

201029014A

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

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
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	主任研究官

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（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. ワクチン誘導免疫の HIV 複製防御効果に関する研究	13
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. 経口 DNA ワクチンの開発に関する研究	21
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	27
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	30
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	34
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	37
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・主任研究官）	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	41
IV. 研究成果の刊行物・別刷	45

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 国立感染症研究所エイズ研究センター長

研究要旨

HIV 感染拡大は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。我々が開発を進めているセンダイウイルス（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 CTL 誘導ワクチンの最適化と、さらに有効な次世代ワクチン開発に結びつく基礎研究を進めることとした。平成 22 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 ベクターの接種経路の解析を行い、経鼻接種が有利であることを明らかにした。(2) 選択する CTL 標的抗原の最適化に向けた研究では、日本人 HIV 感染者の解析から CTL 逃避と考えられる変異の同定を進めるとともに、CTL の選択圧に基づく逃避変異の置換を検出した。さらに、抗原特異的 CTL のレベルとウイルス複製抑制能の相関の有無の検討を行い、Gag 特異的 CTL に加え Vif 特異的 CTL が高いウイルス複製抑制能を有する可能性を見出した。(3) ヘルパー T リンパ球（HTL）反応に関する研究では、サルエイズモデルにて、感染慢性期の体内ウイルス量と HTL の多機能性との逆相関を確認した。(4) 中和抗体誘導に関する研究では、HIV Env gp120 の構造計算から V1/V2 ループが中和反応に影響する機序を示唆する結果を得た。これらの結果は、エイズワクチンのデリバリーシステムの最適化と選択抗原の最適化に結びつく重要な成果である。

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・主任研究官

A. 研究目的

HIV 感染者数の増大は、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。特にアフリカ等で極めて深刻な状況にあることに加え、流行地域での感染拡大が 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 薬耐性変異株の選択促進に結びつく可能性も危惧されている。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に向けた研究を推進することとした。

我々が開発を進めているセンダイウイルス（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での HIV

感染拡大抑制効果を期待する予防ワクチンとして、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 CTL 誘導ワクチンの最適化に向けた研究を進展させるとともに、さらに有効な次世代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進めることとした。一方、我々は近年、感染急性期の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、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を推めることとした。

具体的には、HIV 複製抑制に結びつく免疫誘導法の選別により、有効な防御免疫を選択的に誘導する予防エイズワクチン確立への進展を企図し、以下の研究を行うこととした。特に (i) CTL 反応、(ii) ヘルパー T リンパ球 (HTL) 反応、(iii) 中和抗体反応に着目し、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、ワクチンによる免疫誘導が曝露後のウイルス複製に与える影響を検証することとした。また、HIV 感染者の解析等、抗原選択に関する検討を進めた。

1. CTL 誘導ワクチンのデリバリーシステムの研究
- 1-1. SeV ベクターワクチンの最適化 (俣野)
- 1-2. 併用プライム法の開発 (保富)
2. CTL 誘導ワクチンの抗原選択法の研究
- 2-1. CTL 抗原提示効率の解析 (森川)
- 2-2. CTL 逃避変異の解析 (三浦・俣野)
- 2-3. 各抗原特異的 CTL 誘導効果の解析 (俣野)
3. HTL 反応と中和抗体反応についての研究
- 3-1. HTL 反応が HIV 複製に及ぼす影響の解析 (寺原)
- 3-2. 中和抗体誘導に結びつく抗原構造の推定 (横山)

平成 22 年度は、平成 21 年度の研究を進展させ、以下の研究を行った。

- 1-1. SeV ベクターワクチン接種経路の検討
- 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 ワクチンの免疫誘導能の解析
- 2-1. 細胞内および HIV 粒子内の Gag 蛋白定量
- 2-2. 日本人 HIV 感染者およびサルエイズモデルにおける CTL 逃避変異の解析
- 2-3. 各抗原特異的 CTL のレベルと SIV 複製抑制能の相関の有無の検討による有効な抗原特異的 CTL の検索
- 3-1. SIV 感染慢性期の HTL 反応の解析
- 3-2. HIV Env gp120 構造計算

B. 研究方法

(1-1) SIV Gag 発現 SeV (SeV-Gag) ベクターワクチンをサルに経鼻あるいは筋肉内接種し、誘導される Gag 特異的 CTL レベルを比較検討した。SeV-Gag 接種量は昨年度に有効性を確認した 6×10^8 CIU (従来量の 1/10) とした。また、SeV-Gag ベクター接種の 15 週前に SeV 感染を行ったサルにても同様の実験を行い、抗 SeV 中和抗体の影響を調べた。

(1-2) HEV-VLP に HIV Env エピトープを組み込んだ VLP-HIVenv ベクターの内腔に SIV gag cDNA を封入したワクチンをマウスに接種し免疫誘導能を検討した。

(2-1) His タグ付 HIV Gag 蛋白を大腸菌で発現精製し、定量用標準液とした。HeLa 細胞に HIV 分子クローンを transfection し、細胞および精製粒子の希釈列を作製して半定量 Western blotting を行った。

(2-2) 東京大学医科学研究所附属病院に 1992 年から 2009 年までに来院した日本人未治療慢性 HIV (clade B) 感染患者で CD4 陽性 T 細胞数 $\geq 200/\mu\text{l}$ の 163 名について HLA class I タイプ及び HIV Gag アミノ酸配列を決定し、統計学的手法により、HLA 関連変異の同定を試みた。また SIV 感染サルの慢性期の CTL 逃避変異を解析した。

(2-3) ワクチン接種後の SIVmac239 チャレンジ実験で SIV 複製の制御に至った MHC-I (主要組織適合遺伝子複合体クラス I) ハプロタイプ A 共有サル群の末梢血リンパ球を用い、各抗原特異的 CTL レベルと CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能の相関の有無を検討した。

