

200808015A

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 俣野 哲朗

平成21(2009)年 3月

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 俣野 哲朗

平成21(2009)年 3月

研究組織

研究者氏名		所属	職名
俣野 哲朗	研究代表者	東京大学医科学研究所	教授
木村 彰方	研究分担者	東京医科歯科大学難治疾患研究所	教授
朱 亜峰	研究分担者	ディナベック株式会社	事業開発本部長
明里 宏文	研究分担者	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
研究代表者：俣野哲朗（東京大学医科学研究所・教授）	
II. 分担研究報告書	
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	11
研究代表者：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
研究分担者：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
研究分担者：朱 亜峰（ディナベック株式会社・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
研究分担者：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	31
IV. 研究成果の刊行物・別刷	33

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

研究代表者 俣野 哲朗 東京大学医科学研究所教授

研究要旨

世界の HIV 感染者数増大は深刻な問題であり、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可能性が考えられ、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効果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、ビルマ産アカゲザ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 20 年度には、(1)これまでの研究でワクチン有効性が認められた MHC-I ハプロタイプ 90-120-Ia 陽性サル群での解析を進め、そのワクチン有効性に関与すると考えられる Gag241-249 エピトープ特異的 CTL を誘導する単独エピトープ発現ワクチンベクターを構築した。このベクターを用いることにより、エピトープ特異的 CTL メモリーの誘導が HIV 曝露後の有効な CTL 誘導や HIV 複製制御にいかにか結びつくかという問題の解決が可能となることが期待される。また、アカゲザルの MHC-I 遺伝子である Mamu-A 遺伝子の多様性を遺伝子配列レベルで解析し、個体ごとに発現する遺伝子数が異なること、一般的には各ハプロタイプには高発現 Mamu-A が 1 個と低発現 Mamu-A が複数個存在することを確認した。(2)霊長類間での比較ゲノム解析から、TLR4 遺伝子の細胞外ドメインの一部が旧世界ザル以降に進化速度が速くなっていることを見出した。この結果から、旧世界ザル以降の霊長類の進化におけるウイルス等微生物感染の強い正の選択圧が示唆された。(3)昨年度の解析で、サル細胞での SIV 複製に重要な役割を担っていることが示されたサイクロフィリン A (CypA) について、SIV 複製サイクルの侵入後逆転写までの過程および感染性ウイルス産生過程に影響を及ぼしていることが示され、ヒト細胞での HIV 複製における CypA の影響と同様であることが示された。本研究の進展は、CTL 誘導型予防エイズワクチン有効性への宿主ゲノム多様性の影響の解明に結びつき、現在計画中のワクチン臨床試験第 1 相に引き続き第 2・3 相への進展に向けてのさらなる根拠の提示に貢献することが期待される。

研究分担者

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

近年の HIV 治療薬開発の進展にもかかわらず、世界における HIV 感染者数の増大は深刻な問題である。HIV 感染者数の増大は、薬剤耐性 HIV や新興再感染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、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、免疫応答に関わる宿主ゲノム多様性の関与を理解することで、より有効なワクチン開発に結びつくことが期待される。

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、ビルマ産アカゲザ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 20 年度は、主に以下の検討を行った。

- (1a) これまでの研究でワクチン有効性が認められた MHC-I ハプロタイプ 90-120-1a 陽性サル群について、その有効性の機序解明に向けた解析を進めた。まず、その有効性に関与すると考えられる 3 つのエピトープ特異的 CTL 反応を解析し、さらに、そのうちの一つの CTL エピトープ Gag241-249 を単独で発現するワクチンベクターを構築して、その CTL 誘導能を検討した。
- (1b) アカゲザルの MHC-I 遺伝子構造の解明を進展させるべく、Mamu-A 遺伝子多様性の詳細な解析を行った。
- (2) 宿主自然免疫反応に関与する TLR4 等の遺伝子について、霊長類間での比較ゲノム解析を行った。

- (3) 平成 19 年度の解析で、サル細胞での SIV 複製に重要な役割を担っていることが示された CypA が、SIV 複製サイクルのどの過程に影響を与えているかについて検討した。

B. 研究方法

- (1a) DNA/SeV-Gag ワクチン接種後 SIVmac239 チャレンジを行った 90-120-1a 陽性アカゲザルにおいて、これまで同定してきた 3 つのエピトープ (Gag206-216, Gag241-249, Gag373-380) 特異的 CTL 反応の解析を行った。さらに、単独 Gag241-249 エピトープ発現ワクチンベクターとして、Gag241-249 を含むペプチドと EGFP 融合蛋白を発現するプラスミド DNA および SeV ベクターを構築し、そのワクチン接種サルにおいて Gag241-249 特異的 CTL 誘導の有無を検討した。(俣野・朱)
- (1b) アカゲザル MHC-I 遺伝子多型の解析を進展させた。特に Mamu-A 遺伝子多様性の遺伝子配列レベルでの詳細な解析を進め、系統樹解析を行うとともに、個体ごとに代表的な発現アレルを決定した。(木村)
- (2) 進化学的な観点から HIV/AIDS 関連遺伝子の同定を行うことを企図し、その前段階として、霊長類における免疫関連遺伝子における進化的選択圧がかかるドメインを特定する方法論を検討することとした。霊長類 7 種について TLR とその関連遺伝子群の配列を決定し、比較ゲノム解析による遺伝子進化の解析を行い、選択圧のかかった領域を推定した。(木村)
- (3) サル細胞での SIV 複製サイクルにおいて、CypA が影響する過程を知る目的で、SIV 感染後のウイルス DNA 合成量を測定し、SIV 感染効率への CypA 阻害剤 (サイクロスポリン A [CsA]) の影響を検討した。一方、CTL の標的認識の回避に寄与しうる HIV Nef 蛋白について、これまでの我々の知見を基に、MHC-I 発現制御機能領域の変異体とその宿主因子である AP-1 の mu1A 鎖との相互作用に関しての解析を行った。(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) 90-120-Ia 陽性サルにおける Gag 特異的 CTL 反応の解析では、SIV チャレンジ後は、いずれの3つのエピトープ (Gag206-216、Gag241-249、Gag373-380) 特異的 CTL についても効率よい誘導が認められた。さらに、構築した単独 Gag241-249 エピトープ発現ワクチンベクターを用いたプライム・ブーストワクチン接種により、効率よい Gag241-249 特異的 CTL の誘導が認められた。(図1)。(侯野・朱)
- (1b) Mamu-A・Mamu-B 遺伝子の cDNA のクローニングを継続した。さらに、塩基配列解析・家系情報解析により、ハプロタイプ上の Mamu-A 遺伝子構造を推定した(表1)。塩基配列を決定した cDNA の約 2/3 がこれまでに報告のない新規アレルであり、各ハプロタイプは、基本的には1個の高発現遺伝子 (Mmau-A1) と、複数の比較的発現の低い遺伝子群 (minor Mamu-A) とで構成されていた。一方、系統樹解析を行うと、Mamu-A1 の多様性が極めて大きいこと、minor Mamu-A のアレルはクラスターを成していることが判明した(図2)。(木村)
- (2) 自然免疫系に係る TLR 遺伝子群 (TLR1~TLR10) および関連遺伝子群 (MYD88, TILAP, TICAM1, TICAM2, MD2 および CD14) について、ヒト、チンパンジー、ポノゴ、ゴリラ、オランウータン、カニクイザル、アカゲザルの遺伝子配列を決定した。TLR4 の細胞外ドメインには正の選択圧 (アミノ酸置換を伴う塩基変異が多い) があり、これに対して、TLR7 の細胞内領域と MYD88 には負の選択圧 (アミノ酸置換を伴う塩基変異が極めて少ない) ことが判明した。TLR4 の細胞外ドメインへの進化圧が霊長類の進化のどの時点で生じたのかを推定する目的で、原猿類、新世界ザルを含めて合計 25 種の霊長類について TLR4 の選択圧関連領域の塩基配列を決定して比較した。その結果、正の選択圧は旧世界ザル以降に生じたものと考えられた。(木村)
- (3) SIV 産生細胞の CsA 処理および SIV 感染標的細胞の CsA 処理いずれにおいても、SIV cDNA 合成効率の低下がみられ、SIV 粒子内の CypA だけでなく感染標的細胞内の CypA も、SIV 感染後のウイルス DNA 合成効率を維持するのに必要であることが示唆された(図3)。一方、Nef, mu1A 鎖、MHC-I の細胞内動態解析では、Nef, mu1A 鎖および MHC-I 分子が細胞内のエンドソームもしくはライソソームで共局在していることが認められた。一方で、MHC-I 発現

抑制機能が著しく低下した変異体 W13A、V16E、V16R では MHC-I 発現は細胞表面において高率に認められ、3分子の共局在が殆ど見られなかったのに対し、比較的機能が残存していた W13Y、V16A では共局在が認められた。(明里)

D. 考察

エイズワクチン開発においては、HIV に曝露した際、どのような免疫誘導が HIV 複製抑制に結びつくかということを知ることが重要であるが、さらに、ワクチンによりどのような免疫を誘導すれば HIV 曝露後の有効な免疫誘導に結びつくかということも重要である。これらの課題解決に向け、本研究では、ワクチンにより SIV 持続感染成立阻止にいたる 90-120-Ia 陽性サル群を用いた解析を進展させた。特に、構築に成功した単独エピトープ特異的 CTL 誘導システムは、Gag241-249 エピトープ特異的 CTL メモリーの誘導が、SIV チャレンジ後の有効な CTL 誘導、さらには SIV 複製制御に結びつくかという問題解決に貢献する有用な系であると考えられる。

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。解析対象のビルマ産アカゲザルで決定したアレルの 2/3 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が、残りの既知のアレルはインド産あるいは中国産のアカゲザルと同程度に一致していた。このことは、これらの地域のアカゲザルはもともと同一集団から派生したが、長期間地理的に隔離されて独自の集団を形成したことを示唆する。ビルマ産アカゲザルでは、インド産アカゲザルで SIV elite controller とされる Mamu-A*01 および Mamu-B*17 は認められず、従来報告されているアレルとは全く異なる SIV elite controller が発見される可能性が期待されることから、今後さらに Mamu-A、Mamu-B 遺伝子解析を進める予定である。

一方、進化遺伝学的な観点からの比較ゲノム解析によって HIV/AIDS 関連遺伝子の候補を選択する試みを実施した。霊長類において(i)正の自然選択を受け、(ii)アカゲザルを含む旧世界ザル以降に多様性を増加し、(iii)ヒトやアカゲザルと比較してチンパンジーでのゲノム多様性が小さい、の3条件を満たす遺伝子を選択すれば、それらが HIV/AIDS 関連遺伝子の候補となる。本研究では、TLR4 遺伝子の細胞外ドメインはこれらの条件を満たしており、今後 TLR4 遺伝子のゲノム多様性と AIDS およびワクチン効果との関連を検討する予定である。

SIV 複製に影響する因子の解析では、SIV 産生サル細胞の CsA 処理により、産生される SIV 粒子内への CypA 取り込み効率が低下し、その感染性が阻害された。さらに、SIV 感染標的細胞の CsA 処理によっても感染効率の低下がみられた。したがって、サル細胞での SIV 複製における CypA の関与は、ヒト細胞での HIV 複製における CypA の関与と同様な機序である可能性が示唆された。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。

また、Nef 蛋白による MHC class-I 発現抑制機能は HIV・SIV 共に認められ、HIV・SIV 持続感染における免疫回避に貢献している可能性が高い。我々はこれまで、Nef N 末端領域に MHC-I 発現抑制に寄与する Nef WVM motif を見出したが、今年度の結果から、この motif は mu1A 鎖との特異的相互作用により MHC-I 発現制御に寄与しているものと考えられた。

E. 結論

DNA/SeV-Gag ワクチンにより SIV 持続感染成立阻止にいたる MHC-I ハプロタイプ 90-120-Ia 陽性サルにおける解析を進めた。Gag241-249 エピトープを単独で発現させるワクチンベクターを構築し、90-120-Ia 陽性サルへの接種により、Gag241-249 特異的 CTL を誘導できることを示した。このワクチンベクターを用いた実験系は、エピトープ特異的 CTL メモリーの誘導がどのような SIV 複製抑制効果をもたらすかを明らかにするための系として期待される。

アカゲザルにおける CTL 免疫応答の個体差形成に関わる MHC-I 遺伝子群の多様性を遺伝子配列レベルで解明した。さらに、進化遺伝学的な観点からのアプローチによって免疫応答の個体差形成に関わる遺伝的要因を検討することで、より有効なワクチン効果をもたらすための戦略が得られる可能性があると考えられる。

SIV 複製に影響する因子の解析では、平成 19 年度にサル細胞での SIV 複製に重要な役割を担っていることを示した CypA について、SIV 複製サイクルの侵入後逆転写までの過程および感染性ウイルス産生過程に影響を及ぼしていることが示され、ヒト細胞での HIV 複製における CypA の影響と同様であることが示された。Nef WVM motif については、mu1A 鎖との特異的相互作用により MHC-I 発現制御に寄与しているものと考えられた。

本研究の進展は、CTL 誘導型予防エイズワクチ

ン有効性への宿主ゲノム多様性の影響の解明に結びつき、現在計画中のワクチン臨床試験第 1 相に引き続き第 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) Seki S, Kawada M, Takeda A, Igarashi H, Sata T, Matano T. Transmission of simian immunodeficiency virus carrying multiple cytotoxic-T-lymphocyte escape mutations with diminished replicative ability can result in AIDS progression in rhesus macaques. *J Virol* 82:5093-5098, 2008.
- (2) 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* 22:993-994, 2008.
- (3) Moriya C, Horiba S, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Matano T. Antigen-specific T-cell induction by vaccination with a recombinant Sendai virus vector even in the presence of vector-specific neutralizing antibodies in rhesus macaques. *Biochem Biophys Res Commun* 371:850-854, 2008.
- (4) Takeuchi H, Matano T. Host factors involved in resistance to retroviral infection. *Microbiol Immunol* 52:318-325, 2008.
- (5) Yamamoto H, Matano T. Anti-HIV adaptive immunity: determinants for viral persistence. *Rev Med Virol* 18:293-303, 2008.
- (6) Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Iwamoto N, Kurihara K, Takeda A, Moriya C, Takeuchi H, Akari H, Matano T. Gag-specific cytotoxic T lymphocyte-based control of primary simian immunodeficiency virus replication in a vaccine trial. *J Virol* 82:10199-10206, 2008.
- (7) Takeda A, Igarashi H, Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Inoue M, Iida A, Shu T, Hasegawa M, Matano T. Evaluation of the immunogenicity of replication-competent V-knocked-out and replication-defective F-deleted Sendai virus vector-based vaccines in macaques. *Vaccine* 26:6839-6843, 2008.
- (8) Nakajima T, Kimura A: Genetic factors which confer sensitivity to highly active antiretroviral therapy (HAART) in HIV-infected subjects: implication of a benefit of an earlier initiation of HAART in HIV therapy. *Pharmacogenomics*

9:1347-1351, 2008.

- (9) Nakajima T, Ohtani H, Satta Y, Uno Y, Akari H, Ishida T, Kimura A. Natural selection in the TLR-related genes in the course of primate evolution. *Immunogenetics* 60:727-735, 2008.
- (10) Nakajima T, Kaur G, Mehra NK, Kimura A. HIV-1/AIDS susceptibility and copy number variation in CCL3L1, a gene encoding a natural ligand for HIV-1 co-receptor CCR5. *Cytogenet Genome Res*, in press.
- (11) Izumi T, Takaori-Kondo A, Shirakawa K, Higashitsuji H, Itoh K, Io K, Matsui M, Iwai K, Kondoh H, Sato T, Tomonaga M, Ikeda S, Akari H, Koyanagi Y, Fujita J, Uchiyama T. Mdm2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif. *Retrovirology* 6:1, 2009.
- ## 2 学会発表
- (1) Matano T. A CTL-based AIDS vaccine using a Sendai virus vector. The 7th Japan-China International Conference of Virology, Tokyo, Japan, 6/2/2008.
- (2) 侯野哲朗. エイズ. 第 34 回日本医学会シンポジウム、東京、7/17/2008.
- (3) Iwamoto N, Yamamoto H, Tsukamoto T, Kuwano T, Kawada M, Matano T. Induction of CD8 cells with strong anti-SIV efficacy in macaques passively immunized with neutralizing antibody. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 9/9/2008.
- (4) Matano T. The impact of T-cell and antibody responses on SIV replication. US-Japan Cooperative Medical Science Program, 21th Joint Meeting of the AIDS Panels, Tokyo, Japan, 9/12/2008.
- (5) Kuwano T, Kawada M, Tsukamoto T, Iwamoto N, Matano T. Influence of MHC-I polymorphisms on the efficacy of a T cell-based vaccine in a macaque AIDS model. The 9th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 9/18/2008.
- (6) Matano T. Impact of vaccine-induced Gag-specific CTL responses on SIV control. The 9th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 9/19/2008.
- (7) 塚本徹雄, 川田真幹, 岩本南, 桑野哲矢, 井上誠, 飯田章博, 朱亜峰, 長谷川護, 侯野哲朗. CTL エピトープのみ発現する予防エイズワクチンの検討. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、10/28/2008.
- (8) 岩本南, 山本拓也, 山本浩之, 塚本徹雄, 桑野哲矢, 川田真幹, 横田(恒次)恭子, 侯野哲朗. 感染急性期の中和抗体受動免疫による細胞性免疫誘導および長期の SIV 複製抑制効果. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、10/28/2008.
- (9) 桑野哲矢, 川田真幹, 塚本徹雄, 岩本南, 井上誠, 飯田章博, 朱亜峰, 長谷川護, 侯野哲朗. サルエイズモデルにおける宿主 MHC 遺伝子多型の細胞性免疫誘導ワクチン効果への影響の解析. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、10/28/2008.
- (10) 石井洋, 川田真幹, 武内寛明, 明里宏文, 上野貴将, 滝口雅文, 侯野哲朗. Gag 特異的 CTL クローンの SIV 複製抑制能の解析. 第 22 回日本エイズ学会学術集会、大阪、11/28/2008.
- (11) Matano T, Yamamoto T, Iwamoto N, Yamamoto H, Kawada M. Induction of functional T-cell responses in neutralizing antibody-triggered SIV control. The 26th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, San Juan, Puerto Rico, 12/12/2008.
- (12) 侯野哲朗. エイズワクチン開発の国際共同研究センダイ・ベクタープロジェクト始まる. 千里ライフサイエンスセミナー: 免疫・感染症シリーズ第 2 回「新興・再興感染症のトピックス」、吹田、1/30/2009.
- (13) 侯野哲朗. CTL のエイズウイルス複製抑制効果: サルエイズモデルにおける解析. 京都大学ウイルス研究所シンポジウム「霊長類を用いた生命科学研究」、京都、2/18/2009.
- (14) 中島敏晶, 大谷仁志, 颯田葉子, 宇野泰広, 明里宏文, 石田貴文, 木村彰方: 霊長類における Toll-like receptor (TLR) 関連遺伝子の分子進化と自然選択 第 10 回日本進化学会 ワークショップ、東京、2008 年 8 月
- (15) 中島敏晶, 大谷仁志, 颯田葉子, 宇野泰広, 明里宏文, 石田貴文, 木村彰方: 霊長類における Toll-like receptor (TLR) 関連遺伝子の分子進化と自然選択 第 17 回日本組織適合性学会、大阪、2008 年 9 月
- (16) 中島敏晶, 大谷仁志, 颯田葉子, 宇野泰広, 明里宏文, 石田貴文, 木村彰方: 霊長類における Toll-like receptor (TLR) 関連遺伝子の分子進化と自然選択 第 53 回日本人類遺伝学会、横浜、2008 年 9 月
- (17) Naruse T, Chen Z, Yanagida R, Hinohara K, Mori K, Matano T, Miyazawa M, Kimura A: Diversity of MHC class I-A genes in rhesus macaque. 第 8 回あわじしま感染症・免疫フォーラム、兵庫、2008 年 9 月.
- (18) 成瀬妙子, 柳田梨紗, 侯野哲朗, 森 一泰, 保富康宏, 宮澤正顕, 木村彰方: ヒトおよびアカゲザルにおける NKG2D レセプター関連遺伝子の多型解析. 第 17 回日本組織適合性学会大会、大阪、2008 年 9 月.

