

200932023A

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

課題番号 H21-エイズ-一般-007

HIV 感染防御免疫誘導に関する研究

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

エイズ対策研究事業

課題番号 H21-エイズ-一般-007

HIV 感染防御免疫誘導に関する研究

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
保富 康宏	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	センター長
三浦 聡之	研究分担者	東京大学医科学研究所	准教授
森川 裕子	研究分担者	北里大学北里生命科学研究所	教授
寺原 和孝	研究分担者	国立感染症研究所免疫部	研究員
横山 勝	研究分担者	国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター	研究員

目 次

I. 総括研究報告書	
HIV 感染防御免疫誘導に関する研究	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. ワクチン誘導免疫の HIV 複製防御効果に関する研究	11
研究代表者：俣野哲朗（東京大学医科学研究所・教授）	
2. 経口 DNA ワクチンの開発に関する研究	18
研究分担者：保富康宏（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・センター長）	
3. CTL エスケープ変異の HIV 複製能に及ぼす影響に関する研究	24
研究分担者：三浦聡之（東京大学医科学研究所・准教授）	
4. Gag 抗原に関する研究	28
研究分担者：森川裕子（北里大学北里生命科学研究所・教授）	
5. ヘルパーT細胞反応に関する研究	32
研究分担者：寺原和孝（国立感染症研究所免疫部・研究員）	
6. 中和抗体誘導に関する研究	35
研究分担者：横山勝（国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター ・研究員）	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	39
IV. 研究成果の刊行物・別刷	41

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
総括研究報告書

HIV 感染防御免疫誘導に関する研究

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

HIV 感染拡大は、流行地域だけではなくグローバルな視点で取り組み克服すべき国際的重要課題である。本研究は、この問題解決に必要な予防エイズワクチン開発を目的とし、HIV 複製抑制に結びつく防御免疫反応の選択的誘導のための論理基盤確立を目指すものである。我々が開発したセンダイウイルス（SeV）ベクターを用いた細胞傷害性 T リンパ球（CTL）誘導エイズワクチンは、サルエイズモデルで初めて有効性を示した点で注目され、接種者全員への効果は期待できないものの集団レベルでの HIV 感染拡大抑制効果を期待した第 1 世代ワクチンとして国際共同臨床試験計画が進展中である。本研究では、この第 1 世代予防ワクチンの有効性の確立と、接種者全員への感染発症防御効果を有する第 2 世代予防ワクチンの開発を進めることとした。平成 21 年度には、(1) CTL 誘導ワクチンのデリバリーシステム最適化に向けた研究として、SeV ベクターワクチンの 2 回経鼻接種が有効であることを明らかにし、併用プライム法候補としては HEV-VLP を用いた DNA ワクチンを構築した。(2) CTL 誘導抗原選択法の樹立に向けた研究として、抗原提示効率測定のための細胞内および HIV 粒子内の Gag 定量を行った。さらに、HIV 感染者における CTL 逃避変異同定のための HLA 遺伝子型および gag 塩基配列決定を行った。サルエイズモデルでは、予防ワクチン接種によりウイルス曝露後の CTL 反応の優位性（ドミナンス・パターン）が変わりうることを示す結果を得た。(3) 中和抗体誘導法の樹立に向けた研究として、HIV gp120 の構造計算により V3 配列の荷電量の CD4 結合領域への影響を見出した。ヘルパー T リンパ球反応解析系の確立も行った。特に、CTL 反応の優位性に関する結果は、有効な CTL 誘導法あるいは広範な CTL 誘導法の開発に方向性を与える極めて重要かつ斬新な成果である。

研究分担者

保富康宏 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・センター長
三浦聡之 東京大学医科学研究所・准教授
森川裕子 北里大学北里生命科学研究所・教授
寺原和孝 国立感染症研究所免疫部・研究員
横山 勝 国立感染症研究所病原体ゲノム解析
研究センター・研究員

A. 研究目的

HIV 感染者数の増大は、特にアフリカ等の流行地域において極めて深刻な状況にある。流行地域での感染拡大は、HIV に増殖・変異の場を与えることから、宿主免疫反応による抑制をよりうけにくい HIV 変異株や抗 HIV 薬耐性変異株の出現に結びつく可能性が考えられ、免疫不全傾向にある

HIV 感染者数の増加を介した新興再興感染症出現促進に結びつく可能性も危惧されている。したがって、HIV 感染拡大は、流行地域だけではなくグローバルな視点で取り組み克服すべき国際的重要課題である。本研究は、この問題解決に必要な予防エイズワクチン開発を目指すものである。

HIV は感染後誘導される適応免疫によっても排除されきらず持続感染に至るため、エイズワクチン開発には、自然感染の模倣を基本とする従来のワクチンを超えた新たな戦略が必要となる。特に、HIV 感染標的が免疫担当細胞であるため、免疫活性化が必ずしも HIV 複製抑制に結びつかず、逆に複製促進に結びつく可能性がある。そこで本研究は、HIV 複製抑制に結びつく防御免疫反応を選択的に誘導する予防エイズワクチン開発を目的とする。

我々が開発したセンダイウイルス (SeV) ベクターを用いた細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 誘導エイズワクチンは、サルエイズモデルで初めて有効性を示した点 (J Exp Med 199:1709) で注目され、接種者全員への効果は期待できないものの集団での HIV 感染拡大抑制効果を期待した第 1 世代ワクチンとして、国際エイズワクチン推進構想 (IAVI) との国際共同臨床試験計画が米国にて進展中である。本研究では、この第 1 世代予防ワクチンの有効性確立に向けた研究を進展させるとともに、接種者全員への感染発症防御効果を有する第 2 世代予防ワクチン開発に向け、HIV 複製抑制に結びつく CTL の選択的誘導に関する研究を開始した。一方、我々は近年、中和抗体受動免疫が機能的 T 細胞反応誘導を促進する可能性を示したが (Rev Med Virol 18:293)、この抗体と T 細胞の協調作用を期待して中和抗体誘導に関する研究も開始した。

特に、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、ワクチンによる各種免疫誘導が SIV 曝露後の SIV 複製に与える影響を検証することとした。(i) ウイルス多様性に対応した CTL 誘導の効果、(ii) ワクチンによるヘルパー T リンパ球 (HTL) 誘導の影響、(iii) 中和抗体と T 細胞の協調作用等に主眼をおき、以下のような研究を進め、HIV 複製抑制に結びつく免疫誘導法を選別して有効な感染防御免疫を選択的に誘導する予防エイズワクチンへの進展を企図している。