(3-1) ワクチン非接種サル 16 頭の SIV 感染後約 30 週の末梢血リンパ球を用い、昨年度に確立した方法で SIV 特異的 HTL 反応を解析して、血漿中ウイルス量との相関の有無を検討した。HTL 反応の解析においては、SIV Gag・Pol・Vif・Vpx 発現細胞を用いて抗原刺激後、CD4 陽性 T リンパ球中の MIP-1 β ・IL-2・TNF- α ・IFN- γ ・CD107a (5 マーカー) 誘導を細胞内免疫染色により検出し、多機能性を評価した。

(3-2) 主にホモロジーモデリング法により、CD4 結合前および結合後の HIV Env gp120 分子モデルを構築した。CD4 結合前後の分子モデルについては分子動力学計算により、V1/V2 ループの配置を調べた。

(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) SeV-Gag ベクター経鼻接種および筋肉内接種のいずれによっても効率よく Gag 特異的 CTL が誘導された。一方、SeV 感染サル（抗 SeV 中和抗体存在下）においては、経鼻接種による Gag 特異的 CTL 誘導は認められたが、筋肉内接種では CTL 誘導がほとんど認められなかった。

(1-2) SIV gag cDNA を封入した VLP-HIVenv ベクターワクチンのマウスでの Gag・Env 特異的免疫誘導能を確認した。

(2-1) HeLa 細胞の単位細胞あたりの Gag 蛋白量は 7-10 pg（約 $0.7-1 \times 10^8$ 分子）と概算された。産生粒子中の Gag 蛋白量は細胞内量の約 15-20% と判明した。

(2-2) HIV 感染者の解析では、HLA 関連変異は計 21 個同定され、そのうち 13 個は adapted mutations（対応する HLA 陽性患者で有意に多い変異）、8 個は nonadapted mutations（対応する HLA 陽性患者で有意に少ない変異）であった（表 1）。これらの HLA 関連変異のうち、Los Alamos National Laboratory HIV database に報告されている CTL エピトープ部位にあるものは約半数で（adapted 6/13、nonadapted 5/8）、比較的高率に実際の CTL 逃避変異を反映している可能性が示唆された。

一方、MHC-I ハプロタイプ A 陽性の SIV 感染サル R01-007 の解析では、Gag206-216 特異的 CTL からの逃避変異として Gag L216S 変異が選択されていたが、感染 150 週目には、Gag206-216 特異的 CTL からの逃避変異 D205E が V340M 変異とともに選択され、L216S 変異は検出されなくなっていた（L216 に復帰）（図 1）。

(2-3) Env など多くの SIV 抗原については、特異的 CTL のレベルと SIV 複製抑制能との相関が認められなかったが、Gag206-216 および Gag241-249 特異的 CTL のレベルは SIV 複製抑制能と相関を示した。さらに Vif 特異的 CTL も SIV 複製抑制能と比較的強い相関を示した（図 2）。

(3-1) SIV 特異的 HTL（5 マーカーのいずれかの特異的誘導が認められた HTL）の頻度は、血漿中ウイルス量との相関を示さなかった。一方、SIV 感染慢性期において、HTL の多機能性については、

血漿中ウイルス量と有意な逆相関を示した。

(3-2) HIV Env gp120 分子モデルより（図 3）、CD4 結合前では、V1/V2 ループは gp120 コアから最も離れて配置され、V3 が gp120 コアと V1/V2 ループの間に配置されることが予測された。CD4 結合後では、V1/V2 ループは CD4 を支えるような構造を取ることが予測された。

D. 考察

(1) SeV ベクターワクチンの接種経路について、従来通りの経鼻接種だけでなく筋肉内接種でも CTL 誘導能が確認できた。しかし、ワクチン対象者に抗 SeV 中和抗体陽性者が含まれる可能性を考慮すると、経鼻接種が有利であり、また、SeV ベクター複数回接種においても経鼻接種が有利であると考えられた。本研究の結果は、SeV ベクター経鼻接種ワクチンでは、臨床応用の障壁の一つとして留意すべき抗ベクター抗体の問題については克服できることを支持している。

(2) Gag 定量結果から、細胞内 Gag 蛋白のうち HIV 粒子に取り込まれず抗原提示に結びつく分解経路に至る可能性のあるものが約 8 割（細胞あたり 5×10^7 分子以上）であると考えられた。

HIV 感染者の解析結果からは、CTL 逃避変異を反映すると考えられる HLA 関連変異の同定が進んだが、それとともに本邦の HIV 流行株に対する日本人に特徴的な HLA class I 拘束性 CTL として未同定のものの存在も示唆され、今後これらの CTL エピトープの同定が必要と考えられた。

SIV 感染サルの CTL 逃避変異の置換を示した結果からは、CTL が逃避変異選択の後もウイルス複製に対し抑制的に働いていることが示された。

各抗原特異的 CTL の解析からは、Gag 特異的 CTL に加え Vif 特異的 CTL が高い SIV 複製抑制能を有する可能性が示され、CTL 誘導ワクチン抗原としての Gag および Vif の優位性が示唆された。

(3) SIV 感染慢性期において、体内ウイルス量と HTL 多機能性との逆相関が示されたが、この結果をもとに、今後さらに HTL 多機能性の解析を進める予定である。

一方、HIV Env gp120 分子モデルの解析では、CD4 結合前後で V1/V2 ループの配置が変化すると予測され、CD4 結合前の V1/V2 ループは中和抗体の V3 へのアクセスを制限する可能性が考えられた。

