サル (対照群) では持続感染が成立したが、90-120-Ia を共有するワクチン接種群では、全例で SIVmac239 複製は制御され、チャレンジ後 2 ヶ月時のウイルス血症は検出下限以下であった。90-010-Id を共有するワクチン接種群でも、2 ヶ月時のウイルス血症は低い傾向にあったが、90-010-Ie、90-088-Ij を各々共有するワクチン接種群では、ワクチン非接種群と同様、持続感染が成立した。Gag 特異的 CTL レベルの解析では、たしかに 90-120-Ia 共有サル群ではワクチンによる高いレベルの誘導が認められたが、他の群では必ずしも誘導レベルとウイルス量との相関は得られず、SIV 複製制御における CTL の質の重要性が示唆された。一方、SIV 複製に対する自然免疫の影響についても検討することを目的として、培養細胞系においてナイーブ CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能を測定する系を樹立し、解析を開始した。その結果、個体によっては、高い SIV 複製抑制能を示す CD8 陽性細胞を有していることが示された。本研究の成果は、MHC-I ハプロタイプ依存性の CTL 誘導ワクチンの効果を初めて示すものであり、CTL 誘導エイズワクチン開発戦略の方向性を示す点で極めて重要である。

A. 研究目的

世界における HIV 感染者数増大は極めて深刻な問題であり、この問題克服の切り札となるエイズワクチン開発は国際的重要課題である。我々はこれまで、センダイウイルス (SeV) ベクターを用いた細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 誘導型予防エイズワクチン (DNA プライム・Gag 発現 SeV ベクターブースト [DNA/SeV-Gag] 法) を開発し、サルエイズモデルにおいて、その優れた CTL 誘導能を明らかにしてきた。このワクチンについては、接種サル全頭ではないものの世界で唯一の SIV 複製制御 (持続感染成立阻止効果) が認められた

め、エイズワクチン臨床試験を推進・支援する国際的組織である国際エイズワクチン推進構想 (IAVI) と共同で、臨床試験第 1 相 (安全性試験) を計画中である。この臨床試験の有効性評価の段階に進むにあたっては、集団におけるワクチン有効性に関するサルエイズモデルでの情報が有用であり、集団を構成する個々の宿主ゲノム多様性を考慮したワクチン効果の解析が極めて重要である。さらに、より有効な予防エイズワクチン開発に向けて、免疫応答に関わる宿主ゲノム多様性の関与を理解し、その知見を生かすことが肝要である。

そこで本研究では、我々の CTL 誘導型予防エイズワクチンの臨床応用に向け、宿主ゲノム多様性のワクチン有効性への影響を明らかにすることを目的として、サルエイズモデルにて、宿主遺伝子多型のワクチン効果への影響を解析することとした。特に、CTL 反応に直接関与する宿主主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) および自然免疫に関与する MHC 関連分子について、その遺伝子多型のワクチン有効性への影響の解析を重点的に進めることとした。

平成 19 年度は、まず、これまで特定してきた MHC クラス I (MHC-I) ハプロタイプのうち 4 つ (90-120-Ia、90-010-Id、90-010-Ie、90-088-Ij) について、各々を有するサル群における予防 DNA/SeV-Gag ワクチンの抗 SIVmac239 効果を検討した。一方、SIV 複製に対する自然免疫の影響についても検討することを目的として、培養細胞系においてナイーブ CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能を測定する系を樹立し、解析を開始した。

B. 研究方法

(1) MHC-I ハプロタイプ別のワクチン有効性の解析：以下の 5 頭のワクチン非接種サルおよび 9 頭のワクチン接種サルへの SIVmac239 チャレンジ実験において、MHC-I ハプロタイプ別の解析を行った。

MHC-I ハプロタイプ	ワクチン 非接種群	ワクチン 接種群
90-120-Ia	R02-007	R01-007
		R02-003
		R02-012
90-010-Id	R01-012	R01-009
		R03-021
		R01-008
90-010-Ie	R01-011	R01-010
		R06-038
90-088-Ij	R02-004	R02-001
		R03-015

ワクチン接種プロトコールは、SIV gag・pol 等を発現する DNA 筋注 (DNA プライム) とプライム 6 週後の SeV-Gag 経鼻接種 (SeV-Gag ブースト) とし、ブースト後約 3 ヶ月の時点で SIVmac239 チャレンジを行った。チャレンジ後の血漿中ウイルス量の測定、およびブースト後の Gag 特異的 CTL レベルの測定 (細胞内免疫染色による抗原特異的インターフェロン γ [IFN- γ] 誘導測定) を行った。

(2) ナイーブ CD8 陽性細胞の培養細胞レベルで

の SIV 複製抑制能の解析：4 頭のナイーブサルの末梢血単核球 (PBMC) を用い、分離した CD8 陰性細胞に SIV を感染させ、CD8 陽性細胞非存在下あるいは存在下にて培養を継続し、両者間の SIV 増殖を比較検討した。

(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医科学研究所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。用いた組換え生物等については、第二種使用等拡散防止措置確認申請承認 (大臣確認) 済みである。

C. 研究結果

(1) MHC-I ハプロタイプ別のワクチン有効性の解析：SIVmac239 チャレンジ後約 2 ヶ月時点 (セットポイント期) の血漿中ウイルス量を図 1 に示す。ワクチン非接種サルでは、全て持続感染が成立し、血漿中ウイルス量は高値 (10^4 - 10^6 コピー/ml) を示した。一方、90-120-Ia 共有ワクチン接種サルでは、全て持続感染成立が阻止され、血漿中ウイルス量は検出限界以下であった。また、90-010-Id 共有ワクチン接種サル 2 頭のうち 1 頭でも持続感染成立が阻止されウイルス量は検出限界以下となり、もう 1 頭も比較的低いウイルス量 (10^4 コピー/ml 以下) を示した。90-010-Ie 共有ワクチン接種サル 2 頭のうち 1 頭でも持続感染成立が阻止されウイルス量は検出限界以下となったが、もう 1 頭は高いウイルス量 (10^4 コピー/ml 以上) を示した。90-088-Ij 共有ワクチン接種サルは 2 頭とも持続感染を呈し、高いウイルス量を示した。

各ワクチン接種サルの SeV-Gag ブースト後の Gag 特異的 CTL レベル (図 2) を調べたところ、90-120-Ia 共有サルは高い Gag 特異的 CTL レベルを示したが、残りの 3 つの MHC-I ハプロタイプ共有サルでは、持続感染成立阻止の有無 (阻止群：R01-009、R01-008、[R03-021] / 非阻止群：R01-010、R02-001、R03-015) と Gag 特異的 CTL レベル間に有意な相関は認められなかった。

(2) ナイーブ CD8 陽性細胞の培養細胞レベルでの SIV 複製抑制能の解析：解析系を確立し、4 頭の PBMC を用いた検討を行った。その結果、そのうちの 1 頭 (図 3 左上) において、ナイーブ CD8 陽性細胞の高い SIV 複製抑制効果が認められた。

D. 考察

MHC-I ハプロタイプ別のワクチン有効性の解析において、MHC-I ハプロタイプ 90-120-Ia 共有サルおよび 90-010-Id 共有サルでは、ワクチンによる SIV 複製抑制効果が認められたが、90-010-Ie 共有サルおよび 90-088-Ij 共有サルでは、ワクチンの有効性が明確でなかった。さらに、持続感染成立阻止の有無と Gag 特異的 CTL レベル間に有意な相関は認められなかった。したがって、本研究は、MHC-I ハプロタイプ依存的なワクチン効果を初めて明示するものであるとともに、この CTL 誘導型予防エイズワクチンによる持続感染成立阻止において、誘導される CTL の量だけではなく質も重要である可能性を示唆するものである。

ナイーブ CD8 陽性細胞の培養細胞レベルでの SIV 複製抑制能の解析においては、個体によっては、高い SIV 複製抑制能を示す CD8 陽性細胞を有していることが示された。したがって、CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能に影響する宿主因子の存在の可能性が考えられ、今後、その同定に努める予定である。

E. 結論

ワクチンにより SIV 持続感染成立阻止にいたる MHC ハプロタイプ共有サル群および持続感染成立が阻止できない MHC ハプロタイプ共有サル群を見出した。また、その有効性の有無は、誘導される CTL レベルだけで決まるものではないことも示された。この結果は、MHC-I ハプロタイプ依存的なワクチン効果を初めて明示するものであり、CTL 誘導型予防エイズワクチン開発における CTL の質の解析の重要性を示唆するものとして重要である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1 論文発表

- (1) Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Takeda A, Igarashi H, Watkins DI, Matano T. Long-term control of simian immunodeficiency virus replication with central memory CD4⁺ T-cell preservation after non-sterile protection by a cytotoxic T lymphocyte-based vaccine. *J Virol* 81:5202-5211, 2007.
- (2) Nagai Y, Inoue M, Iida A, Zhu Y-F, Hasegawa M, Kato A, Matano T. Sendai virus engineering: From reverse genetics to vector development. *Virus Expression Vectors* (Ed.: Hefferon KL), *Trasworld Research Network*, 123-146, 2007.
- (3) Yamamoto H, Kawada M, Takeda A, Igarashi H, Matano T. Post-infection immunodeficiency virus control by neutralizing antibodies. *PLoS ONE* 2:e540, 2007.
- (4) Morikawa Y, Goto T, Yasuoka D, Momose F, Matano T. Defect of human immunodeficiency virus type 2 Gag assembly in *saccharomyces cerevisiae*. *J Virol* 81:9911-9921, 2007.
- (5) Tsukamoto T, Yuasa M, Yamamoto H, Kawada M, Takeda A, Igarashi H, Matano T. Induction of CD8⁺ cells able to suppress CCR5-tropic simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication by controlled infection of CXCR4-tropic simian-human immunodeficiency virus in vaccinated rhesus macaques. *J Virol* 81:11640-11649, 2007.
- (6) Takeda A, Matano T. Inhibition of infectious murine leukemia virus production by Fv-4 env gene products exerting dominant negative effect on viral envelope glycoprotein. *Microbes Infect*, 9:1590-1596, 2007.
- (7) Moriya C, Igarashi H, Takeda A, Tsukamoto T, Kawada M, Yamamoto H, Inoue M, Iida A, Shu T, Hasegawa M, Nagai Y, Matano T. Abrogation of AIDS vaccine-induced cytotoxic T lymphocyte efficacy in vivo due to a change in viral epitope flanking sequences. *Microbes Infect*, in press.
- (8) Tsukamoto T, Dohki S, Ueno T, Kawada M, Takeda A, Yasunami M, Naruse T, Kimura A, Takiguchi M, Matano T. Determination of a major histocompatibility complex class I restricting simian immunodeficiency virus Gag241-249 epitope. *AIDS*, in press.
- (9) Takeuchi H, Matano T. Host factors involved in resistance to retroviral infection. *Microbiol Immunol*, in press.

2 学会発表

- (1) Tsukamoto T, Yuasa M, Kawada M, Takeda A, Matano T. Effective CD8(+) cell responses against SIV superchallenge in SHIV-controllers. 4th IAS Conference on HIV pathogenesis, Treatment and Prevention, Sydney, Australia, 7/22-25/2007.
- (2) Matano T, Tsukamoto T, Yuasa M, Yamamoto H, Kawada M. Induction of CD8 cell responses able to suppress CCR5-tropic SIVmac239 replication by controlled SHIV infection in rhesus macaques. The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 9/1-5/2007.
- (3) Moriya C, Horiba S, Matano T. Efficient antigen-specific CTL induction by a recombinant Sendai virus vector vaccine in rhesus macaques

with pre-existing anti-vector antibodies The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 9/1-5/2007.

