

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月4日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24659481

研究課題名（和文） 新たなキラーT細胞標的分子「リポペプチド」に着目した、ヒトエイズ制御の新戦略

研究課題名（英文） Identification of cytotoxic T lymphocyte responses to lipopeptides in human immunodeficiency virus-infected patients.

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）：サルエイズモデルにおいて、サル免疫不全ウイルスが産生するリポペプチドを標的としたキラーT細胞の免疫応答が誘導され、感染制御に働くことが示されつつある。一方、ヒトにおけるリポペプチド特異的T細胞応答の存在や意義は不明であった。本研究において、ヒト免疫不全ウイルス感染患者末梢血中には、リポペプチド特異的T細胞が存在し、感染防御因子のひとつであるインターフェロンガンマを産生することを初めて明らかにした。

研究成果の概要（英文）：A new pathway for host defense has recently been identified in the monkey model of AIDS, in which lipopeptide-specific cytotoxic T lymphocytes expand and combat against infection. However, it remains to be determined whether such T cell responses may exist in humans. In this study, we found for the first time that lipopeptide-specific T cells existed in the circulation of a fraction of human immunodeficiency virus-infected patients, capable of producing interferon-gamma, one of the major host-protective factors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

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：エイズ、リポペプチド、キラーT細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 蛋白質抗原と脂質抗原：二つの抗原レパートリー

免疫系の標的となる抗原の主体は「蛋白質」であると考えられてきた。これに対して、研究代表者・杉田らの近年の研究成果から、第二の抗原レパートリーとして、「脂質」を特異的に認識する免疫システムの存在が明らかにされている。樹状細胞に発現したヒトグループ1 CD1 分子は、結核菌などの細菌やがん細胞が産生する脂質抗原を結合し、T細胞に抗原提示する。これによって活性化されたT細胞群は、感染細胞やがん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、結核感染症や白血病をモデ

ルにした実験系を用いて実証されてきた。

(2) リポペプチド抗原：第三の抗原レパートリー

一方、ウイルス感染防御の場合、以下の2つの理由から、上記の既知の抗原認識のみでは十分ではないと考えられる。まず、蛋白質抗原認識には一定（多くの場合9アミノ酸残基）のペプチド長を要し、その特異性の高さからアミノ酸変異による免疫エスケープが容易である。また、ウイルスには固有の脂質が存在しないため、脂質抗原提示が成立しない。

ヒト免疫不全ウイルスやサル免疫不全ウイルスが産生する Nef 蛋白質は、N末端グリ

シン残基に宿主由来のミリスチン酸 (C14 直鎖脂肪酸) が結合することにより、リポ蛋白質としてその機能を発揮する。研究代表者・杉田らは、ミリスチン酸付加 Nef ペプチドが細胞傷害性 T 細胞の特異的標的抗原となることを初めて示し、リポペプチドが新たな抗原レパートリーを構築する可能性を提唱した (図 1)。(Morita D, Igarashi T, Horiike M, Mori N, Sugita M. J. Immunol. 187(2): 608-612, 2011)

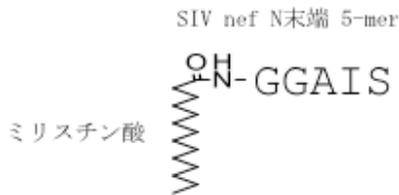


図1 新しいT細胞標的リポペプチドの構造

(3) リポペプチドという新しい chemical class のワクチン開発の可能性

多くの微生物感染症において、蛋白質抗原をベースにした特異ワクチンが開発され、感染症の制御に多大な貢献をしてきた。しかし一方で、病原体のエスケープ変異や MHC 分子の多型性に起因する low-responder 集団の存在が、グローバルなワクチン開発の障壁となっている感染症が残されていることも事実である。

