

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293240

研究課題名(和文) エイズ病態進行に及ぼす HIV-1 逃避変異に関する研究

研究課題名(英文) Study about HIV-1 escape mutation exerted on AIDS clinical condition progress

研究代表者

滝口 雅文 (Takiguchi, Masafumi)

熊本大学・エイズ学研究センター・教授

研究者番号：00183450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞傷害性T細胞(CTL)の認識を障害するHIV-1の変異が、どのように病態進行に影響を与えるかを明らかにした。HIV-1感染者430名の解析から、CTLの認識に影響を与えている可能性がある283の変異を同定した。その内、HLA-B52/C12に 관련된 5つのPOL領域の変異は、HIV-1の増殖力を低下させ、4つのエピトープを認識するCTLにより選択されことを明らかにした。HLA-B52/C12を持った患者では、CTLによるHIV-1の増殖の抑制だけでなく、逃避変異が選択された場合でも、ウイルス増殖そのものが低下し、これによりエイズへの進行が遅れると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of escape mutants selected by HIV-1-specific CTLs in progression to AIDS. First, we analyzed HLA-associated mutations in 430 HIV-1-infected Japanese individuals. We found 283 HLA-associated mutations in our cohort. Five mutations associated with HLA-B52/C12 is associated with lower plasma viral load. In vitro analysis confirmed that these mutations were selected by HLA-B*52:01- or C*12:02-restricted CTLs and that the mutant viruses having these mutation has lower replication capacity than wild-type ones. The present study demonstrated that HLA-B52/C12 may control HIV-1 replication in individuals having these protective alleles and the mutation selected by these CTLs has low replication capacity, This is the mechanism of slow progression to AIDS in individuals having protective haplotype, HLA-B:52:01-C*12:02.

研究分野：感染免疫学

キーワード：AIDS HIV-1 T細胞 変異

1. 研究開始当初の背景

- (1) HIV-1 感染症の予後を決定する宿主因子として、白人やアフリカ人では、HLA-B*57, -B*27 が発症遅延因子、HLA-B*35:02, -B*35:03 は発症促進因子であることが知られており、HLA-B*57, -B*27 分子が提示する HIV-1 ペプチドを認識する CTL により、HIV-1 の増殖が抑えられていることが明らかになっている。一方、HLA-B*57, -B*27 は、日本人ではほとんど見られず、他の HLA クラス I 分子が日本人での HIV-1 増殖抑制に関与していることが推定される。我々は、1983 年頃に血液製剤から HIV-1 に感染した血友病患者の長期予後に関与する HLA クラス I 抗原の解析を行い、HLA-B*51:01 のみが長期の発症遅延に関与していることを明らかにした。さらに最近、約 500 名の日本人の HIV 慢性感染者の HLA 解析から、HLA-B*52:01-Cw*12:02 のハプロタイプと HLA-B*67:01 が発症遅延に相関することを明らかにした。これらのことから、HLA-B*57, -B*27 をほとんど保有していない日本人やアジア人では、病態進行に関与している HLA が、白人やアフリカ人とは異なっていると考えられた。
- (2) HIV-1 は最も変異性が高いウイルスとして知られているが、Reverse transcriptase による翻訳ミスなどのウイルス自体の性格によるものだけでなく、宿主の免疫系による変異の選択が多様性獲得に関与していると考えられている。これらに関与する免疫系としては、CTL と中和抗体が知られている。中和抗体は Env 蛋白に結合するため、Env の変

異の選択に強く関与している。一方、CTL は HIV-1 の構成蛋白由来のペプチドを結合させた HLA クラス I 分子を認識するため、全ての HIV-1 蛋白の変異選択に関わっている。HLA-B*57, B*27 を保有している白人やアフリカ人では、これらの HLA 分子に拘束した CTL により、逃避変異を持った HIV-1 が選択されており、これらの変異は HIV-1 増殖能を低下させることがわかっている。すなわち、CTL による HIV-1 の増殖抑制と変異によるウイルス増殖低下の両方により、HLA-B*57, B*27 を持った患者ではウイルス量が低下し、発症の遅延が起こることが明らかになってきた。しかし、CTL から逃避できる変異は、HLA-B*57, B*27 拘束性の CTL によってのみ選択されるのではなく、他の HLA クラス I 分子拘束性の CTL によっても選択されることが良く知られている。また白人やアフリカ人の HLA クラス I 抗原アレルと HIV-1 の変異との相関解析から、多数の逃避変異が CTL により生体内で選択されていることが示唆された。

2. 研究の目的

- (1) 我々が長い間築き上げてきた日本人の HIV-1 感染者のコホートを用いて、まだ全体像が明らかになっていない日本人 HIV-1 感染者で、逃避変異の選択に関与している CTL の同定と、CTL による選択される逃避変異の多様性形成を解析し、さらに選択された逃避変異のウイルス増殖能、患者の予後に関する効果を明らかにし、逃避変異による HIV-1 の病原性の増強を明らかにする。
- (2) 具体的には、① 感染者の HIV-1 の

シーケンス解析を行い、その多くが CTL からの免疫逃避変異と考えられる各 HLA アリールと相関する変異 (HLA-associated mutation) を明らかにする。②これらの変異が実際に CTL からの逃避変異であるかを、CTL による変異ペプチドの認識能、変異ウイルス感染細胞に対する認識能を調べることにより明らかにする。③逃避変異ウイルスの増殖能等のウイルス学的機能を解析する。④CTL クローンを作成し、逃避変異選択機序を解明する。⑤逃避変異の蓄積が感染者体内で HIV-1 増殖に与える影響を、逃避変異を持つ患者と持たない患者を比較する。これにより、逃避変異が患者の病態進行に与える効果を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 430名の HIV-1 感染者の HLA と Gag, Pol, Nef 部分のシーケンス解析を行い、*Phylogenetically Dependency Network Model* を用いて各 HLA アリールと相関する変異を明らかにした。またこれらの変異蓄積における感染者の病態進行における影響を明らかにした。
- (2) これらの変異の内、重要な変異に関して CTL 逃避変異であるか明らかにするために、CTL エピトープの同定をし、CTL を作製して、変異エピトープを認識できるか明らかにした。
- (3) 患者由来の Gag-protease 領域の部位を組みこんだウイルスを作製してその増殖能を調べた。また HLA-B*52:01 に相関した 5 つの変異ウイルスを作製してそのウイルス増殖能を調べた。
- (4) CTL クローンを作製して、HIV-1 感染細胞認識能、HIV-1 増殖抑制能、テトラマーの T 細胞レセプター結合能など調べ、逃避変異選択機序を明

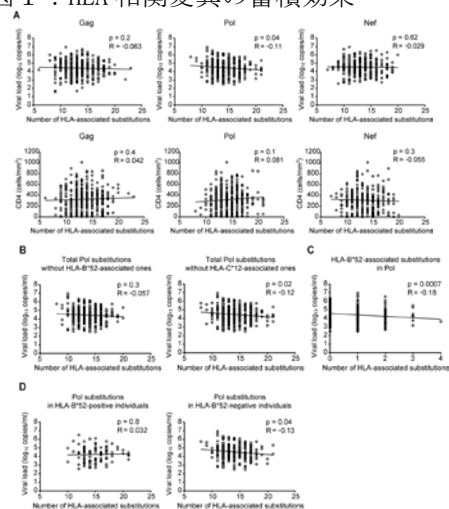
らかにした。

- (5) 逃避変異を持つ患者と持たない患者での HIV-1 ウイルス量と CD4T 細胞数を比較し、逃避変異が患者の病態進行に与える効果を明らかにした。

4. 研究成果

- (1) HLA-associated mutation の解析とその病態進行における効果：日本人 HIV-1 慢性感染者 430 名の HLA と Gag, Pol, Nef 部分のシーケンス解析を行い、各 HLA アリールと相関する変異を明らかにした。その結果、283 の HLA-associated mutation を明らかにした (Gag 94, Pol 86, Nef 104)。また Pol 領域の変異数と HIV-1 ウイルス量は負の相関、CD4T 細胞数とは正の相関がみられ (図 1 A)、Pol 領域の逃避変異の蓄積は、ウイルス増殖の低下に繋がると考えられた。特に HLA-B*52:01 に相関する 4 つの Pol 領域の 5 つの変異の蓄積は、その効果が大きかった (図 1B-C) (Chikata et al. J. Virol 2014)。

図 1 : HLA 相関変異の蓄積効果



- (2) HLA-B*52:01 に関連する 5 つの変異部分を認識する CTL エピトープの認識の変異認識：上記 5 つの変異を含む CTL エピトープの同定を試みた結果、Pol 領域において 2 種類の新規 HLA-B*52:01 拘束性 CTL エピトープと 1 種類の新規 HLA-C*12:02 拘束性 CTL エピトープの同

定ができた。さらにエピトープ特異的 CTL によって変異ペプチドが全く認識されない、あるいは CTL による変異ウイルス感染細胞の認識が wild-type 感染細胞の認識よりも弱いことが示され、これらの変異は HLA-B*52:01 拘束性ならびに HLA-C*12:02 拘束性 CTL によって選択された逃避変異であることが明らかとなった。さらに、これらの変異を持つウイルスは wild-type のウイルスよりも in vitro ウイルス増殖能が低いことが示された。以上の結果、HLA-B*52:01 拘束性ならびに HLA-C*12:02 拘束性 CTL によって選択されたこれらの Pol 変異が感染者に蓄積することで、ウイルス増殖能が低下し、pVL がコントロールされていることが明らかとなった (Murakoshi et al. J. Virol 2017)。

(3) 免疫逃避のウイルス増殖能に与える影響 : 306 名の HIV-1 感染者から Gag-protease 領域の部位を組みこんだウイルスを作製して、その増殖能と血漿ウイルス量との相関を調べたところ、相関がみられなかった。一方、protective allele である HLA-B*52:01 (約 20%) あるいは B*67:01 (約 1%) を持った感染者を除いて解析したところ、ウイルス増殖能と血漿ウイルス量は正の相関を、一方 CD4T 細胞数とは負の相関がみられた。このことから、この部位の変異で生じるウイルスの増殖能は、患者の病態進行に影響を与えると考えられた (Sakai et al. Retrovirology 2015)。一方、HLA-B*52:01 に相関する 5 つの Pol 領域の変異ウイルスを作製し、その増殖能を解析したところ変異がないウイルスより増殖能の低下がみられ、これらの変異と血漿ウイルス量の相関のデータを、確認できた (Murakoshi et al. J. Virol. 2017)。

(4) 逃避変異の選択と認識の解析 : Nef の Y135F mutant は、HLA-A*24:02 拘束性の RF10 epitope (RYPLTFGWCF) 特異的 CTL により選択される免疫逃避変異であることがよく知られている。一方、この RF10 に含まれる RW8 は、superimposed Nef epitope として CTL に認識される epitope でもある。これらの 2 つの epitopes を認識する CTL と逃避変異 Y135F の選択、逃避変異 epitope を認識する新たな CTL の誘導に関して免疫学的方法、構造解析など様々な方法を用いて解析した。その結果これらの逃避変異は、RY10, RW8 特異的 CTL いずれにおいても選択されるが、この変異を持ったウイルスは、新たな RF10-2F epitope (RFPLTFGWCF) 特異的 CTL の誘導をするが、RW8-2F 特異的 CTL の誘導は出来ないことが明らかになった。これは 2 F に変異することで、ペプチドと HLA-A*24:02 間の水素結合の 1 つが消失しペプチド結合が不安定化するが、この不安定化の効果がより強く 8-mer peptide で起こるからである。このように 1 つの逃避変異が、2 つの異なった CTL に対して、異なった免疫適合する事が明らかになり、HIV-1 と HIV-1 特異 CTL 間の相互進化がより複雑に生体内で起きていることが明らかになった (Sun et al. Cell Reports 2016)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Murakoshi H, Koyanagi M, Chikata T, Rahman MA, Kuse N, Sakai K, Gatanaga H, Oka S, and Takiguchi M, 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, **J. Virol** 91:e02082-16, 2017 (査読あり)
- ② Sun X, Shi Y, Akahoshi T, Fujiwara M,

Gatanaga H, Schönbach C, Kuse N, Appay V, Gao GF., Oka S, and Takiguchi M. Effects of a single escape mutation on T cell and HIV-1 co-adaptation, **Cell Reports** 15:2279-2291, 2016 (査読あり)

- ③ Sakai K., C. Takayuki, Brumme ZL., Brumme CJ., Gatanaga H., Oka S, and Takiguchi M. Lack of a significant impact of Gag-Protease-mediated HIV-1 replication capacity on clinical parameters in treatment-naive Japanese individuals, **Retrovirology** 12:98, 2015 (査読あり)
- ④ Chikata T, Carlson JM, Tamura Y, Borghan MA, Naruto T, Hashimoto M, Murakoshi H, Le AQ, Mallal S, John M, Gatanaga H, Oka S, Brumme ZL, Takiguchi M. Host-specific adaptation of HIV-1 subtype B in the Japanese population, **J. Virol.** 88: 4764-4775, 2014 (査読あり)

[学会発表] (海外学会に限定 計 2 件)

- ① Masafumi Takiguchi, Control of HIV-1 accumulating escape mutations by CTLs specific for conserved and cross-reactive epitopes, The U.S. Japan Cooperative Medical Sciences Program presents 50th Anniversary Celebration (Bethesda, USA), January 13-14, 2016
- ② Keiko Sakai, Takayuki Chikata, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, and Masafumi Takiguchi, Investigation of the association of Gag-Protease dependent replication capacities with clinical outcomes of HIV-1 infection, Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI) 2015 (Seattle, USA), February 23-26, 2015

[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 HP

<http://www.caids.kumamoto-u.ac.jp/data/takiguchi/default.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

滝口 雅文 (TAKIGUCHI, Masafumi)

熊本大学・エイズ学研究センター・教授

研究者番号：00183450

(2) 研究分担者

無し ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

岡 慎一 (OKA, Shinichi)

国立国際医療研究センター・エイズ治療・研究開発センター・センター長

研究者番号：20194326

(4) 研究協力者

久世 望 (KUSE, Nozomi)

村越 勇人 (MURAKOSHI, Hayato)

近田 貴敬 (CHIKATA, Takayuki)

Zabrina Burumme (ZABRINA, Burumme)