

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390130
 研究課題名（和文） HIV 感染における細胞性免疫応答と抗原提示とのダイナミクスの解明
 研究課題名（英文） Analysis of HIV specific cellular immune response and antigen presentation in HIV infection.

研究代表者
 岩本 愛吉 (IWAMOTO AIKICHI)
 東京大学医科学研究所・教授
 研究者番号 10133076

研究成果の概要：

HIV は抗原性を変化させることで細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) による免疫監視機構から逃れている。本研究では HIV 抗原の質的变化に対する細胞性免疫応答の解析を行った。HIV 感染者体内には「変化した HIV 抗原」を認識する CTL は存在するが、その多様性は低く、疲弊した状態に陥っていることが明らかとなった。また、HIV 抗原の変化は集団レベルにおける HIV の病原性にも影響を与える可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
2008年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：HIV、HLA、細胞傷害性 T 細胞 (CTL)、抗原認識、エピトープ

1. 研究開始当初の背景

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染症は三大感染症の一つであり、ワクチンの開発が急がれる感染症のひとつであるが、未だ感染防御に有効なワクチンは開発されていない。有効なワクチンの開発には病原体に対する宿主免疫がどのように働いているかを明らかにすることが重要である。

HIV の抑制には細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) による細胞性免疫応答が重要であると考えられている。HIV 特異的 CTL は急性感染期では強力に誘導され、HIV を効果的に排除していることが明らかとなっている。一方、慢性期

では HIV 特異的 CTL が高頻度に存在しているにも関わらず、必ずしもウイルスのコントロールに寄与しているわけではない。

慢性感染期に HIV 特異的 CTL の働きに影響を及ぼす要因として「抗原の変化」と「CTL の質的变化」が挙げられる。CTL は細胞表面の T 細胞受容体 (TCR) により HLA クラス I 分子に提示される 10 アミノ酸前後の抗原ペプチド (エピトープ) を認識する。一方、HIV は変異を起こしやすいウイルスで、CTL の攻撃対象となるエピトープ内にアミノ酸変化を生じ CTL による認識から逃れたウイルスが選択的に増殖することが知られている。つまり、

宿主免疫系から見ると慢性感染期には「抗原の変化」が起きているということになる。宿主の免疫応答が抗原の変化にどのように対応しているのかは明らかとなっていない。

上述したように、HLA クラス I 分子は細胞性免疫応答において抗原を規定する重要な分子である。HLA クラス I 分子は非常に多様性に富んでおり、これまでに欧米、アフリカなどのコホートをを用いた研究により HLA クラス I 型と病態進行の間に関連性があることが明らかとなっている。HLA -B57, -B27, -B51 は病態遅延と関連する HLA 型として知られているが、これらの HLA に提示されるエピトープで生じた抗原の変化がウイルス自体の複製能力を低下させるため HIV 抑制に貢献していると考えられている。このことから HIV 感染において抗原の変化が感染病態に影響を及ぼしていることが示唆される。

しかしながら日本人は HLA 型の種類の分布が他の人種とは大きく異なっており、日本人集団では HLA -B57, -27 は存在せず、HLA クラス I 型と病態進行の関連については明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究では日本人集団で遺伝子頻度が非常に高い HLA -A24 に提示されるエピトープに注目し、HIV 抗原の質的变化に対応したエピトープ特異的な CTL の性状を明らかにする。また、HIV 特異的 CTL の働きが日本人集団における HIV 感染病態に与える影響を明らかにする。

【抗原の質の変化と対応する抗原特異的な CTL の性状の解析】

慢性感染時に頻繁に見られるエピトープの変化、すなわち「抗原の質の変化」が HIV 特異的 CTL に与える影響を明らかにする。多くの感染者で特異的な CTL が高頻度に見られ、さらにエピトープ内に特定のアミノ酸変異を有する変異体が発見することが明らかなイムノドミナントなエピトープに注目し、野生型、変異型のエピトープを認識する CTL の多様性や機能の違いを明らかにする。

【HLA 遺伝子型と病態進行に関する解析】

日本人集団における HLA クラス I 型の病態進行に対する影響を明らかにするため、HIV 感染者の HLA クラス I 遺伝子型を解析し、病態の進行を表す臨床的指標との関連性について検討する。特に遺伝子頻度が高い HLA -A24、欧米、アフリカのコホートで感染防御に働くことが知られている HLA -B51 などに注目して解析を行う。

3. 研究の方法

【抗原の質の変化と対応する抗原特異的な CTL の性状の解析】

HLA -A24 拘束性の CTL エピトープの中でも特異的な CTL が高頻度に見られ、HLA -A24 感染者体内で特定のアミノ酸変異が高頻度に見られる HIV -Nef タンパク質由来のエピトープ Nef138 -10 (RYPLTFGWCF) に注目した。私達はこれまでの研究で Nef138 -10 では HLA -A24 陽性感染者で特異的に 2 番目のアミノ酸がタイロシン (Y) からフェニルアラニン (F) に変化している (RFPLTFGWCF) ことを明らかにしている。本研究では HLA -A24 陽性で、Nef138 -10 が既に野生型 (WT) から変異型エピトープ (2F) に変化している慢性感染期の HIV 感染者を対象として Nef138 -10 特異的 CTL の解析を行った。Nef138 -10 特異的な CTL を WT と 2F の認識能によって区別するために、WT と 2F のエピトープを提示する HLA クラス I テトラマーを複製した。同時に染色できるようにそれぞれ異なる蛍光色素で標識した。

HLA -A24 陽性の HIV 感染者 PBMC を Nef138 -10 ペプチド刺激下で培養した後、テトラマー染色を行い Nef138 -10 特異的 CTL を検出し、T 細胞受容体 (TCR) レパートリーの解析と CTL の性状解析を行った。

(1) 変異エピトープを認識する Nef138 -10 特異的 CTL の TCR レパートリーの解析

テトラマー陽性細胞をセルソーターを用いて分取し、RNA 抽出後、SMART 法により TCR 鎖可変領域の遺伝子を増幅した後、クローニングし、TCR レパートリーの解析を行った。

(2) 変異エピトープを認識する Nef138 -10 特異的 CTL における PD -1 発現量の解析

HLA クラス I テトラマーと同時に抗 PD -1 抗体で染色を行い、テトラマーによる染色パターンの異なる細胞集団の PD -1 発現量に関して解析を行った。

【HLA 遺伝子型と病態進行に関する解析】

141 名の日本人 HIV 感染者の末梢血単核球 (PBMC) から抽出した DNA を用いて HLA クラス I 遺伝子型を決定し、血中 HIV 量、CD4T リンパ球数との関連を統計学的解析を行った。

本研究内容は当該施設の倫理審査委員会により承認されており、臨床材料の提供を受ける際には書面でインフォームドコンセントを得た。

4. 研究成果

【抗原の質の変化と対応する抗原特異的な CTL の性状の解析】

HLA-A24 陽性 HIV 感染者 PBMC をペプチド刺激下で培養後、Tet(WT)と Tet(2F)で重染色をしたところ、多くの感染者で図1のような染色パターンが見られ、Tet(WT)のみと結合する集団 (WT+) と Tet(WT)、Tet(2F)双方と結合する集団 (WT+/2F+) が存在していた。

Nef138-10 が 2F に変化した感染者体内には WT と 2F の認識能の異なる Nef138-10 特異的 CTL が存在し、WT のみを認識する CTL と WT、2F の双方を認識する Nef138-10 特異的 CTL があることが明らかとなった。

本研究では Nef138-10 特異的 CTL において、WT+細胞と、抗原の変化に対応して出現したと考えられる WT+/2F+細胞について、TCR レポートリーの解析と CTL の機能的な状態を反映することが知られている PD-1 分子の発現量に関して検討した。

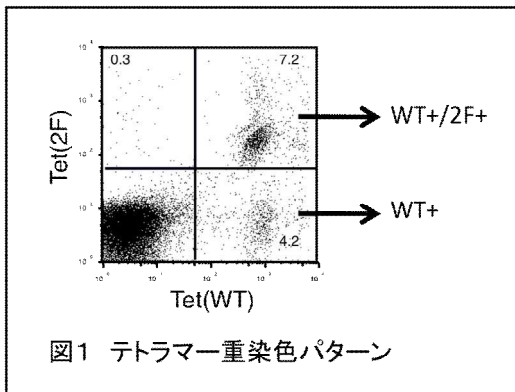


図1 テトラマー重染色パターン

(1) 変異エピトープを認識する Nef138-10 特異的 CTL の TCR レポートリーの解析

7名の HLA-A24 陽性 HIV 感染者について WT+、WT+/2F+細胞集団を分取し、TCR 鎖 (TRB) のレポートリーを解析したところ、WT+細胞では多様な TRB-V、J 遺伝子が使用されていたが、WT+/2F+細胞では TRB-V 遺伝子は 4-1、TRB-J 遺伝子は 2-7 が高頻度で使用されていた (図2)。さらに CDR3 領域のアミノ酸配列を解析したところ、WT+細胞では CDR3 領域の長さ、アミノ酸配列ともに多様性に富んでいたが、WT+/2F+細胞では CDR3 領域の長さ、アミノ酸配列ともに感染者間でも非常に類似していた。

(2) 変異エピトープを認識する Nef138-10 特異的 CTL における PD-1 発現量の解析

13名の感染者について WT+、WT+/2F+、テトラマー陰性 (非特異的 CTL) 細胞の PD-1 発現量を比較した。その結果、テトラマー陰性細胞と比較すると WT+、WT+/2F+ともに有意に PD-1 発現量が高かった。さらに WT+細胞と WT+/2F+細胞を比較したところ、WT+/2F+細胞

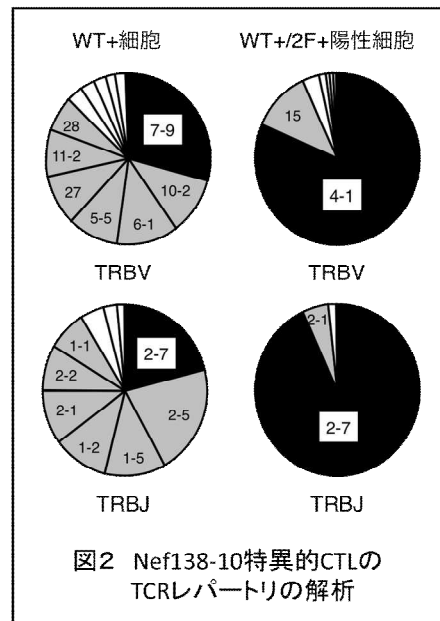


図2 Nef138-10特異的CTLの TCRレポートリーの解析

の PD-1 発現量は WT+細胞に比べて顕著に高いことが明らかとなった (図3)。抗原の変化に対応して出現したと考えられる CTL は PD-1 が高発現しており、機能的に低下している可能性が示唆された。

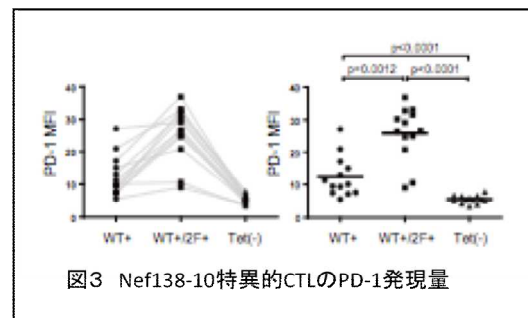


図3 Nef138-10特異的CTLのPD-1発現量

以上の結果から、抗原の変化が容易に起こる HIV 感染症において、宿主の免疫監視機構は抗原の変化に対応して変異エピトープを認識する CTL を誘導するが、その CTL の多様性は低く、機能的にも低下していると考えられ、HIV のコントロールに十分機能していないことが示唆された。

【HLA 遺伝子型と病態進行に関する解析】

日本人集団における HLA-A24 の遺伝子頻度は 30%を超えており、HLA 型の遺伝子頻度としては世界でも他に例をみないほど高い。遺伝子頻度が高い HLA 型では感染者間で HLA を共有する可能性が高く、CTL の選択圧から逃れた変異を持つウイルスに感染する可能性が高いと考えられる。しかしながら A24 陽性者、陰性者間で HIV 量に有意な差は見られず、現時点では HLA-A24 が病原性に与える影響は少ないことが示唆された。一方で、遺伝子

頻度がある程度高く、他のコホートで病態進行遅延に關与している HLA-B*57:01 關して解析したところ、HLA-B*57:01 陽性者では感染した年代が新しい感染者ほど血中 HIV 量が増加していることが明らかとなった。HIV の抑制に寄与していたエピトープに CTL からのエスケープ変異が集団レベルで蓄積した結果、その CTL による HIV 抑制効果が減弱しつつあることが示唆された。

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 12 件)

1. Nunoya, J-I., Nakashima, T., Kawana-Tachikawa, A., Kiyotani, K., Ito, Y., Sugimura, K., Iwamoto, A. Generation of recombinant monoclonal antibodies against an immunodominant HLA-A*2402-restricted HIV-1 CTL epitope. AIDS Research and Human Retroviruses In press.
2. Maeda, T., Oyaizu, N., Endo, T., Odawara, T., Nakamura, T., Iwamoto, A., Fujii, T. Pneumocystis jirovecii pneumonia in an AIDS patient: Unusual manifestation of multiple nodules with multiloculated cavities. European Journal of Radiology In Press.
3. Miyazaki, E., Kawana-Tachikawa, A., Tomizawa, M., Nunoya J-I., Odawara T., Fujii, T., Shi, Y., Gao G.F., Iwamoto, A. Highly restricted T-cell receptor repertoire in the CD8+ T-cell response against an HIV-1 epitope with a stereotypic amino acid substitution. AIDS 23:651-660. 2009
4. Zong, L., Chen, Y., Peng, H., Gao, F., Iwamoto, A., Gao, G.F. Rehesumacaque: a tight homodimeric CD8 α / α . Proteins: Structure, Function and Bioinformatics 75: 241-244, 2009.
5. Mizukoshi, F., Yamamoto, T., Mitsuki Y.Y., Terahara, K., Kawana-Tachikawa, A., Kobayashi, K., Iwamoto, A., Morikawa, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y. Activation of HIV-1 Gag-specific CD8+ T cells by yeast-derived VLP-pulsed dendritic cells is influenced by the level of mannose on the VLP antigen. Microbes Infection 11:191-199, 2009.
6. Hosoya, N., Miura, T., Kawana-Tachikawa, A., Shioda, T., Odawara, T., Nakamura, T., Kitamura, Y., Kano, M., Kato, A., Hironaka, T., Hasegawa, M., Nagai, Y., Iwamoto, A. Comparison between Sendai virus and Adenovirus vectors in induction of HIV-1 genes into human dendritic cells. J. Medical Virology, 80:373-382, 2008.
7. Komuro, I., Sunazuka, T., Akagawa, K.S., Yokota, Y., Iwamoto, A., Omura, S. Erythromycin derivatives inhibit HIV-1 replication in macrophages through modulation of MAPK activity to induce small isoforms of C/EBP β . Proc. Natl. Acad. USA. 105: 12509-12514, 2008.
8. Liu, H., Nakayama, E.E., Theodorou, I., Nagai, Y., Likanonsakul, S., Wasi, C., Debre, P., Iwamoto, A., Shioda, T. Polymorphisms in CCR5 chemokine receptor gene in Japan. International J. Immunogenetics. 34:325-335, 2007.
9. Nakayama, E.E., Carpentier, W., Costagliola, D., Shioda, T., Iwamoto, A., Debre, P., Yoshimura, K., Autran, B., Matsushita, S., Theodorou, I. Wild type and H43Y variant of human TRIM5 show similar anti-human immunodeficiency virus type 1 activity both in vivo and in vitro. International J. Immunogenetics 59:511-515, 2007.
10. Song, H., Nakayama, E.E., Likanonsakul, S., Wasi, C., Iwamoto, A., Shioda, T. A three-base deletion polymorphism in the upstream non-coding region of human interleukin 7 (IL-7) gene could enhance levels of IL-7 expression. International J. Immunogenetics 34:107-113, 2007.
11. Wichukchinda, N., Kitamura, Y., Rojanawiwat, A., Nakayama, E.E., Song, H., Pathipvanich, P., Auwanit, W., Sawanpanyalert, P., Iwamoto, A., Shioda, T., Ariyoshi, K. The polymorphisms in DC-SIGNR affect susceptibility to HIV-1 infection. AIDS Research and Human Retroviruses 23:686-692, 2007.
12. Hoshino, S., Sun, B., Konishi, M., Shimura, M., Segawa, T., Hagiwara, Y., Koyanagi, Y., Iwamoto, A., Mimaya, J., Terunuma, H., Kano, S., Ishizaka, Y. Vpr in plasma of HIV-1-positive patients is correlated with the HIV-1 RNA titers.

AIDS Research and Human Retroviruses
23:391-397, 2007.

[学会発表](計23件)

1. Kawana-Tachikawa, A. Contribution of Gag-specific CD8+ T cells to HIV control in a population lacking HLA-B57/27. Keystone Symposia: HIV Immunology, Infection to Immune Control. Keystone, March 22-27, 2009.
2. 古賀道子. 日本人集団においてHLA多型性が慢性感染期血中HIV-1ウイルス量に与える影響の解析. 第22回日本エイズ学会学術集会. 大阪. 2008.11.26-28.
3. 中村仁美. 超多剤耐性患者における新規抗HIV薬 Etravirin、Darunavir、Raltegravirの併用効果第22回日本エイズ学会学術集会. 大阪. 2008.11.26-28.
4. 鯉淵智彦. HAARTを施行したHIV/HBV重複感染者13例の解析. 第22回日本エイズ学会学術集会. 大阪. 2008.11.26-28.
5. 鯉淵智彦. HAART導入時に急性肝障害を生じ、1ヶ月後にHBe抗体陽性となったHBVキャリアの1例. 第22回日本エイズ学会学術集会. 大阪. 2008.11.26-28.
6. 菊地正. 特異な経過を辿った結核による免疫再構築症候群の一例. 第22回日本エイズ学会学術集会. 大阪. 2008.11.26-28.
7. 宮崎 菜穂子. 既治療患者における薬剤耐性(多剤耐性)HIVの現状調査. 第22回日本エイズ学会学術集会. 大阪. 2008.11.26-28.
8. 中山香. HIV セットポイントを規定する免疫関連因子とHIV特異的細胞生免疫応答の解析. 第56回日本ウイルス学会学術集会. 岡山 2008.10.26-28
9. Iwamoto, A. "Japan and infectious diseases: A historical view." APRU WorldInstitute Workshop, "Strengthening Public Health Systems in the Pacific Rim: The Role of Research Universities in Responding to Aging & Chronic Diseases, Infectious Disease and Health Security Issues." Tokyo. June 23-25, 2008.
10. Kawana-Tachikawa, A. Maintenance of Proliferative PD-1 Low Memory CD8+ T cells Specific for Eradicated Virus in HIV-1 Patients with High CD4 Count. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Boston, Feb 3-6, 2008.
11. 水越文徳. 抗原の糖鎖による樹状細胞の cross-presentationの影響. 第21回日本エイズ学会学術集会. 広島 2007.11.28-30
12. 宮崎菜穂子. 当院外来患者へのアンケート調査で見られた服薬の問題点と服薬指導の意義. 第21回日本エイズ学会学術集会. 広島 2007.11.28-30
13. Iwamoto, A. HIV treatment and complications. International Conference on AIDS/HIV. China Association of Chinese Medicine AIDS Branch. Zhengzhou, Henan, China. Nov 24-26, 2007.
14. Yamamoto, T. Development of a novel IFN-gamma detection system of virus-specific T cell activation by flow cytometry. 第37回日本免疫学会学術集会. 東京 2007.11.20-22
15. Iwamoto, A. Antigen presentation and recognition: A tale of immunogenic HIV-1 CTL epitope in Japanese population with high HLA-A24 positivity. International Symposium on Basic and Applied Immunology. Beijing, China. Oct 29-30, 2007.
16. 中山香. HIVセットポイントを規定する免疫関連因子の探索. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌 2007.10.21-23
17. 布矢純一. HIV由来抗原ペプチドを提示したMHC class I/ペプチド複合体と特異的に結合する単クローン抗体の作製. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌 2007.10.21-23
18. Iwamoto, A. A tale of HIV epidemic among highly HLA-A24-positive Japanese population. The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awajishima. Sep 2-5, 2007.
19. Iwamoto, A. Monitoring and adherence of antiretroviral therapy. In Skills Building Workshop on clinical management of HIV infection and antiretroviral therapy. The 8th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. Colombo, Aug 19-23, 2007.
20. Kawana-Tachikawa, A. Highly restricted T cell receptor repertoire against an immunodominant HIV-1 CTL epitope with a stereotypic amino acid substitution. 4th IAS Conference on HIV Pathogenesis,

- Treatment and Prevention. Sydney, July 22 -25, 2007.
21. Nunoya, J-I. Generation of monoclonal antibodies cross-reactive for the wildtype and an escape mutant of an immunodominant CTL epitope. 4th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. Sydney, July 22 -25, 2007.
 22. Iwamoto, A. HIV epidemic in highly HLA A24 positive Japanese population. 2007 International Conference for Bioeconomy (BioEco2007). Tianjin, Jun 26 -28, 2007.
 23. 鯉淵智彦 . HAARTを施行したHIV/HBV重複感染者の解析 . 第81回日本感染症学会学術集会 . 京都 2007.4.10 -11

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岩本 愛吉 (IWAMOTO AIKICHI)
東京大学医科学研究所・教授
研究者番号 : 10133076

(2)研究分担者

立川 愛 (TACHIKAWA AI)
東京大学医科学研究所・助教
研究者番号 : 10396880