

博士論文

論文題目

日本人 HIV-1 感染者における Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞の解析

氏名 齋藤 泉

目次

第1章	研究の背景と目的	3
第2章	材料と方法	7
第3章	結果	14
第4章	考察	21
第5章	謝辞	27
第6章	参考文献	28
図表		40

第 1 章 研究の背景と目的

後天性免疫不全症候群(AIDS)の原因となるヒト免疫不全ウイルス 1 型 Human Immunodeficiency type 1 (HIV-1) は、血液や粘膜からの感染後、急性期および慢性期を経て AIDS を発症する。HIV-1 は 1983 年に発見されてから 30 年以上経過している(1)。HIV-1 の臨床像として様々な問題があり、その一つとして HIV-1 感染者では様々な癌の発生のリスクが上昇するが、HPV (Human papillomavirus) 感染と子宮頸がんのような他のウイルス感染による癌の発症についてはよく知られている。特に婦人科領域において子宮頸がんでは前癌病変のリスクは HIV-1 感染者において非感染者の 5 倍となり、ハイリスク型の HPV-16 または 18 の感染が危険因子として挙げられている(2)。また抗 HIV-1 治療により HPV の消失や CIN (cervical intraepithelial neoplasia, 子宮頸部上皮内腫瘍) の退縮があると言われている(3)。さらに産科領域においては HIV-1 の母子感染が問題となる。その経路には主に経胎盤感染、産道感染、母乳感染などがあり、先進国での報告は激減しているものの、主に発展途上国では未だに年間約 33 万人の HIV-1 母子感染が起きている(4)。また、HIV-1 母子感染による早産、死産、低出生体重児のリスクの増加、胎児異常などの研究はこれまでに多くなされている(5)。妊娠中の抗 HIV 薬投与による予防により妊婦の母子感染に

において 95-98%の母子感染において効果が得られ、そのリスクが 5%以下に低減される(6-10)などの報告があり、HIV-1 感染症は性感染症や母子感染症として産婦人科領域でも様々な問題となっている。

現在抗レトロウイルス療法 (antiretroviral therapy, ART) により、HIV-1 の増殖を抑制することが出来るようになり、HIV-1 感染者の生命予後は改善されたが、HIV-1 を感染者の体内から完全に排除することは困難である。ART を開始した HIV-1 感染者は実質生涯治療を継続する必要があることになるが、高い内服率を守りながら長期間の内服を続けることは、患者の QOL の低下、経済的負担、副作用など様々な問題を惹起する。

HIV-1 感染は高ウイルス量を呈する急性感染期、その後比較的安定したウイルス量となる慢性感染期、そして免疫が破綻し高いウイルス量とともに日和見感染症を伴う AIDS 期という流れで経過する。これまでに様々な研究から慢性期の血中ウイルス量と病気の進行には関連があり、血中ウイルス量の低い患者は進行が遅くなることが分かっている(11-13)。HIV-1 感染では、感染直後から HIV-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞が強力に誘導され、ウイルス量のコントロールに非常に重要な役割を果たしていることが明らかとなっている(14-18)。試験管内で HIV-1 感染者由来の HIV-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞を HIV-1 感染細胞と共培養することでウイルス産生が抑制され(18)、抗 CD8 モノクローナル抗体投与前はウイ

ルスコントロールが良好であった SIV（サルエイズ）モデルにおいて、CD8 陽性 T 細胞を抗体で 99.9%減少させるとウイルス量の上昇が確認され(19)、このような個体で CD8 陽性 T 細胞が回復するとウイルスが再度抑制されることもわかっている(20)。

HIV-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞は HIV-1 感染細胞を認識して細胞傷害性を発揮する。HIV-1 の遺伝子として構造遺伝子である *gag, pol, env* および制御遺伝子 *tat, rev, nef, vif, vpr, vpu* がある（図 1 A）。HIV-1 感染ではこの 9 つすべてのウイルスタンパク質由来の抗原に対して CD8 陽性 T 細胞が誘導されるが、その中でも *gag, pol, nef* に多くの反応が見られる（図 1B）。また、これまでの研究によりすべての HIV-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞が抗ウイルス効果をもつのではなく、特定の HIV-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞のみウイルス量のコントロールに寄与することが分かった(21-23)。南アフリカで行われた研究では、Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞のみが血中ウイルス量の抑制に関与することが分かった(24)。

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はプロテアソームによるプロセッシングを受けペプチド断片として処理される。このペプチド断片のうち一部が主要組織適合抗原（major histocompatibility complex, MHC）クラス I 分子と結合して複合体を形成する。このペプチドをエピトープと呼ぶ。ヒトの MHC class I 分子はヒト白血球抗原（human

leukocyte antigen, HLA) と呼ばれる。

CD8 陽性 T 細胞 は T 細胞受容体 (T cell receptor, TCR) を介してペプチドを提示した HLA class I 分子を認識し、細胞傷害性を発揮する。CD8 陽性 T 細胞応答の抗原特異性は各個人がどの HLA class I 遺伝子型を持つかで規定されているが、HLA class I 遺伝子型は人種により大きく異なっており (図 2、25,26)、日本人においては Gag, Pol 特異的 CD8 陽性 T 細胞応答がウイルス量のコントロールに有効であり、12 種類のエピトープが HIV-1 のウイルス抑制に寄与するという報告があるが(27)、まだ研究は少ない。

今回私は日本人の検体を用い、日本人慢性期 HIV-1 感染者における Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞の反応と血中ウイルス量の関係、また Gag における血中ウイルス量のコントロールに関与する部位の特定について調べることを目的とした。

第 2 章 材料と方法

対象患者

2005 年 3 月から 2012 年 7 月までの間に、東京大学医科学研究所附属病院感染免疫内科を受診し HIV-1 感染している日本人の患者で、慢性期、未治療の患者 68 人を対象とした。68 人のうち男性 63 人、女性 5 人であった。

本研究では、初診より半年以上経過している患者より採血し、その血漿および末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) を使用した。サンプル採取時の 血中ウイルス量の中央値は 14000 コピー/ml (40 ~ 320000 コピー/ml)、CD4 陽性 T 細胞数の中央値は 385 個/ μ l (125 ~ 1290 個/ μ l) であった。血漿と PBMC を標準的な手技で分離し、使用直前まで血漿は-80°C、PBMC は-196°Cの液体窒素中にそれぞれ保存した。また、すべての患者は抗 HIV-1 治療薬の使用経験はなかった。本研究は、東京大学医科学研究所倫理審査委員会によって承認され (承認番号 20-47-210521, 20-31-1120)、すべての患者からインフォームド・コンセントが得られた。

HLA class I 遺伝子型の決定

QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN)を使用し、標準的な手技によってゲノム DNA を PBMC から抽出した。WAKFlow HLA typing kit (Wakunaga)と

Luminex Multi-Analyte Profiling system (Luminex Corporation)を使用して
HLA class I 遺伝子型の決定を行った。

培地

100 U/ml のペニシリンとストレプトマイシン、10%の不活性化した牛胎児
血清を含む RPMI 1640 (R10) (Wako)を使用した。

ペプチド

Gag 領域において主に 15 アミノ酸(12-17 アミノ酸)からなるペプチドを 10 ア
ミノ酸ずつオーバーラップさせながら、Gag タンパク質全長をカバーするよう
に合成されたオーバーラップペプチド(overlapping peptide: OLP、Sawady
Technology CO.,Ltd.)全 115 種を使用した。OLP は DMSO (ジメチルスルホキ
シド)にて 5mg/ml に調整し、使用するまで-80°Cで保存した。Matrix として各
OLP を 8 μ l ずつ加え、各 OLP の濃度が 200 μ g/ml となるように RPMI1640
を用いて 200 μ l にメスアップした。

IFN- γ ELISpot assay

PBMC は実験に使用する 6 時間前に R10 で解凍した。PVDF (polyvinyl-

difluoride) 膜を使用した 96 ウェルプレート (MAIPS4510; Millipore) に抗ヒト IFN- γ モノクローナル抗体 1-D1k (5 μ g/ml、Mabtech, PBS で希釈) を入れ、4 $^{\circ}$ C で 一晩静置した。抗原として上記 OLP を R10 で 終濃度 1 μ g/ml になるように希釈し、50 μ l ずつウェルに分注した。PBMC は 7.5~10 \times 10⁴ 個/50 μ l になるよう R10 で調整し OLP が入ったウェルに加えた。陰性対照として OLP が入っていないウェルに PBMC と R10 を分注した。陰性対照は 3 ウェル用意した。陽性対象は PHA を使用し 2 μ g/ml で使用した。

プレートを 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ の条件下で 16 ~ 18 時間インキュベーションし、0.01% tween-20 を添加した phosphate-buffered saline (PBST) で 6 回洗浄した。次にビオチン化した抗 IFN- γ モノクローナル抗体 7-B6-1 (1 μ g/ml、Mabtech) を加え、室温で 1 時間静置し、PBST で洗浄を行った。最後に streptavidin-alkaline phosphatase conjugate (1000 倍希釈、Mabtech) を加え、室温で 1 時間静置後 PBST を用いて洗浄した。Alkaline phosphatase-conjugated substrate (Bio-Rad) を使って 15 分間発色反応を行い、現れたスポットを KS ELISPOT compac (Carl Zeiss) で数えて、反応性 T 細胞数 (spot-forming units/10⁶ PBMC, SFU/10⁶ PBMC) を算出した。50 SFU/10⁶ PBMC 以上、陰性対照の平均 SFU/10⁶ PBMC の 3 倍以上、さらにネガティブコントロールの平均 SFU/10⁶ PBMC +3 \times 標準偏差以上のうち、最も高値をカットオフ値と

し、それ以上の場合、反応性 T 細胞ありと判断した (28)。

エピトープと HLA 拘束性情報の収集

本研究では、エピトープとして Los Alamos HIV molecular immunology database の中で "Best-defined CTL/CD8+ Epitope" として記載されている、HLA 拘束性と長さが同定されているものを採用した。

(http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/tables/optimal_ctl_summary.html)

血漿からのウイルス RNA 抽出

ウイルス RNA は血漿 140 μ l を用いて QIAamp viral RNA Mini kit (QIAGEN) を使用して抽出した。抽出されたウイルス RNA は 80 μ l の 0.04% アジ化ナトリウムを含む RNase フリー水に溶解し、RT-PCR で使用するまで -80°C で保存した。

RT-PCR

抽出された HIV RNA から相補鎖 DNA (c-DNA) を合成し HIV-1 gag 領域を増幅した。逆転写酵素として SuperScript III Reverse Transcriptase、DNA ポリ

メラーゼとして Platinum Taq DNA polymerase with High Fidelity を用いた one-step Superscript III RTplatinum TaqHiFi system (Invitrogen) を使用して、reverse transcription PCR (RT-PCR) を施行した。5 μ l のウイルス RNA、20 μ l の 2 \times reaction mix、200nM の forward と reverse の outer primer、0.8 μ l の enzyme mix と、蒸留水でそれぞれ 40 μ l の反応混合物を作成した。RT-PCR の primer は、標準的な HIV-1 実験株である HXB2 (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/REVIEWS/HXB2.htm>) の配列に準じて作成した。Forward primer として AAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAG (HXB2: 623-649)、Reverse primer として TAACCCTGCGGGATGTGGTATTCC (同 2849-2826) を使用した。50 $^{\circ}$ C 30 分にて逆転写反応を行った後、94 $^{\circ}$ C 2 分後、94 $^{\circ}$ C 15 秒、56 $^{\circ}$ C 30 秒、68 $^{\circ}$ C 2 分を 35 cycle にて PCR を行った。Second-round PCR は、Takara Ex Taq Hot Start Version (Takara Bio Inc) を用いて施行した。RT-PCR から得られた 2 μ l の PCR 産物を使用して反応混合物を作成した。Second-round PCR の primer のシーケンスは、Forward primer として GCGGCGACTGGTGAGTACGCC (同 734-754)、Reverse primer として TCCTTTAGTTGCCCCCCTATC (同 2314-2294) を使用した。PCR の条件は、94 $^{\circ}$ C 2 分後、94 $^{\circ}$ C 30 秒、60 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 2 分を 35 cycle し、最後に 68 $^{\circ}$ C 10 分とした。PCR で増幅した産物は、アガロー

スゲル電気泳動にて確認し、増幅が確認できたものは Qiaquick PCR purification kit (QIAGEN)を使用して精製した。

塩基配列決定

ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を使用してシーケンス解析を行い、Applied Biosystems 3130xl genetic analyzer で解析を行い、塩基配列を得た。得られた塩基配列をアミノ酸に翻訳した。Los Alamos National Laboratory (LANL) 内のツール Consensus Maker (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/CONSENSUS/consensus.html>) を利用して、consensus 配列を作成した。

統計解析

実験データは GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA)を用いて統計解析を行った。反応部位数とウイルス量、CD4数の関連は2群間の比較には Mann-Whitney U 検定、多群間比較にはKruskal-Wallis検定を用いて評価した。反応性T細胞数の総和とウイルス量及びCD4数の関連はSpearman's correlation 解析を用いて評価した、各OLPの反応者の数とウイルス量の関連

についてはMann-Whitney U 検定を用いて評価した。有意差は $P < 0.05$ とした。

第3章 結果

本研究で用いた HIV-1 感染者の HLA class I 遺伝子型の解析

本研究で対象とした 68 人の HIV-1 感染者の HLA class I 遺伝子型を決定し、報告されている日本人の 4 桁レベルの HLA class I 遺伝子頻度と比較した(28) (図 3)。本実験で用いた患者では日本人全体と比較し大きく偏りが無い集団であることが明らかとなった。

Gag 特異的 T 細胞応答標的部位の決定

Gag 特異的 T 細胞応答の検出は IFN- γ ELISpot-assay にて行った。抗原として Gag 領域全体をカバーする全 115 種類の 15 アミノ酸からなる overlapping peptide(OLP)を使用した。限られた臨床材料を用いて Gag 特異的 T 細胞応答を網羅的に解析するため、OLP を用いて図 4 の通り matrix を作成した。まず、pool-A として Gag-1,-12,23,34,45,56,67,78,89,100,111 の 11 種のペプチドを混注、一方 pool-1 には 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11 の 11 種のペプチドを混注し、同様に 22 種類の OLP-pool を作成し、それぞれの OLP pool に対する T 細胞反応の有無を調べた。

この Matrix を使った Gag 特異的 T 細胞の標的部位の決定法について、以下に説明する。例えばある感染者で pool-F と pool-r に反応が見られた場合 (図

5A)、その両方の pool に含まれる Gag-72 に対する T 細胞応答であると決定することができる(図 5B)。実際に Gag-72 を用いて ELISpot assay を行ったところ、IFN- γ 産生細胞が検出された (図 5C)。

また、図 6A のように pool-B,C,I,J,K、pool-l,p,r,v に反応が見られた場合は、反応の見られた全ての pool の交差する OLP、Gag-2,3,9,10,11,46,47,53,54,55,68,69,75,76,77,112,113 の 20 種類が、反応性 OLP 候補となる(図 6B)。さらに候補となった各 OLP を抗原として ELISpot assay を行ったところ、図 6C のように、Gag-9,10,46,47,77,113 の 6 種類の OLP で IFN- γ 産生細胞が見られた。このように Matrix を用いて解析を行うことにより、全 115 種類の OLP に対する反応全てを検討するのに比べ、少量の臨床材料で Gag に存在する T 細胞反応の反応部位を決定し、各感染者において、T 細胞反応の反応部位数と、 10^6 PBMC 中の Gag 特異的反応性 T 細胞数 (IFN- γ 産生細胞数) を算出することが可能となった。隣り合う OLP で反応が見られる例が多く存在していたが、OLP は 10 アミノ酸ずつオーバーラップしているため、同一のエピトープに対する反応であると考え、1 つの標的部位としてカウントし、以降の解析を行った。

日本人 HIV-1 感染者における Gag 特異的 T 細胞反応

68人の HIV-1 慢性感染者に対し、Matrix を用いて Gag 特異的 T 細胞応答について解析を行った。その結果、各感染者において反応の見られた OLP の種類（反応部位数）は中央値で 1 種類（range 0-5）であり、各 OLP に対する IFN- γ 産生細胞数（反応性 T 細胞数）は、中央値 770 SFC/10⁶ PBMC（range 0-6600 SFC/10⁶ PBMC）であった。各 OLP に対して T 細胞反応の見られた人数（反応者数）と、反応性 T 細胞数を図 7 に示す。Gag の中でも p24 領域に多く応答が見られることが分かった。

Gag 特異的 T 細胞反応と血中ウイルス量(VL)、CD4 数の関連

日本人 HIV-1 感染者における Gag 特異的 T 細胞応答のウイルス抑制への寄与を調べるため、各感染者における反応部位数、反応性 T 細胞数と、HIV 感染症の病態を表す指標である血中ウイルス量 (VL)、CD4 数との関連を調べた。その結果、反応部位数によって VL に有意差が見られ、反応部位数が多い感染者ほどウイルス量が有意に低かった(図 8A)。一方、反応部位数と CD4 数とについても同様の解析を行ったが、有意な違いは見られなかった(図 8B)。次に各 OLP に対する反応性 T 細胞数の総和と VL、CD4 数の関連を調べたところ、いずれも関連は見られなかった(図 9)。これらの結果より、ウイルス量のコン

トロールには Gag 特異的 T 細胞の反応部位の数が重要であることが示唆された。

各 HIV-1 感染者における反応部位とエピトープ、HLA 拘束性の検討

T 細胞の抗原認識は HLA 拘束性であり、HIV-1 については欧米、アフリカコホートを中心とした研究により、多くの T 細胞エピトープが報告され、それらの HLA 拘束性も明らかとなっている (Los Alamos HIV molecular immunology database 2014 (<http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/pdf/2014/immuno2014.pdf>)) (図 1 B)。しかしながら、人種間で HLA 分布は大きく異なるため、私は日本人集団における各 OLP に対する T 細胞反応について、HLA class I 遺伝子型との関連について検討した。各 HIV-1 感染者において T 細胞反応が見られた OLP について、HLA class I 遺伝子型との関連について調べた。3 人以上で T 細胞反応が見られた 10 ヶ所の OLP について、反応者の HLA class I 遺伝子型を調べた。方法で述べた通り、隣り合う OLP について反応が見られた場合は同一のエピトープに対する反応である可能性が高いため、1 領域として検討した。図 10 に反応者の HLA class I 遺伝子型と、各 OLP のアミノ酸配列、database に報告のあるエピトープとその HLA 拘束性、それぞれの反応性 T 細胞数を示す。多くの場

合、これまでに報告されたエピトープの HLA 拘束性と同一の遺伝子型、あるいは血清型を共有する HLA class I 遺伝子型を有していたが、報告のあるエピトープを拘束する HLA class I 遺伝子型をいずれも有していない場合も見られ、まだ明らかとなっていないエピトープが存在していることが示唆された。

各 OLP に対する T 細胞反応とウイルス量(VL)、CD4 数の関連

次に、各 OLP における反応者と非反応者でウイルス量に違いがあるかを検討した (図 11)。3 人以上反応があった 10 か所について検討した結果、OLP-38/39 において反応者で有意にウイルス量が低いことがわかった (反応者 VL 中央値 3.04 コピー/ml vs 非反応者 VL 中央値 4.30 コピー/ml, p value = 0.0002)。同様に CD4 数についても検討を行ったところ、どのエピトープでも差はなかった。本結果から、OLP38/39 に対する T 細胞反応がウイルス抑制効果を有することが示唆された。

日本人 HIV-1 感染者における gag 領域の遺伝子解析

HIV-1 は非常に変異を起こしやすいウイルスであるため、T 細胞による選択圧から逃れたエスケープウイルスが容易に出現することが知られている。そこで、私は、日本人において特徴的なウイルスの変異が見られるか検討するため、

T細胞反応を解析した HIV-1 感染者 68 名の HIV gag 領域の遺伝子解析を行い、アミノ酸配列を決定した。さらに、日本で流行している HIV-1 の特徴を捉えるため、私が解析を行った 68 名のアミノ酸配列より gag 全体の consensus 配列を作成し、”cons-JNP”とし、標準的な実験株である HXB2、database 上の subtype B の consensus 配列 (cons-B) と比較した (図 12)。cons B と cons-JPN はほとんどのアミノ酸が一致していたが、5カ所でアミノ酸が異なっていた。特に今回の研究で複数人反応の見られた 10 か所の OLP の中で 68 人中 7 人に反応の見られた OLP-7/8 に属する 30 番目のアミノ酸のリシン(K)からアルギニン(R)への置換は HLA*A:24 拘束性エピトープからのエスケープ変異であり (56)、68 人中 8 人に反応の見られた OLP-50/51 に属する 219 番目のアミノ酸のヒスチジン(H)からグルタミン(Q)への置換は A*24:02、B*52:01、C*12:02 を持つ患者に見られており、いずれも多人種に比べて日本人に多い HLA class I 遺伝子型であることから、日本人集団において特徴的に見られる変異の可能性を示唆している。

次に 3 人以上反応のあった各 OLP について全患者において各アミノ酸ごとに cons-B と一致した割合を検討した(図 13)。いずれの部位も高度に保存されていたが、中でも OLP-38/39、OLP-46/47、OLP-68/69、OLP-78/79 はほぼ 100%保存されており、変異許容性の低い場所であることが示唆された。続いて、T 細胞

反応により生じた変異について検討するため、T 細胞反応が見られた感染者のみに限定して OLP 全体が cons-B と一致した割合を示した(図 14)。OLP38/39、46/47、100 において反応者の 80%以上で cons-B とアミノ酸配列が完全に一致していた。特に、OLP38/39, 46/47 は多くの感染者で、強い T 細胞反応が見られているにもかかわらず(図 10 B, C)、アミノ酸配列が高度に保存されていたことから、これらの OLP 内に存在するエピトープに対する T 細胞反応からのエスケープ変異は非常に生じにくいことが示唆された。

第4章 考察

今回私は 68 人の PBMC を用い、日本人 HIV-1 感染者における Gag 特異的 T 細胞について解析した。今回の 68 人の HLA class I 遺伝子型はこれまで報告のあった日本人と大きく異なっておらず、偏りのない集団であったと考える。また、初診より半年間経過して無治療でみている患者群を対象としているが、これは急性期症状が完全に消失しウイルス量が確実にセットポイントに達している期間とした。現在の治療開始のガイドライン(<http://www.haart-support.jp/pdf/guideline2015.pdf>)に基づき、検体を採取した時期と治療開始基準を考慮したが、血中ウイルス量や CD4 陽性 T 細胞数においても特に良好にコントロールされている群などの偏りはなかったと考える。

Gag 全体をカバーする OLP を用いて日本人慢性期の HIV-1 感染者の Gag 特異的 T 細胞応答を網羅的に解析した。Matrix を用いることで 10ml 程度の血液由来の PBMC で解析可能であった。IFN- γ 産生細胞は活性化 T リンパ球および NK 細胞が産生するが、所属研究室の先行研究において、同じ Gag OLP を用いて CD8 陽性 T 細胞を除去した PBMC で同様の検討を行ったところ、ほとんど IFN- γ 産生細胞が見られなかったため、今回見られた反応も CD8 陽性 T 細胞由来のものと考えられる。

Gag 特異的 T 細胞の反応部位数とウイルス量は関連しており、反応性 T 細胞数は関連がなかった。過去の研究では反応性 T 細胞の数に関しては数が多い方がウイルス量がコントロールされている、一方で関連がないとの報告もあり、議論の余地の残る結果となっているが(29-32)、本研究ではウイルス量のコントロールには反応性 T 細胞の数ではなく反応部位数が重要であるという結果が得られた。これはより多くの部位を T 細胞応答の標的とすることで、ある一つのエピトープが変異してもその他のエピトープに対する応答でウイルス量が抑制できるためではないかと考える。

また、今回の 68 人の日本人集団においては Los Alamos HIV molecular immunology database において OLP 内に拘束性エピトープが報告されている defined epitope の HLA 拘束性と同一の遺伝子型、あるいは血清型を共有する HLA class I 遺伝子型を有していた。しかし、一部には報告のないものがあり、まだこれまでに判明していないエピトープが存在することを示している。

私は、ウイルス側の遺伝子解析も行い、今回対象とした日本人 HIV-1 感染者での consensus 配列を決定した。世界中の subtype B の配列をもとに作成された cons-B と比較して、5 か所異なるアミノ酸を明らかにした。5 か所のうち 3 か所は今回の研究で反応が見られず、2 か所には反応が見られた。そのうち OLP-7/8 に属する 30 番目のアミノ酸は既報の A*24:02 拘束性エピトープの中

