

# 論文の内容の要旨

## 論文題目

エピトープスイッチング：HIV-1 感染における  
重複した CTL エピトープの出現と消滅の連動性に関する研究

氏 名 韓 忠勇

## 背景

HIV-1 感染細胞において、ウイルス由来の遺伝子から翻訳されるタンパク質の一部が主要組織適合抗原 (MHC) クラス I 分子上に 8~11 アミノ酸からなるペプチド断片として発現される。このペプチドをエピトープと呼ぶ。ヒトの MHC クラス I 分子はヒト白血球抗原 (HLA) と呼ばれ、それぞれ多型性のある HLA-A、HLA-B、そして HLA-C 分子として細胞表面に発現している。HIV-1 のエピトープは、HLA-A、HLA-B、あるいは HLA-C 分子上に結合した状態で発現する。以下この複合体をペプチド-HLA 複合体 (pHLA) と呼ぶ。細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) は T 細胞受容体 (TCR) を介して pHLA を認識し、細胞傷害性を発揮する。この CTL の細胞傷害性によりウイルスを産生する HIV-1 感染細胞を除去することが、血中ウイルス量のコントロールに深く関与している。

20 年を超える過去の研究から HIV-1 における多数の CTL エピトープが同定された。膨大な数の HIV-1 エピトープが報告されているが HIV-1 感染者において必ずしも全てのエピトープに対する反応が見られるわけではない。その原因の一つとして多様性に富んだ変異の影響が考えられる。HIV-1 は複製の過程でゲノム上に頻繁に変異を生ずるが、その一部が CTL からの細胞傷害性を直接・間接的に回避する方向に選択されていく (Arien et al., 2007, Nat Rev Microbiol; Brumme et al.,

2009, PLoS One)。そこで HIV-1 ゲノムに生じた変異がある特定のアミノ酸を置換することでその周辺のエピトープ性質が大きく変化する可能性が考えられる。過去の研究報告のほとんどは CTL エスケープ変異によるエピトープの消滅に関するものであった。だが慢性持続感染期において長い期間活発な CTL 機能とウイルス量がつりあっていることからエピトープ機能の出現をも含めた複雑なメカニズムが予想される。エピトープ特異的免疫応答とウイルス変異に対する詳しい研究が必要とされている。

## 材料と方法

本研究では、日本人の約 60%が発現する MHC クラス I 分子である HLA-A24 を発現する HIV-1 感染者 46 人を対象に HIV-1 の HLA-A24 拘束性 CTL エピトープに特異的な免疫応答を調べた。各エピトープに対する特異的免疫応答は HIV-1 感染者の PBMC を用いた IFN- $\gamma$  ELISpot assay にて測定した。また、ウイルスの塩基配列を調べるために HIV-1 感染者の血漿から HIV-1 genomic RNA を抽出し、遺伝子解析を行った。エピトープペプチドの HLA に対する結合能は peptide-HLA binding assay を用いて調べた(Furutsuki et al., 2004, J Virol)。Nef126-10, Nef134-10 の抗原提示を解析するために、両エピトープを含むポリペプチドを発現する抗原 plasmid と HLA-A24 を発現する 293T 細胞、そして Nef126-10, Nef134-10 特異的 CTL クローンを作製した。次に HLA-A24 陽性 293T 細胞に抗原 plasmid を遺伝子導入して抗原提示細胞とし、エピトープ特異的 CTL クローンと共培養後 ELISA にて上清中の IFN- $\gamma$  量を測定した。各エピトープに対する functional avidity は段階希釈したエピトープペプチドを用いて IFN- $\gamma$  ELISpot assay を行うことで算出した。

## 結果 1

最初に、HIV immunology database に報告されている HLA-A24 拘束性 CTL エピトープ 11 種類について解析を行った。IFN- $\gamma$  ELISpot Assay の結果、Nef タンパク質由来のエピトープ Nef126-10、Nef134-10 に対して 46 人の感染者中それぞれ 50.0%、80.4%で免疫応答がみられた。Nef126-10、Nef134-10 に対する免疫応答と HIV-1 のエピトープ近傍のアミノ酸配列との関係を調べた結果、Nef126-10 に対する反応性と Nef 配列内 135 番目アミノ酸の tyrosine (Y)から phenylalanine (F)への変異(Y135F)の間に強い関連性がみられた。この関係を明らかにするために Peptide-HLA binding assay を行ったところ、Y135F により Nef126-10 と HLA-A24 との結合力が大きく向上した事が確認された。続いて、ポリペプチドを細胞内から発現することにより、変異の有無でエピトープ特異的 CTL クローンの pHLA 認識がどのように変わるかを確認した。Nef134-10 において、野生型配列と変異型配列ポリペプチドを細胞内から発現させた時、CTL クローンによって野生型配列エピトープが認識されたものの変異型配列エピトープは認識されなかった。一方で、Nef126-10 においては、変異型配列は CTL クローンによって認識されたが、野生型配列は認識されなかった。最後に、野生型塩基配列から変異型に変化が確認された一人の患者において、エピトープ特異的

免疫応答がどのように変化するかを経時的に調べることで、感染者体内でこの現象が起きているかを確認した。その結果、野生型塩基配列の時に確認できなかった Nef126-10 特異的免疫応答が Y135F の出現後に誘導されていることが確認できた。

## 結果 2

今回の解析に用いた 46 人の患者の塩基配列情報において、Y135F が見られた 35 人のうち 25 人から、Nef 配列内 133 番目アミノ酸 isoleucine (I) から threonine (T) への変異 (I133T) が観察された。I133T と Y135F との強い関連性がみられたことから、Nef126-10/Nef134-10 への影響が考えられたが、HLA への結合、CTL による認識では違いを示さなかった。よって I133T 出現のメカニズムを明らかにするために次の実験を行った。まず、海外の急性感染者 cohort の経時的な塩基配列解析データから Y135F と I133T が HLA-A24 陽性患者集団の中でどのような頻度で起こっているかを調べた。Kaplan-Meier plot 結果から、I133T は Y135F と同等に比較的早期に現れる変異であることが分かった。続いて、I133T/Y135F 変異型ウイルスを持つ患者集団において *ex vivo* IFN- $\gamma$  ELISpot assay による Nef126-10(8I10F) と Nef126-10(8T10F) に対する免疫応答の強さとウイルス量との相関を調べたところ、Nef126-10(8I10F) 特異的免疫応答の強さとウイルス量との間で有意な逆相関の関係が認められた。一方、Nef126-10(8T10F) 特異的免疫応答はウイルス量と相関を示さなかった。さらに Nef126-10(8I10F) や Nef126-10(8T10F) と HLA-A24 複合体の結晶構造解析をすることでエピトープの構造の違いを調べた。結晶構造からは、8 番目の isoleucine 又は threonine は TCR の方向を向いていて TCR との結合に影響を及ぼしている可能性が示唆された。また、Y135F 単独の変異型アミノ酸配列を示す患者集団と I133T/Y135F 変異型配列を示す患者集団が Nef126-10(8I10F) と Nef126-10(8T10F) に対してどのような応答を示すかについて *ex vivo* IFN- $\gamma$  ELISpot assay により調べたところ、Y135F 単独の患者集団では Nef126-10(8T10F) 特異的な免疫応答が全く見られなかったことから、I133T は Nef126-10 エピトープにおいて異なる CTL サブセットを誘導するエスケープ変異である可能性が示唆された。最後に両エピトープの機能性の違いを確認するために I133T/Y135F 変異型ウイルスを持つ患者集団において Nef126-10(8I10F) と Nef126-10(8T10F) 特異的な CTL 集団の functional avidity を比較した結果、Nef126-10(8I10F) 特異的 CTL 集団は Nef126-10(8T10F) 特異的 CTL 集団より有意に高い functional avidity を持っていることが明らかになった。