1. CTL 誘導ワクチンデリバリーシステムの研究
 - 1-1. SeV ベクターワクチンシステムの最適化
 - 1-2. 併用プライム法の開発
2. CTL 誘導ワクチンの抗原選択法の研究
 - 2-1. 抗原提示効率に基づく有効な CTL 抗原選択
 - 2-2. CTL 逃避変異の解析
 - 2-3. 多様な SIV に対する CTL 誘導効果の解析
3. HTL 反応と中和抗体反応についての研究
 - 3-1. SIV に対する HTL 誘導効果の解析
 - 3-2. 抗原構造推定に基づく中和抗体誘導法開発

平成 21 年度は以下の研究を進展させた。

- 1-1. SeV ベクターワクチン接種量・回数の検討
- 1-2. E 型肝炎ウイルス様粒子 (HEV-VLP) を用いた SIV 抗原発現 DNA ワクチンの作製
 - 2-1. 細胞内および HIV 粒子内の Gag 蛋白定量
 - 2-2. HIV 特異的 CTL 逃避変異の同定
 - 2-3. ワクチン誘導 CTL の SIV 曝露後 2 次反応の解析
- 3-1. SIV 特異的 HTL 反応解析系の確立
- 3-2. HIV Env gp120 構造計算

B. 研究方法

(1-1) カニクイサル 6 頭に対し、DNA プライム後 6 週目に、従来の 1/10 量 (6×10^8 CIU) の SIV Gag 発現 F 欠損非複製型 SeV (SeV-Gag) ベクター経鼻接種 (ブースト 1 回目) を行い、さらにその 9 週後に同量の SeV-Gag ベクター経鼻接種 (ブースト 2 回目) を行った。このうち 3 頭には、抗 SeV 既存免疫誘導群 (pre-SeV 群) として、DNA プライム 9 週前に複製型 SeV を経鼻接種を行い、他の 3 頭 (naive 群) と比較検討した。1 回目・2 回目の各 SeV-Gag 経鼻接種直前の血漿中の SeV 特異的中和抗体価および接種後 1-2 週目に誘導される Gag 特異的 CTL 反応を測定した。(俣野)

(1-2) 経口投与可能な HEV の VLP に HIV Env エピトープを組み込んだ VLP-HIVenv (キメラ VLP) ベクターを作製し、さらに SIV gag cDNA を封入したワクチン作製を試み、その DNA 封入効率を測定した。(保富)

(2-1) MG132 処理でプロテアソーム分解を、クロロキン処理でエンドソーム分解を阻害し、細胞内 Gag 蛋白を定量的に解析した。GFP を指標とした Gag 蛋白定量のために GagGFP/pNL を構築した。細胞内の Gag:GagPol 発現比率と粒子内の比率を測定した。(森川)

(2-2) 未治療日本人 HIV 感染者について、HLA アリル特異的な HIV Gag アミノ酸変異 (推定的 CTL 逃避変異) を統計学的手法により同定するため、HLA クラス I 遺伝子型およびウイルス Gag アミノ酸配列を決定した。(三浦)

(2-3) SIVmac239 感染後 Gag206-216 特異的 CTL 反応と Gag241-249 特異的 CTL 反応が優位に誘導される主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラス I ハプロタイプ 90-120-Ia 共有アカゲサルを用い、Gag241-249 領域を含む Gag236-251 ペプチドと EGFP との融合蛋白を発現する DNA と SeV ベクターワクチン接種により Gag241-249 特異的 CTL が誘導された 6 頭 (単独エピトープワクチン接種群) において、SIVmac239 チャレンジ後 2 週目および 12 週目の Gag206-216 特異的 CTL 反応と Gag241-249 特異的 CTL 反応を測定し、非ワクチン接種群 6 頭および対照ワクチン接種群 6 頭と比較検討した。(俣野)

(3-1) SIV 特異的 HTL 反応について、抗原特異的サイトカイン・細胞傷害性顆粒産生能を指標とした高感度の解析系の確立を進めた。SIV 感染慢性期のサル末梢血リンパ球を用い、VSV-G シュードタイプ SIV を感染させた同一個体の B lymphoblastoid cell line との共培養 (抗原刺激) 後、CD4 陽性 T リンパ球中の MIP-1 β , IL-2, TNF- α ,

INF- γ , CD107a の誘導を細胞内免疫染色により解析した。(寺原)

(3-2) ホモロジーモデリング法および分子動力学計算により HIV Env gp120 分子モデルを構築し、V3 配列の荷電量の影響を調べた。多様性解析においては、公共データベースに登録されている HIV Env アミノ酸配列情報を用いてエントロピーを求めた。(横山)

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え生物等を用いる実験については、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、実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針を遵守し、実施機関の動物実験委員会の承認を得てから開始した。ヒトサンプルを用いる研究については、該当する倫理指針を遵守し、実施機関の倫理委員会の承認を得てから開始した。

C. 研究結果

(1-1) 従来の 1/10 の接種量でも、SeV-Gag 経鼻接種により効率よい Gag 特異的 CTL 誘導が認められた。naive 群の 2 回目の SeV-Gag 経鼻接種時および pre-SeV 群の 1 回目の SeV-Gag 経鼻接種時には、1:50 - 1:100 の SeV 特異的中和抗体価が認められたが、効率よい Gag 特異的 CTL 誘導が認められた (図 1)。

(1-2) VLP-HIVenv への SIV gag cDNA 封入効率の検討では、0.35 mg の DNA が 1 mg の VLP に封入されていた。この SIV gag cDNA 封入 VLP を用い、in vitro で培養細胞に遺伝子導入を試みたところ、SIV gag cDNA の細胞内への導入が確認された。

(2-1) MG132 処理およびクロロキン処理のいずれの場合も、細胞内 Gag 蛋白量に顕著な差はなかった。細胞内の Gag:GagPol 発現比率は 10-20:1 であったが、粒子内の比率は 5-10:1 であった。

(2-2) 未治療日本人 HIV 感染者 (約 180 名) において HLA クラス I アリル (図 2) および Gag アミノ酸配列を決定した。内 169 名が HIV サブタイプ B に感染していた。現在、統計学的手法による HLA 関連変異 (推定的 CTL 逃避変異) の同定を進展中である。

(2-3) SIV 感染急性期において、非ワクチン接種群と対照ワクチン接種群では、Gag206-216 特異的 CTL 反応のみ、あるいは Gag206-216 特異的 CTL 反応と Gag241-249 特異的 CTL 反応の両者が認められたが、単独エピートワクチン接種群では、Gag206-216 特異的 CTL 反応がほとんどみられず、Gag241-249 特異的 CTL が優位に高レベルに誘導

