

## [別紙 1]

### 論文の内容の要旨

論文題目      ヒト免疫不全ウイルス 1 型に対する細胞傷害性 T 細胞  
の標的解析と解析法の開発

氏名            立川（川名） 愛

ヒト免疫不全ウイルス 1 型（HIV-1）感染において、細胞傷害性 T 細胞（CTL）による細胞性免疫がウイルスのコントロールに重要な働きを担っていると考えられている。しかしながら、非常に強い CTL 応答が誘導される一方、HIV-1 は感染個体から排除されることはなく、宿主免疫系は HIV-1 に打ち勝つことができない。「ウイルス」対「宿主」の免疫応答の攻防について多くの研究がなされているが、現時点でも「なぜ宿主の免疫応答で HIV-1 を完全に排除できないか、なぜごく一部の人がウイルスのコントロールに成功しないか」という疑問に対する答えは出ていない。その主な原因の一部として、HIV-1 の変異原性の高さと、免疫担当細胞の機能異常が考えられる。HIV-1 はレトロウイルスであり、そのゲノム複製の過程で高頻度に核酸に変異が入る。また HIV-1 は、宿主免疫において統御的な役割を担う CD4 陽性 T 細胞に感染し、その多くを破壊するため他の免疫担当細胞も正しく機能していない可能性がある。

そこで本研究ではまず、ウイルスの変化、特に CTL によって認識される部分の変化を解析すること

によって、ウイルスがどのようにして宿主免疫の攻撃から逃れているのかを検討した。CTL は MHC クラス I 分子によって提示された10アミノ酸前後の抗原ペプチド(エピトープ)を認識する。本研究の開始頃、HLA-B35 によって提示される複数のエピトープが同定されていたため、その解析を行った。次いで、HIV-1 特異的な CTL の機能解析を行うために、高感度に抗原特異的な CD8T 細胞を検出することができる MHC クラス I/ペプチド複合体テトラマーの独自の作製法を考案した。動物細胞での高発現系であるセンダイウイルス(SeV)ベクターを用いて、MHC クラスI/ペプチド複合体を作製し、テトラマー化した。さらに同じ SeV ベクターを用いて HIV-1 特異的な免疫応答を活性化できることを確認した。

#### 1. HIV-1 の HLA-B35 拘束性 CTL エピトープにおけるステレオタイプなアミノ酸変化の蓄積

HLA-B35 陽性 HIV-1 感染者 10 名と HLA-B35 陰性 HIV-1 感染者 16 名の血清から、RT-PCR により HLA-B35 によって提示される9ヶ所のエピトープを含むウイルスゲノムを増幅し、塩基配列を決定した上で、HIV-1 SF-2 株の塩基配列と比較した。特に HLA-B35 陽性者に関しては経時的な変化を見るために約1年間隔の2時点の血清に関して解析した。その結果、HLA-B35 の陽性、陰性に関わらず高頻度に見られるアミノ酸変化と、HLA-B35 陽性者に有意に高頻度に見られるアミノ酸変化が確認された。前者は HIV-1 ゲノムの多型性を示すものと推定した。一方、HLA-B35 陽性 HIV-1 感染者に有意に高頻度で、かつアミノ酸変化を伴うエピトープが 3 ヶ所存在した (B35-1、B35-2、B35-9)。B35-1 では 6 番目のアスパラギン酸(D)からグルタミン酸(E)への変化(B35-1-D6E)、B35-2 では 3 番目の D から E への変化(B35-2-D3E)、B35-9 では 11 番目のタイロシン(Y)からフェニルアラニン(F)への変化 (B35-9-Y11F)が B35 陽性者において高頻度に認められた。B35-1、B35-2、B35-9 のエピトープは HLA-B35 陽性者体内では HLA-B35 により提示され、その選択圧の下で B35-1-D6E、B35-2-D3E、B35-9-Y11F を持つウイルスが何らかの有利な点を持ち、優位に増殖したと推測される。

B35-9-Y11Fについては、ペプチドの HLA-B35 分子への結合や野生型の B35-9 を認識する CTL クローンによる傷害性に異常が認められないことが既に報告されていたため、B35-1、B35-2 に関して、特異的な CTL クローンによる B35-1-D6E、B35-2-D3E の認識を検討した。B35-2-D3E に関しては標

的細胞として B35-1-D6E、B35-2-D3E ペプチドをパルスした HLA-B35 発現細胞と、B35-1-D6E、B35-2-D3Eを発現する組み換えワクチニアウイルスを感染させた HLA-B35 発現細胞を用いた。その結果 B35-2-D3E は B35-2 特異的な CTL クローンによって認識されにくくなっていることがわかった。

また全てのエピトープに関して、1 年間隔の 2 時点において調べた 65 組のエピトープのうち 48 組 (73.8%) においてはアミノ酸に変化は見られなかった。その中には CTL が存在するのにも関わらずまさにその配列を保持する HIV が主要な集団として存在するものがあつた。この結果から生体内では CTL によって認識されやすいエピトープとされにくいエピトープが存在し、たとえ特異的な CTL が存在していても、ウイルスを排除するに十分な機能を発揮していないことが示唆された。そこで私は HIV-1 特異的 CTL の精密な機能解析を行うために必須の分子である MHC クラス I テトラマーの作製を試みた。

## 2. HIV-1 のエピトープを提示するヒト MHC クラス I/ペプチド複合体発現系の構築とその応用

まずヒトの MHC クラス I 分子の重鎖である HLA-A\*2402 細胞外領域の C 末端にビオチン付加配列とヒスチジンタグを持つ融合タンパク質 (A24-BSP<sub>his</sub>) を発現する SeV を作製した。次いで、HLA-A\*2402 によって提示される HIV-1Nef タンパク質由来のエピトープ (Nef138-10) をリンカーを介して N 末端に付加した $\beta$ 2 ミクログロブリン(Nef138- $\beta$ 2m)を発現する SeV を作製した。これら2つのウイルスを重感染させることによって、その感染細胞培養上清に A24-BSP<sub>his</sub> と Nef138- $\beta$ 2m からなる複合体 (A24/Nef138- $\beta$ 2m)が分泌された。A24/Nef138- $\beta$ 2m をヒスチジンタグを用いて精製し、ビオチン付加後 streptavidin-PE と反応させることによって、A24/Nef138- $\beta$ 2m 4量体(テトラマー)を作製することに成功した。A24/Nef138- $\beta$ 2m テトラマーを用いて Nef138-10 特異的な CTL クローンを特異的に染色できた。また HLA-A24 陽性 HIV-1 感染者の末梢血単核球(PBMC)中の Nef138-10 特異的な CD8T 細胞を高感度に検出することが可能であつた。

さらに Nef138- $\beta$ 2m を発現する SeV を用いて細胞表面上の HLA-A24 分子による抗原提示を増強することを試みた。Nef138- $\beta$ 2m を発現する SeV 感染細胞培養上清をパルスした HLA-A24 陽性細胞を標的細胞として、Nef138-10 特異的な CTL クローンによる細胞傷害活性を測定した。その際、対照とし

て HLA-A\*2402 拘束性の他の HIV-1 Env タンパク質由来のエピトープ (Env584-11) を融合した $\beta$ 2m (Env584- $\beta$ 2m) を発現する SeV 感染細胞培養上清を用いてコントロールとした。その結果、Nef138-10 特異的な CTL クローンは Env584- $\beta$ 2m をパルスした標的細胞に対して細胞傷害活性を示さず、Nef138- $\beta$ 2m をパルスした細胞特異的に傷害した。また、その傷害活性は、より高濃度の Nef138-10 ペプチドをパルスした場合とほぼ同等であった。このことから Nef138- $\beta$ 2m は細胞外から可溶性分子として細胞にパルスした場合 MHC クラス I 分子によって提示され、特異的な CTL によって認識され得ることが明らかになった。さらに Nef138- $\beta$ 2m を発現する SeV を HLA-A24 陽性の標的細胞に感染させ同様の実験を行ったところ、Nef138- $\beta$ 2m 発現 SeV 感染細胞が Nef138-10 特異的 CTL クローンによって特異的に傷害された。

このように MHC クラス I を発現する SeV ベクターを用いて 1) 抗原特異的な CD8 陽性 T 細胞を高感度に検出できるテトラマーの作製が、2) エピトープを融合した $\beta$ 2m を細胞外からパルス、もしくは、3) 感染性ベクターとして用いることにより細胞表面の MHC クラス I 分子上にそのエピトープを提示することが可能であることが明らかになった。以上から、このベクター系は解析法としてばかりでなく、遺伝子治療ベクターとして用いることができる可能性があることが示された。

本研究において HIV-1 感染個体内において、HIV-1 は CTL による選択圧を受けていると考えられる部位に有意に高頻度に特定のアミノ酸変化が生じていることがわかった。またエピトープ内の中の 1 箇所のアミノ酸変化によって CTL からの認識を逃れうることを示唆する結果を得た。また、CTL が存在しているにも関わらずそのエピトープを持つ HIV-1 が個体内で主要な集団として存在していることが明らかになった。このことは、HIV-1 特異的な CTL が感染個体内で十分に機能していない可能性を示唆している。SeV ベクターを用い、MHC クラス I テトラマーの作製に成功したので、今後 HIV-1 特異的な CD8T 細胞の詳細な解析を行う予定である。

HIV-1 感染において見られる CTL の機能不全や CD4T 細胞の減少などに対して、免疫治療が有

用かもしれない。SeV はヒトに病原性を示さない、宿主域が広い、導入された遺伝子の発現量が高い、非分裂細胞にも感染するなど、治療としての遺伝子導入に有用なベクターと考えられている。本研究で開発したエピトープを融合したβ2mを発現するSeVは HIV-1 感染症に限らず、他の感染症や癌に対する免疫治療において抗原特異的な CD8T 細胞に対する抗原提示を増強し、それらを活性化するために応用できる可能性がある。