

200908006A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 俣野 哲朗

平成22(2010)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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 俣野 哲朗

平成22(2010)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	京都大学霊長類研究所	教授

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 . . .	17
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	22
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	24
研究分担者：明里宏文（京都大学霊長類研究所・教授）	
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宿主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 21 年度には、(1) MHC クラス I (MHC-I) ハプロタイプ別の DNA/SeV-Gag ワクチン効果の解析を頭数を増やして進展させ、90-120-Ia 陽性サル群と 90-010-Id 陽性サル群におけるワクチン有効性を確認した。さらに、ワクチンによる単独 Gag241-249 エピトープ特異的 CTL メモリー誘導が SIV 複製制御に結びつくことを明らかにし、予防ワクチンによる CTL メモリー誘導が曝露後の HIV 複製制御に貢献しうることを初めて証明した。なお、ビルマ産アカゲサル 100 頭の MHC-I (Mamu-A・Mamu-B) 遺伝子塩基配列解析によって同定した 176 アリルのうち 107 アリル (60.8%) は新規アリルであった。(2) 比較ゲノム解析を用いた進化医学的手法により TRIM5a および TIM1 が HIV・エイズ関連遺伝子であることを証明した。(3) 本研究で見いだした Nef の WVM motif は μ 1A 鎖との特異的結合により MHC-I 発現制御を規定することを明らかにした。本研究の成果は、CTL 誘導予防エイズワクチン効果への宿主ゲノム多様性の影響の解明に結びつき、CTL 誘導予防エイズワクチンの論理基盤を提示するものであり、計画推進中の国際共同エイズ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 京都大学霊長類研究所・教授

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、SeV ベクターを用いた CTL 誘導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段階に進む際には、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おい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宿主因子については、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宿主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 21 年度は、主に以下の検討を行った。

- (1a) MHC-I ハプロタイプ別の CTL 誘導ワクチン有効性の解析の進展。
- (1b) 予防ワクチンによる単独エピトープ特異的 CTL メモリー誘導の SIV 感染抑制効果の解析。
- (1c) ビルマ産アカゲサルの MHC-I (Mamu-A・Mamu-B) 遺伝子塩基配列解析。
- (2a) サルの NKG2D レセプターのリガンドである ULBP4 遺伝子の多型解析とその SIV 複製への関与についての検討。
- (2b) ヒトの TRIM5 α 遺伝子多型の解析とその HIV 複製への関与についての検討。
- (2c) 比較ゲノム手法を用いた進化的解析による HIV 感受性に関与する宿主因子の同定。
- (3) 本研究で見いだした Nef の WVM motif の MHC-I 発現制御機序についての検討。

B. 研究方法

- (1a) MHC-I ハプロタイプ別ワクチン効果の解析：各群の頭数を増やして進展させ、ワクチン接種群と非ワクチン接種群の血漿中ウイルス量を比較検討した。(俣野・朱)

(1b) CTL メモリー誘導の抗 SIV 感染効果の解析：MHC-I ハプロタイプ 90-120-1a 陽性アカゲサルを用い、6 頭に Gag241-249 エピトープ単独発現ベクターワクチンを接種した後 SIVmac239 をチャレンジし、血漿中ウイルス量を調べ、非ワクチン接種群 6 頭と比較検討した。(俣野・朱)

(1c) サル MHC-I 遺伝子群の解析：ビルマ産アカゲサル 100 頭の MHC-I 遺伝子群 cDNA をクローニングし塩基配列を決定した。これまでの Mamu-A 遺伝子解析に加え Mamu-B 遺伝子解析を行った。得られた配列をデータベースと比較し、新規アリルについては、公的塩基配列データベースに登録するとともに、動物 MHC 命名委員会に登録して新たな命名を受けた。(木村)

(2a) サル MHC-I 様遺伝子群の解析：ビルマ産アカゲサル 28 頭の ULBP4 ゲノム遺伝子の第 2・第 3 エクソンの塩基配列を決定し、多型領域の分布を明らかにするとともに、多型と SIV 感受性との関連を検討した。(木村)

(2b) ヒト TRIM5 α 遺伝子多型の解析：サルの HIV 感染抵抗性への関与が知られている TRIM5 α について、日本人とインド人のゲノム多様性を解析し、多型と HIV 感受性との関連を検討した。(木村)

(2c) 比較ゲノム手法を用いた進化的解析：霊長類を対象とした比較ゲノム解析として、免疫・炎症に関与する遺伝子群について、進化過程で選択圧がかかった遺伝子を抽出し、そのうち HIV 感受性との関連が推定される遺伝子について、ヒトにおける多型と HIV 感受性との関連を検討した。(木村)

(3) Nef と μ 1A 鎖の相互作用の解析：免疫沈降解析により、HIV Nef あるいは Nef の N 末端領域変異体と μ 1A 鎖の共沈の有無を検討した。また、AMBER 9 ソフトウェアにより分子動態シミュレーションおよび結合エネルギー解析を行った。(明里)

