

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32669

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870552

研究課題名(和文) 予後の悪いHLAを持つHIV-1感染者のHIV-1増殖抑制機序の解明

研究課題名(英文) Effect of CTL responses on control of HIV-1 infection in Japanese individuals carrying HLA-B*35:01

研究代表者

小柳 円 (Koyanagi, Madoka)

日本獣医生命科学大学・公立大学の部局等・助教

研究者番号：00543399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：日本人に多いHLA-B*35:01は、他のHLAを持つ感染者に比較し、血中ウイルス量が高く、エイズ病態進行に関連がある。本研究では、HIV感染制御に関するB*35:01拘束性細胞傷害性T細胞(CTL)の機能解析を行った。4種類のエピトープに対して、より多く反応を示す感染者ほど、ウイルス量が低く、いくつかのエピトープに対する反応が重なることで、生体内ではウイルス増殖抑制の相乗効果が得られると考えられた。4つのエピトープ領域内にはB*35:01陽性感染者で優位に蓄積していた2つのアミノ酸変異を認めしたが、CTL反応には影響がなく、交差反応を示し、ウイルス増殖に重要な役割を果たしていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：HLA-B*35:01 allele associates with high viral load (VL) in Japanese chronically HIV-1 clade B-infected individuals. We investigated the effect of cytotoxic T cell (CTL) responses to HLA-B*35:01-restricted epitopes on the control of HIV-1 in these individuals. Each CTL response to 4 out of 16 HLA-B*35:01-restricted epitopes was significantly but weakly associated with lower VL. The magnitude and the breadth of those 4 epitopes were significantly associated with lower VL. These results indicate even if the each response showed insufficient control of HIV-1, the multiple CTL responses to HLA-B*35:01-restricted epitopes, synergistically affect on the control of HIV-1 in HLA-B*35:01+ Japanese individuals. We found 2 significant association of the presence of HLA-B*35:01 allele with mutants, however HLA-B*35:01-restricted epitopes specific CTLs show cross-reactive with mutants. Those cross-reactive and WT specific CTLs contribute to the control of WT and mutant HIV-1 replication.

研究分野：免疫学

キーワード：HIV CTL HLA

1. 研究開始当初の背景

HLA-B*35:01 は日本人に多くみられ、日本で感染が広まっている HIV-1 サブタイプ B に感染した日本人 HLA-B*35:01 陽性 HIV-1 感染者では、他の HLA を持つ感染者に比較し、血中ウイルス量が高く、エイズの病態進行が早いことが報告されている。これに対し、アフリカ人 HLA-B*35:01 陽性 HIV-1 サブタイプ C 感染者の血中ウイルス量は他の HLA を持つ感染者との差が見られない。我々はこれまでに、HLA-B*35:01 陽性 HIV-1 感染者について、日本人とアフリカ人のコホートを比較し、HIV-1 増殖抑制に重要な HIV-1 Gag 特異的細胞傷害性 T 細胞(CTL)反応は日本人感染者において、欠如していることを示した。

2. 研究の目的

この重要な HIV-1 Gag に対する CTL 反応がみられないにもかかわらず、ウイルス量が低く制御されている HLA-B*35:01 陽性日本人 HIV 感染者も存在する。本研究は、このような感染者において、ウイルス感染制御に関与する CTL を見出し、それらの CTL の機能を解析することにより、HIV-1 感染制御メカニズムを解明した。

3. 研究の方法

(1) ウイルス増殖抑制に関与する CTL の選出

既知の16種類(Nef 3, Gag 4, Pol 5, Rev 1, Env 3 種類)のエピトープペプチドをサブタイプ B のアミノ酸配列をもとに作製し、これらの B*35:01 拘束性エピトープペプチドに対する *ex vivo* の反応を無治療 B*35:01 陽性サブタイプ B 慢性感染者 63 人の PBMC を用いて IFN- γ Elispot assay により検出した。これらの個々のエピトープ特異的 CTL 反応の有無と血中ウイルス量との関係を Mann-Whitney 法により明らかにする。また、CTL 反応の頻度とウイルス量との関係を Kruskal-Wallis 法にて解析した。

(2) TCR の抗原認識能の解析

研究成果(1)により、選出したエピトープに特異的な CTL クローンを作成した。段階希釈をしたエピトープペプチドを結合させた B*35:01 陽性抗原提示細胞(C1R-B*35:01)に対する B*35:01 拘束性エピトープ特異的 CTL

クローンの IFN- γ 産生能を細胞内サイトカイン染色により検出し、TCR 認識能を評価した。

(3) CTL 逃避変異の解析

B*35:01 陽性および陰性サブタイプ B 感染者の血漿より RNA を抽出し、HIV-1 のアミノ酸配列を確認し、B*35:01 特異的な変異がエピトープ配列に蓄積されているかを解析した。

