

201124007A

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

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
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……………	15
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……………	23
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……………	30
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……………	33
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……………	37
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……………	40
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……………	43
IV. 研究成果の刊行物・別刷……………	47

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の開発を目指し、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進めることを目的とするものである。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、集団レベルでの HIV 感染拡大抑制効果を期待する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 誘導エイズ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推進し、平成 23 年度には以下の成果を得た。(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では、抗 SeV 中和抗体存在下での SeV ベクター経鼻接種の抗原特異的 CTL 誘導能の確認を行った。(2) CTL 誘導ワクチン抗原最適化に向けた研究では、有望な標的抗原である HIV Gag 蛋白の主な分解経路はプロテアソーム経路であることを示す結果を得た。一方、邦人 HIV 感染者の解析で、CTL 逃避変異株の国内での広がり示唆する結果を得た。さらに、サルエイズモデルにおける解析で、ワクチンによる CTL 誘導が HIV 曝露後の CTL 優位性に大きく影響すること、つまり、CTL 誘導ワクチンの選択抗原の違いが曝露後のワクチン抗原特異的 CTL 反応と非ワクチン抗原特異的 CTL 反応の協調パターンに大きく影響し、HIV 複製制御の有無を左右しうることを示す結果を得た。(3) 中和抗体に関する研究では、標的となる HIV Env の構造計算により、gp120 三量体モデルを構築し、V1/V2 ドメインが抗 V3 中和抗体のエピトープへのアクセス障壁となりうることを示す結果を得た。本研究結果は、予防エイズワクチンのデリバリーシステム最適化と選択抗原最適化に結びつく重要な成果である。

研究分担者

俣野 哲朗 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。特に流行地域で極めて深刻な状況にあり、感染拡大が抗 HIV 薬耐性変異や免疫逃避変異を有する HIV 株流行に結びつく危険性も問題視されている。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免疫反応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では、自然感染の模倣を基本とする従来のワクチンの概念を超えた新戦略が必要となる。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 感染拡大抑制効果を期待する第 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、より高い防御効果を有する第2世代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 細胞反応誘導に結びつく可能性を示したが、この抗体と T 細胞の協調作用を期待して、ヘルパー T リンパ球 (HTL) 反応と中和抗体反応に関する研究を展開した。

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、以下の研究を行った。

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 23 年度は、以下の研究を行った。

- 1-1. 抗 SeV 抗体存在下の SeV ベクターワクチン経鼻接種の CTL 誘導能の確認。
- 1-2. E 型肝炎ウイルス様粒子 (HEV-VLP) を用いた DNA ワクチンのサルでの免疫誘導能の解析。
- 2-1. 細胞内 Gag 蛋白分解動態の解析。
- 2-2. 邦人 HIV 感染者由来の HIV gag・pro 領域の変異が HIV 複製能に及ぼす影響の解析。
- 2-3. ワクチンによる CTL 誘導が SIV 曝露後の CTL 優位性・SIV 複製制御に及ぼす影響の解析。
- 3-1. SIV 感染慢性期の SIV 特異的 HTL 反応の解析。
- 3-2. HIV Env gp120 構造計算、三量体モデル構築。

B. 研究方法

- 1-1. サルにおいて抗 SeV 中和抗体存在下の SIV Gag 発現 SeV (SeV-Gag) ベクターワクチン経鼻接種による Gag 特異的 CTL 誘導能の確認を行った。
- 1-2. HEV-VLP に HIV Env エピトープを組込んだキメラ VLP (VLP-HIVenv) 内腔に SIV gag cDNA を封入したワクチン 10 mg をカニクイザルに 2 週おきに 3 回経口投与し、HIV/SIV 特異的免疫誘導を解析した。

2-1. 細胞内 Gag 蛋白動態について、サイクロヘキシミド処理 (新規蛋白合成阻害)、MG132 処理 (プロテアソーム分解阻害)、クロロキン処理 (エンドソーム分解阻害) により定量的に解析した。また、Gag-EGFP 発現系を構築し細胞内動態を調べた。さらに、開始コドン R の Gag 蛋白、LAMP1 融合 Gag 蛋白を発現させ、分解経路を解析した。

2-2. 1992-2009 年に東京大学医科学研究所附属病院を受診した日本人未治療 HIV 感染者の血漿から HIV gag-pro cDNA を増幅し、HIV 分子クローン NL4-3 に挿入してキメラ HIV を作製し、その複製能の経時的変化をみた。

2-3. MHC-I ハプロタイプ A 共有サル群において、SIV 感染後、Gag206-216 エピトープ (Gag206) 特異的 CTL 反応と Gag241-249 エピトープ (Gag241) 特異的 CTL 反応が優位に誘導されることに着目し、予防ワクチンによる Gag206 特異的 CTL と Gag241 特異的 CTL の誘導効果を比較検討した。非ワクチン接種群 (Naive 群 6 頭)、Gag241 特異的 CTL 誘導ワクチン接種群 (Gag241 群 6 頭)、Gag206 特異的 CTL 誘導ワクチン接種群 (Gag206 群 5 頭) について、SIV チャレンジ後のウイルス学および免疫学的解析を行った。

3-1. 非ワクチン接種サルに加え、DNA プライム・SeV-Gag ベクターブーストワクチン接種サルも含めて、SIV 感染慢性期 (20-34 週) における SIV 特異的 HTL 反応を解析した。SIV Gag・Pol・Vif・Vpx 発現細胞を用いた抗原刺激後、CD4 陽性 T リンパ球における MIP-1 β ・IL-2・TNF- α ・IFN- γ ・CD107a 誘導を細胞内免疫染色で検出し、多機能性を測定した。

3-2. ホモロジーモデリング法により、HIV gp120 単量体分子モデルを構築した。このモデルに糖鎖を付加し、分子動力学計算を行ってより最適な構造を得た。PDB より得た電子顕微鏡構造に分子モデルを重ね合わせ、三量体分子モデルを構築した。

(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・所属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. 比較的高い抗 SeV 中和抗体価 (90%感染阻止率 1:800) の存在下で、従来量 (6×10^9 CIU) の SeV-Gag ベクター経鼻接種により、効率よい Gag 特異的 CTL 誘導が確認された。
- 1-2. VLP-DNA ワクチン接種サル群で HIV Env に対する免疫誘導が確認された。
- 2-1. 蛋白合成阻害剤処理により細胞内 Gag 蛋白分解は測定できた。この分解はプロテアソーム阻害剤処理にて阻止されたが、クロロキン処理では阻止されなかった (図 1)。Gag-EGFP 発現細胞の蛋白合成を止めると、Gag-EGFP の減少と局在変化が認められた。開始コドン R の Gag はより効率良くプロテアソーム経路で、LAMP1 融合 Gag はリソソーム経路で分解された。
- 2-2. 感染者由来 HIV gag-pro を組込んだキメラ HIV の *in vitro* 複製能の近年の有意な低下が示された (図 2)。2000 年以前の感染者の解析では、HLA-A24 陽性者と陰性者でキメラ HIV の複製能に差が認められたが (A24 陽性 < A24 陰性)、近年ではその違いが認められなくなっていた。
- 2-3. SIV 曝露後 2 週目、Naive 群は Gag206 特異的 CTL・Gag241 特異的 CTL の両者の反応を示したが、Gag241 群は Gag241 特異的 CTL 反応、Gag206 群は Gag206 特異的 CTL 反応のみを示し、群間で CTL 優位性に大きな違いがみられた (図 3)。5 週目には、Gag206 群で Gag206 特異的 CTL からの逃避変異選択が認められたが、Gag241 群では変異が認められなかった。Gag241 群では全頭で SIV 複製が制御されたが、Gag206 群では 2 頭が持続感染を呈した。Gag206 群では、SIV 曝露後 Gag206 特異的 CTL 反応が優位となるが、この CTL に対する逃避変異選択が加速され、SIV 複製制御が困難になると考えられた。一方、Gag241 群では、SIV 曝露後 Gag241 特異的 CTL 反応が優位となり、その後 Gag206 特異的 CTL 反応も加わって SIV 複製制御に結びつくと考えられた (図 4)。
- 3-1. ワクチン非接種群・ワクチン接種群ともに、感染慢性期の SIV 特異的 HTL 多機能性と血漿中ウイルス量の逆相関を示した。
- 3-2. HIV gp120 三量体分子モデルより、V1/V2 ループはウイルス粒子最外殻に配置され、gp120 ほぼ全体が糖鎖に覆われることが示唆された。抗 V3 中和抗体抵抗性株では、同一 gp120 分子内の V1/V2 ドメインにより、V3 エピトープが被覆されることを示す結果が得られた (図 5)。

D. 考察

- 1-1. 抗 SeV 中和抗体存在下における SeV ベクターワクチン経鼻接種の高い CTL 誘導能を確認した。
- 1-2. 本研究の経口 VLP-DNA ワクチンは、効率よい粘膜免疫誘導能を有する可能性もあり、SeV ベクターワクチンと併用するプライム候補として期待される。
- 2-1. Gag 蛋白の主な分解経路はプロテアソーム経路であることが示された。この知見は Gag 抗原提示効率を考えるうえで重要である。なお、Gag-EGFP 検出系は Gag 蛋白の分解経路・速度解析系として有用である。開始コドン R への置換や LAMP1 融合等の分子修飾法は、抗原提示効率改善に有用である可能性が示唆された。
- 2-2. 邦人で最も頻度の高い HLA-A24 に拘束される CTL からの逃避変異により HIV 複製能が減弱すると仮定すると、近年、その逃避変異体が邦人集団内に広がり、優勢な HIV 株になっている可能性が考えられた。
- 2-3. HIV 曝露後急性期にワクチン抗原特異的 CTL の 2 次反応が優位となり、非ワクチン抗原特異的 CTL 反応の誘導が遅れることが明らかとなった。ワクチンによる CTL 誘導が曝露後の CTL 優位性に大きく影響し、CTL 逃避変異選択の促進・遅延に結びつきうることが示された。つまり、ワクチン抗原選択の仕方、HIV 曝露後のワクチン抗原特異的 CTL と非ワクチン抗原特異的 CTL の協調パターンに違いが生じ、HIV 複製制御の有無を左右しうる事が判明した。本結果は、CTL 誘導ワクチンの抗原選択において極めて重要な知見を与えるものである。
- 3-1. 感染慢性期において体内ウイルス量が低いほど HTL 機能が維持されると考えられた。
- 3-2. HIV gp120 三量体分子モデルでは、V1/V2 ループはウイルス粒子の最外殻に配置され、V3 の近傍に位置し、そのため、V1/V2 ループの揺らぎの程度および V3 の配置が、抗 V3 抗体の V3 へのアクセスのしやすさを決めると考えられた。

E. 結論

CTL 誘導エイズワクチン抗原候補として有望な HIV Gag 蛋白の主な分解経路は、抗原提示に結びつきうるプロテアソーム経路であることを示す結果を得た。邦人 HIV 感染者の解析では、国内における CTL 逃避変異株の広がりを示す結果を得た。さらに、エイズワクチン抗原最適化に結びつく重要な知見として、ワクチンによる CTL 誘導

