

論文の内容の要旨

論文題目 ヒト免疫不全ウイルス感染における
細胞性免疫応答とウイルス変異の解析

氏 名 加藤 次朗

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染において、細胞傷害性 T 細胞(CTL)がウイルス抑制に重要な役割を果たす一方、HIV はその易変異性により CTL から逃避する。CTL に対する抗原提示分子であるヒト白血球型抗原(HLA)は日本において多様性が低く、特に HLA-A*24:02 は日本人の約 60% が保有する対立遺伝子である。HLA-A*24:02 陽性者頻度の高さから、HIV は日本への伝播以降 HLA-A*24:02 拘束性 CTL からの逃避変異を蓄積している。HLA-A*24:02 陽性者の 8 割で観察される、Nef タンパク質 135 位のチロシン(Y)からフェニルアラニン(F)への変異(Y135F 変異)は、野生型 (Y135)ウイルスに感染した約 8 割の HLA-A24 陽性者体内で 1 年以内に生じること、国内の HLA-A24 陰性者においても約 3 割の感染者で観察され、国内でこの変異を持つウイルスが流行していることなどが報告されている。また、Y135F 変異と関連した HLA-A*24:02 拘束性抗原決定基(エピトープ)として 10 残基の Nef134-10(wt) (RYPLTFGWCF)と 8 残基の Nef134-8(wt) (RYPLTFGW)が同定されている。Nef134-10 については Y135F 変異選択への寄与が示唆されているが、1) Nef134-8 の Y135F 変異選択への寄与については不明である。また、2) 変異型ウイルス感染者の予後についても不明な点が多い。本研究ではこれらを、ウイルス学的・免疫学的・臨床的側面から解析した。

§ 1 Nef134-8 による Y135F 変異選択圧の解析

まず、医科研附属病院に通院中の HIV-1 感染者の中から、1) B 亜型ウイルスに感染、2) 未治療あるいは治療中断中、3) HLA-A*24:02 陽性の 31 名を無作為に選び、保存検体中の血漿中ウイルスを直接シーケンスした。結果、血漿 Y135 ウイルス陽性者は 7 名(23%)、血漿 135F ウイルス陽性者は 23 名(74%)、血漿 135W ウイルス陽性者は 1 名(3%)で、これまでの報告通り Los Alamos HIV database 登録のデータと有意差があった($p < 0.0001$, Fisher's exact test)。血漿 Y135 陽性者のうち、野生型の配列を持つものは 2 名のみで、Nef134-10 と Nef134-8 で共有される L137I 変異が 1 名、T138C 変異が 2 名、Nef134-8 領域外だが Nef134-10 領域には含まれる C142P 変異および F143Y 変異がそれぞれ 1 名で観察された。この 31 名について、四量体化ペプチド-HLA 複合体(テトラマー)を用いてエピトープ特異的 CTL の解析を行った。末梢血単核球(PBMC)を Nef134-10(wt)あるいは Nef134-8(wt)ペプチドで刺激後 2 週間培養し、抗 CD8 抗体、Nef134-10(wt)/A*24:02 テトラマー(Tet-10(wt))および Nef134-8(wt) /A*24:02 テトラマー

(Tet-8(wt))で二重染色してフローサイトメトリーにより解析した。血漿 Y135 陽性者では、Nef134-10 領域だけに変異のある C142P・F143Y 感染者 2 名(29%)のみが Tet-10(wt)+ T 細胞陰性で、Tet-8(wt)+ T 細胞陰性者はいなかった(0%)。一方、血漿 135F/W 陽性者 24 名では、Tet-10(wt)+ T 細胞陰性は特徴的な HLA 又は特殊な変異を有する 4 名(17%)のみであるのに対し、Tet-8(wt)+ T 細胞陰性は 12 名(50%)で有意な差があった($p = 0.0305$, Fisher's exact test)。以上の結果から、Nef134-8 CTL の誘導と Y135F 変異には関連があると考えられる。

次に、Nef134-8 CTL のみが誘導されていた血漿 Y135 陽性者 2 名について経時観察した所、135F 変異体が選択された事から、Nef134-8 CTL の Y135F 変異選択圧への寄与が実証された。

さらに、Nef134-8 CTL が変異選択圧となる機構について解析を行った。Y135F 変異は、Nef134-10 および Nef134-8 の HLA-A*24:02 に対する結合アンカーである 2Y を 2F へと変異させる事から、Y135F 変異はペプチド-HLA 間結合力を変化させると考えられる。そこで T2-A24 stabilization assay により、ペプチド-HLA 間結合力を確認した。結果、Nef134-8 の最大結合量は Nef134-10 の 7 割程度しかなく、また Nef134-8 の半量結合濃度は 2F 変異により 30 倍以上増加し、 $1\mu\text{M}$ をはるかに超えていた。故に、Y135F 変異はペプチド-HLA 間結合力依存的に Nef134-8 抗原提示を低下させると考えた。そこで Y135F 変異による抗原提示量の低下を解析するため、ミニジーンによりエピトープ蛋白質を発現させた HLA-A*24:02 安定導入 293FT 細胞を抗原提示細胞として準備し、野生型エピトープと変異型エピトープを同程度認識可能な dual-tropic CTL クローンによる IFN- γ 産生量を検討した。その結果、Nef134-10 と Nef134-8 の双方のエピトープで Y135F 変異により IFN- γ 産生が減少したが、Nef134-10 では IFN- γ 産生が約 20%残るのに対し、Nef134-8 は陰性対照と同等の IFN- γ 量であった(One-way ANOVA(有意水準 5%)における Tukey 事後テスト)。この結果は、Y135F 変異により Nef134-8 の抗原提示がほぼ消失する事を示唆している。

以上の結果から、Nef134-8 CTL による Y135F 変異選択圧は 2F 抗原提示の消失によるものである事が示唆され、血漿 Y135 陽性者-血漿 135F/W 陽性者間で CTL 誘導が異なる理由も明らかになった。一方、Nef134-10 は抗原提示が完全には消失せず、特殊な条件下にない血漿 135F 陽性者全員で Nef134-10 CTL が誘導されていた。この CTL の特徴を解析するため、13 名の Tet-10(wt)+ TCR レポートリー解析を行った。結果、血漿 Y135 陽性者 2 名では、Nef134-10 wt/2F dual-tropic CTL に特徴的な TRBV4-1 クローンがわずかで、TRBV4-1 クローン頻度が感染者間で大きく異なる血漿 135F 陽性者と対照的であった。そして、Nef134-8 CTL 陽性者と陰性者の比較では、TRBV4-1 クローン頻度に差が無かった($p=0.9427$, Mann-Whitney test)。

§ 2 逃避変異ウイルスへの初感染による臨床病態変化の解析

血漿 135F ウイルス陽性者には、Y135 野生型ウイルスで初感染したのち変異が選択された個体と、135F 変異型ウイルスによって初感染した個体の 2 群があると考えられるため、初感染ウイルス特定の手法を考える必要がある。まず、Nef134-8(2F)抗原提示の消失から、Nef134-8 CTL 誘導の有無は初感染ウイルスの種類を推測する材料となり得る。さらに私は、血漿 135F ウイルス陽性者における初感染ウイルスを特定するため、初診時に近い日付の PBMC 中プロウイルスを次世代シーケンサーで解析し、野生型ウイルスの痕跡である Y135 プロウイルス(Y-prov)の検出を試みた。血漿 135F 感染者 18 名中 16 名から出力データが得られ、Nef134-10 領域に塩基挿

入／欠失がない配列を抽出した所、中央値で 1571 リード(606 - 14011 リード)を得た。解析の結果、Y-prov 陽性者が 6 名、陰性者が 10 名であった。この 2 群についてプロウイルス解析時点の感染時点からの時間経過について差が無い事を確認するため、まずカルテ調査を行った所、顕著な記載の差はなく、またプロウイルス解析時点の初診時からの期間を比較すると、Y-prov 陽性群(中央値 0 週, 最長 31 週)と陰性群(中央値 0 週, 最長 58 週)の間に有意差は無かった($p = 0.4683$, Mann-Whitney test)。そして、感染成立からのプロウイルス解析までの期間の差を推測するため、*nef* プロウイルス quasi-species の各遺伝子配列間の遺伝的距離の統計を取った。PCR 増幅領域全長が読み取れた塩基配列のみを抽出すると中央値で 1257 リード(496 - 11771 リード)が得られ、これを基に全配列ペアの遺伝的距離を算出した。遺伝的距離の 25 パーセンタイル点を Y135 プロウイルス陽性群と陰性群で比較したところ有意差が無かった($p = 0.7812$, Mann-Whitney test)事から、感染成立時点からプロウイルス解析時点までの期間の偏りは大きくないと考えた。

Y-prov の有無と Nef134-8 CTL の有無を対応させたところ、Nef134-8 CTL 陽性者 8 名のうち 4 名が Y-prov 陰性、Nef134-8 CTL 陰性者 8 名のうち 6 名が Y-prov 陰性で、これらの分類法に対応関係は無かった($p = 0.6084$, Fisher's exact test)。そこで、Y-prov の有無と Nef134-8 CTL の有無とを組み合わせ、血漿 135F 陽性者を 4 群に分類する事にした。そして、Y-prov 陽性/Nef134-8 CTL 陽性を Y135 初感染、Y-prov 陰性/Nef134-8 CTL 陰性を 135F 初感染と推定した。

次に Tet-10(wt)⁺ TCR レパートリーについて、血漿ウイルス・プロウイルス Y135 陽性群－血漿 135F 陽性/Y-prov 陰性群間で比較したところ、血漿 135F 陽性/Y-prov 陰性者群で TRBV4-1 頻度が有意に高く($p = 0.0492$, Mann-Whitney test)、かつレパートリー多様度が低い傾向($p = 0.0727$, Mann-Whitney test)にあった。135F 初感染の場合、Nef134-10 wt single-specific CTL は誘導されず、TRBV4-1 クローンを中心とした Nef134-10 dual-specific CTL のみが誘導されると考えられる事から、Y-prov の有無の判定はある程度初感染ウイルスを反映している事が示唆された。さらに、Y-prov 陽性/ Nef134-8 CTL 陰性者 2 名は TRBV4-1 クローンが全く観察されず、Y135 に初感染したと推定された。しかしながら、Y-prov 陰性/ Nef134-8 CTL 陽性者 1 名は TRBV4-1 クローンが 94%を占め、判断材料に欠ける事から、この群に含まれる感染者を以降の解析から除外した。

最後に、初感染ウイルスが Y135 野生型か 135F 変異型かにより臨床経過がどのような影響を受けるか、解析した。そこで、血漿 Y135 陽性者 7 名および血漿 135F 陽性/Y-prov 陽性者 6 名を含む Y135 初感染群 13 名と、血漿 135F 陽性/Y-prov 陰性/ Nef134-8 CTL 陰性である 135F 初感染群 6 名について、血中ウイルス量および血中 CD4 細胞数を初診時から 250 週まで経過観察した。結果、全期間のウイルス量および初診時 CD4 細胞数に差は見られなかったものの、初診後 50 週ごとの CD4 細胞数中央値については 135F 初感染群が全期間において有意に低く、CD4 細胞数 350 cells/ μ L 以下で推移した。(初診時 CD4 の $p=0.0832$ 、50 週毎の比較では、それぞれ $p = 0.0097$, 0.0074, 0.0070, 0.0091, 0.0126 (いずれも Mann-Whitney test))。以上から、HLA-A*24:02 適応変異を遂げた 135F ウイルスに初感染した HLA-A*24:02 陽性者では、ウイルス量とは関係なく病態進行が速い事が示唆された。

本研究の結果から、1) Nef134-10 と同様、Nef134-8 も Y135F 変異選択圧に寄与し、その機序はペプチド－HLA 間結合力の極度な低下による抗原提示の消失である事、2) Y135 プロウイルス陰性かつ Nef134-8 CTL 陰性の感染者は、135F ウイルスへの初感染が強く推認される事、3) HLA

適応変異を獲得した HIV が、同じ HLA を持つ新規感染者に伝播する際には、ウイルス量に影響を及ぼすことなく早期から病態を悪化させる事、以上 3 点が明らかとなった。本研究は特に、遺伝的多様性が低い地域・民族におけるウイルス適応変異の伝播がウイルス新規感染者の予後を悪化させ、その人口集団に対する選択圧となる事を実際に示した、初めての報告であると思われる。

日本では近年 HIV 感染者の早期受診が勧奨されているが、HLA-A*24:02 適応変異ウイルスの国内流行により、早期治療が必要な新規 HIV 感染者が増加する恐れがある。本研究の成果は、早期発見・早期治療の重要性を示唆するメッセージである。またワクチン開発に於いては、Nef134-10(2F)の様な、抗原提示が残るタイプの逃避変異型エピトープ特異的 CTL を誘導し、野生型ウイルスだけでなく適応変異ウイルスに対する防御効果も付与するなど、適応変異ウイルスの新規感染による早期からの病態悪化を防ぐ戦略を練る必要がある。本研究の成果を基にした治療方針の策定、予防法・治療法の開発など、今後の動向に期待したい。