にある

(<http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/pdf/2014/immuno2014.pdf>)。

A*24:02 は 6 割の日本人が持ち、リジン(K)からアルギニン(R)への置換へのエスケープ変異が見られる(33)。OLP-50/51 に属する 219 番目のアミノ酸のヒスチジン(H)からグルタミン(Q)への置換に関しては、OLP-50/51 に反応のあった感染者の HLA class I 遺伝子型を確認したところ 8 人中 4 人で A*24:02-B*52:01-C*12:02 を共通して有する。A*24:02-B*52:01-C*12:02 は日本人で最も多いハプロタイプであり、A*24:02, B*52:01, C*12:02 に加えて反応者で見られる B*40, C*14 もアフリカ系アメリカ人、白人種に比べて日本人で頻度が高い HLA class I 遺伝子型である。これらの HLA class I 遺伝子型のいずれかに拘束性のエピトープがあり、そのエピトープに対する選択圧の結果、ヒスチジン(H)ではなくグルタミン(Q)が選択されている可能性がある。日本人集団において Gag 特異的 T 細胞応答からのエスケープ変異が蓄積している可能性が考えられ、感染者の遺伝的背景に HIV-1 が適応していると考えられる。HIV-1 進化の最も強い推進力は CD8 陽性 T 細胞からのエスケープ変異(34)である。エスケープ変異しても変異ウイルスの複製能が十分に回復せず病原性が低下するとの報告もあるが(35,36)、エスケープ変異が流行することで CD8 陽性 T 細胞反応から逃れ病原性が上昇するとの報告もある(37)。変異したウイルスの増

増殖能が野生型と比べ同等以上である場合は、同じ HLA class I 遺伝子型を持たない新たな宿主に感染した場合変異ウイルスが増殖する。変異したウイルスが野生型と比べ増殖能が低い場合は、同じ HLA class I 遺伝子型を持たない宿主に感染した時に特異的 CD8 陽性 T 細胞が誘導されず、わずかに存在する野生型が増殖する。このように体内で CD8 陽性 T 細胞によって選択された変異ウイルスは感染を繰り返すことで集団内に蓄積されることが考えられる。日本人のように遺伝的背景が狭い集団では病原性変化速度が早い可能性がある。

今回の結果では OLP-38/39 特異的 CD8 陽性 T 細胞の反応者にのみ有意にウイルス量の低下が見られた。OLP-38/39 はカプシドを構成する蛋白質 p24 に存在する。ウイルス量の良好なコントロールに寄与していると考えられる HLA-B*27 や HLA-B*57/5801 拘束性のエピトープに対する CD8 陽性 T 細胞も p24 に強い反応を示す。これらの CD8 陽性 T 細胞が標的とした部位はカプシドの複合体構造形成や、感染細胞における HIV-1 の複製に必要と考えられているサイクロフィリン A との結合などウイルス複製に極めて重要である(36,38 図 15)。

OLP-38/39 も HIV-1 に対する CD8 陽性 T 細胞反応の中で、HIV-1 の複製上重要な役割を担う部位を標的としており、非常に強い淘汰圧として働いている可能性がある。これまでに日本人検体を用いた実験で Murakoshi らは 13 種類のエピトープと血中ウイルス量の抑制が関連するとの報告をしている(27)が、この

うち Gag EM11 は OLP-38/39 と一部一致しており、同部位が高度に保存されていることもわかっている。これらの結果からも同部位が日本人においてウイルス量のコントロールに寄与すると考えられる。

また、それぞれの患者のシーケンスに基づいて OLP を合成して抗原とすると、その瞬間に患者の中に存在するウイルスに対する反応性 T 細胞を定量することができるが、それは多数の患者に対して行うのが困難であり、今回は subtype B に基づいた配列を用いた。今後はエピトープと HLA 拘束性を決定して、optimal エピトープを明確にしてから再現すればさらに有意義なものとなると考える。

さらに、本研究においては OLP-38/39 は変異性が低く淘汰圧として重要であると考えたが、同様に変異率が低い OLP46/47 ではウイルス量は有意な減少が認められなかった。今回はウイルス側の要因であるシーケンス解析を行ったが、CD8 陽性 T 細胞側の要因としてエピトープの発現量や発現するまでの時間などを検討することにより、さらに OLP-38/39 がウイルス量のコントロールに寄与する要因について明確にできると考える。

今回私の研究では HIV-1 感染日本人集団における Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞の解析を行い、ウイルス量のコントロールに関わる標的部位を特定した。HIV-1 は極めて高い変異性を利用して CD8 陽性 T 細胞から逃避するが、今回の研究で

明らかとなった領域を選択しウイルス複製を制御することが可能になることも考えられる。また、産婦人科領域において、母子感染予防における妊娠中の ART は重要であるが、使用する抗レトロウイルス薬の数が増えるほど未熟児発生率が上昇することが示されている(40)。HIV-1 ワクチンが開発されることでそれらのリスクを回避でき、母子感染予防においても大きな意味を持つと考える。ウイルス量コントロールが可能となる領域に対する CD8 陽性 T 細胞反応を誘導することで、日本人における HIV-1 ワクチンの開発の一助となることを期待する。

第5章 謝辞

本研究のために多大な知識を与えて下さり、実験操作など親切にご指導して下さい、東京大学医科学研究所先端医療研究センター感染症分野准教授（現国立感染症研究所エイズ研究センター）立川愛博士に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、価値ある助言して下さい、東京大学医学部産婦人科、藤井知行教授、大須賀穰教授、川名敬准教授、国立国際医療センター婦人科医長矢野哲先生に深く感謝いたします。

最後に研究を進めるにあたって、いろいろとお世話になりました。東京大学医学部産婦人科、永松健先生、足立克之先生、富尾賢介先生、江口聡子先生、山下亜紀先生に深く感謝いたします。

第 6 章 参考文献

1. Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220:868-871.1983
2. Ellerbrock TV, Chiasson MA, Bush TJ, Sun XW, Sawo D, Brudney K, Wright TC Jr. Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women. *JAMA*. 23;283(8):1031-7.2000
3. Hidalgo-Tenorio, Rivero-Rodriguez, Gil-Anguita, Lopez De Hierro, Palma, Ramírez-Taboada, Esquivias, López-Ruz, Javier-Martínez, Pasquau-Liaño . Antiretroviral therapy as a factor protective against anal dysplasia in HIV-infected males who have sex with males. *PLoS One*. Mar 27;9(3) 2014
4. UNAIDS. Report on the global AIDS epidemic. 2012. Geneva.
5. Remington JS, Mcleod R, Thulliez P, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO. Infectious diseases in the fetus and

newborn infant. 5th edition, WB Saunders Company, Philadelphia, p. 205-346, 2001

6. Cooper ER, Charurat M, Mofenson L, Hanson IC, Pitt J, Diaz C, Hayani K, Handelsman E, Smeriglio V, Hoff R, Blattner W; Women and Infants' Transmission Study Group. Combination antiretroviral strategies for the treatment of pregnant HIV-1-infected women and prevention of perinatal HIV-1 transmission. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 29(5):484–94. 2002
7. Dao H, Mofenson LM, Ekpini R, Gilks CF, Barnhart M, Bolu O. International recommendations on antiretroviral drugs for treatment of HIV-infected women and prevention of mother-to-child HIV transmission in resource-limited settings: 2006 update. *American journal of obstetrics and gynecology*. 197(3 Suppl):S42–55. 2007
8. Dorenbaum A, Cunningham CK, Gelber RD, Culnane M, Mofenson L, Britto P, Rekacewicz C, Newell ML, Delfracis JF, Cunningham-Schrader B, Mirochnick M, Sullivan JL; International PACTG 316 Team. Two-dose intrapartum/newborn nevirapine and standard

- antiretroviral therapy to reduce perinatal HIV transmission: a randomized trial. *Jama*. 288(2):189–98. 2002
9. Jamieson DJ, Clark J, Kourtis AP, Taylor AW, Lampe MA, Fowler MG, Mofenson LM. Recommendations for human immunodeficiency virus screening, prophylaxis, and treatment for pregnant women in the United States. *American journal of obstetrics and gynecology*. 197(3 Suppl):S26–3. 2007
 10. Jaspan HB, Garry RF. Preventing neonatal HIV: a review. *Current HIV research*. 1(3):321–7.2003
 11. Mellors JW, Rinaldo CR, Jr., Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 272: 1167-1170.1996
 12. Lyles RH, Munoz A, Yamashita TE, Bazmi H, Detels R, Rinaldo CR, Margolick JB, Phair JP, Mellors JW. Natural history of human immunodeficiency virus type 1 viremia after seroconversion and proximal to AIDS in a large cohort of homosexual men. Multicenter AIDS Cohort Study. *J Infect Dis* 181: 872-880.2000

13. Mellors JW, Margolick JB, Phair JP, Rinaldo CR, Detels R, Jacobson LP, Muñoz A. Prognostic value of HIV-1 RNA, CD4 cell count, and CD4 Cell count slope for progression to AIDS and death in untreated HIV-1 infection. *JAMA* 297: 2349-2350.2007
14. Borrow, P., H. Lewicki, B. H. Hahn, G. M. Shaw, and M. B. Oldstone. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 68:6103-6110.1994
15. Koup, R. A., J. T. Safrit, Y. Cao, C. A. Andrews, G. McLeod, W. Borkowsky, C. Farthing, and D. D. Ho. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* 68:4650-4655.1994
16. Matano, T., R. Shibata, C. Siemon, M. Connors, H. C. Lane, and M. A. Martin. Administration of an anti-CD8 monoclonal antibody interferes with the clearance of chimeric simian/human immunodeficiency virus during primary infections of rhesus macaques. *J Virol* 72:164-169.1998

17. Goulder, P. J., and D. I. Watkins. Impact of MHC class I diversity on immune control of immunodeficiency virus replication. *Nat Rev Immunol* 8:619-630.2008
18. Walker CM, Moody DJ, Stites DP, Levy JA. CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication. *Science* 234: 1563-1566.1986
19. Schmitz, J. E., M. J. Kuroda, S. Santra, V. G. Sasseville, M. A. Simon, M. A. Lifton, P. Racz, K. Tenner-Racz, M. Dalesandro, B. J. Scallon, J. Ghrayeb, M. A. Forman, D. C. Montefiori, E. P. Rieber, N. L. Letvin, and K. A. Reimann. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science* 283:857-860.1999
20. Jin X, Bauer DE, Tuttleton SE, Lewin S, Gettie A, Blanchard J, Irwin CE, Safrit JT, Mittler J, Weinberger L, Kostrikis LG, Zhang L, Perelson AS, Ho DD. Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Exp Med* 189: 991-998.1999

21. A. J. McMichael and Rowland-Jones SL . Cellular immune responses to HIV. *Nature* :410, 980.2001
22. S.G. Deeks and B. D. Walker, Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity* , 27, 406.2007
23. P. K. Kiepiela, Kholiswa Ngumbela , Christina Thobakgale , Dhanwanthie Ramduth , Isobella Honeyborne , Eshia Moodley , Shabashini Reddy , Chantal de Pierres , Zenele Mncube , Nompumelelo Mkhwanazi , Karen Bishop , Mary van der Stok , Kriebashnie Nair , Nasreen Khan , Hayley Crawford , Rebecca Payne , Alasdair Leslie , Julia Prado , Andrew Prendergast , John Frater , Noel McCarthy , Christian Brander , Gerald H Learn , David Nickle , Christine Rousseau , Hoosen Coovadia , James I Mullins , David Heckerman , Bruce D Walker & Philip Goulder. CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat. Med.* 13, 46.2007
24. Photini Kiepiela, Kholiswa Ngumbela, Christina Thobakgale, Dhanwanthie Ramduth, Isobella Honeyborne, Eshia Moodley,

Shabashini Reddy, Chantal de Pierres, Zenele Mncube,
Nompumelelo Mkhwanazi, Karen Bishop, Mary van der Stok,
Kriebashnie Nair, Nasreen Khan, Hayley Crawford, Rebecca Payne,
Alasdair Leslie, Julia Prado, Andrew Prendergast, John Frater, Noel
McCarthy, Christian Brander, Gerald H Learn, David Nickle,
Christine Rousseau, Hoosen Coovadia, James I Mullins, David
Heckerman, Bruce D Walker & Philip Goulder. CD8+ T-cell
responses to different HIV proteins have discordant associations
with viral load. *Nature Medicine* 13:46 – 53.2007

25. Yoshiki Itoh, Nobuhisa Mizuki, Tsuyako Shimada, Fumihiro Azuma,
Mitsuo Itakura, Koichi Kashiwase, Eri Kikkawa, Jerzy K. Kulski,
Masahiro Satake and F. Azuma High-throughput DNA typing of
HLA-A, -B, -C, and -DRB1 loci by a PCR-SSOP-Luminex method in
the Japanese population. *Immunogenetics* :57 ;717-729.2005
26. Kai Cao, Jill Hollenbach, Xuejiang Shia, Wenxia Shia, Michael
Chopeka, Marcelo A Fernández-Viña. Analysis of the frequencies of
HLA-A, B, and C alleles and haplotypes in the five major ethnic
groups of the United States reveals high levels of diversity in these

loci and contrasting distribution patterns in these populations.