- (4) Matano T, Kawada M, Kuwano T, Naruse T, Kimura A. Association of AIDS vaccine efficacy with MHC haplotypes in rhesus macaques. The 25th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Monterey, CA, USA, 9/10-13/2007.
- (5) 守屋智草、井上誠、飯田章博、朱亜峰、長谷川護、俣野哲朗. センダイウイルスベクターエイズワクチンの免疫誘導効率に対する抗ベクター抗体の影響の解析. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、3D14、札幌、10/23/2007.
- (6) 守屋智草、井上誠、飯田章博、朱亜峰、長谷川護、俣野哲朗. 抗原特異的細胞性免疫誘導に必要なセンダイウイルスベクターワクチン接種量の解析. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、3D14、札幌、10/23/2007.
- (7) 塚本徹雄、俣野哲朗. CD8 陽性細胞集団のエイズウイルス抑制能を評価する. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、3WSB3、札幌、10/23/2007.
- (8) Matano T. CD8 cell responses against SIV replication. International Symposium on Basic and Applied Immunobiology, Beijing, China, 10/29/2007.

- (9) Matano T. SIV replication under CD8 cell responses. Center for AIDS Research, Kumamoto University, 10th Anniversary Symposium, Kumamoto, Japan, 11/15/2007.
- (10) Matano T. The Current Progress in AIDS Vaccine Development. International Forum of Crisis Management for Infectious Disease, Tokyo, Japan, 11/18/2007.
- (11) 川田真幹、俣野哲朗. CTL 誘導エイズワクチン接種サルへのエスケープ変異ウイルス感染実験. 第 21 回日本エイズ学会学術集会、OS07-53、広島、11/28/2007.
- (12) 守屋智草、堀場聡、井上誠、飯田章博、朱亜峰、長谷川護、俣野哲朗. 抗ベクター抗体存在下におけるセンダイウイルスベクターエイズワクチンの CTL 誘導能の解析. 第 11 回日本ワクチン学会学術集会、横浜、12/9/2007.
- (13) 俣野哲朗. 予防エイズワクチン開発: HIV 感染拡大阻止への期待. ワクチン開発の研究・評価に関するフォーラム: 日本発のワクチン開発をめざして II、東京、1/21/2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

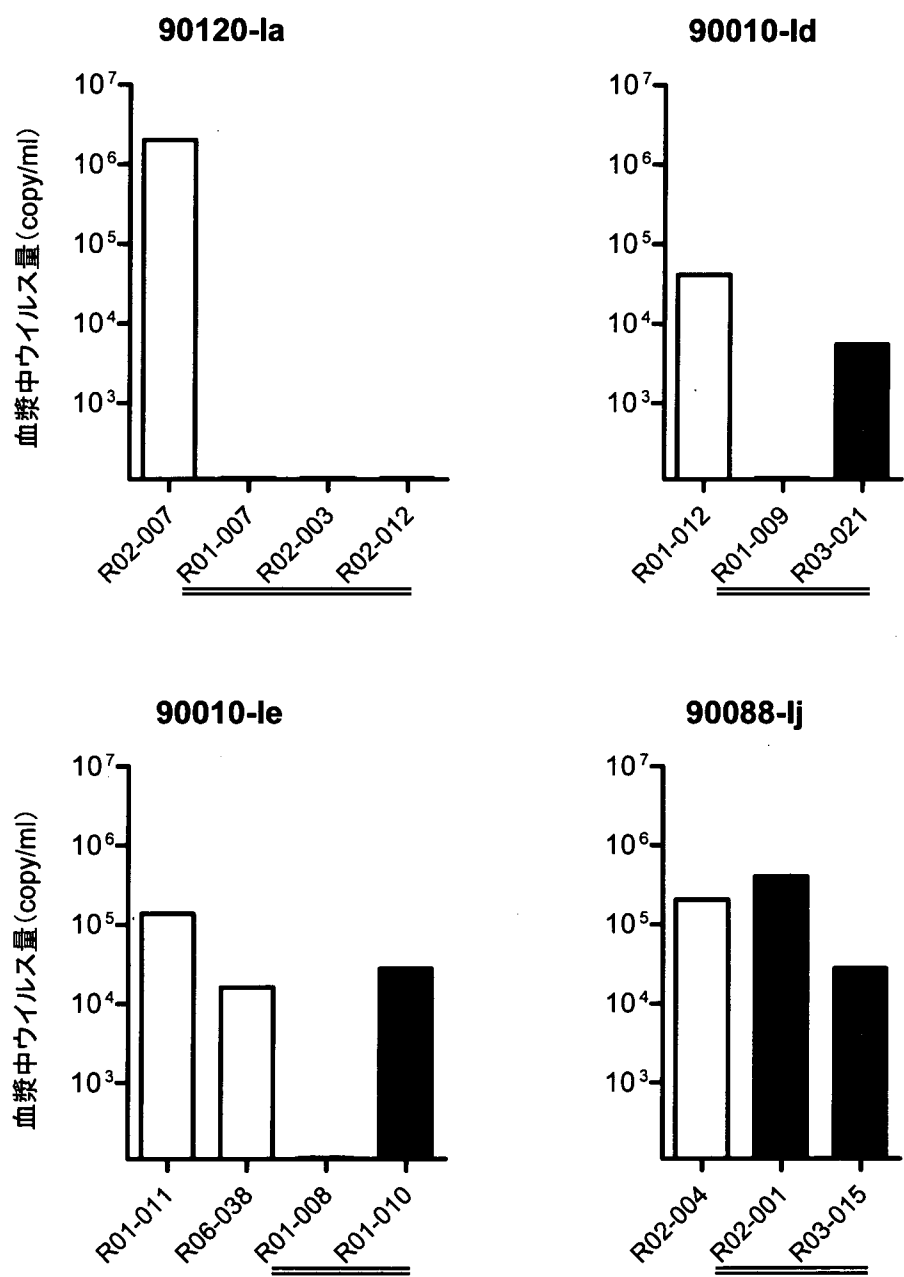


図1 MHC-Iハプロタイプ別のSIVチャレンジ後2ヶ月の血漿中ウイルス量
各ハプロタイプ共有群のうち二重線を引いたものはワクチン接種群である。

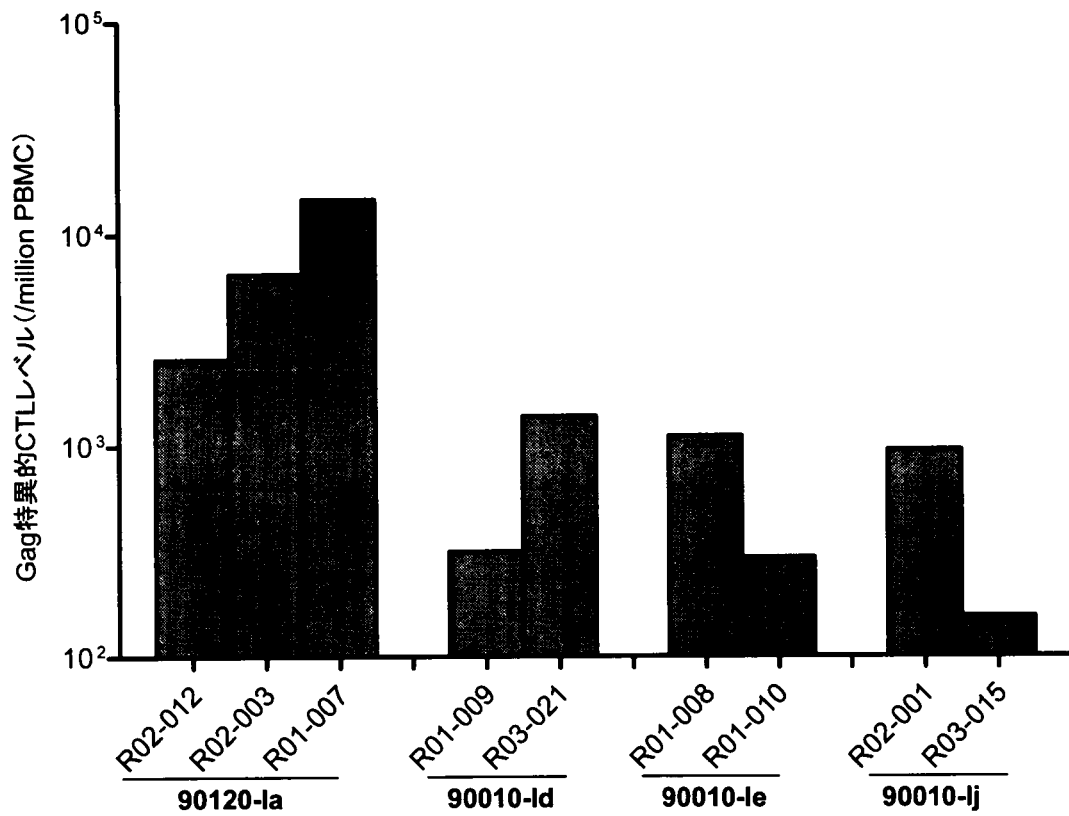


図2 ワクチン接種サルMHC-Iハプロタイプ別のSeV-Gag接種後のGag特異的CTLレベル

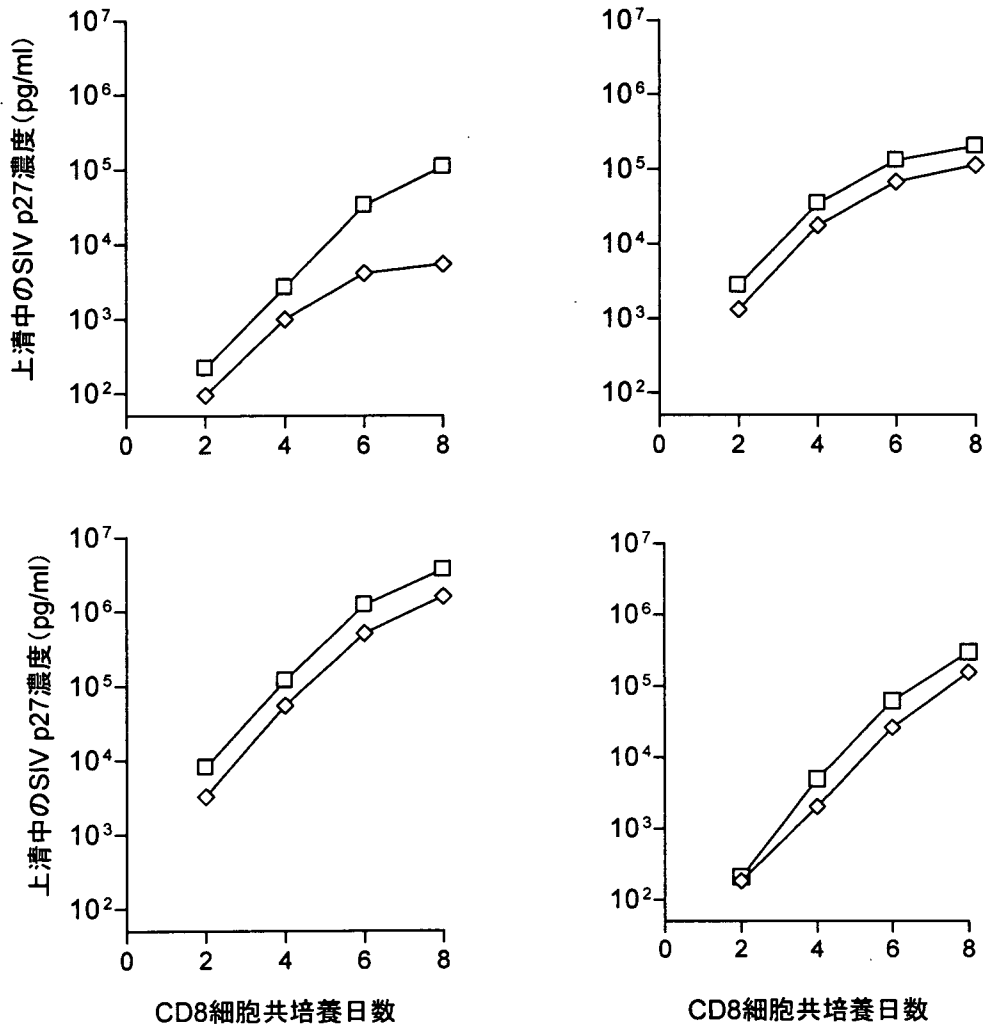


図3 CD8陽性細胞のSIV複製抑制能
4頭の実験結果を示す。四角はCD8陽性細胞非存在下におけるSIV増殖、三角は
ナイーブCD8陽性細胞存在下におけるSIV増殖を示す。