されていた (図 3)。

(3-1) VSV-G シュードタイプ SIV 感染 2 日目に SIV Gag CA (p27) 発現を確認した。DNA プライム・SeV-Gag ブーストワクチン後の SIVmac239 チャレンジで、SIV 複製が制御されたサル慢性期のリンパ球を用いた解析では、CD4 陽性 T リンパ球中の各種サイトカイン・CD107a の SIV 特異的誘導が検出された。

(3-2) HIV Env V3 配列の荷電量が +7 の gp120 は、+3 の gp120 よりも CD4 結合部位が広いことが示された (図 4)。多様性解析により、荷電量 +7 では +3 よりも CD4 結合ループ周辺のアミノ酸がより多様であることが判明した。

D. 考察

(1-1) DNA プライム・SeV ブーストワクチンにおいて従来の 1/10 量の SeV-Gag ベクター経鼻接種で効率よい Gag 特異的 CTL 誘導能を有することが示されたが、低接種量による臨床応用は安全性および実用性の面で有利であると考えられる。さらに、SeV ベクター 2 回経鼻接種の有効性が示されたが、2 回接種はブースト効果の点で有利であるだけでなく、異なる抗原発現 SeV ベクターを用いることにより、より広範な CTL 誘導に結びつく可能性が期待される。

(1-2) SIV gag cDNA を封入した VLP-HIVenv は、HIV Env および SIV Gag 特異的免疫誘導を企図したワクチンである。HEV の VLP は経口投与で小腸粘膜まで到達することが確認されていることから、このシステムによる粘膜免疫誘導の可能性が期待される。

(2-1) GagPol は Gag より効率よく粒子に取り込まれることが示唆された。現在、プロテアソームやエンドソームの阻害における Gag 蛋白のプロセッシングと細胞内局在を検討中である。

(2-2) 今回得られた HLA クラス I 遺伝子型と HIV Gag アミノ酸配列から、日本人で流行している HIV 株における推定的な CTL 逃避変異が同定され、その変異が HIV 複製能に与える影響の解析が可能となることが期待される。

(2-3) ワクチン接種により HIV 曝露後急性期の CTL 反応の優位性 (ドミナンス・パターン) が変わる可能性が示された。この CTL のドミナンス・パターンを検討することにより、曝露後に有効な CTL 反応が優位に誘導されること、あるいは広範な CTL 反応が誘導されることを企図して、ワクチンにより誘導する CTL を選択する戦略が考えられる。

(3-1) 機能的 SIV 特異的 HTL 反応解析系を確立

することができた。今回の解析では、ワクチンにより SIV 複製制御に至ったサル慢性期には、機能的な SIV 特異的 HTL 反応が誘導されていることが示唆された。

(3-2) HIV Env gp120 では、V3 配列の荷電量が大きくなると CD4 結合部位が広がったことから、荷電量が大きいと CD4 結合部位を認識する中和抗体による感受性が大きいと考えられる。多様性解析の結果も、CD4 結合ループ周辺のアミノ酸が抗体による選択圧をうけていることを示唆しており、上記の結果を支持している。

E. 結論

CTL 誘導ワクチンのデリバリーシステム最適化に向け、SeV ベクターワクチンの 2 回経鼻接種が有効であることを明らかにした。併用プライム法候補としては、HEV-VLP を用いた DNA ワクチンを構築した。CTL 誘導抗原選択法の樹立に向け、抗原提示効率測定のためとなる細胞内および HIV 粒子内の Gag 定量を行った。また、HIV 感染者における CTL 逃避変異同定のため、HLA 遺伝子型および gag 塩基配列決定を行った。サルエイズモデルでは、ワクチン接種によりウイルス曝露後の CTL 反応のドミナンス・パターンが変わりうるという重要な知見を得た。HTL 反応については解析系を確立した。中和抗体誘導法の樹立に向け、HIV gp120 の構造計算を進め、V3 配列の荷電量の CD4 結合領域への影響を見出した。これらの結果は、第 1 世代予防エイズワクチン有効性の確立および有効な免疫反応を選択的に誘導する第 2 世代予防エイズワクチン開発に結びつく重要な成果である。

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) 野村拓志、俣野哲朗. エイズワクチン開発の論理. ウイルス (日本ウイルス学会)、59:267-276、2009.
- (4) Yamamoto H, Matano T. Neutralizing antibodies in SIV control: co-impact with T cells. *Vaccine*, in press.
- (5) Morioka T, Yamanaka K, Mori H, Omoto Y, Tokime K, Kakeda M, Kurokawa I, Gabazza E, Tsubura A, Yasutomi Y, Mizutani H. IL-4/IL-13 antagonist DNA vaccination successfully suppresses Th2 type chronic dermatitis. *Br J Dermatol* 160:1172-1179, 2009.
- (6) Takano JI, Tachibana H, Kato M, Narita T, Yanagi T, Yasutomi Y, Fujimoto K. DNA characterization of simian *Entamoeba histolytica*-like strains to differentiate them from *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Res* 105:929-937, 2009.
- (7) Yasutomi Y. Establishment of specific pathogen-free macaque colonies in Tsukuba Primate Research Center of Japan for AIDS research. *Vaccine*, in press.
- (8) Fujimoto K, Takano J, Narita T, Hanari K, Shimozawa N, Sankai T, Yoshida T, Terao K, Kurata T, Yasutomi Y. Simian Retrovirus type D infection in a colony of cynomolgus monkeys. *Comp Med*, in press.
- (9) Cueno ME, Karamatsu K, Yasutomi Y, Laurena AC, Okamoto T. Preferential expression and immunogenicity of HIV-1 Tat fusion protein expressed in tomato plant. *Transgenic Res*, in press.
- (10) Oka Y, Tashiro H, Mizutani-Noguchi M, Koga I, Sugao Y, Shirasaki R, Miura T, Akiyama N, Kawasugi K, Fujimori S, Shirafuji N. Successful unrelated bone marrow transplantation for a human immunodeficiency virus type-1-seropositive acute myelogenous leukemia patient following HAART. *Int J Hematol* 91:140-145, 2010.
- (11) Pereyra F, Palmer S, Miura T, Block B, Wiegand A, Rothchild A, Baker B, Rosenberg R, Cutrell E, Seaman M, Coffin J, Walker B. Persistent low level viremia in HIV-1 elite controllers and relationship to immunologic parameters. *J Infect Dis* 200:984-990, 2009.
- (12) Chen H, Piechocka-Trocha A, Miura T, Brockman M, Julg B, Baker B, Rothchild A, Block B, Schneidewind A, Koibuchi T, Pereyra F, Allen T, Walker B. Differential neutralization of human immunodeficiency virus (HIV) replication in autologous CD4 T cells by HIV-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* 83:3138-3149, 2009.
- (13) Miura T, Brumme C, Brockman M, Brumme Z, Pereyra F, Block B, Trocha A, John M, Mallal S, Harrigan PR, Walker B. HLA-associated viral mutations are common in human immunodeficiency virus type 1 elite controllers. *J Virol* 83:3407-3412,

- 2009.
- (14) 三浦聡之. HIV Elite Controllers : HIV 感染症の自然制御. 感染症, 39:219-223. 2009.
- (15) Koga M, Tachikawa A, Heckerman D, Odawara T, Nakamura H, Koibuchi T, Fujii T, Miura T, Iwamoto A. Transition of impact of HLA class I allele expression on HIV-1 plasma virus loads at a population level over time. *Microbiol Immunol*, in press.
- (16) Nishi M, Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Sawasaki T, Morishita R, Perrem K, Aoki I, Morikawa Y, Yamamoto N. Requirement for microtubule integrity in the SOCS1-mediated intracellular dynamics of HIV-1 Gag. *FEBS Let* 585:1243-1250, 2009.
- (17) Suyama M, Daikoku E, Goto T, Sano K, Morikawa Y. Reactivation from latency displays HIV particle budding at plasma membrane, accompanying CD44 upregulation and recruitment. *Retrovirology* 6:63, 2009.
- (18) Urano E, Ichikawa R, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi Y, Komano J. T cell-based functional cDNA library screening identified SEC13-like 1a carboxy-terminal domain as a negative regulator of human immunodeficiency virus replication. *Vaccine*, in press.
- (19) Yokoyama M, Mori H, Sato H. Allosteric regulation of HIV-1 reverse transcriptase by ATP for nucleotide selection. *PLoS ONE* 5:e8867, 2010.
- (20) Onyango C, Leligdowicz A, Yokoyama M, Sato H, Song H, Nakayama EE, Shioda T, de Silva T, Townend J, Jaye A, Whittle H, Rowland-Jones S, Cotton M. HIV-2 capsids distinguish high and low virus load patients in a West African community cohort. *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、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、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、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) 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. 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よく増殖する. 第23回日本エイズ学会学術集会、名古屋、11/28/2009.
- (16) 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.
- (17) 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.
- (18) 松原明弘、高村史記、加藤翔太、保富康宏. SIVmac239 Env gp120 アスパラギン(N)結合型糖鎖の宿主免疫応答に対する影響. 第57回日本ウイルス学会、東京、10/25-27/2009.
- (19) 松原明弘、高村史記、草川茂、武部豊、森一泰、永井美之、保富康宏. SIVmac239 Env gp120 アスパラギン結合型糖鎖の宿主免疫応答に対する影響. 第23回日本エイズ学会、名古屋、11/26-28/2009.
- (20) Tsujimura Y, Yasutomi Y. Administration of Ag85B showed therapeutic effects to allergic asthma by inducing Th1 response and Interleukin-17. 第38回日本免疫学会、大阪、12/1-3/2009.
- (21) Nienke EH, Yasutomi Y, Niikura M. Protective Mucosal Immunity against a Model Viral Enteric Infection by a Generic Chimeric Hepatitis E Virus-like Particle Vaccine System. The American Society for Virology 28th Annual Meeting, Vancouver, 7/11-15/2009.
- (22) 鯉淵智彦、今井健太郎、菊地正、古賀道子、中村仁美、三浦聡之、藤井毅、岩本愛吉. HAART 導入一年半後に CD4 数の減少を来たし、diffuse large B-cell lymphoma と診断された一例. 第23回日本エイズ学会学術集会、名古屋、11/26-28/2009.
- (23) 菊地正、古賀道子、鯉淵智彦、今井健太郎、中村仁美、三浦聡之、小田原隆、藤井毅、岩本愛吉. ART 初回導入した ABC、TDF 使用症例の血清脂質の経時的変化について. 第23回日本エイズ学会学術集会、名古屋、11/26-28/2009.
- (24) 今井健太郎、前田卓也、菊地正、宮崎菜穂子、鯉淵智彦、古賀道子、中村仁美、三浦聡之、藤井毅、岩本愛吉. ペンタミジンによる低血糖が長期間遷延した AIDS 患者の一例. 第23回日本エイズ学会学術集会、名古屋、11/26-28/2009.
- (25) 今井健太郎、菊地正、鯉淵智彦、古賀道子、中村仁美、三浦聡之、藤井毅、岩本愛吉. ニューモシスチス肺炎と肺ノカルジア症を合併した AIDS 患者の一例. 第58回日本感染症学会東日本地方会学術集会、東京、10/30-31/2009.
- (26) Koga M, Tachikawa A, Heckerman D, Odawara T, Nakamura H, Koibuchi T, Fujii T, Miura T, Iwamoto A. The impacts of HLA class I alleles on HIV-1 plasma virus loads in a unique Asian population with a narrow spectrum of HLA, and their changes at the population level over time. 5th IAS Conference on HIV pathogenesis, Treatment and Prevention, Capetown, South Africa, 19-22 July 2009.
- (27) Miura T, Brumme ZL, Brumme CJ, Block B, Brockman MA, Trocha A, Pereyra F, Kaufmann D, Iwamoto A, Rosenberg E, Jessen H, Kelleher A, Markowitz M, Little S, Walker BD, AIEDRP network. Characterization of HIV-1 from Acute/Early Infection in Individuals who Subsequently become Viremia Controllers. 5th IAS Conference on HIV pathogenesis, Treatment and Prevention, Capetown, South Africa, 19-22 July 2009.
- (28) Urano E, Okunaga H, Morikawa Y, Komano J. Inhibition of HIV-1 replication by the co-chaperone DNAJ/HSP40 protein family. CSH Retrovirus Meeting, New York, 5/1/2009.
- (29) Haraguchi H, Morikawa Y. Live-cell imaging of human immunodeficiency virus Gag-Pol trafficking. 第9回感染症免疫フォーラム、淡路島、9/10/2009.
- (30) 原口日和、森川裕子. HIV-1 Gag-Pol 蛋白の膜結合と細胞内トラフィック. 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、10/26/2009.
- (31) 周東翔、原口日和、百瀬文隆、瀧永博之、森川裕子. 非ヌクレオチド系逆転転写酵素阻害剤エファビレンツによる HIV 粒子形成阻害機構. 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、10/26/2009.
- (32) 星野悠、奥長浩之、森川裕子. HIV-1 の粒子遊離抑制宿主因子 BST-2 はエンドソーム HRS の強発現により優先的に分解される. 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、10/26/2009.
- (33) 浦野恵美子、市川玲子、森川裕子、芳田剛、小柳義夫、駒野淳. T細胞における HIV-1 抵抗性遺伝子のスクリーニング—SEC14L1a C末端ドメインの同定とその機構解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、10/26/2009.
- (34) 鈴木陽一、山元誠司、大川克也、増田貴夫、森川裕子、小柳義夫. レトロウイルスインテグラーゼ結合性因子 Huw1 の同定と HIV-1 感染における役割. 第57回日本ウイルス学会学術集

