

201319033A

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 H25-エイズ-一般-007

T細胞誘導を主とする
予防エイズワクチン開発に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 俣野 哲朗

平成26（2014）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 H25-エイズ-一般-007

T細胞誘導を主とする
予防エイズワクチン開発に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 俣野 哲朗

平成26（2014）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
立川 愛	研究分担者	東京大学医科学研究所	准教授
小柳 円	研究分担者	熊本大学エイズ学研究センター	特任助教
松岡 佐織	研究分担者	国立感染症研究所 エイズ研究センター	研究員
寺原 和孝	研究分担者	国立感染症研究所免疫部	主任研究官

目 次

I. 総括研究報告書

- T 細胞誘導を主とする予防エイズワクチン開発に関する研究 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. サルエイズモデルにおける最適化抗原発現ベクターワクチン効果に . . . 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. ヒト HLA およびサル MHC を中心としたゲノム多様性と免疫応答に . . . 13
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）
3. 各種 HLA クラス I 拘束性 CTL エピトープ候補の網羅的解析 19
研究分担者：立川愛（東京大学医科学研究所・准教授）
4. universal HLA クラス I 拘束性 CTL 反応と関連変異に関する研究 22
研究分担者：小柳円（熊本大学エイズ学研究センター・特任助教）
5. T 細胞誘導エイズワクチン臨床試験に向けた最適化抗原設計に関する 26
研究
研究分担者：松岡佐織（国立感染症研究所エイズ研究センター・研究員）
6. 経鼻センダイウイルスベクターワクチンの粘膜免疫誘導に関する研究 . . . 30
研究分担者：寺原和孝（国立感染症研究所免疫部・主任研究官）

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 33

IV. 研究成果の刊行物・別刷 35

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

T 細胞誘導を主とする予防エイズワクチン開発に関する研究

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

アフリカを中心とする世界の HIV 感染拡大を抑制することは国際的最重要課題の一つであり、本邦の HIV 感染症制圧のためにも必要である。感染者の早期診断・治療推進に加え、切り札となるワクチンの開発が切望されている。我々はこれまで優れた細胞傷害性 T 細胞（CTL）誘導能を有するセンダイウイルス（SeV）ベクターを用いたワクチン開発研究を進めてきた。平成 25 年にはこのワクチンの国際共同臨床試験第 1 相がルワンダ等で開始され、次の有効性評価段階（第 1－2 相）への進展に向けて発現抗原の最適化が求められている。本研究は、この T 細胞誘導エイズワクチンの実用化に向け、HIV 持続感染阻止に結びつくよう最適化した抗原発現系を設計することを目的とする。これまでの我々の研究で、Gag 蛋白および Vif 蛋白が有効な CTL の標的抗原候補であることが示されたことから、Gag・Vif 蛋白内標的領域断片を繋いだ最適化抗原を設計する計画である。CTL エピトープ情報を基に設計したサル免疫不全ウイルス（SIV）最適化抗原発現ワクチンのサルエイズモデルにおける有効性検証と、HLA 遺伝子型および CTL エピトープ情報の収集に基づく HIV 最適化抗原設計を推進することとした。平成 25 年度には、ワクチンにより SIV 持続感染阻止に至ったサルサンプルを用い、持続感染阻止に結びつく Gag・Vif 特異的 CTL の標的領域を同定した。また、HIV/SIV 防御免疫として重要視されている腸管免疫反応について、サルモデルでの解析系を確立した。一方、世界で普遍的に認められるユニバーサル HLA アレルに関する解析を進め、まず、その一つである HLA-B*07:02 に拘束される 16 種のエピトープに対する CTL 反応を、HIV サブタイプ B・C 感染者リンパ球を用いて測定し、データを収集した。また、アフリカ・ガーナの HLA アレル頻度を調べ、地域特有に頻度の高い HLA アレルを複数見出し、HLA 関連 HIV 変異同定を開始した。さらに、各種 HLA アレル拘束性の CTL エピトープの網羅的解析系を検討した。これらの情報の蓄積は、最適化抗原設計およびその検証系構築に直結するものとして重要である。

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
立川 愛 東京大学医科学研究所・准教授
小柳 円 熊本大学エイズ学研究センター・特任助教
松岡佐織 国立感染症研究所エイズ研究センター・研究員
寺原和孝 国立感染症研究所免疫部・主任研究官

A. 研究目的

世界の HIV 感染者数は 3 千万人を超え、毎年 2 百万人以上の新たな感染が発生している。アフリカを中心とする世界の HIV 感染拡大を抑制することは国際的最重要課題の一つであり、毎年約 1500 人の新規 HIV 感染者・エイズ患者が報告される本邦の感染拡大抑制のためにも必要である。

そのためには、感染者の早期診断・治療の推進に加え、切り札となるワクチンの開発が切望されている。我々はこれまで、優れた CTL 誘導能を有する SeV ベクターを用いた予防エイズワクチン開発研究を推進し、ワクチンによる Gag 抗原特異的 CTL 誘導が持続感染阻止に結びつく可能性をサルエイズモデルで明らかにしてきた。平成 25 年には、この T 細胞誘導ワクチンの国際共同臨床試験第 1 相が国際エイズワクチン推進構想 (IAVI) 主動でルアンダ等にて開始されており、次の有効性評価のステップ (第 1-2 相) への進展には、発現する抗原の最適化が求められている。そこで本研究では、この T 細胞誘導ワクチンの実用化に向け、HIV 持続感染阻止に結びつくよう最適化した抗原発現系設計を目指すこととした。

