

201009017A

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 H22-政策創薬-一般-004

宿主ゲノム多様性に対応する抗原発現ベクターを用いた
治療エイズワクチン開発

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 俣野 哲朗

平成23（2011）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 H22-政策創薬-一般-004

宿主ゲノム多様性に対応する抗原発現ベクターを用いた
治療エイズワクチン開発

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 俣野 哲朗

平成23（2011）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	国立感染症研究所 エイズ研究センター	センター長
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	ダイナベック株式会社 ダイナベック研究所	事業開発本部長

目 次

I. 総括研究報告書

- 宿主ゲノム多様性に対応する抗原発現ベクターを用いた 1
治療エイズワクチン開発
研究代表者：俣野哲朗（国立感染症研究所エイズ研究センター長）

II. 分担研究報告書

1. 各種抗原発現 SeV ベクターを用いた治療エイズワクチン効果に 7
関する研究
研究代表者：俣野哲朗（国立感染症研究所エイズ研究センター長）
2. 治療エイズワクチン効果に関与する宿主遺伝子型に関する研究 14
研究分担者：木村彰方（東京医科歯科大難治疾患研究所・教授）
3. SIV各種抗原発現SeVベクター作製 20
研究分担者：朱亜峰（ディナベック株式会社ディナベック研究所
・事業開発本部長）

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 23

IV. 研究成果の刊行物・別刷 25

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

宿主ゲノム多様性に対応する抗原発現ベクターを用いた治療エイズワクチン開発

研究代表者 侯野 哲朗 国立感染症研究所エイズ研究センター長

研究要旨

抗 HIV 薬多剤併用療法（HAART）の導入により HIV 感染者においてウイルス複製を制御することが可能となった。しかし、エイズ発症阻止には長期間の服薬継続が必要となるため、抗 HIV 薬による副作用や薬剤耐性株出現等が問題となる。したがって、HIV 複製の抑制に重要な細胞傷害性 T リンパ球（CTL）を HAART 中に誘導する治療エイズワクチンの開発は、日本を含む先進国での HIV 感染者治療の長期有効性を確立するための重要戦略である。我々はこれまで、優れた CTL 誘導能を有するセンダイウイルス（SeV）ベクターを開発し、SeV ベクターを用いた予防エイズワクチン国際共同臨床試験計画を進展中である。本研究は、この SeV ベクターを治療エイズワクチンのデリバリーシステムとして応用するもので、サルエイズモデルにおける解析により、有効な CTL 誘導に結びつく抗原選択のための論理基盤を確立することを目的とする。有効な CTL の標的候補となりうる抗原を発現する SeV ベクターを用いた治療ワクチン効果について、その抗原特異的 CTL 反応が元来ドミナントである個体とそうでない個体にて検証することとした。平成 22 年度は、(1) 治療ワクチン評価系の確認実験として、サル免疫不全ウイルス（SIV）感染サルにおいて抗 HIV 薬投薬システムを導入し、3 ヶ月間の HAART を行って血漿中ウイルス量および CTL 反応の変化を確認した。(2) 治療ワクチン評価に必要な主要組織適合遺伝子複合体クラス I（MHC-I）および MHC-I 様遺伝子等のサル宿主遺伝子多型の解析を進展させ、アカゲサルおよびカニクイサルにおいて新規 MHC-I アリルを同定した。(3) SIV Gag 発現 SeV ベクターに加えて、Vif、Nef、RT および IN を各々発現する SeV ベクターを作製した。(4) 治療ワクチン評価実験に MHC-I ハプロタイプ E 共有サル群、W 共有サル群および S 共有サル群を使用することとし、SIV 感染で、E 共有群では Nef・Env 抗原特異的 CTL が優位に誘導され、W・S 共有群では Gag・Vif 抗原特異的 CTL が優位に誘導されることを確認した。これらの結果をもとに、平成 23 年度には、HAART 中の SeV ベクター治療ワクチンにより Gag・Vif 特異的 CTL 誘導を行い、MHC-I ハプロタイプ E 共有群と W・S 共有群で、その効果を比較検討する予定である。

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

A. 研究目的

抗 HIV 薬多剤併用療法（HAART）導入により HIV 感染者におけるウイルス複製抑制が可能となった。しかし、その抑制を維持してエイズ発症を阻止するためには長期間の服薬継続が必要となるため、副作用や薬剤耐性株出現が問題となる。本研究は、このような課題の克服に向けて、HIV 感染者治療の長期有効性の確立に結びつく治療

エイズワクチンの開発を目的とする。HAART による体内抗原量の低下に基づき HIV 特異的細胞傷害性 T リンパ球（CTL）反応も減弱するが、治療エイズワクチンによる CTL 反応誘導によって、より強固なウイルス複製制御状態を維持し、最終的には抗 HIV 薬投薬量・期間の軽減を目指すものである。

我々はこれまで、世界有数の CTL 誘導能を有するセンダイウイルス（SeV）ベクターを開発し（*J Exp Med* 199:1709）、SeV ベクターを用いた予防エイズワクチン国際共同臨床試験計画を進展中である。本研究は、この SeV ベクターを治

療エイズワクチンのデリバリーシステムとして応用するもので、有効な CTL の標的抗原選択のための論理基盤の確立を目的とする。我々がこれまで確立してきた独自の主要組織適合遺伝子複合体クラス I (MHC-I) ハプロタイプ共有サル群を用い、MHC-I 遺伝子型別解析をサル免疫不全ウイルス (SIV) 感染エイズモデルにて推進する。

治療エイズワクチンの抗原選択においては、有効性が指摘されている Gag 抗原特異的 CTL と、最近の我々の研究により有効性が示唆された Vif 抗原特異的 CTL に着目し、まずは、各々を発現する SeV ベクター (SeV-Gag、SeV-Vif) を治療エイズワクチンとして接種することとした。さらに自然感染で優位となっている「ドミナント CTL」の誘導と、優位でない「サブドミナント CTL」の誘導のどちらが有効であるかの検討を行うこととした。

平成 22 年度は、これらの検討を行うために、以下の実験を行った。

(1) 治療ワクチン評価系の確認実験：サルエイズモデルでの HAART 導入およびその効果の確認

(2) 治療ワクチン効果に関連するサル MHC-I 等の宿主遺伝子多型の解析

(3) SIV 各抗原発現 SeV ベクターの作製

(4) 治療ワクチン評価実験に用いるサル群選択と SIV 感染における CTL 反応の把握

B. 研究方法

(1) 治療ワクチン評価系の確認実験：コンビビル (AZT/3TC)、ビリアード (TDF)、カレトラ (LPV/RTV) を混入した餌を SIVmac239 感染慢性期のアカゲサルに HAART として 3 ヶ月間投与し、血漿中ウイルス量および SIV 特異的 CTL 反応の経時的変化を解析した。

(2) サル宿主遺伝子多型の解析：アカゲサル 70 頭、カニクイサル 24 頭の MHC-I 遺伝子群および MHC-I 様遺伝子群 (活性化 NK レセプターである NKG2D レセプターのリガンド[ULBP]) の cDNA の解析を行った。

(3) SIV 各抗原発現 SeV ベクター作製：SIV の各抗原 (Vif・Nef・IN および RT) を発現する F 遺伝子欠損型 SeV ベクターの調製と大量生産を実施した。

(4) 治療ワクチン評価のための SIV 感染実験：治療ワクチン評価実験には、MHC-I ハプロタイプ E、W および S を各々共有するアカゲサル群を用いることとし、E 群 4 頭、W 群 2 頭、S 群 2 頭に SIVmac239 をチャレンジして、感染初期の SIV 特異的 CTL 反応を解析した。

(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、実施機関の倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

(1) 治療ワクチン評価系の確認実験：SIV 感染サル 2 頭への HAART 導入に成功し、3 ヶ月間の HAART を行った。2 頭とも、HAART 開始後にウイルス複製は制御され、HAART 終了後にウイルス血症の再出現を示した。SIV 抗原特異的 CTL 反応は、HAART 開始後に減弱したが、HAART 終了後に回復し、抗 HIV 薬投薬前後の CTL 反応の優位性には変化はなかった。

(2) サル宿主遺伝子多型の解析：これまで進めてきたアカゲサルの解析に加え、カニクイサルの解析も進展させ、Mafa-A1 遺伝子座の多様性を示すとともに、数多くの新規 MHC-I アリルを同定した。ULBP4 の多様性を示す結果も得た。

(3) SIV 各抗原発現 SeV ベクター作製：パッケージング細胞株を利用し、4 種類の SeV ベクターを大量生産した。力価測定・配列確認・無菌試験などの確認を行い、in vivo 試験に十分使用可能なクオリティーでの調製に成功した。

(4) 治療ワクチン評価のための SIV 感染実験：SIV 感染初期において、E 共有群 4 頭では、Nef・Env 特異的 CTL 反応が優位で、Gag 特異的 CTL あるいは Vif 特異的 CTL 反応はほとんど認められなかった。一方、W あるいは S 共有群 4 頭では、Gag・Vif 特異的 CTL 反応が優位であった。

D. 考察

本研究では、治療エイズワクチン評価のためのサルエイズモデルにおける HAART の効果を確認することができた。さらに、基本となる治療ワクチン評価実験には、MHC-I ハプロタイプ E、W および S を各々共有するサル群を用いることとし、SIV 感染後、E 共有サル群では Gag・Vif 特異的 CTL 反応が優位ではなく、W・S 共有サル群では Gag・Vif 特異的 CTL 反応が優位であることを確認した。

さらに正確な治療ワクチン評価に向けて、サル宿主遺伝子多型の解析を進展させた。これまでの我々の研究で、アカゲサル Mamu-A 遺伝子座にメジャーなアリルが 2 個存在するハプロタイプが

確認されていたが、さらにカニクイサル解析で、Mafa-A1 遺伝子座にメジャーアレルが 2 個存在するハプロタイプや検出されないハプロタイプが認められた。NKG2D レセプターのリガンドの多様性の検討では、アカゲサル、カニクイサルとも ULBP4 の多様性が極めて大きいことが判明した。一方、治療ワクチン用の SIV 各抗原発現 SeV ベクター作製を順調に実施した。

これらの結果をもとに、平成 23 年度には、SeV ベクター治療エイズワクチンにより Gag・Vif 特異的 CTL 誘導を行い、元来 Gag・Vif 特異的 CTL 反応がドミナントでない E 共有サル群とドミナントである W・S 共有サル群で、その効果を検討する予定である。

E. 結論

治療ワクチン評価系の確認実験として、SIV 感染サルにおいて抗 HIV 薬投薬システムを導入し、3 ヶ月間の HAART を行って血漿中ウイルス量および CTL 反応の変化を確認した。また、サル MHC-I 等の宿主遺伝子多型の解析を進展させ、特にカニクイサルにおいて数多くの新規 MHC-I アレルを同定した。一方、SIV Gag 発現 SeV ベクターに加えて、Vif、Nef、RT および IN を各々発現する SeV ベクターを作製した。治療ワクチン評価実験には MHC-I ハプロタイプ E 共有群、W 共有群および S 共有群を使用することとし、SIV 感染で、E 共有群では Nef・Env 抗原特異的 CTL が優位に誘導され、W・S 共有群では Gag・Vif 抗原特異的 CTL が優位に誘導されることを確認した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1 論文発表

- (1) Naruse TK, Chen Z, Yanagida R, Yamashita T, Saito Y, Mori K, Akari H, Yasutomi Y, Miyazawa M, Matano T, Kimura A. Diversity of MHC class I genes in Burmese-origin rhesus macaques. *Immunogenetics* 62:601-611, 2010.
- (2) Iwamoto N, Tsukamoto T, Kawada M, Takeda A, Yamamoto H, Takeuchi H, Matano T. Broadening of CD8⁺ cell responses in vaccine-based simian immunodeficiency virus controllers. *AIDS* 24:2777-2787, 2010.
- (3) Inagaki N, Takeuchi H, Yokoyama M, Sato H, Ryo A, Yamamoto H, Kawada M, Matano

T. A structural constraint for functional interaction between N-terminal and C-terminal domains in simian immunodeficiency virus capsid proteins. *Retrovirology* 7:90, 2010.