- 会、東京、10/25/2009.
- (35) 浦野恵美子、倉持紀子、供田洋、武部豊、駒野淳、森川裕子。酵母膜結合 Gag-Gag 反応系で同定された HIV-1 アセンブリー阻害剤。第 23 回日本エイズ学会学術集会、名古屋、11/28/2009.
- (36) 山元誠司、大川克也、増田貴夫、森川裕子、小柳義夫、鈴木陽一。HIV-1 インテグラーゼ相互作用因子 Huw1 による HIV-1 の感染抑制。第 23 回日本エイズ学会学術集会、名古屋、11/26/2009.
- (37) Hoshino Y, Okunaga H, Morikawa Y. Overexpression of HRS induces preferential degradation of BST-2, an anti-HIV-1 host factor. 第 32 回日本分子生物学会学術集会、横浜、12/10/2009.
- (38) Urano E, Ichikawa R, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi Y, Komano J. SEC14-like 1a carboxy-terminal domain negatively regulated the infectivity of human immunodeficiency virus replication. 第 32 回日本分子生物学会学術集会、横浜、12/10/2009.
- (39) 光木裕也、水越文徳、渋沢謙太郎、寺原和孝、竹田誠、柳雄介、森川裕子、横田(恒次)恭子。HIV-1 感染と麻疹ウイルス感染が相互に及ぼす影響及びその機構の解析。第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、10/26/2009.
- (40) 渋沢謙太郎、光木裕也、寺原和孝、柳雄介、小林和夫、横田恭子。樹状細胞を標的とした HIV-1 増殖抑制 shRNA 発現レンチウイルスの開発。第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、2009 年 12 月。
- (41) 土屋貴嗣、光木裕也、寺原和孝、渋沢謙太郎、小林和夫、横田(恒次)恭子。CD4 標的レンチウイルスベクターの開発。第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、2009 年 12 月。
- (42) 横山勝、長縄聡、北村勝彦、佐藤裕徳。HIV-1 エンベロープ蛋白質の荷電変化によるウイルス中和感受性と細胞指向性の調節。第 9 回日本蛋白質科学会年会、熊本、5/22/2009.
- (43) 野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、三宅在子、横山勝、大出裕高、佐藤裕徳、足立昭夫。HIV-1 Env の 1 アミノ酸変異による増殖促進機構の解析。第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、10/26/2009.
- (44) 大出裕高、横山勝、蜂谷敦子、神田忠仁、瀧永博之、佐藤裕徳。HIV-1 の EFV/NVP 耐性獲得と ETV の抗 HIV 活性維持の分子機序。第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、10/26/2009.
- (45) 横山勝、大出裕高、野間口雅子、神田忠仁、足立昭夫、佐藤裕徳。HIV-1 Env V3 ループ構造の安定性を制御するアミノ酸。第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、10/27/2009.
- (46) 大出裕高、横山勝、神田忠仁、佐藤裕徳。HIV-1 前駆体蛋白質の切断効率を制御する構造特性。第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、10/27/2009.
- (47) 大出裕高、横山勝、神田忠仁、佐藤裕徳、伊部史朗、藤崎誠一郎、間宮均人、濱口元洋、杉浦互、横幕能行。コンピュータシミュレーションによる HIV-1 プロテアーゼの薬剤耐性度予測。第 47 回日本生物物理学会年会、徳島、10/31/2009.
- (48) 大出裕高、横山勝、蜂谷敦子、岡慎一、神田忠仁、瀧永博之、佐藤裕徳。HIV-1 逆転写酵素 V106I/V179D 変異による NNRTI 活性変化の分子機序。第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会、名古屋、11/26/2009.
- (49) 大出裕高、横山勝、神田忠仁、佐藤裕徳。HIV-1 前駆体蛋白質切断部位の構造特性と切断効率の関連。第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会、名古屋、11/26/2009.
- (50) 横山勝、大出裕高、野間口雅子、神田忠仁、足立昭夫、佐藤裕徳。HIV-1 Env V3 ループ構造の安定性を制御するアミノ酸。第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会、名古屋、11/26/2009.
- (51) 横山勝。計算科学による HIV-1 Gp120 の構造解析。第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会、シンポジウム、名古屋、11/27/2009.
- (52) 野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、三宅在子、横山勝、大出裕高、佐藤裕徳、足立昭夫。サル細胞指向性 HIV-1 Env の細胞馴化による増殖適応変異の解析。第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会、名古屋、11/28/2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1 特許取得

- (1) パラミクソウイルスベクターを用いた経鼻噴霧型結核ワクチン (特願 2009-252218)
- (2) パラインフルエンザ 2 型ウイルスベクター (hPIV2) を用いたアトピー性皮膚炎治療薬 (特願 2009-235915)

2 実用新案登録

なし。

3 その他

なし。

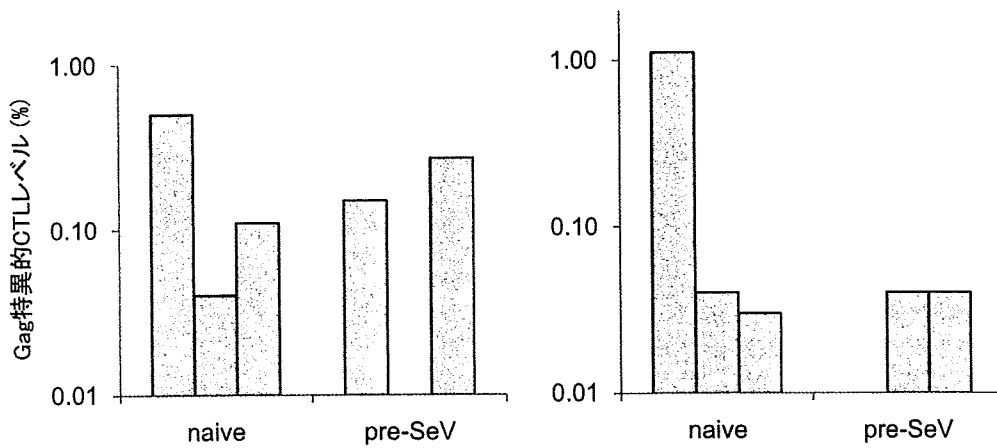


図1 SeV-Gag (10^8) プラストによるGag特異的CTL誘導
DNAプライム後の1回目のSeV-Gagベクター経鼻接種後（左）および2回目のSeV-Gagベクター経鼻接種後（右）のサル末梢血リンパ球中のGag特異的CTLレベルを示す。

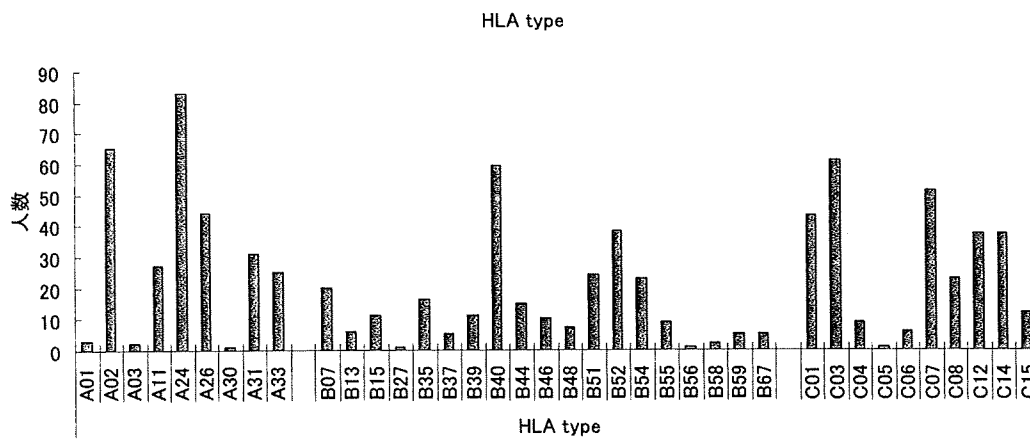


図2 日本人HIV感染症患者におけるHLAクラスI遺伝子型の分布

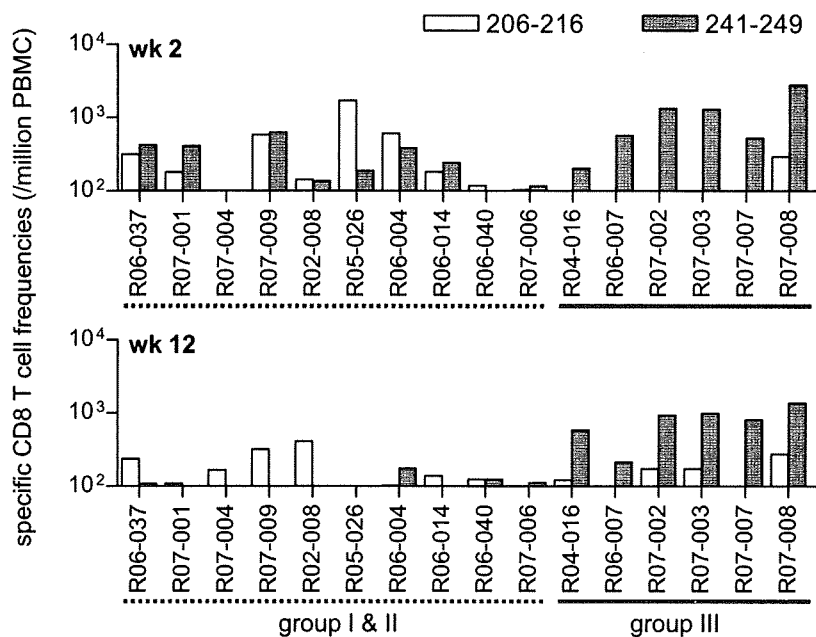


図3 単独CTLエピトープ発現ワクチン接種サルのSIV曝露後のGag特異的CTL反応
非ワクチン接種群と対照ワクチン接種群 (group I & II) および単独Gag241-249エピトープ
ワクチン接種群 (group III) におけるSIV感染後2週目 (上) と12週目 (下) の
末梢血リンパ球中のGag206-216特異的CTLとGag241-249特異的CTLレベルを示す。



図4 HIV-1 gp120のV3とCD4結合ループの配置
ホモロジーモデリング法および分子動力学計算により構築したHIV-1 gp120分子モデル。
HIV-1 p120 outer domain 全体 (左) とCD4結合部位周辺 (右)。V3配列の荷電量が+3、
荷電量が+7の構造を重ね合わせている。リボン表示はgp120を表している。

Ⅱ. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

ワクチン誘導免疫の HIV 複製防御効果に関する研究

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

本研究は HIV 感染拡大阻止に必要とされる予防エイズワクチン開発を目指すものである。我々が開発してきたセンダイウイルス (SeV) ベクターを用いた細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 誘導エイズワクチンは、サル免疫不全ウイルス (SIV) 感染サルエイズモデルで初めて有効性を示した点で注目され、接種者全員への効果は期待できないものの集団レベルでの HIV 感染拡大抑制効果の期待のもと国際共同臨床試験計画が進展中である。本研究では、この第 1 世代予防ワクチンの有効性の確立と接種者全員への感染発症防御効果を有する第 2 世代予防ワクチンの開発に向け、SeV ベクターワクチンシステムの最適化を進めるとともに、多様な SIV に対する CTL 誘導効果の解析を進めることとした。平成 21 年度は、サルモデルを用い、まず、SeV ベクターワクチン接種量・回数検討を行った。その結果、従来の 1/10 量の SeV ベクター経鼻接種でも十分な CTL 誘導効果を有すること、および 2 回目の SeV ベクター経鼻接種でも CTL 誘導効果を有することを確認した。さらに、ワクチン誘導 CTL の HIV 曝露後の 2 次反応を検討する目的で、単独 Gag241-249 エピトープ特異的 CTL 誘導ワクチン接種サルにおける SIV チャレンジ後急性期の CTL 反応の解析を行った。その結果、SIV 感染急性期において、対照群では Gag206-216 特異的 CTL 反応と Gag241-249 特異的 CTL 反応の両者の誘導が認められたが、単独 Gag241-249 特異的 CTL 誘導群では、Gag206-216 特異的 CTL 反応誘導がほとんど認められず、Gag241-249 特異的 CTL 反応が優位に高レベルに誘導されていた。この結果は、ワクチン接種により HIV 曝露後に誘導される CTL 反応の優位性 (ドミナンス・パターン) が変わる可能性を示すものとして極めて重要であり、この CTL のドミナンス・パターンを検討することにより、HIV 曝露後に有効な CTL 反応が優位に誘導されること、あるいは広範な CTL 反応が誘導されることを企図して、ワクチンにより誘導する CTL を選択する戦略が考えられる。

A. 研究目的

HIV 感染者数の増大は、流行地域だけではなくグローバルな視点で取り組み克服すべき国際的重要課題である。本研究は、この問題解決に必要な予防エイズワクチン開発を目指すものである。

われわれが開発を進めてきたセンダイウイルス (SeV) ベクターを用いた細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 誘導エイズワクチンは、サル免疫不全ウイルス (SIV) 感染サルエイズモデルで初めて有効性を示した点 (J Exp Med 199:1709) で注目され、接種者全員への効果は期待できないものの、集団での HIV 感染拡大抑制効果を期待した第 1 世代予防エイズワクチンとして、国際エイズワクチン推進構想 (IAVI) との国際共同臨床試験計画が米国にて進展中である。本研究では、この第 1 世代ワクチンの有効性確立に向けた研究を進展

させるとともに、接種者全員への感染発症防御効果を有する第 2 世代予防エイズワクチン開発に向け、HIV 複製抑制に結びつく CTL の選択的誘導に関する研究を開始することとした。

平成 21 年度は、サルエイズモデルにおいて、以下の 2 点を主目的とした研究を行った。

(1) CTL 誘導ワクチンのデリバリーシステムとしての SeV ベクターワクチンシステム最適化を目的とした研究として、SeV ベクターワクチン接種量・回数が CTL 誘導に及ぼす影響の検討。

(2) 有効な CTL 誘導のための論理基盤確立に向け、多様な SIV に対する CTL 誘導効果解明を目的とした研究として、ワクチン誘導 CTL の SIV 曝露後 2 次反応の解析。

B. 研究方法

(1-1) SeV ベクター接種量についての予備実験： DNA プライム後 6 週目に、従来量 (6×10^9 CIU)、従来の 1/10 量 (6×10^8 CIU) あるいは 1/100 量 (6×10^7 CIU) の SIV Gag 発現 F 欠損非複製型 SeV (SeV-Gag) ベクター経鼻接種ブーストを、各々カニクイサル 1 頭ずつに行い、ブースト後 1-2 週目に誘導される Gag 特異的 CTL 反応を測定した。

(1-2) SeV ベクター接種回数に関する検討： カニクイサル 6 頭に、DNA プライム後 6 週目に、従来の 1/10 量 (6×10^8 CIU) の SeV-Gag ベクター経鼻接種 (ブースト 1 回目) を行い、さらにその 9 週後に同量の SeV-Gag ベクター経鼻接種 (ブースト 2 回目) を行った。このうち 3 頭には、抗 SeV 既存免疫誘導群 (pre-SeV 群) として、DNA プライム 9 週前に複製型 SeV を経鼻接種を行い、他の 3 頭 (naive 群) と比較検討した。1 回目・2 回目の各 SeV-Gag 経鼻接種直前の血漿中の SeV 特異的中和抗体価および接種後 1-2 週目に誘導される Gag 特異的 CTL 反応を測定した。

(2) 単独 Gag241-249 エピトープ特異的 CTL 誘導サルにおける SIV 曝露後の CTL 反応の解析： われわれはこれまで、MHC クラス I ハプロタイプ 90-120-Ia 共有アカゲサルでは、SIVmac239 感染後、Gag206-216 特異的 CTL 反応と Gag241-249 特異的 CTL 反応が優位に誘導されることを示してきた。本研究では、Gag241-249 領域を含む Gag236-251 ペプチドと EGFP との融合蛋白を発現する DNA と SeV ベクターを用いたプライム・ブーストワクチン接種をうけ、Gag241-249 特異的 CTL 誘導が確認された 90-120-Ia 共有アカゲサル 6 頭 (単独エピトープワクチン接種群) において、SIVmac239 チャレンジ後 2 週目および 12 週目の Gag206-216 特異的 CTL 反応と Gag241-249 特異的 CTL 反応を測定し、非ワクチン接種群 (6 頭) および (EGFP 発現 DNA と SeV ベクターを用いた) 対照ワクチン接種群 (6 頭) と比較検討した。

なお、抗原特異的 CTL レベルについては、Gag 発現ワクシニアウイルスベクターあるいは Gag ペプチドを用いた抗原刺激特異的インターフェロン γ 誘導細胞を細胞内免疫染色で検出することにより測定した。SeV 特異的中和抗体価については、EGFP 発現 SeV ベクター感染を 90% 阻害する血漿希釈倍率を測定することにより決定した。

(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

(1-1) SeV ベクター接種量についての予備実験： 従来の 1/100 量の接種も含め、いずれの接種量の SeV-Gag ベクター経鼻接種でも Gag 特異的 CTL 誘導が認められた (図 1)。したがって、従来の 1/10 量の接種でも十分な CTL 誘導効果が期待できると予想された。

(1-2) SeV ベクター接種回数に関する検討： 1 回目の SeV-Gag ベクター接種後、1 頭を除いて Gag 特異的 CTL 誘導が認められた (図 2)。2 回目の SeV-Gag ベクター接種後も 1 頭を除いて Gag 特異的 CTL 反応が認められた (図 3)。1 回目接種時、pre-SeV 群では 1:50 - 1:100 の SeV 特異的中和抗体価が認められた (図 2)。2 回目接種時の SeV 特異的中和抗体価は、naive 群のうち 2 頭では 1:50、残り 1 頭では検出レベル以下であったが、pre-SeV 群では 1:200 - 1:800 であった (図 3)。

