

## 論文の内容の要旨

論文題目：HIV-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞(CTL)の T 細胞受容体レパートリーの解析

指導教員：岩本愛吉

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

宮崎恵梨子

ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) はヒトに後天性免疫不全症候群 (AIDS) を引き起こす原因ウイルスである。このウイルスの増殖を抑制する宿主の免疫応答において、細胞障害性 T 細胞 (Cytotoxic T lymphocyte ; CTL) が非常に重要な役割を果たしていることが報告されている。CTL は細胞表面に提示された HIV-1 タンパク由来の抗原ペプチドと HLA class I 分子との複合体 (HLA-class I / 抗原ペプチド複合体) を認識すると、種々のサイトキシンを分泌し細胞を傷害する。急性感染期では、この HIV-1 特異的 CTL の働きにより HIV-1 感染細胞は破壊されて血中のウイルス量は急速に減少するが、完全に排除するまでには至らない。

CTL は T 細胞受容体 (T cell receptor ; TCR) を介して HLA-class I / 抗原ペプチド複合体を認識して標的細胞を排除する。この TCR による抗原ペプチドの認識は厳密であり、提示されるペプチド内に一つのアミノ酸置換が起きても HLA-class I 分子との結合能、あるいは TCR による抗原認識能が低下し、CTL の細胞傷害活性が低下する場合があることが知られている。

TCR は  $\alpha$ 鎖と  $\beta$ 鎖によって構成されており、免疫グロブリンと同様に可変部領

域と定常領域を持ったヘテロ 2 量体構造をしている。この $\alpha$ 鎖および $\beta$ 鎖遺伝子は、T 細胞の分化過程で体細胞遺伝子組み換えによって結合される V、(D)、J 遺伝子断片から構成されている。遺伝子再構成の際にそれぞれの鎖の結合部において塩基が不規則に添加あるいは削除されることで TCR の $\alpha$ 、 $\beta$  2 量体としては理論上  $10^{15}$  以上もの多様性が獲得できると考えられている。可変部領域の各遺伝子断片と定常領域の結合部は抗原特異性を決定しており、相補性決定領域 (complementarity-determining region ; CDR) と呼ばれ、ループ構造を形成している。CDR には CDR1、CDR2、および CDR3 があり、CDR3 は TCR と抗原ペプチドを提示した HLA-class I 分子との接触面の中央に位置し、抗原ペプチドを直接認識しているため CD8 陽性 T 細胞による抗原認識に非常に重要であることが明らかになっている。CDR は $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖のどちらにも存在するが、HLA-class I /抗原ペプチド複合体とより緊密に接触する $\beta$ 鎖の CDR3 のほうが抗原認識に重要で、その長さおよび配列が影響していると考えられている。

一方、HIV-1 は変異を起こしやすいウイルスであり、感染患者個体内では多様な変異型が存在する不均一な集団 (準種) を形成していると考えられている。HIV-1 では変異した多様なウイルスの中から、その宿主内での環境に適したウイルスが増殖してくることが報告されている。

この変異型の中には CTL の認識から逃れることができるもの (エスケープ変異) が生じてくる。我々日本人では約 60% が陽性である HLA、HLA-A24 に提示される抗原ペプチド (エピトープ) に着目した。現在までに HLA-A24 拘束性のエピトープは現在までに 16 種類報告されており、その中でも Nef 遺伝子由来のエピトープ、RYLPTGWCF (Nef138) は HIV-1 感染患者において高頻度 (90% 以上) に特異的な CTL が存在する、免疫学的に優位なエピトープであることが明らかになっている。当研究室の以前の研究で、HLA-A24 陽性の日本人 HIV-1

感染患者ではこのエピトープの野生型(wt)の配列は一例も認められず、2番目のチロシン (Y)がフェニルアラニン(F)に置換された変異型(2F)が 9 割以上の患者から検出されることを報告しており、2F 変異型は、CTL による認識を逃れることのできるエスケープ変異であることを示唆している。そこで私はエスケープ変異が生じることが知られているこの Nef138 エピトープに注目し、その野生型ならびに変異型エピトープに特異的な CD8 陽性 T 細胞の TCR の解析を行い、エピトープ内のアミノ酸変化が TCR による認識に与える影響についての検討を試みた。

CTL による認識において、異なる TCR では認識する HLA-class I /抗原ペプチド複合体が違ふということが報告されている。しかし、HIV-1 抗原認識における TCR レパートリーならびに CDR3 の影響に関してはまだ報告数も少なく、完全には明らかにされていない。また、そのほとんどがクローンを用いた系での研究であり実際の体内での状況を反映しているとは言いがたく、さらに野生型と変異型のエピトープをそれぞれ認識する CTL についての研究はヒトでは報告されていない。本研究では、HLA-A24 陽性の日本人 HIV-1 感染患者 7 名について、末梢血中に存在する Nef138 エピトープの野生型(wt)ならびにその変異型(2F)にそれぞれ特異的な CD8 陽性 T 細胞の TCR レパートリーを、抗原認識により重要なβ鎖に特に注目して解析を行った。

抗原特異的な CD8 陽性 T 細胞の検出には HLA-class I テトラマーを用いた。これは、ビオチンを付加した HLA-class I /ペプチド複合体を蛍光標識したストレプトアビジンにて 4 量体化し、フローサイトメトリーにて抗原特異的な CD8 陽性 T 細胞を高感度に検出できる手法である。本研究では、A24/Nef138(wt)-APC テトラマーおよび A24/Nef138-PE テトラマーを作製し、それぞれの抗原ペプチドに結合する CD8 陽性 T 細胞を特異的に分取した。

TCR 遺伝子の増幅には 5'RACE 法の応用である SMART (Switching Mechanism At the 5'end of the RNA Transcript) 法を利用した。SMART 法は、cDNA の 5'末端と 3'末端に同一の配列を付加して完全長 cDNA の合成を行なう方法で、5'末端配列の不明な遺伝子の増幅に有用である。本研究では、TCR の $\alpha$ 鎖または $\beta$ 鎖の可変部領域全長ならびに定常領域の一部を特異的に増幅することを試みた。さらに増幅した遺伝子、ならびにアミノ酸の塩基配列を決定し、詳細な解析を行った。

本研究で得られた結果は以下の通りである。

慢性期の HLA-A24 陽性 HIV-1 感染患者の体内では、Nef138 特異的な CTL には野生型(wt)ペプチドのみを認識する CD8 陽性 T 細胞；(wt+)、野生型(wt)と変異型(2F)の両方のペプチドを認識する CD8 陽性 T 細胞の集団；(dual+)、および変異型(2F)のみを認識する CD8 陽性 T 細胞；(2F+)の 3 種類が存在することを明らかにした。

(wt+)および(dual+)の TCR $\beta$ 鎖遺伝子のレパートリーについて解析を行ったところ、(wt+)は TCR $\beta$ 鎖遺伝子は各個体内で 3-10 種類検出され、平均でも 6.7 種類と複数の TCR を使用していることが分かった。また、その CDR3 にも個体内および患者間では共通点は見られなかった。一方、(dual+)は平均 2.8 種類と TCR $\beta$ 鎖の多様性は(wt+)と比べると著しく少なく( $P < 0.0001$ )、特定の遺伝子、TRBV4-1 を使用しているものが全体の 89%と非常に多かった。さらに、TRBJ に着目すると、(dual+)では TRBJ2-7 という遺伝子を使っているものが 95%と非常に高頻度であった。

*in vitro* における拡大培養の結果、特定の TCR を持つ CD8 陽性 T 細胞だけが

選択的に増殖してこのような偏りが生じたことも考えられるので、*ex vivo* における PBMC を 2 種類のテトラマーと抗 TRBV4k 抗体を用いて多重染色してみたところ、患者体内においても(dual+)は 95%以上が TRBV4 を発現していることがわかった。よって、(dual+)が使用している TCR $\beta$ 鎖遺伝子は感染患者の個体内ですでに偏っていたことが確認できた。この理由として以下のことを考えた。Nef138(2F)はプロセッシングに影響を及ぼすエスケープ変異型であることが示唆されており、体内においては提示される抗原量が少ないこと予想される。そのため、それを認識できる TCR は、ある程度結合能が高い TCR に限られてしまうと考えられる。TRBV4-1、TRBJ2-7 という遺伝子を持つ TCR は HLA-A24/Nef138(2F)複合体との結合能が高く、これが選択的に誘導されてきたと推察される。

さらに、TRBV4-1、TRBJ2-7 を使用している TCR 遺伝子の CDR3 領域に着目すると、アミノ酸残基数、配列ともに非常によく似ていたことが明らかになり、一定のモチーフを持っていることが分かった。CDR3 のアミノ酸配列の TCR の認識への影響を解析した報告は少なく、タンパクの立体構造を決定して、さらに詳細な解析を試みる必要がある。

一方、それぞれの HIV-1 感染患者の CD4 陽性 T 細胞数、CD8 陽性 T 細胞数、およびウイルス量と TCR レパートリーとの関係に着目したところ、CD8 陽性細胞数、および血漿中のウイルス量との関連性は見いだせなかったが、CD4 陽性細胞数が 400copies/mL 以上の患者の PBMC においては、(wt+)が存在することが確認された。CD4 陽性 T 細胞数がある程度高い患者では免疫機能が保持されており、感染時に存在していた野生型により誘導されたメモリー細胞が維持されていて、これが *in vitro* の刺激により増殖して(wt+)が検出できたたのではないかと考えた。一方、CD4 陽性 T 細胞数が低い患者では免疫機構は破綻しており、

メモリー細胞の維持ができなかったため(wt+)を誘導できなかったと考えた。しかし、ウイルス量との関係は見られなかったことから、認識できる TCR レポートリーが多いことがウイルスの増殖抑制に直接関係しているのではないことが示唆された。

TCR レポートリーの経時的な変化を検討するために、1名の患者について2年おきに3時点(99年、01年、03年)で採血したPBMC中のCD8陽性T細胞のTCRβ鎖について解析を行った。Nef138(2F)ペプチドを認識するCD8陽性T細胞のTCRレポートリーを経時的に観察したところ、そのレポートリーは入れ替わっており、さらに経過と共に収束していた。このことより、慢性期においても新たなプライミングが継続して行われていることが明らかになった。

本研究では日本人向けのワクチン開発の一助とするべく、日本人の約6割が持つHLA-A24に拘束性の抗原ペプチドの中でももっとも免疫学的に優位なペプチド;Nef138を認識するCTLに着目してそのワクチン候補としての可能性を考えた。Nef138は、変異によるTCRレポートリーの限定によりCTLエスケープ型として蔓延したと考えられるため、ターゲットとするペプチドはイムノドミナントであるだけでなく、それを認識できるCTLのTCRレポートリーが多いものが適切なのではないかと予想される。今後は、日本人向けの治療ワクチンの開発を目指し、HLA-A24拘束性の抗原ペプチドの中で、認識できるCTLの数だけでなくそのTCRレポートリーの多少にも注目して細胞傷害活性の高いCTLを誘導できるようなペプチドを検討したい。