- (4) Saito A, Nomaguchi M, Iijima S, Kuroishi A, Yoshida T, Lee Y-J, Hayakawa T, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Yasutomi Y, Adachi A, Matano T, Akari H. Improved capacity of a monkey-tropic HIV-1 derivative to replicate in cynomolgus monkeys with minimal modifications. *Microbes Infect*, 13:58-64, 2011.
 - (5) Wichukchinda N, Nakajima T, Saipradit N, Nakayama EE, Ohtani H, Rojanawiwat A, Pathipvanich P, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P, Shioda T, Kimura A. TIM1 haplotype may control the disease progression to AIDS in a HIV-1-infected female cohort in Thailand. *AIDS* 24(11):1625-1631, 2010.
 - (6) Itaya S, Nakajima T, Kaur G, Terunuma H, Ohtani H, Mehra N, Kimura A. No evidence of an association between the APOBEC3B deletion polymorphism and susceptibility to HIV infection and AIDS in Japanese and Indian populations. *J Infect Dis.* 202(5): 815-816, 2010.
 - (7) Sugimoto C, Watanabe S, Naruse T, Kajiwara E, Shiino T, Umamo N, Ueda K, Sato H, Ohgimoto S, Hirsh V, Villinger F, Ansari AA, Kimura A, Miyazawa M, Suzuki Y, Yamamoto N, Nagai Y, Mori K. Protection of macaques with diverse MHC genotypes against a heterologous SIV by vaccination with a deglycosylated live-attenuated SIV. *PLoS ONE* 5(7):e11678, 2010.
 - (8) Griesenbach U, McLachlan G, Owaki T, Somerton L, Shu T, Baker A, Tennant P, Gordon C, Vrettou C, Baker E, Collie DD, Hasegawa M, Alton EW. Validation of recombinant Sendai virus in a non-natural host model. *Gene Ther* 18(2):182-8, 2011.
- ### 2 学会発表
- (1) 俣野哲朗. センダイウイルスベクターを用いたエイズワクチン開発. 第 26 回日本 DDS 学会、大阪、6/17/2010.
 - (2) Nomura T, Takahashi N, Yamamoto H, Naruse T, Kimura A, Matano T. The effect of MHC-I haplotypes on SIV replication in Burmese rhesus macaques. 9th International Veterinary Immunology Symposium, Tokyo,

- Japan, 8/19/2010.
- (3) Matano T. Vaccine-based SIV control in a group of Burmese rhesus macaques sharing a MHC class I haplotype. 9th International Veterinary Immunology Symposium, Tokyo, Japan, 8/19/2010.
 - (4) Iwamoto N, Tsukamoto T, Kawada M, Takeda A, Yamamoto H, Takeuchi H, Matano T. Vaccine-based simian immunodeficiency virus controllers acquire broader CD8⁺ cell responses able to suppress multiple escape mutant virus replication. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, 8/26/2010.
 - (5) Inagaki N, Takeuchi H, Matano T. Functional interaction between N-terminal and C-terminal domains in simian immunodeficiency virus capsid proteins. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 9/8/2010.
 - (6) Ishii H, Matano T. Risk of accelerating CTL escape mutant selection post-viral exposure by prophylactic AIDS vaccination. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 9/9/2010.
 - (7) Matano T. The effect of CTL memory induction by prophylactic vaccination on CTL dominance post-SIV exposure. US-Japan Cooperative Medical Science Program, 23th Joint Meeting of the AIDS Panels, Awaji, Japan, 9/10/2010.
 - (8) Ishii H, Matano T. Alteration of CTL dominance post-viral exposure by prophylactic AIDS vaccination. AIDS Vaccine 2010, Atlanta, GA, USA, 9/30/2010.
 - (9) Matano T., Matsuoka S, Ishii H, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T., Hasegawa M. Intranasal Sendai viral vector administration is more immunogenic than intramuscular in the presence of anti-vector antibodies. AIDS Vaccine 2010, Atlanta, GA, 9/30/2010.
 - (10) Matano T. The effect of prophylactic vaccination on CTL dominance post-SIV exposure in rhesus macaques. 11th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 10/7/2010.
 - (11) Inagaki N, Takeuchi H, Matsuoka S, Matano T. Critical amino acid residues for functional interaction between N-terminal and C-terminal domains in SIV capsid proteins. The 28th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, New Orleans, LA, USA, 10/20/2010.
 - (12) 稲垣奈都子、武内寛明、横山勝、佐藤裕徳、梁明秀、俣野哲朗. SIV CA の N ドメインと C ドメインの機能的相互作用に関わるアミノ酸残基の同定. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (O1-2-15)、徳島、11/7/2010.
 - (13) 石井洋、岩本南、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗. 予防エイズワクチンによる CTL dominance の変化. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (O2-2-24)、徳島、11/8/2010.
 - (14) 高橋尚史、石井洋、高原悠佑、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗. 自然感染で優位な Gag 特異的 CTL が誘導されない MHC-I ハプロタイプ共有サル群における Gag 特異的 CTL 誘導ワクチン効果の解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (O2-2-25)、徳島、11/8/2010.
 - (15) 高原悠佑、松岡佐織、石井洋、堀池麻里子、三浦智行、五十嵐樹彦、俣野哲朗. サルエイズモデルにおける HAART 実施前後の CTL 反応の比較. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (O2-2-26)、徳島、11/8/2010.
 - (16) 野村拓志、山本浩之、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗. ビルマ産アカゲザルにおける MHC クラス I ハプロタイプの SIV 感染への影響の解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (O3-2-02)、徳島、11/9/2010.
 - (17) 岩本南、石井洋、山本浩之、武内寛明、俣野哲朗. CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能と抗原特異的 CTL レベルの相関の解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (O3-2-03)、徳島、11/9/2010.
 - (18) 俣野哲朗. エイズワクチン開発：国際共同臨床試験プロジェクト. 第 13 回ヒューマンサイエンス総合研究ワークショップ、東京、11/25/2010.
 - (19) 俣野哲朗. エイズワクチン開発：HIV 感染症克服への挑戦. 第 24 回日本エイズ学会学術集会、東京、11/26/2010.
 - (20) 石井洋、岩本南、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗. CTL 誘導型予防 AIDS ワクチンの抗原選択が CTL エスケープ変異出現に与える影響. 第 24 回日本エイズ学会学術集会、東京、11/26/2010.
 - (21) Naruse T, Kimura A. Genetic diversity of ULBP gene family in human and macaques. 13th Cardiovascular Genomics and Atherosclerosis Symposium. Seoul, Korea, 10/2/2010.

- (22) Nomura T, Takahashi N, Yamamoto H, Naruse T, Kimura A, Matano T. Vaccine-based SIV control in a group of Burmese rhesus macaques sharing a MHC class I haplotype. 9th International Veterinary Immunology Symposium. Tokyo, Japan, 8/16/2010.
- (23) 中島敏晶、Nuanjun Wichukchinda、Nongluk Saipradit、中山英美、大谷仁志、Archawin Rojanawiwat、Panita Pathipvanich、有吉紅也、Pathom Sawanpanyalert、塩田達雄、木村彰方. Th1/Th2 バランス調節因子 TIM1 と HIV-1 感染感受性および予後との関わり. 第 19 回日本組織適合性学会、東京、9/18/2010.
- (24) 中島敏晶、木村彰方. HIV/AIDS 感受性、抵抗性とゲノム多様性 (教育講演). 第 19 回日本組織適合性学会、東京、9/19/2010.
- (25) 中島敏晶、Nuanjun Wichukchinda、Nongluk Saipradit、中山英美、大谷仁志、Archawin Rojanawiwat、Panita Pathipvanich、有吉紅也、Pathom Sawanpanyalert、塩田達雄、木村彰方. タイ人女性 HIV-1 感染集団における TIM1 遺伝子多型と HIV-1 感染感受性および予後との関わり. 第 55 回日本人類遺伝学会、大宮、10/29/2010.
- (26) 成瀬妙子、陳智勇、柳田梨紗、山下智子、齋藤祐介、森一泰、保富康宏、宮澤正顕、俣野哲朗、木村彰方. 実験動物アカゲザルの MHC クラス I 多様性解析. 第 19 回日本組織適合性学会大会、東京、9/18/2010.
- (27) 成瀬妙子、奥田裕紀子、俣野哲朗、明里宏文、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 RAET1/ULBP 遺伝子群の多様性. 日本人類遺伝学会第 55 回大会、大宮、10/28/2010.
- (28) 齋藤祐介、成瀬妙子、明里宏文、俣野哲朗、木村彰方. カニクイザル産地別家系調査による MHC クラス I 遺伝子(Mafa-A, Mafa-B)遺伝子のハプロタイプの決定. 第 19 回日本組織適合性学会大会、東京、9/18/2010.
- (29) 奥田裕紀子、成瀬妙子、俣野哲朗、森一泰、保富康宏、宮澤正顕、木村彰方. アカゲザル ULBP4 遺伝子の多様性. 第 19 回日本組織適合性学会大会. 東京. 2010 年 9 月 18 日.
- (30) Hara H, Hironaka T, Inoue M, Iida A, Shu T, Hasegawa M, Nagai Y, Lombardo A, Parks C, Sayeed E, Ackland J, Cormier E, Price M, Excler JL. Sendai-specific neutralizing antibody prevalence in different geographic populations: implication for AIDS vaccine development with Sendai vevtors. AIDS Vaccine 2010 Conference. Atlanta, Georgia USA. Sep 28-Oct 1, 2010.

H. 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。

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

各種抗原発現 SeV ベクターを用いた治療エイズワクチン効果に関する研究

研究代表者 侯野 哲朗 国立感染症研究所エイズ研究センター長

研究要旨

抗 HIV 薬多剤併用療法（HAART）により HIV 感染者の体内ウイルス量は低下するが、それとともに体内抗原量の低下に基づき HIV 特異的細胞傷害性 T リンパ球（CTL）反応も減弱する。治療エイズワクチンは、このような投薬中の HIV 感染者を対象とし、CTL 反応を誘導することによって、より強固なウイルス複製制御状態を維持し、できれば投薬量・期間の軽減を目指すものである。我々はこれまで、極めて優れた CTL 誘導能を有するセンダイウイルス（SeV）ベクターを開発し、SeV ベクターを用いた予防エイズワクチンの国際共同臨床試験計画が進展中である。本研究は、この SeV ベクターを治療エイズワクチンのデリバリーシステムとして応用するもので、有効な CTL の標的抗原選択に結びつく科学的根拠の獲得を目的とする。平成 22 年度は、まず、治療エイズワクチンの評価に用いるサルエイズモデルにおける HAART の効果の確認を進めた。サル免疫不全ウイルス（SIV）感染サルにおいて抗 HIV 薬投薬システムを導入し、3 ヶ月間の HAART を行って HAART 開始後の体内ウイルス量の低下および HAART 終了後の体内ウイルス量の上昇（ウイルス血症再出現）を確認した。また、SIV 特異的 CTL レベルについても、HAART 開始後の低下ならびに HAART 終了後の上昇を確認した。各抗原特異的 CTL 反応の解析では、HAART 前後で CTL 反応の優位性のパターンに特に変化を認めなかった。一方、治療エイズワクチンの抗原選択においては、有効な CTL の標的抗原である可能性が示唆されている Gag 抗原と Vif 抗原に着目し、さらに自然感染で優位となっている「ドミナント CTL」の誘導と、優位でない「サブドミナント CTL」の誘導のどちらが有効であるかの検討を行うこととした。平成 22 年度は、この検討に、これまで確立してきたシステムを用い、MHC-I（主要組織適合遺伝子複合体クラス I）ハプロタイプ E 共有群、W 共有群および S 共有群を使用することとし、SIV 自然感染で誘導される各抗原特異的 CTL 反応を解析した。その結果、E 共有群では Nef・Env 抗原特異的 CTL が優位に誘導され、W・S 共有群では Gag・Vif 抗原特異的 CTL が優位に誘導されることを確認した。これらの結果をもとに、平成 23 年度には、SeV ベクター治療エイズワクチンにより Gag・Vif 特異的 CTL 誘導を行い、元来 Gag・Vif 特異的 CTL 反応がドミナントでない E 共有群とドミナントである W・S 共有群とで、その効果を比較検討する予定である。

A. 研究目的

1990 年代後半以降、抗 HIV 薬多剤併用療法（HAART）の導入により先進国ではエイズ発症の抑制が可能となってきた。しかし、HAART によっても HIV 感染者の体内から完全にウイルスを排除することは困難で、投薬を中断するとウイルス血症が再発することが知られており、長期の HAART 継続が必要となる。治療エイズワクチンは、このような投薬中の HIV 感染者を対象とし、抗 HIV 治療の長期的有効性の確立を目的とするものである。

HAART による体内抗原量の低下に基づき HIV 特異的細胞傷害性 T リンパ球（CTL）反応も減弱する。本研究の治療エイズワクチンは、このような HIV 感染者の HAART 中に CTL 反応を誘導し、より強固なウイルス複製制御状態を維持して、できれば投薬量・期間の軽減を目指すものである。我々はこれまで、極めて優れた CTL 誘導能を有するセンダイウイルス（SeV）ベクターを開発し、SeV ベクターを用いた予防エイズワクチンの国際共同臨床試験計画が進展中である。本研究は、この SeV ベクターを治療エイズワクチンのデリ

バリーシステムとして応用するもので、サルエイズモデルにおける解析により、有効な CTL の標的抗原選択に結びつく科学的根拠の獲得を目的とする。

治療エイズワクチンの抗原選択においては、有効性が指摘されている Gag 抗原特異的 CTL と、最近の我々の研究により有効性が示唆された Vif 抗原特異的 CTL に着目し、各々を発現する SeV ベクター (SeV-Gag、SeV-Vif) を治療エイズワクチンとして接種することとした。さらに自然感染で優位となっている「ドミナント CTL」の誘導と、優位でない「サブドミナント CTL」の誘導のどちらが有効であるかの検討を行うこととした。これらの解析には、我々がこれまで確立してきた独自の主要組織適合遺伝子複合体クラス I (MHC-I) ハプロタイプ共有ビルマ産アカゲサル群が有用である。平成 22 年度は、これらの検討を行うために、サルエイズモデルにおける HAART 導入およびその効果の確認、ならびに検討に用いるサルの選択および SIV 感染実験を行った。

B. 研究方法

(1) サルエイズにおける HAART の効果確認：コンビビル (AZT/3TC)、ピリアード (TDF)、カレトラ (LPV/RTV) を混入した餌を SIVmac239 感染慢性期のアカゲサルに HAART として 3 ヶ月間 (35 週より 47 週まで) 投与し、血漿中ウイルス量および SIV 特異的 CTL 反応の経時的変化を解析した。SIV 特異的 CTL 反応は、末梢血 CD8 陽性 T リンパ球において、SIV 各抗原アミノ酸配列をカバーするオーバーラッピングペプチドを用いた抗原刺激後に誘導されるインターフェロンを細胞内免疫染色で検出することにより測定した。

(2) 治療ワクチン評価のための SIV 感染実験：治療ワクチン評価実験には、これまで我々が集積してきた情報をもとに、MHC-I ハプロタイプ E、W および S を各々共有するビルマ産アカゲサル群を用いることとした。これらのサル計 8 頭 (E 4 頭、W 2 頭、S 2 頭) に SIVmac239 をチャレンジ (静注) し、感染初期 (3 ヶ月) の SIV 特異的 CTL 反応を解析した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、倫理面も含めて、実施機関および所属機関の動物実験委員会の審査をうけ、その承認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) および機関承認済みである。

C. 研究結果

(1) サルエイズにおける HAART の効果確認：SIV 感染サル 2 頭への HAART 導入に成功し、3 ヶ月間の HAART を行った。2 頭とも、HAART 開始後にウイルス複製は制御され、血漿中ウイルス量の低下を示し、HAART 終了後に血漿中ウイルス量の上昇 (ウイルス血症の再出現) を示した (図 1)。SIV 抗原特異的 CTL 反応は、HAART 開始後に減弱したが、HAART 終了後に回復した。基本的に、HAART 開始前に優位であった CTL 反応が HAART 終了後も優位であり、抗 HIV 薬投薬前後の CTL 反応の優位性には変化はなかった (表 1)。

(2) 治療ワクチン評価のための SIV 感染実験：SIV 感染初期において (表 2)、E 共有群 4 頭では、Nef・Env 特異的 CTL 反応が優位であった。Gag 特異的 CTL あるいは Vif 特異的 CTL 反応はほとんど認められなかった。一方、W あるいは S 共有群 4 頭では、Gag・Vif 特異的 CTL 反応が優位であった。

D. 考察

本研究では、治療エイズワクチン評価のためのサルエイズモデルにおける HAART の効果を確認することができた。HAART 前後での CTL 反応の優位性にも変化はなく、今後、治療ワクチンにより CTL 反応の優位性に変化を与える場合との比較検討が期待される。さらに、SIV 感染 MHC-I ハプロタイプ E 共有サル群では Gag・Vif 特異的 CTL 反応が優位ではなく、W・S 共有サル群では Gag・Vif 特異的 CTL 反応が優位であることを確認することができた。

これらの結果をもとに、平成 23 年度には、SeV ベクター治療エイズワクチンにより Gag・Vif 特異的 CTL 誘導を行い、元来 Gag・Vif 特異的 CTL 反応がドミナントでない E 共有群とドミナントである W・S 共有群とで、その効果を比較検討する予定である。

E. 結論

治療エイズワクチン評価のためのサルエイズモデルにおける HAART の効果を確認し、投薬前後で CTL 反応の優位性に変化がないことを示す結果を得た。治療ワクチン評価用のサル群として、

Gag・Vif 特異的 CTL 反応がドミナントでない群 (MHC-I ハプロタイプ E 共有群) とドミナントである群 (W あるいは S 共有群) を準備した。

これらの結果をもとに、平成 23 年度には、Gag・Vif を各々発現する SeV ベクターを用いた治療エイズワクチンの効果を、元来 Gag・Vif 特異的 CTL 反応がドミナントでない E 共有群とドミナントである W・S 共有群とで、比較検討する予定である。

F. 研究発表

1 論文発表

- (1) Naruse TK, Chen Z, Yanagida R, Yamashita T, Saito Y, Mori K, Akari H, Yasutomi Y, Miyazawa M, Matano T, Kimura A. Diversity of MHC class I genes in Burmese-origin rhesus macaques. *Immunogenetics* 62:601-611, 2010.
- (2) Iwamoto N, Tsukamoto T, Kawada M, Takeda A, Yamamoto H, Takeuchi H, Matano T. Broadening of CD8⁺ cell responses in vaccine-based simian immunodeficiency virus controllers. *AIDS* 24:2777-2787, 2010.
- (3) Inagaki N, Takeuchi H, Yokoyama M, Sato H, Ryo A, Yamamoto H, Kawada M, Matano T. A structural constraint for functional interaction between N-terminal and C-terminal domains in simian immunodeficiency virus capsid proteins. *Retrovirology* 7:90, 2010.
- (4) Saito A, Nomaguchi M, Iijima S, Kuroishi A, Yoshida T, Lee Y-J, Hayakawa T, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Yasutomi Y, Adachi A, Matano T, Akari H. Improved capacity of a monkey-tropic HIV-1 derivative to replicate in cynomolgus monkeys with minimal modifications. *Microbes Infect*, 13:58-64, 2011.

2 学会発表

- (1) 俣野哲朗. センダイウイルスベクターを用いたエイズワクチン開発. 第 26 回日本 DDS 学会、大阪、6/17/2010.
- (2) Nomura T, Takahashi N, Yamamoto H, Naruse T, Kimura A, Matano T. The effect of MHC-I haplotypes on SIV replication in Burmese rhesus macaques. 9th International Veterinary Immunology Symposium, Tokyo, Japan, 8/19/2010.
- (3) Matano T. Vaccine-based SIV control in a group of Burmese rhesus macaques sharing

a MHC class I haplotype. 9th International Veterinary Immunology Symposium, Tokyo, Japan, 8/19/2010.

- (4) Iwamoto N, Tsukamoto T, Kawada M, Takeda A, Yamamoto H, Takeuchi H, Matano T. Vaccine-based simian immunodeficiency virus controllers acquire broader CD8⁺ cell responses able to suppress multiple escape mutant virus replication. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, 8/26/2010.
- (5) Inagaki N, Takeuchi H, Matano T. Functional interaction between N-terminal and C-terminal domains in simian immunodeficiency virus capsid proteins. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 9/8/2010.
- (6) Ishii H, Matano T. Risk of accelerating CTL escape mutant selection post-viral exposure by prophylactic AIDS vaccination. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 9/9/2010.
- (7) Matano T. The effect of CTL memory induction by prophylactic vaccination on CTL dominancy post-SIV exposure. US-Japan Cooperative Medical Science Program, 23th Joint Meeting of the AIDS Panels, Awaji, Japan, 9/10/2010.
- (8) Ishii H, Matano T. Alteration of CTL dominancy post-viral exposure by prophylactic AIDS vaccination. *AIDS Vaccine 2010*, Atlanta, GA, USA, 9/30/2010.
- (9) Matano T, Matsuoka S, Ishii H, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M. Intranasal Sendai viral vector administration is more immunogenic than intramuscular in the presence of anti-vector antibodies. *AIDS Vaccine 2010*, Atlanta, GA, 9/30/2010.
- (10) Matano T. The effect of prophylactic vaccination on CTL dominancy post-SIV exposure in rhesus macaques. 11th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 10/7/2010.
- (11) Inagaki N, Takeuchi H, Matsuoka S, Matano T. Critical amino acid residues for functional interaction between N-terminal and C-terminal domains in SIV capsid proteins. The 28th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, New Orleans, LA, USA, 10/20/2010.
- (12) 稲垣奈都子、武内寛明、横山勝、佐藤裕徳、

- 梁明秀、俣野哲朗. SIV CA の N ドメインと C ドメインの機能的相互作用に関わるアミノ酸残基の同定. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (O1-2-15)、徳島、11/7/2010.
- (13) 石井洋、岩本南、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗. 予防エイズワクチンによる CTL dominancy の変化. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (O2-2-24)、徳島、11/8/2010.
- (14) 高橋尚史、石井洋、高原悠佑、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗. 自然感染で優位な Gag 特異的 CTL が誘導されない MHC-I ハプロタイプ共有サル群における Gag 特異的 CTL 誘導ワクチン効果の解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (O2-2-25)、徳島、11/8/2010.
- (15) 高原悠佑、松岡佐織、石井洋、堀池麻里子、三浦智行、五十嵐樹彦、俣野哲朗. サルエイズモデルにおける HAART 実施前後の CTL 反応の比較. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (O2-2-26)、徳島、11/8/2010.
- (16) 野村拓志、山本浩之、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗. ビルマ産アカゲザルにおける MHC クラス I ハプロタイプの SIV 感染への影響の解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (O3-2-02)、徳島、11/9/2010.
- (17) 岩本南、石井洋、山本浩之、武内寛明、俣野哲朗. CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能と抗原特異的 CTL レベルの相関の解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (O3-2-03)、徳島、11/9/2010.
- (18) 俣野哲朗. エイズワクチン開発：国際共同臨床試験プロジェクト. 第 13 回ヒューマンサイエンス総合研究ワークショップ、東京、11/25/2010.
- (19) 俣野哲朗. エイズワクチン開発：HIV 感染症克服への挑戦. 第 24 回日本エイズ学会学術集会、東京、11/26/2010.
- (20) 石井洋、岩本南、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗. CTL 誘導型予防 AIDS ワクチンの抗原選択が CTL エスケープ変異出現に与える影響. 第 24 回日本エイズ学会学術集会、東京、11/26/2010.

