

平成 30 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：2016～2017

課題番号：16K19159

研究課題名(和文) ナイーブT細胞から高機能なHIV-1特異的CD8陽性T細胞を誘導する機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of induction of high-functional HIV-1-specific CD8 T cells from naive T cells

研究代表者

久世 望 (KUSE, NOZOMI)

熊本大学・エイズ学研究センター・特任助教

研究者番号：80710409

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)：HIV-1感染において、高機能なHIV-1特異的CD8陽性T細胞を誘導することは予防ワクチンの開発やリザーバーウイルスを排除するために非常に重要である。しかし、これまでにナイーブT細胞から高機能なHIV-1特異的CD8陽性T細胞を誘導する方法は確立していない。本研究ではSTINGリガンドcGAMPによってウイルス抑制能の強いHIV-1特異的CD8陽性T細胞をナイーブT細胞から効率的に誘導できることを明らかにした。このことからSTINGリガンドがCTL誘導型AIDSワクチンの開発や根治療法にとって有効である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：HIV-1-specific CD8+ T cells are required for immune suppression of HIV-1 replication and elimination of the viral reservoirs. However, effective priming method of functional HIV-1-specific CD8+ T cells from naive T cells remains unclear. The present study demonstrated that STING ligand cGAMP effectively induced functional HIV-specific CD8+ T cells with ability to suppress HIV-1 from naive T cells. These findings suggest that STING ligand is useful for AIDS vaccines and cure treatment.

研究分野：感染免疫学

キーワード：HIV-1 CTL CD8陽性T細胞 ナイーブT細胞 プライミング STINGリガンド

1. 研究開始当初の背景

HIV-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞(CTL)は HIV-1 抑制制御に非常に重要である。我々はこれまでに日本人の HIV-1 慢性感染者を対象とした解析で、生体内で HIV-1 を強く抑制している様々なエピトープ特異的 CTL を同定してきた。一方、ウイルス抑制機能を持つ CTL がワクチンを接種した HIV-1 非感染者のナイーブ細胞から誘導されてくるかどうかは明らかになっておらず、治療・予防ワクチンとして有効な細胞性免疫の誘導が可能かどうか、誘導された特異的 T 細胞の抗ウイルス活性機能を解析する必要はある。

2. 研究の目的

本研究は HIV-1 感染者で比較的高頻度に見られ、生体内でウイルスを強く抑制できる CTL エピトープ抗原を用いて HIV-1 非感染者のナイーブ T 細胞から効率的に誘導され強いウイルス抑制能を持つ HIV-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞を誘導する方法とその誘導機序を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) HIV-1 非感染者の検体

HLA-A*2402 陽性 HIV-1 非感染者の末梢血から PBMC を分離して研究に使用した。

本研究は熊本大学の倫理委員会の承認を得ている。ヒト由来の検体の使用と遺伝子解析についてはすべてインフォームド・コンセントをとり、本人の承諾なく使用されることはない。

(2) ナイーブ T 細胞からの HIV-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞の誘導

HLA-A*2402 陽性 HIV-1 非感染者の PBMC を Flt3 リガンドで刺激したのち Nef138-10 エピトープペプチドとともに TLR4 リガンド LPS または STING リガンド 3'3' cGAMP で刺激を行った。培養 10 日目に特異的テトラマーで染色し Nef138-10 特異的 CD8 T 細胞の頻度を解析しプライミングの効率を調べた。

(3) HIV-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞の機能解析

ナイーブ T 細胞から誘導された T 細胞から T cell line を作製し様々な機能解析を行った。まず抗原ペプチドに対するサイトカインの産生能を解析し多機能性について調べた。次に健康人由来の HIV-1 感染 CD4 細胞と T cell line を共培養し、上清中のウイルス量を測定することによって T cell line のウイルス抑制能を調べた。さらに特異的テトラマーの染色によって TCR の結合能を解析した。また細胞内のグランザイム、パーフォリン、T-bet を染色し、エフェクター機能に必要な分子の発現量を解析した。

これらの解析では HIV-1 感染者から樹立されたウイルス抑制能の強い CTL クローンを比較対象としておいた。

(4) TCR クロノタイプの解析

抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞をソーティングし、シングルセルレベルで TCR の遺伝子解析を行いナイーブ T 細胞から誘導される TCR ク

ロノタイプを調べた。

4. 研究成果

(1) ナイーブ T 細胞からの HIV-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞の誘導

LPS と cGAMP でナイーブ T 細胞から in vitro 実験系で誘導できた Nef138-10 特異的 CD8 陽性 T 細胞由来の頻度をテトラマー解析によって比較した。その結果、2つのリガンドの間でテトラマー特異的 T 細胞の頻度に差はみられなかった(図1)。このことから LPS と cGAMP でナイーブ T 細胞からの HIV-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞の誘導効率は変わらないことが示唆される。

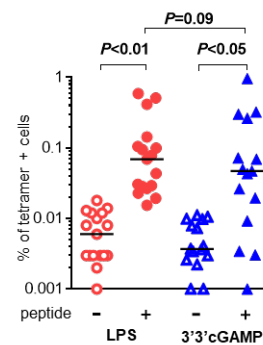


図1. ナイーブ T 細胞からの Nef138-10 特異的 CD8 陽性 T 細胞の誘導

(2) ナイーブ T 細胞由来の HIV-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞の機能解析

樹立した T cell line の IFN γ , IL-2, TNF α , MIP1 β の産生能を調べたところ、LPS も cGAMP もどちらもこれらのサイトカイン・ケモカインを産生できる多機能性を持っていた。しかし cGAMP で誘導した T cell line のほうが LPS よりも有意に多機能性が高いことが分かった。

次に HIV-1 の抑制能を解析した結果、LPS で誘導した T cell line はほとんど抑制能を持っていないことが分かった(図2)。一方、cGAMP で誘導した T cell line は強いウイルス抑制能を示した(図2)。このことから cGAMP はウイルス抑制能が強い HIV-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞を効率的に誘導できることが示唆される。

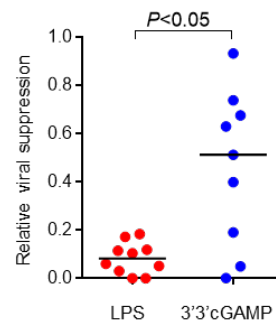


図2. ナイーブ T 細胞から誘導した Nef138-8 特異的 T cell line のウイルス抑制能

(3)TCR 結合能とクロノタイプ

cGAMP で誘導された T cell line が LPS に比べてなぜウイルス抑制能が強いのかその機構を解明することにした。まずウイルス抑制能に影響を及ぼすと報告されている TCR の結合能をテトラマーを用いて解析した。しかしながら 2 つのリガンドで誘導された T cell line の TCR の結合能の強さに有意な差はみられなかった。また cGAMP で誘導された T cell line のウイルス抑制能と TCR の結合能の強さに相関はみられなかった。このことから TCR 以外の要因が cGAMP で誘導した T cell line のウイルス抑制能の強さに関与していることが考えられる。

さらにナイーブ T 細胞から誘導した T cell line の TCR クロノタイプを調べた。その結果、LPS および cGAMP どちらで誘導した T cell line も HIV-1 感染者(エフェクターやメモリー T 細胞)で検出される TCR クロノタイプとは異なり様々な TCR クロノタイプが誘導されていることが分かった。これらのことから cGAMP は機能性の高い TCR を選択的にナイーブ T 細胞から誘導しているわけではないということが示唆される。

(4)エフェクター分子の発現量

さらに細胞傷害活性に強く関連のあるエフェクター分子(パーフォリン、グランザイム、T-bet)の発現量を解析した。その結果、cGAMP で誘導した T cell line の細胞内のパーフォリン、グランザイム B の発現量は LPS に比べて高いことが分かった(図 3)。さらに cGAMP で誘導した T cell line のパーフォリンの発現量はウイルス抑制能との強さに相関がある傾向が見られた。これらのことから cGAMP のウイルス抑制能の強さはパーフォリンの発現量が強く影響していることが示唆された。

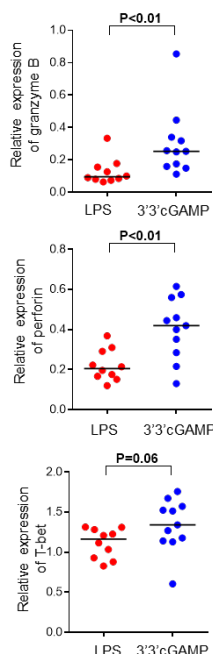


図 3. ナイーブ T 細胞から誘導した Nef138-10 特異的 CD8 陽性 T 細胞のエフェクター分子の発現量

(5)結論

本研究の in vitro 実験系にて STING リガンド cGAMP はパーフォリンのようなエフェクター分子の発現量を高めることによって HIV-1 抑制能の強い HIV-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞を HIV-1 非感染者のナイーブ T 細胞から効率的に誘導できることが考えられる。したがって、STING リガンドが高機能な CTL の誘導に必要なエイズ予防・治療ワクチンに応用できることが示唆される。

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 4 件)

Takayuki Chikata*, Giang Van Tran*, Hayato Murakoshi, Tomohiro Akahoshi, Ying Qi, Vivek Naranbhai, Nozomi Kuse, Yoshiko Tamura, Madoka Koyanagi, Sachiko Sakai, Dung Hoai Nguyen, Dung Thi Nguyen, Ha Thu Nguyen, Trung Vu Nguyen, Shinichi Oka, Maureen P. Martin, Mary Carrington, Keiko Sakai, Kinh Van Nguyen, and Masafumi Takiguchi (*Equal contribution), HLA class I-mediated HIV-1 control in Vietnamese infected with HIV-1 subtype A/E, [査読有] J. Virol. 92:e01749-17, 2018 doi: 10.1128/JVI.01749-17

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

Zhansong Lin, Kimiko Kuroki, Nozomi Kuse, Xiaoming Sun, Tomohiro Akahoshi, Ying Qi, Takayuki Chikata, Takuya Naruto, Madoka Koyanagi, Hayato Murakoshi, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, Mary Carrington, Katsumi Maenaka, Masafumi Takiguchi, HIV-1 control by NK cells via reduced interaction between KIR2DL2 and HLA-C*12:02/C*14:03, [査読有] Cell Reports 17:2210-2220, 2016 doi: 10.1016/j.celrep.2016.10.075.

Xiaoming Sun, Yi Shi, Tomohiro Akahoshi, Mamoru Fujiwara, Hiroyuki

Gatanaga, Christian Schonbach, Nozomi Kuse, Victor Appay, George F. Gao, Shinichi Oka, and Masafumi Takiguchi, Effects of a single escape mutation on T cell and HIV-1 co-adaptation, [査読有] Cell Reports, 15:2279-2291, 2016 doi: 10.1016/j.celrep.2016.05.017

[学会発表](計30件)

Chengcheng Zou, Hayato Murakoshi, Nozomi Kuse, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, Tomas Hanke, and Masafumi Takiguchi, Control of HIV-1 by CD8+ T cells specific for Gag epitopes in conserved-region mosaic vaccine, Keystone Symposia: Progress and Pathways Toward an Effective HIV Vaccine (J6) (Banff, Canada), 2018
Masafumi Takiguchi, Takayuki Chikata, Giang Van Tran, Hayato Murakoshi, Tomohiro Akahoshi, Ying Qi, Vivek Naranbhai, Nozomi Kuse, Yoshiko Tamura, Madoka Koyanagi, Sachiko Sakai, Dung Hoai Nguyen, Dung Thi Nguyen, Ha Thu Nguyen, Trung Vu Nguyen, Shinichi Oka, Maureen P. Martin, Mary Carrington, Keiko Sakai, and Kinh Van Nguyen, HLA class I-mediated HIV-1 control in Vietnamese infected with HIV-1 subtype A/E, 20th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim /U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program:AIDS and Immunology Joint Panel (Shenzhen, China), 2018
Masafumi Takiguchi, Hayato Murakoshi, Takayuki Chikata, Tomohiro Akahoshi, Nozomi Kuse, Zhansong Lin, Mary Carrington, Hiroyuki Gatanaga, and Shinichi Oka, HLA class I-mediated HIV-1 control in HIV-1 infection, 20th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim/U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (Shenzhen, China), 2018
Yu Zhang, Nozomi Kuse, Hayato Murakoshi, Tomohiro Akahoshi, Takayuki Chikata, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, and Masafumi Takiguchi, Analysis of conserved epitopes-specific and cross-reactive CTLs controlling HIV-1 in Japanese individuals, 18th Kumamoto AIDS Seminar (Kumamoto, Japan), 2017
Chengcheng Zou, Hayato Murakoshi, Nozomi Kuse, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, Tomas Hanke, and Masafumi Takiguchi, Control of HIV-1 by CD8+ T cells recognizing Gag

conserved region, 18th Kumamoto AIDS Seminar (Kumamoto, Japan), 2017
Zhansong Lin, Takayuki Chikata, Giang Van Tran, Hayato Murakoshi, Tomohiro Akahoshi, Nozomi Kuse, Yoshiko Tamura, Madoka Koyanagi, Sachiko Sakai, Dung Hoai Nguyen, Dung Thi Nguyen, Ha Thu Nguyen, Trung Vu Nguyen, Keiko Sakai, Kinh Van Nguyen, and Masafumi Takiguchi, The Effect of KIR Genes on HIV-1 Control in the Vietnamese Cohort, 18th Kumamoto AIDS Seminar (Kumamoto, Japan), 2017
Takayuki Chikata, Giang Van Tran, Hayato Murakoshi, Tomohiro Akahoshi, Nozomi Kuse, Ying Qi, Yoshiko Tamura, Madoka Koyanagi, Sachiko Sakai, Dung Hoai Nguyen, Dung Thi Nguyen, Ha Thu Nguyen, Trung Vu Nguyen, Shinichi Oka, Marry Carrington, Keiko Sakai, Kinh Van Nguyen, and Masafumi Takiguchi, HLA class I-mediated HIV-1 control in Vietnamese infected with HIV-1 subtype A/E, 18th Kumamoto AIDS Seminar (Kumamoto, Japan), 2017
Tomohiro Akahoshi, Nozomi Kuse, Hayato Murakoshi, Takayuki Chikata, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, and Masafumi Takiguchi, Generation of HIV-1 polymorphism at RT135 via coevolution of multiple HIV-1-specific T cells with HIV-1, 18th Kumamoto AIDS Seminar (Kumamoto, Japan), 2017
Nozomi Kuse, Xiaoming Sun, Tomohiro Akahoshi, Anna Lissina, Takuya Yamamoto, Victor Appay, and Masafumi Takiguchi, STING ligand effectively prime functional HIV-1-specific CD8+ T Cells from naive T cells, 18th Kumamoto AIDS Seminar (Kumamoto, Japan), 2017
Nozomi Kuse, Xiaoming Sun, Tomohiro Akahoshi, Anna Lissina, Ken J. Ishii, Takuya Yamamoto, Victor Appay, and Masafumi Takiguchi, Effective priming of CD8+ T cells with ability to suppress HIV-1 replication using STING ligand, IAS 2017 (Paris, France), 2017
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 escape mutation selected by HLA-A*24:02-restricted CD8+ T cells on HIV-1 control by HLA-B*35:01-restricted ones and T cell adaptation, IAS 2017 (Paris, France), 2017
Nozomi Kuse, Xiaoming Sun, Tomohiro

Akahoshi, Anna Lissina, Takuya Yamamoto, Victor Appay, and Masafumi Takiguchi, Effective priming of functional HIV-1-specific CD8+ T Cells from naive T cells using STING ligand, 第 46 回日本免疫学会学術集会 (仙台), 2017 年

Hayato Murakoshi, Tomohiro Akahoshi, Madoka Koyanagi, Takayuki Chikata, Nozomi Kuse, and Masafumi Takiguchi, Impact of a single escape mutation selected by HLA-A*24:02-restricted CD8+ T cells on HIV-1 control by HLA-B*35:01-restricted ones and T cell adaptation, 第 46 回日本免疫学会学術集会 (仙台), 2017 年

近田 貴敬, Tran Van Giang, 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 アリルおよび HLA 關連 HIV-1 多型のエイズ病態進行に及ぼす影響, 第 31 回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京), 2017 年

赤星 智寛, 久世 望, 村越 勇人, 近田 貴敬, 湯永 博之, 岡 慎一, 滝口 雅文, 複数の異なった HLA 拘束性 CTL による RT135 変異の選択とその相互作用, 第 31 回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京), 2017 年

久世 望, Sun Xiaoming, 赤星 智寛, Lissina Anna, 山本 拓也, Appay Victor, 滝口 雅文, STING リガンドによるウイルス抑制機能の高い HIV-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞のプライミング, 第 31 回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京), 2017 年
村越 勇人, 久世 望, 赤星 智寛, 近田 貴敬, Zhang Yu, 湯永 博之, 岡 慎一, 滝口 雅文, 強い HIV-1 増殖抑制能を有した CTL による変異 HIV-1 の認識, 第 31 回日本エイズ学会学術集会・総会 (東京), 2017 年

Takayuki Chikata, Hayato Murakoshi, Tomohiro Akahoshi, Nozomi Kuse, Yoshiko Tamura, Keiko Sakai, and Masafumi Takiguchi, Identification of a detrimental HLA haplotype and the effect of its associated HIV-1 mutations in HIV-1 subtype A/E-infected Vietnamese, 第 65 回日本ウイルス学会学術集会 (大阪), 2017 年
Zhansong Lin, Kimiko Kuroki, Nozomi Kuse, Xiaoming Sun, Tomohiro Akahoshi, Ying Qi, Takayuki Chikata, Takuya Naruto, Madoka Koyanagi, Hayato Murakoshi, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, Mary Carrington, Katsumi Maenaka, and Masafumi Takiguchi, Control of HIV-1 by NK cells via

KIR-2DL2 and 2 HLA-C alleles, 2nd Kumamoto IRCMS International Symposium and 17th Kumamoto AIDS Seminar (Kumamoto, Japan), 2016

Takayuki Chikata, Giang Van Tran, Hayato Murakoshi, Yoshiko Tamura, Tomohiro Akahoshi, Nozomi Kuse, Madoka Koyanagi, Sachiko Sakai, Keiko Sakai, Kinh Van Nguyen, and Masafumi Takiguchi, Contribution of HLA class I alleles to clinical outcome in HIV-1 subtype A/E infected Vietnamese individuals, 2nd Kumamoto IRCMS International Symposium and 17th Kumamoto AIDS Seminar (Kumamoto, Japan), 2016

⑲ Tomohiro Akahoshi, Masao Hashimoto, Takayuki Chikata, Hayato Murakoshi, Nozomi Kuse, Yoshiko Tamura, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, and Masafumi Takiguchi, Co-evolution between HIV-1 escape mutant and HIV-1-specific T cells, 2nd Kumamoto IRCMS International Symposium and 17th Kumamoto AIDS Seminar (Kumamoto, Japan), 2016

⑳ Nozomi Kuse, Xiaoming Sun, Tomohiro Akahoshi, Anna Lissina, Victor Appay, and Masafumi Takiguchi, Functional analysis of HIV-1-specific CD8+ T cells primed in vitro from naive T cells, 2nd Kumamoto IRCMS International Symposium and 17th Kumamoto AIDS Seminar (Kumamoto, Japan), 2016

㉑ Nozomi Kuse, Xiaoming Sun, Tomohiro Akahoshi, Anna Lissina, Victor Appay, and Masafumi Takiguchi, In Vitro Priming of HIV-1-specific CD8+ T Cells from Naive T Cells, HIVR4P 2016 (Chicago, USA), 2016

㉒ 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), 2016

㉓ Zhansong Lin, Nozomi Kuse, Tomohiro Akahoshi, Kimiko Kuroki, Katsumi Maenaka, and Masafumi Takiguchi, The effect of one amino acid difference outside of peptide binding groove of HLA-C molecules on NK cell function and HIV-1 control, 第 45 回日本免疫学会学術集会 (沖縄・宜野湾), 2016 年

㉔ Nozomi Kuse, Xiaoming Sun, Tomohiro Akahoshi, Anna Lissina, Takuya Yamamoto, Ken J. Ishii, Victor Appay,

- and Masafumi Takiguchi, In vitro priming of HIV-1-specific CD8+ T cells from naive T cells, 第45回日本免疫学会学術集会(沖縄・宜野湾), 2016年
- ⑳ Zhan Song Lin, Nozomi Kuse, Tomohiro Akahoshi, Kimiko Kuroki, Katsumi Maenaka, and Masafumi Takiguchi, The effect of a single CTL escape -mutation on HIV-1 control by NK cell functions, 第30回日本エイズ学会学術集会・総会(鹿児島), 2016年
- ㉑ 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), 2016年
- ㉒ 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), 2016年
- ㉓ Takayuki Chikata, Giang Van Tran, Hayato Murakoshi, Yoshiko Tamura, Tomohiro Akahoshi, Nozomi Kuse, Keiko Sakai, Kinh Van Nguyen, and Masafumi Takiguchi, Contribution of HLA class I alleles to clinical outcome in HIV-1 subtype A/E infected Vietnamese individuals, 第64回日本ウイルス学会学術集会(札幌), 2016年

〔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/takiguchi/default.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久世 望 (KUSE, Nozomi)

熊本大学エイズ学研究センター・特任助教
研究者番号: 80710409

(2) 研究協力者

村越 勇人 (MURAKOSHI, Hayato)

赤星 智寛 (AKAHOSHI, Tomohiro)