

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860335

研究課題名(和文) HIV-1増殖制御に寄与する逃避変異HIV-1特異的CTLの抗ウイルス機能の解析

研究課題名(英文) Analysis of anti-virus ability of escape mutant HIV-1-specific CTLs contributing to HIV-1 control

研究代表者

赤星 智寛 (Akahoshi, Tomohiro)

熊本大学・エイズ学研究センター・特定事業研究員

研究者番号：10635783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞傷害性T細胞(CTL)の認識から逃避した変異型HIV-1の感染伝播は、近年の感染者における病態進行の早まりの要因として示唆されている。しかし病態が急速に進行しないのはなぜか？日本人HIV-1慢性感染者集団で変異の頻度が低いCTL認識部位を指標に、変異型HIV-1を認識するCTLの存在を検証した。その結果、HIV-1の逃避変異の前後において変異型HIV-1を認識および/もしくはその増殖を抑制できるCTLが誘導されていることを明らかにした。変異型HIV-1に対して増殖抑制能を有するCTLが病態進行の遅延に寄与している可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：It has been suggested that circulation of mutant HIV-1 which had acquired mutations to escape from immune pressure of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) was associated with more rapid disease progression in recent HIV-1-infected individuals than that in previous ones. However, why does the disease still gradually progress rather than more rapidly? To address this issue, I investigated presence of HIV-1-specific CTLs recognizing mutant HIV-1 in context of CTL epitopes which were observed low frequent mutations in a cohort of treatment-naive chronically HIV-1-infected Japanese. As a result, I found that HIV-1-specific CTLs were induced before/after emergence of mutant HIV-1, which CTLs had an ability to recognize mutant viruses and/or to suppress replication of mutant viruses. This result suggests that CTLs having the ability to suppress mutant viruses contribute to a delay of the disease progression.

研究分野：HIV-1感染症におけるT細胞免疫応答

キーワード：HIV-1 CTL 逃避変異 変異の蓄積 HIV-1増殖制御

1. 研究開始当初の背景

(1) HIV-1 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) は、HIV-1 感染者体内において、HIV-1 の増殖制御を担う一方で、その免疫圧から逃避する HIV-1 (逃避変異体) の選択にも寄与している。逃避変異体は感染伝播し、HIV-1 感染者集団において蓄積してきており(1)、近年、HIV-1 感染者の病態進行の早まりの要因として示唆されている(2, 3, 4)。一方で、HIV-1 感染者の病態が急速に進行しないのはなぜだろうか？逃避変異体を認識する CTL の関与が考えられるが、では HIV-1 のどのような抗原部位(エピトープ)を認識する CTL が HIV-1 の増殖制御に寄与しているのだろうか？感染者において、逃避変異体を特異的に認識する変異特異的 CTL や野生型 HIV-1 およびその逃避変異体の両方を認識する交差反応性 CTL が誘導されていることが知られている(5, 6)。しかし、これら CTL の HIV-1 増殖制御における寄与については十分に検討されていない。

(2) これまでに、筆者らのグループは HLA-A*24:02 に提示される 2 種類のエピトープ、Nef138-147 と Gag28-36 エピトープにおいて選択される逃避変異体に対して、変異特異的 CTL が誘導されていることを見出した(7, 8)。しかし、これら変異特異的 CTL のウイルス増殖抑制能は、野生型特異的 CTL と比べて弱いことを示した。近年の日本人 HIV-1 慢性感染者集団におけるウイルスシーケンスの解析から、これらの逃避変異は高度に蓄積しており(70-80%)、これら CTL はウイルスの増殖制御に寄与していないと考えられた。一方で、最近筆者らは、逃避変異の頻度がある程度一定に抑えられているエピトープを見出した。それは、HLA-B*54:01 に提示される 8-mer から 11-mer の長さが異なる 4 種類のエピトープが重複している Pol155-165 (FPISPIETVPV) エピトープである。このエピトープは多様なエピトープ特異的 CTL を誘導し、HIV-1 感染細胞を効果的に傷害することを示した(9)。しかし、HIV-1 感染細胞を効果的に傷害するにも関わらず、この重複エピトープに選択される逃避変異 (E161D:7D) の頻度は、近年の日本人 HIV-1 慢性感染者集団において 20% に留まっている。この結果から、7D 変異を認識する CTL が存在し、7D 変異の蓄積に影響を与えていると考えられる。これらの研究から、変異特異的 CTL の中には、HIV-1 の増殖制御に寄与している CTL と寄与していない CTL が存在していると考えられる。逃避変異の頻度は、前者の CTL が誘導されているエピトープでは高く、後者の CTL が誘導されているエピトープでは低いことが推測される。

2. 研究の目的

(1) 変異低蓄積エピトープでは、変異ウイルスに対して増殖制御能を有する CTL が誘導されていると推測される。本研究では、まず

HLA-B*54:01 に提示される Pol155-165 エピトープに着目し、変異特異的 CTL の誘導の有無とそれら CTL の抗ウイルス機能を解析し、変異特異的 CTL の HIV-1 増殖制御における役割の解明を進める。

(2) さらに、Pol155-165 エピトープの解析において得られた結果が、他の変異低蓄積エピトープにおいても当てはまるのか検討する。

3. 研究の方法

(1) 研究体制

国立国際医療研究センターのエイズ治療・研究開発センター (ACC) 湯永博之先生 (研究協力者) から HIV-1 感染者由来血液検体および臨床データをご提供いただいた。

(2) Pol155-165-7D 変異特異的 CTL の抗ウイルス機能とエピトープシーケンスの長期的解析

逃避変異の蓄積率が低いエピトープでは HIV-1 の増殖制御に寄与する変異特異的 CTL が誘導されているという仮説を検証するため、CTL の抗ウイルス機能を *ex vivo* および *in vitro* の実験系により解析し、また、エピトープ領域のウイルスシーケンスを長期的に解析することで、CTL 応答とウイルスとの相互作用を検討した。

CTL 応答の *ex vivo* 解析: HIV-1 感染者の末梢血単核球 (PBMC) を用い、IFN-ELISPOT 試験および/もしくはテトラマー結合試験をおこなった。

CTL の抗ウイルス機能の *in vitro* 解析: CTL クローンもしくは CTL ラインを樹立し、ペプチドパルス細胞とウイルス感染細胞に対する細胞傷害活性もしくは細胞内 IFN-産生応答をそれぞれクロム放出試験もしくは細胞内サイトカイン染色試験により測定した。次に、健常人の PBMC から分離した CD4 陽性細胞を用いて、CTL によるウイルス増殖抑制試験もしくはウイルス選択試験をおこなった。

エピトープ領域のシーケンスの長期的解析: 血漿中ウイルスのエピトープ領域のシーケンスをダイレクト法もしくはクローニング法により長期的に解析した。

(3) 他の変異低蓄積エピトープにおける変異特異的 CTL の抗ウイルス機能とエピトープシーケンスの長期的解析

(2) の解析で得られた結果が他の同様なエピトープにおいても当てはまるか、(2) と同じ手法により検討した。

4. 研究成果

日本人 HIV-1 慢性感染者集団において逃避変異の蓄積率が低い CTL エピトープを指標に、逃避変異型 HIV-1 の増殖制御に寄与する CTL の存在を検証した。

(1) PoI155-165-7D 変異特異的 CTL の抗ウイルス機能とエピトープシーケンスの長期的解析

HLA-B*54:01 に提示される PoI155-165 エピトープ (FPISPIETVPV: WT) の逃避変異型 (FPISPIDTVPV: 7D) に着目し (日本人 HIV-1 慢性感染者集団の HLA-B*54:01 陽性者において蓄積率約 20%) HLA-B*54:01 陽性 HIV-1 感染者において誘導されている CTL の抗ウイルス機能と、エピトープシーケンスの変化を長期的に解析した。

HIV-1 感染初期から経過観察できた 2 人では、WT ウイルスから 7D ウイルスが選択され、感染慢性期から経過観察できた 3 人では、経過観察中 (3~10 年) WT と 7D の両ウイルスが比率を変えながらも併存していた。感染者の PBMC を用いて WT と 7D ペプチドに対する IFN- γ 産生応答を ELISPOT 試験で調べた結果、感染初期の 2 人では、7D ウイルス選択前に WT と 7D ペプチドに対して既に応答が見られ、そのうち 1 人では、7D ウイルス選択後に 7D ペプチドに対する応答が優位になった。感染慢性期の感染者 3 人のうち実験可能であった 2 人では、両ペプチドに対する応答が観察期間中 (2~3 年) 維持されていた。さらに、その 2 人の PBMC をテトラマーで染色した結果、7D 特異的な T 細胞が優位に検出され、また WT と 7D に結合する交差反応性の T 細胞も検出された。そのうち 1 人の慢性感染者から樹立した 7D 特異的 CTL クローンと交差反応性 CTL クローンは、ウイルス感染 CD4 陽性 T 細胞に対して、7D ウイルスと両ウイルスの増殖をそれぞれ抑制した。

これらの結果は、7D ウイルスに対して増殖抑制能を有する CTL が 7D 変異の低頻度な蓄積に寄与している可能性を示している。また、ウイルスと CTL があたかも互いに適応しながらバランスを取っている可能性を示唆している。7D ウイルス新規感染者において、同様な CTL が誘導されているか検討の余地が残っている。

(2) PoI283-8V 変異特異的 CTL の抗ウイルス機能とエピトープシーケンスの長期的解析

PoI155-165 エピトープの解析で得られた結果が、他の変異低蓄積エピトープにおいても当てはまるか検証した。次に着目したエピトープは、HIV-1 の PoI 領域の逆転写酵素 (RT) の 128~135 番目に位置し、2 種類の HLA 分子 (HLA-B*51:01 と B*52:01) に提示される CTL エピトープ (TAFTIPSI: T18) である。筆者らの以前の研究において、日本人 HIV-1 慢性感染者集団の HLA-B*51:01 陽性者では、I135T 変異 (約 60%) が優位に検出されたのに対して、B*52:01 陽性者では、I135T、I135L、I135V 変異が同程度 (各約 20~30%) に検出された (10)。先の研究において、この変異選択パターンの違いは、それぞれの HLA 拘束性 T18 特異的 CTL の抗ウイルス機能の違いによる可能

性を示したが、なぜそれぞれの HLA 陽性者において、そのような選択パターンが生じるのか明らかでなかった。

そこで、HLA-B*52:01 陽性慢性感染者において、変異型エピトープを認識する CTL の存在を検証した。その結果、I135V 変異後に、新たに HLA-C*12:02 に提示されるエピトープ (TAFTIPSVN: TN9-8V) が創出されることを見出した。日本人集団において、ほとんどの HLA-B*52:01 陽性者は、HLA-C*12:02 を有している。V 変異型ウイルスを有する HLA-B*52:01-C*12:02 陽性慢性感染者 8 人の PBMC をテトラマーで染色した結果、6 人において、TN9-8V 特異的 CD8 陽性 T 細胞を検出した。その内 3 人から分離した TN9-8V 特異的 T 細胞は、V 変異型ウイルス感染細胞に加えて、T 型および I 型ウイルス感染細胞も認識した。また、エピトープシーケンスの長期的解析が可能であった別の 1 人の HIV-1 慢性感染者において、ウイルスは I V M L と野生型から種々の変異型に継時的に変化していた。

これらの結果から、HLA-B*52:01-C*12:02 陽性 HIV-1 慢性感染者において、HLA-B*52:01 拘束性 T18 特異的 CTL と HLA-C*12:02 拘束性 TN9-8V 特異的 CTL が共働することで、RT135 における変異の多様性に寄与していることが考えられる。このエピトープにおけるウイルスと変異特異的 CTL の相互作用をより明確にするためには、さらに解析数を増やす必要がある。

(3) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクトおよび今後の展望

過去の未治療の HIV-1 慢性感染者集団の研究から (11, 12, 13)、HIV-1 は集団中の HLA に適応するように変化 (進化) してきていることが明らかになり、その変化の蓄積は HLA 関連多型として検出される。しかし、本研究課題で着目した変異低蓄積エピトープのような場合、HLA の有無によって変異の頻度に有意差がないため、HLA 関連多型としては検出されず、一見すると免疫圧がかかっていないように見える。しかし、実際には、多機能でより広範な認識能を有する CTL がウイルスの変化を抑え込んでいる場合があり (14, 15)、CTL の誘導の有無を調べることは重要である。本研究課題では、変異型 HIV-1 に対して認識能および/もしくは増殖抑制能を有する変異特異的 CTL の存在を明らかにし、それら CTL がウイルスの変化を制限もしくはより多様に導いている可能性を示唆することができた。それぞれの機序として、前者は同じ HLA 拘束性の変異特異的 CTL が関与していること、後者は別の HLA 拘束性の変異特異的 CTL が関与していることを示した。

今後は、CTL の免疫圧から逃避した HIV-1 に対して、どの程度そのような CTL が誘導されまたそれら CTL が HIV-1 の増殖制御に実際にどの程度寄与しているか明らかにしていきたい。それらの知見は、HIV-1 感染者集団

の CTL の免疫圧から逃避した HIV-1、つまりその集団に適応した HIV-1 に対して効果的なワクチンの開発に寄与すると期待する。

<引用文献>

1. Kawashima et al. Nature, 2010
2. Crum-Cianflone et al. Clin Infect Dis, 2009,
3. Muller et al. PLOS Pathog, 2009,
4. Nakamura et al. Intern Med, 2011
5. Allen et al. J Virol. 2005,
6. Liu et al. PLOS One. 2011
7. Fujiwara et al. J Virol. 2008,
8. Akahoshi et al. J Virol. 2012
9. Hashimoto and Akahoshi et al. Eur J Immunol. 2012
10. Yagita et al, J Virol, 2013
11. Carlson et al, Nat Med. 2016
12. Chikata et al, J Virol. 2014
13. Tran et al, AIDS, 2016
14. Ladell et al, Immunity, 2013
15. Murakoshi et al, J Virol, 2015

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計4件)

Tomohiro Akahoshi, Madoka Koyanagi, Hayato Murakoshi, Nozomi Kuse, and Masafumi Takiguchi, collaborators: Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, An escape mutation selected by HIV-1-specific CTLs generates a novel CTL epitope, 第44回日本免疫学会学術集会, 2015年11月18日, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

Tomohiro Akahoshi, Madoka Koyanagi, Hayato Murakoshi, Nozomi Kuse, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka and Masafumi Takiguchi, HIV-1-specific CD8+ T cells restricted by the most frequent HLA haplotype in Japan may shape viral polymorphism at RT135, 第16回熊本エイズセミナー, 2015年10月8日~9日, 阿蘇リゾートグランヴィリオホテル(熊本県・阿蘇市)

Tomohiro Akahoshi, Hayato Murakoshi, Takiguchi Masafumi, Collaborators: Masao Hashimoto, Takayuki Chikata, Yoshiko Tamura, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, Conflicting viral selection by HIV-1-specific CTLs, 第43回日本免疫学会学術集会, 2014年12月11日, 国立京都国際会館(京都府・京都市)

Tomohiro Akahoshi, Masao Hashimoto, Hayato Murakoshi, Takayuki Chikata, Yoshiko Tamura, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, and Masafumi Takiguchi, Conflicting viral selection by

HIV-1-specific CTLs, 第15回熊本エイズセミナー, 2014年10月2日~3日, 阿蘇リゾートグランヴィリオホテル(熊本県・阿蘇市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

赤星 智寛 (AKAHOSHI Tomohiro)

熊本大学・エイズ学研究センター・特定事業研究員

研究者番号: 10635783

(2)研究協力者

瀧永 博之 (GATANAGA Hiroyuki)

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