(2) 単独 Gag241-249 エピトープ特異的 CTL 誘導サルにおける SIV 曝露後の CTL 反応の解析： SIV 感染急性期において、非ワクチン接種群と対照ワクチン接種群では、Gag206-216 特異的 CTL 反応のみ、あるいは Gag206-216 特異的 CTL 反応と Gag241-249 特異的 CTL 反応の両者が認められたが、単独エピトープワクチン接種群では、Gag241-249 特異的 CTL 反応が優位に認められた (図 4)。

D. 考察

DNA プライム・SeV ベクターブーストワクチンにおいて、従来の 1/10 量の SeV-Gag ベクター経鼻接種でも効率よい Gag 特異的 CTL 誘導能を有することが示された (なお、本研究で示した 3 頭以外にも同様の結果が得られている)。低接種量による臨床応用は、安全性および実用性の面で有利であると考えられる。

SeV-Gag ベクター 2 回接種の実験では、1 回目の接種後の CTL 反応との比較により、naive 群では 2 回目の接種によるブースト効果があると考えられたが、pre-SeV 群では 2 回目の接種によるブースト効果は確認できなかった。SeV ベクター複数回接種においては、接種時の SeV 特異的中和抗体価が問題となるが、本研究の naive 群の 2 回

目接種と pre-SeV 群の 1 回目接種の結果から、1:100 以下の SeV 特異的中和抗体価の存在下でも、SeV ベクター経鼻接種により十分な抗原特異的 CTL 誘導が可能であることが示された。本研究は SeV ベクター 2 回接種の有効性を示すものであるが、2 回接種は、ブースト効果の点で有利であるだけでなく、異なる抗原発現 SeV ベクターを用いることにより、より広範な CTL 誘導に結びつく可能性が期待される。

ワクチンによる Gag241-249 特異的 CTL 誘導サルの SIV 曝露後の CTL 反応の解析では、自然感染時と比べて、感染急性期に Gag241-249 特異的 CTL 反応がより優位に誘導されることが明らかとなった。このことは、ワクチン接種により HIV 曝露後に誘導される CTL 反応の優位性(ドミナンス・パターン)が変わる可能性を意味している。この CTL のドミナンス・パターンを検討することにより、曝露後に有効な CTL 反応が優位に誘導されること、あるいは広範な CTL 反応が誘導されることを企図して、ワクチンにより誘導する CTL を選択する戦略が考えられる。

E. 結論

CTL 誘導ワクチンのデリバリーシステム最適化に向け、サルを用いた解析を行い、SeV ベクターワクチンの経鼻接種量を従来の 1/10 としても十分な CTL 誘導能があることを確認した。さらに 2 回経鼻接種が有効であることを明らかにした。サルエイズモデルでは、ワクチン接種によりウイルス曝露後に誘導される CTL 反応の優位性が変わりうるという極めて重要な知見を得た。これらの結果は、第 1 世代予防エイズワクチンの有効性確立および有効な免疫反応を選択的に誘導する第 2 世代予防エイズワクチンの開発に結びつく重要な成果である。

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) 野村拓志, 俣野哲朗. エイズワクチン開発の論理. ウイルス(日本ウイルス学会), 59:267-276, 2009.
- (4) 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) 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. 第 2 世代サル指向性 HIV-1 クローンはカニクイザル個体において効率よく増殖する. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、名古屋、11/28/2009.
- (16) 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.
- (17) 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

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

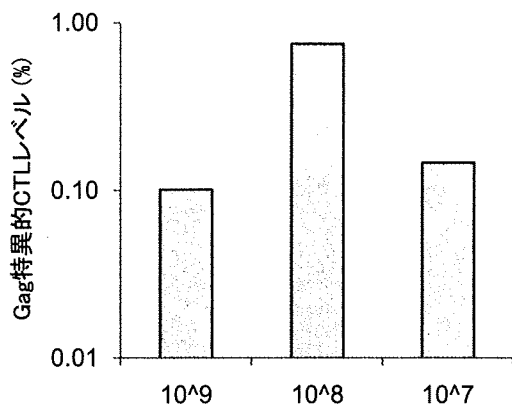


図1 低用量SeV-GagブーストによるGag特異的CTL誘導（予備実験）
 DNAプライム後、SeV-Gagベクターを 6×10^9 CIU (10^9)、 6×10^8 CIU (10^8)、 6×10^7 CIU (10^7) 経鼻接種（ブースト）した各々のカニクイサルで、ブースト後1週目に誘導される末梢血リンパ球中のGag特異的CTLレベルを示す。最も低用量のブーストでもGag特異的CTL誘導が確認された。

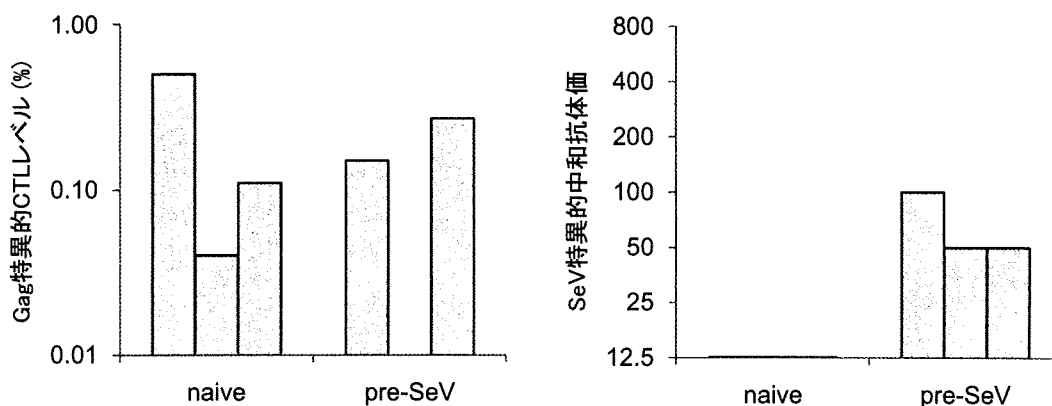


図2 1回目のSeV-Gag (10^8) ブーストによるGag特異的CTL誘導
 (左) DNAプライム後、SeV-Gagベクターを 6×10^8 CIU（従来の1/10量）経鼻接種した後の末梢血リンパ球中のGag特異的CTLレベルを示す。6頭のカニクイサルのうち、3頭はプライム9週前にSeV経鼻接種を行い（pre-SeV群）、残り3頭（naive群）と比較した。両群ともGag特異的CTL誘導が確認できた。
 (右) 1回目のSeV-Gagベクター経鼻接種直前の血漿中SeV特異的中和抗体価を示す。pre-SeV群では、1:50 - 1:100の中和抗体価が認められた。