が HIV 曝露後の CTL 優位性、さらにはワクチン抗原と非ワクチン抗原特異的 CTL の協調パターンに大きく影響することを示す結果を得た。この結果は、ワクチン抗原選択により HIV 複製制御の有無を左右しうることを意味している。本研究結果は、第 1 世代予防エイズワクチン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) 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) Matsuoka S, Matano T. Strategy for prevention of HIV-1 transmission. *Journal of Disaster Research* 6:421-425, 2011.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Saito Y, Naruse TK, Akari H, Matano T, Kimura A. Diversity of MHC class I haplotypes in cynomolgus macaques. *Immunogenetics* 64:131-141, 2012.
- 7) 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.
- 8) Seki S, Matano T. CTL escape and viral fitness in HIV/SIV infection. *Front Microbiol* 2:267, 2012.
- 9) 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.
- 10) Matsuo K, Yasutomi Y. *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin as a vaccine vector for global infectious disease control. *Tuberculosis Res Treat*, Epub 2011.
- 11) Chono H, Saito N, Yasutomi Y, Mineno J, Kato I. In vivo safety and persistence of endoribonuclease gene-transduced CD4+ T cells in cynomolgus macaques for HIV-1 gene therapy model. *PloS One* 6: Epub 2011.
- 12) Xing L, Wang JC, Li TC, Yasutomi Y, Lara J, Purcell R, Takeda N, Miyamura T, Holland RC. Spatial configuration of hepatitis E virus antigenic domain. *J Virol* 85:1117-1124, 2011.
- 13) 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.
- 14) Okabayashi S, Uchida K, Ohno C, Hanari K, Goto I, Yasutomi Y. Periventricular Leucomalacia (PVL)-like lesions in two neonatal cynomolgus monkeys (*macaca fascicularis*). *J Comp Pathol* 144:204-211, 2011.
- 15) Uchida A, Sasaguri H, Kimura N, Tajiri M, Ohkubo T, Ono F, Sakaue F, Kanai K, Hirai T, Sano T, Shibuya K, Kobayashi M, Yamamoto M, Yokota S, Kuboddera T, Tomori M, Sakaki K, Enomoto M, Hirai Y, Kumagai J, Yasutomi Y, Mochizuki H, Kuwabara S, Uchihara T, Mizusawa H, Yokakota T. Non-human primate model of ALS with cytoplasmic mislocalization of TDP-43. *Brain* in press.
- 16) Iwasaki Y, Mori K, Ishii K, Maki N, Iijima S, Yoshida T, Okabayashi S, Katakai Y, Lee J, Saito A, Fukai H, Kimura N, Ageyama N, Yoshizaki S, Suzuki T, Yasutomi Y, Miyamura T, Kannagi M, Akari H. Long-term persistent GBV-B infection and development of a chronic and progressive hepatitis C-like disease in marmosets. *Frontiers Microbiol*, in press.
- 17) Hirata H, Kawai S, Maeda M, Jinnai M, Fujisawa K, Katakai Y, Hikosaka K, Tanabe K, Yasutomi Y, Ishihara C. Identification and phylogenetic analysis of Japanese Macaque Babesia-1 (JM-1)

- detected from a Japanese Macaque (*Macaca fascicularis*). *Am J Trop Med Hyg*, in press.
- 18) Saito A, Kono K, Nomaguchi M, Yasutomi Y, Adachi A, Shioda T, Akari H, Nakayama EE. Geographic, genetic, and functional diversity of antiretroviral host factor TRIMCyp in cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). *J Gen Virol*, in press.
 - 19) Mori M, Sriwanthana B, Wichukchinda N, Boonthimat C, Tsuchiya N, Miura T, Pathipvanich P, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P. Unique CRF01_AE Gag CTL epitopes associated with lower HIV-viral load and delayed disease progression in a cohort of HIV-infected Thais. *PLoS One* 6(8):e22680, 2011.
 - 20) Huang KH, Goedhals D, Carlson JM, Brockman MA, Mishra S, Brumme ZL, Hickling S, Tang CS, Miura T, Seebregts C, Heckerman D, Ndung'u T, Walker B, Klenerman P, Steyn D, Goulder P, Phillips R, Bloemfontein-Oxford Collaborative Group, van Vuuren C, Frater J. Progression to AIDS in South Africa is associated with both reverting and compensatory viral mutations. *PLoS One* 6(4):e19018, 2011.
 - 21) Dahirel V, Shekhar K, Pereyra F, Miura T, Artyomov M, Talsania S, Allen TM, Altfeld M, Carrington M, Irvine DJ, Walker BD, Chakraborty AK. Coordinate linkage of HIV evolution reveals regions of immunological vulnerability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(28):11530-11535, 2011.
 - 22) Nakayama K, Nakamura H, Koga M, Koibuchi T, Fujii T, Miura T, Iwamoto A, Kawana-Tachikawa A. Imbalanced production of cytokines by T cells associates with the activation/exhaustion status of memory T cells in chronic HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*, Epub on Sep 23, 2011.
 - 23) Yamamoto SP, Okawa K, Nakano T, Sano K, Ogawa K, Masuda T, Morikawa Y, Koyanagi Y, Suzuki Y. Huw1, a novel cellular interactor of Gag-Pol through integrase binding, negatively influences HIV-1 infectivity. *Microbes Infect* 13(4): 339-349, 2011.
 - 24) Tomita Y, Noda T, Fujii K, Morikawa Y, Kawaoka Y. The cellular factors Vps18 and Mon2 are required for efficient production of infectious HIV-1 particles. *J Virol* 85(11): 5618-5627, 2011.
 - 25) Fukuma A, Abe M, Morikawa Y, Miyazawa T, Yasuda J. Cloning and characterization of the antiviral activity of feline Tetherin/BST-2. *PLoS One* 6(3): e18247, 2011.
 - 26) Urano E, Kuramochi N, Ichikawa R, Yamagata Murayama S, Miyauchi K, Tomoda H, Takebe Y, Nermut M, Komano J, Morikawa Y. Novel postentry inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 replication screened by yeast membrane-associated two-hybrid system. *Antimicrob Agents Chemth* 55(9): 4251-4260, 2011.
 - 27) Momose F, Sekimoto T, Ohkura T, Jo S, Kawaguchi A, Nagata K, Morikawa Y. Apical transport of influenza A virus ribonucleoprotein requires Rab11-positive recycling endosome. *PLoS One* 6 (6): e21123, 2011.
 - 28) Ohkura T, Kikuchi Y, Kono N, Itamura S, Komase K, Momose F, Morikawa Y. Epitope mapping of neutralizing monoclonal antibody in avian influenza A H5N1 virus hemagglutinin. *Biochem Bioph Res Co* 418:38-43, 2012.
 - 29) Fukuma A, Abe M, Urata S, Yoshikawa R, Morikawa Y, Miyazawa T, Yasuda J. Viral and cellular requirements for the budding of feline endogenous retrovirus RD-114. *Virol J*, in press.
 - 30) Terahara K, Yamamoto T, Mitsuki Y, Shibusawa K, Ishige M, Mizukoshi F, Kobayashi K, Tsunetsugu-Yokota Y. Fluorescent reporter signals, EGFP and DsRed, encoded in HIV-1 facilitate the detection of productively infected cells and cell-associated viral replication levels. *Front Microbiol* 2: 280, 2012.
 - 31) Miyamoto T, Yokoyama M, Kono K, Shioda T, Sato H, Nakayama EE. A Single Amino Acid of Human Immunodeficiency Virus Type 2 Capsid Protein Affects Conformation of Two External Loops and Viral Sensitivity to TRIM5 α . *PLoS ONE* 6: e22779, 2011.
 - 32) Nishitsuji H, Yokoyama M, Sato H, Yamauchi S, Takaku H. Identification of amino acid residues in HIV-1 reverse transcriptase that are critical for the proteolytic processing of Gag-Pol precursors. *FEBS Letters* 585:3372-3377, 2011.
- ## 2 学会発表
- 1) Nomura T, Iwamoto N, Inagaki N, Matsuoka S, Yamamoto H, Matano T. Dynamics of viral CTL escape mutations toward higher viral replicative ability in vivo. The 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention, Rome, Italy, 7/18/2011.
 - 2) Takahashi N, Saito A, Nomaguchi M, Iwamoto N, Adachi A, Akari H, Matano T. Viral recovery from cynomolgus macaques controlling a simian-tropic HIV-1 challenge. The XVth International Congress of Virology (VI-PO21-7), Sapporo, Japan, 9/13/2011.
 - 3) 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 (VI-PO35-37), Sapporo, Japan, 9/15/2011.
- 4) Nakane T, Matano T, Yamamoto H. Post-infection passive immunization of SIVmac239-specific, non-neutralizing antibodies does not control virus replication in vivo. The XVth International Congress of Virology (VI-PO51-16), Sapporo, Japan, 9/15/2011.
 - 5) Nomura T, Yamamoto H, Shi S, Iwamoto N, Matano T. Analysis of viral genome sequences in SIV controllers. The XVth International Congress of Virology (VI-SY41-4), Sapporo, Japan, 9/15/2011.
 - 6) Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Yoshida T, Yasutomi Y, Matano T, Adachi A, Akari H. Genotypic variation of cynomolgus monkey TRIM5alpha determines the susceptibility to monkey-tropic HIV-1 infection. The XVth International Congress of Virology (VI-SY41-5), Sapporo, Japan, 9/15/2011.
 - 7) 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 (VI-SY51-3), Sapporo, Japan, 9/16/2011.
 - 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) 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.
 - 11) 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.
 - 12) 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.
 - 13) 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.
 - 14) Takahashi N, Saito A, Nomaguchi M, Iwamoto N, Adachi A, Akari H, Matano T. Virus recovery from cynomolgus macaques controlling viremia in the chronic phase after a simian-tropic HIV-1 challenge. The 29th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Seattle, WA, USA, 10/26/2011.
 - 15) Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Yoshida T, Yasutomi Y, Yakahashi N, Matano T, Adachi A, Akari H. Susceptibility of cynomolgus monkeys to monkey-tropic HIV-1 infection is determined by TRIM5α genotypes. The 29th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Seattle, WA, USA, 10/26/2011.
 - 16) 俣野哲朗. HIV 感染症の克服に向けて. 練馬医師会学術部主催学術講演会、東京、11/17/2011.
 - 17) 高橋尚史、齊藤暁、野間口雅子、松岡佐織、足立昭夫、明里宏文、俣野哲朗. サル指向性 HIV-1 感染慢性潜伏期のカニクイサルからの感染性ウイルスの回収. 第 25 回日本エイズ学会学術集会、東京、11/30/2011.
 - 18) 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.
 - 19) 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.
 - 20) 中根拓、山本浩之、俣野哲朗. サル免疫不全ウイルス感染急性期における非中和結合抗体の受動免疫の影響. 第 25 回日本エイズ学会学術集会、東京、11/30/2011.
 - 21) 齊藤暁、河野健、中山英美、足立昭夫、野間口雅子、保富康宏、俣野哲朗、塩田達雄、明里宏文. サル指向性 HIV-1 への感受性に影響を与えるマカクサル TRIM5 遺伝子の多様性. 第 25 回日本エイズ学会学術集会、東京、12/2/2011.
 - 22) 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.
- 23) 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.
- 24) 俣野哲朗. HIV 感染症の克服に向けて. 市民公開シンポジウム「エイズ克服への挑戦ーエイズの治療と予防の最先端ー」、名古屋、1/28/2012.
- 25) Matano T. HIV vaccine development. Symposium on Research and Quality Control of Vaccines, Beijing, China, 2/20/2012.
- 26) Watanabe K, Matsubara A, 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. Interantional Union of Microbiological Societies 2011, Sapporo, 9/11-17/2011.
- 27) Okamura T, Shimizu Y, Matsuo K, Yasutomi Y. Adjuvant molecule Ag85B cDNA insertion into live attenuated simian-human immunodeficiency virus enhances the SHIV-specific immune responses in Cynomolgous monkeys. Interantional Union of Microbiological Societies 2011, Sapporo, 9/11-17/2011.
- 28) 塩釜ゆみ子、河岡義裕、保富康宏. ヘルパーT細胞反応制御によるインフルエンザウイルス感染に対する免疫反応. 第152回日本獣医学学会、大阪、9/19-21/2011.
- 29) 塩釜ゆみ子、保富康宏. Th制御とインフルエンザ感染の関係. 第40回日本免疫学会、千葉、11/27-29/2011.
- 30) 岡村智崇、保富康宏. カニクイザルを用いたアジュバント組み込みサルヒト免疫不全ウイルスの効果. 第40回日本免疫学会、千葉、11/27-29/2011.
- 31) 和田剛、小原道法、保富康宏. C型慢性肝炎モデルマウスを用いた治療用DNAワクチンの評価. 第40回日本免疫学会、千葉、11/27-29/2011.
- 32) 辻村佑祐、保富康宏: 好酸菌分泌抗原 Ag85Bは局所にインターロイキン-17,-22を誘導することでアレルギー喘息の治療効果を促す. 第40回日本免疫学会、千葉、11/27-29/2011.
- 33) 渡邊健太、保富康宏. ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスベクターを用いた新規結核ワクチンの開発. 第40回日本免疫学会、千葉、11/27-29/2011.
- 34) 田尻和子、保富康宏. SOCS1遺伝子治療による自己免疫性心筋炎の制御効果の検討. 第40回日本免疫学会、千葉、11/27-29/2011.
- 35) 渡邊健太、松尾和浩、保富康宏. ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスをベクターとした新規結核ワクチンの開発. 第15回日本ワクチン学会、東京、12/10-11/2011.
- 36) Nomura S, Hosoya N, Kikuchi T, Koga M, Nakamura H, Koibuchi T, Fujii T, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Miura T. Replication capacities of chimeric NL4-3 encoding gag-protease from modern HIV-1 isolates are significantly reduced compared to those derived from isolates in the early days of epidemic in Japan. 6th IAS Conference on HIV pathogenesis, Treatment and Prevention, Rome, Italy, 7/17-22/2011.
- 37) 野村滋、菊地正、細谷紀彰、古賀道子、中村仁美、鯉渕智彦、藤井毅、立川愛、岩本愛吉、三浦聡之. 無症候慢性 HIV-1 陽性者由来 gag-protease を発現するキメラ NL4-3 ウイルス複製能の患者初診年による変化. 第25回日本エイズ学会学術集会、東京、11/30-12/2/2011.
- 38) Haraguchi H, Noda T, Kawaoka, Y, Morikawa Y. Human immunodeficiency virus GagPol negatively regulates its membrane binding and particle assembly. CSH Retrovirus Meeting, New York, 5/24/2011.
- 39) Haraguchi H, Noda T, Kawaoka, Y, Morikawa Y. The Pol region of human immunodeficiency virus GagPol negatively regulates its membrane binding and particle assembly. 第15回国際ウイルス学会、札幌、9/13/2011.
- 40) Fukuma A, Morikawa Y, Miyazawa T, Yasuda J. Establishment of feline cell line suitable for vaccine manufacturing. 第15回国際ウイルス学会、札幌、9/13/2011.
- 41) Ohkura T, Kikuchi Y, Kono N, Itamura S, Komase K, Momose F, Morikawa Y. Epitope mapping of neutralizing antibody in avian influenza A H5N1 virus hemagglutinin and construction of its single-chain variable fragment. 第15回国際ウイルス学会、札幌、9/13/2011.
- 42) Momose F, Sekimoto T, Ohkura T, Jo S, Kawaguchi A, Nagata K, Morikawa Y. Apical transport of influenza A virus ribonucleoprotein requires Rab11-positive recycling endosome. 第15回国際ウイルス学会、札幌、9/13/2011.
- 43) 中山順之、百瀬文隆、森川裕子. Rab蛋白質を指標とした HIV Gag蛋白質の細胞内輸送経

