

平成30年 4月25日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15284

研究課題名(和文) ウイルスリザーバー排除を目指したHIV特異的エフェクター細胞の再探索

研究課題名(英文) Reinvestigating HIV-specific effector cells targeting latent reservoir cells

研究代表者

上野 貴将 (UENO, Takamasa)

熊本大学・エイズ学研究センター・准教授

研究者番号：10322314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：HIV/AIDS感染症分野では、多くの基礎研究や臨床試験が行われ、優れた有効性を示す抗レトロウイルス剤が開発されてきたが、未だ完治に至っていない。新たな研究の展開が求められている。本研究では、これまでの研究で期待した結果が得られず、凍結保存していた感染者由来の細胞を用いて、新たなアッセイ系で再評価することで、新しいエフェクター細胞サブセットの探索を試みた。アッセイ系の構築には成功したが、全く新しい細胞サブセットの同定には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Although the antiretroviral therapy successfully prolongs lives of HIV-infected patients, the current therapy is insufficient to eradicate infected cells. Exploring new type of antiviral effector cells that specifically eradicate HIV-infected cells is warranted. In this study, we sought to establish novel assay systems for antiviral effector cells and proceed functional screening using previously frozen cells that had been analyzed for nonfunctioning when tested other purposes. Although we have succeeded in establishing some new assay systems, we could not find novel type of effector cells harboring strong antiviral effector functions.

研究分野：viral immunology

キーワード：HIV/AIDS

1. 研究開始当初の背景

HIV/AIDS 感染症分野では、多くの基礎研究や臨床試験が行われて来たが、エイズワクチンは未だ効果を発揮するに至っていない。抗レトロウイルス薬剤は、優れた有効性を示して来たが、未だ治癒に向けての戦略を描けていない。抗レトロウイルス薬剤はサブサハラアフリカなどの HIV が激しく流行する地域においても行き渡りつつあるが、それだけに次の課題(Off Therapy)に向けた基礎的な研究が強く求められている。これまで実施されてきた研究の単なる延長ではなく、視点を変えた挑戦的な研究が望まれている。今年になって、Env 抗体の抗原結合ドメインを T 細胞に導入した改変 T 細胞によるウイルスリザーバーの排除など野心的な論文が相次いで報告されているが、現状の方法では極めて人工的な系であるため、広く臨床応用が展開できると思えない。加えて、薬剤療法下に残存する少数の HIV 感染細胞に対する免疫制御は乏しい。例えば、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤で再活性化したウイルス感染細胞に対して、CTL 応答が乏しいという報告が相次いだ。また、リザーバーウイルスには CTL 逃避変異が蓄積されており、通常の CTL では排除が困難と報告された(Nature 2015)。一方、サル感染モデルの研究から、MHC クラス II 以外の分子が CD8 T 細胞に対して抗原提示し、ウイルス制御に有効であることが報告された(Science 2013)。そこで、これまで見過ごしていた細胞たちに注目して、HIV 感染細胞ターゲットとする新しいエフェクター細胞の探索を行い、薬剤療法下のリザーバーウイルスの免疫制御を可能とする独自の研究を展開したいと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、これまで単に凍結保存していた感染者由来の細胞を用いることで、新しいエフェクター細胞サブセットの探索、HLA クラス II 以外の分子が担う抗原提示の可能性の検討、および、HLA 分子による抗原提示と免疫逃避の解析を進める。

3. 研究の方法

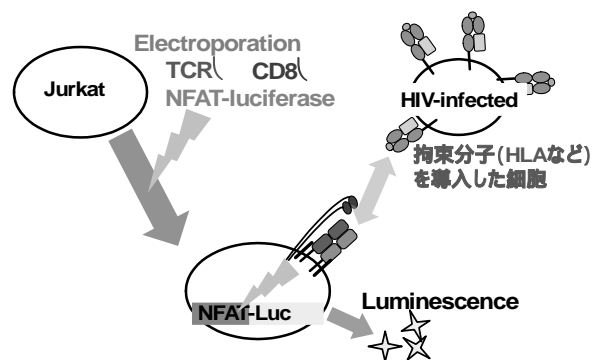
(1) HIV 感染者由来 T 細胞の再培養

RPMI1640 に 10 %FCS と、100unit/ml IL2 を加えた培養液を用いた。必要に応じて、フィーダー細胞を加えた。96 ウェル U プレートで、3 日間に一度培養液を半量ずつ交換しながら、

3 週間に渡って培養した。細胞の増殖が認められたウェルについては、他のプレートに移して培養を継続することとした。

(2) TCR バイオアッセイの立ち上げ

再培養したプライマリー細胞がそのままエフェクター機能アッセイ系に持ち込めないときのために(細胞数が十分でないなど)、高感度な TCR バイオアッセイ系の立ち上げを行なった。具体的には、Jurkat 細胞に TCR 遺伝子とコレセプター遺伝子(CD8 や CD4 など)、NFAT 制御下でルシフェラーゼを発現するコンストラクトをエレクトロポレーション法で共発現させる系を試みた(下図)。



(3) フローサイトメトリー法による解析

通常の方法で、細胞表面および細胞内染色法を用いて、エフェクターおよびターゲット(HIV 感染細胞を含む)の解析を行った。感染者由来細胞の再培養で、十分な増殖が認められた場合には、感染細胞あるいは不活化したウイルス粒子を抗原として、サイトカイン産生や CD107a 発現などの解析系を準備した。

(4) 人権の保護及び法令等の遵守への対応

HIV 感染者の臨床情報と感染者の血液成分(リンパ球)は、承認された研究計画のもと、国立国際医療研究センター病院において、インフォームドコンセントを得た対象者からのみ、採取した。熊本大学の研究者は、匿名化された検体を受け取り、実験に用いた。熊本大学の倫理委員会で承認を得ている。

4. 研究成果

(1) HIV 感染者由来 T 細胞の再培養

感染者の PBMC をペプチドで刺激して培養

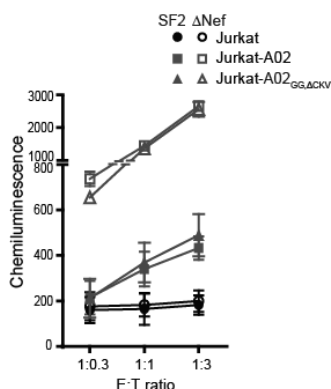
してきた細胞である。刺激に用いたペプチドも HLA 遺伝子型も多岐に渡る。そのため、本研究では、フィトヘマグルチニン (PHA) を刺激剤として用いた。多くのケースでフィーダー細胞を加えたが、場合によっては、フィーダー細胞なしでの培養も試みることにした。

これまでの研究活動で感染者由来の細胞を用いた実験の途中で、機能が明確でないため、凍結して放置していた細胞バイアルから、約 100 バイアルを選び、細胞の再活性化と培養を行った。その多くが、もともと生細胞数が少なかったこと、凍結してから 5 年以上経過していたことなどから、培養が困難であることは想定していた。試みた結果は想定以上で、増殖に成功した細胞は皆無であった。CTL クローンとして樹立し、十分な細胞数で凍結していた細胞について検討した結果は、期待したほどではないながらも細胞の増殖が認められたことから、凍結時の細胞数が大きく影響したものと示唆された。

最近、日本国内では特に、速やかに抗レトロウイルス薬剤の投与を始めるため、治療前のタイミングで感染者から十分な量の血液検体の供与を受けることが困難となっている。今後は、サブサハラアフリカ地域などを念頭にコホート共同研究を進めることで、HIV 感染免疫研究を続けるための検体収集を考えて行きたい。

(2) TCR バイオアッセイ

感染者由来の細胞から cDNA ライブラリーを調製し、抗原認識を担うレセプター (T 細胞レセプターを想定) のクローニングを行ない、抗原特異的なエフェクター機能のアッセイを計画した。そこで、TCR バイオアッセイ系を立ち上げて、HIV 感染細胞に対する応答の感受性と特異性を調べた。その結果、下図に示すように、このアッセイ系は HIV-1 Nef による HLA 発現低下による抗原量の差を検出可能なほど感度が良いことが分かった。



(3) まとめ

本研究では、挑戦的で萌芽期にある研究として、これまでに凍結してきた感染者由来の細胞の再解析を計画した。しかしながら、最も大きなポイントであった細胞の再培養という過程で期待した成果を出すことができなかった。一方で、新しい TCR バイオアッセイ系の確立や、興味深い TCR の同定など、さまざまな成果を得ることができた。今後は、治療下の感染者の検体を用いて、リザーバー細胞に対する免疫応答について詳細な解析を進めていきたい。

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)

Mwimanzi Francis, Toyoda Mako, Mahiti Macdonald, Mann Jaclyn, Martin Jeffrey, Bangsberg David, Brockman Mark, Goulder Philip, Kirchoff Frank, Brumme Zabrina, Ndung'u Thumbi, Ueno Takamasa (2018) Resistance of major histocompatibility complex class B (MHC-B) to Nef-mediated downregulation relative to that of MHC-A is conserved among primate lentiviruses and influences antiviral T cell responses in HIV-1-infected individuals. *J Virol* 92(1) e01409-17 DOI: 10.1128/JVI.01409-17 [査読有]

Hisashi Ueta Yusuke Kitazawa Yasushi Sawanobori Takamasa Ueno, Satoshi Ueha Kouji Matsushima Kenjiro Matsuno (2018) Single blood transfusion induces the production of donor-specific alloantibodies and regulatory T-cells mainly in the spleen. *International Immunology* 30:53-67 DOI: 10.1093/intimm/dxx078 [査読有]

Yi Shi, Ai Kawana-Tachikawa, Feng Gao, Jianxun Qi, Chuansheng Liu, Jia Gao, Hao Cheng, Takamasa Ueno, Aikichi Iwamoto, George Gao (2017) Conserved V 1 binding geometry in a setting of locus-disparate pHLA recognition by / TCRs: insight into recognition of HIV peptides by TCR. *J Virol* 91: e00725-17 [査読有]

Doreen Kamori, Takamasa Ueno (2017)

HIV-1 Tat and viral latency: what we can learn from naturally occurring sequence variations. *Front. Microbiol.* 8:80. doi: 10.3389/fmicb.2017.00080 [査読有]

Doreen Kamori, Zafrul Hasan, Jun Ohashi, Ai Kawana-Tachikawa, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, Takamasa Ueno (2017) Identification of two unique naturally occurring Vpr sequence polymorphisms associated with clinical parameters in HIV-1 chronic infection. *J Med Virol* 89:123-129 DOI: 10.1002/jmv.24612 [査読有]

[学会発表] (計 12 件)

Francis Mwimanzi, Macdonald Mahiti, Mako Toyoda, Frank Kirchhoff, Thumbi Ndung'u, Takamasa Ueno: Relative resistance of MHC-B to Nef-mediated downregulation is conserved among lentiviruses and correlates with reduced viral loads in HIV-1-infected patient. ワークショップ5、第31回日本エイズ学会学術集会・総会、東京(日本)、2017年11月24日-26日

上野貴将. MHC と HIV-1 Nef との相互作用と免疫制御への影響, 第26回日本組織適合性学会大会 招待講演 シンポジウム4 感染症領域におけるMHC研究, JMS アステールプラザ(広島市) 2017年10月27日~10月29日

Francis Mwimanzi, Mako Toyoda, Macdonald Mahiti, Jaclyn K Mann, Frank Kirchhoff, Thumbi Ndung'u, Takamasa Ueno: Relative resistance of HLA-B for downregulation by naturally occurring Nef sequences influences antiviral immune control in vivo. ワークショップ3、第65回日本ウイルス学会学術集会、大阪市(日本) 2017年10月24日-26日

Toyoda Mako, Kamori Doreen, Carlson Jonathan, Gatanaga Hiroyuki, Kawana-Tachikawa Ai, Oka Shinichi, Pizzato Massimo, Ueno Takamasa. Naturally arising HIV-1 Nef variants that impair Nef's ability to counteract SERINC3/5 are associated with decreased plasma viremia. 18th Kumamoto AIDS Seminar. Kumamoto Kenmin Koryu Kaikan-Parea. October 30th-November 1st, 2017.

豊田真子、Kamori Doreen、Jonathan Carlson、瀧永博之、立川(川名)愛、岡慎一、Massimo Pizzato、上野貴将. Differential ability to antagonize SERINC3/5 counteraction by naturally arising HIV-1 Nef variants associating with decreased plasma viremia. 第65回日本ウイルス学会学術集会。大阪国際会議場。2017年10月24日-10月26日

Toyoda Mako, Kamori Doreen, Carlson Jonathan, Gatanaga Hiroyuki, Kawana-Tachikawa Ai, Oka Shinichi, Pizzato Massimo, Ueno Takamasa. Impaired Nef's ability to counteract SERINC5 is associated with decreased plasma viremia. 9th IAS Conference on HIV Science (IAS 2017) Paris, France. July 23-26, 2017

Francis Mwimanzi, Macdonald Mahiti, Toyoda Mako, Jaclyn K Mann, Thumbi Ndung'u, Takamasa Ueno: Relative resistance of HLA-B for downregulation by Nef is a fundamental property across lentiviral lineage. 9th International AIDS Society Conference on HIV Sciences、パリ(フランス共和国) 2017年7月23日-26日

Toyoda Mako, Kamori Doreen, Carlson Jonathan, Gatanaga Hiroyuki, Kawana-Tachikawa Ai, Oka Shinichi, Pizzato Massimo, Ueno Takamasa. Impaired Nef's ability to counteract SERINC5 is associated with decreased plasma viremia. Keystone Symposia Conference. Modeling Viral Infections and Immunity. Stanley Hotel, Estes Park, Colorado. May 1-4, 2017.

豊田真子、Kamori Doreen、立川(川名)愛、瀧永博之、岡慎一、上野貴将. アクセサリー蛋白質に対する免疫淘汰圧がウイルス複製に与える影響。第30回日本エイズ学会学術集会・総会。鹿児島県民交流センター。2016年11月23日-11月25日

Toyoda Mako, Kamori Doreen, Pizzato Massimo, Ueno Takamasa. Naturally occurring HIV-1 Nef variants that impair Nef's ability to counteract SERINC5 and enhance virion infectivity. 2nd Kumamoto IRCMS International Symposium and 17th Kumamoto AIDS Seminar. Kumamoto

Kenmin Koryu Kaikan-Parea. October 31st-November 2nd, 2016.

豊田真子、Kamori Doreen、上野貴将.
Viral fitness cost imposed by naturally occurring HLA-associated polymorphisms across HIV-1 accessory proteins. 第64回日本ウイルス学会学術集会. 札幌コンベンションセンター. 2016年10月23日-10月25日

Toyoda Mako, Kamori Doreen, Ueno Takamasa. Naturally occurring HLA-associated Nef polymorphisms that are associated with decreased plasma viral load and impaired Nef-mediated enhancement of virion infectivity. 41st Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Retroviruses. NY, USA. May 23-28, 2016.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 貴将 (Takamasa Ueno)
熊本大学・エイズ学研究センター・准教授
研究者番号: 10322314

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし