

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 20 日現在

機関番号：82603

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893294

研究課題名(和文)SIV複製制御サル群を用いたエイズウイルス複製抑制維持に関わる因子の解明

研究課題名(英文)Mechanism analysis of lasting of AIDS virus control with SIV controllers.

研究代表者

野村 拓志(Nomura, Takushi)

国立感染症研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：80711001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はSIV感染ビルマ産アカゲザルエイズモデルを用いてMHC-I haplotype 90-120-1aの拘束するCTLエピトープとしてNef9-19、Nef89-97およびNef193-203を新たに同定した。同複製制御群における解析によりNef9-19およびNef89-97のCTL逃避変異は早期に蓄積し当該領域に特異的なCTL応答の複製制御への有効性は低下するものの、Nef193-203に対する変異蓄積はより遅くNef193-203特異的CTL応答が感染後2年で多くの個体で認められたことから、Nef193-203特異的CTL応答が複製制御群における複製制御維持に寄与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：CTL epitopes Nef9-19, Nef89-97 and Nef193-203 restricted by MHC-I haplotype 90-120-1a were newly identified by using SIV infected Burmese rhesus macaque AIDS model in this research. A group of macaques that control SIV replication for more than 2 years showed multiple nef mutations including those escaping from Nef9-19 and Nef89-97 epitope-specific CTL responses at 2 years post SIV challenge. However, almost no mutation was observed in Nef193-203 epitopes, suggesting that Nef193-203 epitope-specific CTL responses may maintain efficacy of SIV suppression in this group. Moreover, Nef193-203 specific CTL responses were detected in almost all animals at 2 years post challenge. Thus, Nef193-203 specific CTL responses may contribute to sustained viremia control in SIV controllers.

研究分野：感染病態学

キーワード：エイズウイルス サルエイズモデル 新規CTLエピトープ決定 CTL逃避変異選択 複製抑制維持 宿主免疫応答 免疫動態解析

1. 研究開始当初の背景

HIV (ヒト免疫不全ウイルス) 感染者数は今日でも増加傾向にあり、2011年には世界でおよそ3400万人がHIVに感染しているとみられている。抗HIV薬剤による治療が行われるようになったことで、AIDSの発症の遅延と死亡率の低下が先進諸国で見られるようになったが、病態進行を抑えるためには抗HIV薬を服用し続ける必要があり、各国の社会保障費用の大きな負担となっている。HIV感染症は持続感染症であり初期感染の鑑別が難しく、急性期につづく数年にわたる無症状期に感染者はHIVの伝播の機会を増やしてしまう結果となる。現段階における予防エイズワクチンの効果の目標は、HIVの完全な感染防御ではなく、HIV感染時の血中ウイルス量を減少させるとともにAIDS発症までの期間を延長し、集団中のHIVの伝播を抑制することである。アカゲザル/サル免疫不全ウイルス(SIV)感染症によるサルエイズモデルはヒトのHIV感染症と近似性の高い病態を示し、HIV感染症の解析および予防法の検討のために有用である。本研究室で開発中のGag発現CTL誘導型予防エイズワクチンの接種により、MHC-Iハプロタイプ90-120-1a共有アカゲザルの多くはSIVの複製を抑制する。しかしこれらのSIV複製抑制個体には、感染後2年以上の長期にわたってSIV複製抑制を維持する個体と、一時的に抑制するものの後にCTL逃避変異体が選択・増殖することで最終的にAIDSを発症する個体が存在する(Kawada et al, J. Virol. 80:1949-58, 2006)。同様に、複製抑制者でのCTL逃避変異体による血中ウイルス量の再出現は、HIV感染ヒトにおいても報告されている(Goulder et al, Nat. Med. 3:212-7, 1997; Feeney et al, J. Virol. 78:8927-30, 2004)。同一のMHC-Iの遺伝的背景を有し、同一のCTL誘導型予防エイズワクチンの接種を受けたSIV複製抑制個体間でも病態進行に差異が存在することから、これらの個体の複製抑制の性状には何らかの違いが存在すると考察されることに、申請者は着目した。

2. 研究の目的

SIV複製が制御されている個体では血漿中ウイルスRNA量が検出限界以下となるため、血漿からのウイルスゲノムのPCR増幅は困難であり、CTL逃避変異選択の有無を評価することは困難である。所属研究室では過去の研究で、少数個体において末梢血リンパ球からのプロウイルスゲノムの検出を試み、CTL逃避変異の複製抑制個体内での蓄積を限定的に示している(Kawada et al, J. Virol. 80:1949-58, 2006)。本研究では、所属研究室がコホートとして保有する十分な頭数のMHC-Iハプロタイプ90-120-1a共有SIV複製制御サル群を用い、末梢血リンパ球由来のCD4陽性T細胞からのより高感度なウイルスゲノムの増幅を行い、感染慢性期のGag・Nef

のCTL逃避変異の蓄積とその出現の時相の解析を試みる。さらにSIV複製制御サル群を用いて、MHC-Iハプロタイプ90-120-1aに拘束されるGag・Nefの複数のエピトープ特異的CTL応答とそのパターンを含む、宿主CTL応答の詳細な解析を行い、複製抑制個体の病態進行の差異を規定する因子となる、宿主免疫応答機構と持続感染ウイルスのCTL逃避変異選択の関係の解明を目指した。

本研究では宿主特異性および倫理的観点から困難なHIVのin vivoでの実験系のモデル系として、ヒトにおけるHIV感染症との近似性が極めて高いSIV感染アカゲザルエイズモデルを用いた。特に申請者の所属研究室はCTL誘導型予防エイズワクチンにより血中ウイルス量を検出限界未満まで抑制したMHC-Iハプロタイプ90-120-1a共有アカゲザルのコホートを十分な数保有していることから、本研究に必要なツールを揃える事ができた。

HIVまたはSIV複製抑制個体と、ウイルス複製を抑制しなかった個体のウイルス感染に対する免疫学的な差異はこれまでに部分的に検討されており、MHC-Iハプロタイプ90-120-1aと同様に遅い病態進行と関わるProtective MHC-IアレルおよびHLAアレルである、SIV感染Mamu-B*17共有インド産アカゲザルおよびHIV-1感染HLA-B*5701共有ヒトを用いた研究では、複製抑制個体と非複製抑制個体での明確な免疫学的な差異は見出されなかった(Maness et al, J. Virol. 82:5245-54, 2008; Mendoza et al, J. Virol. 86:4014-8, 2012)。SIV感染Mamu-B*08共有インド産アカゲザルを用いた最近の研究では、ドミナントCTLエピトープに対する逃避変異体の急性期における選択の有無が、ウイルス複製制御の成否に関わることが明らかになっている(Mudd et al, J. Immunol. 188:3364-70, 2012)ものの、この原因となる詳細な免疫学的機構は不明瞭である。また、HIVまたはSIV複製抑制個体の病態進行に関わる宿主の免疫学的な解析は殆ど行われていなかった。特に複製抑制個体内に存在するウイルスゲノム性状と、宿主免疫動態の詳細および複製抑制維持(病態進行)の関連はこれまでに知られておらず、本研究の独創的・新規的な点であった。

宿主免疫機構のより詳細な解明が、HIV感染症の制圧には必須であり、本研究はその一部を担うと考えられた。また本研究により得られる知見は、ヒトでの臨床応用により集団中のウイルス量の減少が期待されているCTL誘導型予防エイズワクチンの開発への寄与が期待されるとともに、将来行われるであろう治療を目指した治療や、その効果の評価にも寄与することが期待できる。

3. 研究の方法

本研究は以下の3つに大別されて進行した。

(1) MHC-Iハプロタイプ90-120-1aに拘束さ

れる Nef の CTL エピトープの決定

一般的に HIV または SIV 感染症において、ウイルスの構造タンパク質である Gag 特異的 CTL 応答はウイルス複製制御に大きく関わる事が知られている (Kiepiela et al, Nat. Med. 13:46-53, 2007)。MHC-I ハプロタイプ 90-120-1a に拘束される Gag の CTL エピトープは既に同定されており、MHC-I ハプロタイプ 90-120-1a 共有サルの SIV 複製抑制にも Gag 特異的 CTL 応答が重要であることが報告されている (Kawada et al, J. Virol. 80:1949-58, 2006; Kawada et al, J. Virol. 82:10199-206, 2008)。また一般的には複製制御への寄与は小さいとされる、非構造タンパク質である Nef 特異的 CTL の複製制御への寄与を SIV 感染 *Mamu-B*08* 共有インド産アカゲザルで示した報告も存在する。(Mudd et al, Nature 491:129-33, 2013)。一方で、MHC-I ハプロタイプ 90-120-1a 共有サルにおける Nef 特異的 CTL 応答の SIV 複製抑制へのマグニチュードは現在までに明らかではなく、複製抑制維持への関与を考察する必要があった。本研究の初期段階においては、まず MHC-I ハプロタイプ 90-120-1a に拘束される Nef の CTL エピトープの同定を行った。SIV 感染ワクチン非接種個体の感染慢性期の血中ウイルス RNA から *nef* 遺伝子の非同義置換を解析した結果、MHC-I ハプロタイプ 90-120-1a 特異的な Nef アミノ酸置換として P12Q, S13A D89E, I90M S201Y, Q202E の3箇所が、申請者の先行研究により得られている (Nomura et al, J. Virol. 86:6481-90, 2012)。これらの Nef 非同義置換は CTL 逃避変異であり、MHC-I 分子の認識するアンカーペプチドの近隣に位置する可能性が考えられた。このため 20mer の Nef オーバーラッピングペプチドを用いて、大まかに CTL エピトープを絞り込んだのち、一般的に MHC-I では 8-10mer といわれる特異的ペプチドを作製し、MHC-I ハプロタイプ 90-120-1a 共有 SIV サルの凍結保存された末梢血リンパ球を用い、CTL エピトープの同定を行った。なお特異的ペプチドの一部は 11mer であった。

(2) 複製抑制個体における Gag・Nef のエピトープ特異的 CTL 応答の経時的な解析

上記のように、先行して MHC-I ハプロタイプ 90-120-1a に拘束される Nef の CTL エピトープを決定したのちに、Nef エピトープ特異的 CTL 応答を、感染急性期から慢性期の感染後 2 年程度にわたり経時的に解析した。本試行には所属研究室がコホートとして保有する、MHC-I ハプロタイプ 90-120-1a 共有 SIV 複製抑制サル群の凍結保存末梢血リンパ球を用いた。CTL 逃避変異が選択され、ドミナントとなった場合、当該エピトープ特異的 CTL は有効性を失い応答は消退すると考えられる。一方 CTL 逃避変異体が出現しても MHC-I 分子との結合性が完全には失われず、CTL 側の TCR 再構成によりエピトープ特異的 CTL の

有効性が維持されることも考えられる。これらを踏まえて複製抑制個体における Nef と Gag エピトープ特異的 CTL 応答の誘導パターンについて、それぞれが SIV 感染後に現出/消退する時相の解析を行い、複製抑制個体内に存在するプロウイルスゲノム性状および複製抑制維持との関連について考察した。同時に Nef の CTL 逃避変異エピトープペプチドを作製し、MHC-I 分子との結合性または特異的 CTL による認識効率の変化を解析した。CTL による変異体の複製制御能を評価することは、MHC-I ハプロタイプ 90-120-1a 共有サルにおける Nef 特異的 CTL 応答の SIV 複製抑制への寄与を解明する一助となりうると考えられた。

(3) 複製抑制個体における CTL 逃避変異の選択時期の解析

ウイルス複製抑制個体における、感染急性期における CTL 逃避変異の選択の早さと、その後の病態進行または複製抑制維持との関連の解明も課題の一つである。血漿中のウイルス RNA を用いた、CTL 逃避変異の選択の時期について複製抑制個体と非制御個体間で比較して検討した研究は過去に存在するが (Mudd et al, J. Immunol. 188:3364-70, 2012)、ウイルス複製抑制個体の予後の転帰と関連して調査した知見はこれまでに得られておらず新規性があり、CTL 誘導型予防エイズワクチン開発とその評価のための有用性が見込まれる。凍結保存末梢血リンパ球由来の CD4 陽性 T 細胞中のプロウイルスゲノムについて *nef* 配列の解析を行い、Nef の CTL エピトープ逃避変異の選択と蓄積を評価した。さらに *gag* プロウイルスゲノム配列の解析による、Gag の CTL エピトープ逃避変異の蓄積の進行時相との比較を行い、各 CTL エピトープ間での宿主 CTL 応答の誘導機序および変異蓄積の差異の考察を行った。

4. 研究成果

MHC-I ハプロタイプ 90-120-1a の拘束する SIV 特異的 CTL エピトープとして既に Gag206-216, Gag241-249 および Gag373-380 が同定されている。Gag 本研究では新たに MHC-I ハプロタイプ 90-120-1a の拘束する CTL エピトープとして Nef9-19, Nef89-97 および Nef193-203 を同定し、特に Nef193-203 と Gag241-249 は同一の MHC-I アレルである *Mamu-A1*065:01* に、Nef89-97 と Gag206-216 は *Mamu-A1*043:01* に拘束されることを見出した。SIV 感染ウイルス複製非抑制個体の感染慢性期において当該エピトープ領域に高い頻度で見られるアミノ酸置換変異を持つペプチドを用いて CTL の認識効率の解析を行った結果、NefP12Q, NefP12S, NefI90R および NefS201Y などの変異をもつペプチドの認識効率が wild type のペプチドと比較して低下している傾向があり、これらのアミノ酸置換変異が CTL 逃避変異であることが示唆され

た。

SIV 感染後 2 年以上の長期にわたり複製制御を維持した MHC-I haplotype *90-120-1a* 共有ビルマ産アカゲザル群コホートにおいて感染後 2 年の CD4 陽性 T 細胞中に含まれるプロウイルスの Nef エピトープ領域の塩基置換を解析したところ、Gag の各エピトープと Nef9-19 および Nef89-97 では CTL 逃避変異とみられる塩基置換が認められた個体群においても、Nef193-203 における塩基置換はほとんどの個体で認められなかった。ドミナントエピトープであり感染後 2 年以内の複製制御に強く寄与するとみられる Gag 各エピトープ特異的 CTL 応答と、Nef9-19 および Nef89-97 特異的 CTL 応答の複製制御への有効性は CTL 逃避変異選択により感染後 2 年まで低下するものの、Nef193-203 特異的 CTL 応答による複製制御能が持続している可能性が示唆された。

この群において Gag および Nef エピトープ特異的 CTL 応答を経時的に解析したところ、Gag の各エピトープ特異的 CTL 応答は感染後 2 年にかけて消退する傾向にあった。また Nef9-19 および Nef89-97 特異的 CTL 応答にくらべて Nef193-203 特異的 CTL 応答を示す個体が多く、Nef193-203 特異的 CTL 応答が感染後 2 年の複製制御維持に寄与することが示唆された。

本研究は SIV 複製制御サル群を用いて、宿主の CTL 応答と、体内に存在するプロウイルスゲノムの CTL 逃避変異選択のパターンを新規に描出し、エイズウイルス複製抑制維持に関わる免疫学的機序の一端を明らかにした。

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 4 件)

1. Kazutaka Terahara, Hiroshi Ishii, Takushi Nomura, Naofumi Takahashi, Akiko Takeda, Teiichiro Shiino, Yasuko Tsunetsugu-Yokota and Tetsuro Matano, Vaccine-Induced CD107a+ CD4+ T Cells Are Resistant to Depletion Following AIDS Virus Infection. *Journal of virology*, 英文査読有, 2014, 88:14232-14240. DOI: 10.1128/JVI.02032-14

2. Takushi Nomura, Hiroyuki Yamamoto, Naofumi Takahashi, Taeko K. Naruse, Akinori Kimura and Tetsuro Matano, Identification of SIV Nef CD8(+) T cell epitopes restricted by a MHC class I haplotype associated with lower viral loads in a macaque AIDS model. *Biochemical and biophysical research communications*, 英文査読有, 2014, 450:942-947. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.06.072

3. Nami Iwamoto, Naofumi Takahashi, Sayuri Seki, Takushi Nomura, Hiroyuki Yamamoto, Makoto Inoue, Tsugumine Shu, Taeko K. Naruse, Akinori Kimura and Tetsuro Matano, Control of simian immunodeficiency virus replication by vaccine-induced Gag- and Vif-specific CD8+ T cells. *Journal of virology*, 英文査読有, 2014, 88:425-433. DOI: 10.1128/JVI.02634-13

4. Taku Nakane, Takushi Nomura, Shoi Shi, Midori Nakamura, Taeko K. Naruse, Kimura, Akinori Kimura, Tetsuro Matano and Hiroyuki Yamamoto, Limited impact of passive non-neutralizing antibody immunization in acute SIV infection on viremia control in rhesus macaques. *PLoS One*, 英文査読有, 2013, 8:e73453 DOI:10.1371/journal.pone.0073453

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Takushi Nomura, Lasting SIV control by multiple Gag, Vif, and Nef epitope-specific CD8+ T cells. 32ND ANNUAL SYMPOSIUM ON NONHUMAN PRIMATE MODELS FOR AIDS, Nov. 11-14th 2014, Portland, Oregon, USA

2. Takushi Nomura, Broadening of CD8+ T-cell targets precedes accumulation of proviral escape mutations in SIV controllers. The 15th KUMAMOTO AIDS Seminar, Oct. 1-3rd 2014, Aso, Kumamoto

3. Takushi Nomura, Association between broadening of CD8+ T-cell target and accumulation of proviral escape mutations in SIV controllers. Keystone symposia "HIV Vaccines: Adaptive Immunity and Beyond (X3)", Mar. 9-14th 2014, Banff, Alberta, Canada

4. 野村拓志、SIV 感染制御群における制御維持への Vif および Nef 特異的細胞傷害性 T リンパ球反応の関与に関する研究、第 61 回ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10-12 日、神戸

〔図書〕(計 件)

該当なし

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www0.nih.go.jp/niid/ARC/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 拓志 (NOMURA, Takushi)

国立感染症研究所・エイズ研究センター・
任期付研究員

研究者番号：80711001

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし