

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16181

研究課題名(和文) 抗レトロウイルス療法下のHIV-1特異的T細胞の解析

研究課題名(英文) Identification of HIV-1-specific CTLs from HIV-1-infected individuals on long-term antiretroviral therapy (ART)

研究代表者

近田 貴敬 (CHIKATA, TAKAYUKI)

熊本大学・ヒトレトロウイルス学共同研究センター・特任助教

研究者番号：60749711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：長期ART検体検体よりPBMCを分離し、HIV-1コントロールに重要な役割を持つエピトープに対するCTL反応を調べたところ、慢性感染時より大きく減弱しているものの、18名中13名で、いずれかのエピトープに対するCTL反応が認められた。一方でテトラマーを作製し、より感度の高い検出方法を試みたところ、IFN- $\gamma$  ELISPOT assayではCTL反応無しと判定されたエピトープでも、特異的T細胞の集団が検出された。本研究の成果により、長期にわたるARTにより抗原に即座に応答することのできるメモリーT細胞の数が、予測通りに減弱していたものの、数多くの検体でCTL反応が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに我々が同定したCTLは、日本人HIV-1感染者体内の感染細胞を認識し効果的に殺傷することのできると期待され、Shock and Killによるリザーバー排除の行う場合の有用なCTLの候補である。本研究によって抗レトロウイルス療法(ART)開始後数年が経っていてもHIV-1特異的メモリーT細胞が残存していることが確認された。この結果は今後日本でShock and Killが実施される際に、我々が以前同定したHIV-1増殖抑制能を有するCTLを標的として、誘導を試みることができると示唆している。

研究成果の概要(英文)：We isolated PBMCs from HIV-1-infected Japanese individuals on long-term antiretroviral therapy (ART), and analyzed the CTL responses to 13 epitopes that were already demonstrated as the protective epitopes in HIV-1 infection by IFN- $\gamma$  ELISPOT assay. Although the number of the spot numbers were reduced compared with the result of chronic phase, CTL responses were detected in 13 out of 18 individuals ( $>100$  SFU / 1,000,000 PBMC). On the other hand, we synthesized the HLA tetramer for the epitopes that were not observed the CTL responses by ELISPOT. Finally, we could detect the population of HIV-1 specific CTLs using by tetramer staining. Our results confirmed that HIV-1 specific T cells remained after long-term ART. This suggests that we can induce and expand these protective epitope specific CTLs to eliminate HIV-1 infected cells in Shock and Kill strategy.

研究分野：HIV-1

キーワード：HIV-1 エピトープ CTL Shock and Kill CD8 ART

## 1. 研究開始当初の背景

抗レトロウイルス療法 (ART) の進歩により、感染者体内のウイルス量を検出限界以下にまで抑制することができ、今や HIV 感染症は慢性疾患のひとつになった。しかし ART 中断後、速やかにウイルスのリバウンドが起こるため、薬剤摂取を生涯継続しなければならない。その原因は、HIV-1 が潜伏感染しているためである。ウイルスが潜伏感染している細胞は主に CD4 陽性 T 細胞であり、「リザーバー」と呼ばれ、ART 中でも継続的に体内に存在している。HIV 感染症根治のためには、このリザーバーをいかにして体内から排除するかが重要な課題となっているが、いまだ確立された治療法はない。

近年「Shock and Kill」と呼ばれる方法が提唱され、研究がおこなわれてきた。休眠状態のリザーバーを薬剤などにより活性化状態にし、HIV-1 抗原 (エピトープ) を提示させ、HIV 特異的 CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を誘導させることによりリザーバーを破壊しようとする試みである。また、ART 中であるため抗 HIV-1 薬の効果で非感染細胞への新規感染は防ぐことができる。これまで我々のグループは、網羅的に無治療慢性日本人 HIV-1 感染者の HIV-1 特異的 CD8 細胞反応 (CTL 反応) と感染者の病態を解析することで、HIV-1 コントロールに重要な役割を持つ CTL を明らかにしてきた。その結果、合計 13 種類の HIV-1 増殖抑制能を有する CTL を特定した [Murakoshi H, et al., J Virol, 2015. Chikata T, et al., J Infect Dis. 2017]。これらの CTL は日本人に比較的多く保有されている HLA 型に拘束されており、Shock and Kill を実施する際に、多くの日本人 HIV-1 感染者に対して有効な CTL であると考えられる。

これらの CTL が長期的に ART を受けている感染者にどの程度残存しているかを明らかにし、その機能を詳細に解析することができれば、体内からリザーバーを効果的に排除することのできる CTL の候補を特定することができると期待される。

## 2. 研究の目的

我々は、長期的に ART を受けている感染者にどの程度有効な CTL が残存しているかという疑問を解明することを目的として、無治療時から ART 時にかけて経時的に CTL 反応を検出し、どのような HIV-1 特異的メモリー T 細胞が保持されているかを調べ、続いて詳細な表現型・機能解析を行う。我々が以前同定した CTL について、そのメモリー T 細胞が ART 治療時に存在するか詳細な解析をおこなうことは、今後日本で Shock and Kill が実施される際の重要な情報を与えることができると期待される。またそのみならず、ART 中の CTL の解析により、臨床免疫学的な知見も与えるものであると考えられる。

## 3. 研究の方法

### (1) HIV-1 感染者検体

瀧永博之医師 (研究協力者: 国立国際医療 研究センター所属) の協力のもと、先行研究で同定した 13 個のエピトープに対し CTL 反応の解析を実施した 18 人の日本人 HIV-1 感染者について、ART 治療時の血液検体の採取ならびに臨床情報 (血中ウイルス量および CD4 陽性 T 細胞数) の収集を行った。

### (2) 長期 ART 中検体における CTL 反応の解析

収集した ART 治療中の血液検体より PBMC を分離し、各エピトープに対する CTL 反応の時間的変化を IFN- $\gamma$  ELISPOT assay によって解析した。さらに、慢性感染時の検体で得られた CTL 反応のデータと比較解析し、CTL 反応の継時的な変化を解析した。

### (3) テトラマー作製および HIV-1 特異的 T 細胞の検出

長期 ART によりメモリー T 細胞は消失もしくは減衰している可能性があり、残存している CTL を検出するためには感度の高い方法を用いる必要があった。IFN- $\gamma$  ELISPOT assay ではペプチドに即座に反応する CTL しか検出されないため、代替の方法としてテトラマーを用いることにした。HIV-1 コントロールに重要な役割を持つ CTL として過去に同定した、HLA-B\*52:01 拘束性エピトープである Gag R18、Pol SI8、Gag WV8、Gag MI8、および HLA-C\*12:02 拘束性エピトープである Pol IY11、Nef MY9 について、テトラマーを作製した。続いて、HLA-B\*52:01 および HLA-C\*12:02 を持つ検体より分離した PBMC をテトラマーで染色し、特異的 T 細胞の検出を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) 長期 ART 検体の収集

これまで我々のグループは、網羅的に無治療慢性日本人 HIV-1 感染者の CTL 反応と感染者の病態を解析することで、HIV-1 コントロールに重要な役割を持つ 13 種類の CTL を特定してきた。これらの研究をもとに、無治療慢性感染時検体において CTL 反応 (Spots > 200 / 1 million

CD8 cells) が観測された検体に絞り、引き続き国立国際医療 研究センターにて継続的に血液の採取が実施されているかどうかを調べた。その結果、長期 ART 治療 HIV-1 感染者 18 人 (ウイルス量検出限界以下) の検体を得ることができた。治療開始からの経過時間は平均 5 年であった。

### (2) CTL 反応の検出

長期 ART 治療 HIV-1 感染者から得られた PBMC に対し、慢性感染時に CTL 反応が観測された 13 種のエピトープ (Gag TL9, Gag MI8, Gag RI8, Gag WV8, Gag NL11, Gag AA9, Pol SV9, Pol SI8, Pol LA9, Pol IT10, Pol GI8, Pol IY11, Nef MY9) のいずれかを処理したところ、慢性感染時より減弱するものの、CTL 反応が認められることが明らかになった (図 1)。反応が消失してしまった検体は 5 人 (28%) のみであり、長期の ART 治療によって HIV-1 抗原がほとんど存在しなくなったとしても数年はメモリー T 細胞が残存していることが認められた。慢性感染時に非常に強い反応を示しているも、長期 ART により CTL が完全に消失している検体もあり、また減衰率と ART 治療期間の相関関係は認められなかった。

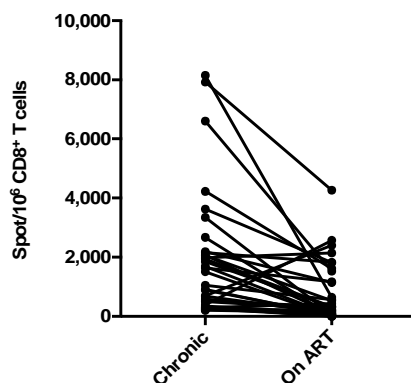


図 1. 慢性期および ART 下の CTL 反応の推移

### (3) テトラマーによる特異的 T 細胞の検出

従来 CTL 反応を調べるためにおこなってきた IFN- $\gamma$  ELISPOT assay では、長期 ART によって減少してしまった CTL 反応を検出することが困難である可能性があった。上記の研究結果により比較的多くの検体で CTL 反応が検出されたが、IFN- $\gamma$  ELISPOT assay で検出できなかった CTL 反応があると考えられた。そのためより正確にエピトープ特異的 T 細胞の分布を解析することのできるテトラマーを用いることが検討された。HLA-B\*52:01 拘束性エピトープである Gag RI8, Pol SI8, Gag WV8, Gag MI8, および HLA-C\*12:02 拘束性エピトープである Pol IY11, Nef MY9 を用いて、HLA-B\*52:01 および HLA-C\*12:02 を持つ検体の PBMC を染色し、同時に IFN- $\gamma$  ELISPOT assay でも CTL 反応の検出を試みたところ、CTL 反応無しと判定されたエピトープでも、特異的 T 細胞の集団 (CD8+Tet+ > 0.1% in CD3+ T cells) が認められた (図 2)。この結果より、長期 ART 治療により T 細胞が減弱し、IFN- $\gamma$  ELISPOT assay では観測することのできない集団があることが示唆された。

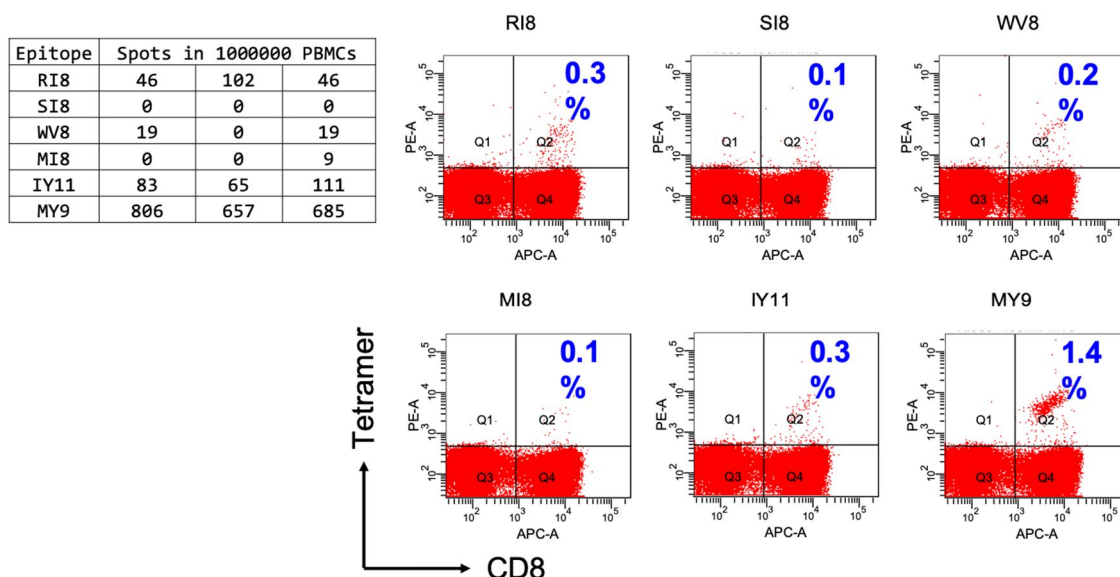


図 2. 6 種のエピトープにおけるテトラマー染色

#### (4) 今後の展望

本研究によって抗レトロウイルス療法（ART）開始後数年が経っていても HIV-1 特異的メモリーT細胞が残存していることが確認された。この結果は今後日本で Shock and Kill が実施される際に、我々が以前同定した HIV-1 増殖抑制能を有する CTL を標的として、誘導を試みることができる可能性を示唆している。

しかし一方で、テトラマーによるエピトープ特異的T細胞の検出方法の方が、IFN- $\gamma$  ELISPOT assay よりも感度が高いことが明らかになった。当初の計画では、IFN- $\gamma$  ELISPOT assay を用いて多くの検体を網羅的に解析するものであったが、対象とする全てのエピトープに関してテトラマーを作製し、解析を行う必要性が明らかとなった。今後、13 種類のエピトープのテトラマーを大量に作製し、それと同時に詳細な表現型・機能解析を行っている予定である。それにより、臨床免疫学的な知見も与えるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Murakoshi Hayato, Zou Chengcheng, Kuse Nozomi, Akahoshi Tomohiro, Chikata Takayuki, Gatanaga Hiroyuki, Oka Shinichi, Hanke Tomas, Takiguchi Masafumi	4. 巻 15
2. 論文標題 CD8+ T cells specific for conserved, cross-reactive Gag epitopes with strong ability to suppress HIV-1 replication	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Retrovirology	6. 最初と最後の頁 46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12977-018-0429-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Murakoshi Hayato, Kuse Nozomi, Akahoshi Tomohiro, Zhang Yu, Chikata Takayuki, Borghan Mohamed Ali, Gatanaga Hiroyuki, Oka Shinichi, Sakai Keiko, Takiguchi Masafumi	4. 巻 93
2. 論文標題 Broad Recognition of Circulating HIV-1 by HIV-1-Specific Cytotoxic T-Lymphocytes with Strong Ability to Suppress HIV-1 Replication	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01480-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01480-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zou Chengcheng, Murakoshi Hayato, Kuse Nozomi, Akahoshi Tomohiro, Chikata Takayuki, Gatanaga Hiroyuki, Oka Shinichi, Hanke Tomas, Takiguchi Masafumi	4. 巻 93
2. 論文標題 Effective Suppression of HIV-1 Replication by Cytotoxic T Lymphocytes Specific for Pol Epitopes in Conserved Mosaic Vaccine Immunogens	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e02142-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.02142-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究協力者	湯永 博之  (GATANAGA Hiroyuki)		