- (19) 成瀬妙子、陳 智勇、柳田梨紗、日野原邦彦、森 一泰、俣野哲朗、宮澤正顕、木村彰方：アカゲザル MHC-A (Mamu-A) 遺伝子群の多様性。日本人類遺伝学会第 53 回大会、横浜、2008 年 9 月。
- (20) Naruse T, Kimura A: Immunogenetics of MHC in susceptibility to infectious disease. 11th Cardiovascular Genetics and Atherosclerosis Symposium Satellite Meeting, Seoul, Korea, Nov. 2008.
- (21) 成瀬妙子、陳 智勇、柳田梨紗、日野原邦彦、森 一泰、俣野哲朗、宮澤正顕、木村彰方：アカゲザル MHC-A(Mamu-A) 遺伝子群の多様性。BMB2008(第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会)、神戸、2008 年 12 月
- (22) Takeuchi H, Inagaki N, Ishii H, Kuwano T, Akari H, Matano T: Cyclophilin A affects SIV replication positively in monkey but negatively in human cells. Cold Spring Harbor meeting on Retroviruses, New York, May 2008.
- (23) 武内寛明、石井洋、桑野哲夫、稲垣奈都子、明里宏文、俣野哲朗：Cyclophilin A はサルエイズウイルスの宿主域を規定する細胞性因子である。第 56 回日本ウイルス学会学術集会（岡山市）平成 20 年 10 月
- (24) 飯島沙幸、李永仲、明里宏文：HIV-1 Nef の MHC-I 発現抑制機能：AP-1A mu subunit との相互作用と機能発現。第 22 回日本エイズ学会学術集会（大阪）平成 20 年 11 月

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

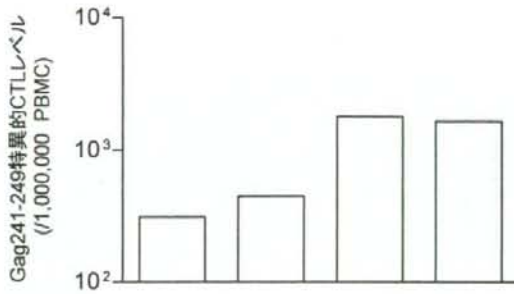


図1 単独エピトープ発現ワクチン接種後のGag241-249特異的CD8 T細胞レベル

系統	産地	haplotype	RSCA-A	cloned A	Major A (A1)	Minor A	その他
90-120	ミャンマー	a	3	2	A1_4301		A1_6501
		b	2	2	A1_1806N	A2_0504	
90-010	ミャンマー	d	2	1	A1_3202N		
		e	3				
90-030	ミャンマー	g	3	2	A1_9401N	A2_0511	
		h	1	1		A4_1403	
90-088	ミャンマー	j	2~3	1	A1_2204N		
		k	4	2	A1_1806N	A2_0528N	
89-002	ラオス	p	2~4	3	A1_1807N	A4_1403	A2_0103N
		q	2~3	1	A1_5002N		
91-010F1		s	3	2	A1_0308	A2_0510	
		t	2	2	A1_2203N	A4_1410N	
95-014F1		z	3	1	A1_1104N		
89-003		89003-1		1	A1_2302N		
89-003		89003-2		1	A1_5602		

表1 アカゲザルMamu-Aハプロタイプ構成

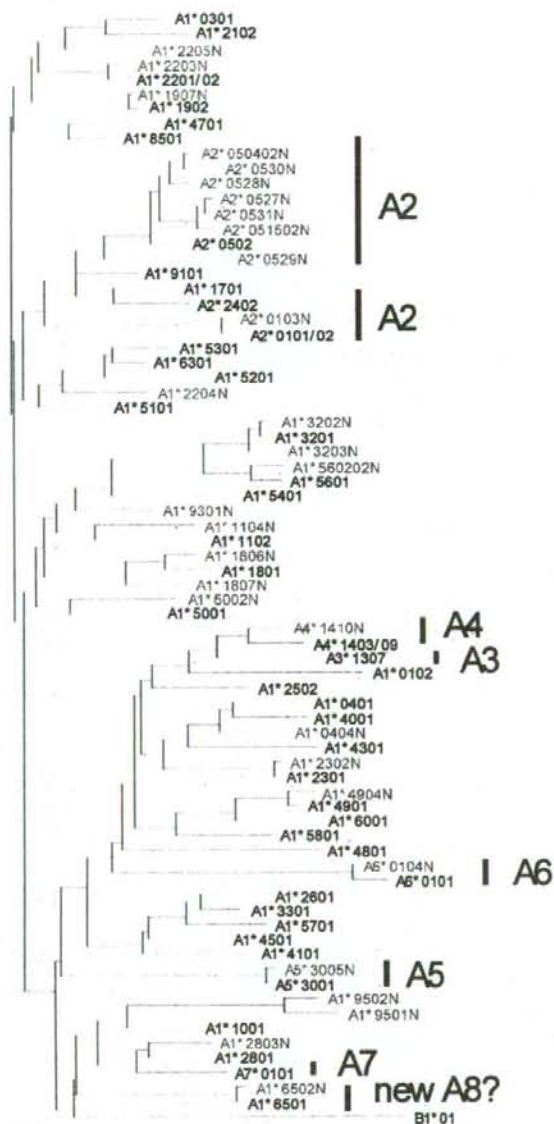
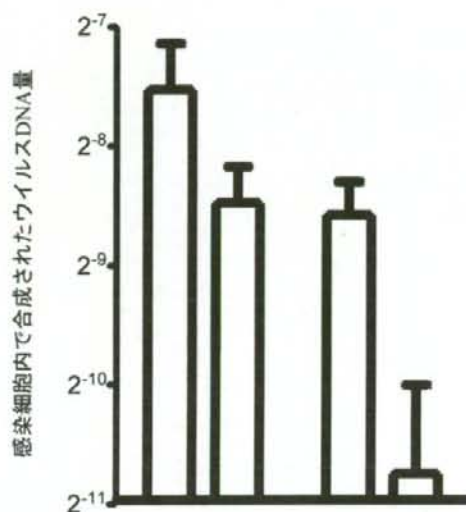


図2 Mamu-A遺伝子アレルの系統樹



ウイルス産生細胞の CsA処理の有無	-	-	+	+
ウイルス標的細胞の CsA処理の有無	-	+	-	+

図3 サルTリンパ球株 (HSC-F細胞) SIV感染効率へのサイクロスポリンA (CsA)の影響
SIV感染24時間後の細胞内合成ウイルスDNA量をリアルタイムPCR法にて測定した。
SIV産生細胞あるいは標的感染細胞をCsA (2.5 μ M) 処理した影響を示す。

Ⅱ. 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

研究代表者 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の 4 つ (90-120-1a、90-010-1d、90-010-1e、90-088-1j) 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、90-120-1a あるいは 90-010-1d を有する群ではワクチン効果がみられないという結果を得た。平成 20 年度は、このうちワクチン効果の認められる 90-120-1a 共有サル群における解析を進め、ワクチン接種群では SIV チャレンジ後急性期に、これまで同定してきた Gag206-216 エピトープ、Gag241-249 エピトープおよび Gag373-380 エピトープ特異的 CTL が効率よく誘導されることを確認した。さらに、このうち SIV 複製抑制に特に重要な役割を担っていることが考えられる Gag241-249 エピトープを単独で発現させるワクチンベクターを構築し、90-120-1a 陽性サルへの接種により、Gag241-249 特異的 CTL を誘導できることを示した。エイズワクチン開発においては、どのような免疫誘導が HIV 複製抑制に結びつくかということを知ることが重要であるが、本研究で得られたワクチンベクターを用いた実験系は、エピトープ特異的 CTL メモリーの誘導がどのような SIV 複製抑制効果をもたらすかを明らかにするための系として期待される。

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 複製抑制 (持続感染成立阻止効果) が認められたため、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) ハプロタイプの中の 4 つ (90-120-1a、90-010-1d、90-010-1e、90-088-1j) 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、MHC-I ハプロタイプによって、ワクチン有効性が認められるものと認められないものがあること、つまりワクチン効果に違いがみられることを明らかにした。平成 20 年度は、ワクチン有効性が認められる 90-120-1a 陽性サルについて、これまで同定してきたエピトープ特異的 CTL 反応を解析し、さらにこのうちのひとつのエピトープを単独で発現するワクチンベクターを構築することとした。

B. 研究方法

(1) 90-120-1a 陽性サルにおける Gag 特異的 CTL 反応の解析: DNA/SeV-Gag ワクチン接種後 SIVmac239 チャレンジを行った 90-120-1a 陽性アカゲサル 4 頭において、ワクチン接種後 (SeV-Gag プースト後) および SIV チャレンジ後の末梢血リンパ球を用い、これまで同定してきた 3 つのエピトープ (Gag206-216、Gag241-249、Gag373-380) 特異的 CTL 反応の解析 (細胞内免疫染色による抗原特異的インターフェロン γ 誘導測定) を行った。

(2) 単独 Gag241-249 エピトープ発現ワクチンベクターの構築: Gag241-249 を含むペプチドと EGFP 融合蛋白を発現するプラスミド DNA および SeV ベクターを構築した。アカゲサル 4 頭にこのワクチン (DNA プライム・SeV プースト) を接種した後の末梢血リンパ球を用い、Gag241-249 特異的 CTL 反応の解析を行った。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、倫理面も含めて、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) 90-120-1a 陽性サルにおける Gag 特異的 CTL 反応の解析 (図 1): DNA/SeV-Gag ワクチン接種後、Gag206-216 特異的 CTL は全頭において認められ、優位となる傾向がみられた。Gag241-249 特異的 CTL も 4 頭中 3 頭に認められたが、Gag373-380 特異的 CTL 誘導は 1 頭にししか認められなかった。一方、SIV チャレンジ後は、いずれのエピトープ (Gag206-216、Gag241-249、Gag373-380) 特異的 CTL についても効率よい誘導が認められた。

(2) 単独 Gag241-249 エピトープ発現ワクチンベクターの構築 (図 2): 単独ベクター発現ベクターを用いたプライム・ブーストワクチン接種により、全頭において、効率よい Gag241-249 特異的 CTL の誘導が認められた。

D. 考察

エイズワクチン開発においては、HIV に曝露した際、どのような免疫誘導が HIV 複製抑制に結びつくかということを知ることが重要であるが、さらに、ワクチンによりどのような免疫を誘導すれば HIV 曝露後の有効な免疫誘導に結びつくかということも重要である。これらの課題解決に向け、本研究では、ワクチンにより SIV 持続感染成立阻止にいたる 90-120-1a 陽性サル群を用いた解析を進展させた。我々の最近の研究により、このワクチン接種群の SIV 複製制御に、Gag206-216、Gag241-249 および Gag373-380 特異的 CTL が中心的役割をしていることが示されたが、本研究により、たしかにこれらのエピトープ特異的 CTL が効率よく SIV 感染急性期に誘導されていることが確認できた。

さらに、本研究では、単独エピトープ特異的 CTL 誘導システムを構築できた。このワクチンベクターを用いた実験系は、Gag241-249 エピトープ特異的 CTL メモリーの誘導が、SIV チャレンジ後の有効な CTL 誘導、さらには SIV 複製制御に結びつくかという問題解決に貢献する有用な系であると考えられる。

E. 結論

DNA/SeV-Gag ワクチンにより SIV 持続感染成立阻止にいたる MHC-I ハプロタイプ 90-120-1a 陽性サルにおける解析を進め、ワクチン接種後の SIV チャレンジにて、急性期に、これまで同定してきた Gag206-216 エピトープ、Gag241-249 エピトープおよび Gag373-380 エピトープ特異的 CTL が効率よく誘導されることを確認した。

さらに、Gag241-249 エピトープを単独で発現させるワクチンベクターを構築し、90-120-Ia 陽性サルへの接種により、Gag241-249 特異的 CTL を誘導できることを示した。このワクチンベクターを用いた実験系は、エピトープ特異的 CTL メモリーの誘導がどのような SIV 複製抑制効果をもたらすかを明らかにするための系として期待される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1 論文発表

- (1) Seki S, Kawada M, Takeda A, Igarashi H, Sata T, Matano T. Transmission of simian immunodeficiency virus carrying multiple cytotoxic-T-lymphocyte escape mutations with diminished replicative ability can result in AIDS progression in rhesus macaques. *J Virol* 82:5093-5098, 2008.
- (2) 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* 22:993-994, 2008.
- (3) Moriya C, Horiba S, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Matano T. Antigen-specific T-cell induction by vaccination with a recombinant Sendai virus vector even in the presence of vector-specific neutralizing antibodies in rhesus macaques. *Biochem Biophys Res Commun* 371:850-854, 2008.
- (4) Takeuchi H, Matano T. Host factors involved in resistance to retroviral infection. *Microbiol Immunol* 52:318-325, 2008.
- (5) Yamamoto H, Matano T. Anti-HIV adaptive immunity: determinants for viral persistence. *Rev Med Virol* 18:293-303, 2008.
- (6) Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Iwamoto N, Kurihara K, Takeda A, Moriya C, Takeuchi H, Akari H, Matano T. Gag-specific cytotoxic T lymphocyte-based control of primary simian immunodeficiency virus replication in a vaccine trial. *J Virol* 82:10199-10206, 2008.
- (7) Takeda A, Igarashi H, Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Inoue M, Iida A, Shu T, Hasegawa M, Matano T. Evaluation of the immunogenicity of replication-competent V-knocked-out and replication-defective F-deleted Sendai virus vector-based vaccines in macaques. *Vaccine* 26:6839-6843, 2008.

