

201210003A

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 俣野 哲朗

平成25（2013）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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 俣野 哲朗

平成25（2013）年 3月

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 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 薬併用療法（ART）によるエイズ発症阻止にはほぼ一生涯にわたる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等に加え医療費高騰が大きな問題となる。したがって、HIV 増殖抑制に重要な細胞傷害性 T リンパ球（CTL）を ART 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法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科学的根拠を獲得することを目的とした。有効な CTL の標的抗原候補として Gag・Vif 抗原を選択し、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 反応が元来優位となる個体とそうでない個体にて検証することとした。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 ART 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。平成 24 年度は実験頭数を増やして解析を完了し、W/S 共有群だけでなく E 共有群においても、ART 中止後も含め Gag・Vif 特異的 CTL 反応を優位とすることが可能であることを明らかにした。さらに ART 中止後の解析から、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確認された。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重要である。サル MHC-I 遺伝子多型解析では、我々の実験系に用いられるビルマ産アカゲサル集団の大部分のアレル同定を完了した。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、MHC 関連遺伝子群の多様性解析も展開し、大きな遺伝子多様性を有する ULBP2（活性化 NK レセプター NKG2D のリガンド）の多型の一部は分子表面に存在し、推定される NKG2D レセプターとの結合面にも分布していることを見出した。以上、本研究の治療ワクチン実験で得られた結果は、治療エイズワクチンで Gag・Vif 抗原を標的とする CTL 反応を誘導することの合理性を支持するものとして重要な成果である。

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 薬併用療法（ART）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

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、これらの課題克服に向け、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。ART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) 反応も減弱することから、治療エイズワクチンで CTL 反応を誘導することによって、より強固な HIV 複製制御状態を維持することを目指し、最終的には抗 HIV 薬投薬量・期間の軽減に結びつくことを期待するものである。

我々はこれまで、世界有数の CTL 誘導能を有するセンドライウイルス (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科学的根拠の獲得を目的とする。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、これらの抗原特異的 CTL 反応がもともと SIV 感染で優位となる個体群と、優位とならない個体群の両者において検討を行うこととした。

平成 24 年度は、優位な Gag・Vif 特異的 CTL 反応と関連しない MHC-I ハプロタイプ E を共有するサル群と関連する W/S を共有するサル群を用い、前年度より開始した治療ワクチン実験に頭数を追加して解析を完了した。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、サル

MHC-I 遺伝子群および MHC 関連遺伝子群の多様性解析研究を継続し進展させた。

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 5 頭および W/S 共有アカゲサル 5 頭を用い、SIVmac239 チャレンジ後、経時的に血漿中ウイルス量および SIV 抗原特異的 CTL 反応を解析した。全頭に 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、ART として投与した。治療ワクチン接種群 6 頭 (E 共有群 3 頭、W/S 共有群 3 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 ベクターと SeV-Vif ベクターを経鼻接種し、2 回目には抗 SIV 中和抗体静注を加えた。治療ワクチン効果の検討目的で、2 回目の治療ワクチン接種後 ART を中止し、治療ワクチン接種群と対照群 (非接種群) 間で比較検討を行った。

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。さらにヒト ULBP3 と NKG2D との結晶解析結果を参考にして 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。

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 チャレンジ後いずれのサルも持続感染を呈した。12 週目の ART 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。32 週目に ART 中止した後の解析で、治療ワクチン接種群は対照群と比べウイルス血症出現が約 1 週間遅れる傾向を示した。治療ワクチン接種群では、ART 開始直前（12 週目）と比べて ART 終了後 3 か月目（45 週目）のウイルス量が低下しており、前者に対する後者の比は、対照群に比べ有意に低値を示した。

感染初期 ART 開始前まで、E 共有群では Gag・Vif 以外の主に Nef 抗原を標的とする CTL 反応が優位で、Gag・Vif 特異的 CTL 反応は優位ではなかった。一方、W/S 共有群では Gag あるいは Vif 特異的 CTL 反応が優位となる傾向にあった。ART 開始後、全頭で SIV 抗原特異的 CTL 反応の減弱がみられたが、26 週目の 1 回目の治療ワクチン接種後、E 共有群・W/S 共有群のいずれにおいても、Gag・Vif 特異的 CTL 反応の誘導が認められた。治療ワクチン接種群では、W/S 共有群だけでなく E 共有群においても、ART 終了後にわたって Gag・Vif 抗原特異的 CTL 反応がより優位となっていた。

サル MHC-I 遺伝子多型解析では、我々の実験系に用いられるビルマ産アカゲサル集団の大部分のアレル同定を完了した。MHC 関連遺伝子群の多様性解析では、特に、活性化 NK レセプター NKG2D のリガンド ULBP2 の遺伝子多型解析を進展させ、多型の一部は分子表面に存在し、推定された NKG2D レセプターとの結合面にも分布していることを見出した。

D. 考察

治療ワクチン接種によって、W/S 共有群では、元来 SIV 感染で優位となる Gag・Vif 特異的 CTL 反応が増強される結果が得られた。E 共有群では、元来 SIV 感染で優位とならない Gag・Vif 特異的 CTL 反応が、治療ワクチン接種により誘導された。

特に ART 終了後 SIV の各抗原特異的 CTL 反応が誘導される状況においても Gag・Vif 特異的 CTL 反応が優位となったことは、有効性に乏しい CTL より、高い有効性が期待される Gag・Vif 特異的 CTL 反応を優位とすることが可能であることを示すものであり、重要な結果である。

治療ワクチン接種群の血漿ウイルス量は、ART 中止後、対照群と比較して有意に低値を示した。この結果は、本治療ワクチンによって、ART 終了が可能となるような機能的治癒には至らないものの、より強固なウイルス複製制御状態に至ったことを示唆するものである。本研究結果は、優位な Gag・Vif 抗原特異的 CTL 反応と相関する MHC-I を有する個体であっても有しない個体であっても、治療エイズワクチンで Gag・Vif 抗原を標的とする CTL 反応を誘導することの合理性を支持するものとして重要な成果である。

サル MHC-I 遺伝子群および MHC-I 関連遺伝子群の多様性解析の進展は、このような治療ワクチンの有効性に関与する宿主因子の解明に貢献しうることに加え、ワクチン効果の評価の正確性向上に結びつくことが期待される。

E. 結論

サルエイズモデルにおいて、ART 下の SeV-Gag および 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、優位な Gag・Vif 特異的 CTL 反応と関連する MHC-I を有する個体であっても有しない個体であっても、Gag・Vif 特異的 CTL 反応を優位に誘導できることを示した。さらに、治療ワクチン接種群では対照群と比べ有意に強く SIV 増殖が抑制されていることを示す結果を得た。本研究成果は、Gag・Vif 抗原を標的とする CTL 反応を誘導する治療エイズワクチンの有効性を示すものとして重要である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

- 1 論文発表
- 1) Nomura T, Yamamoto H, Shiino T, Takahashi N, Nakane T, Iwamoto N, Ishii H, Tsukamoto T, Kawada M, Matsuoka S, Takeda A, Terahara K, Tsunetsugu-Yokota Y, Iwata-Yoshikawa N, Hasegawa H, Sata T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Association of major histocompatibility complex class I haplotypes with disease progression after simian immunodeficiency virus challenge in Burmese rhesus macaques. *J Virol* 86:6481-6490, 2012.
 - 2) Nomura T, Matano T. Association of MHC-I genotypes with disease progression in HIV/SIV infections. *Front Microbiol* 3:234, 2012.
 - 3) Kurihara K, Takahara Y, Nomura T, Ishii H, Iwamoto N, Takahashi N, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Moriya C, Matano T. Immunogenicity of repeated Sendai viral vector vaccination in macaques. *Microbes Infect* 14:1169-1176, 2012.
 - 4) Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Saito A, Akari H, Yasutomi Y, Matano T, Sato H, Adachi, A. Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. *Microbes Infect* 15:56-65, 2013.
 - 5) Takahashi N, Nomura T, Takahara Y, Yamamoto H, Shiino T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Sakawaki H, Miura T, Igarashi T, Koyanagi Y, Naruse TK, Kimura A, Matano T. A novel protective MHC-I haplotype not associated with dominant Gag-specific CD8+ T-cell responses in SIVmac239 infection of Burmese rhesus macaques. *PLoS ONE* 8:e54300, 2013.
 - 6) Ohtani H, Naruse TK, Iwasaki Y, Akari H, Ishida T, Matano T, Kimura A. Lineage-specific evolution of T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 gene in the primates. *Immunogenetics* 64(9): 669-678, 2012.
 - 7) Sharma G, Ohtani H, Kaur G, Naruse TK, Sharma SK, Vajpayee M, Kimura A, Mehra NK. Status of TIM-1 exon 4 haplotypes and CD4+T cell counts in HIV-1 seroprevalent North Indians. *Hum Immunol* 74(2):163-165, 2013.
 - 8) Nakayama EE, Nakajima T, Kaur G, Miyama J, Terunuma H, Mehra NK, Kimura A, Shioda T. A naturally occurring single amino acid substitution in human TRIM5a linker region affects its anti-HIV-1 activity and susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*, in press.
- 2 学会発表
- 1) 俣野哲朗. HIV 感染症におけるウイルスと宿主細胞性免疫の相互作用. 平成 24 年度遺伝子病制御研究所研究集会: 感染・免疫・炎症・発癌、札幌、6/19/2012.
 - 2) Takahara Y, Nakamura M, Matsuoka S, Sakawaki H, Miura T, Igarashi T, Koyanagi Y, Naruse T, Kimura A, Matano T. Impact of therapeutic vaccination on CTL immunodominance and viral suppression in SIV-infected rhesus macaques under HAART. Towards an HIV cure, Pre-conference symposium and The XIXth International AIDS Conference, Washington, DC, USA, 7/21 & 7/26/2012.
 - 3) Matano T. SIV control by vaccine-based Gag/Vif-specific CTL induction. 14th Annual International Meeting, Institute of Human Virology, Baltimore, MA, USA, 10/16/2012.
 - 4) Matano T. Stable viral control in the presence of silent proviruses in a macaque AIDS model. The 13th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 10/24/2012.
 - 5) 高橋尚史、野村拓志、高原悠佑、山本浩之、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗. サルエイズモデルにおける Gag 以外のウイルス抗原特異的 CTL 反応が関与する SIV 複製抑制機序. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、11/13/2012.

