

論文の内容の要旨

論文題目 リバースイムノジェネティクスを用いたHLA-B*35に提示される
HIV-1細胞障害性T細胞抗原エピートープの同定

志賀 元

(研究背景)

細胞障害性T細胞 (CTL) は、HIV-1感染症の病態進行メカニズムの上で、また生体内におけるHIV-1ウィルス排除機構の中で、重要な役割を担っていると考えられている。詳細な機序が解明されていないこれらのメカニズムを明らかにし、感染防御法や治療法を開発するために、CTLが認識するHIV-1エピートープを、数多く同定し解析することが望まれている。これまでに行われてきたオーバーラッピングペプチドを用いたエピートープ解析法では、手技が煩雑である上に、あらかじめ得られたCTLに対応したウィルスの部分タンパクの限られた数のエピートープしか、一度には同定することができなかった。Pamerらによって考案されたリバースイムノジェネティクスは、あらかじめ作成したエピートープ候補ペプチドの中から、実際にCTLに認識されるものを絞り込んで行くエピートープ解析法である。FalkらによるHLA結合ペプチドモチーフの解明や、Takamiyaらによるバインディングアッセイ法の確立により、その絞り込みの手順もかなり簡便なものになった。本研究は、このリバースジェネティクスを用いて、HIV-1SF2株の全アミノ酸配列を対象として、HLA-B*35拘束性CTLエピートープの大規模な検索を行ったものである。それにより大量のCTLエピートープの同定を試みるとともに、得られたエピートープの細胞内部からのプロセッシングをも組み換えワクシニアウィルス感染細胞を用いることで検討し、より完全な形でのエピートープ解析法として、リバースイムノジェネティクスを確立することを目的とした。

(研究方法)

1) Falkらにより報告されたHLA-B*3501結合モチーフに基づいて、HIV-1SF2株

の全アミノ酸配列の中から候補ペプチドを選択する。

2) 選択された候補ペプチドを合成し、それぞれについて HLA-B*3501 分子に対する結合能を Takamiya らの方法により測定する。

3) HLA-B*3501 を保有する HIV-1 感染患者の血液から分離したリンパ球を、HLA-B*3501 分子に結合することが確認されたペプチドで刺激する。

4) ペプチドで刺激した患者リンパ球のペプチド特異的な CTL 活性の有無を、ペプチドを提示した細胞に対する CTL 活性を測定することにより確認する。

5) ペプチド特異的な CTL 活性が確認されたリンパ球について、そのペプチドが由来するウィルスタンパク遺伝子を導入した組み換えワクシニアウイルスに感染した細胞に対する CTL 活性を検討し、対象としたペプチドが細胞内でプロセッシングされ、細胞表面に提示されることを確認する。

(結果)

HIV-1・SF2 株のアミノ酸配列の中から抜き出した、HLA-B*3501 結合モチーフに合致したアミノ酸配列は、全部で 64 種類であった。これらをすべてペプチドとして合成し、それぞれについて HLA-B*3501 分子に対する結合能を測定したところ、結合親和性が認められたペプチドは 27 種類であった。この 27 種類のペプチドで、HLA-B35 を保有している 2 名の HIV-1 感染患者のリンパ球を刺激したところ、合計 12 種類のペプチドに対して、HLA-B*3501 拘束性で、ペプチド特異的な CTL 活性を持つ Bulk CTL を誘導することができた。これらの Bulk CTL の HIV-1 タンパク遺伝子を導入した組み換えワクシニア感染細胞に対する CTL 活性を検討した結果、12 種類のペプチドのうち 1 種類は、細胞内からの誘導提示が確認できず、さらに 1 種類は、HLA-B*3501 ではなく、HLA-B*5101 拘束性のエピトープであることが判明した。残る 10 種類については、細胞内からの誘導提示も確認され、HLA-B*3501 拘束性の HIV-1 ウィルス CTL エピトープであると判定された。列記すると次の通りである。

HIV-B35-14 (pol330-338: NPDIVIQY)、HIV-B35-18 (pol587-596: EPIVGAETFY)、
HIV-B35-SF2-25 (pol587-596: EPIVGAETF)、HIV-B35-POL-20 (pol311-319: SPAIFQSSM)、
HIV-B35-SF2-4 (pol273-282: VPLDKDFRKY)、HIV-B35-SF2-24 (pol448-456: IPLTEEAEL)、
HIV-B35-SF2-6 (nef75-85: RPQVPLRPMTY)、HIV-B35-SF2-8 (nef72-80: FPVRPQVPL)、
HIV-B35-SF2-33 (env77-85: DPNPQEVVL)、HIV-B35-SF2-36 (env255-263: RPIVSTQLL)

これらのうち、HIV-B35-SF2-24 及び HIV-B35-SF2-33 の 2 種類は、組み換えワクシニアウイルス感染細胞に対する検討の中で、HLA-B*5101 分子にも結合提示認識されていることが判明した。また、HIV-B35-18 は、そのアミノ酸配列の中に HIV-B35-SF2-25 を含んでいるが、前者によって誘導された Bulk CTL は、後者を負荷したターゲット細胞に対しても CTL 活性を示した。HIV-B35-SF2-6 もその配列の中に (VPLRPMTY) というモチーフに合致した配列を含んでおり、この配列は Culmann らによって CTL エピトープとしてすでに報告されているものでもあるが、HIV-B35-SF2-6 によって誘導された Bulk CTL は、この配列のペプチドを負荷したターゲット細胞に対して CTL 活性を示さなかった。

(考察)

HLA-B35 拘束性の HIV-1 ウィルス CTL エピトープは、今回我々が同定した 10 種類を除くと、現在までに合計 6 種類が同定されている。このうち 1 種類は、今回我々が

同定したものの変異エピトープである。今回同定した10種類のうち新規のものを9種類と考えると、B35拘束性のHIV-1ウィルスCTLエピトープは合計15種類となる。この数は、これまでに最も多くのHIV-1ウィルスCTLエピトープが同定されたHLAタイプであるHLA-A2の13種類を凌ぐものである。

今回我々が同定した10種類のエピトープのうち2種類は、HLA-B*3501とHLA-B*5101の2種類のHLA両方に結合提示されるエピトープであることが判明した。このような共通エピトープは、これまでに報告されたことはなく、HLAの抗原提示メカニズムを考える上で興味深い現象である。

今回我々が同定した10種類のエピトープのうち2種類は、そのアミノ酸配列の中に別のエピトープを包含したものであった。うち1種類から誘導されたBulk CTLは、包含されたエピトープを負荷したターゲット細胞に対して活性を示し、包含されたエピトープと共通したエピトープである可能性も残された。別の1種類から誘導されたBulk CTLは、包含されたエピトープを負荷したターゲット細胞に対して活性を示さず、包含されたエピトープとは別のエピトープとして機能していると考えられた。

今回検討を行ったHLA-B35分子は、HIV-1感染症の病態進行の上での *rapid progressing* 因子であるとされている。今回の検討の中で観察された現象の中には、その機序解明につながるものは必ずしも認められなかった。しかし、この問題を含めて、HIV-1感染症の未だ解明されていない特殊な病態の中で、CTLが大きな役割を果たしていることは、多くの研究者が指摘している。より多くの種類のエピトープの解析が必要と考えられているが、今回我々が、飛躍的なまでに大量のエピトープを同定できたことは、病態解明に大きく寄与するものと考えられる。

感染防御の上でのCTLの役割は明らかではないが、HIV感染に対し高いリスクを有しながらHIV-1抗体陰性にとどまっている健常者の血液からHIV-1エピトープ特異的なCTLが誘導されている事実から見ても、その関与は確実である。リバーシムノジェネティックスを他のHLA分子に適用していくことで、ウィルスの易変異性とHLAの多様性に阻まれていたHIV-1ペプチドワクチンについても、展望が開けるものと考えられる。