ミリスチン酸修飾は、その蛋白質の N 末端に短いモチーフ (N 末端ミリスチン酸付加シグナル) を必要とするため、ウイルスが、自身の蛋白質の機能に影響を与えることなく、この領域にアミノ酸変異を導入することは困難である。実際、複数の研究成果から、ヒト免疫不全ウイルス Nef 蛋白質の N 末端は、最もアミノ酸変異が生じ難い領域のひとつであることが分かっている。さらに、ミリスチン酸付加ペプチド特異的 T 細胞応答の少なくとも一部は、多型性のない分子に拘束される。従って、ウイルスが生み出す「リポペプチド」に対する免疫応答を賦活化するワクチンは、エスケープ変異を許し難く、万人に有効なワクチンとなることが期待される。

2. 研究の目的

ヒト免疫不全ウイルスの感染に対する蛋白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。本研究グループは、サルエイズモデルにおいて、ミリスチン酸付加 Nef ペプチド (リポペプチド) に対する、細胞傷害性 T

細胞応答の存在を明らかにした。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ある。そこで、本研究ではヒト免疫不全ウイルス感染ヒト検体を用いて、この新しい T 細胞応答を詳細に解析し、「リポペプチド」を標的とした新しいワクチン戦略を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) リポペプチド抗原の合成

Fmoc 固相合成法により合成したヒト免疫不全ウイルス Nef 蛋白質由来 N 末 5mer, 6mer の各ペプチドに活性化ミリスチン酸を作用させ、N 末端アミノ酸に共有結合させることによりミリスチン酸付加ペプチドを合成し、さらにトリフルオロ酢酸にて固相担体より切り出したのち、逆相カラムによって精製した。

(2) 血液サンプル

京都大学医学部附属病院に通院あるいは入院されているヒト免疫不全ウイルス感染患者より少量の末梢血の提供を受けた。

実施に先立って「京都大学大学院医学研究科・医学部・医学部附属病院 医の倫理委員会」に研究計画を提出し、承認を得た。また実施にあたっては、研究協力者に時間をかけて十分な説明を尽くした上で、委員会の所定の様式に準拠したインフォームドコンセントを得た。

(3) エリスポット法

末梢血より常法にしたがって単核球を単離し、種々の合成抗原の存在下あるいは非存在下で 24 時間培養を行った。インターフェロンガンマ産生細胞を、市販のエリスポットキットを用いて検出した。一部の実験においては、末梢血単核球を顆粒球マクロファージコロニー刺激因子とインターロイキン 4 の存在下で 3 日間培養することにより得た単核球由来樹状細胞を抗原提示細胞として用いた。

(4) T 細胞株の樹立

末梢血単核球を抗原とともに培養し、さらに数週ごとに末梢血単核球と抗原を加え、培養を継続した。中途より T 細胞増殖因子であるインターロイキン 2 を添加し、抗原特異的 T 細胞を株化した。T 細胞の活性化は、培養液中に放出されるインターフェロンガンマを ELISA 法で測定することにより評価した。

4. 研究成果

(1) リポペプチド抗原の合成

これまでの解析からリポペプチド抗原提示に適したアミノ酸長を 5 ないし 6 残基と推定し、ヒト免疫不全ウイルス Nef 蛋白質の N

末端 5 残基、6 残基のペプチドにミリスチン酸を付加したりポペプチド抗原を合成した。この際、下表のように、ヒト免疫不全ウイルス Nef 蛋白質の N 末端 7 残基内 (MGGKWSK) に低頻度で見られる変異 (MGNKWSK、MGSKWSK) に着目し、これらの変異抗原についても合成を行った。また、各抗原のコントロールとしてミリスチン酸を付加しない、ペプチド抗原の合成を行った。得られた各種抗原はマスペクトロメトリーを用いてその分子種を確認した。

MGGKWSK	ATG GGT GGC AAG TGG TCA AAA
	Met Gly Gly Lys Trp Ser Lys
MGSKWSK	---- -- A-- ---- -- -- --
	Ser
MGNKWSK	--- -- AA- --- -- -- --
	Asn

表1 Nef N末端アミノ酸変異のパターン

(2) ヒト免疫不全ウイルス感染者末梢血におけるリポペプチド特異的 T 細胞の検出

まず 8 名のヒト免疫不全ウイルス感染者より末梢血単核球を得、合成 Nef リポペプチド存在下あるいは非存在下でインターフェロンガンマエリスポット法を行った。その結果、1 名 (#05) の末梢血において、ミリスチン酸付加を受けた GSKWS 配列を持つリポペプチドに対して応答しインターフェロンガンマを産生する T 細胞の存在を確認した。この T 細胞はフリーフォームのペプチドやミリスチン酸には反応を示さなかったことから、両者が共有結合したリポペプチドを特異的に認識すると結論づけた。

一方、末梢血単核球全体を用いたこの方法では、十分な抗原提示細胞の供給が出来ていない可能性を考え、感染者よりまず単球由来樹状細胞を誘導し、これを抗原提示細胞として使用したインターフェロンガンマエリスポット法に切り替えた。10 名の感染者より得た末梢血リンパ球を応答細胞として用いたところ、1 名 (#15) において、ミリスチン酸付加を受けた GSKWS 配列を持つリポペプチドに対して反応しインターフェロンガンマを産生する末梢血 T 細胞の存在を確認した。上記と同様に、フリーフォームのペプチドやミリスチン酸には反応を示さないことから、両者が共有結合したリポペプチドを特異的に認識すると結論づけた。一方この感染者において、GGKWS や GNKWS 配列を有するリポペプチドを特異的に認識する T 細胞の存在は確認されなかった。

このリポペプチド特異的末梢血 T 細胞の表面マーカーの解析や産生するサイトカイン

プロファイルの決定などは、ポピュレーションサイズが小さいことから解析を進めることはできなかった。そこで、抗原特異的 T 細胞株を樹立することによりさらなる解析を展開した。

(3) リポペプチド特異的ヒト T 細胞株の樹立と解析

#05 由来の末梢血単核球を、ミリスチン酸付加を受けた GSKWS 配列を持つリポペプチドを用いて複数回抗原刺激を行った結果、このリポペプチドに対して抗原特異性を示す CD8 アルファ鎖ベータ鎖陽性細胞傷害性 T 細胞株の樹立に成功した。

他方、#15 由来の末梢血リンパ球を自己由来樹状細胞とミリスチン酸付加を受けた GSKWS 配列を持つリポペプチドを用いて複数回刺激を行った結果、T 細胞株の樹立に成功した。しかし細胞数が充分には得られず、さらなる解析は行えなかった。

(4) まとめ

本研究の目的であったヒトにおける Nef リポペプチドに対する T 細胞応答の存在を明らかにすることができた。この T 細胞ポピュレーションには、防御性サイトカインであるインターフェロンを産生する CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞が含まれることから、この新しい免疫経路が感染防御に関与している可能性が高い。したがって、リポペプチドワクチン開発の端緒が開かれた。

Nef 蛋白質 N 末端部分のアミノ酸配列は高度に保存されている。野生型配列に加えて、報告のある稀な変異配列を持つリポペプチド特異的 T 細胞応答の存在が確認できたことは、このリポペプチド応答がわずかなウイルス変異も許容しないことを示唆した。

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)

① Daisuke Morita, Yukie Yamamoto, Juri Suzuki, Naoki Mori, Tatsuhiko Igarashi, and Masahiko Sugita. Molecular requirements for T cell recognition of N-myristoylated peptides derived from the simian immunodeficiency virus Nef protein. *J. Virol.* 2013. 87(1): 482-488. 査読有
DOI: 10.1128/JVI.02142-12.

[学会発表] (計 1 件)

① 森田大輔、五十嵐樹彦、森直樹、杉田昌彦 ウイルス蛋白質のミリスチン酸修飾を検知する新たな T 細胞応答 第 23 回日本生体防御学会学術集会 (東京) 2012 年 7 月

9-11 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

高折 晃史 (TAKAORI AKIFUMI)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：20324626

(3) 連携研究者

なし