

論文の内容の要旨

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

背景

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 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、そして免疫が破たん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では進行が遅いことが分かっている。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。HIV-1 感染では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、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明らかとなりつつあり、南アフリカの大規模コホート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。

CD8 陽性 T 細胞は T 細胞受容体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るが、HLA class I 遺伝子型は人種により大きく異なっており、日本人集団においても詳細な検討が必要である。

今回私は日本人慢性期 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。

材料と方法

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 に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。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、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。T 細胞応答の検討は、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)全 115 種を抗原として使用し、22 ウェルで全種類の反応を検討できるよう 11 種類ずつ混注した matrix を用いた IFN- γ ELISpot assay で行った。

HIV-1 の遺伝子解析は、血漿からウイルス RNA を抽出し、RT-PCR, nested PCR により

cDNA を合成、HIV-1 gag 領域を増幅し、シーケンス解析を行った。

結果

68 人の HIV-1 感染者に対し、Gag 特異的 T 細胞応答について解析を行った。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 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 細胞応答の有無を調べた。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 T 細胞反応の反応部位を決定することが可能となった。その結果、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。次に日本人 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と反応性 T 細胞数と、HIV-1 感染症の病態を表す指標である血中ウイルス量 (VL) と 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 VL が有意に低かった。一方、反応部位数と CD4 数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。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。これらの結果より、VL 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。

次に各 HIV-1 感染者において 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。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。

次に、各 OLP における反応者と非反応者で VL に違いがあるかを検討した。前述の 10 か所について検討した結果、OLP-38/39 (Gag の 160 番目から 179 番目のアミノ酸に相当) において反応者で有意に VL が低いことがわかった。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。

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、日本で流行している HIV-1 の特徴を捉えるため、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。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 か所の中で OLP-7/8 (Gag の 28 番目から 46 番目のアミノ酸に相当) 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、OLP-50/51 (Gag の 211 番目から 229 番目のアミノ酸に相当) 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。

次に前述した各 OLP について全サンプル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。いずれの部位も高度に保存されていたが、中でも OLP-38/39 を含む 4 か所はほぼ 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。OLP38/39 を含む 3 か所において反応者の 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(Gag の 193 番目から 210 番目のアミノ酸に相当)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、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。

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。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。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、日本人において 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が、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。

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、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配列を明らかにした。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。2 か所のうち、Gag30 番目は既報の A*24:02 拘束性エピトープの中にある。A*24:02 は約 6 割の日本人が持ち、リシン(K)からアルギニン(R)へのエスケープ変異が見られる。Gag219 番に関して同部位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 を共通して有すると考えられた。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であることが明らかとなっている。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*57/58:01 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。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。

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。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。