

201108012A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 俣野 哲朗

平成24（2012）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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 俣野 哲朗

平成24（2012）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  
治療エイズワクチン開発…………… 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. 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…………… 5  
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…………… 12  
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…………… 17  
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…………… 19

## IV. 研究成果の刊行物・別刷…………… 21

# 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 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

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 の標的候補として Gag・Vif を選択し、これらを発現する SeV ベクターを用いた治療ワクチンの効果について、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 23 年度は、サル免疫不全ウイルス (SIV) 感染初期に Gag・Vif 特異的 CTL 反応が優位となる MHC-I ハプロタイプ W/S 共有群と優位にならない E 共有群とを使用し、感染後の HAART 治療中に Gag 発現 SeV および Vif 発現 SeV ベクターを治療ワクチンとして 2 回経鼻接種して、その効果を検討した。その結果、ドミナント CTL・サブドミナント CTL のいずれの誘導も効率よく行うことができた。HAART 中止後の解析では、治療ワクチン接種群で有意に強く SIV 複製が抑制されていることを示す結果が得られた。本結果は本治療エイズワクチンの有効性を示すものとして極めて重要である。一方、宿主多様性をふまえたサルモデル解析系の向上に向け、アカゲサル MHC-I 遺伝子群 (Mamu-A・Mamu-B) の多様性解析を継続した。さらに、MHC-I 様遺伝子群の多様性解析も展開し、活性化 NK レセプター NKG2D のリガンド ULBP2 の遺伝子多様性は大きいことを見出した。今後もデータを蓄積し、治療ワクチンの有効性を検証するとともに、その有効性の機序解明を進める予定である。

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、医療費が莫大となることに加え、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、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 HIV 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 の標的抗原選択に結びつく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こととした。

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、優位となっていない「サブドミナント CTL」の誘導のどちらが有効であるかについて、検討を行うこととした。

平成 23 年度は、前年度に自然感染における CTL 反応の優位性を確認した MHC-I ハプロタイプ E 共有群 (Gag・Vif 特異的 CTL が優位にならない) と、W/S 共有群 (Gag・Vif 特異的 CTL が優位となる) とを使用し、SIV 感染後の HAART 治療中に、SeV-Gag ベクターおよび SeV-Vif ベクターを治療ワクチンとして 2 回経鼻接種して、その効果を解析した。また、宿主多様性をふまえたサルモデル解析系の向上に向け、アカゲサル MHC-I 遺伝子群の多様性解析を継続するとともに、MHC-I 様遺伝子群の多様性解析も展開した。

## B. 研究方法

治療ワクチンの有効性検証を目的として、MHC-I ハプロタイプ E 共有アカゲサル 4 頭および W/S 共有アカゲサル 4 頭を用いた実験を行った。全頭に対し SIVmac239 感染後 12 週目より 32 週目まで、コンビビル (AZT/3TC)、ビリアード (TDF)、カレトラ (LPV/RTV) を混入した餌を投与する HAART 治療を行った。治療ワクチン接種群 4 頭 (E 共有群 2 頭、W/S 共有群 2 頭) には、26 週目と 32 週目に治療ワクチンとして、F 遺伝子欠損非複製型 SeV-Gag ベクターおよび SeV-Vif ベクターを経鼻接種した。2 回目の治療ワクチンでは、抗 SIV 中和抗体静注を加えた。これらのサルにおいて、血漿中ウイルス量および SIV 抗原特異的 CTL 反応を経時的に解析した。治療ワクチン効果を検討するため、2 回目の治療ワクチン接種後 HAART を中止して、治療ワクチン接種群と非接種群間でウイルス血症再出現の比較検討を行った。

アカゲサル遺伝子多様性の解析においては、ま

ず、MHC-I 遺伝子群の cDNA をクローニングし、塩基配列を決定した。また、ULBP2 遺伝子群の第 2・第 3 エクソンを増幅し、塩基配列を決定した。

サルの MHC-I ハプロタイプ決定および遺伝子多様性の解析については木村が担当し、SeV-Gag ベクターおよび SeV-Vif ベクターの供給については朱が担当した。サル実験およびウイルス学的・免疫学的解析については俣野が担当した。

## (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

SIV 感染初期には、E 共有群では Nef・Env 特異的 CTL 反応が優位であり、W/S 共有群 4 頭では Gag・Vif 特異的 CTL 反応が優位であった。感染後 12 週目に HAART を開始後、血漿中ウイルス量は減少し、検出下限値前後となった。SIV 抗原特異的 CTL 反応も減弱した。

感染後 26 週目に治療ワクチン接種を行ったところ、その翌週には、E 共有群の 2 頭では、Gag・Vif 特異的 CTL 反応が誘導され優位となり、W/S 共有群の 2 頭でも、Gag・Vif 特異的 CTL 反応が誘導され、より優位となっていた。

感染後 32 週目に治療ワクチン接種を行い、HAART を中止したところ、治療ワクチン非接種群に比べ、治療ワクチン接種群ではウイルス血症出現が約 1 週間遅れ、有意に強く SIV 複製が抑制されていることを示す結果が得られた。

アカゲサル遺伝子多様性の解析では、平成 23 年度には 62 頭分の MHC-I 遺伝子多型情報を獲得した。ULBP2 遺伝子群の解析では、多様性が大きいことを示す結果が得られた。