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。

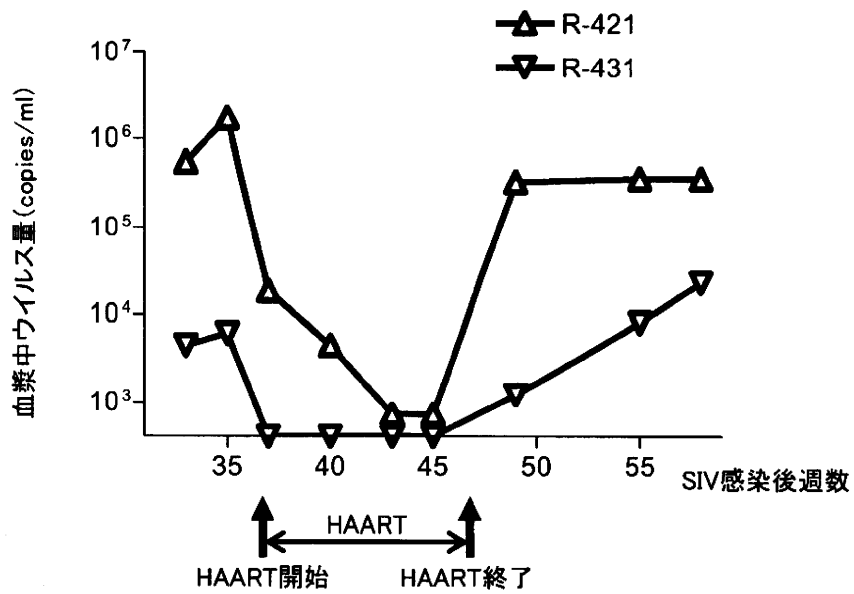


図1. HAART治療による血漿中ウイルス量の変化
 アカゲサル2頭(R-421・R-431)にSIV感染後35週目より47週目まで
 HAARTを行った。

		Gag		Pol		Vif	Vpx Vpr	Tat Rev	Env		Nef
		N側半分	C側半分	N側半分	C側半分				N側半分	C側半分	
R-421											
HAART前	wk 33	+	++	-	-	-	-	++	+	-	+
HAART中	wk 45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HAART後	wk 49	-	+++	-	-	+	+	++	+	-	+
R-431											
HAART前	wk 33	+	-	-	-	-	+	++	-	-	-
HAART中	wk 45	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
HAART後	wk 49	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-

表 1. HAART前後の抗原特異的CTL反応

図 1 で示したSIV感染サル 2 頭 (R-421・R-431) のHAART (SIV感染後35週より47週) 開始前 (33週)、HAART中 (45週)、HAART中止後 (49週) のSIV各抗原特異的CTL反応レベル (- / + / ++ / +++) を示す。

サル MHC-I haplotype		Gag		Pol		Vif	Vpx	Vpr	Tat	Rev	Env		Nef
		N側 半分	C側 半分	N側 半分	C側 半分						N側 半分	C側 半分	
E	#1	-	-	-	-	++	+	-	++	-	++	-	+++
E	#2	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+
E	#3	-	+	-	-	-	-	-	+	+	++	-	++
E	#4	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	++
W	#5	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
W	#6	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
S	#7	+	++	+	+	++	-	-	+	+	-	-	++
S	#8	+	+	-	-	++	-	-	-	-	+	-	++

表 2. SIV感染初期の抗原特異的CTL反応

MHC-I haplotype E (4頭)、W (2頭) あるいはS (2頭) 陽性サルのSIV感染初期のSIV抗原特異的CTL反応の有無を示す。

治療エイズワクチン効果に関与する宿主遺伝子型に関する研究

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

研究要旨

SIV 実験アカゲザル個体についての Mamu-A および Mamu-B 遺伝子の多様性を引き続き検討するとともに、カニクイザルについても Mafa-A 遺伝子および Mafa-B 遺伝子の多様性を解析した結果、81 アリルを検出したが、そのうち 36 アリル(44.4%)は新規アリルであった。また、Mafa-A1 遺伝子が検出されないハプロタイプや Mafa-A1 遺伝子が 2 個存在するハプロタイプが認められたことから、旧世界ザルの MHC-A1 遺伝子座は従来考えられていたよりもさらに多様性が大きいことが判明した。一方、NKG2D レセプターのリガンドである ULBP4 遺伝子にはアカゲザル、カニクイザルともに大きな多様性があることが示された。さらに、比較ゲノム解析を用いた進化医学的手法によって、TIM1 が HIV/AIDS 関連遺伝子であることがさらに証明された。また、11 個の IgSF 遺伝子群が有意な進化選択圧を受けていることを見出した。

A. 研究目的

ヒトを始めとする高等動物では外来抗原に対する免疫応答性に個体差があり、このためウイルス感染に対する感受性・抵抗性やワクチン接種効果が個体によって異なっている。このような免疫応答の個体差は生体の発達過程で形成されるが、そこには遺伝的背景が強く関与する。すなわち、免疫応答性は T 細胞、NK 細胞、抗原提示細胞、B 細胞などの協調によって形成されるが、これらの細胞間の機能連関には種々の分子、ことに MHC 分子群、MHC 関連分子群、NK レセプター群などの免疫応答関連分子群が関わるが、これらの分子群には個体差（遺伝的多型性ないしゲノム多様性）が存在し、このゲノム多様性が免疫応答性の個体差の形成に重要な機能を発揮する。従って、有効なワクチンを開発する上では、このような免疫応答に関わるゲノム多様性の関与を理解し、その知見を生かすことが必要である。

HIV ワクチン開発においてはヒトを対象とした実験が困難であることから動物モデルが用いられるが、マウスやラットなどは免疫応答関連分子群の構成自体がヒトとは大きく異なっており、その知見をヒトに生かす上では制約がある。一方、チンパンジーなどの高等霊長類では、MHC 遺伝子群の構成はヒトと類似しているが多様性が限られており、また希少種であることから、モデル動物としての有用性には限界がある。これに対して、アカゲザルを用いた研究は、これまでに MHC