## 考察と展望

HLA-A24 陽性患者において、Nef134-10 特異的免疫応答により出現した Y135F によって、新たなエピトープとして Nef126-10 が出現したことが証明された。Nef126-10 において、Y135F は HLA-A24 との結合に重要な C 末端アンカーを変える変異であり、変異後 Nef126-10 の HLA-A24 への結合力を大きく向上させてエピトープ特異的 CTL を誘導した。Y135F によって誘導された Nef126-10(8I10F) 特異的 CTL はエピトープ特異的免疫応答の強さとウイルス量との間に逆相関の関係を示していたことから、ウイルス抑制に寄与している可能性が考えられる。I133T は、エピトープペプチドと HLA 複合体の結晶構造解析結果から pHLA-TCR の結合を変化させる変異であることが示唆された。また、Y135F 単独の変異を持つ個人においては I133T 後の Nef126-10(8T10F)

を認識する CTL が存在しないことから、Nef126-10(8T10F)特異的 CTL は Nef126-10(8I10F)とは違う CTL サブセットであり、I133T 後に新しい TCR レパトリーを持つサブセットとして誘導されたことが示唆された。HIV-1 は慢性持続感染期において絶えない免疫応答と HIV-1 の複製がバランスと取り、多くの患者において長い期間にわたり安定したウイルス量を呈する。従来の研究では HIV-1 のエピトープ周辺アミノ酸変異によって CTL の選択圧からウイルスが逃れるメカニズムだけが報告されてきた。しかし過去に報告されたサルエイズモデルの研究で CTL が働かなくなった宿主においてはウイルスの複製能が飛躍的に上昇することが以前知られていることから (Jin et al., 1999, *J Exp Med*)、比較的安定に長期間にわたって HIV-1 の複製を抑えるメカニズムをエスケープ変異だけでは説明できない。今回の研究は HIV-1 が宿主との間で変異を繰り返しているうちに、本来存在しないエピトープが出現する事を発見しており、これによって誘導された CTL によってウイルスが抑制されている可能性も示唆された。これはまさに HIV-1 の慢性持続感染期において宿主の中で起きている宿主とウイルスとの攻防の一部を映し出しており、別の HLA、違う HIV-1 のゲノム上にも同じようなメカニズムでエピトープが出現、消滅を繰り返している可能性が十分考えられる。これはまた、従来の HIV-1 の CTL 誘導ワクチン開発において免疫原としてコンセンサスの配列だけを考えることの不十分さを認識できるきっかけとなるだろう。このような HIV-1 エスケープ変異による抗原提示の違いが、誘導される免疫に及ぼす影響を考えることで、今後 HIV-1 特異的 CTL 誘導ワクチン開発に寄与できることを期待する。

## 参考文献

- Arien, K. K., G. Vanham and E. J. Arts (2007). "Is HIV-1 evolving to a less virulent form in humans?" *Nat Rev Microbiol* **5**(2): 141-151.
- Brumme, Z. L., M. John, J. M. Carlson, C. J. Brumme, D. Chan, M. A. Brockman, L. C. Swenson, I. Tao, S. Szeto, P. Rosato, J. Sela, C. M. Kadie, N. Frahm, C. Brander, D. W. Haas, S. A. Riddler, R. Haubrich, B. D. Walker, P. R. Harrigan, D. Heckerman and S. Mallal (2009). "HLA-associated immune escape pathways in HIV-1 subtype B Gag, Pol and Nef proteins." *PLoS One* **4**(8): e6687.
- Furutsuki, T., N. Hosoya, A. Kawana-Tachikawa, M. Tomizawa, T. Odawara, M. Goto, Y. Kitamura, T. Nakamura, A. D. Kelleher, D. A. Cooper and A. Iwamoto (2004). "Frequent transmission of cytotoxic-T-lymphocyte escape mutants of human immunodeficiency virus type 1 in the highly HLA-A24-positive Japanese population." *J Virol* **78**(16): 8437-8445.
- Jin, X., D. E. Bauer, S. E. Tuttleton, S. Lewin, A. Gettie, J. Blanchard, C. E. Irwin, J. T. Safrit, J. Mittler, L. Weinberger, L. G. Kostrikis, L. Zhang, A. S. Perelson and D. D. Ho (1999). "Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques." *J Exp Med* **189**(6): 991-998.