

論文の内容の要旨

論文題目: CD8 陽性細胞の免疫不全ウイルス複製抑制能の解析

指導教員 俣野 哲朗 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 塚本 徹雄

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)・サル免疫不全ウイルス(SIV)などの免疫不全ウイルス感染症においては、宿主適応免疫反応が誘導されるにもかかわらずウイルス複製が持続し、最終的にはエイズ発症にいたる。適応免疫の代表的エフェクターである細胞傷害性 T リンパ球(CTL)を含む CD8 陽性細胞は免疫不全ウイルス複製抑制に重要であることが知られているが、HIV 感染後誘導される CD8 陽性細胞の HIV 複製抑制効果は充分ではなく、慢性持続感染が成立する。予防エイズワクチン開発では、この慢性持続感染成立阻止が試みられているが、安全性・有効性ともに十分なものは確立されていない。安全性の面で問題のある弱毒化生ワクチンは、唯一持続感染成立阻止効果を有するが、その機序については不明である。そこで本研究では、どのような免疫誘導が免疫不全ウイルス複製の制御に結びつくかを知る目的で、SIV 感染サル慢性エイズモデルにおいて CD8 陽性細胞反応を中心とした解析を行った。まず、CD8 陽性細胞集団の SIV 複製抑制能を培養細胞レベルで評価する系を確立し、生ワクチンで高い SIV 複製抑制能を有する CD8 陽性細胞が誘導されることを示す結果を得た。さらに、SIV 複製抑制能を有していることが示唆されていた2つの SIV Gag エピトープ特異的 CTL を各々単独で誘導できるワクチンシステムを確立し、ワクチンによる各々のエピトープ特異的 CTL の誘導が SIV 複製制御に結びつくことを明らかにした。これらの結果は、HIV 慢性持続感染成立阻止に結びつく免疫機序解明に貢献するものとして重要である。

I. CD8 陽性細胞の in vitro SIV 複製抑制能の解析

これまで、HIV・SIV 感染症における CD8 陽性細胞あるいは CTL 反応に関して、主にウイルス特異的 CTL レベルの測定がなされてきたが、これは必ずしも HIV・SIV 複製抑制能を反映しているわけではない。そこで本研究では、まず、培養細胞レベルで、CD8 陽性細胞存在下における SIV 複製を測定することにより、CD8 陽性細胞の in vitro SIV 複製抑制能を解析する系を確立した。具体的には、末梢血単核球 (PBMC) から選択分離した CD8 陰性細胞に SIVmac239 を感染させてターゲットとし、PBMC から選択分離した CD8 陽性細胞をエフェクターとした。エフェクターとターゲットを共培養し、培養上清中に産生される SIV Gag 抗原量を定量して、エフェクターを加えない場合と比較することにより、CD8 陽性細胞の in vitro での SIV 増殖抑制能を調べた。

