

令和 6 年 4 月 25 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07061

研究課題名（和文）SIV感染における特異的CD8陽性T細胞ドミナンスの複製制御に与える影響の解析

研究課題名（英文）Analysis of CD8+T-cell dominance in SIV progressor

研究代表者

野村 拓志（Nomura, Takushi）

熊本大学・ヒトレトロウイルス学共同研究センター・講師

研究者番号：80711001

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：SIV複製非制御サルでは、感染後1年以内に7つのCD8陽性T細胞のエピトープ領域のうち5から7か所でウイルス変異が選択されていた。感染後6カ月間の血中ウイルス量は、感染後1年の時点で変異が選択されたCD8陽性T細胞エピトープ領域数と正の相関があり、感染後早期のウイルス増殖とのちの変異選択の蓄積の関連性を示した。SIV複製非制御個体では、Gag241-249特異的CD8陽性T細胞反応が早期に誘導されていたが、必ずしもGag241-249エピトープ領域における変異の早期選択につながらず、エピトープ領域における変異選択の順序は免疫誘導の優位性のみでは決定されない可能性があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SIV感染複製非制御サルを用い、高精度にウイルスの変異選択出現の感染後週数を同定することで、T細胞エピトープ領域における変異選択の階層性を明らかとした。さらに、感染後早期のウイルス増殖とのちの変異選択の蓄積の関連性を示した。本モデルはエピトープ領域における変異選択順序を決定する要因の解析に有用であり、本研究結果はウイルス複製制御下におけるウイルスと宿主CTLとの相互作用の理解に結びつく基盤情報として重要である。

研究成果の概要（英文）：Viral mutant selections in seven epitope regions associated with CD8-positive T-cell responses were examined in SIV progressors. Hierarchy of these epitope mutations in sequential selection was indicated. Higher viral load was correlated with enhanced accumulation of viral mutations. This model would be useful for analysis of the determinants for sequential epitope mutation selection, contributing to understanding of virus-host CD8+ T-cell interaction in HIV infection.

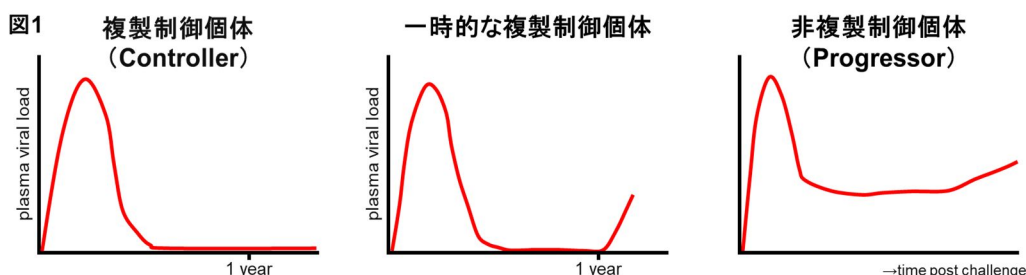
研究分野：感染免疫学

キーワード：SIV HIV 複製制御 免疫ドミナンス 複製非制御個体 エピトープ領域 変異選択

1. 研究開始当初の背景

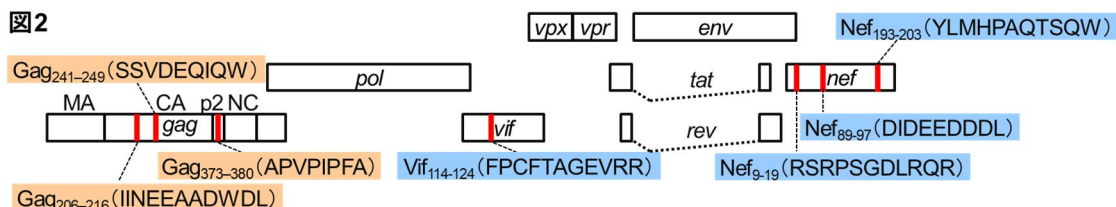
全世界での HIV 感染者数は 2019 年末には 3800 万人と推定されており、増加傾向であった。新規感染者数は減少傾向であり 2000 年の約 280 万人に対し同年約 170 万人が新規に HIV に感染したと試算されていた。わが国では新規感染者数の報告数は 900 名強と、人口比率で見るとアフリカなどの流行地と比較すると少ないものの、新規感染者は 2007 年以降 1000 人前後を推移しており、新規感染者の減少している他の多くの先進諸国とは異なり予断を許さない状況といえた。抗レトロウイルス薬治療 (ART) の進歩と普及により世界での AIDS 発症による死者数は減少しているものの、HIV は感染細胞の染色体内にプロウイルスとして長期間存在し、ART 中断後に復帰する起源となる潜伏感染細胞を体内から完全に排除することはできない。病態の進行を抑えるためには抗 HIV 薬の服用を一生続ける必要があり、感染者への負荷とともに、社会保障費用の負担も大きい。HIV の完治を目指した一般的な治療は現在までになく、その確立が望まれた。HIV の完治を目指した一般的な治療や、予防ワクチンは現在までに実用化されておらず、その確立が望まれる。HIV 感染者からのウイルスの完全な排除には薬剤だけでは不十分であり、宿主の免疫応答つまり細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 応答を有効に惹起する必要があるとの議論がなされており (K Deng, et al., Nature 517:381-5, 2015.) CTL 反応と体内ウイルス排除の機構のより詳細な解析は、完治に向けた基礎知見となりうる。

アカゲザルにおけるサル免疫不全ウイルス (SIV) 感染エイズモデルは、ヒトの HIV 感染症と近似性の高い病態を示す動物モデルである。申請者は以前の研究において、SIVmac239 感染 MHC-I ハプロタイプ 90-120-1a 共有ビルマ産アカゲサル群を用い、SIV 複製制御個体 (Controller と呼称) における CTL による長期複製制御維持機構を解析し (Nomura T. et al., PLoS Pathog 11:e1005247, 2015.) 複製制御状態の異なる 2 つの群を見出している。本研究に引き続き申請者らは当該動物モデルを用いて潜伏感染細胞動態を明らかとしつつあり、同時に SIV Controller における長期複製制御維持に必要な CTL 反応の性質を部分的に解明した。SIV Controller を用いた一連の解析では、Controller の一部の個体ではドミナント CTL にかわりサブドミナント CTL が感染慢性期に複製制御維持に感染慢性期に寄与すると報告しているが、Controller では血中ウイルス量が検出限界未満となるため、体内で選択された CTL 逃避変異の解析を継続して行うことができず、宿主免疫反応からの逃避のパターンを高精度に描出することは難しかった。さらに SIVmac239 感染 MHC-I ハプロタイプ 90-120-1a 共有サルは安定した長期の複製制御を示す個体もいれば、複製制御が一時的でちにウイルス血症が再出現する場合や、複製制御に至らない非複製制御個体 (Progressor) もおり、その転帰はさまざまである (図 1)。この MHC-I ハプロタイプ 90-120-1a 共有サルが SIV 感染後に複製制御に至るか否かを規定するウイルス側・宿主免疫側の因子はいまだに不明であり、SIV 感染に対する細胞免疫応答と逃避変異選択の詳細な解析が必要であった。



2. 研究の目的

本研究では MHC-I ハプロタイプ 90-120-1a 共有 SIV Progressor に着目し、細胞性免疫応答と逃避変異選択の詳細な解析を行い、ウイルス特異的 CD8 陽性 T 細胞応答のドミナンスと複製制御の機序を考察することを第一の目的とした。これまでの研究により MHC-I ハプロタイプ 90-120-1a 共有サルの MHC-I 拘束性エピトープの基礎的な知見が蓄積されており、Gag₂₀₆₋₂₁₆、Gag₂₄₁₋₂₄₉、Gag₃₇₃₋₃₈₀、Vif₁₁₄₋₁₂₄、Nef₉₋₁₉、Nef₈₉₋₉₇、Nef₁₉₃₋₂₀₃ が MHC-I ハプロタイプ 90-120-1a に拘束されるエピトープとして同定されていた (図 2、Kawada M, et al. J. Virol. 2006、Nomura T, et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2014)。



