

## 論文の内容の要旨

論文題目： 日本国内で流行している HIV の遺伝子解析と  
HIV 感染者に対する免疫遺伝子治療用ベクターの開発

指導教官： 岩本 愛吉 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名： 細谷 紀彰

### 【研究の背景】

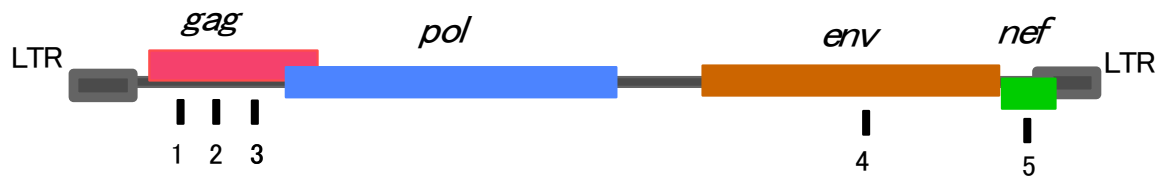
ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV) は後天性免疫不全症候群 (AIDS) の原因ウイルスである。HIV 感染者は体内のウイルスを完全に排除することができず、抗 HIV 薬の服薬を生涯続けなければならない。しかし、抗 HIV 薬による副作用、薬剤耐性ウイルスの出現など様々な問題が表面化しつつあり、抗 HIV 薬に代わる治療の開発が急務である。一方、HIV 感染者の 5~10% は長期未発症者と呼ばれ、抗 HIV 薬の助けがなくとも HIV を抑制している。長期未発症の機序はいまだ解明されていないが、ヘルパー T 細胞、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) などの細胞性免疫が HIV の増殖抑制に大きな役割を果たしているという報告がある。CTL の活性化には抗原提示細胞による抗原の提示が必須である。樹状細胞 (DC) は強力な抗原提示細胞であり、メモリーのみならずナイーブ T 細胞の活性化を誘導することが可能である。HIV 感染者体内の DC は T 細胞の活性化を誘導する能力が低いことが以前から指摘されており、機能不全であると考えられている。しかし *in vitro* で培養した DC においては、その傾向はみられない。従って、HIV 感染者から細胞を分離し、*ex vivo* で DC を誘導した後に抗原を導入し、CTL へ十分な刺激を伝えることができれば、機能不全に陥っている免疫を活性化できる可能性がある。本研究では、HIV 感染者に対す

る DC を用いた CTL 誘導型の免疫遺伝子治療を目指し、CTL を活性化するための抗原を検討する情報として、日本人 HIV 感染者の検体を解析し、HIV 感染者個体内で CTL の標的となっているウイルス遺伝子配列を中心に解析を行い、日本人感染者で流行している HIV の特徴を解析することを目指した（第一章）。また、DC へ抗原のデリバリーシステムを検討するために、遺伝子治療用ベクターの開発を目指した（第二章）。

### 【第一章：日本国内で流行している HIV の遺伝子解析】

CTL 誘導型の免疫遺伝子治療を目指す上で CTL を活性化する抗原を検討することは重要である。CTL は T 細胞レセプター (TCR) によってウイルスタンパク質由来ペプチドを提示した主要組織適合抗原 (MHC、ヒトでは HLA と呼ばれる) クラス I 複合体を認識し、細胞傷害性を発揮する。HLA 分子上に提示され、TCR に認識されるペプチドを CTL エピトープと呼ぶ。提示される CTL エピトープには一定のモチーフが存在し、HLA 分子との結合に重要なアミノ酸と TCR による抗原認識に重要なアミノ酸がある。CTL エピトープとなっているアミノ酸に変異が生じると HLA 分子と結合できなくなる、あるいは CTL によって認識されなくなる可能性がある。HIV は変異を起こしやすいウイルスであり、実際に CTL の選択圧から逃れた変異 (エスケープ変異) を持つウイルスが HIV 感染者体内で増殖している例が報告されている。HLA には多型性があり、日本人では約 60% が HLA-A24 陽性である。そこで本研究では、日本人で頻度の高い HLA-A24 に注目し、HIV 感染者個体内で CTL により認識される HLA-A24 拘束性 CTL エピトープとその周囲のアミノ酸配列を調べた。

実験では、性感染群 (HLA-A24 陽性 23 人、陰性 20 人) と血友病群 (HLA-A24 陽性 15 人、陰性 13 人) の日本人 HIV 感染者、及び対照としてオーストラリア人性感染群 (HLA-A24 陽性 2 人、陰性 11 人) 計 84 人の血漿を用いた。HIV 感染者の血漿から HIV-1 RNA を抽出し、RT-PCR により CTL エピトープを含む領域を増幅し、塩基配列を決定した。HIV における HLA-A24 拘束性 CTL エピトープとその名称を (図 1) に示す。Gag タンパク質中にある gag28-9、gag263-10、gag296-11、Env タンパク質中にある env584-11、Nef タンパク質中にある nef138-10 の 5 箇所の CTL エピトープについて標準株 (HIV-1 SF2 株) と比較して変異の有無を調べた。



(図 1) HIV における HLA-A24 拘束性 CTL エピトープ

1. gag28-9、2. gag263-10、3. gag296-11、4. env584-11、5. nef138-10

その結果、HLA-A24 拘束性 CTL エピトープにおいて HLA-A24 陽性者に高頻度にみられる変異 (gag28-9 の 3 位の位置の K から R への変異 (K3R) 、 env584-11 の 4 位の位置の R から K への変異 (R4K) 、 nef138-10 の 2 位の Y から F への変異 (Y2F) 、 nef138-10 から-1 位の位置のフランキンゲン部位にある I から T への変異 (I-1T) ) が明らかとなった。CTL エピトープ内のアミノ酸変異にバリエーションは少なく、ある特定のアミノ酸への変異であった。gag263-10、gag296-11 エピトープに特徴的なアミノ酸変異はみられなかった。HLA-A24 拘束性 CTL エピトープのアミノ酸配列に変異がみられるものとみられないものが存在することから CTL による選択圧は CTL エピトープによって違いがあると考えられた。また、HLA-A24 陽性者において CTL エピトープの変異を経時的に調べると、いずれの変異も変化なく保持されたままであった。一方、HLA-A24 陰性者では nef138-10 に HLA-A24 陽性者で高頻度に見られた変異 (Y2F) が標準株のアミノ酸へと置き換わる変異 (復帰変異) がみられた。このことは Y2F が HLA-A24 による選択圧下でアドバンテージを持つ変異であり、これらの変異を持つウイルスは HLA-A24 陽性 HIV 感染者個体内で安定であることが示唆された。本研究より日本人で頻度の高い HLA-A24 における HIV 感染者個体内の CTL エピトープの配列が明らかとなった。HIV 感染症において日本人に対して CTL エピトープを考慮に入れた免疫遺伝子治療を行う場合において有用な情報が得られた。

## 【第二章：HIV 感染者に対する免疫遺伝子治療用ベクターの開発】

HIV 感染者に対する DC を用いた CTL 誘導型の免疫遺伝子治療を目指し、DC に適切な遺伝子導入用ベクターを選ぶことを目的として、安全で高い遺伝子導入効率と発現効率を特徴とするセンダイウイルス (SeV) ベクターとアデノウイルス (AdV) ベクターを用いて、DC に遺伝子導入を行い、導入効率及び、細胞毒性を比

較検討した。また、ウイルスベクター導入 DC の細胞表面マーカーの変化を調べ、ウイルスベクターを導入することによる DC への影響を検討した。さらに実際の HIV 感染者由来 DC を用いて HIV 特異的免疫の誘導を試みた。

実験は、健康人由来末梢血単核球より単球を分離し、IL-4 と GM-CSF の存在下で 7 日間培養し DC を誘導した。SeV ベクターは多段階増殖可能な第一世代型 SeV ベクターと、ゲノムから融合タンパク質遺伝子を欠損させた非伝播型の第二世代型 dF-SeV ベクターを用いて検討を行った。遺伝子導入効率を調べるために GFP を発現するウイルスベクターを感染させ、GFP の発現量と細胞毒性を調べるために死細胞をヨウ化プロピディウムにて染色しフローサイトメトリーにて解析した。

まず始めに感染価 (MOI) を変化させ、次に時間を変化させて導入効率の最適化を行った。SeV ベクターは DC へ MOI=2 で感染を行い 24 時間後が細胞毒性も弱く、発現効率が最適であった。SeV ベクターは低い MOI でも遺伝子導入可能であり、外来遺伝子を高発現可能であった。第一世代型 SeV ベクター及び、第二世代型 dF-SeV ベクターでは導入効率、細胞毒性に差はみられなかった。AdV ベクターは DC へ MOI=1000 で感染を行い 48 時間後が細胞毒性も弱く、発現効率が最適であった。AdV ベクターは MOI をあげれば効率よく遺伝子導入でき、細胞毒性も SeV ベクターに比べ弱かった。最適化した条件で SeV ベクター、AdV ベクターを用いて DC に HIV Gag タンパク質及び、Env タンパク質を効率よく発現させることが可能であった。ウイルスベクターを導入することによる DC への影響を、細胞表面マーカーの解析により調べた。SeV ベクター、AdV ベクター共に DC の成熟化 (maturation) を誘導する傾向がみられた。HIV 感染者由来の DC に HIV タンパク質発現 SeV ベクター、AdV ベクターをそれぞれ導入し、HIV 特異的免疫の誘導を IFN- $\gamma$  の Enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT) を用いて調べた。その結果、SeV ベクター、AdV ベクターを導入した DC 共に HIV 特異的 IFN- $\gamma$  の産生細胞の誘導みられた。SeV ベクターではより多くの HIV 特異的 IFN- $\gamma$  の産生細胞の誘導がみられた。SeV ベクター感染 DC、AdV ベクター感染 DC を用いることで効率よく HIV 特異的免疫を誘導可能であった。これまで、SeV ベクターを用いて DC への遺伝子導入及び、免疫誘導を詳細に解析した報告はない。AdV ベクターはこれまでも、DC への遺伝子導入、免疫の誘導が可能であることが報告されているが、この AdV ベクターと比較しても SeV ベクターは非常に有用なベクターであることがわかった。今後の HIV 感染症に対する研究と治療への応用が期待される。