

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870550

研究課題名(和文)強いHIV-1増殖抑制能を持つHIV-1特異的細胞傷害性T細胞に関する研究

研究課題名(英文)Study on HIV-1-specific cytotoxic T cells effectively controlling HIV-1

研究代表者

村越 勇人(MURAKOSHI, HAYATO)

熊本大学・エイズ学研究センター・産学官連携研究員

研究者番号：60646123

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)：本研究では、日本人HIV-1サブタイプB感染者401人について、HIV-1特異的CD8陽性T細胞の反応を網羅的に解析することで、HIV-1増殖抑制能を持つCD8陽性T細胞の同定を試みた。その結果、HIV-1感染制御に関与した13個のHIV-1 エピトープ特異的CD8陽性T細胞の同定に成功した。さらに、これら13エピトープのうち、9エピトープはHIV-1 サブタイプB感染者において保存されており、3エピトープは特異的T細胞によってcross-recognitionされることが判明し、これら12エピトープはAIDSワクチンの抗原としてきわめて有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We here sought to identify CD8+ T cells controlling HIV-1 variants in 401 Japanese individuals chronically infected with HIV-1 subtype B, in which protective alleles HLA-B\*57 and HLA-B\*27 are very rare, by using comprehensive and exhaustive methods. We identified 13 HIV-1 epitope-specific CD8+ T cells controlling HIV-1 in Japanese individuals though 9 of these epitopes were not previously reported. Nine of these epitopes were conserved among HIV-1 subtype B-infected individuals, whereas three out of 4 non-conserved epitopes were cross-recognized by the specific T cells. These findings indicate that these 12 epitopes are strong candidates of antigens for AIDS vaccine. The present study highlighted a strategy to identify CD8+ T cells controlling HIV-1 and demonstrated effective control of HIV-1 by those specific for 12 conserved or cross-reactive epitopes.

研究分野：感染症内科学、ウイルス学

キーワード：細胞傷害性T細胞 HIV HLA

1. 研究開始当初の背景

欧米、アフリカでは、HIV-1 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 反応の網羅的解析がさかんに行われていたが、日本ではまだこのような網羅的解析が行われていなかった。また、南アフリカでの HIV-1 感染者は HIV-1 サブタイプ C に感染している人が多く、日本人 HIV-1 感染者に多く見られるサブタイプ B とは異なる。さらに、南アフリカと日本では HLA アリルの頻度が大きく異なり、南アフリカにおいて HIV-1 感染者の予後が良いと言われている HLA-B57 や B27 は、日本人にほとんど見られない。

2. 研究の目的

本研究では、無治療慢性日本人 HIV-1 感染者 401 人について、11-mer の HIV-1 オーバラップペプチドを用い、HIV-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞の反応を網羅的に解析することで、HIV-1 コントロールに關与する CD8 陽性 T 細胞の同定を試みた。

3. 研究の方法

(1) HIV-1 感染者の検体

国立国際医療研究センター、エイズ治療・研究開発センターより提出された 401 人の日本人無治療慢性 HIV-1 感染者の抹消血検体から PBMC を分離し、研究に使用した。

(倫理面の配慮)

本研究は、提出されている末梢血検体について、ヘルシンキ宣言に基づいたインフォームドコンセントを患者から取得し、末梢血の提供を受けている。本研究内容は、熊本大学と国立国際医療研究センターの倫理委員会承認を受けている。

(2) HIV-1 コントロールと關与する CTL エピトープ候補の同定

401 人の HIV-1 感染者において、HIV-1 Nef, Gag, Pol 領域を網羅した 11-mer のオーバラップペプチドのカクテルに対する CTL 反応を調べ、カクテルに対する反応、HLA 拘束分子、血漿中ウイルス量あるいは CD4T 細胞数との関係を調査した。調査後、低いウイルス量ならびに高い CD4T 細胞数と有意な相関を示す HLA を選び出した。その後、これらの HLA に拘束された 11-mer ペプチド特異的 CTL を見つけ出し、さらに、11-mer ペプチドに含まれる最適な長さの CTL エピトープの同定を試みた。

(3) 同定したエピトープ候補の HIV-1 コントロールとの関連性の再評価

同定したエピトープ候補が HIV-1 感染制御と本当に關連しているか明らかにするため、本研究の HIV-1 感染者において、同定したエピトープ候補に対する反応を ELISPOT assay で評価し、ウイルス量あるいは CD4T 細胞数との関係を再調査した。

(4) エピトープ特異的 CTL によって選択される逃避変異ウイルスの有無

HIV-1 感染者において同定したエピトープ内のアミノ酸シーケンスを調査し、HLA 拘束分子を持つ人と持たない人の間でエピトープ内変異の頻度について統計解析を行った。さらに、変異エピトープペプチドの作製を行い、コンセンサスあるいは変異エピトープペプチドに対する反応を ELISPOT assay によって検出することで、変異が CTL によって選択された逃避変異であるか判断した。

4. 研究成果

(1) HIV-1 コントロールと關与する CTL エピトープ候補

401 人の HIV-1 感染者について、カクテルに対する反応、HLA 拘束分子、血漿中ウイルス量あるいは CD4T 細胞数との関係を調査したところ、23 カクテルの反応で、低いウイルス量または高い CD4T 細胞数と關連した 14 種類の HLA を見つけた。さらに、それらのカクテルから低いウイルス量または高い CD4T 細胞数と關連した 8 種類の HLA に拘束された 11-mer シングルペプチド特異的 CTL 反応を見つけた。最終的にそれらのシングルペプチドに含まれた 19 個の最適エピトープを同定した。

(2) HIV-1 コントロールと關与したエピトープ特異的 CTL

同定した 19 個のエピトープ候補について、CTL 反応を ELISPOT assay で再評価した結果、8 個の Gag および 5 個の Pol に特異的な CTL が低いウイルス量と高い CD4 細胞数と有意に相関していることが判明した。また、これらの 13 個の CTL 反応の breadth がウイルス量と強い負の相関、CD4T 細胞数と強い正の相関を示し (図 1)、日本人感染者では、これらの 13 個の CTL の相乗効果によって HIV-1 感染の制御がされていることが明らかとなった。

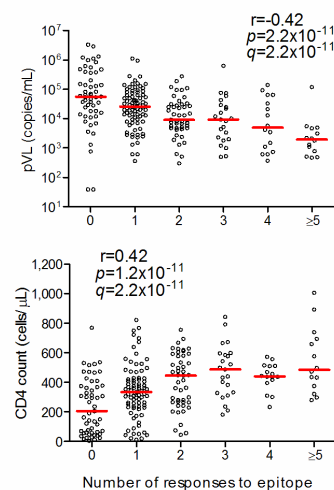


図 1 13 個のエピトープ特異的 CTL 反応の breadth と血漿中ウイルス量または CD4T 細胞数の関係

### (3) エピトープの保存性

本研究の感染者においてエピトープ領域のウイルスシーケンスを解析したところ、13個のエピトープのうち、9個のエピトープがおよそ85%がそれ以上の HIV-1 サブタイプ B 感染者において保存されていることが明らかとなった (表 1)。

