

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 24 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22659188
 研究課題名（和文） CD1・脂質免疫応答に着目した、エイズワクチン開発の新戦略
 研究課題名（英文） CD1/lipid immunity-based vaccines against AIDS

研究代表者
 杉田 昌彦（SUGITA MASAHIKO）
 京都大学・ウイルス研究所・教授
 研究者番号：80333532

研究成果の概要（和文）：ヒト免疫不全ウイルス感染に対するタンパク質ワクチンは未だ実用化に至っていない。高頻度に生じるエスケープ変異がその主因と考えられ、効果的なワクチンの開発には、変異を許し難い T 細胞エピトープの同定が急務である。本研究は、細胞培養系およびサルエイズモデルを用い、ミリスチン酸付加 Nef ペプチド（リポペプチド）に対するキラー T 細胞応答の存在と機能を明らかにした。ミリスチン酸付加は高度に保存された領域で起こり、かつその反応はウイルスの病原性において重要であることから、リポペプチドは有効なエイズワクチンとなる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Effective protein vaccines against infection with human immunodeficiency virus remain to be established. The difficulties arise from the frequent escape mutations, and thus, identification of T cell epitopes that admit of no arbitrary mutations is crucial. We have identified cytotoxic T cell responses to myristoylated Nef peptides (lipopeptides) both in cell culture and in the monkey model of human AIDS. Because the protein myristoylation occurs in highly conserved amino acid sequences and is critical for virulence, the present study underscored the possibility that lipopeptides could be an ideal target for anti-AIDS vaccines.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	900,000	0	900,000
2011 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	570,000	3,370,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：感染症防御学、リポペプチド、エイズ、ワクチン、CD1

1. 研究開始当初の背景

(1) 免疫系の標的となる抗原の主体はタンパク質であると考えられてきた。これに対して最近の研究から、「脂質」を特異的に認識する新しい免疫システムの存在が明らかになってきた。樹状細胞や活性化マクロファ-

ジに発現したヒトグループ 1CD1 分子(CD1a、CD1b、CD1c) は、微生物由来の脂質抗原を結合し、主として CD8 陽性キラー T 細胞に抗原提示する。これによって活性化されたキラー T 細胞群は、感染細胞を直接制御するエフェクター細胞として生体防御の一翼を担うこ

とが結核菌感染症をモデルにした実験系を用いて実証され、脂質特異的免疫応答という新しい視点に立った病態解明とそれに基づく診断、治療法の開発が進められようとしている。

(2) ウイルスは固有の脂質合成系を持たない。しかし、たとえばヒト免疫不全ウイルス(HIV)が産生する Nef タンパク質や C 型肝炎ウイルスが産生する NS4B タンパク質は、宿主細胞の machinery を利用して脂質修飾(ミリスチン酸あるいはパルミチン酸付加)を受け、その機能を発揮する。したがって、免疫系がこの脂質化ウイルスタンパク質(リポペプチド)を特異的に認識して応答することができれば、ウイルス制御の有効な手段となることが考えられる。そこで研究代表者はこの作業仮説を検証するため、研究分担者の五十嵐樹彦と共同でサルエイズモデルを用いた研究を展開した。その結果、サル免疫不全ウイルスに感染したアカゲザル個体において、ミリスチン酸付加 Nef ペプチドに対する T 細胞応答が存在することが示唆された。

(3) 以上のことから、リポペプチド特異的 T 細胞応答の分子機構や機能を明らかにすることは、リポペプチドという新しいタイプの抗エイズワクチンの開発に向けて重要であると考えられた。

2. 研究の目的

サル免疫不全ウイルスに感染したサルにおいて、ミリスチン酸付加 Nef ペプチド(リポペプチド)に対するキラー T 細胞の存在ならびのその機能を明らかにする。また抗原特異的 T 細胞株を樹立し、その抗原認識機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) リポペプチドの合成：ペプチド合成樹脂として C 末端アミノ酸残基が予め付加された NovaSyn TGA resin あるいは Wang-resin を使用した。Fmoc 固相合成法によりペプチド部位の合成を行ったのち、脂肪酸の付加を行った。さらに切断試薬(95%TFA、2.5%トリイソプロピルシラン、2.5%蒸留水)によりペプチド部分を樹脂から切り出し、HPLCにより精製を行った。最終標品を LC/MS に供し、分子量および純度の確認を行った。

(2) T 細胞株の樹立：アカゲザル末梢血単核球を単離し、5 ug/ml のリポペプチド抗原存在下で培養を開始した。2 週間毎に、放射線照射末梢血単核球と抗原を用いて追加刺激を行った。培養液中のインターロイキン 2 濃度を少しずつ高めてゆき、最終的には 3 nM の濃度で用いた。

(3) T 細胞アッセイ：T 細胞と放射線照射した末梢血単核球および抗原を混合培養し、24 時間後に上清を回収した。上清中のインターフェロンガンマ濃度ならびにパーフォリン濃度を、市販の ELISA キットを用いて測定した。

(4) フローサイトメトリー：常法に従い施行した。細胞傷害性アッセイにおいては、まず T 細胞株を CFSE で標識したのち、抗原の存在下あるいは非存在下で末梢血単核球と混合培養した。4.5 時間後に細胞を回収し、PE 標識抗体(CD3、CD14、CD20)による染色を行ったのち、フローサイトメトリーによる解析を行った。

(5) アカゲザル感染実験：アカゲザルの飼養ならびに実験においては、当該機関の規程ならびに関係法律を遵守して行った。6 頭のアカゲザルに 2,000 TCID₅₀ の SIVmac239 ウイルスを経静脈的に感染させ、以後経時的に採血を行い、インターフェロンガンマ ELISPOT アッセイを施行した。

4. 研究成果

(1) リポペプチド特異的 T 細胞株の樹立に成功した。SIV Nef タンパク質の N 末端 5 アミノ酸残基にミリスチン酸を付加したリポペプチド抗原(C14-nef5、図 1)に対する T 細胞株 2N5.1 を樹立した。C14-nef5 のペプチド部分や脂肪酸部分を単独あるいは混和して投与しても T 細胞の活性化は起こらなかったことから、両者が共有的に結合することが抗原活性に必須であることが示された(図 1)。この T 細胞株は CD8 陽性であり(図 2)、抗原刺激に依存してインターフェロンガンマやパーフォリンを産生する典型的なキラー T 細胞の表現系を有していた。

図 1

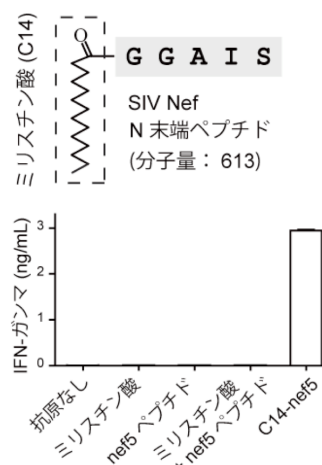
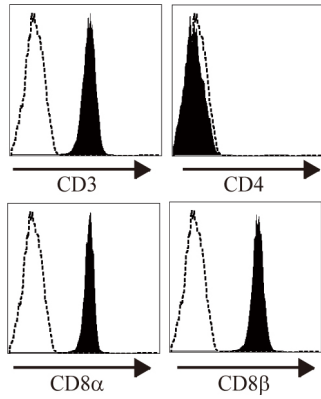
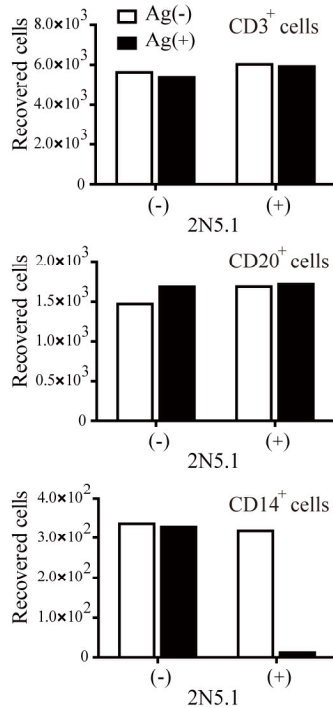


図 2



2) リポペプチド抗原提示分子に関する情報を得た。上記 T 細胞株の活性化に関わる抗原提示分子には、機能的に個体差がないこと、ミリスチン酸を収容するポケット構造を有することを示した。またこの抗原提示分子は主として末梢血単球に発現することを、フローサイトメトリーを用いた細胞傷害性アッセイにより示した (図 3)。

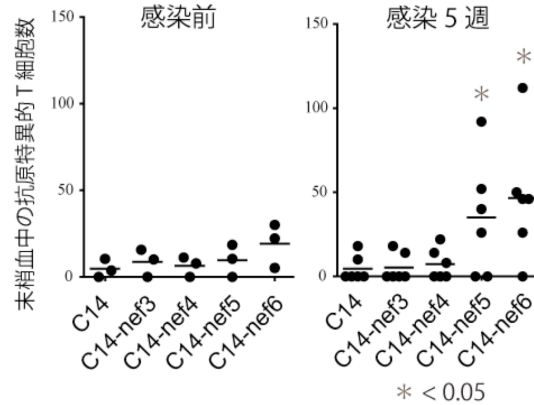
図 3



(3) 感染個体においてリポペプチド特異的 T 細胞応答を検出した。サル免疫不全ウイルス (病原性 SIVmac239 株) に感染したサル 6 個体において、感染後 5 週目の末梢血を用いてインターフェロンガンマ ELISPOT アッセイを施行したところ、ウイルス感染に伴い、ミリスチン酸付加を受けた Nef-5mer あるいは Nef-6mer のリポペプチドに対する T 細胞応答が誘起されることを実証した (図 4)。この T

細胞応答の強さは、血中のウイルス量と負の相関を示したことから、ミリスチン酸付加 Nef ペプチド特異的 T 細胞応答が実際にウイルス制御に寄与する可能性が示唆された。

図 4



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 1 件)

Morita D, Igarashi T, Horiike M, Mori N, Sugita M. Cutting edge: T cells monitor N-myristoylation of the Nef protein in simian immunodeficiency virus-infected monkeys. J. Immunol. 187(2): 608-612, 2011.

[学会発表] (計 1 件)

森田大輔、五十嵐樹彦、堀池麻理子、森直樹、杉田昌彦: Nef 蛋白質のミリスチン酸修飾をモニターする新たな免疫システム 第 25 回日本エイズ学会学術集会 東京 2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日

[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.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/SugitaLab.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉田 昌彦 (SUGITA MASAHIKO)
京都大学・ウイルス研究所・教授
研究者番号：80333532

(2) 研究分担者

五十嵐 樹彦 (IGARASHI TATSUHIKO)
京都大学・ウイルス研究所・教授
研究者番号：90467431

(3) 連携研究者

該当なし