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た研究では、SeV ベクターの接種経路と

して経鼻接種が有利であることを明らかにした。CTL 誘導抗原選択法の樹立に向けた研究では、Gag 蛋白定量にて細胞内 Gag 蛋白の約 8 割が HIV 粒子に取り込まれず分解されることを示唆する結果を得た。また、本邦の HIV 感染者において CTL 逃避と考えられる変異の同定を進めるとともに、CTL の選択圧に基づく逃避変異の置換という現象を見出した。さらに、各抗原特異的 CTL のレベルと SIV 複製抑制能の相関の解析から、Gag 特異的 CTL に加え Vif 特異的 CTL が高い SIV 複製抑制能を有する可能性を初めて示した。一方、サルエイズモデルにて、感染慢性期の体内ウイルス量と HTL の多機能性との逆相関を確認した。HIV Env gp120 の構造計算からは、V1/V2 ループが中和抗体の標的結合に影響する機序を示唆する結果を得た。これらは、エイズワクチンのデリバリーシステム最適化および選択抗原の最適化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 H, Matano T Neutralizing antibodies in SIV control: co-impact with T cells. *Vaccine* 28S:B13-B17, 2010.
- (2) 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.
- (3) 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.
- (4) 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.
- (5) 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.
- (6) Yoshida T, Saito A, Iwasaki Y, Iijima S, Kurosawa T, Katakai Y, Yasutomi Y, Reimann KA, Hayakawa T, Akari H. Characterization of natural killer cells in tamarins: a technical basis for studies of innate immunity. *Frontiers Microbiol* 2011, in press.
- (7) Xing Li, Wang JC, Li T-C, Yasutomi Y, Lara J, Khurdyakaov Y, Schofield D, Emerson S, Purcell R, Takeda N, Miyamura T, Holland RC. Spatial configuration of hepatitis E virus antigenic domain. *J Virol* 85:1117-1124, 2011.
- (8) Chono H, Matsumoto K, Tsuda H, Saito N, Lee, K, Kim S, Shibata H, Ageyama N, Terao K, Yasutomi Y, Mineno J, Kim S, Inoue M, Kato I. Acquisition of HIV-1 resistance in T lymphocytes using an ACA-specific E.coli mRNA interferase. *Human Gene Ther* 22:35-43, 2011.
- (9) Okabayashi S, Uchida K, Nakayama H, Ohno C, Hanari K, Goto I, Yasutomi Y. Periventricular Leucomalacia (PVL)-like lesions in two neonatal cynomolgus monkeys (*macaca fascicularis*). *J Comp Pathol* 2010 Epub.
- (10) Yasutomi Y. Establishment of Specific Pathogen-Free Macaque Colonies in Tsukuba Primate Research Center of Japan for AIDS research. *Vaccine* 28S:B75-B77, 2010.
- (11) 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*. 60:51-53, 2010.
- (12) 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* 19:889-895, 2010.
- (13) Brumme ZL, Li C, Miura T, Sela J, Rosato PC, Brumme CJ, Markle T, Martin E, Block BL, Trocha T, Kadie CM, Allen TM, Pereyra F, Heckerman D, Walker BD, Brockman MA. Reduced replication capacity of NL4-3 recombinant viruses encoding RT-Integrase sequences from HIV-1 elite controllers. *J Acquir Immune Defic Syndr* 56(2): 100-108, 2011.
- (14) Nakamura H, Miyazaki N, Hosoya N, Koga M, Odawara T, Kikuchi T, Koibuchi T, Kawana-Tachikawa A, Fujii T, Miura T, Iwamoto A. Long-term successful control of super-multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 infection by a novel combination therapy of raltegravir, etravirine, and boosted-darunavir. *J Infect Chemother* 17(1):105-110, 2011.
- (15) Gesprasert G, Wichukchinda N, Mori M, Shiino T, Auwanit W, Sriwanthana B, Pathipvanich P, Sawanpanyalert P, Miura T, Auewarakul P, Thitithanyanont A, Ariyoshi K. HLA-associated immune pressure on Gag protein in

- CRF01_AE-infected individuals and its association with plasma viral load. *PLoS One* 5(6):e11179, 2010.
- (16) Miura T, Brumme ZL, Brockman MA, Rosato P, Sela J, Brumme CJ, Pereyra F, Kaufmann DE, Trocha A, Block BL, Daar ES, Connick E, Jessen H, Kelleher AD, Rosenberg E, Markowitz M, Schafer K, Vaida F, Iwamoto A, Little S, Walker BD. Impaired replication capacity of acute/early viruses in persons who become HIV controllers. *J Virol* 84:7581-7591, 2010.
- (17) Wright JK, Brumme ZL, Carlson JM, Heckerman D, Kadie CM, Brumme CJ, Wang B, Losina E, Miura T, Chonco F, van der Stok M, Mncube Z, Bishop K, Goulder PJ, Walker BD, Brockman MA, Ndung'u, T. Gag-protease-mediated replication capacity in HIV-1 subtype C chronic infection: associations with HLA type and clinical parameters. *J Virol* 84:10820-10831, 2010.
- (18) Julg B, Pereyra F, Buzon MJ, Piechocka-Trocha A, Clark MJ, Baker BM, Lian J, Miura T, Martinez-Picado J, Addo MM, Walker BD. Infrequent recovery of HIV from but robust exogenous infection of activated CD4(+) T cells in HIV elite controllers. *Clin Infect Dis* 51:233-238, 2010.
- (19) Brockman MA, Brumme ZL, Brumme CJ, Miura T, Sela J, Rosato PC, Kadie CM, Carlson JM, Markle TJ, Streeck H, Kelleher AD, Markowitz M, Jessen H, Rosenberg E, Altfeld M, Harrigan PR, Heckerman D, Walker BD, Allen TM. Early selection in Gag by protective HLA alleles contributes to reduced HIV-1 replication capacity that may be largely compensated in chronic infection. *J Virol* 84(22):11937-11949, 2010.
- (20) 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* 28(S2):B68-B73, 2010.
- (21) Haraguchi H, Sudo S, Noda T, Momose F, Kawaoka Y, Morikawa Y. Intracellular localization of human immunodeficiency virus type 1 Gag and GagPol products and virus particle release: Relationship with the Gag-to-GagPol ratio. *Microbiol Immunol* 54(12):734-746, 2010.
- (22) Yamamoto SP, Okawa K, Nakano T, Sano K, Ogawa K, Masuda T, Morikawa Y, Koyanagi Y, Suzuki Y. Huwel, a novel cellular interactor of Gag-Pol through integrase binding, negatively influences HIV-1 infectivity. *Microrganisms Infect*, in press.
- (23) Terahara K, Nochi T, Yoshida M, Takahashi Y, Goto Y, Hatai H, Kurokawa S, Jang MH, Kweon M-N, Domino SE, Hiroi T, Yuki Y, Tsunetsugu-Yokota Y, Kobayashi K, Kiyono H. Distinct fucosylation of M cells and epithelial cells by Fut1 and Fut2, respectively, in response to intestinal environmental stress. *Biochem Biophys Res Commun* 404: 822-828, 2011.
- (24) Onyango CO, Leligidowicz 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* 28 Suppl 2:B60-B67, 2010.
- (25) Kono K, Song H, Yokoyama M, Sato H, Shioda T, Nakayama EE. Multiple sites in the N-terminal half of simian immunodeficiency virus capsid protein contribute to evasion from rhesus monkey TRIM5 α -mediated restriction. *Retrovirology* 7:72, 2010.

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) Iwamoto N, Tsukamoto T, Kawada M, Takeda A, Yamamoto H, Takeuchi H, Matano T. Induction of broad CD8 cell responses effective against replication of a variant virus with multiple escape mutations in simian immunodeficiency virus controllers. XVIII International AIDS Conference, Vienna, Austria, 7/22/2010.
- (3) 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.
- (4) 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.
- (5) 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.
- (6) 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.
- (7) 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.
- (8) 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.
- (9) Ishii H, Matano T. Alteration of CTL dominance post-viral exposure by prophylactic AIDS vaccination. AIDS Vaccine 2010, Atlanta, GA, USA, 9/30/2010.
- (10) 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.
- (11) 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.
- (12) 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.
- (13) 武内寛明, 俣野哲朗. ヒト細胞におけるサルエイズウイルス感染増殖能を規定するウイルス側領域. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (O1-2-14)、徳島、11/7/2010.
- (14) 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.
- (15) 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.
- (16) 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.
- (17) 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.
- (18) 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.
- (19) 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.
- (20) 中根拓、山本浩之、俣野哲朗. サル免疫不全ウイルス全粒子を抗原とする ELISA 法を用いた液性免疫応答の解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (P3-093)、徳島、11/9/2010.
- (21) 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.
- (22) 齊藤暁、河野健、黒石歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、保富康宏、俣野哲朗、明里宏文. カニクイザルにおける第 3 世代サル指向性 HIV-1 の増殖の解析. 第 24 回日本エイズ学会学術集会、東京、11/25/2010.
- (23) 齊藤暁、河野健、黒石歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、保富康宏、俣野哲朗、明里宏文. カニクイザル TRIM5 allele がサル指向性 HIV-1 の増殖に与えるインパクト. 第 24 回日本エイズ学会学術集会、東京、11/25/2010.
- (24) 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.
- (25) 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.
- (26) 塩釜ゆみ子、松原明弘、河岡義裕、保富康宏. ヘルパー T 細胞 (Th) 制御によるインフルエンザ感染病態とワクチン効果の検討第 13 回日本ワクチン学会、東京、12/11-12/2010.
- (27) 保富康宏. アジュバント分子組み込みエイズウイルスの開発 (シンポジウム) 第 24 回日本エイズ学会、東京、11/24-26/2010.
- (28) 下澤律浩、高橋一郎、柴田宏昭、伊奈田宏康、野阪哲哉、保富康宏. カニクイザル体細胞に由来する人工多能性幹細胞の作製第 57 回日本実験動物学会、京都、5/12-14/2010.
- (29) Tsujimura Y, Yasutomi Y. Therapeutic effects of Ag85B in allergic asthma by inducing not only Th1 response but also Interleukin-17, -22 production.^{14th} International Congress of Immunology. Kobe Japan, 8/22-27/2010.
- (30) Matsubara A, Watanabe K, Kawano M, Mizuno S,

- Tsujimura Y, Inada H, Fukumura M, Sugawara I, Nosaka T, Matsuo K, Yasutomi Y. Intranasal immunization with replication-deficient recombinant human parainfluenza type 2 virus-Ag85B showed protective effects against *Mycobacterium tuberculosis* infection. TB Vaccines. A Second Global Forum, Tallinn, Estonia, 9/21-24/2010.
- (31) Yasutomi Y. Gene delivery of suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) showed therapeutic effects to autoimmune myocarditis in mice. 2nd Annual International Congress of Cardiology, Shanghai, China, 12/7-9/2010.
- (32) 菊地正、堀本研子、藤井毅、安達英輔、今井健太郎、清水少一、古賀道子、中村仁美、鯉渕智彦、立川愛、三浦聡之、河岡義裕、岩本愛吉. HIV 感染者における 2009 パンデミックインフルエンザ (H1N1) ワクチン接種後の中和抗体価の推移. 第 24 回日本エイズ学会学術集会、東京、11/24-26/2010.
- (33) 清水少一、菊地正、古賀道子、安達英輔、今井健太郎、中村仁美、鯉渕智彦、三浦聡之、藤井毅、岩本愛吉. テノホビルの骨代謝に及ぼす影響. 第 24 回日本エイズ学会学術集会、東京、11/24-26/2010.
- (34) 菊地正、安達英輔、清水少一、古賀道子、今井健太郎、中村仁美、鯉渕智彦、三浦聡之、藤井毅、岩本愛吉. ART 初回導入後の血清脂質の長期的な変化について. 第 24 回日本エイズ学会学術集会、東京、11/24-26/2010.
- (35) Urano E, Kuramochi N, Tomoda H, Takebe Y, Miyauchi K, Komano J, Morikawa Y. Inhibitor of HIV-1 Gag assembly screened by yeast membrane-associated system. CSH Retrovirus Meeting, New York, 5//2010.
- (36) Yamamoto SP, Okawa K, Masuda T, Morikawa Y, Koyanagi Y, Suzuki Y. Modulation of HIV-1 infection at late phase by an integrase-interactor Huw1. CSH Retrovirus Meeting, New York, 5//2010.
- (37) Haraguchi H, Morikawa Y. Live-cell imaging of human immunodeficiency virus Gag and Gag-Pol trafficking. 第 10 回感染症免疫フォーラム、淡路島、9/9/2009.
- (38) Hoshino Y, Okunaga H, Morikawa Y. Overexpression of HRS induces BST-2 downregulation through its clathrin-binding domain. 第 10 回感染症免疫フォーラム、淡路島、9/9/2009.
- (39) Urano E, Kuramochi N, Miyauchi K, Ishikawa R, Tomoda H, Takebe Y, Komano J, Morikawa Y. A novel postentry inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 replication screened by yeast membrane-associated two-hybrid system. 第 10 回感染症免疫フォーラム、淡路島、9/8/2009.
- (40) 原口日和、周東翔、森川裕子. HIV-1 Gag/GagPol 蛋白の発現比率と相関する成熟産物の細胞内局在と粒子形成効率. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、11/8/2009.
- (41) 星野悠、奥長浩之、森川裕子. ESCRT-0 エンドソーム因子 HRS の共発現により、BST-2 はエンドサイトーシスされる. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、11/8/2009.
- (42) 浦野恵美子、倉持紀子、市川玲子、宮内浩典、供田洋、武部豊、駒野淳、森川裕子. HIV-1 Gag を標的とする低分子化合物 BMMP によるウイルスエントリー阻害機構. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、11/7/2009.
- (43) 福間藍子、阿部真澄、宮沢孝幸、森川裕子、安田二郎. ネコ Tetherin/BST-2 による RD-114 ウイルスの産生抑制. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、11/9/2009.
- (44) Terahara K, Ishige M, Mitsuki Y, Shibusawa K, Watanabe S, Okada S, Kobayashi K, Tsunetsugu-Yokota Y. Characteristic activation/differentiation phenotype of CD4⁺ T cells and their distinct susceptibility to X4-type and/or R5-type HIV-1 infection in humanized NOD/SCID/Jac3-null mice. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, 8/22-27/2010.
- (45) Mitsuki Y, Shibusawa K, Terahara K, Kobayashi K, Takeda M, Yanagi Y, Tsunetsugu-Yokota Y. HIV-1 infection enhances the susceptibility of T cells to measles virus infection by upregulating signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) expression. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, 8/22-27/2010.
- (46) Shibusawa K, Mitsuki Y, Terahara K, Yanagi Y, Kobayashi K, Tsunetsugu-Yokota Y. Inhibition of HIV-1 replication by engineered lentivirus vectors: a potential advantage of SLAM-mediated virus entry. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, 8/22-27/2010.
- (47) Shibusawa K, Mitsuki Y, Terahara K, Ishige M, Yanagi Y, Kobayashi K, Tsunetsugu-Yokota Y. Inhibition of HIV-1 replication by envelope-engineered lentivirus vectors: efficient gene delivery using envelope protein of measles virus. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 9/7-10/2010.
- (48) 石毛真行、寺原和孝、光木裕也、渋沢謙太郎、小林和夫、岡田誠治、横田 (恒次) 恭子: HIV-1 感染モデルとしてのヒト化マウスの妥当性と

- X4 および R5 HIV-1 感染、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、11/7-9/2010.
- (49) 洪沢謙太郎、光木裕也、寺原和孝、石毛真行、柳雄介、小林和夫、横田(恒次)恭子：麻疹ウイルスエンベロープをもちいた HIV-1 増殖抑制性レンチウイルスベクターの開発とその有効性、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、11/7-9/2010.
- (50) Yokoyama M, Naganawa S, Kitamura K, Sato H. Influence of Net Positive Charge in V3 Sequence on Conformation of HIV-1 gp120 outer domain. 5TH GERMAN JAPANESE HIV SYMPOSIUM, Tokyo, Japan, 5/10-11/2010.
- (51) 横山 勝. ゲノミクス、計算科学、実験科学の手法に基づく HIV の中和抗体逃避機構の研究. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、シンポジウム、徳島、11/7-9/2010.
- (52) 河野 健、横山 勝、佐藤裕徳、塩田達男、中山英美. アカゲザル TRIM5 α は HIV-2/SIVmac キャプシドの複数領域を認識する. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、11/7-9/2010.
- (53) 土肥直哉、齊藤 暁、明里宏文、藤原佐知、三宅在子、横山 勝、大出裕高、佐藤裕徳、足立昭夫、野間口雅子. サル指向性 HIV-1 CA の 1 アミノ酸変異はサル細胞での増殖を促進する. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、11/7-9/2010.
- (54) 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. アカゲザルに存在する抗 HIV-1 因子 TRIM5 α と tetherin を回避するサル細胞指向性 HIV-1 の構築. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、11/7-9/2010.
- (55) 野間口雅子、齊藤 暁、明里宏文、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. サル細胞で効率良く増殖する HIV-1 の構築—アカゲザル TRIM5 α と tetherin による抑制の回避— 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、11/24-26/2010.
- (56) 泉 泰輔、横山 勝、篠原正信、松井道志、井尾克宏、佐藤裕徳、高折晃史. 抗 HIV-1 宿主因子 APOBEC3G の N 末端ポケット構造の重要性. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、11/24-26/2010.
- (57) Izumi T, Yokoyama M, Shinohara M, Matsui M, Ito M, Sato H, Takaori-Kondo A. Model structure of APOBEC3G N-terminal region reveals a binding pocket modulating HIV-1 Vif interaction and RNA required for encapsidation. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010)、神戸、12/7-10/2010.

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 (PCT/JP2010/069435)
- 2 実用新案登録
なし。
- 3 その他
なし。

	PredictorVariable	TargetVariable	TT	TF	FT	FF	PValue	qValue
adapted	B15	26#R	12	17	5	129	2.13E-07	0.000942
adapted	C14	81#A	19	19	21	101	6.33E-06	0.000948
adapted	B07	357#G	24	0	82	55	1.32E-05	0.013318
adapted	B40	482#D	16	40	8	96	3.71E-05	0.028831
adapted	B35	377#N	16	0	83	52	0.000171	0.075704
adapted	A24	362#I	15	73	2	73	0.000191	0.097803
adapted	A31	397#R	8	20	8	128	0.000236	0.102488
adapted	C08	207#D	6	19	3	134	0.000303	0.112929
adapted	A26	487#A	45	1	88	25	0.00032	0.112829
adapted	B35	90#K	4	13	1	141	0.000371	0.11766
adapted	C07	147#I	52	3	80	28	0.000375	0.11766
adapted	C14	82#L	4	34	0	125	0.000818	0.170822
adapted	C07	479#K	5	49	0	107	0.000635	0.170822
nonadapted	C14	81#T	14	24	89	33	3.33E-07	0.000842
nonadapted	B15	26#K	12	17	95	39	5.49E-06	0.008948
nonadapted	B40	482#E	24	22	88	18	1.41E-05	0.013318
nonadapted	B07	357#S	8	24	47	90	4.56E-05	0.032233
nonadapted	A24	362#V	73	15	73	2	0.000191	0.097803
nonadapted	A31	397#K	29	8	128	8	0.000236	0.102488
nonadapted	C08	207#E	19	6	134	3	0.000303	0.112929
nonadapted	C07	147#L	3	52	27	81	0.000614	0.170822

表 1. 日本人HIV-1 (clade B) 感染者 (163名) のHLA関連変異

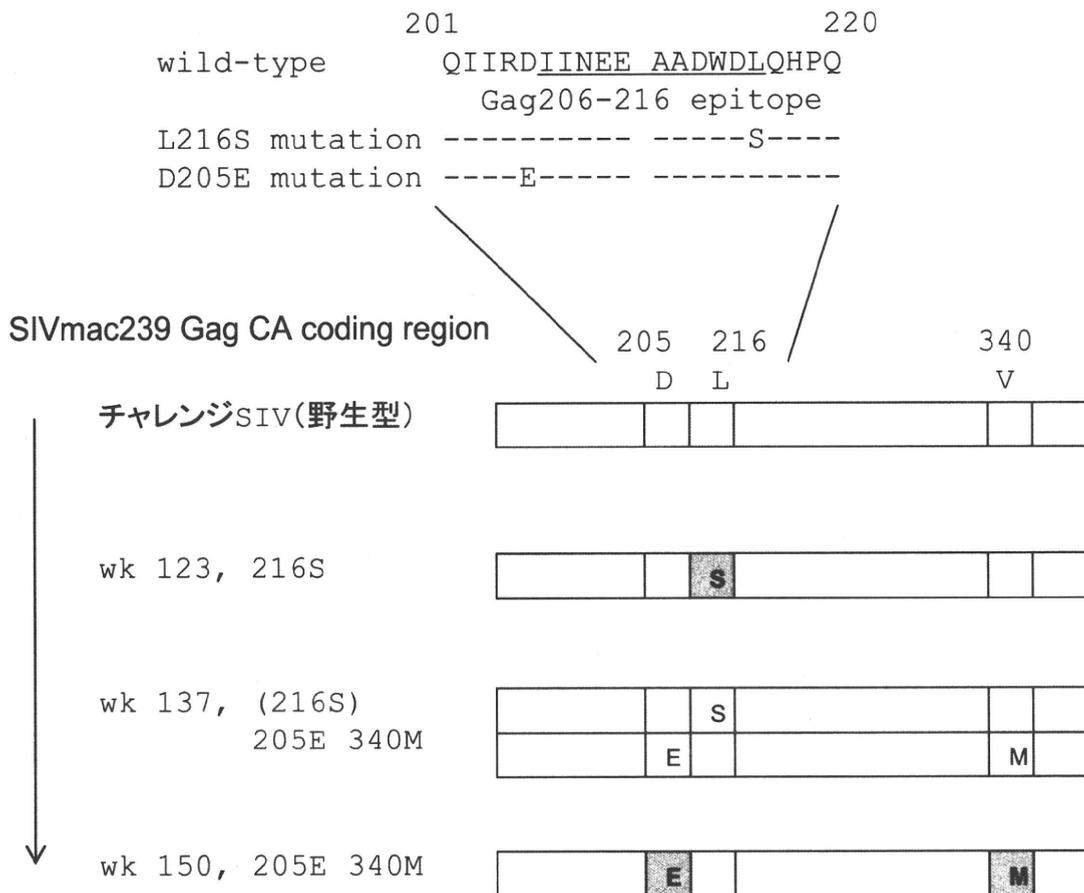


図 1. SIV感染慢性期におけるGag206-216特異的CTLからの逃避変異の置換
 MHC-IハプロタイプA陽性のSIV感染サルにおいて、感染初期にはGag206-216特異的CTLからの逃避変異L216Sが選択され2年以上維持されていたが、感染後約3年の時点では、L216S変異は認められなくなり、Gag206-216特異的CTLからの逃避変異D205Eが相補変異V340Mを伴って選択されていた。

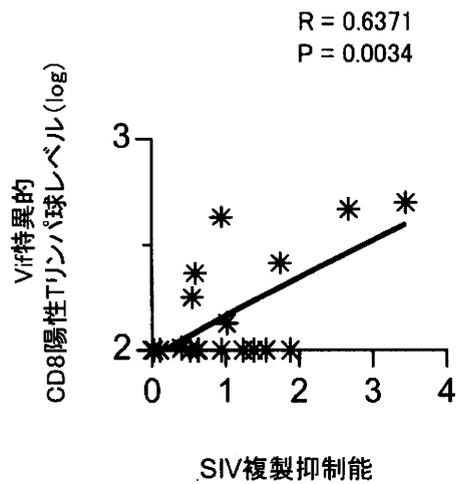
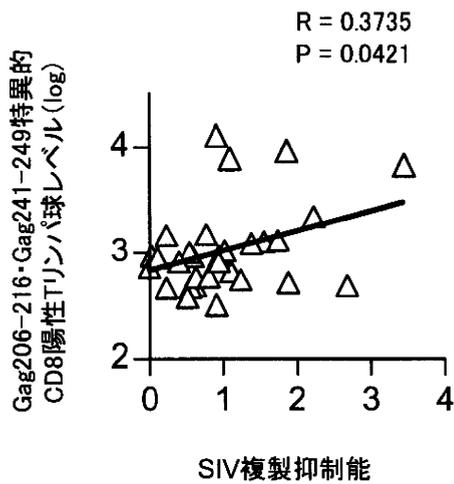


図2. 抗原特異的CTLレベルとCD8陽性細胞のin vitroでのSIV複製抑制能との相関
SIV複製制御サル群の感染初期と慢性期の各タイムポイントの末梢血リンパ球を用い、各種SIV抗原特異的CD8陽性Tリンパ球レベルおよびCD8陽性細胞のin vitroでのSIV複製抑制能を測定し、両者の相関の有無を調べた。Gag206-216・Gag241-249特異的CD8陽性Tリンパ球レベルおよびVif特異的CD8陽性Tリンパ球レベルがSIV複製抑制能との有意な相関を示した。

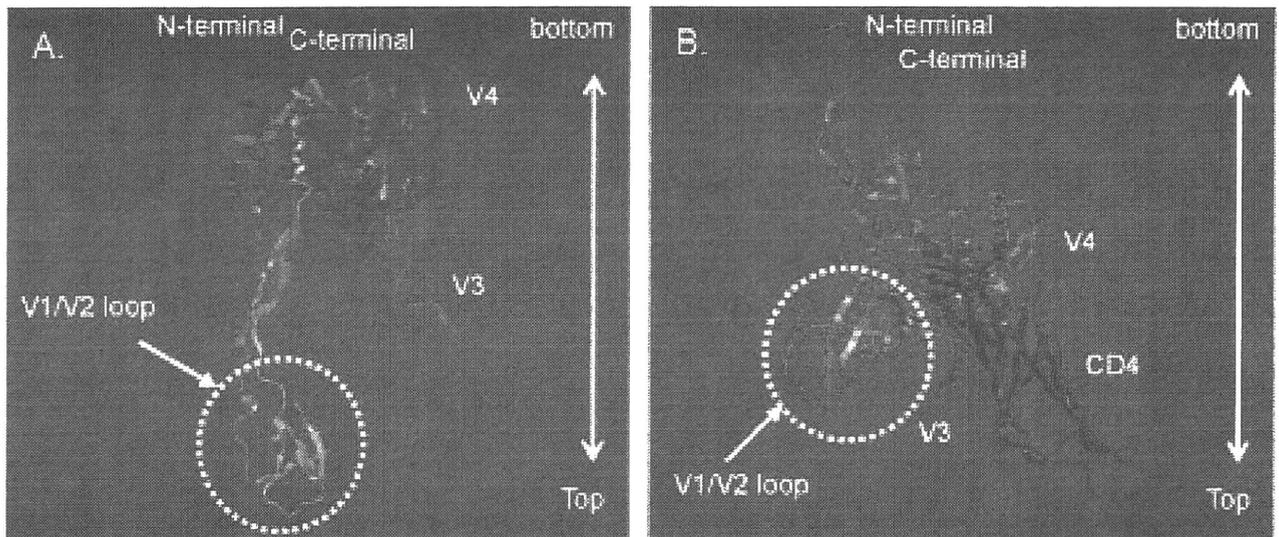


図3. V1/V2ループを含むHIV-1 Env gp120分子モデル
 CD4結合前 (A) とCD4結合後 (B)。ホモロジーモデリング法および分子動力学計算により構築した。

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 国立感染症研究所エイズ研究センター長

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、このデリバリーシステムの最適化を進めるとともに、有効性の向上を目指し、至適抗原選択のための基盤確立に向け、各種抗原特異的 CTL 誘導効果の解析を進めることとした。平成 21 年度は、サルモデルにて、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、ワクチン接種により HIV 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知見を得た。平成 22 年度は、(1) サルモデルにて、SeV ベクターの接種経路として従来から行ってきた経鼻接種に加えて筋肉内注射 (筋注) の検討を行い、筋注の場合、CTL 誘導は可能ではあるが、抗 SeV 抗体存在下では CTL 誘導が妨げられることを示した。一方、経鼻接種では抗 SeV 抗体存在下でも CTL 誘導を認め、SeV ベクターワクチンの接種経路として経鼻接種が有利であることを確認した。この結果から、臨床応用の障壁の一つとして留意すべき抗ベクター抗体の問題については克服できると考えられた。(2) SIV 複製制御サル群における SIV 各種抗原特異的 CTL レベルと CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能の相関の有無を検討し、Vif 抗原特異的 CTL レベルが SIV 複製抑制能と相関することを明らかにした。この結果は、有効な CTL の標的抗原として、これまで示唆されてきた Gag 抗原に加え、新たに Vif 抗原も有力候補であることを示唆するものとして極めて重要である。(3) SIV 感染慢性期の解析から、CTL 逃避変異の置換という現象を見出した。この結果は、CTL が逃避変異選択の後にも間接的にウイルス複製抑制に貢献しうることを示すものとして注目される。

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推進することとした。

平成 21 年度は、サルモデルにて、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。一方、ワクチン誘導 CTL の SIV 曝露後 2 次反応の解析を行い、ワクチン接種によって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重要な知見を得た。

平成 22 年度は、サルエイズモデルにおいて、以下の 3 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経路が 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、SIV 各種抗原特異的 CTL レベルと CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能の相関の有無の検討。

(3) ワクチンの有効性に関与しうる CTL 逃避変異の選択機序に関する研究。

B. 研究方法

(1) SeV ベクター接種経路に関する検討: SeV ベクター筋肉内接種 (筋注) による CTL 誘導能を測定し、従来の経鼻接種による CTL 誘導能と比較することとした。接種時の抗 SeV 抗体の影響も同時に検討することとし、以下の 4 群のカニクイサル (計 23 頭) について、F 欠損非複製型 SIV Gag 発現 SeV (SeV-Gag) ベクター接種後 1-2 週目に誘導される Gag 特異的 CTL 反応を測定した。

第 I 群 (n=6) : SeV-Gag 経鼻接種

第 II 群 (n=5) : SeV 感染後 SeV-Gag 経鼻接種

第 III 群 (n=6) : SeV-Gag 筋注

第 IV 群 (n=6) : SeV 感染後 SeV-Gag 筋注

いずれも SeV-Gag ベクターワクチン接種量は 6×10^8 CIU (低接種量) とし、その 6 週前に DNA ワクチン筋注 (プライム) を行った。第 II 群・第 IV 群では、SeV-Gag ベクター接種 15 週前に複製型 SeV を経鼻接種した。Gag 特異的 CTL レベルについては、Gag 発現細胞を用いた抗原刺激後にインターフェロング誘導が認められる細胞を免疫染色により検出することにより測定した。血漿中抗 SeV 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。

(2) SIV 抗原特異的 CTL レベルと CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能の相関の有無の検討: これまでのワクチン接種後の SIVmac239 チャレンジ実験で、SIV 複製が制御され血漿中ウイルス量が検出限界以下となった主要組織適合遺伝子複合体クラス I (MHC-I) ハプロタイプ 90-120-Ia 共有アカゲサル群のうち 7 頭の末梢血より分離されたリンパ球を用いて解析を行った。このうち 4 頭

(R06-015, R03-014, R03-012, R02-002) は SIV Gag を主抗原とする DNA プライム SeV ブーストワクチンをうけ、3 頭 (R04-015, R04-016, R06-007) は SIV Gag206-216・Gag241-249 エピトープを主抗原とする DNA プライム SeV ブーストワクチンを

うけた。いずれも感染慢性期 (R06-015, R03-014, R03-012: 約 1 年時, R02-002, R04-015, R04-016, R06-007: 約 2-3 年時) に複数の CTL 逃避変異 (Gag L216S, D244E, I247L, A312V, A373T) を有する変異 SIV のスーパーチャレンジをうけたが、血漿中 SIV 量は検出限界以下のまま維持されたサルである。

これらのサルの SeV ベクターブースト後、SIV チャレンジ後 5 カ月目ならびに約 1-3 年目および変異 SIV スーパーチャレンジ後の末梢血リンパ球より分離された CD8 陽性細胞の *in vitro* での SIVmac239 複製抑制能を調べた。一方、SIV チャレンジ後の上記タイムポイントの SIV 各抗原特異的 CTL レベルを測定し、CD8 陽性細胞の SIV 複製抑制能との相関の有無を検討した。

なお、SIV 複製抑制能については、末梢血リンパ球より CD8 陽性細胞を除外した CD8 陰性リンパ球に SIV を感染させ、末梢血リンパ球よりの分離 CD8 陽性細胞を加えた共培養の上清中に産生される SIV 量 (SIV gag RNA コピー数) を測定し、CD8 陽性細胞を加えない培養上清中に産生される SIV 量より何倍低下するかを算出することにより決定した。SIV の各抗原特異的 CTL レベルについては、SIV 各抗原の全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、ペプチド抗原刺激後のインターフェロング誘導細胞を免疫染色により検出することにより測定した。

(3) SIV 感染慢性期の CTL 逃避変異の解析: これまでの研究から、90-120-Ia 陽性サルでは、SIV 感染後 Gag206-216 エピトープ特異的 CTL 反応が誘導され、その逃避変異 Gag L216S が選択されることが判明している。このような 90-120-Ia 陽性 SIV 感染サル数頭の慢性期の血漿より RNA を抽出し SIV gag 塩基配列を調べた。

(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所属機関の動物実験委員会の審査を受け、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) および機関承認済みである。

C. 研究結果

(1) SeV ベクター接種経路に関する検討: SeV-Gag ベクター経鼻接種実験では、第 I 群だけでなく第 II 群でも、SeV-Gag ベクター経鼻接種後に効率よい Gag 特異的 CTL 誘導が認められた。