Human Immunology : 62:1009-1030.2001

27. Murakoshi H, Akahoshi T, Koyanagi M, Chikata T, Naruto T, Maruyama R, Tamura Y, Ishizuka N, Gatanaga H, Oka S, Takiguchi M. Clinical Control of HIV-1 by Cytotoxic T Cells Specific for Multiple Conserved Epitopes. J Virol. May;89(10):5330-9. 2015
28. Streeck H1, Frahm N, Walker BD. The role of IFN-gamma Elispot assay in HIV vaccine research. Nat Protoc. 4(4):461-9.2009
29. 中島 文明, 中村 淳子, 横田 敏和 日本人の4桁レベルのHLAハプロタイプ分布 MHC: Major Histocompatibility Complex. 8. 1-32. 2001
30. Crawford, H., J. G. Prado, A. Leslie, S. Hue, I. Honeyborne, S. Reddy, M. van der Stok, Z. Mncube, C. Brander, C. Rousseau, J. I. Mullins, R. Kaslow, P. Goepfert, S. Allen, E. Hunter, J. Mulenga, P. Kiepiela, B. D. Walker, and P. J. Goulder. Compensatory mutation partially restores fitness and delays reversion of escape mutation within the immunodominant HLA-B*5703-restricted Gag epitope in chronic human immunodeficiency virus type 1 infection. J Virol 81:8346-8351.2007

31. Boutwell, C. L., C. F. Rowley, and M. Essex. Reduced viral replication capacity of human immunodeficiency virus type 1 subtype C caused by cytotoxic-T-lymphocyte escape mutations in HLA-B57 epitopes of capsid protein. *J Virol* 83:2460-2468.2009
32. Edwards BH, Bansal A, Sabbaj S, Bakari J, Mulligan MJ, Goepfert PA. Magnitude of functional CD8⁺ T-cell responses to the gag protein of human immunodeficiency virus type 1 correlates inversely with viral load in plasma. *J Virol* 76:2298 –2305. 2002
33. Zuñiga R, Lucchetti A, Galvan P, Sanchez S, Sanchez C, Hernandez A, Sanchez H, Frahm N, Linde CH, Hewitt HS, Hildebrand W, Altfeld M, Allen TM, Walker BD, Korber BT, Leitner T, Sanchez J, Brander C. Relative dominance of Gag p24-specific cytotoxic T lymphocytes is associated with human immunodeficiency virus control. *J Virol* 80:3122– 3125. 2006
34. Yoshiyuki Yokomaku, Hideka Miura, Hiroko Tomiyama, Ai Kawana-Tachikawa, Masafumi Takiguchi, Asato Kojima, Yoshiyuki Nagai , Aikichi Iwamoto, Zene Matsuda, and Koya Ariyoshi. Impaired Processing and Presentation of Cytotoxic-T-Lymphocyte (CTL)

Epitopes Are Major Escape Mechanisms from CTL Immune Pressure
in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J. Virol.*
February 78. 3 1324-1332.2004

35. Todd M. Allen, Marcus Altfeld, Shaun C. Geer, Elizabeth T. Kalife,
Corey Moore, Kristin M. O'Sullivan, Ivna DeSouza, Margaret E.
Feeney, Robert L. Eldridge, Erica L. Maier, Daniel E. Kaufmann,
Matthew P. Lahaie, Laura Reyor, Giancarlo Tanzi, Mary N.
Johnston, Christian Brander, Rika Draenert, Jurgen K. Rockstroh,
Heiko Jessen, Eric S. Rosenberg,¹ Simon A. Mallal, and Bruce D.
Walker. Selective Escape from CD8+ T-Cell Responses Represents
a Major Driving Force of Human Immunodeficiency Virus Type 1
(HIV-1) Sequence Diversity and Reveals Constraints on HIV-1
Evolution. *J Virol.* Nov; 79(21): 13239–13249.2005
36. KJ, Chetty P, Draenert R, Addo MM, Feeney M, Tang Y, Holmes EC,
Allen T, Prado JG, Altfeld M, Brander C, Dixon C, Ramduth D,
Jeena P, Thomas SA, St John A, Roach TA, Kupfer B, Luzzi G,
Edwards A, Taylor G, Lyall H, Tudor-Williams G, Novelli V,
Martinez-Picado J, Kiepiela P, Walker BD, Goulder PJ. HIV

evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission.

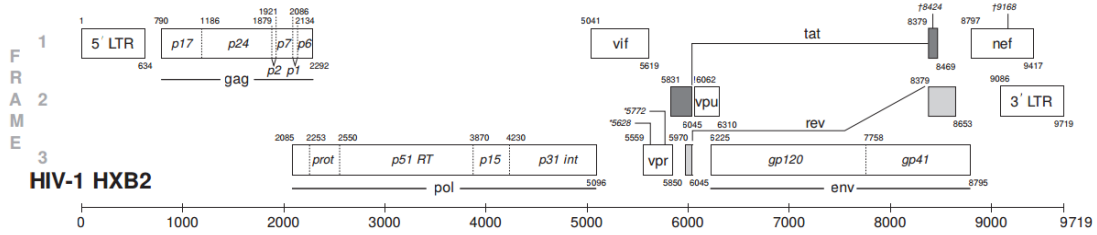
Nat Med. Mar;10(3):282-9. 2004

37. Schneidewind A, Brockman MA, Yang R, Adam RI, Li B, Le Gall S, Rinaldo CR, Craggs SL, Allgaier RL, Power KA, Kuntzen T, Tung CS, LaBute MX, Mueller SM, Harrer T, McMichael AJ, Goulder PJ, Aiken C, Brander C, Kelleher AD, Allen TM. Escape from the dominant HLA-B27-restricted cytotoxic T-lymphocyte response in Gag is associated with a dramatic reduction in human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol.* Nov;81(22):12382-93.2007
38. Joshua T. Herbeck,^a Viktor Müller,^c Brandon S. Maust,^a Bruno Ledergerber,^d Carlo Torti,^e Simona Di Giambenedetto,^f Luuk Gras,^g Huldrych F. Günthard,^d Lisa P. Jacobson,^h James I. Mullins,^{a,b} and Geoffrey S. Gottlieb. Is the virulence of HIV changing? A meta-analysis of trends in prognostic markers of HIV disease progression and transmission *AIDS.* Jan 14; 26(2): 193–205.2012
39. Brockman MA, Schneidewind A, Lahaie M, Schmidt A, Miura T, Desouza I, Ryvkin F, Derdeyn CA, Allen S, Hunter E, Mulenga J,

Goepfert PA, Walker BD, Allen TM. Escape and compensation from early HLA-B57-mediated cytotoxic T-lymphocyte pressure on human immunodeficiency virus type 1 Gag alter capsid interactions with cyclophilin A. *J Virol.* Nov;81(22):12608-18.2007

40. European Collaborative Study, Swiss Mother and Child HIV Cohort Study. Combination antiretroviral therapy and duration of pregnancy. *AIDS*;14:2913-20.2000

A)



B)

HIV-1におけるこれまでに報告されたエピトープの数

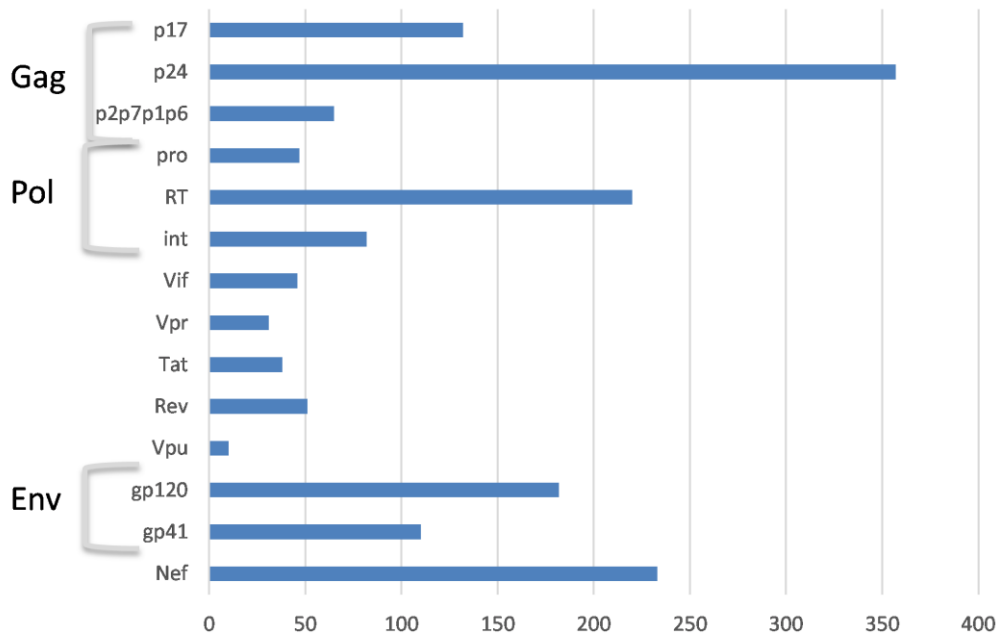


図 1 HIV-1 のゲノム構造と各部位における CTL エピトープの数

A) HIV-1 ゲノム構造

B) これまでに報告された HIV-1 における CTL エピトープの数

(HIV database

<http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/pdf/2014/immuno2014.pdf> より
改変)

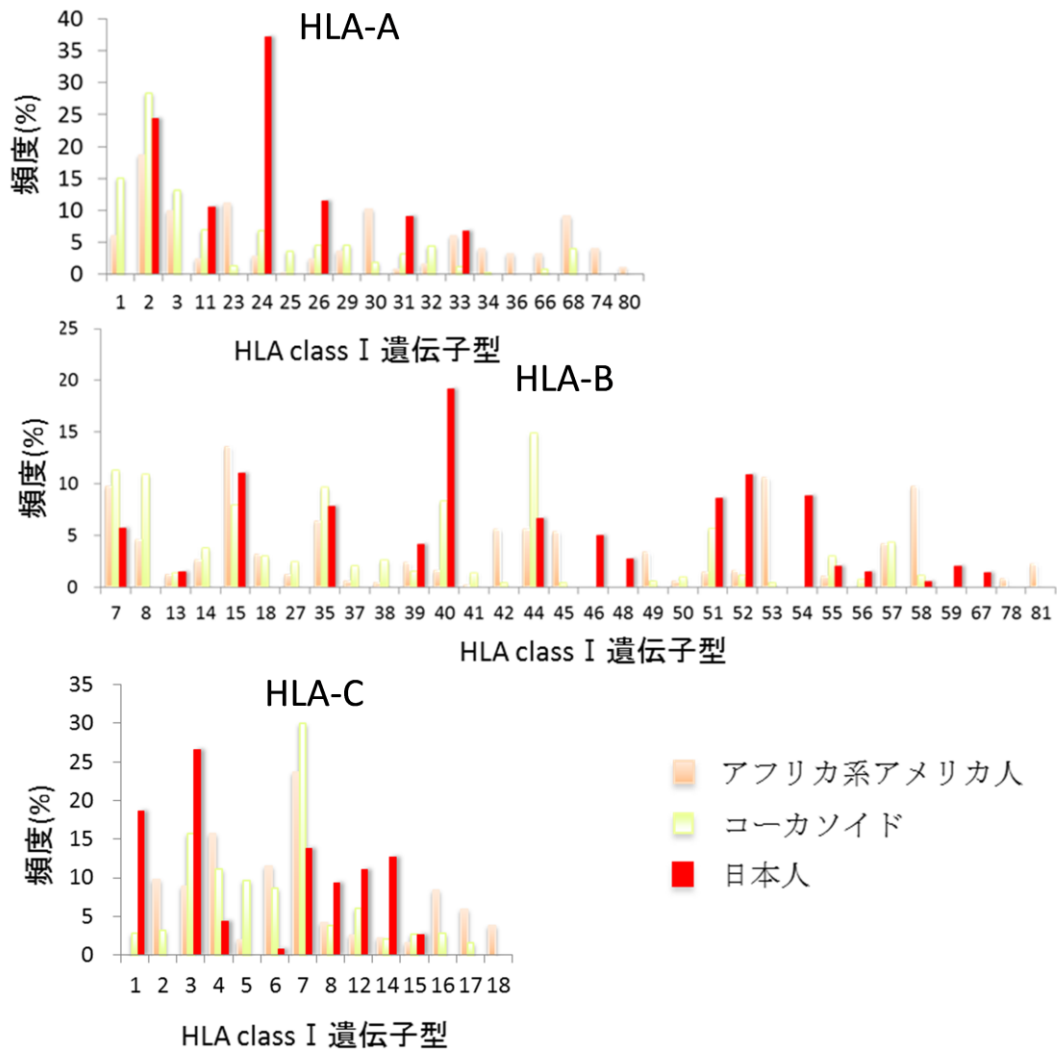


図2 人種間におけるHLA class I 遺伝子型の頻度

頻度が1%以上のもののみ記載。

引用文献(25,26 より)

