

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19588

研究課題名(和文) HIV-1感染者の予後に関わるHIV-1特異的細胞傷害性T細胞の解析

研究課題名(英文) Study on HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes responsible for AIDS progression in HIV-1-infected individuals

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・特任講師

研究者番号：60646123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、HLA-B\*35:01陽性感染者に見られるHIV-1コントロールと関連したHIV-1特異的細胞傷害性T細胞(CTL)に着目し、この細胞の機能がどのような機序で損なわれているのか解析を行った。その結果、HLA-B\*35:01拘束性NefYF9エピートープに見られるHLA-A\*24:02拘束性CTLによって選択されたY135F変異の出現により、YF9特異的CTLのHIV-1増殖抑制能が減弱されることが判明した。これは、変異の出現によって、wild-type特異的CTLが消失し、HIV-1増殖抑制能が弱い変異特異的CTLが誘導されることに起因していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To clarify this mechanism, we identified HLA-B\*35:01-restricted epitope-specific CD8+ T cells controlling HIV-1 in 63 HIV-1 clade B-infected Japanese individuals having HLA-B\*35:01 and further analyzed the effect of mutations within the epitopes on the T cell responses. The T cell responses to GagNY9, PolVY10, NefRY11, or YF9 epitopes were significantly associated with low plasma viral load. A breadth of the T cell responses to these 4 epitopes was inversely correlated with it. The control of HIV-1 by YF9-specific T cells are impaired by NefY135F mutation associated with HLA-A\*24:02. The ex vivo longitudinal analysis of the YF9-specific T cells showed that the Y135F mutant-specific T cells and wild type-specific/cross-reactive T cells were elicited before and after an emergence of the mutant virus. However, the former T cells failed to control HIV-1 replication whereas the latter T cells contributed to the control of HIV-1.

研究分野：感染免疫学

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

MHC class I分子は多様性に富んでおり、エイズ発症に強く関与していることが知られている。最近我々は、約500人の日本人無治療慢性 HIV-1 感染者について、HLA と血漿中ウイルス量 (pVL) または CD4T 細胞数の関係を調査した。その結果、日本人 HIV-1 感染者の約 15% もの割合を占める HLA-B\*35:01 陽性感染者は、他の HLA を持つ感染者と比較して、有意に pVL が高く、CD4T 細胞数が少ないことが明らかとなり、HLA-B\*35:01 がエイズ発症進行と強く関係していることが示された。しかしながら、HLA-B\*35:01 陽性日本人感染者のエイズ発症進行メカニズムはまだ明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究では、HLA-B\*35:01 陽性感染者に見られる HIV-1 感染制御と関連した HIV-1 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) に着目し、この細胞の機能がどのような機序で損なわれているのか解析を行った。

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 HLA-B\*35:01 陽性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) HLA 関連ゲノム変異の解析

日本人慢性 HIV-1 感染者 430 人の HLA-B\*35:01 拘束性エピトープ部位におけるウイルスシーケンスの解析を行った。変異の頻度と HLA の有無の関係について統計解析を行い、HLA 関連ゲノム変異の同定を行った。

(3) CTL の HIV-1 増殖抑制能の解析

健康人の PBMC から分離した CD4T 細胞に NL4-3 または Nef Y135F に変異させた NL4-3 を感染させ、HIV-1 感染 CD4T 細胞を作製する。作製した感染細胞を Nef YF9 特異的 CTL クローンと数日間共培養した後、培養液の上清を回収し、HIV-1 のタンパク質である p24 を ELISA 法にて検出することで、CTL による HIV-1 増殖抑制能を評価する。それぞれのウイルスに対する増殖抑制能を比較し、変異によって CTL による HIV-1 増殖抑制効果がどのように変化するかを明らかにする。

(4) MHC テトラマーによる YF9 特異的、cross-reactive、および YF9-1F 特異的 CTL の検出

MHC テトラマーは、抗原ペプチド・MHC 複合体を四量体化したもので、抗原特異的 T 細胞の解析に用いられる。HLA-B\*35:01 および

HLA-A\*24:02 を持つ日本人感染者において、変異の出現前後における CTL の抗原特異性を YF9 テトラマーおよび YF9-1F 変異テトラマーの dual staining によって解析する。

4. 研究成果

(1) HLA-B\*35:01 拘束性エピトープにおける変異の蓄積

以前の研究で 4 つのエピトープ (Gag NY9, Pol VY10, Nef RY11, Nef YF9) 特異的 CTL が HIV-1 のコントロールに重要な役割を果たしていることを示したが、これら 4 つのエピトープ領域について、HLA-B\*35:01 関連ゲノム変異の有無について解析したところ、1 つのエピトープで HLA-B\*35:01 関連ゲノム変異が認められた。しかし、その変異を持つ人と持たない人の中で pVL に差は認められず、この変異はエピトープ特異的 CTL 応答に影響していないと考えられた。さらに今度は、4 つのエピトープ領域について、HLA-B\*35:01 以外の HLA 関連ゲノム変異を解析したところ、3 つのエピトープで 4 つの HLA 関連ゲノム変異が認められた。そのうち Nef YF9 エピトープ上の HLA-A\*24:02 関連 Y135F 変異だけが日本人感染者で蓄積していることが判明した (図 1)。

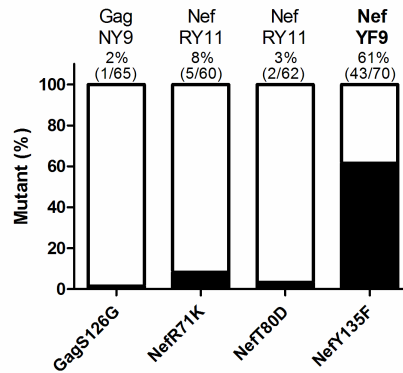


図 1 日本人感染者における NefY135F 変異の蓄積

さらに、この変異を持つ人は持たない人よりも有意に pVL が高いことが認められ、Y135F 変異は Nef YF9 特異的 CTL による HIV-1 増殖抑制を減弱していると考えられた (図 2)。

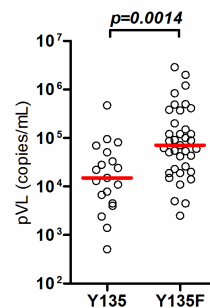


図 2 血漿中ウイルス量に及ぼす Y135F 変異の影響

(2) NefYF9 特異的 CTL の機能に及ぼす変異の影響

YF9 特異的 CTL クローンを作製し、Y135F 変異の CTL 機能への影響を解析した結果、

Y135F 変異は CTL による抗原ペプチドの認識を減弱させることが判明した。さらに、Y135F 変異は in vitro での YF9 特異的 CTL のウイルス増殖抑制能を有意に低下させることが明らかとなり、HLA-B\*35:01 陽性感染者において Y135F 変異ウイルスは YF9 特異的 CTL によって排除されにくいと考えられた ( 図 3 )。

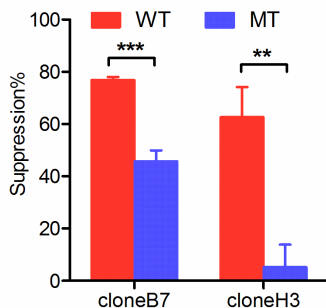


図 3 CTL の HIV-1 増殖抑制能に及ぼす変異の影響

( 3 ) YF9 特異的 CTL および Y135F 変異の longitudinal analysis

さらに、YF9 特異的 CTL による HIV-1 コントロールの減弱されるメカニズムを解明するため、YF9 特異的 CTL と Y135F 変異について longitudinal analysis を行った。その結果、変異が出現する前は、wild-type 特異的および cross-reactive CTL が誘導され、変異が出現すると、wild-type 特異的 CTL が消

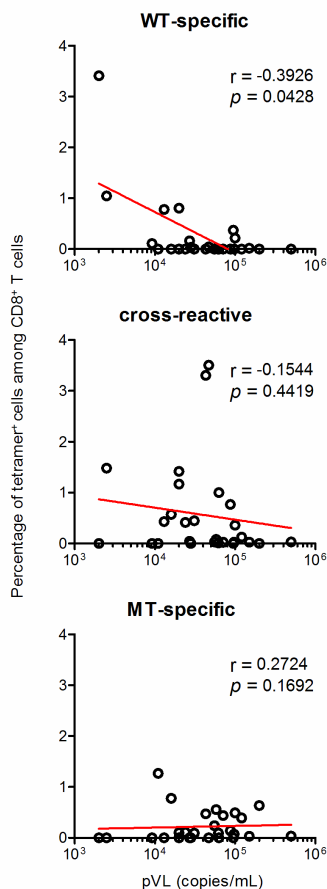


図 4 CTL の頻度と血漿中ウイルス量の関係

失し、Y135F 変異特異的 CTL が新たに誘導されることが判明した。さらに、wild-type 特異的、cross-reactive、または Y135F 変異特異的 CTL の頻度と血漿中ウイルス量の関係について解析した結果、wild-type 特異的 CTL の頻度はウイルス量と有意な負の相関を示したのに対し、変異特異的 CTL は相関を示さなかった ( 図 4 )。以上の結果、wild-type 特異的 CTL は HIV-1 増殖を抑制できるが、変異特異的 CTL は HIV-1 増殖を抑制できないと考えられた。したがって、変異の出現後、Y135F 変異特異的 CTL が誘導されるが、この T 細胞の HIV-1 増殖抑制能が弱いため、血漿中ウイルス量が上昇してしまうことが推察された。

## 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 )

Hayato Murakoshi,\* Madoka Koyanagi,\* Takayuki Chikata, Mohammad Arif Rahman, Nozomi Kuse, Keiko Sakai, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, and Masafumi Takiguchi (\*Equal contribution), Accumulation of Pol mutations selected by HLA-B\*52:01-C\*12:02 protective haplotype-restricted CTLs causes low plasma viral load due to low viral fitness of mutant viruses, [ 査読有 ] J. Virol, 91:e02082-16, 2017 doi: 10.1128/JVI.02082-16.

Beatrice Ondondo, Hayato Murakoshi, Genevieve Clutton, Sultan Abdul-Jawad, Edmund G.-T. Wee, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, Andrew J. McMichael, Masafumi Takiguchi, Bette Korber and Tomas Hanke, Novel conserved-region T-cell mosaic vaccine with high global HIV-1 coverage is recognized by protective responses in untreated infection, [ 査読有 ] Mol Ther. 24:832-842, 2016 doi: 10.1038/mt.2016.3.

Giang Van Tran,\* Takayuki Chikata,\* Jonathan M. Carson, Hayato Murakoshi, Dung Hoai Nguyen, Yoshiko Tamura, Tomohiro Akahoshi, Nozomi Kuse, Keiko Sakai, Sachiko Sakai, Kyle Cobarrubias, Shinichi Oka, Zabrina L. Brumme, Kinh Van Nguyen, and Masafumi Takiguchi (\*Equal contribution), A strong association of HLA-associated Pol and Gag mutations with clinical parameters in HIV-1 subtype A/E infection, [ 査読有 ] AIDS 30:681-689,

2016 doi:  
10.1097/QAD.0000000000000969.  
Nozomi Kuse\*, Mohammad Arif Rahman\*, Hayato Murakoshi\*, Giang Van Tran, Takayuki Chikata, Madoka Koyanagi, Kinh Van Nguyen, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, and Masafumi Takiguchi, Different Effects of Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor Resistance Mutations on Cytotoxic T Lymphocyte Recognition between HIV-1 Subtype B and Subtype A/E Infections (\*Equal contribution), [査読有] J. Virol. 89:7363-7372, 2015 doi: 10.1128/JVI.00974-15.

[学会発表](計12件)

Hayato Murakoshi, Tomohiro Akahoshi, Madoka Koyanagi, Takayuki Chikata, Katherine L James, Yoshiko Tamura, Nozomi Kuse, Xiaoming Sun, Hiroyuki Gatanaga, Sarah L Rowland-Jones, Shinichi Oka, and Masafumi Takiguchi, Impact of a Single HLA-A\*24:02-associated Escape Mutation on HLA-B\*35:01-associated HIV-1 Control and T cell Adaptation, 第30回日本エイズ学会学術集会・総会(鹿児島県鹿児島市 かがしま県民交流センター), 招待講演、2016年11月24-26日  
近田 貴敬, Giang Van Tran, 村越 勇人, 田村 美子, 赤星 智寛, 久世 望, 阪井 恵子, 小柳 円, Kinh Van Nguyen, 滝口 雅文, ベトナム人 HIV-1 サブタイプ A/E 感染者コホートにおけるエイズ病態進行に關与する HLA アリルの探索, 第30回日本エイズ学会学術集会・総会(鹿児島県鹿児島市 かがしま県民交流センター), 2016年11月24-26日  
赤星 智寛, 端本 昌夫, 村越 勇人, 近田 貴敬, 田村 美子, 湯永 博之, 岡 慎一, 滝口 雅文, HIV-1 と特異的 CTL の相互適応, 第30回日本エイズ学会学術集会・総会(鹿児島県鹿児島市 かがしま県民交流センター), 2016年11月24-26日

Hayato Murakoshi, Tomohiro Akahoshi, Madoka Koyanagi, Takayuki Chikata, Katherine L James, Nozomi Kuse, Yoshiko Tamura, Sarah L Rowland-Jones, Shinichi Oka, Hiroyuki Gatanaga, and Masafumi Takiguchi, Impaired Effect of HLA-A\*24:02-Associated Mutation on HLA-B\*35:01-Associated HIV-1 Control, HIVR4P 2016 (Chicago, USA), October 17-21, 2016  
田村 美子, 村越 勇人, 丸山 理恵,

Dung Hoai Nguyen, Giang Van Tran, 赤星 智寛, 久世 望, 近田 貴敬, 阪井 恵子, 小柳 円, 酒井 幸子, 岡 慎一, Kinh Van Nguyen, 滝口 雅文, ベトナム人 HIV-1 感染者に見られる HIV-1 感染制御に關与した HIV-1 特異的細胞傷害性 T 細胞, 第29回日本エイズ学会学術集会・総会(東京文京区 東京ドームホテル), 2015年11月30日-12月1日  
近田 貴敬, Giang Van Tran, Jonathan Carlson, 村越 勇人, Dung Hoai Nguyen, 田村 美子, 赤星 智寛, 久世 望, 阪井 恵子, 小柳 円, 酒井 幸子, Kyle Cobarrubias, 岡 慎一, Zabrina Brumme, Kinh Van Nguyen, 滝口 雅文, ベトナム人 HIV-1 subtype A/E 感染者コホートにおける HLA-associated polymorphism の同定, 第29回日本エイズ学会学術集会・総会(東京文京区 東京ドームホテル), 2015年11月30日-12月1日

村越 勇人, 田村 美子, 丸山 理恵, Dung Hoai Nguyen, Giang Van Tran, 赤星 智寛, 久世 望, 阪井 恵子, 小柳 円, 酒井 幸子, 岡 慎一, Kinh Van Nguyen, 滝口 雅文, ベトナム人慢性 HIV-1 感染者における HIV-1 特異的細胞傷害性 T 細胞の網羅的解析, 第29回日本エイズ学会学術集会・総会(東京文京区 東京ドームホテル), 2015年11月30日-12月1日

Takayuki Chikata, Hayato Murakoshi, Madoka Koyanagi, Tomohiro Akahoshi, and Masafumi Takiguchi, The impact of one amino-acid substitution outside the binding groove between HLA-C\*03 subtypes in binding of HIV-1 peptide to the HLA molecules, 第44回日本免疫学会学術集会(北海道札幌市 札幌コンベンションセンター), 2015年11月18-20日

Tomohiro Akahoshi, Madoka Koyanagi, Hayato Murakoshi, Nozomi Kuse, and Masafumi Takiguchi, 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(北海道札幌市 札幌コンベンションセンター), 2015年11月18-20日

Hayato Murakoshi, Madoka Koyanagi, Tomohiro Akahoshi, Takayuki Chikata, and Masafumi Takiguchi, HIV-1-specific CD8+ T cells responsible for rapid AIDS progression in HIV-1-infected Japanese individuals carrying HLA-B\*35:01, 第44回日本免疫学会学術集会(北海道札幌市 札幌コンベンションセンター), 2015年11月18-20日  
Tran Van Giang, Takayuki Chikata,

Yoshiko Tamura, Tomohiro Akahoshi,  
Hayato Murakoshi, Nozomi Kuse,  
Shinichi Oka, Keiko Sakai, Nguyen  
Van Kinh, Masafumi Takiguchi,  
Identification of HLA-associated  
polymorphisms in a cohort of HIV-1  
subtype A/E infection, IAS 2015  
(Vancouver, Canada), July 19-22, 2015  
Hayato Murakoshi, Tomohiro  
Akahoshi, Madoka Koyanagi,  
Takayuki Chikata, Takuya Naruto,  
Rie Maruyama, Yoshiko Tamura,  
Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, and  
Masafumi Takiguchi, Control of HIV-1  
by cytotoxic T cells specific for  
multiple conserved epitopes, IAS 2015  
(Vancouver, Canada), July 19-22, 2015

〔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](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・特任講師

研究者番号：60646123

### (2) 研究協力者

瀧永 博之 (GATANAGA, Hiroyuki)

近田 貴敬 (CHIKATA, Takayuki)

赤星 智寛 (AKAHOSHI, Tomohiro)