- 路の解析. 第34回日本分子生物学会学術集会、横浜、12/15-16/2011.
- 44) Mitsuki Y, Shibusawa K, Terahara K, Kobayashi K, Morikawa Y, Nakayama T, 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. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan, 9/11-16/2011.
- 45) 渋沢謙太郎、寺原和孝、石毛真行、光木裕也、横田(恒次) 恭子. 麻疹ウイルス偽型化 HIV-1 抑制性 shRNA 発現レンチウイルスベクターのヒト化マウスにおける in vivo 評価. 第25回日本エイズ学会学術集会、東京、11/30-12/2/2011.
- 46) 石毛真行、寺原和孝、渋沢謙太郎、光木裕也、池野翔太、小林和夫、岡田誠治、横田(恒次) 恭子. R5 および X4 HIV-1 同時感染ヒト化マウスモデルによる感染早期のウイルス優位性の解析. 第25回日本エイズ学会学術集会、東京、11/30-12/2/2011.
- 47) 佐藤裕徳、本村和嗣、大出裕高、横山勝. 免疫逃避を介しての生体内指向進化. 第11回日本蛋白質科学会年会、ワークショップ、大阪、2011.
- 48) Izumi T, Io K, Yokoyama M, Shinohara M, Shirakawa K, Matsui M, Uchiyama T, Sato H, Shindo K, Takaori-Kondo A. Arginine at position 122 of APOBEC3G might be involved in interaction to Vif, but not to RNA required for encapsidation. XV International Congress of Virology (International Union of Microbiological Societies 2011 Congress), Hokkaido, Japan, 9/11-16/2011.
- 49) Miyamoto T, Yokoyama M, Kono K, Shioda T, Sato H, Nakayama EE. A single amino acid of human immunodeficiency virus type 2 capsid protein affects conformation of two external loops and viral sensitivity to RRIM5 α . XV International Congress of Virology (International Union of Microbiological Societies 2011 Congress), Hokkaido, Japan, 9/11-16/2011.
- 50) Yokoyama M, Naganawa S, Yoshimura K, Matsushita S, Sato H. V3 region-regulated conformations of HIV-1 gp120 outer domain bring insights into structural mechanism of immune evasion. XV International Congress of Virology (International Union of Microbiological Societies 2011 Congress), Hokkaido, Japan, 9/11-16/2011.
- 51) 大出裕高、本村和嗣、横山勝、渦永博之、佐藤裕徳. Roche-454 Genome Sequencer FLX Titanium による HIV 準種解析系の構築. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、11/30-12/2/2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1 特許取得

- 1) 遺伝子導入用ウイルスベクターの製造方法(特願 2011-025234)
- 2) 新規な組換え BCG ワクチン (特願 2011-199422)

2 実用新案登録

なし。

3 その他

なし。

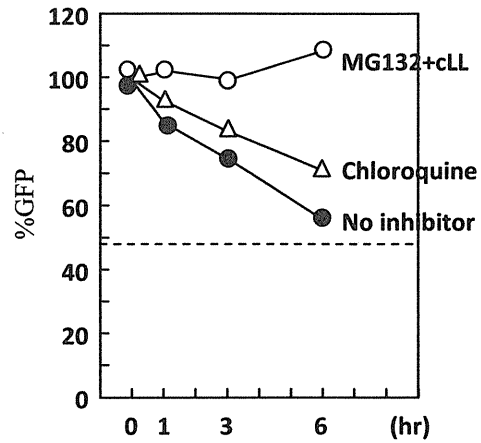


図1. 細胞内Gag抗原の経時的分解。

HeLa細胞にGag-GFPを発現させ、蛋白合成阻害剤サイクロヘキシミドを添加するとともに、プロテアソーム阻害剤 (MG132+cLL) あるいはリソソーム阻害剤 (Chloroquine) を加えて培養し、経時的にGFP蛍光量をプレートリーダーで測定した。新規蛋白合成を止めると細胞内のGag-GFP蛍光量は経時的に減少し、その半減期は約8時間と概算された。クロロキン処理ではGag-GFP減少を止められなかったが、プロテアソーム阻害剤を処理すると減少が見られなくなったことから、分解の主な経路はプロテアソーム経路であると考えられた。

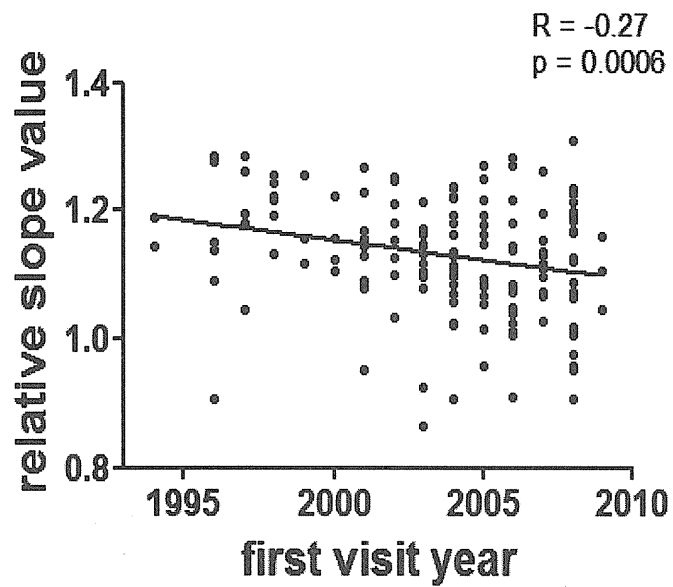


図2. 感染者由来gag-pro組込みHIV-1の複製能と初診年との逆相関。
 初診時HIV-1感染者由来のgag-proを組込んだHIV-1のin vitro複製能と初診年との間に有意な逆相関が認められた (clade B, n = 156)。

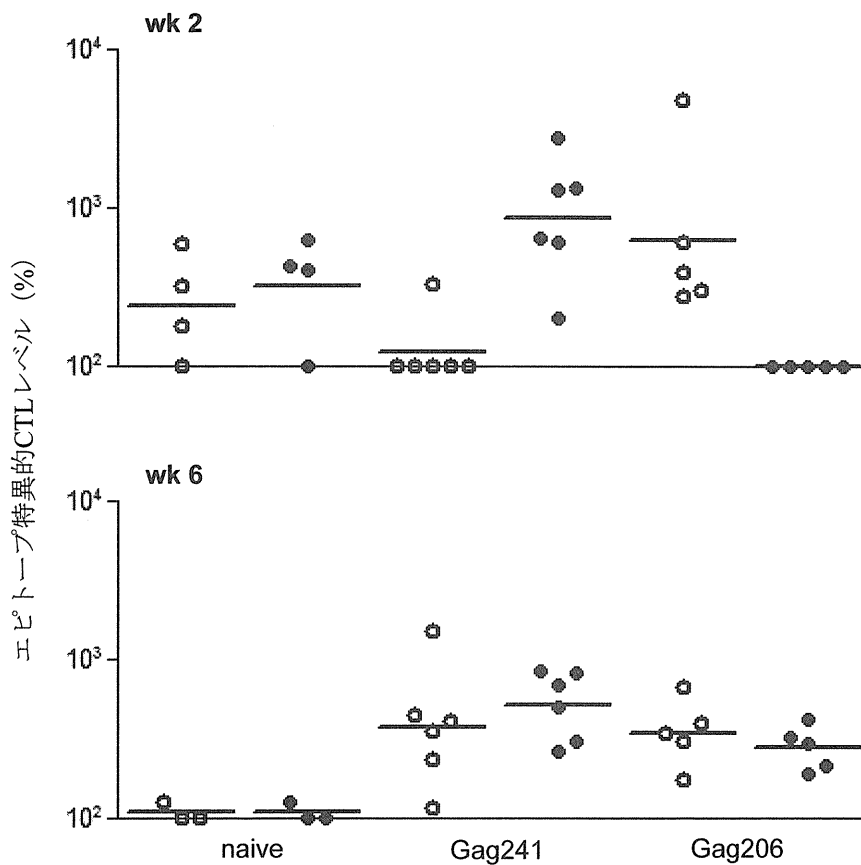


図3. 単独エピトープ特異的CTLメモリー誘導のSIV曝露後のCTL反応への影響。
 非ワクチン接種群 (naive)、Gag241-249エピトープ特異的CTL誘導ワクチン接種群 (Gag241)、
 Gag206-216エピトープ特異的CTL誘導ワクチン接種群 (Gag206) について、SIVチャレンジ後2週
 目および6週目のGag206-216特異的CTL反応 (白丸) とGag241-249特異的CTL反応 (黒丸) を調べ
 た。2週目には、Gag241群ではGag241特異的CTL反応が優位となり、Gag206特異的CTL誘導の遅
 延が認められ、Gag206群ではGag206特異的CTL反応が優位となり、Gag241特異的CTL誘導の遅延
 が認められた。

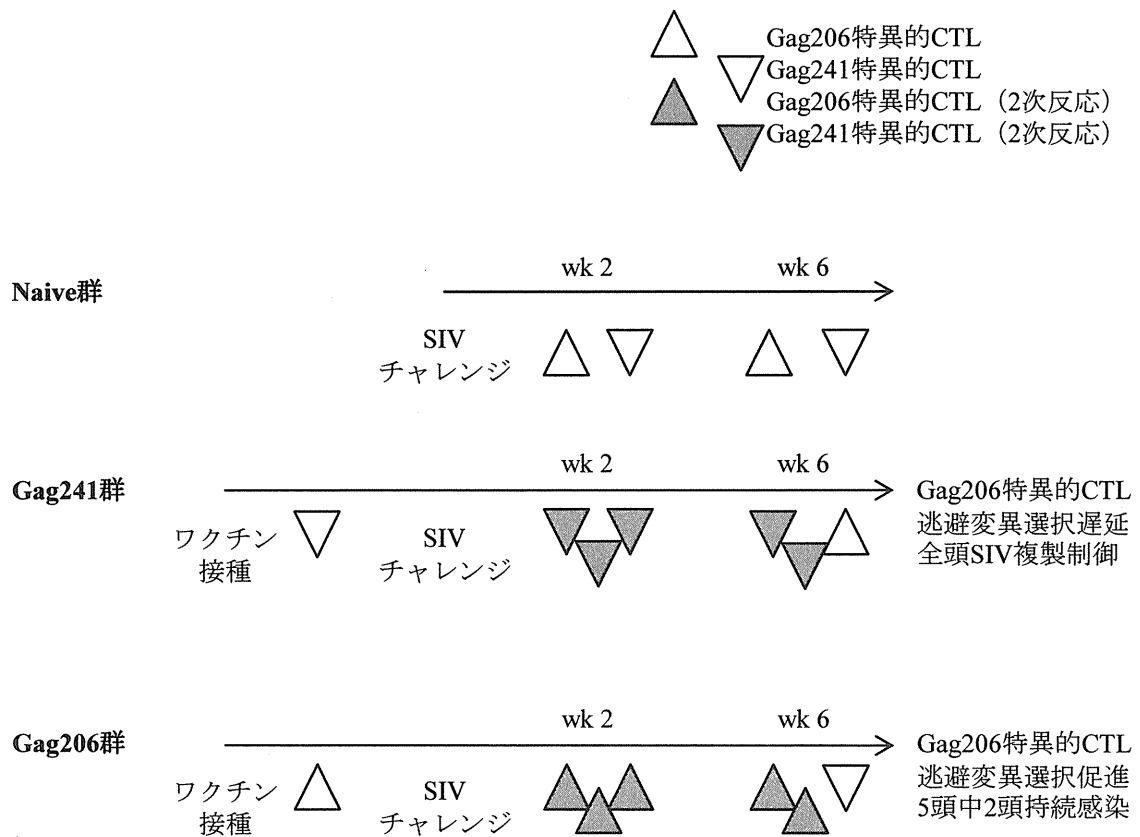


図4. エピトープ特異的CTLメモリー誘導効果を示すシエーマ。
 SIV曝露後、Gag241群では、メモリー由来のGag241特異的CTL反応が優位となり、さらにナイーブ由来のGag206特異的CTL反応も加わってSIV複製制御にいたる。Gag206群では、メモリー由来のGag206特異的CTL反応が優位となるが、Gag206特異的CTL逃避変異選択が加速されることもあり、SIV複製制御にいたらない頻度が比較的高い。

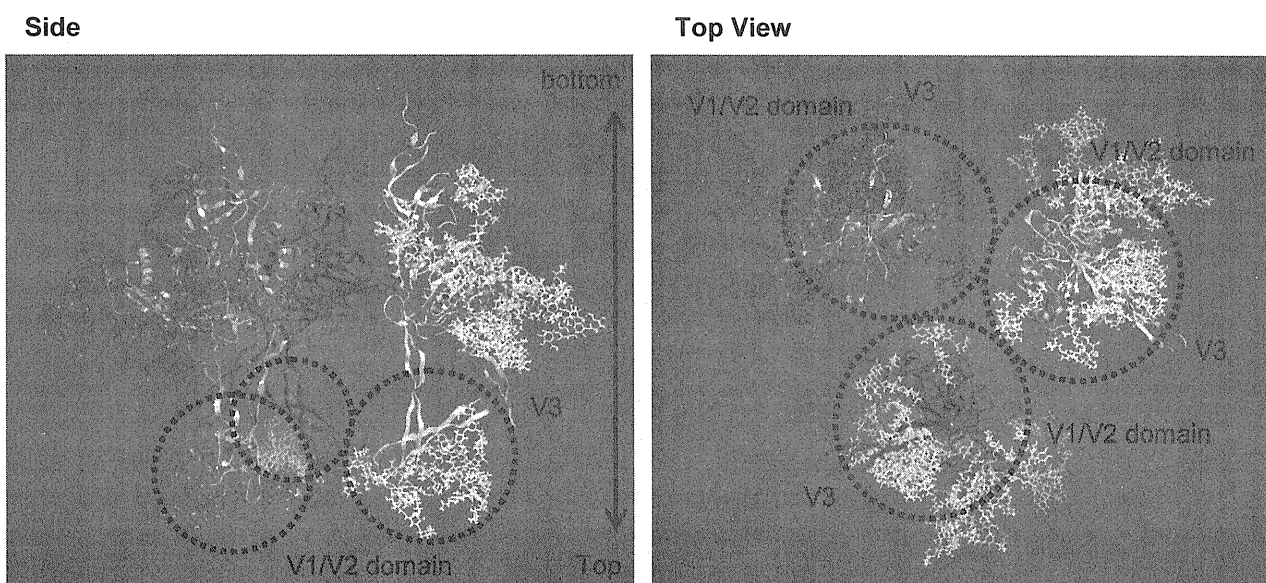


図5. V1/V2ループを含む糖鎖付HIV-1 gp120三量体分子モデル。
 ホモロジーモデリング法および分子動力学計算により構築したHIV-1 gp120分子モデルを、クライオ電子顕微鏡法により得られた構造に重ね合わせることで構築した。

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に向け、ワクチン誘導免疫の HIV 複製防御効果の解明を進めるものである。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、有望な CTL 誘導ワクチンデリバリーシステム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 21-22 年度は、サルモデルにて SeV ベクターの接種量と接種経路の解析を行い、従来の 1/10 量でも十分な CTL 誘導能を有することを示すと同時に、筋注では抗 SeV 抗体存在下で CTL 誘導が妨げられるが、経鼻接種では抗 SeV 抗体存在下でも効率よい CTL 誘導に至ることを明らかにした。一方、抗原選択に関する研究では、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結果を得た。平成 23 年度は、MHC-I ハプロタイプ A 共有サル群を用い、予防ワクチンによる Gag206-216 エピトープ特異的 CTL 誘導と Gag241-249 エピトープ特異的 CTL 誘導の効果を比較検討した。Gag206 特異的 CTL 誘導群では、SIV 曝露後 Gag206 特異的 CTL 反応が優位となるが、この CTL に対する逃避変異選択が加速され、SIV 複製の制御が困難になる現象が認められた。一方、Gag241 特異的 CTL 誘導群では、SIV 曝露後 Gag241 特異的 CTL 反応が優位となり、その後 Gag206 特異的 CTL 反応も加わって、SIV 複製制御に結びつくことが示された。これらの結果は、CTL 誘導ワクチンで選択する抗原の違いが、HIV 曝露後のワクチン抗原特異的 CTL 反応と非ワクチン抗原特異的 CTL 反応の優位性および協調パターンに大きく影響し、HIV 複製制御の有無を左右しうることを示しており、CTL 誘導エイズワクチンの抗原選択において極めて重要な知見を与えるものである。

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。

我々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 反応の選択的誘導に関する研究を推進することとした。

平成 21-22 年度は、サルモデルにて SeV ベクターの接種量と接種経路の解析を行い、従来の 1/10 量でも十分な CTL 誘導能を有することを示すと同時に、筋注では抗 SeV 抗体存在下で CTL 誘導が妨げられるが、経鼻接種では抗 SeV 抗体存在下でも効率よい CTL 誘導に至ることを明らかにし