## D. 考察

治療ワクチン実験において、E 共有群では、SIV 感染初期には Gag・Vif 特異的 CTL 反応は優位ではなかったが、HAART 中の SeV-Gag・SeV-Vif ベクター治療ワクチン接種により、元来サブドミナントな CTL の誘導が達成され、Gag・Vif 特異的 CTL 反応が優位となった。W/S 共有群では、SIV 感染初期に Gag・Vif 特異的 CTL 反応が優位となり、SeV-Gag・SeV-Vif ベクター治療ワクチン接種によって、元来ドミナントな CTL 反応が増強され、

Gag・Vif 特異的 CTL 反応がより優位となった。このように、本治療ワクチン接種により、ドミナント CTL・サブドミナント CTL のいずれの誘導も効率よく行うことができた。

HAART を中止した後、治療ワクチン非接種群に比べ治療ワクチン接種群の SIV 複製はより強く抑制されていることを示す結果が得られた。この結果は本治療ワクチンの有効性を示すものとして重要な成果である。今後はさらにデータを蓄積し、本治療ワクチンの有効性を検証するとともに、ドミナント CTL 誘導とサブドミナント CTL 誘導の比較検討も含め、有効性の機序解明を進める予定である。

アカゲサル MHC-I 遺伝子群の多様性解析は着実に進展している。MHC-I 様遺伝子群に関しては、活性化 NK レセプター-NKG2D レセプターのリガンドの遺伝子多様性の検討を進めている。平成 22 年度には、アカゲサル・カニクイサルの ULBP4 の遺伝子多様性が極めて大きいことを示したが、今年度は HLBP2 の遺伝子多様性も大きいことが判明した。これらの情報集積は宿主多様性をふまえたサルモデル解析系の向上に結びつくと期待される。

## E. 結論

SeV ベクターを用いた治療エイズワクチンの有効性を検証する目的で、サルエイズモデルにおいて、HAART 中の SeV-Gag ベクター・SeV-Vif ベクター治療エイズワクチンの接種効果を解析し、ドミナント CTL・サブドミナント CTL 各々の誘導に成功した。HAART 中止後の解析により、治療ワクチン接種群では有意に強く SIV 複製が抑制されていることを示す結果が得られた。この結果は、本治療エイズワクチンの有効性を示すものとして極めて重要である。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1 論文発表

- 1) Takahara Y, Matsuoka S, Kuwano T, Tsukamoto T, Yamamoto H, Ishii H, Nakasone T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Sakawaki H, Horiike M, Miura T, Igarashi T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Dominant induction of vaccine antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses after simian immunodeficiency virus challenge. *Biochem Biophys Res Commun* 408:615-619, 2011.

- 2) Nakamura M, Takahara Y, Ishii H, Sakawaki H, Horiike M, Miura T, Igarashi T, Naruse TK, Kimura A, Matano T, Matsuoka S. Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses during primary simian immunodeficiency virus infection in Burmese rhesus macaques. *Microbiol Immunol* 55:768-773, 2011.
- 3) Moriya C, Horiba S, Kurihara K, Kamada T, Takahara Y, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Matano T. Intranasal Sendai viral vector vaccination is more immunogenic than intramuscular under pre-existing anti-vector antibodies. *Vaccine* 29:8557-8563, 2011.
- 4) Ishii H, Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Matsuoka S, Shiino T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Naruse TK, Kimura A, Takiguchi M, Matano T. Impact of vaccination on cytotoxic T lymphocyte immunodominance and cooperation against simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques. *J Virol* 86:738-745, 2012.
- 5) Seki S, Matano T. CTL escape and viral fitness in HIV/SIV infection. *Front Microbiol* 2:267, 2012.
- 6) Takeuchi H, Ishii H, Kuwano T, Inagaki N, Akari H, Matano T. Host cell species-specific effect of cyclosporine A on simian 1 immunodeficiency virus replication. *Retrovirology* 9:3, 2012.
- 7) Ohtani H, Nakajima T, Akari H, Ishida T, Kimura A. Molecular evolution of immunoglobulin superfamily genes in primates. *Immunogenetics* 63: 417-428, 2011.
- 8) Naruse TK, Okuda Y, Mori K, Akari H, Matano T, Kimura A. ULBP4/RAET1E is highly polymorphic in the Old World monkey. *Immunogenetics* 63: 501-509, 2011.
- 9) Takaki A, Yamazaki A, Maekawa T, Shibata H, Hirayama K, Kimura A, Hirai H, Yasunami M. Positive selection of Toll-like receptor 2 polymorphisms in two closely related old world monkey species, rhesus and Japanese macaques. *Immunogenetics* 64: 15-29, 2012.
- 10) Saito Y, Naruse TK, Akari H, Matano T, Kimura A. Diversity of MHC class I haplotypes in cynomolgus macaques. *Immunogenetics* 64: 131-141, 2012.

### 2 学会発表

- 1) Takahara Y, Nakamura M, Higashi R, Horiike M, Miura T, Igarashi T, Naruse T, Kimura A, Matano T, Matsuoka S. Cytotoxic T lymphocyte responses during highly active antiretroviral therapy in simian immunodeficiency virus-infected macaques. The XVth International Congress of Virology, Sapporo, Japan, 9/15/2011.



