

## 論文の内容の要旨

論文題目 抗HIV薬投与下のウイルス特異的CD8陽性T細胞誘導効果  
に関する研究

氏 名 中村 碧

ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus, HIV) は、ヒトCD4陽性細胞を主標的とするレトロウイルスで、ヒトに感染して慢性持続感染を生じ、その結果エイズ (後天性免疫不全症候群) を引き起こす。逆転写酵素阻害剤 (RTI) やプロテアーゼ阻害剤 (PI) などの抗HIV薬治療によって、HIVの複製は制御されるが、感染者体内からウイルスは完全に排除されるわけではなく、治療を中断するとウイルス血症が再出現するため、HIV感染者は半永久的に治療を継続する必要がある。長期に渡る服薬のため、副作用および薬剤耐性変異株出現リスクに加え、医療費高騰の問題が生じている。また近年、投薬下の感染者において、骨粗鬆症や心血管障害等の非エイズ疾患の促進がみられることが報告されており、検出限界以下の持続的HIV複製の問題が示唆されている。これらをふまえ、より安定したHIV複製の抑制、さらには抗HIV薬治療継続を必要としない機能的治癒達成に結びつく治療法の開発が望まれている。

HIV感染症においては、ウイルス特異的CD8陽性T細胞反応がHIV複製抑制に中心的役割を担っている。抗HIV薬治療下においてもCD8陽性T細胞反応はHIV複製抑制に寄与すると考えられるが、ウイルス抗原の減少に伴いCD8陽性T細胞反応は低下する (図1)。したがって、投薬下にウイルス特異的CD8陽性T細胞反応を誘導・増強することは、HIV複製抑制状態をより安定なものとする可能性が期待される。

これまでの研究から、HIV特異的CD8陽性T細胞のすべてが高いHIV複製抑制能を有するわけではなく、特にGag抗原を標的とするCD8陽性T細胞は高いHIV複製抑制能を有する傾向が強いことが示されている。さらに所属研究室では、サル免疫不全ウイルス (simian immunodeficiency virus, SIV) 感染サルエイズモデルの解析から、Vif抗原を標的とするCD8陽性T細胞の有効性を示唆する結果を報告している。そこで本研究では、サルエイズモデルにて抗HIV薬治療下における治療ワクチン接種実験を行い、Gag・Vif特異的CD8陽性T細胞誘導効果を検討することとした。

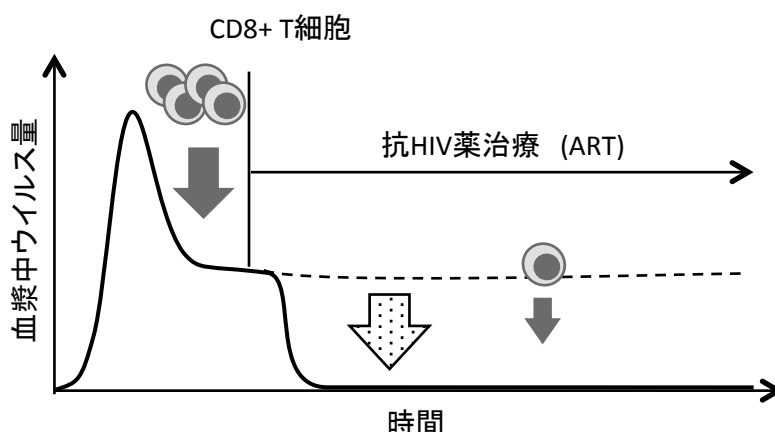


図1. HIV感染症における投薬下の血中ウイルス量およびCD8陽性T細胞反応の変化

### 1. 抗HIV薬治療下の治療ワクチン接種により誘導されるCD8陽性T細胞反応の解析

CD8陽性T細胞の標的抗原エピトープは主要組織適合遺伝子複合体クラスI (MHC-I) と結合して細胞表面に提示されることから、MHC-Iの遺伝子型はCD8陽性T細胞のHIV複製抑制効果に大きく影響することが知られている。本研究では、MHC-IハプロタイプE (6頭)、W (4頭)、S (2頭) をそれぞれ共有する12頭のビルマ産アカゲサルを用い、SIVmac239経静脈感染後12週目から32週目まで抗HIV薬3剤 (AZT/3TC、TDF、LPV/r) を投与した。血中ウイルス量の解析では、全12頭においてSIV慢性持続感染の成立が確認され、投薬開始後にはウイルス量は低下した。感染後26週目にMHC-IハプロタイプE陽性サル3頭、W陽性サル2頭、S陽性サル1頭の計6頭 (治療ワクチン接種群) に、SIV Gag発現センダイウイルスベクター (SeV-Gag) およびSIV Vif発現センダイウイルスベクター (SeV-Vif) を治療ワクチンとして経鼻接種した。SIV各抗原のoverlapping peptide poolを用いた刺激後のIFN- $\gamma$ 産生CD8陽性T細胞頻度を測定することにより、SIV各抗原特異的CD8陽性T細胞反応の解析を行ったところ (MHC-IハプロタイプE陽性サル6頭については所属研究室のメンバーにより解析)、投薬開始前には、E陽性群ではNef特異的CD8陽性T細胞反応、W・S陽性群ではGag・Vif特異的CD8陽性T細胞反応がそれぞれ優位に誘導されていたが、投薬開始後にはいずれの個体においてもSIV抗原特異的CD8陽性T細胞頻度は減少した。投薬下 (感染後26週目) にSeV-Gag・SeV-Vif接種を行った6頭すべてにおいて、27週目にGag・Vif特異的CD8陽性T細胞反応誘導が確認された。

ワクチン接種によって誘導されたCD8陽性T細胞反応の体内ウイルス量への影響を調べるため、治療ワクチン接種群6頭には感染後32週目に再度SeV-Gag・SeV-Vif接種を行った後、抗HIV薬治療を中止して、その後のCD8陽性T細胞反応と血中ウイルス量を解析した。治療ワクチン非接種群では、投薬中止後にウイルス血症の再出現 (血中ウイル

ス量の再上昇) が認められ、治療開始前と同様、E陽性群ではNef特異的CTL反応、W・S陽性群ではGag・Vif特異的CD8陽性T細胞反応の優位な誘導が認められた。一方、治療ワクチン接種群では、非接種群と同様、ウイルス血症の再出現が認められたが、6頭のうち2頭では血中ウイルス量は低値を示した。CD8陽性T細胞反応については、W・S陽性群だけでなくE陽性群においても、Gag・Vif特異的CD8陽性T細胞反応が優位のままであり、治療ワクチンによりCD8陽性T細胞反応のimmunodominanceを変えることができないことを確認した。

## 2. 治療ワクチン接種群におけるCD8陽性細胞のウイルス複製抑制能の解析

投薬下の治療ワクチン接種によるCD8陽性T細胞反応の誘導が、CD8陽性細胞のウイルス複製抑制能の増強に結びつくかどうかを調べる目的で、CD8陽性細胞のウイルス複製抑制能を培養細胞系で解析した (*in vitro* viral suppression assay [VSA])。SIV感染後10週目 (投薬開始前、pre-ART [pre])、27週目 (投薬下、under ART [art])、34週目 (投薬中止後、post-ART [post]) の末梢血から分離したPBMC (peripheral blood mononuclear cell) を、それぞれ抗CD8抗体磁気ビーズを用いてCD8陽性細胞分画とCD8陰性細胞分画とに分離した。分離したCD8陽性細胞分画をエフェクター細胞 ( $E_{pre}$ 、 $E_{art}$ 、 $E_{post}$ )、CD8陰性細胞分画を標的細胞 (SIV<sub>pre</sub>産生細胞、SIV<sub>post</sub>産生細胞) とし、標的細胞とエフェクター細胞を共培養して培養上清中のSIV Gag CA (p27) 量をELISAにより測定した。エフェクター存在下・非存在下でのp27量を比較することにより、各エフェクター細胞のSIV複製抑制能を評価した。治療ワクチン非接種群では、投薬下のエフェクター細胞 ( $E_{art}$ ) のSIV複製抑制能はSIV<sub>pre</sub>・SIV<sub>post</sub>のいずれの標的に対しても投薬前 ( $E_{pre}$ ) と比べて低下するが、治療ワクチン接種群では、6頭中4頭において $E_{art}$ のSIV複製抑制能は $E_{pre}$ と比べて増強されており、投薬下のワクチン接種によってSIV複製抑制能が増強されることが示された。

このSIV複製抑制能と*in vivo*で誘導されたSIV抗原特異的CD8陽性T細胞頻度との関係を調べたところ、治療ワクチン接種群では、投薬前の標的 (SIV<sub>pre</sub>) に対する治療ワクチン接種後 (27週目) のCD8陽性細胞 ( $E_{art}$ ) の複製抑制能と、27週目のGag特異的CD8陽性T細胞頻度との有意な相関が認められた。さらに、投薬中止後の標的 (SIV<sub>post</sub>) に対する投薬中止後 (34週目) のCD8陽性細胞 ( $E_{post}$ ) の複製抑制能と、34週目のGag特異的CD8陽性T細胞頻度との間にも有意な相関が認められた。この結果から、投薬下の治療ワクチン接種によって誘導されたGag特異的CD8陽性T細胞反応は、SIV複製抑制に寄与していることが示された。

治療ワクチン接種群で、この*in vitro* VSAで解析したSIV複製抑制能と血中ウイルス量との関係を調べたところ、投薬中止後 (34週目) のエフェクター ( $E_{post}$ ) の投薬前の標

的 ( $SIV_{pre}$ ) に対する複製抑制能は、血中ウイルス量との間に相関を示さなかったが、 $E_{post}$ の投薬中止後の標的 ( $SIV_{post}$ ) に対する複製抑制能は、感染後36週目における血中ウイルス量との間に逆相関を示した。

最後に、各個体の投薬前・投薬中止後の血漿由来SIVおよびVSAにおける標的細胞 ( $SIV_{pre}/SIV_{post}$  産生細胞) とCD8陽性細胞の共培養上清由来SIVゲノムのうち、*gag*・*vif* cDNAの塩基配列をダイレクトシーケンス法によって解析した。各個体の血漿由来SIVゲノムcDNAについて、共有するMHC-Iハプロタイプごとに比較したところ、MHC-IハプロタイプE陽性サルでは、*gag*および*vif*のいずれにおいてもアミノ酸置換を伴う変異はほとんど選択されていなかった。一方、MHC-IハプロタイプW/S陽性サルでは、*gag*については6頭中4頭、*vif*については全頭で、それぞれアミノ酸置換を伴う変異が選択されていた。特にW陽性サルでは、Vif 66番目のアミノ酸、S陽性サルではGag 28番目のアミノ酸およびVif 115番目のアミノ酸置換が、それぞれ各群で共通して選択されていた。E陽性サルとW/S陽性サルで確認された*gag*・*vif* cDNAにおける変異選択の差異は、Gag・Vif特異的CD8陽性T細胞のウイルス複製抑制圧の違いに基づくものであると考えられ、特にW/S陽性サルで選択されていたGag・Vifのそれぞれのアミノ酸置換は、MHC-IハプロタイプW/S由来MHC-I関連変異である可能性が考えられた。

以上の結果から、抗HIV薬治療下におけるGag特異的CD8陽性T細胞反応誘導は、投薬下のより安定したウイルス複製制御に貢献しうることを示唆された。今後、投薬中止後も血中ウイルス量が低値を示した2頭を中心とした解析を進めることにより、より最適化した抗原特異的CD8陽性T細胞誘導に基づく安定したウイルス複製制御法の構築に結びつくことが期待される。