HLA	Epitope	Sequence	Frequency (percentage)	
			Clade B*	Our cohort
B*52:01	Gag MI8	MQLMKETI	1741/1931 (90.2)	328/352 (93.2)
	Gag QA11	QMLKKTINEEA	1662/1931 (86.1)	301/340 (88.5)
	Gag R18	RMYSPTSII	1222/1931 (63.3)	236/346 (68.2)
		-----V--	382/1931 (19.8)	44/346 (12.7)
		-----S--	96/1931 (5.0)	30/346 (8.7)
		-----A--	41/1931 (2.1)	16/346 (4.6)
	-----I--	67/1931 (3.5)	5/346 (1.4)	
Gag WV8	WMTEILLV	1845/1931 (95.6)	356/367 (97.0)	
Pol SI8	SOYALGII	914/999 (91.5)	306/330 (92.7)	
B*67:01	Gag EM11	EGATPQDLNLM	1779/1931 (92.1)	337/352 (95.7)
	Gag TL9	TPQDLNLM	1794/1931 (92.9)	337/351 (96.0)
	Gag NL11	NPDCKTTLKAL	1694/1931 (87.7)	334/341 (97.9)
	Gag AA9	ATLEEMMTA	1715/1931 (88.8)	317/354 (89.5)
A*02:06	Pol SV9	SQIYAGIRV	438/999 (43.8)	64/310 (20.6)
		-----P---	375/999 (37.5)	148/310 (47.7)
		-----P--I	24/999 (2.4)	46/310 (14.8)
		-----S---	37/999 (3.7)	29/310 (9.4)
B*40:06	Pol LA9	LEGRKILLVA	506/999 (50.7)	217/294 (73.8)
		-----V----	356/999 (35.6)	45/294 (15.3)
B*40:02	Pol GI8	GERIVDII	533/999 (53.4)	126/327 (38.5)
		-----I----	377/999 (37.7)	143/327 (43.7)
		-----M----	24/999 (2.4)	27/327 (8.3)

\* with reference to the Los Alamos database

表 1 HIV-1 clade B 感染者におけるエピトープの保存性

また、HLA 関連ゲノム変異は 2 つのエピトープでしか認められなかった (図 2)。

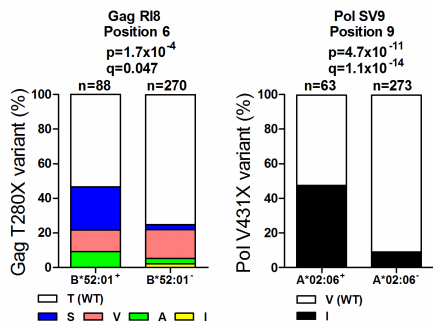


図 2 Gag R18 および Pol SV9 エピトープにおける HLA 関連ゲノム変異

さらに、保存されていない 4 つのエピトープについて、変異ペプチドを作製し、ELISPOT assay によって特異的 T 細胞の交叉反応性を調べたところ、Gag R18 の変異ペプチドは全く T 細胞に認識されず (図 3)、逃避変異であることが判明した。一方、他の 3 つのエピトープでは、T 細胞による交叉反応が認められた (図 3)。したがって、Gag R18 以外の 12 個のエピトープは AIDS ワクチンの抗原として非常に有用であることが示唆された。

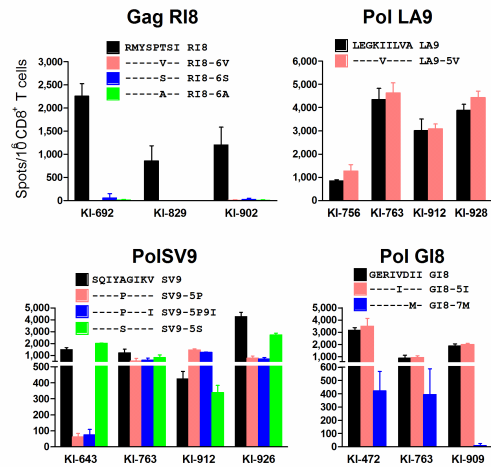


図 3 エピトープ特異的 CTL による変異ペプチドへの認識

### 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 5 件)

Hayato Murakoshi, Tomohiro Akahoshi, Madoka Koyanagi, Takayuki Chikata, Takuya Naruto, Rie Maruyama, Yoshiko Tamura, Naoki Ishizuka, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, and Masafumi Takiguchi, Clinical Control of HIV-1 by Cytotoxic T Cells Specific for Multiple Conserved Epitopes. *J. Virol.* [査読有] 89:5330-5339, 2015 doi: 10.1128/JVI.00020-15.

Mohammad Arif Rahman, Nozomi Kuse, Hayato Murakoshi, Takayuki Chikata, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, Masafumi Takiguchi, Raltegravir and elvitegravir-resistance mutation E92Q affects HLA-B\*40:02-restricted HIV-1-specific CTL recognition. *Microbes and Infection*, [査読有] 16:434-438, 2014 doi: 10.1016/j.micinf.2014.03.003.

Takayuki Chikata, Jonathan M. Carlson, Yoshiko Tamura, Mohamed Ali Borghan, Takuya Naruto, Masao Hashimoto, Hayato Murakoshi, Anh Q. Le, Simon Mallal, Mina John, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, Zabrina L. Brumme, and Masafumi Takiguchi, Host-specific adaptation of HIV-1 subtype B in the Japanese population, *J. Virol.* [査読有] 88:4764-4775, 2014 doi: 10.1128/JVI.00147-14.

Koji Watanabe\*, Hayato Murakoshi\*, Yoshiko Tamura, Madoka Koyanagi, Takayuki Chikata, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, and Masafumi Takiguchi (\*Equal contribution), Identification of

cross-clade CTL epitopes in HIV-1 clade A/E-infected individuals by using the clade B overlapping peptides, *Microbes and Infection*, [査読有] 15:874-886, 2013 doi: 10.1016/j.micinf.2013.08.002.

Hiroiyuki Gatanaga, Hayato Murakoshi, Atsuko Hachiya, Tsunefusa Hayashida, Takayuki Chikata, Hirotaka Ode, Kiyoto Tsuchiya, Wataru Sugiura, Masafumi Takiguchi, and Shinichi Oka, Naturally selected rilpivirine-resistant HIV-1 variants by host cellular immunity, *Clinical Infectious Disease*, [査読有] 57:1051-1055, 2013 doi: 10.1093/cid/cit430.

[学会発表](計 14 件)

Hayato Murakoshi, Tomohiro Akahoshi, Madoka Koyanagi, Takayuki Chikata, and Masafumi Takiguchi, Effective control of HIV-1 by cytotoxic T cells specific for multiple conserved epitopes, 第 43 回日本免疫学会学術集会(国立京都国際会館、京都府京都市), 2014 年 12 月 10-12 日

Tomohiro Akahoshi, Hayato Murakoshi, and Masafumi Takiguchi, Conflicting viral selection by HIV-1-specific CTLs, 第 43 回日本免疫学会学術集会(国立京都国際会館、京都府京都市), 2014 年 12 月 10-12 日

Mohammad Arif Rahman, Nozomi Kuse, Hayato Murakoshi, Madoka Koyanagi, Hiroiyuki Gatanaga, Shinichi Oka and Masafumi Takiguchi, Effect of protease inhibitor- and integrase inhibitor-resistant mutations on HIV-1-specific CTL recognition, Keystone Symposia: X3, HIV Vaccines: Adaptive Immunity and Beyond (Banff, Canada), March 9-14, 2014

Hayato Murakoshi, Madoka Koyanagi and Masafumi Takiguchi, Control of HIV-1 by HIV-1-specific CD8+ T cells in chronically HIV-1-infected Japanese individuals, 第 42 回日本免疫学会学術集会(幕張メッセ、千葉県千葉市), 2013 年 12 月 11-13 日

Tomohiro Akahoshi, Hayato Murakoshi and Masafumi Takiguchi, Reversion of a CTL escape mutation by escape mutant-specific CTLs, 第 42 回日本免疫学会学術集会(幕張メッセ、千葉県千葉市), 2013 年 12 月 11-13 日

Koji Watanabe, Hayato Murakoshi, Madoka Koyanagi, Takayuki Chikata and Masafumi Takiguchi, Cross-clade CD8+ T cell responses in chronically HIV-1 clade A/E-infected individuals, 第 42

回日本免疫学会学術集会(幕張メッセ、千葉県千葉市), 2013 年 12 月 11-13 日  
Madoka Koyanagi, Hayato Murakoshi and Masafumi Takiguchi, Synergistic CTL responses effect on viraemia control of HIV-1 infection in Japanese individuals carrying HLA-B\*35:01 allele associated with rapid disease progression, 第 42 回日本免疫学会学術集会(幕張メッセ、千葉県千葉市), 2013 年 12 月 11-13 日

Mohammad Arif Rahman, Nozomi Kuse, Hayato Murakoshi, Takayuki Chikata, Hiroiyuki Gatanaga, Shinichi Oka and Masafumi Takiguchi, Effect of drug resistant mutations on HIV-1-specific CTL recognition, 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会(熊本市国際交流会館、市民会館崇城大学ホール/熊本市市民会館、熊本県熊本市), 2013 年 11 月 20-22 日  
Tran Van Giang, Tomohiro Akahoshi, Hayato Murakoshi, Nozomi Kuse, Madoka Koyanagi, Takayuki Chikata, Yoshiko Tamura, Nguyen T. Hoai Dung, Nguyen Vu Trung, Junko Tanuma, Keiko Sakai, Shinichi Oka, Nguyen Van Kinh and Masafumi Takiguchi, Establishment of a cohort of treatment-naive patients chronically infected with HIV-1 in Hanoi, 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会(熊本市国際交流会館、市民会館崇城大学ホール/熊本市市民会館、熊本県熊本市), 2013 年 11 月 20-22 日

近田 貴敬, Jonathan M Carlson, 田村美子, Mohamed Ali Borghan, 成戸卓也, 端本 昌夫, 村越 勇人, Simon Mallal, Mina John, 湯永 博之, 岡 慎一, Zabrina L Brumme, 滝口 雅文, 日本人と白人における HIV-1 サブタイプ B の HLA-Associated Polymorphism の比較解析, 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会(熊本市国際交流会館、市民会館崇城大学ホール/熊本市市民会館、熊本県熊本市), 2013 年 11 月 20-22 日

村越 勇人, 日本人 HIV-1 感染者で見られる HIV-1 増殖抑制能に關与する細胞傷害性 T 細胞, 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会(熊本市国際交流会館、市民会館崇城大学ホール/熊本市市民会館、熊本県熊本市), 招待講演、2013 年 11 月 20-22 日

Takayuki Chikata, Jonathan M Carlson, Yoshiko Tamura, Mohamed Ali Borghan, Takuya Naruto, Masao Hashimoto, Hayato Murakoshi, Simon Mallal, Mina John, Hiroiyuki Gatanaga, Shinichi Oka, Zabrina L. Brumme and Masafumi Takiguchi, HIV-1 polymorphisms associated with 4-digit HLA alleles in Japanese individuals chronically

infected with the clade B virus, AIDS Vaccine 2013 (Barcelona, Spain) October 7-10, 2013

Hayato Murakoshi, Koji Watanabe, Yoshiko Tamura, Madoka Koyanagi, Takayuki Chikata, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka and Masafumi Takiguchi, Cross-clade CD8+ T cell responses in chronically HIV-1 clade A/E-infected individuals, AIDS Vaccine 2013 (Barcelona, Spain) October 7-10, 2013  
Madoka Koyanagi, Hayato Murakoshi, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka and Masafumi Takiguchi, Synergistic effect of multiple CTLs on control of HIV-1 in Japanese individuals carrying HLA-B\*35:01 allele associated with rapid disease progression, AIDS Vaccine 2013 (Barcelona, Spain) October 7-10, 2013

〔その他〕

ホームページ等

熊本大学エイズ学研究センター滝口プロジェクト研究室ホームページ

<http://www.caids.kumamoto-u.ac.jp/data/takiguchi/default.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村越 勇人 (MURAKOSHI, Hayato)

熊本大学エイズ学研究センター・産学官連携  
研究員

研究者番号：60646123

(2) 研究協力者

瀧永 博之 (GATANAGA, Hiroyuki)

近田 貴敬 (CHIKATA, Takayuki)

田村 美子 (TAMURA, Yoshiko)