- 2) Nomura T, Yamamoto H, Shi S, Iwamoto N, Matano T. Analysis of viral genome sequences in SIV controllers. The XVth International Congress of Virology, Sapporo, Japan, 9/15/2011.
- 3) Ishii H, Iwamoto N, Matsuoka S, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Naruse T, Kimura A, Matano T. Efficacy of single epitope-specific cytotoxic T lymphocyte induction by vaccination against a simian immunodeficiency virus challenge. The XVth International Congress of Virology, Sapporo, Japan, 9/16/2011.
- 4) Matano T. Post-challenge SIV-specific CTL responses in vaccinated macaques. Bridging the Sciences, the 25th Joint Meeting of the United States-Japan Cooperative Medical Science Program AIDS Panels, Atlanta, GA, USA, 9/23/2011.
- 5) Matano T. Impact of prophylactic vaccination with Sendai viral vectors on post-challenge CTL responses in a macaque AIDS model. The 5th Vaccine and ISV Annual Global Congress, Seattle, WA, USA, 10/2/2011.
- 6) 俣野哲朗. サルエイズモデル：MHC-I 遺伝子型と病態の関連について. 難治疾患共同研究拠点研究集会「霊長類動物モデルを用いた難治疾患研究」、東京、10/7/2011.
- 7) Matano T. Impact of prophylactic vaccination on post-exposure CTL cooperation against SIV replication in rhesus macaques. The 12th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 10/20/2011.
- 8) Takahara Y, Nakamura M, Sakawaki H, Miura T, Igarashi T, Koyanagi Y, Naruse T, Kimura A, Matano T, Matsuoka S. Impact of therapeutic vaccination during HAART on CTL immunodominance in SIV infection. The 12th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 10/21/2011.
- 9) Kurihara K, Takahara Y, Matano T. Combination of intranasal and intramuscular Sendai virus vector immunization. The 12th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 10/21/2011.
- 10) 中村碧、高原悠佑、阪脇廣美、堀池麻里子、三浦智行、五十嵐樹彦、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗、松岡佐織. サルエイズモデル感染初期におけるMHCクラスIハプロタイプ別のCTL反応優位パターンの解析. 第25回日本エイズ学会学術集会、東京、11/30/2011.
- 11) 栗原京子、高原悠佑、原裕人、井上誠、飯田章博、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の経鼻接種と筋肉内接種の併用効果の解析. 第25回日本エイズ学会学術集会、東京、11/30/2011.
- 12) Nakamura M, Takahara Y, Matsuoka S, Matano T. Analysis of cytotoxic T lymphocyte responses under HAART in a macaque AIDS model. The 3rd Korea-Japan Joint Symposium on HIV/AIDS, Seoul, Korea, 12/10/2011.
- 13) 俣野哲朗. サルモデルを用いたエイズワクチン開発研究. 第4回滋賀医科大学サルシンポジウム「サル類と感染症、最近の話題」、大津、12/19/2011.
- 14) Matano T. HIV vaccine development. Symposium on Research and Quality Control of Vaccines, Beijing, China, 2/20/2012.
- 15) 中島敏晶、大谷仁志、明里宏文、石田貴文、木村彰方. 霊長類における免疫グロブリンスーパーファミリー (IgSF) の分子進化. 第20回日本組織適合性学会大会、静岡、8/30/2011.
- 16) 成瀬妙子、奥田裕紀子、森一泰、明里宏文、俣野哲朗、木村彰方. 旧世界ザルにおけるULBP4/RAET1E遺伝子の多様性. 第20回日本組織適合性学会大会、静岡、8/29/2011.
- 17) 成瀬妙子、森一泰、明里宏文、俣野哲朗、木村彰方. アカゲザルULBP2/RAET1H遺伝子の多様性. 日本人類遺伝学会第56回大会、幕張、11/10/2011.
- 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 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

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。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、これらの抗原特異的 CTL 反応が自然感染で優位である場合 (ドミナント CTL の誘導) と優位でない場合 (サブドミナント CTL の誘導) の両者の検討を行うこととした。平成 23 年度は、前年度に確認した MHC-I ハプロタイプ E 共有群と W/S 共有群を使用し、SIV 感染後の HAART 治療中に Gag 発現 SeV ベクターおよび Vif 発現 SeV ベクターを治療ワクチンとして 2 回経鼻接種した。2 回目の治療ワクチンにおいては抗 SIV 中和抗体接種を併用した。E 共有群では、感染初期に Nef 等の抗原特異的 CTL 反応が優位となり、その後の HAART 中の CTL 反応は減弱していたが、治療ワクチン接種によって Gag・Vif 特異的 CTL 反応が効率よく誘導され優位となった。一方、W/S 共有群では、感染初期に Gag・Vif 特異的 CTL 反応が優位となり、その後の HAART 中の CTL 反応は減弱していたが、治療ワクチン接種によって Gag・Vif 特異的 CTL 反応がより優位に誘導された。つまり、ドミナント CTL・サブドミナント CTL のいずれの誘導も効率よく行うことができた。2 回目の治療ワクチン接種後 HAART を中止し、その後 2 週目の血漿中ウイルス量を調べたところ、治療ワクチン接種群では有意に強く SIV 複製が抑制されていることを示す結果が得られた。本研究結果は、治療エイズワクチンの有効性を示すものとして極めて重要である。今後は、さらにデータを蓄積して有効性を検証するとともに、その有効性の機序解明を進める予定である。

### 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 反応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としては、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」の誘導の両者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 23 年度は、前年度に確認した MHC-I ハプロタイプ E 共有群と W/S 共有群を使用し、SIV 感染後の HAART 治療中に SeV-Gag ベクターおよび SeV-Vif ベクターを治療ワクチンとして 2 回経鼻接種して、その効果を解析した。

## B. 研究方法

MHC-I ハプロタイプ E 共有アカゲサル 4 頭および W/S 共有アカゲサル 4 頭を用いた。全頭に対し SIVmac239 感染後 12 週目より 32 週目まで HAART 治療を行った。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 HAART として投与した。治療ワクチン接種群 4 頭 (E 共有群 2 頭、W/S 共有群 2 頭) には、26 週目と 32 週目に治療ワクチンとして、非複製型 SeV-Gag ベクターおよび SeV-Vif ベクターを経鼻接種した。2 回目の治療ワクチンでは、抗 SIV 中和抗体静注を加えた。治療ワクチン効果を検討するため、2 回目の治療ワクチン接種後 HAART を中止して、治療ワクチン接種群と非接種群間でウイルス血症再出現の比較検討を行った。これらのサルにおいて、血漿中ウイルス量および SIV 抗原特異的 CTL 反応の経時変化を解析した。SIV 抗原特異的 CTL 反応については、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 $\gamma$  を細胞内免疫染色で検出することにより測定した。

### (倫理面への配慮)

全ての動物実験は、倫理面も含めて、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

SIV 感染初期の解析では、いずれのサルも持続感染を呈した (図 1)。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・Vif 特異的 CTL 反応認められたものは 1 頭ずつであった (図 2)。一方、W/S 共有群 4 頭では、Gag・Vif 特異的 CTL 反応が優位であった (図 3)。

感染後 12 週目に HAART を開始後、血漿中ウイルス量は減少し、検出下限値前後 (7 頭で検出限界以下) となった (図 1)。SIV 抗原特異的 CTL 反応も減弱した。

感染後 26 週目に治療ワクチン接種を行い、その翌週 (27 週目) の末梢血リンパ球を用いて SIV 抗原特異的 CTL 反応を解析したところ、E 共有群の 2 頭では、Gag・Vif 特異的 CTL 反応が誘導され、優位となっていた (図 2)。W/S 共有群の 2 頭でも、Gag・Vif 特異的 CTL 反応が誘導され、より優位となっていた (図 3)。

感染後 32 週目に治療ワクチン接種を行い、HAART を中止して、その後の血漿中ウイルス量の変化を調べたところ、治療ワクチン非接種群に比べ、治療ワクチン接種群ではウイルス血症出現が約 1 週間遅れる傾向がみられた。HAART 開始直前 (感染後 12 週目) と HAART 終了後 2 週目 (感染後 34 週目) のウイルス量の比をとると、治療ワクチン非接種群に比べ、治療ワクチン接種群は有意に低値を示した (図 1)。

## D. 考察

E 共有群では、SIV 感染初期には Gag・Vif 特異的 CTL 反応は優位ではなかったが、SeV-Gag・SeV-Vif ベクター治療ワクチン接種により、サブドミナント CTL 誘導が達成され、Gag・Vif 特異的 CTL 反応が優位となった。W/S 共有群では、SIV 感染初期に Gag・Vif 特異的 CTL 反応が優位となり、SeV-Gag・SeV-Vif ベクター治療ワクチン接種によって、ドミナント CTL 反応が増強され、Gag・Vif 特異的 CTL 反応がより優位となった。この両者でどちらの方がより有効であるかについては、今後の検討課題である。

HAART を中止した後の血漿中ウイルス量の解析で、治療ワクチン非接種群に比べ治療ワクチン接種群の SIV 複製はより強く抑制されていることを示す結果が得られた。この結果は、治療ワクチンの有効性を示すものとして重要な成果である。今後は、さらにデータを蓄積して有効性を検証するとともに、その有効性の機序解明を進める予定である。

## E. 結論

サルエイズモデルにおいて、SeV-Gag・SeV-Vifベクターを用いた治療エイズワクチン接種効果を解析し、ドミナントCTL・サブドミナントCTL各々の誘導に成功した。HAART 中止後のウイルス血症再出現の比較により、治療ワクチン非接種群と比べて治療ワクチン接種群では有意に強くSIV複製が抑制されていることを示す結果が得られた。本研究結果は、治療エイズワクチンの有効性を示すものとして極めて重要である。

## F. 研究発表

### 1 論文発表

- 1) Takahara Y, Matsuoka S, Kuwano T, Tsukamoto T, Yamamoto H, Ishii H, Nakasone T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Sakawaki H, Horiike M, Miura T, Igarashi T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Dominant induction of vaccine antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses after simian immunodeficiency virus challenge. *Biochem Biophys Res Commun* 408:615-619, 2011.
- 2) Naruse TK, Okuda Y, Mori K, Akari H, Matano T, Kimura A. ULBP4/RAET1E is highly polymorphic in the Old World monkey. *Immunogenetics* 63:501-509, 2011.
- 3) Nakamura M, Takahara Y, Ishii H, Sakawaki H, Horiike M, Miura T, Igarashi T, Naruse TK, Kimura A, Matano T, Matsuoka S. Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses during primary simian immunodeficiency virus infection in Burmese rhesus macaques. *Microbiol Immunol* 55:768-773, 2011.
- 4) Moriya C, Horiba S, Kurihara K, Kamada T, Takahara Y, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Matano T. Intranasal Sendai viral vector vaccination is more immunogenic than intramuscular under pre-existing anti-vector antibodies. *Vaccine* 29:8557-8563, 2011.
- 5) Saito Y, Naruse TK, Akari H, Matano T, Kimura A. Diversity of MHC class I haplotypes in cynomolgus macaques. *Immunogenetics* 64:131-141, 2012.
- 6) Ishii H, Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Matsuoka S, Shiino T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Naruse TK, Kimura A, Takiguchi M, Matano T. Impact of vaccination on cytotoxic T lymphocyte immunodominance and cooperation against simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques. *J Virol* 86:738-745, 2012.
- 7) Seki S, Matano T. CTL escape and viral fitness in HIV/SIV infection. *Front Microbiol* 2:267, 2012.
- 8) Takeuchi H, Ishii H, Kuwano T, Inagaki N, Akari H, Matano T. Host cell species-specific effect of cyclosporine A on simian 1 immunodeficiency virus replication. *Retrovirology* 9:3, 2012.

### 2 学会発表

- 1) Takahara Y, Nakamura M, Higashi R, Horiike M, Miura T, Igarashi T, Naruse T, Kimura A, Matano T, Matsuoka S. Cytotoxic T lymphocyte responses during highly active antiretroviral therapy in simian immunodeficiency virus-infected macaques. The XVth International Congress of Virology, Sapporo, Japan, 9/15/2011.
- 2) Nomura T, Yamamoto H, Shi S, Iwamoto N, Matano T. Analysis of viral genome sequences in SIV controllers. The XVth International Congress of Virology, Sapporo, Japan, 9/15/2011.
- 3) Ishii H, Iwamoto N, Matsuoka S, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Naruse T, Kimura A, Matano T. Efficacy of single epitope-specific cytotoxic T lymphocyte induction by vaccination against a simian immunodeficiency virus challenge. The XVth International Congress of Virology, Sapporo, Japan, 9/16/2011.
- 4) Matano T. Post-challenge SIV-specific CTL responses in vaccinated macaques. Bridging the Sciences, the 25th Joint Meeting of the United States-Japan Cooperative Medical Science Program AIDS Panels, Atlanta, GA, USA, 9/23/2011.
- 5) Matano T. Impact of prophylactic vaccination with Sendai viral vectors on post-challenge CTL responses in a macaque AIDS model. The 5th Vaccine and ISV Annual Global Congress, Seattle, WA, USA, 10/2/2011.
- 6) 俣野哲朗. サルエイズモデル：MHC-I 遺伝子型と病態の関連について. 難治疾患共同研究拠点研究会「霊長類動物モデルを用いた難治疾患研究」、東京、10/7/2011.
- 7) Matano T. Impact of prophylactic vaccination on post-exposure CTL cooperation against SIV replication in rhesus macaques. The 12th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 10/20/2011.
- 8) Takahara Y, Nakamura M, Sakawaki H, Miura T, Igarashi T, Koyanagi Y, Naruse T, Kimura A, Matano T, Matsuoka S. Impact of therapeutic vaccination during HAART on CTL immunodominance in SIV infection. The 12th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 10/21/2011.
- 9) Kurihara K, Takahara Y, Matano T. Combination of intranasal and intramuscular Sendai virus vector immunization. The 12th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 10/21/2011.

- 10) 中村碧、高原悠佑、阪脇廣美、堀池麻里子、三浦智行、五十嵐樹彦、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗、松岡佐織. サルエイズモデル感染初期におけるMHCクラスIハプロタイプ別のCTL反応優位パターンの解析. 第25回日本エイズ学会学術集会、東京、11/30/2011.
- 11) 栗原京子、高原悠佑、原裕人、井上誠、飯田章博、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の経鼻接種と筋肉内接種の併用効果の解析. 第25回日本エイズ学会学術集会、東京、11/30/2011.
- 12) Nakamura M, Takahara Y, Matsuoka S, Matano T. Analysis of cytotoxic T lymphocyte responses under HAART in a macaque AIDS model. The 3rd Korea-Japan Joint Symposium on HIV/AIDS, Seoul, Korea, 12/10/2011.
- 13) 俣野哲朗. サルモデルを用いたエイズワクチン開発研究. 第4回滋賀医科大学サルシンポジウム「サル類と感染症、最近の話題」、大津、12/19/2011.
- 14) Matano T. HIV vaccine development. Symposium on Research and Quality Control of Vaccines, Beijing, China, 2/20/2012.
- 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。

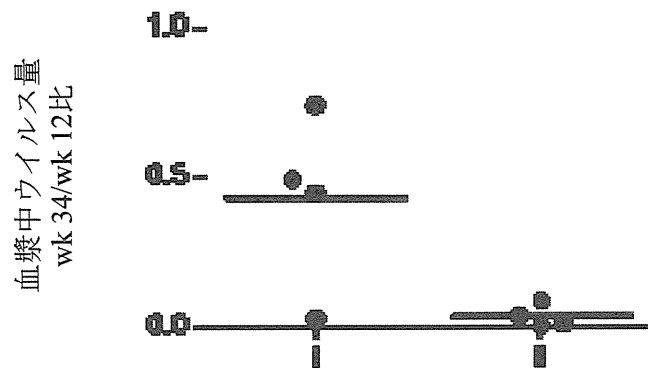
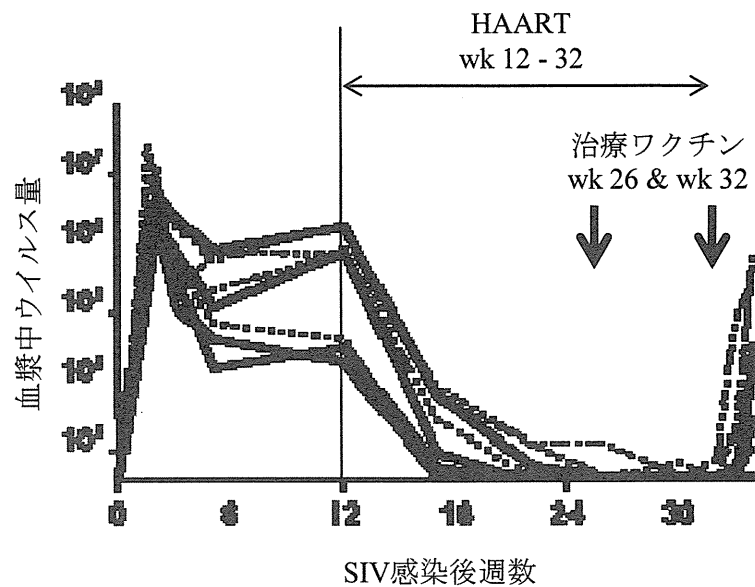


図1. SIV感染後の血漿中ウイルス量

上段：血漿中ウイルス量の経時変化。全頭、HAART（第12-32週）を受けた。治療ワクチン非接種群（点線）は、E群2頭・WS群2頭。治療ワクチン接種群（実線）は、E群2頭・WS群2頭で、第26週と第32週に治療ワクチンを受けた。

下段：第34週と第12週の血漿中ウイルス量の比。治療ワクチン非接種群（I）と比較して、治療ワクチン接種群（II）は有意に低値を示した（ $p=0.0392$ ）。

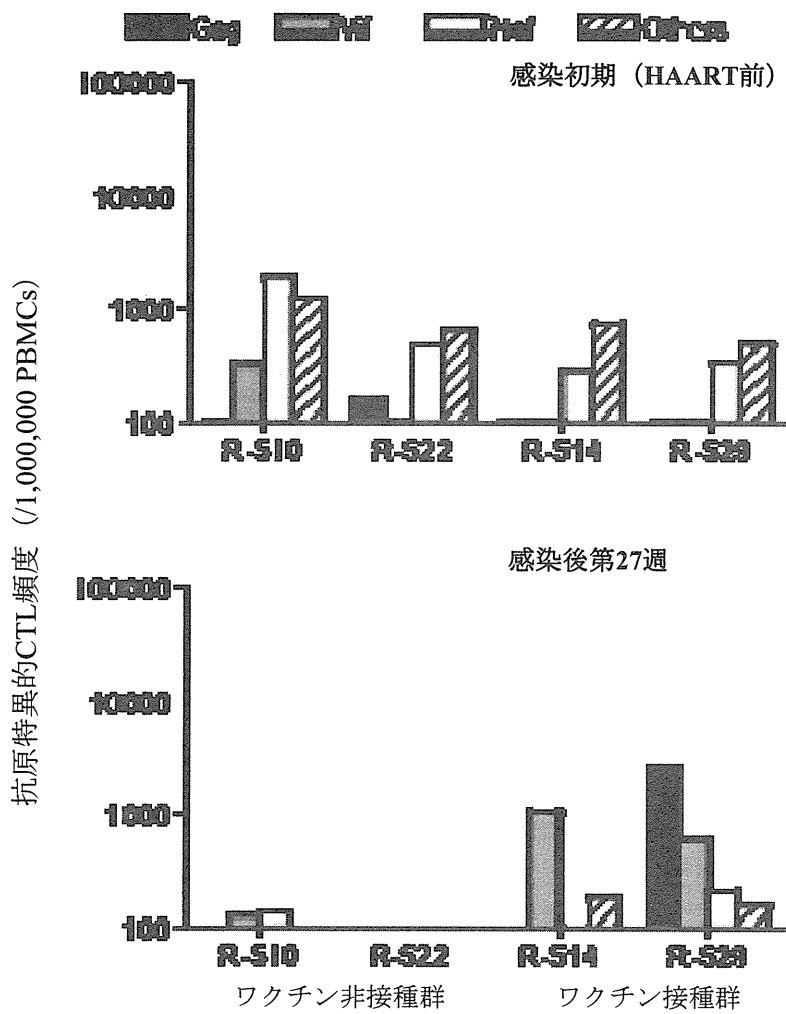


図2. E共有群における抗原特異的CTL反応

上段：SIV感染初期、HAART前のGag、Vif、Nef、他のSIV抗原特異的CTL頻度。

下段：SIV感染後第27週。1回目の治療ワクチン後1週目。



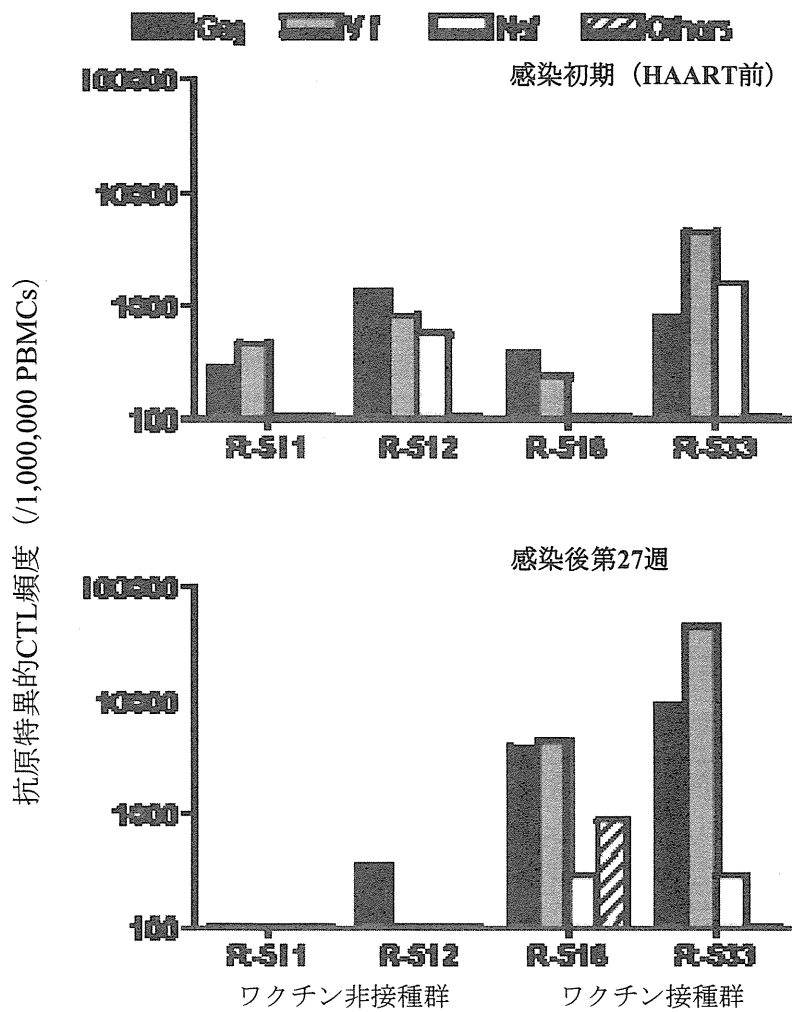


図3. W/S共有群における抗原特異的CTL反応

上段: SIV感染初期、HAART前のGag、Vif、Nef、他のSIV抗原特異的CTL頻度。

下段: SIV感染後第27週。1回目の治療ワクチン後1週目。

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

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した。また、昨年度は NKG2D レセプターのリガンドである ULBP4 遺伝子の多型を検討したが、本年度は ULBP2 遺伝子の多様性を検討した。その結果、アカゲザルではヒトに比べてはるかに大きな多様性があることが示された。すなわち、旧世界ザルでは ULBP2 遺伝子が重複 (ULBP2.1, ULBP2.2) しており、そのいずれもが多型を有していた。また、3D 立体モデル上にこれらの多型をマップしたところ、ULBP4 多型と同様に、ULBP2 多型の多くは分子表面にはなかった。しかし、ULBP2.1 の多型の一部は分子表面に存在したことから、NKG2D レセプターによるリガンド認識機構が ULBP2.1 では一部異なっていることが示唆された。一方、比較ゲノム解析を用いた進化医学的手法によって、HIV/AIDS 関連遺伝子であることが昨年度までに判明した TIM1 について、3D 立体モデル上への多様性マッピングとさらなる進化的検討を行った。その結果、TIM1 への進化選択圧は TIM1 分子の片側の表面にマップされ、この面で他の分子と相互作用していることを示唆した。また、TIM1 遺伝子は新世界ザルでは複数の系統で異なるメカニズムで偽遺伝子化しており、きわめて特異な進化を遂げたことが示された。

### 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

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 62 個体である。
- 2) MHC クラス I 様遺伝子群の解析：ワクチン効果検証実験に用いたアカゲザル個体の ULBP2 遺伝子群 (ULBP2.1 および ULBP2.2) 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。既報のアリルと比較し、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。これとは別に、ヒト集団についても ULBP2 遺伝子多型を解析した。さらに、ULBP2 分子の 3D モデルを構築し、多型部位のマッピングを行った。
- 3) 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) が加かった遺伝子を抽出した。なかでも TIM1 遺伝子は強い選択圧がかかったと推定されることから、霊長類 24 種について TIM1 ゲノム配列を決定し、系統進化を検討した。また、選択圧がかかったアミノ酸配列を 3D 立体モデル上にマッピングして、その分布を検討した。さらに、新世界ザルでは TIM1 遺伝子が偽遺伝子化していることが推定されたため、新世界ザル由来の T 細胞株における TIM1 遺伝子発現を RT-PCR 法で検討した。

(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) (承認番号 2011-002 号、平成 23 年 7 月 19 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。昨年度までの約 170 頭に加えて 62 頭を追加解析した。これまでに対象集団に見出されていなかった既知アリルは複数発見されたが、新規の対立遺伝子は見出されなかった。このことから、ワクチン実験に用いている集団における MHC アリルのセットはほぼ解明されたことを示す。
- 2) MHC クラス I 様遺伝子群の解析：昨年度に引き続き、活性化 NK レセプターである NKG2D レセプターのリガンド (ULBP) についての解析を行った。昨年度までに、アカゲザルでは ULBP1~ULBP3 は多型に乏しいが、ULBP4 は著明な多型性を示すこと、カニクイザルでも ULBP4 が著明な多型性を示すことを明らかにしたが、本年は ULBP2 遺伝子を対象として解析した。ULBP 遺伝子群は遺伝子ファミリーを構成するが、アカゲザルでは遺伝子重複 (図 1) が生じており、2 個の ULBP2 遺伝子が存在する。

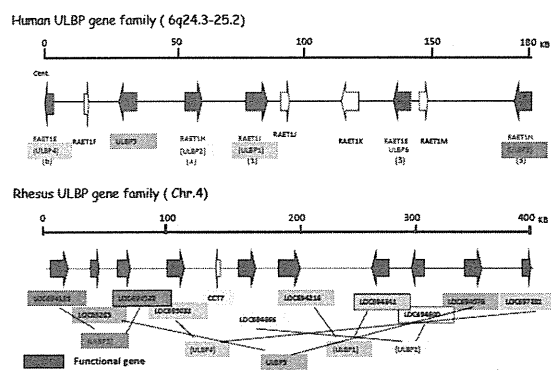


図 1 ヒトおよびアカゲザルの ULBP 領域の遺伝子構造

そこで、アカゲザルのゲノムデータベースから、中でヒト ULBP2 に相同な配列を探索したところ、予想どおり 2 種の ULBP2 様配列が得られた。また、ヒトでは ULBP2 と類似する

ULBP6 遺伝子が存在するが、アカゲザルにはヒト ULBP6 の相同配列はなかった。また、それらのゲノム構造を比較すると、アカゲザルの 2 個の ULBP2 遺伝子 (ULBP2.1 と ULBP2.2 と仮称) はいずれも膜結合型であるのに対し、ヒト ULBP2 および ULBP6 は GPI アンカー型であった (図 2)。

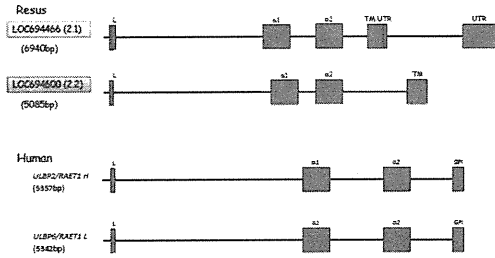


図 2 アカゲザルとヒトの ULBP2 類似遺伝子群のゲノム構造

また、塩基配列の比較からもゲノム構造と同様に、アカゲザル ULBP2.1, ULBP2.2 とヒト ULBP2, ULBP6 は異なるクラスターを構成した (図 3)。

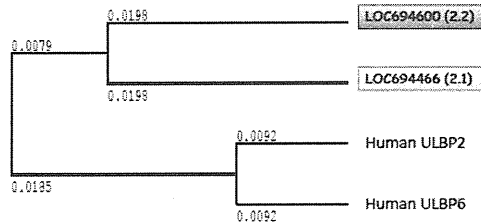


図 3 ULBP2 様遺伝子群の系統樹

ついで、ヒトおよびアカゲザルにおける多型を探索したところ、ヒトでは ULBP2 には 2 種、アカゲザルでは ULBP2.1 に 6 種、ULBP2.2 に 10 種のアリルが検出された (表 1)。

表 1 ヒトおよびアカゲザルの ULBP2 遺伝子アリル数

	Number of alleles	EX2		Int 2	EX3	
		Polymorphism	Non-Synonymous	Polymorphism	Polymorphism	Non-Synonymous
Human	2	0	0	0	1	0 (0%)
LOC694466 (2.1)	6	6	6 (100.0%)	5	6	3 (50.0%)
LOC694600 (2.2)	10	17	6 (35.3%)	13	13	9 (69.2%)

また、これらのゲノム多様性は特定の領域にクラスターリングしていた (図 4)。

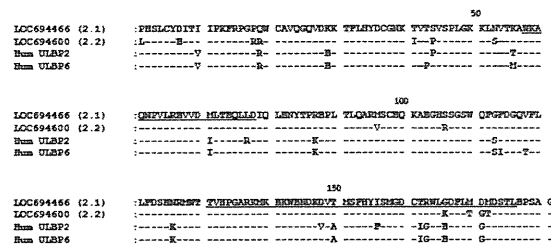


図 4 ヒトおよびアカゲザルの ULBP2 配列多様性

一方、同定したアリル配列で系統樹を作製すると、図 5 に示すとおり、MHC 多型と同様な複数の小さなクラスターで構成されていることが分かった。

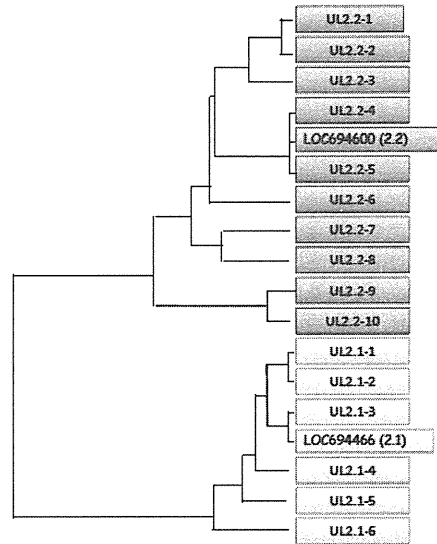


図 5 アカゲザル ULBP2 アリルの系統樹

さらに、ヒト ULBP3 をテンプレートとしてアカゲザル ULBP2.1 および ULBP2.2 の 3D モデルを作製し、その上に多型をマップしたところ、ULBP4 で観察されたように、ULBP2 多型のほとんどは分子表面には存在しなかった。しかし、ULBP2.1 の 3 か所の多型 (63, 167, 171 位) は、NKG2D との結合部分である分子表面の  $\alpha$  ヘリックス構造上にマップされた (図 6)。

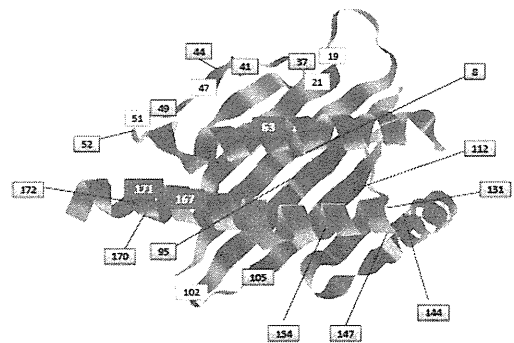


図 6 ULBP2 立体モデル上への多型マッピング

3) 比較ゲノム手法を用いた進化的解析：昨年度までの進化医学的解析から、TIM1 遺伝子には強い進化選択圧がかかったこと、これがヒトでの HIV/AIDS 関連遺伝子であることが証明された。すなわち、TIM1 多型ハプロタイプ (D3-A) がタイ人集団およびインド人集団で HIV/AIDS 抵抗性と有意な関連を示した。