- 6) 石井洋、野村拓志、高橋尚史、高原悠佑、松岡佐織、俣野哲朗。SIV 感染アカゲザルにおける各ウイルスタンパク抗原特異的 CTL 反応の網羅的解析。第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、11/14/2012.
- 7) 野村拓志、山本浩之、明里宏文、俣野哲朗。SIV 複製抑制マカクサルにおける CTL 逃避変異体の選択による複製抑制破綻機構の解析。第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、11/14/2012.
- 8) 俣野哲朗。エイズワクチン開発。ポスト日本ワクチン学会シンポ・サテライトシンポジウム、東京、11/19/2012.
- 9) 高橋尚史、山本浩之、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗。サルエイズモデルにおける Nef 抗原特異的細胞傷害性 T リンパ球反応が関与するウイルス複製制御機序に関する研究。第 26 回日本エイズ学会学術集会、横浜、11/24/2012.
- 10) 中村碧、高原悠佑、松岡佐織、阪脇廣美、三浦智行、五十嵐樹彦、小柳義夫、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗。サルエイズモデルにおける抗 HIV 薬投与下の CTL 反応誘導型治療ワクチン接種効果の解析。第 26 回日本エイズ学会学術集会、横浜、11/26/2012.
- 11) 安健博、中島敏晶、柴田宏樹、成瀬妙子、有村卓朗、安波道郎、木村彰方。NFKBIL1 はヒトおよびウイルス遺伝子のスプライシングを制御する。第 21 回日本組織適合性学会、東京、9/15/2012.
- 12) 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 遺伝子の多様性解析。第 21 回日本組織適合性学会、東京、9/15/2012.
- 13) 成瀬妙子、小西真紀子、柳田梨紗、照沼裕、Gaurav Sharma, Gurvinder Kaur, Narinder K Mehra, 木村彰方。HIV/AIDS 感受性の個体差と KIR, HLA 遺伝子多型。第 21 回日本組織適合性学会、東京、9/16/2012.
- 14) 木村彰方、大谷仁志、成瀬妙子、Gaurav Sharma, Gurvinder Kaur, Narinder K Mehra, 明里宏文、石田貴文、俣野哲朗。霊長類における TIM1 遺伝子進化と HIV/AIDS。第 21 回日本組織適合性学会、東京、9/16/2012.
- 15) 安健博、中島敏晶、柴田宏樹、成瀬妙子、有村卓朗、安波道郎、木村彰方。HLA 領域内の NFKBIL1 はヒトおよびウイルス遺伝子の選択的スプライシングを制御する。日本人類遺伝学会、東京、10/25/2012.
- 16) 成瀬妙子、森一泰、明里宏文、俣野哲朗、木村彰方。旧世界ザル ULBP2/RAET1H 遺伝子の多様性解析。日本人類遺伝学会、東京、10/25/2012.
- 17) Takahashi N, Nomura T, Takahara Y, Yamamoto H, Naruse T, Kimura A, Matano T. A protective MHC-I haplotype not associated with Gag-specific CD8+ T-cell responses in SIVmac239 infection of rhesus macaques. 30th Annual Symposium in Nonhuman Primate Models for AIDS, USA, Oct. 2012.
- 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 薬治療 (ART) により HIV 感染者体内でのウイルス増殖抑制が可能となったが、エイズ発症阻止のためにはほぼ生涯にわたる長期間の ART 継続が必要となる。ART 中では体内抗原量の低下に基づき、ウイルス増殖抑制に重要な役割を担う HIV 特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 反応も減弱することが知られている。治療エイズワクチンはこのような ART 中の HIV 感染者を対象とするもので、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することを目指し、投薬量・期間の軽減の可能性を追求するものである。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獲得を目的とした。有効な CTL の標的抗原候補蛋白である Gag 抗原と Vif 抗原に着目し、サルエイズモデルにおいて優位な Gag・Vif 抗原特異的 CTL 反応に結びつく MHC-I ハプロタイプ W/S を共有する群と結びつかない MHC-I ハプロタイプ E を共有する群の両者において検討を行うこととした。ART 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、2 回目には抗 SIV 中和抗体接種を併用した。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、ART 開始後 CTL 反応の減弱がみられたが、治療ワクチン接種によって ART 終了後も Gag・Vif 特異的 CTL 反応がより優位に誘導された。一方 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、ART 開始後 CTL 反応の減弱がみられたが、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 ART 終了後も優位であった。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。対照群と比較して治療ワクチン接種群では、ART 中止後約 3 か月の血漿中ウイルス量が ART 開始前より有意に低下しており、ART 中の治療ワクチン接種によってより強固なウイルス複製制御状態となっていることが示唆された。本研究結果は、優位な Gag・Vif 抗原特異的 CTL 反応と関連する MHC-I を有する個体であっても有しない個体であっても、治療エイズワクチンで Gag・Vif 抗原を標的とする CTL 反応を誘導することの合理性を支持するものとして重要な成果である。

A. 研究目的

1990 年代後半以降、抗 HIV 薬併用療法 (ART) の導入によりエイズ発症の抑制が可能となってきた。しかし、ART によっても HIV 感染者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 ART 継続が必要となる。治療エイズワクチンは、このような ART 中の HIV 感染者を対象とし、まず第一には ART の長期的有効性の確立を目的とするものである。

細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 反応は HIV 複製抑制に中心的な役割を果たすが、ART による体内抗原量低下に基づき HIV 抗原特異的 CTL 反応も減弱することが知られている。本研究の治療エイズワクチンは、HIV 感染者の ART 中に 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維持を目指し、投薬量・期間の軽減の可能性を追求するものである。

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、サル免疫不全ウイルス (SIV) 感染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。さらにこれらの抗原特異的 CTL 反応がもともと SIV 感染で優位となる個体群と、優位とならない個体群の両者において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 年度の解析により優位な Gag・Vif 特異的 CTL 反応に相関しない MHC-I ハプロタイプ E 共有群と相関する W/S 共有群を使用することに決定した。平成 23 年度より SIV 感染後 ART 中の SeV-Gag ベクターおよび SeV-Vif ベクターの治療ワクチン実験を開始し、平成 24 年度には頭数を追加するとともに解析を完了した。

B. 研究方法

MHC-I ハプロタイプ E 共有アカゲサル 5 頭および W/S 共有アカゲサル 5 頭を用い、SIVmac239 チャレンジ後、経時的に血漿中ウイルス量および

SIV 抗原特異的 CTL 反応を解析した。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 γ を細胞内免疫染色で検出することにより測定した。

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)、ピリアード (TDF)、カレトラ (LPV/RTV) を混入した餌を ART として投与した。治療ワクチン接種群 6 頭 (E 共有群 3 頭、W/S 共有群 3 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、2 回目には抗 SIV 中和抗体静注を加えた。治療ワクチン効果の検討目的で、2 回目の治療ワクチン接種後 ART を中止し、治療ワクチン接種群と対照群 (非接種群) 間でウイルス血症再出現の比較検討を行った。

(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のものである。

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。感染後 12 週目に ART 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 (図 1)。

感染後 32 週目に治療ワクチン接種を行い ART 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、対照群と比べ、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。治療ワクチン接種群では、ART 開始直前 (感染後 12 週目) と比べて ART 終了後 3 か月目 (感染後 45 週目) のウイルス量が低下しており、両者の比は、治療ワクチン接種群では対照群に比べ有意に低値を示した (図 2)。

感染初期（感染後 12 週目：図 3）、E 共有群では Gag・Vif 以外の主に Nef 抗原を標的とする CTL 反応が優位で、Gag・Vif 特異的 CTL 反応は優位ではなかった。一方、W/S 共有群では Gag あるいは Vif 特異的 CTL 反応が優位となる傾向にあった。

ART 開始後、全頭でこれらの SIV 抗原特異的 CTL 反応の減弱がみられたが、感染後 26 週目の 1 回目の治療ワクチン接種後、E 共有群・W/S 共有群のいずれにおいても、Gag・Vif 特異的 CTL 反応の誘導が認められた（30 週目：図 3）。ART 終了後、各種 SIV 抗原特異的 CTL 反応の誘導が認められたが、治療ワクチン接種群では、W/S 共有群だけでなく E 共有群においても、Gag・Vif 特異的 CTL 反応がより優位となっていた（34 週目：図 3）。

D. 考察

W/S 共有群では、元来 SIV 感染で優位となる Gag・Vif 特異的 CTL 反応が治療ワクチン接種によって増強される結果が得られた。E 共有群では、元来 SIV 感染で優位とならない Gag・Vif 特異的 CTL 反応が、治療ワクチン接種により誘導された。特に ART 終了後 SIV の各抗原特異的 CTL 反応が誘導される状況においても Gag・Vif 特異的 CTL 反応が優位となったことは、有効性に乏しい CTL より、高い有効性が期待される Gag・Vif 特異的 CTL 反応を優位とすることが可能であることを示すものであり、重要な結果である。

治療ワクチン接種群において、ART 中止後ウイルス血症の再出現が認められたが、再出現が遅延する傾向が認められただけでなく、血漿ウイルス量も対照群と比較して有意に低値を示した。この結果は、本治療ワクチンによって、ART 終了が可能となるような機能的治癒には至らないものの、より強固なウイルス複製制御状態に至ったことを示唆するものである。つまり、優位な Gag・Vif 抗原特異的 CTL 反応と相関する MHC-I を有する個体であっても有しない個体であっても、治療エイズワクチンで Gag・Vif 抗原を標的とする CTL 反応を誘導することの合理性を支持するものと

して重要な成果である。

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、優位な Gag・Vif 抗原特異的 CTL 反応と相関する MHC-I を有する個体であっても有しない個体であっても、Gag・Vif 特異的 CTL 反応を優位に誘導できることを示した。ART 中止後の解析により、治療ワクチン接種群では対照群と比べ有意に強く SIV 増殖が抑制されていることを示す結果が得られた。本結果は、Gag・Vif 抗原を標的とする CTL 反応を誘導する治療エイズワクチンの有効性を示すものとして重要な成果である。

F. 研究発表

1 論文発表

- 1) Nomura T, Yamamoto H, Shiino T, Takahashi N, Nakane T, Iwamoto N, Ishii H, Tsukamoto T, Kawada M, Matsuoka S, Takeda A, Terahara K, Tsunetsugu-Yokota Y, Iwata-Yoshikawa N, Hasegawa H, Sata T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Association of major histocompatibility complex class I haplotypes with disease progression after simian immunodeficiency virus challenge in Burmese rhesus macaques. *J Virol* 86:6481-6490, 2012.
- 2) Ohtani H, Naruse TK, Iwasaki Y, Akari H, Ishida T, Matano T, Kimura A. Lineage-specific evolution of T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 gene in the primates. *Immunogenetics* 64:669-678, 2012.
- 3) Nomura T, Matano T. Association of MHC-I genotypes with disease progression in HIV/SIV infections. *Front Microbiol* 3:234, 2012.
- 4) Kurihara K, Takahara Y, Nomura T, Ishii H, Iwamoto N, Takahashi N, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Moriya C, Matano T. Immunogenicity of repeated Sendai viral vector

vaccination in macaques. *Microbes Infect* 14:1169-1176, 2012.

- 5) Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Saito A, Akari H, Yasutomi Y, Matano T, Sato H, Adachi, A. Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. *Microbes Infect* 15:56-65, 2013.
- 6) Takahashi N, Nomura T, Takahara Y, Yamamoto H, Shiino T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Sakawaki H, Miura T, Igarashi T, Koyanagi Y, Naruse TK, Kimura A, Matano T. A novel protective MHC-I haplotype not associated with dominant Gag-specific CD8+ T-cell responses in SIVmac239 infection of Burmese rhesus macaques. *PLoS ONE* 8:e54300, 2013.

2 学会発表

- 1) 俣野哲朗. HIV 感染症におけるウイルスと宿主細胞性免疫の相互作用. 平成 24 年度遺伝子病制御研究所研究集会: 感染・免疫・炎症・発癌、札幌、6/19/2012.
- 2) Takahara Y, Nakamura M, Matsuoka S, Sakawaki H, Miura T, Igarashi T, Koyanagi Y, Naruse T, Kimura A, Matano T. Impact of therapeutic vaccination on CTL immunodominance and viral suppression in SIV-infected rhesus macaques under HAART. Towards an HIV cure, Pre-conference symposium and The XIXth International AIDS Conference, Washington, DC, USA, 7/21 & 7/26/2012.
- 3) Matano T. SIV control by vaccine-based Gag/Vif-specific CTL induction. 14th Annual International Meeting, Institute of Human Virology, Baltimore, MA, USA, 10/16/2012.
- 4) Matano T. Stable viral control in the presence of silent proviruses in a macaque AIDS model. The 13th Kumamoto AIDS

Seminar, Kumamoto, Japan, 10/24/2012.

- 5) 高橋尚史、野村拓志、高原悠佑、山本浩之、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗. サルエイズモデルにおける Gag 以外のウイルス抗原特異的 CTL 反応が関与する SIV 複製抑制機序. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、11/13/2012.
- 6) 石井洋、野村拓志、高橋尚史、高原悠佑、松岡佐織、俣野哲朗. SIV 感染アカゲザルにおける各ウイルスタンパク抗原特異的 CTL 反応の網羅的解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、11/14/2012.
- 7) 野村拓志、山本浩之、明里宏文、俣野哲朗. SIV 複製抑制マカクサルにおける CTL 逃避変異体の選択による複製抑制破綻機構の解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、11/14/2012.
- 8) 俣野哲朗. エイズワクチン開発. ポスト日本ワクチン学会シンポ・サテライトシンポジウム、東京、11/19/2012.
- 9) 高橋尚史、山本浩之、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗. サルエイズモデルにおける Nef 抗原特異的細胞傷害性 T リンパ球反応が関与するウイルス複製制御機序に関する研究. 第 26 回日本エイズ学会学術集会、横浜、11/24/2012.
- 10) 中村碧、高原悠佑、松岡佐織、阪脇廣美、三浦智行、五十嵐樹彦、小柳義夫、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗. サルエイズモデルにおける抗 HIV 薬投与下の CTL 反応誘導型治療ワクチン接種効果の解析. 第 26 回日本エイズ学会学術集会、横浜、11/26/2012.

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。

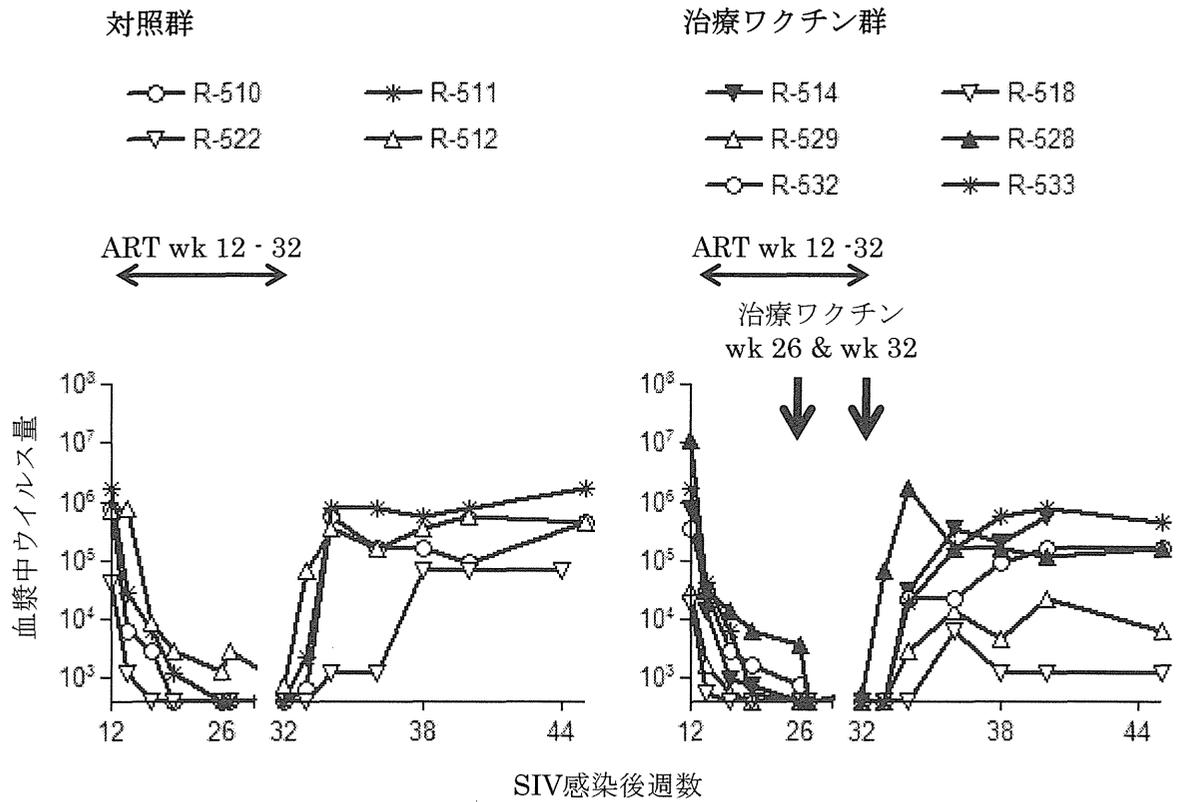


図1. 血漿中ウイルス量の経時変化

対照群（左、n = 4）と治療ワクチン群（右、n = 6）の抗HIV薬治療（ART）開始後の血漿中ウイルス量（コピー数/ml）の経時変化を示す。全頭、SIV感染後第12-32週にARTを受けた。治療ワクチン接種群、第26週と第32週に治療ワクチンを受けた。

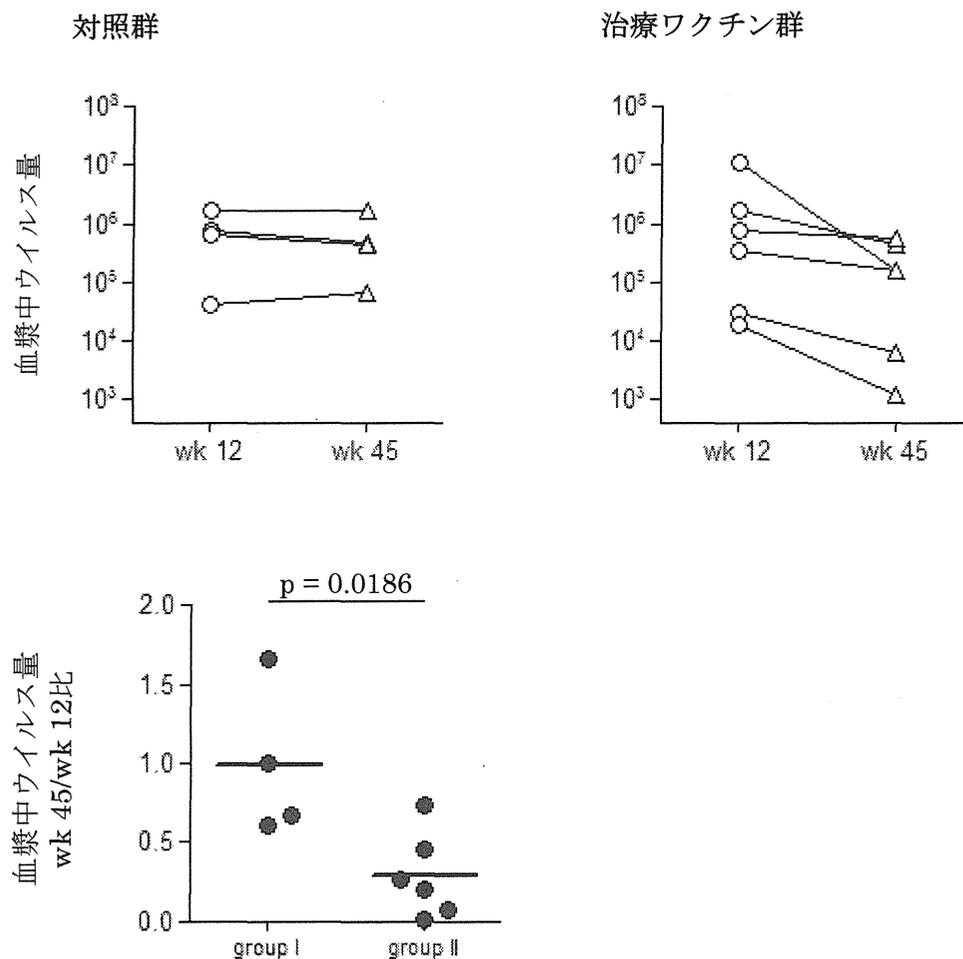


図2. ART前後の血漿中ウイルス量の比較

上段：対照群（左、n = 4）と治療ワクチン群（右、n = 6）のART開始直前（SIV感染後12週目 [wk 12]）とART終了後3か月（wk 45、R-514はwk 40）の血漿中ウイルス量（コピー数/ml）。

下段：wk 45とwk 12の血漿中ウイルス量の比。対照群（group I）と比較して、治療ワクチン接種群（group II）は有意に低値を示した（p = 0.0186 by t-test）。

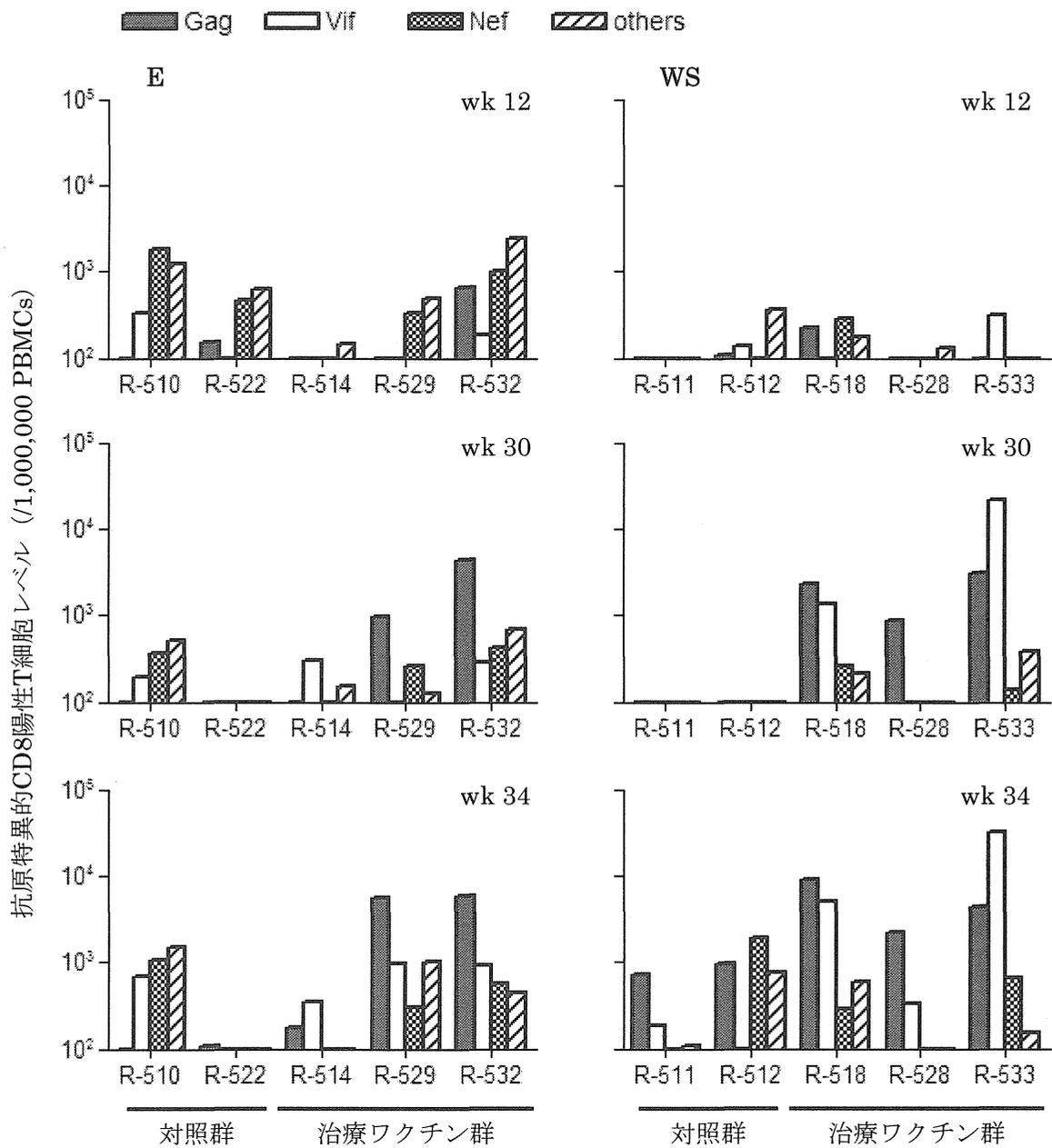


図3. 抗原特異的CTL反応

ART開始直前 (wk 12)、ART中1回目の治療ワクチン接種後1か月 (wk 30) および2回目の治療ワクチン接種・ART終了後2週間 (wk 34) のE共有群 (左) およびWS共有群 (右) におけるGag、Vif、Nefおよび他のSIV抗原特異的CTLレベルを示す。

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 実験に用いる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、昨年度に引き続き NKG2D レセプターのリガンドである ULBP2 遺伝子の多様性を検討した。その結果、アカゲザル、カニクイザルともに、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、旧世界ザルに共通して、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、アカゲザル ULBP2.1 の多型の一部は分子表面に存在しており、ヒト ULBP3-NKG2D レセプターの結晶構造から推定される結合面にも多型が分布していた。これに対して、カニクイザルでは ULBP2.2 の多型の一部が分子表面に分布することが判明した。このことは、旧世界ザルでは ULBP2.1 もしくは ULBP2.2 のどちらか一方のみで NKG2D レセプターとの結合多様性を示し、他の ULBP 遺伝子とは異なる機能を有することを示唆する。一方、ヒト MHC (HLA) 領域内に存在し、自己免疫疾患と関連することが知られている機能不明な遺伝子 NFKBIL1 について解析し、これがコードする IκBL タンパクが、核スペckルに分布すること、cdc-like kinase 1 (CLK1) と結合すること、CLK1 による CD45 および CTLA4 遺伝子のスプライシング促進を抑制すること、さらに CLK1 によるインフルエンザウイルスの M 遺伝子のスプライシング促進を抑制することを明らかにした。NFKBIL1 の発現性には個体差があり、これがプロモーター多型に依存することから、免疫制御やウイルス感染応答における個体差形成に関わるものと考えられた。これとは別に、比較ゲノム解析を用いた進化医学的手法によって、TIM1 遺伝子に続いて、新たに OAS1 が霊長類において進化選択圧を強く受ける遺伝子であることを見出した。

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。また、進化医学的手法を用いて、霊長類において強い進化選択圧を受けた遺伝子を抽出し、これを候補遺伝子として、HIV/AIDS との関連を検討することを合わせて目的とする。

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使用する可能性がある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 80 個体である。
- 2) MHC クラス I 様遺伝子群の解析：アカゲザル 28 個体およびカニクイザル 26 個体を対象として、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。さらに、ヒト ULBP3 と NKG2D との結晶解析結果を参考にして 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 (SIV_{mac}) から高等霊長類 (チンパンジー) ウイルス (SIV_{chimp}) 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 SIV_{mac} 感染に比較的抵抗性であり、チンパンジーは SIV_{chimp} 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) がかった遺伝子を抽出した。昨年度までに強い選択圧がかかったと推定される TIM1 遺伝子を検討し、TIM1 の D3-A ハプロタイプがタイ人集団において AIDS 発症への抵抗性をもたらすことが判明したため、これとは別のインド人集団において HIV/AIDS との関連を検討した。さらに、今年度は霊長類において進化選択圧がかかったと推定される OAS1 について、選択圧がかかったアミノ酸配列を検討した。

- 4) NFKBIL1 遺伝子機能の検討：ヒト MHC (HLA) クラス I 領域とクラス III 領域の境界部にマップされ、慢性関節リウマチ等の自己免疫疾患との関連が知られている NFKBIL1 遺伝子 (IkBL タンパク) について、酵母 2 ハイブリッド法を用いて結合するタンパク群を同定した。一方、EGFP-IkBL を用いて IkBL が核スペckルに局在することを明らかにしたが、上述の IkBL 結合タンパクの内核スペckルに分布することが知られている CLK1 に着目して、IkBL との機能連関について、免疫関連遺伝子 CD45 および CTLA4 のスプライシング制御とインフルエンザウイルス M 遺伝子のスプライシング制御への関わりを検討した。

(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) (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 230 頭に加えて 80 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 1 種類のみ (Mamu-A1*18 new) であった。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。また、これまでに解析を終えた Mamu クラス I ハプロタイプ

構造をまとめると、表1の通りであった。すなわち、アカゲザルのクラス I ハプロタイプは、発現の高い major A および major B が各 1 個と複数の minor A および minor B によって構成されていたが、major A が 2 個あるハプロタイプが存在した。

表1 アカゲザル MHC クラス I ハプロタイプ構成

Haplotype	Major A (major A)	minor A	major B	minor B
A	A1*043:01 A1*085:01		B*081:03 B*068:04	B*089:01 B*124:01
B	A1*018:08	A2*005:31	B*038:03 B*037:01	B*043:01 B*162:01
D	A1*032:02		B*064:01 B*102:01:01	
E	A1*068:01		B*005:02 B*015:04	
J	A1*008:01:02		B*007:02 B*039:01	
P	A1*018:07	A2*01:03	B*001:01:01 B*007:02	
W	A1*022:03		B*001:01:02 B*007:02:03	B*017:03
S	A1*003:08		B*068:04	

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 ULBP2 遺伝子が 2 個 (ULBP2.1 および ULBP2.2) 存在し、いずれも著明な多型性を示すことが判明したが、今年度は解析個体数を増やして多型性をさらに解析するとともに、カニクイザルについても ULBP2 遺伝子の多型性を検討した。その結果、アカゲザルでは ULBP2.1 に 6 アリル、ULBP2.2 に 9 アリルが検出されたが、これに対してカニクイザルでは、ULBP2.1 に 10 アリル、ULBP2.2 に 8 アリルが検出された (表 2)。

表2 アカゲザルおよびカニクイザルの ULBP2 多様性

	rhesus	cynomolgus
ULBP2.1	6	10
ULBP2.2	9	8

ついで、アカゲザル ULBP2 アミノ酸配列とヒト ULBP2 および ULBP6 のアミノ酸配列を比較し、そのゲノム多様性部位をシークエンス上にマップしたところ、旧世界ザル ULBP2 には、ヒト ULBP3 と NKG2D との結合に関わる部位にも多型が存在した (図 1)。

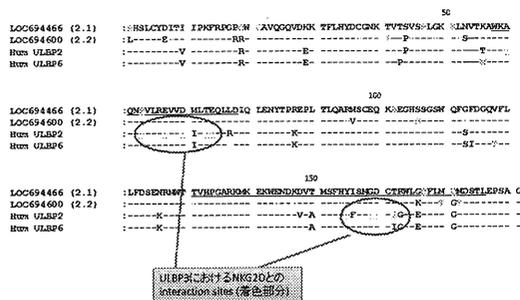


図1 旧世界ザル ULBP2 配列の多様性部位

ついで、同定したアカゲザルおよびカニクイザルの ULBP2.1 および ULBP2.2 のアリル配列で系統樹を作製すると、図 2 に示すとおり、MHC 多型と同様に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。また、アカゲザルとカニクイザルのアリルは分離せずに同一クラスター内に存在することから、ULBP2 の遺伝子重複はアカゲザルとカニクイザルが分岐するよりも以前に生じていたと推定された。

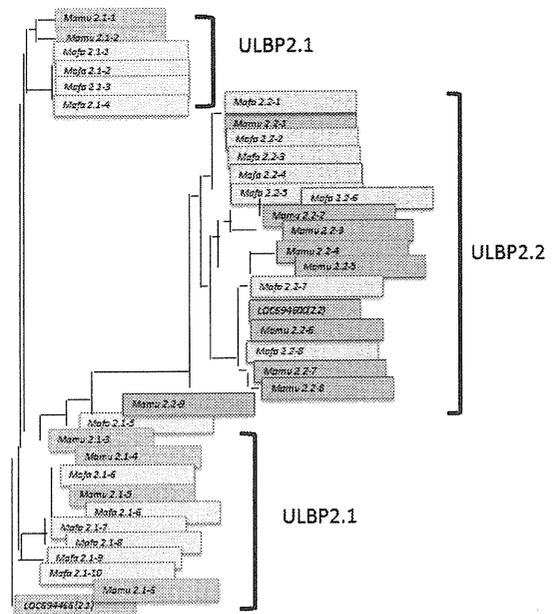


図2 旧世界ザル ULBP2 アリルの系統樹

さらに、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、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 α ヘリックス構造上に存在した (図 3)。

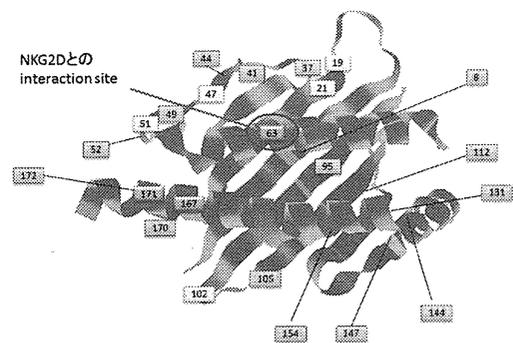


図3 アカゲザル ULBP2 の多型マッピング