これまでの我々の研究で、Gag 蛋白および Vif 蛋白が有効な CTL の標的抗原候補であることが示されたことから、Gag・Vif 蛋白内の標的領域断片を繋いだ最適化抗原を設計する計画で、以下の 2 点を推進することとした。

(1) CTL エピトープ情報を基に設計した SIV 最適化抗原発現ワクチンのサルエイズモデルにおける有効性の検証。

(2) HLA 遺伝子型と CTL エピトープ情報の収集に基づく HIV 最適化抗原設計。

平成 25 年度には、以下の解析を推進した。

(1-1) サルエイズモデルでの SIV 複製制御に結びつく Gag・Vif 特異的 CTL の標的領域の同定。

(1-2) HIV/SIV 防御免疫として注視されている腸管免疫反応のサルモデルでの解析系の確立。

(2-1) ユニバーサル HLA アレルの一つ B*07:02 拘束性エピトープ特異的 CTL 反応のデータ収集。

(2-2) ガーナ HIV 感染者の HLA 遺伝子型同定および HIV ゲノム解析。

(2-3) HLA アレル拘束性 CTL エピトープの網羅的解析系の検討。

B. 研究方法

(1-1) これまでに行った MHC-I ハプロタイプ E (90-120-Ia) 共有ビルマ産アカゲサルワクチン接種・SIV 感染実験の凍結サンプルを用い、ワクチン接種により SIV 持続感染が阻止された 6 頭 (Gag ワクチン接種群 5 頭中 3 頭および Vif・Nef ワクチン接種群 6 頭中 3 頭) で感染急性期に誘導される CTL 標的領域の同定を進めた。また、非ワクチン接種サル 7 頭を含めた 18 頭について、経時的に採取・保存された血漿由来 SIV ゲノム cDNA の塩基配列を解析した。(俣野・木村)

(1-2) SIV 感染サルの安楽殺・解剖時に採取した空調および回腸よりリンパ球を分離する方法を検討し、得られたリンパ球を用いた免疫染色・FACS 解析を行った。(寺原・俣野)

(2-1) HLA-B*07:02 に拘束性される 16 種類のエピトープに対する CTL 反応を、HLA-B*07:02 陽性 HIV サブタイプ B および C 感染者のリンパ球を用いて測定した。(小柳)

(2-2) ガーナ野口記念医学研究所の協力により得られたガーナ HIV 感染者血液由来 DNA を用いて、HLA クラス I アレルのタイピングを行った。(松岡・木村)

(2-3) HLA-A*24:02 拘束性 Nef134-10 エピトープについて、A*24:02 発現 TAP 欠損細胞を用いて測定した各種ペプチド結合能の結果と、公開のエピトープ予測プログラム*を用いた各種ペプチド結合能の算出結果とを比較検討した。(立川)

(*<http://tools.immuneepitope.org/mhci/>)

(倫理面への配慮)

ヒト検体を用いる実験については、適宜、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針や臨床研究に関する倫理指針等に基づき、所属機関等の倫理委員会の承認のもと推進した。動物実験については、基本指針に基づき、実施機関および所属機関の動物実験委員会の審査をうけ、その承認を得てから開始した。用いた組換え生物等について

は、第二種使用等拡散防止措置確認申請承認（大臣確認）および機関承認済みである。

C. 研究結果

(1-1) SIV 持続感染阻止に至った 6 頭において、感染急性期に誘導された CTL の標的領域を Gag あるいは Vif 蛋白内に各々同定した。そのうち 4 頭では、これら CTL 標的領域内のアミノ酸置換に至る逃避変異が感染急性期に選択されていた。MHC-I ハプロタイプ E 陽性サルで誘導される CTL エピトープ Nef45-53 コード領域については、ワクチンで SIV 複製制御に至らなかったサルでは感染後 1 ヶ月で変異選択が認められたが、ワクチンで SIV 持続感染阻止に至ったサルでは変異選択は認められなかった。

(1-2) サル小腸粘膜固有層よりのリンパ球分離プロトコールを確立した。1 サンプル (15 cm) あたり 10^6 個以上の細胞の回収が可能となった。

(2-1) HLA-B*07:02 拘束性エピトープ 16 種類のうち、サブタイプ B もしくは C 感染者群の 10% 以上で CTL 反応を示したものは 12 種類であった。サブタイプ B もしくは C とアフリカ当該地域で流行のサブタイプ A・AG で保存されていたエピトープ 7 種類のうち、サブタイプ B もしくは C 感染者群の 10% 以上で CTL 反応を示したものは 4 種類であった。サブタイプ C 感染者群では、これらのうち p24 GL9 エピトープ特異的 CTL 反応陽性群が陰性群と比較して有意に低い血中ウイルス量を示した。

(2-2) 西アフリカのガーナでは、HLA-A アレルのうち、A*23:01、A*03:01、A*30:01、A*02:01、A*33:03 の頻度が高いことが判明した。このうち A*30:01 および A*33:03 は、アジアおよび西アフリカに高頻度に分布するものであった。

(2-3) HLA へのペプチド結合能の測定結果と、予測プログラムを用いた結合能算出結果は必ずしも一致せず、前者の重要性が確認された。

D. 考察

(1-1) SIV 持続感染阻止に至ったサルで同定した標的領域特異的 CTL については、感染急性期に逃避変異選択が認められたことから、強力な SIV 複製抑制能を有し、SIV 持続感染阻止に中心的役割を果たしたと考えられた。本研究では、このような有効な Gag・Vif 特異的 CTL の蛋白内の標的領域の情報蓄積を進める予定である。

同定した CTL 標的領域は、共有する MHC-I ハプロタイプ E ではなく、各個体のもう一方の MHC-I ハプロタイプ由来の MHC-I に拘束されるエピトープである可能性が高いと考えられ、同定された CTL による SIV 持続感染阻止が、MHC-I ハプロタイプ E 特有のものではなく、一般化可能な知見であることを支持している。

(1-2) サルにおける腸管免疫解析系を確立できた。平成 26 年度以降はこのプロトコールを用い、SIV 感染サル等の腸管由来リンパ球を用いた解析を行う計画である。

(2-1) HIV サブタイプ B・C 感染者群の各々 10% 以上に誘導される HLA-B*07:02 拘束性エピトープを 4 種類見出した。このうち p24 GL9 エピトープ特異的 CTL については、高い HIV サブタイプ C 複製抑制能を有していると考えられた。平成 26 年度以降も、各種ユニバーサル HLA アレルに関連する CTL 反応および HIV 変異の情報収集を推進する予定である。

(2-2) ガーナ HIV 感染者の解析では、対象地域に特有の HLA アレルを中心に関連 HIV 変異解析を推進する予定である。

(2-3) HLA へのペプチド結合能について、現時点で入手可能な予測プログラムの精度では実測値と必ずしも一致しないことが確認された。HLA 拘束性 CTL エピトープの網羅的同定において、より精度の高いペプチド結合能予測プログラムの開発が望まれる。

E. 結論

CTL エピトープ情報を基に SIV 最適化抗原を設計し、その発現ワクチンのサルエイズモデルにおける有効性を検証する計画で、SIV 複製制御に結びつく Gag・Vif 特異的 CTL の標的領域を同定した。一方、HIV 最適化抗原設計のための HLA 遺伝子型と CTL エピトープの情報収集に向け、ユニバーサル HLA アレルの一つ B*07:02 拘束性エピトープ特異的 CTL に関する情報を蓄積し、p24 GL9 エピトープ特異的 CTL の高い HIV サブタイプ C 複製抑制能を示唆する結果を得た。これらの情報蓄積は、T 細胞誘導エイズワクチンの最適化抗原設計およびその検証系構築に直結する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) Iwamoto N, Takahashi N, Seki S, Nomura T, Yamamoto H, Inoue M, Shu T, Naruse TK, [Kimura A](#), [Matano T](#). Control of SIV replication by vaccine-induced Gag- and Vif-specific CD8⁺ T cells. *J Virol* 88:425-433, 2014.
- 2) Burwitz BJ, Wu HL, Reed JS, Hammond KB, Newman LP, Bimber BN, Nimiyongskul FA, Leon EJ, Maness NJ, Friedrich TC, Yokoyama M, Sato H, [Matano T](#), O'Connor DH, Sacha JB. Tertiary mutations stabilize CD8⁺ T lymphocyte escape-associated compensatory mutations following transmission of simian immunodeficiency virus. *J Virol*, in press.
- 3) Nakane T, Nomura T, Shi S, Nakamura M, Naruse TK, [Kimura A](#), [Matano T](#), Yamamoto H. Limited impact of passive non-neutralizing antibody immunization in acute SIV infection on viremia control in rhesus macaques. *PLoS ONE* 8(9): e73453, 2013.
- 4) An J, Nakajima T, Shibata H, Arimura T, Yasunami M, [Kimura A](#). A novel link of HLA locus to the regulation of immunity and infection: NFKBIL1 regulates alternative splicing of human immune-related genes and influenza virus M gene. *J Autoimmun* 47: 25–33, 2013.
- 5) An J, [Kimura A](#). IκBL mapped within the HLA region is a novel regulator of alternative splicing involved in the pathogenesis of immune-related diseases. *MHC* 20(3):191-197, 2013.
- 6) Naruse TK, Akari H, [Matano T](#), [Kimura A](#). Divergence and diversity of ULBP2 genes in rhesus and cynomolgus macaques. *Immunogenetics*, in press.
- 7) Shimizu A, [Kawana-Tachikawa A](#), Yamagata A, Han C, Zhu D, Sato Y, Nakamura H, Koibuchi T, Carlson J, Martin E, Brumme CJ, Shi Y, Gao GF, Brumme ZL, Fukai S, Iwamoto A. Structure of TCR and antigen complexes at an immunodominant CTL epitope in HIV-1 infection. *Sci Rep* 3:3097, 2013.
- 8) Teeranaipong P, Hosoya N, [Kawana-Tachikawa A](#), Fujii T, Koibuchi T, Nakamura H, Koga M, Kondo N, Gao GF, Hoshino H, Matsuda Z, Iwamoto A. Development of a rapid cell-fusion-based phenotypic HIV-1 tropism assay. *J Int AIDS Soc* 16:18723, 2013.
- 9) [Kawana-Tachikawa A](#), Llibre JM, Bravo I, Escrigo R, Mothe B, Puig J, Puertas MC, Martinez-Picado J, Blanco J, Manzardo C, Miro JM, Iwamoto A, Pozniak AL, Gatell JM, Clotet B, Brander C; MARAVIBOOST investigators. Effect of Maraviroc Intensification on HIV-1-Specific T Cell Immunity in Recently HIV-1-Infected Individuals. *PLoS One* 9:e87334, 2014.
- 10) Watanabe K, Murakoshi H, Tamura Y, [Koyanagi M](#), Chikata T, Gatanaga H, Oka S, Takiguchi M.

Identification of cross-clade CTL epitopes in HIV-1 clade A/E-infected individuals by using the clade B overlapping peptides, *Microbs Infect* 15:874-886, 2013.

- 11) Kløverpris HN, Adland E, Koyanagi M, Stryhn A, Harndahl M, Matthews PC, Shapiro R, Walker BD, Ndung'u T, Brander C, Takiguchi M, Buus S, Goulder P. HIV Subtype Influences HLA-B*07:02-Associated HIV Disease Outcome. *AIDS Res Hum Retroviruses*, in press.
- 12) Ikeno S, Suzuki M, Muhsen M, Ishige M, Kobayashi M, Ohno S, Takeda M, Nakayama T, Morikawa Y, Terahara K, Okada S, Takeyama H, Tsunetsugu-Yokota Y. Sensitive detection of measles virus infection in the blood and tissues of humanized mouse by one-step quantitative RT-PCR. *Front Microbiol* 4:298, 2013.

2 学会発表

- 1) Ishii H, Matsuoka S, Matano T. Association of Gag-specific CD28⁺CD95⁺ CD8⁺ T-cell responses in lymph nodes with lower viral loads. The 21th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, MA, USA, 3/4/2014.
- 2) Nomura T, Yamamoto H, Matano T. Association between broadening of CD8⁺ T-cell targets and accumulation of proviral escape mutations in SIV controllers. HIV Vaccines (X3), Keystone Symposia, Banff, Alberta, Canada, 3/10/2014.
- 3) 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 遺伝子の種特異的多様性. 日本人類遺伝学会第 58 回大会、仙台、11/21/2013.
- 4) 中村碧、高原悠佑、松岡佐織、三浦智行、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 誘導治療ワクチン接種による SIV 増殖抑制能の増強効果の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、11/10-12/2013.
- 5) Kawana-Tachikawa A. Interaction between virus and host immune response during chronic HIV-1 infection. The 9th China-Japan Laboratory Workshop: Pathogenesis, Gene regulation, and signal transduction. Beijing, China, 11/1/2013.
- 6) 立川 (川名) 愛、韓忠勇、清水晃尚、細谷紀彰、中村仁美、古賀道子、鯉淵智彦、岩本愛吉. 重複する CTL エピトープ部位に生じた 1 アミノ酸変異によるエピトープの消滅と出現. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、11/10-12/2013.
- 7) 石坂彩、立川 (川名) 愛、中村仁美、古賀道子、細谷紀彰、鯉淵智彦、野本明男、岩本愛吉、水谷荘利. HIV-1 陽性者末梢血からの HIV-1 短鎖 RNA の検出および定量法の確立. 第 27 回日本エイズ学会学術集会、熊本、11/20-22/2013.
- 8) Meribe SC, Kawana-Tachikawa A, Takamasa Ueno T. Naturally arising amino-acid polymorphisms within functional regions of HIV-1 Nef influence viral persistence in vivo. 第 42 回日本免疫学会学術集会、千葉、12/11-13/2013.
- 9) Meribe SC, Hasan Z, Gatanaga H, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Oka S, Ueno T. Linkage between disease status and a naturally-arising mutation in functional region of HIV-1 Nef. 21th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Boston, MA, USA. 3/3-6/2014.
- 10) Nakayama-Hosoya K, Ishida T, Hosoya T, Nakamura H, Koga M, Koibuchi T, Iwamoto A, Kawana-Tachikawa A. Low IL-2 expression by epigenetic modification is associated with immunosenescence in HIV non-controllers. HIV Pathogenesis – Virus vs Host (X4), Keystone

Symposia, Banff, Alberta, Canada, 3/9-14/2014.

- 11) Van Giang T, Akahoshi T, Murakoshi H, Kuse N, Koyanagi M, Chikata T, Tamura Y, Dung NT, Trung NV, Tanuma J, Sakai K, Oka S, Van Kinh N, Takiguchi M. Establishment of a cohort of treatment-naive patients chronically infected with HIV-1 in Hanoi. 第27回日本エイズ学会学術集会、熊本、11/20-22/2013.
- 12) Lin Z, Koyanagi M, Takiguchi M. Inhibition of human NK cell function by an HLA-Cw*12:02-restricted HIV-1 CTL epitope peptide and its escape mutant peptide. 第42回日本免疫学会学術集会、千葉、12/11-13/2013.
- 13) Watanabe K, Murakoshi H, Koyanagi M, Chikata T, Takiguchi M. Cross-clade CD8+ T cell responses in chronically HIV-1 clade A/E-infected individuals. 第42回日本免疫学会学術集会、千葉、12/11-13/2013.
- 14) Murakoshi H, Koyanagi M, Takiguchi M. Control of HIV-1 by HIV-1-specific CD8+ T cells in chronically HIV-1-infected Japanese individuals. 第42回日本免疫学会学術集会、千葉、12/11-13/2013.
- 15) Koyanagi M, Murakoshi H, Takiguchi M. Synergistic CTL responses effect on viraemia control of HIV-1 infection in Japanese individuals carrying HLA-B*35:01 allele associated with rapid disease progression. 第42回日本免疫学会学術集会、千葉、12/11-13/2013.
- 16) 石井洋、野村拓志、高橋尚史、松岡佐織、俣野哲朗. サルエイズモデルにおいて感染慢性期に誘導される SIV 特異的 CTL 反応の標的抗原とメモリーフノタイプとの関連性についての解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、11/10-12/2013.
- 17) 石井洋、野村拓志、高橋尚史、松岡佐織、俣野哲朗. 感染慢性期において血漿中ウイルス量と相関・逆相関する各抗原特異的 CTL 反応および優位性についての解析. 第27回日本エイズ学会学術集会、熊本、11/20-22/2013.
- 18) 池野翔太、鈴木基臣、寺原和孝、石毛真行、駒瀬勝啓、竹田誠、森川裕子、中川哲夫、柳雄介、竹山春子、横田（恒次）恭子. ヒト化マウスの麻疹ウイルスベクター評価系への応用. 第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、11/10-12/2013.

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（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

サルエイズモデルにおける最適化抗原発現ベクター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

アフリカを中心とする世界の HIV 感染拡大を抑制することは国際的最重要課題の一つであり、毎年約 1500 人の新規 HIV 感染者・エイズ患者が報告される本邦の HIV 感染症制圧のためにも必要である。そのためには、感染者の早期診断・治療の推進に加え、切り札となるワクチンの開発が切望されている。我々はこれまで優れた細胞傷害性 T 細胞（CTL）誘導能を有するセンダイウイルス（SeV）ベクターを用いたエイズワクチン開発研究を展開し、サルエイズモデルにてワクチンによる Gag 抗原特異的 CTL 誘導が持続感染阻止に結びつく可能性を明らかにした。本研究では、この SeV ベクターを用いたワクチンの実用化に向け、HIV 持続感染阻止に結びつくよう最適化した抗原発現系の設計を目指すこととした。これまでの研究で、ウイルス Gag 蛋白および Vif 蛋白が有効な CTL の標的抗原候補であることが示されたことから、Gag・Vif 蛋白内の標的領域断片を繋いだ最適化抗原を設計する計画である。この設計の有効性をサルエイズモデルで検証するために、平成 25 年度には、サル免疫不全ウイルス（SIV）Gag・Vif 蛋白内の CTL 標的領域同定を進めた。ワクチンによって SIV 曝露後急性期の Gag・Vif 特異的 CTL 誘導に基づく SIV 持続感染阻止に至ったサルサンプルを用い、誘導された Gag・Vif 特異的 CTL の標的領域を同定した。ウイルスゲノムの解析で、感染早期にこれら CTL からの逃避変異選択が認められたことから、同定した標的領域特異的 CTL は SIV 持続感染阻止に中心的役割を果たしたと考えられた。これらの情報蓄積は、最適化抗原設計およびその検証系構築に直結するものとして重要である。

A. 研究目的

世界の HIV 感染者数は 3 千万人を超え、毎年 2 百万人以上の新たな感染が発生している。アフリカを中心とする世界の HIV 感染拡大を抑制することは国際的最重要課題の一つであり、感染者の早期診断・治療の推進に加え、ワクチンの開発が切望されている。我々はこれまで優れた CTL 誘導能を有する SeV ベクターを用いたワクチン開発研究を展開し、サルエイズモデルにて、ワクチンによる Gag 抗原特異的 CTL 誘導が持続感染阻止に結びつく可能性を明らかにした。2013 年

には、このワクチンの国際共同臨床試験第 1 相が開始されており、次の有効性評価のステップ（第 1－2 相）への進展に向けて発現抗原の最適化が求められている。本研究では、この SeV ベクターを用いたワクチンの実用化に向け、HIV 持続感染阻止に結びつくよう最適化した抗原発現系設計を目指すこととした。

これまでの我々の研究で、Gag 蛋白および Vif 蛋白が有効な CTL の標的抗原候補であることが示されたことから、Gag・Vif 蛋白内の標的領域断片を繋いだ最適化抗原を設計する。研究班では、

HLA 遺伝子型情報と HIV CTL エピトープ情報の収集に基づく HIV 最適化抗原設計と、SIV CTL エピトープ情報に基づいて設計した SIV 最適化抗原発現ワクチンのサルエイズモデルにおける有効性検証を推進する計画である。本分担研究では、後者のサルエイズモデルでの検証を推進することとした。

平成 25 年度には、我々が独自に樹立を進めてきた主要組織適合遺伝子複合体クラス I (MHC-I) ハプロタイプ共有ビルマ産アカゲサル群のうち、Nef 特異的 CTL と関連する MHC-I ハプロタイプ E を共有するサル群を用いてこれまでに行った Gag 発現ワクチンおよび Vif・Nef 発現ワクチン接種実験の凍結サンプルを用い、Gag・Vif 蛋白内の有効な CTL 標的領域同定を進めた。

B. 研究方法

MHC-I ハプロタイプ E (90-120-Ia) 共有ビルマ産アカゲサル 18 頭を用いてこれまでに行ったワクチン接種・SIV チャレンジ実験の凍結サンプルを用いて解析を進めた。18 頭の内訳は、非ワクチン接種群 7 頭、Gag ワクチン接種群 5 頭、Vif・Nef ワクチン接種群 6 頭で、いずれも SIVmac239 経静脈チャレンジを受けた。Gag ワクチン接種群は、DNA ワクチン接種後 Gag 発現 SeV ベクターワクチン接種を受け、Vif・Nef ワクチン接種群は、DNA ワクチン接種後 Vif および Nef 発現 SeV ベクターワクチン接種を受けた。非ワクチン接種群 7 頭は SIV 持続感染を示したが、Gag ワクチン接種群 5 頭のうち 3 頭および Vif・Nef ワクチン接種群 6 頭のうち 3 頭では SIV 持続感染成立が阻止された。これらの SIV 複製制御サル計 6 頭の末梢血リンパ球を用い、感染急性期に誘導される CTL 標的領域の同定を進めた。また、全サルについて経時的に採取・保存された血漿を用い、抽出した RNA より RT-PCR にて SIV ゲノム cDNA を増幅し、塩基配列を解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験については、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

Gag ワクチン接種群のうち SIV 複製制御に至った 3 頭において、感染急性期に誘導された CTL の標的領域を Gag 蛋白内に各々同定した (Gag 367-381・273-292・385-400) (表 1)。感染 5 週目の血漿由来ウイルス cDNA の塩基配列解析では、これら 3 頭のうち 2 頭で、CTL 標的領域内のアミノ酸置換に至る gag 変異が選択されていた (表 1)。これら I377T および I391T 変異は、各々 Gag367-381 および Gag385-400 特異的 CTL からの逃避を引き起こす変異であった。

Vif・Nef ワクチン接種群のうち SIV 複製制御に至った 3 頭においても感染急性期に誘導された CTL の標的領域を Vif 蛋白内に各々同定した (Vif 65-76・113-132・134-148) (表 2)。感染 6 週目の血漿由来ウイルス cDNA の塩基配列解析では、これら 3 頭のうち 2 頭で、CTL 標的領域内のアミノ酸置換に至る vif 変異が選択されていた (表 2)。Y143C 変異については Vif134-148 特異的 CTL 逃避変異であることが確認された。

さらに、MHC-I ハプロタイプ E 由来 MHC-I 拘束性 CTL エピトープ Nef45-53 コード領域の nef 塩基配列を調べたところ、Gag ワクチン接種群および Vif・Nef ワクチン接種群のうち、SIV 複製制御に至らなかった 5 頭では、感染後 1 ヶ月で Nef45-53 コード領域の変異選択が認められた。一方、Gag ワクチン接種群および Vif・Nef ワクチン接種群のうち、SIV 持続感染阻止に至った 6 頭では、1 頭 (R10-010) を除いて Nef45-53 コード領域の変異選択は認められなかった (図 1)。

D. 考察

Gag ワクチン接種群および Vif・Nef ワクチン接種群のうち SIV 持続感染阻止に至ったサルにおいて SIV 感染急性期に優位に誘導される Gag および Vif 特異的 CTL の標的領域を同定することができた。また、血漿由来ウイルス cDNA の解析から、感染急性期にこれら CTL からの逃避変異が選択されることが確認された。一方、SIV 複製非制御群では、感染急性期の gag・vif 変異選択は認められなかった。これらの結果から、同定した標的領域特異的 CTL は、強い SIV 複製抑制能を有し、SIV 持続感染阻止に中心的役割を果たしたと考えられた。本分担研究では、このような有効な Gag・Vif 特異的 CTL の蛋白内標的領域の情報蓄積を進める予定である。

同定した CTL 標的領域は個体間で異なっていたことから、共有する MHC-I ハプロタイプ E ではなく、各々の個体が有するもう一方の MHC-I ハプロタイプ由来の MHC-I に拘束されるエピトープである可能性が高いと考えられた。このことは、本研究で同定された Gag・Vif 特異的 CTL による SIV 持続感染阻止が、MHC-I ハプロタイプ E 特有のものではなく、一般化しうる知見であることを支持している。

血漿由来ウイルス cDNA Nef45-53 コード領域については、SIV 複製非制御群では感染急性期に変異選択が認められたが、SIV 複製制御群ではエピトープ配列が維持されていた。したがって SIV 複製非制御群では、感染急性期に Nef45-53 エピトープ特異的 CTL が SIV 複製に対し抑制作用を発揮するものの逃避変異が選択され、他の CTL の助けもなく、SIV 持続感染成立に至ったと考えられる。一方、SIV 複製制御群では、非ワクチン接種群でも誘導される Nef45-53 エピトープ特異的 CTL に、強い SIV 複製抑制能を有する Gag・Vif 特異的 CTL 反応が加わり、SIV 持続感染阻止に至ったと推測される。

E. 結論

ワクチンによって SIV 持続感染阻止に至ったサルのサンプルを用い、SIV 持続感染阻止に結びつく Gag・Vif 特異的 CTL の標的領域を同定した。これらの情報蓄積は、T 細胞誘導エイズワクチンの最適化抗原設計およびその検証系構築に直結するものとして重要である。

F. 研究発表

1 論文発表

- 1) Iwamoto N, Takahashi N, Seki S, Nomura T, Yamamoto H, Inoue M, Shu T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Control of SIV replication by vaccine-induced Gag- and Vif-specific CD8⁺ T cells. *J Virol* 88:425-433, 2014.
- 2) Burwitz BJ, Wu HL, Reed JS, Hammond KB, Newman LP, Bimber BN, Nimiyongskul FA, Leon EJ, Maness NJ, Friedrich TC, Yokoyama M, Sato H, Matano T, O'Connor DH, Sacha JB. Tertiary mutations stabilize CD8⁺ T lymphocyte escape-associated compensatory mutations following transmission of simian immunodeficiency virus. *J Virol*, in press.
- 3) Naruse TK, Akari H, Matano T, Kimura A. Divergence and diversity of ULBP2 genes in rhesus and cynomolgus macaques. *Immunogenetics*, in press.

2 学会発表

- 1) Ishii H, Matsuoka S, Matano T. Association of Gag-specific CD28⁺CD95⁺ CD8⁺ T-cell responses in lymph nodes with lower viral loads. The 21th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, MA, USA, 3/4/2014.
- 2) Nomura T, Yamamoto H, Matano T.

Association between broadening of CD8+ T-cell targets and accumulation of proviral escape mutations in SIV controllers. HIV Vaccines (X3), Keystone Symposia, Banff, Alberta, Canada, 3/10/2014.

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。

サルID	Gag CTL標的領域	選択されたgag変異 (感染5週目)
R01-008	Gag367-381	I377T
R08-002	Gag273-292	無
R08-006	Gag385-400	I391T

表 1. Gag特異的CTL反応と逃避変異

Gagワクチン接種によりSIV持続感染が阻止されたMHC-IハプロタイプE共有サル3頭において感染急性期に誘導されたGag特異的CTLの標的領域および選択された（血漿由来）SIVゲノムgag領域の変異を示す。

サルID	Vif CTL標的領域	選択されたvif変異 (感染6週目)
R10-010	Vif65-76	H66Y
R10-011	Vif113-132 & 134-148	Y143C
R10-014	Vif113-132	無

表 2. Vif特異的CTL反応と逃避変異

Vif・Nefワクチン接種によりSIV持続感染が阻止されたMHC-IハプロタイプE共有サル3頭において感染急性期に誘導されたVif特異的CTLの標的領域および選択された（血漿由来）SIVゲノムvif領域の変異を示す。

		Nef45-53 GLDKGLSSL		Nef45-53 GLDKGLSSL		
非ワクチン接種群						
R01-011	1 mo	-----F	R09-011	1 mo	-----	
	6 mo	-S-----		6 mo	-----P	
	1 yr	----C----		1 yr	--G-----P	
R05-007	1 mo	-----	R06-038	1 mo	-----	
	6 mo	-----		6 mo	-----	
	1 yr	-----		1 yr	-----	
R08-003	1 mo	-----	R09-005	1 mo	-----	
	6 mo	--G-----		6 mo	--G-----	
	1 yr	-----R		1 yr	--G-----H	
R08-007	1 mo	-----				
	6 mo	-S-----				
	1 yr	-S-----				
Gagワクチン接種群						
SIV非制御群						
R01-010	1 mo	-----P	R01-008	1 mo	-----	
	6 mo	--G-----P		R08-002	1 mo	-----
	1 yr	--G-----			6 mo	E-----
R05-010	1 mo	E-----	R08-006		1 yr	E-----
	6 mo	E-G-----		1 mo	-----	
	1 yr	--G-----		6 mo	-----	
			1 yr	-----		
Vif・Nefワクチン接種群						
SIV非制御群						
R08-012	1 mo	-----P	R10-010	1 mo	A-----	
	6 mo	-----P		6 mo	E-----P	
	1 yr	E-----S---		1 yr	E-----	
R10-012	6 mo	----D---P	R10-011	1 mo	-----	
	1 yr	----L--P		6 mo	-----	
	1 mo	-----R		1 yr	-----	
R10-013	6 mo	-----R	R10-014	1 mo	-----	
	1 yr	--G-----		6 mo	-----	
				1 yr	-----	

図1. CTLエпитープNef45-53コード領域の変異

非ワクチン接種群、Gagワクチン接種群およびVif・Nefワクチン接種群より経時的に採取された血漿由来SIVゲノムのNef45-53コード領域の変異（アミノ酸置換）を示す。

ヒト HLA およびサル MHC を中心としたゲノム多様性と免疫応答に関する研究

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

アカゲザルおよびカニクイザルについて、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、アカゲザル、カニクイザルともに、2 種類の ULBP2 遺伝子 (ULBP2.1 および ULBP2.2) を有しており、その多様性もヒトに比べてはるかに大きいことが示された。また、霊長類 ULBP 遺伝子群を用いた系統樹解析から、旧世界ザル ULBP2.2 遺伝子はヒトやチンパンジーを含む霊長類の ULBP 遺伝子群とともに ULBP2.1 から分岐していること、ヒト ULBP6 はチンパンジー・ゴリラとの分岐後に ULBP2 から遺伝子重複したことが推定された。さらに、3D 立体モデル上に ULBP2.1 および ULBP2.2 に認められた多型をマップしたところ、アカゲザルでは ULBP2.1、カニクイザルでは ULBP2.2 のみで、NKG2D との結合部位に多型が存在することが判明した。一方、ヒト ULBP2 では NKG2D との結合部位に多型が分布していたことから、旧世界ザルでは ULBP2.1 もしくは ULBP2.2 に機能分担が生じたことを示唆する。一方、ヒト MHC (HLA) 領域内に存在し、自己免疫疾患への感受性・抵抗性との関連が明らかになっているものの、その機能が不明な遺伝子 NFKBIL1 の機能を詳細に解析し、これがコードする IκB タンパクが、免疫関連遺伝子群やインフルエンザウイルス遺伝子の選択的スプライシングを CLK1 と拮抗し、抑制的に制御すること、またスプライシング制御には SR 蛋白が必要であるが、そのリン酸化には依存しないことを解明した。このことは、MHC 領域による免疫制御と感染制御に新たな視点をもたらすものであるが、NFKBIL1 には多型に依存した発現多様性があることから、免疫や感染機能における個体差を解明する手がかりとなると考えられた。

A. 研究目的

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の実験動物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にはそのような制約が少なく、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が明らかにされている。しかし、その他の分子群の多様性がワクチン効果の個体差形成にどのように関与しているか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、実験動物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、旧世界ザル（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、これらのゲノム多様性とアカゲザル実験個体における 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、ヒトにおいては、ウイルス感染症や自己免疫疾患への感受性・抵抗性が HLA 領域によって遺伝的に制御されていることが知られているが、HLA 領域内には多数の遺伝子が存在し、互いに強い連鎖不平衡にあるため、個々の遺伝子がどのように感染・免疫制御に関わるかは必ずしも明らかではない。このため、これまでの遺伝学的解析によって、免疫制御に関わることが示されているものの機能が不明な NFKBIL1 遺伝子 (IkBL 分子) の機能を詳細に検討することを合わせて目的とする。

B. 研究方法

- サル MHC クラス I 様遺伝子群の解析：アカゲザル 37 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シング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した。また、本研究で得られたデータと、公開データベースにある霊長類 (ヒト、チンパンジー、ゴリラ、オリーブヒヒ) の ULBP 遺伝子群 (ULBP1~ULBP6) を用いて、ULBP 遺伝子群の系統樹を作製した。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。
- ヒト 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、関節リウマチ等の自己免疫疾患や高安静脈炎等の慢性炎症性疾患との関連が知られている NFKBIL1 遺伝子 (IkBL タンパク) について機能解析を行った。昨年度までに

IkBL が CLK1 と結合することを明らかにしたが、今年度は、免疫関連遺伝子 (CD45、CTLA4、CD72) のスプライシング制御とインフルエンザウイルス M 遺伝子群のスプライシング制御への関わりをさらに詳細に検討した。

(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

- MHC クラス I 様遺伝子群の解析：活性化 NK レセプターである NKG2D レセプターのリガンド (RAET1/ULBP) についての解析を行った。ヒトでは RAET1/ULBP 遺伝子座に ULBP1~ULBP6 の 6 個の遺伝子がマップされているが、旧世界ザルではこの領域に遺伝子重複が生じていることが知られている。昨年度までに、アカゲザル、カニクイザルとも 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した。その結果、ULBP2.1 アリルはアカゲザルで 15 種 (Mamu-ULBP2.1)、カニクイザルで 11 種 (Mafa-ULBP2.1) が、ULBP2.2 アリルはアカゲザルで 11 種 (Mamu-ULBP2.2)、カニクイザルで 10 種 (Mafa-ULBP2.2) が見出された。旧世界ザル ULBP2 多様性の特徴は exon2 および exon3 ともアミノ酸置換をもたらす塩基置換が多いことであるが、ことに exon2 にはアミノ酸置換が多かった。これはヒト ULBP2 や ULBP6 にも認められる特徴であり、ULBP 遺伝子群の進化過程において選択圧が存在したことを示唆する (表 1)。

Locus	Number of alleles	exon 2		intron 2		exon 3	
		Polymorphic sites	Non-Synonymous sites (%)	Polymorphic sites	Polymorphic sites	Non-Synonymous sites (%)	
Mamu ULBP2.1	15	10	10 (100%)	14	7	4 (57.1%)	
Mafa ULBP2.1	11	8	7 (87.5%)	12	6	3 (50.0%)	
Mamu ULBP2.2	11	7	6 (85.7%)	9	14	9 (64.3%)	
Mafa ULBP2.2	10	17	7 (41.2%)	13	12	9 (75.0%)	
Human ULBP2	NC	17	14 (82.3%)	0	15	11 (74.0%)	
Human ULBP6	NC	14	13 (92.9%)	1	17	11 (64.7%)	

表 1 旧世界ザルおよびヒトの ULBP2 多様性

について、旧世界ザルの ULBP2 遺伝子群配列