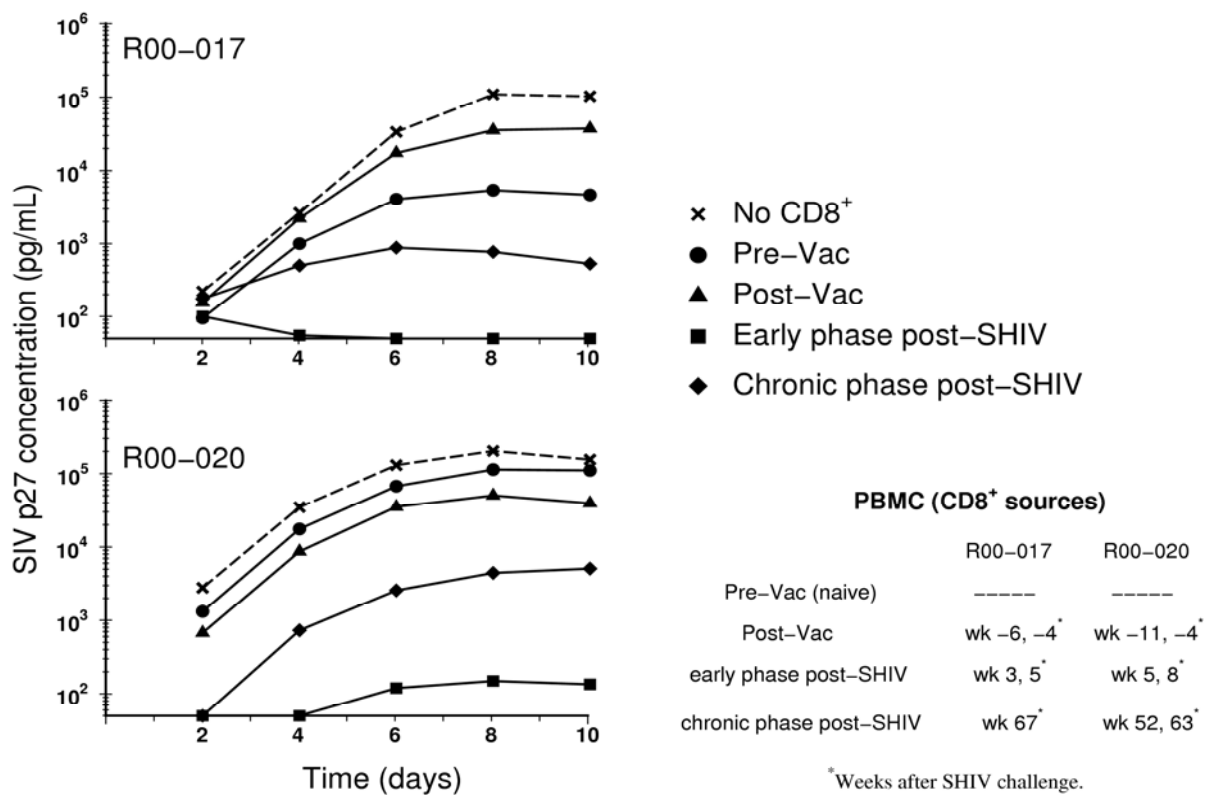


図 1 SHIV 複製制御したサル CD8(+) 細胞による in vitro での SIV 複製抑制効果の検討

私の所属する研究室では、センダイウイルス (SeV) に SIV Gag を発現させるベクター (SeV-Gag) のワクチンとしての効果をサルエイズモデルにて検証してきた。急性エイズを引き起こす CXCR4 指向性 HIV/SIV キメラウイルス SHIV89.6PD チャレンジ実験では全ワクチン接種サルでウイルス複製が制御されたが、慢性持続感染を引き起こす CCR5 指向性 SIVmac239 チャレンジ実験ではワクチン接種サルの半数でしか持続感染成立阻止効果が認められなかった。前者の SHIV 複製制御サル群の感染慢性期

における SIVmac239 スーパーチャレンジ実験では、生ワクチンと同様、SIV 複製は制御され、抗 CD8 抗体を用いた CD8 枯渇実験から、この SIV 複製制御に CD8 陽性細胞が中心的役割を果たしていることが示唆された。したがって、これらの SeV-Gag ワクチン接種サルでは、SHIV チャレンジ後に SIV 複製制御に結びつく免疫が誘導されたと考えられた。

そこで本研究では、私の樹立した解析系を用い、SHIV 複製制御サル群で SeV-Gag ワクチン接種後に誘導された CD8 陽性細胞とさらに SHIV チャレンジ後に誘導された CD8 陽性細胞の *in vitro* での SIV 複製抑制能を調べ、比較検討した(図 1)。その結果、SHIV チャレンジ後の CD8 陽性細胞は、SeV-Gag ワクチン接種後(SHIV チャレンジ前)の CD8 陽性細胞よりも強力な SIV 増殖抑制能を有することが明らかとなった。本結果は、ウイルス感染により高い SIV 複製抑制能を有する免疫反応が誘導されることを初めて具体的に示すものであり、生ワクチンと同様の高いウイルス複製抑制能を有する CD8 陽性細胞を誘導することが慢性持続感染成立阻止に結びつくことを示唆するものである。

なお、本研究で確立した CD8 陽性細胞の *in vitro* ウイルス複製抑制能の解析系は、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)遺伝子型によらず任意の個体に適用でき、CTL クローンを評価する場合と比べ、個体レベルのウイルス複製抑制効果をより反映する可能性が期待される。

II. ワクチンによる単独エピトープ特異的 CTL 誘導の SIV 複製抑制効果の解析

私の所属する研究室では、SeV-Gag を用いた予防ワクチン接種により確実に SIV 複製制御にいたる MHC クラス I(MHC-I)ハプロタイプ *90-120-Ia* 共有サル群を同定している。CTL エスケープ変異の解析から、この SIV 複製制御に、Gag₂₀₆₋₂₁₆ エピトープ特異的 CTL および Gag₂₄₁₋₂₄₉ エピトープ特異的 CTL が強く関与していることが示唆された。

本研究では、これらのエピトープ特異的 CTL についての解析をさらに進め、各々の CTL メモリーのみをワクチンで誘導しておくだけで SIV 複製制御にいたるかどうかを検討した。まず、MHC ハプロタイプ *90-120-Ia* を構成するいくつかの MHC-I アレル cDNA を各々発現する細胞株を樹立し、Gag₂₀₆₋₂₁₆ 特異的 CTL および Gag₂₄₁₋₂₄₉ 特異的 CTL の各々のエピトープを拘束する MHC-I アレル同定に結びつけた。また、Gag₂₄₁₋₂₄₉ 特異的 CTL を特異的に認識するテトラマーも獲得した。

次に、Gag₂₀₆₋₂₁₆ エピトープを含む Gag の 15 アミノ酸(Gag₂₀₂₋₂₁₆)あるいは Gag₂₀₆₋₂₁₆ エピトープを含む Gag の 15 アミノ酸(Gag₂₃₆₋₂₅₀)を EGFP との融合蛋白として発現する単独エピトープ発現 DNA および単独エピトープ発現 SeV ベクターを構築した。これらを用いて、MHC-I ハプロタイプ *90-120-Ia* を有するアカゲサル 9 頭に対し、DNA プライム SeV ブーストワクチン接種・SIVmac239 チャレンジ実験を行った。3 頭には EGFP のみを発現するワクチン接種、2 頭には Gag₂₃₆₋₂₅₀-EGFP を発現するワクチン接種、2

頭には Gag₂₀₂₋₂₁₆-EGFP と Gag₂₃₆₋₂₅₀-EGFP を発現するワクチン接種を行った。これら 7 頭は SeV ブースト後約 3 ヶ月の時点で、また残る 2 頭はナイブの状態に SIVmac239 チャレンジし、経時的に血漿中ウイルス量を測定した(図 2)。その結果、EGFP のみを発現するワクチン接種を受けたサルでは、これまで得られていた非ワクチン接種群の SIV チャレンジ実験と同様、少なくとも 8 週目まではウイルス血症が持続したが、エピートプ発現ワクチンの接種を受けた他の 4 頭においては、8 週目までに SIV 複製が制御され、血漿中ウイルス量が検出下限以下に抑えられた。血中ウイルスゲノムの塩基配列の解析では、SIV 複製制御が認められた 4 頭において 8 週目までに、Gag₂₀₆₋₂₁₆ 特異的 CTL からのエスケープ変異が選択されていた。これらの結果から、90-120-Ia 共有サル群では、SIV チャレンジ前に Gag₂₀₆₋₂₁₆ 特異的 CTL あるいは Gag₂₄₁₋₂₄₉ 特異的 CTL メモリーが誘導されていれば、慢性持続感染成立阻止にいたることが明らかとなった。このような単独エピートプ特異的 CTL のメモリー誘導が HIV 複製制御に寄与することを示す報告は初めてである。

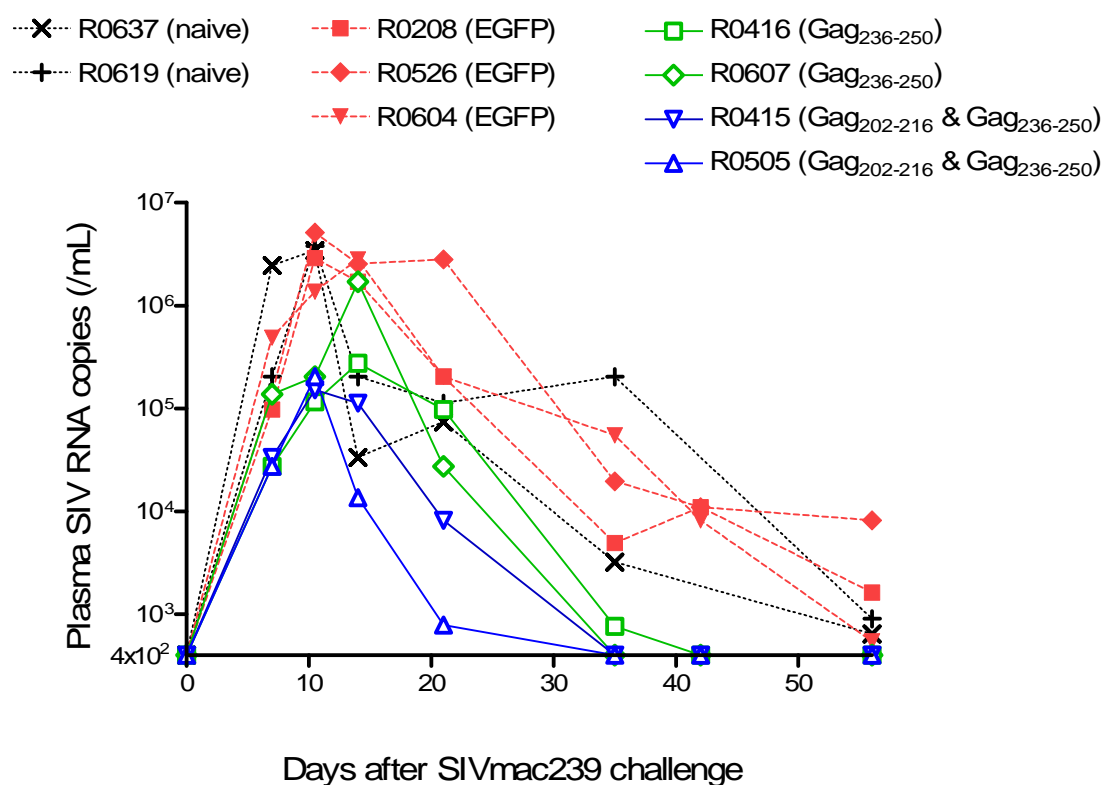


図 2 単独 CTL エピートプ発現ベクター、または eGFP 発現ベクターにてワクチンした 5 頭のビルマ産アカザルの SIVmac239 チャレンジ後の血中ウイルス量。