(倫理面への配慮)

組換え生物等に関する第二種使用等拡散防止措置確認申請については、実施機関の承認あるいは文部科学大臣の確認を得ている。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実施機関の動物実験委員会の審査を受け、承諾を得てから開始した。ヒト遺伝子解析研究については実施機関の倫理審査委員会の審査を受け、研究機関長の承認を得ている。

C. 研究結果

- (1a) MHC-I ハプロタイプ別ワクチン効果の解析 (図1): 90-120-1a 陽性群および 90-010-1d 陽性群ではワクチン接種サル全頭で SIV 複製が制御され、ワクチン有効性が確認された。一方、90-088-1j 陽性群ではワクチン接種サル全頭とも非ワクチン接種サルと同様の SIV 持続感染を呈し、ワクチン有効性が認められなかった。
- (1b) CTL メモリー誘導の抗 SIV 感染効果の解析 (図2): 単独エピトープワクチン接種群では、血漿中ウイルス量は非ワクチン接種群と比較して優位に低値を示し、SIV 複製が制御された。
- (1c) サル MHC-I 遺伝子群の解析 (表1): Mamu-A や Mamu-B 等合計 176 対立遺伝子を同定した。これらのうち 107 (60.8%) 遺伝子はこれまでに報告のない新しい対立遺伝子であった。また、既知の対立遺伝子との一致は、ほとんどが中国産アカゲサルとの一致であり、インド産アカゲサルとの一致は限られていた。各々の MHC-I ハプロタイプを構成する Mamu-A・Mamu-B アリルの同定も進展した。
- (2a) サル MHC-I 様遺伝子群の解析: 活性化 NK レセプターである NKG2D レセプターのリガンド ULBP についての解析では、昨年度までに ULBP1・ULBP2・ULBP3 遺伝子の多様性が小さいことを示してきたが、本年度は ULBP4 の解析を行い、16 対立遺伝子を同定して、その多様性が大きいことを見いだした。しかし、SIV 免疫応答への ULBP4 の多様性の寄与は大きくはないと推定された。
- (2b) ヒト TRIM5 α 遺伝子多型の解析 (表2): 10 種類の多型が検出され、His43Tyr、G176del および Gly110Arg 等が HIV 感染抵抗性・感受性と関連することが推定された。
- (2c) 比較ゲノム手法を用いた進化的解析: 免疫関連遺伝子群のうち進化過程での選択圧の指標が高い傾向を示したのものには、既知の HIV・エイズ関連遺伝子である MHC・CCR5・CCL3L1 や、上記の TRIM5 α も含まれていた。そのうちのひとつである TIM1 遺伝子について、タイ人で検討したところ、エイズ関連症状の発生頻度に相関する多型が見いだされた。
- (3) Nef と μ 1A 鎖の相互作用の解析: 免疫沈降解析では、野生型 Nef は μ 1A 鎖と共沈したが M20A 変異体は共沈されなかった。in silico 解析では、野生型 Nef と比較して、M20A および W13A 変異体の μ 1A 鎖への結合エネルギーの顕著な低下がみられ、WVM モチーフが Nef と μ 1A 鎖の結合ドメインであることが示された。

D. 考察

我々がこれまで確立してきた MHC-I ハプロタイプ共有アカゲサル群を用いることにより、MHC-I ハプロタイプ別の CTL 誘導ワクチン有効性を見出すことができた。今後、各々の MHC-I ハプロタイプ共有群におけるワクチン効果の機序の解明の進展が期待される。さらに、ワクチンによる CTL メモリー誘導が HIV 曝露後の HIV 複製制御に結びつくことを初めて明らかにした。CTL 誘導予防エイズワクチンについては、多数のエピトープ特異的 CTL メモリーが誘導されたとしても、HIV の多様性のため、侵入してくる HIV を認識できるものは限られていると考えられる。しかし、本研究の成果は、一つのエピトープ特異的 CTL メモリーが認識できただけでも HIV 複製抑制効果を発揮できる可能性を示している。これらの結果は、学術的に意義の大きい新しい知見であるとともに、CTL 誘導予防エイズワクチン開発の論理基盤として重要な意義を有している。

MHC-I 遺伝子多様性の解析では、ビルマ産アカゲサルは、多くの場合、欧米で使用されているインド産アカゲサルとは異なる Mamu-A・Mamu-B アリルを有していることが確認された。一方、TRIM5 α ・TIM1 等の遺伝子多型が HIV 感受性と関連することを示すことができた。

本研究で新たに見いだされた Nef の WVM motif は μ 1A 鎖との特異的結合により MHC-I 発現制御を規定する機能ドメインであることが示された。トリプトファンをベースとしたいわゆるタイロシンモチーフおよびメチオニン側鎖構造との分子間相互作用が μ 1A 鎖との特異的結合を規定しているという知見はこれまで知られていなかったものである。また本研究で得られた Nef を介する MHC-I 発現制御機序に関する知見は、エイズワクチン開発においても有用である。

E. 結論

SIV Gag 発現 SeV ベクターを用いた CTL 誘導予防エイズワクチンの有効性について、いくつかの MHC-I ハプロタイプ共有サル群の解析を進展させることにより、MHC-I ハプロタイプに依存したワクチン効果を確認した。さらに、ワクチンによる CTL メモリー誘導が曝露後の HIV 複製制御に貢献していることを初めて明らかにした。

ゲノム多様性の解析を進展し、ビルマ産アカゲサル MHC-I 遺伝子群の多様性分布を解明した。また、NKG2D レセプターのリガンドである ULBP4 遺伝子は、アカゲサルでは著明な多様性を

呈することを見いだした。さらに、進化医学的手法により HIV・エイズ関連遺伝子が同定可能であることを示した。一方、本研究で見いだした Nef の WVM motif は $\mu 1A$ 鎖との特異的結合により MHC-I 発現を制御することを明らかにした。本研究の成果は、CTL 誘導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、CTL 誘導予防エイズワクチンの論理基盤を提示するものである。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1 論文発表

- (1) Yamamoto T, Iwamoto N, Yamamoto H, Tsukamoto T, Kuwano T, Takeda A, Kawada M, Tsunetsugu-Yokota Y, Matano T. Polyfunctional CD4⁺ T-cell induction in neutralizing antibody-triggered control of simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 83:5514-5524, 2009.
- (2) Tsukamoto T, Takeda A, Yamamoto T, Yamamoto H, Kawada M, Matano T. Impact of cytotoxic-T-lymphocyte memory induction without virus-specific CD4⁺ T-cell help on control of a simian immunodeficiency virus challenge in rhesus macaques. *J Virol* 83:9339-9346, 2009.
- (3) Shichi D, Ota M, Katsuyama Y, Inoko H, Naruse T, Kimura A. Complex divergence at a microsatellite marker C1_2_5 in lineage of HLA-Cw/-B haplotype. *J Hum Genet* 54:224-229, 2009.
- (4) Nakajima T, Nakayama EE, Kaur G, Terunuma H, Mimaya J, Ohtani H, Mehra N, Shioda Y, Kimura A. Impact of novel TRIM5alpha variants, Gly110Arg and G176del, on the anti-HIV-1 activity and the susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS* 23:2091-2100, 2009.
- (5) Nakajima T, Kimura A. Comparative genomics: insight into human health and disease. In *The HLA Complex in Biology and Medicine: a resource book*. (Mehra N, ed), pp566-588, Jaypee Brothers Medical Publishers Ltd, New Delhi, 2010.
- (6) Iwasaki Y, Akari H, Murakami T, Kumakura S, Dewan MZ, Yanaka M, Yamamoto N. Efficient inhibition of SDF-1 α -mediated chemotaxis and HIV-1 infection by novel CXCR4 antagonists. *Cancer Sci* 100:778-781, 2009.
- (7) Hassan R, Suzu S, Hiyoshi M, Takahashi-Makise N, Ueno T, Agatsuma T, Akari H, Komano J, Takebe Y, Motoyoshi K, Okada S. Dys-regulated activation of a Src tyrosine kinase Hck at the Golgi disturbs N-glycosylation of a cytokine receptor Fms. *J Cell Physiol* 221:458-468, 2009.
- (8) Kuroishi A, Saito A, Shingai Y, Shioda T, Nomaguchi M, Adachi A, Akari A, Nakayama EE. Modification of a loop sequence between alpha-helices 6 and 7 of virus capsid (CA) protein in a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) derivative that has simian immunodeficiency virus (SIVmac239) vif and CA alpha-helices 4 and 5 loop improves replication in cynomolgus monkey cells. *Retrovirology* 6:70, 2009.
- (9) Yamamoto H, Matano T. Neutralizing antibodies in SIV control: co-impact with T cells. *Vaccine*, in press.

2 学会発表

- (1) 俣野哲朗. エイズワクチン開発：HIV 感染防御に何が必要か？. 第 36 回東京大学医学研究所創立記念シンポジウム「感染防御の最前線」、東京、5/29/2009.
- (2) Takahashi N, Tsukamoto T, Iwamoto N, Takahara Y, Naruse T, Kimura A, Matano T. Mapping of cytotoxic T lymphocyte epitopes in rhesus macaques showing vaccine-based control of simian immunodeficiency virus replication. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 9/9/2009.
- (3) Moriya C, Kamada T, Kurihara K, Takahara Y, Inoue M, Shu T, Hasegawa M, Matano T. Immunogenicity of intranasal and intramuscular immunization with a Sendai virus vector. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 9/9/2009.
- (4) Matano T. Effect of vaccine-induced memory T cells on HIV/SIV replication after virus exposure. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 9/11/2009.
- (5) 守屋智草、栗原京子、鎌田健男、井上誠、生亜峰、長谷川護、俣野哲朗. 抗ペクター抗体存在下におけるセンダイウイルスペクターエイズワクチンの CTL 誘導効率の解析. 第 13 回日本ワクチン学会学術集会、札幌、9/27/2009.
- (6) Matano T. Immunogenicity of an intranasal Sendai virus vector vaccine. Japan-France Vaccine and Infectious Diseases Workshop, Osaka, Japan, 10/10/2009.
- (7) Matano T. Sendai virus. Satellite Session: Replicating Viral Vectors for use in AIDS Vaccines, AIDS Vaccine 2009, Paris, France, 10/19/2009.
- (8) Tsukamoto T, Matano T. Impact of single epitope-specific CD8⁺ T cell memory induction by prophylactic vaccination on immunodeficiency virus control. AIDS Vaccine 2009, Paris, France,

- 10/20/2009.
- (9) 守屋智草、鎌田健男、栗原京子、高原悠佑、井上誠、朱亜峰、長谷川護、俣野哲朗。Sendaiウイルスベクターワクチン接種経路の検討。第57回日本ウイルス学会学術集会(2C24)、東京、10/26/2009。
- (10) 岩本南、塚本徹雄、俣野哲朗。広範なSIV特異的細胞性免疫誘導機序の解析。第57回日本ウイルス学会学術集会(2C28)、東京、10/26/2009。
- (11) 高橋尚史、塚本徹雄、岩本南、高原悠佑、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗。細胞性免疫誘導エイズワクチンの有効性が認められたサルにおけるSIV特異的CTLのエピトープ探索。第57回日本ウイルス学会学術集会(2C29)、東京、10/26/2009。
- (12) 高原悠佑、武内寛明、石井洋、高橋尚史、三浦智行、五十嵐樹彦、俣野哲朗。ビルマ産アカゲザルSIV感染により誘導されるCTLエピトープの探索。第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、10/26/2009。
- (13) Takahashi N, Iwamoto N, Moriya C, Tsukamoto T, Matano T. Analysis of a cohort of unvaccinated and vaccinated Burmese rhesus macaques after SIVmac239 challenge. The 27th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Boston, MA, USA, 10/29/2009.
- (14) Moriya C, Kurihara K, Kamada T, Takahara Y, Inoue M, Shu T, Hasegawa M, Matano T. Immunogenicity of a Sendai virus vector vaccine expressing SIV Gag in the presence of anti-vector antibodies. The 27th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Boston, MA, USA, 10/29/2009.
- (15) 俣野哲朗。エイズワクチン開発：霊長類動物モデルの重要性。第5回霊長類医科学フォーラム「先端医科学研究の現状」、つくば、12/10/2009。
- (16) Matano T. Dynamics of cytotoxic T lymphocyte responses in simian immunodeficiency virus controllers. 2nd Symposium of the IMSUT & RCAST Global COE, Tokyo, Japan, 3/2/2010.
- (17) Nakajima T, Kimura A: Association of TRIM5-alpha with HIV/AIDS susceptibility. 12th Cardiovascular Genomics and Atherosclerosis Symposium. Seoul, October 16-17, 2009.
- (18) Naruse T, Yamashita T, Mori K, Chen Z, Saito Y, Matano T, Kimura A: MHC class I diversity and efficacy of vaccination against SIV (simian immunodeficiency virus) in rhesus macaque 12th cardiovascular genomics and atherosclerosis symposium Korea, October 16-17 2009.
- (19) Kimura A, Nakajima T, Naruse T, Yanagida R, Ohtani H, Konishi M, Terunuma H, Mimaya J, Nakayama E, Shioda T, Kaur G, Mehra N: Evolutional aspects of human genome diversities controlling the susceptibility and/or resistance to HIV-1/AIDS. 33rd Australian and South East Asian Tissue Typing Association Conference. New Delhi, November 12-15, 2009.
- (20) Nakajima T, Kimura A: Natural selection in the TLR-related genes in the course of primate evolution. 33rd Australian and South East Asian Tissue Typing Association Conference. New Delhi, November 12-15, 2009.
- (21) Naruse T, Yamashita T, Mori K, Chen Z, Saito Y, Matano T, Kimura A: MHC class I diversity and efficacy of SIV vaccines. 33rd Australian and South East Asian Tissue Typing Association Conference. New Delhi, November 12-15, 2009.
- (22) 中島敏晶、中山英美、Gurvinder Kaur、三間屋純一、照沼裕、大谷仁志、Narinder Mehra、塩田達雄、木村彰方：日本人およびインド人集団におけるTRIM5 α 遺伝子多型とHIV感受性の関わり。第54回日本人類遺伝学会、東京、2009年9月
- (23) 成瀬妙子、奥田裕紀子、俣野哲朗、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54回日本人類遺伝学会、東京、2009年9月
- (24) 中島敏晶、中山英美、Gurvinder Kaur、三間屋純一、照沼裕、大谷仁志、Narinder Mehra、塩田達雄、木村彰方：霊長類SIV感受性を制御するTRIM5 α 遺伝子とヒトHIV感染感受性・抵抗性との関連。第18回日本組織適合性学会大会、名古屋、2009年9月。
- (25) 成瀬妙子、山下知子、森一泰、陳智勇、齋藤祐介、俣野哲朗、木村彰方：アカゲザルMHCクラスI多様性とSIV(simian immunodeficiency virus)ワクチン効果。第18回日本組織適合性学会大会、名古屋、2009年9月。
- (26) 小西真紀子、柳田梨紗、成瀬妙子、中島敏晶、照沼裕、三間屋純一、木村彰方：HIV感染後AIDS発症の個体差とKIR遺伝子多型、HLA遺伝子多型との関連。第18回日本組織適合性学会大会、名古屋、2009年9月。
- (27) 齊藤暁、飯島沙幸、岩崎優紀、黒石歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、俣野哲朗、明里宏文：SIV由来CAh6/7loopを持つ第2世代サル指向性HIV-1クローンはカニクイザル個体で効率よく増殖する。第57回ウイルス学会(東京)平成21年10月25-27日

(28) 齊藤暁、飯島沙幸、岩崎優紀、明里宏文：第
2世代サル指向性 HIV-1 クロームはカニクイザ
ル個体において効率良く増殖する。第23回日
本エイズ学会学術集会（名古屋）平成21年1
1月26-28日

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

- 1 特許取得
該当なし。
- 2 実用新案登録
該当なし。
- 3 その他
該当なし。

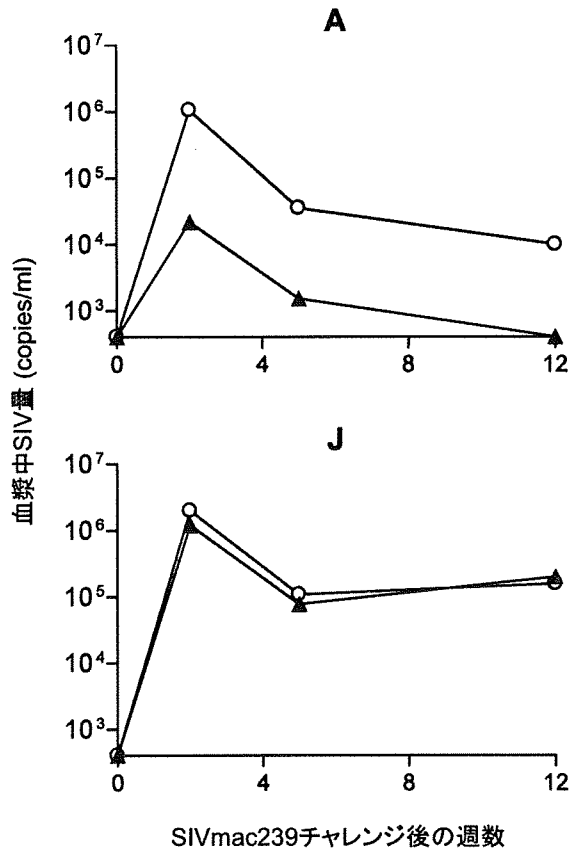


図1 MHC-Iハプロタイプ別のDNA/SeV-Gagワクチン効果
 各々のMHC-Iハプロタイプ陽性サル群について、非ワクチン接種群（白丸、N）
 およびDNA/SeV-Gagプライムブーストワクチン接種群（黒三角、V）の
 SIVmac239チャレンジ後の血漿中SIV量の相乗平均を示す。
 90-120-Ia (A) (N: n=6; V: n=5) 、 90-088-Ij (J) (N: n=3; V: n=3)。

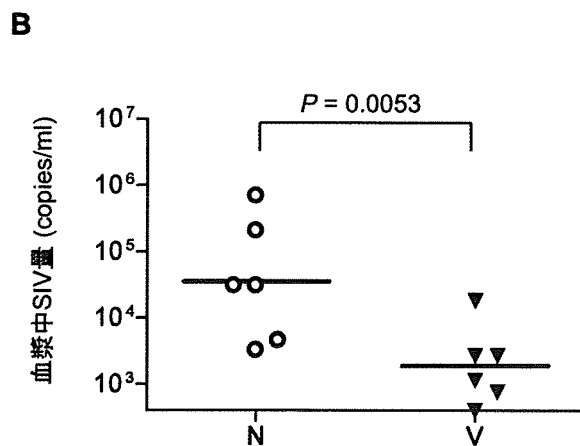
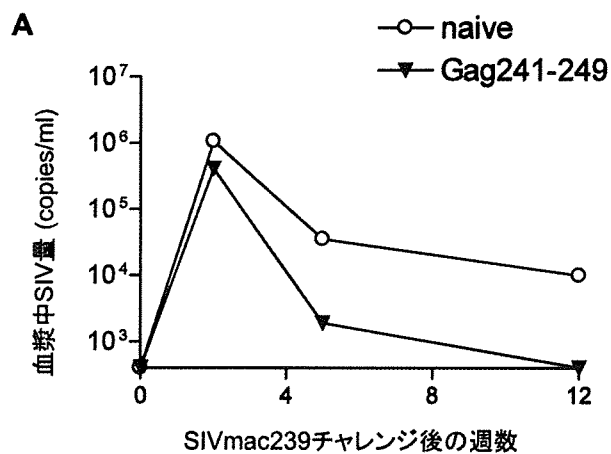


図2 Gag241-249特異的CTLメモリー誘導の効果
 非ワクチン接種サル群6頭（白丸、N）と Gag241-249エピトープ発現ベクターワクチン接種サル群6頭（黒逆三角、V）（90-120-Ia陽性）のSIVチャレンジ後の血漿中SIV量の相乗平均(A)および5週目の比較(B)。ワクチン接種群のSIV量は有意に低値を示した。

表1 アカゲザル実験個体のMHCクラスI遺伝子多様性

遺伝子座	解析個体数	観察された アリル数	新規アリル(数、頻度)		既知アリル(数、頻度)	
Mamu-A	100	75	46	61.3%	29	38.7%
Mamu-B	83	84	50	59.5%	34	40.5%
Mamu-I	83	17	11	64.7%	6	35.3%
Ohters	83	2	0		AG:1 F:1	
合計		176	107	60.8%	69	39.2%

表2 日本人およびインド人集団におけるTRIM5 α 多型性

Sequence Variations*	Japanese		Indian		Caucasian	African-American
	control (n=487)	HIV-1 infected subjects (n=94)	control (n=99)	HIV-1 infected subjects (n=101)	control (n=96)	control (n=96)
Gly31Ser	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.032
His43Tyr	0.184	0.133	0.227	0.134****	0.115	0.068
Cys58Tyr	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011
G175del	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Asp109Asp	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005
Gly110Arg	0.002	0.021***	0.000	0.000	0.000	0.000
Gly110Glu	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.005
Val112Phe	0.052	0.043	0.192	0.198	0.052	0.021
Thr128Thr	0.000	0.011**	0.000	0.000	0.000	0.000
Arg136Gln	0.105	0.144	0.177	0.173	0.349	0.177

Ⅱ. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
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、世界で初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-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 SIV 効果を検討し、少なくとも 90-120-Ia を有する群ではワクチン効果が認められるが、90-088-Ij を有する群ではワクチン効果が認められないという結果を得た。平成 20 年度には、90-120-Ia 陽性サル群の解析を進め、特にワクチン接種群で SIV チャレンジ後急性期に、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 反応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。本年度 (平成 21 年度) は、MHC-I ハプロタイプ別の解析を頭数を増やして進展させ、90-120-Ia 陽性サル群と 90-010-Id 陽性サル群におけるワクチン効果を確認した。さらに、Gag241-249 エピトープ単独発現ベクターワクチン接種サルへの SIV チャレンジ実験により、Gag241-249 特異的 CTL メモリー誘導が SIV 複製制御に結びつくことを明らかにした。この結果は、ワクチンによる CTL メモリー誘導が曝露後の HIV 複製制御に貢献しうることを初めて証明するものであり、CTL 誘導予防エイズワクチン開発の論理基盤として極めて重要である。

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サル免疫不全ウイルス (SIV) 複製制御 (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) プロジェクトを推進中である。この臨床試験の有効性評価の段階に進むには、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、より有効なエイズワクチン開発に向け、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-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、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、90-120-Ia 陽性サルの解析を進め、特にワクチン接種群で SIV チャレンジ後急性期に、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 反応の効率よい誘導を確認した。さらに、Gag241-249 エピトープを単独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。本年度 (平成 21 年度) は、MHC-I ハプロタイプ別の解析を頭数を増やして進展させる一方、Gag241-249 エピトープ単独発現ベクターワクチン接種による Gag241-249 特異的 CTL メモリー誘導の抗 SIV 効果を検討する目的で、SIV チャレンジ実験を行った。

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：各群の頭数を増やした解析を進展させた。90-120-Ia 陽性群については非ワクチン接種サル 6 頭とワクチン接種サル 5 頭、90-010-Id 陽性群については非ワクチン接種サル 3 頭とワクチン接種サル 3 頭、90-010-Ie 陽性群については非ワクチン接種サル 3 頭とワクチン接種サル 3 頭、90-088-Ij 陽性群については非ワクチン接種サル 3 頭とワクチン接種サル 3 頭の解析を行った。ワクチン接種群には、SIV gag・pol 等を発現する DNA を筋注後 6 週目に SeV-Gag ベクターの経鼻接種を行い、その約 3 ヶ月後に SIVmac239 をチャレンジ (静注) して、血漿中ウイルス量を非ワクチン接種群と比較検討した。

(2) Gag241-249 エピトープ単独発現ワクチン接種サルへの SIV チャレンジ：Gag241-249 エピトープ単独発現ベクターワクチン接種 90-120-Ia 陽性アカゲサルに SIVmac239 をチャレンジし、血漿中ウイルス量を調べ、非ワクチン接種 90-120-Ia 陽性群と比較検討した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、倫理面も含めて、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関する第二種使用等拡散防止措置確認申請については、実施機関の承認あるいは文部科学大臣の確認を得ている。

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 (図 1)：90-120-Ia 陽性群ではワクチン接種サル 5 頭全頭で SIV 複製が制御され、90-010-Id 陽性群でもワクチン接種サル 3 頭全頭で SIV 複製が制御された。90-010-Ie 陽性群ではワクチン接種サル 3 頭のうち 1 頭でのみ SIV 複製が制御された。90-088-Ij 陽性群ではワクチン接種サル 3 頭とも非ワクチン接種サルと同様の SIV 持続感染を呈した。

(2) Gag241-249 エピトープ単独発現ワクチン接種サルへの SIV チャレンジ (図 2)：単独エピトープワクチン接種群では、血漿中ウイルス量は、ピーク時・5 週目・セットポイント期とも、非ワクチン接種群と比較して優位に低い値を示し、SIV 複製が制御された。

D. 考察

我々がこれまで確立してきた MHC-I ハプロタイプ共有アカゲサル群を用いることにより、MHC-I ハプロタイプ別の CTL 誘導ワクチン有効性を見出すことができた。今後、各々の MHC-I ハプロタイプ共有群におけるワクチン効果の機序の解明の進展が期待される。

単独エピトープ特異的 CTL 誘導システムについての成果は、ワクチンによる CTL メモリー誘導が HIV 曝露後の HIV 複製制御に結びつくことを初めて示したのとして極めて重要である。CTL 誘導予防エイズワクチンについては、多数のエピトープ特異的 CTL メモリーが誘導されたとしても、HIV の多様性のため、侵入してくる HIV を認識できるものは限られていると考えられる。しか

し、本研究の成果は、一つのエピトープ特異的 CTL メモリーが認識できただけでも HIV 複製抑制効果を発揮できる可能性を示している。これらの結果は、学術的に意義の大きい新しい知見であるとともに、CTL 誘導予防エイズワクチン開発の論理基盤として重要な意義を有している。

E. 結論

SIV Gag 発現 SeV ベクターを用いた CTL 誘導予防エイズワクチンの有効性について、いくつかの MHC-I ハプロタイプ共有サル群の解析を進展させることにより、MHC-I ハプロタイプに依存したワクチン効果を確認した。さらに、単独 CTL エピトープ発現ベクターワクチンを用いた解析により、ワクチンによる CTL メモリー誘導が曝露後の HIV 複製制御に貢献しうることを初めて明らかにした。

F. 研究発表

1 論文発表

- (1) Yamamoto T, Iwamoto N, Yamamoto H, Tsukamoto T, Kuwano T, Takeda A, Kawada M, Tsunetsugu-Yokota Y, Matano T. Polyfunctional CD4⁺ T-cell induction in neutralizing antibody-triggered control of simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 83:5514-5524, 2009.
- (2) Tsukamoto T, Takeda A, Yamamoto T, Yamamoto H, Kawada M, Matano T. Impact of cytotoxic-T-lymphocyte memory induction without virus-specific CD4⁺ T-cell help on control of a simian immunodeficiency virus challenge in rhesus macaques. *J Virol* 83:9339-9346, 2009.
- (3) Yamamoto H, Matano T. Neutralizing antibodies in SIV control: co-impact with T cells. *Vaccine*, in press.

2 学会発表

- (1) 俣野哲朗. エイズワクチン開発：HIV 感染防御に何が必要か？. 第 36 回東京大学医科学研究所創立記念シンポジウム「感染防御の最前線」、東京、5/29/2009.
- (2) Takahashi N, Tsukamoto T, Iwamoto N, Takahara Y, Naruse T, Kimura A, Matano T. Mapping of cytotoxic T lymphocyte epitopes in rhesus macaques showing vaccine-based control of simian immunodeficiency virus replication. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 9/9/2009.
- (3) Moriya C, Kamada T, Kurihara K, Takahara Y,

Inoue M, Shu T, Hasegawa M, Matano T. Immunogenicity of intranasal and intramuscular immunization with a Sendai virus vector. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 9/9/2009.

- (4) Matano T. Effect of vaccine-induced memory T cells on HIV/SIV replication after virus exposure. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 9/11/2009.
- (5) 守屋智草、栗原京子、鎌田健男、井上誠、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 誘導効率の解析. 第 13 回日本ワクチン学会学術集会、札幌、9/27/2009.
- (6) Matano T. Immunogenicity of an intranasal Sendai virus vector vaccine. Japan-France Vaccine and Infectious Diseases Workshop, Osaka, Japan, 10/10/2009.
- (7) Matano T. Sendai virus. Satellite Session: Replicating Viral Vectors for use in AIDS Vaccines, AIDS Vaccine 2009, Paris, France, 10/19/2009.
- (8) Tsukamoto T, Matano T. Impact of single epitope-specific CD8⁺ T cell memory induction by prophylactic vaccination on immunodeficiency virus control. AIDS Vaccine 2009, Paris, France, 10/20/2009.
- (9) 守屋智草、鎌田健男、栗原京子、高原悠佑、井上誠、朱亜峰、長谷川護、俣野哲朗. センダイウイルスベクターワクチン接種経路の検討. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (2C24)、東京、10/26/2009.
- (10) 岩本南、塚本徹雄、俣野哲朗. 広範な SIV 特異的細胞性免疫誘導機序の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (2C28)、東京、10/26/2009.
- (11) 高橋尚史、塚本徹雄、岩本南、高原悠佑、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗. 細胞性免疫誘導エイズワクチンの有効性が認められたサルにおける SIV 特異的 CTL のエピトープ探索. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (2C29)、東京、10/26/2009.
- (12) 高原悠佑、武内寛明、石井洋、高橋尚史、三浦智行、五十嵐樹彦、俣野哲朗. ビルマ産アカゲザル SIV 感染により誘導される CTL エピトープの探索. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、10/26/2009.
- (13) Takahashi N, Iwamoto N, Moriya C, Tsukamoto T, Matano T. Analysis of a cohort of unvaccinated and vaccinated Burmese rhesus macaques after SIVmac239 challenge. The 27th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Boston, MA, USA, 10/29/2009.
- (14) Moriya C, Kurihara K, Kamada T, Takahara Y,

- Inoue M, Shu T, Hasegawa M, Matano T. Immunogenicity of a Sendai virus vector vaccine expressing SIV Gag in the presence of anti-vector antibodies. The 27th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Boston, MA, USA, 10/29/2009.
- (15) 俣野哲朗. エイズワクチン開発：霊長類動物モデルの重要性. 第5回霊長類医科学フォーラム「先端医科学研究の現状」、つくば、12/10/2009.
- (16) Matano T. Dynamics of cytotoxic T lymphocyte responses in simian immunodeficiency virus controllers. 2nd Symposium of the IMSUT & RCAST Global COE, Tokyo, Japan, 3/2/2010.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

- 1 特許取得
該当なし。
- 2 実用新案登録
該当なし。
- 3 その他
該当なし。

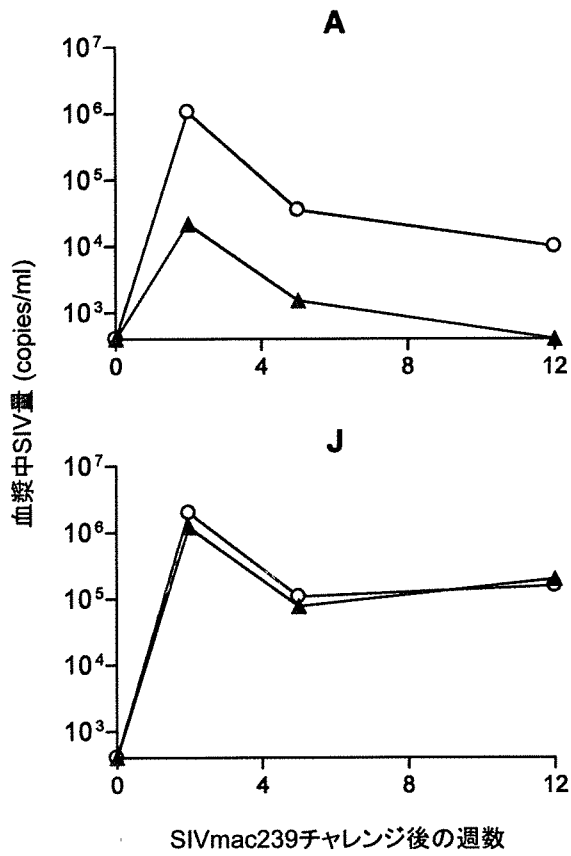


図1 MHC-Iハプロタイプ別のDNA/SeV-Gagワクチン効果
 各々のMHC-Iハプロタイプ陽性サル群について、非ワクチン接種群（白丸、N）
 およびDNA/SeV-Gagプライムブーストワクチン接種群（黒三角、V）の
 SIVmac239チャレンジ後の血漿中SIV量の相乗平均を示す。
 90-120-Ia (A) (N: n=6; V: n=5) 、90-088-Ij (J) (N: n=3; V: n=3)。