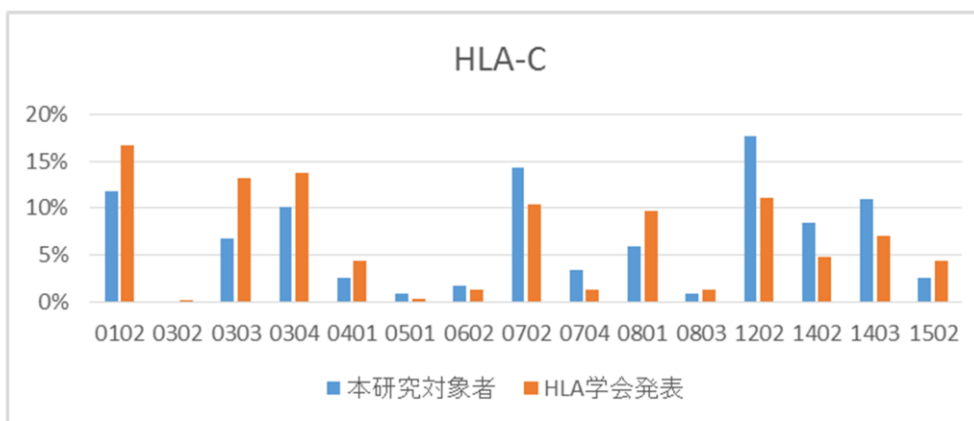
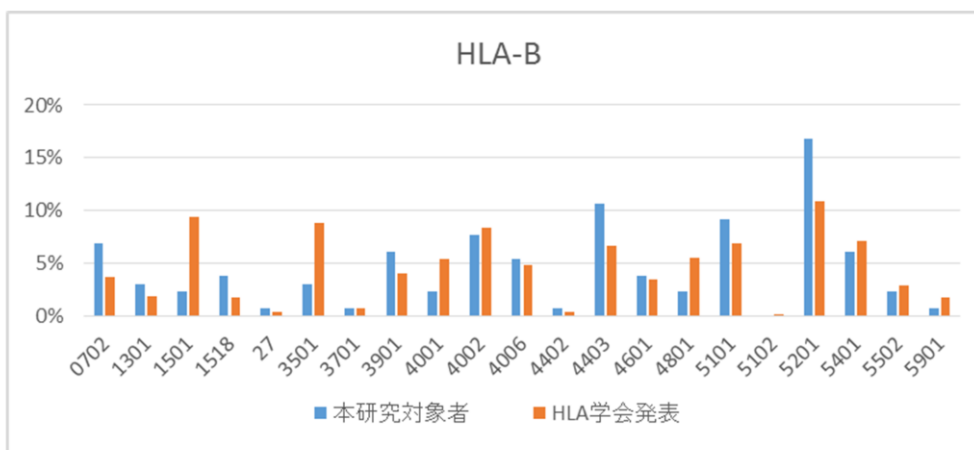
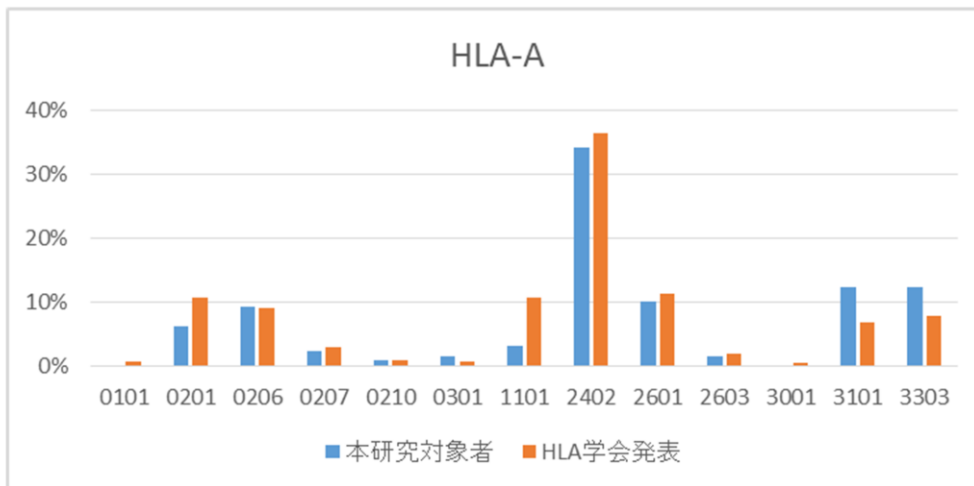


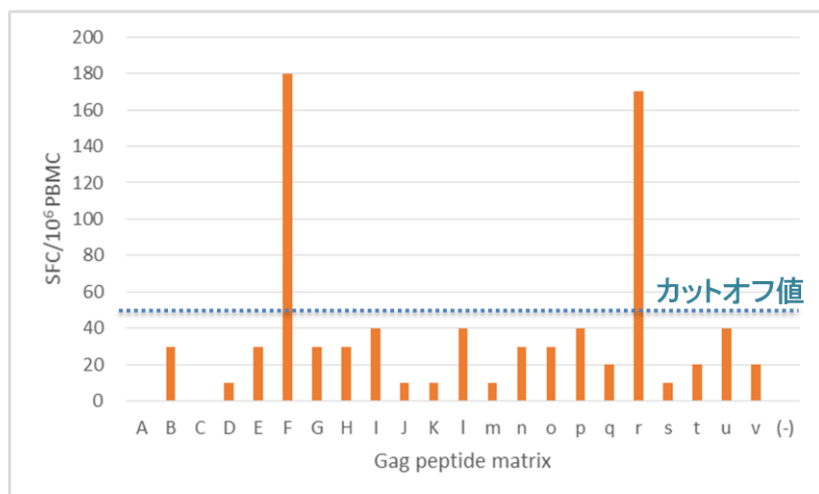
図3 本研究で対象とした HIV-1 感染者と日本人 HLAclass I 遺伝子型の比較
 青が本研究で対象者、赤が日本組織適合性学会により明らかとなっている HLA
 class1 遺伝子型を示す。横軸がそれぞれの HLA class I 遺伝子型、縦軸は HLA
 学会発表(29)における日本人における割合および本研究対象者における割合を
 示す。

	pool-A	pool-B	pool-C	pool-D	pool-E	pool-F	pool-G	pool-H	pool-I	pool-J	pool-K
pool-l	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
pool-m	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
pool-n	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
pool-o	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
pool-p	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
pool-q	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
pool-r	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77
pool-s	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88
pool-t	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99
pool-u	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
pool-v	111	112	113	114	115						

図 4 Gag-matrix の作成

例えば pool-A として Gag-1,12,23,34,45,56,67,78,89,100,111 の 11 種のペプチドを混注、一方 pool-l には 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11 の 11 種のペプチドを混注し、同様に 22 種類の OLP-pool を作成した

A)



B)

	pool-A	pool-B	pool-C	pool-D	pool-E	pool-F	pool-G	pool-H	pool-I	pool-J	pool-K
pool-l	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
pool-m	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
pool-n	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
pool-o	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
pool-p	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
pool-q	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
pool-r	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77
pool-s	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88
pool-t	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99
pool-u	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
pool-v	111	112	113	114	115						

C)

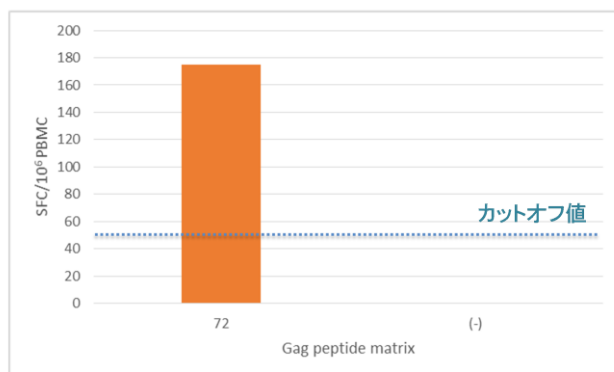
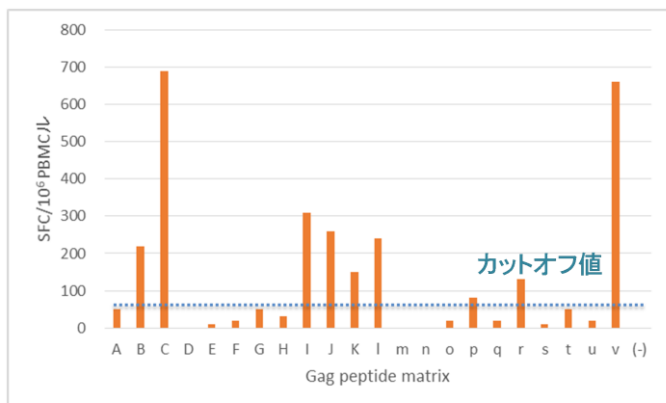


図 5 Gag-matrix における単独の T 細胞標的部位の決定

A)



B)

	pool-A	pool-B	pool-C	pool-D	pool-E	pool-F	pool-G	pool-H	pool-I	pool-J	pool-K
pool-l	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
pool-m	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
pool-n	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
pool-o	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
pool-p	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
pool-q	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
pool-r	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77
pool-s	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88
pool-t	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99
pool-u	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
pool-v	111	112	113	114	115						

C)