変異が見られたエピトープに関しては、変異ペプチドに対する CTL の反応を検討した。

4. 研究成果

(1) ウイルス増殖抑制に関与する CTL の選出

無治療 B*35:01 陽性サブタイプ B 慢性感染者 63 人の末梢血より PBMC を調整した。これらの PBMC を用いて B*35:01 拘束性エピトープペプチド 16 種類(Nef 3, Gag 4, Pol 5, Rev 1, Env 3 種類)に対する *ex vivo* の反応を IFN- γ Elispot assay により検出し、これらの個々のエピトープ特異的 CTL 反応の有無と血中ウイルス量との関係を解析したところ、Gag NY9, Pol VY10, Nef RY11 および YY9 エピトープに対する反応を示した感染者は反応を示さなかった感染者に比較し優位に低いウイルス量を示していた ($p < 0.05$)。また、他のペプチドに対する反応は血中ウイルス量との相関はみられなかった。さらに、これらの4エピトープに対する全スポット数と血中ウイルス量との関係を解析した結果、全エリスポット数が多いほど血中ウイルス量は低い相関が得られた ($r = -0.50$, $p = 5.4 \times 10^{-5}$)。また、4つのエピトープの内、3から4つのエピトープに反応を示した感染者は一つも反応を示していない感染者に比較し優位に血中ウイルス量が低く、CTL 反応の頻度が高いほど、ウイルス量が低いことが明らかになった ($p = 1.1 \times 10^{-3}$)。このことから個々の反応より、いくつかのエピトープに対する反応が重なったことで、生体内ではウイルス増殖抑制の相乗効果が得られたと考えられる。

(2) TCR の抗原認識能の解析

作成した4つのエピトープ特異的 (Gag NY9, Pol VY10, Nef RY11およびYY9) CTLクローンのエピトープペプチドに対するIFN- γ 産生能を検討した結果、Pol VY10, Nef RY11およびYY9エピトープ特異的CTLはペプチドを強く認識しており、高いIFN- γ 産生を示していた。しかしながら、Gag NY9に反応を示した感染者が少なく、CTLクローンを作成することができなかった。

(3) CTL逃避変異の解析

実験成果(1)でHIV増殖抑制に関与していると考えられる4つのエピトープ (Gag NY9, Pol VY10, Nef RY11およびYY9)に関して、CTL逃避変異の解析を行った。CTL逃避変異は、強いCTL反応によりエピトープ内外のアミノ酸配列に変異を起こし、CTLによるエピトープの認識ができず、変異ウイルスが体内で除去されることなく増殖し、体内の蓄積されることである。まず、B*35:01陽性、陰性サブタイプB感染者の血漿よりHIV-1のアミノ酸配列を確認し、B*35:01特異的な変異がエピトープ配列に蓄積されているかを解析した。その結果、B*35:01陽性感染者に優位に蓄積が見られた2つの変異を認めた (Pol VY10-6E, Nef RY11-11F)。そこで、これらのエピトープ特異的CTLクローンを用いて、変異ペプチドと野生型ペプチドに対するIFN- γ 産生を比較した。しかしながら、変異ペプチドに対するCTL反応は野生型に対するものと差がなく、交差反応を示していた。この結果から、これらのエピトープは変異してもなお、ウイルス増殖に重要な役割を果たしていると考えられる。

63人のB*35:01陽性感染者において、4つウイルス増殖抑制に重要と考えられるエピトープの内、3つから4つのエピトープに反応を示した感染者はわずか5%にとどまった。そこで、エピトープ隣接配列(前後5アミノ酸以内)における変異がCTL反応に及ぼす影響を明らかにするため、エピトープ外にアミ

ノ酸解析の範囲を広げ、検討を行った。しかしながら、B*35:01特異的な変異は見られなかった。このことから、CTL反応を示していない感染者ではこれらの変異がありエピトープがプロセッシングされず抗原提示が起こらない可能性は低いと考えられる。

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.* 89:5330-9, 2015 (査読有)

Yutaka Arimura, Kazuhiro Shimizu, Madoka Koyanagi, Junji Yagi. Effects of protein tyrosine phosphatase-PEST are reversed by Akt in T cells. *Cell Signal.* 26:2721-9, 2014 (査読有)

Henrik Klopperpris, Emily Adland, Madoka Koyanagi, Anette Stryhn, Mikkel Harndahl, Philippa C Matthews, Roger Shapiro, Bruce Walker, Thumbi Ndung'u, Christian Brander, Masafumi Takiguchi, Soren Buus, and Philip JR Goulder, HIV subtype influences HLA-B*07:02-associated HIV disease outcome, *AIDS Research and Human Retroviruses*, 30:468-475, 2014 (査読有)

Koji Watanabe, Hayato Murakoshi, Yoshiko Tamura, Madoka Koyanagi, Takayuki Chikata, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, and Masafumi Takiguchi, Identification of cross-clade CTL epitopes in HIV-1 clade A/E-infected individuals by using the clade B overlapping peptides, *Microbes and Infection*, 15:874-886, 2013 (査読有)

小柳 円, 滝口 雅文, エイズ進行を規定するHLAとその機序、臨床免疫・アレルギー科、60:561-567, 2013 (査読無)

[学会発表](計19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(京都), 2014年12月10-12日

Hayato Murakoshi, Tomohiro Akahoshi, Madoka Koyanagi, Takayuki Chikata, Takuya Naruto, Rie Maruyama, Yoshiko Tamura, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, and Masafumi Takiguchi, Effective control of HIV-1 by cytotoxic T cells specific for multiple conserved epitopes, 15th KUMAMOTO AIDS Seminar (Kumamoto, Japan) October 1-3, 2014

Takayuki Chikata, Hayato Murakoshi, Madoka Koyanagi, Tomohiro Akahoshi, Shinichi Oka, and Masafumi Takiguchi, The impact of amino-acid substitution at a position outside the peptide binding groove of HLA-C subtypes in HIV-1-specific T cell recognition, 15th KUMAMOTO AIDS Seminar (Kumamoto, Japan) October 1-3, 2014

Tran Van Giang, Takayuki Chikata, Yoshiko Tamura, Tomohiro Akahoshi, Hayato Murakoshi, Nozomi Kuse, Madoka Koyanagi, Shinichi Oka, Keiko Sakai, Nguyen Van Kinh, and Masafumi Takiguchi, Identification of HLA-associated HIV-1 subtype A/E polymorphism in a Vietnamese cohort, 15th KUMAMOTO AIDS Seminar (Kumamoto, Japan) October 1-3, 2014

Mohammad Arif Rahman, Nozomi Kuse, Hayato Murakoshi, Madoka Koyanagi, Hiroyuki 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

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(千葉), 2013年12月11-13日

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(千葉), 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(千葉), 2013年12月11-13日

Zhansong Lin, Madoka Koyanagi and Masafumi Takiguchi, Inhibition of human NK cell function by an HLA-Cw*12:02-restricted HIV-1 CTL epitope peptide and its escape mutant peptide, 第42回日本免疫学会学術集会(千葉), 2013年12月11-13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), 2013年11月20-22日

Madoka Koyanagi, Hayato Murakoshi, Tomohiro Akahoshi, Takayuki Chikata, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka and Masafumi Takiguchi, Synergistic effect of a combination of CTL response on control of HIV-1 in Japanese individuals carrying HLA-B*35:01 allele associated with rapid disease progression, 14th KUMAMOTO AIDS Seminar (Kumamoto, Japan) October 29-31, 2013

Hayato Murakoshi, Madoka Koyanagi, Hiroyuki Gatanaga, Takuya Naruto, Shinichi Oka and Masafumi Takiguchi, Control of HIV-1 by HIV-1 immunodominant epitope-specific CD8+ T cells in chronically HIV-1-infected Japanese individuals, 14th KUMAMOTO AIDS Seminar (Kumamoto, Japan) October 29-31, 2013

Koji Watanabe, Hayato Murakoshi, Yoshiko Tamura, Madoka Koyanagi, Rie Maruyama, Takayuki Chikata, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka and Masafumi Takiguchi, Cross-clade CD8+ T cell responses in chronically HIV-1 clade A/E-infected individuals, 14th KUMAMOTO AIDS Seminar (Kumamoto,

Japan) October 29-31, 2013

Zhansong Lin, Madoka Kovanagi and Masafumi Takiguchi, Inhibition of human NK cell function by an HLA-Cw*12:02-restricted HIV-1 CTL epitope peptide and its escape mutant peptide, 14th KUMAMOTO AIDS Seminar (Kumamoto, Japan) October 29-31, 2013

Tran Van Giang, Tomohiro Akahoshi, Hayato Murakoshi, Nozomi Kuse, Madoka Kovanagi, 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, 14th KUMAMOTO AIDS Seminar (Kumamoto, Japan) October 29-31, 2013

Mohammad Arif Rahman, Nozomi Kuse, Hayato Murakoshi, Madoka Kovanagi, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka and Masafumi Takiguchi, Effect of protease inhibitor- and integrase inhibitor-resistant mutations on HIV-1-specific CTL recognition, 14th KUMAMOTO AIDS Seminar (Kumamoto, Japan) October 29-31, 2013

Madoka Kovanagi, 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

Hayato Murakoshi, Koji Watanabe, Yoshiko Tamura, Madoka Kovanagi, 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

村越 勇人, 小柳 円, 瀧永 博之, 成戸 卓也, 岡 慎一, 滝口 雅文, 日本人 HIV-1 感染者で見られる HIV-1 増殖抑制に關与する CTL, 第 15 回白馬シンポジウム (名古屋), 2013 年 7 月 19-20 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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小柳 円 (KOYANAGI, Madoka)

日本獣医生命科学大学 応用生命科学部
助教

研究者番号：00543399

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし