

令和 3 年 6 月 25 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15175

研究課題名（和文）抗原提示効率に関わるウイルス・宿主因子相互作用の解析

研究課題名（英文）Analysis of interactions between virus and host factors regarding antigen presentation

研究代表者

関 紗由里（Seki, Sayuri）

国立感染症研究所・エイズ研究センター・主任研究官

研究者番号：70758325

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ウイルス特異的細胞傷害性T細胞（CTL）反応の誘導は、有効なHIV感染症制御戦略である。しかし、HIV複製抑制効果の高いウイルス特異的CTLを効率的に誘導するためには、抗原の最適化が必要である。本研究では、ウイルス蛋白質Vifを発現する標的細胞が、細胞内で宿主因子APOBEC3Gと相互作用を有する場合に、CTLから効率よく傷害されることを示した。本結果は、HIV抗原デザインに対する分子的な基盤を与える重要な知見である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においては、宿主因子と相互作用を有するウイルス蛋白質が、固有のメカニズムによってエイズウイルス複製制御に結びつく有効なCTL抗原となりうる可能性が新しく見出された。宿主因子・ウイルス蛋白質・CTL反応それぞれの機構が繋がった学術的意義は大きい。また、本研究はHIV感染症の流行を抑えるための免疫反応誘導戦略を考える上で、より有効な抗原をデザインするための理論基盤の一部をなすため、社会的意義のある成果である。

研究成果の概要（英文）：Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses has been shown to be important in controlling HIV infection. Optimization of antigens is necessary to induce virus-specific CTLs effectively. In the present study, target cells expressing Vif were killed by CTLs efficiently in the presence of Vif-APOBEC3G interaction. These results gave molecular level insight into reasonable design of HIV antigens.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ヒト免疫不全ウイルス サル免疫不全ウイルス 細胞傷害性T細胞 抗原提示 宿主因子

1. 研究開始当初の背景

抗レトロウイルス薬の進歩により HIV 感染者の予後は改善しつつあるが、薬剤単独による制御ではその経費は莫大であり、現状では主な流行地域であるアフリカなどにおいて十分に治療薬が行き渡っていない。また、副作用・薬剤耐性ウイルス出現の問題などを含めて考えれば抗レトロウイルス薬療法には限界があり、根本的な HIV 感染症克服には HIV 感染拡大阻止に結びつく予防ワクチンの開発が不可欠である。エイズワクチン戦略としての細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 誘導の有効性は、HIV およびサル免疫不全ウイルス (SIV) 感染症の解析やサルエイズモデルでの抗 CD8 抗体接種による CTL 枯渇実験によって明らかにされているが、HIV 複製抑制効果の高いウイルス特異的 CTL を効率的に誘導するためには、ワクチン抗原の最適化が必要である。ウイルス株間で保存性の高い領域を選択するもの (Rolland et al., *PLoS Pathog.*, 2007) や in silico で最適な抗原の組み合わせをシミュレートするもの (Barouch et al., *Nat. Med.*, 2010) など様々な戦略が研究されている中で、『そもそも有効なワクチン抗原となりうるウイルス蛋白質の性質とは何か?』を解明することが求められている。

さらに、宿主因子とウイルス蛋白質の相互作用に関する分子レベルの研究は、HIV 複製を抑制する新規薬剤の開発を目論んで国内外で数多く行われている。たとえば Vif および Vif と複合体を形成し分解される宿主因子 APOBEC3G/F に関しては近年、転写共役因子 CBF- がこの複合体に含まれることが報告され (Zhang et al., *Nature*, 2011; Jager et al., *Nature*, 2011) これまで困難だった Vif の構造解析が宿主因子複合体との共発現で可能となり (Guo et al., *Nature*, 2014) ますま注目されてきている。一方で、APOBEC3G/F と CTL 反応の関係を探った研究の報告は 2 報に留まる (Casartelli et al., *J Exp Med.*, 2010; Monajemi et al., *PLoS One*, 2014) 上に、ここには Vif についての言及がない。しかし近年のサルエイズモデルにおける研究は Vif 特異的 CTL 反応がウイルス複製抑制に有効であることを示しており (Loffredo et al., *J Virol.*, 2008; Mudd et al., *Nature*, 2012) 申請者は Vif が有効な抗原となる原因が宿主因子との相互作用にあるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、宿主因子との相互作用がウイルス抗原提示に与える影響の解析という切り口で、宿主因子・ウイルス蛋白質・CTL 反応それぞれの機構を繋ぎ、有効なワクチン抗原としてのウイルス蛋白質の性質の一つを明らかにすることを目的とする。将来的には感染防御機構を増強するための新しい方法として、宿主因子とウイルス蛋白質の相互作用を調整し特定のウイルス蛋白質抗原提示を促進するという戦略の起点となることも期待される。

CTL 反応を誘導する抗原としての各ウイルス蛋白質の有効性を、感染から CTL 反応が出現するまでの時間で論じた報告はこれまでも存在したが (Sacha et al., *J Immunol.*, 2007) 感染細胞による抗原提示効率から根源的に明らかにしようとする研究は全く新しい試みである。本研究が完成すれば、宿主因子と相互作用を有するウイルス蛋白質が固有のメカニズムによって HIV/SIV 複製制御に結びつく有効な CTL 抗原となる可能性が示される。さらに、HIV/SIV 感染個体内でこの機序に関連した変異体が認められ実際に誘導される CTL 反応に影響を及ぼすことが示された場合は、CTL・宿主因子との攻防によるウイルス進化の新たな知見となる。

3. 研究の方法

(1) MHC-I 分子発現細胞株の樹立とウイルス蛋白質発現ベクターの構築

HIV・SIV エピトープ特異的 CTL 反応の報告がある MHC-I 遺伝子型を選定し、MHC-I 分子発現ベクターを構築した。これを用いて目的の MHC-I 分子を恒常的に発現する細胞株を樹立した。使用する細胞株については、発現している宿主因子の種類と量をあらかじめ文献やウエスタンブロッティングで調べ、多様な解析ができるよう血球系細胞から数種類の候補を決定した。樹立した細胞表面の MHC-I 分子発現は特異的抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、フローサイトメトリーで確認した。細胞株の樹立完了までに Vif-エピトープ発現ベクターを作製した。樹立した MHC-I 分子発現細胞株に Vif-エピトープを発現させ、同時に発現するレポーターによってフローサイトメトリーで発現を確認した。

(2) エピトープ特異的 CTL の樹立と標的細胞との共培養で得られる反応の解析

CTL の樹立には所属研究室で保有しているアカゲザル末梢血単核細胞 (PBMC) をエピトープペプチドと 2 週間共培養し、放射線照射したアロジェニック PBMC とともに IL-2 で刺激しつつ 2~3 週間培養した。テトラマー染色とフローサイトメトリーで樹立を確認した。CTL の反応性は(1)

の標的細胞と共培養して、共培養前後の Vif-エピトープ発現細胞数変化を、同時に発現するレポーターを用いてフローサイトメトリーで測定し、キリング効率を計算して調べた。

(3) 宿主因子発現がウイルス抗原提示に及ぼす影響の解析

宿主因子がウイルス抗原提示に与える影響を調べるため、APOBEC3G 発現が十分に認められる CEM と認められない CEMSS の双方を使用して(2)を行い比較解析した。

(4) 宿主因子によるウイルス抗原提示への作用機序の解明

宿主因子との相互作用を損なうようなウイルス蛋白質変異体が Vif と APOBEC3G (Lavens et al., *Nucleic Acids Res.*, 2010) について判明している。site-directed mutagenesis 法を用いて相互作用の責任領域に変異を有する変異 Vif-エピトープ発現ベクターを作製した。この発現ベクターを用いて(2)を行い野生型 Vif-エピトープ発現ベクターを用いた場合と比較した。

4. 研究成果

MHC-I 分子発現細胞株の樹立とウイルス蛋白質発現ベクターの構築を行った。まず MHC-I 分子発現ベクターを構築し、これを用いて目的の MHC-I 分子を恒常的に発現する細胞株を樹立した。使用する細胞株については、発現している宿主因子の種類と量の検討を踏まえ、多様な解析対象とできる血球系細胞である CEM を選択した。樹立した細胞表面の MHC-I 分子発現は特異的抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、フローサイトメトリーにて確認した。対応するウイルス蛋白質発現ベクターとして、代表者の近年の報告を踏まえ Vif-エピトープ発現ベクターを作製した。樹立した MHC-I 分子発現細胞株にベクターを用いてウイルス蛋白質を発現させ、同時に発現するレポーターによってフローサイトメトリーで発現を確認し、今後の基礎となる実験系の構築を得た。

次に、樹立した特定の MHC-I 分子発現細胞株と Vif-エピトープ発現ベクターを用いて、エピトープ特異的 CTL によるキリングを測定する系を樹立した。CEM にベクターを用いて Vif-エピトープを発現させ、同時に発現するレポーターによってフローサイトメトリーで発現を確認したのち、エピトープ特異的 CTL と共培養を行った。共培養前後の Vif-エピトープ発現細胞数変化からキリング効率を計算した。

さらに、作製した特定の MHC-I 分子発現細胞株 CEM、または Vif と相互作用する宿主因子 APOBEC3G を発現しない CEMSS と Vif-エピトープ発現ベクターを用いて、エピトープ特異的 CTL によるキリングを測定した。ターゲット細胞にベクターを用いて Vif-エピトープを発現させ、同時に発現するレポーターによってフローサイトメトリーで発現を確認したのち、エピトープ特異的 CTL と共培養を行って共培養前後の Vif-エピトープ発現細胞数変化からキリング効率を計算した。また、APOBEC3G と結合できない変異 Vif-エピトープを発現するベクターも作製して用いた。その結果、CEM においては野生型 Vif-エピトープを発現させた場合に、変異型 Vif-エピトープを発現させた場合よりもキリング効率が有意に高くなったが、CEMSS においては野生型と変異型でキリング効率に差がなかった(図1)。本研究は、Vif が抗原提示されやすい抗原であるために必要な性質の一つを明らかにしたものであり、代表者は今後、他のウイルス蛋白質についても同様の解析を行いたいと考えている。

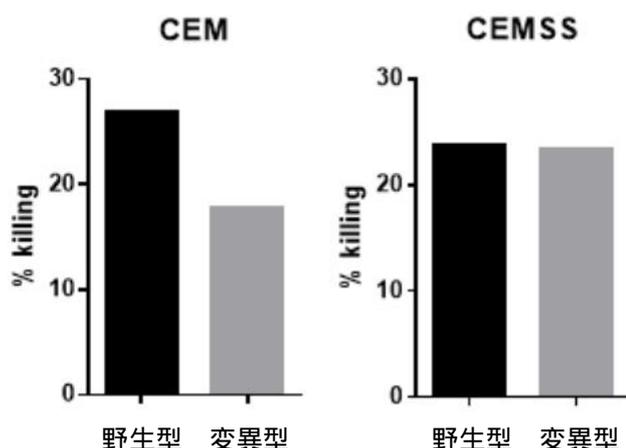


図 1. Vif 宿主因子結合の有無と CTL キリング効率
CEM、CEMSS に野生型/変異型 Vif-エピトープを発現させ、共培養した CTL によるキリング効率を測定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Parbie Prince Kofi, Mizutani Taketoshi, Ishizaka Aya, Kawana-Tachikawa Ai, Runtuwene Lucky Ronald, Seki Sayuri, Abana Christopher Zaab-Yen, Kushitor Dennis, Bonney Evelyn Yayra, Ofori Sampson Badu, Uematsu Satoshi, Imoto Seiya, Kimura Yasumasa, Kiyono Hiroshi, Ishikawa Koichi, Ampofo William Kwabena, Matano Tetsuro	4. 巻 74
2. 論文標題 Fecal Microbiome Composition in Healthy Adults in Ghana	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 42～47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7883/yoken.JJID.2020.469	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakamura-Hoshi Midori, Takahara Yusuke, Matsuoka Saori, Ishii Hiroshi, Seki Sayuri, Nomura Takushi, Yamamoto Hiroyuki, Sakawaki Hiromi, Miura Tomoyuki, Tokusumi Tsuyoshi, Shu Tsugumine, Matano Tetsuro	4. 巻 10
2. 論文標題 Therapeutic vaccine-mediated Gag-specific CD8+ T-cell induction under anti-retroviral therapy augments anti-virus efficacy of CD8+ cells in simian immunodeficiency virus-infected macaques	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11394
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-68267-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hau Trang Thi Thu, Nakamura-Hoshi Midori, Kanno Yoshiaki, Nomura Takushi, Nishizawa Masako, Seki Sayuri, Ishii Hiroshi, Kawana-Tachikawa Ai, Hall William W., Nguyen Thi Lan Anh, Matano Tetsuro, Yamamoto Hiroyuki	4. 巻 512
2. 論文標題 CD8+ T cell-based strong selective pressure on multiple simian immunodeficiency virus targets in macaques possessing a protective MHC class I haplotype	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 213～217
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.03.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 関紗由里, 岩谷靖雅, 石井洋, 俣野哲朗
2. 発表標題 Vifの抗原提示に関する研究
3. 学会等名 第34回日本エイズ学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Prince Kofi Parbie, Taketoshi Mizutani, Aya Ishizaka, Sayuri Seki, Christopher Zaab-Yen Abana, Dennis Kushitor, Evelyn Yayra Bonney, Sampson Badu Ofori, William Kwabena Ampofo, Koichi Ishikawa, Tetsuro Matano
2. 発表標題 Fecal bacterial profile in HIV associated gut microbial dysbiosis
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Prince Kofi Parbie, Taketoshi Mizutani, Aya Ishizaka, Sayuri Seki, Christopher Zaab-Yen Abana, Dennis Kushitor, Evelyn Yayra Bonney, Sampson Badu Ofori, William Kwabena Ampofo, Koichi Ishikawa, Tetsuro Matano
2. 発表標題 Microbial dysbiosis and associated functional shifts in gut microbiome of HIV infected patients
3. 学会等名 第33回日本エイズ学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hau Thi Thu Trang, Takushi Nomura, Sayuri Seki, Midori Nakamura-Hoshi, Hiroshi Ishii, Taeko K. Naruse, Akinori Kimura, Tetsuro Matano, Hiroyuki Yamamoto
2. 発表標題 Protective and non-protective MHC-I haplotype-associated CD8+ T-cell responses in simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------