クラス I 分子の多様性が CTL 誘導ワクチンの有効性と直接関連することを明らかにしたが、その他の分子群の多様性の関与については不明な点が多い。

ワクチンの *in vivo* 効果を最大限に発揮させるためには、多種多様な免疫応答関連分子群のうち、どの分子の機能的多様性に注目すべきかを明らかにすることが不可欠であるが、ヒトを用いた研究には制約があるため、まずはアカゲザルを対象としたワクチン開発系での解析を通じて情報を得て、その情報をヒト HIV ワクチン開発に応用することが有効な手法である。また、ワクチン接種後に SIV 感染が生じた場合のサル個体の臨床予後と免疫応答関連分子群のゲノム多様性との関連を検討することで、ヒト HIV 感染予後を規定するゲノム多様性に関する有用な情報が得られると考えられる。

そこで本研究では、アカゲザルやカニクイザルを対象として、MHC 分子群、MHC 関連分子群、NK レセプター群などの免疫応答関連分子群のゲノム多様性を検討し、これと CTL 誘導型ワクチンによる SIV ウイルス感染制御効果との関連を評価しつつ、新たなワクチン開発戦略を得ることを目的とする。

B. 研究方法

1) サル MHC クラス I 遺伝子群の解析：昨年度に引き続き、ワクチン効果検証実験に用いたア

カゲザル個体について、MHC クラス I 遺伝子群の cDNA をクローニングし、塩基配列を決定した。今年度に新しく解析対象としたのは約 70 個体である。得られた配列をデータベースと比較し、既報アレルと一致しないものについては、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。また、昨年度までのアカゲザルの検討で MHC の多様性 (アレル頻度やハプロタイプ頻度) が地域ごとに大きくことなることが判明したため、カニクイザルについても、5 家系 24 個体を対象として、MHC クラス I 遺伝子群 (Mafa-A, Mafa-B など) の cDNA 解析を行った。

- 2) MHC クラス I 様遺伝子群の解析: 昨年に引き続きワクチン効果検証実験に用いたアカゲザル個体の ULBP4 ゲノム遺伝子の第 2 および第 3 エクソンを PCR で増幅し、ダイレクトシーケンス法によって塩基配列を決定した。既報のアレルと比較し、多型領域の分布を明らかにするとともに、多型とワクチン効果との関連を検討した。また、上記のカニクイザル 5 家系 24 個体についても同様に ULBP4 遺伝子の多型を検討した。
- 3) ヒト HIV/AIDS 感受性に係る宿主要因の解析: HIV 感染感受性や AIDS 発症感受性には個体差があるため、昨年度に比較ゲノム解析で候補遺伝子として選択し、タイ人集団で HIV/AIDS と関連することが判明した TIM1 遺伝子のゲノム多様性について、インド人集団の HIV 感染者ならびに一般健常者について解析し、HIV 感染感受性との関連について検討した。
- 4) 比較ゲノム手法を用いた進化的解析: ウイルスの塩基配列解析から、アカゲザル等の旧世界猿ウイルス (SIVmac) から高等霊長類 (チンパンジー) ウイルス (SIVchimp) を経由して HIV へと進化して来たと考えられる。一般に、旧世界猿は SIVmac 感染に比較的抵抗性であり、チンパンジーは SIVchimp に感染しても AIDS 発症に比較的抵抗性であることから、その宿主要因の解明が必要である。そこで、霊長類を対象とした比較ゲノム解析として、免疫グロブリンスーパーファミリー遺伝子群について Bn/Bs を計算し、霊長類の進化過程において選択圧 (Bn/Bs>1 は正の選択、<1 は負の選択) がかかった遺伝子を抽出した。また、それらの遺伝子のうち HIV/AIDS との関連が推定される遺伝子についてヒトにおけるゲノム多様性と HIV/AIDS 感受性との関連を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究にはヒト遺伝子解析研究が含まれるが、以下のとおり東京医科歯科大学難治疾患研究所倫理審査委員会に研究計画を申請し、審査を受けた後、研究機関長による実施承認を受けている。研究課題「HIV ウイルス感染防御機構の究明に関わる研究」(実施責任者 木村彰方) (平成 18 年 7 月 6 日付承認)

C. 研究結果

- 1) サル MHC クラス I 遺伝子群の解析: 本研究ではワクチン実験に用いているミャンマー産あるいはラオス産のアカゲザルを対象として、MHC クラス I 遺伝子 (Mamu-A および Mamu-B) cDNA の多様性をシーケンスレベルで検討した。昨年度までの 100 頭に加えて約 70 頭を追加解析した結果、新規 Mamu-A 対立遺伝子を○種、新規 Mamu-B 対立遺伝子を△種同定した。一方、最近ワクチン実験への使用が検討されているカニクイザルについても、マレーシア、フィリピン、インドネシアで親個体を捕獲し、現在飼育している 5 家系 24 個体 (図 1) を対象として、Mafa-A、Mafa-B の多様性を解析した。

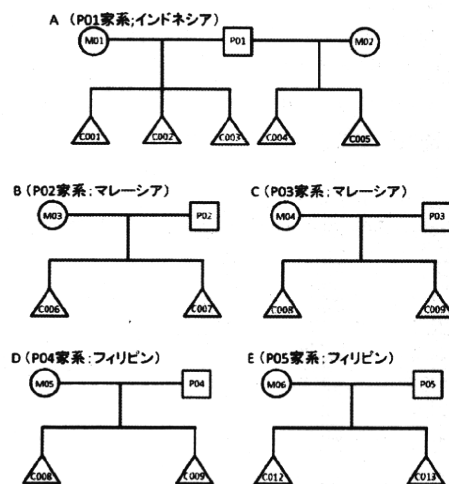


図 1 対象としたカニクイザルの家系図

その結果、表 1 に示すとおり、Mafa-A 遺伝子では 29 種類のアレルが検出され、うち 11 種類 (37.9%) がこれまでに報告のない新規アレルであった。一方、Mafa-B 遺伝子では 42 種類のアレル中 19 種類 (45.2%) が新規アレルであった。それ以外に Mamu-I および Mamu-AG 遺伝子のアレルが検出されたが、MHC 全体として合計 81 種類のアレルが検出され、そのうち 36