2 学会発表

- (1) Matano T. A CTL-based AIDS vaccine using a Sendai virus vector. The 7th Japan-China International Conference of Virology, Tokyo, Japan, 6/2/2008.
- (2) 俣野哲朗. エイズ. 第 34 回日本医学会シンポジウム、東京、7/17/2008.
- (3) Iwamoto N, Yamamoto H, Tsukamoto T, Kuwano T, Kawada M, Matano T. Induction of CD8 cells with strong anti-SIV efficacy in macaques passively immunized with neutralizing antibody. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 9/9/2008.
- (4) Matano T. The impact of T-cell and antibody responses on SIV replication. US-Japan Cooperative Medical Science Program, 21th Joint Meeting of the AIDS Panels, Tokyo, Japan, 9/12/2008.
- (5) Kuwano T, Kawada M, Tsukamoto T, Iwamoto N, Matano T. Influence of MHC-I polymorphisms on the efficacy of a T cell-based vaccine in a macaque AIDS model. The 9th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 9/18/2008.
- (6) Matano T. Impact of vaccine-induced Gag-specific CTL responses on SIV control. The 9th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 9/19/2008.
- (7) 塚本徹雄、川田真幹、岩本南、桑野哲矢、井上誠、飯田章博、朱亜峰、長谷川護、俣野哲朗. CTL エピトープのみ発現する予防エイズワクチンの検討. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、10/28/2008.
- (8) 岩本南、山本拓也、山本浩之、塚本徹雄、桑野哲矢、川田真幹、横田(恒次)恭子、俣野哲朗. 感染急性期の中和抗体受動免疫による細胞性免疫誘導および長期の SIV 複製抑制効果. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、10/28/2008.
- (9) 桑野哲矢、川田真幹、塚本徹雄、岩本南、井上誠、飯田章博、朱亜峰、長谷川護、俣野哲朗. サルエイズモデルにおける宿主 MHC 遺伝子多型の細胞性免疫誘導ワクチン効果への影響の解析. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、10/28/2008.
- (10) 石井洋、川田真幹、武内寛明、明里宏文、上野貴将、滝口雅文、俣野哲朗. Gag 特異的 CTL クローンの SIV 複製抑制能の解析. 第 22 回日本エイズ学会学術集会、大阪、11/28/2008.
- (11) Matano T, Yamamoto T, Iwamoto N, Yamamoto H, Kawada M. Induction of functional T-cell responses in neutralizing antibody-triggered SIV control. The 26th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, San Juan, Puerto Rico, 12/12/2008.

- (12) 俣野哲朗. エイズワクチン開発の国際共同研究センダイ・ベクタープロジェクト始まる. 千里ライフサイエンスセミナー：免疫・感染症シリーズ第2回「新興・再興感染症のトピックス」、吹田、1/30/2009.
- (13) 俣野哲朗. CTL のエイズウイルス複製抑制効果：サルエイズモデルにおける解析. 京都大学ウイルス研究所シンポジウム「霊長類を用いた生命科学研究」、京都、2/18/2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

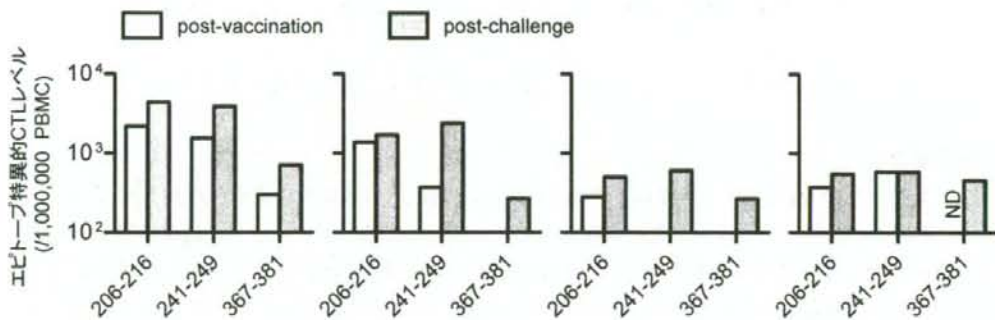


図1 ワクチン後およびSIVチャレンジ後のGagエピトープ特異的CD8 T細胞レベル
 ワクチン接種後およびSIVチャレンジ後のGag206-216、Gag241-249、Gag367-381特異的CD8 T細胞レベルを示す。

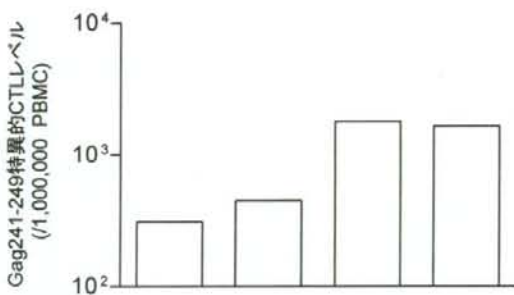


図2 単独エピトープ発現ワクチン接種後のGag241-249特異的CD8 T細胞レベル