すでに SIV 感染サルの PBMC・血漿等が凍結保存され蓄積されており、準備がなされていた

め、本研究ではこれを用いる予定とした。MHC-I ハプロタイプ *90-120-1a* 共有 SIV Progressor の血漿中 SIV RNA ゲノムを RT-PCR 法を用いて増幅し、エピトープ領域の塩基配列からアミノ酸配列を解析し、これらのエピトープに変異選択が生じた感染後の週数を決定する方針とした。このウイルス RNA の解析は経時的にかつ短間隔に行うことで、高い精度で変異選択の出現時期を解析することを期しており、各エピトープにおける逃避変異の出現時期および順序のパターンを評価することとした。また MHC-I ハプロタイプ *90-120-1a* 共有 SIV Progressor において抗原特異的 T 細胞動態を解析することで、複製制御に有利にはたらく CTL 応答と、複製制御に不利にはたらく CTL 応答の性情についての知見を得ることを期待した。また各エピトープ特異的な CTL 応答の誘導時期と、各エピトープにおける逃避変異選択の出現時期を重ね合わせることで、CTL 応答が誘導されてから CTL 逃避変異が選択されるまでの期間が解析でき、Progressor の個体内での各エピトープにおける CTL 逃避変異の選択されやすさと有効な期間の評価が可能であると考えられた。

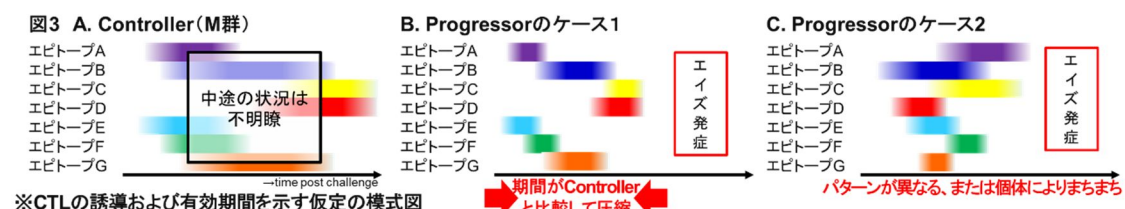
Controller の一部の個体 (M 群) では、Gag の CTL エピトープに対して CTL 逃避変異が蓄積した結果、Gag のエピトープ特異的な CTL 応答の有効性が低下し、かわって Vif₁₁₄₋₁₂₄ および Nef₁₉₃₋₂₀₃ エピトープ特異的 CTL が誘導されることで感染後 2 年以降に複製制御維持に寄与する可能性があることを申請者は過去に報告しているが、検体が限定されていたことから解析できた感染後週数の間隔が大きい。特に CTL 逃避変異の選択の時期と、エピトープごとの逃避変異選択の順序の情報は限られているものの、Vif₁₁₄₋₁₂₄ および Nef₁₉₃₋₂₀₃ エピトープ特異的 CTL が遅れて誘導されることで複製制御維持の最後の要となる場合があることは明確に示されている (Nomura T. et al., PLoS Pathog 11:e1005247, 2015.)。本研究では、Progressor を用いて高精度に CTL 応答誘導と逃避変異選択のドミナンスを解析することを主目的としているが、この過去に得られた Controller での知見と比較することで、Controller と Progressor の CTL 反応の誘導と逃避変異選択のドミナンスの比較を行うことがふたつめの目的であった。

3. 研究の方法

本研究では MHC-I ハプロタイプ *90-120-1a* を共有する 7 個体の SIV Progressor のコホート群を用いて解析を行った。まず凍結保存してある血漿から RNA を抽出し、RT-PCR 法により MHC-I ハプロタイプ *90-120-1a* に拘束される Gag₂₀₆₋₂₁₆、Gag₂₄₁₋₂₄₉、Gag₃₇₃₋₃₈₀、Vif₁₁₄₋₁₂₄、Nef₉₋₁₉、Nef₈₉₋₉₇、Nef₁₉₃₋₂₀₃ エピトープを含む領域を増幅し、エピトープ領域におけるアミノ酸非同義置換変異を配列解析により決定した。エピトープ領域における変異選択の時期を評価するため、血漿中ウイルス RNA 配列の解析を経時的に行い、変異選択の感染後週数を同定した。また感染後 3, 6, 12 か月の PBMC をエピトープペプチド-MHC-I テトラマー 用いて染色し、フローサイトメトリー法により Gag₂₄₁₋₂₄₉ および Nef₁₉₃₋₂₀₃ 特異的 CD8 陽性 T 細胞頻度を解析した。

このように本研究では細胞性免疫応答と逃避変異選択の詳細な解析を行い、細胞免疫応答のドミナンスと複製制御の機序を明らかとした。続いて Controller と Progressor の CTL 応答誘導と逃避変異選択のドミナンスの比較を行うことで、protective MHC-I 遺伝子である MHC-I ハプロタイプ *90-120-1a* を共有するサルが SIV 感染後に複製制御に至るか否かを規定するウイルス側・宿主免疫側の因子を考察した。

過去の研究 (Nomura T. et al., PLoS Pathog 11:e1005247, 2015.) により限定的ながら明らかとなった Controller (M 群) の知見では、ドミナント CTL である Gag のエピトープ特異的 CTL の効果が逃避変異の選択により減弱した結果、Vif₁₁₄₋₁₂₄ および Nef₁₉₃₋₂₀₃ エピトープ特異的 CTL がサブドミナント CTL として後期に誘導され複製制御に寄与するものであった (図 3A)。Progressor においては Controller と各エピトープ特異的 CTL 応答の誘導の順序や CTL 逃避変異選択の順序はおおむね同じであるものの、Progressor におけるその経過が Controller と比較して短期間に圧縮されている可能性がある (図 3B)。この場合、Progressor では早期に CTL 逃避変異の蓄積が進行し、血中ウイルス量の制御に至らない説明となる。いっぽうでより興味がある可能性は、Controller (M 群) と Progressor の各エピトープ特異的 CTL 応答の誘導・CTL 逃避変異選択の順序が全く異なったり、Progressor のなかでも CTL 応答の誘導・CTL 逃避変異選択のパターンが一定せず個体によりまちまちなパターンを示す場合である (図 3C)。この場合、全く新しい知見として、SIV 複製制御に必要なウイルス特異的 CD8 陽性 T 細胞ドミナンスが存在することが明らかとなることが想定された。



4. 研究成果

HIV 感染症では、CD8 陽性 T 細胞は MHC-I により拘束された複数のエピトープを認識し、ウイルス複製制御に中心的な役割を担う。持続感染に際し、宿主体内のウイルスに CD8 陽性 T 細胞

ピトープ領域に逃避変異が選択され蓄積すると、CD8 陽性 T 細胞によるウイルス制御が破綻し病態が進行することが示されている。しかし、HIV/SIV 感染症における CD8 陽性 T 細胞エピトープの変異選択の階層性は、十分に解明されていなかった。SIVmac239 感染ビルマ産アカゲサルエイズモデルはヒトにおける HIV 感染症と高い近似性を示すモデルであり、当時の所属研究室では SIV 感染に対し強い複製制御を示す MHC-I 遺伝子型である、MHC-I ハプロタイプ *90-120-1a* を共有するサル群において誘導される SIV 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応の性質と複製制御の関連を報告していた。本研究では、7 個体の MHC-I ハプロタイプ *90-120-1a* 共有 SIV 複製非制御サルを用い、MHC-I ハプロタイプ *90-120-1a* に関連する 7 か所の CD8 陽性 T 細胞のエピトープ領域におけるウイルス変異選択の感染後週数および順序を検討した。SIV 複製非制御サルでは、感染後 1 年以内に 7 つの CD8 陽性 T 細胞のエピトープ領域のうち 5 から 7 か所でウイルス変異が選択されていた。Gag₂₀₆₋₂₁₆ と Nef₉₋₁₉ の 2 つのエピトープ領域において最初に変異が選択され、Vif₁₁₄₋₁₂₄ エピトープ領域では遅く 3 個体では感染後 1 年の時点でも変異が選択されず、Gag₂₄₁₋₂₄₉ エピトープ領域での変異選択時期は中間の傾向であった。感染後 6 カ月間の血中ウイルス量は、感染後 1 年の時点で変異が選択された CD8 陽性 T 細胞エピトープ領域数と正の相関があり、感染後早期のウイルス増殖とのちの変異選択の蓄積の関連性を示した。SIV 複製非制御個体では、Gag₂₄₁₋₂₄₉ 特異的 CD8 陽性 T 細胞反応が早期に誘導されていたが、必ずしも Gag₂₄₁₋₂₄₉ エピトープ領域における変異の早期選択につながらず、エピトープ領域における変異選択の順序は免疫誘導の優位性のみでは決定されない可能性があることが示唆された。さらに、Controller の過去の知見と比較すると、Progressor は変異選択の順序は大幅には変わらないものの、その期間が圧縮されていることが示唆された。本モデルはエピトープ領域における変異選択順序を決定する要因の解析に有用であり、本研究結果は、ウイルス複製制御下におけるウイルスと宿主 CTL との相互作用の理解に結びつく基盤情報として重要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Daniel Thoresen, Kenta Matsuda, Akane Urakami, Mya Myat Ngwe Tun, Takushi Nomura, Meng Ling Moi, Yuri Watanabe, Momoko Ishikawa, Trang Thi Thu Hau, Hiroyuki Yamamoto, Yuriko Suzaki, Yasushi Ami, Jonathan F. Smith, Tetsuro Matano, Kouichi Morita, and Wataru Akahata	4. 巻 ahead of print
2. 論文標題 A tetravalent dengue virus-like particle vaccine induces high levels of neutralizing antibodies and reduces dengue replication in non-human primates	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e00239-24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/jvi.00239-24	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 該当する

1. 著者名 Midori Nakamura-Hoshi, Takushi Nomura, Masako Nishizawa, Trang Thi Thu Hau, Hiroyuki Yamamoto, Midori Okazaki, Hiroshi Ishii, Kenzo Yonemitsu, Yuriko Suzaki, Yasushi Ami, and Tetsuro Matano	4. 巻 11(4)
2. 論文標題 HTLV-1 Proliferation after CD8 + Cell Depletion by Monoclonal Anti-CD8 Antibody Administration in Latently HTLV-1-Infected Cynomolgus Macaques	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e0151823
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/spectrum.01518-23	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 Ntim Nana Afia Asante, Ishii Hiroshi, Jomori Moe, Yamamoto Hiroyuki, Matano Tetsuro, Nomura Takushi	4. 巻 607
2. 論文標題 Hierarchy of multiple viral CD8+ T-cell epitope mutations in sequential selection in simian immunodeficiency infection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 124 ~ 130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.03.108	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 Ishii Hiroshi, Terahara Kazutaka, Nomura Takushi, Okazaki Midori, Yamamoto Hiroyuki, Shu Tsugumine, Sakawaki Hiromi, Miura Tomoyuki, Watkins David I., Matano Tetsuro	4. 巻 30
2. 論文標題 Env-independent protection of intrarectal SIV challenge by vaccine induction of Gag/Vif-specific CD8+ T cells but not CD4+ T cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Therapy	6. 最初と最後の頁 2048 ~ 2057
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymthe.2022.02.023	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 Kanno Yoshiaki, Hau Trang Thi Thu, Kurokawa Rise, Nomura Takushi, Nishizawa Masako, Matano Tetsuro, Yamamoto Hiroyuki	4. 巻 35
2. 論文標題 Late-phase dominance of a single epitope-specific CD8+ T-cell response in passive neutralizing antibody-infused simian immunodeficiency virus controllers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 AIDS	6. 最初と最後の頁 2281 ~ 2288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/QAD.0000000000003013	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Takushi Nomura
2. 発表標題 The development of a novel animal model for analyzing immune responses in tissues which contributes to eliminating the HIV reservoir.
3. 学会等名 第37回日本エイズ学会学術集会・総会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 黒川理世、Chatherine Silas Mtali, Omnia Reda、佐藤賢文、小野昌弘、野村拓志
2. 発表標題 SARS-CoV-2感染マウスモデルを用いた年齢依存的な病態に関連するT細胞動態の解析
3. 学会等名 第70回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ntim Nana Afia Asante, Takushi Nomura, Hiroshi Ishii, and Tetsuro Matano
2. 発表標題 Selection of multiple viral CD8+ T-cell escape mutations associated with a protective MHC-I haplotype in persistent SIV infection
3. 学会等名 The 22nd Kumamoto AIDS Seminar
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 ウイルス病態学分野 website 研究業績
<https://kumamoto-u-hrc-virop.wixsite.com/website/%E7%A0%94%E7%A9%B6%E6%A5%AD%E7%B8%BE>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------