

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590412

研究課題名（和文）HIV タンパク質の動態が細胞性免疫応答の抗 HIV 活性に与える影響

研究課題名（英文）Influence of HIV protein kinetics on anti-HIV effects in HIV-specific cellular immune response

研究代表者

立川 愛（TACHIKAWA AI）

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：10396880

研究成果の概要（和文）：

HIV 感染では多様な標的部（エピトープ）に対する HIV 特異的細胞傷害性 T 細胞(CTL) が誘導される。本研究では、HIV が 1 アミノ酸の変異を獲得することによって複数のエピトープの抗原性が変化し、既存のエピトープが消失し、新しいエピトープが出現する「エピトープスイッチング」が起きることを見いだした。慢性感染症である HIV 感染において、宿主免疫監視機構とウイルスの動態はこれまで考えられてきた以上に複雑な相互作用の結果、決定されているものであることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Strong and broad HIV-specific CTLs are induced against numerous targets (epitopes) during HIV infection. In this study, we demonstrates a mechanism, which generates *de novo* CTL epitope after one amino acid change that might result from the CTL pressure to the overlapping epitope. This novel “epitope switching” mechanism that occurs in host immunity might help the understanding of cellular immunity and CTL vaccine development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：病原性、HIV 感染症、CTL、抗原提示、エスケープ変異

1. 研究開始当初の背景

HIV 感染におけるウイルス制御には宿主の細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) による細胞性免疫応答が重要であることが、臨床材料やサルエイズモデルによる多くの知見により明らかとなってきた。しかしながら、海外で行われた大規模な CTL 誘導型ワクチンの臨床試

験では全く効果が見られず、失敗に終わった。このような背景のもと、HIV ワクチン開発において HIV に対する細胞性免疫応答に関して、分子レベルでの基礎的知見を蓄積することの重要性が再認識されている。HIV 感染では感染初期から経過を通して非常に強い CTL 誘導が観察されるが、HIV 特異的

CTL の頻度と血中 HIV 量の間には相関がなく、個々の CTL の質が重要であることが明らかとなってきた。CTL の標的となる部位 (エピトープ) は HIV タンパク質全体に存在しており、数千種類のエピトープが報告されている。中でも Gag と Nef タンパク質に多くのエピトープが存在しており、数十のエピトープが重複している部位もある。CTL に認識されるエピトープは 10 アミノ酸前後のペプチドであり、1 アミノ酸の変化がその抗原性に影響を及ぼす。HIV は非常に変異を起しやすいうイルスであるため、CTL による選択圧から逃避したエスケープウイルスが容易に出現する。このような状況では、あるエピトープに対する CTL 選択圧からの逃避の結果生じたアミノ酸変異が、重複する他のエピトープの抗原性に影響を与える可能性がある。

2. 研究の目的

長期の感染経過をたどり、多様な CTL が誘導される慢性 HIV 感染症における、CTL の抗 HIV 作用とウイルスの相互作用について明らかにする。本研究では、HLA-A*2402 (HLA-A24) によって提示される重複する CTL エピトープに注目し、HLA-A24 陽性 HIV 感染者で特異的に出現するアミノ酸変異がそれぞれのエピトープに特異的な CTL の抗原認識に与える影響について、検討を行った。

3. 研究の方法

HLA-A24 拘束性エピトープに対する HIV 慢性感染者での CTL 応答: HLA-A24 陽性慢性 HIV 感染者の末梢血単核球(PBMC)を非特異的に刺激し、試験管内で増殖させた細胞を用いて、各エピトープ配列の合成ペプチドを抗原として Interferon- γ ELISpot assay を行った。

HIV 感染者のウイルス遺伝子解析: HIV 感染者血漿からウイルス RNA を抽出し、Nef126-10, Nef134-10 を含む領域を RT-PCR にて増幅し、シーケンスを行った。

CTL クローンの樹立: HLA-A24 陽性慢性 HIV 感染者 PBMC を Nef126-10, Nef134-10 ペプチドにて刺激後 IL-2 存在下で培養し、クローニングを行った。

野生型及び変異を有するエピトープと HLA-A24 との結合能、特異的 CTL クローンとのアビディティの評価:

HLA-A24 との結合能は T2-A24 細胞を用いて評価した(*J Virol*,2004,78:8437-45)。特異的 CTL クローンとのアビディティは、段階希釈したペプチドをパルスした HLA-A24 陽性細胞と CTL クローンを共培養し、上清中の IFN- γ 産生量を測定することで算出した。

野生型及び変異を有するエピトープのプロセッシング効率の評価

Nef126-10, Nef134-10 を含む Nef タンパク質の一部とルシフェラーゼとの融合タンパク

質を発現するプラスミドを構築し、HLA-A24 を発現する 293T 細胞に遺伝子導入を行い、抗原提示細胞とした。遺伝子導入 24 時間後に Nef126-10 及び Nef134-10 特異的 CTL クローンと共培養し、上清中の IFN- γ 産生を測定することで抗原提示量を解析した。

なお、臨床材料 (HIV 感染者の末梢血) は東京大学医科学研究所附属病院を受診する HIV-1 感染者で、本研究への参加に同意を得られた方から提供していただいた。本研究内容は東京大学医科学研究所の倫理審査委員会により承認されている。

4. 研究成果

【HLA-A24 拘束性エピトープに対する CTL の反応性】

47 名の HLA-A24 陽性慢性 HIV 感染者の PBMC を用いて、報告されている 11 種類 HLA-A24 拘束性 CTL エピトープ (Gag 6 種類、Pol 2 種類、Nef 3 種類) に対する CTL 応答を解析した。その結果、エピトープ間で反応性が大きく異なっており、中でも Nef 由来の Nef126-10, Nef134-10 に対してそれぞれ約 50%、80% の感染者で強い CTL 応答が見られ、この重複する 2 つのエピトープはイムノドミナントなエピトープであることが明らかとなった。

【Nef126-10, Nef134-10 におけるアミノ酸変化と CTL 応答の関連性】

Nef126-10, Nef134-10 について末梢血中の HIV 遺伝子解析を行ったところ、75% を超える感染者で両エピトープが重複している 135 番目のアミノ酸 (Nef135) が野生型のタイロシン (Y) からフェニルアラニン (F) へ変異していた。(この結果は以前報告した結果と同様であり、先行研究では HLA-A24 陰性感染者では出現頻度が低いことを明らかにしている (*J Virol*,2004,78:8437-45)) Nef135 変異の出現と Nef126-10, Nef134-10 特異的 CTL 応答の関連性を調べたところ、Nef134-10 特異的な CTL 応答はウイルスのアミノ酸配列に関わらず反応が見られたが、Nef126-10 に対する CTL 応答は Nef135 が野生型である感染者では全く検出されず、135F である感染者では全例で CTL 応答が検出された。この結果により 135F 変異が Nef126-10 特異的 CTL 応答の出現に強く関与していることが示唆された。

【Nef135 におけるアミノ酸変化と Nef126-10, Nef134-10 の抗原提示】

抗原提示に影響を与える要因、1) HLA との結合能、2) 特異的 CTL による認識 (アビディティ)、3) 細胞内でのエピトープの切り出し (プロセッシング) 効率に関して、Nef135 が Y (野生型) と F (変異型) の場合での Nef124-10, Nef134-10 について、検討を行った。その結果、Nef134-10 はいずれの場合でも HLA-A24 と強く結合し、特異的 CTL に

より認識されたが、細胞内で抗原を発現させた場合、Nef135F ではほとんど抗原提示されていなかった。一方、Nef126-10 においては、Nef135Y の場合、HLA-A24 との結合能が著明に低く、また特異的 CTL にほとんど認識されず、抗原提示もされていなかったのに対して、Nef135F の場合、HLA-A24 との結合能、特異的 CTL による認識ともに高く、細胞内で抗原発現させた場合でも特異的 CTL に非常に強く認識されていた。すなわち、「Nef135 が野生型の場合、Nef126-10 はエピトープとして抗原提示されておらず Nef134-10 が抗原提示される、一方 Nef135 が変異型の場合、Nef134-10 はほとんど提示されず Nef126-10 が抗原提示される」ことが明らかとなった。Nef135 のアミノ酸変化が、Nef134-10 の抗原提示を消失させ、Nef126-10 を新たにエピトープとして創出したことが強く示唆された。

【HIV 感染者体内での Nef135F の出現と Nef126-10, 134-10 に対する CTL 応答の経時的解析】

HIV 感染者で実際に Nef135 のアミノ酸変化と Nef126-10, Nef134-10 に対する CTL 応答の連動が見られるかを確認するため、血中 HIV の Nef135 が感染の経過において Y から F に変化した HIV 感染者の Nef126-10, Nef134-10 特異的 CTL を経時的に解析した。その結果、ウイルスが Nef135Y の時点では Nef134-10 特異的 CTL 応答のみが検出されたが、Nef135F に変異した後の時点では、Nef126-10 に対する強い CTL 応答が検出され、Nef134-10 に対する CTL 応答は減弱していた。この結果により、実際に HIV 感染者において Nef126-10 特異的 CTL 選択圧により Nef135 が Y から F に変異することで、Nef126-10 が新たにエピトープとして創出されたことが明らかとなった。

これまで、HIV 感染における細胞性免疫応答とウイルス間の相互作用に関して多くの研究がなされ、HIV 特異的 CTL の選択圧によりエスケープ変異が出現し、その結果 CTL の標的となるエピトープが消失する事例は多く報告されてきた。しかしながら、本研究では異なる CTL 選択圧からのエスケープの結果生じた 1 アミノ酸変異が、新たなエピトープを創出することを世界に先駆けて明らかにした。HIV 感染慢性期では多くの場合、長期間安定したウイルス量が維持されており、その間ウイルス、宿主免疫応答の間である程度の平衡状態が保たれている。HIV に対する宿主免疫監視機構とウイルス間の相互作用はこれまで考えられてきたような「ウイルスの一方的な宿主免疫監視機構からの逃避」だけではなく、双方向に作用することで比較的長い静的動態を保っている可能性が考

えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Nishimura T, Kaneko S, Kawana-Tachikawa A, Tajima Y, Gotoh H, Zhu D, Nakayama K, Iriguchi S, Uemura Y, Shimizu T, Takayama N, Yamada D, Nishimura K, Ohtaka M, Watanabe N, Takahashi S, Iwamoto A, Koseki H, Nakanishi M, Eto K, Nakauchi H. Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by pluripotency reprogramming and redifferentiation. *Cell Stem Cell*. 12:114-26, 2013 (査読有)
doi:10.1016/j.stem.2012.11.002
2. Nomura S, Hosoya N, Brumme ZL, Brockman MA, Kikuchi T, Koga M, Nakamura H, Koibuchi T, Fujii T, Carlson JM, Heckerman D, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Miura T. Significant Reductions in Gag-protease Mediated HIV-1 Replication Capacity Over the Course of the Epidemic in Japan. *J Virol*. 87:1465-76, 2013 (査読有)
doi:10.1128/JVI.02122-12.
3. Kikuchi T, Iwatsuki-Horimoto K, Adachi E, Koga M, Nakamura H, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Koibuchi T, Miura T, Fujii T, Kawaoka Y, Iwamoto A. Improved neutralizing antibody response in the second season after a single dose of pandemic (H1N1) 2009 influenza vaccine in HIV-1-positive adults. *Vaccine*. 30:3819-23. 2012 (査読有)
doi: 10.1016/j.vaccine.2012.03.083.
4. Nakayama K, Nakamura H, Koga M, Koibuchi T, Fujii T, Miura T, Iwamoto A, Kawana-Tachikawa A. Imbalanced production of cytokines by T cells associates with the activation/exhaustion status of memory T cells in chronic HIV Type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 28:702-14, 2012 (査読有)
doi:10.1089/AID.2011.0073
5. Nakamura H, Miyazaki N, Hosoya N, Koga M, Odawara T, Kikuchi T, Koibuchi T, Kawana-Tachikawa A, Fujii T, Miura T, Iwamoto A. Long-term successful control of super-multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 infection by a novel combination therapy of raltegravir,

- etravirine, and boosted-darunavir. *J Infect Chemother.* 17: 105-10, 2011 (査読有)
6. Iwamoto A, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A. HIV-1 tropism. *Protein Cell.* 1:510-3, 2010 (査読有)
doi: 10.1007/s13238-010-0066-2.
 7. Liu J, Wu P, Gao F, Qi J, Kawana-Tachikawa A, Xie J, Vavricka CJ, Iwamoto A, Li T, Gao GF. Novel immunodominant peptide presentation strategy: a featured HLA-A*2402 restricted CTL-epitope stabilized by intra-chain hydrogen-bonds from SARS-CoV nucleocapsid protein. *J Virol.* 84:11849-57, 2010 (査読有)
doi: 10.1128/JVI.01464-10.
 8. Koga M, Kawana-Tachikawa A, Heckerman D, Odawara T, Nakamura H, Koibuchi T, Fujii T, Miura T, Iwamoto A. Changes in impact of HLA class I allele expression on HIV-1 plasma virus loads at a population level over time. *Microbiol Immunol.* 54:196-205, 2010 (査読有)
doi:10.1111/j.1348-0421.2010.00206.x.

[学会発表] (計 18 件)

1. Han Chungyong, Shimizu A, Zhu D, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A. Impact of an amino acid change within overlapping CTL epitopes in HIV-1 infection. Keystone symposia, HIV Vaccines. Feb 2013. Keystone Colorado, USA
2. Kawana-Tachikawa A, Llibre JM, Bravo I, Escrig R, Mothe B, Miro JM, Gatell JM, Iwamoto A, Clotet B, Brander C. Prolonged preservation of HIV-specific cellular immunity in recently HIV-infected individuals receiving Maraviroc intensified HAART. 20th conference on retroviruses and opportunistic infections. Mar 2013. Atlanta, USA.
3. Kawana-Tachikawa A. Mechanisms underlying disruption of T cell immunity during chronic HIV-1 infection. The 2nd Joint Global COE Symposium of the IMSUT & RCAST Global COE, The University of Tokyo and Chiba University Global COE "Current and Future Trends in Genome-based Immunity, Infection and Cancer" Jan 2013, Tokyo.
4. Kikuchi T, Iwabu Y, Kawana-Tachikawa A, Koga M, Nomura S, Hosoya N, Brumme ZL, Heiko J, Kelleher AD, Markowitz M, Pereyra F, Trocha A, Walker BD, Iwamoto A, Tokunaga K, Miura T. Anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif protein from elite controllers is attenuated compared to those from untreated chronic progressors of those from individuals with acute infection. XIX International AIDS Conference, July 2012, Washington DC, USA.
5. Hosoya N, Teeranaipong P, Kawana-Tachikawa A, Kondo N, Hoshino H, Matsuda Z, Iwamoto A. "Development of a HIV-1 phenotypic tropism assay using dual split protein (DSP)-mediated membrane fusion detection system". 1st Asian Conference on Hepatitis B and C, HIV and Influenza. May 2012. Beijing, China.
6. Nomura S, Hosoya N, Kikuchi T, Koga M, Nakamura H, Koibuchi T, Fujii T, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Miura T. Replication capacities of chimeric NL4-3 encoding gag-protease from modern HIV-1 isolates are significantly reduced compared to those derived from isolates in the early days of epidemic in Japan. 6th International AIDS Society Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. July 2011. Rome Italy
7. Kikuchi T, Iwatsuki-Horimoto K, Adachi E, Imai K, Shimizu S, Miyazaki N, Koga M, Nakamura H, Kawana-Tachikawa A, Koibuchi T, Miura T, Fujii T, Kawaoka Y, Iwamoto A. Induction and maintenance of neutralizing antibodies after single dose of non-adjuvanted split 2009 pandemic H1N1 influenza A vaccine in HIV-1 positive population. 6th International AIDS Society Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. July 2011. Rome Italy
8. Gu L, Kawana-Tachikawa A, Shiino T, Hosoya N, Nunoya J, Koibuchi T, Fujii T, Miura T, Matsushita M, Sugiura W, and Iwamoto A. Development of a PCR-SSOP-Liminex Assay for HIV-1 Drug Resistance. Session IV: Virology, Novel Therapies, and New Technologies. 24th Joint Meeting of the AIDS Panels, United States-Japan Cooperative Medical Science Program. HIV Resistance: Impact in Asia. Grand Copthorne Hotel, Singapore. December 2010.
9. Teeranaipong P, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Kondo N, Hoshino H, Matsuda Z, and Iwamoto A. Novel HIV-1 Phenotypic Tropism Assay without Pseudotyped Virions. Session IV: Virology, Novel Therapies, and New Technologies. 24th Joint Meeting of the AIDS Panels,

- United States-Japan Cooperative Medical Science Program. HIV Resistance: Impact in Asia. Grand Copthorne Hotel, Singapore. December 2010.
10. Nakayama K, Kawana-Tachikawa A, Nakamura H, Miura T, Fujii T, Koibuchi T, Iwamoto A. T cell activation and exhaustion associates with skewed cytokines/chemokines production in chronic HIV-1 infection. 14th International Congress of Immunology. August 2010. Kobe, Japan
 11. Nakayama K, Kawana-Tachikawa A, Nakamura H, Miura T, Fujii T, Koibuchi T, Iwamoto A. HIV-1 viral burden has an impact on Th1- and Th17-related cytokines/chemokines production of T cells. 18th International AIDS Conference. July 2010. Vienna, Austria.
 12. 菊地正、岩部幸枝、立川(川名)愛、古賀道子、野村滋、細谷紀彰、Brumme ZL, Heiko J, Kelleher AD, Markowitz M, Pereyra F, Trocha A, Walker BD, 岩本愛吉、徳永研三、三浦聡之。HIV-1 elite controller における HIV-1 Vif の抗 APOBEC3G 活性の低下。第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月。大阪。
 13. 立川(川名)愛、Beatriz Mothe-Pujadas, Marta Massanella, Josep M Libre, Bonaventura Clotet, 岩本愛吉, Christian Brander. 感染早期での HAART 開始時における Maraviroc による HAART 増強の T 細胞に与える影響。第 26 回日本エイズ学会学術集会。2012 年 11 月。横浜
 14. 菊地正、岩附研子、安達英輔、古賀道子、中村仁美、立川愛、鯉淵智彦、藤井毅、河岡義裕、岩本愛吉。HIV 感染者におけるパンデミック 2009(H1N1) インフルエンザワクチンの初回接種前後と 2 年目の接種前後の中和抗体価の推移。第 12 回東京大学生命科学シンポジウム、2012 年 6 月。東京
 15. 立川(川名)愛。HIV 感染慢性期における T 細胞の免疫病態。第 25 回日本エイズ学会学術集会。2011 年 12 月、東京
 16. 野村滋、菊地正、細谷紀彰、古賀道子、中村仁美、鯉淵智彦、藤井毅、立川愛、岩本愛吉、三浦聡之。無症候慢性 HIV-1 陽性者由来 gag-protease を発現するキメラ NL4-3 ウイルス複製能の患者初診年による変化。第 25 回日本エイズ学会学術集会、2011 年 12 月。東京
 17. 谷 麗君、細谷 紀彰、立川(川名)愛、中村 仁美、古賀 道子、松下 正毅、Biyang Lu、三浦 聡之、岩本 愛吉。HIV-1 サブタイプ未同定の検体を用いた配列

特異的オリゴプローブによる薬剤耐性変異の検出。第 25 回日本エイズ学会学術集会 2011 年 12 月。東京

18. 野村滋、菊地正、細谷紀彰、古賀道子、中村仁美、鯉淵智彦、藤井毅、立川愛、岩本愛吉、三浦聡之。無症候慢性 HIV-1 陽性者由来 gag-protease を発現するキメラ NL4-3 ウイルス複製能の患者初診年による変化。第 25 回日本エイズ学会学術集会。2011 年 12 月。東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.idimsut.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立川 愛 (TACHIKAWA AI)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号：10396880

(2) 研究分担者

三浦 聡之 (MIURA TOSHIYUKI)
長崎大学・熱帯医学研究所・客員教授
研究者番号：00296576