

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03726

研究課題名(和文) エイズ完治療法に必要な細胞傷害性T細胞の同定とその誘導法の研究

研究課題名(英文) Identification and induction of cytotoxic T cells for HIV-1 cure treatment

研究代表者

滝口 雅文 (Takiguchi, Masafumi)

熊本大学・ヒトレトロウイルス学共同研究センター・シニア教授

研究者番号：00183450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：複数の抗HIV-1薬による治療中の患者からHIV-1を完全に排除する治療を確立するためには、HIV-1潜伏感染細胞を認識するT細胞を誘導させる必要がある。本研究では、HIV-1の免疫逃避変異を認識できるCD8+T細胞の同定と、ナイーブT細胞からHIV-1の増殖を抑制できるCD8+T細胞の誘導を試みた。前者では2つの変異エピトープ(PolR18-6VおよびNefFF9)特異的T細胞を変異ウイルス感染者で同定し、これらのT細胞が変異ウイルス感染細胞を認識することを明らかにした。後者ではSTINGリガンドを用いてナイーブT細胞からHIV-1増殖抑制能を持ったHIV-1特異的T細胞の誘導に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性のウイルス感染症には、HIV-1以外にも肝炎、HTLV-1、ヘルペス感染症等があり、これらの感染症での原因ウイルスの排除は医学的にも非常に重要である。その中でもHIV-1感染症は、ウイルスの変異が最も激しく、ウイルスが人のゲノムの中に潜伏する最も治療が難しい感染症である。本研究は、潜伏するウイルスがわずかに活性化した時に認知できるT細胞や変異抗原を認知するT細胞を明らかにした研究で、エイズ研究ばかりでなく、他のウイルス感染症の研究にも貢献する研究成果と考えられる。

研究成果の概要(英文)：To achieve the treatment that eliminates HIV-1 in patients undergoing cART, it is necessary to establish a method that induce T cells which recognize HIV-1 latent cells. In the present study, we studied identification of CD8+ T cells which recognize mutations escaped from HIV-1-specific T cells as well as induction of CD8+ T cells having ability to strongly suppress HIV-1 replication from naive T cells. We found that HLA-B*52:01-restricted PolR18-6Vmutant-specific CD8+ T cells and HLA-B*35:01-restricted NefFF9 mutant-specific CD8+ T cells were elicited in individuals infected with HIV-1 mutant viruses and that these T cells effectively recognized cells infected with the mutant virus. We also established a method using a STING ligand for priming of functional HIV-1-specific CD8+ T cells from naive T cells. We effectively induced functional CD8+ T cells specific for three protective epitopes.

研究分野：ヒトのウイルス感染症分野の免疫学

キーワード：HIV-1 細胞傷害性T細胞 完治療法 逃避変異

1. 研究開始当初の背景

HIV-1 感染症は、抗 HIV-1 薬ができるまでは 2-4 年程度で多くの感染者がエイズで死亡する病気であったが、複数の抗 HIV-1 薬による治療法 (cART) が樹立され、先進国のみならず多くの国で死の病気ではなくなりつつある。しかし、HIV-1 は潜伏感染するために治療を中断することはできず、薬による副作用の問題や経済的な負担の問題、さらに一部の国では薬剤耐性ウイルスの出現の問題が起きている。このため完治療法の確立が強く期待されているが、潜伏感染 HIV-1 を排除する治療法 (Cure 治療) はまだ確立していない。Cure 治療の候補として、潜伏感染ウイルスを活性化させ、さらに活性化させた HIV-1 潜伏感染細胞を認識する免疫による感染細胞を排除する方法が考えられているが、どのような免疫が有効か全くわかっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、cART 治療下で潜伏 HIV-1 を再活性化させた細胞を認識できる能力を持った細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を明らかにし、その誘導方法を確立する。cART 治療下で HIV-1 潜伏感染細胞を再活性化させた場合は、自然感染時の HIV-1 感染細胞と比べて HIV-1 抗原の発現量は極めて少ないと考えられるので、わずかな HIV-1 の発現量でも認識できる CTL を同定する必要がある。また流行している HIV-1 は多様な変異を持っており、これらの HIV-1 が潜伏感染していると考えられるので、多様な変異を持った HIV-1 でも認識できる能力を持った CTL が、完治療には必要である。さらに cART 治療患者では、体内で HIV-1 蛋白が極めてわずかしか発現していないため、抗原提示によるメモリー T 細胞の維持は大きく低下しており、多くの患者では HIV-1 特異的 T 細胞はほとんど検出することができない。以上のことから本提案研究では、1. 抗原認識感度が高く、多様な変異を持った HIV-1 感染細胞を認識できる CTL の同定、2. cART 治療下でほとんど消失したか機能不全状態になっている CTL の再活性、もしくは再誘導する方法を確立する。これにより完治療に必要な T 細胞側の問題点を解決する。

3. 研究の方法

(1) 免疫逃避変異ウイルス感染者で HIV-1 変異ウイルスを認識することができる CTL の同定：
エピトープ部位の逃避変異を持っている感染者を選択するために HIV-1 シークエンス解析を行い、解析対象エピトープ部位に逃避変異を持っていると考えられる患者を選択する。これらの患者の PBMC を使用し、ELISPOT アッセイを用いて逃避変異エピトープに対する CTL を持っている患者を同定する。さらに逃避変異エピトープペプチドを使用し作製したテトラマーを用いて、これらの患者の PBMC 中に逃避変異エピトープ特異的 T 細胞を検出し、これを分離培養して、逃避変異エピトープ特異的 CTL 細胞株を作製する。逃避変異 HIV-1 ウイルスを作製し、この CTL 細胞株を用いて、逃避変異 HIV-1 感染細胞の認識能、HIV-1 増殖能抑制能の測定を行い、HIV-1 逃避変異ウイルスの増殖を強く抑制する CTL を明らかにする。

(2) 2 年以上の cART 治療患者での HIV-1 特異的 CD8 + T 細胞の検出：

患者体内の特異的 CTL の有無の確認を行うために、2 年以上 cART 治療を受け、血漿ウイルス量 (pVL) が検出限界以下の HIV-1 サブタイプ B 感染者 90 名を対象とし、63 種類のエピトープペプチドに対する治療前後の T 細胞数を ELISPOT アッセイで解析した。

(3) naïve T細胞から高機能 HIV-1 特異的 CTL を誘導：

HIV-1 非感染者の末梢血単核細胞を STING リガンド 3'3'-cGAMP で刺激を入れ、HLA-B*52:01 エピトープペプチド存在下で 10 日間培養して、エピトープ特異的 CD8 + T 細胞が誘導できるかを調べた。さらに誘導できた T 細胞の機能を解析した。

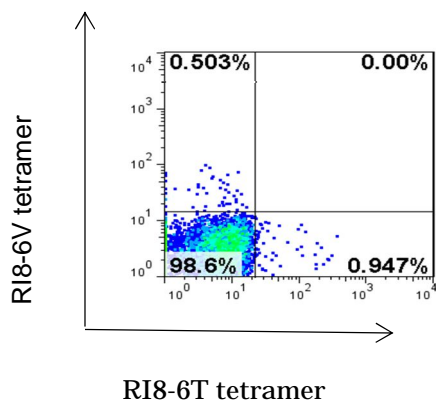
4. 研究成果

(1) 免疫逃避変異ウイルス感染者で HIV-1 変異ウイルスを認識することができる CTL の同定：

HLA-B*52:01 拘束性 T 細胞エピトープ GagRI8 は、HIV-1 の増殖を強く抑制する“抑制エピトープ”として知られており、HLA-B*52:01 陽性感染者の 26% に 3 つの変異 (Gag280A/S/V) が見られる。そこで、RI8 特異的 T 細胞と RI8 逃避変異特異的 T 細胞による HIV-1 の増殖抑制についての研究を行った。その結果、Gag280A/S 変異ウイルスに感染した HLA-B*52:01 陽性患者では、これらの変異ウイルス特異的 T 細胞の誘導が見られなかったが、Gag280V 変異ウイルスに感染した患者では、この変異を認識する RI8-6V 変異特異的 T 細胞の誘導が見られた (図 1)。RI8-6V 変異特異的 T 細胞は、Gag280V 変異ウイルスの増殖を抑制したことから、野生型ウイルス Gag280I を選択すると考えられた。一方、野生型および RI8-6V 変異特異的 T 細胞が誘導できた人は、誘導できなかった人と比べて、高い CD4T 細胞数が見られたことから、これらの T 細胞の存在により体内の HIV-1 の増殖は抑制されていると考えられた。これらのことから、この変異特異的 T 細胞は HIV-1 の増殖抑制に貢献していることが明らかにできた。

HLA-B*35:01 拘束性エピトープである NefYF9 内の NefY135F 変異は、NefYF9 特異的 T 細胞からの逃避変異である。この変異を持った HLA-B*35:01 陽性者では、NefYF9 特異的 T 細胞が誘導されており、NefY135F 変異ウイルス感染細胞を認識し、そのウイルスの増殖抑制能を保有していた。

図 1



(2) 2年以上の cART 治療患者での HIV-1 特異的 CD8 + T 細胞の検出：

治療前後に ELISPOT アッセイで解析した HIV-1 特異的 T 細胞のうち約 42% が治療後も検出されたが、これらの T 細胞数は治療前に比べると 26% 程度まで低下していた。治療後に見られる T 細胞の検出頻度は治療期間により大きな影響を受けないが、治療直前の CD4 数および pVL とはそれぞれ負の相関および正の相関が見られた。特に AIDS で治療開始した HIV-1 感染者では、治療前の CD4 数と治療後の T 細胞の検出頻度に強い負の相関が見られ、治療による CD4 数の回復が大きいほど治療後の T 細胞の検出頻度が高い傾向が見られた。さらに AIDS 治療患者の多くで HIV-1 特異的 T 細胞の増殖能が治療前に比べると回復していることがわかった。このことから治療前に HIV-1 特異的 T 細胞の検出が困難だった AIDS 患者でも、治療で免疫的回復が見られ

ると特異的 T 細胞の誘導とその機能回復が示唆された。これらの研究成果から、cART 治療患者に見られる HIV-1 特異的 T 細胞の一部は、再活性化した潜伏感染細胞を認識できる可能性がある。今後このような解析が行うことが重要と考えられた。

(3) naïve T 細胞から高機能 HIV-1 特異的 CTL を誘導：

STING リガンド 3'3'-cGAMP と 4 つの HLA-B*52:01 の protective エピトープペプチドを用いて、ナイーブ T 細胞からエピトープ特異的 CD8 陽性 T 細胞の誘導を試みた。4 つの HLA-B*52:01 拘束性のエピトープのうち 3 つが STING によってナイーブ T 細胞から誘導できることが確認できた。一方、3 つの HLA-C*12:02 エピトープペプチドを用いても特異的な CD8 陽性 T 細胞の誘導はできなかった(図2)。誘導できた HLA-B*52:01 拘束性 T 細胞は強いウイルス抑制能を保有し、細胞傷害活性に関与するパーフォリン分子の発現量も高かった(図3)。以上のことから、STING リガンドを用いた機能を持った HIV-1 特異的 T 細胞の誘導による Cure 治療の可能性が期待された。

図 2

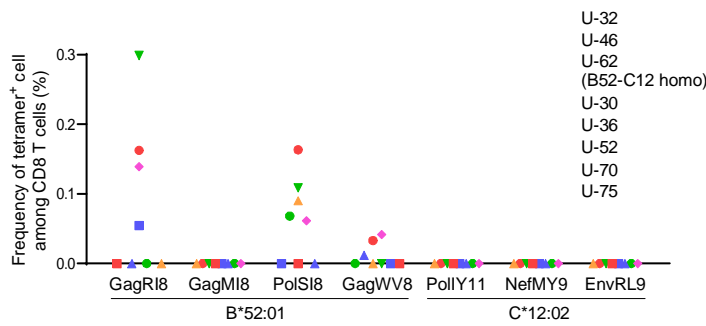
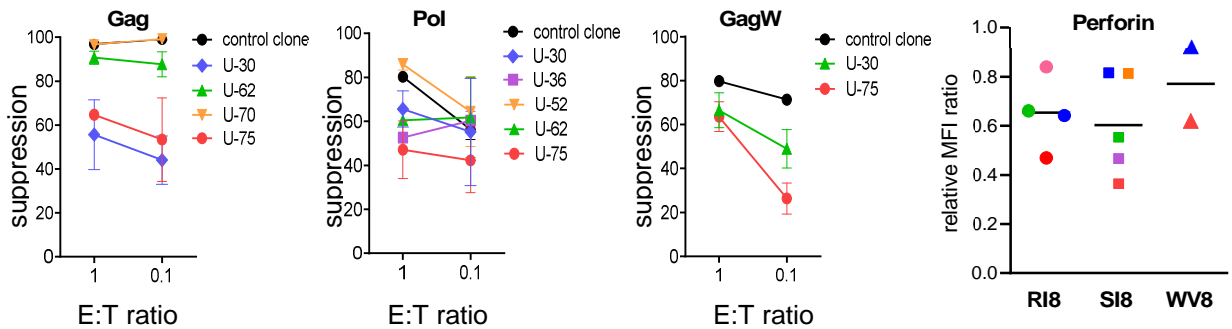


図 3



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Zhang Yu, Chikata Takayuki, Kuse Nozomi, Murakoshi Hayato, Gatanaga Hiroyuki, Oka Shinichi, Takiguchi Masafumi	4. 巻 96
2. 論文標題 Immunological Control of HIV-1 Disease Progression by Rare Protective HLA Allele	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01248-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/jvi.01248-22	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 -
1. 著者名 Kuse Nozomi, Akahoshi Tomohiro, Takiguchi Masafumi	4. 巻 95
2. 論文標題 STING Ligand-Mediated Priming of Functional CD8+ T Cells Specific for HIV-1-Protective Epitopes from Naive T Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e00699-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.00699-21	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 -
1. 著者名 Kuse Nozomi, Murakoshi Hayato, Akahoshi Tomohiro, Chikata Takayuki, James Katherine L., Gatanaga Hiroyuki, Rowland-Jones Sarah L., Oka Shinichi, Takiguchi Masafumi	4. 巻 95
2. 論文標題 Collaboration of a Detrimental HLA-B*35:01 Allele with HLA-A*24:02 in Coevolution of HIV-1 with T Cells Leading to Poorer Clinical Outcomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01259-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01259-21	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 Zhang Yu, Kuse Nozomi, Akahoshi Tomohiro, Chikata Takayuki, Gatanaga Hiroyuki, Oka Shinichi, Murakoshi Hayato, Takiguchi Masafumi	4. 巻 94
2. 論文標題 Role of Escape Mutant-Specific T Cells in Suppression of HIV-1 Replication and Coevolution with HIV-1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01151-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01151-20	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kuse Nozomi
2. 発表標題 Effective priming of functional CD8+ T cells specific for HIV protective epitopes from naive T cells
3. 学会等名 Oxford-Kumamoto Universities Joint Annual Symposium 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Zhang Yu, Chikata Takayuki, Kuse Nozomi, Murakoshi Hayato, Gatanaga Hiroyuki, Oka Shinichi, Takiguchi Masafumi
2. 発表標題 Immunological Control of HIV-1 Disease Progression by Rare Protective HLA Allele
3. 学会等名 Oxford-Kumamoto Universities Joint Annual Symposium 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kuse Nozomi、Akahoshi Tomohiro、Takiguchi Masafumi
2. 発表標題 Functional CD8+ T cells specific for HIV-1 protective epitopes primed with STING Ligand
3. 学会等名 第35回日本エイズ学会学術集会・総会 日仏シンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

熊本大学 ヒトレトロウイルス学共同研究センター 国際先端研究部門 国際連携分野（滝口研究室）
<https://kumamoto-u-jrchri.jp/takiguchi/default.html>

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 分 担 者	近田 貴敬 (Chikata Takayuki) (60749711)	熊本大学・ヒトレトロウイルス学共同研究センター・特任講師 (17401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関