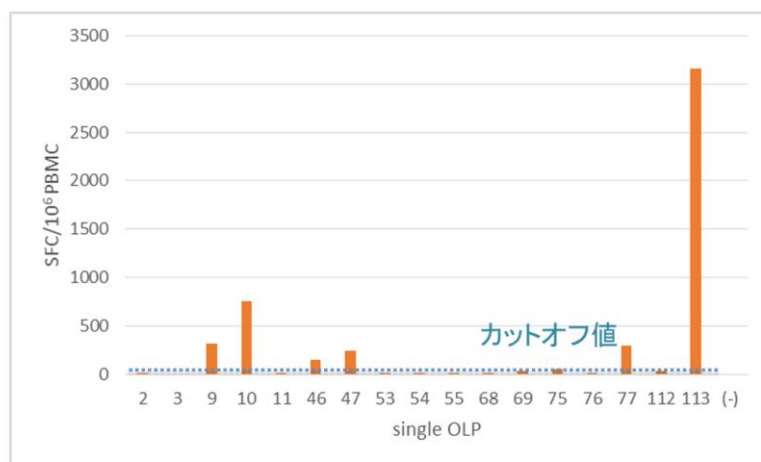


図 6 Gag-matrix における複数の T 細胞標的部位の決定

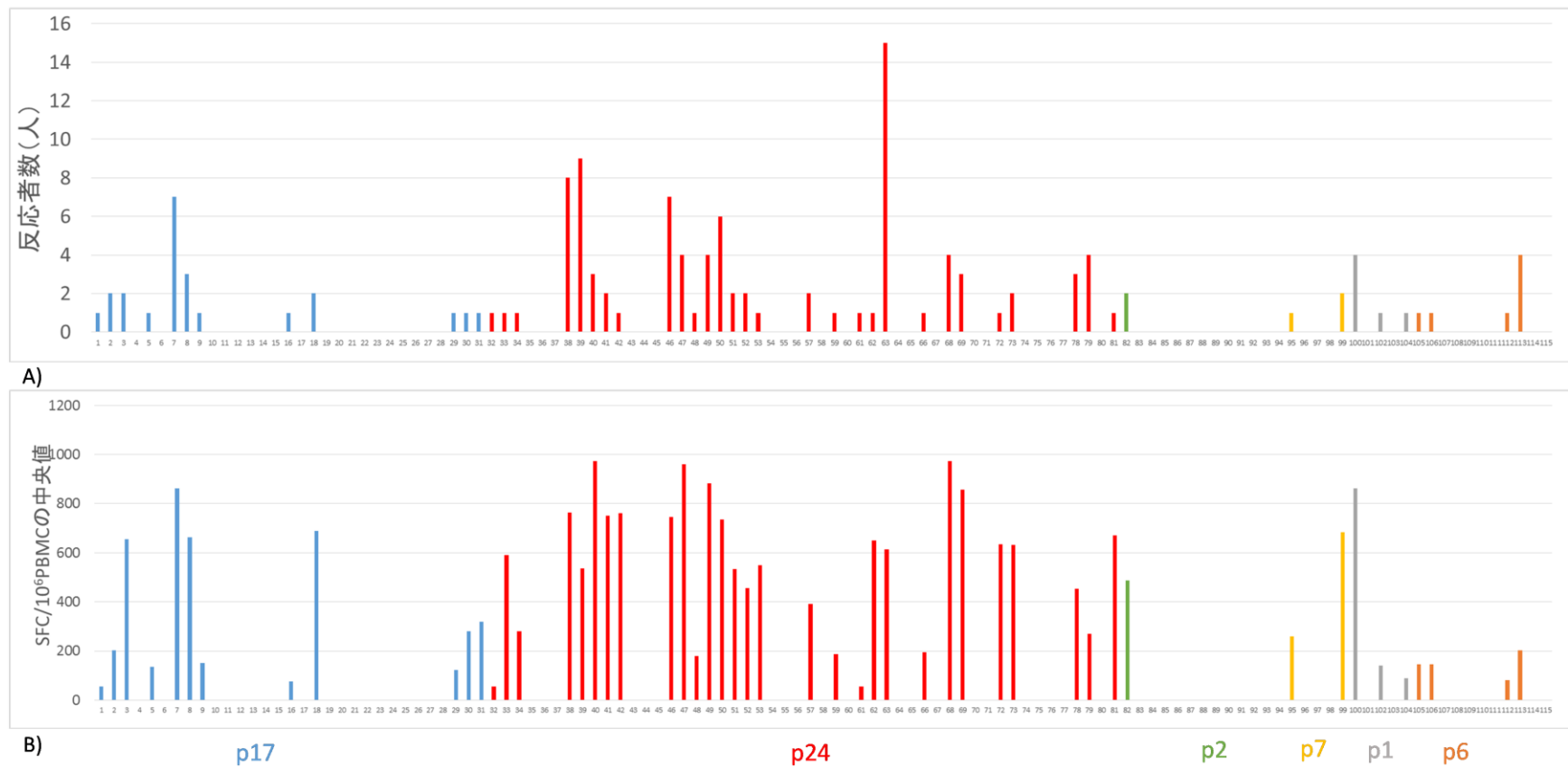


図 7 日本人 HIV-1 感染者における Gag 特異的 T 細胞反応の解析

A)各 OLP に対する反応者数…横軸に OLP 番号、縦軸に反応者数を示す。

B)各 OLP に対する反応性 T 細胞数…横軸に OLP 番号、縦軸に反応性 T 細胞数の中央値(SFC/10⁶PBMC)を示す。

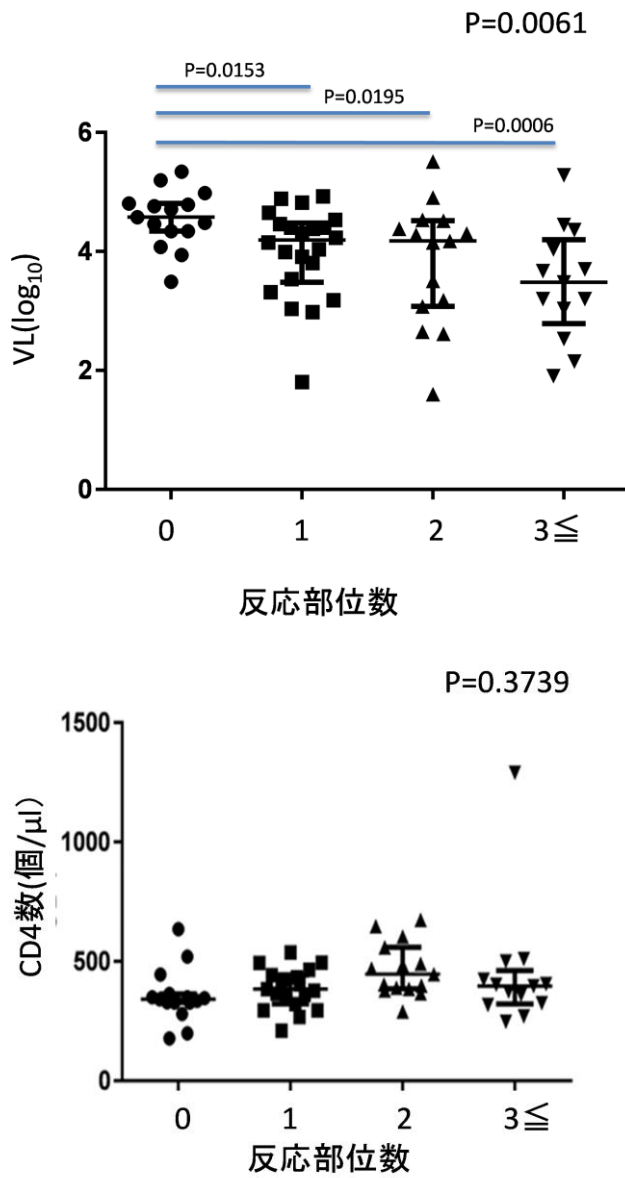


図8 反応のあった OLP の数とウイルス量(VL)、CD4 陽性 T 細胞の関連

横軸に反応の合った OLP の数、縦軸にウイルス量 (VL,log₁₀) を示す。横線は中央値、エラーバーは IQR を示す。(Kruskal-Wallis 検定)

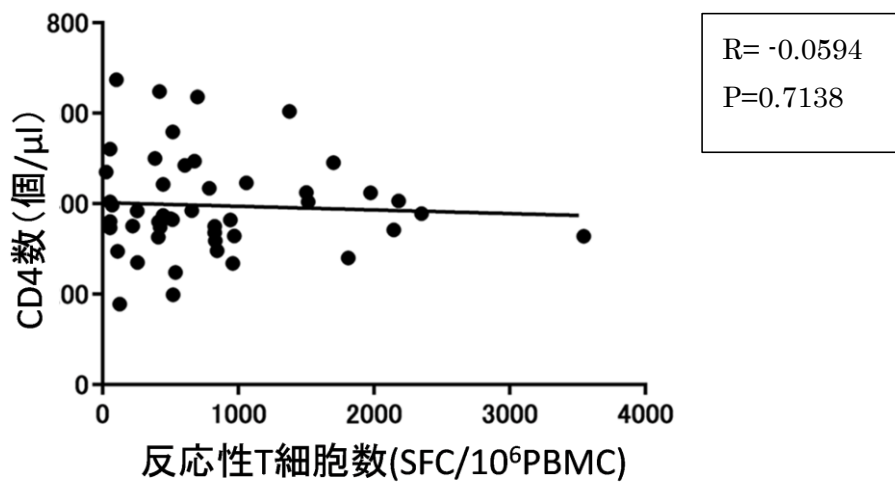
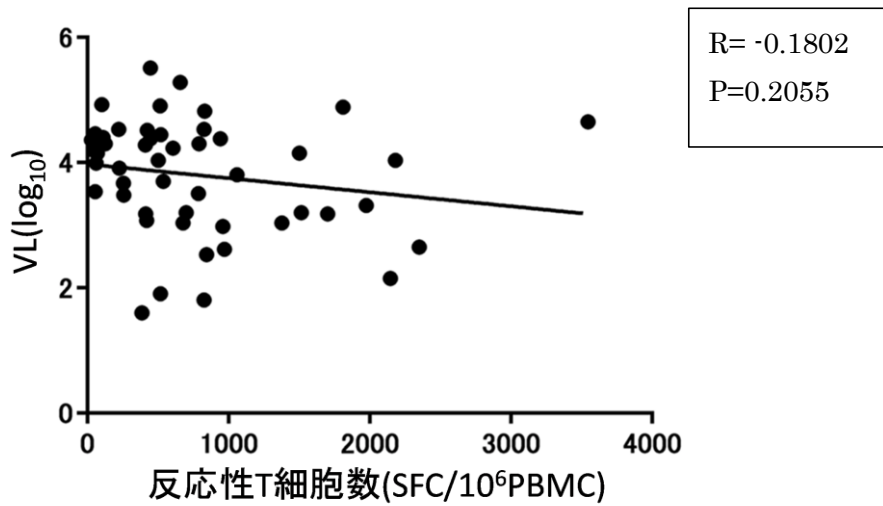


図9 Gag 特異的 T 細胞応答の頻度とウイルス量(VL)、CD4 数の関連

各点は一人の HIV-1 感染者が示した SFU/ 10^6 PBMC とウイルス量(VL

\log_{10}),CD4 数 (個/ μ l) を意味する (Spearman' s correlation analysis)

A) <OLP-7,8>

患者番号	HLA-A		HLA-B		HLA-C		反応性T細胞数
738	2402	2601	3501	5201	0303	1202	860
750	0206	2402	4801	1518	0304	0704	660
765	0206	2402	0702	5201	0702	1202	120
723	0201	2402	1301	4001	0304	-	925
954	2402	2601	4001	5201	0401	1202	465
714	2402	2402	1301	5201	0304	1202	510
1054	0201	3101	2603	5201	1202	-	755

	28	46
HXB2		KYKCLKHIVWASRELERFAV
OLP-7		KYKCLKHIVWASREL
OLP-8		KHIVWASRELERFAV
A*24:02 (Gag28-9)		KYKCLKHIVW
A*26:01 (Gag28-9)		KYKCLKHIVW
Cw*04 (Gag28-9)		KYKCLKHIVW
B*35:01 (Gag36-9)		WASRELERF

B) <OLP-38,39>

患者番号	HLA-A		HLA-B		HLA-C		反応性T細胞数
604	2601	3101	4002	-	0304	-	950
574	2601	3101	0702	5101	0702	1402	540
507	0207	2601	3701	5401	0102	0602	1020
491	2402	2601	5502	4002	0102	0304	290
621	2602	3303	4403	5401	0102	1403	310
540	2402	-	5201	5401	0102	1202	970
1081	2402	2602	4601	5201	0102	-	465
770	2402	2602	1518	5201	0304	0704	752
802	2602	-	0702	4403	ND	ND	1100
683	0206	2602	0702	5202	0702	1502	1320
527	2603	3303	4403	5201	1402	1403	980
387	2402	-	4006	5201	0801	1202	1270
632	2402	3101	5101	5201	1202	1402	860
801	2402	3303	4006	5201	1202	1403	790

	160	179
HXB2		EEKAFSPEVIMFSAALSEGA
OLP-38		EEKAFSPEVIMFSA
OLP-39		SPEVIMFSAALSEGA
B*44:15 (Gag160-9)		EEKAFSPEV
A*26:01 (Gag167-9)		EVI PMFSAL
Cw*03 (Gag167-9)		EVI PMFSAL
Cw*01:02 (Gag168-8)		VI PMFSAL

図 10 各 OLP に反応のあった HIV-1 感染者における HLA class I 遺伝子型とこれまでに報告された HLA 遺伝子型の比較の検討

左の太字は検体番号を示す。HIV molecular immunology database に報告されているエピトープと HLA 拘束性を示す。報告のあった HLA class I 遺伝子型を黄色、それと血清型が同じものは橙で示した。反応性 T 細胞数の単位は SFC/10⁶ PBMC である。

C) <OLP-46,47>

患者番号	HLA-A		HLA-B		HLA-C		反応性T細胞数
387	2402	-	4006	5201	0801	1202	374
742	2402	3303	4403	4002	0303	1403	1015
801	2402	3303	4006	5201	1202	1403	990
1032	2402	-	4006	5201	0801	1202	975
729	2402	-	5201	-	1202	-	950
1054	0201	3101	2603	5201	1202	-	570
68	2402	2602	5502	5901	0102	-	690
637	2402	3303	0702	4403	0702	1403	1060

193

210

HXB2
 OLP-46
 OLP-47
 A*02 (Gag193-11)
 B*52 (Gag194-9)
 A*02 (Gag197-9)
 B*40 (Gag202-9)

GHQAAMQMLKETINEEAA
 GHQAAMQMLKETI
 AAMQMLKETINEEAA
 GHQAAMQMLKE
 HQAAMQMLK
 AMQMLKETI
 KETINEEAA

D) <OLP-50,51>

患者番号	HLA-A		HLA-B		HLA-C		反応性T細胞数
637	2402	3303	0702	4403	0702	1403	686
387	2402	-	4006	5201	0801	1202	490
742	2402	3303	4403	4002	0303	1403	520
729	2402	-	5201	-	1202	-	215
1054	0201	3101	2603	5201	1202	-	540
801	2402	3303	4006	5201	1202	1403	760
68	2402	2602	5502	5901	0102	-	560
1032	2402	-	4006	5201	0801	1202	135

211

229

HXB2
 OLP-50
 OLP-51
 B*07:02 (Gag216-9)

EWDRVHPVHAGPIAPGQMR
 EWDRLHPVHAGPIA
 LHPVHAGPIAPGQMR
 HPVHAGPIA

C) <OLP-46,47>

	HLA-A		HLA-B		HLA-C		反応性T細胞数
387	2402	-	4006	5201	0801	1202	374
742	2402	3303	4403	4002	0303	1403	1015
801	2402	3303	4006	5201	1202	1403	990
1032	2402	-	4006	5201	0801	1202	975
729	2402	-	5201	-	1202	-	950
1054	0201	3101	2603	5201	1202	-	570
68	2402	2602	5502	5901	0102	-	690
637	2402	3303	0702	4403	0702	1403	1060

	193	210
HXB2		GHQAAMQMLKETINEEAA
OLP-46		GHQAAMQMLKETI
OLP-47		AAMQMLKETINEEAA
A*02 (Gag193-11)		GHQAAMQMLKE
B*52 (Gag194-9)		HQAAMQMLK
A*02 (Gag197-9)		AMQMLKETI
B*40 (Gag202-9)		KETINEEAA

D) <OLP-50,51>

	HLA-A		HLA-B		HLA-C		反応性T細胞数
637	2402	3303	0702	4403	0702	1403	686
387	2402	-	4006	5201	0801	1202	490
742	2402	3303	4403	4002	0303	1403	520
729	2402	-	5201	-	1202	-	215
1054	0201	3101	2603	5201	1202	-	540
801	2402	3303	4006	5201	1202	1403	760
68	2402	2602	5502	5901	0102	-	560
1032	2402	-	4006	5201	0801	1202	135

	211	229
HXB2		EWDRVHPVHAGPIAPGQMR
OLP-50		EWDRVHPVHAGPIA
OLP-51		LHPVHAGPIAPGQMR
B*07:02 (Gag216-9)		HPVHAGPIA

図 10 各 OLP に反応のあった HIV-1 感染者における HLA class I 遺伝子型と

これまでに報告された HLA 遺伝子型の比較の検討

E) <OLP-52,53>

患者番号	HLA-A		HLA-B		HLA-C		反応性T細胞数
888	0206	3303	1301	5401	0102	0602	575
993	0206	0210	3901	4006	0702	0801	312
1032	2402	3303	4403	5201	1202	1403	640

HXB2
 OLP-52
 OLP-53
 B*13 (Gag226-10)

220
 AGPIAPGQMREPRGSDIA²³⁷
 AGPIAPGQMREPR
 IAPGQMREPRGSDIA
 GQMREPRGSDI

F) <OLP-63>

患者番号	HLA-A		HLA-B		HLA-C		反応性T細胞数
632	0201	2402	4002	5201	0304	1502	767
765	0207	3303	4403	5201	0102	1403	696
681	2601	3101	0702	5201	0303	0803	890
850	2402	-	4006	5201	0801	1202	134
871	2402	2601	3501	5201	0303	1202	975
1029	2401	3303	4403	5201	1202	1403	278
1056	1101	1101	3901	5201	0702	0801	620
892	2402	3101	4601	5201	0102	1402	450
801	3101	3303	4403	5201	0401	1403	375
843	2601	3101	1501	4801	0303	0803	720
954	0206	2603	1501	4601	0102	0303	477
507	2402	3101	3901	5101	0702	1402	895
610	2601	3101	0702	5101	0702	1402	1020
742	2402	3101	5101	1501	0401	1402	355
525	2601	3101	4002	-	0304	-	160
637	2402	3303	0702	4403	0702	1403	378

HXB2
 OLP-63
 B*15:01 (Gag269-9)
 B*52:01 (Gag275-8)

268
 LGLNKIVRMYSPTSI
 LGLNKIVRMYSPTSI
 GLNKIVRMYSPTSI
 282

図 10 各 OLP に反応のあった HIV-1 感染者における HLA class I 遺伝子型と

これまでに報告された HLA 遺伝子型の比較の検討

G) <OLP-68,69>

患者番号	HLA-A		HLA-B		HLA-C		反応性T細胞数
201	0201	2402	5101	5401	0102	1402	975
604	2601	3101	4002	-	0304	-	940
540	2402	-	5101	5401	0102	1402	670
592	0206	3101	3901	5101	0702	1402	992

HXB2
 OLP-68
 OLP-69
 A*02:01 (Gag291-10)
 A*26 (Gag294-11)
 A*24 (Gag294-11)
 A*24:02 (Gag295-9)
 A*26:01 (Gag296-9)
 Cw*03:04 (Gag296-9)

290
 309
 KEPFRDYVDRFYKTLRAEQA
 KEPFRDYVDRFYKTL
 DYVDRFYKTLRAEQA
 EPFRDYVDRF
 RDYVDRFYKTL
 RDYVDRFYKTL
 DYVDRFYKT
 YVDRFYKTL
 YVDRFYKTL

H) <OLP-78,79>

患者番号	HLA-A		HLA-B		HLA-C		反応性T細胞数
592	0206	3101	3901	5101	0702	1402	496
654	0206	2402	0702	-	0702	-	230
715	0206	0210	3901	4006	0702	0801	510
889	2402	-	0702	5201	ND	ND	670

HXB2
 OLP-78
 OLP-79
 A*02:06 (Gag 341-9)

337
 353
 LGPAATLEEMMTACQGV
 LGPAATLEEMMTA
 AATLEEMMTACQGV
 ATLEEMMTA

図 10 各 OLP に反応のあった HIV-1 感染者における HLA class I 遺伝子型と

これまでの報告された HLA 遺伝子型の比較の検討

I) <OLP-100>

患者番号	HLA-A		HLA-B		HLA-C		反応性T細胞数
971	0201	2402	4002	5101	0304	1502	465
491	2402	2601	5502	4002	0102	0304	870
582	2601	2603	0702	5201	0702	1202	915
930	1101	3101	5401	5603	0102	-	970

HXB2
 OLP-100
 B*40:02 (Gag427-8)

⁴²⁵DC⁴³⁸TERQANFLGKIW
 DCTERQANFLGKIW
 TERQANFL

J) <OLP-113>

患者番号	HLA-A		HLA-B		HLA-C		反応性T細胞数
971	0201	2402	4002	5101	0304	1502	210
1054	0201	3101	2602	5201	1202	-	375
1032	2402	3101	4601	5101	0102	1402	194

HXB2
 OLP-113
 A*02:01 (Gag481-9)
 B*40 (Gag481-9)

⁴⁸⁰DK⁴⁹³E⁴⁹³LYPLTSLRSLF
 DKELYPLTSLRSLF
 KELYPLASL
 KELYPLASL

図 10 各 OLP に反応のあった HIV-1 感染者における HLA class I 遺伝子型と

これまでに報告された HLA 遺伝子型の比較の検討

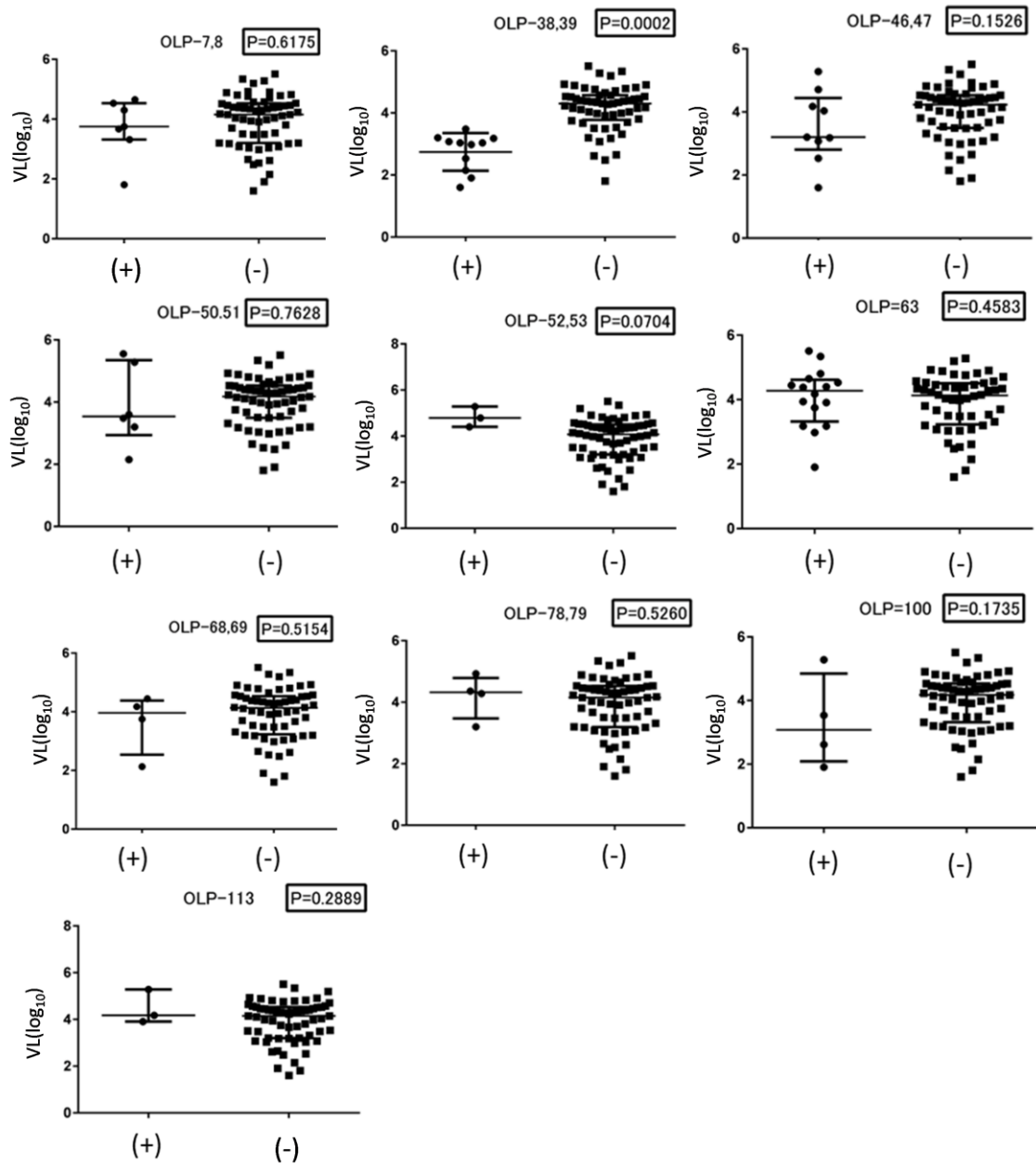


図 11 各 OLP の反応者数と血中ウイルス量の関連

横軸の+が反応者数、-が非反応者数を示す。縦軸は血中ウイルス量(VL log₁₀)を示す。横線は中央値、太い横線の示す範囲は四分位数範囲を示す。

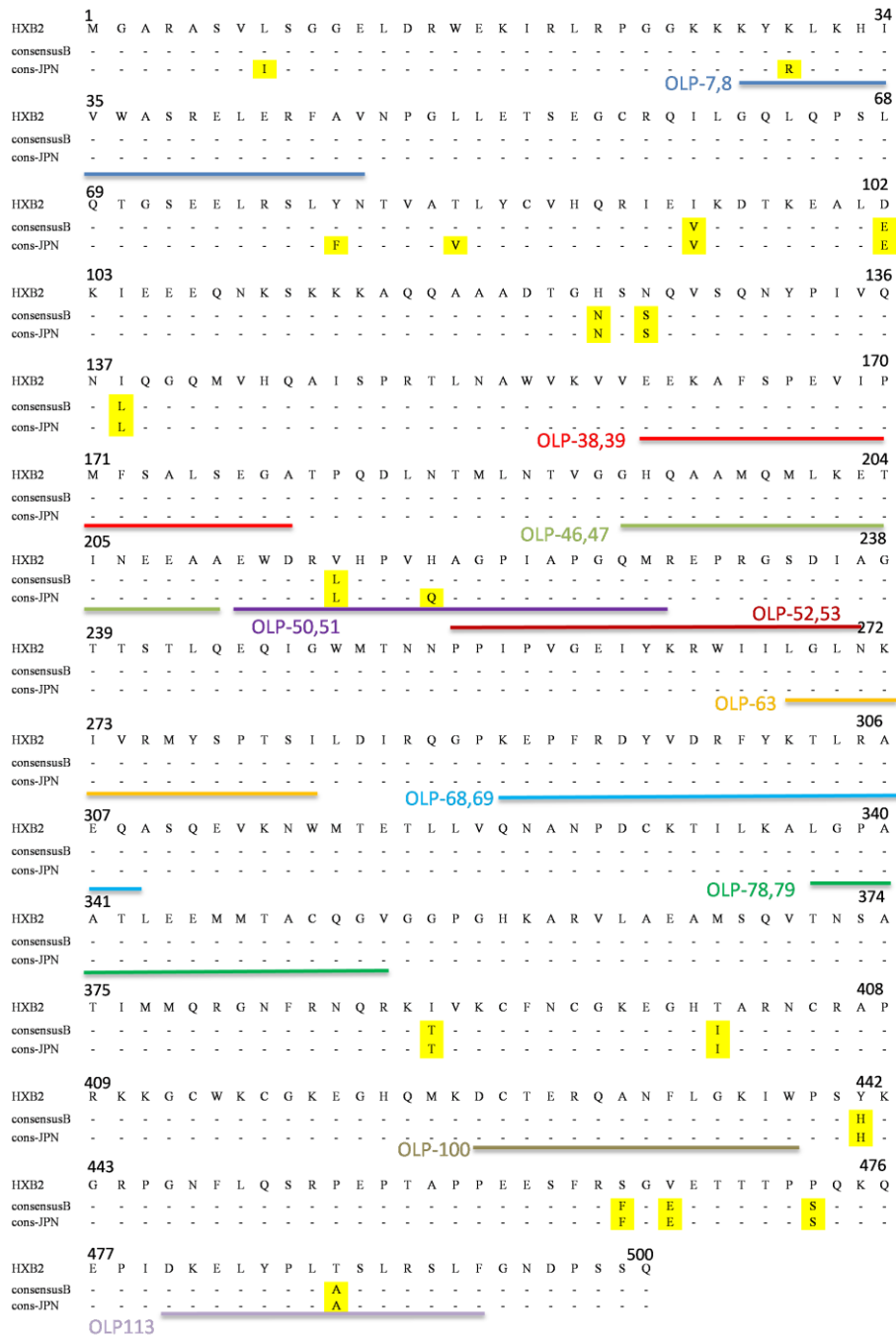


図 12 日本人 HIV-1 感染者における gag 領域の遺伝子解析

上段が HXB2, 2 段目が cons B、3 段目が私のデータを用いた consensus (cons-JPN) である。黄が HXB2 と異なる部位を示している。

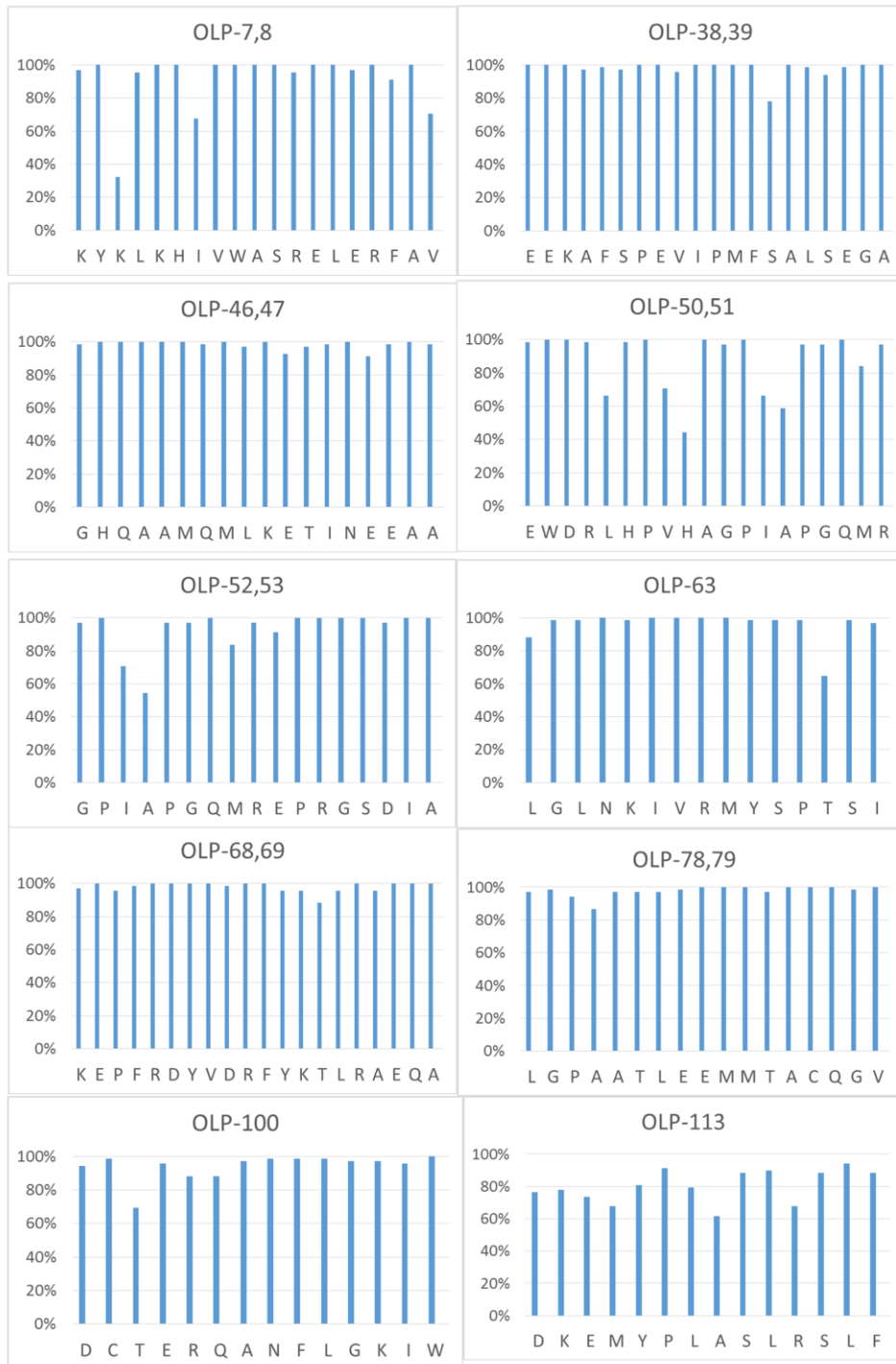


図 13 各アミノ酸ごとの cons-B と一致した割合

横軸に各 OLP のアミノ酸配列、縦軸に cons-B と一致した割合を示す

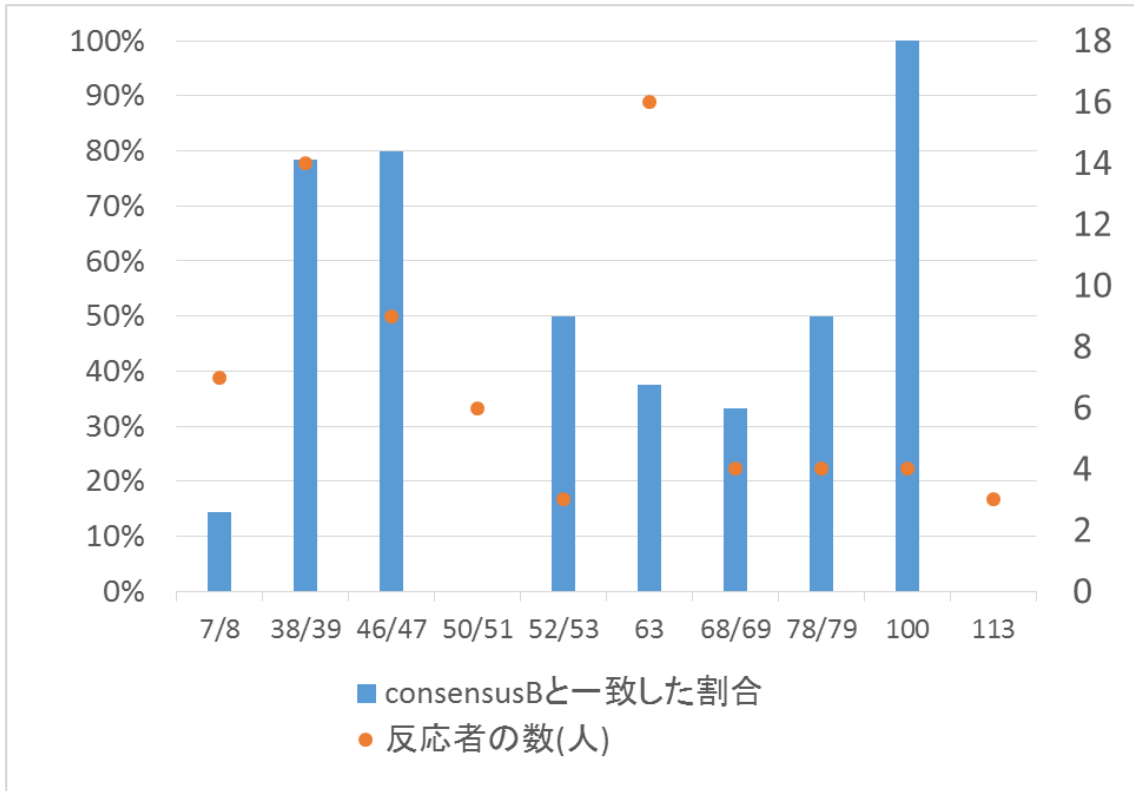


図 14 OLP 全体における cons-B と一致した割合

オレンジが反応者数、青の棒グラフが cons-B と完全に一致した割合を示す

左の縦軸は一致した割合(%）、右側の縦軸は反応者の人数(人)を示す。

MGARASVLSG GELDRWEKIR LRPGGKKKYK LKHIVWASRE LERFAVNPGL
 LETSEGCRQI LGQLQPSLQT GSEELRSLYN TVATLYCVHQ RIEIKDTKEA
 LDKIEEEQNK SKKKAQAAA DTGHSNQVSQ **NYPIVQNIQG QMVHQAISPR**
p24
B57-KF11
TLNAWVKVVE EKAFSPEVIP MFSALSEGAT PQDLNMTLNT VGGHQAAMQM
OLP-38/39 CypA binding loop
 LKETINEEAA EWDRVHPVHA GPIAPQMRE PRGSDIAGTT **STLQEIQGWM**
B57-TW10
B27-KK10
 TNNPIPVG EYKRWILGL NKIVRMYSPT SILDIRQGPK EPFRDYVDRF
 YKTLRAEQAS QEVKNWMTET LLVQANPDC KTILKALGPA ATLEEMMTAC
 QGVGGPGHKA RVLAEAMSQV TNSATIMMQR GNFRNQRKIV KCFNCGKEGH
 TARNCRAPRK KGCWKCGKEG HQMKDCTERQ ANFLGKIWPS YKGRPGNFLQ
 SRPEPTAPPE ESFRSGVETT TPPQKQEPID KELYPLTSLR SLFGNDPSSQ

図 15 HLA-B*27 や HLA-B*57 拘束性のエピトープに対する CD8 陽性 T 細胞応答の部位と OLP-38/39 の反応部位