

平成 30 年 6 月 1 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：16K19614

研究課題名(和文) HIV-1増殖抑制に関与するHIV-1特異的CD4陽性ヘルパーT細胞に関する研究

研究課題名(英文) Study on HIV-1-specific CD4+ T cells that can control HIV-1 replication.

研究代表者

近田 貴敬 (CHIKATA, TAKAYUKI)

熊本大学・エイズ学研究センター・研究員

研究者番号：60749711

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)：我々は無治療慢性日本人HIV-1感染者を対象にして、HIV-1増殖抑制に寄与するHIV-1特異的CD4T細胞を同定するため、オーバーラップペプチドを用いてCD4T細胞反応を解析した。その結果、Gag3、Gag4、Pol18カクテルに対するCD4T細胞反応が低い血中ウイルス量と相関していたが、続く特異的CD4T細胞の樹立はできなかった。一方で、CD4T細胞反応が非常に強かったGag6カクテル中のGag17-45ペプチドを用いたところ、HIV-1特異的CD4T細胞クローンの樹立に成功した。本研究の成果はHIV-1感染制御ワクチンの開発に重要な知見を与えるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To clarify and identify of HIV-1-specific CD4+ T cells that contributed to suppression of HIV-1 replication, we analyzed the specific CD4+ T cell responses using Gag, Pol, Nef overlapping 17-mer peptides and its pools in 394 chronically HIV-1 clade B-infected Japanese individuals. We found that the T cell responders to the 3 peptide pools, Gag3, Gag4, and Pol18, had lower plasma viral load than the non-responders, and total magnitude of their responses were significantly correlated with lower plasma viral load. However, we could not establish Gag3, Gag4, and Pol18-specific CD4+ T cells from the responders. In contrast of them, we finally succeeded to establish the CD4+ T cell clones specific for a single 17mer peptide, Gag17-45, in Gag6 peptide pool from a Gag6-responder who showed high T cell response. These results gave the important knowledge and information for the development of HIV-1 vaccine.

研究分野：感染免疫学

キーワード：HIV-1特異的CD4陽性T細胞 Gag HIV-1

## 1. 研究開始当初の背景

HIV 感染拡大の阻止は急務であり、早期診断・治療促進に加え、有効なワクチン開発が求められている。HIV-1 感染者の体内では、感染後に HIV-1 特異的細胞傷害性 CD8 陽性 T 細胞 (CTL) や中和抗体が誘導され、感染細胞の排除や標的細胞への侵入阻害によって HIV-1 の増殖を抑制することが知られている。一方で、CD4 陽性ヘルパー T 細胞 (CD4T 細胞) は、抗原提示細胞表面上の HLA class II 分子・エピトープ複合体を認識し、様々なサイトカインを産生し、CTL やマクロファージの機能発現の誘導、または B 細胞を分化成熟させ抗体産生を誘導させる役割を持っている。したがって、ワクチンによって HIV-1 特異的 CD4T 細胞を誘導させることにより、HIV-1 特異的 CTL や HIV-1 特異的中和抗体産生 B 細胞を活性化することができ、感染制御・防御が可能になるものと考えられる。

そこで我々は HIV-1 感染者において網羅的な HIV-1 特異的 CD4T 細胞反応の解析を行い、HIV-1 増殖抑制に関連する HIV-1 特異的 CD4T 細胞を検出し、有効な標的エピトープの同定やその機能を詳細に解析することで、HIV-1 特異的 CTL の活性化機序や B 細胞の抗体誘導機序を明らかにし、その成果は HIV-1 特異的 CD4T 細胞誘導ワクチン開発における標的抗原の最適化や、エイズの病態解析に対して重要な知見を与えるものと期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、無治療慢性 HIV-1 感染者における HIV-1 抗原特異的に反応する CD4T 細胞の解析をおこない、HIV-1 増殖抑制に寄与する HIV-1 特異的 CD4T 細胞を探索し、標的エピトープを同定する。さらに、これら CD4T 細胞の詳細な機能解析をおこない、HIV-1 増殖抑制に結びつく免疫機序を明らかにすることを目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) HIV-1 感染者検体

瀧永博之医師 (研究協力者: 国立国際医療研究センター所属) の協力のもと、394 人の日本人無治療慢性 HIV-1 感染者の血液検体の採取ならびに臨床情報 (血中ウイルス量および CD4 陽性 T 細胞数) の収集を行った。また、得られた PBMC より MACS 法により CD4 陽性 T 細胞を分離し、本研究に用いた。

### (2) CD4T 細胞反応と感染者血中ウイルス量との相関解析

HIV-1 感染を制御することのできる可能性の高い、低い血中ウイルス量と相関する CD4T 細胞反応を同定するため、まず 394 人の無治療慢性日本人 HIV-1 感染者について、HIV-1 Gag, Pol および Nef 遺伝子領域を網羅し、複数個の 17 mer HIV-1 オーバーラップペプチドを含むペプチドカクテルを用い、

IFN- ELISPOT 法による特異的 CD4T 細胞反応の網羅的解析を行った。続いて、一定の反応 (Spots > 200 / 1 million CD4 cells) を示した感染者と示さなかった感染者の血中ウイルス量を比較解析した。また、ペプチドカクテルに対する T 細胞反応の強さ (Spots / 1 million CD4 cells) と血中ウイルス量の相関解析を行った。

### (3) 17mer オーバーラップペプチドの同定

ペプチドカクテル中のいずれの 17mer オーバーラップペプチドが反応しているかを明らかにするため、まず ELISPOT 法により反応が認められた感染者の PBMC から、MACS 法により CD4 陽性 T 細胞および CD19 陽性細胞を分離した。続いて、オーバーラップペプチドカクテルを処理し、カクテルに反応する CD4T 細胞を誘導した。さらに抗原提示細胞 (同一感染者の PBMC より樹立した EBV-transformed B 細胞株) およびカクテルに含まれる個々のシングルオーバーラップペプチドを用い、細胞内サイトカイン (IFN- ) 染色法によって反応を検出した。

### (4) 最適長エピトープの決定

17mer オーバーラップペプチド特異的 CD4T 細胞およびオーバーラップペプチドを基に新たに合成した短いペプチドを結合させた抗原提示細胞を用い、細胞内サイトカイン (IFN- ) 染色法によって各々の IFN- 産生能を比較し、HLA class II 分子との結合に最適な長さのエピトープペプチドの決定を試みた。

### (5) エピトープ特異的 CD4T 細胞クローンの樹立

エピトープペプチドに反応を示した感染者の PBMC から MACS 法によって分離した CD4 陽性 T 細胞を用いて、エピトープ特異的 CD4T 細胞クローンを樹立した。

## 4. 研究成果

### (1) 低い血中ウイルス量に関与する 17mer オーバーラップペプチドカクテルの同定

394 人の無治療慢性日本人 HIV-1 感染者の PBMC 検体から分離された CD4 陽性 T 細胞 (CD4T 細胞) に HIV-1 Gag, Pol, Nef 領域を網羅する 17mer オーバーラップペプチドカクテルを処理し、特異的 CD4T 細胞反応の網羅的解析を行った結果、Gag 領域: 2 種, Pol 領域: 2 種, Nef 領域: 1 種のカクテルに対して CD4T 細胞反応を示す感染者が、反応を示さなかった感染者に比べ有意に低いウイルス量を示していた。続いて、CD4T 細胞反応の強さと感染者の血中ウイルス量の相関関係を解析した結果、Gag 領域: 4 種, Pol 領域: 4 種, Nef 領域: 1 種のカクテルに対する CD4T 細胞反応がウイルス量と有意に負の相関関係を示した。これらのうち前者の解析結果と一致したものは Gag3, Gag4, Pol18 カクテ

ルであり、特に Gag4 カクテルに反応する感染者検体が多かった (図 1, 2)。これらカクテルに HIV-1 感染を制御することのできる可能性の高い CD4T 細胞に特異的なエピトープ候補が含まれていると考えられた。

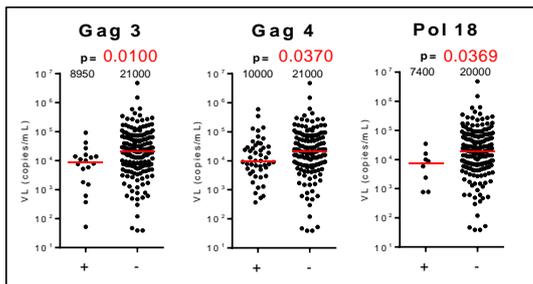


図 1. Gag3, 4, Pol18 に対する CD4T 細胞反応を示す感染者 (+) および反応を示さなかった感染者 (-) における血中ウイルス量の比較

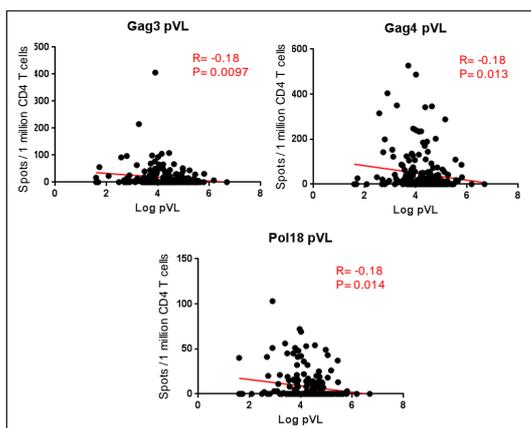


図 2. Gag3, 4, Pol18 に対する CD4T 細胞反応の強さ (Total spots) と血中ウイルス量の相関関係

### (2) Gag4 カクテル特異的 CD4T 細胞の樹立

続いて、Gag4 カクテル中のいずれのシングル 17 mer オーバーラップペプチドが反応しているかどうかを明らかにするため、Gag4 に反応した感染者検体を用い、個々のペプチドを処理したところ、Gag17-27, Gag17-28 および Gag17-30 のペプチドが標的エピトープを含むペプチドの候補として同定された。さらに、Gag4 カクテルおよび Gag17-27, Gag17-28, Gag17-30 を感染者の CD4T 細胞に処理し、特異的 CD4T 細胞の樹立を試みたが、非常に反応性が低いことが明らかになった。これは慢性感染者では健康人に比べ CD4T 細胞数も少なく、また HIV-1 感染によりエピトープに対する応答能が減弱されてしまっているものと考えられた。

### (3) HIV-1 特異的 CD4T 細胞樹立

エピトープ特異的 CD4T 細胞樹立を目的として、IFN- $\gamma$  ELISPOT 法に網羅的解析の際に反応が強かったカクテルおよび検体の組み合わせにより試みた。Gag3, Gag4, Pol18 カクテルに反応した検体における IFN- $\gamma$  ELISPOT 法の結果は 200~400 spots / 1

million CD4 cells であり、一方で Gag6 に反応した感染者検体は網羅的解析の中で最も反応の強い 2374 spots / 1 million CD4 cells であった。Gag6 に反応した感染者検体の PBMC より CD4T 細胞を分離し、Gag6 カクテルを処理したところ、特異的 CD4T 細胞株の樹立に成功した。また、Gag6 カクテル中のいずれのシングル 17 mer オーバーラップペプチドが反応しているかどうかを明らかにするため、個々のペプチドを処理し、細胞内サイトカイン (IFN- $\gamma$ ) 染色法によって各々の IFN- $\gamma$  産生能を調べたところ、Gag17-43, Gag17-44 および Gag17-45 のペプチドに対して応答することが明らかとなり、その中でも Gag17-45 に対して最も強く応答した。

続いて、Gag17-45 に焦点をあて、Gag17-45 特異的 CD4T 細胞クローンの樹立を試みたところ、応答性の強いクローンを樹立することに成功した。また、IL-2, IL-4 の発現を確認したところ、IFN- $\gamma$  と同様に IL-2 の発現も認められ、IL-4 の発現もわずかに認められた (図 3)。

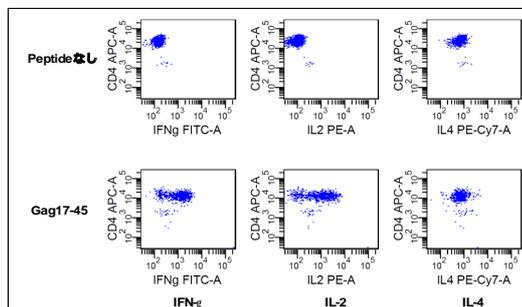


図 3. Gag17-45 特異的 CD4T 細胞クローンにおける種々のサイトカインの産生

続いて、最適長エピトープを同定するために 17mer の Gag17-45 ペプチドのアミノ酸配列 (WIIILGLNKIVRMYSPTS) に基づき、より短いペプチド (12~16mer) を合成して、Gag17-45 特異的 CD4T 細胞クローンに処理したところ、N 末端のトリプトファン (W) がその認識に不可欠であることが明らかとなった (Table 1)。この結果により、HLA class II 分子は非常にフレキシブルにペプチドに結合することができ、CD4T 細胞によって認識されることが確認された。

Table 1. 種々のペプチドに対する Gag17-45 特異的 CD4T 細胞クローンの IFN- $\gamma$  産生

Peptide	Sequence	IFN- $\gamma$ + cells in CD4+ T
Gag14-45	WIIILGLNKIVRMYSPTS	91.5
GagWM12	WIIILGLNKIVRM	91.9
GagWY13	WIIILGLNKIVRMY	88.0
GagWS14	WIIILGLNKIVRMYS	88.2
GagWP15	WIIILGLNKIVRMYS	92.0
GagWT16	WIIILGLNKIVRMYSPT	91.1
GagLS12	LNKIVRMYSPTS	0.3
GagGS13	GLNKIVRMYSPTS	0.0
GagLS14	LGLNKIVRMYSPTS	0.0
GagIS15	ILGLNKIVRMYSPTS	0.0
GagIS16	IILGLNKIVRMYSPTS	0.0

#### (4) 今後の展望

これまでの結果により HIV-1 特異的 CD4 陽性 T 細胞を同定・誘導することができたものの、HIV-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞とは異なり非常に困難であることが明らかになった。これまで我々のグループは HIV-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞の樹立をするための方法は確立していたが、今後 HIV-1 特異的 CD4 陽性 T 細胞を樹立するために様々な工夫を試みる必要があると考えられた。また、本研究では網羅的に解析する際に IFN- ELISPOT 法を用いたが、性質の異なる CD4 陽性 T 細胞 (Th1 および Th2) を同定するために IL-2 や IL-4 ELISPOT 法も同時に用いる必要があると考えられる。

本研究により、HIV-1 特異的 CD4 陽性 T 細胞を同定・誘導するための最適な抗原の探索のための重要な知見が多く得られた。今後、HIV-1 感染制御および防御に対するワクチンを開発するために、本研究により得られた知見を元に、さらに多くのエピトープの同定およびエピトープ特異的 CD4 陽性 T 細胞を樹立し、それらの成果を蓄積していく必要があると考えられる。

#### 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)

Chikata T\*, Tran GV\*, Murakoshi H, Akahoshi T, Qi Y, Naranbhai V, Kuse N, Tamura Y, Koyanagi M, Sakai S, Nguyen DH, Nguyen DT, Nguyen HT, Nguyen TV, Oka S, Martin MP, Carrington M, Sakai K, Nguyen KV, Takiguchi M. (\* equal contribution. HLA Class I-Mediated HIV-1 Control in Vietnamese Infected with HIV-1 Subtype A/E, [査読有], 2018, J Virol 92:5 e01749-17.

doi: 10.1128/JVI.01749-17.

Chikata T\*, Murakoshi H\*, Koyanagi M, Honda K, Gatanaga H, Oka S, and Takiguchi M. (\* equal contribution). Control of HIV-1 by an HLA-B\*52:01-C\*12:02 protective haplotype, [査読有], 2017, J Infect Dis. 216:1415-1424.

doi: 10.1093/infdis/jix483.

Gatanaga H, Brumme ZL, Adland E, Reyes-Teran G, Avila-Rios S, Mejia-Villatoro CR, Hayashida T, Chikata T, Van Tran G, Van Nguyen K, Meza RI, Palou EY, Valenzuela-Ponce H, Pascale JM, Porrás-Cortés G, Manzanero M, Lee GQ, Martin JN, Carrington MN, John M, Mallal S, Poon AFY, Goulder P, Takiguchi M, Oka S, International HIV Adaptation

Collaborative. Potential for immune-driven viral polymorphisms to compromise antiretroviral-based preexposure prophylaxis for prevention of HIV-1 infection. [査読有], 2017, AIDS 31:1935-1943.

doi: 10.1097/QAD.0000000000001575.

Murakoshi H, Koyanagi M, Chikata T, Rahman MA, Kuse N, Sakai K, Gatanaga H, Oka S, Takiguchi M. Accumulation of Pol Mutations Selected by HLA-B\*52:01-C\*12:02 Protective Haplotype-Restricted Cytotoxic T Lymphocytes Causes Low Plasma Viral Load Due to Low Viral Fitness of Mutant Viruses. [査読有], 2017, J Virol 91:4 e02082-16.

doi: 10.1128/JVI.02082-16.

##### [学会発表](計9件)

Takayuki Chikata, Hayato Murakoshi, Madoka Koyanagi, and Masafumi Takiguchi, Control of HIV-1 by an HLA-B\*52:01-HLA-C\*12:02 protective haplotype, 第46回日本免疫学会学術集会, 仙台国際センター(仙台), 2017年12月12-14日

近田 貴敬, 村越 勇人, 湯永 博之, 岡慎一, 滝口 雅文, 日本人およびベトナム人 HIV-1 感染者の病態進行の抑制に關与する細胞傷害性 T 細胞, 第31回日本エイズ学会学術集会・総会 シンポジウム, 中野サンプラザ(東京), 2017年11月24-26日

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 関連 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, 中野サンプラザ(東京), 2017年11月24-26日

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, くまもと県民交流館 パレア(熊本), October 30 - November 1, 2017

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, 大阪国際会議場 (大阪), 2017 年 10 月 24-26 日

Takayuki Chikata, Hayato Murakoshi, Madoka Koyanagi, Kazutaka Honda, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, and Masafumi Takiguchi, Control of HIV-1 by HLA-B\*52:01-restricted or C\*12:02-restricted cytotoxic T lymphocytes specific for 6 epitopes in an HIV-1-infected Japanese cohort where HLA-B\*57 and HLA-B\*27 are very rare, IAS 2017, パリ(フランス), July 23 - 26, 2017

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, かしま県民交流センター (鹿児島), 2016 年 11 月 24-26 日

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, くまもと県民交流館 パレア(熊本), October 31 - November 2, 2016

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, 札幌コンベンションセンター (札幌), 2016 年 10 月 23-25 日

〔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>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近田 貴敬 (CHIKATA, Takayuki)  
熊本大学エイズ学研究センター・研究員  
研究者番号: 60749711

(2) 研究協力者

瀧永 博之 (GATANAGA, Hiroyuki)